

Composants du lait à activité nutraceutique

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

Zaragosse 2006

1

Le Lait, un aliment unique

Seul aliment déterminé et conçu pour
subvenir à **tous les** besoins du jeune à un
moment critique de son existence: celui
qui suit sa naissance, où il quitte un milieu
très protégé (le ventre de sa mère) pour
être confronté à une multitude
d'agressions par l'environnement externe
Pas d'équivalent!!!

Zaragosse 2006

2



Zaragosse 2006

3



Zaragosse 2006

4

Quelques rappels sur le Lait

C'est, à la fois:

Une suspension particulière stable contenant par ordre décroissant de taille: cellules somatiques (10 à 20 μm), globules de matière grasse (1 à 10 μm), bactéries (0,2 à 5 μm), micelles de caséine (0,03 à 0,3 μm)

Une solution vraie contenant des composants azotés: macromolécules protéiques, des peptides, des acides aminés libres, hormones, nucléotides..., du sucre (lactose), des sels minéraux, des vitamines et de l'eau

Quelques rappels sur le Lait (2)

- Lait de vache le plus exploité dans le monde (composition moyenne, 128 g.kg^{-1} MS dont 40 g.kg^{-1} MG, 32 g.kg^{-1} protéines, 48 g.kg^{-1} lactose, 8 g.kg^{-1} sels minéraux) mais dans pays méditerranéens, depuis temps immémoriaux: utilisation des laits de chèvre, brebis, chamelle, ânesse, jument

Connotation Santé

- Depuis plus de 15 ans, l'aliment et spécialement le lait n'est plus considéré comme une simple source de nutriments: protéines (acides aminés), lipides (acides gras), glucides (énergie) et minéraux (Ca) mais comme également un apport d'éléments régulant des fonctions physiologiques majeures du métabolisme:

fonctions nutraceutiques

Aliments fonctionnels à partir du lait

Plan de l'exposé

- Critères à prendre en compte pour la séparation des molécules laitières à effet nutraceutique
- Protéines entières majeures et mineures
- Peptides bio-actifs

Critères à prendre en compte (1)

- Le lait est un liquide particulièrement complexe, au moins 100 000 espèces moléculaires différentes avec des multi-fonctionnalités opposées, ce qui conduit à un équilibre final bien adapté aux besoins généraux du mammifère nouveau-né.
- En conséquence, l'adaptation spécifique à une nutrition ou à une fonctionnalité particulière requiert soit un enrichissement de la molécule cible soit un appauvrissement de la molécule anti-cible soit les deux actions

Critères à prendre en compte(2)

- La plupart des molécules bio-actives sont **thermosensibles**, en conséquence un enrichissement spécifique doit être réalisé avec des technologies physiques mises en œuvre à des températures modérées.
- La fragmentation des molécules laitières doit être réalisée avec des enzymes **physiologiques** pour des raisons de sécurité et d'allégations
- Le lait étant produit, collecté et transformé dans un environnement non stérile, la technologie doit être réalisée avec un produit **débactérisé** et doit éviter toute multiplication bactérienne.

Zaragosse 2006

11

Facts to be considered (3)

At each step of the process, it is required:

1. To guaranty hygienic safety of the product

Use of technology leading to the highest safety

2. To preserve biological activity by the use of the right separation method and physico-chemical parameters to be carried out

Consideration of relationships between process, structure and functionality

3. To take in account the generated co-products (they are no by-products) which are part of the global economy of the process

Integrated and global technology

Zaragosse 2006

12

Sanitation du lait par une technologie « douce » la Microfiltration sur membrane

Zaragosse 2006

13

Selective separation of bacteria

- Milk collected never sterile, always contaminated by many sources with potential risks of pathogenic bacteria
- **MF interesting alternative** to heat treatments
- Process developed named « Bactocatch »
- Used parameters for skim milk:
 - velocity: 7 m/s
 - temperature: 50°C (37°C possible)
 - “Sterilox” with 1.4 µm pore size
 - UTP value: 0.5 bar
 - Volumetric reduction factor: 20 ext.. to 200

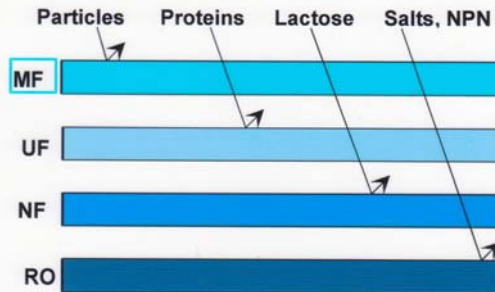
Zaragosse 2006

14

MEMBRANE MICROFILTRATION (MF)

