

ProHydrolase™

AUMENTA LA BIODISPONIBILITA' DELLE PROTEINE DEL SIERO DI LATTE.



ProHydrolase™ è il nuovo blend proteolitico studiato per superare i problemi di biodisponibilità insiti nella digestione e nell'assorbimento delle proteine del siero di latte, nutrienti ad elevato valore biologico, molto indicati come integratori per mantenere la massa magra e accelerare il recupero muscolare negli sportivi. E' noto, infatti, che una significativa percentuale di una dose orale di queste proteine viene persa perché le proteasi endogene non riescono a idrolizzarle in frammenti peptidici di 2-3 amminoacidi sufficientemente piccoli da poter essere assorbiti entro i limiti imposti dal tempo di transito gastro-intestinale e dai sistemi epiteliali di trasporto attivo. L'aggiunta di opportune quantità di **ProHydrolase™** alla base siero-proteica ne aumenta enormemente la biodisponibilità e ne massimizza tutti benefici sia strutturali che funzionali. Oltre a questa importantissima azione farmacocinetica **ProHydrolase™** riduce sensibilmente la frazione di peptidi con lunghezza idonea a stimolare una risposta locale del sistema immunitario, diminuendo così l'incidenza di alcuni effetti indesiderati: gonfiore di stomaco, eruttazioni, nausea e spasmi intestinali. **ProHydrolase™** è una miscela di proteasi ad attività standardizzata, minimo 3500 HUT per 10 mg. Il dosaggio consigliato è 10 mg per ogni grammo di proteine.

Cenni sulle proteine e il loro metabolismo.

Il tessuto muscolare è costituito fondamentalmente da proteine, macromolecole biologiche che non possono essere depositate come accade per gli altri grandi nutrienti (carboidrati e grassi).

Il nostro assetto proteico complessivo è il risultato d'un processo dinamico di *turn over* delle molecole proteiche che sono continuamente degradate e neosintetizzate. Il corretto equilibrio è diverso da un individuo all'altro e può essere garantito solo dall'assunzione alimentare ed

eventualmente da un'opportuna integrazione. In quanto materiale di costruzione dei muscoli, tutti gli atleti in cui la massa muscolare diventa critica per la prestazione sportiva hanno un fabbisogno proteico superiore che è difficile soddisfare solo con l'alimentazione quotidiana. Le proteine sono catene d'amminoacidi legati con legame peptidico a formare strutture molto complesse che in base alla costituzione chimica si possono dividere in semplici (costituite solo da amminoacidi) e coniugate (la catena amminoacidica è legata a molecole d'altra natura). Fino a qualche anno fa era in voga una classificazione didattica degli amminoacidi presenti nel cibo, che li suddivideva in essenziali (quelli che l'organismo non può sintetizzare e vanno assunti con la dieta) e non-essenziali (quelli neo-sintetizzabili). Dal momento che tutti gli amminoacidi sono in realtà "essenziali" per l'espletamento delle normali funzioni biologiche è preferibile la distinzione tra superflui ed indispensabili sottolineando, tuttavia, che in situazioni particolari anche un amminoacido superfluo può diventare indispensabile. La glutamina, ad esempio, è un amminoacido superfluo che in caso di trauma (vedi l'attività fisica intensa o ustioni estese) può essere richiesto in quantità così elevate da superare la capacità biosintetica e rendere obbligata la supplementazione. La tabella che segue suddivide gli amminoacidi in base al criterio appena esposto:

Superflui:	Indispensabili:
Alanina	Lisina
Ac glutammico	Isoleucina (c)
Ac. aspartico	Leucina (c)
Glicina	Valina (c)
Serina	Treonina
Istidina	Metionina
Prolina	Fenilalanina
Glutammina (a)	Triptofano
Arginina	
Cisteina (b)	
Tirosina (b)	

(a) indispensabile in condizioni di alto stress fisico.
 (b) indispensabile se metionina e fenilalanina non sono disponibili
 (c) amminoacidi a catena ramificata (BCAA)

Tabella 1: amminoacidi indispensabili e superflui.

Il fabbisogno proteico è estremamente variabile in base al peso, all'età, alla composizione corporea, al tipo d'attività fisica svolta, alla sua frequenza e intensità.

