RZECZPOSPOLITA POLSKA

Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **237617**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **426163**

(22) Data zgłoszenia: **02.07.2018**

(51) Int.Cl.
C12P 7/42 (2006.01)
C12P 17/10 (2006.01)
C12R 1/645 (2006.01)

(54) **Sposób produkcji kwasu kynureninowego**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
13.01.2020 BUP 02/20

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
04.05.2021 WUP 09/21

(73) Uprawniony z patentu:
UNIWERSYTET PRZYRODNICZY WE WROCŁAWIU, Wrocław, PL
UNIWERSYTET MEDYCZNY W LUBLINIE, Lublin, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
WALDEMAR RYMOWICZ, Wrocław, PL
MAGDALENA WRÓBEL-KWIATKOWSKA, Krzeptów, PL
WALDEMAR TURSKI, Lublin, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Anna Kasperowicz

PL 237617 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób otrzymywania kwasu kynureninowego. Wynalazek może znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i w medycynie.

Kwas kynureninowy (KYNA) jest aminokwasem o nazwie chemicznej: kwas 4-hydroksychinolino-2-karboksylowy i jest metabolitem tryptofanu, który powstaje na szlaku przemian kynureniny. KYNA powstaje z kynureniny pod wpływem enzymu – aminotransferazy kynureninowej, a aktywność tego enzymu jest hamowana przez kwas aminooksyoctowy.

Występuje on w tkankach i płynach ustrojowych w ludzkim organizmie i pełni istotną rolę w funkcjonowaniu ośrodkowego układu nerwowego. Ma korzystne działania na szeroko rozumiany metabolizm. Ma działanie przeciwdrgawkowe, działanie przeciwwrzodowe w owrzodzeniu żołądka wywołanym stresem, alkoholem i działaniem innych substancji toksycznych, zmniejsza wydzielanie soku żołądkowego, obniża ciśnienie tętnicze krwi, ma działanie przeciwbakteryjne i może regulować skład flory bakteryjnej w przewodzie pokarmowym. Wykazuje działanie przeciwzapalne, antyoksydacyjne i neuroprotekcyjne, a w warunkach *in vitro* również działanie przeciwnowotworowe. Ponadto, korzystnie wpływa na tkankę tłuszczową, gospodarkę lipidową i insulinę. Wymienione powyżej działania wskazują, że KYNA może być wykorzystany w łagodzeniu lub leczeniu wielu schorzeń. Kwas kynureninowy jest wchłaniany z przewodu pokarmowego i osiąga wysokie stężenie we krwi i tkankach, co umożliwia jego podawanie drogą doustną.

Znane są tylko nieliczne sposoby otrzymywania kwasu kynureninowego przez drożdże w czasie fermentacji brzeczek piwnych.

Znany jest sposób produkcji kwasu kynureninowego w brzeczkach piwnych przez szczep *Saccharomyces cerevisiae* NCYC 88. Po 8 dniach fermentacji powstało 333,1 μg/L KYNA (Cemile Yilmaz. Investigation of changes in amino acids during different fermentation conditions. 2017. Praca doktorska).

W innym sposobie produkcji kwasu kynureninowego w brzeczkach piwnych przez szczep *Saccharomyces pastorianus* NCYC 203. Po 12-godzinnym procesie fermentacji otrzymano 94,0 μg/L kwasu kynureninowego. (Cemile Yilmaz, Investigation of changes in amino acids during different fermentation conditions. 2017. Praca doktorska).

Znany jest także sposób produkcji kwasu kynureninowego przez drożdże *Saccharomyces uvarum* w podłożach hodowlanych zawierających tryptofan. (Mariko Shin, Keiji Sano, Chisae Umezawa. Journal of Nutritional Science and Vitaminology, 1991, 37, str. 269).

