



UFOP-SCHRIFTEN | RAPSÖL & ERNÄHRUNG

ABSCHLUSSBERICHT

Untersuchungen zum Vergleich der biofunktionellen Wirkungen von Lupinenprotein mit und ohne Phytasezusatz auf die vaskuläre Gesundheit

Autoren

Prof. Dr. Gabriele I. Stangl
Martin Luther Universität Halle-Wittenberg
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Humanernährung

Endbericht UFOP

Untersuchungen zum Vergleich der biofunktionellen Wirkungen von Lupinenprotein mit und ohne Phytasezusatz auf die vaskuläre Gesundheit

Prof. Dr. Gabriele I. Stangl
Martin Luther Universität Halle-Wittenberg
Institut für Agrar- und Ernährungswissenschaften, Humanernährung
Von-Danckelmann-Platz 2
06120 Halle (Saale)

1. Aufgabenstellung

Einheimische Proteinpflanzen wie Lupine, Erbse und Ackerbohne sind aufgrund ihres hohen Eiweißgehaltes und der günstigen Aminosäurezusammensetzung ein wichtiger Bestandteil in der menschlichen Ernährung. Insbesondere bei fleischarmer oder vegetarischer Kost stellen sie eine unverzichtbare Eiweißquelle dar. Untersuchungen aus unserer Arbeitsgruppe haben gezeigt, dass diese Proteine auch günstige Wirkungen auf den Cholesterolfstoffwechsel und die Arteriosklerose bzw. Gefäßverkalkung entfalten. Neben den Hauptnährstoffen enthalten einheimische Proteinpflanzen auch sekundäre Pflanzenstoffe wie Phytinsäure (Hexa-Inositolphosphat). Phytinsäure reichert sich insbesondere bei Entölung der Pflanzen sowie bei der Herstellung von Proteinisolaten an. Phytinsäure gilt aufgrund der mineralstoffbindenden Wirkung als antinutritiver Pflanzenstoff PALLAUF (1997). Andererseits mehren sich wissenschaftliche Hinweise, dass Phytinsäure auch positive Wirkungen im Organismus entfaltet. Diese in der Literatur beschriebenen Wirkungen der Phytinsäure ähneln in vielerlei Hinsicht den Effekten, die wir beim Einsatz von Lupinenprotein beobachtet haben. Unsere Hypothese war daher, dass gewisse Wirkungen des Lupinenproteinisolates auf die Effekte der proteinassoziierten Phytinsäure zurückzuführen sind. Da ein entsprechender Vergleich zwischen phytinsäurehaltigem und phytinsäurefreiem Lupinenprotein bislang fehlte, sollte dieser im Rahmen unseres Projektes durchgeführt werden.

Basierend auf früheren Beobachtungen, die zeigten, dass Lupinenproteinisolat eine cholesterolsenkende und kalzifizierungshemmende Wirkung aufweist sowie den in der Literatur bekannten Effekten von Phytinsäure, sollten im Rahmen des Projektes folgende Fragen beantwortet werden:

Welchen Anteil hat die Phytinsäure am biofunktionellen Wirkprofil von Lupineproteinen bzw. welche biofunktionellen Wirkungen sind auf die Proteinkomponente der Lupine und welche biofunktionellen Wirkungen sind auf die proteinassoziierte Phytinsäure zurückzuführen? Im Fokus der Untersuchungen standen die Effekte von Lupineproteinen mit assoziierter Phytinsäure und phytinsäurefreien Lupineproteinen im Vergleich zu Casein auf den Cholesterolspiegel sowie die Bildung und Zusammensetzung von atherosklerotischen Plaques. Auch mögliche synergistische Effekte zwischen Proteinkomponente und Phytinsäure sollten mit Hilfe dieses Versuches aufgezeigt werden.

Die geplanten Zielstellungen sollten an einem Atherosklerose-Mausmodell untersucht werden. Hierzu wurde ein Tierversuch mit ApoE-knockout-Mäusen, einem etablierten Atherosklerosemodell COLEMAN (2006), durchgeführt.

Als Zielparame-ter sollten die Wirkungen der Interventionen auf die Konzentrationen des zirkulierenden Cholesterols im Plasma, die Cholesterolausscheidung über die Fäzes, sowie die Bildung und Zusammensetzung atherosklerotischer Plaques untersucht werden. Im Rahmen der Blutgefäßanalysen wurde vor allem die vaskuläre Kalzifizierung erfasst, da diese in früheren Lupinenproteinstudien signifikant gegenüber einer Casein-Diät beeinflusst wurde. Da die Mäuse erst nach einigen Wochen und Monaten atherosklerotische Plaques entwickeln, sollen die Diäten über einen Zeitraum von 4 Monaten verabreicht werden.

2. Material und Methoden

2.1 Versuchsaufbau

Der Versuch beinhaltete 4 Gruppen. Eine Gruppe erhielt Lupineproteine mit einem natürlichen Gehalt an Phytinsäure. Um zu prüfen, ob auch

phytinsäurefreie Lupineproteine biofunktionelle Wirkungen entfalten, sollten die Tiere zu den Lupineproteinen einen Phytasezusatz erhalten, der das Phosphat vom dem Inositolmolekül abspaltet und damit potenzielle Wirkungen der Phytinsäure aufhebt. Als entsprechende Kontrolle diente eine Casein-Gruppe mit entsprechendem Phytinsäure- und Phytasezusatz. Die Tabelle zeigt das zweifaktorielle Versuchsdesign mit den Faktoren „Protein“ und „Phytinsäure“ noch einmal detailliert (Tab. 1).

Tab. 1: Versuchsdesign

	Proteinquelle			
	Lupinenproteinisolat mit assoziierter Phytinsäure		Casein mit Phytinsäurezusatz (entsprechend der Menge im Lupinenprotein)	
Phytinsäure	- Phytase	+ Phytase	-Phytase	+ Phytase
	Gruppe 1	Gruppe 2	Gruppe 3	Gruppe 4

2.2 Phytinsäureanalytik

Die Bestimmung der Konzentration der Phytinsäure in den Proteinisolaten wurde nach der Methode von Harland durchgeführt HARLAND (1986). Zunächst erfolgte die Extraktion der Phytinsäure mittels 2,4% HCl. Anschließend wurden die Proben filtriert und auf einem Anionentauschermaterial immobilisiert (AG1-X4, Bio-Rad Laboratories, Hercules, California, USA). Nach Waschen des Säulenmaterials mit 0,1 M NaCl erfolgte die Elution der gebundene Phytinsäure mit 0,7 M NaCl. Das Eluat wurde in 5 M HClO₄, 1 M H₂SO₄ hydrolysiert und bei 250°C verascht. Anschließend wurde die Menge des anorganischen Phosphates nach Zugabe eines Farbreagens spektrophotometrisch quantifiziert. Der Phytinsäuregehalt konnte dann anhand der Konzentration des anorganischen Phosphates berechnet werden.

2.3 Rohrnährstoffanalyse nach Weender

Die Analyse der Rohrnährstoffgehalte der Proteine wurde gemäß der offiziellen Methoden des Verbandes Deutscher Landwirtschaftlicher Untersuchungs- und Forschungsanstalten durchgeführt BASSLER (1976).

2.4 Bestimmung der Aminosäurezusammensetzung der Diätproteine

Die Proteine wurden oxidiert und anschließend mit 6 M HCl hydrolysiert BASSLER (1976). Die Trennung und Quantifizierung der Aminosäuren erfolgte mittels Ionentauscher-Chromatographie in einem Aminosäureanalyser (Biotronic LC 3000; Eppendorf, Hamburg; Germany). Zur Bestimmung von Tryptophan wurden die Proteine zunächst mit Bariumhydroxid inkubiert und anschließend erfolgte die Quantifizierung mittels reverse-phase HPLC FONTAINE (1998); EDER (2001).

2.5 Herstellung der Proteine und Diäten

Zunächst erfolgte die Bestimmung des Phytinsäuregehaltes des Lupinenproteinisolates (Fraunhofer Institut für Verfahrenstechnik und Verpackung IVV, Freising, Deutschland) und des Caseins (Meggler, Wasserburg, Deutschland). Den Casein-Diäten wurde eine den Lupineproteinen entsprechend gleiche Menge an Phytinsäure zugesetzt, so dass vor der Phytasebehandlung alle Diäten identische Phytinsäuregehalte aufwiesen. Für die Phytaseinkubation wurden Casein und Lupineproteine mit Wasser vermengt (600 ml Wasser/200 g Protein). Anschließend wurde den Proteinen 40 mg Phytase (Natuphos 10000, BASF, Deutschland) zusetzt. Die Diäten ohne Phytasezusatz wurden bis auf die Phytasezugabe analog behandelt. Alle Protein-Wasser Gemische wurden für 18 h bei 35°C (Temperaturoptimum der Phytase) inkubiert, um eine möglichst vollständige Hydrolyse der Phytinsäure zu erzielen. Anschließend wurde das Protein-Wasser Gemisch mit allen weiteren Diätkomponenten gemischt, gefriergetrocknet und bei -20°C gelagert. Die Zusammensetzung der Diäten ist in Tabelle 2 zusammengefasst.

