

Anna PASTERNAKIEWICZ i Małgorzata DŻUGAN¹

WZROST DROŹDŹY *Saccharomyces cerevisiae* W OBECNOŚCI SOLI KOBALTU(II) W PODŁOŻU HODOWLANYM

GROWTH OF *Saccharomyces cerevisiae* YEAST IN CULTIVATION MEDIA ENRICHED BY COBALT(II) IONS

Streszczenie: Do prawidłowego wzrostu drożdży niezbędne są optymalne stężenia makro- i mikroelementów. Badano wpływ jonów kobaltu(II) na wzrost i plon biomasy drożdży *Saccharomyces cerevisiae* namnażanych na podłożu naturalnym i syntetycznym. Badano również absorpcję kobaltu przez komórki drożdży. Stwierdzono niekorzystne działanie większych stężeń kobaltu na dynamikę wzrostu i plon biomasy drożdży. Bioakumulacja kobaltu w komórkach zależała od jego zawartości w medium hodowlanym i od rodzaju podłoża.

Słowa kluczowe: drożdże, kobalt, wzrost, bioakumulacja

Na rozmnażanie drożdży w warunkach produkcyjnych wpływa wiele czynników, m.in. natlenienie pożywki, pH, temperatura, ciśnienie osmotyczne oraz obecność różnych związków chemicznych. Szczepy drożdży wykorzystywane w przemyśle spożywczym powinny charakteryzować się dużą aktywnością fermentacyjną, zdolnością komórek do namnażania, do wykorzystywania różnych związków organicznych, dobrą odpornością na ciśnienie osmotyczne, trwałością w czasie przechowywania i stabilnością cech użytkowych [1]. Właściwości te w dużej mierze zależą od składu jonowego podłoża hodowlanego. Dla wielu pierwiastków można wyznaczyć przedziały stężeń, poniżej których występuje zjawisko deficytu, zaś powyżej nich pierwiastek hamuje procesy życiowe organizmu, a nawet może prowadzić do jego śmierci [2].

Fizjologiczna rola kobaltu wiąże się z procesem syntezy protein i witaminy B₁₂, aktywacją procesów enzymatycznych, ponadto jest kofaktorem wielu enzymów. Jednak, podobnie jak inne metale ciężkie, w większych stężeniach jest toksyczny. Optymalne stężenie dla prawidłowego wzrostu i funkcji życiowych drożdży jest małe (0,1÷1 μM), a wyraźne zahamowanie wzrostu większości szczepów występuje powyżej 90 μM [3].

Celem badań było wyznaczenie korzystnych dla wzrostu *Saccharomyces cerevisiae* przedziałów stężeń kobaltu, a także określenie możliwości eliminowania jego niekorzystnego działania poprzez wprowadzenie do pożywki hodowlanej soli innych metali.

Materiał i metody

Materiał badawczy stanowiły drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* rasy Mautner oraz hybryd YT 411x5p. Do namnażania stosowano podłoża naturalne - niechmieloną brzeczke piwną oraz syntetyczne podłoża Rose'a. Prowadzono hodowle dynamiczne na termostatowanej wstrząsarce laboratoryjnej (30°C, 40 h, objętość podłoża

