

Ludwika TOMASZEWSKA, Krzysztof CYBULSKI, Anita RYWIŃSKA

e-mail: ludwika.tomaszewska@up.wroc.pl

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

## Wpływ źródła witamin na biosyntezę erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica*

### Wstęp

Glicerol, będący głównym produktem ubocznym powstającym podczas produkcji biopaliw, może być stosowany jako tani substrat do procesów z udziałem mikroorganizmów. Badania prowadzone w ostatnich latach wskazały możliwość wykorzystania tego surowca do produkcji alkoholi wielowodorotlenowych, w tym erytrytoli, mannitolu oraz arabitoli, przez drożdże *Yarrowia lipolytica* [Rymowicz i in. 2008, 2009; Tomaszewska i in. 2011].

Erytrytol jest alkoholem cukrowym powszechnie występującym w naturze m.in. w miodzie, owocach, grzybach, wodorostach, czy fermentowanej żywności i napojach [Gossens i Röper, 1994]. Wykorzystywany jest w przemyśle chemicznym, kosmetycznym, farmaceutycznym oraz spożywczym. Do żywności dodawany jest głównie jako środek słodzący (posiada 60–80% słodczy w odniesieniu do sacharozy), teksturotwórca, utrzymujący wilgotność, stabilizator oraz sekwestrant, a jego użycie nie jest limitowane [Berni i in. 1996]. Wzrost zainteresowania tym poliolem powodowany jest jego szczególnymi właściwościami – bardzo niską kalorycznością ( $0,2 \text{ kcal}\cdot\text{g}^{-1}$ ), erytrytol nie wpływa na poziom insuliny we krwi, nie jest metabolizowany przez bakterie obecne w jamie ustnej, a w odróżnieniu od innych polioli stosowanych jako zamienniki cukru, nie wywołuje nietolerancji pokarmowej [Makinen i in., 2001; Moon i in., 2010]. Erytrytol może być wytwarzany na drodze chemicznej poprzez konwersję skrobi w wysokiej temperaturze w obecności katalizatora niklowego, jednak proces ten jest nieefektywny i kosztowny [Pfeifer i in., 1960]. Do produkcji erytrytoli zdolnych jest wiele gatunków drożdży i bakterii, natomiast ze względu na wydajność i selektywność biosyntezy przemysłowa produkcja erytrytoli odbywa się przy udziale *Aureobasidium*, a stosowanymi substratami są glukoza lub sacharoza [Moon i in., 2010]. Biosynteza erytrytoli z wykorzystaniem tanich i niekonwencjonalnych surowców, takich jak glicerol, jest zagadnieniem nowym i mało poznanym.

Celem niniejszej pracy była ocena wpływu źródła witamin na wydajność oraz dynamikę biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez szczep drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia K1.

### Materiały i metody

#### Mikroorganizm

Przedmiotem badań był szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 pochodzący z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Szczep przechowywano na skosie YM, w temperaturze  $4^\circ\text{C}$ .

#### Substrat

W badaniach jako źródło węgla i energii wykorzystano czysty glicerol (98%) (POCH; Gliwice).

#### Podłoża

**Podłoże inokulacyjne** do hodowli wstrząsanych i bioreaktorowych zawierało [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]: glicerol – 50,0; YNB (*Yeast Nitrogen Base*) – 0,67; woda destylowana do  $1 \text{ dm}^3$ .

**Podłoże produkcyjne do hodowli wstrząsanych** zawierało ( $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ): glicerol – 100,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,0;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,2; NaCl – 25;  $\text{CaCO}_3$  – 3; wybrane źródło witamin: ekstrakt drożdżowy – 0,2–1,0/ namok kukurydziany – 0,01–12/ tiamina –  $1\cdot 10^{-6}$ – $2\cdot 10^{-4}$ ; woda destylowana do  $1 \text{ dm}^3$ .

