

## SCHOPNOSTĚ BAKTÉRIÍ VIAZAŤ A PREMIENÄŤ SELÉN NA BIOLOGICKY VYUŽITEĽNÚ FORMU

JOZEF GRONES a MARIÁN MAČOR

Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava, Slovenská republika, e-mail: grones@fns.uniba.sk

Došlo dňa 26.IV.1999

Kľúčové slová: selén, akumulácia selénu, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*, *Acetobacter*

### 1. Úvod

Prírodné látky s antioxidantnými účinkami na organizmus v potravinách v poslednom období nabierajú na význame. Chránia jednotlivé komponenty buniek pred oxidácnym stresom. Stres sa môže prejaviť ako dôsledok metabolizmu bunky, ale môže byť zapríčinený aj vonkajšími faktormi ako sú mutagény fyzikálneho a chemického pôvodu. Z tohto hľadiska nadobúdajú zvýšený význam najmä mikronutrienty s antioxidantnými vlastnosťami medzi ktoré patria vitamíny skupiny C a E, flavonoidy, antokyány a minerálne stopové prvky. A práve minerálne stopové prvky ako je zinok, selén, meď, chróm a ďalšie sú predmetom štúdia mnohých laboratórií zaoberajúcich sa racionálnou výživou živočíchov a človeka. Prírodné antioxidanty sú významné z hľadiska protektívneho účinku, nie len na LDL cholesterol, ale majú predovšetkým antikancerogénne a antimutagénne vlastnosti.

Selén v bunkách živých organizmov sa vyskytuje viazaný na selenocysteín, kde je jednou z integrálnych súčastí enzýmu glutationperoxidázy, ktorý sa zúčastňuje pri intracelulárnom opravnom mechanizme oxidatívnych poškodení v bunke. Selén je tiež prítomný v 5-iodotyronín-deamináze<sup>1</sup>, v selenoproteíne P a ďalších selenoproteínoch<sup>2</sup>. V poslednom období sa ukazuje, že selenoproteíny majú podstatný pozitívny vplyv na imunitný systém vyšších organizmov<sup>3</sup>.

Mnohé ochorenia ako je kardiomyopatia, postihuje prevažne malé deti a gravidné ženy a osteofria je spôsobená príjmom menej ako 19 µg selénu na deň<sup>4</sup>. Ak je selén v optimálnej koncentrácii v organizme, zabraňuje tvorbe rakoviny a hlavne potláča kardiovaskulárne ochorenia<sup>5,6</sup>.

Selén sa v základných potravinách vyskytuje v dvoch formách. V organickej podobe, v bielkovinách ako súčasť selenometionínu a selenocysteínu, alebo v anorganickej forme ako seleničitan a selenan. Vzájomný vzťah oboch foriem pri metabolizme popísal Young<sup>7</sup>. Koncentrácia selénu v potravinách je závislá od prírodných podmienok, tj. od koncentrácie selénu v poľnohospodárskej pôde<sup>8</sup>. Selén sa naspäť do pôdy dostáva po biologickej recyklácii v organizme v podobe trimetylselenonia v močovine, ako aj vo forme elementárneho selénu a kovového selénu. Relatívne inertná forma selénu sa mení prostredníctvom pôdných baktérií na selenit a selenan<sup>9</sup>.

Množstvo selénu v prostredí je rozdielne a je závislé od prírodných podmienok v jednotlivých krajinách<sup>10</sup>. V Japonsku je to až 130 µg.kg<sup>-1</sup> zeminy<sup>11</sup>, pričom na Slovensku iba

25 µg.kg<sup>-1</sup> zeminy čo sa negatívne odráža aj na jeho množstve v základných potravinách, ako je mlieko, syry, vajcia a chlieb. Najväčší obsah selénu je v rybách, obilninách, vajciach, šošovicí, hubách a v brazílskych orechoch.

I keď sa v poslednom období venuje značná pozornosť štúdiu vplyvu selénu na ľudský organizmus o jeho metabolizme v ľudských bunkách vieme ešte pomerne málo hoci poznáme efekt chemickej formy selénu na niektoré závažné ochorenia človeka. Mnohé štúdie potvrdzujú, že selenometionín do buniek prechádza aktívnym transportom podobne ako metionín, naproti tomu anorganický selén bunky absorbujú mechanizmom difúzie cez bunkovú membránu. Selenocysteín prechádza do bunky aktívnym mechanizmom spolu s ostatnými bázičnými aminokyselinami<sup>12-14</sup>.

