

PRODUCTION OF SELENIUM YEAST – OPTIMIZATION OF CULTIVATION CONDITIONS

Anežka Poláková, Eva Szabová, Dana Urminská, Silvia Šillerová

ABSTRACT

Selenium is an essential trace element, which has an important role in human nutrition. It has antimutagenic, antiviral and anticarcinogenic effects, selenium is involved in the antioxidant defence systems, in which selenoproteins carry out protective function against oxidative stress initiated by excess reactive oxygen species (ROS) and reactive nitrogen species (NOS). In human nutrition absorption of selenium from food is important. However the Se content in food is highly dependent on the amount of selenium in the soil and also on the ability of plants to take up and accumulate the element. Dietary intake of selenium are sub-optimal in the populations of many countries. Baker's yeast is most commonly used for the production of nutritional supplements and the using of selenium yeast is definite possibility how to increase amount of selenium in the organism. Aim of this work was to obtain selenium-enriched yeast of *Saccharomyces cerevisiae*, Kolín and 612. Submerged aerobic cultivation of yeast was carried out with different concentrations (10, 20, 30, 40 and 50 mg/L) of sodium selenite in the medium, which were added at two different stages: in the yeast's growth phase, i.e. immediately after the inoculation of the yeast and in the stationary phase, i.e. sodium selenite was added after 24 hours of incubation. Se in selenium-enriched yeast is present in the form of seleno-amino acids, particularly as selenomethionine. Selenocysteine is present in much lesser amount. Organoselenium compounds are more bioavailable and effective than selenite or selenate for antioxidant activity.

Keywords: selenium, yeast, supplementation, *Saccharomyces cerevisiae*, selenite, yield

ÚVOD

Pre väčšinu organizmov, od baktérií cez riasy až po cicavce, je selén životne dôležitý mikroelement. Je inkorporovaný v mnohých enzýmoch, ktoré pôsobia ako antioxidanty, napr. glutatiónpoxidáza a tioredoxínreduktáza, a tiež je súčasťou jódtyroníndejodínázy, ktorá ovplyvňuje aktivitu tyroidných hormónov (Vacchina a kol., 2010). Organoselénové zlúčeniny sa začali intenzívne skúmať po zistení ich schopnosti významne znižovať nebezpečenstvo vzniku rakoviny pľúc, prostaty a hrubého čreva (Burk a kol., 2006). Množstvo Se v organizmoch závisí od jeho dostupnosti vo výžive. Selén je v potravinách prítomný hlavne v biologicky využiteľných organických zlúčeninách. Anorganické formy tohto prvku sa objavujú menej často a vo veľmi nízkych koncentráciách (Amoako a kol., 2009). Podľa Dumont a kol. (2006) sa koncentrácia Se v obilninách pohybuje od 0,01 do 0,55 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, v mäse, rybách a vajciach sú to hodnoty medzi 0,01 až 0,36 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Obsah Se v mlieku a mliečnych výrobkoch môže byť nižší než 0,001 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, ale dosahuje aj 0,17 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Z potravín sú na Se najchudobnejšie ovocie a zelenina, s obsahom od 0,001 do 0,022 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$. Obsah selénu v potravinách závisí od jeho množstva v pôde, ktoré je rôzne v závislosti od krajiny, regiónu a tiež od schopnosti rastlín prijať a akumulovať tento prvok. V celosvetovom meradle sa výživový príjem selénu u dospelých jedincov pohybuje od 11 do 5000 $\mu\text{g}\cdot\text{deň}^{-1}$, priemerne je to však 20 až 300 $\mu\text{g}\cdot\text{deň}^{-1}$. WHO stanovila

