

Über das Vorkommen von bioaktiven Peptiden in Käse

Einleitung	3
Bioaktive Peptide aus Milchproteinen	4
Entstehung von Peptiden in Käse	5
Bioaktive Peptide in Käse	8
<i>ACE-hemmende Peptide</i>	8
<i>Casomorphine</i>	10
<i>Phosphopeptide</i>	11
<i>Andere bioaktive Peptide</i>	12
Haben bioaktive Peptide in Käse eine physiologische Wirkung?	12
Folgerungen	14
Zusammenfassung	14
Résumé	14
Summary	14
Key words	14
Literatur	15

Titelbild: Peptidmapping

Original erschienen in:
Mitt. Lebensm. Hyg. 94, 136-154 (2003)

Herausgeber:
FAM
Eidg. Forschungsanstalt für Milchwirtschaft
Liebefeld
CH-3003 Bern
Telefon +41 (0)31 323 84 18
Fax +41 (0)31 323 82 27
<http://www.fam-liebefeld.ch>
e-mail info@fam.admin.ch

Autoren:
Hans-Peter Bachmann, Ueli Bütikofer und Robert Sieber

Kontaktadresse für Rückfragen:
Dr. Hans-Peter Bachmann
e-mail hans-peter.bachmann@fam.admin.ch
Telefon +41 (0)31 323 84 91
Fax +41 (0)31 323 82 27

Gestaltung: Müge Yildirim

Erscheinungsweise:
In unregelmässiger Folge mehrmals jährlich.

Ausgabe:
Juli 2003, Nr. 456

ISSN 1660-2587

Über das Vorkommen von bioaktiven Peptiden in Käse

H.-P. Bachmann, U. Bütikofer und R. Sieber
Eidgenössische Forschungsanstalt
für Milchwirtschaft (FAM),
Liebefeld, CH-3003 Bern

Die primäre Rolle der Ernährung besteht darin, den Körper mit den verschiedenen Nährstoffen zu versorgen. Neue Forschungsergebnisse zeigen auf, dass die Ernährung zusätzlich verschiedene körperliche Funktionen beeinflussen und dadurch das Wohlbefinden steigern, das Krankheitsrisiko verringern und die Lebensqualität verbessern kann. Dies hat zur Entwicklung von neuen, gesundheitsfördernden Lebensmitteln (Functional Food) geführt.

Milch und Milchprodukte sind dank ihrer vielseitigen Zusammensetzung geradezu prädestiniert, diese wichtige Rolle in der Ernährung zu erfüllen. Dies umso mehr, da nebst den Hauptnährstoffen der Lebensmittel auch andere Stoffe mit spezifischen Funktionen vorhanden sind (1). Auch können diese Eigenschaften durch technologische Massnahmen beeinflusst werden (2). Am Beispiel der Käseherstellung kann dieser Einfluss auf den ernährungsphysiologischen Wert von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren dargestellt werden (Tab. 1). Unter den verschiedenen Substanzen, die technologisch beeinflusst werden können, steht im folgenden unter dem Einfluss der enzymatischen Hydrolyse das Vorkommen der Peptide und hier im speziellen dasjenige der bioaktiven Peptide im Zentrum des Interesses. Diese kommen natürlicherweise im Käse vor und entsprechen unter den fünf Megatrends:

- Gesundheit und Wohlbefinden
- Sicherheit
- Vergnügen
- Convenience
- Ethische Werte,

die in der Ernährung im Vordergrund stehen (3), dem Megatrend „Gesundheit und Wohlbefinden“.

Tabelle 1: Positive (+) und negative (-) technologische Einflussfaktoren bei der Käseherstellung auf den ernährungsphysiologischen Wert von Proteinen, Peptiden und Aminosäuren (modifiziert nach 2)

Technologische Faktoren	Physikochemische Veränderungen	Einfluss auf ernährungsphysiologischen Wert
Hitzebehandlung	Protein-Denaturierung	Verbesserung der Verdaulichkeit (+) Reduktion Trypsin-Inhibitor-Aktivität (+) Zerstörung hitzeempfindlicher Aminosäuren (-)
	Intramolekulare Reaktionen Reaktion mit Zucker Aktivierung Plasmin	Kreuzverbindungen (-) Blockierung von Lysin (-) Bildung von Peptiden (+)
pH-Veränderung	Saure Hydrolyse	Verbesserung der Verdaulichkeit (+) Unspezifische Spaltung von Peptidbrücken (-) Zerstörung säureempfindlicher Aminosäuren (-) Kreuzverbindungen (-) Isomerisierung, Racemisierung (-)
Enzymatische Hydrolyse	Reaktion mit Proteinasen Reaktion mit Peptidasen	Bildung von Peptiden (+) Abbau von Peptiden (-) Bildung von kleineren Peptiden (+)

Bioaktive Peptide aus Milchproteinen

Milchproteine sind unter den verschiedenen Lebensmittelproteinen die wichtigste Quelle für bioaktive Peptide (4). Letztere bestehen aus 3 bis 20 Aminosäuren und entstehen sowohl aus der Hydrolyse von Kaseinen als auch von Molkenproteinen (3):

- durch die Wirkung der Enzyme (Trypsin, Pepsin) im Verdauungstrakt
- bei der Fermentation mit proteolytischen Milchsäurebakterien
- durch die Wirkung der Enzyme von proteolytischen Mikroorganismen (Abb. 1).

Dabei ist die Spaltung durch Verdauungsenzyme der wichtigste Weg. Kaseine werden unter *in vivo*-Bedingungen zu verschiedenen bioaktiven Verbindungen abgebaut (6). Viele bioaktive Peptide haben verschiedene physiologische Wirkungen (7). *Darragh* (8) präsentiert eine aktuelle Übersicht über bioaktive Peptide, die aus Milchproteinen stammen. Darin sind 52 verschiedene Peptide aufgelistet, wobei die ACE-hemmenden Peptide (ACE = Angiotensin I-Converting Enzyme, EC 3.4.15.1, Angiotensin-

Umwandlungs-Enzym) mit ca. 30 % die grösste Gruppe darstellen. In Tab. 2 sind die aus den Milchproteinen entstandenen bioaktiven Peptide mit ihrer Aminosäuresequenz zusammengestellt.

Starterkulturen ohne hohe proteolytische Aktivität (Joghurt, Säurewecker) führten in den Untersuchungen von *Pihlanto-Leppälä et al.* (12) zu keinen bioaktiven Peptiden. Erst nach Zugabe von Trypsin oder Pepsin konnten bioaktive Peptide nachgewiesen werden. Dabei waren die Kasein-Peptide aktiver als die Molkenprotein-Peptide. Milchsäurebakterien mit einer höheren Proteinase-Aktivität wie z.B. *Lactobacillus (L.) helveticus* führen zu mehr bioaktiven Peptiden. Ihre Peptidasen können aber diese Peptide auch wieder abbauen (13). Nach *Takano* (14) ist einzig *L. helveticus* in der Lage, in Sauermilch blutdrucksenkende Peptide zu bilden. So ist beispielsweise bereits ein blutdrucksenkender Milchdrink mit der Bezeichnung Evolus^R auf dem finnischen Markt (15). Auch ist dieser Keim in der Lage, immunomodulierende Peptide in fermentierter Milch freizusetzen (16).