**Podłoże produkcyjne do hodowli w bioreaktorach** miało skład [ $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ]: glicerol – 100,0;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  – 2,26;  $\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 1,0;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 0,22; NaCl – 26,4; wybrane źródło witamin: ekstrakt drożdżowy – 1,0/ namok kukurydziany – 12/ tiamina –  $2\cdot 10^{-4}$  lub  $4\cdot 10^{-4}$ ; woda wodociągowa – do  $1 \text{ dm}^3$ .

Podłoża sterylizowano w  $121^\circ\text{C}$  przez 20 minut.

Podłoża sterylizowano w  $121^\circ\text{C}$  przez 20 minut.

#### Warunki prowadzenia hodowli

**Hodowle inokulacyjne** prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej typu CERTOMAT IS (*Sartorius Stedim Biotech GmbH*), w  $300 \text{ cm}^3$  kolbach stożkowych zawierających  $50 \text{ cm}^3$  podłoża inokulacyjnego przez 72 godziny w temperaturze  $29,5^\circ\text{C}$ , przy 140 rpm. Do zaszczerpienia podłoża produkcyjnego w bioreaktorze używano  $200 \text{ cm}^3$  zawiesiny komórek namnożonych w hodowli inokulacyjnej.

**Hodowle produkcyjne wstrząsane** szczepiono  $1 \text{ cm}^3$  zawiesiny komórek namnożonych w hodowli inokulacyjnej. Hodowle prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej j/w, w  $300 \text{ cm}^3$  kolbach stożkowych zawierających  $30 \text{ cm}^3$  podłoża produkcyjnego, przez 7 dni.

**Hodowle produkcyjne bioreaktorowe** prowadzono w 5-litrowym bioreaktorze Biostat B Plus przy objętości roboczej  $2 \text{ dm}^3$ . Szybkość napowietrzania wynosiła 0,6 vvm, prędkość obrotowa mieszadła 800 rpm, temperatura  $30^\circ\text{C}$ . w czasie procesu  $\text{pH}$  3,0 utrzymywano automatycznie za pomocą 20% NaOH. Hodowle prowadzono do momentu wyczerpania źródła węgla w podłożu. Próby do analiz pobierano 2–3 razy dziennie.

#### Metody analityczne

Biomasę oznaczano metodą wagową.

Stężenie glicerolu, erytrytoli, mannitolu, arabitoli, kwasu cytrynowego oraz kwasu  $\alpha$ -ketoglutarynowego oznaczano metodą HPLC na kolumnie *HyperRez XP carbohydrate H<sup>+</sup>* (Dionex, *UltiMate 3000 Series*) połączonej z detektorami UV ( $\lambda = 210 \text{ nm}$ ) i IR, w temperaturze pokojowej, przy szybkości przepływu fazy cieplej (25 mM kwasu trifluoroctowego; TFA) przez kolumnę równej  $0,6 \text{ cm}^3\cdot\text{min}^{-1}$ .

#### Opis stosowanych oznaczeń

X – biomasa, GLY – glicerol, ERY – erytrytol, MAN – mannitol, ARA – arabitol, KC – kwas cytrynowy, KG – kwas  $\alpha$ -ketoglutarynowy,  $Y_{ERY}$  – wydajność erytrytoli (g wytworzonego ERY / g zużytego substratu),  $Q_{ERY}$  – szybkość objętościowa produkcji erytrytoli,  $q_{ERY}$  – szybkość właściwa produkcji erytrytoli, T – czas.

### Omówienie i dyskusja wyników

W hodowlach wstrząsanych oceniono wpływ ekstraktu drożdżowego, namoku kukurydzianego oraz tiaminy na produkcję erytrytoli z glicerolu przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1. Drożdże *Y. lipolytica* są naturalnymi auktrotrofami tiaminowymi, niezdolnymi do syntezy pirymidynowej struktury tego związku [Chernyavskaya i in. 2000]. Ekstrakt drożdżowy jest doskonałym źródłem wielu składników odżywczych, jednak ze względu na koszty, jego zastosowanie w procesach prowadzonych na większą skalę nie jest korzystne. Namok kukurydziany, będący tańszym surowcem, również dostarcza może wielu składników odżywczych niezbędnych dla wzrostu drożdży [Hajny G. i in. 1964].

