

JOLANTA KRZYCZKOWSKA, EWA BIAŁECKA-FLORJAŃCZYK,  
IZABELA STOLARZEWICZ

## BIOTECHNOLOGICZNE METODY OTRZYMYWANIA SUBSTANCJI ZAPACHOWYCH

### Streszczenie

Rozwój przemysłu spożywczego, nowych źródeł i sposobów pozyskiwania surowca, a także wzrost świadomości społeczeństwa powoduje, że oczekiwania konsumentów wobec żywności ulegają ciągłym zmianom. W ostatnich latach obserwuje się rosnące zainteresowanie naturalnymi dodatkami do żywności, otrzymywanymi przy zastosowaniu metod biotechnologicznych. W poniższym artykule dokonano przeglądu substancji zapachowych produkowanych na drodze biotechnologicznej, przy udziale mikroorganizmów – drożdży, bakterii, grzybów bądź izolowanych z nich enzymów.

**Słowa kluczowe:** aromat, mikroorganizmy, synteza enzymatyczna, substancje zapachowe

### Wstęp

W ostatnich latach obserwuje się ciągły wzrost zapotrzebowania na substancje zapachowe. Dzięki ich zastosowaniu zwiększa się atrakcyjność sensoryczną produktów, przez co stają się bardziej akceptowane przez konsumenta [13]. Syntetyczne substancje aromatyzujące dominują nad przyprawami pod względem możliwości standaryzacji, łatwości dozowania, jak również istotną przy produkcji sterylnością. Ponadto zastosowanie syntetycznych aromatów spożywczych pozwala na stabilizację właściwości sensorycznych produktów, które ze względu na niekorzystne warunki klimatyczne, długotrwałe przechowywanie czy obróbkę fizyczną utraciły w pewnym stopniu swój naturalny aromat i smak.

Wzrost wrażliwości społeczeństwa na problemy ekologiczne przyczynia się do wyboru przyjaznych dla środowiska metod produkcji związków zapachowych, co stanowi impuls do rozwoju rynku aromatów pochodzenia biotechnologicznego. W dyrektywie Rady WE [27] określono, że za naturalne substancje aromatyzujące uważa się nie tylko związki wydzielone ze źródeł naturalnych poprzez zastosowanie procesu

---

*Mgr inż. J. Krzyczkowska, dr hab. E. Białicka-Florjańczyk prof. SGGW, dr inż. I. Stolarzewicz, Katedra Chemii, Wydz. Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa*

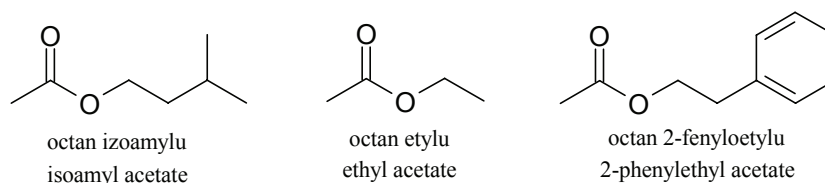
fizycznego (np. ekstrakcji), lecz także otrzymane z surowców naturalnych w wyniku przemiany przeprowadzonej przy użyciu enzymów lub mikroorganizmów. Możliwości wykorzystania ekstrakcji związków z naturalnych źródeł są ograniczone, gdyż istotne sensorycznie składniki roślin występują często w niewielkiej ilości, stąd też ich izolacja i otrzymanie w odpowiednio dużej ilości są z reguły kosztowne. Przykładem jest keton malinowy, który występuje w malinach w śladowych ilościach – poniżej 4 mg na 1 kg owoców [24]. Problemem jest także niestandardowość materiału roślinnego, na co wpływ mają niekontrolowane czynniki, takie jak: warunki środowiskowe czy choroby roślin. W związku z tym cena związków pochodzenia naturalnego jest wielokrotnie wyższa niż identycznych substancji otrzymanych w wyniku syntezy chemicznej, chociaż z chemicznego punktu widzenia nie ma między nimi różnicy.

Zdolność mikroorganizmów do wytwarzania związków zapachowych znana jest od dawna; przykładem tego jest żywność fermentowana, w której za typowy zapach odpowiedzialna jest cała gama substancji produkowanych przez drobnoustroje [16, 19, 29]. Toteż jedną z metod otrzymywania substancji zapachowych jest ich synteza *de novo* z wykorzystaniem mikroorganizmów [13, 24]. Alternatywną metodą ich bioprodukcji są biotransformacje, czyli synteza z (o ile jest to możliwe) surowców naturalnych w reakcjach katalizowanych przez enzymy.

W poniższym przeglądzie przedstawiono obie te metody w odniesieniu do kolejnych grup substancji zapachowych, sklasyfikowanych pod względem ich budowy chemicznej.

## Estry

W większości produktów spożywczych o intensywnym aromacie stwierdzono obecność związków z grupy estrów. Najliczniejszą grupę stanowią estry krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych ( $C_2$ - $C_8$ ). Octany: etylu, izoamylu, 2-fenyletylu czy izobutyłu (rys. 1) stanowią główny aromat piwa [29]. Dzięki intensywnemu zapachowi (octan izoamylu – aromat bananowy, octan etylu – brzoskwiński, malinowy, ananasowy, octan izobutyłu – wiśniowy, malinowy, truskawkowy) odgrywają one również istotną rolę w przemyśle spożywczym – roczna produkcja estrów izoamylu wynosiła już w 1989 roku ok. 74 tys. kg [10].



Rys. 1. Estry zapachowe.

Fig. 1. Aroma-active esters.

