

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY**

(19) **PL** (11) **231944**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **416693**

(51) Int.Cl.

C12P 7/18 (2006.01)

C07C 31/24 (2006.01)

C12R 1/645 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **30.03.2016**

(54)

Sposób otrzymywania erytrytolu

(43) Zgłoszenie ogłoszono:

09.10.2017 BUP 21/17

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:

30.04.2019 WUP 04/19

(73) Uprawniony z patentu:

**UNIwersytet PRZYRODNICZY
WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL**

(72) Twórca(y) wynalazku:

**WALDEMAR RYMOWICZ, Wrocław, PL
MAGDALENA RAKICKA, Komorowo, PL
ANITA RYWIŃSKA, Wrocław, PL**

(74) Pełnomocnik:

rzec. pat. Anna Kasperowicz

PL 231944 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania erytrytoli. Wynalazek może znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Znane są sposoby otrzymywania erytrytoli z czystej glukozy, sacharozy i mieszaniny glukozy i fruktozy lub mieszaniny gliceroli i melasy buraczanej przy udziale drożdży w hodowlach okresowych, okresowych zasilanych i okresowych powtórzeniowych.

W innym sposobie produkcji erytrytoli z glukozy przez drożdże z gatunku *Pseudozyma tsukubaensis* KN75 w hodowli okresowej zasilanej prowadzonej przez około 90 godzin w bioreaktorze, otrzymano 245 g/l erytrytoli, z szybkością objętościową produkcji erytrytoli 2,86 g/lh i wydajnością erytrytoli 0,61 g/g (Marimuthu Jeya, Kyoung-Mi Lee, Manish Kumar Tiwari, Jung-Soo Kim, Paramasamy Gunasekaran, Sang-Yong Kim, In-Won Kim, Jung-Kul Lee, Applied Microbiology and Biotechnology, 2009, 83, str. 225).

Znany jest również sposób okresowej produkcji erytrytoli zasilanej syropem glukozowym przez szczep *Trichosporon* sp. W hodowli węgłnej w 5 litrowym bioreaktorze, w temperaturze 35°C, przy szybkości mieszania równej 600 obr/min otrzymywano do 240 g/l erytrytoli z wydajnością od 0,40 do 0,45 g/g (Jinbyung Park, Byungcheol Seo, Jungryul Kim, Yongkun Park, Journal of Fermentation and Bioengineering, 1998, 86 (6), str. 577).

W innym sposobie produkcji erytrytoli z glukozy przez drożdże z rodzaju *Moniliella* sp. N61188-12, w 144 godzinnej hodowli okresowej zasilanej prowadzonej w 2000 litrowym bioreaktorze, gdzie zastosowano wysokie stężenie całkowite glukozy równe 400 g/l otrzymano 237,8 g/l erytrytoli z szybkością objętościową produkcji erytrytoli 1,98 g/lh i z wydajnością 0,595 g/g (Shie-Jea Lin, Chiou-Yen Wen, Pei-Ming Wang, Jang-Cheng Huang, Chi-Liang Wei, Jin-Wei Chang, Wen-Shen Chu, Process Biochemistry, 2010, 45, str. 973).

Znany jest również proces okresowej produkcji erytrytoli w pożywkach syntetycznych zawierających glicerol i melasę buraczaną przez drożdże z gatunku *Yarrowia lipolytica*. Po 144 godzinach hodowli z 200 g/l gliceroli uzyskano 114 g/l erytrytoli z szybkością objętościową produkcji erytrytoli 1,04 g/lh i wydajnością 0,57 g/g (Mirończuk Aleksandra, Rakicka Magdalena, Biegalska Anna, Rymowicz Waldemar, Dobrowolski Adam, Bioresource Technology, 2015, 198, str. 445).

Jednym ze sposobów jest produkcja erytrytoli z gliceroli przez szczep *Yarrowia lipolytica* Wratistlavia MK1. Produkcję przy udziale tego szczepu prowadzi się w bioreaktorze w systemie periodycznym lub periodycznym powtórzeniowym. W 96 godzinnej hodowli periodycznej uzyskuje się 79,5 g/l erytrytoli z wydajnością 0,53 g/g, a w hodowli periodycznej powtórzeniowej 224 g/l erytrytoli z wydajnością 0,77 g/g (Mirończuk Aleksandra, Dobrowolski Adam, Rakicka Magdalena, Rywińska Anita, Rymowicz Waldemar, Process Biochemistry, 2015, 50, str. 61).

