



Biokonwersja kwasu *trans*-cynamonowego do L-fenylalaniny przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula*

Iwona Gientka, Stanisław Błażej, Wanda Duszkiewicz-Reinhard
Zakład Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Wydział Technologii
Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, Warszawa

Bioconversion of *trans*-cinnamic acid to L-phenylalanine by *Rhodotorula* sp.

Summary:

The synthesis of the aromatic amino acid L-phenylalanine has received considerable attention in recent years due to its increasing importance as precursor to the dipeptide sweetener aspartame. Phenylalanine ammonia lyase (PAL), which occurs in yeast, catalyzes the nonoxidative deamination of L-Phe to *trans*-cinnamic acid (tCA), has industrial application in the synthesis of L-Phe. Superior producers of PAL are *Rhodotorula* sp. PAL is induced in yeast cell by the presence of L-Phe, while glucose represses PAL synthesis. Different additives and conditions during inducing PAL: permeabilizing, reducing and stabilization agents, as well as pH and temperature during bioconversion targeting to higher productivity of L-Phe were discussed.

Adres do korespondencji

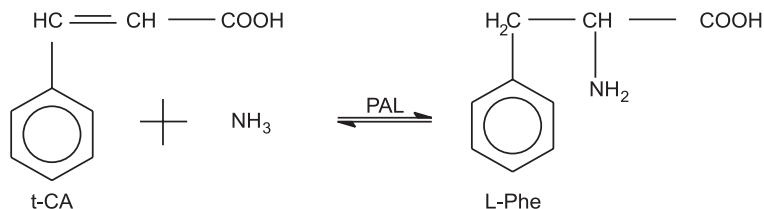
Iwona Gientka,
Zakład Biotechnologii
i Mikrobiologii Żywności,
Wydział Technologii
Żywności,
Szkoła Główna
Gospodarstwa Wiejskiego,
ul. Nowoursynowska 159 c,
02-776 Warszawa.

Key words:

phenylalanine ammonia lyase, *trans*-cinnamic acid, L-phenylalanine, yeast, *Rhodotorula* sp.

1. Wstęp

Enzym amoniakoliza fenylalaninowa (EC 4.3.1.5) szeroko rozpowszechniony w komórkach roślinnych, katalizuje spontaniczną nieoksydatywną deaminację L-fenylalaniny do kwasu *trans*-cynamonowego i amoniaku (1). W dalszym cyklu przemian



Rys. 1. Reakcja biokonwersji kwasu *trans*-cynamonowego do L-feniloalaniny.

metabolicznych kwas *trans*-cynamonowy może zostać przekształcony do lignin, flawonoidów, polifenoli i hormonów (2).

Enzym ten występuje również powszechnie w komórkach grzybów (3). Po raz pierwszy obecność amoniakolizy fenyloalaninowej (PAL, ang. *phenylalanine ammonia lyase*) w komórkach drożdży została potwierdzona przez Ogatę w 1966 r. (4). Od tego czasu wielokrotnie wykazywano aktywność PAL m.in. w komórkach *Streptomyces verticillatus* (5), *Sporolobomyces pararoseus* (6), *Rhizoctonia solani* (7), *Endomyces lindneri* (8), *Cladosporium cladosporioides* (9). Jednak największym producentem tego enzymu są drożdże *Rhodospiridium toruloides* i ich forma anamorficzna z rodzaju *Rhodotorula* (3,10,11).

Główne zadanie amoniakolizy fenyloalaninowej występującej w komórkach drożdży polega na uczestnictwie w przyswajaniu fenyloalaniny jako źródła węgla i azotu (12).

W praktyce medycznej oczyszczony preparat enzymatyczny PAL znajduje zastosowanie w leczeniu fenyloketonurii (13), oraz neoplastycznych nowotworów u myszy (14). Jednak od wielu lat, zainteresowaniem naukowców cieszy się przede wszystkim możliwość wykorzystania PAL do produkcji L-feniloalaniny z kwasu *trans*-cynamonowego (1,15). Proces ten jest stosowany w przemysłowej produkcji tego aminokwasu na drodze mikrobiologicznej (15,16).

2. Charakterystyka i zastosowanie L-feniloalaniny

Feniloalanina (Phe), kwas L-2-amino-3-fenylpropionowy, należy do tzw. aminokwasów aromatycznych, zawiera pierścień fenylowy, połączony z grupą metylową $-\text{CH}_2-$ i podobnie jak tryptofan, wykazuje charakter silnie hydrofobowy (17). Dla ssaków nieposiadających szlaku biosyntezy aminokwasów aromatycznych jest aminokwasem egzogennym, który należy dostarczać do organizmu wraz z pożywieniem (18).

Feniloalanina znalazła zastosowanie w przemyśle spożywczym, a także farmaceutycznym, np. do produkcji 3,4-dihydroksyfeniloalaniny (L-DOPA) – leku stosowanego w chorobie Parkinsona (19). Wzrost komercyjnego znaczenia L-Phe w ostatnich latach został wywołany wynalezieniem aspartamu. Aspartam (nazwy handlowe:

Nutra Sweet, Equal, Sanecta) to popularny słodzik, 200-krotnie słodszy od cukru, a obecnie szeroko stosowany w technologii żywności oraz produkcji leków. Aspartam jest dipeptydem zbudowanym z L-Phe i kwasu L-asparaginowego. W przemyśle funkcjonuje pod symbolem E 951 (20). Szacuje się, że roczna produkcja L-feniloalaniny wynosi 7000 ton (21). Wraz ze wzrostem zapotrzebowania na produkty typu „light” przewiduje się dalszy wzrost produkcji L-feniloalaniny jako substratu do otrzymywania aspartamu.

