

CHARAKTERYSTYKA, WŁAŚCIWOŚCI ORAZ ZNACZENIE BIOTECHNOLOGICZNE ESTERAZ BAKTERYJNYCH

Małgorzata Lewandowska, Włodzimierz Bednarski,
Maria Wachowska, Natalia Kordala
Uniwersytet Warmińsko-Mazurski w Olsztynie

Streszczenie. Na podstawie informacji literaturowych zaprezentowano aktualną wiedzę o właściwościach biokatalitycznych esteraz bakteryjnych oraz metodach ich modyfikacji. Uwzględniając informacje o specyficznej aktywności esteraz, opisano różnice między nimi a lipazami. Zwrócono uwagę na ich specyfikę substratową oraz na uwarunkowania związane ze środowiskiem reakcji ze szczególnym uwzględnieniem zawartości wody. Przedstawiono również przykłady potwierdzające znaczenie biotechnologiczne esteraz w kształtowaniu cech smakowo-zapachowych serów, wina, a także w produkcji niektórych składników żywności, farmaceutyków lub kosmetyków. Wskazano na współczesne możliwości doskonalenia cech genetycznych bakterii w kierunku poprawy wydajności syntezy esteraz oraz ich specyficzności ważnej w praktyce.

Słowa kluczowe: esterazy, właściwości biokatalityczne, smak, zapach, ser, wino

WSTĘP

Kryteria postępu w biotechnologii żywności uwzględniają potrzebę pogłębiania wiedzy o znaczeniu mikroorganizmów oraz enzymów w syntezie związków odpowiedzialnych za smak i zapach produktów spożywczych. W tym zakresie zwraca się uwagę na lepsze poznanie właściwości biokatalitycznych grzybów strzępkowych oraz bakterii. Wśród nich dominują bakterie fermentacji mlekowej, powszechnie stosowane w produkcji serów oraz napojów fermentowanych, w tym win [Marilley i Casey 2004, Holland i in. 2005, Oliszewski i in. 2007, Sumbly i in. 2010, Pérez-Martin i in. 2013].

Do ważnych składników współtworzących kompozycje związków smakowo-zapachowych zalicza się estry. W ich otrzymywaniu duże znaczenie mają procesy katalizo-

wane przez esterazy, które są słabiej poznaną grupą enzymów, często utożsamianą z lipazami. Mając to na względzie, w niniejszym opracowaniu przedstawiono charakterystykę właściwości wybranych esteraz bakteryjnych oraz opisano ich znaczenie w produkcji serów, win, preparatów smakowo-zapachowych stosowanych w produkcji żywności, a także specyficznych związków przydatnych w farmacji i kosmetyce. Zwrócono również uwagę na współczesne możliwości genetycznego doskonalenia komórek bakterii sprzyjające zwiększeniu wydajności biosyntezy esteraz oraz poprawie ich właściwości biokatalitycznych.

WŁAŚCIWOŚCI BIOKATALITYCZNE ESTERAZ

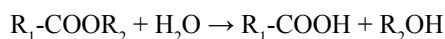
Esterazy (karboksylesterazy, E.C.3.1.1.1) są definiowane jako enzymy katalizujące hydrolizę/syntezę estrów kwasów organicznych, preferujące substraty rozpuszczalne w wodzie, głównie triacyloglicerole zbudowane z krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych [Bornscheuer 2002, Holland i in. 2005, Sumbly i in. 2010]. Występują one jako pojedyncze monomery lub oligomery. Ich masa cząsteczkowa mieści się w granicach od 25 do 85 kDa [Sumbly i in. 2010].

W literaturze terminy esterazy i lipazy są często używane zamiennie. Należy podkreślić, że są to dwie różniące się grupy enzymów, a zrozumienie tych rozbieżności jest istotne dla poznania ich znaczenia w tworzeniu związków smakowo-zapachowych, np. w serach [Collins i in. 2003, Liu i in. 2004a, Holland i in. 2005]. Różnice między lipazami i esterazami dotyczą:

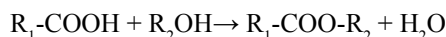
- długości łańcucha hydrolizowanych acyloestrów,
- fizykochemicznych właściwości substratów,
- kinetyki reakcji enzymatycznych.

Obecnie wiadomo, że esterazy, podobnie jak lipazy, w zależności od warunków katalizują reakcje:

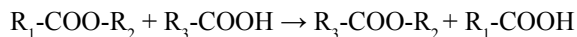
- hydrolizy



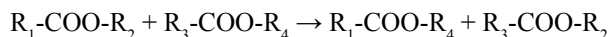
- estryfikacji



- acidolizy



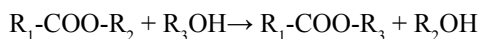
- transestryfikacji



Właściwości biokatalityczne esteraz zależą również od ich źródła. Na przykład esterazy syntetyzowane przez bakterie fermentacji mlekowej są przeznaczone do katalizowania reakcji estryfikacji [Bornscheuer 2002, Holland i in. 2005].

Esterazy wykazują większą specyficzność substratową wobec reszt acylowych o długości łańcucha 2–10 atomów węgla. Hydrolizują, jak już wspomniano, substraty rozpuszczalne w wodzie oraz podlegają regułom kinetyki reakcji według Michaelisa-Menten.