Nieznane są natomiast sposoby ciągłej produkcji erytrytoli w pożywkach zawierających w swoim składzie glicerynę.

Okazało się, że drożdże *Yarrowia lipolytica* potrafią syntetyzować efektywnie erytrytol w długoterminowych systemach hodowlanych, w bardzo niskim pH. Celem wynalazku było zatem opracowanie ciągłej hodowli produkcji erytrytoli prowadzone na zasadzie chemostatu.

Gliceryna o różnej czystości jest otrzymywana jako produkt uboczny w takich procesach jak: (i) transestryfikacja kwasów tłuszczowych w procesie produkcji biodiesla, (ii) w procesie hydrolizy wodnej tłuszczów zwierzęcych lub roślinnych, (iii) w procesach biosyntezy przez drożdże. Gliceryna surowa zawiera różne zanieczyszczenia (resztki kwasów tłuszczowych, metanol, mydła, makroelementy takie jak sód, potas, fosfor lub mikroelementy takie jak żelazo, miedź, cynk). Zawartość zanieczyszczeń w surowej glicerynie zależy od metody jej otrzymywania.

Istotą wynalazku jest to, że proces ciągłej biosyntezy erytrytoli prowadzi się w warunkach chemostatu, gdzie przy nadmiarze gliceryny czynnikiem limitującym wzrost drożdży i produkcję erytrytoli jest stężenie azotu w pożywce zasilającej bioreaktor, którą dozuje się do bioreaktora pierwszego w sposób ciągły z odpowiednią szybkością i odbiera się płyn pofermentacyjny z komórkami drożdży i erytrytolem i wprowadza się do kolejnego bioreaktora z taką samą szybkością, gdzie następuje całkowite wykorzystanie gliceryny przez drożdże. Z drugiego reaktora odbiera się płyn pofermentacyjny z komórkami drożdży i erytrytolem w sposób ciągły. Szybkości dozowania świeżej pożywki zasilającej i odbiór płynu fermentacyjnego są jednakowe, co powoduje, że objętość pożywki w bioreaktorach jest stała przez cały czas prowadzenia procesu ciągłego. W stanie ustalonym dochodzi do równowagi i stężenie erytrytoli, niewykorzystanej gliceryny oraz biomasy są stałe przez cały czas procesu ciągłego.

Podłoże przygotowuje się w taki sposób, że na 1 litr objętości miesza się glicerynę w ilości od 10 do 30 g, ekstrakt drożdżowy w ilości od 0,1 do 5,0 g, bakto-pepton od 0,5 do 5 g, oraz pozostałą ilość wody, po czym ustala się pH na poziomie od 4 do 6. Tak przygotowane podłoże wprowadza się do zbiornika z pożywką zasilającą w ilości od 20 do 30% jego objętości, całość sterylizuje się, chłodzi do temperatury pokojowej, a następnie zaszczenia się podłoże czystą kulturą drożdży *Yarrowia lipolytica*, wytrząsa z prędkością od 150 do 200 obr/min, w temperaturze co najmniej 26°C przez co najmniej dwie doby. Tak uzyskane inokulum wprowadza się do bioreaktora pierwszego w ilości od 5 do 20% objętości roboczej, gdzie pozostałą jego objętość stanowią gliceryna w ilości od 60 do 200 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w ilości od 1,0 do 10,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w ilości od 0,2 do 2 g/L, KH_2PO_4 w ilości od 0,1 do 1,5 g/l; ekstrakt drożdżowy w ilości od 0,1 do 5,0 g oraz pozostałą ilość wody i prowadzi hodowlę w temperaturze co najmniej 26°C, przy obrotach mieszadła na minutę od 400 do 1000, szybkości napowietrzania od 100 do 800 ml/min. Po upływie co najmniej dwóch dób, do bioreaktora pierwszego w sposób ciągły wprowadza się podłoże zasilające o składzie: gliceryna w ilości od 200 do 400 g, ekstrakt drożdżowy w ilości od 0,1 do 15,0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w ilości od 1,0 do 10,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w ilości od 0,2 do 2 g/L, NaCl w ilości od 1 do 40 g/L, KH_2PO_4 w ilości od 0,1 do 1,5 g/l oraz pozostałą ilość wody, z szybkością wprowadzania od 6 do 30 ml/h, przy objętości roboczej bioreaktora pierwszego od 1 do 4 litrów, przy czym poziom pH utrzymuje się na poziomie 2,5–3,0 przez cały czas prowadzenia procesu biosyntezy erytrytolu, następnie wypływający z bioreaktora pierwszego płyn fermentacyjny z komórkami drożdży i erytrytolem jest kierowany do drugiego bioreaktora. Wypływający w sposób ciągły z tego bioreaktora płyn fermentacyjny z komórkami drożdży i erytrytolem wprowadzany jest do zbiornika na płyn fermentacyjny, następnie z płynów z tego zbiornika oddziela się biomasę drożdży od cieczy poprzez filtrację, natomiast płyn fermentacyjny poddaje się dekoloryzacji na węglu aktywnym, a jony usuwa na wymiennicach jonowych, kolejno płyn zawierający erytrytol zatęża się do około 50% suchej masy na wyparce próżniowej, a powstałe w temperaturze pokojowej kryształy oddziela się poprzez filtrację, przemywa wodą i suszy.

