

Fermentációs technológiával előállított vörös elemi szelén nanogömbök alkalmazása és vizsgálata egereken végzett kísérletben

Prokisch József – Babka Beáta – Eszenyi Péter – Sztrik Attila – Takács Tímea

Debreceni Egyetem Agrár- és Gazdálkodástudományok Centruma, Mezőgazdaság-, Élelmiszertudományi és Környezetgazdálkodási Kar, Bio- és Környezetenergetikai Intézet, Debrecen
jprokisch@agr.unideb.hu

ÖSSZEFOGLALÁS

Egereken végzett kísérleteink során fermentációs úton előállított szelénformák, NanoSel és LactoMicroSel[®], toxicitását szeretnénk volna összehasonlítani más szerves és szervetlen szelénformákkal. A NanoSel és Lactomicrosel[®] termékeket tejsavbaktériumok segítségével állítottuk elő saját laboratóriumunkban (Prokisch et al., 2010; Eszenyi et al., 2011). A szervetlen szelénformákat: szelenit; szelenát, a szerves formát: Sel-Plex[®] és az általunk gyártott Nano-Se és Lactomicrosel[®] termékeket laboratóriumi egerek standard tápjába kevertük, majd ezt etettük az egerekkel két héten keresztül. Az egerek exterminálását követően figyeltük a túlélési arányt, vizsgáltuk az egerek testsúly változását, illetve mértük a vér antioxidáns szintjét FRAP módszerrel.

Kulcsszavak: szelén, toxicitás, egér kísérlet, LactoMicroSel[®]

SUMMARY

In our experiments we tested the toxicity of Nano-Se and LactoMicroSel[®] compared with other organic and inorganic selenium forms, in case of a subacute animal test. We produced the Nano-Se and LactoMicroSel[®] by probiotic lactic acid bacteria in our laboratory. (Prokisch et al., 2010; Eszenyi et al., 2011). We mixed the inorganic selenium forms, selenite and selenate, the organic form, Sel-Plex[®] and our products, Nano-Se and LactoMicroSel[®] into the standard food of laboratory mice and we fed them for two consecutive weeks. After the extermination we observed mortality, the change of body mass, and measured the blood antioxidant capacity with FRAP method.

Keywords: selenite, toxicity, animal test, LactoMicroSel[®]

IRODALMI ÁTTEKINTÉS

A szelén egy esszenciális mikroelem minden emlős számára (Rayman, 2000), ugyanakkor a különböző szelénformák eltérő toxikussága is ismert, illetve nagy koncentrációknál kimutatták karcinogén anyagok által előidézett rákos megbetegedések elleni pozitív és tumor növekedés gátló hatását is (Ip, 1998). A legtöbb ilyen jellegű kísérletben 2–4 mg/kg szelént adtak egerek és patkányok takarmányához, illetve ivóvizéhez, mely koncentráció már megközelíti a szub-krónikus szelén szintet. De az elfogyasztott szelén toxikussága nem csak a koncentráción, hanem a választott szelénformán is múlik. A régóta elfogadott dogma az, hogy az elemi szelén (Se₀) vízben nem oldódik, biológiailag semleges állapotban van, illetve, hogy a 300 nm méret határnál nagyobb, baktériumok által előállított vörös és szürke elemi szelén gömbök kevésbé felvehetőek az

élőlények számára (Combs et al., 1996; Oremland et al., 2004). De Zhang et al. (2001) azt találták, hogy a 20–60 nm közötti vörös elemi szelén (Nano-Se) a szelenithez hasonlóan jól vehető fel az élőlények számára, melyet Se-hiányos patkányokban és sejtenyészetekben vizsgáltak szeleno-enzimek indukálásával. Továbbá nem volt mérhető különbség a 5–200 nm szelengömbök szeleno-enzimek szabályozásában sem sejtenyészetekben, sem egér máj vizsgálatoknál (Zhang et al., 2004). A szelenitet széles körben vizsgálták már más szelénformákkal összehasonlítva, toxicitás, felvehetőség és rákmegelőző hatás tekintetében. Egereken végzett kísérletek alapján vörös színű Nano-Se kisebb akut toxicitással bír, de hasonló biológiai felvehetőséggel a szelenithez képest, amit az LD₅₀ érték is jól szemléltet. Nano-Se: 113,0 mg/kg, Szelenit: 15,7 mg/kg (Zhang et al., 2001). Az olyan szerves szelénformák, mint például a szelenometionin toxikusabbnak bizonyultak hosszabb idejű kísérletekben (Spallholz és Hoffman, 2002), illetve gyengébb rákellenes hatást is mutattak (Finley és Davis, 2001)

