

UNIwersytet PRZYRODniczy w LUBLINIE

Wydział Nauk o Żywności i Biotechnologii
Dyscyplina naukowa: Technologia żywności i żywienia

mgr Michał Jacek Czelej

Rozprawa doktorska

Optymalizacja metody wytwarzania w skali przemysłowej oraz ocena właściwości prozdrowotnych uzyskanych peptydów z białek jaja kurzego i serwatki

Optimization of the production method on an industrial scale and evaluation of the health-promoting properties of the peptides obtained from egg whites and whey

Rozprawa doktorska wykonana w Katedrze Biotechnologii,
Mikrobiologii i Żywienia Człowieka
oraz firmie Biolive Innovation Sp z o.o. w ramach Programu MNiSW (MEiN)
„Doktorat Wdrożeniowy” (DWD/487/2020)

Promotor: prof. dr hab. Adam Waśko
Opiekun zakładowy: dr inż. Tomasz Czernecki

Lublin, 2024

Serdeczne podziękowania kieruję do:

Pana prof. dr hab. Adama Waśko

za wsparcie w trakcie realizacji niniejszej pracy, wszelką pomoc, życzliwość, a także motywację i ogromną cierpliwość. Pana ogromna wiedza i doświadczenie były nieocenionym źródłem inspiracji i ukierunkowania moich badań. Dzięki Pana profesora wskazówkom nauczyłem się patrzeć na badania z szerszej perspektywy, co umożliwiło mi osiągnięcie lepszych wyników.

Pana dr inż. Tomasza Czerneckiego

za wielką pomoc, celne wskazówki, długie dyskusje i owocne eksperymenty. Pana analityczne podejście i umiejętność rozwiązywania problemów znacznie przyczyniły się do osiągnięcia wyników w ramach tej pracy. Pana zaangażowanie i gotowość do udzielania pomocy nawet w najtrudniejszych chwilach były dla mnie niezwykle cenne. Dzięki Pana cierpliwości i wyrozumiałości mogłem zyskać głębsze zrozumienie skomplikowanych zagadnień, co było kluczowe dla sukcesu mojej pracy badawczej.

Pana dr Jacka Wawrzykowskiego

za pomoc, która przerastała wszelkie oczekiwania, wsparcie ponad siły i zaangażowanie bez granic. Pana niesłabnąca chęć dzielenia się wiedzą oraz troska o każdy szczegół były nieocenione na każdym etapie mojej pracy. Pana wsparcie pozwoliło mi z powodzeniem przejść przez najtrudniejsze momenty badań, dając mi pewność, że mogę sprostać wszystkim wyzwaniom.

Wyrazy wdzięczności kieruję także do wszystkich **Pracowników Wydziału Nauk o Żywności i Biotechnologii** Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie za wsparcie i życzliwość. Atmosfera współpracy i otwartości na pomoc była i jest nieoceniona.

Michał.

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data 30.09.2024

Podpis promotora Adam Witek

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora i Opiekuna zakładowego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami,
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego,
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD wersją elektroniczną.

Data 30.09.2024

Podpis autora Olivia Celj

*niepotrzebne skreślić

Wykaz prac naukowych oraz procedur produkcyjnych stanowiących przedmiot rozprawy doktorskiej

PUBLIKACJA I

Czelej M., Garbacz K., Czernecki T., Wawrzykowski J., Waśko A. (2022). Protein hydrolysates derived from animals and plants – a review of production methods and antioxidant activity. *Foods*, 11(13), 1953.

Punkty MEiN: 140

IF: 5,200

PUBLIKACJA II

Czelej M., Czernecki T., Garbacz K., Wawrzykowski J., Jamioł M., Michalak K., Walczak N., Wilk A., Waśko A. (2023). Egg yolk as a new source of peptides with antioxidant and antimicrobial properties. *Foods*, 12(18), 3394.

Punkty MEiN: 140

IF: 4,700

PUBLIKACJA III

Czelej M., Garbacz K., Czernecki T., Rachwał K., Wawrzykowski J., Waśko A. (2024). Whey protein hydrolysates: Production, properties, and biological activities. *Foods*, 13 – w recenzji.

Punkty MEiN: –

IF: –

PROCEDURA PRODUKCJI BIOLGICZNIE AKTYWNYCH PEPTYDÓW Z ŻÓŁTKA JAJA

PROCEDURA PRODUKCJI PEPTYDÓW Z BIAŁEK SERWATKOWYCH

Sumaryczna liczba punktów według komunikatu MEiN za publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego obowiązującego w roku wydania pracy: 280 pkt

Impact Factor publikacji zgodnie z listą Journal Citation Reports zgodnie z rokiem opublikowania: 9,900

Liczba cytowań (bez autocytowań) według Web of Science/Scopus: 19(18)/22(21) na dzień 27.09.2024 r.

Spis treści

1	Streszczenie.....	6
2	Wykaz skrótów.....	8
3	Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej.....	10
4	Hipotezy i cel rozprawy.....	12
5	Struktura przeprowadzonych badań.....	13
5.1	Etapy weryfikacji hipotez badawczych.....	13
6	Materiały i metody.....	16
6.1	Materiały do badań.....	16
6.1.1	Żółtka jaj.....	16
6.1.2	Białka serwatkowe.....	17
6.2	Metody badawcze.....	18
6.2.1	Odtłuszczony granulat żółtka jaja i białka serwatkowe – Etapy II-V.....	18
6.2.2	Skalowanie metody wytwarzania do skali przemysłowej – Etapy VI-VII (nieopublikowane opracowanie własne – RD).....	22
7	Omówienie wyników i dyskusja.....	23
7.1	Badania z zakresu pozyskania peptydów z żółtek jaj o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych (PII) – Etapy II-III.....	23
7.1.1	Skład aminokwasów.....	23
7.1.2	Oznaczanie zawartości tłuszczu.....	24
7.1.3	Stopień hydrolizy DH.....	25
7.1.4	Badanie profilu peptydów.....	28
7.1.5	Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej.....	30
7.1.6	Aktywność przeciwbakteryjna.....	32
7.2	Badania z zakresu pozyskania peptydów z białek serwatkowych o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych (PIII) – Etapy IV-V.....	34
7.2.1	Stopień hydrolizy białek serwatkowych przez różne enzymy.....	34
7.2.2	Właściwości przeciwutleniające peptydów uzyskanych poprzez enzymatyczną hydrolizę białek serwatkowych (PIII).....	36
7.2.3	Aktywność przeciwbakteryjna peptydów z białek serwatkowych.....	38
7.2.4	Identyfikacja peptydów pochodzących z białek serwatkowych i ich przewidywana aktywność biologiczna.....	39
8	Wnioski.....	62
9	Bibliografia.....	65
10	Załączniki.....	73

1 Streszczenie

W ostatnich latach znacząco wzrasta przemysłowe zainteresowanie bioaktywnymi peptydami pochodzącymi z żywności. Potencjalne ich źródło stanowią surowce pochodzenia zwierzęcego tj. jaja i mleko.

W związku z powyższym, celem rozprawy doktorskiej było opracowanie i optymalizacja metody wytwarzania bioaktywnych peptydów w skali przemysłowej oraz ocena właściwości prozdrowotnych uzyskanych peptydów z białek żółtka jaja kurzego i serwatki z zastosowaniem hydrolizy enzymatycznej.

Dokonano oceny i wyboru pod względem dostępności i opłacalności ekonomicznej surowców do otrzymywania peptydów, przeskalowania metodyki otrzymywania bioaktywnych peptydów ze skali laboratoryjnej do skali przemysłowej, opracowania pod kątem uzyskania najwyższej wydajności procesu hydrolizy białek z żółtka jaja kurzego i serwatki, jak również przeprowadzono badania *in vitro* peptydów uzyskanych z tych białek pod kątem ich potencjalnych właściwości przeciwutleniających i przeciwbakteryjnych oraz *in silico* w kierunku potencjalnych właściwości prozdrowotnych.

Wykazano, że efektywność hydrolizy enzymatycznej determinowana jest rodzajem enzymu, stosunkiem enzymu do substratu, sposobem przygotowania matrycy, temperaturą, wartością pH, jak i wielkością wyodrębnionego peptydu oraz jego sekwencją aminokwasową. Zastosowanie papainy i pepsyny umożliwiło uzyskanie najwyższego stopnia hydrolizy białek żółtka jaja i serwatkowych. Większość zidentyfikowanych sekwencji peptydowych stanowiły nowe peptydy, które wcześniej nie były opisane ani zdeponowane w bazach danych. Peptydy te posiadały liczne właściwości prozdrowotne, w tym przeciwutleniające i przeciwbakteryjne. Zastosowanie w procesie hydrolizy papainy prowadzi do istotnego wzrostu aktywności przeciwutleniającej otrzymanych mieszanin peptydów, mierzonej testem z rodnikiem DPPH i kationorodnikiem ABTS. Mieszaniny te odznaczały się również silnym działaniem przeciwko bakteriom Gram (+). Zoptymalizowane laboratoryjnie warunki hydrolizy umożliwiły przeskalowanie procesu do skali przemysłowej, z zachowaniem oznaczonej aktywności biologicznej peptydów.

Słowa kluczowe: bioaktywne peptydy, żółtko jaja, białka serwatkowe, hydroliza

Summary

In recent years, industrial interest in food-derived bioactive peptides has significantly increased. Potential sources of these peptides include animal-derived raw materials such as eggs and milk.

Therefore, the aim of the doctoral dissertation was to develop and optimize a method for the production of bioactive peptides on an industrial scale and to evaluate the health-promoting properties of peptides derived from chicken egg yolk and whey proteins through enzymatic hydrolysis.

The study involved assessing and selecting raw materials for peptide production based on the availability and economic feasibility, scaling up the methodology for obtaining bioactive peptides from laboratory to industrial scale, and optimizing the process to achieve the highest efficiency of protein hydrolysis from egg yolk and whey proteins. Additionally, *in vitro* studies were conducted on peptides derived from these proteins to evaluate their antioxidant and antimicrobial properties, and *in silico* analyses were performed to investigate their potential health benefits.

It was demonstrated that the efficiency of enzymatic hydrolysis is determined by the type of enzyme, enzyme-to-substrate ratio, matrix preparation method, temperature, pH value, as well as the size and amino acid sequence of the extracted peptides. The use of papain and pepsin enabled the highest degree of hydrolysis of both egg yolk and whey proteins. Most of the identified peptide sequences were novel, having not been previously described or deposited in databases. These peptides exhibited numerous health-promoting properties, including antioxidant and antimicrobial activities. The application of papain in the hydrolysis process led to a significant increase in the antioxidant activity of the resulting peptide mixtures, as measured by the DPPH radical and ABTS cation radical assays. These mixtures also exhibited strong activity against Gram-positive bacteria. The optimized laboratory hydrolysis conditions enabled scaling up the process to an industrial scale while maintaining the determined biological activity of the peptides.

Key words: bioactive peptides, egg yolk, whey proteins, hydrolysis

2 Wykaz skrótów

Skrót	Znaczenie
ACE	Enzym konwertujący angiotensynę
AT	Angiotensyna
<i>B.</i>	<i>Bacillus</i>
BAEE	Ester etylowy N α -benzoilo-L-argininy
BHA	Butylohydroksyanizol
BHT	Butylowany hydroksytoluen
BPs	Bioaktywne peptydy
CaMPDE	Fosfodiesteraza cyklicznych nukleotydów zależnych od kalmoduliny
Da	Dalton
DH	Stopień hydrolizy
DPP-III	Dipeptydylopeptydaza III
DPP-IV	Dipeptydylopeptydaza IV
EtOH	Etanol
EYPe	Białko żółtka jaja po hydrolizie
EYPr	Białko żółtka jaja
g	Gram
<i>g</i>	Przyspieszenie ziemskie
godz.	Godzina
GRAS	Ogólnie uznane za bezpieczne
HCCA:DHA	Kwas alfa-cyjano-4-hydroksycynamonowy : Kwas 2,5-dihydroksybenzoesowy
HMG-CoA	3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzym A
HMGR	Reduktaza 3-hydroksy-3-metyloglutarylu
Hz	Herc
kDa	Kilodalton
kV	Kilowolt
LC-MS	Spektrometria mas sprzężona z wysokosprawną chromatografią cieczową
mg	Miligram
min.	Minuta
ml	Mililitr
mol/dm ³	Stężenie wyrażone w molach na decymetr sześcienny
nl	Nanolitr
PI	Publikacja I
PII	Publikacja II
PIII	Publikacja III
PAM	Białko związane z inhibitorem Myc
PEP	Prolylendopeptydaza
ppm	Liczba części na milion
RD	Rozprawa doktorska
TBHQ	Tert-butylohydrochinon
TE	Ekwiwalent troloksu
temp.	Temperatura
U	Unit (jednostka)

μl	Mikrolitr
v:v	Stosunek objętościowy
w/w	Wagowo/wagowy
WPI	Izolat białek serwatkowych

3 Uzasadnienie podjętej tematyki badawczej

Wraz z ewolucją zachowań konsumpcyjnych człowieka, wzrasta zapotrzebowanie na zdrowe i naturalne produkty spożywcze (Asioli i in. 2017, Le i in. 2023). Postęp, który dokonywał się w nauce i przemyśle w ostatnich dziesięcioleciach, sprawił, że w produkcji żywności dozwolonych do stosowania jest ponad 350 substancji dodatkowych (Rozporządzenie nr 1333/2008), wykorzystywanych w celu uzyskania pożądanego efektu technologicznego, m.in. kształtowania wartości odżywczej, cech organoleptycznych czy przedłużenia trwałości. Wśród tych związków znajdują się syntetyczne przeciwutleniacze, w tym tert-butylohydrochinon (TBHQ) – E 319, butylohydroksyanizol (BHA) – E 320 czy butylowany hydroksytoluen (BHT) – E 321, które są często dodawane do żywności, aby zapobiec jej przedwczesnemu zepsuciu (Rozporządzenie nr 1129/2011, Kimatu i in. 2017). Długotrwałe spożywanie tych związków budzi obawy związane z ich potencjalnymi niebezpiecznymi skutkami dla organizmu człowieka (Girgih i in. 2015, Kimatu i in. 2017, Xu i in. 2021). W związku z tym istotna jest identyfikacja naturalnych substytutów syntetycznych przeciwutleniaczy. Liczne publikacje naukowe wskazują na możliwość wykorzystania surowców i produktów zwierzęcych, roślinnych, jak i grzybowych do produkcji biologicznie aktywnych peptydów i białek, które w przyszłości będą w stanie w dużej mierze zastąpić obecne stosowane związki syntetyczne (Girgih i in. 2015, Liu i in. 2016, Kimatu i in. 2017, Nasri 2017, Ozuna i León-Galván 2017, Zamora-Sillero 2018, Mardani i in. 2023).

Bioaktywne peptydy (BPs) stanowią grupę związków organicznych charakteryzujących się licznymi właściwościami prozdrowotnymi, m.in. przeciwdrobnoustrojowymi, przeciwutleniającymi, przeciwnowotworowymi, immunomodulacyjnymi, hipotensyjnymi czy insulinomimetycznymi. BPs można uzyskać z białek podczas trawienia żołądkowo-jelitowego, fermentacji, hydrolizy enzymatycznej lub w reakcjach chemicznych *in vitro* (Kimatu i in. 2017, Nasri 2017, Mardani i in. 2023). Hydroliza enzymatyczna jest uważana za szczególnie ważną metodę pozyskiwania BPs, ponieważ w porównaniu z metodami chemicznymi wymaga łagodnych warunków reakcji, generuje niewiele niepożądanych związków ubocznych oraz umożliwia uzyskanie wysokiej wydajności i jakości produktu. Ponadto, posiada status GRAS (ang. Generally Recognized As Safe), czyli jest uznana za bezpieczną. Jednakże, należy szczególnie podkreślić, że podczas tego procesu istnieje możliwość modyfikacji – poprawy bioaktywności uzyskanych

hydrolizatów białkowych, co jest determinowane, m.in. rodzajem enzymu, czasem przetwarzania, pH czy temperaturą (Jamil i in. 2016, Nasri 2017, Mardani i in. 2023). Wskazuje się, że białka o właściwościach przeciwutleniających czy przeciwbakteryjnych i ich pochodne hydrolizaty mogą stanowić naturalną i bezpieczną alternatywę dla syntetycznych substancji, które pozostają w organizmie przez długi czas, co może przyczynić się nawet do wystąpienia choroby nowotworowej (Jamil i in. 2016, Xu i in. 2021).

W odpowiedzi na rosnące zainteresowanie nowymi źródłami bioaktywnych peptydów oraz metodami zwiększania ich wydajności i bioaktywności, firma Biolive Innovation Sp. z o.o. aktywnie zaangażowała się w działania badawcze w tym obszarze. Ukierunkowała je na stworzenie całej gamy produktów – bioaktywnych peptydów o zweryfikowanych właściwościach, m.in. przeciwutleniających i przeciwbakteryjnych. W realizowanych przez Spółkę badaniach kluczowe jest stosowanie różnych protokołów enzymatycznych, które umożliwiają wybór optymalnych warunków procesu, dostosowanych do źródła białka i jego charakteru. Celem jest zwiększenie wydajności reakcji poprzez skrócenie czasu hydrolizy, obniżenie kosztów procesu i uzyskanie pożądaných peptydów. Rozeznanie rynkowe i literaturowe wskazuje, że obiecującym obszarem do badań B+R jest opracowanie metod wytwarzania peptydów nie tylko ze źródeł roślinnych, ale także zwierzęcych, tj. serwatka czy żółtka jaj. Uzyskane w ten sposób peptydy mogą znaleźć zastosowanie jako składniki w produkcji suplementów diety, dodatków do żywności oraz składników fortyfikujących żywność o konkretnym zastosowaniu dietetycznym. Dla każdego produktu, który może być wprowadzony na rynek, istnieje konieczność opracowania dedykowanych receptur i procedur testowych, co niesie za sobą wysokie koszty powstawania nowych produktów (konieczność posiadania specjalistycznych urządzeń czy też korzystanie z usług laboratoriów zewnętrznych) oraz znacznie wydłuża czas wprowadzania innowacyjnych produktów na rynek. Biolive Innovation Sp. z o.o., reagując na sygnały rynkowe, podejmuje działania ukierunkowane na opracowanie metod wytwarzania oraz analizę właściwości prozdrowotnych mieszanek peptydów otrzymanych w skali przemysłowej.

4 Hipotezy i cel rozprawy

Na podstawie potrzeb i problemu badawczego zgłoszonego przez firmę Biolive Innovation Sp. z o.o. oraz dokonanego przeglądu literaturowego sformułowano następujące hipotezy badawcze, które zweryfikowano w niniejszej rozprawie:

1. Białka o różnym pochodzeniu, poddane hydrolizie, mogą stanowić źródło peptydów o właściwościach bioaktywnych.
2. Właściwości bioaktywne peptydów są determinowane warunkami hydrolizy białka.
3. Cennym surowcem do prowadzenia kontrolowanej hydrolizy, ukierunkowanej na pozyskiwanie bioaktywnych peptydów o właściwościach przeciwutleniających i bakteriostatycznych, jest żółtko jaja oraz serwatka i produkty na jej bazie.

W związku ze sformułowanymi hipotezami badawczymi, celem rozprawy doktorskiej było opracowanie i optymalizacja metody wytwarzania bioaktywnych peptydów w skali przemysłowej oraz ocena właściwości prozdrowotnych uzyskanych peptydów z białek żółtka jaja kurzego i serwatki.

Cele szczegółowe badań obejmowały:

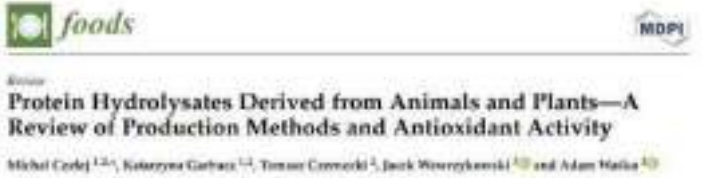
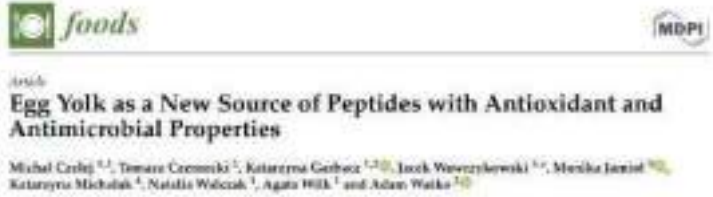

- ocenę i wybór pod względem dostępności i opłacalności ekonomicznej surowców do otrzymywania peptydów,
- przeskalowanie metodyki otrzymywania bioaktywnych peptydów ze skali laboratoryjnej do skali przemysłowej,
- opracowanie pod kątem uzyskania najwyższej wydajności procesu hydrolizy białek z żółtka jaja kurzego i serwatki,
- badania *in vitro* peptydów uzyskanych z białek z żółtka jaja kurzego i białek serwatkowych pod kątem ich potencjalnych właściwości przeciwutleniających i przeciwbakteryjnych oraz *in silico* w kierunku potencjalnych właściwości prozdrowotnych,
- opracowanie procedur produkcji peptydów z żółtka jaja oraz białek serwatkowych.

5 Struktura przeprowadzonych badań

5.1 Etapy weryfikacji hipotez badawczych

Weryfikacji hipotez badawczych dokonano poprzez wykonywanie odpowiednich doświadczeń, analiz i opracowań, zgodnie z założeniami przedstawionymi w Tabeli 1. Efekty dokonanej weryfikacji hipotez załączono w formie trzech publikacji, jak również nieopublikowanych wyników badań i opracowań własnych, które łącznie stanowią przedmiot rozprawy doktorskiej.

Tabela 1. Etapy weryfikacji hipotez badawczych

Etap	Hipoteza	Założenia	Publikacja
I	1	Przygotowanie przeglądowej publikacji naukowej przedstawiającej aktualną wiedzę na temat metod wytwarzania peptydów w procesie hydrolizy białek zwierzęcych i roślinnych oraz ocena ich aktywności przeciwutleniającej.	
II	2	Badania dotyczące możliwości wytworzenia bioaktywnych peptydów z białek żółtka jaja w procesie enzymatycznej hydrolizy.	
III	3	Ocena właściwości bioaktywnych <i>in vitro</i> oraz <i>in silico</i> peptydów wytworzonych z białek żółtka jaja kurzego w procesie enzymatycznej hydrolizy.	
IV	2	Badania dotyczące możliwości wytworzenia bioaktywnych peptydów z białek serwatki w procesie enzymatycznej hydrolizy.	<p>Nieopublikowane badania własne (RD) – praca w recenzji.</p>
V	3	Ocena właściwości bioaktywnych <i>in vitro</i> oraz <i>in silico</i> peptydów wytworzonych z białek serwatki w procesie enzymatycznej hydrolizy.	<p>Nieopublikowane badania własne (RD) – praca w recenzji.</p>
VI	2, 3	Opracowanie procesu wytwarzania na skalę przemysłową bioaktywnych peptydów z białek żółtka jaja kurzego.	<p>Nieopublikowane opracowanie własne (RD).</p>
VII	2, 3	Opracowanie procesu wytwarzania na skalę przemysłową bioaktywnych peptydów z białek serwatkowych.	<p>Nieopublikowane opracowanie własne (RD).</p>

Metody zastosowane w poszczególnych etapach badań wyszczególniono w Tabeli 2.

Tabela 2. Metody weryfikacji hipotez badawczych

Metody	Etap						
	I	II	III	IV	V	VI	VII
Przegląd literatury	✓	✓	✓	✓	✓		
Skład aminokwasów		✓	✓				
Zawartość białka ogólnego		✓	✓				
Zawartość tłuszczu		✓	✓				
Stopień hydrolizy		✓	✓	✓	✓		
Identyfikacja peptydów		✓	✓	✓	✓		
Właściwości przeciwutleniające		✓	✓	✓	✓		
Aktywność przeciwbakteryjna		✓	✓	✓	✓		
Analiza statystyczna		✓	✓	✓	✓		
Skalowanie metody wytwarzania do skali przemysłowej						✓	✓

6 Materiały i metody

6.1 Materiały do badań

Materiały do badań w ramach niniejszej dysertacji stanowiły płynne i pasteryzowane żółtka jaj (**PII**) oraz izolat białek serwatkowych (**PIII**), które stanowiły materiał do pozyskania peptydów. – **Etapy II-V**

6.1.1 Żółtka jaj

W doświadczeniu zaprezentowanym w pracy **PII** wykorzystano płynne i pasteryzowane żółtka jaj pakowane aseptycznie, pobrane ze świeżych jaj klasy A (Eipro, Niemcy). Jeden kilogram produktu odpowiadał 63 żółtkom jaj. Średnia wartość odżywcza w 100 g płynnego żółtka jaja (wyrażona jako średnia \pm odchylenie standardowe) przedstawiała się następująco: tłuszcz – $25,0 \pm 0,1$ g, węglowodany – $0,9 \pm 0,0$ g, białko – $14,0 \pm 0,1$ g i popiół – $0,2 \pm 0,0$ g, zaś wartość energetyczna – 1155 kJ/279 kcal.

Pozyskanie peptydów z białka żółtka jaja

Odtłuszczone białka żółtka jaja uzyskano przez ekstrakcję 96% etanolem – EtOH (Chempur, Polska) w łagodnych warunkach. Proces przeprowadzono w czterech etapach (70% EtOH, 40% EtOH, 90% EtOH, woda). W pierwszym etapie żółtka jaja energicznie wymieszano z 70% roztworami alkoholu w stosunku 1:1 (v:v). Następnie mieszaninę odwirowano przy $3000 \times g$ przez 30 min. (MPW-380, Polska). Fazę ciekłą usunięto, a osad wykorzystano w następnym etapie. Poszczególne etapy przeprowadzono analogicznie. W ostatnim etapie przeprowadzonym z wodą uzyskano odtłuszczony granulat żółtka jaja i przechowywano go w temperaturze $-20^{\circ}C$ do czasu dalszego użycia.

Hydrolizę enzymatyczną żółtka jaja przeprowadzono przy użyciu dostępnej w handlu pepsyny z błony śluzowej żołądka wieprzowego w proszku, ≥ 400 jednostek/mg białka (Sigma-Aldrich, USA) oraz papainy z surowego proszku lateksu papai, 1,5–10 jednostek/mg substancji stałej (Sigma-Aldrich, USA). Proces przeprowadzono przy zawartości enzymu 1:10 w stosunku do ilości białka, w temp. $37^{\circ}C$ dla pepsyny i $70^{\circ}C$ dla papainy, przy wartości pH roztworu optymalnej dla działania poszczególnych enzymów, tj. 3,0 i 6,0, odpowiednio. (**PII**)

6.1.2 Białka serwatkowe

W badaniach wykorzystano również komercyjny izolat białek serwatkowych (WPI, ang. whey protein isolate) z mleka krowiego o zawartości białka 84% (BioTechUSA LTD, Budapeszt, Węgry) celem pozyskania peptydów – **PIII**. Skład aminokwasowy produktu przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Zawartość aminokwasów (mg) w 100 g izolatu białek serwatkowych – WPI użytego w badaniach

Aminokwasy niezbędne (mg)	Aminokwasy warunkowo niezbędne (mg)	Aminokwasy nie-niezbędne (mg)
Histydyna	1500	Arginina 2008 Alanina 3836
Izoleucyna	4712	Cysteina 2552 Kwas asparaginowy 8564
Leucyna	8680	Glutamina i kwas glutaminowy 17208 Glicyna 1428
Metionina	1880	Prolina 4424 Seryna 3804
Fenylalanina	2556	Tyrozyna 2384
Treonina	5176	
Tryptofan	1368	
Walina	4564	

Pozyskanie peptydów z białek serwatkowych

Celem pozyskania peptydów z białek serwatkowych również zastosowano hydrolizę enzymatyczną. Do hydrolizy użyto trzech różnych enzymów, tj. pepsyny (z błony śluzowej żołądka wieprzowego, ≥ 400 jednostek/mg białka (Sigma-Aldrich, USA)), papainy (z surowego proszku lateksu papai, 1,5–10 jednostek/mg ciała stałego (Sigma-Aldrich, USA)) i trypsyny (z trzustki wołowej, liofilizowany proszek, $\geq 10\ 000$ jednostek BAEE/mg białka (Sigma-Aldrich, USA)), w celu wybrania enzymu o najlepszym stopniu hydrolizy i umożliwienia uzyskania peptydów o najwyższej aktywności przeciwutleniającej. Izolat

białka rozpuszczono w wodzie MilliQ (Merck, USA), podgrzano, a następnie wartość pH roztworu dostosowano do optymalnej wartości dla działania poszczególnych enzymów, tj. 3,0, 6,0 i 8,0, odpowiednio dla pepsyny, papainy i trypsyny. Hydrolizę enzymatyczną przeprowadzano przez 3 godz., przy ciągłym mieszaniu, przy stosunku enzym/substrat 1:10 (w/w) w temp. 37°C dla pepsyny i trypsyny oraz 70°C dla papainy. Należy zaznaczyć, że stosunek enzymu do substratu ustalono w ramach badań wstępnych, opartych o analizę wieloczynnikową. Reakcję zatrzymano, podgrzewając mieszaninę do 100°C i utrzymując przez 15 min. Następnie hydrolizat schłodzono do 37°C i wirowano przy 3000×g przez 30 min. Otrzymany supernatant liofilizowano i przechowywano w temp. 4°C do dalszych analiz. **(PIII)**

6.2 Metody badawcze

6.2.1 Odtłuszczony granulak żółtka jaja i białka serwatkowe – Etapy II-V

Skład aminokwasowy. Celem przygotowania próbki do oznaczenia zawartości aminokwasów niesiarkowych, przeprowadzono hydrolizę kwasową białek zgodnie z metodologią zaproponowaną przez Davies'a i Thomas'a (1973). Hydrolizę zasadową białek przeprowadzono w celu oznaczenia zawartości tryptofanu. Próbkę białka do oznaczenia aminokwasów siarkowych przygotowano zgodnie z procedurą opisaną przez Schram'a i in. (1954). Oznaczanie zawartości aminokwasów przeprowadzono w analizatorze aminokwasów Ingos AAA 400 (Czechy) przy użyciu chromatografii jonowymiennej niskojonowej z derywatyzacją kolumnową (Ostion LG ANB) z ninhydryną i detekcją fotometryczną. **(PII)**

Oznaczenia zawartości białka ogólnego dokonano metodą spektrofotometryczną (spektrofotometr MaestroNano Micro-Volume, Tajwan). Pomiaru w próbce białka dokonywano względem wody, przy długości fali 280 nm. **(PII)**

Oznaczanie zawartości tłuszczu. Do oceny zawartości tłuszczu, a jednocześnie wydajności procesu odtłuszczania zastosowano metodę Soxhleta, stosując metodę opisaną przez Thieux i in. (2003). Procedurę przeprowadzono w próbce poddanej liofilizacji. **(PII)**

Reakcja enzymatyczna. Hydrolizę żółtek jaj przeprowadzono w następujących etapach:

1. Rozpuszczenie odtłuszczonego ekstraktu białkowego z żółtka jaja (111 g o zawartości białka 18%) w 1 l wody MilliQ (Merck, USA), ogrzewając do osiągnięcia temp. 70°C.
2. Ustalenie wartości pH = 6,0 za pomocą 0,1 mol/dm³ roztworu NaOH.
3. Dodatek papainy w stosunku wagowym 10% do masy białek żółtka jaja.
4. Ogrzewanie i mieszanie roztworu w 70°C przez 2 godz.
5. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej poprzez podgrzanie do 100°C i utrzymanie przez 15 min.
6. Schłodzenie do 37°C i ustalenie wartości pH na poziomie 3,0 za pomocą 1 mol/dm³ HCl.
7. Dodatek pepsyny w stosunku wagowym 10% do masy białek żółtka jaja.
8. Ogrzewanie i mieszanie roztworu w temp. 37°C przez 2 godz.
9. Zatrzymanie reakcji enzymatycznej poprzez podgrzanie do 100°C i utrzymanie przez 15 min.
10. Schłodzenie hydrolizatu i odwirowanie przy 3000×g przez 30 min.
11. Oddzielenie supernatanta, liofilizacja i przechowywanie w temp. 4°C do czasu dalszego użycia. **(PII)**

Stopień hydrolizy (DH, ang. degree of hydrolysis) określono metodą spektrofotometryczną, poprzez pomiar ilościowy rozpuszczalnych peptydów obecnych w supernatancie. Pobierano 500 µl hydrolizatu w określonych odstępach czasu, tj. 0; 0,5; 1; 2 i 3 godz. od momentu rozpoczęcia procesu hydrolizy i natychmiast zmieszano z 10% kwasem trichlorooctowym w stosunku 1:1 (v/v). Następnie próbki inkubowano przez 15 min. w temp. pokojowej, po czym wirowano (5500×g, 10 min.). Absorbancję mierzono przy 280 nm. DH obliczono jako procent rozpuszczalnych peptydów do całkowitej zawartości białka w mieszaninie. **(PII, PIII)**

Identyfikacja peptydów. W przypadku peptydów pozyskanych z białek żółtek jaj identyfikacja została dokonana za pomocą metody MALDI-TOF/MS. Liofilizowany proszek hydrolizatu oczyszczono zgodnie z procedurą Jehmlich i in. (2014). Oczyszczoną próbkę peptydu w ilości 3 µl mieszało z 3 µl nasyconego roztworu matrycy HCCA:DHA (50:50 (v:v)). Materiał osadzono na płytce AnchorChip MALDI z powłoką hydrofobową (Bruker, Niemcy). Widma masowe rejestrowano za pomocą spektrometru Ultraflex III MALDI TOF-TOF (Bruker, Niemcy) a opracowano przy użyciu oprogramowania flexAnalysis 3.0 (Bruker, Niemcy). **(PII)**

Natomiast, peptydy z białek serwatkowych zidentyfikowano metodą LC-MS. Próbkę peptydów po hydrolizie papainą (3 mg) rozpuszczono w buforze wodorowęglanu amonu a następnie filtrowano przez filtr o masie cząsteczkowej odcięcia 30 kDa (Sartorius Stedim Biotech, Niemcy). Analizę przeprowadzono przy użyciu systemu LC-MS składającego się z systemu Evosep One HPLC (Evosep Biosystems, Dania) sprzężonego ze spektrometrem masowym Orbitrap Exploris 480 (Thermo Scientific, USA). Stosowano jednorazowe kolumny pałpkowe Evotips Pure C18 zgodnie z instrukcją producenta. Peptydy frakcjonowano przez 88 min. z wstępnie zdefiniowanym gradientem Evosep przy szybkości przepływu 220 nl/min. na kolumnie analitycznej Dr Maisch C18 AQ (1,9 μ m, średnica wewnętrzna – 150 μ m, długość – 15 cm, Evosep Biosystems, USA). Parametry akwizycji zależne od danych były następujące: 40 najlepszych prekursorów wybranych do analizy MS2, fragmentacja indukowana kolizją NCE 30%. Pełne skany MS obejmowały zakres mas 300-1600 m/z z rozdzielczością 60000. Skany MS2 akwizycji przeprowadzono z rozdzielczością 15000. Okno izolacji jonów ustawiono na 1,6 m/z. Surowe dane poddano wstępnemu przetworzeniu za pomocą Mascot Distiller (wersja 2.8, Matrixscience), a peptydy/białka zidentyfikowano za pomocą pakietu Mascot (wersja 2.8, Matrix-science) po ponownej kalibracji masy offline za pomocą MScan (wersja 3.0, <http://proteom.ibb.waw.pl/mscan>). Parametry wyszukiwania były następujące: enzym – Brak, modyfikacje zmienne – Utlenianie (M), maksymalne pominięte rozszczepienia – 2, tolerancja jonów fragmentacyjnych – 0,01 Da, tolerancja jonów macierzystych ustawiona indywidualnie po ponownej kalibracji w zakresie 7-11 ppm. Baza danych zawsze zawierała popularne zanieczyszczenia (common Repository of Adventitious Proteins – (cRAP), 115 sekwencji, 86853323495 pozostałości). Baza danych specyficzna dla gatunku: *Bos taurus* (47245 sekwencji) z Uniprot (dostęp 02_2023). Aktywność biologiczną uzyskanych peptydów analizowano na podstawie ich sekwencji aminokwasowych, wykorzystując bazę danych BIOPEP-UWM (Minkiewicz i in. 2019). **(PIII)**

Oszacowania potencjału antyoksydacyjnego dokonano trzema metodami, tj. FRAP (Benzie i Strain 1996), DPPH (Blois 1958) oraz ABTS (Floegel i in. 2011). Próbki do analiz przygotowano poprzez ekstrakcję 10 mg próbki liofilizatu peptydu w 1 ml dejonizowanej wody (5 min, 15 Hz (MM400 Retsch, Niemcy)), odwirowanie (3 min, 15°C, 33000 \times g, Hettich 32R, Niemcy) i zebranie supernatanta. Pomiary absorbancji przeprowadzono przy użyciu spektrofotometru (Marcel s330, Polska). **(PII, PIII)**

Metoda FRAP (ang. Ferric Reducing Antioxidant Power), czyli metoda oznaczania zdolności redukowania jonów żelaza – polega na redukcji kompleksu Fe^{3+} -TPTZ (2,4,6-tris(2-pirydylo)-1,3,5-triazyn) do Fe^{2+} -TPTZ przy niskim pH. 50 μl próbki zawierającej roztwór peptydów mieszano ze 150 μl odczynnika FRAP. Odczytu absorbancji dokonano przy długości fali 593 nm w stosunku do próbki ślepej (Benzie i Strain 1996). **(PII, PIII)**

Metoda DPPH to oznaczanie aktywności wymiatania wolnych rodników przy użyciu stabilnego rodnika DPPH (1,1-difenyl-2-pikrylohydrazyl). Ocena aktywności przeciwutleniającej badanych peptydów opierała się na krzywych standardowych, które zostały utworzone dla ekwiwalentów troloksu (TE) i kwasu askorbinowego. 50 μl alikwotów roztworu peptydów mieszano ze 150 μl metanolowego roztworu DPPH. Absorbancję odczytano przy długości fali 517 nm względem próbki ślepej (Blois 1958). **(PII, PIII)**

Metoda ABTS polega na określeniu stopnia zmiatania rodników ABTS⁺ (kwas 2,2'azyno-bis(3-etylobenzotiazolino-6-sulfonowy)) wytworzonych podczas reakcji z nadsiarczanem potasu. Do 1 ml próbki mieszaniny peptydów dodano 50 μl roztworu roboczego (ABTS i nadsiarczan potasu w wodzie dejonizowanej). Absorbancję rejestrowano przy 734 nm w porównaniu z próbką ślepą (Floegel i in. 2011). **(PII, PIII)**

Oznaczenie aktywności przeciwbakteryjnej. W celu oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej peptydów z białek żółtek jaj łącznie pobrano próbki 10 szczepów bakterii Gram (+) i Gram (-) należących do różnych gatunków z zepsutych owoców i warzyw. Identyfikację gatunkową bakterii metodą MALDI-TOF/MS (Bruker, Niemcy) przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną przez Kosikowską i in. (2014). Zidentyfikowano dziesięć gatunków, tj. cztery należące do rodzaju *Bacillus* (*B. cereus* – n = 2, *B. megaterium* – n = 1 i *B. pumilus* – n = 1), *Kocuria rhizophila* – n = 1), *Serratia liquefaciens* – n = 1, *Pseudomonas aeruginosa* – n = 1, *Hafnia alvei* – n = 1, *Acinetobacter radioresistans* – n = 1 i *Stenotrophomonas maltophila* – n = 1. Bakterie hodowano na agarze Luria Bertani (Biocorp, Polska) w temperaturze 30°C przez 24 godz. Identyfikację gatunków z pobranych kolonii przeprowadzono przy użyciu MALDI-TOF/MS (Bruker, Niemcy). Test dyfuzji studzienkowej wykonano przy użyciu agaru Mueller'a-Hinton'a (Biomaxima, Polska). Inokulum przygotowano przy użyciu szczepów bakteryjnych z hodowli w bulionie Mueller'a-Hinton'a (Biomaxima, Polska). Zawiesinę standardu każdego szczepu bakterii sporządzono w sterylnym roztworze soli fizjologicznej (SigmaAldrich, USA). Zaszczepiony agar wylano na płytkę testową. Następnie z agaru wycinano cztery studzienki, każdy o średnicy 7 mm, i do każdej studzienki wprowadzono 50 μl roztworu EYPe o stężeniu

50 mg/ml. Płytki inkubowano przez dobę w temp. 37°C, a następnie mierzono strefy zahamowania wzrostu bakterii wokół studzienek. **(PII)**

Z kolei, w celu oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej peptydów z białek serwatkowych łącznie pobrano próbki 8 szczepów bakterii Gram (+) i Gram (-) należących do różnych gatunków z zepsutych owoców i warzyw, tj. *Bacillus* sp., *B. cereus*, *B. megaterium*, *B. pumilus*, *Staphylococcus capitis*, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Brevundimonas diminuta*, i *Rhizobium radiobacter*. Identyfikacja gatunkowa bakterii i pozostałe etapy oznaczania aktywności przeciwbakteryjnej peptydów przebiegały analogicznie, jak w badaniach w ramach pracy **PII**, przy czym do studzienek o średnicy 8 mm wprowadzono 70 µl roztworu o stężeniu 50 mg/ml. **(PIII)**

Analiza statystyczna została przeprowadzona za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji (ANOVA) przy użyciu pakietu Statistica w wersji 13.0 (StatSoft, Polska, TIBCO Software Inc., USA). Test Tukey'a *post hoc* zastosowano, aby przeanalizować istotne różnice między danymi przy wartości $p < 0,05$. Uzyskane wyniki wyrażono jako średnia \pm odchylenie standardowe. **(PII, PIII)**

6.2.2 Skalowanie metody wytwarzania do skali przemysłowej – Etapy VI-VII (nieopublikowane opracowanie własne – RD)

Uzyskane w ramach pracy doktorskiej wyniki badań w skali laboratoryjnej wykorzystano do przeskalowania metod wytwarzania peptydów biologicznie aktywnych do skali przemysłowej. Opracowany proces wytwarzania bioaktywnych peptydów zawarto w procedurach produkcyjnych.

Opracowane procedury produkcyjne zostały zamieszczone w Załącznikach.

7 Omówienie wyników i dyskusja

7.1 Badania z zakresu pozyskania peptydów z żółtek jaj o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych (PII) – Etapy II-III

7.1.1 Skład aminokwasów

W ramach badań własnych dokonano oceny profili aminokwasów w żółtku jaja przed (EYPr) i po hydrolizie enzymatycznej (EYPe) – Tabela 4. Zhydrolizowane białko żółtka jaja zawierało najmniej tryptofanu – 16,6 mg/g, zaś najwięcej kwasu glutaminowego – 103,4 mg/g. Należy zauważyć, że niezależnie od hydrolizy enzymatycznej, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy i leucyna były najliczniej występującymi aminokwasami. Aminokwasy te stanowiły znaczną część składu białka żółtka jaja. Badania własne, wskazujące na wzrost zawartości aminokwasów w materiale poddanym hydrolizie, stanowią potwierdzenie wyników uzyskanych przez Pokorę i in. (2013) oraz Attia i in. (2020). Może to być przypisane obecności enzymów, które nieznacznie zwiększają zawartość białka w mieszance. Przeprowadzona analiza statystyczna wskazała istotne różnice w zawartości aminokwasów w zależności od hydrolizy enzymatycznej, z wyjątkiem seryny, metioniny i histydyny.

Tabela 4. Skład aminokwasowy białka żółtka jaja i hydrolizatów białka żółtka jaja (mg/g białka) (średnia ± odchylenie standardowe)

Aminokwas	Białko żółtka jaja – EYPr (mg/g)	Hydrolizaty białka żółtka jaja – EYPe (mg/g)	Wartość p
Kwas asparaginowy	54,3 ± 3,1	72,1 ± 4,1	0,000425
Treonina	28,3 ± 1,9	38,5 ± 2,6	0,000728
Seryna	48,4 ± 5,3	53,7 ± 5,9	0,223833
Glutamina	76,1 ± 4,2	103,4 ± 5,7	0,000240
Prolina	23,3 ± 1,9	38,6 ± 3,2	0,000502
Glicyna	17,0 ± 0,1	33,9 ± 0,2	< 0,000000
Alanina	29,7 ± 0,7	40,5 ± 1,0	0,000006
Cysteina	7,9 ± 3,2	27,3 ± 11,0	0,033286
Walina	32,4 ± 0,9	43,7 ± 1,3	0,000008
Metionina	15,5 ± 5,3	16,8 ± 5,7	0,748595
Izoleucyna	29,3 ± 0,9	35,9 ± 1,1	0,000079
Leucyna	50,7 ± 0,3	58,5 ± 0,3	< 0,000000
Tyrozyna	23,9 ± 2,2	32,5 ± 2,9	0,003252
Fenyloalanina	25,6 ± 1,2	32,8 ± 1,6	0,000321
Histydyna	15,5 ± 2,2	18,3 ± 2,6	0,152067
Lizyna	41,9 ± 1,1	54,2 ± 1,4	0,000008
Arginina	43,0 ± 1,2	51,4 ± 1,5	0,000146
Tryptofan	11,4 ± 0,4	16,6 ± 0,6	0,000005

p < 0,05 – różnice statystycznie istotne

7.1.2 Oznaczanie zawartości tłuszczu

Odtłuszczanie EYPr (denaturacja etanolem lub heksanem) prawdopodobnie wpływa na rozpuszczalność białek i zmniejsza ich wartość biologiczną i biotechnologiczną (Wang i Wang 2009, Chay i in. 2011). Wykazano, że kontrolowana hydroliza enzymatyczna jest

skuteczną metodą modyfikacji białek, a metodę tę zastosowano, m.in. do białek serwatkowych (Severin i Xia 2006).

W badaniach własnych średnia ilość lipidów w suchej masie żółtka jaja wynosiła 50,6% (Tabela 5), co jest zgodne z ogólnym stanem wiedzy. Jak pokazują wyniki metody Soxhleta, ekstrakcja lipidów nie była kompletna. Po czterech etapach ekstrakcji zawartość tłuszczu obniżyła się statystycznie istotnie z 50,6% do 18,9%, dlatego metoda ta nie jest tak skuteczna, jak ekstrakcja lipidów przy użyciu roztworów etanolu i heksanu (Wang i Wang 2009). Chociaż wydajność ekstrakcji lipidów może nie osiągnąć maksymalnego poziomu, zachowanie jakości białka i redukcja szkodliwych warunków, w tym ilości zużywanych toksycznych odczynników, są bardziej widocznymi celami, potencjalnie przewyższającymi powiązane ograniczenia.

Tabela 5. Zawartość lipidów w suchej masie żółtka jaja (%) (średnia \pm odchylenie standardowe)

Próbka	Białko	Białko żółtka jaja po hydrolizie (EYPe)			
	żółtka jaja (EYPr)	I etap	II etap	III etap	IV etap
Średnio (%)	50,6 ^e \pm 2,3	43,9 ^d \pm 1,3	35,5 ^c \pm 1,4	27,5 ^b \pm 1,5	18,9 ^a \pm 1,2

a-e – różnice statystycznie istotne przy $p < 0,05$

7.1.3 Stopień hydrolizy DH

Hydroliza enzymatyczna jest najczęściej stosowaną metodą ekstrakcji peptydów. Właściwości produktu zależą w dużym stopniu od: specyficzności i selektywności enzymu, temperatury, pH i stosunku enzymu do substratu. W badaniach własnych użyto papainy i pepsyny. Enzymy wybrano na podstawie wcześniejszych przeprowadzonych wstępnych badań nad DH różnych enzymów. Temperatura i pH stosowane podczas badań odpowiadały optymalnym wartościom dla enzymów, tj. odpowiednio: 70°C, pH = 6,0 i 37°C, pH = 3,0. DH jest ważnym parametrem opisującym hydrolizę enzymatyczną i może odpowiadać za kontrolowanie takich czynników, jak skład i właściwości peptydów. Ilość enzymu może mieć znaczący wpływ na DH, co przyczyniło się do uwzględnienia w badaniach własnych różnych ilości zastosowanego enzymu – Tabela 6. Analiza wpływu czasu i stężenia enzymu na wydajność hydrolizy wykazała, że istniały statystycznie istotne różnice w stopniu

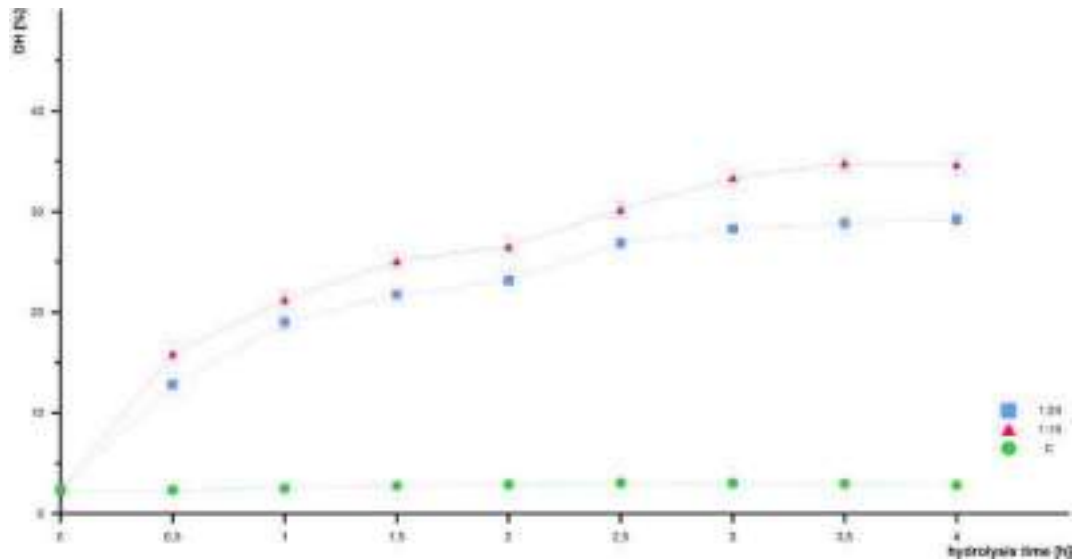
hydrolizy uzyskanej w próbkach o zawartości enzymu 1:10 i 1:20 w stosunku do ilości białka.

