



Schweizerische Eidgenossenschaft
Confédération suisse
Confederazione Svizzera
Confederaziun svizra

Eidgenössisches Volkswirtschaftsdepartement EVD
Forschungsanstalt Agroscope Liebefeld-Posieux ALP

Bioaktive Peptide in der Milch

Barbara Walther

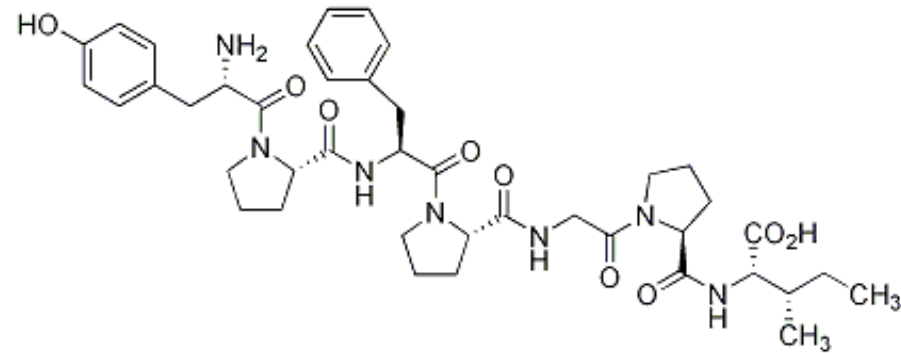
Bern, 31. Oktober 2006



Merkmale und Vorkommen von bioaktiven Peptiden

- Bioaktive Peptide = Proteinabbauprodukte, die eine physiologische Wirkung zeigen
- Inaktiv innerhalb der Sequenz des Proteins
- Die physiologische Wirkung wird erst durch die Proteolyse freigesetzt
- durch Fermentation oder bei Verdauung
- 1979 Nachweis von Peptiden mit biologischer Aktivität am Beispiel der Casomorphine

Bovines β -Casomorphin

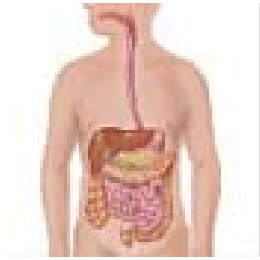




Proteolytische Aktivierung von bioaktiven Peptiden

in vivo-Verdauung

Lebensmittelproduktion



Intestinale oder Plasmaenzyme

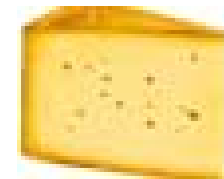
Proteinasen und Peptidasen

Bioaktive Peptide

Gärung



Proteinasen und Peptidasen der Rohmilch- bzw. Starterflora



Bioaktive Peptide

Bioaktive Peptide 1 g Kasein → 10 - 60 mg bioaktive Peptide



Aminosäuresequenz: einige bioaktive Peptide

	1			31			
α_{s1} -Kasein	199	RPKHPIKHQG	LPQEVLNENL	LRFFVAPFPE	VFGKEKVNEL	SKDIGSESTE	DQAMEDIKQM
β -Kasein	209	RELEELN VP G	EIVESLSSE	ESITRINKKI	EKFQSEEQQQ	TEDELQDKIH	PFAQTQSLV Y
β -Laktoglobulin	162	LIVTQTMKGL	DIQKVAGTWY	SLAMAASDIS	LLDAQSAPLR	VYVEELKPTP	EGDLEILLQK
α -Laktalbumin	123	EQLTKCEVFR	ELKDLKGYGG	VSLPEWVCTT	FHTSGYDTQA	IVQNNDSTE Y	GLF QINNKIW
	61			91			
α_{s1} -Kasein		EAESISSEE	IVPNSVEOKH	IOKEDVP SER	YLGYLEQLLR	LKKYK VP QLE	IVPNSAEERL
β -Kasein		PFPGPIPN SL	PQNI P PLTQT	PVV VPP FLQP	EVMGVSKVKE	AMAPKH KEMP	FPKYPVEPF T
β -Laktoglobulin		WENGECAQKK	IIAEKTK IP A	VFKIDALNEN	KVLVLDTDYK	KYLLFCMENS	AEPEQSLACQ
α -Laktalbumin		CKDDQNPSS	NICNISCDF	LDDDLTDDIM	CVKKILDKVG	IN Y WL AHKAL	CSEKLDQWLC
	121			151			
α_{s1} -Kasein		HSMKEGIHAQ	QKEPMIGVNQ	ELAYFYPELF	RQFYQLDAYP	SGAWYY V PLG	TQYTDAPSFS
β -Kasein		ESQSLTLTDV	ENLHLPLPLL	QSWMHQPHQP	LPPTVMFPPQ	SVLSLSQSKV	LP V PQ KAV PY
β -Laktoglobulin		CLVRTPEVDD	EALEKFDKAL	KAL PMHIRLS	FNPTQLEEQC	HI	
α -Laktalbumin		EKL					
	181						
α_{s1} -Kasein		D IPNPIGSEN	SEK TTMPLW				
β -Kasein		PQR DMPIQAF	LLY QEPVLGP	VRGPFPIIV			

