

BADANIA ZDOLNOŚCI WIĄZANIA MAGNEZU PRZEZ DROŹDŻE PIEKARSKIE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* W HODOWLI STACJONARNEJ

Wanda Duszkiewicz-Reinhard, Małgorzata Gniewosz,
Stanisław Błazejak, Adam Bańkowski

Streszczenie: Badano zdolność wiązania magnezu przez przemysłowy szczep drożdży piekarskich podczas hodowli stacjonarnej na podłożu YPD, wzbogaconym w jony magnezu w ilości 0,25, 0,5 i 1,25 Mg²⁺/dm³. Jony magnezu pochodziły z dwóch soli: MgSO₄ x 7H₂O lub MgCl₂ x 6H₂O. Sole magnezu dodawano do podłoża doświadczalnych na początku hodowli lub pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu drożdży. Równolegle prowadzono hodowlę na podłożu kontrolnym (YPD bez dodatku jonów Mg²⁺). Zawartość magnezu oznaczano metodą ASA w biomacie nie płukanej oraz w biomacie dwukrotnie płukanej wodą dejonizowaną. We wszystkich wariantach hodowli prowadzonych na podłożach doświadczalnych uzyskano istotnie wyższą zawartość magnezu w biomacie komórkowej niż w drożdżach hodowanych na podłożu kontrolnym. Zaobserwowano, że rosnące stężenia jonów magnezu w podłożach doświadczalnych (niezależnie od źródła), powodowały zwiększanie zawartości tego pierwiastka w nie płukanej biomacie komórkowej, chociaż stwierdzone różnice nie zawsze należały do statystycznie istotnych. Dodatek magnezu do podłoża pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu nie spowodował podwyższenia zawartości magnezu w biomacie badanej po 24 i 48 h hodowli w stosunku do podłoża wzbogaconych w magnez na początku hodowli. Większa część magnezu była luźno związana z komórkami drożdży, co stwierdzono porównując zawartości magnezu w biomacie płukanej z zawartością tego pierwiastka w biomacie nie płukanej. Zarówno rodzaj źródła magnezu, jak również jego stężenie w podłożu nie miało istotnego wpływu na przyrost biomasy komórkowej drożdży.

Słowa kluczowe: *Saccharomyces cerevisiae*, magnez, biopierwiastki, drożdże

WSTĘP

Magnez spełnia wiele ważnych funkcji w każdym żywym organizmie. W komórkach drożdży bierze udział w przebiegu około połowy wszystkich procesów i szlaków metabolicznych przemiany białek, tłuszczów i cukrów. Uczestniczy w aktywacji ponad 300 enzymów, w tym wszystkich syntetaz, fosfataz i kinaz [Walker 1994, Rees i Ste-

wart 1997]. W komórce występuje przeważnie w formie uwodnionej, jako stabilny hydrat $\text{Mg}(\text{H}_2\text{O})_6^{2+}$. Stężenie wolnego Mg^{2+} w cytosolu komórkowym wynosi od 0,2 do 1,0 mM. W mitochondriach jon magnezowy zlokalizowany jest głównie w matriks (41%), natomiast 50% znajduje się w przestrzeni międzybłonowej. Stężenie wolnego Mg^{2+} w matriks mitochondrialnym jest wyższe niż w cytosolu komórkowym, co jest związane z udziałem magnezu w syntezie wiązań wysokoenergetycznych przy wytwarzaniu i magazynowaniu energii w formie ATP [Pasternak 1999]. Duża ilość magnezu wewnątrzkomórkowego związana jest z białkami oraz ujemnie naładowanymi cząsteczkami. Poza tym znaczne ilości tego pierwiastka znajdują się w jądrze i retikulum endoplazmatycznym [Pasternak i Floriańczyk 1995].

Obecność magnezu związana jest z prawidłowym działaniem takich struktur komórkowych, jak błony komórkowe, jądro komórkowe, mitochondria, rybosomy i lizosomy [Walker 1994]. Między innymi w błonie komórkowej tworzy związki kompleksowe z fosfolipidami, dzięki którym zmniejszona jest płynność i przepuszczalność błon komórkowych, utrzymuje integralność spirali DNA, właściwą strukturę chromosomów w jądrze komórkowym, a także stan sprzężenia mitochondriów. Magnez ma wpływ na prawidłową przepuszczalność błon mitochondrialnych, umożliwia agregację rybosomów w polisomy oraz stabilizuje błonę lizosomów [Pasternak 1999].

