

Produkcja 2-fenyloetanolu (PEA) przez drożdże z ekstrakcją *in situ* za pomocą cieczy jonowych

Patrycja OKUNIEWSKA, Urszula DOMAŃSKA-ŻELAZNA, Aneta POBUDKOWSKA – Zakład Chemii Fizycznej, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, Warszawa; Jolanta MIERZEJEWSKA – Zakład Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych, Instytut Biotechnologii, Wydział Chemiczny, Politechnika Warszawska, Warszawa

Prosimy cytować jako: CHEMIK 2016, 70, 9, 491–496

Wstęp

PEA jest cennym aromatem o delikatnym różanym zapachu stosowanym w przemyśle spożywczym, perfumeryjnym i chemii gospodarczej, jak również konserwantem (leki) i środkiem dezynfekującym (np. truskawki). Duże zapotrzebowanie na PEA powoduje, iż poszukiwane są wciąż nowe metody produkcji. Alternatywą dla syntetycznego PEA jest pozyskiwanie tego aromatu z płatków róży. Koszty takiej produkcji są jednak bardzo wysokie – cena olejku różanego (ok. 66–79% PEA [1]) ok. 4 600 euro/kg [2]. W tej pracy wykorzystano drożdże do syntezy PEA. Produkt takiej syntezy, w myśl prawa, traktowany jest jako naturalny [3] i jedynym problemem są tu niskie końcowe stężenia produktu. Problem ten można rozwiązać przez ekstrakcję produktu *in situ* [4]. Możliwe są następujące sposoby ekstrakcji *in situ* PEA: adsorpcja [5–8], mikrokapsułki [9, 10], ekstrakcja na membranie [11], ekstrakcja ciecz-ciecz z wykorzystaniem kwasu oleinowego [12, 13] lub ILs [4, 9, 14–17]. Techniki te pozwalają zwiększyć produkcję PEA do ok. 6 g/L w przypadku hodowli prowadzonej w kolbkach i od 12 g/L do 26 g/L dla hodowli w reaktorach z dozowaniem substratów [18]. W pracy wykorzystano ekstrakcję ciecz-ciecz za pomocą cieczy jonowych, ze względu na możliwość dobrania cieczy jonowej do potrzeb badań oraz prostotę tego rozwiązania, jak również możliwość powtórnego wykorzystania cieczy jonowej po reekstracji PEA. Celem pracy było znalezienie najlepszej cieczy jonowej do ekstrakcji PEA *in situ*.

Opis

Część eksperymentalna

Materiały

W badaniach wykorzystywano pożywkę YPD do namnożenia drożdży (20 g/L glukozy, 10 g/L ekstraktu drożdżowego, 20 g/L peptonu), a właściwą część eksperymentu prowadzono na pożywce produkcyjnej (10 g/L glukozy, 10 g/L sacharozy, 6 g/L L-fenyloalaniny (L-Phe), 4 g/L KH_2PO_4 , 0,4 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L ekstraktu drożdżowego). W badaniach wykorzystano szczep *Saccharomyces cerevisiae* AM1 d z kolekcji Zakładu Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych. Jako ekstrahenty *in situ* wykorzystano $[\text{C}_8\text{iQuin}][\text{NTf}_2]$ (opis syntezy i czystość podano w artykule [19]) $[\text{BMPyr}][\text{NTf}_2]$ (Ioli-tec, >0,99), $[\text{P}_{6,6,6,14}][\text{TCM}]$ (MERCK KGaA, $\geq 0,98$ [20]), $[\text{HMPIP}][\text{NTf}_2]$ (Ioli-tec, >0,99[4]).

