

Oddziaływanie jonów Cr(III) na dynamikę
i efekty fermentacji zacierów kukurydzianych VHG

Joanna Kawa-Rygielska

Oddziaływanie jonów Cr(III) na dynamikę i efekty fermentacji zacierów kukurydzianych VHG

Autor
dr inż. Joanna Kawa-Rygielska

Opiniodawca
prof. dr hab. inż. Tadeusz Miśkiewicz

Redaktor merytoryczny
prof. dr hab. inż. Ewelina Dziuba

Opracowanie redakcyjne
Magdalena Kozińska

Korekta
Elżbieta Winiarska-Grabosz

Łamanie i projekt okładki
Paweł Wójcik

Monografie CXLIII

© Copyright by Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Wrocław 2012

ISSN 2083-5531
ISBN 978-83-7717-094-6

WYDAWNICTWO UNIWERSYTETU PRZYRODNICZEGO WE WROCŁAWIU
Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki
ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel. 71 328-12-77
e-mail: wyd@up.wroc.pl

Nakład 100 + 16 egz. Ark. wyd. 7,2. Ark. druk. 7,0
Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

Spis treści

| | |
|---|----|
| 1. Wstęp | 7 |
| 2. Geneza, cel pracy i zakres badań | 13 |
| 3. Materiał i metody badań | 15 |
| 3.1. Materiał badawczy | 15 |
| 3.2. Zakres prowadzonych badań | 18 |
| 3.3. Wpływ suplementacji podłoża hodowlanego jonami Cr(III) na cechy morfologiczne i fizjologiczne drożdży gorzelniczych | 24 |
| 3.3.1. Ocena dynamiki wzrostu drożdży gorzelniczych na podłożu syntetycznym w obecności Cr(III) | 24 |
| 3.3.2. Charakterystyka cech drożdży podczas hodowli wstrząsanych na podłożu syntetycznym w obecności jonów Cr(III) | 24 |
| 3.4. Przygotowanie prób fermentacyjnych z kukurydzy | 25 |
| 3.4.1. Charakterystyka wybranych cech surowca | 25 |
| 3.4.2. Przygotowanie zacierów | 26 |
| 3.4.3. Przygotowanie inokulum drożdży | 27 |
| 3.4.4. Fermentacja etanolowa zacierów kukurydzianych | 27 |
| 3.5. Charakterystyka cech biotechnologicznych drożdży gorzelniczych podczas fermentacji zacierów kukurydzianych | 27 |
| 3.6. Obliczenie wydajności procesu i parametrów kinetycznych. | 29 |
| 4. Omówienie wyników | 30 |
| 4.1. Charakterystyka cech biotechnologicznych drożdży gorzelniczych podczas wzrostu na podłożu syntetycznym YPG wzbogaconym jonami Cr(III) | 30 |
| 4.1.1. Parametry wzrostu drożdży gorzelniczych w obecności Cr(III) | 30 |
| 4.1.2. Dynamika fermentacji etanolowej na podłożu syntetycznym YM z dodatkiem Cr(III). | 39 |
| 4.2. Dynamika i efekty fermentacji etanolowej w zacierach kukurydzianych o różnej zawartości surowca | 42 |
| 4.3. Charakterystyka wybranych cech biotechnologicznych drożdży gorzelniczych w zacierach kukurydzianych z dodatkiem chromu ($60 \text{ mg Cr(III)} \cdot \text{l}^{-1}$) | 50 |
| 4.3.1. Aktywność fermentacyjna drożdży gorzelniczych w przefiltrowanych zacierach kukurydzianych 20 i 36% (VHG) z dodatkiem $60 \text{ mg Cr(III)} \cdot \text{l}^{-1}$ | 50 |

| | |
|--|----|
| 4.3.2. Przyrost biomasy podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych wzbogaconych w Cr(III) | 62 |
| 4.3.3. Zawartość składników mineralnych w komórkach drożdży podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych wzbogaconych w Cr(III). | 69 |
| 4.3.4. Biosorpcja chromu przez komórki drożdży podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych wzbogaconych w Cr(III). | 73 |
| 4.3.5. Przemiany kwasów tłuszczowych w komórkach drożdży podczas fermentacji zacierów kukurydzianych wzbogaconych w Cr(III). | 73 |
| 5. Dyskusja | 81 |
| 5.1. Wybór szczepów drożdży | 81 |
| 5.2. Suplementacja podłoża jonami Cr(III) | 82 |
| 5.3. Wpływ Cr(III) na parametry wzrostu drożdży gorzelnicznych | 84 |
| 5.4. Wpływ warunków fermentacji oraz obecności Cr(III) na aktywność fermentacyjną drożdży | 86 |
| 5.5. Wpływ Cr (III) na wybrane cechy drożdży gorzelnicznych podczas fermentacji | 89 |
| 6. Wnioski. | 93 |
| 7. Piśmiennictwo | 95 |

1. Wstęp

Wśród dostępnych na rynku odnawialnych źródeł energii na uwagę zasługują biopaliwa, a szczególnie bioetanol – odwodniony alkohol etylowy, otrzymywany z produktów roślinnych na drodze fermentacji etanolowej [Leiper i wsp. 2006, Prasad i wsp. 2007, Walker 2011]. Dzięki temu bioetanol jest przyjazny środowisku i stanowi jeden z najbardziej obiecujących biopaliw płynnych [Kavalov 2004]. Etanol może być dodawany bezpośrednio do benzyny lub po przetworzeniu na eter etylo-tert-butylowy. Ze względu na wyższą liczbę oktanową w porównaniu ze zwykłą benzyną jest mniej toksyczny i wybuchowy [Demirbas 2007]. Stosowany jako dodatek do paliw zmniejsza emisję tlenku węgla i innych toksycznych składników spalin (m.in. benzenu i cząstek stałych). CO₂ będący produktem spalania etanolu nie powoduje wzrostu netto ogólnej ilości tego gazu w atmosferze, ponieważ wytwarzany jest z surowców roślinnych, które asymilują CO₂. Zatem utlenianie etanolu jest elementem naturalnego obiegu węgla w przyrodzie. Jedną z wad stosowania etanolu jako dodatku do paliw jest jego gorsza smarowność [Tomasik, Jamroz 2008].

Zgodnie z dyrektywą Parlamentu Europejskiego 2003/30/EC udział biopaliw w paliwach tradycyjnych powinien wynosić 7% do 2015 r. i 20% do 2020 r. Na podstawie tej dyrektywy szacuje się, że zapotrzebowanie na bioetanol jako paliwa transportowego w krajach Unii Europejskiej w 2012 r. powinno wynosić 12,7 biliona litrów. Aby to osiągnąć, potrzebne będą znaczne naukowe i technologiczne inwestycje [Kupczyk 2008, Nikolić i wsp. 2008].

Główną przeszkodą stosowania biopaliw na szeroką skalę są bariery ekonomiczne. Ich koszty produkcji są obecnie wyższe niż produkcji paliw konwencjonalnych [Kupczyk 2007, Kupczyk, Ruciński 2008]. Wzrost produkcji etanolu na potrzeby paliwowe związany jest z koniecznością zmian technologicznych mających unowocześnić i zwiększyć skalę produkcji oraz obniżyć koszty jednostkowe. Jedynie te rozwiązania, które ograniczą koszty wytwarzania bioetanolu i pozwolą na obniżenie jego ceny, uczynią go konkurencyjnym w stosunku do paliw konwencjonalnych [Krishnan i wsp. 2000, Sanchez, Cardona 2008]. W celu obniżenia kosztów poszukuje się nowych, tanich surowców, ponieważ stanowią ok. 50–60% ceny etanolu. Na szczególną uwagę zasługuje kukurydza, która w ostatnich latach wzbudza coraz większe zainteresowanie. Jest wydajnym surowcem do produkcji etanolu dzięki wysokiej zawartości skrobi i niskiej polisacharydów nieskrobiowych oraz ze względu na wysoką efektywność energetyczną [Gulami i wsp. 1996, Lipski 2003, Michalski 2005, Bal 2006, Michalski 2007, Kawa-Rygielska, Dziuba 2006, Kawa-Rygielska 2007, Chmielewska i wsp. 2007]. Ponadto istotną rolę w produkcji etanolu na potrzeby paliwowe

odgrywa produkcja biopaliw drugiej generacji (2G) ze względu na zagospodarowanie odpadów przemysłu rolno-spożywczego [Lynd i wsp. 1991, Sanchez, Cardona 2008, Dias i wsp. 2011].

Oprócz poszukiwania nowych i tanich surowców opracowuje się również rozwiązania mające skrócić czas przygotowania surowca skrobiowego oraz zmniejszyć straty składników fermentujących. Jedną z metod, która pozwala zrealizować wytyczne dotyczące przygotowania surowca, jest beciśnieniowe uwalnianie skrobi [Stecka i wsp. 1996, Sieliwanowicz 2003, Wójcik, Czupryński 2003]. W metodzie tej wysokoenergetyczny proces parowania surowca zastąpiony jest jego rozdrobnieniem. Pozytywne efekty jej stosowania to: zmniejszenie zapotrzebowania na energię cieplną, ograniczenie zużycia wody i mniejsze ilości odprowadzonych ścieków oraz poprawa wskaźników technologicznych, m.in. wzrostu produktywności etanolu oraz skrócenie czasu fermentacji [Czupryński, Kotarska 2003].

Najważniejszym parametrem technologicznym gorzelni jest praktyczna wydajność etanolu. Aby uzyskać maksymalną wydajność etanolu z surowca, kluczową sprawą jest ustalenie optymalnych warunków prowadzenia procesu, tj. określenie optymalnej zawartości ekstraktu w zacierze, temperatur fermentacji czy dobór najlepszego szczepu odpornego na warunki intensywnej produkcji etanolu [Alper i wsp. 2006, Agu i wsp. 2008].

Jednym z istotnych rozwiązań w zakresie zwiększania wskaźnika wydajności fermentacji i końcowej koncentracji etanolu jest fermentacja zacierów o wysokim stężeniu ekstraktu (VHG) (ang. *Very High Gravity*) [Thomas i wsp. 1994a, Bvochora i wsp. 1999, Wang i wsp. 1999, Devantier i wsp. 2005, Pereira i wsp. 2010]. Technologia VHG definiowana jest jako „proces przygotowania i fermentacji zacierów zawierających powyżej 27 g składników rozpuszczalnych w 100 g zacieru” [Thomas i wsp. 1993]. W technologii VHG stosuje się zacierzy zawierające nawet do 30–40% suchej substancji. Zalety wynikające z zastosowania technologii VHG są następujące:

- wzrost końcowej koncentracji etanolu,
- redukcja kosztów destylacji etanolu wskutek uzyskania wyższych stężeń etanolu, nawet powyżej 15% w/v,
- znaczne zmniejszenie zużycia wody technologicznej,
- obniżenie kosztów zużycia energii,
- wzrost przepustowości gorzelni,
- zmniejszenie ilości odpadów oraz
- obniżenie ryzyka skażenia bakteryjnego [Bai i wsp. 2004, Reddy, Reddy 2006a, 2006b].

Należy pamiętać, że pomimo licznych korzyści fermentacja z udziałem drożdży gorzelniczych w środowisku VHG jest utrudniona, ze względu na niekorzystne wysokie ciśnienie osmotyczne wynikające z wysokiej koncentracji węglowodanów oraz duże stężenie alkoholu powstałego pod koniec procesu [Bonin, Ślusarska 2007], co wywołuje stresy (osmotyczny i etanolowy) w komórkach drożdży gorzelniczych [Graves i wsp. 2007, Grajek, Szymanowska 2008].

Kluczową rolę w zniwelowaniu negatywnego wpływu środowiska na komórki drożdży może odegrać zastosowanie nowoczesnych rozwiązań zmniejszających stres osmotyczny (m.in. technologia SSF – ang. Simultaneous Saccharification and Fermentation – jedno-

czesnego scukrzania i fermentacji czy metoda zacierania ze skróconym czasem scukrzania). Stres etanolowy można ograniczyć przez stosowanie np. fermentacji próżniowej, fermentacji z unieruchomionymi komórkami drożdży czy metody perwaporacji [Stenberg i wsp. 2000, Alkasrawi i wsp. 2003].

Dużym zainteresowaniem w produkcji bioetanolu z zacierów o wysokiej zawartości surowca cieszy się technologia SSF polegająca na jednoczesnym scukrzaniu i fermentacji [Karimi i wsp. 2006, Ohgren i wsp. 2006, Linde i wsp. 2007, Srichuwong i wsp. 2009]. W metodzie SSF glukoamylaza dodawana jest razem z drożdżami do podłoża fermentacyjnego, po jego ochłodzeniu do temperatury fermentacji 30°C. W ten sposób podczas procesu fermentacji stężenie glukozy i maltozy utrzymywane jest na relatywnie niskim poziomie, rzędu 1–5%, gdyż uwalniane cukry są natychmiast wykorzystywane przez drożdże, co eliminuje inhibicję przez substrat i ogranicza stres osmotyczny. Również stężenie etanolu podczas fermentacji nie wzrasta drastycznie i jego oddziaływanie na komórki drożdży jest słabsze. Ograniczenia systemu SSF to m.in.: różnice optimumów temperaturowych hydrolizy węglowodanów z udziałem glukoamylazy (45–50°C) i fermentacji (28–35°C). Spowolniona aktywność glukoamylazy w temperaturze fermentacji może powodować wydłużenie procesu, a szczególnie etapu zafermentowania. W efekcie często dochodzi do zakażeń mikrobiologicznych i rozwoju niepożądanego mikroflory. Jak wynika z badań prowadzonych przez Devantier i wsp. [2005], istotną rolę w technologii SSF odgrywa dobór właściwej dawki enzymu oraz szczepu drożdży. Najlepsze efekty uzyskano, zwiększając o 1/3 ilość glukoamylazy. Metoda równoczesnego scukrzania i fermentacji pozwala na uzyskanie wyższej wydajności etanolu oraz eliminuje konieczność stosowania oddzielnych reaktorów służących do scukrzania i fermentacji. Zastosowanie technologii SSF do fermentacji zacierów VHG pozwala na zwiększenie zdolności przerobowych gorzelnii. Metoda jednoczesnego scukrzania i fermentacji ma szersze zastosowanie, a mianowicie do produkcji kwasu mlekowego z zastosowaniem bakterii gatunku *Lactobacillus delbrueckii* oraz do produkcji biopaliw II generacji z odpadów ligninocelulozowych [Anuradha i wsp. 1999, Isci i wsp. 2008, Oloffson i wsp. 2008].

Innym rozwiązaniem w technologii fermentacji zacierów VHG jest stosowanie zacierania ze skróconym czasem scukrzania. W metodzie tej hydroliza dekstryn odbywa się częściowo w procesie zacierania w temperaturze optymalnej do działania enzymów scukrzających, natomiast dalsze scukrzanie następuje już w czasie fermentacji. Ten sposób pozwala również na ograniczenie stresu osmotycznego ze względu na uwolnienie tylko części cukrów prostych w procesie zacierania [Ohgren i wsp. 2007].

Obok rozwiązań technologicznych istotną rolę w technologii VHG odgrywa suplementacja podłoża fermentacyjnego składnikami chroniącymi komórki drożdży przed wpływem wysokiego ciśnienia osmotycznego (tzw. osmoprotektantami), takimi jak: glicyna czy prolina. Ich obecność wpływa na poprawę żywotności komórek drożdży podczas fermentacji, wzrost wykorzystania cukrów fermentujących oraz poprawę efektywności procesu [Thomas i wsp. 1994b].

W technologii produkcji etanolu na cele paliwowe należy zwrócić szczególną uwagę na dobór drobnoustrojów przemysłowych wykazujących dużą odporność na niekorzystne warunki środowiskowe [Jimenez, Benitz 1987, Ingledew 1993, Heggart i wsp. 1999, Yamaji i wsp. 2003]. Drożdże *S. cerevisiae* ciągle należą do najczęściej wykorzystywanych

na całym świecie mikroorganizmów w przemysłowej produkcji etanolu z surowców skrobiowych [Stewart, Russel 1987, Rose, Harrison 1993]. W odpowiednich warunkach środowiskowych drożdże *S. cerevisiae* mogą produkować i tolerować wysokie stężenia etanolu [Thomas i wsp. 1996, Man i wsp. 2003, Pina i wsp. 2004]. Kilku badaczy zaobserwowało, że ekstrakt drożdżowy, amoniak, mocznik, wapń i magnez mają ochronny wpływ zarówno na wzrost, fermentację, jak i żywotność drożdży, co stymuluje szybkość fermentacji i produkcję etanolu [Rees, Stewart 1998, Edens i wsp. 2002, De Nicola i wsp. 2009, Laopaiboon i wsp. 2009, Miranda i wsp. 2009]. *S. cerevisiae* mogą utylizować glukozę, fruktozę, mannozę, maltozę, a niektóre także maltotriozę. Nie mają zdolności fermentowania dekstryn i skrobi.

Istotną rolę w procesie fermentacji surowca skrobiowego odgrywa wstępny etap przygotowania surowca polegający na hydrolizie skrobi do cukrów prostych z udziałem handlowych enzymów upłynniających i scukrzających. Od efektów procesu zacierania zależą kinetyka i sprawny przebieg procesu fermentacji. W celu ograniczenia kosztów produkcji poszukuje się drożdży, które mają uzdolnienia amylolityczne, co pozwoli na zmniejszenie zużycia enzymów [Stewart, Russel 1987, Horn i wsp. 1992, Kręgiel 2005, Kłosowski i wsp. 2006].

Przedmiotem wielu doświadczeń w licznych ośrodkach badawczych na świecie jest dążenie do pełnego poznania i wyjaśnienia problemu oddziaływania wybranych pierwiastków na wzrost drożdży oraz wydajność fermentacji prowadzonej z ich udziałem [Błażejczak i wsp. 2004, Bonin, Ślusarska 2007, Chaung i wsp. 2008]. Wiadomo, że drożdże wymagają odpowiedniego stężenia kationów w podłożu do utrzymania struktury i funkcjonalności błon komórkowych, określonych interakcji międzykomórkowych, np. flokulacji, oraz łagodzenia skutków stresów środowiskowych. Niektóre metale są również czynnikami decydującymi o intensywności pobierania związków odżywczych, przyroście biomasy, regulacji ciśnienia osmotycznego oraz odporności na stresy w trakcie fermentacji [Grajek, Walkowiak-Tomczak 1993, Walker i wsp. 1996, Vasudevan i wsp. 2002, Poreda i wsp. 2007, 2009, Soyuduru i wsp. 2009, Li i wsp. 2010]. Korzystnie na przebieg fermentacji alkoholowej oraz przyrost biomasy mogą oddziaływać pierwiastki takie jak: magnez, cynk, mangan, miedź, selen czy żelazo, które na poziomie komórkowym aktywnie uczestniczą w metabolizmie wszystkich organizmów żywych [Walker, Maynard 1997, Błażejczak i wsp. 2002, Rutherford, Bird 2004, De Nicola i wsp. 2009].

Wiele cennych informacji na temat roli pierwiastków w komórkach żywych organizmów odkryto niedawno. Odnosi się to również do pierwiastka śladowego, jakim jest chrom. Jest to składnik mineralny, którego nazwa pochodzi od greckiego chroma, oznaczającego kolor, barwę. Chrom przez wiele lat był uznawany za pierwiastek toksyczny. Dopiero w 1957 roku, przy okazji badań nad cukrzycą odkryto, że pełni jedną z podstawowych funkcji w metabolizmie glukozy. Ponadto spełnia istotną funkcję w metabolizmie lipidów i białek, wchodzi w skład niektórych enzymów oraz pobudza ich aktywność [Offenbacher i wsp. 1985, Davies, Vincent 1997, Vincent 1999, Balk i wsp. 2007, Poljsak i wsp. 2009]. Znanych jest 9 stopni utlenienia chromu, ale jedynie jony Cr(III) i Cr(VI) tworzą trwałe związki. Za szkodliwy uważa się chrom na szóstym stopniu utlenienia, ponieważ wykazuje działanie toksyczne, mutagenne i kancerogenne [Kirpnick-Sobol i wsp. 2006, Summer i wsp. 2005], dlatego przedmiotem wielu badań jest chrom na trzecim

stopniu utlenienia. Pierwsze doniesienia o wpływie chromu na regulowanie metabolizmu glukozy przedstawił pod koniec lat 50. Mertz i Schwarz [1955]. Zauważyli oni, że u szczurów karmionych pokarmem bez Cr(III) wystąpiły zaburzenia tolerancji glukozy, które ustępowały po podaniu drożdży browarniczych. Wzrost zdolności usuwania glukozy z krwi pod wpływem diety opartej na drożdżach browarniczych sugerował, że w jej skład wchodzi czynnik odpowiedzialny za taką reakcję organizmu. Ze względu na powiązanie nowo odkrytej substancji z metabolizmem glukozy nazwano ją czynnikiem tolerancji glukozy (GTF – Glucose Tolerance Factor) [Schwarz, Mertz 1959]. Otrzymana substancja biologicznie aktywna zawierała jony Cr(III), a także kwas nikotynowy, glicynę, cysteinę i kwas glutaminowy. W latach 60. przeprowadzono podobne badanie na szczurach, które potwierdziło opinie o istotnej roli biologicznych kompleksów związku chromu w szybkości usuwania glukozy z krwi [Schroeder i wsp. 1962].

W wielu badaniach wykazano, że istotnym czynnikiem wpływającym na skuteczność regulowania poziomu glukozy była forma chromu, przy czym najlepsze działanie wykazywały kompleksy chromu z kwasem nikotynowym oraz ekstrakt drożdżowy zawierający kompleks GTF, natomiast najgorsze sole nieorganiczne. Wynikało to ze znacznie lepszego wchłaniania organicznych związków kompleksowych z chromem niż soli nieorganicznych [Anderson i wsp. 1978]. Pod koniec lat 80. odkryto i wyizolowano z wątroby m.in. psa i królika oligopeptyd LMWCr (Low-Molecular-Weight-Chromium) o masie 1500Da [Yamamoto i wsp. 1988]. Oprócz 4 atomów chromu oligopeptyd zawiera aminokwasy: glicynę, cysteinę, kwas glutaminowy, kwas asparaginowy oraz ich pochodne aminowe. Skład aminokwasów wchodzących w LMWCr zależy od miejsca, z którego oligopeptyd został wyizolowany. Najprawdopodobniej związek ten poprzez aktywację receptora insuliny kinazy tyrozynowej ułatwia wiązanie insuliny do receptorów w komórce, dzięki czemu poprawia się metabolizm glukozy. Uważa się że GTF jest produktem hydrolizy oligopeptydu LMWCr, powstającym w czasie próby izolacji „biologicznego” chromu. W jednym z doświadczeń chrom zastąpiono innymi metalami: Mn, Cu, Zn i badano aktywność tak zmodyfikowanego kompleksu LMWCr. Żaden z analizowanych jonów metali nie wykazał porównywalnej aktywności z chromem (III) [Schwarz, Mertz 1959, Davies, Vincent 1997]. Znane są również syntetyczne związki kompleksowe chromu oraz różnorodne związki koordynacyjne chromu z ligandami naturalnymi, takimi jak cysteina, glicyna czy kwas nikotynowy [Gałuszka i wsp. 1998, Jain i wsp. 2007].

Obecnie większość prac badawczych skupia się na analizie możliwości bioakumulacji związków chromu (III) i (VI) w komórkach drożdży [Juvera-Espinoza i wsp. 2006].

Drożdże jako eukariotyczne mikroorganizmy mają zdolność do pobierania chromu z roztworów wodnych i magazynowania go w komórkach oraz przekształcania jego form nieorganicznych w organiczne [Beran i wsp. 1995, Mishra, Doble 2008]. Scharakteryzowanie procesu akumulacji jest istotne nie tylko ze względu na zrozumienie transportu chromu i jego lokalizacji w komórkach drożdży, ale również z uwagi na możliwość zastosowania drożdży „chromowych” jako suplementu żywności lub pasz. Ponadto zdolność drożdży do tworzenia metalobiałek wykorzystywana jest w procesie remediacji środowisk skażonych związkami Cr(VI) [Rapaport, Muter 1995, Haq, Shakoori 1998, Ozer, Ozer 2003]. Liczne prace prowadzone z udziałem drożdży pozwalają określić wpływ chromu na strukturę DNA, RNA, poziom białek w komórkach [Gadd, Griffiths 1978,

Ding i wsp. 2000, Wang i wsp. 2004], oraz parametry ich wzrostu. Od kiedy dowiedziano, że Cr(III) jest mniej toksyczny niż Cr(VI), powszechnie używa się go do doświadczeń z różnym mikroorganizmami [Pas i wsp. 2004]. Najczęściej stosowanym materiałem biologicznym są drożdże paszowe *Candida intermedia* [Pas i wsp. 2004, Batic, Raspor 2000] i *Yarrowia lipolytica* [Musiał i wsp. 2005], drożdże piekarskie *S. cerevisiae* [Zetic i wsp. 2001, Stecka i wsp. 2001] oraz drożdże browarnicze *S. cerevisiae* [Ding i wsp. 2000, Ferreira i wsp. 2010]. Mikroorganizmy te stosowane są jako źródło substancji biologicznie aktywnych (białek oraz witamin). Drobnoustroje wzbogacane w chrom (III) używane są jako suplementy żywności i pasz [Ono, Weng 1982, Bag i wsp. 2000, Kovacs i wsp. 2007, Kaewkhomdee i wsp. 2010, Zielińska, Chojnacka 2010]. We wspomnianych badaniach chrom dodawano do podłoży w postaci wodnych roztworów soli. Najczęściej stosowano $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [Pas i wsp. 2004, Zetic i wsp. 2001], $\text{KCr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ [Pas i wsp. 2004], $\text{K}_2\text{Cr}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ [Batic, Raspor 2000] oraz $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3$ [Karpnick-Sobol i wsp. 2006].

W publikacjach naukowych zajmujących się wzbogacaniem drożdży w rozmaite pierwiastki widoczny jest niedostatek prac dotyczących udziału Cr(III) w procesach fermentacyjnych.

2. Geneza, cel pracy i zakres badań

Rosnące zainteresowanie technologii i biotechnologii żywności chromem wynika z faktu, iż w ostatnich latach znacznie poszerzyła się wiedza o jego wielokierunkowym znaczeniu w metabolizmie komórki. Chrom w postaci trójwartościowej jest niezbędny do właściwego przebiegu procesów metabolicznych, uczestniczy w przemianach węglowodanów (m.in. glukozy) oraz procesach syntezy białek i kwasów tłuszczowych. Został zidentyfikowany jako składnik centrów aktywnych wielu enzymów, jak również jako nieodłączna część biologicznie aktywnych kompleksów chromomoduliny (LMWCr).

Do tej pory nie praktykuje się wzbogacania podłoża stosowanych do namnażania drożdży gorzelnicznych i fermentacji etanolowej związkami chromu. Dotychczasowa wiedza na temat roli tego pierwiastka w tym procesie jest bowiem stanowczo niewystarczająca. Wprawdzie publikowane nieliczne wyniki badań laboratoryjnych wskazują na możliwość poprawy dynamiki tego procesu w obecności jonów Cr(III), to jednak nie dotyczą one fermentowania zacierów kukurydzianych, szczególnie typu VHG, które mogą odegrać kluczową rolę w realizacji zamierzeń polityki paliwowej Unii Europejskiej. Mankamentem technologii VHG jest relatywnie niższa efektywność konwersji surowca do etanolu, która jest konsekwencją specyficznych w tej metodzie warunków polegających m.in. na wysokim stężeniu glukozy w początkowym etapie procesu i dużej zawartości etanolu w jego końcowym stadium. W takich warunkach komórki drożdży narażone są na stres osmotyczny obniżający ich potencjał do przekształcania obecnych w zacierze węglowodanów do etanolu. Jak wynika z dotychczasowych wyników badań nad rolą Cr(III) w metabolizmie węglowodanów, skutecznym remedium w takiej sytuacji może być suplementacja zacierów VHG jonami Cr(III). Korzyści z tego typu badań nie ograniczałyby się tylko do bliższego poznania praktycznych aspektów fermentowania zacierów kukurydzianych wzbogaconych w Cr(III), ale także poznawczych. W ogóle bowiem nic nie wiadomo na temat powiązania Cr(III) z cechami fizjologicznymi i morfologicznymi komórek drożdży fermentujących takie zacierzy, składem nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych czy ich zdolnością do akumulowania tego pierwiastka.

W związku z tym, celem pracy była ocena oddziaływania suplementacji Cr(III) zacierów kukurydzianych o wysokiej zawartości surowca (VHG) na intensywność i efek-

tywność produkcji etanolu oraz zmiany cech morfologicznych i fizjologicznych badanych drożdży gorzelnicznych.

Osiągnięcie celu wymagało zrealizowania następującego zakresu badań:

- ocenę cech fizjologicznych i morfologicznych drożdży gorzelnicznych podczas wzrostu na podłożu syntetycznym YPG z dodatkiem Cr(III);
- oznaczenie dynamiki fermentacji etanolowej na podłożu syntetycznym YM z dodatkiem Cr(III);
- ocenę dynamiki i efektów fermentacji etanolowej w naturalnych zacierach kukurydzianych o wzrastającej zawartości surowca od 20 do 40%;
- oznaczenie przebiegu i parametrów technologicznych fermentacji zacierów kukurydzianych VHG z dodatkiem Cr(III);
- określenie zmian zachodzących w stosowanych szczepach drożdży w czasie fermentacji zacierów VHG z dodatkiem Cr(III) w aspekcie cech morfologicznych i fizjologicznych, a zwłaszcza zawartości kwasów tłuszczowych nasyconych i nienasyconych.

3. Materiał i metody badań

3.1. Materiał badawczy

Materiał biologiczny stanowiły cztery szczepy drożdży gorzelnicznych: *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red, *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007, *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, *Saccharomyces cerevisiae* D2 (stosowano go tylko w I etapie badań).

Szczepy przechowywano w Zakładzie Technologii Fermentacji Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu na skosach YM w temperaturze +4°C. Charakterystykę szczepów podano w tabeli 1.

Tabela 1
Table 1

Charakterystyka szczepów wykorzystanych w badaniach
Characteristics of strains used in experiments

| Szczepy Strains | Charakterystyka Characteristics |
|--|--|
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Etanol Red | Szczep z kolekcji firmy Division of S.I. Lesaffre „FERMENTIS”; wyselekcjonowany do przemysłowej produkcji alkoholu. Charakteryzuje się dobrą żywotnością zwłaszcza w technologii fermentacji „wysokich stężeń zacierów”, odporny na wysokie stężenia etanolu [materiały informacyjne Lesaffre Company] |
| <i>Saccharomyces cerevisiae</i> D2 | Szczep przechowywany w kolekcji kultur Katedry Technologii Rolnej i Przechowalnictwa UP we Wrocławiu, drożdże stosowane w gorzelnictwie rolniczym do fermentacji zacierów skrobiowych [Sobkowicz i wsp. 1984] |
| <i>Saccharomyces diastaticus</i> ATCC 13007 | Szczep z kolekcji ATCC. Charakteryzuje się wysoką tolerancją na etanol, wytwarza enzym glikoamylazę, może hydrolizować i fermentować dekstryny [Korhola 1987] |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> ATCC 48086 | Szczep z kolekcji ATCC, mutant UV odporny na deoksy-d-glukozę. Charakteryzuje się wysoką aktywnością amylolityczną, wytwarza: alfa-amylazę, glikoamylazę, enzymy hydrolizujące wiązania α -1,6 glikozydowe [Wilson i wsp. 1982] |

W tabeli 2 przedstawiono charakterystykę podłoży wzrostowych i fermentacyjnych, wraz z zastosowanymi dawkami preparatów enzymatycznych.

Tabela 2
Table 2

Podłoża stosowane w pracy
Media used in experiments

| Etap pracy Stage of work | Skład podłoża Composition of medium | Ilość Quantity | Rodzaj podłoża Kind of medium |
|-----------------------------|--|--------------------------------------|--|
| 1 | 2 | 3 | 4 |
| | Podłoże YM Glukoza Pepton Ekstrakt słodowy Ekstrakt drożdżowy + agar | 2,0% 1,0% 0,6% 0,6% 2,0% | Przechowywanie szczepów (skosy) |
| Etap I | Podłoże YPG Glukoza Pepton Ekstrakt drożdżowy | 2,0% 1,0% 1,0% | Namnażanie biomasy (10 ml) – hodowle statyczne |
| Etap I | Podłoże YPG Glukoza Pepton Ekstrakt drożdżowy + CrCl ₃ 6H ₂ O stężenie Cr (III): 0; 8; 30; 60; 156; 200 mg·l ⁻¹ | 2,0% 1,0% 1,0% | Namnażanie biomasy w aparacie Bioscreen Hodowle wstrząsane (48 h) |
| Etap II, III, IV | Podłoże YM Glukoza Pepton Ekstrakt słodowy Ekstrakt drożdżowy | 2,0% 1,0% 0,6% 0,6% | Namnażanie biomasy (10 ml) – hodowle statyczne – etap II, III i IV (100 ml) – hodowle wstrząsane – etap II, III, IV |
| Etap II | Podłoże YM (glukoza 2%) + CrCl ₃ 6H ₂ O Stężenie Cr(III): 0; 8; 30; 60; 156; 200 mg·l ⁻¹ | | Namnażanie biomasy |
| | Podłoże YM (glukoza 10%) + CrCl ₃ 6H ₂ O Stężenie Cr(III): 0; 8; 30; 60; 156; 200 mg·l ⁻¹ | | Próby fermentacyjne – podłoże modelowe |

Tabela 2 cd.
Table 2 cont.

| 1 | 2 | 3 | 4 |
|----------|--|-------------------------------|---|
| Etap III | Zaciery kukurydziane (20%) (50 g kukurydzy/250 g próby) + preparaty enzymatyczne*: – Termamyl S.C. – Spiryzyme Fuel – OPTIMASH™ Bg | 0,25 ml 0,30 ml 0,25 ml | Podłoża fermentacyjne naturalne Ziarno kukurydzy poddane wcześniejszemu rozdrobnieniu po zmieszaniu z wodą stanowiło podstawowy składnik podłoża. Zaciery przygotowano metodą bezciśnieniowego uwalniania skrobi (BUS) z udziałem preparatów enzymatycznych w dawkach zgodnych z zaleceniami producenta. *wraz ze wzrostem ekstraktu w zacierze stosowano wyższe dawki preparatów enzymatycznych |
| | Zaciery kukurydziane (24%) (60 g kukurydzy/250 g próby) + preparaty enzymatyczne: – Termamyl S.C. – Spiryzyme Fuel – OPTIMASH™ Bg | 0,30 ml 0,36 ml 0,30 ml | |
| | Zaciery kukurydziane (28%) (70 g kukurydzy/250 g próby) + preparaty enzymatyczne: – Termamyl S.C – Spiryzyme Fuel – OPTIMASH™ Bg | 0,35 ml 0,42 ml 0,35 ml | |
| | Zaciery kukurydziane (32%) (80 g kukurydzy/250 g próby) + preparaty enzymatyczne: – Termamyl S.C. – Spiryzyme Fuel – OPTIMASH™ Bg | 0,40 ml 0,48 ml 0,40 ml | |
| | Zaciery kukurydziane (36%) (90 g kukurydzy/250 g próby) + preparaty enzymatyczne: – Termamyl S.C – Spiryzyme Fuel – OPTIMASH™ Bg | 0,45 ml 0,54 ml 0,45 ml | |
| | Zaciery kukurydziane (40%) (100 g kukurydzy/250 g próby) + preparaty enzymatyczne: – Termamyl S.C – Spiryzyme Fuel – OPTIMASH™ Bg | 0,5 ml 0,6 ml 0,5 ml | |
| Etap IV | Zaciery kukurydziane: 20 i 36% (VHG) + preparaty enzymatyczne*: – Ceremix 6X MG – Termamyl S.C* – Spiryzyme Fuel* – OPTIMASH™ Bg* + suplementacja CrCl ₃ ·6H ₂ O Stężenie Cr(III) – (0 i 60 mg·l ⁻¹) | 0,07 g/50 g surowca | Zaciery poddano filtracji przed fermentacją *wraz ze wzrostem ekstraktu w zacierze stosowano wyższe dawki preparatów enzymatycznych |

Enzymy dozowano zgodnie z zaleceniami producenta [Kapela, Solarek 2005], a ich charakterystykę przedstawiono w tabeli 3.

Tabela 3
Table 3

Charakterystyka preparatów enzymatycznych
Characteristic of enzyme preparations

| Enzym Enzyme | Producent Producent | Charakterystyka Characteristic |
|-----------------|------------------------|---|
| Ceremix 6X MG | Novozymes | preparat zawierający enzymy α -amylazy, β -glukanazy, proteazy, pentozanazy, celulazy; źródłem enzymów są: <i>Bacillus sp.</i> i <i>Humicola sp.</i> |
| Termamyl S.C. | Novozymes | preparat enzymatyczny upłynniający skrobię o szerokim zakresie pH; w skład preparatu wchodzi termostabilna α -amylaza produkowana przez szczep bakterii <i>Bacillus stearothermophilus</i> |
| Spiryzyme Fuel | Genencor | preparat glukoamylazy stosowany do scukrzania upłynnionych zacierów przy produkcji destylatu rolniczego; enzym ten wyróżnia się wysoką termostabilnością, pozostaje aktywny w temperaturach od 30 do 70°C |
| OPTIMASH™ Bg | Genencor | preparat zawierający enzymy hydrolizujące polisacharydy nieskrobiowe; enzym izolowany z genetycznie modyfikowanego szczepu <i>Trichoderma reesei</i> |

3.2. Zakres prowadzonych badań

W pierwszym etapie pracy oceniono wpływ suplementacji modelowego podłoża wzrostowego YPG jonami Cr(III) na parametry wzrostu, cechy morfologiczne i fizjologiczne drożdży gorzelniczych. Materiał biologiczny stanowiły drożdże: *S. cerevisiae* Ethanol Red, *S. diastaticus* ATCC 13007, *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, *S. cerevisiae* D2. Do podłoża YPG dodano Cr(III) w postaci $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Stężenie Cr(III) w podłożach wynosiło: 0; 8; 30; 60; 156; 200 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Namnażanie drożdży prowadzono w automatycznym turbidymetrze Bioscreen C oraz w trwających 48 godz. hodowlach wstrząsanych. Realizacja I etapu badań zakładała wyznaczenie parametrów dynamiki wzrostu drożdży: czasu trwania logarytmicznej fazy wzrostu, maksymalnej szybkości właściwej wzrostu, maksymalnego przyrostu biomasy (podczas hodowli w aparacie Bioscreen C) oraz przyrost biomasy, ocenę stanu fizjologicznego drożdży, średniej średnicy komórek, a także możliwości akumulacji jonów chromu w komórkach drożdży (podczas 48 godz. hodowli wstrząsanych). Doświadczenie wykonano zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 1a. Wyniki pracy omówiono w p. 4.1.1.

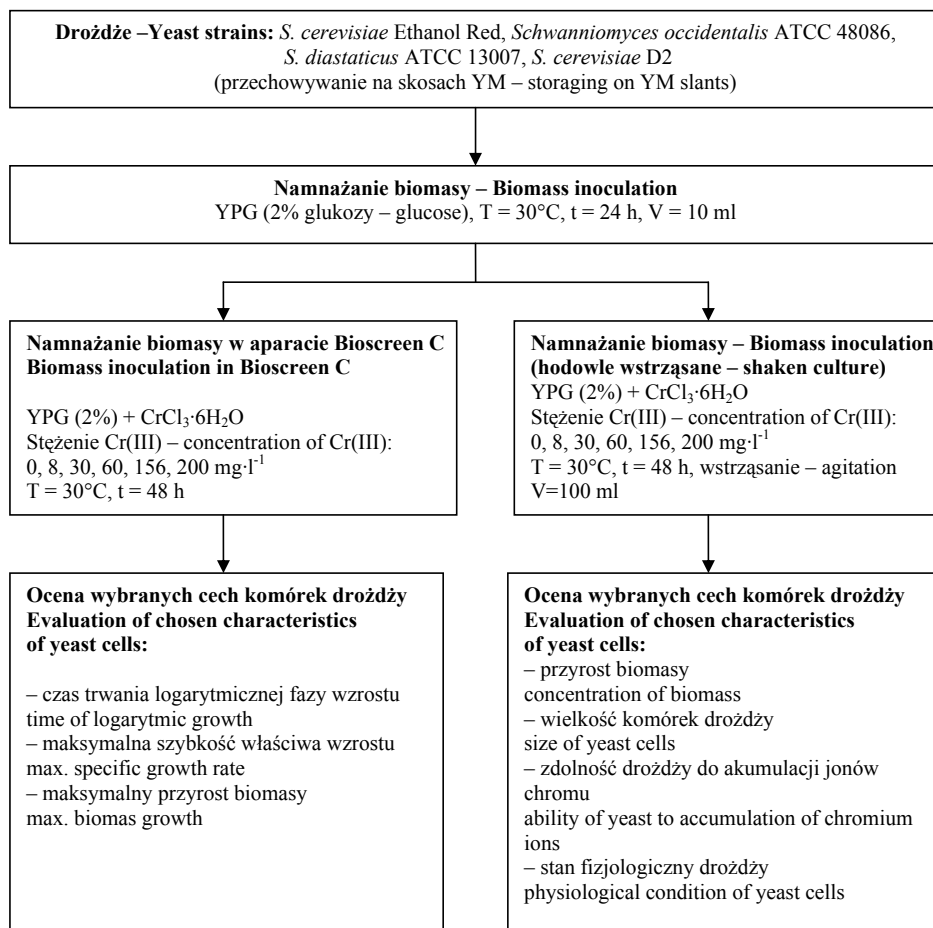
W drugim etapie pracy oceniono wpływ Cr(III) na aktywność fermentacyjną drożdży gorzelniczych. Proces fermentacji prowadzono na podłożu modelowym YM. Zastosowano dwa warianty suplementacji Cr(III) (wariant I – suplementacja podłoża wzrostowego,

wariant II – suplementacja podłoża fermentacyjnego). Stężenie Cr(III) było identyczne jak w etapie I. Doświadczenie wykonano zgodnie ze schematem przedstawionym na rysunku 1b. Wyznaczono dynamikę fermentacji podłoży modelowych z udziałem badanych szczepów drożdży. Wyniki opisano w p. 4.1.2.