Magnez w istotny sposób oddziałuje na wzrost i cechy technologiczne drożdży *S. cerevisiae* [Brady i Duncan 1994, Walker i in. 1996, Pasternakiewicz i Tuszyński 1997, Walker i Maynard 1997]. Większa dostępność magnezu w podłożach fermentacyjnych przyczynia się do skrócenia fazy wzrostu drożdży, a także podwyższa końcową wydajność etanolu [Dombek i Ingram 1986]. Walker [1998] opisał magnez jako czynnik zapobiegający stresowi komórek drożdży. Podczas fermentacji komórki narażone są na szereg stresów pochodzących z otaczającego środowiska (fizyczne, chemiczne i biologiczne), których skutki mogą być niwelowane zwiększoną obecnością jonów magnezu w podłożu. Jony Mg^{2+} chronią komórki drożdży zwłaszcza przed stresem spowodowanym wysoką temperaturą, toksycznym działaniem etanolu i wysokim ciśnieniem osmotycznym [Dombek i Ingram 1986, D'Amore i in. 1988, Dasani i in. 1990]. W tych ekstremalnych warunkach zapobiegają obumieraniu komórek i przedłużają ich żywotność poprzez zachowanie strukturalnej i funkcjonalnej integracji błony cytoplazmatycznej [Walker 1998].

W niniejszej pracy postanowiono sprawdzić zdolność wiązania magnezu przez drożdże piekarskie *S. cerevisiae*, przy znacznym zwiększeniu ilości tego pierwiastka w podłożu hodowlanym. Postanowiono także wyjaśnić, czy zdolność wiązania magnezu przez komórki jest zależna od rodzaju soli wprowadzanej do podłoża. Podjęto również próbę oceny trwałości wiązania jonów Mg^{2+} z komórkami drożdży.

MATERIAŁY I METODY

Przedmiotem badań były przemysłowe drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* (szczep Nr 102), pochodzące z Muzeum Czystych Kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW w Warszawie. Szczep przechowywano na skosach brzezczkowych w temp. +4°C.

Inoculum przygotowywano na podłożu płynnym YPD [Suizu i in. 1996] i namnażano przez 24 h w temp. 28°C na wstrząsarce laboratoryjnej (ROSI 1000, Thermolyne,

USA) o 200 rpm do uzyskania gęstości optycznej $OD_{600} = 2,1$, co odpowiadało liczbie komórek $1,3 \times 10^7$ jtk/cm³.

Podłożem kontrolnym było podłoże YPD, natomiast **podłożami doświadczalnymi** podłoże YPD wzbogacone w jony magnezu pochodzące z dwóch związków: $MgSO_4 \times 7H_2O$ lub $MgCl_2 \times 6H_2O$. Przyjęto trzy poziomy dodatki soli magnezu tak, aby zawartość magnezu w podłożach wynosiła $0,25g Mg^{2+}/dm^3$, $0,5g Mg^{2+}/dm^3$ i $1,25g Mg^{2+}/dm^3$ (w przeliczeniu na czysty pierwiastek). Wodne roztwory soli magnezu dodawano do podłoża hodowlanego na początku hodowli lub pod koniec (sprawdzonej eksperymentalnie – materiały własne) logarytmicznej fazy wzrostu, tj. w 18 godzinie hodowli.

Podłoże kontrolne i podłoża doświadczalne szczepiono inoculum – 10% (v/v). **Hodowle drożdży** prowadzono metodą stacjonarną w temp. 28°C przez 48 h.

Zawartość magnezu w biomase komórkowej drożdży badano **metodą absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej (ASA)**.

Zawartość magnezu w biomase komórkowej drożdży oznaczano po 6, 24 i 48 godzinach prowadzenia hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych. Odwirowaną, 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 Shimadzu, AA660, Japonia) [Bryłka i in. 1995]. Absorbancję mierzono przy długości fali równej 285,2 nm. Otrzymane wyniki wyrażano w miligramach Mg^{2+} na gram suchej biomasy drożdży.

Zawartość biomasy komórkowej drożdży badano po odwirowaniu jej przy 3500 rpm przez 10 minut (MPW 365, Mechanika Precyzyjna, Polska). Otrzymaną mokrą biomasę suszono najpierw w temperaturze 60°C przez 2 godziny, a następnie w 105°C, aż do ustalenia stałej masy. Badania prowadzono w trzech powtórzeniach.