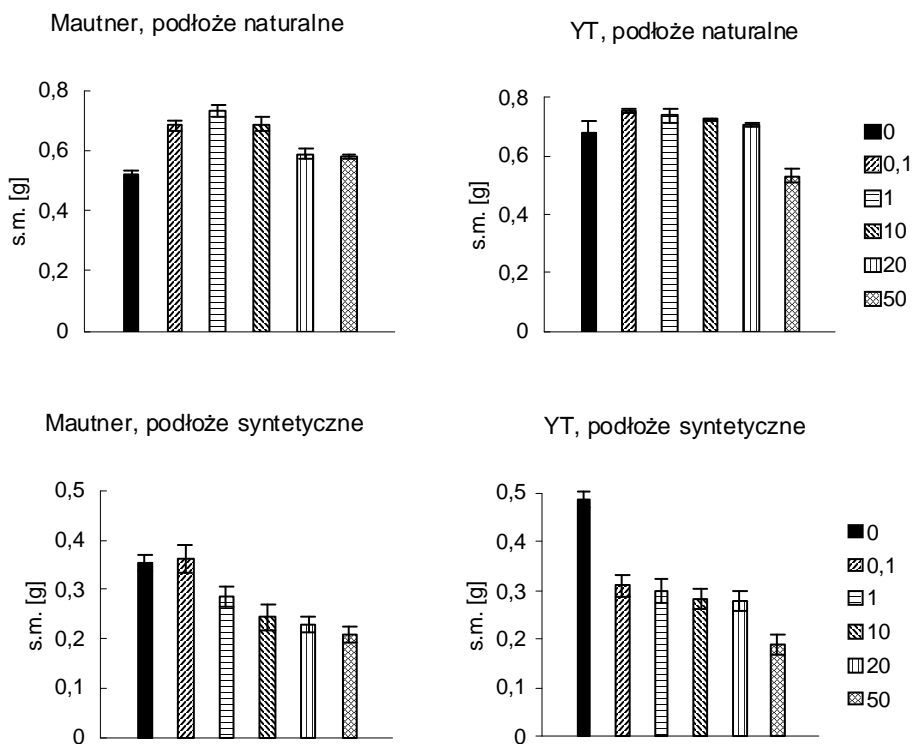
¹ Katedra Chemii i Toksykologii Żywności, Wydział Biologiczno-Rolniczy, Uniwersytet Rzeszowski, ul. M. Œwiklińskiej 2, 35-601 Rzeszów, email: apast@univ.rzeszow.pl

hodowlanego 100 cm³). Do pożywek wprowadzano Co(NO₃)₂ w takich ilościach, aby stężenia kobaltu w próbkach były: 0,1; 1; 10; 20 i 50 μM.

Podczas procesu drożdżowania kontrolowano wzrost drożdży poprzez pomiary absorbancji podłoża ($\lambda = 520$ nm), a po jego zakończeniu uzyskaną zawiesinę drożdży wirowano, przemywano wodą redestylowaną, ważono i suszono do stałej masy. Zawartość kobaltu w komórkach drożdży oznaczano metodą atomowej spektroskopii absorpcyjnej.

Wyniki i ich omówienie

Na wzrost badanych drożdży znaczny wpływ miało podłoże hodowlane, użyte do namnażania. Plony suchej masy rasy Mautner były dla każdego zastosowanego stężenia soli kobaltu większe niż uzyskane po hodowli na brzeczce, do której nie dodano Co²⁺. W przypadku hybryda YT zaobserwowano jedynie niewielkie zmniejszenie plonu biomasy (w porównaniu z próbą kontrolną) po namnażaniu na brzeczce piwnej z dodatkiem 50 μM soli kobaltu (rys. 1).



Rys. 1. Plon biomasy drożdży namnażanych w obecności soli kobaltu [μM] w podłożu hodowlanym

Fig. 1. The biomass yield of the yeast after culturing in the presence of cobalt salt in the growth medium

Obecność jonów kobaltu w syntetycznym medium Rose'a przyczyniła się do zahamowania wzrostu drożdży zarówno rasy Mautner, jak i hybryda YT. Dla wszystkich hodowli stwierdzono zmniejszenie ilości powstałej suchej masy drożdży w stosunku do prób odniesienia. Jedynie ilość biomasy drożdży rasy Mautner w obecności 0,1 μM Co^{2+} (0,361 g) była porównywalna z otrzymaną dla hodowli bez dodatku soli kobaltu (0,355 g).

Większa odporność badanych szczepów na podwyższone zawartości jonów kobaltu w brzeczce piwnej w stosunku do podłoża syntetycznego mogła być spowodowana jej bogatszym, różnorodnym składem. Jony kobaltu, zaliczane według klasyfikacji Pearsona [4] do grupy kwasów przejściowych, mogą być wiązane przez białkowe składniki brzeczki. Uzyskane połączenia kompleksowe, o rozmiarach znacznie większych niż wolne jony, miały utrudniony dostęp do komórek, a więc w mniejszym stopniu wpływały hamująco na procesy życiowe drożdży. Ponadto związane w postaci połączeń kompleksowych jony kobaltu nie wykazywały dużej toksyczności. W syntetycznym podłożu jony kobaltu były bardziej dostępne dla komórek *S. cerevisiae* i w większym stopniu hamowały ich wzrost (rys. 1).

