

LOKALIZACJA MAGNEZU W KOMÓRKACH DROŻDŻY PASZOWYCH *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950 WZBOGACONYCH O TEN PIERWIASTEK

Stanisław Błażej, Wanda Duszkiewicz-Reinhard,
Małgorzata Gniewosz, Bożena Mazurkiewicz
Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Streszczenie. Badano lokalizację magnezu w komórkach drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 hodowanych na podłożach doświadczalnych wzbogaconych o ten jon w stężeniach 1,25 g Mg²⁺/dm³ lub 2,0 g Mg²⁺/dm³ w postaci soli chlorkowej. Wyznaczono, jaka część magnezu związanego z drożdżami podczas 48-godzinnej hodowli węgłnej uległa wewnątrzkomórkowej bioakumulacji, a jaka pozostawała w ścianie komórkowej. Jednocześnie badano wpływ zastosowanych dawek magnezu w podłożach hodowlanych na syntezę białek przez szczep *C. utilis*. Wzbogacenie podłoża hodowlanego w magnez spowodowało trzykrotny wzrost zawartości tego pierwiastka w biomacie komórkowej drożdży w porównaniu z biomasą z hodowli kontrolnej na standardowym podłożu YPD. W ścianie komórkowej drożdży z 24-godzinnej hodowli doświadczalnej znajdowało się 80% całkowitej puli jonów Mg²⁺ związanych z komórkami. Po dwóch dobach hodowli węgłnej drożdży na podłożach doświadczalnych procentowy udział jonów Mg²⁺ w ścianie komórkowej stanowił około 60% całkowitej zawartości magnezu związanego z komórkami. Wzbogacenie magnezem podłoża YPD spowodowało 14-20-procentowy (w zależności od dawki jonów i czasu hodowli) wzrost zawartości białka ogólnego w biomacie komórkowej w porównaniu z hodowlą kontrolną (bez dodatku magnezu). Równoczesne zwiększenie zawartości białka i jonów Mg²⁺ w komórkach drożdży może sugerować powstawanie biopleksów magnezu.

Słowa kluczowe: magnez, *Candida utilis*, drożdże, biopleksy, metalobiałka

WSTĘP

Wraz z rozwojem dietyki i nauk o żywieniu zwierząt coraz więcej uwagi zwraca się na poprawne zbilansowanie składników diety, w tym biopierwiastków niezbędnych do prawidłowego funkcjonowania organizmów żywych. Magnez, cynk, mangan, selen, miedź, chrom czy żelazo, często jako koenzymy, regulują przebiegiem metabolizmu

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

komórkowego. W ostatnich latach coraz częściej stwierdza się objawy niedoboru magnezu u ludzi i zwierząt, co zwróciło uwagę na drożdże, które mogą być źródłem nie tylko cennego w diecie białka, lecz także deficytowych biopierwiastków. Drożdże potrafią wiązać ze środowiska jony metali, a następnie trwale włączać je w swoje struktury komórkowe. W ten sposób może dochodzić do powstawania trwałych kompleksów z białkami określanymi jako biopleksy lub metalobiałka [Liu i in. 2002, Spears 1996]. Dotychczasowe badania [Świątkiewicz i Korelski 1998, Vandergrift 1991] wykazały, że takie formy połączenia magnezu z białkami są znacznie lepiej przyswajalne przez organizmy ludzkie i zwierzęce niż preparaty mineralne tego pierwiastka. Wzbogacona w magnez biomasa komórkowa drożdży paszowych *Candida utilis*, którą charakteryzuje wysoka zawartość białka o zbilansowanym składzie aminokwasowym może stanowić interesującą alternatywę wobec suplementacji farmakologicznej stosowanej w niedoborze tego kationu.

Celem podjętych badań było określenie rozmieszczenia magnezu w komórkach drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950, hodowanych metodą wglębną na podłożach doświadczalnych, wzbogaconych w ten pierwiastek w postaci soli chlorkowej. Wyznaczono, jaka część magnezu związanego przez komórki drożdży uległa wewnątrzkomórkowej bioakumulacji, a jaka pozostała w ścianie komórkowej oraz jaki wpływ na to wiązanie miał czas hodowli. Zbadano także wpływ magnezu dodawanego do podłoża doświadczalnych na syntezę białek przez badany szczep drożdży paszowych. Zakres przeprowadzonych badań obejmował następujące zagadnienia:

- określenie wpływu dodatku magnezu do podłoża hodowlanych na plon biomasy badanych drożdży paszowych,
- dezintegrację komórek drożdży za pomocą ciekłego azotu,
- oznaczenie zawartości magnezu i białka ogólnego w komórkach oraz ścianie komórkowej drożdży.

MATERIAŁ I METODYKA PRACY

Materiał biologiczny

Do badań wykorzystano szczep drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 pochodzący z kolekcji czystych kultur Zakładu Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW.

Drożdże przechowywano w temperaturze +4°C na podłożu stałym YPD (skosy) [Robinson i in. 2000].

Podłoża mikrobiologiczne

- Podłoże kontrolne
Jako podłoże kontrolne do hodowli wglębnej drożdży zastosowano płynną pożywkę YPD. Jest to standardowe podłoże wzrostowe o następującym składzie: 2% glukozy, 2% peptonu i 1% ekstraktu drożdżowego [Robinson i in. 2000].
- Podłoże doświadczalne
Jako podłoże doświadczalne do hodowli wglębnej drożdży zastosowano płynną pożywkę YPD wzbogaconą w jony Mg^{2+} . Magnez dodawano do podłoża w postaci soli

MgCl₂×6H₂O w takiej ilości, aby zawartość tego jonu wynosiła odpowiednio 1,25 g/dm³ lub 2,0 g/dm³.

- Podłoże YPD z 2-procentowym agarem
Podłoże stosowano do przechowywania drożdży na skosach.

Przygotowanie *inoculum*

Inoculum przygotowywano przez zaszczepienie płynnego podłoża YPD 24-godzinną czystą kulturą drożdży *C. utilis*. Hodowlę prowadzono w temperaturze +28°C na wytrząsarce posuwisto-zwrotnej SM -30 Control (Buechler, Niemcy) o amplitudzie drgań 200 cykli/min do momentu uzyskania wartości OD równej 2,00. Czas hodowli wynosił średnio od 20 do 22 godzin.

Przyjęte parametry hodowli stworzyły optymalne warunki dla wzrostu drożdży. Uzyskane *inoculum* stanowiło wyjściowy materiał do zaszczepienia płynnych podłoży kontrolnych oraz doświadczalnych w danej serii badań.