ACE, Casomorphin, **Phosphopeptid**, immunostimulierend



Opioidwirkende Peptide

Fragmente von β -Kasein (β -Kasomorphin 11):

60



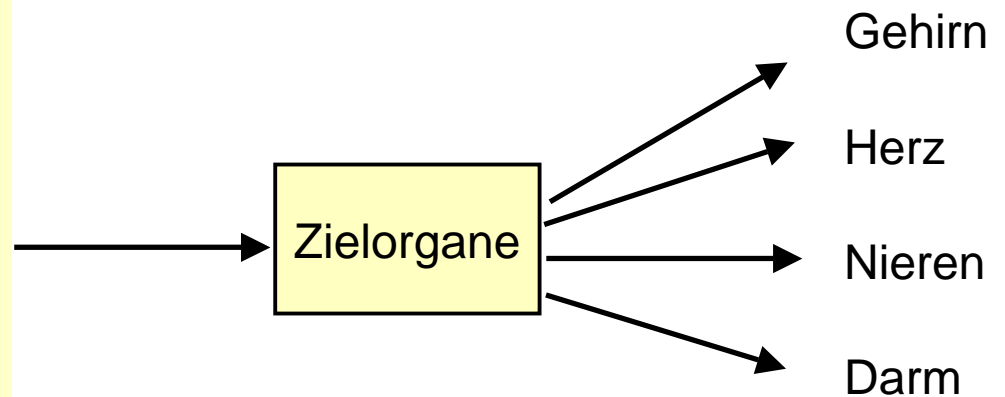
70

Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile-Pro-Asn-Ser-Leu

Bioaktivität

Bindung an Opiatrezeptoren

- Schmerzstillende Wirkung
- Stimulation der Sekretion von Insulin and Somatostatin
- Verlängerung der gastrointestinalen Transitzeit
- Regulation des intestinalen Transports von Aminosäuren
- Steigerung der Absorption von Wasser und Elektrolyten





Mineralbindende Peptide

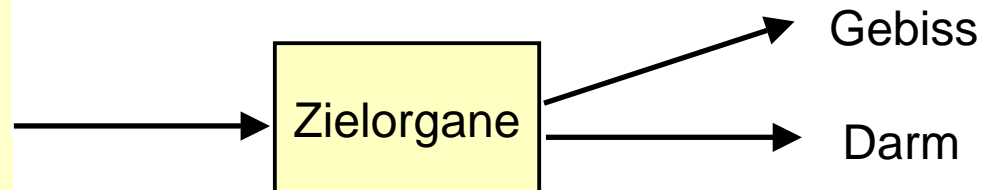
Fragment von α_{s1} -Kasein:

⁶⁴
SerP-Ile-SerP-SerP-SerP-Glu-Glu-Ile-Val-Pro-
Asn-SerP-Val-Glu-Gln-Lys-His-Ile-Gln-Lys-Glu
₈₄

Bioaktivität

mineralbindend

- Remineralisierung des Zahnschmelzes (antikariogene Wirkung)
- Steigerung der intestinalen Absorption von Kalzium und anderen Mineralien
- Immunomodulation





Blutdrucksenkende Peptide

Fragment von α_{s1} Kasein (Kasokinin):