Esterazy wykazują zdolności do katalizowania reakcji syntezy estrów zgodnie ze schematem reakcji alkoholizy:



W środowisku wodnym grupy acylowe kwasów tłuszczowych z glicerolu są transferowane do cząsteczki alkoholu. Warto zaznaczyć, że w tym zakresie esterazy cechuje również specyficzność substratowa. Potwierdzeniem tego są właściwości esteraz z *Lactococcus lactis* i *Lactobacillus rhamnosus*, które w syntezie estrów w reakcji alkoholizy preferują di- i monoacyloglicerole [Sumbly i in. 2010]. Obecnie wiadomo, że specyficzne właściwości biokatalityczne esteraz w znacznym stopniu zależą od struktury białka enzymatycznego, w tym głównie od sekwencji aminokwasów. Wykazano na przykład, że decyduje ona o termostabilności aktywności esteraz z *Pseudomonas aeruginosa* lub *Salmonella typhimurium* [Bornscheuer 2002]. Esterazy wykazują wysoką regio- i stereospecyficzność. Między innymi dlatego są one aplikacyjnie atrakcyjne w produkcji optycznie czynnych związków przydatnych w produkcji leków [Liu i in. 2015]. Ich ważną cechą jest także stabilność w reakcjach prowadzonych w rozpuszczalnikach organicznych [Kashima i in. 2000, Bornscheuer 2002].

W modyfikacji (doskonaleniu) właściwości biokatalitycznych esteraz stosowane są techniki inżynierii genetycznej [Bornscheuer 2002, Sumbly i in. 2009, Yoon i in. 2014]. Potwierdzeniem takich możliwości są rekombinanty esteraz *Pseudomonas fluorescens* o zmienionej, bardzo przydatnej praktycznie enancjoselektywności [Krebsfänger 1998]. Podobne efekty uzyskano, stosując procedury ukierunkowanej ewolucji, które doprowadziły do zmiany specyficzności substratowej oraz enancjoselektywności wymienionej esterazy. Wspomnianą technikę sprawdzono również w odniesieniu do esterazy z *Rhodobacter sphaeroides* [Ma i in. 2013]. Potwierdzeniem skuteczności stosowanej metody jest także poprawa właściwości biokatalitycznych esterazy z *Bacillus subtilis* [Maqbool i in. 2002].

Przykładem propozycji nowych metod pozyskiwania esteraz o przemysłowo przydatnych termostabilnych właściwościach są badania opisane przez Zhu i innych [2013], w których uzyskano nową termostabilną esterazę, korzystając z metagenomowej biblioteki genów przygotowanej z próbek DNA wyizolowanych z dna ciepłych, głębokich wód wschodniego Pacyfiku. Otrzymane geny klonowano w komórkach *Escherichia coli* i otrzymano rekombinowaną esterazę, wykazującą bardzo dużą aktywność w środowisku o temperaturze 60°C i kwasowości odpowiadającej pH 8,0.

ZNACZENIE ESTERAZ BAKTERYJNYCH W KSZTAŁTOWANIU CECH SMAKOWO-ZAPACHOWYCH SERÓW

Do komponentów współtworzących smak i zapach serów zalicza się: aldehydy, estry, dikarbyny, krótko- i średniołańcuchowe kwasy tłuszczowe, metyloketony, laktony, a także związki fenolowe i związki zawierające siarkę [Marilley i Casey 2004, Holland i in. 2005, Ávila i in. 2007, Mikš-Krajnik 2012]. Składniki te pochodzą z przemian biochemicznych laktozy, cytrynianów, białek oraz tłuszczu mlekowego, prowadzonych

głównie przez mikroorganizmy oraz enzymy rodzime lub dodane do mleka. W tym zakresie ważną rolę odgrywają lipazy oraz esterazy bakterii fermentacji mlekowej [Liu i in. 2004a, Oliszewski i in. 2007].

Znaczące oddziaływanie na zapach i smak serów mają wolne kwasy tłuszczowe, głównie krótkołańcuchowe C_2-C_8 , które nawet przy niewielkiej koncentracji (1 promil) powodują lub wzmacniają takie smaki i zapachy, jak: zjełczały, serowy, ostry, kozi, mydlasty, woskowy. W przeciwieństwie do nich nawet śladowe ilości estrów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych do C_{10} wzmacniają zapach owocowy, np. pochodny jabłek, bananów, gruszek ananasów lub truskawek [Collins i in. 2003, Holland i in. 2005, Mukdsi i in. 2014]. Pomimo że wymienione cechy nie są preferowane przez konsumentów serów, to maskujące oddziaływanie estrów na niekorzystne posmaki wywołane obecnością krótko- i średniołańcuchowych wolnych kwasów tłuszczowych należy uznać jako technologicznie ważne.

