

**Agrovoc descriptors:** yeasts, candida, biomass, protoplasts, cells, extracts, chromium, extraction, atomic absorption spectrometry

**Agris category codes:** F60

University of Ljubljana  
Biotechnical Faculty  
Food Science and Technology Department

COBISS koda 1.01

## Ekstrakcija kroma iz kvasne biomase

Maja PAŠ<sup>1</sup>, Radmila MILAČIČ<sup>2</sup>, Peter RASPOR<sup>3</sup>

Delo je prispelo 15. decembra 2007, sprejeto 28. aprila 2008.

Received December 15, 2007, accepted April 28 2008.

### IZVLEČEK

Celokupni krom v kvasni biomasi ni dober pokazatelj količine organsko vezanega oz. biološko aktivnega kroma. Namen študije je bil preizkusiti različne reagente za ekstrakcijo organsko vezanega kroma iz kvasnih celic in protoplastov ter optimizirati parametre ekstrakcije. Kvasovke *Candida intermedia* ZIM 156 smo namnoževali 12 oz. 22 ur pri 28 °C v kemijsko definiranim gojišču z dodanim 1 mM CrCl<sub>3</sub> oz. Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (20 μM Cr<sup>6+</sup>). Izprane kvasne celice smo suspendirali v reagentih za ekstrakcijo (0,05 M EDTA, 0,7 M CH<sub>3</sub>COONa, 0,1 M NH<sub>3</sub>, 0,1 M Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) ter suspenzije inkubirali pri 28 °C. Optimizirali smo čas ekstrakcije, mešanje med ekstrakcijo in koncentracijo suspenzije kvasovk v EDTA. Iz dela kvasnih celic smo pripravili protoplaste in iz njih ekstrahirali krom. Vsebnosti kroma v ekstraktih, celokupnega kroma v kvasni biomasi in kroma v protoplastih smo določili z atomsko absorpcijsko spektroskopijo. Na podlagi dobljenih rezultatov smo kot najprimernejši reagent za ekstrakcijo izbrali EDTA, najugodnejši čas ekstrakcije 21 ur, pri čemer stresanje ni potrebno. Iz rezultatov je tudi razvidno, da se z EDTA iz kvasnih celic ekstrahira približno enak delež kroma kot iz protoplastov, kar velja za obe uporabljeni kromovi spojini v gojišču. Ne moremo pa zaključiti, ali je bil krom, ekstrahiran iz protoplastov, intracelularnega izvora ali je bil vezan v celičnih membranah. Zato bi bilo potrebno v nadaljnjih raziskavah natančneje določiti lastnosti ekstraktov z EDTA, predvsem identificirati spojine, na katere je vezan krom.

**Ključne besede:** kvasovke, krom, ekstrakcija

---

Ta članek je del doktorskega dela asist. dr. Maje Paš. Mentor: prof. dr. Peter Raspor

This paper is a part of dissertation of Maja Paš. Supervisor: Prof., Ph. D. Peter Raspor

<sup>1</sup> Asist., dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana, E-pošta: maja.pas@bf.uni-lj.si

<sup>2</sup> Doc. dr., Institut Jožef Stefan, Odsek za znanosti o okolju, Jamova 39, SI-1000 Ljubljana

<sup>3</sup> Prof. dr., Univerza v Ljubljani, Biotehniška fakulteta, Oddelek za živilstvo, Jamnikarjeva 101, SI-1000 Ljubljana

## ABSTRACT

### EXTRACTION OF CHROMIUM FROM YEAST BIOMASS

Total chromium in yeast biomass does not indicate well the amount of organically bound or biologically active chromium. The study presented in this paper investigated different reagents for extraction of organically bound chromium from yeast cells and yeast protoplasts and different parameters of extraction procedure. Yeasts *Candida intermedia* ZIM 156 were cultivated for 12 or 22 hours at 28 °C in chemically defined medium containing 1mM CrCl<sub>3</sub> or Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (20 µM Cr<sup>6+</sup>). Washed yeast cells were resuspended in appropriate reagents for extraction (0.05 M EDTA, 0.7 M CH<sub>3</sub>COONa, 0.1 M NH<sub>3</sub>, 0.1 M Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O) and suspensions were incubated at 28 °C. Extraction time, mixing conditions and concentration of yeast suspension in EDTA were optimized. An aliquot of yeast cells was used to prepare protoplasts from which chromium was extracted. Chromium content in extracts, in yeast biomass and in protoplasts was analysed by atomic absorption spectrometry. On the basis of our results EDTA was chosen as the most appropriate reagent for extraction, optimal extraction time was 21 hours without shaking. Furthermore, the results obtained for both chromium compounds showed, that the amounts of extracted chromium from yeast cells and from protoplasts were approximately the same. Nevertheless, we can not conclude, whether chromium, which was extracted from yeast protoplasts originated from cell interior or from yeast cell membranes. In further research exact properties of EDTA extracts should be determined and chromium compounds in the extracts should be identified.

