

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA  
V NITRE  
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**129376**

**BIOTRANSFORMÁCIA SELÉNU KVASINKAMI  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**2011**

**Bc. Miriama Čelková**

**SLOVENSKÁ POĽNOHOSPODÁRSKA UNIVERZITA  
V NITRE  
FAKULTA BIOTECHNOLÓGIE A POTRAVINÁRSTVA**

**BIOTRANSFORMÁCIA SELÉNU KVASINKAMI  
*SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Diplomová práca**

Študijný program:	Aplikovaná biológia
Študijný odbor:	1536800 Biológia
Školiace pracovisko:	Katedra biochémie a biotechnológie
Vedúci diplomovej práce:	Ing. Eva Szabová, PhD.

**Nitra 2011**

**Bc. Miriama Čelková**

## ČESTNÉ VYHLÁSENIE

Podpísaná Bc. Miriama Čelková vyhlasujem, že som diplomovú prácu na tému “Biotransformácia selénu kvasinkami *Saccharomyces cerevisiae*“ vypracovala samostatne s použitím uvedenej literatúry a ďalších informačných zdrojov.

Som si vedomá zákonných dôsledkov v prípade, ak hore uvedené údaje nie sú pravdivé.

V Nitre 20. apríla 2011

.....  
podpis autora práce

## **POĎAKOVANIE**

Týmto by som sa chcela poďakovať vedúcej diplomovej práce Ing. Eve Szabovej, PhD., za odbornú pomoc, cenné rady a poznatky, ktoré mi poskytla pri vypracovaní diplomovej práce.

## Abstrakt

Selenizované kvasinky sú vhodnejším zdrojom selénu ako selénany alebo seleničitany, pretože organicky viazaný selén je pre organizmus dostupnejší. Takto obohatené kvasinky je možné používať ako doplnok výživy.

Cieľom práce bolo sledovanie zvyšujúceho sa obsahu selénu v mikrobiálnych bunkách *Saccharomyces cerevisiae* a tiež zabudovávanie organických foriem selénu do kvasiniek počas ich kultivácie na živnej pôde s prídavkom rôznych koncentrácií seleničitanu sodného.

Do YPD média sa pridávala anorganická forma selénu,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$ , v dvoch variantoch. Na začiatku kultivácie, teda v rastovej fáze kvasiniek a po 24 hodinách kultivácie – v stacionárnej fáze. V oboch variantoch sa použili rôzne koncentrácie seleničitanu sodného, od 10 do 50  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Ako z výsledkov vyplýva, kvasinky absorbovali najvyššie množstvo selénu pri obohacovaní média seleničitanom sodným v nerastovej fáze. V kmeni Kolín sa pri najvyššej koncentrácii  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  v živnej pôde zaznamenal oproti kontrole 48,57-násobný nárast tohto prvku a v kmeni 612 bolo po rovnakej kultivácii zistené 96,76-násobne väčšie množstvo selénu. Kým kvasinky absorbovali najvyššie množstvo selénu pri obohacovaní média seleničitanom sodným v nerastovej fáze, zabudovávanie tohto prvku do organickej formy v podobe selénometionínu prebiehalo hlavne v rastovej fáze kultivácie kvasiniek. V biomase kultivovanej v YPD médiu bez prídavku selénu bol obsah selénometionínu nulový. Pri najvyššej koncentrácii seleničitanu sodného, 50  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  média, bol v kmeni Kolín, v rastovej fáze, zistený obsah selénometionínu 158,2  $\mu\text{g}$  v 1 g biomasy a v stacionárnej fáze rastu iba 12,8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  buniek. Kmeň 612 obsahoval v rastovej fáze 95,7  $\mu\text{g}$  v 1 g kvasiniek a v stacionárnej fáze 7,1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  kvasinkovej biomasy.

**Kľúčové slová:** selenizované kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, selénometionín, príjem selénu

## Abstract

Selenium yeasts are more appropriate source of selenium as selenite or selenate, because organically bound selenium is better accessible for the organism. Enriched yeasts in this way can be used as a dietary supplement.

The aim of our study was to monitor the increasing content of selenium in microbial cells of *Saccharomyces cerevisiae* and also transform it into the organic form of selenium during cultivation in the culture medium with the addition of various concentrations of sodium selenite.

In YPD medium was added inorganic form of selenium,  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  in two variants. At the beginning of cultivation, thus in the growth phase of yeasts and after 24 hours of cultivation – in the stationary phase. In both versions were used different concentrations of sodium selenite, from 10 to 50  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . As results show, yeasts absorbed the highest amount of selenium in sodium selenite enriched media in non-growth phase. In the yeast strain Kolín, at the highest concentration of  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  in the culture medium, was reported 48,57-fold increase of this element beside control and in the strain 612 was detected, after the same cultivation, 96,76-fold greater amount of selenium. While yeasts absorbed the highest amount of selenium in sodium selenite enriched media in non-growth phase, transformation of this element in organic form (selenomethionine) occur mainly in the growth phase. In the biomass cultivated in YPD medium without addition of selenium was selenomethionine content zero. At the highest concentration of sodium selenite in the growth medium, 50  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ , in the strain Kolín, in the growth phase, was recorded 158,2  $\mu\text{g}$  SeMet in 1 g biomass and in the stationary phase of growth it was only 12,8  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . The strain 612 contained 95,7  $\mu\text{g}$  in 1 g yeasts in the growth phase and in stationary phase 7.1  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  yeast biomass.

**Key words:** selenized yeast *Saccharomyces cerevisiae*, selenium uptake, selenomethionine

# OBSAH

ZOZNAM SKRATIEK A ZNAČIEK .....	8
ÚVOD .....	9
1 PREHĽAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY .....	10
1.1 SELÉN .....	10
1.1.1 Všeobecná charakteristika selénu .....	10
1.1.2 Funkcie .....	11
1.1.3 Výskyt Se v potravinách .....	11
1.1.4 Denná potreba .....	12
1.1.4.1 Príznaky pri nedostatku .....	13
1.1.4.2 Príznaky pri prebytku .....	14
1.1.5 Dostupnosť selénu .....	15
1.1.6 Selenoproteíny .....	16
1.1.6.1 Glutatión .....	16
1.1.6.2 Glutatiónperoxidáza .....	16
1.1.6.3 Glutaredoxíny .....	16
1.1.7 Selén v liečbe a prevencii rôznych ochorení .....	17
1.1.8 Metabolizmus selénu .....	18
1.2 KVASINKY .....	19
1.2.1 Všeobecná charakteristika kvasiniek .....	19
1.2.2 Rozmnožovanie kvasiniek .....	20
1.2.2.1 Vegetatívne rozmnožovanie .....	20
1.2.2.1 Generatívne rozmnožovanie .....	20
1.2.3 Rod <i>Saccharomyces</i> .....	21
1.2.4 Výživa kvasiniek .....	22
1.2.5 Metabolizmus kvasiniek .....	24
1.2.6 Kultivácia kvasiniek .....	26
1.2.6.1 Vsádzková kultivácia .....	27
1.2.6.2 Prítokovaná kultivácia .....	27
1.2.6.3 Kontinuálna kultivácia .....	28
1.2.6.4 Kombinovaná kultivácia .....	28
1.2.7 Produkcia biomasy kvasiniek <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	30
1.2.7.1 Pekárske droždie .....	30
1.2.7.2 Krmné droždie .....	31
1.2.8 Bunková hmota kvasiniek z nutričného hľadiska .....	31
1.2.9 Možnosti využitia kvasiniek .....	32
1.3 SELENIZOVANÉ KVASINKY .....	33
1.3.1 Selén v mikroorganizmoch .....	33
1.3.2 Charakteristika selenizovaných kvasiniek .....	34
1.3.3 Biochemizmus selénu v kvasinkách .....	36
1.3.4 Selenoproteíny v kvasinkách .....	38
1.3.4.1 Selenoproteín P .....	39
1.3.5 Produkcia selenizovaných kvasiniek .....	39
1.3.6 Komerčné preparáty obohatené o selén .....	41

1.3.7 Sorpčný mechanizmus buniek <i>S. cerevisiae</i> .....	44
1.3.7.1 Sorpcia bunkovým povrchom .....	44
1.3.7.2 Intracelulárna akumulácia .....	45
1.3.8 Transport selénu .....	45
1.3.9 Gény ovplyvňujúce toxicitu/rezistenciu voči selénu .....	47
1.3.10 Optimalizácia kultivačného média verzus výťažky selénu .....	48
1.3.11 Toxicita selénu .....	48
1.3.12 Stanovenie selénu .....	50
2 CIEĽ PRÁCE .....	52
3 MATERIÁL A METODIKA .....	53
3.1 OPTIMALIZÁCIA ŽIVNÉHO MÉDIA .....	53
3.2 KULTIVÁCIA KVASINIEK <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> NA ŽIVNEJ PÔDE S PRÍDAVKOM SELÉNU .....	53
3.3 STANOVENIE SELÉNU VO VZORKÁCH KVASINIEK .....	54
3.4 STANOVENIE SELENOMETIONÍNU VO VZORKÁCH KVASINIEK .....	54
4 VÝSLEDKY .....	56
4.1 VÝŤAŽKY BIOMASY KMEŇOV KOLÍN A 612 V ZÁVISLOSTI OD KONCENTRÁCIE GLUKÓZY .....	56
4.2 VPLYV PRÍDAVKU SELENIČITANU SODNÉHO NA VÝŤAŽOK BIOMASY V RASTOVEJ A STACIONÁRNEJ FÁZE .....	57
4.3 OBSAH ABSORBOVANÉHO SELÉNU POČAS RASTOVEJ A STACIONÁRNEJ FÁZY V KMEŇOCH 612 A KOLÍN .....	58
4.4 OBSAH SELENOMETIONÍNU V KMEŇOCH 612 A KOLÍN V RASTOVEJ A STACIONÁRNEJ FÁZE .....	59
4.4 VÝŤAŽOK SELÉNU [MG] Z JEDNEJ BANKY (100 CM <sup>-3</sup> MÉDIA) U KMEŇOV 612 A KOLÍN .....	60
5 DISKUSIA .....	61
6 NÁVRH NA VYUŽITIE POZNATKOV .....	63
7 ZÁVER .....	64
8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERAÚRY .....	66
PRÍLOHY .....	73



## Zoznam skratiek a značiek

- AAS – atómová absorpčná spektrometria
- Aft1, Aft2 – gény riadiace homeostázu železa v bunke
- DNP - 2,4-dinitrofenol
- DSB – dvojreťazcové zlomy (double-strand breaks)
- EPS - extracelulárna polymerická substancia
- ETA-AAS – atómová absorpčná spektrometria s elektrotermickou atomizáciou
- Gpx (1, 2, 3) – glutatiónperoxidázy
- Grx (1, 2, 3, 4, 5) – glutaredoxíny
- GSH – glutatión
- GSSG - glutatión disulfid
- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peroxid vodíka
- HG-AAS - atómová absorpčná spektrometria s generovaním hydridov
- HPLC - vysoko-rozlišovacia kvapalinová chromatografia
- KCN- kyanid draselný
- NaN<sub>3</sub> - azid sodný
- PEP- pulzné elektrické pole
- ROS – reaktívne formy kyslíka
- SeCM – selenometylselenocysteín
- SeL – seleničitan
- SeM – selenometionín

## ÚVOD

Na základe nedostatku selénu vo výžive, nielen v slovenskej populácii, sa mikronutrient selén zaradil medzi hlavné zložky potravín, ktorých príjem je nevyhnutné sledovať. Zároveň ako významný ochranný faktor – antioxidant, si selén zasluhuje pozornosť a dostatočné informácie o svojom zastúpení v potravinách nielen na Slovensku, ale aj v zahraničí. Slovenská republika, ako aj celý európsky región, patrí medzi lokality s nízkou koncentráciou selénu v pôde, čo sa následne odráža v jeho nízkom obsahu v potravinách, a tým i v ľudskom organizme.

Človek sa po stáročia prispôbuje zmenám životného prostredia a výživy. V poslednom storočí však nastali výrazné zmeny v životnom prostredí (intenzívnejšie UV žiarenie, spálne splodiny a i.), ktoré zapríčiňujú neschopnosť organizmu človeka, aj napriek primeranej životospráve a výžive, sa adekvátne prispôbiť. K tomu môžeme pripočítať stres a rozmáhajúce sa fajčenie, či konzumáciu alkoholu. Následkom toho zaznamenávame vzostup civilizačných ochorení. Stúpa chorobnosť a úmrtnosť na kardiovaskulárne a onkologické choroby, počet ľudí trpiacich na diabetes a obezitu. Sú to všetko choroby, ktoré úzko súvisia nielen so zhoršujúcim sa životným prostredím, ale aj výživou, ktorej sa pripisuje 30 až 70 percentný podiel na ich vzniku.

Vonkajšie faktory životného prostredia, fajčenie a stres podnecujú v našom organizme tvorbu veľmi reaktívnych voľných častíc – radikálov. V prípade nedostatku vhodných obranných mechanizmov v organizme, tieto reaktívne častice vytvárajú v tele prostredie pre vznik chorôb. Ľudské telo má vlastné obranné mechanizmy chrániace organizmus pred voľnými radikálmi. Na zvýšenie obranyschopnosti organizmu je nevyhnutné prijímať v potrave antioxidanty.

Keďže obsah selénu v potravinách v Európe klesá (hlavne jeho výskyt v pôde a tým aj v potravinách) je potrebné jeho obsah u ľudí zvýšiť, pričom jedno z možných riešení by mohlo byť zabudovávanie anorganického selénu kvasinkami do organickej formy, selenocysteínu a selenometionínu. Takto obohatené kvasinky je možné používať ako doplnok výživy.

# 1 PREHLAD O SÚČASNOM STAVE RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

## 1.1 Selén

### 1.1.1.Všeobecná charakteristika selénu

Selén je životne dôležitý mikroelement pre väčšinu organizmov - od baktérií a rias, až po cicavce. V roku 1817 ho objavil J.J. Berzelius, ale ako dôležitý mikroprvok bol uznaný iba v roku 1957, pretože predtým hlavným stretom záujmov výskumov bola toxicita daného prvku. Selén je prvkom štvrtej skupiny Mendelejevovho periodického systému, preto má ako nekovový, tak aj kovový charakter. Tvorí chemické zlúčeniny (anorganické a organické), analógy sírnych zlúčenín, menovite seleničitany ( $\text{SeO}_3^{2-}$ ), selénany ( $\text{SeO}_4^{2-}$ ), selenidy, selenometionín ( $\text{CH}_3\text{-Se-CH}_2\text{-CH-(NH}_2\text{)-COOH}$ ), selenocysteín ( $\text{HSe-CH}_2\text{-CH-(NH}_2\text{)-COOH}$ ), atď. (Stenchuk et al., 2006).

Dnes sa používa do expozimetrov ako fotobunka a od r. 1973 sa považuje za kľúčový prvok vo výžive. Svojimi vlastnosťami sa podobá síre a je z pôdy rýchlo vyplavovaný najmä kyslými dažďami. Preto sa jeho výskyt v pôde a v rastlinách v kyslom prostredí znižuje. Nízky obsah selénu v pôde a v celých ekosystémoch je najmä v priemyselných oblastiach. Na druhej strane sa vo zvýšenom množstve vyskytuje v produktoch pochádzajúcich z morí a vodných nádrží, kde sa selén akumuluje. Selén sa v liečbe začal uplatňovať až po roku 1979, kedy sa potvrdil jeho význam pri liečení rakoviny. V ľudskom organizme sa vyskytuje v obsahu 10 až 30 mg. Nachádza sa najmä v pečeni, obličkách, slezine, pankrease a v mužských semenníkoch (Zachar, 2004).

Hlavným zdrojom selénu pre ľudí a živočíchy sú rastliny, ktoré asimilujú tento prvok v závislosti od jeho koncentrácie, dostupnosti, formy selénu v pôde a druhu rastliny. Najčastejšie formy selénu v pôde sú seleničitany a selénany. Celkový obsah selénu v pôde má veľmi široké rozpätie od 0,000005 do 1,2 g.kg<sup>-1</sup>. Rozpätie koncentrácie selénu od jej minimálnej požiadavky po letálnu dávku je veľmi malá. Dôležité zlúčeniny selénu sú uvedené v tabuľke 1 (Stenchuk et al., 2006).

Tabuľka 1: Dôležité zlúčeniny selénu (Merz a Holl, 2007).

Zlúčenina	Oxidačný stupeň
Selenometionín	Se <sup>-2</sup>
Selenocysteín	
Selenid	
Dimetylselenid	
Trimetylselenonium	
Selenodiglutaťón	Se <sup>0</sup>
Selenopersulfid	
Seleničitan	Se <sup>+4</sup>
Selénan	Se <sup>+6</sup>

### 1.1.2 Funkcie

- ◆ posilňuje imunitný systém
- ◆ ako súčasť enzýmu glutatiónperoxidázy chráni organizmus pred voľnými radikálmi, podobne ako vitamín E
- ◆ chráni organizmus pred slnečným žiarením, vírusovými a bakteriálnymi infekciami
- ◆ pôsobí proti chemickým alergiám, zlučuje sa s ťažkými kovmi (kadmium, olovo, ortuť) a tým tieto prvky zneškodňuje
- ◆ má protirakovinové účinky
- ◆ zlepšuje funkciu buniek pečene, svalov a týmusu
- ◆ zvyšuje plodnosť
- ◆ zvyšuje účinnosť štítnej žľazy a podporuje zmenu tyroxínu na účinný trijódtyronín
- ◆ pomáha pri liečení autoimunitných a degeneratívnych ochorení (Mosnáčková et al., 2004).

### 1.1.3 Výskyt Se v potravinách

Selén sa vyskytuje v zemskej kôre, v množstve približne 0,05 - 0,09 mg.kg<sup>-1</sup>. Obsah selénu v prírodných vodách sa pohybuje medzi 0,1 – 400 µg.dm<sup>-3</sup>, v pôdach medzi 0,06 – 1,8 µg.g<sup>-1</sup>. Se sa vyskytuje v pivovarníckom droždi, brokolici, hnedej ryži, mliečnych výrobkoch, rybách, cesnaku, cibuli, morských riasach, morských živočíchoch, zelenine, koreňoch lopúcha, kuchynskom korení, semenách, orechoch,

hlohu, prasličke, prhl'ave, šípke, či rebríčku obyčajnom. Vysoký obsah selénu je v klíčkoch rôznych druhov obilnín. Naopak, selén je málo zastúpený v bielej ryži, bielej múke a iných rafinovaných výrobkoch (Zachar, 2004).

Obsah selénu v jednotlivých potravinách mierne kolíše, ale jeho zdroje sú dobre známe. Sú to predovšetkým: mäso (najmä pečeň), vajcia, mliečne výrobky, semená a orechy a v menšom množstve aj obilniny, ovocie a zelenina. Napríklad v 100 g tekvicových semiačok je vyše 33  $\mu\text{g}$  selénu, v rovnakom množstve vlašských orechov a vajec je ho vyše 20  $\mu\text{g}$ , v kuracej pečeni asi 40  $\mu\text{g}$  a v kyslomliečnych výrobkoch vyše 4  $\mu\text{g}$ . Z ovocia sú obsahom selénu zaujímavé najmä hrušky (vyše 7  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) a slivky (vyše 6  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ), ale aj hrozno (vyše 3  $\mu\text{g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ) a ďalšie. Dobrým zdrojom selénu je tiež chlieb, pretože ho konzumujeme denne. Obilniny všeobecne obsahujú vyše 2  $\mu\text{g}$  selénu na 100 g. Vedci sa zaoberali aj zmenami obsahu selénu v dôsledku spracovania a tepelnej úpravy potravín. Niektoré zlúčeniny selénu sú prchavé, a tak k určitým menším stratám dochádza, celkový obsah selénu v strave to však ovplyvňuje veľmi málo (Šinková, 2007).

Koncentrácia Se v hovädzom mäse je nižšia v porovnaní s bravčovým mäsom a hydinou, pretože do krmiva pre dobytok sa selén nepridáva. Vo všeobecnosti majú vnútornosti vyšší obsah selénu. Obsah selénu v mäse na Slovensku je nižší ako napr. v Nemecku alebo vo Francúzsku. Z požívateľín boli zistené najvyššie hladiny Se u vajec a rýb, pričom sladkovodné ryby ho majú iba polovičné množstvo oproti morským. Priemerná koncentrácia selénu v mlieku je 7  $\mu\text{g}\cdot \text{dm}^{-3}$ , zatiaľ čo v mliečnych výrobkoch ako sú tvaroh a syry je množstvo tri až päťkrát väčšie. Ovocie a zelenina sú chudobnými zdrojmi selénu, výnimkou sú iba strukoviny, vzhľadom na ich vyšší obsah bielkovín (Maďarič a Kadrabová, 1999).

#### **1.1.4 Denná potreba**

Denná potreba je 65  $\mu\text{g}$  pre mužov aj pre ženy. Liečebné dávky môžu byť až do 200  $\mu\text{g}$  denne. 600  $\mu\text{g}$  sa môže používať len po určitú dobu pri vírusových ochoreniach alebo ako súčasť liečebného programu pri liečení rakoviny (Zachar, 2004).

V protiklade k dostatočnému selénovému statusu u Američanov, vykazujú Európania, na základe nižšieho obsahu selénu v pôde, skôr suboptimálny selénový status (Thomson, 2004).

Za optimálnu hranicu selénu v plazme sa považuje hodnota okolo  $100 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . V európskych krajinách sa príjem selénu pohybuje v rozmedzí  $25 - 150 \mu\text{g}\cdot\text{deň}^{-1}$ . Za optimálny denný príjem selénu sa považuje  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  hmotnosti, pričom vedecky odporúčané výživové dávky sú diferencované podľa veku a záťaže človeka (zvyšené nároky organizmu na selén sú napr. u tehotných a dojčiacich žien) (Šinková, 2007). Lobinski (2000) vo svojich štúdiách uvádza ako primerané koncentrácie selénu v potrave od  $0,1 - 1,0 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ , a zodpovedajúcu dávku selénu pri preventívnej liečbe  $5 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  ľudskej váhy. Bayer (2000) tvrdí, že horná hranica liečebného prísunu selénu je  $500 \mu\text{g}\cdot\text{deň}^{-1}$ .

#### 1.1.4.1 Príznaky pri nedostatku

Pri nedostatku selénu sa vyskytuje vyčerpanosť, svalová slabosť, únava, poruchy rastu, vysoká hladina cholesterolu, infekcie, poruchy pečene, nedostatočná funkcia týmusu a prejavy neplodnosti, infarkty, rakovina, zápaly a kožné choroby. V priebehu tehotenstva nedostatok selénu zvyšuje riziko vrodených väd, najmä srdcových (Zachar, 2004).

