

BADANIE ZDOLNOŚCI WIĄZANIA MAGNEZU PRZEZ DROŹDŻE PIWOWARSKIE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* W WARUNKACH HODOWLI STACJONARNEJ

Stanisław Błażej, Wanda Duszkiewicz-Reinhard,
Małgorzata Gniewosz, Ewa Rostkowska-Demner, Ewa Domurad

Streszczenie: Badano możliwość wiązania jonów Mg^{2+} przez szczep drożdży piwowskich *Saccharomyces cerevisiae* Nr 1. Hodowle drożdży prowadzono na podłożu YPD wzbogaconym w sole magnezu $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ lub $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, metodą stacjonarną (bez napowietrzania). Sole dodawano w takiej ilości, aby udział czystego pierwiastka w podłożu wynosił $0,25 \text{ g/dm}^3$, $0,50 \text{ g/dm}^3$ lub $1,25 \text{ g/dm}^3$. Podłoże YPD wzbogacano w jony Mg^{2+} na początku hodowli lub pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu drożdży. Celem oceny trwałości związania jonów Mg^{2+} z komórkami drożdży piwowskich zawartość magnezu oznaczano w odwirowanej biomacie drożdży przemywanych i nie przemywanych wodą dejonizowaną. Badany szczep wykazał zdolność trwałego wiązania jonów Mg^{2+} z podłoża doświadczalnych. Dodatek $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sprzyjał wiązaniu magnezu z podłoża YPD przez drożdże piwowskie oraz pozwalał uzyskać nieco wyższe plony biomasy (dla dawek jonów Mg^{2+} $0,50 \text{ g/dm}^3$ i $1,25 \text{ g/dm}^3$), niż z podłoża doświadczalnych z dodatkiem soli $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Najwięcej magnezu trwale zwiazanego z biomasą komórkową ($15,20 \text{ mg Mg}^{2+}/\text{dm}^3$ podłoża) otrzymano po 24-godzinnej hodowli z dodatkiem soli chlorkowej w ilości $1,25 \text{ g Mg}^{2+}/\text{dm}^3$ podłoża.

Słowa kluczowe: biopierwiastki, metalobiałka, biopleksy, magnez, *Saccharomyces cerevisiae*

WSTĘP

Wraz z rozwojem cywilizacji obserwuje się wzrost zainteresowania społeczeństw zdrowiem i bezpieczną dla niego żywnością. Prawidłowe zbilansowanie składników diety nabiera szczególnego znaczenia w dobie postępu technologicznego, który dokonuje się w przetwórstwie żywności. Bardzo często żywność o wysokim stopniu przetworzenia zubożona jest o wiele cennych składników, w tym często o związki mineralne. Potrzeba suplementacji diety ludzi i zwierząt w mikroelementy skierowała uwagę na

drobnoustroje, a szczególnie pewne gatunki drożdży, które mogą stanowić uzupełniające źródło deficytowych pierwiastków i witamin. Powszechnie uznawane za organizmy bezpieczne są łatwe w hodowli i umożliwiają uzyskanie wysokiego plonu biomasy komórkowej w stosunkowo krótkim czasie.

Drożdże *Saccharomyces cerevisiae*, dzięki charakterystycznej strukturze ściany komórkowej zawierającej m.in. mannanoproteiny, chętnie wiążą na swej powierzchni dwuwartościowe jony metali [Lipke i Ovalle 1998, Lo i in. 1999]. Sprzyja temu obecność wolnych grup fosforanowych, karboksylowych, aminowych, i wodorosiarczkowych występujących w fosfomannanach i białkach powierzchniowych komórek drożdży. Zaadsorbowane kationy mogą zostać przeniesione do wnętrza komórki przez specyficzne białka transportowe, kodowane przez geny grupy ALR, co w konsekwencji prowadzi do bioakumulacji metalu w drożdżach [MacDiarmid i Gardner 1998].

W ostatnich latach zwrócono uwagę na metalobiałka, zwane również biopleksami [Mardarowicz 1997, Świątkiewicz i Korelski 1998]. Zaliczane są do nich liczne białka wiążące tak ważne dla prawidłowego funkcjonowania organizmu biopierwiastki, jak magnez, cynk, chrom, selen, miedź, czy żelazo. Jedną z dróg pozyskiwania biopleksów do ewentualnego uzupełniania niedoborów biopierwiastków w diecie jest wiązanie tych mikroelementów ze strukturami komórkowymi drożdży.

Biopierwiastkiem o szczególnym znaczeniu dla funkcjonowania organizmów żywych jest magnez. Wykazuje wielokierunkową aktywność biologiczną związaną z aktywacją licznych enzymów, udziałem w syntezie białek, kwasów nukleinowych, metabolizmie lipidów oraz termoregulacji [Birch i Walker 2000].

W Polsce zjawisko niedoboru magnezu w organizmie dotyczy przeszło 50% populacji. Zalecane dzienne spożycie magnezu dla człowieka wynosi 300-370 mg, co przy około 40-procentowym wykorzystaniu z diety uzasadnia celowość produkcji żywności wzbogaconej w ten biopierwiastek [Brzozowska 1998].

Biopierwiastki podawane w postaci metalobiałek (biopleksów) są lepiej przyswajalne przez organizm w porównaniu z preparatami farmaceutycznymi przygotowanymi na bazie organicznych lub nieorganicznych soli tych pierwiastków [Krejpcio i in. 1999, Olędzka 1999]. Produkty spożywcze (np. wyroby piekarskie) otrzymane z udziałem drożdży wzbogaconych w magnez lub preparaty drożdżowe zawierające biopleksy magnezowe mogłyby stanowić w przyszłości dodatkowe źródło tego pierwiastka przy jego deficycie w diecie ludzi i zwierząt.