W stosowanych podłożach po 7 dniach hodowli wstrząsanych wartość  $\text{pH}$  wynosiła, zależnie od użytego źródła witamin 3,6–3,8; 2,1–2,7; 3,4–4,2, odpowiednio dla ekstraktu drożdżowego, namoku kukurydzianego oraz tiaminy. Stężenie biomasy zależało od użytego źródła witamin i było znacznie zróżnicowane, natomiast niezależnie od dodanego składnika ilość biomasy wzrastała wraz ze zwiększaniem stężenia źródła witamin (Tab. 1), co jest zgodne z wynikami wcześniej prezentowanych badań [Chernyavskaya i in., 2000; Hajny i in., 1964]. Poziom biomasy był najniższy dla hodowli z wykorzystaniem  $0,01 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$  namoku kukurydzianego, gdzie wyniósł zaledwie  $1,6 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$ , natomiast przy zastoso-

waniu  $12 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  tego źródła witamin stwierdzono najwyższe stężenie biomasy, równe  $8,9 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ .

Badany szczep drożdży był zdolny do produkcji erytrytoli przy zastosowaniu każdego ze źródeł witamin, a ilość uzyskiwanego produktu, wartość parametrów kinetycznych oraz wydajność jego biosyntezy wzrastała wraz ze zwiększeniem stężenia źródła witamin w podłożu. Spośród zbadanych czynników najlepszym źródłem witamin był namok kukurydziany [ $12 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ], przy użyciu którego drożdże produkowały  $20,7 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  erytrytoli z wydajnością  $0,28 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Produktywność oraz szybkość właściwa produkcji erytrytoli przy najwyższej zastosowanej dawce namoku wynosiły odpowiednio,  $0,12 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  i  $0,014 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Dwukrotnie niższe, niż w prezentowanej pracy, stężenie erytrytoli [ $11,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ] uzyskano w badaniach z wykorzystaniem glicerolu i *Pseudozyma tsukubaensis*.

Tab. 1. Charakterystyka biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez szczep drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w hodowlach wstrząsanych przy zastosowaniu różnych źródeł witamin

Źródło witamin	X [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	ERY [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	MAN [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	ARA [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	KC [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	KG [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	$Y_{ERY}$ [ $\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ ]	$Q_{ERY}$ [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ]	$q_{ERY}$ [ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$ ]
[ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	Ekstrakt drożdżowy								
1,0	8,0	16,3	1,0	0,1	2,0	0,6	0,25	0,10	0,012
0,8	8,7	15,4	1,0	0,1	2,4	0,5	0,24	0,09	0,011
0,6	8,3	11,9	0,9	0,1	2,7	0,6	0,20	0,07	0,009
0,4	7,1	9,9	0,7	0,1	2,1	0,6	0,18	0,06	0,008
0,2	6,2	6,5	0,6	0,1	2,8	0,7	0,13	0,04	0,006
[ $\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	Namok kukurydziany								
12,0	8,9	20,7	1,1	0,4	4,0	0,4	0,28	0,12	0,014
4,0	8,5	18,3	1,2	0,7	4,1	0,4	0,25	0,11	0,013
4,0	7,5	14,9	1,4	0,9	4,5	0,7	0,22	0,09	0,012
1,0	6,3	9,8	1,2	1,2	6,2	0,4	0,15	0,06	0,009
0,1	3,6	1,9	0,4	3,6	0,0	3,8	0,06	0,01	0,002
0,05	2,0	1,7	0,0	5,7	0,0	4,5	0,06	0,01	0,005
0,025	1,8	0,8	0,0	4,4	0,0	2,5	0,03	0,00	0,003
0,01	1,6	1,2	0,0	4,5	0,0	2,9	0,05	0,01	0,005
[ $\mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ]	Tiamina								
200	5,2	7,2	0,4	0,0	2,1	0,2	0,18	0,04	0,008
100	4,8	6,1	0,1	0,0	2,3	0,3	0,16	0,04	0,007
50	4,5	4,5	0,0	0,0	1,8	0,3	0,14	0,03	0,006
20	5,4	2,4	0,1	0,0	1,7	0,5	0,08	0,01	0,003
10	3,4	2,2	0,0	0,2	0,9	0,8	0,09	0,01	0,004
1	3,3	2,5	0,0	1,0	0,1	3,0	0,09	0,02	0,004

