

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Romana HABOT

**ŠTUDIJ ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA
SPOJINE NA OSNOVI MAGNEZIJA**

DIPLOMSKO DELO

Univerzitetni študij

Ljubljana, 2007

UNIVERZA V LJUBLJANI
BIOTEHNIŠKA FAKULTETA
ENOTA MEDODDELČNEGA ŠTUDIJA MIKROBIOLOGIJE

Romana HABOT

**ŠTUDIJ ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA SPOJINE NA
OSNOVI MAGNEZIJA**

DIPLOMSKO DELO
Univerzitetni študij

**STUDY OF ANTIOXIDATIVE ACTION OF THE SUBSTANCE
CONTAINING MAGNESIUM**

GRADUATION THESIS
University studies

Ljubljana, 2007

Diplomsko delo je zaključek univerzitetnega študija mikrobiologije. Delo je bilo opravljeno v laboratoriju na Katedri za biotehnologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete Univerze v Ljubljani.

Študijska komisija univerzitetnega dodiplomskega študija mikrobiologije je za mentorja diplomskega dela imenovala prof. dr. Petra RASPORJA, za somentorico asist. dr. Polono JAMNIK in za recenzenta doc. dr. Blaža CIGIĆA.

Mentor: prof. dr. Peter RASPOR

Somentorica: asist. dr. Polona JAMNIK

Recenzent: doc. dr. Blaž CIGIĆ

Komisija za oceno in zagovor:

Predsednik: prof. dr. Franc Viktor NEKREP

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za zootehniko

Član: prof. dr. Peter RASPOR

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Članica: asist. dr. Polona JAMNIK

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Član: doc. dr. Blaž CIGIĆ

Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo

Datum zagovora:

Naloga je rezultat lastnega raziskovalnega dela.

Romana HABOT

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA

- ŠD Dn
- DK UDK 579.22:582.282.23:546.46(043)=863
- KG kvasovke / *Saccharomyces cerevisiae* / magnezij / askorbinska kislina / oksidativni stres / antioksidanti / znotrajcelična oksidacija / energijska metabolna aktivnost
- AV HABOT, Romana
- SA RASPOR, Peter (mentor) / JAMNIK, Polona (somentorica), / CIGIČ, Blaž (recenzent)
- KZ SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- ZA Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Enota medoddelčnega študija mikrobiologije
- LI 2007
- IN ŠTUDIJ ANTIOKSIDATIVNEGA DELOVANJA SPOJINE NA OSNOVI MAGNEZIJA
- TD Diplomsko delo (Univerzitetni študij)
- OP XI, 41 str., 3 pregl., 7 sl., 8 pril., 62 vir.
- IJ sl
- JI sl / en
- AL Namen naloge je bil preučiti vpliv spojine na osnovi magnezija na znotrajcelično oksidacijo in celično energijsko metabolno aktivnost pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155. Spojino na osnovi magnezija smo dodali h kulturi kvasovk, ki smo jo namnožili do začetka stacionarne faze rasti. Kot pozitivno kontrolo smo dodali raztopino askorbinske kisline. Celice kvasovk so bile izpostavljene spojini na osnovi magnezija 1, 3 in 24 ur. Znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovke *S. cerevisiae* smo ocenili z uporabo barvila diklorofluorescein. Rezultati so pokazali, da prisotnost spojine na osnovi magnezija zniža znotrajcelično oksidacijo. Znižanje je bilo večje, kot pri askorbinski kislini. Energijsko metabolno aktivnost celice kvasovke *S. cerevisiae* smo določali z uporabo komercialnega testa BacTiter-Glo™ Cell Viability Assay. Dodatek spojine na osnovi magnezija ni vplival inhibitorno na rast celic kvasovke. Energijska metabolna aktivnost je bila višja od kontrole po 1, 3 in 24 urah.

KEY WORDS DOCUMENTATION

- N Dn
- DC UDC 579.22:582.282.23:546.46(043)=863
- CX yeasts/ *Saccharomyces cerevisiae* / magnesium / ascorbic acid / oxidative stress / antioxidants / intracellular oxidation / energy metabolic activity
- AU HABOT, Romana
- AA RASPOR, Peter (supervisor) / JAMNIK, Polona (co-advisor) / CIGIĆ, Blaž (reviewer)
- PP SI-1000 Ljubljana, Jamnikarjeva 101
- PB University of Ljubljana, Biotechnical Faculty, Interdepartmental Programme in Microbiology
- PY 2007
- TI STUDY OF ANTIOXIDATIVE ACTION OF THE SUBSTANCE CONTAINING MAGNESIUM
- DT Graduation thesis (University studies)
- NO XI, 41 p., 3 tab., 7 fig., 8 ann., 62 ref.
- LA sl
- AL sl / en
- AB The aim of the research was to investigate the effect of the substance containing magnesium on intracellular oxidation and cell energy metabolic activity of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* – ZIM 2155. Yeast cells were exposed to the substance containing magnesium in the beginning of stationary growth phase for 1, 3 and 24 hours. As a positive control we added solution of ascorbic acid. Yeast culture was exposed to the substance containing magnesium for 1, 3 and 24 hours. Intracellular oxidation in the cells of *S. cerevisiae* was assessed using dichlorofluorescein. The results showed, that presence of substance containing magnesium in the medium decreased intracellular oxidation. The decrease was higher than in the case of ascorbic acid. Energy metabolic activity of *S. cerevisiae* cells was determined using commercial kit BacTiter-Glo™ Cell Viability Assay. The presence of substance containing magnesium did not show inhibitory effect on yeast growth. Energy metabolic activity increased compared to control after 1, 3 and 24 hours.

KAZALO VSEBINE

KLJUČNA DOKUMENTACIJSKA INFORMACIJA	III
KEY WORDS DOCUMENTATION	IV
KAZALO VSEBINE	V
KAZALO PREGLEDNIC	VII
KAZALO SLIK	VIII
KAZALO PRILOG	IX
OKRAJŠAVE IN SIMBOLI	X
SLOVARČEK.....	XI
1 UVOD	1
1.1 OPREDELITEV PROBLEMA	1
1.2 CILJI RAZISKOVANJA.....	2
1.3 DELOVNA HIPOTEZA	2
2 PREGLED OBJAV	3
2.1 SPOJINA NA OSNOVI MAGNEZIJA	3
2.1.1 Prehrambeno dopolnilo v obliki amorfnih silikatnih mineralov	3
2.2 KVASOVKE IN OKSIDATIVNI STRES.....	6
2.2.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)	7
2.2.1.1. Superoksidni anion	7
2.2.1.2. Vodikov peroksid	8
2.2.1.3. Hidroksilni radikal	8
2.2.2 Antioksidativni obrambni sistemi	8
3 MATERIALI IN METODE	12
3.1 POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA	12
3.2 METODE DELA	13
3.2.1 Priprava inokuluma	13
3.2.2 Aerobna submerzna kultura na stresalniku –	
glavni bioproces	13
3.2.3 Dodatek in izpostavitve celic kvasovke spojini na osnovi	
magnezija.....	13
3.2.4 Ocena znotrajcelične oksidacije	14
3.2.5 Določanje energijske metabolne aktivnosti celic	15
3.2.6 Štetje celic.....	16
3.2.7 Statistična obdelava podatkov	17
3.3 MATERIALI	18
3.3.1 Mikroorganizem	18
3.3.2 Gojišča	18
3.3.2.1. Trdno YEPD gojišče.....	18

3.3.2.2. Tekoče YEPD gojišče.....	18
3.3.3 Reagenti in raztopine	19
3.3.3.1. Izpostavitev celic	19
3.3.3.2. Ocena znotrajcelične oksidacije	19
3.3.3.3. Določanje energijske metabolne aktivnosti celic	19
3.3.3.4. Štetje celic	19
3.3.4 Pribor in oprema	19
3.3.4.1. Priprava gojišč, raztopin	19
3.3.4.2. Priprava inokuluma	20
3.3.4.3. Ocena znotrajcelične oksidacije	20
3.3.4.4. Določanje enegijske metabolne aktivnosti	21
3.3.4.5. Štetje celic	21
3.3.4.6. Shranjevanje kultur, reagentov, raztopin.....	21
4 REZULTATI.....	22
4.1 DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE ZA INOKULUM	22
4.2 DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE ZA GLAVNI BIOPROCES	23
4.3 OCENA ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE	24
4.4 DOLOČANJE ENERGIJSKE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC	26
4.5 ŠTETJE CELIC	27
5 RAZPRAVA IN SKLEPI.....	28
5.1 DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE	28
5.2 OCENA ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE.....	29
5.3 DOLOČANJE ENERGIJSKE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC	31
5.4 ŠTETJE CELIC	33
5.5 SKLEPI.....	33
6 POVZETEK.....	34
7 VIRI	35
ZAHVALA	
PRILOGE	

KAZALO PREGLEDNIC

Preglednica 1:	Primarni in sekundarni antioksidativni obrambni sistemi pri kvasovkah (Moradas-Ferreira in Costa, 2000)	9
Preglednica 2:	Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993)	18
Preglednica 3:	Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993)	18

KAZALO SLIK

Slika 1: Hodogram celotnega poskusa s katerim smo določali znotrajcelično oksidacijo in energijsko metabolno aktivnost celic kvasovke <i>S. cerevisiae</i> po izpostavitvi spojini na osnovi magnezija.....	12
Slika 2: Aerobna submerzna kultura kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na stresalniku ($V_D = 100$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min).....	22
Slika 3: Aerobna submerzna kultura kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> na stresalniku ($V_D = 450$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min).....	23
Slika 4: Ocena znotrajcelične oksidacije v gojišču YEPD z dodanimi različnimi spojinami glede na kontrolo ($V_D = 100$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min), kot izmerjena fluorescenca pri 520 nm v odvisnosti od različnih časov kulture.....	24
Slika 5: Koeficienti znižanja znotrajcelične oksidacije v gojišču YEPD z dodanimi različnimi spojinami glede na kontrolo ($V_D = 100$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min).....	24
Slika 6: Energijska metabolna aktivnost kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v gojišču YEPD z dodanimi različnimi spojinami glede na kontrolo ($V_D = 100$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min), kot izmerjena luminiscenca v odvisnosti od različnih časov kulture.....	26
Slika 7: Ocena števila celic kvasovke <i>Saccharomyces cerevisiae</i> v gojišču YEPD z dodanimi različnimi spojinami glede na kontrolo ($V_D = 100$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min) v odvisnosti od različnih časov kulture.....	27

KAZALO PRILOG

- Priloga A1:** Meritve optične gostote (OD_{650}) med aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* na stresalniku ($V_D = 100$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min) - namnoževanje inokuluma
- Priloga A2:** Meritve optične gostote (OD_{650}) med aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* na stresalniku ($V_D = 450$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min) - glavni poskus
- Priloga B1:** Meritve fluorescenca za določanje znotrajcelične oksidacije pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* brez (kontrola) in po dodatku spojin
- Priloga B2:** Koeficienti znižanja znotrajcelične oksidacije pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* brez (kontrola) in po dodatku spojin
- Priloga C:** Meritve luminiscence za določanje celične energijske metabolne aktivnosti pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* brez (kontrola) in po dodatku spojin
- Priloga D:** Povprečne vrednosti števila celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v gojišču YEPD z dodanimi različnimi spojinami glede na kontrolo
- Priloga E:** Izmerjene vrednosti pH v gojišču YEPD s kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in dodanimi spojinami ($t = 0$, $pH = 5,17$)
- Priloga F:** Izmerjene vrednosti ORP po dodatku spojine na osnovi magnezija v gojišču YEPD in izmerjene vrednosti ORP ter pH po dodatku spojine na osnovi magnezija destilirani vodi v različnih časovnih obdobjih

OKRAJŠAVE IN SIMBOLI

ATP	adenozin-5-trifosfat
c	koncentracija
dH ₂ O	destilirana voda
ddH ₂ O	bidestilirana voda
DCF	fluorescentna oblika diklorofluoresceina
DNA	deoksiribonukleinska kislina
FDA	(ang. Food and drug administration)
H ₂ DCF	diklorofluorescein
H ₂ DCFDA	diacetatna oblika diklorofluoresceina
KV	koeficient variiranja
h	ura
HSP	stresni proteini (angl. heat shock proteins)
M	mol/L
mM	10 ⁻³ mol/L
min	minuta
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
obr./min	obrati na minuto
OD ₆₅₀	optična gostota ($\lambda = 650$ nm)
ORP	oksidoredukcijski potencial
RDA	(ang. recommended daily intake)
RFU	(angl. relative fluorescence unit)
RLU	(angl. relative luminiscence unit)
ROS	reaktivne kisikove zvrsti
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SD	standardni odklon
T	temperatura
t	čas
V _D	delovni volumen
vol %	volumski odstotek
YEPD	gojišče
ZIM	Zbirka industrijskih mikroorganizmov, Biotehniška fakulteta, Ljubljana

SLOVARČEK

Antioksidant: vsaka snov, ki je sposobna že v nizki koncentraciji opazno zadržati ali zavreti oksidacijo substrata.

Antioksidativni obrambni sistemi: sistemi, ki pri normalnih pogojih rasti učinkovito vzdržujejo reaktivne kisikove zvrsti na osnovni, neškodljivi ravni in popravljajo celične poškodbe.

Energijska metabolna aktivnost: sposobnost celice, da vrši reakcije, s katerimi si zagotavlja energijo in redukcijsko moč.

Oksidativni stres: posledica izpostavitve celic specifičnim stresnim razmeram, ko nivo reaktivnih kisikovih zvrsti preseže antioksidativno sposobnost celice.

Reaktivne kisikove zvrsti: nekatere molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih in spojine kisika z vodikom, klorom in dušikom (npr. vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorna kislina (HOCl) in singletni kisik ($^1\text{O}_2$)).

Znotrajcelična oksidacija: merilo za vsebnost reaktivnih kisikovih zvrsti v celici.