Jak podają Jones i Greenfield [1984] optymalne stężenie magnezu w podłożu potrzebne do wzrostu komórek *S. cerevisiae* wynosi 50-100 mg Mg^{2+}/dm^3 . Obecność w środowisku jonów Mg^{2+} stymuluje i wydłuża żywotność drożdży poprzez stabilizację błony cytoplazmatycznej, błon mitochondrialnych, rybosomów oraz utrzymanie właściwej struktury chromosomów [Walker 1994, Walker i Birch 1996, Pasternak 1999]. Pierwiastek ten może chronić komórki drożdży przed stresem wywołanym wysokim stężeniem etanolu, wysoką temperaturą i ciśnieniem osmotycznym. Niewielkie ilości etanolu, które powstają w początkowych fazach fermentacji pobudzają wchłanianie magnezu w wyniku wzrostu przepuszczalności błony cytoplazmatycznej. Wyższe stężenia etanolu, powstające w dalszych fazach fermentacji, działają toksycznie i hamują wzrost komórek [Walker i Birch 1996]. Największą biosorpcję jonów Mg^{2+} z podłoża obserwujemy zwykle w pierwszym okresie hodowli drożdży, po czym następuje wolniejsze wiązanie pierwiastka ze strukturami wewnątrzkomórkowymi. W późniejszych etapach hodowli, wraz z postępującym procesem starzenia się i obumierania komórek, można zauważyć ponowne uwalnianie tych jonów do środowiska [Brady i Duncan 1994].

Celem pracy było zbadanie możliwości naturalnego wiązania magnezu przez komórki drożdży piwowskich *Saccharomyces cerevisiae* w zależności od stężenia jonów Mg^{2+} w podłożu i rodzaju zastosowanej soli w warunkach hodowli stacjonarnej.

Zakres badań obejmował:

– określenie wpływu rodzaju soli magnezu i jej stężenia w podłożu na plon biomasy drożdży piwowskich *S. cerevisiae* Nr 1,

– określenie zdolności wiązania jonów Mg^{2+} przez drożdże piwowskie *S. cerevisiae* Nr 1 w zależności od dodanej soli i jej dawki, a także ustalenie najlepszego, z punktu widzenia ilości wiązanego magnezu z komórkami, momentu wprowadzenia badanych soli do podłoża hodowlanego w warunkach doświadczenia.

MATERIAŁ I METODYKA PRACY

Material biologiczny

W niniejszej pracy zastosowano szczep drożdży piwowskich *Saccharomyces cerevisiae* Nr 1 pochodzący z kolekcji czystych kultur Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie. Drożdże przechowywano na skosach brzezkowych w temperaturze 4°C i co 4 tygodnie przeszczepiano na świeże skosy.

Inoculum przygotowano szczepiąc materiałem ze skosu płynne podłoże YPD. Hodowlę prowadzono przez 24 godziny w temperaturze 28°C na wstrząsarce ROSI 1000 (Thermolyne, USA) przy 200 rpm. Uzyskane *inoculum* stanowiło wyjściowy materiał do zaszczerpienia płynnych podłoży kontrolnych i doświadczalnych w danej serii badań.

Podłoża mikrobiologiczne

Brzeczka z agarem [Burbianka i Pliszka 1983] służyła do przechowywania drożdży *S. cerevisiae* Nr 1.

Podłoże YPD z 2-procentowym agarem [Suizu i in. 1994, Blackwell i in. 1997] stosowano do liczenia drożdży metodą płytkową w czasie wzrostu badanego szczepu *S. cerevisiae* Nr 1 na podłożu kontrolnym.

Jako **podłoże kontrolne** do hodowli stacjonarnej drożdży stosowano płynne podłoże YPD.

Jako **podłoża doświadczalne** zastosowano płynne podłoża YPD wzbogacone w jony Mg^{2+} pochodzące z dwóch związków: $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ lub $MgSO_4 \cdot 7H_2O$. Przyjęto trzy poziomy dodatku soli magnezu tak, aby zawartość magnezu w podłożach wynosiła 0,25 g/dm³, 0,50 g/dm³ i 1,25 g/dm³.

Hodowla drożdży na podłożach kontrolnych i doświadczalnych wzbogaconych w jony magnezu

Celem wzbogacenia w magnez komórek drożdży piwowskich *S. cerevisiae* zastosowano dwa warianty hodowli na płynnych podłożach doświadczalnych:

Wariant I – magnez dodawano do podłoża YPD w postaci soli $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ lub $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ na początku hodowli. Wariant ten oznaczono jako **t = 0**.

Wariant II – magnez dodawano do podłoża YPD w postaci soli $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ lub $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ pod koniec fazy logarymicznego wzrostu drożdży. Wariant ten oznaczono jako $t = 24$.

Hodowle drożdży na podłożach doświadczalnych prowadzono metodą stacjonarną (bez napowietrzania) w temperaturze $28^\circ C$ przez 48 godzin. Równolegle przeprowadzono hodowle badanego szczepu drożdży na podłożu kontrolnym YPD (bez dodatku magnezu). Wykonano co najmniej trzy serie badań obejmujące każdy z wymienionych wariantów hodowli. W trakcie doświadczenia kontrolowano plon biomasy komórek drożdży oraz zawartość magnezu w biomacie komórkowej. Oznaczenia przeprowadzono w 0, 24 i 48 godzinie hodowli dla wariantu I, a dla wariantu II w 24 i 48 godzinie hodowli, ponieważ na początku hodowli w wariantcie II plon biomasy i zawartość magnezu w biomacie były takie same jak w hodowli na podłożu kontrolnym (sole magnezu w wariantcie II dodawano do płynnych podłoży YPD dopiero po 24 godzinach, tj. pod koniec fazy wzrostu logarymicznego).

CZĘŚĆ ANALITYCZNA

Oznaczenie liczby komórek drożdży

Liczbę komórek drożdży oznaczano podczas wzrostu populacji szczepu piwowarskiego *S. cerevisiae* Nr 1 na podłożu kontrolnym YPD. Badano wzrost drożdży w trakcie 72-godzinnej hodowli stacjonarnej. Liczbę komórek drożdży określano metodą płytkową, posiewając wgłębnie na podłożu YPD z 2-procentowym agarem po 1 cm^3 z trzech kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych [Burbianka i Pliszka 1983].

Oznaczenie gęstości optycznej (OD)

Oznaczenie gęstości optycznej wykonywano w celu ustalenia orientacyjnej liczby komórek drożdży w *inoculum* i podłożach hodowlanych. Pomiar OD przeprowadzono na spektrofotometrze (Spectronic 20 Genesys, USA) przy długości fali 600 nm w czasie hodowli stacjonarnej na podłożu kontrolnym YPD [Pasternakiewicz i Tuszyński 1997].