Cruciali, inoltre, sono la provenienza e qualità delle proteine ingerite che i nutrizionisti misurano attraverso alcuni parametri che fungono anche da guida per valutare gli integratori:

P.E.R. (Protein Efficiency Ratio): indica l'aumento di peso corporeo d'un animale da esperimento per grammo di proteina assunta (la quale costituisce unica fonte alimentare per il test).

$$\text{P.E.R.} = (\text{g di peso corporeo guadagnati} / \text{g di proteina assunti})$$

B.V. (Biological Value): esprime il valore dell'azoto proteico effettivamente utilizzato e non escreto con urine e feci.

$$\text{B.V.} = (\text{g di Azoto assunto} / \text{g di Azoto assorbito}) \times 100$$

N.P.U. (Net Protein Utilization): indice della quota di azoto trattenuta a livello intestinale

$$\text{N.P.U.} = (\text{g di azoto trattenuto} / \text{g di azoto assunto}) \times 100$$

Con questi calcoli è possibile, fino a un certo punto, quantificare la qualità nutrizionale di una proteina confrontando prodotti di diversa matrice e lavorazione.

Nell'ambito delle proteine del latte si è potuto ad esempio stabilire che il latte intero ha un BV di 91 (PER = 3.1), la caseina 77 (PER = 2.9) e le proteine del siero 100 (PER = 100), il massimo della scala. La biodisponibilità delle proteine ingerite non è assoluta e a seconda delle condizioni individuali, della matrice in cui sono disperse, della loro natura e composizione una frazione non inferiore al 5 % viene eliminata con le feci.

La digestione inizia nello stomaco ad opera della tripsina e pepsina coadiuvate nella loro azione idrolitica dall'acido cloridrico; all'intestino tenue giunge, dunque, un insieme di peptidi con catene di lunghezza variabile che sono ulteriormente scissi ad opera degli enzimi pancreatici. Possono essere assorbiti (tramite carrier di membrana presenti sulle cellule epiteliali) solo gli aminoacidi liberi ed i di- e tri-peptidi, mentre le catene aminoacidiche con quattro o più monomeri devono essere ancor più idrolizzate. Molti di questi carrier sono aspecifici e, pertanto, possono subire fenomeni di saturazione se un aminoacido eccede certe concentrazioni; anche se teoricamente dovrebbero essere più biodisponibili, gli aminoacidi liberi vengono assorbiti più lentamente sia per i citati fenomeni di competizione sia perché i trasportatori per di e tri-peptidi sono più abbondanti ed efficienti. Una volta entrati nel torrente circolatorio gli aminoacidi (qualunque sia la loro fonte) sono del tutto indistinguibili dal punto di vista dell'attività biologica pertanto la biodisponibilità e la velocità d'assorbimento sono due elementi che fanno la differenza. Ecco perché si suole parlare di proteine "lente" (come la caseina) e "veloci" (come quelle del siero di latte), un concetto farmacocinetico studiato su volontari sani. Essi sono stati divisi in due gruppi e fatti digiunare per 10 ore prima di somministrargli 30 grammi di proteine del siero e 30 g di caseina, rispettivamente: con le prime, dopo 1 ora dall'assunzione, si verifica un picco nella concentrazione plasmatica di leucina che torna a livelli normali dopo 4 ore; con la seconda l'innalzamento delle concentrazioni ematiche di leucina è meno pronunciato ma più costante nel tempo.

Ogni giorno il nostro organismo scinde e risintetizza circa 300 g di proteine; la maggior parte dei loro aminoacidi viene riutilizzata mentre (mangiando normalmente) il 4-5 % di essi è escreto. Il bilancio azotato (la differenza tra azoto assorbito ed escreto) risente anche dell'apporto calorico complessivo: per esempio una dieta ipocalorica fa perdere più azoto di una ipercalorica e aproteica. Il fabbisogno proteico è stimato all'incirca in 50-60 mg/Kg di peso corporeo/die e tenendo conto della biodisponibilità delle principali fonti alimentari e della variabilità inter-individuale l'RDA per le proteine è fissata a 0.8 g/Kg/die. Negli atleti questo dato cambia sensibilmente perché viene incrementato dall'esercizio sia aerobico che anaerobico: nel primo caso gli aminoacidi (particolarmente i ramificati) sono usati anche a scopo energetico tanto da rappresentare fino al 10 % dell'energia spesa durante un lungo allenamento; nel secondo caso (ad esempio per un body builder) servono soprattutto in funzione strutturale. Secondo alcuni dati i fabbisogni proteici sono grosso modo i seguenti: 1,2-1,4 g/kg/die negli sport aerobici; 1,6-1,8 g/kg/die nelle attività anaerobiche; 2,5-3 g/kg/die nel caso per i body builder.

