



## Monoterpeny – stare związki, nowe zastosowania i biotechnologiczne metody ich otrzymywania

Mariusz Trytek<sup>1</sup>, Roman Paduch<sup>2</sup>, Jan Fiedurek<sup>1</sup>,  
Martyna Kandefor-Szerszeń<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Zakład Mikrobiologii Przemysłowej,

<sup>2</sup>Zakład Wirusologii i Immunologii, Uniwersytet Marii Curie-Skłodowskiej,  
Lublin

### Monoterpenes – old compounds, new applications, and biotechnological methods of their production

#### Summary

Monoterpenes are the largest class of plant secondary metabolites. The review discusses some of their key roles in chemical ecology. Several applications of monoterpenes in flavour and fragrance industry, bioremediation, in prevention and therapy of several inflammatory infection, potential disease-preventive phytochemicals, especially for cancer development, are presented. This review also aims at a potential offered by biocatalysis for the synthesis of valuable natural monoterpenes, highlighting relevant biotransformation of suitable precursors (like pinene, limonene, myrcene) using microorganism and porphyrins. The industrial processes based on biotechnological methods are also discussed in terms of their advantages over classical chemical synthesis and extraction from natural sources.

#### Key words:

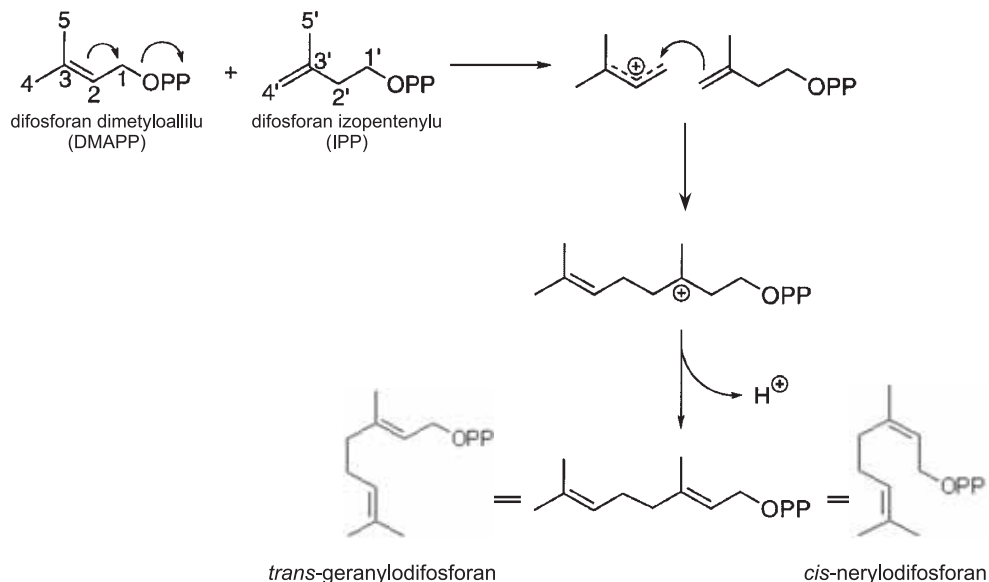
monoterpenes, fragrances, food ingredients, anticarcinogenic properties, biotransformation, cytochrome P-450.

#### Adres do korespondencji

Mariusz Trytek,  
Zakład Mikrobiologii  
Przemysłowej,  
Uniwersytet  
Marii Curie-Skłodowskiej,  
ul. Akademicka 19,  
20-033 Lublin.

### 1. Wprowadzenie

Terpeny stanowią największą klasę wtórnych metabolitów roślin. Obejmuje ona około 30 000 zdefiniowanych związków (1), wśród których znanych jest ponad 400 monoterpenów (2). Monoterpeny i ich utlenione analogi zwane terpenoidami, cha-



Rys. 1. Biosynteza monoterpenu.