TANGENTIAL FILTRATION

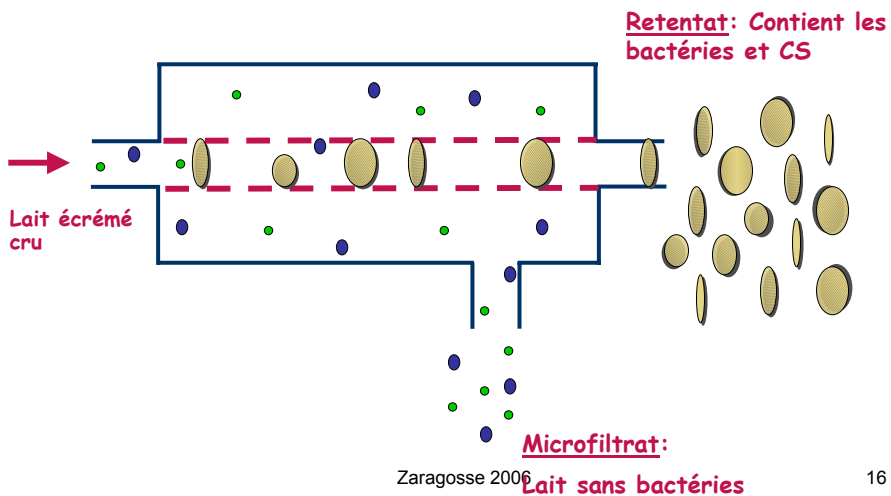
Ø SIZE 13 µm → 0.1 µm



15

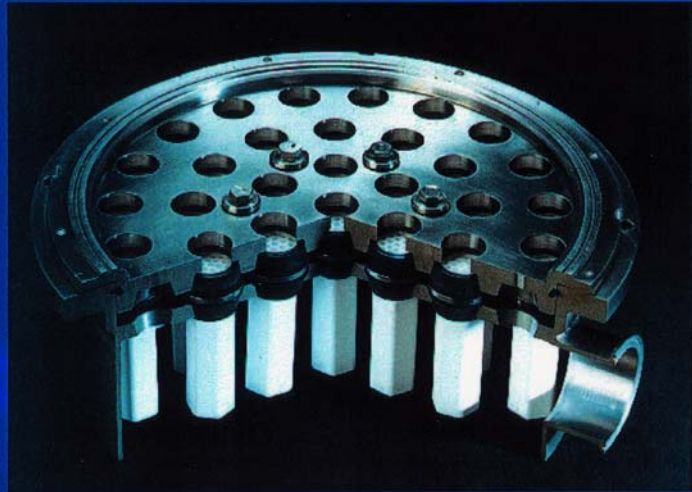
Microfiltration

Procédé de séparation par membrane pores: Ø 1,4 µm -
Pression: 0,5 bars

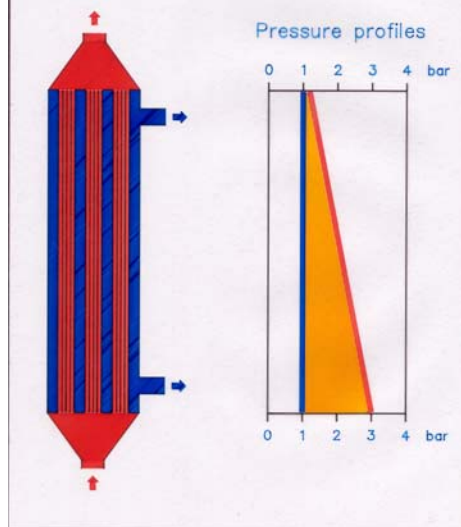


16

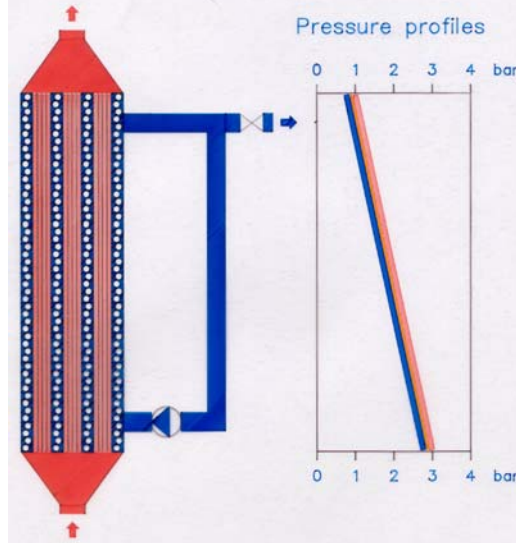
Module head cut-away view



CONVENTIONAL CROSS-FLOW MICROFILTRATION

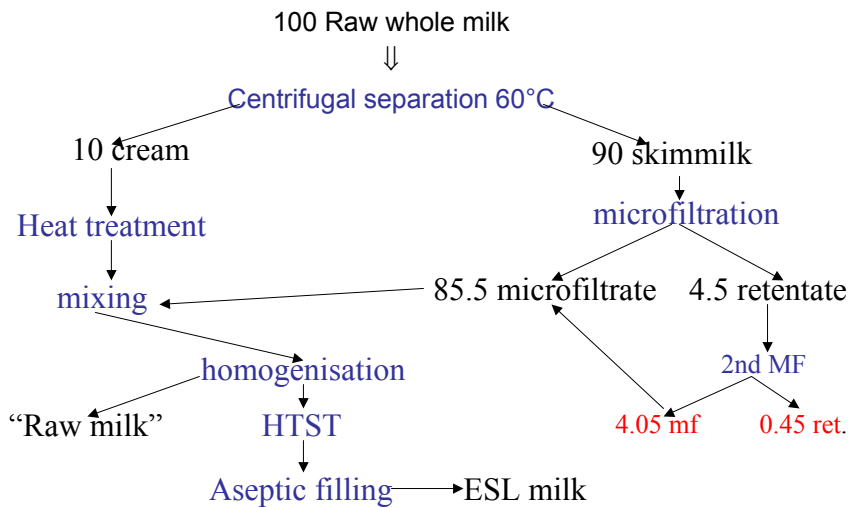


UNIFORM TRANSMEMBRANE PRESSURE MICROFILTRATION



19

Selective separation of bacteria: process



Zaragosse 2006

20

Selective separation of bacteria: performances

- Permeation rates
 - Flux: 500 l.h⁻¹.m⁻²
 - Proteins: 99.0 %
 - Total solids: 99.5 %
- Total retention of somatic cells
- **Decimal reduction :3.5** mesophilic flora
- **:4.5** spore forming flora

Zaragosse 2006

21

Selective separation of pathogenic bacteria

- Decimal reductions
 - *Listeria monocytogenes* **3.4**
 - *Brucella abortus* **4.0**
 - *Salmonella typhimurium* **3.5**
 - *Mycobacterium tuberculosis* **3.7**
- Usual contaminations: 1 to 10 CFU/ml
- **MF skimmilk less than 1 CFU/litre!!**

Zaragosse 2006

22



Zaragosse 2006

23



Zaragosse 2006

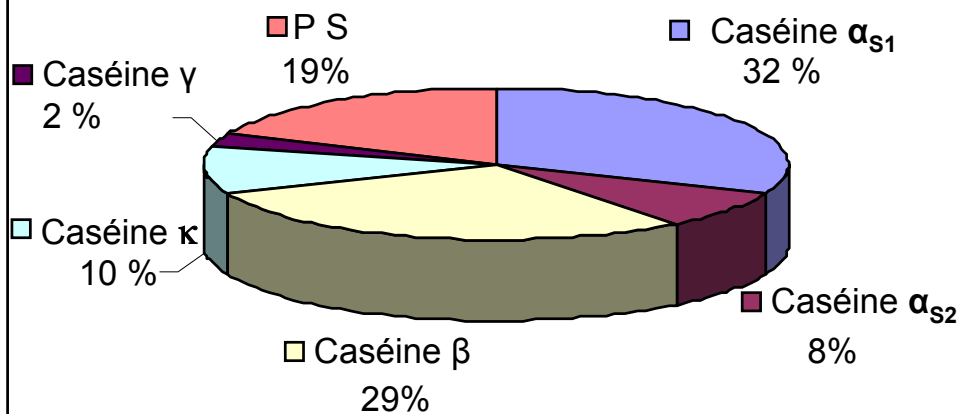
24

Protéines majeures du Lait à activités fonctionnelles: La caséine et ses peptides Les protéines du Lactosérum

Zaragosse 2006

25

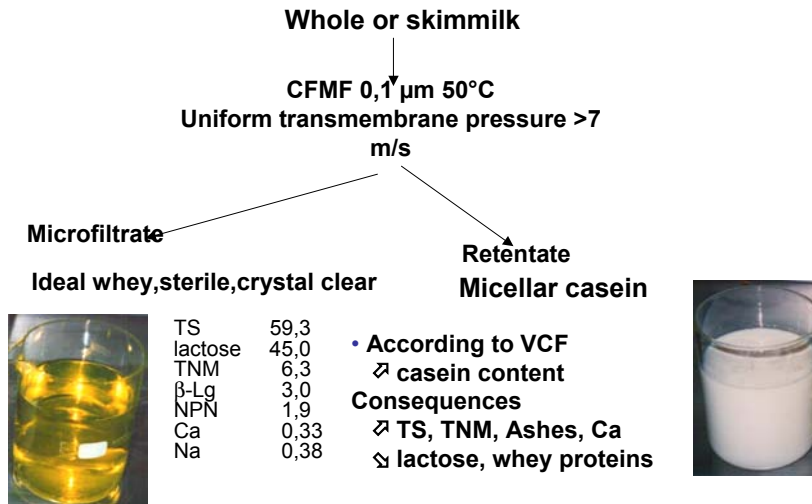
Protéines du Lait: 32 g.kg⁻¹



Zaragosse 2006

26

Native casein separation by CFMF



Decimal phages reduction 2,8

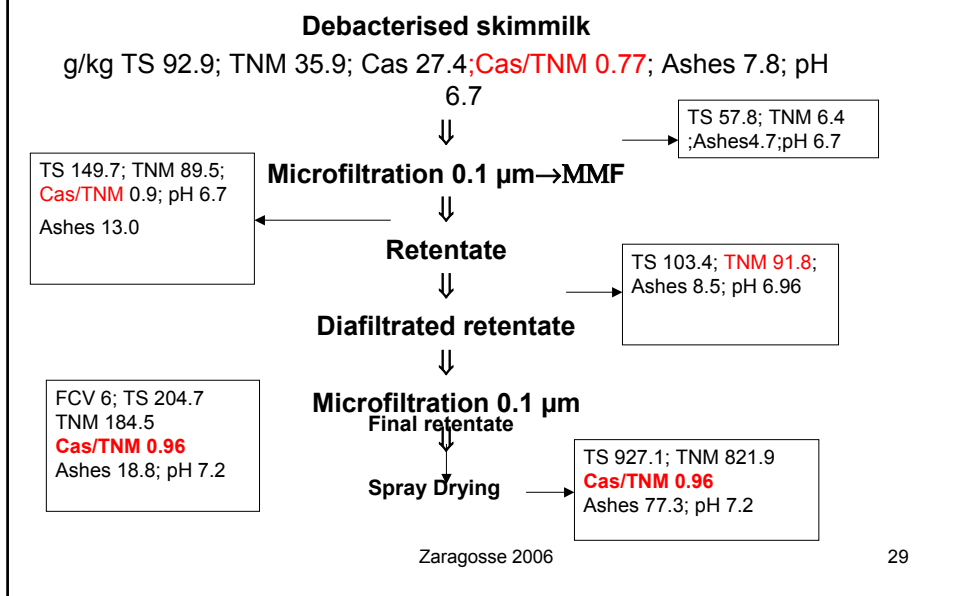
2006

27

Séparation sélective de la caséine micellaire Paramètres du procédé

- Membrane Sterilox® céramique, diamètre canaux 4 mm
- Température : 50°C mais le procédé fonctionne à 35°C
- Vitesse de recirculation du rétentat MF : 7.2 m.s⁻¹
- Pression Transmembranaire : 500 mb
- Flux de Perméation : 75 - 80 l.h⁻¹.m⁻²
- Facteur de concentration volumique: 3:1
- Temps entre 2 nettoyages : 10 h
- Dénombrement bactérien dans le MMF : stérile
- Virus: selon Gauthier & al (1992) D.R. =3