**Key words:** yeasts, chromium, extraction

## 1 UVOD

Krom je pomemben za normalen potek metabolizma ogljikovih hidratov in lipidov. Primeren dnevni vnos (»Adequate Intake«) kroma za odrasle ljudi je od 20 do 35 µg, odvisno od spola, starosti in posebnih fizioloških stanj (nosečnost, dojenje) (Institute of Medicine, Food and Nutrition Board, 2001). Mnoge raziskave potekajo v smeri dokončne identifikacije biološko aktivne oblike kroma in iskanja tako naravnih kot sintetičnih kromovih kompleksov, ki bi bili varni in učinkoviti kot prehranski dodatek. (Andersson s sod, 2007; Jain s sod., 2007; Liu, 2007; Shoeib in Mester, 2007).

S kromom obogatena kvasna biomasa vsebuje »biostabilizirane« in netoksične oblike kroma, zato lahko predstavlja dober naraven vir kroma za prehranske aplikacije (Kaszycki s sod., 2004). Kljub številnim poskusom izolacije in karakterizacije (Shoeib in Mester, 2007), pa natančna struktura (narava) omenjenih oblik kroma v kvasnih celicah še vedno ni določena. Po drugi strani pa skušajo avtorji ovrednotiti količino t.i. biološko aktivnega oz. organsko vezanega kroma v kvasni biomasi z uporabo različnih metod ekstrakcije kroma iz kvasnih celic, pri čemer uporabljajo različne reagente, npr. NH<sub>4</sub>OH, etanol. Vsebnost celokupnega akumuliranega kroma namreč ni dober pokazatelj količine biološko aktivnega kroma v kvasni biomasi. (Toepfer s sod., 1973; Anderson s sod., 1978; Demirci in Pometto, 2000; Kaszycki s sod., 2004)

Kljub temu pa definicija "organsko vezanega kroma" v kvasnih celicah ni povsem pojasnjena.

Z uporabo različnih reagentov za ekstrakcijo kroma iz kvasnih celic in protoplastov ter optimizacijo parametrov ekstrakcije smo skušali izbrati najprimernejši reagent za ekstrakcijo biološko aktivne oblike kroma iz kvasnih celic.

Reagente za ekstrakcijo smo izbrali na osnovi izsledkov nekaterih raziskav, pri katerih je šlo bodisi za ekstrakcijo kroma iz zemlje oz. odpadnega blata (Kožuh s sod., 1994; Milačič in Štupar, 1995; Ure, 1996; Lombardi in Garcia Jr., 2002; Tarvainen in Kallio, 2002; Jean, 2007) ali pa za ekstrakcijo kroma iz mikrobne biomase (Toepfer s sod., 1973; Anderson s sod., 1978; Demirci in Pometto, 2000; Kaszycki s sod., 2004)

## 2 MATERIALI IN METODE

### Priprava s kromom obogatene kvasne biomase

V raziskavi smo uporabili kvasovko *Candida intermedia* ZIM 156 iz Zbirke industrijskih mikroorganizmov na Biotehniški fakulteti v Ljubljani. Tri dni staro kulturo kvasovk smo prenesli z agarja v kemijsko definirano gojišče z vrednostjo pH 4 (Paš s sod., 2004), tako da smo dosegli začetno optično gostoto ( $\lambda = 650$  nm) kvasne suspenzije okrog 0,25. Sledilo je aerobno namnoževanje kvasovk ( $200 \text{ min}^{-1}$ ,  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ) do pozne eksponentne faze rasti (optična gostota okrog 1,8 pri  $\lambda = 650$  nm).

Tako pripravljen inokulum (6 vol%) smo uporabili za pripravo s kromom obogatene kvasne biomase. Namnoževanje kvasovk je potekalo 22 ur v kemijsko definiranim gojišču, ki je vsebovalo 1 mM  $\text{CrCl}_3$  ( $28 \text{ }^\circ\text{C}$ ,  $200 \text{ min}^{-1}$ ).

Po zaključeni kultivaciji smo brozge centrifugirali (5 minut,  $4000 \text{ min}^{-1}$ ) in kvasne celice trikrat izprali z 0,015 M fosfatnim pufrom (pH = 4).

Količino celokupnega kroma v kvasni biomasii smo določili s sušenjem izpranih kvasnih celic pri temperaturi  $105 \text{ }^\circ\text{C}$  do konstante mase in razgradnjo suhe biomase z dodatkom 65 %  $\text{HNO}_3$  (1 ml / 20 mg ss) ter s segrevanjem 30 minut pri temperaturi  $140 \text{ }^\circ\text{C}$ . Po razgradnji kvasne biomase in ohladitvi na sobno temperaturo smo vzorce razredčili z bidestilirano vodo in določili vsebnost kroma. Za ta namen smo uporabili bodisi plamensko atomsko absorpcijsko spektroskopijo (PAAS) ali pa elektrotermično atomsko absorpcijsko spektroskopijo (ETAAS). Tehniko smo izbrali glede na koncentracijo kroma v vzorcu – za koncentracijske nivoje  $\mu\text{g ml}^{-1}$  smo uporabili PAAS, za koncentracijske nivoje  $\text{ng ml}^{-1}$  pa ETAAS.

