

TVORBA ACE INHIBITORŮ V MLÉCE RŮZNÝMI KMENY BIFIDOBAKTERIÍ LIDSKÉHO PŮVODU

Vladimír Dráb, Ladislav Bár, Lenka Tůmová

Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o.

Production of ACE inhibitors in milk with Bifidobacterium strains of human origin

Abstrakt

Cílem této studie bylo nalézt možné producenty ACE inhibitorů v mléce schopných snižovat krevní tlak mezi kmeny bifidobakterií izolovaných ze stolice. Získané výsledky ukazují, že tvorba ACE inhibitorů je kmenově specifická. Nalezeno bylo několik kmenů s účinností inhibice kolem 90 %.

Klíčová slova: ACE inhibitory, bioaktivní peptidy, kyselina hippurová, *Bifidobacterium*

Abstract

Search for stool originating bifidobacteria with ACE inhibitory activity in milk was subject of this study. Obtained results showed, that production of ACE inhibitors is strain specific. Some potent strains with 90 % inhibition degree were found.

Key words: ACE inhibitors, bioactive peptide, hippuric acid, *Bifidobacterium*

Úvod

Řada bioaktivních peptidů získaných z mléčných bílkovin má vliv na lidské zdraví. Tyto peptidy přímo ovlivňují řadu biologických procesů svou antimikrobiální, imunomodulační a jinou aktivitou (Clare a Swaisgood, 2000). V posledních letech byla značná pozornost zaměřena na možné léčení vysokého krevního tlaku pomocí různých peptidů inhibujících ACE (angiotensin-I-converting enzyme). Vysoký krevní tlak, způsobený výživou, nadváhou, životním stylem nebo genetickou predispozicí, je velmi nebezpečný faktor ovlivňující vznik kardiovaskulárních onemocnění (Pihlanto a kol., 2010). Některé bakterie mléčného kvašení produkují ACE inhibitory štěpením mléčných bílkovin. Z kaseinu jsou např. odštěpovány tripeptidy IPP (Ile-Pro-Pro) a VPP (Val-Pro-Pro) inhibující ACE (Gonzalez-Gonzalez a kol., 2011; Otte a kol., 2011). Pro získání bioaktivních peptidů jsou zpravidla používány bakterie s vysokou proteolytickou aktivitou jako je *L. helveticus*. Další možností je využití mikroorganismů s rozdílnými fermentačními a enzymatickými vlastnostmi, které svým synergickým působením uvolní bioaktivní peptidy z příslušné bílkoviny (Donkor

a kol., 2007). Publikované studie se zaměřují především na bakterie mléčného kvašení, zejména laktobacily, a existuje jen málo informací o schopnostech jiných intestinálních druhů uvolňovat tyto bioaktivní složky štěpením mléčných bílkovin. Gonzales-Gonzales a kol. (2013) popsali kmen *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 s vyšší inhibiční aktivitou než měly bakterie mléčného kvašení včetně *L. helveticus* DSM 13137 produkujícího kasokininy IPP a VPP. Inhibiční působení bylo způsobeno peptidy LVYFPF a LPLP pocházejícími z β -kaseinu ($f(58-63)$, $f(135-138)$). Tato práce se proto zaměřila na porovnání různých lidských izolátů bifidobakterií z hlediska jejich schopnosti produkovat inhibitory ACE v mléce.

Materiál a metody

Materiál

Pro detekci inhibitorů ACE je možné použít hippuryl-His-Leu-OH (HHL) jako substrát. Inkubace substrátu s ACE vede k jeho hydrolyze. Při této reakci dochází k uvolnění His-Leu a kyseliny hippurové, jejíž obsah může být následně stanoven různými metodami (Wu a kol., 2002; Kilpi a kol., 2007; Sieber a kol., 2010). Pro srovnání účinnosti jsou používány silné syntetické inhibitory jako je captopril (Wu a kol., 2002).

Ke stanovení aktivity ACE inhibitorů byl použit 5 mM HHL - Hippuryl-His-Leu-OH (Bachem, Bubendorf, Switzerland), ACE (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) o koncentraci 60 μ M/ml a 1 mM captopril (Sigma-Aldrich). Veškeré roztoky pro měření ACE inhibitorů byly ředěny v 0,05M borátovém pufru o pH 8,2 obsahujícím 0,3 M NaCl.

Jako separační pufr pro CE byl použit 120 mM dekahydrát tetraboritanu sodného s přidávkem 0,5 mM cetyltrimethylamoniumbromidu (CTAB), jehož pH bylo pomocí kyseliny chlorovodíkové upraveno na hodnotu 8 při 25 °C. Připravený pufr byl před použitím filtrován přes polypropylenový filtr (0,20 μ m) a následně odplyněn v ultrazvukové lázni (10 min.). Pro kvantifikaci kys. hippurové byla použita kapilární elektroforéza Agilent CE 3D G1600 (Agilent Technologies, USA) s UV detekcí a použitou křemennou kapilárou o průměru 75 μ m, celkové délce 64,5 cm a efektivní délce 56 cm (Polymicro technologies, USA).

