

## Sposób wytwarzania 2-fenyletanolu

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 2-fenyletanolu z wykorzystaniem oleju rzepakowego do *in situ* wydzielania produktu 2-fenyletanolu (ang. 2-phenylethanol, 2-PE) z hodowli w trakcie biotechnologicznego procesu wytwarzania 2-PE z udziałem drożdży.

2-PE to aromatyczny alkohol o różnym zapachu o szerokim spektrum zastosowania (głównie w przemyśle spożywczym, perfumeryjnym i kosmetycznym). Na skalę przemysłową, 2-PE można otrzymać poprzez ekstrakcję z płatków róży lub na drodze syntezy chemicznej, jednak tylko 2-PE uzyskany w wyniku ekstrakcji ze źródeł naturalnych posiada status produktu naturalnego i może stanowić dodatek np. do żywności. Ponieważ ekstrakcja z płatków róż jest bardzo kosztowna, a synteza chemiczna generuje toksyczne odpady, potrzebne są alternatywne sposoby produkcji 2-PE. Obiecującym rozwiązaniem może być wykorzystanie procesów biotechnologicznych w celu uzyskania 2-PE, który będzie spełniać kryteria dla produktu naturalnego, zgodnie z prawodawstwem europejskim i światowym. Produkcja tego związku z wykorzystaniem drożdży, jako katalizatora, jest alternatywną metodą do ekstrakcji z płatków kwiatów. Pozwala ona nie tylko na otrzymanie naturalnego aromatu, ale i produktu o konkurencyjnej cenie.

Powszechnie wiadomo, że drożdże mogą metabolizować L-fenylalaninę (ang. *L-phenylalanine*; L-Phe) z wytworzeniem 2-PE, jednak stężenie 2-PE w granicach powyżej 2 g/L jest toksyczne dla wzrostu drożdży. Z tego powodu, prowadzenie zwykłej hodowli okresowej drożdży jest mało opłacalne. Konieczne jest zwiększenie wydajności uzyskiwanego 2-PE i obniżenie kosztów produkcji poprzez zastosowanie metod *in situ* wydzielania toksycznego produktu z cieczy hodowlanej.

Przedmiotem wynalazku jest sposób, w którym prowadzi się dwu-fazową hodowlę okresową w pożywce dedykowanej do produkcji 2-fenyletanolu z dodatkiem oleju rzepakowego jako fazy organicznej dodawanej do medium hodowlanego tak, aby jego stężenie wynosiło 30% v/v do 50% v/v, monitorując przyrost biomasy poprzez mierzenie OD600 oraz stężenie 2-fenyletanolu w fazie wodnej będącej cieczą hodowlaną oraz organicznej. Po zakończeniu bioprocessu, hodowlę wiruje się i oddziela biomasę oraz fazę wodną od fazy organicznej. Hodowlę korzystnie prowadzi się w temperaturze 30°C.

Zgodnie ze zgłoszeniem patentowym, olej rzepakowy może być wykorzystywany do *in situ* ekstrakcji 2-PE w trakcie prowadzenia hodowli drożdży, co umożliwia zwiększenie wydajności całego procesu, co ilustruje przykład I wykonania. Zgodnie z wynalazkiem, prowadzi się dwufazową płynną hodowlę okresową drożdży, poprzez dodanie do hodowli oleju rzepakowego, jako fazy organicznej w stężeniu końcowym 30% (v/v). Na zakończenie bioprocessu, fazę wodną (ciecz hodowlaną) oddziela się od fazy organicznej. Faza organiczna, czyli olej rzepakowy zawierający 2,8% (w/v) 2-PE, spełnia kryteria produktu naturalnego i może mieć zastosowanie w przemyśle spożywczym w branży cukierniczo-piekarniczej, jako dodatek aromatyzujący, przy produkcji kosmetyków, np. wyrobu mydeł, czy przy produkcji środków czyszczących.

Zastosowanie oleju rzepakowego do ekstrakcji *in situ* 2-PE z cieczy hodowlanej zwiększyło ponad trzykrotnie wydajność produkcji 2-PE przez drożdże.

Wyniki badań zostały zilustrowane na wykresach i tabeli, gdzie Fig. 1 pokazuje krzywą wzrostu drożdży w dwu-fazowej hodowli okresowej, Fig. 2 pokazuje krzywą kalibracji do oznaczenia 2-PE, a Tab. 1 pokazuje stężenie 2-PE (w/v) w cieczy hodowlanej i w fazie organicznej, oraz produktywność w systemie dwu-fazowym.

Wynalazek ilustrują poniższe przykłady wykonania.