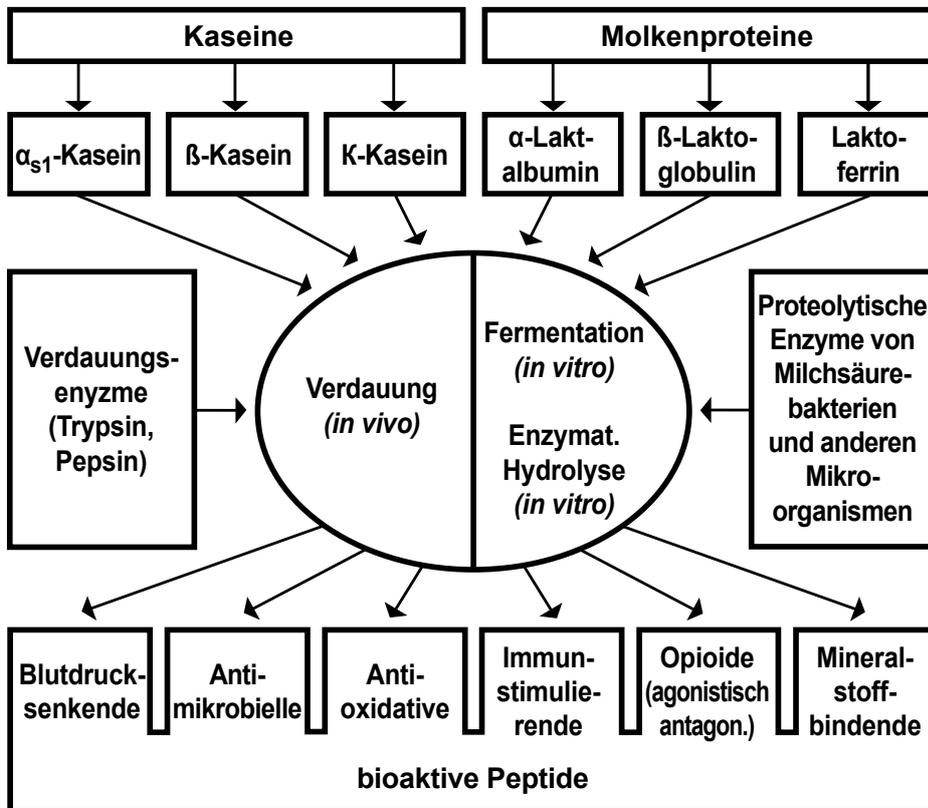


Abb. 1: Produktion von bioaktiven Peptiden (modifiziert nach 5)

Entstehung von Peptiden in Käse

Käse enthält natürlicherweise eine Vielzahl verschiedener Peptide, welche aus der Proteolyse des Kaseins stammen und Flavour und Textur mitprägen. Bei der Primärproteolyse werden die Kaseine durch Proteinase zu grösseren Peptiden gespalten. Die wichtigen Proteinase sind dabei:

- Chymosin
- Plasmin
- Proteinase der Rohmilchflora (bei Rohmilchkäse)
- Proteinase der Starterkulturen

Chymosin wird bei der Herstellung von Hartkäse während des Brennens des Käsebruches inaktiviert, die Primärproteolyse wird deshalb stark vom Plasmin geprägt. Letzteres wird zwar einerseits

durch die Erhitzung der Milch inaktiviert, andererseits ist aber die Plasmin-Aktivität nach der Milcherhitzung dennoch häufig höher, weil dabei Plasminogen zu Plasmin aktiviert wird. Durch das Plasmin wird das β-Kasein schneller hydrolysiert als das α_{s1}-Kasein. Chymosin spaltet bevorzugt das α_{s1}-Kasein (17). Die Bildung von bioaktiven Peptiden ist deshalb sehr stark vom Brennen des Käsebruches abhängig: in gebrannten Hartkäsen ist eher mit bioaktiven Peptiden aus dem β-Kasein und in Halbhartkäsen mit solchen aus dem α_{s1}-Kasein zu rechnen. Falls das Chymosin beim Brennen nicht inaktiviert wird, ist der Übergang in den Käse stark pH-abhängig: je tiefer der pH-Wert beim Abfüllen, desto höher der Chymosin-Gehalt im Käse.

Tabelle 2: Herkunft, Aminosäure-Sequenz und physiologische Wirkung der bioaktiven Peptide aus Milchproteinen (zusammengestellt nach 8–12)

<i>Bioaktive Peptide</i>	<i>Proteinquelle</i>	<i>Aminosäure-Sequenz</i>	<i>Physiologische Wirkung</i>
Casokinine	α_{s1} -Kasein	23-27, 23-34, 25-27, 28-34, 91-92, 142-147, 157-164, 194-199	ACE-hemmend
	β -Kasein	48-61, 49-61, 50-61, 52-61, 53-61, 54-61, 55-61, 56-61, 57-61, 58-61, 59-61, 60-66, 74-76, 84-86, 108-113, 140-143, 169-174, 177-179, 177-181, 177-183, 179-181, 181-183, 193-198, 193-202	ACE-hemmend
	α -Laktalbumin	18-19, 50-53	ACE-hemmend
	β -Laktoglobulin	102-103, 102-105, 104-105, 142-148, 146-149, 147-148, 148-149	ACE-hemmend
<i>Opioide</i>			
α -Casomorphine	α_{s1} -Kasein	90-95, 90-96, 91-96	Opioidagonisten
β -Casomorphine	β -Kasein	60-62, 60-63, 60-64, 60-65, 60-66, 60-67, 60-70	Opioidagonisten
Casoxine	κ -Kasein	25-34, 33-38, 34-38, 35-38, 35-42, 58-61	Opioidantagonisten
α -Laktorphin	α -Laktalbumin	50-53	Opioidagonist
β -Laktorphin	β -Laktoglobulin	102-105	Opioidagonist
Laktoferroxin	Laktoferrin	313-323	Opioidantagonist
Phosphopeptide	α_{s1} -Kasein	43-58, 59-79, 66-74	mineralbindend
	β -Kasein	1-25, 7-18, 29-41, 33-48	mineralbindend
Casoplateline	κ -Kasein	103-111, 106-112, 106-116, 112-116, 113-116	antithrombotisch
	Laktoferrin	39-42	antithrombotisch
Immunopeptide	α_{s1} -Kasein	194-199	immunstimulierend
	β -Kasein	1-25, 23-34, 28-34, 60-66, 63-68, 191-193, 191-199, 193-202	immunstimulierend
	α -Laktalbumin	18-20, 50-51	immunstimulierend
Isradicin	α_{s1} -Kasein	1-23	antimikrobiell
Casocidin	α_{s2} -Kasein	165-203	antimikrobiell
Laktoferricin	Laktoferrin	17-41	antimikrobiell
	β -Kasein	1-25, 60-66	cytomodulierend

Verschiedene Keime der Rohmilchflora wie *Pseudomonas* oder *Bacillus* spp. sind starke Proteinase-Bildner. Bei den Starterkulturen ist die Proteinase-Aktivität sehr unterschiedlich. Bei mesophilen Kulturen ist die Aktivität eher höher als bei thermophilen Kulturen. Unter den thermophilen Milchsäurebakterien ist die Aktivität bei *L. helveticus* höher als bei den Subspezies von *L. delbrueckii* oder *Str. thermophilus* (18).