Tab. 2 Zusammensetzung der Versuchsdiäten.

Komponente	g/kg Diät
Protein (Casein/Lupinenproteinisolat)	200
Stärke	264,5
Saccharose	200
Schweineschmalz	200
Sojaöl	5
Cholesterol	0,5
Vitamin- und Mineralstoffmischung	60
Cellulose	50
Zusätze (Phytase, DL-Methionin, Phytinsäure)	20

2.6 Versuchstiere und Versuchstierhaltung

Für die Studie wurden wachsende ApoE-knockout-Mäuse (B6.129P2-Apoe^{tm1Unc}/J mice) eingesetzt (Jackson Laboratory, Bar Harbor, Maine, USA). Bis zum Beginn des Versuches erhielten die Tiere eine kommerziell erhältliche Standarddiät für Mäuse ("altromin 1324", Altromin, Lage, Deutschland). Die Tiere wurden paarweise in Makrolon Käfigen gehalten und erhielten während des Versuches Futter und Wasser *ad libitum*. Im Versuchsraum wurde die Temperatur konstant auf 20-22°C eingestellt. Die Luftfeuchtigkeit betrug 50-60%. Die Mäuse wurden 12 Stunden bei Dunkelheit und 12 Stunden bei Dämmerlicht gehalten. Die wöchentliche Futteraufnahme pro Käfig und der wöchentliche Gewichtszuwachs jedes einzelnen Tieres wurden während des gesamten Versuches erfasst.

2.7 Gewinnung des Probenmaterials

Am Ende der 4-monatigen Versuchsphase wurden die Tiere nach Ätherbetäubung durch Dekapitieren getötet. Zur Gewinnung des Serums wurde das Blut in entsprechende Proberöhrchen aufgefangen und für 5 min bei 10.000 g zentrifugiert. Das Serum wurde bei -80°C gelagert. Für weitere Analysen wurden Leber und Herz incl. Aortenwurzel sowie die Aorta (Bereich: Mitte des Aortenbogens bis zur iliakalen Bifurkation) entnommen und ebenfalls bei -80°C

gelagert. Das Herz wurde sofort in Gefriermedium (Neg50, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) eingebettet und bei -80°C gelagert.

2.8 Gewinnung und Aufbereitung der Fäzesproben

Für die Bestimmung des Cholesterolgehaltes wurden die Fäzesproben über einen Zeitraum von 3 Tagen während der letzten Versuchswoche gesammelt. Anschließend wurden die Fäzes gefriergetrocknet und mit Hilfe eines Mörsers zerkleinert. Die Proben wurden bei -20°C gelagert.

2.9 Extraktion der Gesamtlipide aus Leber und Fäzes

Die Lipide aus den homogenisierten Lebern und Fäzes wurden mittels Hexan/Isopropanol (3:2) durch Schütteln für 16 h bei Raumtemperatur extrahiert HARA (1978). Die so gewonnen Lipidextrakte wurden dann bei -20°C gelagert.

2.10 Bestimmung des Cholesterolgehaltes in Leber und Fäzes

Zunächst wurden den gewonnen Lipidextrakten Aliquots entnommen. Das Lösungsmittel wurde verdampft und anschließend wurden die Lipide in einem Triton/Chloroform-Gemisch (1:1, w/w) aufgenommen DE HOFF (1978). Nach Abdampfen des Lösungsmittels wurden die Cholesterolgehalte der Proben mit Hilfe eines enzymatischen Testkits nach Angaben des Herstellers spektrophotometrisch quantifiziert (Diagnostic Systems, Holzheim, Deutschland).

2.11 Bestimmung der Cholesterolkonzentration im Serum

Vor der Bestimmung der Cholesterolkonzentration wurde das Serum 1:1 in 0,9% NaCl verdünnt. Die anschließende Quantifizierung erfolgte mittels eines enzymatischen Testkits analog zur Quantifizierung der Cholesterolgehalte in den Lipidextrakten von Leber und Fäzes (Diagnostic Systems).

2.12 Bestimmung der Konzentration von anorganischem Phosphat und Magnesium im Serum

Beide Parameter wurden mit Hilfe eines colorimetrischen Testkits analysiert (Analyticon Biotechnologies GmbH, Lichtenfels, Deutschland). Die Messung erfolgte spektrophotometrisch nach Angaben des Herstellers.

2.13 Quantifizierung atherosklerotischer Plaques mittels der *en face* Methode

Der Aortenbereich zwischen der Mitte des Aortenbogens und der iliakalen Bifurkation wurde entnommen, gespült und über Nacht in 2% Paraformaldehyd in PBS fixiert. Anschließend wurden die Aorten longitudinal eröffnet und zwischen 2 Objektträgern fixiert und fotografiert. Die Plaquerflächen sind ohne weitere Färbung sichtbar. Die Quantifizierung der Plaquerflächen erfolgte mit Hilfe der Software ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

2.14 Anfertigung der Gefrierschnitte der Aortenwurzel und Auswertung der gefärbten Präparate

Nach der Entnahme wurden die Herzen mit 0,9% NaCl gespült und in Gefriermedium eingebettet (Neg50, Thermo Scientific). Anschließend wurden mit Hilfe eines Gefriermikrotoms (CM 1850 UV Mikrotom, Jung; Leica Instruments, Nussloch, Deutschland) 7 µm dicke Schnitte beginnend an der Aortenwurzel angefertigt. Die histomorphometrische Charakterisierung und die Quantifizierung der Färbung erfolgte mittels eines Axiovert 200 Mikroskops und der Software AxioCamMRc, Axiovision rel. 4.8.2 (Carl Zeiss, Jena, Deutschland). Mit Hilfe des Software Programmes konnten die kalzifizierten Areale, Plaque- und Gewebeflächen, die mittels Ölrot gefärbten Lipide sowie die immunhistologischen Signale quantifiziert werden.

2.15 Quantifizierung der vaskulären Lipide mit Hilfe der Ölrot Färbung

Mit Hilfe der Ölrot Färbung können neutrale Lipide sichtbar gemacht werden. Die Präparate wurden in 10%-iger Formollösung fixiert und anschließend in 60%-iger Färbelösung (Stammlösung: 0,5% Oil Red O (Sigma Aldrich) in Isopropanol) 15 min gefärbt. Nach dem Waschen der Schnitte in aqua dest. wurden sie getrocknet und mit Gelatine (Dr. Hollborn und Söhne GmbH und Co KG, Leipzig, Deutschland) eingedeckt.

2.16 Quantifizierung der vaskulären Kalzifizierung mittels von-Kossa-Silberfärbung

Mit Hilfe der von-Kossa-Silberfärbung wurde die vaskuläre Kalzifizierung in den histologischen Schnitten der Aorta sichtbar gemacht. Zunächst wurden die Schnitte mit 10% Formol in Ethanol fixiert. Anschließend wurden die Präparate 1 h in 5%-iger wässriger Silbernitratlösung inkubiert und in aqua dest. gewaschen. Es folgte die Reduktion des Silbers mit 5% NaCO₃ in 9%-iger Formaldehydlösung für 2 min. Nach dem Waschen in aqua dest. wurden die Schnitte für 5 min in 5%-iger Natriumthiosulfatlösung fixiert und erneut in aqua dest. gewaschen. Die Präparate wurden dann in Goldner 1 Lösung (Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gegengefärbt, erneut gewaschen und nach dem Trocknen mit Eukitt (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) eingedeckt.

2.17 Immunhistochemische Analysen

Für die immunhistochemischen Analysen wurden die Präparate zunächst für 10 min in eiskaltem Aceton fixiert. Anschließend wurde die endogene Peroxidase durch Inkubation in 0,3% H₂O₂ in MeOH blockiert. Nach dem Waschen der Präparate mit PBS wurden die Schnitte 20 min mit 5% BSA in PBS behandelt und anschließend über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper (CD68, AbD SeroTec, Düsseldorf, Deutschland) inkubiert. Nach dem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur (goat anti rat, AbD SeroTec). Ungebundene Antikörper wurden durch Waschen entfernt. Nach Zugabe von DAB Lösung und weiteren Waschschritten mit PBS wurden die Schnitte mit Hämalaun-Eosin (Carl Roth) gegengefärbt, gewaschen, getrocknet und mit Aquatex (Merck, Darmstadt, Deutschland) eingedeckt.

