

ANNA RACZYŃSKA-CABAJ, EDYTA LIPIŃSKA, EUGENIUSZ SOB CZAK

W PŁY W JONÓ W MAGNEZU NA WZROST DROŹDŹY PIEKARSKICH *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

Streszczenie

Sprawdzono wpływ dodatku $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ na wydajność biomasy komórkowej drożdży piekarskich. Zbadano również zdolność wiązania magnezu przez drożdże podczas hodowli na podłożu YPG i w warunkach przemysłowych. W skali przemysłowej ustalono, że celowe jest zwiększanie dodatku magnezu w poszczególnych propagacjach. W hodowli laboratoryjnej plon biomasy uzyskany z podłoża kontrolnego był istotnie mniejszy od plonów z hodowli doświadczalnych wzbogaconych w magnez (stężenie Mg^{2+} : 0,05; 0,3 i 0,5 g $Mg^{2+} \cdot dm^{-3}$ podłoża). Zaobserwowano, że wzrost zawartości magnezu w podłożu powodował zwiększenie ilości tego pierwiastka w biomacie komórkowej drożdży piekarskich.

Słowa kluczowe: *Saccharomyces cerevisiae*, biopierwiastki, magnez, bioakumulacja.

Wprowadzenie

W drożdźownictwie powszechne jest wzbogacanie podłoża hodowlanego solami magnezu. Niewielkie ilości magnezu znajdują się w podstawowych surowcach stosowanych w procesie produkcyjnym, czyli w melasie i wodzie technologicznej. Niestety melasa zawiera niewystarczające dla drożdży ilości tego pierwiastka. Zawarty w niej magnez występuje na poziomie ok. 0,01–0,06% s.s. [8]. Woda technologiczna zawiera również małe ilości magnezu tj. od 5 do 60 $mg \cdot dm^{-3}$ [12]. Niedobór tego pierwiastka uzupełniany jest głównie przez dodatek siarczanu magnezu lub innych soli magnezowych.

W komórce drożdży magnez może występować w dwóch formach: wolnej i związanej. Ta ostatnia przeważa i może być dodatkowo zróżnicowana na magnez związany z białkami, różnymi anionami lub w kompleksach z ATP [7]. Magnez związany jest dla komórek drożdży nieosiągalny w procesach fizjologicznych i bioche-

micznych, dlatego tylko forma wolnego magnezu jest odpowiedzialna za kontrolę zależnych od tego pierwiastka procesów wewnątrzkomórkowych. Tylko 0,5–5,0% całej puli wewnątrzkomórkowego magnezu stanowi formę wolną – zjonizowaną. Jak podaje Pasternak [13], stężenie wolnego magnezu w komórce wynosi od 0,2 do 1,0 mM. Największe ilości wolnego magnezu są zlokalizowane w wakuolach, z których zostaje on uwalniany, gdy komórka wyczerpie z podłoża jego zapasy [2].

Transport magnezu z podłoża do komórki drożdżowej jest dwuetapowy. Pierwsza faza, metabolicznie niezależna, polega na wiązaniu jonów Mg^{2+} przez ścianę komórkową, druga zaś, energetycznie zależna, polega na przemieszczaniu się kationów tego pierwiastka przez błonę cytoplazmatyczną [5, 21]. Według Chena i Tinga [4] za wiązanie jonów magnezu w ścianie komórkowej odpowiedzialne są grupy karboksylowe, hydroksylowe i fosforanowe.

Dostępność magnezu wpływa na podziały komórkowe drożdży, ich wielkość oraz szybkość wzrostu. Stwierdzono, że pierwiastek ten dodany w odpowiednich ilościach do podłoża hodowlanego przyczynia się m.in. do skrócenia lag fazy i podnosi plon biomasy komórkowej drożdży [6, 14]. Dlatego celem pracy było sprawdzenie wpływu magnezu na wydajność drożdży piekarskich oraz na ilość tego pierwiastka związanego z biomasą komórkową uzyskaną z hodowli przemysłowej i laboratoryjnej.

