

Rapport

Bioaktive komponenter i kød

Dato 7. maj 2010
Proj.nr. 1378961-02
Version 1
KIJ/MT

Litteraturstudium

Baggrund

Der eksisterer i dag en lang række eksempler på, at kødbaserede bioaktive komponenter besidder sundhedsfremmende egenskaber. F.eks. findes carnosin, anserin, L-carnitine, konjugeret linolsyre (CLA), glutathione, taurin og kreatin i denne kategori [3]. Der er især meget fokus på de bioaktive komponenter afledt fra proteinfraktionen i kød, der også af fødevareindustrien betragtes som en meget lovende gruppe funktionelle ingredienser i relation til human sundhed [4].

Formålet med nærværende litteraturstudium er at få klarlagt, hvilke anvendelsesmuligheder der er for kommerciel udnyttelse af bioaktive peptider fra kød. Specielt vil mulighederne for en produktion af funktionelle peptider på basis af "low value" udskæringer og slagteriaffald blive belyst.

Der er tidligere gennemført et litteraturstudium med henblik på at opsummere den nuværende viden omkring bioaktive komponenter, specielt i svinekød [16]. I gruppen af bioaktive komponenter var de blodtrykssænkende peptider dem, der var bedst beskrevet. Som afgrænsning i det tidligere litteraturstudium blev der fokuseret på de peptider, der udviser inhiberende aktivitet overfor ACE (Angiotensin I-converting enzyme), et enzym der er involveret i bl.a. regulering af blodtryk og vandladning.

Introduktion

Mange af de peptider, der frigøres *in vitro* eller *in vivo* fra animalske og vegetabiliske proteiner, er bioaktive og har en fysiologisk funktion i mennesker med normal eller tilstrækkelig ernæringstilstand.

Peptiderne har været tilskrevet forskellige sundhedseffekter:

- inhibering af ACE-aktivitet
- antimikrobiel aktivitet
- kolesterolsænkende effekt
- reduktion af risikoen for blodpropper (antithrombose)
- regulering af blodsukkerniveau
- antioxidant aktivitet
- forøgelse af mineralabsorption og/eller bio-tilgængeligheden
- immunomodulerende funktion
- smertelindring m.m. (opiate peptider)
- prebiotisk funktion
- regulering af energimetabolismen

Hvorvidt peptider og hydrolysater fra kødproteiner besidder ovennævnte egenskaber, og derfor sandsynligvis også kan udnyttes som ingredienser i fysiologiske funktionelle levnedsmidler eller kosttilskud, vil blive klarlagt i den følgende gennemgang. Desuden gennemgås kort mulighederne for udvikling af fermenterede funktionelle kødprodukter, eller for "genopdagelse" af funktionaliteten i de eksisterende produkter, som det har været tilfældet for flere mejeriprodukter.

De anvendte metoder til fremstilling af hydrolysater, samt til dokumentation af den forventede effekt, vil blive samlet i et selvstændigt afsnit.

Sundhedsfremmende egenskaber i bioaktive komponenter, udvundet fra animalske proteiner

Inhibering af ACE-aktivitet

Enzymet ACE (Angiotensin I-converting enzyme) spiller en vigtig rolle i regulering af blodtryk og vandladning. Enzymet omdanner angiotensin I til angiotension II, der medfører karsammentrækning, øget perifer karmodstand, øget natrium- og vandretention og dermed øget blodtryk. ACE inaktiverer desuden et karudvidende peptid. ACE-hæmmere anvendes i behandlingen af forhøjet blodtryk, og de vigtigste farmakologiske virkninger er karudvidelse, øget natriumudskillelse, øget vandladning og nedsat blodtryk [1, cf. 16].

Peptider med ACE-inhiberende effekt er blevet isoleret fra forskellige fødevarer som mælk, majs, sojabønner, hvede og fisk. Inden for de senere år er ACE inhiberende peptider desuden isoleret fra svinekød samt biprodukter fra slagting [11, 19].

Antimikrobiel aktivitet

Antimikrobielle peptider har været isoleret fra såvel æg- som mælkeproteiner. Der har været særlig opmærksomhed omkring peptider dannet ved hydrolyse af lactoferrin fra mælk, der udviser en bred antibakteriel aktivitet mod både gram-positive og gram-negative bakterier [cf. 4].

