

Ludwika TOMASZEWSKA-HETMAN, Krzysztof CYBULSKI, Małgorzata GRYSZKIN,
Waldemar RYMOWICZ, Anita RYWIŃSKA

e-mail: Ludwika.Tomaszewska@up.wroc.pl

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

Biosynteza erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica* w obecności różnych soli

Wstęp

Współcześnie obserwuje się znaczny wzrost zainteresowania produktami ekologicznymi oraz o obniżonej kaloryczności. Zainteresowanie to objęło również możliwość zastosowania w produktach spożywczych erytrytoli, wpisującego się w najnowsze trendy żywieniowe jako naturalny i bezpieczny substytut cukru (0,2 kcal/g) [Gossens i Röper 1994, Moon i in., 2010].

Niska wydajność metod chemicznych spowodowała, iż związek ten produkowany jest na skalę komercyjną jedynie w procesach biotechnologicznych, przy udziale mikroorganizmów, z których większość odznacza się wysoką osmotolerancją. W przemysłowej produkcji erytrytoli głównymi substratami są glukoza, sacharoza oraz hydrolizaty skrobiowe [Moon i in., 2010].

Ze względu na stosunkowo wysoki koszt biosyntezy erytrytoli, warunkujący końcową cenę produktu (3÷6 USD), wiele uwagi poświęcono możliwości obniżenia kosztów procesu poprzez selekcję szczepów, optymalizację warunków hodowlanych oraz możliwość zastosowania tańszych substratów [Tomaszewska, 2014].

Prowadzone w ostatnich latach badania wskazały na wysoki potencjał procesu biosyntezy erytrytoli z glicerolu przy udziale drożdży *Yarrowia lipolytica*. W aspekcie przemysłowego wykorzystania szczególnie korzystna jest tolerancja tych mikroorganizmów na wysokie stężenie NaCl, wahania zawartości składników mineralnych oraz pierwiastków śladowych w podłożu, a także możliwość prowadzenia procesów hodowlanych w warunkach obniżonej sterylności [Tomaszewska i in., 2012; Rywińska i in., 2013].

Celem prezentowanej pracy było zbadanie wpływu podwyższonego ciśnienia osmotycznego, poprzez dodatek różnych soli, na biosyntezę erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Yarrowia lipolytica* oraz na aktywność enzymów odpowiedzialnych za produkcję tego związku.

Materiały i metody

Mikroorganizm

W badaniach wykorzystano szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* A-6, pochodzący z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu, przechowywany na skosie YM (*Yeast-Malt Extract Agar*), w temp. 4°C.

Substrat

W przeprowadzonych badaniach źródło węgla i energii stanowił glicerol o czystości 98% (POCH, Gliwice).

Podłoża

Podłoże inokulacyjne zawierało [g/L]: glicerol – 50,0; bactopeton – 5,0; ekstrakt drożdżowy – 3,0; ekstrakt słodowy – 3,0; woda destylowana – do 1L, pH 6.5.

Podłoże produkcyjne miało skład [g/L]: glicerol – 150,0; namok kukurydziany – 40,0; ekstrakt drożdżowy – 1,0; MgSO₄ x 7H₂O – 1,0; KH₂PO₄ – 0,2; CaCl₂/KCl/NaCl – w stężeniach wskazanych w tab. 1; woda wodociągowa – do 1L, pH 3.0.

Warunki prowadzenia hodowli

Hodowle inokulacyjne szczepiono materiałem komórkowym pochodzącym ze skosów YM z glukozą. Hodowle prowadzono na wstrząsarce rotacyjnej typu CERTOMAT IS (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Niemcy), w 300-mL kolbach stożkowych zawierających 100 mL podłoża inokulacyjnego, przy 140 rpm, przez 72 godziny w temp. 29,5°C.

Hodowle produkcyjne szczepiono 200 mL zawiesiny komórek, namnożonych w hodowlach inokulacyjnych. Hodowle prowadzono w 5-L bioreaktorze (*Biostat B Plus*, Niemcy), przy objętości roboczej 2 L, szybkości napowietrzania 0,6 vvm, prędkości obrotowej mieszadła 800 rpm i temp. 30°C. W czasie trwania procesu pH 3.0 utrzymywano automatycznie za pomocą dodatku 20% NaOH. Próby do oznaczeń (10 mL) pobierano 2 – 3 razy dziennie. W hodowlach dwuetapowych drugą porcję soli dodawano po 24 godzinach trwania procesu. Hodowle prowadzono do momentu całkowitego wyczerpania źródła węgla w podłożu.