Micellar casein making process

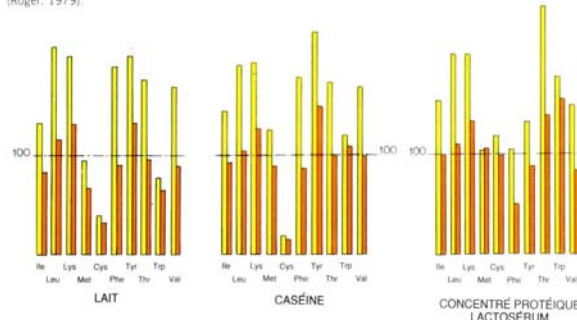


Intérêts potentiels de la caséine micellaire

- Enrichissement du lait de fromagerie
- Matériau de charge pour les fromages fondus
- Remplacement des caséinates
- Teneur en Ca élevée 2.9 % = Accroissement
 - de la capacité tampon (yoghourt; levains)
 - de la valeur nutritionnelle Ca assimilable
- Préservation de la motilité des spermatozoïdes (dilueur de sperme INRA 96)
- Matériau de départ pour préparer les caséines individuelles ($\beta - \alpha_s$), le caséinomaclopeptide ou leurs dérivés pour des fonctions nutraceutiques

Caséine: déficiente en acides aminés soufrés Les protéines du lactosérum: les meilleures pour les Humains

Figure 1 : composition en acides aminés essentiels du lait, de la caséine et d'un concentré protéique de lactosérum exprimés en % de leur teneur dans l'œuf et dans la protéine FAO (Roger, 1979).

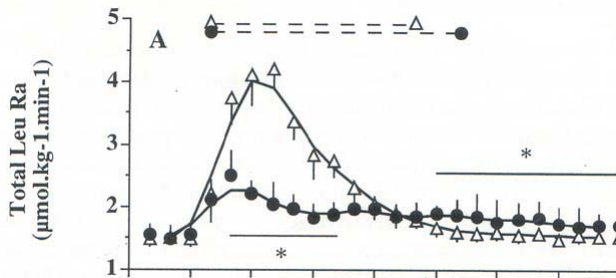


Zaragosse 2006

31

Protéines du Lait et Nutrition humaine

- Casein: **Slow proteins**
- Whey Proteins: **Fast proteins**



Δ Rate of absorption of whey proteins
• Rate of absorption of native casein

Zaragosse 2006

32

Protéines du Lait et Nutrition humaine

- Digestion rate regulates post-prandial protein retention (Dangin & al., 2001)
- WPI given every 20 min during 240 min (slow meal) instead in once 30 g (fast meal) (22 p)
- **Results: protein utilisation (Δ Leu balance)**
- **Fast meals : WPI = 0.66 ; AA = 0.62**
- **Slow meals : WPI = 0.80 ; Cas = 0.78 ; $\neq$ signif.**

WPI fast meal for young ; WPI slow meal for elderly

Zaragosse 2006

33

Un compromis technologique à trouver

- **Obtention de la caséine micellaire optimum si procédé MF 0,1 μ m à 50 °C**
- **Mais à cette température induction de la réaction de Maillard = lactosylation des protéines de lactosérum et notamment de la β -lactoglobuline**
- **Température MF abaissée à 37°C pour minimiser cette lactosylation = perte en Lys disponible et allergénicité**

Zaragosse 2006

34

La caséine du Lait: Source de caséines individuelles: α_{s1} , β et κ et de Peptides

Zaragosse 2006

35

Séparation des caséines β et α_{s1}

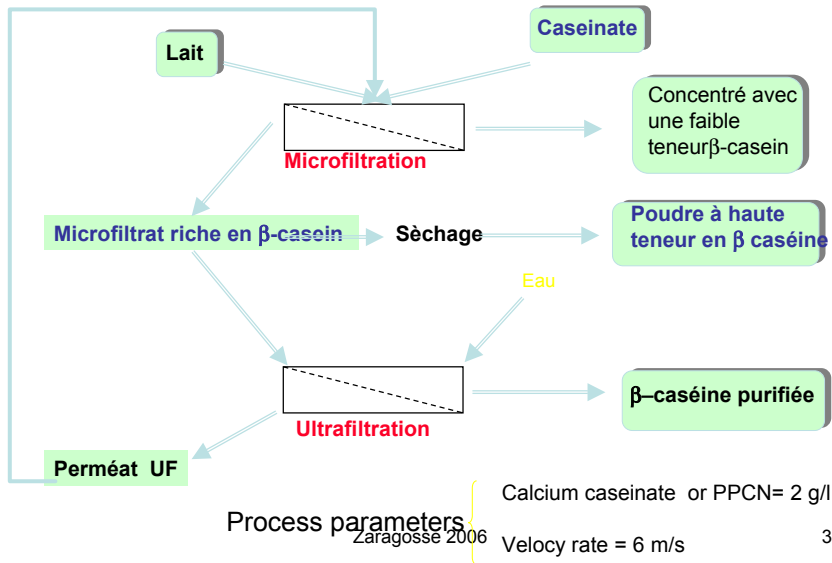
Séparation de la caséine β : utilisation de son hydrophobicité, se « démicellarise » à basse température (MF à + 2 °C et bas pH) ou à partir de caséine présure additionnée d'un séquestrant de Ca

Séparation de la caséine α_{s1} : voir rapport AFSSA

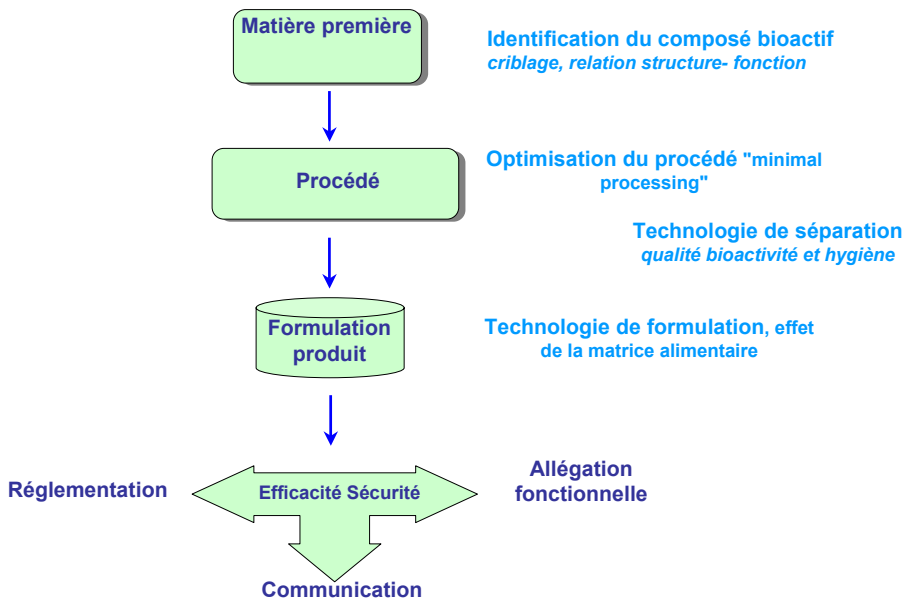
Zaragosse 2006

36

Procédé de séparation de la β -caséine



Approche intégrée pour le développement d'aliment fonctionnel à base de peptides bioactifs du lait



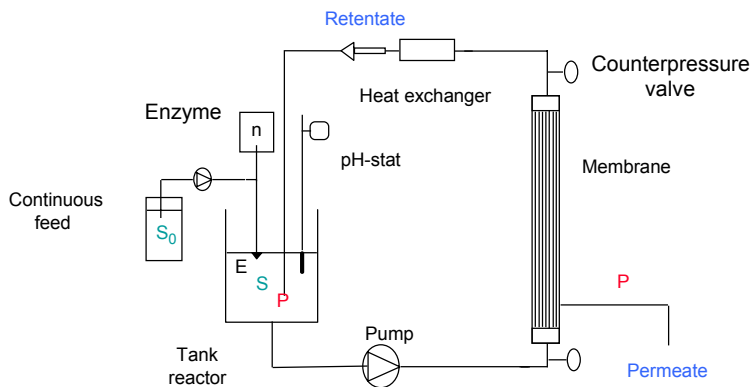
Oriented enzymatic hydrolysis of milk proteins

- **Oriented release of a specific sequence needs:**
 - To know and to control enzymatic kinetics of proteolysis
 - a very complex phenomenon
 - protein, **a multiple substrate**
 - intermediary products become **substrates** and some can be **insoluble** (heterogeneous catalysis???)
 - For example, a protein with 10 hydrolysable bonds will lead to 54 intermediary products and 11 final peptides (if the 10 bonds are hydrolysed at 100%)
- **Continuous stirred Tank Membrane Reactor, the Solution**

