

PATENTOVÝ SPIS

(11) Číslo dokumentu:

309 775

(13) Druh dokumentu: **B6**

(51) Int. Cl.:

C12N 1/20 (2006.01)
C12P 3/00 (2006.01)

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: **2022-263**
(22) Přihlášeno: **14.06.2022**
(40) Zveřejněno: **27.09.2023**
(Věstník č. 39/2023)
(47) Uděleno: **17.08.2023**
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: **27.09.2023**
(Věstník č. 39/2023)

(56) Relevantní dokumenty:
HYRŠLOVÁ, Ivana, et al. Selenium accumulation and biotransformation in Streptococcus, Lactococcus, and Enterococcus strains. Journal of Functional Foods, 6.4.2022, 2022, Vol. 92, p. 1-9, ISSN 1756-4646, abstrakt, závěr, str. 2, sl. 2, odst. 1; CHEN, Yue, et al. Protective effect of selenium nanoparticle-enriched Lactococcus lactis NZ9000 against enterotoxigenic Escherichia coli K88-induced intestinal barrier damage in mice. Applied and Environmental Microbiology, 2021, Vol. 87, No. 23, p. 1-15, ISSN 0099-2240, abstrakt, závěr, str. 11, poslední odstavec; KRAUSOVÁ, Gabriela, et al. Development of selenized lactic acid bacteria and their selenium bioaccumulation capacity. Fermentation, 2020, Vol. 6, No. 3, ISSN 2311-5637, celý dokument; KRAUSOVÁ, Gabriela, et al. In vivo bioavailability of selenium in selenium-enriched Streptococcus thermophilus and Enterococcus faecium in CD IGS rats. Antioxidants, 2021, Vol. 10, No. 3, ISSN 2076-3921, celý dokument.
CN 108735670 A.

(73) Majitel patentu:
Výzkumný ústav mlékárenský s.r.o., Praha 6,
Vokovice, CZ
Vysoká škola chemicko-technologická v Praze,
Praha 6, Dejvice, CZ
Česká zemědělská univerzita v Praze, Praha 6,
Suchbát, CZ

(72) Původce:
MVDr. Gabriela Krausová, Ph.D., Košice, SK
Ing. Ivana Hyršlová, Praha 4, Chodov, CZ
Ing. Vladimír Dráb, Sedlčany, CZ
Ing. Antonín Kaňa, Ph.D., Chrášťany, CZ
Ing. Věra Kantorová, Praha 8, Kobylisy, CZ
Ing. Ivo Doskočil, Ph.D., Choceň, CZ

(74) Zástupce:
NEOLEGAL - advokátní a patentová kancelář, Ing.
Jaroslav Novotný, Římská 2135/45, 120 00 Praha 2,
Vinohrady

(54) Název vynálezu:
**Selenizovaný kmen bakterie Lactococcus
lactis subsp. lactis CCM 9190**

(57) Anotace:
Průmyslový kmen bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* obohacený selenem uložený v České sbírce mikroorganismů, Kamenice 5, Brno, pod číslem CCM 9190 a prostředek obsahující tento kmen pro prevenci a/nebo ošetření stavů způsobených nutričním deficitem selenu v dietě. Prostředek může obsahovat i další probiotické kmeny, základní kultury, případně prebiotika, sušené mléko, vitamíny nebo minerální látky.

CZ 309775 B6

Selenizovaný kmen bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM 9190

Oblast techniky

5

Vynález se týká selenizovaných, tj. selenem-obohacených bakteriálních buněk kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM 9190, které slouží jako zdroj biologicky dostupných forem selenu (Se), kterými jsou především organické sloučeniny Se a nanočástice elementárního Se. Vynález obsahuje kmen ve formě živých, příp. inaktivovaných buněk, pro použití jako přípravek pro
10 prevenci a/nebo ošetření stavů způsobených nutričním deficitem selenu v dietě.

Dosavadní stav techniky

15 Pro účely lidské výživy je možná suplementace doplňků stravy na bázi anorganického Se dle Nařízení Komise (ES) č. 1170/2009. Podle uvedeného nařízení je možná také suplementace organicky-vázaného Se, 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.
20 nepřinášejí konzumentům další benefity, např. dodání 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:
25 i) dodání Se pro biologické procesy; ii) zvýšená biologická dostupnost Se ve formě méně toxických organických sloučenin nebo ve formě nanočástic; iii) individuální zdravotní přínosy BMK a kvasinek v živých nebo inaktivovaných formách (např. produkce organických kyselin, probiotická funkce, produkce antimikrobiálních sloučenin, bakteriocinů atd.

Schopnost transformovat anorganický Se mají kromě kvasinek také BMK, a potenciál Se-obohacených BMK, jak naznačují mnohé studie, např. 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 a méně toxické, organické formě představovat také zdroj probioticky působících bakterií. Mezi BMK patří rody, jako např. *Lactobacillus*, *Lactococcus*,
35 *Enterococcus* a další. Zejména koky (např. laktokoky z rodu *Lactococcus*) jsou odolnější vůči působení seleničitanu v růstovém médiu, např. ve srovnání s tyčinkami nebo bifidobakteriemi, které jsou na přítomnost Se v médiu mnohem citlivější. Navíc, koky lépe odolávají také podmínkám lyofilizace, a počty životaschopných buněk u kmene CCM 9190 dosahují cca 10⁹ kolonie-tvořících jednotek (KTJ/g).

40 Kmen CCM 9190 je součástí startérových mlékařských kultur na výrobu fermentovaných nápojů a některých sýrů. Kmen je dlouhodobě používán v mlékárenském průmyslu pro jeho výhodné sensorické, zejména aromatické vlastnosti. Kromě příznivých technologických a sensorických vlastností se kmen vyznačuje také významnou produkcí nisinu a prokázán byl jeho signifikantní antiklostridiální účinek (Havlíková a kol., 2017 a 2018).

45

Jelikož růstová schopnost v přítomnosti selenu, a tím i tolerance k Se, jako i další vlastnosti (schopnost biotransformovat a zabudovávat do jednotlivých Se-sloučenin a Se-nanočástic) jsou kmenově specifické, je účelem vynálezu získání kmene poskytujícího nejlepší zdroj organicky vázaného selenu, jak z pohledu akumulace Se, distribuce Se-sloučenin a co nejmenší cytotoxicity
50 těchto Se-sloučenin, příp. elementárních forem Se. Navíc, obohacení kmene selenem umožní také zvýšení antioxidační kapacity kmene.

