

# ACTA SCIENTIARUM POLONORUM

Czasopismo naukowe założone w 2001 roku przez polskie uczelnie rolnicze

**Biotechnologia**

Biotechnologia

Biotechnology

8(3) 2009



Bydgoszcz Kraków Lublin Olsztyn  
Poznań Siedlce Szczecin Warszawa Wrocław

**Rada Programowa *Acta Scientiarum Polonorum***

Kazimierz Banasik (Warszawa), Janusz Falkowski (Olsztyn),  
Florian Gambuś (Kraków), Franciszek Kluza (Lublin),  
Janusz Prusiński (Bydgoszcz), Jerzy Sobota (Wrocław) – przewodniczący,  
Stanisław Socha (Siedlce), Waldemar Uchman (Poznań)

**Rada Naukowa serii *Biotechnologia***

Danuta Witkowska (Wrocław) – przewodnicząca, Włodzimierz Bednarski (Olsztyn),  
Włodzimierz Grajek (Poznań), Anna Maraz (Budapeszt, Węgry),  
Zdzisław Targoński (Lublin), Vesna Zechner-Krpan (Zagrzeb, Chorwacja)

Opracowanie redakcyjne i korekta:  
Elżbieta Winiarska-Grabosz  
Janina Szydłowska

Łamanie  
Alina Gebel

Projekt okładki  
Daniel Morzyński

ISSN 1644-065X

*Wydanie publikacji dofinansowane ze środków  
Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu*

© Copyright by Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu,  
Wrocław 2009

Redaktor Naczelny – prof. dr hab. Andrzej Kotecki  
ul. Sopocka 23, 50-344 Wrocław, tel./fax 71 328-12-77  
e-mail: [wyd@up.wroc.pl](mailto:wyd@up.wroc.pl) <http://www.up.wroc.pl>

Nakład 200 + 16 egz. Ark. wyd. 3,1. Ark. druk. 3,0.  
Druk i oprawa: EXPOL, P. Rybiński, J. Dąbek, Spółka Jawna  
ul. Brzeska 4, 87-800 Włocławek

## CHARAKTERYSTYKA PÓLCIĄGŁEJ BIOSYNTETYZY KWASU CYTRYNOWEGO Z GLICEROLU PRZEZ DROŹDŹE

Anita Rywińska, Piotr Juszczak, Artur Gryszkin,  
Waldemar Rymowicz

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** Badano aktywność kwasotwórczą oraz stan fizjologiczny szczepu *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 podczas półciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego. Proces rozpoczęto jako hodowlę fed-batch, a następnie przeprowadzono 8 cykli hodowlanych, różniących się objętością wymienianego podłoża. W pierwszych czterech cyklach wymieniano około 30% (0,4 dm<sup>3</sup>), w kolejnych 40% (0,5 dm<sup>3</sup>) objętości roboczej bioreaktora. Wymiana 0,4 dm<sup>3</sup> podłoża umożliwiała otrzymanie do 175 g·dm<sup>-3</sup> kwasu cytrynowego z wydajnością 0,66 g·g<sup>-1</sup>. Zwiększenie wymienianej objętości podłoża wpłynęło na obniżenie stężenia kwasu cytrynowego do 120 g·dm<sup>-3</sup>; wzrost stężenia biomasy, erytrytolu oraz wzrost udziału w populacji komórek o objętości powyżej 60 μm<sup>3</sup>. Ocena stanu fizjologicznego drożdży podczas długoterminowego procesu wykazała ich dobrą żywotność oraz wysoką stabilność genetyczną i fenotypową.

**Słowa kluczowe:** kwas cytrynowy, glicerol odpadowy, hodowla półciągła, *Yarrowia lipolytica*

### WSTĘP

Prace nad biosyntezą kwasu cytrynowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* zostały zapoczątkowane w latach 60. XX wieku i są kontynuowane do dzisiaj. Przedmiotem intensywnych badań były m.in. zagadnienia związane z oceną dynamiki procesu syntezy tego kwasu w różnych systemach hodowlanych. Najwięcej informacji w literaturze z tego zakresu można znaleźć na temat procesów okresowych, w których stężenie substratu wynosiło od 10 do 15% [Anastassiadis i Rhem 2006, Arzumanov i in. 2000a, Rymowicz i in. 2006, Rywińska i in. 2006, Rywińska i in. 2008, Wojtatowicz i Rymowicz 1995]. Hodowle okresowe nie pozwalają na maksymalne wykorzystanie aparatury i możliwości komórek, z drugiej strony stanowią idealny system w badaniach

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: Anita Rywińska, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. C.K. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: anita.rywinska@up.wroc.pl

modelowych nad optymalizacją składu podłoża, parametrów technologicznych oraz w badaniach skriningowych. Modyfikacje procesów okresowych (okresowe zasilane, fed-batch albo hodowle półciągłe, repeated fed-batch) [Kim i in. 2007, Kumar i in. 1991] umożliwiają, poprzez przedłużenie fazy efektywnej produkcji, uzyskanie wyższych parametrów technologicznych procesu biosyntezy, szczególnie wydajności i szybkości produkcji. W hodowlach stacjonarnych powtórzeniowych następuje kolejno odtwarzanie fazy wzrostu i/lub tylko stanów stacjonarnych (hodowle z zawracaniem komórek). Część podłoża zostaje odebrana z bioreaktora, a w to miejsce zostaje wprowadzona świeża pożywka. Skład wprowadzanego podłoża powinien być zbilansowany, pozwalający nie tylko na odtworzenie biomasy, ale również na utrzymanie dobrej żywotności i aktywności kwasotwórczej komórek, co jest szczególnie istotne w powtórzeniowych hodowlach okresowych z zawracaniem komórek [Bubbico i in. 1996, Parente i in. 1995]. W tematycznym piśmiennictwie można znaleźć nieliczne prace opisujące proces półciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego przez drożdże *Y. lipolytica* [Arzumanov i in. 2000a, 2000b, Anastasiadis i Rhem 2006, Rywińska i in. 2008, Wojtatowicz i Rymowicz 1995], w których jako źródło węgla wykorzystano etanol i glukozę.

W ostatnich latach szczególnym zainteresowaniem badaczy, jako źródłem węgla i energii w procesach biotechnologicznych, stają się naturalne oleje roślinne [Aurich i in. 2003, Kamzolova i in. 2005, 2008] oraz glicerol odpadowy pochodzący z produkcji biodiesla [Papanikolaou i Aggelis 2003, Papanikolaou i in. 2002, Rymowicz i in. 2006]. Poszukiwania nowych metod waloryzacji takich odnawialnych surowców odpadowych, zwłaszcza glicerolu, w cenniejsze produkty chemiczne w procesach mikrobiologicznych znajduje się dopiero w fazie badań laboratoryjnych kilku ośrodków naukowych [Papanikolaou i Aggelis 2003, Chen i in. 2003, Lee i in. 2001, Ito i in. 2005]. Dlatego wykorzystanie glicerolu jako źródła węgla i energii do produkcji kwasu cytrynowego przez drożdże *Y. lipolytica* jest szczególnie uzasadnionym kierunkiem badań.

Celem pracy jest ocena aktywności kwasotwórczej oraz stanu fizjologicznego szczepu *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 podczas półciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z odpadowego glicerolu.

## MATERIAŁ I METODY

**Mikroorganizmy.** W badaniach wykorzystano szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31 pochodzący z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczep ten jest mutantem octanowym (oct<sup>-</sup>) o szorstkim fenotypie kolonii uzyskanym w wyniku mutagenizacji szczepu dzikiego *Y. lipolytica* A-101 promieniami UV. Szczep przechowywano na skosach YM, w temperaturze 4°C.

**Podłoża.** Skład podłoży hodowlanych przedstawiono w tabeli 1.

**Surowiec.** W badaniach stosowano glicerol odpadowy pochodzący z produkcji estrów metylowych (biorafineria SG BODDINS GmbH, Niemcy) zawierający 850 g·dm<sup>-3</sup> glicerolu i 65 g·dm<sup>-3</sup> NaCl.

**Warunki prowadzenia hodowli.** Hodowle inokulacyjne prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej typu Elpan przy 160 rpm w 0,25 dm<sup>3</sup> kolbach stożkowych zawierających 0,025 dm<sup>3</sup> podłoża inokulacyjnego przez 72 godz. w temperaturze 30°C. Do zaszczepienia podłoża produkcyjnego w bioreaktorze używano 0,05 dm<sup>3</sup> zawiesiny komórek namnożonych w hodowli inokulacyjnej. Proces biosyntezy kwasu cytrynowego prowa-

dzono w 3,5-litrowym bioreaktorze typu BIOFLO III (New Brunswick, USA), o objętości roboczej 1,3 dm<sup>3</sup>, przy szybkości przepływu powietrza 0,2 vvm, szybkości obrotowej mieszadła 600 rpm, w temperaturze 30°C. W czasie procesu pH podłoża utrzymywano automatycznie na poziomie 5,5 za pomocą 40% NaOH.

Bezpośrednio po zaszczepieniu objętość podłoża produkcyjnego wynosiła około 0,85 dm<sup>3</sup>. W czasie hodowli fed-batch podłoże produkcyjne zasilono dwukrotnie roztworem glicerolu odpadowego w 24 i 48 h, w ilości po 0,22 dm<sup>3</sup>, tak aby stężenie całkowite glicerolu wynosiło 200 g·dm<sup>-3</sup> (przy objętości roboczej zbiornika 1,3 dm<sup>3</sup>). Po wyczerpaniu glicerolu z podłoża w hodowli fed-batch odbierano z bioreaktora odpowiednią ilość zawiesiny komórkowej (0,4 lub 0,5 dm<sup>3</sup>) i uzupełniano analogiczną objętością świeżego podłoża do objętości 1,3 dm<sup>3</sup>, przy czym początkowe stężenie glicerolu wynosiło każdorazowo 100 g·dm<sup>-3</sup>. Każdą wymianę objętości podłoża przeprowadzano czterokrotnie.

Tabela 1. Stosowane podłoża hodowlane

Table 1. Culture media used

Nazwa i skład podłoża Medium name and composition	Przeznaczenie Application
<b>Agar YM:</b> ekstrakt drożdżowy, 3 g; ekstrakt słodowy, 3 g; pepton, 5 g; glukoza, 20 g; agar, 20 g; woda destylowana, 1 dm <sup>3</sup> <b>YM agar:</b> yeast extract, 3 g; malt extract, 3 g; peptone, 5 g; glucose, 20 g; agar, 20 g; distilled water, 1 dm <sup>3</sup>	hodowla drożdży, przechowywanie drożdży yeast cultivation, yeast maintenance
<b>Podłoże inokulacyjne:</b> glicerol, 50 g; NH <sub>4</sub> Cl, 3 g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 1 g; yeast extract, 1 g; woda destylowana, 1 dm <sup>3</sup> <b>Inoculum medium:</b> glycerol, 50 g; NH <sub>4</sub> Cl, 3 g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,5 g; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 1 g; yeast extract, 1 g; distilled water, 1 dm <sup>3</sup>	hodowla inokulacyjna seed cultures
<b>Podłoże produkcyjne I:</b> glicerol, 200 g; NH <sub>4</sub> Cl, 3 g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,2 g; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 1 g; ekstrakt drożdżowy, 1 g; woda wodociągowa, 1 dm <sup>3</sup> <b>Production medium I:</b> glycerol, 200 g; NH <sub>4</sub> Cl, 3 g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,2 g; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 1 g; yeast extract, 1 g; tap water, 1 dm <sup>3</sup>	hodowla okresowa zasilana fed-batch culture
<b>Podłoże produkcyjne II:</b> glicerol, 100 g; NH <sub>4</sub> Cl, 4 g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,2 g; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 1 g; yeast extract, 1 g; woda wodociągowa, 1 dm <sup>3</sup> <b>Production medium II:</b> glycerol, 100 g; NH <sub>4</sub> Cl, 4 g; KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , 0,2 g; MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O, 1 g; ekstrakt drożdżowy, 1 g; tap water, 1 dm <sup>3</sup>	hodowla półciągła repeat-batch culture
<b>Agar YNB – OCT:</b> YNB (Difco), 6,7 g; octan sodu 10 g; agar 20 g; woda destylowana, 1 dm <sup>3</sup> <b>YNB acet-agar:</b> YNB (Difco), 6,7 g; sodium acetate 10 g; agar 20 g; distilled water, 1 dm <sup>3</sup>	kontrola częstości rewertantów oct <sup>-</sup> acet <sup>+</sup> revertant frequency control

#### Pomiar ogólnej liczby komórek, liczby komórek pączkujących i martwych.

W próbach pobieranych w trakcie hodowli oznaczano ogólną liczbę komórek, liczbę komórek pączkujących (N<sub>p</sub>) i liczbę komórek martwych (N<sub>BM</sub>), według metodyki opisanej przez Rywińską i in. (2008).

#### Ocena częstości rewersji fenotypu oct<sup>-</sup> i badanie stabilności fenotypu kolonii fil<sup>-</sup>.

Stabilność mutacji oct<sup>-</sup> i fil<sup>-</sup> oceniano metodą płytkową odpowiednio na agarze YNB – OCT i agarze YM wg procedury opisanej przez Rywińską i in. [2003].

**Pomiar objętości komórek.** W próbach pobieranych w trakcie hodowli oznaczano objętość komórek za pomocą laserowego analizatora cząstek Mastersizer 2000 firmy Malvern. Komórki podzielono na 6 klas: I (0,1–20,0  $\mu\text{m}^3$ ), II (20,1–40,0  $\mu\text{m}^3$ ), III (40,1–60,0  $\mu\text{m}^3$ ), IV (60,1–80,0  $\mu\text{m}^3$ ), V (80,1–100,0  $\mu\text{m}^3$ ), VI (> 100,0  $\mu\text{m}^3$ ).

**Metody analityczne.** Biomase (X) oznaczano metodą wagową. Kwas izocytrynowy (ICA) oznaczano metodą enzymatyczną przy udziale dehydrogenazy cytrynianowej [Goldberg i Ellis 1983].

Stężenie kwasu cytrynowego (CA), glicerolu (GLY), erytrytolu (ER) i mannitolu (MAN) oznaczano metodą HPLC na kolumnie Aminex HPX87H podłączonej do detektorów UV ( $\lambda = 210 \text{ nm}$ ) i RI w temperaturze pokojowej. Szybkość przepływu fazy ciekłej (20 mM  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) przez kolumnę wynosiła 0,6  $\text{cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$ .

#### Spis użytych symboli

$q_{\text{CA}}$  = szybkość właściwa produkcji kwasu cytrynowego – specific citric acid production rate ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ )

$Q_{\text{CA}}$  = szybkość produkcji kwasu cytrynowego – volumetric citric acid production rate ( $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ )

$Y_{\text{CA}}$  = wydajność całkowita kwasu cytrynowego – total yield of citric acid ( $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ).

## WYNIKI I DISKUSJA

Szczegółowej analizie poddano przebieg procesu półciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego przez szczep *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31. Proces rozpoczęto jak hodowlę fed-batch, w której całkowite stężenie glicerolu wynosiło 200  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Hodowlę prowadzono przez 118 h do momentu wyczerpania glicerolu ze środowiska hodowlanego. Uzyskano stężenie biomasy i kwasu cytrynowego na poziomie, odpowiednio: 17,8  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  oraz 130  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (tab. 2). Na tym etapie z bioreaktora pobrano 0,4  $\text{dm}^3$  zawiesiny komórek i uzupełniono w sposób sterylny taką samą objętością świeżego podłoża, którego skład był skomponowany tak, aby przy objętości roboczej bioreaktora 1,3  $\text{dm}^3$  stężenie glicerolu wynosiło 100  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Proces prowadzono do całkowitego wyczerpania substratu z podłoża hodowlanego. Przeprowadzono cztery wymiany po 0,4  $\text{dm}^3$ , a następnie cztery wymiany w analogiczny sposób po 0,5  $\text{dm}^3$ .

Podczas wymiany 0,4  $\text{dm}^3$  czas kolejnych cykli hodowlanych wynosił od 72 do 90 h, natomiast przy wymianie 0,5  $\text{dm}^3$  był krótszy – od 71 do 78 h (tab. 2). Maksymalne stężenie biomasy w pierwszych dwóch cyklach przy wymianie 0,4  $\text{dm}^3$ , wynosiło około 16  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  w kolejnych dwóch było niższe o wartości 13–14  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Natomiast z każdą kolejną wymianą 0,5  $\text{dm}^3$  podłoża hodowlanego stężenie biomasy wynosiło około 15  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Podczas czterech pierwszych cykli hodowlanych końcowe stężenie CA zwiększało się od 142 do 174  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , w kolejnych cyklach utrzymywało się na wyrównanym poziomie, około 120  $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  (tab. 2).

Drożdże produkowały kwas cytrynowy z różną dynamiką w zależności od ilości wymienianego podłoża. Zarówno szybkość objętościowa ( $Q_{\text{CA}}$ ), jak i szybkość właściwa ( $q_{\text{CA}}$ ) syntezy kwasu cytrynowego były wyższe podczas wymiany 0,4  $\text{dm}^3$  podłoża niż podczas wymiany 0,5  $\text{dm}^3$  (tab. 2). Podobnie kształtuje się wydajność produkcji kwasu cytrynowego. W czterech pierwszych cyklach wynosiła od 0,41 do 0,66  $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ , natomiast podczas kolejnych cykli była niższa – od 0,31 do 0,46  $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ . Malejące wartości tych parametrów świadczyły o obniżaniu się dynamiki produkcji kwasu cytrynowego w czasie trwania hodowli.

