

WAWRZYNIEC WAŁAWEK, JOLANTA MAŁAJOWICZ

ZASTOSOWANIE WYBRANYCH ADSORBENTÓW DO WYDZIELANIA Z PODŁOŻA HODOWLANEGO GAMMA-DEKALAKTONU PRODUKOWANEGO PRZEZ DROŻDŻE *YARROWIA LIPOLYTICA*

Streszczenie

Gamma-dekalakton (GDL) to cykliczny ester o intensywnym, brzoskwińowo-olejowym zapachu, wykrywalnym przy stężeniu poniżej 5 mg/dm³. Związek ten stosuje się w przemyśle spożywczym do nadania właściwych cech sensorycznych takim produktom, jak: napoje, wyroby piekarskie, desery, słodycze czy gumy do żucia. GDL jest objęty statusem GRAS (*Generally Recognized As Safe*) i uznawany za bezpieczny dodatek do żywności. Lakton może być produkowany metodami chemicznymi lub biotechnologicznymi. Wzrost świadomości konsumentów i aktualny trend w kierunku bioproduktów przyczynia się do upowszechniania biotechnologicznej syntezy γ -dekalaktonu. Trudnością w produkcji GDL z udziałem mikroorganizmów jest wydzielenie go z podłoża biotransformacyjnego, stanowiącego mieszaninę metabolitów mikroorganizmów i nieprzereagowanego substratu lipidowego (kwasu rycynolowego).

Celem niniejszej pracy była próba wydzielenia poprzez adsorpcję γ -dekalaktonu (GDL) z podłoży biotransformacyjnych, w których substratem był olej rycynowy przekształcany do związku zapachowego za pośrednictwem drożdży *Yarrowia lipolytica*. Efektywność adsorpcji analizowano przy zastosowaniu dwóch adsorbentów: Amberlitu XAD-4 i wermikulitu. Spośród dwóch badanych adsorbentów skuteczniejszym w adsorpcji laktonu z podłoży, w okresie fazy wzrostu logarytmicznego drożdży (4. dzień biotransformacji), był Amberlit XAD-4. Po 10 min od wprowadzenia tego adsorbenta do środowiska reakcji możliwe było zaadsorbowanie ok. 61 \pm 3 % laktonu. Początkowa szybkość adsorpcji GDL na Amberlicie XAD-4 wynosiła 4,365 \times 10⁻³ g GDL/g adsorbenta/min i była ok. 2,8-krotnie wyższa w porównaniu z wermikulitem. Wydłużanie czasu biotransformacji (do 7 dni) skutkowało zmniejszeniem efektywności adsorpcji.

Słowa kluczowe: γ -dekalakton, adsorpcja, Amberlit XAD-4, wermikulit, *Yarrowia lipolytica*

Wprowadzenie

Gamma-dekalakton (C₁₀H₁₈O₂) (GDL) to cykliczny ester o intensywnym, brzoskwińowo-olejowym zapachu, wyczuwalnym nawet w stężeniu poniżej 5 mg/dm³.

*Mgr inż. W. Waławek, dr inż. J. Małajowicz, Katedra Chemii, Instytut Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159C, 02-776 Warszawa.
Kontakt: jolanta_malajowicz@sggw.edu.pl*

Enancjomer R γ -dekalaktonu naturalnie występuje w większości owoców, przy czym w sposób istotny kształtuje on aromat brzoskwiń, moreli i truskawek. Występowanie GDL odnotowuje się także w maśle, mleku, serach, piwie, rumie, czerwonym i białym winie, mango czy śliwkach [7, 13]. Lakton jest objęty statusem GRAS (*Generally Recognized As Safe*) i uznawany za bezpieczny dodatek do żywności, dopuszczony przez FDA (*Food and Drug Administration*) – Amerykańską Agencję ds. Żywności i Leków [29]. Zatwierdzony przez Radę Europy dodatek γ -dekalaktonu do żywności to 20 ppm. Stosowanie tego związku zapachowego w przemyśle spożywczym ma na celu nadanie właściwego aromatu wyrobom czekoladowym, napojom, wyrobom piekarskim, gumom do żucia, deserom czy słodyczom [14]. W tab. 1. przedstawiono dane na temat zastosowania GDL do produkcji żywności.

Tabela 1. Wybrane przykłady zastosowania γ -dekalaktonu do produkcji żywności, odnotowane przez FEMA – Stowarzyszenie Producentów Aromatów i Ekstraktów USA

Table 1. Selected examples of using γ -decalactone in food production, as reported by FEMA – The Flavor and Extract Manufacturers Association of the United States

Kategoria żywności Food category	Stężenie γ -dekalaktonu [ppm] Concentration of γ -decalactone [ppm]
Napoje alkoholowe / Alcoholic drinks	2,65
Wyroby piekarskie / Bakery products	21,06
Ser / Cheese	13,70
Guma do żucia / Chewing gum	0,30
Mrożone przetwory mleczne / Frozen milk products	15,41
Galaretki, puddingi / Jellies, puddings	7,36
Landrynki / Hard candy	0,67
Napoje bezalkoholowe / Alcohol-free drinks	8,04

GDL może być produkowany na drodze chemicznej lub biotechnologicznej [18]. Opisane w literaturze chemiczne metody jego syntezy najczęściej zawierają etap syntezy kwasu 4-hydroksydekanowego, który z łatwością cyklizuje do racemicznego γ -dekalaktonu [6, 8]. Udoskonalane od wielu lat metody biotechnologiczne bazują na procesie β -oksydacji kwasu rycynolowego lub jego estrów zachodzącym w peroksy-somach komórek mikroorganizmów [15]. Dotychczas w badaniach nad wydajną biosyntezą laktonu wykorzystywano m.in. takie mikroorganizmy, jak: *Yarrowia lipolytica* [12, 26, 27], *Pichia guilliermondii* [11], *Sporobolomyces odoratus* [19], *Sporidiobolus salmonicolor* [21], *Sporidiobolus ruineni* [4] czy *Rhodotorula aurantiaca* [1], które hodowano na podłożach z dodatkiem m.in. oleju rycynowego.