W organizmach ssaków L-Phe jest przekształcana do tyrozyny przez enzym hydroksylazę feniloalaninową. Enzym ten katalizuje utlenianie L-Phe do tyrozyny przy współudziale NADP. Dziedzicznie uwarunkowany niedobór aktywności hydroksylazy L-feniloalaninowej w wątrobie jest przyczyną choroby zwanej fenylketonurią (PKU, ang. *phenylketonuria*). Chorobę tę pod względem klinicznym cechuje przede wszystkim upośledzenie rozwoju umysłowego. Poza tym z mniejszą lub większą częstotliwością pojawiają się stany podniecenia, zaburzenia encelograficzne, zwiększone napięcie mięśni oraz drgawki i napady epileptyczne (22). W przypadku fenylketonurii poziom feniloalaniny w osoczu krwi może wzrosnąć nawet do 60 mg/100 ml, podczas gdy prawidłowy poziom wynosi 1,65 mg/100 ml (23). Sugeruje się, że amoniakoliza feniloalaninowa, a dokładniej jej połączenia z PEG w szczególności linio- wy 20 kDa PEG-PAL mogą być środkiem terapeutycznym w fenylketonurii (24,25).

Feniloalaninę otrzymuje się ze źródeł naturalnych, metodami syntezy chemicznej oraz metodami mikrobiologicznymi.

Feniloalanina pozyskana ze źródeł naturalnych jest czynna optycznie, co pozwala pominąć proces rozdzielania izomerów. Najczęściej izolowana jest z białek typu owoalbuminy i laktoalbuminy (26). Jednak koszty, pracochłonność, jak i dostępność surowca znacznie zmniejszają atrakcyjność stosowania tej metody.

Na drodze chemicznej L-feniloalaninę syntetyzuje się m.in. z wykorzystaniem estru kwasu malonowego. Metody chemiczne, znane już od roku 1850, np. synteza Streckera, prowadzą do otrzymania związków będących mieszaniną racemiczną. W celu uzyskania czystych izomerów optycznych konieczny jest dodatkowy etap rozdzielania, który prowadzi do podniesienia kosztów produkcji (27).

W tym kontekście na szczególną uwagę zasługują drożdże *Rhodotorula gracilis*. Mogą one być źródłem enzymu, oksydazy D-aminokwasowej (DAAO, EC 1.4.3.3), stosowanego do rozdzielania mieszanin racemicznych aminokwasów. Enzym ten katalizuje przekształcenie tylko D-formy przez α -aminokwas do α -ketokwasu (28).

Formę L-feniloalaniny można bezpośrednio uzyskać w procesie biokonwersji kwasu *trans*-cynamonowego (tCA, ang. *trans-cinnamic acid*) wykorzystując amoniakolizę feniloalaninową pochodzącą z drożdży *Rhodotorula* sp. (29).

3. Struktura i właściwości amoniakolizy fenyloalaninowej

Przeprowadzone przez Hodginsa (14) badania struktury i właściwości amoniakolizy fenyloalaninowej pochodzącej z komórek drożdży *Rhodotorula glutinis* (ATTC 15385) wykazały, że enzym ten jest tetramerem o masie cząsteczkowej 275 kDa. W roku 1990 Adachi zbadał enzym wyodrębniony z komórek *Rhodospiridium toruloides* (IFO 0559) i wykazał, że enzym jest dimerem, a jego masa cząsteczkowa wynosi 165 kDa (30). Jako przyczynę różnic mas cząsteczkowych uznano technikę oczyszczania enzymu. W badaniach enzymów wyizolowanych z pszenicy i ziemniaków, wskazuje się jeszcze większe masy cząsteczkowe, które wynoszą odpowiednio 306 i 330 kDa. PAL zlokalizowany jest głównie w cytoplazmie, a niewielkie jego ilości znaleziono także na szorstkim ER (31).

Według najnowszych badań uznaje się, że w centrum aktywnym enzymu znajduje się pochodna grupy imidazolowej w skrócie MIO (*methylidene imidazolone*), która powstaje przez cyklizację tripeptydu AlaSerGly i ma charakter silnie elektrofilowy. Jej obecność w centrum aktywnym enzymu sugeruje się na podstawie analizy rentgenostrukturalnej amoniakolizy histydynowej (EC 4.3.1.3), która wykazuje wysoką homologię w stosunku do PAL (19-29% identycznej sekwencji). Istnienie grupy MIO w amoniakolizie fenyloalaninowej potwierdzono także w badaniach metodą różnicowej UV-spektroskopii (32). Przewidywana obecność grupy MIO w centrum aktywnym PAL została potwierdzona w 2004 r., kiedy to na podstawie badań krystalograficznych pierwszy raz oznaczono strukturę przestrzenną enzymu wyizolowanego z *Rhodospiridium toruloides* (33).