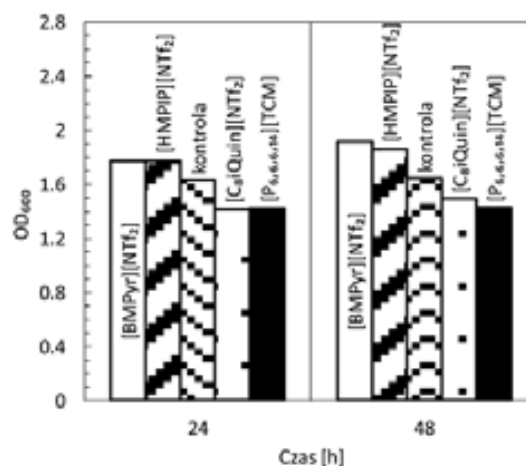
Metodyka

Do kolby miarowej 100 mL zawierającej 10 mL pożywki YPD przeniesiono 3 kolonie drożdżowe. Hodowle pozostawiono w inkubatorze z wytrząsaniem (30°C, 220 rpm, Lab Companion SI-600R). Następnego dnia nocną hodowlą zaszczepiono pożywkę produkcyj-

ną, aby początkowa gęstość optyczna hodowli, mierzona przy długości fali $\lambda = 600$ nm (OD_{600}), wynosiła 0,2. Hodowlę prowadzono w inkubatorze z wytrząsaniem (30°C, 220 rpm). Co 1 h mierzono OD_{600} hodowli, przy OD_{600} ok. 1 do 4 kolbek (100 mL) rozlano po 12 mL (kolby z ekstrahentem) i po 15 mL (kolby kontrolne) hodowli oraz dodano po 3 mL ekstrahenta. Hodowle prowadzono w dwóch powtórzeniach biologicznych. W próbie bez ekstrahenta badano wzrost drożdży (pomiar OD_{600} przez 8 h). Po 24 h i 48 h hodowle zwirowano (25°C, 1000 g, 2 min, Eppendorf Centrifuge 5804R) w celu rozdzielania faz i zmierzono OD_{600} fazy wodnej. Następnie ponownie zwirowano (25°C, 2000 g, 3 min) w celu oddzielenia biomasy. Fazy pobrano do próbek i dodano objętościowo analogiczną porcją acetonitrylu (2-krotne rozcieńczenie). Końcowe stężenia 2-fenyloetanolu oznaczono w obu fazach za pomocą HPLC (Agilent Technologies 1200 series, kolumna C18, 25°C, 1 mL, Acetonitryl:Woda = 50:50) przy długości fali $\lambda = 220$ nm.

Omówienie wyników

Zastosowano zupełnie nowe cieczy jonowe jako potencjalne ekstrahenty *in situ* PEA. Z przedstawionych rezultatów hodowli (Wyk. 1) jasno wynika, że dodatek cieczy jonowych może mieć różny wpływ na wzrost drożdży. Dwie cieczy jonowe $[\text{BMPyr}][\text{NTf}_2]$ ($\text{OD}_{600}^{24\text{h}} = 1,78$, $\text{OD}_{600}^{48\text{h}} = 1,92$) i $[\text{HMPIP}][\text{NTf}_2]$ ($\text{OD}_{600}^{24\text{h}} = 1,78$, $\text{OD}_{600}^{48\text{h}} = 1,86$) powodowały intensywniejszy wzrost drożdży, a pozostałe dwie $[\text{C}_8\text{iQuin}][\text{NTf}_2]$ ($\text{OD}_{600}^{24\text{h}} = 1,36$, $\text{OD}_{600}^{48\text{h}} = 1,50$) i $[\text{P}_{6,6,6,14}][\text{TCM}]$ ($\text{OD}_{600}^{24\text{h}} = 1,42$, $\text{OD}_{600}^{48\text{h}} = 1,43$) spowalniały wzrost drożdży w stosunku do kontroli ($\text{OD}_{600}^{24\text{h}} = 1,64$, $\text{OD}_{600}^{48\text{h}} = 1,65$), co widać wyraźnie na Wykresie 1. Spowolnienie wzrostu mogło być związane z koniecznością dodatkowej adaptacji drożdży do tych konkretnych cieczy jonowych. Natomiast intensywniejszy wzrost najprawdopodobniej jest wynikiem niskiego stężenia PEA w fazie wodnej, a więc wykluczenia jego hamującego wpływu na wzrost drożdży zaczynającego się przy stężeniach 2–3 g/L [21].