Material i metody badań

W pracy wykorzystano przemysłowe drożdże piekarskie (szczep nr 2200), pochodzące z Mazowieckiej Wytwórni Drożdży Piekarskich w Józefowie k. Błonia. Szczip namnażano na płynnym podłożu YPG [18] przez 24 h w temp. 28°C na wytrząsarce (SM-30 Control, Edmund Bühler) o 200 rpm.

Hodowle kontrolne w skali laboratoryjnej prowadzono w modelowym podłożu YPG, natomiast hodowle doświadczalne w podłożu YPG wzbogaconym w magnez (w postaci $MgSO_4 \cdot 7H_2O$) tak, aby końcowe stężenie tego pierwiastka w podłożach wynosiło ok. 0,03 i 0,05 g $Mg^{2+} \cdot dm^{-3}$. Wybór takich stężeń był podyktowany powszechnym ich stosowaniem w skali przemysłowej. Zastosowano również stężenia dziesięciokrotnie większe tj. 0,3 g i 0,5 g $Mg^{2+} \cdot dm^{-3}$. Hodowle prowadzono metodą wgłębną, w kolbach płaskodennych o pojemności 200 cm³ po wprowadzeniu 80 cm³ podłoża, w temp. 28°C przez 72 h na wytrząsarce o 200 rpm.

W pracy zamieszczono również wyniki dotyczące hodowli drożdży piekarskich w skali przemysłowej. W tym przypadku podłoże hodowlane stanowiła brzeczka melasowa wzbogacona w azot, fosfor i magnez według przyjętego przez zakład schematu technologicznego.

Zawartość magnezu w podłożach kontrolnych i doświadczalnych, wodzie technologicznej oraz biomasie komórkowej drożdży badano metodą absorpcyjnej spektrofotometrii atomowej (ASA) [3] przy $\lambda = 285,2$ nm. Oznaczenie zawartości magnezu w

biomasie komórkowej drożdży, po uprzednim jej zmineralizowaniu, wykonywano w 6., 24., 48. i 72. h hodowli. Mineralizację próbek wykonano w kolbach Kjeldahla z użyciem stężonego HNO_3 , HClO_4 i 10% roztworu HCl .

Oznaczenia zawartości magnezu w wodzie technologicznej wykonywano bezpośrednio w próbkach, bez konieczności ich odpowiedniego przygotowania.

Plon biomasy badano po jej odwirowaniu przy 3000 rpm przez 10 min (MPW 365, Mechanika Precyzyjna, Polska). Oznaczenie zawartości s.s. w uzyskanej biomasie komórkowej drożdży wykonano przy użyciu wagosuszarki (Radwag, typ WPS 30 s) w założonych parametrach suszenia tj.: temp. 105°C do momentu uzyskania stałej masy. Badania wykonano w trzech powtórzeniach.

Wyniki badań poddano analizie statystycznej testem Tukey'a ($\alpha = 0,05$) w programie Statgraphics Plus wersja 4.1. Badano istotność wpływu zastosowanych w pracy stężeń magnezu na plon biomasy oraz zawartość Mg^{2+} w biomasie komórkowej drożdży.

Wyniki i dyskusja

Badanie plonu biomasy komórkowej drożdży oraz zawartego w niej magnezu po hodowli w skali przemysłowej

Badania rozpoczęto od sprawdzenia w skali przemysłowej zależności między zawartością magnezu w podłożu hodowlanym a uzyskanym plonem biomasy komórkowej drożdży. Podłoże hodowlane stanowiła brzeczek melasowy wzbogacony $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Źródłem magnezu oprócz melasy i soli magnezowej była również woda technologiczna. Ze względu na to, że poszczególne etapy produkcji, zaczynając od małego propagatora, a kończąc na generacji handlowej, różniły się ilością zużytej melasy i wody technologicznej oraz dawką dodanego siarczanu magnezu, końcowe stężenie tego pierwiastka w podłożu hodowlanym zawierało się w granicach $0,02\text{--}0,07 \text{ g dm}^{-3}$ [tab. 1].

