

УДК 57.083.1:[579.864+579.873.1]:546.33'234

КУЛЬТИВУВАННЯ БІФІДО- І ЛАКТОБАКТЕРІЙ В СЕРЕДОВИЩАХ ІЗ НАТРІО СЕЛЕНІТОМ

Л. В. Капрельяниц, доктор технічних наук, професор*, *E-mail: leonid@onaft.edu.ua*
О. О. Лівенцова, Кандидат технічних наук, доцент**, *E-mail: liventsova_helen@mail.ru*
Н. С. Трегуб, аспірант*, *E-mail: natashenka.tregub@mail.ru*
*Кафедра біохімії, мікробіології та фізіології харчування
**Кафедра харчової хімії

Одеська національна академія харчових технологій, вул. Канатна, 112, Одеса, Україна, 65039

Анотація. У статті наведено дані щодо актуальності створення нових альтернативних джерел органічних форм селену. Описано здатність мікроорганізмів до біотрансформації селену. Наведено дані стосовно впливу концентрацій натрію селеніту на приріст біомаси лакто- і біфідобактерій. Визначено, що підвищені концентрації натрію селеніту пригнічують ріст мікроорганізмів. Основними показниками, що характеризують накопичення біомаси були значення оптичної щільності середовища культивування та кількість колонієутворюючих одиниць мікроорганізмів. Підтверджено здатність до біотрансформації неорганічних форм селену досліджуваними мікроорганізмами в процесі їх культивування. За допомогою флуориметричного методу визначено кількісний вміст біотрансформованого селену.

Ключові слова: лактобактерії, біфідобактерії, пробіотики, натрію селеніт, оптична щільність.

КУЛЬТИВИРОВАНИЕ БИФИДО- И ЛАКТОБАКТЕРИЙ В СРЕДАХ С НАТРИЯ СЕЛЕНИТОМ

Л. В. Капрельяниц, доктор технических наук, профессор*, *E-mail: leonid@onaft.edu.ua*
О. О. Ливенцова, кандидат технических наук, доцент**, *E-mail: liventsova_helen@mail.ru*
Н. С. Трегуб, аспирант*, *E-mail: natashenka.tregub@mail.ru*
*Кафедра биохимии, микробиологии и физиологии питания
**Кафедра пищевой химии

Одесская национальная академия пищевых технологий, ул. Канатна, 112, Одесса, Украина, 65039

Аннотация. В статье приведены данные касающиеся актуальности производства новых альтернативных источников органических форм селена. Описана способность микроорганизмов к биотрансформации селена. Приведены данные касательно влияния концентраций натрия селенита на прирост биомассы лакто- и бифидобактерий. Установлено, что повышенные концентрации натрия селенита угнетают рост микроорганизмов. Основными показателями, характеризующими накопление биомассы, были показатели оптической плотности среды культивирования и количества колониеобразующих единиц микроорганизмов. Доказано, что исследуемые микроорганизмы способны к биотрансформации неорганических форм селена и к превращению его в органические формы в процессе культивирования. С помощью флуориметрического метода определен количественный состав биотрансформированного селена.

Ключевые слова: лактобактерии, бифидобактерии, пробиотики, натрия селенит, оптическая плотность



Copyright © 2015 by author and the journal "Food Science and Technology".

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Вступ

У наш час існує проблема низького рівня надходження мікроелементу селену до організму людини з продуктами харчування. Аналіз літературних даних свідчить про актуальність розробки нових джерел органічних форм мікроелементу. Перспективним біотехнологічним шляхом отримання таких джерел селену є використання в якості об'єктів для його біотехнологічного встроювання бактерій роду *Lactobacillus acidophilus* та *Bifidobacterium bifidum*.