Biotechnologiczna produkcja estrów dotyczy przede wszystkim reakcji bezpośredniej estryfikacji lub transestryfikacji, katalizowanych przez lipazy, najczęściej w rozpuszczalnikach organicznych. Pozyskiwane z różnych źródeł lipazy mogą uczestniczyć w reakcji w postaci wolnej bądź immobilizowanej. Dzięki swej selektywności, w zależności od pochodzenia, preferują syntezy określonego typu estrów konkretnych kwasów i alkoholi, decydując o profilu zapachowym produktu [3, 19, 25]. Poza tym reakcje prowadzone w rozpuszczalnikach organicznych, w których lipazy również zachowują swą aktywność, umożliwiają lepszą rozpuszczalność hydrofobowych substratów, eliminują uboczne reakcje, do których przyczyniała się obecność wody, ułatwiają odzyskanie enzymu i nieprzereagowanego produktu, jak również eliminują zakażenia mikrobiologiczne [3, 20]. Romero i wsp. [20] badali syntezę octanu izoamylu w heksanie, katalizowaną przez immobilizowaną lipazę *Candida antarctica*. Przebadano cztery różne donory acylu: kwas octowy, octan amonu, octan etylu i bezwodnik octowy. Spośród tych reagentów najlepsze rezultaty w produkcji octanu izoamylu obserwowano przy zastosowaniu bezwodnika octowego. Najwyższą wydajność estru osiągnęto przy stężeniu  $0,8 \text{ mol/dm}^3$  bezwodnika octowego, trzykrotnym nadmiarze alkoholu, stężeniu enzymu  $13,8 \text{ g/mol}$  bezwodnika i temp.  $40 \text{ }^\circ\text{C}$ . Przy zastosowaniu tych warunków octan izoamylu produkowany był w ilości  $9,5 \text{ g/g}$  enzymu/h. Biotechnologiczna produkcja tego estru prowadzona była także z kwasu octowego i alkoholu izoamylowego przy udziale immobilizowanych lipaz z *Candida cylindracea* czy *Rhizomucor miehei*. Najwyższy stopień przereagowania (80 %) i wysokie stężenie estru ( $380 \text{ g/dm}^3$ ) osiągnęto przy zachowaniu warunków: 1 mol kwasu na 2 mole alkoholu, 5 % wagowych enzymu w stosunku do substratu i w temp.  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ . Hamowanie aktywności enzymu następowało dopiero przy zastosowaniu stężenia kwasu octowego powyżej  $3,6 \text{ mol/dm}^3$  [10]. Kolejnym estrem kwasu octowego, otrzymywanym na drodze biotechnologicznej i mającym duże znaczenie w przemyśle aromatów spożywczych jest octan benzylu (aromat gruszki, truskawki, jaśminu). Związek ten generowano w reakcji transestryfikacji octanu winylu z alkoholem benzylovym przy zastosowaniu handlowej lipazy Lipozyme<sup>®</sup> RM IM. Stosując do reakcji 1 mol alkoholu benzylovego na 8 moli octanu winylu, temp. inkubacji  $45 \text{ }^\circ\text{C}$  uzyskiwano 100-procentowe przereagowanie substratów już w ciągu 10 min [18]. Drogą biotechnologiczną wytworzono także octan butylu – ester o zapachu ananasowym. Do reakcji syntezy tego estru wykorzystano butanol i kwas octowy. Katalizatorem reakcji była immobilizowana lipaza z *Rhizopus oryzae*. Największe przereagowanie uzyskano przy użyciu równomolowych ilości substratów, w temp.  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  i 45-procentowym dodatku wody [22].

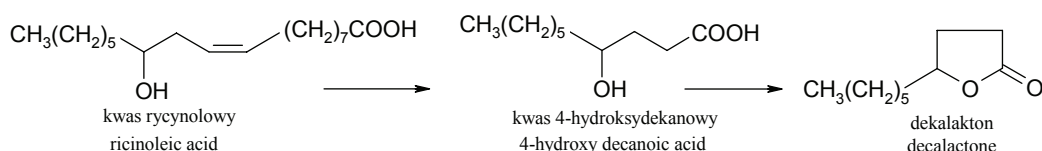
Synteza estrów zapachowych przy udziale lipaz była prowadzona także przez Larios i wsp. [15]. Frakcję B lipazy z *Candida antarctica* (CAL-B) wykorzystano do biokatalitycznej produkcji estrów krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych. Przeprowadzono reakcję estryfikacji *n*-butanolu i geraniolu z różnymi kwasami kar-

boksyłowymi: octowym, masłowym, izowalerianowym, fenylooctowym i tyglinowym ((*E*)-2-metylobut-2-enowym). Najwyższą wydajność syntezy (powyżej 80 %) zaobserwowano w reakcji *n*-butanolu z kwasem masłowym i izowalerianowym, przy czym czas reakcji do osiągnięcia tej samej wydajności, przy zastosowaniu kwasu izowalerianowego był znacznie dłuższy. Zbadano także enancjoselektywność CAL-B, w heksanie, w reakcji butanolu z  $\alpha$  bądź  $\beta$  podstawionymi kwasami karboksylowymi: kwasem mlekowym, 2-metylomasłowym, 3-hydroksymasłowym i 2-hydroksyheksanowym. Badania dowodzą, że CAL-B może być użyta jako dobry katalizator w reakcjach estryfikacji krótkołańcuchowych estrów zapachowych (tyglinianu *n*-butylu, tyglinianu geranylu oraz 2-hydroksypropionianu butylu, 2-metylomaślanu butylu i 2-hydroksyheksanianu *n*-butylu) prowadzonych w środowisku rozpuszczalników organicznych, ale enancjoselektywność tego enzymu w stosunku do krótkołańcuchowych kwasów karboksylowych jest znikoma [15].

