

# Bioaktive Peptide in Käse

Dr. Hans-Peter Bachmann, Ueli Bütikofer, Dr. Robert Sieber,  
Eidgenössische Forschungsanstalt für Milchwirtschaft,  
Liebefeld (FAM), Bern

Teil II



Foto: CMA

## Casomorphine

$\beta$ -Casomorphine haben eine agonistisch opioide Wirkung und sind resistent gegenüber der Wirkung von Verdauungsenzymen. Die Bezeichnung „opioide“ wird für alle natürlichen und synthetischen Substanzen verwendet, die eine mit Morphin vergleichbare Wirkung haben. Casomorphine können die Darmpassage verlängern und dadurch Diarrhoe bekämpfen<sup>[11]</sup>.

Die biologisch aktive Sequenz der Casomorphine besteht aus sieben Aminosäuren (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) aus dem  $\beta$ -Kasein ( $\beta$ -CN 60-66). Das gesamte Peptid wird  $\beta$ -Casomorphin-7 genannt und es kann schrittweise zu weiteren Casomorphinen abgebaut werden. Biologische Aktivität wurde bis zum  $\beta$ -Casomorphin-3 (Tyr-Pro-Phe) nachgewiesen.

Das Dipeptid Tyr-Pro weist keine Bioaktivität mehr auf. Die Casomorphine fallen durch ihren hohen Anteil an Prolin auf. Das Prolin verhindert auch den Abbau im Verdauungssystem durch Pepsin, Trypsin und Chymotrypsin. Leider verfügen Milchsäurebakterien über verschiedene Prolinspezifische Peptidasen (z.B. Pep-X) und können deshalb  $\beta$ -Casomorphine abbauen<sup>[44]</sup>. Es gibt jedoch grosse Unterschiede zwischen den verschiedenen Käsesorten, so scheint Pep-X in Cheddar nur eine marginale Rolle zu spielen<sup>[45]</sup>. Ein Mutant von *L. helveticus*, der keine X-Prolyl-Dipeptidylaminopeptidase bildet, führte bei den Untersuchungen von Matar und Goulet<sup>[46]</sup> zu einem höheren Gehalt an  $\beta$ -Casomorphin-4.

Addeo et al.<sup>[32]</sup> wiesen in Parmigiano Reggiano (nach 2, 6 und 15 Mo-

naten) Vorstufen von  $\beta$ -Casomorphinen nach. In 14 Monate altem Grana Padano fanden Ferranti et al.<sup>[22]</sup> sieben bioaktive Vorläufer-Peptide des  $\beta$ -Kaseins, welche die Sequenz 60-66 enthielten (57-68, 57-72, 58-72, 57-76, 58-76, 57-72, 57-77). In einem 38 Monate alten Käse waren diese nicht mehr vorhanden, was darauf hinweist, dass diese Peptide der Wirkung der Käse-Enzyme nicht widerstehen konnten. In diesem Käse war nur noch das Peptid 60-72 vorhanden, so dass anzunehmen ist, dass es das Endpeptid dieser  $\beta$ -Kasein-Vorläufer ist.

In Cheddar, Swiss, Blauschimmelkäse, Brie und Limburger fanden Muehlenkamp und Warthesen<sup>[44]</sup> keine  $\beta$ -Casomorphine. Sie konnten experimentell aufzeigen, dass  $\beta$ -Casomorphine unter den Bedingungen (pH, NaCl), wie sie in Käse vorkommen, durch Peptidasen der Starterkultur (*Lactococcus lactis* ssp. *cremoris*) abgebaut werden. Dagegen fanden Jarmolowska et al.<sup>[47]</sup> im Peptidextrakt von Brie sowie von Kashkaval und Camping Käsen eine Opioid-Aktivität, aber nicht in Tilsiter. Sie isolierten sodann aus Brie 0,5 bis 1,5 mg / 100 g  $\beta$ -Casomorphin-7. Einzig in Cheddar fanden Dionysius et al.<sup>[41]</sup>  $\beta$ -Casomorphin-3, nicht aber in Edamer, Swiss, Feta, Camembert und Blauschimmelkäse. In Edamer (mit oder ohne Zusatz von Bifidobakterien) hingegen wiesen Sabikhi und Mathur<sup>[48]</sup>  $\beta$ -Casomorphin-3 in einer Konzentration von etwa 35 mg / 100 g nach, wobei der Gehalt im Verlauf der dreimonatigen Reifung leicht abnahm. Weder  $\beta$ -Casomorphin-5 noch Morphiceptin ( $\beta$ -Casomorphin-4-Amid) konnten in höheren Mengen nachgewiesen werden, was mit einem proteolytischen Weiterabbau durch Peptidasen der Starterkulturen erklärt wurde. In kommerziell erhältlichem Edamer wurden 64 mg / 100 g

$\beta$ -Casomorphin-3 nachgewiesen.