### 2. Materiál a metódy

#### 2.1. Bakteriálne kmene

Bakteriálne kmene *Acetobacter pasteurianus* a *Escherichia coli* použité v experimentoch pochádzajú zo zbierky mikroorganizmov na katedre molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave. Kmene *Lactobacillus* sú zo zbierky mikroorganizmov Výskumného ústavu potravinárskeho v Bratislave z pracovniaka VÚP Biocentrum Modra.

#### 2.2. Kultivačné média a kultivácia baktérií

Kmene *E. coli* sme kultivovali na kvapalnom Luria-Bartoni (LB) médiu (5 g tryptón, 5 g kvasničný autolyzát, 5 g NaCl pH 7,2 na 1000 ml média), bunky *Acetobacter pasteurianus* na YPM médiu (5 g kvasničný autolyzát, 3 g peptón, 20 g manitol) pri teplote 28 °C a *Lactobacillus* na MM médiu (5 g kvasničný autolyzát, 10 g hovädzí extrakt, 10 g peptón, 20 g glukóza, 5 ml Tween 80, 2 g K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 5 g octán sodný, 2 g citrónan amónny, 0,2 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0,05 g MnSO<sub>4</sub> pH 6,2 na 1000 ml média) pri teplote 37 °C. Pri príprave pevných médií sme pridávali 20 g agaru na liter média. Média boli suplementované seleničitanom sodným do koncentrácie uvedenej v jednotlivých experimentoch.

#### 2.3. Stanovenie koncentrácie selénu

Rozrastené bunky sme usadili 10 min centrifugáciou pri 12 000 g a po zliati supernatantu sme bunky dvakrát premyli destilovanou vodou. Po mineralizácii supernatantu a sedimentu sme koncentráciu selénu stanovili atómovou absorbnou spektrometriou (merania sa uskutočnili vo Výskumnom ústave potravinárskom v Bratislave). Ako štandard sme použili seleničitan sodný.

### 3. Výsledky a diskusia

V európskych krajinách je príjem biologicky dôležitých nutričných antioxidantov oproti odporúčanému príjmu pomerne nízky. Tento stav je spôsobený rozdielom v stravovaní sa obyvateľstva. Preferuje sa zvýšená konzumácia predovšetkým rafinovaných tukov a cukrov na úkor nerafinovaných<sup>15</sup>.

Nemenej významným faktorom nízkeho príjmu selénu je predovšetkým nízka konzumácia ovocia a zeleniny, ktoré organizmus obohacujú nielen o antioxidanty minerálneho pôvodu, ale aj o polyfenolické zlúčeniny (taníny), antokyány, betakyány a zmes rôznych potrebných vitamínov.

Jednou z možností ako suplementovať nedostatok mikroelementov v potravinách je ich pridávanie do potravín v takej forme, ktorú je organizmus schopný najlepšie využiť. Najjednoduchšia suplementácia selénu do potravín je priame pridávanie anorganických solí. Z hľadiska efektívnosti je výhodnejšie selén pridávať prostredníctvom mikroorganizmov, ktoré ho zabudujú v organickej forme do aminokyselín a bielkovín v podobe selenoproteínov. Experimenty ukázali, že takéto začlenené selén do aminokyselín ako je cysteín a metionín prebieha prevažne v eukaryotických bunkách. Z potravinárskeho hľadiska najmä v bunkách mliečnych baktérií, ako je *Lactobacillus*, alebo v potravinárskych nepatogénnych kvasinkách. Iné typy baktérií ukladajú ťažké kovy, napr. telúr, vo forme kryštálov<sup>16</sup>. Bunky octových baktérií ukladajú selén v upravenej amorfnej metabolizovateľnej forme.