Tabela 6. Wpływ wartości stosunku enzymu do substratu (białka) na stopień hydrolizy (%) (średnia \pm odchylenie standardowe)

Stosunek enzymu do substratu	Czas hydrolizy (godz.)								
	Papaina					Pepsyna			
	0,0	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4
	Stopień hydrolizy – DH (%)								
Bez enzymu	2,30 \pm 0,02	2,32 \pm 0,04	2,49 \pm 0,05	2,77 \pm 0,04	2,87 \pm 0,03	3,06 \pm 0,04	3,02 \pm 0,05	2,97 \pm 0,04	2,84 \pm 0,04
1:20	2,30 ^A \pm 0,02	12,82 ^B \pm 0,06	19,04 ^C \pm 0,04	21,78 ^D \pm 0,04	23,20 ^E \pm 0,05	26,87 ^F \pm 0,04	28,29 ^G \pm 0,17	28,87 ^H \pm 0,06	29,23 ^I \pm 0,04
1:10	2,30 ^A \pm 0,02	15,89 ^B \pm 0,06	21,27 ^C \pm 0,04	25,11 ^D \pm 0,04	26,53 ^E \pm 0,04	30,23 ^F \pm 0,04	33,36 ^G \pm 0,04	34,83 ^H \pm 0,04	34,71 ^I \pm 0,05

A-I – różnice statystycznie istotne przy $p < 0,01$ w obrębie stosunku enzymu do substratu

W każdym przypadku największy wzrost DH obserwowano w ciągu pierwszych 60 min. hydrolizy (Wykres 1), po czym reakcja postępowała znacznie wolniej, a zmiany DH nie były znaczące. Można zasugerować, że maksymalne rozszczepienie peptydu następuje w ciągu pierwszej minuty hydrolizy. Wyniki te są zgodne z wynikami przedstawionymi dla innych źródeł białka, np. ryb (Sathivel i in. 2003) lub glutenu pszennego (Kong i in. 2007). Biorąc pod uwagę wyniki zebrane w Tabeli 6, najlepszy do enzymatycznej hydrolizy odtłuszczonego białka żółtka jaja był 10%-dodatek enzymu (stosunek enzymu do substratu wynoszący 1:10). W tym przypadku DH wzrósł z wartości początkowej 2,32% do 34,71%. Był to efekt wdrożenia sekwencyjnego, dwuetapowego podejścia do hydrolizy, obejmującego początkową 2-godzinną hydrolizę papainą, a następnie następującą 2-godzinną hydrolizę pepsyną.



C – kontrola (bez enzymu), 1:10 i 1:20 – stosunek enzymu do substratu (białka)

Wykres 1. Wpływ wartości stosunku enzymu do substratu na stopień hydrolizy

Porównanie uzyskanych wyników z wynikami literaturowymi dla krótkiego czasu trawienia (2-4 godz.) z enzymami (25-33%), tj. neutraza, pronaza, alkalaza czy trypsyna (Young i in. 2010, Chay i in. 2011, Pokora i in. 2013, Trziszka i in. 2013), zaprezentowano w Tabeli 7.

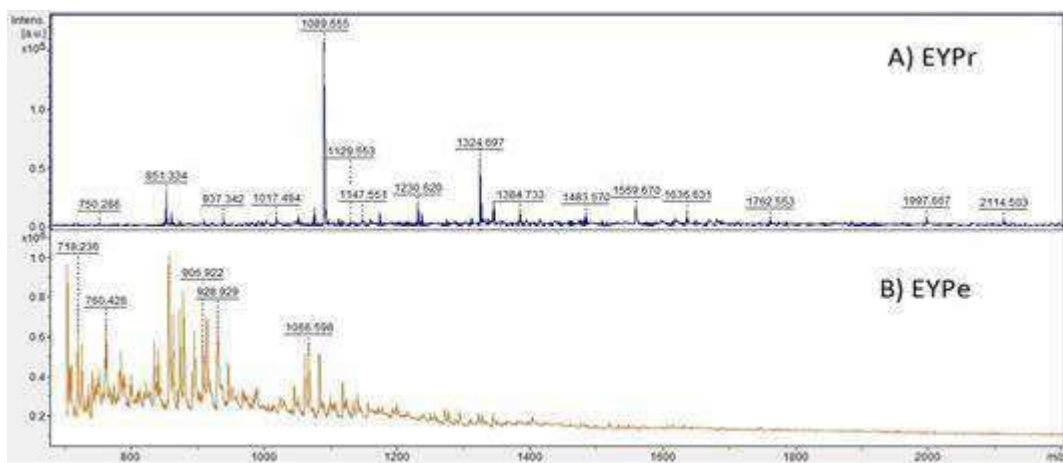
Zastosowanie dwuetapowego przeprowadzenia hydrolizy istotnie wpłynęło na poprawę DH. Analiza porównawcza z innymi metodami hydrolizy opartymi na enzymach wykazała konkurencyjność prezentowanego podejścia w osiągnięciu znacznego wzrostu DH.

Tabela 7. Porównanie wartości stopnia hydrolizy dla różnych typów enzymów

Enzym	Czas trawienia (godz.)	Warunki	Stopień hydrolizy – DH (%)	Źródło literaturowe
Neutraza	3	200 U/mg, pH 7,0, 45°C	12	Sarmadi i Ismail (2010)
Neutraza	2	Brak danych	27	Pokora i in. (2013)
Neutraza + Pronaza	3 – każdy enzym	Brak danych	27	Eckert i in. (2013)
Alkalaza + Proteaza N	3	Stosunek enzymu do białka 0,5% (w/w)	25,3	Chay i in. (2011)
Trypsyna	3	Białko jaja, 1 U/mg białka, 30°C	14	Graszkiewicz i in. (2007)
Trypsyna	3	0,5% (w/w), 45°C	15,6	Graszkiewicz i in. (2007)
Pepsyna	2	Brak danych	45,3	Zambrowicz i in. (2015)

7.1.4 Badanie profilu peptydów

W przeprowadzonych badaniach własnych przy zastosowaniu techniki MALDI-TOF/MS nie użyto żadnych standardów peptydów, dlatego też omawiając wyniki ograniczono się do stwierdzenia obecności lub braku specjalnych pików w zakresach m/z, co jest wystarczające do oceny przebiegu procesu enzymatycznej hydrolizy. Po dwuetapowej hydrolizie (DH = 34,76%) większość pików peptydów mieściła się w zakresie od 700 do 1400 Da (Wykres 2). W porównaniu z profilem peptydów przed hydrolizą enzymatyczną, rozkład pików zmienił się tak, że zaobserwowano większą liczbę mas pomiędzy 700 a 1100 Da. Peptydy z substratu o dużej masie cząsteczkowej zostały przekształcone w mniejsze peptydy wraz z upływem czasu reakcji. W przypadku widma próbki surowego żółtka jaja uzyskano większą liczbę cięższych peptydów i małych białek, które zostały rozszczepione po trawieniu. Ilość pików reprezentujących peptydy o mniejszej masie cząsteczkowej wzrosła po hydrolizie kosztem większych mas cząsteczkowych.



Wykres 2. Widma masowe: A) białka żółtka jaja (EYPr); B) białka żółtka jaja po hydrolizie (EYPe) po dwuetapowej hydrolizie przy stosunku ekstraktu do substratu (białka) 1:10

Na podstawie uzyskanego widma próbki hydrolizatu i stosunku m/z, fragmenty sekwencji peptydów określono metodą sekwencjonowania RapidDeNovo. Fragmenty sprawdzono w bazie danych aktywności peptydów BIOPEP (Minkiewicz i in. 2019). Ostateczne sekwencje peptydów ustalono przy użyciu BLAST i kalkulatora masy peptydu. Niektórym peptydom przypisano właściwości biologiczne, co przedstawiono w Tabeli 8. Peptydy DSYEHGGEP, LMSYMWSTSM, PGVTYPHPGQDTSAG i PTDQKVGWGGEGQIQ zidentyfikowano jako związki przeciwutleniające, a peptydy DSYEHGGEP, HVDLDEVANKIA i FEDPERQESSRKE wskazano jako substancje przeciwdrobnoustrojowe. Wyniki te zdecydowanie sugerują potrzebę dalszych badań właściwości przeciwutleniających i przeciwbakteryjnych omawianych hydrolizatów.

Tabela 8. Peptydy uzyskane po trawieniu papainą i pepsyną wraz z ich aktywnością sprawdzoną w bazie danych BIOPEP (Minkiewicz i in. 2019)

m/z	Sekwencja	Aktywność
849.381	YPWTQR	opiod inhibitor ACE
949.407	ITMIAPSAF	inhibitor ACE
990.481	DSYEHGGEP	przeciwbakteryjna przeciwutleniacz
996.487	VVSGPYIVY	inhibitor ACE
1002.475	QQGVEQGTR	przeciwnowotworowa
1230.620	KPQMTEEQIK	przeciwnowotworowa
1236.595	LMSYMWSTSM	przeciwutleniacz
1324.697	HVDLDEVANKIA	przeciwbakteryjna
1394.566	YINQMPQKSRE	inhibitor ACE
1483.570	PGVTYHPHGQDTSAG	przeciwutleniacz
1636.631	FEDPERQESSRKE	przeciwbakteryjna przeciwnowotworowa
1670.622	PTDQKVGWGGEGQIQ	przeciwutleniacz
1681.584	YIEAVNKVSPRAGQ	inhibitor ACE

m/z – stosunek masy do ładunku

7.1.5 Oznaczanie aktywności przeciwutleniającej

Aktywność przeciwutleniającą oznaczano trzema metodami: poprzez zdolność do wychwytywania wolnych rodników DPPH· i ABTS·+ oraz metodą FRAP. W każdym przypadku testowano aktywność liofilizowanej mieszaniny peptydów uzyskanej po dwuetapowej hydrolizie przy stosunku ekstraktu do substratu (białka) 1:10. Oznaczenia przeprowadzono w trzykrotnym powtórzeniu, a uzyskane wartości uśredniano. Uzyskane wyniki wskazywały, że mieszanina białka żółtka jaja po hydrolizie (EYPe) miała znaczący potencjał przeciwutleniający. Wykazywała silną skuteczność w wychwytywaniu rodników DPPH· i odbarwianiu kationów rodników ABTS·+. Jak podali Memarpoor-Yazdi i in. (2013)

oraz Eckert i in. (2018), sekwencja aminokwasów peptydu w dużym stopniu wpływa na aktywność przeciwutleniającą. Hydrofobowe aminokwasy, jak alanina, walina, leucyna, prolina, metionina, tyrozyna, walina i fenyloalanina odgrywają rolę w ważnych mechanizmach przeciwutleniających.

Wspomniane aminokwasy występowały w większych ilościach w odtłuszczonych hydrolizatach żółtka jaja (Tabela 4). Analiza sekwencji aminokwasowych peptydów uzyskanych po hydrolizie wykazała w wielu przypadkach dużą ilość aminokwasów aromatycznych. Ich aromatyczne pozostałości stabilizują rodniki podczas reakcji wymiatania poprzez dostarczanie protonów do rodników z niedoborem elektronów, na co wskazali Delgado i in. (2015). Sheih i in. (2009) zasugerowali, że obecność tyrozyny może przekształcać wolne rodniki w rodniki fenoksyłowe, co prowadzi do zahamowania reakcji łańcuchowej peroksydacji.

Wyniki testów DPPH \cdot i ABTS $\cdot+$ są w wielu przypadkach wyższe niż te określone dla powszechnych produktów dietetycznych. Przykładowo, aktywność w teście odbarwiania ABTS $\cdot+$ osiągnęła 390,43 mmol troloksu/kg (Tabela 9). Była ona wyższa w porównaniu ze szpinakiem (8,49 mmol troloksu/kg), papryczką chili (7,62 mmol troloksu/kg) czy maliną (16,79 mmol troloksu/kg) w suchej masie (Pellegrini i in. 2003). Również aktywność zbierająca DPPH \cdot w przypadku mieszanki EYPe była znacznie wyższa. Jak wynika z dotychczas opublikowanych badań, 10 z 13 truskawek charakteryzuje się jednym z najwyższych ekwiwalentów kwasu askorbinowego (520,70 mg/100 g) (Floegel i in. 2011). Wynik ten jest znacznie niższy niż uzyskany dla EYPe (1776,66 \pm 32,99 mg kwasu/100 g) – Tabela 9. Porównanie wyników własnych z wynikami dla frakcji peptydów żółtka jaja (Eckert i in. 2018) wykazało, że rozdzielone i klarowne frakcje peptydowe miały wyższe wartości: od 0,50 do 2,75 μ mol troloksu/mg w teście DPPH \cdot i od 19,90 do 88,25 μ g Fe $^{2+}$ /mg w teście FRAP. Może to być związane z wysokim narażeniem na czyste, skoncentrowane peptydy. Naszym założeniem było stworzenie mieszaniny o wartościach antyoksydacyjnych w prosty sposób. Eckert i in. (2018) przedstawili porównywalne wyniki zdolności wymiatania wolnych rodników przez foswitynę (0,11 μ mol troloksu/mg) po 5-godzinnej hydrolizie proteazami bakteryjnymi. Graszkiwicz i in. (2007) wykazali podobne poziomy aktywności wymiatania wolnych rodników przez hydrolizat białka jaja (z trypsyną) po rozdzieleniu z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii cieczowej w odwróconym układzie faz. Dla dwóch frakcji osiągnięto wartości 0,18 i 0,19 μ mol troloksu/mg.

Tabela 9. Aktywność przeciwutleniająca białka żółtka jaja po hydrolizie – EYPe (średnia ± odchylenie standardowe)

Próbka	FRAP (mmol Fe ²⁺ /kg)	FRAP (µg Fe ²⁺ /mg)	DPPH (mg [*] /100g)	DPPH (µmol troloksu/mg)	ABTS (mmol troloksu/kg)
EYPe	16,45 ± 0,19	0,11 ± 0,02	1776,66 ± 32,99	0,92 ± 0,04	390,43 ± 8,92

* – kwasu askorbinowego

Znacznie słabszą aktywność obliczono dla redukcji jonów żelazowych. Mieszanina peptydów wykazała znacznie niższą aktywność FRAP niż czerwona kapusta (51,53 mmol Fe²⁺/kg) lub czerwona porzeczka (44,86 mmol Fe²⁺/kg). Może to być związane z małą zawartością seryny w proponowanych peptydach, których grupa hydroksylowa uczestniczy w redukcji jonów metali. Różnice w wartościach uzyskanych metodą wymiatania wolnych rodników i metodą FRAP mogą być również spowodowane różnicami w warunkach reakcji. Według Zou i in. (2011), skuteczność metody przeciwutleniającej dającej wysokie wartości ekwiwalentów troloksu lub kwasu askorbinowego jest związana z różnym mechanizmem leżącym u podstaw testów oceny, nawet dla tego samego składu. Wskazali, że odpowiedni dobór testów przeciwutleniających jest wysoce skorelowany nie tylko z sekwencją aminokwasów, ale także z optymalnymi warunkami reakcji.

7.1.6 Aktywność przeciwbakteryjna

Mechanizm działania peptydów przeciwdrobnoustrojowych obejmuje wiązanie się z błoną komórkową poprzez przyciąganie elektrostatyczne pomiędzy resztami kationowymi peptydów i składnikami anionowymi lub lokalnymi lipidami błony zewnętrznej. Peptydy przeciwdrobnoustrojowe działają, zarówno na bakterie Gram (+), jak i Gram (-) (Li i in. 2021). Mieszanina EYPe w stężeniu 50 mg/ml hamowała wzrost badanych szczepów – Tabela 10. Silne hamowanie wykryto u bakterii Gram (+), podczas gdy bakterie Gram (-) były mniej wrażliwe na peptydy. Mniejsze strefy hamowania obserwowano przy stężeniu 25 mg/ml. Właściwości te wynikają z obecności sekwencji DSYEHGGEP, HVDLDEVANKIA i FEDPERQESSRKE, które zidentyfikowano jako odpowiedzialne za aktywność przeciwbakteryjną – Tabela 10.

Tabela 10. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa białka żółtka jaja po hydrolizie – EYPe (średnia \pm odchylenie standardowe)

Szczep	Gram	Strefa hamowania (mm)	
		EYPe (50 mg/ml)	EYPe (25 mg/ml)
<i>Bacillus cereus</i> 1	(+)	20,0 \pm 1,0	10,7 \pm 0,6
<i>Bacillus cereus</i> 2	(+)	13,0 \pm 1,0	9,0 \pm 1,0
<i>Bacillus megaterium</i>	(+)	13,7 \pm 0,6	9,7 \pm 0,6
<i>Bacillus pumilus</i>	(+)	12,0 \pm 1,0	9,3 \pm 0,6
<i>Kocuria rhizophila</i>	(+)	11,7 \pm 0,6	7,7 \pm 0,6
<i>Serratia liquefaciens</i>	(-)	12,3 \pm 0,6	8,3 \pm 0,6
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)	9,3 \pm 0,6	8,0 \pm 1,0
<i>Hafnia alvei</i>	(-)	9,3 \pm 0,6	9,0 \pm 1,0
<i>Acinetobacter radioresistans</i>	(-)	8,7 \pm 0,6	7,7 \pm 0,6
<i>Stenotrophomonas maltophila</i>	(-)	8,7 \pm 0,6	7,7 \pm 0,6

Podobne wyniki zaobserwowali Pellegrini i in. (2004), którzy odkryli, że szczepy Gram (+) *Bacillus* są wysoce podatne na działanie peptydów trawionych trypsyną i chymotrypsyną. Jednocześnie wskazali słabą aktywność bakteriobójczą peptydów przeciwko bakteriom Gram (-). Aktywność przeciwdrobnoustrojową peptydów żółtka jaja opisali również Pimchan i in. (2023). Po frakcjonowaniu peptydów z żółtek jaj hydrolizowanych pepsyną zidentyfikowali 13 peptydów o aktywności przeciwbakteryjnej, które hamowały wzrost *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* i *Salmonella typhimurium*. Wzrost tych gatunków bakterii jest również skutecznie hamowany przez ekstrakty roślinne, które, podobnie jak peptydy, wydają się być dobrą alternatywą dla antybiotyków, zwłaszcza jako naturalne środki zapobiegające i wspomagające podczas zatruc pokarmowych (Mostafa i in. 2018).

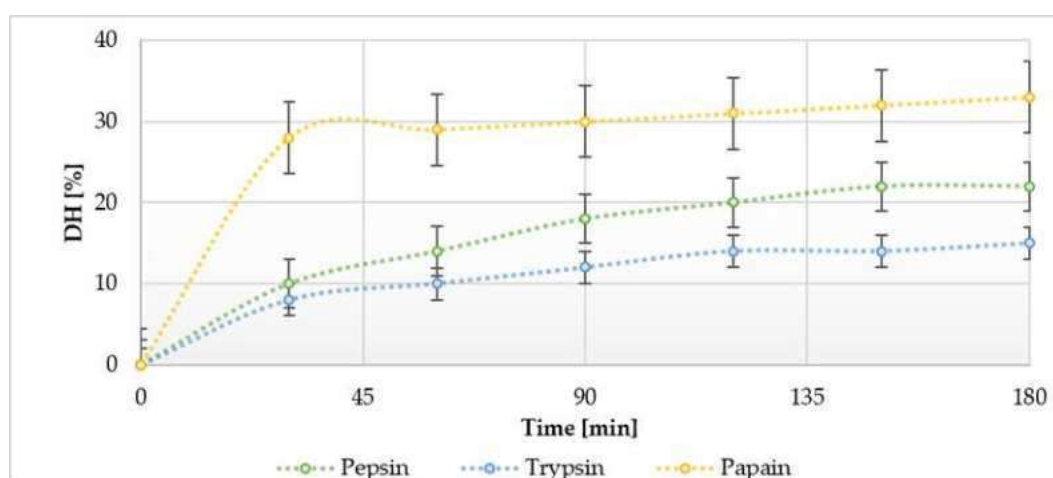
7.2 Badania z zakresu pozyskania peptydów z białek serwatkowych o właściwościach przeciwutleniających i przeciwdrobnoustrojowych (PIII) – Etapy IV-V

7.2.1 Stopień hydrolizy białek serwatkowych przez różne enzymy

Jak wskazano w pracy (PI), aktywność enzymów odgrywa ważną rolę w hydrolizie białek. W pierwszym etapie badań przeprowadzono enzymatyczną hydrolizę białek serwatkowych przy użyciu trzech różnych enzymów i w tych samych warunkach reakcji enzymatycznej (wybranych po wstępnej optymalizacji; wyniki własne nieopublikowane) (PIII). Wcześniej pomyślnie przetestowano różne komercyjne proteazy do produkcji bioaktywnych hydrolizatów z mleka, w tym białek serwatkowych. W pracy (PIII) do analizy wybrano reakcje katalizowane przez pepsynę, papainę i trypsynę. Dla każdego z wariantów stopień hydrolizy określono w różnych punktach czasowych. Na Wykresie 3 przedstawiono wpływ specyficzności enzymu i czasu reakcji na stopień hydrolizy. Wykazano, że spośród trzech enzymów użytych w naszym badaniu, białka serwatkowe hydrolizowane papainą po 3-godzinnej reakcji wykazały istotnie wyższe wartości DH niż serwatka hydrolizowana trypsyną czy pepsyną. Stopień szybkości hydrolizy wynosił: 15%, 22% i 33%, odpowiednio dla trypsyny, pepsyny i papainy (Wykres 3). Najwyższą wydajność reakcji enzymatycznej, ocenianą na podstawie stosunku uwolnionych peptydów do całkowitej zawartości białka, odnotowano w przypadku zastosowania hydrolizy z papainą (DH 33% po 3 godz.). Warto również zauważyć, że już półgodzinna reakcja pozwoliła na osiągnięcie wysokiego stopnia hydrolizy białka serwatkowego.

Zróżnicowany proces trawienia enzymatycznego daje różne ilości i rodzaje peptydów z tej samej matrycy żywności. Wybór konkretnego enzymu do katalizowania hydrolizy białka jest kierowany oceną jego selektywności i dostępnymi danymi literaturowymi wskazującymi na jego przydatność (PI). W przeprowadzonych badaniach do hydrolizy użyto najczęściej stosowanych enzymów żołądkowo-jelitowych, tj. pepsyny i trypsyny (PIII). Ponadto, wybrano je, uwzględniając dane literaturowe sugerujące, że te enzymy są zdolne do generowania peptydów o działaniu hamującym dipeptydylopeptydazę IV (DPP-IV) i enzymu konwertującego angiotensynę (ACE) (Chatterjee i in. 2015, Jia i in. 2020) oraz o właściwościach bakteriobójczych (Wang i in. 2020), przeciwnadciśnieniowych, przeciwutleniających (Giromini i in. 2019) i cytoochronnych (Ballatore i in. 2020). W ostatnich latach prowadzono również badania mające na celu uzyskanie bioaktywnych

peptydów z białek serwatkowych przy użyciu enzymów pochodzenia roślinnego. Wcześniej wskazywano, że proteazy pochodzenia roślinnego (kardosyny A i B, papaina, bromelaina i ficyna) mogą być stosowane do uzyskiwania peptydów o aktywności hamującej ACE (Estévez i in. 2020, Peslerbes i in. 2022). W związku z tym papaina została również wybrana do tych badań (PIII). Enzym ten ma również pewne zalety, tj. większą aktywność enzymatyczną i łagodne warunki hydrolizy (Peslerbes i in. 2022). Jego zastosowanie umożliwia obniżenie kosztów produkcji i poprawę wydajności, produktywności. Ponadto, papaina ma wąski zakres działania – pH = 5-7, ale jest aktywna w szerokim zakresie temperatur, w tym w wyższych (<90°C) (Kaur i in. 2023).



Wykres 3. Stopień hydrolizy (%) białek serwatkowych przez pepsynę, trypsynę i papainę w zależności od czasu działania enzymu

Badania literaturowe dotyczące hydrolizy serwatki wykazały dość różne poziomy przebiegu procesu dla różnych stosowanych enzymów. Jest to związane z faktem, że wydajność enzymatycznej hydrolizy białek serwatkowych zależy od takich czynników, jak rodzaj enzymu i substratu, ich stosunek, warunki hydrolizy i mieszania (Kordala i in. 2021). W badaniu przeprowadzonym przez Wang i in. (2020) hydrolizę białek serwatkowych przeprowadzono przy użyciu trzech różnych enzymów. Znacznie niższy stopień hydrolizy zaobserwowano w wariantach z trzygodzinną hydrolizą papainą (DH = 9,3%), podczas gdy lepsze wyniki uzyskano dla próbek hydrolizowanych alkalazą (6 godz., DH = 32,2%) i trypsyną (4 godz., DH = 25,2%). Jednak czasy reakcji i zastosowane temperatury różniły się. Kaur i in. (2023) również zaobserwowali niższy poziom hydrolizy białek serwatkowych przy użyciu papainy (DH = 17,69%). Zbliżone wyniki do badań własnych (DH na poziomie 32,28%) wykazali Du i in. (2022).

7.2.2 Właściwości przeciwutleniające peptydów uzyskanych poprzez enzymatyczną hydrolizę białek serwatkowych (PIII)

Określono następnie właściwości przeciwutleniające hydrolizatów serwatkowych uzyskanych poprzez enzymatyczną hydrolizę z udziałem pepsyny, trypsyny i papainy (Tabela 11). Przesłanką do podjęcia badań w kierunku tych właściwości była wypomniana rosnąca częstość występowania chorób cywilizacyjnych i zwiększenie zainteresowania żywnością bioaktywną o ukierunkowanym oddziaływaniu na organizm człowieka. Właściwości przeciwutleniające odnoszą się do zdolności niektórych cząsteczek do neutralizowania nadmiernych ilości wolnych rodników tlenowych w organizmie, które odpowiadają za uszkodzenie komórek i są powiązane z występowaniem chorób (PI). Do określenia aktywności przeciwutleniającej stosuje się dwie kategorie metod: redukcję jonów metali do jonów o niższym utlenianiu przez badany przeciwutleniacz (FRAP) oraz zdolność do wychwytywania stabilnych wolnych rodników (ABTS·+, DPPH). Bardzo często stosowaną metodą pomiaru aktywności przeciwutleniającej, w tym również żywności, jest ocena aktywności wymiatającej rodniki kationowe ABTS·+.

Badania własne wskazały na znaczny potencjał przeciwutleniający wszystkich uzyskanych hydrolizatów (Tabela 11).

Tabela 11. Potencjał przeciwutleniający peptydów uzyskanych poprzez enzymatyczną hydrolizę białek serwatkowych

Zastosowany enzym	ABTS (TE* $\mu\text{mol/g}$)	FRAP (TE* $\mu\text{mol/g}$)	DPPH (TE* $\mu\text{mol/g}$)
Pepsyna	297,44 ^a \pm 24,11	16,22 \pm 2,03	4,87 ^c \pm 0,22
Trypsyna	361,96 ^b \pm 31,02	19,68 \pm 1,50	1,75 ^a \pm 0,03
Papaina	527,36 ^c \pm 25,13	17,56 \pm 2,16	3,56 ^b \pm 0,17

* – ekwiwalent troloksu (TE)

a-c – różnice statystycznie istotne przy $p < 0,05$

Spośród hydrolizatów uzyskanych z trzygodzinnej reakcji z różnymi enzymami najwyższą aktywność odnotowano dla białek serwatkowych trawionych papainą – 527,36 TE $\mu\text{mol/g}$, a następnie trypsyną i pepsyną (odpowiednio: 361,96 i 297,44 TE $\mu\text{mol/g}$). Ze względu na prostotę, krótki czas analizy oraz stosunkowo wysoką

dokładność i powtarzalność wyników, test oparty na badaniu reaktywności rodnika DPPH z próbką jest jedną z najczęściej stosowanych metod pomiaru potencjału wymiatającego peptydów. Wyniki analizy DPPH hydrolizatów białek serwatkowych ekstrahowanych różnymi enzymami wykazały najwyższy potencjał wymiatania wolnych rodników formuły uzyskanej przy użyciu trypsyny – 19,68 TE $\mu\text{mol/g}$. Zdolność ta przy użyciu papainy i pepsyny była nieznacznie niższa, tj. odpowiednio: 17,56 i 16,22 TE $\mu\text{mol/g}$.

W przypadku metody FRAP badania wskazały najwyższy potencjał redukujący hydrolizatu białek serwatkowych przygotowanych przy użyciu pepsyny – 4,87 TE $\mu\text{mol/g}$, podczas gdy niższą wartość zaobserwowano dla hydrolizatu z udziałem papainy – 3,56 TE $\mu\text{mol/g}$. Hydrolizat uzyskany przy zastosowaniu trypsyny miał najniższy potencjał przeciwutleniający – 1,75 TE $\mu\text{mol/g}$.

Różnice zaobserwowane w aktywności redukującej wolne rodniki hydrolizatów białek serwatkowych przygotowanych przy użyciu różnych enzymów mogą być przypisane specyficzności enzymu do konkretnego miejsca w łańcuchu peptydowym. Jest on również powiązany z DH białek składowych, które ostatecznie wytwarzają hydrolizat zawierający różne składy aminokwasów (Kumar i in. 2016). DH i enzymy stosowane do katalizy hydrolizy odgrywają kluczową rolę w ustalaniu siły redukującej hydrolizatów białkowych. Obserwowane różnice w aktywności przeciwutleniającej pomiędzy testowanymi hydrolizatami białkowymi mogą być związane ze specyficznym profilem aminokwasowym peptydów (Wu i in. 2003). Sekwencja aminokwasów znacząco wpływa również na siłę aktywności przeciwutleniającej peptydów ze względu na różnice w aktywności poszczególnych aminokwasów związane z różnicami w strukturze łańcucha bocznego. Aktywność ta przypisywana jest grupom łatwo utleniającym się, tj. grupie indolowej w tryptofanie, grupie imidazolowej w histydynie, tiolowej w cysteinie, fenolowej grupie hydroksylowej w tyrozynie i tioeterowej w metioninie (Matsui i in. 2018). Ohashi i in. (2015) stwierdzili, że tripeptydy zawierające tyrozyne wykazywały wyższą aktywność przeciwutleniającą przeciwko hydrofilowemu rodnikowi ABTS \cdot^+ w porównaniu do tripeptydów zawierających histydyne, co sugeruje istotną rolę reszt tryptofanu i tyrozyny w określaniu aktywności wymiatania rodników. Testowane tripeptydy charakteryzowały się słabą aktywnością wymiatania przeciwko hydrofobowemu rodnikowi DPPH, a ich aktywność przeciwutleniająca przeciwko peroksydacji kwasu linolowego wykazała wysokie korelacje z testami ABTS i niskie korelacje z testami FRAP i DPPH. Stanowi to wyjaśnienie różnic w wynikach testów potencjału przeciwutleniającego zaobserwowanych w badaniach własnych.

7.2.3 Aktywność przeciwbakteryjna peptydów z białek serwatkowych

Ocenie aktywności przeciwbakteryjnej peptydów z białek serwatkowych poddano jedynie hydrolizat z serwatki wytworzony przy użyciu papainy. Wybrano go na podstawie uzyskanego najwyższego stopnia hydrolizy i silnej aktywności przeciwutleniającej.

Analizowano wpływ peptydów z białek serwatkowych na wzrost ośmiu izolatów bakteryjnych, wcześniej uzyskanych z zepsutej żywności. Strefy zahamowania wzrostu były miarą aktywności przeciwbakteryjnej tych hydrolizatów. Strefy zahamowania wzrostu wokół studzienki z peptydami pochodzącymi z białek serwatkowych obserwowano dla czterech testowanych szczepów bakteryjnych, tj. *Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus capitis* i *Rhizobium radiobacter* (Tabela 12). Najwyższą aktywność przeciwbakteryjną obserwowano wobec *Bacillus* sp. ze strefą zahamowania 11 mm. Nie wykryto zahamowania wzrostu dla *Bacillus cereus*, *Bacillus pumilus*, *Exiguobacterium aurantiacum* i *Brevundimonas diminuta*. Wyniki te wskazują na selektywny hamujący wpływ peptydów zawartych w hydrolizatach z białek serwatkowych na wzrost niektórych szczepów bakterii. Obserwowany efekt można przypisać zdolności bakterii, w tym *Bacillus* spp., do wydzielania pozakomórkowych proteaz, które są zdolne do inaktywacji peptydów przeciwbakteryjnych, na co wskazali Thwaite i in. (2006).

Tabela 12. Aktywność przeciwdrobnoustrojowa peptydów z białek serwatkowych hydrolizowanych przy użyciu papainy

Gatunek bakterii	G(+)/G(-)	Strefa zahamowania wzrostu (mm)
<i>Bacillus</i> sp.	G(+)	11
<i>Bacillus cereus</i>	G(+)	0
<i>Bacillus megaterium</i>	G(+)	8
<i>Bacillus pumilus</i>	G(+)	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	G(+)	10
<i>Exiguobacterium aurantiacum</i>	G(+)	0
<i>Brevundimonas diminuta</i>	G(-)	0
<i>Rhizobium radiobacter</i>	G(+)	9

Wcześniejsze badania wykazały, że enzymatyczna hydroliza białek serwatkowych powoduje uwolnienie peptydów przeciwdrobnoustrojowych, które są zaszyfrowane w białkach serwatkowych. Pozytywny wpływ enzymatycznej hydrolizy papainy na aktywność przeciwdrobnoustrojową wykazano wcześniej w przypadku hydrolizatów papainy, np. białek serwatkowych mleka bawolego i wielbłądziego (Salami i in. 2010, Meignanalakshmi i Vinoth Kumar 2013, Abdel-Hamid i in. 2016).

Peptydy pochodzące z degradacji β -laktoglobuliny, w tym peptyd AASDISLLDAQSAPLR zidentyfikowany w badaniach własnych, są odpowiedzialne za wskazaną aktywność przeciwdrobnoustrojową hydrolizatu. Potencjalnie ten efekt może być również przypisywany obecności innych sekwencji w uzyskanych peptydach pochodzących z hydrolizy β -laktoglobuliny, tj. VAGTWY, VLVLDTDYK i IPAVFK o aktywności przeciwdrobnoustrojowej, które zostały wcześniej zidentyfikowane przez Pellegrini i in. (2001). Obecność peptydów przeciwdrobnoustrojowych w hydrolizacie daje podstawy, aby wnioskować, że dodanie tych peptydów do produktów spożywczych może mieć hamujący wpływ na wzrost niektórych niepożądanych bakterii obecnych w żywności.

7.2.4 Identyfikacja peptydów pochodzących z białek serwatkowych i ich przewidywana aktywność biologiczna

Postępując zgodnie z metodologią hydrolizy z udziałem papainy i warunkami opisanymi w rozdziale Materiały i metody, wyekstrahowano i zidentyfikowano 107 peptydów. Analiza LC-MS zidentyfikowała peptydy o różnej długości, tj. od 7 do 27 aminokwasów. W ramach badań podjętych w firmie Biolive Innovation Sp z o.o. dokonano przygotowania szczegółowej listy wszystkich zidentyfikowanych sekwencji peptydowych, w tym informacji o białkach, z których pochodzą, oraz aktywności biologicznej peptydów, określonej na podstawie danych dostępnych w bazach danych i przewidywane na podstawie sekwencji (Tabela 13).

Tabela 13. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
LILR2	A0A075CD25	LEVLPKP	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwutleniający; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Albumina bydlęca	A0A140T897,	VTKLVTDLTKVH	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
	A0A3Q1LNN7, P02769,	LVTDLTKVH	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
	B0JYQ0	KLVTDLTKVH	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Łańcuch ciężki dyneiny aksonemalnej 17	A0A3Q1LFR8, A0A3Q1LFZ1, A0A3Q1LS97, A0A3Q1LUZ9, A0A3Q1M5E4, A0A3Q1M7H2, A0A3Q1MI93, A0A3Q1MLC2, E1BLB4, G3N2A4	LDEILEKI	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Białko coiled-coil zawierająca 88C	A0A3Q1LKA7, E1BCQ3	KVLLLVL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja wychwyty glukozy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
ATPaza transportująca fosfolipidy 8B3; ATPaza transportująca fosfolipidy; ATPaza, klasa I, typ 8B	A0A3Q1LLH5, F1MFC4, Q0II98	PIMLVIL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Łańcuch ciężki dyneiny aksonemalnej 10	A0A3Q1LNB4, A0A3Q1M7C5, F1MSP8	HIRILVT	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor fosfodiesterazy zależnej od cyklicznego adenozynomonofosforanu; inhibitor reniny
Białko ADAMTS-20	A0A3Q1LQP7, E1B900	IPLPLLVT	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro aminopeptidazy; inhibitor laktocepiny
Białko wymiany anionów, elektrogeny kotransporter wodorowęglanu sodu 1	A0A3Q1LUF6, A0A3Q1LVR7, B2NIZ2, E1BIN2, F6RYQ5, Q9GL77	APILKFI	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor fosfodiesterazy zależnej od cyklicznego adenozynomonofosforanu; inhibitor reniny

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Białko endometrium związane z progestagenem, główny alergen beta-laktoglobulina, beta-laktoglobulina	A0A3Q1LYE8, A0A3Q1M701, B5B0D4, P02754	VYVEELKPTPEGDLEIL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja uwalniania GLP-1; neuropeptyd; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; wiążący cynk; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylo peptidazy III (DPP-III); osteoanaboliczny
		ASDISLLDAQSAPLRVY	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro aminopeptydazy; inhibitor laktocepiny
		LDAQSAPLRVY	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro aminopeptydazy; inhibitor laktocepiny
		VEELKPTPEGDLEIL	Znane: wiążący cynk; Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja uwalniania GLP-1; neuropeptyd; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; wiążący cynk; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		SDISLLDAQSAPLRVY	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro aminopeptydazy; inhibitor laktocepiny

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Białko endometrium związane z progestagenem, główny alergen beta-laktoglobulina, beta-laktoglobulina	A0A3Q1LYE8, A0A3Q1M701, B5B0D4, P02754	KIDALNENKVL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		ALKALPMHIR	Potencjalnie: inhibitor ACE; Neuropeptyd; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor fosfodiesterazy zależnej od cyklicznego adenozynomonofosforanu; inhibitor reniny
		VRTPEVDDEALEKFDKALKALPMHIRL	Potencjalnie: inhibitor ACE; Neuropeptyd; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; dipeptydydyl peptidase III inhibitor; inhibitor fosfodiesterazy zależnej od cyklicznego adenozynomonofosforanu; inhibitor reniny; hypocholesterolemic
		KTKIPAVFKID	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; wiążący cynk; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
		YVEELKPTPEGDLEIL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja uwalniania GLP-1; neuropeptyd; przeciwutleniające; wiążący cynk; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; wiążący cynk; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; osteoanaboliczny
		ELKPTPEGDLEIL	Znana aktywność: wiążący cynk; Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; stymulacja uwalniania GLP-1; przeciwutleniające; wiążący cynk; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Białko endometrium związane z progestagenem, główny alergen beta-laktoglobulina, beta-laktoglobulina	A0A3Q1LYE8, A0A3Q1M701, B5B0D4, P02754	ALNENKVLVLDTDYK	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; stymulacja wychwyty glukozy; Regulating; przeciwwzkrzepowe; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		VFKIDALNENKVLVL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		AMAASDISLLDAQSAPLRVY	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; stymulacja wychwyty glukozy; regulujące; przeciwutleniające; hipotensyjne; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro aminopeptidazy; inhibitor laktocepiny
		LIVTQTMKGLDIQKVAGTWYSLA	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; immunomodulujące; neuropeptyd; regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwutleniające; aktywacja proteolizy zależnej od ubikwityny; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		AASDISLLDAQSAPLRVY	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; regulujące; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwutleniające; hipotensyjne; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro aminopeptydazy; inhibitor laktocepiny

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Białko endometrium związane z progestagenem, główny alergen beta-laktoglobulina, beta-laktoglobulina	A0A3Q1LYE8, A0A3Q1M701, B5B0D4, P02754	VYVEELKPTPEGDLEILL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja uwalniania GLP-1; neuropeptyd; przeciwutleniające; wiążący cynk; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; osteoanaboliczny
		VEELKPTPEGDLEILL	Potencjalnie: ACE-inhibitor, stymulacja wychwyty glukozy; stymulacja uwalniania GLP-1, stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; neuropeptyd; przeciwutleniające; wiążący cynk; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		AMAASDISLLDAQSAPLR	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; stymulowanie wychwyty glukozy; regulujący; hipotensyjny; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro aminopeptydazy; inhibitor laktocepiny
		LLDAQSAPLRVY	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulowanie wychwyty glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro; inhibitor laktocepiny
		VLDTDYKKYL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; regulujące; przeciwzakrzepowe; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Białko endometrium związane z progestagenem, główny alergen beta-laktoglobulina, beta-laktoglobulina	A0A3Q1LYE8, A0A3Q1M701, B5B0D4, P02754	ISLLDAQSAPLRVY	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulowanie wychwyty glukozy; regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro; inhibitor laktocepiny
		FKIDALNENKVL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulowanie wychwyty glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		KTKIPAVFKID ALNENKVLVL	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; stymulowanie wychwyty glukozy; przeciwutleniające; wiążący cynk; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		ISLLDAQSAPLRV	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulowanie wychwyty glukozy; regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro; inhibitor laktocepiny
		KPTPEGDLEILL	Potencjalnie: inhibitor ACE; neuropeptyd; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		LIVTQTMKGLD IQKVAGTW	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
		KIDALNENKVLVL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Białko endometrium związane z progestagenem, główny alergen beta-laktoglobulina, beta-laktoglobulina	A0A3Q1LYE8, A0A3Q1M701, B5B0D4, P02754	KTKIPAVFKIDALNENKVLVLDTDYK	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwwakrzepowe; przeciwbakteryjny; wiążący cynk; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		DISLLDAQSAPLRVY	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulowanie wychwyty glukozy; regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; przeciwtleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro; inhibitor laktocepiny
		AASDISLLDAQSAPLR	Znane: przeciwbakteryjny; Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; stymulowanie wychwyty glukozy; regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; hipotensyjne; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro; inhibitor laktocepiny
		FKIDALNENKVLVL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulowanie wychwyty glukozy; przeciwtleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
		LAMAASDISLLDAQSAPLR	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; stymulowanie wychwyty glukozy; regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; hipotensyjne; aktywacja proteolizy zależnej od ubikwityny; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro; inhibitor laktocepiny

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Białko endometrium związane z progestagenem, główny alergen beta-laktoglobulina, beta-laktoglobulina	A0A3Q1LYE8, A0A3Q1M701, B5B0D4, P02754	VYVEELKPTPEG	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja uwalniania GLP-1; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; osteoanaboliczne
		LDAQSAPLRV	Potencjalnie: inhibitor ACE; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro; inhibitor laktocepiny
		IPAVFKID	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
		LIVTQTMKGLDIQK VAGTWYS	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; immunomodulujące; neuropeptyd; stymulacja wychwytu glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
		MAASDISLLDAQSAPLRV	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; stymulacja wychwytu glukozy; regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; hipotensyjne; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro; inhibitor laktocepiny
		VEELKPTPEGDLEILLQ	Potencjalnie: inhibitor ACE; neuropeptyd; stymulacja wychwytu glukozy; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja uwalniania GLP-1; przeciwutleniające; wiążący cynk; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Białko endometrium związane z progestagenem, główny alergen beta-laktoglobulina, beta-laktoglobulina	A0A3Q1LYE8, A0A3Q1M701, B5B0D4, P02754	FDKALKALPMHIR	Potencjalnie: inhibitor ACE; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor fosfodiesterazy zależnej od cyklicznego adenylozynomonofosforanu; inhibitor reniny
		VYVEELKPTPE	Potencjalnie: ACE-inhibitor; stymulacja wychwytu glukozy; stymulacja uwalniania GLP-1; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; neuropeptyd; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; osteoanaboliczne
		NENKVLVLDTDYKKYLLF	Potencjalnie: ACE-inhibitor, przeciwbakteryjny; stymulacja wychwytu glukozy; neuropeptyd; regulujące; przeciwzakrzepowe; przeciwutleniające; ligand permeazy bakteryjnej; agonista opioidowy; wiążący cynk; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; osteoanaboliczne
		IDALNENKVL	Potencjalnie: ACE-inhibitor; stymulacja wychwytu glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; osteoanaboliczne
		KPTPEGDLEIL	Znane: inhibitor dipeptydylopeptydazy IV, wiążący cynk; Potencjalnie: ACE-inhibitor; stymulacja wychwytu glukozy; neuropeptyd; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor alfa-glukozydazy
		LIVTQTMKGLDIQKVA GTWYSLAM	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwbakteryjny; immunomodulujące; neuropeptyd; regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; stymulacja wychwytu glukozy; przeciwutleniające; aktywacja proteolizy zależnej od ubikwityny; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
PMS1 homolog 2, komponent systemu naprawy błędnie sparowanych zasad	A0A3Q1M1S8, A0A3Q1M5A6, A0A3Q1N669, E1BA65	KLLLA VL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja wychwytu glukozy; activating ubiquitin-mediated proteolysis; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
Białko C2, należące do rodziny 35 nośników substancji rozpuszczonych	A0A3Q1M589, Q29RM0	DLELLLR	Potencjalnie: ACE-inhibitor; stymulacja wychwytu glukozy; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny
Białko zawierające domenę RRM	A0A3Q1M5Y7	APLIKFL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwytu glukozy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor fosfodiesterazy zależnej od cyklicznego adenozymonofosforanu; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro aminopeptydazy; inhibitor laktocepiny
Cynkowa metalopeptydaza OMA1, Metaloendopeptydaza OMA1	A0A3Q1M649, Q3SZN3	KLLAIIV	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwytu glukozy; aktywacja proteolizy zależnej od ubikwityny; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
Regulator transportu lizosomalnego	A0A3Q1MD56, A5JIU1, F1MLZ4, Q9TTK4	DLELLTI	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwytu glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Alfa-S1-kazeina	A0A3Q1MJE5, A0A3Q1NG86, B5B3R8, P02662	APFPEVF	Znana aktywność: inhibitor alfa-glukozydazy; Potencjalnie: inhibitor ACE; inhibitor ACE2; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
białko MTCP1	A0A3Q1NJI0, G3N2C7	VEELLLK VEELLLKLL GVEELLLKL VEELLLKL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja wychwytu glukozy; przeciwutleniające; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Beta-kazeina	A0A452DHW7, A0A4D6WI58, A0A4D6WP97, P02666, J9UHS4, J9UJ96, T1T0C1	DELQDKIHPF	Potencjalnie: inhibitor ACE; inhibitor ACE2; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV, inhibitor dipeptydylopeptydazy III
Beta-kazeina	A0A452DHW7, A0A4D6WP97, J9UHS4	YPFPGPIHN	Potencjalnie: przeciwwamnezyjne; inhibitor ACE; przeciwzakrzepowe; immunomodulujące; opioidowe; regulujące aktywność błony śluzowej żołądka; przeciwzakrzepowe; przeciwutleniające; inhibitor wydzielania insuliny; chemotaktyczne; agonista opioidowy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor ACE2; inhibitor beta-kazomorfiny-5 butyrylocholinoesterazy; inhibitor białka związanego z Myc