odporúčaný denný príjem selénu v množstve 50 – 200 μg (Patrick, 2004). Preto je nesmierne dôležité v oblastiach s nízkym príjmom tohto mikroelementu zvyšovať jeho obsah v potrave, napr. formou rôznych aditív. V posledných rokoch sa venuje veľká pozornosť využitiu mikroorganizmov na selénovú suplementáciu. Je známe, že hlavne kvasinky sú pri vhodných kultivačných podmienkach schopné akumulovať veľké množstvá selénu a inkorporovať ho do selénových zlúčenín, hlavne selénometionínu (Yin a kol., 2010). Autori Kaur a Bansal (2006) zistili, že počas rastu kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* (MTCC 1766) sa potenciálne toxický seleničitan sodný, pridaný do YPD média, v bunkách transformoval na neškodné organické látky, selénové aminokyseliny. Ouerdane a Mester (2008) opisujú špeciálny kmeň kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* BY4741, neschopný syntetizovať metionín, ak bola zdrojom síry anorganická zlúčenina, ktorý však syntetizoval selénometionín v prítomnosti seleničitých a selénových solí. Analýza genómu kvasiniek ukázala, že neobsahujú gény pre expresiu selénoproteínov, ani špeciálnu štruktúru SECIS (Selenocysteine Insertion Sequence) (Araie a Shiraiwa, 2009). Avšak, aminokyselinová analýza selenizovaných kvasiniek alebo brazílskych orechov, populárnych selénových doplnkov v prevencii rakoviny, dokázala, že základnou selénovou zlúčeninou v proteínových hydrolyzátoch je selénometionín (Wrobel a kol., 2003). Selénometionín je náhodne včlenený do proteínov kvôli editovacej tolerancii metionyl-tRNA syntetázy (Moroder, 2005). Je to jediná známa neproteinogénna aminokyselina, ktorá je inkorporovaná do celulárnych bielkovín, zatiaľ čo všetky ostatné neproteinogénne aminokyseliny pôsobia viac, či menej, inhibične na rast buniek (Budisa a kol., 1995).

Cieľom práce bolo optimalizovať podmienky kultivácie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* tak, aby sa následným prídavkom seleničitanu dosiahla maximálna saturácia biomasy organickými zlúčeninami Se a zároveň sa dosiahol čo najvyšší výťažok biomasy.

MATERIÁL A METÓDY

Chemikálie:

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

Produkčné mikroorganizmy:

Použité produkčné kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*, kmene Kolín a 612, boli získané v spolupráci so Slovenskými liehovarmi a likérkami, a.s. Leopoldov.

Zloženie optimalizovaného YPD (Yeast Peptone Dextrose) média pre kultiváciu *Saccharomyces cerevisiae*:

10 g.dm⁻³ kvasničného autolyzátu, 20 g.dm⁻³ peptónu pre bakteriológiu, 35 g.dm⁻³ glukózy, pH živného média 5,5 (Kaur a Bansal, 2006; Sharma a Anand, 2006; Jinping a kol., 2008; Šillerová a kol., 2010).

Produkcja kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*:

Submerzná aeróbná kultivácia produkčných kmeňov kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* sa uskutočnila v bankách s objemom 1 000 cm³ na laboratórnej trepačke s 280 ot.min⁻¹ pri teplote 30 °C po dobu 48 hodín. Objem živnej pôdy bol 100 cm³. Za účelom prídavku rovnakého množstva kvasničných buniek, sa na kultiváciu použilo vegetatívne inokulum v exponenciálnej fáze rastu, z ktorého sa do každej banky pridala alikvótna časť, obsahujúca 1x10⁷ buniek.cm⁻³. Po skončení kultivácie boli kvasinky zo živnej pôdy izolované odstrednením pri 1509 x g počas 30 minút, s následným dvojnásobným premývaním destilovanou vodou a opätovným odstred'ovaním. Sediment buniek bol po zmrazení tekutým dusíkom stabilizovaný lyofilizáciou. Získané preparáty si zachovávajú svoje biologické vlastnosti a môžu sa skladovať bez straty biologickej aktivity (Káš a kol., 2006).