Im Rahmen der Sekundärproteolyse werden anschliessend die grösseren Peptide durch die Wirkung der Peptidasen schrittweise verkleinert. Dabei werden die endständigen Aminosäuren sehr unterschiedlich schnell abgespalten. Dies bewirkt, dass einzelne Peptide im Käse sehr rasch weiter abgebaut werden, während andere Peptide länger vorliegen oder sogar akkumuliert werden können. Die Starterkulturen sind die weitestwichtigsten Peptidase-Bildner, womit die Sekundärproteolyse im Käse deshalb von der eingesetzten Starterkultur beeinflusst wird (18).

Die gesamte Proteolyse ist stark abhängig vom Wassergehalt, pH-Wert, Salzgehalt im Käse und von der Reifungszeit. Auch die Reifungstemperatur ist von grosser Bedeutung, insbesondere für die Primärproteolyse. Deshalb erstaunt es nicht, dass die nachgewiesenen Peptide zwischen den verschiedenen Arbeiten stark differieren können. Hinzu kommt noch, dass die Peptide sowohl aus dem wasserlöslichen wie auch wasserunlöslichen Extrakt isoliert und identifiziert werden. Dabei beschränkten sich diese Studien mehrheitlich auf Cheddar, Blauschimmelkäse, Parmigiano-Reggiano und Grana Padano sowie Serra da Estrela und Feta (19). Doch auch in Emmentaler konnten mehr als 100 wasserlösliche Peptide aufgetrennt werden (20) und von *Gagnaire et al.* (21) wurden 91 Peptide im Alter von 4, 13, 36 und 50 Tagen identifiziert, von denen die meisten vom α_{s1} - (n=51) und β -Kasein (n=28) und einige wenige vom α_{s2} - (n=9) und κ -Kasein (n=1) herkommen (Tab. 3).

α_{s1} -Kasein	α_{s2} -Kasein	β -Kasein	κ -Kasein
1-6, 1-7, 1-8, 1-9, 1-13, 1-14, 1-16, 1-21, 1-22, 1-23 3-9, 3-14 4-7, 4-9, 4-13, 4-14 5-21, 5-24 6-9, 6-13, 6-14, 6-21, 6-24 7-13, 7-14, 7-16, 7-23 8-13, 8-14, 8-23 9-14 10-14, 10-16, 10-23 14-21, 14-23 15-19, 15-21, 15-23 16-21, 16-22, 16-23 17-23 19-23 24-30 <u>25-30</u> , <u>25-32</u> 31-34, 31-35 32-35 34-38	1-21, 1-24 7-21 16-19 35-66 116-122 153-162 184-188 194-199	1-6, <u>1-28</u> 7-14 , <u>7-28</u> 8-28 11-14, 11-28 , 11-29 , 11-32? 12-28 13-28 15-25 , 15-28 16-25 , 16-28 18-25 29-31 33-52 64-67, 64-68, 64-69 <u>74-79</u> , <u>74-82</u> <u>82-88</u> 95-102, 95-107 <u>193-209</u> 199-202	20-24

Tabelle 3:
Aminosäuresequenz der im Saft von Emmentaler im Alter von 4, 13, 36 und 50 Tagen nachgewiesenen Peptide (21)

Bei den fett markierten Peptiden handelt es sich nach *Gagnaire et al.* um Phosphopeptide, beim kursiv markierten Peptid um Isradicin und bei den unterstrichenen Peptiden um solche, aus denen möglicherweise noch bioaktive Peptide entstehen könnten.

Die Situation mit den Peptiden in Käse wird dadurch noch komplexer, dass die Proteolyse einen dynamischen Prozess darstellt und während einer für jeden Käse unterschiedlichen Reifungsdauer ablaufen kann. Das zeigt sich deutlich in den vorerwähnten Untersuchungen von *Gagnaire et al.* (21) sowie von *Ferranti et al.* (22). Haben die ersten Autoren Emmentaler im Alter von 4, 13, 36 und 50 Tagen auf das Vorkommen von Peptiden untersucht (Tab. 3), dehnten die letzteren ihre Untersuchungen bei Grana Padano auf das Alter von 14 und 38 Monate aus. Im jüngeren Grana Padano fanden sie 30 vom β -, 44 vom α_{s1} -, 13 vom α_{s2} - und 3 vom κ -Kasein abstammende Peptide und im älteren handelte es sich bei 5 der 8 (β), 15 von 27 (α_{s1}), 0 von 1 (α_{s2}) und 1 von 2 (κ) noch vorhandenen Peptide um neu entstandene Peptide.

Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass unter den in Käsen vorhandenen Peptide auch natürlicherweise verschiedene bioaktive Peptide und deren Vorstufen vorkommen können. Auch Molke und Molkenproteinhydrolysate sind eine potenzielle Quelle für bioaktive Peptide (23 - 25).

Bioaktive Peptide in Käse

Der Vergleich der von *Gagnaire et al.* (21) nachgewiesenen Peptide im Emmentaler mit den bekannten aus dem Milchprotein abstammenden bioaktiven Peptiden (Tab. 2) zeigt, dass auch in Käse mit verschiedenen bioaktiven Peptiden zu rechnen ist (Tab. 3). Da es sich in dieser Studie um relativ junge Emmentaler handelt, können im weiteren Verlauf der Käsereifung aus einzelnen der aufgeführten Peptide wie auch aus dem noch nicht abgebauten Kaseinen zusätzlich bioaktive Peptide entstehen. Denn nach *Korhonen* und *Pihlanto-Leppälä* (7) verfügen Milchsäurebakterien über ein Transport-System für Aminosäuren, Di- und Tripeptide sowie Oligopeptide bis zu 18 Aminosäuren. Längere Oligopeptide,

die nicht absorbiert werden können, sind demnach eine potenzielle Quelle für die Bildung von bioaktiven Peptiden durch intrazelluläre Peptidasen, die nach der Autolyse freigesetzt werden.

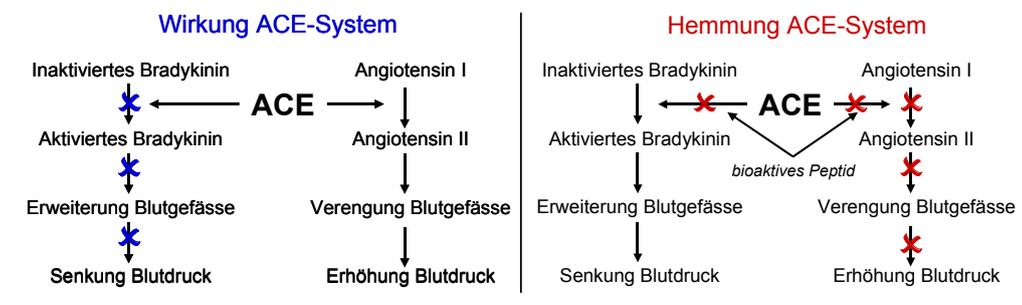
ACE-hemmende Peptide

Der Mechanismus der ACE-Hemmung ist in Abb. 2 dargestellt. Das ACE katalysiert die Umwandlung des Angiotensins I (Dekapeptid) in Angiotensin II (Oktapeptid), das stark gefäßverengend (vasokonstriktorisch) und damit blutdrucksteigernd wirkt. Gleichzeitig hemmt es die Aktivierung des inaktiven Bradykinins, das gefäßerweiternd (vasodilatierend) und damit blutdrucksenkend wirkt. Aus der Hemmung des ACE durch ACE-hemmende Peptide resultiert deshalb eine Blutdrucksenkung.

