

MAŁGORZATA PLESZCZYŃSKA

## PERSPEKTYWY ZASTOSOWANIA BIOTECHNOLOGII W PRODUKCJI LOTNYCH ZWIĄZKÓW SMAKOWO-ZAPACHOWYCH

### Streszczenie

Praca prezentuje obecny stan badań nad mikrobiologiczną produkcją naturalnych związków smakowo-zapachowych, zwłaszcza laktonów, związków aromatycznych (waniliny i aldehydu benzooesowego) oraz terpenów. Szczególny nacisk położono na przedstawienie zalet, ograniczeń oraz perspektyw wykorzystania w tym celu procesów biotransformacji.

### Wstęp

Związki smakowo-zapachowe pierwotnie pochodziły z roślin wyższych lub zwierząt. Dzisiaj duża ich część powstaje w laboratoriach chemicznych, a zapotrzebowanie na tego typu substancje ciągle rośnie. Coraz częściej spożywamy żywność wysoko przetworzoną. Większość produktów rolnych poddawana jest różnym zabiegom technologicznym, od zbioru niedojrzałych owoców i warzyw, obróbki mechanicznej i termicznej do przedłużającego się przechowywania. Powoduje to utratę przynajmniej części substancji smakowo-zapachowych. Podobne zmiany towarzyszą nowym technikom przetwarzania żywności, m.in. produkcji mrożonych półproduktów, mikrofalowaniu i modyfikowaniu pierwotnego składu produktów. Na przykład, wskutek obniżania zawartości tłuszczu w celu zmniejszenia wartości kalorycznej żywności może drastycznie zmienić się jej jakość, ponieważ tłuszcze są często rozpuszczalnikiem i środowiskiem ochronnym dla wielu związków odpowiadających za smak i zapach. Rośnie również zapotrzebowanie na substancje smakowe i zapachowe ze strony dynamicznie rozwijającego się przemysłu chemicznego, perfumeryjnego, farmaceutycznego i spożywczego. Powstaje ogromny rynek zbytu, a to stwarza nowe możliwości produkcji.

Zapotrzebowanie na syntetyczne substancje zapachowe i smakowe jest nadal ogromne, ale stosunkowo łatwe do otrzymania i dość tanie produkty syntezy chemicznej nie zawsze są w stanie sprostać wymaganiom konsumentów, którzy coraz częściej żądają substancji naturalnych, zdrowych, przyjaznych dla środowiska i pochodzących z odnawialnych źródeł. W ustawodawstwie pogłębia się rozróżnienie pomiędzy związkami naturalnymi, a syntetycznymi, identycznymi z naturalnymi. Wytwarzanie naturalnych substancji smakowo-zapachowych w oparciu o materiał roślinny lub zwierzęcy ma kilka istotnych wad, m.in. zmienność składu i wydajności produktu końcowego uzyskiwanego z różnych źródeł geograficznych, ale także z jednego źródła zależnie od stanu pogody, chorób itp.; ograniczenia handlowe wynikające z tropikalnego lub subtropikalnego położenia upraw większości roślin używanych w przemyśle i niestabilności politycznej tych regionów; ograniczenia ekologiczne, a przede wszystkim stałe obniżanie się dostępności tradycyjnych materiałów, takich jak roślinne olejki eteryczne, ambra, piżmo, cybet i w konsekwencji wysokie ceny – powyżej 5000 USD/kg.

Opisane trudności nie dotyczą dodatków smakowo-zapachowych, które mają taką samą budowę i skład chemiczny, jak odpowiadające im związki pochodzenia roślinnego lub zwierzęcego, ale produkowane są przy użyciu mikroorganizmów. Produkcja biotechnologiczna jest niezależna od wpływów zewnętrznych, a charakteryzuje się stałą wydajnością i jakością produktu. Podczas gdy metody chemiczne prowadzą do tworzenia mieszaniny izomerów oraz wielu produktów ubocznych, procesy biotechnologiczne charakteryzują się stereo- i regiospecyficznością, a także specyficznością w zakresie typu reakcji. Przebiegają w łagodnych warunkach i rzadko towarzyszą im uciążliwe reakcje uboczne. Produkty biotechnologiczne mają też dodatkowe cechy korzystne, np. większą trwałość podczas obróbki i gotowania, właściwości barwiące lub konserwujące. Istotne jest, że substancje te, pomimo ich zewnętrznego pochodzenia w stosunku do produktu, którego cechy mają stymulować lub przypominać, mogą uzyskać status naturalności. Warunkiem jest by prekursor, z którego powstają – w wyniku przekształcenia enzymatycznego lub termicznego – był naturalny [26].