23 27 34
Phe-Phe-Val-Ala-Pro-Phe-Pro-Gln-Val-Phe-Gly-Lys

1 9
Arg-Pro-Lys-His-Pro-Ile-Lys-His-Gln

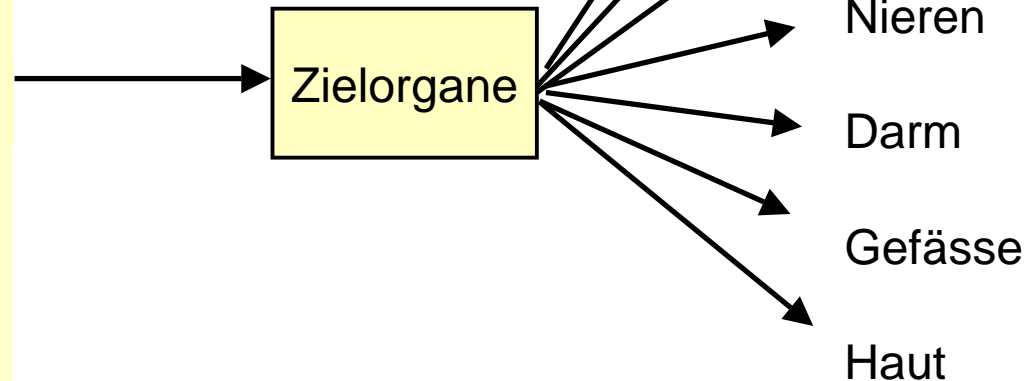
Fragmente von β -Kasein (Kasokinine):

74 76 84 86
Ile-Pro-Pro Val-Pro-Pro

Bioaktivität

Hemmung des Angiotensin-Umwandlungs-Enzyms (ACE)

- blutdrucksenkende Wirkung
- Immunomodulation
- Einfluss auf die neuro-endocrinale Informationsübertragung





Weitere bioaktive Peptide in Milch

- antithrombotisch
- immunomodulierend
- antimikrobiell
- zellmodulierend
- antikanzerogen
- antikariogen
- entzündungshemmend
- cholesterinsenkend
- ...



Bluthochdruck in der Schweiz

Ärztliche Behandlung: Chronische Krankheiten 1)

2002, in % der Wohnbevölkerung ab 15 Jahren

	Total	Männer	Frauen
Hoher Blutdruck	14.0	13.6	14.3
Heuschnupfen / Allergien	10.0	9.7	10.2
Rheuma	8.5	6.0	11.0
Depression	5.0	4.2	5.8
Chronische Bronchitis / Emphysem	3.4	3.4	3.4
Diabetes	3.4	3.9	2.9
Krebs / Geschwulst	2.7	2.2	3.2

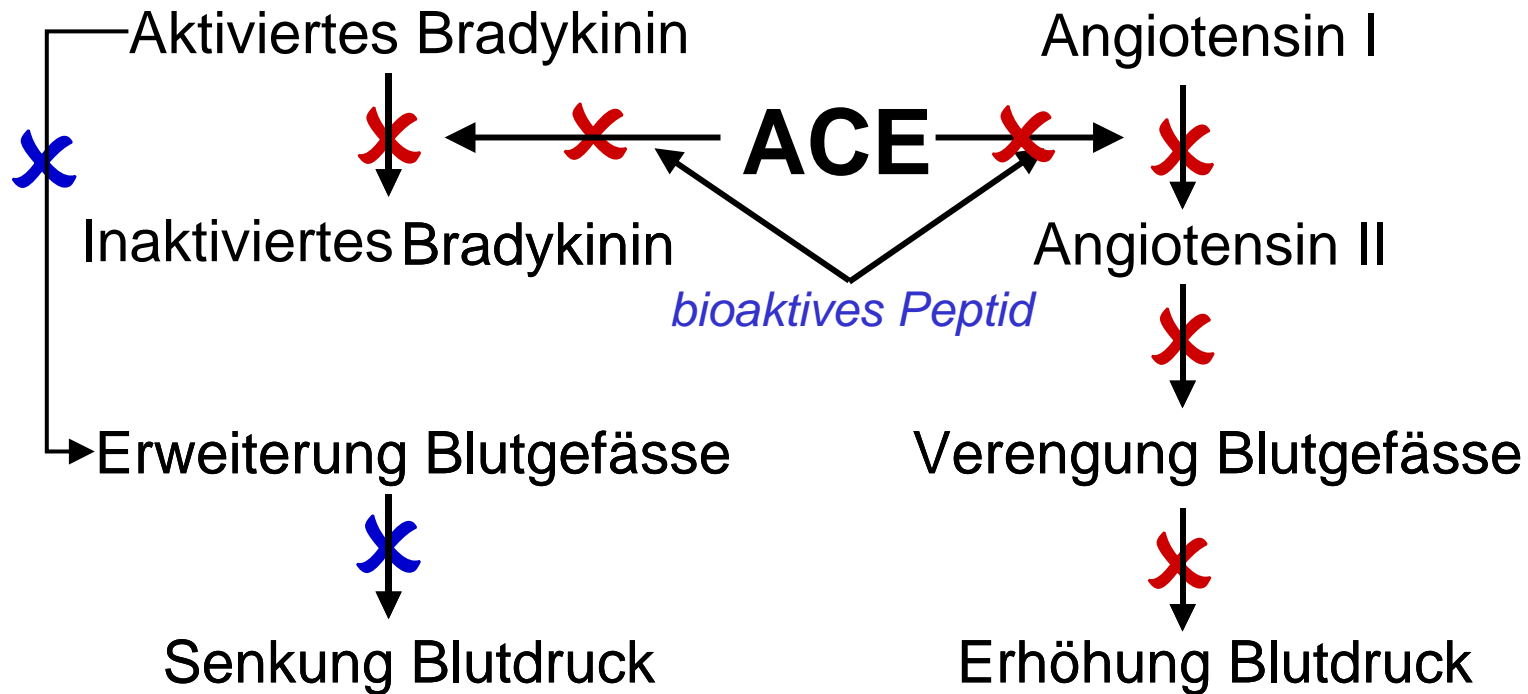
Anteil der Bevölkerung, die täglich* Mittel gegen Bluthochdruck nehmen