ACE-hemmende Peptide (Casokinine aus α_{s1} - und β -Kasein) wurden bereits mehrfach in Milch nachgewiesen (11). In Milch, die mit *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* SS1 oder *L. lactis* ssp. *cremoris* FT4 fermentiert wurden, konnten 34 Peptide gefunden werden, davon waren 26 resp. 16 mit einer ACE-hemmenden Wirkung. In der ersten waren es Peptide des β -Kaseins mit der Sequenz 6-14, 7-14, 73-82, 71-82, and 75-82 und in der zweiten 7-14, 47-52, and 169-175 (β -Kasein) und 155-160 and 152-160 (κ -Kasein). Diese Peptide waren gegenüber einer weiteren Proteolyse während der Herstellung oder durch Trypsin und Chymotrypsin resistent (26). Auch *Nakamura et al.* (27) fanden in Sauermilch, die mit *L. helveticus* und *Saccharomyces cerevisiae* fermentiert wurden, zwei ACE-hemmende Peptide mit der Aminosäuresequenz Val-Pro-Pro und Ile-Pro-Pro, die in der Primärstruktur des β -Kaseins (74-76, 84-86) und κ -Kaseins (108-110) vorkommen. Milch, die mit zwei Stämmen von *L. helveticus* (CHCC637 und CHCC641, Hansen) fermentiert wurden, enthielt ACE-hemmende Peptide, nicht aber mit *L. lactis* CHCC1448 (Hansen) fermentierte Milch (28). Der bereits erwähnte finnische Milchdrink wird mit *L. helveticus* LBK-16H hergestellt und enthält die Peptide Val-

Abbildung 2:

Mechanismus der ACE-Hemmung: Das Angiotensin-Umwandlungs-Enzym (ACE) katalysiert die Umwandlung des inaktiven Angiotensins I zu II und hemmt diejenige des inaktivierten Bradykinins (links). Bioaktive Peptide unterbinden die Wirkung des ACE (rechts).



Pro-Pro (VPP) und Ile-Pro-Pro (IPP) (15). In Milchprodukten mit einer schwachen Proteolyse (Joghurt, Quark, Frischkäse) war die ACE-hemmende Aktivität gering (29). Im weiteren wurden blutdrucksenkende Peptide auch in Protease-behandelten Molkenprotein (23), Sauermilch (30) und in einem mit *L. helveticus* CPN4 fermentierten Joghurt-ähnlichen Produkt (31) gefunden. Da *L. lactis* ssp. *cremoris* wie auch *L. helveticus* bei der Fabrikation von Käsen zum Einsatz gelangen, kann also auch in Käsen mit dem Vorkommen von diesen Peptiden gerechnet werden, was auch inzwischen mehrfach bestätigt wurde.

Bereits 1992 bezeichneten *Addeo et al.* (32) Parmigiano-Reggiano als eine Quelle für Peptide mit potenziell blutdrucksenkender Wirkung. Auch in anderen italienischen Käsesorten (Mozzarella, Italico, Crescenza, Gorgonzola) (4) wie auch in finnischen Käsen (33) wurden ACE-hemmende Peptide gefunden. Im wasserlöslichen Extrakt von Crescenza wurde das Peptid mit der stärksten ACE-Hemmung als Sequenz aus dem β -Kasein (β -CN 58-72) identifiziert und enthält somit die Sequenz des β -Casomorphins-7 (β -CN 60-66) (4). Dieses ACE-hemmende Peptid kann die Aktivität von Endopeptidasen und Aminopeptidasen, nicht aber der X-Prolyl-Dipeptidyl-Aminopeptidase von Laktokokken hemmen (34). Im weiteren

wurden im wasserlöslichen Extrakt von Norvegia, Jarlsberg, Cheddar und Blauschimmelkäsen Peptide mit einer ACE-Hemmung nachgewiesen. Es handelte sich dabei um Peptide mit der Sequenz 58-72, 193-209 und 194-209 des β -Kaseins (35). Dabei soll es sich beim Fragment 193-209 um ein Bitterpeptid handeln (36, 37), das durch eine intrazelluläre Oligoendopeptidase von *Lactococcus lactis* abgebaut werden kann (38).

Nach *Meisel et al.* (29) stieg in gereiften Käsen (Camembert, Edamer, Emmentaler, Gouda, Harzer, Leerdamer, Roquefort, Tilsiter, Cheddar, Parmesan) die ACE-hemmende Aktivität mit zunehmender Proteolyse bis zu einem Optimum an (Verhältnis der freien zu peptidgebundenen Aminosäuren ungefähr 0,5) und sank anschliessend wieder ab. Aus der Analyse des wässrigen Extraktes von Gouda mittleren Alters folgerten diese Autoren, dass viele verschiedene, kleine Peptide (2-4 Aminosäuren) für die ACE-hemmende Aktivität verantwortlich zeichnen. Auch in den Untersuchungen von *Saito et al.* (39) war die ACE-hemmende Aktivität in Gouda nach 24 Monaten kleiner als nach 8 Monaten. Diese Autoren stellten zudem bei Ratten, die mit den isolierten ACE-hemmenden Peptiden gefüttert wurden, eine Abnahme des Blutdrucks fest. In diese Untersuchungen wurde unter anderem auch ein Schwei-

zer Emmentaler einbezogen. Letzterer wies aber im Vergleich mit den anderen Käsesorten (Gouda, Edamer, Havarti, Camembert, Blauschimmelkäse) nur eine mittlere ACE-Hemmung auf. Die stärkste Hemmung bewirkte Gouda. Unter den vier isolierten Peptiden aus dem 8 Monate alten Gouda wiesen zwei (α_{s1} -Kasein 1-9; β -Kasein 60-68) eine wirksame ACE-hemmende Aktivität auf. Auch aus Emmentaler konnte ein Peptid mit der Sequenz 1-9 des α_{s1} -Kaseins isoliert werden (40). Dionysius *et al.* (41) wiesen blutdrucksenkende Peptide in Cheddar und Feta (Laktoferrin 288-289 und 319-320), nicht aber in Swiss, Camembert und Blauschimmelkäse nach.

Ryhänen et al. (33) entwickelten mit einem Gemisch von handelsüblichen Starterkulturen (12 verschiedene Stämme von *Lactococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Propionibacterium* sp., *Lactobacillus* sp., *L. acidophilus* und *Bifidobacterium* sp.) eine neue Käsesorte, die sie Festivo nannten und die sich durch verschiedene ernährungsphysiologische Vorteile auszeichnete: probiotische Mikroorganismen, reduzierter Fettgehalt und ACE-hemmende Peptide. Die ACE-Hemmung stieg mit fortschreitender Proteolyse an, erreichte nach 13 Wochen ihre Höhepunkt und nahm anschliessend wieder ab. Die drei Peptide mit der stärksten Hemmung wurden als N-terminale Peptide des α_{s1} -Kaseins identifiziert: (α_{s1} -CN 1-9), (α_{s1} -CN 1-7) und (α_{s1} -CN 1-6). Diese Autoren folgerten, dass Peptide aus der Primärproteolyse durch das Chymosin in der Folge durch Peptidasen der Starterkulturen weiter hydrolysiert wurden.