rakteryzują się właściwościami smakowo-zapachowymi oraz zróżnicowaną aktywnością biologiczną. Powstają one na drodze metabolizmu kwasu mewałonowego w cytozolu komórek roślinnych, aczkolwiek w najnowszych badaniach nad ich biosyntezą wskazuje się na udział w tym procesie szlaku niezależnego od kwasu mewałonowego (3), którego większość enzymów zlokalizowanych jest w plastydach (4). Zasadniczy etap biosyntezy terpenów polega na kondensacji difosforanu izopentenyłu (IPP) z difosforanem dimetyloallilu (DMAPP), zachodzącej zgodnie z regułą izoprenową. W wyniku tej reakcji powstają dwie izomeryczne formy (*cis* i *trans*) o otwartym łańcuchu węglowodorowym. Są to dziesięciowęglowe jednostki, będące prekursorami dla wszystkich mono-, seskwi- oraz wyższych terpenów (rys. 1). Z formy *trans*-geranylodifosforanu powstaje geraniol, występujący w bodziszku (*Geranium*), róży (*Rosa*) i pelargonii (*Pelargonium*). Forma *cis*-nerylodifosforan przekształcana jest w nerol, jeden z głównych składników olejków cytrusowych (5).

Najbardziej rozpowszechnionymi w przyrodzie monoterpunami są R-(+)-limonen i  $\alpha$ -pinen. Na skalę przemysłową, R-(+)-limonen w ilości około 73 000 ton rocznie produkowany jest metodą ekstrakcji ze skórek owoców cytrusowych. Z kolei  $\alpha$ -pinen otrzymywany jest głównie z terpentyny, będącej produktem ubocznym po przerobieniu pulpy celulozowej drzew iglastych. Niski koszt surowców do produkcji tych monoterpenu powoduje, że są one substratami tanimi i powszechnie dostępnymi. Szereg związków o właściwościach zapachowych lub znaczeniu medycznym, ma zbliżony do nich szkielet węglowy, co sprzyja otrzymywaniu wartościowych terpenoidów w prostych jedno-, dwuetapowych reakcjach utleniania omawianych pre-

kursorów. Metody biotechnologiczne, zwłaszcza biotransformacja, są szczególnie użyteczne w tego typu reakcjach chemicznych.

## 2. Biologiczna rola terpenów

Związki organiczne, wchodzące w skład olejków eterycznych, są wtórnymi metabolitami roślin. Każdego roku w lasach wytwarzanych jest  $1,4 \times 10^9$  ton terpenów (6), z czego duża część uwalniana jest do atmosfery.

Od stuleci mikroorganizmy i owady nieprzerwanie poddawane są działaniu wtórnych metabolitów roślin, wskutek czego, między nimi a światem roślin ukształtował się zróżnicowany zespół interakcji – od symbiozy po patogenność. „Proces koewolucji pomiędzy roślinami oraz ich naturalnymi wrogami – do których należą wirusy, bakterie, nicienie, insekty i ssaki – zmierza, według wielu biologów, do wygenerowania jak największej różnorodności na ziemi” (7). Proces ten wiąże się z produkcją coraz to nowych substancji lotnych przez rośliny oraz indukcją nowych enzymów w mikroorganizmach, w celu ich detoksyfikacji. Intensywna woń i właściwości toksyczne olejków eterycznych chronią rośliny przed kolonizacją mikroorganizmów i większych pasożytów. Z czasem drobnoustroje uodparniają się na te substancje, które pierwotnie były dla nich związkami toksycznymi. Dla organizmu roślinnego obok toksycznych właściwości olejków eterycznych ważne są ich wonne właściwości, gdyż intensywny zapach wabi owady zapylające rośliny (8).

Oddziaływanie między drobnoustrojami, insektami a roślinami prowadzi często do zmian profilu zapachowego olejków emitowanych do atmosfery. Dla roślinożerców są one sygnałem, który pomaga w odróżnieniu rośliny opanowanej przez mikroorganizmy od nie zainfekowanej (9). Niekiedy, kolonie owadów wybierają rośliny zainfekowane, gdyż mikroorganizmy oprócz dostarczania owadom podstawowych aminokwasów, mogą pomagać w redukcji toksycznego działania wtórnych metabolitów roślin. W odpowiedzi rośliny produkują specyficzne lotne związki przyciągające pasożyty roślinożerców (10,11). Podobnie reagują one na pasożyty żerujące na liściach, produkując terpeny wabiące drapieżne owady, które tworzą w ten sposób specyficzną armię „ochroniarzy”. „Zjawisko to jest szeroko rozpowszechnione w królestwie roślin, oznacza to, że mechanizm odpowiedzialny za produkcję tego typu związków posiada większość z nich. Wystarczy, zatem wprowadzić tylko jeden gen, aby uruchomić szlak produkcji tego typu sygnałów” – twierdzi H. Bouwmeester – biochemik z Uniwersytetu Wageningen, który z produkcją odpowiednich terpenów przez rośliny wiąże nadzieje na zwalczanie szkodników roślin uprawnych oraz zredukowanie ilości stosowanych w tym celu pestycydów (12).