1 UVOD

1.1 OPREDELITEV PROBLEMA

Aerobni organizmi se stalno soočajo s toksičnimi stranskimi učinki molekularnega kisika in sicer preko tvorbe reaktivnih kisikovih zvrsti (ROS) med normalnim celičnim metabolizmom (mitohondrijska respiratorna veriga, številne reakcije katalizirane z oksidazami, kjer nastaja kot produkt vodikov peroksid) (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Reaktivne kisikove zvrsti so molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih in enim ali več ne parnih elektronov (Santoro in Thiele, 1997). Njihove glavne tarče so DNA, lipidi in proteini, pri čemer nastane še več ROS, ki povzročijo še dodatne poškodbe celičnih organelov (mitohondrij, jedro), celičnih membran in encimov (Singler in sod, 1999). Kopičenje oksidiranih molekul vodi do celične smrti (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Celice so razvile obrambne sisteme proti ROS. Pomembno predstavljajo antioksidanti, ki vežejo kovinske ione, encimsko odstranjujejo oksidante in/ali pa sami neposredno reagirajo z ROS (Singler in sod., 1999). Antioksidativne obrambne sisteme delimo na primarne in sekundarne. Delujejo tako, da nevtralizirajo ROS, popravijo poškodbe in odstranijo oksidirane molekule (Moradas-Ferreira in sod., 1996). Različni stresni dejavniki (oksidanti, toplotni šok, etanol, težke kovine) povečajo količino ROS in posledica je indukcija antioksidativnih obrambnih sistemov – oksidativni stresni odgovor. Oksidativni stres nastopi kot posledica porušenega ravnotežja med ROS in antioksidanti v celici, do česar lahko pride zaradi izrabe znotrajceličnih antioksidantov in/ali povečane tvorbe ROS (izpostavitve celicam snovem, ki povzročajo tvorbo ROS) (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Poleg endogenih antioksidantov, poznamo tudi eksogene antioksidante, ki jih pridobimo s hrano. Poleg antioksidantov, ki so sestavine različnih živil, zlasti sadja in zelenjave, na tržišču obstaja veliko vitaminskih in drugih prehrabnih dopolnil z antioksidativnim delovanjem. Antioksidativno delovanje je zelo pomembna vloga prehrabnih dopolnil. Nudijo zaščito pred oksidativnimi poškodbami, kar preprečuje mnoge bolezni, kot so rak, bolezni srca in ožilja in sladkorna bolezen (Ames in sod, 1993; Gutteridge in Halliwell,

1994). Preučevana spojina na osnovi magnezija je komercialno prehrambeno dopnilo s sestavo (točka 3.3.3.1), ki v celoti ni poznana, saj gre za poslovno skrivnost. Je močan eksogeni antioksidant z oksido-redukcijskim potencialom okrog – 600 mV.

Za preučevanje delovanja spojine na osnovi magnezija smo uporabili kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*. Je eden izmed najboljše proučenih organizmov tako z vidika genetike kot fiziologije. V njenem genomu so bili najdeni strukturni in funkcionalni homologi skoraj vseh sesalčjih genov (Piškur in Langkjaer, 2004). Metabolizem kvasovk lahko primerjamo z metabolizmom in določenimi funkcijami višjih organizmov, kar jim daje lastnosti dobrih modelnih organizmov (Yanagida, 2002).

1.2 CILJI RAZISKOVANJA

Cilj pričujoče diplomske naloge je bil dokazati antioksidativno delovanje spojine na osnovi magnezija v in *in vivo* pogojih. Uporabili smo kvasovko *Saccharomyces cerevisiae*, ki se je pokazala kot primeren modelni organizem, na podlagi katerega smo lahko sklepali o delovanju spojine na osnovi magnezija tudi pri višjih evkariontih.

1.3 DELOVNA HIPOTEZA

Postavili smo dve hipotezi:

- izpostavitve celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* spojini na osnovi magnezija ne povzroči inhibicije rasti
- izpostavitve celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* spojini na osnovi magnezija zniža znotrajcelično oksidacijo

2 PREGLED OBJAV

2.1 SPOJINA NA OSNOVI MAGNEZIJA

2.1.1 Prehrambeno dopolnilo v obliki amorfnih silikatnih mineralov

Amorfni silikatni minerali, velikokrat opisani kot kamena moka, so bili nekdaj običajni v naravnih vodnih virih in obilno prisotni v ledeniških potokih. Purdy-Lloyd s sodelavci (2001) navaja, da ti amorfnih silikatni minerali vodi, v kateri se nahajajo, zagotavljajo antioksidativni oziroma visok oksido-redukcijski potencial.

Ledeniške vode ponekod po svetu so še vedno bogate z amorfnimi silikatnimi minerali, ki so večinoma prisotni kot nano delci (Dove in Rimstidt, 1994). Sodeč po navedbah teh znanstvenikov so doslej našli le pet krajev, kjer je v ledeniških potokih voda bogata z amorfnimi silikatnimi minerali. V teh ledeniških potokih naj bi bil tudi anionski vodik (H^-). Vodik v tej obliki je zelo reaktiven in ima ionsko aktivnost v raztopinah (Gauyacq, 1987).

Z geokemičnimi analizami sta Dove in Rimstidt (1994) pokazala, da naj bi imeli ti silikatni minerali številne pozitivne lastnosti. Ena izmed teh lastnosti je vezava vode in drugih elementov za transport. Na podlagi teh analiz naj bi tudi dokazala, da se ti mineralni delci lahko vežejo z reduciranim vodikom.

Znanstveniki so uspeli pripraviti specifične silikatne analoge teh mineralov, ki so jih dodali v prehrambena dopolnila. Silikatni delci so lahko sintetizirali. Združujejo se v skupke t.i. Microclusters (Flanagan Technologies, Inc., Cottonwood, AZ). Površine teh mikro skupkov so lahko zasičene z reduciranimi vodikovimi ali hidridnimi (H^-) ioni. Ti delci nato delujejo kot reducirajoče učinkovine ali antioksidanti v primeru raztopine (standardni oksido-redukcijski potencial, -550 mV) (Dove in Rimstidt, 1994).

V določenih laboratorijih so se znanstveniki veliko ukvarjali s temi silikatnimi amorfnimi minerali. Na novo so sintetizirali spojine iz skupine hidridov in proučevali njihove lastnosti. Silikatni hidridi so ene izmed prvih sintetiziranih spojin iz te skupine (Stephanson in Flanagan, 2003a). Ti hidridi so sestavljeni iz silicijevega ogrodja, ki se združuje v obliki monomernih kletk. Stephanson in Flanagan (2003a) trdita, da delujejo kot prenašalci negativno nabitih vodikovih ionov. Zaradi domnevnih pozitivnih lastnosti so te

silikatne hidride intenzivno proučevali več let. S številnimi študijami so želeli dokazati, da so netoksični in varni za uporabo kot prehrabena dopolnila (Flanagan in Purdy-Lloyd, 1999; Jaqmin in sod., 1996). Njihova uporaba v znanosti, medicini in inženiringu se je drastično povečala v zadnjih nekaj letih (Stephanson in Flanagan, 2003a). Za silicij in silicijeve spojine že nekaj časa velja, da igrajo pomembno vlogo za zdravje organizma. Silicij sodeluje v celičnem razvoju (Williams, 1986) in je esencialni element za normalen razvoj in rast kosti (Carlisle, 1982). Povezan je z različnimi biokemijskimi mehanizmi v različnih organizmih, še posebej pri tvorbi ogrodja diatomej in drugih enoceličarjev (Morse, 1999).

Z merjenjem ORP (oksidoredukcijski potencial) so pokazali, da silikatni hidridi močno znižajo potencial v vodni raztopini, in sicer na vrednost -700 mV. S tem so hoteli pokazati, da ima ta spojina morda celo boljši oksidoredukcijski potencial od drugih znanih antioksidantov, kot so askorbinska kislina, ubikinon ali β karoten. Poleg tega, da silikatni hidridi pokažejo pomembne spremembe v merjenju ORP, prav tako zvišajo pH na raven alkalne raztopine (tudi do pH 8,7). Stephanson in sodelavci (2002) trdijo, da kombinacija oksidoredukcijskega potenciala in pH omogočata takšni spojini značilnosti močnega reducenta, ki ima velik potencial kot antioksidant in lovilec prostih radikalov.

S testiranjem so pokazali, da te spojine kažejo pomembne pozitivne lastnosti predvsem v *in vitro* pogojih. V takšnih pogojih naj bi naredili kar nekaj raziskav (Stephanson in sod 2002; Stephanson in Flanagan, 2003a; Stephanson in Flanagan 2003b).

V zadnjih nekaj letih so razvili novo aktivno vodikovo spojino z unikatno biokemično aktivnostjo. Silikatnim hidridom so dodali magnezij in tako naj bi po pričevanju teh znanstvenikov (Stephanson in Flanagan, 2006) pridobili prehrabeno dopolnilo s še več pozitivnimi lastnostmi.

Pregled literature predstavlja predvsem prednosti uporabe spojine na osnovi magnezija kot dopolnila v sodobni prehrani. Natančna analiza predstavljenih virov kaže, da so avtorji usmerili svoje delo v dokazovanje pozitivnih lastnosti proučevane spojine. To je razvidno iz dejstva, da gre za publikacije, ki niso v naboru del revij z faktorjem vpliva ali pa so celo iz nabora poljudnih publikacij. Pri pregledu literature se je tudi pokazalo, da glavni avtorji

teh publikacij niso velikokrat citirani s strani drugih znanstvenikov. Referenčnih virov, ki bi poskušali analizirati to prehrabeno dopolnilo skozi kritično analizo ni najti. Zasedili smo nekaj poljudnih publikacij, ki se dotikajo te preučevane spojine na osnovi magnezija z nasprotujočega vidika (Microhydrin, 1999; Daniells, 2006; Melton, 2006). Izhajajoč iz tega pregleda nekaterih virov lahko trdimo, da je nemogoče celovito oceniti realno stanje na področju te spojine kot prehrabnega dopolnila, zato pa bo potrebno v prihodnosti opraviti še nekaj dodatnih raziskav. Ta problem nakazuje potrebo obširnih znanstvenih raziskav na tem področju, ki bodo odgovorile na številna odprta vprašanja in dale kritičen pogled na samo področje prehrabnih dopolnil.

Problem področja prehrabnih dopolnil se kaže tudi v tem, da številne institucije, ki regulirajo to področje (npr. FDA (ang. Food and Drug Administration), Urad za zdravila), klasificirajo te spojine kot nutriente, zato niso deležni sistemskih bioabsorpcijskih in toksikoloških preizkusov pred široko uporabo na trgu, kot jih opravljajo na zdravilih. V ZDA se vitaminski pripravki, ki vsebujejo tudi do 10 krat večje vrednosti od RDA (ang. recommended daily intake), ne uvrščajo med zdravila, zato niso pod kontrolo FDA, ki spremlja bioabsorpcijske in toksikološke teste zdravil pred prihodom na tržišče. Evropska komisija ima skoraj desetletje v pripravi predlog regulative za področje vitaminskih in mineralnih dopolnil, ki niso regulirana s predpisi za področje zdravil, kar je s harmonizacijo zakonodaje sprejela tudi Slovenija. V Sloveniji področje vitaminskih in mineralnih dopolnil le delno ureja Pravilnik o razvrstitvi vitaminskih in mineralnih izdelkov za peroralno uporabo, ki so v farmacevtskih oblikah, in so dostopni na tržišču kot zdravila. Vitaminska in mineralna dopolnila se štejejo za zdravila, če dnevni odmerki vitaminov, mineralov in oligoelementov, ki jih vsebujejo, presegajo določene vrednosti, navedene v tabelah pravilnika (Pravilnik o razvrstitvi vitaminskih..., 2003). Neupoštevanje tega danes omogoča nekontrolirano uživanje tudi velikih odmerkov vitaminov in mineralov pri prebivalstvu.

Ta diplomatska naloga je prikaz enega izmed začetnih osnovnih korakov, ki bi lahko začeli razjasnjevati to vse bolj perečo problematiko. Proučevanja tega prehrabnega dopolnila smo se lotili, ker nas je zanimal *in vivo* učinek in prikazano dejstvo, da naj bi imela ta spojina na osnovi magnezija visok antioksidativen potencial. Tukaj je šlo za kompleksen

sistem živih organizmov, ki lahko tudi popolnoma izniči lastnosti, ki so se prikazale v testiranih *in vitro*. Da bi lahko zagotovo trdili o pozitivnih lastnostih te spojine, bi bilo potrebno napraviti še veliko nadaljnjih raziskav, ki bi morale temeljiti na znanstvenih dejstvih.

2.2 KVASOVKE IN OKSIDATIVNI STRES

V kvasovkah, kakor tudi drugih višjih evkariontih, ROS nastajajo že med normalnim celičnim metabolizmom. To je normalen del celičnega metabolizma. Pod normalnimi fiziološkimi pogoji se celični antioksidativni obrambni sistemi lahko izognejo celičnim poškodbam. To ravnotežje se poruši, če so kvasne celice izpostavljene različnim stresnim pogojem, kot so oksidanti, visoke temperature, etanol in kovinski ioni, ki povečajo produkcijo ROS v celicah. Celica zazna povišane koncentracije ROS, kar privede do indukcije obrambnih mehanizmov - oksidativni stresni odgovor (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Kvasne celice so izredno podobne celicam sesalcev na nivoju makromolekul in organelov. Veliko število kvasnih proteinov kaže funkcionalno zamenljivost z visoko homolognimi človeškimi proteini. Ti organizmi lahko rastejo v aerobnih pogojih in so zato nenehno izpostavljeni reaktivnim kisikovim zvrstem, ki nastajajo kot stranski produkti celičnega metabolizma. Glavni vir ROS predstavlja mitohondrijska respiratorna veriga in številne reakcije katalizirane z oksidazami, kjer nastaja kot produkt vodikov peroksid (Halliwell in Gutteridge, 1999; Moradas-Ferreira in sod., 1996).

Pod normalnimi fiziološkimi pogoji celične poškodbe prepreči antioksidativna obramba, ki nevtralizira ROS (primarna obramba) in popravi molekulske poškodbe ali odstrani oksidirane molekule (sekundarna obramba). Pod določenimi stresnimi pogoji, nivo ROS preseže antioksidativne obrambne sposobnosti celic, zato se celice soočijo z oksidativnim stresom (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Oksidativen stres je definiran kot porušitev ravnovesja med tvorbo ROS in učinkovitostjo antioksidativnih sistemov. Do neravnovesja lahko prihaja iz več različnim vzrokov. Eden izmed njih je porušenje delovanja antioksidativnih obrambnih sistemov zaradi mutacij v pripadajočih encimih in/ali pomanjkanju antioksidantov v celici. Drugi razlogi so lahko

povečana tvorba ROS zaradi izpostavljenosti celice spojinam, ki vodijo do nastanka ROS, ali aktivacija sistemov za nastanek ROS v celici (Halliwell in Gutteridge, 1999; Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

2.2.1 Reaktivne kisikove zvrsti (ROS)

Reaktivne kisikove zvrsti (ROS) so molekule kisika v različnih redukcijskih in/ali vzbujenih stanjih ter spojine kisika z različnimi elementi, kot je vodik, klor in dušik (Sigler in sod., 1999).

