

Schopnosť *Escherichia coli* a *Lactobacillus* spp. akumulovať selén v biologicky využiteľnej forme

JOZEF GRONES - MARIÁN MAČOR - PETER SIEKEL - VLADIMÍRA BILSKÁ

SÚHRN. Prokaryotické a eukaryotické mikrobiálne bunky sú schopné akumulovať niektoré významné ťažké kovy, ktoré môžu v bunke uchovávať v podobe kryštálov, amorfnej masy alebo inkorporovať do bielkovín za tvorby metaloproteínov. Táto schopnosť bola skúmaná v deviatich kmeňoch baktérií *Escherichia coli*, ako aj v osemnástich bakteriálnych druhoch rodu *Lactobacillus*. Ukázala sa rôzna schopnosť rastu bakteriálnych kmeňov pri rôznej koncentrácii seleničitanu od 1,72 do 17,2 g.l⁻¹ pre *Escherichia coli* a od 8,6 do 43 g.l⁻¹ pre *Lactobacillus* spp.

KLÚČOVÉ SLOVÁ: selén, akumulácia selénu, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*

Význam prírodných látok s antioxidantnými vlastnosťami v potravinách je nesporný a ich príjem (objem) v humánnej výžive neustále vzrastá. Je známe, že chránia jednotlivé komponenty buniek pred oxidatívnym stresom. Stres je dôsledkom metabolizmu, ale môže byť zapríčinený aj faktormi vonkajšieho prostredia, medzi ktoré zaraďujeme mutagény chemické i fyzikálne, ako je napr. UV žiarenie. Z tohto aspektu sú významné mikronutrienty s antioxidantnými vlastnosťami, ako sú vitamíny C a E, flavonoidy, antokyány a minerálne stopové prvky, medzi ktoré sa zaraďuje zinok, selén, meď a ďalšie. Prírodné antioxidanty sú významné z hľadiska ich antikancerogénnych a antimutagénnych vlastností, ako i protektívnych účinkov na LDL cholesterol.

Doc. RNDr. Jozef GRONES, CSc., RNDr. Marián MAČOR, CSc., Katedra molekulárnej biológie, Prírodovedecká fakulta, Univerzita Komenského, Mlynská dolina B-2, 842 15 Bratislava 4.

RNDr. Peter SIEKEL, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Priemyselná 4, P. O. box 25, 824 75 Bratislava 26.

Mgr. Vladimíra BILSKÁ, Výskumný ústav ropy a uhľovodíkov, Vlčie Hrdlo, 824 12 Bratislava 23.

Selén, ako selenocysteín, je jednou z integrálnych častí enzýmu glutatión-peroxidázy, ktorý sa zúčastňuje pri intracelulárnom opravnom mechanizme oxidatívnych poškodení v bunke. Selén je tiež prítomný v 5'-iódotyronín deamináze [1] v selenoproteíne P a ďalších selenoproteínoch [2]. V poslednom období sa ukazuje, že selenoproteíny majú podstatný pozitívny vplyv na imunitný systém organizmu [3].

Kardiomyopatia vyskytujúca sa v Číne v oblasti Keshan je ochorenie spôsobené nízkou koncentráciou selénu v pôde a následne v potravinách. Postihuje malé deti a gravidné ženy, pričom organizmus prijíma menej ako 19 mg selénu na deň [4]. Osteotrafia je ďalším ochorením spôsobeným deficitom selénu v potravinách, ktorým trpí prevažne obyvateľstvo žijúce v centrálnych oblastiach Ázie. Selén, ako antioxidant v potravinách, je stredobodom záujmu v mnohých klinických laboratóriách [5]. Selén nachádzajúci sa v optimálnych koncentráciách v organizme zabraňuje vzniku rakoviny a kardiovaskulárnych ochorení [6].