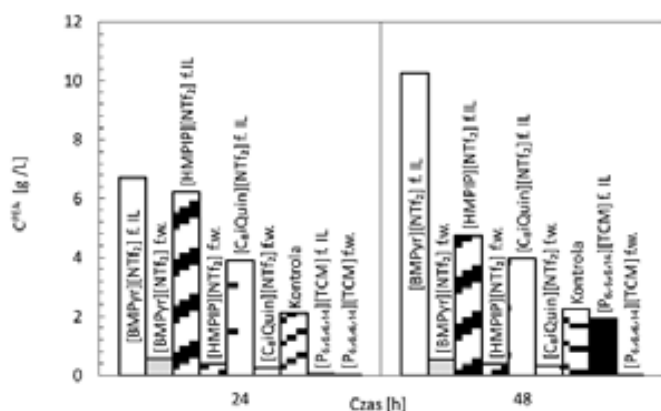


Wyk. 1. Zależność wzrostu hodowli przedstawiona w formie gęstości optycznej przy długości fali $\lambda = 600$ nm

*Autor do korespondencji:

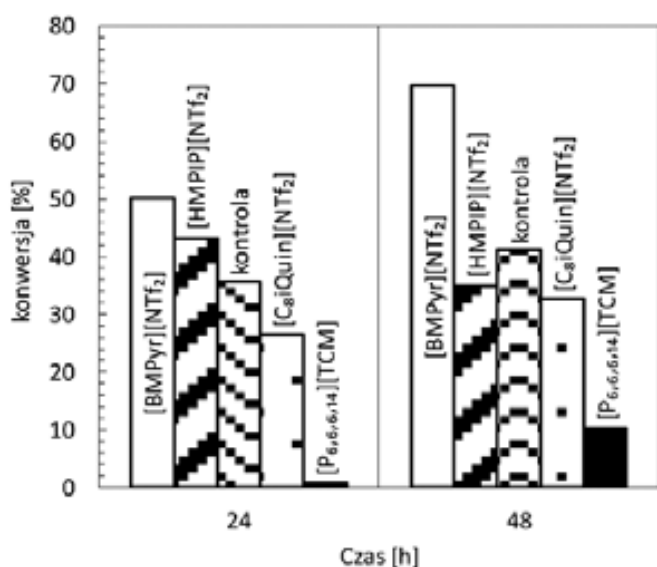
Mgr inż. Patrycja OKUNIEWSKA, e-mail: pokuniewska@ch.pw.edu.pl

Dla trzech z przebadanych cieczy jonowych po 24 h hodowli otrzymano stężenia PEA w gramach w przeliczeniu na liter hodowli dużo wyższe niż dla próby kontrolnej (bez ekstrahenta) – $2,10 \pm 0,009$ g/L. Były to w kolejności malejącej: [BMPyr][NTf₂] (w fazie IL $6,71 \pm 0,006$ g PEA/L), z [HMPIP][NTf₂] (w fazie IL $6,21 \pm 0,010$ g/L), [C₈iQuin][NTf₂] (w fazie IL $3,89 \pm 0,004$ g/L). Dla [P_{6,6,6,14}][TCM] stężenie PEA po 48 h hodowli wynosiło w fazie IL jedynie $0,05 \pm 0,005$ g/L. Produkcja 2-fenyletanolu była jeszcze w toku o czym świadczą dużo wyższe stężenia po 48 h. Stężenie PEA w próbkach po 48 h w zależności od cieczy jonowej w kolejności malejącej: [BMPyr][NTf₂] (w fazie IL $10,25 \pm 0,019$ g/L), [HMPIP][NTf₂] (w fazie IL $6,21 \pm 0,009$ g/L), [C₈iQuin][NTf₂] (w fazie IL $3,89 \pm 0,007$ g/L), kontrola (bez ekstrahenta) $2,10 \pm 0,014$ g/L, [P_{6,6,6,14}][TCM] (w fazie IL $1,92 \pm 0,007$ g/L). Zależności te przedstawiono na Wykresie 2.