Opcja biotechnologiczna w wytwarzaniu czystych substancji smakowo-zapachowych obejmuje syntezę *de novo* przez mikroorganizmy rosnące na tanim substracie (fermentację) oraz biotransformację i biokonwersję, przez które rozumie się pojedyncze lub wieloetapowe przemiany egzogenego prekursora w produkt podobny strukturalnie, ale o większej wartości. Do transformacji używa się mikroorganizmów, enzymów, komórek roślinnych i kultur tkankowych. Rocznie drogą biokatalizy mikrobiologicznej (głównie fermentacji) wytwarza się tysiące ton nietlotnych dodatków smakowych, takich jak słodziki (fruktoza), acidulanty (kwas cytrynowy) i substancje przyprawowe (kwas glutaminowy). Natomiast możliwości biotechnologicznej produkcji związków lotnych powstały dopiero niedawno. Dość wysokie koszty stosowanych obecnie bioprocessów sprawiają, że w przemyśle wykorzystuje się jeszcze niewiele

takich produktów, przede wszystkim niektóre estry, aldehydy (wanilina, aldehyd benzoowy),  $\gamma$  i  $\delta$  laktony.

## Laktony

Znaczenie laktonów jako dodatków aromatycznych do żywności opiera się na ich charakterystycznych właściwościach sensorycznych. Są wśród nich związki o zapachu śmietankowym, brzoskwiniowym, orzechowym, kokosowym, miodowym, owocowym i innym. Ich zaletą jest niski próg zapachowy, wynoszący około 0,1 ppm.

Laktony są cząsteczkami, które mają pierścień laktonowy (pierścień węglowy z jednym atomem tlenu), pochodzący z wewnątrzcząsteczkowej estryfikacji pomiędzy grupą hydroksylową i karboksylową hydroksykwasu tłuszczowego. Naturalne, spełniające funkcję zapachową laktony, nasycone i nienasycone, zawierają od 6 do 12 atomów węgla, mają strukturę gamma lub delta, budowę przeważnie liniową, choć kilka jest też makrocyclicznych. Różnice strukturalne (liczba atomów węgla w pierścieniu i łańcuchu bocznym, obecność wiązań podwójnych, chiralność) wpływają na jakość zapachu cząsteczki [10].

Spośród dostępnych drogą biotechnologiczną i mających znaczenie przemysłowe  $\gamma$  i  $\delta$  laktonów najważniejsze są te odnoszące się bezpośrednio do kwasów oktanowego, dekanowego i dodekanowego. Najbardziej znany i najszerzej wykorzystywany jest 4-dekanolakton o zapachu brzoskwiniowym, który wchodzi w skład wielu produktów żywnościowych (produktów mleczarskich, soków, deserów w proszku, itd.).

Biosynteza laktonów jest złożona i niezbyt dobrze poznana. Zdolność syntezy *de novo* posiada wiele mikroorganizmów: grzyby (*Polyporus durus* [7], *Ischnoderma benzoinum* [2]), grzyby nitkowate (*Trichoderma* [11], *Fusarium paeae* [24]) i drożdże (*Sporobolomyces odoratus* [25]). Wydajność tych procesów jest jednak bardzo niska (kilka mg/ml), dlatego zainteresowanie badaczy i producentów skupia się na bardziej efektywnym wytwarzaniu tych związków drogą biotransformacji naturalnych prekursorów. Bezpośrednimi prekursorami laktonów są hydroksykwasy tłuszczowe – naturalne lub syntetyzowane przez mikroorganizmy z kwasów tłuszczowych, zawierających lub nie zawierających grupy hydroksylowej lub ketonowej. Najważniejszym, jedynym łatwo dostępnym i tanim związkiem wyjściowym dla syntezy 4-dekanolaktonu jest olej rycynowy, otrzymywany z *Ricinus communis*, a ściślej jego główny (90%) składnik – kwas rycynolowy, który jest naturalnym hydroksykwasem [10].

Rozkład kwasów tłuszczowych przebiega drogą  $\beta$ -oksydacji. U drożdży proces ten zachodzi w peroksysomach. Początkowo sądzono, że podczas  $\beta$ -oksydacji nie uwalniają się z kompleksu multienzymatycznego metabolity pośrednie. Jednak w latach osiemdziesiątych wykryto nagromadzenie się produktów pośrednich podczas

utleniania kwasu palmitynowego przez całe mitochondria. Okazało się możliwe wykrycie tego szlaku do otrzymywania ważnych substancji organicznych.