Oznaczenia zawartości magnezu w biomase komórkowej oraz plon biomasy kontrolowano w 6, 24 i 48 godzinie hodowli (gdy magnez dodawano na początku hodowli) oraz w 18 godzinie (10 minut po dodaniu soli magnezu), 24 i 48 godzinie (gdy magnez dodawano pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu drożdży).

Wyniki badań poddano analizie statystycznej testem Duncana w programie Statgraphics Plus, wersja 2.1. Przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji z powtórzeniami.

WYNIKI I DYSKUSJA

Badanie zawartości magnezu w biomase komórkowej drożdży hodowanych na podłożu kontrolnym i podłożach doświadczalnych

W tabeli 1 i 2 przedstawiono zawartość magnezu w biomase komórkowej drożdży hodowanych na podłożu kontrolnym (YPD) i podłożach doświadczalnych z trzema różnymi dawkami jonów Mg^{2+} pochodzących z $MgCl_2 \times 6H_2O$ lub $MgSO_4 \times 7H_2O$, wprowadzanymi na początku hodowli. Zawartość magnezu badano w biomase nie płukanej (tj. odwirowanej od supernatantu) oraz w biomase płukanej (tj. po odwirowaniu dwukrotnie płukanej wodą dejonizowaną).

Z danych literaturowych wynika, że wiązanie magnezu przebiega w dwóch fazach [Walker 1994]. W pierwszej fazie następuje szybkie przyłączenie jonów Mg^{2+} do powierzchni zewnętrznej komórki, co jest niezależne od ich metabolizmu. Druga faza jest wolniejsza i wymaga dostarczenia energii. Polega ona na transporcie metali do wnętrza komórki, głównie do kompleksów polifosforanowych wewnątrz wakuoli. W wychwytywaniu metali pomocne są niskocząsteczkowe białka, tzw. metalotioneiny lub fitoche-latyny [Brady i Duncan 1994]. Tak więc w biomacie nie płukanej oznaczano zawartość magnezu, który w większej części był zlokalizowany na zewnątrz komórki, na skutek przyciągania jonów Mg^{2+} do obszarów o ładunku ujemnym, którymi prawdopodobnie były kompleksy białkowo-węglowodanowe ściany komórkowej. Potencjalne punkty tych przyłączeń zawierają grupy fosforanowe, hydroksylowe, karboksylowe i inne [Brady i Duncan 1994]. Z kolei w biomacie płukanej wodą dejonizowaną oznaczano zawartość magnezu trwale związanego ze strukturami komórkowymi. Wewnątrz komórki magnez tworzy trwale połączenia z kwasami nukleinowymi, fosfolipidami i poli-fosforanami w obecności jonów ortofosforanowych, a w ścianie komórkowej z manno-proteinami [Mochaba i in. 1996].

Drożdże piekarskie Nr 102 hodowane na podłożu kontrolnym YPD wiązały najwięcej magnezu w 6 h hodowli (3,10 mg Mg/g s.s. – tab. 1 i 2). W kolejnych dwóch dobach (tj. po 24 h i 48 h) zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży utrzymywała się na nieco niższym poziomie (2,40-2,57 mg Mg/g s.s.), lecz obserwowane różnice nie były statystycznie istotne. Rose i Harrison [1969] podają, że drożdże zawierają przeciętnie 0-3 mg magnezu w gramie suchej substancji (drożdże piekarskie średnio 2-3 mg Mg/g s.s.), a więc badany szczep drożdży przemysłowych charakteryzował się stosunkowo dużą początkową zawartością tego pierwiastka.

Tabela 1. Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży hodowanych na podłożach kontrolnym i doświadczalnych ($MgCl_2 \times 6H_2O$ dodawany na początku hodowli)

Table 1. Content of magnesium in the yeast biomasses cultivated in control and experimental conditions (magnesium as $MgCl_2 \times 6H_2O$ added at the beginning of cultivation)

Rodzaj podłoża Kind of media	Czas hodowli, h – Time of cultivation, h					
	6	24	48	6	24	48
	w biomacie nie płukanej non-washed biomasses			w biomacie płukanej washed biomasses		
mg Mg/g s.s.						
YPD (kontrolne) YPD (control)	3,10 ab	2,57 a	2,46 a	2,61 AB	2,41 A	2,40 A
YPD (doświadczalne) YPD (experimental)	dodatek $MgCl_2 \times 6H_2O$ addition of $MgCl_2 \times 6H_2O$					
YPD + 0,25 g Mg^{2+}/dm^3	4,81 c	3,74 b	3,60 b	3,34 DE	2,86 BC	2,92 BCD
YPD + 0,50 g Mg^{2+}/dm^3	6,46 d	4,74 c	4,74 c	3,72 E	3,18 CD	3,13 CD
YPD + 1,25 g Mg^{2+}/dm^3	9,55 f	8,83 ef	8,35 e	3,67 E	3,33 DE	3,20 CD

a, b, c... – te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy.