Tabela 2. Charakterystyka półciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego przez *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31  
 Table 2. Results of the citric acid production from raw glycerol in repeated-batch culture by *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 strain

Nr wymiany Batch No.	Ilość wymianianego podłoża Cultivation mode [dm <sup>3</sup> ]	Czas hodowli Cultivation time [h]	X	CA	ICA	ER	MAN	Y <sub>CA</sub> [g·g <sup>-1</sup> ]	Q <sub>CA</sub> [g·dm <sup>-3</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	q <sub>CA</sub> [g·g <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	Białko Protein [%]
Fed-batch	–	118	17,8	130	3,3	0,8	3,8	0,65	1,1	0,062	26,9
I	0,4	72	16,2	142	2,3	11	4,5	0,5	0,7	0,043	28,5
II	0,4	74	16	145	2,2	16,9	3,4	0,41	0,55	0,034	28,4
III	0,4	90	13	175	1,5	22	4,8	0,66	0,73	0,056	29,7
IV	0,4	78	14,3	174	1,3	32,5	5,7	0,49	0,63	0,044	28,2
V	0,5	77	12,7	118,2	1,7	30,6	4,8	0,31	0,4	0,031	31,3
VI	0,5	73,5	15,2	121	2,6	28,9	5,2	0,36	0,49	0,032	30,6
VII	0,5	73	15,8	115	2,2	24,3	5,3	0,46	0,63	0,04	36,4
VIII	0,5	71	15,7	122	1,7	18,9	0,8	0,38	0,53	0,029	32,5

W tematycznym piśmiennictwie praktycznie nie ma przykładów półciąglych procesów biosyntezy CA z udziałem drożdży *Y. lipolytica*. W procesie opisanym przez Arzumanov i in. [2000a, 2000b] – na etanolu przez szczep *Y. lipolytica* VKM Y2373 utrzymywał wysoką aktywność kwasotwórczą przez 700 h, a szybkość właściwa produkcji kwasu cytrynowego była w zakresie od 0,104 do 0,138  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Według Anastasiadis i Rhem [2006] w hodowli półciąglej osmofilny szczep *Candida oleophila* ATCC 20177 produkował z glukozy do 167  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  kwasu cytrynowego z szybkością 1,28  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$  i wydajnością 0,43  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ . Jak podają autorzy, proces ten był stabilny przez około 20 powtórzeń (wymian). Dla porównania, szczep *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31 w hodowli półciąglej produkował maksymalnie 54,5  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  kwasu cytrynowego z wydajnością 0,58  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , ale proces był stabilny tylko przez 4 kolejne wymiany (300 h) [Rywińska i in. 2008].

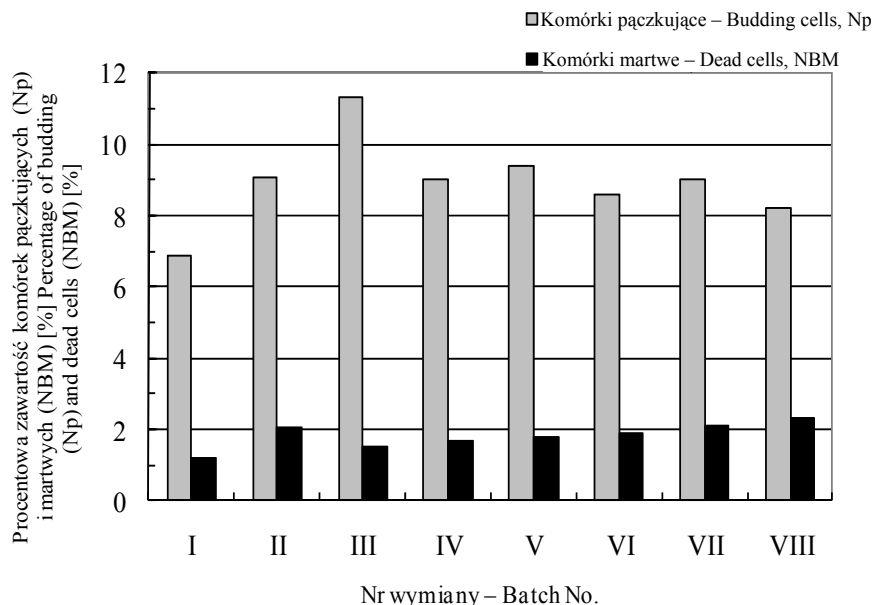
W hodowlach okresowych powtórzeniowych z zawracaniem biomasy uzyskiwano maksymalne wartości wydajności w zakresie od 0,69 do 0,93  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ , produktywności od 0,46 do 1,36  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}\cdot\text{h}^{-1}$  i szybkości właściwej produkcji kwasu cytrynowego od 0,032 do 0,095  $\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$ . Jednakże procesy te były stabilne tylko przez okres czasu 4–10 dni [Bubbico i in. 1996, Parente i in. 1995, Wojtatowicz i Rymowicz 1995].

Użyty w niniejszej pracy szczep *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 produkował niewielką ilość kwasu izocytrynowego. Najwyższe stężenie tego produktu ubocznego, podczas kolejnych wymian hodowli półciąglej, wynosiło 2,6  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , co oznacza, że czystość procesu była bardzo wysoka, a kwas izocytrynowy nie przekraczał 2,5% sumy wytworzonych kwasów cytrynowych. W zależności od zastosowanego glicerolu (odpadowy lub czysty) i typu hodowli (okresowa wstrząsarkowa lub węgłbna okresowa w bioreaktorze) stężenie kwasu izocytrynowego w hodowlach z użyciem mutantów octanowych wynosiło od 0,3 do 5,8  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$  [Rymowicz i in. 2005, 2006, Rywińska i in. 2009]. W badaniach Levinson i in. [2007] spośród 27 szczepów wyselekcjonowanych do procesu produkcji kwasu cytrynowego z glicerolu tylko jeden produkował mniej niż 10% kwasu izocytrynowego.

W omawianym w niniejszej pracy procesie, równoległe z kwasem cytrynowym, tworzone były alkohole cukrowe takie jak erytrytol i mannitol. Końcowe stężenie mannitolu, aż do VII wymiany było w przybliżeniu stałe, około 4–5  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Podobną ilość mannitolu równoległe z kwasem cytrynowym nagromadzał inny szczep, *Y. lipolytica* IMK 2, podczas okresowej biosyntezy kwasu cytrynowego z glukozy [McKay i in. 1994]. Autorzy stwierdzili, że produkcja mannitolu może mieć związek z wewnętrzną regulacją pH. Natomiast, jak wskazują wyniki zawarte w tabeli 2, ilość erytrytolu znacznie się zwiększała podczas pierwszych czterech cykli, aż do 32,5  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Najprawdopodobniej produkcja tak znacznych ilości tego alkoholu cukrowego jest odpowiedzią mikroorganizmu na wzrastające ciśnienie osmotyczne [Kets i in. 1996]. W trakcie kolejnych wymian, kiedy stężenie kwasu cytrynowego było zdecydowanie niższe, stężenie erytrytolu obniżało się od 30,6 do 18,9  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ .

Podczas trwania całego procesu odnotowano dobry stan fizjologiczny populacji *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31. Średni udział komórek pączkujących w fazie stacjonarnej każdego cyklu hodowlanego wynosił od 6,9 do 11,3% (rys. 1). Biorąc pod uwagę fakt, że biomasa nie przyrastała w tej fazie hodowli, nasuwa się przypuszczenie, iż zastosowany substrat zawierał niewielką ilość przyswajalnych dla drożdży składników. Niezbędne do podtrzymania wzrostu i mnożenia się komórek składniki mogły pochodzić również z autolizy komórek.





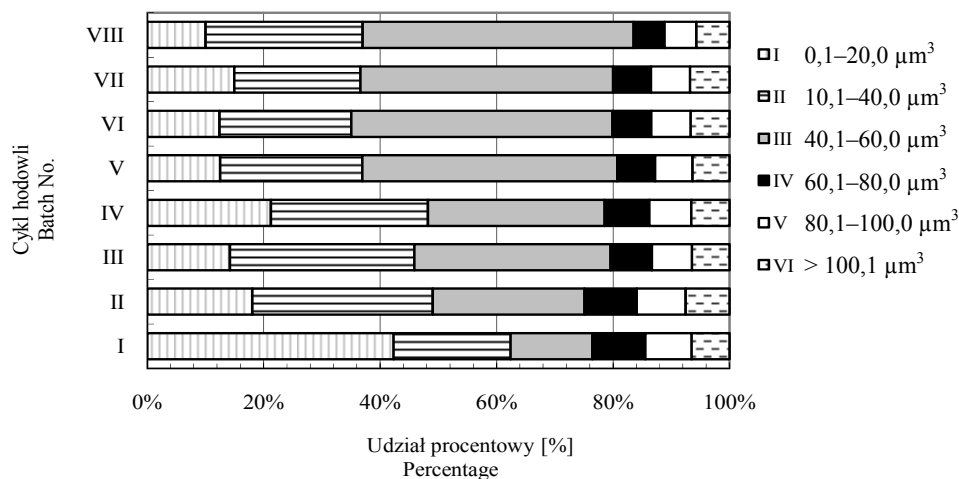
Rys. 1. Procentowy udział komórek pączkujących ( $N_p$ ) i martwych ( $N_{BM}$ ) w kolejnych cyklach półciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu odpadowego przez *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31

Fig. 1. Percentage of budding ( $N_p$ ) and dead ( $N_{BM}$ ) cells during repeated-batch culture of *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 on glycerol media

Wybrany do badań szczep drożdży charakteryzował się dobrą żywotnością, co obrazuje rysunek 1. Komórki martwe, wybarwiający się błękitem metylenowym ( $N_{BM}$ ), stanowiły niewielką frakcję populacji, od 1,1 do 2,3%. Inni autorzy stwierdzali obecność martwych komórek już po 50 h hodowli, a po 500 h żywotność drożdży obniżała się nawet do 25% [Bubbico i in. 1996, Parente i in. 1995]. Przy użyciu laserowego analizatora cząstek analizie poddano zmiany wielkości komórek podczas omawianego procesu. Na podstawie uzyskanych wyników komórki podzielono na 6 klas objętościowych (co  $20 \mu\text{m}^3$ ), a na rysunku 2 przedstawiono średni udział poszczególnych klas w kolejnych cyklach. W pierwszym cyklu hodowlanym ponad 60% komórek zaliczono do I i II klasy objętości, w kolejnych trzech cyklach udział tych komórek obniżał się i wynosił około 50% całej populacji. Podczas wymiany  $500 \text{ cm}^3$  (V–VIII cykl) obserwowano zdecydowany wzrost udziału większych komórek, zwłaszcza tych o objętości wynoszącej od  $40,1$  do  $60 \mu\text{m}^3$ . Wyniki uzyskane w niniejszej pracy potwierdzają wcześniejszą tezę autorów tego opracowania [Rywińska i in. 2004, 2008, Żarowska i in. 2004], że w okresach gdy proces biosyntezy kwasu cytrynowego jest stabilny, drożdże są jednorodne pod względem wielkości, a w populacji komórek przeważają te najmniejsze.

Jak obrazuje tabela 2, zawartość białka w biomacie drożdży była wysoka i wynosiła od 26,9 do 36,4%. Według innych autorów zawartość białka w komórkach drożdży wykorzystywanych w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego wynosiła od 17 [Anastassiadis i in. 2002] do 22,4% [Rymowicz i Rywińska 2003]. Według Moresi i in. [1994] jednym z wyróżników intensywnej nadprodukcji kwasu cytrynowego przez

drożdże jest obniżenie ilości białka w komórce do około 17–24%, co znalazło potwierdzenie w wynikach uzyskanych w niniejszej pracy, gdzie niższą zawartość białka w komórkach drożdży stwierdzono w czterech pierwszych cyklach hodowlanych, kiedy proces biosyntezy kwasu przebiegał z większą szybkością i wydajnością.



Rys. 2. Udział poszczególnych klas komórek szczepu *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 podczas hodowli półciągłej

Fig. 2. Percentage of volumetric classes of *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 cells during repeated batch-culture

Jak wiadomo, szczepy drożdży uzyskane na drodze mutagenizacji są bardziej narażone na zmiany degeneracyjne w długoterminowych procesach ciągłych niż szczepy dzikiego typu, dlatego monitorowanie ich cech genotypowych i fenotypowych jest szczególnie ważne w tego typu hodowlach. W procesie prowadzonym w niniejszej pracy szczep Wratislavia 1.31 cechował się wysoką stabilnością zarówno cech morfologicznych, jak i mutacji oct<sup>-</sup>. Podczas półciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glukozy, prowadzonej z udziałem tego samego szczepu, załamaniu biosyntezy kwasu towarzyszyło ujawnianie się (w posiewach na agarze YM) segregantów tworzących gładkie kolonie [Rywińska i in. 2008], czego nie obserwowano w niniejszej pracy.

Mutacja oct<sup>-</sup> warunkuje czystość fermentacji cytrynowej, co jest szczególnie ważne w przypadku producentów CA. Stabilność fenotypu oct<sup>-</sup> oceniano na końcu każdego etapu, we wszystkich cyklach hodowli była ona wysoka (tab. 3). Częstość rewersji fenotypu octanowego wynosiła poniżej  $5,3 \times 10^{-7}$  osobników, a więc była rzadsza niż częstość mutacji spontanicznych ( $10^{-5} - 10^{-7}$ ) [Bednarski 1990].

Tabela 3. Stabilność mutacji oct<sup>-</sup> w drożdżach *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31  
 Table 3. Stability of the acu<sup>-</sup> mutation in *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31

Cykl hodowli Batch No.	Częstość rewertantów oct <sup>+</sup> Frequency of acu <sup>+</sup> [c.f.u.·cm <sup>3</sup> ]
I	< 3,7 x 10 <sup>-7</sup>
II	< 5,3 x 10 <sup>-7</sup>
III	< 4,9 x 10 <sup>-7</sup>
IV	< 3,8 x 10 <sup>-7</sup>
V	< 5,2 x 10 <sup>-7</sup>
VI	< 4,9 x 10 <sup>-7</sup>
VII	< 4,5 x 10 <sup>-7</sup>
VIII	< 3,9 x 10 <sup>-7</sup>

## PODSUMOWANIE

Badany proces półciągłej produkcji kwasu cytrynowego z glicerolu pozwolił na intensyfikację procesu i wzrost stężenia kwasu cytrynowego do 174 g·dm<sup>-3</sup>, kiedy odbierano 0,4 dm<sup>3</sup> zawiesiny komórkowej i dodawano taką samą objętość świeżej pożywki zawierającej glicerol i pierwiastki biogenne, takie jak N i P. Jednak w kolejnych cyklach hodowli, podczas wymiany 0,5 dm<sup>3</sup>, produkcja kwasu cytrynowego utrzymywała się na zdecydowanie niższym poziomie. W tym czasie w środowisku hodowlanym obserwowano wzrost stężenia biomasy i zawartości białka w komórkach, a populacja drożdży stawała się bardzo niejednorodna pod względem wielkości komórek. Ponadto, mutant octanowy *Y. lipolytica* Wratislavia 1.31 utrzymywał w trakcie długoterminowej hodowli półciągłej (ponad 600 godzin) szorstki fenotyp kolonii oraz fenotyp oct<sup>-</sup>.

## PIŚMIENNICTWO

- Anastassiadis S., Aivasidis A., Wandrey C., 2002. Citric acid production by *Candida* strains under intracellular nitrogen limitation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 81–87.
- Anastassiadis S., Rhem H.J., 2006. Citric acid production from glucose by yeast *Candida oleophila* ATCC 20177 under batch, continuous and repeated batch cultivation. *Electron. J. Biotechnol.*, 9, 26–39.
- Arzumanov T.E., Shishkanova N.V., Finogenova T.V., 2000a. Biosynthesis of citric acid by *Yarrowia lipolytica* repeat-batch culture on ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53 (5), 525–529.
- Arzumanov T.E., Sidorov I.A., Nadezdha V.S., Finogenova T.V., 2000b. Mathematical modeling of citric acid production by repeated batch culture. *Enzyme Microb. Technol.*, 26, 826–833.
- Aurich A., Förster A., Mauersberger S., Barth G., Stottmeister U., 2003. Citric acid production from renewable resources by *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnol. Adv.*, 21, 454–455.
- Bednarski W., 1990. Wybrane aspekty utrwalania oraz przechowywania drobnoustrojów przemysłowych. *Przem. Ferm. Owoc.-Warzyw.*, 3, 13–14.
- Bubbico R., Presti S., Bravi M., Moresi M., Spinosi M., 1996. Repeated batch citrate production by *Yarrowia lipolytica* using yeast recycling by cross-flow microfiltration. *Agro Food-Ind. Hi-Tech.*, 3, 35–38.