W syntezie estrów odpowiedzialnych za smak i zapach serów znacząca jest aktywność esteraz bakterii fermentacji mlekowej (LAB) [Mukdsi i in. 2009, Taboada i in. 2014]. Obecnie wiadomo, że szczepy bakterii LAB zdolne są do syntezy etylomaślanów dzięki aktywności esterazy, która w reakcji alkoholizy transferuje resztę kwasu masłowego z tributyriny na etanol. W ten sposób potwierdzono, że esterazy z LAB są alkoholtransferazami, katalizującymi przenoszenie grup acylowych kwasów tłuszczowych z glicerolu na wodę (hydroliza) lub na alkohole (synteza). Znany jest również fakt, że esterazy z LAB zdolne są transferować grupy acylowe kwasów tłuszczowych na inne alkohole (nie tylko na etanol).

Do technologicznie ważnych właściwości LAB zaliczyć należy zdolność do syntezy estrów etylowych z etanolu, tributyriny, di- i monoacylogliceroli przez całe ich komórki, na przykład przez bakterie *Streptococcus thermophilus*, przy czym w reakcjach biorą udział kwasy o długości łańcucha do C_{10} [Liu i in. 2004b]. Wykazanie tych zdolności ma duże znaczenie praktyczne – umożliwia selekcję kultur starterowych z dużą aktywnością esteraz w środowisku poprzez dodatek etanolu oraz dobór mono-, di- lub triacylogliceroli. Potwierdzono to np. w produkcji sera cheddar, gdzie zastosowano rekombinowaną esterazę z *Lactobacillus rhamnosus*, dodając ją do mleka z określoną dawką etanolu [Holland i in. 2005]. Podobne wnioski sprecyzowali Pedersen i inni [2013], badając aktywność esteraz w kulturach starterowych, zawierających heterofermentatywne bakterie mlekowe. Stwierdzili większą aktywność esteraz w obecności krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych, wskazując jednocześnie na decydujący wpływ obecności etanolu na syntezę estrów etylowych.

Korzystny wpływ dodatku etanolu do mleka przeznaczonego do produkcji serów wykazano także w badaniach Richoux i innych [2008]. Syntezę estrów w serach można intensyfikować, produkując je z mleka zawierającego lipidy wstępnie zhydrolizowane do mono- i diacylogliceroli. Wytworzone według tej procedury sery zawierają więcej estrów i odznaczają się korzystnym smakiem i zapachem [Holland i in. 2005].

Do regulacji aktywności esteraz w serach można zastosować technikę wysokich ciśnień (HHP – high hydrostatic pressure). Wpływ HHP na aktywność esteraz, a także profil kwasów tłuszczowych zależy zarówno od stosowanych kultur bakterii, jak i od parametrów ciśnienia, rodzaju sera oraz okresu, w jakim ser jest poddawany presuryzacji [Ávila i in. 2007, Alonso i in. 2011, Calzada i in. 2014]. Calzada i inni [2014] wykazali wzrost

aktywności esterazy w serze brie presuryzowanym w 400 MPa, najprawdopodobniej na skutek uwolnienia enzymu wewnątrzkomórkowego z mikroorganizmów. Jednak zwiększenie ciśnienia do 600 MPa, pomimo większej lizy komórek bakteryjnych, powodowało inaktywację wydzielanego enzymu. Należy podkreślić, że nie zawsze intensyfikacja procesu lipolizy, jak i tworzenie się nadmiernej ilości estrów w serach są pożądane. Istotne jest natomiast zachowanie charakterystycznego dla danego rodzaju sera profilu związków aromatycznych.

Aktywność esteraz w szczepach LAB można regulować (modyfikować), stosując techniki inżynierii genetycznej. Geny esteraz niektórych szczepów LAB zostały sklonowane i zsekwencjonowane. Dotyczy to takich rodzajów bakterii, jak: *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus helveticus*. Efektem sekwencjonowania genów u *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus acidophilus* oraz *Lactobacillus rhamnosus* jest wykazanie ich predyspozycji do syntezy nowych, nieznanych esteraz [Holland i in. 2005]. Techniki inżynierii genetycznej umożliwiają kontrolę aktywności esteraz, a tym samym oddziaływanie na intensywność syntezy estrów decydujących o smaku i zapachu serów [Bornscheuer 2002, Holland i in. 2005]. Potwierdzeniem takich możliwości jest nadekspresja genu esterazy w *Lactococcus lactis* indukowana nizyną. Prowadzi ona do zwiększenia aktywności esterazy zdolnej do syntezy estrów oraz alkoholizy [Holland i in. 2005]. Inną możliwością jest inaktywacja (blokowanie) genów esteraz w komórkach bakterii.

O potrzebie genetycznego doskonalenia szczepów LAB w kierunku poprawy zdolności do biosyntezy esteraz świadczą wyniki badań Esteban-Torres i innych [2014a, 2014b]. Klonowano w nich gen kodujący aktywność esterazy z *Lactobacillus plantarum* do genomu *Escherichia coli*, a otrzymany rekombinant stosowano w biosyntezie esterazy. Otrzymany preparat enzymatyczny charakteryzował się korzystną aktywnością w temperaturze 5°C, w środowisku o pH 5,0, przy koncentracji NaCl w zakresie 2,5–25%. Potwierdzono jego przydatność w produkcji serów, dodając go do mleka po pasteryzacji.