Постановка проблеми

В останні роки значно розширились уявлення про есенціальність для організму людини багатьох міnorних компонентів їжі, котрі раніше не розглядалися в якості факторів, котрі необхідні для нормального функціонування організму людини. Дефіцит цих біологічно-активних речовин викликає зниження

резистентності організму людини до дії несприятливих факторів навколишнього середовища, формування імунodefіцитних станів. Важливу роль у підтриманні здорового статусу населення відіграє есенціальний мікроелемент селен [2,12]. Сьогодні актуальним напрямком досліджень є розробка нових продуктів харчування збагачених органічними формами селену, а також розробка селен-збагачених біологічно-активних добавок (БАД).

Літературний огляд

Селен – есенціальний мікроелемент незамінний у харчуванні людини. Він виконує роль агента, котрий сприяє детоксикації реакційноздатних похідних кисню; мікроелемент бере участь в утворенні макрофагів, еритроцитів; грає роль протипухлинного фактору; є складовою частиною багатьох ферментів та гормонів [3,7].

Одним із способів подолання селенодефіцитів, є розробка нових продуктів збагачених цим мікроелементом [1]. Літературні дані свідчать, що мікроорганізми здатні акумулювати і біотрансформувати неорганічні форми селену [5,8]. При додаванні джерела селену до середовища культивування значна його частина поглинається та біотрансформується мікроорганізмами з утворенням його органічних форм та наноструктур Se^0 [4, 9, 14]. Після біотрансформації в бактеріальній клітині близько 32 % селену знаходиться в мембранах, 22 % входить до складу клітинної стінки, 52 % – входить до складу амінокислот та розчинних білків протоплазми (із них 72 % міститься у фракції білків і амінокислот, 1 % зв'язаний із ліпідами і 27 % селену знаходиться в неорганічній формі). Біологічний синтез органічних форм селену, порівняно із іншими методами, потребує мало енергії та економічних витрат. Він є екологічно безпечним та виключає можливість утворення шкідливих побічних продуктів [8, 11, 13]. Це дозволяє включати їх в добовий раціон в дозах більших за середньодобову [10].

Основна частина

Метою роботи було визначення впливу концентрацій селену на динаміку накопичення біомаси культур лакто- і біфідобактерій та визначення кількісного вмісту акумульованого мікроорганізмами мікроелементу.

У роботі використовували музейні культури *Lactobacillus acidophilus* штам 412/307 та *Bifidobacterium bifidum* - I. Культивуацію лактобактерій проводили на середовищі із сирної сироватки, а біфідобактерій на кукурудзяно-лактозному середовищі. В

якості джерела селену використовували натрію селеніт Na_2SeO_3 (ТОВ НВП Хемел). Натрію селеніт розчиняли в стерильній дистильованій воді й додавали в середовище культивування в концентраціях 5 мкг/см³, 10 мкг/см³, 15 мкг/см³, 20 мкг/см³. Контролем слугувало середовище без додавання натрію селеніту. Посівний матеріал вносили в колби з середовищем у кількості 5 %.

Основним завданням роботи було визначення впливу концентрацій селену на накопичення біомаси лакто- і біфідобактерій, що визначали за показниками оптичної щільності (ОЩ), та у підрахунку колонієутворюючих одиниць на см³ середовища, а також визначення кількісного вмісту акумульованого мікроорганізмами селену.

Оптичну щільність суспензії визначали при 590 нм (фотокolorиметр КФК-2-УХЛ 4.2, кювета з відстанню 1 см). По отриманим даним строїли графіки в напівлогарифмічних координатах. Кількість колонієутворюючих одиниць (КУО/см³) визначали методом десятикратних розведень.

Вміст селену в мікроорганізмах визначали флуориметричним методом з використанням 2,3-діамінонафталіну (ГОСТ РФ 55449-2013). Спектри люмінесценції визначали на спектрометрі СДЛ-1 (ЛОМО Ленінград) із ртутною лампою ДШР-250, світлофільтром УФС-2, при довжині хвиль 313 і 365 нм.