Popsány a patentovány jsou v současné době preparáty různých selenizovaných kmenů jako krmných aditiv, zejména pro použití u zvířat. Ve většině případů se jedná o obohacení pouze
55 přidáním anorganického Se. V případě obohacení selenizovanými kmeny se jedná o směsné

preparáty různých BMK, kvasinek, octových bakterií a bifidobakterií, taky pro použití v krmných aditivech, např. směsná kultura *Enterococcus faecium* a *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. Nevýhodou těchto preparátů je to, že se jedná o směsi, a tudíž se nejedná o monokulturu, tj. jeden specifický kmen. Kromě obohacení selenem, uvedené kmeny, na rozdíl od selenizovaného kmene CCM 9190 nedisponují dalšími příznivými vlastnostmi (např. produkce nisinu, antiklostridiální působení, vhodné technologické a aromatvorné vlastnosti pro aplikaci jako startérové kultury apod.). Také nejsou dostatečně popsány funkční a probiotické vlastnosti těchto selenizovaných kmenů (např. zlepšení antioxidačních vlastností a dalších v důsledku obohacení selenem).

10

Podstata vynálezu

Výše uvedené nedostatky odstraňuje selenem-oboahcený kmen bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, který byl vyselektován ze souboru testovaných 18 kmenů na základě jeho příznivých vlastností za účelem selenizace. Kmen byl deponován v České sbírce mikroorganismů (CCM) v Brně, která má statut mezinárodního ukládacího místa pro patentové kultury ukládané podle Budapešťské smlouvy, pod číslem CCM 9190.

15

Kmen se vyznačuje: a) dobrou schopností vázat a akumulovat anorganický selen z růstového média, b) produkcí organických forem selenu, ve formě seleno-aminokyselin a Se-nanočástic, c) zlepšenými antioxidačními vlastnostmi vlivem selenizace, d) nízkou toxicitou a dobrou schopností prostupu přes buněčné membrány, a f) dobrou adhezí na tkáňový model lidských epiteálních buněk tlustého střeva *in vitro*.

20

25

Objasnění výkresů

Vynález bude blíže osvětlen pomocí výkresů, kde obr. 1 představuje postup přípravy selenizovaných kmenů. Obr. 2 představuje chromatogramy enzymatického extraktu kmene CCM 9190 rostoucího v médiu o koncentraci seleničitanu sodného 10 mg/l (A) a 50 mg/l (B). Jednotlivé sloučeniny jsou označeny zkratkami: selenan (SeVI), seleničitan (SeIV), selenocystin (SeCys2), methylselenocystin (MeSeCys), selenomethionin (SeMet) a neidentifikované sloučeniny (N1 až N6). Obr. 3 ukazuje suspenzi selenem obohacených buněk před lyofilizací. Koncentrace seleničitanu sodného v médiu 10 mg/l (A) a 50 mg/l (B). Obr. 4 ukazuje snímky provedeny pomocí transmisního elektronového mikroskopu (TEM) (1), distribuce velikostí nanočástic na základě TEM (2) a na základě sp-ICP-MS (3) pro kmen rostoucí v médiu o koncentraci seleničitanu sodného 10 mg/l (A) a 50 mg/l (B). Obr. 5 ukazuje koncentrace selenu ve formě seleničitanu, selenocystinu a neidentifikované sloučeniny N1 v odebraných vzorcích na apikální straně (čas 0 hod) a na bazolaterální straně (časy 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 h). Jak je patrné z grafů, dochází ke zvýšení propustnosti seleničitanu mezi 30 min s maximálním průchodem po 2 h po podání dárcovského roztoku, následně je vidět sestupná tendence koncentrace mezi 2 a 4 h po přidání dárcovského roztoku. U selenocysteinu je patrné, že z koncentrace v dárcovském roztoku se jen pomalu zvyšuje koncentrace selenocysteinu na basolaterální straně po průchodu přes buněčnou monovrstvu. A s postupujícím časem koncentrace lineárně roste. V testované trávěnině byl zaznamenán i neznámý vzorek selenu, kdy jeho vrchol koncentrace byl 1,5 h po přidání dárcovského roztoku, následně se koncentrace snižovala. Na obr. 6 je zobrazen vliv přídatku 0 až 100 mg/l seleničitanu sodného na růst kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM9190 v M17 bujonu při 30 °C. Graf na obr. 7 ukazuje srovnání cytotoxicity selenizovaného kmene CCM 9190 a seleničitanu sodného. Na obr. 8 jsou zobrazeny adhezní schopnosti selenizovaného kmene CCM 9190 po přídatku 10 a 30 mg/l seleničitanu sodného.

30

35

40

45

50

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1

5

V jednom provedení vynálezu je kmen ve formě biologicky čisté, lyofilizované kultury (obr. 1), jako monokultura kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM 9190).

Příklad 2

10

V jiném provedení vynálezu je kmen ve formě inaktivovaných buněk monokultury kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM 9190 v lyofilizované formě.

Příklad 3

15

V dalším provedení vynálezu je kmen obsažen v přípravku, který obsahuje i další probiotické kmeny, základní kultury, případně různá prebiotika, sušené mléko, vitamíny nebo minerální látky. Kmen může být součástí tablet, kapslí, prášku nebo potravin, jako jsou např. mléčné výrobky.

20 Příklad 4

Vynález poskytuje kmen ve formě živých nebo inaktivovaných buněk, jako prostředek pro doplnění selenu v případě jeho deficitu v dietě.

25 Pracovní postup:

a) identifikace a typizace kmene

30 *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM 9190 je deponován v České sbírce mikroorganismů (CCM) na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, na Ústavu experimentální biologie, Kamenice 5, 625 00 Brno.

35 Kmen je identifikován jako *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* pomocí API 50CHL (Biomérieux, Francie), identifikace potvrzena také druhově specifickou PCR; a 16S rRNA (anotovaná sekvence uložena v GenBank pod číslem OM475720). Mikroskopicky se jedná o drobné koky, ojedinele tvoří kratší řetězky koků a tvoří součást mikroflóry základních smetanových kultur.

b) příprava selenem-obohaceného kmene CCM 9190 (selenizace)

40 Lyofilizovaný kmen *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CCM 9190 se před selenizací nejprve obnoví v M17 bujonu při 30 °C a třikrát se přeočkuje. Poté se M17 bujon s přídavkem seleničitanu sodného inokuluje kmenem v exponenciální fázi růstu a kultivuje se po dobu 24 hodin, viz obr. 1. Selenizované buňky pro další analýzy se dvakrát promyjí sterilní deionizovanou vodou a separují se pomocí centrifugace po dobu 5 minut při zrychlení 4100 g. Následně je selenizovaný kmen
45 zlyofilizován a jsou stanoveny počty živých bakterií plotnovou metodou na M17 agaru při teplotě 30 °C po dobu 48 hodin. Také je stanoven obsah selenu i jednotlivých seleno-sloučenin a seleno-nanočástic.