Metody analityczne

Biomasa była oznaczana metodą wagową po odwirowaniu próby (*Centrifuge MPW-56*, Polska), separacji na filtrze membranowym ϕ 0,45 μ m (*Milipore*, USA) i wysuszeniu do stałej masy w wagosuszarce (*RAD WAG MAC 110/NH*, Polska) w temp. 105°C.

Stężenie glicerolu, erytrytoli i mannitoli oznaczano metodą HPLC na kolumnie *HyperRez XP carbohydrate H⁺* (*Dionex, UltiMate 3000 Series*, Japonia) połączonej z detektorem IR, w temp. 65°C, przy szybkości przepływu fazy ciekłej (25 mM kwasu trifluorooctowego) przez kolumnę równą 0,6 mL/min.

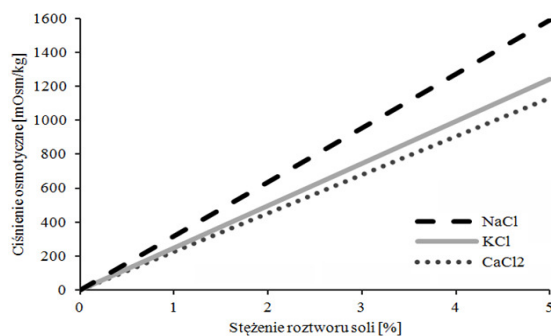
Ciśnienie osmotyczne zmierzono za pomocą osmometru *Marcel OS 3000* (*Marcel*, Polska).

Próby do oznaczeń aktywności enzymatycznych pobierano po 24 godzinach trwania hodowli produkcyjnych. Przygotowanie ekstraktów komórkowych oraz oznaczenia aktywności transketolazy i reduktazy erytrozy wykonano zgodnie z metodyką opisaną wcześniej w pracy [Tomaszewska i in., 2014].

Wyniki i dyskusja

Pierwszy etap badań miał na celu porównanie wpływu ciśnienia osmotycznego uzyskanego poprzez dodatek różnych soli na produkcję erytrytoli oraz parametry jego biosyntezy. Na podstawie wyznaczonych krzywych (Rys. 1) wybrano odpowiednie stężenia badanych soli.

Doświadczenie przeprowadzono w dwóch wariantach: jako jednoetapowy proces biosyntezy, z zastosowaniem jednakowego początkowego ciśnienia osmotycznego dla różnych soli (Tab. 1A) oraz jako proces dwuetapowy, w którym stosowano takie same stężenia początkowe różnych soli, zwiększając ciśnienie osmotyczne po 24 godzinach poprzez dodatek kolejnej porcji danej soli (Tab. 1B). Uzyskane wyniki przedstawiono w tab. 2. W hodowlach jednoetapowych (Tab. 1A), dodatek soli skutkowało zwiększeniem początkowego ciśnienia osmotycznego o 1 Osm/kg.



Rys. 1. Zależność ciśnienia osmotycznego od stężenia wodnych roztworów różnych soli.

Tab. 1. Wpływ jednoetapowego (A) oraz dwuetapowego (B) dodatku różnych soli na zmiany ciśnienia osmotycznego podczas biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica* A-6

Dodatek soli [%]	Ciśnienie osmotyczne [Osm/kg]			
	0 h	24 h	24 h*	Koniec hodowli**
A				
brak soli	2,3	2,0	-	1,0
4,5% CaCl ₂	3,3	3,1	-	2,3
4% KCl	3,3	3,2	-	2,3
3,25% NaCl	3,3	3,0	-	2,2
B				
2,5+2,5% CaCl ₂	2,7	2,5	2,9	2,1
2,5+2,5% KCl	2,7	2,7	3,5	2,4
2,5+2,5% NaCl	3,1	3,0	3,7	2,9

* pomiar po dodaniu porcji soli; ** czas trwania hodowli [h] przedstawiono w tab. 2

Dla wszystkich badanych wariantów, niezależnie od obecności i typu stosowanej soli, w trakcie trwania hodowli ciśnienie osmotyczne płynu hodowlanego spadało i na koniec hodowli było niższe od początkowego o ok. 1 Osm/kg. W hodowlach dwuetapowych (Tab. 2A) najwyższe początkowe i końcowe ciśnienie osmotyczne uzyskano w hodowli, w której zastosowano dodatek NaCl.

