

Piotr JUSZCZYK, Marta MARCINKIEWICZ, Anita RYWIŃSKA, Waldemar RYMOWICZ

e-mail: piotr.juszczuk@up.wroc.pl

Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Nauk o żywności, Uniwersytet Przyrodniczy, Wrocław

Biosynteza erytrytoli z gliceryny przez drożdże *Yarrowia lipolytica* w hodowli okresowej

Wstęp

Erytrytol jest alkoholem cukrowym należącym do grupy polioli i posiadającym cztery atomy węgla, z których każdy zawiera grupę hydroksylową. Erytrytol został uznany za zamiennik sacharozy czwartej generacji po sorbitolu, izomalcie i preparacie zawierającym ekstrakty roślinne o nazwie *Alveosweet* [Clarke, 1995]. Ze względu na symetryczność swojej cząsteczki występuje tylko w formie mezo- i jest diastereoizomerem treitolu. Obecność grup redukujących w cząsteczce erytrytoli zapewnia jego wysoką termostabilność, a także odporność na środowisko. Związek ten posiada podobny profil smakowy w stosunku do sacharozy. W przeliczeniu na masę daje to około 60–70% uczucia słodkiego smaku powodowanego przez sacharozę. Indeks glikemiczny erytrytoli wynosi zero. Oznacza to, że obecność erytrytoli nie wpływa na poziom glukozy i insuliny we krwi, może być zatem bez przeszkód stosowany przez osoby cierpiące na cukrzycę [Bornet i in., 1996]. Ze względu na obecność grup hydroksylowych związek ten może również pełnić funkcję antyoksydacyjną, dzięki której będzie łączył się z wolnymi rodnikami i chronić w ten sposób komórkę przed ich szkodliwym działaniem [den Hartog G. i in. 2010]. Erytrytol produkowany jest na skalę przemysłową z glukozy na drodze biologicznej z użyciem osmotofilnych drożdży *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42 [Sawada i in., 2009]. W produkcji biodiesla, produktem ubocznym generowanym w dużych ilościach jest gliceryna (glicerol). Szacuje się, że obecnie na rynku jest dostępne ponad 1 milion ton tego surowca, który może być z powodzeniem wykorzystany, jako źródło węgla w procesach biotechnologicznych. Gliceryna odpadowa była z powodzeniem wykorzystana w procesach biosyntezy kwasu bursztynowego, propionowego, 1,3-propanodiolu, 1,3-dihydroxyacetonu, wodoru, etanolu i innych cennych produktów [Yazdani i Gonzalez, 2007]. Nasze ostatnie badania wykazały, że glicerol może być także wykorzystany do biosyntezy erytrytoli lub jednoczesnej produkcji erytrytoli i kwasu cytrynowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* [Rymowicz i in., 2009]. Niewiele jest informacji naukowych dotyczących biosyntezy erytrytoli z udziałem tego gatunku drożdży. Celem niniejszej pracy jest badanie przesiewowe (screening) szczepów drożdży z gatunku *Y. lipolytica* do efektywnego i wydajnego procesu produkcji erytrytoli z glicerolu.

Materiały i metody

W badaniach wykorzystano 14 szczepów *Y. lipolytica*, które były izolowane z gleby lub żywności i są zdeponowane w kolekcji *Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności*.

Uzdołnienia do nadprodukcji erytrytoli z glicerolu o różnej czystości, prowadzono w hodowlach wglębnych w 5-litrowym bioreaktorze w podłożu zawierającym 150 g/L glicerolu technicznego o czystości 98% (v/v) lub odpadowego pochodzącego z produkcji biopaliw z rafinerii *Trzebinia* o czystości 76% (v/v).

Podłoże uzupełniano źródłem azotu ($(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$), fosforu (KH_2PO_4) i witamin (ekstrakt drożdżowy).

Oznaczenie stężenia erytrytoli, glicerolu, mannitolu i kwasu cytrynowego wykonywano metodą HPLC, biomasę oznaczano metodą wagową [Rymowicz i in., 2009].

Wyniki i dyskusja

W celu wyselekcjonowania najlepszego producenta erytrytoli z glicerolu wykonano hodowle okresowe w bioreaktorze. Wstępnie ustalono następujące warunki prowadzenia procesu hodowlanego: temperatura 30°C, pH 3,0 i szybkość obrotów mieszadła 800 rpm.