Ten sam szczep był zdolny do biosyntezy  $134 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  erytrytoli z wydajnością  $0,45 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$  gdy stosowanym substratem była glukoza [Jeya i in., 2009]. Spośród przebadanych [Lee i in., 2001] składników odżywczych, najlepszym dla produkcji erytrytoli z glukozy przez *Torula* sp. okazał się kwas fitynowy, którego dodatek umożliwił zwiększenie uzyskiwanych ilości polioliu z  $46,3$  do  $58,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Tiamina w ilości  $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  nie wpływała na produkcję erytrytoli przez *Torula* sp., natomiast dalsze zwiększanie stężenia tej witaminy, w zakresie  $1,0 \div 100 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ , prowadziło do stopniowego hamowania biosyntezy, aż do całkowitej inhibicji produkcji erytrytoli przy stężeniu tiaminy wynoszącym  $200 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ . W niniejszej pracy zwiększanie stężenia tiaminy wpływało pozytywnie zarówno na wzrost drożdży, jak i produkcję erytrytoli, jednak należy podkreślić, iż stosowany zakres stężeń  $1 \div 200 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  był tysiąckrotnie niższy niż we wspomnianych badaniach ( $1 \div 200 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) [Lee i in., 2001]. Produkcja erytrytoli z glukozy przez *Torula* sp. była badana również w pracy [Hajny i in., 1964], która oceniała wpływ ekstraktu drożdżowego ( $2, \div 20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) i namoku kukurydzianego na proces biosyntezy. Najlepszą wydajność produkcji erytrytoli ( $38,7\%$ ) otrzymano przy zastosowaniu  $5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  ekstraktu drożdżowego. Zwiększanie stężenia ekstraktu drożdżowego powodowało znaczny wzrost stężenia biomasy, co negatywnie wpływało na wydajność produkcji erytrytoli, która przy  $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  ekstraktu wyniosła zaledwie  $9,1\%$ . Zależność taką obserwowano również w przypadku zwiększenia stężenia namoku ku-

kurydzianego. Zastosowanie  $12,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  namoku kukurydzianego, skutkowało osiągnięciem wyższej wydajności produkcji erytrytoli równej  $36,3\%$ , a więc wyższej niż w prezentowanej pracy ( $28\%$ ) w przypadku zastosowania zbliżonej ilości namoku. Podobną wydajność produkcji erytrytoli ( $\sim 34\%$ ) uzyskano podczas biosyntezy tego związku z glukozy przez drożdże *Moniliella* sp. przy optymalnym stężeniu ekstraktu drożdżowego, które w zależności od szczepu wyniosło  $10 \div 12,5 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  [Lin S.J. et al. 2001]. Przy zastosowaniu namoku kukurydzianego ( $60 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) wydajność biosyntezy erytrytoli przez *Moniliella* sp. znacznie obniżyła się i w zależności od szczepu osiągnęła wartość  $13,5 \div 27\%$ .