Obecnie znana jest sekwencja nukleotydowa genu kodującego PAL w komórkach drożdży *R. toruloides* (34) i *R. rubra* (35). Indukcja aktywności PAL jest raczej rezultatem syntezy *de novo* niż wynikiem aktywacji prekursora (36). Amoniak i glukoza wpływają na syntezę PAL przez regulację poziomu funkcjonalnego PAL mRNA (37). Przeprowadzono również doświadczenia polegające na wprowadzaniu genu *pal* wraz z intronami pochodzącego z *R. toruloides* do komórek *E. coli* (38) i *Saccharomyces cerevisiae* (39), które jednak nie doprowadziły do biosyntezy enzymu. Dopiero wbudowanie cDNA w wektor plazmidowy doprowadziło do jego ekspresji w komórkach *E. coli*. Aktywność tak rekombinowanego enzymu wynosi zaledwie 3-5 mU (40), co w porównaniu z aktywnością tego enzymu u dzikich szczepów *Rhodotorula glutinis* na poziomie 150-200 mU jest wartością nieporównywalnie małą (38).

Ukierunkowane poszukiwania dzikich szczepów o dużej aktywności amoniakolizy fenyloalaninowej rozpoczęto w roku 1967 (41) od prób izolacji szczepów na podłożach z fenyloalaniną jako jedynym źródłem węgla i azotu. Skuteczność tej metody była jednak niewielka, gdyż na takich podłożach rosły drobnoustroje wykorzystujące fenyloalaninę w innych mechanizmach niż tylko jako substrat dla amoniakolizy fenyloalaninowej (42). Podejmowano także próby wykorzystania kwasu *trans*-cynamonowego jako jedynego źródła węgla w podłożu selektywnym. Na takich podłożach znajdowano kolonie drobnoustrojów, które w dalszych badaniach

nie wykazały aktywności PAL (43,44). Najwięcej komórek zawierających PAL uzyskano na selektywnym podłożu z L-tyrozyną (10). Substrat ten, został wybrany zgodnie z założeniem, że metabolizm tyrozyny z udziałem PAL jest bardzo powolny. Dlatego też w większych koloniach na podłożu selektywnym z L-Tyr spodziewano się wysokiego poziomu aktywności PAL. Stosując tę procedurę wyizolowano drożdże z gatunków *Rhodotorula rubra*, *Rhodotorula glutinis*, *Rhodotorula minuta*, *Rhodospiridium toruloides* i *Sporidiobolus pararoseus* wykazujące wysoką aktywność amoniakolizy feniloalaninowej.

4. Charakterystyka drożdży z rodzaju *Rhodotorula*

Drożdże *Rhodotorula* należą do Królestwa *Fungi*, gromady *Basidiomycota*, klasy *Uredinomyces*, rzędu *Sporidiales*, rodziny *Sporidiobolaceae* i rodzaju *Rhodotorula* (45,46). Najbardziej charakterystyczną cechą fizjologiczną tych drożdży jest wytwarzanie barwników karotenoidowych. Kolonie przyjmują barwę od łososiowej przez różową, koralową aż do krwistoczerwonej. Barwniki karotenoidowe chronią komórki przed działaniem promieni światła widzialnego i bliskiego ultrafioletu (47).

Drożdże z rodzaju *Rhodotorula* znajdowano m.in. w produktach roślinnych, zwierzęcych oraz w powietrzu. Są także, obok *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, szeroko rozpowszechnione w wodzie słodkiej i w morskiej (46). Należą do mikroflory szkodliwej występującej na maśle, serze, śmietanie, mięsie czy drożdżach piekarskich (48). Mogą tolerować wysokie stężenia soli, nawet do 1M NaCl (49).

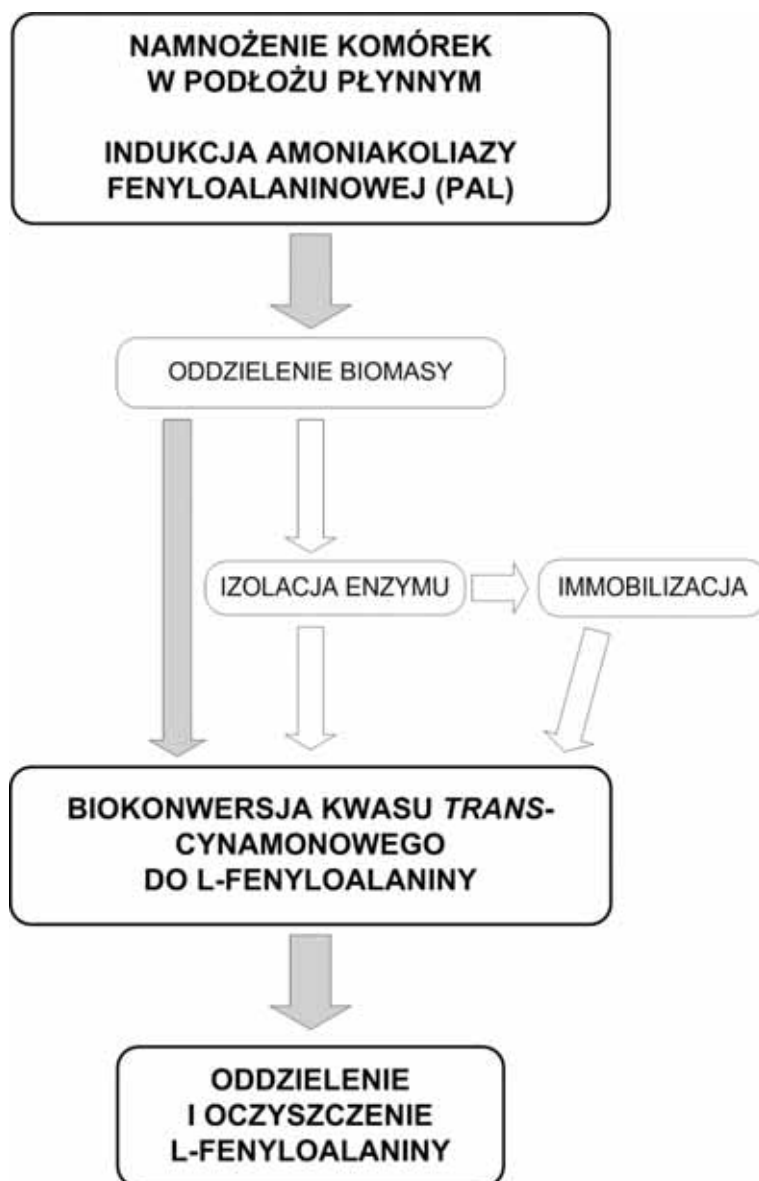
Drożdże z rodzaju *Rhodotorula* charakteryzują się niską patogennością, choć można znaleźć doniesienia, w których wskazuje się na takie właściwości niektórych gatunków. Drożdże rodzaju *Rhodotorula* mogą być czynnikiem etiologicznym oportunistycznych mykoz u podatnych gospodarzy, zwłaszcza pacjentów z AIDS lub ostrą białaczką (50-52).