Hodowla drożdży na podłożu kontrolnym i doświadczalnym

Podłoża kontrolne i doświadczalne szczepiono *inoculum* w ilości 10% (v/v). Hodowlę prowadzono zachowując takie same parametry, jakie zastosowano przygotowując *inoculum* (28°C, 200 cykli/min). W 0, 24 i 48 godzinie hodowli wgłębniej pobierano próbki, które stanowiły materiał do dalszych badań, obejmujących oznaczenie plonu biomasy komórkowej, zawartości magnezu oraz azotu ogólnego w biomacie i w ścianie komórkowej *C. utilis*.

Pomiar gęstości optycznej

Gęstość optyczna (OD) jest wskaźnikiem aktualnej liczby komórek znajdujących się w hodowli. W każdej serii doświadczeń hodowlę *inoculum* prowadzono do momentu uzyskania tej samej wartości OD (równej 2,00). Dzięki temu liczba komórek drożdży wprowadzanych z *inoculum* do podłoży kontrolnych i doświadczalnych w każdej serii badań była na jednakowym poziomie.

Pomiary gęstości optycznej wykonywano za pomocą spektrofotometru (Spectronic 20 Genesys, USA) przy długości fali 600 nm.

Oznaczenie plonu biomasy komórkowej drożdży

W 0, 24 i 48 godzinie hodowli pobierano próbki z podłoży kontrolnych i doświadczalnych do zważonych gilz i wirowano przez 10 minut przy 4000 obr/min (Centrifuge MPW-365, Polska). Płyn nad osadu (supernatant) zlewano, a odwirowaną biomasę suszono w temperaturze +80°C (suszarka SML 32/250 Zelmed, Polska) do uzyskania stałej masy. Wyniki plonu biomasy podawano w przeliczeniu na 1 dm³ podłoża (g s.s./dm³) [Pasternakiewicz i Tuszyński 1997].

Przygotowanie biomasy komórkowej do oznaczania zawartości białka i magnezu

Z 24- oraz 48-godzinnej hodowli drożdży na podłożu kontrolnym lub doświadczalnym pobierano próbki do zważonej gilzy wirowniczej. Zawiesinę komórek drożdży wirowano przez 10 minut przy prędkości 4000 obr/min, po czym płyn nad osadu (supernatant) odrzucano. W celu dokładnego usunięcia pozostałości podłoża hodowlanego odwirowaną biomasę komórkową płukano wodą dejonizowaną i ponownie wirowano, po czym suszono w temperaturze +80°C do uzyskania stałej masy. Wyszuszone osady poddawano mineralizacji w aparacie do spalań (Büchi Digestion Unit K-435, Niemcy).

Po mineralizacji biomasy komórkowej oznaczano w niej zawartość magnezu oraz białka ogólnego.

Mechaniczna dezintegracja komórek drożdży za pomocą ciekłego azotu

Mechaniczną dezintegrację komórek drożdży za pomocą ciekłego azotu zastosowano w celu oddzielenia ścian komórkowych od cytozolu. Dzięki temu możliwe było oznaczenie zawartości magnezu i białka w ścianie komórkowej oraz obliczenie ich zawartości w protoplasmie.

Z 24- oraz 48-godzinnej hodowli drożdży na podłożu kontrolnym lub doświadczalnym pobierano próbki do zważonej gilzy wirowniczej. Dalej postępowano tak, jak w wypadku przygotowania biomasy komórkowej do oznaczenia białka i magnezu, ale z pominięciem ostatniego etapu, tj. suszenia komórek drożdży. Odwirowaną biomasę przenoszono do moździerza ceramicznego, traktowano ciekłym azotem (temperatura -196°C) i rozcierano. Ciekły azot dolewano kilkakrotnie celem skutecznej dezintegracji komórek drożdży. Roztartą biomasę przenoszono, popłukując wodą dejonizowaną, do zważonych gilz i wirowano przez 10 minut przy prędkości 4000 obr/min, po czym supernatant odrzucano. Otrzymany osad zawierający fragmenty ścian komórkowych przemywano wodą dejonizowaną, ponownie wirowano i suszono w temperaturze +80°C do uzyskania stałej masy. Wyszuszone osady poddawano mineralizacji w aparacie do spalań (Büchi Digestion Unit K-435, Niemcy). Po mineralizacji w próbkach zawierających fragmenty ścian komórkowych oznaczano zawartość magnezu i białka ogólnego.

Zarówno zawartość magnezu, jak i białka w ścianie komórkowej wyrażano w miligramach w przeliczeniu na 1 g suchej substancji komórek drożdży (mg białka lub mg magnezu/g s.s.). W związku z tym wcześniej określono procentowy udział ściany komórkowej w suchej substancji drożdży *C. utilis* ATCC 9950 przyjmując założenie, że masa odwirowanych fragmentów po roztarciu próbki biomasy drożdży w ciekłym azocie stanowiła ścianę komórkową.

Oznaczenie zawartości magnezu w biomacie komórkowej drożdży oraz w ścianach komórkowych metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA)

Celem oznaczenia było ustalenie zawartości magnezu w komórkach drożdży oraz w ścianie komórkowej (otrzymanej w warunkach dezintegracji drożdży ciekłym azotem), a następnie na tej podstawie obliczenia zawartości tego pierwiastka w protoplastach. Oznaczenia zawartości magnezu prowadzono w wysuszonej biomacie lub fragmentach ścian komórkowych drożdży.

Procedura postępowania obejmowała dwa etapy: mineralizację próbek oraz oznaczanie zawartości magnezu metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej.

- Mineralizacja

Wysuszoną i zważoną biomasę komórek drożdży lub wysuszone i zważone fragmenty ścian komórkowych przenoszono do gilz i spalano w temperaturze 600°C, w mieszaninie kwasu azotowego i kwasu nadchlorowego (Büchi Digestion Unit K-435, Niemcy).

- Oznaczanie zawartości magnezu metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej (ASA)

Oznaczanie zawartości magnezu w przygotowanych próbkach wykonano metodą absorpcyjnej spektrometrii atomowej w Zakładzie Analiz Fizyko-Chemicznych SGGW.

Metoda ASA jest metodą analityczną, która wykorzystuje zjawisko absorpcji promieniowania elektromagnetycznego charakterystycznego dla danego pierwiastka. Wielkość absorpcji tego promieniowania przez wolne atomy oznaczanego pierwiastka jest miarą jego stężenia w badanej próbce [Bryłka i in. 1995].

Oznaczanie zawartości magnezu metodą ASA przeprowadzano na spektrometrze absorpcyjnym (Shimadzu AA-660, Japonia) przy długości fali 285 nm. Wyniki podano w przeliczeniu na 1 gram suchej substancji drożdży.

