

BADANIE ZDOLNOŚCI WIĄZANIA MAGNEZU PRZEZ DROŹDŻE PASZOWE *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950 W WARUNKACH HODOWLI WGLĘBNEJ

Stanisław Błazejak, Wanda Duszkiewicz-Reinhard,
Małgorzata Gniewosz, Tomasz Kamiński

Streszczenie. Badano zdolność naturalnego wiązania jonów Mg^{2+} przez szczep drożdży paszowych *Candida utilis* (syn. *Pichia jadinii*) ATCC 9950. Hodowle drożdży prowadzono metodą wglębną na podłożu YPD wzbogaconym w sole magnezu $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ lub $MgCl_2 \cdot 6H_2O$. 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. Dodatek magnezu w postaci $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ sprzyjał wiązaniu tego pierwiastka z podłoża YPD przez drożdże paszowe, natomiast podany w postaci soli $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ pozwalał uzyskać wyższe plony biomasy komórkowej niż z podłoża YPD wzbogaconych w sól chlorkową. Najwięcej magnezu trwale związanego z biomasa komórkową ($9,09 \text{ mg Mg}^{2+}/\text{g s.s.}$) otrzymano po 48-godzinnej hodowli z dodatkiem soli chlorkowej w ilości $1,25 \text{ g Mg}^{2+}/\text{dm}^3$, wprowadzonej do podłoża pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu.

Słowa kluczowe: biopierwiastki, metalobiałka, biopleksy, magnez, *Candida utilis*, *Pichia jadinii*

WSTĘP

Obserwowany w ostatnich latach dynamiczny rozwój biotechnologii prowadzi do nowych rozwiązań praktycznych związanych z produkcją żywności. Dbalność o jakość żywności, jej bezpieczeństwo zdrowotne oraz prawidłowe zbilansowanie składników diety stały się wyznacznikiem rozwoju społeczeństw.

Istotną częścią diety są biopierwiastki takie, jak magnez, cynk, chrom, kobalt, mangan, miedź, selen, czy żelazo, które na poziomie komórkowym aktywnie uczestniczą w metabolizmie wszystkich organizmów żywych.

Szczególną rolę wśród wymienionych mikroelementów odgrywa magnez, który jako integralny składnik koenzymów lub grup prostetycznych aktywuje ok. 300 enzymów odpowiedzialnych za przemiany metaboliczne białek, tłuszczów, węglowodanów i kwasów nukleinowych [Walker 1994, Birch i Walker 2000 Gawęcki i Hryniewiecki 2000]. Nasi-

lające się zjawiska niedoboru magnezu w diecie ludzi i zwierząt zwróciły uwagę na drożdże, których biomasę komórkową można wzbogacić w magnez w takim stopniu, by stała się naturalnym źródłem tego deficytowego pierwiastka [Soral-Śmietana i in. 1999, Tuszyński i Pasternakiewicz 2000].

Niektóre rodzaje drożdży od dawna wykorzystywane są w żywieniu zwierząt jako tanie źródło białka, a obecnie również w postaci żywych kultur jako dodatki probiotyczne. W przeprowadzonych badaniach [Mardarowicz 1997, Lipiński 1998] wykazano pozytywny wpływ komórek drożdży (zwłaszcza oligomannanów tworzących strukturę ściany komórkowej) na procesy trawienne zachodzące w przewodzie pokarmowym zwierząt, co wyraża się wzrostem liczby pożądaných bakterii fermentacji mlekowej przy jednoczesnym spadku zawartości pałeczek z rodziny *Enterobacteriaceae* (np. *Escherichia*, *Proteus*, *Serratia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*) i niektórych patogenów, jak np. *Salmonella* i *Clostridium*.

Oligomannany i białka występujące w zewnętrznej warstwie ściany komórkowej drożdży sprzyjają biernej biosorpcji kationów metali zawartych w środowisku na powierzchni komórki. Zaadsorbowane kationy, dzięki mechanizmom transportu aktywnego lub dyfuzji ułatwionej, mogą być przenoszone do wnętrza komórki i akumulowane w postaci metalobiałek, określaných również jako biopleksy [Walker 1994, MacDiarmid i Gardner 1997, Chmiel 1998, Lipke i Ovalle 1998].

Zainteresowanie biopleksami wzrasta na całym świecie dzięki doniesieniom o lepszej przyswajalności przez organizmy ludzi i zwierząt mikroelementów pochodzących z połączeń organicznych niż z solami nieorganicznymi tych pierwiastków. Biopleksy łączą w sobie wartość żywieniową zarówno mikroelementu, jak i części organicznej (aminokwasu, peptydu lub białka), natomiast w odróżnieniu od soli mineralnych, nie oddysocjują w środowisku wodnym jonów metali, dzięki czemu przyswajalność takiej formy kationów przez organizm jest porównywalna z przyswajalnością białka [Świątkiewicz 1998].

Wzbogacenie biomasy komórek drożdży w jony Mg^{2+} stwarza możliwość uzyskania biopleksów, które można wykorzystać do suplementacji diety zwierząt, a po zabiegach obniżających zawartość kwasów nukleinowych również ludzi [Krejpcio i in. 1999, Olędzka 1999].

Celem niniejszej pracy było zbadanie zdolności naturalnego wiązania jonów Mg^{2+} przez komórki drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 w zależności od źródła tego pierwiastka, jego dawki w podłożu oraz czasu prowadzenia hodowli wglębnej. Ponadto podjęto próbę ustalenia jaka część magnezu zawartego w podłożach wzbogaconych w ten jon wiąże się trwale z komórkami drożdży.