Selén sa v 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 obidvoch foriem pri metabolizme popísal Young [7]. Koncentrácia selénu v potravinách je závislá od prírodných podmienok, t. j. od koncentrácie selénu v poľnohospodárskej pôde [8]. Selén sa naspäť do pôdy dostáva po biologickej recyklácii v organizme v podobe trimetylselenonia v močovine, ako aj vo forme elementárneho selénu. Relatívne inertná forma selénu sa mení prostredníctvom pôdných baktérií na selenit a selenan [9].

Množstvo selénu v prostredí je rozdielne a je závislé nielen od prírodných podmienok v jednotlivých krajinách, ale líši sa aj v jednotlivých regiónoch príslušnej krajiny. Príkladom môže byť znova Čína, kde sú oblasti, v ktorých zastúpenie selénu v pôdach je menšie ako 10 mg.kg^{-1} , pričom odporúčaný príjem pre človeka je minimálne 5 mg na deň [10]. Pri porovnávaní krajín, množstvo selénu v pôde v Turecku je 30 mg.kg^{-1} , naproti tomu v Japonsku 130 mg.kg^{-1} [11]. Na Slovensku sa ukazuje, že obsah selénu v pôde je okolo 25 mg.kg^{-1} , čo sa negatívne odráža aj na jeho množstve v základných potravinách, ako je mlieko, syry, vajcia a chlieb. Najbohatší obsah selénu v potravinách je v rybách, obilninách, vajciach, šošovici, 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, i keď poznáme efekt chemickej formy selénu na niektoré závažne 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 bázickými aminokyselinami [12-14].

Materiál a metódy

Bakteriálne kmene

Bakteriálne kmene *Escherichia coli* použité v experimentoch sú uvedené v tabuľke 1 a pochádzajú zo Zbierky mikroorganizmov na Katedre molekulárnej biológie Prírodovedeckej fakulty UK v Bratislave. Kmene *Lactobacillus* sú zo zbierky mikroorganizmov Výskumného ústavu potravinárskeho v Bratislave, umiestnenej na detašovanom pracovisku VÚP - Biocentrum Modra.

Kultivačné médiá a kultivácia baktérií

Kmene *Escherichia coli* sme kultivovali v kvapalnom Luria-Bartani (LB) médiu (5 g peptón, 5 g kvasničný autolýzát, 5 g NaCl pH 7,2 na 1 000 ml

TABUĽKA 1. Použité bakteriálne kmene.

TABLE 1. Used bacterial strains.

Kmeň ¹	Genotyp ²	Literatúra ³
<i>E. coli</i> K12	divý typ	[15]
<i>E. coli</i> TG1	K12 (lac-pro) SupE, thi, hsd 05, F ⁻ , traD36, proAB, lacI ^q , ZΔM15	[16]
<i>E. coli</i> DH1	F ⁻ , gyrA96, recA1, rclA1, endA1, thi1, hsdR17, supE44, λ ⁻	[17]
<i>E. coli</i> HB101	F ⁻ , leuB6, proA2, recA13, thi1, ara14, lacY1, galK2, xyl5, mtl1, rpsL20, λ ⁻ , supE44, hsd S20 r _B m _B	[18]
<i>E. coli</i> JM108	JM109 minus F ⁻	[19]
<i>E. coli</i> JM109	recA1, endA1, gyrA96, thi, hsd R17, supE44, relA1, λ ⁻ , Δ(lac-proAB) [F ⁻ , traD36, proAB, lacI ^q , ZΔM15]	[19]
<i>E. coli</i> BB4	LE329.23 [F', lacIqZ, M15, proAB, Tn10(Tc ^r)]	[20]
<i>E. coli</i> XL1	recA1, endA1, gyr A96, thi-1, hsd R17, sup E44, lac, [F ⁻ , tra D36, proAB, lacIqZΔM15, Tn10(Tc ^r)]	[21]
<i>E. coli</i> MC4100	F ⁻ araD138, Δ(argF-lac)U169, rpsL 150, (Str ^r) relA1, flbB5301, deoC1, ptsF25, rbsR	[20]

1 - strain, 2 - genotype, 3 - references.

média), do ktorého sme pridávali selén podľa koncentrácií uvedených v časti Výsledky a diskusia. Pri kultivácii na tuhom LB médiu sme pridávali 18 g agaru na 1 000 ml média.