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Beta-kazeina	A0A452DHW7, A0A4D6WP97, J9UHS4	VYPPFGPIH	Znana aktywność: inhibitor prolyl endopeptydazy (przeciwamnezyjne); Potencjalnie: przeciwamnezyjne; inhibitor ACE; przeciwzakrzepowe; immunomodulujące; opioidowe; regulujące aktywność błony śluzowej żołądka; przeciwzakrzepowe; przeciwutleniające; inhibitor wydzielania insuliny; chemotaktyczne; agonista opioidowy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor ACE2; inhibitor beta-kazomorfin-5 butyrylocholinoesterazy; inhibitor białka związanego z Myc
		LVYPPFGPIH	Znana aktywność: inhibitor ACE; Potencjalnie: przeciwamnezyjne; inhibitor ACE; przeciwzakrzepowe; immunomodulujące; opioidowe; regulujące aktywność błony śluzowej żołądka; przeciwzakrzepowe; przeciwutleniające; inhibitor wydzielania insuliny; chemotaktyczne; agonista opioidowy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor ACE2; stymulacja wychwytu glukozy; inhibitor beta-kazomorfin-5 butyrylocholinoesterazy; inhibitor białka związanego z Myc
		PPFGPIH	Potencjalnie: inhibitor prolyl endopeptydazy; przeciwamnezyjne; inhibitor ACE; przeciwzakrzepowe; regulujące aktywność błony śluzowej żołądka; inhibitor wydzielania insuliny; chemotaktyczne; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor ACE2; inhibitor białka związanego z Myc

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Beta-kazeina	A0A452DHW7, A0A4D6WP97, J9UHS4	YPFPGPIH	Potencjalnie: inhibitor prolyl endopeptydazy; przeciwapnezyjne; inhibitor ACE; przeciwzakrzepowe; immunomodulujące; opioidowe; regulujące aktywność błony śluzowej żołądka; przeciwzakrzepowe; przeciwutleniające; inhibitor wydzielania insuliny; chemotaktyczne; agonista opioidowy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor ACE2; inhibitor beta-kazomorfiny-5 butyrylocholinoesterazy; inhibitor białka związanego z Myc
		DKFLDDDLTD KFLDDDLTD DKFLDDDLT	Potencjalnie: inhibitor ACE; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor fosfodiesterazy zależnej od cyklicznego adenosynomonofosforanu; inhibitor reniny
Alfa-laktalbumina	A0A452DI34, B6V3I5, G9G9X6, P00711	TTFHTSGYDTQAIQV	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwytu glukozy; wiążące wapń; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny
		TFHTSGYDTQAIQV	
		DKFLDDDLTDDIM KFLDDDLTDDIM	Potencjalnie: inhibitor ACE; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor fosfodiesterazy zależnej od cyklicznego adenosynomonofosforanu; inhibitor reniny
		KFLDDDLT KFLDDDLTDDIM	
		RELKDLKGYGGVS	Potencjalnie: inhibitor ACE; immunomodulujące; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor reduktazy 3-hydrokso-3-metyloglutarylokoenzymu A; inhibitor dipeptydylopeptydazy III

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Alfa-laktalbumina	A0A452DI34, B6V3I5, G9G9X6, P00711	INYWLAH	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwzapalne; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; wiążący cynk; aktywacja proteolizy zależnej od ubikwityny; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
Białko z motywem wiążącym RNA 44 (RBM44)	A0A452DIH8, E1BC15	LDEIILR	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny
Beta-kazeina	A0A4D6WI58, P02666, J9UJ96, T1T0C1	YFPFGPIPNS	Znany: agonista receptora opioidowego (beta-kazomorfin-11); Potencjalnie: przeciwnadciężenne; inhibitor ACE; przeciwzakrzepowe; immunomodulujące; opioidowe; regulujące aktywność błony śluzowej żołądka; przeciwzakrzepowe; przeciwutleniające; inhibitor wydzielania insuliny; chemotaktyczne; agonista opioidowy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor ACE2; inhibitor beta-kazomorfin-5 butyrylocholinoesterazy; inhibitor białka związanego z Myc
		FPGPIPNS	Potencjalnie: przeciwnadciężenne; inhibitor ACE; przeciwzakrzepowe; immunomodulujące; regulujące aktywność błony śluzowej żołądka; przeciwzakrzepowe; inhibitor wydzielania insuliny; chemotaktyczne; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor białka związanego z Myc
Białko BOD1L	A6QQK0, F1N2G1	VEEILVK	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Receptor dla sekretyny hormonu wzrostu	A9QMC3, B5U8Y5, B7ZFQ1, C1PHZ1, C1PHZ2, C1PHZ4, C1PI23, C1PI24, C1PI29, C1PI30, C1PI32	KLVILVI	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Powtórzenia WD i białko o strukturze coiled-coil	E1BDF4	KLLLLILV	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Białko COG3	E1BGA6	LDELLEKL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Białko rusztowania symplekin	E1BJF6	DIELLLK DIELLLKLI DIELLLKL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja wychwyty glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Białko zawierające domenę SET 1A, metylotransferaza lizyny histonowej	E1BLX2	EVEILLH	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; neuropeptyd; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy
Otoferlina	E1BMQ1	KIVLALL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwyty glukozy; aktywacja proteolizy zależnej od ubikwityny; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Proteoglikan siarczanu heparanu 2	F1MER7	LDELLVR	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwytu glukozy; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Białko MROH8	F1MK54, G3MWQ0	KIVLLAI	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwytu glukozy; aktywacja proteolizy zależnej od ubikwityny; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III
Białko Slit3	F1MMM6	DLEILTL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwytu glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Białko zawierające domenę GP-PDE	F1MTT5	KILILLV	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwytu glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Białko MED 12	F1MZ95, G3N1K4	LLPLPKP	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwytu glukozy; przeciwutleniające; hipotensyjne; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor reniny; inhibitor Xaa-Pro; inhibitor laktocepiny
Białko SLC13A4	F6R7G2, Q08E60	KLLLVIL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja wychwytu glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Beta-1,4 N-acetylogalaktozaminytransferaza	G3X7L4	KLLLLLV	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja wychwytu glukozy; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Transtyretyna (TTR)	O46375	GSPAANVGKVF	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwutleniające; hipotensyjne; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
		LDTKSYWKS LG ISPFHEFAEVVF	Potencjalnie: inhibitor ACE; Regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej; Anti inflammatory; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny; inhibitor fosfodiesterazy zależnej od cyklicznego adenozynomonofosforanu; hipolipemiczny; ACE2 inhibitor

Tabela 13. c.d. Zidentyfikowane sekwencje peptydów uzyskane w wyniku hydrolizy białek serwatkowych przez papainę, informacje o białkach, z których pochodzą oraz przewidywane aktywności biologiczne peptydów

Pochodzenie (białko)	Identyfikator białka (UniProt)	Sekwencja aminokwasowa	Znana aktywność peptydu lub potencjalna aktywność biologiczna (na podstawie bazy danych BIOPEP-UWM)
Transtyretyna (TTR)	O46375	DAVRGSPAANVGKVF	Potencjalnie: inhibitor ACE; przeciwutleniające; hipotensyjne; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor leucylotransferazy
Galaktoza-3-O-sulfotransferaza 3	Q0VCH4	KILLVL	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja wychwytu glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV
Białko palca cynkowego 574	Q29RK0	EVELLYK	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych; stymulacja wychwytu glukozy; immunostymulujący; przeciwzakrzepowe; przeciwutleniające; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV; inhibitor alfa-glukozydazy; inhibitor dipeptydylopeptydazy III; inhibitor reniny
Histamina N-metylotransferaza	Q58DV7	KILIIIV	Potencjalnie: inhibitor ACE; stymulacja wychwytu glukozy; neuropeptyd; inhibitor dipeptydylopeptydazy IV

W zależności od zastosowanych warunków reakcji enzymatycznej, w szczególności od rodzaju enzymu, po hydrolizie białek serwatkowych uzyskuje się peptydy o różnych masach cząsteczkowych. Końcowy skład i sekwencja aminokwasów determinują bioaktywność powstałego hydrolizatu. W przeprowadzonych badaniach każdemu peptydowi przypisano więcej niż jeden typ przewidywanej aktywności biologicznej. Często zdarza się, że pojedynczy peptyd ma więcej niż jedną funkcję ze względu na wzajemne powiązanie szlaków metabolicznych kontrolujących określone funkcje. Ponadto, niektóre peptydy mogą służyć jako cząsteczki sygnałowe i w ten sposób wywierać wpływ na poziomie systemowym.

Na podstawie sekwencji peptydowych uzyskanych za pomocą LC-MS, po przeszukaniu baz danych, zidentyfikowano aktywność biologiczną kilku peptydów. Należą do nich peptydy wiążące cynk takie, jak VEELKPTPEGDLEIL i ELKPTPEGDLEIL pochodzące z trawienia β -laktoglobuliny. Badania wykazały, że peptydy mogą reagować z jonami cynku, tworząc chemicznie stabilne i rozpuszczalne chelaty. Są one zaangażowane w transport pierwiastków i mogą zapobiegać interakcji cynku z różnymi związkami, np. kwasem fitynowym, w przewodzie pokarmowym. Chelaty peptydów cynkowych mogą być stosowane jako nowy sposób suplementowania organizmu ludzkiego cynkiem, ponieważ cynk obecny w takim chelacie może dostać się do organizmu w trybie wchłaniania peptydu (Fu i in. 2020). Takie wiążące cynk peptydy mogą mieć cenne zastosowania odżywcze jako nośniki cynku w diecie, zwiększając biodostępność i bioaktywność tego pierwiastka. Ponadto, peptydy posiadające ligandy cynku są farmakologicznie istotne jako inhibitory enzymów zależnych od cynku (metaloproteinazy), które są użyteczne w kontrolowaniu patogenezы chorób zapalnych (Udechukwu i in. 2021).

Zidentyfikowano również peptyd APFPEVF pochodzący z trawienia α -S1-kazeiny. Jest znany z zastosowania w zapobieganiu i leczeniu stanów patologicznych związanych z α -glukozydazą (Maugard i in. 2018, 2019). Bazy danych dostarczyły również informacji na temat aktywności peptydów uzyskanych podczas hydrolizy białek serwatkowych przy użyciu β -kazeiny, tj. VYFPFGPIH, LVYFPFGPIH i YFPFGPIPNS. Peptyd VYFPFGPIH został zgłoszony jako inhibitor aktywności prolyl endopeptydazy (PEP), powiązanej z zaburzeniami neurodegeneracyjnymi. Inhibitory PEP są uważane za środki, które mogą odwrócić utratę pamięci wywołaną przez związki amnezyjne (Hsieh i in. 2016). LVYFPFGPIH został zidentyfikowany jako inhibitor ACE, który wywiera działanie przeciwnadciśnieniowe, podczas gdy YFPFGPIPNS jest znany jako β -kazomorfin-11, która należy do agonistów receptora opioidowego. Bioaktywne peptydy z tej rodziny są

zdolne do wiązania się i aktywowania receptorów opioidowych zlokalizowanych w różnych regionach ciała (w tym w układzie odpornościowym, przewodzie pokarmowym i potencjalnie w ośrodkowym układzie nerwowym) i mogą różnicowo wpływać na takie procesy, jak immunosupresja, wchłanianie składników odżywczych z przewodu pokarmowego, sygnalizacja opioidowa, hiperglikemia czy stres oksydacyjny (Meisel i Frister 1989, de Vasconcelos i in. 2023).

Analiza aktywności innych peptydów wskazuje, że mogą one wywierać szereg korzystnych efektów fizjologicznych, w tym obniżać ciśnienie krwi, zapobiegać chorobom układu krążenia, działać hipolipidemicznie, utrzymywać homeostazę glukozy, regulować aktywność błony śluzowej żołądka, oddziaływać na układ nerwowy oraz działać jako środki: przeciwcukrzycowe, przeciwnowotworowe, przeciwzapalne, immunomodulujące, przeciwdrobnoustrojowe, przeciwutleniające i osteoanaboliczne.

Badania Kaur i in. (2023) wykazały, że proteom mleka zawiera peptydy, które są nieaktywne w natywnym białku, ale po uwolnieniu stanowią biologicznie aktywne peptydy, które mogą oddziaływać z odpowiednimi receptorami i regulować różnorodne funkcje fizjologiczne w organizmie. Peptydy uwalniane z białek serwatkowych wykazały działanie przeciwnadciśnieniowe (inhibitory ACE), przeciwutleniające, przeciwnowotworowe oraz poprawiające funkcje poznawcze i pamięć.

Za główne wspólne cechy biologicznie aktywnych peptydów uważa się aktywność przeciwutleniającą i przeciwdrobnoustrojową. W badaniach własnych zidentyfikowano 16 peptydów potencjalnie odpowiedzialnych za obserwowaną aktywność przeciwdrobnoustrojową hydrolizatu. Z kolei, 58 peptydów pochodzących z trawienia białek serwatkowych jest potencjalnie związanych z potwierdzoną *in vitro* aktywnością przeciwutleniającą. Aktywność ta została również powiązana z zapobieganiem nowotworów. Wśród zidentyfikowanych peptydów było również 12 wskazujących na potencjalną aktywność przeciwnowotworową. Peptydy takie, jak białko związane z inhibitorem Myc (PAM, ang. protein associated with Myc), inhibitor DPP-III (ang. dipeptidyl peptidase III – dipeptydylopeptydazy III) i regulator aktywności kinazy fosfoglicerynianowej, mogą być również proponowane jako wywierające działanie przeciwnowotworowe. Peptydy o działaniu immunomodulacyjnym i przeciwzapalnym (w tym inhibitor aminopeptydazy Xaa-Pro i inhibitor DPP-III) mogą mieć funkcje bardziej ogólnoustrojowe, częściowo związane również z zapobieganiem nowotworom i odpornością.

Jedną z najczęstszych biologicznych aktywności peptydów jest hamowanie enzymu konwertującego angiotensynę (ACE), co w analizach *in silico* przypisano wszystkim peptydom uzyskanym w ramach przeprowadzonych badań własnych. Efekt ten obejmuje hamowanie enzymu konwertującego angiotensynę, który przekształca angiotensynę I (AT I) w angiotensynę II (AT II), w efekcie zmniejszając poziom ATII we krwi, który w nadmiarze zwęża naczynia, powodując wzrost ciśnienia krwi. Wcześniej wskazano (Chamata i in. 2020), że kilka peptydów pochodzących z mleka i serwatki (białek serwatkowych) wykazuje wysoką aktywność hamującą ACE *in vitro* (peptydy IPP, LIVTQ, IIAE, LVYPPF). Spośród peptydów zidentyfikowanych w tej pracy, APFPEVF, jak wcześniej przewidywano, ma aktywność hamującą ACE (FitzGerald i in. 2020).

Oprócz peptydów hipotensyjnych, obniżanie ciśnienia krwi i działanie przeciwmiażdżycowe przypisuje się również peptydom z inhibitorem CaMPDE (ang. calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase, czyli fosfodiesterazy cyklicznych nukleotydów zależnych od kalmoduliny), inhibitorem DPP-III i inhibitorem reniny, a także częściowo peptydom stymulującym uwalnianie substancji wazoaktywnych. Z kolei, peptydy o działaniu hipolipemicznym są również częściowo związane z zapobieganiem chorobom sercowo-naczyniowym. Działanie to przypisuje się peptydom z aktywnością inhibitora reduktazy HMG-CoA (ang. 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A, czyli 3-hydroksy-3-metyloglutarylokoenzymu A). W badaniach własnych z analizy *in silico* wskazano, że jeden ze zidentyfikowanych peptydów (RELKDLKGYGGVS) może wykazywać taką aktywność. Hamując aktywność HMGR (ang. 3-hydroxy-3-methylglutaryl reductase, czyli reduktazy 3-hydroksy-3-metyloglutarylu), peptydy te obniżają tempo biosyntezy cholesterolu (Pak i in. 2012, Bansal i Cassagnol 2024).

W przeciwieństwie do wyżej wymienionych aktywności, wśród przewidywanych aktywności peptydów przedstawionych w analizach *in silico*, aktywność przeciwcukrzycowa, przeciwwirusowa, przeciwmiażdżycowa i regulująca błonę śluzową jelit zasługuje na szczególną uwagę (Maestri i in. 2019). Kilka grup aktywności peptydowych jest związanych z potencjałem przeciwcukrzycowym i utrzymaniem homeostazy glukozy. Spośród przewidywanych aktywności przypisywanych peptydom zidentyfikowanym w badaniach własnych, peptydy o potencjalnej aktywności inhibitora DPP IV i inhibitora alfa-glukozydazy, a także stymulujące uwalnianie peptydu glukagonopodobnego 1 i regulujące kinazę fosfoglicerynianową mogą wykazywać takie efekty. W badaniach własnych zidentyfikowano 17 peptydów o działaniu przeciwwirusowym, bowiem okazały się mieć działanie inhibitora aminopeptydazy

Xaa-Pro. Należy również zwrócić uwagę na peptydy o przewidywanym działaniu na układ nerwowy. Należą do nich peptydy o potencjalnym działaniu neuropeptydowym, opioidowym, przeciwnieżylnym i inhibitory β -kazomorfiny-5 butyrylocholinesterazy.

8 Wnioski

Osiągnięcie naukowe, stanowiące zbiór trzech publikacji oraz nieopublikowanych wyników badań i opracowań własnych, dotyczy możliwości wykorzystania surowców pochodzenia zwierzęcego (żółtka jaja i serwatki) do produkcji bioaktywnych peptydów, ze szczególnym uwzględnieniem właściwości przeciwutleniających i przeciwbakteryjnych, w procesie kontrolowanej hydrolizy enzymatycznej. Uzyskane wyniki umożliwiły sformułowanie następujących wniosków:

1. Pogłębiony przegląd literatury umożliwił wybór wstępnych parametrów prowadzenia procesu hydrolizy enzymatycznej wybranych białek pochodzenia zwierzęcego, tj. żółtka jaja kurzego i białek serwatkowych, ukierunkowanej na pozyskanie peptydów o aktywności przeciwutleniającej i przeciwbakteryjnej.
2. Enzymatyczna hydroliza stanowi kluczowy etap, zarówno w procesie produkcji peptydów żółtkowych, jak i serwatkowych. Efekt końcowy hydrolizy determinowany jest licznymi czynnikami, w tym głównie: rodzajem enzymu, stosunkiem enzymu do substratu, temperaturą, wartością pH czy wielkością wyodrębnionego peptydu oraz jego sekwencją aminokwasową. Przeprowadzając hydrolizę enzymatyczną białka żółtka jaja kurzego, najbardziej optymalne okazało się zastosowanie procesu dwuetapowego z użyciem papainy i pepsyny, z zachowaniem stosunku substratu do enzymu 1:10, w temperaturze 70°C i pH = 6,0 dla papainy, zaś dla pepsyny – 37°C i pH = 3,0. Natomiast, w przypadku białek serwatkowych najlepsze rezultaty uzyskano przy użyciu papainy, przy stosunku enzymu do substratu również wynoszącym 1:10, w tych samych warunkach temperatury i pH.
3. W procesie przygotowania żółtek jaja kurzego ważnym etapem jest usunięcie frakcji lipidowych, umożliwiające skrócenie czasu hydrolizy, zwiększenie stopnia hydrolizy oraz uzyskanie białek o lepszej rozpuszczalności i jakości.
4. Wykorzystując serwatkę do uzyskania bioaktywnych peptydów, kluczowym etapem produkcji peptydów jest proces ultrafiltracji, który skutecznie eliminuje laktozę, ale także może powodować utratę części małowcząsteczkowych peptydów, co może wpłynąć na ostateczny profil bioaktywny produktu.
5. W badaniach nad hydrolizatami białek serwatkowych, papaina wykazała najwyższy stopień hydrolizy, osiągając poziom 33,00% po trzech godzinach procesu. Podobnie, w przypadku hydrolizatów białka z żółtek jaj, zastosowanie papainy i pepsyny

- doprowadziło do uzyskania peptydów o wysokim stopniu hydrolizy (33,36%) i pożądaných właściwościach bioaktywnych.
6. Kontrolowana hydroliza białka z żółtek jaja i serwatki umożliwia uzyskanie mieszaniny peptydów o silnych właściwościach przeciwutleniających. Zastosowanie papainy prowadzi do istotnego wzrostu aktywności przeciwutleniającej otrzymanych mieszanin, mierzonej testem z rodnikiem DPPH i kationorodnikiem ABTS. Szczególnie wysoką aktywność przeciwutleniającą oznaczono dla mieszanin peptydów otrzymanych z żółtek jaja kurzego, która mierzona z rodnikiem DPPH wynosiła 1776,66 mg ekwiwalentu kwasu askorbinowego/100 g, a mierzona z kationorodnikiem ABTS – 390,43 mmol troloksu/kg. Uzyskane wyniki potwierdzają możliwość ich zastosowania jako naturalnych przeciwutleniaczy w żywności.
 7. Mieszaniny peptydów otrzymane w procesie kontrolowanej hydrolizy białka z żółtek jaja i serwatki wykazały właściwości przeciwbakteryjne. Mieszaniny peptydów z żółtek jaja charakteryzowały się silnym działaniem przeciwko bakteriom Gram (+), w tym *Bacillus cereus*, co może czynić je wartościowymi składnikami naturalnych konserwantów żywności. Podobne właściwości przeciwbakteryjne wykazano w przypadku mieszaniny peptydów otrzymanych z hydrolizy białek serwatkowych, które hamowały wzrost szeregu patogenów, w tym *Bacillus cereus* i *Staphylococcus aureus*.
 8. Zastosowanie nowo zaprojektowanych warunków reakcji enzymatycznej hydrolizy białek żółtka jaja kurzego z wykorzystaniem papainy pozwoliło na zidentyfikowanie za pomocą spektrometrii masowej 1234 sekwencji peptydów. Natomiast w przypadku białek serwatkowych oznaczono ich 107. Większość zidentyfikowanych sekwencji peptydowych stanowiły nowe peptydy, które wcześniej nie były opisane ani zdeponowane w bazach danych.
 9. Otrzymane hydrolizaty stanowiły źródło peptydów o wielokierunkowym oddziaływaniu na organizm człowieka. W przypadku mieszanin uzyskanych z hydrolizatu białek serwatkowych, peptydy o właściwościach przeciwutleniających, np. peptyd o sekwencji LDAQSAPLRVY, oraz o właściwościach przeciwbakteryjnych, np. peptyd o sekwencji AASDISLLDAQSAPLR, stanowiły 16,8% i 4,5% mieszaniny, odpowiednio. Dodatkowo zidentyfikowano szereg peptydów o innych potencjalnych funkcjach, tj. inhibicja ACE (28,1%), stymulacja wychwyty glukozy (18,6%), działanie neuropeptydowe (9,2%), inhibicja reniny

(8,4%), stymulacja uwalniania substancji wazoaktywnych (5,2%), działanie przeciwnowotworowe (3,2%), hipotensyjne (2,3%), przeciwapnezyjne (2,0%) czy opioidowe (1,7%). Natomiast w mieszaninach uzyskanych po hydrolizie białka z żółtek jaja kurzego peptydy o właściwościach przeciwutleniających, reprezentowanych przykładowo przez peptyd o sekwencji PTDQKVGWGGEGQIQ, oraz o właściwościach przeciwbakteryjnych, np. peptyd o sekwencji HVDLDEVANKIA, stanowiły 25,0% i 18,8%, odpowiednio. Mieszanina ta zawierała również peptydy o potencjalnej funkcji inhibicji ACE (31,2%) oraz o działaniu antyproliferacyjnym (18,8%) i opioidowym (6,2%).

10. Zoptymalizowane laboratoryjnie warunki hydrolizy umożliwiły przeskalowanie procesu do skali przemysłowej (przy wsadzie jednorazowym większym niż 1000 kg białka), z zachowaniem oznaczonej aktywności biologicznej peptydów.
11. Doświadczenia rynkowe w obrocie bioaktywnymi mieszaninami peptydów wskazują, że kluczowym wyzwaniem przyszłych badań jest opracowanie metod zwiększania stabilności peptydów podczas przechowywania i obróbki termicznej, co jest istotne dla ich zastosowania w przemyśle spożywczym. Mikroenkapsulacja oraz modyfikacje chemiczne mogą poprawić trwałość i biodostępność peptydów. Konieczne są również badania kliniczne, aby potwierdzić ich skuteczność prozdrowotną, zwłaszcza w zakresie właściwości przeciwdrobnoustrojowych, antyoksydacyjnych i przeciwzapalnych.
12. Na podstawie doświadczenia rynkowego stwierdzono, że uzyskane hydrolizaty zawierające mieszaninę bioaktywnych peptydów mogą potencjalnie znaleźć zastosowanie w opracowywaniu żywności i napojów funkcjonalnych, suplementów diety lub nutraceutyków.

9 Bibliografia

Abdel-Hamid, M.; Goda, H.A.; De Gobba, C.; Jenssen, H.; Osman, A. Antibacterial activity of papain hydrolyzed camel whey and its fractions. *Int. Dairy J.* 2016, 61, 91–98.

Asioli, D.; Aschemann-Witzel, J.; Caputo, V.; Vecchio, R.; Annunziata, A.; Næs, T.; Varela, P. Making sense of the “clean label” trends: A review of consumer food choice behavior and discussion of industry implications. *Food Res. Int.* 2017, 99, 58–71.

Attia, Y.A.; Al-Harathi, M.A.; Korish, M.A.; Shiboob, M.H. Protein and amino acid content in four brands of commercial table eggs in retail markets in relation to human requirements. *Animals* 2020, 10, 406.

Ballatore, M.B.; Bettiol, M.R.; Vanden Braber, N.L.; Aminahuel, C.A.; Rossi, Y.E.; Petroselli, G.; Erra-Balsells, R.; Cavaglieri, L.R.; Montenegro, M.A. Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin. *Food Chem.* 2020, 319, 126472.

Bansal, A.B.; Cassagnol, M. HMG-CoA reductase inhibitors. W: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542212/>.

Benzie, I.F.F.; Strain, J.J. The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”: The FRAP assay. *Anal. Biochem.* 1996, 239, 70–76.

Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *Nature* 1958, 181, 1199–1200.

Chamata, Y.; Watson, K.A.; Jauregi, P. Whey-derived peptides interactions with ACE by molecular docking as a potential predictive tool of natural ACE inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* 2020, 21 (3), 864.

Chatterjee, A.; Kanawjia, S.K.; Khetra, Y.; Saini, P. Discordance between *in silico* and *in vitro* analyses of ACE inhibitory and antioxidative peptides from mixed milk tryptic whey protein hydrolysate. *J. Food Sci. Tech.* 2015, 52 (9), 5621–5630.

Chay Pak Ting, B.P.; Mine, Y.; Juneja, L.R.; Okubo, T.; Gauthier, S.F.; Pouliot, Y. Comparative composition and antioxidant activity of peptide fractions obtained by ultrafiltration of egg yolk protein enzymatic hydrolysates. *Membranes* 2011, 1, 149–161.

Davies, M.G.; Thomas, A.J. An investigation of hydrolytic techniques for the amino acid analysis of foodstuffs. *J. Sci. Food Agric.* 1973, 24, 1525–1540.

de Vasconcelos, M.L.; Oliveira, L.M.F.S.; Hill, J.P.; Vidal, A.M.C. Difficulties in establishing the adverse effects of β -casomorphin-7 released from β -casein variants – A review. *Foods* 2023, 12 (17), 3151.

Delgado, M.C.O.; Galleano, M.; Añón, M.C.; Tironi, V.A. Amaranth, peptides from simulated gastrointestinal digestion: Antioxidant activity against reactive species. *Plant Foods Hum. Nutr.* 2015, 70, 27–34.

Du, X.; Jing, H.; Wang, L.; Huang, X.; Wang, X.; Wang, H. Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases. *LWT – Food Sci. Tech.* 2022, 159, 113257.

Eckert, E.; Pokora, M.; Zambrowicz, A.; Szołtysik, M.; Dąbrowska, A.; Chrzanowska, J.; Trziszka, T. The application of microbial proteases to obtain egg yolk protein hydrolysates with antioxidant and antimicrobial activity. *Żywn. Nauk. Technol. Ja.* 2013, 1, 105–118.

Young, D.; Fan, M.Z.; Mine, Y. Egg yolk peptides up-regulate glutathione synthesis and antioxidant enzyme activities in a porcine model of intestinal oxidative stress. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58, 7624–7633.

Eckert, E.; Zambrowicz, A.; Bobak, Ł.; Zabłocka, A.; Chrzanowska, J.; Trziszka, T. Production and identification of biologically active peptides derived from by-product of hen egg-yolk phospholipid extraction. *Int. J. Pept. Res. Ther.* 2018, 25, 669–680.

Estévez, N.; Fuciños, P.; Fuciños, C.; Jauregi, P.; Tovar, C.A.; Rúa, M.L. Hydrolysis of whey protein as a useful approach to obtain bioactive peptides and a β -lg fraction with different biotechnological applications. *Food Hydrocoll.* 2020, 109, 106095.

FitzGerald, R.J.; Cermeño, M.; Khalesi, M.; Kleekayai, T.; Amigo-Benavent, M. Application of *in silico* approaches for the generation of milk protein-derived bioactive peptides. *JFF* 2020, 64, 103636.

Floegel, A.; Kim, D.O.; Chung, S.J.; Koo, S.I.; Chun, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* 2011, 24, 1043–1048.

Fu, T.; Zhang, S.; Sheng, Y.; Feng, Y.; Jiang, Y.; Zhang, Y.; Yu, M.; Wang, C. Isolation and characterization of zinc-binding peptides from mung bean protein hydrolysates. *Eur. Food Res. Technol.* 2020, 246, 113–124.

Girgih, A.T.; He, R.; Hasan, F.M.; Udenigwe, C.C.; Gill, T.A.; Aluko, R.E. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chem.* 2015, 173, 652–659.

Giromini, C.; Lovegrove, J.A.; Givens, D.I.; Rebucci, R.; Pinotti, L.; Maffioli, E.; Tedeschi, G.; Sundaram, T.S.; Baldi, A. *In vitro*-digested milk proteins: Evaluation of angiotensin-1-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities, peptidomic profile, and mucin gene expression in HT29-mtx cells. *J. Dairy Sci.* 2019, 102 (12), 10760–10771.

Graszkiewicz, A.; Zelazko, M.; Trziszka, T.; Polanowski, A. Antioxidative capacity of hydrolysates of hen egg proteins. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 2007, 4, 195–199.

Hsieh, C.H.; Wang, T.Y.; Hung, C.C.; Hsieh, Y.L.; Hsu, K.C. Isolation of prolyl endopeptidase inhibitory peptides from a sodium caseinate hydrolysate. *Food Funct.* 2016, 7 (1), 565–573.

<http://proteom.ibb.waw.pl/mscan>

Jamil, N.H.; Halim, N.R.; Sarbon, N.M. Optimization of enzymatic hydrolysis condition and functional properties of eel (*Monopterus* sp.) protein using response surface methodology (RSM). *Int. Food Res. J.* 2016, 23, 1–9.

Jehmlich, N.; Gولاتowski, C.; Murr, A.; Salazar, G.; Dhople, V.M.; Hammer, E.; Völker, U. Comparative evaluation of peptide desalting methods for salivary proteome analysis. *Clin. Chim. Acta.* 2014, 434, 16–20.

Jia, C.L.; Hussain, N.; Joy Ujiroghene, O.; Pang, X.Y.; Zhang, S. W.; Lu, J.; Liu, L.; Lv, J.P. Generation and characterization of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from trypsin-hydrolyzed α -lactalbumin-rich whey proteins. *Food Chem.* 2020, 318, 126333.

Kaur, S.; Vasiljevic, T.; Huppertz, T. Milk protein hydrolysis by actinidin – kinetic and thermodynamic characterisation and comparison to bromelain and papain. *Foods* 2023, 12 (23), 4248.

Kimatu, B.M.; Zhao, L.; Biao, Y.; Ma, G.; Yang, W.; Pei, F.; Hu, Q. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. *Food Chem.* 2017, 230, 58–67.

Kong, X.; Zhou, H.; Qian, H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* 2007, 102, 759–763.

Kordala, N.; Bednarska, M.; Adamczak, M. Health-promoting properties of bioactive peptides (BAP) in dairy products – biotechnological and medical aspects. *Med. Og. Nauk. Zdr.* 2021, 27 (2), 107–116.

Kosikowska, U.; Stepien-Pysniak, D.; Ozga, D.; Wernicki, A.; Malm, A. Identification of *Bacillus* spp. colonizing the nasal mucosa of healthy adults living in the suburban area using the matrix-assisted laser desorption-ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* 2014, 27, 137–141.

Kumar, D.; Chatli, M.K.; Singh, S.; Mehta, N.; Kumar, P. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Rumin. Res.* 2016, 139, 20–25.

Le, T.H.; Disegna, M.; Lloyd, T. National food consumption patterns: converging trends and the implications for health. *EuroChoices* 2023, 22 (1), 66–73.

Li, W.; Separovic, F.; O'Brien-Simpson, N.M.; Wade, J.D. Chemically modified and conjugated antimicrobial peptides against superbugs. *Chem. Soc. Rev.* 2021, 50, 4932–4973.

Liu, R.; Xing, L.; Fu, Q.; Zhou, G.H.; Zhang, W.G. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and byproducts. *Antioxidants* 2016, 5, 32.

Maestri, E.; Pavlicevic, M.; Montorsi, M.; Marmiroli, N. Meta-analysis for correlating structure of bioactive peptides in foods of animal origin with regard to effect and stability. *CRFSFS* 2019, 18 (1), 3–30.

Mardani, M.; Badakné, K.; Farmani, J.; Aluko, R. E. Antioxidant peptides: Overview of production, properties, and applications in food systems. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 2023, 22 (1), 46–106.

Matsui, R.; Honda, R.; Kanome, M.; Hagiwara, A.; Matsuda, Y.; Togitani, T.; Ikemoto, N.; Terashima M. Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. *Food Chem.* 2018, 245, 750–755.

Maugard, T.; Bordenave-Juchereau, S.; Piot, J.M.; Ben-Henda, Y.; Sirvent, P.; Peltier, S. Compositions for preventing and/or treating pathological conditions associated with alpha-glucosidase. 2018. Patent Pub. No. US 2018 / 0104303 A1.

Maugard, T.; Bordenave-Juchereau, S.; Piot, J.M.; Ben-Henda, Y.; Sirvent, P.; Peltier, S. Compositions for preventing and/or treating pathological conditions associated with alpha-glucosidase. 2019. Patent Pub. No. US 10,500,245 B2.

Meignanalakshmi, S.; Vinoth Kumar, S. Antibacterial activity of papain hydrolysates of buffalo milk whey milk whey protein against mastitis pathogens. IJPBS 2013, 4, 1133–1138.

Meisel, H.; Frister, H. Chemical characterization of bioactive peptides from *in vivo* digests of casein. J. Dairy Res. 1989, 56 (3), 343–349.

Memarpoor-Yazdi, M., Mahaki, H., Zare-Zardini, H., Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from zizyphus jujube fruits. J. Funct. Foods 2013, 5, 62–70.

Minkiewicz, P.; Iwaniak, A.; Darewicz, M. BIOPEP-UWM Database of bioactive peptides: Current opportunities. IJMS 2019, 20, 5978.

Mostafa, A.A.; Al-Askar, A.A.; Almaary, K.S.; Dawoud, T.M.; Sholkamy, E.N.; Bakri, M.M. Activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi J. Biol. Sci. 2018, 25, 361–366.

Nasri, M. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities and applications in foods and health benefits. A review. Adv. Food Nutr. Res. 2017, 81, 109–159.

Ohashi, Y.; Onuma, R.; Naganuma, T.; Ogawa, T.; Naude, R.; Nokihara, K.; Muramoto, K. Antioxidant properties of tripeptides revealed by a comparison of six different assays. Food Sci. Technol. Res. 2015, 21 (5), 695–704.

Ozuna, C.; León-Galván, M.F. Cucurbitaceae seed protein hydrolysates as a potential source of bioactive peptides with functional properties. BioMed Res. Int. 2017, 2017, 2121878.

Pak, V.V.; Koo, M.; Kwon, D.Y.; Yun, L. Design of a highly potent inhibitory peptide acting as a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase. Amino Acids 2012, 43 (5), 2015–2025.

Pellegrini, A.; Dettling, C.; Thomas, U.; Hunziker, P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. BBA – Gen Subjects 2001, 1526, 131–140.

Pellegrini, A.; Hülsmeier, A.J.; Hunziker, P.; Thomas, U. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. Biochim. Biophys. Acta 2004, 1672, 76–85.

Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *J. Nutr.* 2003, 133, 2812–2819.

Peslerbes, M.; Fellenberg, A.; Jardin, J.; Deglaire, A.; Ibáñez, R.A. Manufacture of whey protein hydrolysates using plant enzymes: Effect of processing conditions and simulated gastrointestinal digestion on angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity. *Foods* 2022, 11 (16), 2429.

Pimchan, T.; Tian, F.; Thumanu, K.; Rodtong, S.; Yongsawatdigul, J. Isolation, identification, and mode of action of antibacterial peptides derived from egg yolk hydrolysate. *Poultry Sci.* 2023, 102, 102695.

Pokora, M.; Eckert, E.; Zambrowicz, A.; Bobak, Ł.; Szoltyś, M.; Dąbrowska, A.; Chrzanowska, J.; Polanowski, A.; Trziszka, T. Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. *Food Sci. Nutr.* 2013, 1, 184–195.

Rozporządzenie Komisji (UE) nr 1129/2011 z dnia 11 listopada 2011 r. zmieniające załącznik II do rozporządzenia Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 poprzez ustanowienie unijnego wykazu dodatków do żywności, Dz.U. L 295 z 12.11.2011 r.

Rozporządzenie Parlamentu Europejskiego i Rady (WE) nr 1333/2008 z dnia 16 grudnia 2008 r. w sprawie dodatków do żywności, Dz.U. L 354 z 31.12.2008 r.

Salami, M.; Moosavi-Movahedi, A.A.; Ehsani, M.R.; Yousefi, R.; Haertlé, T.; Chobert, J.M.; Razavi, S.H.; Henrich, R.; Balalaie, S.; Ebadi, S.A.; Pourtakdoost, S.; Niasari-Naslaji, A. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. *J. Agric. Food Chem.* 2010, 58 (6), 3297–3302.

Sarmadi, B.H.; Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* 2010, 31, 1949–1956.

Sathivel, S.; Bechtel, P.J.; Babbitt, J.; Smiley, S.; Crapo, C.; Reppond, K.D.; Prinyawiwatkul, W. Biochemical and functional properties of herring (*Clupea harengus*) byproduct hydrolysates. *J. Food Sci.* 2003, 68, 2196–2200.

Schram, E.; Moore, S.; Bigwood, E.J. Chromatographic determination of cystine as cysteic acid. *Biochem. J.* 1954, 59, 33–37.

Severin, S.; Xia, W.S. Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *J. Food Biochem.* 2006, 30, 77–97.

Sheih, I.C.; Wu, T.K.; Fang, T.J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour. Technol.* 2009, 100, 3419–3425.

STATISTICA ver. 13.0 software (TIBCO Software Inc., USA).

Thiex, N.J.; Anderson, S.; Gildemeister, B. Crude fat, hexanes extraction, in feed, cereal grain, and forage (Randall/soxtec/submersion method): Collaborative study. *J. AOAC Int.* 2003, 86, 899–908.

Thwaite, J.E.; Hibbs, S.; Titball, R.W.; Atkins, T.P. Proteolytic degradation of human antimicrobial peptide LL-37 by *Bacillus anthracis* may contribute to virulence. *Antimicrob. Agents* 2006, 50, 7.

Udechukwu, M.C.; Dang, C.; Udenigwe, C.C. Identification of zinc-binding peptides in ADAM17-inhibiting whey protein hydrolysates using IMAC-Zn²⁺ coupled with shotgun peptidomics. *Food Prod. Process Nutr.* 2021, 3, 5.

Wang, G.; Wang, T. Egg yolk protein modification by controlled enzymatic hydrolysis for improved functionalities. *Int. J. Food Sci. Technol.* 2009, 44, 763–769.

Wang, R.; He, S.; Xuan, Y.; Cheng, C. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates-Zn complexes. *J. Food Meas. Charact.* 2020, 14 (1), 254–261.

Wu, H.C.; Chen, H.M.; Shiau, C.Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber austriasicus*). *Food Res. Int.* 2003, 36 (9–10), 949–957.

Xu, X.; Liu, A.; Hu, S.; Ares, I.; Martínez-Larrañaga, M. R.; Wang, X.; Martínez M.; Arturo A.; Martínez, M. A. Synthetic phenolic antioxidants: Metabolism, hazards and mechanism of action. *Food Chem.* 2021, 353, 129488.

Zambrowicz, A.; Pokora, M.; Setner, B.; Dłabrowska, A.; Szołtysik, M.; Babij, K.; Szewczuk, Z.; Trziszka, T.; Lubec, G.; Chrzanowska, J. Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: Isolation and characterization. *Amino Acids* 2015, 47, 369–380.

Zamora-Sillero, J.; Gharsallaoui, A.; Prentice, C. Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: An overview. *Mar. Biotechnol.* 2018, 20, 118–130.

Zou, Y.; Chang, S.K.C.; Gu, Y.; Qian, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compositions of lentil (*Lens culinaris* var. *morton*) extract and its fractions. *J. Agric. Food Chem.* 2011, 59, 2268–2276.

Review

Protein Hydrolysates Derived from Animals and Plants—A Review of Production Methods and Antioxidant Activity

Michał Czelej ^{1,2,*}, Katarzyna Garbacz ^{1,2}, Tomasz Czernecki ², Jacek Wawrzykowski ³ and Adam Waiko ²

¹ BioLive Innovation Sp. z o.o., 3 Dąbrzowski Street, 20-262 Lublin, Poland; katarzyna.garbacz@up.lublin.pl

² Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, R. Skromna Street, 20-704 Lublin, Poland; tomasz.czernecki@up.lublin.pl (T.C.); adam.waiko@up.lublin.pl (A.W.)

³ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, 12 Akademicka Street, 20-400 Lublin, Poland; jacek.wawrzykowski@up.lublin.pl

* Correspondence: michal.czelej@up.lublin.pl



Czelej, M.; Garbacz, K.; Czernecki, T.; Wawrzykowski, J.; Waiko, A. Protein Hydrolysates Derived from Animals and Plants—A Review of Production Methods and Antioxidant Activity. *Foods* **2022**, *11*, 1953. <https://doi.org/10.3390/foods11131953>

Academic Editor: Cristina Moinet Vilhanga

Received: 19 May 2022

Accepted: 26 June 2022

Published: 30 June 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: There is currently considerable interest on the use of animal, plant, and fungal sources in the production of bioactive peptides, as evidenced by the substantial body of research on the topic. Such sources provide cheap and environmentally friendly material as it often includes waste and by-products. Enzymatic hydrolysis is considered an efficient method of obtaining peptides capable of antioxidant activity. These properties have been proven in terms of radical-scavenging capacity using the DTPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2-azino-bis(3-ethyl-6-sulphoazoline-6-sulphonic acid)), hydroxyl and superoxide radical methods. Additionally, the reducing power, ferrous ion-chelating (FIC), ferric reducing antioxidant power (FRAP), and the ability of the protein hydrolysates to inhibit lipid peroxidation have also been explored. The results collected in this review clearly indicate that the substrate properties, as well as the conditions under which the hydrolysis reaction is carried out, affect the final antioxidant potential of the obtained peptides. This is mainly due to the structural properties of the obtained compounds such as size or amino acid sequences.

Keywords: bioactive peptides; protein hydrolysates; plants; animals; enzymatic hydrolysis; antioxidant activity

1. Introduction

With the currently evolving human consumption behavior, the demand for healthy and natural food products is on the increase [1]. At the same time, however, many synthetic antioxidants including butylated hydroxytoluene (BHT) butylated hydroxyanisole, tert-butylhydroquinone, and propyl gallate are frequently added to food to prevent its premature deterioration [2,3]. The longstanding consumption of these compounds has raised concerns associated with their potential hazardous effects on the human body [4,5]. Hence, identifying natural substitutes for synthetic antioxidants. Numerous scientific publications pay special attention to the use of animal, plant and fungal sources for the production of biologically active peptides and proteins, which in the future will be able to largely replace the current synthetic compounds on the market [6–10].

Bioactive peptides (BPs) are a group of organic compounds characterized by many health-promoting properties such as immunomodulatory, antihypertensive, antimicrobial, insulin-mimetic, or antioxidant effect. BPs can be obtained during gastrointestinal digestion, fermentation, enzymatic hydrolysis, or in chemical reactions in vitro [5,11,12]. Generally, peptides are formed of 2 to 100 amino acid residues. Their bioactive potency is dependent on the inherent composition and sequence of amino acid residues. Peptides encoded in the sequence of their parent proteins are mostly inactive, but they can be converted into their active form by applying enzymes or chemical reagents.

Enzymatic hydrolysis is considered a particularly important method of generating bio-functional peptides. Compared to chemical methods, it required mild reaction conditions, generates few undesirable side products, and facilitates high yield and product quality [13]. Additionally, the bioactivity of the obtained protein hydrolysates can be improved during this process as it is affected by several parameters, including the type of enzyme, processing time, pH, and temperature [14]. Various proteinases such as alkalase [1,3,5,15–23], neutrase [24,25], papain [1,17,26–28], pepsin [1,15,25,26,28–36], trypsin [1,20,21,25,28,29,32–40], chymotrypsin [28,29,40], protex 6L [37], salszyme L 200 [37], viscozyme L [41], pancematin [34,30,33,41–44], cellulase [45], thermolysin [23], flavourzyme [3,19,21,46], carolase [37,47,48], protanex [22,25,37,49], and bromelain [37,45,50–56] have been extensively employed in the production of peptides with antioxidative properties. Furthermore, biologically active peptides have also been obtained using protease of bacterial and fungal origin such as *Bacillus subtilis* A26 [51], *Bacilluslicheniformis* NH1, *Bacillus pumilus* A1, *Bacillus mayorensis* A21, *Aspergillus clavatus* ES1, *Saccharomyces pastorianus* [24], and *Yarrowia lipolytica* [52].

In the last decade, antioxidative proteins and their derived hydrolysates have been subject to particular research scrutiny. They could constitute natural and safe alternatives to synthetic antioxidants as after oral administration, they are degraded into the harmless components of amino acids, as opposed to synthetic antioxidants that can be adsorbed and remain in the body for long periods of time and can eventually cause cancer [30].

Hence, the following paper focuses on various protein hydrolysates with shown antioxidative properties, derived from different kinds of animal, plant and fungal proteins and described in literature in recent years. To this end, we cite results relevant to a variety of sources, including one's alternative to well-established material such as soybeans, wheat or whey. Although enzymatic hydrolysis has many advantages (e.g., the nature of GRAS) and is widely used to obtain protein hydrolysates, researchers are still looking for new approaches to increase the yield of bioactive peptides. Therefore, it is crucial in the conducted studies to use different enzymatic protocols that will allow the selection of optimal process conditions adapted to the protein source and its nature, which will increase the efficiency of the reaction by reducing the hydrolysis time, reduce the process cost and allow to obtain the desired peptides. Our aim was to collect recent achievements in this field and elaborate on the effectiveness of different enzymes against different protein sources. The results presented in the following article will help scientists to make more informed decisions regarding the choice of enzymes as well as optimization of the hydrolysis process in terms of the appropriate enzyme/substrate ratio, reaction time, pH, temperature, and deactivation conditions.

2. The Animal Kingdom

2.1. Methods of Obtaining Protein Hydrolysates of Animal Origin

A wide range of protein hydrolysates with antioxidative potential have been extracted from various fish, insects, domestic fowl, as well as zoonotic products (Table 1).

Table 1. Methods of obtaining protein hydrolysates of animal origin.

