

Sposób produkcji 2-fenyloetanolu i zastosowanie permeatu serwatki do produkcji 2-fenyloetanolu

Przedmiotem wynalazku jest sposób mikrobiologicznego zagospodarowania permeatu serwatki, w którym prowadzi się hodowlę okresową lub ciągłą drożdży do produkcji 2-fenyloetanolu, monitorując stężenie 2-fenyloetanolu, L-fenyloalaniny i laktozy w płynie hodowlanym oraz parametr ChZT.

Przemysł mleczarski generuje ogromne ilości odpadów o wysokim wskaźniku ChZT (chemiczne zapotrzebowanie na tlen) i BZT (biochemiczne zapotrzebowanie na tlen), co czyni je niebezpiecznymi dla środowiska. Głównym odpadem jest permeat serwatki bogaty w związki organiczne oraz minerały, który powstaje w procesie wytwarzania koncentratu białka serwatkowego poprzez ultrafiltrację serwatki. Mleczarnie na pierwszym etapie zagospodarowania tego odpadu suszą go rozpyłowo, co pozwala na odzyskanie wody oraz zmniejszenie jego objętości. Wysuszony permeat serwatki jest bogaty w laktozę (ok. 80% zaw.) i białka małocząsteczkowe (ok. 3-5% zaw.), dlatego częściowo może być wykorzystany dalej w przemyśle spożywczym i paszowym. Jednak nie sposób jest go w całości zagospodarować, stąd koncepcja wykorzystania jako podłoża dla drożdży produkujących 2-fenyloetanol (2-PE).

2-PE to alifatyczny alkohol o różnym zapachu, szeroko wykorzystywany m.in. w aromatach dodawanych do kosmetyków i żywności. Dodatkowo posiada on także cenne właściwości bakterio- i grzybobójcze, więc może również pełnić rolę naturalnego konserwantu. Na skalę przemysłową 2-PE otrzymywany jest na drodze ekstrakcji z płatków róży lub syntezy chemicznej. Co ważne, tylko 2-PE uzyskany w wyniku ekstrakcji posiada status produktu naturalnego i może stanowić dodatek np. do żywności. Ponieważ ekstrakcja z płatków róż jest bardzo kosztowna, potrzebne są alternatywne sposoby produkcji naturalnego 2-PE. Obecnie w skali laboratoryjnej coraz częściej stosowaną techniką jest ścieżka biotechnologiczna, wykorzystująca różne mikroorganizmy, w tym drożdże i bakterie. Powszechnie wiadomo, że drożdże mogą metabolizować L-phe do 2-PE na drodze szlaku Ehrlicha, w granicach stężeń 2-5 g/l (Hua i Xu, 2011). Konieczne jest jednak zapewnienie kluczowych warunków do produkcji, w tym wybór odpowiedniego szczepu drożdży i podłoża hodowlanego.

Znane są również sposoby wykorzystania podłoży hodowlanych na bazie serwatki lub innych organicznych odpadów do wydajnej hodowli drożdży, które będą produkowały 2-PE.

W publikacji Chreptowicz i wsp., 2018 opisano, że serwatka i produkty uboczne z przetwarzania buraków cukrowych mogą być dobrym surowcem do bioprodukcji 2-PE.

W patencie P.227208 ujawniono sposób wytwarzania naturalnego 2-PE na podłożu zawierającym L-feniloalaninę przez szczep *Saccharomyces cerevisiae* oraz sposób ekstrakcji uzyskanego 2-PE z płynu pochodowlanego.

W zgłoszeniu patentowym US2013/0084615 ujawniono sposób wytwarzania etanolu i białkowej paszy drożdżowej z permeatu serwatki, gdzie permeat serwatki stanowi substrat dla szczepu drożdży, do przekształcenia laktozy do dwutlenku węgla i alkoholu etylowego. W przykładzie wykonania szczepem drożdży był wybrany szczep *Kluyveromyces marxianus*.