W efekcie realizacji I i II etapu badań wybrano optymalną (w przypadku drożdży gorzelnicznych) dawkę Cr(III) oraz etap procesu technologicznego właściwy do jego dozowania.

Mając na uwadze warunki przemysłowej produkcji etanolu, w trzecim etapie badań przygotowano zacierzy gorzelniczne zawierające odpowiednio: 20, 24, 28, 32, 36, 40% wagowych rozdrobnionej kukurydzy (p. 3.1, tab. 2). Proces zacierania przeprowadzono metodą bezciśnieniowego uwalniania skrobi z udziałem enzymów upłynniających i scukrzających w zaciernicy laboratoryjnej typ Typ LB 12 Lochner Labor (parametry technologiczne procesu opisano w p. 3.4). Testy fermentacyjne prowadzono w temperaturze 30°C przy udziale trzech szczepów drożdży *S. cerevisiae* Ethanol Red, *S. diastaticus* ATCC 13007 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. W etapie tym oceniono wpływ wzrastającej zawarości ekstraktu z surowca w zacierze na dynamikę i efekty końcowe fermentacji etanolowej, takie jak: stężenie etanolu, wydajność procesu fermentacji, profile węglowodanowe (glukoza, fruktoza, maltoza, maltotrioza, dekstryny), zawartość kwasów organicznych (bursztynowego, octowego, mlekowego), glicerolu oraz stan fizjologiczny komórek drożdży po fermentacji. Przebieg procesu oraz zakres wykonanych analiz przedstawiono na rysunku 2. Wyniki pracy omówiono w p. 4.2.

W kolejnym etapie badań oceniono wpływ Cr(III) na dynamikę, parametry technologiczne, kinetyczne fermentacji zacierów kukurydzianych VHG (36%) oraz zacierów 20% (zacierzy wybrano na podstawie III etapu badań), a także wybrane cechy biotechnologiczne drożdży gorzelnicznych. Podłoża po procesie zacierania przefiltrowano i suplementowano Cr(III) w ilości 60 mg·l⁻¹ (dawkę chromu wybrano na podstawie I i II etapu badań). Proces fermentacji prowadzono również w podłożach przygotowanych bez chromu. Analizę prób fermentacyjnych prowadzono co 24 godz., aż do czasu zakończenia procesu. Podczas fermentacji kontrolowano: stężenie etanolu, wydajność procesu fermentacji, profile węglowodanowe (glukozę, fruktozę, maltozę, maltotriozę, dekstryny), zawartość kwasów organicznych (bursztynowego, octowego, mlekowego) i glicerolu oraz parametry kinetyczne procesu (szybkość zużycia cukrów oraz szybkość tworzenia etanolu). Ocena wpływu Cr(III) na wybrane cechy drożdży obejmowała: przyrost biomasy, rozmiar ich komórek, skład pierwiastkowy, zmiany składu kwasów tłuszczowych i zdolność do akumulacji jonów chromu. Przebieg doświadczenia oraz zakres wykonanych analiz przeprowadzono zgodnie ze schematem umieszczonym na rysunku 3. Wyniki omówiono w p. 4.3.

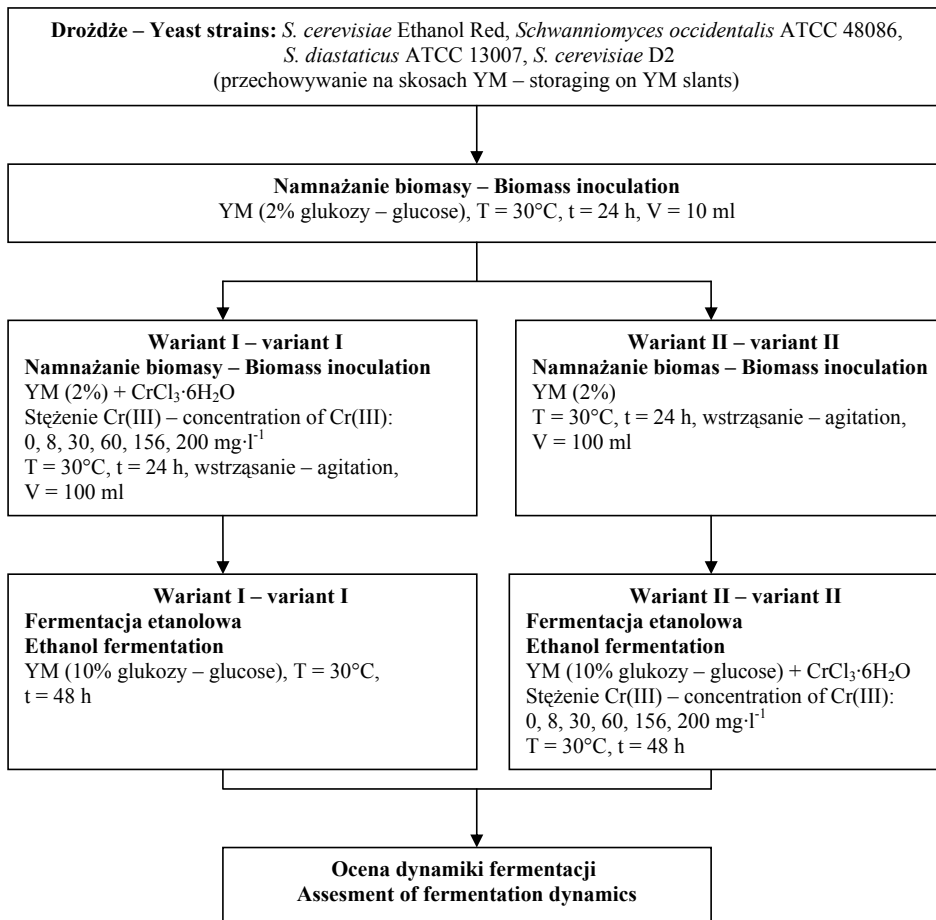


Rys. 1a. Schemat I etapu badań

Wpływ Cr(III) na parametry wzrostu i wybrane cechy drożdży gorzelnicznych

Fig. 1a. Diagram of I phase of experiments

Influence the addition of Cr(III) on the yeast growth parameters and chosen characteristics of yeast

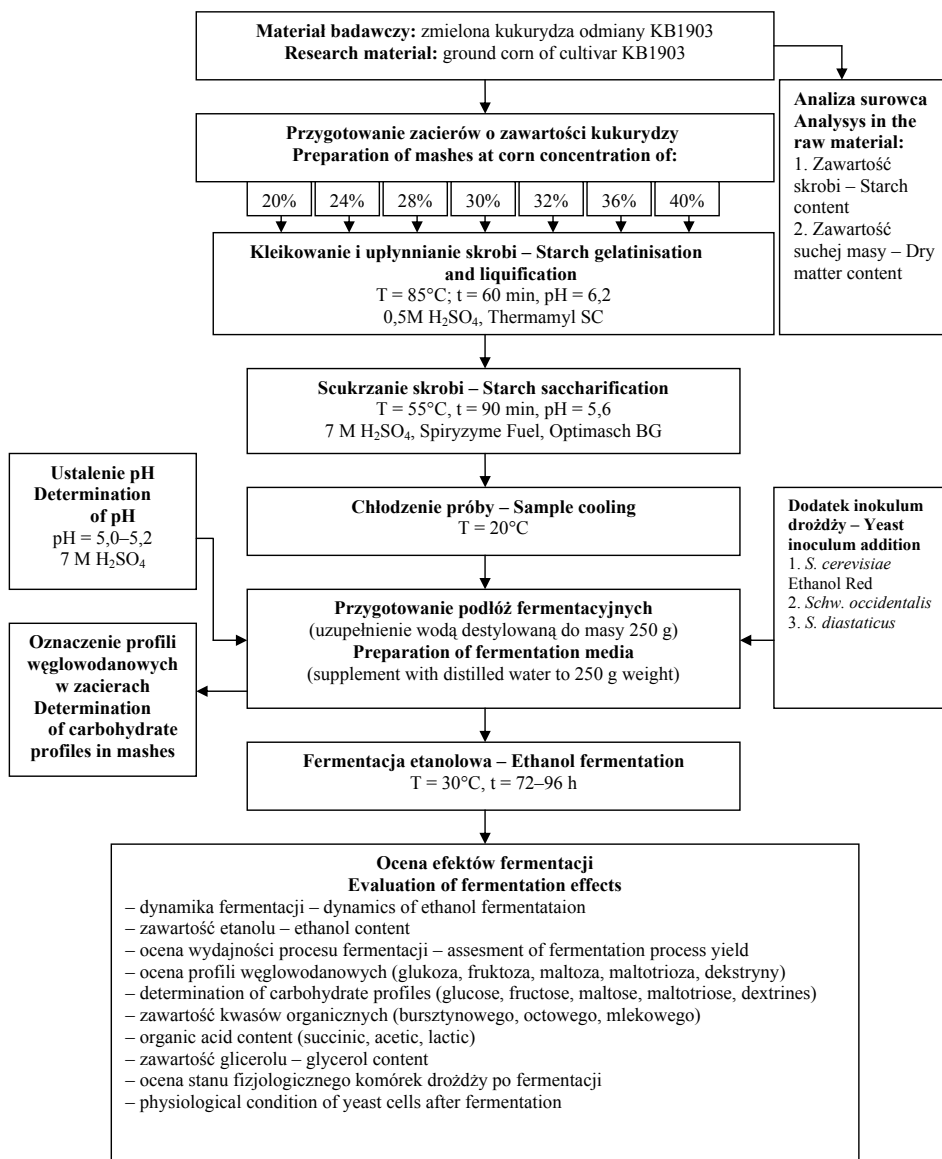


Rys. 1b. Schemat II etapu badań.

Wpływ Cr(III) na dynamikę fermentacji etanolowej

Fig. 1b. Diagram of II phase of experiments

Influence the addition of Cr(III) on the on dynamics of ethanol fermentation

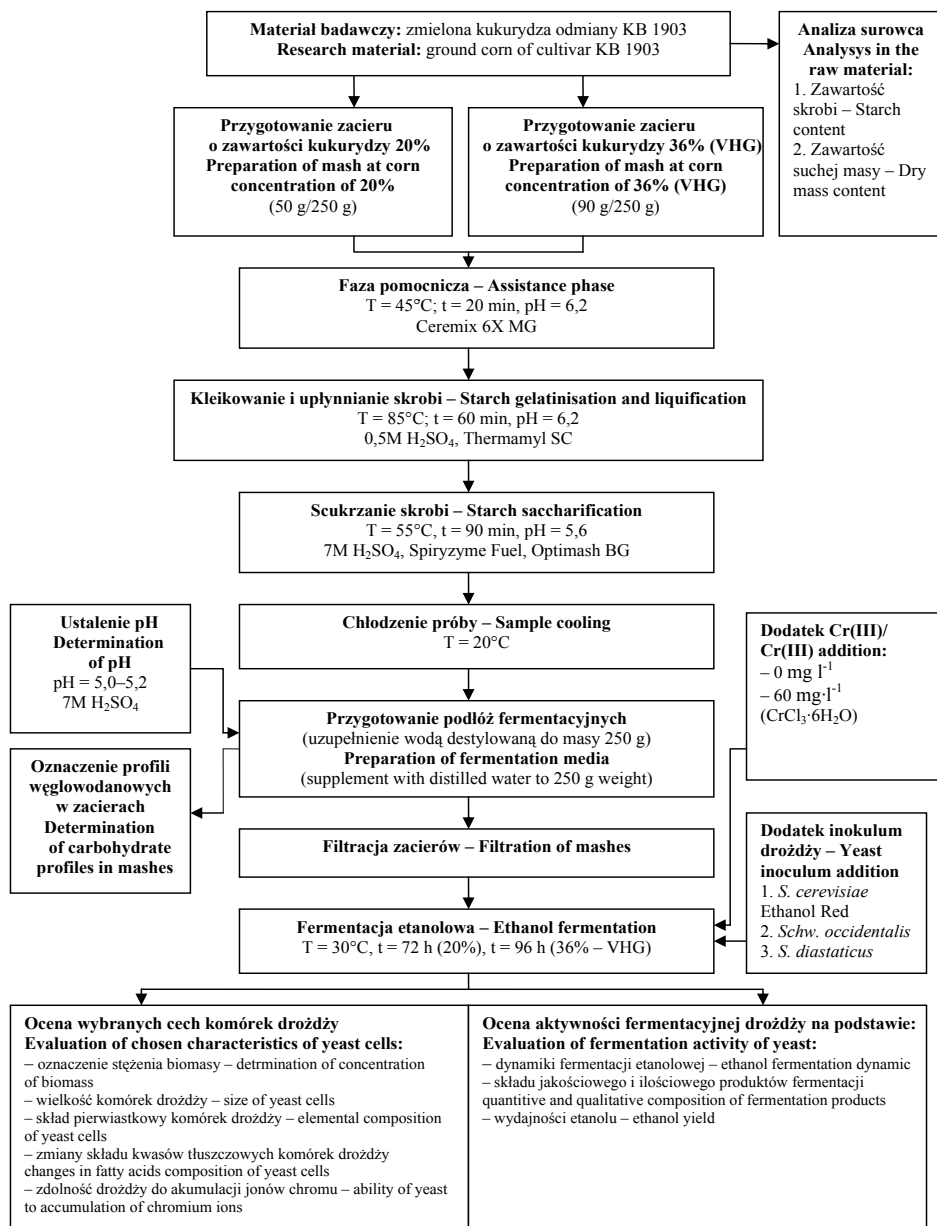


Rys. 2. Schemat III etapu badań.

Dynamika i efekty fermentacji etanolowej w zacierach kukurydzianych o różnej zawartości surowca

Fig. 2. Diagram of III phase of experiments

Dynamics and effects of ethanol fermentation in corn mashes of different raw material content



Rys. 3. Schemat IV etapu badań.
Charakterystyka cech biotechnologicznych drożdży
podczas fermentacji zacierów kukurydzianych z dodatkiem Cr(III)

Fig. 3. Diagram of IV phase of experiments.

Biotechnological characteristics of yeast during fermentation of maize mashes with Cr(III) addition

3.3. Wpływ suplementacji podłoża hodowlanego jonami Cr(III) na cechy morfologiczne i fizjologiczne drożdży gorzelniczych

Ocenę dynamiki wzrostu drożdży gorzelniczych przeprowadzono na podłożu YPG wzbogaconym w Cr(III) w postaci $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Stężenie Cr(III) w podłożach wynosiło: 8, 30, 60, 156, 200 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, (p. 3.1, tab. 2). Próbę kontrolną stanowiło podłoże bez chromu.

3.3.1. Ocena dynamiki wzrostu drożdży gorzelniczych na podłożu syntetycznym w obecności Cr(III)

Oznaczenie wykonano w aparacie Bioscreen C, bazując na pomiarze gęstości optycznej podłoża w czasie hodowli drobnoustrojów. W urządzeniu tym prowadzono wzrost mikrohodowli w studzienkach (400 μl) kasety inkubacyjnej. Warunki prowadzenia hodowli były następujące: temperatura 30°C, wstrząsanie ciągle, pomiar zmętnienia co 20 min, czas inkubacji 48 godz. Otrzymane wyniki przetworzono za pomocą oprogramowania (BioLink). Na podstawie krzywych wzrostu (dane niepublikowane) będących zależnością gęstości optycznej od czasu hodowli wyznaczono:

- czas trwania fazy logarytmicznego wzrostu (h),
- maksymalną szybkość właściwą wzrostu [μ_{max}] obliczono według wzoru:

$$\mu_{\text{max}} = (\ln \text{OD}_{\text{max}} - \ln \text{OD}_{\text{min}}) / (t_{\text{max}} - t_{\text{min}})$$

gdzie:

μ_{max} – maksymalna szybkość właściwa wzrostu [h^{-1}],

OD_{t_2} – maksymalna wartość gęstości optycznej w fazie logarytmicznego wzrostu,

OD_{t_1} – minimalna wartość gęstości optycznej w fazie logarytmicznego wzrostu,

t_{min} – czas odpowiadający wartości OD_{max} ,

t_{max} – czas odpowiadający wartości OD_{min} .

- maksymalny przyrost biomasy wyrażony jako delta absorbancji $D_{\text{max}} \text{OD}$:

$$D_{\text{max}} \text{OD} = \text{OD}_{\text{max}} - \text{OD}_{\text{min}}$$

gdzie:

OD_{max} – maksymalna wartość gęstości optycznej w fazie logarytmicznego wzrostu,

OD_{min} – minimalna wartość gęstości optycznej w fazie logarytmicznego wzrostu.

3.3.2. Charakterystyka cech drożdży podczas hodowli

wstrząsanych na podłożu syntetycznym w obecności jonów Cr(III)

Hodowle wstrząsane prowadzono przez 48 godz. w kolbach stożkowych o pojemności 250 cm^3 w podłożu YPG (kontrola) oraz YPG wzbogaconym w Cr(III) w stężeniu: 8, 30, 60, 156, 200 $\text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$. Skład podłoży przedstawiono w tabeli 2, pkt 3.1 metodyki badań. Warunki hodowli były optymalne do wzrostu drożdży (temp. 30°C, ciągle wstrząsanie). Po odwirowaniu i przemyciu biomasy przeprowadzono charakterystykę wybranych cech drożdży zgodnie z założeniami pracy. Oceniono wpływ obecności jonów Cr(III) oraz jego stężenia w podłożu na wybrane cechy drożdży.

Oznaczono:

- Przyrost biomasy drożdży poprzez pomiar gęstości zawiesiny komórek za pomocą spektrofotometru BECKMAN DU-650 przy długości fali $\lambda = 560$ nm oraz wyznaczenie na podstawie krzywych standardowych (dane niepublikowane) zmian stężenia suchej substancji drożdży [$\text{g}\cdot\text{l}^{-1}$] w czasie wzrostu.
- Stan fizjologiczny drożdży gorzelnicznych w preparacie mikroskopowym. Przy użyciu komory Thoma określono procentowy udział komórek pączkujących oraz nieaktywnych (barwiących się błękitem metylenowym).
- Wielkość komórek drożdży za pomocą laserowego analizatora cząstek Mastersizer 2000G firmy Malvern Instruments. Średnicę komórek badanych szczepów mierzono w czasie 0 przed zaszczepieniem podłoża hodowlanego oraz po 24 i 48 godz. wzrostu drożdży w podłożu YPG z dodatkiem lub bez dodatku Cr(III). Na podstawie przebiegu krzywych rozkładu wielkości komórek wyznaczono ich średnicę. Komórki podzielono na cztery klasy wielkości: I klasa (0,2–4,5 μm), II klasa (4,6–8,0 μm), III klasa (8,1–15 μm), IV klasa (15,1–20 μm). Przyjęto, że do klasy I kwalifikują się oderwane od komórek pączki bądź też komórki o bardzo małych rozmiarach. W II klasie znajdowały się komórki o typowej wielkości. W skład klasy III mogły wchodzić komórki pączkujące. Megakomórki bądź te o nietypowych kształtach i rozmiarach wchodziły w skład klasy IV.
- Zawartość chromu ogółem w odwirowanej (3000 obr./min) i dwukrotnie przemyczonej biomasy drożdży przeprowadzono metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej. Próby do oznaczeń chromu zostały poddane mineralizacji na mokro w piecu mikrofalowym Plazmatronika Uniclever II. Roztwory mineralizatów umieszczano w naczyniach plastikowych w autosamplerze aparatu AAS Perkin Elmer 3110 z kuetwą grafitową HGA-600. W programie temperaturowym od 120 do 2500°C następowało suszenie, piroliza i atomizacja próbki. W chwili zatomizowania próbki aparat dokonywał pomiaru absorbancji promieniowania przez atomy chromu. Analizy przeprowadzono w Katedrze Bromatologii i Dietetyki Akademii Medycznej we Wrocławiu.

3.4. Przygotowanie prób fermentacyjnych z kukurydzy

3.4.1. Charakterystyka wybranych cech surowca

Surowcem do przygotowania prób fermentacyjnych było ziarno kukurydzy odmiany KB 1903. Ziarno pochodziło ze Stacji Hodowli Roślin Rolniczych „Nasiona Kobierzycze” Sp. z o.o. W surowcu oznaczono zawartość suchej substancji oraz skrobi. Oznaczenie zawartości suchej masy wykonano za pomocą wagosuszarki typu WPS 50S. Wynik odczytywano, jako procentową zawartość suchej masy w surowcu. Oznaczenie zawartości skrobi w surowcu wykonano metodą Eversa w modyfikacji Grossfelda [BS EN ISO 10520:1998]. Zawartość skrobi w surowcu wynosiła 63, a suchej masy 91%. Uzyskane wyniki posłużyły do obliczenia wydajności procesu fermentacji etanolowej.

3.4.2. Przygotowanie zacierów

Do przygotowania zacierów wykorzystano energooszczędną metodę bezciśnieniowego uwalniania skrobi (BUS). Ziarno kukurydzy rozdrobniono wstępnie na śrutowniku (typ VEB Muhlenbau), a następnie zmielono na młynku laboratoryjnym (typ WŻ-1). Rozdrobnioną kukurydżę odważono do kubków zaciernych, przygotowując zacier o zawartości surowca: 20, 24, 28, 32, 36 i 40% wagowych (Etap III). Skład zacierów przedstawiono w tabeli 4. Do etapu IV wybrano zacier o zawartości surowca 20 i 36% (VHG).

Tabela 4

Table 4

Skład zacierów kukurydzianych
Corn mashes composition

| Lp. | Rodzaj zacieru [%] Type of mash | Udział surowca w zacierze [% wagowych kukurydzy] Raw material content in mash [weight % of corn] |
|-----|------------------------------------|---|
| 1 | 20 | 20 |
| 2 | 24 | 24 |
| 3 | 28 | 28 |
| 4 | 32 | 32 |
| 5 | 36 | 36 |
| 6 | 40 | 40 |

Po skorygowaniu pH za pomocą 0,5M H₂SO₄ do wartości 6,2 zawieszinę kukurydzy z wodą poddano procesowi zacierania w zaciernicy laboratoryjnej Typ LB 12 Lochner Labor. Pierwszym etapem zacierania było skleikowanie i upłynnianie skrobi zawartej w surowcu. Proces przeprowadzono w temperaturze 85°C, w czasie 60 minut z zastosowaniem enzymu upłynniającego Termamyl S.C. Ilość dodanego enzymu była przeliczana odpowiednio do danego stężenia surowca (tab. 2, p. 3.1). Zacier schłodzono do temperatury 55°C i skorygowano pH do wartości 5,8 za pomocą 7M H₂SO₄.

Drugim etapem zacierania było scukrzanie oraz hydroliza polisacharydów nieskrobiowych. Proces przeprowadzono w temperaturze 55°C w czasie 90 minut z zastosowaniem enzymów Spiryzyme Fuel i OPTIMASH™ Bg. Dawki enzymów ustalono adekwatnie do zawartości surowca w zacierze (tab. 2, p. 3.1). W czasie procesu prowadzono kontrolę scukrzania, wykonując próbę jodową. Po zakończeniu tego etapu zacier schłodzono do temperatury 20°C, pH zacieru ustalono na 5 za pomocą pH-metru Mettler Toledo typ MP220. Dozowano inokulum drożdży przygotowane zgodnie z pkt. 3.4.3. Próby uzupełniono wodą do 250 g.

W etapie IV pracy zastosowano dodatkowy preparat enzymatyczny Ceremix 6X MG. Zacier przygotowany do fermentacji przesączono. Proces filtracji zacierów był niezbędny w celu przeprowadzenia charakterystyki wybranych cech drożdży zgodnie ze schematem pracy (p. 3.2, rys. 3). Uzyskane filtry rozdzieleno na dwie części – jedną z nich uzupełniono Cr(III) w dawce 60 mg·l⁻¹, drugą przygotowano bez chromu (0 mg Cr(III)·l⁻¹). Filtry zaszczepiono drożdżami i przeprowadzono fermentację.

3.4.3. Przygotowanie inokulum drożdży

Szczepki drożdży uaktywniono w probówkach w podłożu płynnym YM (p. 3.1 metodyki, tab. 2) w temperaturze 30°C, w czasie 24 godz. Tak uaktywnioną biomasą zaszczepiono podłoże YM (100 cm³) i hodowano w temperaturze 30°C przez 72 godz. Następnie biomasę drożdży odwirowano (3000 obr./min) i po przemyciu poddano standaryzacji. Proces ten wykonano na podstawie krzywych zależności absorbancji od suchej masy drożdży (dane niepublikowane). 100 g podłoża fermentacyjnego szczepiono 0,15 g s.m. drożdży.

3.4.4. Fermentacja etanolowa zacierów kukurydzianych

Fermentację etanolową prowadzono metodą okresową w temperaturze 30°C z użyciem drożdży gorzelnicznych. Czas fermentacji wynosił od 72 do 96 godz. Analizy wykonywano w czasie 0, 24, 48, 72 godz. oraz w przypadku zacierów o wysokiej zawartości surowca także po 96 godz. Podczas fermentacji kontrolowano:

- Dynamikę procesu fermentacji na podstawie ilości wydzielonego CO₂. Próby ważono aż do momentu, gdy różnica między kolejnymi ważeniami była nie większa niż 0,02 g. Ilość wydzielonego dwutlenku węgla w czasie procesu podano w procentach [%] w odniesieniu do całkowitej ilości wydzielonego gazu.
- Skład ilościowy i jakościowy podłoży fermentacyjnych, wykorzystując metodę wysoko sprawnej chromatografii cieczowej HPLC. Oznaczono: ilość wytworzonego etanolu, profile węglowodanowe (glukozy, fruktozy, maltozy, maltotriozy, dekstryn) oraz produkty uboczne: glicerol i kwasy organiczne (bursztynowy, octowy, mlekowy).

Do pomiaru wykorzystano chromatograf cieczowy D-7000 HPLC firmy Merck z kolumną firmy BIO-RAD HPX-87H o średnicy 7,8 mm i długości 300 mm, detektorem RI (temperatura detekcji 60°C), szybkość przepływu eluentu 0,6 ml·min⁻¹, wielkość nstrzyku próby 0,25 µl.

3.5. Charakterystyka cech biotechnologicznych drożdży gorzelnicznych podczas fermentacji zacierów kukurydzianych

Charakterystykę cech drożdży gorzelnicznych wykonywano podczas fermentacji zacierów VHG (36%) oraz zacierów 20% poddanych filtracji, w wariacie bez chromu (próba kontrolna) oraz z dodatkiem Cr(III) w ilości 60 mg·l⁻¹ (zgodnie ze schematem IV etapu pracy, p 3.2, rys. 3).

Materiał do badań pobierano po 24., 48., 72. i 96. godz. fermentacji. Drożdże wirowano i przemywano 2-krotnie wodą w celu wydzielenia biomasy z podłoża fermentacyjnego. Podczas fermentacji kontrolowano:

- Stężenie biomasy (p. 3.3.2).
- Stan fizjologiczny drożdży (p. 3.3.2).
- Rozmiar komórek drożdży (p. 3.3.2).
- Biosorpcję jonów chromu ogółem (p. 3.3.2).
- Zawartość jonów: Na, K, Ca, Mg, Fe oraz Zn w biomacie drożdży, po mineralizacji prób w piecu mikrofalowym do spalań na mokro MARS 5 firmy CEM, za pomocą

spektrometru absorpcji atomowej „Spektra AA 240FS” firmy Varian. Oznaczenie zawartości Na, Ca i K wykonano metodą atomowej spektrometrii emisyjnej, a Mg, Fe i Zn metodą atomowej spektrometrii absorpcyjnej [Kunachowicz 1997].

– Skład jakościowy i ilościowy kwasów tłuszczowych w komórkach drożdży. Ekstrakcję kwasów tłuszczowych z komórki drożdży wykonano zmodyfikowaną metodą Ackmana [1998]. Modyfikacja polegała na tym, że dokładnie wysuszoną próbkę biomasy drożdży potraktowano mieszaniną benzenu i metanolowego kompleksu trójfluorku boru. Próbę wytrząsano, a następnie ogrzewano przez 15 min w temp. 50°C. Takie warunki były optymalne do przeprowadzenia procesu estryfikacji. Po ochłodzeniu do próby dodano H₂O. Próbę odwirowano, górną warstwę odparowano w atmosferze azotu, a suchą pozostałość rozpuszczano w CH₂Cl₂. Analizę estrów metylowych kwasów tłuszczowych przeprowadzono za pomocą chromatografu gazowego PU 4410 firmy Philips wyposażonego w detektor FID. Rozdziału dokonano na kolumnie kapilarnej RTX-2330 (105 m, 0.25 mm ID, 0.2 µm df) firmy Restek stosując jako gaz nośny hel. Oznaczone kwasy tłuszczowe zostały podzielone na trzy grupy:

- MCFA (C10-C14): (Medium Chain Fatty Acids; średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe);
- SFA (LCFA) (C16-C18): (Long Chain Fatty Acids; długołańcuchowe kwasy tłuszczowe);
- UFA (C16:1, C18:1, C18:2, C18:3): (Unsaturated Fatty Acids; nienasycone kwasy tłuszczowe) [Beltran i wsp. 2008].

Klasyfikację oznaczonych kwasów do poszczególnych grup przedstawiono w tabeli 5.

Tabela 5
Table 5

Klasyfikacja kwasów tłuszczowych
Classification of fatty acids

| Grupa kwasów Group of acids | Oznaczenie Name | Nazwa systematyczna Systematic name | Nazwa zwyczajowa Ordinary name |
|--------------------------------|--------------------|--|-----------------------------------|
| MCFA | C 10:0 | dekanowy | kaprynowy |
| | C 12:0 | dodekanowy | laurynowy |
| | C 14:0 | tetradekanowy | mirystynowy |
| SFA (LCFA) | C 16:0 | heksadekanowy | palmitynowy |
| | C 18:0 | oktadekanowy | stearynowy |
| UFA | C 14:1 | tetradecenowy | oleomirystynowy |
| | C 16:1 | heksadecenowy | oleopalmitynowy |
| | C 18:1 | oktadecenowy | oleinowy |
| | C 18:2 | oktadekadienowy | linolowy |
| | C 18:3 | oktadekatrienowy | linolenowy |

Zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w komórkach drożdży wyrażono jako procent całkowitej ilości kwasów tłuszczowych. Na podstawie uzyskanych wyników obliczono współczynnik UFA/SFA (kwasów nienasyconych/kwasów nasyconych) [Torija i wsp. 2003a].

3.6. Obliczenie wydajności procesu i parametrów kinetycznych

Na podstawie ilości uzyskanego etanolu obliczono wydajność etanolu ze skrobi Y ($g_{\text{etanolu}} \cdot 100 g_{\text{skrobi}}^{-1}$), a także wydajność praktyczną etanolu w stosunku do teoretycznej [%] według równania fermentacji etanolowej i zawartości skrobi w otrzymanych zacierach.

Według oznaczonej ilości węglowodanów w podłożach po zacieraniu oraz ilości cukru nieprzefermentowanego i stężenia etanolu w płynach fermentacyjnych obliczono:

1. szybkość zużycia cukru – r_s [$g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$],
2. stopień odfermentowania cukru – α ,
3. szybkość tworzenia etanolu – r_p [$g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$].

Szybkość zużycia cukru obliczono według wzoru (1)

$$r_s = -\frac{\Delta[S]}{\Delta t} = \frac{[S]_p - [S]_k}{t_k - t_p} \quad (1)$$

gdzie:

- r_s – szybkość zużycia cukru [$g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$],
- $[S]_p$ – stężenie początkowe cukru w przeliczeniu na glukozę [$g \cdot l^{-1}$],
- $[S]_k$ – stężenie końcowe cukru w przeliczeniu na glukozę [$g \cdot l^{-1}$],
- t_p – czas początkowy [h],
- t_k – czas końcowy [h].

Stopień odfermentowania cukru α obliczono ze wzoru (2)

$$\alpha = \frac{[S]_p - [S]_k}{[S]_p} \cdot 100\% \quad (2)$$

gdzie:

- α – stopień odfermentowania cukru [%],
- $[S]_p$ – stężenie początkowe cukru w przeliczeniu na glukozę [$g \cdot l^{-1}$],
- $[S]_k$ – stężenie końcowe cukru w przeliczeniu na glukozę [$g \cdot l^{-1}$].

Szybkość tworzenia etanolu obliczono według wzoru (3)

$$r_p = \frac{\Delta[P]}{\Delta t} = \frac{[P]_k - [P]_p}{t_k - t_p} \quad (3)$$

gdzie:

- r_p – szybkość tworzenia etanolu [$g \cdot l^{-1} \cdot h^{-1}$],
- $[P]_p$ – stężenie początkowe etanolu [$g \cdot l^{-1}$],
- $[P]_k$ – stężenie końcowe etanolu [$g \cdot l^{-1}$],
- t_p – czas początkowy [h],
- t_k – czas końcowy [h].

W celu obliczenia wyżej wymienionych parametrów kinetycznych oznaczone węglowodany: dekstryny, maltotriozę i maltozę przeliczono na glukozę.

4. Omówienie wyników

4.1. Charakterystyka cech biotechnologicznych drożdży gorzelniczych podczas wzrostu na podłożu syntetycznym YPG wzbogaconym jonami Cr(III)

Czynniki środowiskowe, w tym zawartość związków mineralnych, wpływają na parametry wzrostu drożdży gorzelniczych. Ze względu na brak danych charakteryzujących taki wpływ przez jony Cr(III) pierwszy etap pracy poświęcono określeniu skutków dodatku Cr(III) na parametry wzrostu, cechy fizjologiczne i morfologiczne drożdży gorzelniczych oraz ich zdolność do biosorpcji tego pierwiastka podczas namnażania biomasy.

4.1.1. Parametry wzrostu drożdży gorzelniczych w obecności Cr(III)

Podstawowe wskaźniki wzrostu drożdży w podłożu syntetycznym (wykonane wg metodyki p. 3.3.1) zależały w zróżnicowany sposób od ich cech oraz stężenia dodanego Cr(III) (tab. 6).

Maksymalna właściwa szybkość wzrostu drożdży rosła (o 5–10%) w obecności 8–60 mg Cr(III)·l⁻¹ i malała (o 5–8%), gdy stężenie tego jonu było wyższe od 156 mg Cr(III)·l⁻¹. Przekroczenie tego progu stężenia skutkowało wydłużeniem logarytmicznej fazy wzrostu drożdży *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 o 0,5 i 1 godz. w przypadku *S. diastaticus* ATCC 13007.

Dodatek Cr(III) wpłynął na wskaźnik maksymalnego przyrostu biomasy (ΔOD_{max}). W przypadku szczepów: *S. cerevisiae* Etanol Red i *S. cerevisiae* D2 obserwowano wzrost tego wskaźnika, gdy stężenie Cr(III) nie przekraczało poziomu 30 mg·l⁻¹. W warunkach wyższego stężenia Cr(III) wartości omawianego parametru były porównywalne lub niższe w odniesieniu do prób kontrolnych. Obecność Cr(III), niezależnie od stężenia, wspomagała tworzenie biomasy przez szczep *S. diastaticus* ATCC 13007.

Tabela 6

Table 6

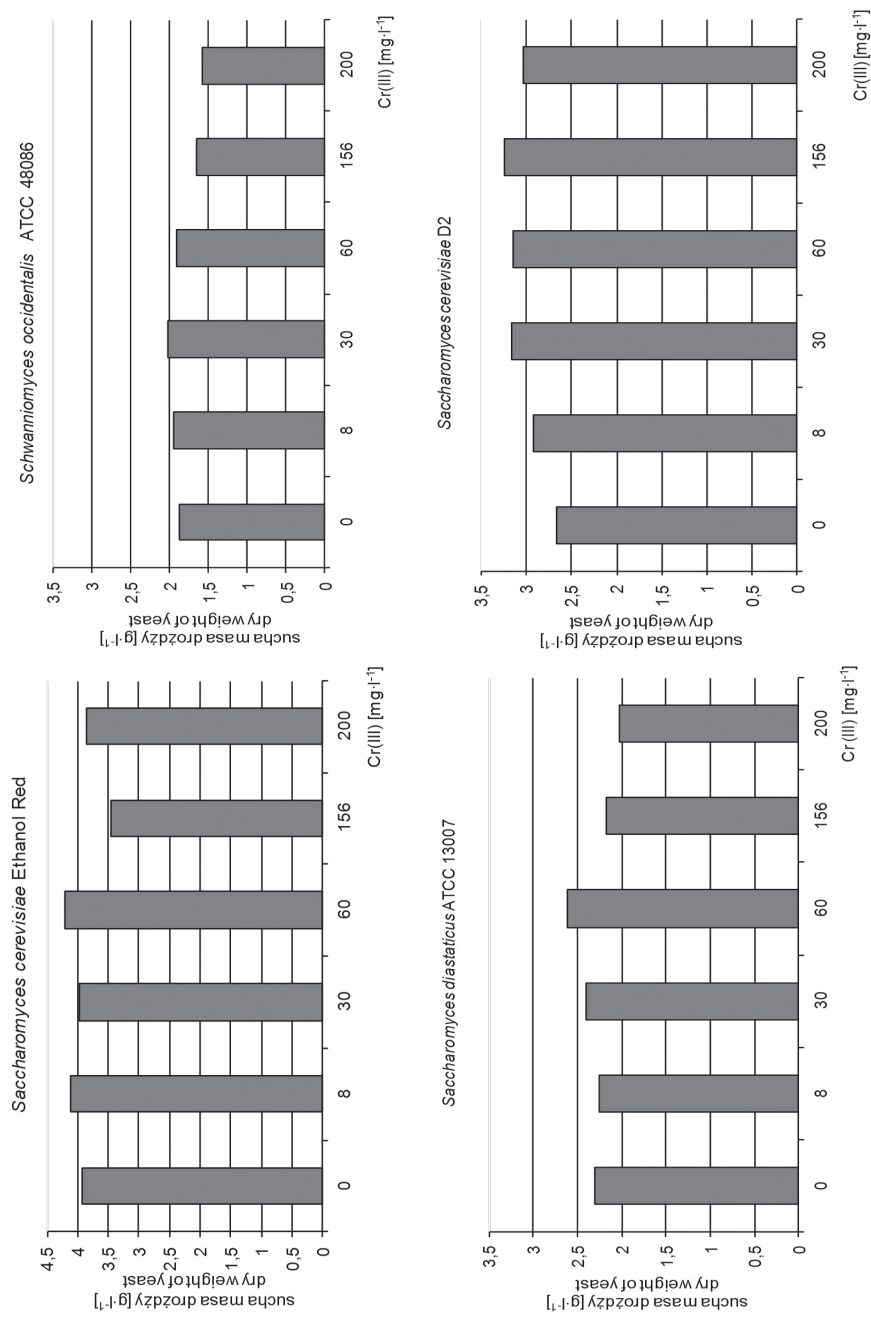
Wybrane parametry wzrostu drożdży gorzelnicznych obliczone na podstawie krzywych wzrostu na podłożu YPG w obecności jonów Cr(III), (Bioscreen C)

Selected growth parameters calculated according to growth curves

of distillery yeast on YPG medium in the presence of Cr(III), (Bioscreen C)

| Szczepy Strains | Stężenie [mg·l ⁻¹] Concentration Cr (III) | Czas trwania logarytmicznego wzrostu [h] Time of logarithmic growth | Maksymalna właściwa szybkość wzrostu μ_{\max} [h ⁻¹] Max. specific growth rate | Maksymalny przyrost biomasy ΔOD_{\max} Max. biomass growth |
|--|--|--|--|--|
| <i>S. cerevisiae</i> Etanol Red | 0 | 4,63 | 0,23 | 1,08 |
| | 8 | 4,63 | 0,24 | 1,13 |
| | 30 | 4,63 | 0,24 | 1,12 |
| | 60 | 4,63 | 0,23 | 1,07 |
| | 156 | 5,00 | 0,21 | 1,06 |
| | 200 | 5,00 | 0,21 | 1,06 |
| <i>Schwanniomyces occidentalis</i> ATCC 48086 | 0 | 5,33 | 0,22 | 1,16 |
| | 8 | 5,00 | 0,23 | 1,13 |
| | 30 | 5,00 | 0,23 | 1,12 |
| | 60 | 5,00 | 0,24 | 1,22 |
| | 156 | 5,67 | 0,22 | 1,22 |
| | 200 | 5,67 | 0,21 | 1,16 |
| <i>S. diastaticus</i> ATCC 13007 | 0 | 5,00 | 0,22 | 1,12 |
| | 8 | 5,00 | 0,23 | 1,15 |
| | 30 | 5,00 | 0,23 | 1,14 |
| | 60 | 5,33 | 0,22 | 1,16 |
| | 156 | 5,67 | 0,21 | 1,18 |
| | 200 | 5,67 | 0,21 | 1,17 |
| <i>S. cerevisiae</i> D2 | 0 | 6,00 | 0,21 | 1,22 |
| | 8 | 5,67 | 0,20 | 1,13 |
| | 30 | 6,00 | 0,21 | 1,23 |
| | 60 | 6,00 | 0,21 | 1,24 |
| | 156 | 6,00 | 0,20 | 1,22 |
| | 200 | 6,00 | 0,20 | 1,20 |

Pozostałe cechy drożdży badano w hodowlach wstrząsanych na podłożu YPG wzbogaconym Cr(III). Największy przyrost biomasy wykazywał szczep *S. cerevisiae* Ethanol Red, a najniższy *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 (rys. 4). Badane szczepy reagowały na wzrastające dawki Cr(III) do poziomu 60 mg·l⁻¹ wyższym przyrostem biomasy, zaś wysokie dawki chromu powyżej 156 mg·l⁻¹ wpłynęły na obniżenie zawartości biomasy o 10–15% w porównaniu z próbami kontrolnymi. Ilość biomasy szczepu *S. cerevisiae* D2 była wyższa w porównaniu z próbą kontrolną przy wszystkich dawkach Cr(III).