5. Produkcja L-feniloalaniny na drodze biokonwersji

Według danych literaturowych (10,11,14,16) organizmami najczęściej opisywanymi i stosowanymi do otrzymania L-feniloalaniny metodą biokonwersji są bogate w enzym PAL drożdże *Rhodotorula glutinis*, a także *Rhodotorula mucilaginosa* i *Rhodospiridium toruloides*.

Schemat produkcji L-feniloalaniny z wykorzystaniem tych organizmów obejmuje trzy zasadnicze etapy:

- indukcję amoniakolizy feniloalaninowej w komórkach drożdży,
- biokonwersję kwasu *trans*-cynamonowego do L-Phe,
- oddzielenie i oczyszczenie L-feniloalaniny.



Rys. 2. Schemat produkcji L-fenyloalaniny z wykorzystaniem drożdży z rodzaju *Rhodotorula* sp.

5.1. Namnożenie komórek w podłożu płynnym oraz indukcja amoniakolizy feniloalaninowej

Do namnożenia komórek drożdży stosuje się standardowe procedury, które zapewniają odpowiednie źródła węgla, najczęściej w postaci glukozy. W charakterze nieorganicznych źródeł azotu stosuje się fosforan lub siarczan amonu. Organicznymi źródłami azotu mogą być aminokwasy, pepton, hydrolizaty proteinowe, mąka sojowa lub syrop kukurydziany. Za najlepszy uznaje się jednak ekstrakt drożdżowy. Witaminy, składniki mineralne i inne czynniki wzrostowe dostarczane są wraz ze źródłami węgla i azotu, albo dodawane oddzielnie. Typowe biopierwiastki jak cynk, magnez, żelazo, kobalt i wapń mogą być dodawane do podłoża w formie soli nieorganicznych (53).

W warunkach hodowli z napowietrzeniem na zbilansowanych podłożach stwarzane są dogodne warunki wzrostu. Namnożone komórki po odwirowaniu przenosi się do podłoża, w którym następuje indukcja enzymu odpowiedzialnego za produkcję feniloalaniny. Rolę induktora spełnia L-feniloalanina lub D,L-feniloalanina, L-tyrozyna, D,L-tyrozyna (53), a także L-izoleucyna (11). Przeciętą dawką L-feniloalaniny w podłożu, która indukuje produkcję PAL wynosi 0,4-0,5% (54,55,10). Stosowanie wyższych dawek nie wpływa istotnie na wzrost aktywności enzymu, za to znacznie podwyższa koszty jego produkcji (53). Dobre wyniki uzyskiwano stosując jako induktor mieszaninę feniloalaniny i izoleucyny odpowiednio w ilościach 0,5 i 0,05% w podłożu (3,11).

Uzyskanie maksymalnej ekspresji PAL determinuje odpowiednie stężenie źródeł węgla i azotu podczas hodowli komórek drożdży. Zaobserwowano również zjawisko represji katabolicznej syntezy PAL przez glukozę (36). Przedmiotem badań był także wpływ innych źródeł węgla na indukcję amoniakolizy feniloalaninowej (10). Wykazano, że żaden z badanych szczepów nie syntetyzował PAL w obecności cukrów i alkoholi.

Evans i wsp. badali wpływ stężenia jonów amonowych, dodawanych w postaci $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, na regulację syntezy PAL. Wraz ze zmniejszaniem stężenia tych jonów w środowisku aktywność enzymu wzrastała (10). Nadal trwają poszukiwania innych, tańszych od czystych aminokwasów źródeł induktorów. Obiecującym źródłem takich związków może być, jak się wydaje, kazeina lub hydrolizaty krwi (53).