Haileselassie et al.<sup>[49]</sup> fanden in Enzym-modifiziertem Käse  $\beta$ -Casomorphin-7, falls bei der Fabrikation einzig Neutrase® eingesetzt wurde. Wurden zusätzlich noch Enzyme von L. casei zugesetzt, konnte kein  $\beta$ -Casomorphin-7 mehr nachgewiesen werden. Die Autoren erklärten dies mit einem Abbau durch die Peptidasen von L. casei.

### Phosphopeptide

Phosphopeptide bilden Chelate mit  $Ca^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  und  $Fe^{2+}$  und verbessern dadurch deren Aufnahme. Sie haben zudem eine antikariogene Wirkung<sup>[7]</sup>, fördern die Knochendichte und haben dadurch eine präventive Wirkung gegen Osteoporose<sup>[50]</sup>.

Addeo et al.<sup>[32]</sup>, Roudot-Algaron et al.<sup>[51]</sup> und Singh et al.<sup>[45]</sup> wiesen in Parmigiano-Reggiano, Comté bzw. Cheddar verschiedene Phosphopeptide nach. Gagnaire et al.<sup>[21]</sup> fanden in relativ jungem Emmentaler 17 verschiedene Phosphopeptide (Tab. 3) und Ferranti et al.<sup>[52]</sup> identifizierten in 14 Monate altem Grana Padano 45 verschiedene Phosphopeptide in einer Konzentration von etwa 15 g/kg Käse, dabei stammten 24 vom  $\beta$ -Kasein, 16 vom  $\alpha_{s1}$ -Kasein und 5 vom  $\alpha_{s2}$ -Kasein. Diese Peptide wurden durch das Plasmin gebildet und durch Peptidasen der Starterkulturen weiter verkürzt. Deutsch et al.<sup>[18]</sup> stellten fest, dass Phosphopeptide durch thermophile Milchsäurebakterien nur sehr langsam hydrolysiert werden.

Phosphopeptide können in Käse durch die saure Phosphatase dephosphoryliert werden<sup>[45,51]</sup>. So wurden in jungem Emmentaler die Peptide mit der Aminosäuresequenz 12-28, 13-28, 15-28 und 15-25 des  $\beta$ -Kaseins dephosphoryliert<sup>[21]</sup>. Diese Phosphatase kommt in der Milch vor und wird zudem auch von verschiedenen Milchsäurebakterien gebildet. Lavanchy und Bühlmann<sup>[53]</sup> fanden in verschiedenen Schweizer Käsesorten allerdings einen hohen Gehalt an Phosphoserin, was darauf schliessen lässt, dass die Aktivität der sauren Phosphatase begrenzt ist (wahrscheinlich handelt es sich bei dem freien Phosphoserin um Phosphopeptide<sup>[54]</sup>).

Zeit	Ausgangsprotein $\alpha_{s1}$ -Kasein		$\beta$ -Kasein		$\kappa$ -Kasein	
	Milch	Joghurt	Milch	Joghurt	Milch	Joghurt
<b>Magen</b>						
20 min	4-15 35-49	<b>24-35..</b> 70-82.. 143-153 180-191..	1-12 <b>29-41</b> 30-41.. 33-44.. <b>106-120</b> <b>107-114</b>	94-105.. <b>164-175..</b>	<b>106-117</b> <b>106-117..</b> 107-118..	<b>106-117..</b>
1 h			6-17.. 29-40.. <b>164-175..</b>			<b>106-117..</b>
4 h	120-131 143-149		<b>164-175..</b>			<b>106-117.. 106-117..</b>
<b>Zwölffingerdarm</b>						
20 min	<b>25-32</b> <b>28-35</b> 106-114 133-138 <b>144-149</b> 174-184		<b>7-18..</b> <b>83-93</b> <b>84-92</b> 114-119		107-113	
40 min	14-18.. 174-184		1-12.. 7-16 145-156.. 155-165.. <b>69-80..</b>		107-115	
4 h						<b>106-115</b>

Tab. 4: Im menschlichen Magen und Zwölffingerdarm identifizierte Kasein-Peptide nach Milch- oder Joghurtverzehr<sup>[7]</sup>

ohne ... = komplettes Peptid; mit ... = N-terminale Sequenz des Peptides  
Bei den fett markierten Sequenzen handelt es sich um bioaktive Peptide oder um Vorläufer von bioaktiven Peptide.