50 c) Vliv různých koncentrací seleničitanu sodného na růst kmene *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* CCM 9190

Inhibiční vliv seleničitanu sodného na viabilitu testovaného kmene byl posuzován na základě spektrofotometrického měření změny absorbance při vlnové délce 620 nm během 24-hodinové kultivace při teplotě 30 °C v M17 bujonu s různými koncentracemi seleničitanu sodného (0, 5, 10,
55 30, 50 a 100 mg/l). Z výsledků je patrný minimální inhibiční efekt za přítomnosti seleničitanu

sodného na růst kmene *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM 9190, kdy došlo jen k mírnému posunu logaritmické fáze růstu a k nepatrnému snížení počtů mikroorganismů v závislosti na zvyšující se koncentraci seleničitanu sodného v médiu. Výsledky jsou graficky zpracovány na grafu na obr. 6.

5

d) Vliv selenu na antioxidační aktivitu kmene CCM 9190

Antioxidační aktivita selenizovaného a neselenizovaného kmene CCM 9190 byla stanovena pomocí metody DPPH, která je jednou ze základních metod pro posouzení antiradikálové aktivity. Je založena na reakci testovaného vzorku s DPPH (1,1-difenyl-2-(2,4,6-trinitrofenyl)hydrazyl). Změna absorbance byla stanovena spektrofotometricky při vlnové délce 517 nm. Při porovnání změny antioxidační aktivity selenizovaného ($42,4 \pm 9,9 \%$) a neselenizovaného ($24,8 \pm 8,6 \%$) kmene CCM 9190 bylo zjištěno statisticky významné ($P < 0,05$) zvýšení antioxidační aktivity u kmene po selenizaci.

15

e) akumulace selenu a distribuce seleno-sloučenin v selenem-obohacených bakteriálních buňkách kmene CCM 9190

Celkové množství selenu v lyofilizované kultuře bylo stanoveno metodou hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) po rozkladu vzorku koncentrovanou HNO_3 v mikrovlnném mineralizátoru. Obsah jednotlivých sloučenin selenu pak byl stanoven spojením kapalinové chromatografie s ICP-MS po extrakci proteázou XXIII v Tris-HCl pufru ($\text{pH} = 7,5$) po dobu 24 h při 37°C (podrobný postup viz Kantorová a kol., 2022). Selen byl v obou případech měřen na linii $m/z = 80$ a jako vnitřní standard byl použit tellur měřený na linii $m/z = 128$. Charakterizován byl kmen, který byl kultivován aerobně 24 h při 37°C v mediu se seleničitanem sodným o koncentracích 10 a 50 mg/l.

25

Celkový obsah selenu byl u kmene CCM 9190 selenizovaného v médiu s obsahem 50 mg/l seleničitanu významně vyšší (43 ± 15 mg/g) než v médiu s obsahem 10 mg/l seleničitanu ($3,85 \pm 0,69$ mg/g). V extraktech byl identifikován selen ve formě seleničitanu, selenanu, selenocystinu, methylselenocysteinu a selenomethioninu. Další šest nalezených sloučenin nebylo identifikováno. Relativní zastoupení jednotlivých sloučenin selenu vzhledem k celkovému obsahu selenu v extraktu se však mezi kmeny selenizovanými v médiích s obsahem selenu 10 a 50 mg/l seleničitanu významně neliší viz, tab.1 a obr. 2A a 2B.

35

Tab. 1: Chromatogram, celkový obsah selenu, Se-sloučeniny

Celkový obsah selenu, obsah jednotlivých sloučeniny selenu a extrakční účinnost. Hodnoty jsou uváděny jako průměr doplněný rozšířenou nejistotou za symbolem \pm nebo směrodatnou odchylkou uvedenou v závorce. Hodnoty jsou vztaženy na lyofilizovaný vzorek. Indexem „N“ jsou označeny sloučeniny, jejichž struktura nebyla zatím objasněna.

40

Koncentrace seleničitanu v médiu	10 mg/l	50 mg/l
Celkový obsah Se	$3,85 \pm 0,69$ mg/g	43 ± 15 mg/g
Obsah Se ve formě selenanu	0,984 (0,039) $\mu\text{g/g}$	4,0 (1,7) $\mu\text{g/g}$
Obsah Se ve formě seleničitanu	8,42 (0,88) $\mu\text{g/g}$	3,27 (0,17) $\mu\text{g/g}$
Obsah Se ve formě selenocystinu	92,1 (5,5) $\mu\text{g/g}$	36,2 (3,4) $\mu\text{g/g}$
Obsah Se ve formě sloučeniny N1	54,6 (5,3) $\mu\text{g/g}$	37,5 (5,2) $\mu\text{g/g}$
Obsah Se ve formě methylselenocysteinu	5,45 (0,29) $\mu\text{g/g}$	3,10 (0,19) $\mu\text{g/g}$
Obsah Se ve formě sloučeniny N2	2,79 (0,41) $\mu\text{g/g}$	1,15 (0,12) $\mu\text{g/g}$
Obsah Se ve formě sloučeniny N3	8,63 (0,20) $\mu\text{g/g}$	10,7 (1,5) $\mu\text{g/g}$
Obsah Se ve formě sloučeniny N4	1,86 (0,44) $\mu\text{g/g}$	1,45 (0,89) $\mu\text{g/g}$
Obsah Se ve formě sloučeniny N5	4,2 (1,2) $\mu\text{g/g}$	2,1 (2,9) $\mu\text{g/g}$
Obsah Se ve formě selenomethioninu	6,54 (0,91) $\mu\text{g/g}$	4,72 (0,46) $\mu\text{g/g}$

Obsah Se ve formě sloučeniny N6	1,26 (0,10) µg/g	1,41 (0,22) µg/g
Celkový obsah Se v extraktu	356 ± 55 µg/g	202 ± 41 µg/g
Extrakční účinnost *	9,2 ± 1,1 %	0,47 ± 0,09 %