Rys. 4. Przyrost biomasy drożdży po 48 godz. hodowli wstrząsanej na podłożu YPG wzbogaconym w Cr (III)

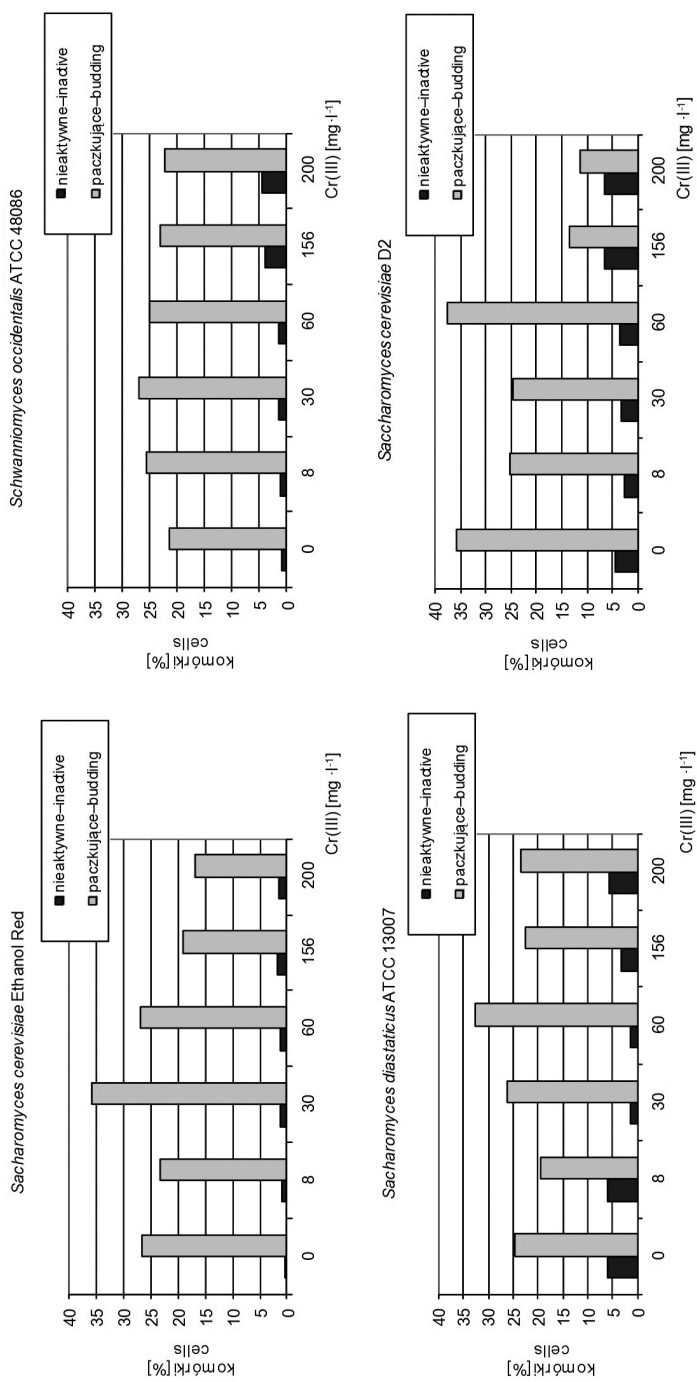
Fig. 4. Yeast biomass concentration after 48 h shaken culture on YPG medium enriched with Cr (III)

Dobrym wskaźnikiem charakteryzującym stan fizjologiczny drożdży jest udział w biomacie pączkujących i nieaktywnych komórek (rys. 5). Po 48 godzinach wzrostu drożdży w podłożu YPG bez dodatku Cr(III) udział komórek pączkujących wynosił od 22 (*Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) do 36% (*S. diastaticus* ATCC 13007), zaś nieaktywnych od 1 (*S. cerevisiae* Ethanol Red) do 7% (*S. diastaticus* ATCC 13007). Większą ilością komórek pączkujących charakteryzowały się szczepy *S. cerevisiae* Ethanol Red oraz *S. diastaticus* ATCC 13007 rosnące na podłożach z dodatkiem Cr(III) – od 30 do 60 mg·l⁻¹ oraz szczep *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 podczas wzrostu na podłożu z Cr(III) – od 8 do 60 mg·l⁻¹. W obecności Cr(III) do 60 mg·l⁻¹ drożdże charakteryzowały się również niższym (*S. diastaticus* ATCC 13007) lub porównywalnym (*S. cerevisiae* Ethanol Red, *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) w stosunku do prób kontrolnych, udziałem komórek nieaktywnych. Z kolei gdy stężenie Cr(III) było wyższe od 156 mg·l⁻¹, zaobserwowano obniżenie ilości komórek pączkujących (drożdży *S. cerevisiae* Ethanol Red oraz *S. cerevisiae* D2) oraz wzrost ilości komórek nieaktywnych (drożdży *S. cerevisiae* D2 oraz *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) w porównaniu z próbą kontrolną. Drożdże *S. cerevisiae* D2 reagowały na obecność Cr(III) obniżeniem udziału komórek pączkujących o 10% już przy stężeniu 8 mg·l⁻¹ oraz o 25% w obecności 200 mg·l⁻¹. Wysoki udział komórek pączkujących tego szczepu (porównywalny z próbą kontrolną) odnotowano jedynie w obecności 60 mg Cr(III)·l⁻¹.

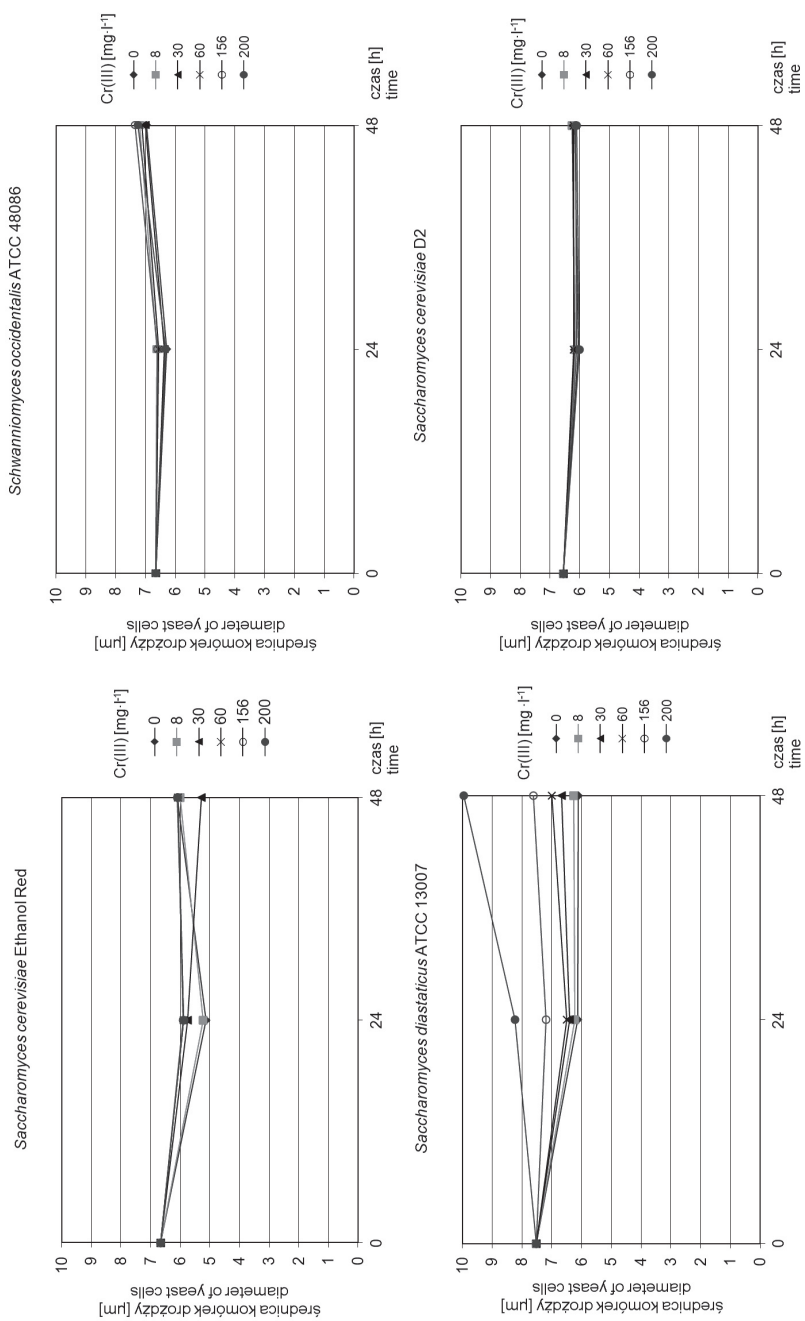
Ważną do oceny cech morfologicznych drożdży była wielkość komórek (p. 4.5). W hodowli stanowiącej inokulum średnica komórek wynosiła od 6,5 do 6,8 μm (rys. 6). Wyjątkiem były komórki drożdży *S. diastaticus* ATCC 13007, których średnica była większa i wynosiła 7,6 μm. Wielkość komórek nie ulegała zasadniczym zmianom podczas hodowli w środowiskach o różnym stężeniu Cr(III) (rys. 6), poza szczepem *S. diastaticus* ATCC 13007. Rozmiar jego komórek, zwłaszcza w drugiej dobie hodowli, zwiększał się wraz ze wzrastającym stężeniem chromu w środowisku, osiągając najwyższą wartość (10 μm) w podłożu YPG z dodatkiem 200 mg Cr(III)·l⁻¹.

Największy udział w biomacie przygotowanej do zaszczepienia miały komórki o rozmiarach 4,6–8,0 μm (klasa II), a więc typowe komórki (rys. 7).

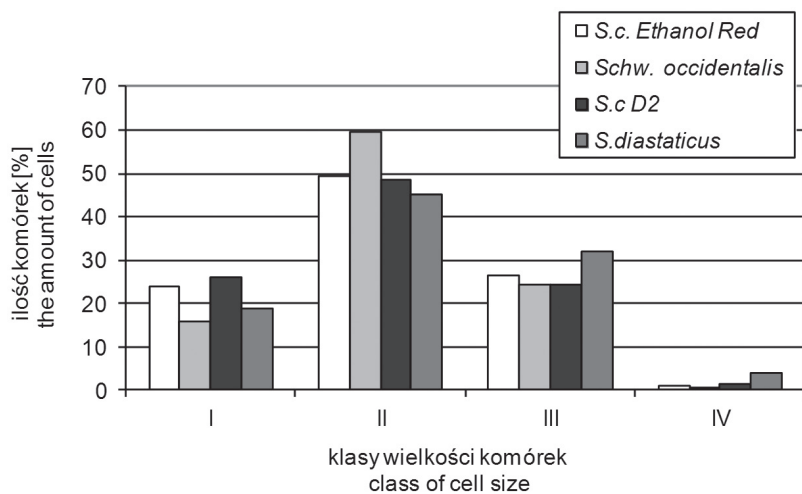
W czasie hodowli na podłożach wzbogacanych w Cr(III) nie stwierdzono jego znaczącego wpływu na udział procentowy komórek w poszczególnych klasach wielkości większości badanych szczepów drożdży. Podobnie jak w inokulum najwięcej komórek (60–70%) znajdowało się w klasie II o wymiarach 4,6–8,0 μm (rys. 8). Występowanie komórek w poszczególnych klasach wielkości było raczej uzależnione od rodzaju szczepu drożdży niż obecności Cr(III) w podłożu hodowlanym. Jedyny wyjątek stanowiły drożdże *S. diastaticus* ATCC 13007. W przypadku tego szczepu wraz ze wzrostem stężenia Cr(III) w środowisku hodowlanym obserwowano obniżenie zawartości komórek w klasie drugiej z 60 do 45% i wzrost udziału komórek w klasie III i IV. Pojawienie się megakomórek w klasie IV w ilości do 4,5% było charakterystyczne tylko dla szczepu *S. diastaticus* ATCC 13007. W tym przypadku ilość komórek o bardzo dużej średnicy zwiększała się wraz ze wzrostem stężenia chromu w podłożu.



Rys. 5. Stan fizjologiczny komórek drożdży po hodowli na podłożu YPG wzbogaconym w Cr(III)
 Fig. 5. The physiological condition of yeast cells after culture on YPG medium enriched with Cr(III)

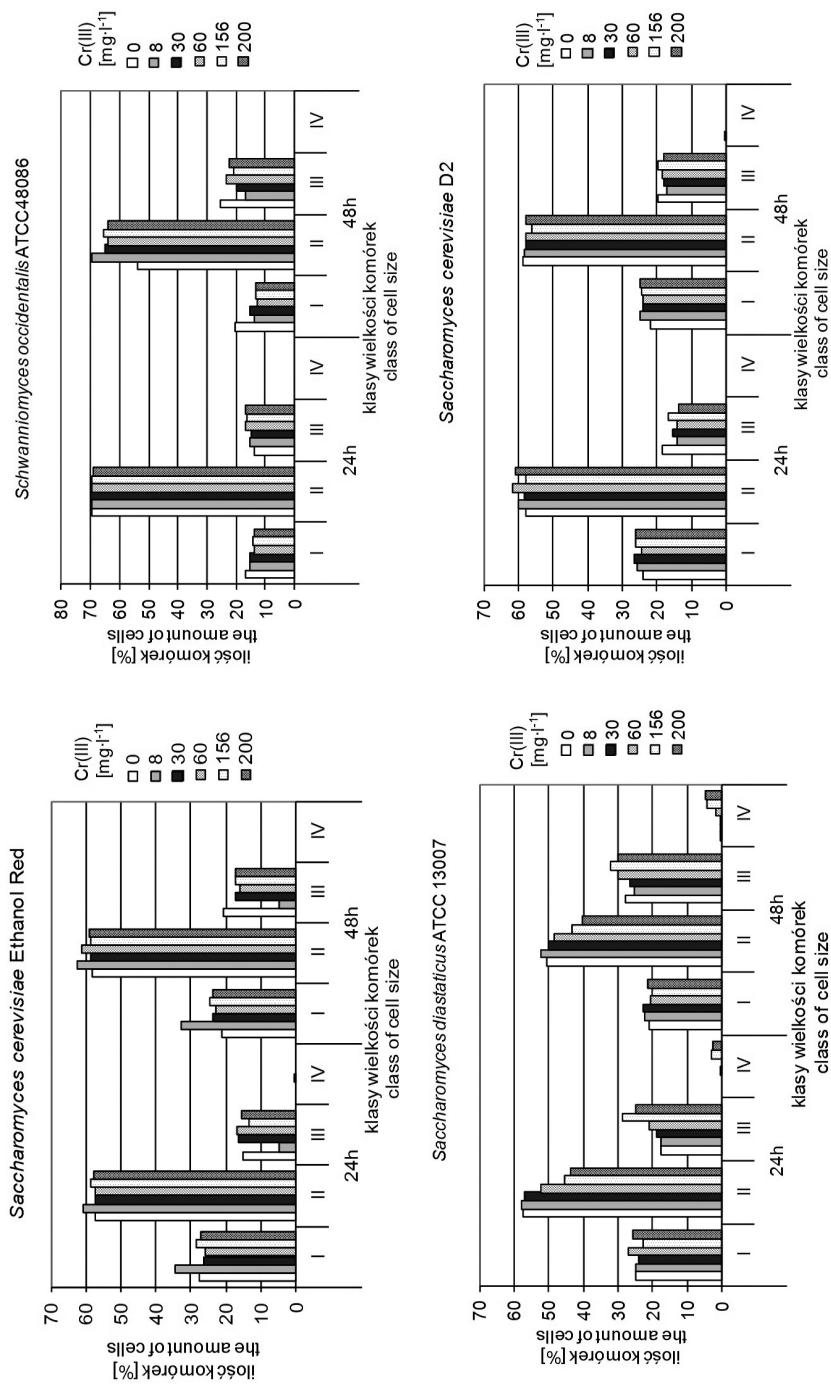


Rys. 6. Średnica komórek drożdży w czasie wzrostu na podłożu YPG wzbogaconym w Cr(III)
 Fig. 6. Diameter of yeast cells during growth on YPG medium enriched with Cr (III)



Rys. 7. Udział komórek drożdży w poszczególnych klasach wielkości przed zaszczepieniem do podłoża YPG wzbogaconego w Cr(III)

Fig. 7. The share of yeast cells in different size classes before inoculation to YPG medium enriched with Cr (III)



Rys. 8. Udział komórek drożdży gorzelnicznych w poszczególnych klasach wielkości podczas hodowli wstrząsanej na podłożu YPG z dodatkiem Cr(III)
 Fig. 8. The share of distillery yeast cells in different size classes during shaken culture on YPG medium enriched with Cr(III)

W komórkach drożdży prób kontrolnych (bez dodatku Cr(III)) stwierdzono śladowe ilości chromu, które wynosiły od 0,05 (*S.cerevisiae* D2) do 0,14 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m. (*S. diastaticus* ATCC 13007). Wszystkie badane szczepy drożdży wykazywały zdolność pobierania tego pierwiastka ze środowiska hodowlanego i jego bioakumulacji (tab. 7). Ilość chromu w biomase drożdży rosła wraz ze wzrostem stężenia Cr(III) w podłożu, przy czym zawartość chromu w biomacie zależała od szczepu drożdży. Podczas namnażania największej chromu (powyżej 800 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.) przyswoiły szczepy *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 oraz *S. cerevisiae* D2, a najmniej *S. cerevisiae* Etanol Red (430 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.).

Tabela 7

Table 7

Zawartość chromu w komórkach drożdży po 48 godz. wzrostu w podłożu YPG w obecności Cr (III)

The content of chromium in yeast cells after 48 h growth in YPG medium in the presence of Cr (III)

| Stężenie [mg·l ⁻¹] Concentration Cr (III) | Zawartość chromu [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.] The content of chromium [$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ d.w.] | | | |
|--|---|--|----------------------------|-------------------------------------|
| | <i>S.cerevisiae</i> Etanol Red | <i>Schwanniomyces</i> <i>occidentalis</i> ATCC 48086 | <i>S. cerevisiae</i> D2 | <i>S. diastaticus</i> ATCC 13007 |
| 0 | 0,10 | 0,11 | 0,05 | 0,14 |
| 8 | 40,85 | 13,00 | 80,56 | 20,75 |
| 30 | 110,72 | 130,60 | 160,40 | 80,55 |
| 60 | 230,22 | 170,43 | 300,96 | 160,56 |
| 156 | 350,64 | 400,68 | 400,97 | 380,82 |
| 200 | 430,10 | 820,20 | 880,86 | 540,96 |

Podsumowując, można stwierdzić, że dodatek jonów Cr(III) do modelowego podłoża hodowlanego YPG w ilości do 60 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ wpłynął pozytywnie na parametry kinetyczne wzrostu badanych szczepów drożdży gorzelnicznych. Stwierdzono także poprawę dynamiki wzrostu drożdży (zwiększenie maksymalnej właściwej szybkość wzrostu, maksymalnego przyrostu biomasy) oraz wzrost stężenia biomasy. Odnotowano również większy procentowy udział komórek pączkujących niż w próbach kontrolnych. W obecności 156 oraz 200 $\text{mg Cr(III)}\cdot\text{l}^{-1}$ obserwowano obniżenie ilości komórek pączkujących drożdży oraz wzrost ilości komórek nieaktywnych w porównaniu z próbami kontrolnymi. Nie stwierdzono wpływu Cr(III) na cechy morfologiczne (rozmiar komórek drożdży). Wyjątkiem był szczep *S. diastaticus* ATCC 13007, rozmiar jego komórek, zwłaszcza w drugiej dobie hodowli, zwiększał się wraz ze wzrastającym stężeniem Cr(III) w środowisku.

Drożdże wykazywały zdolność bioakumulacji chromu. Najwięcej nagromadziły go szczepy *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 oraz *S. cerevisiae* D2, a najmniej *S. cerevisiae* Etanol Red.

4.1.2. Dynamika fermentacji etanolowej na podłożu syntetycznym YM z dodatkiem Cr(III)

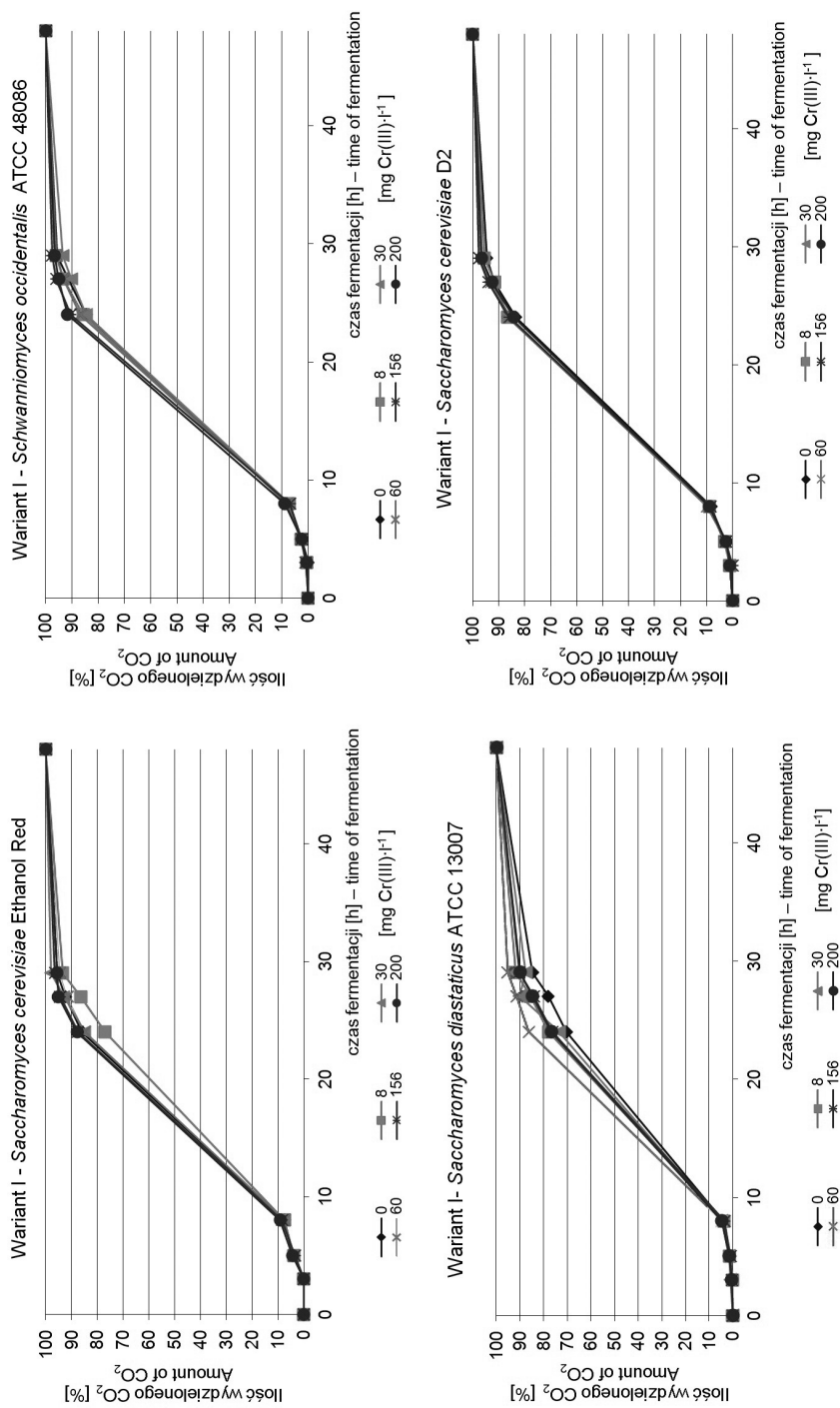
Doświadczenie przeprowadzono w dwóch wariantach (p. 3.2, rys. 1b). W wariacie I – chlorek chromu dodano do podłoża wzrostowego, a w drugim do podłoża fermentacyjnego.

Celem tak skonstruowanego doświadczenia był zamiar oceny wpływu jonów Cr(III) na przebieg fermentacji etanolowej glukozy w zależności od stężenia tego pierwiastka oraz zastosowanego wariantu suplementacji. Przebieg dynamiki fermentacji, stanowiący wyznacznik aktywności fermentacyjnej drożdży, przedstawiono jako procentowy udział wydzielonego CO₂ w odniesieniu do całkowitej ilości wydzielonego gazu.

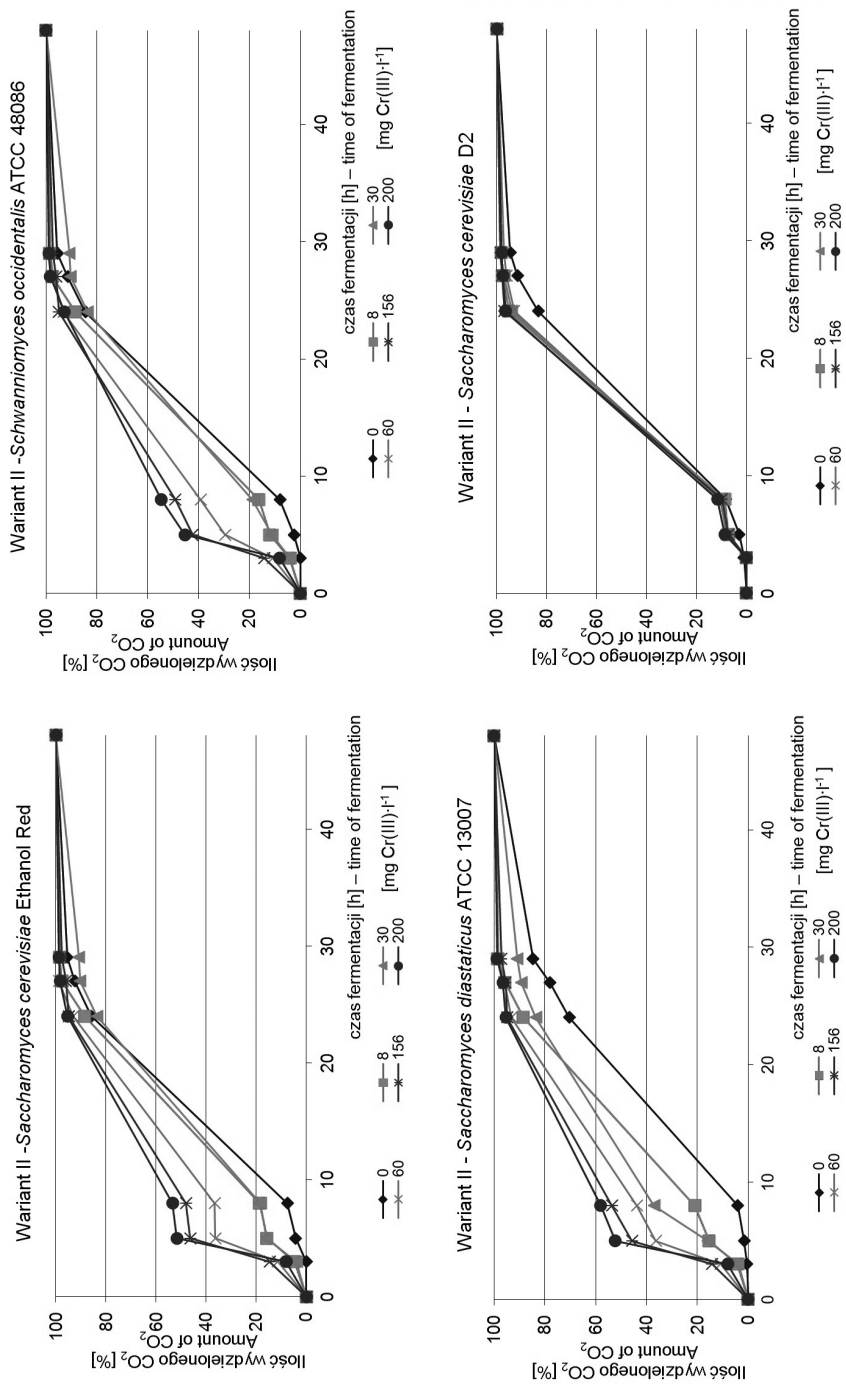
Dodanie Cr(III) do podłoża wzrostowego nie wywierało wpływu na dynamikę fermentacji badanych szczepów drożdży, niezależnie od jego dawki (rys. 9). Natomiast wyraźny wpływ na aktywność fermentacyjną badanych szczepów wykazywał dodatek Cr(III) bezpośrednio do podłoża fermentacyjnego (wariant II). Aktywność fermentacyjna drożdży z wyjątkiem *S. cerevisiae* D2 rosła wraz ze wzrostem stężenia Cr(III) w podłożu fermentacyjnym (rys. 10). Stwierdzono, że suplementacja Cr(III) podłoża fermentacyjnego wpłynęła na skrócenie fazy zafermentowania. Największe różnice w ilości wydzielonego CO₂ obserwowano w pierwszych 6 godzinach fermentacji. W tym czasie w próbach kontrolnych wydzieliło się zaledwie 7,5% gazu, natomiast w próbach wzbogacanych Cr(III) odnotowano nawet 50% całkowitej ilości wydzielonego CO₂. Wzrost aktywności fermentacyjnej drożdży obserwowano także po pierwszej dobie procesu, wówczas w próbach kontrolnych odnotowano 70–75% całkowitej ilości wydzielonego gazu, natomiast w próbach zawierających 200 mg Cr(III)·l⁻¹ wydzieliło się o 25% gazu więcej.

Dodatek Cr(III) do podłoża fermentacyjnego nie wpłynął na dynamikę fermentacji szczepu *S. cerevisiae* D2. Po pięciu godzinach fermentacji etanolowej różnica w ilości wydzielonego gazu pomiędzy próbą o najlepszej aktywności fermentacyjnej (wariant II z dodatkiem 200 mg Cr(III)·l⁻¹), a próbą kontrolną wynosiła zaledwie 5%, podczas gdy w przypadku wcześniej omówionych szczepów drożdży różnica ta wynosiła nawet 50%. Po 24 godz. procesu aktywności fermentacyjnej drożdży w podłożach zawierających Cr(III) były zbliżone. Ilość wydzielonego gazu w tych eksperymentach wynosiła około 96%, natomiast w doświadczeniach prowadzonych na podłożu kontrolnym równała się 83%.

Stwierdzono, że dodatek Cr(III) do podłoży fermentacyjnych miał korzystny wpływ na dynamikę fermentacji wszystkich badanych drożdży z wyjątkiem szczepu *S. cerevisiae* D2. Do dalszych etapów pracy wybrano wariant II (suplementacja podłoża fermentacyjnego jonami Cr(III)) i zrezygnowano z udziału szczepu *S. cerevisiae* D2, ponieważ dodatek Cr(III) nie poprawił jego aktywności fermentacyjnej. Analizując wpływ Cr(III) na parametry wzrostu i aktywność fermentacyjną w podłożach modelowych (syntetycznych), do dalszego etapu pracy wybrano dawkę 60 mg Cr(III)·l⁻¹, ponieważ wpływała ona korzystnie na parametry wzrostu drożdży gorzelniczych, ich stan fizjologiczny oraz nie powodowała zmian cech morfologicznych.



Rys. 9. Dynamika wydzielenia CO₂ podczas fermentacji podłoża syntetycznego z dodatkiem lub bez dodatku Cr(III) (wariant I)
 Fig. 9. Dynamics of CO₂ secretion during synthetic medium fermentation with or without Cr(III) addition (variant I)

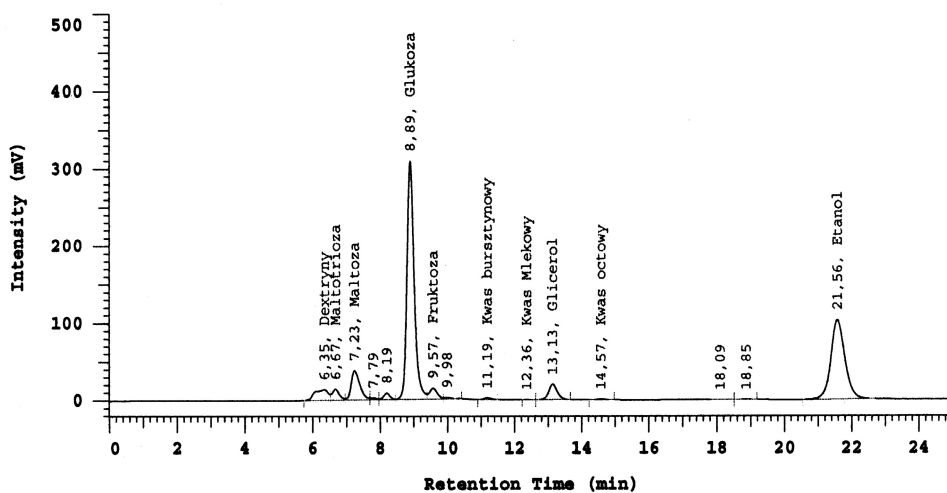


Rys. 10. Dynamika wydzielania CO₂ podczas fermentacji podłoża syntetycznego z dodatkiem lub bez dodatku Cr(III) (wariant II)
 Fig. 10. Dynamics of CO₂ secretion during synthetic medium fermentation with or without Cr(III) addition (variant II)

4.2. Dynamika i efekty fermentacji etanolowej w zacierach kukurydzianych o różnej zawartości surowca

Mając na uwadze warunki przemysłowej produkcji etanolu, w kolejnym etapie pracy zastosowano podłoża naturalne przygotowane z kukurydzy i oceniono wpływ jej zawartości w zacierze na aktywność fermentacyjną drożdży gorzelnicznych.

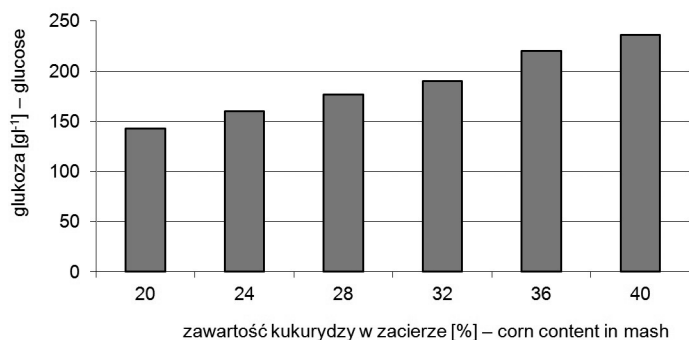
W wyniku procesu zacierania przeprowadzonego w warunkach laboratoryjnych (p. 3.4.2) otrzymano 6 zacierów kukurydzianych o zróżnicowanej zawartości surowca w zakresie od 20 do 40% (p. 3.1 tab. 2). Na podstawie analizy profili węglowodanowych uzyskanych metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej w zacierach stwierdzono obecność glukozy, fruktozy, maltozy, maltotriozy oraz dekstryn, a przykładowy chromatogram przedstawiono na rysunku 11.



Rys. 11. Chromatogram profili węglowodanowych i produktów fermentacji etanolowej zacierów kukurydzianych

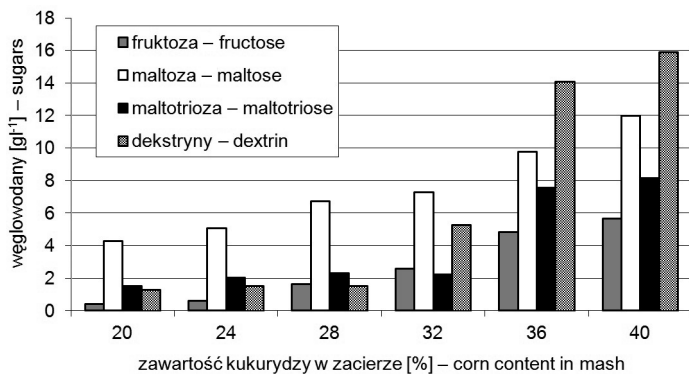
Fig. 11. Chromatogram of carbohydrate profiles and products of ethanol fermentation of corn mashes

Wraz ze wzrostem zawartości kukurydzy w zacierze podnosił się poziom węglowodanów w podłożu fermentacyjnym, głównie glukozy (rys. 12) od 143 (zacier 20%) do 236 g·l⁻¹ (zacier 40%) oraz maltozy (rys. 13) od 4 (zacier 20%) do 12 g·l⁻¹ (zacier 40%). W zacierach o zawartości surowca do 28% ilość pozostałych węglowodanów (tj. fruktozy, maltotriozy oraz dekstryn) utrzymywała się poziomie nieprzekraczającym łącznie stężenia 5 g·l⁻¹ (rys. 13). Najwyższe stężenie polisacharydów stwierdzono w zacierach gęstych (36 i 40%), ilość maltotriozy była czterokrotnie wyższa, a dekstryn dwunastokrotnie w porównaniu z zacierami 20%. Fakt ten świadczy o niskiej efektywności hydrolizy skrobi w zacierach gęstych.



Rys. 12. Początkowe stężenie glukozy w zacierach kukurydźnianych o wzrastającej zawartości surowca

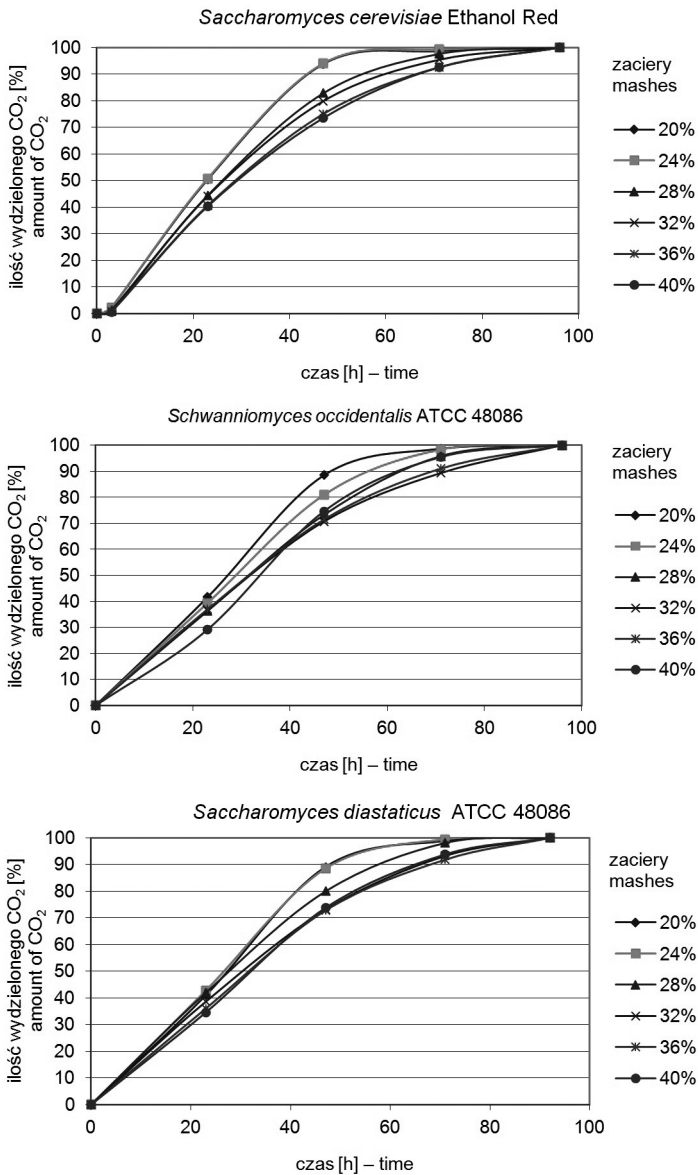
Fig. 12. Initial glucose concentration in corn mashes of increasing raw material content



Rys. 13. Początkowe stężenie węglowodanów w zacierach kukurydźnianych o wzrastającej zawartości surowca

Fig. 13. Initial carbohydrates concentration in corn mashes of increasing extract content

Wzrost ekstraktu z kukurydzy w zacierze osłabiał dynamikę fermentacji z udziałem badanych drożdży. Największe różnice obserwowano w pierwszej i drugiej dobie procesu. Ilość wydzielanego CO₂ w zacierach 36 i 40% była niższa średnio o 10–20% w porównaniu z zacierami 20 i 24%, a po 92 godzinach procesu jego ilości były zbliżone we wszystkich próbach fermentacyjnych i wynosiły powyżej 90%. Najlepszą dynamiką fermentacji charakteryzował się szczep gorzelniczy *S. cerevisiae* Etanol Red (rys. 14).