Příprava supernatantů testovaných kmenů

Vzorky mikroorganismů byly obnoveny ze zamražených kultur zaočkováním 10 % do 9 ml MRSC bujonu s 0,05 % L-cystein hydrochloridu (MRS bujon Merck 1.10661 + 2 g NaHCO₃/l), následně inokulací 1 % do 9 ml 10% RSMKA (obnovené odstředěné mléko Lactino, Promil PML a.s., Nový Bydžov + 0,5 % kvasničného extraktu LabM, Lancashire, UK) a nakonec do 40 ml 16% RSMKA. Po ukončení kultivace při 37 °C (24-48 h - do sražení mléka) byly vzorky odstředěny při 9000 g (15 minut, 4 °C). Získaný supernatant byl přefiltrován přes skládaný filtr 390 (Munktell Inc., Raleigh, USA), sterilován pomocí mem-

Tab. 1 Míra inhibice angiotensin-I konvertujícího enzymu u kmenů bifidobakterií lidského původu

Druh	Označení kmene	% inhibice
<i>Bifidobacterium adolescentis</i>	RB 54-P	93,4
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	RB 1-MPP	74,3
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	RB 16-P	64,0
<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i>	RB 26-P	56,5
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	RB 31-P	43,8
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	RB 58-P	89,5
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	RB 61-P	63,2
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	RB 70-P	65,6
<i>Bifidobacterium breve</i>	RB 44-P	91,5
<i>Bifidobacterium breve</i>	RB 59-P	62,1
<i>Bifidobacterium breve</i>	RB 49-P	59,8
<i>Bifidobacterium breve</i>	RB 51-BH-7A	56,7
<i>Bifidobacterium breve</i>	RB 66-P	66,8
<i>Bifidobacterium dentium</i>	RB 42-P	53,3
<i>Bifidobacterium dentium</i>	RB 68-6A	64,8
<i>Bifidobacterium dentium</i>	RB 68-6B	64,0
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	RB 25-P	91,2
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	RB 45-P	90,0
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	RB 46-6A	54,5
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	RB 47-P	49,7
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	RB 50-P	75,6
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	RB 53-P	57,9
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	RB 62-V-7A	80,1
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	RB 65-6A	62,5
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>longum</i>	RB 67-P	64,4
<i>Bifidobacterium longum</i> subsp. <i>infantis</i>	RB 64-V-7A	77,9
<i>Bifidobacterium</i> sp.	RB 65-6B	59,4
průměrná hodnota		67,9

bránového filtru GD/X 0,2 µm (Whatman plc., Kent, UK) a následně uložen v mrazicím boxu při - 20 °C do doby použití. Jako negativní kontrola bylo použito nezaočkované mléko okyselené 80 % kyselinou L-mléčnou na pH 4,6. Další postup byl shodný s přípravou vzorků z fermentovaného mléka (označení negativní kontroly 16cfe).

Měření aktivity ACE inhibitorů

Příprava vzorků pro měření aktivity ACE inhibitorů byla optimalizována podle Pihlanto a kol. (2009) a Kilpi a kol. (2007). Do předem vyhřátých zkumavek (37 °C) bylo pipetováno 10 µl vzorku a 90 µl 5 mM HHL (hippuryl-His-Leu-OH). Připravená směs byla inkubována při 37 °C po dobu 5 minut. Po uplynutí této doby bylo do zkumavek přidáno 30 µl ACE (60 µM/ml), získaná směs promíchána na vortexu a temperována ve vodní lázni při 37 °C po dobu 60 minut. Následně byla reakce ukončena přidávkem 15 µl 5M HCl. Slepý vzorek byl získán použitím 10 µl 16 cfe, negativní kontrola (Ko-ACE) použitím borátového pufru místo vzorku i ACE.

Měření obsahu kyseliny hippurové pomocí kapilární elektroforézy s UV detekcí

Metoda detekce kyseliny hippurové byla optimalizována podle článku Carpio a kol. (2010). Pracovní postup byl shodný s postupem uvedeným v publikaci Lízalová a kol. (2013).