Warunki hodowli w poszczególnych etapach produkcji są bardzo zróżnicowane, szczególnie jeżeli chodzi o stopień napowietrzenia podłoża. To właśnie stężenie tlenu rozpuszczonego w podłożu w głównej mierze decyduje o stopniu namnożenia biomasy komórkowej drożdży piekarskich [10, 16]. Znalazło to potwierdzenie w tej części doświadczenia, gdyż najmniejszą wydajność biomasy uzyskano w małym propagatorze, w którym praktycznie prowadzona była hodowla stacjonarna (bez napowietrzania), natomiast największą w generacji handlowej, w której intensywność napowietrzania kształtowała się na poziomie ok. $3000\text{--}5000 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$. Ze względu na tak zróżnicowane warunki hodowli wpływ magnezu na wydajność biomasy komórkowej był trudny do określenia.

Tabela 1

Plon biomasy i zawartość magnezu w biomasie komórkowej drożdży hodowanych w warunkach przemysłowych.

Yield of yeast biomass and content of magnesium in the yeast biomass cultivated in industrial scale.

Generacja Generation	Zawartość magnezu w podłożu Content of magnesium in medium [g · dm ⁻³]	Plon biomasy Yield of biomass [g s.s. · dm ⁻³]	Zawartość magnezu w biomasie Content of magnesium in the biomasses [mg Mg · g s.s.]
Mały propagator Small propagator	0,07	8,0 a	4,32 A
Duży propagator Big propagator	0,05	12,58 b	1,66 B
Generacja AB AB generation	0,04	15,59 b	1,19 C
Generacja zarodowa (I) I generation	0,03	40,96 c	0,98 D
Generacja handlowa Commercial generation	0,02	45,54 d	0,93 E

a, b, ...A, B – wartości średnie z tym samym indeksem literowym nie różnią się statystycznie istotnie.

a, b, ...A..B – mean values with the same superscripts letter are not significantly different.

Drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* nr 2200 hodowane w skali przemysłowej wiązały magnez na istotnie różnym poziomie. Stwierdzono, że najwięcej magnezu zawierały drożdże pochodzące z małego propagatora tj. 1,66 mg·g⁻¹s.s. (stężenie w podłożu 0,07 g·dm⁻³), natomiast najmniej drożdże pochodzące z generacji zarodowej i handlowej tj. 0,98 i 0,93 mg·g⁻¹s.s. (stężenie w podłożu 0,03 i 0,02 g·dm⁻³). Można przypuszczać, że zjawisko to było w dużym stopniu związane z wydajnością procesu namnażania biomasy komórkowej. Najmniejszą ilość biomasy przy jednoczesnym największym stężeniu magnezu w podłożu odnotowano w małym propagatorze. Przyczyniło się to do związania największej ilości Mg²⁺ przez badane drożdże. W miarę uzyskiwania coraz większego plonu biomasy w kolejnych propagacjach, ilość dostępnego, a tym samym związanego przez drożdże Mg²⁺ była coraz mniejsza. Biorąc powyższe pod uwagę nasuwa się wniosek, że w celu uzyskania większego stężenia magnezu w drożdżach handlowych należałoby odpowiednio zwiększyć dawkę Mg²⁺ w poszczególnych propagacjach.

Badanie plonu biomasy komórkowej drożdży oraz zawartego w niej magnezu po hodowli na podłożach kontrolnym i doświadczalnych w skali laboratoryjnej

W celu ujednoczenia warunków hodowli drożdży piekarskich zastosowano modelowe podłoże YPG o niezmiennym składzie chemicznym. Ilość magnezu w tym podłożu utrzymuje się na stałym poziomie ok. $0,03 \text{ g dm}^{-3}$. Z danych literaturowych wynika, że minimalne zapotrzebowanie na magnez rosnących komórek wynosi ok. $0,02 \text{ g dm}^{-3}$ [11]. Zastosowane podłoże zawierało więc wystarczającą ilość magnezu do hodowli drożdży, jednak wartość ta była mniejsza od optymalnej. Jak podaje Walker [21], optymalny do wzrostu drożdży poziom tego pierwiastka kształtuje się w przedziale $0,05\text{--}0,1 \text{ g dm}^{-3}$ i jest to wartość charakterystyczna dla poszczególnych szczepów.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że plon biomasy uzyskany z podłoża kontrolnego był istotnie mniejszy od wydajności hodowli na podłożach wzbogaconych w magnez [tab. 2]. Jest to zgodne z danymi literaturowymi, gdyż jak podają Tuszyński i Pasternakiewicz [19], dodatek magnezu do podłoża hodowlanego w zakresie $0,024\text{--}0,48 \text{ g dm}^{-3}$ pozytywnie wpływa na zwiększenie przyrostu biomasy komórkowej drożdży.