Altersgruppe	Männer	Frauen
15-24 Jahre	(0.5)	(0.3)
25-34 Jahre	(1.3)	(0.4)
35-44 Jahre	3	1.8
45-54 Jahre	7.5	6.9
55-64 Jahre	20.6	21.4
65-74 Jahre	34.5	32.8
75+ Jahre	33.6	40.5
Total	10.3	12.1



Wirkung der ACE-hemmenden Peptide I

Hemmung ACE - System



ACE-hemmende Peptide: blutdrucksenkend



Wirkungsnachweis in vitro

- N-Hippuryl-Histidyl-Leucin (HHL) + ACE → Hippursäure + Histidyl-Leucin
- Quantifizierung der ACE-hemmenden Aktivität
 - Spektrofotometrisch
 - Chromatografisch
 - Fluorometrisch
- Wirksamkeit des Inhibitors als IC_{50} angegeben



Fähigkeit, in vitro ACE zu hemmen, ist Hinweis für eine blutdrucksenkende Wirkung in vivo, aber...



Wirkungsnachweis in vivo

Peptid muss

- Zielorgan erreichen
- Verdauung im Darm überstehen
- aus dem Darm ins Serum gelangen
- Verdauungsenzyme im Bürstensaum, im Intrazellularraum und im Serum überleben
- Veränderungen in der Leber überstehen

➔ **Nur mit in vivo Studien lässt sich der blutdrucksenkende Effekt eines Peptids verlässlich beurteilen**



Rattenstudien

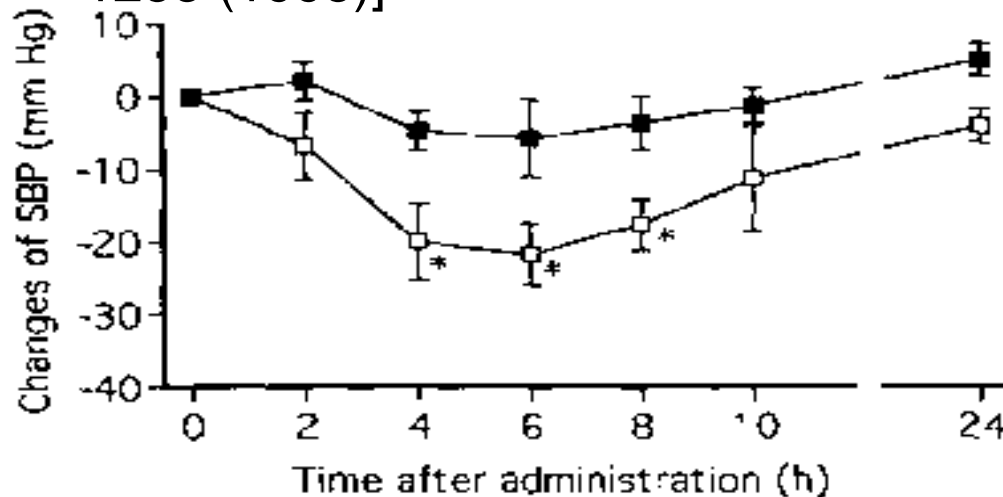
- Verschiedene Peptide an SHR (spontaneously hypertensive rats) getestet
- Fragmente von allen wichtigen Kaseinen und Molkenproteinen
- Mehr Studien an SHR mit Kasokininen als mit Laktokininen
- Kasokinine: Keine Beziehung zwischen Kettenlänge und hypotensiver Antwort
- Laktokinine: blutdrucksenkende Wirkung bei 4 oder weniger AS
- Keine Beziehung zwischen Blutdrucksenkung und IC_{50} Wert
- Blutdruckreaktion (systolisch) +1,3 bis -80 mmHg
- Achtung: Studiendesign unterschiedlich!