A szelén toxicitást kiterjedten vizsgálták már állatokban, melyekből kiderül, hogy a növekedés visszamaradása az egyik fő állapotjelzője a szelénmérgezésnek állatokban. Hiszen a szelén retardációt okoz a növekedési hormon szintjének csökkentésével és a szomatomedin c termelésével (Thorlacius-Ussing et al., 1987). A U.S. National Research Council 1976-ban megállapította, hogy a növekedés gátlás a legjobb indikátora a szelén toxikus hatásának. A szelén mérgezés jól kimutatható a máj hisztológiájának, méretének és enzimeinek vizsgálatával is, mivel a májban a legtöbb esetben nekrozist indukál (Orskov és Flyvbjerg, 2000). Még nem publikált eredményink alapján is elmondható, hogy a szervek közül a májban akkumulálódik a legjobban a szelén, kémiai formától függetlenül.

Kísérleteink során (Prokisch et al., 2010; Eszenyi et al., 2011) arra a felismerésre jutottunk, hogy a tejsavbaktériumok (*Lactobacillus bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*) az 1 mg/liternél nagyobb koncentrációban szelént szelenitként tartalmazó tápközegben a szelenitet elemi szelénre redukálják és a sejten belül tárolják. Tápleves helyett tápoldatként akár tej is alkalmazható.

Az így létrehozott elemi szelén gömb alakú, méretét és kristályformáját pedig a baktériumfaj határozza meg. A folyamathoz nincs szükség levegő kizárására, sem levegő bevezetésére. A nanoméretű (50–500 nm) és gömb formájú szemcsék mérete és kristályformája a választott mikroorganizmusra jellemző és az által meghatározott.

A technológia egyszerűsége, gyorsasága és az alkalmazott törzsek veszélytelensége jelentős előrelépést jelent a szelén nanogolyók előállításában és biztató a szelénpótlást jövőjét illetően. Más technológiával, kémiai reakciók eredményeként előállított elemi szelén nanorészecskék alakjának és méretének egyneműsége, minősége nem közelíti meg a tejsavbaktériumokat alkalmazó fermentációs technológiával előállított anyag jellemzőit. További felhasználás szerint két terméket különböztetünk meg, a tisztított NanoSel-t és szelénel dúsított joghurt port (1. ábra), a LactoMicroSel®-t.

1. ábra: LactoMicroSel® – szelénel dúsított joghurt por

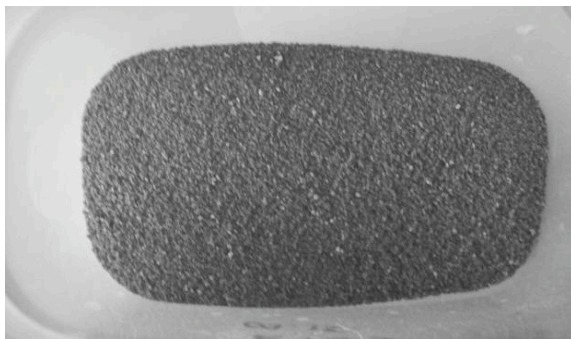


Figure 1: LactoMicroSel® – selenium enriched yoghurt powder

ANYAG ÉS MÓDSZER

Az állatkísérletben minden szelénformára 3 koncentrációsintet állítottunk be, 0,5–5,0–50 mg/kg koncentrációban tartalmazott szelént az elkészített egértáp. A tápot 2 héten keresztül folyamatosan etették az egekkel. Az alap egértáp kukorica alapú volt, így jól modellezte az extrudált kukorica termékeinket. A kontroll és a 3 koncentrációsint az 5 szelénformával összesen 16 kísérleti beállítást jelentett. Kísérleti beállításban minden kezelési csoport 6 egérből állt, így összesen 96 egérré volt szükség.

EREDMÉNYEK

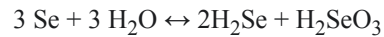
Az elsődleges paraméter az állatok elhullási adata volt (1. táblázat).

A legnagyobb alkalmazott szeléndózis szerves szelénsóknál már nagyon mérgező volt, a 6-ból 4, illetve 5 egér elpusztult. A Lactomicrosel esetén toxicitás tüneteket egyáltalán nem mutattak az egerek. A tömegcsökkenés (2. ábra) is jó jelzés a toxicitás mértékének értékeléséhez. A tömegcsökkenés adatai az alábbiak.

Jól látható, hogy a lactoMicroSel még a legnagyobb dózisban sem okozott jelentős tömegcsökkenést a kísérleti állatoknál, ez azt jelzi, hogy a legkevésbé toxikus forma. A felszívódás értékeléséhez a szerves szeléntartalma mellett egyszerűen mérhető paraméter a vérplazma antioxidáns szintje. Valamennyi szelénforma növeli a vérszérum antioxidáns aktivitását (3. ábra). Kis koncentrációban leginkább a Lactomicrosel és a Nanosel növelte a vérplazma FRAP módszerrel meghatározott antioxidáns szintjét.