* nízká extrakční účinnost je dána přítomností nanočástic selenu, které jsou z extraktu před speciální analýzou odfiltrovány.

f) produkce nanočástic selenu kmenem CCM 9190 a jejich charakterizace

5

Nanočástice selenu byly 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 byly připravovány tak, že bylo naváženo 0,005 g lyofilizovaného do polyethylenové zkumavky, bylo přidáno 5 ml 1 % (v/v) methanol a vzorek byl sonikován v ultrazvukové lázni po dobu 20 min. Poté byl vzorek zředěn 250× 1 % (v/v) metanolem a ihned analyzován. V případě měření TEM byl vzorek dispergován a ředěn stejným způsobem, avšak pouze v demineralizované vodě. Vzorek byl pak nanesen na měděnou mřížku (velikost 300 mesh), vysušen a analyzován. Pro charakterizaci byl použit kmen, který byl kultivován aerobně 24 h při 37 °C v mediu se seleničitanem sodným o koncentracích 10 a 50 mg/l.

15

Nanočástice selenu pozorované u kmene CCM 9190 byly produkovány extracelulárně. Podíl selenu ve formě nanočástic na celkovém obsahu selenu byl u kmene CCM 9190 selenizovaného v mediu s obsahem 50 mg/l seleničitanu významně vyšší (68±14 %) než v mediu s obsahem 10 mg/l seleničitanu (36±5 %). To je dáno jak produkcí většího počtu nanočástic (6,5±2,6) × 10¹¹ g⁻¹ v mediu s obsahem 50 mg/l seleničitanu a 2,31±0,54) × 10¹¹ g⁻¹ v mediu s obsahem 10 mg/l seleničitanu, tak produkcí částic o větším průměru (171±60 nm v mediu s obsahem 50 mg/l seleničitanu a 98±34 nm v mediu s obsahem 10 mg/l seleničitanu, viz obr. 3 a 4. Vyšší obsah nanočástic selenu se projevuje také výraznějším červeným zbarvením suspenze buněk.

25

Tab. 2: Velikosti a číselné koncentrace nanočástic a jejich zastoupení ve vzorku.

koncentrace seleničitanu sodného v mediu (mg/l)	průměr nanočástic na základě TEM (nm)	průměr nanočástic na základě sp-ICP-MS (nm)	číselná koncentrace nanočástic na základě sp-ICP-MS (g ⁻¹)	celkový obsah selenu ve formě nanočástic (mg/g)	podíl obsahu selenu ve formě nanočástic na celkovém obsahu selenu (%)
10	99 ± 18	98 ± 34	(2,31 ± 0,54) × 10 ¹¹	1,39 ± 0,29	36 ± 5
50	167 ± 19	171 ± 60	(6,5 ± 2,6) × 10 ¹¹	29,2 ± 5,9	68 ± 14

Hodnoty jsou uváděny jako průměr ± rozšířená nejistota. Hodnoty jsou vztaženy na lyofilizovaný vzorek. Průměrná velikost nanočástic je uváděna jako maximum normálního rozdělení (pro TEM) a logaritmicke-normálního rozdělení (pro sp-ICP-MS) proloženého histogramem naměřených velikostí.

30

g) simulace průchodu selenem-obohaceného kmene CCM 9190 trávicím traktem v *in vitro* podmínkách

35

Trávení proběhlo podle standardizovaného *in vitro* statického modelu trávení INFOGEST, rozděleného na orální, žaludeční a intestinální fázi. V orální části bylo naváženo 5 g lyofilizovaného vzorku a následně přidáno 5 ml simulované slinné šťávy (chlorid vápenatý 1,5mM, slinná amyláza 75 jednotek/ml). Po 2-minutové inkubaci byla přidána žaludeční šťáva (pepsin 2 000 jednotek, gastrická lipáza jednotek/ml, chlorid vápenatý s výslednou koncentrací 0,15 mmol/l) a bylo sníženo pH na 3,0. Vzorek byl 2 hodiny inkubován ve vodní lázni při 37 °C s pravidelným promícháním vzorku. Po dvou hodinách byla přidána simulovaná střevní šťáva

40

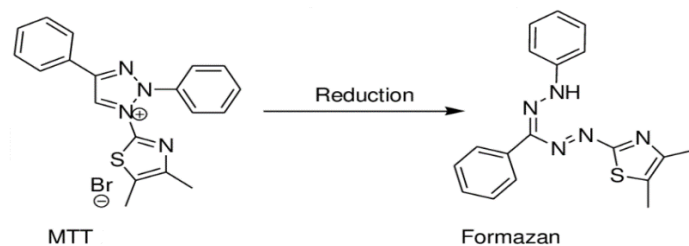
(chlorid vápenatý 0,6 mmol/l, žluč 10 mmol/l, pankreatin 100 jednotek/ml) a upraveno pH na 7,0 s následnou 2hodinovou inkubací při 37 °C s průběžným mícháním vzorku. Po ukončení testu byl trávicí proces ukončen zamražením vzorku na -80 °C (Brodkorb et al. 2019), vzorky byly zamrazeny až do dalšího testování.

5

h) stanovení cytotoxicity selenem-obohaceného kmene CCM 9190 v *in vitro* podmínkách za použití tkáňového modelu

Buněčné linie HT29 a Caco-2 byly kultivovány pomocí modifikované metody dle Mosmann (1983). Ke stanovení cytotoxicity bylo využito žluté rozpustné tetrazolové soli 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-difenyl tetrazol bromid (MTT). MTT vytváří v mitochondriích živých buněk rozpustné fialové krystaly hvězdicovitého tvaru nazývané formazan, který je následně rozpuštěn prostřednictvím dimethylsulfoxidu a spektrofotometricky měřen při vlnové délce 555 nm na přístroji Tecan Infinite M Nano+ (Tecan, Austria). Naměřená absorbance je lineárně

15



Pro testování cytotoxicity byl použit kmen, který byl kultivován aerobně 24 h při 37 °C v médiu se seleničitanem sodným o koncentracích 0, 5, 10 a 30 mg/l. Následně byl kmen centrifugován při 2000 RPM 10 min a 3× promyt 5 ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS). Dále byl kmen o všech koncentracích dle potřeby naředěn na stejnou optickou denzitu a zlyzovány v lázni při 80 °C 20 min. Po následném zchlazení byl kmen ještě jednou centrifugován, bylo odstraněno PBS a nahrazeno stejným množstvím média Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (EMEM) (Sigma – Aldrich CZ) s přísadkou 10 % Fetal Bovine Serum (Sigma – Aldrich CZ), 1 % hydrogenuhličitanu sodného (Sigma – Aldrich CZ), 1 % pyrvátu sodného (Sigma – Aldrich CZ), 1 % neesenciálních aminokyselin (Sigma – Aldrich CZ). Takto připravený kmen byl pipetován po jednotlivých koncentracích seleničitanu na 96 – jamkovou destičku s buněčnými liniemi Caco-2 a HT29 v poměru 9:1. Jako kontrola bylo použito obohacené medium DMEM bez přidaného kmene. Destička byla kultivována 72 h při 37 °C a 5 % CO₂.