W zgłoszeniu JP2014204715 ujawniono natomiast sposób hodowli drożdży mających zdolność wytwarzania substancji zapachowych w podłożu zawierającym organiczne źródło azotu wybrane z grupy składającej się z ekstraktu drożdżowego, produktu degradacji białka sojowego i aminokwasu wybranego spośród metioniny i feniloalaniny. Stężenie aminokwasu w podłożu hodowlanym wynosi 25mM lub więcej. Przy czym substancją zapachową jest metionol i 2-feniloetanol. Substancja zapachowa akumuluje się w podłożu w stężeniu 100 ppm lub wyższym.

Zgodnie z wynalazkiem, permeat serwatki może być wykorzystywany do produkcji 2-PE w trakcie prowadzenia okresowych i ciągłych płynnych hodowli drożdży z gatunku *K. marxianus*, co ilustrują przykłady I i II wykonania. Mikroorganizmy te są drożdżami kefirowymi, które wytwarzają enzym beta-galaktozydazę i dzięki temu są zdolne do wykorzystania serwatki jako substratu w procesie fermentacji (Belem M. A. F. i Lee B. H., 1998).

Zastosowanie odpadu przemysłu mleczarskiego obniża koszt produkcji 2-feniloetanolu oraz redukuje wskaźnik ChZT permeatu serwatki, czyniąc go mniej toksycznym dla środowiska. Ponadto namnożona biomasa drożdży GRAS *K. marxianus* produkujących 2-PE może być zastosowana jako wysokobiałkowy dodatek do pasz lub do produkcji bioetanolu z odpadów mleczarskich. Wynalazek zapewnia biotechnologiczny sposób wytwarzania 2-feniloetanolu, przy czym uzyskany produkt jest naturalny.

Dla procesu realizowanego w sposób okresowy na zakończenie bioprodukcji, płyn hodowlany oddziela się od biomasy, a następnie wydziela z niej produkt końcowy, co ilustruje przykład III wykonania i oznacza jego zawartość, co ilustruje przykład IV wykonania. Do wydzielenia 2-feniloetanolu wykorzystano standardową metodę ekstrakcji

z użyciem schłodzonego do 4°C octanu etylu bez intensywnego mieszania, a następnie odparowano octan etylu. Dla procesu realizowanego w sposób ciągły, od 24 h hodowli stale odbierany jest płyn hodowlany zawierający biomasę drożdży oraz 2-PE, a do układu z taką samą szybkością dozowana jest świeża porcja podłoża hodowlanego. Ze strumienia płynu hodowlanego z bioreaktora, po odfiltrowaniu biomasy, produkt końcowy jest wydzielany poprzez ekstrakcję octanem etylu, co ilustruje przykład III wykonania i jego ilość oznaczana jest zgodnie z przykładem IV wykonania.

Dzięki zastosowaniu permeatu serwatki do mikrobiologicznej produkcji 2-PE z płynu hodowlanego, możliwe jest również ponad 2-krotne (w przypadku hodowli okresowej) oraz prawie 10-krotne (w przypadku hodowli ciągłej) zmniejszenie ChZT permeatu serwatki, co ilustruje Tab. 3 przykład VI wykonania.

ISTOTA WYNAŁAZKU

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania 2-feniloetanolu przez drożdże z gatunku *Kluyveromyces marxianus* w podłożu do produkcji 2-feniloetanolu, w którym hodowlę prowadzi się w podłożu będącym niesterylizowanym roztworem wodnym wysuszonego permeatu serwatki.

Korzystnie hodowlę prowadzi się w sposób okresowy lub ciągły.

Korzystnie hodowlę prowadzi się w temperaturze w zakresie 25-37°C.

Korzystnie podłoże do hodowli zawiera wysuszony permeat serwatki w stężeniu 1,5-3 % (w/v).

Jeszcze bardziej korzystnie podłoże do hodowli zawiera L-feniloalaninę w stężeniu 5 g/l. Korzystnie hodowlę okresową prowadzi się przez 2-7 dni. Korzystnie hodowlę ciągłą prowadzi się przez 2-7 dni.