Ustalono, że optymalna temperatura dla syntezy PAL wynosi na ogół od 20 do 30°C (3). Temperatura powyżej 30°C niekorzystnie wpływa na aktywność enzymu. W komórkach *Rhodotorula rubra* aktywność osiągała wartość maksymalną w temperaturze hodowli 25°C, natomiast w 35°C była niższa o 75%. W przypadku amoniakolizy feniloalaninowej pochodzącej z komórek *Rhodotorula graminis* aktywność tego enzymu w temp. hodowli 35°C obniżała się o 30% w porównaniu z jego aktywnością w temp. hodowli 25°C.

Kolejnym czynnikiem istotnie wpływającym na indukcję PAL jest pH, którego optymalna wartość według danych literaturowych (56,11) powinna wynosić od 5,5 do 7,5.

Proces indukcji PAL powinien przebiegać w takich warunkach, aby zbyt wysoki stopień natlenienia hodowli nie prowadził do proteolitycznego rozkładu enzymu. El-Batal podaje, że podczas hodowli wgłębnej na wytrząsarce rotacyjnej liczba obrotów nie powinna przekraczać 105 na minutę (11).

Hodowlę drożdży na podłożu indukcyjnym prowadzi się do momentu, gdy enzym PAL osiągnie aktywność przynajmniej 0,2-2 U/ml (53). Na podłożu z fenyloalaniną największą aktywność enzymu w przypadku szczepu *R. glutinis* obserwowano w 16-18 godzinie hodowli. Po osiągnięciu stacjonarnej fazy wzrostu aktywność enzymu gwałtownie spada. Yamada i wsp. podają, że dodatek L-izoleucyny do podłoża indukcyjnego przeciwdziała temu niekorzystnemu zjawisku i pozwala utrzymać wysoką aktywność enzymu w komórkach drożdży *Rhodotorula glutinis* podczas ich dalszej hodowli (1).

Komórki zawierające amoniakolizację fenyloalaninową mogą być wrażliwe na kataboliczną represję syntezy enzymu. Istnieje zatem potrzeba usuwania metabolitów oraz ich prekursorów z podłoża. W tym celu oddziela się komórki z podłoża przez odwirowanie lub filtrację, po czym przemywa się i zawiesza w wolnym od metabolitów środowisku.

5.2. Biokonwersja kwasu *trans*-cynamonowego do L-fenyloalaniny

W procesie biokonwersji tCA do L-Phe z udziałem PAL wykorzystuje się reakcję odwrotną zachodzącą w wysokim pH. Optymalne pH procesu mieści się w zakresie 9-11 (53) i zależy od przynależności gatunkowej stosowanych drożdży. Przykładowe wartości optymalnej kwasowości czynnej środowiska wynoszą: pH 9,5 – dla komórek drożdży *Rhodospiridium toruloides* (57), pH 10,5 – dla *Rhodotorula rubra* (15), pH 10,0 – dla *R. glutinis* IFO 0559 (1), pH 11,0 – dla mutantów *Rhodotorula glutinis* (58). Poniżej wartości pH równej 9 następuje deaminacja L-Phe do kwasu *trans*-cynamonowego.

Biokonwersja zachodzi przy dużym nadmiarze amoniaku w stosunku do kwasu *trans*-cynamonowego. W związku z tym najczęściej stosowane stężenie amoniaku wynosi od 2 do 9 M NH_4OH (15).

W celu uzyskania dużego stężenia L-Phe zawartość kwasu cynamonowego w mieszaninie reakcyjnej zasadniczo powinna być wysoka. Jednocześnie stwierdzono (56), że nadmierna koncentracja tCA w środowisku reakcji jest inhibitorem aktywności amoniakolizacji fenyloalaninowej. Tym samym konieczne staje się określenie możliwie maksymalnej zawartości tego związku w mieszaninie. Według danych objętych patentem (59) optymalne stężenie tCA w podłożu powinno wynosić 5-30 g/l (najczęściej 10-20 g/l). Według innych autorów (56) graniczne stężenie kwasu nie powinno przekraczać 7,4 g/l (50 mM). Mechanizm inhibicji kwasem cynamonowym prawdopodobnie polega na aktywacji proteaz, które rozkładają PAL. Z całą pewnością wysokie stężenie kwasu *trans*-cynamonowego obniża aktywność PAL, podobnie

jak wewnątrzkomórkowe enzymy proteolityczne nieodwracalnie niszczą ten enzym. Ocenia się, że system inaktywacji enzymu może być zależny od aktywności tlenu w środowisku i może wymagać odpowiedniego stężenia jonów chlorkowych. Evans i wsp. podają, że zahamowanie syntezy PAL może również następować w obecności izoleucyny, feniloalaniny, a także w warunkach obniżonej zawartości tlenu (60).

Optymalna temperatura, w jakiej zachodzi biokonwersja, wynosi 15-20°C, przy czym proces może przebiegać w zakresie temperatur 5-40°C. Niższa temperatura reakcji korzystnie wpływa na przedłużenie stabilności enzymu i stwarza możliwość wykorzystania komórek drożdży w procesie ciągłym (53). Inni autorzy (15) obserwowali stałą wydajność biokonwersji w zakresie temp. 25-40°C. Takac i wsp. uznali temperaturę 30°C za optymalną, wówczas gdy L-Phe była wytwarzana przez komórki *Rhodotorula glutinis* (56). Wzrost temperatury do 40°C powodował spadek stężenia aminokwasu o około 50% w porównaniu do przebiegu procesu w temperaturze optymalnej.