Hamujący wpływ większych stężeń kobaltu nie zmniejszył się po wprowadzeniu do podłoża hodowlanego innego jonu dwuwartościowego (Ca^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Zn^{2+} lub Cu^{2+}). Przy równoczesnej obecności soli kobaltu i miedzi uzyskano jeszcze mniejsze plony biomasy na skutek nakładania się toksycznego działania obu pierwiastków (tab. 1). Utworzone połączenia polisacharydów ściany komórkowej drożdży z jonami wapnia, magnezu czy manganu, należącymi do grupy twardych kwasów Pearsona, nie stanowiły prawdopodobnie bariery przestrzennej, przeszkadzającej w przedostawaniu się kobaltu do wnętrza komórek [5].

Plon biomasy drożdży namnażanych w obecności par jonowych

Tabela 1

The biomass yield of yeast after culturing in the presence of pair of metal ions

Table 1

Skład jonowy podłoża	Plon biomasy drożdży [g]			
	Brzeczka piwna		Podłoże Rose'a	
	Mautner	YT	Mautner	YT
Kontrola	0,522	0,678	0,355	0,486
20 μM Co^{2+}	0,588	0,706	0,285	0,299
20 μM Co^{2+} + 20 mM Ca^{2+}	0,470	0,666	0,325	0,349
20 μM Co^{2+} + 20 mM Mg^{2+}	0,493	0,666	0,235	0,224
20 μM Co^{2+} + 20 μM Mn^{2+}	0,758	0,637	0,265	0,339
20 μM Co^{2+} + 40 μM Zn^{2+}	0,698	0,701	0,299	0,333
20 μM Co^{2+} + 20 μM Cu^{2+}	0,367	0,472	0,175	0,162

Zawartość kobaltu w biomase drożdży zależała od początkowej jego ilości w podłożu. Pożywki stosowane w doświadczeniu (próby kontrolne, bez dodatku soli metali) zawierały naturalnie niewielkie ilości jonów kobaltu: odpowiednio 0,20 i 0,13 μM w brzeczce piwnej i podłożu syntetycznym. Komórki drożdży, namnożone na pożywkach, do których nie dodawano soli kobaltu, gromadziły niewielkie jego ilości. Absorpcja kobaltu w komórkach drożdżowych namnażanych na podłożu Rose'a znacząco wzrosła w obecności 20 μM Co^{2+} . Stwierdzono 0,929 μmola kobaltu w 1 g suchej masy drożdży rasy Mautner i 1,489 μmola w 1 g s.m. badanego hybryda (tab. 2). Uzupełnienie składu podłoża solami cynku

i manganu spowodowało znacznie mniejsze nagromadzenie kobaltu w komórkach obydwóch szczepów, przy obecności soli magnezu i wapnia nie stwierdzono wyraźnych różnic w bioakumulacji kobaltu. Z kolei jony miedzi stymulowały pobieranie kobaltu, zwłaszcza przez drożdże rasy Mautner.

Rezultaty te są zbliżone do otrzymanych przez Norrissa i Kelly'ego [6].

Tabela 2
Bioakumulacja kobaltu w komórkach drożdży hodowanych w obecności wybranych jonów metali

Table 2
Cobalt bioaccumulation in the yeast cells culturing in the presence of chosen metal ions

Skład jonowy podłoża	Zawartość kobaltu [$\mu\text{mol/g s.m.}$]			
	Brzeczka piwna		Podłoże Rose'a	
	Mautner	YT	Mautner	YT
Kontrola	0,132	0,087	0,073	0,051
20 $\mu\text{M Co}^{2+}$	3,570	2,072	0,929	1,489
20 $\mu\text{M Co}^{2+}$ + 20 mM Ca^{2+}	3,509	2,251	0,901	1,171
20 $\mu\text{M Co}^{2+}$ + 20 mM Mg^{2+}	3,620	1,979	0,951	1,270
20 $\mu\text{M Co}^{2+}$ + 20 $\mu\text{M Mn}^{2+}$	3,123	2,154	0,906	0,733
20 $\mu\text{M Co}^{2+}$ + 40 $\mu\text{M Zn}^{2+}$	1,636	1,180	0,769	0,964
20 $\mu\text{M Co}^{2+}$ + 20 $\mu\text{M Cu}^{2+}$	4,295	3,348	1,540	1,689

