

# Wytwarzanie etanolu z laktozy przez komórki drożdży unieruchomione w kulkach agaru porowatego

*Janusz Szczodrak*

*Zofia Szczodrak*

*Adrian Wiater*

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej  
Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej  
Lublin

## 1. Wprowadzenie

W ostatnich latach opublikowano wiele prac na temat zastosowania unieruchomionych komórek drożdży lub bakterii do otrzymywania alkoholu etylowego metodą półciąglą lub ciągłą (1). Zalety stosowania immobilizowanych komórek w fermentacji alkoholowej spowodowały, że zainteresowanie tym procesem nieustannie zwiększa się, tym bardziej, że etanol od czasu światowego kryzysu energetycznego traktowany jest w wielu krajach jako rezerwowe źródło energii i paliw (2). Na szczególną uwagę zasługuje możliwość włączenia tej technologii do wykorzystania olbrzymich zapasów serwatki oraz roślinnych surowców odnawialnych, stanowiących podstawowe produkty uboczne przemysłu rolno-spożywczego (3,4).

Unieruchamianie drożdży w produkcji etanolu oparte jest dotychczas głównie na pułapkowaniu (inkluzji) w żelach, które polega na fizycznym zamknięciu komórek wewnątrz struktury polimeru formowanego najczęściej w postaci kulek. Spośród licznych nośników używanych do pułpkowania drożdży (agar, alginian, karaginan, pektyna, poliakryloamid, żelatyna) na szczególną uwagę zasługują żele agarowe. W literaturze można spotkać doniesienia na temat wykorzystania komórek drobnoustrojów unieruchomionych w kulkach agarowych do produkcji etanolu, ksylitolu i kwasu mlekowego (5,6).

Naturalne żele agarowe odznaczają się nietoksycznością, dużą stabilnością oraz wytrzymałością mechaniczną i mikrobiologiczną, ale są przy tym kruche i łamliwe. Ich zastosowanie do immobilizacji komórek jest często ograniczone ze względu na utrudnioną dyfuzję tlenu i innych składników do wnętrza żelu oraz ograniczony transport na zewnątrz nośnika produktów utworzo-

nych przez unieruchomione w nim komórki (7). W związku z tym opracowano szereg metod polegających na udoskonaleniu niektórych właściwości żeli agarowych. Jako przykład może służyć agar porowaty, otrzymywany poprzez kopolimeryzację agaru i alginianu i odpłukaniu z uzyskanej mieszaniny alginianu wapnia za pomocą buforu fosforanowego (8). Utworzony żel odznacza się wysoką porowatością. Cecha ta jest szczególnie ważna w procesach fermentacyjnych, w których zachodzi wzrost komórek i wydzielanie dużej ilości gazów. Unieruchamianie komórek w agarze porowatym pozwala na swobodne wydzielanie produktów gazowych w trakcie fermentacji, co zapobiega z kolei mechanicznemu rozrywaniu nośnika i uwalnianiu komórek.

We wcześniejszych badaniach wyselekcjonowano drożdże *Candida pseudotropicalis* zdolne do wytwarzania dużych ilości etanolu na podłożu z laktozą i zagęszczoną serwatką (9). Celem pracy było określenie optymalnych warunków dla przebiegu fermentacji alkoholowej prowadzonej przez unieruchomione w żelu agaru porowatego komórki *C. pseudotropicalis* oraz ich wykorzystanie w procesie okresowej (półciągłej) fermentacji podłoży zawierających laktozę.

## 2. Materiały i metody

### 2.1. Mikroorganizm i podłoża hodowlane

Drożdże *Candida pseudotropicalis* 65 przetrzymywano w temp. 4°C na skosach agaru brzeczkowego. Do namnażania biomasy służyła pożywka Hughesa z 2% laktozą (10).

Fermentację alkoholową prowadzono na podłożu Hughesa zawierającym 120 g/l laktozy (podłoże L). Permeat serwatkowy, zawierający 85,25% laktozy, uzyskano z Akademii Rolniczo-Technicznej w Olsztynie. Podłoże fermentacyjne z dodatkiem permeatu (P) wykonano w dwu wariantach: P+ i P-. Podłoże P- uzyskano przez rozpuszczenie 140 g permeatu serwatkowego w 1 l wody destylowanej (końcowe stężenie laktozy wynosiło 12%). Podłoże P+ przygotowano przez uzupełnienie podłoża P- solami mineralnymi i ekstraktem drożdżowym o składzie identycznym jak w pożywce Hughesa. Serwatkę kwasową o pH 4,3 i stężeniu laktozy 3,92-4,20% otrzymano z Okręgowej Spółdzielni Mleczarskiej w Lublinie. Serwatkę odbiałczano trzykrotnie przez ogrzanie w autoklawie w temp. 117°C przez 5 min i sączenie na sączku z bibuły filtracyjnej. Po zagęszczeniu na wyparce próżniowej uzyskano dwa warianty podłoża serwatkowego (S) różniące się stopniem zagęszczenia. Podłoże określane w dalszej części pracy jako S<sub>2</sub> było zagęszczone 2,8-krotnie (zawartość laktozy 10%), a S<sub>3</sub> 3-krotnie (zawartość laktozy 12%). Odczyn wszystkich pożywek fermentacyjnych ustalano na poziomie 5,0, a następnie rozlewano je w ilości po 100 ml do kolb stożkowych o pojemności 300 ml i wyjaławiano w temp. 117°C w czasie 10 min.



