

WPLYW pH NA ZDOLNOŚĆ WIĄZANIA MAGNEZU PRZEZ DROŻDŻE PASZOWE *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950 PODCZAS HODOWLI WGLĘBNEJ

Stanisław Błazejak, Wanda Duszkiewicz-Reinhard,
Małgorzata Gniewosz, Monika Chojnacka

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Badano wpływ pH środowiska hodowlanego na zdolność trwałego wiązania jonów magnezu przez komórki drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950. Jednocześnie określono wpływ kwasowości czynnej podłoża wzbogaconego w magnez na plon biomasy komórkowej. W tym celu pH podłoży YPD ustalono na poziomach 5,0; 6,0; 7,0 oraz suplementowano jonami Mg^{2+} w dawce $1,25 \text{ g/dm}^3$ na początku 48-godzinnej hodowli wglębnej. Stwierdzono korzystny wpływ wyższego pH podłoża na zawartość magnezu w komórkach drożdży i plon biomasy. Najwięcej magnezu ($4,26 \text{ mg/g}_{s.s.}$) zawierały drożdże po 48 godzinach hodowli na podłożu o pH 7,0, natomiast najwyższy plon biomasy w warunkach doświadczenia ($15,51 \text{ g}_{s.s./dm}^3$) uzyskano również z tego podłoża, ale po 24 godzinach. Kwasowość czynna była tym czynnikiem środowiska, który decydował o zdolności drożdży do trwałego wiązania magnezu, poprzez regulowanie jego dostępności do zewnętrznych struktur ściany komórkowej

Słowa kluczowe: *Candida utilis*, pH, magnez, biokumulacja

WPROWADZENIE

Zdolność drożdży do wiązania kationów obecnych w środowisku hodowlanym stwarza możliwość otrzymywania naturalnych biopleksów tych mikroelementów, które są deficytowe w diecie ludzi i zwierząt. Specyficzna struktura zewnętrznej warstwy ściany komórkowej bogatej w mannoproteiny sprzyja sorpcji kationów w ilościach często przekraczających zapotrzebowanie fizjologiczne drożdży. Zaadsorbowane kationy ulegają wewnątrzkomórkowej bioakumulacji w organellach komórkowych tak, aby w wypadku niedoboru istotnego dla metabolizmu komórkowego kationu móc szybko uzupełnić jego brak [Klimiuk i Łebkowska 2004, Liu i in. 2002, Graschopf i in. 2001, Lipke i Ovalle 1998, MacDiarmid i Gardner 1998].

Adres do korespondencji – Corresponding author: dr. inż. Stanisław Błazejak, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Szkoły Głównej Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-787 Warszawa, e-mail: blazejak@delta.sggw.waw.pl

Magnez jest biopierwiastkiem kluczowym dla prawidłowego funkcjonowania różnych szlaków metabolicznych u organizmów eukariotycznych poprzez aktywację przeszło 300 enzymów, stabilizację błon cytoplazmatycznych, mitochondriów, rybosomów i kwasów nukleinowych [Birch i Walker 2000, Walker 1994]. Jednak coraz powszechniejszy niedobór tego pierwiastka w organizmie człowieka, sięgający nawet 80% populacji, często wymaga suplementacji farmakologicznej. Podawanie magnezu w postaci preparatów soli organicznych lub nieorganicznych okazuje się mało skuteczne ze względu na niską przyswajalność takich form tego kationu, wynikającą z trudności w przekraczaniu bariery dwuwarstwy lipidowej błony cytoplazmatycznej. Stąd alternatywnym rozwiązaniem staje się ograniczanie niedoboru magnezu przez wprowadzenie do diety biomasy drożdżowej wzbogaconej jonami Mg^{2+} lub preparatu białkowo-mineralnego uzyskanego z drożdży wzbogaconych w ten kation. Magnez podany w postaci biopleksu, w przeciwieństwie do kationu Mg^{2+} , jest dobrze przyswajalny, ponieważ w połączeniu z białkami bez trudu przekracza hydrofobowe błony komórkowe [Mardarowicz 1997, Vandergrift 1991].

Sorpcja jonów Mg^{2+} przez drożdże, a w rezultacie późniejsze wewnątrzkomórkowe gromadzenie magnezu w formie biopleksów, zależy od szeregu czynników środowiskowych. Szczególna rola przypada kwasowości czynnej podłoża hodowlanego, która warunkuje ten niewymagający wydatku energetycznego komórki pierwszy etap wiązania kationów z drożdżami [Goksungur i in. 2005, Gadd 2004, Słaba i Długoński 2002].

Jony $[H^+]$ i $[OH^-]$ odgrywają istotną rolę w bezpośredniej regulacji procesów metabolicznych, a przede wszystkim decydują o kierunku i szybkości reakcji enzymatycznych. Nadmierne stężenie jonów $[H^+]$ lub $[OH^-]$ w cytozolu hamuje szereg przemian, powoduje zakłócenie równowagi między wytwarzaniem a zużywaniem ATP w komórce oraz spadek syntezy białka z jednostki zużytego węgla.