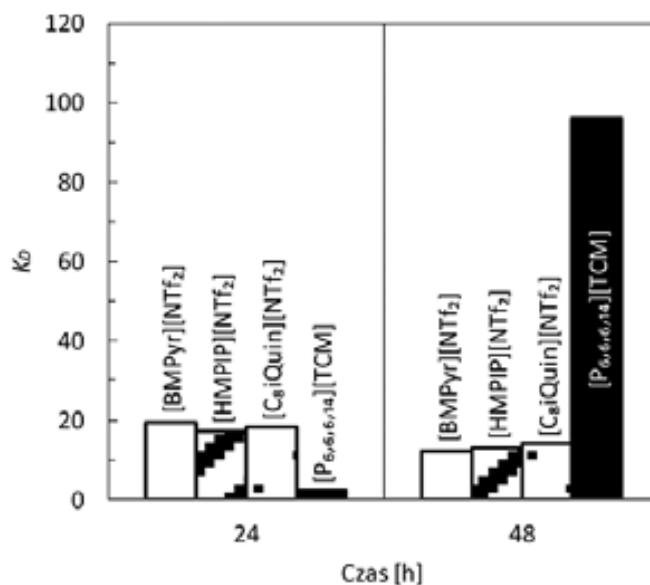


Wyk. 2. Stężenie PEA po 24 h i 48 h w gramach na liter hodowli w fazie wodnej (f. w.) i fazie cieczy jonowej (f. IL)

Wyniki biokonwersji L-Phe do PEA (Wyk. 3) na poziomie 70% dla [BMPyr][NTf₂] po 48 h świadczą o tym, że możliwa byłaby dalsza konwersja. W związku z tym planowane są kolejne hodowle 72-godzinne. Współczynniki podziału PEA między fazę organiczną i wodną (Wyk. 4) świadczą o dobrej ekstrakcji PEA przez wybrane cieczy jonowe. Dla [P_{6,6,6,14}][TCM] po 48 h wartość współczynnika podziału jest najwyższa, jednak stężenia PEA w hodowli są bardzo niskie, jak już wcześniej wspomniano, co czyni tę ciecz jonową nieprzydatną do ekstrakcji *in situ*.



Wyk. 3. Procent biokonwersji L-fenylalaniny (L-Phe) do 2-fenyletanolu (PEA)



Wyk. 4. Współczynnik podziału (K_D) 2-fenyletanolu (PEA) pomiędzy fazę cieczy jonowej a fazę wodną

Podsumowanie i wnioski

Żadna ze zbadanych cieczy jonowych nie okazała się toksyczna dla drożdży *Saccharomyces cerevisiae* AM1 d. Z przedstawionych wyników jasno wynika, że najlepszym ekstrahentem na potrzeby ekstrakcji *in situ* PEA jest bis(trifluorometylosulfonyl)imidek butylometylo-pyrrolidynowy [BMPyr][NTf₂]. Świadczy o tym wysoka konwersja L-Phe (50% po 24 h i 70% po 48 h), wysokie stężenia PEA w fazie cieczy jonowej ($6,71 \pm 0,006$ g/L po 24 h i $10,25 \pm 0,019$ g/L po 48 h) oraz wysoki współczynnik podziału PEA pomiędzy fazę cieczy jonowej a fazę wodną ($K_D = 12,22$ po 24 h i $K_D = 19,4$ po 48 h). Również obiecujący dla celów ekstrakcyjnych jest [HMPIP][NTf₂] co wynika z konwersji L-Phe, która jest zbliżona do kontroli (43% po 24 h i 35% po 48 h), wysokie stężenia PEA w fazie cieczy jonowej ($4,74 \pm 0,009$ g/L po 24 h i $6,21 \pm 0,010$ g/L po 48 h) oraz wysoki współczynnik podziału PEA pomiędzy fazę cieczy jonowej a fazę wodną ($K_D = 17,01$ po 24 h i $K_D = 12,97$ po 48 h). Jednak procent konwersji L-Phe (maksymalnie 70% po 48 h) sugeruje, że należałoby dłużej prowadzić hodowlę (np. przez 72 h) w celu całkowitego wykorzystania substratu. Zbadane w tej pracy cieczy jonowe okazały się znacznie lepsze od zbadanych wcześniej cieczy jonowych z tym samym anionem i następującymi kationami: 1-benzyl-3-metylimidazoliowym ($\sim 1,2$ gPEA/L, $K_D = 17,6$), 1-metylo-1-propylopiperydynowym ($\sim 1,2$ gPEA/L, $K_D = 11,6$), metylotriocetylloammoniumowym (~ 1 gPEA/L, $K_D = 4,0$) [15].