Source	Part of Source	Enzymatic Hydrolysis				Enzymatic Deactivation				Dehydration	MW of PH/Peptides Sequence	Antioxidant Activity PH/Peptide	References		
		Type of Enzyme	E/S Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	DH (%)	Temp (°C)	Time (min)					pH	Reagent
<i>Ballistes philippinensis</i>	whole	trypsin	3:100	9	45	4	17.54	100	10	-	-	lyophilization	Highest content fraction of MW 1–3 kDa	DPPH 38.77%	Yu et al., 2018
	whole	neurase	3:100	6.5	45	4	18.3	100	10	-	-	lyophilization	Highest content fraction of MW <1 kDa	DPPH 68.55%	
	whole	pepsin	3:100	4	45	4	8.34	100	10	-	-	lyophilization	highest content of MW fraction >5 kDa	DPPH 63.98%	
<i>Pancreo glabra</i>	skin	pepsin	1:20	8	55	3	16.52	90	5	-	-	lyophilization	MW: 3 kDa	DPPH 422.97; 416.03 (mg BHT Eq./mL)—retentates (R) and permeates (P) fraction	Blanco et al., 2017
<i>Scyliorhinus orcinus</i>	skin	pepsin	1:20	8	55	3	15.80	90	5	-	-	lyophilization	MW: 3 kDa	DPPH 605.40; 601.70 (mg BHT Eq./mL)—retentates (R) and permeates (P) fraction	
<i>Xiphias gladius</i>	skin	pepsin	1:20	8	55	3	12.56	90	5	-	-	lyophilization	MW: 3 kDa	DPPH 465.63; 448.0 (mg BHT Eq./mL)—retentates (R) and permeates (P) fraction	
<i>Thaenius abaxeres</i>	skin	pepsin	1:20	8	55	3	11.49	90	5	-	-	lyophilization	MW: 3 kDa	DPPH 435.97; 437.67 (mg BHT Eq./mL)—retentates (R) and permeates (P) fraction	Jiang et al., 2014
<i>Dasyatis centroura</i>	muscle	celastase	1:100	9.5	50	5	-	100	15	-	-	lyophilization	MW III: <5 kDa MW II: 5–10 kDa MW I: >10 kDa HEKVC HDFPVC	DPPH 39.36% —for PH 1.47.23% II: 36.27 III: 50.54 EC ₅₀ 0.0677 (mM) EC ₅₀ 0.0510 (mM)	
	muscle	neutral protease	1:100	7	50	5	-	100	15	-	-	lyophilization	n. d.	32.33% —for PH	
	muscle	pepsin	1:100	7	55	5	-	100	15	-	-	lyophilization	n. d.	40.23% —for PH	

Table 1. Cont.

Source	Part of Source	Type of Enzyme	Enzymatic Hydrolysis				Enzymatic Deactivation				Dehydration	MW of PH/Peptides Sequence	Antioxidant Activity PH/Peptide	References	
			ES Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	DH (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH					Reagent
	muscle	pepsin	1:100	2	37.5	5	-	100	15	-	-	lyophilization	n. d.	32.63% —for pH	
	muscle	trypsin	1:100	7.6	37.5	5	-	100	15	-	-	lyophilization	n. d.	39.37% —for PH	
<i>Oreochromis niloticus</i>	head, skin, trimmings, fins, frames and viscera	pepsin	1:100	2.5	37	3	-	100	15	-	-	spray drying	MW < 18 kDa	2.5 mg/ml, DPPH scavenging 73.62%	Tajjal et al., 2017
<i>Sardinella aurita</i>	muscle	proteases from <i>B. subtilis</i> A26	3:1	8	45	5	10	-	-	-	0.1 N HCl	lyophilization	LVIHYAGTVDYD; FRPQQPYTQP LIGDLKLSQF; NVLSCGTTMYPG; VIVEGLERT	highest reducing power and ORAC value	Jamil et al., 2017
<i>Rastrelliger laevis</i>	backbones	pepsin	1:100	2	37	6	24.7	100	10	-	-	lyophilization	n. d.	DPPH 46% ABTS 58.5%	Shenif et al., 2017
	backbones	papain	1:100	6	37	3	18.1	100	10	-	-	lyophilization	n. d.	DPPH 36% ABTS 37.54%	
<i>Nareichthys opferiensis</i>	head	papain	3:20	7.6	50	5	-	90	10	-	-	lyophilization	WEGPLK, GPP, CVPLT	DPPH IC ₅₀ 4.43 mg/ml, IC ₅₀ 1.92 mg/ml, IC ₅₀ 4.54 mg/ml	Chi et al., 2015
Salmon	backbones	Cordase® PP	1:10	-	50	2	22.1	>90	5	-	-	lyophilization	MW > 2.5 kDa	DPPH 32% *	Slizyte et al., 2016
	backbones	Cordase® 7089	1:10	-	50	2	18.3	>90	5	-	-	lyophilization	MW 2.5–6.5 kDa	DPPH 25%	
	backbones	Protases®	1:10	-	50	2	20.9	>90	5	-	-	lyophilization	MW 0.14 kDa—free amino acids	DPPH 36% *	
	backbones	Borekito 40 GLU/g/Papain 100 TU/mg	1:10	-	50	2	14.8	>90	5	-	-	lyophilization	MW 5.5–6.5 kDa	DPPH about 27% *	

Table 1. Cont.

Source	Part of Source	Type of Enzyme	Enzymatic Hydrolysis				Enzymatic Deactivation				Dehydration	MW of PH/Peptides Sequence	Antioxidant Activity PH/Peptide	References	
			ES Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	DH (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH					Reagent
	backbone	Protex 6L	1:10	-	50	2	18.2	>90	5	-	-	lyophilization	MW 2.5–6.5 kDa	DPPH 25–26%*	
	backbone	Sealzyme L-200	1:10	-	50	2	17.1	>90	5	-	-	lyophilization	MW 5.5–6.5 Da	DPPH 25–26%*	
	backbone	trypsin	1:10	-	50	2	18.1	>90	5	-	-	lyophilization	MW >2.5 kDa	DPPH about 21%*	
	pectoral fin	alkalase	1:100	7	50	8	around 10	100	15	-	-	lyophilization	n. d.	DPPH IC ₅₀ 4.76 mg/mL	
	pectoral fin	flavourzyme	1:100	7	50	8	around 10	100	15	-	-	lyophilization	n. d.	DPPH IC ₅₀ 3.62 mg/mL	
	pectoral fin	neumase	1:100	7	50	8	around 10	100	15	-	-	lyophilization	n. d.	DPPH IC ₅₀ 4.95 mg/mL	
Salmón	pectoral fin	pepsin	1:100	2	37	8	around 10	100	15	-	-	lyophilization	Phe-Leu-Asn-Glu-Phe-Leu-His-Val (MW 1018.48 Da)	DPPH IC ₅₀ 1.63 mg/30—for proteolytic hydrolysate DPPH IC ₅₀ 496 µM—for octapeptide	Ahn et al., 2014
	pectoral fin	Protases	1:100	77	50	8	around 10	100	15	-	-	lyophilization	n. d.	DPPH IC ₅₀ 4.08 mg/mL	
	pectoral fin	trypsin	1:100		57	8	around 10	100	15	-	-	lyophilization	n. d.	DPPH IC ₅₀ 4.53 mg/mL	
	roe	alkalase	1.5:100	8	55	3	12.7	85–95	20	-	-	vacuum drying	n. d.	DPPH IC ₅₀ 1.151 mg/mL	
Cyprinus Carpio	roe	pepsin	1.5:100	2	37	3	30	85–95	20	-	-	vacuum drying	n. d.	DPPH IC ₅₀ 2.25 mg/mL	Chalamaiah et al., 2015
	roe	trypsin	1.5:100	8	37	3	14.5	85–95	20	-	-	vacuum drying	n. d.	DPPH IC ₅₀ 1.158 mg/mL	
Oxyptis melgiri	muscle	protease from <i>Serratia maritima</i>	1:3	8	45	8	17.6	80	20	-	-	lyophilization	high MW peptides	DPPH 51.29% (at 6 mg/mL)	Salem et al., 2017 [37]

Table 1. Cont.

Source	Part of Source	Type of Enzyme	Enzymatic Hydrolysis				Enzymatic Deactivation				Dehydration	MW of PH/Peptides Sequence	Antioxidant Activity PH/Peptide	References	
			ES Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	DH (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH					Reagent
	muscle	protease from <i>Bacillus subtilis</i> A26	1:5	8	45	8	21	80	20	-	-	lyophilization	highest level of peptides, with MW < 0.3 kDa	DPPH 25.1% (at 6 mg/mL)	
<i>Litopenus tamaris</i>	whole	Protamex	1:100	7	50	-	10 and 20	90	20	-	-	lyophilization	n. d.	ABTS about 48% (at 5.0 mg/mL)—values for DH 10% about 66% (at 5.0 mg/mL)—DH 20%	Latorres et al., 2017
	whole	alcalase	1:100	8	50	-	10 and 20	90	20	-	-	lyophilization	n. d.	ABTS about 68% (at 5.0 mg/mL)—values for DH 10% about 56% (at 5.0 mg/mL)—DH 20%	
<i>Gryllodes sigillata</i>	whole	α -amylase, pepsin, pancreatin, and bile extract solution	4:100	-	37	1	-	100	5	-	-	lyophilization	MW \leq 3.5 kDa	ABTS IC ₅₀ 15.24 μ g/mL DPPH IC ₅₀ 17.97 μ g/mL	
<i>Tenebrio molitor</i>	whole	α -amylase, pepsin, pancreatin, and bile extract solution	4:100	-	37	1	-	100	5	-	-	lyophilization	MW \leq 3.5 kDa	ABTS IC ₅₀ 24.31 μ g/mL DPPH IC ₅₀ 93.33 μ g/mL	Zabłocka et al., 2017
<i>Schizocera grisea</i>	whole	α -amylase, pepsin, pancreatin, and bile extract solution	4:100	-	37	1	-	100	5	-	-	lyophilization	MW \leq 3.5 kDa	ABTS IC ₅₀ 12.1 μ g/mL DPPH IC ₅₀ 88.81 μ g/mL	

Table 1. Cont.

Source	Part of Source	Type of Enzyme	Enzymatic Hydrolysis				Enzymatic Deactivation				Dehydration	MW of PH/Peptides Sequence	Antioxidant Activity PH/Peptide	References	
			E/S Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	DH (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH					Reagent
<i>Albugo galathea</i>	muscle	flavourzyme	3:100	5.42	50.09	1.08	12.11	100	12	-	-	lyophilization	n.d.	ABTS 79.15% DPPH 88.33%	Wang et al., 2018
<i>Gallus gallus domesticus</i>	muscle	flavourzyme	3:100	5.42	50.09	1.08	12.86	100	12	-	-	lyophilization	n.d.	ABTS 78.23% DPPH 86.32%	
Barr	muscle	flavourzyme	3:100	5.42	50.09	1.08	10.52	100	12	-	-	lyophilization	n.d.	ABTS 70.57% DPPH 80.15%	
<i>Canis domesticus</i>	milk	mixture of pepsin and pepsinatin	-	5.3 then 7.5	37	4	-	100	10	-	-	lyophilization	LEHQQTEDLQXQQL (MW: 1860.85 Da, LL-15); YLEELHRLNAGY (1477.63 Da, YY-11); RGLHPVPO (903.04 Da, RQ-8)	ABTS IC ₅₀ < 0.01 mg/mL DPPH IC ₅₀ 0.01 mg/mL —for YY-11 ABTS IC ₅₀ 0.03 mg/mL DPPH IC ₅₀ 0.03 mg/mL —for LL-15 ABTS IC ₅₀ 0.07 mg/mL DPPH IC ₅₀ 0.06 mg/mL —for RQ-8	Himayouni-Tahriri et al., 2017.
<i>Canis domesticus</i>	milk	alkalase	1:100	6	50	6	15.5	100	10	-	-	lyophilization	n.d.	DPPH about 19 µmol TE/g	Al-Shami et al., 2018
	milk	bromelain	1:100	7	50	6	23.8	100	10	-	-	lyophilization	n.d.	DPPH 23 µmol TE/g	
	milk	papain	1:100	7	50	6	39.6	100	10	-	-	lyophilization	n.d.	DPPH 21 µmol TE/g	

Table 1. Cont.

Source	Part of Source	Type of Enzyme	Enzymatic Hydrolysis				Enzymatic Deactivation				Dehydration	MW of PH/Peptides Sequence	Antioxidant Activity PH/Peptide	References	
			ES Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	DH (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH					Reagent
<i>Buffalo</i>	milk	trypsin	1:100	7.9	37	3	-	90	15	-	-	lyophilization	RELEI, MEENKQ, BELLEI, LQS, GNACE,	n.d.	Shady et al., 2017
	milk	alkalase	1:100	5.7	55	3	-	90	15	-	-	lyophilization	PRG, TVA, TAAG, HCL, LISLS	n.d.	
<i>Gallus gallus domesticus</i>	egg white	protease from <i>Y. lipolytica</i>	1:30	8	37	24	38	100	15	-	-	lyophilization	MW < 3 kDa	DPPH 0.21 µM Trolox _{eq} /mg	Pokora et al., 2017
<i>Gallus gallus domesticus</i>	egg yolk	protease from <i>C. ficiflua</i>	1:7.52	8	37	4	-	100	15	-	-	lyophilization	LAPSLNGKPKPD	DPPH 6.05 µM Trolox _{eq} /mg FRAP 296.07 µg Fe ²⁺ /mg	Zambrowicz et al., 2015 [19]

* Increased radical scavenging activity in comparison to unhydrolyzed protein. n.d., not determined; PH, protein hydrolyzate; G, Glycine; P, Proline; A, Alanine; V, Valine; L, Leucine; I, Isoleucine; M, Methionine; C, Cysteine; F, Phenylalanine; Y, Tyrosine; W, Tryptophan; H, Histidine; K—R, Arginine; Q, Glutamine; N, Asparagine; E, Glutamic Acid; D, Aspartic Acid; S, Serine; T, Threonine.

2.2. Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates Derived from Fish

Blanco et al. [35] prepared and investigated four hydrolysates derived from fish skin collagen of two shark species (*Prionace glauca* and *Squaliolus laticauda*) and the two bonny fish species (*Thunnus albacares* and *Xiphias gladius*). All of the samples were screened for antioxidant activity and radical-scavenging capacity utilizing DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) and ABTS (2,2-azino-bis-(3-ethyl-benzothiazoline-6-sulphonic acid)). The recorded results were expressed in milligrams of BHT equivalent per 1 mL of hydrolysate (mg BHT Eq mL⁻¹). Furthermore, the inhibition of lipid peroxidation (estimated with a β -carotene assay) of collagen hydrolysates from these species was also evaluated. Previous studies [39,60] suggested that the antioxidant activity of protein hydrolysates was associated with the degree of hydrolysis. Blanco et al., observed the lowest antioxidant potency in the hydrolysate obtained from *Prionace glauca* (405.3 and 151.2 mg BHT Eq mL⁻¹, respectively for the DPPH and ABTS method), which simultaneously exhibited the highest degree of hydrolysis (16.52%). Meanwhile, although the hydrolysate prepared from *Xiphias gladius* demonstrated a higher degree of hydrolysis (12.56%) than the one generated from *Thunnus albacares* (11.49%), it was identified as capable of the highest antioxidant activity (677.20 and 253.77 mg BHT Eq mL⁻¹, respectively for the DPPH and ABTS assay). The findings suggest that the antioxidant activity of protein hydrolysates could be associated not only with the degree of hydrolysis, but also with other factors such as the presence of amino acids capable of interacting with free radicals, e.g., the SH group in cysteine [59,61,62]. On the basis on the β -carotene evaluation, the highest antioxidant potential was observed for the hydrolysate derived from *Squaliolus laticauda* (20.86 mg BHT Eq mL⁻¹) which displayed a high degree of hydrolysis (15.8%).

Ktari et al. [34] carried out research on the *Salaria basilica* protein hydrolysates obtained by subjecting fish material this to hydrolysis using crude alkaline protease extracts from the same species, sardinella, and smooth hound. The study revealed that rats fed with a hypercholesterolemic diet and treated with the obtained hydrolysate were protected against oxidative stress caused by their high-cholesterol diet. A dose of 400 mg of the protein hydrolysate per kg of body weight administrated for eight weeks was shown to restore the levels of enzymatic as well as non-enzymatic components of the antioxidant barrier. All three *Salaria basilica* hydrolysates were reported to trigger a decrease in the activity of superoxide dismutase (SOD) (by between 30 and 45 U/mg protein), glutathione peroxidase (GSH-Px) (between 0.0025 and 0.0035 μ mol GSH mg protein/min), and catalase (between 3 and 4 μ mol H₂O₂/mg protein/min) relative to the same parameters examined in the hearts of hypercholesterolemic rats (approx. 58 U/mg protein, 0.0044 μ mol GSH mg protein/min and 7.5 μ mol H₂O₂/mg protein/min, respectively). In turn, the level of glutathione (GSH) was observed to increase in the heart of rats treated with the three obtained hydrolysates (by between 450 and 650 μ g/g tissue) as compared to rats fed with a high-cholesterol diet (approx. 260 μ g/g tissue). A similar effect of the same *Salaria basilica* hydrolysates was reported in the liver of rats with alloxan-induced diabetes [35]. These findings make the *Salaria basilica* protein hydrolysates promising antioxidants potentially beneficial in cases of diabetes and cardiovascular diseases caused by high-cholesterol levels.

Jiang et al. [1] described the preparation and antioxidant potency of five protein hydrolysates derived from *Dacrydium nanaoides*. All of the obtained hydrolysates were subjected to scavenging activity (DPPH, O₂⁻) and reducing power assays by way of redox-linked colorimetric reactions and electron-transfer evaluations, respectively. It was reported that the DPPH scavenging effect screen revealed an increase whose extent depended on the enzyme used: neutral (32.33%) < pepsin (32.63%) < alcalase (39.36%) < trypsin (39.37%) < papain (40.21%), whereas the scavenging capacity evaluated with the O₂⁻ method increased as follows: pepsin (7.57%) < trypsin (18.85%) < papain (20.78%) < alcalase (23.06%) < neutral (25.25%). Moreover, all five hydrolysates were reported to have reduced power (0.33, 0.309, 0.260, 0.234 and 0.229, respectively for the trypsin, alcalase, papain, neutral and pepsin hydrolysates). Given that alcalase was identified as an enzyme capable of generating bioactive peptides from natural protein hydrolysates [63] and based on the above-mentioned

results, the researchers selected alcalase hydrolysate for further studies. After ultrafiltration, the fraction of alcalase hydrolysate with the molecular weight of under 5 kDa demonstrated the highest antioxidative activity (50.54 and 28.11% for the DPPH and O_2 -radical assays, respectively, 0.343 for reducing power estimation). Next, it was purified by way of gel filtration chromatography. Of the four obtained fractions, the one with the molecular weight ranging from 0.3 to 1.2 kDa showed the potential for the strongest activity and as such, it was further purified by way of two-fold reverse-phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC). Eventually, matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF MS) allowed the identification of the purified peptides as His-Asp-His-Pro-Val-Cys (706.8 Da) and His-Glu-Lys-Val-Cys (614.7 Da), whose DPPH (0.0310%, 0.0677%; respectively) and O_2 -radical scavenging activity (0.3817%, 0.3744%; respectively) made them promising antioxidative components in functional foods.

Tejpal et al. [36] studied protein hydrolysates formed from *Oreochromis niloticus* by-products stored on ice for 0, 24 and 48 h. Antioxidant properties of these hydrolysates were tested in terms of DPPH free-radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and linoleic acid peroxidation inhibition activity (LAPI). It was demonstrated that pepsin hydrolysate obtained from the fresh waste sample was capable of stronger scavenging activity at the concentrations of 1 mg/mL (45.89%), 1.5 mg/mL (52.36%), 2 mg/mL (64.79%), and 2.5 mg/mL (73.62%), as well as higher ferric reducing antioxidant power at the concentrations of 20 mg/mL (0.7), 30 mg/mL (0.82), and 50 mg/mL (1.30), as compared to hydrolysates prepared from the ice storage waste. These findings are thought to result from differences in the sequence of peptides obtained from the fresh and the ice-stored by-products. The cited authors found that hydrolysis of the fresh fish waste released peptides that were bigger and contained more His, Arg, Tyr and Phe compared to those generated from hydrolysis of the ice stored fish waste. The presence of the above-mentioned amino acids was associated with stronger radical scavenging activity [64]. In addition, the hydrolysate produced from fresh *Oreochromis niloticus* by-products induced a higher lipid peroxidation inhibitory effect (55.49%) than the hydrolysate obtained after 24 (43.57%) and 48 (43.65%) hours of ice storage. These findings coincide with the report by Elavarasan et al. [65] who noted that protein hydrolysates can act as antioxidants towards lipid peroxidation. Furthermore, Roslan et al. [13] reported that alcalase hydrolysates prepared from *Oreochromis niloticus* possess the ability to inhibit the angiotensin I-converting enzyme (ACE) at 88.26%, which is of particular significance in regulating blood pressure.

Vieira et al. [24] investigated protein hydrolysates produced from *Sardinia pilchardus* treated with brewer's spent yeast proteases (Bsy), alcalase and neutrase. The DPPH radical-scavenging assay and ferric ion reducing antioxidant power (FRAP) assay were used to evaluate the antioxidant potency of the newly obtained hydrolysates. The results were presented as micromole of Trolox per mL of hydrolysate ($\mu\text{M TE mL}^{-1}$). The angiotensin I-converting enzyme inhibitory (ACE-I) activity was also analyzed. The researchers demonstrated that the muscle hydrolysate prepared with neutrase and alcalase has over twice the radical-scavenging capacity (780, 870 $\mu\text{M TE mL}^{-1}$, respectively) compared to the one produced using brewer's spent yeast proteases (360 $\mu\text{M TE mL}^{-1}$). Likewise, the ferric ion reducing antioxidant power was two times higher for muscle neutrase and alcalase hydrolysates (162, 160 $\mu\text{M TE mL}^{-1}$, respectively) as compared to the muscle hydrolysate obtained with brewer's spent yeast proteases (80 $\mu\text{M TE mL}^{-1}$). It was also shown that the alcalase hydrolysate produced from the viscera of *Sardinia pilchardus* showed the highest antioxidant activity screened using both the DPPH (840 $\mu\text{M TE mL}^{-1}$) and FRAP (190 $\mu\text{M TE mL}^{-1}$) methods, whereas the viscera neutrase hydrolysate revealed the lowest antioxidant potential (660 and 110 $\mu\text{M TE mL}^{-1}$ for DPPH and FRAP assay, respectively). In turn, the strongest ACE-I activity was recognized for muscle and viscera hydrolysates prepared with brewer's spent yeast proteases (984 and 828 $\mu\text{g protein mL}^{-1}$, respectively).

Taberi et al. [66] prepared bioactive peptides—antioxidant and ACE inhibitors, from mixed Kawakawa (*Euthyone affinis*) muscle using pepsin extracted from skipjack tuna. The thus obtained hydrolysates were firstly divided into four fractions depending on the molecular weight, and then assessed using DPPH scavenging chelating metal ion assay (Fe^{2+}), reducing power assay, and linoleic acid model system. It was concluded that the investigated fraction samples were good antioxidants whose radical scavenging was enhanced with increasing concentration of peptides in the test sample. The hydrolysates reached almost 100% of DPPH scavenging activity, a result comparable to a commercial BHT antioxidant. As for the other mentioned methods, the results were also promising: the percentage of metal chelating activity almost reached the value of EDTA. Peptide fractions revealed the lowest reductant power for the peptide fraction with the highest molecular weight, and no significant difference was observed for fractions, with ascorbic acid used as positive control. The results in terms of inhibition of the linoleic auto-oxidation showed that the fractions with lower molecular weight were the most potent and effective inhibitors, almost as good as vitamin E. An interesting proposal entailing food preservation with the use of antioxidant and antimicrobial peptides obtained from the Argentine croaker was presented in Romani et al. [67]. The authors studied the potential use of peptides bonded onto polyethylene film surfaces as actively antioxidant packaging materials. Peptides were obtained via enzymatic hydrolysis with alcalase as the proteolytic enzyme at the enzyme/protein ratio of 30 U/g. It was reported that clean native polyethylene film did not show any significant radical scavenging ability, whereas the polyethylene surface enriched with peptides reached 1 nmol Trolox/cm² of free radical scavenging capacity. Currently, work is underway to increase the quantity of peptides bound to the surface as well as to test the ability to preserve food containing compounds contributing to food spoilage, including lipids, lycopene, and ascorbic acid.

Yaghoubzadeh et al. [68] studied the bioactivity of protein hydrolysates obtained from the skin of rainbow trout. The antioxidant properties of hydrolysates were evaluated by measuring the DPPH radical inhibitory power as well as the ferric reducing antioxidant ability. The cited article described two hydrolysis reactions preceded by deactivation of the internal enzymes present in the fish. The first reaction involved the addition of 1% of alcalase against the protein content, the second was performed using flavourzyme enzyme with the addition of 1% protein content. The increasing trend in terms of DPPH radical inhibition was strongly correlated with increasing concentrations of the tested hydrolysate samples in for reactions involving the addition of alcalase and flavourzyme. Furthermore, a slightly higher percentage of DPPH free radical scavenging was obtained in the case of the flavourzyme hydrolyzed product—at the concentration of 800 ppm it reached almost 50%. The trend in terms of reducing power was similar: the higher the concentration of hydrolysate, the greater the reducing power. The highest reducing power was also observed for the flavourzyme enzyme.

2.3. Antioxidant Potency of Protein Hydrolysates Prepared from Insects

Zielinska et al. [44] extensively examined protein hydrolysates obtained from heat-treated edible insects: *Gryllobates sigillatus*, *Tenebrio molitor* and *Schistocerca gregaria*. For each of the species, the samples were divided into four groups: boiled (in boiling water for 10 min at 100 °C), baked (in a heated oven at 150 °C for 10 min), raw, and proteins derived from raw insects. All of the samples were digested with gastrointestinal enzymes: α -amylase, pepsin, pancreatin, and a bile extract solution. Next, the obtained hydrolysates were subjected to dialysis (using a membrane tube with molecular weight cut-off of 3.5 kDa) and an absorption process. DPPH and ABTS radical scavenging activity as well as ion chelating potency and reducing power were measured to estimate the antioxidant capacity of the respective hydrolysates. In addition, anti-inflammatory potency was analyzed in terms of lipoxygenase and cyclooxygenase-2 inhibitory potential. The results of these assays (with the exception of reducing power) were expressed as IC₅₀ values, that is the peptide concentration required for 50% inhibition. It was found that the hydrolysate ob-

tained from raw *T. molitor* was capable of producing the strongest ABTS antiradical activity ($IC_{50} = 5.3 \mu\text{g/mL}$) whereas the ones derived from baked *G. sigillatus* and the proteins from *S. gregaria* showed the highest DPPH radical scavenging potency ($IC_{50} = 28.5 \mu\text{g/mL}$, in both cases) before the absorption process. In turn, after the absorption, the hydrolysate generated from the baked *G. sigillatus* was identified as the most potent in the ABTS ($IC_{50} = 10.7 \mu\text{g/mL}$) and DPPH ($IC_{50} = 10.9 \mu\text{g/mL}$) assays. On the other hand, the lowest values of ABTS and DPPH scavenging activity before the absorption were observed for the hydrolysates of boil and raw *T. molitor* ($IC_{50} = 28.9$ and $109.4 \mu\text{g/mL}$, respectively), whereas after the absorption process the lowest ABTS and DPPH evaluation values were noted for the hydrolysates formed from the protein of *T. molitor* ($IC_{50} = 24.31 \mu\text{g/mL}$) and *S. gregaria* ($IC_{50} = 88.81 \mu\text{g/mL}$). In terms of the Fe^{2+} chelating capacity, the hydrolysate prepared from the protein of *G. sigillatus* was shown to be the most active ($IC_{50} = 16.18 \mu\text{g/mL}$) before the absorption, while the one generated from boiled *S. gregaria* exhibited the strongest metal chelating potency ($IC_{50} = 5.57 \mu\text{g/mL}$) after the absorption process. Furthermore, the hydrolysates derived from raw and baked *G. sigillatus* were reported as having the highest reducing power before (0.771) and after (0.286) absorption, respectively. The anti-inflammatory potential tests revealed that the hydrolysate obtained from the protein of *S. gregaria* was the most potent in inhibiting the activity of lipoxygenase (LOX) both before ($IC_{50} = 0.65 \mu\text{g/mL}$) and after ($IC_{50} = 3.13 \mu\text{g/mL}$) the process of absorption. Moreover, the hydrolysates from raw material and protein of *S. gregaria* showed the strongest inhibitory effect against cyclooxygenase (COX) before ($IC_{50} = 10.91 \mu\text{g/mL}$) and after ($IC_{50} = 5.05 \mu\text{g/mL}$) absorption, respectively.

Sousa et al. [69] studied protein hydrolysates obtained from edible lesser mealworms (*A. diaperinus*) and their potential antioxidant activity. The tested peptide samples were obtained by hydrolyzing with alcalase 2.5 L and corolase PP. In each case, the enzyme to substrate ratios were 0.5, 1.5 and 3.0% (p/n). DPPH and ORAC radical scavenging activity assays were employed to estimate the antioxidant capacity for the best peptide samples. The authors identified peptide mixture obtained through the longest hydrolysis process and with the highest E/S ratio as the most suitable antioxidant. It was strongly connected with increasing the degree of hydrolysis. In this case, the Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) was $5.8 \mu\text{mol TE/mL}$ for alcalase and $6.6 \mu\text{mol TE/mL}$ for corolase PP. The authors also considered ORAC values. Here, the results for the 1.5 and 3.0% E/S alcalase 2.5 L products were not significantly different. The results presented for corolase PP indicated the conditions of 3.0% (E/S) and 6 h-long reactions as the most suitable for obtaining the highest TEAC value ($12.3 \mu\text{mol TE/mL}$).

The biological potency of protein hydrolysate obtained from silkworm pupae was examined by Zhang et al. [70]. The hydrolysate was obtained from a 3-h reaction with the addition of 3% neutral protease and purified through ultrafiltration using a membrane with the molecular mass cut off sizes of 5 and 3 kDa. The lyophilized fractions were tested to determine the ABTS radical scavenging activity. During the studies, the authors identified and characterized two novel antioxidant peptides with the following sequences: FKGPACA and SVLGTGC. The peptides possessed high radical scavenging potential comparable with the results reported for such antioxidants as GSH and Trolox. The antioxidant effects can be due to the peptides' short amino acid sequences. To determine the exact antioxidant fragments in their chains, the authors divided the peptides into shorter sections: FKGPACA into FKGP and ACA, and SVLGTGC into SVLG and TGC. They found that ACA and TGC fragments showed higher antioxidant activity than FKGP and SVLG. For this reason, the authors identified those amino acid fragments as the active centers responsible for antioxidation.

2.4. Antioxidant Capacity of Protein Hydrolysates Obtained from Domestic Fowl

Wang and Shahidi [66] investigated the antioxidative capacity of protein hydrolysates derived from turkey (*Meleagris gallopavo*) and chicken (*Gallus gallus domesticus*) meat. The researchers obtained the hydrolysates from an enzymatic hydrolysis reaction with

flavourzyme. The obtained protein hydrolysates were subjected to ABTS, DPPH, and hydroxyl radical scavenging activity estimations as well as reducing power and ferrous ion chelating capacity assays with a view to evaluating their antioxidant potency. Both investigated hydrolysates were shown to have comparable antioxidative potential. There were no significant differences in the scavenging activity evaluated in terms of ABTS (turkey: 79.13%; chicken: 78.23%), DPPH (turkey: 88.33%; chicken: 86.52%), and hydroxyl radicals (turkey: 42.52%; chicken: 43.11%) between the analyzed hydrolysates. Likewise, the ferrous ion chelating capacity values were similar: 15.09% for the protein hydrolysate generated from turkey and 15.42% for the one prepared from chicken. Furthermore, the turkey and chicken hydrolysates exhibited similar reducing power, (0.89) (0.8), respectively.

2.5. Antioxidant Potential of Protein Hydrolysates Produced from Zoonotic Products

In a recent study, Al-Shamsi et al. [17] reported the *in vitro* antioxidant activity of camel (*Camelus dromedarius*) milk protein hydrolysates. The hydrolysates were obtained by reacting raw milk with three proteolytic enzymes: alcalase, bromelain and papain. The antioxidant capacity was assessed in terms of ABTS and DPPH radical scavenging activity as well as ferric-reducing antioxidant power (FRAP) and ferrous iron-chelating potency. The results of the evaluations (with the exception of the chelating activity which was calculated as a percentage) were presented as micromoles of Trolox equivalents (TE) per gram of the sample (μmol of TE/g). The DPPH method showed similar activity for bromelain (about 25 μmol of TE/g), papain (about 21 μmol of TE/g) and alcalase (about 19 μmol of TE/g) hydrolysates. In turn, the ABTS scavenging capacity of the hydrolysate produced with papain was two times higher (about 48 μmol of TE/g) than in the case of bromelain (about 20 μmol of TE/g), whereas the alcalase-produced hydrolysate showed moderate activity (about 34 μmol of TE/g). The reducing power of all three hydrolysates ranged between 30 and 40 μmol of TE/g. Similarly, the metal chelating activity was within the range from 30 to 40% for all studied hydrolysates. Further efforts were undertaken by Al-Shamsi et al. to investigate lipid peroxidation inhibitory potency of camel milk hydrolysates in two real food model systems i.e., grape seed oil-in-water emulsion and fish mince. The ability to prevent lipid peroxidation was studied by estimating thiobarbituric acid reactive substances assay. The hydrolysate generated with papain was found to have stronger potency in inhibiting lipid peroxidation when compared to hydrolysates prepared with alcalase and bromelain. Moreover, the study demonstrated that camel milk hydrolysates were more efficient in preventing TBARS formation at higher concentrations, rather than lower. Finally, camel milk without hydrolysis was not capable of inhibiting lipid peroxidation in the oil-in-water emulsion and fish mince systems.

Pokora et al. [50] evaluated the antioxidant capacity of protein hydrolysate and peptide fractions obtained from egg white. This hydrolysate was obtained using non-commercial serine protease from *Yarrowia lipolytica* yeast. Subsequently, it was ultra-filtered through a 3 kDa membrane and then fractionated with RP-HPLC. The hydrolysate and all of the produced fractions were evaluated in terms of antioxidant potency by analyzing their DPPH free radical scavenging activity, ferric reducing antioxidant power (FRAP), and Fe (II) ion chelation activity. The cited researchers demonstrated that the egg white hydrolysate showed strong ability to chelate Fe (II) with the value of 688.5 μg Fe²⁺/mg, high ferric reducing antioxidant capacity with the value of 35.3 μg Fe²⁺/mg, and noticeable free radical scavenging capacity with the value of 0.21 μM Trolox_{eq}/mg. Furthermore, all of the prepared peptide fractions also demonstrated antioxidative potential within the ranges of 0.02–0.16 μM Trolox_{eq}/mg, 2.09–12.48 μg Fe²⁺/mg and 21.73–206.96 μg Fe²⁺/mg for the DPPH, FRAP and Fe (II) chelating assays, respectively. Nonetheless, the antioxidative capacity of all of the peptide fractions was lower than that of the initial hydrolysate. Similar findings were reported by Li et al. [71]. The researchers observed that in some cases, purification of hydrolysates actually decreases their antioxidant activity, which is often due to an entire system of interactions between peptides and free amino acids. Additionally, Pokora et al. studied the cytokine-inducing potential of egg white protein hydrolysates and

peptide fractions. The cytokine-inducing activity was examined under an *ex vivo* stimulation of human whole blood cell cultures containing lipopolysaccharide from *E. coli* and the tested hydrolysates. The results revealed that the egg white protein hydrolysate dosed at 100 µg/ml, could stimulate the blood cells to release anti-inflammatory IL-10 in amounts comparable to those reported for lipopolysaccharide. At the same time, it was observed that the level of pro-inflammatory IL-6 generated in response to the investigated hydrolysate was noticeably higher in comparison to the untreated cells, but almost 50% lower than reported for lipopolysaccharide. Overall, the egg white protein hydrolysate appeared to be a good stimulator of cytokine production in human whole blood cell cultures.

3. The Plants Kingdom

3.1. Methods of Obtaining Protein Hydrolysates of Plant Origin

Given the fact that diet containing a significant number of fruits and vegetables is linked to lower incidence of diseases related to oxidative stress [99], many researchers have focused their investigations on antioxidative protein hydrolysates derived from various available plants (Table 2). Figure 1 shows a diagram of the extraction, purification and identification of bioactive peptides of plant origin.

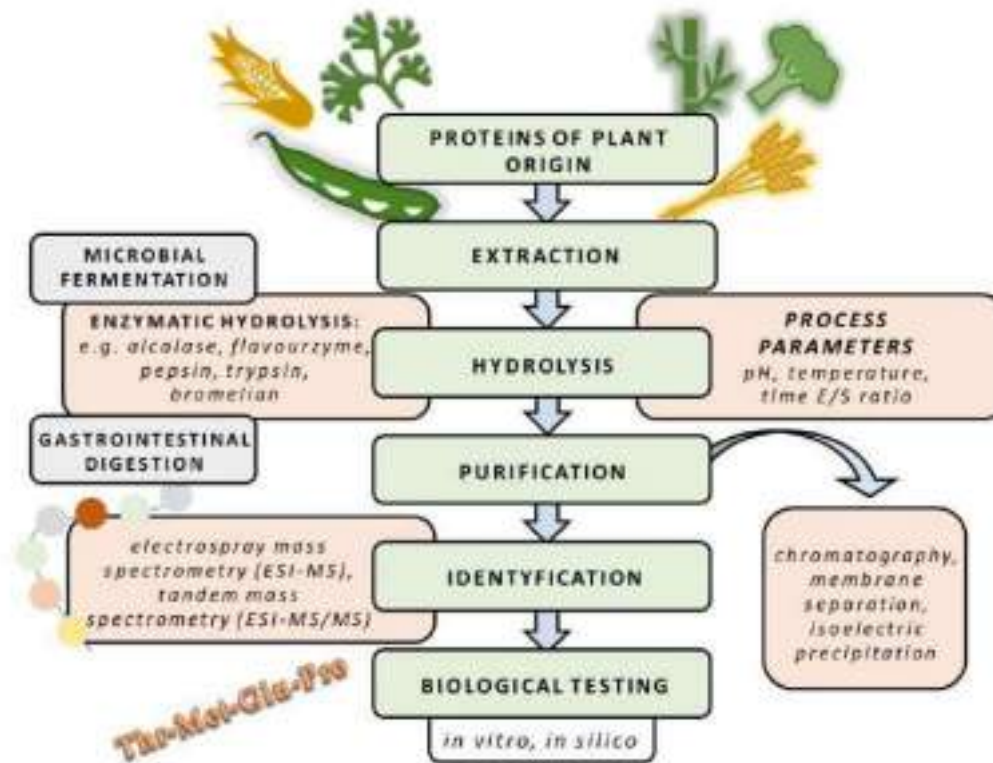


Figure 1. Diagram of bioactive peptide preparation from plant origin.

Table 2. Methods of obtaining protein hydrolysates of plant origin.

Source	Part of Source	Enzymatic Hydrolysis					Enzymatic Deactivation					Dehydration	MW of PH/Peptides Sequence	Antioxidant Activity PH/Peptide	References
		Type of Enzyme	E/S Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	DH (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH	Reagent				
<i>Tetradlea obtusifolia</i>	whole	alkalase	1:10	8	60	4	-	-	-	2	TFA	lyophilization	WPRGYPH, GPRG/KPLG/PE WYGPDS/KFL, SOWDRF	EC ₅₀ = 4.70 EC ₅₀ = 13.97 EC ₅₀ = 0.82 EC ₅₀ = 5.73	Momrose et al., 2018
<i>Palmaria palmata</i>	whole	Cunilase® pp	1:100	7	50	4	-	90	20	-	-	lyophilization	SEMTRVGGQM	ORAC: 132.43 [TE/μmol] FRAP: 21.23 [TE/μmol]	Hamedy et al., 2017
<i>Fucus spiralis</i>	whole	cellulase then bromelain	1:100	4.5 then 7	50 then 37	20	-	100	10	-	-	lyophilization	MW F1: <1 kDa F2: 1–3 kDa F3: >3 kDa	FRAP: F1: 86.03 F2: 32.73 F3: 80.50	Paiva et al., 2017
<i>Spirulina sp.</i>	whole	pepsin then trypsin and α-chymotrypsin	1:100	2.2 then 6.3	37	2 then 2.5	-	100	10	-	-	lyophilization	TMEFGK ⁷	EC ₅₀ 0.1 mg/ml	Hoo et al., 2017
<i>Schizochytrium sp.</i>	whole	alkalase then flavoenzyme	10:100 then 12.5:100	9 then 6.7	50	6 then 8	8.37 then 21.48	100	10	-	-	lyophilization	MW <1 kDa >5 kDa	DPPH IC ₅₀ 550 μg/ml ADTS IC ₅₀ 17.5 μg/ml, for MW <1 kDa	Cai et al., 2017
<i>Agaricus bisporus</i>	fruiting bodies	alkalase	2.5:100	9	50	4	about 18	100	15	-	-	lyophilization	MW <1 kDa 1–3 kDa 3–5 kDa 5–10 kDa	DPPH (MW < 1, 1–3, 3–5, 5–10 kDa) about EC ₅₀ 0.64; 0.52, 0.64, 0.61	Kimoto et al., 2017
	fruiting bodies	pancreatin	2.5:100	7.5	37	4	about 12.5	100	15	-	-	lyophilization,	MW <1 kDa 1–3 kDa 3–5 kDa 5–10 kDa	DPPH (MW < 1, 1–3, 3–5, 5–10 kDa) about EC ₅₀ 0.64; 0.13, 0.64, 0.21)	

Table 2. Cont.

Source	Part of Source	Type of Enzyme	Enzymatic Hydrolysis					Enzymatic Deactivation					Dehydration	MW of PIV Peptides Sequence	Antioxidant Activity PIV/Peptide	References
			E/S Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	DH (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH	Reagent					
	fruiting bodies	ferrousulphate	2.5:100	7	50	4	about 3	100	15	-	-	lyophilization	MW <1 kDa 1–3 kDa 3–5 kDa 5–10 kDa	DPPH (MW <1; 1–3; 3–5; 5–10 kDa) about IC ₅₀ 0.64 0.25; 0.64; 0.30		
	fruiting bodies	alkaline-pancreatin	2.5:100	9.0 then 7.5	50 then 37	2 then 2	about 18.5	100	15	-	-	lyophilization	MW <1 kDa 1–3 kDa 3–5 kDa 5–10 kDa	DPPH (MW <1; 1–3; 3–5; 5–10 kDa) about IC ₅₀ 0.64 0.42; 0.64; 0.24		
	fruiting bodies	alkaline-ferrousulphate	2.5:100	9.0 then 7.0	50 then 37	2 then 2	about 16	100	15	-	-	lyophilization	MW <1 kDa 1–3 kDa 3–5 kDa 5–10 kDa	DPPH (MW <1; 1–3; 3–5; 5–10 kDa) about IC ₅₀ 0.64 0.38; 0.64; 0.15		
Zingiberaceae	rhizome	pepsin then pancreatin	1:20	2.5 then 7.5	37	3 then 3	-	80	20	-	-	lyophilization	MW 12.4–12.8 kDa	IC ₅₀ 41.78 µg/mL	Indrawan et al., 2016	
Cucurbitaceae	seed	trypsin	1:50	7.5	37	4	-	heated in water bath	20	-	-	lyophilization	n.d.	DPPH: IC ₅₀ 49.3 µg/mL ABTS: IC ₅₀ 142.3 µg/mL		
Citrusaceae	seed	trypsin	1:50	7.5	37	4	-	heated in water bath	20	-	-	lyophilization	n.d.	DPPH: IC ₅₀ 80.3 µg/mL ABTS: IC ₅₀ 179 µg/mL	Dash et al., 2017	
Leguminosae	seed	trypsin	1:50	7.5	37	4	-	heated in water bath	20	-	-	lyophilization	n.d.	DPPH: IC ₅₀ 46 µg/mL ABTS: IC ₅₀ 108 µg/mL		
Cucurbitaceae	seed	pepsin	1:100	2.2	37	5	19.38	95–100	15	-	-	lyophilization	n.d.	IC ₅₀ 2.41 µg/mL	Aribe et al., 2016 [72]	
	seed	trypsin	1:100	8	37	5	26.26	95–100	15	-	-	lyophilization	n.d.	IC ₅₀ 2.82 µg/mL		
	seed	alkalase	1:100	8	60	5	13.16	95–100	15	-	-	lyophilization	n.d.	IC ₅₀ 3.20 µg/mL		

Table 2. Cont.

Source	Part of Source	Type of Enzyme	Enzymatic Hydrolysis					Enzymatic Deactivation					Dehydration	MW of PIV Peptides Sequence	Antioxidant Activity PIV/Peptide	References
			E/S Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	DH (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH	Reagent					
<i>Ziziphus maurandia</i>	seed	neutrase	1:10	7	55	2	-	100	10	-	-	lyophilization	MW <1 kDa 1–3 kDa 3–10 kDa ≥10 kDa	TACC 0.89 U/mg (at 800 mg/kg)	Zhu et al., 2017 [71]	
<i>Mungfabu</i>	defatted mung-bean meal	bruselain	5, 10, 15, 20,100	6	50	6, 12, 18, 24	50.4	95	15	-	-	evaporation	MW <10 kDa	DPPH and ABTS 80, 90%	Sankin et al., 2018	
<i>Vigna radiata</i>	seed	alkalase	20×10^4 U _g ⁻¹	9.5	60	2.5	61.5	100	10	-	-	lyophilization	n.d.	DPPH and ABTS K ₅₀ = 0.77 and 0.79 µg/mL ₅₀	Gupta et al., 2018	
	seed	trypsin	25×10^4 U _g ⁻¹	8	37	3.5	46.4	100	10	-	-	lyophilization	n.d.	K ₅₀ about 1.5 µg/mL		
<i>Phaseolus vulgaris</i>	pod	pepsin	1:20	2	37	2	-	100	5	-	-	lyophilization	n. d.	DPPH and ABTS 46.12% 92.32%—hydrolysates obtained from heat treated beans	Korai et al., 2014	
<i>Phaseolus vulgaris</i>	seed	alkalase	1:20	2	50	7	11.5	90	10	-	-	lyophilization	n. d.	higher ABTS scavenging activity for alkalase treated protein	Evangelho et al., 2017 [74]	
	seed	pepsin	1:20	2	37	2	27.09	90	10	-	-	lyophilization	n. d.			
<i>Vigna subterranea</i>	seed	alkalase	4:100	7	55	24	38	95	5	-	-	lyophilization	hydrolysates produced using trypsin contained higher large-size peptides (>3.5 kDa) compared to the other hydrolysates	DPPH 0.761 µg trolox eq./mg	Munir et al., 2018	
	seed	trypsin	1:100	7	55	24	22	95	5	-	-	lyophilization		DPPH 5.72 µg trolox eq./mg		
	seed	thermolysin	1:100	8	70	24	27.5	95	5	-	-	lyophilization		DPPH 1.325 µg trolox eq./mg		
<i>Glycine max</i>	defatted soy flour	peptidases from latex of <i>Melaleuca pomifera</i> fruits	1:10	8.0	45	3	36.2	100	7	-	-	-	Theoretical sequences of peptides (DLLEHLSVYDNEGALIE) (LPAAYPPVYNATINLNLALAI) RRQDIFRNQICLPIVMIQRINRQ (YNLQSGDMLIIVYACDFIYYIV)	K ₅₀ 31.6 µg/mL ₅₀ ABTS 157.6 µg trolox eq./mg ORAC 176.9 µm TE/g	Jana et al., 2018 [73]	

Table 2. Cont.

Source	Part of Source	Type of Enzyme	Enzymatic Hydrolysis				Enzymatic Deactivation				Dehydration	MW of PIV Peptides Sequence	Antioxidant Activity PIV/Peptide	References	
			E/S Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	Yield (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH					Reagent
Glycine max	defatted soy flakes	Coniase PP	3:100	7.5	50	3	about 26 for 80 MPa, about 27 for 100 MPa, about 28 for 120 MPa, about 29 for 200 MPa, about 31 for 300 MPa	100	10	-	-	lyophilization	MW < 3 kDa	ABTS: 30.6%	Guan et al., 2018
Vandaine substance	seed	alkalase	1:100	8	50	4	-	90	15	4	2M HCl	lyophilization	n.d.	EC ₅₀ about 25 µg/mL	Ariue et al., 2017 [76]
	seed	pepsin	1:100	2	37	4	-	90	15	4	2M NaOH	lyophilization		EC ₅₀ about 22 µg/mL	
	seed	trypsin	1:100	8	37	4	-	90	15	4	2M HCl	lyophilization		EC ₅₀ 27 µg/mL	
Prementum	corn gluten meal	alkalase	9.13:100	8.6	50	2.5	-	100	10	-	-	lyophilization	AGIPM, AGLPM, HALGA, and HAEGA H1: MW < 1 kDa H2: 10 kDa < MW < 30 kDa	DPPH H1: 66.89% H2: 71.49%	Jiang et al., 2018
Rice (arborio)	defatted rice bran	pepsin then trypsin	1:100	1.5 then 7	37	2 then 2	-	95	10	-	-	lyophilization	F1: MW < 5 kDa, F2: MW 5–5 kDa, and F3: MW 5–10 kDa	F1/F2/F3 DPPH 66.25/58.57; 43.98 µmol Trolox equivalent/g ABTS 425.81; 430.12–403.28 µmol Trolox equivalent/g	Thongthai et al., 2018

Table 2. Cont.