Optymalne pH środowiska dla wzrostu większości rodzajów drożdży mieści się w zakresie pH 4,0-5,0. Badania prowadzone przez Thomasa [1980] wykazały, że szybkość wzrostu drożdży *Candida utilis* jest optymalna pomiędzy pH 3,5-5,0. Poniżej wartości pH 3,5 wydłużał się czas generacji, a w środowisku o pH 2,5 wzrost komórek ulegał prawie całkowitemu zahamowaniu.

Kwasowość czynna podłoża hodowlanego jest podstawowym czynnikiem regulującym chemisorpcję kationów przez komórki drożdży. Obecność w ścianie komórkowej kompleksów białkowo-węglowodanowych zawierających grupy funkcyjne (m.in.: fosforanowe, hydroksylowe, karboksylowe, aminowe) nadaje im ujemny ładunek, przez co sprzyja wiązaniu jonów metali na powierzchni drożdży [Klimiuk i Łebkowska 2004, Park i in. 2003, Tuszyński i Pasternakiewicz 2000].

Niskie pH podłoża hodowlanego powoduje zwiększenie zawartości wolnych jonów metali w środowisku ale jednocześnie sprawia, że kationy $[H^+]$ zaczynają współzawodniczyć z kationami metali o miejsce adsorpcji na powierzchni komórki [Tuszyński i Pasternakiewicz 1999]. W konsekwencji ilość pobieranych ze środowiska jonów metali jest wynikiem konkurencji pomiędzy kationami $[H^+]$ a kationami metali.

Gdy pH jest neutralne lub lekko alkaliczne dzięki mniejszemu stężeniu jonów $[H^+]$ w podłożu, wolne pary elektronowe ligandów ściany komórkowej drożdży łatwiej tworzą wiązania koordynacyjne z jonami metali niż w środowisku kwaśnym. Wpływa to na zwiększenie zdolności komórek drożdży do pobierania kationów metali z podłoża hodowlanego. Jednak nadmierny wzrost pH środowiska hodowlanego sprzyja tworzeniu anionów, m.in. w wyniku reakcji dysocjacji związków chemicznych znajdujących się

w podłożu. Powstałe aniony mają zdolność przyłączania kationów metali i tworzenia nierozpuszczalnych związków [Tuszyński i Pasternakiewicz 1999]. W tym wypadku obecność znacznych ilości grup anionowych w środowisku utrudnia wiązanie jonów metali z ligandami ściany komórkowej.

Wysokie wartości pH środowiska hodowlanego prowadzą na ogół do wytrącania znacznych ilości nierozpuszczalnych osadów wodorotlenków i tlenków metali oraz tworzenia jonów hydroksymetalicznych o charakterze słabych kwasów, zdolnych do połączeń kompleksowych z metalami [Tuszyński i Pasternakiewicz 1999]. W rezultacie powoduje to znaczne zmniejszenie zdolności wiązania jonów metali przez komórki drożdży [Park i in. 2003, Brady i Duncan 1994].

Według Jonesa i Greenfielda [1984] szczególne osłabienie zdolności komórek drożdży do pobierania i wiązania dwuwartościowych kationów metali pojawia się wtedy, gdy wartości pH spadają poniżej 5,0. Obserwacje te potwierdzili również Brady i Duncan [1994], wskazując jednocześnie, że maksymalna biosorpcja jonów metali w komórkach większości gatunków drożdży występuje wtedy, gdy pH mieści się w zakresie 5,0-9,0, a odstępstwo od tych wartości w którąkolwiek ze stron prowadzi zwykle do gwałtownego spadku sorpcji.

Celem badań było określenie zdolności komórek drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 do trwałego wiązania magnezu w zależności od pH podłoża hodowlanego wzbogaconego w ten pierwiastek podczas 48-godzinnej hodowli wglębnej. Warunkiem praktycznego wykorzystania drożdży wzbogaconych w magnez jako potencjalnego źródła tego pierwiastka jest uzyskanie odpowiednio dużego plonu biomasy komórkowej, który powinien być przynajmniej taki sam jak w hodowlach na standardowym podłożu YPD o pH 5,0.

Zakres przeprowadzonych badań obejmował następujące zagadnienia:

- wpływ pH podłoża doświadczalnego wzbogaconego w jony Mg^{2+} na zawartość tego pierwiastka w biomacie komórkowej drożdży *C. utilis* w warunkach hodowli wglębnej,
- wpływ pH podłoża doświadczalnego wzbogaconego w jony Mg^{2+} na plon biomasy komórkowej drożdży paszowych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał biologiczny

W badaniach zastosowano szczep drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 pochodzący z kolekcji czystych kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW.