Zaragosse 2006

39

Enzymatic Membrane Reactor



Zaragosse 2006

40

Separation of 3 bioactive peptides encrypted in β -casein an example of an integrated process

Tryptic hydrolysis in high ionic strength:

oriented release of β -CN 1-25(3127D) and of β -CN 33-97

Separation with a 0.2 μ m MF Zr C membrane because of

high electrochemical reactivity of β -CN 1-25 with Zr C

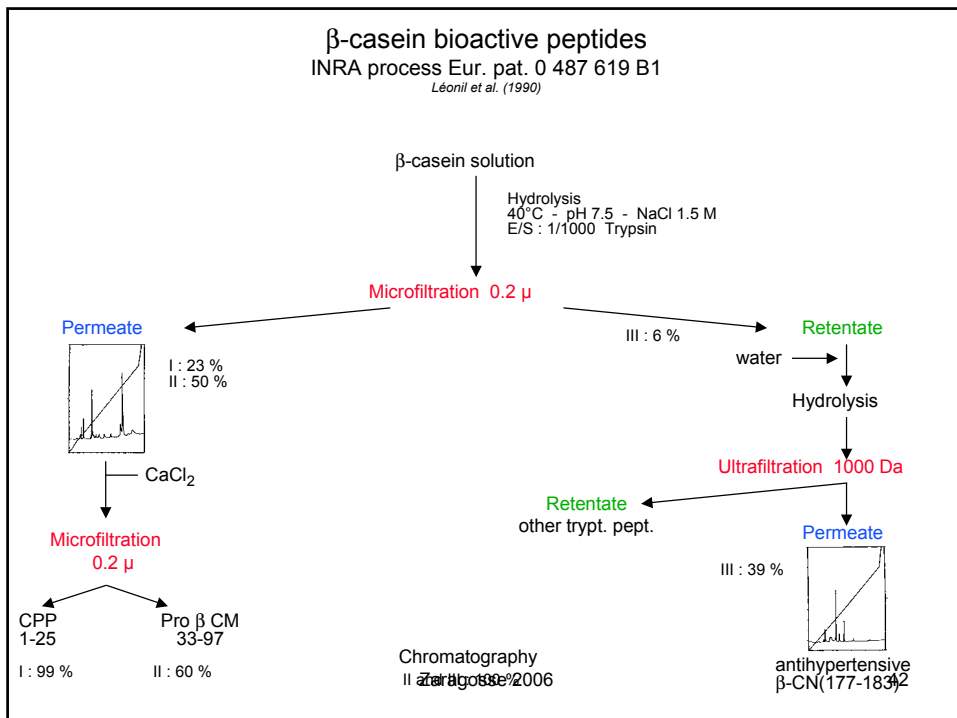
O transmission with a 50 000 D UF membrane

Addition of Ca^{++} allows aggregation of β -CN 1-25 alone and its separation by MF 0.2 μ m

Dilution of 1st MF retentate allows continuation of tryptic hydrolysis and UF with 1 000 D allows specific separation in the permeate of β -CN 177-183 (antihypertensive) (ACE)

Zaragosse 2006

41



Caséinophosphopeptide β 1-25

- CPP enchaînements de 3 à 4 Ser P (caséines β et α_s) = maintien Ca à l'état soluble dans l'intestin grêle malgré pH élevé
- Résultats contradictoires chez animal (régulation très complexe de l'absorption du Ca)
- CPP aussi action anti-cariogénique

β -casomorphine β 60-66

- Identifiée suite à observation sur gluten et caséine dans alimentation schizophrènes
- Dénommée exorphine
- Activité opiacée démontrée *in vitro* et *in vivo* : motilité intestinale (anti-diarrhéique), analgésie (dérivé 5 NH₂:morphiceptine = 1/2 morphine), induction sommeil, régulation endocrine grossesse?, 0 effets secondaires chez homme sain mais concentration anormalement élevée dans psychose *post partum* et mort subite nouveau né

Peptide anti-hypertensif β 177-183

- Séquence inhibitrice de l'ACE (enzyme de conversion de l'angiotensine)
- rappel: Angiotensine I (décapeptide) + ACE = Angiotensine II (octapeptide), puissant vaso-constricteur
- Activité démontrée *in vivo* chez rats hypertendus et chez l'homme (peptide isolé et produit fermenté par *Lactobacillus helveticus*)

Zaragosse 2006

45

Biological activities described in bovine milk proteins

ACTIVITY	PROTEIN-SOURCE	SEQUENCE
Opiate-like	β - Casein α_{s1} - Casein α -Lactalbumin β -Lactoglobulin Sérum albumine	β CN (60-64, 66, 70) α_{s1} CN (90-95, 96), α_{s1} CN (91-96) α LA (50-53) β LG (102-105), β LG (104-105) SAB (399-404)
Anti-opiate	κ - Casein Lactoferrin	κ CN (25-34), κ CN (35-41), κ CN (55-61) LF (673-679)
Anti-thrombotic	κ - Casein Lactoferrin (h)	κ CN (106-111, 116) LFh (39-42)
Anti-hypertensive	β -Casein α_{s1} - Casein	β CN (177-183), β CN (193-202) β CN (194-199) α_{s1} CN (23-27)

Zaragosse 2006

46

Biological activities described in bovine milk proteins (2)

ACTIVITY	PROTEIN-SOURCE	SEQUENCE
Mineral absorption	β - Casein α_{s1} - Casein α_{s2} - Casein	β CN (1-25) 4 P phosphopeptides phosphopeptides
Anti-microbial	Lactoferrin α_{s2} - Casein κ - Casein	LF (17-41) α_{s2} CN (165-209) κ CN (106-209)
Hormone stimul. CCK	κ - Casein	κ CN (106-209)
Anti-cancer	β -Lactoglobulin	β LG (142-148)
Immunostimulation	β - Casein κ - Casein α -Lactalbumin	β CN (63-68), β CN (191-193) β CN (193-209) κ CN (38-39) α LA (18-20)
Zaragosse 2006		

47

Les protéines du lactosérum

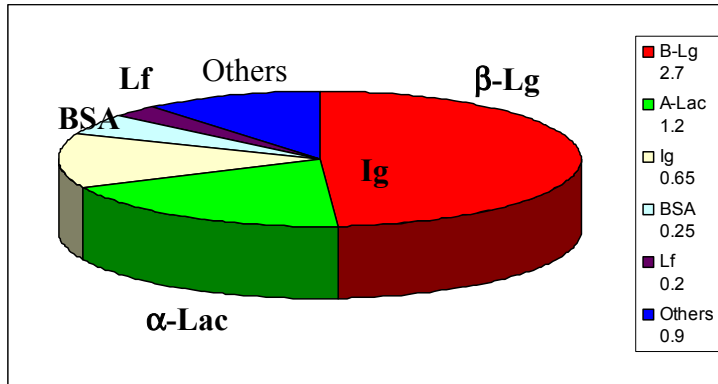
- Protéines totales obtenues par concentration sélective par UF de microfiltrat de lait = isolats ou WPI
- Nombreuses espèces moléculaires: 15000?
- Protéines majeures: β -lactoglobuline, α -lactalbumine, Serum albumine, Immunoglobulines, Proteose-Peptides
- Protéines mineures: Lactoferrine, lactoperoxydase, osteopontine, cystatine C, TGF- β , TGF- α , etc, etc

Zaragosse 2006

48

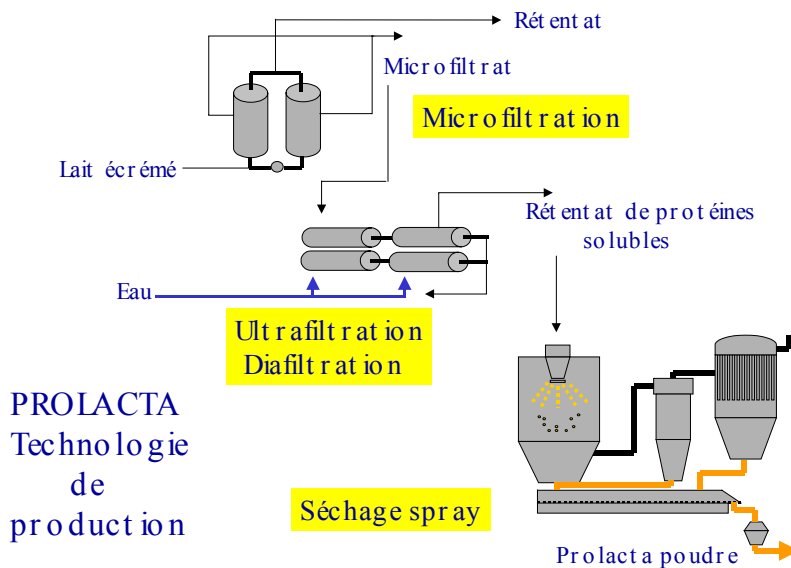
Whey Proteins

- Composition



Zaragosse 2006

49



Zaragosse 2006

50

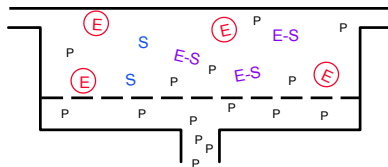
Hydrolysats enzymatique total

- Objectif: nutrition « grêles courts » (grands réséqués du tractus digestif (cancers))
- Cahier des charges: absorption **totale** sur 60-70 cm d'intestin par nutri-pompe
- substrat WPI; enzyme:pancréatine