2.18 Statistische Auswertung

Alle Werte sind als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Die statistischen Analysen wurden mit SPSS 20 (IBM, Armonk, NY, USA) durchgeführt. Mit Hilfe der zweifaktoriellen ANOVA wurden die Effekte des Proteins (Casein vs. Lupine), der Phytase (mit vs. ohne) sowie deren Interaktion analysiert. Bei signifikantem F-Wert, wurde der LSD Test als post-hoc Test gewählt. Als Signifikanzniveau wurde eine Irrtumswahrscheinlichkeit von 5%

($p \leq 0,05$) festgelegt. Ein p -Wert $\leq 0,1$ wurde als tendenzieller Unterschied definiert.

3.1 Rohnährstoffgehalt der Proteinisolate

Die Daten der Nährstoffanalyse (Tab. 3) zeigen, dass beide Proteinisolate vergleichbar hohe Proteingehalte aufweisen. Allerdings ist auffällig, dass das Lupinenproteinisolat etwas höhere Gehalte an Rohasche, Rohfett und Faseranteil aufwies als Casein.

Tab. 3 Nährstoffzusammensetzung der eingesetzten Proteinisolate

	Casein	Lupineproteine
Trockenmasse	91,4%	94,2%
Rohprotein	94,2%	95,7%
Rohasche	2,2%	4,6%
Rohfett	0,43%	2,7%
NDF	n.n.	0,99%
ADF	0,6%	0,43%
Lignin	n.n.	0,07%
Hemicellulose	n.n.	0,56%
Cellulose	n.n.	0,36%

Die Nährstoffanalyse wurde nach Weender durchgeführt. N.n. = nicht nachweisbar, Zellwandbestandteile: NDF = *neutral detergent fibre*, ADF = *acid detergent fibre*

3.2 Aminosäurezusammensetzung der Proteine und Diäten

Um einem Defizit an essentiellen Aminosäuren vorzubeugen, wurden die beiden Versuchsproteine vor Versuchsbeginn auf ihre Gehalte an Aminosäuren analysiert. Tab. 4 gibt einen Überblick über den Gehalt aller Aminosäuren in den Diäten. Den Diäten sollten jeweils 20% Protein zugesetzt werden. Zur Vermeidung eines Defizits an schwefelhaltigen Aminosäuren wurde den Lupinenprotein-Diäten 4,4 g DL-Methionin/kg Diät zugesetzt werden. Alle

anderen Aminosäuren waren in bedarfsdeckenden Mengen vorhanden und mussten nicht der Diät zugesetzt werden. Hinsichtlich der Aminosäurezusammensetzung fällt auf, dass Lupineproteine gegenüber Casein außer Methionin deutlich weniger Lysin, aber auffallend hohe Konzentrationen an Arginin aufweisen.

Tab. 4 Aminosäurezusammensetzung der Diäten bezogen auf die Aminosäure-Analyse der eingesetzten Proteine.

Aminosäure (g/kg Diät)	Casein-Diäten (20% Protein)	Lupinen- Protein-Diäten (20% Protein)	NRC Empfehlung [g/kg Diät]
Cys	0,6	2,3	5,0
Met	4,5	0,6	
Thr	6,7	5,0	4,0
Val	10,9	6,5	5,0
Ile	8,2	7,3	4,0
Leu	15,7	13,1	7,0
His	4,6	4,1	2,0
Lys	13,3	6,9	4,0
Arg	5,8	18,4	3,0
Asp	11,4	17,3	12,2
Ser	9,3	8,2	9,7
Glu	33,8	36,7	36,3
Pro	18,0	7,3	20,5
Gly	3,0	6,5	3,2
Ala	4,9	5,1	4,6
Tyr	7,3	4,8	9,3
Trp	2,2	1,5	
Phe	8,6	7,1	8,8

3.3 Phytinsäuregehalte der Diäten

Zunächst wurde die Phytinsäurekonzentration des Lupinenproteinisolates und des Caseins bestimmt. Im Casein war keine Phytinsäure nachweisbar. Das Lupinenproteinisolat enthielt 20 g/kg Phytinsäure. Daher wurde dem Casein jeweils 40 g/kg Na-Phytat zugesetzt, was einer finalen Konzentration von 20 g Phytinsäure/kg Casein entspricht. Sowohl für das Protein-Phytinsäuregemisch

als auch für die fertigen Diäten wurde der Phytinsäuregehalt analytisch bestimmt.

Die Hydrolyse der Phytinsäure der Proteine für die Diäten bedurfte zunächst einer Optimierung. Ziel war es dabei, eine möglichst geringe Menge Enzym einsetzen zu müssen und dennoch eine möglichst vollständige Hydrolyse der Phytinsäure zu erzielen. Da die enzymatische Reaktion ausschließlich in wässrigem Milieu stattfindet, wurde zunächst getestet, wie viel Wasser dem Protein mindestens zugesetzt werden muss, um eine optimale Aktivität des Enzyms zu gewährleisten. Im nächsten Schritt wurden das Casein-Phytinsäure-Gemisch und das Lupinenproteinisolat unterschiedlich lang mit verschiedenen Mengen an Phytase inkubiert. Für jeden Testansatz wurde der Phytinsäuregehalt am Ende der Inkubationszeit bestimmt. Dies ist exemplarisch für ausgewählte Testansätze in Tabelle 5 dargestellt. Dabei zeigte sich, dass eine Inkubation mit 40 mg Phytase/200 g Protein für 18 Stunden geeignet ist, um die Phytinsäure vollständig zu spalten. Die Phytinsäurekonzentration in der Kontrolle, welche nicht mit Phytase inkubiert wurde, zeigte keine Veränderung der Phytinsäurekonzentration durch die Inkubation bei 35°C.

Tab. 5 Finale Phytinsäurekonzentrationen der getesteten Phytase-Reaktionsansätze.

Phytase [mg/200g Protein]	Zeit [h]	Finale Phytinsäurekonzentration [mg/g Protein]
40	4	5,5
80	18	0,0
40	18	0,0
0	18	20
0	0	20

3.4 Futteraufnahme und Gewichtsentwicklung der Tiere

In Tabelle 6 sind die Futteraufnahmen, die finalen Gewichte, die Gewichtszunahmen und die Lebergewichte aller Gruppen aufgeführt. Bei keinem der genannten Parameter zeigten sich Unterschiede zwischen den 4 Gruppen, damit konnte ein Futter- bzw. gewichtsbedingter Einfluss auf die zu messenden Cholesterolspiegel und die Atherogenese ausgeschlossen werden.

Tab. 6 Futteraufnahme, finales Gewicht, Gewichtszunahme und finales Lebergewicht der Tiere.

Diätprotein	Casein	Casein	Lupinen- proteine	Lupinen- proteine
Phytase	(-)	(+)	(-)	(+)
Futteraufnahme [g/d und Käfig]	3,10 ± 0,38	5,48 ± 0,44	5,24 ± 0,62	5,26 ± 0,44
Gewicht final [g]	31,2 ± 1,3	31,5 ± 3,6	32,2 ± 2,5	32,4 ± 2,6
Gewichtszunahme [g]	12,7 ± 1,5	12,9 ± 2,5	12,6 ± 2,2	13,2 ± 1,8
Lebergewicht [g]	1,22 ± 0,11	1,32 ± 0,22	1,32 ± 0,20	1,25 ± 0,22

Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 12). Da je 2 Tiere in einem Käfig untergebracht waren, wurde die Futteraufnahme pro Käfig erfasst (n = 6). Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA statistisch ausgewertet.

3.5 Cholesterol- und Triglyceridkonzentrationen im Serum

Die Serumcholesterolkonzentrationen der Mäuse aus den beiden Lupineproteine-Gruppen waren signifikant niedriger als die der Mäuse aus den Casein-Cruppen (Abb. 1). Der Phytasezusatz hatte keinen Einfluss auf die Cholesterolkonzentration im Serum.