Stwierdzono, że wszystkie szczepy drożdży produkowały erytrytol zarówno z glicerolu odpadowego jak i technicznego. Końcowe stężenie erytrytoli w podłożu produkcyjnym oraz stężenie produktów ubocznych zależało od użytego mikroorganizmu, jak również od rodzaju glicerolu (Tab. 1A i B). W pożywkach zawierających glicerol odpadowy stężenie erytrytoli wynosiło od 19 do 80 g/L, natomiast, gdy użyto glicerol techniczny, stężenie erytrytoli było niższe i wynosiło od 14 do 49 g/L (Tab. 1B). Najwięcej erytrytoli (80 g/L) produkował szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1 z glicerolu odpadowego.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy były niższe od wyników uzyskanych przez innych autorów w procesach biosyntezy erytrytoli z glukozy przez inne gatunki drożdży osmotofilnych takich jak *Moniliella* sp., *Trichosporon* sp., *Aureobasidium* sp., *Torula* sp., czy *Pseudozyma tsukubaensis*, gdzie stężenie erytrytoli było w zakresie od 118 do 243 g/L [Lin i in., 2002; Park i in., 1989; Ishizuka i in., 1998; Oh i in., 2001; Jeya i in., 2009]. Należy jednak zaznaczyć, że stężenie całkowite substratu było w przytoczonych badaniach wyższe i przekraczało często 400 g/L glukozy.

Tab. 1 Porównanie procesu biosyntezy erytrytoli przez wybrane szczepy *Y. lipolytica* w pożywkach z glicerolem 150 g/L

| Szczep <i>Y. lipolytica</i> | A. Glicerol odpadowy (76%) | | | | |
|--------------------------------|------------------------------|--------------|-------------|--------------------|---------------------|
| | ERY [g/L] | MAN [g/L] | KC [g/L] | Y_{ERY} [g/g] | Q_{ERY} [g/Lh] |
| Wratislavia K1 | 80 | 12 | 0,5 | 0,53 | 1,01 |
| Wratislavia AWG-7 | 43 | 6 | 3 | 0,27 | 0,44 |
| A-101 | 47 | 12 | 6 | 0,31 | 0,61 |
| 1.22 | 49 | 10 | 13 | 0,30 | 0,62 |
| 8661 UV*1 | 45 | 9 | 1 | 0,31 | 0,67 |
| 3DR | 37 | 11 | 29 | 0,25 | 0,39 |
| 5bDR | 41 | 8 | 4 | 0,27 | 0,41 |
| SKO 1 | 43 | 14 | 14 | 0,29 | 0,43 |
| SKO 2 | 35 | 13 | 0 | 0,26 | 0,41 |
| SKO 3 | 52 | 15 | 4 | 0,35 | 0,54 |
| SKO 4 | 44 | 18 | 3 | 0,29 | 0,47 |
| SKO 5 | 57 | 15 | 10 | 0,38 | 0,59 |
| SKO 6 | 43 | 10 | 2 | 0,33 | 0,72 |
| N-15 | 19 | 0 | 0 | 0,13 | 0,10 |
| Szczep <i>Y. lipolytica</i> | B. Glicerol techniczny (98%) | | | | |
| | ERY [g/L] | MAN [g/L] | KC [g/L] | Y_{ERY} [g/g] | Q_{ERY} [g/Lh] |
| Wratislavia K1 | 47 | 20 | 12 | 0,48 | 0,30 |
| Wratislavia AWG-7 | 47 | 24 | 17 | 0,48 | 0,30 |
| A-101 | 34 | 24 | 16 | 0,42 | 0,22 |
| 1.22 | 44 | 22 | 8 | 0,49 | 0,30 |
| 8661 UV*1 | 46 | 22 | 9 | 0,47 | 0,29 |
| 3DR | 41 | 20 | 24 | 0,47 | 0,27 |
| 5bDR | 28 | 20 | 22 | 0,29 | 0,19 |
| SKO 1 | 34 | 20 | 19 | 0,46 | 0,22 |
| SKO 2 | 47 | 35 | 9 | 0,42 | 0,27 |
| SKO 3 | 44 | 43 | 8 | 0,41 | 0,26 |
| SKO 4 | 49 | 37 | 10 | 0,44 | 0,31 |
| SKO 5 | 36 | 25 | 23 | 0,40 | 0,26 |
| SKO 6 | 33 | 17 | 23 | 0,45 | 0,22 |
| N-15 | 14 | 0 | 0 | 0,08 | 0,09 |

Y_{ERY} – wydajność produkcji erytrytoli; ERY – erytrytol; MAN – mannitol; Q_{ERY} – objętościowa szybkość produkcji erytrytoli; KC – kwas cytrynowy.

Wydajność produkcji erytrytoli (Y_{ERY}) wynosiła od 0,13 do 0,53 g/g na glicerolu odpadowym oraz od 0,09 do 0,30 g/g na glicerolu technicznym. Objętościowa szybkość produkcji erytrytoli (Q_{ERY}) była na poziomie od 0,10 do 1,01 g/L·h dla glicerolu odpadowego i od 0,08 do 0,48 g/L·h dla glicerolu technicznego.