Tabela 2

Plon biomasy drożdży piekarskich hodowanych na podłożach: kontrolnym i doświadczalnych.
Yield of bakery yeast biomasses cultivated in control and experimental conditions.

Rodzaj podłoża Kind of medium	Plon biomasy [$\text{g s.s.} \cdot \text{dm}^{-3}$] / Yield of yeast biomasses [$\text{g s.s.} \cdot \text{gm}^{-3}$]			
	Czas hodowli [h] / Time of cultivation [h]			
	6	24	48	72
$0,03 \text{ g Mg}^{2+} \cdot \text{dm}^{-3}$ (kontrolne) $0,03 \text{ g Mg}^{2+} \cdot \text{dm}^{-3}$ (control)	2,56 a	11,61 b	12,1 bc	10,94 b
$0,05 \text{ g Mg}^{2+} \cdot \text{dm}^{-3}$	3,11 a	12,47 c	13,01 d	12,46 c
$0,28 \text{ g Mg}^{2+} \cdot \text{dm}^{-3}$	3,23 a	14,51 e	14,6 e	11,57 b
$0,53 \text{ g Mg}^{2+} \cdot \text{dm}^{-3}$	3,39 a	15,10 f	15,63 f	11,58 b

a, b – wartości średnie z tym samym indeksem literowym nie różnią się statystycznie istotnie.
a, b – mean values with the same superscripts letter are not significantly different.

Wzrost wydajności drożdży w procesie namnażania biomasy komórkowej obserwowano do 48 h zarówno w przypadku podłoża kontrolnego, jak i podłoży wzbogaconych w magnez. Dodatkowo należy podkreślić, że zastosowane w pracy stężenia magnezu nie spowodowały zahamowania wzrostu badanych drożdży.

Według Jonesa i Greenfielda [9] oraz Reesa i Stewarta [14], całkowite zahamowanie wzrostu drożdży następuje dopiero przy stężeniu magnezu na poziomie ok. 25 g dm^{-3} , a więc dawce pięćdziesiąt razy większej.

Jak podają Saltukoglu i Slaughter [17], komórki drożdży podczas wzrostu wiążą stałe ilości magnezu. Porównując wyniki dotyczące hodowli kontrolnych i wzbogacających magnezem stwierdzono, że ilość magnezu wiązanej przez biomasę komórkową drożdży była tym większa, im większą dawkę tego pierwiastka zastosowano do suplementacji podłoża (tab. 3). We wszystkich rodzajach hodowli (kontrolna i doświadczalne) stwierdzono istotne różnice w zawartości magnezu w uzyskanej biomacie komórkowej, bez względu na czas trwania procesu namnażania. Wzrost zawartości magnezu w biomacie komórkowej drożdży, niezależnie od stężenia tego pierwiastka w podłożu, występował do 48. h hodowli. Po tym czasie zaobserwowano uwalnianie magnezu do podłoża. Podobne zjawisko opisali Tuszyński i Pasternakiewicz [20], według których największa biosorpcja magnezu miała miejsce w pierwszych fazach hodowli biomasy. W miarę upływu czasu wraz z postępującym procesem starzenia się i obumierania komórek, drożdże uwalniały magnez do podłoża.

Tabela 3

Zawartość magnezu w biomacie drożdży piekarskich hodowanych na podłożach: kontrolnym i doświadczalnych.

Content of magnesium in yeast biomasses cultivated in control and experimental conditions.