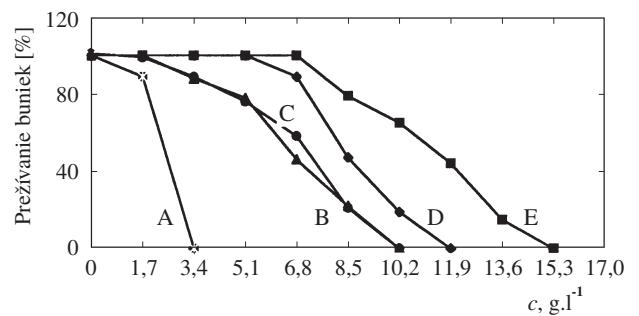
### 3.1. Schopnosť rastu buniek *E. coli* na médiách so selénom

Pri kultivácii na médiách so selénom, je potrebné sústrediť sa na kmene, ktoré sú schopné akumulovať selén či už v amorfnej forme, alebo vo forme selenoproteínov. Z hľadiska významu a využiteľnosti bakteriálnych druhov na kumuláciu selénu v bunkách sme testovali potravinársky významne druhy baktérií rodov *Lactobacillus* a *Acetobacter* v porovnaní s niektorými základnými laboratornými kmeňmi buniek *Escherichia coli*. Po pridaní bakteriálnej kultúry do potravín sa očakáva dosiahnutie potrebnej dennej dávky pre ľudský organizmus.

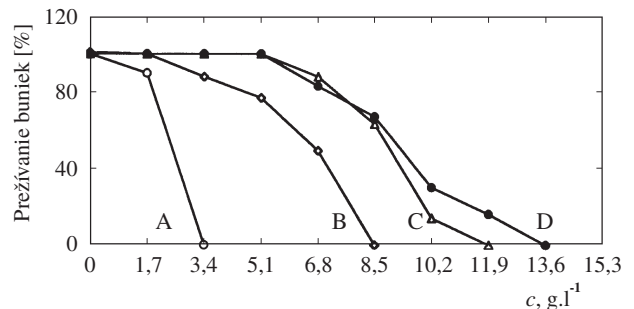
Deväť druhov buniek *Escherichia coli* sme kultivovali na tekutom LB médiu s prídavkom seleničitanu sodného v koncentráciách od 0,86–17,2 g na liter média. Všetky testované baktérie sú schopné rásť a prežívať do koncentrácie 1,72 g na liter média. Pri vyšších koncentráciách seleničitanu (obrázky 1 a 2) je schopnosť rastu a prežívania buniek menšia. Najnižšiu rezistenciu voči seleničitanu majú bunky *Escherichia coli* XL1 a *Escherichia coli* JM109, oproti tomu najvyššiu rezistenciu voči selénu sa prejavuje v bunkách *Escherichia coli* BB4. Ako ukazujú výsledky vyššie percento prežívania majú bunky, ktoré sa viac menej podobajú divým kmeňom oproti bunkám konštruovaným pre molekulárno biologické analýzy v laboratóriách.

### 3.2. Schopnosť rastu buniek *Lactobacillus spp.* rásť na seléne

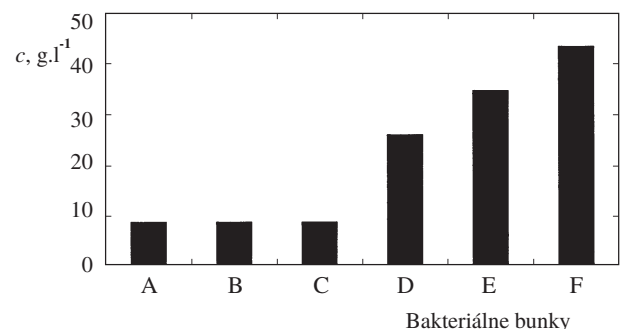
Z potravinárskeho hľadiska 18 významných baktérií rodov *Lactobacillus* sme testovali na schopnosť rastu na kultivačnom médiu, do ktorého sa pridával seleničitan rôznej koncentrácie. Dvanásť z nich *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis* LM3/1, *Lactobacillus brevis* LM4/3, *Lactobacillus brevis* LM5/5, *Lactobacillus sake* 16, *Lactobacillus plantarum* 965, *Lactobacillus paracasei* LM5/6, *Lactobacillus bavaricus* M/401, *Streptococcus thermophilus*, *Pediococcus parvulus*, *Pediococcus pentosaceus* FBB 61, *Pediococcus pentosaceus* FBB 61/12 (tabuľka I) bolo schopných rásť v aeróbných podmienkach na médiách so seleničitanom do maximálnej kon-