ESTERAZY BAKTERYJNE W PRODUKCJI WIN

Fermentacja malolaktyczna (MLF), zachodząca jako wtórny proces winifikacji, prowadzi do przekształcenia kwasu jabłkowego do kwasu mlekowego i ditlenku węgla. Dokonuje się to za sprawą bakterii fermentacji mlekowej (LAB), i może zachodzić spontanicznie, bądź może być indukowane przez zaszczepienie odpowiednimi kulturami starterowymi LAB. Wpływa na trzy różne wyróżniki jakościowe wina: kwasowość, stabilność mikrobiologiczną i atrakcyjność sensoryczną [Knoll i in. 2011].

Obecnie wiadomo, że większość rodzajów bakterii biorących udział w procesie produkcji wina, takich jak: *Oenococcus*, *Pedicoccus* i *Lactobacillus*, wykazuje aktywność esteraz. Część z nich związana jest z metabolizmem żywych komórek bakterii, a część pochodzi z wewnątrzkomórkowego supernatantu z bakterii rozwijających się w soku winogron. To one głównie modyfikują profil smaku i aromatu wina. Oczywiście pojawienie się aktywności esteraz wewnątrzkomórkowych jest poprzedzone zniszczeniem ścian komórkowych bakterii. Esterazy bakteryjne są zdolne nie tylko do syntezy, ale również do hydrolizy estrów w czasie dojrzewania wina. Synteza estrów zachodzi głównie po re-

akcji alkoholizy. Sprzyja temu duża koncentracja etanolu oraz aktywność transferaz, jaką wykazują esterazy LAB aktywne, jak wspomniano wcześniej, wobec mono- i diacylogliceroli C₆–C₁₀, lecz nieaktywne wobec triacylogliceroli, z wyjątkiem tributyriny [Sumbly i in. 2010, Perez-Martin i in. 2013].

Liczne badania potwierdziły, że estry etylowe, takie jak: octan etylu, mleczan etylu, kapronian etylu, są syntetyzowane w czasie fermentacji malolaktycznej następującej bezpośrednio po fermentacji alkoholowej. Wykazano również, że w trakcie jej przebiegu stężenie estrów jest zmienne i zależy głównie od szczepów bakterii LAB biorących w niej udział [Sumbly i in. 2010, Perez-Martin i in. 2013]. Jednym z dokładniej zbadanych gatunków prowadzących fermentację MLF jest *Oenococcus oeni* [Bartowski i Borneman 2011, Lerm i in. 2011, Malherbe i in. 2012]. Wspomniane bakterie mają rozbudowany pakiet szlaków metabolicznych i enzymów, które wytwarzają lotne związki wtórne w stężeniach znacznie powyżej ich progu detekcji zapachowej, w tym octan etylu i estry wyższych alkoholi, lotne kwasy tłuszczowe oraz związki siarki. Wzmocnienie owocowo-jagodowego charakteru czerwonego wina jest ważnym celem dla winiarzy, a jednym ze sposobów jest wykorzystanie wybranych szczepów *O. oeni* w celu osiągnięcia pożądanego stylu trunku. Badania prowadzone przez zespół Sumbly i innych [2009, 2010, 2012a, 2012b, 2013] dotyczące m.in. charakterystyki wewnątrzkomórkowych esteraz z *O. oeni* wskazały na złożony charakter ich działania. Wykazano silne uwarunkowanie środowiskiem namnażania badanych bakterii, tj. obecnością związków indukujących, np.: etanolu, kwasu masłowego, maślanu etylu czy czynnikami stresogennymi (SO₂) [Sumbly i in. 2014].

Warto zaznaczyć, że esterazy bakteryjne są zróżnicowaną grupą enzymów, a ich aktywność może zależeć również od substratów (odmiany winorośli) i parametrów środowiska, głównie od temperatury i kwasowości. Warunki technologiczne panujące podczas fermentacji, tj. niskie pH (2,0–4,0) oraz temperatura (10–25°C), pozwalają np. na zachowanie około 60% aktywności esteraz z *Oenococcus*, wobec około 40% z *Lactobacillus* i *Pediococcus*, co czyni te pierwsze bardziej przydatnymi w procesie kształtowania aromatu win [Matthews i in. 2007]. Interesującym jest fakt, że w zależności od stosowanych szczepów LAB obserwuje się zwiększenie lub zmniejszenie koncentracji octanu etylu – estru zawsze występującego w winach. Jego obecność w niewielkim stężeniu determinuje owocowy charakter trunku, natomiast zawartość powyżej 200 mg·l⁻¹ staje się przyczyną wady wina określanej mianem nuty „rozpuszczalnikowej”. Seria eksperymentów przeprowadzonych przez zespół Sumbly i innych [2010] dowiodła, że esterazy LAB są zdolne zarówno do syntezy, jak i hydrolizy estrów w czasie fermentacji win. Przetestowano właściwości oczyszczonych esteraz EstA2 i EstB28 w warunkach modelowej reakcji hydrolizy z udziałem estrów etylowych (octanu, maślanu, kapronianu, kaprylanu) oraz syntezy z wykorzystaniem etanolu i kwasów (octowego, masłowego i kapronowego). Profile związków aromatycznych potwierdziły dwojaki charakter zachodzących reakcji, uzależniony zarówno od rodzaju esterazy, jak i dostępnych substratów. Natomiast charakterystyka zmian w składzie estrów po reakcji z udziałem wybranych szczepów bakterii *O. oeni* w warunkach fermentacji MLF win białych (chardonnay) i czerwonych (cabernet

net) wskazała na zwiększony udział maślanu etylu w winie czerwonym niezależnie od zastosowanego szczepu. Wyniki badań Matthews i innych [2007] analizujących aktywność esteraz z kilkunastu szczepów bakteryjnych wobec substratów o różnej długości łańcuchów wykazały wybiórcze zdolności hydrolityczne niektórych LAB – m.in. aktywność esteraz z Lac26 względem estrów C₂, co może być korzystnym aspektem w usuwaniu nadmiaru octanu etylowego z win.