Tolerancja na wysokie zasolenie środowiska jest cechą wyróżniającą drożdże *Y. lipolytica*, które zdolne są do wzrostu w obecności nawet 12% NaCl [Andreishcheva i in., 1999]. Poddanie komórki stresowi osmotycznemu, najczęściej wywołanemu zmianą zasolenia środowiska hodowlanego, prowadzi do wielu zmian na poziomie morfologicznym, fizjologicznym i molekularnym [Blomberg i Adler 1992]. Najczęściej obserwowaną odpowiedzią na ten rodzaj stresu jest ograniczenie wzrostu [Kim i in. 1997; 1999; Betts i in. 1999; Cho i in. 1999], natomiast u mikroorganizmów osmotolerancyjnych następuje uruchomienie mechanizmów przeciwdziałających wysokiemu ciśnieniu osmotycznemu środowiska - zazwyczaj poprzez gromadzenie niskocząsteczkowych związków (tj. polioili takich jak glicerol, arabitol, erytrytol, mannitol, czy rybitol), działających jako osmoprotektanty, bez inhibicji czy inaktywacji enzymów [van Eck i in., 1993; Lucca i in., 2002; Park i in., 2011].

W hodowli w prezentowanej pracy, w której nie stosowano dodatku soli końcowe stężenie biomasy wyniosło 28,1 g/L (Tab. 2). W pozostałych hodowlach obecność soli w podłożu ograniczyła przyrost biomasy nawet do 20,6 g/L przy zastosowaniu KCl. Zaobserwowano, iż podwyższenie ciśnienia osmotycznego w wyniku dodatku soli wpłynęło pozytywnie zarówno na stężenie erytrytoli jak i na parametry produkcyjne biosyntezy tego związku.

W porównaniu do hodowli kontrolnej po zastosowaniu dodatku soli czas biosyntezy zmniejszył się o ok. 30%. W zależności od rodzaju soli, stężenie erytrytoli i wydajność jego produkcji wzrosły nawet o ok. 40%, natomiast objętościowa i specyficzna szybkość produkcji wzrosły nawet dwukrotnie. Najlepsze wyniki osiągnięto w hodowli z 4,5% CaCl₂, gdzie uzyskano 85,7 g/L erytrytoli z wydajnością 0,56 g/g oraz produktywnością 1,13 g/Lh. Porównywalne stężenie erytrytoli, produkowanego ze zbliżoną wydajnością, uzyskano w hodowli jednoetapowej z KCl oraz dwuetapowej z NaCl.

Warto jednak zwrócić uwagę, iż w tych hodowlach szybkość właściwa produkcji uległa znacznemu obniżeniu, co może być tłumaczone mniejszym inhibitoryjnym wpływem soli na przyrost biomasy w tych hodowlach. Ponadto, we wszystkich hodowlach, w wyniku obecności soli znacząco obniżyło się stężenie mannitolu, będącego produktem ubocznym biosyntezy erytrytoli, z 22,8 g/L w hodowli bez soli, do poziomu 2,2÷5,0 g/L w obecności różnych soli.

Podobną tendencję, czyli wzrost stężenia erytrytoli oraz inhibicję produkcji mannitolu w obecności NaCl obserwowano również we wcześniejszych badaniach nad biosyntezą erytrytoli z glicerolu przez *Y. lipolytica*, [Tomaszewska i in., 2012, Tomaszewska i in., 2014, Yang i in. 2014].

