

Piotr JUSZCZYK, Agata DWOJAK, Anita RYWIŃSKA, Waldemar RYMOWICZ

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

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

Produkcja erytrytoli z glicerolu odpadowego przez drożdże *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 w bioreaktorze membranowym

Wstęp

W ostatnich latach wzrosło zainteresowanie przemysłu spożywczego alkoholami wielowodorotlenowymi (poliolami) takimi jak: erytrytol czy mannitol, ze względu na ich szereg unikatowych właściwości. Erytrytol jest związkiem niskokalorycznym (wartość energetyczna wynosi $\leq 0,2$ kcal/g), posiada umiarkowaną słodycz (60÷80% słodkości sacharozy) i może z powodzeniem zastąpić w produktach spożywczych sacharozę. Właściwości te stały się głównym bodźcem do prowadzenia badań nad wydajną i opłacalną produkcją tej substancji na drodze mikrobiologicznej z użyciem drożdży *Yarrowia lipolytica* i glicerolu odpadowego, jako substratu, pochodzącego z produkcji estrów metylowych wyższych kwasów tłuszczowych.

Badania koncentrują się nie tylko na izolacji szczepów i ich genetycznym ulepszaniu [Musiał i in., 2011; Rywińska i in., 2012a], ale także nad optymalizacją składu podłoża produkcyjnego oraz warunków hodowli [Marcinkiewicz i in., 2012; Rywińska i in. 2012b].

W mikrobiologicznej produkcji erytrytoli zastosowano różne systemy hodowlane takie jak: okresowe, okresowe zasilane, lub okresowe powtórzeniowe, które pozwoliły przy niewielkiej ilości produktów ubocznych na wydajną produkcję erytrytoli [Rymowicz i in., 2009]. Jednak hodowle okresowe nie pozwalają na pełne wykorzystanie potencjału produkcyjnego komórek mikroorganizmów. Wydaje się, że hodowla ciągła w bioreaktorze membranowym, w której zachodzi ciągła recyrkulacja komórek, poprzez zastosowanie modułów membranowych, pozwoli na lepsze wykorzystanie potencjału produkcyjnego nierosnących komórek.

Celem niniejszej pracy była ocena przydatności bioreaktora membranowego w procesie ciągłej produkcji erytrytoli przez drożdże *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 w podłożach, zawierających różne stężenia glicerolu odpadowego.

Materiały i metody

Mikroorganizm. Przedmiotem badań był mutant octanowy (oct) drożdży *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 o gładkim fenotypie kolonii (fil). Szczep pochodził z kolekcji własnej Katedry Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności Uniwersytetu Przyrodniczego we Wrocławiu. Drożdże przechowywano na skosach agarowych YM w temperaturze +4°C.

Substrat. W pracy jako źródło węgla i energii stosowano glicerynę kosmetyczną 99,5% (POCH) oraz glicerynę surową pochodzącą z produkcji biodiesla (rafineria Lotos S.A, Polska) zawierającą 760g/l glicerolu i 73 g/l NaCl.

Techniki prowadzenia hodowli

Hodowle inokulacyjne prowadzono w 300 ml kolbach stożkowych zawierających 100 ml podłoża inokulacyjnego YMG (g/l): glicerol-50, pepton bakteriologiczny-5, ekstrakt drożdżowy-3, ekstrakt maltozowy-3) na wstrząsarce rotacyjnej (Centromat IS, Sartorius) przez 72 godziny przy obrotach 140 rpm i w temperaturze 30°C. Tak przygotowane hodowle drożdży, w ilości 200 ml, stanowiły inokulum dla hodowli prowadzonych w bioreaktorach.

Hodowle produkcyjne prowadzono w 5-litrowym bioreaktorze BIOSTAT B Plus (Sartorius) w objętości roboczej 2 l, przy szybkości przepływu powietrza 0,6 vvm, szybkości obrotowej mieszadła 800 rpm i w temperaturze 30°C. W czasie procesu, pH 3,0 utrzymy-