### Preizkušanje reagentov za ekstrakcijo

Za preizkušanje posameznih reagentov za ekstrakcijo in za optimiziranje koncentracije kvasovk v reagentu za ekstrakcijo smo uporabili s kromom obogateno kvasno biomaso, ki smo jo namnožili v popolnoma neodvisnih kultivacijah (opisano zgoraj). Izprane kvasne celice smo suspendirali v reagentu za ekstrakcijo ter suspenzije inkubirali pri temperaturi  $28 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Uporabili smo naslednje reagente:

- 0,05 M vodna razt. EDTA (Kompleksal III;  $\text{C}_{10}\text{H}_{14}\text{N}_2\text{Na}_2\text{O}_8 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ), pH = 7,
- 0,7 M vodna razt.  $\text{CH}_3\text{COONa}$ , pH = 5,
- 0,1 M vodna razt.  $\text{NH}_3$ , pH = 10,
- 0,1 M vodna razt.  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  ( $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ ), pH = 11.

V postopku ekstrakcije smo optimizirali:

- čas ekstrakcije (vzorčenje med inkubacijo),
- mešanje med ekstrakcijo (polovica vzorcev se je stresala ( $200 \text{ min}^{-1}$ ), druga polovica pa ne),
- koncentracijo suspenzije kvasovk v EDTA (5, 10 in 15 % suspenzija).

Po določenih časih ekstrakcije smo vzorce centrifugirali (5 minut,  $4000 \text{ min}^{-1}$ ) in v supernatantih določili količino kroma (z AAS), ki se je ekstrahiralo iz kvasnih celic.

### Ekstrakcija kroma iz kvasnih celic in protoplastov z 0,05 M EDTA

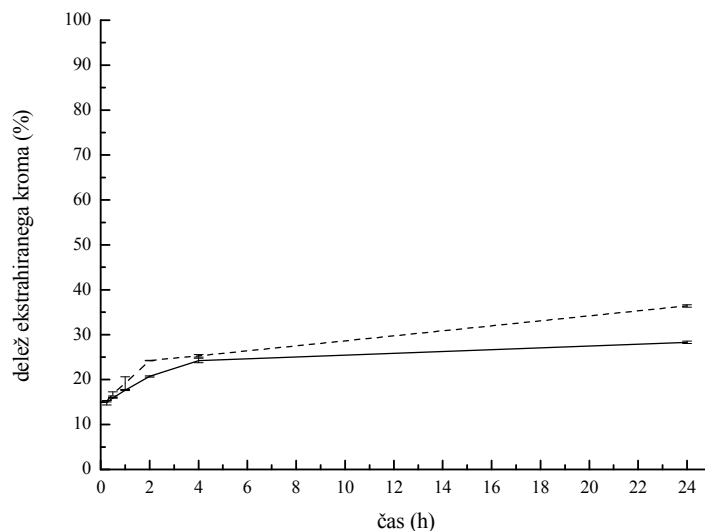
Po prej opisanem postopku smo pripravili s kromom obogateno kvasno biomaso, pri čemer smo kot vir kroma v gojišču uporabili dve kromovi spojini:  $1 \text{ mM CrCl}_3$ , v katerem je oksidacijsko stanje kroma +3 in  $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$  kot  $\text{Cr}^{6+}$ -spojino s koncentracijo kroma  $20 \text{ }\mu\text{M}$ . Aerobna submerzna kultura kvasovk v gojišču z dodanimi kromovimi spojinama je potekala 12 ur (do pozne eksponentne faze rasti). Z vsako od kromovih spojin smo izvedli tri neodvisne kulture.

Izprane kvasne celice smo razdelili na tri dele:

- iz dela celic smo z EDTA ekstrahirali krom in določili njegovo vsebnost v ekstraktih,
- iz drugega dela kvasnih celic smo po postopku, opisanem v Paš s sod. (2004) pripravili protoplaste kvasnih celic, in iz njih ekstrahirali krom. Postopek ekstrakcije in določitev količine ekstrahirane kroma je bil enak kot za cele kvasne celice, le da smo v primeru protoplastov namesto vodne razt. EDTA uporabili EDTA v 0,6 M KCl.
- tretji del celic smo uporabili za določitev vsebnosti celokupnega kroma v kvasnih celicah (po prej opisanem postopku).