## 2.2. Immobilizacja

Namnożoną masę drożdży (24-godzinna hodowla) unieruchamiano metodą pułapkowania w żelu agarowym (8,11). Kulki (średnica 2,5-3,0 mm) formowano przez zmieszanie w temp. 47,5°C agaru, drożdży oraz alginianu sodowego i wkropleniu tej mieszaniny do 2% roztworu  $\text{CaCl}_2$ . Końcowe stężenie wilgotnej masy drożdży w powstałej mieszaninie wynosiło najczęściej 17%. Po 45 min utrwalania, utworzony alginian wapnia wypłukiwano z kulek za pomocą 0,05 M potasowego buforu fosforanowego (pH 7,5).

## 2.3. Warunki fermentacji

Fermentację alkoholową przeprowadzano w kolbach stożkowych à 300 ml zaopatrzonych w rurki fermentacyjne i zawierających 100 ml zagęszczonej serwatki (S) lub jej permeatu (P) oraz taką samą ilość podłoża z laktozą (L). Zawartość laktozy w pożywkach wynosiła od 10 do 12%. Po zasianiu pożywek unieruchomionym biokatalizatorem (najczęściej w ilości 200 kulek na kolbę), próby fermentacyjne inkubowano w cieplarni w czasie 48 godz. w temp. 30°C (jeśli nie podano inaczej). Po zakończeniu fermentacji pożywkę odbierano, a kulki suszono do stałej masy lub używano ich do zaszczepiania następnej partii podłoża. Hodowle okresowe powtórzeniowe (ang. *repeated batch culture*) prowadzono w czasie 18 dni, wymieniając podłoże co 36 godz.

Zastosowano następujące parametry charakteryzujące przebieg fermentacji alkoholowej: stopień zużycia substratu ( $S = \text{g zużytej laktozy/g wyjściowej laktozy } 100\%$ ), końcowe stężenie etanolu ( $P = \text{g/l}$ ), wydajność etanolu ( $Y_{P/S} = \text{g etanolu/g zużytej laktozy}$ ), wydajność praktyczna (WP), czyli procentowo wyrażony stosunek wytworzonego alkoholu do maksymalnej ilości etanolu, który mógłby powstać ze zużytej laktozy.

## 2.4. Metody analityczne

Etanol oznaczano metodą Kellermanna (12), zaś masę nośnika i drożdży wagowo przez wysuszenie w temp. 105°C. Zawartość laktozy w odfermentowanych podłożach mierzono za pomocą wysokosprawnej chromatografii cieczowej. Analizy tego cukru dokonywano przy użyciu chromatografu cieczonego LC-5A firmy Laboratorni Pristoje (Praga, Czechy), wyposażonego w detektor refraktometryczny RIDK-101. Do badań zastosowano kolumnę stalową o wymiarach 0,4 cm x 15 cm, wypełnioną nośnikiem  $\text{LiChrosorb-NH}_2$ , 10  $\mu\text{l}$  firmy Merck (Darmstadt, Niemcy). Fazę ruchomą stanowiła mieszanina acetonitrylu i wody dejonizowanej. Szybkość przepływu fazy ruchomej wynosiła 1 ml/min, zaś objętość nanoszonej na kolumnę próbki 20  $\mu\text{l}$ . Analizę przeprowadzono w warunkach izokratycznych, tj. przy stałym stężeniu acetonitrylu. Próbki płynów pochodzących z podłoży P-, P+, S<sub>2</sub> i S<sub>3</sub> odbiałczano za pomocą 10% TCA, rozcieńczano eluentem do żądanej objętości i odwirowywano.



### 3. Wyniki i dyskusja

#### 3.1. Optymalizacja warunków fermentacji laktozy z udziałem immobilizowanych komórek drożdży

Określenie optymalnych warunków dla przebiegu fermentacji laktozy obejmowało takie czynniki jak: stężenie wilgotnej masy drożdży w mieszaninie agaru i alginianu użytej do formowania kulek, ilość dodanych do nastawu drożdży immobilizowanych, temperaturę, wyjściowy odczyn podłoża oraz czas fermentacji.