- Chen X., Xiu Z., Wang J., Zhang D., Xu P., 2003. Stechiometric analysis and experimental investigation of glycerol bioconversion to 1,3-propanediol by *Klebsiella pneumoniae* under microaerobic conditions. *Enzyme Microb. Technol.*, 33(4), 386–394.
- Goldberg D., Ellis G., 1983. Isocitrate dehydrogenase, [in:] Bergmeyer H.U. (ed). *Methods of enzymatic analysis*. Verlag Chemie, Weinheim, 3, 183–190.
- Ito T., Nakashimada Y., Senba K., Matsui T., Nishio N., 2005. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J. Biosci. Bioeng.*, 100(3), 260–265.
- Kamzolova S.V., Finogenova T.V., Morgunov I.G., 2008. Microbial production of citric and isocitric acids from sunflower oil. *Food Technol. Biotechnol.*, 46(1), 51–59.
- Kamzolova S.V., Morgunov I.G., Aurich A., Perevoznikova O.A., Shishkanova N.V., Finogenova T.V., Stottmeister U., 2005. Lipase secretion and citric acid production in *Yarrowia lipolytica* yeast grown on animal and vegetable fat. *Food Technol. Biotechnol.*, 43, 113–122.
- Kets E.P.W., Galinski E.A., De Wit M., De Bont J.A.M., Heipieper H.J., 1996. Mannitol, a novel bacterial compatible solute in *Pseudomonas putida*. S12. *J. Bacteriol.*, 178, 6665–6670.
- Kim Y.H., Kang S.W., Lee J.H., Chang H.I., Yun C.W., Paik H.D., Kang C.W., Kim S.W., 2007. High cell density fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* JUL3 in fed-batch culture for the production of  $\beta$ -glucan. *J. Ind. Eng. Chem.*, 13(1), 153–158.
- Kumar P.K.R., Singh A., Schügerl K., 1991. Fed-batch culture for direct conversion of cellulosic substrates to acetic acid/ethanol by *Fusarium oxysporum*. *Proc. Biochem.*, 26, 209–216.
- Lee P.C., Lee W.G., Lee S.Y., Chang H.N., 2001. Succinic acid production with reduced by-product formation in the fermentation of *Anaerobiospirillum succiniciproducens* using glycerol as a carbon. *Biotechnol. Bioeng.*, 72(1), 41–48.
- Levinson W.E., Kurtzman C.P., Kuo T.M., 2007. Characterization of *Yarrowia lipolytica* and related species for citric acid production from glycerol. *Enzyme Microb. Technol.*, 41, 292–295.
- McKay I.A., Maddox I.S., Brooks J.D., 1994. High specific rates of glucose utilization under conditions of restricted growth are required for citric acid accumulation by *Yarrowia lipolytica* IMK 2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 41 (1), 73–78.
- Moresi M., 1994. Effect of glucose concentration on citric acid production by *Y. lipolytica*. *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, 60, 387–395.
- Papanikolaou S., Aggelis G., 2003. Modelling aspects of the biotechnological valorization of crude glycerol: production of citric acid by *Yarrowia lipolytica* and 1,3-propanediol by *Clostridium butyricum*. *J. Chem. Technol. Biotech.*, 78(5), 542–547.
- Papanikolaou S., Muniglia L., Chevalot I., Aggelis A., Marc I., 2002. *Yarrowia lipolytica* as a potential producer of citric acid from raw glycerol. *J. Appl. Microbiol.*, 92, 737–744.
- Parente E., Ricciardi A., Mancino M., Moresi M., 1995. Produzione di acido citrico da *Yarrowia lipolytica* con riciclo di biomassa per centrifugazione asettica. *Ann. Microbiol. Enzym.*, 45, 97–107.
- Rymowicz W., Juszczak P., Rywińska A., Żarowska B., Musiał I., 2005. Produkcja kwasu cytrynowego z odpadowego glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Biotechnologia, monografie*, 2 (2), 46–54.
- Rymowicz W., Rywińska A., 2003. Ciągła produkcja kwasu cytrynowego z syropu glukozowego przez mutant *Yarrowia lipolytica* w reaktorze membranowym. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 2(1–2), 2003, 21–30.
- Rymowicz W., Rywińska A., Żarowska B., Juszczak P., 2006. Citric acid production from crude glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Pap.*, 60(5), 391–394.
- Rywińska A., Wojtatowicz M., Żarowska B., Rymowicz W., 2008. Biosynthesis of citric acid by yeast *Yarrowia lipolytica* A-101-1.31 under repeated batch cultivation, *EJPAU* 11(1).

- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Musiał I., 2004. Characteristics of physiology state of *Yarrowia lipolytica* mutants during continuous citric acid production in membrane reactor on glucose syrup. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 3 (1–2), 85–95.
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Wojtatowicz M., 2009. Biosynthesis of citric acid from glycerol by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* in fed-batch fermentation. *Food Technol. Biotechnol.*, 47 (1) 1–6.
- Rywińska A., Wojtatowicz M., Rymowicz W., 2006. Citric acid biosynthesis by *Yarrowia lipolytica* A-101-1.31 under deficiency of various medium macrocomponents. *EJPAU* 9(1).
- Rywińska A., Wojtatowicz M., Wielebińska A., 2003. Otrzymywanie mutantów Fil<sup>-</sup> drożdży *Yarrowia lipolytica* do produkcji kwasu cytrynowego. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 2 (1–2), 11–20.
- Wojtatowicz M., Rymowicz W., 1995. Produktywność i wydajność drożdżowej fermentacji cytrynowej w różnych systemach hodowlanych. *Biotechnologia*, 2 (29), 123–129.
- Żarowska B., Rymowicz W., Rywińska A., Musiał I., 2004. Characteristics of continuous citric acid biosynthesis by acetate mutants of *Yarrowia lipolytica* on fructose syrup. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.*, 3 (1–2), 85–95.

#### CHARACTERISTIC OF CITRIC ACID BIOSYNTHESIS FROM RAW GLYCEROL BY YEAST IN REPEATED-BATCH FERMENTATION

**Abstract.** The objective of the current study was to determine growth and acid-forming activities, morphology and physiology of *Yarrowia lipolytica* Wratislawia 1.31. The process was started as a fed-batch cultivation after that repeated batch cultivation was carried out in 4 batches for each volume of changing medium (0.4 and 0.5 dm<sup>3</sup>). When 0.4 dm<sup>3</sup> of fresh medium was exchanged this strain produced 175 g · dm<sup>-3</sup> citric acid and the citric acid yield was high 0.66 g·g<sup>-1</sup>. Increasing the volume of medium exchanged (to 0.5 dm<sup>3</sup>) affected the lower concentration of citric acid to 120 g · dm<sup>-3</sup> but increase the concentration of biomass and erythritol was observed. Physiological state assessment of yeasts used in the study showed their good viability and high genetic and phenotypic stability.

**Key words:** citric acid, raw glycerol, repeated- batch culture, *Yarrowia lipolytica*

Accepted for print – Zaakceptowano do druku: 30.09.2009

Do cytowania – For citation: Rywińska A., Juszczak P., Gryszkin A., Rymowicz W., 2009. Charakterystyka półciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez drożdże. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 8(3), 3–14.



## **BIOREMEDIACJA Z UDZIAŁEM DROŻDŻY *YARROWIA LIPOLYTICA*: UNIERUCHOMIONE W ALGINIANIE KOMÓRKI ORAZ ICH WPŁYW NA AUTOCHTONICZNĄ MIKROFLORE GLEBY I KIEŁKOWANIE OWSA**

Agnieszka Kowalczyk, Monika Michniewicz, Małgorzata Robak  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

**Streszczenie.** W pracy sprawdzano wpływ warunków atmosferycznych na trwałość granulki alginianowej zawierającej unieruchomione komórki drożdży *Yarrowia lipolytica* podczas ich przetrzymywania w terenie przez pięć jesienno-zimowych miesięcy. W warunkach laboratoryjnych badano wpływ dodatku drożdży *Y. lipolytica* na kiełkowanie owsa i mikroflorę autochtoniczną gleby. Po okresie zimowego przechowywania granulki zawierały żywe drożdże *Y. lipolytica*. Obecność granulki pozytywnie wpłynęła na autochtoniczną mikroflorę, powodując wzrost liczby mikroorganizmów. W testach laboratoryjnych dodatek preparatu drożdży (zawiesina lub granulki) spowodował wzrost liczby mikroorganizmów gleby i poprawił kiełkowanie owsa. Otrzymane wyniki zdecydowanie zachęcają do kontynuacji badań nad produkcją biopreparatów drożdży *Y. lipolytica* przeznaczonych do bezpośredniego wprowadzania do gleby.

**Słowa kluczowe:** *Yarrowia lipolytica*, bioremediacja gleby, stabilność granulki alginianowej

### **WSTĘP**

Wielu geologów uważa, że ropa naftowa postrzegana jako zanieczyszczenie środowiska nie stanowi problemu. Jest biologicznego pochodzenia i naturalnie występuje w gruncie. Niestety, już niewielka jej ilość na tyle zmienia smak wody, że nie jesteśmy w stanie wypić nawet kilku jej łyków. Dlatego powierzchniowe zanieczyszczenia gruntów związkami ropopochodnymi, mogącymi ostatecznie dyfundować do ujęć wody pitnej, stają się zagrożeniem dla środowiska, podobnie jak obszary skażone, na których z racji stężenia tych substancji nie ma życia. W Polsce wielu naukowców zajęło się już tym problemem, szukając mikrobiologicznych preparatów efektywnie oczyszczających skażony teren [Lisowska i Długoński 2003, Mrozik i in. 2005, Wójcik i Tomaszewska

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: Małgorzata Robak, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, ul. Norwida 25, 50-375 Wrocław, e-mail: malgorzata.robak@up.wroc.pl

2005]. Niemniej większość z tych preparatów zawierała bakterie. Natomiast do usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych zdolne są także drożdże z gatunku *Yarrowia lipolytica* [Robak 2006]. Wchodzą one również w skład preparatów stosowanych w celu wzbogacenia ryzosfery [Vassilev i in. 2001a, 2001b] i poprawy przyswajalności fosforu [Takita i in. 1999].

Drożdże te w postaci wolnych i immobilizowanych w alginianie wapnia komórek były wykorzystane do biodegradacji związków ropopochodnych w glebie metodą *in situ* w okolicy Bornego Sulinowa [Żogała i in. 2005]. Wprowadzenie biomasy drożdży do odwiertów doprowadziło do zaniku zanieczyszczenia (obserwowanego wcześniej jako anomalia, określona i umiejscowiona przez pomiary elektrooporowe oraz elektromagnetyczne) i jednocześnie znacznie wzbogaciło mikroflorę glebę [Robak i in. 2007, Żogała i in. 2008]. Obserwowany postęp oczyszczania gruntu metodą *in situ* jest wynikiem działalności drożdży, metabolizujących szkodliwe substancje do komponentów komórkowych i wydzielających metabolity sprzyjające rozwojowi innych organizmów. Obumierające komórki drożdży wzbogacają dodatkowo glebę w cenne składniki pokarmowe. Obficie zaczyna rozwijać się mikroflora, poprawia się ukorzenienie i rozwój roślin. Przy analizie mikrobiologicznej gleby należy jednak pamiętać, że ilość mikroorganizmów w glebie jest zmienna w zależności od pór roku, temperatury, ilości opadów, a także samej struktury gleby [Paul i Clark 2000]. Często trudne jest ilościowe porównanie flory mikrobiologicznej z tego samego obszaru podlegającego zmieniającym się warunkom atmosferycznym. Możliwa jest jedynie ocena przyrostu liczby drobnoustrojów w odniesieniu do kontrolnej próby gleby pobranej w tym samym czasie z przyległego nie poddanego bioremediacji terenu.

Celem pracy było zbadanie wpływu szczepionki drożdżowej na autochtoniczną mikroflorę gleby przechowywanej w odizolowanych pojemnikach zakopanych na głębokość 0,6 metra na okres zimy oraz określenie dawki i postaci szczepionki *Y. lipolytica* dającej najlepsze wyniki w odniesieniu do kiełkowania owsa. W pracy badano także wpływ postaci preparatu: wolnych komórek (zawiesina) i unieruchomionych w alginianie wapnia (granulki) na zmiany liczebności mikroflory gleby i kiełkowanie owsa. Wyznaczono również trwałość preparatu immobilizowanych drożdży poprzez pomiar sprężystości granulki poddanych działaniu różnych czynników.

## MATERIAŁ I METODY

**Drożdże:** do badań wykorzystano szczep drożdży *Y. lipolytica* A-101 pochodzący z kolekcji Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Zapas kultury przechowywano na skosie YM w temperaturze 4°C.

**Podłoża:** podłoże inokulacyjne w 1 l zawierało: 2 g peptonu, 2 g ekstraktu drożdżowego oraz 40 g syropu glukozowego; podłoże wzrostowe w 1 l zawierało 1 g ekstraktu drożdżowego, 70 g syropu glukozowego, 1 g  $MgSO_4 \times 7 H_2O$ , 5 g  $NH_4Cl$  oraz 0,5 g  $KH_2PO_4$ .

**Hodowla:** Biomagę uzyskano z hodowli prowadzonej w bioreaktorze AK 210 w temperaturze 28°C, przy stałym pH 5,5 (dozowanie NaOH) i napowietrzaniu 1,2 l $\times$ min<sup>-1</sup>, przez 48 godzin. Inokulum stanowiło dziesięć procent objętości hodowli. Po 48-godzinnej hodowli otrzymano 5 l zawiesiny biomasy zawierającej 6 $\times$ 10<sup>9</sup> komórek drożdży w 1 ml, a w przeliczeniu na suchą masę 10,8 gxl<sup>-1</sup>.



**Immobilizacja komórek drożdży:** do 2000 ml 2,5% alginianu sodu dodawano 500 ml zagęszczonej biomasy (zawierającej  $3 \times 10^9$  kom x ml<sup>-1</sup>), mieszano, a powstały roztwór wkraplało za pomocą wieloigłowej dyszy do 0,2-molowego roztworu chlorku wapnia. Otrzymano 2,5 l granulek. Ilość komórek w 1 ml granulek wynosiła  $1,7 \times 10^9$ .

**Gleba** do oceny trwałości granulek pochodziła z trzech miejsc: z Bornego Sulinowa, Brzegu (gleba po rafinacji oleju rzepakowego) i Granicznej (gleba kontrolna). W celu sprawdzenia wytrzymałości powstałych w procesie immobilizacji drożdży *Y. lipolytica* granulek oraz żywotności wolnych komórek, po wymieszaniu preparatów drożdży z trzema rodzajami gleby (w proporcjach podanych w tab. 1), zakopano je w specjalnych zamkniętych pojemniczkach na głębokości około 0,6 m i przechowywano przez okres pięciu miesięcy: od 31 października do 25 marca. Końcowa objętość każdej próby wynosiła 100 ml. Próby wykonano w trzech powtórzeniach. W poniższej tabeli (tab. 1) przedstawiono zawartość gleby oraz szczepionki w poszczególnych wariantach eksperymentu. Próbki gleby po wykopaniu z terenu poddano analizie makroskopowej, sensorycznej, mikrobiologicznej oraz zbadano twardość granulek.

Tabela 1. Ilość gleby, granulek oraz płynnej biomasy drożdży (zawiesiny) w zastosowanych wariantach eksperymentu

Table 1. Quantity of soil, beads and yeasts biomass (suspension) in performed variants of experiments

Miejsce pobrania gleby Soil provenence	Objętość – Volume [ml]		
	Gleba:Zawiesina Soil:Suspension	Gleba:Granulki Soil:Beads	Gleba kontrolna Control soil
Borne Sulinowo	50:50	50:50 75:25	100
Brzeg	50:50	50:50 75:25	100
Graniczna	50:50	50:50 75:25	100

**Analiza mikrobiologiczna:** oznaczenie ogólnej liczby drobnoustrojów wykonano metodą PCA (plate count agar) na agarze odżywczym. Do oceny ogólnej liczby drożdży i pleśni użyto podłoża agarowego z oksytetracykliną ( $0,1 \text{ gxl}^{-1}$ ). W celu sprawdzenia obecności drożdży *Y. lipolytica* podobne makroskopowo kolonie przesiewano na podłożu MMT z dodatkiem 1% heksadekanu [Robak 2002] i podłożu do oceny produkcji kwasów o pH 6,8 zawierające w 1 l 150 g glukozy; 1,0 g MgSO<sub>4</sub>; 1,5 g NH<sub>4</sub>Cl; 0,2 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 ml roztworu pierwiastków śladowych, 300 µg tiaminy, 22 µg czerwieni bromofenolowej oraz 25 g agaru. W przypadku wzrostu drożdży na podłożu z heksadekanem oraz zmiany zabarwienia podłoża z czerwieni bromofenolową z czerwonego na żółty – produkcja kwasów organicznych – można przypuszczać o obecności drożdży *Y. lipolytica*. W celu sprawdzenia aktywności drożdży unieruchomionych w granulkach posiano je na wyżej wymienione podłoża: do produkcji kwasu cytrynowego oraz do wzrostu na heksadekanie.

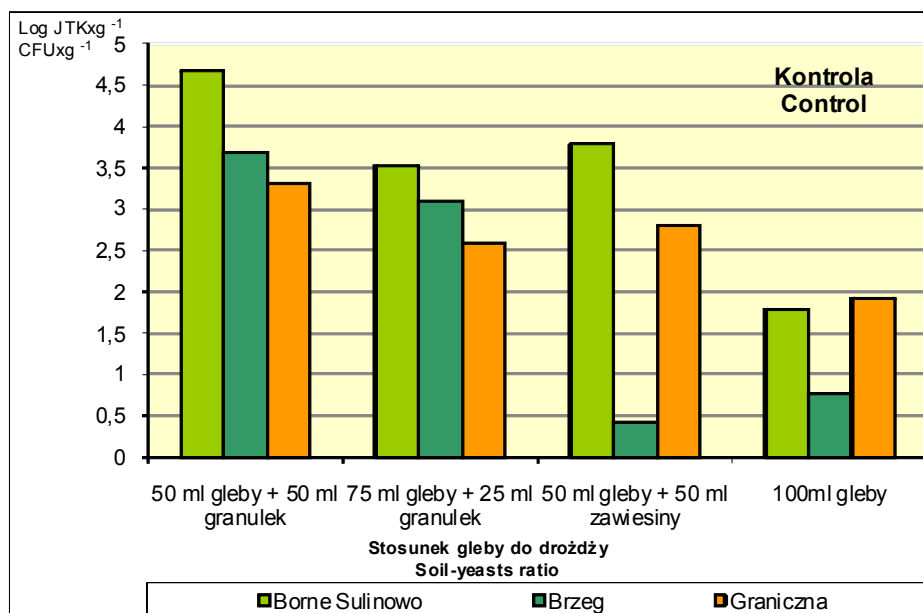
**Analiza twardości granulek:** twardość granulek kontrolnych (świeżych), przechowywanych w lodówce, poddanych działaniu: temperatury, środków czystości oraz wykopanych z ziemi zbadano za pomocą aparatu INSTRON 5544.