Różne mikroorganizmy, wykazujące aktywność lipazową do hydrolizy oleju rycynowego, są zdolne tolerować powstające kwasy tłuszczowe i, co najważniejsze, mogą prowadzić częściową  $\beta$ -oksydację kwasu rycynolowego. Do biodegradacji tego kwasu najczęściej używa się drożdży *Yarrowia lipolytica*, a ponadto: *Cladosporium suaveolens*, *Pichia etchellsii*, *Candida petrophilium*, *Sporobolomyces odoros*, *Rhodotorula glutinis*, *Monilia fructicola* oraz *Aspergillus niger* i *Phanerochaete chrysosporium* [8]. W przypadku *Yarrowia*, po pewnej liczbie cykli  $\beta$ -oksydacji, ester zredukowanego hydroksykwasu (kwas 4-hydroksydekanowy – bezpośredni prekursor laktonu) i koenzymu A jest uwalniany z kompleksu utleniającego. Końcowe stężenie kwasu 4-hydroksydekanowego wynosi od 5 do nawet 10 g/l. Spontanicznie następuje tylko częściowa cyklizacja hydroksykwasu i dlatego, aby uzyskać zadowalającą wydajność, laktonizację należy prowadzić ogrzewając substrat w środowisku o odczynie kwaśnym [10].

Zakończona sukcesem konwersja kwasu rycynolowego do 4-dekanolaktonu zapoczątkowała poszukiwanie innych źródeł hydroksykwasów tłuszczowych. W słodkich ziemniakach i pewnych żywicach występują kwasy 11-hydroksypalmitynowy i 3,11-dihydroksymirystynowy, które drożdże transformują do odpowiednich  $\delta$ -laktonów, 5-dekanolaktonu i 5-oktanolaktonu. Takich naturalnych źródeł hydroksykwasów tłuszczowych jest jednak niewiele, a ich zasoby są mało obfite, szuka się możliwości pozyskiwania tych związków drogą biotechnologiczną, np. poprzez zastosowanie mikroorganizmów do wprowadzania grupy hydroksylowej do łańcucha węglowego kwasu tłuszczowego. Może się to odbywać albo przez działanie lipoksygenazy na naturalne polinienasycone kwasy tłuszczowe lub przez ich bezpośrednią hydroksylację. I tak, fermentacja oleju kokosowego, bogatego źródła kwasu oktanowego, przy użyciu *Aspergillus niger*, *Phanerochaete chrysosporium*, *Cladosporium suaveolens* i *Pichia etchellsii* jest dobrą drogą do otrzymywania 4-oktanolaktonu. *Sporobolomyces odoros* i pewne gatunki *Mortierella* mogą również przyłączać grupę hydroksylową do czwartego węgla i wytwarzać odpowiednio  $\gamma$ -dekanolakton z kwasu dekanowego i  $\gamma$ -oktanolakton z kwasu oktanowego. Gamma i delta laktony z odpowiednich kwasów tłuszczowych lub ich estrów etylowych produkują niektóre gatunki *Mucor*, ze względu na zdolność umieszczania grupy funkcyjnej przy 4 lub 5 węglu w kwasach karboksylowych zawierających od 4 do 20 atomów węgla. Wytwarzanie laktonów z długołańcuchowych kwasów tłuszczowych wymaga, obok wprowadzenia grupy hydroksylowej, także skrócenia łańcucha oraz laktonizacji. Wielu autorów [8] opisuje mikrobiologiczną (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Yarrowia* i *Pseudomonas*) transformację kwasu oleinowego do kwasu 10-hydroksyoktadekanowego, który przy użyciu mikroorganizmów mających zdolność do jego  $\beta$ -oksydacji jest prze-

kształcany w  $\gamma$ -dodekanolakton. *Acetobacter* i *Rhodococcus* w analogiczny sposób prowadzą konwersję kwasu linolowego i linolenowego do nienasyconych  $\gamma$ -laktonów. Reakcje te są stereospecyficzne i przebiegają z dużą wydajnością, jednak produktem większości z nich są 10-hydroksykwas, co znacznie zawęża możliwości otrzymywania szerokiej gamy laktonów, ponieważ rodzaj powstającego laktonu ( $\delta$  czy  $\gamma$ ) zależy od pozycji grupy hydroksylowej w łańcuchu alifatycznym.

Alternatywny sposób otrzymywania dużych ilości  $\delta$ -laktonów polega na mikrobiologicznej redukcji odpowiednich  $\alpha,\beta$ -nienasyconych laktonów obecnych w oleju z kory drzewa Massoi (*Cryptocaria massoia*, Indonezja). W reakcji biorą udział grzyby należące do *Basidiomycetes* i drożdże *Saccharomyces cerevisiae* [27].