W dążeniu do pełniejszego poznania mechanizmu syntezy lub hydrolizy estrów sklonowano i sekwencjonowano kilkanaście genów odpowiedzialnych za wymienione zależności biokatalityczne [Matthews i in. 2007, Sumbly i in. 2010]. Stwierdzono, że pomimo dualistycznego działania, przebadane geny esteraz odgrywają bardziej istotną rolę w syntezie estrów niż w hydrolizie [Sumbly i in. 2012b]. Prowadzone są także badania w celu poznania właściwości nowych, nieznanych esteraz bakteryjnych mających znaczenie w tworzeniu związków smakowo-zapachowych win [Sumbly i in. 2010]. Do ciekawych propozycji technologicznych zaliczyć można otrzymywanie i stosowanie preparatów esteraz immobilizowanych w produkcji win, z możliwością sterowania procesem poprzez regulację zawartości octanu etylu w winie [Lee i in. 2007, Sumbly i in. 2010]. Obecność tego estru decyduje również o walorach smakowych octu winnego. W jego tworzeniu ważne jest oddziaływanie esteraz bakterii fermentacji octowej. Potwierdzeniem tego są wyniki badań Kashima i innych [2000], w których wskazano na znaczenie esteraz z *Aceetobacter pasteurianus* w produkcji octu.

Stosowanie technik inżynierii genetycznej stwarza również możliwość kontroli oddziaływania esteraz na smak i zapach win, np. poprzez blokowanie lub nadekspresję genów kodujących esterazy o aktywności acylotransferaz. Fakt ten ma jednak obecnie jedynie wartość naukową, gdyż bezpośrednie stosowanie enzymów bakteryjnych pozyskanych technikami rekombinacji nie jest akceptowane przez konsumentów [Sumbly i in. 2014]. Alternatywą może być wykorzystanie systemów ekspresji postrzeganych jako żywnościowo-przyjazne (food-grade), które na przestrzeni ostatniej dekady cieszą się dużym zainteresowaniem [Peterbauer i in. 2011].

Na szczególną uwagę zasługuje także technika ukierunkowanej ewolucji (DE – direct evolution), określana również mianem ewolucji adaptacyjnej, która z powodzeniem może być stosowana w odniesieniu do rodzaju *Lactobacillus* [Wu i in. 2014]. Zakłada się, że mikroorganizm umieszczony w warunkach ciągłego stresu dostosowuje się do środowiska i wykształca populację o korzystnych zmodyfikowanych właściwościach [Dragosits i Mattanovich 2013].

INNE KIERUNKI ZASTOSOWANIA ESTERAZ

Przykładem enzymów stosowanych w kilku gałęziach przemysłu w celu otrzymywania koncentratów atrakcyjnych związków są karboksylesterazy, charakteryzujące się takimi właściwościami, jak: specyficzność substratowa, regiospecyficzność oraz chiralna selektywność [Bornscheuer 2002]. Szczególne znaczenie mają karboksylesterazy w syntezie estrów krótkołańcuchowych kwasów tłuszczowych o właściwościach przydatnych

w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym lub kosmetycznym. Aplikacyjnie preferowane jest otrzymywanie estrów kwasu octowego z pierwszorzędowymi alkoholami. Odznaczają się one atrakcyjnymi właściwościami zapachowymi. Jednym z nich jest octan izoamylu – ważny komponent dodatków zapachowych stosowanych w przemyśle spożywczym [Torres i in. 2009b].

Ważną cechą enzymów katalizujących reakcje syntezy wspomnianych estrów jest stabilność aktywności w środowisku o małej zawartości wody, tj. w obecności rozpuszczalników organicznych. Jednym z nich jest esteraza S-86 syntetyzowana przez ekstremofilny szczep *Bacillus licheniformis* S-86 [Torres i in. 2009a]. Do znanych enzymów produkowanych przez wymienione bakterie zalicza się wysokooczyszczoną esterazę typu II, wykazującą zdolność syntezy octanu izoamylowego w środowisku o pH 8,0 w temperaturze 60–65°C. Z badań Torres i innych [2009b] wynika, że esterazę typu II można w postaci immobilizowanej stosować w syntezie octanu izoamylowego z alkoholu izoamylowego i p-nitrophenylooctanu – jako donora reszty amylowej. Reakcję prowadzono w heksanie, a jej wydajność wyniosła 42,8%. Esterazę z *Bacillus licheniformis* stosowano również w syntezie estrów etylowych kwasów kapronowego C₆ i kaprylowego C₈. Największą wydajność reakcji (95%) uzyskano, prowadząc proces w n-heptanie (z niewielkim dodatkiem wody 0,1% v/v) w temperaturze 45°C [Alvarez-Macarie i Baratti 2000]. Karboksylesterazy stosowane są do wydzielania kwasu ferulowego z polisacharydów, takich jak pektyny lub ksylany [Bornscheuer 2002, McClendon i in. 2011]. Wiadomo, że kwas ferulowy jest substratem do otrzymywania waniliny, ważnego komponentu koncentratów związków aromatycznych stosowanych w przemyśle spożywczym [Shin i Chen 2006, Kaur i in. 2013], a dzięki swoim właściwościom antyoksydacyjnym i przeciwzapalnym pełni ważną funkcję w kosmetyce i medycynie [Fazary i Yu 2007, Uraji i in. 2013].