A, B, C... – te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy.

a, b, c... – means with the same superscripts letters are not significantly different.

A, B, C... – means with the same superscripts letters are not significantly different.

Tabela 2. Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży hodowanych na podłożach kontrolnym i doświadczalnych ($MgSO_4 \times 7H_2O$ dodawany na początku hodowli)Table 2. Content of magnesium in the yeast biomasses cultivated in control and experimental conditions (magnesium as $MgCl_2 \times 7H_2O$ added at the beginning of cultivation)

Rodzaj podłoża Kind of media	Czas hodowli, h – Time of cultivation, h					
	6	24	48	6	24	48
	w biomacie nie płukanej non-washed biomasses			w biomacie płukanej washed biomasses		
mg Mg/g s.s.						
YPD (kontrolne) YPD (control)	3,10 ab	2,57 a	2,46 a	2,61 AB	2,41 A	2,40 A
YPD (doświadczalne) YPD (experimental)	dodatek $MgSO_4 \times 7H_2O$ addition of $MgSO_4 \times 7H_2O$					
YPD + 0,25 g Mg^{2+}/dm^3	4,16 bc	4,31 bc	4,11 bc	3,70 DE	3,36 BCD	3,53 CD
YPD + 0,50 g Mg^{2+}/dm^3	4,85 c	6,16 d	6,25 d	3,71 DE	3,23 BC	3,62 CD
YPD + 1,25 g Mg^{2+}/dm^3	8,72 e	8,24 e	7,50 e	4,13 E	3,07 BCD	3,95 E

a, b, c... – te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy.

A, B, C... – te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy.

a, b, c... – means with the same superscripts letters are not significantly different.

A, B, C... – means with the same superscripts letters are not significantly different.

We wszystkich wariantach hodowli prowadzonych na podłożach doświadczalnych uzyskano istotnie wyższą (3,13-9,55 mg/g s.s.) zawartość magnezu w biomacie komórkowej niż w drożdżach hodowanych na podłożu kontrolnym. Zaobserwowano także (tab. 1 i 2), że rosnące stężenia jonów magnezu w podłożach doświadczalnych (niezależnie od źródła) powodowały zwiększanie zawartości tego pierwiastka w nie płukanej biomacie komórkowej, chociaż stwierdzane różnice nie zawsze należały do statystycznie istotnych.

W hodowlach na podłożu z dodatkiem $MgCl_2 \times 6H_2O$ (tab. 1) największą ilość magnezu (bez względu na wielkość zastosowanej dawki) obserwowano w biomacie komórkowej po 6 godzinach hodowli, tj. na początku logarytmicznej fazy wzrostu drożdży. Zawartość Mg^{2+} jaka została związana przez drożdże wynosiła 9,55 mg/g s.s. (po dawce 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 podłoża) i była ponad trzykrotnie wyższa niż w biomacie hodowanej na podłożu kontrolnym. Po 24 h i 48 h hodowli drożdże uwalniały część jonów Mg^{2+} do podłoża, dlatego zawartość tego pierwiastka w biomacie komórkowej była istotnie mniejsza.

W hodowlach na podłożach doświadczalnych z dodatkiem $MgSO_4 \times 7H_2O$ (tab. 2) zauważono nieco inne tendencje. W poszczególnych przedziałach czasowych nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości magnezu w biomacie komórkowej drożdży po dodaniu Mg^{2+} na poziomie 0,25 i 1,25 g/dm³. Wyjątek stanowi hodowla z zastosowaniem 0,5 g Mg^{2+}/dm^3 , w wyniku której drożdże po 24 i 48 godzinach zawierały istotnie więcej tego pierwiastka niż po 6 godzinach. Należy jednak podkreślić, że dodatek do podłoża 0,25 i 0,5 g Mg^{2+}/dm^3 z soli siarczanowej powodował, że zawartość magnezu w nie płukanej biomacie była większa niż przy zastosowaniu soli chlorkowej. Może to być związane z lepszą adaptacją przemysłowych szczepów drożdży piekarskich do tego rodzaju soli magnezu, które są stosowane w procesach przemysłowych przebiegających z ich udziałem.

