



MINISTERSTVO ŠKOLSTVÍ,
MLÁDEŽE A TĚLOVÝCHOVY



Charakterizace selenem-obohacených mikroorganismů

(typ výsledků „Nmet“ – Metodika)

Zpracovali:

MVDr. Gabriela Krausová, Ph.D.

Ing. Ivana Hyršlová

Ing. Iva Mrvíková

doc. Ing. Antonín Kaňa, Ph.D.

Ing. Věra Kantorová

Ing. Ivo Doskočil, Ph.D.

Výzkumný ústav mlékárenský, s.r.o., Praha

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

Česká zemědělská univerzita v Praze

ISBN 978-80-88390-05-3 (MILCOM)

Říjen 2022

Vydavatel:

Pro: Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Vysokou školu chemicko-technologickou v Praze a Českou zemědělskou univerzitu v Praze vydal MILCOM a.s.,

Ke Dvoru 12a, Praha 6, 16000

Forma vydání:

Metodika je vydávána pouze elektronicky ve formátu PDF.

Zveřejněno na webové stránce:

https://www.vumlekarensky.cz/upload/soubory/metodiky/COST_CM_2022.pdf

1. Vydání 2022

ISBN 978-80-88390-05-3 (MILCOM)

Podíl autorů na tvorbě certifikované metodiky:

MVDr. Gabriela Krausová, Ph.D. – podíl 14 %

Ing. Ivana Hyršlová – podíl 10 %

Ing. Iva Mrvíková – podíl 10 %

doc. Ing. Antonín Kaňa, Ph.D. – podíl 17 %

Ing. Věra Kantorová – podíl 16 %

Ing. Ivo Doskočil, Ph.D. – podíl 33 %

Jména oponentů a organizace pro vydání osvědčení:

1) Odborník z daného oboru: Ing. Eva Šviráková, Ph.D.

Pracoviště: Ústav konzervace potravin, Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

2) Pracovník státní správy: MVDr. Sylva Havelková

Pracoviště: Oddělení veterinární asanace a SEUROP, Státní veterinární správa

Dedikace na projekt:

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MŠMT, programu INTER-EXCELLENCE, COST LTC 20014 s názvem „Research of selenium-enriched lactic acid bacteria, bifidobacteria and yeasts and influence of low-pH stress exposure on their selenium biotransformation efficiency“ a institucionální podpory MZE-RO1422 (DKRVO).

Obsah

1. Úvod.....	4
2. Cíl metodiky.....	5
3. Vlastní popis metodiky.....	5
3.1 Příprava selenem-obohacených mikroorganismů	5
3.2 Vliv různých koncentrací seleničitanu sodného na mikrobiální růst	6
3.3 Akumulace selenu a distribuce sloučenin selenu v selenem obohacených buňkách.....	6
3.4 Testování produkce nanočástic selenu u selenizovaných kmenů a jejich charakterizace....	6
3.5 Testování antioxidačních vlastností selenizovaných kmenů.....	7
3.6 Testování cytotoxicity (MTT) a adherence selenizovaných kmenů v podmínkách <i>in vitro</i> za použití tkáňového modelu.....	7
3.7 Simulace průchodu selenizovaných kmenů trávicím traktem v podmínkách <i>in vitro</i>	9
4. Srovnání „novosti postupů“.....	9
5. Popis uplatnění certifikované metodiky.....	10
6. Ekonomické aspekty.....	10
7. Seznam související použité literatury.....	11
8. Publikace předcházející metodice.....	11
9. Jména oponentů a názvy jejich organizací.....	12
10. Dedikace.....	12

1 Úvod

Pro účely lidské výživy je možná suplementace doplňků stravy na bázi anorganického selenu (Se) dle Nařízení Komise (ES) č. 1170/2009. Podle uvedeného nařízení je možná také suplementace organicky vázaného selenu, a to formou selenem obohacených, tzv. selenizovaných, kvasnic. Takto obohacené kvasnice tvoří součást některých doplňků stravy vyskytujících se v tržní síti. Nicméně, nedostatek těchto preparátů spočívá v tom, že se zde vyskytují kvasnice v inaktivované formě (tj. nepřinášejí konzumentům další benefity), a to např. dodáním živých prospěšných mikroorganismů, které mohou kolonizovat střevní trakt a uplatnit se jako probiotika.

