

Lidia Stasiak-Różańska, Stanisław Błażejczak

OCENA SKUTECZNOŚCI WIĄZANIA MAGNEZU PRZEZ BIOMASĘ *Candida utilis* ATCC 9950 ORAZ ŚCIANY KOMÓRKOWE TYCH DROŻDŻY

Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Wydział Nauk o Żywności,
Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Oceny Żywności,
dr hab. S. Błażejczak, prof. SGGW

*Porównano zdolność wiązania magnezu przez biomasę oraz ściany komórkowe oddzielone od cytosolu komórek drożdży paszowych *Candida utilis*. Wiązanie Mg^{2+} następowało podczas inkubacji w podłożach kontrolnych (YPD) lub doświadczalnych (wodny roztwór $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ o stężeniu Mg^{2+} 1,25 g/L). Najwyższa zawartość magnezu, związana z biomasą po 24 godzinach inkubacji w roztworze soli tego pierwiastka wynosiła 6,13 mg/g s.s. W tych samych warunkach ściany komórkowe *C. utilis* związały 5,03 mg Mg/g s.s.*

Hasła kluczowe: biopleksy, wiązanie magnezu, *Candida utilis*
Key words: bioplexes, binding of magnesium, *Candida utilis*

Magnez (Mg) jest pierwiastkiem, który odgrywa kluczową rolę w wielu procesach biochemicznych, zachodzących w organizmach ludzi, zwierząt, a także w komórkach drobnoustrojów. Pierwiastek ten aktywuje ponad 300 różnych enzymów, które uczestniczą m.in. w transkrypcji białek, budowaniu struktury kwasów nukleinowych i chromosomów oraz transporcie mikroelementów przez błony komórkowe (1,2). Magnez bierze także udział w procesie syntezy oraz rozpadu związków makroenergetycznych, szczególnie adenozyntrofosforanu (ATP), aktywuje enzymy metabolizmu lipidów, uczestniczy również w bilansowaniu równowagi mineralnej organizmu (2, 3).

Spożycie magnezu u osób dorosłych powinno kształtować się na poziomie 300 – 400 mg Mg^{2+} /dobę. Zalecane jest aby dawka ta była większa w żywieniu dzieci i młodzieży, a także osób aktywnych fizycznie i kobiet w ciąży (4).

Niedobór magnezu w organizmie człowieka może mieć poważne konsekwencje. Przy braku tego składnika mineralnego największe zaburzenia obserwuje się w pracy mózgu, serca oraz mięśni. Dieta uboga w magnez może prowadzić do nadciśnienia tętniczego, miażdżycy, arytmii lub choroby niedokrwiennej serca (4, 5, 6).

Bogatym źródłem magnezu są rośliny strączkowe (fasola, groch łuskany) oraz niektóre owoce morza (krewetki, małże, ostrygi) (1). W Polsce magnez dostarczany jest w diecie najczęściej wraz z produktami zbożowymi, ziemniakami oraz mlekiem i jego przetworami (3). Przystawalność magnezu wraz z pożywieniem przez organizm ludzki jest niewielka i w zależności od rodzaju spożywanych produktów może

wynosić 13 – 46% (7), dlatego osobom z niedoborem tego pierwiastka często zaleca się suplementowanie, które również nie zawsze jest w stanie pokryć całe dzienne zapotrzebowanie na magnez. Pewnym rozwiązaniem problemów związanych z niską przyswajalnością składników mineralnych może być przyjmowanie preparatów zawierających biopleksy, zwane również metalobiałkami. Biopleksy obecne w biomacie drożdży powstają w wyniku wiązania określonych jonów przez białka, występujące w ścianie komórkowej tej grupy mikroorganizmów (8). W porównaniu do źródeł nieorganicznych biopleksy są mniej toksyczne i lepiej przyswajalne przez organizm. Dodatkowo wykazują stabilność w szerokim zakresie kwasowości czynnej środowiska, co jest szczególnie ważne z uwagi na różne wartości pH panujące w poszczególnych odcinkach przewodu pokarmowego (8).

Do produkcji preparatów bogatych w biopleksy wykorzystuje się obecnie drożdże z gatunku *Candida utilis*. Biomasa tych drobnoustrojów jest cennym składnikiem pasz w żywieniu zwierząt, a po usunięciu kwasów nukleinowych może stanowić wartościowy element w żywieniu ludzi (9).