Ważnym etapem produkcji związków zapachowych na drodze biotechnologicznej jest ich wydzielenie w możliwie najczystszej postaci z podłoża hodowlanego. Nie jest to proces łatwy, a szczególne trudności sprawia odzyskiwanie związków zapachowych,

które charakteryzują się wysoką lotnością oraz niską rozpuszczalnością. Ponadto medium hodowlane, w którym dane związki aromatyczne się znajdują, jest zazwyczaj bardzo złożone. W celu wydzielenia związków zapachowych z podłoża stosowano dotychczas różne techniki, które polegały m.in. na procesach: ekstrakcji, permeacji, destylacji oraz adsorpcji. Często opisywaną w literaturze metodą jest ekstrakcja rozpuszczalnikami [10, 20]. Najczęściej stosowana jest ekstrakcja w układzie ciecz-ciecz. Metoda ta nie sprawdza się jednak w przypadku heterogenicznych podłoży biotransformacyjnych. Obecność w podłożach fazy lipidowej (ma to miejsce w przypadku biotechnologicznej syntezy γ -dekalaktonu, gdzie substratem jest olej rycynowy) sprawia, że wraz z pożądanym produktem reakcji do fazy organicznej ekstrahowane są pozostałości substratów lipidowych. Inną stosowaną metodą wydzielenia laktonów jest proces perwaporacji. Polega on na selektywnym transporcie składnika przez membranę, np. ceramiczną, o średnicy porów rzędu poniżej 5 nm. Perwaporacja zachodzi w łagodnych warunkach oraz umożliwia selektywne wydzielenie pożądanego związku [5]. Możliwe jest również zastosowanie bezpośredniej separacji produktu z podłoża hodowlanego poprzez adsorpcję na węglu aktywnym, porowatym hydrofobowym polimerze lub porowatej żywicy. Takie rozwiązania próbowano już zastosować w skali laboratoryjnej, m.in. przy wyodrębnianiu związków zapachowych z grupy estrów [9, 18, 24] a także samego γ -dekalaktonu [2, 3]. Materiały porowate są powszechnie i chętnie stosowane z uwagi na ich właściwości, w tym głównie ich dużą powierzchnię właściwą, dużą porowatość, chłonność, nieznaczną aktywność chemiczną oraz dużą wytrzymałość mechaniczną i możliwość regeneracji. Należy jednak pamiętać, że adsorpcja w fazie ciekłej, a z taką mamy do czynienia przy wyodrębnianiu γ -dekalaktonu z podłoża hodowlanego, jest dużo bardziej złożonym zjawiskiem niż adsorpcja w fazie gazowej. Obecność cząstek rozpuszczalnika i tworzenie miceli przez zaadsorbowane molekuly przyczynia się do wzrostu złożoności adsorbowanej cieczy. Ponadto na wydajność adsorpcji składnika z fazy ciekłej wpływają również takie czynniki jak: pH roztworu, rozpuszczalność adsorbowanego składnika w stosowanym rozpuszczalniku, temperatura, w której prowadzony jest proces czy samo stężenie adsorbenta. Wobec powyższego dobranie właściwego adsorbenta i warunków adsorpcji laktonu z wodnego podłoża biotransformacyjnego, celem uzyskania pożądanego wydajności procesu, wymaga przeprowadzenia wielu analiz. Niemniej jednak adsorpcja uważana jest za obiecującą technikę ze względu na prostotę wykonania, dostępność materiałów, możliwą do osiągnięcia wysoką wydajność i stosunkowo niski koszt procesu [25].

Celem niniejszej pracy była próba wydzielenia poprzez adsorpcję γ -dekalaktonu (GDL) z podłoży biotransformacyjnych, w których substratem był olej rycynowy przekształcany do związku zapachowego za pośrednictwem drożdży *Yarrowia lipolytica*. Efektywność adsorpcji analizowano przy zastosowaniu dwóch adsorbentów: Amberlitu

XAD-4 (syntetycznego kopolimeru styrenu i diwinylobenzenu) i wermikulitu (naturalnego krzemianu warstwowego).

Material i metody badań

Material doświadczalny stanowił szczep drożdży *Yarrowia lipolytica* KKP379 pozyskany z Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego w Warszawie oraz adsorbenty: Amberlit XAD-4 i wermikulit.

W celu oznaczenia poziomu adsorpcji GDL w układach modelowych do kolb stożkowych o obj. 100 cm³ wprowadzano 0,25 g GDL ($\geq 98\%$, Sigma-Aldrich, Niemcy) rozpuszczonego w 10 cm³ etanolu (96 %, POCH, Polska) oraz 15 cm³ wody destylowanej. Kolby wstawiano na mieszadło magnetyczne celem dobrego wymieszania składników. Po 5 min mieszania pobierano próbkę kontrolną, po czym do roztworu wprowadzano wybrany adsorbent w stężeniu 30 g/dm³. Po dodaniu adsorbentu kolby wstawiano na wytrząsarkę (IKA, Niemcy, 140 rpm) i w odstępach 10 min przez okres 1 h z roztworu pobierano próbki właściwe (1,5 cm³) do oznaczeń chromatograficznych.