На першому етапі досліджень визначали динаміку накопичення біомаси лактобактерій на селеновмісному середовищі культивування. Отримані дані відображено на рис. 1

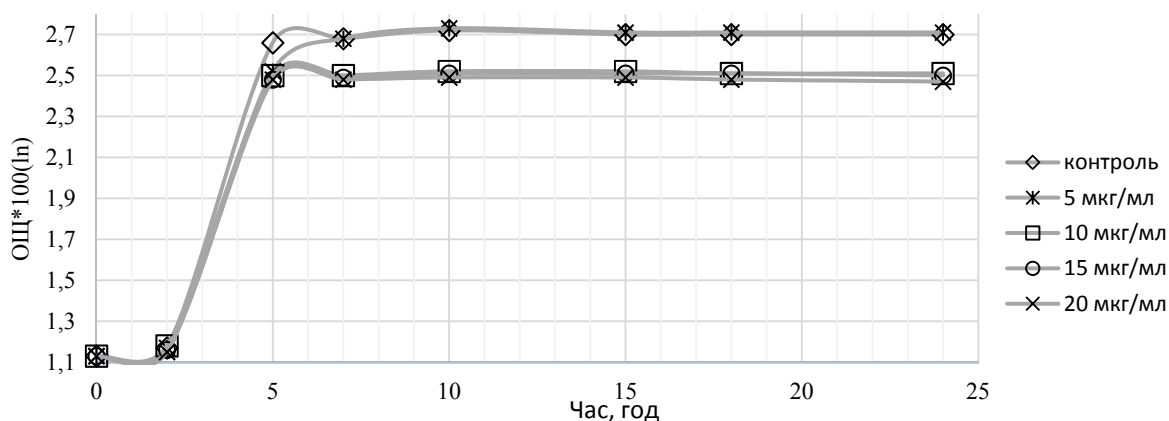


Рис. 1. Показники оптичної щільності біомаси лактобактерій

Отримані дані свідчать про вплив концентрацій натрію селеніту на приріст біомаси лактобактерій. Показники оптичної щільності (ОЩ) у пробі із вмістом натрію селеніту в кількості 5 мкг/см³ були близькі до контролю та не суттєво від нього відрізнялися протягом всього періоду культивування. В пробах із вмістом Na_2SeO_3 15 – 20 мкг/см³ показники ОЩ протягом усього часу культивування були меншими

порівняно з контролем. Показники ОЩ у пробах із концентрацією Na_2SeO_3 5 – 10 мкг/см³ були близькими до контролю. Дані свідчать про пригнічення росту лактобактерій високими концентраціями натрію селеніту.

Динаміка накопичення біомаси біфідобактерій при культивуванні на селеновмісному середовищі відображена на рис. 2.

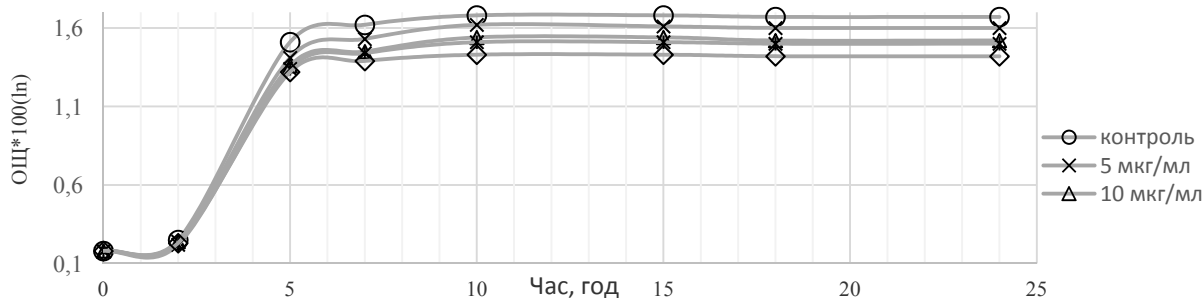


Рис. 2. Показники оптичної щільності біомаси біфідобактерій

Дані рис. 2 свідчать про більш інтенсивний вплив концентрацій Na_2SeO_3 на накопичення біомаси біфідобактерій, порівняно з лактобактеріями. Відмічено, що показники ОЩ при концентрації 5 мкг/см³ близькі до контролю, але при даній концентрації відмічено зниження в динаміці накопичення біомаси. Підвищення концентрацій селену до 10 – 15 мкг/см³