Zvolené koncentrace 0, 5 a 10 mg/l seleničitanu sodného nevykazovaly žádné toxické účinky na testovaných buněčných liniích, koncentrace 30 mg/l seleničitanu sodného již vykazovala toxické účinky na testovaných buněčných liniích patrné. Z dostupných údajů lze říct, že přídavek selenem-obohaceného kmene až o koncentraci 10 mg/L může být považován za bezpečný. Výsledky jsou znázorněny v grafu na obr. 7.

ch) stanovení prostupu seleno-sloučenin vytvořených kmenem CCM 9190 přes slizniční membrány *in vitro*

40

Propustnost přes buňky střevního epithelu byla stanovena na buněčné linii Caco-2. Caco-2 je buněčná linie, která se získává z lidského kolorektálního adenokarcinomu. Ačkoli se jedná o buňky rakovinného původu, velmi se podobají lidským intestinálním enterocytům a hodnoty permeability získané pomocí Caco-2 modelu korelují s absorpcí účinné látky v lidském organismu. Inerty před vlastním vyšetím buněk byly na apikální straně navlhčeny kompletním DMEM médiem a po 2 minutách bylo přidáno medium s koncentrací buněk $0,6 \times 10^6$ buněk/ml. Následně bylo přidáno medium na bazolaterální stranu. Po 6 hodinách došlo k výměně media na obou stranách pro

45

odstranění neadherovných buněk. Insety byly kultivovány 21 dnů, aby došlo ke vzniku z morfoloického a fyziologického hlediska plně vyvinuté konfluentní buněčné monovrstvy. První dva týdny probíhalo krmení každý druhý den, kdy bylo kompletní DMEM medium měněno na apikální i bazolaterální straně. Poslední týden byly insety s buněčnou vrstvou krmeny každý den, kdy bylo medium měněno na apikální i bazolaterální straně. Poslední výměna media před vlastním pokusem byla provedena nejpozději 16 hodin před samotným experimentem.

V den pokusu byly insety přeneseny do nové destičky a 3× promyty pomocí HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) s pH 7,4. Následně bylo na apikální a bazolaterální stranu přidáno 500 ml čerstvého HBSS a byla změřena hodnota transepiteliální elektrické rezistence (TEER). Následně byla přidána Luciferová žluť o koncentraci 25 $\mu\text{mol/l}$ a destička byla inkubována na orbitální třepačce umístěné v inkubátoru po dobu 1 hodiny při 150 rpm. Z bazolaterální strany byl odebrán vzorek, který byl následně změřen při vlnové délce 480 nm/530 nm. Insety, ve kterých byla integrita více než 95 %, byly zařazeny do testu.

Před vlastním testem byly insety opět 3× promyty HBSS. Následně byl připraven dárcovský roztok s testovaným vzorkem, kdy bylo smícháno 400 μl HBSS a 100 μl tráveniny s testovaným vzorkem. 500 μl takto připraveného vzorku bylo přidáno na apikální stranu. Na bazolaterální stranu bylo přidáno 500 μl čistého HBSS. Z apikální strany bylo ihned odebráno 50 μl vzorku jako čas 0 h. Následně byla destička inkubována při 37 °C na orbitální třepačce umístěné v inkubátoru při 150 rpm. V časech 0,5; 1; 1,5; 2; 3; 4 h bylo odebráno z bazolaterální strany vždy 250 μl vzorku, který byl okamžitě zamražen. Odebraný objem byl vždy nahrazen 250 μl čistého HBSS. Po ukončení pokusu byl odebrán i zbytek z apikální strany a vzorky zamrazeny. Insety byly následně 3× promyty HBSS a poté sklizeny pomocí metanolu a také zamrazeny. Všechny takto připravené vzorky byly skladovány při -80 °C až do stanovení obsahu jednotlivých sloučenin selenu spojením kapalinové chromatografie s ICP-MS. Vzorek byl analyzován přímo bez jakékoliv další úpravy. Selen byl v obou případech měřen na linii $m/z = 80$ a jako vnitřní standard byl použit tellur měřený na linii $m/z = 128$. Popis k testování permeability je uveden při popisu obr. 5, v kapitole „Objasnění výkresů“.

i) adheze selenizovaného kmene CCM 9091 na tkáňový model lidských epiteliálních buněk tlustého střeva *in vitro*

Ke stanovení adherence selenem-obohaceného kmene CCM 9190 byly použity buněčné linie lidského střevního adenokarcinomu Caco2 a HT-29 v poměru 9 : 1 a koncentraci 4×10^4 , které byly kultivovány na 24 – jamkových destičkách po dobu 14 dní při 37 °C a 5 % koncentrací CO₂. Po odsátí a promytí buněčných linií byly na destičku pipetovány bakteriální suspenze o koncentraci 10⁷, které byly připraveny z čerstvě narostlých bakteriálních kmenů kultivovaných za přítomnosti 10 a 30 mg/l seleničitanu sodného, jako kontrola byl použit bakteriální kmen kultivovaný v mediu bez přítomnosti seleničitanu sodného. Buněčné linie s bakteriální suspenzí byly kultivovány 90 min v inkubátoru při 37 °C a 5 % koncentrací CO₂. Pro stanovení adherence bylo použito desítkové ředění a následně byla použita plotnová metoda.

Na základě analýz je možné konstatovat, že obohacení kmene CCM 9091 selenem (přídavkem seleničitanu sodného do kultivačního média o koncentraci 10 a 30 mg/l), má za následek zvýšení jeho adhezni schopnosti. Výsledky adheze jsou graficky znázorněny na obr.8.