Den viden, der ligger indenfor kødområdet, er meget ny [7]. I det pågældende arbejde blev hydrolysater fra sarcoplasmatiske og cytoplasmatiske proteiner i lever og lungevæv fra kvæg undersøgt for antimikrobiel aktivitet. Peptider med en molekylvægt < 10 kDa blev afprøvet i mikrobiologiske assays mod forskellige gram-positive og gram-negative mikroorganismer. Resultaterne viste, at leverhydrolysater kunne reducere væksten af E. Coli mellem 60 og 98 %, afhængig af hvor lang tid leveren havde været hydrolyseret. Hydrolysaterne forventes at kunne anvendes som naturligt konserveringsmiddel. Resultaterne blev præsenteret ved ICoMST 2009 [7]. Der er endnu ikke udarbejdet yderligere officielle publikationer.

Kolesterolsænkende effekt

Mælk og sojaproteiner besidder en kolesterolsænkende effekt, der er påvist i et peptid fra enzymatisk hydrolyse af β -lactoglobulin [cf. 4]. Der har i de senere år været arbejdet med hydrolysater fra kalvehjerter, der ligeledes har vist sig at kunne sænke den micellære opløselighed af kolesterol *in vitro* [17, 18]. Kolesteroloptaget i caco-2-celler blev samtidig undertrykt (se metodeafsnit), når kole-

sterol-micellerne indeholdt hydrolysatet. I et fodringsforsøg med rotter havde de dyr, der blev fodret med kalvehjertehydrolysatet, et signifikant lavere kolesterolniveau i serum end dem, der blev fodret med casein. Indekstallet for åreforkalkning var desuden reduceret. Kolesterolabsorptionen var også signifikant lavere og blev ledsaget af en ændring af den fækale steroidudskillelse. Det antages derfor, at den kolesterolsænkende effekt involverer en inhibering af kolesterolabsorptionen i tyndtarmen. Resultaterne leder til nye anvendelsesmuligheder for biprodukter som sundhedsfremmende additiver i levnedsmidler [18].

Reduktion af risikoen for blodpropper Det har ikke været muligt at finde eksempler på bioaktive komponenter fra kød, der kan medføre reduktion af risikoen for blodpropper (antithrombotiske peptider). Den viden, der i dag ligger på området, omhandler et peptid afledt fra mælkeproteinet K-casein, der kan forhindre trombocyttaggregation cf. [4].

Regulering af blodsukkerniveau I et fodringsforsøg med rotter med for højt blodtryk indgik der kød (ikke nærmere defineret) hydrolyseret med trypsin og pankreatin. Ud over en blodtryksnedsættende effekt viste resultaterne en mindre sænkning af blodsukkerniveauet i forhold til kontrolgruppen. Måling af en komponent, der er korreleret til diabetes (HbA1c), indikerede samtidig, at hydrolysatet har en diabetessænkende effekt. Resultaterne blev præsenteret ved ICoMST 2009 [1]. Der er endnu ikke udarbejdet yderligere officiel publikation [2].

Antioxidativ aktivitet Det er velkendt, at lipidoxidation i levnedsmidler forårsager forringelser af spisekvaliteten ved dannelse af harsk lugt eller uacceptabel smag. Kvalitetsændringerne vil derfor ofte medføre en begrænsning på holdbarheden. I visse sammenhænge sættes indtagelse af oxiderede fødevarer desuden i forbindelse med udvikling af alvorlige sygdomme, som f.eks. forstørret lever (hepatomegali) og nekrose af epitel-væv [21].

Muligheden for brug af syntetiske antioxidanter i levnedsmidler er begrænset eller er direkte forbudt i nogle lande [21]. Det er derfor oplagt at udvikle mere sikre antioxidanter fra naturlige kilder.

Flere forsøg har vist, at peptider af bl.a. animalsk oprindelse udviser antioxidant aktivitet, jf. nedenstående eksempler. Peptider med basiske eller sure aminosyrer har været særligt bemærkelsesværdige [cf. 4].