Zakres wykonanych badań obejmował następujące zagadnienia:

- wzrost drożdży *C. utilis* podczas hodowli wglębnej na podłożu kontrolnym,
- określenie zdolności wiązania jonów Mg^{2+} przez komórki drożdży w zależności od rodzaju i dawki soli oraz ustalenie takiego momentu wprowadzania jonów Mg^{2+} do podłoża hodowlanego, w którym wiązanie tego pierwiastka jest największe,
- określenie wpływu stężenia jonów Mg^{2+} w podłożach doświadczalnych w zależności od rodzaju soli magnezu na plon biomasy komórkowej drożdży paszowych *C. utilis*,
- ocena stopnia wykorzystania jonów Mg^{2+} przez komórki drożdży *C. utilis* z podłoży wzbogaconych w ten kation.

MATERIAŁ I METODYKA PRACY

Materiał biologiczny

Materiałem biologicznym zastosowanym w niniejszej pracy był szczep drożdży paszowych *Candida utilis* (syn. *Pichia jadinii*) ATTC 9950 pochodzący z kolekcji czystych kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW. Drożdże przechowywano na skosach brzezkowych w temperaturze +4°C.

Podłoża mikrobiologiczne

– **brzeżka z 2-procentowym agarem** [Burbianka i Pliszka 1983] na której przechowywano szczep drożdży *C. utilis*,

– **YPD z 2-procentowym agarem** [Suizu i in. 1994] stosowano do liczenia drożdży metodą płytkową celem zbadania wzrostu *C. utilis* podczas hodowli wglębnej na płynnym podłożu YPD,

– **podłoże kontrolne** – do hodowli wglębnej drożdży paszowych stosowano płynne podłoże YPD o pH 5,0,

– **podłoża doświadczalne** – do hodowli wglębnej drożdży paszowych używano płynne podłoże YPD wzbogacone w sole magnezu ($\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ lub $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$); sole dodawano w takich ilościach, aby zawartość jonów Mg^{2+} wynosiła odpowiednio: $0,25\text{g Mg}^{2+}/\text{dm}^3$, $0,50\text{g Mg}^{2+}/\text{dm}^3$ i $1,25\text{g Mg}^{2+}/\text{dm}^3$.

Hodowla drożdży paszowych na podłożach kontrolnych i doświadczalnych wzbogaconych w jony magnezu

Inoculum drożdży przygotowano szczepiąc materiałem ze skosu płynne podłoże YPD. Zaszczepioną matkę namnażano przez 24 godziny w temperaturze 28°C na wstrząsarce posuwisto-zwrotnej o częstotliwości 200 cykli/min (E. Bühler SM-30 Control, Niemcy). Uzyskane *inoculum* stanowiło materiał wyjściowy do zaszczepienia płynnych podłoży kontrolnych i doświadczalnych w danej serii badań. Podłoża hodowlane (kontrolne i doświadczalne) w poszczególnych seriach szczepiono wówczas, gdy gęstość optyczna (OD) *inoculum* miała tę samą wartość. W doświadczeniu, w 24-godzinnej hodowli, wynosiła ona 2,150.

Celem wzbogacenia komórek drożdży paszowych *C. utilis* w magnez przyjęto dwa warianty wprowadzania soli do płynnych podłoży doświadczalnych:

– **wariant I** – magnez do podłoża YPD dodano w postaci soli $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ lub $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ na początku hodowli ($t = 0$),

– **wariant II** – magnez do podłoża YPD dodano w postaci soli $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ lub $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu ($t = 24$).

Hodowle drożdży na podłożach doświadczalnych prowadzono metodą wglębną w temperaturze 28°C przez 48 godzin na wstrząsarce posuwisto-zwrotnej o częstotliwości 200 cykli/min (E. Bühler SM-30 Control, Niemcy). 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 komórkowej drożdży oraz zawartość magnezu w biomacie komórkowej i w płynie pohodowlanym. Oznaczenia przeprowadzono w 0, 24 i 48 godzinie hodowli dla wariantu I ($t = 0$) oraz w 24 i 48

godzinie hodowli dla wariantu II ($t = 24$), ponieważ na początku hodowli w wariancie II plon biomasy i zawartość magnezu w biomacie były takie same jak w hodowli na podłożu kontrolnym (sole magnezu w wariancie II dodawano do płynnych podłoży YPD dopiero po 24 godzinach, tj. pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu).

CZEŚĆ ANALITYCZNA

Oznaczenie liczby komórek drożdży

Liczbę komórek drożdży oznaczono metodą płytkową na podłożu YPD z 2-procentowym agarem, wykonując posiewy z trzech kolejnych rozcieńczeń dziesiętnych w trakcie 72-godzinnej hodowli wglębnej. Próbkę do badań pobierano w 0, 2, 4, 6, 8, 24, 30, 48 i 72 godzinie hodowli [Burbianka i Pliszka 1983].

Oznaczenie gęstości optycznej (OD)

Oznaczenie gęstości optycznej wykonywano w celu szybkiego określenia orientacyjnej liczby komórek drożdży w *inoculum* oraz przy badaniu wzrostu drożdży paszowych na płynnym podłożu YPD w warunkach doświadczenia. Pomiary OD przeprowadzono na spektrofotometrze (Spectronic 20 Genesys, USA) przy długości fali 600 nm [Pasternakiewicz i Tuszyński 1997].

Oznaczenie plonu biomasy komórkowej drożdży

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

Oznaczenie zawartości magnezu w biomacie komórkowej drożdży, supernatancie i odcieku metodą absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej (ASA)

Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży kontrolowano po 0, 24 i 48 godzinach 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 oznaczano zawartość magnezu metodą ASA (spektrofotometr Shimadzu 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.