VPP und IPP

1995: Ein japanisches Forscherteam berichtet über die ACE-hemmende Eigenschaft einer fermentierten Milch, die mit einer *Lactobacillus helveticus*-Starterkultur fermentiert wurde [Nakamura et al. J.Dairy Sci., 78, 777 (1995)]

1995: Das gleiche Forscherteam identifiziert die beiden Peptide VPP und IPP und berichtet über erfolgreiche Tierversuche mit spontan hypertensiven Ratten [Nakamura et al., J.Dairy Sci. 78, 1253 (1995)]



← 5ml Milch
← 5ml Sauermilch



CALPIS,
as marketed in 1919

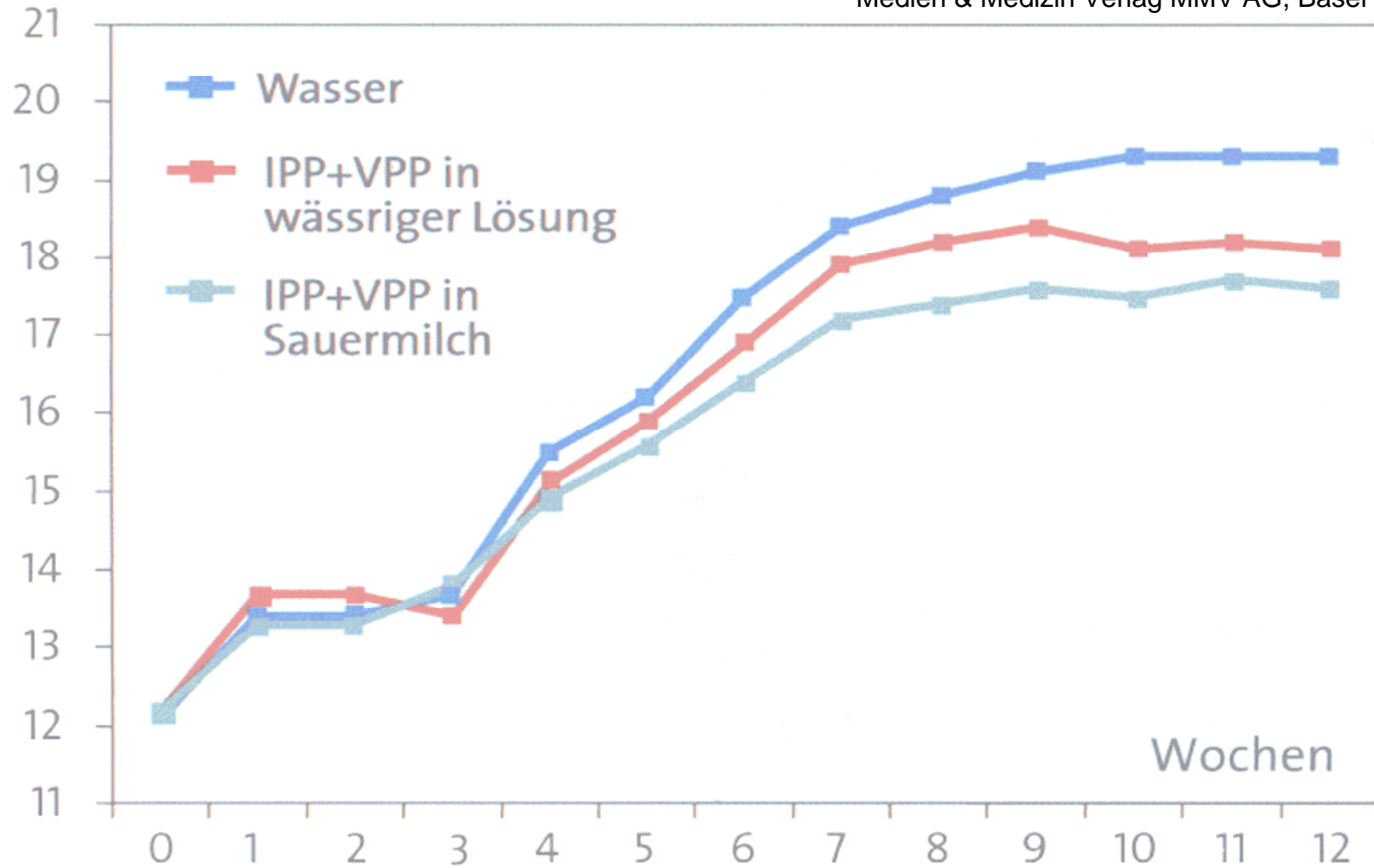


Rattenstudie

SBD (mmHg)