Le proteine del siero di latte sono le più consumate tra gli sportivi per gli alti BV e PER, l'eccellente profilo amminoacidico (contengono circa il 25 % di amminoacidi ramificati, il top tra le varie proteine) e la buona solubilità. Oltre alle proprietà strutturali hanno azioni biologiche aggiuntive che conferiscono loro effetti salutistici peculiari studiati anche in chiave farmacologica: alcuni tri-peptidi in esse contenuti stimolano la sintesi di glutazione e IGF-1 (*Insulin like Growth Factor 1*) una citochina con un ruolo primario nella regolazione della sintesi proteica cellulare; alcuni di questi di-peptidi, inoltre, modulano la sensibilità dolorosa agendo sul sistema degli oppioidi endogeni. Chimicamente sono una miscela di alfa-lattoalbumina, beta-lattoglobulina, immunoglobuline (soprattutto IgA e IgG), sieroalbumina e altri peptidi minori. Quelle a scambio ionico, di qualità superiore, hanno una composizione media che non si discosta molto dalla seguente:

50 % beta-lattoglobulina (a sua volta costituita dal 50 % c.a. di BCAA)
22 % alfa-lattoalbumina
5 % sieroalbumina bovina
10 % immunoglobuline
12 % peptidi minori (lattoferrina, lattoperossidasi, lisozima, micropeptidi, ecc.)

Tab. 2: composizione-media di proteine del siero di latte a scambio ionico.

Sono il prodotto di prima scelta per chi è intollerante al lattosio e per l'assunzione immediatamente prima e dopo la prova fisica, quando occorre fornire energia (dai ramificati gluconeogenetici) e mattoni per la ricostruzione delle strutture perse durante lo sforzo. Pur essendo presentate come le proteine a più alta biodisponibilità, gli studi farmacocinetici hanno rivelato che se le proteine del siero non sono sufficientemente pre-idrolizzate una frazione significativa della dose non è assorbita perché l'idrolisi biologica non procede abbastanza velocemente rispetto ai tempi di transito gastro-intestinali (approssimativamente 30' per lo svuotamento gastrico e 2 ore per il passaggio nel tenue). Questo accade in parte per ragioni fisiologiche legate all'attività e concentrazione delle proteasi e all'innalzamento del pH gastrico per effetto tampone creato dall'alimento proteico ingerito, in parte per questioni legate al prodotto: le fasi di lavorazione pre-essiccamento delle proteine del siero formano coacervati proteici difficilmente attaccabili dagli enzimi. Se l'idrolisi non procede in modo efficiente fino alla formazione di amminoacidi liberi, di- e tri-peptidi non solo l'assorbimento è scarso ma si formano quantità abbastanza elevate di peptidi più lunghi, detti epitopi, che peggiorano la tollerabilità gastro-intestinale. Se con l'assunzione di sieroproteine si verificano nausea, gonfiore di stomaco e addominale, meteorismo o spasmi intestinali la causa non è da ricercarsi in un'intolleranza al lattosio; si tratta di una reazione locale di carattere allergico innescata da questi frammenti proteici con almeno 14 amminoacidi: la beta-lattoglobulina contenuta nelle proteine del siero, ad esempio, ne è molto ricca.

Per ovviare a questi inconvenienti e massimizzare effetti fisiologici e *compliance* dell'atleta verso gli integratori contenenti proteine del siero la **Deerland Enzymes** ha messo a punto il

ProHydrolase[™] una miscela di proteasi ottenute da colonie di varie specie di *Bacillus* e da *Ananas comosus*.

Le modificazioni farmacocinetiche indotte dal **ProHydrolase**[™] sull'assorbimento delle siero-proteine di latte sono state studiate sia *in vitro* che *in vivo*, in un lavoro-pilota su 6 volontari sani.