Podłoża mikrobiologiczne

- podłoża kontrolne – płynna pożywka YPD [Robinson 2000],
- podłoża doświadczalne – płynna pożywka YPD wzbogacona jonami Mg^{2+} pochodzącymi z soli $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ cz.d.a. (POCH) w takiej ilości, aby zawartość jonów Mg^{2+} wynosiła $1,25 \text{ g/dm}^3$.

Do przechowywania szczepu drożdży oraz przygotowania materiału do zaszczepienia *inoculum* zastosowano stałe podłoże YPD z 2-procentowym agarom.

Wszystkie podłoża przygotowano na wodzie dejonizowanej oraz sterylizowano w autoklawie w temperaturze 121°C przez 20 min.

Ustalanie pH podłoży mikrobiologicznych

Kwasowość czynną podłoży kontrolnych i doświadczalnych ustalono używając 0,1M HCl lub 0,1M NaOH tak, aby w poszczególnych hodowlach wynosiła odpowiednio: 5,0, 6,0 i 7,0. Stężenie jonów wodorowych oznaczano za pomocą pehametru (Conbest CP-501, Polska). Ustawiając pH podłoży wzięto pod uwagę jego nieznaczny spadek podczas procesu sterylizacji, dlatego też uwzględniono poprawkę pH wynoszącą +0,2 jednostki.

Przygotowanie *inoculum*

Inoculum drożdży *Candida utilis* przygotowano na płynnym podłożu YPD w objętości 80 cm³. Namnażanie drożdży prowadzono w temp. 28°C na wstrząsarce posuwisto-zwrotnej o częstotliwości 200 cykli/min (E. Bühler SM-30 Control, Niemcy) do uzyskania gęstości optycznej (OD) równej 2,00, co w warunkach doświadczenia trwało średnio 20-22 h. Po osiągnięciu wymaganego OD, biomasę drożdży odwirowywano w warunkach sterylnych (ok. 1500 × g, 10 min, wirówka Eppendorf 5804 R, Niemcy), płukano wodą dejonizowaną, ponownie wirowano, po czym zawieszono w 80 cm³ jałowej wody dejonizowanej w celu przygotowania matki drożdżowej o pH neutralnym. *Inoculum* o pH 7,0 stanowiło materiał wyjściowy, który w ilości 10% (v/v) wprowadzano do podłoży kontrolnych i doświadczalnych w danej serii badań.

Hodowla drożdży *Candida utilis* na podłożach kontrolnych i doświadczalnych

Kolby płaskodenne zawierające po 90 cm³ podłoża kontrolnego (bez dodatku magnezu) lub doświadczalnego (wzbogaconego w magnez) o określonym pH, tj. 5,0, 6,0 lub 7,0 szczepiono 10 cm³ *inoculum*. Hodowle prowadzono przez 48 h w temp. 28°C na wstrząsarce posuwisto-zwrotnej o częstotliwości 200 cykli/min (E. Bühler SM-30 Control, Niemcy) Podczas hodowli kontrolowano plon biomasy komórkowej drożdży oraz zawartość magnezu w komórkach *C. utilis*. Oznaczenia wykonywano bezpośrednio po wprowadzeniu *inoculum* (T0) oraz po 24 (T24) i 48 (T48) godzinach procesu.

Oznaczanie gęstości optycznej (OD)

Wykonywano celem szybkiego oszacowania liczby komórek drożdży w materiale przeznaczonym do zaszczepienia podłoży hodowlanych w kolejnych seriach doświadczeń. Metoda polegała na pomiarze absorbancji próbki *inoculum* w zakresie światła widzialnego. Pomiar OD przeprowadzano na spektrofotometrze (Spectronic 20 Genesys, USA) przy długości fali 600 nm [Pasternakiewicz i Tuszyński 1997].

Oznaczenie plonu biomasy komórkowej drożdży

Plon biomasy komórkowej drożdży oznaczano metodą suszenia po odwirowaniu próbek z poszczególnych hodowli (ok. 1500 × g, 10 min, wirówka MPW-340, Polska).

Wynik podawano w gramach suchej substancji drożdży na decymetr sześcienny hodowli [$\text{g}_{\text{s.s.}}/\text{dm}^3$].

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

Odwirowane, 2-krotnie przepłukane wodą dejonizowaną, wysuszone i zważone próbki biomasy drożdży z poszczególnych hodowli mineralizowano w mieszaninie kwasów azotowego i nadchlorowego (BUCHI Digestion Unit K-435, Niemcy). W tak przygotowanych próbkach oznaczano zawartość magnezu metodą ASA (spektrofotometr Shimadzu AA-660, Japonia). Absorbancję mierzono przy długości fali równej 285,2 nm [Eksperymentalna chemia... 1995]. Wyniki podawano w mg Mg^{2+} na gram suchej substancji biomasy drożdży [$\text{mg Mg}^{2+}/\text{g}_{\text{s.s.}}$].