Výpočet inhibiční aktivity

Výpočet inhibiční aktivity byl s úpravami proveden podle článku Pihlanto a kol. (2010). Inhibiční aktivita je uváděna v procentech.

$$\text{Inhibiční aktivita (\%)} = \frac{H_{16cfe} - H_{vzorek}}{HK_{16cfe} + H_{Ko-ACE}} \cdot 100$$

Výsledky a diskuze

Získané výsledky pro jednotlivé kmeny bifidobakterií jsou uvedeny v tabulce 1. Z presentovaných výsledků je patrné, že množství ACE inhibitorů vznikajících v mléce bylo značně rozdílné a kmenově specifické. Průměrná hodnota inhibice byla 67,9 %, přičemž nejnižší naměřená inhibiční aktivita byla 43,8 % a nejvyšší více než 93 %. U pěti testovaných kmenů se míra inhibice pohybovala kolem 90 %, což je na úrovni maximální hodnoty dosažené kmenem *Enterococcus faecalis* RL27-VGA-7A2 (Lízalová a kol., 2013) a srovnatelná s účinkem 1 mM captoprilu, syntetického léčiva používaného k léčbě vysokého krevního tlaku (Atkinson a Robertson, 1979). V dostupné literatuře nebyly dosud publikovány výsledky systematického testování bifidobakterií z hlediska schopnosti tvorby ACE inhibitorů v mléce. Jsou dostupné výsledky pouze pro jednotlivé kmeny např. kmen *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5 (Gonzales-Gonzales a kol., 2013). Na základě námi získaných výsledků je možné usuzovat, že některé kmeny bifidobakterií mohou tvořit v mléce řadu ACE inhibitorů srovnatelné účinnosti jako proteolyticky aktivní laktobacily a enterokoky. Cílem této předběžné studie nebyla identifikace jednotlivých účinných složek a je pravděpodobné, že testované kmeny bifidobakterií produkují odlišné aktivní peptidy, než bakterie mléčného kvašení s výraznou proteolytickou a aminopeptidázovou aktivitou.

Závěr

V porovnání s kmeny bakterií mléčného kvašení testovanými v předcházející studii (Lízalová a kol., 2013) byla průměrná hodnota inhibice pro testované kmeny bifidobakterií vyšší - 67,9 x 43,9 %. Dosažené výsledky naznačují možnost získání potentních kmenů tvořících ACE inhibitory v mléce mezi bifidobakteriemi lidského původu. Potentní kmeny s mírou inhibice vyšší než 90 % by bylo možné použít jako doplňkové kultury pro výrobu fermentovaných mléčných výrobků využitelných pro podpůrnou léčbu vysokého krevního tlaku, neboť bifidobakterie, s výjimkou druhu *B. dentium*, nepředstavují pro zdravou populaci žádné zdravotní riziko.

Poděkování

Práce vznikla za finanční podpory projektu QI11B053 a institucionální podpory VÚM s.r.o., rozhodnutí RO0514.

Literatura

ATKINSON A. B., ROBERTSON J. I. (1979): Captopril in the treatment of clinical hypertension and cardiac failure. *Lancet* 2 (8147): 836-9.

- CARPIO A., RODRÍGUEZ-ESTÉVEZ V., SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ M., ARCE L., VALCÁRCCEL M. (2010): Differentiation of organic goat's milk based on its hippuric acid content as determined by capillary electrophoresis. *Electrophoresis*, 31, s. 2211 - 2217.
- CLARE D. A. and SWAISGOOD H. E. (2000): Bioactive Milk Peptides: A Prospectus. *Journal of Dairy Science*, 83, s. 1187-1195.
- DONKOR O. N., HENRIKSSON A., SINGH T. K., VASILJEVIC T., SHAH N. P. (2007): ACE-inhibitory activity of probiotic yoghurt. *International Dairy Journal*, 17, s. 1321-1331.
- GONZALEZ-GONZALEZ C. R., TUOHY K. M., JAUREGI P. (2011): Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. *International Dairy Journal*, 21, s. 615-622.
- GONZALEZ-GONZALEZ C., GIBSON T., JAUREGI P. (2013): Novel probiotic-fermented milk with angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides produced by *Bifidobacterium bifidum* MF 20/5. *International Journal of Food Microbiology*, 167, s. 131-137
- KILPI E. E. - R., KAHALA M. M., STEELE J. L., PIHLANTO A. M., JOUTSJO-KI V. V. (2007): Angiotensin I-converting enzyme inhibitory activity in milk fermented by wild-type and peptidase-deletion derivatives of *Lactobacillus helveticus* CNRZ32. *International Dairy Journal*, 17, s. 976-984.
- LÍZALOVÁ M., BÁR L., DRÁB V. (2013): Tvorba ACE inhibitorů různými kmeny bakterií mléčného kvašení. *Mlékařské listy-Zpravodaj* 141, s. XVIII-XX.
- PIHLANTO A., VIRTANEN T., KORHONEN H. (2010): Angiotensin I converting enzyme (ACE) inhibitory activity and hypertensive effect of fermented milk. *International Dairy Journal*, 20, s. 3-10.
- SIEBER R., BÜTIKOFER U., EGGER CH., PORTMANN R., WALTHER B., WECHSLER D. (2010): ACE-inhibitory activity and ACE-inhibiting peptides in different cheese varieties. *Dairy Science Technology*, 90, s. 47-73.
- WU J., ALUKO R. E., MUIR A.D. (2002): Improved method for direct high-performance liquid chromatography assay of angiotensin-converting enzyme-catalyzed reactions. *Journal of Chromatography A*, 950, s. 125-130.