Selenizace kvasinek a bakterií mléčného kvašení (BMK) poskytuje výhody, jako jsou následující: a) dodání Se pro biologické procesy, b) zvýšená biologická dostupnost Se ve formě méně toxických organických sloučenin nebo ve formě nanočástic, c) individuální zdravotní přínosy BMK a kvasinek (např. produkce organických kyselin, probiotická funkce, produkce antimikrobiálních sloučenin, bakteriocinů atd.).

Schopnost transformovat anorganické formy selenu vykazují kromě kvasinek také BMK. Na potenciál selenem obohacených BMK poukazují mnohé studie. Uvádí se např. jejich hepatoprotektivní účinek (Yi a kol., 2020), antibakteriální aktivita (Yang a kol., 2009) a další. Selenizované BMK mohou tedy kromě dodání Se v jeho lépe biologicky dostupné, méně toxické, organické formě představovat také zdroj probioticky působících bakterií. Mezi BMK patří rody jako např. *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*. Zejména koky (např. laktokoky) jsou odolnější vůči působení seleničitanu v růstovém médiu ve srovnání s tyčinkami (např. laktobacily nebo bifidobakteriemi), které jsou na přítomnost selenu v médiu citlivější.

Některé vlastnosti bakterií jsou kmenově specifické, jedná se např. o schopnost růstu v přítomnosti seleničitanu, toleranci k selenu, schopnost biotransformovat a zabudovávat selen do jednotlivých sloučenin selenu a nanočástic selenu. Hlavním účelem selenizací je získání kmene poskytujícího nejvhodnější zdroj organicky vázaného selenu (a to jak z pohledu akumulace selenu, tak z pohledu distribuce sloučenin selenu), a také kmene s co nejnižší cytotoxicitou sloučenin selenu, případně elementárních forem selenu. Navíc, obohacení kmene selenem umožní zvýšení jeho antioxidační kapacity.

V současné době jsou popsány a patentovány preparáty s obsahem různých selenizovaných kmenů, které jsou součástí krmných aditiv, zejména pro použití u zvířat. Ve většině případů se jedná o obohacení pouze přidáním anorganického selenu. V případě obohacení selenizovanými

kmeny se jedná o směsné preparáty různých BMK, kvasinek, octových bakterií a bifidobakterií. Součástí krmných směsí mohou být i aditiva, obsahující např. směsnou kulturu *Enterococcus faecium* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Nevýhodou těchto preparátů je to, že se jedná o směsi a ne o monokultury. Dále, že kmeny nedisponují příznivými vlastnostmi (např. produkcí bakteriocinů a dalších antimikrobiálních látek) přinášejícími zdravotní benefity apod. A dále také, že nejsou dostatečně popsány funkční a probiotické vlastnosti těchto selenizovaných kmenů (např. zlepšení antioxidačních a dalších vlastností v důsledku obohacení selenem).

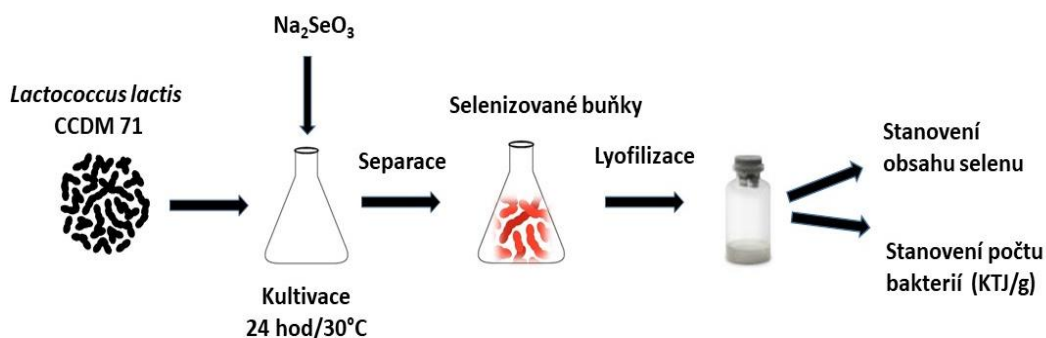
2 Cíl metodiky

Cílem předkládané metodiky je podat ucelené shrnutí metod a postupů pro testování selenem obohacených mikroorganismů, včetně jejich schopnosti akumulace a biotransformace selenu a testování funkčních vlastností selenem obohacených kmenů, s následným výběrem vhodných kandidátů pro selenizaci.