Skupiny populácie, ktoré sú vystavené vyššiemu riziku nedostatočného príjmu selénu:

1. mladí ľudia, ktorí nekonzumujú vyváženú stravu (napr. študenti),
2. vegetariáni, pretože ich denný príjem selénu je v mnohých prípadoch pod  $10 \mu\text{g}$  (tieto skupiny ľudí konzumujú najmä ovocie a zeleninu, komodity, ktoré sú chudobné na selén),
3. starí ľudia, ktorí nekonzumujú dostatok mäsa (z ekonomických dôvodov, zlý chrup),
4. tehotné a dojčiace ženy (plod a dojča odčerpá selén, zvyčajne je potrebné dopĺňanie jeho príjmu výživovými doplnkami),
5. fajčiari (koncentrácia selénu v krvi fajčiarov je nižšia ako v krvi nefajčiarov, selén sa u fajčiarov dostatočne neabsorbuje, preto je potrebná vyššia dávka selénu v dôsledku vyššej tvorby voľných radikálov), chronicky chorí jedinci, tráviace poruchy zvyšujú riziko deficitu selénu (napr. porucha vstrebávania - malabsorpcia, celiakia - alergia na lepok, strata chuti, jednostranná strava, hnačky, časté zvracanie, nižšia koncentrácia selénu v krvi bola zistená u pacientov s rakovinou, ochorením srdca, artritídou, pri aplikácii niektorých kortikoidov) (Mosnáčková et al., 2003).

V roku 1993 boli priemerné koncentrácie selénu v plazme vyšetrených osôb z rozličných častí Slovenska v rozpätí 46 – 77  $\mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , čo nás zaraďuje ku krajinám s nízkym statusom selénu. Zároveň sa potvrdilo, že vegetariáni sú na tom jednoznačne horšie, ako ľudia konzumujúci i mäso. Nízke hladiny selénu u obyvateľov Slovenska sú dané jeho nízkym obsahom v pôde, a tým aj v rastlinách, zvieratách a potravinových výrobkoch. Od uvedených výskumov sa na slovenský trh dostali niektoré nové výrobky obohatené o selén (jogurty, vajcia, hydina), zvýšila sa aj spotreba výživových doplnkov so selénom a možno teda očakávať, že sa deficit zmiernil, zásadné zlepšenie je však málo pravdepodobné. Podľa štatistických údajov (vychádzajúcich z údajov o konzumácii jednotlivých potravín) je priemerný príjem selénu na Slovensku 38  $\mu\text{g}\cdot\text{deň}^{-1}$ . V záujme dobrého zdravia by sme mali prijímať viac selénu. Svetová zdravotnícka organizácia odporúča jeho denný príjem na osobu v množstve 50 - 200  $\mu\text{g}$ . V prípade určitých porúch môžu pomôcť výživové doplnky pod dohľadom lekára, ale bežný spotrebiteľ nevie odhadnúť, kde je hranica medzi užitočným a toxickým pôsobením, pritom nie je vylúčené, že si môže aj uškodiť (Šinková, 2007). Antikarcinogénny účinok rozličných zlúčenín selénu v potlačení nádoru prsnej žľazy (pozorovaný u potkanov) možno vidieť v tabuľke 2.

Tabuľka 2. Antikarcinogénny účinok zlúčenín selénu (Stenchuk et al., 2006).

Zlúčenina	Dávka selénu v ppm na 50 % potlačenie nádoru
Selenometylselenocysteín	2
Seleničitan	3
Selenometionín	4-5
Selenocysteín	4-5

#### 1.1.4.2 Príznaky pri prebytku

Nadbytok selénu môže vzniknúť len pri prijímaní selénových doplnkov. Hranica je medzi liečebnou dávkou selénu (200  $\mu\text{g}$ ) a toxickou dávkou (900  $\mu\text{g}$ ). K príznakom otravy patria nervozita, depresia, nevoľnosť a zvracanie, cesnakový zápach dychu a potu, strata vlasov a nechtovej platničky (Zachar, 2004).

Vysoké hladiny selénu v krvi sa prejavujú ochorením, tzv. selenózou. K jej symptómom patria poruchy trávenia, strata vlasov, biele škvrny na nechtoch a poškodenie nervov. Ochorenie je pomerne zriedkavé, môže však k nemu dôjsť

v dôsledku priemyselných havárií a prieniku selénu z pôdy do plodín, prípadne pri nekontrolovanom príjme selénu formou výživových doplnkov. Práve z tohto dôvodu je potrebné vedieť, akým spôsobom sa dá zabezpečiť prívod potrebného množstva selénu bez toho, aby sme ohrozili svoje zdravie (Šinková, 2007).

Podľa Bayera (2000) sa majú zlepšiť predovšetkým selenoanalýzy jednotlivých selénových preparátov, aby sa predchádzalo nesprávnemu dávkovaniu tohto mikroprvku. Bol totiž zaznamenaný prípad, kedy odporúčaná dávka tabliet so selenizovanými kvasinkami predstavovala príjem  $1880 \mu\text{g}\cdot\text{deň}^{-1}$  Se, čo je vysoko nad odporúčanými hodnotami.

Je známe, že v dôsledku nerovnomernej distribúcie v pôde je Čína známa oblasťami, ktoré obsahujú najviac selénu na svete a zároveň aj oblasťami, kde ľudia trpia špecifickým ochorením z nedostatku selénu. Oblasti chudobné na selén sú napríklad aj Sibír a Severná Kórea (Šinková, 2007).

### **1.1.5 Dostupnosť selénu**

Výskum potvrdil, že biologická dostupnosť selénu pre organizmus závisí od jeho chemickej formy a taktiež od výživových faktorov ako sú napr. zloženie a obsah bielkovín, cukrov, vlákniny, minerálnych látok, vitamínov a mastných kyselín. Biologicky dostupnejší je selén viazaný v organickej forme a práve v potravinách sa vyskytuje daný prvok v bielkovinách vo forme selenometionínu a selenocysteínu (Maďarič a Kadrabová, 1999).

Dôležitosť selénu bola objavená v roku 1957 v práci K. Schwarze, ktorý zistil, že u potkanov kŕmených kvasinkami s nízkym obsahom vitamínu E zabránil prídavok selénu rozvoju pečenej nekrózy. V nasledujúcich rokoch bola preukázaná esencialita selénu pre ďalšie organizmy, vrátane človeka (Dastyh, 2004).

Na stanovenie biologickej využiteľnosti rozličných foriem selénu, bola skupina samičiek potkana prikrmovaná doplnkami selénu ( $0,04$ ;  $0,08$ ;  $0,16$  a  $0,32 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ) buď vo forme seleničitanu alebo biomasou selenizovaných kvasiniek. Jeho obsah, ako aj aktivita glutatióneroxidázy v pečeni, sére a erytrocytoch vzrástli postupne v závislosti od prídavku selénu. Preukázalo sa, že biologická dostupnosť selénu je v selenizovaných kvasinkách v porovnaní so seleničitanom vyššia nielen v tkanivách, ale aj aktivita glutatióneroxidázy je vyššia, na základe čoho môžeme konštatovať, že Se-kvasinky sú lepším zdrojom selénu ako seleničitan (Yoshida et al., 1999).



### 1.1.6 Selenoproteíny

Funkčnou formou selénu sú biologicky aktívne selenoproteíny: enzýmy - glutatiónperoxidáza, jódtyronín-5-dejodináza a ďalšie, ktoré obsahujú aminokyselinu - selenocysteín. Uvedené enzýmy chránia bunky pred oxidatívnym poškodením, resp. menia hormón štítnej žľazy tyroxín na biologicky aktívny trijódtyronín, čím zasahujú do metabolizmu a vývoja organizmu (Maďarič a Kadrabová, 2003).

#### 1.1.6.1 Glutatión

Glutatión, významný tripeptid pozostávajúci z kyseliny glutámovej, cysteínu a glycínu, je tiež súčasťou biologicky aktívnych selenoproteínov. Vyskytuje sa v rastlinnej i živočíšnej bunke. Existuje v dvoch formách, oxidovaný glutatión (GSSG) a redukovaný glutatión (GSH). Oxidovaná forma sa uplatňuje ako kofaktor enzýmov v biochemických reakciách. Redukovaná forma chráni bunku pred oxidatívnymi zmenami, ktoré spôsobujú voľné kyslíkové radikály (Kopřiva a Malota, 2008).

#### 1.1.6.2 Glutatiónperoxidáza

Selén tvorí súčasť antioxidačne pôsobiaceho enzýmu glutatiónperoxidázy, ktorý chráni bunky organizmu pred oxidačným poškodením voľnými radikálmi produkovanými bežne počas metabolizmu a zapríčiňujúcimi vznik a rozvoj niektorých chronických ochorení. Selén je esenciálny stopový prvok, je dôležitý pre človeka a musí byť dodávaný do organizmu z vonkajšieho prostredia (Einig, 2003).

#### 1.1.6.3 Glutaredoxíny

Glutaredoxíny (glutatión závislé oxidoperoxidázy) sa viažu na Fe/S centrá bielkovín alebo sa na ich tvorbe zúčastňujú. Glutaredoxíny sú relatívne heterogénna skupina oxidoreduktáz. Ako členovia tioredoxínovej rodiny katalyzujú pomocou dvoch cysteínov, ktoré sú usporiadané v Cys-X-X-Cys-motíve. Od ostatných členov tioredoxínovej rodiny sa líšia univerzálnym tripeptidom glutatiónom (GSH), ktorý slúži ako ich kofaktor. GSH sa sám oxiduje na glutatión disulfid (GSSG), ktorý je

prostredníctvom glutatión reduktázy opäť regenerovaný. Pomer redoxného páru GSH/GSSG určuje redoxnú rovnováhu v bunke (Hudemann, Berndt a Lillig, 2007).

Taktiež nadmerná expresia glutatiónreduktázy zvyšuje rezistenciu voči seleničitanu. Glutaredoxínový systém *S. cerevisiae* pozostáva z piatich skupín enzýmov: Grx1 a Grx2 patria k ditiol-glutaredoxínom a k monotiol-glutaredoxínom patria Grx3, Grx4 a Grx5. Grx1 sa vyskytuje v cytosóle a riadi ochranu pred superoxidmi. Grx2 môže byť lokalizovaný v cytosóle aj mitochondriách a je zodpovedný za väčšinu GSH-závislých disulfidových redoxných reakcií. Grx3 a Grx4 sa nachádzajú v jadre a zúčastňujú sa na regulácii železa prostredníctvom Aft1 transkripčného faktora. Mitochondriálny Grx5 je zahrnutý do syntézy Fe/S klastrov bielkovín. Znefunkčnenie Grx5 génu vedie k akumulácii železa v bunke, čo môže vyvolať oxidatívne poškodenie (Lewinska a Bartosz, 2008). Syntéza Fe/S klastrov prebieha v mitochondriách na štruktúrnom proteíne. Pri strate Grx5 dochádza k obohateniu Fe/S centier na danom štruktúrnom proteíne, takže sa predpokladá, že Grx5 zohráva funkciu pri prenose Fe/S klastrov na cieľové proteíny (Hudemann, Berndt a Lillig, 2007).

### **1.1.7 Selén v liečbe a prevencii rôznych ochorení**

Selén je nevyhnutný aj na zabezpečenie normálnej funkcie imunitného systému a štítnej žľazy. Jeho nedostatok v strave sa prejavuje zníženou antioxidačnou ochranou organizmu a v konečnom dôsledku celým radom rôznych ochorení - od chronického zlyhania obličiek až po svalovú dystrofiu či stuhnuté kĺby. Neskôr sa zistilo, že selén pôsobí ochranné proti celému radu ochorení hospodárskych zvierat (Šinková, 2007).

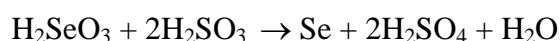
Vedecké štúdie poukázali aj na skutočnosť, že pri vyššom príjme selénu klesá úmrtnosť na niektoré druhy rakoviny (pľúc, hrubého čreva a prostaty), zatiaľ čo v oblastiach s nízkou hladinou selénu v pôde, kde obyvateľstvo prijíma menej selénu v strave, dochádza k častejšiemu výskytu niektorých druhov rakoviny a srdcovo-cievnych ochorení. Hoci všetky súvislosti ešte neboli jednoznačne potvrdené, bol vyvinutý celý rad výživových doplnkov so selénom, ktorých producenti propagujú najmä priaznivé účinky proti rakovine a srdcovo-cievnym ochoreniam (Šinková, 2007). V období r. 1983 – 1993 sa v USA uskutočnil rozsiahly výskum s vyše 1 300 jedincami vo veku od 18 do 80 rokov, ktorého výsledky dokázali priaznivé pôsobenie selénu z pivovarských kvasiniek. Významne sa znížila úmrtnosť na rakovinu, a to až o 52 %

v porovnaní s kontrolnou skupinou. Došlo k zníženiu výskytu rakoviny pľúc, hrubého čreva a prostaty. Niektorí vedci navrhli, aby sa pri liečbe rakoviny používali dokonca vyššie dávky selénu. Pri pokusoch na zvieratách sa dokázal ochranný účinok selénu proti nepriaznivému pôsobeniu UV-žiarenia, v dôsledku čoho sa významne znížil výskyt prípadov rakoviny kože (Šinková, 2007).

Zistilo sa, že neplodní muži majú veľmi nízke hladiny selénu v plazme. Škótska štúdia, ktorá trvala 2 roky, poukázala na skutočnosť, že dopĺňanie selénu v strave zvyšuje pohyblivosť spermií a podporuje plodnosť. Nedostatok selénu v organizme môže poukazovať na nedostatočný prívod v strave, ale aj na tráviace poruchy, v dôsledku ktorých sa selén v organizme neabsorbuje a nevyužíva účinne, čo sa uskutočňuje monitorovaním nutričného stavu pacienta. Hladinu Se môžeme zistiť i na základe analýzy vlasov a nechtov. K horšiemu využívaniu živín dochádza pri ochorení na HIV/AIDS, pričom deficiencia selénu je sprievodným znakom postupujúceho ochorenia (Šinková, 2007).

### 1.1.8 Metabolizmus selénu

Chemické a fyzikálne vlastnosti selénu a síry sú podobné. Selén a síra majú podobnú konfiguráciu atómov v najokrajovjších valenčných vrstvách, i napriek tomu, že tretia vrstva u selénu je kompletne zaplnená elektrónmi. Pokiaľ sú atómy S a Se v kovalentnom alebo iónovom stave, je elektronegativita, polarizácia a väzobná energia v princípe rovnaká. Predošlé pokusy so živými systémami nám hovoria, že tieto dva prvky, ktoré sú po chemickej i fyzikálnej stránke podobné, sa nie vždy môžu in vivo navzájom substituovať. Na rozdiely poukazuje aj nasledujúca rovnica:



V rovnici štvormocný selén v seleničitane podlieha redukcii, zatiaľ čo štvormocná síra v siričitane podlieha oxidácii.

Chemické rozdiely medzi redukciou seleničitanov a oxidáciou siričitanov sa odzrkadľujú v metabolizme týchto zlúčenín u cicavcov, u ktorých sú zlúčeniny selénu spravidla redukované, zatiaľ čo zlúčeniny síry sú oxidované.

Ďalšie chemické rozdiely možno vidieť v sile kyslíkatých a bezkyslíkatých kyselín selénu a síry ( $\text{H}_2\text{Se}$  a  $\text{H}_2\text{S}$ ). Kým oxokyseliny selénu a síry majú podobnú silu,  $\text{H}_2\text{Se}$  je

oveľa silnejšia kyselina ako  $H_2S$ . Tento rozdiel je možné vidieť v schopnosti disociácie selenohdrylovej skupiny selenocysteínu v porovnaní so sulfhydrylovou skupinou cysteínu. Rozdiel je veľmi dôležitý z biologického hľadiska, pretože pri fyziologickom pH, je sulfhydrylová skupina v cysteíne (alebo iných tioloch) hlavne v protónovanej forme a selenohdrylová skupina v selenocysteíne (alebo iných selenoloch) existuje dlhšie v disociovej forme (Shameberger, 1983).

## 1.2 Kvasinky

### 1.2.1 Všeobecná charakteristika kvasiniek

Kvasinky sú všeobecne definované ako jednobunkové (unicelulárne) eukaryotické organizmy. Rod *Saccharomyces* systematicky zaraďujeme do ríše *Fungi*, triedy *Saccharomycetes*, čeľade *Saccharomycetaceae*, ktoré sa rozmnožujú nepohlavne pučaním, sú nemelanizované (biele alebo červené). Názov *Saccharomyces* pochádza z gréckeho jazyka a v preklade znamená „cukrová huba“ a druhový názov *cerevisiae* pochádza z latinčiny a znamená „pivný“. Pôvodne bol tento druh izolovaný z povrchových buniek plodov hrozna (Šipický a Šubík, 1992).

Kvasinky sú pravdepodobne jedny z najstarších domestikovaných organizmov. V roku 1680 holandský mikrobiológ Anton van Leeuwenhoek pravdepodobne ako prvý pozoroval kvasinky, ale v tom čase ich nepovažoval za živé organizmy, ale skôr len za akési globulárne štruktúry (Tančinová a Labuda, 2009).

Louis Pasteur dokázal, že alkoholové kvasenie je spôsobené živými kvasinkami. Jedná sa o anaeróbnú fermentáciu, pri ktorej sa energia glukózy uvoľnená pri glykolýze, spotrebuje na tvorbu etanolu. Pri oxidácii sacharidov za aeróbných podmienok, až na  $CO_2$  a  $H_2O$ , bunka odbúrava glukózu menšou rýchlosťou než za anaeróbných podmienok, čo označujeme ako Pasteurov efekt (Kocková- Kratochvílová, 1982).

## 1.2.2 Rozmnožovanie kvasiniek

### 1.2.2.1 Vegetatívne rozmnožovanie

Väčšina kvasiniek sa rozmnožuje pučaním, kedy je dcérska bunka spojená kanálikom s materskou bunkou. Pred pučaním dochádza k deleniu endoplazmatického retikula, tiež k opakovanému deleniu vakuol a mitochondrie majú pretiahnutý tvar. Do novovznikajúcej bunky vstupujú najskôr vakuoly a mitochondrie a následne aj jadro (po mitotickom delení) s ostatnými organelami a cytoplazmou. Cytoplazmatická membrána uzatvorí kanálik medzi dcérskou a materskou bunkou a v danom mieste dochádza k syntéze endoplazmatického retikula a tvorbe bunkovej steny. Pospájaním drobných vakuol do jednej veľkej je pučanie ukončené. V niektorých prípadoch ostávajú bunky aj po pučaní spojené a vytvárajú tzv. „bunkové zväzky“. Za optimálnych rastových podmienok trvá bunkové delenie asi 2 hodiny (Šilhánková, 2009).

### 1.2.2.1 Generatívne rozmnožovanie

Pohlavný spôsob je charakterizovaný splývaním dvoch haploidných buniek za vzniku zygóty. Zygóty sa môžu vegetatívne mitoticky deliť a ich diploidné potomstvo vytvára meiózou haploidné spóry, ktoré sa môžu tiež vegetatívne rozmnožovať a tvoriť haploidné potomstvo, ktoré môže opäť konjugovať. Takto dochádza pravidelne k striedaniu diploidnej a haploidnej fázy (Šipický a Šubík, 1992).

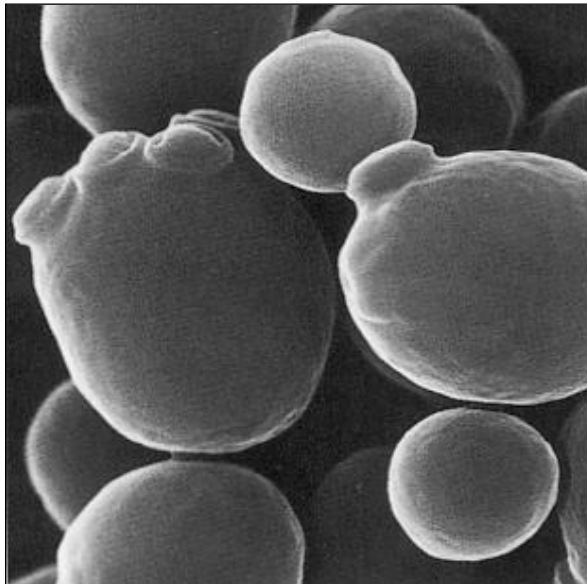
Výsledkom pohlavného rozmnožovania sú pohlavné spóry. U kvasiniek sú to endospóry umiestnené v asku, tzv. askospóry. Generatívne rozmnožovanie je charakterizované konjugáciou (kopuláciou) dvoch haploidných buniek a spájaním ich jadier. Následne sa diploidné jadro delí meiózou na štyri haploidné jadrá, ktoré sú základom pohlavných spór, alebo dochádza ešte k mitóze a až potom vznikajú spóry, čo poukazuje na pravidelné striedanie haploidnej a diploidnej fázy buniek. V rode *Saccharomyces* hovoríme o izogamnom spájaní, pretože spájajúce sa haploidné bunky sú približne rovnaké. Spájanie materskej bunky a jej vegetatívneho potomstva je možné iba u homothalických kmeňov. U heterothalických kmeňov kopulujú len bunky jedného párovacieho typu s bunkami opačného párovacieho typu. U *S. cerevisiae* sa vyskytujú aj homothalické aj heterothalické kmene, pričom ich párovacie typy sa označujú  $\alpha$  a  $a$ . Pre sporuláciu je potrebný silný aeróbný metabolizmus, ktorý sa zabezpečuje

neprítomnosťou skvasiteľných cukrov, sporuláciu podporuje taktiež vysoké pH (Šilhánková, 2009).

### 1.2.3 Rod *Saccharomyces*

Množí sa vegetatívnym multilaterálnym pučaním, pričom vznikajú jazvy zrodu, ktoré sú dobre viditeľné na obr.1. Diploidné bunky sa bezprostredne menia na asky (Šilhánková, 2009).

Obr. 1. Jazvy zrodu u *S. cerevisiae* (www.chtf.stuba.sk, [cit. 2009-01-04])



Druh *Saccharomyces cerevisiae* je pivná, vínna, liehovarnícka a pekárnska kvasinka. Fermentuje hexózy: glukózu a galaktózu, disacharidy: sacharózu a maltózu a trisacharid rafinózu. Laktózu a dusičnany neasimiluje. V jednotlivých odvetviach fermentačného priemyslu sa využívajú špeciálne kmene vyhovujúce daným požiadavkám (Kocková-Kratochvílová, 1982).

Tvar buniek je guľatý až oválny, so zreteľnou ostro ohraničenou vakuolou, čo je charakteristické pre staršie bunky. Bunky majú rozmer 6 až 7 x 7,5 až 8,5 μm. Morfológia buniek kvasiniek súvisí so spôsobom ich vegetatívneho rozmnožovania (Šipický a Šubík, 1992).

Rozmnožujú sa pučaním a za krátky čas sa v kvapalnom médiu usadí na dne nádoby viditeľná vrstva sedimentu. Z fyziologických vlastností má najväčší význam ich schopnosť anaeróbne skvasovať hexózy na etanol a CO<sub>2</sub> podľa rovnice:



Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sa veľmi dobre kultivujú v sladínovom substráte, čo sa využíva aj pri ich identifikácii a kontrole čistoty. U kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* využívaných v pekárstve ako droždie sa pri ich výrobe vytvára aeróbne prostredie prevzdušňovaním záparty, čo má za následok potláčanie vzniku etanolu a podporu rastu kvasničnej hmoty (Kalina a Váňa, 2005).

Kvasinky *Saccharomyces uvarum* (pôvodne označované *S. carlsbergensis*) sú pravdepodobne tiež kmeňom *S. cerevisiae*. Používajú sa pri spodnom kvasení piva. Po prekvasení substrátu klesajú na dno a rafinózu štiepia úplne, lebo obsahujú enzým melibiázu. Spodné kvasenie prebieha pri teplote 6-10°C, čo vyžaduje dlhšiu dobu, pri ktorej dochádza k vyčisteniu mladiny a vzniknuté pivo má dlhšiu dobu trvanlivosti ako tie, ktoré sú pripravené vrchnými pivovarníckymi kvasinkami. Tieto kmene kvasiniek sú podobné pekárskym kvasinkám, lebo neobsahujú enzým melibiázu, z rafinózy skvasujú iba odštiepenú fruktózu a v prostredí ostáva nevyužitá melibióza (Šilhánková, 2009).