Poza omówionymi, duże znaczenie mają laktony o zapachu piżmowym. Mają przewagę nad syntetycznymi piżmami, ponieważ bardziej przypominają piżmo naturalne, są lepiej tolerowane przez skórę i łatwo ulegają degradacji. Drożdże *Torulopsis bombicola* przekształcają kwas palmitynowy lub jego estry do kwasu 16-hydroksyheksadekanowego, który wytwarzany jest w postaci glikolipidu. Jest to jeden z najbardziej wydajnych procesów w przemyśle perfumeryjnym. Wydajność wynosi około 40% i otrzymuje się 300 g/l glikolipidu. Jest on poddawany hydrolizie, a następnie cyklizacji do heksanodekanolaktonu [16].

## Związki aromatyczne

Naturalne związki aromatyczne takie, jak wanilina, aldehyd benzoesowy, alkohol  $\beta$ -fenyloetylowy, są ważną częścią rynku substancji smakowo-zapachowych.

### Wanilina

Wanilina jest najpowszechniej używanym dodatkiem smakowo-zapachowym. Jej roczne zużycie wynosi 12000 ton, z czego tylko od 20 do 50 ton pochodzi ze strązków *Vanilla* sp. (głównie *V. plantifolia*), a pozostała część jest syntetyzowana chemicznie z surowców petrochemicznych i częściowo ligninowych. Wanilina syntetyczna kosztuje około 15 dolarów za kilogram, a naturalna, nawet do 4000 dolarów. Jak dotąd nie udało się rozwinąć efektywnej produkcji waniliny drogą mikrobiologiczną. Możliwych do zaakceptowania wydajności nie osiąga się ani podczas syntezy *de novo*, ani z wykorzystaniem kultur tkankowych komórek roślinnych *Vanilla* [21]. Obiecująco przedstawia się natomiast biotransformacja naturalnych fenylopropanowych prekursorów, takich jak: eugenol, izoeugenol, kwas ferulowy, alkohol koniferylowy i weratrylowy, lignina, stilbeny fenolowe. Koszt handlowy tych prekursorów waha się od 100 do 150 dolarów za kilogram. Zakładając 50–60% poziom transformacji, szacunkowy koszt produktów biotransformacji wyniesie ok. 1000 USD/kg, a biorąc pod uwagę ich

naturalność – cena sprzedaży może sięgnąć 2000 USD/kg [20]. Jednak obecnie wydajność bioprocessów nie przekracza jeszcze 1 g/l.

Stilbeny fenolowe występują powszechnie w korze świerkowej. Badania nad biotransformacją tych związków w kierunku waniliny prowadzono w laboratoriach japońskich, gdzie zidentyfikowano nową, pochodzącą z *Pseudomonas* dioksygenazę, która oksydacyjnie rozszczepia stilbeny do odpowiadających aldehydów aromatycznych [13].

Eugenol jest tanim i dostępnym na skalę przemysłową składnikiem olejku goździkowego. Opatentowano produkcję waniliny z eugenolu przy użyciu szczepu *Pseudomonas* TK 2102, który przejściowo akumuluje wanilinę – do 280 mg/l, a także inne metabolity: alkohol i aldehyd koniferylowy, kwas ferulowy i alkohol wanilinowy. *Penicillium simplicissimum* przeprowadza eugenol do aldehydu koniferylowego oraz przekształca alkohol wanilinowy w wanilinę. Uzyskane wydajności biotransformacji są jednak niskie [13]. Nieco lepsze rezultaty uzyskuje się stosując izoeugenol (występuje w olejku z gałki muszkatołowej), ale jest on jednocześnie mniej dostępny. *Aspergillus niger* ATCC 9142 jest zdolny do transformacji izoeugenolu do waniliny z 10% wydajnością, wanilina jest następnie przeprowadzana w alkohol i kwas wanilinowy. Również *Serratia marcescens* przekształca izoeugenol; po optymalizacji wydajność waniliny wynosi 3,8 g/l (z eugenolu – 0,018 g/l) [21].

Prekursorem waniliny może też być kwas ferulowy, który jest produktem mikrobiologicznego utleniania ligniny, a także powszechnie występuje w ścianach roślin (m.in. traw), gdzie jest estrowo związany z polisacharydami i można go stamtąd wydajnie izolować. [23]. Biotransformacja tego związku przeprowadzana jest przez bakterie, grzyby i drożdże. Podczas wzrostu *Pseudomonas fluorescens* na kwasie ferulowym, metabolitami pośrednimi są wanilina, kwas wanilinowy i protokatechowy [5]. *Corynebacterium glutamicum* wytwarza z kwasu ferulowego mieszaninę waniliny (76 mg/l, w obecności inhibitora dehydrogenazy wanilinowej – DL-ditiotreitolu) i kwasu wanilinowego [18]. W podobnych warunkach przy udziale kultur tkankowych *Spirulina platensis* prekursor ulega przemianie do waniliny (116 mg/l), kwasu wanilinowego, *p*-hydroksybenzoesowego, protokatechowego, kumarynowego i alkoholu wanilinowego [22]. Również grzyby białej zgnilizny drewna, *Polyporus versicolor* i *Fomes fomentarius*, degradowują kwas ferulowy do waniliny, która może być odwracalnie redukowana do alkoholu wanilinowego lub utleniana do kwasu wanilinowego. *Pycnoporus cinnabarinus*, przekształcający kwas ferulowy do waniliny, alkoholu i kwasu wanilinowego, został wykorzystany w dwustopniowym procesie biokonwersji: w pierwszym etapie *Aspergillus niger* przeprowadza kwas ferulowy w wanilinowy z wydajnością molarną 88%, w drugim – *P. cinnabarinus* redukuje go do waniliny. Ostatnio doniesiono, że używając kultur *P. cinnabarinus* o dużej gęstości można uzyskać około 700 mg waniliny z jednego litra podłoża [19].