3 Vlastní popis metodiky

3.1 Příprava selenem obohacených mikroorganismů

Lyofilizovaný kmen se před selenizací nejprve obnoví v příslušném bujónu (např. M17 bujón pro laktokoky, streptokoky, enterokoky; MRS bujón pro laktobacily atd.), kultivuje se za optimálních podmínek pro daný kmen a třikrát se přeočkuje. Poté se bujón s přídatkem seleničitanu sodného zaočkuje kmenem v exponenciální fázi růstu a kultivuje se po dobu 24 h (viz obr. 1). Pro další analýzy se selenizované buňky dvakrát promyjí sterilní deionizovanou vodou a separují se pomocí odstředění po dobu 5 min při $4100 \times g$. Následně je selenizovaný kmen lyofilizován a jsou stanoveny počty živých bakterií plotnovou metodou na příslušném agaru za podmínek pro konkrétní kmen. Také je stanoven obsah selenu, jednotlivých sloučenin selenu a nanočástic selenu.



Obr. 1. Příprava selenem obohacených bakterií druhu *Lactococcus lactis*.

3.2 Vliv různých koncentrací seleničitanu sodného na mikrobiální růst

Inhibiční vliv seleničitanu sodného na životaschopnost testovaného kmene se posoudí na základě spektrofotometrického měření změny absorbance při vlnové délce 620 nm během 24h kultivace v příslušném bujONU (dle mikroorganismu) s různými koncentracemi seleničitanu sodného (0, 5, 10, 30, 50 a 100 mg/l).

3.3 Akumulace selenu a distribuce sloučenin selenu v selenem obohacených mikrobiálních buňkách

Celkové množství selenu v lyofilizované kultuře se stanoví metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) po rozkladu vzorku koncentrovanou HNO₃ v mikrovlnném mineralizátoru. Obsah jednotlivých sloučenin selenu je pak stanoven s využitím kapalinové chromatografie v kombinaci s metodou ICP-MS, po extrakci s proteasou XXIII v Tris-HCl pufru (pH 7,5) při 37 °C po dobu 24 h (podrobný postup viz Kantorová a kol., 2022). Selen je v obou případech měřen na linii $m/z = 80$ a jako vnitřní standard se použije tellur měřený na linii $m/z = 128$.

3.4 Testování produkce nanočástic selenu u selenizovaných kmenů a jejich charakterizace

Nanočástice selenu jsou charakterizovány z hlediska velikosti a struktury transmisí elektronovou mikroskopií (TEM) a z hlediska velikosti a číselné koncentrace metodou ICP-

MS, v režimu měření jednotlivých částic (sp-ICP-MS). Vzorky pro měření metodou sp-ICP-MS se připraví tak, že se naváží 0,005 g lyofilizátu do polyethylenové zkumavky, přidá se 5 ml 1 obj. % methanolu a vzorek se sonikuje v ultrazvukové lázni po dobu 20 min. Poté se vzorek zředí 250× 1 obj. % metanolem a ihned se analyzuje. V případě měření s využitím TEM je vzorek dispergován a ředěn stejným způsobem, avšak pouze v demineralizované vodě. Vzorek je pak nanesen na měděnou mřížku (velikost 300 mesh), vysušen a analyzován.

3.5 Testování antioxidačních vlastností selenizovaných kmenů

Antioxidační aktivita selenizovaných a neselenizovaných kmenů se stanoví pomocí metody DPPH, která je jednou ze základních metod pro posouzení antiradikálové aktivity. Je založena na reakci testovaného vzorku s DPPH (1,1-difeny-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Změna absorbance se stanoví spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm.