Zaragosse 2006

51

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

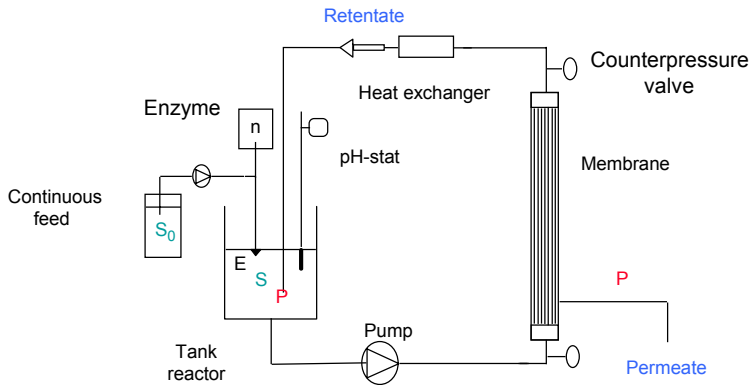
Optimal Enzyme activity
High Enzyme/Substrate ratio
Short holding time
Continuous running

Integrated process = bioconversion and separation in one step

Zaragosse 2006

52

Enzymatic Membrane Reactor



Zaragosse 2006

53

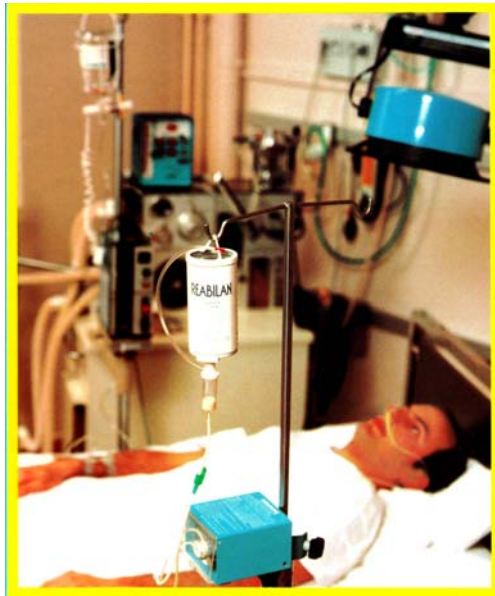
Bouhallab et al., *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (1995) 42, 692-696

Caractéristiques du procédé INRA (brevet 1979) « Réabilan »

- Substrat: WPI 70 à 90 g.kg⁻¹
 - Température: 40 °C
 - Enzyme: Pancréatine
 - Ratio: Enzyme / substrat 12 %
 - pH régulé à 8,5 par KOH
 - Pouvoir coupure membrane UF: 5000 Da
- = séparation continue d'une solution stérile de petits peptides (5 à 10 résidus)

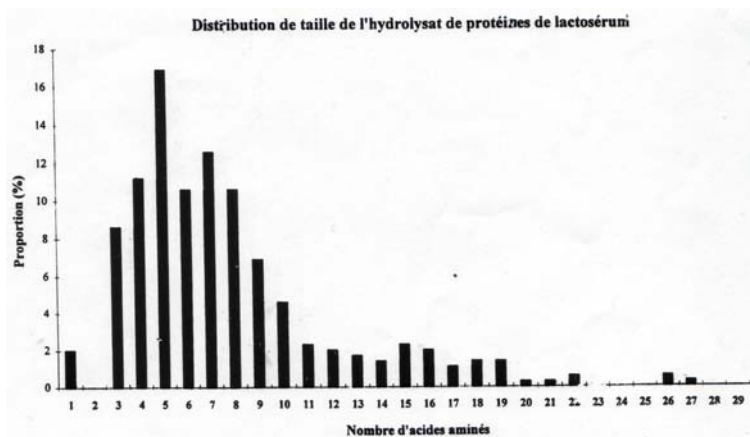
Zaragosse 2006

54



Zaragosse 2006

55



In post operative patients, better bio-availability than whole casein but identical balance (synthesis - breakdown) (Beaufrere & al.,1996)

Zaragosse 2006

56

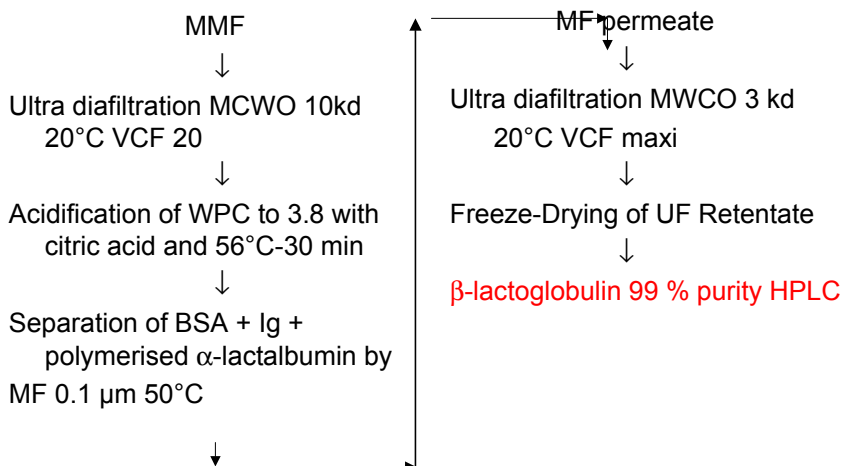
Isolement des protéines individuelles du lactosérum

β -lactoglobuline
 α -lactalbumine
Lactoferrine
Lactoperoxydase
Immunoglobulines
Facteurs de croissance: EGF, IGF,
TGF- β ...

Zaragosse 2006

57

Procédé de préparation de la β -lactoglobuline



Zaragosse 2006

58

Health and Individual Whey Proteins

β -lactoglobulin

- High content in sulphur amino acids: 5 Cyst + 4 Met (glutathion pathway)
- Lipocalline structure: fatty acids transport and other hydrophobic molecules (retinol?)
- Bio-active peptides: β -lactorphin 102-105 (opiac)
 - β -lactokinin 78-80; 142-148 (antihyper)
 - β -lactotensin 146-149 (ileon contraction)
- **but heat sensibility (Maillard) and allergenicity**

Potential interests of α -lactalbumin

- High content in Tryptophane (4 residues per mole, 6 %), precursor of many brain hormones (Serotonine, Dopamine)
- High content in Cysteine (8 residues per mole)
- Infant food formulas
- Induction of apoptosis of lung carcinogenous cells (Hakansson & al)
- contraceptive (Shur, patent) and spermicide action in equine (Batelier)
- Ca
- opioïd and bactericide peptides

Health and Individual Whey Proteins

Immunoglobulins

- 0.8 g/l whey is a low source vs colostrum
- Highly heat sensible but native in MMF
- Separation and concentration could be interesting in a global process of research of high value added of all whey components
- High protective effect on young mammals such as foals and piglets

Colostrum

J. - L. Maubois

Colostrum composition

(Foley and Otterby J. Dairy Sc.1978)

- Defined as the mixture of the milkings of the three days following parturition
- Main components, in g.kg⁻¹ decrease as follows:
 - Total solids: 239 (1st milking) to 141 (4th milking)
 - Proteins: 140 (1st milking) to 41 (4th milking)
 - Fat: 67 (1st milking) to 39 (4th milking)
 - Lactose 27 (1st milking) to 44 (4th milking)
 - Mineral salts 11.1 (1st milking) to 7.4 (4th milking)
- Ig content increases with cow's age

Zaragosse 2006

63

Colostrum bioactive Components

(Scammel, Austr. J. Technol. 2001)