Obohatenie kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* selénom:

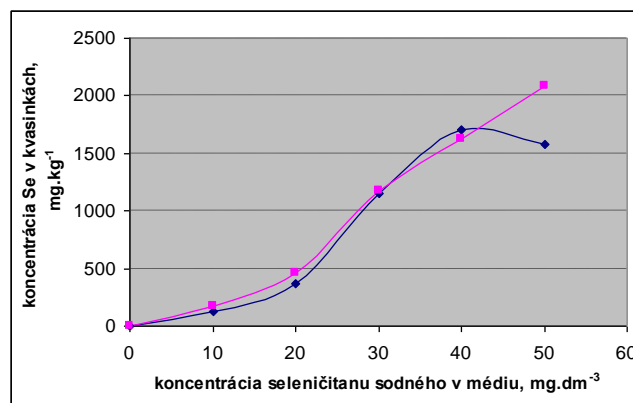
Do YPD média sa pridávala anorganická forma selénu, filtráciou sterilizovaný roztok Na₂SeO₃, v dvoch variantoch. Na začiatku kultivácie, teda v rastovej fáze kvasiniek a po 24 hodinách kultivácie – v stacionárnej fáze. V oboch variantoch sa použili rôzne koncentrácie seleničitanu sodného, 10, 20, 30, 40 a 50 mg.dm⁻³. Po skončení kultivácie bol postup izolácie kvasiniek rovnaký ako v prípade získania pôvodnej biomasy produkčných kmeňov.

Získaná sušina kvasinkovej biomasy bola za účelom stanovenia selénu analyzovaná v akreditovanom laboratóriu EL spol. s r.o. v Spišskej Novej Vsi atómovou absorpčnou spektrometriou s generovaním hydridov (HG-AAS).

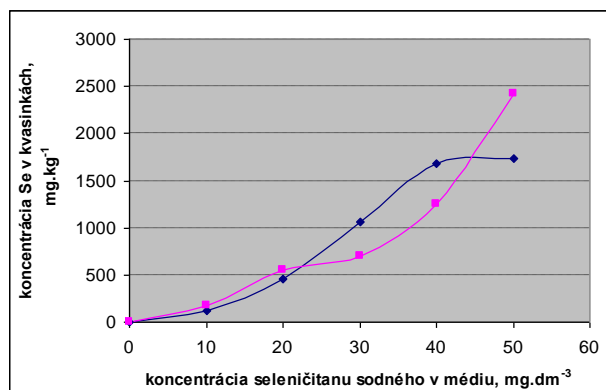
Počet buniek kvasiniek v 1 cm³ bol určený pomocou hemocytometra (Bürker).

VÝSLEDKY A DISKUSIA

Na základe predchádzajúcich pokusov optimalizácie množstva uhlíkatého zdroja v kultivačnom médiu a doby kultivácie *Saccharomyces cerevisiae*, kmene Kolín a 612 (Šillerová a kol., 2010), obsahovala živná pôda vhodná pre vytvorenie optimálnych rastových podmienok a pre získanie maximálnej produkcie biomasy pri obohacovaní média seleničitanom, koncentráciu glukózy 3,5 %. Obohacovanie kvasiniek selénom bolo uskutočnené v dvoch rôznych fázach kultivácie. Roztok seleničitanu sodného bol pridávaný na začiatku kultivácie, v skoršej rastovej fáze a po 24 hodinách od začiatku kultivácie, kedy je podľa Stahla (2004) kultúra vo fáze spomaleného rastu alebo v postdiauxickej fáze. Obrázok 1 a 2 potvrdzuje zistenia Ponce de León a kol. (2002), že kvasinky absorbovali najvyššie množstvo selénu pri obohacovaní média seleničitanom sodným v nerastovej fáze, hoci v tomto variante pokusov boli o polovicu kratšie vystavené expozícii selénu ako pri prvom variante. Albers a kol. (2007) zistili, že kvasinky v postdiauxickej fáze, prechádzajúce z respirofermentačného rastu na glukóze, do respiračného rastu na etanole v „batch“ kultúrach, majú lepšiu odolnosť voči stresu a hladovaniu, v porovnaní s bunkami rastúcimi logaritmicky na glukóze. Analýzou mikroelementov v kontrolných vzorkách kvasiniek sa zistilo v kmeni Kolín 1,78 mg Se.kg⁻¹ biomasy a v kmeni 612 bolo stanovené množstvo selénu 2,38 mg.kg⁻¹ biomasy. Pri obohatení média selénom vo fáze spomaleného rastu, sa v kmeni Kolín 1172-násobne zvýšilo množstvo tohto prvku a v kmeni 612 bolo po rovnakej kultivácii stanovené 1054-násobne väčšie množstvo selénu. Porovnaním absorpcie Se kvasinkami závislej od obohatenia média seleničitanom v logaritmickú a fáze spomaleného rastu, bol v médiu s najvyššou koncentráciou seleničitanu, t.j. 50 mg.dm⁻³, zistený nižší obsah akumulovaného Se v rastovej fáze, a to v kmeni Kolín o 31,8 % a v kmeni 612 o 39,4 %.