Nieznane są natomiast sposoby produkcji KYNA przez drożdże w pożywkach mineralnych zawierających w swoim składzie fruktozę, glukozę, glicerynę, kwasy tłuszczowe otrzymywane w procesie rafinacji olejów roślinnych, inulinę, sacharozę, melasę buraczaną otrzymywaną w procesie produkcji cukru białego i oleje roślinne.

Okazało się, że zarówno szczepy dzikie *Yarrowia lipolytica* jak i zmodyfikowane genetycznie drożdże *Yarrowia lipolytica*, które posiadają wklonowany do swojego genomu gen SUC2, pochodzący z drożdży *Saccharomyces cerevisiae* produkują inwertazę, enzym, który hydrolizuje sacharozę do glukozy i fruktozy i rosną na pożywkach zawierających sacharozę, a transformanty *Y. lipolytica*, które mają wklonowany gen INU1 do swojego genomu, pochodzący z drożdży *Kluyveromyces marxianus* CBS6432, produkują inulinazę, enzym, który hydrolizuje inulinę do fruktozy i rosną na pożywkach zawierających inulinę, w hodowlach periodycznych zawierających w podłożu hodowlanym sacharydy, kwasy tłuszczowe lub oleje roślinne potrafią syntetyzować duże ilości KYNA.

Celem wynalazku było, zatem opracowanie produkcji KYNA przez ten gatunek drożdży w hodowli periodycznej.

Istotą wynalazku jest to, że na 1 litr objętości miesza się fruktozę lub glukozę, lub glicerynę, lub sacharozę lub kwasy tłuszczowe, lub inulinę, lub oleje roślinne w ilości od 10 do 80 g, ekstrakt drożdżowy w ilości od 0,1 do 5,0 g, bakto-pepton od 0,5 do 5 g, oraz pozostałą ilość wody. Ustala się pH na poziomie od 4 do 7, następnie tak przygotowane podłoże wprowadza się do naczynia w ilości od 20 do 30% jego objętości. Całość sterylizuje się, chłodzi się do temperatury pokojowej, a następnie zaszczepia się podłoże czystą kulturą drożdży *Yarrowia lipolityca*. Kolejno wszystko wytrząsa z prędkością od 110 do 200 obr./min, w temperaturze co najmniej 26°C przez co najmniej dwie doby. Tak uzyskane inokulum wprowadza się do bioreaktora w ilości od 5 do 20% objętości roboczej, gdzie pozostałą objętość stanowią fruktoza lub glukoza, lub glicerol, lub kwasy tłuszczowe, lub inulina, lub oleje roślinne w ilości od 30 do 80 g/l, $(NH_4)_2SO_4$ w ilości od 1,0 do 10,0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 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. Hodowlę prowadzi się w bioreaktorze w temperaturze co najmniej 26°C, przy obrotach mieszadła na minutę od 400 do 1000, szybkości napowietrzania od 100 do 800 ml/min. Poziom pH utrzymuje się na poziomie 4,1–4,3 przez cały czas prowadzenia procesu biosyntezy KYNA. Po 8 dobach hodowli oddziela się biomasę drożdży od cieczy poprzez filtrację, płyn fermentacyjny poddaje się dekoloryzacji na węglu aktywnym, a jony usuwa na wymieniaczach jonowych, następnie płyn zawierający KYNA zatęża się 20-krotnie. Otrzymuje się płynny koncentrat kwasu kynureninowego.

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

Korzystnie także jest, gdy inokulum wprowadza się do bioreaktora w ilości od 10 do 20% objętości roboczej.

Korzystnie również jest, gdy utrzymuje się pH na poziomie 4,1–4,3 w czasie procesu hodowlanego.

Korzystnie także jest, gdy do pożywki dodamy od 1 do 5% miodu pszczelego.

Korzystnie także jest, gdy do pożywki dodamy od 10 do 30 mg/l tryptofanu.

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

Zaletą jest również to, że wydajność produkcji KYNA osiąga najwyższy poziom od 6 do 8 mg/l, gdy źródłem węgla jest fruktoza. Dodatkowo otrzymuje się od 12 do 18 g/l suchej biomasy drożdży, która zawiera od 24 do 48 mg/kg KYNA.