Nach *Gómez-Ruiz et al.* (42) sind verschiedene Peptide für die ACE-hemmende Wirkung von 8 Monate altem Manchego, aus Schafmilch hergestellt, verantwortlich. Aus dem wasserlöslichen Extrakt konnten zehn Peptide aus dem α_{s1} -Kasein, fünf aus dem α_{s2} -Kasein und sechs aus dem β -Kasein identifiziert werden und ein Dipeptid kann aus verschiedenen Kaseinen herkommen.

Diese Autoren ermittelten zudem in Käse aus roher Milch eine stärkere ACE-Hemmung als in Käse aus pasteurisierter Milch.

In einem Proteinhydrolysat eines Seetangs wurden sieben Dipeptide mit einer ACE-Hemmung bei spontan hypertensiven Ratten nachgewiesen: Val-Tyr, Ile-Tyr, Ala-Trp, Phe-Tyr, Val-Trp, Ile-Trp und Leu-Trp (43). Von diesen sind nur die drei Peptide Ala-Trp, Phe-Tyr und Leu-Trp in der Struktur eines Kaseins, des α_{s1} -Kaseins, vorhanden, sodass diese Dipeptide während der Proteolyse im Käse entstehen könnten.

Casomorphine

β -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 (11).

Die biologisch aktive Sequenz der Casomorphine besteht aus sieben Aminosäuren (Tyr-Pro-Phe-Pro-Gly-Pro-Ile) aus dem β -Kasein (β -CN 60-66). Das gesamte Peptid wird β -Casomorphin-7 genannt und es kann schrittweise zu weiteren Casomorphinen abgebaut werden. Biologische Aktivität wurde bis zum β -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 Prolin-spezifische Peptidasen (z.B. Pep-X) und können deshalb β -Casomorphine abbauen (44). Es gibt jedoch grosse Unterschiede zwischen den verschiedenen Käsesorten, so scheint Pep-X in Cheddar nur eine marginale Rolle zu spielen (45). Ein Mutant von *L. helveticus*, der keine X-Prolyl-

Dipeptidylaminopeptidase bildet, führte bei den Untersuchungen von Matar und Goulet (46) zu einem höheren Gehalt an β -Casomorphin-4.

Addeo et al. (32) wiesen in Parmigiano Reggiano (nach 2, 6 und 15 Monaten) Vorstufen von β -Casomorphinen nach. In 14 Monate altem Grana Padano fanden *Ferranti et al.* (22) sieben bioaktive Vorläufer-Peptide des β -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 β -Kasein-Vorläufer ist.

In Cheddar, Swiss, Blauschimmelkäse, Brie und Limburger fanden *Muehlenkamp* und *Warthesen* (44) keine β -Casomorphine. Sie konnten experimentell aufzeigen, dass β -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.* (47) 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 β -Casomorphin-7. Einzig in Cheddar fanden *Dionysius et al.* (41) β -Casomorphin-3, nicht aber in Edamer, Swiss, Feta, Camembert und Blauschimmelkäse. In Edamer (mit oder ohne Zusatz von Bifidobakterien) hingegen wiesen *Sabikhi* und *Mathur* (48) β -Casomorphin-3 in einer Konzentration von etwa 35 mg / 100 g nach, wobei der Gehalt im Verlauf der dreimonatigen Reifung leicht abnahm. Weder β -Casomorphin-5 noch Morphiceptin (β -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 β -Casomorphin-3 nachgewiesen.

Haileselassie et al. (49) fanden in Enzym-modifiziertem Käse β -Casomorphin-7, falls bei der Fabrikation einzig Neutrase[®] eingesetzt wurde. Wurden zusätzlich noch Enzyme von *L. casei* zugesetzt, konnte kein β -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 (7), fördern die Knochendichte und haben dadurch eine präventive Wirkung gegen Osteoporose (50).

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

Phosphopeptide können in Käse durch die saure Phosphatase dephosphoryliert werden (45, 51). So wurden in jungem Emmentaler die Peptide mit der Aminosäuresequenz 12-28, 13-28, 15-28 und 15-25 des β -Kaseins dephosphoryliert (21). Diese Phosphatase kommt in der Milch vor und wird zudem auch von verschiedenen Milchsäurebakterien gebildet. Lavanchy und Bühlmann (53) fanden in verschiedenen Schweizer Käsesorten

allerdings einen hohen Gehalt an Phosphoserin, was darauf schliessen lässt, dass die Aktivität der sauren Phosphatase begrenzt ist¹.

Andere bioaktive Peptide

Die Wirkung der bioaktiven Peptide auf das Immunsystem und dessen Stimulation durch diese Peptide ist äusserst komplex (7). *Dionysius et al.* (41) konnten die immunstimulierenden Peptide mit der Aminosäuresequenz 193-209 und 192-209 des β -Kaseins in allen untersuchten Käsesorten (Cheddar, Edamer, Swiss, Feta, Camembert und Blauschimmelkäse) nachweisen. Auch in jungem Emmentaler wurde ein immunstimulierendes Peptid (193-209 des β -Kaseins) gefunden (Tab. 3). Ebenso können Phosphopeptide immunstimulierend wirken (6). Im weiteren fanden *Dionysius et al.* (41) in Blauschimmelkäse ein Peptid gegen Gedächtnisschwund (β -CN A1 59-67).

Zu den bioaktiven Peptiden zählen auch antimikrobiell wirkende und cytomodulierende Peptide (Tab. 2). Isracidin (α_{S1} -CN 1-23) wird durch Chymosin abgespalten und vermag *Staphylococcus aureus* und *Candida albicans* zu hemmen (55). Es wurde in jungem französischem Emmentaler nachgewiesen (Tab. 3) und auch dieses Peptid kann in Käse durch die Wirkung einer intrazellulären Proteinase abgebaut werden (56, 57). Peptide aus einem lyophilisierten Extrakt von Gouda hemmen die Vermehrung von Leukämiezellen (58). Aus Edamer wurde ein Peptid mit der Sequenz 47-52 des β -Kaseins isoliert, das in einem in vitro-Caco-2-Zellmodell die Absorption von β -Laktoglobulins hemmte (59).

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, lie-

gen Daten zu den Phosphopeptiden im Zusammenhang mit der Kariesprävention vor. Dass Käse eine antikariogene Wirkung aufweist, wurde bereits mehrfach aufgezeigt (60). 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 Kaufflächenabriebes, der Zahndefekte und der Fissurenkaries ab, während Butterkäse, Camembert, Cheddar, Doppelrahmfrischkäse, Emmentaler, Greyerzer und Schafkäse das Ausmass der Zahndefekte nicht beeinflussten sowie mit jungem und alten Gouda, Roquefort und Stilton nur das Ausmass der Beläge abnahm (61). 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 (62 - 64). Dagegen beeinflussten Kaseinphosphopeptide in fermentierter Milch den Kalziumstoffwechsel von postmenopausalen Frauen nicht (65).

Für die übrigen bioaktiven Peptide in Käse wie beispielsweise den ACE-hemmenden Peptiden sind physiologische Wirkungen in Analogie zu anderen Daten wie den mit Sauermilchprodukten erzielten Resultaten zu erwarten. In Versuchen mit spontanen hypertensiven Ratten (28, 66 - 68) wie auch beim Menschen (69, 70) konnte eine blutdrucksenkende Wirkung der mit *L. helveticus*-Stämmen hergestellten Sauermilchprodukte - in diesen wie der Sauermilch Calpis™ (27) und dem fermentierten Milchdrink Evolus® (15) wurden blutdrucksenkende Peptide gefunden - festgestellt werden. In placebo-kontrollierten Versuchen

¹Wahrscheinlich handelt es sich bei dem freien Phosphoserin um Phosphopeptide (54).