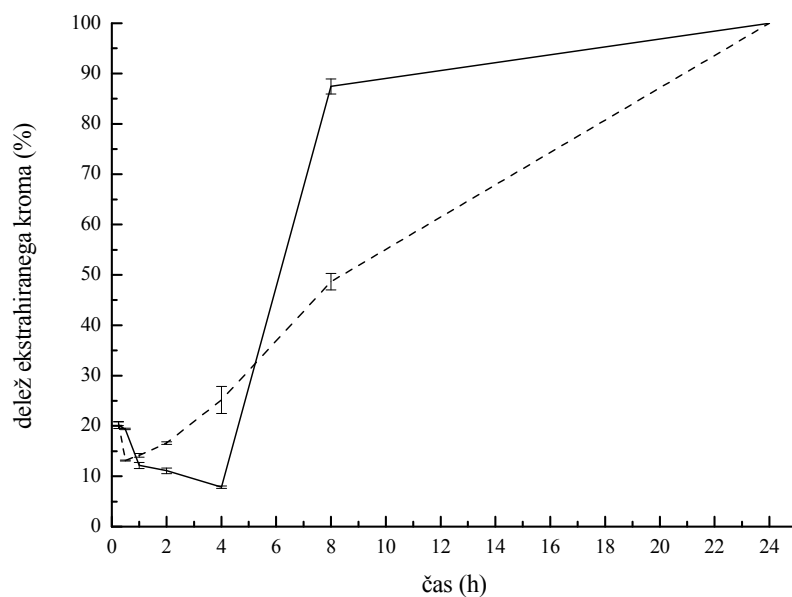
## 3 REZULTATI IN RAZPRAVA

### Izbor reagenta za ekstrakcijo in optimizacija parametrov ekstrakcije



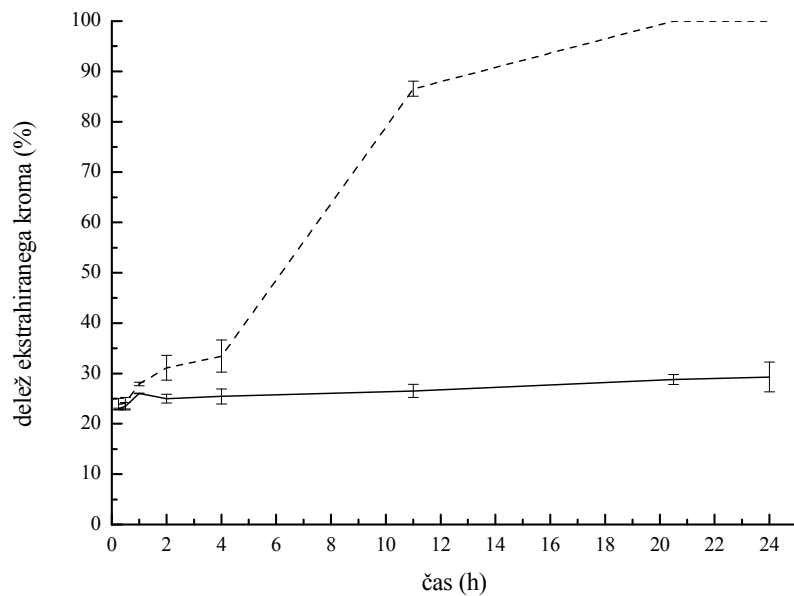
Slika 1: Deleži z EDTA ekstrahirane kroma od celokupnega kroma v kvasnih celicah (konc. celokupnega kroma je  $40,0 \text{ }\mu\text{g/g}$  mokre biomase) v odvisnosti od časa ekstrakcije in stresanja (— brez stresanja, - - - - s stresanjem)

Figure 1. EDTA extractable chromium (as percentage of total accumulated chromium in yeast cells; total chromium concentration was  $40.0 \text{ }\mu\text{g/g}$  wet biomass) vs. extraction time and shaking pattern (— no shaking, - - - - shaking)



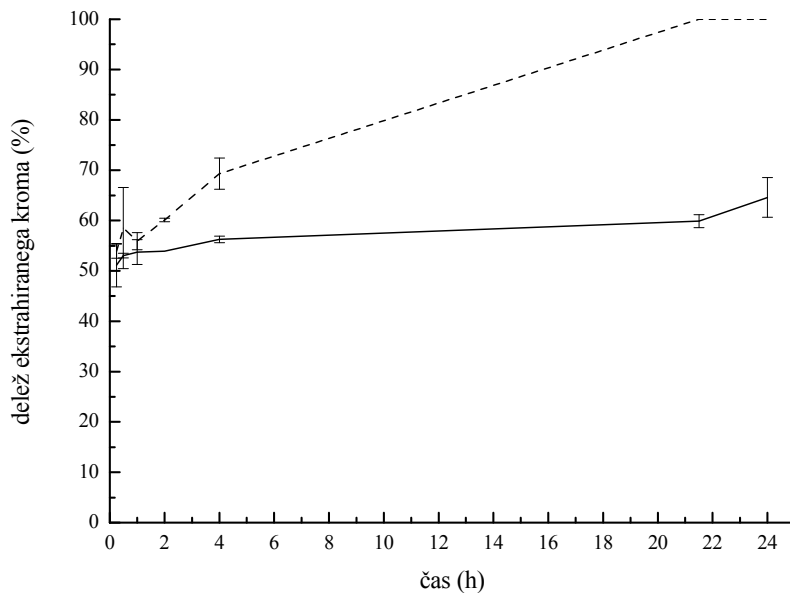
Slika 2: Deleži z  $\text{NH}_3$  ekstrahiranega kroma od celokupnega kroma v kvasnih celicah (konc. celokupnega kroma je  $50,0 \mu\text{g/g}$  mokre biomase) v odvisnosti od časa ekstrakcije in stresanja (— brez stresanja, - - - - s stresanjem)