Obr. 1. Percento prežívajúcich buniek *Escherichia coli* v tekutom kultivačnom médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu sodného. A *Escherichia coli* TG1, B *Escherichia coli* BB4, C *Escherichia coli* XL1, D *Escherichia coli* K12, E *Escherichia coli* HB101



Obr. 2. Percento prežívajúcich buniek *Escherichia coli* v tekutom kultivačnom médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu sodného. A *Escherichia coli* JM108, B *Escherichia coli* JM109, C *Escherichia coli* DH1, D *Escherichia coli* MC4100



Obr. 3. Rast buniek na médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu sodného. A *Lactobacillus plantarum* BILL DCAM 026, B *Lactobacillus plantarum* LV 4/10 DCAM 077, C *Lactobacillus lactis* subsp. *cremoris* DCAM 088, D *Lactobacillus pentosus* DCAM 006, E *Lactobacillus sake* 16 DCAM 109, F *Lactobacillus plantarum* C11 DCAM 110

centrácie 6 g na liter média. Naproti tomu ďalších šesť druhov *Lactobacillus* rástlo na seleničitan v koncentračnom rozsahu od 8,6 do 43 g na liter kultivačného média (obrázok 3).

### 3.3. Schopnosť rastu buniek *Acetobacter pasteurianus* na seléne

Prokaryotické bunky *Acetobacter* patria podobne ako *Lactobacillus* medzi významné baktérie využívané v potravinárskom priemysle. Preto schopnosť buniek rásť na vyšších kon-

Tabuľka I

Schopnosť rastu baktérií mliečneho kvasenia na MM médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu sodného (c)

Baktérie	Medzinárodné označenie kmeňov	c [g.l <sup>-1</sup> ]
<i>Lactobacillus plantarum</i>	DCAM 004	1,7
<i>Lactobacillus brevis</i> LM3/1	DCAM 080	0,8
<i>Lactobacillus brevis</i> LM4/3	DCAM 081	1,7
<i>Lactobacillus brevis</i> LM5/5	DCAM 082	3,5
<i>Lactobacillus sake</i> 16	DCAM 108	5,2
<i>Lactobacillus plantarum</i> 965	DCAM 111	1,7
<i>Lactobacillus paracasei</i> LM5/6	DCAM 083	0,8
<i>Lactobacillus bavaricus</i> M/401	DCAM 112	3,5
<i>Streptococcus thermophilus</i>	DCAM 009	1,7
<i>Pediococcus parvulus</i>	DCAM 116	4,2
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB 61	DCAM 113	5,2
<i>Pediococcus pentosaceus</i> FBB 61/12	DCAM 114	1,7

centráciách selénu je z potravinárskeho hľadiska dosť významna. Pri štúdiu schopnosti kumulácie selénu do buniek baktérií *Acetobacter* sme testovali štyri druhy *A. pasteurianus* 2374, *A. pasteurianus* 3612, *A. pasteurianus* 3613 a *A. pasteurianus* 3614. Bunky na minimálnych tekutých ako aj pevných médiách rástli do koncentrácie seleničitanu 17,2 g.l<sup>-1</sup>. Bunky *A. pasteurianus* 3612 a *A. pasteurianus* 3614 boli schopné rásť až do koncentrácie 56,8 g.l<sup>-1</sup> selénu. Z rozrastených buniek po ich niekoľkonásobnom premytí a mineralizácii sme stanovovali koncentráciu selénu v bunkách atómovou absorpčnou spektrometriou.

Pri porovnaní dvoch základných bakteriálnych druhov *Escherichia coli* a *Lactobacillus* vidieť, že prevažná väčšina buniek oboch druhov baktérií je schopná rásť na seličitane do koncentrácie 6 g.l<sup>-1</sup>. Naproti tomu niektoré druhy sú schopné rásť na médiu s trojnásobnou koncentráciou seleničitanu a niektoré druhy *Lactobacillus* dokonca na médiu s koncentráciou selénu viac ako 40 g.l<sup>-1</sup>. Tieto koncentrácie sú dostatočne vysoké na to, aby po suplementácii potravín živými bunkami rodu *Lactobacillus* alebo bielkovinami tohto druhu pokryli dennú dávku selénu potrebnú pre optimálnu reguláciu metabolických dráh vo vyšších organizmoch.

