

Blažena Drábová

Dana Urminská

Jakub Mutňanský

**Antioxidačné enzýmy liehovarníckych
kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae***

Nitra 2020

Názov: Antioxidačné enzýmy liehovarníckych kvasiniek
Saccharomyces cerevisiae

Autori:

Ing. Blažena Drábová, PhD. (2,50 AH)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP
doc. RNDr. Dana Urminská, CSc. (2,50 AH)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP
Ing. Jakub Mutňanský (0,94 AH)
Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre, FBP

Recenzenti:

prof. Ing. Miroslava Kačániová, PhD., FZKI SPU v Nitre
doc. Ing. Stanislav Šilhár, CSc., VÚP Bratislava NPPC Nitra

Schválila rektorka Slovenskej poľnohospodárskej univerzity v Nitre
dňa 20. 1. 2020 ako vedeckú monografiu.

Vydané s finančnou podporou projektu KEGA č. 030SPU-4/2019.
Autorkou fotografií na obálke je Blažena Drábová, 2014.

ISBN 978-80-552-2142-7

Obsah

Úvod	7
1 Súčasný stav riešenej problematiky	9
1.1 Liehovarnícke kvasinky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9
1.2 Oxidačný stres	12
1.2.1 Reaktívne formy kyslíka	15
1.2.2 Reaktívne formy dusíka (RNS)	19
1.3 Antioxidačný systém	19
1.4 Neenzýmové antioxidanty	22
1.4.1 Glutatión	22
1.4.2 Vitamín C	22
1.4.3 Vitamín E	22
1.4.4 Karotenoidy	23
1.4.5 Flavonoidy	23
1.5 Antioxidačné enzýmy	23
1.5.1 Superoxiddismutázy	24
1.5.2 Kataláza	27
1.5.3 Glutatiónperoxidázy	29
1.6 Metódy stanovenia celkovej antioxidačnej kapacity	32
1.6.1 Metóda DPPH	34
1.6.2 Metóda ABTS	34
1.6.3 Metóda FRAP	35
1.6.4 Metóda ORAC	35
1.6.5 Metóda TRAP	35
1.7 Izolácia a purifikácia antioxidačných enzýmov	36

1.7.1	Dezintegrácia buniek	36
1.7.2	Purifikácia antioxidačných enzýmov	37
2	Cieľ práce	40
3	Materiál a metódy	41
3.1	Biologický materiál	41
3.2	Kultivácia <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	41
3.3	Rastové charakteristiky kvasiniek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42
3.3.1	Stanovenie sušiny gravimetricky	43
3.4	Dezintegrácia buniek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	43
3.4.1	Mechanická dezintegrácia použitím sklenených guľčiek	43
3.4.2	French Press	44
3.4.3	Sonifikácia	44
3.5	Stanovenie celkovej antioxidačnej kapacity metódou ABTS	44
3.6	Stanovenie aktivity superoxiddismutázy	45
3.7	Stanovenie aktivity glutatiónperoxidázy	46
3.8	Izolácia a purifikácia superoxiddismutázy	46
3.9	Izolácia glutatiónperoxidázy	47
3.10	Stanovenie molekulovej hmotnosti superoxiddismutázy metódou SDS	47
3.11	Stanovenie pH optima a teplotného optima enzýmov	49
3.12	Matematicko-štatistické vyhodnotenie výsledkov	49
4	Výsledky a diskusia	50
4.1	Výber živnej pôdy pre kultiváciu liehovarníckych kvasiniek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
4.1	Rastové charakteristiky <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	52
4.2	Mechanická dezintegrácia buniek kvasiniek	57
4.3	Celková antioxidačná kapacita kvasiniek <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	60