## Aldehyd benzoesowy

Następną po wanilinie ważną substancją zapachową jest aldehyd benzoesowy, używany jako kluczowy składnik zapachu migdałowego i wiśniowego. Syntetyczny aldehyd benzoesowy otrzymywany jest jako produkt uboczny w produkcji fenolu i kosztuje 3 USD/kg, przy zużyciu 7000 t w ciągu roku. Naturalny aldehyd benzoesowy jest uwalniany enzymatycznie z amygdaliny – glikozydu obecnego w nasionach owoców, np. moreli i wiśni (zużycie 20 t). Jednak konkurencyjnie powstają w tym procesie niewielkie ilości związków toksycznych. Pewna ilość aldehydu (80 t/rok) powstaje też z naturalnego aldehydu cyamonowego, pochodzącego z oleju z kasji. Nie otrzymał on jednak statusu GRAS (Generally Recognized As Safe). Prekursorem biologicznej produkcji aldehydu benzoesowego jest dość tania i łatwo dostępna fenyloalanina. Mikrobiologicznej degradacji tego związku nie towarzyszą toksyczne produkty uboczne, produkt może być uznany za naturalny, ale uzyskiwane wydajności są nadal niskie.

*Pseudomonas putida* katabolizuje L-fenyloalaninę poprzez fenylopirogronian, aldehyd fenylooctowy i fenylooctan do soli kwasu migdałowego. Ten ostatni związek jest przekształcany w kwas benzoilomrówkowy, z którego po dekarboksylacji powstaje aldehyd benzoesowy. Mutanty *P. putida* akumulują benzoilomrówczan, który następnie przeprowadzany jest do aldehydu, w bezkomórkowej reakcji z użyciem dekarboksylazy wyizolowanej ze szczepu dzikiego lub z innych bakterii; jest to korzystne, ponieważ bezpośrednie nagromadzenie aldehydu benzoesowego stwarza problemy związane z jego toksycznością. Również *Proteus vulgaris* przekształca aromatyczne aminokwasy do odpowiadających kwasów fenylopirogronowych, z których następnie łatwo – za pomocą łagodnych zasad – otrzymuje się aldehyd benzoesowy [9]. W biokonwersji fenyloalaniny do aldehydu benzoesowego bierze udział wiele grzybów białej zgnilizny, m.in.: *Poria xantha*, *Ischnoderma benzoinum*, *Dichomitis squalens*, *Bjerkandera adusta*, *Polyporus tuberaster*. Zależnie od szczepu, metabolizm fenyloalaniny jest różny i prowadzi do tworzenia się koproduktów, np. 3-fenylopropanolu (o zapachu kwiatowym podobnym do róży) lub 2-fenyloctanolu – aromatu o delikatnym zapachu różanym z odcieniem hiacyntu [19].

## Terpeny

Terpeny są dobrym i jednocześnie trudnym substratem do przeprowadzenia biotransformacji. Zdolność mikroorganizmów do transformacji terpenów jest zrozumiała, wszak każdego roku, głównie w lasach, produkowanych jest  $1.75 \cdot 10^8$  t terpenów, które muszą zostać rozłożone. Istnieje wiele mikroorganizmów zdolnych do ich degradacji lub konwersji do związków o dodatkowych właściwościach, np. sesquiterpen walencen – tani komponent olejku pomarańczowego – przez bakterie może być przeprowadzony do drogiego nootkatonu – ważnego aromatu grejpfruta. Łatwodostępnym i tanim ter-