A legnagyobb dózisú kezeléseknél viszont kevesebb szívódott fel belőle, mint a szerves szelénből. Ez magyarázza az alacsonyabb toxicitását is (4. ábra). A

jelenség megértéséhez kidolgoztunk egy modellt. Ez alapján feltesszük, hogy az elemi szelén nano méretű vörös módosulata a biológia rendszerekben az alábbi egyensúlyi kémia folyamattal jellemezhetően kerül a szervezetbe:



A keletkező hidrogén-szelenid koncentrációja állandó és nagyon alacsony érték. Ez az egyensúlyi folyamat biztosítja, hogy a szervezet egy nagyon jól felvevődő szelénformát nagyon alacsony koncentrációban folyamatosan elérjen. Az egyensúlyi folyamat szabályozó hatásának eredményeként ez a szelén soha nem lesz túl sok a szervezetnek, de a folyamat azt is biztosítja, hogy ugyanakkor legyen felvehető. A mechanizmus igazolására folyamatosan végzünk kísérleteket.

1. táblázat

A kísérleti állatok elhullási aránya

Szelénforma(1)	Se koncentráció a takarmányban (mg/kg)(2)	Elhullás (db)(3)	Elhullás (%) (4)
0	0	0	0
Se(VI)	0,5	0	0
Se(VI)	5,0	0	0
Se(VI)	50	5	83
Se(IV)	0,5	0	0
Se(IV)	5,0	0	0
Se(IV)	50	4	66
Se-met	0,5	0	0
Se-met	5,0	0	0
Se-met	50	0	0
NanoSe	0,5	0	0
NanoSe	5,0	0	0
NanoSe	50	0	0
LactoMicroSel	0,5	0	0
LactoMicroSel	5,0	0	0
LactoMicroSel	50	0	0

Table 1: Mortality during the test

Selenium form(1), Selenium concentration in the forage(2), Mortality (piece)(3), Mortality (%) (4)

2. ábra: Az egerek testtömegének csökkenése a kontrollhoz képest

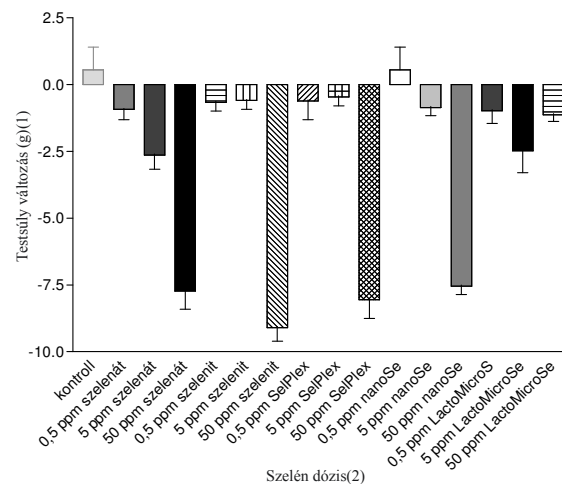


Figure 2: Mouse body mass change(g) compared to control Body weight change (g)(1), Selenium dose(2)

3. ábra: Vérszérumszintek alacsony szelén koncentrációjánál

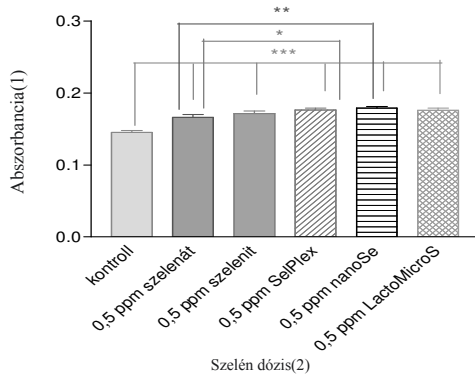


Figure 3: Blood serum antioxidant levels at low selenium concentration

Absorbance(1), Selenium dose(2)

4. ábra: Vérszérumszintek magas szelén koncentrációjánál

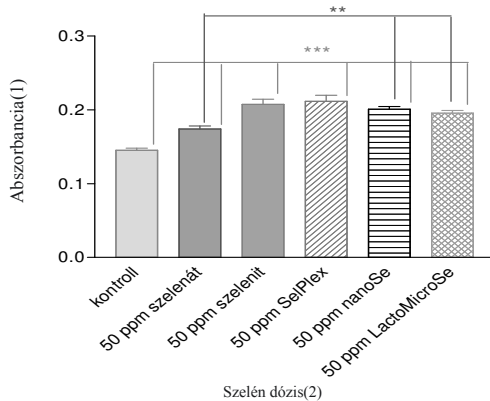


Figure 4: Blood serum antioxidant levels at high selenium concentration

Absorbance(1), Selenium dose(2)