Analiza statystyczna

Wyniki oznaczeń uzyskane w 7 seriach doświadczeń (każda w 3 powtórzeniach) poddano analizie statystycznej za pomocą programu komputerowego Statgraphics Plus wersja 5.1. Przeprowadzono analizę wariancji oraz test Duncana dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$. Najmniejsze istotne różnice (NIR) między porównywanymi średnimi wartościami plonów biomasy i zawartości magnezu w komórkach drożdży z hodowli na podłożach o zróżnicowanym pH przedstawiono w tabelach 2 i 4.

WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

Niniejsza praca stanowi kontynuacją zagadnień badawczych realizowanych w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW [Błażej i in. 2003, Błażej i Duszkiewicz-Reinhard 2004]. Określono wpływ różnych wartości pH środowiska hodowlanego wzbogaconego w magnez na zdolność wiązania tego kationu przez komórki drożdży *Candida utilis* oraz na wzrost drożdży, czego wyrazem był plon biomasy komórkowej. Przyjęte w badaniach poziomy stężenia jonów $[\text{H}^+]$ w podłożach hodowlanych wynikały z doniesień literaturowych, które sugerują optymalne wiązanie jonów Mg^{2+} przez komórki drożdży w zakresie pH 5,0-7,0 [Park i in. 2003, Brady i Duncan 1994].

Do badań nad wiązaniem magnezu w warunkach hodowli wglębnej zastosowano podłoże YPD, o stałym składzie z łatwo przyswajalnym źródłem węgla, które gwarantuje optymalny wzrost drożdży [Blackwell i in. 1997]. Podłoże wzbogacono w jony Mg^{2+} w dawce $1,25 \text{ g}/\text{dm}^3$, w postaci $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$. Wybór takiego źródła magnezu wynikał z jego dostępności, dobrej rozpuszczalności, braku toksyczności wobec drożdży w stosowanym stężeniu oraz wyników wcześniejszych prac nad wiązaniem tego kationu przez drożdże paszowe [Błażej i in. 2003, Rees i Stewart 1997].

Aby zapewnić porównywalność wyników z kolejnych serii badań, hodowlę *inoculum* na płynnym podłożu YPD prowadzono do uzyskania określonej i stałej wartości gęstości optycznej ($\text{OD} = 2,00$). Postępowanie takie gwarantowało wprowadzenie do podłoża hodowlanych podobnej liczby komórek drożdży w poszczególnych seriach doświadczeń.

Oznaczenie zawartości magnezu przeprowadzono w wysuszonych próbkach biomasy drożdży płukanej 2-krotnie po odwirowaniu wodą dejonizowaną. W ten sposób usuwano tę część jonów Mg, które nie związały się z komórkami, lecz jedynie luźno zaadsorbowały na powierzchni ściany komórkowej lub też znajdowały się w przestrzeniach międzykomórkowych biomasy drożdżowej. Zmiany zawartości magnezu w komórkach drożdży, w zależności od pH podłoża i czasu prowadzenia hodowli, zamieszczono w tabeli 1.

Tabela 1. Wpływ pH podłoża doświadczonego wzbogaconego w magnez na zawartość tego pierwiastka w biomacie *C.utilis* podczas 48-godzinnej hodowli węgłnej (wartości średnie z 7 serii, n = 21)

Table 1. Influence of pH experimental medium enriched with magnesium on the contents of this element in *C. utilis* biomass during cultivation in dynamic conditions (average value with 7 series, n = 21)

Czas hodowli Cultivation time h	Zawartość magnezu w biomacie, mg Mg ²⁺ /g s.s. Content of magnesium in biomass, mg Mg ²⁺ /g d.w.		
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
T0	0,92±0,10a*	0,86±0,08a	0,95±0,11a
T24	2,88±0,14b	3,34±0,17d	3,16±0,16c
T48	3,76±0,22e	4,20 ±0,25f	4,26±0,28f

*Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy.

*The same marks lack of significant difference superscript.

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że po 24 i 48 godzinach hodowli zastosowane wartości pH podłoży doświadczone miały istotny wpływ na zdolność drożdży paszowych *C. utilis* do wiązania jonów Mg²⁺, znajdujących się w środowisku (tab. 1).

W czasie T0, czyli na początku hodowli, uzyskane wyniki zawartości magnezu w biomacie komórkowej nie różniły się istotnie (tab. 1). Oznaczało to, że pH podłoża nie miało wpływu na początkową zdolność komórek drożdży do biosorpcji magnezu z podłoża hodowlanego. Najwięcej magnezu związanego z komórkami (0,95 mg Mg²⁺/g_{s.s.}) zawierała biomasa otrzymana z podłoża doświadczonego o pH 7,0.