Najlepsze parametry hodowlane produkcji erytrytoli uzyskano w hodowli szczepu *Wratisslavia K1* w podłożach zawierających oba rodzaje substratu, przy czym w pożywce z glicerolem odpadowym były one wyższe niż z glicerolem technicznym. Wydajność procesu produkcji erytrytoli z glukozy była w zakresie od 0,33 do 0,61 g/g. Według pracy [Jeya i in., 2009] szczep produkcyjny *P. tsukubaensis* produkował z glukozy erytrytol z najwyższą wydajnością 0,61 g/g. Natomiast najwyższą szybkość produkcji erytrytoli (2,26 g/L·h) uzyskali w swoich badaniach [Oh i in., 2001]. Jest to szybkość dwukrotnie wyższa w porównaniu do wyników uzyskanych w hodowlach na glicerolu szczepu *Wratisslavia K1*, prezentowanych w niniejszej pracy.

Wszystkie badane szczepy drożdży *Y. lipolytica*, oprócz produktu głównego, tworzyły również produkty uboczne takie jak: mannitol i kwas cytrynowy, niezależnie od rodzaju glicerolu. Wyjątek stanowił szczep N-15, który w hodowli zawierającej oba rodzaje substratów, nie produkował kwasu cytrynowego i mannitolu. Mannitol był głównym produktem ubocznym tworzonym przez większość analizowanych użytych szczepów drożdży. Większe ilości tego związku syntetyzowane były w podłożu z glicerolem technicznym (od 17 do 43 g/L) niż z odpadowym (od 6 do 18 g/L). Szczep *Y. lipolytica* SKO 3 produkował prawie tyle samo mannitolu (43 g/L), co erytrytoli (44 g/L) w podłożu hodowlanym zawierającym glicerol techniczny. Jest to o tyle interesujący przypadek, że szczep ten mógłby w przyszłości być wykorzystany do jednoczesnej biosyntezy obu związków w jednym procesie, co w znacznym stopniu mogłoby obniżyć koszty związane z ich produkcją.

Niższa selektywność procesu biosyntezy erytrytoli z glicerolu technicznego przez badane szczepy *Y. lipolytica*, wynika z braku w podłożu NaCl, który jest obecny w glicerolu odpadowym. Nasze inne badania wskazały, że obecność soli podwyższa ciśnienie osmotyczne i obniża produkcję mannitolu (dane niepublikowane).

Końcowe stężenie kwasu cytrynowego w płynach pochodzących było zróżnicowane, szczególnie w odniesieniu do glicerolu odpadowego, albowiem wahało się od 0,5 do 29 g/L (Tab. 1A). Natomiast w przypadku glicerolu technicznego było na poziomie od 8 do 23 g/L. Najwięcej tego produktu ubocznego tworzył szczep 3DR w pożywce z glicerolem odpadowym, natomiast najmniejsze ilości produkowane były także z udziałem tego substratu przez szczepy *Wratisslavia K1* i 1.22.

Końcowe stężenie biomasy po zakończeniu biosyntezy erytrytoli wahało się w granicach od 12 do 23 g/L w pożywkach z glicerolem odpadowym i od 12 do 17 g/L, w pożywkach zawierających glicerol techniczny. Wyższy plon biomasy w hodowlach z glicerolem odpadowym jest wynikiem obecności w nim przyswajalnych źródeł azotu i fosforu pochodzących z rzepaku będącego surowcem w produkcji biopaliw.

Przeprowadzone w niniejszej pracy badania, pokazały że wszystkie użyte szczepy drożdży *Y. lipolytica* produkowały erytrytol z glicerolu w przy pH 3,0. Produktami ubocznymi towarzyszącymi temu procesowi były mannitol i kwas cytrynowy oraz w niewielkich ilościach kwas α -ketoglutarynowy i arabitol (dane niepublikowane). Najwyższą selektywnością procesu charakteryzowała się hodowla z udziałem szczepu *Wratisslavia K1*, który produkował małe ilości produktów ubocznych. Produktami ubocznymi powstającymi podczas procesu produkcji erytrytoli z glukozy przez drożdże z rodzaju *Moniliella* były inne produkty takie jak glicerol oraz rybitol [Lin S-J i wsp., 2010].

Wnioski

1. Drożdże z gatunku *Y. lipolytica* niezależnie od źródła ich pochodzenia (gleba, żywność, szczepy dzikie, mutanty) produkowały erytrytol z glicerolu w warunkach deficytu azotu i pH 3,0. Spośród 14 testowanych szczepów z tego gatunku, najlepszym producentem erytrytoli z glicerolu odpadowego i technicznego był szczep *Y. lipolytica* *Wratisslavia K1*.