Do specyficznych kierunków zastosowania esteraz bakteryjnych zaliczyć można laktono-specyficzną esterazę z *Pseudomonas fluorescens*, stosowaną w hydrolizie enzymatycznej laktonów przydatnej w otrzymywaniu ω-hydroksykwasów, które następnie są metabolizowane do adipatów, związków użytecznych w przemyśle farmaceutycznym [Khalameyzer i in. 1999]. Innym przykładem jest p-nitrobenzyl esteraza pozyskana z *Bacillus subtilis* stosowana w produkcji antybiotyków [Bornscheuer 2002].

WNIOSKI

Na podstawie charakterystyki właściwości biokatalitycznych esteraz wybranych bakterii można wykazać różnice między nimi a lipazami z uwzględnieniem ich znaczenia w tworzeniu składników smakowo-zapachowych w produktach spożywczych, głównie w serach i winach.

Stosowanie współczesnych metod modyfikacji właściwości enzymów oraz technik doskonalenia cech genetycznych bakterii (producentów esteraz) sprzyja poprawie wydajności ich biosyntezy, a także cech ważnych w praktyce, np. specyficzności substratowej czy termostabilności.

Istnieją coraz większe możliwości stosowania esteraz w otrzymywaniu koncentratów związków smakowo-zapachowych, a także komponentów farmaceutyków i kosmetyków.

LITERATURA

- Alonso R., Picon A., Rodríguez B., Gaya P., Fernández-García E., Nuñez M., 2011. Microbiological, chemical, and sensory characteristics of Hispánico cheese manufactured using frozen high pressure treated curds made from raw ovine milk. *Int. Dairy J.* 21, 484-492.
- Alvarez-Macarie E., Baratti J., 2000. Short chain flavor ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 10, 377-383.
- Ávila M., Calzada J., Garde S., Nuñez M., 2007. Effect of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* strain and high-pressure treatment on the esterase activity and free fatty acids in Hispánico cheese. *Int. Dairy J.* 17, 1415-1423.
- Bartowsky E., Borneman A., 2011. Genomic variations of *Oenococcus oeni* strains and the potential to impact on malolactic fermentation and aroma compounds in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 92, 441-447.
- Bornscheuer U.T., 2002. Microbial carboxyl esterases: classification, properties and applications in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.* 26, 73-81.
- Calzada J., Olmo A., Picon A., Nuñez M., 2014. Effect of high-pressure-processing on lipolysis and volatile compounds of Brie cheese during ripening and refrigerated storage. *Int. Dairy J.* 39, 232-239.
- Collins Y.F., McSweeney P.L.H., Wilkinson M.G., 2003. Lipolysis and free fatty acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *Int. Dairy J.* 13, 841-866.
- Dragosits M., Mattanovich D., 2013. Adaptive laboratory evolution-principles and applications for biotechnology. *Microb. Cell Fact.* 12, 64.
- Esteban-Torres M., Santamaría L., de las Rivas B., Muñoz R., 2014a. Characterization of a cold-active and salt-tolerant esterase from *Lactobacillus plantarum* with potential application during cheese ripening. *Int. Dairy J.* 39, 312-315.
- Esteban-Torres M., Mancheño J.M., de las Rivas B., Muñoz R., 2014b. Production and characterization of a tributyrin esterase from *Lactobacillus plantarum* suitable for cheese lipolysis. *J. Dairy Sci.* 97, 6737-6744.
- Fazary A.E., Ju Y.H., 2007. Feruloyl esterases as biotechnological tools: current and future perspectives. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)* 39(11), 811-828.
- Holland R., Liu S.Q., Crow L.V.L., Delabre M.L., Lubbers M., Bennet M., Norris G., 2005. Esterases of lactic acid bacteria and cheese flavor: milk fat hydrolysis, alcoholysis and esterification. *Int. Dairy J.* 15, 711-718.
- Kashima Y., Iijima M., Nakano T., Tayama K., Koizumi Y., Udaka S., Yanagida F., 2000. Role of intracellular esterases in the production of esters by *Acetobacter pasteurianus*. *J. Biosci. Bioeng.* 89, 81-83.
- Kaur B., Chakraborty D., Kaur G., Kaur G., 2013. Biotransformation of rice bran to ferulic acid by pediococcal isolates. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 170, 854-867.
- Khalameyzer V., Fischer J., Bornscheuer U.T., Altenbuchner J., 1999. Screening, nucleotide sequence and biochemical characterization of an esterase from *Pseudomonas fluorescens* with high activity towards lactones. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 477-482.
- Knoll C., Fritsch S., Schnell S., Grossmann M., Rauhut D., du Toit M., 2011. Influence of pH and ethanol on malolactic fermentation and volatile aroma compound composition in white wines. *LWT – Food Sci. Technol.* 44, 2077-2086.
- Krebsfänger N., Zocher F., Altenbuchner J., Bornscheuer U.T., 1998. Characterization and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *Enzyme Microb. Technol.* 22, 641-646.