wano automatycznie za pomocą 20% NaOH. Hodowle biomasy drożdży prowadzono metodą okresową w podłożu o składzie (g/l): gliceryna kosmetyczna – 70, ekstrakt drożdżowy-1, (NH₄)₂SO₄ – 3, KH₂PO₄ – 0,25, MgSO₄ x 7 H₂O – 1, NaCl – 25. Po wyczerpaniu substratu w podłożu, do bioreaktora wprowadzano różne podłoża zasilające ze stałą szybkością (14 ml/h). Permeat odbierano również w sposób ciągły z taką samą szybkością. Stosowano trzy podłoża zasilające zawierające (g/l): NaCl – 25; ekstrakt drożdżowy; gliceryna – 100 (PP1), 150 (PP2) i 200 (PP3). Wartość szybkości rozcieńczenia wynosiła $D = 0,007 \text{ h}^{-1}$. Do hodowli ciągłej zastosowano zewnętrzny, spiralny moduł membranowy Cell-Free Sampling (Bio-engineering) do ciągłego zawracania komórek drożdży do bioreaktora.

Pomiar ogólnej liczby komórek, liczby komórek pączkujących i martwych

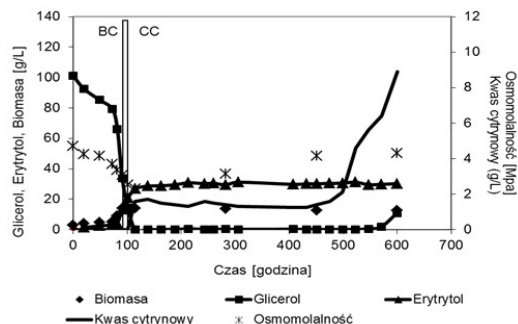
W próbach pobieranych w trakcie hodowli oznaczano ogólną liczbę komórek oraz liczbę komórek pączkujących. Oznaczenia wykonano w komorze Thoma. Liczbę komórek pączkujących odnoszono do ogólnej liczby komórek. Wyniki podano w procentach. Komórki martwe oznaczano w preparatach barwionych błękitem metylenowym (1:10000). Liczono komórki ciemnogranatowe w stosunku do ogólnej liczby komórek. Wyniki podano w procentach.

Metody analityczne

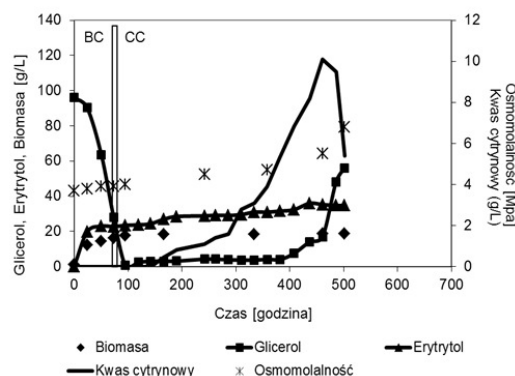
Biomasę drożdży oznaczano metodą wagową. Zawartość białka w biomacie drożdży oznaczano metodą Kjeldahla w aparacie Kjeltec 2400. Stężenia glicerolu resztkowego, erytrytoli, mannitolu, arabitolu, kwasu α -ketoglutarynowego oraz kwasu cytrynowego oznaczono metodą HPLC na kolumnie HyperRez XP H⁺ (Dionex, Ultimate 3000 Series) połączonej z detektorem UV ($\lambda = 210 \text{ nm}$) oraz IR. Analizy wykonano w temperaturze 65°C przy szybkości przepływu fazy ruchomej przez kolumnę 0,6 ml/min. Fazę ruchomą stanowił 25 mM kwas trifluorooctowy. W płynie pohodowlanym oznaczono osmotalność (mOsMol/kg) za pomocą osmometru Os 3000 (Marcell, Polska). Otrzymane wyniki przeliczono na ciśnienie osmotyczne wyrażone w MPa [Janáček i Sigler, 1996].