### Andere bioaktive Peptide

Die Wirkung der bioaktiven Peptide auf das Immunsystem und dessen Stimulierung durch diese Peptide ist äusserst komplex<sup>[7]</sup>. Dionysius et al.<sup>[41]</sup> konnten die immunstimulierenden Peptide mit der Aminosäuresequenz 193-209 und 192-209 des  $\beta$ -Kaseins in allen untersuchten Käsesorten (Cheddar, Edamer, Swiss, Feta, Camembert und Blauschimmelkäse) nachweisen. Auch in jungem Emmentaler wurde ein immunstimulierendes Peptid (193-209 des  $\beta$ -Kaseins) gefunden (Tab. 3). Ebenso können Phosphopeptide immunstimulierend wirken<sup>[6]</sup>. Im weiteren fanden Dionysius et al.<sup>[41]</sup> in Blauschimmelkäse ein Peptid gegen Gedächtnisschwund ( $\beta$ -CNA1 59-67).

Zu den bioaktiven Peptiden zählen auch antimikrobiell wirkende und cytomodulierende Peptide (Tab. 2). Isradicin ( $\alpha_{s1}$ -CN 1-23) wird durch Chymosin abgespalten und vermag Staphylococcus aureus und Candida albicans zu hemmen<sup>[55]</sup>. Es wurde in jungem französischem Emmentaler nachgewiesen (Tab. 3) und auch dieses Peptid kann in Käse durch die Wirkung einer intrazellulären Proteinase abgebaut werden<sup>[56,57]</sup>. Peptide aus einem lyophilisierten Extrakt von Gouda hemmen die Vermehrung von Leukämie-Zellen<sup>[58]</sup>.

Aus Edamer wurde ein Peptid mit der Sequenz 47-52 des  $\beta$ -Kaseins isoliert, das in einem in vitro-Caco-2-Zellmodell die Absorption von  $\beta$ -Laktoglobulins hemmt<sup>[59]</sup>.



Foto: CMA

## Haben bioaktive Peptide in Käse eine physiologische Wirkung?

Zur Frage, ob bioaktive Peptide in Käse eine physiologische Wirkung beim Tier und/oder beim Menschen ausüben, liegen Daten zu den Phosphopeptiden im Zusammenhang mit der Kariesprävention vor. Dass Käse eine antikariogene Wirkung aufweist, wurde bereits mehrfach aufgezeigt<sup>[60]</sup>. Dabei wirkten verschiedene Käse unterschiedlich auf die durch eine 10 %ige Saccharose-Lösung bei Ratten verursachten starken Zahnschäden und dicken Beläge. Mit Brie, Edamer, Esrom, Harzer, Havarti, Limburger, Mozzarella, Parmesan und Tilsiter nahmen die Belagflächengröße und das Ausmass des Kauflächenabriebes, der Zahndefekte und der Fissurenkaries ab, während Butterkäse, Camembert, Cheddar, Doppelrahmfrischkäse, Emmentaler, Greyzer und Schafkäse das Ausmass der Zahndefekte nicht beeinflussten sowie mit jungem und alten Gouda, Roquefort und Stilton nur das Ausmass der Beläge abnahm<sup>[61]</sup>. Diese Wirkung kann auf das Vorkommen von Phosphopeptiden in Käse zurückgeführt werden. Dabei komplexieren Kaseinphosphopeptide mit amorphem Kalziumphosphat und können verwendet werden, um das Kalziumphosphat in den Zahnplaques zu lokalisieren und den Zahnschmelz zu remineralisieren<sup>[62-64]</sup>. Dagegen be-

einflussten Kaseinphosphopeptide in fermentierter Milch den Kalziumstoffwechsel von postmenopausalen Frauen nicht<sup>[65]</sup>.