- Lee J.H., Hwang E.T., Kim B.C., Lee S.-M., Sang B.-I., Choi Y.-S., Kim J., Gu M.B., 2007. Stable and continuous long-term enzymatic reaction using an enzyme-nanofiber composite. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 75, 1301-1307.
- Lerm E., Engelbrecht L., du Toit M., 2011. Selection and characterization of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* South African wine isolates for use as malolactic fermentation starter cultures. *S. Afric. J. Enol. Vitic.* 32, 280-295.
- Liu S.-Q., Holland R., Crow V.L., 2004a. Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *Int. Dairy J.* 14, 923-945.
- Liu S.-Q., Baker K., Bennett M., Holland R., Norris G., Crow V.L., 2004b. Characterization of esterases of *Streptococcus thermophilus* ST1 and *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* B1079 as alcohol acyltransferases. *Int. Dairy J.* 14, 865-870.
- Liu J.-Y., Bian H.-P., Tang Y., Bai Y.-P., Xu J.-H., 2015. Double substituted variant of *Bacillus amyloliquefaciens* esterase with enhanced enantioselectivity and high activity towards 1-(3',4'-methylenedioxyphenyl)ethyl acetate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 99, 1701-1708.
- Ma J., Wu L., Guo F., Gu J., Tang X., Jiang L., Liu J., Zhou J., Yu H., 2013. Enhanced enantioselectivity of a carboxyl esterase from *Rhodobacter sphaeroides* by directed evolution. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 4897-4906.
- Maqbool Q.A., Johri S., Verma L., Riyaz-ul-Hassan S., Verma V., Koul S., Taneja S.C., Parshad R., Qazi G.N., 2002. Purification and characterization of a novel enantioselective hydrolase from *Bacillus subtilis*. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 36 (Pt 3), 227-234.
- McClendon S.D., Shin H.-D., Chen R.R., 2011. Novel bacterial ferulic acid esterase from *Cellvibrio japonicus* and its application in ferulic acid release and xylan hydrolysis. *Biotechnol. Lett.* 33, 47-54.
- Malherbe S., Tredoux A., Nieuwoudt H., du Toit M., 2012. Comparative metabolic profiling to investigate the contribution of *O. oeni* MLF starter cultures to red wine composition. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 39, 477-494.
- Marilley L., Casey M.G., 2004. Flavours of cheese products: metabolic pathways, analytical tools and identification of producing strains. *Int. J. Food Microbiol.* 90, 139-159.
- Matthews A., Grbin M.A., Jiranek V., 2007. Biochemical characterisation of the esterase activities of wine lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 77(2), 329-337.
- Mikš-Krajnc M.H., 2012. Rola paciorkowców mlekowych i pałeczek propionowych w procesie dojrzewania sera typu szwajcarsko-holenderskiego. *ŻNTJ* 1(80), 45-59.
- Mukdsi M.C.A., Medina R.B., de F. Alvarez M., González S.N., 2009. Ester synthesis by lactic acid bacteria isolated from goat's and ewe's milk and cheeses. *Food Chem.* 117, 241-247.
- Mukdsi M.C.A., Falentin H., Maillard M.B., Chuat V., Medina R.B., Parayre S., Thierry A., 2014. The Secreted Esterase of *Propionibacterium freudenreichii* has a major role in cheese lipolysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 80, 751-756.
- Oliszewski, R., Medina R. B., Gonzalez S. N., Perez Chaia A.B., 2007. Esterase activities of indigenous lactic acid bacteria from argentinean goats' milk and cheeses. *Food Chem.* 101, 1446-1450.
- Pedersen T.B., Ristagno D., McSweeney P.L.H., Vogensen F.K., Ardöa Y., 2013. Potential impact on cheese flavour of heterofermentative bacteria from starter cultures. *Int. Dairy J.* 33, 112-119.
- Pérez-Martín F., Seseña S, Izquierdo P.M., Palop M.L., 2013. Esterase activity of lactic acid bacteria isolated from malolactic fermentation of red wines. *Int. J. Food Microbiol.* 163, 153-158.
- Peterbauer C., Maischberger T., Haltrich D., 2011. Food-grade gene expression in lactic acid bacteria. *Biotechnol. J.* 6, 1147-1161.