Wyniki

Proces produkcji erytrytoli w podłożu zasilającym zawierającym 100 g/l glicerolu surowego, przedstawiono na Rys. 1. Proces ciągły rozpoczęto w 102 godzinie hodowli, przy stężeniu biomasy i erytrytoli na poziomie odpowiednio 14,1 i 20,7 g/l. Podłoże PP1 było dozowane w sposób ciągły przez 498 godzin. W tych warunkach plon biomasy uległ nieznacznemu obniżeniu z 14,1 do 11,9 g/l, a stężenie erytrytoli kształtowało się na poziomie 26,5 – 31,2 g/l. Użyty szczep drożdży produkował nieznaczne ilości produktów ubocznych: mannitolu, arabitolu i kwasu α – ketoglutarynowego jednak ich ilość nie przekraczała 2 g/l (dane nieprezentowane). Stężenie kwasu cytrynowego początkowo kształtowało się na poziomie 1,25 – 1,7 g/l, jednakże w czasie trwania procesu obserwowano stały przyrost jego ilości do 8,9 g/l na końcu hodowli (Rys. 1). Analizując przebieg hodowli zauważono wzrost ciśnienia osmotycznego w czasie procesu fermentacji z 2,45 na początku do 4,3 MPa na końcu hodowli (Rys. 1). Hodowlę ciągłą z użyciem podłoża zasilającego zawierającego 150 g/l glicerolu surowego, rozpoczęto w 95 godzinie procesu periodycznego, przy stężeniu biomasy i erytrytoli odpowiednio, 17,6 i 23,5 g/l (Rys. 2).



Rys. 1. Przebieg ciągłej biosyntezy erytrytoli w reaktorze membranowym z glicerolu odpadowego (100 g/L) przez drożdże *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 (szybkość rozcieńczania $D = 0,007 \text{ h}^{-1}$)

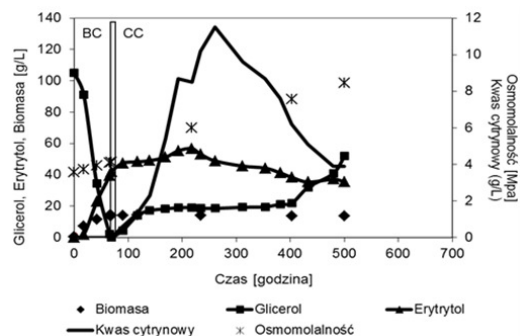


Rys. 2. Przebieg ciągłej biosyntezy erytrytoli w reaktorze membranowym z glicerolu odpadowego (150 g/L) przez drożdże *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 (szybkość rozcieńczania $D = 0,007 \text{ h}^{-1}$)

Proces był kontynuowany przez kolejne 407 h. W hodowli ciągłej stężenie erytrytoli wzrastało osiągając maksymalną wartość 36 g/l w 437 godzinie procesu. W kolejnych godzinach procesu ilość erytrytoli uległa nieznacznemu obniżeniu do poziomu 34,7 g/l (Rys. 2).

Plon biomasy w czasie całego procesu kształtował się na poziomie 18,0 g/l. W 408 godzinie hodowli zaobserwowano wzrost stężenia glicerolu w permeacie do wartości 7,5 g/l. Proces przerwano, gdy w strumieniu wypływającym stężenie substratu osiągnęło 56 g/l. W hodowli zasilanej podłożem PP2 stwierdzono obecność produktów ubocznych, takich jak mannitol, kwas α – ketoglutarynowy oraz kwas cytrynowy, jednak ich ilość nie przekraczała 1 g/l (dane nieprezentowane). Głównym produktem ubocznym, którego biosynteza rozpoczęła się w 166 godzinie procesu, był kwas cytrynowy (Rys. 2). W pobranych próbkach obserwowano również wzrost ciśnienia osmotycznego z 4,5 do 6,8 MPa w momencie zakończenia procesu.

Proces produkcji erytrytoli w podłożu PP3, zawierającym 200 g/l glicerolu surowego, przedstawiono na Rys. 3. Proces ciągły rozpoczęto w 66 godzinie przy stężeniu biomasy i erytrytoli odpowiednio na poziomie, 14,2 i 39,4 g/l. Proces ciągły prowadzono do 434 godziny. Ilość biomasy w trakcie całego procesu uległa obniżeniu z 14,2 do 10,8 g/l w ostatniej godzinie hodowli. Stężenie erytrytoli wzrastało do 218 godziny hodowli ciągłej i wynosiło maksymalnie 56,8 g/l, a następnie obniżało się do wartości 35,4 g/l na końcu procesu. Substrat resztkowy w strumieniu wypływającym pozostawał na poziomie około 20 g/l do 403 godziny procesu, jednak w kolejnych godzinach hodowli, ilość glicerynu wzrastała osiągając 52 g/l na końcu hodowli. W trakcie biosyntezy erytrytoli w podłożu PP3 drożdże produkowały śladowe ilości mannitolu, arabitolu oraz kwasu α – ketoglutarynowego (dane nieprezentowane). Stężenie kwasu cytrynowego, wzrastało do wartości 11,5 g/l w 261 godzinie, a następnie jego ilość stopniowo zmniejszała się osiągając poziom 3,9 g/l w ostatniej godzinie procesu. Wartość ciśnienia osmotycznego systematycznie rosła do wartości 8,5 MPa w momencie zakończenia hodowli (Rys. 3). Skład podłoża zasilającego miał istotny wpływ na dynamikę produkcji erytrytoli z glicerolu odpadowego co przedstawiono w tab. 1.