Component per L	Colostrum	Milk
IgA g	6.2 - 3.2	0.1
IgG1 g	87 - 48	0.4
IgG2 g	2.9 - 1.6	0.05
IgM g	6.1 - 3.7	0.05
IGF-1 mg	2.0 - 0.1	0.025
IGF-11 mg	2.0 - 0.1	0.002
TGF-β mg	4.0 - 2.0	0.001
Lactoferrin g	2.0 - 1.5	0.1
Lactoperoxidase mg	30	20
Lysozyme mg	0.7 - 0.1	0.3 - 0.1

Zaragosse 2006

64

Efficacy

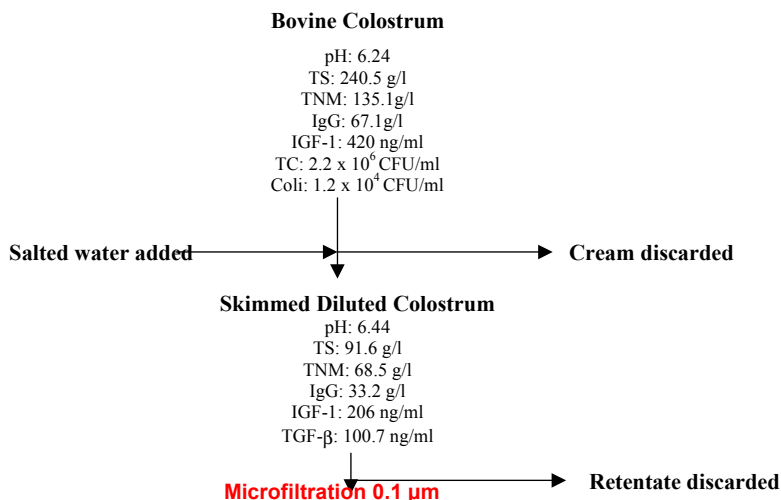
Sedona Labs sheet

- Rump & al., 1992: good therapeutic effect on 37 HIV patients with chronic diarrhoea; same observation by Plettenberg & al., 1993, Greenberg and Cello, 1996
- Bitzan & al., 1998: bovine colostrum blocks attachment of *H. pylori* to its lipid receptors
- Huppertz & al., 1999: bovine colostrum very efficient against diarrhoea associated with pathogen *E. coli*
- He & al., 2001: bovine whey colostrum strongly enhances human immune response (no information on the process to obtain the whey)

Zaragosse 2006

65

Preparation of serocolostrum 1



Zaragosse 2006

66

Preparation of serocolostrum 2

MF 0.1 µm with diafiltration

pH: 6.70
TS: 9.6 g/l
TNM: 4.9 g/l
IgG: 3.1 g/l
IGF-1: 26.7 ng/ml

↓
Ultrafiltration

Retentate

pH: 6.78
TS: 94.4 g/l
TNM: 88.9 g/l
IgG: 81.9 g/l
IGF-1: 200.0 ng/ml
TGF-β: 160.0 ng/ml
TC: 2.0×10^7 CFU/ml
Coli: < 10 CFU/ml

↘
UF permeate

TS: 5.2 g/l
TNM: 0.3 g/l
IGF-1: 5.3 ng/ml

↓
Freeze-Dried Powder

TNM: 921.3 g/kg
IgG: 848.7 g/kg
IGF-1: 2.0 ng/mg
TGF-β: 1.70 ng/mg
TC: 1.0×10^7 CFU/g
Coli: < 10 CFU/g

Zaragosse 2006

67

Colostrinin®: a cytokine-like polypeptide

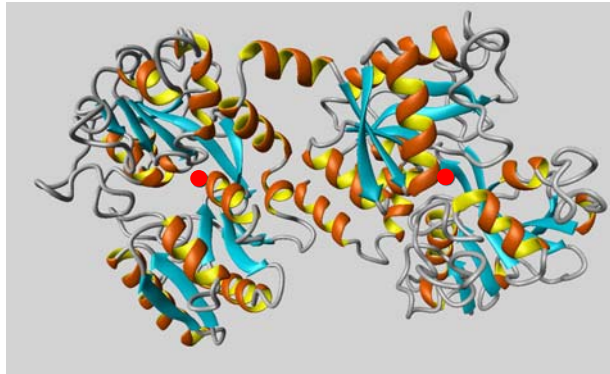
(Mikulska and Lisowski, Immunopharm. and Innunotox.2003)

- Polypeptidewith a high Pro content (22%) isolated from **ovine** colostrum, MW 3 x 6,000 Da but active biopeptide only 9 aa (chymotrypsin hydrolysis)
(Val-Glu-Ser-Tyr-Val-Pro-Leu-Phe-Pro)
- Immunoregulatory activity through regulation of inflammatory cytokines and inhibition of NO and O₂⁻ surproduction by membrane LPS
- Procognitive action = Improvment of mild Alzheimer's disease patients (46) (100 µg/2nd day; one year)

Zaragosse 2006

68

Lactoferrin



Three-dimensional structure of lactoferrin (Moore *et al.*, 1997)

Glycoprotein (80 kDa) with 2 lobes and 2 Fe³⁺ binding sites

Zaragosse 2006

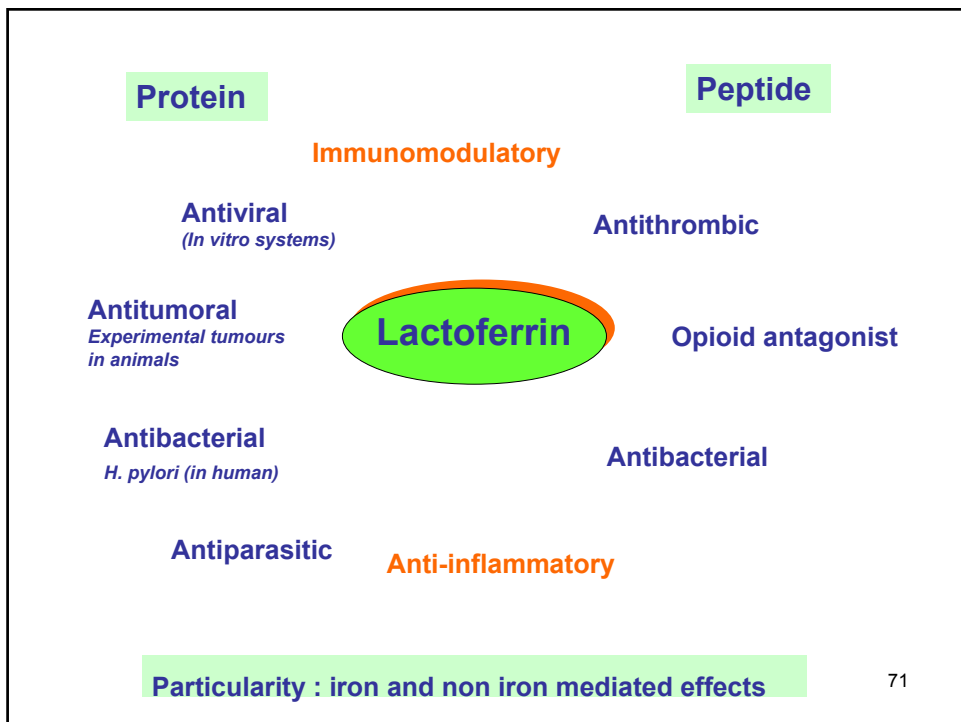
69

Valeur santé de la lactoferrine

- Protéine très étudiée, PM 78000 Da, pHi 9, joue un rôle majeur dans l'absorption du Fe, inhibe la croissance bactérienne par ferriprivation, stimule système immunitaire (anti-carcinogène) et contient plusieurs peptides bio-actifs: 17-38 (apoptose des cellules humaines leucémiques (Roy & al., 2002);
- 39-42, 30-37, 28-34, (3 x anti-thrombotiques),
- 318-323 (anti-opioïde) et 17-41 (anti-microbien)
- **Avec Lp, utilisation activité anti-bactérienne, en nutrition animale, en substitution des antibiotiques**

Zaragosse 2006

70



Health and Individual Whey Proteins

Minor whey proteins

- Numerous minor proteins of which physiological activities strongly dependant of technological history starting from milk
- Growth factors: multifunctionalities
- TGF- β (4.3 ng/ml) stimulates epithelial cell migration at wound sites, anti-psoriasis, treatment of gastrointestinal disorders, even chemotherapy induced mucositis, etc
- IGF-1 for anabolism (malnutrition)

Réponse à l'ostéoporose

Viellissement population = prévalence accrue de l'ostéoporose dans tous les pays et spécialement population féminine post ménopause (10% âge >50 ans) des pays développés = coût France > 10⁹ €