Druh *S. exiguus* fermentuje glukózu, galaktózu a sacharózu. Vyskytuje sa na ovocí, ovocných produktoch, limonádach, fermentovaných nápojoch, vo výrobkoch studenej kuchyne, klobásových údeninách a na mliečnych produktoch (Görner a Valík, 2004).

*S. piriformis* sa používa pri výrobe zázvorového piva, *S. sake* zasa pri výrobe saké. Dnes sú tieto druhy považované za vyšľachtené kmene druhu *S. cerevisiae*. Iba varietou je aj taxón *S. vini* či *S. ellipsoideus*, kvasinky vínne, izolované z prírody – z kvetov, plodov aj pôdy ovocných sádov a používané pri výrobe vína. Druh *S. fragilis* sa používa ku skvasovaniu mliečnych výrobkov (Kalina a Váňa, 2005).

#### 1.2.4 Výživa kvasiniek

Živná pôda musí spĺňať tieto predpoklady:

1. mať dostatok vody a vlhkosti, najlepšie ak je izotonická s bunkami kvasiniek, t.j. asi 30 % vlhkosti
2. obsahovať zdroj uhlíka, dusíka, fosfor a síru
3. poskytovať mikroelementy, ktoré pôsobia v malých dávkach
4. obsahovať rastové faktory, ako sú vitamíny a aminokyseliny
5. spĺňať určité pH (6 alebo nižšie) (Vraná, 1986).

1. Viazaná voda zabezpečuje hydratáciou polysacharidov pružnosť a rozťažnosť cytoplazmatickej membrány a bunkovej steny. Hydratáciou bielkovín sa zabezpečujú vitálne reakcie a v povrchových vrstvách protoplazmy umožňuje voda selektívnu priepustnosť. Voľná voda sprostredkúva rozdelenie medziproduktov metabolizmu, odvádza nadbytočné teplo a je transportným prostriedkom pri látkovej premene. Zníženie obsahu vody zapríčiňuje dočasnú disfunkciu bunky a tá sa dostáva do stavu pokoja, v ktorom môže zotrvať určitý čas bez vykonávania akejkoľvek činnosti. Na základe tejto vlastnosti sa pripravujú intaktné sušené kvasinky vhodné na fermentáciu alebo prípravu enzýmov (Kocková-Kratochvílová, 1982). Na prípravu natívnych živných pôd sa používa vodovodná voda, ale nesmie obsahovať vysoké koncentrácie železa, chloridov a chlóru. Pri syntetických pôdach používame destilovanú vodu (Michalík, 1999).
2. Najpoužívanejšími zdrojmi uhlíka sú sacharidy, ktoré sa používajú v čistej forme alebo v komplexných zmesiach (Michalík, 1999). Kvasinky využívajú jednoduché sacharidy (glukózu, fruktózu, mannózu, galaktózu), disacharidy (sacharózu, maltózu) a niektoré trisacharidy (rafinózu, maltotriózu). Transport určitých sacharidov nastáva difúziou, sacharóza sa štiepi vo vnútri bunky na fruktózu a glukózu pomocou enzýmu invertáza. Maltóza a maltotrióza sa transportujú aktívnym transportom. Enzýmy zabezpečujúce transport a štiepenie týchto sacharidov sú indukčné, čiže sa syntetizujú iba v prípade potreby (Šepel'ová a kol., 2003). Vhodným zdrojom uhlíka je aj melasa, ktorá obsahuje až 50 % sacharózy, 20 % organických látok, 10 % solí a 20 % vody (Michalík, 1999). Zdrojom dusíka pre kvasinky sú organické zlúčeniny obsiahnuté v peptóne, kvasničnej vode, sladine atď. Kvasinky vedia využívať aj amónne soli (síran amónny, fosforečnan amónny) a tiež dusičnany a dusitany, ktoré musia bunky zredukovať na amoniakálnu formu, čo zabezpečuje nitrátreduktázový systém. Aminokyseliny sú dobrým zdrojom dusíka i uhlíka a majú úlohu aj rastového faktora (Michalík, 1999). Fosfor vo forme  $P_2O_5$  sa zúčastňuje na stavbe dôležitých látok, akými sú fosfoproteíny, fosfolipidy, nukleoproteíny, nukleové kyseliny a fosforylované polysacharidy a do živnej pôdy sa pridávajú vo forme draselných a amónnych fosforečnanov (Kocková-Kratochvílová, 1982).



3. Obsah horčíka v bunkách zvyšujeme prídavkom síranu horečnatého alebo vodou s vyšším obsahom horčíka. Horečnaté ióny sú stimulátormi viacerých enzýmových procesov tým, že zvyšujú aktivitu fosfatáz (Kocková-Kratochvílová, 1982).
4. Kvasinky rastú dobre na pôde s asparagínom, kyselinou asparágovou alebo glutámovou, s glutamínom, arginínom, leucínom, alanínom a valínom. Tryptofán, tyrozín, izoleucín, fenylalanín, metionín a prolín využívajú len niektoré kvasinky, a cysteín nevyužívajú skoro vôbec. L-lyzín rod *Saccharomyces* neasimuluje (Kocková-Kratochvílová, 1982).
5. Optimálne pH pre rast a rozmnožovanie kvasiniek je v rozmedzí od 4,2-5 (Šepel'ová a kol., 2003).

Najčastejšie používané živné pôdy:

1. YPD (Yeast-Pepton-Dextrose): 0,3 g práškového kvasničného extraktu, 1 g peptónu, 0,5 g glukózy, 2 g agaru na 100 ml vody.
2. Sladinový agar: pH sladiny sa upraví na 6,5 roztokom 10 % Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>. Sladinový agar sa pripraví pridaním 1,5-2 % agaru (Kocková-Kratochvílová, 1990).

### 1.2.5 Metabolizmus kvasiniek

Bunky získavajú energiu potrebnú na priebeh biosyntetických procesov katabolickými reakciami, pričom sa využíva asi len 29 % celkovej energie. Zvyšná energia sa uvoľňuje do prostredia formou tepla.

Energetická bilancia etanolového kvasenia predstavuje zisk dvoch mólov ATP z jedného mólu glukózy, pričom v aeróbnych podmienkach vzniká až 38 mólov. Za aeróbnych podmienok pri koncentrácii glukózy nižšej ako 5 mmol odbúrava bunka tento substrát menšou rýchlosťou než v anaeróbných podmienkach, čo sa označuje ako Pasteurov efekt. Je to následok základných regulačných mechanizmov, ktoré sa týkajú rôznych kľúčových enzýmov metabolizmu glukózy. Anaeróbne dehydrogenačné pochody prejdú na aeróbnny proces, ktorý je sprevádzaný zvýšenou tvorbou biomasy za súčasného zníženia spotreby substrátu. Zastavuje sa i tvorba produktov kvasenia, lebo substrát je oxidovaný až na CO<sub>2</sub> a H<sub>2</sub>O, čo sa využíva na zvýšenie produkcie kvasničnej biomasy (Rebroš a kol., 2005).

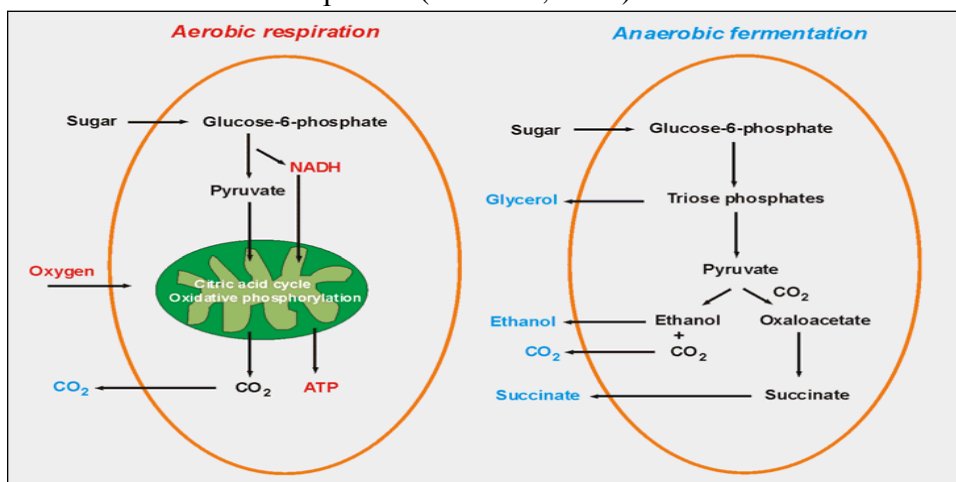
Rozdiely medzi aeróbnou a anaeróbnou respiráciou je vidieť na obr. 2.

Podľa aktivity dýchania sa delia kvasinky na:

1. kvasinky aeróbne, u ktorých dýchanie tvorí až 100 % (kŕmne kvasinky)
2. kvasinky, u ktorých sa aeróbne a anaeróbne procesy vyrovnávajú (pekárenské a vrchné pivovarnícke kvasinky)
3. kvasinky s prevládajúcim anaeróbnym metabolizmom, kedy dýchanie tvorí asi 10-15 % (liehovarnícke, vínne a spodné pivovarnícke kvasinky)

U *S. cerevisiae* predstavuje zmena anaeróbných podmienok na aeróbne až 10-násobný nárast množstva vytvorenej biomasy (Kocková-Kratochvílová, 1990).

Obr. 2 Aeróbna a anaeróbna respirácia (Feldman, 2005).



Kvasinky môžu využívať pyruvát dvoma spôsobmi. V prítomnosti O<sub>2</sub> vstupuje pyruvát do mitochondriálnej matrix, kde je oxidatívne dekarboxylovaný na acetyl-CoA prostredníctvom pyruvátdehydrogenázového multienzymového komplexu. Táto reakcia spája glykolýzu s Krebsovým cyklom, v ktorom je acetyl-CoA kompletne oxidovaný, vznikajú 2 molekuly CO<sub>2</sub> a redukovaný NADH+H<sup>+</sup> a FADH<sub>2</sub>. Počas anaeróbnej fermentácie cukrov „reoxidujú“ kvasinky NADH+H<sup>+</sup> na NAD<sup>+</sup> v dvoch krokoch. V prvom kroku je pyruvát dekarboxylovaný pyruvátdekarboxylázou na acetaldehyd a CO<sub>2</sub> a v druhom kroku sa redukuje acetaldehyd alkoholdehydrogenázou na etanol. Sprievodným javom je aj tvorba glycerolu z dihydroxyacetónfosfátu (Feldman, 2005).

Ak koncentrácia glukózy dosiahne za aeróbných podmienok vyššie hodnoty ako 5 mmol, je respirácia potlačená a nastáva fermentačný proces, čo sa označuje ako Crabtree efekt (glukózový efekt, kontra-Pasteurov efekt). Predpokladá sa, že glukóza inhibuje syntézu enzýmov dýchacieho reťazca alebo ich inaktivuje a inaktivuje aj transport sacharidov do bunky. Glukózový efekt spôsobuje problémy v kontinuálnych fermentáciách pri zmene zriedovacej rýchlosti z menšej na väčšiu. Pri menšej zriedovacej rýchlosti je metabolizmus oxidatívny (kvasinky majú tendenciu skvasovať

glukózu na CO<sub>2</sub> a biomasu, bez produkcie etanolu) a pri vyššej je fermentačný (výťažok etanolu sa zvyšuje na úkor znižujúceho sa množstva biomasy) (Rebroš a kol., 2005).

Ďalším regulačným mechanizmom uplatňujúcim sa u *S. cerevisiae* je katabolická represia. Glukóza, alebo počiatočný produkt glukózového metabolizmu, inhibuje syntézu rôznych dýchacích enzýmov a tiež enzýmov glukoneogenézy. Glukózová represia má u *S. cerevisiae* za následok dlhodobú adaptáciu na degradáciu glukózy výhradne na etanol a CO<sub>2</sub>. V aeróbnej vsádzkovej kultúre môžu byť bunky po utilizácii glukózy dereprimované a môže nastať indukcia enzýmov dýchacieho reťazca. Bunka prejde do druhej fázy rastu, tzv. diauxie. To má za následok reutilizáciu vytvoreného etanolu, čím sa zníži jeho obsah vo vyfermentovanom médiu. U *S. cerevisiae* sa uplatňuje aj katabolická inaktivácia, ktorá je rýchlejšia ako katabolická represia. Zdá sa, že nastáva glukózou indukovanou deaktiváciou niektorých kľúčových enzýmov, ako je napríklad fruktóza-1,6-bisfosfatáza. *S. cerevisiae* je zaraďovaná ku glukózo-senzitívnym kvasinkám, u ktorých sa môže vyskytovať aj limitovaná oxidácia, kedy bunka rastie na sacharidovom substráte a pyruvát je v nadbytku. V prítomnosti kyslíka by sme preto mohli metabolizmus označiť za respiračne-fermentačný. U *S. cerevisiae* je optimalizácia respirácie nevyhnutná pri produkcii biomasy, zatiaľ čo optimalizácia fermentácie je dôležitá pri výrobe nápojov a v liehovarníckom priemysle (Rebroš a kol., 2005).

### 1.2.6 Kultivácia kvasiniek

Hlavné faktory, od ktorých závisí kultivácia kvasiniek:

- O<sub>2</sub>
- koncentrácia sacharidov
- teplota
- kmene kvasiniek
- pH

Optimálne pH je 4,2-5. Pri zachovaní ostatných optimálnych podmienok kultivácie má pH pomerne malý vplyv na rýchlosť rozmnožovania ako aj fermentácie (Šepeľová, 2003).

#### 1.2.6.1 Vsádzková kultivácia

Vsádzková kultivácia predstavuje uzatvorený systém, ktorý obsahuje počiatočné, limitujúce množstvo živín (Rebroš, 2005). U kvasiniek rodu *S. cerevisiae* sa vyskytuje tento typ kultivácie iba zriedka, pretože tento druh kvasiniek je citlivý na glukózu. Ak je potrebné naakumulovať väčšie množstvo biomasy, musí kultúra rásť v aeróbnych podmienkach a byť limitovaná glukózou. Z tohto dôvodu sa vsádzkové kultivácie využívajú predovšetkým na výskumné účely. *S. cerevisiae* sa môže za rovnakých podmienok správať rôzne, hlavne ak sa jedná o geneticky upravené kvasinky a práve preto sa väčšina autorov zaoberá najskôr s vsádzkovými kultiváciami, aby mohli byť následne stanovené ďalšie postupy pri prítokových a kontinuálnych kultiváciách. Vsádzkové kultivácie pomáhajú tiež stanoviť optimálne pH, teplotu alebo tlak kyslíka pre vybraný kultivačný proces (Šturdík a Zigová, 1999).

#### 1.2.6.2 Prítokovaná kultivácia

Fed-batch (prítokovaná) kultivácia súvisí s dávkovacou stratégiou. Jej cieľom je kontrolovať koncentráciu živín a predlžovať produktívnu fázu vsádzkového procesu (Rebroš a kol., 2005). Prítokovaním možno do média pridávať vyčerpané živiny resp. nemusia byť dodávané vo vysokých, často až inhibične pôsobiacich množstvách, ako to býva u vsádzkových kultivácií. Riziko kontaminácie je taktiež nižšie, keďže prebiehajúce procesy sú kratšie ako pri kontinuálnej kultivácii. Ďalšou výhodou je prerušenie procesu práve v optimálnom čase. Pri tomto spôsobe kultivácie je dôležité zloženie živnej pôdy. Na rast biomasy je najvhodnejšie použiť komplexné médium s kvasničným extraktom. Hodnoty zriedovacej rýchlosti sa nemôžu dostať nad hodnoty, kedy sa oxidatívny rast začína kombinovať s oxidatívno-fermentačným rastom. Takto môžeme dosiahnuť vysokú koncentráciu biomasy *S. cerevisiae*, až 50-60 g.dm<sup>-3</sup>. Rastová rýchlosť je kritickou veličinou najmä vo veľkých prevádzkach. Nie je totiž možné, aby sa živiny okamžite po dávkovaní dostali rovnomerne do všetkých priestorov reaktora (Šturdík a Zigová, 1999).

### 1.2.6.3 Kontinuálna kultivácia

Exponenciálny rast vsádzkovej kultúry môže byť predĺžený prídavkom čerstvého média do bioreaktora. Ak je čerstvé médium kontinuálne pridávané k takejto kultúre vhodnou rýchlosťou a produkty kontinuálne odoberané, po čase sa dosiahne ustálený stav, kedy tvorba novej biomasy je rovná strate buniek z reaktora. V porovnaní so vsádzkovými kultiváciami majú kontinuálne viaceré výhody: zníženie vstupných nákladov vďaka zvýšenej objemovej efektívnosti procesu, jednoduchosť kontrolovania procesu v ustálenom stave, zvýšená výťažnosť procesu, konštantné zloženie produktov (Rebroš, 2005).

Takýto proces sa uskutočňuje najmä s kvasinkami, ktoré nie sú geneticky modifikované, pretože u nich dochádza k problémom so stabilitou plazmidov. Kontinuálna kultivácia sa často využíva na produkciu metabolitov alebo etanolu, ako aj na produkciu kvasničnej biomasy pre potravinárske účely. So zvyšovaním sa koncentrácie etanolu sa zvyšuje aj jeho spotreba, dochádza k nárastu biomasy a k súčasnému poklesu koncentrácie glycerolu. Pri koncentrácii kyslíka vyššej ako 40% sa glycerol úplne stráca a aj koncentrácia etanolu klesá. Zried'ovacia rýchlosť ako aj teplota výrazne ovplyvňujú priebeh kultivácie. Dobré výsledky produkcie biomasy poukazujú na zried'ovaciu rýchlosť práve zabezpečujúcu výlučne oxidatívny rast. Oxidatívno-fermentačný rast je pre produkciu biomasy nežiaduci, pretože znižuje výťažnosť (Šturdík a Zigová, 1999).

### 1.2.6.4 Kombinovaná kultivácia

Kontinuálna kultivácia sa často spája s recykláciou buniek, možno tak dosiahnuť vysokú koncentráciu biomasy. Kontinuálny proces v spojení s tangenciálnou mikrofiltráciou dosahuje produkciu biomasy až  $300 \text{ g.dm}^{-3}$ . Súčasne sa môže separovať produkt vylučovaný do média a u bielkovín sa tak zabráni proteolýze. Ďalšou kombináciou je imobilizácia a kultivačný proces. U kvasiniek dochádza k ovplyvneniu fyziológie ako aj metabolizmu a teda aj celého kultivačného procesu. Pri imobilizácii *S. cerevisiae* do karagénanového gélu je dôležité jeho zloženie a počiatková bunková koncentrácia, lebo od toho závisí efektívnosť celého procesu. Pri aeróbnej kultivácii akou je aj kultivácia biomasy sa zvýšenie prestupu kyslíka zabezpečuje buď prídáním kyslíkového vektora (napr. n-dodekán, preflourokarbón) do média alebo úpravou

bioreaktora. Technická úprava bioreaktoru na zintenzívnenie prestupu kyslíka sa využíva podstatne častejšie, používajú sa tzv. „air-lift“ reaktory (Šturdík a Zigová, 1999).

#### 1.2.6.5 Kultivácia kvasiniek firmy LincoHefe využívaných na produkciu selenizovaných kvasiniek

Produkcia kvasiniek rodu *S. cerevisiae* je viacstupňový proces rozmnožovania čistej kultúry. Prvý krok tvorí príprava laboratórnej čistej kultúry. Za sterilných podmienok sa kvasinky naočkujú do kvapalnej živnej pôdy alebo na šikmý agar. Následne sú inkubované v termostate po dobu asi 24 hodín pri teplote 30°C, pričom dochádza na dne k tvorbe zákalov. Druhý krok tvorí príprava prevádzkovej čistej kultúry. Substrát melasa, ktorá sa používa i vo všetkých nasledujúcich stupňoch produkcie kvasiniek, je v prvom rade zdrojom uhlíka a energie, lebo obsahuje až asi 47-50 % sacharózy. Melasa obsahuje zlúčeniny dusíka, fosforu a síry iba v malej miere, preto musia byť tieto prvky k substrátu pridávané. Melasa sa musí najskôr sterilizovať horúcou ostrou parou, kvôli obsahu iných mikroorganizmov. Získavanie podnikových čistých kultúr prebieha kultiváciou čistej laboratórnej kultúry v malom fermentačnom zariadení na melasovej sladine (sladina sa pridáva ako rastový faktor) a trvá približne 24 hodín. Na základe slabého prevzdušnenia a vysokého obsahu cukru tvoria kvasinky prevažne alkohol a málo bunkovej hmoty. V treťom kroku nastáva tvorba násadových kvasiniek 1, ktoré sa kultivujú „Fed-batch“ systémom. Takýto typ kultivácie sa uskutočňuje z dôvodu látkovej výmeny, pretože prívodom vzduchu a zníženým obsahom sacharózy v substráte sa dosahuje nárast biomasy a znižuje sa produkcia alkoholov. Obsah alkoholov, pH hodnoty ako aj teplota sú vyhodnocované počítačom a po 16 hodinovej kultivácii sa určí definitívne množstvo melasy, ktorá sa bude kontinuálne privádzať do fermentora a je merané indukčným prietokomerom a regulované procesným riadiacim systémom. Kultivácia je ukončená zastavením prísunu živín, kvasinky sú od zápery oddelené najčastejšie pomocou centrifúg. Odtekajúce kvasinky sú zachytávané do chladiacich nádrží a okamžite chladené. V štvrtom stupni sa tvoria násadové kvasinky 2, pričom sa na kultiváciu použije časť násadových kvasiniek 1 a kultivácia prebieha za rovnakých podmienok ako pri násadových

kvasinkách 1. Násadové kvasinky slúžia ako inokulum pre tzv. expedičné kvasinky (Merz a Holl, 2007).

### **1.2.7 Produkcia biomasy kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae***

Produkcii biomasy je vhodné uskutočňovať ako vysoko-hustotnú (high-cell density – HCD) kultiváciu. Kvasinky musia byť v bioreaktore limitované glukózou, čo možno dosiahnuť iba prítokovanou alebo kontinuálnou kultiváciou. Hustotu buniek neovplyvňuje iba systém kultivácie, ale aj počiatočné podmienky, množstvo inokula (násadové kvasinky), celkový objem bioreaktora, použitý kvasinkový kmeň, dĺžka kultivácie a spôsob stanovenia sušiny (Šturdík a Zigová, 1999).

#### **1.2.7.1 Pekárske droždie**

Na produkciu pekárenského droždia (aj piva) sa vyžaduje vyrovnanosť tvaru buniek (vajcovitý alebo krátky elipsoidný), veľkosti buniek a stálosť technologických vlastností. V priebehu rokov sa vyseletovali kmene kvasiniek s poškodenou sporulačnou schopnosťou, pretože sporulácia, ako aj pohlavný proces rozmnožovania, spôsobujú premenlivosť kultúr eukaryotických organizmov. Boli získané bunky polyploidné alebo aneuploidné, kedy bol v dôsledku nadbytku chromozómov poškodený priebeh meiózy (Šilhánková, 2009).