Oznaczenie plonu biomasy komórkowej drożdży

Plon biomasy komórkowej oznaczano poprzez pobranie do zważonej gilzy 8 cm^3 płynu pohodowlanego i odwirowanie przez 10 minut przy 3500 obr./min (wirówka MPW-365, Polska). Płyn z nad osadu zlewano, a biomasę komórkową ważono. Mokry osad suszono wstępnie w temperaturze $60^\circ C$ przez 2 godziny, po czym dosuszano w temperaturze $105^\circ C$ do uzyskania stałej masy. Wynik podawano w gramach suchej substancji na decymetr sześcienny (g s.s. na dm^3) podłoża.

Oznaczenie zawartości magnezu w biomacie komórkowej drożdży metodą absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej (ASA)

Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży oznaczano po 0, 24 i 48 godzinach prowadzenia hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych. Odwirowanie

waną, wysuszoną i zważoną biomasę drożdżową z poszczególnych hodowli mineralizowano spalając w mieszaninie kwasów azotowego i nadchlorowego. W tak przygotowanych próbkach określano zawartość magnezu metodą ASA (spektrofotometr Schimadzu AA660, Japonia) [Bryłka i in. 1995]. Absorbancję mierzono przy długości fali równej 285,2 nm. Otrzymane wyniki wyrażono w miligramach Mg^{2+} na gram suchej substancji biomasy drożdży.

Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej, którą przeprowadzono za pomocą pakietu statystycznego Statgraphics Plus wersja 4.1. Badano istotność wpływu różnych dawek jonów Mg^{2+} w podłożach na plon biomasy oraz zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży. Przeprowadzono analizę wariancji, testem Tukey'a dla sprawdzenia istotności różnic (alfa = 0,05) wartości średnich. Wyniki analizy statystycznej zamieszczono w tabelach 2-8.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Wzrost drożdży piwowarskich *S. cerevisiae* Nr 1 na podłożu kontrolnym YPD

Celem tego etapu pracy było określenie przybliżonego czasu zakończenia fazy logarytmicznego wzrostu drożdży piwowarskich *S. cerevisiae* Nr 1 na podłożu kontrolnym YPD w hodowli stacjonarnej (bez napowietrzania). Podłoże szczepiono 24-godzinnym *inoculum* w ilości 10% (v/v), po czym oznaczano liczbę komórek w czasie 72-godzinnej hodowli. Aby zagwarantować wprowadzenie do podłoża możliwie jednakowej liczby komórek drożdży hodowlę *inoculum* na płynnym podłożu YPD prowadzono do uzyskania ściśle określonej wartości gęstości optycznej wynoszącej 2,00 (zwykle po 24 godzinach hodowli wgłębnej).

Z danych literaturowych [Blackwell i in. 1995] wyraźnie wynika, że wiązanie jonów metali przez drożdże wiąże się z ich aktywnością życiową, a zatem z fazą wzrostu komórek. Z tego powodu w dalszej części badań równoległe do serii, w których magnez wprowadzono do podłoża doświadczalnego YPD na początku hodowli (wariant I, t = 0) wykonano serie, w których podłoże hodowlane wzbogacano w jony Mg^{2+} wówczas, gdy liczba komórek drożdży była największa (wariant II, t = 24). Teoretycznie wiadomo, że taki moment pojawia się na końcu logarytmicznej fazy wzrostu.

W tabeli 1 pokazano zmiany liczby komórek drożdży piwowarskich i gęstości optycznej podłoża kontrolnego YPD zaszczerzonego 24-godzinnym *inoculum* w czasie 72-godzinnej hodowli stacjonarnej. Największą liczbę komórek wynoszącą $2,5 \cdot 10^8$ jtk/cm³ odnotowano po 24 godzinach hodowli. Po tym czasie wzrost drożdży stawał się coraz słabszy i po 30 godzinach stabilizował się na poziomie $1,3 \cdot 10^8$ jtk/cm³, aż do momentu zakończenia hodowli. Podobnie przebiegały zmiany gęstości optycznej, której maksymalną wartość (1,39) stwierdzono także w 24 godzinie hodowli. W kolejnych godzinach OD ulegało nieznacznemu spadkowi, po czym utrzymywało się na jednakowym poziomie (1,3) do końca doświadczenia. Uzyskane wyniki potwierdziły przyjęte wcześniej założenie określające w przybliżeniu zakończenie fazy wzrostu logarytmicznego szczepu piwowarskiego *S. cerevisiae* Nr 1 w około 24 godzinie hodowli stacjonarnej.

Tabela 1. Zmiany liczby komórek drożdży piwowarskich *S. cerevisiae* oraz gęstości optycznej (OD) podłoża pohodowlanego w kolejnych godzinach hodowli stacjonarnej na standardowej pożywce YPD

Table 1. Changes in the cfu of *S. cerevisiae* cells and optical density (OD) during cultivation (without aeration) in the control medium YPD

Czas hodowli, h Cultivation time, h	Liczba komórek, jtk/cm ³ Cells, cfu	Gęstość optyczna, OD Optical density, OD
0	1,0·10 ⁷	0,46
2	1,3·10 ⁷	0,58
4	1,9·10 ⁷	0,86
6	5,0·10 ⁷	1,13
24	2,5·10 ⁸	1,39
30	1,2·10 ⁸	1,36
48	1,3·10 ⁸	1,30
72	1,3·10 ⁸	1,30

Wpływ jonów magnezu na plon biomasy komórkowej drożdży *S. cerevisiae* Nr 1

W tej części badań oceniano, w jaki sposób jony Mg²⁺, pochodzące z dwóch różnych soli, wpływały na wielkość uzyskanego plonu biomasy komórkowej drożdży piwowarskich. Przeprowadzono analizę statystyczną określającą, czy zastosowane dawki magnezu wpływały istotnie na przyrost biomasy. Uzyskane wyniki w I i II wariancie hodowli przedstawiono w tabelach 2-4.