3.6 Testování cytotoxicity (MTT) a adherence selenizovaných kmenů v podmínkách *in vitro* za použití tkáňového modelu

Kultivace tkáně

Buněčné linie kolorektálního adenokarcinomu Caco-2 a HT29 se kultivují v kultivačních lahvích (o velikosti 75 cm²), a to v 15 ml média Dulbecco's Modified - Eagle's Medium (DMEM) obohaceného o: 10 % Fetal Bovine Serum (FBS), 1 % hydrogenuhličitanu sodného, 1 % pyruvátu sodného, 1 % neesenciálních aminokyselin, 1 % penicilinu (10 000 jednotek) a streptomycin (100 mg). Kultivace probíhá po dobu 7 dní. Každý druhý den se médium vymění za čerstvé. Po 7 dnech se buněčné linie sklídí. V prvním kroku se buňky opláchnou 5 ml pufru PBS (Phosphate Buffered Saline), který se následně odstraní. Poté se k buňkám přidá 5 ml trypsinu, který se nechá působit 3-5 min. Po uplynutí této doby se trypsin zneutralizuje, a to přidáním 5 ml média DMEM. Pomocí plastové škrabky se buněčné linie uvolní a obsah lahve se přenesení do 15 ml zkumavky typu Falcon a odstředí při 200 × g po dobu 10 minut. Staré médium se odstraní a přidá se médium nové o objemu 5 ml, ve kterém se buňky dispergují. Do nové kultivační lahve se přidá 15 ml média DMEM. Ze zkumavky se odebere 1 ml suspenze a přenesení do této nové kultivační lahve. Kultivační láhev se umístí do inkubátoru CO₂ (37 °C, atmosféra 5 % CO₂).

Založení 24-jamkové destičky

Z důkladně dispergované buněčné suspenze se odebere 100 μl , smíchá se 100 μl tripanové modři, následně nanese do Bürkerovy komůrky a vypočte se koncentrace buněk v 1 ml suspenze. Do buněčné směsi se přidá $3,6 \times 10^4$ Caco-2 buněk a $0,4 \times 10^4$ HT29 buněk. Tato směs se pipetuje do jamky v objemu 500 μl a takto připravená destička je uložena v kultivačním boxu. Po dobu 14 dní se každé 2–3 dny vyměňuje médium za čerstvé.

Cytotoxicita (MTT)

Připravená buněčná suspenze o koncentraci $2,5 \times 10^3$ buněk/ml se pipetuje do 96-jamkové destičky v množství 200 μl . Po 24 h se odstraní staré médium a přidá se 100 μl nového média spolu s testovanými vzorky o daných koncentracích. Takto se testují vzorky s buňkami inkubovanými po dobu 72 h. Po této době se médium se vzorky odstraní a nahradí 100 μl čistého média s MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,2-diphenyl-2H-tetrazol bromid) (1 $\mu\text{g/ml}$). Po 2 h v inkubátoru CO_2 se médium s MTT odstraní a nahradí 100 μl DMSO. Absorbance se měří při 555 nm a 720 nm; jde o referenční hodnoty. Procento životaschopných buněk se vypočítá v porovnání s kontrolou, která představuje buňky bez přidání selenizovaných bakterií. Následně se stanoví bezpečné koncentrace pro další testování adherence probiotik na buněčný model.

Test adherence

Pro zjištění adhezenčních vlastností se použije modifikovaná metodika (Jensen a kol., 2012). Staré médium se odsaje z každé jamky a buněčná monovrstva se $3\times$ propláče PBS. Poté se na monovrstvu střevních buněk přidají testované koncentrace mikrořas, a to s kultivačním médiem bez suplementu o objemu 1 ml a o požadované koncentraci vzorku. Destička se následně inkubuje po dobu 2 h, při 37 $^{\circ}\text{C}$, v 5% atmosféře CO_2 . Po uplynutí této doby se jamky $3\times$ promyjí PBS z důvodu odstranění neadherovaných bakterií na monovrstvu, která se následně rozruší přidáním 300 μl 1% Tritonu-X100 na jamku po dobu 30 s, a poté se doplní 700 μl PBS. Vytvořená suspenze s životaschopnými bakteriemi se standardně zředí, a poté naočkuje na Petriho misky a zalije Rogosa agarem. Po inkubaci při 37 $^{\circ}\text{C}$ po 72 h za aerobních podmínek se spočítají narostlé kolonie (KTJ) a stanoví se adherence, vyjádřená jako procento adhereovaných bakterií z množství celkově přidávaných bakterií.