Pekárske droždie sa pripravuje aeróbnou kultiváciou z melasy. Melasová zápara sa prevzdušňuje sterilným stlačeným vzduchom privádzaným ku dnu kvasných tankov, pričom aeróbny metabolizmus je zabezpečený prítokovaním zápary („Fed-Batch“ systém), takže sa kvasinky rozmnožujú za zníženej koncentrácie sacharózy. Napriek tomu dochádza k tvorbe určitého množstva etanolu v dôsledku čiastočnej hexózovej represie (Šilhánková, 2009). Melasa musí byť obohatená o amónne soli a fosfát a kultivácia prebieha vo viacerých stupňoch s postupne sa zväčšujúcimi objemami. Melasa sa zo zásobníkov čerpá do sterilizačnej kade, kde sa po úprave pH a pridaní minerálnych látok sterilizuje ostrou parou. Centrifugáciou z posledného stupňa kultivácie sa získava tzv. kvasničné mlieko, ktoré sa riedi čistou vodou a opakovane sa centrifuguje na 11 % sušiny. „Lisované“ droždie obsahuje asi 30 % sušiny a pripravuje

sa na kontinuálnych rotačných filtroch, prípadne filtráciou na kalolisoch (Michalík a kol., 1999).

#### 1.2.7.2 Krmné droždie

Výroba krmného droždia prebieha aeróbnou kontinuálnou kultiváciou, systémom chemostatu, pričom používaným substrátom sú predovšetkým odpadové suroviny. Sušením kvasničného mlieka v rozprašovacích sušiarňach sa získava konečný produkt (Michalík a kol., 1999).

#### 1.2.8 Bunková hmota kvasiniek z nutričného hľadiska

Bunková hmota kvasiniek obsahuje 65 až 83 % vody, pričom nielen obsah vody ale aj obsah sušiny závisí od veku a kultivačných podmienok buniek.

Hlavným podiel sušiny tvoria bielkoviny (zvyčajne 50 %) a glykogén (u *S. cerevisiae* až 30 %). Nukleové kyseliny predstavujú 10 % sušiny, polysacharidy 5 % a popol 8 %.

Podiel bielkovín a glykogénu môžeme v pekárskom droždí regulovať predovšetkým dávkovaním dusíkatých živín v živnom médiu. Znížením pomeru dusíkatých živín k uhlíkatým znížime obsah bielkovín a zvýšime obsah glykogénu, čo sa prejavuje síce zníženou kultiváciou, ale zvýšenou trvanlivosťou droždia. Kvasinky nemôžu nahradiť celú požiadavku živočíšnych bielkovín vo výžive človeka kvôli vysokému obsahu nukleových kyselín, pretože vysoký obsah RNA a purínov v potrave vedie k vzniku závažného kĺbového ochorenia - dny. Maximálna denná dávka RNA je asi 2 g, preto sa v súčasnosti kladie veľký dôraz na odstránenie purínov a RNA, predovšetkým z kvasiniek. Z organických zlúčenín sa v nízkych koncentráciách vyskytujú predovšetkým vitamíny skupiny B (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>) a provitamín D (ergosterol). Na vitamíny skupiny B sú bohaté predovšetkým pivovarnícke kvasinky, ktoré odčerpávajú z mladiny. Hlavnou zložkou popola je oxid fosforečný, ktorého obsah v sušine môžeme do určitej miery regulovať zložením kultivačného prostredia. Z iónov kovov prevažuje K<sup>+</sup>, zatiaľ čo Mg<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> a Na<sup>+</sup> sú zastúpené v oveľa menšom množstve (Šilhánková, 2009).



### 1.2.9 Možnosti využitia kvasiniek

Kvasinky sú dlhodobo využívané v spojitosti s biotechnológiami, potravinárskym a farmaceutickým priemyslom. Tradične sa využívajú pri výrobe dôležitých produktov ako sú chlieb, víno, pivo, šumivé alkoholické nápoje, či destiláty. Takýchto špecifických fermentácií sa zúčastňujú hlavne kmene rodu *Saccharomyces*. Takisto sa využívajú na produkciu palív, invertáz, glycerolu alebo sa využívajú ako súčasť krmív pre hospodárske zvieratá (Kaur a Bansal, 2006). Pri výrobe piva vzniká ako vedľajší produkt „sladový kvet“ (klíčky a koreňky jačmeňa), ktorý je bohatý na živiny a využíva sa ako vitamínový doplnok do krmív a zdroj rastových faktorov pre priemyslové fermentácie (Michalík a kol., 1999). Špeciálne kmene *S. cerevisiae* sa používajú na prípravu provitamínu D (ergosterolu), ktorý sa ožiarением UV svetlom mení na vitamín D. Z kvasiniek sa izolujú aj enzýmy (invertáza - extracelulárny enzým používaný v cukrovarníctve a pekárstve), koenzýmy, nukleotidy či nukleozidy (ATP, NAD<sup>+</sup>, ADP) (Šilhánková, 2009).

V súčasnosti sa kvasinky v priemysle uplatňujú čoraz viac. Nedávno našli viaceré druhy kvasiniek využitie v biotransformáciach, bioremediáciach, pri výrobe chirálnych zlúčenín, pri výrobe aditívnych látok, pri spracovaní tukov a olejov, pri kontrolách vo farmácii a pri výrobe bielkovín. Rozvoj genetiky a molekulárnej biológie poskytuje možnosti genetickej manipulácie kvasiniek a ich využitie pre komerčné účely (www.chem.sk, [cit. 2008-04-14]). Vedľajšími produktami pri výrobe liehu sú prchavejšie zložky (predovšetkým aldehydy) a vyššie alkoholy, tzv. pribudlina, ktoré majú technické využitie (napr. rozpúšťadlá) a výpalky, používané na výrobu peletovaných krmív alebo krmneho droždia (možné len s prídavkom melasy) (Michalík a kol., 1999).

Kvasinky, ktoré majú zvyčajne maximálnu odolnosť voči toxicite selénu sa využívajú v bioremediácii pôdy znečistenej týmto prvkom (Tamas a Wysocki, 2001). Pekárske kvasinky sú výborným zdrojom čistých potravinárskych bielkovín (40-60 %). Bunky sa najskôr mechanicky dezintegrujú, bunkové steny sa oddelia centrifugáciou a miernym zahriatím sa aktivujú ribonukleázy, ktoré hydrolyzujú RNA (na akceptovateľné množstvo asi 2 %), pretože väčší obsah nukleových kyselín pôsobí na organizmus škodlivo. Pridaním etanolu sa vyzráža asi polovica bielkovín, ktoré sú vysoko čisté a nedenaturované, čo má význam pre ich využitie ako náhrady časti mäsa. Bunkové steny sa môžu po ich izolácii využívať ako krmivo (Michalík a kol., 1999).

## 1.3 Selenizované kvasinky

### 1.3.1 Selén v mikroorganizmoch

I keď sú u mikroorganizmov určité podobnosti v metabolizme selénu a síry, sú tu i rozdiely založené na individualite týchto prvkov. Príjem selénu u *Chlorella vulgaris* narúša sulfát a príjem sulfátu u *Penicillium chrysogenum* je blokovaný seleničitanom. Predpokladá sa, že táto inhibícia je sprostredkovaná sulfátovou permeázou. Toxicita selénanov v kvasinkách môže byť znížená sulfátom (Shamberger, 1983).

V roku 2008 sa Ouerdane a Mester po prvýkrát zaoberali kvantitatívnym nahradením metionínu (Met) za selenometionín (SeMet), pričom zaznamenaná substitúcia bola vyššia ako 98 %, pričom kvasinky štandardného typu rástli na médiu, ktoré obsahovalo selenometionín. Včleňovanie selénu do proteínov v kvasinkách vo forme selenometionínu či prostredníctvom rôznych organických a anorganických foriem selénu a síry prítomných v médiu, ktoré umožňujú optimalizáciu zloženia syntetického rastového média, sa následne zabezpečuje maximálne zabudovávanie selenometionínu do kvasiniek. Použitím kyseliny askorbovej a minimálneho množstva cysteínu ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) sa dosiahlo zabudovanie limitované oxidatívnym stresom vzhľadom na prítomnosť selénu. S výnimkou malého množstva cysteínu ( $5 \mu\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ), neboli žiadne iné zdroje síry nevyhnutné na zabezpečenie rastu kvasiniek. V médiu obsahujúcom  $\text{Se}^{\text{IV}}$  bola dosiahnutá maximálna 50 % substitúcia metionínu za selenometionín, čo je výrazne viac ako u zvyčajných, komerčne dostupných selenizovaných kvasiniek. Pre rast kvasiniek v médiu, ktoré neobsahovalo metionín, ale bolo doplnené selenometionínom, mohla byť stanovená úplná substitúcia metionínu za selenometionín. Konkrétny kmeň kvasiniek, ktorý nie je schopný syntézy metionínu za využitia anorganickej síry, produkoval SeMet v prítomnosti anorganicky viazaného selénu. Táto skutočnosť by mohla poukazovať na to, že zabudovávanie anorganických solí selénu ( $\text{S}^{\text{VI}}$  a  $\text{Se}^{\text{IV}}$ ) nenastáva výhradne tými istými biologickými dráhami ako sú určené pre síru. Redukcia anorganických foriem selénu na selán ( $\text{H}_2\text{Se}$ ), ktorý reaguje s organickými zlúčeninami prítomnými v médiu alebo v kvasinkách a možný metabolizmus prostredníctvom nešpecifických enzymatických dráh (ako je transsulfurácia), môžu mať značný význam v produkcii selénových aminokyselín počas rastu kvasiniek.

### 1.3.2 Charakteristika selenizovaných kvasiniek

Väčšina prípravkov, ktoré sú v predaji, má základ v kvasinkách (najčastejšie sa jedná o *S. cerevisiae*) a v nich organicky viazanom seléne. Obsah Se v kvasinkách býva zväčša 62,5 mg na 100 g kvasiniek. Množstvo Se, ktoré ľudský organizmus potrebuje, je 50-200  $\mu\text{g}\cdot\text{deň}^{-1}$ , pričom výrobcovia odporúčajú podávať potravinové doplnky vo forme selenizovaných kvasiniek spolu s potravou (Sippel, 1995).

Fungujúci imunitný systém vyžaduje adekvátne hladiny selénu, pretože selén výrazným spôsobom ovplyvňuje aktivitu daného systému. Dlhodobé podávanie selénom obohatených kvasiniek skupine ľudí nad 65 rokov v dávke 100  $\mu\text{g}\cdot\text{deň}^{-1}$  po dobu šiestich mesiacov, obnovilo resp. podporilo niektoré funkcie imunitného systému. U ľudí, ktorým podávali 200  $\mu\text{g}$  selénu denne pšenickou a kvasinkami obohatenými selénom, sa zvýšila hladina selénu v plazme zo 70 na 160  $\mu\text{g}$  (Maďarič a Kadrová, 2003).

Ako výživový doplnok možno selén nájsť vo forme selenizovaných kvasiniek buď samotný alebo spolu s antioxidantmi pôsobiacimi vitamínmi, minerálnymi látkami, stopovými prvkami a aminokyselinami. Selén sa v selenizovaných kvasinkách nachádza ako v anorganicky, tak aj v organicky viazaných formách, predovšetkým ako selenometionín alebo selenocysteín. Podľa nových pokusov môžu takéto kvasinky obsahovať až 20 rozličných zlúčenín selénu a jedná sa predovšetkým o vysokomolekulové organické štruktúry (Bayer et al., 2000).

Kvôli znepokojeniu vyjadrenému európskou spoločnosťou, vyhlásila Vedecká potravinárska komisia, že selén obsahujúce kvasinky sú nedostatočne charakterizované a môžu potenciálne vytvoriť toxické hladiny selénu v tkanivách. Súčasné prehodnotenia majú preskúmať oprávnenosť tohto nebezpečenstva. Diagramy biosyntézy a metabolizmu selénových zlúčenín ukazujú, ktorá forma sa môže vytvoriť v selénových preparátoch a ktorú môžeme očakávať v selenizovaných kvasinkových preparátoch. Vo všetkých prípadoch je selenometionín najviac zastúpenou formou, predstavujúcou až 54-74 % celkovo obsiahnutého Se (Rayman, 2004).

Se-kvasinky sú schopné zvýšiť aktivitu selenoenzýmov a ich uplatnenie je vyššie ako anorganických zdrojov selénu. Sprostredkované štúdie Se-kvasiniek ukázali prospech tejto formy pri prevencii rakoviny, na imunitnú odpoveď a na HIV infekciu. Z asi jedného tucta dodatkových štúdií, žiaden nepreukázal toxicitu vyrovnávanú prísunom 800  $\mu\text{g}$  Se. $\text{deň}^{-1}$  za obdobie dlhšie ako jeden rok. Bolo skonštatované, že

selenizované kvasinky z akreditovaných výrobní sú adekvátne charakterizované a reprodukčnej kvality (Rayman, 2004).

Dnešné štúdie majú za cieľ dosiahnuť rovnováhu medzi zabudovaním selénu a optimálnym rastom kvasinkových buniek, súčasne za zvýšeného antioxidačného obranného statusu kvasiniek. Počas oxidatívneho stresu plní tento prvok dôležitú úlohu u všetkých buniek rovnako. Do živného média bol pridaný seleničitan sodný o rôznej koncentrácii. Doplnok selénu výrazne zvýšil hladinu glutatióneroxidázy v porovnaní s ostatnými oxidačnými enzýmami, rovnako sa zlepšil enzýmový obranný systém kvasiniek voči oxidatívnym účinkom. Tieto výsledky poukazujú na dobré nutričné využitie, takže selenizované kvasinky môžeme považovať za bezpečný zdroj selénu (Kaur a Bansal, 2006).

Počas rastu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* je seleničitan, ktorý je potenciálne toxický a v menšej miere biologicky dostupná forma Se ako organicky viazaný selén, transformovaný na bezpečnú a vysoko biologicky aktívnu formu selénu, s lepšími nutričnými vlastnosťami. Poznatky o biosyntéze týchto zlúčenín majú rozhodujúci význam pre pochopenie mechanizmu zabudovania selénu a predovšetkým pre antikarcinogénnu aktivitu selenizovaných kvasiniek (Stenchuk, 2006).

Podľa Polatajko a spol. (2004) bola overovaná komplexnosť vzniku vo vode rozpustných selénových zlúčenín v kvasinkách. Boli zistené prekvapivé výsledky v porovnaní s predchádzajúcimi štúdiami. Pozorovanie totiž poukazuje na to, že SeMet je vo vode nerozpustná frakcia, ktorej viazanie fyzikálnymi mechanizmami na zložky bunkových stien je uprednostňované pred chemickou inkorporáciou do proteínov. Selénom obohatené kvasinky obsahujú selén v organickej i anorganickej forme, čo je dôležité z hľadiska jeho biologickej dostupnosti. Aktivita enzýmu glutatióneroxidázy v krvných doštičkách sa po užívaní Se-kvasiniek za štyri týždne zdvojnásobila. Nízky status selénu v organizme ľudí je úmerný riziku kardiovaskulárnych alebo onkologických chorôb. Soli selénu sú dobre rozpustné vo vode a ak ich prijmeme väčšie množstvo, vyplavia sa močom (Blatná, 1998).

Selén má centrálnu úlohu v antioxidačných dráhach a ako kofaktor glutatióneroxidázy. Dnešné štúdie poukazujú na hodnotenie štyroch rozličných preparátov inaktivovaných kvasiniek, obsahujúcich rozdielne koncentrácie selénu a glutatiónu, na kombinovanú aterosklerózu a diabetes u škrečkov. Škrečky boli dokrmované kvasinkovými produktami v priebehu troch mesiacov. Kvasinky obohatené

o najvyššie dávky selénu a glutatiónu redukovali hmotnosť indukovanú cukrovkou, inhibovaný bol aj nárast cholesterolu a triglyceridov v plazme, spôsobený krmivami s vysokým obsahom cholesterolu a tukov, vzrástol čas potrebný na oxidáciu LDL, taktiež došlo k vyššej inhibícii aterosklerózy ako pri skrmovaní kvasiniek obohatených o nižšie hladiny selénu a glutatiónu. Záverom bolo konštatované, že pre zefektívnenie priaznivých zmien glutatiónu, cholesterolu, aterosklerózy a na demonštráciu antioxidantného efektu boli vhodné kvasinky s vyšším obsahom selénu a aj glutatiónu. Kvasinky s vysokým obsahom selénu a nižším obsahom glutatiónu boli najvhodnejšie na upravenie hladín selénu a glukózy (Agbor a Vinson, 2007).

### 1.3.3 Biochemizmus selénu v kvasinkách

Anorganický selén môže byť asimilovaný všetkými druhmi organizmov, i keď využitie jeho zlúčenín závisí od ich chemickej povahy a druhu organizmov. Asimilácia selénanu, ktorý je hlavným zdrojom selénu v pôde, nastáva v rastlinách ako i u kvasiniek dráhou redukcie sulfátu, keďže príslušné enzýmy nerozlišujú síru a selén. U Archeí a Eubaktérií (pravdepodobne nie u všetkých) a u živočíchov (bezstavovce a stavovce) môže byť selén zahrnutý do polypeptidových reťazcov vo forme SeCys, ktorú označujeme ako dvadsiatuprvú proteínogénnu aminokyselinu. Syntéza týchto proteínov, ktoré nazývame selenoproteíny, má zahŕňať selenošpecifické mechanizmy, ktoré majú rozlíšiť selén a síru. UGA kodón uskutočňuje viazanie SeCys do proteínov, ale v iných prípadoch vystupuje ako stop kodón, čiže sa vyskytuje na konci génu. Tento spôsob selenocysteínového začlenenia je špecifický, a tak sa Se stáva komponentom aktívnych centier množstva selenoproteínov, napríklad formiátdehydrogenáz, glutatiónpoxidáz a tioredoxínreduktáz. Počas niekoľkých desaťročí, po objavení selénu ako dôležitého mikroprvku, bolo identifikovaných viac ako 20 eukaryotických a 15 prokaryotických selenoproteínov obsahujúcich dvadsiatuprvú kódovanú aminokyselinu, selenocysteín. Tieto proteíny sa podieľajú na redoxných reakciách prostredníctvom selenocysteínu, a plnia tak dôležitú úlohu v katalytickom cykle. Zohrávajú taktiež významnú úlohu pri malígnych nádoroch, delení buniek, metabolizme kyslíka, detoxikačných procesoch, indukovanej apoptóze a funkcii imunitného systému (Stenchuk et al., 2006).

Rýchlosť biosyntézy selenoproteínov v mitochondriách a cytosole kvasiniek *Saccharomyces uvarum* závisí od koncentrácie seleničitanu sodného v médiu.

V mitochondriách kvasiniek sa nachádza selenoproteín (SP1) zvyšujúci aktivitu glutatiónpoxidázy, pričom jej koncentrácia okamžite maximálne stúpa a znižuje sa koncentrácia seleničitanu sodného. Druhý selenoproteín (SP2) bol nájdený v mitochondriách aj cytosole. Oba proteíny obsahujú L-selenocysteín. Bolo dokázané, že koncentrácia selénu v suchej hmote kvasiniek vzrastla po obohatení média seleničitanom sodným (Haas a Velten, 1992).

Druhý spôsob zabudovávania selénu do proteínov je nešpecifický, čo znamená, že môže nahradiť síru voľnými aminokyselinami, akými sú SeMet a SeCys. Avšak takéto proteíny nenazývame selenoproteínmi. Účinok substitúcie metionínu a cysteínu za ich selénové deriváty závisí od počtu substitúcií a ich umiestnenia v polypeptide, čo môže jeho funkciu podporiť alebo znížiť až na nulu, prípadne ju neovplyvňovať. Tento spôsob funguje na úrovniach každého živého systému, v kvasinkách i organelách, kde prebieha syntéza selenoproteínov (Riese, 2007).

Bolo stanovené, že metabolizmus selénu u kvasiniek nezahŕňa syntézu selenoproteínov, pretože genóm kvasiniek neobsahuje kodón UGA v oblasti otvoreného čítacieho rámca. Syntézy selenoproteínov nie sú schopné ani rastliny. Tento fakt predpokladá, že kvasinky ako aj rastliny stratili príslušné mechanizmy v priebehu evolúcie, prípadne nebolo spracované dostatočné množstvo štúdií jednotlivých druhov a rodov (Stenchuk et al., 2006).

Štúdium 40 druhov kvasiniek, z toho 404 kmeňov, preukázalo široké rozpätie tolerancie k selénovým zlúčeninám. Rast niektorých kmeňov bol inhibovaný v roztoku selénu už pri koncentrácií  $10^{-4}$  mol.dm<sup>-3</sup>, zatiaľ čo iné rástli aj v prítomnosti  $10^{-1}$  mol.dm<sup>-3</sup> koncentrácie. Vo všeobecnosti platí, že askomycéty sú tolerantnejšie k selénovým zlúčeninám, ako bazídiové huby. Chemické zloženie média, predovšetkým obsah aminokyselín obsahujúcich síru, ovplyvňuje citlivosť k tomuto prvku. Vplyv selénu na kvasinky bol pozorovaný za použitia selénanu ako jeho zdroja. Bolo dokázané, že tento analóg síranu ovplyvňuje rast *S. cerevisiae* v závislosti od jeho koncentrácie. V prítomnosti 1-5 mmol.dm<sup>-3</sup> selénanu v živnej pôde sa spomalí exponenciálny rast kultúry a prechod do stacionárnej fázy nastáva za zníženého počtu buniek. Negatívny vplyv selénanu na rast kvasinkovej kultúry spôsobuje najmä potlačenie mitózy, ako aj letálny účinok na bunku (Golubev a Golubev, 2002).

Tabuľka 3: Obsah (v %) organických a anorganických zlúčenín Se v kvasinkovej biomase (pričom celkový obsah selénu je 1922  $\mu\text{g.kg}^{-1}$  suchej hmoty kvasiniek) (Stenchuk et al., 2006).

Zlúčenina	%
Selénan	nebol detekovaný
Seleničitan	1
Selenocysteín	0,5
Selenocystationín	1
Se-methylselenocysteín	0,5
Glutamyl-Se-metylcysteín	0,5
Selenometionín	85
Se-adenosylselenohomocysteín	3
Selenolantionín	1,5
Celkový obsah selénu	93

Za určitých podmienok môžu kvasinky akumulovať selén a zabudovávať ho do zlúčenín uvedených v tabuľke č. 3. Pri kultivácii v živnom médiu so seleničitanom je za istých podmienok okolo 60 % organického selénu lokalizovaných v štruktúrnych kompartmentoch kvasiniek, menovite v zložkách membránových mikrozómov, v endoplazmatickom retikule, Golgiho aparáte, mitochondriách a iných organelách. Organicky viazaný selén bol nájdený v peptidoch, kde bola selénom nahradená síra, v lipidových frakciách (membránových i nemembránových), glykoproteínových frakciách bunkových stien a štruktúrnych zložkách kvasinkových povrchov. Napriek tomu ešte stále nie je daná definitívna odpoveď na otázku, či účinnosť tohto zložitého biologického systému závisí od substitúcie síry selénom. Pravdepodobne ako v prípade enzýmov u baktérií, efekt bude závisieť od počtu a lokalizácií substitúcií (Stenchuk et al., 2006).