W biomacie płukanej zawartość magnezu była mniejsza niż w biomacie nie płukanej (tab. 1 i 2). Więcej jonów Mg^{2+} zostało wypłukanych z biomasy hodowanej w podłożu z dodatkiem $MgCl_2 \times 6H_2O$ niż z dodatkiem $MgSO_4 \times 7H_2O$ zwłaszcza wówczas, gdy sole tego pierwiastka były dodawane na początku hodowli.

Wprowadzenie magnezu do hodowli 18-godzinnych (tab. 3 i 4) spowodowało, że drożdże przez pierwsze 18 h zużywały magnez znajdujący się w podłożu YPD, a następnie wiązały mniejsze jego ilości niż wówczas, gdy dodawany był na początku hodowli. Stwierdzono także, że w tych warunkach zawartość magnezu w biomacie nie płukanej wzrastała proporcjonalnie do zastosowanej dawki jonów Mg^{2+} . Największą ilość magnezu, wynoszącą 7,90 mg/g s.s. stwierdzono w biomacie nie płukanej po zastosowaniu dawki wynoszącej 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 , pochodzącej z soli chlorkowej. W tej hodowli zanotowano blisko trzykrotnie większą ilość związanego magnezu (w porównaniu z biomasą z podłoży kontrolnych), a w hodowli o tym samym stężeniu jonów Mg^{2+} w postaci $MgSO_4 \times 7H_2O$ zawartość tego pierwiastka w biomacie była około dwukrotnie większa. W kolejnych godzinach zauważono niewielką tendencję spadkową ilości związanego magnezu, chociaż stwierdzone różnice nie były statystycznie istotne.

Proces płukania biomasy spowodował, że zawartość tego pierwiastka w komórkach była po zastosowaniu soli siarczanowej na tym samym poziomie co w drożdżach otrzymanych z podłoży kontrolnych (tab. 4).

Drożdże akumulują niewielkie ilości jonów magnezu, wapnia i manganu. Wiązanie magnezu przez komórki drożdży można poprawić przez dodanie niektórych pierwiastków. Duży wpływ na pobieranie magnezu mają jony Co^{2+} i Zn^{2+} [Tuszyński i Pasternakiewicz 2000]. Podobne wnioski wysunęli Soral-Śmietana i in. [1993], którzy po wzbogaceniu brzeczki piwnej o 0,1% czystego magnezu oraz identyczne stężenie jonów cynku znacznie zwiększyli przyswajalność jonów Mg^{2+} przez komórki drożdży w stosunku do hodowli kontrolnych.

Tabela 3. Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży hodowanych na podłożach kontrolnym i doświadczalnych ($MgCl_2 \times 6H_2O$ dodawany pod koniec logarymicznej fazy wzrostu)
Table 3. Content of magnesium in the yeast biomasses cultivated in control and experimental conditions (magnesium as $MgCl_2 \times 6H_2O$ added at the end of lag phase)

Rodzaj podłoża Kind of media	Czas hodowli, h – Time of cultivation, h					
	6	24	48	18	24	48
	w biomacie nie płukanej non-washed biomasses			w biomacie płukanej washed biomasses		
mg Mg/g s.s.						
YPD (kontrolne) YPD (control)	2,94 ab	2,57 ab	2,46 a	2,50 AB	2,41 A	2,40 A
YPD (doświadczalne) YDP (experimental)	dodatek $MgCl_2 \times 6H_2O$ addition of $MgCl_2 \times 6H_2O$					
YPD + 0,25 g Mg^{2+}/dm^3	3,74 abcd	3,40 abc	3,08 ab	3,30 E	3,10 CBD	3,07 CDE
YPD + 0,50 g Mg^{2+}/dm^3	5,20 e	4,96 de	4,57 cde	2,90 CD	2,82 BCD	2,80 BC
YPD + 1,25 g Mg^{2+}/dm^3	7,90 f	7,65 f	7,53 f	3,37 E	3,26 E	3,16 DE

a, b, c... – te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy.

A, B, C... – te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy.

a, b, c... – means with the same superscripts letters are not significantly different.

A, B, C... – means with the same superscripts letters are not significantly different.