Zakładając, że ilość dodanych do podłoża kulek agarowych będzie jednokowa, można sądzić, iż czynnikiem decydującym o przebiegu fermentacji będzie stopień nasycenia kulek komórkami drożdży. Jego miarą jest ilość wilgotnej masy drożdży w mieszaninie agaru i alginianu użytej do formowania kulek. W związku z tym zbadano wpływ ilości drożdży w nośniku (w przedziale stężeń od 8 do 25%) na wydajność fermentacji alkoholowej, prowadzonej w czasie 48 godz. na podłożu z laktozą. Należy zaznaczyć, że w tej serii doświadczeń ilość dodanych do nastawu kulek z immobilizowanymi drożdżami była stała i wynosiła 200/100 ml podłoża. Z danych zebranych w tabeli 1 wynika, że optymalne stężenie biomasy w kulkach wynosi 17%. W tych warunkach drożdże wytwarzały około 51 g/l alkoholu etylowego zużywając około 95% zawartej w podłożu laktozy. Uzyskane wyniki znajdują potwierdzenie w badaniach opublikowanych wcześniej przez Roukas (13,14) i Rao i wsp. (8), którzy do wzbudzania fermentacji etanolowej stosowali optymalne stężenie immobilizowanych drożdży na poziomie od 11 do 20%.

W tabeli 1 przedstawiono wyniki konwersji laktozy do etanolu po zaszczepieniu podłoża różną ilością drożdży immobilizowanych w kulkach agaru porowatego. Nasycenie nośnika biomasą było stałe i wynosiło 17%. Ilość dodanych do podłoża kulek wahała się od 100 do 300, co odpowiadało suchej masie zawartych w nich drożdży od 0,43 do 1,23 g. Wysokie parametry fermentacji (wydajność etanolu rzędu 48 g/l, konsumpcję cukru na poziomie 97%, wydajność praktyczną 77%) otrzymano po dodaniu do pożywki 200 kulek unieruchomionego biokatalizatora i ta ilość nośnika została wybrana do dalszych badań. Zwiększenie liczby kulek do 300 spowodowało jedynie 4,7% wzrost stężenia wytworzonego przez drożdże alkoholu. Również Rymowicz i wsp. (15), w badaniach nad wytwarzaniem kwasu cytrynowego przez unieruchomione w alginianie komórki *Yarrowia lipolytica*, określili optymalną ilość nośnika w podłożu na poziomie 20 g wilgotnej masy, zaś optymalne stężenie zawartych w nich drożdży wynosiło 10%.

TABELA 1

OPTIMALIZACJA WARUNKÓW FERMENTACJI LAKTOZY Z UDZIAŁEM UNIERUCHOMIONYCH W AGARZE POROWATM KOMÓREK *Candida pseudotropicalis*

Czynnik	Drożdże <sup>1</sup> (g/100 ml)	Parametry fermentacji <sup>2</sup>				Końcowe	
		S (%)	P (g/l)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	pH	WP (%)	
stężenie wilgotnej masy drożdży (%) <sup>3</sup>	8,48	0,22	59,15	41,46	0,58	108,40	4,35
	16,96	0,25	94,24	50,68	0,44	83,22	4,46
	25,44	0,50	95,56	50,68	0,44	82,05	4,33
liczba kulek na 100 ml podłoża	100	0,43	89,10	43,77	0,40	75,89	4,25
	200	0,50	97,17	48,38	0,41	76,92	4,20
	300	1,23	97,08	50,68	0,43	80,03	4,38
temperatura (°C)	30	0,24	95,56	52,98	0,46	85,79	4,45
	35	0,90	98,33	50,68	0,43	79,63	4,30
	45	0,12	98,41	52,98	0,44	83,17	4,50
pH	3,0	0,36	61,81	42,62	0,58	102,49	3,10
	4,0	0,49	77,87	50,68	0,54	100,00	3,82
	5,0	0,48	98,66	52,98	0,44	83,45	4,07
	6,0	0,53	96,42	27,64	0,24	44,33	4,30
czas fermentacji (godz.)	12	–	13,89	16,70	0,72	57,62	4,80
	24	–	53,41	31,56	0,50	91,24	4,41
	36	–	85,10	44,34	0,43	84,48	4,43
	48	–	92,26	46,65	0,42	79,19	4,42
	60	–	92,92	46,65	0,41	77,56	4,22

<sup>1</sup>Sucha masa drożdży w nośniku. <sup>2</sup>Opisano w rozdziale Materiały i metody. <sup>3</sup>Mieszanina agaru, alginianu i drożdży służyła do formowania kulek nośnika z immobilizowanymi drożdżami.