Vsi aerobni organizmi uporabljajo molekularni kisik (O_2) za respiracijo ali oksidacijo substratov za učinkovito pridobitev energije. Med redukcijo molekularnega kisika do vode se ustvarijo ROS, če kisik ne sprejme vseh štirih elektronov (Manček in Pečar, 2001; Toyokuni in sod., 1995; Ames in sod., 1993). V to skupino ne spadajo samo prosti radikali, kot so superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$), hidroperoksidni radikal (HO_2^{\cdot}), hidroksilni radikal (OH^{\cdot}), peroksilni (ROO^{\cdot}) in alkoksilni radikal (RO^{\cdot}), ampak tudi reaktivne kisikove spojine: vodikov peroksid (H_2O_2), hipoklorna kislina ($HOCl$) in singletni kisik (1O_2) (Gomes in sod., 2005).

ROS se delijo na primarne in sekundarne zvrsti. Primarne ROS, kamor spada superoksidni anion, vodikov peroksid in hidroksilni radikal, reagirajo s celičnimi komponentami, kot so lipidi, proteini, DNA. Posledica je tvorba sekundarnih ROS (hidroperoksidi, alkoksilni in peroksilni radikali, epoksidi ali aldehidi), ki povzročijo še dodatne poškodbe celičnih organelov (Ames in sod., 1993; Sigler in sod., 1999).

2.2.1.1 Superoksidni anion ($O_2^{\cdot-}$)

Superoksidni anion nastaja v veliko procesih kot stranski produkt. Nastaja pri redukciji kisika v dihalni verigi, avtooksidaciji znotrajceličnih spojin ter pri različnih znotrajceličnih procesih (Sigler in sod., 1999). Je slabo reaktiven, vendar lahko kljub temu povzroči inhibicijo antioksidativnih in mitohondrijskih encimov. Med njih spadajo glutacion peroksidaza, katalaza, mitohondrijski NADH reduktaza, peroksidaza in ATP-aza (Sigler in sod., 1999; Halliwell in Gutteridge, 1999). Reagira lahko tudi z encimi, ki vsebujejo Fe-S

centre, kar povzroči inaktivacijo encimov in povečano količino železa v celici (Sigler in sod., 1999).

2.2.1.2 Vodikov peroksid (H_2O_2)

Vodikov peroksid nastaja med normalnim celičnim metabolizmom (Fridovich, 1995). Nima neparnih elektronov in zato ne sodi med proste radikale. Po velikosti je podoben molekuli vode in lahko učinkovito prehaja čez membrane in difundira po celotni celici. Je boljši oksidant kot superoksidni anion (Khan in Wilson, 1995). Deluje kot ključni reaktant v reakcijah nastajanja visoko reaktivnih hidroksidnih radikalov preko različnih mehanizmov (Santoro in Thiele, 1997).

2.2.1.3 Hidroksilni radikal ($OH\cdot$)

Hidroksilni radikal je najbolj reaktiven med ROS in lahko reagira s skoraj vsemi makromolekulami v celici (lipidi, proteini, DNA) (Sigler in sod., 1999). Molekuli, s katero reagira, odvzame vodik (H) ali se veže na dvojno vez in pogosti spodbudi verižne reakcije (Sigler in sod., 1999; Manček in Pečar, 2001).

2.2.2 Antioksidativni obrambni sistemi

Kvasovke za svoje preživetje poleg antioksidativne obrambe inducirajo tudi druge mehanizme, kot je na primer sinteza stresnih proteinov. Oksidativni stresni odgovor se vklopi, ko celice zaznajo povišano koncentracijo ROS. Povišana koncentracija ROS v celici je lahko posledica več različnih procesov: prehod iz anaerobnih v aerobne razmere; povečana aktivnost mitohondrijske dihalne verige; izpostavitve celic visokim koncentracijam oksidantov, kot so vodikov peroksid ali zdravila, ki proizvajajo ROS ali znižujejo moč antioksidativne obrambe (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Adaptacija na stresne pogoje vključuje zgodnje odgovore, ki omogočajo skoraj takojšnjo zaščito pred subletalnimi stresnimi pogoji, in pozne odgovore, ki omogočajo bolj učinkovito zaščito pred močnim stresom in omogoči celici vrnitev v ne stresne pogoje. Zgodnji odziv je posledica post translacijske aktivacije že prej obstoječih obrambnih mehanizmov, kot tudi aktivacije signalnih poti, ki vzpodbudijo pozni odgovor. Ta omogoči

sintezo stresnih proteinov in antioksidativno obrambo. Tako specifični kot osnovni stresni odgovor je posledica prisotnosti oksidantov (Costa in Moradas-Ferreira, 2001).

Antioksidant je vsaka snov, ki lahko že v nizki koncentraciji glede na koncentracijo substrata kot tarče radikalov, zadrži ali zavre oksidacijo substrata (Halliwell in Gutteridge, 1999). Ta definicija se nanaša tako na encimske kot tudi ne-encimske komponente.

Preglednica 1: Primarni in sekundarni antioksidativni obrambni sistemi pri kvasovkah (Moradas-Ferreira in Costa, 2000)

obrambni sistemi	funkcija
primarni sistemi	
encimski	
Cu/Zn superoksid-dismutaza	odstranjevanje $O_2^{\cdot-}$ v citoplazmi
Mn supeoksid-dismutaza	odstranjevanje $O_2^{\cdot-}$ v mitohondriju
katalaza A	razgradnja H_2O_2 v peroksisomih
katalaza T	razgradnja H_2O_2 v citoplazmi
citokrom C-peroksidaza	razgradnja H_2O_2 v mitohondriju
Glutation-peroksidaza	razgradnja H_2O_2 in lipidnih hidroperoksidov
Glutation-reduktaza	redukcija oksidiranega glutaciona
Tioredoksin-peroksidaza	razgradnja alkilnih hidroperoksidov
Tioredoksin-reduktaza	redukcija oksidiranega tioredoksina
glukoza-6-fosfat-dehidrogenaza	redukcija $NADP^+$ v NADPH
neencimski	
glutation	odstranjevanje prostih radikalov, združevanje z elektrofilni
metalotionini	vezava Cu, odstranjevanje $O_2^{\cdot-}$ in OH^{\cdot}
tioredoksin	redukcija oksidiranega glutaciona
poliamini	vezava Cu, zaščita lipidov pred oksidacijo
ubikvinon	lovljenje lipidnih radikalov
sekundarni sistemi	
8-okso-gvanin-glikozilaza/liaza	izrezovanje oksidiranih DNA baz
AP-endonukleaza	rezanje apurinskih/apirimidinskih (AP) mest, tvorba 3'-hidroksilnih skupin na AP mestih
metionin sulfoksid-izomeraza	redukcija metionin sulfoksidov
protein disulfidi-zomeraza	redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
glutation	redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
tioredoksin	redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
glutaredoksin	redukcija disulfidnih mostičkov v proteinih
stresni proteini HSP	sodelujejo pri razgradnji oksidiranih proteinov

Antioksidativne obrambne sisteme razdelimo na primarne in sekundarne (Preglednica 1). Primarni sistemi imajo nalogo, da preprečijo iniciacijske in/ali propagacijske reakcije radikalov/oksidantov s celičnimi komponentami. Sem sodijo tako encimski kot tudi ne-

encimski obrambni sistemi. Sekundarni antioksidativni obrambni sistemi prevzamejo vlogo, ko raven oksidantov naraste do take mere, da primarni obrambni sistemi niso več zadostni in nastopijo poškodbe (Davies, 1986).

Poleg endogenih antioksidantov poznamo tudi eksogene, ki jih pridobivamo s hrano in prehrabnimi dopolnili. Predvsem v svežem sadju in zelenjavi so našli veliko snovi, ki delujejo pozitivno na imunski sistem, kot so flavonoidi, resveratrol in rastlinski antioksidanti. Vse te učinkovine igrajo pomembno vlogo v ohranjanju zdravja in v zaščiti pred različnimi bolezenskimi stanji. Znano je, da varujejo srce in ožilje, krepijo imunski sistem, delujejo proti tumorjem in protivnetno in pomagajo pri obnovi jeter. Prav tako te učinkovine niso znani alergeni. Njihova antioksidativna vloga je ena izmed pomembnejših fizioloških vlog in zato sveže sadje in zelenjavo uvrščamo v skupino funkcionalnih živil (Ames in sod., 1993; Gutteridge in Halliwell, 1994).

Številne študije navajajo, da bi lahko z uporabo antioksidantov preprečevali nastanek oksidativnega stresa. Vendar pa vse več raziskav dokazuje tudi neželene učinke antioksidantov, njihovo t.i. pro-oksidativno delovanje. Rezultati bazičnih raziskav ugotavljajo pomembno vlogo vitaminov v patofiziologiji bolezni povezanih z oksidativnim stresom (Abbey in sod., 1993; Emmert in Kirchner, 1999) kot so: arteroskleroza, hipertenzija, katarakta, revmatoidni artritis, maligna obolenja, Parkinsonova in Alzheimerjeva bolezen (Brown in sod., 1999; Love in Jenner, 1999; Halliwell in Gutteridge, 1999). Vzporedno z bazičnimi raziskavami potekajo tudi epidemiološke raziskave, ki so ugotovile znižano pojavnost bolezni srca in ožilja in raka pri osebah, ki so s hrano zaužile večje količine vitaminov C, E in β -karotena. Pri teh osebah se je zvišala serumska raven omenjenih vitaminov (Carr in Frei, 1999; Gey 1993; Gey in Puska, 1989). Do sedaj je raziskovalcem uspelo dokazati znižano pojavnost raka in bolezni srca in ožilja le pri ljudeh, ki zaužijejo dovolj veliko količino sadja in zelenjave, ne pa pri osebah, ki uživajo dopolnila vitaminov (Halliwell, 2000). Uživanje sadja in zelenjave zniža nastanek prostih radikalov v telesu in s tem povzročene oksidativne poškodbe DNA, medtem ko veliko študij dokazuje, da le dopolnila vitaminov C, E in β -karotena DNA poškodb ne znižajo (Deng in sod., 1998; Rehman in sod., 1998; Prieme in sod., 1997; Rehman in sod., 1999).

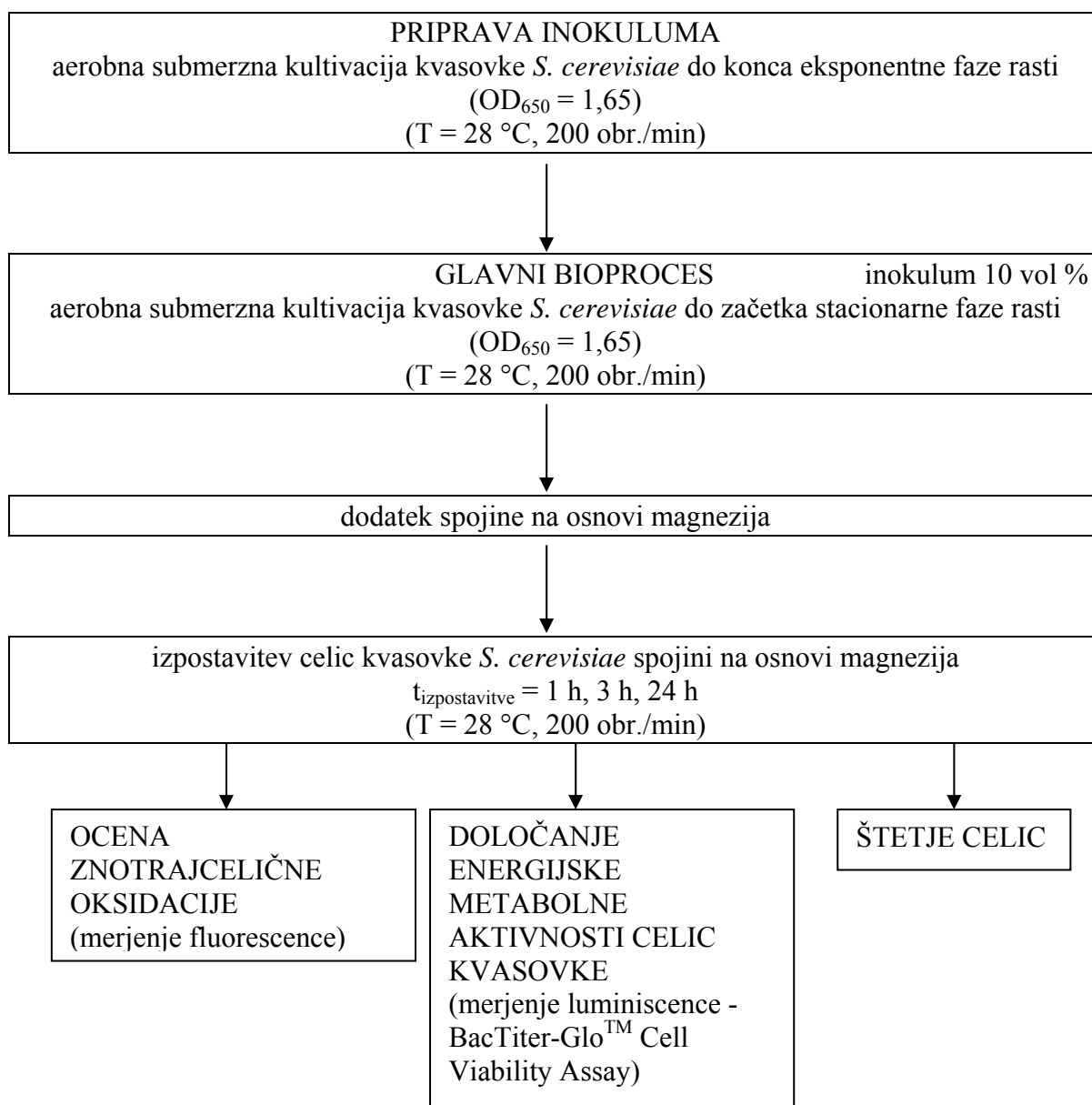
Pomembno dejstvo je, da zdrav odrasel posameznik ob uživanju pestre mešane hrane ob primeru zadostnega energijskega vnosa, dodatnega uživanja vitaminskih in mineralnih dopolnil ne potrebuje. Vendar je današnji način pridelave hrane privedel do tega, da so živila osiromašena z minerali in vitamini. Zaradi intenzivnega kmetijstva zemlji primanjkuje mineralov, zaradi transporta sadja le tega poberejo nezrelega, znano pa je, da se antioksidanti sintetizirajo šele ob dozorevanju (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Zavedati se moramo, da uporaba sintetičnih vitaminskih dodatkov ni alternativa rednemu uživanju sadja in zelenjave. V sadju je več tisoč spojin, katerih vplivov na zdravje še ne poznamo. Zelo verjetno veliko antioksidantov še ni odkritih, poleg tega je kombinacija antioksidantov v sadju in zelenjavi optimalna, saj povzroči njihovo medsebojno regeneracijo in s tem potencira njihovo obrambo pred prostimi radikali.