Podczas biosyntezy erytrytoli przez drożdże, w podłożu hodowlanym mogą być obecne także inne poliole, w tym mannitol, arabitol, czy rybitol oraz kwasy – cytrynowy i  $\alpha$ -ketoglutarynowy [Almagro A. i in. 2001, Moon H.J. i in. 2010]. W prezentowanej pracy stężenie mannitolu nie przekroczyło  $1,4 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ . Niskie stężenie tego polioliu mogło być spowodowane dodatkami chlorku sodu (patrz: Materiały i metody), którego obecność w podłożu pozytywnie wpływa na produkcję erytrytoli, natomiast hamuje biosyntezę mannitolu przez drożdże *Y. lipolytica* [Tomaszewska i Rywińska, 2011]. Ilość uzyskiwanego arabitolu zwiększała się wraz ze zmniejszeniem stężenia źródła witamin, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi w pracy [Hajny, 1964]. Warty uwagi jest, iż w niniejszej pracy produkcja arabitolu była zależna również od stosowanego źródła witamin. Stężenie tego polioliu nie przekroczyło  $1,0 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  w przypadku stosowania ekstraktu drożdżowego i tiaminy, natomiast osiągnęło nawet  $5,7 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  gdy źródłem witamin był namok kukurydziany. w podłożach z namokiem obserwowano również obecność znacznych ilości kwasu  $\alpha$ -ketoglutarynowego ( $2,9 \div 6,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), podczas gdy w pozostałych podłożach kwasem otrzymywanym w większej ilości był cytrynian (do  $2,8 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ). Może być to tłumaczone niewielką ilością tiaminy dostarczanej przez namok kukurydziany ( $0,09 \div 0,3 \text{ mg}$  tiaminy /  $100 \text{ g}$  namoku [Lawford i Rousseau, 1995]). Deficyt tiaminy jest głównym czynnikiem warunkującym produkcję kwasu  $\alpha$ -ketoglutarynowego i pirogronowego przez *Y. lipolytica*, natomiast wyższe stężenia tej witaminy ukierunkowują biosyntezę na produkcję kwasu cytrynowego [Chernyavskaya i in., 2000; Finogenova i in., 2005].

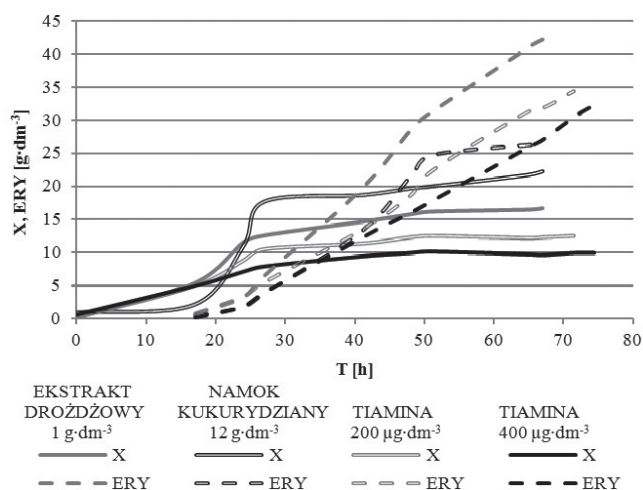
W kolejnym etapie pracy, w hodowlach bioreaktorowych, oceniono wpływ wybranych stężeń badanych źródeł witamin na kinetykę i wydajność procesu produkcji erytrytoli przez szczep *Wratislavia* K1. Wzrost biomasy i produkcję erytrytoli przedstawiono na Rysunku 1, natomiast parametry, takie jak wydajność, produktywność oraz szybkość właściwa produkcji, zostały zestawione w tab. 2.

Hodowle prowadzono do momentu całkowitego wykorzystania źródła węgla w podłożu, co w zależności od zastosowanego źródła witamin trwało  $67 \div 74,5 \text{ h}$  (Rys. 1). Stacjonarną fazę wzrostu drożdże osiągnęły po  $22 \div 27 \text{ h}$ . Stwierdzono znaczące różnice w ilości uzyskanej biomasy. Najwyższe stężenie biomasy, równe  $22,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ , obserwowano w hodowli z namokiem kukurydzianym, podczas gdy najniższe, uzyskane w hodowli z  $400 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  tiaminy, było ponad dwukrotnie mniejsze ( $10 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ).