Esattamente come si fa per studiare i farmaci, in laboratorio sono state ricreate le condizioni che mimano l'ambiente gastrico, intestinale e le diverse condizioni di pH e del medium di somministrazione: l'effetto del **ProHydrolase**[™] è stato misurato tramite gel- elettroforesi con SDS

(Sodio Dodecil Solfato). L'idrolisi delle proteine del siero dopo 90 minuti è incompleta quando esse sono sottoposte alle condizioni che mimano quelle dell'intestino tenue secondo la metodica USP: 37° C, pH 6.8 e aggiunta di pancreatina 1 % (fig. 1 e 2).

In Vitro Study

Figure 1.

Whey hydrolysis visualized by silver stain gel electrophoresis under USP physiological conditions (37°C, pH6.8) of the small intestine for 90 minutes with either 10mg ProHydrolase/ g protein or USP pancreatin standard (1%) and a combination of both.

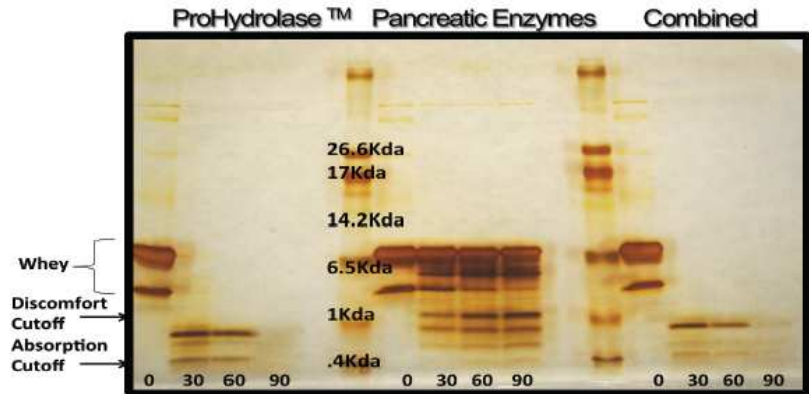
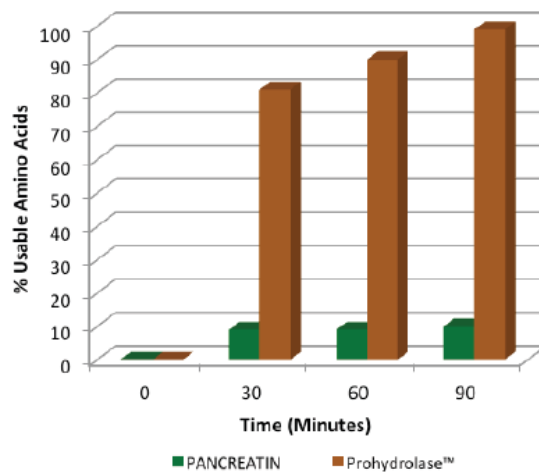
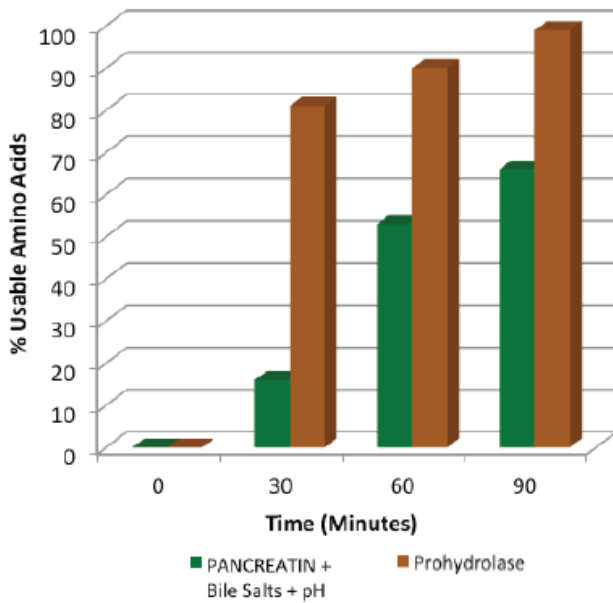


Figure 2.

Whey hydrolysis visualized by silver stain gel electrophoresis densitometry under USP physiological conditions (37°C, pH6.8) of the small intestine for 90 minutes with either 10mg ProHydrolase/ g protein or USP pancreatin standard (1%).