Tabela 4. Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży hodowanych na podłożach kontrolnym i doświadczalnych ($MgSO_4 \times 7H_2O$ dodawany pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu)
 Table 4. Content of magnesium in the yeast biomasses cultivated in control and experimental conditions (magnesium as $MgCl_2 \times 7H_2O$ added at the end of lag phase)

Rodzaj podłoża Kind of media	Czas hodowli, h – Time of cultivation, h					
	6	24	48	18	24	48
	w biomacie nie płukanej non-washed biomasses			w biomacie płukanej washed biomasses		
mg Mg/g s.s.						
YPD (kontrolne) YPD (control)	2,94 ab	2,57 ab	2,46 a	2,50 A	2,41 A	2,40 A
YPD (doświadczalne) YPD (experimental)	dodatek $MgSO_4 \times 7H_2O$ addition of $MgSO_4 \times 7H_2O$					
YPD + 0,25 g Mg^{2+}/dm^3	3,40 abc	2,93 ab	3,37abc	2,60 A	2,59 A	2,50 A
YPD + 0,50 g Mg^{2+}/dm^3	4,74 cd	4,50 cd	4,02 cd	2,06 A	2,62 A	2,48 A
YPD + 1,25 g Mg^{2+}/dm^3	6,26 ef	6,80 f	6,04 ef	2,54 A	2,69 A	2,61 A

a,b,c... – te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy.

A, B, C... – te same litery oznaczają brak statystycznie istotnej różnicy.

a, b, c... – means with the same superscripts letters are not significantly different.

A, B, C... – means with the same superscripts letters are not significantly different.

Badanie plonu biomasy komórkowej drożdży na podłożach: kontrolnym i doświadczalnych

Celem ustalenia wpływu zastosowanych dawek soli magnezu na tempo wzrostu drożdży oznaczono plon biomasy komórkowej otrzymanej na podłożach kontrolnym i doświadczalnym.

Na podstawie przeprowadzonej analizy statystycznej stwierdzono, że w hodowli stacjonarnej rodzaj i dawka soli magnezu występujących w podłożach doświadczalnych nie miały istotnego wpływu na uzyskane plony biomasy drożdżowej.

Chociaż obserwowane różnice nie były statystycznie istotne należy zauważyć, że wprowadzenie $MgCl_2 \times 6H_2O$ spowodowało uzyskanie plonu biomasy komórkowej po 48 h hodowli w obu wariantach czasowych największego (3,33-3,75 g s.s./dm³ podłoża) (tab. 5 i 6).

W podłożach doświadczalnych zawierających $MgSO_4 \times 7H_2O$ najwyższy plon biomasy stwierdzono po 24 h hodowli, gdy omawiany związek wprowadzono na początku doświadczenia (3,99 g s.s./dm³), zaś po 48 h, gdy dodano go pod koniec fazy logarytmicznej wzrostu drożdży (3,60 g s.s./dm³). Wydaje się, że zaznaczony został stymulujący wpływ tej soli na wzrost badanego szczepu drożdży.

Dodatek jonów Mg^{2+} w ilości 1,25 g/dm³ (zarówno w postaci chlorku, jak i siarczuanu magnezu), który był zdecydowanie większy od optymalnych ilości tego pierwiastka w podłożu, nie spowodował ani znacznego przyrostu ani obniżenia plonu biomasy.

Rees i Stewart [1997] ustalili, że całkowite zahamowanie wzrostu drożdży następuje dopiero po dodaniu 25 g magnezu na 1 dm³ podłoża.

Tabela 5. Plon biomasy drożdży hodowanych na podłożach: kontrolnym i doświadczalnych (źródło magnezu: A) $MgCl_2 \times 6H_2O$ dodawane na początku hodowli i B) pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu)

Table 5. Yield of yeast biomass cultivated in control and experimental conditions (magnesium as $MgCl_2 \times 6H_2O$ added: (A) – at the beginning (B) – at the end of lag phase)

Rodzaj podłoża Kind of media	A			B		
	Czas hodowli, h – Time of cultivation, h					
	6	24	48	18	24	48
	$g \cdot dm^{-3}$					
YPD (kontrolne) YPD (control)	2,74 A	3,15 A	3,47 A	2,79 A	3,15 A	3,49 A
YPD (doświadczalne) YPD (experimental)	dodatek $MgCl_2 \times 6H_2O$ addition of $MgCl_2 \times 6H_2O$					
YPD + 0,25 g Mg^{2+}/dm^3	2,16 A	3,48 A	3,66 A	2,88 A	3,29 A	3,49 A
YPD + 0,5 g Mg^{2+}/dm^3	2,23 A	3,68 A	3,75 A	2,89 A	3,35 A	3,45 A
YPD + 1,25 g Mg^{2+}/dm^3	2,59 A	3,41 A	3,60 A	2,71 A	3,25 A	3,33 A

A – litera oznacza brak statystycznie istotnej różnicy.