Magnez wiązany przez drożdże w procesie dwuetapowym. Pierwszy z nich ma charakter chemisorpcyjny i polega na wiązaniu jonów Mg^{2+} ze ścianą komórkową, a w szczególności z grupami funkcyjnymi obdarzonymi ujemnym ładunkiem. Faza ta nie wymaga nakładu energii i nie zależy od metabolizmu komórki (10). Drugi etap, określany jako wewnątrzkomórkowa bioakumulacja, dotyczy aktywnego transportu jonów magnezu przez błonę cytoplazmatyczną do wnętrza komórki i zależy od temperatury oraz aktywności życiowej komórek drożdży (11).

Celem pracy było porównanie zdolności naturalnego wiązania jonów magnezu z podłoża kontrolnego YPD oraz z roztworu soli $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ przez biomasę komórkową *C. utilis* ATCC 9950 oraz ściany komórkowe martwych komórek tych drożdży.

MATERIAŁ I METODY

Szczep drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 pochodził z Amerykańskiej Kolekcji Czystych Kultur.

Zdolność wiązania magnezu przez biomasę lub ściany komórkowe drożdży z gatunku *C. utilis* badano w podłożach kontrolnych YPD, o składzie: glukoza 20 g/L; pepton 20 g/L, ekstrakt drożdżowy 10 g/L oraz w podłożach doświadczalnych, które stanowił wodny roztwór $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ o stężeniu Mg^{2+} 1,25 g/L.

Przygotowanie biomasy *C. utilis*: 100 cm³ podłoża YPD szczepiono czystą kulturą drożdży i hodowano w temperaturze 28°C do momentu osiągnięcia gęstości optycznej równej 2,0 ($\lambda = 600$ nm). Uzyskaną biomasę wirowano (10 min, 3500 obr/min), płukano i zawieszano w 10 cm³ jałowej wody dejonizowanej, po czym w całości przenoszono do podłoża kontrolnego lub doświadczalnego, których objętość wynosiła po 90 cm³.

W celu sprawdzenia zdolności wiązania magnezu wyłącznie przez ściany komórkowe *C. utilis* przeprowadzono dezintegrację komórek w procesie łączącym metody termiczne z fizycznymi. W pierwszej kolejności przepłukaną i odwirowaną biomasę drożdży zamrażano w temperaturze -20°C na okres 90 dni. Po tym czasie

rozrożnione komórki poddawano sonikacji (180 W, 20 kHz, 30 min), ponownie zamrażano (-20°C, 20 godz.) i sonikowano (180 W, 20 kHz, 30 min). Udział zdeintegrowanych komórek drożdży w zawieszynie wynosił 40%. Zdeintegrowane i przepłukane wodą komórki wirowano (10 min, 3500 obr/min), zawieszano w 10 cm³ jałowej wody destylowanej i przenoszono do podłoża kontrolnego lub doświadczalnego o objętości 90 cm³ każde. Biomasa oraz ściany komórkowe inkubowano w kolbach na wytrząsarkach o ruchu rotacyjnym w temperaturze 28°C.

Doświadczenie prowadzono w 2 równoległych seriach, w każdej serii oznaczano 3 próbki, każde oznaczenie powtarzano 3 razy. Zawartość magnezu w próbkach oznaczano bezpośrednio po wprowadzeniu biomasy lub ścian komórkowych do podłoża oraz po czasie 0,5; 2,0; 4,0; 6,0 i 24 godziny. Próbki mineralizowano w mieszaninie 5 cm³ 65% HNO₃ z 2 cm³ 70% HClO₃ w temperaturze 600°C, w aparacie do spalań (Büchi Digestion Unit K-435). Zawartość magnezu oznaczano metodą ICP – AES (atomowa spektrometria emisyjna z plazmą wzbudzoną indukcyjnie). Próbki analizowano przy trzech długościach linii emisyjnych (279,0 nm, 280,2 nm, 285,2 nm), każdy pomiar wykonywano w trzech powtórzeniach. Otrzymane wyniki przeliczano na mg Mg²⁺/g s.s. Analizę statystyczną wyników opracowano przy zastosowaniu programu Statgraphics Plus 4.1. Wieloczynnikową analizę wariancji przeprowadzono z wykorzystaniem testu Tukey'a przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