Zawartość magnezu w supernatancie (płyn z nad osadu otrzymany po odwirowaniu biomasy komórkowej drożdży z podłoża hodowlanego) i odcieku (płyn z nad osadu otrzymany po odwirowaniu biomasy komórkowej dwukrotnie przemytej wodą dejonizowaną) oznaczano analogicznie jak w biomacie komórkowej z tą jednak różnicą, że wynik podawano w miligramach Mg^{2+} na decymetr sześcienny podłoża hodowlanego.

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 biomasie komórkowej drożdży. Dokonano porównania wartości średnich za pomocą testu Tukey'a dla poziomu istotności $\alpha = 0,05$. Wyniki analizy statystycznej (najmniejsze istotne różnice między porównywanymi średnimi, tzw. NIR) zamieszczono w tabelach 2-7.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I Dyskusja

Niniejsza praca jest kontynuacją zadań badawczych realizowanych w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW [Duszkiewicz-Reinhard i in. 2002].

Nadrzędnym celem było uzyskanie z podłoży doświadczalnych biomasy komórkowej z dużą zawartością trwale związanego z nią magnezu i jednoczesnym otrzymaniu plonu biomasy porównywalnego z hodowlą na standardowym podłożu YPD. Trwale wiązanie magnezu z komórkami drożdży sugeruje, że mogą to być biopleksy, które można wykorzystać do suplementacji diety zwierząt bądź ludzi przy coraz powszechniejszym niedoborze tego biopierwiastka.

Do badań nad wiązaniem magnezu w warunkach hodowli wglębnej zastosowano podłoża doświadczalne przygotowane na bazie standardowego podłoża YPD, które gwarantuje optymalny wzrost drożdży [Blackwell i in. 1997]. Podłoża doświadczalne wzbogacono w jony Mg^{2+} pochodzące z dwóch soli nieorganicznych (chlorku i siarczynu). Wybór takich źródeł magnezu oraz zastosowanych dawek podyktowany został ich dostępnością, dobrą rozpuszczalnością oraz brakiem toksyczności w stosowanych stężeniach wobec drożdży [Rees i Steward 1997, 1999, Soral-Śmietana i in. 1999].

Wzrost drożdży paszowych *C. utilis* na standardowym podłożu YPD

Badanie wzrostu na podłożu YPD pozwoliło ustalić, po jakim czasie hodowli drożdży paszowych *C. utilis* liczba komórek osiągała wartość maksymalną. Jednym z przyjętych celów pracy było porównanie zdolności wiązania jonów Mg^{2+} dodanych do podłoży doświadczalnych na początku hodowli i pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu z komórkami badanego szczepu.

Analizując uzyskane wyniki (tab. 1) stwierdzono, że największą liczbę komórek drożdży w podłożu YPD, wynoszącą $6,31 \cdot 10^9$ jtk/cm³, osiągnięto po 24 godzinach. Po 48 i 72 godzinach hodowli liczba żywych komórek zmniejszała się i wynosiła odpowiednio $6,02 \cdot 10^9$ jtk/cm³ i $4,57 \cdot 10^9$ jtk/cm³. Równocześnie do 24 godziny hodowli następował dynamiczny przyrost biomasy komórkowej. Po dobie hodowli otrzymano 10,63 g s.s./dm³ podłoża YPD. W miarę przedłużania czasu hodowli przyrost plonu biomasy komórkowej stawał się znikomy. Po 30 i 48 godzinach wynosił odpowiednio 10,78 g s.s./dm³ i 10,74 g s.s./dm³.

Podobny charakter zmian obserwowano w przypadku wyników pomiaru gęstości optycznej podłoża YPD w czasie wzrostu badanych drożdży paszowych (tab. 1). W ciągu 24 godzin od momentu zaszczepienia podłoża YPD wartość OD wzrosła z 0,968 do 2,193. Po tym czasie, aż do zakończenia hodowli, OD podlegało nieznacznym wahaniom.

Tabela 1. Zmiany liczby komórek drożdży paszowych *C. utilis*, gęstości optycznej (OD) podłoża pohodowlanego oraz plonu biomasy w kolejnych godzinach hodowli węgłnej na standardowej pożywce YPD

Table 1. Changes in number of cells of *C. utilis*, optical density (OD) and yield of biomass during cultivation in the control medium YPD

Czas hodowli Cultivation time h	Liczba komórek, jtk/cm ³ Number of cells, cfu/cm ³	Gęstość optyczna Optical density OD	Plon biomasy, g s.s./dm ³ Yield of biomass, g d.w./dm ³
0	7,24·10 ⁷	0,968	2,25
2	2,45·10 ⁸	1,198	3,00
4	5,12·10 ⁸	1,488	5,07
6	1,44·10 ⁹	1,640	6,32
8	1,66·10 ⁹	1,728	6,47
24	6,31·10 ⁹	2,193	10,63
30	4,54·10 ⁹	2,198	10,78
48	6,02·10 ⁹	2,189	10,74
72	4,57·10 ⁹	2,240	10,46

Po 72 godzinach osiągnęło wartość 2,240, a więc nieco wyższą niż po 24 godzinach, co można tłumaczyć postępującymi procesami autolizy komórek drożdży.

Na podstawie uzyskanych rezultatów zmian liczby komórek, OD i plonu biomasy w czasie 72-godzinnej hodowli węgłnej *C. utilis* na podłożu YPD można zauważyć, że po 24 godzinach tempo wzrostu drożdży ulegało wyraźnemu zahamowaniu, co świadczyło o zakończeniu logarytmicznej fazy wzrostu w warunkach doświadczenia.

Badanie zdolności wiązania magnezu przez komórki drożdży *C. utilis* z podłoży kontrolnych i doświadczalnych

Podstawowym celem pracy było sprawdzenie zdolności badanego szczepu drożdży *C. utilis* do naturalnego wiązania magnezu. Oznaczano zawartość tego pierwiastka w nie przemywanej i przemywanej biomase komórkowej drożdży hodowanych na podłożu kontrolnym YPD i podłożach doświadczalnych YPD wzbogaconych w różne dawki magnezu.