Figure 2.  $\text{NH}_3$  extractable chromium (as percentage of total accumulated chromium in yeast cells; total chromium concentration was  $50.0 \mu\text{g/g}$  wet biomass) vs. extraction time and shaking pattern (— no shaking, - - - - shaking)



Slika 3: Deleži z  $\text{CH}_3\text{COONa}$  ekstrahirane kroma od celokupnega kroma v kvasnih celicah (konc. celokupnega kroma je  $28,2 \mu\text{g/g}$  mokre biomase) v odvisnosti od časa ekstrakcije in stresanja (— brez stresanja, - - - - s stresanjem)

Figure 3.  $\text{CH}_3\text{COONa}$  extractable chromium (as percentage of total accumulated chromium in yeast cells; total chromium concentration was  $28.2 \mu\text{g/g}$  wet biomass) vs. extraction time and shaking pattern (— no shaking, - - - - shaking)



Slika 4: Deleži z  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  ekstrahirane kroma od celokupnega kroma v kvasnih celicah (konc. celokupnega kroma je  $29,9 \mu\text{g/g}$  mokre biomase) v odvisnosti od časa ekstrakcije in stresanja (— brez stresanja, - - - - s stresanjem)

Figure 4.  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  extractable chromium (as percentage of total accumulated chromium in yeast cells; total chromium concentration was  $29.9 \mu\text{g/g}$  wet biomass) vs. extraction time and shaking pattern (— no shaking, - - - - shaking)

Na Slikah 1-4 so prikazani rezultati ekstrakcije kroma iz kvasnih celic z različnimi reagenti za ekstrakcijo po 22-urni kultivaciji kvasovk v gojišču z  $1 \text{ mM CrCl}_3$ .

Iz rezultatov je razvidno, da ima čas ekstrakcije najmanjši vpliv na količino ekstrahirane kroma iz kvasnih celic, če kot reagent za ekstrakcijo uporabimo EDTA ali  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Sliki 1 in 3), medtem ko se količina ekstrahirane kroma pri ekstrakciji z  $\text{NH}_3$  ali  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  s časom ekstrakcije povečuje (Sliki 2 in 4). V zadnjih dveh primerih se po 24 urah iz kvasnih celic ekstrahira ves akumulirani krom, kar lahko pripišemo poškodbam kvasnih celic zaradi uporabljenih reagentov (eden od možnih vzrokov bi lahko bila visoka vrednost pH).

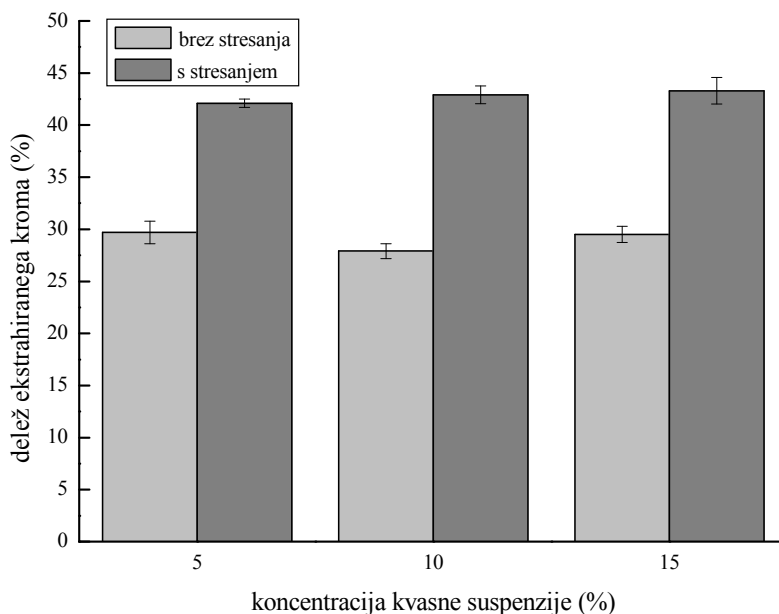
V literaturi najdemo podatke o primerjavi ekstrakcije kroma iz kvasovk z  $0,1 \text{ M NH}_4\text{OH}$  in  $50 \%$  vodno razt. etanola, ki je pokazala, da se je z  $\text{NH}_4\text{OH}$  sicer ekstrahiralo več kroma iz kvasovk, vendar pa je bil le majhen delež povezan z biološko aktivnostjo. Tako naj bi se kot boljše merilo za količino organsko vezanega kroma v kvasovkah izkazala ekstrakcija z etanolom, saj je količina kroma

v ekstraktih odgovarjala biološki aktivnosti kroma.  $\text{NH}_4\text{OH}$  in etanol povzročita spremembo permeabilnosti celičnih membran. (Toepfer s sod., 1973; Anderson s sod., 1978; Demirci in Pometto, 2000)