Source	Part of Source	Type of Enzyme	Enzymatic Hydrolysis				Enzymatic Deactivation				Dehydration	MW of PIV Peptides Sequence	Antioxidant Activity PIV/Peptide	References	
			E/S Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	DH (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH					Reagent
<i>Ferula glauca</i>	seed	trypsin	1:100	6.5	37	3	-	80	20	-	-	lyophilization	SQRDLGGNNQYLK	DPPH 6.66%, ABTS 78.81%, Fe ²⁺ chelating ability 54.20%	Agrawal et al., 2016 [77]
<i>Anacardium occidentale</i>	seed	indigenous aspartic protease	-	2	40	16	5.3	85	10	-	-	lyophilization	n.d.	hydrolyzate ORAC IC ₅₀ 0.058 ABTS IC ₅₀ 2.1 mg/mL	Sabbione et al., 2016 [78]
	seed	pepsin	1:50	2	37	16	19.7	95	10	-	-	-	-	n.d.	Aldho et al., 2017
	seed	trypsin	1:50	8	37	16	46.6	95	10	-	-	-	-	n.d.	
seed	pancreatin	1:50	8	37	16	47.5	95	10	-	-	-	-	n.d.		
<i>Cassia acida</i>	seed	pepsin then the mixture of trypsin and pancreatin	1:20 then 1:25	2 then 8.5	37	2 then 4	34	95	10	-	-	-	Pepsin hydrolysis—high number of peptides (1000–1500; 2000–2500 Da)	n.d.	Aldho et al., 2017
	stem	papain	1:100	6.5	37	2	-	100	0.1	-	-	lyophilization	VLYSTPVKMDWEVGR; VETVVATAQSETMR; HRCININSR	SRCA 64.19% at 0.0125 mg/mL	
<i>Tinospora cordifolia</i>	stem	pepsin	13:33	2.2	37	2	-	-	-	8	Na ₂ CO ₃	lyophilization	n.d.	DPPH about 52%—for trypsin hydrolysate	Pachaiappan et al., 2018
	stem	trypsin and α-chymotrypsin	1:5	7.8 then 8	37	2	-	100	0.1	-	-	lyophilization	n.d.	DPPH 79.04%—for trypsin hydrolysate after 30 min digestion	
<i>Abrus caryofyllus</i>	seed	trypsin	1:3	7.8	37	2.5 and 5	-	80	10	-	-	lyophilization	Peptide fraction > 10 kDa	ABTS 24.74; 32.81%	Gera et al., 2017
	seed	chymotrypsin	1:5	7.8	37	2.5 and 5	-	80	10	-	-	lyophilization	Peptide fraction > 10 kDa	ABTS 28.32; 37.67%	
	seed	pepsin-trypsin	1:3	2 then 7.8	37	2.5 and 5	-	80	10	-	-	lyophilization	Peptide fraction > 10 kDa	ABTS 29.15; 29.30%	

Table 2. Cont.

Source	Part of Source	Type of Enzyme	Enzymatic Hydrolysis					Enzymatic Deactivation				Dehydration	MW of PH/Peptides Sequence	Antioxidant Activity PH/Peptide	References
			E/S Ratio	pH	Temp (°C)	Time (h)	Yield (%)	Temp (°C)	Time (min)	pH	Reagent				
<i>Linum catharticum</i>	seed	pepsin	2.5:100	2	37	42.41	39.82	100	10	-	-	air-drying	n.d.	DPPH 32.94% ABTS 88.18%	Sotawane et al., 2017
<i>Juglans regia</i> L.	defatted walnut meal	pancreatin and viscozyme L.	0.8:100	7	55	16	6.6	95	15	-	-	lyophilization	n.d.	ORAC 1752.88 µmol TE/g ABTS 257.94 µmol TE/g at 0.4 mg/ml.	Li et al., 2017

n. d., not determined; PH, protein hydrolysates; SRCA, superoxide radical scavenging activity; TAOC, total antioxidant capacity; G, Glycine; P, Proline; A, Alanine; V, Valine; L, Leucine; I, Isoleucine; M, Methionine; C, Cysteine; F, Phenylalanine; Y, Tyrosine; W, Tryptophan; H, Histidine; K—R, Arginine; Q, Glutamine; N, Asparagine; E, Glutamic Acid; D, Aspartic Acid; S, Serine; T, Threonine.

3.2. Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates Derived from Marine Plants

Paiva et al. [45] described the preparation and results of the antioxidant studies on peptide fractions derived from the *Fucus spiralis* protein hydrolysate. After a two-step hydrolysis, first with cellulase then with bromelain, the obtained hydrolysate was subjected to ultrafiltration using three different membranes with the molecular weight cut-off of 1 and 3 kDa. This allowed the cited authors to prepare peptide fractions with different molecular weight ranges: Fr1 (<1 kDa), Fr2 (1 kDa ≤ Fr2 < 3 kDa), and Fr3 (≥3 kDa). The antioxidant activity of the above-mentioned fractions was tested using three assays: DPPH free radical scavenging activity (FRSA), ferrous ion-chelating (FIC), and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The highest scavenging capacity in terms of DPPH free radicals was observed for Fr1 (86.03%) followed closely by Fr3 (80.50%), while the lowest result was obtained for Fr2 (32.73%). It is noteworthy that Fr1 showed radical scavenging potency comparable to that of synthetic antioxidant BHT (about 95%). In terms of FIC, Fr3 showed the strongest chelating capacity (47.33%), followed by Fr1 (40.28%) and Fr2 (28.47%). Similarly, Fr3 was found to exhibit the highest FRAP (0.538) when compared to Fr1 (0.334) and Fr2 (0.185). Moreover, Fr3 was shown to possess a remarkable ACE-inhibitory activity (86.80%).

Harnesly et al. [47] investigated protein hydrolysate produced from *Palmaria palmate* by way of digestion with food-grade Corolase[®] PP enzyme.

The antioxidant activity of the newly obtained hydrolysate was screened in terms of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The results of the above assays were presented as micromole of Trolox equivalents per gram dry weight (μmol TE/g dw). The authors found that the protein hydrolysate derived from *Palmaria palmate* showed antioxidant potency in both the ORAC (483.69 μmol TE/g dw) and the FRAP (25.29 μmol TE/g dw) evaluations. The studied hydrolysate was subsequently fractionated, after which the researchers identified, synthesized and examined the obtained peptides. One of the same, the peptide with the sequence: Ser-Asp-Ile-Thr-Arg-Pro-Gly-Gly-Asn-Met was observed to show the highest antioxidant activity (152.43 and 21.23 nmol TE/μmol peptide for ORAC and FRAP assays, respectively).

The biological potency of protein hydrolysate prepared from *Schizochytrium* sp. was investigated by Cai et al. [10]. This hydrolysate was obtained in a two-step hydrolysis, first with alcalase then with flavourzyme. Subsequently, it was divided into two fractions using a 3 kDa membrane. The antioxidant activity of *Schizochytrium* sp. protein hydrolysate was tested by conducting ABTS and DPPH radical scavenging examinations as well as reducing power evaluation. The researchers identified the fraction of hydrolysate characterized by molecular weight of under 3 kDa as possessing strong ABTS and DPPH scavenging capacity (IC₅₀ = 17.5 and 350 μg/mL, respectively). Likewise, at the concentration of 1 mg/mL, higher reducing power was observed for the fraction containing peptides with molecular weight below 3 kDa, as compared to the fraction including peptides with molecular weight above 3 kDa (0.54 and 0.33 respectively). Furthermore, the antioxidant potential of the fraction with molecular weight below 3 kDa was examined *in vivo* in mice with acute alcohol-induced liver injury. The study demonstrated that mice treated with the *Schizochytrium* sp. protein hydrolysate dosed at 100 and 300 mg per kg of body weight for 24 consecutive were able to restore the activity of hepatic catalase (CAT), SOD and GSH-Px as well as the level of glutathione (GSH). In addition, the fraction containing *Schizochytrium* sp. peptides with molecular weight below 3 kDa was shown to induce a decrease in the activity of serum alanine aminotransferase (ALT) (by 36.9% and 41.4%, respectively, for the doses of 100 and 300 mg kg⁻¹ b.w.), aspartate aminotransferase (AST) (by 23.8% and 25.8%, respectively, at 100 and 300 mg kg⁻¹ b.w.), and the level of hepatic malondialdehyde MDA (by 27.0% and 38.7%, respectively, at 100 and 300 mg kg⁻¹ b.w.) in comparison to group receiving only alcohol. The above findings evidence that *Schizochytrium* sp. protein hydrolysate is a promising antioxidant in the context of alcohol-induced liver diseases.

3.3. Antioxidant Capacity of Protein Hydrolysates Obtained from Cucurbitaceae

Dash and Ghosh [79] studied protein hydrolysates obtained from Cucurbitaceae seeds. The antioxidant potency of trypsin hydrolysates of *Cucurbit moschata*, *Citrullus lanatus* and *Lagenaria siceraria* was tested using DPPH, ABTS, hydrogen peroxide, and nitric oxide evaluations, as well as lipid peroxidation inhibition estimation assays. The results in terms of scavenging activity were presented as the IC_{50} value, that is, the concentration of sample required to scavenge 50% of free radicals. The cited authors found that the hydrolysates prepared from *L. siceraria* and *C. moschata* demonstrated radical-scavenging capacity over two times stronger (46 and 49.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) than that observed for *C. lanatus* (80.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in the DPPH method. The ABTS assay has also revealed the highest radical scavenging for the *L. siceraria* hydrolysate (108 $\mu\text{g}/\text{mL}$), followed by the hydrolysate *C. moschata* (142.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), and from *C. lanatus* (179 $\mu\text{g}/\text{mL}$). It was reported that the nitric oxide scavenging potency of the examined hydrolysates increased in the following order: *C. lanatus* (102 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < *C. moschata* (59.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < *L. siceraria* (32.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Similarly, the inhibition of hydrogen peroxide radicals by the studied hydrolysates increased in the following sequence: *C. lanatus* (243.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < *C. moschata* (153.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) < *L. siceraria* (141.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Moreover, the hydrolysate formed from *Lagenaria siceraria* was identified as capable of lipid peroxidation inhibitory activity that was two times higher (20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) than observed for *Cucurbit moschata* (43.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and *Citrullus lanatus* (49.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

3.4. Antioxidant Potential of Protein Hydrolysates Produced from *Vigna radiata*

Gupta et al. [20] investigated the biological properties of mungbean (*Vigna radiata*) vicilin protein hydrolysate. The antioxidant potency of alcalase and trypsin-generated mungbean vicilin protein hydrolysates was screened in terms of DPPH and ABTS radical scavenging potential, as well as ferric-reducing antioxidant power, and ferrous ion chelating potency. Furthermore, the antiproliferative effects on human breast cancer cells and ACE inhibitory activity of the hydrolysates were also examined. The research indicated that alcalase mungbean vicilin protein hydrolysate showed stronger DPPH and ABTS scavenging capacity (IC_{50} = 0.77 and 0.78 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectively) than its trypsin counterpart (IC_{50} about 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for both evaluations). Likewise, higher metal chelating activity was observed for the alcalase (about 70%) as compared to the trypsin (about 40%) hydrolysate. On the other hand, the ferric-reducing antioxidant power and reducing power assay results were lower for alcalase hydrolysate (about 290 $\text{mmol Fe(II)}/\text{mg}$ extract and about 0.45%, respectively) as compared to the trypsin analogue (about 340 $\text{mmol Fe(II)}/\text{mg}$ extract and about 0.55%, respectively). However, in terms of ACE inhibitory effects, the alcalase mungbean vicilin protein hydrolysate was found to be more active (IC_{50} = 0.32 mg/mL) relative to trypsin mungbean vicilin protein hydrolysate (IC_{50} = 0.54 mg/mL). The antiproliferative effects of *Vigna radiata* protein hydrolysate were investigated against two breast cancer cell lines: MCF-7 and MDA-MB-231. The mungbean seed protein hydrolysate prepared using trypsin was found to be more cytotoxic towards MCF-7 cells (IC_{50} = 0.45 mg/mL) than the mungbean seed protein hydrolysate produced using alcalase (IC_{50} = 0.73 mg/mL). In turn, the alcalase hydrolysate of mungbean vicilin was more cytotoxic against MDA-MB-231 (IC_{50} = 0.48 mg/mL) as compared to the analogue obtained with trypsin (IC_{50} = 0.54 mg/mL).

Mung bean peptides were also investigated by Xie et al. [79]. The authors subjected dehulled and ground beans to two-hour enzymatic reactions carried out using: alcalase, neutrase, papain and protamex, with the enzyme: substrate ratio of 3:100 (*w/v*). All of the reactions were ended with inactivation of the enzyme by boiling. Next, the obtained peptide solutions were centrifuged, adjusted to pH 4.2, dialyzed, and lyophilized. Before determining the antioxidation capacity, the prepared powders were subjected to DH determination. Of the four enzymes, the authors selected alcalase for further study due to its achievement of the highest degree of hydrolysis. Before the antioxidant assays, the lyophilized powder was dissolved and subjected to ultrafiltration to create three permeates with different molecular weights: MPBH-I (<3 kDa), MPBH-II (3–10 kDa), and MPBH-

III (>10 kDa). The DPPH scavenging capacity for the <3 kDa solution was the highest and almost as high as for the ascorbic acid control sample (74% radical scavenging). Moreover, in terms of the hydroxyl radical scavenging ability, MPBHs-I produced the highest value of circa 50%. Similarly, in the case of Fe^{2+} chelating activity and reducing power, this fraction returned the best results ability. However, the values were nonetheless significantly lower than for the tested ascorbic acid sample.

3.5. Antioxidant Activity of Protein Hydrolysates Generated from Zingiberaceae

Inthowanarud et al. [30] prepared and studied fifteen pepsin/pancreatin hydrolysates derived from plants of the Zingiberaceae family. All of the samples were examined in terms of their in vitro antioxidant activity using the DPPH method. The obtained results were expressed as IC_{50} value. Ascorbic acid was used for reference in the comparison of the IC_{50} values of the hydrolysates. Among the fifteen selected plant species, protein hydrolysates obtained from four of the same (*Alpinia galangal*, *Curcuma longa*, *Kaempferia puyiflora* and *Zingiber officinale*) exhibited no antioxidant capacity. As for the remaining eleven protein hydrolysates formed from Zingiberaceae plants, the observed antioxidant potency increased in the following sequence: *Roseosbergia pandurata* ($IC_{50} = 131.8 \mu\text{g/mL}$) < *Curcuma amarisima* ($IC_{50} = 127.0 \mu\text{g/mL}$) < *Curcuma aromatic* ($IC_{50} = 118.2 \mu\text{g/mL}$) < *Curcuma atrovirens* ($IC_{50} = 84.5 \mu\text{g/mL}$) < *Hedychium coronarium* ($IC_{50} = 56.1 \mu\text{g/mL}$) < *Zingiber zerumbet* ($IC_{50} = 54.6 \mu\text{g/mL}$) < *Zingiber ottensii* ($IC_{50} = 44.9 \mu\text{g/mL}$) < *Curcuma zanthorrhiza* ($IC_{50} = 39.4 \mu\text{g/mL}$) < *Zingiber cassumunar* ($IC_{50} = 38.6 \mu\text{g/mL}$) < *Curcuma sp.* ($IC_{50} = 36.3 \mu\text{g/mL}$) < *Curcuma zokoria* ($IC_{50} = 25.7 \mu\text{g/mL}$). It should be noted that the strongest antioxidant activity, observed for the protein hydrolysate obtained from *Curcuma zokoria*, was very close to that of ascorbic acid ($IC_{50} = 22.3 \mu\text{g/mL}$). Therefore, this protein hydrolysate was chosen by the authors for further purification and examination. Of the five fractions obtained from the Q Sepharose ion exchange chromatography, only the one eluting in the 0.5M NaCl showed antioxidant capacity with the $IC_{50} = 41.78 \mu\text{g/mL}$. The same fraction was also found to be capable of inducing lower cytotoxic effects towards the human tumor derived hepatoma (HEP-G2) and colon (SW620) cell lines ($IC_{50} = 200.8$ and $241.0 \mu\text{g/mL}$, respectively). Moreover, the MALDI-TOF analysis determined the molecular weight of the active protein hydrolysate as approximately 12.4–12.8 kD.

3.6. Antioxidant Potency of Protein Hydrolysates Formed from Moringa oleifera

Garza et al. [40] evaluated the antioxidant capacity of *Moringa oleifera* protein hydrolysates and peptide fractions. Protein hydrolysates from the seeds of the above-mentioned tree were obtained by way of 2.5 and 5-h enzymatic hydrolysis with three proteolytic enzymes: pepsin, trypsin, and chymotrypsin. Next, the newly obtained hydrolysates were subjected to ultrafiltration using a 10 kDa membrane in order to prepare peptide fractions. The antioxidant potency of the protein hydrolysates as well as the respective peptide fractions was evaluated using the ABTS assay and the results were presented as mM Equivalents of Trolox (ET) per mg of protein. Based on the performed examination, the authors found that peptide fractions > 10 kDa digested for 5 h were capable of inducing stronger antioxidant activity as compared to those digested for 2.5 h as well as the protein hydrolysates. The antioxidant activity of hydrolysates generated with trypsin (4.19 mM ET/mg protein for 2.5 h and 5.20 mM ET/mg protein for 5 h) was reported to be comparable to the results observed for chymotrypsin-formed hydrolysates (5.22 mM ET/mg protein for 2.5 h and 6.02 mM ET/mg protein for 5 h). In turn, the hydrolysate obtained with the mixture of pepsin and trypsin in 5-h hydrolysis was shown to be capable the highest antioxidant potency (13.86 mM ET/mg protein) of all of the protein hydrolysates, but the result was nonetheless lower than that for the peptide fraction formed by chymotrypsin for 5 h (17.86 mM ET/mg protein) or the mixture of pepsin and trypsin in 5 and 2.5-h hydrolysis (18.26 and 27.43 mM ET/mg protein, respectively). The results of this study, which are in line with the report of Zhao et al. [80], evidence that the antioxidant activity

of protein hydrolysates is dependent on the specificity of the proteolytic enzyme and the duration of hydrolysis.

4. The Fungus Kingdom

Kimata et al. [1] carried out a study on *Agaricus bisporus* protein hydrolysates. The hydrolysates were obtained from the reaction of enzymatic hydrolysis with three different enzymes: alcalase, pancreatin, flavourzyme and two mixtures: alcalase with pancreatin and alcalase with flavourzyme. Next, each hydrolysate was ultrafiltered using four different membranes with the molecular weight cut-off of 1, 3, 5 and 10 kDa. All of the obtained hydrolysates and peptide fractions were screened for antioxidant activity in terms of DPPH radical scavenging activity (DRSA), metal chelating potency, and ferric reducing antioxidant power (FRAP). The results of the DRSA and Fe^{2+} chelating capacity analysis were expressed as EC_{50} values, i.e., the sample concentration of required for a 50% reduction in DRSA and the sample concentration that reduced chelating activity by 50%. The study revealed that of all of the studied hydrolysates, the one prepared with pancreatin was capable of demonstrating the highest radical scavenging activity ($\text{EC}_{50} = 0.25 \text{ mg/mL}$). The peptide fractions < 1 kDa and 3–5 kDa were found to exhibit the least scavenging potency with respect to their parent hydrolysates and other peptide fractions. In turn, the peptide fraction in the range of 1–3 kDa obtained by treatment with pancreatin showed the strongest DRSA activity ($\text{EC}_{50} = 0.13 \text{ mg/mL}$). In terms of ferric reducing antioxidant power, all of the protein hydrolysates and peptide fractions were observed to show a concentration-dependent increase. Likewise, the highest FRAP was reported for pancreatin hydrolysate (0.16 and 0.41 at the concentration of 1 and 3 mg/mL , respectively), and its peptide fraction 1–3 kDa (0.62 at the concentration of 3 mg/mL). On the other hand, the alcalase hydrolysate was confirmed as having the strongest capacity to chelate Fe^{2+} ($\text{EC}_{50} = 0.96 \text{ mg/mL}$) relative to other hydrolysates. The alcalase peptide fraction 1–3 kDa was also shown to induce the highest metal chelating activity ($\text{EC}_{50} = 1.2 \text{ mg/mL}$) when compared to other peptide fractions.

5. Structure—Activity Relationship

The antioxidant activity of protein hydrolysates and peptides is influenced both by the methods with which they are obtained, as well as their structural features. Therefore, scientists in their research pay more and more attention to the relationship between the structure of peptides and their activity (SAR). Particle size, amino acid composition and sequence, as well as hydrophobicity are mainly analyzed. However, still these relationships are not fully clear [81]. This is due to the fact that several factors interact simultaneously, e.g., hydrolysis conditions, size and amino acid composition of the obtained peptide, which ultimately determines its final activity. When discussing the influence of peptide size on the antioxidant potential, the authors of numerous publications point out that the peptides with smaller mass ($\leq 3 \text{ kDa}$) are characterized by higher antioxidant activity. In the presented literature review, similar results were noticed, among others, analyzing the work of Phongthai et al., 2018; Cai et al., 2017, who obtained the highest antioxidant activity for peptide fractions < 3 kDa. From the literature collected in this review, we can clearly see the differences in the molecular weight profiles of the hydrolysates. This is related to the specificity of the substrates as well as the activity of the enzymes studied under the given reaction conditions. Obtaining peptides with lower molecular weight is critically affected by the hydrolysis step—its time, the enzymes used or the temperature. Yu et al. (2018) in their work performed hydrolysis of *Ruditapes philippinarum* using trypsin, neutrase and pepsin. The neutrase hydrolysate contained the highest content of low molecular weight peptides. This is probably due to the fact that neutrase is an endopeptidase that does not have a specific enzymatic cutting site.

Another widely discussed aspect in the literature is the effect of amino acid composition of peptides on their activity. Aromatic amino acids (Tyr, His, Trp, Phe) show high free radical scavenging ability. This is due to the fact that they can transfer protons to

electron-deficient radicals. One of the most widely discussed amino acids in the literature in the context of antioxidant activity is histidine. Histidine has an imidazole ring in its structure, which is responsible for scavenging lipid peroxyl radicals or chelating metal ions [6]. Peptides with antioxidant activity containing histidine in their composition have been discussed by Ahn et al., 2014; Homayouni-Tabrizi et al., 2017; Shazly et al., 2017; Jemil et al., 2017; Jiang et al., 2014, among others. Some authors also point out that the position of histidine on the N-terminus of the amino acid chain increases its bioactivity. Peptides containing hydrophobic amino acids, i.e., Ala, Tyr, Pro, Phe, Ile, Leu, and Phe, Trp, as well as peptides containing cysteine in their chains are also characterized by high antioxidant activity. The future of biological peptide activity analysis is quantitative structure-activity relationship modeling (QSAR). The multidimensional data obtained in this method allow to understand many aspects of chemical and biological interactions. Moreover, it reduces the costs associated with classical analytical methods.

6. Conclusions and Future Perspective

Biologically active peptides, due to their antioxidant, immunomodulatory, anticancer and antimicrobial properties, can be successfully used to create functional foods. Additionally, some of them are characterized by high specificity, lack of toxicity and high efficiency at low doses. Despite the above advantages, the use of BPs in functional foods is still limited. To change this, further research is needed on the extraction of the peptides, the stability of their biological activity, and the determination of the relationship between their structure and activity. According to available study, biologically active protein hydrolysates could constitute a valuable natural component for future applications not only in food products but also in the pharmaceutical, nutraceutical, and cosmetic industries. As demonstrated in this review, various protein sources subjected to various treatments can produce peptide mixtures with different antioxidant properties. Nearly all of above examples of protein sources, be it animal, plant, or fungal, can be used to obtain a peptide mixture with significant antioxidant properties. As clearly demonstrated in the above article, the radical scavenging capacity is primarily dependent on hydrolysis conditions such as: enzyme type, E:S ratio, temperature, and pH. In addition, the size of the extracted peptide and their amino acid sequence are also important. Therefore, future research on bioactive peptides will see strong development of both analytical methods and tools for *in silico* studies. Another challenge will be to determine the molecular mechanisms of action and bioavailability of peptides in a food matrix.

Author Contributions: Conceptualization, M.C., K.G., J.W. and A.W.; writing—original draft preparation, M.C., K.G., J.W. and T.C.; writing—review and editing, M.C., T.C. and A.W.; supervision, A.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The analyzed publications are available from the authors.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Jiang, H.; Teng, T.; Sun, J.; Xu, Y.; Zhao, Z.; Lian, D. Purification and characterization of antioxidative peptides from round scad (*Decapterus muriei*) muscle protein hydrolysate. *Food Chem.* **2014**, *154*, 158–163. [CrossRef] [PubMed]
- Girgin, A.T.; He, R.; Hasan, F.M.; Udenigwa, C.C.; Gill, T.A.; Aluko, R.E. Evaluation of the *in vitro* antioxidant properties of a cod (*Gadus morhua*) protein hydrolysate and peptide fractions. *Food Chem.* **2015**, *173*, 652–659. [CrossRef] [PubMed]
- Kimura, B.M.; Zhao, L.; Bian, Y.; Ma, G.; Yang, W.; Pei, F.; Hu, Q. Antioxidant potential of edible mushrooms (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. *Food Chem.* **2017**, *230*, 58–67. [CrossRef] [PubMed]
- Homayouni-Tabrizi, M.; Asodeh, A.; Soltani, M. Cytotoxic and antioxidant capacity of camel milk peptides: Effects of isolated peptide on superoxide dismutase and catalase gene expression. *J. Food Drug Anal.* **2017**, *25*, 367–375. [CrossRef]

5. Ghelichi, S.; Shahbampour, B.; Pourashouri, P.; Hajjithalian, M.; Jacobsen, C. Extraction of unsaturated fatty acid-rich oil from common carp (*Cyprinus carpio*) roe and production of defatted roe hydrolysates with functional, antioxidant, and antibacterial properties. *J. Sci. Food Agric.* **2018**, *98*, 1407–1415. [\[CrossRef\]](#)
6. Liu, R.; King, L.; Fu, Q.; Zhou, G.H.; Zhang, W.G. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and byproducts. *Antioxidants* **2016**, *5*, 32. [\[CrossRef\]](#)
7. Ozuna, C.; León-Galván, M.F. Cucurbitinase seed protein hydrolysates as a potential source of bioactive peptides with functional properties. *Biomol Res. Int.* **2017**, *2017*, 2123878. [\[CrossRef\]](#)
8. López-Barrios, L.; Gutiérrez-Urbe, J.A.; Serra-Soldador, S.O. Bioactive peptides and hydrolysates from pulses and their potential use as functional ingredients. *J. Food Sci.* **2014**, *79*, R273–R283. [\[CrossRef\]](#)
9. Naezi, M. Protein hydrolysates and biopeptides: Production, biological activities and applications in foods and health benefits. A review. *Adv. Food Nutr. Res.* **2017**, *81*, 109–159.
10. Zamora-Sillero, J.; Ghazalpour, A.; Prentice, C. Peptides from fish by-product protein hydrolysates and its functional properties: An overview. *Mar. Biotechnol.* **2018**, *20*, 118–130. [\[CrossRef\]](#)
11. Boschini, C.; Scigliasso, G.M.; Resta, D.; Arnoldi, A. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chem.* **2014**, *145*, 34–40. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
12. Omuh, J.O.; Girgih, A.T.; Ahsan, R.E.; Allam, M. In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. *Food Chem.* **2014**, *150*, 366–373. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
13. Roslan, J.; Yusof, K.F.M.; Abdullah, N.; Kamal, S.M.M. Characterization of fish protein hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by product. *Agric. Agric. Sci. Procedia* **2014**, *2*, 312–319. [\[CrossRef\]](#)
14. Janil, N.H.; Halim, N.R.; Sarben, N.M. Optimization of enzymatic hydrolysis condition and functional properties of eel (*Monopterus albus*) protein using response surface methodology (RSM). *Int. Food Res. J.* **2016**, *23*, 1–9.
15. Chalmalah, M.; Jyothirmayi, T.; Dwan, P.V.; Kumar, B.D. Antioxidant activity and functional properties of enzymatic protein hydrolysates from common carp (*Cyprinus carpio*) roe (egg). *J. Food Sci. Technol.* **2015**, *52*, 5817–5825. [\[CrossRef\]](#)
16. Latorres, J.M.; Rios, D.G.; Saggiomo, G.; Wasielesky, W., Jr. Functional and antioxidant properties of protein hydrolysates obtained from white shrimp (*Litopenaeus setiferus*). *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *55*, 721–729. [\[CrossRef\]](#)
17. Al-Shamsi, K.A.; Mudgil, P.; Hassan, H.M.; Maqsood, S. Camel milk protein hydrolysates with improved technofunctional properties and enhanced antioxidant potential in vitro and in food model systems. *J. Dairy Sci.* **2018**, *10*, 47–60. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
18. Montano, C.M.; Capriotti, A.L.; Cavallere, C.; La Barbera, G.; Piovesana, S.; Chiozzi, R.Z.; Lagrè, A. Peptidomic strategy for purification and identification of potential ACE-inhibitory and antioxidant peptides in *Tetradymus obliquus* microalgae. *Anal. Biomol. Chem.* **2018**, *410*, 3573–3586. [\[CrossRef\]](#)
19. Cai, X.; Yan, A.; Fu, N.; Wang, S. In vitro antioxidant activities of enzymatic hydrolysate from *Schizochytrium* sp. and its hepatoprotective effects on acute alcohol-induced liver injury in vivo. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 115. [\[CrossRef\]](#)
20. Gupta, N.; Srivastava, N.; Bhagwanant, S.S. Vicilin—A major storage protein of mungbean exhibits antioxidative potential, antiproliferative effects and ACE inhibitory activity. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0191265. [\[CrossRef\]](#)
21. Mung, M.A.M.; Minka, S.R.; Herde, T. Investigation on antioxidant, angiotensin converting enzyme and dipeptidyl peptidase IV inhibitory activity of Bambara bean protein hydrolysates. *Food Chem.* **2018**, *255*, 162–169. [\[CrossRef\]](#)
22. Zhang, Y.; Zhou, F.; Zhao, M.; Ning, Z.; Sun-Waterhouse, D.; Sun, B. Soy peptide aggregates formed during hydrolysis reduced protein extraction without decreasing their nutritional value. *Food Funct.* **2017**, *8*, 4384–4395. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
23. Jiang, Y.; Zhang, M.; Liu, S.; Cheng, S. Contribution of specific amino acid and secondary structure to the antioxidant property of corn gluten proteins. *Food Res. Int.* **2018**, *105*, 836–844. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Vieira, E.F.; Pinho, O.; Ferreira, I.M. Bio-functional properties of sardine protein hydrolysates obtained by brewer's spent yeast and commercial proteases. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 5414–5422. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
25. Ahn, C.-B.; Kim, J.-G.; Je, J.-Y. Purification and antioxidant properties of octapeptide from salmon byproduct protein hydrolysate by gastrointestinal digestion. *Food Chem.* **2014**, *147*, 78–85. [\[CrossRef\]](#)
26. Sherif, S.A.; Balasubramanian, S.; Banaratharan, K.; Ponnuragan, P. Synthesis and in vitro antioxidant functions of protein hydrolysate from backbones of *Rastrelliger brachyurus* by proteolytic enzymes. *Stud. J. Biol. Sci.* **2014**, *21*, 19–26. [\[CrossRef\]](#)
27. Chi, C.-F.; Wang, B.; Wang, Y.-M.; Zhang, B.; Dong, S.-G. Isolation and characterization of three antioxidant peptides from protein hydrolysate of bluefin leatherjacket (*Nemulon septentrionale*) heads. *J. Food. Fosh* **2015**, *12*, 1–10. [\[CrossRef\]](#)
28. Pachaiappan, R.; Tamboli, E.; Acharya, A.; Su, C.-H.; Gopinath, S.C.B.; Chen, Y.; Velusamy, P. Separation and identification of bioactive peptides from stem of *Thlaspi arvense* (Willd.) Miers. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0195717. [\[CrossRef\]](#)
29. Heo, S.-Y.; Ko, S.-C.; Kim, C.S.; Oh, G.W.; Ryu, B.; Qian, Z.J.; Kim, G.; Park, W.S.; Choi, I.W.; Pham, T.T.; et al. A heptameric peptide purified from *Spirulina* sp. Gastrointestinal hydrolysate inhibits angiotensin I-converting enzyme and angiotensin II-induced vascular dysfunction in human endothelial cells. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *39*, 1072–1082. [\[CrossRef\]](#)
30. Inthawanarat, K.; Sangvanich, P.; Puthong, S.; Karnchanatit, A. Antioxidant and antiproliferative activities of protein hydrolysate from the rhizomes of *Zingiberaceae* plants. *Phil. J. Pharm. Sci.* **2016**, *39*, 1893–1903.
31. Karas, M.; Jakubczyk, A.; Soymanowska, U.; Mizerska, M.; Zielińska, E. Antioxidant activity of protein hydrolysates from raw and heat-treated yellow string beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Acta Sci. Pol. Technol. Aliment.* **2014**, *13*, 385–391. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

32. Phongthai, S.; D'Amico, S.; Schoenlechner, R.; Homthawornchou, W.; Rawdkuen, S. Fractionation and antioxidant properties of rice bran protein hydrolysates stimulated by *in vitro* gastrointestinal digestion. *Food Chem.* **2018**, *240*, 156–164. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
33. Aiello, G.; Lammi, C.; Boschin, G.; Zanoni, C.; Arnoldi, A. Epuration of potentially bioactive peptides generated from the enzymatic hydrolysis of bovine proteins. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 10374–10384. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Sonawane, S.K.; Arya, S.S. Bioactive L-ascifissin protein hydrolysates using Box–Behnken design. *Biotec* **2017**, *7*, 218. [\[CrossRef\]](#)
35. Blanco, M.; Vázquez, J.A.; Pérez-Martin, R.I.; Sotelo, C.G. Hydrolysates of fish skin collagen: An opportunity for valorizing fish industry byproducts. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 131. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
36. Tejpal, C.S.; Vijayagopal, P.; Elavarasan, K.; Prabu, D.L.; Lakshmi, R.G.K.; Asha, K.K.; Arundhan, R.; Chamerjee, N.S.; Mathan, S. Antioxidant, functional properties and amino acid composition of pepsin-derived protein hydrolysates from whole tilapia waste as influenced by pre-processing ice storage. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 4257–4267. [\[CrossRef\]](#)
37. Slizyte, R.; Romml, K.; Mozurkayte, R.; Eck, P.; FIVE, K.; RUSTAD, T. Bioactivities of fish protein hydrolysates from defatted salmon backbones. *Biotecnol. Rep.* **2016**, *11*, 99–109. [\[CrossRef\]](#)
38. Shady, A.B.; He, Z.; El-Aziz, M.A.; Zeng, M.; Zhang, S.; Qin, F.; Chen, J. Fractionation and identification of novel antioxidant peptides from buffalo and bovine casein hydrolysates. *Food Chem.* **2017**, *232*, 753–762. [\[CrossRef\]](#)
39. Dash, P.; Ghosh, G. Amino acid composition, antioxidant and functional properties of protein hydrolysates from *Cucarbitaceae* seeds. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 4162–4172. [\[CrossRef\]](#)
40. Garza, N.G.G.; Keyoc, J.A.C.; Castillo, J.A.T.; Zambrano, E.A.G.; Ancona, D.B.; Guerrero, L.C.; Garcia, S.R.S. Biofunctional properties of bioactive peptide fractions from protein isolates of moringa seed (*Moringa oleifera*). *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 4268–4276. [\[CrossRef\]](#)
41. Li, W.; Zhao, T.; Zhang, J.; Xu, J.; Sun-Waterhouse, D.; Zhao, M.; Su, G. Effect of walnut protein hydrolysate on scopolamine-induced learning and memory deficits in mice. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 2102–2110. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
42. Zhao, T.; Su, G.; Wang, S.; Zhang, Q.; Zhang, J.; Zheng, L.; Sun, B.-G.; Zhao, M. Neuroprotective effects of acetylcholinesterase inhibitory peptides from anchovy (*Colitis mactius*) against glutamate-induced toxicity in PC12 cells. *J. Agric. Food Chem.* **2017**, *65*, 11192–11201. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
43. Su, G.; Zhao, T.; Zhao, Y.; Sun-Waterhouse, D.; Qiu, C.; Huang, P.; Zhao, M. Effect of anchovy (*Colitis mactius*) protein hydrolysate and its Maillard reaction product on combating memory-impairment in mice. *Food Res. Int.* **2016**, *82*, 112–120. [\[CrossRef\]](#)
44. Zielinska, E.; Burzyski, B.; Karas, M. Antioxidant and anti-inflammatory activities of hydrolysates and peptide fractions obtained by enzymatic hydrolysis of selected heat-treated edible insects. *Nutrients* **2017**, *9*, 970. [\[CrossRef\]](#)
45. Paiva, L.; Lima, E.; Neto, A.I.; Baptista, J. Angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity, antioxidant properties, phenolic content and amino acid profiles of *Fucus spiralis* L. protein hydrolysate fractions. *Mar. Drugs* **2017**, *15*, 311. [\[CrossRef\]](#)
46. Wang, D.; Shaheen, F. Protein hydrolysate from turkey meat and optimization of its antioxidant potential by response surface methodology. *Food Sci.* **2018**, *39*, 1824–1831. [\[CrossRef\]](#)
47. Hamedy, P.A.; O'Keefe, M.B.; FitzGerald, R.J. Fractionation and identification of antioxidant peptides from an enzymatically hydrolysed *Paluaria palustris* protein isolate. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 416–422. [\[CrossRef\]](#)
48. Guan, H.; Diao, X.; Jiang, F.; Han, J.; Kong, B. The enzymatic hydrolysis of soy protein isolate by Carotene PP under high hydrostatic pressure and its effect on bioactivity and characteristics of hydrolysates. *Food Chem.* **2018**, *245*, 89–96. [\[CrossRef\]](#)
49. Choi, J.-S.; Kim, J.-W.; Park, J.B.; Pyo, S.E.; Hong, Y.-K.; Kim, S.K.; Kim, M.-R. Blood glycerina-modulating effects of melanin snail protein hydrolysates in mice with type II diabetes. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *39*, 1437–1451. [\[CrossRef\]](#)
50. Sonkin, C.; Laobakajit, N.; Kerdchoechuen, O.; Ratanakharakchai, K. Volatile flavour compounds, sensory characteristics and antioxidant activities of mungbean meal protein hydrolysed by bromelain. *J. Food Sci. Technol.* **2018**, *55*, 265–277. [\[CrossRef\]](#)
51. Jemil, I.; Abdellhedi, O.; Nasri, R.; Mira, L.; Jridi, M.; Arisny, M.-C.; Tridra, F.; Nasri, M. Novel bioactive peptides from enzymatic hydrolysis of Sardinella (*Sardinella aurata*) muscle proteins hydrolysed by *Bacillus subtilis* A26 proteases. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 121–133. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Pokora, M.; Zambowicz, A.; Zablocka, A.; Dąbrowska, A.; Szotylik, M.; Babj, K.; Eckert, E.; Trzaska, T.; Chrzanoska, J. The use of serine protease from *Yarrowia lipolytica* yeast in the production of biopeptides from denatured egg white proteins. *Acta Biotheor. Pol.* **2017**, *64*, 245–253. [\[CrossRef\]](#)
53. Yu, Y.; Fan, F.; Wu, D.; Yu, C.; Wang, Z.; Du, M. Antioxidant and ACE inhibitory activity of enzymatic hydrolysates from *Ruditapes philippinarum*. *Molecules* **2018**, *23*, 1189. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Ktari, N.; Bkhairia, I.; Nasri, R.; Koki, R.B.A.; Salem, R.B.S.-B.; Amara, I.B.; Zeghal, N.; Salah, B.B.; Salah, R.B.; Nasri, M. Zebra blenny protein hydrolysates as a source of bioactive peptides with prevention effect against oxidative dysfunctions and DNA damage in heart tissues of rats fed a cholesterol-rich diet. *Food Res. Int.* **2017**, *100*, 423–432. [\[CrossRef\]](#)
55. Ktari, N.; Nasri, R.; Mraoufi, K.; Hemsden, K.; Belguith, O.; Boudaouara, T.; Feki, A.; Nasri, M. Antioxidative and ACE inhibitory activities of protein hydrolysates from zebra blenny (*Salaria biola*) in alloxan-induced diabetic rats. *Process Biochem.* **2014**, *49*, 890–897. [\[CrossRef\]](#)
56. Kim, M.-R.; Kim, K.-W.; Park, J.B.; Hong, Y.-K.; Kim, S.K.; Choi, J.-S. Anti-obesity effects of yellow catfish protein hydrolysate on mice fed a 45% kcal high-fat diet. *Int. J. Mol. Med.* **2017**, *40*, 784–800. [\[CrossRef\]](#)
57. Salem, R.B.S.-B.; Bkhairia, I.; Abdellhedi, O.; Nasri, M. Octopus vulgaris protein hydrolysates: Characterization, antioxidant and functional properties. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *54*, 1442–1454. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

58. Zambrowicz, A.; Eckert, E.; Pokora, M.; Bobak, L.; Dąbrowska, A.; Szałtysik, M.; Trziszka, T.; Chramowska, J. Antioxidant and antidiabetic activities of peptides isolated from a hydrolysate of an egg-yolk protein by-product prepared with a proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *RSC Adv.* **2015**, *5*, 10460–10467. [\[CrossRef\]](#)
59. Klampong, V.; Borjakul, S.; Kantachote, D.; Shabidi, F. Antioxidative activity and functional properties of protein hydrolysate of yellow stripes trevally (*Scolarides leptolepis*) as influenced by the degree of hydrolysis and enzyme type. *Food Chem.* **2007**, *102*, 1317–1327. [\[CrossRef\]](#)
60. Theodorou, A.F.; Raghavan, S.; Kristinsson, H.G. Antioxidative activity of protein hydrolysates prepared from alkaline-aided channel catfish protein isolates. *J. Agric. Food Chem.* **2008**, *56*, 7459–7466. [\[CrossRef\]](#)
61. Quian, Z.-J.; Jung, W.K.; Kim, S.K. Free radical scavenging activity of a novel antioxidant peptide purified from hydrolysate of bullhead skin, *Rana catesbeiana* Slater. *Bioresour. Technol.* **2004**, *95*, 1690–1698. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
62. Sarmadi, B.H.; Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* **2010**, *31*, 1949–1956. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
63. Wjesekara, I.; Qian, Z.J.; Ryu, B.; Ngoo, D.H.; Kim, S.K. Purification and identification of antihypertensive peptides from seaweed papfish (*Sargassum schlegelii*) muscle protein hydrolysate. *Food Res. Int.* **2011**, *44*, 703–707. [\[CrossRef\]](#)
64. You, L.; Zhao, M.; Kegemstein, J.M.; Res, J. Purification and identification of antioxidative peptides from loach (*Misgurnus aspidirostratus*) protein hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Res. Int.* **2010**, *43*, 1167–1173. [\[CrossRef\]](#)
65. Elavarasan, K.; Navane Kumar, V.; Shanmugam, B.A. Antioxidant and functional properties of fish protein hydrolysates from fresh water carp (*Cyprus carpio*) as influenced by the nature of enzyme. *J. Food Process. Preserv.* **2014**, *38*, 1207–1214. [\[CrossRef\]](#)
66. Taheri, A.; Bakhtshizadeh, G.A. Antioxidant and ace inhibitory activities of kawakawa (*Entyurus affinis*) protein hydrolysate produced by skipjack tuna pepsin. *J. Aquat. Food Prod. Technol.* **2019**, *29*, 149–166. [\[CrossRef\]](#)
67. Kumar, V.P.; Martins, V.G.; Goddard, J.M. Radical scavenging polyethylene films as antioxidant active packaging materials. *Food Control* **2020**, *108*, 106946. [\[CrossRef\]](#)
68. Yaghoobzadeh, Z.; Ghadikolai, F.T.; Kalvosi, H.; Safari, R.; Faniati, E. Antioxidant activity and anticancer effect of bioactive peptides from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) skin hydrolysate. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2020**, *26*, 623–632. [\[CrossRef\]](#)
69. Sousa, P.; Borges, S.; Pinado, M. Enzymatic hydrolysis of insect *Alphitobius diaperinus* towards the development of bioactive peptide hydrolysates. *Food Funct.* **2020**, *11*, 3529–3548. [\[CrossRef\]](#)
70. Zhang, Y.; Wang, J.; Zhu, Z.; Li, X.; Sun, S.; Wang, W.; Sadiq, F.A. Identification and characterization of two novel antioxidant peptides from silkworm pupae protein hydrolysates. *Eur. Food Res. Technol.* **2021**, *247*, 343–352. [\[CrossRef\]](#)
71. Li, B.; Chen, F.; Wang, X.; Ji, B.; Wu, Y. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysate by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chem.* **2007**, *102*, 1135–1143. [\[CrossRef\]](#)
72. Arise, R.C.; Yelaman, A.A.; Ekan, O.E. In vitro antioxidant and α -amylase inhibitory properties of watermelon seed protein hydrolysates. *Eur. J. Food Res. Technol.* **2016**, *14*, 163–172. [\[CrossRef\]](#)
73. Zhu, S.Y.; Jiang, N.; Tu, J.; Yang, J.; Zhou, Y. Antioxidant and anti-aging activities of *Silybum marianum* protein hydrolysate in mice treated with D-galactose. *Biomol. Environ. Sci.* **2017**, *30*, 623–631. [\[PubMed\]](#)
74. Evangelho, J.A.D.; Vaziri, N.L.; Pinto, V.Z.; Berrini, J.J.; Dias, A.R.G.; Zavanze, E.D.R. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) protein hydrolysates: Physicochemical and functional properties. *Food Chem.* **2017**, *214*, 460–467. [\[CrossRef\]](#)
75. Jara, A.M.R.; Liggieri, C.S.; Brano, M.A. Preparation of soy protein hydrolysates with antioxidant activity by using peptidases from latex of *Machim pumilifer* fruits. *Food Chem.* **2018**, *264*, 326–333. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
76. Arise, A.K.; Alabi, A.M.; Nwachukwu, I.D.; Malomo, S.A.; Abiku, R.E.; Amoson, E.O. Inhibitory properties of bambara groundnut protein hydrolysate and peptide fractions against angiotensin-converting enzymes, resin and free radicals. *J. Sci. Food Agric.* **2017**, *97*, 2834–2841. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
77. Agrawal, H.; Joshi, R.; Gupta, M. Isolation, purification and characterization of antioxidative peptide of pearl millet (*Pennisetum glaucum*) protein hydrolysate. *Food Chem.* **2016**, *204*, 365–372. [\[CrossRef\]](#)
78. Sabbioni, A.C.; Ibañez, S.M.; Martínez, E.N.; Adán, M.C.; Solís, A.A. Antithrombotic and antioxidant activity of amaranth hydrolysate obtained by activation of an endogenous protease. *Plant. Food Hum. Nutr.* **2016**, *71*, 174–182. [\[CrossRef\]](#)
79. Xie, J.; Du, M.; Shen, M.; Wu, T.; Lin, L. Physico-chemical properties, antioxidant activities and angiotensin-I converting enzyme inhibitory of protein hydrolysates from Mung bean (*Vigna radiata*). *Food Chem.* **2019**, *276*, 243–250. [\[CrossRef\]](#)
80. Zhao, Q.; Xiong, H.; Selomulya, C.; Chen, X.D.; Zhang, H.; Wang, S.; Zhou, Q. Enzymatic hydrolysis of rice dreg protein: Effects of enzyme type on the functional properties and antioxidant activities of recovered proteins. *Food Chem.* **2012**, *134*, 1360–1367. [\[CrossRef\]](#)
81. Sla, A.; Bougatef, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *J. Funct. Foods* **2016**, *21*, 16–26. [\[CrossRef\]](#)

Article

Egg Yolk as a New Source of Peptides with Antioxidant and Antimicrobial Properties

Michał Czołej ^{1,2}, Tomasz Czerniecki ², Katarzyna Garbacz ^{1,2}, Jacek Wawrzykowski ^{3,4}, Monika Jamioł ³, Katarzyna Michalak ⁴, Natalia Walczak ¹, Agata Wilk ¹ and Adam Waśko ²

¹ Biotive Innovation Sp. z o.o., Dolnośląskiego 3, 20-262 Lublin, Poland

² Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skomna 8, 20-704 Lublin, Poland

³ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland

⁴ Department of Epizootiology and Clinic of Infectious Diseases, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Głęboka 30, 20-612 Lublin, Poland

* Correspondence: jacek.wawrzykowski@up.lublin.pl



Citation: Czołej, M.; Czerniecki, T.; Garbacz, K.; Wawrzykowski, J.; Jamioł, M.; Michalak, K.; Walczak, N.; Wilk, A.; Waśko, A. Egg Yolk as a New Source of Peptides with Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Foods* **2023**, *12*, 3394. <https://doi.org/10.3390/foods12183394>

Academic Editor: Pascal Degrassat

Received: 1 August 2023

Revised: 5 September 2023

Accepted: 7 September 2023

Published: 11 September 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: A significant increase in interest in food-derived peptides obtained mostly through enzymatic reactions has been observed in the past few years. One of the best sources of bioactive peptides are defatted egg yolk proteins, which can potentially find application as high-quality nutritional supplements for infants with cow's milk protein intolerance and as natural preservatives. The aim of this study was to obtain peptides from defatted egg yolk protein, to study their antioxidant and antimicrobial properties, and to identify peptides with bioactive properties. To control the course of the process, MALDI-TOF/MS (matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight/mass spectrometry) spectra were also examined. The peptide mixture obtained through enzyme digestion was tested for its antioxidant properties by measuring the scavenging activity in 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl radical (DPPH•), 2,2'-azobis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) radical cation decolorization (ABTS•+), and ferric reducing activity (FRAP) assays. Antimicrobial activity was also studied. The peptide mixture exhibited significant antioxidant activity: DPPH—1776.66 ± 32.99, ABTS—390.43 ± 8.92, and FRAP—16.45 ± 0.19. The inhibition of bacterial growth by two concentrations of the peptide mixture was examined. The best result was obtained in *Salmonella enterica*, with an inhibition zone of 20.0 ± 1.0 and 10.7 ± 0.6 mm at the concentrations of 50 and 25 mg/mL, respectively. The results of the study suggest that the mixture of egg yolk peptides may exhibit a number of health-promoting properties.