Aby określić trwałość związania Mg²⁺ ze strukturami komórkowymi drożdży z każdej hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych pobierano dwie równoległe próbki. W jednej z nich odwirowaną biomasę drożdży suszono, ważono i spalano celem oznaczenia zawartości magnezu, w drugiej zaś biomasę komórkową, przed oznaczeniem w niej zawartości magnezu, dwukrotnie przemywano wodą dejonizowaną.

Zadaniem wody, wykazującej charakter dipolowy, było związanie tej części jonów Mg²⁺, które nie wniknęły do wnętrza komórki, lecz na zasadzie chemisorpcji luźno zaadsorbowały się na zewnętrznej warstwie ściany komórkowej drożdży.

Otrzymane wyniki poddano analizie statystycznej testem Tukey'a w celu określenia istotności wpływu zastosowanych dawek magnezu w podłożach doświadczalnych na jego wiązanie z biomasą komórkową (tab. 2-5).

Stosując wariant I (t = 0) wprowadzania jonów Mg²⁺ do podłoży doświadczalnych w postaci MgCl₂·6H₂O najwięcej magnezu trwale zwiazanego z komórkami drożdży uzyskano po 48 godzinach hodowli (tab. 2). Wartości te dla, wzrastających dawek magnezu w podłożach doświadczalnych, wynosiły odpowiednio 3,17, 3,57 i 6,90 mg Mg²⁺/g s.s.

i były istotnie większe od jego zawartości w komórkach drożdży uzyskanych z kontrolnego podłoża YPD. Należy przy tym zwrócić uwagę, że nieznacznie mniejsze ilości magnezu wiązały się prawie natychmiast z komórkami drożdży po wprowadzeniu *inoculum* do podłoża doświadczalnych (2,48, 3,37 i 5,37 mg Mg²⁺/g s.s.). Wartości te były kilka razy większe w porównaniu z próbą kontrolną, która wynosiła 1,08 mg Mg²⁺/g s.s. Może to oznaczać, że drożdże w fazie logarytmicznego wzrostu wykazują szczególnie duże zapotrzebowanie na magnez. Szybkie przyswajanie magnezu w fazie logarytmicznej spowodowane było żywotnością drożdży, które intensywnie pączkowały. Na tym etapie wzrostu niezbędnym czynnikiem dla namnażających się komórek była obecność w środowisku jonów Mg²⁺ [Birch i Walker 2000, Suizu i in. 1994].

Tabela 2. Zawartość magnezu w biomase komórkowej drożdży paszowych *C. utilis* podczas hodowli węgłębnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w MgCl₂·6H₂O (wariant I, t = 0)

Table 2. Contents of magnesium in *C. utilis* biomass during the cultivation 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	0	24	48
	biomasa bez przemywania, mg Mg ²⁺ /g s.s. biomass without washing, mg Mg ²⁺ /g d.w.			biomasa z przemywaniem, mg Mg ²⁺ /g s.s. biomass with washing mg Mg ²⁺ /g d.w.		
YPD – kontrolne YPD – control	2,03A*	1,49A	1,23A	1,08a*	1,11a	1,02a
YPD + 0,25 g Mg ²⁺ /dm ³	3,62B	5,01C	3,79B	2,48b	3,03bc	3,17bc
YPD + 0,50 g Mg ²⁺ /dm ³	6,31D	4,35BC	3,90B	3,37bc	3,35bc	3,57c
YPD + 1,25 g Mg ²⁺ /dm ³	10,76E	11,69EF	11,89F	5,37d	6,45e	6,90e

*Średnie z tym samym indeksem literowym nie różnią się istotnie.

*Means with the same letter did not differ significantly.

W przypadku zastosowania MgSO₄·7H₂O jako źródła jonów Mg²⁺ w podłożach doświadczalnych (tab. 3) można zauważyć, że komórki drożdży wiązały wyraźnie mniej magnezu niż gdy źródłem tego pierwiastka była sól chlorkowa (tab. 2). Dotyczyło to szczególnie największej dawki jonów Mg²⁺ zawartej w podłożach doświadczalnych (1,25 g Mg²⁺/dm³), przy której trwałe związanie magnezu z komórkami *C. utilis* wyniosło odpowiednio 2,12, 2,67 i 2,90 mg Mg²⁺/g s.s. po 0, 24 i 48 godzinach hodowli (tab. 3). Z analogicznych hodowli na podłożach doświadczalnych wzbogaconych MgCl₂·6H₂O uzyskane wyniki były przeszło dwukrotnie wyższe (tab. 2).

Najwięcej magnezu (pochodzącego z soli siarczanowej) trwale związanego z biomasą komórkową drożdży, 3,16 mg Mg²⁺/g s.s., uzyskano po 24 godzinach hodowli po zastosowaniu dawki 0,50 g Mg²⁺/dm³ podłoża (tab. 3). Wynik ten nie różnił się jednak istotnie od zawartości magnezu w biomase komórkowej po 48 godzinach hodowli z wykorzystaniem dawek 0,5 i 1,25 g Mg²⁺/dm³ w podłożach doświadczalnych. Na podstawie wyników tej części badań można przypuszczać, że zastosowanie wyższych dawek magnezu w podłożach niż 0,5 g Mg²⁺/dm³ pochodzących z siarczanu jest niecelowe z punktu założeń pracy.