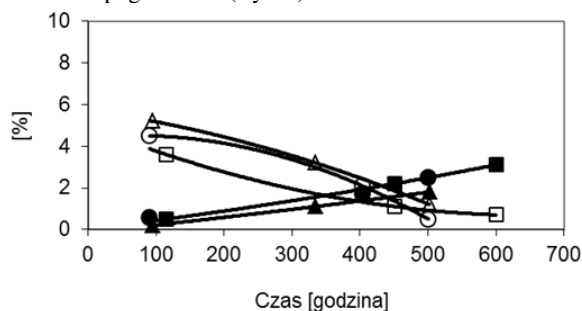
Rys. 3. Przebieg ciągłej biosyntezy erytrytoli w reaktorze membranowym z glicerolu odpadowego (200 g/L) przez drożdże *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1 (szybkość rozcieńczania $D = 0,007 \text{ h}^{-1}$)

Stężenie glicerolu w podłożu zasilającym miało także wpływ na zawartość białka w komórkach drożdży (Tab. 1). Stężenie białka w komórkach drożdży obniżała się wraz ze wzrostem stężenia glicerolu surowego w dozowanym podłożu z 33,4 do 31,7 %. Najwyższą zawartość białka w biomacie drożdży, 33,4 % oznaczono w komórkach, które prowadziły proces produkcji erytrytoli w podłożu zasilającym zawierającym 100 g/l substratu.

Tab. 1. Wpływ stężenia glicerolu w podłożu zasilającym na zawartość białka w biomacie drożdży oraz na parametry procesu produkcji erytrytoli

Podłoże zasilające	Q_{ERY} [g/lh]	q_{ERY} [g/g h]	Y_{ERY} [g/g]	Białko [%]
PP1	0,20	0,016	0,30	33,4
PP2	0,21	0,012	0,21	32,1
PP3	0,28	0,024	0,23	31,7

Stan fizjologiczny komórek drożdży w czasie długoterminowego procesu ciągłego w reaktorze membranowym (500÷600 h) ulegał nieznacznemu pogorszeniu (Rys. 4).



Rys. 4. Wpływ stężenia glicerolu w podłożu zasilającym na ilość komórek pączkujących (□) i martwych (■) 100 g/l, (Δ, ▲) 150 g/l (○, ●) 200 g/l w biomacie drożdży *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1

Dyskusja wyników

W przeprowadzonych badaniach wykonano trzy hodowle ciągłe z recyrkulacją biomasy drożdży przy dozowaniu podłoża o różnym stężeniu glicerynu, odpowiednio 100, 150 i 200 g/l i szybkości rozcieńczania $D = 0,007 \text{ h}^{-1}$. Oceniano wpływ stężenia glicerolu w podłożu zasilającym na dynamikę i wydajność procesu produkcji erytrytoli z glicerynu surowego przez drożdże *Y. lipolytica* Wratislavia K1. Najwyższe stężenie erytrytoli w permeacie (56,8 g/l) uzyskano stosując podłoże zasilające o stężeniu substratu 200 g/l.

W hodowlach okresowych z zastosowaniem drożdży *Y. lipolytica* i glicerynu odpadowego, Tomaszewska i in. [2012] oraz Rywińska i in. [2012a], uzyskiwali podobne ilości produktu od 59,8 do 71,0 g/l. W innych badaniach zastosowanie hodowli okresowych zasilanych pozwoliło na uzyskanie stężeń erytrytoli powyżej 100 g/l [Tomaszewska i in., 2012; 2014; Rywińska i in., 2013].