Kolejnym przedmiotem wynalazku jest zastosowanie permeatu serwatki do wytwarzania 2-feniloetanolu, charakteryzujące się tym, że permeat serwatki jest rozpuszczany w niesterylnej wodzie wodociągowej w stężeniu 1,5-3 % (w/v).

Korzystnie 2-feniloetanol jest wytwarzany przez drożdże *K. marxianus*.

Jeszcze bardziej korzystnie do podłoża dodawana jest L-feniloalanina w stężeniu 5g/l.

Wyniki badań zostały zilustrowane na rysunku, gdzie:

Fig. 1. przedstawia schemat ideowy hodowli okresowej,

Fig. 2. przedstawia schemat ideowy hodowli ciągłej,

Fig. 3. przedstawia krzywą kalibracji do oznaczenia 2-PE,

Fig. 4. przedstawia krzywą kalibracji do oznaczenia L-phe,

Fig. 5. przedstawia krzywą kalibracji do oznaczenia laktozy,

Fig. 6. przedstawia zmiany ChZT w trakcie hodowli okresowej i ciągłej,

Wynalazek ilustrują poniższe przykłady wykonania.

Przykład I

Warunki prowadzenia hodowli okresowej drożdży.

W bioreaktorze o całkowitej objętości 4,8 l (Applikon Biotechnology) prowadzono 48-h płynną wstrząsaną (250 rpm) i napowietrzaną (1,5 l/min) hodowlę okresową drożdży z gatunku *K. marxianus* w temp. 30°C w 2 l podłoża dedykowanego do produkcji 2-fenyloetanolu o składzie: 25 g/l suszony permeat serwatki, 5 g/l L-feniloalanina w wodzie wodociągowej bez sterylizacji.

Na koniec hodowli oznaczano: ilość wyprodukowanego 2-PE oraz zużytej L-phe poprzez analizę HPLC-DAD, jak opisano w przykładzie wykonania III, ilość zużytej laktozy poprzez analizę HPLC-RI (przykład IV wykonania) oraz parametr ChZT w płynie hodowlanym (fazie wodnej) zgodnie z normą DIN ISO 15705 – H45, co opisuje przykład wykonania V. Na koniec procesu fermentacji (po 48 h) określono także:

właściwą szybkość wzrostu (μ), jako $\mu = \frac{dOD_{600}}{OD_{600} \cdot dt} [1/h]$,

produkcyjność procesu (P), jako $P = \frac{\Delta C_{2PE}}{\Delta t} [mg/l/h]$,

wydajność produkcji (Y_{2PE}), jako $Y_{2PE} = \frac{\Delta C_{2PE}}{\Delta C_{2PE}^{th}} * 100 [\%]$,

współczynnik wydajności produkcji 2-PE względem L-phe ($Y_{P/S}$), jako $Y_{P/S} = \frac{\Delta C_{2PE}}{\Delta C_{L-phe}} [-]$
oraz

zużycie laktozy (Z_{L-phe}), jako $Z_{L-phe} = \left(1 - \frac{C_{L-phe}}{C_{L-phe.0}}\right) * 100 [\%]$.

Każdy pomiar wykonywano w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawiono w Tabeli 1.

Tab. 1. Stężenie 2-PE, L-phe, laktozy w cieczy hodowlanej, kluczowe parametry procesowe oraz produkcyjność w systemie okresowym po 48h.

Parametr	Wartość
końcowe OD ₆₀₀ [-]	6,26±0,07
Właściwa szybkość wzrostu [1/h]	0,36±0,00
2-PE [g/l]	2,59±0,15
2-PE [g]	5,18±0,46
L-phe [g/l]	1,88±0,08
laktoza [g/l]	0,00±0,00
P [mg/l/h]	53,96
Y _{2-PE} [-]	0,70
Y _{P/S} [-]	0,52
Z _{L-phe} [%]	62,40

Przykład II

Warunki prowadzenia hodowli ciągłej drożdży.