A – means with the same superscripts letter are not significantly different.

Tabela 6. Plon biomasy drożdży hodowanych na podłożach: kontrolnym i doświadczalnych (źródło magnezu: A) $MgSO_4 \times 7H_2O$ dodawane na początku hodowli i B) pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu)

Table 6. Yield of yeast biomass cultivated in control and experimental conditions (magnesium as $MgCl_2 \times 7H_2O$ added: (A) – at the beginning (B) – at the end of lag phase)

Rodzaj podłoża Kind of media	A			B		
	Czas hodowli, h – Time of cultivation, h					
	6	24	48	18	24	48
	$g \cdot dm^{-3}$					
YPD (kontrolne) YPD (control)	2,74 A	3,15 A	3,47 A	2,79 A	3,15 A	3,49 A
YPD (doświadczalne) YPD (experimental)	dodatek $MgSO_4 \times 7H_2O$ addition of $MgSO_4 \times 7H_2O$					
YPD + 0,25 g Mg^{2+}/dm^3	2,88 A	3,98 A	3,29 A	3,10 A	3,40 A	3,44 A
YPD + 0,5 g Mg^{2+}/dm^3	3,20 A	3,31 A	3,45 A	2,84 A	3,48 A	3,60 A
YPD + 1,25 g Mg^{2+}/dm^3	2,53 A	3,99 A	3,29 A	3,00 A	3,33 A	3,58 A

A – litera oznacza brak statystycznie istotnej różnicy.

A – means with the same superscripts letter are not significantly different.

Sole magnezu pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu drożdży, tj. w 18 godzinie hodowli nie spowodowały dalszego, istotnego przyrostu biomasy. We wszystkich tych hodowlach uzyskiwano podobne plony biomasy drożdży, niezależnie od dawki magnezu w podłożu, rodzaju i czasu hodowli. Zbieżne wyniki otrzymali Tuszyński i Pasternakiewicz [1994], którzy stwierdzili największy przyrost biomasy w brzeczках z dodatkiem magnezu powyżej 0,5 g/dm³.

PODSUMOWANIE

1. Badany szczep przemysłowych drożdży piekarskich Nr 102 miał zdolność wiązania jonów Mg^{2+} z podłoża doświadczalnych zawierających 0,25, 0,5 lub 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 podłoża w formie chlorku lub siarczanu.

2. W zastosowanych warunkach doświadczenia najwięcej magnezu związanego z nie płukaną biomasą drożdży uzyskano po 6 h hodowli w podłożu z dodatkiem 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 w postaci soli chlorkowej. Przepuszczalnie w tych warunkach większa część jonów Mg^{2+} związana była luźno ze ścianą komórkową drożdży.

3. Zawartość magnezu w płukanej biomacie komórkowej drożdży była większa wówczas, gdy jony magnezu (niezależnie od rodzaju soli) dodawano na początku hodowli. Na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że trwałe wiązanie tego pierwiastka przez komórki drożdży dokonuje się w początkowej fazie wzrostu.

4. Dodanie magnezu w postaci soli chlorkowej w logarytmicznej fazie wzrostu powodowało, że zawartość tego pierwiastka w płukanej biomacie komórkowej była większa niż po zastosowaniu soli siarczanowej.

5. Wzbogacenie podłoża hodowlanego w sole magnezu (niezależnie od źródła i dawki) nie wpłynęło w sposób istotny na uzyskany plon biomasy drożdżowej.

6. Uzyskane wstępne wyniki badań wskazują na możliwość hodowli drożdży piekarskich wzbogaconych w magnez przy zachowaniu porównywalnego plonu biomasy.