Celem oznaczenia poziomu adsorpcji GDL w podłożach biotransformacyjnych prowadzono hodowlę drożdży *Yarrowia lipolytica*. Do namnożenia mikroorganizmów przygotowano płynne podłoże namnażające YPG o składzie: ekstrakt drożdżowy (BTL, Polska) – 10 g/dm³, pepton (BTL, Polska) – 20 g/dm³, glukoza (Chempur, Polska) – 20 g/dm³. Drożdże ze skosów agarowych przeszczepiano do kolby kulistej płaskodennej zawierającej 50 cm³ podłoża namnażającego. Hodowlę prowadzono przez 24 h w temp. 27 °C w inkubatorze (IKA, Niemcy) z wytrząsaniem, na poziomie 140 rpm. Po tym czasie 1 cm³ inokulum zaszczipiano właściwe podłoże biotransformacyjne składające się z oleju rycynowego (Carl Roth, Niemcy) – 100 g/dm³, peptonu (BTL, Polska) – 20 g/dm³ oraz Tweenu 80 (Acros Organics, Belgia) – 5 g/dm³. Biotransformację prowadzono przez 7 dni w temp. 27 °C, z wytrząsaniem na poziomie 140 rpm. W 4. i 7. dniu hodowli wykonywano badania poziomu adsorpcji gamma-dekalaktonu z podłoża.

We wskazanych dniach biotransformacji komórki drożdży oddzielano od podłoża biotransformacyjnych poprzez wirowanie (wirówka MPW 351, Polska, wirnik kątowy, 10 min, 10000 rpm). Supernatant zlewano znad osadu komórek drożdży i zakwaszono 10-procentowym kwasem solnym do obniżenia pH do wartości ok. 2 (kwas 4-hydroksydekanowy powstały w procesie β -oksydacji łatwiej cyklizuje w środowisku kwaśnym do γ -dekalaktonu). Po zakwaszeniu do każdego roztworu dodawano 100 cm³/dm³ alkoholu etylowego (zwiększenie rozpuszczalności laktonu). Roztwór umieszczano na mieszadle magnetycznym na 5 min, celem wymieszania i pobrania reprezentatywnej próbki kontrolnej (1,5 cm³). Następnie do podłoża wprowadzano wybrane adsorbenty: Amberlit XAD-4 lub wermikulit w ilości 30 g/dm³. Od tego mo-

mentu, w odstępach 10-minutowych, przez pół godziny pobierano próbki do oznaczeń chromatograficznych ($1,5 \text{ cm}^3$).

Do analizy poziomej desorpcji GDL z adsorbentów oddzielano je od roztworów poprzez sączenie przez bibułę filtracyjną. Adsorbenty przenoszono do gilz ekstrakcyjnych i ekstrahowano trzykrotnie porcją 20 cm^3 eteru dietylowego (POCH, Polska), po czym próbki poddawano analizie z zastosowaniem chromatografii gazowej (GC).

Do $1,5 \text{ cm}^3$ pobieranych próbek dodawano $20 \mu\text{l}$ γ -undekalaktanu (standard wewnętrzny) oraz $1,5 \text{ cm}^3$ chlorku metylenu jako ekstrahenta. Próbki ekstrahowano, a następnie analizowano za pośrednictwem GC (YL 6100 Young Lin Instrument, Korea Południowa, kolumna kapilarna BPX70 $60 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$) w programie temperaturowym: przetrzymanie przez 1 min w temp. $165 \text{ }^\circ\text{C}$, kolejno przyrost temperatury od 165 do $180 \text{ }^\circ\text{C}$ w tempie $3 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$ i ostateczny wzrost temperatury od 180 do $205 \text{ }^\circ\text{C}$ w tempie $5 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. Gazem nośnym w analizach był azot, temperatura detektora wynosiła $280 \text{ }^\circ\text{C}$, przepływ ustalono na poziomie $1,1 \text{ cm}^3/\text{min}$.

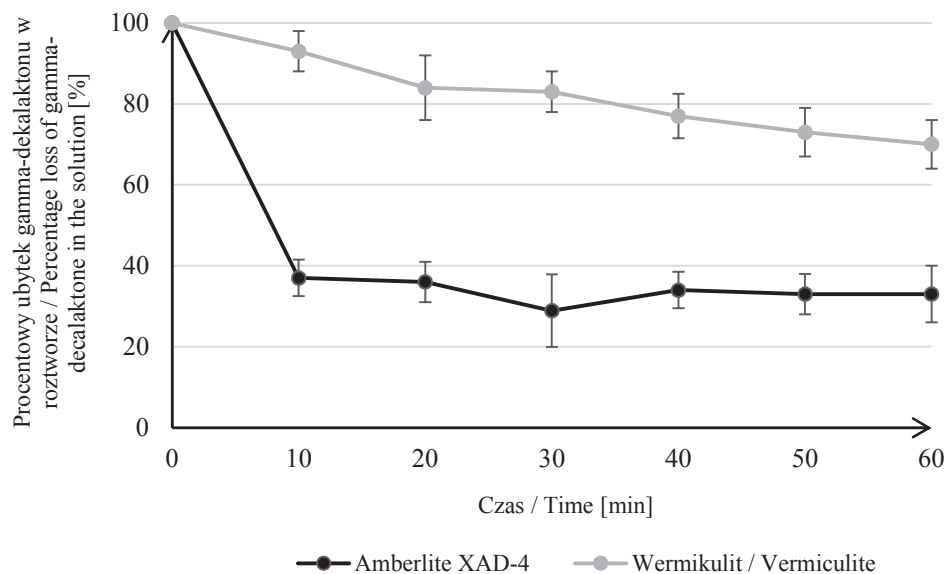
Wszystkie analizy wykonywano w 3 powtórzeniach. Wyniki poddano analizie statystycznej, obliczono wartości średnie oraz odchylenia standardowe. Istotność różnic pomiędzy wartościami średnimi weryfikowano testem Tukeya ($p \leq 0,05$). Obliczenia wykonano w programie statystycznym Statistica 12,0.