Průmyslová využitelnost

Selenem obohacený kmen *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM 9190 je využitelný pro prevenci a/nebo ošetření stavů způsobených nutričním deficitem selenu v dietě. Využitelný je samotný kmen v lyofilizované formě se zachováním dostatečného množství životaschopných buněk, jako i kmen inaktivovaný (postbiotikum). Další aplikační formou je prostředek obsahující selenizovaný kmen

CCM 9190, který může obsahovat i další probiotické kmeny, základní kultury, případně prebiotika, sušené mléko, vitamíny nebo minerální látky.

5 Literatura:

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

- 10 Havlíková, Š., Marková, J., Dráb, V., Kavková, M. (2017): The anti-clostridial effect of lactococci adjunct cultures in Dutch type of low scalded cheese: from selection to application. Microbial Spoilers in Foods, pp 73.

- 15 Havlíková, Š., Kvasničková, E., Kavková, M., Němečková, I. (2018): The anticlostridial effect of lactococcal and enterococcal adjunct starters in Dutch-type low-scalded cheese. International Journal of Dairy Technology, 71, 107-119.

- 20 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.

- 25 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*. Dig. Dis. Sci., 54, 246-254.

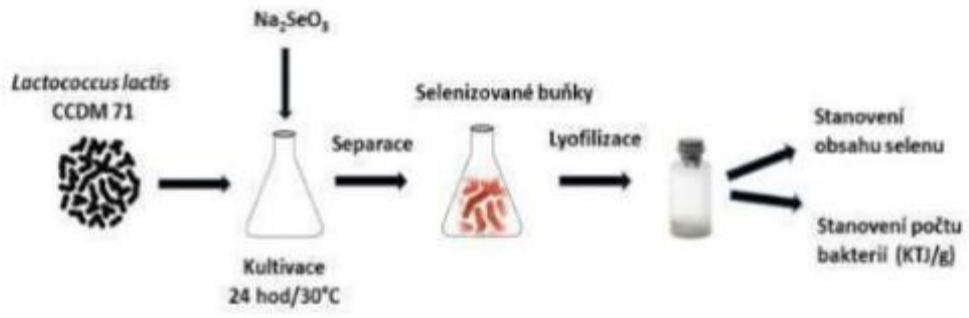
- 30 Yi, H.W., Zhu, X.X., Huang, X.L., Lai, Y.Z., Tang, Y. (2020): Selenium-enriched *Bifidobacterium longum* protected alcohol and high fat diet induced hepatic injury in mice. Chin. J. Nat. Med., 18, 169-177.

PATENTOVÉ NÁROKY

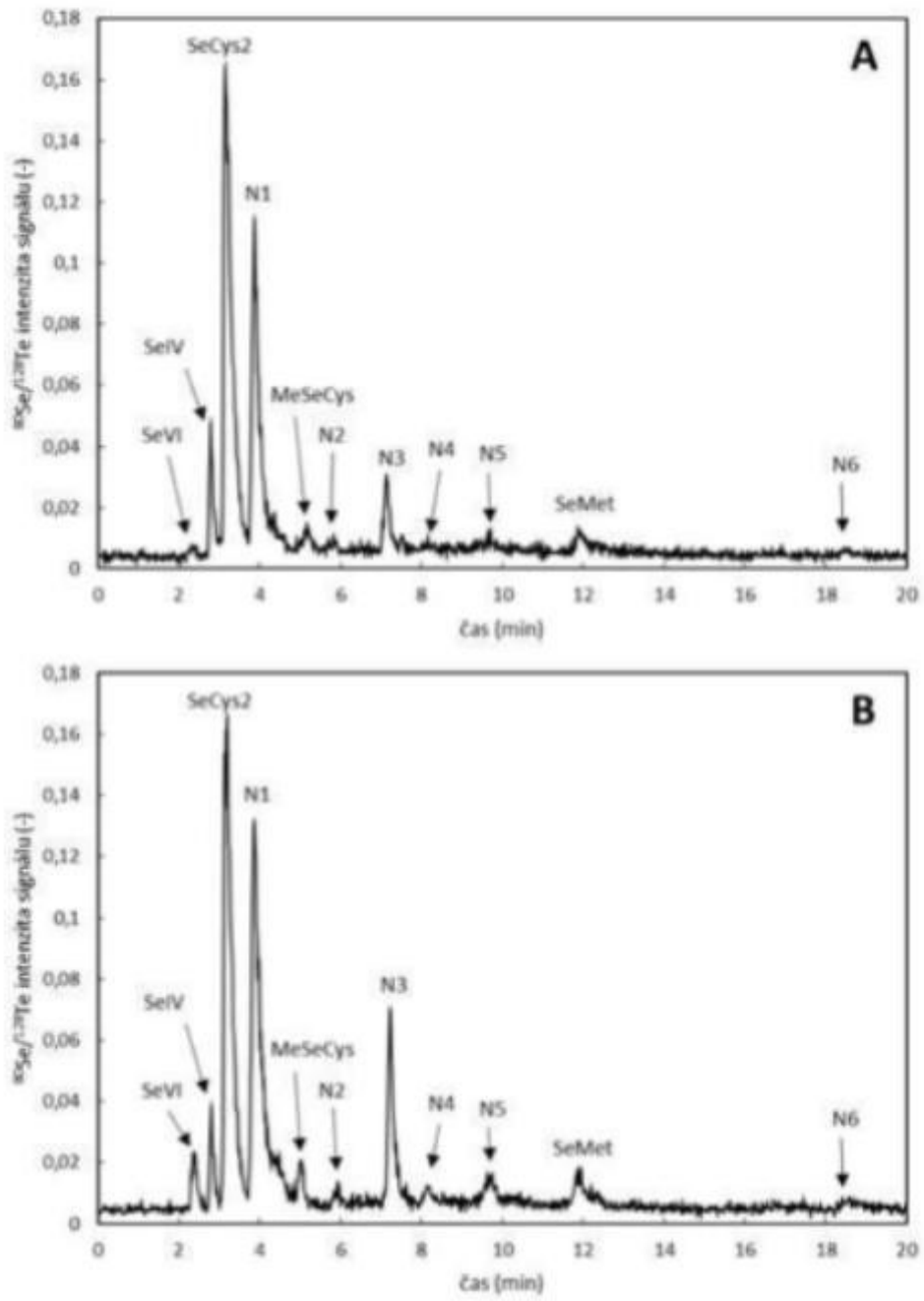
- 5 1. Selenizovaný kmen bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM 9190 pro řešení nutričního deficitu selenu v dietě, který je deponován v České sbírce mikroorganismů, CCM, na Přírodovědecké fakultě Masarykovy univerzity, na Ústavu experimentální biologie, Kamenice 5, 625 00 Brno.
2. Selenizovaný kmen bakterie *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* CCM 9190, podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že obsahuje organicky vázaný selen, nebo selen v jeho elementární formě nanočástic.
- 10 3. Přípravek pro prevenci a/nebo ošetření stavů způsobených nutričním deficitem selenu v dietě, **vyznačující se tím**, že obsahuje selenizovaný kmen bakterie podle nároku 2.
4. Přípravek podle nároku 3, **vyznačující se tím**, že dále obsahuje další probiotické kmeny, základní kultury, případně prebiotika, sušené mléko, vitamíny nebo minerální látky.