W biotechnologicznej produkcji estrów zapachowych wykorzystywane są również esterazy. Np. do otrzymywania estrów etylowych średniołańcuchowych kwasów tłuszczowych zastosowano esterazy drożdżowe i grzybowe [4]. W syntezie kapronianu etylu i kaprylanu etylu – estrów o cierpkim, jabłkowym zapachu [29] istotnym w świecie aromatów, wykorzystano esterazę z *Bacillus licheniformis* [3]. Aktywność esteraz ma również istotne znaczenie w przekształcaniu średniołańcuchowych kwasów uwalnianych podczas anaerobowej fermentacji, prowadzonej przy produkcji napojów fermentowanych [4].

Kolejną grupą związków zapachowych otrzymywanych w procesach biotechnologicznych są cykliczne estry – laktony. Charakteryzują się one przyjemnym, intensywnym zapachem i są dość rozpowszechnione w naturze. Mogą być izolowane z owoców, warzyw, orzechów, produktów mlecznych i mięsa. Zapach laktonów jest uzależniony od wielkości pierścienia, długości bocznego łańcucha węglowego, obecności nienasyconych wiązań i konfiguracji centrów chiralnych. Możliwość produkcji laktonów na drodze biotechnologicznej odkryto już w 1960 r., gdy zbadano przekształcenia kwasu rycynolowego do C<sub>16</sub>, C<sub>14</sub> i C<sub>12</sub> hydroksykwasów przy udziale bakterii i komórek zwierzęcych [28]. Wysoko cenionym składnikiem aromatów owocowych jest  $\gamma$ -dekalakton. Rynkowa sprzedaż  $\gamma$ -dekalaktonu sięga kilkuset ton rocznie.  $\gamma$ -dekalakton charakteryzuje się dość intensywnym, olejowo-brzoskwiniowym aromatem wyczuwalnym już przy stężeniu 5 mg/dm<sup>3</sup> [23]. Chemiczna synteza tego związku prowadzi do powstania racemicznej mieszaniny, enancjomeru *R* (występującego w brzoskwiniach i w większości innych owoców) oraz enancjomeru *S* (charakterystycznego dla mango). Stąd też ceniona jest bioprodukcja  $\gamma$ -dekalaktonu pozwalająca na zachowanie czystości optycznej [13]. Obecnie na skalę przemysłową  $\gamma$ -dekalakton jest otrzymywany z kwasu rycynolowego – głównego kwasu tłuszczowego w oleju rycynowym (ok. 90 %) bądź jego estrów metylowych, przy udziale drożdży (rys. 2)

[23, 28]. Wysoką wydajność produktu obserwuje się przy użyciu do reakcji drożdży *Yarrowia lipolytica*. Wynika to z dobrego adaptowania się tych mikroorganizmów w środowisku hydrofobowych substratów, dzięki licznym lipazom, cytochromowi P450, oksydazom acetylo-CoA i zdolności produkcji biosurfaktantów [28].



Rys. 2. Biosynteza  $\gamma$ -dekalaktonu z kwasu rycynolowego (kwasu (*R*)-12-hydroksyoktadek-9-enowego) przez drożdże *Yarrowia lipolytica*.

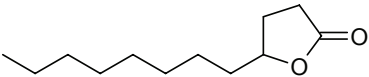
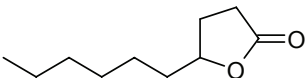
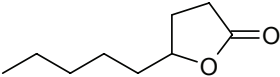
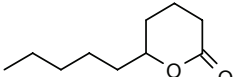
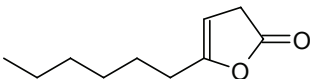
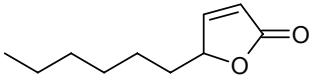
Fig. 2. Biosynthesis of ricinoleic acid ((*R*)-12-hydroxyoctadec-9-enoic acid) to  $\gamma$ -decalactone by *Yarrowia lipolytica*.

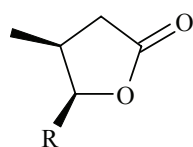
Dalsze korzystne zmiany można uzyskać przy zastosowaniu inżynierii genetycznej. Mutacja szczepu *Yarrowia lipolytica* pozwala na uzyskanie nawet 11 g  $\gamma$ -dekalaktonu na  $\text{dm}^3$  w ciągu 55 h [23]. Drożdże *Yarrowia lipolytica* są zdolne także do produkcji dużych ilości innych laktonów [28] np. 3-hydroksy- $\gamma$ -dekalaktonu, który jest prekursorem dec-2-en-4-olidu czy dec-3-en-4-olidu (tab. 1) [9]. Ten ostatni związek ma bardziej intensywny zapach brzoskwiniowy niż  $\gamma$ -dekalakton, nie jest jednak wykorzystywany przez przemysł aromatów spożywczych ze względu na trudności oddzielenia go od izomerycznego dec-2-en-4-olidu, który charakteryzuje się zapachem grzybowym [28]. Garcia i wsp. [9] przeprowadzili badania, w których określili wpływ różnych czynników środowiskowych na produkcję 3-hydroksy- $\gamma$ -dekalaktonu. Uzyskane przez nich wyniki stanowią ważny krok w otrzymywaniu dec-2-en-4-olidu oraz dec-3-en-4-olidu. Przebadano wpływ stężenia substratu, pH, napowietrzania i rozpuszczalności tlenu. Zaobserwowano kluczową rolę tlenu w produkcji 3-hydroksy- $\gamma$ -dekalaktonu. Najwyższą wydajność reakcji (0,5 mola) osiągnęto przy 5- i 30-procentowej rozpuszczalności tlenu oraz pH 4,5. Podjęto także próby otrzymania  $\gamma$ -dekalaktonu przy użyciu innych mikroorganizmów np.: *Monilia fructicola*, *Sporobolomyces odours*, *Rhodotorula glutinis*, *Sporidiobolus spp.*, *Aspergillus niger*, *Pichia etchellsii*, *Cladosporium suaveolens*, ale uzysk produktu przy zastosowaniu tych drobnoustrojów nie przekraczał  $1 \text{ g/dm}^3$ .