3 MATERIALI IN METODE

Do končnih rezultatov smo v procesu raziskovanja prišli s pomočjo dveh različnih metod. Po izpostavitvi celic kvasovke *S. cerevisiae* spojini na osnovi magnezija, smo določali znotrajcelično oksidacijo in energijsko metabolno aktivnost. Na koncu smo dodali še štetje celic. Poskus je obsegal več delov, ki so si sledili v smiselnem zaporedju (slika 1).

3.1 POTEK EKSPERIMENTALNEGA DELA



Slika 1: Hodogram celotnega poskusa s katerim smo določali znotrajcelično oksidacijo in energijsko metabolno aktivnost celic kvasovke *S. cerevisiae* po izpostavitvi spojini na osnovi magnezija

3.2 METODE DELA

3.2.1 Priprava inokuluma

Kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* smo gojili in vzdrževali na petrijevih ploščah s trdnim YEPD gojiščem. Tri dni staro kulturo smo nato prenesli s cepilno zanko s petrijeve plošče v 100 mL tekočega YEPD gojišča. Tega smo predhodno pripravili v 500 mL erlenmajericah s stransko roko. Po umerjanju spektrofotometra z gojiščem je znašala začetna optična gostota suspenzije kvasovk v gojišču, izmerjena pri valovni dolžini 650 nm, približno 0,10. Sledila je aerobna submerzna kultivacija kvasne biomase na stresalniku pri temperaturi 28 °C in hitrosti mešanja 200 obr./min. Rast kvasovke smo spremljali z merjenjem optične gostote na vsaki dve uri v dveh ponovitvah. Na podlagi dobljene rastne krivulje smo določili vrednost OD, ki je ustrezala koncu eksponentne faze rasti (OD = 1,65).

3.2.2 Aerobna submerzna kultivacija na stresalniku – glavni bioproces

Tudi v tem primeru smo spremljali rast kvasovke z merjenjem optične gostote pri valovni dolžini 650 nm. 45 mL predhodno pripravljenega inokuluma (točka 3.2.1) smo z merilnim valjem prenesli v 1000 mL erlenmajerice s stransko roko s 405 mL tekočega gojišča YEPD. Inokulum je tako predstavljal 10 vol % suspenzije. Sledila je aerobna submerzna kultivacija kvasovke *S. cerevisiae* pri temperaturi 28 °C in hitrosti mešanja 200 obr./min. Tudi v tem primeru smo delali v dveh ponovitvah. S pomočjo te rastne krivulje smo določili začetek stacionarne faze rasti kvasovke (OD = 1,65).

3.2.3 Dodatek in izpostavitve celic kvasovke spojini na osnovi magnezija

Brozgo smo razdelili po 100 mL v štiri 500 mL erlenmajerice s stransko roko. 50 mL preostale brozge smo prenesli v sterilno centrifugirko za kontrolo ob času 0, ki smo jo potrebovali pri vsakem poskusu, da smo se prepričali o enotnem izhodišču. V dve erlenmajerici smo v 100 mL brozge vedno dodali spojino na osnovi magnezija ali askorbinsko kislino v primeru pozitivne kontrole v isti koncentraciji ($c = 2,5$ g/L), preostali dve pa sta nam služili za kontrolo. Vse štiri erlenmajerice smo ponovno dali na rotacijski

stresalnik pri temperaturi 28 °C in 200 obr./min. Čas izpostavitve je bil odvisen od poskusa, saj smo preverjali učinek spojine na osnovi magnezija po 1, 3 in 24 urah.

3.2.4 Ocena znotrajcelične oksidacije

Znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovke *S. cerevisiae* smo ocenili z uporabo barvila diklorofluorescein (H₂DCF). Spojina, ki jo dodamo v obliki diacetata (H₂DCFDA), prehaja v celico s pasivnim transportom, kjer se deacetilira do H₂DCF s pomočjo nespecifičnih esteraz. V tej obliki se barvilo zadržuje v celici in se v prisotnosti oksidantov oksidira do fluorescentne oblike (DCF). Nastanek fluorescentne oblike barvila je indikator znotrajcelične oksidacije (Jakubowski in Bartosz, 1997; Halliwell in Gutteridge, 1999). Ker ni popolnoma jasno, katere ROS lahko oksidirajo barvilo, se diklorofluorescein uporablja za splošno oceno znotrajcelične oksidacije in ne za določanje posameznih zvrsti (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Načeloma se fluorescentna oblika barvila določa fluorimetrično s pretočnim citometrom ali fluorimetrom po razbitju celic, vendar so ugotovili, da se oksidirana oblika diklorofluoresceina lahko tudi transportira iz celice kvasovke *S. cerevisiae* in tako je mogoče merjenje fluorescentne oblike tudi v supernatantu. Določitev zunajcelične koncentracije oksidirane oblike diklorofluoresceina preko merjenja fluorescence je merilo za znotrajcelične oksidacijske procese (Jakubowski in Bartosz, 1997).

Za oceno znotrajcelične oksidacije smo izvedli aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *S. cerevisiae* na rotacijskem stresalniku kot je opisano v točki 3.2.2. V 450 mL namnožene kulture kvasovk *S. cerevisiae* smo dodali 4,5 mL raztopine barvila diklorofluorescein diacetat, ki smo ga predhodno pripravili za vsak poskus posebej. Po dodatku barvila smo kulturo inkubirali 15 minut v temi na rotacijskem stresalniku pri 28 °C in 200 obr./min. S tem smo dosegli prehod barvila v celice, kjer je potekla deacetilacija in oksidacija.

Po določenem času izpostavitve (točka 3.2.3) smo dali vzorce brozge v centrifugirke in centrifugirali 3 minute pri 4000 obr./min. Enako smo naredili tudi z vzorci, ki smo jih odvzeli ob času 0. Odstranili smo supernatant in celice resuspendirali v ustreznem volumnu fosfatnega pufra. Ponovno smo centrifugirali, odstranili supernatant in biomaso prenesli v dveh ponovitvah v mikrocentrifugirke (po 0,050 g). Vzorce smo prenesli na led.

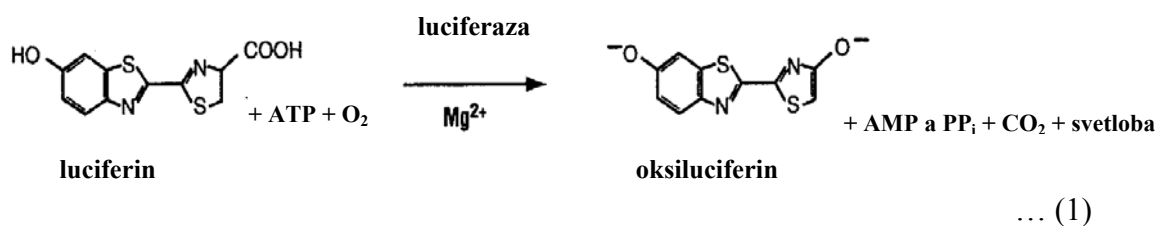
Pozorni smo bili na to, da so se vsi nadaljnji koraki določanja znotrajcelične oksidacije odvijali na hladnem (0 °C) in so bili čim manj izpostavljeni svetlobi.

V vsako mikrocentrifugirko smo dodali primeren volumen ohlajenega fosfatnega pufru (500 µL za 0,050 g biomase) in za konico majhne žlice sterilnih cirkonij kremenčevih kroglic. Nato smo pripravili celični ekstrakt, in sicer z razbijanjem celic s cirkonij kremenčevimi kroglicami. V vsaki mikrocentrifugirki smo razbijali celice na vrtničniku eno minuto in jih nato eno minuto hladili na ledu. To smo ponovili trikrat. Tako smo sprostil znotrajcelično vsebino. Tako pripravljene celične homogenate smo nato centrifugirali pri 13000 obr./min, 5 minut pri 4 °C. Supernatante smo prenesli v nove mikrocentrifugirke in jih desetkrat redčili z ddH₂O.

Razredčene supernatante (200 µL) smo prenesli v mikrotitrsko ploščico in izmerili fluorescenco (λ vzbujanja = 488 nm, λ emisije = 520 nm). Vsak vzorec smo nanegli v štirih paralelkah. Poleg njih smo na mikrotitrsko ploščico nanegli še ddH₂O in fosfatni pufer kot negativno kontrolo.

3.2.5 Določanje energijske metabolne aktivnosti celic

Energijsko metabolno aktivnosti celic kvasovke *S. cerevisiae* smo določali s komercialnim bioluminiscentnim testom BacTiter-Glo™ Cell Viability Assay, ki nam določa število živih celic v kulturi z merjenjem količine ATP. Zaznavanje temelji na naslednji reakciji:



Količina ATP korelira s celično živostjo. Le nekaj minut po poškodbi celičnih membran, celica izgubi sposobnost sinteze ATP in endogene ATP-aze razgradijo vse preostale molekule ATP. Nivo ATP tako strmo upade. BacTiter-Glo™ reagent ima tri različne funkcije. Lizira celične membrane in tako izpusti ATP, inhibira endogene ATP-aze in

priskrbi luciferin, luciferazo in ostale komponente nujne za merjenje ATP s pomočjo bioluminiscentne reakcije. Test ima številne prednosti. Proizvaja stabilni luminiscentni signal, ki ga lahko zaznamo že 5 minut po dodatku reagenta in ostane stabilen približno 30 minut razpolovnega časa. Uporaben je za raznolike vrste mikroorganizmov in zazna že samo deset mikrobnih celic, kar mu daje značilnost izjemne občutljivosti (Promega Corporation, 2004).

Po 1, 3 in 24 urah od dodatka spojine na osnovi magnezija, smo odvzeli po 1 mL bioprocenke brozge, in sicer suspenzije celic brez dodatka substance na osnovi magnezija in z dodatkom substance na osnovi magnezija ali askorbinske kisline v primeru pozitivne kontrole, in jo prenesli v 2 mL Eppendorf mikrocentrifugirke. Napolnili smo luknjice na mikrotitrski plošči s 100 μ L suspenzije celic v dveh paralekah in temu dodali po 100 μ L BacTiter-Glo™ reagenta. S pomočjo optičnega čitalca smo vsebino premešali in inkubirali v temi 5 minut. Po 5 minutni inkubaciji smo izmerili luminiscenco. Poleg vzorcev smo nanegli, kot negativno kontrolo, tudi gojišče (YEPD) in gojišče z dodatkom spojine na osnovi magnezija ali askorbinske kisline.

3.2.6 Štetje celic

Po 1, 3 in 24 urah od dodatka spojine na osnovi magnezija smo v vsakem poskusu odvzeli po 1 mL bioprocenke brozge, in sicer suspenzije celic brez dodatka spojine na osnovi magnezija in z dodatkom te ali askorbinske kisline, in jo prenesli v 2 mL Eppendorf mikrocentrifugirke. Pripravili smo redčitve po Kochu in v ustrezni redčitvi (10^{-2}) določili število celic s pomočjo Bürker-Türkove števne ploščice, ki ima vgravirano mrežo kvadratkov. Prešteli smo celice v petih kvadratih, znotraj večjega kvadrata. Po enačbi (2) smo izračunano povprečno število celic na kvadratek (\bar{N}) pomnožili s faktorjem redčitve ter konstanto $2,5 \cdot 10^5$.

$$\text{Število celic/mL} = \bar{N} \cdot 2,5 \cdot 10^5 \cdot 10^2 \quad \dots (2)$$

3.2.7 Statistična obdelava podatkov

Povprečna vrednost

Vse meritve so bile izvedene v večih ponovitvah. V primeru ocene znotrajcelične oksidacije smo napravili več bioloških poskusov, znotraj vsakega smo imeli 2 paralelki. V primeru spojine na osnovi magnezija smo napravili 3 ponovitve za čas po 1 in 3 urah ter 4 ponovitve za čas po 24 urah. V primeru pozitivne kontrole in druge oblike spojine na osnovi magnezija smo napravili po 2 ponovitvi za čas po 1 in 3 urah in po dve za čas po 24 urah. Pri določanju energijske metabolne aktivnosti in štetju celic smo napravili po 2 biološka poskusa s po dvema paralelkama za vsako preučevano snov.

Rezultate meritev smo lahko med seboj primerjali, saj smo imeli vedno enotno izhodišče (čas 0) in kontrolne vzorce, ki so se ujemali. Podali smo jih kot povprečne vrednosti vseh merjenj znotraj določene metode in časa meritve (\bar{x}) - enačba (3) (Košmelj, 2001).

$$\bar{x} = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n} \quad \dots (3)$$

n.....število vzorcev

x_i.....vrednosti i-te meritve

Standardni odklon, koeficient variiranja

Za oceno variabilnosti rezultatov smo uporabili standardni odklon (SD) - enačba (4) in koeficient variiranja (KV) - enačba (5) (Košmelj, 2001).

$$SD = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad \dots (4)$$

$$KV (\%) = \frac{SD}{\bar{x}} \cdot 100 \quad \dots (5)$$

Vse izračune smo naredili s pomočjo računalniškega programa Microsoft Excel.

3.3 MATERIALI

Pri eksperimentalnem delu smo uporabili številne spodaj naštete standardno laboratorijsko opremo in materiale, ki so razvrščeni glede na uporabo pri posameznih metodah.

3.3.1 Mikroorganizem

Uporabili smo sev kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* - ZIM 2155 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov Biotehniške fakultete.

Kvasovko smo gojili na petrijevih ploščah s trdnim gojiščem YEPD v inkubatorju pri temperaturi 28 °C in jo vsake tri dni precepljali.

3.3.2 Gojišča

3.3.2.1. Trdno YEPD gojišče

Za precepljanje in hranjenje kulture smo uporabili trdno gojišče YEPD.

Preglednica 2: Sestava trdnega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

sestavina	masa [g]
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0
pepton (Oxoid)	20,0
brezvodna glukoza (Kemika)	20,0
agar (Biolife)	20,0
dH ₂ O	do 1000 ml

Gojišče smo najprej zaklejili, nato pa sterilizirali 20 minut pri temperaturi 121 °C in tlaku 1,1 bar. Po končani sterilizaciji smo gojišče ohladili na 45 °C in razlili v petrijevke.

