

Le κ -glycomacropeptide

Jean - Louis Maubois
I.N.R.A. Rennes France

GMP Zaragoza 2006

1

K-caséino-macropeptide

- Fragment 106-169 de la caséine κ , PM:7500
- Relargué par action de la chymosine hydrolyse de la liaison Phe - Met par la chymosine = coagulation enzymatique du lait (fromagerie) = paracaséine (insoluble) + GMP (soluble)
- 20 à 25 % de la caséine κ , soit 1,25 g.kg⁻¹ de lait
- Famille hétérogène de molécules:2 variants génétiques et au moins 13 formes de glycosylation + 2 sinon 3 phosphorylations
- 0 acide aminé aromatique

GMP Zaragoza 2006

2

Le κ -glycomacropeptide

- Action de stimulation de la sécrétion de la cholécystokinine (hormone digestive induisant contraction vésicule biliaire = digestion des lipides et régulation de la sécrétion des enzymes pancréatiques = prise de nourriture)
- Action anti-thrombotique des séquences 106-116; 112-116 (inhibition fixation fibrinogène aux récepteurs plaquettaires)

Le κ -glycomacropeptide

- Induction sécrétion CCK démontrée *in vitro* sur anse intestinale de rat isolée, *in vivo* sur rats et porcs (mais résultats variables car préparations GMP non purifiées)
- puis sur volontaires humains avec produit très purifié (Beaufrère & *al.*)

Preparation of κ -caseinomacropptide

Micellar casein

water $\rightarrow$ ↓ $\leftarrow$ rennet

Coagulation

35°C -pH 6.5 (HCl)



Microfiltration 0.1 μ m(50°C)

↓ $\rightarrow$ Retentate

Ultrafiltration of microfiltrate (3 kd) (50°C)



Product G

GMP Zaragosse 2006

5

Hydrolyse continue du κ -CMP dans un CSTMR

κ -CMP a **3 sites** de coupure trypsique dans sa partie N-terminale

Hydrolyse trypsique conduit à **2 groupes de peptides**:

4 petits: (106-112; 106-111; 113-116; 112-116) MW < 700

connus comme anti thrombotiques

3 gros: (112-169; 113-169; 117-169)

Utilisation d'une membrane UF avec un cut-off of 3 000 D

Réjection totale des gros peptides, substrate et de l'enzyme et la perméation des petits peptides

Productivité x 3 11g vs 4g peptide actif /g enzyme

GMP Zaragosse 2006

6

Effets nutraceutiques potentiels du κ -caseinomacropeptide

- Nutrition des patients souffrants de phenyl-cétonurie (κ -CMP ne contient pas de Phe, Tyr and Trp)
- Inhibition des bactéries (*S. mutans*) de la plaque dentaire = kappacine (P nécessaire pour activité = + perm. mb μ org.)
- Inhibition de *Vibrio cholerae* et de *Vibrio influenzae*
- Relarguage de peptides antithrombotiques (N-terminal): blocage des récepteurs apparaissant sur les plaquettes sanguines, ce qui empêche la liaison avec les chaînes α et γ (séquences 95-97 et 400-411) du fibrinogène et donc la formation du caillot sanguin