Wykorzystując zdolność drożdży piekarskich *Saccharomyces cerevisiae* do enancjoselektywnej redukcji grupy karbonylowej, można z kwasu 3-metylo-4-oksooktanowego otrzymać izomery *cis* i *trans* laktonów, występujących jako składniki zapachowe whisky i koniaku (whisky i cognac lactones) (rys. 3) [24].

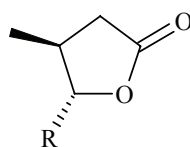
Tabela 1

Laktony produkowane przez drożdże *Yarrowia lipolytica*.  
Lactones produced by the *Yarrowia lipolytica* yeast.

Struktura związku Compound Structure	Nazwa związku Name of compound	Nuty zapachowe Scent notes
	$\gamma$ -dodekalakton $\gamma$ -dodecalactone	brzoskwiniowy / peach, masłowy / butter, tłuszczowy / fatty
	$\gamma$ -dekalakton $\gamma$ -decalactone	brzoskwiniowy / peach, tłuszczowy / fatty, owocowy / fruity
	$\gamma$ -nonalakton $\gamma$ -nonalactone	kokosowy / coconut, tłuszczowy / fatty, owocowy / fruity, anyżkowy / aniseed
	$\delta$ -dekalakton $\delta$ -dekalactone	brzoskwiniowy / peach, oleisty / oily, kremowy / creamy
	dec-3-en-4-olid dec-3-en-4-olide	owocowy / fruity, oleisty / oily, tłuszczowy / fatty
	dec-2-en-4-olid dec-2-en-4-olide	grzybowy / mushroom



stereoizomer *cis*  
stereoisomer *cis*



stereoizomer *trans*  
stereoisomer *trans*

R=C<sub>4</sub>H<sub>9</sub> whisky lacton  
R=C<sub>5</sub>H<sub>11</sub> cognac lacton

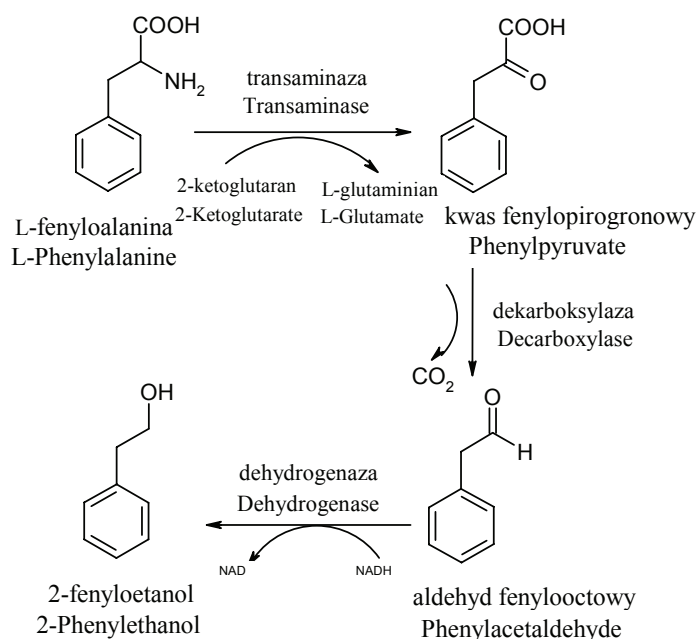
Rys. 3. Izomery *cis* i *trans* laktonów występujących jako składniki zapachowe koniaku i whisky.

Fig. 3. Isomers of *cis* and *trans* lactones occurring as odour components of cognac and whisky.

### Alkohole, aldehydy i kwasy karboksylowe

Nie tylko estry są cennymi związkami w świecie aromatów spożywczych. Spośród alkoholi istotne znaczenie ma 2-fenyletanol. Dotychczas produkcja tego związku zdominowana była przez metody chemiczne. Obecnie poszukiwane są biotechnolo-

giczne drogi syntezy 2-fenyletanolu, który jest produkowany przez wiele bakterii, a także przez niektóre drożdże. Najważniejszą naturalną drogą otrzymywania 2-fenyletanolu jest degradacja naturalnej L-fenylalaniny przy udziale enzymów drożdżowych. Reakcja polega na deaminacji L-fenylalaniny do kwasu fenylpyrogro-nowego, a następnie dekarboksylacji kwasu do aldehydu fenylacetaldehidu, który po-przez działanie dehydrogenazy jest przekształcany w 2-fenyletanol (rys. 4) [23].



Rys. 4. Przekształcanie aminokwasu – L-fenylalaniny do 2-fenyletanolu przy udziale drożdży *Yarrowia lipolytica*.

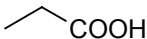
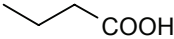
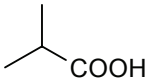
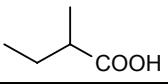
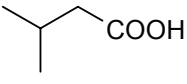
Fig. 4. Transformation of amino acid - L-phenylalanine into 2-phenylethanol by yeast *Yarrowia lipolytica* yeast.