**Ocena kiełkowania owsa:** szalki Petriego napełniono glebą w ilości 80 g na płytkę, a następnie dodano 0,2 lub 2 ml zawiesiny drożdży, albo 0,8; 8 g granulek zawierających drożdże. Po wymieszaniu, na powierzchni gleby na każdą płytkę, wyłożono po 10 ziarniaków owsa. Każda próba została wykonana w czterech powtórzeniach. Hodowle prowadzono w temperaturze pokojowej, przez okres 24 dni. Podłoże znajdujące się w płytce podlewano 25 ml wody destylowanej 2 razy dziennie. Po zakończeniu rekultywacji gleby ziarno zostało zebrane i określono procent ziarna, które wykiełkowało, zmierzono długość korzonków, hypokotyli i listków poszczególnych roślin.

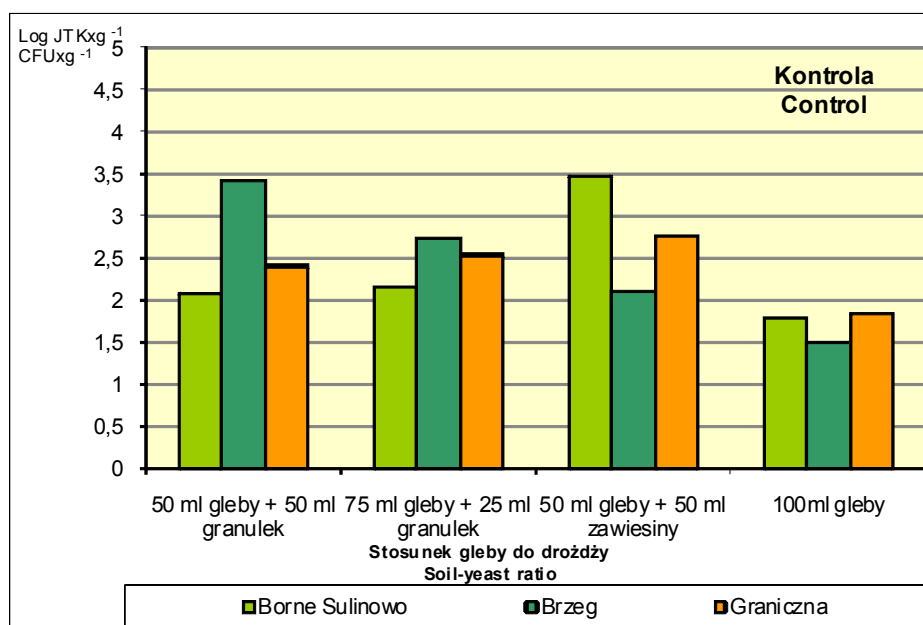
## WYNIKI I DISKUSJA

W pracy sprawdzano wytrzymałości granulek powstałych w procesie immobilizacji drożdży *Y. lipolytica* na czynniki środowiska. W pierwszej kolejności badano wpływ niskiej temperatury na żywotność unieruchomionych drożdży podczas ich przetrzymywania w glebie przez okres jesienno-zimowy (~5 miesięcy). W celu zachowania warunków naturalnych pojemniczki z glebą i szczepionką zakopano w ziemi na głębokości około 60 cm. Po okresie przechowywania wykonano porównawczą analizę mikrobiologiczną (rys. 1 i 2). Uzyskane wyniki wskazują na pozytywny wpływ dodanych drożdży na mikroflorę zamkniętej w pojemnikach gleby. Pomimo że ilość mikroorganizmów była zdecydowanie mniejsza niż w analizach wcześniejszych (jesiennych), widać wzrost liczby mikroorganizmów w próbkach z dodatkiem granulek. Kolejnym dowodem na działalność *Y. lipolytica* mimo mrozu było wykazanie obecności żywych drożdży wykorzystujących heksadekan oraz powodujących zakwaszenie podłoża hodowlanego w granulkach alginianowych. Granulki te stwierdzono we wszystkich próbach, ale były stosunkowo mało wytrzymałe na zgniecenie (tab. 2). W naturalnych warunkach, po dwuletnim okresie pobytu w glebie granulki ulegają rozkładowi (dane nie publikowane), podobnie jak ulegają rozpadowi pod wpływem środków czystości (tab. 3) i nie nadają się do stosowania w przypadku ścieków neutralizowanych NaOH.

Obok pozytywnego wpływu dodatku drożdży *Y. lipolytica* na autochtoniczną mikroflorę wykazano, że ich obecność w glebie (zarówno w postaci zawiesiny, jak i granulek alginianowych) stymulowała proces kiełkowania ziarna oraz rozwój kielków (tab. 4). Drożdże powodowały wzrost długości korzonków, hypokotyli i listków roślin w porównaniu z roślinami uzyskanymi w próbie kontrolnej. Udział wykiełkowanego ziarna w ich obecności – również był większy niż w próbie kontrolnej. W próbach z dodatkiem zawiesiny drożdży najlepsze wyniki uzyskano przy objętości 2 ml zawiesiny, gdzie ziarno wykiełkowało w 67,5%, a średnie długości korzeni, hypokotyli i listków wynosiły odpowiednio: 4,16, 2,78 i 4,62 cm. Nieco mniejszy procent skielkowanego ziarna uzyskano w próbach z dodatkiem 0,8 g granulek: 62,5%. Za to średnie długości korzeni, hypokotyli oraz listków były największe ze wszystkich prób, bo wynosiły odpowiednio: 6,44, 3,15 i 6,00 cm. W próbie kontrolnej wykiełkowało 47% ziarniaków, a średnie długości korzeni, hypokotyli oraz listków liczyły odpowiednio 2,32, 1,66 i 2,8 cm. Zatem dodatek unieruchomionych drożdży ponad dwukrotnie poprawił mierzone parametry kiełkowania owsa.



Rys. 1. Ogólna liczba bakterii w próbkach gleby przechowywanych przez 3 miesiące zimy  
Fig. 1. Total number of bacteria in soil samples maintained during 3 winter months



Rys. 2. Ogólna liczba drożdży i pleśni w próbkach gleby przechowywanych przez 3 miesiące zimy  
Fig. 2. Total number of yeast and molds in soil samples maintained during 3 winter months

Tabela 2. Wartość siły [N] potrzebnej do zgniecenia granulek alginianowych oraz ocena wizualna granulek

Table 2. Value of force [N] needed to crack alginate beads and beads visual appreciation

Rodzaj granulek Type of beads	Średnica granulek Diameter of beads [mm]	Siła zgniecenia* Crack force * [N]	Ocena wizualna Visual appreciation
IMMOBILIZACJA I IMMOBILISATION I			
Świeżo otrzymane Freshly obtained	2,0	4,63	sprężyste, przezroczyste, kuliste, wszystkie granulki pękły elastic, transparent, round, all beads cracked
	4,5	3,92	
Po 133 dniach w glebie After 133 days in soil	1,7	Pomiar niemożliwy Impossibile to measure	suche, drobne, spłaszczone, bez sprężystości, miękkie, barwa ziemi, żadne nie pękają, wszystkie są miażdżone dry, small, flat, without previous elasticity, soft, soil colored, all did not cracked but were deformed to flat form
Po 7 dniach w ściekach After 7 days in waste- water treatment	2,0	1,59	sprężyste, mało przezroczyste, kuliste, wszystkie granulki pękły elastic, nontransparent, round, all beads crack
IMMOBILIZACJA II IMMOBILISATION II			
Świeżo otrzymane Freshly obtained	1,5	5,17	sprężyste, przezroczyste, kuliste, wszystkie granulki pękły elastic, transparent, round, all beads crack
	5,0	6,92	
Po 13 dniach w glebie After 13 days In soil	3,5	6,59	mniej sprężyste niż świeże, barwa ziemi, kuliste, nie wszystkie pękają, niektóre ulegają zmiżdżeniu less elastic, non all cracked, soil colored, some were deformed to flat form
Po 30 dniach w glebie After 30 days in soil	3,3	11,40	barwa ziemi, częściowo spłaszczone, nie wszystkie pękają, niektóre ulega- ją zmiżdżeniu soil colored, some flat, non all cracked, some were deformed to flat form

\* Średnia siła [N] z 10 pomiarów  
Means force [N] of 10 measures

Tabela 3. Wpływ środków czystości na trwałość granulek. Wartość siły [N] potrzebna do zgniecenia granulek

Table 3. Effect of detergents on beads form. Value of force [N] needed to crack the beads

Rodzaj granulek Type of algina te beads	Średnica granulek Diameter of beads [mm]	Siła zgniecenia* Crack force* [N]	Uwagi Notes
Woda – kontrola Water – control	1,5	4,63	Kształt kulisty po 7 dniach Round form after 7 days
	5,0	6,56	
Proszek do prania „Dosia” Washing powder „Dosia”	1,5	–	Całkowicie upłynnione po 24 h Totally liquefied after 24 hours
	5,0	–	
Płyn do mycia naczyń „Ludwik” Liquid dishes cleaner „Ludwik”	1,5	–	Całkowicie upłynnione po 48 h Totally liquefied after 48 hours
	5,0	–	Upłynnione częściowo po 48 h Partially liquefied after 48 hours
Płyn do mycia naczyń „Pur extra” Liquid dishes cleaner „Pur extra”	1,5	–	Upłynnione częściowo po 48 h Partially liquefied after 48 hours
	5,0	–	
Środek czyszcząco-dezynfekujący „Domestos” Liquid cleaner-disinfector „Domestos”	1,5	–	Upłynnione całkowicie po 48h Partially liquefied after 48 hours
	5,0	–	

\* Średnia siła [N] z 10 pomiarów  
Means force [N] of 10 measures

Wszystkie wymienione czynniki są kolejnymi dowodami na wielokierunkową możliwość wykorzystania drożdży *Y. lipolytica*. Szczególnie, że jest to gatunek niepatogeniczny dla człowieka [Yoshida i Hashimoto 1986]. Może być zatem wykorzystany nie tylko w bioremediacji gleby zanieczyszczonej ropą, ale także w oczyszczaniu środowiska z pestycydów [Prządo i in. 2004], poprawiając ukorzenianie i rozwój roślin [Vassilev i in. 2001a, 2001b]. Możliwe jest również jednoczesne stosowanie preparatów drożdży oraz wysiewu roślin charakteryzujących się zdolnościami do fitoremediacji [Kondzielski i Buczkowski 1999].

Podsumowując, można stwierdzić, że otrzymane wyniki zdecydowanie zachęcają do dalszej kontynuacji badań nad bioremediacją gleby ze związków ropopochodnych przy użyciu drożdży *Y. lipolytica*. W szczególności nad produkcją biopreparatów drożdży tego gatunku przeznaczonych do bezpośredniego wprowadzania do gleby.

## WNIOSKI

1. Dodatek preparatu drożdży (wolne lub unieruchomione komórki, wpływa na wzrost liczby mikroorganizmów gleby i poprawia rozwój roślin.
2. Preparat immobilizowanych drożdży wykazuje pozytywne działanie po 5-miesięcznym jesienno-zimowym okresie przechowywania w glebie na głębokości 0,6 m i zawiera żywe komórki.
3. Uzyskane granulki ulegają upłynnieniu w obecności środków czystości.

**Podziękowanie.** Autorzy dziękują dr hab. Agnieszce Kicie z Katedry Technologii Rolnej i Przechowywania Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu za pomoc przy pomiarze sprężystości granulek alginianowych.

## PIŚMIENNICTWO

- Kondzielski I., Buczkowski R., 1999. Fitoremediacja – nowa, obiecująca metoda stosowana w ochronie środowiska. *Ekologia i Technika*, 3, 79–84.
- Lisowska K., Długoński J., 2003. Biodegradacja związków ropopochodnych przez grzyby strzępkowe. *Biotechnologia*, 4(63), 92–100.
- Mrozik A., Piotrowska-Seget Z., Łabużek S., 2005. Bacteria in bioremediation of hydrocarbon – contaminated environments. *Post. Mikrobiol.*, 44 (3), 227–23.
- Paul E.A., Clark E.F., 2000. *Mikrobiologia i biochemia gleb*. Lublin.
- Prządo D., Robak M., Steininger M., 2004. Biodegradation of chloroorganic pesticides by *Yarrowia lipolytica*. [in:] *New agrochemicals and their safe use for health and environment*, Chemistry for Agriculture, 5, 326–331.
- Robak M., 2002. Studia nad wykorzystaniem octanu i wydzielaniem cytrynianu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*. *Zesz. Nauk. AR Wroc., Technologia Żywności*, Nr 442, Rozprawy CXCII, 1–91.
- Robak M., 2006. Czy możliwa jest bioremediacja środowiska z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica*? *Ekonatura*, 3, 22–23.
- Robak M., Żogała B., Rymowicz W., Wojtatowicz M., 2006. Zgłoszenie patentowe P-38007.
- Robak M., Żogała B., Seweryn M., Dubiel R., 2007. Zastosowanie drożdży *Yarrowia lipolytica* do usuwania zanieczyszczeń ropopochodnych z gruntu metodą „*in situ*”. III Kongres Biotechnologii, Poznań, poster T2/47.
- Takita E., Koyama H., Hara T., 1999. Organic Acid Metabolism in Aluminium-Phosphate Utilizing Cells of Carrot (*Daucus carota L.*). *Plant Cell Physiol.*, 40(5), 489–495.
- Vassilev N., Vassileva M., Azcon R., Medina A., 2001a. Application of free and Ca-alginate-entrapped *Glomus deserticola* and *Yarrowia lipolytica* in soil-plant system. *Journal of Biotechnology*, 91, 237–242.
- Vasilev N., Vassileva M., Azcon R., Medina A., 2001b. Interactions of an arbuscular mycorrhizal fungus with free or co-encapsulated cells of *Rhizobium trifoli* and *Yarrowia lipolytica* inoculated into soil-plant system. *Biotechnology Letters*, 23, 149–151.
- Wójcik P., Tomaszewska B., 2005. *Biotechnologia w remediacji zanieczyszczeń organicznych*. *Biotechnologia* 4 (71), 156-172.
- Yoshida M., Hashimoto K., 1986. Assessment of the pathogenicity of yeast used in the production of single cell protein. *Agric. Biol. Chem.*, 50(8), 2117–2118.
- Żogała B., Robak M., Rymowicz W., Wzientek K., Rusin M., Maruszczak J., 2005. Geoelectrical Observation of *Yarrowia lipolytica* Bioremediation of Petrol-Contaminated Soil. *Polish Journal of Environmental Studies*, 14 (5), 665–669.
- Żogała B., Dubiel R., Robak M., Zuberek W.M., Wzientek K., 2008. Observation of the bioremediation of oil contaminated soils-application of EM and resistivity imaging methods, Near Surface 2008, 14th European Meeting of Environmental and Engineering Geophysics, Kraków, BO4, str. 4.

**YARROWIA LIPOLYTICA IN BIOREMEDIATION:  
CELLS ENTRAPPED IN ALGINATE AND THEIR INFLUENCE  
ON AUTOCHTHONIC MICROFLORA  
AND OATS GERMINATION**

**Abstract.** In this work the influence of atmospheric conditions on stability of alginate beads containing immobilized *Yarrowia lipolytica* yeast cells after their storage in field during five months of autumn-winter was measured. In laboratory, the influence of soil supplementation by yeasts on oats germination and autochthonic soil microflora was analyzed. Autumn-winter stored beads contained living *Y. lipolytica* yeasts. Beads presence had a positive effect on autochthonic microflora, causing increase of microbial cells number. In laboratory tests, supplementation of soil by yeasts preparation (suspension or beads) caused amelioration of oats germination and increase in autochthonic microbial cells number. Obtained results clearly encourage to continue the study on formulation of *Y. lipolytica* yeasts bioproduct, designated to direct soil application.

**Key words:** *Yarrowia lipolytica*, soil bioremediation, alginate beads stability

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.09.2009

Do cytowania – For citation: Kowalczyk A., Michniewicz M., Robak M., 2009. Bioremediacja z udziałem drożdży *Yarrowia lipolytica*: unieruchomione w alginianie komórki oraz ich wpływ na autochtoniczną mikroflorę gleby i kiełkowanie owsa. Acta Sci. Pol. Biotechnol. 8(3), 15–24.