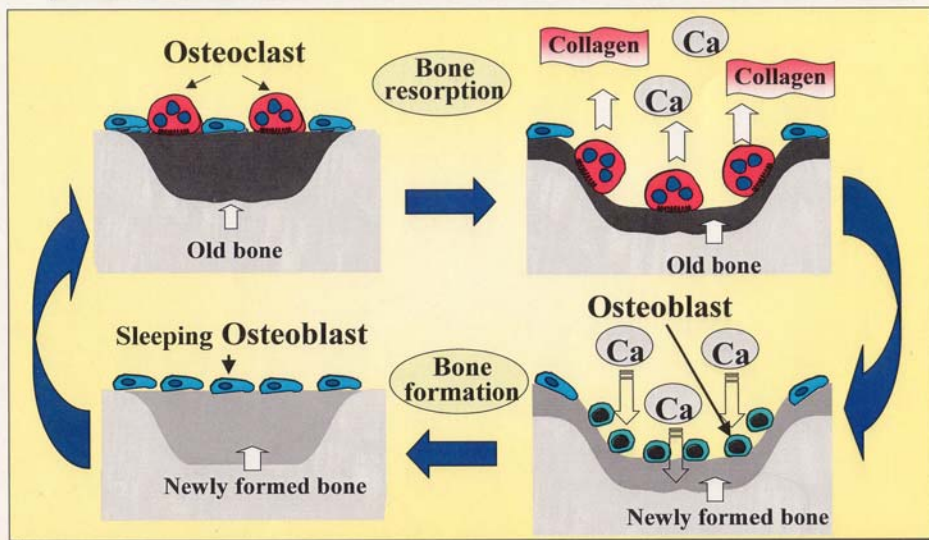
Fractures osseuses attribuées à une activité accrue non hormono-régulée (- œstrogène) des ostéoclastes

Apports de calcium ne suffisent pas, sa mobilisation par les ostéoblastes doit être stimulée

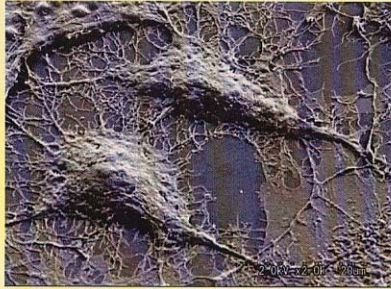
Zaragosse 2006

73

Bone Remodeling



Bone Formation by Osteoblast



Osteoblast

Generate collagen



Conjugate Ca and P



Mineralization



Newly formed bone

Bone Resorption by Osteoclast

Osteoclast



Production of the acid,
protease



Dissolution of calcium
Degradation of collagen



Resorption

“Milk Basic Proteins”

- Procédé développé par Snow Brands (Japon)
- Fraction à haut pHi de WPC après élimination de la Lf et de la Lp = **Milk Basic Proteins**.
- 2 études cliniques sur femmes (33) et hommes (30) (30 à 40 ans) ont montré que la **Cystatine C** avait une activité inhibitrice sur la résorption de l'os par action sur la Cathepsine K (Matsuoka *et al.*, 2002) ainsi qu'une action de stimulation des ostéoblastes grâce à 2 autres composants: une protéine à haute mobilité électrophorétique et le kininogène (Takada and Aoe, 2004)

Health and Individual Whey Proteins

Minor whey proteins

- **Osteopontin** (PP group); 22 mg/l; 60KD high content in Ser-P and Thr-P; bone mineralisation (Merry & al., 1993); regulation inflammatory process (Denhart & al., 2001)
- **Cystatin C**: 13.4 KD; pHi high; inhibits bone resumption, shown by feeding ovariectomised rats with whey proteins fraction; maintains bone density (Takada & al., 1997)

Ostéopontine (1)

- Glycoprotéine, PM 60 000 Da produite par les cellules osseuses: ostéoclastes et ostéoblastes
- Présente dans la **fraction PP** du lait 22 mg.L⁻¹
- pHi 4 à 5
- Préparation par chromatographie (Bayless & &l., 1997)
- Séquence Arg-Gly-Asp d 'adhésion sur cellules + muscle lisse
- rôle majeur dans la minéralisation de la matrice osseuse (collagène + protéoglycanes + autres) appelée ostéoïde
- et dans la régulation des processus inflammatoires

Ostéopontine (2)

- Serait hydrolysée par la chymosine en Ileu₂₆-Tryp₂₇ ; (Kumura & al., 2004) conséquences physiologiques mais chez nouveau né, passage par estomac?
- WPC classiques vs Prolacta?
- Colostrum serait beaucoup plus riche 200 mg.L⁻¹ vs 22 mg.L⁻¹ dans lait

Folate Binding protein

- Prévalence majeure en déficience vitaminique est la déficience en folate or **rôle essentiel** dans la synthèse des bases constitutives de l'ADN
- Conséquences de cette déficience:
 - dysplasie des cellules gastro-intestinales
 - anémie mégaloblastique (méga hématies)
 - défauts des tubes neuraux (anencéphalie, Sp.Bi.)
 - hyperhomocystéinémie (cancers, pb vasculaires)

Zaragosse 2006

81

Folate Binding protein

- ANR pour folate 0,4 mg /jour pour éviter risques grossesse
- Folate nettement + biodisponible si lié à une protéine spécifique (absorption lente et complète; pas d'utilisation préférentielle par microflore digestive)
- Lait n'est pas une source élevée de folate mais biodisponibilité élevée en raison présence **FBP** dans sérum (10 mg/L) liant 1:1 (cf Parodi, 1997)
- FBP:222 aa;8 S-S;glycosylée à 10%;PM:30 000D
- Impureté d'élution en chromatographie IE de la β -lactoglobuline; présence probable dans « Prolacta »

Zaragosse 2006

82

Folate Binding protein

- Bioactivité de la FBP décroît fortement avec intensité du traitement thermique si > 90°C (perte >50%)
- Folate séparé aux pH acides mais se relie immédiatement à la FBP dans le jéjunum
- Autres protéines de liaison avec vitamines du groupe B dans lactosérum, seule étudiée celle liant B12

Zaragosse 2006

83

Growth factors in milk

Growth factors (GF)	Concentration µg/L	Biological effects
Epidermal GF (EGF)	2-5	Trophic effects on gastrointestinal tractus
Transforming GF (TGF)		
TGF α		Trophic effects on gastrointestinal tractus
TGF β	4-5	Growth cell control
Insulin GF (IGF)	10	
IGFI		Trophic effects on intestine and pancreas
IGF-II		Maturation of intestine

Zaragosse 2006

84

Transforming Growth Factor - β

- Protéine multifonctionnelle PM 2 x 127200 Da(S-S); lait et lactosérum 4 $\mu\text{g.L}^{-1}$
- 3 formes connues $\beta 1$ à $\beta 3$ chez mammifères
- Sous forme latente dans les produits laitiers
- Non dégradé par les enzymes digestifs mais activé par le pH acide de l'estomac

Transforming Growth Factor - β

- Puissant inhibiteur cytotatique des kératinocytes
- Antagoniste de l'EGF (Epithelial Growth Factor)
- Probablement activé « *in vivo* » par la plasmine
- Traitement par voie orale des psoriatiques dont les cellules épidermiques sont déficientes en **TGF β à la dose de 1,5 mg/jour prix 1,5 à 2 €/jour**
- Serait aussi un puissant stimulateur de l'angiogenèse (vascularisation)
- Effet cicatrisant par activation des fibroblastes

Facteurs de croissance

- Sources Lactosérum acide + riche
exemple: TGF- β
lait $3,7 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
lactosérum pH 6,2 $2,0 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
lactosérum pH 4,6 $3,1 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$
- Ou mieux serocolostrum **$1,15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$**
(Pakkanen, 1998)

Growth factors in milk

- General effects of growth factors on homeostasis of gastrointestinal tractus
- But also recent studies show the potential of these molecules on cell development. **One example anti-psoriasis activity of TGF β (Jouan et al, 2001 patent)**
- Although genetic engineering is capable to produce growth factors but milk is a good vector since protective proteins such casein in milk should be promoting factors for the activity of all these components

In conclusion

- Almost all components of milk have a physiological function beyond nutrition even minor components not yet identified
- Milk possesses a natural “cluster” of nutrients that protect the health of gastrointestinal tractus and enhance the immune system. They are the first targets of diet
- More human clinical studies are needed to prove efficiency in all cases and investigations of involved mechanisms
- Research strategy different of industrial strategy

Conclusions

The chosen examples show:

numerous technologies are already available for preparing milk bioactive peptides

very purified for experiments on Human volunteers
highly enriched for commercial products

Technologies are far in advance compared to legislation!!!