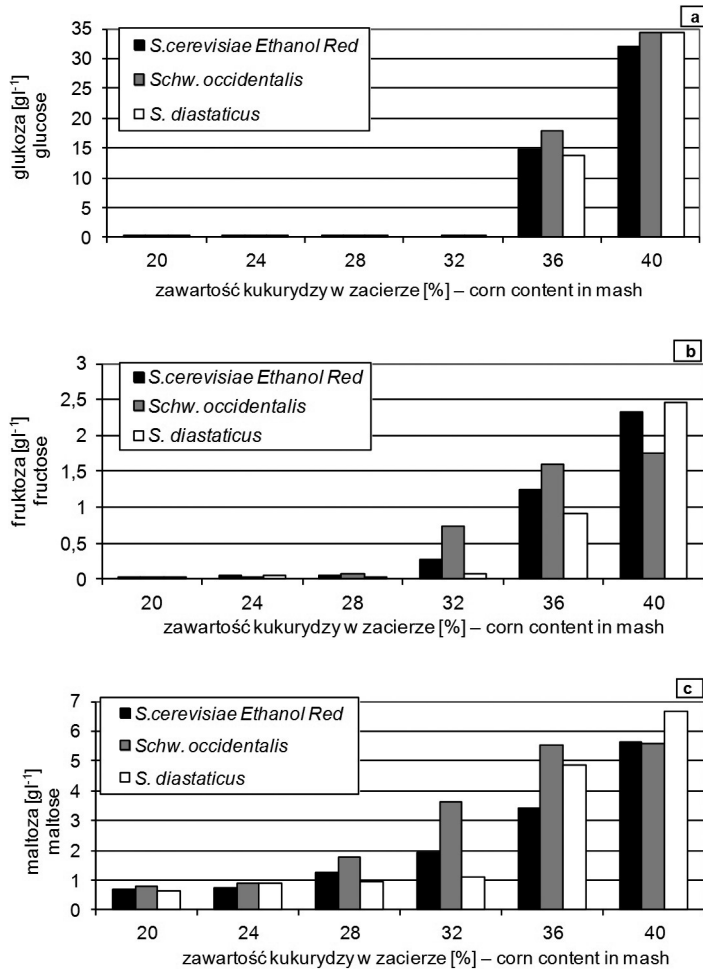


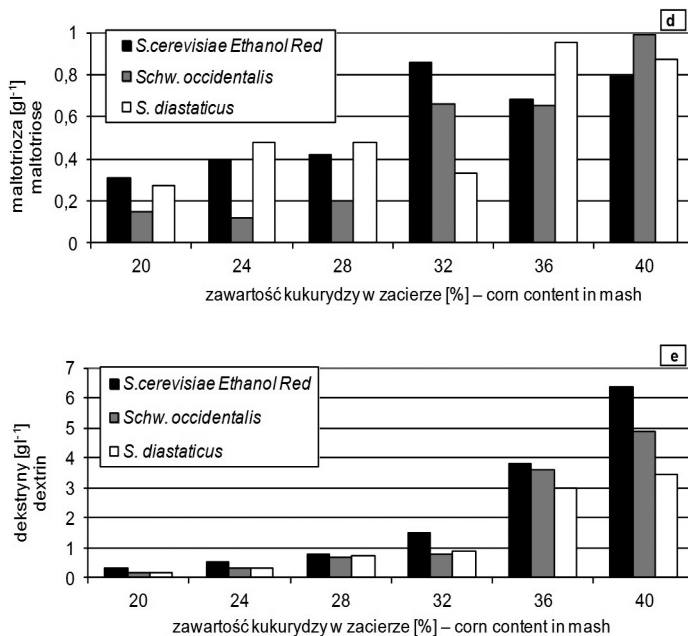
Rys. 14. Dynamika wydzielania CO₂ podczas fermentacji zacierów kukurydzianych o wzrastającej zawartości surowca

Fig. 14. Dynamics of CO₂ secretion during fermentation of corn mashes of increasing raw material content

Analiza profili węglowodanowych przefermentowanych zacierów wykazała, iż badane drożdże gorzelnicze wykorzystały całkowicie glukozę i fruktozę obecną w zacie-

rach zawierających do 32% surowca (rys. 15). Ilości maltozy, maltotriozy i dekstryn były niewielkie i wynosiły od 1 do 2 g·l⁻¹. Znaczne ilości węglowodanów wykazano w przefermentowanych zacierach gęstych (zacierzy 36 i 40%) (rys. 15). Największy procent w nich stanowiła glukoza (60–70%), następnie maltoza (10–15%) oraz dekstryny (6–11%). Ilości nieprzefermentowanych cukrów zależały również od szczepu drożdży użytego do fermentacji. Najniższe stężenie dekstryn odnotowano w próbach fermentowanych z udziałem drożdży amyloリティcznych *S. diastaticus* ATCC 13007 oraz *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, zaś najniższe ilości glukozy oraz maltozy w przypadku szczepu *S. cerevisiae* Ethanol Red.





Rys. 15. Profile węglowodanowe przefermentowanych zacierów kukurydzianych o wzrastającej zawartości surowca

a. glukoza, b. fruktoza, c. maltoza, d. maltotrioza, e. dekstryny

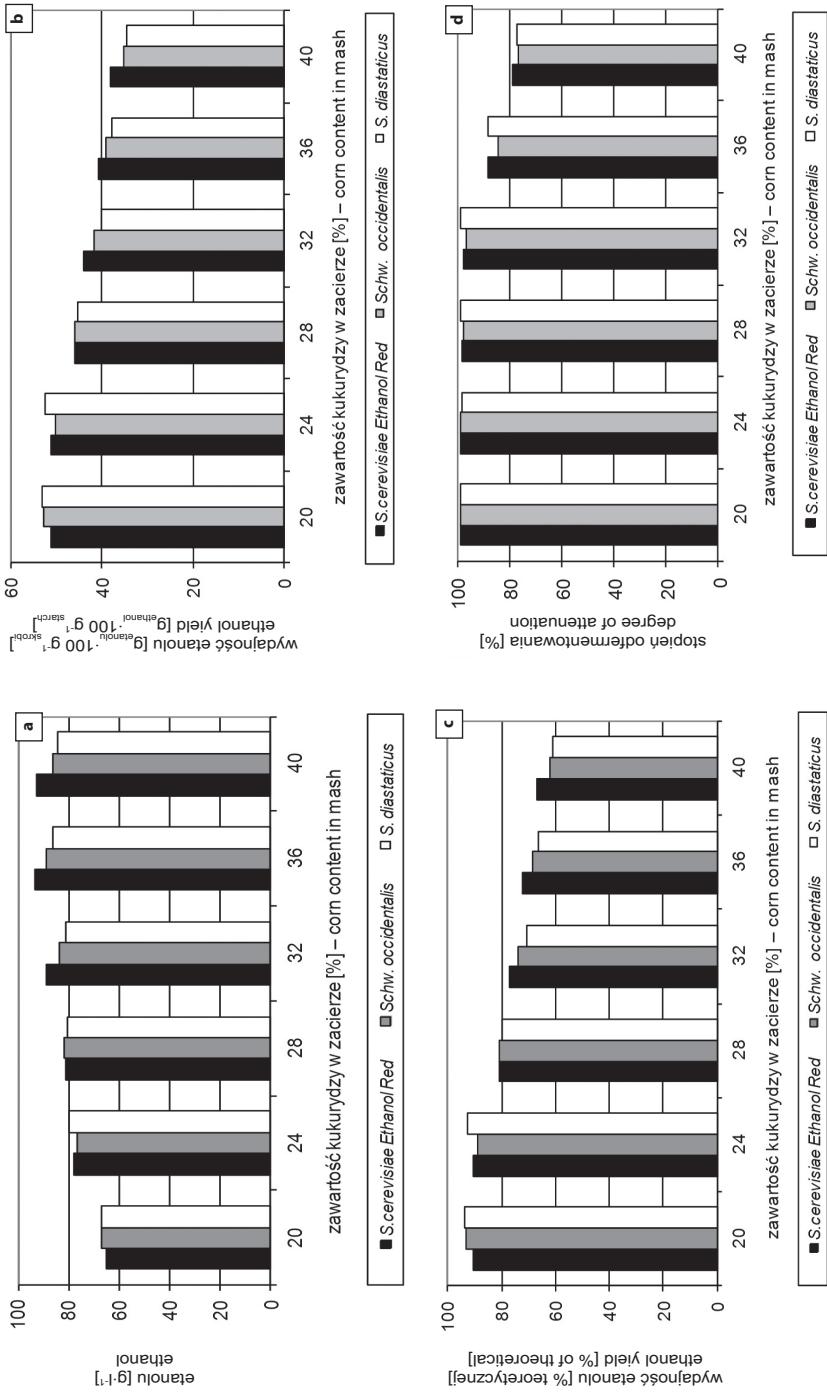
Fig. 15. Carbohydrate profiles after fermentation of corn mashes of increasing raw material content

a. glucose, b. fructose, c. maltose, d. maltotriose, e. dextrin

Wzrastającej zawartości kukurydzy w zacierach od 20 do 36% towarzyszyły większe ilości tworzono etanolu (od 65 do 92 g l⁻¹), ale przekroczenie poziomu 40% surowca skutkowało obniżeniem jej zawartości o 2–3 g l⁻¹ (rys. 16a). Pomimo wzrostu stężenia etanolu w podłożach fermentacyjnych wraz ze zwiększaniem zawartości surowca w zacierze jego wydajność ze skrobi oraz wydajność praktyczna procesu obliczone zgodnie z p. 3.6, obniżyły się (rys. 16b, rys. 16c). Zdolności badanych drożdży do wydajnej produkcji etanolu były więc zróżnicowane. Stwierdzono, że najlepszą wydajność etanolu osiągnięto w zacierach 20 i 24% z udziałem drożdży *S. diastaticus* ATCC 13007 (90–92% teoretycznej). Wzrost zawartości surowca w zacierach skutkowało obniżeniem wydajności praktycznej etanolu niezależnie od stosowanego szczepu do 62–68% (w zacierze 40%). Najlepszą wydajnością praktyczną w zacierach gęstych (36–40%) charakteryzował się szczep *S. cerevisiae* Etanol Red, a najniższą *S. diastaticus* ATCC 13007 (rys. 16c).

Potwierdzeniem zmniejszania się wydajności etanolu podczas fermentacji zacierów o podwyższonej zawartości ekstraktu było obniżanie się stopnia wykorzystania cukrów (rys. 16d). Wysoki stopień odfermentowania (99–97%) odnotowano w zacierach zawierających do 32% surowca, zaś w pozostałych podłożach fermentacyjnych obserwowano obniżenie wartości omawianego parametru do poziomu 78% (zacier 40%).

Nielotnym produktem ubocznym fermentacji etanolowej jest glicerol. Jego zawartość w przefermentowanych zacierach rosła wraz z większą ilością kukurydzy od 5,6 do 10,2 g l⁻¹,



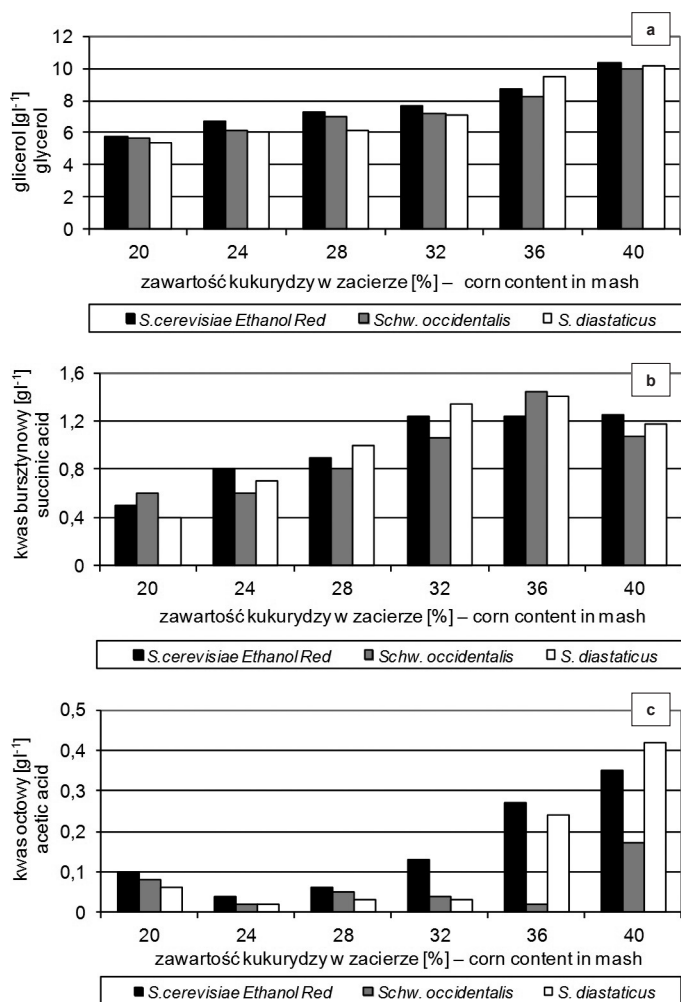
Rys. 16. Efekty końcowe fermentacji zacierów kukurydzianych o wzrastającej zawartości surowca

a. ilość etanolu, b. wydajność etanolu, c. wydajność praktyczna etanolu, d. stopień odfermentowania

Fig. 16. Final effect of fermentation of corn mashes of increasing raw material content

a. amount of ethanol, b. ethanol yield, c. practical ethanol yield, d. degree of attenuation

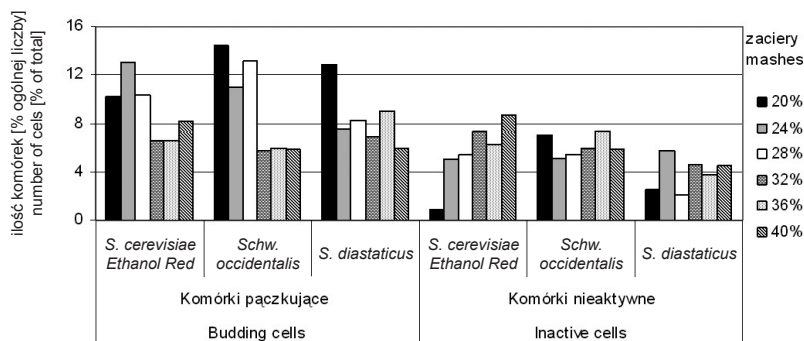
osiągając najwyższy poziom w zacierze 40% (rys. 17a). Podobne tendencje wykazano w przypadku kwasów organicznych. W przefermentowanych zacierach 40% stężenie kwasu octowego było czterokrotnie wyższe w porównaniu z zacierami 20%, a kwasu bursztynowego dwukrotnie (rys. 17b, 17c).



Rys. 17. Ilość produktów ubocznych tworzonych podczas fermentacji zacierów kukurydzianych o wzrastającej zawartości surowca: a. glicerol , b. kwas bursztynowy, c. kwas octowy
 Fig. 17. Amount of ethanol co-products formed during fermentation of corn mashes of increasing raw material content: a. glycerol, b. succinic acid, c. acetic acid

Zróżnicowane warunki środowiska fermentacyjnego wynikające początkowo ze wzrastającego stężenia węglowodanów w zacierze, a następnie wzrastającej ilości wytworzonego etanolu i produktów ubocznych fermentacji, wpłynęły na stan fizjologiczny bada-

nych komórek drożdży oceniany ilością komórek pączkujących i nieaktywnych (rys. 18). Po zakończonej fermentacji w zacierach gęstych (36–40%) udział komórek pączkujących z reguły był dwukrotnie niższy, a nieaktywnych wyższy o 3% (w przypadku *S. cerevisiae* Ethanol Red) i 8% (dla *S. diastaticus* ATCC 13007) w porównaniu z zacierami 20%.



Rys. 18. Stan fizjologiczny komórek drożdży po fermentacji zacierów o wzrastającej zawartości surowca

Fig 18. Physiological condition of yeast cells after fermentation of mashes of increasing raw material content

Podsumowując, można stwierdzić, że wzrost zawartości surowca w zacierze ujawnił różnicowane zdolności badanych drożdży do wydajnej produkcji etanolu. Pomimo większych ilości tworzonego etanolu wydajność procesu obniżała się wraz ze wzrostem ekstraktu z kukurydzy w zacierze. Najlepszą wydajność etanolu oraz najwyższy stopień odfermentowania uzyskano w zacierach 20 i 24% fermentowanych z udziałem wszystkich badanych drożdży. Wzrost zawartości surowca do 32% skutkowało obniżeniem wydajności produkcji etanolu, choć stopień odfermentowania był bardzo wysoki i wynosił powyżej 97%. W efekcie drożdże wykorzystywały prawie całkowicie dostępne w zacierze węglowodany, a obniżenie wydajności etanolu było skorelowane ze wzrostem ilości wytworzonych produktów ubocznych procesu, głównie glicerolu. W zacierach gęstych (36 i 40%) zanotowano najniższą wydajność procesu (62–68% teoretycznej) oraz niski stopień odfermentowania węglowodanów (78%). Po zakończeniu fermentacji stwierdzono w zacierach znaczne ilości nieprzefermentowanych węglowodanów, w tym glukozy (od 15 do 34 g·l⁻¹) oraz maltozy (od 3,5 do 6,5 g·l⁻¹). Stąd też przedmiotem dalszych badań była chęć poprawy efektów fermentacji zacierów gęstych typu VHG drogą suplementacji podłoża fermentacyjnego jonami Cr(III). Do kolejnego etapu badań wybrano zacier 36% (VHG) i 20% jako porównawczy. Powodem rezygnacji z zacieru 40% były problemy z jego filtracją.

4.3. Charakterystyka wybranych cech biotechnologicznych drożdży gorzelniczych w zacierach kukurydzianych z dodatkiem chromu (60 mg Cr(III)·l⁻¹)

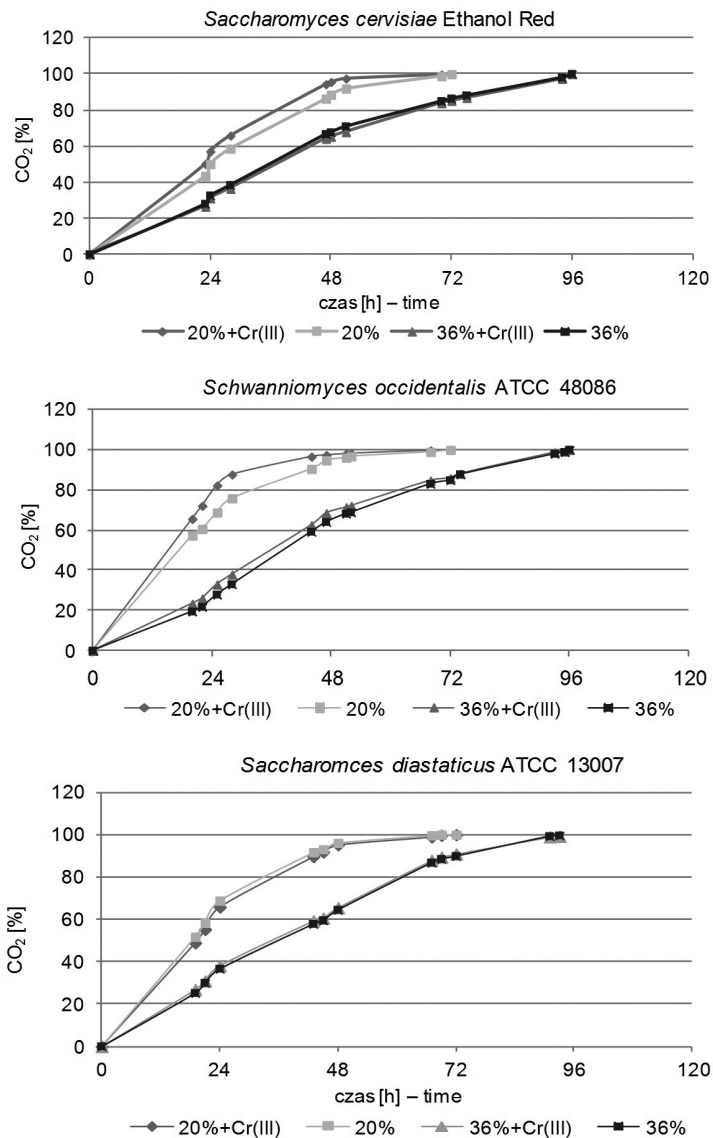
W dostępnej literaturze trudno znaleźć informacje dotyczące wpływu jonów Cr(III) na przebieg i wskaźniki technologiczne fermentacji zacierów kukurydzianych typu VHG oraz cechy morfologiczne i fizjologiczne drożdży gorzelniczych. Wybrane w p. 4.2 podłoża suplementowano Cr(III) w ilości 60 mg·l⁻¹. Taka ilość Cr(III) wpływała korzystnie na parametry wzrostu drożdży oraz dynamikę fermentacji glukozy w podłożu syntetycznym (p. 4.1). Ponadto nie zmieniła ona cech morfologicznych żadnego z badanych szczepów.

4.3.1. Aktywność fermentacyjna drożdży gorzelniczych w przefiltrowanych zacierach kukurydzianych 20 i 36% (VHG) z dodatkiem 60 mg Cr(III)·l⁻¹

Zmienne warunki środowiska fermentacyjnego wynikające zarówno ze zróżnicowanej zawartości ekstraktu z kukurydzy, jak i braku lub obecności Cr(III) (0 i 60 mg Cr(III)·l⁻¹) wpłynęły na przebieg i efekty końcowe procesu fermentacji (rys. 19). W przefiltrowanych zacierach VHG (36%) wysoki ekstrakt z kukurydzy spowalniał dynamikę wydzielania CO₂. W efekcie czas niezbędny do przeprowadzenia fermentacji przefiltrowanych zacierów VHG wynosił 96 godzin, podczas gdy fermentacja zacierów 20% zakończyła się po 72 godzinach. Obecność Cr(III) w ilości 60 mg·l⁻¹ nie wpłynęła na dynamikę wydzielania CO₂ w badanych podłożach kukurydzianych.

Drożdże bardzo szybko wykorzystywały węglowodany zawarte w zacierach 20%. W czasie pierwszej doby wykorzystały 75% glukozy. Po drugiej dobie fermentacji w podłożach kukurydzianych nie stwierdzono obecności glukozy (rys. 20a) ani fruktozy (rys. 20b), a po jej zakończeniu oznaczono jedynie śladowe ilości nieprzefermentowanej maltozy (rys. 24c), maltotriozy (rys. 20d) i dekstryn (rys. 20e).

Dynamika wykorzystania węglowodanów przez drożdże w podłożach VHG była zdecydowanie odmienna. W pierwszej dobie przyswoiły one zaledwie 30% glukozy. W tym samym okresie obserwowano 3–4-krotne obniżenie stężenia maltotriozy i dekstryn oraz wzrost zawartości maltozy. Był to wynik działania enzymów amylolitycznych upłynniających i scukrzających dodanych do podłoża kukurydzianego podczas zacierania (p. 3.4.2) oraz wytworzonych przez drożdże *S. diastolicus* ATCC 13007 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 (rys. 20 a, b, c, d, e). W kolejnych dobach procesu obserwowano stopniowe obniżenie zawartości poszczególnych węglowodanów. Pomimo to, po zakończeniu fermentacji, w podłożach pozostały znaczne ilości nieprzefermentowanych węglowodanów.



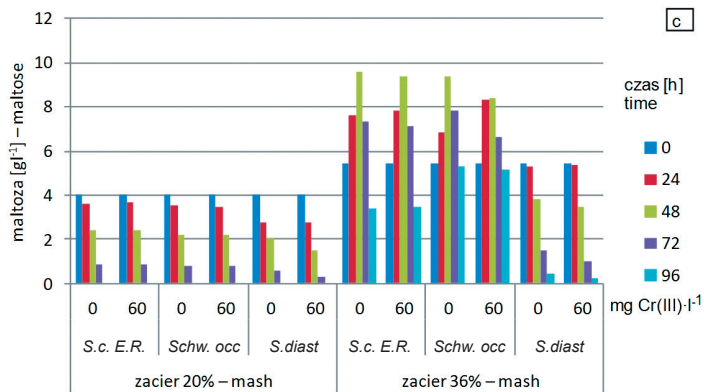
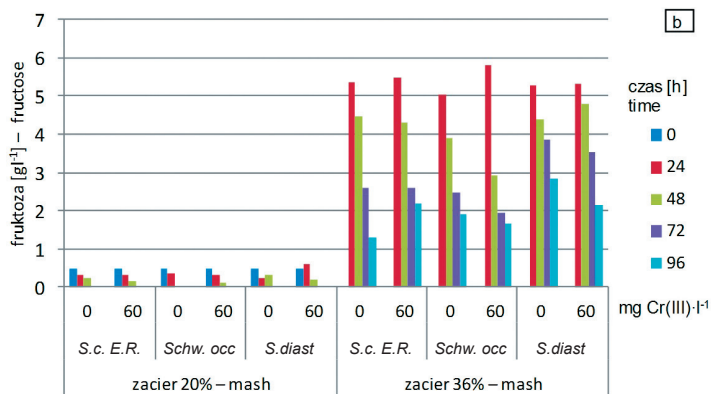
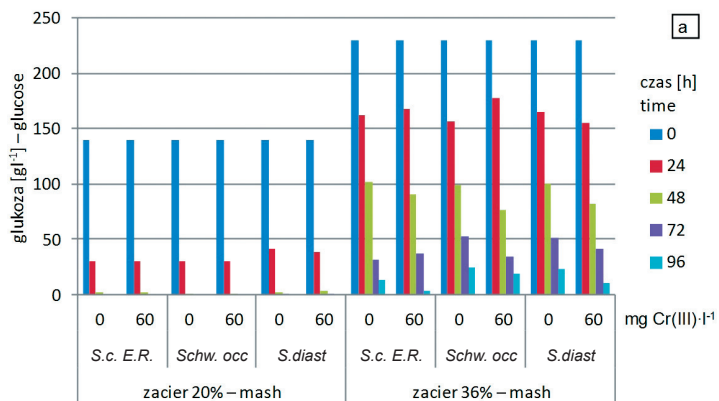
Rys. 19. Dynamika fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku

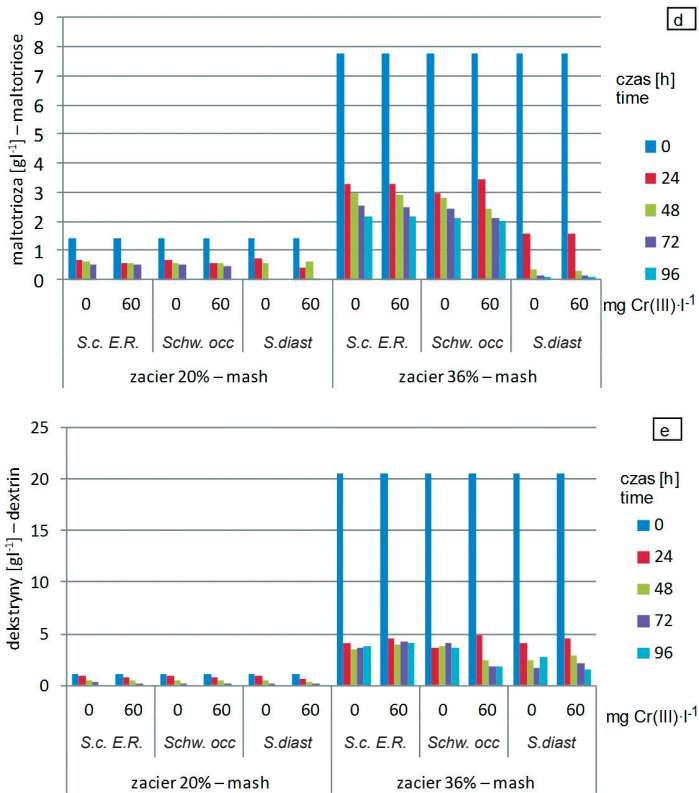
Fig. 19. Dynamics of fermentation of 20 i 36% filtrated corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it

Ich stężenie zależało od zastosowanego szczepu drożdży i wynosiło od 24 (*S. cerevisiae* Ethanol Red) do 37 g·l⁻¹ (*Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086). Najniższe stężenie glukozy (13 g·l⁻¹) stwierdzono w próbach fermentowanych z udziałem *S. cerevisiae* Ethanol Red, a najwyższe w próbie VHG bez dodatku Cr(III) fermentowanej przy użyciu drożdży *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 (rys. 20a). Najniższe ilości nieprzefermentowanej maltozy (rys. 20c), maltotriozy (rys. 20d) i dekstryn (rys. 20e) stwierdzono w próbach fermentowanych przez drożdże *S. diastaticus* ATCC 13007.

Suplementacja podłoża VHG Cr(III) w ilości 60 mg·l⁻¹ wpłynęła na poprawę dynamiki i stopienia wykorzystania węglowodanów. Po zakończonej fermentacji w podłożach kukurydzianych stężenie węglowodanów było niższe i wynosiło od 15 do 29 g·l⁻¹. Najlepsze efekty uzyskano w podłożach fermentowanych z udziałem drożdży *S. diastaticus* ATCC 13007, gdzie końcowe stężenie nieprzefermentowanych węglowodanów było dwukrotnie niższe w porównaniu z próbami niesuplementowanymi. W obecności Cr(III) drożdże szybciej wykorzystywały glukozę, przy czym największe różnice obserwowano w drugiej i trzeciej dobie fermentacji, a w efekcie końcowym stężenie glukozy po fermentacji było niższe w porównaniu z próbami niesuplementowanymi o 13 (*S. diastaticus* ATCC 13007), 10 (*S. cerevisiae* Ethanol Red) i 7 g·l⁻¹ (*Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) (rys. 20a). W obecności jonów Cr(III) drożdże *S. diastaticus* ATCC 13007 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 lepiej wykorzystywały dekstryny, których końcowe stężenie było dwukrotnie niższe w porównaniu z próbami bez dodatku chromu. Nie stwierdzono wpływu Cr(III) na bilans wykorzystania fruktozy i maltotriozy.

Na podstawie analizy profili węglowodanowych oraz ilości wytworzonego etanolu obliczono parametry kinetyczne procesu (zgodnie z p. 3.6): szybkość zużycia cukrów r_s [g·l⁻¹·h⁻¹] (rys. 21), stopień ich odfermentowania α [%] (rys. 22) oraz szybkość produkcji etanolu r_p [g·l⁻¹·h⁻¹] (rys. 24). Najwyższą szybkość zużycia cukrów 4,7 g·l⁻¹·h⁻¹ odnotowano w pierwszej dobie fermentacji w podłożach 20% (rys. 21), zaś w podłożach 36% wartość analizowanego parametru była niższa o 1 g·l⁻¹·h⁻¹. Stopień wykorzystania cukrów w pierwszej i drugiej dobie procesu był o połowę niższy w zacierach VHG w porównaniu z próbami 20%. Obecność Cr(III) wpłynęła zarówno na wzrost szybkości zużycia cukrów, jak i stopnia ich wykorzystania w podłożach 36% od drugiej doby procesu (rys. 21, rys. 22).

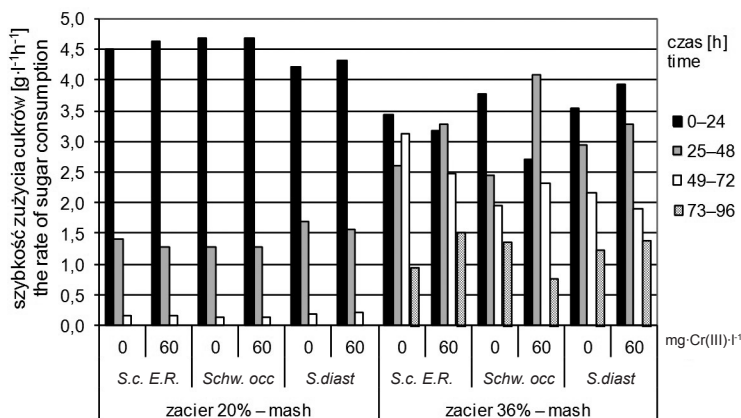




S.c. ER – *Saccharomyces cerevisiae* Etanol Red
 Schw. occ – *Schwanniomyces cccidentalis* ATCC 48086
 S. diast. – *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007

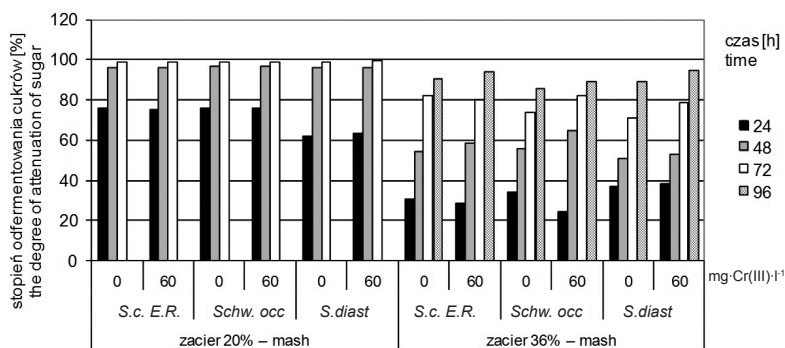
Rys. 20. Zawartość glukozy (a), fruktozy (b), maltozy (c), maltotriozy (d) i dekstryn (e) podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku

Fig. 20. Content of glucose (a), fructose (b), maltose (c), maltotriose (d) and dextrin (e) during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it



Rys. 21. Szybkość zużycia cukru podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku

Fig. 21. Rate of sugar consumption during fermentation of 20 and 36% filtered corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it

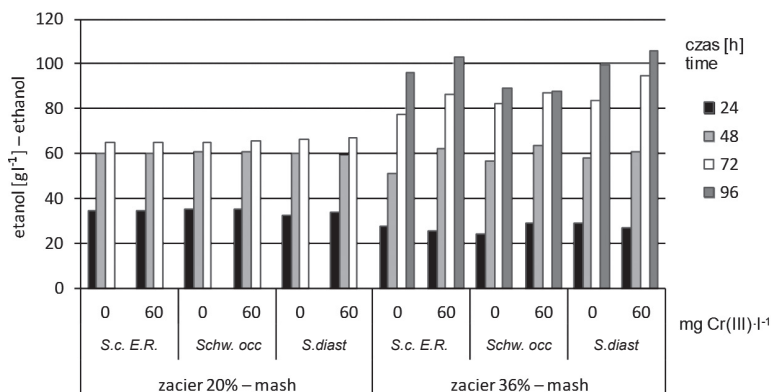


Rys. 22. Stopień wykorzystania węglowodanów po fermentacji zacierów przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku

Fig. 22. Degree of carbohydrate consumption after fermentation of 20 and 36% filtered corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it

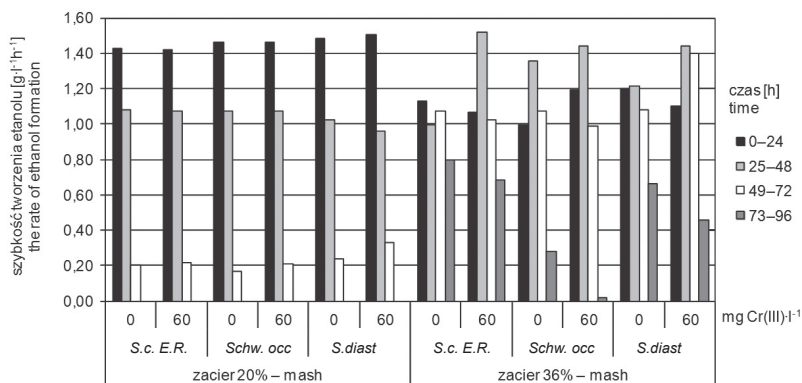
W próbach VHG (36%) wzbogaconych Cr(III) stwierdzono wyższe ilości etanolu w porównaniu z próbami niesuplementowanymi począwszy od drugiej doby procesu (rys. 23). Obserwowano wzrost szybkości produkcji etanolu, szczególnie przez *S. cerevisiae* Ethanol Red i *S. diastaticus* ATCC 13007 (rys. 24), co skutkowało jego wyższym stężeniem po procesie fermentacji odpowiednio o 7 i 12 g·l⁻¹ oraz poprawą wydajności produkcji etanolu (rys. 25). Najbardziej efektywny pod względem ilości etanolu oraz wydajności fermentacji był szczep *S. diastaticus* ATCC 13007, najmniej zaś *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Pomimo wzrostu dynamiki tworzenia etanolu w obecności Cr(III) jego końcowe stężenie nie zmieniło się w przypadku tego szczepu drożdży, natomiast czas potrzebny do jego uzyskania był krótszy o dobę.

W zacierach 20% nie obserwowano wpływu Cr(III) na dynamikę fermentacji węglowodanów, tworzenia etanolu ani jego końcowe stężenie.



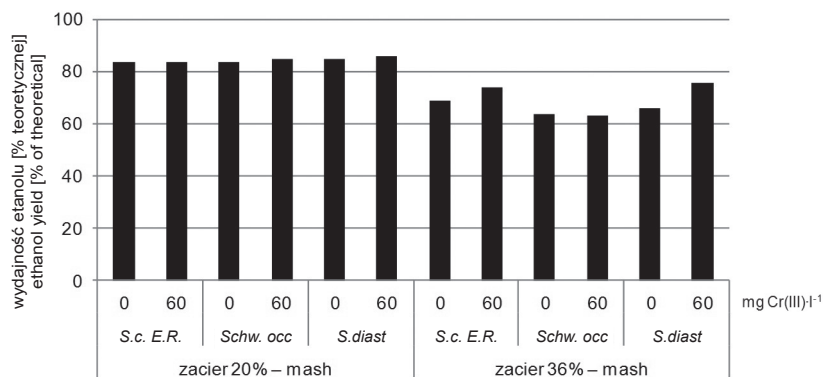
Rys. 23. Zawartość etanolu podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku

Fig. 23. Ethanol content during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it



Rys. 24. Szybkość produkcji etanolu podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku

Fig. 24. Rate of ethanol production during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it



Rys. 25. Wydajność etanolu po fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku

Fig. 25. Ethanol yield after fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it

Stężenie głównego nietożnego produktu ubocznego fermentacji, glicerolu, rosło w kolejnych dobach fermentacji. Niezależnie od obecności czy braku Cr(III) było blisko dwukrotnie wyższe w zacierach 36%, począwszy od pierwszej doby fermentacji (rys. 26). Najniższą jego ilość (od 3,5 do 6 g·l⁻¹) stwierdzono w zacierach fermentowanych przez szczep *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, zaś najwyższą, gdy stosowano szczep *S. diastaticus* ATCC 13007 (od 4 do 8 g·l⁻¹). Obecność jonów Cr(III) nie miała widocznego wpływu na biosyntezę glicerolu niezależnie od ekstraktu ani szczepu drożdży.

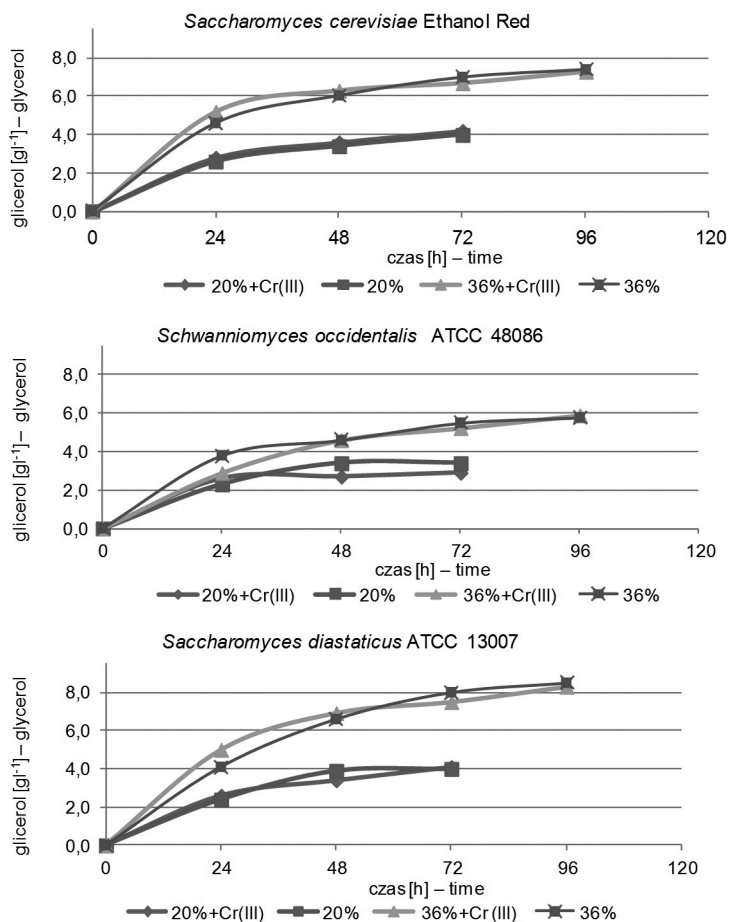
Dynamika tworzenia kwasu bursztynowego w pierwszych dwóch dobach fermentacji była zbliżona niezależnie od zawartości ekstraktu w podłożu fermentacyjnym. Dopiero w 3. i 4. dobie uległa zróżnicowaniu (rys. 27). Końcowe stężenie kwasu bursztynowego było dwukrotnie wyższe w podłożu VHG. Nie stwierdzono wpływu obecności Cr(III) na ilość tworzonego kwasu bursztynowego.

Stężenie kwasu octowego nie przekraczało w podłożach 20% 0,5 g·l⁻¹, a w zacierach VHG było pięciokrotnie wyższe (rys. 28). Dodatek Cr(III) nie miał znacznego wpływu na tworzenie tego kwasu.

Obecność kwasu mlekowego, będącego prawdopodobnie efektem rozwoju bakterii mlekowych, stwierdzono jedynie w śladowych ilościach w podłożach 20% bez dodatku Cr(III) (rys. 29). Tak niskie ilości kwasu mlekowego nie stanowiły u badanych drożdży czynnika hamującego ich aktywność metaboliczną.