Uzyskane wyniki zawartości magnezu w biomacie z hodowli doświadczone w czasie T0 (tab. 1) były zbliżone do wartości otrzymanych z hodowli na podłożach kontrolnych bez dodatkowego źródła tego pierwiastka (tab. 3). Na ogół najwięcej magnezu w biomacie powinno gromadzić się bezpośrednio po wprowadzeniu komórek drożdży do podłoży doświadczone. Związane jest to z dużym zapotrzebowaniem drożdży na ten pierwiastek w logarytmicznej fazie wzrostu, który jest niezbędnym czynnikiem do namnażania komórek. Magnez wpływa na aktywność enzymatyczną, a w konsekwencji na metabolizm komórkowy, dlatego odgrywa decydującą rolę w kontroli procesu wzrostu drożdży [Rees i Stewart 1997]. W warunkach doświadczenia logarytmiczna faza wzrostu drożdży powinna rozpocząć się bezpośrednio po wprowadzeniu 10% (v/v) *inoculum* do podłoży hodowlanych.

Otrzymane rezultaty w T0 mogą świadczyć o osłabionej aktywności drożdży oraz o wystąpieniu przed logarytmiczną fazą wzrostu adaptacyjnej fazy zastoju (lag-fazy).

Wystąpienie i czas trwania lag-fazy zależy od hodowli użytej jako *inoculum*, zwłaszcza jej wieku, składu oraz stopnia dopasowania do nowego podłoża hodowlanego. Komórki drożdży syntetyzują w tym czasie RNA, rybosomy, enzymy i inne związki w celu przystosowania się do nowych warunków środowiska.

W realizowanym doświadczeniu *inoculum* i podłoża hodowlane przygotowano na bazie płynnej pożywki YPD, dlatego drożdże nie powinny potrzebować czasu na adaptację do nowych warunków. Jednak przed wprowadzeniem *inoculum* do podłoża hodowlanych, namnożoną podczas 24-godzinnej hodowli biomasę komórkową odwirowano i przemyto wodą dejonizowaną oraz zawieszono w określonej objętości wody dejonizowanej celem uzyskania matki drożdżowej o neutralnym pH. Komórki drożdży po wprowadzeniu do wody dejonizowanej zostały pozbawione składników pokarmowych, a zatem nagła zmiana ciśnienia osmotycznego mogła doprowadzić do zakłócenia cyklu komórkowego oraz wystąpienia lag-fazy po ich przeniesieniu do podłoża kontrolnych i doświadczalnych. Prawdopodobnie dlatego w T0 nie odnotowano wzmożonego wiązania jonów Mg^{2+} przez komórki drożdży, co występuje w wypadku szczepienia podłoża hodowlanych *inoculum* nieprzemysłowym [Błażej i in. 2003].

W czasie T24 (po zakończeniu fazy logarytmicznej) zastosowane wartości pH podłoża doświadczalnych wpływały istotnie na zawartość magnezu w biomacie komórkowej (tab. 2). Najwięcej magnezu związanego z z drożdżami ($3,34 \text{ mg } Mg^{2+}/g_{s.s.}$) uzyskano z podłoża o pH 6,0. Na otrzymane wyniki korzystnie mogło wpłynąć zmniejszenie zawartości wolnych kationów w środowisku (w porównaniu ze standardowym podłożem YPD o pH 5,0), zdolnych do konkurencji z jonami Mg^{2+} o wiązanie z ligandami obecnymi w ścianie komórkowej drożdży. Dodatkowo, wraz ze wzrostem pH o jednostkę, 10-krotnemu zmniejszeniu uległo stężenie kationów $[H^+]$, co ograniczyło konkurencję pomiędzy jonami Mg^{2+} i $[H^+]$.

Table 2. Wpływ pH podłoża doświadczalnego wzbogaconego w magnez na plon biomasy *C. utilis* podczas 48-godzinnej hodowli węgłnej j (wartości średnie z 7 serii, n = 21)

Table 2. Influence of pH experimental medium enriched with magnesium on the yield of *C. utilis* biomass during cultivation in dynamic conditions (average value with 7 series, n = 21)

Czas hodowli Cultivation time h	Plon biomasy, g s.s./dm ³ Yield of biomass, g d.w./dm ³		
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
T0	1,95±0,23a*	1,89±0,22a	2,30±0,28a
T24	13,93±0,54b	14,37±0,52bc	15,51±0,72c
T48	13,84±0,57b	15,48±0,66c	15,09±0,67c

*Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy.

*The same marks lack of significant difference superscript.

Wyższa wartość pH podłoża w hodowlach 24-godzinnych mogła spowodować wytrącanie nierozpuszczalnych związków, w tym wodorotlenków, tlenków i jonów hydroksymetalicznych zdolnych do połączeń kompleksowych z magnezem. W efekcie w biomacie komórkowej otrzymanej z podłoża o pH 7,0 stwierdzono istotnie mniejszą zawartość magnezu w porównaniu z biomasą z podłoża o pH 6,0 (tab. 1).