3.7 Simulace průchodu selenizovaných kmenů trávicím traktem v podmínkách *in vitro*

Trávení se uskuteční podle standardizovaného *in vitro* statického modelu trávení INFOGEST, rozděleného na orální, žaludeční a intestinální fázi. V orální části se naváží 5 g lyofilizovaného vzorku a následně se přidá 5 ml simulované slinné šťávy (chlorid vápenatý 1,5 mmol/l, slinná amylasa 75 jednotek/ml). Po 2min inkubaci se přidá 5 ml žaludeční šťávy (pepsin 2 000 jednotek, gastrická lipasa 60 jednotek/ml, chlorid vápenatý s výslednou koncentrací 0,15 mmol/l) a pH se sníží na 3,0 pomocí kyseliny chlorovodíkové. Vzorek se 2 h inkubuje na vodní lázni při 37 °C s pravidelným promícháním vzorku. Po 2 h se přidá simulovaná střevní šťáva o objemu 10 ml (chlorid vápenatý 0,6 mmol/l, žluč 10 mmol/l, pankreatin 100 jednotek/ml) a pH se upraví na 7,0 pomocí hydroxidu sodného, s následnou 2h inkubací při 37 °C s průběžným mícháním vzorku. Po ukončení testu se trávicí proces ukončí zamražením vzorku na -80 °C.

4 Srovnání „novosti postupů“

Předkládaná metodika nabízí definování postupu charakterizace selenem obohacených kmenů, a to s ohledem na jejich: a) schopnost vázat a akumulovat anorganický selen z růstového média, b) produkci organických forem selenu a nanočástic selenu, c) antioxidační vlastnosti vlivem selenizace, d) bezpečnost/toxicitu a schopnost prostupu přes buněčné membrány, e) adhezi na tkáňový model lidských epiteliálních buněk tlustého střeva v podmínkách *in vitro*.

V současné době neexistuje metodika, která by umožňovala charakterizovat vlastnosti selenem obohacených kmenů, i když na trhu jsou k dispozici selenizované kvasinky (druh *Saccharomyces cerevisiae*) jako součást doplňků stravy. Kromě kvasinek mají velmi slibný potenciál za účelem selenizace také bakterie mléčného kvašení (BMK) a lze předpokládat, že se v dohledné době bude zvyšovat zájem o obohacování selenem, jakožto významným mikronutrientem. Z tohoto důvodu pak bude potřebná metodika, která umožní tyto selenizované kmény bakterií a kvasinek charakterizovat, jasně stanovit jejich funkční vlastnosti a bezpečnost pro případné využití ve výživě lidí a zvířat.

5 Popis uplatnění certifikované metodiky

Předkládaná certifikovaná metodika bude moci být využita výzkumnými laboratořemi během testování, při rozšíření znalostí o vlivu selenem obohacených mikroorganismů. Dalším relevantním okruhem uživatelů pro uplatnění metodiky jsou zástupci potravinářského průmyslu, výrobci potravinových doplňků, a také další komerční organizace využívající prospěšné mikroorganismy, např. ve formě probiotik v kombinaci s dalšími složkami s pozitivním benefitem na lidské zdraví (např. f. INGREDIA s.r.o., se kterou byla podepsána smlouva o uplatnění předkládané metodiky). Selenem obohacené mikroorganismy se dají využít při prevenci a/nebo ošetření stavů způsobených nutričním deficitem selenu v dietě.

6 Ekonomické aspekty

Tab. 1 Kalkulace pro jeden vzorek při uvažování jednotlivých stanovení

Stanovení	Cena materiálu v Kč pro 1 stanovení (1 vzorek)	Účetní cena v Kč (materiál, odběr vzorků, práce, vyhodnocení)
Příprava selenem obohacených kmenů	200,-	1 000,-
Stanovení tří různých koncentrací seleničitanu sodného na mikrobiální růst	250,-	600,-
Stanovení akumulace selenu (celkové množství Se)	250,-	650,-
Stanovení distribuce sloučenin selenu v selenizovaných buňkách	700,-	1 600,-
Stanovení nanočástic selenu	200,-	550,-
Stanovení antioxidačních vlastností selenizovaných kmenů, <i>in vitro</i>	350,-	1 200,-
Stanovení cytotoxicity na tkáňovém modelu HT29 a Caco2	750,-	2 500,-
Stanovení adherence na tkáňovém modelu HT29 a Caco2	700,-	2 750,-
Test simulace průchodu selenizovaných kmenů trávicím traktem, <i>in vitro</i>	1 500,-	4 500,-
Cena v Kč za 1 vzorek	4 900,-	15 350,-