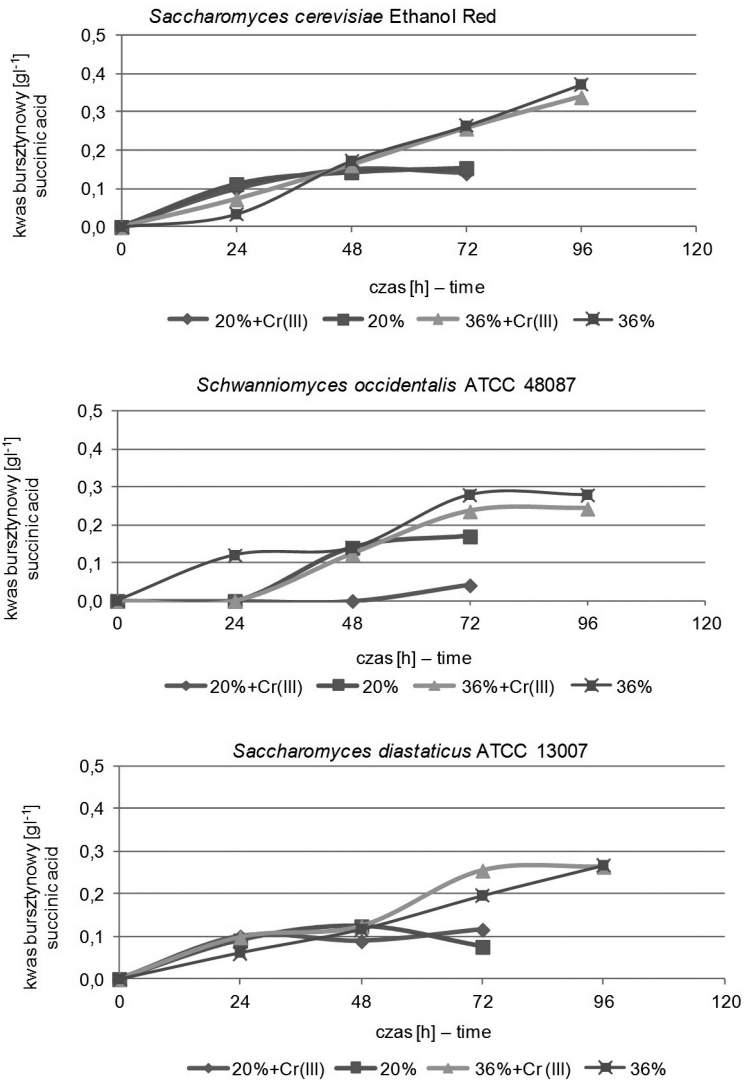
Podsumowując, należy stwierdzić, że w zacierach VHG z dodatkiem Cr(III) w ilości 60 mg·l⁻¹ wskaźniki technologiczne fermentacji uległy znacznej poprawie. Od drugiej doby procesu obserwowano wzrost dynamiki i stopnia wykorzystania węglowodanów, polepszenie parametrów kinetycznych, w tym wzrost szybkości produkcji etanolu. W obecności Cr(III) drożdże szybciej wykorzystywały glukozę, a jej stężenie po fermentacji było niższe w porównaniu z próbami niesuplementowanymi o 13 (*S. diastaticus* ATCC 13007), 10 (*S. cerevisiae* Ethanol Red) i 7 g·l⁻¹ (*Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086).

Ponadto w obecności Cr(III) drożdże amyloglicyzyjne (*S. diastaticus* ATCC 13007 i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) lepiej wykorzystywały dekstryny. W efekcie końcowym uzyskano wzrost stężenia etanolu w próbach fermentowanych przez drożdże *S. cerevisiae* Ethanol Red i *S. diastaticus* ATCC 13007, odpowiednio o 7 i 12 g·l⁻¹, poprawę wydajności procesu oraz skrócenie czasu fermentacji o dobę z udziałem szczepu *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 przy zachowaniu wydajności procesu.

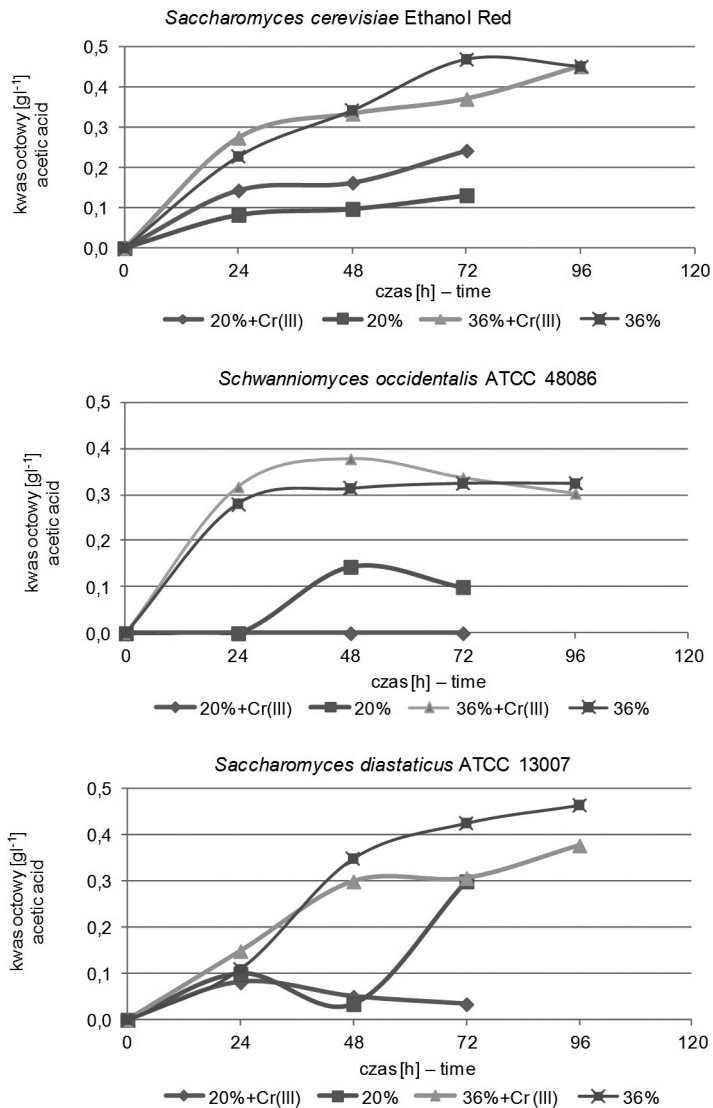


Rys. 26. Zawartość glicerolu podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku

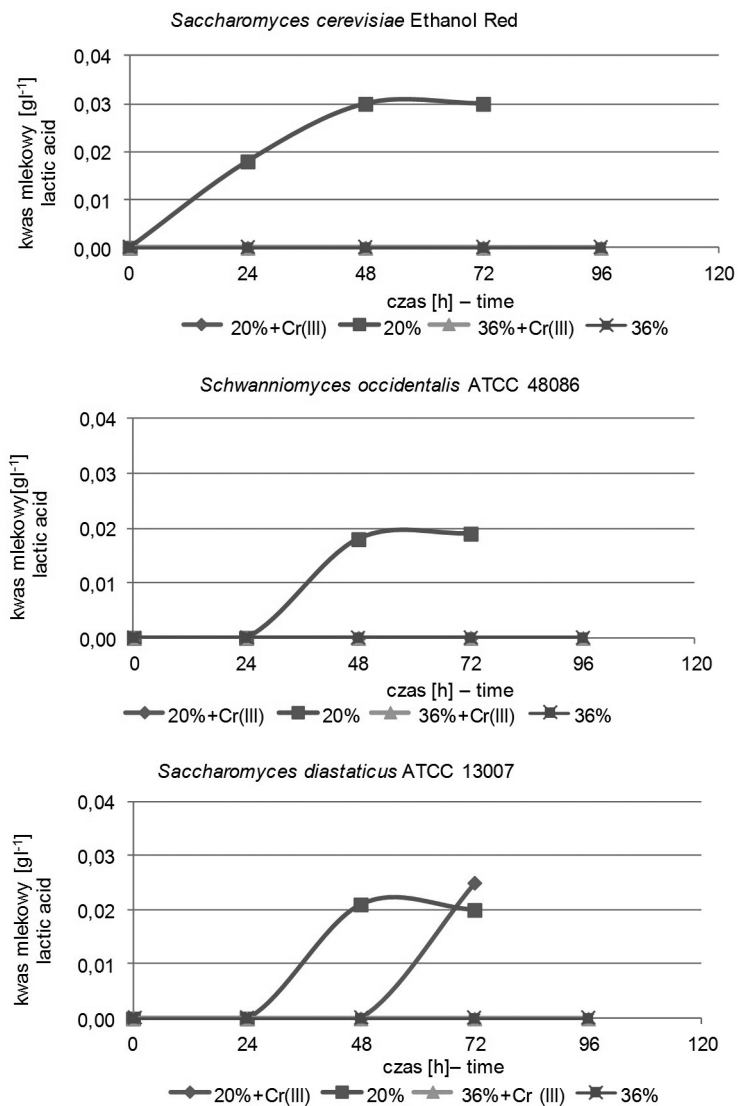
Fig. 26. Glycerol content during fermentation of 20 and 36% filtered corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it



Rys. 27. Zawartość kwasu bursztynowego podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku
 Fig. 27. Succinic acid content during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it



Rys. 28. Zawartość kwasu octowego podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku
 Fig. 28. Acetic acid content during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it



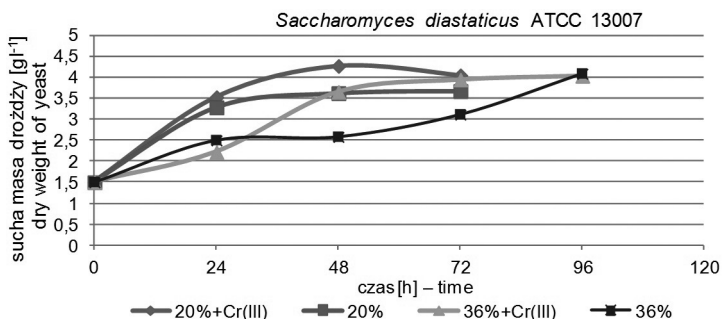
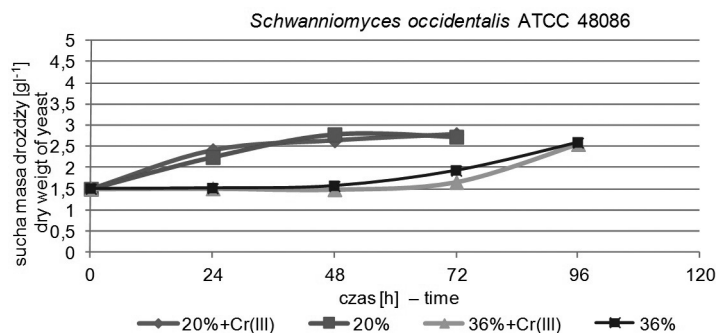
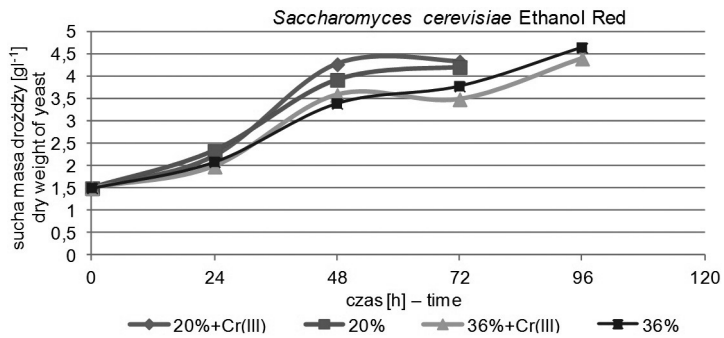
Rys. 29. Zawartość kwasu mlekowego podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku
 Fig. 29. Lactic acid content during fermentation of 20 and 36% filtered corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it

4.3.2. Przyrost biomasy podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych wzbogaconych w Cr(III)

Oprócz składu podłoża fermentacyjnego ważnym czynnikiem wpływającym na tempo i efekty fermentacji były zawartość biomasy i szybkość jej przyrostu.

Największy (blisko dwukrotny) przyrost biomasy drożdży obserwowano w pierwszej (*S. diastaticus* ATCC 13007, *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) i drugiej (*S. cerevisiae* Ethanol Red) dobie fermentacji przefiltrowanych zacierów 20% (rys. 30). W podłożu VHG drożdże (*S. diastaticus* ATCC 13007, *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086) charakteryzowały się dłuższą fazą adaptacji do warunków środowiska, a zawartości ich biomasy były blisko dwukrotnie niższe w porównaniu z zacierami 20%. Jedynie czasowy profil biomasy szczepu *S. cerevisiae* Ethanol Red był podobny w obydwu zacierach, a ponadto szczep ten charakteryzował się najwyższym przyrostem biomasy ($4,5 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ s.m.}$) niezależnie od rodzaju podłoża fermentacyjnego oraz braku lub obecności Cr(III). Najniższy przyrost biomasy ($3,0 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1} \text{ s.m.}$) odnotowano w przypadku szczepu *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, zwłaszcza w podłożu VHG z dodatkiem Cr(III) (rys. 30).

Dodatek $60 \text{ mg Cr(III)}\cdot\text{l}^{-1}$ do podłoża kukurydzianych 20% poprawił dynamikę wzrostu wszystkich badanych drożdży oraz końcową zawartość biomasy drożdży *S. diastaticus* ATCC 13007. Natomiast suplementacja podłoża VHG Cr(III) wpłynęła pozytywnie jedynie na szybkość namnażania biomasy szczepu *S. diastaticus* ATCC 13007.

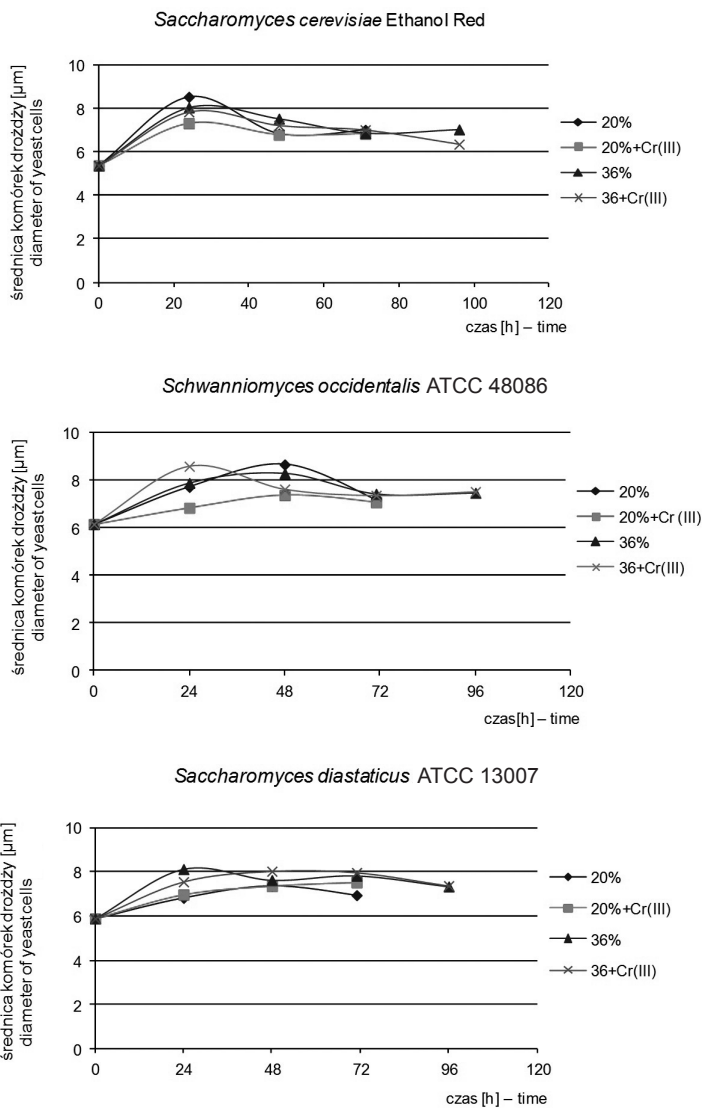


Rys. 30. Dynamika namnażania biomasy podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cr(III) i bez jego dodatku

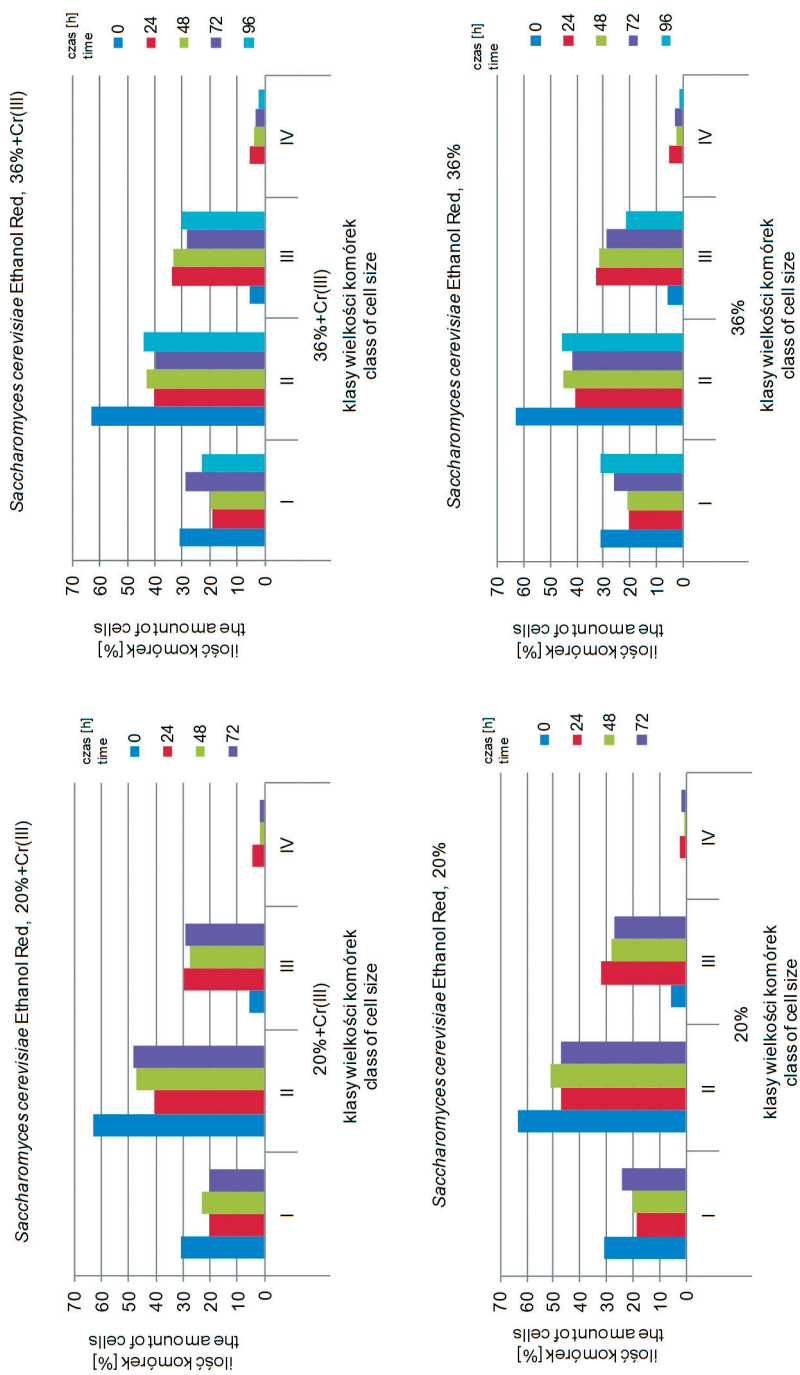
Fig. 30. Dynamics of biomass production during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cr(III) and without it

Wpływ Cr(III) na cechy morfologiczne drożdży gorzelniczych podczas fermentacji oceniono na podstawie zmian wielkości komórek. Średnica komórek drożdży (rys. 31) przed fermentacją wynosiła od 5,5 (*S. cerevisiae* Etanol Red) do 6,1 μm (*Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086). Bez względu na obecność lub brak Cr(III) komórki wszystkich badanych szczepów drożdży zwiększały swoje rozmiary w początkowym etapie fermentacji (do 8,5 μm), a pod koniec fermentacji stawały się mniejsze (7,5 μm). Największe różnice obserwowano w pierwszej i drugiej dobie procesu, rozmiar komórek zwiększył się o 30% i zależał od szczepu drożdży oraz rodzaju podłoża fermentacyjnego. Nie stwierdzono zatem wpływu Cr(III) na wielkość komórek drożdży.

Opierając się jedynie na średnich wartościach rozmiarów komórek nie charakteryzuje wystarczająco struktury populacji według rozmiarów, toteż badane szczepy analizowano również, biorąc pod uwagę podane wcześniej klasy (p. 3.3.2). W biomacie drożdży przed fermentacją obserwowano 60% komórek o typowych rozmiarach od 4,6 do 8,0 μm (klasa II) oraz 25–30% komórek drobnych (0,2–4,5 μm) zaliczanych do I klasy wielkości. Udział komórek w klasie III (8,1–15 μm), do której zaliczamy komórki paczkujące lub te o dużych średnicach, wynosił od 5 (*S. cerevisiae* Etanol Red) do 17% (*Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086). Nie stwierdzono obecności megakomórek o średnicy powyżej 15,1 μm . W ciągu pierwszej doby fermentacji zmniejszał się udział dojrzałych komórek (klasa II) o 15–20%, a także komórek drobnych o średnicy do 8 μm o 10–15%. Stan ten utrzymywał się, z niewielką fluktuacją, do końca procesu fermentacji (rys. 32, 33, 34). Obecność komórek w klasie III, stosunkowo niska w momencie zaszczepienia, zwiększyła się w trakcie fermentacji do poziomu 30%. Ponadto już w pierwszej dobie fermentacji obserwowano pojawienie się megakomórek (klasa IV). Ich ilość była wyższa podczas fermentacji prób VHG i wynosiła 5–6%. Drożdże fermentujące próby VHG charakteryzowały się poza tym wyższym udziałem komórek w klasie III oraz niższym komórek w klasie II w porównaniu z próbami 20%. Inaczej zmieniała się struktura populacji według klas wielkości w przypadku drożdży *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 podczas fermentacji zacierów kukurydzianych 20% z dodatkiem Cr(III) (rys. 33). W czasie fermentacji wykazano wysoką ilość komórek o typowych rozmiarach w klasie II utrzymującą się na poziomie 60% do końca procesu. Obserwowano natomiast spadek liczby komórek drobnych o średnicy poniżej 8 μm do 6%.

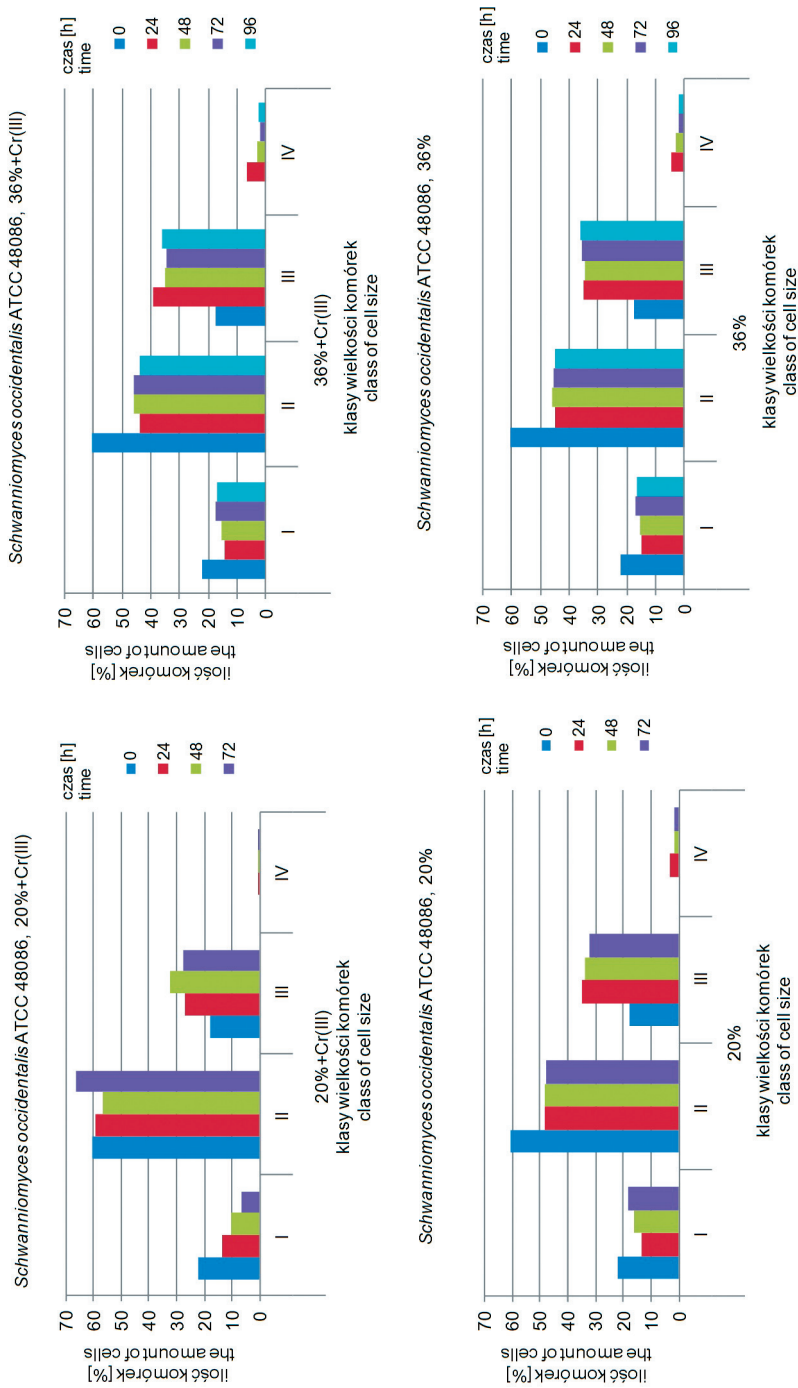


Rys. 31. Średnica komórek drożdży podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cr(III) i bez jego dodatku
 Fig. 31. Diameter of yeast cells during fermentation of 20 and 36% filtered corn mashes in the presence of $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cr(III) and without it

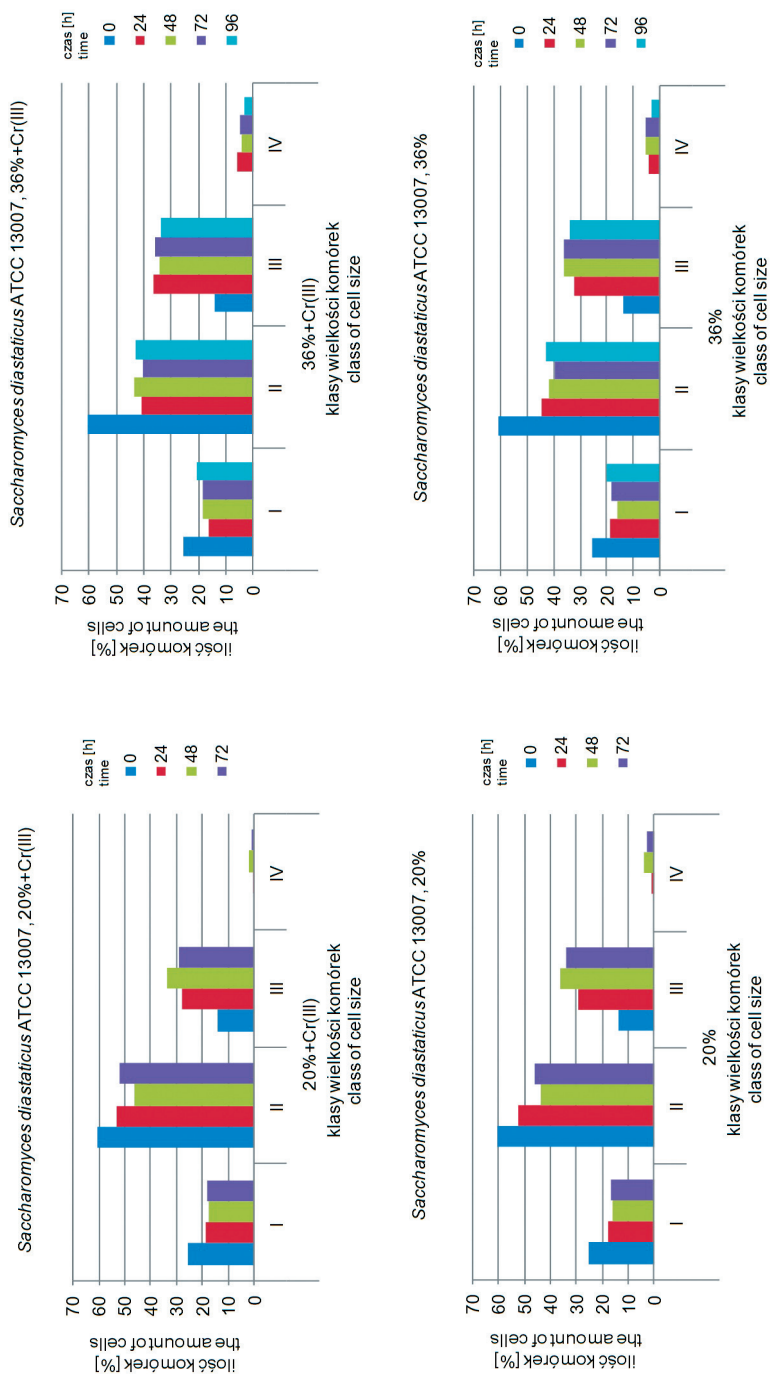


Rys. 32. Udział komórek drożdży *S. cerevisiae* Ethanol Red w poszczególnych klasach wielkości podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku

Fig. 32. The share of *S. cerevisiae* Ethanol Red yeast cells in different size classes during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it



Rys. 33. Udział komórek drożdży *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 w poszczególnych klasach wielkości podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności $60 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Cr(III) i bez jego dodatku
 Fig. 33. The share of *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 yeast cells in different size classes during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of $60 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ Cr(III) and without it



Rys. 34. Udział komórek drożdży *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 w poszczególnych klasach wielkości podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cr(III) i bez jego dodatku

Fig. 34. The share of *Saccharomyces diastaticus* ATCC 13007 yeast cells in different size classes during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cr(III) and without it

4.3.3. Zawartość składników mineralnych w komórkach drożdży podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych wzbogaconych w Cr(III)

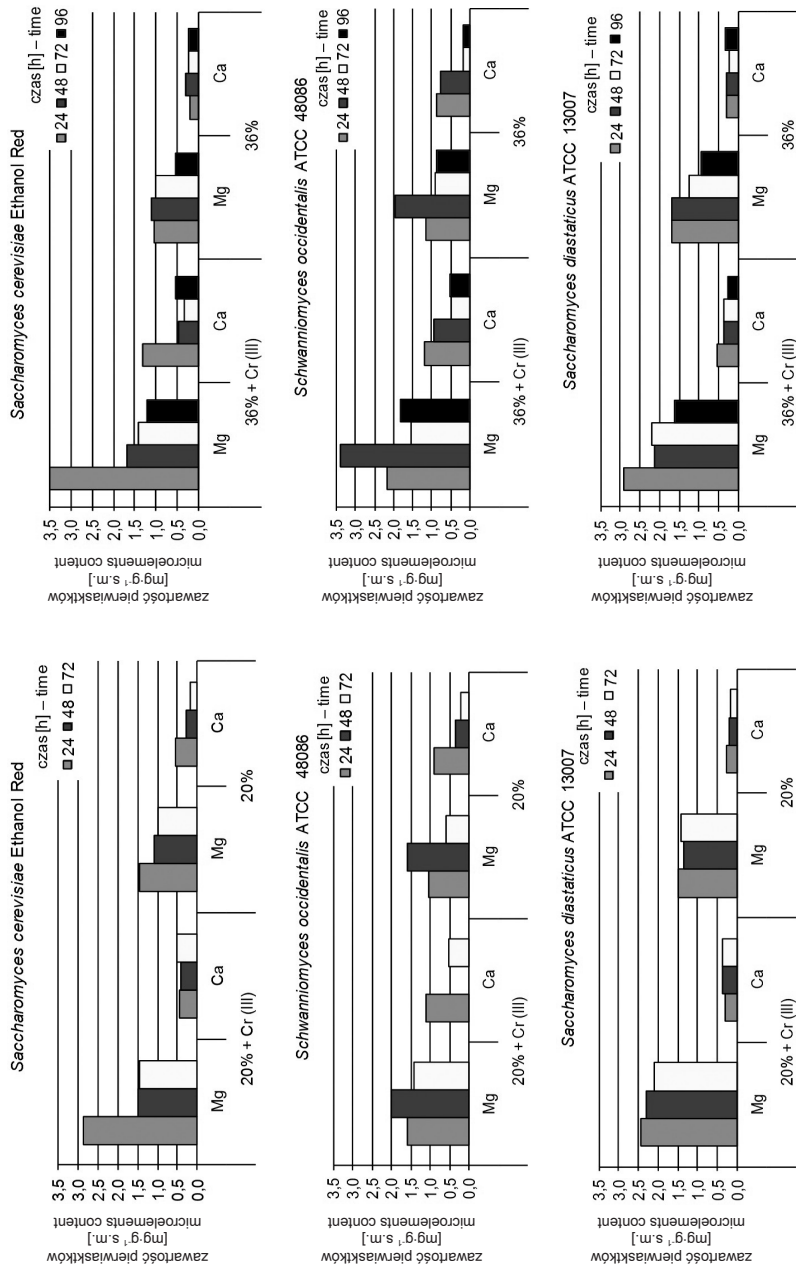
Zawartość składników mineralnych w podłożu fermentacyjnym oraz w biomacie mają zasadnicze znaczenie w prawidłowym metabolizmie komórek drożdży. Ponieważ wprowadzenie nowego pierwiastka (Cr(III)) mogło wpływać na wewnętrzkomórkowy skład pierwiastków, analizowano ten problem, biorąc pod uwagę Mg, Ca, Zn, Fe, Na, K.

Niezależnie od zawartości ekstraktu w podłożu fermentacyjnym zawartość Mg i Ca w komórkach badanych szczepów drożdży malała w miarę postępu fermentacji (rys. 35), z wyjątkiem szczepu *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, w którego komórkach po dwóch dobach fermentacji zaobserwowano wzrost zawartości jonów Mg. Końcowe stężenie Mg i Ca było najniższe w komórkach drożdży fermentujących zacieru kukurydziane VHG (36%). W próbach suplementowanych Cr(III) zawartość tych pierwiastków w komórkach drożdży była wyższa w porównaniu z próbami niesuplementowanymi, zarówno w trakcie procesu, jak i po jego zakończeniu. Wykazano ponadto, że zawartość obydwu pierwiastków w komórkach drożdży fermentujących podłoża VHG z dodatkiem Cr(III) była wyższa po zakończeniu procesu niż w zacierach 20%.

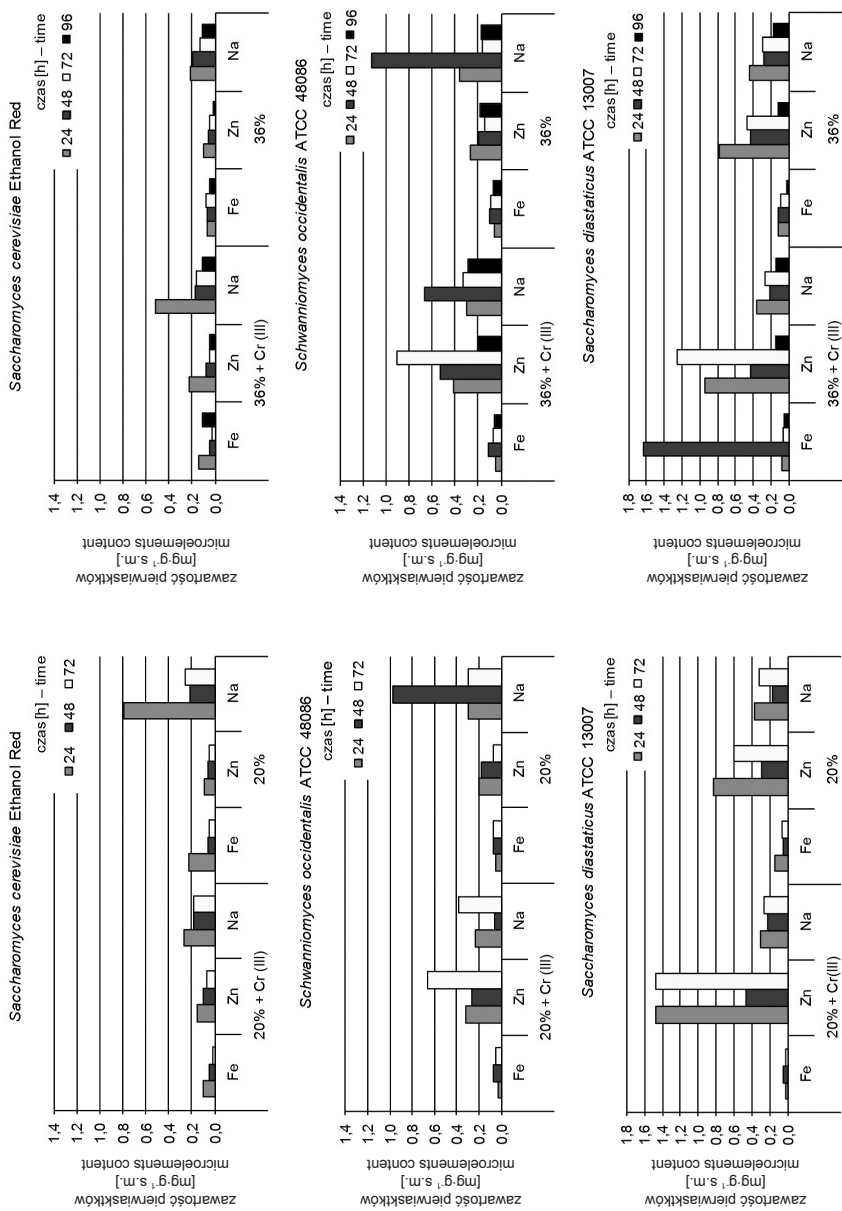
Zawartość Fe, Zn oraz Na w komórkach drożdży po pierwszej dobie fermentacji wynosiła łącznie od 1 do 2 mg·g⁻¹ s.m. (rys. 36). W komórkach drożdży stwierdzono śladowe ilości Fe na poziomie mniejszym od 0,2 mg·g⁻¹ s.m. Zawartość tego pierwiastka albo zmniejszała się u większości badanych szczepów w miarę postępu fermentacji zacierów, albo pozostawała na stałym poziomie. Nie obserwowano wpływu dodatku Cr(III) na zawartość Fe w biomacie stosowanych szczepów drożdży (rys. 36). Najniższy poziom Zn, poniżej 0,2 mg·g⁻¹ s.m., stwierdzono w komórkach drożdży *S. cerevisiae* Ethanol Red, zaś jego siedmiokrotnie wyższą zawartość w komórkach drożdży *S. diastaticus* ATCC 13007. W podłożach fermentacyjnych bez dodatku Cr(III) zawartość Zn w komórkach obniżała się w kolejnych dobach procesu. W obecności jonów Cr(III) drożdże uwalniały, a następnie pobierały Zn z podłoża fermentacyjnego, a jego zawartość w komórkach była wyższa zarówno w trakcie (próba 20 i 36%), jak i po zakończeniu procesu (zacier 20%). Po zakończeniu fermentacji najwyższą zawartość cynku odnotowano w komórkach szczepu *S. diastaticus* ATCC 13007 (w podłożu 20% + Cr(III)). Szczep ten charakteryzował się również niską zawartością jonów Na (0,4–0,2 mg·g⁻¹ s.m.), która utrzymywała się na tym poziomie niezależnie od stężenia składników podłoża fermentacyjnego oraz jego suplementacji Cr(III). W przypadku pozostałych szczepów zawartość Na w komórkach podczas fermentacji była niższa w obecności Cr(III) (rys. 36).

Po pierwszej dobie fermentacji drożdże charakteryzowały się najwyższą zawartością K od 8 (*S. cerevisiae* Ethanol Red, zacier 36%) do 16 mg·g⁻¹ s.m. (*S. diastaticus* ATCC 13007, zacier 36%) (rys. 37). Zawartość K w komórkach drożdży *Saccharomyces* obniżała się w kolejnych dobach fermentacji i była niższa w obecności Cr(III) (rys. 37). Wyjątek stanowił szczep *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086, gdzie początkowe stężenie K wynosiło od 2 do 4 mg·g⁻¹ s.m., a jego maksymalne stężenie w komórkach (18 mg·g⁻¹ s.m.) obserwowano w drugiej lub trzeciej dobie fermentacji.