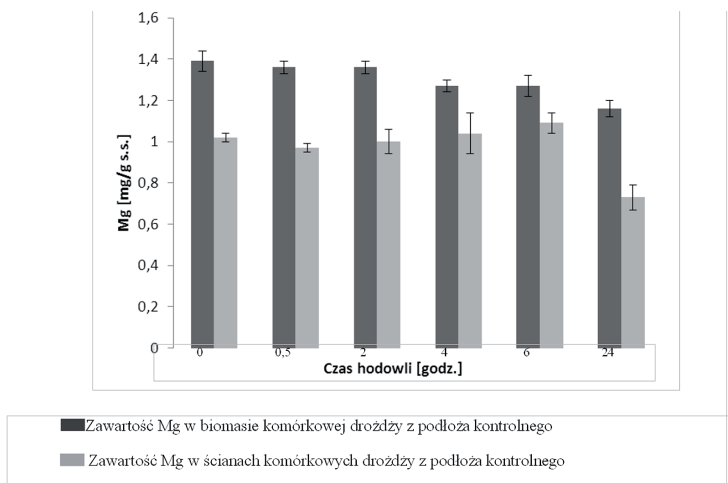
WYNIKI I ICH OMÓWIENIE

W pierwszym etapie porównano stężenie magnezu związanego przez biomasę oraz ściany komórkowe drożdży *C. utilis* podczas inkubacji w podłożu kontrolnym YPD. Na ryc. 1. przedstawiono wyniki pomiaru zawartości magnezu zarówno w biomacie jak i w ścianach komórkowych, które otrzymano po dezintegracji komórek *C. utilis*.

W czasie $t = 0$ zawartość magnezu w biomacie drożdży *C. utilis* z podłoża kontrolnego wynosiła 1,39 mg/g s.s., a w ścianie komórkowej 1,02 mg/g s.s. Podobne wartości utrzymywały się w czasie $t = 0,5$ godziny (1,36 mg/g s.s. w biomacie oraz 0,97 mg/g s.s. w ścianach komórkowych) oraz $t = 2$ godziny (1,36 mg/g s.s. w biomacie oraz 1,00 mg/g s.s. w ścianach komórkowych). Zawartość magnezu w biomacie drożdży *C. utilis* nie uległa zwiększeniu do końca trwania inkubacji (ryc. 1). Udział magnezu związanego ze ścianami komórkowymi drożdży zwiększył się po upływie 4 oraz 6 godzin inkubacji i wynosił odpowiednio 1,04 oraz 1,09 mg Mg²⁺/g s.s. Po zakończeniu procesu (24 godziny) zaobserwowano obniżenie zawartości magnezu w ścianach komórkowych *C. utilis* w porównaniu z zawartością tego pierwiastka oznaczoną we wcześniejszych godzinach inkubacji (ryc. 1).

Jak podaje *Kordialik-Bogacka* (12) martwa biomasa drobnoustrojów może biernie wiązać jony metali za pomocą różnych mechanizmów fizykochemicznych. Biosorpcja kationów przez biomasę drobnoustrojów zależy przede wszystkim od struktury ich ściany komórkowej. Oddzielenie ściany komórkowej od pozostałych elementów komórki, zwiększa dostępność magnezu do ujemnie naładowanych grup

funkcyjnych i wolnych par elektronowych, co w konsekwencji może ułatwić chemisorpcję kationów (12).



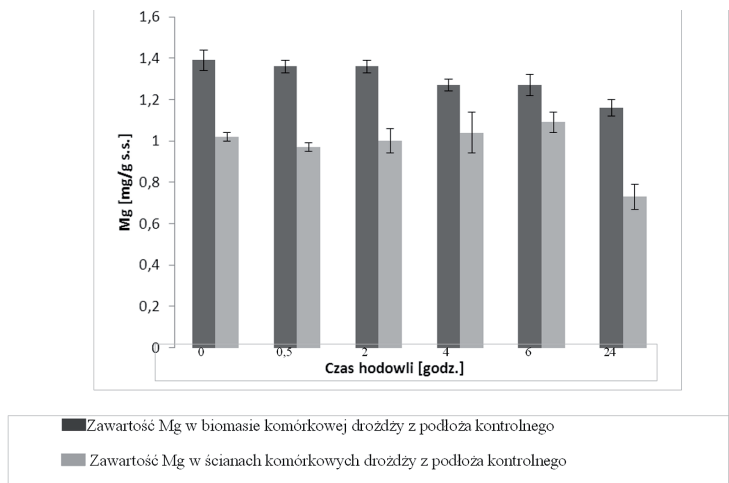
Ryc.1. Zawartość magnezu w biomacie oraz ścianach komórkowych drożdży *C. utilis* z kontrolnego podłoża YPD