викликало, більш інтенсивне зменшення показників ОЩ порівняно з контролем. Найменші показники накопичення біомаси біфідобактерій відмічено при концентрації селеніту натрію – 20 мкг/см³.

Залежність кількості колонієутворюючих одиниць мікроорганізмів від вмісту селену у середовищі культивування відображена в таблиці 1.

Таблиця 1 – Зміна показників КУО лакто- і біфідобактерій у процесі культивування

Час/год	Концентрація натрію селеніту				
	Контроль	5 мкг/см ³	10 мкг/см ³	15 мкг/см ³	20 мкг/см ³
КУО/мл лактобактерій					
5	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵
10	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷
24	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰	10 ⁻¹⁰	10 ⁻⁹
КУО/мл біфідобактерій					
5	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶	10 ⁻⁶
10	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁷
24	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁹	10 ⁻⁸	10 ⁻⁸

Результати таблиці 1 свідчать про вплив селеніту натрію на накопичення біомаси мікроорганізмів, протягом всього процесу культивування. Так концентрація 20 мкг/см³ викликала пригнічення росту лактобактерій. Для біфідобактерій концентраціями пригнічуючими ріст були 15 – 20 мкг/см³.

Наступним етапом було визначення кількісного вмісту біотрансформованого мікроорганізмами селену за допомогою флуориметричного методу. Визначали вміст акумульованого селену за показниками інтенсивності люмінесценції. Отримані дані відображено в таблиці 2.

Таблиця 2 – Залежність інтенсивності люмінесценції від концентрації селеніту натрію в середовищі культивування

Культури мікроорганізмів	Концентрація натрію селеніту, мкг/см ³	Інтенсивність люмінесценції, відн. од.
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	5	15
	10	48
	15	70
	20	98
<i>Bifidobacterium bifidum</i>	5	20
	10	38
	15	52
	20	50

Дані таблиці 2 свідчать про залежність інтенсивності люмінесценції від вмісту Na_2SeO_3 . Максимальні показники інтенсивності люмінесценції зафіксовано у пробі із вмістом селеніту натрію 20 мкг/см³ – для лактобактерій і 15 мкг/см³ – для біфідобактерій.

За отриманими показниками інтенсивності люмінесценції визначали кількісний вміст селену, виражений в мкг/г сухої біомаси мікроорганізмів. Показники кількісного вмісту селену, накопиченого культурами лакто- та біфідобактерій відображено на рис. 3, 4.

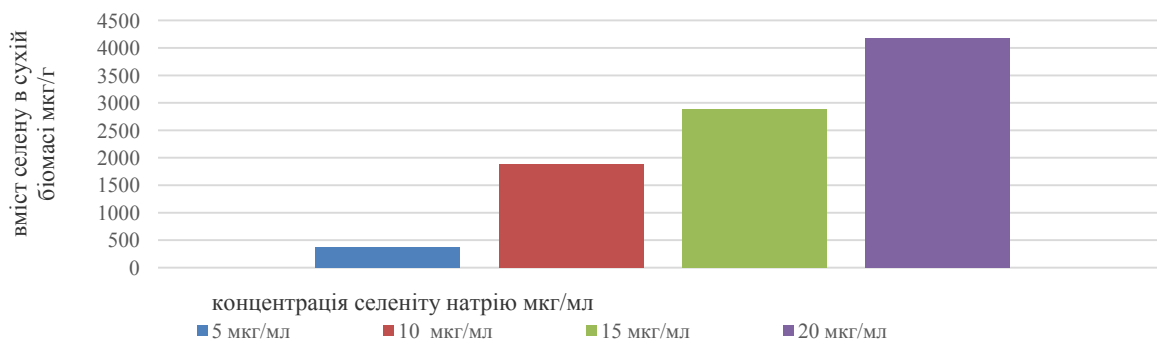


Рис. 3. Динаміка накопичення селену культурою *Lactobacillus acidophilus* штам 412/307