Tabela 2. Plon biomasy komórkowej drożdży piwowarskich *S. cerevisiae* podczas hodowli stacjonarnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w MgCl₂·6H₂O (wariant I, t = 0)
Table 2. Yield of *S. cerevisiae* biomass during the cultivation (without aeration) in the control and experimental media enriched with MgCl₂·6H₂O (variant I, t = 0)

Rodzaj podłoża Medium type	Czas hodowli, h Cultivation time, h		
	0	24	48
	plon biomasy, g s.s./dm ³ yield of biomass, g of d.w./dm ³		
YPD (kontrolne – control)	1,29a*	2,60b	2,96bc
YPD + 0,25 g Mg ²⁺ /dm ³	1,12a	3,12bc	3,07bc
YPD + 0,50 g Mg ²⁺ /dm ³	1,15a	4,20d	3,21c
YPD + 1,25 g Mg ²⁺ /dm ³	1,25a	3,81d	3,21c

*Te same litery oznaczają brak istotnej różnicy.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Najwyższe plony biomasy komórkowej drożdży z podłoży doświadczalnych wzbogaconych w jony Mg²⁺ według wariantu I (niezależnie od zastosowanej soli) stwierdzono w 24 godzinie hodowli (tab. 2-3). W warunkach hodowli metodą stacjonarną (bez napowietrzania) drożdże intensywnie rozmnażały się do momentu wyczerpania zapasów tlenu w podłożu. Należy sądzić, że po 24 godzinach hodowli na skutek coraz bardziej ograni-

czonęgo dostępu tlenu i wzrastającego stężenia etanolu komórki drożdży zaczynały obumierać. Wyrazem tych zmian środowiskowych było obniżenie plonu biomasy komórkowej po 48 godzinach (tab. 2-3). Porównanie plonów biomasy z podłoży kontrolnych i doświadczalnych sugeruje, że dodatek Mg^{2+} powodował szybsze namnożenie biomasy, chociaż obserwowane różnice nie zawsze były statystycznie istotne.

Największy plon biomasy uzyskano po 24 godzinach hodowli z podłoży doświadczalnych zawierających 0,50 g jonów Mg^{2+}/dm^3 . Wynosił on odpowiednio 4,20 g s.s./ dm^3 podłoża dla soli $MgCl_2$ (tab. 2) i 3,60 g s.s./ dm^3 podłoża dla soli $MgSO_4$ (tab. 3). W obu wypadkach otrzymana ilość biomasy komórkowej z podłoży doświadczalnych była istotnie większa niż ta, którą uzyskano z podłoża kontrolnego. Ze względu na wyższe plony biomasy z podłoży zawierających $MgCl_2$ niż $MgSO_4$ (dla dawek jonów Mg^{2+} 0,50 g/ dm^3 i 1,25 g/ dm^3) wariant II hodowli ograniczono jedynie do soli chlorkowej.

Tabela 3. Plon biomasy komórkowej drożdży piwowskich *S. cerevisiae* podczas hodowli stacjonarnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (wariant I, t = 0)
Table 3. Yield of *S. cerevisiae* biomass during the cultivation (without aeration) in the control and experimental media enriched with $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (variant I, t = 0)

Rodzaj podłoża Medium type	Czas hodowli, h Cultivation time, h		
	0	24	48
	plon biomasy, g s.s./ dm^3 yield of biomass, g of d.w./ dm^3		
YPD (kontrolne – control)	1,15a*	2,72b	3,05b
YPD + 0,25 g Mg^{2+}/dm^3	1,18a	3,25bc	2,89b
YPD + 0,50 g Mg^{2+}/dm^3	1,24a	3,60c	2,97b
YPD + 1,25 g Mg^{2+}/dm^3	1,18a	3,19b	3,16b

*Te same litery oznaczają brak istotnej różnicy.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Tabela 4. Plon biomasy komórkowej drożdży piwowskich *S. cerevisiae* podczas hodowli stacjonarnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (wariant II, t = 24)
Table 4. Yield of *S. cerevisiae* biomass during the cultivation (without aeration) in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (variant II, t = 24)

Rodzaj podłoża Medium type	Czas hodowli, h Cultivation time, h	
	24	48
	plon biomasy, g s.s./ dm^3 yield of biomass, g of d.w./ dm^3	
YPD (kontrolne – control)	3,19a*	3,37a
YPD + 0,25 g Mg^{2+}/dm^3	3,34a	3,15a
YPD + 0,50 g Mg^{2+}/dm^3	3,31a	3,23a
YPD + 1,25 g Mg^{2+}/dm^3	3,33a	3,33a

*Te same litery oznaczają brak istotnej różnicy.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Podczas hodowli drożdży na podłożu YPD z dodatkiem $MgCl_2$ wprowadzonym po 24 godzinach według wariantu II (tab. 4), a więc po zakończeniu fazy wzrostu logarymicznego, uzyskane plony biomasy komórkowej nie odbiegały w sposób istotny od ilości biomasy drożdży piwowarskich z podłoża kontrolnego.

Podsumowując tę część badań można stwierdzić, że zastosowanie wariantu I polegającego na dodatku jonów Mg^{2+} w postaci soli chlorkowej na początku hodowli stacjonarnej dawało lepsze rezultaty niż wariantu II. Jednocześnie należy podkreślić, że zastosowanie w obu wariantach hodowli wzrastającego stężenia jonów Mg^{2+} w podłożach doświadczalnych (0,25; 0,50; 1,25 g/dm³) nie powodowało zahamowania wzrostu badanego szczepu drożdży w stosunku do hodowli na podłożu kontrolnym.

Podobne wyniki uzyskali Pasternakiewicz i Tuszyński [1997], którzy stwierdzili, że dodatek magnezu do brzezki hodowlanej w ilości 0,1-1,2 g Mg^{2+} /dm³ podłoża nie powodował obniżenia plonu biomasy w porównaniu z biomasą drożdży hodowanych na brzezce bez dodatkowego źródła tego pierwiastka. Wyniki doświadczeń otrzymane w tej części badań są również zbieżne z doniesieniami innych autorów [Rees i Steward 1997, 1999, Soral-Śmietana i in. 1999], którzy podają, że toksyczna dawka magnezu dla drożdży jest wysoka i całkowite zahamowanie wzrostu następuje przy zawartości około 25 g Mg^{2+} /dm³ podłoża. Zastosowane w niniejszej pracy stężenia jonów magnezu mieściły się w przedziale optymalnym dla wzrostu szczepu piwowarskiego drożdży *S. cerevisiae* Nr 1, co stwarzało szansę uzyskania w dalszej części badań trwałego związku magnezu z komórkami i jednocześnie utrzymanie wysokiego plonu biomasy.