penem jest  $\alpha$ -pinen, otrzymywany przy przerobieniu drewna drzew iglastych. Pod wpływem bakterii *Pseudomonas* ulega on biotransformacji do różnorodnych związków terpenowych: limonenu, borneolu, kamfory, itd. *P. fluorescens* i *Nocardia* mają unikalny szlak degradacji  $\alpha$ -pinenu, w wyniku którego powstają pachnące aldehydy izonawalal o nucie cytrusowej, leśnej, korzennej i nawalal o nucie leśnej i aldehydowej [3]. Mikroorganizmy stosuje się też do rozdzielania mieszanin racemicznych produktów syntezy chemicznej. Przykładem jest DL-mentol. Spośród ośmiu możliwych izomerów (w cząsteczce mentolu są trzy centra chiralne) tylko L-mentol ma pożądaną kombinację miętowego smaku i odczucia świeżości. Naukowcy z Japanese Nippon Terpene Chemical Co. opatentowali i wdrożyli do produkcji metodę otrzymywania L-mentolu w procesie hydrolizy octanu DL-mentolu za pomocą esterazy *Alginomonas nonfermentans* NOF-5 [28].

W literaturze opisano jeszcze wiele innych przykładów biotransformacji terpenów [15, 17], jednak ich toksyczność wobec mikroorganizmów, niskie wydajności, wielorakość metabolitów terpenowych, nietrwałość produktów, składają się w rezultacie na wysokie koszty procesów, co nie sprzyja opracowywaniu i wdrażaniu technologii przemysłowych.

## Estry

Estry są jeszcze jedną ważną grupą związków zapachowych. W owocach występują w niewielkich ilościach (od 1 do 100 ppm), stąd duże znaczenie mają estry syntetyczne, ale okazało się, że można je też produkować przy użyciu mikroorganizmów, np. bakterii mlekowych i *Pseudomonas*. Estry o krótkich łańcuchach mogą powstawać również przez biokonwersję właściwych prekursorów. Oleje fuzlowe – tani produkt uboczny rektyfikacji etanolu – składają się głównie z 3-metylobutanolu, 2-metylobutanolu i izobutanolu. Alkohole te są transformowane przez drożdże *Hansenula mra-kii*, z dużą wydajnością (90% octanu 3-metylobutanolowego), do odpowiednich octanów. Produkowane estry ulatniają się podczas procesu i są adsorbowane na węglu aktywowanym. Otrzymany przez desorpcję koncentrat może służyć jako naturalny aromat bananowy [14].

## Podsumowanie

Chociaż w ostatniej dekadzie opisano wiele procesów biotransformacji, które można by było wykorzystać do wytwarzania związków smakowo-zapachowych, to liczba zastosowań przemysłowych jest nadal dość ograniczona.

Oto niektóre przyczyny tego stanu rzeczy [1]:

- brak tanich, dostępnych w dużych ilościach prekursorów;
- toksyczność substratu i produktu dla mikroorganizmów;



- niskie stężenia produktu;
- niskie wydajności;
- długi czas reakcji;
- przejściowe gromadzenie produktu;
- lotność i niska rozpuszczalność substratów i produktów (duże straty w procesie produkcyjnym);
- złożoność szlaków biokonwersji, której wynikiem jest tworzenie się mieszanin produktów;
- brak możliwości produkcji ze względu na nieznyany sposób indukcji enzymatycznej biokonwersji;
- niestabilność biokatalizatora.

W celu przezwyciężenia tych trudności konieczne jest poszukiwanie i rozwój nowych technologii dodatków smakowo-zapachowych. Przykładem postępu w tej dziedzinie jest prowadzenie enzymatycznej konwersji nie w środowisku wodnym, ale w rozpuszczalnikach organicznych lub w układach dwufazowych. Działania takie pozwalają uniknąć problemów wynikających z niskiej rozpuszczalności, słabej stabilności i toksyczności substratów i produktów oraz związanych z procesami hamowania przez produkt końcowy. Ponadto rozpuszczalniki organiczne mogą być wykorzystywane jako faza ekstrakcyjna dla usuwania produktu *in situ* [4]. Większość dotychczas prowadzonych badań dotyczyła funkcjonowania w tych warunkach izolowanych enzymów hydrolitycznych, chociaż z wielu powodów korzystne jest używanie w procesach biotransformacji całych komórek. Podejmowane są więc różnorodne próby zabezpieczenia komórek przed szkodliwym wpływem rozpuszczalników organicznych - ostatnio szeroko opisywana jest technika mikrokapsułkowania komórek metodą międzyfazowej polimeryzacji [12]. Izolowano też organizmy, które przeżywają wysokie stężenia związków lipofilowych i mogą być stosowane zarówno w środowisku wodnym, jak i dwufazowym. Można ich również użyć jako gospodarzy dla obcych genów kodujących enzymy włączone w biotransformację związków zapachowych [1].