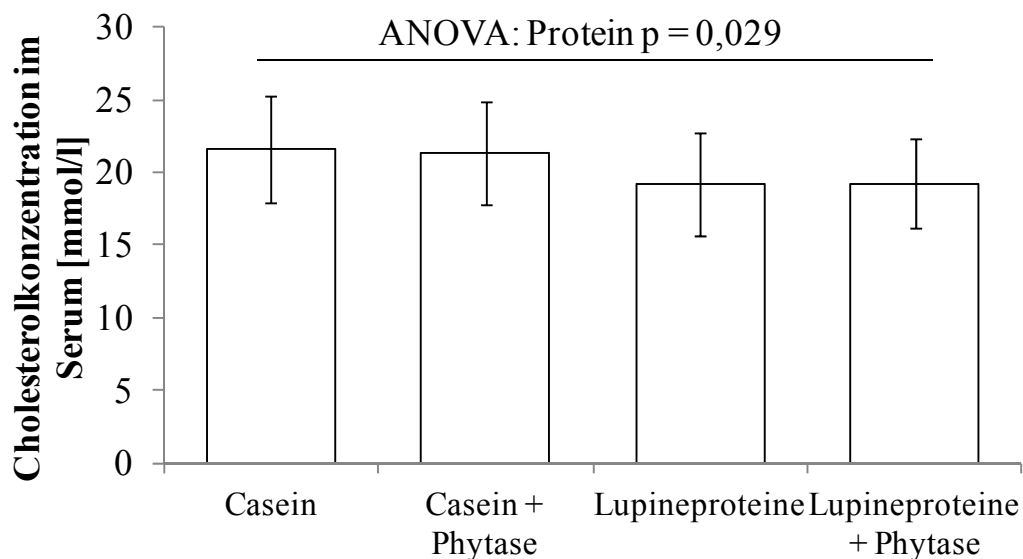


Abb. 1 Cholesterolkonzentration im Serum der Mäuse nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine \pm Phytase. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 12). Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA (ANOVA) statistisch ausgewertet.

Die beiden Proteine bzw. der Phytasezusatz zeigten jedoch keinen Effekt auf die Triglyceridkonzentrationen im Serum (Abb. 2). Insgesamt wiesen die Triglyceridkonzentrationen im Serum deutlich stärkere Schwankungen auf als der Cholesterolspiegel.

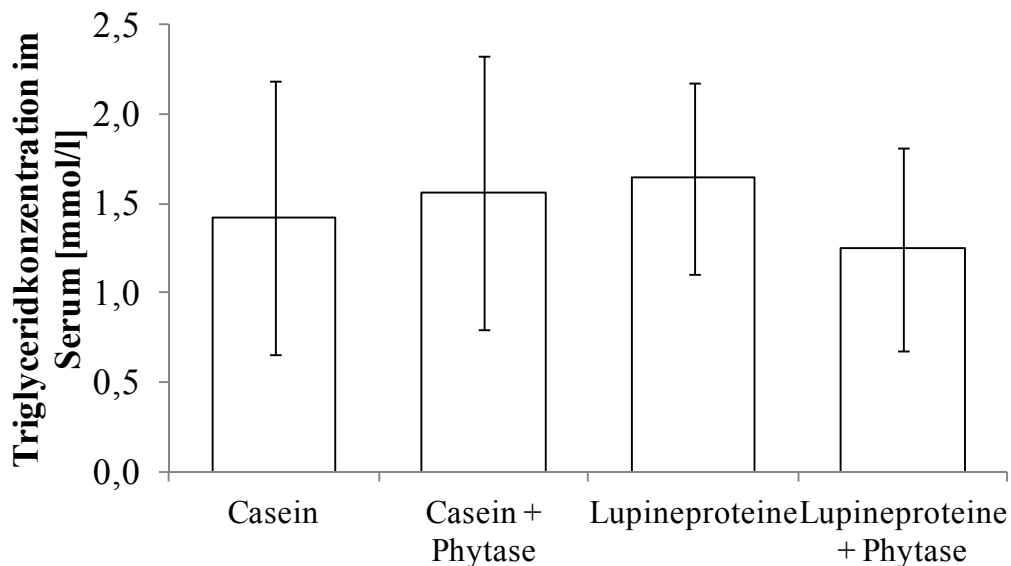


Abb. 2 Triglyceridkonzentration im Serum nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine \pm Phytase. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 12). Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA statistisch ausgewertet.

3.6 Cholesterolgehalt der Leber und fäkale Cholesterolausscheidung

Tabelle 7 zeigt die analysierten Cholesterolkonzentrationen in den Lebern der Mäuse nach 4-monatiger Fütterung der Versuchsdiäten. Im Gegensatz zu den Cholesterolspiegeln im Plasma waren der Cholesterolgehalt der Leber sowie die Mengen an fäkal ausgeschiedenem Cholesterol nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen.

Tab. 7 Cholesterolkonzentration in der Lebern der Mäuse nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine ± Phytase und Cholesterolkonzentration in Fäzes zum Ende der letzten Versuchswoche.

Diätprotein	Casein				Lupine				zweifaktorielle ANOVA		
	Casein (-)	Casein (+)	Lupine (-)	Lupine (+)	Prot.	Phyt.	Prot. x Phyt.				
Cholesterol											
Leber [mg/g]	5,02 ± 0,99	5,2 ± 1,09	5,8 ± 1,18	5,11 ± 0,86	n.s.	n.s.	n.s.				
Fäzes [mg/g]	3,77 ± 0,84	3,69 ± 0,45	3,89 ± 0,60	4,01 ± 0,42	n.s.	n.s.	n.s.				

Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 12). Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA statistisch ausgewertet. Prot. = Protein, Phyt. = Phytase

3.7 Konzentration von Magnesium und anorganischem Phosphat im Serum

Die Abb. 3A und 3B zeigen die Konzentrationen von Magnesium und anorganischem Phosphat im Serum der Mäuse. Sowohl die Konzentration von Magnesium im Serum als auch die Konzentration des anorganischen Phosphats war bei den Tieren, die Lupineproteine erhielten, signifikant höher, als bei den Tieren, die Casein erhielten. Die Phytinsäure zeigte keinen Einfluss auf diese beiden Parameter.

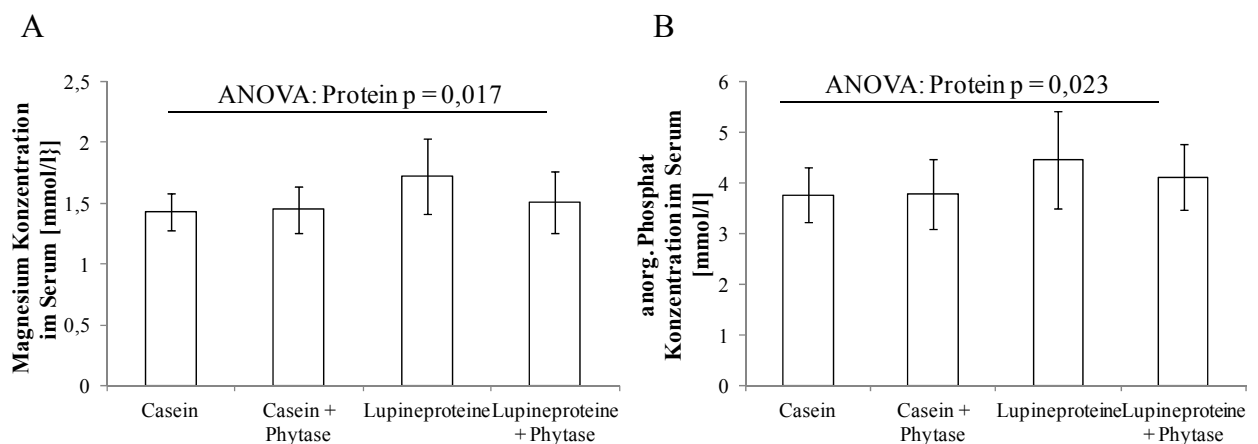


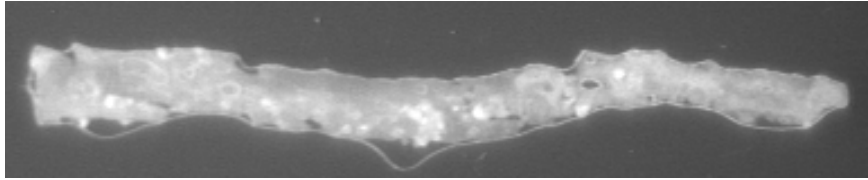
Abb. 3 Konzentration an Magnesium- und anorganischem Phosphat im Serum der Mäuse nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine ± Phytase. Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 12). Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA (ANOVA) statistisch ausgewertet.

3.8 Plaqueflächen der Aorta

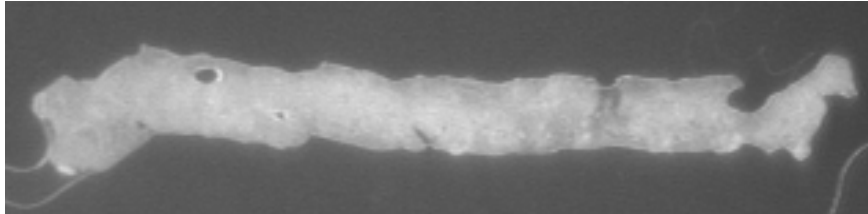
Ein Hauptaugenmerk der vorliegenden Untersuchungen galt der Fragestellung, ob Lupineproteine bzw. Phytinsäure die Entstehung bzw. das Voranschreiten der Atherosklerose beeinflussen kann. Die Plaquefläche kann mit Hilfe verschiedener Methoden quantifiziert werden. Zum einen wurde dazu die Aorta longitudinal eröffnet (*en face* Methode), um die Plaqueareale sichtbar zu machen. Zusätzlich wurden die Plaqueflächen auch in den Querschnitten der Aortenwurzel analysiert.