CARDIOVASC 2005/4

Medien & Medizin Verlag MMV AG, Basel



Sipola et al., Journal of Dairy Research 69 103 (2002)



Humanstudien

- 1992: Sekiya et al. zeigen, dass ein mit Trypsin hydrolysiertes Kasein bei Menschen mit Bluthochdruck sowohl den diastolischen (-6,6 mmHg) als auch den systolischen Blutdruck (-4,6 mmHg) zu senken vermag [Sekiya et al. J.Jap.Soc.Nutr.Food Sci., 45, 513 (1992)]
- 1995: Nakajima et al. finden eine blutdrucksenkende Wirkung von Extrakten von *Lactobacillus casei* [Nakajima et al., J.Clin.Biochem.Nutr., 18, 181 (1995)]
- 2003: Pins und Keenan zeigen in einem Versuch die blutdrucksenkende Wirkung (SBP: -11 mmHg; DBP: -7 mmHg) von Molkenproteinhydrolysat [Pins & Keenan, Faseb Journal 17, A1110 (2003)]



Evolus



- Produkt: Magermilch mit *L. helveticus* LBK-16H während 18-20 h bei 37°C fermentiert
- Functional Food
- Zusammensetzung: Tripeptide VPP (2 mg/100 g) und IPP (1,5 mg/100 g), Milch-TM ↑
- Eigenschaft: blutdrucksenkend



Evolus: Langzeit-Studie



- randomisiert, doppelblind, Placebo-kontrolliert
- 39 Patienten mit Bluthochdruck (155/97 mmHg bei Testgruppe (N=19), 152/96 mmHg bei Kontrollgruppe (N=17))
- 150 ml *L. helveticus* LBK-16H fermentierte Milch oder Kontrollprodukt
- 2 Wochen run-in Periode, dann 21 Wochen Studiendauer

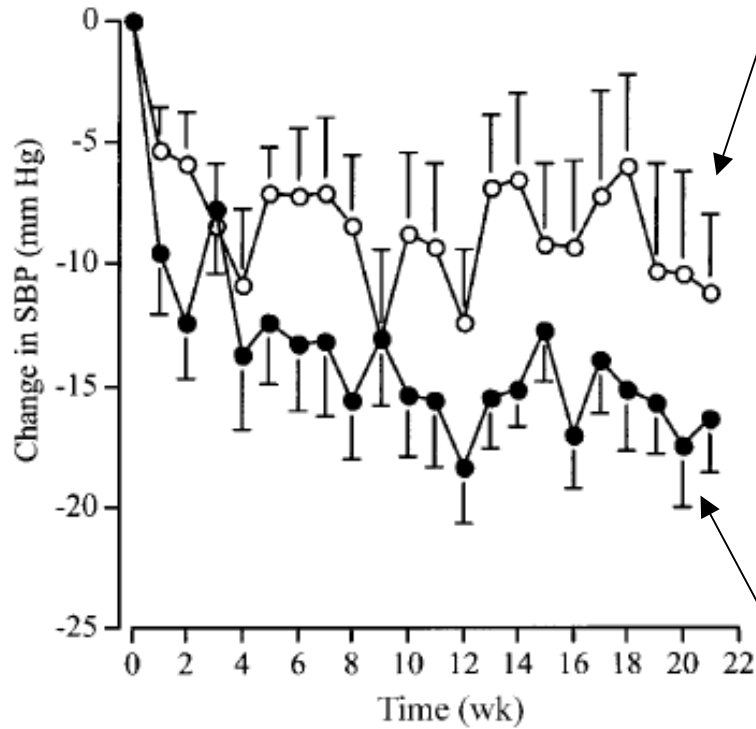
Seppo L. et al., Am.J.Clin. Nutr. 77, 326 (2003)