3.3.2.2. Tekoče YEPD gojišče

Tekoče YEPD gojišče smo uporabili za aerobno submerzno namnoževanje kvasne biomase (točki 3.2.1 in 3.2.2)

Preglednica 3: Sestava tekočega YEPD gojišča (Atlas, 1993)

sestavina	masa [g]
kvasni ekstrakt (Biolife)	10,0
Pepton (Oxoid)	20,0
brezvodna glukoza (Kemika)	20,0
dH ₂ O	do 1000 ml

3.3.3 Reagenti in raztopine

3.3.3.1. Izpostavitve celic

- spojina na osnovi magnezija: magnezijev hidrid silikat, hidroksi-propil-metil celuloza, magnezijev karbamat, magnezijev citrat, kalijev citrat, silicijev oksid, kalijev karbonat, magnezijev sulfat, oleinska kislina, trikalcijev fosfat, magnezijev stearat, sredstvo za uravnavanje vlage - 1 kapsula ~ 250 mg učinkovine
- askorbinska kislina (Sigma) za pripravo 14,2 mM izhodne raztopine v ddH₂O

3.3.3.2. Ocena znotrajcelične oksidacije

- KH₂PO₄ (Merck) za pripravo 50mM vodne raztopine (A)
- K₂HPO₄ (Merck) za pripravo 50mM vodne raztopine (B)
- V (A) + V (B) → 50 mM kalijev fosfatni pufer (pH = 6)
- 96 % etanol (Merck)
- dihidro-2,7-diklorofluorescein diacetat (Sigma) za pripravo 1 mM izhodne raztopine v 96 % etanolu

3.3.3.3. Določanje energijske metabolne aktivnosti celic

- BacTiter-GloTM reagent (Promega)

3.3.3.4. Štetje celic

- NaCl (Merck) za pripravo 0,9 % fiziološke raztopine v dH₂O

3.3.4 Pribor in oprema

3.3.4.1. Priprava gojišč, raztopin

- avtoklav (Sutjeska)
- tehtnici exelence in analytic (Sartorius)
- magnetno mešalo Rotamix 550 MM (Tehtnica Železniki)
- pH meter SevenMulti (Mettler Toledo)

- mikrovalovna pečica (Sanyo)
- brezprašna komora PIO SMBC 122 (Iskra)
- plastične petrijeve plošče (Golias)
- 100 ml in 1000 ml merilni valj
- vrtinčnik EV 100 (Tehtnica Železniki)
- plastične in steklene čaše
- kovinska žlička
- magnetki
- 500 ml merilne bučke
- vatni zamaški

3.3.4.2. Priprava inokuluma

- plastične cepilne zanke za enkratno uporabo
- brezprašna komora PIO SMBC 122 (Iskra)
- spektrofotometer MA 9510 (Iskra)
- rotacijski stresalnik VIBROMIX 403 (Tehtnica Železniki)
- 500 ml erlenmajerice s stransko kiveto (Borosilicate, en utor)
- 1000 ml erlenmajerice s stransko kiveto (Schott Duran, en utor)
- 50 ml in 100 ml merilni valj
- protipenilec
- plinski gorilnik

3.3.4.3. Ocena znotrajcelične oksidacije

- brezprašna komora PIO SMBC 122 (Iskra)
- 500 ml erlenmajerice s stransko kiveto (Borosilicate, en utor)
- rotacijski stresalnik VIBROMIX 403 (Tehtnica Železniki)
- 50 ml plastične sterilne centrifugirke
- 2 ml mikrocentrifugirke (Eppendorf)
- centrifuga LC-321 (Tehtnica Železniki)
- centrifuga (Eppendorf)

- kovinska žlička
- cirkonij-kremenčeve kroglice (Biospec Products, Inc)
- avtomatske pipete (Gilson)
- mikrotitrne plošče - črna, 96 vdolbinic (NUNC)
- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- računalniški programski paket Magellan
- vrtinčnik EV 100 (Tehtnica Železniki)

3.3.4.4. Določanje energijske metabolne aktivnosti

- brezprašna komora PIO SMBC 122 (Iskra)
- 500 ml erlenmajerice s stransko kiveto (Borosilicate, en utor)
- rotacijski stresalnik VIBROMIX 403 (Tehtnica Železniki)
- 50 ml plastične sterilne centrifugirke
- avtomatske pipete (Gilson)
- multikanalna pipeta (Eppendorf)
- mikrotitrne plošče - bela, 96 vdolbinic (NUNC)
- čitalec mikrotitrskih plošč Safire 2 (Tecan)
- računalniški programski paket Magellan

3.3.4.5. Štetje celic

- mikroskop (Leica ATC 2000)
- 2 ml plastične centrifugirke (Eppendorf)
- števna ploščica Bürker-Türk
- avtomatske pipete (Gilson)

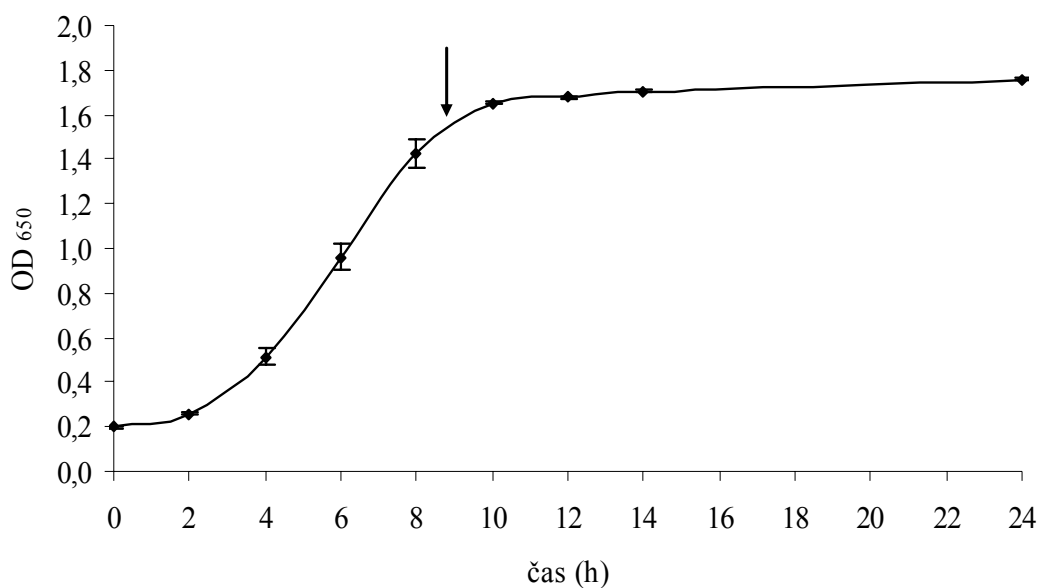
3.3.4.6. Shranjevanje kultur, reagentov, raztopin

- hladilnik (LHT Škofja Loka)
- zamrzovalnik (- 20 °C) (LHT Škofja Loka)
- zamrzovalnik (- 80 °C) (Heto)
- inkubator (Sutjeska)

4 REZULTATI

Eksperimentalni del naloge je bil opravljen od maja do decembra leta 2006. Obsegal je 240 ur laboratorijskega dela. Slednje je bilo opravljeno v laboratoriju Katedre za biotehnologijo, Oddelka za živilstvo, Biotehniške fakultete v Ljubljani. Izhajajoč iz ciljev naloge smo izvedli dve aerobni submerzni kultivaciji kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in ustrezno število ponovitev glavnih bioloških poskusov, ki so obsegali oceno znotrajcelične oksidacije, določanje energijske metabolne aktivnosti celic in štetje celic. Rezultate aerobne submerzne kultivacije smo prikazali v obliki rastnih krivulj. Rezultate glavnih bioloških poskusov smo podali v obliki histogramov.

4.1 DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE ZA INOKULUM



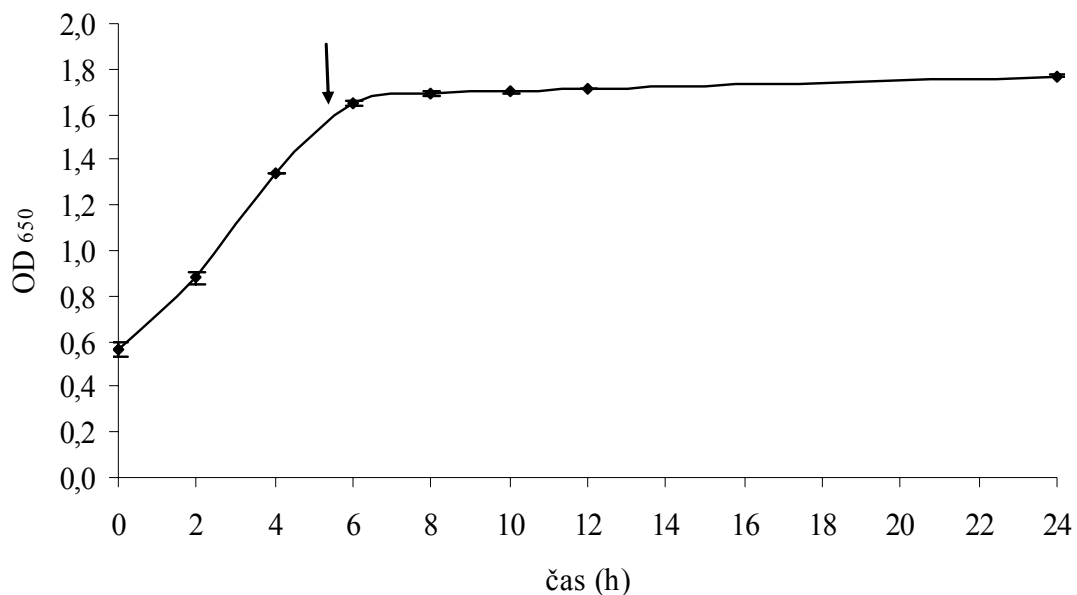
Slika 2: Aerobna submerzna kultivacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* na stresalniku (VD = 100 mL, T = 28 °C, 200 obr./min).

Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti dveh ponovitev.

Na podlagi rastne krivulje (slika 2) smo odčitali vrednost optične gostote, ki je ustrezala koncu eksponentne faze rasti. Ta vrednost je 1,65, ki smo jo dosegli po približno 9 urah.

Pri vseh nadaljnjih kultivacijah smo za inokulacijo uporabili celice, ki so bile v pozni eksponentni fazi rasti, pri čemer je bilo merilo $OD_{650} = 1,65$.

4.2 DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE ZA GLAVNI BIOPROCES



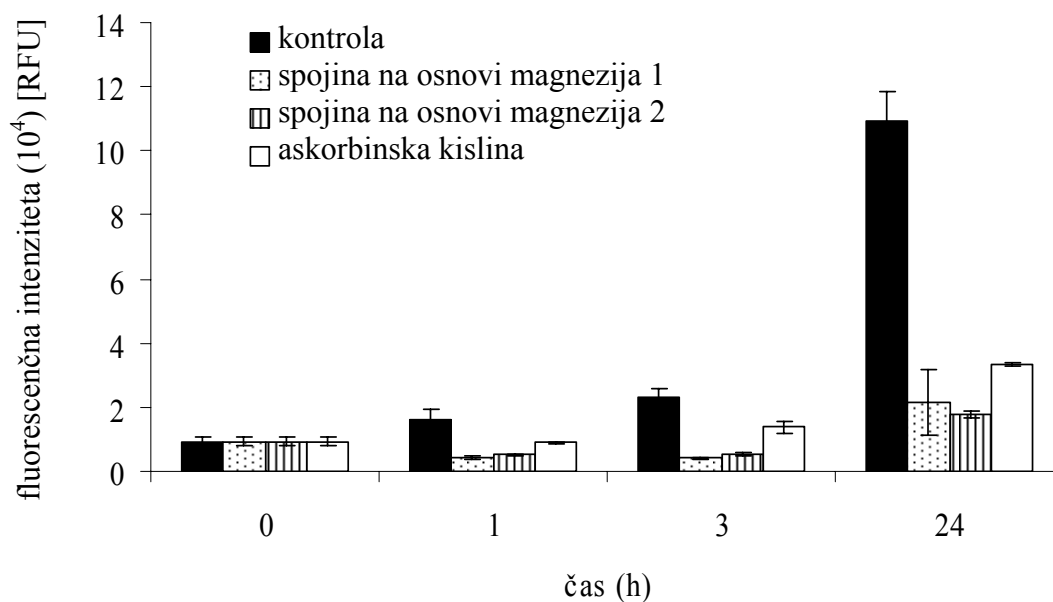
Slika 3: Aerobna submerzna kultivacija kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* na stresalniku ($V_D = 450$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min).

Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti dveh ponovitev.

Na podlagi te rastne krivulje (slika 3) smo odčitali vrednost optične gostote, ki je ustrezala začetku stacionarne faze rasti. Ta vrednost je ustrezala vrednosti 1,65, ki smo jo dosegli po približno 6 urah.

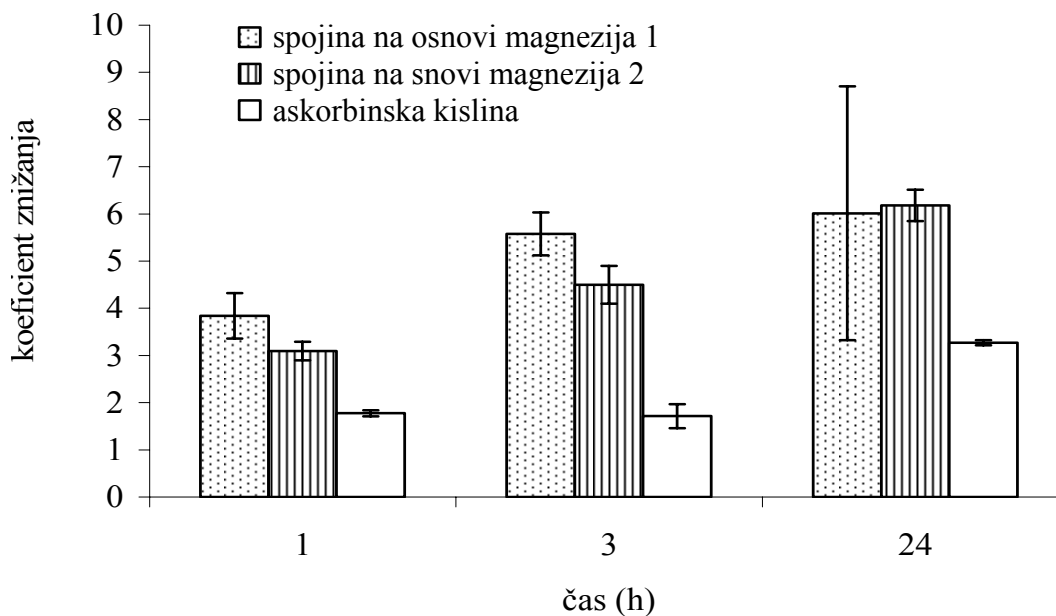
Pri vseh nadaljnjih bioloških poskusih smo uporabili celice, ki so bile v začetku stacionarne fazi rasti, pri čemer je bilo merilo $OD_{650} = 1,65$.