3.8.1 Aortenplaques (*en face* Methode)

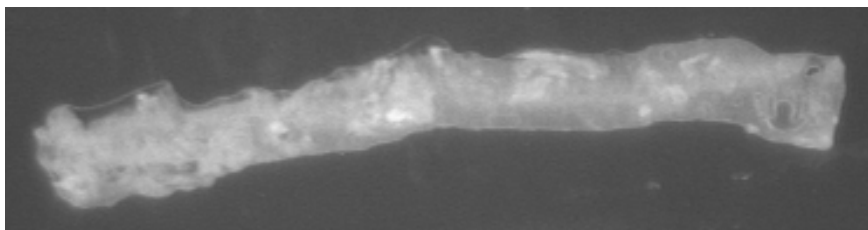
Abb. 4 zeigt ausgewählte Aufnahmen der longitudinal eröffneten Aorten. Die atherosklerotischen Plaques sind als weiße Flächen zu erkennen. Dabei ergab sich jedoch kein signifikanter Unterschied (n = 6) zwischen den 4 Gruppen.



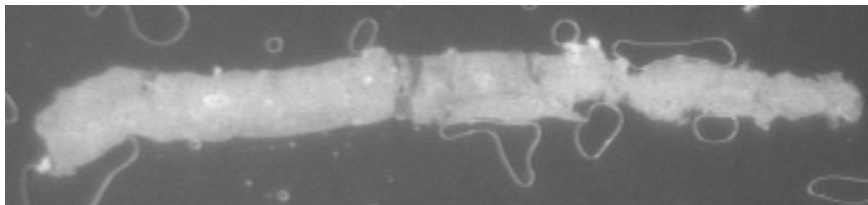
Casein



Casein + Phytase



Lupineproteine



Lupineproteine
+ Phytase

Abb. 4 Exemplarische Aufnahmen der longitudinal eröffneten Aorten.

3.8.2 Plaueflächen im Bereich der Aortenwurzeln (Goldner I-Färbung)

Die Ergebnisse zeigen, dass nach 4-monatiger Intervention alle Tiere eine ausgeprägte Plauebildung im Bereich der Aortenwurzel aufwiesen. Die Goldner I-Färbung, die im Rahmen der von-Kossa-Silberfärbung als Gegenfärbung verwendet wurde, erlaubt die Quantifizierung der Plaueflächen in den histologischen Schnitten im Bereich der Aortenwurzel. Dabei wurde deutlich, dass weder die Proteine noch der Phytasezusatz die Größe der Plaueflächen beeinflussten (Abb. 5).

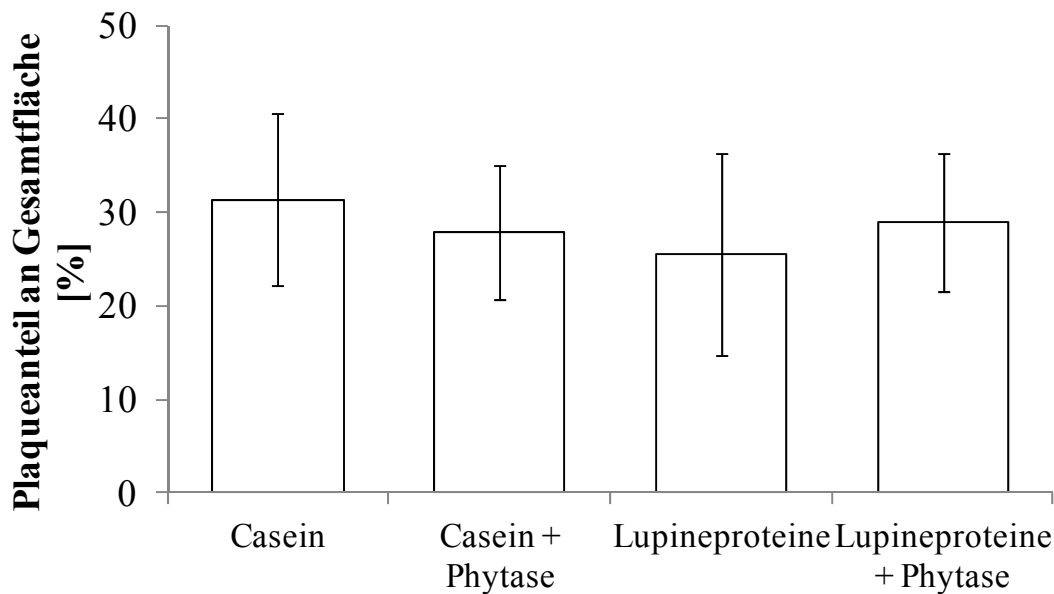


Abb. 5 Plaqueanteil am der Gesamtfläche der Aorta nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine \pm Phytase. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 12). Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA statistisch ausgewertet.

3.9 Zusammensetzung der atherosklerotisch veränderten Gefäßwand im Bereich der Aortenwurzel

3.9.1 Lipidgehalt

Abb. 6 zeigt den Lipidanteil der Gefäße im Bereich der Aortenwurzel der einzelnen Gruppen. Bezüglich des Lipidanteils im Bereich der Aortenwurzel gab es zwischen den Gruppen keine Unterschiede. In Abb. 7 sind für jede Gruppe exemplarische Aufnahmen der Ölrot-O gefärbten Gefrierschnitte der Aorten dargestellt, dabei sind die Lipide als rote Areale sichtbar.

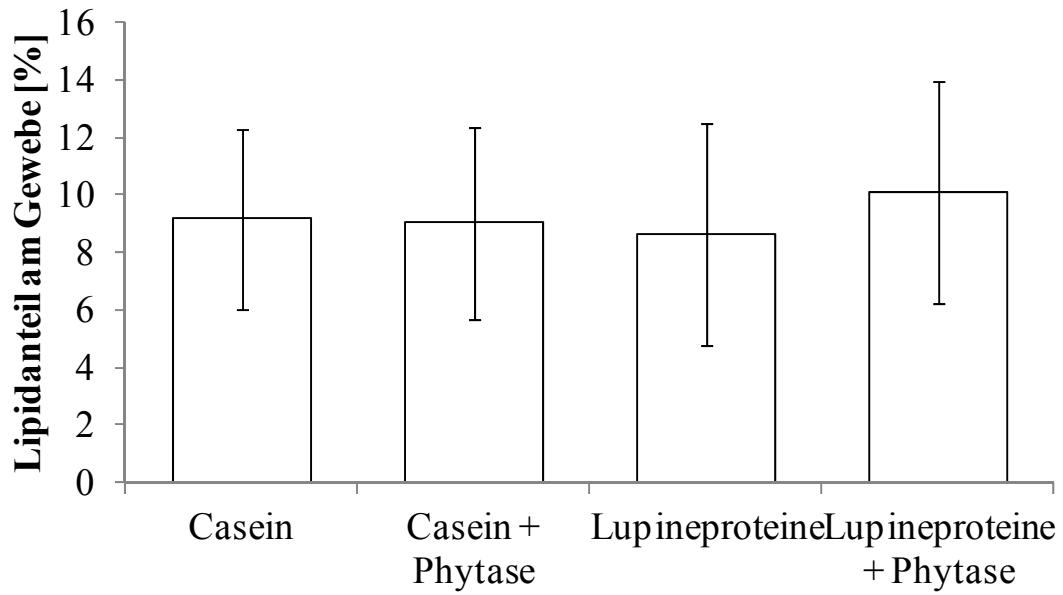


Abb. 6 Lipidanteil am Gewebe im Bereich der Aortenwurzel nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine \pm Phytase. Mittelwerte \pm Standardabweichung (n = 12). Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA statistisch ausgewertet.