W bioreaktorze o całkowitej objętości 4,8 l (Applikon Biotechnology) prowadzono 72-h płynną wstrząsaną (250 rpm) i napowietrzaną (1,5 l/min) hodowlę drożdży z gatunku *Kluyveromyces marxianus* w temp. 30°C w 2 l podłoża dedykowanego do produkcji 2-fenyletanolu o składzie: 25 g/l suszony permeat serwatki, 5 g/l L-feniloalaniny w wodzie wodociągowej bez sterylizacji.

Przez pierwsze 24 h hodowlę realizowano w sposób okresowy jak w pierwszym przykładzie wykonania, w celu namnożenia biomasy drożdży. Następnie od 24 h przechodzono w ciągły tryb pracy, co zostało zrealizowane poprzez podłączenie dwukanałowej pompy perystaltycznej do układu (1,7 ml/min, pompa Lead Fluid BT50S), odbierającej płyn hodowlany z przestrzeni reakcyjnej oraz dozującej do układu 0,5% (w/v) roztwór wodny permeatu serwatki (Fig. 2). Na koniec hodowli oznaczono: ilość produkowanego 2-PE oraz zużytej L-phe poprzez analizę HPLC-DAD, jak opisano poniżej w przykładzie III wykonania, ilość laktozy poprzez analizę HPLC-RI (przykład IV wykonania) oraz parametr ChZT w płynie hodowlanym (fazie wodnej) zgodnie z normą DIN ISO 15705 – H45, co opisuje przykład V wykonania.

Na koniec procesu (po 72 h) określono także:

właściwą szybkość wzrostu (μ), jako $\mu = \frac{dOD_{600}}{OD_{600} \cdot dt} [1/h]$,

produkcyjność procesu (P), jako $P = \frac{\Delta C_{2PE}}{\Delta t} [mg/l/h]$,

wydajność produkcji (Y_{2PE}), jako $Y_{2PE} = \frac{\Delta C_{2PE}}{\Delta C_{2PE}^{th}} * 100[\%]$,

współczynnik wydajności produkcji 2-PE względem L-phe (Y_{P/S}), jako $Y_{P/S} = \frac{\Delta C_{2PE}}{\Delta C_{L-phe}} [-]$

oraz

zużycie laktozy (Z_{L-phe}), jako $Z_{L-phe} = \left(1 - \frac{C_{L-phe}}{C_{L-phe,0}}\right) * 100$ [%].

Każdy pomiar wykonywano w trzech powtórzeniach. Wyniki przedstawiono w Tabeli 2.

Tab. 2. Stężenie 2-PE, L-phe i laktozy (w/v) w płynie hodowlanym, kluczowe parametry procesowe oraz produktyjność w systemie ciągłym po 72h.

Parametr	Wartość
końcowe OD₆₀₀ [-]	2,65±0,06
Właściwa szybkość wzrostu [1/h]	0,28±0,02
2-PE [g/l]	1,15±0,12
2-PE [g]	8,29±0,82
L-phe [g/l]	0,47±0,03
laktoza [g/l]	0,00±0,00
P [mg/l/h]	57,60
Y_{2-PE} [-]	1,12
Y_{P/S} [-]	0,83
Z_{L-phe} [%]	90,60

Przykład III

Wydzielanie 2-PE z płynu pohodowlanego.

Procedura wydzielania 2-PE z płynu pohodowlanego jest modyfikacją sposobu, opisanego w patencie P.227208. Po zakończeniu hodowli płyn pohodowlany z bioreaktora zwirowano (10 000x g, 10 min) w temperaturze 4°C w wirówce Sorval Evolution RC Centrifuge, Thermo Scientific. Biomasę komórkową odrzucono. Supernatant zmieszano z zimnym (4°C) octanem etylu (250 ml octanu etylu na każde 500 ml supernatantu) i wytrząsano delikatnie w rozdzielaczu przez około 3 minuty. Po rozdzieleniu się faz, fazę organiczną i fazę wodną rozdzielono do oddzielnych kolb. Fazę organiczną suszono minimum 30 minut nad bezwodnym siarczanem (VI) magnezu (Chempur). Środek suszący usunięto na sączku celulozowym. Octan etylu odparowywano następnie na wyparce obrotowej Buchi, uzyskując 2-PE.