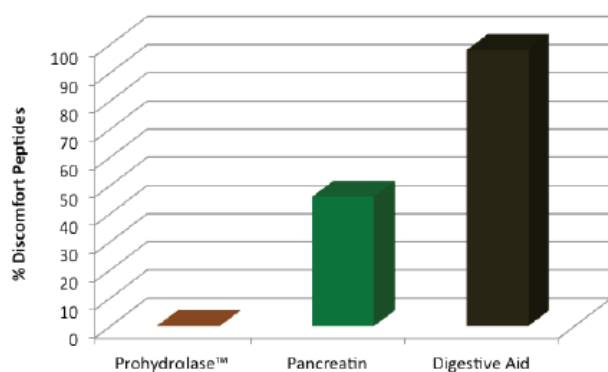
La figura che segue è una rielaborazione dei risultati ottenuti per idrolisi delle proteine del siero di latte sottoposte sia alle condizioni gastriche che a quelle intestinali (vedi legenda):



Whey hydrolysis visualized by silver stain gel electrophoresis densitometry under USP physiological conditions of the stomach (37°C, no pepsin, pH3.0) for 10 minutes and small intestine (37°C, bile salts, pH6.8) for 90 minutes with either 10mg ProHydrolase/ g protein or USP pancreatin standard (1%).

Fig. 3: variazioni nell'idrolisi di proteine del siero di latte *in vitro* sottoposte alle condizioni che mimano il transito gastrico e intestinale con e senza aggiunta di *ProHydrolase*™

L'aggiunta di *ProHydrolase*™ al batch d'idrolisi diminuisce la concentrazione di epitopi responsabili degli effetti indesiderati sull'apparato digerente (fig.4). Dall'analisi delle frazioni elettroforetiche, inoltre, emerge un dato molto interessante: i prodotti d'idrolisi sono quasi esclusivamente di-, tri- e tetra-peptidi e non amminoacidi liberi. Per quanto abbiamo detto prima ciò ha importantissimi risvolti non solo perché l'assorbimento dei di- e tri-peptidi è più rapido ma anche perché tra queste mini-catene sono inclusi composti con le azioni biologiche supplementari già citate e delle quali la tabella 3 riporta solo alcuni esempi più conosciuti.



Quantifying discomfort peptides in whey after digestion under USP physiological conditions of the stomach (no pepsin, pH3.0) for 10 minutes and small intestine (bile salts, pH6.8) for 90 minutes with either 10mg ProHydrolase/ g protein or USP pancreatin standard (1%) or digestive aid at their recommended dosage using Veratox kits from Neogen™.

Fig. 4: **ProHydrolase™** riduce la formazione di epitopi allergizzanti e migliora la tollerabilità delle proteine del siero di latte.

Precursor Protein	Fragment	Peptide Sequence	Name	Function
α-lactalbumin	50-53	Tyr-Gly-Leu-Phe	α-lactorphin	opioid agonist, ACE-inhibition
β-lactoglobulin	102-105	Tyr-Leu-Leu-Phe	β lactorphin	non-opioid stimulatory effect on ileum, ACE-inhibition
	142-148	Ala-Leu-Pro-Met-His-Ile-Arg		ACE-inhibition
	146-149	His-Ile-Arg-Leu	β-lactotensin	ileum contraction

Tab. 3: esempi di azioni biologiche dei peptidi a corta catena derivati dalle siero-proteine del latte.

Lo studio degli effetti *in vivo* del **ProHydrolase™** è stato realizzato su 6 soggetti adulti, maschi, in buone condizioni di salute e non in sovrappeso, nessuno dei quali era sottoposto a dieta iper-proteica né svolgeva attività di body building o di tonificazione muscolare. I volontari hanno digiunato per una notte prima di assumere 50 g di proteine del siero di latte non-idrolizzate disperse in 500 ml d'acqua distillata (braccio di controllo dello studio); dopo la somministrazione sono stati prelevati campioni ematici al tempo 0 e dopo 1.5, 2.5, 3.5 e 4.5 ore e su di essi sono stati quantificati 12 amminoacidi indispensabili per la sintesi proteica. Dopo 5 giorni di *wash out* e una notte di digiuno, la procedura è stata ripetuta somministrando i 50 g di proteine premiscelati con 500 mg di **ProHydrolase™**. I campioni ematici sono stati usati per studiare la farmacocinetica dei singoli 12 analiti separandoli con una colonna cromatografica a scambio ionico, derivatizzandoli con ninidrina e identificandoli con un detector UV. La cinetica della leucina (fig. 5) è rappresentativa dell'impatto che ha il **ProHydrolase™** sull'assorbimento: esso rende ancor più rapide le proteine "veloci" aumentando anche la quantità d'amminoacidi assorbita.