Wyniki i dyskusja

W badaniach nad adsorpcją GDL z podłoża biotransformacyjnych stosowano dwa adsorbenty o odmiennej budowie i właściwościach – wermikulit i Amberlit XAD-4. Pierwszy z nich jest naturalnym materiałem ilastym o warstwowej strukturze, z wieloma krystalicznymi przestrzeniami pełniącymi rolę porów. Jest to materiał tani i powszechnie dostępny, zwiększający swoją objętość od 8 do 30 razy w zależności od stosowanych warunków termicznych [16]. Amberlit XAD-4 to syntetyczny, makroporowaty kopolimer styrenodiwinylobenzenu w postaci białych, półprzezroczystych perełek [30].

W pierwszym etapie badań przeanalizowano efektywność adsorpcji GDL z modelowych roztworów wodnych, w których stężenie laktonu wynosiło $5 \text{ g}/\text{dm}^3$, a stężenie adsorbentów – $30 \text{ g}/\text{dm}^3$. Zmniejszenie stężenia GDL w roztworze, wynikające z adsorpcji, analizowano przez 60 min, a próbki pobierano co 10 min. Wyniki przedstawiono na rys. 1.

W modelowym roztworze wodnym lakton adsorbował się znacznie skuteczniej na Amberlicie XAD-4. Ilość zaadsorbowanego związku sięgała poziomu ok. $67 \pm 2,2 \%$, co w przeliczeniu na masę stanowiło ok. $3,91 \pm 0,31 \text{ g}$ laktonu/ dm^3 . Poprzez ilość zaadsorbowanego GDL rozumie się różnicę pomiędzy początkowym stężeniem związku w roztworze a jego zawartością finalną. W przypadku wermikulitu po 60 min zaadsorbowało się 30% związku, czyli ok. 2,2-krotnie mniej. Ponadto przy zastosowaniu

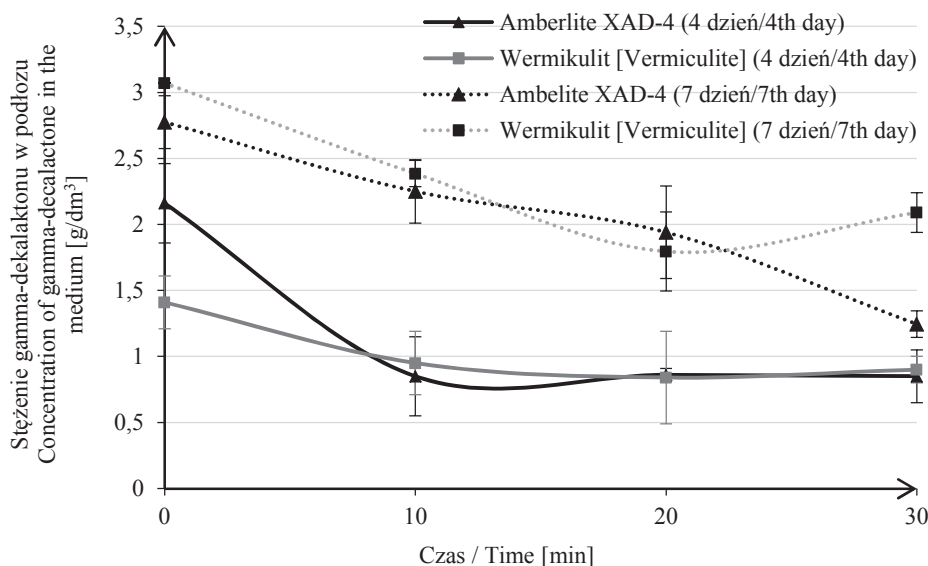


Rys. 1. Adsorpcja γ -dekalaktanu z modelowych roztworów wodnych prowadzona w temp. 25 °C
 Fig. 1. Adsorption of γ -decalactone from model water solutions carried out at 25 °C of temperature

Amberlitu XAD-4 po 40 min kontaktu osiągnięto stan równowagi. Według Li i wsp. [22] makroporowate, polimerowe adsorbenty, w porównaniu z klasycznymi/naturalnymi adsorbentami, takimi jak: silikażel, tlenki glinu czy węgiel aktywowany są znacznie bardziej skuteczne w procesie adsorpcji z uwagi na zróżnicowaną strukturę porów i właściwości fizykochemiczne.