4.3 OCENA ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE



Slika 4: Ocena znotrajcelične oksidacije v gojišču YEPD z dodanimi različnimi spojinami glede na kontrolo (VD = 100 mL, T = 28 °C, 200 obr./min), kot izmerjena fluorescenca pri 520 nm v odvisnosti od različnih časov kultivacije.

Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti ± SD dveh, treh oziroma štirih ponovitev.

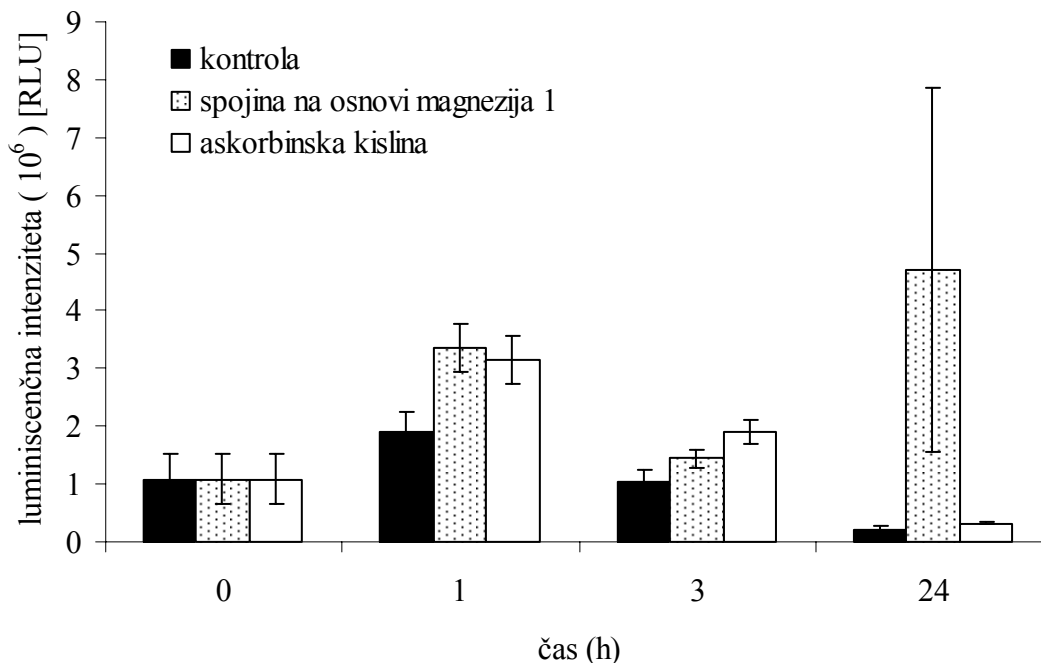


Slika 5: Koeficienti znižanja znotrajcelične oksidacije v gojišču YEPD z dodanimi različnimi spojinami glede na kontrolo (VD = 100 mL, T = 28 °C, 200 obr./min).

Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti ± SD dveh, treh oziroma štirih ponovitev.

Znotrajcelična oksidacija se je znižala pri vseh dodanih spojinah. Najbolj se je znižala po dodatku spojine na osnovi magnezija. Po 1 uri se je znižala za 3,8 krat in za 5,6 krat po 3 urah glede na kontrolo. Po 24 urah je bila znotrajcelična oksidacija še vedno zelo nizka. V primerjavi s kontrolo se je znižala za 6,1 krat. Vendar pa je treba upoštevati, da je po 24 urah prišlo do odstopanja med posameznimi ponovitvami, kar se kaže v nekoliko večjih standardnih odklonih. Askorbinska kislina je tudi znižala znotrajcelično oksidacijo v primerjavi z kontrolo, vendar ne za toliko kot spojina na osnovi magnezija. Spojino na osnovi magnezija smo v tem biološkem poskusu dodajali v dveh oblikah. Med njima nismo zaznali večjih razlik.

4.4 DOLOČANJE ENERGIJSKE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC

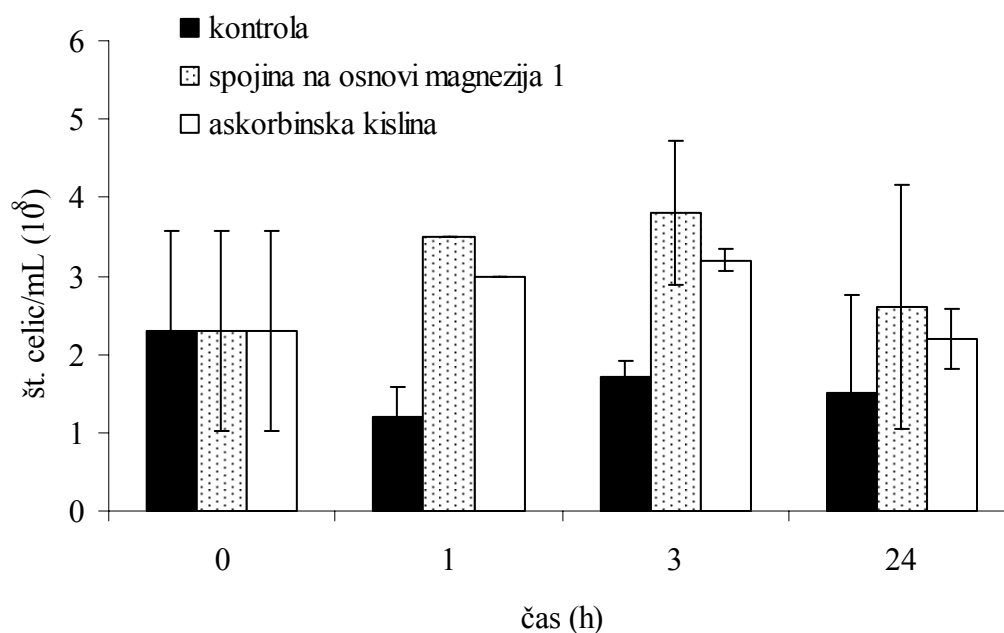


Slika 6: Energijska metabolna aktivnost kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v gojišču YEPD z dodanimi različnimi spojinami glede na kontrolo (VD = 100 mL, T = 28 °C, 200 obr./min), kot izmerjena luminiscenca v odvisnosti od različnih časov kultivacije.

Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev.

Energijska metabolna aktivnost celice kvasovke se je povečala po dodatku spojine na osnovi magnezija. Povečanje energijske metabolne aktivnosti celic je najbolj opazno po 1 uri. Enak učinek smo opazili po dodatku askorbinske kisline. Po 24 urah izpostavitve je bila, v primeru spojine na osnovi magnezija, energijska metabolna aktivnost še vedno zelo visoka v primerjavi s kontrolo, če pogledamo povprečje meritev. Tudi v tem primeru je prišlo po 24 urah do velikih razlik med posameznimi ponovitvami, ki pa so bile v tem primeru zelo očitne.

4.5 ŠTETJE CELIC



Slika 7: Ocena števila celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v gojišču YEPD z dodanimi različnimi spojinami glede na kontrolo (VD = 100 mL, T = 28 °C, 200 obr./min) v odvisnosti od različnih časov kultivacije.

Rezultati so predstavljeni kot povprečne vrednosti \pm SD dveh ponovitev

Statistično gledano se skupno število celic kvasovke ni spreminjalo po izpostavitvi celic kvasovke spojini na osnovi magnezija in askorbinski kislini. Ta metoda je bila le informativna, saj so razlike med posameznimi meritvami v okviru standardnega odklona.

5 RAZPRAVA IN SKLEPI

Skušali smo dokazati hipotezi, da naj bi dodatek spojine na osnovi magnezija h kulturi kvasovk *S. cerevisiae* povzročil znižanje znotrajcelične oksidacije in naj ne bi imel inhibitornega učinka na samo rast.

5.1 DOLOČITEV RASTNE KRIVULJE

Rast kvasovke *S. cerevisiae* smo spremljali z merjenjem optične gostote z namenom določitve rastne krivulje. Zanimal nas je potek rasti kvasovke *S. cerevisiae*, saj smo potrebovali za namnožitev inokuluma kvasno biomaso ob koncu logaritemske faze rasti, za sam bioproces pa kvasno biomaso v začetku stacionarne faze rasti.

Če pogledamo potek krivulje (slika 2), ki kaže odvisnost OD_{650} od časa, vidimo, da je prva faza rasti prilagajanje kvasovke na novo okolje. Kvasovko smo ohranjali na trdnem gojišču YEPD in jo nato inokulirali v tekoče gojišče YEPD, ki ima enako sestavo z izjemo agarja, zato se je kvasovka zelo hitro prilagodila. Fazi prilagajanja je sledila faza pospešene rasti nato pa eksponentna faza rasti. Sledi kratka faza pojemajoče rasti nato pa dolga stacionarna faza, kjer se koncentracija biomase ustali.

Ob koncu eksponentne faze rasti ($OD_{650} = 1,65$) smo inokulum kvasne biomase prenesli v sveže tekoče gojišče YEPD in ponovno določili rastno krivuljo (slika 3). Tokrat faze prilagajanja ni bilo. Takoj se je začela eksponentna faza rasti, ki ji je sledila faza pojemajoče rasti in dolga stacionarna faza.

Stacionarna faza rasti sledi, ko celice kvasovke porabijo ves sekundarni vir ogljika (etanol), ki je nastal v predhodnih fazah rasti. Stacionarna faza rasti je ponavadi posledica pomanjkanja vira ogljika, lahko pa nastopi tudi zaradi pomanjkanja drugih virov hranil (dušik, fosfor in žveplo) (Longo in sod., 1996).

Stacionarna faza rasti celic kvasovke se razlikuje od eksponentne faze rasti v več vidikih. Razlike so fiziološke, biokemijske in morfološke. Celice kvasovk v tej fazi ne brstijo (Werner-Washburne in sod., 1993), so temnejše barve (Bugeja in sod., 1982) in imajo debelejšo celično steno, ki ne vsebuje veliko por (DeNobel in sod., 1990). V citoplazmi sta

se nakopičila glikogen in trehaloza. Zaradi njune prisotnosti, so celice postale bolj odporne na stres (Longo in sod., 1996). Nižji je tudi nivo transkripcije in translacije (Boucherie, 1985).

Tekom stacionarne faze rasti se začnejo kopičiti tudi celične poškodbe. Poškodbe se morajo nujno odstraniti, saj se biosinteza upočasnjuje, ker so se celice kvasovke v tem stanju prenehale deliti (Longo in sod., 1996).

Celice kvasovke *S. cerevisiae* kažejo različne prilagoditve metabolizma med vsako posamezno fazo rasti. Nas je zanimal začetek stacionarne faze rasti, ki se je pričel po približno devetih urah ($OD_{650} = 1,65$) (slika 3). Kvasne celice imajo v tej fazi rasti značilnosti, ki smo jih želeli za nadaljevanje bioprocesa.

Celice kvasovke *S. cerevisiae* v tej fazi rasti so zelo podobne večini celic večceličnih organizmov. Celice namreč večino energije pridobijo iz respiratornega metabolizma in celice so prešle v G_0 fazo celičnega cikla (Longo in sod., 1996). V tem času je že prišlo do produkcije ROS in endogeni antioksidativni sistemi so bili najverjetneje že zelo dejavni. V takšnih pogojih smo lahko proučili tudi delovanje eksogenih antioksidativnih sistemov.

5.2 OCENA ZNOTRAJCELIČNE OKSIDACIJE

Mikroorganizmi se vedno znova soočajo z drastičnimi spremembami okolja v katerem živijo. Posledično morajo celice to zaznati in se pravočasno odzvati na te spremembe. Pomembna je prilagoditev na spreminjajoče se okolje, saj mikroorganizmi težijo k preživetju ne glede na vse (Tamas in Hohman, 2003).

Kot vsi aerobni organizmi se tudi kvasovke soočajo s toksičnimi učinki ROS, ki se sproščajo med normalnim celičnim metabolizmom. V normalnih razmerah rasti so endogeni antioksidativni obrambni sistemi dovolj učinkoviti, da obdržijo količino ROS na neškodljivi ravni (Halliwell in Gutteridge, 1999). Kadar pride do porušanja ravnotežja med tvorbo ROS in antioksidantov v celici nastopi oksidativni stres (Betteridge, 2000). Stres lahko omilimo tudi z eksogenimi antioksidanti v obliki funkcionalnih živil ali prehrambenih dopolnil (Ames in sod., 1993; Gutteridge in Halliwell, 1994).

Celice kvasovke *S. cerevisiae* smo izpostavili prehrabnemu dopolnilu v obliki spojine na osnovi magnezija, in sicer v dveh oblikah (1, 2). Kot pozitivno kontrolo smo uporabili askorbinsko kislino v koncentraciji, ki se je ujemala s koncentracijo ($c = 2,5 \text{ g/L}$) aktivne učinkovine v spojini na osnovi magnezija.

Znotrajcelično oksidacijo smo ocenili z uporabo barvila diklorofluorescein. Višja kot je bila izmerjena vrednost fluorescence, višja je bila znotrajcelična oksidacija.

Meritve fluorescence smo izvedli ob času 0 (začetek stacionarne faze rasti), po 1, 3 in 24 urah izpostavitve prej omenjenim spojinam. Sočasno smo zmeraj opravili tudi meritve pri negativni kontroli, ki nam jo je predstavljala kultura kvasovke brez dodatkov.

Meritve so pokazale, da se je v primeru dodatka vseh spojin celicam kvasovke, znotrajcelična oksidacija znižala v primerjavi s kontrolo (slika 4). Razvidno je, da se je najbolj znižala znotrajcelična oksidacija v vzorcu, ki smo mu dodali spojino na osnovi magnezija. Tudi askorbinska kislina je znižala znotrajcelično oksidacijo, vendar ne v tolikšni meri kot spojina na osnovi magnezija.

Askorbinska kislina (vitamin C) je znan antioksidant, zato smo jo uporabili kot pozitivno kontrolo. Askorbinska kislina izredno hitro reagira z ROS. V *in vivo* pogojih pomaga pri detoksikaciji različnih organskih radikalov, saj je pomemben reducent s številnimi ugodnimi lastnostmi, ki pomagajo celicam pri zaščiti pred ROS (Halliwell in Gutteridge, 1999).