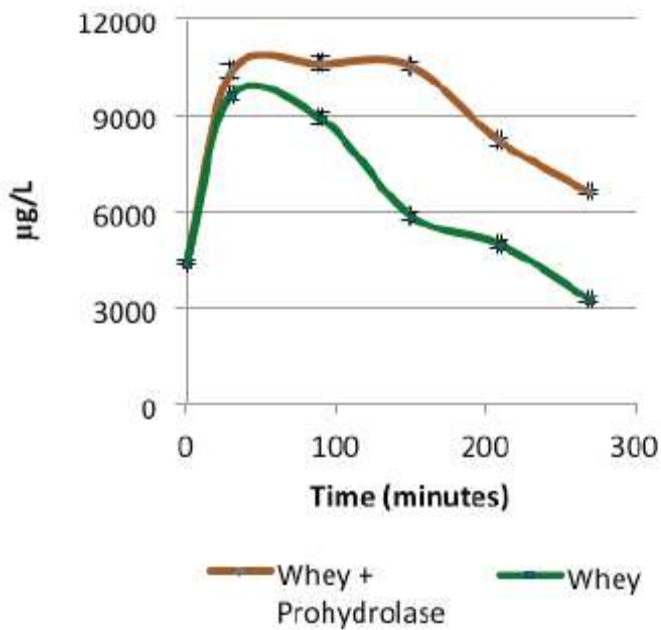
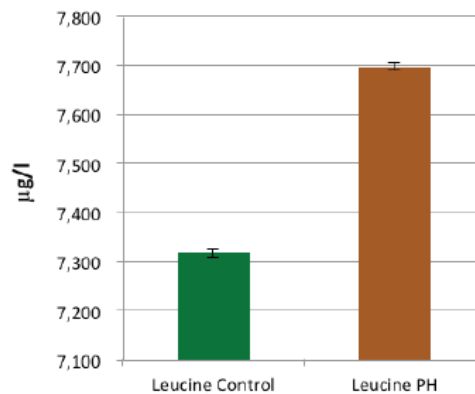


Fig. 5: andamento della curva plasmatica della leucina con e senza *ProHydrolase*[™]

Figure 6.

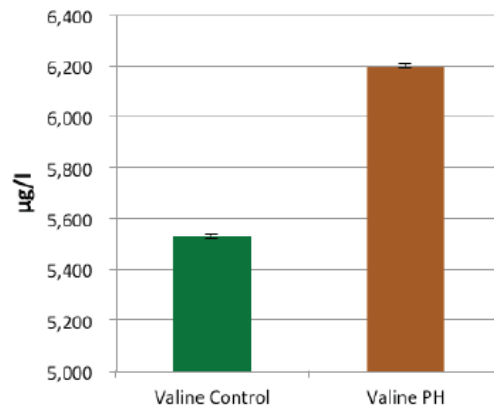
Leucine is the strongest of the BCAAs and is responsible for the regulation of blood-sugar levels, the growth and repair of tissues in skin, bones and of course skeletal muscle. It's a strong potentiator to Human Growth Hormone. It helps in healing wounds, regulating energy and assists in the preventing the breakdown of muscle tissue. Levels increased by 5%.



Total Leucine levels (µg/L) in the blood after consumption of 50g of whey protein over a 4.5 hour time period.

Figure 7.