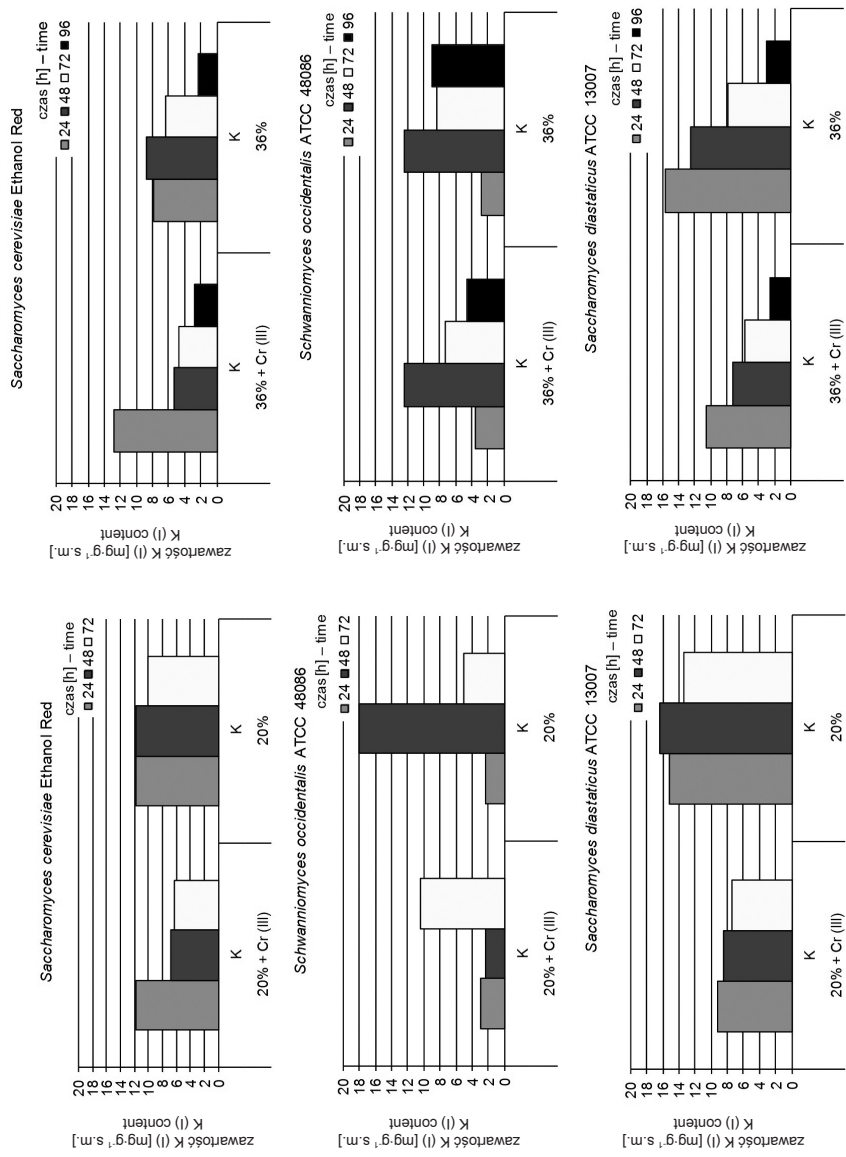
Podsumowując, można stwierdzić, że w obecności Cr(III) obserwowano w trakcie fermentacji oraz po jej zakończeniu, wyższą zawartość Mg, Ca i Zn w komórkach i niższą jonów K i Na. Komórki drożdży *S. diastaticus* ATCC 13007 charakteryzowały się najbardziej stabilnym składem pierwiastków w czasie fermentacji zacierów 20%.



Rys. 35. Zawartość jonów Mg i Ca w komórkach drożdży w czasie fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku
 in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it



Rys. 36. Zawartość jonów Fe, Zn, Na w komórkach drożdży w czasie fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg·l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku
 Fig. 36. Content of Fe, Zn and Na ions in yeast cells during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of 60 mg·l⁻¹ Cr(III) and without it



Rys. 37. Zawartość jonów K w komórkach drożdży w czasie fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności 60 mg.l⁻¹ Cr(III) i bez jego dodatku
 Fig. 37. Content of K ions in yeast cells during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of 60 mg.l⁻¹ Cr(III) and without it

4.3.4. Biosorpcja chromu przez komórki drożdży podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych wzbogaconych w Cr(III)

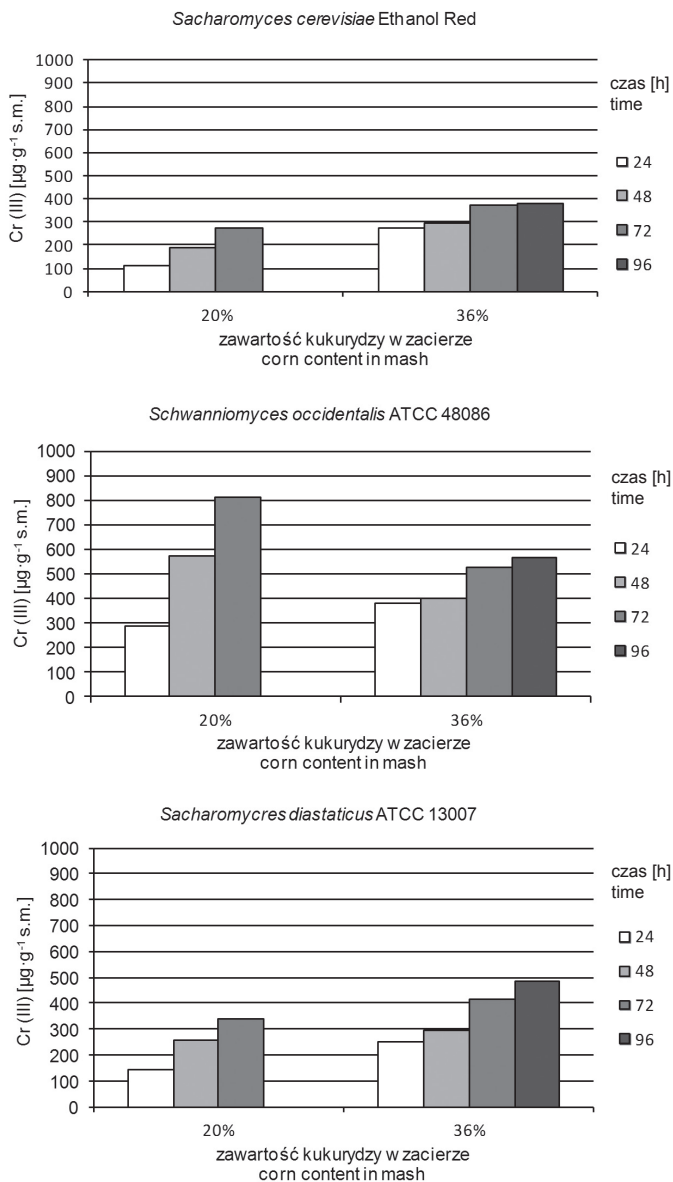
Zawartość chromu w pofermentacyjnej biomacie stosowanych szczepów drożdży była zróżnicowana zarówno w przypadku zacierów kontrolnych (20%), jak i VHG (rys. 38). Najmniejsze ($250 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.) oraz największe ($800 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ s.m.) jego ilości oznaczono odpowiednio w komórkach drożdży *S. cerevisiae* Ethanol Red i *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 fermentujących zacier 20%. Stosowanie tego zacieru prowadziło do gromadzenia mniejszych ilości chromu w komórkach *S. cerevisiae* Ethanol Red, a także *S. diastaticus* ATCC 13007 w porównaniu z zacierami 36%. Odmienne wyniki stwierdzono w przypadku *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086.

Zawartość chromu w biomacie wszystkich szczepów drożdży rosła w miarę postępowania fermentacji obydwu zacierów i osiągała maksymalny poziom po zakończeniu eksperymentów. Podobne były czasowe profile bioakumulacji tego mikroelementu, ale w przypadku zacierów VHG (36%) ilości chromu oznaczone po pierwszej dobie fermentacji były wyraźnie wyższe w porównaniu z zacierami 20%.

4.3.5. Przemiany kwasów tłuszczowych w komórkach drożdży podczas fermentacji zacierów kukurydzianych wzbogaconych w Cr(III)

Zawartość kwasów tłuszczowych, szczególnie nienasyconych, jest cechą określającą odporność komórek drożdży na etanol [Ma, Liu 2010]. Dodawany Cr(III) do zacierów kukurydzianych mógł wpływać na zmianę ich składu.

Badane szczepy drożdży różniły się pod względem zawartości zarówno nasyconych, jak i nienasyconych kwasów tłuszczowych (tab. 8). Najwięcej kwasów nienasyconych stwierdzono w komórkach *S. cerevisiae* Etanol Red (tab. 8), a najmniej w *S. diastaticus* ATCC 13007. W przypadku kwasów nasyconych było odwrotnie. Taki układ zawartości kwasów nasyconych i nienasyconych, wyrażony relacją UFA/SFA (kwasów nienasyconych/kwasów nasyconych), wskazywał na lepszą odporność szczepu *S. cerevisiae* Etanol Red na działanie etanolu niż *S. diastaticus* ATCC 13007. Niezależnie od szczepu komórki drożdży zawierały najwięcej kwasu C16:1 (od 53,22 do 61,16%), a następnie C18:1 (od 23,2 do 26%).



Rys. 38. Bioakumulacja chromu przez komórki drożdży gorzelnicznych podczas fermentacji przefiltrowanych zacierów kukurydzianych 20 i 36% w obecności $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cr(III)

Fig. 38. Bioaccumulation of chromium by distillery yeast cells during fermentation of 20 and 36% filtrated corn mashes in the presence of $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ Cr(III)

Tabela 8

Table 8

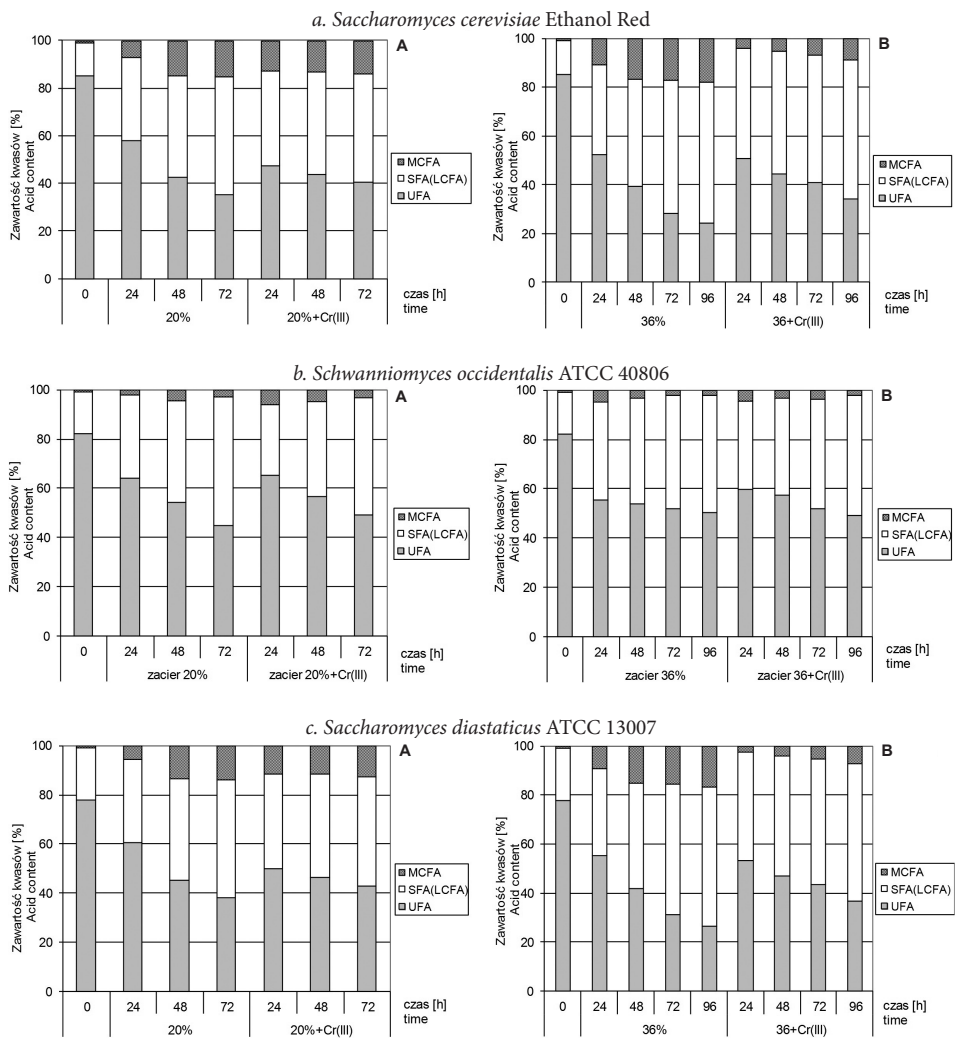
Zawartość kwasów tłuszczowych w badanych szczepach drożdży przed rozpoczęciem fermentacji
Fatty acids content in studied yeast strains before fermentation

| Grupa kwasów A groupe of acids | Kwas tłuszczowy Fatty acid | Zawartość kwasów [% całkowitej ilości kwasów tłuszczowych] Acid content [% of total fatty acids content] | | |
|--------------------------------------|-------------------------------|--|--|-------------------------------------|
| | | Szczep drożdży Yeast strain | | |
| | | <i>S. cerevisiae</i> Ethanol Red | <i>Schwanniomyces</i> <i>occidentalis</i> ATCC 48086 | <i>S. diastaticus</i> ATCC 13007 |
| MCFA | C10: 0* | 0,49 | 0,29 | 0,13 |
| | C12: 0* | 0,12 | 0,15 | 0,15 |
| | C14: 0* | 0,58 | 0,46 | 0,76 |
| SFA(LCFA) | C16:0* | 11,0 | 14,69 | 17,56 |
| | C18:0* | 2,76 | 2,42 | 3,79 |
| UFA | C14:1* | 0,25 | 0,24 | 0,21 |
| | C16: 1* | 61,16 | 55,29 | 53,22 |
| | C18: 1* | 23,21 | 26,06 | 23,60 |
| | C18: 2* | 0,44 | 0,39 | 0,57 |
| | C18: 3* | 0 | 0 | 0 |
| UFA/SFA | | 6,12 | 4,78 | 3,63 |

*indeks oznacza długość łańcucha węglowego i stopień jego nienasylenia

*index means the length of hydrocarbon chain and its degree of unsaturation

Począwszy od pierwszej doby fermentacji w komórkach wszystkich szczepów drożdży nienasyconych ubywało kwasów tłuszczowych (UFA), niezależnie od zawartości ekstraktu w zacierze, jak i braku lub obecności Cr(III) oraz przybywało długołańcuchowych kwasów tłuszczowych (LCFA) (rys. 39). Wzrastała także zawartość średniołańcuchowych kwasów (MCFA) z wyjątkiem szczepu *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Analiza danych ilustrujących zmiany zawartości poszczególnych kwasów tłuszczowych w komórkach stosowanych szczepów drożdży gorzelnicznych przedstawionych w tabelach 9, 10 i 11 nie jest łatwa. Trudno dopatrzeć się wspólnych u wszystkich szczepów zależności pomiędzy składem kwasów tłuszczowych a zawartością ekstraktu w zacierze i brakiem lub obecnością w nim Cr(III). Indywidualność każdego szczepu może być także istotnym czynnikiem komplikującym obraz poszukiwanych zależności. Na tym etapie badań można jedynie pokusić się o stwierdzenie, że dodatek Cr(III) do zacierów kukurydzianych skutkowało wyższą zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych w pofermentacyjnej biomase drożdży. W efekcie współczynnik UFA/SFA (ilości kwasów nienasyconych do nasyconych) był wyższy w komórkach drożdży fermentujących zacieru suplementowane Cr(III) (rys. 40). Może to mieć pozytywny wydźwięk praktyczny polegający na korzystnej poprawie odporności drożdży na wysokie stężenie etanolu w zacierach typu VHG wzbogaconych Cr(III).



Rys. 39. Zawartość kwasów tłuszczowych w komórkach drożdży w trakcie fermentacji zacierów 20% (A) i 36% (B) w zależności od dodatku lub braku Cr(III)

Fig. 39. Fatty acids content in cells of yeast during fermentation of mashes at concentration of 20% (A) and 36% (B) in the presence of Cr(III) and without it

Tabela 9

Table 9

Zawartość kwasów tłuszczowych w komórkach drożdży *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red w czasie fermentacji zacierów 20 i 36% w zależności od dodatku lub braku Cr(III)
Fatty acids content in cells of *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red yeast during fermentation of mashes 20 and 36% in the presence of Cr(III) and without it

| | Zacier [%] Mash | Zawartość kwasów [% całkowitej ilości kwasów tłuszczowych] Acid content [% of total fatty acids content] | | | | | | | |
|---|--------------------|---|------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|---------------------|------------------|
| | | Czas fermentacji [h] – Time of fermentation | | | | | | | |
| | | 24 | | 48 | | 72 | | 96 | |
| | | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) |
| a) Kwas tłuszczowy – Fatty acid MCFA | | | | | | | | | |
| C10:0* | 20 | 1,19 | 6,07 | 6,49 | 6,14 | 6,78 | 6,87 | – | – |
| | 36 | 4,53 | 0,16 | 8,06 | 1,91 | 8,23 | 1,90 | 8,57 | 2,49 |
| C12:0* | 20 | 4,54 | 5,45 | 7,29 | 6,13 | 7,62 | 6,77 | – | – |
| | 36 | 4,64 | 2,18 | 7,78 | 2,62 | 8,07 | 4,05 | 8,69 | 5,78 |
| C14:0* | 20 | 1,19 | 1,31 | 1,24 | 0,78 | 0,85 | 0,49 | – | – |
| | 36 | 1,73 | 1,76 | 1,05 | 0,99 | 0,95 | 0,88 | 0,79 | 0,61 |
| b) Kwas tłuszczowy – Fatty acid SFA(LCFA) | | | | | | | | | |
| C16:0* | 20 | 29,85 | 34,58 | 32,21 | 34,63 | 38,17 | 34,87 | – | – |
| | 36 | 29,43 | 37,36 | 36,13 | 39,68 | 44,75 | 41,63 | 45,35 | 41,66 |
| C18:0* | 20 | 5,17 | 5,30 | 10,24 | 8,42 | 11,24 | 10,62 | – | – |
| | 36 | 7,19 | 7,89 | 7,66 | 10,37 | 9,67 | 10,82 | 12,20 | 15,29 |
| c) Kwas tłuszczowy – Fatty acid UFA | | | | | | | | | |
| C14:1* | 20 | 0,22 | 0,16 | 0 | 0,12 | 0 | 0,10 | – | – |
| | 36 | 0,17 | 0,21 | 0,17 | 0,12 | 0,15 | 0,12 | 0,13 | 0,06 |
| C16:1* | 20 | 26,34 | 20,84 | 21,04 | 17,90 | 19,82 | 14,24 | – | – |
| | 36 | 18,22 | 21,24 | 17,24 | 20,45 | 14,73 | 20,26 | 12,66 | 19,31 |
| C18:1* | 20 | 23,17 | 15,41 | 15,48 | 15,04 | 10,15 | 14,43 | – | – |
| | 36 | 30,33 | 22,53 | 18,41 | 18,08 | 10,47 | 15,97 | 8,91 | 11,17 |
| C18:2* | 20 | 7,72 | 10,33 | 6,00 | 10,32 | 5,37 | 11,10 | – | – |
| | 36 | 3,48 | 6,15 | 3,50 | 5,41 | 2,96 | 4,04 | 2,69 | 3,41 |

*indeks oznacza długość łańcucha węglowego i stopień jego nienasycenia

*index means the length of hydrocarbon chain and its degree of unsaturation

Tabela 10
Table 10

Zawartość kwasów w komórkach drożdży *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 w czasie fermentacji zacierów 20 i 36% w zależności od dodatku lub braku Cr(III)
Fatty acids content in cells of *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 yeast during fermentation of mashes 20 and 36% in the presence of Cr(III) and without it

| | Zacier [%] Mash | Zawartość kwasów [% całkowitej ilości kwasów tłuszczowych] Acid content [% of total fatty acids content] | | | | | | | |
|---|-----------------------|---|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| | | Czas fermentacji [h] – Time of fermentation | | | | | | | |
| | | 24 | | 48 | | 72 | | 96 | |
| | | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) |
| a) Kwas tłuszczowy – Fatty acid MCEFA | | | | | | | | | |
| C10:0* | 20 | 0,38 | 3,14 | 1,10 | 1,90 | 1,32 | 1,42 | – | – |
| | 36 | 2,07 | 1,62 | 0,69 | 0,71 | 0,77 | 2,02 | 0,71 | 1,06 |
| C12:0* | 20 | 0,75 | 2,05 | 1,60 | 2,01 | 1,03 | 1,16 | – | – |
| | 36 | 1,86 | 1,91 | 1,52 | 1,71 | 0,91 | 1,30 | 0,77 | 0,81 |
| C14:0* | 20 | 0,84 | 0,95 | 0,86 | 0,94 | 0,54 | 0,87 | – | – |
| | 36 | 1,10 | 1,04 | 0,95 | 0,77 | 0,64 | 0,60 | 0,64 | 0,49 |
| b) Kwas tłuszczowy – Fatty acid SFA(LCFA) | | | | | | | | | |
| C16:0* | 20 | 28,49 | 24,52 | 33,14 | 29,31 | 35,13 | 33,54 | – | – |
| | 36 | 34,22 | 31,34 | 37,00 | 33,19 | 37,60 | 35,80 | 38,30 | 40,45 |
| C18:0* | 20 | 5,78 | 4,25 | 8,37 | 9,51 | 17,50 | 13,91 | – | – |
| | 36 | 5,38 | 4,36 | 6,02 | 6,30 | 8,30 | 8,41 | 9,56 | 8,25 |
| c) Kwas tłuszczowy – Fatty acid UFA | | | | | | | | | |
| C14:1* | 20 | 0,14 | 0,16 | 0,08 | 0,12 | nd | 0,07 | – | – |
| | 36 | 0,13 | 0,10 | 0,08 | 0,11 | 0 | 0,12 | 0 | 0,07 |
| C16:1* | 20 | 32,96 | 35,15 | 27,81 | 28,42 | 19,145 | 21,88 | – | – |
| | 36 | 30,34 | 30,31 | 29,99 | 29,61 | 29,489 | 29,09 | 29,08 | 28,23 |
| C18:1* | 20 | 24,39 | 20,92 | 21,04 | 19,23 | 20,525 | 18,77 | – | – |
| | 36 | 21,45 | 26,63 | 20,10 | 20,70 | 19,390 | 19,25 | 18,58 | 18,09 |
| C18:2* | 20 | 5,93 | 8,73 | 4,85 | 8,37 | 4,601 | 8,01 | – | – |
| | 36 | 3,15 | 2,48 | 3,36 | 3,96 | 2,905 | 3,06 | 2,36 | 2,24 |

*indeks oznacza długość łańcucha węglowego i stopień jego nienasycenia

*index means the length of hydrocarbon chain and its degree of unsaturation

Tabela 11

Table 11

Zawartość kwasów tłuszczowych w komórkach drożdży *S. diastaticus* ATCC 13007 w czasie fermentacji zacierów 20 i 36% w zależności od dodatku lub braku Cr(III)

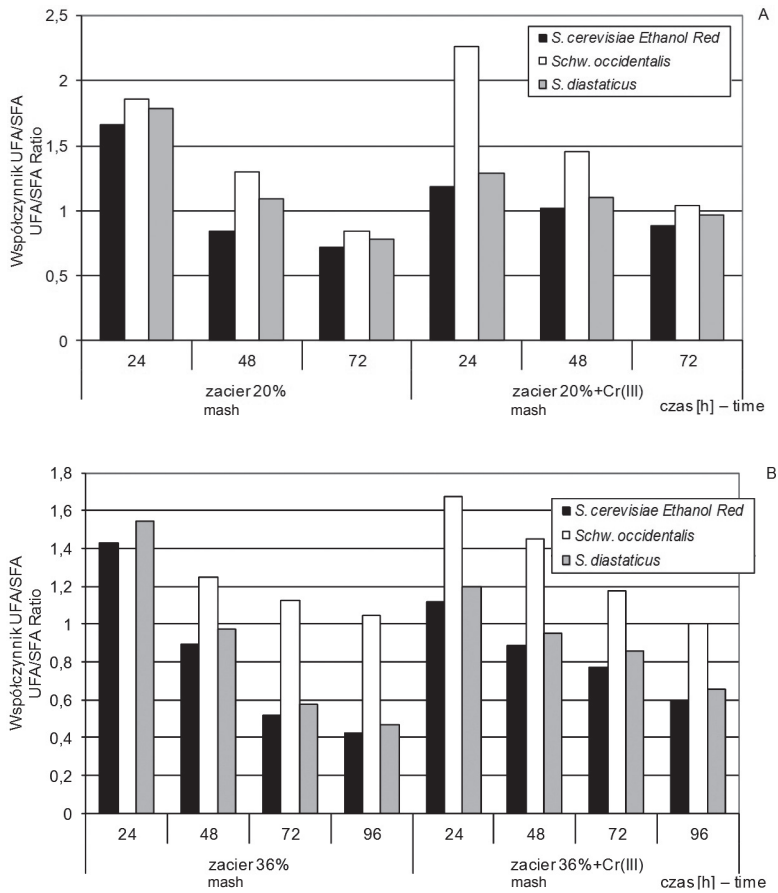
Fatty acids content in cells of yeast *S. diastaticus* ATCC 13007

during fermentation of mashes 20 and 36% in the presence of Cr(III) and without it

| | Zacier [%] Mash | Zawartość kwasów [% całkowitej ilości kwasów tłuszczowych] Acid content [% of total fatty acids content] | | | | | | | |
|---|-----------------------|---|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|---------------------------|---------------------|
| | | Czas fermentacji [h] – Time of fermentation | | | | | | | |
| | | 24 | | 48 | | 72 | | 96 | |
| | | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) | bez without Cr(III) | z – with Cr(III) |
| a) Kwas tłuszczowy – Fatty acid MCFA | | | | | | | | | |
| C10:0* | 20 | 0,69 | 5,57 | 5,99 | 5,62 | 6,28 | 6,37 | – | – |
| | 36 | 4,03 | 0,34 | 7,56 | 1,41 | 7,73 | 1,40 | 8,07 | 1,99 |
| C12:0* | 20 | 4,04 | 4,95 | 6,79 | 5,63 | 7,12 | 6,27 | – | – |
| | 36 | 4,14 | 1,68 | 7,28 | 2,12 | 7,57 | 3,55 | 8,39 | 5,28 |
| C14:0* | 20 | 0,69 | 0,81 | 0,74 | 0,28 | 0,35 | 0,01 | – | – |
| | 36 | 1,23 | 1,26 | 0,55 | 0,49 | 0,45 | 0,38 | 0,29 | 0,11 |
| b) Kwas tłuszczowy – Fatty acid SFA(LCFA) | | | | | | | | | |
| C16:0* | 20 | 29,30 | 34,03 | 31,65 | 34,08 | 37,62 | 34,32 | – | – |
| | 36 | 28,93 | 36,86 | 35,63 | 39,18 | 44,25 | 41,13 | 44,85 | 41,16 |
| C18:0* | 20 | 4,61 | 4,70 | 9,69 | 7,89 | 10,69 | 10,07 | – | – |
| | 36 | 6,69 | 7,40 | 7,15 | 9,87 | 9,17 | 10,32 | 11,99 | 14,79 |
| c) Kwas tłuszczowy – Fatty acid UFA | | | | | | | | | |
| C14:1* | 20 | 0,72 | 0,67 | 0,50 | 0,62 | 0,50 | 0,596 | – | – |
| | 36 | 0,27 | 0,21 | 0,27 | 0,22 | 0,15 | 0,223 | 0,13 | 0,16 |
| C16:1* | 20 | 27,96 | 22,39 | 22,33 | 19,41 | 20,82 | 15,75 | – | – |
| | 36 | 18,92 | 21,94 | 17,94 | 21,05 | 15,53 | 20,962 | 13,66 | 19,81 |
| C18:1* | 20 | 23,67 | 15,91 | 15,98 | 15,54 | 10,65 | 14,935 | – | – |
| | 36 | 31,81 | 24,24 | 19,61 | 19,64 | 11,67 | 17,491 | 9,42 | 12,80 |
| C18:2* | 20 | 8,21 | 10,83 | 6,50 | 10,81 | 5,86 | 11,596 | – | – |
| | 36 | 3,98 | 6,64 | 4,00 | 5,91 | 3,47 | 4,544 | 3,195 | 3,91 |

*indeks oznacza długość łańcucha węglowego i stopień jego nienasycenia

*index means the length of hydrocarbon chain and its degree of unsaturation



Rys. 40. Wartość współczynnika UFA/SFA w komórkach drożdży *S. cerevisiae Ethanol Red*, *Schw. occidentalis* i *S. diastaticus* w trakcie fermentacji zacierów kukurydzianych 20% (A) i 36% (B) w zależności od dodatku lub braku Cr(III)

Fig. 40. UFA/SFA ratio in cells of *S. cerevisiae Ethanol Red*, *S. occidentalis* and *S. diastaticus* during fermentation of mashes at concentration of 20% (A) and 36% (B) in the presence of Cr(III) and without it

5. Dyskusja

W istniejących gorzelnianach wzrost produkcji etanolu na cele paliwowe wiąże się z koniecznością zmian technologicznych prowadzących do unowocześnienia, zwiększenia skali produkcji i obniżenia kosztów jednostkowych. Aby obniżyć cenę bioetanolu i uczynić z niego głównie tanią domieszkę do paliw, należy poszukiwać nowych, energooszczędnych i wydajnych technologii [Krishnan i wsp. 2000, Prasad i wsp. 2007, Pereira i wsp. 2010]. Wydajność praktyczna etanolu jest jednym z najważniejszych parametrów technologicznych gorzelnian. W celu uzyskania jej maksymalnej wartości z surowca sprawą kluczową wydaje się być ustalenie optymalnych warunków prowadzenia procesu, tj. ustalenie odpowiedniej zawartości surowca, składu podłoża, wybór technologii czy dobór najlepszego szczepu odpornego na warunki intensywnej produkcji etanolu [Chi i wsp. 1995, Alper i wsp. 2006, Kawa-Rygielska 2009].

5.1. Wybór szczepów drożdży

Zrozumienie zależności między realnymi warunkami fermentacji przemysłowej a funkcjonowaniem drobnoustrojów jest kluczem do właściwego doboru odpowiednich szczepów i sprawnego kierowania przebiegiem procesu fermentacji [Graves i wsp. 2007, Chuang i wsp. 2008, Berbet i wsp. 2009]. Obecnie w przemyśle najczęściej wykorzystuje się drożdże z rodzaju *Saccharomyces*, których zaletą jest szybkie odfermentowanie zacieru gorzelniczego z jednoczesnym wytworzeniem znacznych ilości etanolu (ok. 11%) w ciągu dwu-, trzydobowej fermentacji [Kondo i wsp. 2002]. Często wykorzystuje się metody inżynierii genetycznej do poprawy cech drożdży gorzelnicznych [Stewart 1981, Chi, Zirong 1994, Carmona i wsp. 2002, Kawa-Rygielska 2004], natomiast nie wszystkie nowe szczepy drożdży otrzymane w ten sposób spełniają wymagania technologiczne, które są następujące: szybkie namnażanie komórek i intensywna fermentacja cukrów w ciągu pierwszych 24 godz. procesu, wysoka produktywność etanolu, tolerancja na wysokie stężenie ekstraktu, etanolu, jak i pH środowiska na poziomie 2,0–3,0 oraz stabilność genetyczna.

W celu poprawy efektywności procesów fermentacji poszukiwane są mikroorganizmy o jeszcze korzystniejszych cechach technologicznych. Przykładem mogą być drożdże o uzdolnieniach amylolitycznych, których przedstawicielami są szczepy *S. diastaticus* ATCC 13007 oraz *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 zastosowane jako materiał biologiczny w badaniach własnych. Niewątpliwą zaletą tych drożdży jest możliwość wykorzystywania związków, których tradycyjne szczepy używane w gorzelnictwie nie potrafią utylizować, m.in. dekstryn i skrobi [Kawa 2002, Dziuba, Kawa-Rygielska 2003].

Drożdże *S. diastaticus* charakteryzują się wysoką aktywnością fermentacyjną, wytwarzają aktywną glukoamylazę oraz są zdolne do hydrolizy i fermentacji dekstryn. Dodatkową zaletą tego gatunku jest wysoka tolerancja na etanol [Laluce, Matton 1984, Zielińska i wsp. 1997].

Najważniejszą cechą biotechnologiczną drożdży *Schwanniomyces occidentalis* jest ich bogaty kompleks amylolityczny [Ingledew 1987]. Szczepy tego gatunku wydzielają do środowiska pozakomórkową α -amylazę, jedną lub dwie formy glukoamylazy oraz enzym hydrolizujący rozgałęzienia w łańcuchu skrobiowym (tzw. debranching enzyme). Synergistyczne działanie obu enzymów daje efekt całkowitego rozkładu skrobi. Drożdże te wykazują uzdolnienia fermentacyjne, ale niestety cechują się niższą odpornością na stężenie etanolu. Niskie tempo fermentacji wynika z faktu, że enzymy amylolityczne tych drożdży są represjonowane przez powstającą z rozkładu skrobi glukozę [Wilson i wsp. 1982]. Poprawę tej cechy uzyskano przez otrzymanie mutantów odpornych na represję kataboliczną w obecności glukozy. Jednym z nich jest zastosowany w badaniach własnych szczep *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086.

Możliwość hydrolizy dekstryn i skrobi bezpośrednio przez układ enzymatyczny drożdży ogranicza lub eliminuje konieczność wprowadzania tych enzymów w procesie zacierania, a co za tym idzie, korzystnie wpływa na obniżenie kosztów produkcji etanolu, co ma istotne znaczenie w jego produkcji na cele paliwowe [Devantier i wsp. 2005]. Ponadto, w warunkach intensywnej produkcji etanolu, poszukiwane są drobnoustroje charakteryzujące się wysoką produktywnością oraz odpornością na stresy środowiska, szczególnie na wysokie stężenie etanolu. Kryteria spełnia zastosowany w badaniach własnych szczep drożdży *Saccharomyces cerevisiae* Ethanol Red wykorzystywany do produkcji etanolu w warunkach przemysłowych [Devantier i wsp. 2005].

Drożdże o bogatym kompleksie amylolitycznym lub drobnoustroje odporne na warunki związane z intensyfikacją produkcji etanolu stanowią szczególnie cenny materiał biologiczny we współczesnym gorzelnictwie.

5.2. Suplementacja podłoża jonami Cr(III)

Tematem wielu badań i dyskusji jest wzbogacanie podłoży hodowlanych i fermentacyjnych w jony różnych pierwiastków, takich jak: Mg, Zn, Ca – w celu określenia ich wpływu na drobnoustroje prowadzące proces fermentacji oraz sam jego przebieg [Edie 1998, Soyuduru i wsp. 2009, Chmielewska, Kawa-Rygielska 2010]. Do tej pory wielu badaczy skupiało się także na zgłębianiu problemu miejsca gromadzenia w komórce pobranych jonów metali [Blackwell i wsp. 1995, Rees, Steward 1997, Tuszyński, Pasternakiewicz 2000, De Feritas i wsp. 2003, Błażej i wsp. 2004, Pagani i wsp. 2007] czy ilości jonów, jaką akumulują komórki [Błażej i wsp. 2002, Duzkiewicz-Reinhard i wsp. 2002].

W badaniach własnych podjęto próbę odpowiedzi na pytanie, czy wzbogacenie podłoża fermentacyjnego w jony Cr(III) wpływa na przebieg, dynamikę i stopień wykorzystania węglowodanów, efekty końcowe fermentacji oraz poprawę cech drożdży gorzelnicznych, szczególnie podczas fermentacji zacierów o wysokiej zawartości ekstraktu (VHG). Zagadnienie jest istotne, gdyż fermentacja zacierów VHG stanowi jedną z możliwości zwiększenia wskaźnika wydajności fermentacji i końcowej koncentracji etanolu. Dotychczasowa wiedza na temat roli tego pierwiastka w procesie jest bowiem niewystarczająca.

Zainteresowanie dodatkiem Cr(III) wynika z dotychczasowych badań prowadzonych z udziałem tego pierwiastka i roli jego biologicznie aktywnych kompleksów w metabolizmie węglowodanów i lipidów organizmów wyższych [Holdsworth, Neville 1990, Balk i wsp. 2007, Krzysik, Grajeta 2010]. Chrom w postaci trójwartościowej jest niezbędny do właściwego przebiegu procesów metabolicznych. To mikroelement uczestniczący w przemianach węglowodanów (m.in. glukozy) oraz procesach syntezy białek, kwasów tłuszczowych i cholesterolu HDL. Został zidentyfikowany jako składnik centrów aktywnych wielu enzymów, jak również jako nieodłączna część czynnika tolerancji glukozy (GTF), [Schwarz, Mertz 1959, Vincent 2001].

Chrom jest pierwiastkiem występującym powszechnie w glebie, wodzie i powietrzu atmosferycznym. Jego obecność została również wykryta w tkankach roślin i zwierząt. Ponadto występuje w wielu produktach spożywczych, takich jak: białe i czerwone wino ($1-5,4 \mu\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$), przyprawy ($37-1205 \mu\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$), produkty przemiału pszenicy czy kukurydzy ($0,9-9,22 \mu\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$), drożdże piwowskie ($2 \mu\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$) oraz suplementy na bazie drożdży piwowskich ($108-604 \mu\text{g}\cdot 100 \text{g}^{-1}$) [Kovacs i wsp. 2007]. W naturze chrom występuje przeważnie na dwóch stopniach utlenienia, które wykazują największą trwałość i stabilność – jako chrom sześciowartościowy Cr(VI) oraz chrom trójwartościowy Cr(III). Obie formy wykazują zróżnicowane właściwości fizykochemiczne [Chatterjee, Luo 2010, Poljsak, wsp. 2009, Kirpnick-Sobol i wsp. 2006, Summer i wsp. 2005]. Również jego bioprzyswajalność zależy od formy, w jakiej występuje. Związki chromu sześciowartościowego są lepiej rozpuszczalne, mobilne i przyswajalne w porównaniu ze słabo rozpuszczalnymi związkami Cr(III) [Vincent 2001], a jednocześnie są bardzo toksyczne [Bagchi i wsp. 2002, Haq, Shakoori 1998].

Chrom w związkach organicznych jest bardziej dostępny biologicznie i ma wyższą aktywność niż pochodzący ze związków nieorganicznych. Przekształcenie chromu nieorganicznego do postaci aktywnej biologicznie ma zasadnicze znaczenie w jego fizjologicznym działaniu [Jain i wsp. 2007].

Chrom, aby osiągnąć pełną aktywność, po wnikięciu do komórek łączy się z odpowiednimi ligandami. Do najczęstszych należą połączenia pierwiastka z kwasem nikotynowym oraz glutationem. Sam chrom nie stymuluje jednak metabolizmu glukozy. Biologicznie czynna forma chromu wchodzi w skład struktury zwanej czynnikiem tolerancji glukozy (GTF), a ta prawdopodobnie jest częścią większego kompleksu chromomoduliny LMWCr. Pomimo wielu lat badań natura tego kompleksu jest wciąż w kręgu zainteresowań naukowców. Wiadomo, iż biologicznie aktywne kompleksy chromu poprawiają działanie insuliny, umożliwiając jej przyłączenie do odpowiednich receptorów komórkowych [Mertz 1993].

Pierwszym źródłem biologicznie aktywnego chromu (GTF) były drożdże browarnicze, obecnie prowadzone są badania nad zdolnością akumulacji chromu z użyciem różnych grup mikroorganizmów, w tym również: alg, bakterii czy grzybów [Simonoff i wsp. 1992, Zielińska, Chojnacka 2010].

Chrom nie jest stosowany jako suplement podłoża fermentacyjnego w gorzelnianach, dlatego jego wprowadzenie do podłoża fermentacyjnego wymaga oceny wpływu jego obecności i stężenia, zarówno na parametry wzrostu drożdży (procesy anaboliczne), jak i na ich aktywność fermentacyjną (aktywność procesów katabolicznych).

5.3. Wpływ Cr(III) na parametry wzrostu drożdży gorzelniczych

Intensywność procesu namnażania biomasy drożdży gorzelniczych w znacznym stopniu zależy od właściwości i składu środowiska hodowlanego, przy czym istnieje minimalne stężenie każdego składnika podłoża propagacyjnego, począwszy od którego komórka jest zdolna ten związek metabolizować. W miarę podwyższania stężenia składników w podłożu tempo przyrostu biomasy zwiększa się do określonego poziomu, zaś jego dalszy wzrost może prowadzić do hamowania procesów życiowych drożdży.

Chrom (III) nie był do tej pory stosowany jako suplement podłoża wzrostowych drożdży gorzelniczych, co tłumaczy brak danych literaturowych dotyczących jego wpływu na parametry wzrostu tych drożdży. Dlatego też w badaniach własnych zastosowano szeroki zakres stężeń Cr(III) od 8 do 200 mg·l⁻¹, a suplementację podłoża prowadzono z udziałem soli CrCl₃·6H₂O. Źródło Cr(III) – jak i jego dawki – wybrano na podstawie przeglądu literatury [Pas i wsp. 2004, Zetic i wsp. 2001]. Celem tak założonego eksperymentu było określenie wpływu Cr(III) na parametry wzrostu drożdży gorzelniczych przy jednoczesnej eliminacji stężeń mogących wywierać wpływ negatywny na biomasę.

Intensywność pobierania i stopień wykorzystywania jonów chromu przez komórki drożdży zależą od jego struktury chemicznej, stopnia utlenienia, stężenia w substracie oraz biodostępności. Ostatnia z wymienionych cech determinowana jest przez rozpuszczalność związków jonowych i obecność ligandów kompleksujących wybrane kationy [Wang, Chen 2006].