W kolejnych doświadczeniach określano aktywność fermentacyjną immobilizowanych komórek *C. pseudotropicalis* w temperaturach 30, 35 i 45°C. Z zebranych w tabeli 1 danych wynika, że badane drożdże osiągnęły najwyższe wydajności etanolu oraz pozostałych parametrów fermentacji praktycznie w całym zakresie użytych temperatur. Odnotowano jedynie niewielkie obniżenie stężenia alkoholu (o 4,3%) oraz wydajności praktycznej (o 7,2%) w temp. 35°C. Drożdże *C. pseudotropicalis* są znane ze swej dość wysokiej tolerancji na temperaturę (16). Komórki wolne, badane wcześniej w naszym laboratorium (9), wykazywały optimum aktywności fermentacyjnej w temp. 40°C. Jednakże w temp. 45°C wydajność produkowanego przez nie etanolu z laktozy lub zagęszczonej serwatki obniżała się o 48%. W doświadczeniach



z drożdżami immobilizowanymi nie obserwowano w tej temperaturze spadku zawartości alkoholu, co można prawdopodobnie tłumaczyć ochronnym działaniem nośnika na zawarte w nim komórki *C. pseudotropicalis*. W dalszych badaniach zastosowano temp. 30°C jako optymalną dla rozwoju i aktywności fermentacyjnej badanych drożdży. Poza wysokim uzyskiem etanolu w tych warunkach, na jej korzyść przemawiają również mniejsze straty alkoholu powstałe w wyniku jego parowania z podłoża w trakcie fermentacji oraz względy ekonomiczne, w tym niższe koszty związane z ogrzewaniem.

W celu wyboru optymalnego pH, fermentację laktozy przeprowadzano w temp. 30°C przy wartościach pH podłoża w zakresie od 3,0 do 6,0. Maksymalną wydajność przemiany cukru do etanolu (53 g/l) przez immobilizowane w żelu agarowym komórki drożdży, uzyskano po 48 godz. przy wyjściowym pH pożywki równym 5,0, który wybrano do dalszych badań (tab. 1). Z opublikowanych danych uzyskanych w przeprowadzonych badaniach nad fermentacją etanolową prowadzoną na ksylozie i glukozie przy udziale drożdży z gatunków *Candida*, *Pichia* i *Saccharomyces*, za optymalny odczyn podłoża uznano pH w zakresie 4,0-5,0 (5,8,13,14,17,18).

Dynamikę produkcji etanolu i zużycia laktozy na tle innych parametrów fermentacji (pH,  $Y_{P/S}$ , WP) w czasie 60 godz. hodowli immobilizowanych komórek drożdży przedstawiono w tabeli 1. Spożycie cukru wzrastało w ciągu całego cyklu hodowlanego, przy czym największe tempo jego przyrostu, podobnie jak i nagromadzenie alkoholu, zarejestrowano w okresie pierwszych 36 godz. fermentacji. Mimo że najwyższą wartość produkcji etanolu (46,6%) uzyskano po 48 godz. fermentacji, to jednak była ona tylko o 5% niższa od tej, jaką notowano już po 36 godz. hodowli. Uzyskane rezultaty pozwalają zatem na skrócenie czasu fermentacji o 12 godz., co w istotny sposób podnosi rentowność całego procesu oraz znacznie zmniejsza ryzyko zakażeń mikroflorą postronną.

Podsumowując ten etap badań ustalono, że optymalne warunki dla przebiegu fermentacji laktozy w oparciu na unieruchomionych komórkach *C. pseudotropicalis* są następujące: ilość inoculum na 100 ml podłoża = 200 kulek nośnika o nasyceniu biomasą 17%, temp. 30°C, pH 5,0, czas fermentacji 36 godz.

### 3.2. Konwersja laktozy do etanolu w serwatce

Ustalone wcześniej optymalne warunki fermentacji posłużyły do prześledzenia zmian jej kinetycznych parametrów w czasie 72-godzinnej hodowli immobilizowanych drożdży *C. pseudotropicalis* na zagęszczonej serwatce kwasowej oraz jej permeacie. Wprowadzono kilka wariantów podłoża serwatkowego, które obejmowały 2,8-krotnie zagęszczoną serwatkę ( $S_2$ ), serwatkę zagęszczoną 3-krotnie ( $S_3$ ), permeat wzbogacony dodatkiem soli mineralnych (P+) oraz permeat bez dodatku soli (P-). W charakterze podłoża kontrolnego zastosowano pożywkę Hughesa z 12% laktozą (L). Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 2.

TABELA 2

DYNAMIKA FERMENTACJI ALKOHOLOWEJ PROWADZONEJ PRZY UŻYCIU UNIERUCHOMIONYCH KOMÓREK  
*C. pseudotropicalis* W RÓŻNYCH PODŁOŻACH ZAWIERAJĄCYCH LAKTOZĘ<sup>1</sup>