Podziękowania

Badania zostały sfinansowane dzięki grantowi Narodowego Centrum Nauki na lata 2015–2018, nr 201/15/B/ST5/00136.

Literatura

- Verma R.S., Padalia R.C., Chauhan A., Singh A., Yadav A.K.: *Volatile Constituents of Essential Oil and Rose Water of Damask Rose, Rosa Damascena Mill., Cultivars from North Indian Hills*. Nat. Prod. Res. 2011, **25**, 17, 1577–1584.
- Kovacheva N., Rusanov K., Atanassov I.: *Industrial Cultivation of Oil Bearing Rose and Rose Oil Production in Bulgaria During 21ST Century, Directions and Challenges*. Biotechnol. Equip. 2010, **24**, 2, 1793–1798.
- Dyrektywa Parlamentu i Rady Europy EC. No 1334/2008. December 16, 2008.
- Okuniewska P., Ramjugernath D., Naidoo P., Domańska U.: *Solubility of Ionic Liquids in 2-Phenylethanol PEA and Water*. Fluid Phase Equilibria 2014, **376**, 55–63.
- Carpiné D., Dagostin J.L.A., da Silva V.R., Igarashi-Mafra L., Mafra M.R.: *Adsorption of Volatile Aroma Compound 2-Phenylethanol from Synthetic Solution onto Granular Activated Carbon in Batch and Continuous Modes*. J. Food Eng. 2013, **117**, 3, 370–377.