15

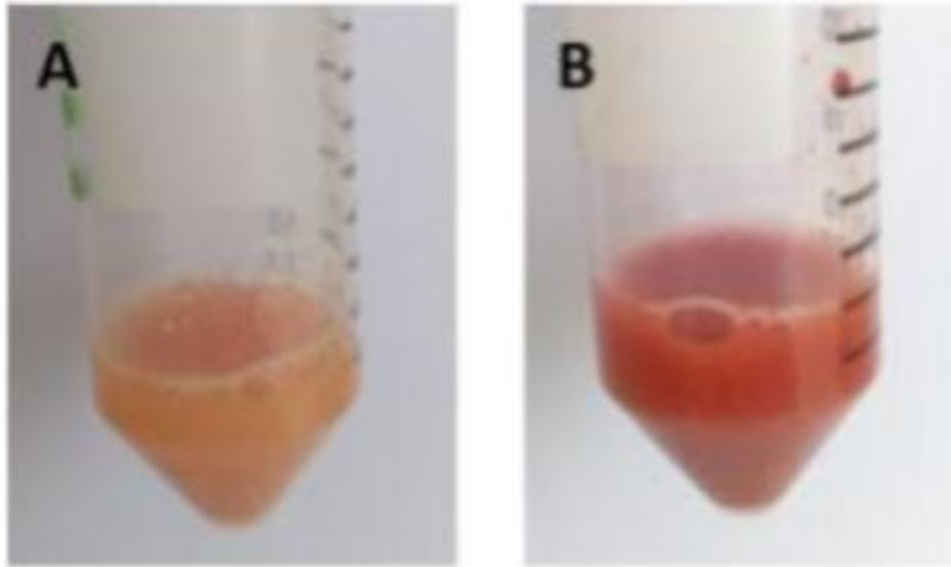
6 výkresů



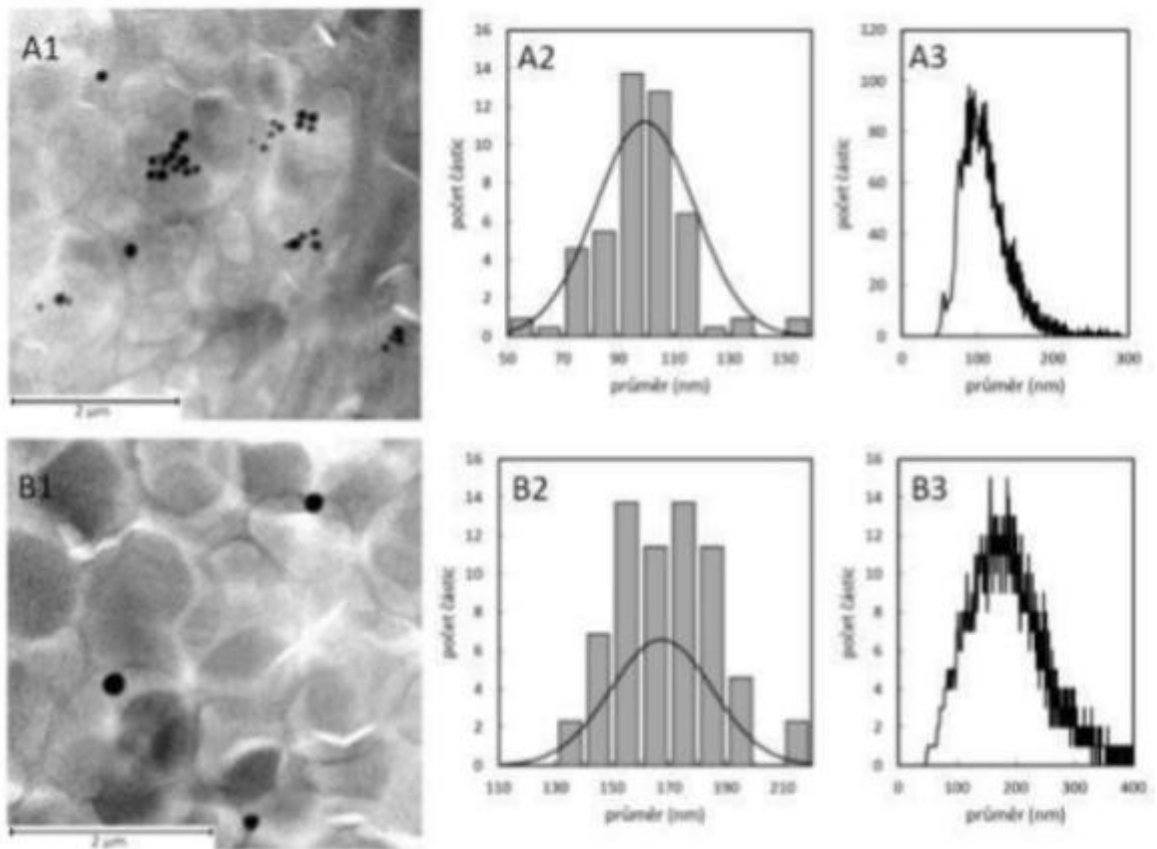
Obr. 1



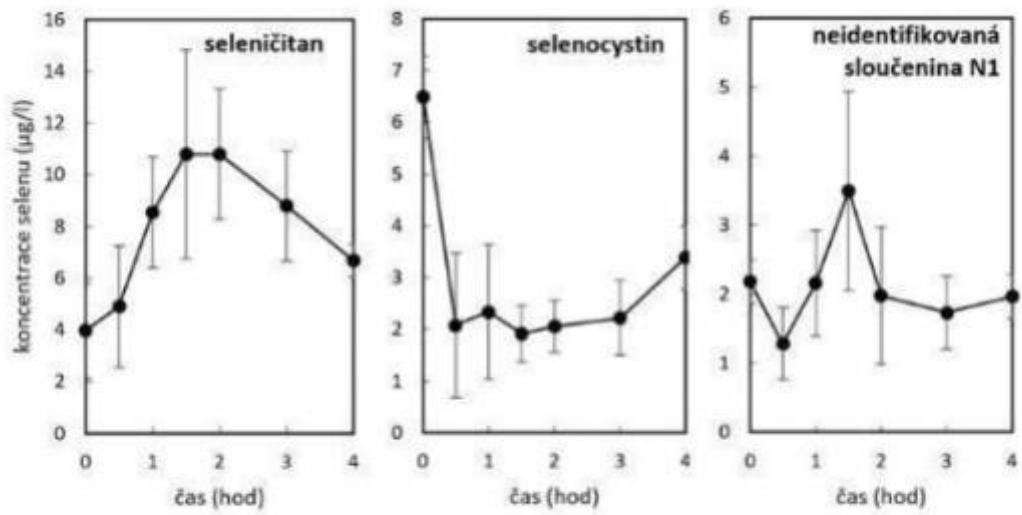
Obr. 2