4.4	Produkcia superoxiddismutázy liehovárnickymi kvasinkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	62
4.5	Vplyv medi na aktivitu superoxiddismutázy	65
4.6	Gélová chromatografia superoxiddismutázy	68
4.7	Ionovýmenná chromatografia superoxiddismutázy	70
4.8	Stanovenie relatívnej molekulovej hmotnosti superoxiddismutázy metódou SDS-PAGE	71
4.9	Vplyv pH a teploty na aktivitu superoxiddismutázy.....	72
4.10	Produkcia glutatiónperoxidázy liehovárnickymi kvasinkami <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
4.11	Vplyv peroxidu vodíka na produkciu glutatiónperoxidázy	75
4.12	Vplyv selénu na produkciu glutatiónperoxidázy	79
4.13	Vplyv pH na aktivitu glutatiónperoxidázy.....	81
5	Návrh na využitie poznatkov pre ďalší rozvoj vedy a praxe	83
	Záver.....	84
6	Zoznam použitej literatúry	86

Úvod

Ľudstvo od pradávna využíva životnú činnosť mikroorganizmov na produkciu potravinársky významných látok. Medzi komerčne najvýznamnejšie mikroorganizmy patria liehovarnícke kvasinky. Výroby piva, vína či liehu, majú tisícročnú tradíciu, avšak až v roku 1857 Luis Pasteur vysvetlil kvasenie - fermentáciu a neskôr význam kvasiniek v tomto procese.

Liehovarnícke kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* patria v súčasnosti medzi najviac využívané mikroorganizmy, a to nielen ako producenti etanolu, ale aj ako modelové výskumné eukaryotické organizmy. V tomto smere sú liehovarnícke kvasinky vhodným objektom pre sledovanie enzýmových reakcií, syntézu obranných látok, ale aj akumuláciu makro- a mikroelementov. V ostatnej dobe sa pozornosť vedcov sústreďuje na využitie kvasiniek pri objasňovaní pôsobenia oxidantov a prooxidantov na rôzne súčasti a molekuly buniek, ako aj na obranné systémy, ktoré kvasinky využívajú na elimináciu pôsobenia týchto látok.

Nerovnováhou medzi oxidantmi a prooxidantmi na jednej strane a obrannými antioxidačnými mechanizmami buniek na druhej strane, sa vytvára oxidačný stres.

Pôsobenie vysoko reaktívnych foriem kyslíka alebo dusíka vedie k poškodeniu biomolekúl, ktoré môže mať pre bunku až letálne dôsledky. V rámci celého ľudského organizmu môže byť oxidačný stres jedným z dôvodov rozvoja tzv. civilizačných ochorení, akými sú kardiovaskulárne alebo onkologické ochorenia.

Kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* sú vďaka dobrému poznaniu ich metabolizmu a jednoduchej kultivácii vhodným organizmom, ktorý je možné využiť pre skúmanie a objasnenie mechanizmu pôsobenia a spôsobu eliminácie oxidantov v eukaryotických bunkách. Primárnym obranným mechanizmom je endogénny antioxidačný systém, v ktorom spolupôsobia predovšetkým enzýmy z triedy oxidoreduktáz a ich kofaktory. Pomocou nich sa v bunkách udržiava potrebná rovnováha medzi oxidantmi a antioxidentmi, pretože reaktívne formy kyslíka alebo dusíka nie sú len látkami, ktorých pôsobenie je potrebné zastaviť, ale v biologických systémoch majú významné pozitívne funkcie. Sú súčasťou protizápalových reakcií, podieľajú sa na ochrane organizmu pred cudzorodými časticami, sú zapojené do regulačných mechanizmov a aktivujú celý rad enzýmov.

Medzi najvýznamnejšie antioxidantné enzýmy patria superoxiddismutáza, kataláza a glutatiónperoxidáza. Typickými kofaktormi sú glutatión, ktorý je vo významnom množstve syntetizovaný práve v liehovarnických kvasinkách a selén, ktorý je prostredníctvom selenocysteínu súčasťou antioxidantných enzýmových reakcií.

Blažena Drábová

Dana Urminská

Jakub Mutňanský

**Antioxidačné enzýmy liehovarníckych
kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae***

Vydala: Slovenská poľnohospodárska univerzita v Nitre

Vydanie: prvé

Náklad: 100 ks

Rok vydania: 2020

Foto na obálke: Ing. Blažena Drábová, PhD.

AH-VH: 5,94-6,11

Neprešlo redakčnou úpravou vo Vydavateľstve SPU v Nitre.

ISBN 978-80-552-2142-7