Tabela 3. Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży paszowych *C. utilis* podczas hodowli wglębnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (wariant I, $t = 0$)

Table 3. Contents of magnesium in *C. utilis* biomass during the cultivation in the control and experimental media enriched with $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (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 d.w.			biomasa z przemywaniem, mg Mg^{2+} /g s.s. biomass with washing mg Mg^{2+} /g d.w.		
YPD – kontrolne YPD – control	2,03AB*	1,49A	1,23A	1,08a*	1,11a	1,02a
YPD + 0,25 g Mg^{2+} /dm ³	2,61B	2,39B	2,53B	1,86b	1,92b	2,53c
YPD + 0,50 g Mg^{2+} /dm ³	5,33D	4,13C	4,19C	2,14bc	3,16e	2,88de
YPD + 1,25 g Mg^{2+} /dm ³	7,27E	5,92D	6,06D	2,12c	2,67d	2,90de

*Średnie z tym samym indeksem literowym nie różnią się istotnie.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Wyniki badań zawarte w tabelach 2-3 wskazują na wyraźną tendencję do usuwania znacznych ilości jonów Mg^{2+} z biomasy komórkowej *C. utilis* po jej dwukrotnym przemyciu wodą dejonizowaną, bez względu na zastosowane źródło magnezu w podłożu doświadczalnym. Maksymalna zawartość magnezu w biomacie bez przemywania z podłoża doświadczalnych wzbogaconych w $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ po 48 godzinach hodowli wynosiła 11,89 mg Mg^{2+} /g s.s. dla dawki 1,25 g Mg^{2+} /dm³ (tab. 2). Po przemyciu biomasy komórkowej wodą dejonizowaną wartość ta spadła do poziomu 6,9 mg Mg^{2+} /g s.s., co stanowiło 58% początkowej zawartości jonów Mg^{2+} . W przypadku $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (tab. 3) dla tej samej dawki jonów Mg^{2+} w podłożu doświadczalnym zawartość magnezu w komórkach drożdży po przemyciu wodą dejonizowaną wynosiła 2,90 mg Mg^{2+} /g s.s., czyli ok. 50% początkowej zawartości (6,06 mg Mg^{2+} /g s.s.). Wydaje się, iż tylko ta część magnezu, która trwale związała się z biomasą komórkową może zostać przetransportowana do wnętrza komórek drożdży i występować w połączeniach o charakterze biopeksów.

Wariant II ($t = 24$) hodowli wglębnej *C. utilis* na podłożach doświadczalnych przeprowadzono w celu sprawdzenia, w jaki sposób dodatek magnezu pod koniec fazy logarytmicznego wzrostu wpłynie na efektywność jego wiązania z komórkami drożdży. Po zastosowaniu dodatku soli $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ w podłożu doświadczalnym, jako źródła jonów Mg^{2+} , najwięcej magnezu trwale związanego z biomasą komórkową odnotowano również po 48 godzinach hodowli (tab. 4). Wartości te dla wzrastających dawek magnezu w podłożach doświadczalnych, wynosiły 2,17, 2,50 i 9,09 mg Mg^{2+} /g s.s. Jedynie z podłoża doświadczalnego wzbogaconego w 1,25 g Mg^{2+} /dm³ uzyskano taką ilość magnezu trwale związanego z komórkami drożdży (9,09 mg Mg^{2+} /g s.s.), która była istotnie większa niż z innych podłoży w tym wariantie hodowli ($t = 24$). W przypadku biomasy komórkowej otrzymanej z pozostałych podłoży w wariantie II (po 24 i 48 godzinach hodowli) stwierdzone różnice w zawartości magnezu trwale związanego z drożdżami *C. utilis* były statystycznie nieistotne (tab. 4). Tę samą prawidłowość zaobserwowano w biomacie komórkowej drożdży nie przemywanych wodą dejonizowaną.

Tabela 4. Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży paszowych *C. utilis* podczas hodowli wglębnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (wariant II, t = 24)Table 4. Contents of magnesium in *C. utilis* biomass during the cultivation 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	24	48
	biomasa bez przemywania, mg Mg^{2+} /g s.s. biomass without washing, mg Mg^{2+} /g d.w.		biomasa z przemywaniem, mg Mg^{2+} /g s.s. biomass with washing mg Mg^{2+} /g d.w.	
YPD – kontrolne YPD – control	1,49A*	1,23A	1,11a*	1,02a
YPD + 0,25 g Mg^{2+} /dm ³	1,99A	2,28A	1,84a	2,17a
YPD + 0,50 g Mg^{2+} /dm ³	3,46A	3,91A	1,92a	2,50a
YPD + 1,25 g Mg^{2+} /dm ³	3,46A	11,26B	3,29a	9,09b

*Średnie z tym samym indeksem literowym nie różnią się istotnie.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Stwierdzono też zaskakująco dużą zawartość magnezu trwale związanego z komórkami *C. utilis* (9,09 mg Mg^{2+} /g s.s.) osiągniętą po 48 godzinach, zwłaszcza, że jony Mg^{2+} w postaci chlorku wprowadzano do podłoża hodowlanego pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu, kiedy metabolizm komórkowy ulega pewnemu spowolnieniu. Być może wysokie stężenie jonów Mg^{2+} (1,25 g Mg^{2+} /dm³) zaindukowało ekspresję genów odpowiedzialnych za transport kationów do wnętrza komórek tym bardziej, że drożdże wykazują predyspozycje do wewnątrzkomórkowej akumulacji pewnego nadmiaru jonów metali obecnych w środowisku. W przypadku omawianej próby zaledwie 20% jonów Mg^{2+} zostało usuniętych po dwukrotnym przemyciu biomasy komórkowej wodą dejonizowaną (bez przemywania – 11,26 mg Mg^{2+} /g s.s., z przemywaniem – 9,09 mg Mg^{2+} /g s.s.), natomiast 80% trwale związało się z komórkami drożdży.