Keywords: antioxidant; egg yolk; enzymatic hydrolysis; bioactive peptides; proteins

1. Introduction

In recent years, society has become more conscious of the close relation between diet and health. This has resulted in the design of functional food that provides health benefits in addition to basic nutrition. Food and nutrition science has moved from identifying and correcting nutritional deficiencies to designing foods that promote optimal health and reduce the risk of diseases. Functional food is created thanks to a wide range of health-promoting additives. Bioactive peptides, which were described for the first time in 1979, might be one such additive [1]. Small peptides, especially di- and tripeptides, show high nutritional and therapeutic value, while larger ones (up to 50 amino acid residues and molecular masses less than 6000 Da) are presumed to be associated with the improved functionality of hydrolysates [2–5]. Bioactive peptides are inactive in the parent protein sequence, but during release by gastrointestinal digestion, fermentation, or enzymatic hydrolysis, they interact with receptors in the body and regulate the function of particular systems, e.g., nutrient uptake and immune defense. Furthermore, they take part in the

transport of metal ions and opioids and have antioxidant, antimicrobial, antiproliferative, and ACE-inhibitory properties [6–10]. Their bioactive potency is dependent on the inherent composition and sequence of amino acid residues.

There are several ways to obtain peptides. In the case of egg yolks, an important step preceding hydrolysis is defatting which is carried out to separate lipids, pigments, and aqueous and protein fractions. One of the most common methods of obtaining peptides is enzymatic proteolysis [6,11,12], which is considered to be highly important for the generation of bio-functional peptides. In comparison with chemical methods (acid or alkaline hydrolysis), it is characterized by mild reaction conditions, low amounts of undesirable products, and a high product yield and quality [5,13,14]. The hydrolysis mechanism generates free amino acid groups, which have, e.g., antioxidant properties and protect organisms and cells from oxidation damage.

Butylated hydroxyanisole (BHA) and butylated hydroxytoluene (BHT) are cost-effective and efficient artificial antioxidants, but their toxicity and carcinogenicity raise concerns [15,16]. Given these reasons and their potential health benefits without side effects, natural antioxidants from food resources have become the object of widespread interest. It has also been shown that a large number of food-delivered peptides have antioxidant properties [3]. Peptides which exhibit antioxidative properties can be derived from different sources: animal (eggs, milk, whey) and plant (wheat, peanut kernel, rice, soybean, sunflower) proteins. One of the aforementioned possible sources of bioactive peptides that scientific research has focused on are hen eggs. Eggs are traditionally considered as a natural source of compounds with antioxidant properties, including several proteins, phospholipids, and certain micronutrients such as vitamin E, vitamin A, selenium, and carotenoids. Egg white is a commonly used source of protein and peptides. Egg yolk is mostly known from lecithin, which is widely used as a lubricant, surfactant, and emulsifying agent. Egg yolk can also provide lysozyme, cystatin, avidin, phosvitin, and phospholipids. Bioactive peptides from eggs include opioid peptides, peptides lowering high blood pressure, inhibiting platelet aggregation, and carrying metal ions, and peptides with immunostimulatory, antimicrobial, antidiabetic, and antioxidant activity [12,17,18]. It has been found that egg yolk protein (EYP) inhibit oxidation in a linoleate emulsion system [19]. Egg yolk phospholipids and phosvitin are reported to have antioxidant properties [20–22]. In vitro tests have shown a better digestibility of EYP than those from milk casein treated with pepsin and trypsin [24].

The aim of this study was to obtain peptides from defatted egg yolk protein by enzymatic reaction and to determine the degree of hydrolysis (DH). Furthermore, the amino acid composition and the protein and fat content were evaluated. The research was complemented by antioxidant and antimicrobial studies and the identification of peptides with bioactive properties.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Liquid and pasteurized aseptically packed egg yolks taken from fresh class A eggs (Eipna, Löhne, Germany) were used in the experiment. One kilogram of the product is equal to 63 egg yolks. The product data specified by the manufacturer are presented in Table 1.

Table 1. Average nutritional value in 100 g of liquid egg yolk (average ± standard deviation).

Energy Value	Fat	Carbohydrates	Proteins	Ash
1155 kJ/ 279 kcal	25.0 g ± 0.1	0.9 g ± 0.0	14.0 g ± 0.1	0.2 g ± 0.0

2.1.1. Enzymes

Enzymatic hydrolysis was performed using commercially available pepsin from porcine gastric mucosa powder, ≥400 units/mg protein (P7125, Sigma-Aldrich, Saint

Louis, MO, USA), and papain from papaya latex crude powder, 1.5–10 units/mg solid (P3375, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA).

2.1.2. Other Reagents

The following compounds were used: ethanol (96%, POCH, Gliwice, Poland), deionized water (resistivity $18.2 \text{ M}\Omega \times \text{cm}$), sodium hydroxide (NaOH, POCH, Gliwice, Poland), trifluoroacetic acid ($\geq 99.0\%$, Merck, Darmstadt, Germany), trichloroacetic acid ($\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine ($\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (97%), sodium acetate trihydrate ($\geq 99.0\%$, Merck, Germany), acetic acid (96%, Avantor, Gliwice, Poland), 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (97.0%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (98.0%, Roche, Basel, Switzerland), potassium persulfate ($\geq 99.0\%$, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), phosphate-buffered saline (PBS, tablets, Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA), barium hydroxide (95%, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and hydrochloric acid (95%, POCH, Gliwice, Poland).

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of Egg Yolk Peptides

Defatted egg yolk proteins were obtained by ethanol (96%, PA, Chempur, Piekary Śląskie, Poland) extraction in mild conditions. The process was conducted in four steps (70% EtOH, 40% EtOH, 90% EtOH, water). In the first step, the egg yolks were vigorously mixed with 70% alcohol solutions in a ratio of 1:1 [wt], next, the mixture was centrifuged at $3000 \times g$ for 30 min (MPW-380, MPW Med. Instruments, Warsaw, Poland). The liquid phase was removed and the sediment was used in the next step. The different steps were carried out analogously. In the last step carried out with water, the defatted egg yolk pellet was obtained and stored at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ until further use.

2.2.2. Amino Acid Composition

In order to prepare the sample for the determination of non-sulfur amino acids, the acid hydrolysis of proteins was carried out in the presence of hydrochloric acid at an elevated temperature in accordance with the methodology proposed by Davies and Thomas [25]. Alkaline hydrolysis of proteins was carried out with barium hydroxide to determine the content of tryptophan. The protein sample for the determination of sulfur amino acids was prepared according to the procedure described by Schram and Moore [26]. It involves the oxidation of cysteine to cysteic acid and methionine to methionine sulfone, followed by hydrolysis in the presence of hydrochloric acid. Samples for tryptophan determination were centrifuged (15 min, $3000 \times g$), and the other samples were evaporated and diluted. After filtration through a $0.22 \text{ }\mu\text{m}$ filter, the samples were used for analysis. The amino acid determination was performed in an Ingos amino acid AAA 400 analyzer (Prague, Czech Republic) using low-ion ion-exchange chromatography with column derivatization (Oxion LG ANB) with ninhydrin and photometric detection at 570 nm and 440 nm for proline. The chromatographic separation was carried out in a system with four eluents, which consisted of buffers with pH 2.6, 3.0, 4.25, and 7.9.

2.2.3. Protein Determination

In the experiment, the protein concentration was determined with the spectrophotometric method (MaestroNano Micro-Volume Spectrophotometer, MAESTROGEN, Hsinchu, Taiwan). Briefly, 2 μL of the protein sample was measured against water. The measurement was conducted at a 280-nm wavelength.

2.2.4. Determination of Fat Content

The Soxhlet method was used to investigate the amount of lipids and the efficiency of the defatting process [27]. The procedure was carried out as follows: 1 g of lyophilized sample was placed in the extraction thimble and extracted for 4 h using hexane. After the

extraction, the hexane was evaporated and the fat was placed in a dryer at 90 °C overnight. The next day, the flask was weighed and the fat content in the sample was determined.

2.2.5. Enzymatic Reaction

The hydrolysis of the egg yolks was carried out as follows: (i) defatted egg yolk protein extract (111 g with 18% protein content) was dissolved in 1 L of MQ water; when the solution reached 70 °C, pH was adjusted to 6.0 using a 0.1 M NaOH solution; (ii) papain was added in a weight ratio of 10% relative to the EYPr mass; (iii) the mixture was stirred at 70 °C for 2 h; (iv) the enzymatic reaction was stopped by heating at 100 °C for 15 min; (v) the solution was cooled to 37 °C and the pH was adjusted to 3.0 using 1 M HCl; (vi) pepsin was added in a weight ratio of 10% relative to EYPr mass; (vii) the mixture was stirred at 37 °C for 2 h; (viii) the enzymatic reaction was stopped by heating at 100 °C for 15 min; (ix) the hydrolysate was cooled down and centrifuged at 3000 × g for 30 min; (x) the supernatant was separated, lyophilized, and stored at 4 °C until further use.

2.2.6. Degree of Hydrolysis (DH)

The degree of hydrolysis was determined by the quantification of soluble peptides. For this purpose, 500 µL of the hydrolysate was collected in intervals (0, 0.5, 1, 1.5, and 2 h after enzyme addition) and mixed immediately with 500 µL of 10% trichloroacetic acid. After 15 min of incubation, the sample was centrifuged at 5500 × g for 10 min. The content of soluble peptides in the supernatant was determined using the spectrophotometric method by measuring the absorbance at 280 nm. The degree of hydrolysis was calculated as the percentage of solubilized peptide to total protein content.

2.2.7. Peptide Identification by MALDI-TOF/MS

MALDI TOF mass spectrometry is an appropriate method to check the presence and mass distribution of peptides in samples. This technique uses appropriate matrices, which cause the ionization and desorption of the tested material. Thanks to the time-of-flight analyzer measuring the time of passage of peptides to the detector, it is possible to determine the mass spectrum.

MALDI spectra were collected to investigate the efficiency of the hydrolysis and to analyze the presence of lower MW peptides in the hydrolysate. A small amount of lyophilized hydrolysate powder was dissolved in 0.1% trifluoroacetic acid and purified with Sample Prep Pipette Tips (ZipTip 0.2 µL, C4 Millipore, Merck, Darmstadt, Germany) according to a standard procedure [Jehmlich, 2014] [26]. Next, 3 µL of purified peptide sample was mixed with 3 µL of an HCCA/DHA saturated matrix solution (50:50 [v:v]). The material was finally deposited on an AnchorChip MALDI plate with a hydrophobic coating (Bruker, Bremen, Germany). Mass spectra were recorded in the active positive reflection mode by an Ultraflex III MALDI TOF-TOF (Bruker, Bremen, Germany) spectrometer. All spectra were collected within the 500–5000 *m/z* range, smoothed (Savitzky-Coley method), and baseline corrected (Top-Hat baseline algorithm) in flexAnalysis 3.0 software (Bruker, Bremen, Germany). The list of peaks with a signal-to-noise ratio greater than 3 was generated in the above-mentioned program.

2.2.8. Antioxidative Potential Estimation

To prepare peptide samples, 10 mg of each exactly weighed peptide lyophilizate sample was extracted in 1 mL of deionized water (5 min, 15 Hz, MM400, Retsch, Haan, Germany). After centrifugation (3 min, 15 °C, 33,000 × g, 32R, Hettich, Tuttlingen, Germany), the supernatant was collected and used for further analyses. Absorbance measurements were carried out using a spectrophotometer (Marcel 6330, Zielonka, Poland).

Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP)

The ferric reducing ability of peptides was determined based on the FRAP method [27]. A 10 mmol/L solution of TPTZ (2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine) in 40 mmol/L HCl was

mixed with 20 mmol/L of $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ and 300 mmol/L of acetate buffer (pH 3.6) at a 1:1:10 v/v/v ratio. Then, 50 μL of the peptide solution was added to 150 μL of the mixture. The samples were mixed and incubated for 5 min at 25 $^\circ\text{C}$. Absorbance was read at 593 nm against a blank sample. The Fe^{2+} ion concentration was assessed by referencing a standard curve established using known concentrations of FeSO_4 solutions.

Determination of DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) Radical-Scavenging Activity

The free radical-scavenging activity measurements were conducted using the stable radical DPPH [30]. A total of 50 μL of the peptide solution was added to 150 μL of the DPPH• methanolic solution. The samples were incubated at 25 $^\circ\text{C}$ for 60 min on a horizontal shaker in darkness. After that, absorbance was read at 517 nm against a blank sample. The assessment of the antioxidant activity of the examined peptides relied on standard curves that had been created for Trolox and ascorbic acid equivalents.

Determination of ABTS•+ (2,2'-azino-bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) Radical-Cation Decolorization Activity

The ABTS•+ working solution was prepared 16 h before measurements by mixing an equal volume of 7 mM ABTS and 2.4 mM potassium persulfate in water. Next, the working solution was diluted with PBS until absorbance reached 0.7 at 734 nm. A total of 1 mL of the peptide mixture sample was mixed with 50 μL of the working solution. Absorbance was read at 734 nm against a blank sample [31].

2.2.9. Determination of Antibacterial Activity

In total, 10 strains of Gram (+) and Gram (−) bacteria belonging to different species were sampled from rotten fruits and vegetables. Species identification of the bacteria by MALDI-TOF/MS was carried out in accordance with the procedure described by Kosikowska et al. [32]. Bacteria were grown on Luria Bertani agar (Biolacorp, Warsaw, Poland) at 30 $^\circ\text{C}$ for 24 h; then, they were subcultured until a homogenous cell culture was obtained. Colonies were picked and species identification using MALDI-TOF/MS (Bruker, Germany) was carried out. Ten species were identified: four belonging to the genera *Bacillus* (*B. cereus*, $n = 2$; *B. megaterium*, $n = 1$; *B. pasteurii*, $n = 1$), *Kocuria rhizophila* ($n = 1$), *Serratia liquefaciens* ($n = 1$), *Pseudomonas aeruginosa* ($n = 1$), *Hafnia alvei* ($n = 1$), *Acinetobacter radiresistans* ($n = 1$), and *Stenotrophomonas maltophilia* ($n = 1$).

The well diffusion test was performed using Mueller–Hinton agar (Biomaxima, Lublin, Poland). The inoculum was prepared using bacterial strains from a 24 h culture in Mueller–Hinton broth (Biomaxima, Lublin, Poland). The suspension of a 0.5 McFarland standard (1.5×10^8) of each bacterial strain was made in a 0.85% sterile saline solution (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA). The inoculated agar was poured into the assay plate. Next, four wells, each 7 mm in diameter, were cut out of the agar, and 50 μL of the EYPe (50 mg/mL) was placed into each well.

2.2.10. Statistical Analysis

Data are expressed as the mean \pm standard deviation. One-way ANOVA followed by a post hoc Tukey's test was performed to analyze the significant differences between the data at the p value < 0.05 using Statistica Version 13.0 (StatSoft, Poland, TIBCO Software Inc., Palo Alto, CA, USA).

3. Results & Discussion

3.1. Amino Acid Composition/Nitrogen Analysis

Table 2 presents the amino acid profiles in the egg yolk before and after the enzymatic hydrolysis. The amount of this bifunctional compound varies from 16.6 ± 0.6 (Trp) to 103.4 ± 5.7 mg/g (Glu). Notably, irrespective of the treatment, glutamic acid, aspartic acid, and leucine were the most abundant amino acids. These amino acids constituted a large portion of the egg yolk protein composition. A similar amino acid profile was

obtained by Pokora et al. [33] in neurase-digested hydrolysates; they also found high levels of serine and alanine. Comparable conclusions were reached by Attia et al. [34] and Adeniyi et al. [35], who determined high levels of these amino acids in egg yolks from different sources. Our study corroborates the findings reported by the aforementioned researchers. This agreement highlights the reliability of our findings, demonstrating a correlation between our results and the conclusions formulated by these authors. The increase in the quantities of almost every amino acid following the hydrolysis process is noteworthy. This may be attributed to the presence of enzymes, which can slightly increase the protein content in the mixture.

Table 2. Amino acid composition of egg yolk protein hydrolysates and egg yolk protein (average \pm standard deviation, mg/g protein, $p < 0.05$ mean statistically significant difference).

Amino Acid	Egg Yolk Protein (EYPe) [mg/g]	Hydrolysates (EYPe) [mg/g]	ANOVA p Value
Asp	54.3 \pm 3.1	72.1 \pm 4.1	0.000425
Thr	28.3 \pm 1.9	38.5 \pm 2.6	0.000728
Ser	48.4 \pm 5.3	53.7 \pm 5.9	0.223833
Glu	76.1 \pm 4.2	103.4 \pm 5.7	0.000240
Pro	23.3 \pm 1.9	38.6 \pm 3.2	0.000302
Gly	17.0 \pm 0.1	33.9 \pm 0.2	<0.000000
Ala	29.7 \pm 0.7	40.5 \pm 1.0	0.000006
Cys	7.9 \pm 3.2	27.3 \pm 11.0	0.013286
Val	32.4 \pm 0.9	43.7 \pm 1.3	0.000008
Met	13.5 \pm 5.3	16.8 \pm 3.7	0.748395
Ile	29.3 \pm 0.9	35.9 \pm 1.1	0.000079
Leu	50.7 \pm 0.3	58.5 \pm 0.3	<0.000000
Tyr	23.9 \pm 2.2	32.5 \pm 2.9	0.003252
Phe	25.6 \pm 1.2	32.8 \pm 1.6	0.000321
His	15.5 \pm 2.2	18.3 \pm 2.6	0.152067
Lys	41.9 \pm 1.1	54.2 \pm 1.4	0.000008
Arg	43.0 \pm 1.2	51.4 \pm 1.5	0.000146
Trp	11.4 \pm 0.4	16.6 \pm 0.6	0.000005

3.2. Determination of Fat Content by Soxhlet Extraction

EYPe defatting is assumed to affect the protein solubility properties and limit their biological and biotechnological values (denaturation with ethanol or hexane [14,36,37]). It has been shown that controlled enzymatic hydrolysis is an effective method of protein modification, and this method has been used in various soy [38,39] and whey [40] proteins.

The average amount of lipids in the dry matter of egg yolk was equal to 50.6% \pm 2.3, which is in agreement with the general state of knowledge. As shown by the results of the Soxhlet method, the extraction of lipids was not complete. After four steps of extraction, the content of fat decreased from 50.6% \pm 2.3 to 18.9% \pm 1.2 (Table 3). Therefore, the method is not as effective as lipid extraction with ethanol and hexane solutions (0.5%) [14]. While the lipid extraction efficiency may not reach its maximum level, the preservation of protein quality and the reduction of harmful conditions, including toxic reactants, are more prominent targets, potentially outweighing the associated limitations.

Table 3. Lipid content (average \pm standard deviation, %) in the dry matter of egg yolk.

Sample	EYPe	EYPe I Step	EYPe II Step	EYPe III Step	EYPe IV Step
Average [%]	50.6 \pm 2.3	43.9 \pm 1.3	35.5 \pm 1.4	27.5 \pm 1.5	18.9 \pm 1.2

3.3. Degree of Hydrolysis DH

Enzymatic hydrolysis is the most applicable method for the extraction of peptides. The properties of this product depend to a great extent on the following parameters: enzyme (specificity and selectivity), temperature, pH, and enzyme-to-substrate ratio (E/S). In this experiment, papain and pepsin were used. The enzymes were selected based on previous preliminary studies on the DH of different enzymes. The temperature and pH applied during the experiment corresponded to the optimum for the enzymes, i.e., 70 °C, 6.0 and 37 °C, 3.0, respectively.

The DH is an important parameter describing enzymatic hydrolysis and may be responsible for controlling such factors as the composition and properties of peptides. The amount of enzyme can have a significant impact on the DH; therefore, the different amounts of the applied enzyme were examined (Table 4). The analysis of the effect of time and the enzyme concentration on hydrolysis efficiency revealed that there were statistically significant differences in the degree of hydrolysis obtained in samples with the 1:10 and 1:20 enzyme content relative to the amount of protein.

Table 4. Effect of the E/S value on the hydrolysis degree (mean \pm standard deviation, %).

E/S Ratio	Time of Hydrolysis (h)								
	Papain			Pepsin			Pepsin		
	60	90	1	1.5	2	2.5	3	3.5	4
Without enzyme	DH (%)								
1:20	2.30 \pm 0.02	2.32 \pm 0.04 *	2.49 \pm 0.05 *	2.77 \pm 0.04 *	2.87 \pm 0.02	3.08 \pm 0.06	3.02 \pm 0.05	2.97 \pm 0.04 *	2.84 \pm 0.06
1:10	2.30 \pm 0.02	12.62 \pm 0.06 *	19.86 \pm 0.04 *	21.78 \pm 0.04 *	23.23 \pm 0.05 *	26.87 \pm 0.04 *	29.29 \pm 0.17 *	28.87 \pm 0.06 *	29.25 \pm 0.04 *
1:5	2.30 \pm 0.02	19.89 \pm 0.06 *	21.37 \pm 0.04 *	25.11 \pm 0.04 *	26.35 \pm 0.04 *	30.25 \pm 0.04 *	35.36 \pm 0.04 *	34.83 \pm 0.08 *	34.71 \pm 0.05 *

*— means statistically significant difference; $p < 0.05$.

In each case, the biggest increase in DH was observed during the first 60 min of hydrolysis (Figure 1), beyond which the reaction progressed at a much slower rate and the DH changes were not significant. It can be suggested that the maximum peptide cleavage occurs during the first minute of hydrolysis. These results are in good agreement with those presented for other protein sources, e.g., fish [41] or wheat gluten [42]. Taking into consideration the results collected in Table 4, the best conditions for the enzymatic hydrolysis of defatted BVP were the 10% enzyme addition (1:10 enzyme to substrate ratio). In this case, the DH increased from the intact value of 2.32% \pm 0.04 to 34.71% \pm 0.05. A remarkable outcome was attained through the implementation of a sequential two-step hydrolysis approach, comprising an initial 2 h papain hydrolysis, followed by a subsequent 2 h pepsin hydrolysis. Table 5 shows a comparison of the present results with those reported for a short digestion time (2–4 h) with such enzymes as neutrase, pronase, alcalase, or trypsin (25–33%) [33,37,43,44].

Table 5. Comparison of the DH value for different types of enzyme.

Enzyme	Digestion Time [h]	Condition	DH (%)	Source
Neutrase	3	200 U/mg, pH 7.0, 45 °C	12	[41]
Neutrase	2	Not available	27	[33]
Neutrase + Pronase	3—each enzyme	Not available	27	[43]
Alcalase + Protase N	3	E/S 0.5% (w/w)	25.5	[37]
Trypsin	3	Egg white, 1 U/1 mg protein, 30 °C	14	[45]
Trypsin	3	0.5% (w/w), 45 °C	15.6	[45]
Pepsin	2	Not available	45.3	[17]

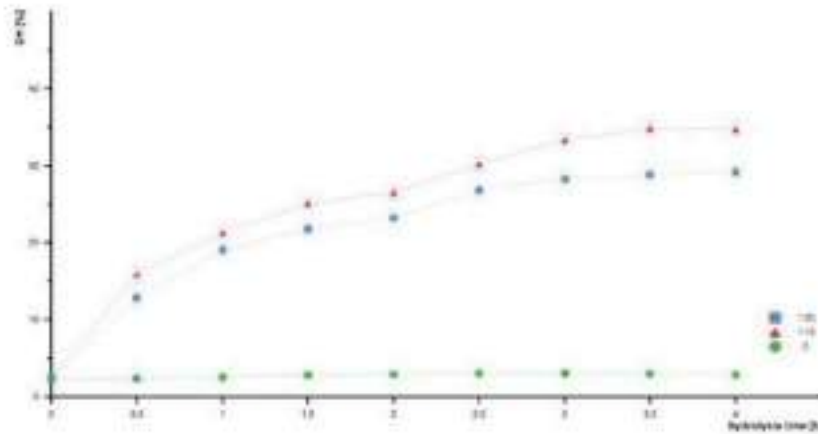


Figure 1. Effect of the ES value on the degree of hydrolysis. C—control (without enzyme); results are shown from a 1:10 and 1:20 enzyme: protein ratio.

The employment of the two-step hydrolysis approach yielded significant DH improvement. The comparative analysis with other enzyme-based hydrolysis methods revealed the competitiveness of the presented approach in achieving a substantial DH increase.

3.4. Investigation of the Peptide Profile by MALDI-TOF/MS Analysis

In this research, we did not use any peptide standards in the analysis; hence, the discussion is limited to the presence or absence of special peaks in *m/z* ranges. After the two-step hydrolysis (DH 34.76%), the majority of the peptide peaks ranged from 700 to 1400 Da (Figure 2). In comparison with the peptide profile before the enzymatic hydrolysis, the distribution of the peaks changed so that a greater number of masses between 700 and 1100 Da were observed. High-molecular-weight peptides from the substrate were converted to smaller peptides with the progress of the reaction time. In the case of the raw egg yolk sample spectrum, there was a higher amount of heavier peptides and small proteins, which were cleaved after the digestion. The main conclusion is that the amount of peaks representing smaller MW peptides increased after the hydrolysis at the expense of larger masses.

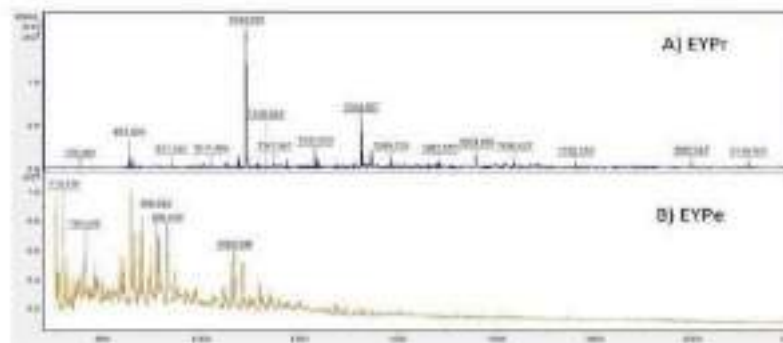


Figure 2. Mass spectra of (A) EYPr; (B) EYPe after two-step hydrolysis with a 1:10 ES.

Based on the obtained spectrum of the hydrolysate sample and the m/z ratio, fragments of peptide sequences were determined by RapidDeNovo sequencing. The fragments were checked in the BIOPEP peptide activity database [46]. The final peptide sequences were determined using BLAST and a peptide mass calculator.

Some of the peptides were assigned biological properties (Table 6). Among them, the peptides DSYEHGGEF, LMSYMWSTSM, PGVTYIHPGQDTSAG, and PTDQKVGWGGEGQIQ were identified as antioxidant compounds, and the peptides DSYEHGGEF, HYDLDEVANKIA, and FEDPERQESSRKE were identified as antimicrobial substances. These results strongly suggest the need for further investigation of the antioxidant and antibacterial properties of the hydrolysates.

Table 6. Peptides obtained after papain-pepsin digestion with their activity checked in the BIOPEP database [46].

m/z	Sequence	Activity
849.281	YFWTCR	opiacid
949.407	ITMIAPSAF	ACE inhibitor
990.481	DSYEHGGEF	antibacterial
996.487	VVSGPYIVY	antioxidant
1002.475	QQGVGQTR	ACE inhibitor
1230.620	KIQMTEEQIK	antiproliferative
1234.595	LMSYMWSTSM	antioxidant
1324.697	HYDLDEVANKIA	antibacterial
1394.566	YINQMIPQSR	ACE inhibitor
1483.570	PGVTYIHPGQDTSAG	antioxidant
1636.631	FEDPERQESSRKE	antibacterial
1670.622	PTDQKVGWGGEGQIQ	antiproliferative
1681.584	YIEAVNKNSFRAGQ	antioxidant
		ACE inhibitor

3.5. Determination of Antioxidant Activity

The antioxidant activity was determined with three methods: by the ability to scavenge DPPH• and ABTS•+ free radicals and with the FRAP method. In every case, the activity of the lyophilized peptide mixture obtained after the two-step hydrolysis with the 1:10 E:S ratio was tested. The antioxidant measurements were repeated three times and the obtained values were averaged.

The data indicated that the EYPe mixture had a significant antioxidant potential. It exhibited strong potency in scavenging DPPH• radicals and ABTS•+ radical cation decolorization. As reported by Memarpoor-Yazdi et al. [47] and Eckert et al. [48], the amino acid sequence of a peptide has a great impact on antioxidant activity. Such hydrophobic amino acids as A, V, L, P, M, Y, W, and F play a role in important antioxidant mechanisms. The aforementioned amino acids were abundant in the defatted egg yolk hydrolysates (Table 3). The analysis of the amino acid sequences of the peptides obtained after the hydrolysis showed a large amount of aromatic amino acids in many cases. Their aromatic residues stabilize radicals during the scavenging reaction through contributing protons to electron-deficient radicals [49]. Sheih et al. [50] suggest that the presence of Y can turn free radicals into phenoxyl radicals, which leads to the inhibition of the peroxidation chain reaction.

The results of the DPPH• and ABTS•+ assays are in many cases higher than those determined for common dietary products. For example, the activity in the ABTS•+ decolorization assay reached 390.43 ± 8.92 mmol Trolox/kg (Table 7). It was higher than for such scavengers as spinach (8.49 mmol Trolox/kg), chili peppers (7.62 mmol Trolox/kg), or raspberries (16.79 mmol Trolox/kg) in dry mass [51]. Also, the DPPH• scavenging activity in the case of the EYPe mixture was much higher. As shown by the literature to date,

strawberries are characterized by one of the highest ascorbic acid equivalents (520.70 mg AA/100 g) [31]. This result is much lower than that obtained for EYPe (1776.66 ± 32.99 mg AA/100 g) (Table 7). The comparison of the results presented in Table 7 with those for egg yolk peptide fractions [48] showed that the separated and clear peptide fractions had higher values: from 0.50 to 2.75 µmol Trolox/mg in the DPPH• assay and from 19.90 to 88.25 µg Fe²⁺/mg in the FRAP test. This may be related to the high exposure to pure concentrated peptides. Our assumption was to create a mixture with antioxidant values in a simple way. Eckert et al. [43] showed comparable results of the free radical scavenging ability of phosvitin (0.11 µM Trolox/mg) after 5 h hydrolysis with bacterial proteases. Graszekiewicz et al. [45] demonstrated similar levels of free radical scavenging activity of egg protein hydrolysate (with trypsin) after separation on RP-HPLC. The values of 0.18 and 0.19 µM Trolox/mg were reached for two fractions.

Table 7. Antioxidant activity of the EYPe mixture sample (average ± standard deviation).

Sample	Ferric Reducing Ability (FRAP) (mmol Fe ²⁺ /kg)	Ferric Reducing Ability (FRAP) (µg Fe ²⁺ /mg)	DPPH Scavenging Activity (mg AA/100g)	DPPH Scavenging Activity (µmol Trolox/mg)	ABTS Radical Cation Decolorization Assay (mmol Trolox/kg)
EYPe	16.45 ± 0.19	0.11 ± 0.02	1776.66 ± 32.99	0.92 ± 0.04	390.43 ± 8.92

A much weaker activity was calculated for ferric reduction. The peptide mixture exhibited a much lower FRAP activity than red cabbage (51.53 mmol Fe²⁺/kg) or red currant (44.86 mmol Fe²⁺/kg). This may be related to the small content of serine in the proposed peptides, whose hydroxyl group takes part in the reduction of metal ions. The significant differences in the values obtained with the free radical scavenging method and the FRAP method may be also caused by the differences in the reaction conditions. As suggested by Zou et al. [52], the effectiveness of the antioxidant method yielding high values of Trolox or ascorbic acid equivalents is related to the different underlying mechanism between the evaluation assays even for the same composition. It has been shown that an appropriate selection of antioxidant assays is highly correlated not only with the amino acid sequence but also with optimal reaction conditions.

3.6. Antibacterial Activity

The mechanism of action of the antimicrobial peptides involves binding to the cell membrane through an electrostatic attraction between the cationic residues of the peptides and anionic components or local lipids of the outer membrane. The antimicrobial peptides act on both Gram (+) and Gram (−) bacteria [18]. The EYPe mixture at the concentration of 50 mg/mL inhibited the growth of the studied strains (Table 8). Strong inhibition was detected in Gram (+) bacteria, while Gram (−) bacteria were less peptide-sensitive. Smaller inhibition zones were observed at the concentration of 25 mg/mL. These properties result from the presence of the sequences DSYEHGGEF, HVDLDEVANKLA, and FEDPERQESS-RKE, which were identified to be responsible for antibacterial activity (Table 6).

Similar results were observed by Pellegrini et al. [53], who found that Gram (+) *Bacillus* strains were highly susceptible to the action of peptides digested by trypsin and chymotrypsin. Simultaneously, they reported a weak bactericidal activity of the peptides against Gram (−) bacteria. The antimicrobial activity of egg yolk peptides was also described by Panchan et al. [54]. They fractionated peptides from pepsin-hydrolyzed egg yolks and identified 13 peptides with antibacterial activity, which inhibited the growth of *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Salmonella typhimurium*. The growth of these species of bacteria is also effectively inhibited by plant extracts, which (like peptides), appear to be a good alternative to antibiotics especially as natural agents to prevent and control food-poisoning diseases [55].

Table 8. Antimicrobial activity of EYPe mixtures (average \pm standard deviation, mm).

No.	Strain	Gram	Inhibition Zone [mm]	
			EYPe [50 mg/mL]	EYPe [25 mg/mL]
1.	<i>Bacillus cereus</i> 1	(+)	20.0 \pm 1.0	10.7 \pm 0.6
2.	<i>Bacillus cereus</i> 2	(+)	15.0 \pm 1.0	9.0 \pm 1.0
3.	<i>Bacillus megaterium</i>	(+)	13.7 \pm 0.6	9.7 \pm 0.6
4.	<i>Bacillus pasteurii</i>	(+)	12.0 \pm 1.0	9.3 \pm 0.6
5.	<i>Lactaris rhizophila</i>	(+)	11.7 \pm 0.6	7.7 \pm 0.6
6.	<i>Serratia liquefaciens</i>	(-)	12.3 \pm 0.6	8.3 \pm 0.6
7.	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(-)	9.3 \pm 0.6	8.0 \pm 1.0
8.	<i>Hafnia alvei</i>	(-)	9.3 \pm 0.6	9.0 \pm 1.0
9.	<i>Acinetobacter radioresistans</i>	(-)	8.7 \pm 0.6	7.7 \pm 0.6
10.	<i>Streptopneumones melleophilus</i>	(-)	8.7 \pm 0.6	7.7 \pm 0.6

4. Conclusions

The findings of the present study suggest that the proposed egg yolk peptide mixture may exhibit a number of pro-health properties. The peptides can function as a natural antioxidant given the high values obtained in the DPPH (1776.66 \pm 32.99 mg AA/100 g) and ABTS (390.43 \pm 8.92 mmol Trolox/kg) assays, which are comparable with those for well-known nutritional compounds considered as antioxidants. The antimicrobial properties of the EYPe have also been confirmed (the greatest against Gram (+) bacteria—*B. cereus* 1 with the value of 20.0 \pm 1.0 mm at the concentration of 50 mg/L), which means that the peptides, which were proven to be potentially effective, can be used as a natural alternative to preserve food stuff and avoid the health hazards posed by chemical antimicrobial agents. The analysis of the MALDI-TOF/MS spectra revealed potential antioxidant peptide sequences (YPWTQR, ITMIAPSAI, DSYEHGGEP, VVSGPYIVY, QQGVFQGT, KIQMTEEQK, LMSYMWSTSM, HVDLDEVANKIA, YINQMPQKSRE, FGVTYTHFGQDT-SAG, FEDPERQESSRKE, PTIQKVGWGGEGQIQ, YIEAVNKVSPRAGQ), which should be thoroughly investigated in the future.

Author Contributions: Conceptualization, T.C.; methodology, K.G.; formal analysis, M.J.; investigation, N.W., A.W. (Agata Wilk) and K.M.; writing—original draft preparation, M.C.; writing—review and editing, J.W.; supervision, A.W. (Adam Waśko). All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Implementation PhD VKT/DW/2/2020.

Data Availability Statement: The data used to support the findings of this study can be made available by the corresponding author upon request.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

- Gobbetti, M.; Stepaniak, L.; De Angelis, M.; Corsenti, A.; Di Cagno, R. Latent Bioactive Peptides in Milk Proteins: Proteolytic Activation and Significance in Dairy Processing. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2002**, *42*, 223–239. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
- Silvestre, M.P.C. Review of methods for the analysis of protein hydrolysates. *Food Chem.* **1997**, *60*, 263–271. [\[CrossRef\]](#)
- Sernadi, B.H.; Ismail, A. Antioxidative peptides from food proteins: A review. *Peptides* **2010**, *32*, 1949–1956. [\[CrossRef\]](#)
- Bao, Z.; Zhao, Y.; Wang, X.; Chi, Y.-J. Effects of degree of hydrolysis (DH) on the functional properties of egg yolk hydrolysate with alkalase. *J. Food Sci. Technol.* **2017**, *34*, 669–678. [\[CrossRef\]](#)
- Zambowicz, A.; Dębska, A.; Bobak, L.; Szczęsny, M. Egg yolk proteins and peptides with biological activity. *Postępy Hig. Med. Dom.* **2014**, *68*, 1524–1529. [\[CrossRef\]](#)
- Hartmann, R.; Meisel, H.; Hartmann, R.; Meisel, H. Food-derived peptides with biological activity: From research to food applications. *Curr. Opin. Biotechnol.* **2007**, *18*, 163–169. [\[CrossRef\]](#)
- Boschin, G.; Scigliuolo, G.M.; Rosta, D.; Arnoldi, A. ACE-inhibitory activity of enzymatic protein hydrolysates from lupin and other legumes. *Food Chem.* **2014**, *145*, 34–40. [\[CrossRef\]](#)

8. Omuh, J.O.; Girgih, A.T.; Akisu, R.R.; Allom, M. In vitro antioxidant properties of chicken skin enzymatic protein hydrolysates and membrane fractions. *Food Chem.* **2014**, *150*, 366–373. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
9. Kimata, B.M.; Zhao, L.; Bao, Y.; Ma, G.; Yang, W.; Pei, Y.; Hu, Q. Antioxidant potential of edible mushroom (*Agaricus bisporus*) protein hydrolysates and their ultrafiltration fractions. *Food Chem.* **2017**, *230*, 58–67. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
10. Eckert, E.; Zambrowicz, A.; Pokora, M.; Setner, B.; Dąbrowska, A.; Szoltyś, M.; Szewczuk, Z.; Polanowski, A.; Trziszka, T.; Chrzanowska, J. Egg-yolk protein by-product as a source of ACE-inhibitory peptides obtained with using unconventional proteinase from Asian pumpkin (*Cucurbita ficifolia*). *J. Proteom.* **2014**, *110*, 107–116. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
11. Lara, A.; Pinedas, B.; Diaz, M. A method of egg-yolk fractionation. Characterization of fractions. *Food Hydrocol.* **2010**, *24*, 434–443. [\[CrossRef\]](#)
12. Mine, Y.; Kovacs-Nolan, J. New insights in biologically active proteins and peptides derived from hen egg. *World Poult. Sci. J.* **2008**, *62*, 87–99. [\[CrossRef\]](#)
13. Roslan, J.; Yusof, K.F.M.; Abdullh, N.; Kamsal, S.M.M. Characterization of Fish Protein Hydrolysate from Tilapia (*Oreochromis niloticus*) by-Product. *Agric. Agric. Sci. Proc.* **2014**, *2*, 312–319. [\[CrossRef\]](#)
14. Wang, G.; Wang, T. Egg yolk protein modification by controlled enzymatic hydrolysis for improved functionality. *Int. J. Food Sci. Technol.* **2009**, *44*, 763–769. [\[CrossRef\]](#)
15. Ito, N.; Fukushima, S.; Tsuda, H. Carcinogenicity and Modification of the Carcinogenic Response by bha, Bht, and Other Antioxidants. *CRC Crit. Rev. Toxicol.* **1988**, *23*, 109–150. [\[CrossRef\]](#)
16. Liu, R.; Xing, L.; Pu, Q.; Zhou, C.; Zhang, W. A Review of Antioxidant Peptides Derived from Meat Muscle and By-Products. *Antioxidants* **2016**, *5*, 32. [\[CrossRef\]](#)
17. Zambrowicz, A.; Pokora, M.; Setner, B.; Dąbrowska, A.; Szoltyś, M.; Babić, K.; Szewczuk, Z.; Trziszka, T.; Lubic, G.; Chrzanowska, J. Multifunctional peptides derived from an egg yolk protein hydrolysate: Isolation and characterization. *Antiox. Antic.* **2015**, *47*, 369–380. [\[CrossRef\]](#)
18. Li, W.; Separovic, F.; O'Brien-Simpson, N.M.; Wade, J.D. Chemically modified and conjugated antimicrobial peptides against superbugs. *Chem. Soc. Rev.* **2021**, *50*, 4932–4973. [\[CrossRef\]](#)
19. Yamamoto, Y.; Soga, N.; Iwano, R.; Miyamoto, T. Antioxidant effect of egg yolk on linoleate in emulsions. *Agric. Biol. Chem.* **1990**, *54*, 3099–3104.
20. King, M.F.; Boyd, L.C.; Sheldon, B.W. Antioxidant properties of individual phospholipids in a salmon oil model system. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1992**, *69*, 545–551. [\[CrossRef\]](#)
21. Sugino, H.; Ishikawa, M.; Nitoda, T.; Koketsu, M.; Junjo, L.R.; Kim, M.; Yamamoto, T. Antioxidative Activity of Egg Yolk Phospholipids. *J. Agr. Food Chem.* **1997**, *45*, 551–554. [\[CrossRef\]](#)
22. Lee, S.K.; Han, J.H.; Decker, E.A. Antioxidant Activity of Phosvitin in Phosphatidylcholine Liposomes and Meat Model Systems. *J. Food Sci.* **2002**, *67*, 37–41. [\[CrossRef\]](#)
23. Lu, C.-L.; Baker, R.C. Characteristics of Egg Yolk Phosvitin as an Antioxidant for Inhibiting Metal-Catalyzed Phospholipid Oxidations. *Poultry Sci.* **1986**, *65*, 2085–2070. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
24. Sakuraba, S.; Kitahata, K.; Miyaya, T.; Gutierrez, M.A.; Loraño, L.R. Protein quality determination of delipidated egg-yolk. *J. Food Compos. Anal.* **2000**, *13*, 773–781. [\[CrossRef\]](#)
25. Davies, M.G.; Thomas, A.J. An investigation of hydrolytic techniques for the amino acid analysis of foodstuffs. *J. Sci. Food Agric.* **1973**, *24*, 1525–1540. [\[CrossRef\]](#)
26. Scheam, E.; Moore, S.; Bigwood, E.J. Chromatographic determination of cystine as cysteic acid. *Biochem. J.* **1954**, *51*, 33–37. [\[CrossRef\]](#)
27. Thies, N.J.; Ardenson, S.; Gledemeyer, B. Crude fat, hexanes extraction, in feed, cereal grains, and forage (Randall/socic/submersion method): Collaborative study. *J. AOAC Int.* **2003**, *86*, 899–908. [\[CrossRef\]](#)
28. Jehlich, N.; Golański, C.; Murr, A.; Salazar, G.; Dhople, V.M.; Hammer, E.; Völker, U. Comparative evaluation of peptide desalting methods for salivary proteome analysis. *Chin. Chem. Lett.* **2014**, *45*, 16–20. [\[CrossRef\]](#)
29. Benzie, L.F.F.; Strain, J.J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power": The FRAP Assay. *Anal. Biochem.* **1996**, *239*, 70–76. [\[CrossRef\]](#)
30. Blois, M.S. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* **1958**, *181*, 1199–1200. [\[CrossRef\]](#)
31. Floegel, A.; Kim, D.-O.; Chung, S.-J.; Koo, S.L.; Chun, O.K. Comparison of ABTS/DPPH assays to measure antioxidant capacity in popular antioxidant-rich US foods. *J. Food Compos. Anal.* **2011**, *24*, 1043–1048. [\[CrossRef\]](#)
32. Kosikowska, U.; Stepien-Pysniak, D.; Orza, D.; Wernicki, A.; Malm, A. Identification of *Bacillus* spp. colonizing the nasal mucosa of healthy adults living in the suburban area using the matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF MS) system. *Curr. Issues Pharm. Med. Sci.* **2014**, *27*, 137–141. [\[CrossRef\]](#)
33. Pokora, M.; Eckert, E.; Zambrowicz, A.; Bobak, L.; Szoltyś, M.; Dąbrowska, A.; Chrzanowska, J.; Polanowski, A.; Trziszka, T. Biological and functional properties of proteolytic enzyme-modified egg protein by-products. *Food Sci. Nutr.* **2013**, *1*, 184–195. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
34. Altia, Y.A.; Al-Harbi, M.A.; Korish, M.A.; Sidsoob, M.H. Protein and Amino Acid Content in Four Brands of Commercial Table Eggs in Retail Markets in Relation to Human Requirements. *Antibiot* **2020**, *20*, 406. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
35. Adeyeye, E.I.; Anifado, M.K.O. Nutritional Qualities of the Amino Acid profile of the Yolk and Albumen of Chicken (Hen) Egg. *BioSci. Biotechnol. Res. Asia* **2011**, *8*, 483–490. [\[CrossRef\]](#)

36. Jung, Y.; Noh, S.K.; Koo, S.I. Egg Phosphatidylcholine Decreases the Lymphatic Absorption of Cholesterol in Rats. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2358–2363. [\[CrossRef\]](#)
37. Chay Pak Ting, B.P.; Mine, Y.; Juneja, L.R.; Okubo, T.; Gauthier, S.F.; Poulet, Y. Comparative Composition and Antioxidant Activity of Peptide Fractions Obtained by Ultrafiltration of Egg Yolk Protein Enzymatic Hydrolysates. *Meat Science* **2003**, *1*, 149–161. [\[CrossRef\]](#)
38. Jung, S.; Murphy, P.A.; Johnson, L.A. Physicochemical and Functional Properties of Soy Protein Substrates Modified by Low Levels of Protease Hydrolysis. *J. Food Sci.* **2005**, *70*, C180–C187. [\[CrossRef\]](#)
39. Lamsal, B.P.; Reitmeyer, C.; Murphy, P.A.; Johnson, L.A. Enzymatic hydrolysis of extruded-extruded soy flour and resulting functional properties. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **2006**, *83*, 731–737. [\[CrossRef\]](#)
40. Severin, S.; Xia, W.S. Enzymatic hydrolysis of whey proteins by two different proteases and their effect on the functional properties of resulting protein hydrolysates. *J. Food Biochem.* **2006**, *30*, 77–97. [\[CrossRef\]](#)
41. Sathivel, S.; Beshel, P.J.; Babbitt, J.; Sealley, S.; Crapo, C.; Reppond, K.D.; Prinyasawatkul, W. Biochemical and Functional Properties of Herring (*Clupea harengus*) Byproduct Hydrolysates. *J. Food Sci.* **2003**, *68*, 2196–2200. [\[CrossRef\]](#)
42. Kong, X.; Zhou, H.; Qian, H. Enzymatic hydrolysis of wheat gluten by proteases and properties of the resulting hydrolysates. *Food Chem.* **2007**, *102*, 799–783. [\[CrossRef\]](#)
43. Eckert, E.; Pokora, M.; Zambrowicz, A.; Szoltyś, M.; Dąbrowska, A.; Chrzanowska, J.; Trziszka, T. The application of microbial proteases to obtain egg yolk protein hydrolysates with antioxidant and antimicrobial activity. *Zywn. Nauk. Technol. J.* **2013**, *1*, 105–118. [\[CrossRef\]](#)
44. Young, D.; Fan, M.Z.; Mine, Y. Egg Yolk Peptides Up-regulate Glutathione Synthesis and Antioxidant Enzyme Activities in a Porcine Model of Intestinal Oxidative Stress. *J. Agric. Food Chem.* **2010**, *58*, 7624–7633. [\[CrossRef\]](#)
45. Groszkiewicz, A.; Zefaroka, M.; Trziszka, T.; Polanowski, A. Antioxidative capacity of hydrolysates of hen egg proteins. *PL J. Food Nutr. Sci.* **2007**, *4*, 195–199.
46. Minkiewicz, P.; Iwaniak, A.; Dorewicz, M. BIOPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 5978. [\[CrossRef\]](#)
47. Memarpoor-Yazdi, M.; Mahaki, H.; Zare-Zardini, H. Antioxidant activity of protein hydrolysates and purified peptides from zizyphus jujube fruits. *J. Funct. Foods* **2013**, *5*, 62–70. [\[CrossRef\]](#)
48. Eckert, E.; Zambrowicz, A.; Bobak, I.; Zablocka, A.; Chrzanowska, J.; Trziszka, T. Production and Identification of Biologically Active Peptides Derived from By-product of Hen Egg Yolk Phospholipid Extraction. *Int. J. Pept. Res. Ther.* **2018**, *25*, 669–680. [\[CrossRef\]](#)
49. Delgado, M.C.O.; Gallardo, M.; Arias, M.C.; Tirón, V.A. Amaranth, Peptides from Simulated Gastrointestinal Digestion: Antioxidant Activity Against Reactive Species. *Plant Foods Hum. Nutr.* **2015**, *70*, 27–34. [\[CrossRef\]](#)
50. Shuib, I.C.; Wu, T.K.; Fang, T.J. Antioxidant properties of a new antioxidative peptide from algae protein waste hydrolysate in different oxidation systems. *Bioresour. Technol.* **2009**, *150*, 3419–3425. [\[CrossRef\]](#)
51. Pellegrini, N.; Serafini, M.; Colombi, B.; Del Rio, D.; Salvatore, S.; Bianchi, M.; Brighenti, F. Total Antioxidant Capacity of Plant Foods, Beverages and Oils Consumed in Italy Assessed by Three Different In Vitro Assays. *J. Nutr.* **2003**, *133*, 2812–2819. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
52. Zou, Y.; Chang, S.K.C.; Gu, Y.; Qian, S.Y. Antioxidant Activity and Phenolic Compositions of Lemil (*Leucaulopsis* var. *Morion*) Extract and Its Fractions. *J. Agric. Food Chem.* **2011**, *59*, 2268–2276. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
53. Pellegrini, A.; Hölzlmeier, A.J.; Hanzlker, P.; Thomas, U. Proteolytic fragments of ovalbumin display antimicrobial activity. *Biochim. Biophys. Acta* **2004**, *1672*, 76–85. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)
54. Pinchan, T.; Tian, F.; Thumana, K.; Redong, S.; Yongsawatdigul, J. Isolation, identification, and mode of action of antibacterial peptides derived from egg yolk hydrolysate. *Poultry Sci.* **2023**, *102*, 102995. [\[CrossRef\]](#)
55. Mostafa, A.A.; Al-Aaskar, A.A.; Almatary, K.S.; Dawsoud, T.M.; Sholkamy, E.N.; Bakri, M.M. Activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. *Saudi J. Biol. Sci.* **2018**, *25*, 361–366. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#)

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

Article

Whey Protein Hydrolysates: Production, Properties, and Biological Activities

Michał Czelej ^{1,2}, Katarzyna Garbacz ^{1,2}, Tomasz Czernecki ³, Kamila Rachwał ², Jacek Wawrzykowski ^{3*} and Adam Waśko ²

¹ Bodelve Innovation Sp. z o.o., Debrzarskiego 3, 20-202 Lublin, Poland

² Department of Biotechnology, Microbiology and Human Nutrition, Faculty of Food Science and Biotechnology, University of Life Sciences in Lublin, Skromna 8, 20-704 Lublin, Poland

³ Department of Biochemistry, Faculty of Veterinary Medicine, University of Life Sciences in Lublin, Akademicka 12, 20-033 Lublin, Poland

* Correspondence: wawrzykowski@ul.lublin.pl

Abstract: Several studies confirm the potential of milk proteins as a source of bioactive peptides. To release peptides from the inactive form in which they are encrypted in the native protein sequence, it is necessary to use the hydrolysis process. Among various methods, the use of enzymes offers great potential due to the favourable conditions associated with this process. Bioactive peptides are still a relevant current research topic, especially concerning their antimicrobial, antioxidant, antihypertensive, and anticancer effects. The implementation of different enzymes and hydrolysis reaction conditions facilitates the acquisition of diverse peptide profiles from the same matrix, which, in turn, provides opportunities to obtain new bioactive compounds with desirable functional effects. This study focuses on obtaining whey protein hydrolysates using pepsin, trypsin, and papain and establishing the degree of whey hydrolysis achieved by these enzymes and their antioxidant activity. Papain showed the highest degree of hydrolysis (33% after 3 hours of the process) and high antioxidant activity; therefore, it was selected for further investigation. Using LC-MS, peptides contained in whey protein hydrolysate obtained using papain were identified, and a range of potential biological activities was assigned to their sequences. The antibacterial and antioxidant activity of the peptides was confirmed by *in vitro* analyses.