Uzyskane rezultaty po 48-godzinnej hodowli wykazały, że najwięcej magnezu związanego z komórkami drożdży ($4,26 \text{ mg Mg}^{2+}/\text{g}_{\text{s.s.}}$) otrzymano z hodowli o pH 7,0 (tab. 1). Przyjęte poziomy kwasowości czynnej podłoży doświadczalnych, wyższe niż w standardowym podłożu YPD o pH 5,0, wpływały istotnie na poprawę efektywności wiązania magnezu z komórkami badanego szczepu drożdży. Nie stwierdzono natomiast istotnej różnicy w zdolności biosorpcji magnezu przez drożdże paszowe z hodowli na podłożach o pH 6,0 i 7,0. Warto również podkreślić, że po 48 godzinach hodowli nie odnotowano uwalniania magnezu z komórek do podłoża. Według Walkera i Duffusa [1980] zjawisko takie może być wywołane procesami autolizy lub uruchomieniem mechanizmów obronnych komórek zapobiegających nadmiernej bioakumulacji magnezu w komórkach i niekorzystnemu oddziaływaniu jego wysokiego stężenia. W warunkach doświadczenia komórki drożdży w fazie wzrostu stacjonarnego nadal wiązały jony magnezu i przypuszczalnie gromadziły ich nadmiar w postaci wewnątrzkomórkowych biopleksów.

Jak podają Blackwell i in. [1995] biosorpcja kationów magnezu jest zdeterminowana aktywnością życiową drożdży, którą podczas hodowli można wyrazić plonem biomasy. Ten wskaźnik żywotności drożdży kontrolowano równolegle z zawartością magnezu w komórkach *C. utilis* podczas 48-godzinnej hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych o zróżnicowanym pH. Zmiany wielkości plonu biomasy komórkowej w zależności od pH podłoża w czasie prowadzenia hodowli wglębnej przedstawiono w tabeli 2. Przyjęte w doświadczeniu wyższe poziomy kwasowości czynnej podłoży (pH 6,0 i 7,0) wpływały korzystnie na uzyskany plon biomasy komórkowej w porównaniu z plonem z podłoża o pH 5,0.

W czasie T24 najwyższy plon biomasy ($15,51 \text{ g}_{\text{s.s.}}/\text{dm}^3$) osiągnięto na podłożu o pH 7,0. Wprawdzie był on istotnie większy niż z hodowli na podłożu o pH 5,0, jednak nie różnił się statystycznie od plonu z podłoża o pH 6,0 (tab. 2).

Po dwóch dobach hodowli (T48) najkorzystniejszy plon biomasy ($15,48 \text{ g}_{\text{s.s.}}/\text{dm}^3$) uzyskano z podłoża o pH 6,0. (tab. 2). Analiza statystyczna potwierdziła istotny wpływ zastosowanej wartości pH podłoża na ilość uzyskanej biomasy. Oznaczało to, że środowisko lekko kwaśne (pH 6,0), w czasie T48, korzystnie oddziaływało na wzrost drożdży paszowych *C. utilis*.

Plony biomasy w T48 z hodowli na podłożu o pH 5,0 i 7,0 były niższe niż w T24 dla tych samych wartości pH (tab. 2). Świadczy to o spowolnieniu tempa wzrostu drożdży w drugiej dobie hodowli oraz pojawiającej się destrukcji komórek w wyniku procesów autolizy. Nie bez znaczenia pozostaje to, że w środowisku o pH 7,0 mogły wytrącać się słabiorozpuszczalne wodorotlenki, przez co ograniczona została dostępność kationów Mg do komórek drożdży, prowadząca w konsekwencji do osłabienia ich wzrostu.

Uzyskane wyniki pomiarów plonu biomasy komórkowej drożdży paszowych w T48 sugerują, że podwyższenie pH podłoża wzbogaconego w jony Mg^{2+} do wartości 6,0-7,0 korzystnie wpłynęło na plon drożdży *C. utilis* w porównaniu z plonem biomasy komórkowej otrzymanym z analogicznych hodowli na standardowym podłożu YPD o pH 5,0 (tab. 2).

Tuszyński i Pasternakiewicz [1999], badając oddziaływanie m.in. jonów Mg^{2+} na wzrost drożdży w zależności od pH środowiska, zaobserwowali na podłożach syntetycznych o pH 5,5 gwałtowny spadek wydajności drożdży, w porównaniu z ich wzrostem, gdy pH wynosiło 3,5 i 4,5. Można sądzić, że na otrzymany rezultat negatywnie wpłynęło zastosowane stężenie jonów Mg^{2+} (50 mM, tj. $1,2 \text{ g}/\text{dm}^3$), ponieważ przy

mniejszej ilości magnezu w podłożu (1-5 mM, tj. 0,024-0,12 g/dm³) wzrost pH środowiska powodował zwiększenie plonu biomasy. Ress i Stewart [1997] ustalili, że minimalne zapotrzebowanie drożdży na magnez wynosi 1,7 mM (0,041 g/dm³). Według Walkera i Maynarda [1996] optymalne stężenie magnezu dla prawidłowego wzrostu drożdży kształtuje się w granicach 10-20 mM (0,24-0,48 g/dm³), zaś całkowite zahamowanie wzrostu następuje dopiero po dodaniu 25 g magnezu na 1 dm³ podłoża (ok. 1 M).