Monoterpeny uczestniczą także w biosyntezie wyższych terpenów, żywic i innych związków o różnych funkcjach biologicznych, takich jak: plastochinony, ubichinony, karotenoidy, sterole, fitoaleksyny, saponiny, a także regulatorów wzrostu i hormonów roślinnych (gibereliny, kwas abscysynowy) (13).

### 3. Zastosowania monoterpenów

Roczne zużycie monoterpenów przez człowieka wynosi  $2,8 \times 10^5$  kg. Wynika ono z dużego zapotrzebowania i szerokiego ich zastosowania w przemyśle perfumeryjno-kosmetycznym, spożywczym, farmaceutycznym i medycznym. Każdego roku, w samym przemyśle perfumeryjno-kosmetycznym i spożywczym do produkcji różnych artykułów wykorzystuje się 30 000 ton  $\alpha$ - i  $\beta$ -pinenu (14). Monoterpeny dostępne są w szerokiej gamie produktów począwszy od odczynników chemicznych, poprzez olejki eteryczne, aż po preparaty farmakologiczne.

#### 3.1. Prozdrowotne działanie monoterpenów

Już w starożytności korzystano z leczniczych i zapachowych właściwości monoterpenów. Świadczą o tym chociażby najstarsze wzmianki o stosowaniu ziół i zawartych w nich olejków eterycznych. Rzymski uczyony Pliniusz zalecał spożywanie nasion kminku przy atakach hysterii, stanach przygnębienia i przy anemicznym wyglądzie (15). W podobnych celach leczniczych stosowano je np. w krajach arabskich. Według legendy, korzenie kminku mieszano z mlekiem i wyrabiano „Chara” – chleb spożywany przez Juliusza Cezara, jak i żołnierzy Valeriusa. Z kolei, w starożytnym Egipcie na szeroką skalę stosowano nasiona kopru (16). Popularną byliną rosnącą w rejonach Morza Śródziemnego była także mięta. Jej nazwa (ang. *Mentha*) pochodzi od imienia greckiej nimfy Menthe, ukochanej Hadesa, którą jego zazdrosna żona Persefona zamieniła w roślinę. Wraz z upływem czasu zapach Menthe stawał się słodszy i przyjemniejszy. Zdaniem Pliniusza (I w. n.e.), mięta poprawia pamięć i pobudza aktywność mózgu, zaś oplatanie głowy tymi roślinami powinno przynosić „ukojenie duszy” (15). Z porad tych korzystali uczniowie rzymskich filozofów nosząc na głowie wianki ze świeżych liści mięty. Arystoteles natomiast, zakazywał wręcz żołnierzom używania mięty przed bitwą, ponieważ jej właściwości mogłyby spowodować zmniejszenie ich zapału do walki. Jednakże rzymscy gladiatorzy używali przed walką olejki z roślin kminku, kopru i mięty do nacierania kończyn. O popularności tych ziół w czasach starożytnych świadczy zapis o składaniu z nich rocznej dziesięciny, o czym jest mowa np. w Ewangelii wg Św. Mateusza.

Obecnie wiadomo, że monoterpeny w organizmie człowieka mają wszechstronne działanie. Wykazano m.in., że przenikają do krwi, działając jako lecznicze substancje chemiczne oraz swoiście sterują pracą mózgu. Składniki olejków eterycznych wykorzystywane są także w leczeniu schorzeń górnych dróg oddechowych (działają wykrztuśnie, przeciwbakteryjnie i przeciwwirusowo) i schorzeń gastrycznych (jako środki żółciopędnie i spazmolityczne). Wiele z nich działa dezynfekująco i aseptycznie na skórę oraz pobudza jej ukrwienie, skutecznie poprawiają samopoczucie, łagodzą bóle mięśni oraz działają uspokajająco lub pobudzająco. Monoterpeny pochodzące z olejków niektórych roślin odpowiedzialne są za właściwości