Keywords: protein hydrolysis; whey protein; biological activity of peptides; LC-MS identification of peptides

Citation: To be added by editorial staff during production

Academic Editor: Pierluigi Lanzetta

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date



Copyright: © 2024 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Whey is referred to as a protein fraction separated during the acid or enzymatic treatment of dairy products during the cheese or casein manufacturing process. It can be considered a by-product, accounting for approximately 85–90% of milk volume, but due to its nutritional and health-promoting values, it can be exploited for the production of dietary supplements or nutraceuticals [1, 2]. This co-product contains soluble milk components, including proteins, lipids, lactose, polyphenols, minerals, and vitamins [3]. β-Lactoglobulin, α-lactalbumin, bovine serum albumin, and immunoglobulins are the most abundant proteins contained in whey. Lactoferrin, lactoperoxidase, and proteosapoptone are represented in lower quantities. Whey proteins also include glycomacropeptide released during plasmin-mediated hydrolysis and present only in sweet whey [4]. Whey proteins are widely used in the food industry due to their composition and properties. These proteins have high solubility and a globular conformation and are susceptible to heat denaturation. In its unprocessed form, however, despite its high nutritional value, whey is an unattractive product to consume due to the high dilution of its ingredients and its perishability [2]. Various approaches and techniques for processing whey have therefore emerged. One

approach is to obtain hydrolysates. Through the use of hydrolysis, it is possible to obtain peptides from whey that can exhibit various biological activities [5]. The main methods are chemical hydrolysis, enzymatic hydrolysis, and the use of fermentation or physical processes as a means of production of bioactive peptides from whey proteins. A widely used process, on account of its low cost and simplicity of application, is chemical hydrolysis. The chemical hydrolysis process employs acidic or basic compounds that, when acting on proteins, lead to the production of free peptides and amino acids. The process results in a mixture of peptides with a variable chemical composition, but its negative effect is the presence of toxic residues in some cases. The process itself is characterised by relatively low yields, and its shortcomings include the temperature and pH conditions used and the application of strong chemicals and solvents, which adversely affect the nutritional and functional properties of the peptides obtained [6]. Another technique widely employed to acquire peptides from whey is enzymatic hydrolysis [7]. The process utilises enzymes with specific properties that correspond to the optimal conditions for the hydrolysis process (e.g. reaction time, temperature, and pH) [3]. The key enzymes employed to obtain bioactive peptides from whey are gastrointestinal enzymes (pepsin, pepsinogen, trypsin, chymotrypsin), enzymes of plant origin (e.g. papain, bromelain, actinidin), and proteolytic microorganisms or microbial proteases (e.g. proteases from lactic acid bacteria and flavourzyme from *Aspergillus oryzae*) [6, 8]. The fermentation process utilises the proteolytic activity of microorganisms, while physical processes involve e.g. microwaves or ultrasound [9].

Bioactive peptides released from whey proteins during their hydrolysis can exhibit a wide spectrum of properties. Literature reports indicate that milk proteins can be a source of peptides with antimicrobial, antihypertensive, antidiabetic, antioxidant, immunomodulatory, anticancer, cytoprotective, mineral chelating, osteanabolic, hypocholesterolemic, opioid, antithrombotic, and anti-inflammatory activities. There is therefore great interest in developing efficient ways of acquiring these peptides for use in the production of functional foods, nutraceuticals, and therapeutic agents. In some countries, products enriched with whey-derived bioactive peptides are starting to be commercially available, e.g. supplements containing bioactive peptides from whey with potential therapeutic use due to their antihypertensive/antidiabetic (HilmarTM 8390), relaxing and sleep-inducing (PravenlinTM), or anti-inflammatory (NOP-47TM) effects. A dietary supplement based on bioactive whey peptides to support the treatment of psoriasis (DermylesTM) is also available [6].

There are still few functional foods on the market containing bioactive whey peptides to enrich the daily diet with health-promoting substances. The use of bioactive peptides derived from food proteins in the development of functional foods is a highly relevant current topic. Functional products containing bioactive compounds with proven health-promoting properties are of increasing interest; hence, research into new ways of obtaining such bioactive peptides to be incorporated into food products holds considerable potential. Considering the great potential of whey as a source of bioactive peptides, this work attempts to obtain new bioactive peptides via enzymatic hydrolysis of whey, identify the peptides using the LC-MS technique, and evaluate the properties of these peptides. The knowledge of the efficient production and properties of these peptides will allow the development of novel food, nutraceutical, or therapeutic products in the future.

2. Materials and Methods

2.1. Materials

Commercial bovine whey protein isolate (84 % protein content) was purchased from BioTechUSA LTD. The amino acid composition of the product is shown in the table below (Table 1).

Table 1. Amino acid content [mg] in 100 g of WPI used in the study.

Essential Amino Acids [mg]	Conditionally Essential Amino Acids [mg]	Nonessential Amino Acids [mg]
Histidine 1500	Arginine 2008	Alanine 3836
Isoleucine 4712	Cysteine 2552	Aspartic acid 8564
Leucine 8680	Glutamine and glutamic acid 17208	Glycine 1428
Methionine 1880	Proline 4424	Serine 3804
Phenylalanine 2556	Tyrosine 2384	
Threonine 5176		
Tryptophan 1368		
Valine 4564		

2.2. Preparation of whey hydrolysates

To acquire peptides from whey proteins, enzymatic hydrolysis was applied. At this stage, three different enzymes were used for hydrolysis: pepsin (from porcine gastric mucus, 2400 units/mg protein, P7125, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), papain (from papaya latex crude powder, 1.5–10 units/mg solid, P3375, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), and trypsin (from bovine pancreas, lyophilised powder, 210,000 BAEE units/mg protein, T1426, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA), with the aim of selecting the enzyme with the best degree of hydrolysis and allowing peptides with the highest antioxidant activity to be obtained. The protein isolate was dissolved in MilliQ water, pre-heated, and the pH of the solution was then adjusted to the optimum value for the action of the individual enzymes, i.e. 3.0, 6.0, and 8.0 for pepsin, papain, and trypsin, respectively. Enzymatic hydrolysis was performed for 3 h, with constant stirring at an enzyme/substrate ratio of 1:10 (w/w), at 37°C for pepsin and trypsin and 70°C for papain. The reaction was stopped by heating the mixture to 100°C for 15 minutes. Subsequently, the hydrolysate was cooled to 37°C and centrifuged at 3000 × g for 30 minutes. The resulting supernatant was lyophilised and stored at 4°C for further analysis (the degree of hydrolysis and antioxidant activity were determined for each variant).

2.3. Determination of degree of hydrolysis

The degree of hydrolysis was established by quantifying the soluble peptides present in the mixture at different time points from the start of the hydrolysis process (time 0, 0.5, 1, 2, and 3 h). For this purpose, 500 µL of the hydrolysate was taken at the indicated time intervals and immediately mixed with 10% trichloroacetic acid in a ratio of 1:1 (v/v). The samples were further incubated for 15 minutes at room temperature, followed by centrifugation (5500 × g, 10 minutes). To determine the concentration of soluble peptides in the supernatant, a spectrophotometric method was used, measuring absorbance at 280 nm.

96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122

The degree of hydrolysis was calculated as the percentage of soluble peptides to the total protein amount in the mixture. 121
124

2.4. Determination of antioxidant potential 125

The antioxidant activity of the peptides was determined as previously described in 126
Czelej et al. [10], employing the ABTS, DPPH, and FRAP assays. Samples were prepared 127
by mixing 10 mg of hydrolysate in 1 ml of deionised water (5 min, 15 Hz, Retsch Mixer 128
MM400, Haan, Germany). The samples were centrifuged for 3 min (15°C, 33 000 × g, Het- 129
tich 32R centrifuge, Tuttlingen, Germany) and the supernatant was used for further anal- 130
ysis. 131

The Ferric Reducing Antioxidant Power (FRAP) of the whey peptides was assessed using 132
a 10 mmol/L solution of 2,4,6-Tris(2-pyridyl)-s-triazine (TPTZ) diluted in 40 mmol/L HCl 133
combined with 20 mmol/L of $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$ and acetate buffer (300 mmol/L, pH 3.6) at a 134
1:1:10 (v:v:v) ratio. 50 μL of the samples containing the peptide solution was mixed with 135
150 μL of FRAP reagent, mixed, and incubated for 5 min at 25°C. Afterwards, the absorb- 136
ance was read at 593 nm (using a Marcel 6330 spectrophotometer, Zielonka, Poland) 137
against a blank sample (containing water instead of the peptide sample). Reducing anti- 138
oxidant power was assessed by reference to a standard curve established using trolox 139
standards. 140

The free radical-scavenging activity was evaluated using the stable radical 1,1-diphenyl- 141
2-picrylhydrazyl (DPPH). 50 μL of aliquots of the peptide solution was mixed with 150 142
 μL of a methanolic DPPH solution. The samples were incubated in the dark at 25°C for 60 143
minutes with shaking. The absorbance of the samples was measured spectrophotometri- 144
cally at 517 nm against a blank sample. The antioxidant activity of the peptides was eval- 145
uated by comparison to a standard curve plotted for trolox standards. 146

The Radical Cation Decolourisation Activity was assayed using 2,20'-azino-bis(3- 147
ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS^{•+}). The ABTS^{•+} working solution was pre- 148
pared by mixing an equal volume of 7 mM ABTS and 2.4 mM potassium persulfate in 149
deionised water and allowed to stand for 16 h until the measurements. The resulting 150
working solution was diluted with PBS until the absorbance reached 0.7 at $\lambda=734$ nm. 50 151
 μL of working solution was added to 1 mL of the peptide mixture sample, and the absor- 152
bance of the samples was measured at 734 nm relative to the blank. 153

2.5. Antibacterial activity 154

The antimicrobial activity of whey peptides was evaluated using the well-diffusion 155
assay. The study involved 8 bacterial strains previously obtained from rotten fruits and 156
vegetables (*Bacillus* sp., *Bacillus cereus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus*, *Staphylococcus* 157
capitis, *Exiguobacterium aurantiacum*, *Brevundimonas diminuta*, and *Rhizobium radiobacter*) 158
[10]. The bacterial strains were cultured in Mueller-Hinton broth (Biomaxima, Lublin, Po- 159
land) at 37°C for 24 h. Then, 100 μL of the bacterial culture was applied to Petri dishes with 160
Mueller-Hinton agar each and spread over the surface. Subsequently, 8 mm diameter 161
wells were cut in the medium. 70 μL of the test peptides at a concentration of 50 mg/ml 162
was added to the wells. The plates were incubated for 24 hours at 37°C, followed by the 163
measurement of bacterial growth inhibition zones around the wells. 164

2.6. Identification and characterisation of bioactive peptides by LC-MS 165

For the identification of peptides, 3 mg of each sample after papain hydrolysis was 166
reconstituted in 400 μL of 100 mM ammonium bicarbonate buffer. The peptides were fil- 167
tered through a Vivacore 30 kDa molecular weight cut-off filter (Sartorius Stedim Biotech, 168
Goettingen, Germany). The samples were analysed using an LC-MS system composed of 169
the Evosep One HPLC System (Evosep Biosystems) coupled to an Orbitrap Explorer 480 170
mass spectrometer (Thermo Scientific). 100 μL of the peptide solution was loaded onto 171
Evotips Pure C18 disposable trap columns according to manufacturer's instructions. The 172

peptides were fractionated for 88 min with a predefined Evosep gradient at a flow rate of 220 nL/min on an analytical column (Dr Maisch C18 AQ, 1.9 µm beads, 150 µm ID, 15 cm long, Evosep Biosystems). The data-dependent acquisition parameters were as follows: top 40 precursors selected for MS2 analysis, collisional induced fragmentation NCE 30%, spray voltage 2.1 kV, funnel RF level 40, and heated capillary temperature 275°C. Full MS scans covered the mass range of 300–1800 *m/z* with a resolution of 60000, a maximum injection time set to Auto, and a normalised AGC target to 300%. MS2 scans were acquired with a resolution of 15000, an Auto maximum injection time, and a Standard AGC target. The ion isolation window was set to 1.6 *m/z*, the dynamic exclusion was set to 20 s, and a minimum intensity threshold was 5e3.

Raw data were pre-processed with Mascot Distiller (version 2.8, Matrixscience) and peptides/proteins were identified with the Mascot suite (version 2.8, Matrixscience) after offline mass recalibration with MScan (version 3.0, <http://proteom.fhb.waw.pl/mScan>). The search parameters were as follows: enzyme – None, variable modifications – Oxidation (M), max missed cleavages – 2, fragment ion tolerance – 0.01 Da, parent ion tolerance set individually after recalibration within range 7–11 ppm. The database always included popular contaminants (common Repository of Adventitious Proteins - (cRAP), 115 sequences, 86853323495 residues). Species-specific database: *Bos taurus* (47245 sequences) from Uniprot (accessed 02_2023).

The biological activity of the obtained peptides was analysed based on their amino acid sequences, utilising the BIOPEP-UWM database [11].

3. Results and Discussion

3.1. Degree of hydrolysis (DH) of whey proteins by various enzymes

Since enzyme activity plays an important role in protein hydrolysis, in the first stage of the study, enzymatic hydrolysis of whey proteins was performed using three different enzymes and the same enzymatic reaction conditions (selected after preliminary optimisation, data not shown). Previously, various commercial proteases have been successfully tested for the production of bioactive hydrolysates from milk, including whey proteins. In this work, reactions catalysed by trypsin, pepsin, and papain were selected for the analysis. For each of the variants, the degree of hydrolysis was determined at different time points. Figure 1 represents the effect of enzyme specificity and reaction time on the degree of hydrolysis (DH). It was demonstrated that among the three enzymes used in our study, whey proteins hydrolysed with papain after a 3-h reaction showed significantly higher DH values than whey hydrolysed with trypsin and pepsin. The degree of hydrolysis rates were 15%, 22%, and 33% for trypsin, pepsin, and papain, respectively (Figure 1). Thus, the highest efficiency of the enzymatic reaction assessed by the ratio of released peptides to total protein content was recorded when hydrolysis with papain was used (DH 33% after 3 h). It is also noteworthy that already a half-hour reaction allowed a high degree of whey protein hydrolysis to be achieved.

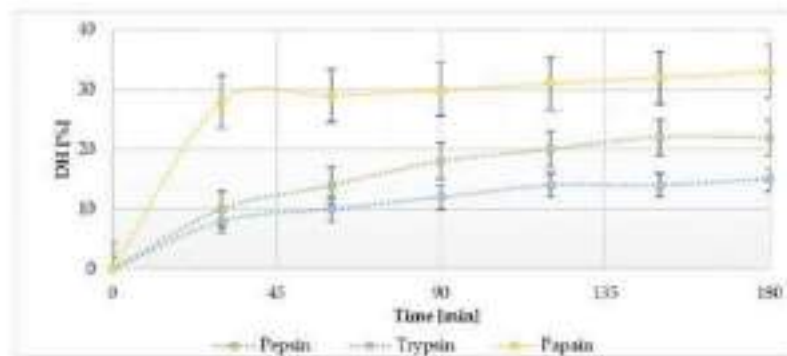


Figure 1. Degree of hydrolysis [%] of whey proteins by pepsin, trypsin, and papain at different time points.

A different enzymatic digestion process yields different quantities and types of peptides from the same food matrix. The selection of a particular enzyme to catalyze protein hydrolysis is guided by evaluation of its selectivity and available literature data indicating its applicability. In this study, the most commonly used gastrointestinal enzymes, i.e. pepsin and trypsin, were used for hydrolysis. Additionally, they were selected considering literature data suggesting that they are capable of generating peptides with dipeptidyl peptidase IV (DPPIV) and angiotensin-converting enzyme (ACE) inhibitory activity [12, 13] and bactericidal [14], antihypertensive, antioxidant [15], and cytoprotective [16] properties. In recent years, research has also been conducted to obtain bioactive whey protein peptides using enzymes of plant origin. Previously, it was reported that plant-derived proteases (cardosins A and B, papain, bromelain, and ficin) could be used to obtain peptides with ACE inhibitory activity [17, 18]. Therefore, papain was also selected for this study. This enzyme was also a good candidate due to its certain advantages, such as faster rates and mild processing conditions [19]. Its application makes it possible to reduce production costs and improve yield/productivity. In addition, papain has a narrow pH range of action (5–7), but an attractive feature is its activity over a broad temperature range, including higher temperatures (<90 °C) [20].

Literature studies involving the hydrolysis of whey have shown quite different levels of hydrolysis for the different enzymes used. This is related to the fact that the efficiency of enzymatic hydrolysis of whey proteins depends on such factors as the type of enzyme and substrate, their ratio, hydrolysis conditions, and mixing conditions [21]. For example, in a study conducted by Wang et al. [14], whey protein hydrolysis was performed using three different enzymes. A significantly lower degree of hydrolysis was observed in variants with three-hour hydrolysis with papain (DH $9.3 \pm 0.3\%$), while better results were obtained for samples hydrolysed with alkalase (6 h, DH $32.2 \pm 2.5\%$) and trypsin (4 h, DH $25.2 \pm 1.7\%$). However, the reaction times and the temperature applied differed. Also Kaur et al. [20] observed lower levels of whey protein hydrolysis using papain (DH of 17.69%), while very similar results to those obtained in this work (DH of 32.28%) were shown by Du et al. [22] in their study.

3.2. Antioxidant properties of peptides obtained via enzymatic hydrolysis of whey proteins

In the next step, the antioxidant properties of whey hydrolysates obtained via enzymatic hydrolysis involving pepsin, trypsin, and papain were determined (Table 2). Given the increasing incidence of civilisation diseases, interest in the antioxidant properties of food products has recently increased. Antioxidant properties relate to the ability of certain molecules to neutralise excessive amounts of free oxygen radicals in the body, which are responsible for cell damage and are linked to the occurrence of diseases. Two categories

212
213
214

215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231

232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243

244
245
246
247
248
249
250

of methods are used to determine antioxidant activity: the reduction of metal ions to lower-oxidation ions by the antioxidant under investigation (FRAP) and the ability to scavenge stable free radicals (ABTS, DPPH). The analyses conducted in this study showed significant antioxidant potential of all the hydrolysates obtained (Table 2).

Table 2. Antioxidant potential of peptides obtained via enzymatic hydrolysis of whey proteins.

Enzyme treatment	ABTS [eq trolox $\mu\text{mol/g}$]	FRAP [eq trolox $\mu\text{mol/g}$]	DPPH [eq trolox $\mu\text{mol/g}$]
Pepsin	297.44 \pm 24.11	16.22 \pm 2.03	4.87 \pm 0.22
Trypsin	361.96 \pm 31.02	19.68 \pm 1.5	1.75 \pm 0.03
Papain	527.36 \pm 25.13	17.56 \pm 2.16	3.56 \pm 0.17

The assessment of ABTS⁺ cation radical scavenging activity is the most commonly used method to measure the antioxidant activity of food ingredients. Among the hydrolysates obtained in the three-hour reaction with different enzymes, the highest activity was recorded for whey proteins digested with papain (527.36 \pm 25.13 [eq trolox $\mu\text{mol/g}$]), followed by trypsin and pepsin (361.96 \pm 31.02 and 297.44 \pm 24.11, respectively).

Owing to its simplicity, short analysis time, and relatively high accuracy and reproducibility of results, an assay based on testing the reactivity of the DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical with the sample is one of the most widely used methods for measuring the scavenging potential of peptides. It is used to measure the total antioxidant potential of food products. The results of the DPPH assay of whey hydrolysates extracted with different enzymes revealed the highest free radical scavenging potential of the formula obtained using trypsin (19.68 \pm 1.5 [eq trolox $\mu\text{mol/g}$]). This capacity using papain and pepsin was slightly lower (17.56 \pm 2.16 and 16.22 \pm 2.03, respectively).

The FRAP method measures antioxidant capacity based on the effect of antioxidants contained in the sample on the rate of reduction of ferric iron (III)/ferricyanide complex to ferrous iron (II). In our study, this assay indicated the highest reducing potential of the whey hydrolysate prepared using pepsin catalysis (4.87 \pm 0.22 [eq trolox $\mu\text{mol/g}$]), while a slightly lower value was observed for the hydrolysate prepared using papain (3.56 \pm 0.17). The hydrolysate obtained using trypsin had the lowest antioxidant potential in this study (1.75 \pm 0.03).

The differences observed in the free radical-reducing activity of whey hydrolysates prepared with the use of different enzymes may be attributable to the specificity of the enzyme to the particular site in the peptide chain. It is also linked to the DH of the constituent proteins, which ultimately produce a hydrolysate containing different amino acid compositions [23]. The DH and the enzymes used to catalyse the hydrolysis have a crucial role in the establishment of the reducing power of protein hydrolysates. The observed differences in the antioxidant activity between the tested protein hydrolysates can be associated with the specific amino acid profile of the peptides [24]. The amino acid sequence also has a significant impact on the potency of the antioxidant activity of peptides due to the variations in the activity of individual amino acids related to differences in the side chain structure. The activity is attributed to easily oxidised groups: the indole group in tryptophan, the imidazole group in histidine, the thiol in cysteine, the phenolic hydroxyl group in tyrosine, and thioether in methionine [25]. In their study, Ohashi et al. [26] showed that tyrosine-containing tripeptides exhibited higher antioxidant activity against the hydrophilic radical ABTS compared to histidine-containing tripeptides, suggesting an essential role of tryptophan and tyrosine residues in the determination of radical scavenging activity. The tripeptides tested showed weak scavenging activity against the hydrophobic

DPPH radical, and their antioxidant activity against linoleic acid peroxidation showed high correlations with ABTS assays and low correlations with FRAP and DPPH assays [26]. This explains the differences in antioxidant potential assay results observed in this work.

3.3. Antibacterial activity of whey peptides

At this stage of the study, only the whey hydrolysate produced with the use of papain was subjected to analysis. It was selected based on the highest degree of hydrolysis and strong antioxidant activity.

The effect of whey peptides on the growth of eight bacterial isolates, previously obtained from spoilage food, was investigated. Zones of growth inhibition were a measure of the antimicrobial activity of the whey hydrolysates. Growth inhibition zones around the well with whey-derived peptides were observed for four of the bacterial strains tested (*Bacillus* sp., *Bacillus megaterium*, *Staphylococcus capitis*, *Rhizobium radiobacter*) (Table 3). The highest antibacterial activity was observed against *Bacillus* sp. with an inhibition zone of 11 mm. No growth inhibition was detected for *B. cereus*, *B. pumilus*, *E. aurantiacus*, and *B. diminuta*. These results indicate a selective inhibitory impact of peptides contained in the whey hydrolysates on the growth of some bacterial strains. The observed effect can be attributed to the ability of bacteria, including *Bacillus* spp., to secrete extracellular proteases that are capable of inactivating antibacterial peptides [27].

Table 3. Antimicrobial activity of whey peptides hydrolysed with the use of papain.

Bacterial species	G(+)/G(-)	Growth inhibition zone [mm]
<i>Bacillus</i> sp.	G(+)	11
<i>Bacillus cereus</i>	G(+)	0
<i>Bacillus megaterium</i>	G(+)	8
<i>Bacillus pumilus</i>	G(+)	0
<i>Staphylococcus capitis</i>	G(+)	10
<i>Erzqobacterium aurantiacus</i>	G(+)	0
<i>Brevondimomas diminuta</i>	G(-)	0
<i>Rhizobium radiobacter</i>	G(+)	9

Many previous studies have shown that the enzymatic hydrolysis of whey proteins results in the release of antimicrobial peptides, which are encrypted in whey proteins. The positive effect of papain enzymatic hydrolysis on antimicrobial activity has previously been shown for papain hydrolysates of e.g. buffalo and camel milk whey proteins [28–30].

The peptides derived from β -lactoglobulin degradation, including the AASDISLLDAQSAPLR peptide identified in this study, are responsible for the identified antimicrobial activity of the hydrolysate. Potentially, this effect may also have been attributable to the presence of other sequences in the obtained peptides derived from the hydrolysis of β -lactoglobulin, i.e. VAGTWY, VLVDIDYK, and IPAVFK with antimicrobial activity, which were previously identified by Pellegrini et al. [31]. The presence of antimicrobial peptides in the hydrolysate suggests that the addition of these peptides to food products may have an inhibitory impact on the growth of some undesirable bacteria present in food.

3.4. Identification of peptides derived from whey and their predicted biological activity

Following the hydrolysis methodology involving papain and the conditions described above, 107 peptides were extracted and identified. The LC-MS analysis identified peptides of varying lengths from 7 to 27 amino acids. A detailed list of all the identified peptide sequences, including information on proteins from which they are derived and the biological activities of the peptides determined from data available in databases and predicted from the sequences, is presented in Table S1.

Depending on the enzymatic reaction conditions used, in particular the type of enzyme, peptides with different molecular weights are obtained after hydrolysis of whey proteins. The final composition and the amino acid sequence determine the bioactivity of the resulting hydrolysate. In our study, more than one type of predicted biological activity was assigned to each peptide. It is common for a single peptide to have more than one function due to the interconnection of metabolic pathways controlling specific functions. In addition, some peptides may serve as signalling molecules and thus exert effects at a systemic level.

Based on the peptide sequences obtained using LC-MS, the biological activities of several of the peptides were identified after a database search. These include zinc binding peptides such as VEELKPTPEGDLEIL and ELKPTPEGDLEIL derived from β -lactoglobulin digestion. Previous studies have shown that peptides can react with zinc ions to form chemically stable and soluble chelates. They are involved in elemental transport and can prevent zinc from interacting with various compounds, e.g. phytic acid, in the gastrointestinal tract. Zinc peptide chelates can be used as a new route of supplementing the human body with zinc, since the zinc present in such a chelate can enter the body in the peptide absorption mode [32]. Such zinc-binding peptides may have valuable nutritional applications as zinc carriers in the diet to increase the bioavailability and bioaccessibility of this element. Furthermore, peptides possessing zinc ligands are pharmacologically relevant as zinc-dependent enzyme inhibitors, useful in controlling inflammatory diseases [33].

The APPEVF peptide derived from α -S1-casein digestion has also been identified. It is known for its application in the prevention and treatment of pathological conditions associated with alpha-glucosidase [34, 35]. The databases also provided information on the activity of peptides obtained during the hydrolysis of whey with the use of β -casein, i.e. VYFFGPIH, LVYFFGPIH, and YFFGPIPS. The VYFFGPIH peptide has been reported as an inhibitor of prolyl endopeptidase (PEP) activity, which has been linked to neurodegenerative disorders.

PEP inhibitors are regarded as agents that can reverse memory loss induced by amnesic compounds [36]. LVYFFGPIH has been identified as an ACE inhibitor, which exerts anti-hypertensive effects, whereas YFFGPIPS is known as β -casomorphin-11, which belongs to the opioid receptor agonists. Bioactive peptides from this family are capable of binding to and activating opioid receptors located in various regions of the body (including the immune system, the gastrointestinal tract, and potentially the central nervous system) and may differentially affect such processes as immunosuppression, gastrointestinal nutrient absorption, opioid signalling, hyperglycaemia, and oxidative stress [37, 38].

The analysis of the predicted activity of other peptides indicates that they may exert a variety of beneficial physiological effects, including lowering blood pressure, preventing cardiovascular disease, hypolipidemic effects, maintaining glucose homeostasis, regulating stomach mucosal membrane activity, having an impact on the nervous system, and acting as anti-diabetic, anti-cancer, anti-inflammatory, immunomodulatory, antimicrobial, antioxidant, and osteoanabolic agents.

Previous studies have shown that the milk proteome includes peptides that are inactive in the native protein but, when released, constitute biologically active peptides that can interact with relevant receptors and regulate physiological functions in the body. They can exhibit diverse biological activities. Peptides released from whey proteins have

328

329

330

331

332

333

334

335

336

337

338

339

340

341

342

343

344

345

346

347

348

349

350

351

352

353

354

355

356

357

358

359

360

361

362

363

364

365

366

367

368

369

370

371

372

373

374

375

376

377

378

379

380

381

proven anti-hypertensive (ACE inhibitors), antioxidant, anti-cancer, and cognitive and memory-enhancing effects [20].

Antioxidant and antimicrobial activities are considered to be the main common features of biologically active peptides. In the present study, 16 peptides potentially responsible for the observed antimicrobial activity of the hydrolysate were identified. In turn, 58 of peptides derived from whey digestion are potentially associated with *in vitro*-confirmed antioxidant activity. Antioxidant activity has also been linked to the prevention of cancer. Among the peptides identified, there were also 12 indicating potential anticancer activity. Peptides with annotated activities, such as the protein associated with Myc (PAM) inhibitor, the DPP-III inhibitor, and the regulator of phosphoglycerate kinase activity can also be proposed to exert anticancer effects. Peptides with immunomodulatory and anti-inflammatory effects (including the aminopeptidase inhibitor Xaa-Pro and the DPP-III inhibitor) may have more generalised body-level functions, also partly related to cancer prevention and immunity.

One of the most common biological activities of peptides is the inhibition of the angiotensin converting enzyme (ACE), which in *in silico* analyses was attributed to all the peptides obtained in this work. This effect involves inhibition of the angiotensin-converting enzyme, which converts angiotensin I (AT I) into angiotensin II (AT II), in effect reducing blood levels of ATII, which in excess constricts the vessels, causing an increase in blood pressure. It was previously reported that several milk- and whey-derived peptides exert high *in vitro* ACE inhibitory activity (IIP peptides, LVITQ, IAAE, LVYFPF) [39]. Among the peptides identified in this work, APFFPEVF was previously predicted to have ACE inhibitory activity [40].

In addition to hypotensive peptides, blood pressure lowering and anti-atherosclerotic effects are also attributed to peptides with CaMPE (Calmodulin-dependent cyclic nucleotide phosphodiesterase) inhibitor, DPP-III inhibitor and renin inhibitor activity, and also partially to peptides stimulating vasoactive substance release. Regarding the prevention of cardiovascular disease, peptides with a hypolipidemic effect are also partly associated with this function. This effect is attributed to peptides with HMG-CoA reductase inhibitor activity. In our work, the *in silico* analyses indicated that one of the identified peptides (RELKDLKGYGGV5) may exhibit such activity. By inhibiting the HMGCR activity, these peptides lower the rate of cholesterol biosynthesis [41, 42].

In contrast to the aforementioned activities, among the predicted activities of the peptides shown in the *in silico* analyses, anti-diabetic, antiviral, anti-sclerotic, and gut mucosa regulating activities are considered particularly unique [43]. Several groups of peptide activities are associated with antidiabetic potential and maintenance of glucose homeostasis. Of the anticipated activities attributed to the peptides identified in this study, peptides with potential DPP IV inhibitor and alpha-glucosidase inhibitor activity as well as stimulating glucagon-like peptide 1 release and regulator of phosphoglycerate kinase may exhibit such effects. Regarding peptides with antiviral activity, the study identified 17 peptides that were found to have aminopeptidase Xaa-Pro inhibitor activity, which may provide an antiretroviral effect. Equally noteworthy is the group of peptides with predicted effects on the nervous system. These include peptides with potential neuropeptide, opioid, anxiolytic, and β -casomorphin-5 butyrylcholinesterase inhibitor activity.

4. Conclusions

Nowadays, food-derived proteins can be considered not only for their nutritional value but also as a potential source for the identification of bioactive peptide sequences. In this study, whey was selected as the matrix due to its protein content, which offers significant potential for the extraction of bioactive peptides. The article describes the hydrolysis of whey proteins and the identification of peptides released during the enzymatic reaction together with their biological activity. The paper shows that the high efficiency of the enzymatic hydrolysis process can be achieved using papain and a relatively high

reaction temperature (70°C). As a result, 107 different peptide sequences were obtained and identified using the LC-MS technique. Through the application of newly designed enzymatic hydrolysis reaction conditions, most of the identified peptide sequences represent new peptides that were not previously described or deposited in databases. Based on *in silico* analyses, the peptide sequences were associated with a wide range of predicted biological activities. In addition, the antioxidant activity of the whey hydrolysates and their selective antimicrobial activity were confirmed by *in vitro* assays. The research presented in this work has yielded a large amount of data regarding new peptides that can be extracted from whey proteins and their potential biological activity. The data confirmed that the hydrolysates obtained could potentially be employed in the development of functional foods and beverages, dietary supplements, or nutraceuticals. The data acquired in this research opens the field for continuation in order to confirm the activity predicted in the *in silico* and *in vitro* experiments. Also, there is a further need to verify their bioavailability and properties in *in vivo* studies to gain a full understanding of their health effects. Following more detailed studies, it might be feasible to exploit the presented peptides for pharmaceutical applications.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: www.mdpi.com/xxx/s1, Table S1: The identified peptide sequences derived via pepsin-catalysed hydrolysis of whey proteins, information on proteins from which they are derived and predicted biological activities of the peptides.

Author Contributions: Conceptualization, M.C., J.W. and A.W.; methodology, M.C., T.C.; software, K.G., K.R., T.C.; validation, M.C., J.W., K.G. and A.W.; investigation, M.C., K.R.; writing—original draft preparation, M.C.; writing—review and editing, M.C., J.W., A.W.; visualization, K.G., K.R.; supervision, A.W. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Implementation PhD VKI/EDW/2/2020.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest.

References

1. Yu, Y.-L.; Amorim, M.; Marques, C.; Calhau, C.; Pintado, M. Effects of whey peptide extract on the growth of probiotics and gut microbiota. *JFF* **2016**, *21*, 507–516.
2. Brandelli, A.; Darot, D.J.; Coimbra, A.P.F. Whey as a source of peptides with remarkable biological activities. *Food Res Int* **2015**, *73*, 149–161. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.03.016>.
3. Zhao, C.; Ashaolu, T.J. Bioactivity and safety of whey peptides: LWT – Food Sci Tech **2020**, *136*, 109935. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109935>.
4. Mahaving, A.R.; Pereira, C.I.; Gomes, A.M.P.; Pintado, M.E.; Xavier Malcata, F. Bovine whey proteins – Overview on their main biological properties. *Food Res Int* **2007**, *40*(10), 1197–211. DOI: [10.1016/j.foodres.2007.07.005](https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.005).
5. Madadiou, A.; Abbaspourad, A. Bioactive whey peptide particles: An emerging class of nutraceutical carriers. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2018**, *58*, 1468–1477. DOI: [10.1080/10408398.2016.1264064](https://doi.org/10.1080/10408398.2016.1264064).
6. Olvera-Bosales, L.B.; Cruz-Guerrero, A.E.; Garcia-Garibay, J.M.; Gómez-Ruiz, L.C.; Costerres-López, E.; Guzmán-Rodríguez, F.; González-Olivares, L.G. Bioactive peptides of whey: obtaining, activity, mechanism of action, and further applications. *Crit Rev Food Sci Nutr* **2023**, *63*, 10351–10381. DOI: [10.1080/10408398.2022.2079113](https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2079113).
7. Silla, A.; Bougatf, A. Antioxidant peptides from marine by-products: Isolation, identification and application in food systems. A review. *JFF* **2016**, *21*, 10–26. DOI: [10.1016/j.jff.2015.11.007](https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.11.007).
8. Li, J.; Hartinger, C.; Zhu, F. Physicochemical properties of infant formula model emulsions stabilised by different whey protein hydrolysates and characteristics of interfacial peptides. *Food Hydrocol* **2023**, *140*, Article 109035. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.109035>.
9. Saadi, S.; Saari, N.; Arwar, F.; Hamid, A.A.; Ghazali, H.M. Recent advances in food biopeptides: Production, biological functionalities and therapeutic applications. *Biochem Adv* **2015**, *33*, 80–116.
10. Czelej, M.; Czerniecki, T.; Garbacz, K.; Wawrzyłowski, J.; Jamiel, M.; Michalak, K.; Walczak, N.; Wilk, A.; Wańko, A. Egg Yolk as a New Source of Peptides with Antioxidant and Antimicrobial Properties. *Foods* **2023**, *12*(18), 3384. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12183384>.

11. Minkiewicz, P.; Iraniak, A.; Dzierżewicz, M. BCIPEP-UWM Database of Bioactive Peptides: Current Opportunities. *IJMS* **2019**, *20*, 5978. DOI:10.3390/ijms20235978. 487-488
12. Jia, C. L.; Hussain, N.; Joy Ujirghere, O.; Peng, X. Y.; Zhang, S. W.; Lu, J.; Liu, L.; & Lv, J. P. Generation and characterization of dipeptidyl peptidase-IV inhibitory peptides from trypsin-hydrolyzed α -lactalbumin rich whey proteins. *Food Chem* **2020**, *318*, 126333. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126333>. 489-491
13. Chatterjee, A.; Karawajla, S. K.; Khetra, Y.; Saini, P. Discordance between in silico & in vitro analyses of ACE inhibitory & antioxidative peptides from mixed milk tryptic whey protein hydrolysate. *J Food Sci Tech* **2018**, *51*(9), 5621–5630. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13197-018-1669-z>. 492-494
14. Wang, R.; S. He, Y.; Xian, C.; Chang. Preparation and characterization of whey protein hydrolysates-Zn complexes. *J Food Man Charact* **2020**, *11* (1), 254–61. DOI: 10.1007/s11694-019-00287-1. 495-496
15. Gimóni, C.; J. A. Lovagrove, D. I. Greco, R. Robeaud, L. Pinotti, E. Mattioli, G. Tedeschi, T. S. Santarone, and A. Bahi. In vitro-digested milk proteins: Evaluation of angiotensin-1-converting enzyme inhibitory and antioxidant activities, peptidomic profile, and mucin gene expression in HT29-mtx cells. *J Dairy Sci* **2019**, *102* (12), 16760–71. DOI: 10.3168/jds.2019-16833. 497-500
16. Ballarín, M. B.; M. d R. Bettel, N. L. Vanden Braber, C. A. Aminahuel, Y. E. Rossi, G. Petroselli, R. Erra-Balsells, L. R. Cavallari, and M. A. Morozzogo. Antioxidant and cytoprotective effect of peptides produced by hydrolysis of whey protein concentrate with trypsin. *Food Chem* **2020**, *319*, 126472. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.126472. 501-503
17. Estévez, N.; P. Facillos, C. Facillos, P. Jauregi, C. A. Tovar, and M. L. Rúa. Hydrolysis of whey protein as a useful approach to obtain bioactive peptides and a β -lg fraction with different biotechnological applications. *Food Hydrocol* **2020**, *109*, 106095. DOI: 10.1016/j.foodhyd.2020.106095. 504-506
18. Peslerbes, M.; Fellenberg, A.; Jardin, J.; Deglaire, A.; Ibáñez, R. A. Manufacture of Whey Protein Hydrolysates Using Plant Enzymes: Effect of Processing Conditions and Simulated Gastrointestinal Digestion on Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity. *Food* **2022**, *11*(16), 2429. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11162429>. 507-509
19. Peslerbes, M.; Fellenberg, A.; Jardin, J.; Deglaire, A.; & Ibáñez, R. A. Manufacture of Whey Protein Hydrolysates Using Plant Enzymes: Effect of Processing Conditions and Simulated Gastrointestinal Digestion on Angiotensin-I-Converting Enzyme (ACE) Inhibitory Activity. *Food* **2022**, *11*(16), 2429. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods11162429>. 510-512
20. Kaur, S.; Vasiljevic, T.; Huppertz, T. Milk Protein Hydrolysis by Actinidin—Kinetic and Thermodynamic Characterisation and Comparison to Bromelain and Papain. *Food* **2023**, *12*(23), 4248. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12234248>. 513-514
21. Kondala, N.; Bednarska, M.; Adamczak, M. Health-promoting properties of bioactive peptides (BAP) in dairy products—biotechnological and medical aspects. *Med Og Nauk Zdr* **2021**, *27*(2), 107–116. DOI: <https://doi.org/10.26444/medog/135343>. 515-516
22. Du, X.; Jing, H.; Wang, L.; Huang, X.; Wang, X.; Wang, H. Characterization of structure, physicochemical properties, and hypoglycemic activity of goat milk whey protein hydrolysate processed with different proteases. *LWT - Food Sci Tech* **2022**, *158*, Article 113257. DOI: 10.1016/j.lwt.2022.113257. 517-519
23. Kumar, D.; Chotli, M.K.; Singh, S.; Mehta, N.; Kumar, F. Antioxidant and antimicrobial activity of camel milk casein hydrolysates and its fractions. *Small Rumin Res* **2016**, *139*, 20–25. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.smallruminres.2016.03.002>. 520-521
24. Wu, H.C.; Chen, H.M.; Shiao, C.Y. Free amino acids and peptides as related to antioxidant properties in protein hydrolysates of mackerel (*Scomber australicus*). *Food Res Int* **2003**, *36*(9–10), 949–957. DOI: 10.1016/S0963-9969(03)00104-2. 522-523
25. Masael, R.; Honda, R.; Kawano, M.; Hagiwara, A.; Matsuda, Y.; Togiani, T.; Kemoto, N.; Terashima M. Designing antioxidant peptides based on the antioxidant properties of the amino acid side-chains. *Food Chem* **2018**, *245*, 750–753. DOI: 10.1016/j.foodchem.2017.11.119. 524-525
26. Ohashi, Y.; Osumi, R.; Naganuma, T.; Ogura, T.; Naude, R.; Nokihiro, K.; Muramoto, K. Antioxidant properties of tripeptides revealed by a comparison of six different assays. *Food Sci Technol Res* **2015**, *21*(5), 695–704. DOI: <https://doi.org/10.3136/istr.21.695>. 526-529
27. Thwaitte, J.E.; Hibbs, S.; Tobell, R.W.; Atkins, T.P. Proteolytic Degradation of Human Antimicrobial Peptide LL-37 by *Bacillus anthracis* May Contribute to Virulence. *Antimicrob Agents* **2006**, *30*, No. 7. DOI: <https://doi.org/10.1128/aac.01488-05>. 530-531
28. Abdel-Hamid, M.; Gada, H.A.; De Gobbi, C.; Janssen, H.; Osman, A. Antibacterial activity of papain hydrolyzed camel whey and its fractions. *Int Dairy J* **2016**, *61*, 91–98. DOI: 10.1016/j.idairy.2016.04.004. 532-533
29. Salami, M.; Moosavi-Movahedi, A. A.; Ehsani, M. R.; Yousefi, R.; Haestlé, T.; Choibert, J. M.; Raavi, S. H.; Henrich, R.; Balafout, S.; Ebadi, S. A.; Pourfakhdost, S.; & Niazari-Naslaji, A. Improvement of the antimicrobial and antioxidant activities of camel and bovine whey proteins by limited proteolysis. *J agric food chem* **2010**, *58*(8), 3297–3302. DOI: <https://doi.org/10.1021/jf903328j>. 534-536
30. Moghanalakshmi, S.; Vinodh Kumar, S. Antibacterial activity of papain hydrolysates of buffalo milk whey milk whey protein against mastitis pathogens. *IJPRS* **2013**, *4*, 1133–1138. 537-539
31. Pellegrini, A.; Dentling, C.; Thomas, U.; Hanzlík, P. Isolation and characterization of four bactericidal domains in the bovine β -lactoglobulin. *IFA - Gen Subjects* **2001**, *1526*, 131–140. DOI: 10.1016/S0044-4160(01)00116-7. 540-541
32. Fu, T.; Zhang, S.; Sheng, Y.; Feng, Y.; Jiang, Y.; Zhang, Y.; Yu, M.; Wang, C. Isolation and characterization of zinc-binding peptides from mung bean protein hydrolysates. *Eur Food Res Technol* **2020**, *246*, 113–124. DOI:10.1007/s00217-019-00367-8. 542-543
33. Udechukwu, M.C.; Dang, C.; Udemejwa, C.C. Identification of zinc-binding peptides in ADAM17-inhibiting whey protein hydrolysates using IMAC-Zn²⁺ coupled with shotgun peptidomics. *Food Prod Process Nutr* **2021**, *3*, 5. DOI: <https://doi.org/10.1186/s43014-020-00048-4>. 544-546

34. Maagard T, Bordenave-Juchereau S, Piot JM, Ben-Henda Y, Sirvent P, Peltier S. Compositions for preventing and/or treating pathological conditions associated with alpha-glucosidase. 2018. Patent Pub. No.: US 2018 / 019030 A1. 547
35. Maagard T, Bordenave-Juchereau S, Piot JM, Ben-Henda Y, Sirvent P, Peltier S. Compositions for preventing and/or treating pathological conditions associated with alpha-glucosidase. 2019. Patent Pub. No.: US 10,500,245 B2. 548
36. Hsieh, C.-H., T.-Y. Wang, C.-C. Hwang, Y.-L. Hsieh, and K.-C. Hsu. Isolation of prolyl endopeptidase inhibitory peptides from a sodium caseinate hydrolysate. *Food Funct* **2016**, *7* (1), 565–73. DOI: 10.1039/c5fo01262g. 549
37. Meisel, H., Frieler, H. Chemical characterization of bioactive peptides from *in vivo* digests of casein. *J Dairy Res* **1989**, *56*(3), 343–9. DOI: 10.1017/s002202990028788. 550
38. de Vasconcelos, M.L., Oliveira, L.M.F.S., Hill, J.P., Vidal, A.M.C. Difficulties in Establishing the Adverse Effects of β -Caseomorphin-7 Released from β -Casein Variants—A Review. *Foods* **2023**, *12*(17):3151. DOI: <https://doi.org/10.3390/foods12173151>. 551
39. Chamata, Y., Watson, K.A., Jauregi, P. Whey-Derived Peptides Interactions with ACE by Molecular Docking as a Potential Predictive Tool of Natural ACE Inhibitors. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*(3):864. DOI: 10.3390/ijms21030864. 552
40. Fitzgerald, R.J., Cermeño, M., Khalesi, M., Kleekayak, T., Amigo-Benavent, M. Application of *in silico* approaches for the generation of milk protein-derived bioactive peptides. *FF* **2020**, *64*, Article 103636. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.iff.2019.103636>. 553
41. Bansal, A.B., Cassagnol, M. HMG-CoA Reductase Inhibitors. In: *StatPearls* [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2024. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK542212/>. 554
42. Pak, V.V., Koo, M., Kwon, D.Y., Yun, I. Design of a highly potent inhibitory peptide acting as a competitive inhibitor of HMG-CoA reductase. *Antise Acids* **2012**, *43*(5):2015–2025. DOI: 10.1007/s00726-012-1276-0. 555
43. Maestri, E., Pavlovic, M., Montorsi, M., Marmiroli, N. Meta-Analysis for Correlating Structure of Bioactive Peptides in Foods of Animal Origin with Regard to Effect and Stability. *CFSFS* **2019**, *18*(1), 3–30. DOI: <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12432>. 556

Disclaimer/Publisher's Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content. 571

Lublin, 27.09.2024 r.