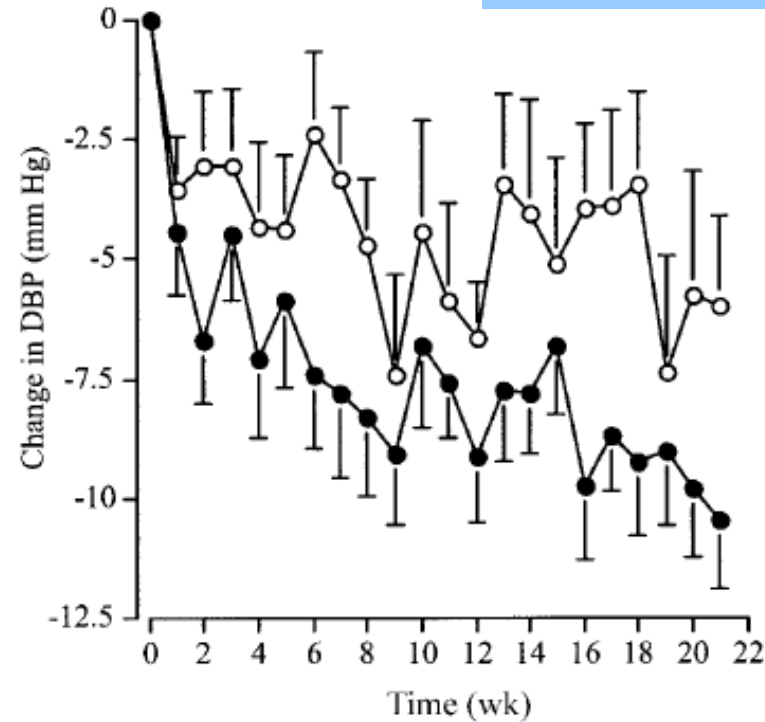
Evolus: Langzeit-Studie



Kontrollgruppe



Testgruppe



Seppo L. et al., Am.J.Clin. Nutr. 77, 326 (2003)



Evolus: Langzeit-Studie - Resultate

Mittlere Differenz Testgruppe/Kontrollgruppe

SBP: 6.7 ± 3.0 mmHg (p=0,030)

DBP: 3.6 ± 1.9 mmHg (p=0,059)