W celu obliczenia zawartości magnezu w protoplastach drożdży założono, że różnica pomiędzy zawartością magnezu w biomasie komórkowej drożdży, a zawartością w ścianach komórkowych (wyodrębnionych metodą mechanicznej dezintegracji komórek ciekłym azotem) oznaczała magnez znajdujący się w protoplastach.

Oznaczenie azotu ogólnego w biomasie i w ścianie komórkowej drożdży

Oznaczenie azotu ogólnego w biomasie i ścianach komórkowych wykonano metodą Kjeldahla [PN-75/A-04018]. Przebiegało ono w trzech etapach, które kolejno obejmowały: mineralizację próbek w stężonym kwasie siarkowym, destylację amoniaku z parą wodną i miareczkowanie kwasem solnym.

Zawartość azotu w analizowanych próbkach przeliczano na zawartość białka ogólnego (zastosowano przelicznik 6,25).

Analiza statystyczna

Badano istotność wpływu dodatku magnezu do podłoża hodowlanego w dawkach 1,25 g Mg²⁺/dm³ lub 2,0 g Mg²⁺/dm³ na zawartość tego pierwiastka oraz białka ogółem w całych komórkach, a także ścianie komórkowej drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950. Określono również istotność wpływu zastosowanych dawek magnezu na plon biomasy komórkowej badanych drożdży. Przeprowadzono dwuczynnikową analizę wariancji oraz test Tukeya dla poziomu istotności α wynoszącego 0,05. Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej za pomocą programu Statgraphics Plus wersja 4.1.

OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Badania przeprowadzone w Zakładzie Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności SGGW, dotyczące wpływu różnych parametrów hodowli na wzrost drożdży o zwiększonym

szonę zawartości magnezu, wykazały, że najwyższy plon biomasy komórkowej uzyskiwano w hodowlach wglębnych, gdy jony Mg^{2+} dodawano do podłoża YPD w postaci soli chlorkowej ($MgCl_2 \times 6H_2O$) w największym z zastosowanych stężeń, tj. 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 [Błażejczak i in. 2002]. Ponieważ do tej pory nie podejmowano prób związanych z wprowadzaniem wyższych dawek magnezu do podłoża doświadczalnych, postanowiono sprawdzić jak wpływa dodatek magnezu w ilości 2,0 g Mg^{2+}/dm^3 na plon biomasy i zawartość magnezu w komórkach drożdży.

Wpływ jonów magnezu na plon biomasy komórkowej drożdży *C. utilis*

Magnez, jako aktywator polimerazy DNA odpowiedzialnej za replikację materiału genetycznego, jest niezbędny dla wzrostu i prawidłowego funkcjonowania komórek drożdży [Walker 1994, Hughes i Poole 1991]. Oznaczenie plonu biomasy komórkowej podczas hodowli wglębnej drożdży *C. utilis* ATCC 9950, na podłożach doświadczalnych wzbogaconych w jony Mg^{2+} w dawkach 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 lub 2,0 g Mg^{2+}/dm^3 i na podłożu kontrolnym bez dodatku tego pierwiastka, wykonano bezpośrednio po wprowadzeniu *inoculum* do podłoża – w 0 godzinie hodowli oraz w 24 i 48 godzinie hodowli.

W tabeli 1 przedstawiono porównanie plonu biomasy komórkowej uzyskanej z hodowli drożdży *C. utilis* ATCC 9950 na podłożach doświadczalnych wzbogaconych w magnez oraz podłożu kontrolnym bez dodatku tego pierwiastka. We wszystkich hodowlach do 48 godziny obserwowano wzrost plonu biomasy komórkowej, przy czym w pierwszej dobie hodowli przyrost ten był największy. Na kontrolnym podłożu YPD, bezpośrednio po wprowadzeniu *inoculum*, plon biomasy wynosił 1,94 g s.s./ dm^3 , a w 24 godzinie hodowli osiągnął wartość 14,71 g s.s./ dm^3 . Na podłożu doświadczalnym wzbogaconym w magnez w ilości 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 wartość ta wzrosła w czasie 24 godzin hodowli z 1,99 g s.s./ dm^3 do 15,60 g s.s./ dm^3 (tab. 1).

Tabela 1. Plon biomasy komórkowej drożdży *C. utilis* z hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych wzbogaconych w $MgCl_2 \times 6H_2O$, g s.s./ dm^3

Table 1. Yield of *C. utilis* biomass during cultivation in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \times 6H_2O$, g d.w./ dm^3

Czas hodowli, h Cultivation time, h	YPD (kontrolne – control)	YPD+1,25 g Mg^{2+}/dm^3	YPD+2,00 g Mg^{2+}/dm^3
0	1,94a	1,99a	1,99a
24	14,71b	15,60c	15,61c
48	14,82b	15,75c	15,73c

Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy.
Means with the same letter did not differ significantly.

Znaczący wzrost plonu biomasy komórkowej, uzyskiwany w pierwszej dobie hodowli związany był z fazową kinetyką wzrostu drożdży. Na podstawie wcześniejszych prac [Błażejczak i in. 2003] ustalono, że log-faza podczas hodowli drożdży *C. utilis* na kontrolnym podłożu YPD i na podłożach doświadczalnych rozpoczyna się między 0, a 1 godziną, a jej zakończenie następuje w przybliżeniu w 24 godzinie hodowli. Po upływie logarytmicznej fazy wzrostu drożdże przechodzą w kolejną, stacjonarną fazę, podczas której następuje znaczne osłabienie dynamiki ich wzrostu. Tłumaczy to istotny

przyrost plonu biomasy komórkowej między 0 a 24 godziną hodowli, kiedy komórki znajdowały się w logarytmicznej fazie wzrostu oraz zahamowanie wzrostu w kolejnej dobie hodowli, kiedy komórki przeszły w fazę stacjonarną. Plony biomasy komórkowej z podłoża kontrolnego i podłoży doświadczalnych po dwóch dobach hodowli nie różniły się istotnie od tych, które otrzymywano po 24 godzinach prowadzenia hodowli.

W 0 godzinie hodowli – bezpośrednio po wprowadzeniu *inoculum* – plony ze wszystkich podłoży były podobne, a przeprowadzona analiza statystyczna nie wykazała istotnych różnic pomiędzy nimi (tab. 1).

Plony biomasy po 24 i 48 godzinach hodowli na podłożach doświadczalnych (wzbogaconych w magnez zarówno w ilości 1,25 g, jak i 2,0 g Mg^{2+}/dm^3) były istotnie wyższe od uzyskanych z podłoża kontrolnego, bez dodatku jonów Mg^{2+} (tab. 1). Największy plon biomasy komórkowej, wynoszący 15,75 g s.s./ dm^3 , osiągnięto w 48 godzinie hodowli na podłożu wzbogacającym w magnez w ilości 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 (tab. 1).