Eksempler på velkendte peptider med antioxidant effekt

Carnosin og anserin er endogene antioxidative dipeptider, som findes i muskelvæv og hjernevæv hos pattedyr, fugle og fisk [15]. Peptiderne går under betegnelsen *nutraceuticals* - der omfatter essentielle næringsstoffer, der besidder egenskaber ud over opretholdelse af normal vækst og vedligehold af kroppen. Carnosin er den dominerende forbindelse i okse, svin og kalkun, mens anserin findes i høje koncentrationer i kanin, laks og kylling. Anserin er den mest robuste i fordøjelsessystemet, og dens fysiologiske funktion i menneskekroppen udnyttes i dag i functional foods [3].

Det er vist, at mælkeproteinet casein effektivt inhiberer lipidoxidation i hakket kød og maskinudbenet kylling [20]. Et peptid oparbejdet fra kødprodukter kan derfor sandsynligvis også anvendes som naturlig antioxidant ved forarbejdning af kød til forebyggelse af off-flavour og forbedring af holdbarheden.

Eksempler på antioxidative peptider fra hydrolysater baseret på kødråvarer og biprodukter

- *Cytoplasmatiske/sarcoplasmatiske proteiner fra kvæglunge, -lever og spidsbryst*
Antioxidantaktiviteten varierede afhængig af vævstype og varigheden af hydrolysetiden [5].
- *Myofibrillære proteiner fra frisk svinekød (longissimus dorsi)*
Antioxidant aktivitet på højde med α -tocopherol, langtidseffekt, da aktiviteten af hydrolysaterne kun langsomt aftog [21].
- *Kollagen fremstillet af svær*
Fire forskellige peptider udviser stærk antioxidativ aktivitet. Typisk kædelængde for peptiderne var 3 - 16 aminosyrer - mindre peptider er mere effektive end større. [12].
- *Keratinholdige biprodukter fra husdyr (fjermel, horn, klove og hove)*
Udviser høj antioxidant aktivitet. Sandsynligvis på grund af et stort indhold af cystein [cf. 17].

Forøgelse af mineralabsorption/bio-tilgængelighed

Peptider kan optræde som "mineralfælder" på specifikke eller uspecifikke bindingssteder, hvilket medfører en forbedret absorption af mineralerne. Effekten er fundet i adskillige peptider dannet ved enzymatisk hydrolyse af mælkeproteiner cf. [4]. I en teknisk review artikel [22] er der uden yderligere henvisninger beskrevet, at L-carnitin hjælper kroppen med at absorbere calcium. Derudover er der ikke fundet referencer, hvor aktiviteten for peptider afledt fra muskelproteiner er beskrevet.

Immuno-modulerende funktion

Immunomodulerende peptider påvirker såvel immunsystemet som cellernes evne til deling. Forskningen har været fokuseret omkring peptider baseret på mælkeproteiner, men også peptider fra hydrolysater af æg, sojabønner og ris har vist at have denne egenskab cf. [4]. Det har ikke været muligt at finde referencer på immunomodulerende peptider baseret på hydrolysater fra kødprotein.

Smertelindring m.m. (opiate peptider)

Opiater, der er betegnelsen for en stofgruppe, der udvindes af opiumsvalmuen (morfin, kodein, etc.), er medvirkende til regulering af funktioner i forbindelse med smertepåvirkning, fysisk anstrengelse, feber og blodtryksvariationer. Til denne gruppe hører opiate peptider, der tilsvarende defineres som peptider med affinitet for opiatreceptorer i hjernen, eller peptider der har opiatlignende effekt.

Det er vist, at proteolytisk nedbrydning af hæmoglobin medfører dannelse af opiate peptider, *hemorphins*. Nyere forskning indikerer desuden, at de kan virke forebyggende mod Alzheimers samt undertrykke spredningen af tumorceller cf. [4].

Det har ikke været muligt at finde referencer på opiate peptider med oprindelse i hydrolysater fra kødproteiner. Potentielle opioidsekvenser er imidlertid identificerede, og der er forventninger til mulige anvendelsesområder [4].