- Richoux R., Maillard M.B., Kerjean J.R., Lortal S., Thierry A., 2008. Enhancement of ethyl ester and flavour formation in Swiss cheese by ethanol addition. *Int. Dairy J.* 18, 1140-1145.
- Shin H.D., Chen R.R., 2006. Production and characterization of a type B feruloyl esterase from *Fusarium proliferatum* NRRL 26517. *Enzyme Microb. Technol.* 38, 478-485.
- Sumby K.M., Matthews A.M., Grbin P.R., Jiranek V., 2009. Cloning and characterization of an intracellular esterase from the wine-associated lactic acid bacterium *Oenococcus oeni*. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 6729-6735.
- Sumby K.M., Grbin P.R., Jiranek V., 2010. Microbial modulation of aromatic esters in wine. Current knowledge and future prospects. *Food Chem.* 121, 1-16.
- Sumby K.M., Grbin P.R., Jiranek V., 2012a. Characterization of EstCOo8 and EstC34, intracellular esterases, from the wine associated lactic acid bacterium *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus hilgardii*. *J. Appl. Microbiol.* 114, 413-422.
- Sumby K.M., Grbin P.R., Jiranek V., 2012b. Validation of the use of multiple internal control genes, and the application of real-time quantitative PCR, to study esterase gene expression in *Oenococcus oeni*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1039-1047.
- Sumby K.M., Grbin P.R., Jiranek V., 2013. Ester synthesis and hydrolysis in an aqueous environment, and strain specific changes during malolactic fermentation in wine with *Oenococcus oeni*. *Food. Chem.* 141, 1673-1680.
- Sumby K.M., Grbin P.R., Jiranek V., 2014. Implications of new research and technologies for malolactic fermentation in wine. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 8111-8132.
- Taboada N.V., López Alzogaray M.S., Mukdsi M.C.A., Medina R.B., 2014. Esterase activities and biochemical properties of lactic acid bacteria isolated from goat's milk cheese in Argentina. *J. Agric. Sci. Technol. B* 4, 752-760.
- Torres S., Martinez M.A., Pandey A., Castro G.R., 2009a. An organic-solvent-tolerant esterase from thermophilic *Bacillus licheniformis* S-86. *Bioresour. Technol.* 100, 896-902.
- Torres S., Baigori M.D., Swathy S.L., Pandey A., Castro G.R., 2009b. Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase. *Food Res. Int.* 42, 454-460.
- Uraji M., Kimura M., Inoue Y., Kawakami K., Kumagai Y., Harazono K., Hatanaka T., 2013. Enzymatic production of ferulic acid from defatted rice bran by using a combination of bacterial enzymes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 171, 1085-1093.
- Wu C., Huang J., Zhou R., 2014. Progress in engineering acid stress resistance of lactic acid bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1055-1063.
- Yoon S., Kim S., Park S., Hong E., Kim J., Kim S., Yoo T.-H., Ryu Y., 2014. Improving the enantioselectivity of an esterase toward (S)-ketoprofenethyl ester through protein engineering. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 100, 25-31.
- Zhu Y., Li J., Cai H., Ni H., Xiao A., Hou L., 2013. Characterization of a new and thermostable esterase from a metagenomic library. *Microbiol. Res.* 168, 589-597.

PROPERTY CHARACTERISTICS AND BIOTECHNOLOGICAL SIGNIFICANCE OF BACTERIAL ESTERASES

Summary. Esterases represent a diverse group of hydrolases catalyzing the cleavage and formation of ester bonds. They are widely distributed in animals, plants and microorganisms. Beside lipases, a considerable number of microbial esterases have also been discovered and overexpressed. Comparisons between esterases and lipases reveal remarkable sequence similarities, despite radically different substrate specificities and physiological functions.

Esterase can perform ester hydrolysis and substrate transesterification reactions. They prefer water-soluble substrates and can only hydrolyze triglycerides composed of short-chain fatty acids. Esterases display high regio- and stereo-specificity, require no co-factors and are usually stable and active in organic solvents. These make them attractive in important industrial and medical applications in the production of optically-pure compounds in fine chemical synthesis, including the metabolic processing of drugs and antimicrobial agents. Esterases originate from mesophilic bacteria as well as from cold-adapted or thermostable organisms. This paper focuses on the considerable amount of research directed at defining the accumulation of esters during fermentation and their contribution to aromas in foods and beverages. From this research, it is obvious that esters are extremely important for the aroma profile of fermented beverages and various dairy products. Based on the available information and a literature search, it is also clear that lactic acid bacteria in fermented beverage and dairy products possess an extensive collection of ester-synthesizing and hydrolyzing activities. This review also presents the major esters reported in wine and cheese and the enzymes responsible for their hydrolysis and synthesis. Ester impact on fermented product aroma and formation during primary and malolactic fermentation was also evaluated. Moreover, the potential applications of current knowledge of esterases are also described. Attention is also paid to the possibility of improving the genetic characteristics of bacteria to improve the synthesis efficiency and specificity of important esterase enzymes. Metabolic engineering is expected to have a significant impact on ester biosynthesis by microorganisms. Genetic engineering offers the potential for further control of wine/cheese aroma, including inactivation or over-expression of esterase and alcohol acetyltransferase genes. As an interesting alternative, GRAS/food-grade expression systems or directed evolution, which are more acceptable for use in food products, are also mentioned.

Key words: esterases, biocatalytic properties, flavour, taste, cheese, wine