Obrázok 1: Závislosť množstva absorbovaného Se v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, kmeň Kolín, od koncentrácie pridávaného seleničitanu sodného, —●— rastová fáza, —■— fáza spomaleného rastu



Obrázok 2: Závislosť množstva absorbovaného Se v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae*, kmeň 612, od koncentrácie pridávaného seleničitanu sodného, —◆— rastová fáza, —■— fáza spomaleného rastu

Zistili sme, že so stúpajúcou koncentráciou selénu v bunkách klesá výťažok biomasy. Vysoké dávky selénových zlúčenín môžu byť toxické, pretože zapríčínujú stratu membránovej integrity a abnormálnu morfológiu jadra (Izquierdo a kol., 2010). Na₂SeO₃ pôsobí na pučiace kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* ako oxidačné činidlo, čím indukuje dvojvláknové zlomy DNA a smrť bunky (Letavayová a kol., 2008). Hmotnosť biomasy kmeňa Kolín pri suplementácii média seleničitanom v rastovej fáze sa znižovala so zvyšujúcou sa koncentráciou danej soli a pri jej množstve 50 mg.dm⁻³ v médiu, bol zaznamenaný pokles kvasinkovej hmoty oproti kontrolnej vzorke až o 70,44 % (Tab. 1). V prípade obohatenia média seleničitanom po 24 hodinách kultivácie, výťažok biomasy postupne klesol o 68,77 % hmotnosti kontrolnej vzorky (Tab. 2). Na₂SeO₃ je pre bunky toxickéjšie v logaritmickú fázu rastu ako vo fáze spomaleného rastu. Súvisí to s vyššou membránovou permeabilitou a intenzívnejším metabolizmom buniek v rastovej fáze (Bronzetti a kol., 2001).

Tabuľka 1: Suplementácia média kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kmeň Kolín seleničitanom sodným v rastovej fáze

Na ₂ SeO ₃ , mg.dm ⁻³ média	počet buniek kvasiniek, (x 10 ⁸). cm ⁻³	hmotnosť biomasy, g.100 cm ⁻³	výťažok biomasy, %
0	3,38	1,264	100
10	3,18	1,1846	93,54
20	2,18	0,9201	72,79
30	2,03	0,3835	30,34
40	1,73	0,3741	29,6
50	1,31	0,3736	29,56

Tabuľka 2: Suplementácia média kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kmeň Kolín seleničitanom sodným vo fáze spomaleného rastu

Na ₂ SeO ₃ , mg.dm ⁻³ média,	počet buniek kvasiniek, (x 10 ⁸). cm ⁻³	hmotnosť biomasy, g.100 cm ⁻³	výťažok biomasy, %
0	3,38	1,264	100
10	3,19	1,2613	99,79
20	3,06	0,8206	64,92
30	2,62	0,5757	45,55
40	2,56	0,5211	41,23
50	1,9	0,3948	31,23