Plony biomasy komórkowej drożdży *C. utilis* z obu hodowli na podłożach doświadczalnych, wzbogaconych w jony Mg^{2+} w dawkach 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 i 2,00 g Mg^{2+}/dm^3 uzyskane podczas 24- i 48-godzinnej hodowli nie różniły się istotnie (tab. 1). Z podłoża doświadczalnego wzbogaconego magnezem w ilości 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 w 24 godzinie hodowli plon biomasy wynosił średnio 15,60 g s.s./ dm^3 , a z podłoża doświadczalnego zawierającego wyższy dodatek jonów Mg^{2+} – 15,61 g s.s./ dm^3 . W 48 godzinie hodowli średnie wartości plonów biomasy uzyskanych z tych podłoży również były podobne i wynosiły odpowiednio 15,75 oraz 15,73 g s.s./ dm^3 (tab. 1).

Zastosowane w badaniach dodatki magnezu do podłoży doświadczalnych (1,25 lub 2,00 g Mg^{2+}/dm^3) wpłynęły istotnie na zwiększenie plonu biomasy komórkowej drożdży *C. utilis* wobec hodowli na podłożu kontrolnym (bez dodatku tego pierwiastka). Walker i Maynard [1996], badając wpływ jonów Mg^{2+} na hodowlę drożdży *S. cerevisiae*, także obserwowali wzrost wydajności biomasy komórkowej, powodowany zwiększeniem stężenia magnezu w podłożu hodowlanym. Stwierdzili jednak, że najwyższą wydajność biomasy osiągnano przy stężeniu magnezu ok. 0,0024 g Mg^{2+}/dm^3 podłoża, a wyższe dawki tego pierwiastka w środowisku nie powodowały już dalszego jej wzrostu. Warto zaznaczyć, iż doświadczenia Walkera i Maynarda [1996] prowadzono przy niskich stężeniach magnezu w podłożu (maksymalnie 0,072 g Mg^{2+}/dm^3) w porównaniu z dawkami zastosowanymi w tej pracy. Nie można zatem wykluczyć możliwości, że gdyby autorzy wprowadzili większy dodatek tego jonu do podłoży hodowlanych (porównywalny do zastosowanych w niniejszej pracy: 1,25 lub 2,0 g Mg^{2+}/dm^3 podłoża) wówczas wzrost wydajności biomasy komórkowej drożdży byłby większy. Z drugiej jednak strony należy pamiętać, że w obu pracach zastosowano nie tylko różne szczepy, ale i gatunki drożdży, a jak podkreślają Rees i Stewart [1997] zdolność biosorpcji magnezu przez drożdże z podłoża hodowlanego jest ich cechą indywidualną i charakterystyczną dla danego szczepu.

Oznaczenie zawartości magnezu w biomasie oraz ścianie komórkowej drożdży

C. utilis

W tej części pracy podjęto próbę określenia w jakim stopniu magnez dodawany do podłoży doświadczalnych został związany ze strukturami ściany komórkowej drożdży, a w jakim uległ wewnątrzkomórkowej bioakumulacji.

Zawartość magnezu w ścianie komórkowej wyrażano w miligramach jonów Mg^{2+} w przeliczeniu na 1 g suchej substancji (całych komórek) drożdży ($mg\ Mg^{2+}/g\ s.s.$), co wymagało wcześniejszego określenia procentowego udziału ściany komórkowej w drożdżach. Na podstawie przeprowadzonych badań ustalono, że ściana komórkowa *C. utilis* ATCC 9950 stanowiła ok. 30% suchej substancji komórek. Dane literaturowe [Orlean 1997, Lipke i Ovalle 1998, Chaffin i in. 1998] wskazują, że procentowy udział ściany komórkowej w suchej substancji drożdży wynosi 15-30%. Wartości te wyznaczają granice średniej zawartości ściany komórkowej w komórkach drożdży, charakterystycznej dla większości gatunków, niemniej jednak dla niektórych szczepów mogą wybiegać poza podany zakres.

Na podstawie otrzymanych wyników (tab. 2) można stwierdzić, iż dodatek magnezu do podłoża doświadczalnych powodował kilkakrotny wzrost zawartości jonów Mg^{2+} w biomacie drożdży w stosunku do komórek *C. utilis* hodowanych na podłożu kontrolnym. Po 24-godzinnej hodowli w głębiej na podłożu kontrolnym komórki drożdży związały średnio $1,81\ mg\ Mg^{2+}/g\ s.s.$, podczas gdy w tym samym czasie na podłożu doświadczalnym wzbogaconym w jony Mg^{2+} w ilości $1,25\ g/dm^3$ zawartość magnezu w komórkach wynosiła $5,47\ mg\ Mg^{2+}/g\ s.s.$ Wartość ta nie różniła się istotnie od tej, którą stwierdzono w komórkach drożdży hodowanych na podłożach zawierających $2,0\ g\ Mg^{2+}/dm^3$.

Tabela 2. Zawartość magnezu w komórkach drożdży *C. utilis* z hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych wzbogaconych w $MgCl_2 \times 6H_2O$, $mg\ Mg/g\ s.s.$

Table 2. Magnesium contents in *C. utilis* biomass during cultivation in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \times 6H_2O$, $mg\ Mg^{2+}/g\ d.w.$

Czas hodowli, h Cultivation time, h	YPD (kontrolne – control)	YPD+1,25 g Mg^{2+}/dm^3	YPD+2,00 g Mg^{2+}/dm^3
24	1,81a	5,47d	5,65d
48	2,07b	4,83c	4,80c

Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy.
Means with the same letter did not differ significantly.

Dłuższy czas hodowli (48 h) powodował istotne obniżenie zawartości magnezu w komórkach drożdży z podłoża doświadczalnych, podczas gdy komórki drożdży z kontrolnego podłoża YPD wykazywały istotnie wyższą zawartość tego pierwiastka niż z hodowli 24-godzinnej.

Podobne tendencje zmian zawartości magnezu obserwowano w ścianie komórkowej drożdży (tab. 3) z tą jednak różnicą, że dodatek jonów Mg^{2+} do podłoża doświadczalnego w dawce $2,0\ g/dm^3$ wpłynął istotnie na zwiększenie zawartości tego pierwiastka po 24 godzinach hodowli w głębiej.