Badanie zdolności wiązania magnezu przez komórki drożdży *S. cerevisiae* z podłoży kontrolnych i doświadczalnych

Wiązanie jonów metali, w tym Mg^{2+} , z komórkami drożdży ma w początkowej fazie tego procesu charakter sorpcji, uwarunkowanej strukturą ściany komórkowej i w zasadzie niezależnej od metabolizmu. W przeciwieństwie do tego etapu włączenie zaadsorbowanego magnezu w wewnątrzkomórkowe biopleksy wymaga aktywnego transportu przebiegającego z udziałem białkowych przenośników [MacDiarmid i Gardner 1998].

Przeprowadzone badania miały na celu sprawdzenie zdolności wiązania magnezu przez badany szczep drożdży piwowarskich w zależności od dawki jonu i rodzaju soli magnezu wprowadzonej do podłoża doświadczalnego.

Zawartość magnezu w biomasie komórkowej drożdży hodowanych metodą stacjonarną na podłożu kontrolnym i podłożach doświadczalnych oznaczano w wariancie I bezpośrednio po ich dodaniu oraz po 24 i 48 godzinach, natomiast w wariancie II po 24 i 48 godzinach.

Do określenia trwałości związku tego pierwiastka ze strukturami komórkowymi drożdży równolegle prowadzono próby, w których biomasę przed oznaczeniem w niej zawartości magnezu dwukrotnie przemywano wodą dejonizowaną. Woda, mająca charakter dipolowy, miała za zadanie usunięcie tej części jonów magnezu, które nie wniknęły do wnętrza komórki na drodze aktywnego transportu, lecz jedynie luźno zaadsorbowały się na ścianie komórkowej drożdży lub też znajdowały się w przestrzeniach międzykomórkowych biomasy drożdżowej.

Uzyskane rezultaty, po opracowaniu statystycznym, przedstawiono w tabelach 5-7. Wyniki badań wskazują na znaczne różnice zawartości magnezu w biomasie przemywanej i nie przemywanej wodą dejonizowaną. Skłania to do przyjęcia hipotezy, iż tylko część magnezu w warunkach doświadczenia była aktywnie transportowana do wnętrza

komórek i wiązana z ich strukturami, natomiast pozostałe jony Mg^{2+} podlegały jedynie adsorpcji na powierzchni ściany komórkowej drożdży. Im więcej magnezu znajdowało się w podłożu doświadczalnym, tym większa jego ilość ulegała luźnemu połączeniu ze ścianą komórkową (np. w nie przemywanej biomase z podłoża doświadczalnego z dodatkiem $1,25 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$ w formie soli chlorkowej zawartość magnezu była przeszło 5 razy większa niż z podłoża kontrolnego i wynosiła odpowiednio $16,55 \text{ mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$ i $2,91 \text{ mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$). Związanie jonów Mg^{2+} z biomasa komórkową było jednak na tyle nietrwałe, iż w wyniku dwukrotnego przemywania wodą dejonizowaną magnez odłączył się od komórek i przechodził do podłoża. Jego zawartość w przemywanej biomacie komórkowej (w hodowli na podłożu doświadczalnym wzbogaconym w $1,25 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$ w postaci chlorku) spadła do poziomu $6,99 \text{ mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$, co wobec początkowej zawartości wynoszącej $16,55 \text{ mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$ stanowiło zaledwie 42% (tab. 5).

Tabela 5. Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży piwowskich *S. cerevisiae* podczas hodowli stacjonarnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (wariant I, $t = 0$)

Table 5. Yield of *S. cerevisiae* biomass during the cultivation (without aeration) in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (variant I, $t = 0$)

Rodzaj podłoża Medium type	Czas hodowli, h Cultivation time, h					
	0	24	48	0	24	48
	biomasa bez przemywania $\text{mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$ biomass without washing $\text{mg } Mg^{2+}/g \text{ of d.w.}$			biomasa z przemywaniem $\text{mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$ biomass with washing $\text{mg } Mg^{2+}/g \text{ of d.w.}$		
YPD (kontrolne – control)	2,91AB*	2,73AB	2,68A	2,91a*	2,73a	2,68a
YPD + $0,25 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$	6,96C	5,23ABC	3,99AB	5,38ab	5,08ab	3,48a
YPD + $0,50 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$	12,49DE	7,67C	5,64BC	6,73bc	5,22abc	3,35a
YPD + $1,25 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$	16,55F	15,01EF	10,64D	6,99c	5,28abc	3,92b

*Te same litery oznaczają brak istotnej różnicy.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Celem pracy było uzyskanie drożdży, które związałyby magnez w sposób trwały, zatem szczególną uwagę poświęcono zawartości magnezu w komórkach drożdży przemywanych wodą dejonizowaną (po odwirowaniu biomasy z hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych). Wyniki zawartości magnezu w drożdżach nie przemywanych traktowano jako dane pomocnicze, bowiem dotyczyły magnezu luźno związanego ze strukturami komórkowymi *S. cerevisiae*. Taki sposób powiązania magnezu z komórkami nie stwarzał szansy na utworzenie trwałych połączeń z białkami określanymi jako biopleksy albo metalobiałka. Wobec tego omówienie wyników przedstawionych poniżej dotyczy zawartości magnezu w biomacie przemywanej.

W wariantcie I hodowli stacjonarnej (tab. 5-6) zaobserwowano, że na ogół najwięcej magnezu w biomacie gromadziło się bezpośrednio po wprowadzeniu komórek drożdży do podłoża doświadczalnych. W warunkach doświadczenia logarytmiczna faza wzrostu drożdży piwowskich rozpoczynała się bezpośrednio po wprowadzeniu 10% (v/v) *inoculum*. Może to oznaczać, że drożdże w fazie logarytmicznego wzrostu mają duże

zapotrzebowanie na magnez, zaś w fazach opóźnionego wzrostu i stacjonarnej komórki uwalniają część tego pierwiastka do podłoża. Szybkie wchłanianie magnezu w fazie logarytmicznego wzrostu spowodowane jest żywotnością komórek, które intensywnie pączkują. Na tym etapie niezbędnym czynnikiem dla namnażających się drożdży jest obecność w środowisku jonów Mg^{2+} [Walker i Duffus 1980, Walker 1994, Blackwell i in. 1995]. Pierwiastek ten uczestniczy w syntezie DNA [Cameron i Smith 1989] aktywując polimerazę DNA, która jest enzymem odpowiedzialnym za proces replikacji materiału genetycznego.