Kmene *Lactobacillus* sme kultivovali na MM médiu (5 g kvasničný autolyzát, 10 g hovädzí extrakt, 10 g peptón, 20 g glukóza, 5 ml Tween 80, 2 g K_2HPO_4 , 5 g octanu sodného, 2 g citronanu amónneho, 0,2 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0,05 g $MnSO_4$ pH 6,2 - 6,6 na 1 000 ml média) pri teplote 28 - 37 °C.

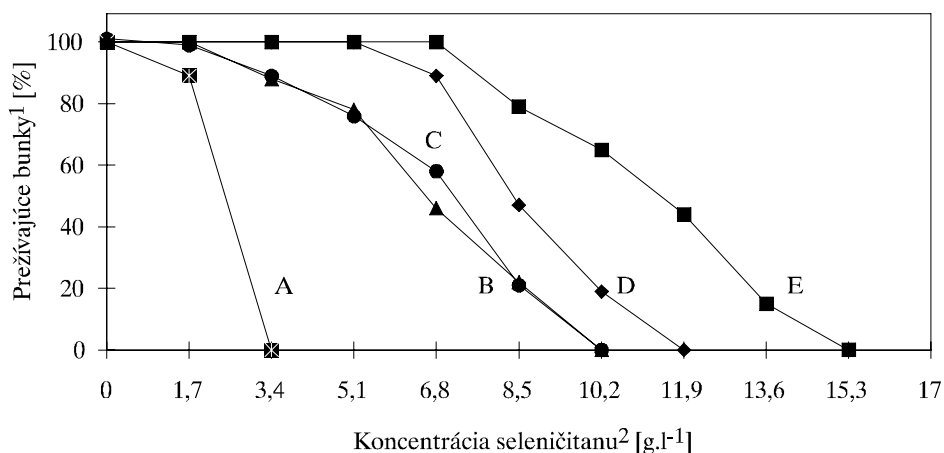
Výsledky a diskusia

V Európe je príjem biologicky dôležitých nutričných antioxidantov oproti odporúčanému príjmu významne nízky. Je to spôsobené zvýšenou konzumáciou rafinovaných tukov a cukrov na úkor nerafinovaných [22]. Ďalším faktorom ich nízkeho príjmu je aj nízky príjem ovocia a zeleniny, ktoré obsahujú okrem antioxidantov minerálneho pôvodu aj polyfenolické zlúčeniny (taníny), antokyány, betakyány a vitamíny.

Jednou z možností ako suplementovať nedostatok antioxidantov v potravinách je ich pridávanie v takej forme, ktorú organizmus najlepšie využije. Selén do potravín môžeme pridávať vo forme anorganických solí, alebo pre organizmus výhodnejších selenoproteínov. Ukazuje sa, že inkorporácia selénu do aminokyselín cysteínu a metionínu z pohľadu potravinárskeho významných mikroorganizmov sa uskutočňuje tak v kvasinkách (eukaryotické organizmy), ako i v baktériách mliečneho kysnutia (prokaryotické organizmy). Iné typy baktérií ukladajú ťažké kovy, ako napr. telúr, vo forme kryštálov [23], octové baktérie ukladajú selén v amorfnej metabolizovateľnej forme.

Pri kultivácii na médiach so selénom je potrebné sústrediť sa na kmene, ktoré sú schopné akumulovať selén či už v amorfnej forme, alebo vo forme selenoproteínov. Po pridaní bakteriálnej kultúry do potravín je potrebné dosiahnuť odporúčanú dennú dávku. Pri štúdiu týchto schopností sme si vybrali základné bakteriálne kmene rodu *Lactobacillus*, ktoré sme porovnávali s referenčnými kmeňmi *Escherichia coli*.