Korzystnie jest, gdy glicerolem jest gliceryna surowa z produkcji biodiesla i/lub z hydrolizy tłuszczów roślinnych i/lub zwierzęcych.

Korzystnie również jest, gdy inokulum wprowadza się do pierwszego bioreaktora w ilości 10% objętości roboczej.

Zaletą sposobu według wynalazku jest wysoka selektywność procesu, w wyniku czego otrzymuje się duże ilości erytrytolu przy niewielkich ilościach produktów ubocznych.

Fig. 1 przedstawia schemat poglądowy prowadzenia procesu produkcji erytrytolu w systemie ciągłym dwustopniowym.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest na przykładach.

P r z y k ł a d 1

Podłoże inokulacyjne o objętości 50 ml zawierające: glicerol – 20 g/l; ekstrakt drożdżowy – 2 g/l; bakto-pepton – 3 g/l; woda wodociągowa do 1 litra, zaszczenia się szczepem *Yarrowia lipolytica* Wratistavlavia K1 i prowadzi hodowlę przez 48 godzin w kolbie stożkowej o objętości 300 ml, w temperaturze 29°C na wstrząsarce rotacyjnej przy 160 obr/min. Hodowla ta stanowi materiał szczepienny właściwej hodowli produkcyjnej, którą przeprowadza się w 5-litrowym bioreaktorze 3, zawierającym 1,5 litra podłoża produkcyjnego o składzie: glicerol – 150 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,6 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 g/l; NaCl – 25 g/l; KH_2PO_4 – 0,25 g/l; ekstrakt drożdżowy – 1 g/l; woda wodociągowa do 1,5 litra. Do utrzymania pH środowiska hodowlanego na poziomie 2,9 stosuje się 10 M NaOH. W trakcie procesu utrzymuje się stałą temperaturę 30°C, szybkość obrotową mieszadła 800 obr/min i szybkość napowietrzania 0,6 litra powietrza/min. Po 48 godzinach prowadzenia hodowli, ze zbiornika z pożywką zasilającą 1 wprowadza się w sposób ciągły przy pomocy pompy zasilającej 2, pożywkę zasilającą o składzie: glicerol – 300 g/l, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ – 4,6 g/l; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0,3 g/l; NaCl – 25 g/l; KH_2PO_4 – 0,25 g/l; ekstrakt drożdżowy – 1 g/l; woda wodociągowa do 1 litra, z szybkością 15 ml/h. Po upływie kolejnych 48 godzin płyn fermentacyjny z bioreaktora 3 wprowadza się za pomocą pompy 4 do bioreaktora 5 z szybkością 15 ml/h. Jednocześnie, w sposób ciągły z bioreaktora 5, odbierany jest płyn fermentacyjny pompą odbierającą 6 z szybkością 15 ml/h, który gromadzony jest w zbiorniku na płyn fermentacyjny 7. Proces ciągłej biosyntezy erytrytolu prowadzi się 700 godzin. W stanie ustalonym w 1 litrze wypływającego płynu fermentacyjnego, otrzymuje się 190 g/l erytrytolu, 3 g/l produktów ubocznych, 5 g/l niewykorzystanej gliceryny oraz dodatkowo 25 g/l suchej biomasy drożdży o zawartości białka 41%. Objętościowa szybkość produkcji ery-

trytolu wynosi 1,5 g/l-h, a wydajność produkcji erytrytolu 0,63 g/g. Następnie otrzymany płyn fermentacyjny wiruje się, przeprowadza dekoloryzację na węglu aktywnym oraz usuwa jony na wymienniczkach jonowych. Kolejny płyn zagęszcza się na wyparce próżniowej do 50% zawartości suchej masy.