Alkalni  $\text{Na}_4\text{P}_2\text{O}_7$  se uporablja predvsem za ekstrakcijo organskih snovi iz odpadnega blata, pri čemer pa se lahko del kovin odcepi od organskih snovi in nastanejo topni kompleksi kovine in pirofosfata. (Lombardi in Garcia Jr., 2002)

Iz Slik 1-4 je prav tako razvidno, da je količina ekstrahiranega kroma iz kvasnih celic v primeru vseh uporabljenih ekstrahentov večja, če vzorce stresamo, kar bi lahko pripisali mehanskim poškodbam kvasnih celic. Najmanjši vpliv stresanja vzorcev opazimo v primeru ekstrakcije z EDTA in  $\text{CH}_3\text{COONa}$  (Sliki 1 in 3).

Na osnovi dobljenih rezultatov smo kot najprimernejši reagent za ekstrakcijo izbrali EDTA, najugodnejši čas ekstrakcije 21 ur, pri čemer stresanje ni potrebno.



Slika 5: Vpliv koncentracije kvasne suspenzije v EDTA in stresanja na količino ekstrahiranega kroma iz kvasnih celic (konc. celokupnega kroma je  $31,2 \mu\text{g/g}$  mokre biomase)

Figure 5. Effect of concentration of yeast suspension in EDTA and shaking pattern on the amount of extracted chromium from yeast cells (total chromium concentration was  $31.2 \mu\text{g/g}$  wet biomass)



Rezultati proučevanja vpliva koncentracije kvasne suspenzije na količino ekstrahirane kroma kažejo (Slika 5), da različne koncentracije kvasne biomase v EDTA (5 %, 10 % in 15 % suspenzija) ob istih pogojih ekstrakcije ne vplivajo na količino ekstrahirane kroma iz kvasovk. Presežek EDTA je očitno dovolj velik, saj mora biti za doseganje optimalne ekstrakcije koncentracija liganda večja od koncentracije kovine (Jean s sod., 2007). Tako smo za nadaljnje poskuse izbrali najnižjo preizkušeno koncentracijo suspenzije kvasovk v EDTA, t.j. 5 %.

Podobno ugotavljajo drugi avtorji: pri ekstrakciji Pb, Cd in Cu z EDTA iz sedimentov koncentracija suspenzije ni imela vpliva na količino ekstrahirane kovine (Fangueiro s sod., 2002). Za ekstrakcijo  $\text{Cr}^{6+}$  iz zemlje pa so uporabili 10 % suspenzijo v 0,05 M EDTA (Grabarczyk, 2006).

### Ekstrakcija kroma iz kvasnih celic in protoplastov z EDTA

Ker smo želeli ugotoviti, iz katerega dela celic izvira ekstrahirani krom, smo z EDTA ekstrahirali krom tako iz kvasnih celic kot iz protoplastov.

Preglednica 1 prikazuje deleže z EDTA ekstrahirane kroma iz kvasnih celic in protoplastov od celokupnega akumuliranega kroma v kvasnih celicah po kultivacijah kvasovk v gojišču z 1 mM  $\text{CrCl}_3$  in 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cr}^{6+}$  ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ ).

Preglednica 1: Deleži z EDTA ekstrahirane kroma iz kvasnih celic in protoplastov od celokupnega akumuliranega kroma po treh neodvisnih kultivacijah v gojiščih z 1 mM  $\text{CrCl}_3$  in 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cr}^{6+}$  ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )

Table 1: EDTA extractable chromium from yeast cells and protoplasts (as percentage of total accumulated chromium in yeast cells) after three independent cultivations in media containing 1 mM  $\text{CrCl}_3$  or 20  $\mu\text{M}$   $\text{Cr}^{6+}$  ( $\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ )

Cr spojina	konc. Cr v kvasni biomasi ( $\mu\text{g/g}$ ss)	delež z EDTA ekstrahirane kroma iz kvasnih celic (%)	konc. Cr v protoplastih ( $\mu\text{g/g}$ ss)	delež z EDTA ekstrahirane kroma iz protoplastov (%)
$\text{CrCl}_3$	$502,8 \pm 9,8$	15,2	$354,5 \pm 27,9$	9,3
	$569,5 \pm 20,5$	11,4	$425,0 \pm 14,0$	7,3
	$480,4 \pm 35,2$	15,6	$393,3 \pm 28,4$	15,8
$\text{Na}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	$18,7 \pm 3,5$	17,4	$14,6 \pm 2,5$	15,5
	$16,9 \pm 0,3$	18,7	$11,3 \pm 2,0$	19,1
	$12,4 \pm 0,6$	21,9	$8,7 \pm 0,5$	23,6

Deleži ekstrahirane kroma iz kvasovk, ki smo jih namnoževali v prisotnosti 1 mM CrCl<sub>3</sub>, se gibljejo od 11,4 do 15,6 % (pregl. 1). Ker se omenjene vrednosti ujemajo z deleži kroma, ekstrahirane iz protoplastov (9,3 do 15,8 %), bi lahko sklepali, da se je z EDTA ekstrahiralo iz kvasnih celic tisti del kroma, ki je bil vezan v protoplastih, ne v celičnih stenah. Podobne ugotovitve kot za CrCl<sub>3</sub> veljajo tudi za Cr<sup>6+</sup>-spojino, t.j. Na<sub>2</sub>Cr<sub>2</sub>O<sub>7</sub> (pregl. 1). Z EDTA se iz kvasnih celic ekstrahira približno enak delež kroma (17,4 do 21,9 %) kot iz protoplastov (15,5 do 23,6 %).

Pri tem ne moremo zaključiti, ali je bil krom, ekstrahiran iz protoplastov, intracelularnega izvora ali je bil vezan v celičnih membranah. Nekateri avtorji namreč poročajo, da se Cr<sup>3+</sup> pri transportu v kvasne celice zadržijo v membranski strukturi (Belagyi s sod., 1999). Rezultati novejših raziskav pa nakazujejo, da so proteini, ki vežejo krom v kvasnih celicah prisotni tako v celični steni kot v citosolu oz. v notranjih celičnih strukturah (Shoeib in Mester, 2007)

Po drugi strani pa, če primerjamo deleže z EDTA ekstrahirane kroma iz kvasnih celic z deleži akumuliranega kroma v celičnih stenah (rezultati prikazani v Paš s sod., 2004), opazimo, da so tudi te vrednosti primerljive. EDTA je močan ligand za oblikovanje kompleksov s kovinami - stabilnostna konstanta ( $K_{ML}$ ) za oblikovanje kompleksov EDTA s Cr<sup>3+</sup> znaša 24,0, kar je visoka vrednost v primerjavi s stabilnostnimi konstantami za komplekse EDTA z nekaterimi drugimi kovinami (Mendham, 2000), zato obstaja velika verjetnost, da EDTA pri stiku s kvasno celico izluži na površino celičnih sten kvasovk vezane kovinske ione. (Blackwell s sod., 1999; Sun s sod., 2001) Znano je tudi, da EDTA povzroči izločanje kalcijevih ionov iz celičnih sten in tako poveča njihovo permeabilnost. (Gadd, 1990; Beveridge s sod., 1997) Nekateri avtorji so EDTA uporabili za izpiranje kvasnih celic oz. za ekstrakcijo kovin, kot sta Ni in Cr iz celičnih sten kvasovk (Kambe-Honjoh s sod., 1997; Blackwell s sod., 1999).

Če celovito pogledamo rezultate ekstrakcije kroma iz kvasne biomase z različnimi reagenti za ekstrakcijo, lahko povzamemo, da je med vsemi uporabljenimi reagenti najprimernejši EDTA in ga kot takega predlagamo za uporabo v tovrstnih metodah dela. Kljub temu pa bi bilo potrebno v nadaljnjih raziskavah določiti lastnosti ekstraktov z EDTA, predvsem identificirati spojine, na katere je vezan krom, saj nimamo dokaza, ali EDTA v resnici le permeabilizira celično steno in veže krom, ki se je nahajal v celičnih stenah kvasnih celic ali prehaja v notranjost kvasnih celic.

#### 4 VIRI

- Andersson, M. A., Petersson Grawé, K. V., Karlsson, O. M., Abramsson-Zetterberg, L. A. G., Hellman, B. E. 2007. Evaluation of the potential genotoxicity of chromium picolinate in mammalian cells *in vivo* and *in vitro*. Food and Chemical Toxicology, 45, 7: 109.
- Anderson, R. A. 1998. Chromium, glucose intolerance and diabetes. Journal of the American College of Nutrition, 17, 6: 548-555.