Nach 21 Wochen

Kontrolle unbehandelt

SBP -8.5 mmHg

DBP -3.8 mmHg

Kontrolle behandelt

SBP -9.2 mmHg

DBP -6.2 mmHg

Test unbehandelt

SBP -14.4 mmHg

DBP -7.7 mmHg

Test behandelt

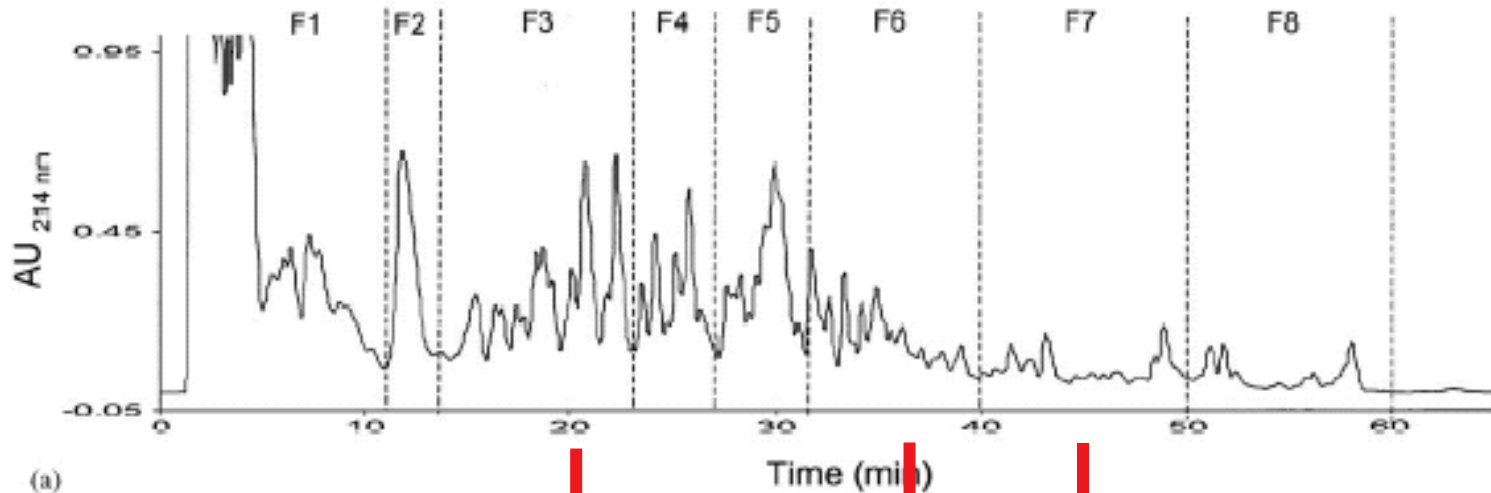
SBP -12.8 mmHg

DBP -6.8 mmHg

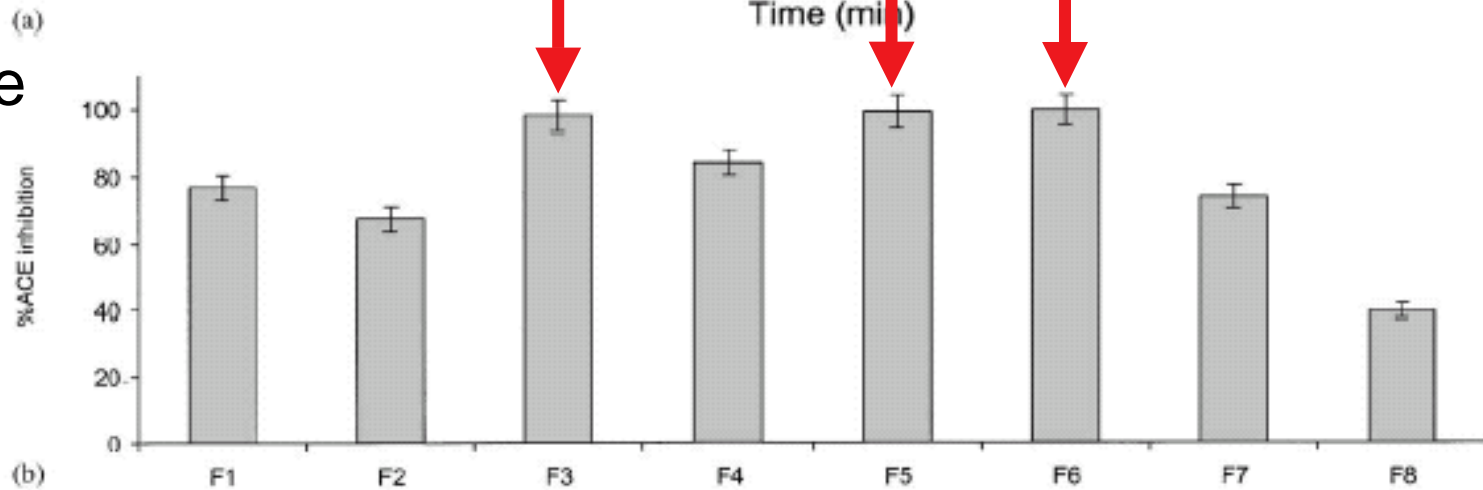


ACE-hemmende Peptide in 8 Mte altem Manchego Käse

RP-
HPLC



ACE-
hemmende
Aktivität





VPP+IPP in kommerziellen Käseproben

	Käsesorte	Alter	Herkunft	VPP+IPP [mg/kg]	IC50 mg K / ml
1	Hobelkäse Berner Oberland	> 18 M	CH	319.5	2.6
2	Emmentaler, Bio	> 4 M	CH	189.5	7.5
3	Gouda old	?	NL	187.8	2.0
4	Appenzeller, viertelfett, räss	7-10 M	CH	159.3	4.2
5	Tilsiter, Rohmilch	> 90 T	CH	150.3	4.4
6	Winzerkäse	?	CH	124.7	9.9
7	Emmentaler, höhlengereift	> 12 M	CH	123.6	7.1
8	Tête de moine	> 75 T	CH	113.5	7.1
9	Vacherin Fribourgeois	> 60 T	CH	108.8	5.0

⇒ Käse enthält physiol. relevante Mengen an VPP & IPP

⇒ Top 10: 1 Ration Käse (50g) ≥ 5 mg VPP & IPP



VPP+IPP in kommerziellen Käseproben

Käsetyp	n	VPP+IPP [mg/kg]	IC50 mg K / ml	Korrelation VPP+IPP &. IC50
		Mittelwert	Mittelwert	r
Weichkäse	11	3±6	17±6	-0.357
Halbhartkäse	17	36±40	13±7	-0.534
Hartkäse	11	93±53	11±7	-0.721
Extra-Hartkäse	5	127±128	13±11	-0.878

⇒ **Gute Korrelation bei Hart- und Extra-Hartkäse zwischen VPP & IPP und IC 50**



- 1460g Weichkäse
- 140g Halbhartkäse
- 50g Hartkäse
- 40g Extra-Hartkäse

5mg VPP&IPP



Was Sie nach Hause nehmen können...