Przykład 2

Przygotowuje się inokulum i prowadzi proces jak w przykładzie 1, z tym, że biosyntezę erytrytolu prowadzi się na glicerynie z produkcji stearyny w pH równym 3,0, a szybkość dozowanej pożywki zasilającej wynosi 20 ml/h. Po upływie kolejnych 48 godzin płyn fermentacyjny z bioreaktora 3 przepompowuje się pompą 4 do bioreaktora 5 z szybkością 20 ml/h. Proces ciągłej biosyntezy erytrytolu prowadzi się 800 godzin. W stanie ustalonym w 1 litrze wypływającego płynu fermentacyjnego, otrzymuje się 125 g/l erytrytolu, 3 g/l produktów ubocznych, 2 g/l niewykorzystanej gliceryny oraz dodatkowo 20 g/l suchej biomasy drożdży o zawartości białka 38,5%. Objętościowa szybkość produkcji erytrytolu wynosi 0,96 g/l-h, a wydajność produkcji erytrytolu 0,4 g/g. Dalej postępuje się jak w przykładzie 1.

Przykład 3

Przygotowuje się inokulum i prowadzi proces jak w przykładzie 1 z tym, że po 48 godzinach prowadzenia hodowli, wprowadza się w sposób ciągły pożywkę zasilającą o składzie: glicerol – 300 g/l; ekstrakt drożdżowy – 9,8 g/l; NaCl – 26,5 g/l; woda wodociągowa do 1 litra, z szybkością 16 ml/h. Po upływie kolejnych 48 godzin płyn fermentacyjny z bioreaktora 3 wprowadza się z pomocą pompy odbierającej 4 do bioreaktora 5 z szybkością 16 ml/h. Proces ciągłej biosyntezy erytrytolu prowadzi się 900 godzin. W stanie ustalonym w 1 litrze wypływającego płynu fermentacyjnego, otrzymuje się 165 g/l erytrytolu, 2 g/l produktów ubocznych, 1 g/l niewykorzystanej gliceryny oraz dodatkowo 28 g/l suchej biomasy drożdży o zawartości 39% białka. Objętościowa szybkość produkcji erytrytolu wynosi 1,35 g/l-h, a wydajność procesu produkcji erytrytolu 0,55 g/g. Dalej postępuje się jak w przykładzie 1.

Przykład 4

Przygotowuje się inokulum i prowadzi proces jak w przykładzie 1, z tym, że biosyntezę erytrytolu prowadzi się ze szczepem *Yarrowia lipolytica* Wratislavia MK1, a szybkość dozowanej pożywki zasilającej wynosi 25 ml/h. Po upływie kolejnych 48 godzin płyn fermentacyjny z bioreaktora 3 wprowadza się do bioreaktora 5 z szybkością 25 ml/h. Po upływie kolejnych 48 godzin płyn fermentacyjny wprowadza się do bioreaktora 5 z szybkością 25 ml/h. Proces ciągłej biosyntezy erytrytolu prowadzi się 850 godzin. W stanie ustalonym w 1 litrze wypływającego płynu fermentacyjnego, otrzymuje się 180 g/l erytrytolu, 4 g/l produktów ubocznych, 2,5 g/l niewykorzystanej gliceryny oraz dodatkowo 21 g/l suchej biomasy drożdży o zawartości 39% białka. Objętościowa szybkość produkcji erytrytolu wynosi 1,35 g/l-h, a wydajność procesu produkcji erytrytolu 0,6 g/g. Dalej postępuje się jak w przykładzie 1.

Wykaz oznaczeń

- 1 – zbiornik z pożywką zasilającą
- 2 – pompa zasilająca bioreaktor
- 3 – bioreaktor pierwszy
- 4 – pompa odbierająca
- 5 – bioreaktor drugi
- 6 – pompa odbierająca
- 7 – zbiornik na płyn fermentacyjny