Přijato do tisku: 4. 11. 2014

Lektorováno: 18. 11. 2014

NUTRIČNÉ ASPEKTY VITAMÍNU D V KONTEXTE MLIKA A MLIČNÝCH VÝROBKOV

MVDr. Hodulová Lucia*, Prof. MVDr. Vorlová Lenka, Ph.D., Mgr. Kostrhounová Romana, Ph.D

1 Ústav hygieny a technológie mléka,

Fakulta veterinární hygieny a ekologie,

Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

*e-mail: hoduloval@vfu.cz, tel: 541 502 729

Nutritional aspects of vitamin D in context of milk and milk products

Súhrn

Problematika vitamínu D je i po zavedení fortifikácie vybraných potravín hlavne v severných krajinách neustále diskutovanou otázkou v celosvetovom meradle. Stredná Európa patrí medzi krajiny s nedostatočnou koncentráciou sérového hydroxyvitamínu D, ktorý je doporučeným indikátorom zásobenia organizmu vitamínom D. Potravinové zdroje vitamínu D sú veľmi obmedzené a zahŕňajú hlavne potraviny živočíšneho pôvodu. Národná legislatíva ČR (Vyhláška č. 225/2008 Sb.) uvádza dpo-

ručený denný príjem vitamínu D 5 µg (200 IU). Medzi najvýznamnejšie živočíšne komodity sa zaraďujú ryby a vnútornosti, kde sa koncentrácie vitamínu D pohybujú v hodnotách od 18 µg/kg v rybej svalovine do 1 200 µg/kg u rybej pečene. Mlieko a mliečne výrobky sú uvádzané ako dobrý zdroj lipofilných vitamínov i napriek nízkym koncentráciám vitamínu D, ktorý je obsiahnutý v mlieku v hodnotách len 0,1 - 1,0 µg/kg.

Kľúčové slová: vitamín D, mlieko, mliečne výrobky, fortifikácia

Abstract

The issue of vitamin D is even after the fortification of selected food, mainly in northern countries, still actual worldwide topic. The middle Europe belongs to the countries with low level of serum 25-hydroxyvitamin D, which is the recommended standard for vitamin D status assessment. Food sources for vitamin D are limited and most of them include food of animal origin. National legislation of the Czech Republic (Decree No. 225/2008 Coll.) declares recommended daily intake of vitamin D 5 µg (200 IU). The most important sources of vitamin D are fish and offal, where the concentration ranged from 18 µg/kg in fish meat to 1 200 µg/kg in fish liver. Milk and milk products are considered as a good source of lipophilic vitamins in spite of low concentrations of vitamin D, which is present in the milk of just 0.1 to 1.0 µg / kg.

Keywords: vitamin D, milk, milk products, fortification

Úvod

Príznaky krivice u detí boli prvýkrát popísané už v roku 1645 a súvislosť s nedostatkom slnečného žiarenia (vitamínu D) preukázaná Sniadeckim takmer o 180 rokov neskôr, v roku 1822. Na princípy terapie, ktoré pozostávali z príjmu živočíšnych tukov a expozície slnečnému žiareniu o vlnových dĺžkach 230 až 313 nm alebo ožarovaniu ortuťovou lampou sa prišlo až na začiatku 20. storočia. V tomto období vykazovalo viac než 90 % detí symptómy deformácie kostí. Posilňujúcou intervenciou v roku 1920 bolo ožarovanie kvasníc UV žiarením. Po týchto opatreniach sa incidencia malnutrií znížila a začalo sa s fortifikáciou mlieka ergosterolom, ktoré sa následne ošetrilo UV žiarením alebo sa priamo fortifikovalo vitamínom D v hodnotách 100 IU. Voľba fortifikácie sa ukázala ako veľmi efektívna k eradikácii krivice v USA a Európe (Holick a Chen, 2008; Rogonski a kol. 2002). Obohacovanie vitamínom D sa tak stalo veľmi populárnou prevenciou a vitamín D sa začal pridávať v USA i do pudingov, hot dogov a dokonca i do piva. O 30 rokov neskôr, ale nastal opačný problém. U dospelých populácie vo Veľkej Británii sa začala vyskytovať hyperkalcémia. Príčina nebola dodnes presne objasnená, ale pripisovala se obohacovaniu mlieka vitamínom D. Dôsledkom bol zakáz fortifikácie mlieka a mliečnych produktov jak vo Veľkej Británii, tak v ostatných európskych krajinách. V súčasnos-