Pozytywna rola chromu jest związana z trzecim stopniem utlenienia. Jednak bardzo słaba rozpuszczalność związków Cr(III) w wodzie w pH = 7,0 powoduje, iż jon ten w niewielkim stopniu przechodzi przez błonę komórkową. Istotną rolę w biosorpcji pierwiastka przez mikroorganizmy odgrywa pH środowiska. Najwyższą akumulację chromu w biomacie flokulujących drożdży piwowarskich stwierdzono przy wyjściowej wartości pH = 5,0 [Ferraz, Teixeira 1999]. Zjawisko to związane jest z wpływem pH środowiska na aktywność grup funkcjonalnych ścian komórkowych drożdży -COOH, -OH, -NH₂ oraz na obecność poszczególnych form jonowych pierwiastka. W środowisku wodnym w pH = 2,0 stwierdzono obecność jedynie jonów Cr⁺³. Chrom w tej postaci nie jest absorbowany przez drożdże *S. cerevisiae*. W pH = 4,0 stwierdzono obecność dwóch form Cr⁺³ (40%) oraz Cr(OH)⁺² (60%), a w pH = 5 dominują formy Cr(OH)⁺² (70%) i Cr(OH)₄⁺⁵ (20%) [Ramos i wsp. 1995]. Najwyższą przyswajalność chromu przez drożdże piekarskie obserwowano w zakresie pH = 5,0–5,2, a dalszy wzrost pH do wartości 5,4 powodował drastyczne obniżenie zdolności jego akumulacji [Mapoleo, Torno 2004].

Rola chromu jako pierwiastka kompleksotwórczego jest dobrze znana. Chrom wykazuje szczególne powinowactwo z twardymi zasadami, czyli ligandami, zawierającymi jako donory elektronów atomy tlenu i azotu. Nieco słabiej łączy się z ligandami poprzez siarkę czy fosfor. Wymienione atomy donorowe występują m.in. w aminokwasach będących składnikami ekstraktu drożdżowego, takich jak: glicyna, cysteina, kwas nikotynowy i kwas glutaminowy [Vincent 2001].

Wykazano, że zdolność do akumulacji jonów chromu jest cechą osobniczą, zależną od czasu namnażania, sposobu prowadzenia hodowli, stężenia wyjściowego biomasy, fazy wzrostu [Batic, Raspor 2000, Kaszycki i wsp. 2004], etapu jego suplementacji, składu pod-

łoża oraz dostępnych w podłożu modulatorów – siarki, fosforu, żelaza i czynników chelatujących [Ksheminska i wsp. 2005, 2008, Mapolelo, Torno 2004, Raspor i wsp. 2000].

Drożdże akumulują chrom głównie podczas logarytmicznej fazy wzrostu. Akumulacja rozpoczyna się szybką biosorpcją na powierzchni komórki i zależy od temperatury [Ferraz, Teixeira 1999], po czym następuje wolne gromadzenie wewnątrz komórki. Chrom przenika przez błonę komórkową drożdży, ale mechanizm tego transportu nie jest wciąż rozpoznany. Jak wynika z badań przeprowadzonych przez Pas i wsp. [2004], w przypadku drożdży paszowych rodzaju *Candida* chrom gromadzony jest głównie w protoplastach (około 70–80%) oraz w ścianie komórkowej (około 15%) i zaledwie 6% absorbowane jest na powierzchni komórki. Stężenie chromu oraz jego rozkład w poszczególnych strukturach komórkowych są uzależnione od źródła chromu oraz jego stopnia utlenienia. Według Pas i wsp. [2004], $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ stanowi jedną z najlepiej przyswajalnych przez drożdże postaci chromu. Ilość chromu zakumulowana w biomacie drożdży *Candida intermedia* podczas hodowli z dodatkiem tej soli była 100-krotnie wyższa niż w obecności $\text{KCr}(\text{C}_2\text{O}_4)_2$.

W niniejszej pracy zastosowano Cr(III) w postaci $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, wzorując się na literaturze przedmiotu [Pas i wsp. 2004, Kaszycki i wsp. 2004]. Badane drożdże gorzelnicze wykazywały zdolność biosorpcji jonów chromu z podłoża. Zawartość tego mikroelementu w komórkach zwiększała się wraz ze wzrostem jego stężenia w podłożu wzrostowym, osiągając poziom od 0,43 do 0,88 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. w zależności od badanego szczepu drożdży. Najwyższą zdolność akumulacji chromu wykazywały szczepy *S. cerevisiae* D2 oraz *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. W przypadku drożdży *Schwanniomyces* zjawisko to prawdopodobnie może być związane z faktem, iż szczep ten zawiera 50% białka w suchej masie i jest stosowany do produkcji SCP (single cell protein) [Wilson i wsp. 1982]. Nieco wyższe ilości chromu oznaczono w drożdżach *Schwanniomyces occidentalis* VKM Y-1565 (1,31 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.) po namnażaniu w obecności $\text{Cr}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 16\text{H}_2\text{O}$ [Ksheminska i wsp. 2005].

Zróżnicowaną zdolność do biosorpcji jonów chromu w zależności od użytego szczepu drożdży wykazały badania Ksheminska i wsp. [2005], w których stwierdzono, że drożdże akumulowały chrom w szerokim zakresie od 0,51 do 11,10 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. (w przypadku szczepu *Candida curvata* VKM Y-39). Z kolei optymalizacja warunków hodowli pozwoliła Liu i wsp. [2001] na uzyskanie maksymalnej zawartości wewnątrzkomórkowego chromu na poziomie 3248 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m. w wybranym szczepie *S. cerevisiae* LZ053.

W niewielu pracach oceniano wpływ Cr(III) na parametry wzrostu i cechy morfologiczne drożdży. W badaniach prowadzonych przez Jianlong i wsp. [2004] stwierdzono wpływ obecności jonów Cr(III) w stężeniu 15 μM na wydłużenie lag fazy oraz ograniczenie wzrostu drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* o 30% w porównaniu z próbami kontrolnymi bez chromu. Podczas badań 51 szczepów drożdży paszowych i piekarskich większość z nich wykazywała wrażliwość na stężenie Cr(III) w ilości 1–2 mM, co przejawiało się wydłużeniem lag fazy. Wzrost koncentracji Cr(III) do poziomu 4 mM powodował obniżenie zawartości biomasy oraz wydłużenie komórek drożdży *Pichia guilliermondii* (poziom stężenia wewnątrzkomórkowego wynosił 0,83 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ s.m.) [Ksheminska i wsp. 2005]. Jednocześnie w innych badaniach obserwowano wpływ Cr(III) w stężeniu 10 mM na cechy morfologiczne badanych drożdży paszowych. Stwierdzono m.in. zmianę kształtu i wielkości komórek wyjściowych oraz komórek pączkujących [Pas i wsp. 2004]. Badano także wpływ chromu na plon biomasy. Musiał i wsp. [2005] zaobserwowali, że

dawka chromu w podłożu wynosząca $80 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ wpłynęła na obniżenie plonu biomasy drożdży *Yarrowia lipolytica*. Stężenie chromu na poziomie $40 \text{ mg Cr(III)}\cdot\text{l}^{-1}$ było najkorzystniejsze w procesie produkcji biomasy tych drożdży w podłożu z substratem tłuszczowym. Z kolei Zetic i wsp. [2001] wykazali, że dawka chromu w ilości $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ w postaci $\text{CrCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ podwyższała plon biomasy drożdży piekarskich *S. cerevisiae* w porównaniu z próbą kontrolną. Zróżnicowana tolerancja drożdży na wzrastające stężenie chromu może być związana z gęstością biomasy, ich stanem fizjologicznym oraz fazą wzrostu. Przy niskiej zawartości biomasy, w obecności Cr(III) dodanego do podłoża na początku fazy logarytmicznego wzrostu zauważono wyższy udział komórek nieaktywnych w porównaniu z próbami, w których zastosowano wysoką zawartość wyjściowej biomasy i suplementację Cr(III) w czasie logarytmicznej fazy wzrostu [Kaszycy i wsp. 2004].

W badaniach własnych obserwowano korzystny wpływ jonów Cr(III) w dawce do $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ na parametry wzrostu badanych szczepów drożdży gorzelniczych. Stwierdzono poprawę dynamiki i zwiększenie szybkości właściwej wzrostu oraz przyrostu biomasy. Odnotowano także większy procentowy udział komórek pączkujących niż w próbach kontrolnych bez Cr(III). Wysokie dawki tego pierwiastka (156 oraz $200 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) na ogół nieznacznie obniżały wartości wspomnianych wskaźników. Pomimo wysokich stężeń Cr(III) nie obserwowano zmian cech morfologicznych drożdży gorzelniczych. Jedyne wyjątek stanowił szczep *S. diastaticus* ATCC 13007. Rozmiar jego komórek zwiększał się wraz ze wzrastającym stężeniem Cr(III) w środowisku. Znaczną tolerancję na wysokie dawki Cr(III) można prawdopodobnie tłumaczyć wysoką odpornością drożdży gorzelniczych na warunki środowiska.

W drugim etapie pracy określono wpływ Cr(III) na aktywność fermentacyjną drożdży w podłożach modelowych oraz wybrano etap procesu technologicznego, w którym suplementacja jest najbardziej efektywna.

5.4. Wpływ warunków fermentacji oraz obecności Cr(III) na aktywność fermentacyjną drożdży

Zachętą do oceny wpływu jonów Cr(III) na aktywność fermentacyjną drożdży były badania prowadzone przez Zetic i wsp. [2001]. Wykazano w nich wzrost ilości wydzielonego CO_2 podczas fermentacji podłoży syntetycznych suplementowanych chromem oraz wyeks-trahowaną z drożdży piekarskich frakcją zawierającą kompleks GTF.

W badaniach własnych suplementacja Cr(III) podczas wzrostu drożdży nie oddziaływała na ich aktywność fermentacyjną. Z kolei dodatek Cr(III) do podłoża fermentacyjnego wpłynął na poprawę dynamiki fermentacji. Obserwowano skrócenie czasu adaptacji drożdży w środowisku fermentacyjnym oraz wzrost ilości wydzielonego CO_2 w pierwszych godzinach fermentacji. Jedyne szczep *S. cerevisiae* D2 w nieznacznym stopniu reagował na obecność Cr(III).

Korzystny wpływ dodatku $\text{CrCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$ można tłumaczyć tym, że chrom przyspiesza metabolizm węglowodanów, ponieważ jest aktywatorem wielu enzymów biorących udział w przemianie glukozy i syntezie białek [Moore, Pettigrew 1990]. Skrócenie czasu adaptacji drożdży do środowiska oraz szybkie zafermentowanie wpływają na poprawę dynamiki fermentacji oraz zabezpieczają środowisko przed rozwojem niepożądanego mikroflory.

Korzystne efekty uzyskane na podłożach modelowych były zachętą do dalszych badań. Podłoża modelowe stosowane w warunkach laboratoryjnych są przydatne we wstępnym etapie badań, które różnią się bardzo od warunków przemysłowych. W celu dostosowania doświadczenia do warunków przemysłowych użyto naturalne zacierzy gorzelnicze. Jako surowiec do przygotowania podłóż wybrano kukurydzę, która stosowana jest obecnie jako jeden z najbardziej efektywnych energetycznie surowców gorzelniczych [Borktun 2003, Michalski 2007, Kawa-Rygielska 2007, Kłosowski i wsp. 2010].

Jednym z najnowszych rozwiązań w zakresie zwiększania wskaźnika praktycznej wydajności fermentacji i końcowej koncentracji etanolu jest fermentacja zacierów o wysokiej zawartości ekstraktu (VHG) (ang. Very High Gravity) [Wang i wsp. 1999, Devantier i wsp. 2005, Pereira i wsp. 2010]. Jest ona wykorzystywana na skalę przemysłową do produkcji etanolu na cele paliwowe szczególnie w USA, gdzie głównym surowcem w produkcji etanolu jest kukurydza [Devantier i wsp. 2005].

Istotną rolę w technologii VHG odgrywają rodzaj zastosowanego do procesu fermentacji surowca oraz jego jakość. Z doświadczeń wynika, iż zawartość surowca skrobiowego w zacierze ma ekonomiczne uzasadnienie do poziomu ok. 28–33%, natomiast w przypadku ziarna kukurydzy zawartość tę można podnieść do 35%. Fakt ten wynika z niskiej zawartości polisacharydów nieskrobiowych. Polisacharydy nieskrobiowe w głównej mierze odpowiadają za lepkość zacieru. Wysoka lepkość z kolei zmniejsza ekstraktywność surowca, utrudnia komórce drożdży kontakt ze środowiskiem, ogranicza sprawny przebieg operacji technologicznych, zwiększa zużycie energii i utrudnia utrzymanie właściwego stanu higienicznego instalacji, co wpływa na cenę produkcji spirytusu [Czupryński, Kotarska 2003]. Dlatego też kukurydza jest przydatna do przygotowania zacierów VHG w większym stopniu niż tradycyjnie stosowane żyto, które charakteryzuje się znacznie wyższą zawartością polisacharydów nieskrobiowych. Pomimo korzystnego składu chemicznego kukurydzy i jej powszechnie potwierdzonej przydatności do produkcji etanolu paliwowego zastosowanie w badaniach własnych zacieru 36% skutkowało dłuższą adaptacją drożdży w środowisku, wydłużeniem fazy zafermentowania i spowolnieniem dynamiki fermentacji, obniżeniem wydajności procesu fermentacji etanolowej, stopnia odfermentowania, wzrostem ilości nieprzefermentowanych węglowodanów oraz pogorszeniem stanu fizjologicznego drożdży w porównaniu z próbami kontrolnymi 20%.

Negatywny wpływ warunków środowiska VHG na aktywność fermentacyjną drożdży związany jest z wysokim stężeniem w zacierach cukrów prostych (głównie glukozy i maltozy), co wywołuje stres osmotyczny w komórkach drożdży [Rolland i wsp. 2002, Pid-docke i wsp. 2009]. Przekroczone zostaje optymalne ciśnienie osmotyczne, wynoszące w komórce od 1,2 do 8,0 atm [Converti i wsp. 1984]. Wraz ze wzrostem stężenia rozpuszczalnych składników ciśnienie osmotyczne w komórce zwiększa się. I tak: przy zawartości 20, 30, 40% cukru w podłożu wynosi ono kolejno 14, 22, 28 atm. Oprócz cukrów prostych i soli mineralnych również nietolne metabolity drożdżowe zwiększają ciśnienie osmotyczne, co powoduje inhibicję substratami [Grajek, Szymanowska 2008].

Wraz ze wzrostem ciśnienia osmotycznego w podłożu obniża się żywotność komórek i słabnie ich aktywność fermentacyjna, zmniejsza przyrost biomasy, obniża wydajność fermentacji, następuje szybka redukcja objętości komórek będąca efektem wydalenia wody z komórki w celu zagęszczenia składników cytoplazmy [Bai i wsp. 2004, Pratt

i wsp. 2003]. Komórka broniąc się przed skutkami stresu osmotycznego, podnosi swoje wewnętrzne ciśnienie, akumulując glicerol i trehalozę [D'Amore i wsp. 1988, Lages, Lucas 1997, Hounsa i wsp. 1998, Wang i wsp. 2001]. Ponadto w wyniku wysokiej końcowej koncentracji etanolu komórki drożdży narażone są na stres etanolowy [D'Amore, Steward 1987, Pratt i wsp. 2003, Bai i wsp. 2004].

Podczas fermentacji etanol kumuluje się w zacierze odfermentowanym, a mając niższą masę cząsteczkową od glukozy i maltozy, powoduje, że silniej zwiększa ciśnienie osmotyczne niż wymienione wcześniej cukry. Jego wysokie stężenie w gęstych zacierach, które może sięgać skrajnie nawet 18%, stwarza zagrożenie w integralności komórek drożdżowych. Etanol hamuje wzrost drożdży i ich żywotność, a także aktywność kluczowych enzymów, np. heksokinazy czy dehydrogenazy. Ponadto etanol zmienia stopień hydratacji błony komórkowej, przez co oddziałuje na jej funkcje (pobieranie składników odżywczych i wydzielanie etanolu z komórki) [Nager-Legmann, Margalith 1987, D'Amore i wsp. 1990, Morakile i wsp. 2002, Mishra, Kaur 1991, Thomas i wsp. 1978]. Etanol działa w tym przypadku jak rozpuszczalnik organiczny fosfolipidów stanowiących główny składnik błon komórkowych, co prowadzi do szybkiej dezintegracji struktury komórek drożdżowych.

Wrażliwość drożdży na etanol w czasie wzrostu i fermentacji może być związana ze składem lipidów membrany komórkowej – głównie steroli i nienasyconych kwasów tłuszczowych [Morakile i wsp. 2002, Aquilera i wsp. 2006]. Badania dowodzą, że im dłuższe łańcuchy kwasów tłuszczowych i większy udział steroli oraz nienasyconych kwasów tłuszczowych, tym wyższa odporność komórek na etanol [Ghareib 1988, Rosa, Sa-Coriera 1992].

Skład kwasów tłuszczowych jest cechą osobniczą drożdży i jest on charakterystyczny w każdym szczepie [Cocito, Delfini 1994, Torija i wsp. 2003a]. Wyższe stężenie jednonienasyconych kwasów tłuszczowych (UFA) w błonie cytoplazmatycznej oraz witaminy i proteiny zwiększają odporność na etanol [Ingram, Buttke 1984, D'Amore i wsp. 1987]. Sugeruje to, że szczególnie pożądanymi kwasami tłuszczowymi są kwasy nienasycone (np. oleinowy) [Mannazzu i wsp. 2008, You i wsp. 2003, Thomas i wsp. 1978].

Skład kwasów tłuszczowych (KT) w błonie komórkowej jest bardzo zmienny (specyficznie u pewnych grup mikrobiologicznych) i wyraźnie zależy od czynników środowiska (np. temperatury fermentacji) [Beltran i wsp. 2008] oraz od składu podłoża [Sroka, Tuszyński 2007, Chaung i wsp. 2008], zawartości w nim kwasów tłuszczowych (KT) i fosfolipidów [Benchekroun, Bonaly 1991, Mizoguchi, Hara 1997, Moonjai i wsp. 2002]. Wydaje się to być naturalne, gdyż błona komórkowa jako pierwsza ma kontakt ze środowiskiem, odgrywa więc ważną rolę w transporcie i tolerancji składników obecnych w podłożu, a niewielkie zmiany w jej składzie mogą wpływać na metabolizm komórki [Valero i wsp. 1998, Torija i wsp. 2003b]. W czasie procesu fermentacji drożdże stopniowo zmieniają skład w swoich frakcjach lipidowych, zawartość kwasów nienasyconych (UFA i MUFA) obniża się, a nasyconych (LSFA i MSFA) wzrasta. Skraca się także średnia długość łańcuchów kwasów tłuszczowych [Thomas i wsp. 1978, Bardi i wsp. 1998, Piper 1995, Chi, Arneborg 1999, DiRusso, Black 1999, You i wsp. 2003, Belviso i wsp. 2004, Mannazzu i wsp. 2008]. Wpływ średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych (MSFA) na komórki drożdży jest negatywny – redukują one hydrofobowy charakter błon komórko-

wych, zaburzają działanie enzymów i zmniejszają odporność na etanol [Arneborg i wsp. 2000, Ma, Liu 2010].

Poprawę tolerancji drożdży na stresy można osiągnąć poprzez wzbogacanie podłoży fermentacyjnych w jony różnych pierwiastków. Dobrze w tym zakresie zostały rozpoznane takie pierwiastki jak cynk, wapń czy magnez [Rees, Steward 1997, 1998, 1999, Bafrncova i wsp. 1999, Bonin, Ślusarska 2007, Soyuduru i wsp. 2009]. Jednoczesna suplementacja podłoża jonami Mg^{+2} w ilości $50 \text{ mM}\cdot\text{l}^{-1}$ oraz 1,5% peptonem pozwoliła na wzrost końcowej koncentracji etanolu z 14,2 do 17% (v/v) w czasie 48 godz. fermentacji zacierów VHG [Wang i wsp. 2007, Li i wsp. 2009].

W badaniach własnych zastosowano niekonwencjonalne rozwiązanie w postaci suplementacji podłoża fermentacyjnego jonami Cr(III). Stworzyło to nowe możliwości do zwiększenia wydajności procesów produkcyjnych w technologii VHG. Stwierdzono, że w zacierze 36% (VHG) obecność Cr(III) wpłynęła na wzrost szybkości zużycia cukrów, stopnia ich odfermentowania oraz szybkości tworzenia etanolu. Poprawę efektów fermentacji obserwowano od drugiej doby procesu, co prawdopodobnie związane było z nagromadzeniem jonów chromu w komórkach drożdży gorzelniczych. Obserwowano korzystny wpływ Cr(III) na szybkość i stopień wykorzystania glukozy, maltozy i dekstryn (w przypadku zastosowania drożdży amyloリティcznych). W efekcie końcowym w obecności Cr(III) stwierdzono wyższe stężenie etanolu w próbach fermentowanych przez drożdże *S. cerevisiae* Ethanol Red i *S. diastaticus* ATCC 13007 oraz skrócenie czasu fermentacji z udziałem szczepu *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086.

Wzrost ilości wytworzonego etanolu w zacierach VHG zmienił skład kwasów tłuszczowych badanych drożdży. Obserwowano większe ilości kwasów nasyconych kosztem obniżenia zawartości kwasów nienasyconych w porównaniu z zacierami 20%. W obecności Cr(III) skład kwasów tłuszczowych drożdży podczas fermentacji był bardziej stabilny. Po zakończonym procesie drożdże charakteryzowały się wyższą zawartością kwasów nienasyconych: oleinowego (C18:1) i linolowego (C18:2), które odgrywają istotną rolę w tolerancji drożdży na etanol.

5.5. Wpływ Cr (III) na wybrane cechy drożdży gorzelniczych podczas fermentacji

Drożdże gorzelnicze wykazywały zdolność do akumulacji jonów Cr(III) podczas fermentacji okresowej kukurydzianych zacierów gorzelniczych. Ilość chromu zakumulowana w komórkach podczas fermentacji rosła w każdej dobie procesu, osiągając najwyższe wartości po jego zakończeniu. Zmienne warunki środowiska podczas fermentacji etanolowej związane z obniżeniem pH z wartości 5,0 do około 3,5–4,0 oraz wzrost koncentracji etanolu zapewne wpływały na dynamikę i ilość gromadzonego chromu w komórkach drożdży gorzelniczych. Wpływ dodatku etanolu do podłoża wzrostowego na zdolność bioakumulacji chromu przez drożdże piekarskie oceniali Mapolelo i Torno [2004]. Jak wynikało z ich badań, suplementacja podłoża wzrostowego etanolem wpłynęła na zmniejszenie stopnia wykorzystania chromu z podłoża wzrostowego. Na ilość zakumulowanego chromu przez drożdże gorzelnicze miała również wpływ zawartość ekstraktu w podłożu fermentacyjnym. Drożdże akumulowały wyższe ilości chromu z podłoża VHG z wyjątkiem

szczepu *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Jak wynika z badań prowadzonych przez Mapolelo i Torno [2004], w obecności zwiększającego się stężenia glukozy w podłożu wzrostowym w zakresie od 10 do 60 mM⁻¹ obserwowano zwiększenie ilości chromu w biomacie drożdży piekarskich. Podobne zależności zauważono we wcześniejszych badaniach prowadzonych przez Anderson i wsp. [1978]. W obecności wysokiego stężenia glukozy w podłożu (25%) drożdże piwowarskie akumulowały wyższe ilości chromu. Zjawisko to tłumaczone jest rolą, jaką chrom odgrywa w tolerancji na wysokie stężenie węglowodanów. Zdolność drożdży *S. cerevisiae* do akumulacji chromu podczas fermentacji ocenili także Demirci i Pometto [2000]. Skupili się oni głównie na ocenie zdolności akumulacji oraz tworzenia biologicznie aktywnych kompleksów chromu przez komórki drożdży podczas fermentacji okresowej i ciągłej. Zdaniem autorów ilość zakumulowanego przez komórki drożdży chromu była zależna od jego stężenia w podłożu i sposobu podawania, a nie od systemu fermentacji.

Jak wynika z badań prowadzonych przez Zielińską i Chojnącką [2010] nad biosoprcją jonów Cr(III) przez cjanobakterię *Spirulina maxima* w układzie zamkniętym, pobór jonów chromu odbywał się na zasadzie wymiany jonowej z pierwiastkami zawartymi w komórkach. W podłożu wzrostowym badacze obserwowali wzrost ilości uwalnianych z komórek jonów Na, K, Mg, Ca. W niniejszej pracy nie zauważono podobnych zależności. W obecności Cr(III) w podłożu fermentacyjnym skład wewnątrzkomórkowy pierwiastków drożdży gorzelnicznych był bardziej stabilny. Stwierdzono także, podobnie jak w badaniach innych autorów, że akumulacja i uwalnianie jonów metali przez drożdże w czasie fermentacji są procesami dynamicznymi, uwarunkowanymi zawartością węglowodanów i alkoholu w produkcie [Mochaba i wsp. 1997, Mizoguchi, Hara 1997], a obecność Cr(III) wpływała na utrzymanie wyższego stężenia wewnątrzkomórkowego takich jonów jak: Mg, Zn, Ca. Stopień uwalniania jonów Mg i K przez komórki drożdżowe bezpośrednio po zaszczepieniu do podłoża jest silnie skorelowany z witalnością komórek gęstwy drożdżowej. Pomiar intensywności tego zjawiska można przyjąć jako jedną z metod oceny kondycji fizjologicznej drożdży [Mochaba i wsp. 1997]. Wyższe stężenie składników mineralnych, takich jak: Zn czy Mg, które są kofaktorami wielu enzymów fermentacyjnych, a zarazem regulatorami stresu środowiskowego, ma znaczący wpływ na przebieg procesu fermentacji.

Na dynamikę oraz efekty końcowe procesu fermentacji wpływa również przyrost biomasy. W niniejszej pracy w obecności Cr(III) stwierdzono poprawę dynamiki wzrostu oraz wyższy przyrost biomasy wybranych drożdży gorzelnicznych. Podobne efekty obserwowali Demirci i Pometto [2000]. Wzrost zawartości biomasy jest szczególnie korzystny w początkowym etapie procesu fermentacji zacierów VHG. W warunkach wysokiej zawartości ekstraktu drożdże charakteryzują się dłuższą fazą adaptacji do warunków środowiska oraz obniżeniem tempa i przyrostu biomasy. Dlatego też w technologii VHG zaleca się zwiększenie stężenia biomasy wyjściowej w celu poprawy wydajności procesu i skrócenia fazy zafermentowania [Demibras 2007]. Wpływ Cr(III) na cechy morfologiczne wyrażone zmianą rozmiaru komórek obserwowano jedynie w przypadku szczepu *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086. Szczep ten akumulował największe ilości chromu zarówno z podłoża wzrostowego, jak i fermentacyjnego.

Podsumowując, przeprowadzone w niniejszej pracy badania dotyczą mało znanych zagadnień. Mimo iż szeroko opisywana jest zdolność mikroorganizmów do akumula-

cji Cr(III) oraz rola tych biologicznie aktywnych kompleksów Cr(III) w metabolizmie glukozy czy syntezie kwasów tłuszczowych w komórkach organizmów wyższych, to jednak niewiele wiadomo na temat zdolności drożdży gorzelniczych do gromadzenia chromu w warunkach fermentacji etanolowej oraz jego oddziaływania na dynamikę i stopień wykorzystania węglowodanów, przebieg i efekty końcowe fermentacji zacierów kukurydzianych typu VHG oraz cechy fizjologiczne i morfologiczne drożdży gorzelniczych.

Niniejsza praca dostarcza więc wielu oryginalnych danych na temat wpływu Cr(III) i jego dawki na parametry wzrostu, przyrost biomasy, stan fizjologiczny czy cechy morfologiczne drożdży gorzelniczych oraz ich aktywność fermentacyjną w podłożach modelowych zawierających glukozę. Ponadto potwierdzono zdolność drożdży gorzelniczych do biosorpcji chromu, wskazując na duże zróżnicowanie pomiędzy szczepami. Na podstawie tych obserwacji wybrano optymalną dla badanych drożdży gorzelniczych dawkę Cr(III) oraz etap procesu technologicznego właściwy w jego suplementacji. Mając na uwadze warunki przemysłowe procesu produkcji etanolu, opisano wpływ zróżnicowanej zawartości ekstraktu w zacierach kukurydzianych na przebieg i efekty końcowe fermentacji etanolowej. Wskazano, że mankamentem technologii fermentacji zacierów kukurydzianych o zawartości surowca powyżej 32% (VHG) jest relatywnie niższa efektywność konwersji węglowodanów do etanolu, a skutecznym remedium w takiej sytuacji może być suplementacja zacierów VHG jonami Cr(III). Ważne zarówno z poznawczego, jak i praktycznego punktu widzenia są wyniki potwierdzające korzystny wpływ Cr(III) w dawce $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ na dynamikę i stopień wykorzystania węglowodanów, szybkość produkcji etanolu oraz wydajność procesu podczas fermentacji zacierów typu VHG. Po raz pierwszy prześledzono wpływ Cr(III) na metabolizm nie tylko glukozy, ale także innych węglowodanów (maltotriozy czy dekstryn) z udziałem drożdży amylolytycznych. Nie potwierdzono przydatności Cr(III) w technologii fermentacji zacierów o zawartości surowca 20%. Suplementacja podłoża fermentacyjnego Cr(III) może być brana pod uwagę przy opracowywaniu procesu produkcji etanolu z zacierów kukurydzianych typu VHG w gorzelniach, ponadto wzbogacenie biomasy drożdży znacznie podniesie wartość paszową wywaru. Uzyskane wyniki mają istotne znaczenie aplikacyjne. Wzrost wydajności etanolu czy skrócenie czasu fermentacji wpływają korzystnie na zwiększenie efektywności pracy gorzelni, jej przepustowości, a w efekcie obniżenie kosztów produkcji, co ma istotne znaczenie w realizacji zamierzeń polityki produkcji biopaliw płynnych.

Korzyści z tego typu badań nie ograniczają się tylko do bliższego poznania aspektów praktycznych fermentowania zacierów kukurydzianych wzbogaconych w Cr(III), ale mają także walory poznawcze.

Nowością w pracy była ocena zdolności akumulacji chromu przez drożdże gorzelnicze podczas fermentacji etanolowej zacierów kukurydzianych. Odnotowano wyższe ilości chromu w biomacie drożdży fermentującej zacieru VHG. Jednocześnie ze względu na fakt uczestnictwa Cr(III) w metabolizmie kwasów tłuszczowych istotnym poznawczym aspektem pracy była ocena jego wpływu na skład nasyconych i nienasyconych kwasów tłuszczowych w komórce drożdży, który dotychczas również nie był badany. Stwierdzono, iż w obecności Cr(III) drożdże charakteryzowały się wyższą zawartością kwasów nienasyco-

nych: oleinowego (C18:1) i linolowego (C18:2), które odgrywają istotną rolę w tolerancji drożdży na etanol.

Pozytywne efekty uzyskane w pracy skłaniają do dalszych badań w zakresie wykorzystania Cr(III) w technologii VHG z uwzględnieniem różnych systemów fermentacji oraz oceną wartości paszowej wywaru zawierającego drożdże wzbogacone jonami Cr(III).

6. Wnioski

1. Obecność Cr(III) w podłożach wzrostowych drożdży gorzelnicznych nieprzekraczająca $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ owocowała korzystniejszą dynamiką i parametrami ich wzrostu, poprawą przyrostu biomasy oraz zwiększonym udziałem komórek pączkujących, natomiast wyższa od $156 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ skutkowała wzrostem ilości komórek nieaktywnych, zmniejszeniem udziału komórek pączkujących oraz pogorszeniem przyrostu biomasy. Dodatek Cr(III) nie wpływał na cechy morfologiczne drożdży z wyjątkiem szczepu *S. diastaticus* ATCC 13007, którego komórki miały w jego obecności większą średnicę.
2. Wprowadzenie Cr(III) bezpośrednio do podłoża fermentacyjnego YPG zdynamizowało fermentację i skróciło fazę zafermentowania glukozy. Aktywność fermentacyjna drożdży poprawiała się, z wyjątkiem *S. cerevisiae* D2, wraz ze wzrostem stężenia Cr(III).
3. Wzrost zawartości surowca w zacierach kukurydzianych różnicował wydajność biosyntezy etanolu, która była najwyższa w zacierach 20 i 24%. Zawartość surowca wyższa od 36% skutkowała obniżeniem wydajności procesu, stopnia odfermentowania, wzrostem ilości nieprzefermentowanych węglowodanów oraz pogorszeniem stanu fizjologicznego drożdży. Dodatek $60 \text{ mg Cr(III)}\cdot\text{l}^{-1}$ poprawił parametry kinetyczne fermentacji zacierów o wysokiej zawartości ekstraktu (VHG). Stwierdzono wzrost szybkości zużycia cukrów, produkcji etanolu, stopnia wykorzystania węglowodanów, a także stężenia etanolu o $12 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (*S. diastaticus* ATCC 13007) i $7 \text{ g}\cdot\text{l}^{-1}$ (*S. cerevisiae* Etanol Red). Jedynie szczep *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 nie wytworzył większych ilości etanolu w obecność Cr(III), ale przyspieszył jego biosyntezę o dobę. Dodatek Cr(III) nie wpłynął na przebieg i efekty końcowe fermentacji zacierów 20%.
4. Drożdże akumulowały Cr(III) zarówno podczas wzrostu na podłożu YPG, jak i fermentacji zacierów kukurydzianych suplementowanych $\text{CrCl}_3\cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Najwięcej chromu akumulowały drożdże *Schwanniomyces occidentalis*, a najmniej *S. cerevisiae* Ethanol Red. Podczas fermentacji zacierów VHG zawartość chromu w komórkach drożdży rodzaju *Saccharomyces* była wyższa niż w zacierach 20%.
5. Dodatek Cr(III) w ilości $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ do zacierów kukurydzianych powodował poprawę dynamiki wzrostu oraz większy przyrost biomasy w porównaniu z próbami niesuplementowanymi. Nie stwierdzono wpływu obecności Cr(III) na rozmiar komórek drożdży z rodzaju *Saccharomyces*.

6. W obecności Cr(III) w komórkach drożdży oznaczono wyższą zawartość Mg, Ca i Zn oraz niższą K i Na, zarówno w trakcie fermentacji, jak i po jej zakończeniu. Najbardziej stabilnym składem oznaczanych pierwiastków charakteryzowały się komórki szczepu *S. diastolicus* ATCC 13007 w czasie fermentacji zacierów 20%.
7. Dodatek Cr(III) do zacierów kukurydzianych skutkowało wyższą zawartością w biomacie pofermentacyjnej drożdży nienasyconych kwasów tłuszczowych. W efekcie współczynnik UFA/SFA (ilości kwasów nienasyconych do nasyconych) był wyższy w komórkach drożdży fermentujących zacieru suplementowane jonami Cr(III).

7. Piśmiennictwo

- Ackman R.G., 1998. Remarks on official methods employing boron trifluoride in the preparation of methyl esters of the fatty acids of fish oils. *JAOCS*, 75 (4), 541–547.
- Agu R.C., Brinhurst T.A., Brosnan J.M., Jack F.R., 2008. Effect of process conditions on alcohol yield of wheat, maize and other cereals. *J. Inst. Brew.*, 114, 39–44.
- Aguilera F., Peinado R.A., Millán C., Ortega J.M., Mauricio J.C., 2006. Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 110, 34–42.
- Alkasrawi M., Eriksson T., Börjesson J., Wingren A., Galbe M., Tjerneld F., Zacchi G., 2003. The effect of Tween-20 on simultaneous saccharification and fermentation of softwood to ethanol. *Enzyme Microb. Tech.*, 33, 71–78.
- Alper H., Moxley J., Nevoigt E., Fink G.R., Stephanopoulos G., 2006. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science Magazine*, 5805 (314), 1565–1568.
- Anderson A.A., Polansky M.M., Roginski E.E., Mertz W., 1978. Factors affecting the retention and extraction of yeast chromium. *J. Agric. Food Chem.*, 26, 858–861.
- Anuradha R., Suresh A.K., Venkatesh K.V., 1999. Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process Biochem.*, 35, 367–375.
- Arneborg N., Jespersen L., Jakobsen M., 2000. Individual cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Zygosaccharomyces bailii* exhibit different short-term intracellular pH responses to acetic acid. *Arch. Microbiol.*, 174, 125–128.
- Bafrcova P., Smogrovicowa D., Slavikova I., Patkova J., Domeny Z., 1999. Improvement of very high gravity ethanol fermentation by media supplementation using *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Lett.*, 21, 337–341.
- Bag H., Turker A.R., Lale M., Tunceli A., 2000. Separation and speciation of Cr(III) and Cr(VI) with *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on sepiolite and determination of both species in water by FAAS. *Talanta*, 51, 895–902.
- Bagchi D., Stohs S.J., Downs B.W., Bagchi M., Preuss H. 2002 Cytotoxicity and oxidative mechanisms of different forms of chromium. *Toxicol.*, 180, 5–22.
- Bai F.W., Chen L.J., Zhang Z., Anderson W.A., Moo-Young M., 2004. Continuous ethanol production and evaluation of yeast cell lysis and viability loss under very high gravity medium conditions. *J. Biotechnol.*, 110, 287–293.
- Bal M.A., 2006. Effects of hybrid type, stage of maturity and fermentation length on whole plant corn silage quality. *Turk. J. Vet. Anim. Sci.*, 30, 331–336.
- Balk E., Tatsioni A., Lichtenstein A., Lau J., Pittas A, 2007. Effect of chromium supplementation on glucose metabolism and lipids. *Diabetes Care*, 30, 2154–2163

- Bardi L., Crivelli C., Marzona M., 1998. Esterase activity and release ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. *Can. J. Microbiol.*, 44, 1171–1176.
- Batic M., Raspor P., 2000. Effect of cultivation mode on a bioprocess for chromium yeast biomass enrichment. *Plugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 439, 73–75.
- Beltran G., Novo M., Guillamon J.M., Mas A., Rozes N., 2008. Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int. J. Food Microbiol.*, 121, 169–177.
- Belviso S., Bardi L., Bartolini A.B., Marzona M., 2004. Lipid nutrition of *Saccharomyces cerevisiae* in winemaking. *Can. J. Microbiol.*, 50, 657–667.
- Benckekroun K., Bonaly R., 1991. Physiological properties and plasma membrane composition of *Saccharomyces cerevisiae* grown in sequential batch culture and in the presence of surfactants. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 673–678.
- Beran M., Stahl R., Beran J.M., 1995. Gycaemic activity of chromium (III)- β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate complex and its presence in yeast extracts. *Analyst*, 120, 979–981.
- Berbert H., Yohannan B.K., Bringham T.A., Brosnan J.M., Pearson S.Y., Walker J.W., Walker G.M., 2009. Evaluation of a Brazilian fuel alcohol yeast strain for scotch whisky fermentation. *J. Inst. Brew.*, 115, 198–207.
- Blackwell K.J., Singleton I., Tobin J.M., 1995. Metal cation uptake by yeast: a review. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 43, 579–584.
- Błażej S., Duszkiwicz-Reinhard W., Gniewosz M., Mazurkiewicz B., 2004. Lokalizacja magnezu w komórkach drożdży paszowych *Candida utilis* ATCC 9950 wzbogaconych w ten pierwiastek. *Acta Sci. Techno.*, 3, 95–110.
- Błażej S., Duszkiwicz-Reinhard W., Gniewosz M., Chojnacka M., 2002. Wpływ pH na zdolność wiązania magnezu przez drożdże paszowe *Candida utilis* ATCC 9950 podczas hodowli węgłbnej. *Acta. Sci. Techno.*, 4, 47–57.
- Bonin S., Ślusarska M., 2007. Wpływ dodatku soli magnezu i wapnia do wysokocukrowych nastawów na proces fermentacji winiarskiej i przyrost biomasy drożdży, *Żywn. Nauk. Technol. Jak.*, 4 (53), 109–119.
- Bortkun O., 2003. Wykorzystanie wysokoenergetycznych odmian kukurydzy do produkcji biopaliw. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 11, 19.
- BS EN ISO 10520:1998, 1998. Native starch. Determination of starch content. Evers polarimetric method, ISBN: 0 580 30395 0.
- Bvochora J.M., Read J.S., Zvauya R., 1999. Application of very high gravity technology to the cofermentation of sweet sorghum juice and sorghum grain. In. *Crop. Prod.*, 11, 11–17.
- Carmona T.A., Jiménez A., Fernández Lobato M., 2002. Analysis of the *Schwanniomyces occidentalis* SWA2 gene promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 207, 69–73.
- Chatterjee N., Luo Z., 2010. Cr-(III)-organic compounds treatment causes genotoxicity and changes in DNA and protein level in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ecotoxicology*, 19, 593–603.
- Chi Z., Arneborg N., 1999. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.*, 86, 1047–1052.
- Chi Z., Jianguo L., Ping X., 1995. Studies on high concentration ethanol fermentation from cooked corn starch by using medium-temperature cooking process, *Chinese J. Biotechnol.*, 11, (3), 171–176.
- Chi Z., Zirong L., 1994. Studies on high concentration ethanol fermentation of raw ground corn by *Saccharomyces* sp. H0, *Chinese J. Biotechnol.*, 10, (2), 113–119.