Pri kultivácii kmeňa 612 bol zaznamenaný nárast hmotnosti biomasy v prvom aj druhom variante pokusov pri koncentrácii 10 mg seleničitanu.dm⁻³ média. V porovnaní s kontrolnou vzorkou sa výťažok biomasy zvýšil o 14,79 % pri dlhšie trvajúcom vystavení buniek pôsobeniu seleničitanu, t.j. ak bol pridaný v skorej rastovej fáze (Tab. 3). Ak seleničitan o rovnakej koncentrácii pôsobil na bunky kmeňa 612 kratší čas, t.j. suplementácia média nastala až počas fázy spomaleného rastu, hmotnosť kvasiniek sa zvýšila o 0,69 % v porovnaní s kontrolnou vzorkou (Tab. 4). Selén má duálny vplyv na kvasinky. V mikromolárnych koncentráciách potláča spontánne mutácie, ale v milimolárnych koncentráciách sa stáva toxickým a zvlášť genotoxickým (Stenchuk a kol., 2006). Stimulačný efekt selénových solí na rastové parametre kvasiniek zaznamenali aj Diowksz a kol. (2000) pri zmiešanej kultivácii kvasiniek a mliečnych baktérií. Pri kultivácii kmeňa Kolín s 10 mg seleničitanu.dm⁻³ média pridanými vo fáze spomaleného rastu sa oproti kontrolnej vzorke znížila hmotnosť biomasy minimálne, iba o 0,21 % a na rozdiel od kmeňa 612, v porovnaní s kontrolnou vzorkou sa výťažok biomasy znížil o 6,28 % pri dlhšie trvajúcom vystavení buniek pôsobeniu seleničitanu, t.j. ak bol pridaný v skorej rastovej fáze.

Tabuľka 3: Suplementácia média kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kmeň 612 seleničitanom sodným v rastovej fáze

Na ₂ SeO ₃ , mg.dm ⁻³ média	počet buniek kvasiniek, (x 10 ⁸). cm ⁻³	hmotnosť biomasy, g.100 cm ⁻³	výťažok biomasy, %
0	3,23	0,9957	100
10	3,39	1,143	114,79
20	2,54	0,8991	90,3
30	1,68	0,4595	46,15
40	1,73	0,399	40,07
50	0,91	0,3561	35,76

Tabuľka 4: Suplementácia média kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kmeň 612 seleničitanom sodným vo fáze spomaleného rastu

Na ₂ SeO ₃ , mg.dm ⁻³ média	počet buniek kvasiniek, (x 10 ⁸). cm ⁻³	hmotnosť biomasy, g.100 cm ⁻³	výt'azok biomasy, %
0	3,23	0,9957	100
10	2,91	1,0026	100,69
20	2,45	0,7148	71,79
30	2,36	0,7263	72,94
40	2,66	0,5985	60,11
50	2,43	0,4469	44,88

ZÁVER

Získané výsledky poukazujú na negatívnu koreláciu medzi výt'azkom kvasinkovej biomasy a vysokou koncentráciou seleničitanu v živnej pôde u oboch analyzovaných kmeňov, čo potvrdil aj úbytok počtu buniek. Výraznejší pokles hmotnosti biomasy, aj počtu buniek, bol zistený pri obohacovaní média seleničitanom v logaritmickú fázu rastu kvasiniek. Pri najnižšej produkcii biomasy sa však v kvasinkách absorbovalo najviac Se, kedy bunky kmeňa Kolín obsahovali po kultivácii so Na₂SeO₃ 2086,16 mg Se.kg⁻¹ biomasy a v kvasinkách kmeňa 612 bolo stanovené 2508,16 mg Se.kg⁻¹ biomasy. Hoci obsah Se v kontrolnej vzorke kmeňa Kolín bol o 25 % nižší ako v kmeni 612, bola pozorovaná vyššia schopnosť akumulácie selénu kvasinkami kmeňa Kolín oproti kmeňu 612. Porovnaním pomeru medzi najnižším poklesom hmotnosti biomasy a zároveň najvyšším absorbovaným množstvom Se, je možné konštatovať, že optimálne podmienky pre kultiváciu kmeňov Kolín a 612, predstavuje médium so 40 mg.dm⁻³ seleničitanu sodného, ktorý je pridaný v stacionárnej fáze rastu.