Tabela 6. Zawartość magnezu w biomase komórkowej drożdży piwowarskich *S. cerevisiae* podczas hodowli stacjonarnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (wariant I, t = 0)

Table 6. Yield of *S. cerevisiae* biomass during the cultivation (without aeration) in the control and experimental media enriched with $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (variant I, t = 0)

Rodzaj podłoża Medium type	Czas hodowli, h Cultivation time, h					
	0			24		
	0	24	48	0	24	48
	biomasa bez przemywania mg Mg^{2+} /g s.s. biomass without washing mg Mg^{2+} /g of d.w.			biomasa z przemywaniem mg Mg^{2+} /g s.s. biomass with washing mg Mg^{2+} /g of d.w.		
YPD (kontrolne – control)	3,10A*	2,51A	2,84A	3,10ab*	2,51a	2,84ab
YPD + 0,25 g Mg^{2+} /dm ³	5,13AB	4,12AB	3,29A	3,19ab	3,78ab	2,70ab
YPD + 0,50 g Mg^{2+} /dm ³	10,54D	6,48BC	4,91AB	5,63c	3,55ab	2,74ab
YPD + 1,25 g Mg^{2+} /dm ³	15,19E	10,05D	9,28CD	4,61bc	4,15bc	3,08ab

*Te same litery oznaczają brak istotnej różnicy.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono znaczący wpływ zastosowanych dawek soli magnezu w podłożu doświadczalnym na jego związanie z biomasą komórkową.

W metodzie stacjonarnej (źródło $MgCl_2$) najczęściej trwale związanego magnezu – 6,99 mg Mg^{2+} /g s.s. – otrzymano w I wariantie hodowli po zastosowaniu dawki 1,25 g/dm³ (tab. 5). Zawartość Mg^{2+} w biomase komórkowej z hodowli na tym podłożu była istotnie wyższa niż z hodowli kontrolnej i doświadczalnej wzbogaconej w 0,25 g Mg^{2+} /dm³. Ilość magnezu trwale związanego z komórkami drożdży (6,99 mg Mg^{2+} /g s.s.) blisko 2,5-krotnie przewyższała wynik jaki uzyskano dla biomasy z hodowli na podłożu kontrolnym (2,91 mg Mg^{2+} /g s.s.).

W metodzie stacjonarnej (źródło $MgSO_4$) najczęściej trwale związanego magnezu – 5,63 mg Mg^{2+} /g s.s. – otrzymano z hodowli, w której zastosowano dawkę 0,5 g Mg^{2+} /dm³ (tab. 6). Podobnie jak w wypadku soli chlorkowej ilość jonów Mg^{2+} trwale związanych z komórkami drożdży była istotnie wyższa niż w biomase z hodowli na podłożu kontrolnym oraz doświadczalnym, wzbogaconym w 0,25 g Mg^{2+} /dm³. Zawartość magnezu w biomase z podłoża kontrolnego (3,10 mg Mg^{2+} /g s.s.) była prawie 2-krotnie niższa w porównaniu z biomasą komórkową z podłoża doświadczalnego z dodatkiem 0,5 g Mg^{2+} /dm³, która wynosiła 5,63 mg Mg^{2+} /g s.s.

Tuszyński i Pasternakiewicz [2000] podają, że zawartość magnezu w biomacie po 40 godzinach hodowli wglębnej na podłożu zawierającym 20 mM jonów Mg^{2+} (tj. ok. $0,5 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$) wynosiła ok. 2 mg/g s.s. W niniejszej pracy, po zastosowaniu tej samej dawki magnezu po 48 godzinach hodowli stacjonarnej otrzymano nieco wyższe wyniki. Stosując jako źródło magnezu sól $MgCl_2$ uzyskano $3,35 \text{ mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$ (tab. 5), zaś dla drugiej soli ($MgSO_4$) uzyskano $2,74 \text{ mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$ biomasy drożdży (tab. 6). Różnice te mogły wynikać z zastosowania w badaniach przez wymienionych autorów wglębnej, a nie stacjonarnej metody hodowli, innego źródła magnezu ($MgNO_3$) lub innego podłoża doświadczalnego (brzeczka piwna).

Ilość magnezu trwale związanego z biomasa komórkową ze wszystkich hodowli na podłożach doświadczalnych wzbogaconych w sól chlorkową była większa niż z hodowli w których magnez dodano w formie siarczanu (tab. 5-6). Dla dawki $1,25 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$ w postaci $MgCl_2$ uzyskano $6,99 \text{ mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$ biomasy drożdży, podczas gdy dla analogicznej hodowli z $MgSO_4$ zaledwie $4,10 \text{ mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$

W związku z tym w wariancie II hodowli (dodatek magnezu do podłoża doświadczalnego YPD pod koniec fazy wzrostu logarytmicznego drożdży) odstąpiono od stosowania $MgSO_4$ jako źródła magnezu.

Celem prowadzenia kolejnych hodowli na podłożach doświadczalnych było sprawdzenie, czy dodatek magnezu pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu wpłynie na efektywność jego wiązania z komórkami drożdży (tab. 7). Biorąc pod uwagę magnez trwale związany ze strukturami drożdży, najwięcej tego pierwiastka gromadziło się w biomacie komórkowej po 48 godzinach hodowli dla dawki $0,5 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$ podłoża doświadczalnego. Uzyskany wynik, $3,48 \text{ mg } Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$, był istotnie większy od zawartości magnezu w biomacie z hodowli kontrolnej. Podobnie dawka, $1,25 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$, wpływała istotnie na ilość magnezu w biomacie przemywanej w stosunku do próby kontrolnej. Jednocześnie należy zaznaczyć, że stwierdzone różnice pomiędzy zawartością magnezu w biomacie z podłoża doświadczalnych zawierających $0,5 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$ oraz $1,25 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$ nie należały do istotnych.