Tab. 2. Charakterystyka biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica* A-6 w warunkach ciśnienia osmotycznego podwyższonego za pomocą dodatku różnych soli jednoetapowo (A) oraz dwuetapowo (B)

Dodatek soli [%]	T [h]	X [g/L]	ERY [g/L]	MAN [g/L]	Y [g/g]	Q [g/Lh]	q [g/gh]
A							
brak soli	105	28,1	62,2	22,8	0,40	0,59	0,021
4,5% CaCl ₂	76	21,5	85,7	5,0	0,56	1,13	0,053
4% KCl	71	26,8	83,9	2,9	0,55	1,18	0,044
3,25% NaCl	72	27,0	74,4	2,4	0,49	1,03	0,038
B							
2,5+2,5% CaCl ₂	76	21,5	66,9	5,0	0,45	0,88	0,041
2,5+2,5% KCl	79	20,6	71,9	2,3	0,47	0,91	0,044
2,5+2,5% NaCl	77	29,4	83,0	2,2	0,56	1,08	0,037

W badaniach poświęconych wpływowi ciśnienia osmotycznego, zwiększanego za pomocą NaCl oraz KCl, podczas biosyntezy erytrytoli z glukozy przez *Trigonopsis variabilis* stężenie erytrytoli było dwukrotnie wyższe gdy ciśnienie osmotyczne zwiększano za pomocą KCl [Kim i in. 1997].

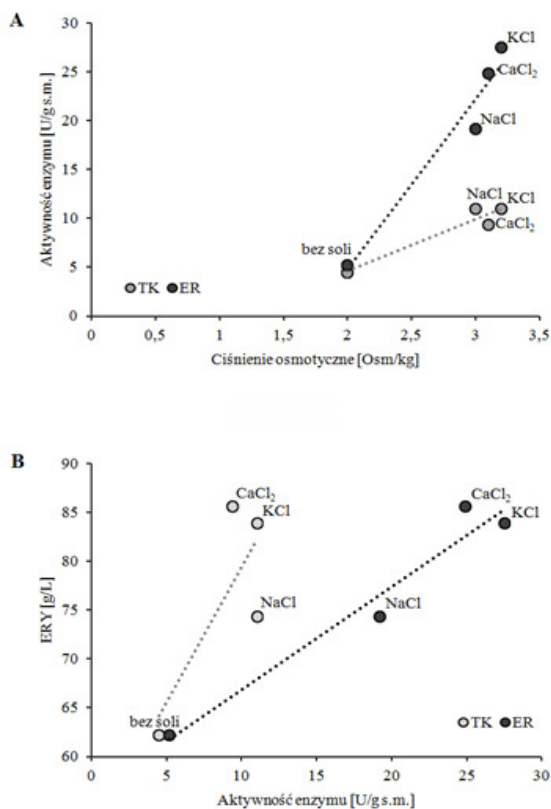
Najlepsze wyniki biosyntezy erytrytoli z glukozy przez *Pichia* sp. oraz *Torula* sp. uzyskano przy ciśnieniu osmotycznym, wynoszącym odpowiednio 1,6 oraz 2,4 Osm/kg, niezależnie czy uzyskano je za pomocą dodatku NaCl, czy KCl [Cho i in. 1999; Kim i in. 1999]. W przypadku hodowli *Pichia* sp. prowadzonych przy obecności soli końcowe stężenie erytrytoli i produktywność erytrytoli było odpowiednio, 2,7 i 2,1 razy wyższe w porównaniu do hodowli bez soli (0,63 Osm/kg). Z kolei w badaniach przeprowadzonych przez Lin i in. [2001] zwiększanie ciśnienia poprzez dodatek NaCl oraz KCl (0,5÷1,5 M), negatywnie wpływało na wydajność erytrytoli produkowanego przez *Moniliella* sp. w podłożach z glukoza.

W kolejnym etapie badań zbadano wpływ różnych soli na aktywność transketolazy i reduktazy erytrozy - enzymów uznawanych za odpowiedzialne za nadprodukcję erytrytoli podczas biosyntezy z erytrytoli przez *Y. lipolytica* A-6 [Moon i in., 2010] - w hodowlach o ustalonym początkowym ciśnieniu osmotycznym 3,3 Osm/kg (Tab. 3).