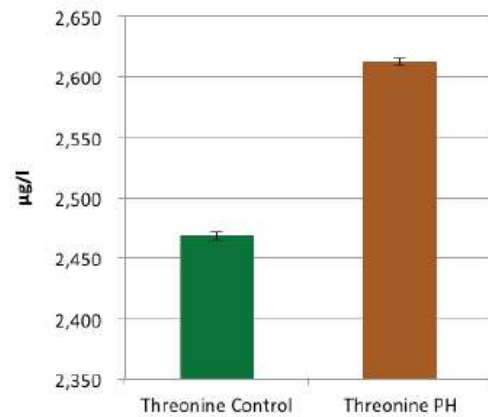
Valine contributes to repair and growth of muscle tissue, as commonly attributed to BCAAs. It is not processed by the liver; rather actively taken up by muscle. It maintains the nitrogen balance and preserves the use of glucose. Levels increased by 11% .



Total Valine levels (µg/L) in the blood after consumption of 50g of whey protein over a 4.5 hour time period.

Figure 8.

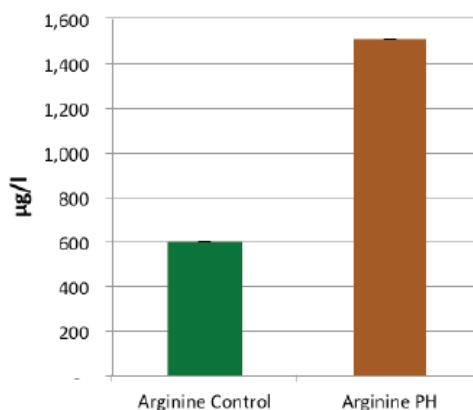
Threonine is an essential amino acid that is never manufactured within the body. Since its main sources are animal (dairy and meat) this doesn't bode well to vegans. It's found in heart, skeletal muscle and nerve tissue in the central nervous system. Threonine is used to form the body's two most important binding substances, collagen and elastin. Threonine is involved in liver functioning, lipotropic functions (when combined with aspartic acid and methionine) and in the maintenance of the immune system by helping in the production of antibodies and promoting growth and activity of the thymus. Perhaps its most useful property is that it allows better absorption of other nutrients; therefore protein sources containing threonine are more bio-available than others. Levels increased by 6%.



Total Threonine levels (µg/L) in the blood after consumption of 50g of whey protein over a 4.5 hour time period.

Figure 9.

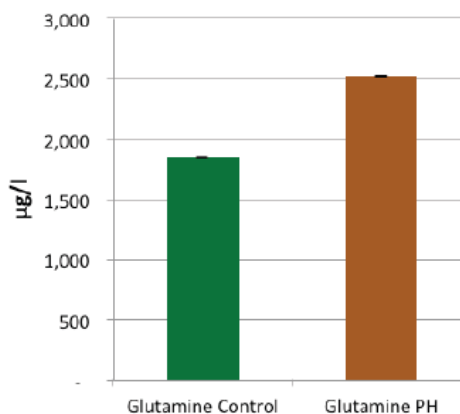
Arginine has amazing nitrogen retention ability. Nitrogen is one of the key elements in muscle protein synthesis. Some plants can absorb nitrogen, but mammals have to make do with what we make ourselves. Arginine enhances the immune system and stimulates the size and activity of the Thymus gland, which makes it a prime choice for anyone in less than optimal health, such as people recovering from injury and HIV patients. Arginine is also a precursor of very important molecules such as creatine and gamma amino butric acid (GABA, a neurotransmitter in the brain). The hormonal release properties include releasing insulin from the pancreas and a massive stimulator in the manufacture of GH (Growth Hormone) from the anterior pituitary. It increases blood flow. It also improves the health of the liver, skin and connective tissues and may lower cholesterol. But mostly it facilitates muscle mass gain while limiting fat storage, because it keeps fat alive in the system and uses it. It's key in weight control. Levels increased by 60%, more than 2.5 times the level obtained from using whey isolate alone.



Total Arginine levels (µg/L) in the blood after consumption of 50g of whey protein over a 4.5 hour time period.

Figure 10.