przeciwbólowe. Wykazano m.in., że myrcen jest aktywnym składnikiem stosowanego w brazylijskiej medycynie ludowej naparu z rośliny *Cymbopogon citratus* (ang. *lemongrass*) (17). Na właściwościach leczniczych monoterpenu w olbrzymim stopniu oparta jest aromaterapia. Na polskim rynku leków, dostępny jest preparat do inhalacji pod nazwą Bronchicum Inhalat, który jest emulsją składającą się z eukaliptolu, terpineolu, olejku sosnowego, tymiankowego i rozmarynowego. Olejek miętowy skutecznie poprawia funkcje układu pokarmowego u pacjentów cierpiących na różnego rodzaju zaburzenia w procesie trawienia. Ponadto, zastosowanie olejku miętowego może łagodzić objawy w zespole wrażliwego jelita, odpływie żołądkowo-jelitowym (tzw. refluks) oraz zakażeniach *Candida albicans* i *Helicobacter pylori* (18).

Dzięki hydrofobowym właściwościom, monotereny służą do rozpuszczania kamieni cholesterolowych i żółciowych u ludzi (18). Duże zainteresowanie budzi ich aktywność przeciwnowotworowa, oraz właściwości przeciwbakteryjne, przeciwgrzybiczne, przeciwwirusowe, immunomodulacyjne i przeciwwzapalne.

### 3.1.1. Aktywność chemoprewencyjna i przeciwnowotworowa

Wiedza dotycząca procesu transformacji nowotworowej, zarówno na poziomie komórkowym jak i molekularnym, pozwoliła na wyodrębnienie nowej strategii w dziedzinie ochrony przed kancerogenezą, określanej jako chemoprewencja (19). Kancerogeneza jest procesem stopniowej akumulacji błędów w genomie oraz zmian biochemicznych w komórce, prowadzących albo do jej śmierci na drodze apoptozy lub do transformacji nowotworowej, dającej początek rozwojowi guza, gdy komórki „uciekną” spod nadzoru immunologicznego organizmu (20). Celem chemoprewencji jest zatem zatrzymanie lub odwrócenie zmian w komórkach w stadium inicjacji rozwoju nowotworu, przez zastosowanie nietoksycznych substancji naturalnych lub czynników farmakologicznych (19).

Wśród wielu związków pochodzenia naturalnego, monotereny, a szczególnie limonen oraz alkohol perylowy spełniają funkcje zarówno czynników chroniących przed rozwojem raka jak i substancji znajdujących zastosowanie w terapii przeciwnowotworowej. Wykazano, że limonen i alkohol perylowy hamują rozwój wielu typów nowotworów, w tym raka sutka, skóry, wątroby, płuc, okrężnicy, trzustki i prostaty (21-24). Aktywność tych monoterpenu oraz ich utlenionych metabolitów związana jest z selektywnym, posttranslacyjnym hamowaniem izoprenylacji onkoproteiny P21<sup>ras</sup>, regulującej wewnątrzkomórkowe przekazywanie sygnałów oraz podziały komórkowe. Posttranslacyjna modyfikacja tego białka jest niezbędna do transformacji komórki, a tym samym do nabycia właściwości onkogennych (25-29). Kolejnym mechanizmem chemoterapeutycznych właściwości limonenu i alkoholu perylowego jest hamowanie syntezy koenzymu Q (CoQ). Spadek ilości CoQ w błonach komórkowych opóźnia przekazywanie sygnałów indukujących ich proliferację oraz czyni komórki nowotworowe podatnymi na stres oksydacyjny (25). Ponadto, jednym z ważniejszych mechanizmów prze-