KÖVETKEZTETÉSEK

Az állatkísérletekkel egyértelműen igazoltuk, hogy a LactoMicroSel a legkevésbé mérgező, de ugyanakkor az egyik legjobban hasznosuló formája a szelénnek. Megállapítottuk, hogy alkalmas az élelmiszerek szelén-szintjének növelésére, a tervezett élelmiszerek előállítására. Alkalmazása az európai parlament és a tanács vitaminok, ásványi anyagok és bizonyos egyéb anyagok élelmiszerekhez történő hozzáadásáról szóló 1925/2006/ek rendelete alapján lehetséges. A rendelet ugyanis pozitív listaként tartalmazza az élelmiszerhez adható szelénformákat, s ebben az általunk a LactoMicroSel® előállításához felhasznált nátrium-hidrogén-szelenit szerepel. Mi ezt a formát adjuk a tejhez, amiből a joghurt készül. Az így előállított anyag a szelént kevésbé mérgező elemi szelén formájában tartalmazza.

Az új szelénforma és előállításának előnyei:

- Az alkalmazott technológia rövid időn (4–24 órá) belül formában és méretben homogén szelén nanogolyók előállítását teszi lehetővé.
- Ipari célú, élelmiszeripari baktériumokat alkalmazó fermentációs úton korábban nem állítottak elő fémeket. Az így előállított szelén homogén szemcseméret eloszlása és szemcsék szabályos formája miatt különösen jó alapanyag nanorétegek kialakítására. A különböző méretű és kristályformájú szelén-golyók, illetve a belőlük előállított szuszpenziók optikai tulajdonsága különleges, a szemcseméret és a kristályforma által meghatározott.
- Az így előállított anyag az orvosi kutatásban mint potenciális daganatellenes szer, a mikroelektronikában mint speciális félvezető találhat piacot.
- Az alkalmazott technológia viszonylagos egyszerűsége jelentős árcsökkentést tesz lehetővé s ez tovább szélesítheti az anyag felhasználásának területeit.

IRODALOM

- Combs, G. F.–Garbisu, C.–Yee, B. C.–Yee, A.–Carlson, D. E.–Smith, N. R.–Magyarosy, A. C.–Leighton, T.–Buchanan, B. B. (1996): Bioavailability of selenium accumulated by selenite-reducing bacteria. *Biological Trace Element Research*. 52. 3: 209–225.
- Eszenyi, P.–Sztrik, A.–Babka, B.–Prokisch, J. (2011): „Elemental, Nano-Sized (100–500 nm) Selenium Production by Probiotic Lactic Acid Bacteria” – *International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics*. 1. 2: 148–152.
- Finley, J. W.–Davis, C. D. (2001): Selenium (Se) from high-selenium broccoli is utilized differently than selenite, selenate and selenomethionine, but is more effective in inhibiting colon carcinogenesis. *Biofactors*. 14. 1–4: 191–196.
- Ip, C. (1998): Lessons from basic research in selenium and cancer prevention. *Journal of Nutrition*. 128. 11: 1845–1854.
- Oremland, R. S.–Herbel, M. J.–Blum, J. S.–Langley, S.–Beveridge, T. J.–Ajayan, P. M.–Sutto, T.–Ellis, A. V.–Curran, S. (2004): Structural and Spectral Features of Selenium Nanospheres Produced by Se-Respiring Bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*. 70. 1: 52–60.
- Orskov, H.–Flyvbjerg, A. (2000): Selenium and human health. *Lancet*. 356. 9233: 942–943.
- Prokisch, J.–Zommara, M. A. (2010): Process for Producing Elemental Selenium Nanospheres United States. 20100189634
- Rayman, M. P. (2000): The importance of selenium to human health. *Lancet*. 356. 9225: 233–241.
- Spallholz, J. E.–Hoffman, D. J. (2002): Selenium toxicity: cause and effects in aquatic birds. *Aquatic Toxicology*. 57. 1–2: 27–37.
- Thorlacius-Ussing, O.–Flyvbjerg, A.–Esmann, J. (1987): Evidence that selenium induces growth retardation through reduced growth hormone and somatomedin C production. *Endocrinology*. 120. 2: 659–663.
- Zhang, J.–Gao, X.–Zhang, L.–Bao, Y. (2001): Biological effects of a nano red elemental selenium. *BioFactors*. 15. 1: 27–38.
- Zhang, J.–Wang, H.–Bao, Y.–Zhang, L. (2004): Nano red elemental selenium has no size effect in the induction of selenoenzymes in both cultured cells and mice. *Life Sciences*. 75. 2: 237–244.