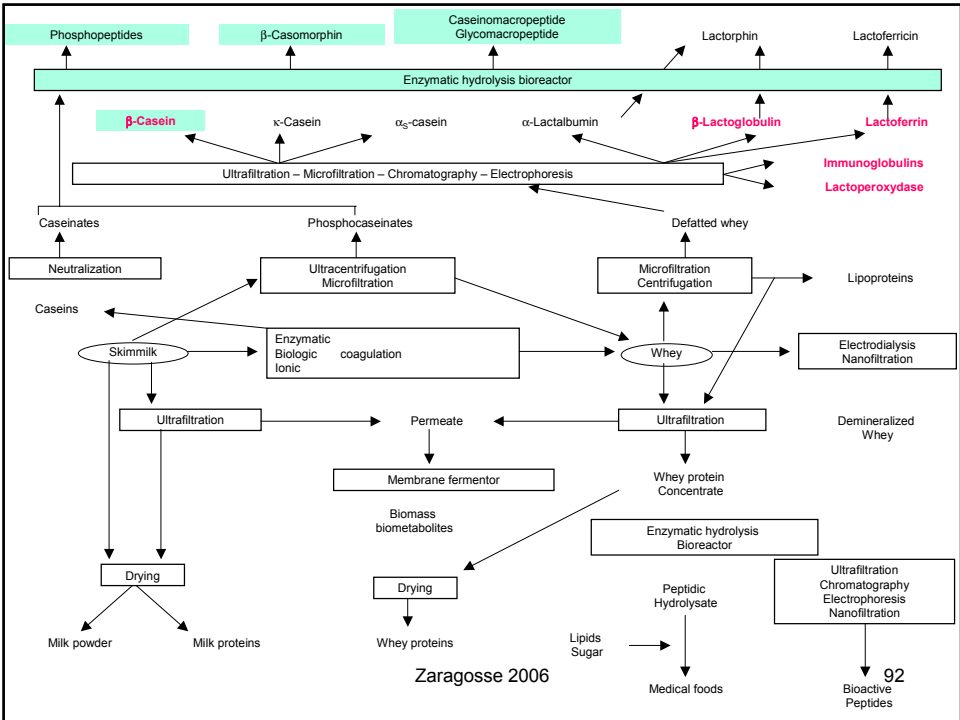
Many demonstrative studies have to be realised but no matter, the dairy family has matter trumps in hands to be one of the main actors in the **Nutraceutical era** with the marvellous liquid : **MILK!!!**

Biological functions of milk proteins

Protein	Function
Total caseins	Ion carrier (Ca, PO ₄ , Fe, Zn, Cu). Precursor of bioactive peptides
α-casein	
β-casein	Immunomodulation
κ-casein	
Total whey proteins	Anticarcinogenic
β-lactoglobulin	Retinol carrier, binding fatty acids
α-lactalbumin	Lactose-synthesis in mammary gland, Ca carrier, Immunomodulation, apoptosis
Immunoglobulins (A, M, G)	Immune protection
Lactoferrin	Antimicrobial, antioxidative, immunomodulation, iron absorption, anticarcinogenic
Lactoperoxidase	Antimicrobial
Lysozyme	Antimicrobial, synergistic effect with immunoglobulins and lactoferrin
Growth factors	Trophic effects on gastrointestinal tractus

Zaragosse 2006

91



Zaragosse 2006

Examples of functional foods



Commercial application of functional foods

Product	Health claim	Country
Phosphopeptides	Anti-cariogenic effect Calcium/osteoporosis	Japan, Australia, New Zealand
ProDiet200™ (Peptide $\alpha_{s1}(91-98)$)	Anxiolytic	USA, Canada, Japan
Calpis™	Anti-hypertensive	Japan
Valio™	Anti-hypertensive	Finlande
Satiatrol™ (CMP)	Appetite control	USA, Europe

Lactoferrin

However biological role of LF in **iron absorption** is not yet clearly understood

Only some observations :

- Iron in human milk is more absorbed than in bovine milk
- LF found in newborn *faeces*
- Presence of specific receptors to the surface of human enterocytes

Zaragosse 2006

95

Potential problems carried in Colostrum

- Johannes disease; *Mycobacterium paratuberculosis* should be removed with RD 4 as *Mb tuberculosis*
- Other disease: If the causal agent is a virus with a size similar to LAB phage, MF 0,1 μm will lead to a DR of 3 (Gautier & al., 1994)
- Mad cow: no literature on the subject but if prion BSE should be present, it will be in the leukocytes and consequently, **not in the serocolostrum**
- Antibiotics: no differences *a priori* with milk

Zaragosse 2006

96

Biological roles milk proteins

Before

Source of :

- nitrogen
- essential amino acids
- protective components

+

Recently

Source of :

- multiple biological functions
- bioactive peptides

Zaragosse 2006

97

Biological activities from milk-derived peptides

- Amino acid sequences (2 up to 64 AA)
- Released by enzymatic hydrolysis
- Modulate physiological functions in organism
- More of 200 sequences listed
- Multifunctional peptides

Zaragosse 2006

98

Biological activities from milk-derived peptides

Bioactivity	Protein precursor	Function
Opioid agonist	β -Casein α_{s1} -Casein α -Lactalbumin β -Lactoglobulin Serum albumin	Central and peripheral nervous systems
Opioid antagonist	κ -Casein Lactoferrin	
Anti-thrombotic	κ -Casein Lactoferrin (h)	
Anti-hypertensive	β -Casein α_{s1} -Casein Lactoferrin β -Lactoglobulin	Blood system

Zaragosse 2006

(Continued)₉₉

Biological activities from milk-derived peptides

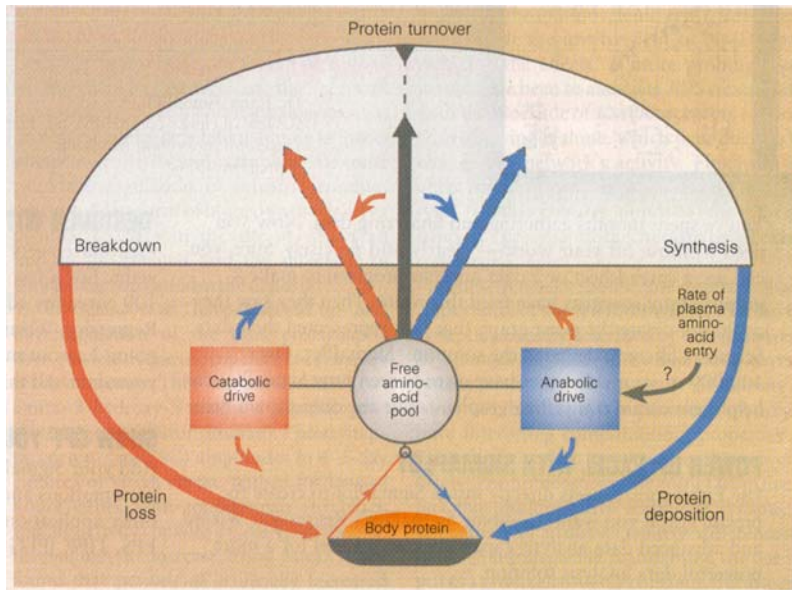
Bioactivity	Protein precursor	Function
Mineral binding	β -Casein α_{s1} -Casein α_{s2} -Casein	Digestive system (absorption, hormonal secretion)
Hormonal secretion (stimul. CCK)	κ -Casein	
Anti-microbial	Lactoferrin α_{s2} -Casein κ -Casein (h, b)	
Immunomodulatory	β -Casein κ -Casein α -Lactalbumin	Immune system

Zaragosse 2006

100

Concept of slow and fast dietary proteins

Nature, 391, 843, 1998, Boirie et al.



Concept of **slow** and **fast** dietary proteins

- The rate of dietary amino acid absorption is faster with whey protein (named **fast** protein) than casein (named **slow** protein)
- This differential kinetic has a major impact on postprandial metabolic response
- Casein promotes postprandial protein deposition whereas whey protein stimulates protein synthesis but also oxidation

Nutritional potentialities

- **With casein improving protein deposition**
 - patients with pathologies like sepsis, burns, skeletal trauma, renal diseases
 - patients with immunodeficiency
 - pre-term infants with low body weight
 - Elderlies

Zaragossse 2000

- **With whey protein avoiding excessive protein deposition**
 - Athletes
 - Slimming diets

105

Développement d'aliment fonctionnel