2. Drożdże *Y. lipolytica* w podłożach zawierających glicerol wytwarzały produkty uboczne takie jak: mannitol, arabitol, kwas cytrynowy i kwas α -ketoglutarynowy.
3. Glicerol odpadowy z produkcji biodiesla jest dobrym surowcem do biosyntezy erytrytoli przez *Y. lipolytica*. Zawarte w nim zanieczyszczenia nie miały istotnego wpływu na obniżenie dynamiki i wydajności procesu biosyntezy erytrytoli przez ten gatunek drożdży.
4. Wstępne wyniki uzyskane w niniejszej pracy wskazują na celowość dalszej kontynuacji badań nad produkcją erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica*, szczególnie w zakresie metod polegających na genetycznym doskonaleniu szczepów, badaniu aktywności kluczowych enzymów odpowiedzialnych za tę biosyntezę, optymalizacją systemów hodowlanych i powiększeniem skali produkcji.

LITERATURA

- Bornett F.R.J., Blayo A., Dauchy F., Slama G., 1996. Gastrointestinal response and plasma and urine determinations in human subjects given erythritol *Regulatory Toxicology and Pharmacology* 24, nr 2, S296-S302. DOI: 10.1006/rtp.1996.0111
- Clarke J., 1995. Bulk sweeteners - multiple choice and the multi-sweetener concept *Food Technology Europe*. 5, nr 1, 185-187.
- den Hartog G., Boots A.W., Perrot A.A., Brouns F., Verkooijen I.W.C.M., Weseler A.R., Haenen G.R.M.M., Bast A., 2010. Erythritol is a sweet antioxidant *Nutrition* 26, nr 4, 449-458. DOI: 10.1016/j.nut.2009.05.004
- Hirata Y., Igarashi K., Azeki S., Atomi H., Imanaka T., 1999. High-level production of erythritol by strain 618A-01 isolated from pollen *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87, nr 5, 630-635. DOI: 10.1016/S1389-1723(99)80126-1
- Ishizuka H., Wako K., Kasumia T., Sasaki T., 1989. Breeding of a mutant of *Aureobasidium* sp. with high erythritol production *Journal of Fermentation and Bioengineering* 68, nr 5, 310-314. DOI: 10.1016/0922-338X(89)90003-2
- Jeya M., Lee K.M., Tiwari M.K., Kim J.S., Gunasekaran P., Kim S.Y., Kim I.W., Lee J.K., 2009. Isolation of a novel high erythritol-producing *Pseudozyma tsukubaensis* and scale-up of erythritol fermentation to industrial level *Applied Microbiology and Biotechnology* 83, nr 2, 225-231. DOI: 10.1007/s00253-009-1871-5
- Koh E-S., Lee T-H., Lee D-Y., Kim H-J., Ryu Y-W., Seo J-H., 2003. Scale-up of erythritol production by an osmophilic mutant of *Candida magnoliae* *Biotechnology Letters* 25, 2103-2105. DOI: 10.1023/B:BILE.0000007076.64338.ce
- Lin S-J., Wena C-Y., Wang P-M., Huang J-C., Wei C-L., Chang J-W., Chu W-S., 2010. High-level production of erythritol by mutants of osmophilic *Moniliella* sp. *Process Biochemistry* 45, nr 6, 973-979. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.03.003
- Oh D-K., Cho C-H., Lee J-K., Kim S-Y., 2001. Increased erythritol production in fed-batch cultures of *Torula* sp. by controlling glucose concentration *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 26, 248-252. DOI: 10.1038/sj.jim.7000122
- Park J., Seo B., Kim J., Park Y., 1998. Production of erythritol in fed-batch cultures of *Trichosporon* sp. *Journal of General Applied Microbiology* 86, nr 6, 577-580. DOI: 10.1016/S0922-338X(99)80010-5
- Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W., 2008. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica* *Wratisslavia K1* *Chemical Papers* 62, nr 3, 239-246. DOI: 10.2478/s11696-008-0018-y
- Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M., 2009. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica* *Biotechnology Letters* 31, nr 3, 377-380. DOI: 10.1007/s10529-008-9884-1
- Sawada K., Taki A., Yamakawa T., Seki M., 2009. Key role for transketolase activity in erythritol production by *Trichosporonoides megachiliensis* SN-G42 *Journal of Bioscience and Bioenergy* 108, 385-390. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.05.008
- Yazdani S.S., Gonzalez R., 2007. Anaerobic fermentation of glycerol: a path to economic viability for the biofuels industry *Current Opinion in Biotechnology* 18, 213-219. DOI: 10.1016/j.copbio.2007.05.002

Badania były realizowane w ramach projektu PO IG 01.01.02-00-074/09 „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylogowych”.