Prebiotisk funktion

Prebiotiske peptider er betegnelsen for de komponenter, der forbedrer aktiviteten af probiotiske bakterier, f.eks. tarmbakterierne *Lactobacillus* og *Bifido*, der tilsat kosten i passende mængder medfører sundhedsmæssige fordele.

Nyere forskning har vist, at actomyocin fra svinekød hydrolyseret med papain forøger væksten af *Bifido* bakterier i mediet [4, upubliceret data].

Regulering af energi-metabolismen

Proteintilskud, i form af hydrolysat fra fiskeprotein [13], har i fodringsforsøg med rotter vist at kunne påvirke niveauet af plasmagaltesalte [14]. Data indikerer potentielle, hidtil ukendte muligheder for regulering af energimetabolismen, f.eks. i forbindelse med forebyggelse af fedme induceret af kosten. Hydrolysatet har et højt indhold af aminosyrerne taurine og glycine, der fremmer galtesaltes opløselighed og fremmer sekretionen fra leveren. I fodringsforsøget blev der opnået et markant forøget niveau af galtesalte i plasma og samtidig et reduceret niveau af leverlipider og plasmatriglycerider. Desuden blev massen af det endogene fedtvæv reduceret. Der er ikke fundet tilsvarende referencer på taurine og glycine kilder i kødprotein.

Træthed er en helt anden form for "energimetabolisme". En japansk virksomhed har således taget patent på et oprenset peptid fra enzymatisk hydrolyse af actomyosin. Peptidet har effekt mod træthed og anvendes som ingrediens i functional food [8].

Sundhedsfremmende egenskaber i fermenterede kødprodukter

Fermenterede funktionelle kødprodukter

Den proteolytiske proces, der forgår under fermentering af f.eks. spegepølser og tørsaltet skinke, har været studeret indgående, da de dannede aromakomponenter er afgørende for den sensoriske kvalitet. Der er endnu ikke påvist dannelse af bioaktive komponenter i de fermenterede kødprodukter, men der er identificeret mange små peptider i tørsaltet skinke, som antages at have en eller anden form for biologisk effekt [4]. Det forventes derfor, at udvikling af nye fermenterede funktionelle kødprodukter, eller en genopdagelse af de traditionelle fermenterede produkter, som det har været tilfældet for flere mejeriprodukter, kan medføre en øget værditilvækst for kødindustrien [4].

Sammenfatning

På baggrund af resultaterne fra den foreliggende litteratursøgning er der fundet sandsynlige anvendelsesmuligheder indenfor

- inhibering af ACE-aktivitet
- antimikrobiel effekt - naturlige konserveringsmidler
- reduktion af kolesterolniveau
- reduktion af blodsukkerniveau
- antioxidant aktivitet
- forøgelse af mineralabsorption
- smertelindring (opiat aktivitet)
- prebiotiske peptider
- regulering af energimetabolismen
- fermenterede kødprodukter

Materialer og metoder

De metoder, der anvendes i ovennævnte studier til at kvantificere bioaktive effekter, er i nogen grad identiske, og kan beskrives i følgende punkter

- 1) Ekstraktion af proteiner fra muskelvæv eller biprodukter
- 2) Hydrolyse af proteinekstrakter med proteaser
- 3) Opkoncentrering
- 4) Separation og oprensning af specifikke peptider
- 5) Dokumentation for virkningsgrad

Matricen homogeniseres, og proteiner ekstraheres ved anvendelse af forskellige buffere, varmepåvirkning, affedtning, dialyse m.m.

Ekstrakterne hydrolyseres herefter ved hjælp af kommercielle enzymer. Der kan anvendes fordøjelsesenzymer som f.eks. pepsin eller andre proteaser, f.eks. termolysin. Der ses ofte positiv effekt af at anvende en passende blanding af enzymer.

Hydrolysaterne kan efterfølgende opkoncentreres, f.eks. med ultrafiltrering eller membranfiltrering, hvor større peptider frasorteres og endelig spray- eller frysetørres.

I nogle tilfælde foretages der en separation og oprensning af specifikke peptider, før den forventede aktivitet dokumenteres. I andre tilfælde arbejdes der direkte videre med de "rå" hydrolysater.