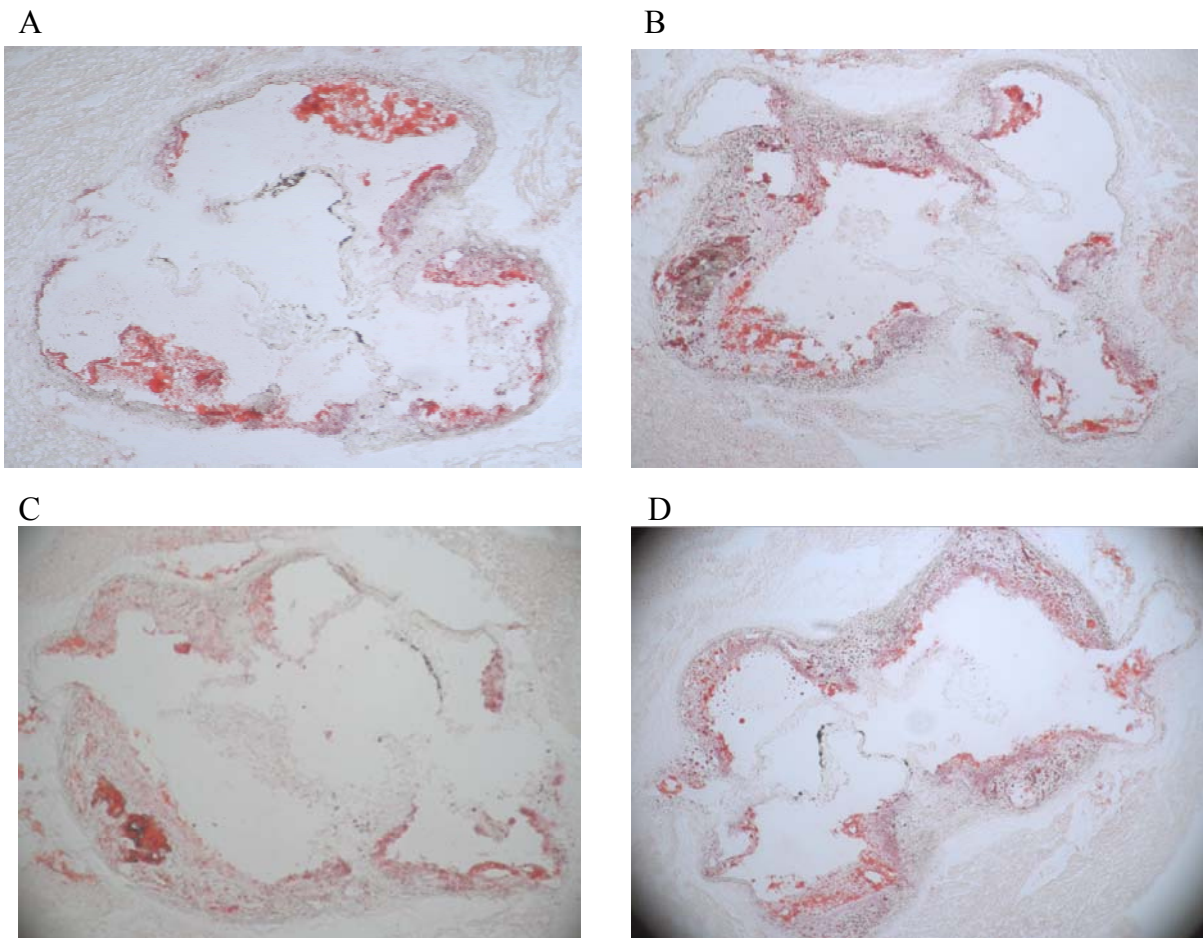


Abb. 7 Exemplarische Aufnahmen der mittels Goldner I Lösung gefärbten histologischen Schnitte im Bereich der Aortenwurzel nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine ± Phytase. A) Casein-Diät, B) Casein+Phytase-Diät, C) Lupineproteine-Diät, D) Lupineproteine+Phytase-Diät.

3.9.2 Kalzifizierungsanteil

Die zweifaktorielle Varianzanalyse zeigt bezüglich der vaskulären Kalzifizierung eine signifikante Interaktion zwischen Protein und Phytase. Dabei wiesen Tiere, die Lupinenprotein ohne Phytase erhielten, die geringsten Kalzifizierungen auf (Abb. 8). Dieser Effekt wurde jedoch durch den Zusatz von Phytase wieder aufgehoben. Allerdings wird aus den beiden Caseingruppen deutlich, dass der bloße Zusatz von Phytase allein keinen Effekt auf die Kalzifizierung aufweist. Abb. 9 zeigt zusätzliche exemplarische Aufnahmen der mittels von-Kossa-Silberfärbung gefärbten Gefrierschnitte der Aorten, dabei sind kalzifizierte Areale schwarz dargestellt.

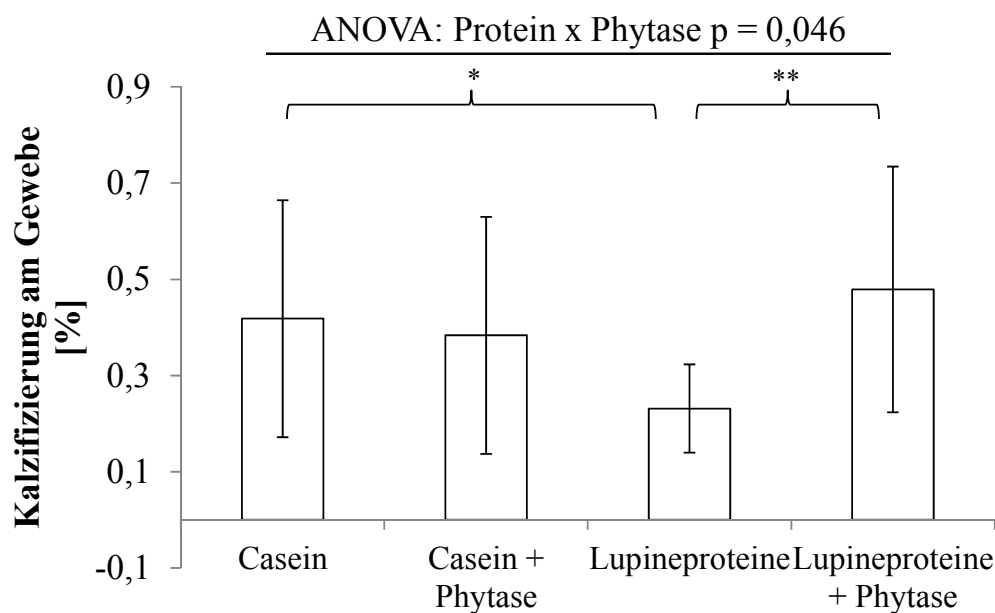


Abb. 8 Kalzifizierung des Artengewebes nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine ± Phytase. Werte sind Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 12). Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA (ANOVA) statistisch ausgewertet. Als *post-hoc*-Test wurde der LSD-Test verwendet. ** signifikanter Unterschied ($p \leq 0,05$), * tendenzieller Unterschied ($p \leq 0,1$).