Po zastosowaniu $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ jako źródła jonów Mg^{2+} w dawce 1,25 g Mg^{2+} /dm³, po 48 godzinach hodowli uzyskano biomasę, która zawierała 2,75 mg Mg^{2+} /g s.s. trwale związanego z komórkami, co stanowiło ok. 50% jego początkowej zawartości w biomacie bez przemywania (tab. 5). Wyniki badań uzyskane z hodowli drożdży paszowych *C. utilis* na podłożach doświadczalnych wzbogacanych w magnez według wariantu II (t = 24 tj. pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu) wskazują, że magnez podany w postaci chlorku wiązał się w większej ilości z komórkami niż pochodzący z soli siarczanowej, szczególnie gdy zastosowano go w największej dawce, 1,25 g Mg^{2+} /dm³.

Analiza statystyczna zawartości magnezu trwale związanego z komórkami drożdży wykazała, że w wariacie I (t = 0) wszystkie zastosowane w warunkach doświadczenia dawki jonów Mg^{2+} wpływały istotnie na jego zawartość w porównaniu z hodowlą kontrolną (tab. 2-3). W wariacie II (t = 24), dla soli $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, jedynie dawka 1,25 g Mg^{2+} /dm³ wywarła istotny wpływ na końcową zawartość tego pierwiastka w biomacie komórkowej w stosunku do próby kontrolnej, natomiast po zastosowaniu $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ jako źródła jonów Mg^{2+} wszystkie zastosowane dawki wpływały istotnie na zawartość magnezu w komórkach drożdży wobec próby kontrolnej po 48 godzinach hodowli (tab. 4-5).

Tabela 5. Zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży paszowych *C. utilis* podczas hodowli wglębnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (wariant II, $t = 24$)

Table 5. Contents of magnesium in *C. utilis* biomass during the cultivation in the control and experimental media enriched with $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (variant II, $t = 24$)

Rodzaj podłoża Medium type	Czas hodowli, h Cultivation time, h			
	24	48	24	48
	biomasa bez przemywania, mg Mg^{2+} /g s.s. biomass without washing, mg Mg^{2+} /g d.w.		biomasa z przemywaniem, mg Mg^{2+} /g s.s. biomass with washing mg Mg^{2+} /g d.w.	
YPD – kontrolne YPD – control	1,49A*	1,23A	1,11a*	1,02a
YPD + 0,25 g Mg^{2+} /dm ³	1,59A	2,35B	1,21a	2,18bc
YPD + 0,50 g Mg^{2+} /dm ³	5,28DE	4,88CD	3,35d	3,09d
YPD + 1,25 g Mg^{2+} /dm ³	4,45C	5,73E	1,86b	2,75cd

*Średnie z tym samym indeksem literowym nie różnią się istotnie.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Wpływ zawartości magnezu w podłożach doświadczalnych na plon biomasy komórkowej drożdży *Candida utilis*

W tej części badań oceniano, która z dodanych soli magnezu do podłoża doświadczalnych korzystniej wpływała na wzrost drożdży *C. utilis*, czego wyrazem była ilość uzyskiwanej biomasy komórkowej. Przeprowadzono analizę statystyczną określającą czy zastosowane dawki magnezu, pochodzące z dwóch różnych soli, wpływały istotnie na plon biomasy komórkowej w porównaniu z hodowlą na podłożu YPD.

Podczas hodowli wglębnej na podłożach doświadczalnych wzbogaconych w jony Mg^{2+} otrzymywano istotnie wyższe plony biomasy niż w hodowlach kontrolnych bez dodatkowego źródła tego pierwiastka (tab. 6-7).

Porównanie plonu biomasy komórkowej uzyskiwanej z podłoża doświadczalnych wzbogaconych jonami Mg^{2+} wskazuje, że sól siarczanowa, w przeciwieństwie do chlorkowej, wpływała korzystniej na wzrost badanego szczepu drożdży paszowych.

Po zastosowaniu $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ najwyższy plon biomasy (15,69 g s.s./dm³) uzyskano już po 24 godzinach przy dawce 0,25 g Mg^{2+} /dm³ (tab. 7), natomiast w przypadku soli $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ najwyższą zawartość biomasy (14,12 g s.s./dm³) uzyskano po 48 godzinach hodowli wglębnej przy dawce magnezu 0,5 g Mg^{2+} /dm³ (tab. 6).

Jak podają Robinson i in. [2000] drożdże *C. utilis* wykazują szczególną skłonność do metabolizmu siarki, w tym również z połączeń nieorganicznych w formie siarczków, siarczanów i tiosiarczanów. Może to tłumaczyć otrzymanie wyższego plonu biomasy komórkowej w warunkach doświadczenia na podłożach wzbogaconych $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ niż po zastosowaniu $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$.

Analiza statystyczna wykazała, że zastosowanie soli $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ jako źródła jonów Mg^{2+} w dawkach 0,5 i 1,25 g Mg^{2+} /dm³ miało istotny wpływ na wysokość uzyskanego plonu biomasy w porównaniu z próbą kontrolną (tab. 6). W przypadku soli $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ stwierdzono istotny wpływ wszystkich badanych stężeń jonów Mg^{2+} na ilość uzyskanej biomasy komórkowej drożdży *C. utilis* w stosunku do hodowli kontrolnej (tab. 7).