ciwnowotworowej aktywności monoterpenu jest aktywacja ekspresji transformującego czynnika wzrostu- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Czynniki te wytwarzane są w latentnej, nieaktywnej formie. Wykazano, że alkohol perylowy pośredniczy w aktywacji TGF- $\beta$  oraz zwiększa ekspresję mRNA dla jego receptorów. Aktywowany TGF- $\beta$  wiąże się z receptorem, indukując sygnał prowadzący do zahamowania cyklu komórkowego w fazie G1 i apoptozy komórki (22,25). Ponadto, aktywacja TGF- $\beta$  indukuje wzrost ekspresji czynników proapoptotycznych, np. białek Bax, Bak lub Bad. Na podstawie analizy regulacji cyklu komórkowego wykazano, że monoterpenu indukuje wzrost ekspresji białka P21<sup>Waf1/Cip1</sup>, będącego inhibitorem cyklinozależnych kinaz (cdk) oraz wywołują spadek ekspresji cyklin E i D1. Redukcja ilości mRNA oraz ekspresji białka dla cykliny D1 ogranicza tworzenie aktywnego kompleksu z cdk4 i zahamowanie cyklu komórkowego w fazie G0. Ponadto, alkohol perylowy wzmacnia wiązanie białka P21<sup>Waf1/Cip1</sup> do kompleksu E-cdk2, hamując tym samym cykl komórkowy w fazie G1 (21,25,30). Przeciwnowotworowa aktywność limonenu i alkoholu perylowego jest obecnie przedmiotem I fazy badań klinicznych (29,31). Ponadto, wykonuje się wstępne, pilotażowe badania kliniczne II fazy mające na celu określenie stopnia akumulacji limonenu i jego metabolitów w nowotworach piersi. Podczas prowadzonych badań wskazuje się, że doustnie podany limonen jest w pełni absorbowany i ulega intensywnej biotransformacji do aktywnych metabolitów: kwasu perylloowego, kwasu dihydroperylloowego i 1,2-dihydroksy-limonenu. Metabolity te wykazują wysoką aktywność farmakologiczną, która nierzadko przewyższa aktywność substancji wyjściowych. Dodatkowo, limonen w dawkach mających aktywność kliniczną jest dobrze tolerowany przez pacjentów z zaawansowanymi nowotworami. Skutki uboczne, jak np. mdłości, wymioty czy biegunka zależne są od dawki monoterpenu i szybko ustępują nie prowadząc do poważnych dysfunkcji organów (29). Alkohol perylowy jest również badany jako inhibitor kancerogenezy indukowanej promieniami ultrafioletowymi. Wykazano, że zastosowany na skórę w formie kremu zmniejsza ryzyko rozwoju czerniaka. Postuluje się zatem, aby uznać go za efektywny czynnik ochronny zabezpieczający przed rozwojem raka skóry (23). Aktywność przeciwnowotworową wykazują również inne monoterpenu, np. karwon, karweol, uroterpenol oraz sobrerol. Ich aktywność wykazano w badaniach nad rakiem piersi (32). Ponadto, geraniol i farnesol charakteryzują się aktywnością skierowaną przeciwko nowotworom trzustki (33,34).

Monoterpenu są nietoksycznymi związkami zawartymi w codziennej diecie, które wykorzystując wiele mechanizmów komórkowych wykazują działanie przeciwnowotworowe. Stanowią zatem nową, obiecującą klasę czynników, mogących znaleźć zastosowanie we współczesnej onkologii.

### **3.1.2. Aktywność przeciwbakteryjna i przeciwgrzybiczna**

Zastosowanie lecznicze monoterpenu wiąże się również z ich aktywnością przeciwdrobnoustrojową. Badania prowadzone są na szczepach bakterii beztleno-

wych oraz tlenowych, w tym bakterii gramdodatnich i gramujemnych. Drobnoustroje wykazują zróżnicowaną wrażliwość na związki pochodzenia roślinnego. Bakterie gramdodatnie są z reguły bardziej podatne na ich działanie aniżeli gramujemne (35).

Mieszanka monoterpenów: terpinen-4-olu,  $\alpha$ -terpineolu, 1,8-cyneolu i linalolu, pochodzących z olejku drzewa herbacianego wykazuje przeciwdrobnoustrojowe działanie na szereg szczepów gramdodatnich i gramujemnych, izolowanych ze skóry, jamy ustnej i górnych dróg oddechowych człowieka. Ponadto, uzyskano obiecujące wyniki w badaniach wykonanych na szczepach gronkowca złocistego (*Staphylococcus aureus*) opornych na metacyklinę. Wskazują one, że mieszanka wymienionych monoterpenów w granicach stężeń 2,5-5 mg/ml hamowała wzrost szczepów tych bakterii, zaś wyższe dawki miały efekt bakteriobójczy (35).