Rodzaj podłoża Kind of medium	Zawartość magnezu w biomacie [$\text{mg Mg}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{s.s.}$] Content of magnesium in the biomass [$\text{mg Mg}^{2+} \cdot \text{g}^{-1} \text{s.s.}$]			
	Czas hodowli [h] / Time of cultivation [h]			
	6	24	48	72
$0,03 \text{ g Mg}^{2+} \cdot \text{dm}^{-3}$ (kontrolne) $0,03 \text{ g Mg}^{2+} \cdot \text{dm}^{-3}$ (control)	0,45 a	0,96 b	0,97 b	0,92 b
$0,05 \text{ g Mg}^{2+} \cdot \text{dm}^{-3}$	1,20 d	1,38 c	1,43 c	1,37 c
$0,28 \text{ g Mg}^{2+} \cdot \text{dm}^{-3}$	1,32 c	1,70 e	1,77 e	1,69e b
$0,53 \text{ g Mg}^{2+} \cdot \text{dm}^{-3}$	2,35 f	2,48 g	2,68 h	2,51 i

a, b – wartości średnie z tym samym indeksem literowym nie różnią się statystycznie istotnie,

a, b – mean values with the same superscripts letter are not significantly different.

Wydaje się, że wzrost zawartości magnezu w biomacie komórkowej drożdży mógł być spowodowany m.in. warunkami hodowli. Pobór jonów magnezu, podobnie jak i innych składników pokarmowych, jest dokładnie regulowany w zależności od zmieniających się warunków środowiska hodowlanego tj: temperatury, pH oraz obecności innych jonów metali [1]. Najlepsza bioakumulacja tego pierwiastka następuje w temp. $25\text{--}30^{\circ}\text{C}$ i przy pH $4,5\text{--}7,5$ [1, 19]. Stosując takie parametry, największą zawartość magnezu w biomacie komórkowej drożdży ($2,68 \text{ mg g}^{-1} \text{s.s.}$) stwierdzono po 48 h

hodowli na podłożu doświadczalnym zawierającym ok. 0,5 g magnezu w 1 dm³. Wartość ta była prawie 3-krotnie większa niż w biomacie uzyskanej z podłoża kontrolnego. Jak podają Rose i Harrison [15], drożdże zawierają, w przeliczeniu na suchą substancję, 0–3 mg Mg(II)·g⁻¹s.s. Można więc stwierdzić, że badany szczep drożdży piekarskich nr 2200 charakteryzował się małą początkową zawartością tego pierwiastka w biomacie, jednak w miarę upływu czasu hodowli uzyskane wartości były bliskie podanym przez Rose i Harrisona [15].

Wnioski

- [1] W związku ze wzrostem plonu biomasy w kolejnych etapach produkcji konieczne wydaje się zwiększenie dodatku magnezu w poszczególnych propagacjach, celem uzyskania odpowiedniego stężenia tego pierwiastka w komórkach drożdży handlowych.
- [2] Stwierdzono, że wydajność hodowli drożdży w skali laboratoryjnej w podłożu kontrolnym była istotnie mniejsza od wydajności hodowli z podłoży wzbogaconych w magnez, przy stężeniach 0,05; 0,3 i 0,5 g Mg²⁺·dm⁻³ podłoża. Badany szczep drożdży piekarskich nr 2200 wiązał magnez zależnie od zawartości tego pierwiastka w podłożu hodowlanym.
- [3] Największą zawartość magnezu tj. 2,68 mg·g⁻¹ s.s. stwierdzono w biomacie drożdży po 48 h hodowli w podłożu doświadczalnym zawierającym 0,5 g Mg²⁺·dm⁻³.