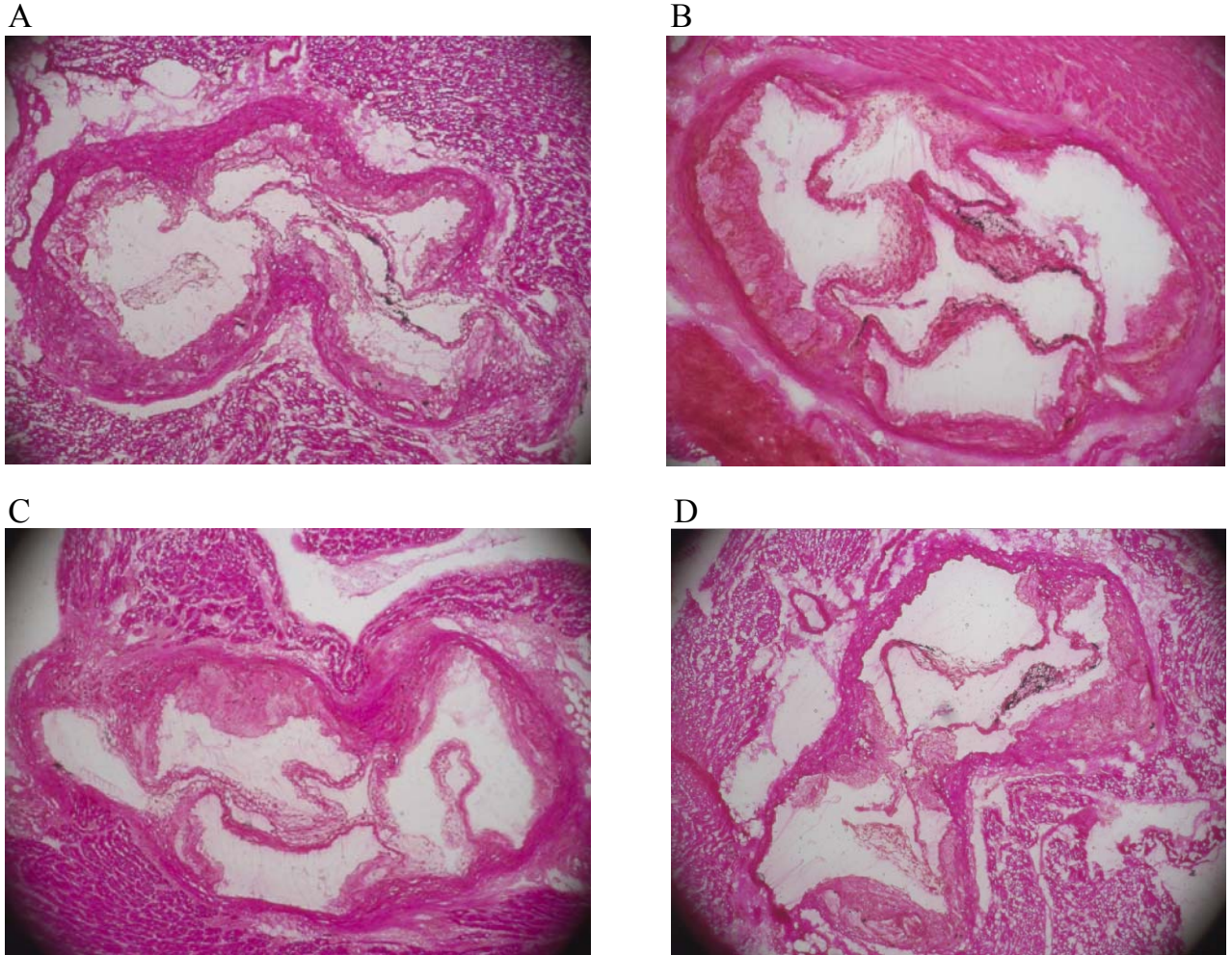


Abb. 9 Exemplarische Aufnahmen der mittels von-Kossa-Silberfärbung gefärbten histologischen Schnitte im Bereich der Aortenwurzel nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine \pm Phytase. A) Casein-Diät, B) Casein+Phytase-Diät, C) Lupineproteine-Diät, D) Lupineproteine+Phytase-Diät.

3.9.3 Makrophagenanteil

Die Atherogenese ist üblicherweise mit entzündlichen Prozessen assoziiert, in denen Makrophagen eine entscheidende Rolle spielen. Abb. 10 zeigt die relative Expression von CD68 als zellulären Marker für Makrophagen und Schaumzellen im Aortengewebe. Der Anteil CD68-positiver Bereiche in der Aortenwurzel wurde jedoch weder durch das Protein noch die Phytinsäure beeinflusst. Exemplarische Aufnahmen sind in Abb. 11 dargestellt.

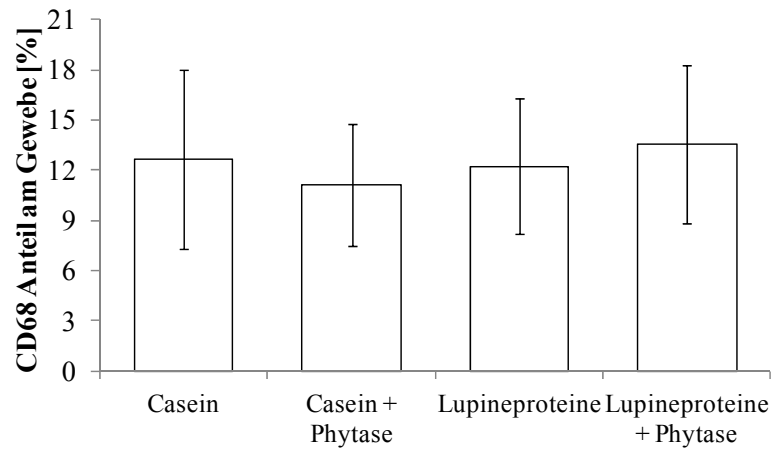
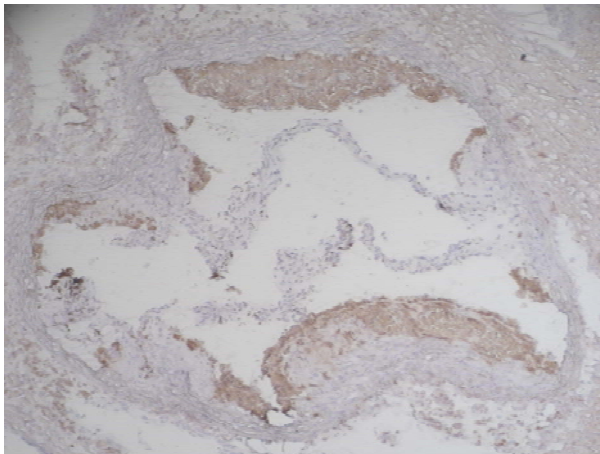


Abb. 10 CD68 Anteil der Gewebe der Aorta nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine ± Phytase. Mittelwerte ± Standardabweichung (n = 12). Die Daten wurden mittels zweifaktorieller ANOVA statistisch ausgewertet.

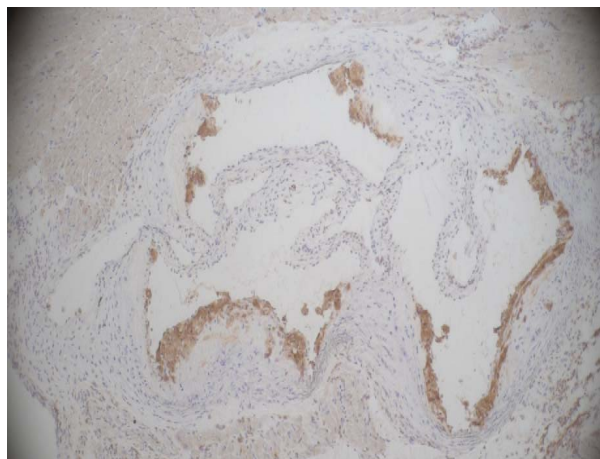
A



B



C



D



Abb. 11 Exemplarische Aufnahmen der anti CD68 Antikörper gefärbten histologischen Schnitte im Bereich der Aortenwurzel nach 4-monatiger Fütterung der Diäten mit 20% Casein bzw. Lupineproteine ± Phytase. A) Casein-Diät, B) Casein+Phytase-Diät, C) Lupineproteine-Diät, D) Lupineproteine+Phytase-Diät. Die Makrophagen sind braun gefärbt.

4 Diskussion

Durch die übliche lebensmitteltechnologische Isolation von Proteinen aus Lupinen ist es nicht möglich, reine Lupinenproteinisolate ohne Phytinsäure herzustellen. Diese proteinassoziierte Phytinsäure gelangt damit auch in die mit Lupineproteinen angereicherten Lebensmittel. Isoliertes Protein aus der einheimischen blauen Lupine enthält durchschnittlich etwa 22 g/kg Phytinsäure. Daher stellte sich die Frage, ob die günstigen Wirkungen von Lupinenproteinisolaten auf den Cholesterolspiegel tatsächlich durch die Proteine selbst oder nicht vielmehr durch die assoziierte Phytinsäure zustande kommen. Diese Frage sollte mit Hilfe eines zweifaktoriellen Versuchsdesigns geklärt werden. Die Daten des vorliegenden Versuches zeigen, dass Lupineproteine sowohl ohne als auch mit Zusatz von Phytase den Cholesterolspiegel gegenüber Casein absenken konnten. Darüber hinaus gab es keine Unterschiede zwischen Phytinsäure-supplementiertem Casein mit und ohne Phytase. In der Summe deuten diese Befunde darauf hin, dass der cholesterolsenkende Effekt von Lupineproteinen nicht auf die Phytinsäure zurückzuführen ist. In einer aktuell durchgeführten Untersuchung an Schweinen als Modelltiere konnte gezeigt werden, dass Tiere, die eine Lupinenprotein-reiche Diät erhielten, deutlich mehr Cholesterin ausschieden als Casein-ernährte Tiere. In der vorliegenden Studie mit ApoE-knockout-Mäusen ließ sich jedoch weder ein Einfluss der Lupineproteine noch der Phytinsäure auf die fäkale Cholesterolausscheidung beobachten. Es ist daher zu vermuten, dass die beobachtete cholesterolsenkende Wirkung in den beiden Lupineproteine-Gruppen nicht durch eine vermehrte Cholesterolexkretion zustande kam.

Bezüglich der Wirkung auf die Atherogenese ergab sich ein differenzierteres Bild. Alle ApoE-knockout-Mäuse entwickelten während des Versuchszeitraumes von 4 Monaten starke atherosklerotische Veränderungen im Bereich der Aortenklappe. Ein besonders interessanter Befund der Studie ist, dass offenbar

nur die Kombination aus Lupineproteinen und assoziierter Phytinsäure die Kalzifizierungen im Bereich der Aortenklappe verminderte, aber nicht Lupineproteine mit Phytasezusatz oder Phytinsäure-supplementiertes Casein. Mäuse, die Lupineproteine mit assoziierter Phytinsäure erhielten, wiesen eine um 44% geringere Kalzifizierung im Vergleich zur Casein-Gruppe auf. Diese kalzifizierungshemmende Wirkung von Lupineproteinen konnte bereits in einer früheren Studie am ApoE-knockout-Mausmodell beobachtet werden WEISSE (2010), so dass die vorliegenden Ergebnisse diesen Befund bestätigen.