Ogromne znaczenie ma także intensywny rozwój badań dotyczących ważnych dla procesów biotransformacji mikrobiologicznych szlaków metabolicznych, który umożliwi nie tylko dokładne ich poznanie w celu, np. określenia etapów ograniczających, ale pozwoli na manipulowanie ich przebiegiem przy użyciu metod tradycyjnych lub technik inżynierii genetycznej. Perspektywy zastosowania inżynierii genetycznej w produkcji związków smakowo-zapachowych są jednak znacznie szersze i obejmują, m.in. ulepszanie procesów przez genetyczną modyfikację biokatalizatorów oraz inżynierię genetyczną szlaków katabolicznych naturalnego produktu. Większość roślinnych związków zapachowych nie jest bowiem produktami pośrednimi metabolizmu pierwotnego, lecz wtórnego, stąd ich biosynteza z substratów użytych w celu wzrostu i

powstawania energii jest wieloetapowa i dość trudno ją zwiększyć. Strategią alternatywną może być wykorzystanie enzymów włączonych w naturalny rozkład produktu, aby wytworzyć związki zapachowe z naturalnych prekursorów, np. wanilinę z eugenolu przy użyciu *Arthrobacter globiformis* [6].

Ważną sprawą jest także usprawnianie izolacji, oczyszczania i zagęszczania produktu, szczególnie wtedy kiedy ilość operacji może być zredukowana lub mogą one być prowadzone w łagodniejszych warunkach.

Większość dostępnych dziś metod biotechnologicznej produkcji związków smakowo-zapachowych jest zbyt kosztowna, a ich usprawnienie wymaga jeszcze wielu badań interdyscyplinarnych. Jednak opłacalności stosowania nowych technik wytwarzania tych substancji dowodzi choćby przykład 4-dekanolaktonu, który kosztuje około 6000 dolarów za kilogram jeśli jest izolowany ze źródeł naturalnych, a produkowany przy użyciu mikroorganizmów jest już pięciokrotnie tańszy.

## LITERATURA

- [1] Berger R.G., De Bont J.A.M., Eggink G., Da Fonseca M.M., Gehrke M., Gros J.-B., Van Keulen F., Krings U., Larroche Ch., Leak D.J., Van Der Werf M.J.: Biotransformations in the flavour industry, In: Swift, K.A.D. (ed.), Current Topics in Flavours and Fragrances., Kluwer Acad. Publ., The Netherlands, 1999, 139.
- [2] Berger R.G., Neuhäuser K., Drawert F.: Biotechnological production of flavor compounds. III. High productivity fermentation of volatile flavors using a strain of *Ischnoderma benzoinum*. Biotechnol. Bioeng., **30**, 1987, 987.
- [3] Best D.J., Floyd N.C., Magalhaes A., Rhodes P.M.: Initial steps in the degradation of alpha-pinene by *Pseudomonas fluorescens* NCIMB 11671, Biocatalysis, **1**, 1987, 147.
- [4] Cabral J.M.S., Aires-Barros M., Pinheiro H., Prazeres D.M.F.: Biotransformation in organic media by enzymes and whole cells, J. Biotechnol., **59**, 1997, 133.
- [5] Cartwright N.J., Smith A.W.R.: Bacterial attack on phenolic enters an enzyme system demethylating vanillic acid, Biochem. J., **102**, 1967, 826.
- [6] Cheetham P.S.J.: Combining the technical push and business pull for natural flavours, Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., **55**, 1997, 1-50.
- [7] Drawert F., Berger R.G., Neuhäuser K.: Über die biosynthese von aromastoffen durch mikroorganismen. 5: Lactone in kulturen von *Polyporus durus*, Chem. Mikrobiol. Technol. Lebensm., **8**, 1983, 91.
- [8] Endrizzi A., Pagot Y., Le Clainche A., Nicaud J.-M., Belin J.-M.: Production of lactones and peroxisomal beta-oxidation in yeasts., Crit. Rev. Biotech., **16**, 1996, 301.
- [9] Feron G., Bonnarne P., Durand A.: Prospects for the microbial production of food flavours, Trends Food Sci. Technol., **7**, 1996, 285.
- [10] Gatfield I.L.: Biotechnological production of flavour-active lactones., Adv. Biochem. Eng./Biotechnol., **55**, 1997, 221.