Tab. 3. Wpływ różnych soli na aktywność enzymów odpowiedzialnych za nadprodukcję erytrytoli podczas jego biosyntezy z erytrytoli przez *Y. lipolytica* A-6

Dodatek soli [%]	Transketolaza [U/g s.m.]	Reduktaza erytrozy [U/g s.m.]
brak soli	4,5	5,2
4,5% CaCl ₂	9,4	24,9
4% KCl	11,0	27,5
3,25% NaCl	11,0	19,2

Zaobserwowano, iż niezależnie od rodzaju dodanej soli, zwiększenie ciśnienia osmotycznego pożywki hodowlanej stymulowało aktywność badanych enzymów. W porównaniu do hodowli bez soli, w obecności badanych soli uzyskano ponad dwukrotny wzrost aktywności transketolazy oraz cztero-, a nawet pięciokrotny wzrost aktywności reduktazy erytrozy. Szczególnie wysoką aktywność reduktazy erytrozy, 24,9 oraz 27,5 U/g s.m., oznaczono w próbach pobranych odpowiednio, z hodowli z dodatkiem CaCl₂ oraz KCl. We wcześniejszych badaniach, prowadzonych z wykorzystaniem szczepu *Y. lipolytica* Wratislavia K1 [Tomaszewska i in. 2014], odnotowano stymulujący efekt obecności NaCl na aktywność transketolazy i reduktazy erytrozy. Aktywność tych enzymów, w fazie wzrostu drożdży, wzrosła około 1,5-krotnie po zwiększeniu ciśnienia osmotycznego z 1,6 do 2,9 Osm/kg. Podczas biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez *Y. lipolytica* CICC 1675, specyficzna aktywność reduktazy erytrozy wzrosła dwukrotnie, gdy ciśnienie osmotyczne zwiększono z 3,21 do 4,17 Osm/kg poprzez dodanie NaCl [Yang i in. 2014].



Rys. 2. Korelacja aktywności enzymów i zastosowanego ciśnienia osmotycznego (A) oraz zależność stężenia erytrytoli od aktywności enzymatycznych (B) w czasie jego biosyntezy z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica* A-6 w obecności różnych soli

Wzrost aktywności reduktazy erytrozy obserwowano również w warunkach podwyższania ciśnienia osmotycznego, przy zastosowaniu KCl oraz NaCl, u drożdży *Candida magnoliae* [Park i in. 2011].

Wartym uwagi jest, iż w prezentowanej pracy zastosowane ciśnienie osmotyczne korelowało z poziomem aktywności reduktazy erytrozy w odpowiednich hodowlach (Rys. 2A), co przekładało się na ilości produkowanego przez drożdże erytrytoli (Rys. 2B). Zależność ta nie była tak jednoznaczna w przypadku transketolazy, co sugeruje iż w przeprowadzonych hodowlach, za enzym odpowiedzialny za wydajną produkcję erytrytoli uważać należy reduktazę erytrozy.

Wnioski

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, iż podwyższone ciśnienie osmotyczne sprzyjało efektywnej biosyntezie erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica*.

Ponadto stężenie erytrytoli zależne było nie tylko od wartości ciśnienia osmotycznego, ale też od rodzaju soli użytej do regulacji ciśnienia i metody jej dodawania do pożywka.

Podwyższone ciśnienie osmotyczne stymulowało aktywność transketolazy oraz - szczególnie silnie - reduktazy erytrozy, co wpływało bezpośrednio na wzrost produkcji erytrytoli oraz poprawę parametrów jego biosyntezy.

Najlepsze wyniki osiągnięto w hodowli jednoetapowej z 4,5% CaCl₂, gdzie uzyskano 85,7 g/L erytrytoli z wydajnością 0,56 g/g oraz produktywnością 1,13 g/Lh.

OZNACZENIA

- X – biomasa [g/L],
- GLY – glicerol [g/L],
- ER – reduktaza erytrozy [U/g s.m.],
- ERY – erytrytol [g/L],
- MAN – mannitol [g/L],
- TK – transketolaza [U/g s.m.],
- Y_{ERY} – wydajność erytrytoli [g wytw. ERY/g zużytego substratu],

- Q_{ERY} – szybkość objętościowa produkcji erytrytoli [g/Lh],
- q_{ERY} – szybkość właściwa produkcji erytrytoli [g/gh],
- s.m. – sucha masa drożdży [g],
- T – czas [h].