Czas fermentacji (godz.)	Podłoże	Parametry fermentacji <sup>2</sup>				pH po hodowli
		S (%)	P (g/l)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	WP (%)	
12	L <sup>3</sup>	37,35	18,43	0,41	83,47	4,71
	P <sup>+</sup> <sup>4</sup>	28,41	23,03	0,36	82,12	4,72
	P <sup>-</sup> <sup>5</sup>	5,24	9,21	0,35	65,13	4,58
	S <sub>2</sub> <sup>6</sup>	8,31	9,21	0,30	57,06	4,45
	S <sub>3</sub> <sup>7</sup>	3,66	6,91	0,29	52,66	4,48
24	L	38,52	29,95	0,52	82,33	4,46
	P <sup>+</sup>	81,36	32,25	0,32	61,30	4,68
	P <sup>-</sup>	43,92	20,79	0,39	72,99	4,52
	S <sub>2</sub>	29,61	11,51	0,33	59,94	4,44
	S <sub>3</sub>	23,21	9,21	0,32	61,35	4,46
36	L	91,76	48,38	0,43	81,53	4,37
	P <sup>+</sup>	80,28	39,16	0,40	75,43	4,60
	P <sup>-</sup>	53,57	32,25	0,50	93,10	4,42
	S <sub>2</sub>	40,34	20,73	0,43	79,45	4,43
	S <sub>3</sub>	25,70	16,12	0,51	96,99	4,45
48	L	96,67	48,38	0,41	77,39	4,34
	P <sup>+</sup>	80,42	39,64	0,53	101,35	4,56
	P <sup>-</sup>	81,69	36,86	0,37	69,77	4,34
	S <sub>2</sub>	52,57	27,64	0,44	81,29	4,39
	S <sub>3</sub>	53,66	23,03	0,35	66,36	4,38
72	L	98,00	48,38	0,40	76,34	4,30
	P <sup>+</sup>	82,13	41,46	0,55	98,20	4,58
	P <sup>-</sup>	81,19	36,86	0,38	70,20	4,38
	S <sub>2</sub>	87,77	43,77	0,41	77,11	4,43
	S <sub>3</sub>	75,12	39,64	0,43	81,42	4,44

<sup>1</sup>Warunki fermentacji: temp. 30°C, wyjściowe pH 5,0, ilość nośnika 200 kulek/100 ml podłoża, stężenie biomasy 16,96%. <sup>2</sup>Opisano w rozdziale Materiały i metody. <sup>3-7</sup>L, podłoże z 12% laktozą; P<sup>+</sup>, permeat serwatkowy wzbogacony dodatkiem soli mineralnych; P<sup>-</sup>, permeat serwatkowy bez dodatku soli; S<sub>2</sub>, serwatka zagęszczona 2,8-krotnie; S<sub>3</sub>, serwatka zagęszczona 3-krotnie.

Spośród użytych do fermentacji podłoży, najlepsze wyniki odnośnie do ilości wytworzonego z laktozy alkoholu etylowego osiągnięto na 12% laktozie. Po 36 godzinach hodowli jego wydajność osiągnęła maksymalną wartość równą 48,4 g/l i była skorelowana z wysokim (96%) zużyciem cukru z podłoża. Na pożywce z serwatką osiągnięto dużo niższe wartości poszczególnych wskaźników technologicznych fermentacji, przy czym najlepszym podłożem dla fermentacji laktozy prowadzonej przez drożdże unieruchomione w żelu agarowym okazał się permeat serwatkowy z dodatkiem soli mineralnych. Po 36 godz. drożdże wytwarzały na tym podłożu 39,2 g/l etanolu, tj. o 19,1%



mniej w stosunku do podłoża z 12% laktozą. Najmniej korzystną dla aktywności fermentacyjnej drożdży okazała się trzykrotnie zagęszczona serwatka, w której po 36 godz. hodowli uzyskano około 59% mniej alkoholu w porównaniu z jego ilością otrzymaną na permeacie z dodatkiem soli mineralnych. W przypadku podłoży serwatkowych, zwłaszcza w odniesieniu do serwatki zagęszczonej trzykrotnie, obserwowano co najmniej 12-godzinne opóźnienie fermentacji, gdyż po 48 godz., a szczególnie po 72 godz., drożdże wytworzyły w tych podłożach zbliżone ilości alkoholu.

Można przypuszczać, że za obniżenie wydajności etanolu na serwatce odpowiedzialnych było kilka czynników. Bogata w azot organiczny serwatka powodowała wystąpienie u drożdży efektu represji azotowej, w wyniku którego większa ilość laktozy została zużyta na budowę biomasy drożdżowej, niż miało to miejsce w przypadku podłoża z laktozą, relatywnie ubogiego w azot. W wyniku zagęszczania serwatki występuje wzrost stężenia rozpuszczalnych soli mineralnych, co powoduje z kolei zwiększenie ciśnienia osmotycznego w pożywce, przed którym drożdże bronią się gromadząc w komórkach glicerol i etanol. O hamującym działaniu ciśnienia osmotycznego na proces fermentacji etanolowej donieśli Zakrzewski i wsp. (19) oraz Dale i wsp. (20).

Do dalszych badań wybrano podłoże z 12% laktozą oraz permeat serwatkowy wzbogacony dodatkiem soli mineralnych.