Po 24 urah se je nivo znotrajcelične oksidacije sicer zvišal, vendar je bil gledano v povprečju glede na kontrolo še vedno nižji (slika 4). Kaj se je dejansko dogajalo v vzorcu po 24 urah ne moremo natančno sklepati, saj je prišlo med posameznimi ponovitvami do odstopanj. Vse kaže, da je ta čas izpostavitve že neprimeren za preučevanje učinkov dodanih spojin na same celice.

Do povišanja znotrajcelične oksidacije je najverjetneje prišlo zaradi povišane produkcije ROS, ki nastajajo med respiratornim metabolizmom. Znotrajcelična oksidacija je kljub vsemu nižja od kontrole, kar bi lahko kazalo na visoko antioksidativno delovanje spojine na osnovi magnezija v celicah. Endogeni antioksidativni sistemi so bili zelo dejavni zaradi

povišane produkcije ROS, vendar je koncentracija ROS po tem času že zelo visoka. Endogeni antioksidativni sistemi ne zadostujejo več. V takšnih razmerah se je pokazal učinek eksogenih antioksidantov. V to skupino se uvrščata tako spojina na osnovi magnezija kot tudi askorbinska kislina.

Koeficient znižanja znotrajcelične oksidacije glede na kontrolo (slika 5), nam delovanje dodanih spojin prikaže še bolj nazorno. Po pričakovanjih je najvišji koeficient znižanja pri spojini na osnovi magnezija, ki pa se minimalno razlikuje pri obeh oblikah te spojine (slika 5). Koeficient znižanja znotrajcelične oksidacije glede na kontrolo je bil ob dodatku askorbinske kisline nižji od koeficienta pri spojini na osnovi magnezija, kar nam je nakazalo, da je spojina na osnovi magnezija boljši antioksidant. Po 24 urah je koeficient statistično gledano enak tistemu po treh urah (slika 5). Iz tega smo sklepali, da je delovanje spojine na osnovi magnezija najverjetneje dolgotrajno, kar dokazujejo tudi podatki o izmerjenem ORP v različnih časovnih obdobjih (priloga F). Kot smo ugotovili že prej (slika 4) je delovanje eksogenih antioksidantov zelo priporočljivo takrat, ko je produkcija ROS tako visoka, da endogeni antioksidativni obrambni sistemi niso več dovolj.

Iz dobljenih rezultatov znotrajcelične oksidacije lahko sklepamo, da ima spojina na osnovi magnezija antioksidativno delovanje pri kvasovki *S. cerevisiae*.

5.3 DOLOČANJE ENERGIJSKE METABOLNE AKTIVNOSTI CELIC

Energijsko metabolno aktivnost celic kvasovke *S. cerevisiae* smo spremljali z merjenjem luminiscence po 1, 3 in 24 urah izpostavitve prej omenjenim učinkovinam. Uporabili smo komercialni test BacTiter-Glo™ Cell Viability Assay, s katerim smo merili energijsko metabolno aktivnost celic v vzorcu z merjenjem količine ATP.

Pri kontroli (slika 6) količina ATP sprva naraste, z upočasnitvijo metabolizma pa prične padati. ATP nastaja med procesom oksidativne fosforilacije, ki je končna stopnja aerobnega metabolizma. Nastane z energijo, ki jo ustvarja transport elektronov. Ti procesi se po določenih fazah celičnega metabolizma prekinejo. Za ATP je značilno, da ob prekinitvi metabolizma zelo hitro izgine in ga ne moremo več zaznati. Razpolovna doba teh molekul je zelo kratka (Boyer, 2005).

Po dodatku spojine na osnovi magnezija in askorbinske kisline se je energijska metabolna aktivnost celic povečala glede na kontrolo (slika 6).

Znano je, da lahko spojina na osnovi magnezija reducira NAD^+ v *in vitro* pogojih (Stephanson in Flanagan, 2004). Ko se NAD^+ reducira, se pretvori v NADH. Nastanek NADH pa je povezan s produkcijo ATP. Več kot nastane NADH, več energije lahko proizvede organizem. Na ta način bi lahko pojasnili višji porast celične energijske metabolne aktivnosti tudi v našem primeru. Sposobnost redukcije se je obdržala tudi po 24 urah (slika 6), kjer smo v povprečju še zmeraj izmerili višjo metabolno aktivnost glede na kontrolo. Glede na večja odstopanja med posameznimi ponovitvami ne moremo zagotovo sklepati kaj se je po tem času dogajalo. Spojina na osnovi magnezija je sicer močan reducent, kar nakazuje tudi oksido-redukcijski potencial (ORP), ki smo ga merili (priloga F). Morda je lahko višja metabolna aktivnost posledica po 24 urah same spojine na osnovi magnezija, ki še naprej reducira NAD^+ , ki je nastal že prej in je zato še zmeraj mogoče zaznati produkcijo ATP, čeprav celica morda ni več v dobrem fiziološkem stanju. Višja energijska metabolna aktivnost glede na kontrolo je bila z določanjem ATP opažena tudi po dodatku askorbinske kisline, ki je znan reducent in dober antioksidant.

Razlika med askorbinsko kislino in spojino na osnovi magnezija je vidna po 24 urah (slika 6), kjer je bila energijska metabolna aktivnost v primeru askorbinske kisline sicer še nekoliko višja od kontrole, vendar nižja od spojine na osnovi magnezija. Askorbinska kislina ima namreč nižji ORP (bolj pozitivna vrednost) od spojine na osnovi magnezija, kar kaže na manjšo redukcijsko moč. Za askorbinsko kislino je znano, da se v živem organizmu regenerira ob prisotnosti reducirane oblike NADH ali glutationa. Za to sta odgovorna encima semidehidoaskorbat-reduktaza in dehidroaskorbat-reduktaza (McKersie, 1996). Nivo glutationa in reducirane oblike NADH s časom upada, saj se metabolizem upočasnjuje, zato se po 24 urah askorbinska kislina najverjetneje ni več regenerirala.

Iz dobljenih rezultatov bi lahko znova sklepali, da je substanca na osnovi magnezija zelo dober antioksidant. To smo dokazali tudi z merjenjem pH (priloga E) in ORP ter pH (priloga F). Spojina na osnovi magnezija je dvignila pH na nivo alkalnega. Z dvigom enote pH se niža ORP. Do sedaj znani antioksidanti (askorbinska kislina itd.) so medij zakisali. Po pregledu literature, so bili rezultati v skladu s predhodnimi študijami.

5.4 ŠTETJE CELIC

Kot dodatek k prejšnjima dvema metodama, smo v vsakem vzorcu celice tudi prešteli (slika 7). Statistično gledano se število celic ni razlikovalo med posameznimi časi izpostavitve prej omenjenim spojinam. Iz teh podatkov nismo mogli veliko sklepati. Na samo število celic kvasovke spojina na osnovi magnezija in askorbinska kislina nista vplivali

5.5 SKLEPI

- Dodatek spojine na osnovi magnezija h kulturi kvasovke *S. cerevisiae* je povzročil znižanje znotrajcelične oksidacije.
- Dodatek spojine na osnovi magnezija h kulturi kvasovke *S. cerevisiae* ni vplival inhibitorno na energijsko metabolno aktivnost celic kvasovke.

6 POVZETEK

Skrb za zdravje je postala ena izmed najpomembnejših dejavnosti v sodobnem svetu. V ospredje so pričela prihajati zdrava prehrana in funkcionalna živila. V to skupino spadajo tudi razna prehrabena dopolnila, ki vsebujejo vitamine, minerale in oligoelemente. Zelo pomembna so tista živila, ki delujejo antioksidativno, saj kažejo lastnosti preprečevanja različnih sodobnih bolezni. Delujejo pozitivno na celice in naj bi upočasnjevala tudi staranje celic, vendar se je treba zavedati, da uporaba sintetičnih vitaminskih dodatkov ni alternativa uživanju sadja in zelenjave. Spojina na osnovi magnezija je komercialno prehrabeno dopolnilo, ki ima antioksidativno delovanje. Je kemično sintetizirana spojina z unikatno biokemično aktivnostjo. Študije *in vitro* so pokazale, da ima ta spojina številne pozitivne lastnosti. Je dober reducent, z nizkim oksido-redukcijskim potencialom. Ker so bile do sedaj vse študije narejene v *in vitro* pogojih, smo se odločili, da preverimo to spojino tudi v *in vivo* pogojih, saj gre dejansko za prehrabeno dopolnilo namenjeno ne vedno najbolje poučenemu potrošniku. Kot modelni organizem smo vzeli celice kvasovke *S. cerevisiae*, saj je eden izmed najbolj preučenihi evkariontskih organizmov. Kvasne celice so izredno podobne celicam sesalcev na nivoju makromolekul in organelov. Prav tako je ta organizem idealen za proučevanje zaradi enostavne kultivacije, hitre rasti, dobro poznane fiziologije in dednega zapisa. V nalogi smo želeli ugotoviti ali spojina na osnovi magnezija resnično deluje antioksidativno tudi v *in vivo* pogojih. Spojino na osnovi magnezija smo dodali h kulturi kvasovke *S. cerevisiae*, ki je bila v začetku stacionarne faze rasti, kjer se že spopada z ROS. Za pozitivno kontrolo smo uporabili raztopino askorbinske kisline, ki je znan antioksidant in na kateri so bile opravljene mnoge študije tako v *in vivo* kot *in vitro* pogojih. Proučevali smo vpliv na znotrajcelično oksidacijo in energijsko metabolno aktivnost. Znotrajcelično oksidacijo v celicah kvasovke *S. cerevisiae* smo izmerili s uporabo barvila diklorofluorescein. Ugotovili smo, da dodatek spojine na osnovi magnezija h kulturi kvasovke zniža znotrajcelično oksidacijo. Energijsko metabolno aktivnost kvasovke *S. cerevisiae* smo določali z uporabo komercialnega testa BacTiter-Glo™ Cell Viability Assay. Ugotovili smo, da so glede na kontrolo, celice kvasovke ob dodatku spojine na osnovi magnezija veliko bolj metabolno aktivne. Iz tega smo sklepali, da spojina na osnovi magnezija pozitivno vpliva na celice kvasovke in ne inhibira njihove rasti.

7 VIRI

- Abbey M., Nestel P.J., Bahurst P.A. 1993. Antioxidant vitamins and low-density-lipoprotein oxidation. *American Journal of Clinical Nutrition* 58: 525-32
- Ames B.N., Shigenaga M.K., Hagen T.M. 1993. Oxidants, antioxidants and degenerative diseases of aging. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 7915-7922.
- Atlas R.M. 1993. *Handbook of microbiological media*. Boca Raton, CRC Press, Inc.: 1006-1007.
- Promega Corporation. 2004. BacTiter-Glo™ Cell Viability Assay. Madison, Promega Corporation: 12 str. (Technical Bulletin; No. 337)
- Betteridge D.J. 2000. What is oxidative stress? *Metabolism*, 49, 2, suppl 1: 3-8.
- Boucherie H. 1985. Protein synthesis during transition and stationary phases under glucose limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 161: 385-392.
- Boyer R. 2005. Temelji biokemije. Ljubljana, Študentska založba: 450-465.
- Brown S.E., Ferrante R.J., Flint Beal M. 1999. Oxidative stress in Huntington disease. *Brain Pathology*, 9: 147-63
- Bugeja D.J., Piggott J.R., Carter B.L.A. 1982. Differentiation of *Saccharomyces cerevisiae* at slow growth rates in glucose-limited chemostat culture. *Journal of General Microbiology*, 128: 2707-2714.
- Carr A.C., Frei B. 1999. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and death in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 69: 1086-107
- Carlisle E.M. 1982. The nutritional essentiality of silicon. *Nutrition Reviews*, 40, 7: 193-198.

- Costa V., Moradas-Ferreira P. 2001. Oxidative stress and signal transduction in *Sachharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. Review. *Molecular Aspects of Medicine*, 22: 217-246.
- Daniells S. 2006. Antioxidant supplements-myth or misunderstood. Montpellier, Nutra ingredients.com, Europe.
<http://www.foodnavigator.com/news/ng.asp?n=69668-antioxidants-vitamin-e-beta-carotene> (26.okt.2007): 3 str.
- Davies K.J.A. 1986. Intracellular proteolytic systems may function as secondary antioxidant defenses: an hypothesis. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 2: 155-173.
- Deng X.S., Tuo J., Poulsen H.E., Loft S. 1998. Prevention of oxidative DNA damage in rats by Brussels sprouts. *Free Radical Research*, 25: 323-33
- DeNobel J.M., Klis F.M., Munnik T., Priem J., van den Ende H. 1990. An assay of relative cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*, *Kluyveromyces lactis* and *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast*, 6: 483-490.
- Dove P.M., Rimstidt J.D. 1994. Silica-water interactions. V: Silica: physical behaviour, geochemistry and materials application. Heaney P.J., Prewitt C.T., Gibbs G.V. (eds.). Washington, Mineralogical Society of America: 259-301 (Reviews in Mineralogy, vol. 29)
- Emmert D.K., Kirchner J.T. 1999. The role of vitamin E in the prevention of heart disease. *Archives of Family Medicine*, 8: 537-42
- Flanagan G.P., Purdy-Lloyd K.L. 1999. A silicate mineral supplement, Microhydrin®, tropes reduced hydrogen providing in vitro biological antioxidant properties. *Proceedings of National Hydrogen Association*, 10: 595-610.
- Fridovich I. 1995. Superoxide radical and superoxide dismutases. *Annual Review of Biochemistry*, 64: 97-112.