Przykład IV

Oznaczanie stężenia 2-fenyloetanolu i L-fenyloalaniny w płynie hodowlanym.

Stężenie 2-PE i L-phe oznaczano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) (SYKAM chromatograph, Sykam GmbH, Eresing, Germany)

z detektorem DAD i kolumną z wypełnieniem C18, 250 x 4,6 mm, 5 µm (kolumna Cosmosil 5C18-MS-II).

Krzywą kalibracji 2-PE (Fig. 3) o współczynniku determinacji $R^2 = 0,9994$, 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. Uzyskano stężenia L-phe o wartości 0,25, 0,5, 1, 1,5, 2, 2,5, 3 g/l. Tak przygotowane próbki wzorcowe nastrzykiwano po 20 µl na kolumnę z wypełnieniem C-18 i analizowano, uzyskując piki o określonym polu powierzchni, odpowiadające stężeniu analizowanego wzorca. Z uzyskanych wyników wykreślono krzywą kalibracji pola powierzchni piku w funkcji jego stężenia (Fig. 3).

Krzywą kalibracji L-phe (Fig. 4) o współczynniku determinacji $R^2 = 0,9998$, wykonano odważając określoną ilość L-phe (BioShop) i rozpuszczając ją w odpowiedniej ilości mieszaniny acetonitryl:woda (1:1), używając acetonitrylu do HPLC (POCH) oraz wody miliQ. Uzyskano stężenia L-phe o wartości 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3 g/l. Tak przygotowane próbki wzorcowe nastrzykiwano po 20 µl na kolumnę z wypełnieniem C-18 i analizowano, uzyskując piki o określonym polu powierzchni, odpowiadające stężeniu analizowanego wzorca. Z uzyskanych wyników wykreślono krzywą kalibracji pola powierzchni piku w funkcji jego stężenia (Fig. 4).

Stężenie 2-PE i L-phe w próbkach analizowano jednocześnie, stosując jako eluent mieszaninę acetonitryl:woda w stosunku 30:70. Pomiary prowadzono przy długości fali $\lambda = 259$ nm i szybkości elucji 1 ml/min. W tym celu 1 ml płynu hodowlanego pobierano z bioreaktora do 1,5-ml próbki typu Eppendorf. Następnie próbki wirowano (15 000xg, 1 min). Uzyskany supernatant przenoszono do czystych 1,5-ml próbek typu Eppendorf, a osad odrzucano. Z tak przygotowanych próbek nastrzykiwano po 20 µl na kolumnę z wypełnieniem C-18 i analizowano.

Jeżeli pole powierzchni piku odpowiadającego 2-PE lub L-phe wykaczało poza obszar krzywej kalibracji próbkę dodatkowo 2-krotnie rozcieńczano mieszaniną acetonitryl:woda (1:1), tak by wynik pomiaru mieścił się w zakresie wyznaczonej krzywej kalibracji. Przy rozcieńczeniu próbek, uzyskane wyniki mnożono przez 2, uzyskując stężenie w wyjściowej próbce badanej.

Przykład V

Oznaczanie stężenia laktozy w płynie hodowlanym.

Stężenie laktozy oznaczano z wykorzystaniem wysokosprawnej chromatografii ciekowej (HPLC) (SYKAM chromatograph, Sykam GmbH, Eresing, Germany) z detektorem refraktometrycznym (RI) i kolumną SETREX IEX H+ (300 × 8 mm, Polymer IEX H form, 8 μm) termostatowaną w 35°C. Detektor RI również termostatowano w 35°C, w celu uniknięcia fluktuacji w odpowiedzi detektora.

Krzywą kalibracji laktozy (Fig. 5) o współczynniku determinacji $R^2 = 0,9984$, wykonano odważając określoną ilość laktozy (POCH) i rozpuszczając ją w odpowiedniej ilości wody miliQ. Uzyskano stężenia laktozy o wartości 0,25, 0,5, 0,75, 1, 1,5, 2, 3 g/l. Tak przygotowane próbki wzorcowe nastrzykiwano po 20 μl na kolumnę z wypełnieniem polimerowym IEX H+ i analizowano, uzyskując piki o określonym polu powierzchni, odpowiadające stężeniu analizowanego wzorca. Z uzyskanych wyników wykreślono krzywą kalibracji pola powierzchni pików w funkcji jego stężenia (Fig. 5).