Na wydajność biokonwersji znaczący wpływ ma obecność jonów Cl⁻ (56). Stosowanie wyższych stężeń Cl⁻ (0,5 M i 1 M) obniżało wydajność procesu. Zauważono także, że przy wyższym stężeniu tCA (powyżej 50 mM) już najniższa badana ilość KCl, wynosząca 0,1 M, powodowała inhibicję PAL. Dlatego też do regulacji pH na początku procesu zaleca się używanie kwasu siarkowego zamiast solnego (11).

Badania wielu autorów (56,60) dotyczyły wpływu metabolitów na proces biokonwersji. Jedynym metabolitem wpływającym na poprawę wydajności procesu był kwas L-glutaminowy. Jego dodatek w ilości 4 g/l do mieszaniny reakcyjnej dla *R. rubra* powodował wzrost wydajności produkcji L-feniloalaniny o około 50%. W przypadku szczepu drożdży *R. glutinis* zastosowanie dodatku glutaminianu sodu w ilości 50 g/l powodowało wzrost wydajności o blisko 500%.

Ponieważ PAL jest enzymem wewnątrzkomórkowym, zatem czynniki rozluźniające strukturę ściany komórkowej powinny zdecydowanie podnosić ilość wyprodukowanej L-feniloalaniny. Dodatek 0,1% Tritonu X-100 podnosi wydajność procesu o blisko 60%. Inne substancje o podobnym działaniu jak chlorek cetydylopimirydiny czy DMSO zwiększa wydajność odpowiednio o 50 i 35% (11). Podobnie korzystny wpływ na wydajność procesu biokonwersji miał dodatek penicyliny do środowiska reakcji (56). Także potraktowanie komórek drożdży niektórymi rozpuszczalnikami organicznymi zwłaszcza acetonem, eterem lub mieszaniną toluenu i etanolu podnosiło wydajność biokonwersji (11).

Niektórzy autorzy (61) uważają, że permeabilizacja agresywnymi związkami typu rozpuszczalniki i alkohole powoduje, że komórki ulegają osłabieniu, co znalazło potwierdzenie w bardzo niskiej wydajności produkcji aminokwasu przez komórki użyte w drugim cyklu. Poleca się, zatem dodatek Tritonu X-100 w niskich stężeniach, który nie prowadzi do głębokich zmian w integralności struktur komórkowych.

Znaczną trudność podczas biokonwersji tCA sprawia utrzymanie stabilności i aktywności enzymu na takim poziomie, aby mógł on być wykorzystywany w następnym cyklu, czy wreszcie w procesie ciągłym. Na stabilność enzymu i w konsekwencji

wyższą wydajność biokonwersji wpływa dodatek L-izoleucyny, który jednak znacznie podnosi koszty produkcji. Inne związki zwiększające stabilność to m.in. glikol polietylenowy, glikol etylenowy, sorbitol, glicerol i glutaraldehyd (11). Evans i wsp. (1987), Takac i wsp. (1995), D’Cuhna i wsp. (1994) oraz El-Batal (2002) podają, że najskuteczniejszą ochronę amoniakolizacji fenyloalaninowej wykazuje glicerol zastosowany w stężeniu 20% (11,56,60,62).

Dokonując oceny wpływu innych czynników na wydajność procesu biokonwersji (60) stwierdzono, że ograniczenie dostępu tlenu w środowisku reakcji może zmniejszyć aktywność metaboliczną komórek, a w rezultacie doprowadzić do obniżenia stopnia proteolitycznego rozkładu enzymu. Skłoniło to El-Batala do określenia wpływu czynników redukujących na wydajność biokonwersji kwasu tCA do L-Phe. Nie stwierdził on zwiększenia wydajności przy dodatku jonów metali takich jak: wapń, cynk, żelazo, miedź, mangan, magnez. Dodatek innych czynników redukujących, a wśród nich 2-merkaptoetanolu i kwas tioglikolowy w stężeniu 400 mg/l znacząco poprawił wydajność procesu, odpowiednio o 49 i 55% przy użyciu komórek w jednym cyklu. W przypadku wykorzystania komórek w kilku cyklach 2-merkaptoetanolu podnosił wydajność aż o 400%, a kwas tioglikolowy o blisko 500% (11).

Inni autorzy (63,64) w swoich pracach koncentrują się głównie na wykorzystaniu poznanych wcześniej zjawisk i zależności zachodzących w procesie biokonwersji w celu podniesienia jej wydajności. Badano m.in. wykorzystanie w procesie ciągłym komórek immobilizowanych w alginianie, stosowano dodatek mieszaniny PEG, glutaraldehydu, sorbitolu oraz deareację przez wysycanie środowiska reakcji azotem.

Standardowo proces biokonwersji trwa 24 h i kończy się odwirowaniem biomasy komórkowej drożdży (65).

5.3. Proces oczyszczania L-fenyloalaniny

Końcowym etapem produkcji L-fenyloalaniny metodą biokonwersji jest jej oczyszczenie. Znane są 4 metody oczyszczania tego aminokwasu opatentowane w Japonii, USA i EU:

1. Patent japoński (No. 194046/1986) – metoda rozdzielania chromatograficznego (ang. *the ion exchange resin adsorption method*). Jest to technika kosztowna, mało wydajna i z tego względu nie znajdująca zastosowania w przemyśle.