Tabelle 4:
Im menschlichen Magen und Zwölffingerdarm identifizierte Kasein-Peptide nach Milch- oder Joghurtverzehr (71.)

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

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.

erhielten im einen Falle 30 ältere Versuchspersonen mit Bluthochdruck täglich während acht Wochen 95 ml Sauermilch (69) und im anderen Falle 39 Patienten während 21 Wochen 150 ml mit *L. helveticus* LBK-16H fermentierte Milch (70). In beiden Fällen konnte eine signifikante Reduktion des systolischen und diastolischen Blutdrucks erzielt werden.

Nach dem Verzehr von Milch² 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 sowie die Absorption im Darm zurückzuführen sind (Tab. 4). In der gleichen Untersuchung (71) wurden sodann im Plasma das κ -Kaseinmakropeptid (106-169), bei dem es sich um einen Inhibitor der Plättchenaggregation handelt (72), und das N-terminale Peptid des α_{s1} -Kaseins (1-23 [Isradicin] nach 20 min und 1-21 nach 40 min) gefunden (71). Bei Neugeborenen wie auch bei Erwachsenen wurden nach Milchverzehr im Darm wie auch im Plasma bioaktive Peptide nachgewiesen: β -Casomorphin-immunreaktives Material im Dünndarm von Erwachsenen (73) und von neugeborenen Kälbern (74), ein antithrombotisches

²Die verabreichte Magermilch, aus der auch Joghurt hergestellt wurde, wurde aus Milchpulver rekonstituiert.

Peptid aus dem κ -Kasein im Plasma von Neugeborenen (75) und immunreaktives Kaseinmakropeptid intraluminal (76) sowie in den Ausscheidungen von Ileostomiepatienten Kaseinphosphopeptide (77).

Käse ist ein vorverdautes Lebensmittel und enthält deshalb bereits verschiedene bioaktive Peptide. 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 Käse- reifung ein dynamischer und teilweise ein lange dauernder 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 Erfolg versprechende 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.

Zusammenfassung

Während der Käsereifung entsteht aus den Kaseinen ein Vielzahl verschiedener Peptide. Einige davon weisen günstige biologische Eigenschaften auf. Es wird

in dieser Übersicht über das Vorkommen von ACE-hemmenden Peptiden, Casomorphinen und Phosphopeptiden in Käse berichtet. Es zeigt sich, dass sich die Käse in bezug auf das Vorkommen von bioaktiven Peptiden unterscheiden können. Damit erweist sich der Käse als ein Lebensmittel, das neben der Lieferung von Nährstoffen noch zusätzliche interessante Eigenschaften aufweist.

Résumé

Durant l'affinage du fromage, de nombreux peptides différents se constituent à partir des caséines. Parmi ces derniers, certains possèdent des propriétés biologiques avantageuses. La présente revue traite des peptides inhibiteurs ACE, des casomorphines et des phosphopeptides dans le fromage. On constate que les fromages peuvent se différencier en fonction de la présence de peptides bioactifs. Il s'avère ainsi que le fromage, en tant qu'aliment, possède outre ses nutriments, d'autres propriétés intéressantes.

Summary «On the occurrence of bioactive peptides in cheese»

During the ripening of cheese, numerous different peptides are formed from casein. Some of these peptides have advantageous biological properties. The present review deals with ACE peptide inhibitors, casomorphins and phosphopeptides in cheese. Cheeses may be differentiated as a function of their bioactive peptides. Cheese, as a food, possess additional interesting properties besides nutrients.

Key words

Cheese, Bioactive peptide, Antihypertensive peptide, Casomorphin, Phosphopeptide

Literatur

- 1 *Steijns J.M.*:
Milk ingredients as nutraceuticals. *Int. J. Dairy Tech.* **54**, 81-88 (2001).
- 2 *Korhonen H., Pihlanto-Leppälä A., Rantamäki P. and Tupasela T.*:
Impact of processing on bioactive proteins and peptides. *Trends Food Sci. Tech.* **9**, 307-319 (1998).
- 3 *Korhonen H.*:
Technology options for new nutritional concepts. *Int. J. Dairy Tech.* **55**, 79-88 (2002).
- 4 *Smacchi E. and Gobetti M.*:
Peptides from several Italian cheeses inhibitory to proteolytic enzymes of lactic acid bacteria, *Pseudomonas fluorescens* ATCC 948 and to the angiotensin I-converting enzyme. *Enzyme Microb. Tech.* **22**, 687-694 (1998).
- 5 *Korhonen H.*:
Technology options for new nutritional concepts. IDF World Dairy Summit, Emerging Technology Conference (2001).
- 6 *Meisel H.*:
Bioactive peptides from milk proteins: a perspective for consumers and producers. *Aust. J. Dairy Tech.* **56**, 83-92 (2001).
- 7 *Korhonen H. and Pihlanto-Leppälä A.*:
Milk protein-derived bioactive peptides - Novel opportunities for health promotion. *Bull. Int. Dairy Federation* **363**, 17-26 (2001).
- 8 *Darragh A.J.*:
Physiological impact of milk protein-encrypted bioactive peptides. *Bull. Int. Dairy Federation* **375**, 25-31 (2002).
- 9 *Sieber R.*:
Über die Bedeutung der Milchproteine in der menschlichen Ernährung. *Schweiz. Milchwirt. Forsch.* **25**, 25-32 (1996).
- 10 *Dziuba J., Minkiewicz P., Nalecz D. and Iwaniak A.*:
Database of biologically active peptide sequences. *Nahrung* **43**, 190-195 (1999).
- 11 *Meisel H. and Schlimme E.*:
Bioactive peptides derived from milk proteins: Ingredients for functional foods? *Kieler Milchwirt. Forschungsber.* **48**, 343-357 (1996).
- 12 *Pihlanto-Leppälä A., Rokka T. and Korhonen H.*:
Angiotensin I converting enzyme inhibitory peptides derived from bovine milk proteins. *Int. Dairy J.* **8**, 325-331 (1998).
- 13 *Maeno M., Yamamoto N. and Takano T.*:
Identification of an antihypertensive peptide from casein hydrolysate produced by a protease from *Lactobacillus helveticus* CP790. *J. Dairy Sci.* **79**, 1316-1321 (1996).
- 14 *Takano T.*:
Milk derived peptides and hypertension reduction. *Int. Dairy J.* **8**, 375-381 (1998).
- 15 *Korpela R.*:
Development and commercialization of Evolus^R antihypertensive milk drink - a case study. *Bull. Int. Dairy Federation* **375**, 70-71 (2002).
- 16 *LeBlanc J.G., Matar C., Valdez J.C., LeBlanc J. and Perdigon G.*:
Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. *J. Dairy Sci.* **85**, 2733-2742 (2002).
- 17 *Kerjean J.R., Bachmann H.P. and Cogan T.*:
Technical note: Cooking temperature of whey and curd during Emmental cheesemaking. *Milchwissenschaft* **56**, 556-556 (2001).
- 18 *Deutsch S.M., Molle D., Gagnaire V., Piot M., Atlan D. and Lortal S.*:
Hydrolysis of sequenced β -casein peptides provides new insight into peptidase activity from thermophilic lactic acid bacteria and highlights intrinsic resistance of phosphopeptides. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 5360-5367 (2000).
- 19 *Sousa M.J., Ardö Y. and McSweeney P.L.H.*:
Advances in the study of proteolysis during cheese ripening. *Int. Dairy J.* **11**, 327-345 (2001).
- 20 *Bütikofer U., Baumann E., Sieber R. and Bosset J.O.*:
Ripening of Emmental cheese wrapped in foil with and without addition of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*. IV. HPLC separation of water soluble peptides. *Lebensm.-Wiss. u. -Tech.* **31**, 297-301 (1998).
- 21 *Gagnaire V., Molle D., Herrouin M. and Léonil J.*:
Peptides identified during emmental cheese ripening: Origin and proteolytic systems involved. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 4402-4413 (2001).
- 22 *Ferranti P., Itolli E., Barone F., Malorni A., Garro G., Laezza P., Chianese L., Migliaccio F., Stingo V. and Addeo F.*:
Combined high resolution chromatographic techniques (FPLC and HPLC) and mass spectrometry-based identification of peptides and proteins in Grana Padano Cheese. *Lait* **77**, 683-697 (1997).