### 1.3.4 Selenoproteíny v kvasinkách

Selén je vo forme selenocysteínu súčasťou selenoproteínov a zložkou všetkých známych selenoenzýmov. SeCys je 21. proteinogénna aminokyselina, ktorej tvorba je

špecificky predurčená v genetickom kóde. Selén je chemicky veľmi podobný síre a vykazuje ako kovové tak aj nekovové vlastnosti.

V sedemdesiatych rokoch bola glutatiónperoxidáza popísaná ako prvý selenoproteín. V súčasnosti sa pripisuje tomuto enzýmu široký pozitívny biologický význam pri infekčných a autoimunitných ochoreniach, ako aj pri prevencii rakoviny (Rayman et al., 2008).

Odporúčaná dávka je  $1 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$  telesnej hmotnosti. Niektorí odborníci majú tendenciu odporúčať vyššie denné dávky selénu, pričom dávky už o hodnote  $120 \mu\text{g}\cdot\text{deň}^{-1}$  sú v súčasnej dobe veľmi diskutované.

Denný prísun asi  $200 \mu\text{g}$  selénu vo forme selenizovaných kvasiniek, ktoré obsahujú predovšetkým selenometionín, má preukázateľne signifikantný ochranný účinok pri rozvoji niektorých foriem rakoviny (Riese, 2007).

#### 1.3.4.1 Selenoproteín P

Selenoproteín P (SePP) je asi 50 kDa veľký extracelulárny glykoproteín, ktorý je exprimovaný hlavne v pečeni a v plazme predstavuje viac ako 50 % celkového obsahu. V porovnaní s ostatnými ľudskými selenoenzýmami obsahuje až 10 molekúl SeCys. Uprostred molekuly sa nachádzajú dve domény, bohaté na histidín, ktoré umožňujú viazanie na heparín (glukóزامínglykán) alebo bunkové membrány. Fyziologická funkcia SePP je ešte aj dnes diskutovaná. Na základe štúdií s rádioaktívnym selénom sa dá predpokladať, že tento proteín zabezpečuje predovšetkým transport a zásobenie cielených periférnych orgánov selénom. SePP tiež redukuje v prítomnosti tioredoxínu aj fosfolipidové peroxidy (Riese, 2007). Taktiež znižuje peroxynitritom indukované poškodenia endotelu na vnútorných stenách ciev, čím možno predpokladať jeho antioxidantnú funkciu vo vaskulárnom systéme. Ďalšia možná funkcia môže spočívať v detoxikácii ortuti (Hg) prostredníctvom väzby Se a Hg v ekvimolárnych množstvách na SePP (Rayman et al., 2008).

#### 1.3.5 Produkcia selenizovaných kvasiniek

Nedostatok selénu u hospodárskych zvierat sa najčastejšie rieši pridávaním anorganických zlúčenín vo forme selénanu alebo seleničitanu do krmív. Od určitého času je povolený príjem selénu aj vo forme selenizovaných kvasiniek (napr. Alkosel®



R397). Keďže v kvasinkách je selén viazaný organicky v SeMet alebo v SeCys, je zvierací organizmus lepšie obohatený o selén (Merz a Holl, 2007).

Na produkciu selenizovaných kvasiniek sa používajú pekárské kvasinky, na čo sú obzvlášť vhodné kmene *Saccharomyces cerevisiae*. Ako živné médium sa používa sterilizovaná a zriedená melasa s prídavkom glukózy. Kyselinou fosforečnou sa upraví pH a živná pôda sa obohatí o seleničitan sodný. Po kultivácii sa bunky od zápary oddelia v odstredivkách a premývaním kvasiniek sa odstraňujú prípadné zvyšky anorganicky viazaného selénu. Takéto kvasinky sú chladené, vysušené a balené.

Počas kultivácie sa selén viaže do aminokyselín pôvodne obsahujúcich síru. Čím viac síry je v zápare k dispozícii, tým ťažšie sa zabudováva selén do kvasiniek. Preto, keď melasa obsahuje väčšie množstvo síranu, je čiastočne nahradzovaná glukózou. Selén je namiesto síry zabudovávaný na to určenými enzýmami do SeCys a SeMet a následne do jednotlivých proteínov. Cieľom takejto kultivácie je dosiahnuť, čo najväčšie množstvo organicky viazaného selénu.

Na základe vysokej biologickej dostupnosti selénu v Se-kvasinkách je u hospodárskych zvierat zlepšený zdravotný stav, plodnosť, zvieratá sú vitálnejšie a posilnená je aj ich obranyschopnosť. Taktiež sa dosahuje zvýšená kvalita mlieka, mäsa a vajec (tabuľka 4) (Merz a Holl, 2007).

*Tabuľka 4:* Význam lepšieho zabezpečenia selénom u hospodárskych zvierat (Merz a Holl, 2007).

Nárast selénu		Zlepšený prevod selénu matkou
Zdravotný stav/ reprodukcia	Kvalita produktu	
+ odolnosť voči stresu, zlepšenie imunitného statusu	+ kvalita mlieka - výskyt subklinickej mastitídy - počet somatických buniek v mlieku	+ imunitný status zlepšený transfer pasívnej imunity a lepšia rezistencia voči stresu
+ odchod placenty	+ kvalita vajec + trvanlivosť, čerstvosť	+ kvalita svaloviny - znížené riziko svalových chorôb (myopatie)
+ kvalita spermií (objem, pohyblivosť)	+ kvalita mäsa: - strata tekutín - oxidačné riziko (farba, pH, trvanlivosť)	
- známky nedostatku selénu		- známky nedostatku selénu

Kvantitatívny pomer rozličných zlúčenín selénu v biomase selenizovaných kvasiniek, závisí od podmienok kultivácie. Je možné produkovať pekárenské kvasinky vysokej kvality obohatené selénom s intenzitou jeho asimilácie  $40\text{-}50 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{hod}^{-1}$ . Obsah neželaného anorganického selénu v bunkách môže byť znížený na 5-6 %, ale v tom prípade bude výt'azok biomasy asi o 20 % nižší. V zodpovedajúcich podmienkach (pH, teplota, obsah selénu v živnom médiu, atď.) bunky *S. cerevisiae* môžu naakumulovať až  $1000\text{-}2000 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  suchej hmoty a viac ako 80% selénu môže byť vo forme SeMet. Na optimalizáciu kvasinkovej kultúry je výhodné použiť procesy kontinuálnej kultivácie (Stenchuk et al., 2006).

Porovnávacie štúdie vplyvu dvoch zlúčenín selénu, organického (selenometionín) a anorganického (seleničitan) na rast, životnosť a antioxidačnú funkciu buniek *S. cerevisiae* ukazujú, že obe formy selénu pri rastúcej koncentrácii v živnej pôde znižujú životnosť buniek ako aj ich kvantitu v kultúre, i keď obsah selénu v bunkách stúpa a účinok selenometionínu na spomínané pochody je silnejší (Bansal a Kaur, 2002).

### 1.3.6 Komerčné preparáty obohatené o selén

Z hľadiska prevencie onkologických, ale aj kardiovaskulárnych ochorení, je výhodné fortifikovať potraviny nielen samotným selénom, ale zmesou mikronutrientov, ktoré majú ochranný vplyv pri vzniku týchto ochorení, ako je tomu napr. u prípravku „Se-Vita“.

Zloženie „Se-Vita“

Selén v organickej forme	12 $\mu\text{g}$
Vitamín E	1,4 mg
Vitamín B <sub>6</sub>	0,3 mg
Vitamín B <sub>12</sub>	0,4 $\mu\text{g}$
Kyselina listová	50,0 $\mu\text{g}$

(Maďarič a Kadrabová, 1999).

Ďalšou novinkou na trhu je Lalmin<sup>TM</sup> Se, čo sú inaktivované neporušené bunky kvasiniek, ktoré obsahujú zvýšené množstvo organicky viazaného selénu vo forme L (+)-selenometionínu, čiže vo forme ľahko dostupnej pre ľudský organizmus. Lalmin<sup>TM</sup> Se je produkovaný kmeňmi rodu *Saccharomyces cerevisiae*, u ktorých bola

vyselektovaná vlastnosť asimilovať veľké množstvo selénu a viazať ho do selenometionínu.

Lalmin™Se ponúka ľahšie a bezpečnejšie dávkovanie v porovnaní s anorganickými zdrojmi selénu. Zabudovávaná dávka selénu sa ľahko vmiešava do finálneho produktu, dôsledkom čoho je garancia dobrej homogénosti.

Odporúčanému dennému príjmu selénu ( $55\mu\text{g}\cdot\text{deň}^{-1}$  pre dospelých podľa US Food and Nutrition Board - National Academy of Science) zodpovedá dávka 27,5 mg Lalmin™Se 2000 (obsahuje 2000 ppm selénu). Dané množstvo neovplyvňuje chuť, farbu ani konzistenciu výsledného produktu.

Lalmin™Se 2000 existuje aj v rozpustnej forme, čo umožňuje aj fortifikáciu nápojov biologicky dostupným selénom.

Práve vďaka jeho vlastnostiam je Lalmin™Se 2000 vhodný na obohatenie množstva jedál a nápojov o prístupný selén, od sušienok, či pasterizovaného mlieka až po mäso. Takto obohatené produkty ponúkajú prírodný, ľahko dávkovateľný a bezpečný zdroj selénu, pôsobí antioxidantne a je doplnkom vitamínu E (Rayman, 2004).

Patentom chránené farmaceutické selénové kvasinky firmy Pharma Nord s názvom SelenoPrecise sú jediné selénové kvasnice na celom svete, ktoré vykazujú stálu kvalitu a dostatočne vysoký stupeň biologickej dostupnosti. U jedincov užívajúcich SelenoPrecise bolo zaznamenaných o 63 % menej prípadov rakoviny prostaty, o 58 % menej prípadov rakoviny hrubého čreva a konečníka a o 46 % menej prípadov rakoviny pľúc (Trnková, 2005).

Veatch a kol. (2005) svoju prácu zamerali na zistenia, do akej miery udávaná dávka zodpovedá skutočnému obsahu Se u jednotlivých značiek, ako aj na zmeny, ktoré môžu nastať v obsahu u jednotlivých produktov po 30 mesiacoch. V roku 2000 testovali 15 rozličných doplnkov Se 12-tich rozdielnych značiek, zakúpených v lekárňach, potravinárskych obchodoch a predajniach so zdravou výživou. Doplnky výživy pozostávali z dvoch chemických foriem, a to zo selenizovaných kvasiniek alebo zo selénanov v dávkach 25, 50, 100 a 200  $\mu\text{g}$  v 1 tablete. V prípade selénanov sa jednalo o multivitamínové prípadne multiminerálne doplnky. Päť z daných produktov (z toho 4 vo forme Se-kvasiniek) bolo testovaných aj v rozličných výrobných množstvách (počet tabliet). O 30 mesiacov neskôr sa rovnaké analýzy uskutočnili na tých istých 10 selénových doplnkoch (9 Se-kvasinky, 1 selénan), z čoho selenizované kvasinky boli dostupné v dvoch množstvách. Hoci sa porovnávanie mohlo uskutočniť iba u 10 z 15 pôvodne analyzovaných produktov, výsledky uvedené v tabuľke 4 poukazujú na

presnejší obsah selénu v selénových doplnkoch u jednotlivých firiem už po uplynutí obdobia dva a pol roka

Tabuľka 5 : (Veatch *et al.*, 2005)

Značka	Produkt	Množ- stvo [bal.]	Rok zakú- penia	Udáv. hodno- ta Se[ $\mu$ g]	Max. hodnota Se [ $\mu$ g]	Min. hodnota Se [ $\mu$ g]	Stred. hodnota Se	Chyba [%]	Chemická forma
A	1	001	2000	200	240,4	228,5	234,8	17,4	Kvasinky
A	1	002	2003	200	213,2	199,4	207	3,5	Kvasinky
B	2	001	2000	200	252,8	230,8	245	22,5	Kvasinky
B	2	002	2003	200	200,4	194,5	198	-1,0	Kvasinky
C	3	001	2000	200	193,2	176,1	185,6	-7,2	Kvasinky
C	3	002	2003	200	241,2	166,5	191	-4,5	Kvasinky
D	4	001	2000	200	268,7	260,5	246,6	32,3	Kvasinky
D	4	002	2003	200	321,8	171,9	213,5	6,7	Kvasinky
E	5	001	2000	200	263,7	237,7	246,4	23,2	Kvasinky
F	6	001	2000	200	230,9	219,2	225,8	12,9	Kvasinky
F	6	002	2003	200	197,2	187,1	192	-4,0	Kvasinky
G	7	001	2000	200	240,2	230,8	235,4	17,7	Kvasinky
G	7	002	2000	200	244,1	222,2	234,1	17,1	Kvasinky
G	7	003	2003	200	210,4	199,4	204	2,0	Kvasinky
H	8	001	2000	200	213,6	206,9	210,5	5,3	Kvasinky
H	8	002	2000	200	245,9	222,3	230,5	15,3	Kvasinky
H	8	003	2003	200	219,8	197,8	206	3,0	Kvasinky
H	8	004	2003	200	309,9	200,4	239	19,5	Kvasinky
H	9	001	2000	100	161,1	95,4	120,5	20,5	Kvasinky
H	9	002	2000	100	142,7	95,8	112,7	12,7	Kvasinky
H	9	003	2003	100	122,1	92,3	106	6,0	Kvasinky
H	10	001	2000	50	70,8	41,6	57,6	15,2	Kvasinky
H	10	002	2000	50	73,1	43,3	53,9	7,8	Kvasinky
H	10	003	2003	50	49,5	45,2	48	-4,0	Kvasinky
I	11	001	2000	50	54	47	50,2	0,4	Kvasinky
J	12	002	2000	50	61,8	54,1	58,3	16,6	Kvasinky
K	13	001	2000	50	85,6	46,8	60	20,0	Kvasinky
L	14	001	2000	25	62,5	22,7	29,4	17,6	Selénan
M	15	001	2000	200	299,4	248,9	268,7	34,4	Selénan
M	15	002	2000	200	292,2	249,3	270,6	35,3	Selénan
M	15	003	2000	200	318,9	248,3	278,3	39,2	Selénan
M	15	004	2003	200	196,9	156,1	173,3	-13,4	Selénan

### 1.3.7 Sorpčný mechanizmus buniek *S. cerevisiae*

Rozlišujeme pasívny spôsob sorpcie neaktívnymi bunkami a aktívny spôsob živými bunkami. Pasívny nezávisí od prísunu energie, najčastejšie funguje na základe funkčných skupín materiálu, bunky a bunkovej steny. Aktívny spôsob závisí od metabolizmu buniek a týka sa transportu kovov (Wang a Chen, 2006).

#### 1.3.7.1 Sorpcia bunkovým povrchom

Bunková stena je prvou bunkovou štruktúrou, s ktorou prichádzajú ióny kovov do styku. Existujú dva základné mechanizmy príjmu kovov bunkovou stenou: stechiometrickou interakciou medzi funkčnými skupinami, a to fosfátovými, karboxylovými, fosfodiesterovými a aminoskupinami a fyzikálno-chemickou adsorpciou alebo anorganickou precipitáciou (Mack et al., 2008).

Niektoré prokaryotické a eukaryotické mikroorganizmy produkujú extracelulárnu polymerickú substanciu (EPS), ktorá je tvorená polysacharidmi, glukoproteínmi, lipopolysacharidmi a rozpustnými peptidmi. Tieto súčasti sekrétu predstavujú množstvo aniónových skupín, ktoré adsorbujú kovové ióny. U kvasiniek je sekrécia EPS nejasná. Flokulentné kmene *S. cerevisiae* vykazovali zvýšenú kapacitu sorpcie kovov. Predpokladá sa, že za flokuláciu je zodpovedný špecifický proteín – lektín, ktorý pravdepodobne patrí k EPS (Machado, Soares, Soares, 2010).

Machado et al. (2008) opisujú vo svojej práci lektínový mechanizmus, kedy flokulácia nastáva ako výsledok interakcie medzi proteínmi bunkovej steny, prítomnými iba u flokulentných kvasiniek a uhl'ovodíkmi (receptormi) susedných buniek, pričom na aktiváciu lektínu je potrebný prísun vápnika.

Na základe výsledkov práce Gharieba a Gadda (2004) bunky *Saccharomyces cerevisiae* rýchlo akumulovali približne  $0,14 \text{ nmol Se} \cdot (10^6 \text{ buniek})^{-1}$ , čo prebiehalo nezávisle od teploty a množstva glukózy v živnom médiu. Po tejto rýchlej fáze nasledovala fáza pomalšieho príjmu selénu, už citlivého na koncentráciu glukózy, teplotu aj metabolické inhibítory ako 2,4-dinitrofenol (DNP), kyanid draselný (KCN) a azid sodný ( $\text{NaN}_3$ ), teda fáza príjmu tohto prvku závislá od metabolizmu.

U *S. cerevisiae* prebieha akumulácia bunkovým povrchom prostredníctvom aktívnych skupín biopolymérov bunkovej steny a membrány. Bunková stena viaže

približne 20 % selénu, zatiaľ čo zvyšná časť je obsiahnutá v protoplaste (Pankiewicz a Jerzy, 2007).

#### 1.3.7.2 Intracelulárna akumulácia

Ak je extracelulárna koncentrácia iónov kovu vyššia ako intracelulárna, ióny kovu môžu prenikať do bunky voľnou difúziou. Kovy môžu vstupovať do bunky pokiaľ bola porušená prirodzene (autolýza) alebo umelo (mechanická sila, ošetrovanie zásadami). Tento proces je nezávislý od metabolizmu, zatiaľ čo ióny transportované cez membránu sú transformované do inej formy, s čím súvisí aj energetická závislosť od metabolizmu (Wang a Chen, 2006).

Intracelulárna akumulácia je spojená s transportom iónov cez membránu do bunky. Pre produkciu selenizovaných kvasiniek sú *S. cerevisiae* zvyčajne kultivované na médiu ochudobnenom o zlúčeniny síry s prídavkom anorganických solí selénu. Jednu z ďalších relatívne jednoduchých a lacných metód, zvyšujúcich intracelulárnu akumuláciu, predstavuje elektroporácia pomocou pulzného elektrického poľa (PEP). Táto metóda sa zvyčajne využíva na inaktiváciu mikroorganizmov. Pomocou PEP vzniká indukovaný transmembránový potenciál, ktorý vedie k vzniku pórov v membráne a tým aj ku zvýšenej permeabilite (Pankiewicz a Jerzy, 2007).

Metabolická aktivita hrá pri príjme selénu dôležitú úlohu, pretože prídavok glukózy značne zvyšuje príjem seleničitanov. Pokiaľ vstupuje selén do bunky takýmto spôsobom, je príjem seleničitanu zaiste ovplyvnený metabolickými inhibítormi. Kyanid draselný (KCN) a azidy narušujú cytochrómoxidázu, čiže pôsobia ako inhibítory respirácie a zároveň znižujú intenzitu príjmu seleničitanu (Gharieb a Gadd, 2004).

#### 1.3.8 Transport selénu

Absorpcia selénu kvasničnými bunkami zahŕňa dva transportné systémy. Pri použití nízkych koncentrácií seleničitanu sodného v živnej pôde, v rozsahu 0,025-0,1 mmol.dm<sup>-3</sup>, kvasinky využívajú vysokoafinitný transportný systém, pri vysokých koncentráciách seleničitanu v médiu, v rozmedzí 0,1-1,0 mmol.dm<sup>-3</sup>, je zapojený nízkoafinitný systém príjmu selénu mikrobiálnymi bunkami.

Niektoré štúdie uvádzajú v *S. cerevisiae* rovnaké transportné dráhy pre selénan aj síran. U baktérie *Selenomonas ruminarium* bol príjem seleničitanu na 100 % inhibovaný pri jeho koncentrácii  $8 \text{ mmol.dm}^{-3}$  a na 47 % pri množstve  $0,8 \text{ mmol.dm}^{-3}$  tejto soli v živnom médiu. U *Saccharomyces cerevisiae* nebol zistený inhibičný účinok na príjem seleničitanu ani pri zvýšených koncentráciách siričitanu či síranu. Naproti tomu nízke koncentrácie siričitanu signifikantne zvýšili jeho príjem, preto môžeme predpokladať, že transport a ukladanie seleničitanu, ako počiatočný krok asimilačnej dráhy selénu, sa u *S. cerevisiae* deje odlišným transportným systémom ako pre siričitan tak i síran. Príjem seleničitanu je potlačený exogénnymi, síru obsahujúcimi, aminokyselinami, ako sú metionín, cysteín a cystín. Prítomnosť metionínu v kultivačnom prostredí čiastočne inhibuje absorpciu selénu, kým ďalšie aminokyseliny, cysteín a cystín úplne inhibovali aktívny transport selénu do buniek. Tieto výsledky dokazujú reguláciu príjmu seleničitanu produktmi metabolizmu síry v bunke. Ďalšie výskumy udávali pomer selénu k síre približne 4:1 ako optimálny pre následnú produkciu organicky viazaného selénu zo seleničitanu alebo selénanu sodného. Iní autori naznačili, že Se ovplyvňuje zloženie bunkovej membrány u *S. cerevisiae*, pretože v nej spôsobuje nárast nasýtených a pokles nenasýtených mastných kyselín. Viaceré literárne zdroje uvádzajú, že akumulácia selénu nastáva hlavne vo vakuolách a závisí od schopnosti bunky redukovať seleničitan na elementárny selén, ktorý predstavuje menej toxickú formu. Proliferácia vakuolárnych komponentov je odpoveďou na zvýšenú koncentráciu seleničitanu, čo len potvrdzuje účasť vakuol v tolerancii voči danej soli u *Saccharomyces cerevisiae* (Gharieb a Gadd, 2004).

Autori Ponce et al. (2002) vo svojej štúdií sledovali 4 rôzne spôsoby sorpcie selénu kvasinkami: pridávanie rôznych koncentrácií seleničitanu sodného do živnej pôdy počas rastovej fázy kvasiniek, prídavok rôznych koncentrácií  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  do média počas nerastovej fázy, pomnožovanie buniek (tvorba násadových kvasiniek) v  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  a pridávanie seleničitanu do YPG média, v ktorom bol zamenený zdroj uhlíka, namiesto glukózy sa použil glycerol. Z hľadiska tvorby selenometionínu sa dosiahlo najväčšie obohatenie kvasiniek v rastovej fáze. Podľa tejto štúdie zvyšovanie množstva selénu pridávaného do média zvyšovalo inhibíciu rastu mikrobiálnych buniek, a hoci sa celková koncentrácia selénu v bunkách aj napriek tomu zvýšila, na druhej strane nedošlo v nich ku zvýšeniu obsahu selenometionínu. Obohacovanie kvasiniek selénom počas nerastovej fázy je výhodné z hľadiska zabránenia inhibície rastu buniek, avšak tu dochádza k menšej tvorbe selenometionínu. Pri násadových kvasinkách ako aj pri

použití glycerolu, ako zdroja uhlíka, bol rast kvasiniek výrazne brzdený. U násadových kvasiniek sa druhy selénových zlúčenín nezmenili, ale kvasinky rastúce v živnom médiu s glycerolom tvorili aj ďalšie formy selénových látok.