W kolejnym etapie badań uwagę skupiono na adsorpcji γ -dekalaktanu z podłoży biotransformacyjnych, w których związek ten był syntetyzowany przez drożdże *Y. lipolytica* z oleju rycynowego. Zbadano efektywność adsorpcji laktonu przy zastosowaniu tego samego stężenia adsorbentów (30 g/dm³). Wyniki tego doświadczenia zamieszczono na rys. 2. Poziom adsorpcji podawano, operując masą adsorbowanego związku zapachowego, a nie jego stężeniem procentowym. Wynikało to ze zróżnicowania poziomu stężenia laktonu w poszczególnych hodowlach w podłożach biotransformacyjnych, z uwagi na nieco odmienną efektywność namnażania komórek drożdżowych i prowadzenia przez nie biotransformacji oleju rycynowego. Stężenie związku zapachowego w podłożach w 4. dniu biotransformacji wahało się od 1,41 ± 0,20 g/dm³ do 2,16 ± 0,33 g/dm³, zaś w 7. dniu – od 2,78 ± 0,12 g/dm³ do 3,07 ± 0,19 g/dm³. Plon biomasy w poszczególnych powtórzeniach zawierał się w granicach 5 ÷ 8,7 g s.s./dm³. Na podstawie wyników adsorpcji z 4. dnia biotransformacji (faza

wzrostu logarytmicznego drożdży) wykazano, że z perspektywy wiązania się laktonu na powierzchni adsorbentów istotne znaczenie miało pierwsze 10 min reakcji (rys. 2). W tym okresie efektywniejsza była adsorpcja GDL za pośrednictwem Amberlitu XAD-4. Zaadsorbowało się na nim ok. $61 \pm 3 \%$ laktonu (zmniejszenie stężenia GDL z poziomu $2,16 \pm 0,33 \text{ g/dm}^3$ do $0,85 \pm 0,28 \text{ g/dm}^3$), czyli ponad dwukrotnie więcej niż na wermikulicie (ok. $33 \pm 4 \%$, zmniejszenie stężenia GDL z $1,41 \pm 0,20 \text{ g/dm}^3$ do $0,95 \pm 0,24 \text{ g/dm}^3$). Wyniki te były zgodne z danymi adsorpcji GDL z modelowych roztworów (rys. 1), jednak różnica dotyczyła czasu, po którym osiągnano stan równowagi adsorpcji – w przypadku roztworów biotransformacyjnych po 4. dniu biotransformacji było to 10 min.



Rys. 2. Adsorpcja γ -dekalaktonu z podłoży biotransformacyjnych po 4 i 7 dniach biotransformacji, prowadzona w temp. $25 \text{ }^\circ\text{C}$

Fig. 2. Adsorption of γ -decalactone from biotransformation media after 4 and 7 days of biotransformation carried out at $25 \text{ }^\circ\text{C}$ of temperature

Próby adsorpcji GDL z podłoży po 7 dniach biotransformacji (faza stacjonarna wzrostu drożdży) (rys. 2) wykazały nieznacznie niższą efektywność tego procesu w przypadku Amberlitu XAD-4. Poziom adsorpcji związku zapachowego wynosił ok. 55% . W przypadku wermikulitu wydajność wiązania laktonu na powierzchni adsorbenta wzrosła do ok. 42% . W tych reakcjach w ciągu 30 min od dodania adsorbentów nie osiągnięto jednak stanu równowagi. Przypuszcza się, że spadek efektywności adsorpcji GDL przez Amberlit XAD-4 w podłożu po 7 dniach biotransformacji może

wynikać ze wzrostu stężenia w podłożu produktów metabolizmu drożdży, a także samego kwasu rycynolowego, uwalnianego wskutek hydrolizy oleju rycynowego. Wysoce prawdopodobne jest, że związki te adsorbowały się na Amberlicie i pogarszały wydajność adsorpcji, mimo wyższego stężenia samego GDL w podłożu (w porównaniu do 4. dnia biotransformacji).

Negatywny wpływ składników podłoża na proces adsorpcji odnotowali Alchihab i wsp. [2]. Naukowcy prowadzili badania nad zastosowaniem makroporowatych żywic Macronet 100, 102, 202 w adsorpcji γ -dekalaktonu z podłoży biotransformacyjnych, do których żywice wprowadzane były na wstępie biotransformacji. Wymienieni autorzy zaobserwowali, że poziom adsorpcji laktonu z bulionu hodowlanego drożdży *Rhodotula aurantiacana* był niższy w stosunku do odnotowanego w modelowych roztworach wodnych. Różnicę tę przypisywali obecności w pożywce oleju rycynowego i biomasy drożdży, która według nich zaadsorbowała część związku.

Uzyskanie pełniejszego obrazu kinetyki adsorpcji z podłoży biotransformacyjnych było możliwe po określeniu początkowej szybkości adsorpcji w każdym z nich (tab. 2).

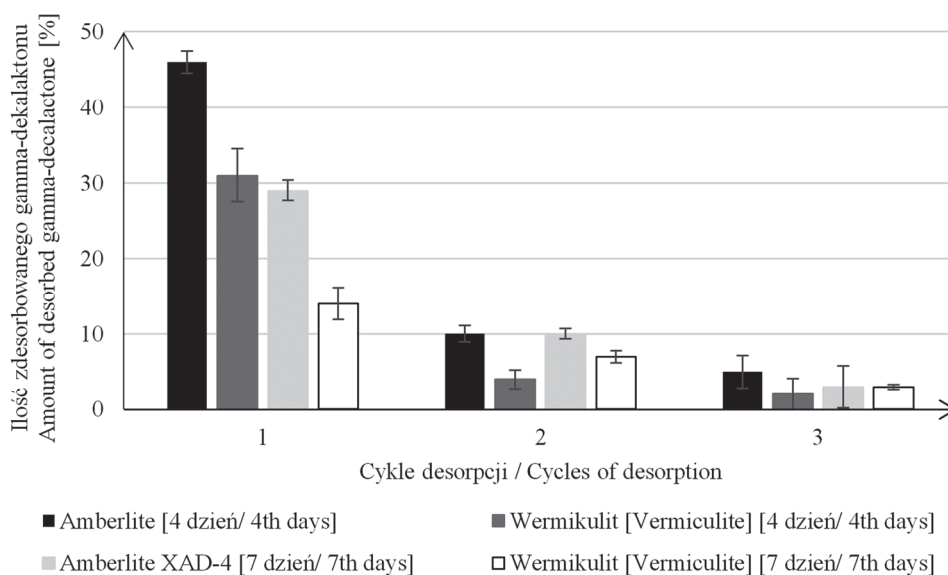
Tabela 2. Początkowa szybkość adsorpcji γ -dekalaktonu na badanych adsorbentach z podłoży po 4 i 7 dniach biotransformacji