- 23 *Abubakar A., Saito T., Kitazawa H., Kawai Y. and Itoh T.:*
Structural analysis of new antihypertensive peptides derived from cheese whey protein by proteinase K digestion. *J. Dairy Sci.* **81**, 3131-3138 (1998).
- 24 *Shah N.P.:*
Effects of milk-derived bioactives: an overview. *Brit. J. Nutr.* **84**, S3-S10 (2000).
- 25 *van der Ven C., Gruppen H., de Bont D.B.A. and Voragen A.G.J.:*
Optimisation of the angiotensin converting enzyme inhibition by whey protein hydrolysates using response surface methodology. *Int. Dairy J.* **12**, 813-820 (2002).
- 26 *Gobbetti M., Ferranti P., Smacchi E., Goffredi F. and Addeo F.:*
Production of angiotensin-I-converting-enzyme-inhibitory peptides in fermented milks started by *Lactobacillus delbrueckii* subsp *bulgaricus* SS1 and *Lactococcus lactis* subsp *cremoris* FT4. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3898-3904 (2000).
- 27 *Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K., Okubo A., Yamazaki S. and Takano T.:*
Purification and characterization of antitensin I-converting enzyme inhibitors from sour milk. *J. Dairy Sci.* **78**, 777-783 (1995).
- 28 *Fuglsang A., Nilsson D. and Nyborg N.C.B.:*
Cardiovascular effects of fermented milk containing angiotensin-converting enzyme inhibitors evaluated in permanently catheterized, spontaneously hypertensive rats. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 3566-3569 (2002).
- 29 *Meisel H., Goepfert A. and Günther S.:*
ACE-inhibitory activities in milk products. *Milchwissenschaft* **52**, 307-311 (1997).
- 30 *Masuda O., Nakamura Y. and Takano T.:*
Antihypertensive peptides are present in aorta after oral administration of sour milk containing these peptides to spontaneously hypertensive rats. *J. Nutr.* **126**, 3063-3068 (1996).
- 31 *Yamamoto N., Maeno M. and Takano T.:*
Purification and characterization of an antihypertensive peptide from a yogurt-like product fermented by *Lactobacillus helveticus* CPN4. *J. Dairy Sci.* **82**, 1388-1393 (1999).
- 32 *Addeo F., Chianese L., Salzano A., Sacchi R., Cappuccio U., Ferranti P. and Malori A.:*
Characterization of the 12% trichloroacetic acid-insoluble oligopeptides of Parmigiano-Reggiano cheese. *J. Dairy Res.* **59**, 401-411 (1992).
- 33 *Ryhänen E.L., Pihlanto-Leppälä A. and Pahkala E.:*
A new type of ripened, low-fat cheese with bioactive properties. *Int. Dairy J.* **11**, 441-447 (2001).
- 34 *Stepaniak L., Fox P.F., Sorhaug T. and Grabska J.:*
Effect of peptides from the sequence 58-72 of β -casein on the activity of endopeptidase, aminopeptidase, and X-prolyl-dipeptidyl aminopeptidase from *Lactococcus lactis* ssp *lactis* MG1363. *J. Agric. Food Chem.* **43**, 849-853 (1995).
- 35 *Stepaniak L., Jedrychowski L., Wroblewska B. and Sorhaug T.:*
Immunoreactivity and inhibition of angiotensin-I converting enzyme and lactococcal oligopeptidase by peptides from cheese. *Ital. J. Food Sci.* **13**, 373-381 (2001).
- 36 *Soeryapranata E., Powers J.R., Hill H.H., Siems W.F., Al-Saad K. and Weller K.M.:*
Matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry method for the quantification of β -casein fragment (f193-209). *J. Food Sci.* **67**, 534-538 (2002).
- 37 *Soeryapranata E., Powers J.R., Fajarrini F., Weller K.M., Hill H.H. and Siems W.F.:*
Relationship between MALDI-TOF analysis of β -CN f193-209 concentration and sensory evaluation of bitterness intensity of aged cheddar cheese. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 4900-4905 (2002).
- 38 *Baankreis R., van Schalkwijk S., Alting A.C. and Exterkate F.A.:*
The occurrence of two intracellular oligoendopeptidases in *Lactococcus lactis* and their significance for peptide conversion in cheese. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **44**, 386-392 (1995).
- 39 *Saito T., Nakamura T., Kitazawa H. Kawai Y. and Itoh T.:*
Isolation and structural analysis of antihypertensive peptides that exist naturally in Gouda cheese. *J. Dairy Sci.* **83**, 1434-1440 (2000).
- 40 *Combes C., Paterson E. and Amadò R.:*
Isolation and identification of low-molecular-weight peptides from Emmentaler cheese. *J. Food Sci.* **67**, 553-559 (2002).
- 41 *Dionysius D.A., Marschke R.J., Wood A.J., Milne J., Beattie T.R., Jiang H., Treloar T., Alewood P.F. and Grieve P.A.:*
Identification of physiologically functional peptides in dairy products. *Aust. J. Dairy Tech.* **55**, 103 (2000).