- Gauyacq J. 1987. Dynamics of negative ions. World Scientific Press, New Jersey. World Scientific Lecture Notes in Physics, vol 15: 172 str.
- Gey K.F. 1993. Prospects for the prevention of free radical disease, regarding cancer and cardiovascular disease. *British Medical Bulletin*, 49: 679-99
- Gey K.F., Puska P. 1989. Plasma vitamins E and A inversly correlated to mortality from ischemic heart disease in cross-cultural epidemiology. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 570: 268-82
- Gomes A., Fernandes E., Lima J.L.F.C. 2005. Fluorescence probes used for detection of reactive oxygen species. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 65: 45-80.
- Gutteridge J.M.C., Halliwell B. 1994. Free radicals and antioxidants in aging and disease: fact or fantasy. V: *Antioxidants in nutrition, health and disease*. Oxford, Oxford University Press: 111-135
- Halliwell B. 2000. The antioxidant paradox. *Lancet*, 355: 1179-1180
- Halliwell B., Gutteridge J.M.C. 1999. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. Oxford, Oxford University Press: 936 str.
- Jakubowski W., Bartosz G. 1997. Estimation of oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae* with fluorescent probes. *International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 29, 11: 1297-1301.
- Jamnik P., Medved P., Raspor P. 2006. Increased glutathione content in yeast *Saccharomyces cerevisiae* exposed to NaCl. *Annals of Microbiology*, 56, 2: 175-178.
- Jamnik P., Raspor P. 2003. Stress response of yeast *Candida intermedia* to Cr (VI). *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 17, 6 : 316-323

- Jamnik P. 2002. Odziv kvasovke *Candida intermedia* na Cr(VI) kot stresni dejavnik. Doktorska disertacija. Ljubljana, Biotehniška fakulteta, Interdisciplinarni podiplomski študij biotehnologije: 123 str.
- Jaqmin G.H., Commenges D., Leteuneur L., Dartiques J.F. 1996. Silica and aluminum in drinking water and cognitive impairment in the elderly. *Epidemiology*, 7: 281-285.
- Khan A.U., Wilson T. 1995. Reactive oxygen species as cellular messengers. *Chemistry and Biology*, 2: 437-445.
- Košmelj K. 2001. Uporabna statistika. Ljubljana, Biotehniška fakulteta Univerze v Ljubljani: 249 str.
- Longo V.D., Butler Gralla E., Selverstone Valentine J. 1996. Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 24; 12275-12280.
- Love S., Jenner P. 1999. Oxidative stress in neurological disease. *Brain Pathology*, 9: 119-131
- Manček B., Pečar S. 2001. Radikali in zaščita pred poškodbami z radikali v bioloških sistemih. *Farmacevtski vestnik*, 52: 133-144.
- Melton L. 2006. The antioxidant myth. *New Scientist*, 191, 2563: 40-43.
<http://www.newscientist.com/article/mg19125631.500> (26.okt.2007): 4 str.
- Microhydrin. 1999. UC Berkeley Wellnes Letter, November 1999.
<http://wellnessletter.com/html/ds/dsMicrohydrin.php> (25.okt.2007): 2 str.
- McKersie B.D. 1996. Oxidative stress. Guelph, University of Guelph, Department of Crop science.
<http://www.plantstress.com/Articles/Oxidative%20Stress.htm#ascorbic>
(11.9.2007): 36 str.

- Moradas-Ferreira P., Costa V., Piper P., Mager W. 1996. The molecular defences against reactive oxygen species in yeast. *Molecular Microbiology*, 19, 4: 651-658.
- Morse D.E. 1999. Silicon biotechnology: Harnessing biological silica production to construct new materials. *Trends in Biotechnology*; 17: 230-232.
- Ostan I., Ostan A., Ambrozius B. 2003. Živa voda podaljša življenje. *Aura*, 161: 46-48.
<http://www.ziva-voda.com/clanki/ziva%20voda%20podaljsa%20zivljenje.pdf>
(11.9.2007): 6 str
- Piškur J., Langkjær R. 2004. Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. *Molecular Microbiology*, 53: 381–389.
- Pravilnik o razvrstitvi vitaminskih in mineralnih izdelkov za peroralno uporabo, ki so v farmacevtskih oblikah, in so dostopni na tržišču kot zdravila. 2003. Uradni list Republike Slovenije, 13, 83: 12230-12238.
- Prieme H., Loft S., Nyssonen K., Salonen J.T., Poulsen H.E. 1997. No effect of supplementation with vitamin E, ascorbic acid or coenzyme Q on oxidative DNA damage estimated by 8-oxo-7,8-dihydro-2-deoxyguanosine excretion in smokers. *American Journal of Clinical Nutrition* 65: 503-07
- Purdy-Lloyd K.L., Wasmund W., Smith L., Raven P. 2001. Clinical effects of a dietary antioxidant silicate supplement, Microhydrin®, on cardiovascular responses to exercise. *Journal of Medical Food*, 4, 3: 151-159.
- Rehman A., Bourne L.C., Halliwell B., Rice-Evans C.A. 1999. Tomato consumption modulates oxidative DNA damage in humans. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 262: 828-31
- Rehman A., Collins S.S., Yang M., Kelly M., Diplock A.T., Halliwell B., Rice-Evans C. 1998. The effects of iron and vitamin C co-supplementation on oxidative damage to DNA in healthy volunteers. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246: 293-298

- Rius H. 1997. Yeast stress responses: achievements, goals and look beyond yeast. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 231-247.
- Santoro N., Thiele D.J. 1997. Oxidative stress responses in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 171-211.
- Siderius M., Mager W.H. 1997. General stress response: In search of a common denominator. V: Yeast stress responses. Hohmann S., Mager, W.H. (eds.). New York, Springer-Verlag: 214-230.
- Singler K., Chaloupka J., Brozmanova J., Stadler N., Höfer M. 1999. Oxidative stress in microorganisms – I. Microbial vs. higher cells – damage and defense in relation to cell aging and death. *Folia Microbiologica*, 44, 6: 587-624.
- Stephanson C.J., Flanagan G.P. 2006. Magnesium activated hydrogen ions and biological activity: Empirical analyses and clinical significance. Minesota, University of Minesota, Phi Sciences.
http://www.phisciences.com/Mg_Activated_Hydrogen_8_22_06.pdf
(5.3.2007): 13 str.
- Stephanson C.J., Flanagan G.P. 2004. Non-toxic hydride energy source for biochemical and industrial venues: ORP and NAD⁺ reduction analyses. *International Journal of Hydrogen Energy*, 29: 459-464.
- Stephanson C.J., Flanagan G.P. 2003a. Synthesis of a novel anionic hydride organosiloxane presenting biochemical properties. *International Journal of Hydrogen Energy*, 28 : 1243-1250.
- Stephanson C.J., Flanagan G.P. 2003b. Antioxidant capacity of silica hydride: a combinational photosensitization and fluorescence detection assay. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine*, 35:1129-1137.

- Stephanson C.J., Stephanson A.M., Flanagan G.P. 2002. Antioxidant capability and efficacy of MegaH™ silica hydride, an antioxidant dietary supplement, by in vitro cellular analysis using photosensitization and fluorescence detection. *Journal of Medical Food*, 5: 9-16.
- Tamas M.J., Hohmann S. 2003. The osmotic stress response of *Saccharomyces cerevisiae*. V: *Yeast stress responses*. Hohmann S., Mager W.H. (eds.). Berlin, Springer: 121-200.
- Toyokuni S., Okamoto K., Yodol J. 1995. Persistent oxidative stress in cancer. *FEBS Letters*, 358: 1-3
- Werner-Washbourne M., Braun E., Johnston G.C., Singer R.A. 1993. Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 57, 2: 383-401
- Yanagida M. 2002. The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biology*, 3, 3: 2003.1-2003.4

ZAHVALA

Najprej bi se rada zahvalila svojemu mentorju prof. dr. Petru Rasporju za koristne nasvete, pomoč in strokovno vodenje pri opravljanju diplomskega dela.

Posebej se zahvaljujem dr. Poloni Jamnik za vsestransko pomoč, podporo, spodbudo, prijazne besede in potrpežljivost med eksperimentalnim delom in pri pisanju same diplomske naloge.

Doc. dr. Blažu Cigiću se zahvaljujem za temeljit pregled naloge.

Dr. Borutu Poljšaku se zahvaljujem za koristne nasvete in pomoč pri pregledu naloge.

Ivici Hočevnar se zahvaljujem za pregled in urejanje literarnih virov.

Celotnemu osebju Katedre za biotehnologijo se zahvaljujem za prijetno delovno vzdušje. Urški Debelak in Mili Krstić se zahvaljujem za pomoč pri delu v laboratoriju.

Za pomoč pri birokratskih zadevah in za vse vzpodbudne besede se zahvaljujem Dragici Markovič.

Zahvaljujem se tudi vsem prijateljem in sošolcem, ki so me podpirali med samim študijem in pri nastanku tega dela.

Posebej se zahvaljujem svoji družini, ki mi je omogočila ta študij, mi nesebično stala ob strani in me podpirala tudi v najtežjih trenutkih. Brez vas mi resnično ne bi uspelo.

In nenazadnje se zahvaljujem tudi tebi Denis. Brez tvoje podpore, potrpežljivosti in ljubezni bi veliko težje dosegala svoje cilje.

Še enkrat HVALA vsem.

PRILOGE

Priloga A1: Meritve optične gostote (OD_{650}) med aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* na stresalniku ($V_D = 100$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min) – namnoževanje inokuluma

čas (h)	$V_D = 100$ mL		
	OD_{650} (A)	OD_{650} (B)	$\overline{OD}_{650} \pm SD$
0	0,195	0,205	$0,200 \pm 0,005$
2	0,263	0,256	$0,260 \pm 0,004$
4	0,486	0,542	$0,514 \pm 0,028$
6	0,918	1,005	$0,962 \pm 0,044$
8	1,383	1,471	$1,427 \pm 0,044$
10	1,648	1,656	$1,652 \pm 0,004$
12	1,674	1,678	$1,676 \pm 0,002$
14	1,701	1,708	$1,705 \pm 0,004$
24	1,758	1,762	$1,760 \pm 0,002$

Priloga A2: Meritve optične gostote (OD_{650}) med aerobno submerzno kultivacijo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* na stresalniku ($V_D = 450$ mL, $T = 28$ °C, 200 obr./min) – glavni poskus

čas (h)	$V_D = 450$ mL		
	OD_{650} (A)	OD_{650} (B)	$\overline{OD}_{650} \pm SD$
0	0,546	0,590	$0,568 \pm 0,022$
2	0,859	0,897	$0,878 \pm 0,019$
4	1,337	1,336	$1,337 \pm 0,000$
6	1,640	1,653	$1,647 \pm 0,007$
8	1,679	1,695	$1,687 \pm 0,008$
10	1,692	1,704	$1,698 \pm 0,006$
12	1,710	1,708	$1,709 \pm 0,001$
24	1,764	1,777	$1,771 \pm 0,006$

Priloga B1: Meritve fluorescence za določanje znotrajcelične oksidacije pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* brez (kontrola) in po dodatku spojin

čas (h)	kontrola		spojina na osnovi Mg 1		spojina na osnovi Mg 2		askorbinska kislina	
	fluorescenca ± SD	KV%	fluorescenca ± SD	KV%	fluorescenca ± SD	KV%	fluorescenca ± SD	KV%
0	9316,70 ± 1361,96	14,62						
1	16047,79 ± 3390,41	21,13	4221,32 ± 501,16	11,87	5200,20 ± 327,89	6,30	9046,20 ± 335,90	3,71
3	23366,66 ± 2564,50	10,98	4207,27 ± 334,90	7,96	5215,21 ± 464,03	8,90	13824,34 ± 1973,61	14,27
24	109151,2 ± 9423,16	8,63	21484,86 ± 10070,27	46,87	17684,00 ± 949,02	5,36	33390,00 ± 533,87	1,60

Priloga B2: Koeficienti znižanja znotrajcelične oksidacije pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* brez (kontrola) in po dodatku spojin

čas (h)	spojina na osnovi Mg 1		spojina na osnovi Mg 2		askorbinska kislina	
	k znižanja	KV%	k znižanja	KV%	k znižanja	KV%
1	3,84±0,28	7,29	3,09±0,14	4,53	1,78±0,04	2,25
3	5,58±0,26	4,66	4,50±0,28	6,22	1,71±0,15	8,77
24	6,01±1,35	22,46	6,18±0,23	3,72	3,27±0,04	1,22

Priloga C: Meritve luminiscence za določanje celične metabolne aktivnosti pri kvasovki *Saccharomyces cerevisiae* brez (kontrola) in po dodatku spojin

čas (h)	kontrola		spojina na osnovi Mg 1		askorbinska kislina	
	luminiscenca \pm SD	KV%	luminiscenca \pm SD	KV%	luminiscenca \pm SD	KV%
0	$1,08 \cdot 10^6 \pm 0,43 \cdot 10^6$	39,81				
1	$1,91 \cdot 10^6 \pm 0,34 \cdot 10^6$	17,80	$3,36 \cdot 10^6 \pm 0,42 \cdot 10^6$	12,50	$3,16 \cdot 10^6 \pm 0,41 \cdot 10^6$	12,98
3	$1,05 \cdot 10^6 \pm 0,20 \cdot 10^6$	19,05	$1,44 \cdot 10^6 \pm 0,16 \cdot 10^6$	11,11	$1,91 \cdot 10^6 \pm 0,21 \cdot 10^6$	11,00
24	$0,21 \cdot 10^6 \pm 0,06 \cdot 10^6$	28,57	$4,70 \cdot 10^6 \pm 3,14 \cdot 10^6$	66,80	$0,32 \cdot 10^6 \pm 0,01 \cdot 10^6$	3,12

Priloga D: Povprečne vrednosti števila celic kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* v gojišču YEPD z dodanimi različnimi spojinami glede na kontrolo

čas (h)	kontrola		spojina na osnovi Mg 1		askorbinska kislina	
	št. celic \pm SD	KV%	št. celic \pm SD	KV%	št. celic \pm SD	KV%
0	$2,30 \cdot 10^8 \pm 1,28 \cdot 10^8$	55,65				
1	$1,18 \cdot 10^8 \pm 0,39 \cdot 10^8$	33,05	$3,55 \cdot 10^8 \pm 0,00 \cdot 10^8$	00,00	$3,05 \cdot 10^8 \pm 0,00 \cdot 10^8$	00,00
3	$1,67 \cdot 10^8 \pm 0,22 \cdot 10^8$	13,17	$3,85 \cdot 10^8 \pm 0,92 \cdot 10^8$	23,90	$3,15 \cdot 10^8 \pm 0,14 \cdot 10^8$	4,44
24	$1,45 \cdot 10^8 \pm 0,90 \cdot 10^8$	62,07	$2,65 \cdot 10^8 \pm 1,65 \cdot 10^8$	62,26	$2,23 \cdot 10^8 \pm 0,39 \cdot 10^8$	17,49

Priloga E: Izmerjene vrednosti pH v gojišču YEPD s kulturo kvasovke *Saccharomyces cerevisiae* in dodanimi spojinami (t = 0, pH = 5,17)

čas (h)	kontrola [pH]	spojina na osnovi Mg 1 [pH]	askorbinska kislina [pH]
1	5,27	7,55	4,40
3	5,23	7,66	4,34
24	5,24	7,90	4,48

Priloga F: Izmerjene vrednosti ORP po dodatku spojine na osnovi magnezija v gojišču YEPD in izmerjene vrednosti ORP ter H po dodatku spojine na osnovi magnezija destilirani vodi v različnih časovnih obdobjih

čas (min)	ORP dH ₂ O [mV]	pH *	ORP YEPD [mV]
5	- 326	7,50	- 30
10	- 573	9,14	- 54
20	- 620	9,57	- 67
60	- 790	9,99	- 411

* izmerjen pH takoj: 3,5