Oświadczenie autorów publikacji

Niniejszym oświadcza się, że publikacja:

Czelej M., Garbacz K., Czernecki T., Wawrzykowski J., Waśko A. (2022) "Protein hydrolysates derived from animals and plants – a review of production methods and antioxidant activity", Foods 11 (13), 1953

powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

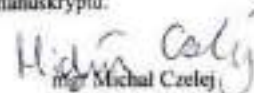
mgr Michał Czelej – opracowanie koncepcji artykułu przeglądowego, gromadzenie i interpretacja danych literaturowych, przygotowanie wersji roboczej i finalnej manuskryptu, przygotowanie i redagowanie odpowiedzi na recenzje, pełnienie roli autora korespondencyjnego;

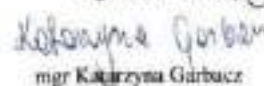
mgr Katarzyna Garbacz – współudział w opracowaniu koncepcji artykułu przeglądowego, współudział w gromadzeniu i interpretacji danych literaturowych, współudział w przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu;

dr inż. Tomasz Czernecki – współudział w gromadzeniu i interpretacji danych literaturowych, współudział w przygotowaniu wersji roboczej i finalnej manuskryptu;

dr Jacek Wawrzykowski – współudział w opracowaniu koncepcji artykułu przeglądowego, współudział w gromadzeniu i interpretacji danych literaturowych, współudział w przygotowaniu wersji roboczej manuskryptu;

prof. dr hab. Adam Waśko – współudział w opracowaniu koncepcji artykułu przeglądowego, nadzór merytoryczny, współudział w przygotowaniu i zatwierdzenie wersji finalnej manuskryptu.


mgr Michał Czelej


mgr Katarzyna Garbacz


dr inż. Tomasz Czernecki


dr Jacek Wawrzykowski


prof. dr hab. Adam Waśko

Oświadczenie autorów publikacji

Niniejszym oświadczam się, że publikacja:

Czelej M., Czernecki T., Garbacz K., Wawrzykowski J., Jamiol M., Michalak K., Walczak N., Wilk A., Wasiko A. (2023) "Egg yolk as a new source of peptides with antioxidant and antimicrobial properties". *Foods* 12, 3394

powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

mgr Michał Czelej – współtworzenie koncepcji pracy, przeprowadzenie przeglądu i analiza danych literaturowych, przygotowanie materiału do badań i współudział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, archiwizacja i opracowanie uzyskanych wyników, przygotowanie wstępnej wersji roboczej pracy, wizualizacja i przygotowanie wersji finalnej manuskryptu w języku polskim i angielskim, współudział w przygotowaniu i redagowaniu odpowiedzi na recenzje;

dr inż. Tomasz Czernecki – opracowanie koncepcji pracy, współudział w przeprowadzeniu przeglądu i analizie danych literaturowych, współudział w przygotowaniu wstępnej wersji roboczej pracy;

mgr Katarzyna Garbacz – opracowanie metodologii badań, walidacja metod badawczych;

dr Jacek Wawrzykowski – współudział w opracowaniu uzyskanych wyników, przygotowanie wersji finalnej manuskryptu do druku, przygotowanie i redagowanie odpowiedzi na recenzje, pełnienie roli autora korespondencyjnego;

dr Monika Jamiol – przeprowadzenie analizy statystycznej;

dr Katarzyna Michalak – przeprowadzenie analiz laboratoryjnych;

dr Natalia Walczak – przeprowadzenie analiz laboratoryjnych;

dr Agata Wilk – przeprowadzenie analiz laboratoryjnych;

prof. dr hab. Adam Wasiko – współudział w interpretacji uzyskanych wyników, nadzór merytoryczny.

Michał Czelej
mgr Michał Czelej

Tomasz Czernicki
dr inż. Tomasz Czernicki

Katarzyna Górbacz
mgr Katarzyna Górbacz

Jacek Wawrzykowski
dr Jacek Wawrzykowski

Monika Jęmiol
dr Monika Jęmiol

Katarzyna Michalak
dr Katarzyna Michalak

Natalia Walczak
dr Natalia Walczak

Agata Wilk
dr Agata Wilk

Adam Waśko
prof. dr hab. Adam Waśko

Oświadczenie autorów publikacji

Niniejszym oświadczają się, że publikacja:

Czelej M., Garbacz K., Czernecki T., Rachwał K., Wawrzykowski J., Waśko A. (2024)
"Whey protein hydrolysates: Production, properties, and biological activities". Foods 13
– w recenzji

powstała w wyniku poniżej określonego, indywidualnego wkładu pracy współautorów:

mgr Michał Czelej – opracowanie koncepcji pracy, przeprowadzenie przeglądu i analiza danych literaturowych, współudział w opracowaniu metodologii badań, współudział w walidacji metod badawczych, przygotowanie materiału do badań i współudział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, archiwizacja i opracowanie uzyskanych wyników, przygotowanie wstępnej wersji roboczej pracy, przygotowanie wersji finalnej manuskryptu w języku polskim i angielskim, przygotowanie i redagowanie odpowiedzi na recenzje;

mgr Katarzyna Garbacz – obsługa specjalistycznego oprogramowania, walidacja metod badawczych, wizualizacja wersji finalnej manuskryptu;

dr inż. Tomasz Czernecki – opracowanie metodologii badań, obsługa specjalistycznego oprogramowania, współudział w archiwizacji i opracowaniu uzyskanych wyników;

Kamila Rachwał – obsługa specjalistycznego oprogramowania, współudział w przeprowadzeniu analiz laboratoryjnych, wizualizacja wersji finalnej manuskryptu;

dr Jacek Wawrzykowski – współudział w opracowaniu koncepcji pracy, współudział w walidacji metod badawczych, współudział w przygotowaniu wersji finalnej manuskryptu do druku, przygotowanie i redagowanie odpowiedzi na recenzje, pełnienie roli autora korespondencyjnego;

prof. dr hab. Adam Waśko – współudział w opracowaniu koncepcji pracy, współudział w walidacji metod badawczych, współudział w przygotowaniu finalnej wersji pracy i odpowiedzi na recenzje, nadzór merytoryczny.

Michał Czelej
mgr Michał Czelej

Katarzyna Gierbacz
mgr Katarzyna Gierbacz

Tomasz Czerniecki
dr inż. Tomasz Czerniecki

Kamila Rachwał
dr Kamila Rachwał

Jacek Wąrzykowski
dr Jacek Wąrzykowski

Adam Wiśko
prof. dr hab. Adam Wiśko



PROCEDURA PRODUKCJI BIOLGICZNIE AKTYWNYCH PEPTYDÓW Z ŻÓŁTKA JAJA

Spis treści:

1. Zakup i transport surowca wyjściowego, enzymów i odczynników chemicznych niezbędnych do produkcji proteopeptydów.
2. Przyjęcie i przechowywanie surowca wyjściowego oraz odczynników do produkcji proteopeptydów.
3. Wypakowanie surowca wyjściowego.
4. Poddanie surowca wyjściowego procesowi oczyszczania.
5. Przygotowanie odczynników do procesu hydrolizy.
6. Hydroliza oczyszczonego surowca.
7. Zateżanie hydrolizatu.
8. Suszenie zateżonego hydrolizatu.
9. Pakownie uzyskanych proteopeptydów.
10. Przechowywanie powstałego produktu.

Ad 1. Zakup surowca wyjściowego, enzymów i odczynników

W procedurze wytwarzania peptydów wykorzystywane są następujące odczynniki, surowce (jeśli nie zaznaczona o jakości co najmniej spożywczej):

1. Płynne pasteryzowane żółtka jaja kurzego,
 - EggYolk EIPRO-Vermarktung GmbH & Co. KG opakowanie 10 litrów typu worek LDPE w kartonie
2. Papaina,
 - Performase 500 TU MD LD o aktywności proteolitycznej 7,46 mU BAPA/mg (ca. 500 TU/mg)., Bart sp. z o.o. ul. Norwida 4 05-250 Słupno, 20 kg worek aluminiowy, towar pakowany próżniowo
3. Pepsyna,
 - Pepsyna 1:10000 NF/USP - 2000 U/g E.P.), Bart sp. z o.o. ul. Norwida 4 05-250 Słupno, 20 kg worek aluminiowy, towar pakowany próżniowo
4. Etanol,
 - Spirytus 95%, Bartex Bartol Sp z o.o., sp. K. , Paproć 111, 64-300 Nowy Tomyśl , opakowanie karnister HDPE 25L
5. Kwas solny
 - Kwas solny 35-38%, Firma Chempur Oddział Piekary Śląskie Jana Lortza 70A 41-940 Piekary Śląskie, opakowanie karnister HDPE 20L
6. Zasada sodowa.
 - Wodorotlenek sodu granulki, Biomus sp. z o.o. ul. Chemiczna 7 20-329 Lublin, worek 25 kg polietylenowy

Dokumentacja z dostawy, COA przechowywana w formie elektroniczne: [HEKATE\Stany magazynowe + certyfikaty, analizy, karty produktów\Dokumenty do surowców - archiwum\Peptydy żółtkowe](#)

Ad 2. Procedura przyjęcia i przechowywania surowca wyjściowego i odczynników

Po przyjęciu surowców sprawdzić jakość opakowania zbiorczego i opakowań jednostkowych. Zanotować wszystkie niezgodności w protokole przyjęcia odczynników, surowców na stan. W protokole zanotować co najmniej: data przyjęcia, numer serii/partii produkcyjnej, data ważności (minimalnej trwałości), producent, dostawca, identyfikator certyfikatu analizy itp.

Dokumentacja z dostawy, COA przechowywana w formie elektronicznej: [HEKATE\Stany magazynowe + certyfikaty, analizy, karty produktów\Dokumenty do surowców - archiwum\Peptydy żółtkowe](#)

Przyjmowane odczynniki opisać datą dostawy i umieścić w magazynie w warunkach określonych w dokumentach dostawy. W przypadku braku wskazanych warunków przechowywania postępować zgodnie z wytycznymi:

1. Płynne, pasteryzowane żółtka jaja kurzego w lodówce utrzymującej temperaturę 4°C do czasu rozpoczęcia procesu ich oczyszczania, nie dłużej niż 38 dni od daty produkcji
2. Enzymy: papainę i pepsynę w lodówce utrzymującej temperaturę 4°C przez czas nie dłuższy niż zadeklarowana przez producenta data przydatności
3. Etanol w magazynie rozpuszczalników
4. Kwas solny oraz zasadę sodową umieścić w temperaturze otoczenia w magazynie odczynników.

W przypadku przechowywania odczynników/surowców w warunkach chłodniczych skontrolować logger temperatury, zanotować wszystkie odstępstwa (przekroczenie temperatury przechowywania >8°C).

Dokumentacja przechowywana w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

Ad 3. Procedura wypakowania surowca wyjściowego

Wyjąć porcję płynnych, pasteryzowanych żółtek jaja kurzego z lodówki. Odciąć róg kartonu z surowcem wyjściowym i przelać go do pojemnika.

W protokole z produkcji zanotować dane identyfikujące użyte odczynniki. Dokumentacja przechowywana w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

Ad 4. Procedura oczyszczania surowca wyjściowego

Poniższy opis dotyczy oczyszczania 100 litrów żółtka. W zależności od potrzeb wykonać przeliczenie dla większej partii.



Fot. 1. Zbiornik z płaszczem grzejnym i zintegrowanym homogenizatorem o pojemności 300 litrów (fot. M. Czelej)

4.1 W I etapie 100 litrów pasteryzowanego żółtka przelać do pojemnika z mieszadłem o pojemności 300 litów. Uruchomić mieszadło (75 obrotów/min.) i za pomocą pompy (0,5 litrów/min.) dodać 100 litrów 70% etanolu (do rozcieńczeń użyć wody destylowanej) i zhomogenizować przy użyciu homogenizatora do momentu uzyskania jednorodnej mieszaniny (około 25 min.). Po tym czasie uruchomić mieszadło (75 obrotów/min.) i kontynuować proces homogenizacji przez 45 min.

4.2 Po homogenizacji przepompować mieszaninę do wirówki dekantacyjnej. Proces separacji prowadzić przy 4000 x g i przepływie 25 litrów/min. do czasu przetworzenia całości wsadu

Supernatant zawierający etanol oraz frakcje lipidową zebrać i przesłać do procedury odzyskiwania etanolu (destylacji).

Pellet zawierający frakcję białkową przekazać natychmiast do etapu II.

Na pojemnikach zanotować: datę procesu, masę otrzymanego półproduktu.

Dokumentacja z produkcji przechowywać w formie elektronicznej:

[HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

W przypadku konieczności zatrzymania procedury przechowywać półprodukty w warunkach chłodniczych <4°C nie dłużej niż 24 godziny.

4.3. W II etapie oczyszczania do otrzymanego peletu dodać 40% etanol w proporcji wagowej 1:1, zhomogenizować za pomocą homogenizatora. Procedurę prowadzić w pojemniku 300l z mieszadłem.

Po homogenizacji przepompować mieszaninę do wirówki dekantacyjnej. Proces separacji prowadzić przy 4000 xg i przepływie 25 l/min.

Supernatant zawierający etanol oraz frakcje lipidową zebrać i przesłać do procedury odzyskiwania etanolu (destylacji).

Pellet zawierający frakcję białkową przekazać natychmiast do etapu III.

Na pojemnikach zanotować: datę procesu, masę otrzymanego półproduktu.

Dokumentacja z produkcji przechowywać w formie elektronicznej:

[HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

W przypadku konieczności zatrzymania procedury przechowywać półprodukty w warunkach chłodniczych $<4^{\circ}\text{C}$ nie dłużej niż 24 godz..

4.4 W III etapie do uzyskanego peletu dodać 85-90% etanol w stosunku 1 część peletu: 2 części alkoholu, zhomogenizować za pomocą homogenizatora. Procedurę prowadzić w pojemniku 300 litrów z mieszadłem.

Po homogenizacji przepompować mieszaninę do wirówki dekantacyjnej. Proces separacji prowadzić przy $4000 \times g$ i przepływie 25 litrów /min.

Supernatant zawierający etanol oraz frakcje lipidową zebrać i przesłać do procedury odzyskiwania etanolu (destylacji).

Pellet zawierający frakcję białkową przekazać natychmiast do etapu IV.

Na pojemnikach zanotować: datę procesu, masę otrzymanego półproduktu.

Dokumentacja z produkcji przechowywać w formie elektronicznej:

[HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

W przypadku konieczności zatrzymania procedury przechowywać półprodukty w warunkach chłodniczych $<4^{\circ}\text{C}$ nie dłużej niż 24 godziny.

4.5 W IV etapie zważony pelet zhomogenizować za pomocą homogenizatora z wodą destylowaną w proporcji 1:1. Procedurę prowadzić w pojemniku 300 litrów z mieszadłem.

Po homogenizacji przepompować mieszaninę do wirówki dekantacyjnej. Proces separacji prowadzić przy $4000 \times g$ i przepływie 25 litrów /min.

Pellet zawierający frakcję białkową jest produktem do procesu hydrolizy.

W otrzymanym peliecie oznaczyć: zawartość suchej masy przy użyciu wagosurszarki, zawartość tłuszczu metodą CLB/PSO/10/2019 wersja 6 oraz zawartość białka metodą CLB/PSO/13/2019 wersja 3 (punkt 4.5).

Na pojemnikach zanotować: datę procesu, masę otrzymanego półproduktu. Dokumentacja z produkcji przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

Półprodukty (pellet) przechowywać w warunkach chłodniczych $<4^{\circ}\text{C}$ nie dłużej niż 72 godz. W przypadku konieczności dłuższego przechowywania pellet można zamrozić (-

20°C) i przechowywać nie dłużej niż 2 miesiące. Produkt po rozmrożeniu natychmiast zużyć., nie zamrażać powtórnie.

4.6 Analiza otrzymanego pelletu białkowego

Okolo 50 g oczyszczonego żółtka umieścić na szalce Petriego, opisując szalkę symbolem partii na denku szalki i przenieść do lodówki -20°C. Żółtko to zostanie zliofilizowane w celu określenia zawartości tłuszczu wykorzystując metodę Soxhleta. Pozostałą ilość żółtka przenieść do plastikowych pojemników, opisać je symbolem partii, przechowywać w lodówce -20°C do momentu użycia. Ze schłodzonego supernatantu zabrać zestalony tłuszcz. Jeśli widoczne są znaczne ilości osadu supernatant zwirować, a następnie przeznaczyć do destylacji alkoholu, który będzie wykorzystany podczas kolejnego procesu oczyszczania żółtek.

Ad 6. Procedura przygotowania odczynników do procesu hydrolizy

6.1 Procedura przygotowania 6M kwasu solnego

Odmierzyć przy pomocy pompy perystaltycznej z przepływomierzem cylindra 5 l 37% HCl i powoli wlać do 5 litrów wody destylowanej. Procedurę przeprowadzić pod wyciągiem, mieszając roztwór w trakcie rozcieńczania przy użyciu mieszadła laboratoryjnego. W przypadku konieczności użycia większej ilości odczynnika ilości odpowiedni zwiększyć.

Pojemnik opisać: datą wytworzenia, numerem partii użytego surowca, dokumentację z przygotowania odczynników przechowywać w formie elektronicznej:

[HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

Roztwór przechowywać w temperaturze otoczenia przez czas nie dłuższy niż 7 dni.

6.2 Procedura przygotowania 5M zasady sodowej

Odważyć na 2 kg NaOH. Tak przygotowaną naważkę rozpuścić w 10 litrach wody destylowanej. Procedurę przeprowadzić pod wyciągiem, mieszając roztwór w trakcie rozcieńczania przy użyciu mieszadła laboratoryjnego.

Procedurę przeprowadzić pod wyciągiem, mieszając roztwór w trakcie rozcieńczania przy użyciu mieszadła laboratoryjnego. W przypadku konieczności użycia większej ilości odczynnika ilości odpowiedni zwiększyć.

Pojemnik opisać: datą wytworzenia, numerem partii użytego surowca, dokumentację z przygotowania odczynników przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

Roztwór przechowywać w temperaturze otoczenia przez czas nie dłuższy niż 7 dni.

Ad 7. Procedura przeprowadzenia procesu hydrolizy

Poniższy opis dotyczy procesu hydrolizy 135,0 kg oczyszczonego surowca wyjściowego prowadzonego w objętości 600 l wody destylowanej. W zależności od ilości użytego surowca wyjściowego ilości pozostałych składników zmieniają się proporcjonalnie. Procedurę prowadzić w pojemniku reakcyjnym 1000 litrów z grzaniem i mieszadłem.

Przed rozpoczęciem procesy sprawdzić poprawność podłączenia wymiennika ciepła do zbiornika. Sprawdzić szczelność połączeń zbiornika, sprawdzić połączenie zaworów wyrównujących ciśnienie).



Fot. 2. Zbiornik 1000 litrów z płaszczem wodnym i homogenizatorem (fot. M. Czelej)

Pierwszy etap hydrolizy:

- 7.1 Do zbiornika reakcyjnego wlać 250 litrów wody destylowanej. Włączyć grzanie przy nastawie temperatury 70°C (czas stabilizacji temperatury około 45 min.)
- 7.2 Do porcji 10 kg oczyszczonego surowca w pojemniku 100 litrów w dodać 500 litrów wody destylowanej i zhomogenizować przy użyciu homogenizatora do uzyskania jednorodnej mieszaniny. Tak przygotowany surowiec wyjściowy przelać do pojemnika reakcyjnego do zbiornika z wodą destylowaną.
Powtórzyć procedurę z całym surowcem, uzupełnić wodę w zbiorniku reakcyjnym do sumarycznej ilości 600 litrów.
- 7.3 W szklanej zlewce odważyć 460 g papainy Performase 500 TU MD LD.
- 7.4 Sprawdzić pH hydrolizy przy użyciu pH-metru Elmetron CPC-461.

W przypadku gdy odbiega ono od 6 uregulować je przy pomocy 6 mol/dm³ HCl lub 5 mol/dm³ NaOH. Proces prowadzony jest automatycznie przy użyciu kontrolera. Sprawdzić poprawność regulacji pH po każdej dodanej porcji rozpuszczonego białka.

7.5 W momencie gdy hydroliza osiągnie temperaturę 70°C i pH 6 dodać do niej odważkę papainy.

7.6 Proces hydrolizy prowadzić 2 godz.

7.7. Po tym czasie inaktywować enzym doprowadzając hydrolizę do temperatury 100°C utrzymującej się przez 10 min.

7.8 Przepompować roztwór przez wymiennik do osiągnięcia temperatury 37°C. Wydajność pompowania około 50 litrów/min.

Drugi etap hydrolizy:

7.9 Doprowadzić temperaturę hydrolizy do 37°C.

7.10 W szklanej zlewce odważyć 230 g pepsyny

7.11 Sprawdzić pH hydrolizy przy użyciu pH-metru Elmetron CPC461

W przypadku gdy odbiega ono od 3 uregulować je przy pomocy 6M HCl lub 5M NaOH.

Proces prowadzony jest automatycznie przy użyciu kontrolera.

7.12 W momencie gdy hydroliza osiągnie temperaturę 37°C i pH 3 dodać do niej odważkę pepsyny.

7.13 Proces hydrolizy prowadzić 2 godz..

7.14 Po tym czasie inaktywować enzym doprowadzając hydrolizę do temperatury 100°C utrzymującej się przez 10 min.

7.15 Przepompować roztwór przez wymiennik do osiągnięcia temperatury 20°C. Wydajność pompowania około 50 litrów/min.

W trakcie procesu zanotować parametry i naważki w tym: temperaturę procesu, ilość użytych surowców,/odczynników, pH procesu, pochodzenie surowców. Dokumentację z przygotowania odczynników przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

Ad 8. Procedura zateżenia hydrolizatu przy użyciu wyparki

W następnym etapie konieczne jest zateżenie roztworu, aby zwiększyć udział zawartości suchej masy. Dopiero tak przygotowany płyn będzie możliwy do wystudzenia przy użyciu suszarki rozpyłowej (opis w punkcie 9).

8.1 Otrzymany hydrolizat przepompować do wyparki. Jednorazowo 200 litrów.



Fot. 3. Wyparka podciśnieniowa o pojemności 300 litrów z mieszadłem (fot. M. Czelej)

8.2 Ustawić temperaturę 80°C na prawym zbiornik, ustawić ciśnienie na 200 mBar. Sprawdzić poprawność pracy wytwornicy pary. Włączyć mieszadło oraz obieg wody chłodniczej.

8.3 Po ustaleniu żadanego ciśnienia, przy którym zawartość zbiornika delikatnie wrze, (kontrolować przez okienko inspekcyjne), unikać pienienia się.

8.4 Przy każdorazowym korygowaniu ciśnienia w zbiorniku głównym należy otworzyć zawór od pompy, a po jego skorygowaniu zamknąć ten zawór.

8.5 Nie należy doprowadzać do zbyt dużego obniżenia ciśnienia gdyż zawartość zbiornika głównego może gwałtownie zacząć się pienić i zanieczyścić chłodnicę.

8.6 Prowadzić proces do odzyskania około 100 litrów destylatu.

8.7 Po oddestylowaniu partii hydrolizatu roztwór z białkiem przepompować do zbiornika pośredniczącego suszarki i kontynuować z kolejną partią. Destylat można odprowadzać w sposób ciągły pamiętając o wyrównaniu ciśnienia w odbieralniku przed otwarciem zaworu spustowego.

W trakcie procesu zanotować parametry w tym: temperaturę procesu, czas i ciśnienie. Dokumentację z przygotowania odczynników przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

Ad 9. Procedura suszenia zatężonego hydrolizatu przy użyciu suszarki rozpyłowej

Do suszenia rozpyłowego użyto suszarki rozpyłowej Spray Dryer TP-S50 firmy Toption Group Limited



Fot. 4. Suszarka rozpyłowa Spray Dryer TP-S50 firmy Toption Group Limited (fot. M. Czelej)

- 9.1 Przed przystąpieniem do pracy sprawdzić wszystkie połączenia rur i przewodów, a zwłaszcza podłączenie pompy perystaltycznej oraz wylot wentylatora wyciągowego.
- 9.2 Odkręcić zawór wody chłodzącej silnik atomizera
- 9.3 Ustawić wartości: temperatury 210°C, przepływu przez pompę perystaltyczną – 40 ml/min. oraz częstotliwość atomizera – 400 Hz.
- 9.4 Włączyć wentylator [fan] oraz grzanie [heating]. Włączyć atomizer [atomizer].
- 9.5 Gdy temperatura osiągnie zadaną wartość, rozpocząć pobieranie hydrolizatu naciskając przycisk [feeding].
- 9.6 Po zakończeniu suszenia wyłączyć pobór hydrolizatu przyciskiem [feeding] Wyłączyć atomizer i grzanie, wciskając odpowiednio przyciski [atomizer] i [heating]. Po ochłodzeniu do 50°C [inlet temperature] wyłączyć wentylator [fan]. Zakręcić dopływ wody chłodzącej silnik atomizera.
- 9.7 Wyjąć wysuszony produkt ze końcowego zbiornika. Istnieje możliwość opróżniania odbieralnika w trakcie pracy suszarki. W tym celu należy zamknąć zawór odbieralnika i przenieść jego zawartość do pojemnika z produktem. Czynność ta należy wykonać szybko aby uniemożliwić przedostanie się produktu gromadzącego się na zamkniętym zaworze do chłodnicy przed pompą. Po opróżnieniu odbieralnik podłączyć do suszarki i odkręcić zawór (zgromadzony produkt opadnie do odbieralnika).

Pojemnik z produktem szczelnie zamknąć i opisać. Produkt może być przechowywany w temperaturze otoczenia przez 1 rok od daty wytworzenia.

W trakcie procesu zanotować parametry w tym czasie, parametry pracy suszarki (szybkość podawania produktu, szybkość atomizera, temperatury suszenia). W otrzymanym produkcie oznaczyć: suchą masę, zawartość tłuszczu i białka (procedura opisana w punkcie 4e) Dokumentację z procesu suszenia przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

Ad 10. Procedura pakowania produktu końcowego

Otrzymany hydrolizat białkowy pakować do pojemników jednostkowych zgodnie z zamówieniem. Na pojemniku jednostkowym umieścić co najmniej: datę przydatności do spożycia i numer partii (datę produkcji) Dokumentację z pakowania przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy żółtkowe](#)

Z każdej partii zapakowanego produktu wybrać losowo 2 pojemniki i przekazać do archiwum.



Fot. 5. Peptydy żółtkowe – produkt końcowy (fot. M. Czelej)

Ad 11. Procedura przechowywania produktu końcowego

Produkt w pojemnikach jednostkowych i/lub opakowaniach zbiorczych przechowywać w magazynie produktów do czasu wysyłki/odbioru.



PROCEDURA PRODUKCJI PEPTYDÓW Z BIAŁEK SERWATKOWYCH

Spis treści:

1. Dostarczenie surowca wyjściowego, zakup enzymów i odczynników chemicznych niezbędnych do produkcji peptydów serwatkowych.
2. Przechowywania surowca wyjściowego, enzymów i odczynników chemicznych do produkcji peptydów serwatkowych.
3. Procedura porcjowania surowca wyjściowego.
4. Procedura usunięcia laktozy i zagęszczenia surowca wyjściowego.
5. Przechowywanie pozbawionego laktozy surowca.
6. Przygotowanie odczynników do procesu hydrolizy.
7. Hydroliza pozbawionego laktozy surowca.
8. Zatężanie hydrolizatu.
9. Suszenie zatężonego hydrolizatu.
10. Pakownie uzyskanych peptydów serwatkowych.
11. Przechowywanie powstałego produktu.

Ad 1. Dostarczenie surowca wyjściowego, zakup enzymów i odczynników chemicznych

W procedurze wytwarzania peptydów wykorzystywane są następujące odczynniki i surowce (jeśli nie zaznaczona o jakości co najmniej spożywczej):

1. Serwatka sproszkowana,
 - Serwatka słodka w proszku / Sweet whey powder, Polser Sp. z o.o. ul. Włocławska 167 87-100 Toruń, Worek 25kg-papierowy z wkładką foliową LDPE
2. Papaina,
 - Performase 500 TU MD LD o aktywności proteolitycznej 7,46 mU BAPA/mg (ca. 500 TU/mg)., Bart sp. z o.o. ul. Norwida 4 05-250 Słupno, opakowanie 20 kg worek aluminiowy, towar pakowany próżniowo
3. Pepsyna,
 - Pepsyna 1:10000 NF/USP - 2000 U/g E.P,), Bart sp. z o.o. ul. Norwida 4 05-250 Słupno, opakowanie 20 kg worek aluminiowy, towar pakowany próżniowo
4. Kwas solny
 - Kwas solny 35-38%, Firma Chempur Oddział Piekary Śląskie Jana Lortza 70A 41-940 Piekary Śląskie, opakowanie 20 litrowy karnister HDPE
5. Zasada sodowa
 - Wodorotlenek sodu granulki, Biomus sp. z o.o. ul. Chemiczna 7 20-329 Lublin, opakowanie 25kg worek polietylenowy

Dokumentacja z dostawy, COA przechowywana w formie elektronicznej: [HEKATE\Stany magazynowe + certyfikaty, analizy, karty produktów\Dokumenty do surowców - archiwum\Peptydy serwatkowe](#)

Ad 2. Procedura przyjęcia i przechowywania surowca wyjściowego i odczynników

Po przyjęciu surowców sprawdzić jakość opakowania zbiorczego i opakowań jednostkowych. Zanotować wszystkie niezgodności w protokole przyjęcia odczynników, surowców na stan. W protokole zanotować: data przyjęcia, numer serii/partii produkcyjnej, data ważności (minimalnej trwałości), producent, dostawca, identyfikator certyfikatu analizy.

Dokumentacja z dostawy, COA przechowywana w formie elektronicznej: [HEKATE\ Stany magazynowe + certyfikaty, analizy, karty produktów\ Dokumenty do surowców - archiwum\Peptydy serwatkowe - surowce](#)

Przyjmowane odczynniki opisać datą dostawy i umieścić w magazynie w warunkach określonych w dokumentach dostawy. W przypadku braku wskazanych warunków przechowywania postępować zgodnie z następującymi wytycznymi:

1. Suszona serwatka w magazynie surowców sypkich w temperaturze pokojowej do czasu rozpoczęcia procesu ich oczyszczania, po otwarciu przechowywać w temperaturze 4°C.
2. Enzymy: papainę i pepsynę w lodówce utrzymującej temperaturę 4°C.
3. Kwas solny oraz zasadę sodową umieścić w temperaturze otoczenia w magazynie odczynników.

W przypadku przechowywania odczynników/surowców w warunkach chłodniczych skontrolować loger temperatury, zanotować wszystkie odstępstwa (przekroczenie temperatury przechowywania >8°C).

Dokumentacja przechowywana w formie elektronicznej: [HEKATE\ Stany magazynowe + certyfikaty, analizy, karty produktów\ Dokumenty do surowców - archiwum\Peptydy serwatkowe - surowce](#)

Ad 3. Procedura porcjowania surowca wyjściowego

Główny surowiec jest odważany/porcjowany przy użyciu wagi RADWAG PS 10100 R2.M. w takiej ilości, jaka jest przewidziana w bieżącej produkcji.

W protokole z produkcji zanotować dane identyfikujące użyte odczynniki. Dokumentacja przechowywana w formie elektronicznej: [HEKATE\ Stany magazynowe + certyfikaty,](#)

Ad 4. Procedura usunięcia laktozy i zagęszczenia surowca wyjściowego

Laktoza jest składnikiem, który nie jest pożądany w końcowym produkcie, oraz utrudnia dalsze przetwarzanie serwatki. W związku z tym należy go usunąć przed dalszymi etapami przetwarzania surowca.

- 4.1 Rozpuścić naważkę serwatki w wodzie demineralizowanej, w proporcji 25 kg na 100 litrów wody. W zależności od potrzeb wykonać przeliczenie dla większej partii. Surowiec umieścić w zbiorniku 300l z mieszadłem, ustawić obroty na 75 RPM i mieszać do całkowitego rozpuszczenia serwatki (około 25 minut).



Fot. 6. Zbiornik z płaszczem grzejnym i zintegrowanym homogenizatorem o pojemności 300 litrów (fot. M. Czelej)

4.2 Następnie surowiec w formie płynnej w pierwszym etapie poddać filtracji przez płytowy celulozowy filtr wstępny (100kDa) 20x20cm, w celu usunięcia nierozpuszczonych pozostałości.



Fot. 7. Płytowy celulozowy filtr wstępny (100 kDa) 20x20cm (fot. M. Czelej)

4.3 W drugim etapie supernatant pozbawiony cząstek stałych poddać filtracji przez filtr zestawu do ultrafiltracji z membraną o punkcie odcięcia 3kDa, celem usunięcia jak największej ilości laktozy (4h). Proces prowadzony jest w obiegu zamkniętym (premetant zawracany jest do zbiornika, supernatant zawierający laktozę jest usuwany). Przepływ roztworu ustawić na 5 l/min, ciśnienie maksymalne 6 bar.

4.4 Po skończonym procesie membrana jest dokładnie przepłukiwana za pomocą 1 mol/dm^3 roztworu zasady sodowej (1h) oraz 10l wody destylowanej w celu całkowitego wypłukania zasady sodowej z systemu filtracyjnego



Fot. 8. Zestaw do ultrafiltracji uzbrojony w filtry z membraną o punkcie odcięcia 3 kDa (fot. M. Czelej)

4.5 W otrzymanym roztworze oznaczyć zawartość suchej masy, zawartość białka metodą CLB/PSO/13/2019 wersja 3 oraz cukrów metodą CLB/PSO/51/2019 wersja 2.

Na pojemnikach zanotować: datę procesu, objętość otrzymanego półproduktu (roztworu serwatki bez laktozy), zawartość suchej masy, zawartość białka oraz cukru. Dokumentacja z produkcji przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy serwatkowe](#)

Ad 5. Przechowywanie pozbawionego laktozy surowca

Pozbawiona laktozy serwatka, do czasu rozpoczęcia procesu hydrolizy, przechowywana jest w (4°C), nie dłużej niż 72 godziny

Ad 6. Procedura przygotowania odczynników do procesu hydrolizy

6.1 Procedura przygotowania 6M kwasu solnego

Odmierzyć przy pomocy pompy perystaltycznej z przepływomierzem cylindra 5 litrów 37% HCl i powoli wlać do 5 litrów wody destylowanej. Procedurę przeprowadzić pod wyciągiem, mieszając roztwór w trakcie rozcieńczania przy użyciu mieszadła laboratoryjnego. W przypadku konieczności użycia większej ilości odczynnika ilości odpowiedni zwiększyć.

Pojemnik opisać: datą wytworzenia, numerem partii użytego surowca, dokumentację z przygotowania odczynników przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy serwatkowe](#)

Roztwór przechowywać w temperaturze otoczenia przez czas nie dłuższy niż 7 dni.

6.2 Procedura przygotowania 5M zasady sodowej

Odważyć na 2 kg NaOH. Tak przygotowaną naważkę rozpuścić w 10 litrach wody destylowanej. Procedurę przeprowadzić pod wyciągiem, mieszając roztwór w trakcie rozcieńczania przy użyciu mieszadła laboratoryjnego.

Procedurę przeprowadzić pod wyciągiem, mieszając roztwór w trakcie rozcieńczania przy użyciu mieszadła laboratoryjnego. W przypadku konieczności użycia większej ilości odczynnika ilości odpowiedni zwiększyć.

Pojemnik opisać: datą wytworzenia, numerem partii użytego surowca, dokumentację z przygotowania odczynników przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy serwatkowe](#)

Roztwór przechowywać w temperaturze otoczenia przez czas nie dłuższy niż 7 dni.

Ad 7. Procedura przeprowadzenia procesu hydrolizy

Poniższy opis dotyczy dwuetapowego procesu hydrolizy serwatki (zawierającej 100 kg rozpuszczonego białka) pozbawionej laktozy prowadzonej w objętości 600 litrów. W pierwszym etapie do trawienia jest używana papaina a w drugim pepsyna. W zależności od ilości użytego surowca wyjściowego, stężenia białka, ilości pozostałych składników, w tym wody, zmieniają się proporcjonalnie. Procedurę prowadzić w pojemniku reakcyjnym 1000 litrów z grzaniem i mieszadłem.



Fot. 9. Zbiornik 1000 litrowy z homogenizatorem i płaszczem wodnym (fot. M. Czelej)

Przed rozpoczęciem procesu należy sprawdzić poprawność podłączenia wymiennika ciepła do zbiornika. Sprawdzić szczelność połączeń zbiornika, sprawdzić połączenie zaworów wyrównujących ciśnienie).

Pierwszy etap hydrolizy:

7.1 Do zbiornika 1000 litrów wlać oczyszczonego z laktozy surowca wyjściowego (przeliczonego tak aby zawartość białka wynosiła 100 kg), uzupełnić wodą do łącznej pojemności 600 litrów. Włączyć grzanie przy nastawie temperatury 70°C (czas stabilizacji temperatury 45 min.).

7.2 W szklanej zlewce odważyć 460g papainy Performase 500 TU MD LD.

7.3 Sprawdzić pH hydrolizy przy użyciu pH-metru ElmetronCPC-461. W przypadku gdy odbiega ono od 3,0 dla pepsyny lub 6,0 dla papainy skorygować je przy pomocy 6M HCl lub 5M NaOH.

7.4 W momencie gdy hydroliza osiągnie temperaturę 70°C i pH 6 dodać do niej naważkę papainy.

7.5 Proces hydrolizy prowadzić przez 2 godz.

7.6 Po tym czasie inaktywować enzym doprowadzając hydrolizę do temperatury 100°C utrzymując ją się przez 10 min.

7.7 Przepompować roztwór przez wymiennik do osiągnięcia temperatury 37°C. Wydajność pompowania 50 litrów/min.

Drugi etap hydrolizy:

7.8 Doprowadzić temperaturę hydrolizy do 37°C.

7.9 W szklanej zlewce odważyć 230 g pepsyny. Pepsyna 1:10000 NF/USP - 2000 U/g E.P,

7.10 Sprawdzić pH hydrolizy przy użyciu pH-metru Elmetron CPC-461.

W przypadku gdy odbiega ono od 3 uregulować je przy pomocy 6 mol/dm³ HCl lub 5 mol/dm³ NaOH.

Proces prowadzony jest automatycznie przy użyciu kontrolera.

7.11 W momencie gdy hydrolizat osiągnie temperaturę 37°C i pH 3 dodać do niej odważkę pepsyny.

7.12 Proces hydrolizy prowadzić 2 godz.

7.13 Po tym czasie inaktywować enzym doprowadzając hydrolizę do temperatury 100°C utrzymującej ją przez 10 min.

7.14 Przepompować roztwór przez wymiennik do osiągnięcia temperatury 20°C. Wydajność pompowania 50 litrów/min.

W trakcie procesu zanotować parametry i naważki w tym: temperaturę procesu, ilość użytych surowców,/odczynników, pH procesu, pochodzenie surowców. Dokumentację z przygotowania odczynników przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy serwatkowe](#)

Ad 8. Procedura zatężania hydrolizatu przy wyparki

8.1 Otrzymany hydrolizat przepompować do wyparki. Jednorazowo 200 litrów.

8.2 Ustawić temperaturę 80°C na prawym zbiornik ustawić ciśnienie no 200 mBar. Sprawdzić poprawność pracy wytwornicy pary. Włączyć mieszadło oraz obieg wody chłodniczej.

8.3 Po ustaleniu żądanego ciśnienia, przy którym zawartość zbiornika delikatnie wrze, (kontrolować przez okienko inspekcyjne), unikać pienienia się.

8.4 Przy każdorazowym korygowaniu ciśnienia w zbiorniku głównym należy otworzyć zawór od pompy, a po jego skorygowaniu zamknąć ten zawór.

8.5 Nie należy doprowadzać do zbyt gwałtownego obniżenia ciśnienia gdyż zawartość zbiornika głównego może gwałtownie zacząć się pienić i zanieczyścić chłodnicę. Nie obniżać ciśnienia poniżej 0,15 bar.

8.6 Prowadzić proces do uzyskania 100 litrów zagęszczonego hydrolizatu.

8.7 Po zagęszczeniu partii hydrolizatu roztwór z białkiem przepompować do zbiornika pośredniczącego suszarki i kontynuować z kolejną partią. Hydrolizat można odprowadzać w sposób ciągły pamiętając o wyrównaniu ciśnienia w odbieralniku przed otworzeniem zaworu spustowego.

W trakcie procesu zanotować parametry w tym: temperaturę procesu, czas i ciśnienie. Dokumentację z przygotowania odczynników przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy](#) [serwatkowe](#)

8.8 Przed ponownym obniżeniem ciśnienia w zbiorniku głównym otworzyć zawór od pompy.

8.9 Po ponownym ustabilizowaniu procesu wrzenia zawartości zbiornika głównego i skraplania się wody zamknąć zawór od pompy.

8.10 Kończąc pracę należy wyrównać ciśnienie w zbiorniku głównym i odbieralniku.

8.11 Wyłączyć grzanie płaszczy grzewczych zielonym guzikiem znajdującym się po prawej stronie skrzynki sterowniczej.

8.12 Wyłączyć urządzenie czerwonym przełącznikiem znajdującym się z boku skrzynki sterowniczej.

8.13 Wyjąć wtyczkę z gniazdka.

8.14 Opróżnić zbiornik główny, odbieralnik oraz zbiornik inspekcyjny.

8.15 Zakreślić dopływ wody.

Ad 9. Procedura suszenia zatężonego hydrolizatu przy użyciu suszarki rozpyłowej

Do suszenia rozpyłowego użyto suszarki rozpyłowej Spray Dryer TP-S50 firmy Toption Group Limited.



Fot. 10. Suszarka rozpyłowa Spray Dryer TP-S50 firmy Toption Group Limited
(fot. M. Czelej)

Przed przystąpieniem do pracy sprawdzić wszystkie połączenia rur i przewodów, a zwłaszcza podłączenie pompy perystaltycznej oraz wylot wentylatora wyciągowego.

9.1 Odkręcić zawór wody chłodzącej silnik atomizera.

9.2 Ustawić wartości: temperatury 210°C, przepływu przez pompę perystaltyczną – 40 ml/min. oraz częstotliwość atomizera – 400 Hz.

9.3 Włączyć wentylator [fan] oraz grzanie [heating]. Włączyć atomizer [atomizer].

9.4 Gdy temperatura osiągnie zadaną wartość, rozpocząć pobieranie hydrolizatu naciskając przycisk [feeding].

9.5 Po zakończeniu suszenia wyłączyć pobór hydrolizatu przyciskiem [feeding] Wyłączyć atomizer i grzanie, wciskając odpowiednio przyciski [atomizer] i [heating]. Po ochłodzeniu do 50°C [inlet temperature] wyłączyć wentylator [fan]. Zakręcić dopływ wody chłodzącej silnik atomizera.

9.6 Wyjąć wysuszony produkt z końcowego zbiornika. Istnieje możliwość opróżniania odbieralnika w trakcie pracy suszarki. W tym celu należy zamknąć zawór odbieralnika i przenieść jego zawartość do pojemnika z produktem. Czynność tę należy wykonać szybko aby uniemożliwić przedostanie się produktu gromadzącego się na zamkniętym zaworze do chłodnicy przed pompą. Po opróżnieniu odbieralnik podłączyć do suszarki i odkręcić zawór (zgromadzony produkt opadnie do odbieralnika).

Pojemnik z produktem szczelnie zamknąć i opisać. Produkt może być przechowywany w temperaturze otoczenia przez 1 rok od daty wytworzenia.

W trakcie procesu zanotować parametry w tym czasie, parametry pracy suszarki (szybkość podawania produktu, szybkość atomizera, temperatury suszenia). W otrzymanym produkcie oznaczyć: suchą masę, zawartość tłuszczu i białka (procedura opisana w punkcie 4.5) Dokumentację z procesu suszenia przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy serwatkowe](#)

Ad 10. Procedura pakowania produktu końcowego

Otrzymany hydrolizat białkowy pakować do pojemników jednostkowych zgodnie z zamówieniem. Na pojemniku jednostkowym umieścić: datę przydatności do spożycia i numer partii (datę produkcji) Dokumentację z pakowania przechowywać w formie elektronicznej: [HEKATE\produkcja\peptydy serwatkowe](#)

Z każdej partii zapakowanego produktu wybrać losowo 2 pojemniki i przekazać do archiwum.



Fot. 11. Peptydy serwatkowe – produkt końcowy (fot. M. Czelej)

Ad 11. Procedura przechowywania produktu końcowego

Produkt w pojemnikach jednostkowych i/lub opakowaniach zbiorczych przechowywać w magazynie produktów do czasu wysyłki/odbioru.