GMP Zaragosse 2006

7



Purification of GMP_A

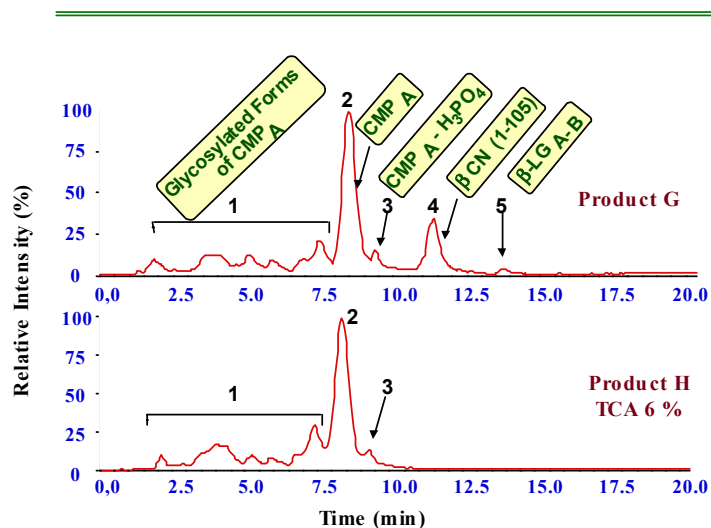


Fig 3
D molle

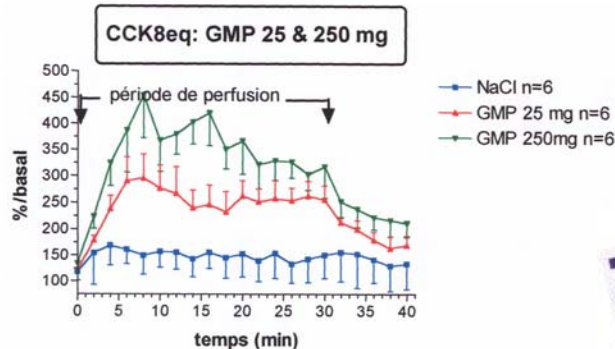
GMP Zaragosse 2006

8

Effect of glycomacropeptide on appetite control

Clinical studies by Beaufrere *et al.*

GMP induces release of **cholecystokinin** in human



Mechanism is more complex in human than in animal

GMP Zaragoza 2006

9

Etude clinique brevet Portman

- 20 sujets obèses recevant 3 préparations:
 - i) placebo à base de maltodextrine
 - ii) 2,4g d 'acide oléique + 2,5 g de WPI + 0,5 g GMP + 3,0g de pomme de terre + 1,0g de glucomannane +0,64g de lactate de Ca + 0,1g d 'alfalfa (stimulation CCK)
 - iii) 1,5 g de GMP
- consommation iii) = réduction de 12,5 % de la prise de nourriture (pâtes) vs réduction de 7,5% consommation ii)

GMP Zaragoza 2006

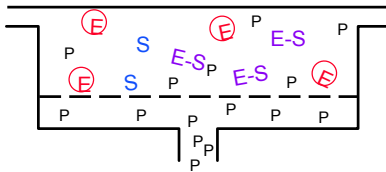
10

Effets nutraceutiques potentiels du κ -caseinomacropéptide (2)

- Etudes en cours au Québec pour démontrer que le GMP inhibe la liaison d '*Helicobacter pylori* (responsable de l 'ulcère gastro-duodénal) à la paroi stomacale via le le blocage de l 'adhésine SAB A
- Transposition de cette propriété du GMP envisagée à d 'autres espèces pathogènes: *E. coli* 0157, *Hemophilus influenzae*, *Vibrio cholerae*

Séparation des peptides à effet anti-thrombotique

Enzymatic membrane reactor



Membrane

Total retention of

Enzyme

Substrate

High MW fragments

Enzyme

- Free enzyme but confined
- Use of soluble enzymes is requested
- Re-uses of enzyme

Process advantages

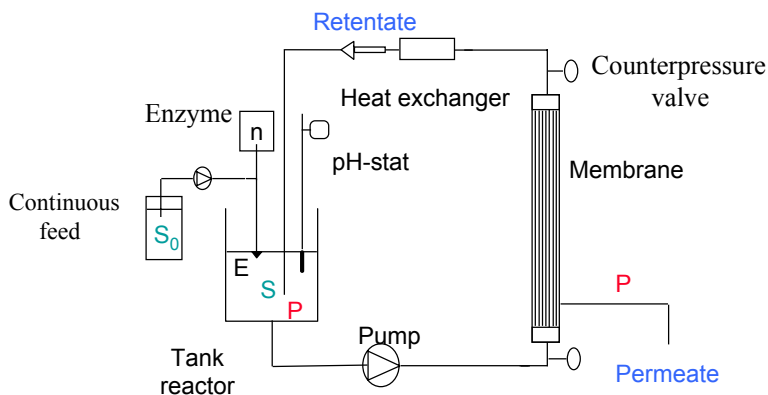
- Optimal Enzyme activity
- High Enzyme/Substrate ratio
- Short holding time
- Continuous running