Table 2. Initial adsorption rate of γ -decalactone on tested adsorbents from mediums after 4 and 7 days of biotransformation

Wyszczególnienie Item	Podłoża biotransformacyjne / Biotransformation mediums			
	po 4 dniach biotransformacji after 4 days of biotransformation		po 7 dniach biotransformacji after 7 days of biotransformation	
	Amberlit XAD-4 Amberlite XAD-4	Wermikulit Vermiculite	Amberlit XAD-4 Amberlite XAD-4	Wermikulit Vermiculite
Początkowe stężenie γ -dekalaktonu Initial concentration of γ -decalactone [g/dm^3]	$2,16 \pm 0,33$	$1,41 \pm 0,20$	$2,78 \pm 0,54$	$3,07 \pm 0,2$
Zaadsorbowana ilość γ -dekalaktonu po 10 min Adsorbed quantity of γ - decalactone after 10 min [g/dm^3]	$1,31 \pm 0,1$	$0,46 \pm 0,22$	$0,53 \pm 1,48$	$0,69 \pm 1,32$
Początkowa szybkość adsorpcji Initial adsorption rate γ -dekalakton [$\text{g}/(\text{adsorbent} [\text{g}]$ $\times \text{min})$ γ -decalactone [$\text{g}/(\text{adsorbent} [\text{g}]$ $\times \text{min})$	$4,365 \times 10^{-3}$	$1,535 \times 10^{-3}$	$1,735 \times 10^{-3}$	$2,28 \times 10^{-3}$

Potwierdzono, że po 4 dniach biotransformacji wyższe (ok. 2,8-krotnie) tempo adsorpcji GDL wykazywał Amberlit XAD-4 (tab. 2). Tendencja ta była odwrotna w podłożach po 7 dniach biotransformacji, w których początkowa szybkość adsorpcji była większa w próbach z wermikulitem (ok. 1,3-krotnie). Do wyższej początkowej szybkości adsorpcji na wermikulicie w podłożu z 7. dnia biotransformacji przyczynił się znaczący wzrost stężenia laktonu w supernatancie. Wydłużenie biotransformacji skutkowało bowiem ponad 2-krotnie większym stężeniem GDL w tym podłożu, co miało z całą pewnością wpływ na bardziej efektywny przebieg procesu adsorpcji.

Amberlit XAD-4 i wermikulit testowano także pod względem desorpcji GDL. W każdym z 3 przeprowadzonych cykli ekstrakcji γ -dekalakton desorbował się z powierzchni adsorbenta. Najwięcej laktonu wyodrębniano w pierwszym cyklu ekstrakcji. Desorpcja z adsorbentów użytych w podłożach z 4-dniowych reakcji biotransformacji przebiegała efektywniej w stosunku do adsorbentów z podłoży po 7-dniowej biotransformacji (rys. 3). W przypadku tych pierwszych poziom zdesorbowanego laktonu wynosił ok. 61 ± 14 % w próbkach z Amberlitem XAD-4 oraz 37 ± 6 % – z wermikulitem. W podłożach po 7 dniach biotransformacji stężenie laktonu wyekstrahowanego z powierzchni Amberlitu XAD-4 oraz wermikulitu wynosiło odpowiednio: 42 ± 12 % oraz 25 ± 5 %.



Rys. 3. Desorpcja γ -dekalaktonu z Amberlitu XAD-4 i wermikulitu przy zastosowaniu trzech cykli ekstrakcji

Fig. 3. Desorption of γ -decalactone from Amberlite XAD-4 and vermiculite using three extraction cycles

Niższe stężenie zdesorbowanego po 7 dniach biotransformacji laktonu z adsorbentów stosowanych w podłożach może być potwierdzeniem obecności na adsorbentach również innych molekuł, które ograniczają zarówno zdolności adsorpcyjne, jak i desorpcyjne laktonu. Luboch i wsp. [23] zwracają bowiem uwagę, że adsorpcja nie przebiega na całej powierzchni adsorbenta; z reguły czynna jest tylko część powierzchni, tzw. centra aktywne. Niekiedy stwierdza się istnienie kilku centrów zdolnych do selektywnego oddziaływania z określonymi molekułami chemicznymi. Zjawiska tego typu odgrywają kluczową rolę w procesach adsorpcyjno-desorpcyjnych.