## FERMENTACJA ETANOŁOWA POŁĄCZONA Z JEDNOCZESNĄ HYDROLIZĄ SKROBI KUKURYDZIANEJ I ZAWRACANIEM FRAKCJI CIEKŁEJ WYWARU W WARUNKACH GORZELNI ROLNICZEJ\*

Daria Szymanowska, Włodzimierz Grajek

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

**Streszczenie.** Przeprowadzono badania nad procesem jednoczesnej hydrolizy i fermentacji (SSF), w którym do hydrolizy skrobi zastosowano preparat Stargen 001. Proces był prowadzony w gorzelnii rolniczej w skali przemysłowej. Do przygotowania zacierów wykorzystano frakcję ciekłą wywaru, którą zawracano wraz z kondensatami pary. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano, że stosując 25% zacier, uzyskano końcowe stężenie etanolu na poziomie 8–10% w/v. Poważnym problemem było zakażenie zacierów kukurydzianych bakteriami mlekowymi. Stężenie kwasu mlekowego w odfermentowanym zacierze dochodziło do 3,8% w/v. Proces SFF połączony z recyrkulacją frakcji stałej wywarów umożliwił całkowitą redukcję zużycia wody technologicznej i w pełni bezściekową produkcję etanolu. Dzięki hydrolizie skrobi natywnej w trakcie fermentacji ograniczono znacznie zużycie energii na cele produkcyjne.

**Słowa kluczowe:** etanol, fermentacja, jednoczesne scukrzanie i fermentacja, wywar, recyrkulacja, *Saccharomyces cerevisiae*, skrobia natywna, kukurydza, hydroliza, Stargen 001

### WSTĘP

Wzrost cen ropy naftowej i potrzeba uniezależnienia się od tego surowca oraz wymogi ochrony środowiska wzbudzają rosnące zainteresowanie produkcją bioetanolu stosowanego jako dodatek do benzyny [Kowalczyk 2003, Michalski 2005]. Od dawna prowadzone są prace związane z produkcją biopaliw drugiej generacji, lecz nie przyno-

---

\* Praca naukowa została sfinansowana ze środków na naukę w latach 2007–2010 jako projekt badawczy rozwojowy nr 0619/P01/2007/02.

---

Adres do korespondencji – Corresponding author: Włodzimierz Grajek, Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 48, 60-627 Poznań, e-mail: grajek@up.poznan.pl

szą one oczekiwanych efektów. Wynika to z braku efektywnych preparatów enzymatycznych, trudnej i kosztownej technologii przygotowania surowców lignino-celulozowych do hydrolizy i braku odpowiednich mikroorganizmów zdolnych do konwersji jednocześnie heksoz i pentoz do etanolu. Aktualnie nadal rozwijane są technologie oparte na produkcji bioetanolu z surowców skrobiowych i sacharozowych [Wheals i in. 1999], a ostatni kryzys gospodarczy wykazał, że konkurencja między wykorzystaniem skrobi na cele żywnościowe i paliwowe jest znacznie wyolbrzymiona. W tej sytuacji celowe wydają się dalsze starania o rozwój technologii pierwszej generacji biopaliw, choć bez wątplenia przyszłość należy do surowców celulozowych [Hamelinck i in. 2005, Wheals i in. 1999].

W wielu krajach podstawowym surowcem do wydajnej produkcji bioetanolu jest kukurydza [Kowalczyk 2003, Michalski 2005]. Dzięki wysokiej zawartości skrobi i jej dużej podatności na hydrolizę enzymatyczną jest wyjątkowo atrakcyjnym substratem do fermentacji etanolowej.

Tradycyjna technologia produkcji etanolu obejmuje rozdrabnianie surowca, upłynnianie i kleikowanie skrobi oraz jej scukrzanie, a następnie fermentację etanolową i destylację. Szczególnie kosztownym zabiegiem jest obróbka hydrotermiczna, wymagająca ogrzania zawiesiny zmielonego surowca do temperatury powyżej 90°C. Ponadto poszczególne etapy procesu produkcyjnego są prowadzone w oddzielnych naczyniach, co podnosi koszty inwestycji i koszty operacyjne. Technologia ta pociąga za sobą również zużycie dużej ilości wody i generuje wysoko obciążone ścieki.

Dużym postępiem było wprowadzenie do praktyki technologii jednoczesnej hydrolizy enzymatycznej skrobi i fermentacji etanolowej (ang. Simultaneous Saccharification and Fermentation; SSF), co skróciło czas całego procesu i zredukowało liczbę zbiorników produkcyjnych. Prawdziwą rewolucję przynosi jednak wprowadzenie na rynek enzymów amylolitycznych zdolnych do bezpośredniej hydrolizy ziaren skrobi (skrobi natywnej). Pozwala to na pominięcie etapu kleikowania i upłynniania skrobi. Preparatem tego typu jest STARGEN 001 produkowany przez amerykańską firmę Genencor [Kumar 2008, Mitchinson 2008]. Dzięki zastosowaniu tego preparatu jest możliwe jednoczesne scukrzanie skrobi i fermentacja etanolowa, przy czym procesy te mogą być realizowane w jednym reaktorze [Kadar i in. 2004, Shigechi i in. 2004]. W efekcie uzyskuje się skrócenie czasu produkcji etanolu i redukcję nakładów energetycznych [Kłosowski i Czupryński 2006, van der Veen i in. 2006, Verma i in. 2000]. Technologia SSF pozwala dodatkowo na stosowanie większych stężeń substratu, gdyż stosowanie natywnej skrobi i natychmiastowe odfermentowanie cukrów prostych istotnie osłabia stres osmotyczny, na który narażone są mikroorganizmy. Pociąga to za sobą prace badawcze zmierzające do uzyskania wytrzymałych ras drożdży gorzelniczych przystosowanych do trudnych warunków środowiskowych [Verma i in. 2000, D'Amore 1987, Hounsa 1998]. Dobrze poznaną pod tym kątem jest rasa Ethanol Red oferowana przez francuską firmę Lesaffre oraz polskie rasy D2 i AS4 [Kłosowski i Czupryński 2006].

Kolejnym krokiem w redukcji kosztów produkcji bioetanolu jest zwracanie ciekłej frakcji wywaru i kondensatów pary z destylacji do przygotowania kolejnych porcji zacieru [Larsson i in. 1997, Montesinos i Navarro 2000]. Najczęściej w praktyce przemysłowej wywar stosowany jest do przygotowania zawiesiny z mączki zbożowej, co niweluje koszty utylizacji odpadu poprodukcyjnego oraz wpływa na oszczędność wody

[Kim i in. 1997]. Nowoczesna technologia, obok wysokiej wydajności produktu, cechuje się niewielkim obciążeniem dla środowiska, ze względu na wspomniane już niższe nakłady energetyczne oraz potencjalną bezodpadowość.

Opisana technologia scukrzania natywnej skrobi nie jest jednak wolna od wad. Niska temperatura procesu, wynikająca z konieczności stosowania kompromisu między temperaturą działania enzymów amylolytycznych i temperaturą wzrostu drożdży, wynosząca zwykle ok. 35°C sprzyja rozwojowi zakażeń mikrobiologicznych, w szczególności bakterii kwasu mlekowego i octowego. W tradycyjnej technologii bakterie te są eliminowane w czasie obróbki termicznej skrobi. Metabolity wtórne tych drobnoustrojów znacznie obniżają pH hodowli, co uniemożliwia normalne działanie enzymów amylolytycznych, i są toksyczne dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae* oraz bakterii *Zymomonas mobilis* [Czarnecki i Grajek 1991, Narendranath i Power 2004, Skinner i Leathers 2004]. Na dzień dzisiejszy jedynym rozwiązaniem tego problemu jest stosowanie antybiotyków.

Polskie gorzelnictwo rolnicze stosuje tradycyjne metody produkcji etanolu i większość wymienionych innowacji nie znalazła dotąd uznania. Niniejsza praca stanowi próbę porównania przebiegu procesu fermentacji etanolowej prowadzonej w skali przemysłowej metodą jednoczesnego scukrzania i fermentacji (SSF) przy wykorzystaniu skrobi natywnej (ziarnistej), nie poddawanej procesowi gotowania oraz skrobi skleikowanej i upłynnionej tradycyjną metodą termiczną, przy czym w wypadku stosowania skrobi nie obrabianej (natywnej) proces rozbudowano dodatkowo o wielokrotne zawracanie frakcji ciekłej wywaru.

## MATERIAŁ I METODY

**Surowiec.** Materiałem wykorzystanym do eksperymentu w gorzelnii rolniczej było ziarno kukurydzy zakupione w gospodarstwie rolnym w Swadzimiu k. Poznania. Zboże zostało zmielone w młynie w gorzelnii na sitach o średnicy 1 mm. Ziarno było zanieczyszczone resztkami gleby i piasku.

**Mikroorganizmy.** Eksperymenty prowadzono, wykorzystując komercyjny szczep drożdży gorzelnicznych Ethanol Red, należący do gatunku *Saccharomyces cerevisiae*, produkowany przez francuską firmę Lesaffre. Drożdże te otrzymano od producenta w postaci liofilizowanej i przechowywano je w szczelnie zamkniętym, szklanym pojemniku, w chłodni o temperaturze 4°C.

**Enzymy.** Do hydrolizy skrobi natywnej stosowano komercyjnie dostępny preparat enzymatyczny STARGEN 001. Jako enzym wspomagający proces hydrolizy dodawano także kwaśną proteazę GC 106 z *Aspergillus niger*. W wypadku technologii tradycyjnej zastosowano następujące enzymy: scukrzający – Spenzyme Fred L® i upłynniający – Fermentzyme®.

Do oznaczeń skrobi w surowcu i zacierach wykorzystano dwa preparaty enzymatyczne: upłynniający Spezyme Ethyl, zawierający termostabilną  $\alpha$ -amylazę (E.C. 3.2.1.1) pochodzącą z genetycznie modyfikowanego szczepu *Geobacillus stearothermophilus*, oraz scukrzający Fermentzyme L-400, zawierający glukoamylazę (E.C. 3.2.1.3). Wszystkie enzymy pochodziły z firmy Genencor International.

### Warunki prowadzenia procesu fermentacji

Doświadczenie zostało przeprowadzone w gorzelnii rolniczej o typowym wyposażeniu technicznym obejmującym młyn młotkowy połączony z wago-zbiornikiem, każd

zacierą z mieszadłem pojemność 4000 l, jet-cooker do upłynniania skrobi, kadzie fermentacyjne o pojemności 8000 l i aparat destylacyjny. Eksperymenty zostały przeprowadzone w trzech seriach. Pierwszą z nich była fermentacja metodą SSF „na zimno”, bez dodatku antybiotyku, drugą – fermentacja metodą SSF „na zimno” z dodatkiem penicyliny, a trzecią – fermentacja traktowana jako punkt odniesienia dla technologii „na zimno”, była przeprowadzona metodą SSF z obróbką skrobi „na gorąco” z użyciem jet-cookera. W obu wariantach fermentacji przeprowadzonej metodą SSF „na zimno” recyrkulowano frakcję ciekłą wywaru. W tym celu wywar po oddestylowaniu etanolu był wirowany na wirówce dekantującej typu WD 350 (Spomasz Wronki) przy 3.000 obr./min z oddzieleniem części stałych, a uzyskaną frakcję ciekłą ponownie wykorzystano do przygotowania kolejnej porcji świeżego zacieru kukurydzianego. W niniejszej pracy wykonano po trzy fermentacje z dwoma zawrotami frakcji ciekłej wywaru.

#### **Technologia SSF „na gorąco”**

Przygotowano 8.000 l 25% zacieru kukurydzianego przez zawieszenie mączki kukurydzianej w wodzie, następnie dodano 500 ml enzymu upłynniającego Spenzyme Fred L<sup>®</sup>. W następnej kolejności zacier przepompowano do jet-cookera w celu skleikowania natywnej skrobi. Proces kleikowania skrobi trwał około 1,5 godz. w temp. 100°C. Po tym etapie zacier z powrotem przepompowano do kadzi zaciernej, gdzie był chłodzony do temperatury 35°C. Po wychłodzeniu ustalono pH zacieru równe 4,0, następnie dodano 1200 ml enzymu scukrzającego Fermentzyme<sup>®</sup> oraz 4 kg drożdży Ethanol Red. Fermentacja była prowadzona przez 72 godz. bez mieszania. W jej trakcie pobierano próby do analiz chemicznych i mikrobiologicznych.

#### **Technologia SSF „na zimno”**

Przygotowano 8.000 l ok. 25% zacieru kukurydzianego przez zawieszenie mączki kukurydzianej w wodzie, ustawiano pH na 5,0 za pomocą kwasu siarkowego, ogrzano zawiesinę do temp. 35°C i wprowadzono do kadzi fermentacyjnej. W celu zapewnienia ciągłego mieszania zacieru kadź wyposażono dodatkowo w zestaw pomp śrubowych cyrkulacyjnych. Do kadzi dodano preparat amylolityczny STARGEN 001 w ilości 2,02 ml kg<sup>-1</sup> s.s, kwaśną proteazę GC 106 w ilości 30 µl kg<sup>-1</sup> s.s oraz drożdże *Saccharomyces cerevisiae* rasy Ethanol Red – 0,5 g/l zacieru. Proces prowadzono metodą jednoczesnej hydrolizy skrobi i fermentacji etanolowej, utrzymując temperaturę 35°C. Jeden z wariantów fermentacji, ze względu na zakażenie bakteriami, uwzględnił dodatek do zacieru penicyliny w ilości 150 mg/l, w celu ochrony przed zakażeniem bakteryjnym. Fermentacja była prowadzona 72 godz. bez regulacji pH. W trakcie fermentacji pobierano próby do analiz chemicznych i mikrobiologicznych.

### **METODY ANALITYCZNE**

**Oznaczanie etanolu, cukrów i kwasów organicznych.** Stężenie etanolu, cukrów prostych i dwucukrów, a także kwasów organicznych w zacierze oznaczano na chromatografie cieczowym MERCK HITACHI (zestaw: automatyczny podajnik prób Merck Hitachi L-7250, pompa Merck Hitachi L-7100) z detektorem refraktometrycznym RI (Merck Hitachi L-7490). Do oznaczeń użyto kolumny Aminex HPX87H 300x7,8 mm (Bio-Rad). Jako eluent stosowano 0,005 M kwas siarkowy przy przepływie 0,6 ml min<sup>-1</sup>. Oznaczenia prowadzono w temperaturze 30°C. Próby наносzono na kolumnę w ilości

30 µl. Identyfikacji ilościowej i jakościowej dokonano metodą standardu zewnętrznego z wykorzystaniem powierzchni pików (pomiar i integracja komputerowa). Próby analizowano po odwirowaniu części stałych, 10-krotnym rozcieńczeniu i przesączeniu supernatantu przez sączki o średnicy porów 0,22 µm (Millex-GS Millipore).

Pomiar ciśnienia osmotycznego wykonano przy użyciu osmometru firmy Marcel (Warszawa, Polska).

**Oznaczanie liczebności drożdży.** Liczebność drożdży w inokulacie i zacierze odfermentowanym oznaczano metodą bezpośrednią, pod mikroskopem świetlnym z zastosowaniem komory Thoma. Żywotność drożdży w inokulacie i zacierze odfermentowanym oznaczano pod mikroskopem świetlnym, przy 40-krotnym powiększeniu, z użyciem 0,01% roztworu błękitu metylenowego. Dokonywano zliczeń komórek martwych (niebieskich) i żywych (nie wybarwionych) z 30 małych kwadratów komory i obliczano procentową żywotność jako stosunek liczby nie wybarwionych komórek do wszystkich zliczonych komórek.

**Oznaczenie zawartości skrobi.** Zawartość skrobi w mączce kukurydzianej i w zacierach oznaczano metodą enzymatyczną wg Holma i wsp. [1986]. Metoda polega na enzymatycznym rozkładzie skrobi do cukrów redukujących i oznaczeniu zawartości cukrów redukujących w reakcji z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym. Naważkę (ok. 0,5 g w przypadku mąki, ok. 1 g w przypadku zacieru odfermentowanego) umieszczano w kolbie Erlenmeyera o pojemności 250 ml, dodawano 50 ml wody destylowanej i wytrząsano przez 10 min w celu rozpuszczenia cukrów redukujących obecnych w próbce. Następnie dodawano 400 µl termostabilnej  $\alpha$ -amylazy (Spezyme Ethyl) i umieszczano kolbkę we wrzącej łaźni wodnej na 15 min w celu upłynnienia skrobi. Po tym czasie chłodzono zawartość kolby do temp. ok. 60°C, dodawano 2,5 ml 4 M buforu octanowego o pH 4.5 oraz 400 µl glukoamylazy (Fermenzyne L-400) i umieszczano kolbę w łaźni wodnej o temp. 60°C na 30 min, w celu scukrzenia. Następnie zawartość kolby przenoszono ilościowo do kolby miarowej o pojemności 100 ml i dopełniano wodą destylowaną, otrzymując bazowe 100-krotne rozcieńczenie. Uzyskany roztwór sączono przez sączki bibułowe; klarowny przesącz poddawano oznaczeniom z kwasem 3,5-dinitrosalicylowym.

**Popiół.** Popiół oznaczano wagowo po spaleniu próbek w piecu muflowym typu Nabertherm, Controller P320 przez 6 godz. w temperaturze 550°C.

**Białko ogólne.** Zawartość białka oznaczono metodą Kjeldahla w aparacie Kjeld-Foss Automatic 16210 firmy FOSS. Próby zmineralizowano na mokro  $H_2SO_4$  w obecności katalizatora. Kwaśny roztwór był zalkalizowany przy użyciu mianowanego roztworu NaOH.

**Włókno surowe.** Oznaczanie włókna surowego polegało na hydrolizie w  $H_2SO_4$  i KOH za pomocą aparatu Fibertec System M 1020 Hot Extractor firmy FOSS. Następnie włókno suszono 3 godz. w temp. 130°C i zważono. Wynik korygowano o zawartość popiołu oznaczanego przez spalenie w piecu muflowym w temp. 550°C przez 6 godzin.