P r z y k ł a d I

#### **Warunki prowadzenia dwu-fazowej hodowli okresowej drożdży.**

Prowadzono 72 h płynną wstrząsaną hodowlę okresową drożdży *Saccharomyces cerevisiae* AM1-d (szczep zdeponowany w Międzynarodowej Kolekcji Kultur Drobnoustrojów Przemysłowych Instytutu Biotechnologii Przemysłu Rolno-Spożywczego pod numerem KKP2055p) w temp. 30°C w pożywce dedykowanej do produkcji 2-fenyletanolu o składzie: 15 g/L glukoza, 8 g/L sacharoza, 5 g/L L-fenylalanina, 0,5 g/L MgSO<sub>4</sub> bezw.cz., 1,7 g/L YNB bez aminokwasów i siarczanu amonu (pH=4,6). W trakcie hodowli monitorowano ilość produkowanego 2-PE poprzez analizę HPLC, jak opisano poniżej w Przykładzie II wykonania. W trakcie hodowli monitorowano przyrost biomasy poprzez pomiary OD<sub>600</sub> (Fig. 1). W momencie, gdy OD<sub>600</sub> wynosiło ~0,8 stosowano dodatek oleju rzepakowego, który jest rozpuszczalnikiem posiadającym status GRAS (ang. *generalny recognized as safe*) w stężeniu końcowym 30% (v/v). Na koniec hodowli (48 h) pobierano 1 mL próby, aby zmonitorować stężenie 2-fenyletanolu w cieczy

hodowlanej (fazie wodnej), co opisuje Przykład III. Stężenie 2-PE w fazie organicznej (oleju rzepakowym) ilustruje Przykład IV. W tym celu, próbki z dwu-fazowych hodowli były wirowane, aby oddzielić biomasę (odpad) od cieczy hodowlanej i fazy organicznej (oleju rzepakowego).

Określono także produktywność procesu (P), jako  $P = \frac{\Delta C_{2PE}}{\Delta t}$  [mg/L/h], wyniki zamieszczono w Tabeli 1.

	2-PE [g/L]			Produkcyjność [mg/L/h]
	f. wodna	f. organiczna	stężenie całkowite*	
<b>Kontrola</b>	3,17±0,05	-	3,17±0,05	66,04±0,05
<b>30% olej</b>	1,99±0,12	28,44±3,44	9,92±0,95	206,67±19,74

\* Wyznaczone na podstawie równania:

$$C_{2PE,fwodna} * V_{f.wodna} + C_{2PE,forg} * V_{f.org} = C_{2PE,całkowite} * V_{całkowite}$$

#### Przykład II

##### Oznaczanie stężenia 2-feniloetanolu w roztworze wodnym (cieczy hodowlanej).

Stężenie 2-PE oznaczano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) (chromatograf PE NELSON NCI900) z detektorem UV/VIS (Perkin Elmer 785A detector) i kolumną z wypełnieniem C18, 250 x 4.6 mm, 5 µm (kolumna Cosmosil 5C18-MS-II).

Krzywą kalibracji (Fig. 2) o współczynniku determinacji  $R^2 = 0,998$ , wykonano odważając określoną ilość 2-PE (MERCK) i rozpuszczając ją w odpowiedniej ilości mieszaniny acetonitryl:woda (1:1), używając acetonitrylu do HPLC (POCH) oraz wody miliQ. Jako eluent stosowano mieszaninę acetonitryl:woda w stosunku 30:70. Pomiary prowadzono przy długości fali  $\lambda = 259$  nm.

Przed analizą próbek z cieczy pohodowlanych na HPLC rozcieńczano je acetonitrylem w stosunku 1:1. Jeżeli pole powierzchni pików odpowiadającego 2-PE wykraczało poza obszar krzywej kalibracji próbki dodatkowo rozcieńczano.

#### Przykład III

##### Oznaczanie stężenia 2-feniloetanolu w oleju rzepakowym (fazie organicznej)

Stężenie 2-PE w oleju rzepakowym analizowano wykorzystując ekstrakcję oraz 2 niezależne metody – wagowo oraz za pomocą HPLC. Do ekstrakcji użyto

acetonitryl cz.d.a. (POCH), rozpuszczalnik niemieszający się z fazą olejową. Każdą próbkę ekstrahowano minimum 6-krotnie w celu całkowitego wydzielenia 2-PE. Do rozdzielacza wlewano 400 mL oleju rzepakowego i dodawano 150 mL acetonitrylu. Całość intensywnie wytrząsano przez 3 min i pozostawiano do rozdzielenia faz. Po każdym stopniu ekstrakcji pobierano 1 mL próbki do oznaczenia zawartości 2-PE (HPLC). Pozostałą fazę acetonitrylową przenoszono do kolby i dodawano środek suszący - bezwodny siarczan (VI) magnezu (POCH). Układ pozostawiano na 20 min w chłodni (4°C), przesączało do zważonej uprzednio kolby i odparowano rozpuszczalnik pod zmniejszonym ciśnieniem. Resztki rozpuszczalnika i ewentualnych innych lotnych składników usuwano na pompie olejowej (ciśnienie poniżej 1 mm Hg). Kolbę ponownie zważono i wyliczono ilość otrzymanego 2-PE, jako różnicę masy kolby z 2-PE i masy pustej kolby. Natomiast fazę olejową zwracano do rozdzielacza i całość procedury powtarzano.

Na koniec zsumowano wyniki po każdym stopniu ekstrakcji uzyskane z pomiarów wagowych oraz HPLC, i wyznaczono zawartość 2-PE w oleju rzepakowym.