### 3.3. Wykorzystanie unieruchomionych komórek do fermentacji laktozy metodą półciąglą

Kolejny etap badań dotyczył zastosowania unieruchomionych drożdży do otrzymywania etanolu z laktozy i permeatu serwatkowego w hodowli okresowej, powtórzeniowej (hodowla półciąglą). Zastosowano 12 cykli fermentacyjnych, w których podłoża wymieniano co 36 godzin. Uzyskane dane przedstawiono w tabeli 3 i na rysunku 1. Na podłożu Hughesa z dodatkiem 12% laktozy aktywność fermentacyjna immobilizowanych drożdży pozostawała praktycznie na stałym poziomie w czasie siedmiu 36-godzinnych cykli hodowlanych. W tym czasie drożdże wytwarzały średnio około 43,6 g/l etanolu. Niewielkie obniżenie jego wydajności (o 15,5%) obserwowano w tym podłożu jedynie w pierwszym cyklu fermentacyjnym. Od ósmego cyklu odnotowano stopniowy spadek wydajności etanolu, który utrzymywał się do końca fermentacji, tj. do 18 dnia. Również Roukas (13) w swoich badaniach nad fermentacją alkoholową, prowadzoną metodą półciąglą, nie zaobserwował w ciągu dziesięciu 12-godzinnych cykli większych zmian w produkcji etanolu przez immobilizowane w żelu alginianowym komórki *Saccharomyces cerevisiae*. Na podłożu z dodatkiem proszku serwatkowego (permeatu) i soli mineralnych, aktywność fermentacyjna drożdży nie była tak stabilna jak w przypadku podłoża z czystą laktozą. Początkowo (od 1 do 3 cyklu) rejestrowano wzrost produkcji etanolu o około 14 g/l, później jego ilość ulegała stopniowo obniżeniu, przy czym największe tempo spadku produkcji alkoholu obserwowano od ósmego cyklu hodowlanego. W czasie 18-dniowej ho-

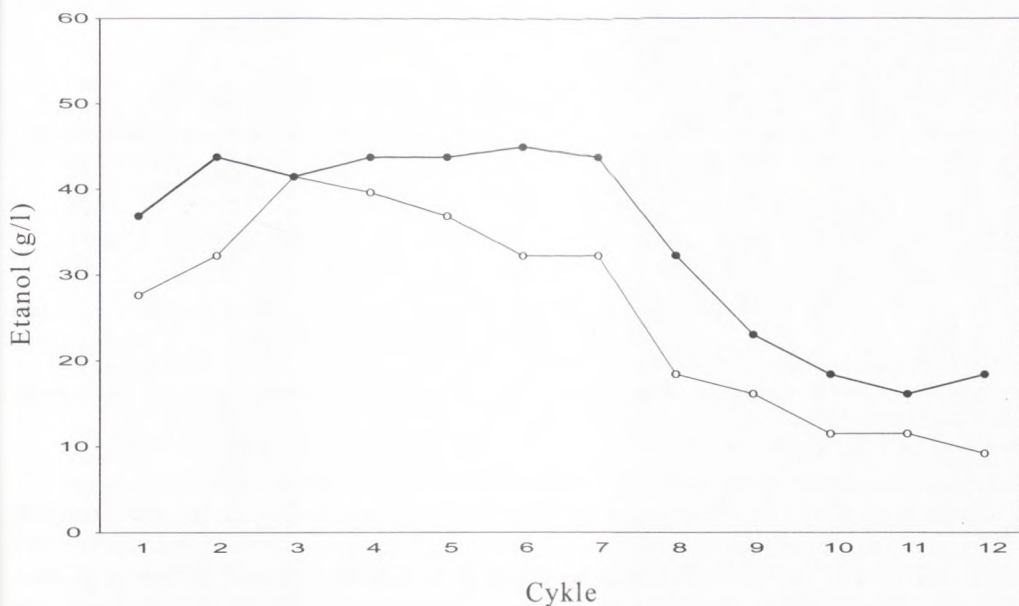


dowli okresowej (powtórzeniowej) nie obserwowano uwalniania komórek drożdży z nośnika, który był stabilny i nie ulegał rozrywaniu pod wpływem wydzielanego w czasie fermentacji dwutlenku węgla.

TABELA 3  
PRZEBIEG FERMENTACJI LAKTOZY PROWADZONEJ METODĄ PÓLCIĄGLĄ PRZEZ  
IMMOBILIZOWANE W KULKACH AGARU POROWATEGO DROŹDZE *C. pseudotropicalis*<sup>1</sup>