Zaletą jest również to, że stosowanie miodu pszczelego, jako źródła fruktozy, pozwala uzyskać bardzo wysokie stężenia KYNA, od 55 do 63 mg/l.

Przedmiot wynalazku przedstawiony jest na przykładach.

P r z y k ł a d 1. Podłoże inokulacyjne o objętości 50 ml zawierające fruktozę – 40 g/l; ekstrakt drożdżowy – 2 g/l; bakto-pepton – 3 g/l; wodę wodociągową do 1 litra, zaszczepia się dzikim szczepem *Yarrowia lipolytica* S-12 i prowadzi hodowlę przez 48 godziny 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, zawierającym 2 litry podłoża produkcyjnego o składzie: fruktoza – 40 g/l; ekstrakt drożdżowy – 1 g/l oraz źródło azotu, fosforu i magnezu; woda wodociągowa do 1 litra. Do utrzymania pH środowiska hodowlanego na poziomie 4,3 stosuje się 10 M NaOH lub 2 M H_2SO_4. W trakcie procesu utrzymuje się stałą temperaturę 29°C, szybkość obrotową mieszadła 500 obr./min i szybkość napowietrzania 0,5 litra powietrza/min. Po 192 godzinach prowadzenia procesu biosyntezy w 1 litrze pożywki, otrzymuje się 8,0 mg/l KYNA oraz dodatkowo 15 g/l suchej biomasy drożdży, która zawiera 30 mg/kg KYNA.

P r z y k ł a d 2. Przygotowuje się inokulum i prowadzi proces jak w przykładzie 1, z tym, że biosyntezę KYNA prowadzi się w pH równym 3,3 i dodatkowo do pożywki dodaje się 10 mg/l tryptofanu. Po 192 godzinach prowadzenia procesu biosyntezy w 1 litrze pożywki otrzymuje się 5,6 mg/l KYNA dodatkowo 13 g/l suchej biomasy drożdży zawierającej 24 mg/kg KYNA.

P r z y k ł a d 3. Przygotowuje się inokulum i prowadzi proces jak w przykładzie 1, z tym, że biosyntezę KYNA prowadzi się w podłożu ze 40 g/l miodu kasztanowego. Po 192 godzinach prowadzenia procesu biosyntezy w 1 litrze pożywki otrzymuje się 63 mg/l KYNA dodatkowo 16 g/l suchej biomasy drożdży zawierającej 151 mg/kg KYNA.

P r z y k ł a d 4. Przygotowuje się inokulum i prowadzi proces jak w przykładzie 1, z tym, że biosyntezę KYNA prowadzi się w podłożu z 20 g/l kwasów tłuszczowych, a hodowlę zaszczepia się dzikim szczepem *Yarrowia lipolytica* A-311. Po 192 godzinach prowadzenia procesu biosyntezy w 1 litrze pożywki otrzymuje się 4 mg/l KYNA, dodatkowo 14 g/l suchej biomasy drożdży zawierającej 3,9 mg/kg KYNA.

P r z y k ł a d 5. Przygotowuje się inokulum i prowadzi proces jak w przykładzie 1, z tym, że biosyntezę KYNA prowadzi się w podłożu z 20 g/l oleju rzepakowego, a hodowlę zaszczepia się dzikim szczepem *Yarrowia lipolytica* A-8. Po 192 godzinach prowadzenia procesu biosyntezy w 1 litrze pożywki otrzymuje się 3,4 mg/l KYNA, dodatkowo 16 g/l suchej biomasy drożdży zawierającej 3,1 mg/kg KYNA.