Tab. 2 Kalkulace pro 15 vzorků

Materiální náklady uživatele	Náklady uživatele na práci *	Náklady celkem	Zisk v Kč	Ekonomický přínos v Kč
24 500,-	15 000,-	39 500,-	230 250,-	190 750,-

*Úvaha o potřebě celkem 50 h práce (tj. selenizace, provedení všech uvedených analýz a testování), s kalkulací 300,- Kč/h.

7 Seznam související použité literatury

Brodkorb, A. et al. (2019): INFOGEST static *in vitro* simulation of gastrointestinal food digestion. *Nature Protocols* 14.

Kantorová, V., Kaňa, A., Krausová, G., Hyršlová, I., Mestek, O. (2022): Effect of protease XXIII on selenium species interconversion during their extraction from biological samples. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105, 104260.

Nařízení Komise (ES) č. 1170/2009 ze dne 30. listopadu 2009, kterým se mění směrnice Evropského parlamentu a Rady 2002/46/ES a nařízení Evropského parlamentu a Rady (ES) č. 1925/2006, pokud jde o seznamy vitaminů a minerálních látek a jejich forem, které lze přidávat do potravin, včetně doplňků stravy.

Yang, J., Huang, K., Qin, S., Wu, X., Zhao, Z., Chen, F. (2009): Antibacterial action of selenium-enriched probiotics against pathogenic *Escherichia coli*. *Digestive Diseases and Sciences*, 54, 246-254.

Yi, H.W., Zhu, X.X., Huang, X.L., Lai, Y.Z., Tang, Y. (2020): Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* protected alcohol and high fat diet induced hepatic injury in mice. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 18, 169-177.

8 Publikace předcházející metodice

Hyršlova, I., Kana, A., Kantorova, V., Krausova, G., Mrvikova, I., Dosekocil, I. Selenium accumulation and biotransformation in *Streptococcus*, *Lactococcus*, and *Enterococcus* strains. *Journal of Functional Foods*, 2022, 92, 105056, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2022.105056>.

Kantorová, V., Kaňa, A., Krausová, G., Hyršlová, I., Mestek, O. Effect of protease XXIII on selenium species interconversion during their extraction from biological samples. *Journal*

of *Food Composition and Analysis*, 2022, 105, 104260, <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104260>.

Krausova, G., Kana, A., Vecka, M., Hyslova, I., Stankova, B., Kantorova, V., Mrvikova, I., Huttl, M., Malinska, H. *In vivo* bioavailability of selenium in selenium-enriched *Streptococcus thermophilus* and *Enterococcus faecium* in CD IGS rats. *Antioxidants* 2021, 10, 463. <https://doi.org/10.3390/antiox10030463>.

Krausova, G., Kana, A., Hyslova, I., Mrvikova, I., Kavkova, M. Development of selenized lactic acid bacteria and their selenium bioaccumulation capacity. *Fermentation* 2020, 6, 91; [doi:10.3390/fermentation6030091](https://doi.org/10.3390/fermentation6030091).

9 Jména oponentů a názvy jejich organizací

1) Oponent z oboru: Ing. Eva Šviráková, Ph.D.

Ústav konzervace potravin

Vysoká škola chemicko-technologická v Praze

2) Oponent ze státní správy: MVDr. Sylva Havelková

Oddělení veterinární asanace a SEUROP

Státní veterinární správa

10 Dedikace

Metodika je výsledkem řešení výzkumného projektu MŠMT, programu INTER-EXCELLENCE, COST LTC 20014 s názvem „Research of selenium-enriched lactic acid bacteria, bifidobacteria and yeasts and influence of low-pH stress exposure on their selenium biotransformation efficiency“ a institucionální podpory MZE-RO1422 (DKRVO).