2. Patent japoński (No. 133893/1985) – metoda zatężenia i krystalizacji fenyloalaniny (ang. *concentration/crystalization method*). Z uwagi na konieczność filtracji przed zatężeniem uważana jest również za technikę trudną i nisko efektywną. Dodatkowo w tym procesie roztwór wymaga neutralizacji, co prowadzi do powstawania niepotrzebnych soli.

3. Patent amerykański (No. 4731469) – metoda z użyciem pierwszorzędowych alkoholi (ang. *a lower alcohol using method*). Kwas cytrynowy rozpuszcza się w alkoholu i dalej jest stamtąd usuwany.

4. Patent europejski (EP 0 556 721 A1) – metoda ekstrakcji z toluenem i rozdzielaniem faz. Proces przebiega z dużą wydajnością, a otrzymany aminokwas wykazuje dużą czystość, co daje podstawy do przemysłowego zastosowania.

6. Perspektywy badawcze

Na podstawie dotychczasowych badań można przypuszczać, że w dalszych pracach związanych z opracowaniem wydajnego procesu produkcji L-feniloalaniny przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* badacze zmierzają do:

1) uzyskania szczepu o dużej ekspresji i aktywności PAL na drodze mutagenizacji chemicznej (3), fizycznej (58), fuzji protoplastów i transformacji (66),

2) zwiększenia wydajności produkcji L-Phe przez stosowanie związków rozluźniających ścianę komórkową drożdży w celu ułatwienia migracji substratów do komórki i produktu na zewnątrz komórki,

3) stabilizacji enzymu podczas procesu biokonwersji metodami immobilizacji całych komórek (63) dodawania czynników redukcyjnych, a w konsekwencji wykorzystania drożdży w ciągłym procesie produkcji L-Phe,

4) wykorzystania analogów feniloalaniny do produkcji innych substancji, np. esteru metyloвого L-feniloalaniny jako bezpośredniego prekursora w syntezie aspartamu (62,67),

5) wyodrębnienia preparatu enzymatycznego z biomasy komórkowej drożdży o wysokiej aktywności PAL.

Literatura

1. Yamada S., Nabe K., Izuo N., Nakamichi K., Chibata I., (1981), *Appl. Environ. Microbiol.*, 42, 773-778.
2. Hao Z., Charles D. J., Yu L., Simon J. E., (1996), *Phytochemistry*, 43, 735-739.
3. Orndorff S. A., Costantino N., Stewart D., Durham D. R., (1988), *Appl. Environ. Microbiol.*, 54, 996-1002.
4. Ogata K., Uchiyama K., Yamada H., (1966), *Agric. Biol. Chem.*, 30, 311-312.
5. Bezanson G. S., Desaty D., Emes A. V., Vining L. C., (1970), *Can. J. Microbiol.*, 16, 147-151.
6. Parkhurst J. R., Hodgins D. S., (1971), *Phytochemistry*, 10, 2997-3000.
7. Kalghati K. K., Subba Rao P. V., (1975), *Biochem. J.*, 149, 65-72.
8. Onishi N., Yokozeki K., Hirose Y., Kubota K., (1987), *Agric. Biol. Chem.*, 51, 291-292.
9. Kupletskaya M. B., Dolnikova G. A., (1992), *Prikladnaja mikrobiologija i biochimija*, 28, 50-54.
10. Evans Ch. T., Hanna K., Conrad D., Peterson W., Misawa M., (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 406-414.
11. El-Batal A. I., (2002), *Acta Microbiol. Pol.*, 51, 139-152.
12. Hoskins J. A., Jack G., Peiris R. J. D., Starr D. J. T., Wade H. E., Wright E. C., Stern J., (1980), *Lancet*, i, 392-394.
13. Fritz R. R., Hodgins D. S., Abell C. W., (1976), *J. Biol. Chem.*, 251, 4646-4650.
14. Hodgins D. S., (1971), *J. Biol. Chem.*, 246, 2977-2985.
15. Evans Ch. T., Hanna K., Payne Ch., Conrad D., Misawa M., (1987), *Enzyme Microb. Technol.*, 9, 417-421.