Na tomto mieste bude potrebné aj odpovedať na položenú otázku, od čoho závisí schopnosť kumulácie vyššej koncentrácie selénu v bunkách a akým mechanizmom sa selén do buniek dostáva. Experimenty ukázali, že bunky *E. coli* TG1 za normálnych podmienok rastú na seléne do koncentrácie 7,1 g.l<sup>-1</sup>. Postupným preočkovávaním na vyššie koncentrácie seleničitanu je možné indukovať ich schopnosť rásť až na koncentráciách do 41,2 g.l<sup>-1</sup> na liter média. Podobne je to aj u buniek *A. pasteurianus*, ktoré bežne rastú na médiách s prídavkom 17,2 g.l<sup>-1</sup> selénu. Adaptovaním buniek v prostredí s vyššou koncentráciou selénu dosiahneme schopnosť rásť buniek až

na 56,8 g.l<sup>-1</sup> koncentracii, čo je trojnásobok pôvodnej koncentrácie. Pri meraní koncentrácie selénu v kultivačnom médiu a v bunkách baktérií pred kultiváciou a po skončení kultivácie sme zistili, že v médiu zostáva asi 11 % z pridávaného selénu. Toto množstvo je vždy rovnaké nech bunky kultivujeme pri akejkoľvek koncentracii selénu. Zostáva nezodpovedaná otázka, prečo bunky z prostredia pri nízkych koncentráciách neviažu selén úplne.

## LITERATÚRA

1. Arthur J. R., Nicol F., Beckett F. J.: *Biochem. J.* 272, 537 (1990).
2. Sunde R. A.: *Ann. Rev. Nutr.* 10, 451 (1990).
3. Kiremidjian-Schumacher L., Stotzy G.: *Envir. Res.* 42, 277 (1997).
4. Yang G. A., Ge K., Chen J., Chen X.: *Wld. Rev. Nutr. Dietet.* 55, 98 (1988).
5. Willett W. C., Stampfer M. J.: *Br. Med. J.* 297, 573 (1988).
6. Casey C. E.: *Proc. Nutr. Soc.* 47, 55 (1988).
7. Young V. R., Nahapetian A., Janghorbani M.: *Am. J. Clin. Nutr.* 35, 1076 (1982).
8. Geering H. R., Car E. E., Jones L. P. H., Allaway W. H.: *Soil. Sci. Soc. Am. Proc.* 32, 35 (1968).
9. Diplock A. T.: *Am. J. Clin. Nutr. Suppl.* 57, 256S (1993).
10. Yang G., Wang S., Zhou R., Sun S.: *Am. J. Clin. Nutr.* 37, 872 (1983).
11. Kumpulainen J. T.: *J. Trace Elem. Electrolytes Health Dis.* 7, 107 (1993).
12. Mason A. C., v knihe: *Trace Minerals in Foods* (Smith K. T., ed), str. 325. Marcel Dekker, New York 1988.
13. Venderland S. C., Butles J. A., Whanger P. D.: *J. Nutr. Biochem.* 3, 359 (1992).
14. Fairweather-Tail S. J.: *Eur. J. Clin. Nutr.* 51, 20 (1997).
15. Kumpulainen J. T., v: *Proceedings of the Technical Workshop on Trace Elements, Natural Antioxidants and Contaminants* (Kumpulainen J. T., ed.). Helsinki Espoo August 2526, 1995, REU Technical Series 49. The Food and Agriculture Organisation of the United Nations, Rome 1996.
16. Burian J., Nguyen Tu, Kľučár L., Guller L., Lloyd-Jones G., Stuchlík S., Fejdi P., Siekel P., Turňa J.: *Folia Microbiol.* 43, 589 (1998).

**J. Grones and M. Mačor** (*Department of Molecular Biology, Comenius University, Bratislava, Slovak Republic*): **Accumulation and Transformation of Selenite by Bacteria in Biologically Utilisable Form**

Prokaryotic and eukaryotic cells accumulate some heavy metals, storing and incorporating them in metalloproteins. This process was studied in nine bacterial strains of *Escherichia coli*, four strains of *Acetobacter pasteurianus* and eighteen genera of *Lactobacillus* bacteria. The results showed the ability of the studied strains to grow at various concentrations of selenium. For the *E. coli*, *A. pasteurianus* and *Lactobacillus* strains, the concentrations ranges were 1.7–17.2, 17.2–56.8 and 8.6–43 g.l<sup>-1</sup> of selenium, respectively.