**Tłuszcz surowy.** Próby poddano ekstrakcji eterem naftowym w aparacie Soxtec System HT 1043 Extraction Unit firmy FOSS, a następnie suszono przez 2 godz. w 103°C i ważono.

**Energia brutto (ciepło spalania).** Próby spalano w kalorymetrze KLMn – 12 w obecności czystego tlenu.

## WYNIKI

Ziarno kukurydziane przeznaczone do produkcji etanolu zawierało 69% skrobi (tab. 1). Wilgotność ziarna graniczyła z wilgotnością krytyczną zabezpieczającą surowiec przed gniciem. Znalazło to odbicie w dużym zakażeniu mikrobiologicznym. Z punktu widzenia prowadzonych badań naukowych surowiec ten można uznać za typowy, gdyż w wielu przypadkach do produkcji bioetanolu przeznacza się ziarno gorszej jakości.

Tabela 1. Skład chemiczny surowca

Table 1. Chemical composition of raw material

Składnik Compound	Zawartość Contents
Sucha substancja [%] Dry matter	84,16
Skrobia [% s.s.] Starch [% d.m.]	69,00
Białko ogólne [% s.s.] Total protein [% d.m.]	8,18
Tłuszcz surowy [% s.s.] Total lipids [% d.m.]	4,04
Włókno surowe [% s.s.] Fiber [% d.m.]	1,95
Popiół surowy [% s.s.] Ash [% d.m.]	1,32
Energia brutto [kJ kg <sup>-1</sup> ] Energy brutto	4095

Ziarno po zmieleniu na sucho w młynie młotkowym zostało wykorzystane do przygotowania zawiesiny mączki kukurydzianej w wodzie. Następnie zawiesinę wprowadzano do kadzi fermentacyjnej, dodawano preparat Stargen 001 oraz drożdże. W ten sposób prowadzono jednoczesną hydrolizę skrobi połączoną z fermentacją etanolową. Po oddestylowaniu etanolu gorący wywar był wirowany w wirówce dekantacyjnej, a frakcję ciekłą ponownie wykorzystano do przygotowania kolejnej porcji zawiesiny mączki kukurydzianej. Proces SSF prowadzono w dwóch wariantach: z osłoną i bez osłony antybiotykowej. Odniesieniem do tych doświadczeń był eksperyment, w którym skrobia przed procesem SFF była upłynniana na gorąco w jet-cookerze, a potem fermentowana w procesie SSF.

W tabeli 2 i 3 przedstawiono dane charakteryzujące przebieg fermentacji prowadzonej technologią zimną z zawracaniem frakcji ciekłej wywaru, w której stosowano scukrzanie skrobi w trakcie fermentacji. Każdy kolejny cykl fermentacyjny zaczynał się przy temperaturze początkowej 35°C, po czym dalszy przebieg procesu odbywał się bez korekty tego parametru. Z kolei kwasowość czynną regulowano tylko na początku pierwszej fermentacji, ustawiając pH na ok. 5,1–5,2.

Tabela 2. Przebieg fermentacji etanolowej zacieru bez dodatku antybiotyku według zimnej technologii SSF z zawracaniem wywaru  
 Table 2. Ethanol fermentation course of corn mash without antibiotic addition using cold SSF technology with stillage recycling

Cykl Cycle	Czas Time [h]	pH	Temp. [°C]	EtOH Ethanol [g <sup>-1</sup> ]	Skrobia Starch [g <sup>-1</sup> ]	Maltoza Maltose [g <sup>-1</sup> ]	Glukoza Glucose [g <sup>-1</sup> ]	Fruktoza Fructose [g <sup>-1</sup> ]	Glicerol Glycerol [g <sup>-1</sup> ]	Kw. mlekowy Lactic acid [g <sup>-1</sup> ]	Kw. octowy Acetic acid [g <sup>-1</sup> ]
I	0 24 48 72	5,1 3,4 3,3 3,3	35 34 30 30	0 53 67 70	174 102 64 33	0,2 0,1 0,1 0,1	14,5 1,0 0,8 5,7	1 0 0 0	0,3 9,2 12,2 12,5	0,4 11,2 15,4 16,8	0,1 2,4 3,3 3,5
II pierwszy zawrót wywaru first stillage recycling	0 24 48 72	3,8 3,9 3,9 3,7	35 34 32 32	0 66 76 79	172 94 49 28	0,8 0,4 0,3 0,2	35,7 1,3 7,6 4,3	0,7 0,3 0,2 0,1	9,2 10,2 10 10	13,3 12,7 13,3 21	3 2,8 3 5,8
III drugi zawrót wywaru secondo stillage recycling	0 24 48 72	3,8 3,8 3,7 3,5	35 34 32 32	0 41 57 62	175 126 51 22	0,4 0,3 0,2 0,1	27,4 38 20,6 21,3	0,9 0,7 0,4 0,2	5,5 8 8,4 8,1	15,2 20,1 29,7 38	3 4,3 5,7 11,0

Tabela 3. Przebieg fermentacji etanolowej zacieru z dodatkiem antybiotyku według zimnej technologii SSF z zawracaniem wywaru  
 Table 3. Ethanol fermentation course of corn mash with antibiotic addition using cold SSF technology with stillage recycling

Cykl Cycle	Czas Time [h]	pH	Temp. [°C]	EtOH Ethanol [gl <sup>-1</sup> ]	Skrobia Starch [gl <sup>-1</sup> ]	Maltoza Maltose [gl <sup>-1</sup> ]	Glukoza Glucose [gl <sup>-1</sup> ]	Fruktoza Fructose [gl <sup>-1</sup> ]	Glicerol Glycerol [gl <sup>-1</sup> ]	Kw. mlekowy Lactic acid [gl <sup>-1</sup> ]	Kw. octowy Acetic acid [gl <sup>-1</sup> ]
I	0 24 48 72	5,2 3,9 3,7 3,7	35 32 31 29	0 50 67 76	172 100 61 22	0,2 0,2 0,1 0	10 0,6 0,6 0,6	0,7 0 0 0	1,1 3,6 4,5 5	0,7 5,7 6,4 8,2	0,4 0,4 0,5 0,6
II pierwszy zawrót wywaru first stillage recycling	0 24 48 72	3,9 4,1 4,0 3,7	35 36 32 28	0 73 80 85	174 94 56 19	0,5 0,4 0,4 0,1	22,7 0,6 7,1 4,1	0,8 0,08 0,07 0,06	4,2 7,1 7,8 8,1	7,2 11,5 15,3 26,5	1,9 1,5 2 2,4
III drugi zawrót wywaru secondo stillage recycling	0 24 48 72	3,8 3,7 3,4 3,3	35 32 31 31	0 40 53 66	173 114 63 45	0,5 0,2 0,1 0,1	29,1 3,3 5,6 6,2	1,1 0,4 0,3 0,2	6,4 6,3 3,3 2,5	22,5 18,7 29 32,5	4,3 4,7 10,2 12,7



Tabela 4. Przebieg fermentacji etanolowej zacierów przygotowanych przy użyciu jet-cookera według technologii SSF (fermentacja kontrolna)  
 Table 4. Ethanol fermentation course of corn mash prepared using jet-cooker SSF process (control)

Cykl Cycle	Czas Time [h]	pH	Temp. [°C]	EtOH Ethanol [g l <sup>-1</sup> ]	Skrobia Starch [g l <sup>-1</sup> ]	Maltoza Maltose [g l <sup>-1</sup> ]	Glukoza Glucose [g l <sup>-1</sup> ]	Fruktoza Fructose [g l <sup>-1</sup> ]	Glicerol Glycerol [g l <sup>-1</sup> ]	Kw. mlekowy Lactic acid [g l <sup>-1</sup> ]	Kw. octowy Acetic acid [g l <sup>-1</sup> ]
Zacier przygotowany na gorąco	0	5,0	35	0	132	4,3	60	1,3	1,2	0,6	0,5
Mash prepared by corn cooking	24	3,9	30	52	92	2	3,6	0,4	5,6	4,4	0,4
	48	3,7	26	83	35	1,2	1,6	0	5,1	4,3	0,6
	72	3,5	24	91	11	1	1,1	0	6	4,2	0,5

Najistotniejszymi parametrami fermentacji etanolowej są końcowe stężenie etanolu w zacierze odfermentowanym oraz wydajność etanolu z odfermentowanych cukrów. W przypadku fermentacji prowadzonych według technologii jednoczesnego scukrzania „na zimno” i fermentacji etanolowej końcowe stężenie etanolu w kolejnych cyklach fermentacyjnych wynosiło dla zacierów nie chronionych antybiotykiem 7,0–7,9–6,2% w/v (tab. 2), a dla zacierów chronionych antybiotykiem odpowiednio 7,6–8,5–6,6% w/v (tab. 3). Generalnie należy ocenić je jako niskie. Największe stężenie końcowe uzyskano w drugim cyklu fermentacyjnym. Analiza danych wskazuje, że różnice między stężeniem etanolu w brzeczках odfermentowanych zawierających dodatek lub brak dodatku antybiotyku były statystycznie istotne. Porównując te dane z wynikami fermentacji prowadzonej metodą klasyczną, należy podkreślić, że uzyskano w niej wyższe stężenie etanolu, przekraczające 9,1% w/v (tab. 4).

Tak niskie stężenie etanolu miało bezpośredni związek z dużym zakażeniem zacierów bakteriami. Świadczą o tym w pierwszym rzędzie wysokie stężenia kwasów organicznych, szczególnie kwasu mlekowego. Porównując wyniki obu serii fermentacji prowadzonej według technologii zimnej SSF, w pierwszym cyklu fermentacyjnym, zakażenie mikrobiologiczne było relatywnie małe. Widoczny był przy tym korzystny wpływ dodatku penicyliny, która wyraźnie hamowała rozwój bakterii. W kolejnych dwóch cyklach fermentacyjnych, gdy do przygotowania zacierów wykorzystywano frakcję ciekłą wywaru, zakażenie bakteryjne gwałtownie wzrastało.

Tabela 5. Porównanie wydajności konwersji cukrów do etanolu uzyskanych w fermentacjach prowadzonych metodą SSF przy różnym przygotowaniu zacieru kukurydzianego  
Table 5. Yield of sugar conversion into ethanol in SSF process using corn mash prepared by different way

Cykl fermentacyjny Fermentation cycle	Wydajność konwersji cukrów do etanolu Yield of sugar conversion into ethanol	Procent wydajności teoretycznej [%] Theoretical yield
SSF, na zimno, bez antybiotyku, recykulacja wywaru SSF, cold process, without antibiotic protection, stillage recycling		
I	0,4232	82,82
II	0,4136	80,94
III	0,3530	69,08
SSF, na zimno, recykulacja zacieru, z antybiotykiem SSF, cold process, with antibiotic protection		
I	0,4310	84,46
II	0,4430	86,702
III	0,3981	78,05
SSF, na gorąco (fermentacja kontrolna) SSF high temperature (control)		
I	0,4612	90,26

W tabeli 5 zestawiono współczynniki wydajności fermentacji obliczone na podstawie bilansów materiałowych. Przedstawiono je jako stosunek ilości zużytego cukru do ilości wytworzonego z niego etanolu oraz jako wydajność rzeczywistą w stosunku do wydajności teoretycznej. Z przedstawionych danych wynika, że duży wpływ na

wydajność procesu fermentacji miała osłona antybiotykowa. Zahamowanie rozwoju bakterii mlekowych i octowych przełożyło się na zwiększenie wydajności etanolu o kilka procent.

Kolejny czynnik wpływający na efektywność procesu fermentacji to zawracanie frakcji stałej wywaru. Wykazano, że w obu seriach fermentacyjnych największą wydajność uzyskano po pierwszym nawrocie wywaru. Prawdopodobnie przyczyną poprawy wydajności było wzbogacenie drugiego wywaru w związki azotowe z pierwszego cyklu. Drugi nawrót wywaru, wskutek kumulacji zakażenia bakteryjnego, był znacznie mniej efektywny. Oceniając przeprowadzone doświadczenia, należy podkreślić, że zastosowanie nawet tylko jednego nawrotu wywaru oznacza zmniejszenie zużycia wody technologicznej o połowę. Zmniejsza się także ilość odpadów poprodukcyjnych (wywaru).

Analizując stężenia kwasów organicznych w fermentowanych zacierach, można zaobserwować prawidłowość, że w każdym kolejnym cyklu fermentacyjnym początkowe stężenie kwasów było coraz większe, co świadczy o ich kumulacji. Wzrastające stężenie początkowe w fermentacjach prowadzonych z zawracaniem frakcji ciekłej wywaru świadczy o wnoszeniu kwasów wraz z wywarem. Generalnie można stwierdzić, że stężenie kwasu mlekowego było kilkakrotnie większe niż kwasu octowego, dochodząc w trzecim cyklu fermentacyjnym do poziomu 32–38  $\text{g l}^{-1}$ . Stężenie kwasu octowego w zacierze po trzech dobach fermentacji przekraczało niewiele ponad 1% w/v. Poziom obu kwasów organicznych w zacierach fermentowanych pod osłoną penicyliny był nieznacznie niższy w stosunku do fermentacji prowadzonych bez osłony antybiotykowej. Odmiennie tendencje wystąpiły w fermentacji kontrolnej, gdzie stężenie kwasu mlekowego zmniejszało się, a stężenie kwasu octowego było stabilne (tab. 4).

Jak wynika z przeprowadzonych pomiarów, zarówno pH fermentowanego zacieru, jak i jego temperatura zmniejszały się w obrębie każdej szarży wraz z upływem czasu fermentacji. Stopniowe wychłodzenie kadzi fermentacyjnej, które wystąpiło praktycznie w każdym eksperymencie, było dość nieoczekiwane i wynosiło 3–7°C w ciągu trzech dób (tab. 2 i 3). Warto przy tym zauważyć, że w próbie kontrolnej, jaką stanowiła fermentacja zacierów przygotowanych według technologii „na gorąco”, temperatura końcowa zacieru była niższa aż o 9°C (tab. 4). Wszystkie serie fermentacji prowadzono w okresie zimowym, przy ujemnych temperaturach zewnętrznych, a temperatura fermentowni wynosiła poniżej 10°C. Sprzyjało to szybkiemu wychłodzeniu kadzi fermentacyjnych.

W trakcie fermentacji obserwowano również silne zakwaszenie fermentowanych zacierów. Niezależnie od tego, czy stosowano dodatek antybiotyku, czy tego nie robiono, największy spadek pH odnotowano w pierwszym cyklu fermentacyjnym. W przypadku zacieru bez osłony antybiotykowej pH zmniejszyło się o 1,75 (tab. 2), natomiast z osłoną antybiotykową o 1,49 (tab. 3). Najmniejszy spadek pH wystąpił w drugim cyklu fermentacyjnym, co w tym wypadku oznaczało pierwszy cykl z recyrkulacją frakcji ciekłej wywaru. W większości fermentacji spadek pH zacieru przy stosowaniu osłony antybiotykowej był mniejszy niż w zacierach bez dodatku penicyliny. Porównując zmiany kwasowości czynnej zacierów przygotowanych według technologii „na zimno” i według technologii „na gorąco”, można stwierdzić, że spadek pH w pierwszym cyklu fermentacyjnym we wszystkich trzech seriach fermentacji był bardzo podobny.

Ciekawie kształtowało się stężenie glicerolu, który jest metabolitem ubocznym fermentacji etanolowej. Jego stężenie dochodziło maksymalnie do 1,2% i w przypadku fermentacji z recyklingiem wywaru największe stężenie tego związku odnotowano w drugim cyklu fermentacyjnym. Wynik ten jest dobrze skorelowany z wartością ciśnienia osmotycznego w zacierach, gdyż wartość tego parametru była najwyższa w drugim cyklu fermentacyjnym (tab. 6).

Ponadto stwierdzono, że w każdym cyklu fermentacyjnym wartość ciśnienia osmotycznego wzrastała w miarę upływu czasu fermentacji, przy czym różnice między poziomem tego parametru na początku fermentacji i po upływie 72 godz. były w przybliżeniu trzykrotne. Najwyższa wartość ciśnienia osmotycznego została osiągnięta w drugim cyklu fermentacyjnym i wynosiła 2277 mOsm kg<sup>-1</sup>.

Tabela 6. Zmiany ciśnienia osmotycznego w trakcie fermentacji zacierów kukurydzianych  
Table 6. Changes in osmotic pressure of corn mashes during fermentation process

Cykle fermentacyjne Fermentation cycle	Ciśnienie osmotyczne zacieru Osmotic pressure of mash [mOsm kg <sup>-1</sup> ]		
	Technologia „na zimno” bez antybiotyku Cold process without antibiotic protection	Technologia „na zimno” z antybiotykiem Cold process with antibiotic protection	Technologia tradycyjna „na ciepło” Traditional high temperature process
I cykl – First cycle			
0	397	297	451
24	1120	1120	1494
48	1484	1484	1912
72	1583	1638	1926
II cykl – Secondo cycle			
0	724	601	Nb No data
24	1715	1693	
48	2043	1795	
72	2277	1933	
III cykl – Third cycle			
0	691	794	Nb No data
24	1205	1328	
48	1827	1547	
72	1971	1653	

Analizując obecność niskocząsteczkowych sacharydów, stwierdzono, że ich stężenie w wywarach było bardzo małe. Analiza chromatograficzna obejmowała glukozę, fruktozę i disacharydy. W praktyce stężenie fruktozy było śladowe, natomiast spośród sacharydów rozpuszczalnych najistotniejszy cukier stanowiła glukoza. Zaobserwowano, że w każdym cyklu fermentacyjnym największe stężenie glukozy wystąpiło na początku procesu fermentacji i sięgało 1–3% w/v, a następnie szybko spadało. Stężenie disacharydów było znacznie mniejsze.