Auf der Basis der bisher analysierten Daten ist die Ursache für diese Beobachtung unklar. Allerdings finden sich in den Untersuchungen von Yu et al. YU (2012) mögliche Erklärungsansätze. Hier wurde gezeigt, dass Phytinsäure im sauren pH-Bereich Proteine bindet und dadurch die Aktivität von Proteasen vermindert, aber auch die Zugänglichkeit der aggregierten Phytinsäure-Protein-Komplexe für Proteasen verschlechtert. Ein häufig postulierter Mechanismus der cholesterolsenkenden Wirkung von Lupineproteine wird auf die Wirkung einzelner intakter, nicht verdauter Peptide der Lupine, wie z.B. dem γ -Conglutin, zurückgeführt CAPRARO (2011); LOVATI (2012). Eine Reduzierung der Proteaseaktivitäten könnte somit zu einer höheren Menge verfügbaren intakten γ -Conglutins beigetragen haben. Somit wäre Phytinsäure indirekt ein Verstärker der kalzifizierungshemmenden Wirkung von Lupinenproteinen. Eine direkte Wirkung von Phytinsäure auf die Kalzifizierung kann aufgrund der vorliegenden Daten ausgeschlossen werden, da mit Phytinsäure angereichertes Casein gegenüber Casein mit Phytasezusatz keinen Effekt auf die Kalzifizierung hatte.

Allerdings scheint sich die antiatherogene Wirkung von Lupinenprotein auf die verminderte Kalzifizierung zu beschränken. Die Plaquerfläche, ebenso wie der Lipid- und Makrophagenanteil der Aortenwurzeln unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen. Dies bestätigt auch die Ergebnisse früherer Untersuchungen der Arbeitsgruppe WEISSE (2010).

Die Entstehung der vaskulären Kalzifizierung wird durch zahlreiche Faktoren begünstigt. Dazu gehören beispielsweise ein erhöhter Cholesterolspiegel, oxidativer Stress, oxidativ modifiziertes LDL, aber auch eine erhöhte Konzentration von anorganischem Phosphat TANG (2006); TOWLER (2006); BYON (2008). Die cholesterolspiegel-senkende Wirkung von Lupinenproteine könnte den kalzifizierungshemmenden Effekt erklären, allerdings war die Senkung des Cholesterolspiegels sowohl bei Lupineproteinen ohne als auch mit Phytasezusatz zu beobachten. Dass eine Senkung des Serumcholesterolspiegels

jedoch nicht unbedingt mit einer kalzifizierungshemmenden Wirkung an den arteriellen Gefäßen einhergehen muss, zeigen aktuelle Studien ALRASADI (2009). In einer Studie mit diabetischen Mäusen konnten Diäten mit Phytinsäure gegenüber Phytinsäure-freien Diäten die Konzentrationen an Plasmacholesterol und LDL-Cholesterol der Tiere vermindern LEE (2005). Auch bei Tilapia und beim Geflügel zeigte der Einsatz von Phytinsäure eine deutliche konzentrationsabhängige Senkung der Cholesterolkonzentration im Plasma LIU (2010); KUMAR (2011). Diesen isolierten Phytinsäureeffekt lassen die vorliegenden Daten jedoch nicht erkennen. Des Weiteren konnte ausgeschlossen werden, dass die Kalzifizierungshemmung aufgrund erniedrigter Phosphatspiegel im Serum resultierte, da die Lupinenproteingruppen sogar etwas höhere Phosphatspiegel aufwiesen. Eine mögliche Ursache für die erhöhten Magnesium- und Phosphatspiegel im Serum ist der höhere Rohaschegehalt des Lupinenproteinisolates im Vergleich zu Casein.

5 Schlussfolgerung

Die Daten der vorliegenden Studie bestätigen die cholesterolsenkende Wirkung von Lupineproteinen. Sie zeigen des Weiteren, dass dieser hypocholesterolämische Effekt auch in Lupineproteinen mit Phytasezusatz nachweisbar ist und schließen damit Phytinsäure als bioaktive Substanz mit nachweislicher Wirkung auf den Cholesterolspiegel aus. Die Aortendaten lassen zudem erkennen, dass nur die Kombination aus Lupineproteinen und Phytinsäure zu einer signifikanten Senkung der Kalzifizierung beiträgt. Eine mögliche Erklärung ist die synergistische Wechselwirkung zwischen Phytinsäure und Lupinenprotein-spaltenden Proteasen.

6 Literatur

- ALRASADI, K., K. ALWAILI, ET AL., 2009: Aortic calcifications in familial hypercholesterolemia: potential role of the low-density lipoprotein receptor gene. *Am Heart J* 157 (1) 170-176
- BASSLER, R. AND H. BUCHHOLZ, 1976: Die chemische Untersuchung von Futtermitteln. Buch III. VDLUFA
- BYON, C. H., A. JAVED, et al., 2008: Oxidative stress induces vascular calcification through modulation of the osteogenic transcription factor Runx2 by AKT signaling. *J Biol Chem* 283 (22) 15319-15327
- CAPRARO, C., A. CLEMENTE, ET AL., 2011: Assessment of the lupin seed glucose-lowering protein intestinal absorption by using in vitro and ex vivo models. *Food Chem* 125 (4) 1279-1283
- COLEMAN, R., T. HAYEK, ET AL., 2006: A mouse model for human atherosclerosis: long-term histopathological study of lesion development in the aortic arch of apolipoprotein E-deficient (E0) mice. *Acta Histochem* 108 (6) 415-424
- DE HOFF, J. L., L. M. DAVIDSON, ET AL., 1978: An enzymatic assay for determining free and total cholesterol in tissue. *Clin Chem* 24 (3) 433-435
- EDER, K., S. PEGANOVA, ET AL., 2001: Studies on the tryptophan requirement of piglets. *Arch Tierernahr* 55 (4) 281-297
- FONTAINE, J., S. BECH-ANDERSEN, ET AL., 1998: Determination of Tryptophan in Feed by HPLC – Development of an Optimal Hydrolysis and Extraction Procedure by the EU Commission DG XII in Three International Collaborative Studies. *Agribiol Res* 51 (2) 97-108
- HARA, A. AND N. S. RADIN, 1978: Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Anal Biochem* 90 (1) 420-426
- HARLAND, B. F. AND D. OBERLEAS, 1986: Anion-exchange method for determination of phytate in foods: collaborative study. *J Assoc Off Anal Chem* 69 (4) 667-670
- KUMAR, V., A. K. SINHA, ET AL., 2011: Phytate and phytase in fish nutrition. *J Anim Physiol Anim Nutr* 96 (3) 335-365
- LEE, S.-H., H.-J. PARK, ET AL., 2005: Effects of dietary phytic acid on serum and hepatic lipid levels in diabetic KK mice. *Nutrition Research* 25 869-876
- LIU, N., Y. RU, ET AL., 2010: Effect of dietary sodium phytate and microbial phytase on the lipase activity and lipid metabolism of broiler chickens. *Br J Nutr* 103 (6) 862-868

- LOVATI, M. R., C. MANZONI, ET AL., 2012: Lupin seed gamma-conglutin lowers blood glucose in hyperglycaemic rats and increases glucose consumption of HepG2 cells. *Br J Nutr* 107 (1) 67-73
- PALLAUF, J. AND G. RIMBACH, 1997: Nutritional significance of phytic acid and phytase. *Arch Tierernahr* 50 (4) 301-319
- TANG, F. T., S. R. CHEN, ET AL., 2006: Hypercholesterolemia accelerates vascular calcification induced by excessive vitamin D via oxidative stress. *Calcif Tissue Int* 79 (5) 326-339
- TOWLER, D. A., J. S. SHAO, ET AL., 2006: Osteogenic regulation of vascular calcification. *Ann N Y Acad Sci* 1068 327-333
- WEISSE, K., C. BRANDSCH, ET AL., 2010: Lupin protein isolate and cysteine-supplemented casein reduce calcification of atherosclerotic lesions in apoE-deficient mice. *Br J Nutr* 103 (2) 180-188
- YU, S., A. COWIESON, ET AL., 2012: Interactions of phytate and myo-inositol phosphate esters (IP1-5) including IP5 isomers with dietary protein and iron and inhibition of pepsin. *J Anim Sci* 90 (6) 1824-1832



Herausgeber:

UNION ZUR FÖRDERUNG VON
OEL- UND PROTEINPFLANZEN E.V. (UFOP)

Claire-Waldoff-Straße 7 · 10117 Berlin

info@ufop.de · www.ufop.de