6. Šimko I., Roriz E., Gramblička M., Illeová V., Polakovič M.: *Adsorption Separation of 2-Phenylethanol and L-Phenylalanine on Polymeric Resins: Adsorbent Screening, Single-Component and Binary Equilibria*. Food Bioprod. Process. 2015, **95**, 254–263.
7. Mei J.: *Enhanced Biotransformation of L-Phenylalanine to 2-Phenylethanol Using an in Situ Product Adsorption Technique*. Process Biochem. 2009, **44**, 8, 886–890.
8. Hua D., Lin S., Li Y., Chen H., Zhang Z., Du Y., Zhang X., Xu P.: *Enhanced 2-Phenylethanol Production from L-Phenylalanine via in Situ Product Adsorption*. Biocatal. Biotransformation 2010, **28**, 4, 259–266.
9. Stark D., Kornmann H., Munch T., Sonnleitner B., Marison I.W., von Stockar U.: *Novel Type of in Situ Extraction: Use of Solvent Containing Microcapsules for the Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by Saccharomyces Cerevisiae*. Biotechnol. Bioeng. 2003, **83**, 4, 376–385.
10. Gao F., Daugulis A.J.: *Bioproduction of the Aroma Compound 2-Phenylethanol in a Solid-Liquid Two-Phase Partitioning Bioreactor System by Kluyveromyces Marxianus*. Biotechnol. Bioeng. 2009, **104**, 2, 332–339.
11. Mihal' M., Vereš R., Markoš J.: *Investigation of 2-Phenylethanol Production in Fed-Batch Hybrid Bioreactor: Membrane Extraction and Microfiltration*. Sep. Purif. Technol. 2012, **95**, 126–135.
12. Stark D., Münch T., Sonnleitner B., Marison I.W., von Stockar U.: *Extractive Bioconversion of 2-Phenylethanol from L-Phenylalanine by Saccharomyces Cerevisiae*. Biotechnol. Prog. 2002, **18**, 3, 514–523.
13. Etschmann M.M.W., Sell D., Schrader J.: *Screening of Yeasts for the Production of the Aroma Compound 2-Phenylethanol in a Molasses-Based Medium*. Biotechnol. Lett. 2003, **25**, 7, 531–536.
14. Wang H., Dong Q., Meng C., Shi X.A., Guo Y.: *A Continuous and Adsorptive Bioprocess for Efficient Production of the Natural Aroma Chemical 2-Phenylethanol with Yeast*. Enzyme Microb. Technol. 2011, **48**, 4–5, 404–407.
15. Sendovski M., Nir N., Fishman A.: *Bioproduction of 2-Phenylethanol in a Biphasic Ionic Liquid Aqueous System*. J. Agric. Food Chem. 2010, **58**, 4, 2260–2265.
16. Xiang Z.Y., Lu Y.C., Zou Y., Gong X.C., Luo G.S.: *Preparation of Microcapsules Containing Ionic Liquids with a New Solvent Extraction System*. React. Funct. Polym. 2008, **68**, 8, 1260–1265.
17. Domańska U., Zawadzki M., Królikowski M., Lewandowska A.: *Phase Equilibria Study of Binary and Ternary Mixtures of {N-Octylisoquinolinium Bis{trifluoromethyl.sulfonyl}imide + hydrocarbon, or an Alcohol, or Water}*. Chem. Eng. J. 2012, **181–182**, 63–71.
18. Hua D., Xu P.: *Recent Advances in Biotechnological Production of 2-Phenylethanol*. Biotechnol. Adv. 2011, **29**, 6, 654–660.
19. Domańska U., Zawadzki M., Królikowska M., Marc Tshibangu M., Ramjugernath D., Letcher T.M.: *Measurements of Activity Coefficients at Infinite Dilution of Organic Compounds and Water in Isoquinolinium-Based Ionic Liquid [C₈Quin][NTf₂] Using GLC*. J. Chem. Thermodyn. 2011, **43**, 3, 499–504.
20. Domańska U., Okuniewska P., Markowska A.: *Phase Equilibrium in Binary Systems of Ionic Liquids, or Deep Eutectic Solvents with 2-Phenylethanol PEA, or Water*. Fluid Phase Equilibria 2016, **424**, 68–78.
21. Stark D., Zala D., Münch T., Sonnleitner B., Marison I.W., von Stockar U.: *Inhibition Aspects of the Bioconversion of L-Phenylalanine to 2-Phenylethanol by Saccharomyces Cerevisiae*. Enzyme Microb. Technol. 2003, **32**, 2, 212–223.

Mgr inż. Patrycja OKUNIEWSKA (mgr inż. 2012 Wydział Chemiczny/Biotechnologia Przemysłowa, PW). Doktorat na WCh PW (2012 – w toku). Liczba publikacji: 5. Zainteresowania naukowe: ekstrakcja, hodowle drożdżowe, 2-fenyletanol.
e-mail: pokuniewska@ch.pw.edu.pl, tel.: 698 692 767

Prof. dr hab. inż., Urszula DOMAŃSKA-ŻELAZNA (Prof. zw. dr hab. inż. n. chem., Wydział Chemiczny PW). Doświadczenie zawodowe: 1968 – pracownik Zakładu Chemii Fizycznej WCh PW, 1991 – 1995 i 2000 – Kierownik ZChF. Nagrody: 2 Ministra Edukacji, Naukowa PW, 25 Nagród Rektora PW. Liczba publikacji: 352 i 5 monografii. Zainteresowania naukowe: termodynamika równowag fazowych, równowagi ciecz-ciało stałe, kalorymetria, korelacje i przewidywania właściwości fizykochemicznych, ciecze jonowe, farmaceutyki i substancje zapachowe.
e-mail: ula@ch.pw.edu.pl, tel.: (22)6282741