- Belagyi, J., Paš, M., Raspor, P., Pesti, M., Pali, T. 1999. Effect of hexavalent chromium on eukaryotic plasma membrane studied by EPR spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1421: 175-182.
- Beveridge, T. J., Hughes, M. N., Lee, H., Leung, K. T., Poole, R. K., Savvaidis, I., Silver, S., Trevors, J. T. 1997. Metal-microbe interactions: contemporary approaches, 38: 177-244.
- Blackwell, K. J., White, J. S., Tobin, J. M. 1999. A novel method for subcellular fractionation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Techniques*, 13: 583-587.
- Demirci, A., Pometto, A. L. 2000. Enhanced organically bound chromium yeast production. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48, 2: 531-536.
- Fangueiro, D., Bermond, A., Santos, E., Carapua, H., Duarte, A. 2002. Heavy metal mobility assessment in sediments based on a kinetic approach of the EDTA extraction: search for optimal experimental conditions. *Analytica Chimica Acta*, 459: 245-256.
- Grabarczyk, M. 2006. Catalytic adsorptive stripping voltammetric determination of Cr(VI) in EDTA extracts from solid samples. *Electrochimica Acta*, 51: 2333-2337.
- Gadd, G. M. 1990. Fungi and yeasts for metal accumulation. V: Microbial mineral recovery. Ehrlich, H. L. ur., Brierley, C. L. ur, New York, Mc Graw-Hill Publishing Company, s. 249-275.
- Institute of Medicine, Food and Nutrition Board. 2001. Dietary Reference Intakes for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc. National Academy Press, Washington, DC.
- Jain, S. K., Rains, J. L., Croad, J. L. 2007. Effect of chromium niacinate and chromium picolinate supplementation on lipid peroxidation, TNF- $\alpha$ , IL-6, CRP, glycated hemoglobin, triglycerides, and cholesterol levels in blood of streptozotocin-treated diabetic rats. *Free Radical Biology and Medicine*, 43, 8: 1124-1131.
- Jean, L., Bordas, F., Bollinger, J.-C. 2007. Chromium and nickel mobilization from a contaminated soil using chelants. *Environmental Pollution*, 147: 729-736.
- Kambe-Honjoh, H., Sugawara, A., Yoda, K., Kitamoto, K., Yamasaki, M. 1997. Isolation and characterization of nickel-accumulating yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 48, 3: 373-378.
- Kaszycki, P., Fedorovych, D., Ksheminska, H., Babyak, L., Wójcik, D., Koloczek, H. 2004. Chromium accumulation by living yeast at various environmental conditions. *Microbiological Research*, 159: 11-17.
- Kožuh, N., Štupar, J., Milačič, R., Gorenc, B. 1994. Optimization of extraction procedure for determination of total water-soluble chromium and chromium(VI) in various soils. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, 56: 207-217.
- Lombardi, A. T., Garcia Jr., O. 2002. Biological leaching of Mn, Al, Zn, Cu and Ti in an anaerobic sewage sludge effectuated by *Thiobacillus ferrooxidans* and its effect on metal partitioning. *Water Research*, 36, 13: 3193-3202.
- Liu, B., Li, Y., Yang, B.-S. 2007. Synthesis, characterization and kinetics properties of chromium(III) complex  $[\text{Cr}(\text{3-HNA})(\text{en})_2]\text{Cl} \cdot \text{H}_2\text{O} \cdot \text{CH}_3\text{OH}$ . *Inorganic Chemistry Communications*, 10: 367-370.

- Mendham, J., Denney, R. C., Barnes, J. D., Thomas, M. J. K. 2000. Vogel's textbook of quantitative chemical analysis. Sixth edition. Edinburgh, Pearson Education Ltd, s. 53.
- Milačič, R., Štupar, J. 1995. Fractionation and oxidation of chromium in tannery waste- and sewage sludge-amended soils. *Environmental Science and Technology*, 29, 2: 506-514.
- Paš, M., Milačič, R., Drašlar, K., Pollak, N., Raspor, P. 2004. Uptake of chromium(III) and chromium(VI) compounds in the yeast cell structure. *BioMetals*, 17, 1: 25-33.
- Raspor, P., Batič, M., Jamnik, P., Josić, D., Milačič, R., Paš, M., Recek, M., Režić-Dereani, V., Skrt, M. 2000. The influence of chromium compounds on yeast physiology. *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica*, 47, 2/3: 143-173.
- Shoeib, T., Mester, Z. 2007. Towards the characterization of metal binding proteins in metal enriched yeast. *Microchemical Journal*, 85: 329-340.
- Sun, B., Zhao, F. J., Lombi, E., McGrath, S. P. 2001. Leaching of heavy metals from contaminated soils using EDTA. *Environmental Pollution*, 113: 111-120.
- Tarvainen, T., Kallio, E. 2002. Baselines of certain bioavailable and total heavy metal concentrations in Finland. *Applied Geochemistry*, 17, 8: 975-980.
- Toepfer, E. W., Mertz, W., Roginski, E. E., Polansky, M. M. 1973. Chromium in foods in relation to biological activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 21: 69-73.
- Ure, A. M. 1996. Single extraction schemes for analysis and related applications. *The Science of the Total Environment*, 178: 3-10.