Tabela 7. Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży piwowskich *S. cerevisiae* podczas hodowli stacjonarnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (wariant II, t = 24)

Table 7. Yield of *S. cerevisiae* biomass during the cultivation (without aeration) in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (variant II, t = 24)

Rodzaj podłoża Medium type	Czas hodowli, h Cultivation time, h			
	24		48	
	biomasa bez przemywania mg $Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$ biomass without washing mg $Mg^{2+}/g \text{ of d.w.}$	1,76A	biomasa z przemywaniem mg $Mg^{2+}/g \text{ s.s.}$ biomass with washing mg $Mg^{2+}/g \text{ of d.w.}$	1,76a
YPD (kontrolne – control)	1,69A*	1,76A	1,69a*	1,76a
YPD + $0,25 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$	4,43BC	3,94B	2,52bc	2,43ab
YPD + $0,50 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$	7,83D	5,87C	2,92bc	3,48c
YPD + $1,25 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$	12,62E	13,12E	3,19c	2,82bc

*Te same litery oznaczają brak istotnej różnicy.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Próby wzbogacenia w magnez biomasy komórkowej drożdży piwowarskich realizowane według wariantu II hodowli stacjonarnej nie spowodowały trwałego związania z komórkami większej ilości jonów Mg^{2+} z podłoża doświadczalnych niż w wariacie I.

Uzyskane rezultaty potwierdzają, że magnez potrzebny jest drożdżom do wzrostu szczególnie w początkowych godzinach prowadzenia hodowli. Wraz z upływem czasu, po zakończeniu fazy logarytmicznego wzrostu, część magnezu może być uwalniana z komórek do podłoża, prawdopodobnie w wyniku postępujących procesów autolizy lub też pewnych mechanizmów obronnych drożdży, które mają zapobiec ich nadmiernemu wysyceniu magnezem. Wydaje się, iż w warunkach doświadczenia maksymalne, możliwe do uzyskania wysycenie magnezem biomasy komórek drożdży piwowarskich *S. cerevisiae* Nr 1 wynosiło ok. 7 mg Mg^{2+} /g s.s.

Podstawowym zamierzeniem pracy, co podkreślano wcześniej, było trwale wzbogacenie komórek drożdży piwowarskich w magnez przy jednoczesnym utrzymaniu wysokiego plonu biomasy, porównywalnego z hodowlą na standardowym podłożu YPD. Praktyczne zastosowanie biomasy komórkowej drożdży piwowarskich jako potencjalnego źródła biopleksów wymaga bowiem równoczesnego spełnienia tych dwóch warunków. Wydaje się, iż dobrym wskaźnikiem łączącym zarówno magnez związany z komórkami drożdży, jak i plon biomasy może być ich iloczyn. W tabeli 8 przedstawiono zawartość magnezu związanego z komórkami drożdży piwowarskich *S. cerevisiae* Nr 1 w 1 dm³ podłoża kontrolnego i podłoża doświadczalnych wzbogaconych w sól chlorkową według wariantu I. W tym wariacie hodowli stacjonarnej odnotowano najwyższy plon biomasy i największą ilość jonów Mg^{2+} związanych trwale z komórkami drożdży (tab. 2 i 5). Podobnie jak wcześniejsze wyniki, interpretacji poddano tylko te, które pochodziły z hodowli otrzymanych po przemyciu drożdży wodą dejonizowaną. Najlepszy rezultat, tj. 15,20 mg Mg^{2+} /dm³ podłoża stwierdzono po 24-godzinnej hodowli z najwyższym (1,25 g/dm³) dodatkiem magnezu w postaci $MgCl_2$. Wynik ten był istotnie wyższy od tego, jaki uzyskano z hodowli na podłożu kontrolnym, jednak nie różnił się statystycznie od wyników z hodowli na pozostałych podłożach doświadczalnych.

Tabela 8. Zawartość magnezu związanego z komórkami drożdży piwowarskich *S. cerevisiae* podczas hodowli stacjonarnej w 1 dm³ podłoża kontrolnego i podłoża doświadczalnych wzbogaconych w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (wariant I, t = 0)

Table 8. Yield of *S. cerevisiae* biomass during the cultivation (without aeration) in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (variant I, t = 0)

Rodzaj podłoża Medium type	Czas hodowli, h Cultivation time, h					
	0	24	48	0	24	48
	biomasa bez przemywania mg Mg^{2+} /g s.s. biomass without washing mg Mg^{2+} /g of d.w.			biomasa z przemywaniem mg Mg^{2+} /g s.s. biomass with washing mg Mg^{2+} /g of d.w.		
YPD (kontrolne – control)	3,70A*	7,10AB	7,90ABC	3,70a*	7,10abd	7,90abd
YPD + 0,25 g Mg^{2+} /dm ³	7,80ABC	16,30BCD	12,30ABCD	4,40ab	14,80c	9,40bd
YPD + 0,50 g Mg^{2+} /dm ³	14,40BCD	32,20E	18,10CD	5,00ab	14,80c	9,40bd
YPD + 1,25 g Mg^{2+} /dm ³	20,70D	57,19F	34,20E	4,10a	15,20c	11,00cd

*Te same litery oznaczają brak istotnej różnicy.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Podsumowując warto zwrócić uwagę na to, że wiązanie jonów Mg^{2+} zawartych w podłożach doświadczalnych z komórkami drożdży następowało prawie natychmiast po wprowadzeniu *inoculum* i osiągało wtedy wartość maksymalną (czas od momentu zaszczerpienia podłoży do odwirowania biomasy potrzebnej do oznaczenia zawartości Mg^{2+} wynosił około 10 minut). W trakcie prowadzenia hodowli stacjonarnych na podłożach kontrolnych i doświadczalnych według wariantu I stwierdzano wzrost plonu biomasy (dynamiczny przez 24 godziny, czyli do zakończenia fazy logarytmicznej) oraz systematyczny spadek zawartości magnezu w komórkach drożdży. Można przypuszczać, iż dobrym rozwiązaniem byłoby wprowadzenie do podłoży doświadczalnych znacznie większej liczby komórek, np. w postaci gęstwy drożdżowej, co nie wymagałoby czasu potrzebnego do namnożenia biomasy.

WNIOSKI

Uzyskane wyniki badań mogą być podstawą do sformułowania następujących stwierdzeń i wniosków:

1. Drożdże piwowskie *S. cerevisiae* Nr 1 wykazały zdolność trwałego i szybkiego wiązania jonów Mg^{2+} z podłoży doświadczalnych wzbogaconych w ten pierwiastek (w postaci chlorku lub siarczanu) w warunkach hodowli stacjonarnej.

2. Najwięcej magnezu trwale związanego z biomasą komórkową drożdży piwowskich *S. cerevisiae* Nr 1, 15,20 mg Mg^{2+}/dm^3 , uzyskano z 24-godzinnej hodowli na podłożu doświadczalnym z dodatkiem 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 w formie soli chlorkowej.