Tabela 6. Plon biomasy komórkowej drożdży paszowych *C. utilis* podczas hodowli wglębnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ (wariant I, $t = 0$)
 Table 6. Yield of *C. utilis* biomass during the cultivation 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
	plon biomasy, g s.s./dm ³ yield of biomass, g d.w./dm ³		
YPD – kontrolne YPD – control	1,93a*	10,81b	10,94b
YPD + 0,25 g Mg ²⁺ /dm ³	1,97a	11,71bc	10,65b
YPD + 0,50 g Mg ²⁺ /dm ³	1,99a	14,09d	14,12d
YPD + 1,25 g Mg ²⁺ /dm ³	1,87a	12,96cd	12,46c

*Średnie z tym samym indeksem literowym nie różnią się istotnie.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Tabela 7. Plon biomasy komórkowej drożdży paszowych *C. utilis* podczas hodowli wglębnej na podłożu kontrolnym i doświadczalnym wzbogaconym w $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ (wariant I, $t = 0$)
 Table 7. Yield of *C. utilis* biomass during the cultivation 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 d.w./dm ³		
YPD – kontrolne YPD – control	1,93a*	10,81b	10,94b
YPD + 0,25 g Mg ²⁺ /dm ³	1,96a	15,69d	14,87d
YPD + 0,50 g Mg ²⁺ /dm ³	1,91a	15,35d	13,85c
YPD + 1,25 g Mg ²⁺ /dm ³	2,00a	15,23d	14,79d

*Średnie z tym samym indeksem literowym nie różnią się istotnie.

*Means with the same letter did not differ significantly.

Wykorzystanie jonów magnezu przez drożdże *C. utilis* z podłoży kontrolnych i doświadczalnych

Przeprowadzone badania wykazały, że najwięcej magnezu związanego z komórkami *C. utilis* uzyskiwano wtedy, gdy dodatek jonów Mg^{2+} do podłoży doświadczalnych był największy (1,25 g/dm³). Ilość magnezu związanego z komórkami drożdży nie wzrastała jednak proporcjonalnie do zastosowanych dawek jonów Mg^{2+} . W związku z tym określono przy jakiej dawce magnezu jego wykorzystanie z podłoży, poprzez trwałe związanie z komórkami drożdży, było największe.

Oznaczenie zawartości magnezu w supernatancie (po odwirowaniu biomasy) i odcieku (po odwirowaniu biomasy przemytej wodą dejonizowaną) przeprowadzono w 0, 24, 48 godzinie hodowli wgłębnej na podłożach doświadczalnych.

Stopień wykorzystania jonów Mg^{2+} z podłoży poprzez trwałe związanie z komórkami drożdży w stosunku do jego początkowej zawartości przed wprowadzeniem *inoculum* wyrażono w procentach.

Zawartość magnezu w standardowym podłożu YPD była niewielka i wahała się w przedziale 0,030-0,034 g/dm³ (do obliczeń przyjęto wartość 0,03 g/dm³). Podobne ilości magnezu znajdują się w brzezce browarniczej oraz w chemicznie zmodyfikowanym podłożu wg Fantesa i Brooksa [Tuszyński i Pasternakiewicz 2000]. Ilości te są jednak mniejsze od 1,7 mM, czyli od minimalnej dawki magnezu wymaganej do prawidłowego wzrostu drożdży [Jones i Greenfield 1984]. Znalazło to potwierdzenie w badaniu plonu biomasy, który w większości przypadków był istotnie niższy dla hodowli prowadzonych na kontrolnym podłożu YPD w porównaniu z podłożami wzbogaconymi w jony tego pierwiastka (tab. 6-7).

W celu określenia stopnia wykorzystania magnezu z podłoży poprzez jego trwałe związanie z komórkami drożdży wykorzystano zależność:

$$\text{Procentowe wykorzystanie jonów magnezu z podłoża} = [(a - b - c) / a] \cdot 100\%$$

gdzie: a – początkowa zawartość Mg w podłożu, mg Mg^{2+} /dm³,

b – zawartość Mg w supernatancie, mg Mg^{2+} /dm³,

c – zawartość Mg w odcieku, mg Mg^{2+} /dm³.

W obu wariantach hodowli na podłożach doświadczalnych (dodatek jonów Mg^{2+} na początku hodowli lub pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu) największe wykorzystanie magnezu z podłoży (niezależnie od rodzaju zastosowanej soli) stwierdzano po 48 godzinach. W wariantcie I (t = 0) stopień wykorzystania magnezu z podłoży doświadczalnych mieścił się w zakresie 29-37%, natomiast w wariantcie II (t = 24) 24-31% (tab. 8).

Wyniki przeprowadzonych badań wskazują, że maksymalny stopień wykorzystania jonów Mg^{2+} w warunkach doświadczenia z podłoży doświadczalnych przy 10-procentowym (v/v) wsiewie *inoculum* nie przekroczył 40% (tab. 8). Jak podają Lo i in. [1999] oraz Lewicki [1982] wiązanie metali z komórkami drożdży ma charakter biosorpcji opisaną równaniem Langmuira. Ilość jonów Mg^{2+} adsorbowanych w monowarstwie ściany komórkowej jest proporcjonalna do całkowitej powierzchni biomasy komórkowej drożdży. Komórki w logarytmicznej fazie wzrostu są zwykle mniejsze niż w fazie stacjonarnej, zatem ich powierzchnia całkowita w jednostce objętości podłoża hodowlanego była większa, co wyraziło się ilością magnezu związanego w tej fazie z komórkami *C. utilis*. Wydaje się, że dla zwiększenia stopnia wykorzystania jonów Mg^{2+} z podłoży doświadczalnych w badanym zakresie stężeń należy znacznie zwiększyć wsiew *inoculum*. Być może dobrym rozwiązaniem byłoby wprowadzenie do podłoży doświadczalnych komórek drożdży *C. utilis* w postaci gęstwy drożdżowej, otrzymanej z odwirowanej 24-godzinnej hodowli biomasy.