Liczba cykli	Rodzaj podłoża	Wskaźniki technologiczne fermentacji <sup>2</sup>				Końcowe pH
		S (%)	P (g/l)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	WP (%)	
1	L <sup>3</sup>	64,64	36,86	0,47	88,18	4,46
	P+ <sup>4</sup>	55,57	27,64	0,41	76,92	4,75
2	L	71,88	43,77	0,51	94,16	4,24
	P+	67,22	32,25	0,39	74,18	4,65
3	L	71,88	41,46	0,47	89,19	4,23
	P+	67,38	41,46	0,50	95,15	4,64
4	L	67,47	43,77	0,54	100,32	4,25
	P+	71,21	39,64	0,45	86,08	4,65
5	L	77,37	43,77	0,47	87,54	4,25
	P+	68,21	36,86	0,45	83,56	4,66
6	L	79,70	44,97	0,47	88,17	4,28
	P+	64,97	32,25	0,41	76,76	4,64
7	L	78,20	43,77	0,46	86,55	4,26
	P+	63,64	32,25	0,53	78,37	4,66
8	L	74,95	32,25	0,35	66,53	4,28
	P+	45,75	18,43	0,32	62,28	4,65
9	L	60,81	23,03	0,31	58,57	4,27
	P+	35,02	16,12	0,38	74,45	4,64
10	L	47,42	18,43	0,31	60,11	4,29
	P+	40,01	11,51	0,25	44,49	4,62
11	L	34,77	16,12	0,38	71,70	4,32
	P+	25,29	11,51	0,40	70,39	4,66
12	L	32,02	18,43	0,47	88,99	4,40
	P+	24,04	9,21	0,31	59,26	4,80

<sup>1</sup>Warunki fermentacji podano w tabeli 2, długość cyklu 36 godz. <sup>2</sup>Opisano w rozdziale Materiały i metody. <sup>3,4</sup>Szczegółowy opis podano w tabeli 2.



Rys. 1. Dynamika produkcji etanolu na podłożach zawierających laktozę w czasie okresowej (półciągłej) fermentacji z wykorzystaniem immobilizowanych komórek *C. pseudotropicalis*. Warunki fermentacji i opis podłoża podano w tab. 2 i 3. ● — podłoże z 12% laktozą, ○ — permeat serwatkowy wzbogacony dodatkami soli mineralnych.

### 3.4. Porównanie wydajności etanolu otrzymanego przez wolne i immobilizowane komórki drożdży

W tabeli 4 zestawiono wartości parametrów kinetycznych fermentacji uzyskanych w tych samych warunkach przez wolne i immobilizowane komórki *C. pseudotropicalis* w czasie fermentacji pożywki zawierającej 12% laktozy oraz permeat serwatkowy z dodatkami soli mineralnych. Z porównania danych wynika, że wydajności etanolu otrzymane przez komórki wolne na obu podłożach były średnio o 11,5% wyższe w stosunku do jego ilości uzyskanych w hodowlach z zastosowaniem komórek immobilizowanych. Jednakże na korzyść tych ostatnich przemawia możliwość wielokrotnego ich wykorzystania bez większych zmian aktywności fermentacyjnych oraz łatwość oddzielenia komórek unieruchomionych od podłoża i zawartych w nim produktów końcowych fermentacji.

Analizując wyniki dotychczas przeprowadzonych fermentacji można wnioskować, że drożdże unieruchomione w agarze porowatym mogą być z powodzeniem wielokrotnie wykorzystywane do otrzymywania etanolu z laktozy. Dalsze badania będą zmierzać w kierunku zwiększenia wydajności tego procesu



TABELA 4  
PARAMETRY KINETYCZNE FERMENTACJI LAKTOZY UZYSKANE PRZEZ WOLNE  
I IMMOBILIZOWANE KOMÓRKI *C. pseudotropicalis*<sup>1</sup>

Komórki	Podłoże	Wskaźniki technologiczne fermentacji <sup>2</sup>				pH po fermentacji
		S (%)	P (g/l)	Y <sub>P/S</sub> (g/g)	WP (%)	
wolne <sup>3</sup>	L <sup>4</sup>	89,10	55,29	0,45	95,89	4,42
	P+ <sup>5</sup>	89,10	43,77	0,40	75,89	4,52
immobilizowane <sup>6</sup>	L	91,76	48,38	0,43	81,53	4,37
	P+	80,28	39,16	0,40	75,43	4,60

<sup>1</sup>Warunki fermentacji: temp. 30°C, wyjściowe pH 5,0, czas 36 godz. <sup>2</sup>Opisano w rozdziale Materiały i metody. <sup>3</sup>Kolby fermentacyjne szczepiono inoculum w ilości 0,08 g suchej masy drożdży/100 ml podłoża. <sup>4,5</sup>Opis podłoży podano w tabeli 2. <sup>6</sup>Ilość nośnika 200 kulek/100 ml podłoża, stężenie wilgotnej masy drożdży w mieszaninie agaru i alginianu użytej do formowania kulek wynosiło 16,96%.

poprzez hydrolizę enzymatyczną laktozy, wykorzystanie kultur mieszanych lub szczepów zmodyfikowanych na drodze genetycznej oraz zastosowanie fermentacji ciągłej w bioreaktorze ze złożem upakowanym. W procesach ciągłych komórki mają zapewniony stały dostęp do substratu, ich rozwój nie jest ograniczony przez własne produkty metaboliczne (zwłaszcza alkohol), stresy środowiskowe (zmiany pH, natlenienie) oraz ryzyko zakażeń obcą mikroflorą.