Istotnymi, lotnymi związkami, dającymi charakterystyczne sensoryczne wrażenie „zielonej smakowości” są też C<sub>6</sub> aldehydy i odpowiadające im alkohole. Przykładem może być *cis*-3-heksen-1-ol („liściowy alkohol”) mający intensywny zapach świeżo ściętej trawy i stanowiący ważny składnik naturalnej nuty zapachowej [1, 23, 24]. Tradycyjna metoda pozyskiwania zielonej nuty zapachowej poprzez destylację olejków roślinnych jest obecnie zastępowana przez biokatalizę. Naturalnymi prekursorami w biokatalitycznej produkcji „zielonej nuty” są kwas linolowy i linolenowy. Działanie lipooksygenazy, otrzymywanej z mąki sojowej, powoduje ich przekształcenie do 13-wodoronadtlenku kwasu oktadeka-9-*cis*-11-*trans*-dienowego (C13-HPOD) bądź odpowiednio 13-wodoronadtlenku-kwasu oktadeka 9-*cis*-11-*trans*-15-*cis*-trienowego

(C13-HPOT). Następnie liaza wodoronadtlenkowa (enzym cytochromu P450) przekształca C13-HPOT i C13-HPOD do aldehydów C<sub>6</sub>, z których dzięki działaniu dehydrogenazy alkoholowej z drożdży piekarskich, w obecności NADH/NAD, powstają odpowiednie alkohole: *cis*-3-heksen-1-ol, *trans*-2-heksen-1-ol czy heksan-1-ol [1, 23]. W grupie lotnych związków tworzących „zieloną nutę” powszechnie wykorzystywanym w przemyśle spożywczym jest także octan *cis*-3-heksen-1-ylu. Chiang i wsp. [8] otrzymali ten związek na drodze biotechnologicznej z wykorzystaniem immobilizowanej lipazy z *Rhizomucor miehei*, która katalizowała reakcję transestryfikacji *cis*-3-heksen-1-olu z triacetiną w *n*-heksanie.

Tabela 2

Produkcja kwasów karboksylowych przez bakterie kwasu octowego.  
Production of carboxylic acids by acetic acid bacteria.

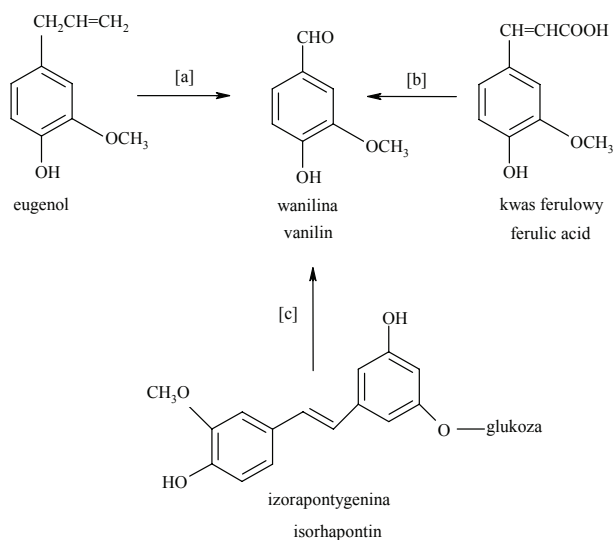
Kwas karboksylowy Carboxylic acid	Zapach/smak Odour/taste	Biokatalizator Biocatalyst
kwas propionowy propionic acid  	ostry / pungent, kwaśny /sour, przypominający skwaśniałe mleko / reminiscent of sour milk, serowy / cheese, masłowy / butter); malina /rasberry, truskawka / strawberry, koniak / cognac, masło / butter	<i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i> <i>Propionibacterium</i>
kwas masłowy butyric acid  	mocny / powerful, przenikliwy / penetrating, przypominający zjeżdżone masło / reminiscent of rancid butter; masło / butter, ser / cheese, orzechy / nut, owoce / fruit	<i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i>
kwas izomasłowy isobutyric acid  	mocny / powerful, przenikliwy / penetrating, w rozcieńczeniu przyjemny / almost pleasant when diluted, owocowy / fruity; ser / cheese, owoce / fruit	<i>Gluconobacter oxydans</i>
kwas 2-metylo masłowy 2-methylbutyric acid  	ostry / pungent, drażniący / acrid, przypominający ser Roquefort / reminiscent of Roquefort cheese, w rozcieńczeniu przyjemny / pleasant when diluted, owocowy / fruity; ser / cheese, masło / butter, czekolada / chocolate	<i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i>
kwas izowalerianowy isovaleric acid  	przenikliwy / diffusive, kwasowy-drażniący / acid-acrid, w rozcieńczeniu serowy / in dilution cheesy, nieprzyjemny / unpleasant, przy dużym rozcieńczeniu (poniżej 20mg/dm <sup>3</sup> ) ziołowy / herbaceous if highly diluted (<20mg/dm <sup>3</sup> ), suchy / dry), orzech / nut, kawa / coffee	<i>Gluconobacter oxydans</i> <i>Acetobacter pasteurianus</i>



Niektóre kwasy karboksylowe dzięki swemu intensywnemu zapachowi i charakterystycznemu smakowi odgrywają istotną rolę w przemyśle spożywczym. Biotechnologiczne pozyskiwanie tych kwasów polega na utlenianiu alkoholi, zachodzącym przy udziale bakterii kwasu octowego: *Acetobacter pasteurianus*, *Gluconobacter oxydans*, *Propionibacterium* (tab. 2) [23].

Duże zainteresowanie budzi również mikrobiologiczna metoda produkcji istotnego w świecie aromatów benzaldehydu. Naturalny benzaldehyd, który stanowi kluczowy składnik zapachów owocowych, m.in. wiśni, pozyskiwany jest z amygdaliny – cyjanogennego glikozydu występującego w pestkach owoców (moreli, wiśni, śliw, brzoskwiń) oraz gorzkich migdałach. Jednakże ekstrakcja prowadzi do powstania niepożądanych produktów ubocznych, np. cyjanowodoru [17]. Dlatego też biokonwersja stanowi alternatywę dla produkcji naturalnego benzaldehydu. W biotechnologicznej produkcji benzaldehydu prekursorem jest L-fenyloalanina [17, 21]. Degradacja tego związku przy udziale grzybów *Ischnoderma benzoinum*, *Bjerkandera adusta* bądź *Polyporus tuberaster* pozwala na uzyskanie benzaldehydu w ilości 71 - 587 mg/l, w zależności od użytego szczepu [17].