LITERATÚRA

ALBERS, E., LARSSON, CH., ANDLID, T., WALSH, M.C., GUSTAFSSON, L. 2007. Effect of nutrient starvation on the cellular composition and metabolic capacity of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Appl. Environ. Microbio.* 73, 2007, p. 4839–4848.

AMOAKO, O. P., UDEN, C. P., TYSON, J. F. 2009. Speciation of selenium dietary supplements; formation of s-(methylseleno)cysteine and other selenium compounds. In *Anal. Chim. Acta* 652, 2009, p. 315–323.

ARAIE, H., SHIRAIWA, Y. 2009. Selenium utilization strategy by microalgae. In *Molecules* 14, 2009, p. 4880–4891.

BUDISA, N., STEIPE, B., DEMANGE, P., ECKERSKORN, C., KELLERMANN, S., HUBER, R. 1995. High-level biosynthetic substitution of methionine in proteins by its analogues 2-aminohexanoic acid, selenomethionine, telluromethionine and ethionine in

Escherichia coli. In *Eur. J. Biochem.* 230, 1995, p. 788–796.

BURK, R. F., NORSWORTHY, B. K., HILL, E. K., MOTLEY, A. K., BYRNE, D. W. 2006. Effects of chemical form of selenium on plasma biomarkers in a high-dose human supplementation trial. In *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 15 (4), 2006, p. 804–810.

BRONZETTI, G., CINI, M., ANDREOLI, E., CALTAVUTURO, L., PANUNZIO, M., CROCE, C. 2001. Protective effects of vitamins and selenium compounds in yeast. In *Mutat. Res.* 496, 2001, p.105–115.

DIOWKSZ, A. B., PEĆZKOWSKA, B., WŁODARCZYK, M., AMBROZIAK, W. 2000. Bacteria/yeast and plant biomass enriched in Se via bioconversion process as a source of Se supplementation in food. In *Progress in Biotechnology* 17, 2000, p. 295–300.

DUMONT, E., VANHAECKE, F., CORNELIS, R. 2006. Selenium speciation from food source to metabolites: a critical review. In *Anal. Bioanal. Chem.* 385, 2006, p. 1304–1323.

IZQUIERDO, A., CASAS, C., HERRERO, E. 2010. Selenite-induced cell death in *Saccharomyces cerevisiae*: Protective role of glutaredoxins. In *Microbiology* 156, 2010, p. 2608–2620.

JINPING, L., QINGHAI, L., ERZHENG, S., DONGZHI, W., SHENGLI, Y. 2008. Application of comparative proteome analysis to reveal influence of cultivation conditions on asymmetric bioreduction of β -keto ester by *Saccharomyces cerevisiae*. In *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 80, 2008, p. 831–839.

KAUR, T., BANSAL, M. P. 2006. Selenium enrichment and anti-oxidant status in baker's yeast, *Saccharomyces cerevisiae* at different sodium selenite concentrations. In *Nutr. Hosp.* 21, 2006, p. 704–708.

KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. 2006. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. PRAHA : VŠCHT, 2004, 258 p. ISBN 80-7080-586-2.

LETAVAYOVÁ, L., VLASÁKOVÁ, D., VLČKOVÁ, J., BROZMANOVÁ, J., CHOVANEC, M. 2008. Rad52 has a role in the repair of sodium selenite-induced DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Mutat. Res.* 652, 2008, p. 198–203.