Tabela 7. Liczebność (L) i przeżywalność (P) komórek drożdżowych w trakcie procesów fermentacji  
 Table 7. Yeast cell counts (L) and viability (P) during fermentation process

Cykl fermentacyjny/ recykulacja Fermentation cycle/re-cycling	Czas Time [h]	Technologia „na zimno” z zawracaniem wywaru Cold process with stillage recycling				Technologia „na gorąco” High temperature technology			
		bez antybiotyku without antibiotic		z antybiotykiem with antibiotic		bez antybiotyku without antibiotic		z antybiotykiem with antibiotic	
		L [jtk ml <sup>-1</sup> ]	P [%]	L [jtk ml <sup>-1</sup> ]	P [%]	L [jtk ml <sup>-1</sup> ]	P [%]	L [jtk ml <sup>-1</sup> ]	P [%]
I	0	0,84 x 10 <sup>8</sup>	100	0,86 x 10 <sup>8</sup>	100	0,85 x 10 <sup>8</sup>	100	0,85 x 10 <sup>8</sup>	100
	24	1,62 x 10 <sup>8</sup>	92	1,82 x 10 <sup>8</sup>	97	1,28 x 10 <sup>8</sup>	97	1,28 x 10 <sup>8</sup>	97
	48	1,68 x 10 <sup>8</sup>	91	1,98 x 10 <sup>8</sup>	97	1,48 x 10 <sup>8</sup>	97	1,48 x 10 <sup>8</sup>	95
	72	1,74 x 10 <sup>8</sup>	89	1,45 x 10 <sup>8</sup>	96	1,5 x 10 <sup>8</sup>	90	1,5 x 10 <sup>8</sup>	90
II/I	0	0,88 x 10 <sup>8</sup>	100	0,76 x 10 <sup>8</sup>	100	Bez zawracania wywaru Without stillage recycling			
	24	1,44 x 10 <sup>8</sup>	90	1,64 x 10 <sup>8</sup>	98	Bez zawracania wywaru Without stillage recycling			
	48	1,09 x 10 <sup>8</sup>	89	1,59 x 10 <sup>8</sup>	93	Bez zawracania wywaru Without stillage recycling			
	72	1,09 x 10 <sup>8</sup>	86	1,40 x 10 <sup>8</sup>	88	Bez zawracania wywaru Without stillage recycling			
III/II	0	0,85 x 10 <sup>8</sup>	100	0,85 x 10 <sup>8</sup>	100	Bez zawracania wywaru Without stillage recycling			
	24	1,17 x 10 <sup>8</sup>	81	1,21 x 10 <sup>8</sup>	97	Bez zawracania wywaru Without stillage recycling			
	48	1,11 x 10 <sup>8</sup>	77	1,18 x 10 <sup>8</sup>	85	Bez zawracania wywaru Without stillage recycling			
	72	1,12 x 10 <sup>8</sup>	75	1,16 x 10 <sup>8</sup>	81	Bez zawracania wywaru Without stillage recycling			

Trudne warunki fermentacji, a szczególnie niskie pH oraz obecność związków toksycznych, głównie kwasów organicznych i etanolu, miały wpływ na rozmnażanie się i żywotność drożdży gorzelnicznych. W tabeli 7 przedstawiono wyniki analizy mikrobiologicznej populacji drożdżowych we wszystkich cyklach fermentacyjnych. Generalnie można stwierdzić, że liczebność komórek drożdżowych w zacierze kształtowała się na poziomie ośmiu cykli logarytmicznych. We wszystkich przypadkach obserwowano wzrost liczebności komórek w ciągu pierwszych 24 h fermentacji. Charakterystyczne jest natomiast zmniejszanie się przeżywalności komórek w miarę upływu czasu w poszczególnych cyklach fermentacyjnych. Widoczna jest przy tym wyraźna zależność stopnia przeżywalności komórek od obecności antybiotyku w zacierze, jak i zależność od ilości recyrkulacji frakcji ciekłej wywaru. Wyniki badań jednoznacznie wskazują, że brak osłony antybiotykowej zmniejsza przeżywalność drożdży. Na żywotność drożdży negatywny wpływ miało także zwracanie wywarów do kolejnego cyklu fermentacyjnego. W obu wypadkach należy to łączyć ze zwiększoną ilością kwasów organicznych będącą konsekwencją rozwoju zakażenia bakteryjnego.

Tabela 8. Bilans materiałowy fermentacji metodą SSF z recyrkulacją frakcji ciekłej wywaru  
Table 8. Material balance of SSF process with stillage recycling

Cykl/Recyrkulacja Cycle/Recycling	Etanol Ethanol [l]	Wywar Stillage [l]	Frakcja ciekła Liquid fraction [l]	Frakcja stała Solid fraction [kg]
I	765	9000	8400	600
II/I	810	9500	8800	700
III/II	810	9500	8800	700

Prowadzenie procesu fermentacji według unowocześnionej technologii, którą zaproponowano w tej pracy, obok oszczędności energetycznych wynikających z pominięcia termicznego kleikowania skrobi, dało także radykalne oszczędności wody. W tabeli 8 przedstawiono bilans materiałowy fermentacji. Wynika z niego, że z każdego cyklu fermentacyjnego zwracano ok. 8800 l frakcji ciekłej do przygotowania kolejnej porcji świeżego zacieru kukurydzianego oraz otrzymywano ok. 700 kg frakcji stałej. Tak duża ilość wody zawrócona do kolejnej szarży, w połączeniu z kondensatami pary pozyskiwanymi w procesie destylacji, pokrywały całkowicie zapotrzebowanie na wodę technologiczną. W praktyce proces ten był całkowicie bezściekowy i nie wymagał dodatkowej wody do sporządzania nowych zacierów.

Tabela 9 przedstawia zawartość głównych składników we frakcji stałej wydzielonej z wywaru. Zawartość suchej substancji w osadzie wynosiła w granicach 26–30%. Głównymi składnikami frakcji stałej był błonnik (10–11%) oraz białko (8–9%). Wartość energetyczna osadu mokrego wynosiła 1500–1700 kJ kcal<sup>-1</sup>. Można więc stwierdzić, że frakcja stała stanowiła wartościową paszę dla bydła.

Tabela 9. Skład frakcji stałej wywaru uzyskanego po fermentacji metodą SSF z recykulacją frakcji ciekłej wywaru  
 Table 9. Composition of stillage solid fraction after SSF fermentation with stillage recycling

Wywar gorzelnicy Stillage	Sucha masa [%] Dry matter	Popiół surowy [%] Crude ash	Białko ogólne [%] Crude protein	Włókno surowe [%] Crude fibre	Tłuszcz surowy [%] Crude fat	Energia brutto [kJ/ kcal] Energy brutto
1 fermentacja bez antybiotyku fermentation without antibiotic	27,43	0,5	8,25	10,4	1,36	1514 / 6,34
2 fermentacja 1 zawrót bez antybiotyku fermentation, first stillage recycling without antibiotic	29,89	0,54	9,52	11,24	1,6	1674 / 7,01
3 fermentacja 2 zawrót bez antybiotyku fermentation, secondo stillage recycling without antibiotic	26,73	0,65	8,2	10,25	2,06	1519 / 6,36
<hr/>						
1 fermentacja z antybiotykami fermentation with antibiotic	28,15	0,45	9,94	10,89	1,55	1572 / 6,58
2 fermentacja z antybiotykami	30,21	0,59	7,71	10	2,29	1689 / 7,04
3 fermentacja z antybiotykami	26,76	0,65	7,24	9,39	1,83	1512 / 6,33

## DYSKUSJA

Badania przeprowadzono w typowej gorzelnii rolniczej produkującej etanol z surowców skrobiowych na cele paliwowe. Zakład ten był wyposażony w młyn młotkowy do mielenia ziarna na sucho oraz w jet-cooker, służący do kleikowania i upłynniania skrobi. Ponadto dokonano w nim dwóch modyfikacji. Pierwsza z nich polegała na wyposażeniu kadzi fermentacyjnej w pompy cyrkulacyjne, w celu wymieszania zacieru w trakcie fermentacji. Druga modyfikacja – to zainstalowanie wirówki dekantacyjnej do oddzielania frakcji stałej wywaru. W ten sposób stworzono warunki do recykulacji frakcji ciekłej wywaru i jej wykorzystania do przygotowania nowej porcji zawiesiny mączki kukurydzianej dla kolejnej fermentacji.

Podstawowy eksperyment polegał na przeprowadzeniu unowocześnionej technologii produkcji bioetanolu, która obejmowała następujące innowacje:

- sporządzanie zacieru w oparciu o zawróconą frakcję ciekłą wywaru z poprzedniej fermentacji;
- stosowanie enzymów zdolnych do hydrolizy skrobi „na zimno”, bez uprzedniej obróbki termicznej (technologia „na zimno”);
- jednoczesna hydroliza enzymatyczna i fermentacja etanolowa, bezpośrednio w kadzi fermentacyjnej w temperaturze fermentacji;
- zastosowanie rasy drożdży odpornych na podwyższoną temperaturę i zwiększone ciśnienie osmotyczne;
- separacja części stałych wywaru i ich suszenie na cele paszowe.

Technologia przygotowania zacieru „na zimno” została przeprowadzona bez osłony i z osłoną antybiotykową. Stosowanie penicyliny służyło wyeliminowaniu zakażenia bakteryjnego. Zaplanowane doświadczenia miały dać odpowiedź na pytanie, czy prowadzenie całego procesu w niskiej temperaturze spowoduje masowy rozwój bakterii i tym samym doprowadzi do pogorszenia wskaźników wydajności.

Punktem odniesienia przy ocenie wyników fermentacji był proces SSF prowadzony przy zastosowaniu klasycznej technologii przygotowania zacieru „na gorąco”, opartej na upłynnieniu skrobi w jet-cookerze.

Proces jednoczesnego scukrzania skrobi i fermentacji etanolowej jest od wielu lat przedmiotem licznych badań i w wielu krajach wszedł do praktyki przemysłowej [Kosaric 1996, Kroumov i in. 2006]. Do jego najważniejszych zalet należy oszczędność czasu produkcyjnego, uproszczenie linii aparaturowej i stworzenie bardziej sprzyjających warunków dla wzrostu drożdży. Odnosi się to szczególnie do zmniejszenia stresu osmotycznego w trakcie fermentacji, co wynika z natychmiastowego pobierania uwolnionych cukrów niskocząsteczkowych przez drożdże. W ten sposób nie dochodzi do dużej kumulacji glukozy i maltozy, jak to się dzieje w klasycznej technologii hydrolizy enzymatycznej skrobi, która jest zwykle prowadzona w kadzi zaciernej jako proces oddzielny, wyprzedzający proces fermentacji.

Badania prowadzone w tej pracy opierały się na wykorzystaniu nowego preparatu enzymatycznego Stargen 001, produkowanego przez amerykańską firmę Genencor. Preparat ten, zawierający alfa-amylazę i glukoamylazę, jest dostosowany do hydrolizy natywnej skrobi ziarnistej. Umożliwia więc pominięcie etapu gotowania surowca skrobiowego, co zmniejsza zużycie energii na cele produkcyjne. Preparat pozwala na stosowanie wysokich stężeń substratu, nie wymaga dodatku soli wapniowych i umożliwia wydajniejsze scukrzenie skrobi. Do jego zalet można zaliczyć relatywnie niską tempera-



turę i niskie pH reakcji enzymatycznej. Dzięki temu można połączyć działanie tego enzymu z jednoczesną fermentacją etanolową. Pojawienie się na rynku preparatu Stargen 001 otwiera nową perspektywę przed produkcją bioetanolu z surowców skrobiowych. W literaturze naukowej pojawiły się także doniesienia innych autorów, którzy odkryli mikroorganizmy produkujące amylazy zdolne do hydrolizy natywnej skrobi [Goyal i in. 2005, Mitsui i in. 2005, Tester i in. 2006]. Można więc oczekiwać, że w najbliższych latach ukaże się większa ilość niskotemperaturowych enzymów hydrolizujących natywną, ziarnistą skrobię.

Biorąc pod uwagę fakt, że wszystkie znane enzymy amylolityczne mają optimum temperaturowe znacznie powyżej temperatury wzrostu mikroorganizmów, kluczowym czynnikiem w technologii SSF jest termoodporność drożdży gorzelnicznych, gdyż ułatwia ona zbliżenie warunków fermentacji do optymalnej temperatury działania preparatu Stargen 001. Z tego względu do badań wybrano drożdże rasy Ethanol Red, produkowane przez francuski koncern Lesaffre (Francja), charakteryzujące się zdolnością do fermentacji w temp. 35°C oraz odpornością na wysokie stężenie etanolu.

Obok zimnego zacierania skrobi drugim istotnym usprawnieniem procesu była recyrkulacja frakcji stałej wywaru. Tworzyły ją komórki drożdżowe oraz resztki ziaren kukurydzy, które nie uległy rozpuszczeniu pod wpływem enzymów. Frakcja ta, po wydzieleniu, była przeznaczona na cele paszowe. Separację zawiesin przeprowadzono przy użyciu wirówki dekantacyjnej. Urządzenie to zdało doskonale zadanie i skutecznie separowało większość cząstek stałych. Frakcja ciepla wywaru była recyrkulowana i ponownie wykorzystana do przygotowania kolejnej porcji zawiesiny mączki kukurydzianej. Objętościowo frakcja ciepla połączona z kondensatami pary wodnej użytej do destylacji etanolu w pełni bilansowały zapotrzebowanie na wodę (tab. 8). Aby ułatwić odzysk kondensatu, para była bezpośrednio wprowadzana w kolumnie destylacyjnej do odfermentowanego zacieru. W ten sposób można było całkowicie zrezygnować z dodatkowego poboru wody technologicznej. Jednocześnie wskutek pełnego wykorzystania wywaru gorzelnia stała się zakładem bezściekowym. Jest to duża korzyść.

Surowiec użyty do badań był średniej jakości. Ziarna były średnio rozwinięte i zanieczyszczone glebą. Z punktu praktyki gorzelniczej surowiec ten może być uznany za typowy, gdyż większość gorzelnii rolniczych produkujących bioetanol kupuje surowiec tani, co często łączy się z jego obniżoną jakością. Ponadto gorzelnia, w której prowadzono badania, miała niskie standardy higieniczne i często dochodziło w niej do zakażeń bakteryjnych.

Badania prowadzono w okresie, w którym temperatura w pomieszczeniach produkcyjnych była relatywnie niska. Rzutowało to silnie na temperaturę fermentacji zacierów. Każdą szarżę produkcyjną rozpoczynano od nastawienia temperatury zacieru na 35°C. Jak pokazują wyniki badań zamieszczone w tabelach 2–4, ilość ciepła generowana w trakcie procesu fermentacji była zbyt niska, aby utrzymać temperaturę początkową przez cały okres fermentacji. W większości przypadków po upływie 72 godz. temperatura spadała nawet do 28°C. Miało to istotny wpływ na aktywność enzymów, które w tej temperaturze zachowują tylko część swej maksymalnej aktywności. Drugim czynnikiem hamującym działanie enzymów była duża kwasowość zacierów. Wartość ich pH zmniejszała się od ok. 5,1–5,2 na początku fermentacji do ok. 3,3–3,6 po trzech dobach prowadzenia procesu fermentacji. Utrzymywanie tak niskiego pH miało na celu ograniczenie rozwoju zakażenia bakteryjnego [Tao i in. 2005]. Oba te czynniki spowodowały jednak, że wykorzystanie skrobi i dynamika fermentacji były mniejsze od oczekiwanej.

Analizując przebieg procesu fermentacji, należy stwierdzić, że najintensywniejsza produkcja etanolu zachodziła w pierwszej dobie fermentacji, po czym ulegała wyraźnemu spowolnieniu. Po 24 godz. stężenie etanolu kształtowało się w większości przypadków na poziomie 5–7% w/v, a w następnych dwóch dobach wzrastało o 1–2% w/v. Maksymalne stężenie etanolu, wynoszące 9,1 w/v, uzyskano po odfermentowaniu zacieru przygotowanego ze skrobi kleikowanej termicznie.

Biorąc pod uwagę niską jakość użytej kukurydzy, należy ocenić, że uzyskane wyniki są zadowalające. Suresh i in. [1999], stosując uszkodzone ziarna pszenicy i sorgo, fermentowali zacier o gęstości 10–30% w/v. Wykazali oni, że optymalna gęstość zacieru dla tych surowców wynosiła 25%, a końcowe stężenie etanolu było znacznie niższe niż w tej pracy i wynosiło dla zacierów pszenicznych 4,4% obj., a dla zacierów z sorga 3,5% obj. Montesinos i Nawarro [2000] badali fermentację mąki pszennej przy użyciu dodatku amyloglukozydazy (Thermamyl, Novozymes) i drożdży *Saccharomyces cerevisiae*. Skrobia pszenna była upłynniana w temperaturze 95°C. Właściwa fermentacja metodą SSF, prowadzona w temp. 35°C, była poprzedzona etapem wstępnej hydrolizy skrobi w temperaturze 60°C. Końcowe stężenie etanolu uzyskane w tych eksperymentach wynosiło 6,7% w/v. Jest to stężenie produktu porównywalne z uzyskanym w tej pracy (tab. 2, I cykl fermentacji).