Stężenie laktozy w próbce analizowano, stosując jako eluent 9 mM kwas siarkowy, i szybkości elucji 1 ml/min. W tym celu 1 ml płynu hodowlanego pobierano z bioreaktora do 1,5-ml probówki typu Eppendorf. Następnie próbki wirowano (15 000xg, 1 min). Uzyskany supernatant przenoszono do czystych 1,5-ml probówek typu Eppendorf, a osad odrzucano. Z tak przygotowanych próbek nastrzykiwano po 20 μl na kolumnę z wypełnieniem polimerowym IEX H+ i analizowano.

Jeżeli pole powierzchni pików odpowiadających laktozie wykraczało poza obszar krzywej kalibracji próbkę dodatkowo 2-krotnie rozcieńczano 9 mM kwasem siarkowym, tak by wynik pomiaru mieścił się w zakresie wyznaczonej krzywej kalibracji. Przy rozcieńczeniu próbek, uzyskane wyniki mnożono przez 2, uzyskując stężenie w wyjściowej próbce badanej.

Przykład VI

Oznaczanie chemicznego zapotrzebowania na tlen (ChZT) w płynie hodowlanym.

Parametr ChZT w pożywce wyjściowej oraz na zakończenie hodowli okresowych i ciągłych analizowano z wykorzystaniem metody spektrofotometrycznej według normy DIN ISO 15705 – H45 (Tab. 3). Procedurę przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta testu komercyjnego Nanocolor CDB 600 firmy Macherey-Nagel. Pobierano 15 ml płynu hodowlanego i wirowano (5 000xg, 5 min). Supernatant przenoszono do nowych probówek a osad odrzucano. Następnie przenoszono w trzech powtórzeniach po 2,0 ml supernatantu do probówek testowych. Probówki mieszano poprzez intensywne wytrząsanie na wortexie przez 5 sekund i inkubowano przez 30 min w 160°C. Po inkubacji próbki chłodzono

w statywie przez 10 minut, a następnie mieszano jak wcześniej. Gdy próbki osiągnęły temperaturę pokojową, umieszczano je w kompaktofotometrze Nanocolor Vario Compact firmy Macherey-Nagel i mierzono wartość ChZT. Jeśli wartość ChZT była poza skalą odczytu, próbkę wyjściową rozcieńczano 2-krotnie a następnie procedurę powtarzano. W przypadku hodowli okresowej wartość ChZT spadła z 33,69 do 18,50 czyli prawie dwukrotnie, natomiast w przypadku hodowli ciągłej wartość parametru ChZT spadła z 33,69 do 2,60 czyli ponad 12-krotnie (Fig. 6).

Wyniki z trzech pomiarów parametru ChZT w podłożu przed hodowlą oraz po zakończeniu hodowli okresowej oraz ciągłej przedstawiono w Tabeli 3.

Tab. 3 Wartość parametru ChZT dla czystego podłoża oraz na zakończenie hodowli okresowej (po 48 h) i hodowli ciągłej (po 72 h).

ChZT [g/l]		
podłoże	h. okresowa	h. ciągła
33,69±1,27	18,50±0,75	2,60±0,40

Literatura

1. Chreptowicz K., Sternicka M., Kowalska P. [i in.], Screening of yeasts for the production of 2-phenylethanol (rose aroma) in organic waste-based media Letters in Applied Microbiology, 2018, 66(2): 153-160.
2. Belem MA, Lee BH. Production of bioingredients from *Kluyveromyces marxianus* grown on whey: an alternative. Crit Rev Food Sci Nutr. 1998 Oct; 38(7):565-98.
3. Hua, D. I Xu, P. (2011) Recent advances in biotechnological production of 2-phenylethanol. Biotechnol Adv 29, 654–660.