Integrated process = bioconversion and separation in one step

GMP Zaragoza 2006

13

Enzymatic Membrane Reactor



GMP Zaragoza 2006

14

Continuous hydrolysis of κ -CMP in a CSTMR

κ -CMP has **3 sites** of tryptic cleavages in N-terminal part

Hydrolysis by trypsin leads to **2 groups of peptides**:

4 small: (106-112; 106-111; 113-116; 112-116) MW < 700

known as anti thrombotic (block receptors of platelets)

3 large: (112-169; 113-169; 117-169)

Use of an UF membrane with cut-off of 3 000 D allows

Total rejection of large peptides, substrate and enzyme

Permeation of small peptides

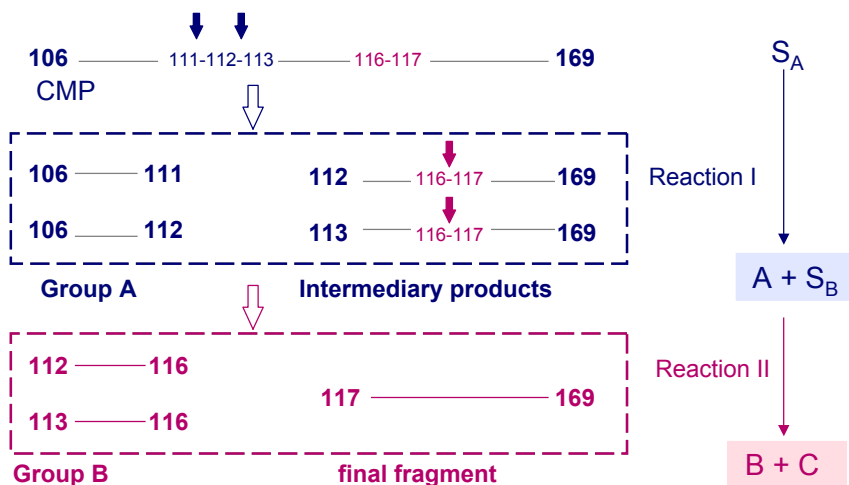
Productivity 3 fold higher 11g vs 4g active peptide/g enzyme

GMP Zaragosse 2006

15

Action of trypsin on CMP

Sequential mechanism : 2 successive reactions



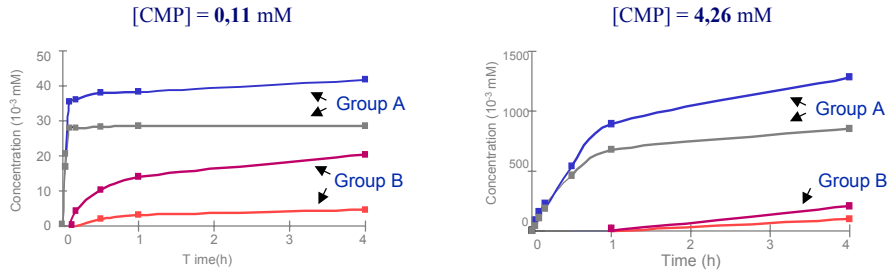
GMP Zaragosse 2006

¹⁶
Bouhallab et al. 1999

Trypsin action on CMP

Batch experiments

- Kinetics of CMP hydrolysis at various substrate concentrations



- Increasing [CMP]: - increased total release of Group A peptides
- increased time delay for Group B peptides release.

GMP Zaragosse 2006

17
Bouhallab et al. 1999

Le κ -glycomacropeptide

- Autres fonctionnalités:
nutrition des « phénylcétonuriques » car 0
acide aminé aromatique dans séquence
GMP
inhibition des bactéries de la plaque dentaire

GMP Zaragosse 2006

18

Le κ -glycomacropeptide

- Molécule nutraceutique multifonctionnelle
- Etudes à mener en **Nutrition et physiologie**
visualisation de la contraction de la vésicule biliaire
études cliniques de la digestion de produits laitiers gras
(beurres - crèmes) **enrichis en GMP** ou boissons?

- **En Technologie**

Procédés de préparation à partir de produits disponibles:
caséinates, lactosérums avec recherche d'une valorisation
optimisée des co-produits par technologies séparatives
directes ou utilisant monomère à pH<4 puis polymérisation
à pH>7 et séparation

GMP Zaragoza 2006