Podłoże użyte do hodowli miało znaczący wpływ na bioakumulację kobaltu. Drożdże namnażane na brzeczce piwnej gromadziły w swych komórkach większe ilości kobaltu. Można przypuszczać na tej podstawie, że utworzone w naturalnym podłożu połączenia kompleksowe kobaltu, mimo swych większych rozmiarów, były łatwiej przyswajalne przez komórki drożdży niż wolne jony Co^{2+} obecne w pożywce syntetycznej. Zmniejszenie zawartości kobaltu w komórkach drożdży w obecności innych soli metali może być według Kasparowej i in. [7] spowodowane blokowaniem przez konkurencyjne jony miejsc w ścianie komórkowej, odpowiedzialnych za wiązanie jonów. Kobalt jest antagonistyczny do większości kationów i jego sorpcja odbywa się przede wszystkim w formie połączeń kompleksowych z białkami i lipidami [8, 9].

Wnioski

1. Ilości kobaltu, niezbędne do prawidłowego wzrostu drożdży *Saccharomyces cerevisiae*, w dużym stopniu zależą od rasy drożdży; drożdże namnażane na pożywce naturalnej wykazują większą tolerancję na obecność jonów kobaltu w podłożu.
2. Dodatkowe wprowadzenie do medium wzrostu pierwiastka o zbliżonych właściwościach chemicznych (Cu) powoduje zmniejszenie plonu biomasy drożdży rasy Mautner i hybryda YT 441x5p.
3. Kobalt jest gromadzony w niewielkich ilościach w komórkach drożdży. Bioakumulacja kobaltu przez drożdże jest uwarunkowana początkowym składem ilościowym i jakościowym podłoża hodowlanego.

Literatura

- [1] Barnett J.A., Payne R.W. i Yarrow D.: Yeast: characteristics and identification. Cambridge University Press, Cambridge 1986.

- [2] Kaim W. i Schwederski B.: *Bioinorganic chemistry: Inorganic elements in the chemistry of life*. Wiley&Sons, Chichester 1994.
- [3] Jones R.P. i Greenfield P.F.: *A review of yeast ionic nutrition. Part I: Growth and fermentation requirement*. *Process Biochem.*, 1984, **19**, 48-60.
- [4] Lippard S.J. i Berg J.M.: *Podstawy chemii bioinorganicznej*. WN PWN, Warszawa 1998.
- [5] Brady D. i Duncan J.R.: *Binding of heavy metals by the cell walls of Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microbiol. Technol.*, 1994, **16**, 633-638.
- [6] Norris P.R. i Kelly D.P.: *Accumulation of cadmium and cobalt by Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 1977, **99**, 317-324.
- [7] Kasparowa S.G., Dawidowa E.G. i Dikanskaja E.M.: *Ustojcziwost' k wysokim koncentracijam kopal'ta i ego akumulacija w kletkach drożdziej*. *Prikl. Biochim. Mikrobiol.*, 1991, **27**(6), 877-88.
- [8] Fuhrman G.-F. i Rothstein A.: *The transport of Zn²⁺, Co²⁺ and Ni²⁺ into yeast cells*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1968, **463**, 325-330.
- [9] White C. i Gadd G.M.: *The uptake and cellular distribution of zinc in Saccharomyces cerevisiae*. *J. Gen. Microbiol.*, 1987, **133**, 727-737.

GROWTH OF *Saccharomyces cerevisiae* YEAST IN CULTIVATION MEDIA ENRICHED BY COBALT(II) IONS

Summary: For a regular growth the yeast requires macro- and microelements at optimal concentrations. The effect of Co²⁺ on growth and biomass yield of Mautner and YT *Saccharomyces cerevisiae* yeast was studied using brewery wort and synthetic medium. Bioaccumulation of cobalt in yeast biomass was also determined. Higher at Co²⁺ concentrations reduced dynamics and yeast growth. The tolerance on the cobalt ions presence in the growth medium depends on the breed. The uptake of cobalt in the yeast cells depended on its content in the medium.

Keywords: yeast, cobalt, growth, bioaccumulation