Wanilina ( $C_8H_8O_3$ , 4-hydroksy-3-metkosi-benzaldehyd) jest ważnym aldehydem w przemyśle spożywczym i kosmetycznym, gdyż stanowi jeden ze składników aromatycznych wanilii. Wanilina występuje w ziarnie tropikalnej rośliny *Vanilia planifolia* w ilości ok. 2 % jej masy, stąd też wyodrębnienie tego związku poprzez ekstrakcję nie przekracza 1 % światowej produkcji. Biotechnologiczny proces produkcji waniliny polega na biokonwersji izoeugenolu lub eugenolu przez szczepy bakterii *Corynebacterium* bądź *Pseudomonas* (rys. 5, reakcja [a]) [13, 23, 30].

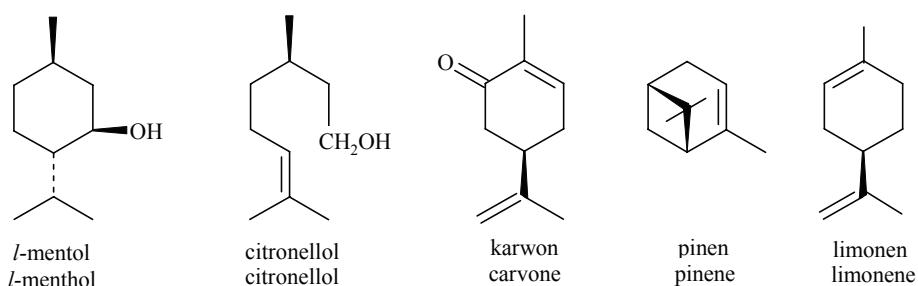


Rys. 5. Możliwe drogi bioprodukcji waniliny.

Fig. 5. Possible pathways for the bioproduction of vanillin.

Produkcja na skalę przemysłową bazuje na biokonwersji kwasu ferulowego pozyskiwanego z otrąb ryżowych (rys. 5, reakcja [b]) [23]. Inną możliwą drogą jest utlenianie naturalnego stilbenolidu, występującego w przyrodzie w postaci glikozydu – izorapontygeniny; utlenianie do waniliny jest katalizowane przez dioksygenazę pochodzącą z *Pseudomonas sp.* (rys. 5, reakcja [c]) [11].

### Pochodne terpenowe



Rys. 6. Struktura terpenów.

Fig. 6. Structure of terpenes.

W ostatnim okresie wrasta zainteresowanie terpenoidami, jako naturalnymi związkami zapachowymi. Terpenoidy występują głównie w wydzielinach drzew szpilkowych, eukaliptusów, w olejkach eterycznych owoców cytrusowych i wielu innych roślin. Odgrywają one nie tylko istotną rolę biologiczną (ochrona przed roślinożercami, insektami), ale i są źródłem określonych zapachów (rys. 6) [2, 11]. Stąd też znaczna część tej grupy związków organicznych, stosowanych w aromatach i kompozycjach zapachowych – mono- i seskwiterpeny oraz ich pochodne tlenowe, pochodzi ze źródeł naturalnych. Obecnie wrasta także zainteresowanie biotechnologicznymi metodami otrzymywania tych związków, ponieważ wiele z nich występuje w postaci konkretnych enancjomerów, zatem biotransformacje są tu preferowane ze względu na stereoselektywność reakcji enzymatycznych (tab. 3) [7].

Większość przekształceń mikrobiologicznych dotyczy monoterenów (rys. 6). Prowadzono badania nad pozyskiwaniem *l*-karwonu z  $\alpha$ - lub  $\beta$ -pinenu na drodze mikrobiologicznej z użyciem *Pseudomonas*, a także citronellolu z citronellalu przy udziale drożdży *Candida reukaufii* AHU 3032 [11]. Ważnym terpenowym alkoholem w przemyśle aromatów jest *l*-mentol. Naturalny *l*-mentol pozyskiwany jest poprzez krystalizację z mięty pieprzowej. Jedną z biotechnologicznych metod jego otrzymywania polega na działaniu esteraz preferujących hydrolizę estrów *l*-mentylu: wyselekcjonowane szczepy *Penicillium*, *Rhizopus*, *Bacillus*, *Trichoderma* prowadzą asymetryczną hydrolizę octowych, propionowych czy kapronowych estrów *d,l*-mentolu.

Tabela 3

Właściwości zapachowe enancjomerów wybranych związków terpenowych.  
Aromatic properties of enantiomers of some selected terpene compounds.

Monoterpeny Monoterpene	Enancjomer Enantiomer	Zapach Fragrance
karwon carvone	( <i>R</i> )-(-) ( <i>S</i> )-(+)	mietowy / spearmint kminkowy / caraway
limonen limonene	( <i>R</i> )-(+) ( <i>S</i> )-(-)	pomarańczowy / orange terpentynowy / turpentine
$\alpha$ -pinen $\alpha$ -pinene	(1 <i>R</i> , 5 <i>R</i> )-(+) (1 <i>S</i> , 5 <i>S</i> )-(-)	słabo mietowy / slightly minty sosnowy / pine tree
mentol menthol	(1 <i>R</i> , 3 <i>R</i> , 4 <i>S</i> )-(-) (1 <i>S</i> , 3 <i>S</i> , 4 <i>R</i> )-(+)	mietowy / minty fenolowy / phenolic

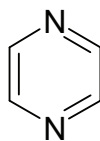
Immobilizowaną lipazę mikrobiologiczną z drożdży *Candida antarctica* wykorzystano w transestryfikacji alkoholi terpenowych z estrami winylowymi. Lipaza katalizowała powstawanie w środowisku organicznym estrów citronellolu i geraniolu z octanu i propionianu winylu jako czynników acylujących. Zastosowanie 10 % enzymu w stosunku do masy reagentów pozwoliło osiągnąć w ciągu 8 - 16 h wydajność reakcji powstawania octanu citronellylu i octanu geranylu rzędu 98 - 99 % [2].