PIŚMIENNICTWO

- Brady D., Duncan J., 1994. Bioaccumulation of metals cations by *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 41, 149-154.
- Bryłka J., Więckowska E., Lewandowski W., Stępiak S., Bortnowska-Bareła B., 1995. Eksperymentalna chemia fizyczna. Wydawnictwo SGGW Warszawa.
- D'Amore T., Panchal C.J., Russell I., Stewart G.G., 1988. Osmotic pressure effects and intracellular accumulation of ethanol in yeast during fermentation. J. Ind. Microbiol., 2, 365-372.
- Dasani G., Worth M.A., Connor M.A., Pamment N.B., 1990. Reasons for the apparent difference in the effects of produced and added ethanol on culture viability during rapid fermentations by *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng., 35, 109-122.
- Dombek K.M., Ingram L.O., 1986. Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. Appl. Environ. Microbiol., 52, 975-981.
- Mochaba F., O'Connor-Cox E.S.C., Axcell B.C., 1996. Effect of yeast quality on the accumulation and release of metal causing beer instability. J. Am. Soc. Brew. Chem., 54 (3), 155-163.
- Pasternak K., 1999. Magnez w fizjologii człowieka. Biul. Magnezol. 4 (2), 480-485.
- Pasternak K., Floriańczyk B., 1995. Metale życia. PWN Warszawa.
- Pasternakiewicz A., Tuszyński T., 1997. Effect of calcium, magnesium, cobalt (II), and zinc cations on the *Saccharomyces cerevisiae* growth. Pol. J. Food Nutr. Sci., 6/47 (4), 61-70.
- Rees M.R., Stewart G., 1997. The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. J. Inst. Brew., 103, 287-299.
- Rose H.A., Harrison J.S., 1969. Getting started with yeast. In: Methods in enzymology. T. 3. Academic Press London.
- Soral-Śmietana M., Wronkowska M., Swigoń A., Kłębukowska L., 1993. Biopierwiastki – możliwości tworzenia kompleksów z polimerami organicznymi. Biul. Magnezol., 4 (2), 418-423.
- Suizu T., Tsutsumi H., Kawado A., Murata K., Suginami K., Imayasu S., 1996. Methods for sporulation of industrially used sake yeasts. J. Fermentat. Bioengin., 81 (2), 93-97.

- Tuszyński T., Pasternakiewicz A., 1994. Wpływ jonów metali na wzrost drożdży piekarskich rasy Maunter i hybrydy XT₄₁₁^{x5p}. Zesz. Nauk. AR Krak., 1994, 24.
- Tuszyński T., Pasternakiewicz A., 2000. Bioaccumulation of metal ions by yeast cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Pol. J. Food Nutr. Sci., 9/50 (4), 31-39.
- Walker G.M., 1994. The roles of magnesium in biotechnology. Crit. Rev. Biotechnol., 14 (4), 311-345.
- Walker G.M., 1998. Magnesium-limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Am. Soc. Brew. Chem., 56 (3), 109-113.
- Walker G.M., Birch R.M., Chandrasena G., Maynard A.I., 1996. Magnesium, calcium, and fermentative metabolism in industrial yeasts. J. Am. Soc. Brew. Chem., 54, 13-18.
- Walker G.M., Maynard I.A., 1997. Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 18, 1-3.

THE STUDY OF *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* BAKERY YEAST STRAIN CAPACITY OF BINDING WITH MAGNESIUM DURING CULTIVATION IN STATIONARY CONDITIONS

Abstract: Capacities of binding magnesium ions by the *Saccharomyces cerevisiae* bakery yeast during cultivation in stationary conditions on the YPD (control) and YPD (experimental) media enriched in 0.25, 0.5 and 1.25 g Mg²⁺/dm³ from two salts: MgSO₄ x 7H₂O or MgCl₂ x 6H₂O were the subject of the study. The salts were added to the experimental media at the beginning of the cultivation or at the end of the logarithmic phase of yeast growth. Magnesium content was evaluated with ASA method in the centrifuged yeast biomass that had and had not been washed with deionized water.

Magnesium content in the yeast cultivated in the experimental media was significantly higher than in the yeast cultivated in the control medium. It was stated that increased concentration of magnesium ions (from all sources used) in the experimental media caused higher amount of magnesium content in non-washed biomass cell although the differences were not always significant.

The addition of magnesium ions at the end of logarithmic phase of growth did not influence the magnesium contents in cell biomass after 24 and 48 hours of cultivation in comparison with the media enriched at the beginning of cultivation (Tab. 1 and 2, Tab. 3 and 4.).

The major part of magnesium was loosely bound with yeast cells what was proved by comparison of magnesium content in yeast biomass that had and had not been washed with deionized water. The type of magnesium salts as well as their concentration did not have a significant influence on the yeast cell biomass yield (Tab. 5 and 6).

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, magnesium, bio-elements, yeast

W. Duszkiwicz-Reinhard, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-767 Warszawa
e-mail: reinhard@delta.sggw.waw.pl