Najważniejsze parametry opisujące proces biotechnologiczny to wydajność produkcji oraz produktywność (objętościowa szybkość

produkcji). Najwyższą jak dotąd wydajność produkcji erytrytoli z glukozy (0,63 g/g) otrzymano w hodowli z udziałem szczepu *Moniliella* sp. 440 N61188-12 [Lin i in., 2010]. Równie wysoką (0,62 g/g) wydajność produkcji erytrytoli, ale z glicerolu kosmetycznego otrzymali Tomaszewska i in. [2014], stosując hodowlę okresową z zasilaniem. Otrzymane w dyskutowanej pracy wartości wydajności procesu produkcji erytrytoli były znacznie niższe i wynosiły (0,21÷0,30 g/g). Wyższą wydajność procesu dla szczepu Wratislavia K1 na poziomie około 0,5 g/g otrzymano w hodowlach okresowych [Tomaszewska i in. 2012; Marcinkiewicz i in., 2012].

W badaniach własnych najwyższą produktywność produkcji erytrytoli ($Q_{ERY} = 0,28$ g/lh) uzyskano w podłożu o zawartości gliceryny 200 g/l. Według Tomaszewska i in. 2014, w hodowlach okresowych z zasilaniem wykorzystując pożywkę z gliceryną szczep Wratislavia K1 wykazywał szybkość produkcji równą 1,46 g/lh. Z kolei w innych badaniach w hodowli z udziałem *Torula* sp. odnotowano znacznie wyższą produktywność erytrytoli, wynoszącą 2,26 g/lh [Oh i in., 2001] oraz 2,0 g/lh w hodowli szczepu *Aureobasidium* sp. SN-G42 [Sawada i in., 2009].

Badania nad procesem biosyntezy erytrytoli z glicerolu przez drożdże *Y. lipolytica* Wratislavia K1 wykazały, że produkowane były także produkty uboczne, głównie mannitol, arabitol, kwas cytrynowy i α -ketoglutaryny. Powstawanie polioli, w tym erytrytoli jest odpowiedzią komórki na stres osmotyczny, który w badaniach własnych indukowano poprzez dodatek NaCl do podłoża hodowlanego. W dyskutowanej pracy wykazano, że wzrost stężenia glicerolu w podłożu dozowanym (100÷200 g/l) powodował wzrost ciśnienia osmotycznego w permeacie (od 4,3 do 8,5 MPa) co spowodowało wzrost stężenia erytrytoli.

Wyniki własne są zbieżne ze spostrzeżeniami innych autorów dotyczących zależności pomiędzy ciśnieniem osmotycznym, a produkcją erytrytoli. Kim i in. [1997] wykazali, że wzrost ciśnienia osmotycznego ma pozytywny wpływ na zwiększenie dynamiki i wydajności procesu biosyntezy erytrytoli z glukozy przez *Trigonopsis variabilis*. Potwierdzają to również badania przeprowadzone przez Rymowicza i in. [2009] oraz Tomaszewskiej i in. [2014] z udziałem różnych szczepów drożdży z gatunku *Y. lipolytica* i glicerolu, jako substratu. Uzyskane w badaniach własnych ilości produktów ubocznych nie były znaczne (poniżej 5 g/l). Jednakże, maksymalne stężenie kwasu cytrynowego w trakcie hodowli kształtowało się na poziomie około 10 g/l, co jak sugerują autorzy tematycznych prac związanych z produkcją kwasu cytrynowego jest związane z deficytem źródła azotu. W długoterminowych procesach ciągłych, szczególnie z wykorzystaniem bioreaktora membranowego, maksymalna szybkość produkcji metabolitu utrzymywana jest przez mikroorganizmy nierosnące. Podczas ciągłej produkcji w warunkach limitacji azotowej w komórkach zachodzą zmiany, które mogą negatywnie wpływać na proces [Rymowicz i Rywińska, 2003].

Potwierdzają to także badania przeprowadzone przez Kim i Roberts [1991], w których wykazano, że w procesie biosyntezy kwasu cytrynowego z udziałem nierosnących komórek drożdży, konieczne jest dostarczanie źródła azotu w celu zabezpieczenia żywotności komórek oraz jej prawidłowego funkcjonowania. W niniejszej pracy w końcowej fazie procesu drożdże zawierały od 31,7 do 33,4% białka w suchej masie, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi przez Rywińską i in. [2013], podczas produkcji kwasu cytrynowego w procesie ciągłym w chemostacie w podłożu z glicerolem. Zdecydowanie niższe stężenie białka w biomacie drożdży (na poziomie 20%) zaobserwowali Rymowicz i Rywińska [2003] prowadząc produkcję kwasu cytrynowego w reaktorze membranowym.