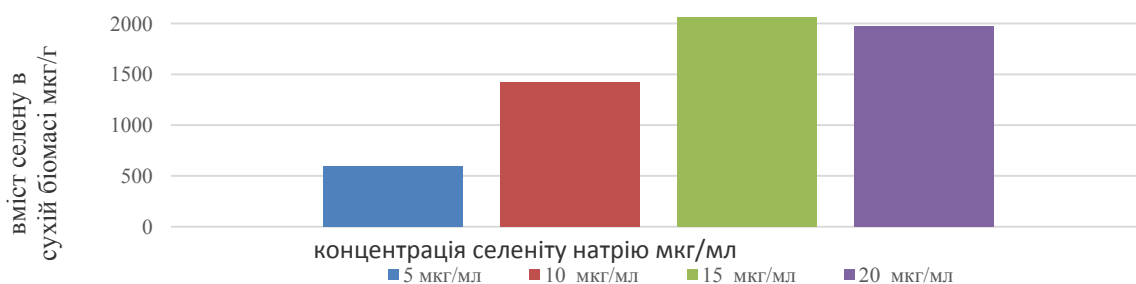


Рис. 4. Динаміка накопичення селену культурою *Bifidobacterium bifidum I*

Динаміка накопичення мікроелементу селену культурами лакто- і біфідобактерій і її інтенсивність прямо пропорційно залежить від кількості селеніту натрію введеного в середовища культивування. Так, максимальна концентрація асимільованого лактобактеріями селену була зафіксована при 20 мкг/см³, а біфідобактеріями – 15 мкг/см³. Відмінності у накопиченні селену досліджуваними штамми мікроорганізмів можна пояснити як особливостями в умовах культивування, так і властивостями досліджуваних штамів лакто- і біфідобактерій. Високі концентрації селеніту натрію в культуральному середовищі провокують захисну реакцію бактеріальних клітин, котра полягає на першому етапі в адсорбції селеніту натрію на секретованих клітинами мікроорганізмів полісахаридах, а в подальшому у відновленні Na₂SeO₃ до нульвалентного селену (Se⁰).

Висновки

Таким чином, визначено пригнічуючий вплив високих концентрацій селеніту натрію (15–20 мкг/см³) на інтенсивність накопичення біомаси мікроорганізмів. Доведено, що при високих концентраціях селеніту натрію інтенсивність його біотрансформації вища, що пов'язано із відсутністю в бактерій механізму регуляції його надходження. Визначено, що раціональні показники накопичення селенозбагачених мікроорганізмів (10⁹–10⁸ КУО/см³) можна отримати через 24 години їх культивування на селеновмісних середовищах культивування. В цих умовах біфідо- і лактобактерії зберігали, як кількісно-якісні, так і фізіолого-функціональні властивості клітин, включаючи пробіотичні ефекти.

Список літератури:

- Капельяниц, Л. В., Йоргачова О. Г. Функціональні продукти / Л.В. Капельяниц, О.Г. Йоргачова.– Одеса: "Друк", 2003. – С. 229-237.
- Augilar, F., Charrandiere U.R., Dusemund B., Galtier P. L-selenomethionine as a source of selenium added for nutritional purposes to food supplements / F. Augilar, U.R. Charrandiere, B. Dusemund, P. Galtier // J. European Food Safety Authority.– 2009. – № 13(10). – P. 1–39
- Fairweather-Tait, S. J., Bao Y., Broadley M. R., Collings, R., Ford D. Selenium in human health and disease. Antioxid Redox Signal / S.J. Fairweather-Tait, Y. Bao, M.R. Broadley, R. Collings, D. Ford // J. Food & Health Innovation Service. – 2011. – № 6(4). – P. 337–383.
- Galano, E., Mangiapane E., Bianga J., Palmese A., Szpunar J. Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics / E. Galano, E. Mangiapane, J. Bianga, A. Palmese, J. Szpunar // Molecular & Cellular Proteomics. – 2006.– № 5(6). – P. 2196–2204.
- Hossein, Yazdi M., Shahverdi A. Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient immune responses in vivo and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer / M. Hossein Yazdi, A. Shahverdi // J. Pharmaceutical Sciences. – 2013. – № 6(2). – P. 21–33.
- Lu, J., Berndt C., Holmgren A. Methabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase / J. Lu, C. Berndt, A. Holmgren // Biochim Biophys Acta. – 2009. – № 3(2). – P. 1513–1519.
- Monsen, E. R. Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, Vitamin E, selenium, and carotenoids / E.R. Monsen // Journal of the American Dietetic Association. – 2000. – № 4(6) – P. 637–640.
- Palomo, M., Gutierrez A. M., Perez-Conde M. C., Camara C., Madrid Y. Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt / M. Palomo, A.M. Gutierrez, M.C. Perez-Conde, C. Camara, Y. Madrid // Food Chemistry. – 2014. – № 12(4). – P. 371–379.

9. Rother, M. Selenium metabolism in procarיות. / M. Rother // J. Ag. Food Chem. – 2012. – № 4(1). – P. 457–470.
10. Stolz, J. F., Basu P., Santini J. M. Arsenic and selenium in microbial metabolism / J.F. Stolz, P. Basu, J.M. Santini // Annual Review of Microbiology. – 2006. – № 60(3). – P. 107–130.
11. Stolz, J. F., Oremland, R. S. Bacterial respiration of arsenic and selenium / J.F. Stolz., R.S. Oremland // FEMS Microbiology Reviews. – 1999. – № 23(8). – P. 615–627.
12. Thomson, C. D., Robinson M. F. Selenium in human health and disease with emphasis on those aspects peculiar to New Zealand / C.D. Thomson, M.F. Robinson // The American Journal of Clinical Nutrition. – 1980. – № 33(4). – P.303–323.
13. Xia S. K., Chen L., Liang J. Q. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus* / S.K. Xia, L. Chen, J.Q. Liang // Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2007. – № 4(4). – P. 55.
14. Yin, Y., Wang O. X., Xing J., Fan Y. R., Wu Z. Antitumor efficacy of *Bifidobacterium longum* carrying endostatin gene enriched with selenium and the distribution of selenium / Y. Yin, O.X. Wang, J. Xing, Y.R. Fan, Z. Wu // African Journal of Microbiology Research. – 2011. – № 5(2). – P. 5615–5621.
15. Zang, Y., Turanov A. A., Hatfield D. L., Gladyshev V. N. In silico identification of genes involved in selenium metabolism: evidence for a third selenium utilization trait / Y. Zang, A.A. Turanov, D.L. Hatfield, V.N. Gladyshev // BMC Genomics. – 2009. № 9(2) – P. 251

CULTIVATION OF BIFIDOBACTERIUM AND LACTOBACILLUS IN MEDIUM WITH SODIUM SELENITE

L. V. Kaprelyants, Doctor of technical sciences, professor**, *E-mail*: leonid@onaft.edu.ua
 E. O. Liventsova, Candidate of technical sciences, associate professor**, *E-mail*: liventsova helen@mail.ru

N. S. Tregub, Graduate student*, *E-mail*: natashenka.tregub@mail.ru
 *Department of Biochemistry, microbiology and physiology of nutrition

**Department of food chemistry

Odessa National Academy of Food Technologies, Kanatnaya st., 112, Odessa, Ukraine, 65039