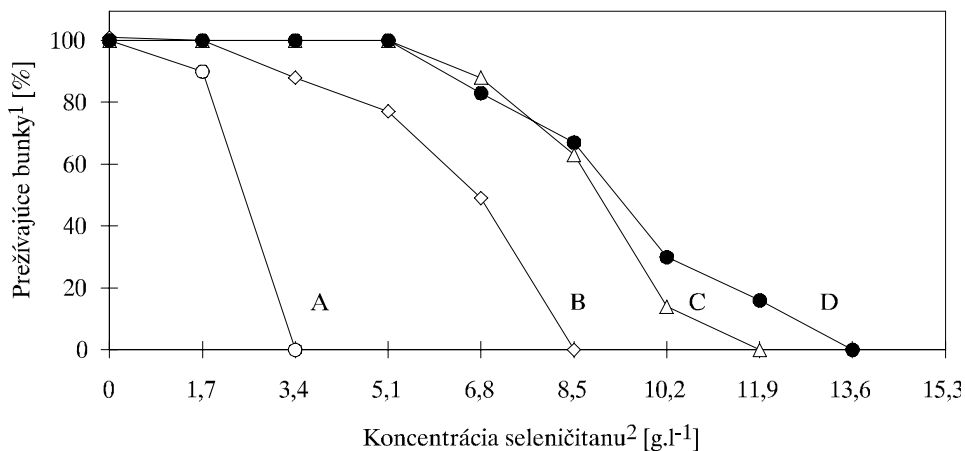
Deväť kmeňov *Escherichia coli*, ako je uvedené v tabuľke 1, sme kultivovali na kvapalnom LB médiu s prídavkom seleničitanu sodného v koncentráciách od 0,86 g do 17,2 g na liter média. Všetky skúmané baktérie boli schopné rásť a prežívať do koncentrácie 1,72 g na liter média. Pri vyšších koncentráciách seleničitanu, obr. 1 a 2, je schopnosť rastu a prežívania bu-



OBR. 1. Percento prežívajúcich buniek *Escherichia coli* v kvapalnom kultivačnom médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu.

FIG. 1. Percentage of surviving cells *Escherichia coli* grown on liquid cultivation medium supplemented with different concentration of selenite.

A - *Escherichia coli* TG1, B - *Escherichia coli* BB4, C - *Escherichia coli* XL1,
D - *Escherichia coli* K12, E - *Escherichia coli* HB101.
1 - surviving cells, 2 - selenite concentration.



OBR. 2. Percento prežívajúcich buniek *Escherichia coli* v kvapalnom kultivačnom médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu.

FIG. 2. Percentage of surviving cells *Escherichia coli* grown on liquid cultivation medium supplemented with different concentration of selenite.

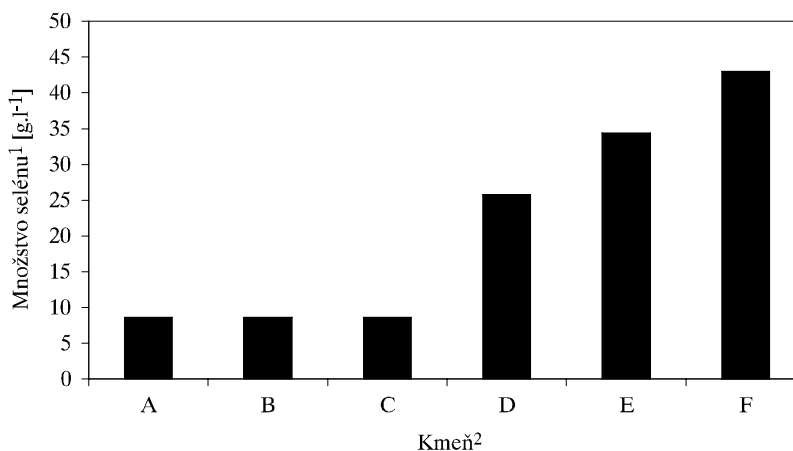
A - *Escherichia coli* JM108, B - *Escherichia coli* JM109, C - *Escherichia coli* DH1,
D - *Escherichia coli* MC4100.
1 - surviving cells, 2 - selenite concentration.