Stężenie etanolu w zacierach przygotowanych według technologii „na zimno” było niższe niż według technologii „na gorąco” i wynosiło maksymalnie 8% w/v. Oznacza to, że nie doszło do pełnej hydrolizy skrobi. Uwolniona skrobia była jednak natychmiast odfermentowywana. Charakterystyczne są przy tym wyniki analizy chromatograficznej cukrów niskocząsteczkowych. Największa koncentracja glukozy i maltozy wystąpiła na początku fermentacji, w momencie gdy intensywnie działały enzymy amylolytyczne, natomiast komórki drożdżowe przechodziły proces rehydratacji. Po pierwszej dobie fermentacji stężenie glukozy osiągało swoje minimum, po czym nieznacznie wzrastało. Należy przy tym podkreślić, że stężenie cukrów niskocząsteczkowych przez cały czas fermentacji utrzymywało się na bardzo niskim poziomie, w zdecydowanej większości przypadków poniżej 1% w/v. Produkty hydrolizy skrobi były więc natychmiast asymilowane przez komórki drożdży i nie hamowały reakcji enzymatycznych, co potwierdzają także wyniki innych autorów [Roy i in. 2001]. W tym kontekście, ciekawych danych dostarczyła analiza ciśnienia osmotycznego w zacierach. Jak to pokazano w tabeli 6, ciśnienie osmotyczne zacieru wzrastało w każdym fermentowanym zacierze wraz z upływem czasu fermentacji. Biorąc pod uwagę małe stężenie niskocząsteczkowych cukrów, głównym czynnikiem osmogennym są metabolity wydzielane przez komórki drożdżowe, a więc przede wszystkim etanol i w mniejszym stopniu kwasy organiczne. Dynamika wzrostu ciśnienia osmotycznego pokrywała się w pełni z dynamiką fermentacji etanolowej i fermentacji kwasowych. Widoczny jest dodatkowy wzrost ciśnienia osmotycznego spowodowany zawrotem frakcji ciekłej wywaru. Wraz z nimi zawracane były sole mineralne pochodzące z mączki kukurydzianej oraz sole kwasów organicznych wytworzonych przez drożdże i bakterie. Maksymalne ciśnienie osmotyczne fermentowanych wywarów dochodziło 2277 mOsmkg<sup>-1</sup>, a więc było czynnikiem hamującym wzrost drożdży. Stres osmotyczny połączony ze stresem etanolowym jest jednym z głównych czynników hamujących rozmnażanie się i metabolizm komórkowy drożdży. Odpowiedzią komórkową na ten stres jest między innymi synteza glicerolu, działającego ochronnie, szczególnie w stosunku do ważnych polimerów komórkowych, jak białka

i kwasy nukleinowe. Również w tym przypadku widoczna była kumulacja glicerolu w zacierze w miarę wzrostu ciśnienia osmotycznego. Pod koniec fermentacji stężenie tego związku dochodziło do 0,5–1,2% w/v.

Poważnym problemem było rozwijające się zakażenie bakteryjne. W piśmiennictwie naukowym zwraca uwagę na ten problem wielu autorów [Czarnecki i Grajek 1991, Narendranath i Power 2004, Skinner i Leathers 2004]. Główną grupą mikroorganizmów zakażających zacierze gorzelnicze są bakterie fermentacji mlekowej, głównie z rodzaju *Lactobacillus*. W gorzelniach amerykańskich, gdzie produkuje się duże ilości bioetanolu na bazie skrobi kukurydzianej, od wielu lat prowadzi się fermentacje pod osłoną antybiotykową (penicylina G lub virginiamycyna) albo w obecności substancji antybakteryjnych, jak np. nadtlenu wodoru [Skinner i Leathers 2004]. Analiza chemiczna wykazała, że wraz z upływem czasu fermentacji szybko zwiększało się stężenie kwasu mlekowego w zacierze. Jego kumulacja następowała w miarę upływu czasu fermentacji, a także wraz z kolejnymi zawrotami wywaru. Temperatura wrzenia kwasu mlekowego wynosi 122°C, w związku z czym pozostaje on po destylacji w wywarze. Widoczne są przy tym różnice między zacierami sporządzonymi ze skrobi upłynnionej termicznie a zacierami ze skrobi przygotowanej „na zimno”. W pierwszym przypadku końcowe stężenie kwasu mlekowego w zacierze wynosiło ok. 4,2 g l<sup>-1</sup> (tab. 4), podczas gdy w zacierach uzyskanych po hydrolizie natywnej skrobi aż 16,8 g l<sup>-1</sup> (tab. 2). Istotne różnice spowodowało także dodanie penicyliny. Dane odnoszące się do pierwszego cyklu fermentacyjnego wskazują, że zacierze chronione antybiotykiem zawierały o połowę mniej kwasu mlekowego niż zacierze bez takiej ochrony (tab. 2 i 3). Wprowadzenie recyrkulacji frakcji cieplej wywaru po dwóch recyrkulacjach – spowodowało wzrost stężenia kwasu mlekowego do 3%. Spadek dynamiki fermentacji etanolowej w IV cyklu fermentacyjnym należy powiązać z wykorzystaniem znacznej puli dostępnych cukrów do syntezy kwasu mlekowego oraz octowego. Ten ostatni kwas występował w zacierze w stężeniu dochodzącym do 1% w/v. Jego temperatura wrzenia wynosi 118°C, a ponadto wiąże się on z jonami metali i etanolem, tworząc octany pozostające w wywarze.

Biorąc pod uwagę praktyczną wydajność kwasu mlekowego z glukozy na poziomie ok. 90%, można stwierdzić, że przy stężeniu kwasu mlekowego na poziomie 38 g l<sup>-1</sup> i 32 g l<sup>-1</sup> na wytworzenie tego kwasu zostało zużyte odpowiednio ok. 42 g l<sup>-1</sup> i 35 g l<sup>-1</sup> glukozy. Gdyby te ilości glukozy zostały przekształcone do etanolu, to zakładając ok. 40-procentową wydajność praktyczną etanolu z glukozy, zostałyby wytworzone dodatkowo odpowiednio ok. 17 g l<sup>-1</sup> i 14 g l<sup>-1</sup> alkoholu. Uzyskane stężenia etanolu po IV cyklu fermentacyjnym świadczą, że w przypadku wyeliminowania fermentacji mlekowej końcowe stężenie etanolu w zacierze byłoby znacznie większe.

Tak duże stężenie obu kwasów było toksyczne dla drożdży, co pokazuje słaby ich wzrost i duża śmiertelność w tym czasie, gdy dochodziło do kumulacji kwasów organicznych i etanolu (tab. 7). Jednocześnie zwraca uwagę fakt, że dodatek antybiotyku zwiększył przeżywalność drożdży. W praktyce, niewielki wzrost populacji komórkowej drożdży wystąpił głównie w pierwszej dobie fermentacji.

Przeprowadzone eksperymenty wskazują jednoznacznie, że jednym z kluczowych warunków procesu SSF z „zimną” hydrolizą skrobi jest rygorystyczne utrzymanie temperatury fermentacji na poziomie 34–35°C [Verma i in. 2000, Czarnecki i Grajek 1991] oraz pH zacieru na poziomie 4,0–5,5. Prowadzenie procesu poniżej optimum temperaturowego wymaga stosowania zwiększonej dawki enzymów, a to oznacza wzrost kosztów

produkcji. Utrzymanie odpowiedniej temperatury zacieru wymaga modyfikacji konstrukcji kadzi fermentacyjnych poprzez ich izolację termiczną oraz zainstalowanie systemu mechanicznego mieszania zacieru. Drugim niezbędnym warunkiem pomyślnego przebiegu procesu jest przeprowadzenie wstępnej dezynfekcji ziarna przed jego mieleciem. Wydaje się, że najkorzystniejszym rozwiązaniem może być jego dezynfekcja chemiczna połączona z rozdrabnianiem na mokro.

## PODSUMOWANIE

Przeprowadzone badania wykazały, że możliwa jest efektywna hydroliza ziarenek skrobiowych przy zastosowaniu preparatu enzymatycznego Stargen 001 w warunkach przemysłowych. W ten sposób można zredukować zapotrzebowanie na energię niezbędną do kleikowania i upłynniania skrobi. Proces oparty na jednoczesnym scukrzaniu natywnej skrobi i fermentacji etanolowej, prowadzony bezpośrednio w kadzi fermentacyjnej, pozwolił na uzyskanie stężenia etanolu na poziomie 7–8% w/v, co odpowiada 8,9–10,1% v/v. Wynik ten można uznać za zadowalający. Istotnym problemem są zakażenia fermentacji bakteriami mlekowymi. Stanowiły one poważną konkurencję dla drożdży i wykorzystały znaczną pulę cukrów do syntezy kwasu mlekowego. Można oczekiwać, że przy utrzymaniu wysokiej higieny w gorzelnii, stosowaniu surowca dobrej jakości oraz wstępnej dezynfekcji kukurydzy metodą chemiczną możliwe będzie znaczne poprawienie wyników fermentacji. Za wysoce korzystne należy uznać wielokrotne wykorzystanie wywaru gorzelniczego. Zawracanie frakcji ciekłej wywaru oraz kondensatów pary zużywanej w procesie destylacji etanolu pozwala na całkowitą rezygnację z dodatku wody technologicznej. Proces jest bezściekowy i nie wymaga dodatku wody. Wydaje się, że nowoczesna technologia opisana w tej pracy ma realne szanse, aby zastąpić tradycyjną technologię gorzelniczną. Wyniki badań prowadzonych w skali pilotażowej potwierdziły powyższe wnioski. Utrzymanie odpowiednich reżimów technologicznych pozwoliło na uzyskanie stężeń etanolu dochodzących do ponad 12% w/v i wydajności etanolu powyżej 90%.

## PIŚMIENNICTWO

- Czarnecki Z., Grajek W., 1991. Starch hydrolysis and its effect on product yield and microbial contamination in yeast ethanol fermentation. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 7, 355–358.
- D'Amore T., 1987. Ethanol tolerance of yeast. *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 322–330.
- Goyal N., Gupta J.K., Soni S.K., 2005. A novel raw starch digesting thermostable-*amylase* from *Bacillus* sp. I-3 and its use in the direct hydrolysis of raw potato starch. *Enzyme Microb. Technol.*, 37, 723–734.
- Hamelinck C.N., Hooijdonk van G., Faaij A.P.C., 2005. Ethanol from cellulosic biomass: techno-economic performance in short-, middle- and long-term. *Biomass & Energy*, 28, 384–410.
- Holm J., Björck I., Drews A., 1986. A rapid method for the analysis of starch, *Starch-Stärke*, 38, (7) 224–226.
- Hounsa C.G., 1998. Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiol.*, 144, 671–680.
- Kadar Z., Szengyel Z., Reczey K., 2004. Simultaneous saccharification and fermentation (SSF) of industrial wastes for the production of ethanol. *Ind. Crops and Products.*, 20, 103–110.

- Kim J-S., Kom B-G., Lee Ch-H., Kim S-W., Jee H-S., Koh J-H., Fane A.G., 1997. Development of clean technology in alcohol fermentation industry. *J. Cleaner Prod.* 5, 263-267.
- Kłósowski G., Czupryński B., Wolska M., 2006. Characteristics of alcoholic fermentation with the application of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts: As-4 strain and I-7-43 fusant with amylolytic properties. *J. Food Eng.*, 76, 500–505.
- Kosaric N., 1996. Ethanol-Potential source of energy and chemical products, [in:] *Biotechnology*, vol 6, Products of primary metabolism, Rhem H.-J and Reed G. (Eds), VHC Publishers, New York, 121–204.
- Kowalczyk E., 2003. Kukurydza ciągle intryguje. *Raport Rolny*, 20, 1–2.
- Kroumov A.D., M'odenes, A.N., Maicon C., de Araujo Tait M.C., 2006. Development of new unstructured model for simultaneous saccharification and fermentation of starch to ethanol by recombinant strain. *Biochem. Eng. J.*, 28, 243–255.
- Kumar M., Native grain amylases in enzyme combinations for granular starch hydrolysis. Patent US 2007/017485 (WO208021050). Publication date: 21.02.2008.
- Larsson M., Galbe M., Zacchi G., 1997. Recirculation of process water in the production of ethanol from softwood. *Bioresources Technol.*, 60, 143–151.
- Michalski T., 2005. Z pola dla przemysłu. Kukurydza rośliną przyszłości. *Agro Serwis. Perspektywy*, wyd. 3, 7–13.
- Mitchinson C., 2008. Development of improved enzymes for bio-refinery. esEGP5, Norwich, UK, 2.04.2008.
- Mitsuiki S., Mukae K., Sakai M., Goto M., Hayashida S., Furukawa K., 2005. Comparative characterization of raw starch hydrolyzing  $\alpha$ -amylases from various *Bacillus* strains. *Enzyme Microb. Technol.*, 37, 410–416.
- Montesinos T., Navarro J-M., 2000. Production of alcohol from raw wheat flour by amyloglucosidase and *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb. Technol.*, 27, 362–370.
- Narendranath N.V., Power R., 2004. Effect of yeast inoculation rate on the metabolism of contaminating lactobacilli during fermentation of corn mash. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 31, 581–584.
- Roy S., Gudi R.D., Vankatesh K.V., Shah S.S., 2001. Optimal control strategies for simultaneous saccharification and fermentation of starch. *Process Biochem.*, 36, 713–722.
- Shigechi H., Fujita Y., Koh J., Mitsuyoshi U., Fukuda H., Kondo A., 2004. Energy-saving direct ethanol production from low-temperature-cooked corn starch using a cell-surface engineered yeast strain co-displaying glucoamylase and  $\alpha$ -amylase. *Biochem Eng. J.*, 18, 149–153.
- Skinner K.A., Leathers T.D., 2004. Bacterial contaminants of fuel ethanol production. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 31, 401–408.
- Suresh K., Kiransree N., Venkateswar Rao I., 1999. Production of ethanol by raw starch hydrolysis and fermentation of damaged grains of wheat and sorghum. *Bioprocess Eng.*, 21, 165–168.
- Tao F., Miao J.Y., Shi G.Y., Zhang K.C., 2005. Ethanol fermentation by an acid-tolerant *Zymomonas mobilis* under non-sterilized condition. *Process Biochem.*, 40, 183–187.
- Tester R.F., Qi X., Karkalas J., 2006. Hydrolysis of native starches with amylases. *Animal Feed Sci. Technol.*, 130, 39–54.
- Van der Veen M.E., Veelaert S., Van der Goot A.J., Boom R.M., 2006. Starch hydrolysis under low water conditions: A conceptual process design. *J. Food Eng.*, 75, 178–186.
- Verma G., Nigam P., Singh D., Chaudhary K., 2000. Bioconversion of starch to ethanol in a single-step process by coculture of amylolytic yeasts and *Saccharomyces cerevisiae* 21. *Bioresource Technol.*, 72, 261–266.
- Wheals A.E., Basso L.C., Alves D.M.G., Amorim HV., 1999. Fuel ethanol after 25years. *Tibtech*, 17, 482–487.

**SIMULTANEOUS SACCHARIFICATION AND ETHANOL  
FERMENTATION OF GRANULAR CORN STARCH  
WITH RECYCLING OF LIQUID FRACTION OF STILLAGE  
IN AN AGRO-DISTILLERY PLANT**

**Abstract.** Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of corn starch using enzyme preparation Stargen 001 was investigated. The experiments were conducted in an agro-distillery plant. The preparation of corn mashed based on the use of corn flour suspended in recycled liquid fraction of stillage and distillation condensates. It was shown that the final concentrations of ethanol after fermentation of 25% w/v mashes were of 8–10% w/v. The elimination of cooking for starch liquefaction allowed to reduce of energy requirements, nevertheless, made a serious problem with bacterial contamination of mashes. The concentration of lactic acid at the end of fermentation process reached up to 3.8% w/v. The SFF process connected with repeated stillage recycling allowed to remove water requirements and to perform this process as discard-less.

**Key words:** ethanol, fermentation, simultaneous saccharification and fermentation, stillage recycling, *Saccharomyces cerevisiae*, granular starch, corn, hydrolysis, Stargen 001

Zaakceptowano do druku – Accepted for print: 30.09.2009

Do cytowania – For citation: Szymanowska D., Grajek W., 2009. Fermentacja etanolowa połączona z jednoczesną hydrolizą skrobi kukurydzianej i zawracaniem frakcji ciekłej wywaru w warunkach gorzelnii rolniczej. *Acta Sci. Pol. Biotechnol.* 8(3), 25–46.

## SPIS TREŚCI CONTENTS

<b>Anita Rywińska, Piotr Juszczyk, Artur Gryszkin, Waldemar Rymowicz</b> Charakterystyka półciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z glicerolu przez drożdże ..... 3 Characteristic of citric acid biosynthesis from raw glycerol by yeast in repeated-batch fermentation	
<b>Agnieszka Kowalczyk, Monika Michniewicz, Małgorzata Robak</b> Bioremediacja z udziałem drożdży <i>Yarrowia lipolytica</i> : unieruchomione w alginianie komórki oraz ich wpływ na autochtoniczną mikroflorę gleby i kiełkowanie owsa ..... 15 <i>Yarrowia lipolytica</i> in bioremediation: cells entrapped in alginate and their influence on autochthonic microflora and oats germination	
<b>Daria Szymanowska, Włodzimierz Grajek</b> Fermentacja etanolowa połączona z jednoczesną hydrolizą skrobi kukurydzianej i zawracaniem frakcji ciekłej wywaru w warunkach gorzelnicy rolniczej ..... 25 Simultaneous saccharification and ethanol fermentation of granular corn starch with recycling of liquid fraction of stillage in an agro-distillery plant	