Gelomyrtol, mieszanka trzech monoterpenów ( $\alpha$ -pinenu, limonenu i 1,8-cyneolu) wykazuje z kolei właściwości lecznicze w ostrym zapaleniu oskrzeli. Wykazano, że gelomyrtol jest dobrze tolerowany przez chorych i pod względem skuteczności leczenia ostrego zapalenia oskrzeli w niczym nie ustępuje antybiotykowi oraz związkowi mukolitycznym. Dodatkowo, zastosowanie monoterpenów wiąże się z mniejszą toksycnością i brakiem powstawania oporności bakterii w porównaniu z klasycznym podejściem terapeutycznym (36). W chorobach oskrzeli silne działanie przeciwbakteryjne wykazuje także mentol. Mechanizm działania mentolu jak również tymolu i linalolu oparty jest na zaburzeniu struktury lipidowej błony komórkowej mikroorganizmów. W konsekwencji, wzrasta jej przepuszczalność dla monoterpenów, które wnikać do komórek bakteryjnych hamują podstawowe mechanizmy metaboliczne drobnoustrojów, prowadząc do ich zabicia (37).

Monoterpeny wykazują również aktywność przeciwgrzybiczą. Badania prowadzi się na dwóch grupach grzybów: drożdżakach i grzybach nitkowatych uznawanych za potencjalnie chorobotwórcze dla człowieka. Rozwój grzybów z rodzaju *Candida* (*C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis*) hamowany jest przez mieszanki monoterpenów. Wysoką aktywność przeciwgrzybiczą wykazują terpinen-4-ol,  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen, 1,8-cyneol, linalol i  $\alpha$ -terpineol (35,38). Poza tym, wymienione monoterpeny hamują rozwój dermatofitów w tym *Trichophyton mentagrophytes*, *T. rubrum* czy *Microsporum gypseum*. Podobnie, wzrost *Aspergillus niger* i *A. flavus* hamowany jest przez wymienione monoterpeny. Należy jednak zwrócić szczególną uwagę na różnice we wrażliwości poszczególnych grup grzybów na aktywność monoterpenów. Wykazano, że dermatofity oraz grzyby mikroskopowe są znacznie oporniejsze na środki pochodzenia roślinnego w porównaniu z drożdżakami (35). Nierzadko zatem wprowadzenie monoterpenów do terapii może okazać się niemożliwe ze względu na trudne do zaakceptowania skutki uboczne, wynikające z konieczności zastosowania wysokich stężeń tych związków.

### 3.1.3. Aktywność przeciwwirusowa

Przeciwwirusowa aktywność monoterpenu jest obecnie słabo poznana. Arma i wsp. wykazali, że isoborneol jest silnym czynnikiem inaktywującym wirusy *Herpes simplex* typu I (HSV-1), który jest ludzkim patogenem wywołującym infekcje skóry, nabłonka śluzowego jamy ustnej, gardła, przełyku i oczu. Po zakażeniu wirus przechodzi w fazę latencji, lecz okresowo może ulec reaktywacji. Ponadto, w pewnych warunkach wirus infekuje centralny układ nerwowy, wywołując zapalenie mózgu i opon mózgowych. Aktywność przeciwwirusowa isoborneolu polega na interakcji grup hydroksylowych monoterpenu z lipidami wirusowego kapsydu oraz zahamowaniu glikozylacji białek wirusowych. W wyniku tych procesów wirus traci swoją infekcyjność (39). Z kolei, mieszanina monoterpenu pochodząca z olejku drzewa herbacianego (terpinen-4-ol,  $\alpha$ -terpineol, 1,8-cyneol, linalol) skutecznie hamuje rozwój wirusów grypy (*Myxovirus influenzae*). Dodatkowo wykazano korzystne efekty lecznicze w przypadku opryszczki wywołanej wirusem *Herpesvirus hominis*, po miejscowym zastosowaniu mieszaniny wymienionych monoterpenu (35).