TABUĽKA 2. Schopnosť rastu baktérií mliečneho kvasenia na médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu.

TABLE 2. Growth ability of lactic acid bacteria on the cultivation medium supplemented with different concentration of selenite.

Kmeň ¹	Medzinárodné označenie kmeňov ²	Koncentrácia seleničitanu ³ [g.l ⁻¹]
<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

1 - strain, 2 - international designation of the strains, 3 - selenite concentration.



Obr. 3. Rast bakteriálnych kmeňov na médiu s rôznou koncentráciou seleničitanu.

Fig. 3. Growth of bacterial strains on medium with different concentration of selenite.

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.

1 - selenium content, 2 - strain.

niek menšia. Najcitlivejšie voči seleničitanu sú kmene *Escherichia coli* XL1, *Escherichia coli* JM109, oproti tomu najvyššia rezistencia sa prejavuje v bunkách *Escherichia coli* BB4.

Z potravinárskeho hľadiska 18 významných baktérií rodov *Lactobacillus* sme skúšali na schopnosť rastu na kultivačnom médiu, do ktorého sme pridávali seleničitan rôznej koncentrácie. Ako ukázali skúšky a prezentuje tabuľka 2, 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) je schopných rásť na médiach so seleničitanom do maximálnej koncentrácie 6 g na liter média (tabuľka 2) v aeróbných podmienkach. Naproti tomu ďalších šesť druhov *Lactobacillus* je schopných rásť a akumulovať selén v koncentračnom rozsahu od 8,6 g do 43 g na liter kultivačného média. Namerané údaje sú zrejmé z obr. 3.

Pri porovnaní dvoch základných bakteriálnych rodov *Escherichia* a *Lactobacillus* sa ukazuje, že prevažná väčšina kmeňov oboch druhov baktérií je schopná rásť a kumulovať selén do koncentrácie 6 g.l⁻¹. Naproti tomu existuje skupina kmeňov, ktoré rastú na médiu s trojnásobnou koncentráciou seleničitanu a druhy *Lactobacillus* rastúce na médiu s koncentráciou selénu viac ako 40 g.l⁻¹. Tieto koncentrácie sú dostatočne vysoké na to, aby po suplementácii potravín živými bunkami rodu *Lactobacillus* s nahromadeným selénom pokryli jeho odporúčanú dennú dávku, ktorá je potrebná pre optimálnu enzýmovú funkciu a reguláciu vo vyšších organizmoch.

Literatúra

1. ARTHUR, J. R. - NICOL, F. - BECKETT, F. J.: Hepatic iodothyronine deiodinase: the role of selenium. *Biochemical Journal*, 272, 1990, s. 537- 540.
2. SUNDE, R. A.: Molecular biology of selenoproteins. *Annual Review of Nutrition*, 10, 1990, s. 451-474.
3. KIREMIDJIAN-SCHUMACHER, L. - STOTZKY, G.: Review. Selenium and immune responses. *Environmental Rechears*, 42, 1997, s. 277-303.
4. YANG, G. A. - GE, K. - CHEN, J. - CHEN, X.: Selenium-related endemic diseases and the daily requirement of humans. *World Review of Nutrition and Dietetics*, 55, 1988, s. 98-152.
5. WILLETT, W. C. - STAMPFER, M. J.: Selenium and cancer. *British Medical Journal*, 297, 1988, s. 573-574.
6. CASEY, C. E.: Selenophilia. *Proceedings of the Nutrition Society*, 47, 1988, s. 55-62.