16. Hamilton B. K., Hsiao H. Y., Swann W. E., Anderson D. M., Delente J. J., (1985), *Trends Biotechnol.*, 3, 64-68.
17. Stryer L., (1997), *Biochemia*, PWN, Warszawa.
18. Sikorski Z.E., (2000), *Chemia żywności*, WNT, Warszawa.
19. Wang H. P., Fan Y. B., Lu H.-H., Hsu W.-L., (2002), *J. Food Drug Anal.*, 10, 81-87.
20. Gerting H., (1996), *Żywność a zdrowie*, PZWL, Warszawa.
21. Libudziś Z., Kowal K., (2000), *Mikrobiologia techniczna*, II, Wyd. PŁ, Łódź.
22. Gumulka W. S. (1996), *Encyklopedia zdrowia*, PWN, Warszawa.
23. Gołąb B., Traczyk W. Z., (1997), *Anatomia i fizjologia człowieka*, Ośrodek Doradztwa i Szkolenia, Łódź.
24. Ikeda K., Schiltz E., Fujii T., Takahashi M., Mitsui K., Koderu Y., Matsushima A., Inada Y., Schulz G. E., Nishimura H., (2005), *Amino Acids*. Published online: (28 June).
25. Gamez A., Sarkissian C. N., Wang L., Kim W., Straub M., Patch M. G., Chen L., Striepkie S., Fitzpatrick P., Lemontt J. F., O'Neill C., Scriver C. R., Stevens R. C., (2005), *Mol. Ther.*, 11(6), 986-989.
26. UK Patent Application GB 2 127 821 A.
27. Jakubke H. D., Jeschkeit H., (1982), *Aminokwasy, peptydy, białka*, PWN, Warszawa.
28. Alonso J., Barredo J. L., Diez B., Mellado E., Salto F., Garcia J. L., Cotres E., (1998), *Microbiol.*, 144, 1095-1101.
29. Chmiel A., (1998), *Biotechnologia. Podstawy mikrobiologiczne i biochemiczne*, PWN, Warszawa.
30. Adachi O., Matsushita K., Shinagawa E., Ameyama M., (1990), *Agric. Biol. Chem.*, 54(11), 2839-2843.
31. Sato T., Takabe K., Fujita M., (2004), *C. R. Biol.*, 327, 827-836.
32. Retej J., (2003), *Biochimica et Biophysica Acta*, 1647, 179-184.
33. Calabrese J. C., Jordan D. B., Boodhoo A., Sariaslani S., Vannelli T., (2004), *Biochemistry*, 36, 11403-11416.
34. Anson J. G., Gilbert H. J., Oram J. D., Minton N. P., (1987), *Gene*, 58, 189-199.
35. Filipula D., Vaslet C. A., Levy A., Sykes A., Strausberg R. L., (1988), *Nucleic Acids Res.*, 16, 11381.
36. Gilbert H. J., Tully M., (1982), *J. Bacteriol.*, 150, 498-505.
37. Gilbert H. J., Stephenson J. R., (1983), *J. Bacteriol.*, 153, 1147-1154.
38. Gilbert H. J., Clarke I. N., Gibson J. R., Stephenson J. R., Tully M., (1985), *J. Bacteriol.*, 161, 314-320.
39. Tully M., Gilbert H. J., (1985), *Gene*, 36, 235-240.
40. Orum H., Rasmussen O. F., (1992), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 36, 745-748.
41. Ogata K., Uchiyama K., Yamada H., (1967), *Agric. Biol. Chem.*, 31, 200-206.
42. Wat C.-K., Towers G. H. N., (1977), *Recent Adv. Phytochem. Biochem. Plant Phenolics*, 12, 371-432.
43. Camm E. L., Towers G. H. N., (1969), *Phytochemistry*, 8, 1407-1413.
44. Camm E. L., Towers G. H. N., (1977), *Prog. Phytochemistry*, 4, 169-188.
45. Kurtzman C. P., Fell J. W., (1998), *The yeasts – a taxonomic study*, Elsevier.
46. Barnett J. A., Payne R. W., Yarrow D., (2000), *Yeast: Characterisation and identification. Third edition*, Cambridge University Press, UK.
47. Schlegel H. G., (2001), *Mikrobiologia ogólna*, PWN, Warszawa.
48. Burbianka M., Pliszka A., (1984), *Mikrobiologia żywności – mikrobiologiczne metody badania produktów żywnościowych*, PZWL, Warszawa.
49. Aguiar C., Lucas C., (2000), *Food Technol. Biotechnol.*, 38(1), 39-46.
50. Gyaurgieva O. H., Bogomdova T. S., Gorshkova E., (1996), *J. Med. Vet. Mycol.*, 34, 357-359.
51. Alliot C., Desablens B., Garidi R., Tabuteau S., (2000), *Clin. Oncol. Uk.*, 12, 115-117.
52. Hsueh P.-R., Teng L.-J., Ho S.-W., Luh K.-T., (2003), *J. Clin. Microbiol.*, 41, 857-859.
53. US Patent 5,474,117 (1986).
54. Kane J. F., Fiske M. J. (1985), *J. Bacteriol.*, 161, 963-966.
55. Marusich W. C., Jensen R. A., Zamir L. O., (1981), *J. Bacteriol.*, 146, 1013-1019.
56. Takac T., Akay B., Ozdamar T. H., (1995), *Enzyme Microb. Technol.*, 17, 445-452.
57. Chang J., Goo Y. M., Lee Ch. H., Lee Y. Y., Kim K. J., (1994), *Bull. Kor. Chem. Soc.*, 15(5), 387-390.
58. El-Batal A. I., Abo-State M., Shibab A., (2000), *Acta Microbiol. Pol.*, 49, 51-61.
59. US Patent 4,574,117 (1986).
60. Evans Ch. T., Conrad D., Hanna K., Peterson W., Choma Ch., Misawa M., (1987), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 399-405.

61. Galabova D., Tuleva B., Spasova D., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 18, 18-22.
62. D'Cunha G. B., Satyanarayan V., Nair P. M., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 421-427.
63. Evans Ch. T., Choma Ch. Conrad D., Misawa M., (1987), *Biotechnol. Bioeng.*, 30, 1067-1072.
64. El-Batal A. I., (2002), *Acta Microbiol. Pol.*, 51, 153-169.
65. US Patent 1,489,468 (1977).
66. US Patent 6,472,496 (2002).
67. D'Cunha G. B., Satyanarayan V., Nair P. M., (1996), *Enzyme Microb. Technol.*, 19, 421-427.