Für die übrigen bioaktiven Peptide in Käse wie beispielsweise den ACE-hemmenden Peptide sind physiologische Wirkungen in Analogie zu anderen Daten wie den mit Sauermilchprodukten erzielten Resultaten zu erwarten. In Versuchen mit spontanen hypertensiven Ratten<sup>[28,66-68]</sup> wie auch beim Menschen<sup>[69,70]</sup> konnte eine blutdruckreduzierende Wirkung der mit *L. helveticus*-Stämmen hergestellten Sauermilchprodukte - in diesen wie der Sauermilch Calpis<sup>TM</sup><sup>[27]</sup> und dem fermentierten Milchdrink Evolus<sup>®</sup><sup>[15]</sup> wurden blutdrucksenkende Peptide gefunden - festgestellt werden. In placebo-kontrollierten Versuchen erhielten im einen Falle 30 ältere Versuchspersonen mit Bluthochdruck täglich während acht Wochen 95 ml Sauermilch<sup>[69]</sup> und im anderen Falle 39 Patienten während 21 Wochen 150 ml mit *L. helveticus* LBK-16H fermentierte Milch<sup>[70]</sup>. In beiden Fällen konnte eine signifikante Reduktion des systolischen und diastolischen Blutdrucks erzielt werden.

Nach dem Verzehr von Milch (die verabreichte Magermilch, aus der auch Joghurt hergestellt wurde, wurde aus Milchpulver rekonstruiert) und Joghurt konnten im Magen und Zwölffingerdarm von erwachsenen Personen verschiedene Peptide nachgewiesen werden, darunter auch bioaktive Peptide. Beim Auftreten dieser Peptide bestehen zwischen Milch- und Joghurtverzehr einige markante Unterschiede, die auf die Fermentationsvorgänge im Joghurt, die unterschiedliche Passagerate von Milch und Joghurt, die Wirkung von Trypsin, Chymotrypsin und Carboxypeptidasen und die Absorption im Darm zurückzuführen sind (Tab. 4). In der gleichen Untersuchung<sup>[71]</sup> wurden sodann im Plasma das  $\kappa$ -Kaseinmakropeptid (106-169), bei dem es sich um einen Inhibitor der Plättchenaggregation handelt<sup>[72]</sup>, und das N-terminale Peptid des  $\alpha_{s1}$ -Kaseins (1-23 [Isradicin] nach 20 min und 1-21 nach 40 min) gefunden<sup>[71]</sup>. Bei Neugeborenen wie auch bei Erwachsenen wurden nach Milchverzehr im Darm wie auch

im Plasma bioaktive Peptide nachgewiesen:  $\beta$ -Casomorphin-immunreaktives Material im Dünndarm von Erwachsenen<sup>[73]</sup> und von neugeborenen Kälbern<sup>[74]</sup>, ein antithrombotisches Peptid aus dem  $\kappa$ -Kasein im Plasma von Neugeborenen<sup>[75]</sup> und immunreaktives Kaseinmakropeptid intraluminal<sup>[76]</sup>. Käse ist ein vorverdautes Lebensmittel und enthält deshalb bereits verschiedene bioaktive Peptide sowie in den Ausscheidungen von Ileostomiepatienten Kaseinphosphopeptide<sup>[77]</sup>.

Auch während der Verdauung der Käse können wie nach Milch- und Joghurtverzehr weitere Peptide entstehen, dabei wird sich Käse eher wie Joghurt verhalten. In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die Käseerzeugung ein dynamischer und teilweise ein langdauernder Prozess darstellt. Dabei können die dabei entstehenden Peptide zu noch kleineren Peptiden und zu freien Aminosäuren abgebaut werden.

## Folgerungen

Bioaktive Peptide, die natürlicherweise im Käse vorkommen, sind eine erfolgsversprechende Möglichkeit, um am Markt eine höhere Wertschöpfung zu erzielen. Die vorliegende Literaturübersicht zeigt, dass auch in traditionellen Schweizer Käsesorten mit dem natürlichen Vorkommen von bioaktiven Peptiden gerechnet werden kann.

Ein interessanter Aspekt ist sicher auch der Einsatz von *L. helveticus* in der Käseherstellung. Diesem Keim wird in vielen publizierten Arbeiten im Vergleich mit anderen Milchsäurebakterien ein grösseres Potenzial für die Bildung von bioaktiven Peptiden zugeschrieben. Der Einsatz von *L. helveticus* wäre auch aus wirtschaftlicher Sicht interessant, da er die Proteolyse zu beschleunigen verspricht.

*Das Literaturverzeichnis kann beim Verlag angefordert werden.*

**Nachdruck mit freundlicher Genehmigung durch die Redaktion der Zeitschrift Mitteilungen aus Lebensmitteluntersuchung und Hygiene.**