- [11] Ghisalberti E.I., Narbey M.J., Dewan M.M., Sivasthamparam K.: Variability among strains of *Trichoderma harzianum* in their ability to reduce take-all and to produce pyrones, *Plant Soil*, **121**, 1990, 287-291.
- [12] Green K.D., Gill I.S., Khan J.A., Vulfson E.N.: Microencapsulation of yeast cells and their use as a biocatalysts in organic solvents, *Biotechnol. Bioeng.*, **49**, 1996, 535-543.
- [13] Hagedorn S., Kaphammer B.: Microbial biocatalysis in the generation of flavor and fragrance chemicals, *Annu. Rev. Microbiol.*, **48**, 1994, 773-800.
- [14] Janssens L., De Pooter H.L., De Mey L., Vandamme E.J., Schamp N.M.: Fusel oil as a precursor for the microbial production of fruity flavours, *Med. Fac. Landbouww. Rijksuniv. Gent.*, **54**, 1989, 1387-1391.
- [15] Janssens L., De Pooter H.L., Schamp N.M., Vandamme E.J.: Production of flavours by microorganisms, *Process Biochem.*, **27**, 1992, 195-215.
- [16] Jeffcoat R., Willis B.J.: A manufacturing process for hexadecanolide, *Dev. Food Sci.*, **18**, 1988, 743-751.
- [17] Krings U., Berger R.G.: Biotechnological production of flavours and fragrances, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **49**, 1998, 1-8.
- [18] Labuda I.M., Keon K.A., Goers S.K.: Microbial bioconversion process for the production of vanillin, In: Schreier, P., Winterhalter, P. (ed.), *Progress in Flavour and Precursor Studies*, Allured Publishing, Carol Stream, FL, 1993, 477-482.
- [19] Lamascolo A., Stentelaire Ch., Asther M., Lesage-Meessen L.: *Basidiomycetes* as new biotechnological tools to generate natural aromatic flavours for the food industry, *TIBTECH*, **17**, 1999, 282-289.
- [20] Muheim, A., Lerch, K.: Towards a high-yield bioconversion of ferulic acid to vanillin, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **51**, 1999, 456-461.
- [21] Ramachandra Rao S., Ravishankar G.A.: Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes, *J. Sci. Food Agric.*, **80**, 2000, 289-304.
- [22] Ramachandra Rao S.: Studies on biotransformation to produce phytochemicals of importance using plant cell cultures, PhD Thesis, University of Mysore, 1998.
- [23] Rosazza J.P.N., Huang Z., Dostal L., Volm T., Rousseau B.: Review: Biocatalytic transformations of ferulic acid: an abundant aromatic natural product, *J. Ind. Microbiol.*, **15**, 1995, 457-471.
- [24] Sarris J., Latrasse A.: Production of odoriferous gamma-lactones by *Fusarium poae*, *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 1985, 3227-3230.
- [25] Tahara S., Fujiwara K., Ishizaka H., Mizutani J., Obata Y.: Gamma-decalactone, one of constituents of volatiles in cultured broth of *Sporobolomyces odorus*, *Agric. Biol. Chem.*, **36**, 1972, 2585-2587.
- [26] The Code of Federal Regulations 21 Food and Drugs, Parts 100-169, revised April 1, 1993, Washington, DC: National Archives and Records Administration, 1993.
- [27] Van der Schaft P.H., ter Burg N., van den Bosch S., Cohen A.M.: Microbial production of natural delta-decalactone and delta-dodecalactone from the corresponding alpha, beta-unsaturated lactones in Massoi bark oil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 1992, 712-714.
- [28] Watanabe Y., Inagaki T.: Large scale biochemical production of L-menthol, *Japan Kokai*, 122, 1978, *Chemical abstracts*, **88**, no. 87656g.

**PROSPECTS FOR THE BIOTECHNOLOGICAL PRODUCTION OF FLAVOURS  
AND FRAGRANCES****S u m m a r y**

This review presents the current state of the art of microbiological production of natural flavours, particularly lactones, aromatic compounds (vanillin, benzaldehyde) and terpenes. Special emphasis is placed on advantages, disadvantages and prospects for application to this end biotransformation processes. ✕

Polskie Towarzystwo Technologów Żywności

Oddział Małopolski

i

Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja w Krakowie

Wydział Technologii Żywności

zapraszają na

Konferencję Naukową z cyklu

“Żywność XXI wieku”

**Żywność w początkowym i zaawansowanym okresie życia człowieka**

Kraków, 11–12 czerwca 2001 r.

***Tematyka konferencji:***

- Żywność dla niemowląt, dzieci i młodzieży – aspekty technologiczne
- Technologia żywności dla osób w wieku zaawansowanym
- Ocena sposobu żywienia tych grup ludności
- Aspekty zdrowotne żywności dietetycznej
- Bezpieczeństwo zdrowotne żywności
- Szanse i perspektywy żywności specjalnego przeznaczenia

***Adres Komitetu Organizacyjnego:***

Konferencja Naukowa

“Żywność w początkowym i zaawansowanym okresie życia człowieka”

mgr inż. Agnieszka Filipiak-Florkiewicz

Katedra Żywienia Człowieka

Al. 29 Listopada 46, 31-425 Kraków

tel. (012) 411 91 44 w. 435

fax (012) 411 77 53

e-mail: rrciesli@cyf-kr.edu.pl