Jednym z najbardziej licznych monoterpenów jest *R*-(+)-limonen. Występuje powszechnie w skórkach owoców cytrusowych, stąd też stanowi niedrogi, powszechnie występujący produkt uboczny. Jego chemiczna struktura jest zbliżona do wielu monoterpenoidów (pochodnych tlenowych, takich jak: alkohol perillylowy, karweol, karwon, mentol) o przyjemnym zapachu, dlatego może on stanowić prekursor w produkcji tych związków zapachowych. Bicas i wsp. [5] prowadzili badania nad biotransformacją *R*-(+)-limonenu do *R*-(+)- $\alpha$ -terpineolu. Związek ten stanowi ważny handlowo produkt, wykorzystywany w mydłach, kosmetykach i preparatach zapachowych, gdyż cechuje się kwiatowym zapachem. Biotransformacje *R*-(+)-limonenu do *R*-(+)- $\alpha$ -terpineolu (C<sub>10</sub>H<sub>18</sub>O) prowadzono z udziałem *Fusarium oxysporum* 152b. Najlepszą wydajność – 2,4 g/l osiągnięto po 72 h od rozpoczęcia reakcji, przy zastosowaniu 0,5 % (v/m) stężenia limonenu w czystej destylowanej wodzie, użytej jako pożywki, w stosunku 0,25 (m/m) inokulum do pożywki, w temp. 26 °C i szybkości mieszania 240 obr./min.

Przekształcanie *R*-(+)-limonenu do *R*-(+)- $\alpha$ -terpineolu metodą biotechnologiczną prowadzone było również z udziałem *Cladosporium* sp. [12], *Pseudomonas gladioli* [6] czy *P. digitatum* [26].

## Związki heterocykliczne

Interesującymi dla przemysłu spożywczego, pod względem zapachu, są też pochodne pirazyny – heterocykliczne związki zawierające w pierścieniu dwa atomy azotu (rys. 7). Pirazyny są mikroskładnikami aromatów stosowanych w produktach spożywczych (w aromacie orzechowym lub pieczonych ziemniaków). Metoksyalkilopirazyny odkryto w różnorodnych warzywach, m.in. w ostrej papryce, ziemniakach, zielonym groszku. W przypadku papryki, za jej typowy zapach odpowiedzialna jest 2-metoksy-3-izobutylopirazyna [11]. Powstawanie alkilopirazyn w produktach żywnościowych związane jest z reakcjami Maillarda i pirolizą związków aminowych. Biotechnologiczna produkcja pirazyn przebiega przy udziale drożdży. Drożdże piekarskie uczestniczą w tworzeniu acyloin, katalizując biotransformację aldehydów alifatycznych i kwasów 2-ketokarboksylowych. Wytworzone tym sposobem acyloiny reagują z 1,2-propanodiaminą tworząc 5,6-dihydropirazyny. Kurniadi i wsp. [14] syntetyzowali z udziałem drożdży piekarskich kilka pochodnych pirazynowych: 2-etylo-3,5-dimetylopirazynę o aromacie orzechowym; 2,3-dietylo-5-metylopirazynę charakteryzującą się zapachem pieczenia oraz 2,3-dietylo-5-metylo-5,6-dihydropirazynę o aromacie skórki chleba.



pirazyna  
pyrazine

Rys. 7. Struktura pirazyny.

Fig. 7. Structure of pyrazine.

## Podsumowanie

Metody biotechnologiczne stanowią doskonałą alternatywę zarówno dla ekstrakcji z materiałów roślinnych, jak i dla typowej syntezy chemicznej. O ile w pierwszym przypadku czynnikiem przemawiającym za biotransformacjami jest koszt procesu, o tyle w drugim decydujące są względy ekologiczne, a w przypadku związków chiralnych – selektywność enzymów. Część omówionych procesów wykorzystywana jest już w przemysłowej produkcji, np. otrzymywanie octanu izoamylu, fenyloetanolu (z L-fenylalaniny), waniliny (z kwasu ferulowego, eugenolu i stilbenów) czy  $\gamma$ -dekalaktonu z kwasu rycynolowego. Inne syntezy zostały wykonane, jak dotąd, w skali laboratoryjnej, jednak olbrzymi potencjał tkwiący w biotransformacjach pozwala przypuszczać, że będą one stosowane coraz powszechniej.