### 1.3.9 Gény ovplyvňujúce toxicitu/rezistenciu voči selénu

Transport selénu je prvým krokom metabolizmu, ktorý zahŕňa jeho redukciu, metyláciu a inkorporáciu do selenoenzýmov. Síranové permeázy Sul1p a Sul2p sú v kvasinkách *S. cerevisiae* zodpovedné za transport síranu, pričom mutované kmene kvasiniek v génoch Sul1 a Sul2 boli rezistentné voči selénanu. Táto skutočnosť poukazuje na akumuláciu selénanu prostredníctvom daných kvasinkových síranových permeáz. Seleničitanové transportéry na molekulovej úrovni neboli v eukaryotických organizmoch identifikované (Rosen a Liu, 2009).

Selén sa viaže v aktívnom centre enzýmu glutatiónperoxidázy (GPx), ktorý redukuje  $H_2O_2$  na  $H_2O$ . Pozitívnu koreláciu je možné pozorovať medzi GPx aktivitou a príjmom selénu, čoho výsledkom je nárast rezistencie voči oxidatívnym poškodeniam. Kvasinky nekódujú „klasickú“ GPx, ale obsahujú tri enzýmy podobné fosfolipidovej hydroperoxidázovej glutatiónperoxidáze, GPx1, 2 a 3, ktoré sú nezávislé od selénu. Prenášač selénu nebol v *S. cerevisiae* identifikovaný, avšak selén je primárne akumulovaný vo vakuolách, čo poukazuje na prítomnosť určitej pumpy. Dôležité je poznamenať, že vyradenie Yap1, ktorý sa ako transkripčný faktor viaže na promotór génu Aft2, alebo Gpx3, poukazuje na citlivosť voči selénu, čo znamená, že oba tieto proteíny zohrávajú určitú úlohu v ochrane bunky voči danému polokovu (Schmidt et al., 2009).

Predpokladá sa, že aj nadmerná expresia glutatión reductázy ovplyvňuje rezistenciu voči seleničitanu, na základe čoho môžeme konštatovať, že aj glutaredoxíny sa podieľajú na rezistencii, či toxicite voči seleničitanu (Lewinska a Bartosz, 2008). Svoju úlohu v rezistencii voči selénu, a teda aj jeho schopnosti ho akumulovať vo vakuolách, plní aj gén YPK9. Mutanti *ypk9-Δ* sú neschopní ukladať nadbytočné množstvá selénu vo vakuolách, preto dochádza k zvyšovaniu jeho koncentrácie v cytoplazme až na toxickú úroveň. YPK9 kóduje pravdepodobne integrálny membránový proteín ovplyvňujúci citlivosť voči dvojmocným iónom kovov a ich ukladanie v bunke (Schmidt et al., 2009).



### 1.3.10 Optimalizácia kultivačného média verzus výťažky selénu

Yin et al. (2009) sa zaoberali vo svojej práci optimalizáciou živného média pre produkciu selénových kvasiniek. Použili médium s koncentráciou  $15 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$   $\text{Na}_2\text{SO}_3$  a rôzne pomery šťavy z naklíčenej hnedej ryže, sladiny a sójovej šťavy, ktorých optimálny pomer predstavuje 4:4:2. Výsledky ukazujú, že dané zloženie média dosahuje maximálne výťažky  $8,5 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  biomasy a  $3,53 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  Se. Prírodné zložky daného média sú vhodné ako pre rast selenizovaných kvasiniek, tak aj pre samotnú akumuláciu selénu.

Teplota  $27,4 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 5,8 a objem  $90 \text{ cm}^3$  boli v práci Yin, Fan a Gu (2010) stanovené ako najvhodnejšie parametre kultivačného média. Glukóza je pre kultiváciu selenizovaných kvasiniek vhodnejším zdrojom uhlíka ako sacharóza. Optimálny obsah jednotlivých živín v médiu je nevyhnutný na dosiahnutie maximálneho zabudovania selénu. Optimálne množstvo glukózy v médiu je  $70 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , najvhodnejšia hodnota pH je 5, doba kultivácie 36 hodín a koncentrácia selénu v bunkách predstavuje  $4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$ , pričom bola dosiahnutá maximálna akumulácia selénu približne  $127 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  suchej hmotnosti biomasy.

Jednu z najvyšších akumulácií selénu u kvasiniek *S. cerevisiae* dosiahol pri svojom výskume Suhajda et al., 2000 a to  $2\ 050 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  suchej hmotnosti pri prídavku  $30 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-3}$  seleničitanu sodného v šiestich parciálnych dávkach rovnomerne pridávaných v priebehu exponenciálneho rastu kvasiniek. Autori zistili, že seleničitan sodný pridaný až po logaritmickom raste buniek vedie k nižšej akumulácii selénu, a to v množstve  $1\ 500 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  kvasničnej biomasy.

### 1.3.11 Toxicita selénu

Molekulové mechanizmy, ktoré robia selén toxickým, sú ešte stále slabo charakterizované. Letavayová et al., (2008) vo svojej štúdii porovnávala toxický vplyv dvoch organických zlúčenín selénu (selenometionín a selenometylselenocysteín) a jednej anorganickej zlúčeniny (seleničitanu sodného). Selenometionín (SeM) a selenometylselenocysteín (SeCM) netvorí metylselenol ( $\text{CH}_3\text{SeH}$ ) redukciou glutatiónu (GSH), ale  $\text{CH}_3\text{SeH}$  je tvorený prostredníctvom katalytickej činnosti metioninázy alebo  $\beta$ -lyázy, pokiaľ sú tieto enzýmy prítomné v bunke. Toxicita seleničitanu (SeL) sa výraznejšie prejavila v exponenciálnej fáze rastu kvasiniek ako

v stacionárnej fáze. Rozdielna toxicita seleničitanu na tieto dve rastové fázy kvasiniek je nejasná. Predpokladá sa ale, že zníženie bunkovej asimilácie seleničitanu a obmedzenie DNA replikácie počas kludovej fázy, môžu byť zodpovedné za rozdiely v indukcii dvojreťazcových zlomov (DSB) DNA počas exponenciálnej a stacionárnej fázy. Poškodenie DNA je totiž jedným z najdôležitejších faktorov, ktoré sú zodpovedné za toxický účinok mnohých zlúčenín. Danú teóriu potvrdzuje aj fakt, že plazmatická membrána vykazuje päťnásobné zníženie permeability pre peroxid vodíka ( $H_2O_2$ ) pri prechode z exponenciálnej fázy do fázy stacionárnej. Pri porovnaní SeL, SeM a SeCM, iba SeL indukuje DSB v závislosti od jeho dávky v médiu. Toxicita seleničitanu bola vo väčšej miere pozorovaná v exponenciálnej fáze rastu, z čoho môžeme usudzovať, že dvojreťazcové zlomy DNA nastávajú počas samotnej replikácie. Pravdepodobne počas replikácie z neopravených jednoreťazcových zlomov vznikajú zlomy dvojreťazcové.

Seleničitan ovplyvňuje homeostázu železa na dvoch úrovniach. Po prvé, selén môže interagovať so železom v kultivačnom médiu, premenou tohto kovu na dostupnú formu pre bunku. Po druhé, môže zasahovať do homeostázy železa nahradením síry v Fe/S klastroch v biosyntéze proteínov v mitochondriách. Dané tvrdenie nám potvrdzuje aj skutočnosť, že kmene kvasiniek, ktoré akumulujú selén alebo železo sú veľmi podobné a tieto dva elementy sú metabolizované cez jednoduché bunkové cesty a ovplyvňujú podobné bunkové procesy (Salin et al., 2008). Mechanizmus toxicity selénu zahŕňa predovšetkým oxidatívnu činnosť. Seleničitan môže spontánne reagovať s glutatiónom pri premene na elementárny selén ( $Se^0$ ) alebo podlieha redukcii v tioredoxnom systéme, pričom môžu vznikať vedľajšie produkty ako reaktívne formy kyslíka (ROS) (Lewinska a Bartosz, 2008). Ióny  $SeO_3^{2-}$  vplývajú na redoxnú rovnováhu viacerými spôsobmi. Každý seleničitan obsahuje tri atómy kyslíka, takže prvým spôsobom ovplyvňovania redoxnej rovnováhy je tvorba reaktívnych foriem kyslíka (ROS) počas redukcie seleničitanu. Druhá metóda je metabolizmus seleničitanu, počas ktorého dochádza ku interakcii s tiolovými derivátmi, vrátane glutatiónu, a najčastejšie vedie k narušeniu redoxnej rovnováhy. Po tretie, seleničitan zasahuje do homeostázy železa a do Fe/S klastrov v biosyntéze proteínov, čím potenciálne zasahuje do mitochondriálnej aktivity a redoxnej homeostázy. Ďalšou vlastnosťou oxidatívneho stresu produkovaného kovmi a polokovmi je zvýšenie expresie génov zahrnutých do metabolizmu metionínu a síry (Salin et al., 2008).

### 1.3.12 Stanovenie selénu

Ako vhodná metóda na stanovenie selénu sa javí technika generovania hydridov (HG-AAS), pretože daná metóda bezpečne odliší signál slepých vzoriek od signálu rastlinného materiálu. V porovnaní s technikou ETA-AAS ponúka metóda HG-AAS nižšiu medzu stanoviteľnosti, čiže daná metóda je vhodná aj na meranie vzoriek s nízkou koncentráciou selénu v zložitých rastlinných matriciach (Hegedüs et al., 2008). Nevýhodou metódy HG-AAS je podľa Hagarovej a Žemberyovej (2005) potreba rozložiť vzorku a previesť selén ( $\text{Se}^{\text{IV}}$ ) na nižší oxidačný stupeň ( $\text{Se}^{\text{IV}}$ ). Ďalším problémom je interferencia kovov skupín VIII. B a I. B periodickej tabuľky. Uvedená metóda vyžaduje pre stanovenie väčšie množstvo vzorky ako je potrebné na priame stanovenie pomocou atómovej absorpčnej spektrometrie s elektrotermickou atomizáciou (ETA-AAS).

Metóda ETA-AAS je citlivá a vyžaduje minimálne množstvo vzorky na stanovenie a nepatrné úpravy vzorky pred samotným stanovením. Nevýhodou danej metódy sú možné matricové interferencie a prchavosť selénu. Straty selénu môžu nastať už pri sušení pri teplotách nižších ako 300 °C (Hagarová a Žemberyová, 2005).

Ďalšou využiteľnou HG-AAS je FI-HG-AAS, čo predstavuje techniku generácie hydridov spojenú s prietokovou injekčnou analýzou. Medzi jej hlavné výhody patrí: vysoká citlivosť, nízka cena stanovenia, rýchlosť prevedenia a redukcia rušivých vplyvov matrice (Koreňovská, 2006).

Atómová absorpčná spektrometria s použitím elektrotermickej atomizácie (ETA-AAS) a grafitových kviet sa používa na stanovenie  $\text{Se}^{\text{IV}}$  a  $\text{Se}^{\text{VI}}$  za predpokladu chemickej predúpravy vzorky. Ide o tvorbu komplexov a extrakciu rozpúšťadlom, separáciu selénu na pevných sorbentoch alebo extrakčné vyzrážanie (Chovancová a Krajňáková, 2004).

Podľa Šimkovej, Hegedüsa a Hegedüsovej (2007), nie je ETA-AAS dostatočne citlivá na stanovenie selénu v komplikovaných rastlinných matriciach s nízkym obsahom selénu. Metóda ETA-AAS s deutériovou kompenzáciou pozadia je však dostatočne citlivá pre stanovenie vyšších koncentrácií selénu (niekoľko desiatok  $\text{mgSe}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) v zložitejších matriciach.

Pri analýzach anorganických foriem selénu sa používa vysoko-rozlišovacia kvapalinová chromatografia (HPLC) spojená so špecifickou detekciou selénu. HPLC je zároveň aj najrozšírenejšia metóda na stanovovanie selénoaminokyselín. Použitelnosť

je limitovaná kompatibilitou mobilnej fázy s detektorom. Seleničitany a selénany sú často separované pomocou aniónovej výmennej chromatografie. Ionomeničová chromatografia je taktiež jednou z viacerých metód používaných na stanovenie trimetylseléniového iónu ( $\text{TMSe}^+$ ), pretože vďaka kationovému charakteru sa dá oddeliť od ostatných anorganických foriem selénu na kationvýmenných kolónach (Chovancová a Krajňáková, 2004).

## 2 CIEĽ PRÁCE

Cieľom diplomovej práce bola:

- kultivácia kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, kmeňov 612 a Kolín, na živnom médiu s prídavkom seleničitanu sodného, jeho sorpcia do mikrobiálnych buniek a transformácia na organickú formu
- zároveň získanie maximálneho množstva biomasy
- stanovenie celkového obsahu selénu v kvasinkách
- stanovenie aminokyseliny selenometionínu – ako organickej formy zabudovaného selénu do kvasiniek *S. cerevisiae*

## 3 MATERIÁL A METODIKA

### Použitý mikrobiologický materiál:

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, konkrétne kmeň 612 a kmeň Kolín, ktoré boli získané na základe spolupráce so Slovenskými liehovarmi a likérkami, a.s., Leopoldov.

Ako kultivačné médium sme v našom pokuse použili YPD (Yeast Peptone Dextrose) médium.

### Zloženie YPD média:

10 g.dm<sup>-3</sup> kvasničného autolyzátu

20 g.dm<sup>-3</sup> peptónu pre bakteriológiu

35 g.dm<sup>-3</sup> glukózy, pH živného média 5,5 (Šillerová, 2010).

### Chemikálie:

Zložky živného média boli získané z ImunnaPharm, a.s., Šarišské Michaľany. Chemikálie použité pri obohacovaní kvasiniek selénom boli zakúpené v Sigma, St. Luis (USA).

### 3.1 Optimalizácia živného média

Pred začiatkom vlastného pokusu sme optimalizovali koncentráciu glukózy v živnom médiu. Do média sme pridávali glukózu o koncentrácii 20 g.dm<sup>-3</sup> až 45 g.dm<sup>-3</sup> za účelom dosiahnutia najvyšších výťažkov biomasy. Kultivácia prebiehala pri teplote 30 °C na trepačke (280 ot.min<sup>-1</sup>) za aeróbných podmienok počas 48 hodín.

### 3.2 Kultivácia kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* na živnej pôde s prídavkom selénu

Do YPD média sme pridávali seleničitan sodný, sterilizovaný filtráciou, v piatich rozličných koncentráciách 10, 20, 30, 40 a 50 mg.dm<sup>-3</sup> média. Schopnosť kvasiniek tvoriť biomasu ako aj zabudovať anorganický selén do buniek a transformovať ho na menej toxickú organickú formu sme sledovali počas rastovej aj stacionárnej fázy. Na rozdiel od rastovej fázy, kedy sme pridávali seleničitan do média hneď na začiatku

kultivácie, v prípade stacionárnej fázy sa  $\text{Na}_2\text{SeO}_3$  pridáva až po 24 hodinách kultivácie, kedy väčšina buniek prechádza z exponenciálnej fázy rastu cez spomalený rast až do fázy, v ktorej populácia kvasiniek je konštantná.

Na tvorbu biomasy kvasiniek sme zvolili submerzný typ kultivácie v bankách s objemom  $1000 \text{ cm}^3$ . Vlastný objem živnej pôdy predstavoval  $100 \text{ cm}^3$ . Kultivácia prebiehala pri teplote  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  na trepačke ( $280 \text{ ot.min}^{-1}$ ) za aeróbnych podmienok počas 48 hodín. Na kultiváciu buniek sme použili vegetatívne inokulum v exponenciálnej fáze rastu, z ktorého sme pridávali do baniek vždy alikvótnu časť, obsahujúcu približne  $1 \times 10^7 \text{ buniek.cm}^{-3}$ . Po skončení kultivácie sme médium aj so získanými bunkami centrifugovali 20 min., pri  $4000 \text{ ot.min}^{-1}$  za účelom oddelenia biomasy od média. Kvasinky sme premývali dvakrát destilovanou vodou a následne centrifugovali na dosiahnutie požadovanej čistoty. Keďže mikrobiálne bunky predstavujú biologicky aktívny materiál, použili sme na ich stabilizáciu lyofilizáciu (mrazovú sublimáciu), pri ktorej si zachovávajú svoje biologické vlastnosti.

### **3.3 Stanovenie selénu vo vzorkách kvasiniek**

Stanovenie selénu prebiehalo v akreditovanom laboratóriu EL spol. s r.o. v Spišskej Novej Vsi. Analýza bola robená pomocou absorpčnej atómovej spektroskopie s generovaním hydridov (HG-AAS, Varian SpectrAA 220, VGA – 76). Podstata metódy spočíva v generácii hydridov analytu. Po redukcii selénu na hydrid v kvapalnej fáze, sa tento prevedie do plynnej fázy a následne podlieha atomizácii v optickej dráhe atómového absorpčného spektrofotometra. Základným rysom tejto techniky je separácia analytu od matrice (teda selénu zo vzorky kvasiniek) a jeho vyššia koncentrácia v absorpčnom prostredí v porovnaní s klasickými metódami atómovej absorpčnej spektrometrie (AAS) (Hegedüs et al., 2005).

### **3.4 Stanovenie selenometionínu vo vzorkách kvasiniek**

Analýza bola robená na RP- HPLC Agilent 1200, na kolóne Zorbax Eclipse AAA, Rapid Resolution  $4,6 \times 150 \text{ mm}$ ,  $3,5 \text{ mikrónov}$ .

Ako mobilné fázy boli použité:

A:  $40 \text{ mmol.dm}^{-3} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$  vo vode, pH-7,8

B: ACN:MeOH:voda (45:45:10, v/v/v).

Bola použitá gradientová elúcia pri prietoku kolónou 2 ml za minútu. Detekcia prebiehala na FLD (fluorescenčnom) detektore pri emisii 450 nm a extinkcii 230 a 338 nm.

Hydrolyzovaná vzorka bola po nariadení vodou filtrovaná cez papierový filter Grade : 391 a následne filtrovaná a dávkovaná cez striekačkový filter SRC grade s porozitou 0,2 mikrometra do vialky HPLC. Ďalšie spracovanie vzorky prebiehalo vo vzorkovači HPLC podľa vypracovaného programu. Tu bola vzorka derivatizovaná pomocou činidla o-phtalaldehyde (OPA) a injektovaná na kolónu prístroja HPLC.

Na identifikáciu hľadanej látky (určenie príslušného píku), bola použitá metóda štandardného prídavku do vzorky, ako i rôznych prídavkov externého štandardu.

Na určenie obsahu selenometionínu vo vzorkách bola použitá viacstupňová kalibračná krivka v rozsahu obsahu selenometionínu od 15,7 do 784 mikrogramov na gram vzorky kvasiniek a aplikačný softvér firmy Agilent (Acta chromatographica, no. 18, 2007).

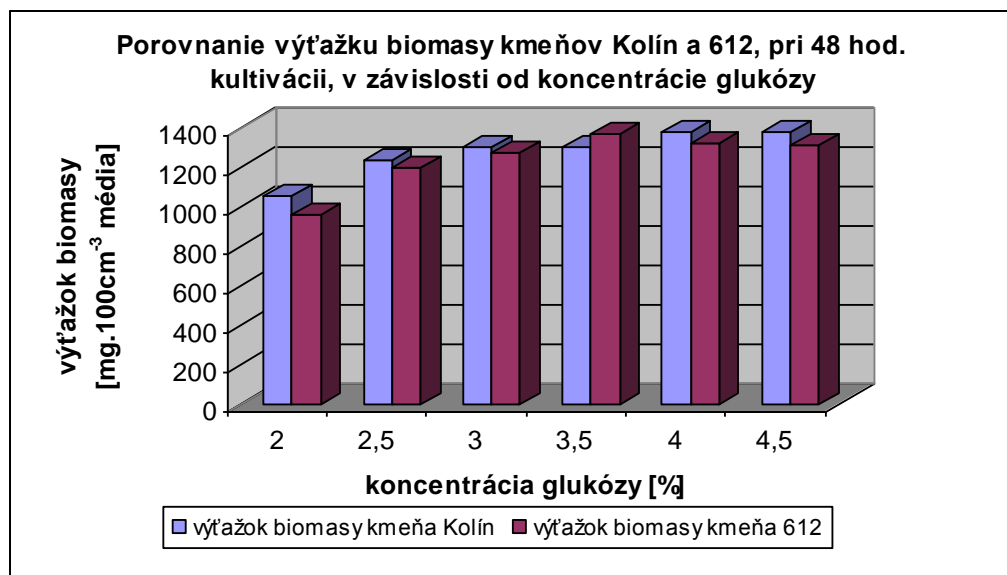


## 4 VÝSLEDKY

### 4.1 Výťažky biomasy kmeňov Kolín a 612 v závislosti od koncentrácie glukózy

V našom pokuse sme porovnávali dva kmene kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, konkrétne kmeň Kolín a kmeň 612. Prvým krokom bola optimalizácia glukózy v rastovom médiu, pričom zo stanovených hodnôt môžeme vidieť, že oba kmene dosahujú maximálnu produkciu biomasy pri rôznych hodnotách glukózy v médiu. Kmeň 612 dosahuje najvyššie výtázky už pri 3,5 % koncentrácii glukózy, čo predstavuje výtazok 1366,2 mg.100 cm<sup>-3</sup> média. Celkovo najvyššie výtázky biomasy dosiahol kmeň Kolín pri 4 % glukóze v médiu, čo predstavuje výtazok biomasy 1376,9 mg.100 cm<sup>-3</sup> média. Ďalším pridávaním glukózy do média dochádzalo k inhibícii rastu kvasiniek (Tabuľka 5, Graf 1).