Proces biosyntezy przebiegał najefektywniej przy zastosowaniu  $1 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  ekstraktu drożdżowego (Tab. 2). w hodowli tej drożdże produkowały  $42,2 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  erytrytoli z wydajnością  $0,43 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ , co odpowiadało produktywności  $0,63 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3} \cdot \text{h}^{-1}$  oraz szybkości właściwej produkcji  $0,038 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ . Mimo niższego stężenia uzyskanego produktu ( $32,3 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ), wyższą właściwą szybkość produkcji erytrytoli ( $0,043 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ ) obserwowano przy zastosowaniu  $400 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  tiaminy, co wynikało z niższego poziomu biomasy w tej hodowli. W porównaniu do hodowli wstrząsanych, jedynie w hodowli z namokiem kukurydzianym nie obserwowano zwiększenia wydajności produkowanego erytrytoli [ $0,28 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$ ] i tylko nieznaczną poprawę pozostałych parametrów kinetycznych procesu (Tab. 1 i 2).

W badaniach nad wpływem różnych witamin na produkcję erytrytoli przez *Torula* sp. [Hajny i in., 1964] nie obserwowano formowania produktu tylko, gdy w składzie podłoża pominięto tiaminę, co sugeruje, iż tiamina B<sub>1</sub> pełni istotną funkcję w procesie biosyntezy tego polioliu. Namok kukurydziany dostarcza niewielkich ilości tej witaminy – zastosowane w hodowli bioreaktorowej stężenie namoku ( $12 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ ) mogło odpowiadać zaledwie  $10,8 \div 36 \mu\text{g} \cdot \text{dm}^{-3}$  tej tiaminy. Można zatem wnioskować, iż załamanie biosyntezy erytrytoli pod koniec procesu,





Rys. 1. Produkcja biomasy i erytrytolu z glicerolu przez szczep drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia K1 przy zastosowaniu różnych źródeł witamin

Tab. 2. Charakterystyka biosyntezy erytrytolu z glicerolu przez szczep drożdży *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w hodowlach bioreaktorowych przy zastosowaniu różnych źródeł witamin

Źródło witamin	T [h]	$Y_{ERY}$ [g·g <sup>-1</sup> ]	$Q_{ERY}$ [g·dm <sup>-3</sup> ·h <sup>-1</sup> ]	$q_{ERY}$ [g·dm <sup>-3</sup> ·h <sup>-1</sup> ]
Ekstrakt drożdżowy 1 g·dm <sup>-3</sup>	67	0,43	0,63	0,038
Namok kukurydziany 12 g·dm <sup>-3</sup>	67	0,28	0,39	0,017
Tiamina 200 µg·dm <sup>-3</sup>	71,5	0,36	0,48	0,038
Tiamina 400 µg·dm <sup>-3</sup>	74,5	0,33	0,43	0,043

obserwowane tylko w hodowli z namokiem, było związane z niewielką ilością tiaminy w podłożu.

Tak jak w przypadku hodowli wstrząsanych, w procesach prowadzonych w bioreaktorze stwierdzono obecność mannitolu i arabitolu, jednak ich stężenie nie przekroczyło, odpowiednio 4,9 i 1,1 g·dm<sup>-3</sup> (dane nie prezentowane). Ponadto, w hodowli z dodatkiem ekstraktu drożdżowego nie stwierdzono produkcji kwasów organicznych, w pozostałych procesach stężenie kwasu  $\alpha$ -ketoglutarynowego nie przekroczyło 0,3 g·dm<sup>-3</sup>, a cytrynowego 4,7 g·dm<sup>-3</sup>.