Tabela 8. Porównanie stopnia wykorzystania magnezu przez drożdże paszowe *C. utilis* z podłoży doświadczalnych wzbogaconych w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ lub $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ w I i II wariancie hodowli wglębnejTable 8. The comparison of percentage utilization magnesium ions by *C. utilis* during the cultivation in experimental media enriched with $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ or $MgSO_4 \cdot 7H_2O$

Rodzaj podłoża Medium type	Czas hodowli Cultivation time h	Supernatant mg Mg^{2+}/dm^3		Odciek Drained liquid mg Mg^{2+}/dm^3		Stopień wykorzysta- nia magnezu Percentage utilization of magnesium %	
		wariant – variant					
		I	II	I	II	I	II
YPD+ $MgCl_2 \cdot 6H_2O$							
0,25 g Mg^{2+}/dm^3	0	197		18,3		23	
	24	199	191	18,1	21,3	23	24
	48	175	186	10,8	7,9	34	31
0,50 g Mg^{2+}/dm^3	0	392		22,7		22	
	24	378	351	18,3	25,5	25	29
	48	362	350	14,8	21,3	29	30
1,25 g Mg^{2+}/dm^3	0	908		47,0		25	
	24	856	845	44,4	57,2	30	30
	48	791	843	45,9	45,4	35	31
YPD+ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$							
0,25 g Mg^{2+}/dm^3	0	183		24,6		26	
	24	175	197	15,7	22,4	32	22
	48	167	196	10,9	13,3	37	25
0,50 g Mg^{2+}/dm^3	0	388		31,0		21	
	24	333	352	28,3	25,8	32	29
	48	327	358	23,5	13,9	34	30
1,25 g Mg^{2+}/dm^3	0	926		49,9		24	
	24	893	916	45,1	86,3	27	22
	48	839	908	40,8	61,1	31	24

PODSUMOWANIE

1. Drożdże paszowe *Candida utilis* ATCC 9950 wykazały zdolność trwałego i szybkiego wiązania jonów Mg^{2+} z podłoży doświadczalnych wzbogaconych w ten pierwiastek (w postaci chlorku lub siarczanu) w warunkach hodowli wglębnej.

2. Najwięcej magnezu trwale związanego z komórkami drożdży, 9,09 mg Mg^{2+}/g s.s., uzyskano po 48-godzinnej hodowli wglębnej z podłoża doświadczalnego wzbogaconego jonami Mg^{2+} (pod koniec logarytmicznej fazy wzrostu) w stężeniu 1,25 g/dm³ pochodzącymi z soli $MgCl_2 \cdot 6H_2O$.

3. Dodatek jonów magnezu w stężeniach 0,25, 0,50 i 1,25 g Mg²⁺/dm³ do standardowego podłoża YPD w postaci soli siarczanowej wpłynął istotnie na wzrost plonu biomasy komórkowej drożdży paszowych w stosunku do hodowli kontrolnej bez dodatku magnezu.

4. W warunkach doświadczenia, stopień wykorzystania jonów Mg²⁺ z podłoża YPD wzbogaconych w ten pierwiastek poprzez trwałe związanie z komórkami drożdży *C. utilis* nie przekroczył 40%.

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.
- 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.
- Chmiel A., 1998. *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*. PWN Warszawa.
- Duszkiewicz-Reinhard W., Gniewosz M., Błażejczak St., Bańkowski A., 2002. Badanie zdolności wiązania magnezu przez drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach hodowli stacjonarnej. *Acta Sci. Pol. Technol. Alimentaria* 1(1), 17-26.
- Gawęcki J., Hryniewiecki L., 2000. *Żywienie człowieka. Podstawy nauki o żywieniu*. PWN Warszawa.
- 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.
- Lewicki P.P., 1982. *Inżynieria procesowa przemysłu spożywczego*. WNT Warszawa.
- Lipke P.N., Ovalle R., 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J. Bacteriol.* 180 (15), 3735-3740.
- Lipiński K., 1998. Zastosowanie kultur drożdży probiotycznych w żywieniu świń. *Trzoda chlewna* 36 (3), 24-25.
- 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. Biological. Chem.* 273 (3), 1727-1732.
- Mardarowicz L., 1997. Drożdże w żywieniu drobiu. *Pol. Drobniar.* 9, 14-16.
- Olędzka R., 1999. Wchłanianie magnezu. *Biul. Magnezol.* 4 (2), 229-235.
- 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.
- Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.D., 2000. *Encyclopedia of Food Microbiology*. Acad. Press, 352-359.

- Soral-Śmietana M., Wronkowska M., Świgoń 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., 1994. The roles of magnesium in biotechnology. *Crit. Rev. Biotechnol.* 14 (4), 311-354.

THE STUDY OF *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950 YEAST STRAIN CAPACITY OF BINDING WITH MAGNESIUM IN DYNAMIC CONDITIONS

Abstract. In this research, the ATCC 9950 *Candida utilis* yeast strain capacity to bind the Mg^{2+} ions was studied. The yeast was cultivated in dynamic conditions (with aeration) in the YPD medium enriched with the $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ or $MgCl_2 \cdot 6 H_2O$ magnesium salts. The salts were being added in such an amount, that the Mg^{2+} content in the medium was $0.25 g/dm^3$; $0.5 g/dm^3$ or $1.25 g/dm^3$. 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 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 mediums. $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ added to the cultivation, favoured the binding of magnesium form the YPD medium by the yeast, but $MgSO_4 \cdot H_2O$ added to the cultivation allowed obtaining higher biomass yield. The largest number of magnesium binding by biomass yeast cells (9,09 mg Mg^{2+}/g d.w.) was obtained from YPD medium after 48-hour cultivation with chloric salt added in the amount of $1.25 g Mg^{2+}/dm^3$ in the end of the logarithmic phase of yeast growth.

Key words: bio-elements, metal proteins, bioplex, magnesium, *Candida utilis*, *Pichia jadinii*

S. Błażejczak, Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 c, 02-787 Warszawa
e-mail: blazejczak@delta.sggw.waw.pl