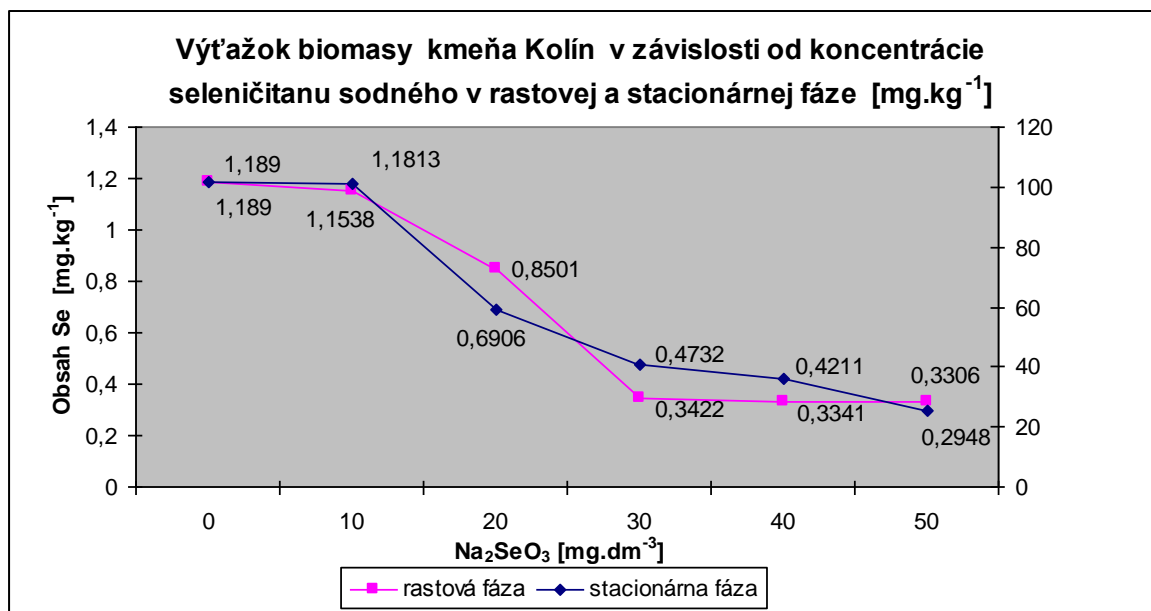
Graf 1



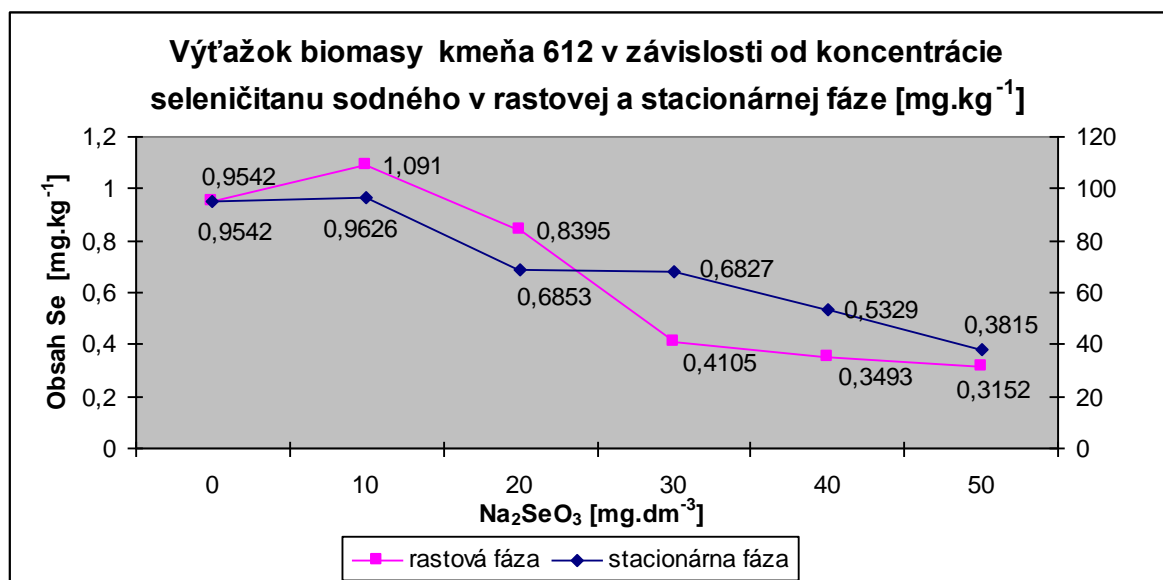
## 4.2 Vplyv prídavku seleničitanu sodného na výťažok biomasy v rastovej a stacionárnej fáze

Z grafu 2 (znázornený kmeň Kolín) a 3 (znázornený kmeň 612) môžeme vidieť výraznejší pokles biomasy už pri 20 mg seleničitanu. $\text{dm}^{-3}$  média, a to v prípade rastovej aj stacionárnej fázy. U oboch kmeňov v rastovej fáze nastáva výraznejší pokles výťažku biomasy od koncentrácie 30 mg a viac seleničitanu. $\text{dm}^{-3}$  média (Tabuľka 6, 7, 8, 9).

Graf 2



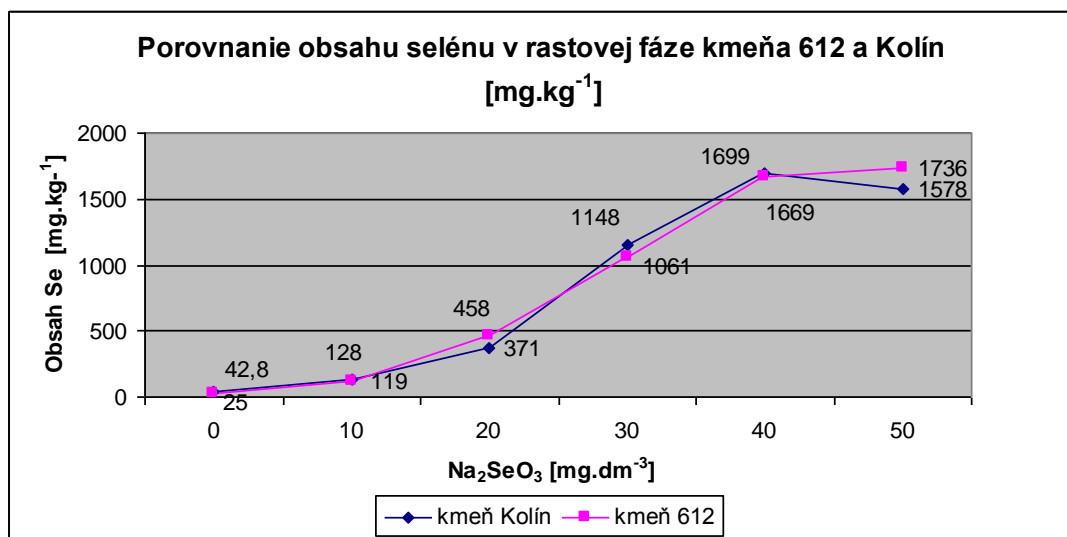
Graf 3



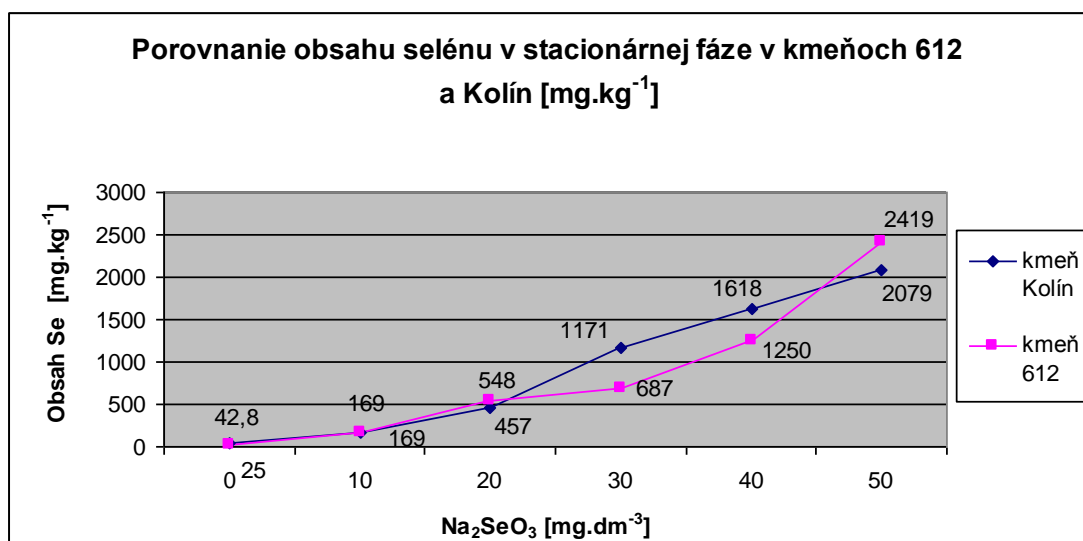
### 4.3 Obsah absorbovaného selénu počas rastovej a stacionárnej fázy v kmeňoch 612 a Kolín

Z grafu 4 a 5 (Tabuľka 10, 11) môžeme jasne vidieť, že so zvyšujúcou sa koncentráciou seleničitanu sodného v kultivačnom médiu, sa zvyšuje aj množstvo zabudovaného selénu bunkami kvasiniek. Najvyššie absorbované množstvo selénu dosiahol kmeň 612 pri najvyššej koncentrácii seleničitanu v médiu, 50 mg.dm<sup>-3</sup>, čo predstavovalo obsah selénu 1736 mg.kg<sup>-1</sup> v rastovej fáze a 2419 mg.kg<sup>-1</sup> vo fáze stacionárnej, v ktorej graf 5 poukazuje aj na lineárnejšie zvyšovanie obsahu selénu v kmeni Kolín.

Graf 4



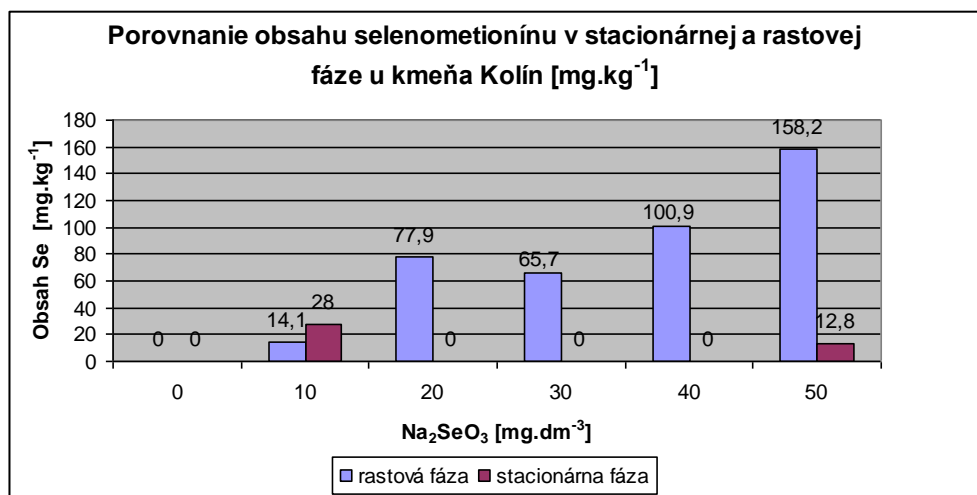
Graf 5



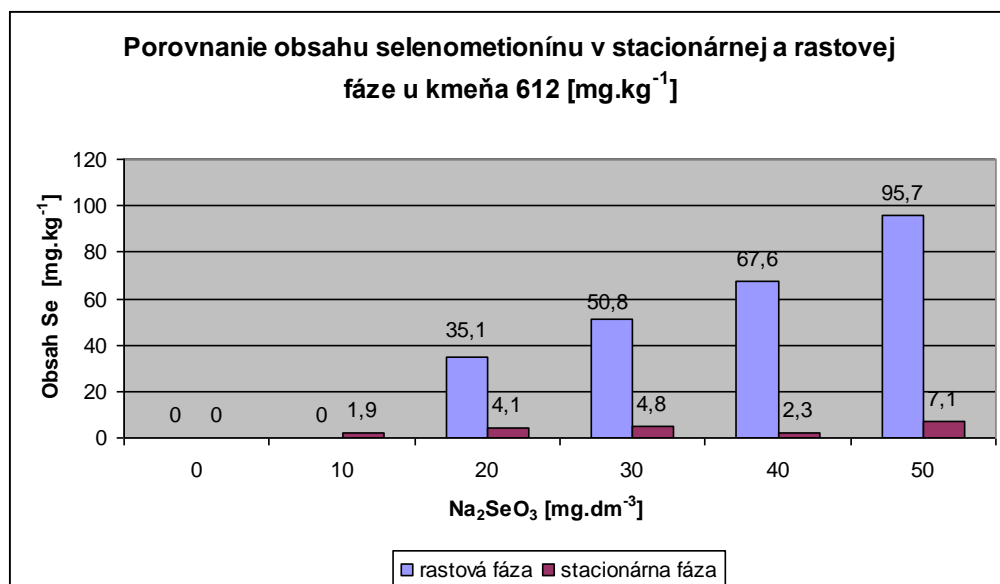
#### 4.4 Obsah selenometionínu v kmeňoch 612 a Kolín v rastovej a stacionárnej fáze

Omnoho vyššie množstvo selenometionínu dosahovali oba kmene v rastovej fáze (Graf 6, 7, Tabuľka 12, 13), čo korešponduje s výsledkami autora Ponce et al., (2002) a celkovo najvyššie akumulované množstvo selenometionínu bolo zistené v kmeni Kolín 158,2 mg.kg<sup>-1</sup>. Z našich zistených výsledkov v stacionárnej fáze, v kmeni Kolín nemôžeme s istotou potvrdiť závislosť medzi prídavkom seleničitanu v médiu a zabudovaným obsahom selenometionínu v kvasinkách.

Graf 6



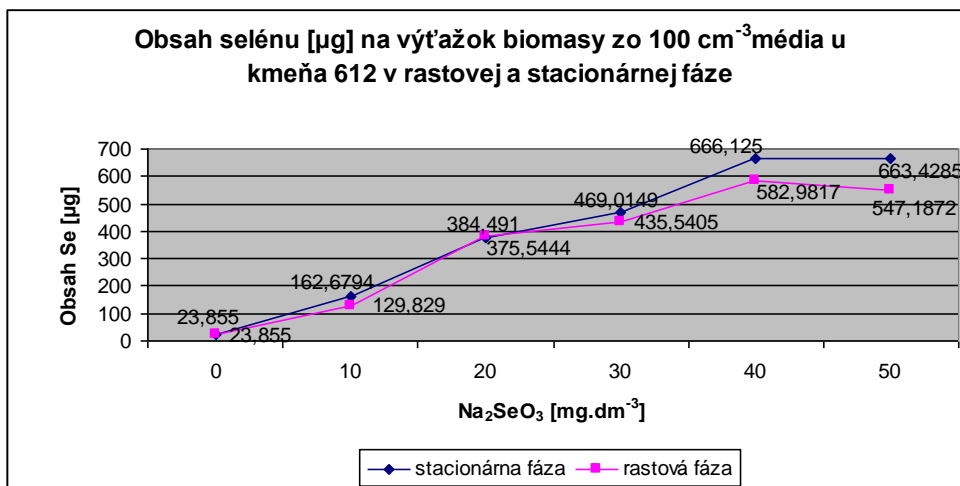
Graf 7



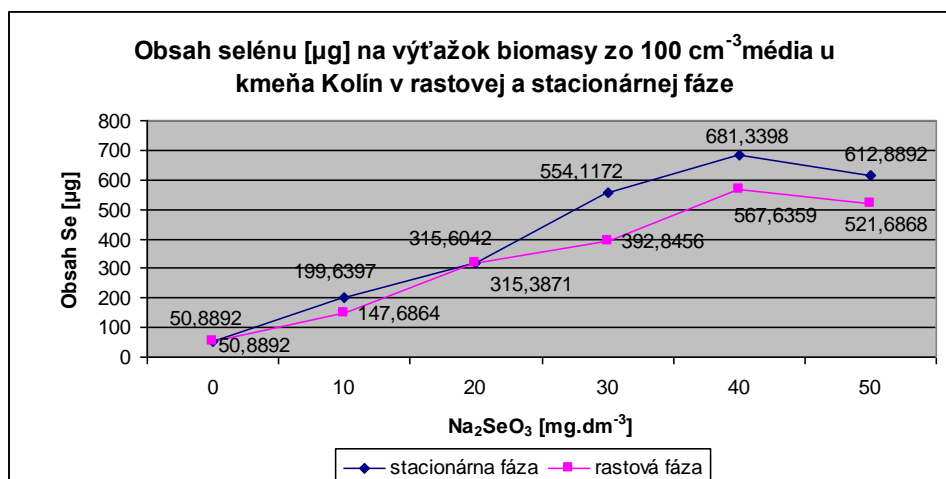
#### 4.4 Výt'azok selénu [ $\mu\text{g}$ ] z jednej banky ( $100\text{ cm}^{-3}$ média) u kmeňov 612 a Kolín

Porovnaním grafu 8 a 9 môžeme reálne posúdiť nielen skutočnú schopnosť kvasiniek zabudovať selén do buniek, ale zároveň aj produkciu biomasy. U oboch kmeňov môžeme pozorovať, že najvyššie výt'azky selénu a najnižší úbytok biomasy sa dosahoval pri  $40\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Pri  $50\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  dochádza už k prílišnej inhibícii rastu kvasiniek, i keď pri danej koncentrácii je bunka schopná zabudovať najviac selénu, celková výt'aznosť selénu na jednu banku sa znižuje. Z grafov taktiež vyplýva, že stacionárna fáza je výhodnejšia z hľadiska produkcie selenizovaných kvasiniek. Najvyššiu hodnotu  $681,3398\ \mu\text{g}$  selénu na biomasu obsiahnutú v  $100\text{ cm}^{-3}$  média dosiahol kmeň Kolín.

Graf 8



Graf 9



## 5 DISKUSIA

Glukóza je pre kultiváciu selenizovaných kvasiniek výhodnejším zdrojom uhlíka ako sacharóza. Vhodný obsah jednotlivých živín v médiu je nevyhnutný na dosiahnutie maximálneho zabudovania selénu. V našom pokuse sme dosiahli najvyššie výťažky biomasy pri 3,5 % ( $35 \text{ g.dm}^{-3}$ , kmeň Kolín) a 4 % ( $40 \text{ g.dm}^{-3}$ , kmeň 612) glukóze obsiahnutej v médiu a doba kultivácie predstavovala 48 hodín, ale Yin et al. (2009) ako optimálne množstvo glukózy v médiu na kultiváciu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* stanovili  $70 \text{ g.dm}^{-3}$  a dobu kultivácie 36 hodín. To poukazuje na nutnosť pri každom kmene ako aj iných podmienkach kultivácie optimalizovať jednotlivé zložky média. 3,5 % glukózu v živnom médiu sme zvolili pre oba kmene, aby sme podporili Pastuerov a potlačili Crabtree efekt, čiže zefektívniť aeróbny proces kultivácie sprevádzaný zvýšenou tvorbou biomasy (Rebroš a kol., 2005).

Ponce et al. (2002) vo svojej štúdii zistil, že pre obohatenie kvasiniek *S. cerevisiae* selénom sa je najvýhodnejšia rastová fáza, pretože práve počas nej sa dosiahli najvyššie množstvá L-selenometionínu v mikrobiálnych bunkách, čo ukazujú aj naše výsledky (Graf 6, 7). Zároveň pridávaním seleničitanu do živného média sa inhibuje rast buniek kvasinkovej kultúry bez zvýšenej tvorby L-selenometionínu, ale celkový obsah selénu sa v kvasinkách zvyšuje, to znamená, že v bunkách sa nachádza v iných organických formách, ako napr. selenocysteín, selenodiglutatión, selenocystationín. Predpokladá sa, že v kvasinkách *S. cerevisiae* sa nachádza viac než 30 druhov selénových zlúčenín (McSheehy et al., 2002). Obohacovanie kvasiniek selénom počas nerastovej fázy je výhodné z hľadiska zabránenia inhibície rastu buniek (Graf 2, 3), avšak tu dochádza k menšej produkcii L-selenometionínu (Tabuľka 12, 13). Toxický účinok mnohých zlúčenín sa zväčša prejaví na poškodení DNA. Aj podľa našich výsledkov sa toxický účinok seleničitanu vo väčšej miere prejavoval v exponenciálnej fáze rastu, z čoho môžeme usudzovať, že poškodenie DNA (dvojreťazcové zlomy) nastáva počas samotnej replikácie (Letavayová et al., 2008).

Vo všetkých prípadoch selenizovaných kvasiniek je selenometionín najviac zastúpenou formou, čo v našom prípade predstavuje 10-16 % z celkovo obsiahnutého Se, zatiaľ čo Rayman (2004) dosiahol vo svojom výskume až 54–74 % SeMet z celkového obsahu selénu v bunkách a v práci autora Stenchuk et al. (2006) predstavoval selenometionín až 80 %. Pri koncentráciách seleničitanu 20, 30 a 40

$\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  v kmeni Kolín neboli stanovené ani stopové množstvá selenometionínu. To môže byť zapríčinené aj nižšou citlivosťou kolóny na HPLC, teda nie úplným oddelením SeMet od iných sírnych aminokyselín, ako metionín a cysteín v bunkách kvasiniek. Podľa Stenchuk et al. (2006) je organicky viazaný selén biologicky lepšie využiteľná forma selénu s lepšími nutričnými hodnotami. Z tohto hľadiska sa môžu zdať kmene 612 a Kolín menej vhodné na produkciu selenizovaných kvasiniek ako vitamínového preparátu. Z organických zlúčenín sa v kvasinkách nestanovoval obsah ostatných organických foriem selénu, čiže nevhodnosť daných kmeňov na produkciu vitamínových preparátov nemôžeme ani potvrdiť.

Polatajko et al. (2004) dokázala vo svojej štúdii, že SeMet je vo vode nerozpustná frakcia, ktorej viazanie fyzikálnymi mechanizmami na zložky bunkových stien je uprednostňované pred chemickou inkorporáciou do proteínov. Za predpokladu, že v rastovej fáze je v médiu prítomný väčší počet buniek pri rovnakej hmotnosti biomasy ako v stacionárnej fáze, dosahuje sa v rastovej fáze omnoho väčšia plocha tvorená bunkovými stenami, na ktorú sa môže viazať SeMet. To by mohlo súvisieť s faktom, že naše výsledky ukazujú výrazne vyššie akumulované množstvo selenometionínu počas rastovej fázy (Graf 6, 7).

V našej práci sme dosiahli u kmeňa 612 pri koncentrácii seleničitanu  $10 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  v médiu prírastok biomasy oproti kontrolnej skupine (bez prídavku seleničitanu). Výraznejší nárast biomasy sme pozorovali u daného kmeňa v rastovej fáze ( $1,091 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) ako vo fáze stacionárnej ( $0,9626 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ), čo sa zhoduje aj s výsledkami práce Poláková, Szabová a Urminská (2011). Autorky v práci poukazujú na duálny charakter seleničitanu na výťažok biomasy. Nízke koncentrácie seleničitanu pôsobia na rast kvasinkovej biomasy stimulačne a vyššie koncentrácie pôsobia inhibične. To potvrdzujú aj naše dosiahnuté výsledky, kedy môžeme pozorovať u kmeňa Kolín výrazné zníženie výťažku biomasy pri koncentráciách seleničitanu vyšších ako  $10 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  v porovnaní s kontrolnou vzorkou. Túto skutočnosť najlepšie vidieť na grafe 2, pri porovnaní výťažku biomasy kmeňa Kolín pri koncentrácii seleničitanu  $10 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  ( $1,1813 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) a  $30 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  ( $0,3422 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).

## 6 NÁVRH NA VYUŽITIE POZNATKOV

Selén je mikronutrient, ktorého rozpätie od minimálnej dávky po letálnu je pomerne malé.

Selenizované kvasinky, ako vhodný výživový doplnok, sú bezpečným zdrojom selénu, ktorý sa už v súčasnej dobe využíva ako prevencia proti srdcovo-cievnyim ochoreniam a proti rakovine.

Ďalšie využitie je ako prísada do krmív pre hospodárske zvieratá, čím sa dosiahne nielen celkové zlepšenie zdravotného stavu zvierat, ale aj následné zvýšenie selénu v živočíšnych produktoch.



## 7 ZÁVER

Selenizované kvasinky sú obvykle kultivované na médiu s prídavkom selénanu alebo seleničitanu, ktorý vo svojich bunkách premieňajú na organické formy selénu. Takto obohatené kvasinky sa využívajú ako doplnok výživy, pretože organicky viazaný selén je pre organizmus dostupnejší.

V našej práci uvádzame kultiváciu dvoch kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*, a to kmeň Kolín a kmeň 612 a ich porovnanie z hľadiska produkcie biomasy a v nej zabudovaného množstva selénu. Pokus bol realizovaný pri piatich rôznych koncentráciách seleničitanu sodného v médiu (10, 20, 30, 40, 50 mg.dm<sup>-3</sup>), ktorý sa pridával v rastovej a v stacionárnej fáze rastu kvasiniek, pričom ako kontrolnú skupinu sme použili dané kmene kultivované v médiu bez prídavku seleničitanu.