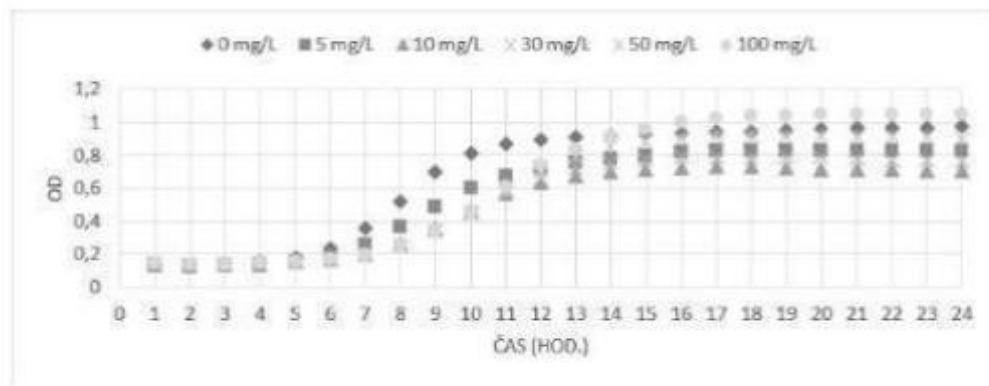
Obr. 3



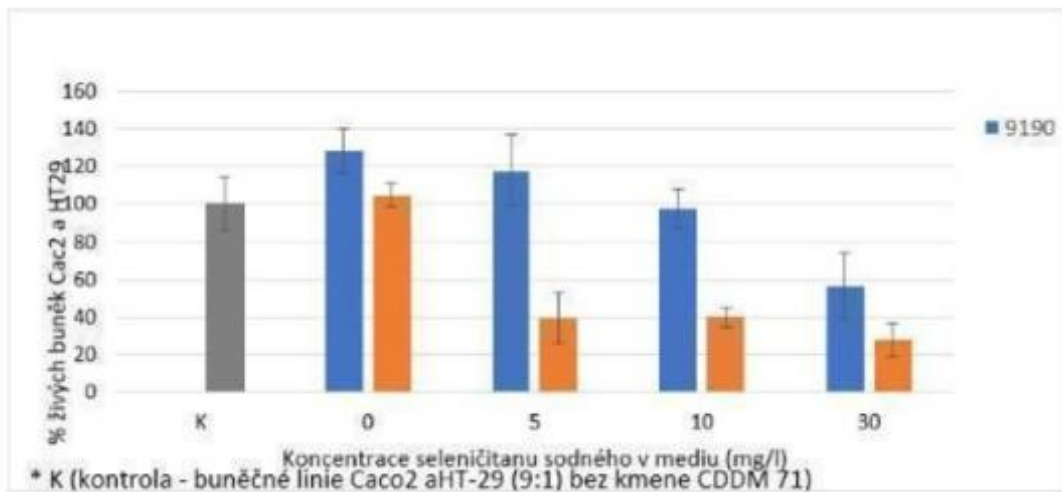
Obr. 4



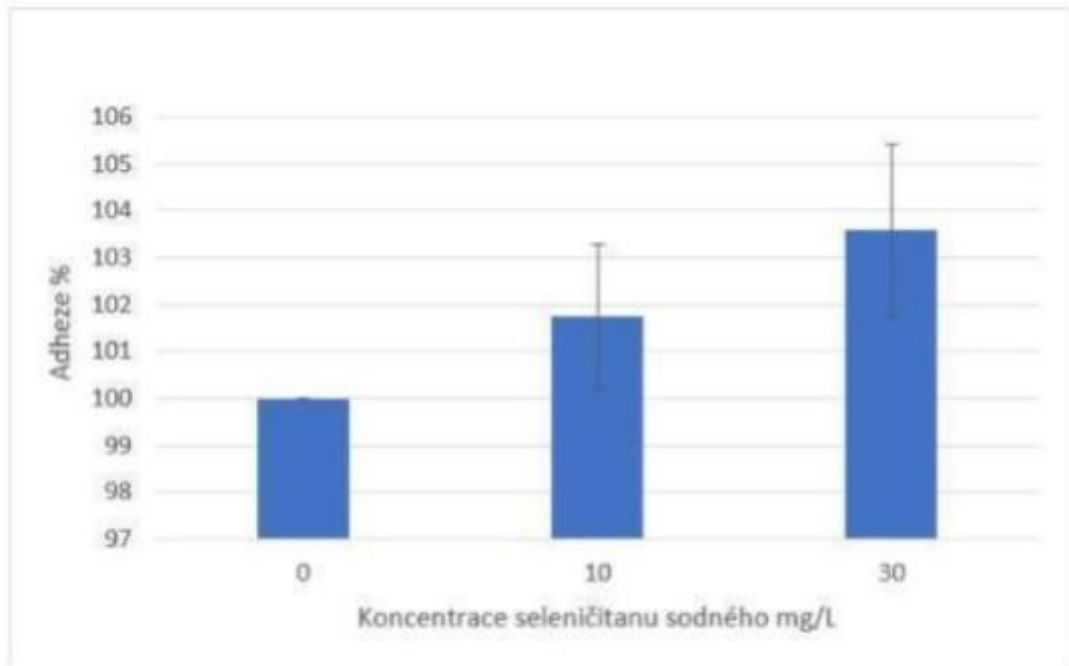
Obr. 5



Obr. 6



Obr. 7



Obr. 8