W komórkach drożdży otrzymanych po 24 godzinach hodowli na podłożach doświadczalnych większość magnezu została związana ze ścianą komórkową (tab. 4). W drożdżach z podłoża doświadczalnego wzbogaconego jonami Mg^{2+} w ilości $1,25\ g\ Mg^{2+}/dm^3$ zawartość magnezu w ścianie komórkowej stanowiła 80% całkowitej zawartości tego jonu w komórce. W komórkach *C. utilis* z podłoża doświadczalnego wzbogaconego jonami Mg^{2+} w dawce $2,00\ g\ Mg^{2+}/dm^3$ 82% magnezu związanego z komórką znajdowało się w ścianie komórkowej. Jony Mg^{2+} zlokalizowane w protoplastach stanowiły jedynie 20 i 18% komórkowej puli tego pierwiastka w komórkach drożdży.

Tabela 3. Zawartość magnezu w ścianie komórkowej drożdży *C. utilis* z hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych wzbogaconych w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, mg Mg/g s.s.Table 3. Magnesium contents in the cell wall of *C. utilis* cells during cultivation in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, mg Mg^{2+} /g d.w.

Czas hodowli, h Cultivation time, h	YPD (kontrolne – control)	YPD+1,25 g Mg^{2+}/dm^3	YPD+2,00 g Mg^{2+}/dm^3
24	1,02a	4,37d	4,64e
48	1,23b	2,98c	2,88c

Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy.
Means with the same letter did not differ significantly.

Tabela 4. Porównanie zawartości magnezu w komórkach, protoplastach i w ścianie komórkowej drożdży *C. utilis* z hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych wzbogaconych w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, mg Mg^{2+}/g s.s.Table 4. Comparison of magnesium contents in the yeast biomass, cell wall and protoplast of *C. utilis* cells during cultivation in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, mg Mg^{2+}/g d.w.

Podłoże Medium	Czas hodowli, h Cultivation time, h	Biomasa komórkowa Yeats biomass	Ściana komórkowa Wall cell	Proto-plast	Procentowa zawartość magnezu, % Percentage contents of magnesium, %	
					ściana komórkowa wall cell	protoplast
YPD (kontrolne – control)	24	1,81	1,02	0,79	56	44
	48	2,07	1,23	0,84	59	41
YPD+1,25 g Mg^{2+}/dm^3	24	5,47	4,37	1,10	80	20
	48	4,83	2,98	1,85	62	38
YPD+2,00 g Mg^{2+}/dm^3	24	5,65	4,64	1,01	82	18
	48	4,80	2,88	1,92	60	40

Bardziej równomierny rozkład magnezu odnotowano w komórkach *C. utilis* z hodowli na podłożu kontrolnym, w których zawartość tego pierwiastka w ścianie komórkowej stanowiła 56% całkowitej ilości magnezu związanego z drożdżami (tab. 4).

Pomimo że komórki drożdży z 24-godzinnej hodowli na podłożu doświadczalnym wzbogaconym w jony Mg^{2+} w ilości 1,25 g Mg^{2+}/dm^3 związały trzy razy więcej magnezu (5,47 mg/g s.s.) niż komórki z podłoża kontrolnego (1,81 mg/g s.s.), to tylko 20% całkowitej ilości tego pierwiastka związanego z biomasa ulegało wewnątrzkomórkowej bioakumulacji (1,10 mg/g s.s.). Było to zaledwie o 40% więcej w porównaniu z komórkami drożdży z podłoża kontrolnego, które w protoplastach zawierały 0,79 mg Mg^{2+}/g s.s. (tab. 4).

Podobne rezultaty otrzymano dla podłoża doświadczalnych wzbogaconych w wyższą dawkę magnezu – 2,00 g Mg^{2+}/dm^3 (tab. 4). Komórki z tego podłoża również związały w przybliżeniu trzy razy więcej jonów Mg^{2+} niż drożdże z podłoża kontrolnego,

lecz tylko 18% całkowitej ilości tego pierwiastka znalazło się w protoplastach (tj. 1,01 mg/g s.s. w stosunku do 5,65 mg/g s.s.), czyli o 28% więcej niż w komórkach drożdży z hodowli kontrolnej (0,79 mg/g s.s.).

W komórkach drożdży otrzymanych z 48-godzinnej hodowli na podłożu doświadczalnym (tab. 4) wzbogaconym jonami Mg^{2+} w ilości 1,25 g/dm³ magnez zlokalizowany w ścianie komórkowej stanowił 62% całkowitej zawartości tego pierwiastka w komórkach *C. utilis* (tj. 2,98 mg/g s.s. w stosunku do 4,83 mg/g s.s.). W komórkach z hodowli doświadczalnej zawierającej wyższy dodatek jonów Mg^{2+} , zawartość magnezu w ścianie była zbliżona i wynosiła 60% całkowitej ilości tego pierwiastka w drożdżach (tj. 2,88 mg/g s.s. w stosunku do 4,80 mg/g s.s.).

W komórkach drożdży otrzymanych po tym samym czasie hodowli z kontrolnego podłoża YPD 1,23 mg Mg^{2+} /g s.s. znalazło się w ścianie komórkowej, co stanowiło 59% ogólnej zawartości magnezu związanego z komórkami *C. utilis*, która wynosiła 2,07 mg/g s.s. (tab. 4). Procentowy rozkład całkowitej puli magnezu w komórkach drożdży z 48-godzinnej hodowli na podłożu kontrolnym i podłożach doświadczalnych pozostawał na wyrównanym poziomie.

Porównując procentowy rozkład całkowitej puli magnezu w komórkach po 24- i 48-godzinnych hodowlach okazało się, że jedynie drożdże otrzymane z kontrolnego podłoża YPD charakteryzowały się podobnym rozkładem tego pierwiastka w obu dobach hodowli. W wypadku drożdży otrzymanych z podłoża doświadczalnych część magnezu związanego w pierwszej dobie na powierzchni ściany komórkowej drożdży w dobie kolejnej uległa przetransportowaniu do wnętrza komórek. W rezultacie, po 48 godzinach hodowli stwierdzono zwiększenie procentowego udziału jonów Mg^{2+} w protoplastach tych drożdży, mimo istotnego spadku całkowitej zawartości magnezu w komórkach w stosunku do hodowli 24-godzinnej (tab. 2 i 3).

Uzyskane wyniki są zbliżone do wcześniejszych rezultatów prac [Błazejak i in. 2002], które wykazały, że zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży piwowarskich otrzymanej z podłoża doświadczalnych wzbogaconych w jony Mg^{2+} była prawie 3-krotnie wyższa niż z hodowli na podłożach bez dodatku magnezu.