- 42 Gomez-Ruiz J.A., Ramos M. and Recio I.: Angiotensin-converting enzyme-inhibitory peptides in Manchego cheeses manufactured with different starter cultures. *Int. Dairy J.* **12**, 697-706 (2002).
- 43 Sato M., Hosokawa T., Yamaguchi T., Nakano T., Muramoto K., Kahara T., Funayama K., Kobayashi A. and Nakano T.: Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides derived from wakame (*Undaria pinnatifida*) and their antihypertensive effect in spontaneously hypertensive rats. *J. Agric. Food Chem.* **50**, 6245-52 (2002).
- 44 Muehlenkamp M.R. and Warthesen J.J.: β -casomorphins: analysis in cheese and susceptibility to proteolytic enzymes from *Lactococcus lactis* ssp *cremoris*. *J. Dairy Sci.* **79**, 20-26 (1996).
- 45 Singh T.K., Fox P.F. and Healy A.: Isolation and identification of further peptides in the diafiltration retentate of the water-soluble fraction of Cheddar cheese. *J. Dairy Res.* **64**, 433-443 (1997).
- 46 Matar C. and Goulet J.: β -casomorphin-4 from milk fermented by a mutant of *Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.* **6**, 383-397 (1996).
- 47 Jarmolowska B., Kostyra E., Krawczuk S. and Kostyra H.: β -casomorphin-7 isolated from Brie cheese. *J. Sci. Food Agric.* **79**, 1788-1792 (1999).
- 48 Sabikhi L. and Mathur B.N.: Qualitative and quantitative analysis of β -casomorphins in Edam cheese. *Milchwissenschaft* **56**, 198-200 (2001).
- 49 Haileselassie S.S., Lee B.H. and Gibbs B.F.: Purification and identification of potentially bioactive peptides from enzyme-modified cheese. *J. Dairy Sci.* **82**, 1612-1617 (1999).
- 50 FitzGerald R.J.: Potential uses of caseinophosphopeptides. *Int. Dairy J.* **8**, 451-457 (1998).
- 51 Roudot-Algaron F., LeBars D., Kerhoas L., Einhorn J. and Gripon J.C.: Phosphopeptides from Comte cheese: nature and origin. *J. Food Sci.* **59**, 544-547 (1994).
- 52 Ferranti P., Barone F., Chianese L., Addeo F., Scaloni A., Pellegrino L. and Resmini P.: Phosphopeptides from Grana Padano cheese: nature, origin and changes during ripening. *J. Dairy Res.* **64**, 601-615 (1997).
- 53 Lavanchy P. et Bühlmann C.: Valeurs normales de certains paramètres importants du métabolisme pour des fromages fabriqués en Suisse. *Schweiz. Milchwirt. Forsch.* **12**, 3-12 (1983).
- 54 de Noni I., Pellegrino L., Resmini P. and Ferranti P.: About presence of free phosphoserine in ripened cheese and in enzymatic hydrolysate of casein. *Nahrung* **41**, 268-273 (1997).
- 55 Lahov E. and Regelson W.: Antibacterial and immunostimulating casein-derived substances from milk: casecidin, isracidin peptides. *Food Chem. Toxicol.* **34**, 131-145 (1996).
- 56 Exterkate F.A. and Alting A.C.: The conversion of the α_{s1} -casein-(1-23)-fragment by the free and bound form of the cell-envelope proteinase of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* under conditions prevailing in cheese. *Syst. Appl. Microbiol.* **16**, 1-8 (1993).
- 57 Exterkate F.A. and Alting A.C.: The role of starter peptidases in the initial proteolytic events leading to amino acids in gouda cheese. *Int. Dairy J.* **5**, 15-28 (1995).
- 58 Meisel H. and Günther S.: Food proteins as precursors of peptides modulating human cell activity. *Nahrung* **42**, 175-176 (1998).
- 59 Tanabe S., Tesaki S., Watanabe J., Fukushi E., Sonoyama K. and Kawabata J.: Isolation and structural elucidation of a peptide derived from Edam cheese that inhibits β -lactoglobulin transport. *J. Dairy Sci.* **86**, 464-468 (2003).
- 60 Sieber R. und Graf H.: Hemmt Käse die Zahnkaries? *Ernährung* **14**, 63-70 (1990).
- 61 Pause B. and Lembke J.: Comparative examination of anti-caries effect of cheeses. II. Results and conclusions. *Milchwissenschaft* **48**, 137-141 (1993).
- 62 Reynolds E.C., Cain C.J., Webber F.L., Black C.L., Riley P.F., Johnson I.H. and Perich J.W.: Anticariogenicity of calcium phosphate complexes of tryptic casein phosphopeptides in the rat. *J. Dent. Res.* **74**, 1272-1279 (1995).
- 63 Reynolds E.C.: Remineralization of enamel subsurface lesions by casein phosphopeptide-stabilized calcium phosphate solutions. *J. Dent. Res.* **76**, 1587-1595 (1997).

- 64 *Rose R.K.:*
Effects of an anticariogenic casein phosphopeptide on calcium diffusion in streptococcal model dental plaques. *Arch. Oral Biol.* **45**, 569-575 (2000).
- 65 *Narva M., Karkkainen M., Poussa T., Lamberg-Allardt C. and Korpela R.:*
Caseinphosphopeptides in milk and fermented milk do not affect calcium metabolism acutely in postmenopausal women. *J. Amer. Coll. Nutr.* **22**, 88-93 (2003).
- 66 *Nakamura Y., Yamamoto N., Sakai K. and Takano T.:*
Antihypertensive effect of sour milk and peptides isolated from it that are inhibitors to angiotensin I-converting enzyme. *J. Dairy Sci.* **78**, 1253-1257 (1995).
- 67 *Nakamura Y., Masuda O. and Takano T.:*
Decrease of tissue angiotensin I-converting enzyme activity upon feeding sour milk in spontaneously hypertensive rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **60**, 488-489 (1996).
- 68 *Leclerc P.-L., Gauthier S.F., Bachelard H., Santure M. and Roy D.:*
Antihypertensive activity of casein-enriched milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Int. Dairy J.* **12**, 995-1004 (2002).
- 69 *Hata Y., Yamamoto M., Ohni M., Nakajima K., Nakamura Y. and Takano T.:*
A placebo-controlled study of the effect of sour milk on blood pressure in hypertensive subjects. *Amer. J. Clin. Nutr.* **64**, 767-771 (1996).
- 70 *Seppo L., Jauhiainen T., Poussa T. and Korpela R.:*
A fermented milk high in bioactive peptides has a blood pressure-lowering effect in hypertensive subjects. *Amer. J. Clin. Nutr.* **77**, 326-330 (2003).
- 71 *Chabance B., Marteau P., Rambaud J.C., Migliore-Samour D., Boynard M., Perrotin P., Guillet R., Jollès P. and Fiat A.M.:*
Casein peptide release and passage to the blood in humans during digestion of milk or yogurt. *Biochimie* **80**, 155-165 (1998).
- 72 *Manso M.A., Escudero C., Alijo M. and Lopez-Fandino R.:*
Platelet aggregation inhibitory activity of bovine, ovine, and caprine κ -casein macropeptides and their tryptic hydrolysates. *J. Food Prot.* **65**, 1992-1996 (2002).
- 73 *Svedberg J., de Haas J., Leimenstoll G., Paul F. and Teschemacher H.:*
Demonstration of β -casomorphin immunoreactive materials in in vitro digests of bovine milk and in small intestine contents after bovine milk ingestion in adult humans. *Peptides* **6**, 825-830 (1985).
- 74 *Umbach M., Teschemacher H., Praetorius K., Hirschhauser R. and Bostedt H.:*
Demonstration of a β -casomorphin immunoreactive material in the plasma of newborn calves after milk intake. *Regul. Peptides* **12**, 223-230 (1985).
- 75 *Chabance B., Jollès P., Izquierdo C., Mazoyer E., Francoual C., Drouet L. and Fiat A.M.:*
Characterization of an antithrombotic peptide from κ -casein in newborn plasma after milk ingestion. *Brit. J. Nutr.* **73**, 583-590 (1995).
- 76 *Ledoux N., Mahé S., Dubarry M., Bourras M., Benamouzig R. and Tomé D.:*
Intraluminal immunoreactive caseinomacropptide after milk protein ingestion in humans. *Nahrung* **43**, 196-200 (1999).
- 77 *Meisel H., Bernard H., Fairweather-Tait S., FitzGerald R.J., Hartmann R., Lane C.N., McDonagh D., Teucher B. and Wal J.M.:*
Detection of caseinophosphopeptides in the distal ileostomy fluid of human subjects. *Brit. J. Nutr.* **89**, 351-359 (2003).