Der er udviklet flere forskellige metoder til dokumentation af virkningsgrad afhængig af de egenskaber, der ønskes påvist. De mest gængse metoder er kort beskrevet i det følgende.

ACE inhibitorisk assay

Hydrolysatets/peptidets evne til at inhibere ACE's omdannelse af hipporyl-L-histidyl-L-leucin til hippursyre måles spektrofotometrisk ved 228 nm [9, 10]. Graden af inhibitorisk aktivitet kan angives på to måder. Den mest anvendte enhed til at beskrive aktiviteten i uspecifikke fraktioner er i procent, hvor en høj procentandel svarer til høj aktivitet. Til specifikke peptider angives IC_{50} -værdien, der er den koncentration af prøven i assayet, der medfører 50 % reduktion af ACE-aktiviteten. En lav koncentration svarer til en høj aktivitet. Der pågår arbejde med at implementere denne metode på DMRI. Der findes også andre metoder til dokumentation af ACE-inhibitorisk aktivitet.

Antioxidant aktivitet

Der er beskrevet 3 forskellige metoder til at undersøge graden af antioxidant aktivitet for peptider; linolsyre peroxidation, DPPH (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) radical scavenging aktivitet og chelat aktivitet mod metalioner [21].

Ved peroxidationsmetoden opblandes prøven i linolsyre opløst i kaliumphosphatbuffer tilsat $FeCl_2$ for at accelerere oxidationen. Hydroperoxiderne, der dannes henholdsvis før og efter inkubation af reaktionsblandingen, måles spektrofotometrisk ved 500 nm. Antioxidantaktiviteten udtrykkes som forholdet mellem indholdet af producerede og inhiberede hydroperoxider.

Den radikale form af DPPH, $DPPH\cdot$, har absorbans ved 517 nm. Absorbansen forsvinder efter reduktion med $H\cdot$, flyttet fra en komponent med antioxidant aktivitet [6]. Dette forhold udnyttes ved en spektrofotometrisk måling, hvor resultatet angives som IC_{50} værdien, der repræsenterer den koncentration af prøven, der medfører 50 % reduktion af det frie radikal.

Kompleksbinding af metalioner (metal ion chelat aktivitet) er medvirkende til at forhindre oxidation. Metal chelat aktiviteten kan bestemmes ved en chelat titrering, hvor en farveændring i metal chelat indikatoren følges spektrofotometrisk ved 400 - 900 nm.

De nævnte metoder til dokumentation af antioxidant aktivitet kan sandsynligvis implementeres på DMRI.

Kolesterolsænkende effekt - in vitro og in vivo

Effekten på kolesterolabsorption kan testes in vitro i en såkaldt caco-2-celle model. Cellerne udtrykker en lang række enzymer og transportører, som er kendetegnende for cellerne i tyndtarmen, og modellen bruges i stort omfang af medicinalindustrien til at forudsige lægemidlers evne til at blive optaget fra tarmen ind i blodbanen.

Effekten på kolesterolmetabolismen in vivo testes i fodringsforsøg med rotter. Metoderne kan ikke umiddelbart implementeres på DMRI.

Aminosyreanalyse

Der er flere eksempler på, at peptider med et højt indhold af sure eller basiske aminosyrer udviser særligt positive bioaktive egenskaber. For at kunne forklare evt. forskelle i aktivitetsniveau er det nødvendigt bl.a. at kunne dokumentere aminosyresammensætningen. Dette kan f.eks. udføres efter en indledende syrehydrolyse, hvor de frigjorte aminosyrer derivatiseres og analyseres kvantitativt ved en GC-MS analyse. Metoden kan sandsynligvis implementeres på DMRI.

Mikrobiologiske assays

Mikrobiologisk aktivitet kan dokumenteres ved en test for inhibering af forskellige bakteriestammer i mikrotiterbrønde eller "agar diffusions assay", hvor man udstanser huller i agaren og måler væksthæmningszoner (well plate antimicrobial assay). Desuden kan der anvendes et inhiberingsassay med flydende vækst (Liquid growth inhibition assay). Metoderne er implementeret på DMRI.

Referencer

- [1] Ahhmed, A. et al. Use of meat hydrolysates as supplemental feed and its effects on lifestyle-related diseases. PE9.14. ICoMST 2009.