Zhang i in. [1997] badali wpływ różnych dawek jonów Mg^{2+} dodawanych do podłoża hodowlanych na pobieranie tego pierwiastka przez drożdże *Schizosaccharomyces pombe*. Jako źródło magnezu stosowali sól siarczanową dodawaną do podłoża hodowlanego w środku logarytmicznej fazy wzrostu drożdży. Po zastosowaniu dawki magnezu 1,97 mM (0,047 g/dm³), poziom tego pierwiastka w komórkach *S. pombe* wzrastał trzykrotnie w stosunku do drożdży hodowanych na podłożu kontrolnym bez dodatkowego źródła jonów Mg^{2+} . Po obniżeniu stężenia magnezu do poziomu 0,06 mM (0,0014 g/dm³) przez ponad pół godziny nie obserwowano zmniejszenia zawartości magnezu w komórkach. Wyniki tych badań doprowadziły autorów do sformułowania wniosku, iż drożdże możliwie jak najdłużej usiłują utrzymać stały poziom zawartości magnezu w komórkach, nawet w sytuacji niskiego stężenia jonów Mg^{2+} w środowisku. Równocześnie stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia jonów Mg^{2+} w podłożu zwiększa się jego zawartość w komórkach drożdży.

Badania przeprowadzone w niniejszej pracy potwierdzają te obserwacje, wskazując jednocześnie, że zawartość magnezu w drożdżach *C. utilis* może wzrastać jedynie do pewnego stałego poziomu, niezależnego od zwiększania stężenia jonu Mg^{2+} w środowisku hodowlanym. Wydaje się, że dodatek magnezu do podłoża doświadczalnych w dawce 1,25 g Mg^{2+} /dm³ jest tym progowym stężeniem, powyżej którego nie następuje już istotne wzbogacanie komórek drożdży paszowych *C. utilis* w magnez.

Zdolność drożdży do wewnątrzkomórkowego gromadzenia magnezu stwarza w przyszłości szansę na wykorzystanie ich biomasy jako naturalnego nośnika biopleksów magnezu w uzupełnianiu niedoboru tego biopierwiastka w diecie ludzi i zwierząt. Przeprowadzone badania wskazały, że możliwe jest znaczące wzbogacenie drożdży w magnez. Najwyższą zawartość magnezu w protoplastach drożdży, wynoszącą 1,92 mg Mg^{2+} /g s.s. otrzymano w 48 godzinie hodowli na podłożu wzbogacającym w jony Mg^{2+} w ilości 2,00 g/dm³ (tab. 4). Choć zawartość magnezu w protoplastach drożdży z podłoża doświadczalnych, wzbogacanych w jony Mg^{2+} , była wyższa w stosunku do uzyskanej na podłożu kontrolnym, to jednak wewnątrzkomórkowa bioakumulacja tego pierwiastka przebiegała najefektywniej na podłożu kontrolnym. Jednym ze sposobów poprawy efektywności mogłoby być wprowadzenie do podłoża doświadczalnego wzbogaconego w magnez określonej ilości biomasy komórkowej, znajdującej się w środku logarytmicznej fazy wzrostu. Według Blackwella i in. [1995] proces bioakumulacji pierwiastków jest uzależniony od żywotności drożdży. Komórki w logarytmicznej fazie wzrostu charakteryzują się dużą powierzchnią całkowitą, dzięki czemu najsprawniej wiążą magnez i inne pierwiastki z podłoża. Poza różnymi modyfikacjami metod hodowli, skutecznym rozwiązaniem może być zastosowanie metod inżynierii genetycznej. Indukcja wzmożonej ekspresji genów drożdży, których produkty odpowiedzialne są za transport magnezu do wnętrza komórki pozwoliłaby na skonstruowanie szczepu zdolnego do wiązania i bioakumulacji znacznych ilości magnezu ze środowiska zewnętrznego [Graschopf i in. 2001, Bui i in. 1999].

Wpływ magnezu w podłożu hodowlanym na zawartość białka w komórkach *C. utilis*

Zwiększone stężenie jonów Mg^{2+} w środowisku może indukować ekspresję genów odpowiedzialnych za produkcję białek. [MacDiarmid i Gardner 1998]. W tej części badań podjęto próbę określenia, czy zastosowane stężenia magnezu w podłożach doświadczalnych wywierały taki wpływ na komórki drożdży paszowych *C. utilis*.

Badano zawartość białka ogólnego w ścianie oraz biomacie komórkowej drożdży w 24 i 48 godzinie hodowli na podłożach kontrolnym oraz doświadczalnych. Porównanie zawartości białka w biomacie, ścianie komórkowej i protoplastach drożdży *C. utilis* z hodowli na tych podłożach zamieszczono w tabelach 5-7.

Stwierdzono, że drożdże z 24-godzinnej hodowli na podłożach doświadczalnych wzbogaconych w magnez w ilości 1,25 lub 2,00 g Mg^{2+} /dm³ wykazywały istotnie większą zawartość białka ogólnego niż drożdże z hodowli na podłożu kontrolnym (tab. 5). W drożdżach z hodowli doświadczalnych średnie zawartości białka były po 24 godzinach najwyższe i wynosiły odpowiednio 63,7 oraz 65,3 g/100 g s.s. W tym samym przedziale czasowym biomasa komórkowa z podłoża kontrolnego zawierała 54,4 g białka/g s.s., a więc 17-20% mniej.

Według danych literaturowych drożdże paszowe mogą zawierać 46-65% białka [Mardarowicz 1997]. Przeprowadzone badania wskazują, że zawartość białka ogólnego w komórkach drożdży *C. utilis* nie odbiegała od podanego zakresu, przy czym w warunkach hodowli na podłożach wzbogacanych w magnez była ona istotnie wyższa niż z hodowli na podłożu bez dodatkowego źródła jonów Mg^{2+} .

Dłuższy czas hodowli (48 h) wpłynął na istotne obniżenie zawartości białka w biomacie komórkowej z podłoża doświadczalnych. Odnotowany spadek zawartości białka

w drugiej dobie hodowli nie dotyczył biomasy otrzymanej z kontrolnego podłoża YPD, gdzie porównanie średniej zawartości białka po 24 i 48 godzinach nie wykazało istotnych różnic (tab. 5).

Tabela 5. Zawartość białka ogólnego w komórkach drożdży *C. utilis* z hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych wzbogaconych w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, g/100 g s.s.

Table 5. Contents of the total protein in *C. utilis* biomass during cultivation in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, g/100 g s.s.

Czas hodowli, h Cultivation time, h	YPD (kontrolne – control)	YPD+1,25 g Mg^{2+}/dm^3	YPD+2,00 g Mg^{2+}/dm^3
24	54,4a	63,7c	65,3c
48	52,4a	59,6b	60,4b

Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy.
Means with the same letter did not differ significantly.

Taki sam kierunek zmian zawartości białka stwierdzono w ścianach wyodrębnionych z biomasy komórkowej po hodowli drożdży *C. utilis* na podłożach kontrolnych i doświadczalnych (tab. 6).