#### 4. Wnioski

- W procesie unieruchamiania drożdży *Candida pseudotropicalis* w żelu agarowym, standardowe inoculum do zaszczepiania nastawu fermentacyjnego powinno zawierać 200 kulek nośnika na 100 ml podłoża, w których stężenie biomasy wynosi 17%.
- Za optymalne warunki dla fermentacji laktozy prowadzonej przez unieruchomione komórki drożdży uznano temperaturę 30°C, wyjściowy odczyn podłoża 5,0 oraz czas hodowli 36 godz.
- Maksymalne nagromadzenie etanolu w ilości 48-50 g/l przez komórki unieruchomione w kulkach agaru porowatego uzyskano na podłożu z 12% laktozą. Na permeacie serwatkowym drożdże wykazywały mniejszą aktywność fermentacyjną, wytwarzając alkohol etylowy w ilości 39,2 g/l.
- Stosując komórki immobilizowane w hodowli półciągłej, wykazano, że ich aktywność fermentacyjna pozostaje praktycznie na stałym poziomie w czasie siedmiu 36-godzinnych cykli hodowlanych.
- W trakcie 18-dniowej hodowli okresowej nie obserwowano uwalniania komórek drożdży z nośnika agarowego, który był stabilny i dzięki swojej strukturze porowatej nie ulegał rozrywaniu pod wpływem wydzielanego podczas fermentacji dwutlenku węgla.

## Literatura

1. Lother A. M., Oetterer M., (1995), Rev. Microbiol., São Paulo, 26, 151-159.
2. Jarosz K., (1995), Przem. Ferm. Owocowo-Warzywny, 39 (9), 11-12.
3. Siso M. I. G., (1996), Bioresource Technol., 57, 1-11.
4. Szczodrak J., Fiedurek J., (1996), Biomass Bioenergy, 10, 367-375.
5. Hinfray C., Jouenne T., Mignot L., Junter G.-A., (1995), Appl. Microbiol. Biotechnol., 42, 682-687.
6. Zayed G., Winter J., (1995), Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 362-366.
7. Omar S. H., (1993), Appl. Microbiol. Biotechnol., 40, 1-6 i 173-181.
8. Rao B. S., Pundle A. V., Prabhune A. A., Shankar V., SivaRaman H., (1986), Appl. Biochem. Biotechnol., 12, 17-24.
9. Szczodrak J., Szewczuk D., Rogalski, J., Fiedurek J., (1997), Acta Biotechnol., 17, 51-61.
10. Hughes D. B., Tudroszen N. J., Moye C. J., (1984), Biotechnol. Lett., 6, 1-6.
11. SivaRaman H., Rao B. S., Pundle A. V., SivaRaman C., (1982), Biotechnol. Lett., 4, 359-364.
12. Kellermann E., (1960), Kvasný Průmysl, 6, 11-12.
13. Roukas T., (1994), Appl. Biochem. Biotechnol., 44, 49-64.
14. Roukas T., (1994), J. Chem. Tech. Biotechnol., 59, 387-393.
15. Rymowicz W., Wojtanowicz M., Robak M., Jurgielewicz W., (1993), Acta Microbiol. Polon., 42, 163-170.
16. Bothast R. J., Kurtzman C. P., Saltarelli M. D., Slininger P. J., (1986), Biotechnol. Lett., 8, 593-596.
17. Jones T. D., Havard J. M., Daugulis A. J., (1993), Biotechnol Lett., 15, 871-876.
18. Gilson C. D., Thomas A., (1995), J. Chem Tech. Biotechnol., 62, 38-45.
19. Zakrzewski E, Zmarlicki S., Woźniak J., (1984), Przem. Ferm. Owocowo-Warzywny, 28 (3), 5-9.
20. Dale M. C., Eagger A., Okos M. R., (1994), Proc. Biochem., 29, 535-544.

### Production of ethanol from lactose by yeast cells immobilized in open-pore agar

#### Summary

An open-pore agar matrix has been shown to be suitable for the entrapment of *Candida pseudotropicalis* whole cells are used in reactions that involve cell growth and gas evolution. The basic conditions for lactose fermentation by immobilized yeast cells i.e. inoculum quantity, pH, temperature and culture time were standardized.

It was shown that yeast cells immobilized in the porous carrier could be used repeatedly in the batch fermentation system for seven 36 h cycles without any substantial loss in ethanol yield, and beads of porous agar with entrapped cells did not rupture, even after periods of 18 d of use.

#### Key words:

*Candida pseudotropicalis*, immobilization, open-pore agar, lactose, whey, batch fermentation, ethanol production.

#### Adres do korespondencji:

Janusz Szczodrak, Zakład Mikrobiologii Przemysłowej, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej, ul. Akademicka 19, 20-033 Lublin.