Literatura

- [1] Blackwell K. J., Singleton I., Tobin J. M.: Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1995, **43**, 579-584.
- [2] Brady D., Duncan J.: Bioaccumulation of metals cations by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1994, **41**, 149-154.
- [3] Bryłka J., Więckowska E., Lewandowski W., Stępiak S., Bortnowska-Bareła B.: Eksperymentalna chemia fizyczna. Wydawnictwo SGGW, Warszawa 1995.
- [4] Chen P., Ting Y. P.: Effect of heavy metal uptake on the electrokinetic properties of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.* 1995, **17** (1), 107-112.
- [5] Conway E. J., Beary M. E.: Active transport of magnesium ions across the yeast cell membrane. *Biochem. J.*, 1958, **69**, 275-280.
- [6] Dombek K. M., Ingran L. O.: Magnesium limitation and its role in apparent toxicity of ethanol during yeast fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1986, **52**, 975-981.
- [7] Elin R. J.: Overview of problems in the assessment of magnesium status. *Magnesium in Cell Processes and Medicine*. Altura. B. M. Durlach J. Seeling M. S., 1987, pp. 67-76.
- [8] Jarosz K., Jarociński J.: *Gorzelnictwo i drożdżownictwo*, WSiP, Warszawa 1994, s. 136-139.
- [9] Jones R. P., Greenfield P. F.: A review of yeast ionic nutrition. I. Growth and fermentation requirements. *Process Biochem.* 1984, **4**, 48-60.
- [10] Miśkiewicz T.: *Sterowanie hodowlą drożdży piekarskich z użyciem komputera*. Praca naukowa. Wyd. AR im. Oskara Langego, Wrocław 1984.

- [11] Maynard A.I.: The influence of magnesium ions on the growth and metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*. Thesis, Dundee Institute of Technology, Dundee, UK, 1993.
- [12] Naumczyk J.: Badania chemiczne wód stosowanych w przemyśle spożywczym. Przem. Ferm. Owoc. Warz., 1999, **1** (1), 12.
- [13] Pasternak K.: Magnez w fizjologii człowieka. Biuletyn Magnezol., 1999, **4**, 2, 480-485.
- [14] Rees E.M., Stewart G.G.: The effects of increased magnesium and calcium concentration on yeast fermentation performance in high gravity worts. J. Inst. Brew., 1997, **103**, 287-299.
- [15] Rose H.A., Harrison J.S.: Getting started with yeast. Methods in enzymology. Academic Press, London 1969.
- [16] Sałek A.: Współzależność pomiędzy niektórymi parametrami biochemicznymi w hodowli drożdży piekarskich. Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., **2**, 1986, 8.
- [17] Saltukoglu A., Slaughter J.: The effect of magnesium and calcium on yeast growth. J. Inst. Brew., 1983, **89**, 81-83.
- [18] Suizu T., Tsutsumi H., Kawado A., Murata K., Suginami K., Imayasu S.: Methods for sporulation of industrially used sake yeasts. J. Fermentat. Bioeng., 1996, **81** (2), 93-97.
- [19] Tuszyński T., Pasternakiewicz A.: Wpływ jonów metali na wzrost drożdży piekarskich rasy Mauter i hybrydu XT₄₁₁ x 5p. Zeszyty Naukowe AR w Krakowie. Technologia Żywności, 1994, **6**, 246.
- [20] Tuszyński T., Pasternakiewicz A.: Effect of calcium, magnesium, cobalt (II) and zinc cations on the *Saccharomyces cerevisiae* growth. Pol. J. Food Nutr. Sci., 1997, **6/47** (4), 61-70.
- [21] Walker G.M.: Yeast physiology and biotechnology. Wiley & Sons, 2000, England 1997, pp. 17-42, pp. 102-106.

INFLUENCE OF MAGNESIUM IONS ON THE GROWTH OF BAKER'S YEAST *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* IN THE LABORATORY AND INDUSTRIAL SCALE

S u m m a r y

The influence of addition of $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ on biomass yield of *Saccharomyces cerevisiae* was evaluated in this study. Capacities of binding magnesium ions by *S. cerevisiae* yeast during cultivation on the YPG-medium (laboratory) and in the industrial scale were analyzed. It was stated that in the industrial conditions the higher amount of magnesium in the respective propagation is required. In the laboratory conditions the yield of yeast cultivated on the experimental media enriched with different amount (0,05, 0,3 and 0,5 g·dm⁻³) of magnesium ions was also significantly higher than the yield from YPD – control medium. Growing concentration of magnesium ions in the experimental media caused the increasing of magnesium content in the yeast biomass.

Key words: *Saccharomyces cerevisiae*, bio-elements, magnesium, bioaccumulation. ☒