Wnioski

1. Gamma-dekalakton można wydzielać z podłoży biotransformacyjnych, bazując na zjawisku adsorpcji.
2. Wydzielanie γ -dekalaktonu z podłoży biotransformacyjnych po 4 dniach reakcji przebiegało z porównywalną skutecznością, jak z roztworów modelowych. Po 10 min od wprowadzenia adsorbenta do środowiska reakcji możliwe było zaadsorbowanie ok. 61 ± 3 % laktonu przy zastosowaniu Amberlitu XAD-4 i ok. 33 ± 4 % przy użyciu wermikulitu.
3. Spośród dwóch badanych adsorbentów: Amberlitu XAD-4 i wermikulitu, skuteczniejszym w adsorpcji laktonu z podłoża biotransformacyjnego w okresie fazy wzrostu logarytmicznego drożdży (4. dzień hodowli) był Amberlit XAD-4. Początkowa szybkość adsorpcji GDL z zastosowaniem tego adsorbenta wynosiła $4,365 \times 10^{-3}$ g GDL/g adsorbenta/min i była ok. 2,8-krotnie wyższa względem wermikulitu.
4. Wydłużenie czasu biotransformacji (do 7 dni) może przyczyniać się do zmniejszenia efektywności adsorpcji GDL. Zależność tę zaobserwowano po zastosowaniu Amberlitu XAD-4. Wzrost w podłożu stężenia produktów metabolizmu drożdży, a także kwasu rycynolowego, będącego produktem hydrolizy oleju rycynowego (substratu biotransformacji), może przyczyniać się do częściowej adsorpcji tych związków na porowatej strukturze adsorbenta i zmniejszać wydajność adsorpcji.
5. Stosowane adsorbenty charakteryzowały się zdolnościami desorpcyjnymi. W każdym z trzech przeprowadzonych cykli ekstrakcji γ -dekalakton desorbował się z powierzchni adsorbentów. Desorpcja z adsorbentów użytych w podłożach z 4-dniowych reakcji biotransformacji przebiegała efektywniej w stosunku do adsorbentów z podłoży po 7-dniowej biotransformacji. W przypadku tych pierwszych poziom zdesorbowanego laktonu wynosił ok. 61 ± 14 % dla Amberlitu XAD-4 oraz 37 ± 6 % dla wermikulitu. W podłożach po 7 dniach biotransformacji stężenie laktonu wyekstrahowanego z powierzchni adsorbenta wynosiło 42 ± 12 % dla Amberlitu XAD-4 oraz 25 ± 5 % dla wermikulitu.

Literatura

- [1] Alchihab M., Destain J., Aguedo M., Majad L., Ghalfi H., Wathelet J.P., Thonart P.: Production of gamma-decalactone by a psychrophilic and a mesophilic strain of the yeast *Rhodotorula aurantiaca*. Appl. Biochem. Biotechnol., 2009, 158 (1), 41-50.
- [2] Alchihab M., Aldric J.M., Aguedo M., Destain J., Wathelet J.P., Thonart P.: The use of macronet resins to recover γ -decalactone produced by *Rhodotorula aurantiaca* from the culture broth. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., 2010, 37, 167-172.
- [3] Alchihab M., Destain J., Aguedo M., Wathelet J.P., Thonart P.: The utilization of gum tragacanth to improve the growth of *Rhodotorula aurantiaca* and the production of γ -decalactone in large scale. Appl. Biochem. Biotechnol., 2010, 162, 233-241.
- [4] Blin-Perrin C., Molle D., Duffose L., Le-Quere J.L., Viel C., Mauvais G., Feron G.: Metabolism of ricinoleic acid into γ -decalactone: β -oxidation and long chain acyl intermedtaies of ricinoleic acid in the genus *Sporidiobolus* sp. FEMS Microbiol. Lett., 2000, 188, 69-74.
- [5] Bluemke W., Schrader J.: Integrated bioprocess for enhanced production of natural flavors and fragrances by *Ceratocystis moniliformis*. Biomol. Eng., 2001, 17, 137-142.
- [6] Braga A., Belo I.: Production of γ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*: Insights into experimental conditions and operating mode optimization. J. Chem. Technol. Biotechnol., 2015, 90, 559-565.
- [7] Burdock G.A.: Fenaroli's Handbook of Flavor Ingredients. 6th ed. CRC Press, Boca Raton 2009.
- [8] Cossy J., Bargiggia F., Bouz S.: Tandem cross-metathesis/hydrogenation/cyclization reactions by using compatible catalysts. Org. Lett., 2003, 5, 459-462.
- [9] Diban N., Ruiz G., Urtiaga A., Ortiz I.: Granular activated carbon for the recovery of the main pear aroma compound: Viability and kinetic modelling of ethyl-2,4-decadienoate adsorption. J. Food Eng., 2007, 78, 1259-1266.
- [10] Dufossé L., Feron G., Mauvais G., Bonnairme P., Durand A., Spinnler H.: Production of gamma-decalactone and 4-hydroxydecanoic acid in the genus *Sporidiobolus*. J. Ferment. Bioeng., 1998, 86, 169-173.
- [11] Endrizzi A., Awade A.C., Belin J.M.: Presumptive involvement of methyl ricinoleate β -oxidation in the production of γ -decalactone by the yeast *Pichia guilliermondii*. FEMS Microbiol. Lett., 1993, 114 (2), 153-159.
- [12] Fickers P., Benetti P.H., Waché Y., Marty A., Mauersberger S., Smit M.S., Nicaud J.M.: Hydrophobic substrate utilisation by the yeast *Yarrowia lipolytica*, and its potential applications. FEMS Yeast Res., 2005, 5, 527-543.
- [13] Gawdzik B., Kamizela A., Szyszkowska A.: Laktony o właściwościach sensorycznych. Chemik, 2015, 69 (6), 342-349.
- [14] Gopinath M., Vijayakumar L., Dhanasekar R., Viruthagiri T.: Microbial biosynthesis of γ -decalactone and its applications – a review. Glob. J. Biotechnol. Biochem., 2008, 3 (2), 60-68.
- [15] Gomes N., Braga A., Teixeira J.A., Belo I.: Impact of lipase mediated hydrolysis of castor oil on γ -decalactone production by *Yarrowia lipolytica*. J. Am. Oil Chem. Soc., 2013, 90, 1131-1137.
- [16] Guan S., Rong S., Wang M., Cai B., Li Q.: Enhanced biotransformation productivity of gamma-decalactone from ricinoleic acid based on the expanded vermiculite delivery system. J. Microbiol. Biotechnol., 2019, 29 (7), 1071-1077.
- [17] Ismadji S., Bhatia S.K.: Adsorption of flavour esters on granular activated carbon. Can. J. Chem. Eng., 2000, 78, 892-901.
- [18] Krzyczkowska J., Białecka-Florjańczyk E., Stolarzewicz I.: Biotechnologiczne metody otrzymywania substancji zapachowych. Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2009, 3 (64), 5-18.
- [19] Lee S.L., Lin S.J., Chou C.C.: Production of γ -decalactone by *Sporobolomyces odoris* in jar fermentors as affected by pH, aeration and fed-batch technique. J. Ferment. Bioeng., 1995, 80 (2), 195-199.