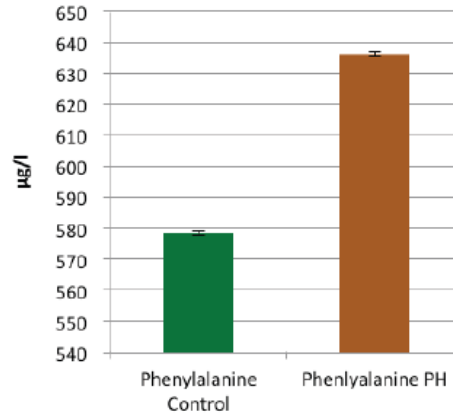
Glutamine is a non-essential amino acid that is present in the body in large amounts. At some times it forms 60 percent of the total amino acid pool. Because it passes through the blood-brain barrier rather easily, it's often called "brain-food". In the brain it converts to glutamic acid, which is essential for brain functioning and increase GABA (gamma-amino-butyric-acid, another popular supplemented amino) needed for mental activities. It is used in synthesis of muscle tissue. It is a nontoxic nitrogen carrier. Perhaps most importantly, it balances the acid/alkaline level, so it reduces lactic acid. Levels increased by 28%.



Total Glutamine levels (µg/L) in the blood after consumption of 50g of whey protein over a 4.5 hour time period.

Figure 11.

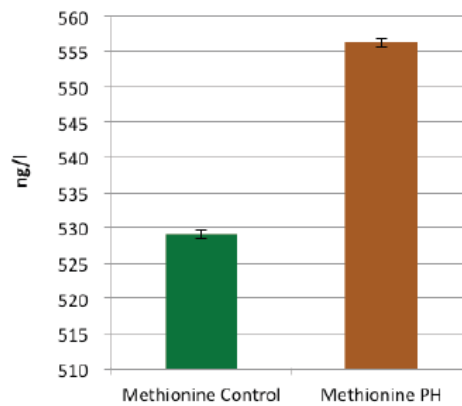
Phenylalanine, the major precursor of tyrosine, enhances learning, memory, mood and alertness. Is a major element in the production of collagen and suppresses appetite. Levels increased by 9%.



Total Phenylalanine levels (µg/L) in the blood after consumption of 50g of whey protein over a 4.5 hour time period

Figure 12.

Methionine is the precursor of cystine and creatine, and may increase antioxidant levels (glutathione) and reduce blood cholesterol levels. It also helps remove toxic wastes from the liver and assists in the regeneration of liver and kidney tissue. Levels increased by 6%.

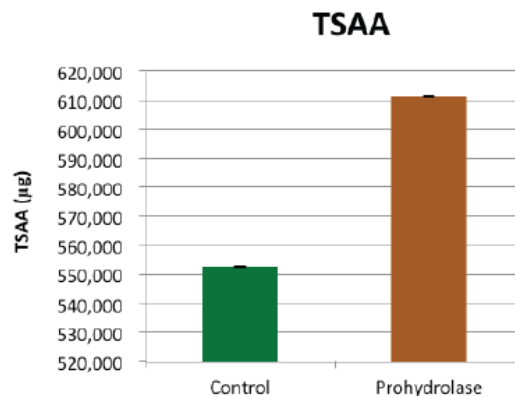


Total Methionine levels (µg/L) in the blood after consumption of 50g of whey protein over a 4.5 hour time period.

Molto significativo è l'effetto del **ProHydrolase**[™] sull'assorbimento complessivo degli amminoacidi le cui concentrazioni plasmatiche dopo 270 minuti dalla somministrazione sono superiori rispetto alle proteine somministrate senza associazione col blend proteasico.

Figure 13.

Total amino acid concentrations increased 60mg in the blood over the 270 minutes after ingestion of whey protein isolate with ProHydrolase when compared to taking whey protein isolate alone. This correlates well with published results showing amino acids increases when taking whey hydrolysate vs. whey protein unprocessed.



Total Amino acid levels (µg/L) in the blood after consumption of 50g of whey protein over a 4.5 hour time period.

Questi studi confermano quanto già evidenziato da altre ricerche in base alle quali l'assorbimento delle proteine del siero di latte è superiore se queste sono in forma idrolizzata; il **ProHydrolase TM** aggiunto in rapporto di 10 mg per ogni grammo di proteina coadiuva i meccanismi idrolitici fisiologici, velocizza l'assorbimento, minimizza la produzione di epitopi peptidici e favorisce la formazione di peptidi compresi fra 2 e 4 monomeri con importanti funzioni biologiche accessorie.

Nutraceutica s.r.l.

Via Idice 270/1 – 40050 Monterenzio – BO

Tel +39 051.929833 Fax +39 051.929830

info@nutraceutica.it

www.nutraceutica.it