Tabela 6. Zawartość białka ogólnego w ścianie komórkowej drożdży *C. utilis* ATCC z hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych wzbogaconych w $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, g/100 g s.s.

Table 6. Contents of the total protein in the cell wall of *C. utilis* cells during cultivation in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, g/100 g s.s.

Czas hodowli, h Cultivation time, h	YPD (kontrolne – control)	YPD+1,25 g Mg^{2+}/dm^3	YPD+2,00 g Mg^{2+}/dm^3
24	6,4a	8,5c	8,9c
48	6,1a	7,4b	7,6b

Ten sam indeks literowy oznacza brak istotnej różnicy.
Means with the same letter did not differ significantly.

Drożdże po 24 i 48 godzinach hodowli na podłożu kontrolnym oraz podłożach doświadczalnych charakteryzowały się zróżnicowaną zawartością białka, jednak procentowy rozkład tego składnika w ścianie komórkowej i protoplasmie wykazywał znaczne podobieństwo (tab. 7).

W biomasie komórkowej drożdży z hodowli na podłożu doświadczalnym wzbogaconym w magnez w stężeniu $1,25 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$ 87% ogólnej zawartości białka znajdowało się w protoplastach, natomiast w ścianie 13%. W drożdżach z podłoża doświadczalnego z większym dodatkiem magnezu ($2,0 \text{ g } Mg^{2+}/dm^3$) wartości te wynosiły odpowiednio 86 i 14%. Z kolei w komórkach otrzymanych z podłoża kontrolnego protoplasty zawierały 88% ogólnej ilości białka zgromadzonego w drożdżach, a ściany 12% (tab. 7).

Po 48 godzinach hodowli drożdży zarówno na podłożu kontrolnym jak i doświadczalnych procentowy rozkład całkowitej puli białka w komórkach był zbliżony do tego, jaki ukształtował się w hodowli 24-godzinnej (tab. 7).

Tabela 7. Porównanie zawartości białka ogólnego w komórkach, protoplastach i w ścianie komórkowej drożdży *C. utilis* z hodowli na podłożach kontrolnych i doświadczalnych wzbogaconych w $MgCl_2 \times 6H_2O$, g/100 g s.s.

Table 7. Comparison of the total protein contents otein in the yeast biomass, cell wall and protoplast in *C. utilis* cells during cultivation in the control and experimental media enriched with $MgCl_2 \times 6H_2O$, g/100 g s.s.

Podłoże Medium	Czas hodowli, h Cultivation time, h	Biomasa komórko- wa Yeats biomass	Ściana komórko- wa Wall cell	Proto- plast	Procentowa zawartość magnezu, % Percentage contents of magnesium, %	
					ściana komórkowa wall cell	protoplast
YPD (kontrolne – control)	24	54,4	6,4	48,0	12	88
	48	52,4	6,1	46,3	12	88
YPD+1,25 g Mg^{2+}/dm^3	24	63,7	8,5	55,2	13	87
	48	59,6	7,4	52,2	12	88
YPD+2,00 g Mg^{2+}/dm^3	24	65,3	8,9	56,4	14	86
	48	60,4	7,6	52,8	13	87

Zastosowane dawki magnezu w podłożach doświadczalnych nie wpłynęły znacząco na zmianę procentowego udziału białka w ścianach komórkowych i protoplastach w porównaniu z hodowlą kontrolną.

Lipke i Ovalle [1998] podają, że procentowa zawartość mannoprotein w ścianie komórkowej wynosi 40%. Udział węglowodanów w mannoproteinach mieści się w przedziale 50-90% [Van der Vaart i in. 1995]. W zawiązku z tym procentowa zawartość białka w ścianie komórkowej, w przeliczeniu na suchą substancję drożdży (uwzględniając jej 30-procentowy udział w suchej substancji w komórkach *C. utilis*), powinna wynosić ok. 6%. W warunkach doświadczenia wartość ta wahała się w zakresie 12-14% (tab. 7), co może świadczyć o zwiększonej syntezie tego związku na podłożach zawierających jony Mg^{2+} , bądź szczególnych właściwościach badanego szczepu drożdży paszowych. Należy jednak pamiętać, że na otrzymane wyniki mógł wpływać sposób wyodrębniania fragmentów ścian komórkowych drożdży w temperaturze ciekłego azotu.

Na podstawie rezultatów przeprowadzonych badań można stwierdzić, iż dodatek magnezu do podłoża hodowlanych w ilościach 1,25 lub 2,00 g Mg^{2+}/dm^3 istotnie zwiększył ogólną aktywność aparatu syntetyzującego białka w komórkach *C. utilis*. Wyniki badań, a zwłaszcza zwiększona sorpcja jonów Mg^{2+} z podłoża doświadczalnych przy równoczesnym wzroście zawartości białka w protoplastach, skłaniają do przyjęcia hipotezy o możliwości powstawania wewnątrzkomórkowych biopleksów magnezu w komórkach drożdży paszowych *C. utilis* ATCC 9950.

PODSUMOWANIE

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pozwoliły na sformułowanie następujących stwierdzeń i wniosków:

1. Badany szczep drożdży paszowych *C. utilis* ATCC 9950 można wzbogacić w magnez podczas hodowli wglębnej na podłożach z dodatkiem soli tego pierwiastka w postaci $MgCl_2 \times 6H_2O$.

2. Biomasa drożdży otrzymana po logarytmicznej fazie wzrostu z hodowli na podłożach zawierających jony Mg^{2+} wykazała znacznie więcej tego pierwiastka w ścianie komórkowej niż w protoplastach.

3. W fazie stacjonarnego wzrostu *C. utilis*, na podłożach doświadczalnych rozkład komórkowej puli magnezu między ściany komórkowe a protoplasty stawał się bardziej równomierny i po 48 godzinach hodowli był podobny jak w biomacie drożdży z podłoża kontrolnego.

4. Dodatek magnezu do podłoża doświadczalnych korzystnie wpłynął na ogólną syntezę białek i plon biomasy komórkowej *C. utilis* w porównaniu z hodowlą kontrolną na standardowej pożywce YPD.

5. Dodatek jonów Mg^{2+} do podłoża YPD w ilości $1,25 \text{ g/dm}^3$ był tym stężeniem progowym, powyżej którego nie stwierdzono istotnego wzrostu zawartości magnezu i białka w komórkach drożdży *C. utilis*.

6. Równoczesny wzrost zawartości magnezu oraz białka w protoplastach drożdży *C. utilis* ATCC 9950 z hodowli doświadczalnych może sprzyjać powstawaniu biopleksów magnezu z białkami.