7. YOUNG, V. R. - NAHAPETIAN, A. - JANGHORBANI, M.: Selenium bioavailability with reference to human nutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 35, 1982, s. 1076-1088.
8. GEERING, H. R. - CAR, E. E. - JONES, L. P. H. - ALLAWAY, W. H.: Solubility and redox criteria for the possible forms of selenium in soils. *Soil Science Society of America Proceedings*, 32, 1968, s. 35-47.
9. DIPLOCK, A. T.: Indices of selenium status in human populations. *American Journal of Clinical Nutrition Supplement*, 57, 1993, s. 256S-258S.
10. YANG, G. - WANG, S. - ZHOU, R. - SUN, S.: Endemic selenium intoxication of human in China. *American Journal of Clinical Nutrition*, 37, 1983, s. 872-881.
11. KUMPULAINEN, J. T.: Selenium in foods and diets of selected countries. *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health and Disease*, 7, 1993, s. 107-108.
12. MASON, A. C.: Selenium. In: Smith, K. T. (Ed). *Trace Minerals in Foods*. New York : Marcel Dekker, 1988, s. 325-355.
13. VENDENDERLAND, S. C. - BUTLES, J. A. - WHANGER, P. D.: Intestinal absorption of selenite, selenate, and selenomethionine in the rat. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 3, 1992, s. 359-365.
14. FAIRWEATHER-TAIL, S. J.: Bioavailability of selenium. *European Journal of Clinical Nutrition*, 51, 1997, s. 20-23.
15. SMITH, H. W.: Survival of orally administered *E. coli* K12 in alimentary tract of man. *Nature*, 255, 1975, s. 500-502.
16. SAMBROOK, J. - FRITSCH, E. F. - MANIATIS, T.: *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1659 s.
17. HANAHAN, D.: Studies of transformations of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166, 1983, s. 557-580.
18. CONDON, C. - WEINER, J. H.: Fumarate reductase of *Escherichia coli*: an investigation of function and assembly using *in vivo* complementation. *Molecular Microbiology*, 2, 1988, s. 43-52.
19. YANISH-PERRON, C. - VIEIRA, J. - MESSING, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequence of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 1985, s. 103-119.
20. SILHAVY, T. J. - BERMAN, M. L. - ENQUIST, L. V.: *Experiments with gene fusion*. New York : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1984. 303 s.
21. BULLOCK, W. O. - FERNANDEZ, J. M. - SHORT, J. M.: XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with β -galaktosidase selection. *BioTechniques*, 5, 1987, s. 376-378.
22. KUMPULAINEN, J. T.: Summary of the activities of the FAO European cooperative research network on trace elements, natural antioxidants and contaminants during 1990-1995. In: Kumpulainen, J. T. (Ed.): *Proceedings of the technical workshop on trace elements, natural antioxidants and contaminants*. Helsinki - Espoo, August 25-26, 1995. REU Technical Series 49. Rome : FAO; MTT, 1996. 209 s.
23. BURIAN, J. - NGUYAN, T. - KLUČÁR, L. - GULLER, L. - LLOYD-JONES, G. - STUCHLÍK, S. - FEJDI, P. - SIEKEL, P. - TURŇA, J.: *In vivo* and *in vitro* cloning and phenotype characterisation of tellurite resistance determination conferred by plasmid pTE53 of clinical isolate *Escherichia coli*. *Folia Microbiologica*, 43, 1998, s. 589-599.

Do redakcie došlo 18.1.1999.

**Capability of *Escherichia coli* and *Lactobacillus* spp. to accumulate selenium
in a biologically utilisable form**

GRONES, J. - MAČOR, M. - SIEKEL, P. - BILSKÁ, V.: Bull. potrav. Výsk., 38, 1999, p. 45-53.

SUMMARY. Prokaryotic and eukaryotic bacterial cells can accumulate some important heavy metals and store them in crystal or amorphous forms or incorporate them to metaloproteines. The process had been studied in nine bacterial strains of *Escherichia coli* and eighteen strains of the genera *Lactobacillus*. Growth ability of cells on medium with different selenite concentrations was shown - from 1.72 to 17.2 g.l⁻¹ for *Escherichia coli* and from 8.6 to 43 g.l⁻¹ for *Lactobacillus* strains.

KEYWORDS: selenium, accumulation of selenium, *Escherichia coli*, *Lactobacillus*