W niniejszej pracy, w stężeniu jonów Mg²⁺ w podłożu wynoszącym 1,25 g/dm³ nie zaobserwowano znacznego spadku plonu biomasy komórkowej przy wzroście pH środowiska (tab. 2) co świadczy o tym, że zastosowana dawka magnezu w podłożu YPD nie miała inhibicyjnego wpływu na wzrost drożdży paszowych w badanym zakresie kwasowości czynnej. Niewykluczone, że wyższe wartości pH podłoża doświadczalnego w pewien sposób chronią komórki drożdży, ograniczając dostępność magnezu poprzez wytrącanie wodorotlenku o słabej rozpuszczalności.

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że kwasowość podłoża wpływała na ilość otrzymywanej biomasy, poprzez regulowanie dostępności magnezu w środowisku hodowlanym. Magnez z kolei, poprzez aktywację polimerazy DNA, mógł odgrywać decydującą rolę w namnażaniu komórek drożdży, a tym samym wpływał na plon. Potwierdzeniem tego poglądu było uzyskanie po T24 i T48 wyższego plonu biomasy komórkowej z podłoża doświadczalnych wzbogaconych w jony Mg²⁺ (tab. 2) niż z podłoża kontrolnych (bez suplementacji chlorkiem magnezu) w tym samym czasie hodowli (tab. 3).

Tabela 3. Wpływ pH podłoża kontrolnego (bez dodatku magnezu) na plon biomasy i zawartość magnezu w biomacie *C. utilis* podczas 48 godzinnej hodowli węgłnej

Table 3. Influence of pH control mediums (without magnesium) on the yield of biomass and contents of this elements in *C. utilis* cells during cultivation in dynamic conditions

Czas hodowli Cultivation time h	Zawartość magnezu w biomacie, mg Mg ²⁺ /g s.s. Content of magnesium in biomass mg Mg ²⁺ /g d.w.			Plon biomasy, g s.s./dm ³ Yield of biomass, g d.w./dm ³		
	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0	pH 5,0	pH 6,0	pH 7,0
T0	0,89	0,92	0,88	1,94	1,85	2,14
T24	1,10	1,12	0,98	11,24	11,37	10,86
T48	1,05	1,02	0,88	11,94	12,55	11,19

WNIOSKI

Na podstawie otrzymanych wyników badań sformułowano następujące stwierdzenia i wnioski:

1. Poziom kwasowości czynnej podłoża w badanym zakresie pH 5,0-7,0 wpływał na poprawę zdolności drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 do wiązania jonów Mg²⁺, znajdujących się w środowisku hodowlanym wzbogaconym w ten pierwiastek w dawce 1,25 g/dm³.

2. Najwięcej magnezu związanego z komórkami drożdży, tj. 4,26 mg Mg²⁺/g_{s.s.}, uzyskano po 48-godzinnej hodowli na podłożu doświadczalnym o pH 7,0.

3. W warunkach doświadczenia stosunkowo najwyższy plon biomasy komórkowej, tj. 15,51 g_{s.s.}/dm³, osiągnięto po 24-godzinnej hodowli na podłożu doświadczalnym o pH 7,0.

4. Wzrost pH podłoża hodowlanego do wartości 6,0 jest wystarczający zarówno do istotnego zwiększenia zawartości magnezu w komórkach drożdży paszowych, jak i uzyskania większego plonu biomasy niż z hodowli na standardowym podłożu YPD o pH 5,0.