Annotation. The article presents data on the relevance of the production of new alternative sources of organic forms of selenium. It describes the ability of microorganisms to selenium bitransformation. The article presents data concerning sodium selenite concentration impact on biomass growth of bifidus and lactic bacteria. It has been proved that high concentrations of sodium selenite inhibit microorganism growth. Main indicators distinguishing biomass accumulation were optical density factors and colony-forming unit quantity. It has been proved that investigated microorganisms available for biotransformation of selenium inorganic forms and its conversion into organic forms during cultivation. By using fluorimetric method quantitative composition of biotransformed selenium has been defined.

Keywords: *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* probiotics, sodium selenite, optical densit

References

1. Kaprel'janc LV, Jorgachova OG. Funkcional'ni produkti. Odessa: "Druk". 2003; 229–237.
2. Augilar F, Charrandiere UR, Dusemund B, Galtier P. L-selenomethionine as a source of selenium added for nutritional purposes to food supplements. J. European Food Safety Authority. – 2009; 13(10): 1–39
3. Fairweather-Tait SJ, Bao Y, Broadley MR, Collings R, Ford D. Selenium in human health and disease. Antioxid Redox Signal. J. Food & Health Innovation Service. 2011; 6(4): 337–383.
4. Galano E, Mangiapane E, Bianga J, Palmese A, Szpunar J. Privileged incorporation of selenium as selenocysteine in *Lactobacillus reuteri* proteins demonstrated by selenium-specific imaging and proteomics. Molecular & Cellular Proteomics. 2006; 5(6): 2196–2204.
5. Hossein Yazdi M, Shahverdi A. Selenium nanoparticle-enriched *Lactobacillus brevis* causes more efficient immune responses in vivo and reduces the liver metastasis in metastatic form of mouse breast cancer. J. Pharmaceutical Sciences. 2013; 6(2): 21–33.
6. Lu J, Berndt C, Holmgren A. Methabolism of selenium compounds catalyzed by the mammalian selenoprotein thioredoxin reductase. Biochim Biophys Acta. 2009; 3(2): 1513–1519.
7. Monsen ER. Dietary reference intakes for the antioxidant nutrients: vitamin C, Vitamin E, selenium, and carotenoids. Journal of the American Dietetic Association. 2000; 4(6): 637–640.
8. Palomo M, Gutierrez AM, Perez-Conde MC, Camara C, Madrid Y. Se metallomics during lactic fermentation of Se-enriched yogurt. Food Chemistry. 2014; 12(4): 371–379.
9. Rother M. Selenium metabolism in procarיות. J. Ag. Food Chem. 2012; 4(1): 457–470.
10. Stolz JF, Basu P, Santini JM. Arsenic and selenium in microbial metabolism. Annual Review of Microbiology. 2006; 60(3): 107–130.
11. Stolz JF, Oremland RS. Bacterial respiration of arsenic and selenium. FEMS Microbiology Reviews. 1999; 23(8): 615–627.
12. Thomson CD, Robinson MF. Selenium in human health and disease with emphasis on those aspects peculiar to New Zealand. The American Journal of Clinical Nutrition. 1980; 33(4): 303–323.
13. Xia SK, Chen L, Liang JQ. Enriched selenium and its effects on growth and biochemical composition in *Lactobacillus bulgaricus*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. – 2007; 4(4): 55.
14. Yin Y, Wang OX, Xing J, Fan YR, Wu Z. Antitumor efficacy of *Bifidobacterium longum* carrying endostatin gene enriched with selenium and the distribution of selenium. African Journal of Microbiology Research. 2011; 5(2): 5615–5621.
15. Zang Y, Turanov AA, Hatfield DL, Gladyshev VN. In silico identification of genes involved in selenium metabolism: evidence for a third selenium utilization trait. BMC Genomics. 2009; 9(2): 251.

Отримано в редакцію 15.12.2015

Прийнято до друку 22.02.2016