3. Zastosowane dawki magnezu w podłożach doświadczalnych, 0,25, 0,50 i 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 , nie wpłynęły na obniżenie plonu biomasy komórkowej *S. cerevisiae* Nr 1 w porównaniu z hodowlą na standardowym podłożu YPD.

4. Uzyskane wyniki badań sugerują możliwość zwiększenia efektywności wiązania magnezu z komórkami drożdży piwowskich poprzez zwiększenie dawki magnezu w podłożach doświadczalnych oraz zastosowanie większej ilości *inoculum*.

PIŚMIENNICTWO

- Birch R.M., Walker G.M., 2000. Influence of magnesium ions on heat shock into *S. cerevisiae* cell by hypotonic downshift. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 26, 678-687.
- Blackwell K.J., Tobin J.M., Avery S.W., 1997. Manganese uptake and toxicity in magnesium – supplemented and unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 47, 180-184.
- Blackwell K.J., Singleton I., Tobin J.M., 1995. Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 579-584.
- Brady D., Duncan J., 1994. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41, 149-154.
- Bryłka J., Więckowska E., Lewandowski W., Stępnik S., Bortnowska-Bareła B., 1995. Eksperymentalna chemia fizyczna. Wyd. SGGW Warszawa.
- Brzozowska A., 1998. Składniki mineralne w żywieniu człowieka. PWN Warszawa.
- Burbianka M., Pliszka A., 1983. Mikrobiologia żywności. PZWL Warszawa.
- Cameron I., Smith N., 1989. Cellular concentration of magnesium and other ions on relation to protein synthesis, cell proliferation and cancer. *Magnesium – Bull.*, 8, 31-44.

- Jones R., Greenfield P., 1984. A review of yeast nutrition: growth and fermentation requirements. *Proc. Biochem.*, 4, 48-54.
- Krejpcio Z., Czarnocińska J., Kolanko M., Gawęcki J., Wójciak R., Filipowski P., 1999. Ocena bioprzyzwajalności magnezu z soli mleczkowej. *Biul. Magnezol.*, 4 (1), 116-122.
- Lipke P.N., Ovalle R., 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.*, 180 (15), 3735-3740.
- Lo W., Chua H., Lam K.H., 1999. A comparative investigation in the biosorption of lead by filamentous fungal biomass. *Chemosphere*, 39 (15), 2723-2726.
- MacDiarmid C.W., Gardner R.C., 1998. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminium ion. *J. Biol. Chem.*, 273 (3), 1727-1732.
- Mardarowicz L., 1997. Drożdże w żywieniu drobiu. *Polskie drobiarstwo*, 9.
- Ołędzka R., 1999. Wchłanianie magnezu. *Biul. Magnezol.*, 4 (2), 229-235.
- Pasternak K., 1999. Magnez w fizjologii człowieka. *Biul. Magnezol.*, 4 (2), 480-485.
- Pasternakiewicz A., Tuszyński T., 1997. Effects of calcium, magnesium, cobalt (III) and zinc cations on the *Saccharomyces cerevisiae* growth. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 47 (4), 61-70.
- Rees M., Steward G., 1997. The effects of increased magnesium and calcium concentration on yeast fermentation performance in high gravity worts. *J. Inst. Brew.*, 103, 287-291.
- Rees M., Steward G., 1999. Effects of magnesium, calcium and wort oxygenation on the fermentative performance of Ale and Lager strains fermenting normal and high gravity worts. *J. Inst. Brew.*, 105 (4), 211-217.
- Soral-Śmietana M., Wronkowska M., Świigoń A., Kłębukowska L., 1999. Biopierwiastki – możliwości tworzenia kompleksów z polimerami organicznymi. *Biul. Magnezol.*, 4 (2), 418-423.
- Suizu T., Tsutsumi H., Kawado A., Imayasu S., Inose T., Kimura A., Murata K., 1994. Induction of yeast sporulation by lysine – related compounds and glutathione – rich conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, 77 (5), 568-572.
- Świątkiewicz S., Korelski J., 1998. Organiczne źródła mikroelementów w żywieniu drobiu. *Biul. Inf. IŻŻ*, 36 (3), 49-60.
- Tuszyński T., Pasternakiewicz A., 2000. Bioaccumulation of metal ions by yeast cell of *Saccharomyces cerevisiae*. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 4, 31-39.
- Walker G., Duffus J., 1980. Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast. *J. Cell Sci.*, 42, 329-356.
- Walker G., 1994. The roles of magnesium in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 14 (4), 311-354.
- Walker G., Birch R., 1996. Magnesium, calcium and fermentative metabolism in industrial yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54 (1), 13-18.

THE STUDY OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* BREWERY YEAST STRAIN CAPACITY OF BINDING WITH MAGNESIUM IN STATIONARY CONDITIONS

Abstract: In the research, the No. 1 *Sacharomyces cerevisiae* brewery yeast strain capacity to bind the Mg^{2+} ions was studied. The yeast was cultivated in stationary conditions in the YPD medium enriched with the $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ or $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ magnesium salts. The salts were being added in such an amount, to make the sheer element content in the medium amount to 0.25 g/dm³; 0.5 g/dm³ or 1.25 g/dm³. The YPD medium was enriched with magnesium ions at the beginning of the cultivation or in the end of the logarithmic phase of yeast growth. In order to evaluate the stability of bonds of Mg^{2+} ions with brewery yeast cells, the magnesium content was evaluated in the centrifuged yeast biomass that had and had not been washed with deionized water. The studied strain proved its capacity of permanent bonds with magnesium ions originating from the experimental media.

MgCl₂·6H₂O added to the cultivation, favoured the binding of magnesium from the YPD medium by the brewery yeast and allowed obtaining slightly higher biomass yield than from experimental media with MgSO₄·7H₂O salt added. The largest number of biomass and magnesium that had bound with it (15.20 Mg²⁺/dm³ of medium) was obtained after 24-hour cultivation with chloric salt added in the amount of 1.25 g Mg²⁺/dm³ of medium.

Key words: bio-elements, metal proteins, bioplex, magnesium, *Saccharomyces cerevisiae*

*S. Błażej, W. Duskiewicz-Reinhard, M. Gniewosz, E. Rostkowska-Demner, E. Domurad, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-767 Warszawa
e-mail: blazejak@delta.sggw.waw.pl*