PIŚMIENNICTWO

- Birch R.M., Walker G.M., 2000. Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbiol. Technol.* 26, 678-687.
- Blackwell K.J., Singleton I., Tobin J.M., 1995. Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 579-584.
- Blackwell K.J., Tobin J.M., Avery S.V., 1997. Manganese uptake and toxicity in magnesium – supplemented und unsupplemented *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, 180-184.
- Błażejczak S., Duszkiewicz-Reinhard W., Gniewosz M., Kamiński T., 2003. Badanie zdolności wiązania magnezu przez drożdże paszowe *Candida utilis* ATCC 9950 w warunkach hodowli węgłonej. *Acta Sci. Pol. Technologia Alimentaria* 2(1), 109-123.
- Błażejczak S., Duszkiewicz-Reinhard W., 2004. Yeast cell biomass as a potential source of magnesium bioplexes-a review. *Pol. J. Food Nutr. Sci.* 13/54, 3, 223-232.
- Brady D., Duncan J., 1994. Bioaccumulation of metal cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41, 149-154.
- Eksperymentalna chemia fizyczna. 1995. Red. J. Bryłka. Wyd SGGW Warszawa, 317-318.
- Gadd G.M., 2004. Microbial influence on metal mobility and application for bioremediation. *Geoderma*, 122 (2-4), 109-119.
- Goksungur Y., Uren S., Guvenc U., 2005. Biosorption of cadmium and lead ions by ethanol treated waste baker's yeast biomass. *Bioresour. Technol.* 96 (1), 103-109.
- Graschopf A., Shtadler J.A., Hoellerer M.K., Eder S., Sieghardt M., 2001. The yeast plasma membrane protein Alr controls Mg²⁺ homeostasis and is subject to Mg²⁺ dependent control of its synthesis and degradation. *J. Biol. Chem.* 19 (276), 16216-16222.
- Jones R.P., Greenfield P.F., 1984. A review of yeast ionic nutrition: growth and fermentation requirements. *Process Biochem.* 4, 48-54.
- Klimiuk E., Łebkowska M., 2004. *Biotechnologia w ochronie środowiska*. PWN Warszawa, 131-160.
- Lipke P.N., Ovalle R., 1998. Minireview. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 180(15), 3735-3740.
- Liu G.J., Martin D.K., Gardner R.C., Ryan P.R. 2002. Large Mg²⁺-dependent currents are associated with the increased expression of ALR1 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Lett.* 213 (2), 231-237.
- 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. *Pol. Drob.* 9, 14-16.
- Park J.K., Lee J.W., Jung J.Y., 2003. Cadmium uptake capacity of two strains of *Saccharomyces cerevisiae* cells. *Enzyme Microbiol. Technol.* 33(4), 371-378.
- Pasternakiewicz A., Tuszyński T., 1997. Effect of calcium, magnesium, cobalt (II), and zinc cations on the *Saccharomyces cerevisiae* growth. *Pol. J. Food Nutr.* 47(4), 61-70.
- Rees M., Stewart G., 1997. The effects of increased magnesium and calcium concentration on yeast fermentation performance in high gravity worts. *J. Inst. Brew.* 103, 287-291.

- Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.D., 2000. Encyclopedia of food microbiology. Acad. Press. 352-359.
- Schlegel H.C., 2001. Mikrobiologia ogólna. PWN Warszawa, 225-272.
- Słaba M., Długoński J., 2002. Mikrobiologiczne usuwanie i odzyskiwanie metali ciężkich. Post. Mikrobiol. 41(2), 167-183.
- Thomas K.C., 1980. Effect of pH on the rate of *Candida utilis* cell cycle initiation. J. Bacteriol. 144 (3), 1193-1196.
- Tuszyński T., Pasternakiewicz A., 1999. Oddziaływanie jonów metali na wzrost drożdży *Saccharomyces cerevisiae* w zależności od pH podłoża hodowlanego. Chem. Inż. Ekol. 6 (5-6), 720-728.
- Tuszyński T., Pasternakiewicz A., 2000. Bioaccumulation of metal ions by yeast cell of *Saccharomyces cerevisiae*. Pol. J. Food Nutr. Sci. 4, 31-39.
- Vandergrift B., 1991. Bioplexes: Practical application. W: Proceeding of Alltech's Seventh Annual Symposium. Biotechnology in the feed industry. Red. L.P. Lyons. Alltech Technical Publications Kentucky, 159-168.
- Walker G., Duffus J., 1980. Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast. J. Cell Sci. 42, 329-356.
- Walker G.M., 1994. The roles of magnesium in biotechnology. Crit. Rev. Biotechnol. 14(4), 311-354.
- Walker G.M., Maynard A.I., 1996. Magnesium – limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Enzyme Microbiol. Technol. 18, 455-459.

INFLUENCE OF THE pH FACTOR OF THE CULTURE MEDIUM ENRICHED WITH MAGNESIUM IONS ON THE ABILITY OF BINDING THIS ELEMENT BY THE YEAST *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950 IN DYNAMIC CONDITIONS

Abstract. The research concerned the influence of the pH of the culture medium on the ability of binding magnesium ions, by the cells of *Candia utilis* ATCC 9950. In the same time, the influence of the active acidity of the culture medium enriched with magnesium on the cell biomass yield. For this purpose, pH of the YPD culture medium has been set on the 5.0, 6.0 and 7.0 and enriched in a constant dose of magnesium, namely 1.25 g/dm³ in the beginning of the 48 hours culture in dynamic condition. The biggest amounts of magnesium binding with the cells (4.26 mg/g d.w.) were present in the cells on the culture medium which pH factor was 7.0 after 48 hours. The biggest biomass yield in the experimental conditions (15.51 g d.w./dm³) was received after 24-hours culture, also on a neutral pH medium. It is possible that the active acidity was the factor of the environment which determined the ability of binding magnesium from the medium by regulating its accessibility for the outer structures of the yeast cells.

Key words: *Candida utilis*, pH, magnesium, bioaccumulation

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 3.10.2005 r.

Do cytowania – For citation: Błażej S., Duszkiewicz-Reinhard W., Gniewosz M., Chojnacka M., 2005. Wpływ pH na zdolność wiązania magnezu przez drożdże paszowe *Candida utilis* ATCC 9950 podczas hodowli wglębnej. Acta Sci. Pol., Technol. Aliment. 4(2), 47-57.