W badaniach nad biosyntezą erytrytolu z glicerolu czystego i odpadowego (150 g·dm<sup>-3</sup>) przez szczep *Y. lipolytica* A-10 użycie ekstraktu drożdżowego w stężeniu 1 g·dm<sup>-3</sup> skutkowało produkcją, odpowiednio 63 i 59 g·dm<sup>-3</sup> erytrytolu z wydajnością 0,41 oraz 0,37 g·g<sup>-1</sup> [Tomaszewska i in., 2011], a więc niższą niż w prezentowanej pracy. w hodowli zasilanej, w której całkowite stężenie substratu wynosiło 300 g·dm<sup>-3</sup>, szczep *Y. lipolytica* K1 zdolny był do produkcji 170 g·dm<sup>-3</sup> erytrytolu z glicerolu odpadowego, z wydajnością 0,56 g·g<sup>-1</sup> oraz produktywnością 1 g·dm<sup>-3</sup>·h<sup>-1</sup>, natomiast w podłożach z glukozą wartość tych parametrów wyniosła, odpowiednio 0,14 g·g<sup>-1</sup> oraz 0,09 g·dm<sup>-3</sup>·h<sup>-1</sup>, a stężenie produktu nie przekroczyło 23 g·dm<sup>-3</sup> [Rymowicz i in., 2009]. Przy zastosowaniu równie wysokiego stężenia glukozy i optymalnej, dla użytego szczepu *Moniliella* sp., dawki ekstraktu drożdżowego (10 g·dm<sup>-3</sup>), mimo znacznych ilości produkowanego erytrytolu (116,4 g·dm<sup>-3</sup>) wydajność produkcji wyniosła 39,4% [Lin i in., 2001], a więc była niższa niż w prezentowanej pracy. Wykorzystanie innych mikroorganizmów do produkcji erytrytolu oparte jest na wykorzystaniu glukozy jako źródła węgla. w procesach tych stężenie produkowanego erytrytolu, zależnie od wykorzystanych drobnoustrojów oraz składu podłoża, oscyloowało w granicach 18÷243 g·dm<sup>-3</sup> [Tomaszewska i in., 2011]. Najwyższą jak dotąd wydajność i produktywność procesu biosyntezy erytrytolu, odpowiednio 0,63 g·g<sup>-1</sup> oraz 1,98 g·dm<sup>-3</sup>·h<sup>-1</sup>, odnotowano dla szczepu *Moniliella* sp. 44 N61188-12 [Lin i in., 2010].

### Podsumowanie i wnioski

Uzyskane wyniki potwierdziły, iż tiamina jest niezbędną witaminą dla wydajnej i efektywnej produkcji erytrytolu z glicerolu przez drożdże

*Y. lipolytica*. Naturalnym źródłem tej witaminy w podłożu produkcyjnym może być ekstrakt drożdżowy oraz namok kukurydziany.

Proces biosyntezy zachodził najefektywniej w hodowlach z dodatkiem 1 g·dm<sup>-3</sup> ekstraktu drożdżowego, w których drożdże produkowały 42,2 g·dm<sup>-3</sup> erytrytolu z wydajnością 0,43 g·g<sup>-1</sup> i szybkością produkcji 0,63 g·dm<sup>-3</sup>·h<sup>-1</sup>.