- [2] Ahhmed, A. 2010. Personlig meddelelse.

- [3] Arihara, K. 2004. Functional foods. In: Encyclopedia of Meat Sciences, vol. 1. Jensen, W.K., Devine, C.& M. Dikeman (eds.). Elsevier Academic Press, pp 492-499.

- [4] Arihara, K., 2006 Functional properties of bioactive peptides derived from meat proteins. In: Advanced technologies for meat processing, chap. 10.

- [5] Bernardini, R. Di and A.M., Mullen et al. 2009. Antioxidant activity of bovine low value muscle and by-products. PE4.101, ICoMST 2009.

- [6] Goupy, P. et al. 1999. Antioxidant composition and activity of barley (*Hordeum vulgare*) and malt extracts and of isolated phenolic compounds. J. Sci. Food Agric. 79, 1625-1634.

- [7] Haves, J. et al. 2009. Antimicrobial activity of bovine lung and liver sarcoplasmatic/cytoplasmatic proteins. PE4.103, ICoMST 2009.

- [8] Japansk patent. JP2007045794. Antifatigue peptide derived from edible meat protein.

- [9] Katayama, K. et al. 2002. Angiotensin-I-converting enzyme activities of porcine skeletal muscle proteins following enzyme digestion. Asian-Aust. J. Anim. Sci. 2003. Vol. 16, No. 3, 417-424.

- [10] Katayama, K. et al. 2003. Peptic hydrolysate of porcine crude myosin has many active fractions inhibiting angiotensin I-converting enzyme. *Asian-Aust. J. Anim. Sci.* 2003. Vol. 16, No. 9, 1384 - 1389.
- [11] Katayama, K. et al. 2008. Porcine skeletal muscle troponin is a good source of peptides with angiotensin-I-converting enzyme inhibitory activity and antihypertensive effects in spontaneously hypertensive rats, *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:355 - 360.
- [12] Li, B. et al 2007. Isolation and identification of antioxidative peptides from porcine collagen hydrolysates by consecutive chromatography and electrospray ionization-mass spectrometry. *Food Chemistry* 102, 1135 - 1143.
- [13] Liaset, B & M. Espe 2008. Nutritional composition of soluble and insoluble fractions obtained by enzymatic hydrolysis of fish-raw materials. *Process Biochemistry*, 43, 2008, 42 - 48.
- [14] Liaset, B. et al. 2009. Fish protein hydrolysate elevates plasma bile acids and reduces visceral adipose tissue mass in rats. *Biochimical et Biophysica Acta* 1791. 2009, 254 - 262.
- [15] Lynch, P.B. & Kerry, J.P. 2000. Utilizing diet to incorporate bioactive compounds and improve the nutritional quality of muscle foods. In: *Antioxidants in muscle foods*. Chap. 17, 455 - 480.
- [16] Meinert, L. Bioaktive komponenter - litteraturstudium 2008. SF: 51021
- [17] Nakade, K. Koji et al. 2009. Cattle heart hydrolysate (HPH) decreases micellar solubility and cholesterol absorption in rats and caco-2-cells. PE9.41. ICoMST 2009.
- [18] Nakade, K. Koji et al. 2009. A cattle heart protein hydrolysate ameliorates hypercholesterolemia accompanied by suppression of the cholesterol absorption in rats and caco-2-cells. *Biosci. Biotechnol. Biochem*, 73, (3), 607 - 612.
- [19] Ohba, R. et al, 2003. Physiological functions of enzymatic hydrolysates of collagen contained in livestock and fish waste. *Food Sci. Technol. Res.* 9 (1), 91 - 93.
- [20] Rossini, K. et al. 2009. *LWT - Food science and technology* 42, 862 - 867.
- [21] Saiga, A., Tanabe, S. and Nishimura, T. J., 2003. Antioxidant activity of peptides obtained from porcine myofibrillar proteins by protease treatment. *J. agric. Food Chem.* 51, 3661 - 3667.
- [22] Sen, A.R. et al. 2008. *Tech. reviews, Indian Food Industry*, Sept. - Oct. '08, 54 - 56. Functional meat products and their health benefits.