- Chmielewska J., Kawa-Rygielska J., 2010. Aktywność fermentacyjna drożdży gorzelnicznych w obecności jonów cynku. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 9 (1), 3–14.
- Chmielewska J., Kawa-Rygielska J., Zięba T., 2007. Ethanol fermentation of maize mashes. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 57, 85–89.
- Chuang X., Xin-Qing Z., Wen-Jie Y., Feng-Wu B., 2008. Improving ethanol tolerance of a self-flocculating yeast by optimization of medium composition. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 2257–2261.
- Cocito C., Delfino C., 1994. Simultaneous determination by GC of free and combined fatty acids and sterols in grape musts and yeasts as silylated compounds. *Food Chem.*, 50, 297–305.
- Converti A., Perego P., Lodi A., 1984. A kinetic study of *Saccharomyces* strains: performance at high sugar concentrations. *Biotechnol. Bioeng.*, 27, 1108–1114.
- Czupryński B., Kotarska K., 2003. Badania zmian lepkości podczas zacierania i fermentacji zacieru żytniego i kukurydzianego sporządzonego metodą bezciśnieniowego uwalniania skrobi (BUS). Aktualne problemy gorzelnictwa rolniczego, 11–17.
- D'Amore T., Stewart G.G., 1987. Ethanol tolerance of yeast. *Enzym. Microb. Tech.*, 9, 322–330.
- D'Amore T., 1990. A study of ethanol tolerance in yeast. *Crit. Rev. Biotechnol.*, 9, 287–304.
- D'Amore T., Panchal C.J., Stewart G.G., 1988. Intracellular ethanol accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Envir. Microbiol.*, 54, 110–114.
- Davies C.M., Vincent J.B., 1997. Chromium in carbohydrate and lipid metabolism. *J. Biol. Inorg. Chem.*, 2, 675–679.
- De Freitas J., Wintz H., Hyon Kin J., Poynton H., Fox T., Vulpe C., 2003. Yeast, a model organism for iron and copper metabolism studies. *BioMetals*, 16, 185–197.
- De Nicola R., Hall N., Melville S.G., Walker G.M., 2009. Influence of zinc on distiller's yeast: cellular accumulation of zinc and impact on spirit congeners. *J. Inst. Brew.*, 115, 265–271.
- Demirbas A., 2007. Progress and recent trends in biofuels. *Prog. Energ. Combust.*, 33, 11–8.
- Demirci A., Pometto A.L., 2000. Enhanced organically bound chromium yeast production. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 531–536.
- Devantier R., Pedersen S., Olsson L., 2005. Characterization of very high gravity ethanol fermentation of corn mash. Effect of glucoamylase dosage, pre-saccharification and yeast strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 68, 622–629.
- Dias M., Pereira da Cunha M., Filho R., Bonomi A., Jesus Ch., Rossell C., 2011. Simulation of integrated first and second generation bioethanol production from sugarcane: comparison between different biomass pretreatment methods. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 38, 955–966.
- Ding W.J., Qian Q.F., Hou X.L., Feng W.Y., Chai Z.F., Wangke, 2000. Determination of chromium combined with DNA, RNA and proteins in chromium-rich brewer's yeast by NAA. *J. Radioanal Nuc Chem.*, 244, 259–262.
- DiRusso C.C., Black P.N., 1999. Long-chain fatty acid transport in bacteria and yeast. Paradigms for defining the mechanism underlying this protein-mediated process. *Mol. Cell Biochem.*, 192, 41–52.
- Duszkiewicz-Reinhard W., Gniewosz M., Błażej S., Bańkowski A., 2002. Badanie zdolności wiązania magnezu przez drożdże piekarskie *Saccharomyces cerevisiae* w warunkach hodowli stacjonarnej. *Acta Sci. Techno.*, 1, 17–26.
- Dziuba E., Kawa-Rygielska J., 2003. Charakterystyka wybranych cech biotechnologicznych hybrydów drożdży *Saccharomyces* i *Schwanniomyces*. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 2003, 2 (1–2), 67–72.
- Edens N.K., Reaves L.A., Bergana M.S., Reyzer I.L., O'Mara P., Baxter J.H., Snowden M.K., 2002. Yeast extract stimulates glucose metabolism and inhibits lipolysis in rat adipocytes in vitro. *Am. Soc. Nutr. Sci.*, 132, 1141–1148.

- Eide D.J., 1998. The molecular biology of metal ion transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu. Rev. Nutr.*, 18, 441–469.
- Ferraz A.I., Teixeira J.A., 1999. The use of flocculating brewer's yeast for Cr(III) and Pb(II) removal from residual wastewaters. *Bioprocess Eng.*, 21, 431–437.
- Ferreira I., Pinho O., Vieira E., Tavarella J.G., 2010. Brewer's *Saccharomyces* yeast: characteristics and potential applications. *Trends Food Sci. Tech.*, 21, 77–84.
- Gadd G.M., Griffiths A.J., 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.*, 4, 303–317.
- Galuszka G., Cieślak-Golonka M., Szeląg A., Starosta J., Wojciechowska A., 1998. Synthetic models for the glucose tolerance factor: the spectroscopic characterization and toxicity studies of monomeric and dimeric Cr(III) species. *Polyhedron*, 17, 3785–3794.
- Ghareib M., 1988. Ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* and its relationship to lipid content and composition. *Folia Microbiol.*, 33, 447–452.
- Grajek W., Szymanowska D., 2008. Stresy środowiskowe działające na drożdże *Saccharomyces cerevisiae* w procesie fermentacji etanolowej. *Biotechnologia*, 3 (82), 46–63.
- Grajek W., Walkowiak-Tomczak D., 1993. Rola błony plazmatycznej w tolerancji drożdży na etanol. *Biotechnologia* 3 (22), 157–165.
- Graves T., Nerendranath N., Power R., 2007. Development of a „stress model” fermentation system for fuel ethanol yeast strains. *J. Inst. Brew.*, 113, 263–271.
- Gulami M., Kohlman K., Ladisch M.R., Hespell R., Bothast R.J., 1996. Assessment of ethanol production options for corn products. *Bioresource Technol.*, 58, 253–264.
- Haq R., Shakoori A.R., 1998. Short Communication: Microbiological treatment of industrial waste containing toxic chromium involving successive use of bacteria, yeast and alga. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 14; 583–585.
- Heggart H.M., Margaritis A., Pilkington H., Stewart R.J., Dowhanick T.M., Russell I., 1999. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics. *Technical quarterly – Master Brewers Association of America*, 36, 1383–1406.
- Holdsworth E.S., Neville E., 1990. Effects of extracts of high- and low-chromium brewer's yeast on metabolism of glucose by hepatocytes from rats fed on high or low-Cr diets. *Brit. J. Nutr.*, 63, 623–630.
- Horn Ch., Preez J.C., Kilian S.G., 1992. Fermentation of grain sorghum starch by co-cultivation *Schwanniomyces occidentalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Bioresource Technol.*, 42, 27–31.
- Hounsa C.G., Brnadt E.V., Thevelein J., Hohmann S., Prior B.A., 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology*, 144, 671–680.
- IngledeW W.M., 1993. Yeasts for production of fuel ethanol. *Cereal Chem.*, 5, 245–291.
- IngledeW W.M., 1987. *Schwanniomyces*: a potential superyeast, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 5, (2), 159–171.
- Ingram L.O., Buttke T.M., 1984. Effects of alcohol on microorganisms. *Adv. Microb. Physiol.*, 25, 256–300.
- Isci A., Murphy P., Anex R., Moore K., 2008. A rapid simultaneous saccharification and fermentation (SSF) Technique to determine ethanol yields. *Bioenerg. Res.*, 1, 163–169.
- Jain S.K., Rains J.L., Road J.L., 2007. Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- α , IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides and cholesterol levels in blood of streptozocin-treated diabetic rats. *Free Rad. Biol. Med.*, 43, 1124–1131.
- Jianlong W., Zeyu M., Xuan Z., 2004. Response of *Saccharomyces cerevisiae* to chromium stress. *Process Biochem.*, 39, 1231–1235.

- Jimenez J., Benitez T., 1987. Adaptation of Yeast Cell Membranes to Ethanol. *Appl. Environ. Microbiol.*, 1196–1198.
- Juvera-Espinosa J., Morales-Barrera L., Cristiani-Urbina E., 2006. Isolation and characterization of a yeast strain capable of removing Cr(VI). *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 114–121.
- Kaewkhomdee N., Mounicou S., Szpunar J., Lobinski R., Shiowatana J., 2010. Characterization of binding and bioaccessibility of Cr in Cr-enriched yeast by sequential extraction followed by two-dimensional liquid chromatography with mass spectrometric detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 1355–1364.
- Kapela T., Solarek L., 2005. Enzymy Nowozymes dla gorzelnictwa – nowoczesne preparaty scukrzające z grupy SAN[®] oraz enzymy pomocnicze. *Przem. Ferm. Owoc.-Warz.*, 5, 26–28.
- Karimi K., Emtiazi G., Taherzadeh M.J., 2006. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with *Mucor indicus*, *Rhizopus oryzae*, and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 40, 138–144.
- Kaszycycki P., Fedorovych D., Ksheminska H., Babyak L., Wójcik D., Koloczek H., 2004. Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microbiol. Res.*, 159, 11–17.
- Kavalov B., 2004. Biofuels Potential in the EU, Report EUR 21012 EN, Report for the Institute for Perspective Technological Studies, European Commission Joint Research Centre.
- Kawa-Rygielska J., 2002. Ulepszanie drożdży przemysłowych metodą fuzji protoplastów – otrzymanie hybridów. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 1 (1–2), 37–46.
- Kawa-Rygielska J., 2004. Obtaining hybrids of distillery yeasts characterized by the ability of fermenting starch, *EJPAU* 7 (2), art. 02.
- Kawa-Rygielska J., 2007. Bioetanol z kukurydzy – czy warto produkować? *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 5, 38–39.
- Kawa-Rygielska J., 2009. Intensyfikacja produkcji etanolu. Nowe, energooszczędne i wydajne technologie. *Agro Przem.*, 2, 32–33.
- Kawa-Rygielska J., Dziuba E., 2006. Kukurydza do produkcji bioetanolu. *Chemia przemysłowa. BMP*, 20–22.
- Kirpnick-Sobol Z., Reliene R., Schiestl R.H., 2006. Carcinogenic Cr(VI) and the nutritional supplement Cr(III) induce DNA deletions in yeast and mice. *Cancer Res.*, 66, 3480–3484.
- Kłowski G., Czupryński B., Wolska M., 2006. Characteristics of alcoholic fermentation with the application of *Saccharomyces cerevisiae* yeast: As-4 nad I-7–43 fusant with amylolytic properties. *J. Food Eng.* 76, 500–505.
- Kłowski G., Mikulski D., Czupryński B., Kotarska K., 2010. Characterization of fermentation of high-gravity maize mashes with the application of pullulanase, proteolytic enzymes and enzymes degrading non-starch polysaccharides. *J. Biosci. Bioeng.*, 5, 466–471.
- Kondo A., Shigechi H., Abe M., Uyama K., Matsumoto T., Takahashi S., Ueda M., Tanaka A., Kishimoto M., Fukuda H., 2002. High-level ethanol production from starch by a flocculent *Saccharomyces cerevisiae* strain displaying cell-surface glucoamylase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 291–296.
- Korhola M., 1987. Yeast in the alcohol industry, *EBC Congress*, 105, 119.
- Kovacs R., Beni A., Karosi R., Sogor C., Posta J., 2007. Investigation of chromium content in food-stuffs and nutrition supplements by GFAAS and determination of changing Cr(III) to Cr(VI) during baking and toasting bread. *Food Chem.*, 105, 1209–1213.
- Kręgiel D., 2005. Efekt Kluyvera u drożdży *Schwanniomyces* sp. *Postęp. Mikrobiol.*, 44, 39–45.
- Krishnan M.S., Taylor F., Davison B.H., Nghiem N.P., 2000. Economic analysis of fuel ethanol production from corn starch using fluidized-bed bioreactors. *Bioresource Technol.*, 75, 99–105.
- Krzysik M., Grajeta H., 2010. Rola chromu w etiopatogenezie wybranych chorób. *Bromat. Chem. Toksykol.*, 3, 428–435.

- Ksheminska H., Fedorovych D., Babyak L., Yanovych D., Kaszycki P., Koloczek H., 2005. Chromium(III) and (VI) tolerance and bioaccumulation in yeast: a survey of cellular chromium content in selected strains of representative genera. *Process Biochem.*, 40, 1565–1572.
- Ksheminska H., Fedorovych D., Honchar T., Ivash M., Gonchar M., 2008. Yeast tolerance to chromium depends on extracellular chromate and Cr(III) chelation, *Food Technol. Biotechnol.*, 46, 419–426.
- Kunachowicz H. (red.), 1997. Wybrane metody analityczne oceny wartości odżywczej żywności. Prace IŻŻ 83, Warszawa.
- Kupczyk A., 2007. Bioetanol – wybrane aspekty rynkowe (1). *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 51 (6), 23–24.
- Kupczyk A., Ruciński D., 2008. Stan aktualny i perspektywy rozwoju krajowego sektora urządzeń do produkcji biopaliw transportowych. *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 1, 25–27.
- Kupczyk A., 2008. Biopaliwa w Unii Europejskiej po 2010 r. – perspektywy Europy Centralnej i Wschodniej., *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 6, 40.
- Lages F., Lucas C., 1997. Contribution to the physiological characterization of glycerol active uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1322, 8–18.
- Laluce C., Mattoon J., 1984. Development of rapidly fermenting strains of *Saccharomyces diastaticus* for direct conversion of starch and dextrin to ethanol, *Appl. Environ. Microbiol.*, 48, 17–25.
- Laopaiboon L., Nuanpeng S., Srinophakun P., Klarnit P., Laopaiboon P., 2009. Ethanol production from sweet sorghum juice using very high gravity technology: Effects of carbon and nitrogen supplementations. *Bioresource Technol.*, 100, 4176–4182.
- Leiper K.A., Schlee C., Tebble I., Stewart G.G., 2006. The fermentation of beet sugar syrup to produce bioethanol. *J. Inst. Brew.*, 112, 122–133.
- Li J., Huang W., Wang X., Tang T., Hua Z., Yan G., 2010. Improvement of alcoholic fermentation by calcium ions under enological conditions involves the increment of plasma membrane H⁺-ATPase activity. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 1181–1186.
- Linde M., Galbe M., Zacchi G., 2007. Simultaneous saccharification and fermentation of steam-pretreated barley straw at low enzyme loadings and low yeast concentration. *Enzyme Mikrob. Technol.*, 40, 1100–1107.
- Lipski S., 2003. Kukurydza surowcem do produkcji etanolu jako komponenta biopaliw – zalety, możliwości, perspektywy. *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.*, 2, 40–41.
- Liu J., Zhang B., He X., Zhang P., Chai Z., 2001. Selection of high biomass, chromium-rich yeast strain and optimization of cultivation conditions. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 27, 195–198.
- Lynd L.R., Cushman, J.H.R., Nichols, J. and Wyman C.E., 1991. Fuel ethanol from cellulosic biomass. *Science Magazine.*, 251, 1318–1323.
- Ma M., Liu Z., 2010. Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 87, 829–945.
- Man You K., Rosenfield C., Knipple D.C., 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependant on cellular oleic acid content. *Appl. Environ. Microbiol.*, 69, 1499–1503.
- Mannazzu I., Angelozzi D., Belviso S., Budroni M., Farris G.A., Goffrini P., Lodi T., Marzona M., Bardi L., 2008. Behaviour of *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during adaptation to unfavourable conditions of fermentation on synthetic medium: Cell lipid composition, membrane integrity, viability and fermentative activity. *Int. J. Food. Microbiol.*, 121, 84–91.
- Mapolelo M., Torto N., 2004. Trace of metal ions in aquatic environments by *Saccharomyces cerevisiae*. *Talanta*, 64, 39–47.
- Mertz W., 1993. Chromium in human nutrition: a review. *J. Nutr.*, 626–663.
- Mertz W., Schwarz K., 1955. Impaired intravenous glucose tolerance as an early sign of diet ray necrotic liver degeneration. *Arch. Biochem. and Biophys.*, 58, 504–506.

- Michalski T., 2005. Możliwości zwiększenia w Polsce produkcji kukurydzy i jej wykorzystania w rolnictwie i przemyśle. *Więś Jutra*, 3 (80), 3–5.
- Michalski T., 2007. Kukurydza – doskonały surowiec do produkcji biopaliw. *Agro Serwis*, Kukurydza – nowe możliwości, 3–9.
- Miranda Jr.M., Batistote M., Cilli E.M., Ernandes J.R., 2009. Sucrose fermentation by Brazilian ethanol production yeasts in media containing structurally complex nitrogen sources. *J. Inst. Brew.*, 115, 191–197.
- Mishra P., Kaur S., 1991. Lipids as modulators of ethanol tolerance in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 697–702.
- Mishra S., Doble M., 2008. Novel chromium tolerant microorganisms: Isolation, characterization and their biosorption capacity. *Ecotox. Environ. Safe.*, 71, 874–879.
- Mizoguchi H., Hara S., 1997. Ethanol-induced alterations in lipid composition of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of exogenous fatty acid. *J. Ferment. Bioeng.*, 83, 12–16.
- Mochaba F.M., O'Connor-Cox E.S.C., Axcell B.C., 1997. A novel and practical yeast vitality method based on magnesium ion release. *J. Inst. Brew.*, 103, 99–102.
- Moonjai N., Verstrepen K.J., Delavaux F.R., Derdelinckx G., Verachtert H., 2002. The effects of linoleic acid supplementation of cropped yeast on its subsequent fermentation performance and acetate ester synthesis. *J. Inst. Brew.*, 108, 227–235.
- Moore G.R., Pettigrew G.W., 1990. *Cytochrome C*, New York: Springer – Verlag, 209–212.
- Morakile G., Kock J.L.F., Botes P.J., 2002. The use of fatty acid and sterol analyses as quality control methods in the brewing industry. *J. Inst. Brew.*, 108, 160–163.
- Musiał I., Juszczyk P., Rymowicz W., Kinal S., 2005. Produkcja drożdży paszowych *Yarrowia lipolytica* wzbogaconych w selen i chrom; *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 4 (1–2), 55–64.
- Nagar-Legmann R., Margalith P., 1987. A comparative study of the lipid composition of yeasts with different fermentative capacities. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 49–54.
- Nikolić S., Mojović L., Pejinić D., Rakin M., Vucurović V., 2008. Improvement of ethanol fermentation of corn Semolina hydrolyzates with immobilized yeast by Medium Supplementation, *Food Technol. Biotechnol.*, 47 (1), 8–389.
- Offenbacher E., Rinko C.J., Pi-Sunyer X., 1985. The effects of inorganic chromium and brewer's yeast on glucose tolerance, plasma lipids, and plasma chromium in elderly subjects. *Am. J. Clin. Nutr.*, 42, 454–461.
- Ohgren K., Bura R., Lesnicki G., Saddler J., Zacchi G., 2007. A comparison between simultaneous saccharification and fermentation and separate hydrolysis and fermentation using steam-pretreated corn stover. *Process Biochem.*, 42, 834–839.
- Ohgren K., Rudolf A., Galbe M., Zacchi G., 2006. Fuel ethanol production from steam-pretreated corn stover using SSF at higher dry matter content. *Biomass Bioenerg.*, 30, 863–869.
- Olofsson K., Bertilsson M., Lidén G., 2008. A short review on SSF – an interesting process option for ethanol production from lignocellulosic feedstocks. *Biotechnol. Biofuels*, 1, 1–7.
- Ono B., Weng M., 1982. Chromium resistant mutants of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, 6, 71–77.
- Ozer A., Ozer D., 2003. Comparative study of the biosorption of Pb(II), Ni(II) and Cr(VI) ions onto *S. cerevisiae*: determination of biosorption heats. *J. Hazard. Mater.*, 100, 219–229.
- Pagani A., Villareal L., Capdevilla M., Atrian S., 2007. The *Saccharomyces cerevisiae* Crs5 Metallothionein metal-binding abilities and its role in the response to zinc overload. *Mol. Microbiol.*, 63, 256–269.
- Pas M., Mialacic R., Draslar K., Pollak N., Raspor P., 2004. Uptake of chromium(III) and chromium(VI) compounds in the yeast cell structure. *BioMetals*, 17, 25–33.

- Pereira F.B., Guimaraes P.M.R., Teixeira J.A., Domingues L., 2010. Optimization of low-cost medium for very high gravity ethanol fermentations by *Saccharomyces cerevisiae* using statistical experimental designs. *Bioresource Technol.*, 101, 7856–7863.
- Piddocke M.P., Kreis S., Heldt-Hansen H.P., Nielsen K.F., Olsson L., 2009. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 84, 453–464.
- Pina C., Snatos C., Couto J.A., Hogg T., 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* – influence of different culture conditions. *Food Microbiol.*, 21, 439–447.
- Piper P., 1995. The heat shock and ethanol stress response of yeasts inhibit extensive similarity and functional overlap. *FEMS, Lett. Appl. Microbiol.*, 134, 121–127.
- Poljsak B., Poci I., Raspor P., Pestl M., 2009. Interference of chromium with biological systems in yeasts and fungi: a review. *J. Basic Microb.*, 49, 1–16.
- Poreda A., Antkiewicz P., Makarewicz M., 2007. Jony metali, ich rola i regulacja wewnątrzkomórkowego stężenia w drożdżach piwowskich, 2007. Materiały z XII Szkoły Technologii Fermentacji, Wrocław, 74–92.
- Poreda A., Antkiewicz P., Tuszyński T., Makarewicz M., 2009. Accumulation and release of metal ions by brewer's yeast during successive fermentations. *J. Inst. Brew.*, 115, 78–83.
- Prasad S., Singh A., Joshi H., 2007. Ethanol as an alternative fuel from agricultural, industrial and urban residues. *Resources, Conserv. Recycling*, 1 (50), 1–39.
- Pratt P.L., Bryce J.H., and Stewart G.G., 2003. The effects of osmotic pressure and ethanol on yeast viability and morphology. *J. Inst. Brew.*, 109 (3), 218–228.
- Ramos R.L., Rubio L.F., Coronado P.M., Barron J.M., 1995. Adsorption of trivalent chromium from aqueous solution onto activated carbon. *J. Chem. Tech. Biotechnol.* 12, 64–67.
- Rapaport A.I., Muter O.A., 1995. Biosorption of hexavalent chromium by yeast. *Process Biochem.*, 30, 145–149.
- Raspor P., Batic M., Jamnik P., Josic D., Milacic R., Pas M., Recek M., Rezić-Dereani V. Skrt M., 2000. The influence of chromium compounds on yeast physiology (a review). *Acta Microbiol. Immunol. Hung.*, 47, 143–173.
- Reddy L.V.A., Reddy O.V.S., 2006a. Rapid and enhanced production of ethanol in very high gravity (VHG) sugar fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*: Role of finger millet (*Eleusine coracana* L.) flour. *Process Biochem.*, 41, 726–729.
- Reddy L.V.A., Reddy O.V.S., 2006b. Improvement of ethanol production in very high gravity fermentation by horse gram (*Dolichos biflorus*) flour supplementation, *Lett. Appl. Microbiol.*, 41, 440–444.
- 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.
- Rees E., Stewart G.G., 1998. Strain specific response of brewer's yeast strains to zinc concentrations in conventional and high gravity worts. *J. Inst. Brew.*, 104, 221–228.
- Rees E., Stewart G.G., 1999. Effects of magnesium, calcium and wort oxygenation on the fermentative performance of ale and lager strains fermenting normal and high gravity worts. *J. Inst. Brew.*, 105, 211–217.
- Rolland F., Winderickx J., Thevelin J.M., 2002. Glucose – sensing and signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res.*, 2, 183–201.
- Rosa M.F., Sa-Correia I., 1992. Ethanol tolerance and activity of plasma – membrane ATPase in *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme. Microb Tech.*, 14, 23–27.
- Rose A.H., Harrison J.S., 1993. The yeasts, 2nd ed. *Yeast Technology*. Academic Press, New York. *Int. J. Food Microbiol.*, 5, 436–516.

- Rutherford J.C., Bird A.J., 2004. Metal-responsive transcription factors that regulate iron, zinc, and copper homeostasis in eukaryotic cells. *Eukaryot. Cell*, 3, 1–13.
- Sanchez O., Cardona C., 2008. Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks. *Bioresource Technology*, 99, 5270–5295.
- Schroeder H.A., Balassa J.J., Tipton I.H., 1962. Abnormal trace metals in man: chromium; *J. Chron. Dis.*, 15, 941–964.
- Schwarz K., Mertz W., 1959. Chromium (III) and the glucose tolerance factor; *Arch. Biochem. Biophys.*, 85, 292–295.
- Sieliwanowicz B., 2003. Żyto i kukurydza w technologii gorzelniczej BUS, zacieranie i fermentacja. Aktualne problemy gorzelnictwa rolniczego, 5–10.
- Simonoff M., Shapcott D., Alameddine S., Sutter-Dub M.T., Simonoff G., 1992. The isolation of glucose tolerance factors from brewer's yeast and their relation to chromium. *Biol. Trace Elem. Res.*, 32, 25–38.
- Sobkowicz G., Banaś J., Aniołowski K., Pabiś E., 1984. Wpływ ras drożdży na tworzenie wyższych alkoholi w czasie fermentacji alkoholowej brzeczek melasowych. *Technol. Żywn.*, 149, 67–73.
- Soyuduru D., Ergun M., Tosun A., 2009. Application of a statistical technique to investigate calcium, sodium, and magnesium ion effect in yeast fermentation. *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 152, 326–333.
- Srichuwong S., Fujiwara M., Wang X., Seyama T., Shiroma R., Arakane M., Mukojima N., Tokuyasu K., 2009. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of very high gravity (VHG) potato mash for the production of ethanol. *Biom. Bioenerg.*, 33, 890–898.
- Sroka P., Tuszyński T., 2007. Changes in organic acid contents during mead wort fermentation. *Food Chem.*, 104, 1250–1257.
- Stecka K., Milewski J.A., Miecznikowski A.H., 1996. Energooszczędna technologia produkcji spirytusu surowego. *Przem. Ferm. i Owoc.-Warz.* 10, 15–19.
- Stecka K., Piasecka-Józwiak K., Badocha E., 2001. Próby otrzymywania biomasy drożdży wzbogaconych w chrom. *Pr. Inst. Lab. Bad. Przem. Spoż.*, 56, 7–17.
- Stenberg K., Galbe M., Zacchi G., 2000. The influence of lactic acid formation on the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of softwood to ethanol. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 71–79.
- Stewart G.G., 1981. The genetic manipulation of industrial yeast strains. *Can. J. Microbiol.*, 27, 973–990.
- Stewart G.G., Russel I., 1987. Biochemistry and genetics of carbohydrate utilization by industrial yeast strains. *Pure Appl. Chem.*, Vol. 59, No. 11, 1493–1500.
- Summer E.R., Shanmuganathan A., Sideri T.C., Willets S.A., Houghton J.E., Avery S.V., 2005. Oxidative protein damage causes chromium toxicity in yeast. *Microbiol.*, 151, 1939–1948.
- Thomas D.S., Hossack J.A., Rose A.H., 1978. Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Microbiol.*, 117, 239–245.
- Thomas K.C., Dhas A., Rossnagel B.G., Ingledew W.M., 1994a. Production of fuel alcohol from hull-less barley by very-high-gravity technology. *Cereal Chem.*, 72 (4), 360–364.
- Thomas K.C., Hynes S.H., Ingledew W.M., 1994b. Effect of particulate materials and osmoprotectants on very-high-gravity ethanolic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 60, 1519–1524.
- Thomas K.C., Hynes S.H., Ingledew W.M., 1996. Practical and theoretical considerations in the production of high concentration of alcohol by fermentation, *Process Biochem.*, 31, 321–331.
- Thomas K.C., Hynes S.H., Jones A.M., Ingledew W.M., 1993. Production of fuel alcohol from wheat by VHG technology: Effect of sugar concentration and fermentation temperature, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 43, 211–225.

- Tomasik P., Jamroz J., 2008. Biopaliwa – prawda i mity. *Przem. Spoż.*, 10, 56–58.
- Torija M.J., Beltran G., Novo M., Poblet M., Rozès N., Guillamón J.M., Mas A., 2003a. Effect of nitrogen source on the fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiol.*, 20, 255–258.
- Torija M.J., Rozès N., Poblet M., Guillamón J.M., Mas A., 2003b. Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds of wine. *Int. J. Food Microbiol.*, 85, 127–136.
- Tuszyński T., Pasternakiewicz A., 2000. Bioaccumulation of metal ions by yeast cell of *Saccharomyces cerevisiae*. *Pol. J. Food Nutr. Sci.*, 4, 31–39.
- Valero E., Millan M.C., Mauricio J.C., Ortega J.M., 1998. Effect of grape skin maceration on sterol, phospholipids, and fatty acid contents of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. *Am. J. Enol. Viticult.*, 49, 119–124.
- Vasudevan P., Padmavathy V., Dhingra S.C., 2002. Biosorption of monovalent and divalent ions on baker's yeast. *Bioresource Technol.*, 82, 285–289.
- Vincent J.B., 1999 Mechanisms of chromium action: low-molecular-weight chromium-binding substance. *J. Am. College Nutr.*, 18, 6–12.
- Vincent J.B., 2001. The bioinorganic chemistry of chromium (III). *Polyhedron*, 20, 1–26.
- Walker G.M., Birch R.M., Chandrasena G., Maynard A.I., 1996. Magnesium, calcium, and fermentative metabolism in industrial yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, 54, 13–18.
- Walker G.M., Maynard A., 1997. Accumulation of magnesium ions during fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microb. Biotechnol.*, 18, 1–3.
- Walker G.M., 2011. 125th anniversary review: fuel alcohol: current production and future challenges, *J. Inst. Brew.*, 117 (1), 3–22.
- Wang F., Gao C., Yang C., Xu P., 2007. Optimization of an ethanol production medium in very high gravity fermentation. *Biotechnol. Lett.*, 29, 233–236.
- Wang J., Chen C., 2006. Biosorption of heavy metals by *Saccharomyces cerevisiae*: A review. *Biotechnol. Adv.*, 24, 427–451.
- Wang J., Zeyu M., Xuan Z., 2004. Response of *Saccharomyces cerevisiae* chromium stress, *Process Biochem.*, 39, 1231–1235.
- Wang S., Thomas K.C., Sosulski K., Ingledew W.M., Sosulski F.W., 1999. Grain pearling and very high gravity (VHG) fermentation technologies for fuel alcohol production from rye and triticale. *Process Biochem.*, 34, 421–428.
- Wang Z., Zhuge J., Fang H., Prior B.A., 2001. Glycerol production by microbial fermentation: a review. *Biotechnol. Adv.*, 19, 201–223.
- Wilson J.J., Khachatourians G.G., Ingledew W.M., 1982. *Schwanniomyces*: SCP and ethanol from starch, *Biotechnol. Lett.*, 4 (5), 333–338.
- Wójcik M., Czupryński B., 2003. Sprawność energetyczna produkcji bioetanolu. Aktualne problemy gorzelnictwa rolniczego, 25–29.
- Yamaji K., Hara S., Mizoguchi H., 2003. Influence of ras function on ethanol stress response of sake yeast. *J. Biosci Bioeng.*, 96, 474–480.
- Yamamoto A., Wada O., Suzuki H., 1988. Purification and Properties of Biologically Active Chromium Complex from Bovine Colostrum. *The Journal of Nutrition*, 118, 39–45.
- You K.M., Rosenfield C.L., Knipple D.C., 2003. Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *App. Envir. Microbiol.*, 69, 1499–1503.
- Zetic V.G., Stehlik-Tomas V., Grba S., Lutitsky L., Kozlek D., 2001. Chromium uptake by *Saccharomyces cerevisiae* an isolation of glucose tolerance factor from yeast biomass. *J. Biosci.*, 26, 217–223.

- Zielińska A., Chojnacka K., 2010. Niskoodpadowa technologia produkcji mineralnych dodatków paszowych na bazie *Spirulina maxima*. Przem. Chem., 89 (4), 590–593.
- Zielińska K., Miecznikowski A., Stecka K., 1997. Próby wykorzystania szczepów drożdży *Saccharomyces diastaticus* w procesie fermentacji alkoholowej. Cz. II. Doskonalenie cech technologicznych szczepu drożdży *Saccharomyces diastaticus* 44. Przem. Ferm. i Owoc.-Warz., 11, 20–22.

The influence of Cr(III) ions on dynamics and fermentation effects of VHG corn mashes

Abstract

Growing interest of food technology and biotechnology in chromium results from the fact that in recent years the knowledge about its multidirectional importance in cell metabolism has widened. Chromium in trivalent form is necessary for the proper course of metabolic processes, participates in the transformation of carbohydrates (i.e. glucose) and in the processes of proteins and fatty acids synthesis. It has been identified as a component of active centers of many enzymes, as well as integral part of biologically active complexes of chromomoduline (LMWCr). So far enrichment of media used for distillery yeast multiplication and ethanol fermentation with chromium compounds were not been practiced. The existing knowledge about the role of this element is in fact strongly insufficient. Although few published laboratory results indicate the possibility of improving the dynamics of this process in the presence of Cr(III), however, this does not concern the fermentation of corn mash, especially VHG type, which may play a key role in implementing the fuel policy objectives of the European Union.

The aim of this study was to assess the impact of very high gravity (VHG) corn mashes supplementation with Cr(III) on the intensity and efficiency of ethanol production and changes in morphological and physiological features of studied distillery yeast.

The studies showed that the presence of Cr(III) not exceeding $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ in the distillery yeast growth media resulted in more advantageous dynamics and parameters of its growth, improvement of biomass growth and increased share of budding cells, however presence higher than $156 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ resulted in increase in inactive cells quantity, decrease in the share of budding cells and deterioration in biomass growth. The addition of Cr(III) did not affect on the morphological features of the yeast except *S. diastaticus* ATCC 13007 strain, which cells had, in its presence, higher diameter. Introduction of Cr(III) directly into the YPG fermentation media dynamized fermentation and shorten the glucose attenuation stage. The fermentation activity of yeast improved, except *S. cerevisiae* D2, with increasing concentration of Cr(III).

Bearing in mind the conditions of industrial ethanol production, there was assessed the effect of different extract concentration in corn mashes on the course and final effects of ethanol fermentation. It was noted that the disadvantage of fermentation technology of corn mashes at above 32% (VHG) of raw material content is relatively lower efficiency of carbohydrates to ethanol conversion, and an effective remedy in this situation may be supplementation of VHG mashes with Cr(III) ions. The addition of 60 mg of Cr(III)·l⁻¹ improved the kinetic parameters of fermentation of mashes at high content of extract (VHG). There was noted increase in sugars consumption rate, ethanol production, degree of attenuation and also ethanol concentration by 12 g·l⁻¹ (*S. diastaticus* ATCC 13007) and 7 g·l⁻¹ (*S. cerevisiae* Ethanol Red). Only *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 strain did not produce larger amounts of ethanol in the presence of Cr(III), but it accelerated its biosynthesis by one day. The addition of Cr(III) did not affect the course and the final effects of fermentation of 20% mashes. Distillery yeast accumulated Cr(III) both during growth on the YPG media and fermentation of corn mashes supplemented with CrCl₃·6H₂O. The highest amounts of chromium was accumulated by *Schwanniomyces occidentalis*, and the lowest by *S. cerevisiae* Ethanol Red. During fermentation of VHG mashes the amount of chromium in the cells of *Saccharomyces* genus yeast was higher than in 20% mashes. The addition of Cr(III) at 60 mg·l⁻¹ to the corn mashes resulted in improvement of growth dynamics and larger biomass growth in comparison to non supplemented samples. There were not observed effects of the presence of Cr(III) on the cell size of the yeast of the genus *Saccharomyces*. In the presence of Cr(III) there were determined higher amounts of Mg, Ca and Zn and lower of K and Na in the yeast cells both during the fermentation and after its completion. The cells of *S. diastaticus* ATCC 13007 strain were featured by the most stable composition of the indicated elements during fermentation of 20% mashes. The addition of Cr(III) to the corn mashes resulted in higher content of unsaturated fatty acids in the biomass after fermentation. In the result the UFA/SFA ratio (amount of unsaturated to saturated acids) was higher in the yeast cells fermenting mashes supplemented with Cr(III) ions.

As a result, studies indicated the usefulness of Cr(III) in the technology of fermentation of VHG distillery mashes.

Key words: ethanol, fermentation, VHG technology, yeast, chromium

Oddziaływanie jonów Cr(III) na dynamikę i efekty fermentacji zacierów kukurydzianych VHG

Streszczenie

Rosnące zainteresowanie technologii i biotechnologii żywności chromem wynika z faktu, iż w ostatnich latach znacznie poszerzyła się wiedza o jego wielokierunkowym znaczeniu w metabolizmie komórki. Chrom w postaci trójwartościowej jest niezbędny do właściwego przebiegu procesów metabolicznych, uczestniczy w przemianach węglowodanów (m.in. glukozy) oraz procesach syntezy białek i kwasów tłuszczowych. Został zidentyfikowany jako składnik centrów aktywnych wielu enzymów, jak również jako nieodłączna część biologicznie aktywnych kompleksów chromomoduliny (LMWCr). Do tej pory nie praktykowano wzbogacania podłoży stosowanych do namnażania drożdży gorzelniczych i fermentacji etanolowej związkami chromu. Dotychczasowa wiedza na temat roli tego pierwiastka w tym procesie jest bowiem stanowczo niewystarczająca. Wprawdzie publikowane nieliczne wyniki badań laboratoryjnych wskazują na możliwość poprawy dynamiki tego procesu w obecności jonów Cr(III), to jednak nie dotyczą one fermentowania zacierów kukurydzianych, szczególnie typu VHG, które mogą odegrać kluczową rolę w realizacji zamierzeń polityki paliwowej Unii Europejskiej.

Celem pracy była ocena oddziaływania suplementacji Cr(III) zacierów kukurydzianych o wysokiej zawartości surowca (VHG) na intensywność i efektywność produkcji etanolu oraz zmiany cech morfologicznych i fizjologicznych badanych drożdży gorzelniczych.

W badaniach wykazano, że obecność Cr(III) w podłożach wzrostowych drożdży gorzelniczych nieprzekraczająca $60 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ owocowała korzystniejszą dynamiką i parametrami ich wzrostu, poprawą przyrostu biomasy oraz zwiększonym udziałem komórek pączkujących, natomiast wyższa od $156 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ skutkowała wzrostem ilości komórek nieaktywnych, zmniejszeniem udziału komórek pączkujących oraz pogorszeniem przyrostu biomasy. Dodatek Cr(III) nie wpływał na cechy morfologiczne drożdży z wyjątkiem szczepu *S. diastaticus* ATCC 13007, którego komórki miały w jego obecności większą średnicę. Wprowadzenie Cr(III) bezpośrednio do podłoża fermentacyjnego YPG zdynamizowało

fermentację i skróciło fazę zafermentowania glukozy. Aktywność fermentacyjna drożdży poprawiała się, z wyjątkiem *S. cerevisiae* D2, wraz ze wzrostem stężenia Cr(III).

Mając na uwadze warunki przemysłowe procesu produkcji etanolu, oceniono wpływ zróżnicowanej zawartości ekstraktu w zacierach kukurydzianych na przebieg i efekty końcowe fermentacji etanolowej. Wskazano, że mankamentem technologii fermentacji zacierów kukurydzianych o zawartości surowca powyżej 32% (VHG) jest relatywnie niższa efektywność konwersji węglowodanów do etanolu, a skutecznym remedium w takiej sytuacji może być suplementacja zacierów VHG jonami Cr(III). Dodatek 60 mg Cr(III)·l⁻¹ poprawił parametry kinetyczne fermentacji zacierów o wysokiej zawartości ekstraktu (VHG). Stwierdzono wzrost szybkości zużycia cukrów, produkcji etanolu, stopnia wykorzystania węglowodanów, a także stężenia etanolu o 12 g·l⁻¹ (*S. diastolicus* ATCC 13007) i 7 g·l⁻¹ (*S. cerevisiae* Etanol Red). Jedynie szczep *Schwanniomyces occidentalis* ATCC 48086 nie wytworzył większych ilości etanolu w obecności Cr(III), ale przyspieszył jego biosyntezę o dobę. Dodatek Cr(III) nie wpłynął na przebieg i efekty końcowe fermentacji zacierów 20%. Drożdże gorzelnicze akumulowały Cr(III) zarówno podczas wzrostu na podłożu YPG, jak i fermentacji zacierów kukurydzianych suplementowanych CrCl₃·6H₂O. Najwięcej chromu akumulowały drożdże *Schwanniomyces occidentalis*, a najmniej *S. cerevisiae* Etanol Red. Podczas fermentacji zacierów VHG zawartość chromu w komórkach drożdży rodzaju *Saccharomyces* była wyższa niż w zacierach 20%. Dodatek Cr(III) w ilości 60 mg·l⁻¹ do zacierów kukurydzianych powodował poprawę dynamiki wzrostu oraz większy przyrost biomasy w porównaniu z próbami niesuplementowanymi. Nie stwierdzono wpływu obecności Cr(III) na rozmiar komórek drożdży z rodzaju *Saccharomyces*. W obecności Cr(III) w komórkach drożdży oznaczono wyższą zawartość Mg, Ca i Zn oraz niższą K i Na zarówno w trakcie fermentacji, jak i po jej zakończeniu. Najbardziej stabilnym składem oznaczanych pierwiastków charakteryzowały się komórki szczepu *S. diastolicus* ATCC 13007 w czasie fermentacji zacierów 20%. Dodatek Cr(III) do zacierów kukurydzianych skutkowało wyższą zawartością w biomacie pofermentacyjnej drożdży nienasyconych kwasów tłuszczowych. W efekcie współczynnik UFA/SFA (ilości kwasów nienasyconych do nasyconych) był wyższy w komórkach drożdży fermentujących zacieru suplementowane jonami Cr(III).

Przeprowadzone badania potwierdziły przydatność Cr(III) w technologii fermentacji zacierów gorzelniczych typu VHG.

Słowa kluczowe: etanol, fermentacja, technologia VHG, drożdże, chrom