P r z y k ł a d 6. Przygotowuje się inokulum i prowadzi proces jak w przykładzie 1, z tym, że biosyntezę KYNA prowadzi się w podłożu z 40 g/l inuliny, a hodowlę zaszczepia się genetycznie zmodyfikowanym szczepem *Y. lipolytica Wratislavia* K1-INU6. Po 192 godzinach prowadzenia procesu biosyntezy w 1 litrze pożywki otrzymuje się 3,6 mg/l KYNA, dodatkowo 14 g/l suchej biomasy drożdży zawierającej 3,4 mg/kg KYNA.

P r z y k ł a d 7. Przygotowuje się inokulum i prowadzi proces jak w przykładzie 1, z tym, że biosyntezę KYNA prowadzi się w podłożu z 40 g/l inuliny, a hodowlę zaszczepia się genetycznie zmodyfikowanym szczepem *Y. lipolytica Wratislavia* K1-AIB pAD-UTGut1. Po 192 godzinach prowadzenia procesu biosyntezy w 1 litrze pożywki otrzymuje się 2,6 mg/l KYNA, dodatkowo 14 g/l suchej biomasy drożdży zawierającej 2,8 mg/kg KYNA.

Zastrzeżenia patentowe

1. Sposób otrzymywania kwasu kynureninowego drogą biosyntezy z wykorzystaniem kultur drożdży *Yarrowia lipolytica*, **znamienny tym**, że przygotowuje się podłoże w taki sposób, że na 1 litr objętości miesza się fruktozę i/lub glukozę, i/lub glicerynę, i/lub kwasy tłuszczowe, i/lub inulinę, i/lub oleje roślinne w ilości od 10 do 80 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 5 do 6, następnie tak przygotowane podłoże wprowadza się do naczynia w ilości od 20 do 30% jego objętości, całość sterylizuje się, chłodzi się do temperatury pokojowej a następnie zaszczepia się podłoże czystą kulturą drożdży *Yarrowia lipolityca*, wytrząsa z prędkością od 100 do 200 obr./min, w temperaturze co najmniej 26°C przez co najmniej dwie doby, po czym tak uzyskane inokulum wprowadza się do bioreaktora, gdzie pozostałą objętość stanowią fruktoza i/lub glukoza, i/lub gliceryna, i/lub kwasy tłuszczowe, i/lub inulina, i/lub oleje roślinne, $(NH_4)_2SO_4$ w ilości od 3,0 do 15,0 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ w ilości od 0,2 do 2 g/L, KH_2PO_4 w ilości od 0,2 do 2 g/L, ekstrakt drożdżowy w ilościach jak poprzednio oraz pozostałą ilość wody i prowadzi hodowlę w temperaturze co najmniej 26°C, przy obrotach mieszadła na minutę od 400 do 1200, szybkości napowietrzania od 100 do 800 ml/min, przy czym poziom pH utrzymuje się na poziomie 4,1–4,3 przez cały czas prowadzenia procesu biosyntezy kwasu kynureninowego, proces biosyntezy prowadzi się od 100 do 300 godzin, po czym oddziela się biomasę drożdży od cieczy poprzez filtrację, brzeczkę pofermentacyjną poddaje się dekoloryzacji na węglu aktywnym a jony usuwa na wymieniaczach, następnie płyn zawierający kwas kynureninowy zatęża się 20-krotnie w wyniku czego otrzymuje się płynny koncentrat kwasu kynureninowego.
2. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że inokulum wprowadza się do bioreaktora w ilości 10% jego objętości roboczej.
3. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że na wyhodowaną biomasę dodaje się także od 10 do 30 mg tryptofanu na 1 litr pożywki produkcyjnej znajdującej się w bioreaktorze.
4. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że pH utrzymuje się na poziomie 4,1–4,3.
5. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że źródłem fruktozy jest inulina.
6. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że źródłem fruktozy są miody pszczele.
7. Sposób, według zastrz. 1, **znamienny tym**, że źródłem węgla jest glukoza i/lub sacharoza, i/lub melasa buraczana, i/lub glicerol, i/lub kwasy tłuszczowe, i/lub oleje roślinne.