### LITERATURA

- Almagro A., Prista C., Begona B., Loureiro-Dias M.C., Ramos J. 2001. Cloning and expression of two genes coding for sodium pumps in the salt-tolerant yeast *Debaryomyces hansenii*. *J. Bacteriol.*, 183, 3251-3255. DOI: 10.1128/JB.183.10.3251-3255.2001
- Bernt W., Borzelleca J., Flamm G., Munro I., 1996. Erythritol: a review of biological and toxicological studies. *Reg. Toxicol. Pharmacol.* 24, 191-197. DOI: 10.1006/rtp.1996.0098
- Chernyavskaya O.G., Shishkanova N.V., Il'chenko A.P., Finogenova T.V., 2000. Synthesis of  $\alpha$ -ketoglutaric acid by *Yarrowia lipolytica* yeast grown on ethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53, 152-158. DOI: 10.1007/s002530050002
- Finogenova T.V., Morgunov I.G., Kamzolova S.V., Chernyavskaya O.G., 2005. Organic acid production by the yeast *Yarrowia lipolytica*: a review of prospects. *Appl. Biochem. Microbiol.* 41, 418-425. DOI: 10.1007/s10438-005-0076-7
- Goossens J., Röper H., 1994. Erythritol: a new sweetener. *Food Sci. Technol. Today* 8, nr 3, 144-149.
- Hajny G., Smith J., Garver J., 1964. Erythritol production by a yeast-like fungus. *Appl. Microbiol.* 12, nr 3, 240-246.
- Hajny G.J., 1964. D-arabitol production by *Endomycopsis chodati*. *Appl. Microbiol.* 12, 87-92.
- Jeya M., Lee K.-M., Kumar T. M., 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. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 83, 225-231. DOI: 10.1007/s00253-009-1871-5
- Lawford H.G., Rousseau J.D., 1995. Establish medium requirements for high yield ethanol production from xylose by existing xylose-fermenting microorganisms. Final Technical Report. NREL Subcontract AAP-4-11195-03. Bioeng. Laboratory Dep. of Biochem., University of Toronto, Canada. [http://alternativefuels7.tpub.com/4536/ Table 12. Composition of corn steep liquor \(26.03.2012\): http://alternativefuels7.tpub.com/4536/45360049.htm](http://alternativefuels7.tpub.com/4536/ Table 12. Composition of corn steep liquor (26.03.2012): http://alternativefuels7.tpub.com/4536/45360049.htm)
- Lee J.K., Ha S.J., Kim S.Y., Oh D.K., 2001. Increased erythritol production in *Torula* sp. With inositol and phytic acid. *Biotechnol. Lett.* 23, 497-500. DOI: 10.1038/sj.jim.7000122
- Lin S.J., Wen C.J., 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. *Proc. Biochem.* 45(6), 973-979. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.03.003
- Lin S.J., Wen C.Y., Liu J.C., Chu W.S., 2001. Screening and production of erythritol by newly isolated osmophilic yeast-like fungi. *Proc. Biochem.* 36, 1249-1258. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00169-8
- Mäkinen K., Isotupa K., Kivilompolo T., Mäkinen P., Toivanen J., Söderling E., 2010. Comparison of erythritol and xylitol saliva stimulants in the control of dental plaque and mutants *Streptococci*. *Caries Res.* 35, 129-135. DOI: 10.1159/000047444
- Moon H.J., Jeya M., Kim I.W., Lee J.K., 2010. Biotechnological production of erythritol and its applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1017-1025. DOI: 10.1007/s00253-010-2496-4
- Pfeifer V., Sohns V., Conway H., Lancaster E., Dabic S., Griffin E., 1960. Two stage process for dialdehyde starch using electrolytic regeneration of periodic acid. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52, 201-206. DOI: 10.1021/ie50603a020
- Rymowicz W., Rywińska A., Gładkowski W., 2008. Simultaneous production of citric acid and erythritol from crude glycerol by *Yarrowia lipolytica*. *Chem. Pap.* 60, 391-394. 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*. *Biotechnol. Lett.* 31, 377-380. DOI: 10.1007/s10529-008-9884-1
- Tomaszewska L., Rywińska A., 2011. Utilization of glycerol into polyols by *Yarrowia lipolytica* yeasts. *Curr. Opin. Biotechnol.* 22, 94. DOI: 10.1016/j.copbio.2011.05.293
- Tomaszewska L., Rywińska A., Musiał I., Utecht M., Juszczyk P., Rymowicz W., Wojtatowicz M., Połomska X., 2011. Skринing szczepów drożdży *Yarrowia lipolytica* do produkcji erytrytolu z glicerolu. *Acta Sci. Pol.* 10, nr 1, 15-28.

**Badania realizowano w ramach projektu nr POIG.01.01.02-00-074/09; „Biotechnologiczna konwersja glicerolu do polioli i kwasów dikarboksylowych”.**