MORODER, L. 2005. Isosteric replacement of sulfur with other chalcogens in peptides and proteins. In *J. Peptide Sci.* 11, 2005, p. 187–214.

OUERDANE, L., MESTER, Z. 2008. Production and characterization of fully selenomethionine-labeled *Saccharomyces cerevisiae*. In *J. Agric. Food Chem.* 56 (24), 2008, p. 11792–11799.

PATRICK, L. 2004. Selenium biochemistry and cancer: a review of the literature. In *Altern. Med. Rev.* 9 (3), 2004, p. 239–258.

PONCE DE LEÓN, C. A., BAYÓN, M. M., PAQUIN, C., CARUSO, J. A. 2002. Selenium incorporation into *Saccharomyces cerevisiae* cells: a study of different incorporation methods. In *J. Appl. Microbiol.* 92, 2002, p. 602–610.

SHARMA, S. C., ANAND, M. S. 2006. Role of selenium supplementation and heat stress on trehalose and glutathione content in *Saccharomyces cerevisiae*. In *App. Biochem. Biotechnol.* 133, 2006, p. 1–7.

STAHL, G., BEN SALEM, S. N., CHEN, L., ZHAO, B., FARABAUGH, P. J. 2004. Translational accuracy during exponential, postdiauxic, and stationary growth phases in *Saccharomyces cerevisiae*. In *Eukaryot. Cell* 3(2), 2004, p. 331–338.

STENCHUK, M. M., CHABAN, L. B., GONCHAR, M. V. 2006. Selenium and yeast: genetic mechanisms of the yeast tolerance to selenium compounds and their analogs. In *Biopolymers and Cell* 22, 2006, p. 3–17.

ŠILLEROVÁ, S., POLÁKOVÁ, A., URMINSKÁ, D., SZABOVÁ, E. 2010. Chemická a biochemická analýza kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae* kmeň Kolín, 612 a Gyöng. In *Potravinárstvo* 1 (4), 2010, p. 85–90.

TINGGI, U. 2008. Selenium: its role as antioxidant in human health. In: *Environ. Health Prev. Med.* 13, 2008, p. 102–108.

VACCHINA, V., MOUTET, M., YADAN, J. C., BAENE, F., KUDLA, B., LOBINSKI, R. 2010. Simultaneous speciation of selenomethionine and 2-hydroxy-4-methylselenobutanoic acid by HPLC–ICP MS in biological samples. In *J. Chromatogr. B* 878, 2010, p. 1178–1180.

WROBEL, K., KANNAMKUMARATH, S. S., WROBEL, K., CARUSO, J. A. 2003. Hydrolysis of proteins with methanesulfonic acid for improved HPLC–ICP–MS determination of seleno-methionine in yeast and nuts. In *Anal. Bioanal. Chem.* 375, 2003, p. 133–138.

YIN, H., FAN, G., GU, Z. 2010. Optimization of culture parameters of selenium-enriched yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) by response surface methodology (RMS). In *Food Sci. Technol.* 43, 2010, p. 666–669.

Pod'akovanie:

Práca bola podporovaná projektami VEGA 1/0740/08 KEGA 334-013 SPU-4/2010 a OP „Výskum a vývoj“ ITMS 26220120054.

Kontaktná adresa:

Ing. Anežka Poláková, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, Email: anezka.polakova@uniag.sk

Ing. Eva Szabová, PhD., Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: eva.szabova@uniag.sk

doc. RNDr. Dana Urminská, CSc., Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: dana.urminska@uniag.sk

Ing. Silvia Šillerová, Department of Biochemistry and Biotechnology, Faculty of Biotechnology and Food Sciences, Slovak Agricultural University, Tr. A. Hlinku 2, 949 76 Nitra, Slovak Republic, E-mail: silvia.sillerova@gmail.com