- [20] Lee S.L., Cheng H.Y., Chen W.C., Chou C.C.: Production of γ -decalactone from ricinoleic acid by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. *Process Biochem.*, 1998, 33 (4), 453-459.
- [21] Lee S.L., Cheng H.Y., Chen W.C., Chou C.C.: Effect of physical factors on the production of γ -decalactone by immobilized cells of *Sporidiobolus salmonicolor*. *Process Biochem.*, 1999, 34, 845-850.
- [22] Li A., Zhang Q., Chen J., Fei Z., Long C., Li W.: Adsorption of phenolic compounds on Amberlite XAD-4 and its acetylated derivative MX-4. *React. Funct. Polym.*, 2001, 49 (3), 225-233.
- [23] Luboch E., Wagner-Wysiecka E., Jamrógiewicz M., Szczygelska-Tao J., Biernat J.: Determination of the chemical structure of potential organic impurities occurring in the drug substance opipramol. *Pharmazie*, 2010, 65 (4), 239-244.
- [24] Medeiros A.B.P., Pandey A., Vandenberghe L.P.S., Pastore G.M., Soccol C.R.: Production and recovery of aroma compounds produced by solid-state fermentation using different adsorbents. *Food Technol. Biotechnol.*, 2006, 44 (1), 47-51.
- [25] Mouzdahir Y.E., Elmchaouri A., Mahboub R., Korili S.A.: Synthesis of nano-layered vermiculite of low density by thermal treatment. *Powder Technol.*, 2009, 189, 2-5.
- [26] Waché Y., Aguedo M., Choquet A., Gatfield I.L., Nicaud J.-M., Belin J.M.: Role of β -oxidation enzymes in γ -decalactone production by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 2001, 67 (12), 5700-5704.
- [27] Waché Y., Aguedo M., LeDall M.T., Nicaud J.-M., Belin J.M.: Optimization of *Yarrowia lipolytica*'s β -oxidation pathway for γ -decalactone production. *J. Mol. Catal. B – Enzym.*, 2002, 19 (20), 347-351.
- [28] Wache Y., Aguedo M., Nicaud J.M., Belin J.M.: Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2003, 61 (5), 393-404.
- [29] Zope D.D., Patnekar S.G., Kanetkar V.R.: Novel synthesis of flavour quality γ -lactones. *Flavour Frag. J.*, 2006, 21 (3), 395-399.
- [30] Xu Z., Zhang Q., Chen J., Wang L., Anderson G.K.: Adsorption of naphthalene derivatives on hypercrosslinked polymeric adsorbent. *Chemosphere*, 1999, 38 (9), 2003-2011.

APPLYING SOME SELECTED ADSORBENTS TO SEPARATE GAMMA-DECALACTONE PRODUCED BY *YARROWIA LIPOLYTICA* FROM CULTURE BROTH

S u m m a r y

Gamma-decalactone (GDL) is a cyclic ester with an intense peach-oil smell, detectable at a concentration below 5 mg/dm³. This compound is applied in the food industry to give appropriate organoleptic properties to products such as: beverages, bakery products, desserts, sweets or chewing gums. GDL comes under the GRAS status (*Generally Recognized As Safe*) and it is considered to be a safe food additive. Lactone can be produced using chemical or biotechnological methods. The increasing consumer awareness and the current trend towards bio-products contribute to the popularisation of biotechnological synthesis of the γ -decalactone. A difficulty in the production of GDL with the participation of microorganisms is its separation from the biotransformation medium, which is a mixture of metabolites of microorganisms and an unreacted lipid substrate (ricinoleic acid).

The objective of the research study was an attempt to separate through adsorption the γ -decalactone (GDL) from biotransformation media, where a substrate was castor oil transformed into a fragrant compound by the *Yarrowia lipolytica* yeast. The adsorption efficiency was analysed with the use of two adsorbents: Amberlite XAD-4 and vermiculite. Of the two adsorbents tested, more effective when adsorbing

lactone from the media, during the logarithmic growth phase of yeast (the 4th day of biotransformation), was Amberlite XAD-4. Circa 61 ± 3 % of lactone could be absorbed 10 minutes after the adsorbent had been introduced into the reaction medium. The initial GDL adsorption rate on the Amberlite XAD-4 was 4.365×10^{-3} g GDL/g adsorbent/min and it was about 2.8 times higher than that on the vermiculite. The extension of biotransformation time (up to 7 days) resulted in the decrease in the adsorption efficiency.

Key words: γ -decalactone, adsorption, Amberlite XAD-4, vermiculite, *Yarrowia lipolytica* 