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania erytrytolu, z gliceryny, drogą biosyntezy z wykorzystaniem kultur drożdży *Yarrowia lipolytica*, **znamienny tym**, że przygotowuje się podłoże w taki sposób, że na 1 litr objętości miesza się glicerynę w ilości od 10 do 30 g, ekstrakt drożdżowy w ilości od 0,1 do 5,0 g, bakto-pepton od 0,5 do 5 g, oraz pozostałą ilość wody, po czym ustala się pH na poziomie od 4 do 6, następnie tak przygotowane podłoże wprowadza się do zbiornika z pożywką zasilającą (1) w ilości od 20 do 30% jego objętości, całość sterylizuje się, chłodzi do temperatury pokojowej, a następnie zaszczenia się podłoże czystą kulturą drożdży *Yarrowia lipolytica*, wytrząsa z prędkością od 150 do 200 obr/min, w temperaturze co najmniej 26°C przez co najmniej dwie doby, po czym tak uzyskane inokulum wprowadza się do bioreaktora (3) w ilości od 5 do 20% objętości roboczej, gdzie pozostałą jego objętość stanowią gliceryna w ilości od 60 do 200 g/l, (NH₄)₂SO₄ w ilości od 1,0 do 10,0 g/L, MgSO₄·7H₂O w ilości

- od 0,2 do 2 g/L, KH_2PO_4 w ilości od 0,1 do 1,5 g/l; ekstrakt drożdżowy w ilości od 0,1 do 5,0 g oraz pozostała ilość wody i prowadzi hodowlę w temperaturze co najmniej 26°C , przy obrotach mieszadła na minutę od 400 do 1000, szybkości napowietrzania od 100 do 800 ml/min, po czym po upływie co najmniej dwóch dób, do bioreaktora (3) w sposób ciągły wprowadza się podłoże zasilające o składzie: gliceryna w ilości od 200 do 400 g, ekstrakt drożdżowy w ilości od 0,1 do 15,0 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ w ilości od 1,0 do 10,0 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ w ilości od 0,2 do 2 g/L, NaCl w ilości od 1 do 40 g/L, KH_2PO_4 w ilości od 0,1 do 1,5 g/l oraz pozostałą ilość wody, z szybkością wprowadzania od 6 do 30 ml/h, przy objętości roboczej bioreaktora (3) od 1 do 4 litrów, przy czym poziom pH utrzymuje się na poziomie 2,5–3,0 przez cały czas prowadzenia procesu biosyntezy erytrytolu, następnie wypływający z bioreaktora (3) płyn fermentacyjny z komórkami drożdży i erytrytolem jest kierowany do drugiego bioreaktora (5), a wypływający w sposób ciągły z bioreaktora (5) płyn fermentacyjny z komórkami drożdży i erytrytolem wprowadzany jest do zbiornika (7), następnie z płynów ze zbiornika (7) oddziela się biomasę drożdży od cieczy poprzez filtrację, natomiast płyn fermentacyjny poddaje się dekoloryzacji na węglu aktywnym, a jony usuwa na wymienniczkach jonowych, kolejno płyn zawierający erytrytol zatęża się do około 50% suchej masy na wyparce próżniowej, a powstałe w temperaturze pokojowej kryształy oddziela się poprzez filtrację, przemywa wodą i suszy.
2. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że glicerolem jest gliceryna surowa z produkcji biodiesla i/lub z hydrolizy tłuszczów roślinnych i/lub zwierzęcych.
 3. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że inokulum wprowadza się do bioreaktora (3) w ilości 10% objętości roboczej.

Rysunek

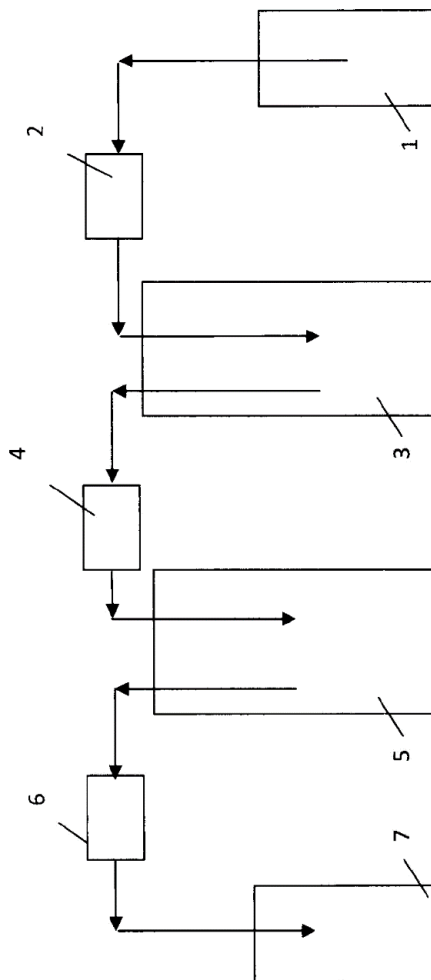


Fig.1