Wnioski

Wstępne badania nad ciągłą biosyntezą erytrytoli z gliceryny przez szczep *Y. lipolytica* Wratislavia K1 w reaktorze membranowym pozwalają na stwierdzenie, że stężenie glicerolu odpadowego w podłożu zasilającym miało wpływ na dynamikę produkcji erytrytoli.

LITERATURA

- Janáček K., Sigler K., 1996. Osmotic pressure: thermodynamic basis and units of measurement. *Folia Microbiologica*, **41**(1), 2-9. DOI: 10.1007/BF02816331
- Lin S.J., Wen 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. *Proc. Biochem.*, **45**(6), 973-979. DOI: 10.1016/j.procbio.2010.03.003
- Kim S.Y., Lee J.H., Kim J.H., Oh D.K., 1997. Erythritol production by controlling osmotic pressure *Trigonopsis variabilis*. *Biotechnol. Lett.*, **19**(8), 727-729. DOI 10.1023/A:1018371722456
- Kim E.K., Roberts R.S., 1991. Rate equations for the vigorous stationary phase fermentation of citric acid by *Saccharomycopsis lipolytica*. *Biotechnol. Bioeng.*, **37**, 985-988. DOI: 10.1002/bit.260371014
- Marcinkiewicz M., Juszczak P., Rywińska A., Rymowicz W., 2012. Wpływ warunków hodowli drożdży *Yarrowia lipolytica* na wydajność syntezy erytrytoli z glicerolu. *Nauki Inż. Techn.*, **3**(6), 90-98
- 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. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 248-252. DOI: 10.1038/sj.jim.7000122
- Rymowicz W., Rywińska A., 2003. Ciągła produkcja kwasu cytrynowego z syropu glukozowego przez mutant *Yarrowia lipolytica* w reaktorze membranowym. *Acta Scient. Polon., Biotechnol.*, **2**(1-2), 21-30
- Rymowicz W., Rywińska A., Marcinkiewicz M. 2009. High-yield production of erythritol from raw glycerol in fed-batch cultures of *Yarrowia lipolytica*. *Biotech. Lett.*, **31**, 377-380. DOI: 10.1007/s10529-008-9884-1
- Rywińska A., Bąk M., Rakicka M., Tomaszewska L., Boruczkowski T., Lazar Z., Musiał I., Rymowicz W., 2012a. Selekcja UV mutantów drożdży *Yarrowia lipolytica* do biosyntezy erytrytoli z glicerolu. *Acta Scient. Polon. Biotechnol.*, **11**(3), 23-38
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Musiał I., 2004. Charakterystyka stanu fizjologicznego mutantów *Yarrowia lipolytica* podczas ciągłej biosyntezy kwasu cytrynowego z syropu glukozowego w reaktorze membranowym. *Acta Scientiarum Polonorum Biotechnologia*, **3**(1-2), 85-95.
- Rywińska A., Rymowicz W., Żarowska B., Skrzypiński A., 2010. Comparison of citric acid production from glycerol and glucose by different strains of *Yarrowia lipolytica*. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **26**, 1217-1224. DOI: 10.1007/s11274-009-0291-0
- Rywińska A., Tomaszewska L., Cybulski K., Rymowicz W., 2013. Biosynteza erytrytoli z glicerolu przez szczep *Yarrowia lipolytica* Wratislavia K1-UV21 w różnych systemach hodowlanych. *Acta Scient. Polon. Biotechnol.*, **12**(1), 37-50
- Rywińska A., Tomaszewska L., Marcinkiewicz M., Rymowicz W., 2012b. Biosynteza erytrytoli z glicerolu przez *Yarrowia lipolytica* Wratislavia 1.31. *Inż. Ap. Chem.*, **51**, nr 4, 179-181
- Sawada K., Taki A., Yamakawa T., Seki M., 2009. Key role for transketolase activity in erythritol production by *Trichosporonoides megachiliensis* SNG42. *J. Biosci. Bioen.*, **108**, 385-390. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2009.05.008
- 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
- Tomaszewska L., Rywińska A., Rymowicz W., 2014. High selectivity of erythritol production from glycerol by *Yarrowia lipolytica*. *Biomass Bioen.*, **64**, 309-320. DOI: 10.1016/j.biombioe.2014.03.005

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