Fig. 1. Magnesium content in the biomass and the cell walls of yeast *C. utilis* from the control YPD medium

Celem kolejnego etapu doświadczenia było porównanie zdolności wiązania magnezu przez biomasę oraz ściany komórkowe drożdży *C. utilis* z roztworu soli $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$. Na ryc. 2 przedstawiono wyniki pomiaru zawartości magnezu w biomacie i ścianach komórkowych w podczas 24-godzinnej inkubacji.

Zawartość magnezu w biomacie *C. utilis* w czasie $t = 0$ wynosiła 5,33 mg/g s.s. Po 6 godzinach inkubacji w roztworze soli magnezu nastąpił wzrost zawartości Mg^{2+} w biomacie (6,11 mg/g s.s.) i na tym poziomie utrzymywał się do końca trwania procesu. Można przypuszczać, że największa ilość magnezu została związana przez biomasę w pierwszych 6 godzinach inkubacji i dalsze jej przedłużanie nie wpływało na biosorpcję Mg^{2+} z komórkami drożdży (ryc. 2). Wiązanie magnezu przez ścianę komórkową *C. utilis* wzrastało systematycznie przez cały okres trwania doświadczenia (ryc. 2). Po 24 godzinach osiągnęło maksymalną wartość 5,03 mg/g s.s.

Przez pierwszych kilka minut kontaktu biomasy drożdży z jonami metalami następuje szybkie i niezależne od metabolizmu wiązanie ich ze ścianą komórkową. Etap ten zachodzi zarówno w komórkach żywych jak i martwych. Dalsza bioakumulacja jonów metali, która pozwala na pobranie większej dawki jonów zachodzi wyłącznie w żywych komórkach drożdży (9, 13).



Ryc. 2. Zawartość magnezu w biomacie oraz ścianach komórkowych drożdży *C. utilis* z roztworu soli $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$.

Fig. 2. Magnesium content in the biomass and the cell walls of yeast *C. utilis* from a solution of $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$.

Li i wsp. (14) badali wiązanie cynku przez żywe i martwe komórki *Streptomyces ciscaucasicus* szczep CCNWHX 72-14 i wykazali, że martwa biomasa związała więcej cynku (54 mg/g) w porównaniu z żywymi komórkami (40 mg/g). W badaniach tych wykazano również, że grupy funkcyjne ściany komórkowej martwych komórek *S. ciscaucasicus* były bardziej zaangażowane w wiązanie cynku niż te, które występowały w komórkach żywych. Na podstawie badań *Li* i wsp. (14) oraz prezentowanych w niniejszej pracy można przypuszczać, że im wyższy stopień dezintegracji komórek tym wiązanie jonów metali przez ścianę komórkową jest wyższe.

Analiza otrzymanych wyników pozwala sądzić, że zdolność wiązania magnezu zależy od udziału zdeintegrowanych komórek *C. utilis* w zawieszynie. Prawdopodobnie wraz ze zwiększeniem stopnia dezintegracji, zwiększeniu uległby udział ścian komórkowych oddzielonych od cytosolu i w konsekwencji zawartość magnezu w biopleksach byłaby wyższa.

WNIOSKI

1. Biomasa drożdży *C. utilis* ATTC 9950 i ściany komórkowe uzyskane w procesie sonikacji wykazały zdolność naturalnego wiązania magnezu z roztworu $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ o stężeniu 1,25 g Mg/dm^3 .

2. Wiązanie magnezu przez biomase komórkową drożdży *C. utilis* z roztworu soli $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ było ponad 5-krotnie większe (wynosiło 6,13 mg Mg^{2+}/g s.s.) w porównaniu z wiązaniem magnezu z podłoża kontrolnego YPD - 1,16 mg Mg^{2+}/g s.s. po tym samym czasie hodowli.