Zistené výsledky poukazujú na pozitívnu koreláciu medzi koncentráciou pridávaného seleničitanu sodného do živného média a obsahom zabudovaného množstva selénu v biomase. Pri najvyššej koncentrácii seleničitanu v médiu, 50 mg.dm<sup>-3</sup>, sme stanovili najvyšší obsah zabudovaného selénu, čo v prípade kmeňa Kolín v stacionárnej fáze predstavovalo hodnotu 2079 mg.kg<sup>-1</sup> a v prípade kmeňa 612 bolo dané množstvo 2419 mg.kg<sup>-1</sup>. V rastovej fáze sa pri najvyššej koncentrácii (50 mg.dm<sup>-3</sup>) seleničitanu akumulovali nižšie množstvá selénu ako vo fáze stacionárnej, čo bolo 1578 mg.kg<sup>-1</sup> v kmeni Kolín a 1736 mg.kg<sup>-1</sup> v kmeni 612.

Naopak negatívnu koreláciu sme pozorovali pri výtazkoch biomasy, ktoré sa znižovali, v závislosti od zvyšujúcej sa dávky seleničitanu sodného v médiu. Toxický vplyv seleničitanu na mikrobiálne bunky bol výraznejší v rastovej fáze, kedy dochádzalo k väčšiemu úbytku biomasy. Jediný pozitívny vplyv seleničitanu, na nárast kvasinkovej biomasy, nastal u kmeňa 612 pri koncentrácii seleničitanu 10 mg.dm<sup>-3</sup> v porovnaní s kontrolnou skupinou.

Pre oba kmene sme stanovili ako najvhodnejšiu koncentráciu seleničitanu v médiu 40 mg.dm<sup>-3</sup>, pridávanú v stacionárnej fáze. Za daných podmienok sa dosahuje optimálny pomer medzi akumulovaným selénom v bunkách a úbytkom biomasy.

Kmeň Kolín môžeme je výhodnejší pre produkciu selenizovaných kvasiniek, pretože akumuloval vyššie množstvo selénu na hmotnosť biomasy získanú pri kultivácii v rovnakom objeme živného média (100 cm<sup>3</sup>). Pri stanovenej optimálnej koncentrácii seleničitanu v médiu (40 mg.dm<sup>-3</sup>) predstavovalo toto množstvo v stacionárnej fáze až 681,3398 µg v kmeni Kolín a 666,125 µg v kmeni 612. Ďalšou výhodnou vlastnosťou

kmeňa Kolín je transformácia väčšieho množstva seleničitanu do formy selenometionínu v porovnaní s kmeňom 612, a to vo fáze rastovej i stacionárnej. Pri najvyššej koncentrácii seleničitanu v médiu ( $50 \text{ mg.dm}^{-3}$ ) zabudoval kmeň Kolín do svojich buniek  $158,2 \text{ mg.kg}^{-1}$  a kmeň 612 asi o tretinu daného množstva menej,  $95,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ .

## 8 ZOZNAM POUŽITEJ LITERAÚRY

1. AGBOR, G. - VINSON, J. 2007. Effect of selenium- and glutathione-enriched yeast supplementation on a combined atherosclerosis and diabetes hamster model. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 55, 2007, no. 21, p. 8731–8736.
2. BLATTNÁ, J. 1998. Minerálne látky a stopové prvky. In *Výživa a potraviny*, roč. 53, 1998, č. 1, s. 13.
3. BAYER, W. et al. 2000. Müssen selenhaltige Nahrungsergänzungsmittel besser überwacht werden?. In *VitaMinSpur*, vol. 15, 2000, p. 172-174.
4. BANSAL, M. P. - KAUR, T. 2002. Growth characteristic and selenium status changes of yeast cells with inorganic and organic selenium supplementation: selenium, a chemopreventive agent. In *Journal of Medicinal Food*, vol. 5, 2002, no. 2, p. 85-90.
5. DASTYCH, M. 2004. Selen - esenciální stopový prvek, In *Roche diagnostics - Laborator Aktuell* 03/04 2004. online [cit. 2008-04-14]. Dostupné na internete: <http://www.roche-diagnostics.cz/download/la/0304/selen.pdf>
6. EINIG, CH. 2005. Wie wichtig ist Selen? In *Berliner Morgenpost* 2005, online [cit. 2005-04-15]. Dostupné na internete: <http://morgenpost.berlin1.de/content/2003/12/27/tt/649727.html>.
7. FELDMAN, H. 2005. Yeast molecular biology. online [cit. 2009-01-04]. Dostupné na internete: <[http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast\\_Biol/](http://biochemie.web.med.uni-muenchen.de/Yeast_Biol/)>
8. GHARIEB, M. M. – GADD, G. G. 2004. The kinetics of <sup>75</sup>[Se]-selenite uptake by *Saccharomyces cerevisiae* and the vacuolization response to high concentrations. In *Mycological Research*, vol. 108, 2009, no. 12, p. 1415-1422.
9. GOLUBEV, V. I. - GOLUBEV, N.V. 2002. Selenium tolerance of yeasts. In *Mikrobiology*, vol. 71, 2002, no. 4, p. 386-390. ISSN 0026-2617.
10. GÖRNER, F. - VALÍK, Ľ. 2004. Aplikovaná mikrobiológia požívateľín. 1. vyd. Bratislava : Malé centrum, 2004. 528 s. ISBN 80-967064-9-7.
11. HAAS, H. J. – VELTEN, M. 1992. Selenoproteins in mitochondria and cytosol of *Saccharomyces uvarum* after growth in podium selenite-supplemented media. In *Journal of Trace Elements and Electrolytes in Health Disease*. vol. 2, 1992, no. 6, p. 70.

12. HAGAROVÁ, I. – ŽEMBERYOVÁ, M. 2005. Stanovenie selénu v krvnom sére detí metódou elektrotermickej atómovej absorpčnej spektrometrie. In *Chemické listy*, vol. 99, 2005, s. 34-39.
13. HEGEDÜS, O. – HEGEDÜSOVÁ, A. – GAŠPARÍK, J. – IVIČIČOVÁ, A. 2005. Hodnotenie metódy stanovenia selénu v zelenine atómovou absorpčnou spektrofotometriou s elektrotermickou atomizáciou a s generovaním hydridov. In *Chemické listy*, vol. 99, 2005, p. 518-524.
14. HEGEDÜS, O. – HEGEDÜSOVÁ, A. – ŠIMKOVÁ, S. - PAVLÍK, V. - JOMOVÁ, K. 2008. Evaluation of the ET-AAS and HG-AAS methods of selenium determination in vegetable. In *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, vol. 70, 2008, no. 6, p. 1287-1291.
15. HUDEMANN, CH. – BERNDT, C. – LILLIG, CH. H. 2008. Glutaredoxine und Eisen-Schwefel-Zentren. In *Biospektrum*, vol. 14, 2008, p. 32-35.
16. CHOVANCOVÁ, D. – KRAJŇÁKOVÁ, M. 2004. Možnosti stanovenia selénu s ohľadom na jeho premeny v biologických systémoch. In *Nova Biotechnologica*, 2004, s. 27-40.
17. KAUR, T. – BANASAL, M. 2006. Selenium enrichment and anti-oxidant status in baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* at different sodium selenite concentrations. In *Nutrición Hospitalaria*, vol. 21, 2006, no. 6, p.704-708.
18. KALINA, T. - VÁŇA, J. 2005. Sinice, houby, mechorosty a podobné organismy v súčasnej biológii. Praha : Karolinum, 2005. 606 s. ISBN: 80-246-1036-1.
19. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. 1982. Kvasinky a kvasinkovité mikroorganizmy. Bratislava : Alfa, 1982. 488 s. ISBN 63-154-82.
20. KOCKOVÁ-KRATOCHVÍLOVÁ, A. 1990. Taxonómia kvasiniek a kvasinkovitých mikroorganizmov. Bratislava : Alfa, 1990. 704 s. ISBN 80-05-00644-6.
21. KOPŘIVA, V. – MALOTA, L. a kol. 2008. Nutriční hodnocení masa sladkovodních a mořských ryb. In *Kvalita potravin*, roč. 8, 2008, č. 1, s. 22.
22. KOREŇOVSKÁ, M. 2006. Determination of arsenic, antimony and selenium by FI-HG-AAS in foods consumed in Slovakia. In *Journal of Food and Nutrition Research*, vol. 45, 2006, no. 2, p. 84-88.

23. LAURENT, O. - MESTER, Z. 2008. Production and Characterization of Fully Selenomethionine-Labeled *Saccharomyces cerevisiae*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, vol. 56, 2008, no. 24, p. 11792-11799.
24. LETAVAYOVÁ, L. – VLASÁKOVÁ, D. – SPALLHOLZ, J. E. – BROZMANOVÁ, J. – CHOVANEC, M. 2008. Toxicity and mutagenicity of selenium compounds in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Mutation Research*, vol. 638, 2008, p. 1-10.
25. LEWINSKA, A. – BARTOSZ, G. 2008. A role for yeast glutaredoxin genes in selenite-mediated oxidative stress. In *Fungal Genetics and Biology*, vol. 45, 2008, p. 1182-1187.
26. LOBINSKI, R. - EDMONDS, J. S. - SUZUKI, K.T. - UDEN, P.C. 2000. Species-selective determination of selenium compounds in biological materials. In *Pure and Applied Chemistry*, vol. 72, 2000, no. 3, p. 447-461.
27. MACK, C. L. – WLHELMI, B. – DUNCAN, J. R. – BURGESS, J. E. 2008. A kinetic study of the recovery of platinum ions from an artificial aqueous solution by immobilized *Saccharomyces cerevisiae* biomass, In *Minerals Engineering*, vol. 21, 2008, p. 31-37.
28. MAĎARIČ, A. – KADRABOVÁ, J. 1999. Selén – hladiny v požívatinách a celodenný príjem na Slovensku. In *Výživa a zdravie*, roč. 44, 2000, č. 1, s. 15-16.
29. MAĎARIČ, A. - KADRABOVÁ, J. 2003. Selénom proti civilizačným chorobám. In *Ozvena*, roč. 12, 2003, č. 1, s. 6-10, ISSN 1335-2490.
30. MAGÁLOVÁ, T. a kol. 1997. Koncentrácia medi, zinku a selénu a ich vzťahu k hladine ceruloplazmínu a aktivite antioxidantných enzýmov. In *Bratislavské lekárske listy*, 1997, č. 1, s. 8-11.
31. MACHADO, M. D. – SOARES, E. V. – SOARES H. M. V. M. 2010. Removal of heavymetals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: application to the treatment of real electroplating effluents containing multielements. In *Journal of Chemical Technology & Biotechnology.*, vol. 85, 2010, p. 1353-1360.
32. MACHADO, M. D. – SANTOS, M. S. F. – GOUVEIA, C. – SOARES, H. M.V.M. – SOARES, V. 2008. Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of

*Saccharomyces cerevisiae*: The flocculation as a separation process. In *Bioresource Technology*, vol. 99, 2008, p. 2107 – 2115.

33. MCSHEEHY, S. – PANNIER, F. – SZPUNNAR, J. – POTIN-GAUTIER, M. – LOBINSKI, R. 2002. Speciation of seleno compounds in yeast aqueous extracts by three-dimensional liquid chromatography with inductively coupled plasma mass spectrometric and electrospray mass spectrometric detection. In *Analyst*, vol. 127, 2002, p. 223. DOI 10.1039/b108680b.

34. MERZ, F. - HOLL, E. 2007. Die Produktion von Selenhefen. In *Mühle + Mischfutter*, vol. 144, 2007, no. 24, p. 851-852.

35. MOSNÁČKOVÁ, J. - KOVÁČIKOVÁ, E. a kol. 2000. Selén v potravinách. Bratislava : NOI, 2000. s. 36. ISBN 80-89088-22-8.

36. OURDANE, L. – MESTER, Z. 2008. Production and characterization of fully selenomethionine-labeled *Saccharomyces cerevisiae*. In *Journal of Agricultural and Food Chemistry*.vol. 56, 2008, no. 24, p. 11792.

37. PANKIEWICZ, U. - JERZY J. 2007. The Effect of Pulse Electric Field on Accumulation of Selenium in Cells of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Journal of Microbiology and Biotechnology*, vol 17, 2007, no. 7, p. 1139 – 1146.

38. POLATAJKO, A. – SLIWKA - KASZYNSKA, M. - DERNOVIC, M. et al. 2004. A systematic approach to selenium speciation in selenized yeast. In *Journal of Analytical Atomic Spectrometry*, vol. 19, 2004, no. 1, p. 114 – 120.

39. PONCE, C. A. – BAYÓN, M. M. – PAQUIN, C. – CARUSO, J. A. 2002. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. In *Journal of Applied Microbiology*, vol. 92, 2002, p. 602- 610.

40. RAYMAN M. P. 2004. The use of high-selenium yeast to raise selenium status: how does it measure up? In *British Journal of Nutrition*. 2004, vol. 92, p. 557-573.

41. RAYMAN, M. P. - INFANTE H. G. – SARGENTA, M. 2008. Food-chain selenium and human health: spotlight on speciation, In *British Journal of Nutrition*. vol. 100, 2008, no. 2, p. 238-253.

42. RIESE, C. 2007. Einfluss des Geschlechts auf den Selenmetabolismus und die Biosynthese von Selenoproteinen : dizertačná práca. Berlin : HU, 2007. 138 s.

43. ROSEN, B. P. – LIU, Z. 2009. Transport pathways for arsenic and selenium: A minireview. In *Environment International*, vol. 35, 2009, p. 512-515.
44. SALIN, H. – FARDEAU, V. – PICCINI, E. – LELANDAIS, G. – TANTY, V. – LEMOINE, S. – CLAUDE, J. – DEVAUX, F. 2008. Structure and properties of transcriptional networks driving selenite stress response in yeasts. In *BMC Genomics*, vol. 9, 2008, p. 1-14.
45. SHAMBERGER, R. J. 1983. *Biochemistry of Selenium*. New York : Plenum, 1983. 334 p.
46. SIPPEL, R.B. 1995. Selén v klinickej medicíne, In *Recipe*, 1995, č. 1, s. 7-9.
47. STENCHUK, M. M. - CHABAN, L. B. - GONCHAR, M. V. 2006. Selenium and yeast: Genetic mechanisms of the yeast tolerance to selenium compounds and their analogs. In *Biopolymers and cell*, 2006, vol. 22, no. 1, p. 3 –17. ISSN 0233-7657.
48. SUHAJDA, A. – HERGOCZKI, J. – JANZSO, B. – PAIS, I. – VERECZKEY, G. 2000. Preparation of selenium yeasts. Preparation of selenium-enriched *Saccharomyces cerevisiae*. In *Trace Elements Medical Biology*, vol. 14, 2000, p. 43-47.
49. ŠILHÁNKOVÁ, L. 2009. *Mikrobiologie pro potravináře a biotechnology*. Praha : Academia, 2009. 364 s. ISBN 978-80-200-1703-1.
50. ŠILLEROVÁ, S. – POLÁKOVÁ, A. – URMINSKÁ, D. - SZABOVÁ, E. 2010. Chemická a biochemická analýza kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kmeň Kolín, 612 a Gyöng. In *Potravinárstvo*, roč. 1, 2010, č. 4, s. 85-90.
51. ŠIMKOVÁ, S. – HEGEDÜS, O. – HEGEDÜSOVÁ, A. 2007. Validácia analytickej metódy ETA-AAS stanovenia selénu. In *VIII. vedecká konferencia doktorandov a mladých vedeckých pracovníkov*. Nitra : UKF, 2007, s. 280-287. ISBN 978-80-8094-106-2.
52. ŠINKOVÁ, T. 2007. Selén a zdravie človeka. In *TRENDY v potravinárstve*, roč. 14, 2007, č. 2, s. 15-16.
53. ŠPICKÝ, M. – ŠUBÍK, J. 1992. *Genetika kvasiniek*, Bratislava : Veda, 1992. 373 s. ISBN 80-224-0396-2.

54. ŠTURDÍK, E. – ZIGOVÁ, J. 1999. Bioinžinierske aspekty produkcie biomasy *Saccharomyces cerevisiae* ako zdroja špeciálnych proteínov. In *Biologické listy*, roč. 64, 1999, č. 1, s. 33-37, ISSN 036-486.
55. TAMAS, M. J. – WYSOCKI, R. 2001. Mechanisms involved in metalloid transport and tolerance acquisition. In *Current Genetics*, 2001. vol. 40, no.1, p. 2-12. ISSN 0172-8083.
56. TANČINOVÁ, D. – LABDUDA, R. 2009. Mykológia. Nitra : SPU, 2009. 110 s. ISBN 978-80-552-0162-7.
57. THOMSON, A. M. - ROGERS, J. T. - WALKER, C. E., STATON, J. M. - LEEDMAN, P. J. 1999. Optimized RNA gel-shift and UV cross-linking assays for characterization of cytoplasmic RNA-protein interactions. In *Biotechniques*, vol. 27, 1999, no. 5, s.1032.
58. TRNKOVÁ, J. 2005. Výskum na prevenciu rakoviny môže podporiť propagáciu dánskych selénových kvasníc, In *Lekárnicke listy*. roč. 7, 2005, č. 5, s. 41.
59. VEATCH, A. E. - BROCKMAN J. D. - SPATE, V. L. - ROBERTSON, J.D. - MORRIS, J. S. 2005. Selenium and nutrition: The accuracy and variability of the selenium content in commercial supplements. In *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*. vol. 264, 2005, no. 1, p. 33-38.
60. VRANÁ, D. 1986. Kvasinky ve výskumu a praxi. Praha : Academia, 1986. 376 s. ISBN 21-023-86.
61. WANG, J. – CHEN, C. 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*. In *Biotechnology Advances*, vol. 24, 2006, p. 427-451.
62. ZACHAR, D. 2004. Humánna výživa II. Živiny. Zvolen : TU, 2004. 218 s. online [cit. 2009-01-04]. Dostupné na internete: <<http://eutrofia.sk/?q=node/98>>
63. YIN, H. – CHEN, Z. – GU, Z. – HAN, Y. 2009. Optimization of natural fermentative medium for selenium-enriched yeast by D-optimal mixture design. In *Food Science and Technology*, vol. 42, 2009, p. 327-331.
64. YIN, H. – FAN, G. – GU, Z. 2010. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RSM). In *Food Science and Technology*, vol. 43, 2010, p. 669.



65. YOSHIDA, M. - FUKUNAGA, K. - TSUCHITA, H. - YASUMOTO, K. 1999. An evaluation of the bioavailability of selenium in high-selenium yeast. In *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, vol. 45, 1999, no. 1, p. 119-128. ISSN 0301-4800.

### **Internetové zdroje:**

66. FURDÍKOVÁ, K. Čisté kultúry vínnych kvasiniek a ich vplyv na originalitu vína. online [cit. 2009-01-04]. Dostupné na internete <http://www.chtf.stuba.sk/kbcht/rozne/prezent/Furdikova.pdf>>

67. online [cit. 2008-04-14]. Dostupné na internete: <<http://www.chem.sk/sk/activities/yeast/ccy/>>

## **Prílohy**

**Tabuľka 5:** Porovnanie výťažku biomasy kmeňov Kolín a 612, pri 48 hod. kultivácii, v závislosti od rôznej koncentrácie glukózy

množstvo glukózy v médiu [%]	výt'azok biomasy kmeňa Kolín [mg.100 cm <sup>-3</sup> média]	výt'azok biomasy kmeňa 612 [mg.100 cm <sup>-3</sup> média]
2	1053,2	957,6
2,5	1236,7	1194,8
3	1301,3	1269,0
3,5	1303,6	1366,2
4	1376,9	1317,1
4,5	1373,5	1305,8

**Tabuľka 6:** Prídavok seleničitanu sodného do kultivačného média v rastovej fáze kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kmeň Kolín

Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> [mg.dm <sup>-3</sup> média]	hmotnosť biomasy [g.100 cm <sup>-3</sup> ]	výt'azok biomasy [%]
0	1,1890	100
10	1,1538	97,040
20	0,8501	71,497
30	0,3422	28,780
40	0,3341	28,099
50	0,3306	27,805

**Tabuľka 7:** Prídavok seleničitanu sodného do kultivačného média v stacionárnej fáze rastu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kmeň Kolín

Na <sub>2</sub> SeO <sub>3</sub> [mg.dm <sup>-3</sup> média]	hmotnosť biomasy [g.100 cm <sup>-3</sup> ]	výt'azok biomasy [%]
0	1,1890	100
10	1,1813	99,352
20	0,6906	58,082
30	0,4732	39,798
40	0,4211	35,416
50	0,2948	24,794

**Tabuľka 8:** Prídavok seleničitanu sodného do kultivačného média v rastovej fáze kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kmeň 612

$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ [ $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ média]	hmotnosť biomasy [ $\text{g}\cdot 100\text{cm}^{-3}$ ]	výt'azok biomasy [%]
0	0,9542	100
10	1,0910	114,337
20	0,8395	87,979
30	0,4105	43,020
40	0,3493	36,607
50	0,3152	33,033

**Tabuľka 9:** Prídavok seleničitanu sodného do kultivačného média v stacionárnej fáze rastu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kmeň 612

$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ [ $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ média]	hmotnosť biomasy [ $\text{g}\cdot 100\text{cm}^{-3}$ ]	výt'azok biomasy [%]
0	0,9542	100
10	0,9626	100,880
20	0,6853	71,819
30	0,6827	71,547
40	0,5329	55,848
50	0,3815	39,981

**Tabuľka 10:** Obsah selénu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, kmeň Kolín, v rastovej fáze a v stacionárnej fáze rastu, po prídavku seleničitanu sodného do kultivačného média

$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ [ $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ média]	Obsah Se v rastovej fáze, [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]	Obsah Se v stacionárnej fáze rastu [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
0	42,8	42,8
10	128	169
20	371	457
30	1148	1171
40	1699	1618
50	1578	2079

**Tabuľka 11:** Obsah selénu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, kmeň 612, v rastovej fáze a v stacionárnej fáze rastu, po prídavku seleničitanu sodného do kultivačného média

$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ [ $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ média]	Obsah Se v rastovej fáze [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]	Obsah Se v stacionárnej fáze rastu [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
0	25	25
10	119	169
20	458	548
30	1061	687
40	1669	1250
50	1736	2419

**Tabuľka 12:** Obsah selénometionínu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, kmeň Kolín, v rastovej fáze a v stacionárnej fáze rastu, po prídavku seleničitanu sodného do kultivačného média

$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ [ $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ média]	Obsah SeMet v rastovej fáze [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]	Obsah SeMet v stacionárnej fáze rastu [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
0	0	0
10	14,1	28,0
20	77,9	0
30	65,7	0
40	100,9	0
50	158,2	12,8

**Tabuľka 13:** Obsah selénometionínu v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, kmeň 612, v rastovej fáze a v stacionárnej fáze rastu, po prídavku seleničitanu sodného do kultivačného média

$\text{Na}_2\text{SeO}_3$ [ $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ média]	Obsah SeMet v rastovej fáze [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]	Obsah SeMet v stacionárnej fáze rastu [ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ]
0	0	0
10	0	1,9
20	35,1	4,1
30	50,8	4,8
40	67,6	2,3
50	95,7	7,1