### Literatura

- [1] Akacha N., Boubaker O., Gargouri M.: Production of hexenol in a two-enzyme system: kinetic study and modeling. *Biotechnology Letters*, 2005, **27**, 1875-1878.
- [2] Akoh C.C., Yee L.B.: Lipase-catalyzed transesterification of primary terpene alcohols with vinyl esters in organic media. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 1998, **4**, 149-153.
- [3] Alvarez-Macarie E., Baratii J.: Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2000, **10**, 377-383.
- [4] Bardi L., Crivelli C., Marzona M.: Esterase activity and release of ethyl esters of medium-chain fatty acids by *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic growth. *Can. J. Microbiol./Rev. can. Microbiol.*, 1998, **44 (12)**, 1171-1176.
- [5] Bicas J., Barros F., Wagner R., Godoy H., Pastore G.: Optimization of *R*-(+)- $\alpha$ -terpineol production by the biotransformation of *R*-(+)-limonene. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 2008 **35**, 1061-1070.
- [6] Cadwallader K., Braddock R., Parish M., Higgins D. Bioconversion of (+)-limonene by *Pseudomonas gladioli*. *J. Food Sci.*, 1989, **54**, 1241-1245.
- [7] Carvalho C., Fonseca M.: Biotransformation of terpenes. *Biotechnol. Advances*, 2006, **24**, 134-142.
- [8] Chiang W. D., Chang S. W., Shieh C. J.: Studies on the optimized lipase-catalyzed biosynthesis of cis-3-heksen-1-yl acetate in n-heksane. *Process Biochemistry*, 2003, **38**, 1193-1199.
- [9] Garcia E., Aguedo M., Gomes N., Choquet A., Belo I., Teixeira J., Belin J., Wache Y.: Production of 3-hydroxy- $\gamma$ -decalactone, the precursor of two decenolides with flavouring properties, by the yeast *Yarrowia lipolytica*. *J. Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2009, **57**, 22-26
- [10] Guvenc A., Kapucu N., Mehmetoglu U.: The production of isoamyl acetate using immobilized lipases in a solvent-free system. *Process Biochemistry*, 2002, **38**, 379-386.
- [11] King R.D., Cheetham P.S.J.: *Food Biotechnology – 2*. Elsevier Applied Science. London 1988.
- [12] Kraidman G., Mukherjee B., Hill J.: Conversion of D-limonene into an optically active isomer of  $\alpha$ -terpineol by a *Cladosporium* species. *Bacteriol. Proc.*, 1969, 69-63.
- [13] Krings U., Berger R.G.: Biotechnological production of flavours and fragrances. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1998, **49**, 1-8.
- [14] Kurniadi T., Rhlid R.B, Fay L.B., Juillerat M.A, Berger R.G.: Chemoenzymatic synthesis of aroma active 5,6-dihydro- and tetrahydropirazines from aliphatic acyloins produced by baker's yeast. *J. Agric. Food Chem.*, 2003, **51 (10)**, 3103-3107.
- [15] Larios A., Garcia H.S., Oliart R.M., Valerio-Alfaro G.: Synthesis of flavor and fragrance esters using *Candida antarctica* lipase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2004, **65**, 373-376.
- [16] Liu S. Q., Holland R., Crow V. L.: Esters and their biosynthesis in fermented dairy products: a review. *Int. Dairy J.*, 2004, **14**, 923-945.
- [17] Lomascolo A., Stentelaire Ch., Asther M., Lesage-Meessen L.: Basidiomycetes as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry. *Tibtech*, 1999, **17**, 282-289.
- [18] Majumder A.B, Singh B., Dutta D., Sadhukhan S., Gupta M.N.: Lipase catalyzed synthesis of benzyl acetate in solvent-free medium using vinyl acetate as acyl donor. *Bioorg. Med. Chem. Letters*, 2006, **16**, 4041-4044.
- [19] Rojas V., Gil J.V., Pinaga F., Manzanares P.: Studies on acetale ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Int. J. Food Microb.*, 2001, **70**, 283-289.
- [20] Romero M.D., Calvo L., Alba C., Daneshfar A., Ghaziaskar H.S.: Enzymatic synthesis of isoamyl acetate with immobilized *Candida antarctica* lipase in n-hexane. *Enzyme Microb. Technol.*, 2005, **37**, 42-48.
- [21] Rozzell J. D.: Commercial scale biocatalysis: myths and realities. *Bioorg. Med. Chem.*, 1999, **7**, 2253-2261.

- [22] Salah R B., Ghamghui H., Miled N., Mejdoub H., Gargouri Y.: Production of butyl acetate ester by lipase from novel strain of *Rhizopus oryzae*. J. Biosci. and Bioeng., 2007, **103 (4)**, 368-372.
- [23] Schrader J., Etschmann M.M. W., Sell D., Hilmer J. M., Rabenhorst J.: Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavour compounds—current industrial processes and future prospects. Biotechnol. Letters, 2004, **26**, 463-472.
- [24] Serra S., Fuganti C., Brenna E.: Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. Trends in Biotechnology, 2005, **23 (4)**, 193-198.
- [25] Talon R., Montel M. C., Berdague J. L.: Production of flavor esters by lipases of *Staphylococcus warneri* and *Staphylococcus xylosus*. Enzyme Microb. Technol., 1996, **19**, 620-622.
- [26] Tan Q., Day D., Cadwallader K. Bioconversion of *R-(+)*-limonene by *P. digitatum* (NRRL 1202). Process Biochem., 1998, **33**, 29-37.
- [27] The Council of the European Communities. Council Directive 88/388/EEC of 22 June 1988.
- [28] Wache Y., Aguedo M., Nicaud J. M., Belin J. M.: Catabolism of hydroxyacids and biotechnological production of lactones by *Yarrowia lipolytica*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 2003, **61**, 393-404.
- [29] Verstrepen K.: Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. J. Biosci. Bioeng., 2003, **96 (2)**, 110-118.
- [30] Xu P., Hua D., Ma C.: Microbial transformation of propenlbenzenes for natural flavour production. Trends in Biotechnology, 2007, **25 (12)**, 571-576.

## BIOTECHNOLOGICAL METHODS FOR PRODUCING ODORIFEROUS SUBSTANCES

### S u m m a r y

The development of food industry, new sources of and methods for winning raw materials, as well as the raising awareness among the population cause the consumer expectations of food to continuously change. It has been reported that, in recent years, consumers have become more and more interested in natural food additives produced using biotechnological methods. The present paper contains a review of odoriferous substances, which are biotechnologically produced with the application of such micro-organisms as: yeast, bacteria, fungi or enzymes isolated from them.

**Key words:** aroma, micro-organisms, enzymatic synthesis, odoriferous substances 