PIŚMIENNICTWO

- Blackwell K.J., Singleton I., Tobin J.M., 1995. Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 43, 579-584.
- Błażej St., Duszkiewicz-Reinhard W., Gniewosz M., Rostkowska-Demmer E., Domurad E., 2002. Badanie zdolności wiązania magnezu przez drożdże piwowarskie *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach hodowli wglębnej. *EJPAU Food Sci. Technol.* 1(2), www.ejpau.media.pl.
- Błażej St., Duszkiewicz-Reinhard W., Gniewosz M., Kamiński T., 2003. Badanie zdolności wiązania magnezu przez drożdże paszowe *Candida utilis* ATCC 9950 w warunkach hodowli wglębnej. *Acta Sci. Pol. Technologia Alimentaria* 2 (1), 109-123.
- Bryłka J., Więckowska E., Lewandowski W., Stępiak S., Bortnowska-Bareta B., 1995. Metody spektroskopowe. Atomowa spektrometria absorpcyjna (ASA). W: *Eksperymentalna chemia fizyczna*. Wyd. SGGW Warszawa, 317-328.
- Bui M.D., Gregan J., Jarosch E., Ragnini A., Schweyen R.J., 1999. The bacterial magnesium transporter CorA can functionally substitute for its putative homologue Mrs2p in the yeast inner mitochondrial membrane. *J. Biol. Chem.* 274 (29), 20438-20443.
- Chaffin W.L., Lopez-Ribot J.L., Casanova M., Gozalbo D., Martinez J.P., 1998. Cell wall and secreted proteins of *Candida albicans*: identification, function and expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62 (1), 130-180.
- Graschopf A., Stadler J.A., Hoellerer M.K., Eder S., Sieghardt M., Kohlwein S.D., Schweyen R.J., 2001. The yeast plasma membrane protein Alr1 controls Mg^{2+} homeostasis and is subject to Mg^{2+} – dependent control of its synthesis and degradation. *J. Biol. Chem.* 276 (19), 16216-16222.

- Hughes M., Poole R., 1991. Metal speciation and microbial growth – the hard (and soft) facts. *J. Gen. Microbiol.* 137, 725-734.
- Lipke P.N., Ovalle R., 1998. 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 Mg^{2+} -dependent currents are associated with the increased expression of *ALR1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Letters* 213 (2), 231-237.
- MacDiarmid C.W., Gardner R.C., 1998. Overexpression of the *Saccharomyces cerevisiae* magnesium transport system confers resistance to aluminum ion. *J. Biol. Chem.* 273 (3), 1727-1732.
- Mardarowicz L., 1997. Drożdże w żywieniu drobiu, nie tylko źródło białka. *Pol. Drob.* 19: 14-16.
- Orlean P., 1997. Biogenesis of yeast wall and surface components. W: *Molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces*. T. 3. Cell cycle and cell biology. Red. J. Pringle, J. Broach, E. Jones. Cold Spring Harbor Laboratory Press New York, 229-362.
- 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.
- PN-75/A-04018. 1975. Oznaczanie białka metodą Kjeldahla. Polski Komitet Normalizacyjny.
- Rees E.M.R., Stewart G.G., 1997. The effects of increased magnesium and calcium concentrations on yeast fermentation performance in high gravity worts. *J. Inst. Brew.* 103, 287-291.
- Robinson R.K., Batt C.A., Patel P.D., 2000. *Candida*. Fungi. Single-cell protein. W: *Encyclopedia of food microbiology*. Acad. Press London, 352-360, 850-854, 2021-2044.
- Schlegel H.G., 2001. Wzrost mikroorganizmów. W: *Mikrobiologia ogólna*. Wyd. Nauk. PWN Warszawa, 225-272.
- Spears J.W., 1996. Organic trace mineral in ruminant nutrition. *Anim. Feed Sci. Technol.* 58, 151-163.
- Świątkiewicz S., Koreleski J., 1998. Organiczne źródła mikroelementów w żywieniu drobiu. *Biul. Inform. IZ.* 34 (3), 49-60.
- 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.
- Van der Vaart J.M., Caro L.H.P., Chapman J.W., Klis F.M., Verrips C.T., 1995. Identification of three mannoproteins in cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 177, 3104-3110.
- Vandergrift B., 1991. Bioplexes: Practical application. W: *Biotechnology in the feed industry*. Red. L.P. Lyons. Proceeding of Alltech's Seventh Annual Symposium. Alltech Technical Publications Kentucky, 159-168
- Walker G.M., 1994. The roles of magnesium in biotechnology. *Crit. Rev. Biotech.* 14 (4), 311-354.
- Walker G.M., Maynard A.I., 1996. Magnesium – limited growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Mikrobiol. Technol.* 18, 455-459.
- Zhang A., Cheng T.P.O., Wu X.Y., Altura B.T., Altura B.M., 1997. Extracellular Mg^{2+} regulates intracellular Mg^{2+} and its subcellular compartmentation in fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. *Cell Mol. Lifeci.* 53, 69-72.

LOCALISE OF MAGNESIUM IN THE CELLS OF FEED'S YEAST *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950 SUPPLEMENTED WITH THIS ELEMENT

Abstract. The study aimed at determining which part of magnesium bound with feed's yeast *C. utilis* ATCC 9950 during batch culture in control (YPD) and experimental medium (YPD with the addition of magnesium) remains in the cell wall and which undergoes intracellular bioaccumulation. The experimental mediums were supplemented with the amount of $MgCl_2 \times 6H_2O$ providing 1.25 g/dm³ or 2.0 g/dm³ content of Mg^{2+} ions.

Moreover determined addition of magnesium ions into experimental mediums on the total protein contents in the yeast biomass. The cultures were run for 48 hours at 28°C in a reciprocating shaker which provided aerobic conditions of the process. The application of mechanical disintegration of the yeast cells (at a temperature of liquid nitrogen) enabled determination of the contents of magnesium and total protein in both cell walls and protoplasts. The yeast biomass from YPD medium (enriched with magnesium) contained about three times more magnesium than from control medium. Average 80% magnesium was localised in the cell walls, but only 20% in protoplasts. After 48-hour cultivation average 60% magnesium ions were in the cell walls and 40% in the yeast protoplasts. The addition of Mg^{2+} ions to the experimental media evoked a significant (even 20%) increase in the total protein content in the yeast biomass compared to the control medium culture.

Key words: bioplexes, metalloproteins, magnesium, bio-elements, *Candida utilis*

Zaakceptowano do druku – Accepted: 27.09.2004 r.

Do cytowania - For citation: Błażejak St., Duszkiewicz-Reinhard W., Gniewosz M., Mazurkiewicz B., 2004. Lokalizacja magnezu w komórkach drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 wzbogaconych o ten pierwiastek. *Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.* 3(2), 95-110.