LITERATURA

- Andreishcheva E. N., Isakova E. P., Sidorov N. N., Abramova N. B., Ushakova N. A., Shaposhnikov G. .L., Soares M. I. M., Zvyagilskaya R. A., 1999. Adaptation to salt stress in a salt-tolerant strain of the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochem. (Moscow)* **64**, 1061-1067
- Betts G. D., Linton P., Betteridge R. J., 1999. Food spoilage yeast: effects of pH, NaCl and temperature on growth. *Food Control* **10**, 27-33. DOI: 10.1016/S0956-7135(98)00151-0
- Blomberg A., Adler L., 1992. Physiology of osmotolerance in fungi. *Adv. Microbiol. Physiol.* **33**, 145-212
- Cho C. H., Kim S. Y., Noh B. S., Oh D. K., 1999. Effect of osmotic pressure of salts on erythritol production by *Pichia* sp. *Food Sci. Biotechnol.* **8**(2), 73-77. PMID: 10521723
- Goossens J., Röper H., 1994. Erythritol: a new sweetener. *Food Sci. Technol. Today* **8**(3), 144-149
- Kim S. Y., Lee K. H., Kim J. H., Oh D. K., 1997. Erythritol production by controlling osmotic pressure in *Trigonopsis variabilis*. *Biotechnol. Lett.* **19**, 727-729. DOI: 10.1023/A:1018371722456
- Kim K. A., Noh B. S., Kim S. Y., Oh D. K., 1999. Effect of osmotic pressure of salts on growth of *Torula* sp. and erythritol production. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**, 91-95
- Lin S. J., Wen C. Y., Liao J. C., Chu W. S., 2001. Screening and production of erythritol by newly isolated osmophilic yeast-like fungi. *Process Biochem.* **36**, 1249-1258. DOI: 10.1016/S0032-9592(01)00169-8
- Lucca M. E., Spencer J. F. T., de Figueroa L. I. C., 2002. Glycerol and arabitol production by an intergeneric hybrid, PB2, obtained by protoplast fusion between *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**, 472-476. DOI: 10.1007/s00253-002-1025-5
- 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
- Park E. H., Lee H. Y., Ryu Y.W., Seo J. H., Kim M. D., 2011. Role of osmotic and salt stress in the expression of erythrose reductase in *Candida magnoliae*. *J. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 1064-1068. DOI: 10.4014/jmb.1105.05029
- Rywińska A., Juszczyk P., Wojtatowicz M., Robak M., Lazar Z., Tomaszewska L., Rymowicz W., 2013. Glycerol as a promising substrate for *Yarrowia lipolytica* biotechnological applications. *Biomass Bioenerg.* **48**, 148-166. DOI: 10.1016/j.biombioe.2012.11.021
- Tomaszewska L., 2014. Postępy mikrobiologicznej produkcji erytrytoli. *Dokowania Młodych Naukowców* **2**, 266-268
- Tomaszewska L., Rakicka M., Rymowicz W., Rywińska A., 2014. A comparative study on a glycerol metabolism to erythritol and citric acid in *Yarrowia lipolytica* yeast cells. *FEMS Yeast Res.* **14**, 966-976. DOI: 10.1111/1567-1364.12184
- Tomaszewska L., Rywińska A., Gładkowski W., 2012. Production of erythritol and mannitol by *Yarrowia lipolytica* yeast in media containing glycerol. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **39**, 1333-1343. DOI: 10.1007/s10295-012-1145-6
- van Eck J. H., Prior B. A., Brandt E. V., 1993. The water relations of growth and polyhydroxy alcohol production by ascomycetous yeasts. *J. Gen. Microbiol.*, **139**, 1047-1054. DOI: 10.1099/00221287-139-5-1047
- Yang L. B., Zhan X. B., Zheng Z. Y., Wu J. R., Gao M. J., Lin C. C., 2014. A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. *Biores. Technol.*, **151**, 120-127. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.10.031

Praca współfinansowana w ramach grantu N N312 256640 Narodowego Centrum Nauki oraz ze środków Krajowego Naukowego Ośrodka Wiodącego KNOW na lata 2014-2018 dla Wrocławskiego Centrum Biotechnologii.