3. Najwyższą zawartość magnezu w biomasie oraz ścianach komórkowych stwierdzono po 24 godzinach hodowli w roztworze $MgSO_4 \times 7H_2O$. Biomasa drożdży zawierała 6,13, natomiast ściany komórkowe 5,03 mg Mg^{2+}/g s.s..

4. Otrzymywanie preparatów bogatych w biopleksy można częściowo usprawnić poprzez zastąpienie żywych komórek drożdży ich ścianami komórkowymi, a podłoży mikrobiologicznych – roztworami soli magnezu.

L. Stasiak-Różańska, S. Błażej

EVALUATION OF THE EFFECTIVENESS OF MAGNESIUM BINDING BY BIOMASS OF *CANDIDA UTILIS* ATCC 9950 AND THE CELL WALLS OBTAINED FROM THESE YEAST

Summary

The aim of this study was a comparison of magnesium binding capacity of the biomass and the cell walls (separated from the cytosol) of cells of *Candida utilis* yeast. The binding of Mg^{2+} followed during incubation in control media (YPD) and experimental (aqueous solution of $MgSO_4 \times 7H_2O$). The highest content of magnesium, bound by the biomass was 6,13 mg/g dw after 24 hours of incubation in the salt solution of this element. In the same time cell walls of *C. utilis* bound 5,03 mg Mg/g dw.

PIŚMIENNICTWO

1. Napiórkowska B.: Magnez – właściwości, działanie, zastosowanie w lecznictwie. artykuł dostępny on-line, 2000. – 2. Jarosz M., Bulhak-Jachymczyk B.: Normy żywienia człowieka. PZWL, Warszawa, 2008. – 3. Gawęcki J., Hryniewiecki L.: Żywnienie człowieka. 2000; Wyd. II., PWN, Warszawa: 211-213. – 4. Niedworok E., Muc-Wierżgon M., Nowakowska-Zajdel E., Dul L., Klakla K.: Magnesium content in daily food portions and the influence of supplementation. Int. J. Immunopathol. Pharmacol., 2011; 24(4): 975-981. – 5. Rowe W.J.: Correcting magnesium deficiencies may prolong life. Clin. Interv. Aging., 2012; 7: 51-54. – 6. Pasternak K.: Magnez w fizjologii człowieka. Biul. Magnezol., 1999; 4 (2): 480-485. – 7. Brzozowska A.: Składniki mineralne w żywieniu człowieka. PWN, Warszawa, 1998. – 8. Gniewosz M., Błażej S., Roman J., Duszkiewicz-Reinhard W.: A study on *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* cell wall capacity for binding magnesium. Eur. Food. Res. Technol., 2006; 224: 49-54. – 9. Błażej S., Duszkiewicz-Reinhard W., Gniewosz M., Wiatrzyk P.: Impact of magnesium and mannose in the cultivation media on the magnesium biosorption, the biomass yield and on the cell wall structure of *Candida utilis* yeast. Eur. Food. Res. Technol., 2008; 227: 695-700. – 10. Vasudevan P., Padmavathy V., Dhingra S.C.: Biosorption of monovalent and divalent ions on baker's yeast. Biores. Technol., 2002; 82 (3): 285-289.
11. Blackwell K.J., Singleton I., Tobin J.M.: Metal cation uptake by yeast: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol., 1995; 43 (4): 579-584. – 12. Kordialik-Bogacka E.: Surface properties of yeast cells during heavy metal biosorption. Cent. Eur. J. Chem., 2011; 9 (2): 348-351. – 13. Rollini M., Musattia A., Erbaa D., Benedetti A., Girardob F. Manzoni M.: Process for obtaining copper-enriched cells of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Biochem., 2011; 46: 1417-1422. – 14. Li H., Lin Y., Guan W., Chang J., Xu L., Guo J., Wei G.: Biosorption of Zn(II) by live and dead cells of *Streptomyces ciscaucasicus* strain CCNWHX 72-14. J. Hazard. Mat., 2010; 179: 151-159.

Adres: 02-787 Warszawa, ul. Nowoursynowska 166.