Dr inż. Aneta POBUDKOWSKA (mgr inż. 2001 Wydział Inżynierii Chemicznej i Procesowej PW, dr n. chem. 2006, WCh PW). Doświadczenie zawodowe: 2004–2010 pracownik techniczny, a od 2010 – adiunkt w Zakładzie Chemii Fizycznej WCh PW. Wyróżnienia/nagrody: 3 Nagrody Rektora PW, Stypendium Min. Nauki i Szkolnictwa Wyższego dla Wybitnych Młodych Naukowców oraz Stypendium Konferencyjne dla Młodych Pracowników Naukowych TNW i FNP. Publikacje: 27. Zainteresowania naukowe: równowagi ciecz-ciało stałe i właściwości farmaceutyków.
e-mail: pobudka@ch.pw.edu.pl, tel.: (22)234 7074

Dr Jolanta MIERZEJEWSKA (mgr n. biol., specjalność mikrobiologia, 2002 r., UW; dr n. biol., specjalność biochemia, 2008 r. IBB PAN). Doświadczenie zawodowe: 2008–2010 asystent IBB PAN, od 2011 r. adiunkt w Zakładzie Technologii i Biotechnologii Środków Leczniczych PW. Wyróżnienia/nagrody: nagroda Rady Naukowej IBB PAN w 2008 r.; laureatka POMOST FNP w 2013 r. Liczba publikacji: 12. Zainteresowania naukowe: biologia bakterii patogennych oraz drożdży, zastosowanie drożdży w produkcji wybranych metabolitów pierwotnych i wtórnych.
e-mail: jmierzejewska@ch.pw.edu.pl, tel.: 22 234 7074

Aktualności z firm

News from the Companies

Dokończenie ze strony 490

Granty ERC dla Polaków!

W tym roku aż trojgu młodym polskim naukowcom udało się zdobyć Starting Grant ERC 2016 (European Research Council). Dr hab. Ewelina Knapska, dr hab. Magdalena Król oraz dr Marcin Pilipczuk zostali laureatami i otrzymali Starting Grants w ramach programu Horyzont 2020. Na konferencji prasowej, poświęconej sukcesowi polskich naukowców, zarówno prezes PAN Jerzy Duszyński, jak i minister nauki i szkolnictwa wyższego Jarosław Gowin podkreślali konieczność rozwijania inicjatyw wspierających aplikujących o granty. Najlepszym przykładem jest istniejące (od kwietnia br.) Biuro ds. Doskonałości Naukowej PAN, które powstało przy współpracy Polskiej Akademii Nauki i resortu nauki. Jak mówił podczas konferencji minister Jaro-

staw Gowin – Sukces trojga naukowców jest wzorem dla ich następców, ale też inspiracją i zachętą do zwiększania środków finansowych na naukę. Premier zwrócił też uwagę na konieczność zmian organizacyjnych i usprawnień, które w przyszłości ułatwią przygotowanie się do wieloetapowych selekcji w tego typu programach grantowych. Gratulując młodym naukowcom, minister Jarosław Gowin powiedział, że to wyjątkowa przyjemność i zaszczyt być ministrem nauki w takich momentach. Sami młodzi badacze chętnie opowiadali o nagrodzonych projektach, ale też o ciężkich etapach selekcji, podczas których mogli liczyć na wsparcie swoich mentorów, współpracowników, uczelnianych biur obsługi badań, czy także Biura ds. Doskonałości Naukowej PAN. (kk)

(<http://www.nauka.gov.pl/>, 31.08.2016)

Dokończenie na stronie 499