### 3.1.4. Aktywność przeciwzapalna i immunomodulacyjna

Jednym z monoterpenu wykazujących aktywność przeciwzapalną jest (-)-linalol. Wykazuje on również właściwości przeciwbólowe oraz zmniejszające obrzęk (40). Przeciwzapalną aktywność posiada również nasycony monoterpenu 1,8-cyneol (eukaliptol). Zakres jego aktywności jest dość szeroki. Hamuje on szlak metabolizmu kwasu arachidonowego, produkcję cytokin przez aktywowane ludzkie monocyty, wykazuje aktywność mukolityczną przez wpływ na produkcję mediatorów zapalnych, jak również znajduje zastosowanie w leczeniu ostrego i przewlekłego zapalenia oskrzeli oraz zatok. Aktywność przeciwzapalną 1,8-cyneolu wykorzystuje się także do leczenia astmy (41). Niezbędne są jednak dalsze badania mające na celu określenie wartości terapeutycznej 1,8-cyneolu w schorzeniach leczonych obecnie sterydami oraz w procesach zapalnych.

## 3.2. Bioaktywne i smakowo-zapachowe właściwości monoterpenu

Monoterpeny służą też jako dodatki aromatyczne do produktów spożywczych, środków czystości i perfum. Limonen oraz  $\alpha$ -pinen, związki niedrogie i łatwo dostępne, znalazły zastosowanie jako rozpuszczalniki, m.in. w badaniach histologicznych i w przemyśle farbiarskim. Limonen używany jest w procesie oczyszczania cyklodekstryn z żelowanej skrobi, z którą tworzy dające się łatwo odfiltrować stałe cząsteczki (42). Może też wchodzić w reakcje polimeryzacji. Opatentowano już materiały otrzymane w wyniku kopolimeryzacji limonenu z etylenem, propylenem czy

norbornadienem (42). W perfumerii istotne znaczenie mają monoterpeny uzyskane bezpośrednio z olejków eterycznych:  $\alpha$ -terpineol, borneol, ich estry z kwasem octowym, myrtenol, eukaliptol, fenchol, linalol, karwon, terpinen-4-ol (43) oraz cytral, geraniol, anetol i mentol (8). Jako składnik perfum często stosowana jest mieszanina ośmiu izomerów izopulegolu, choć w ostatnich badaniach wskazuje się, że jej główny komponent (-)izopulegol jest bezwonny (44). Szereg innych monoterpenu wykorzystywano w celu ulepszania bądź tworzenia nowych „niepowtarzalnych” kompozycji zapachowych. Podejmowane są próby produkcji nowych analogów związków o właściwościach aromatycznych, np. z (*R*)-(-)-karwonu otrzymano analog santalolu – (*Z*)-normetylo-karwo- $\beta$ -santalol o „delikatnie leśnym zapachu z nutą cedrolu” (18). Warto wspomnieć tu o ment-1-ene-8-tiolu, związku otrzymanym po raz pierwszy w roku 1979 w reakcji siarczku wodoru z limonenem. Posiada on charakterystyczny zapach grejpsfrutów i ma jeden z najniższych progów wyczuwalności zapachu spośród substancji naturalnych (45). Bardzo ważną rolę, w perfumowaniu mydeł i innych środków czystości, odgrywają olejki posiadające zdolność utrwalania zapachu innych związków. Zalicza się do nich: olejek cedrowy, sandałowy, kopaiwowy (8).

W trakcie procesu technologicznego, przetwarzane produkty spożywcze, tracą swój naturalny smak i aromat. Zasadnicze znaczenie w przywracaniu ich pierwotnych właściwości mają dodatki aromatyczne – aromaty naturalne, bądź identyczne z naturalnymi. Obecnie największe zapotrzebowanie spośród terpenoidowych związków smakowo-zapachowych w przemyśle spożywczym mają *R*(-)-karwon oraz (-)-mentol, gdyż charakteryzują się orzeźwiającym aromatem miętowym. Wśród ośmiu możliwych izomerów mentolu tylko jeden, (-)-(1*R*,3*R*,4*S*) enancjomer, posiada pożądane właściwości organoleptyczne i stosowany jest w celu poprawy walorów smakowo-zapachowych wielu produktów. Większość (-)-mentolu w dalszym ciągu pozyskiwana jest w wyniku krystalizacji z uprzednio zamrożonego olejku z *Mentha arvensis*. Pomimo wielu prób otrzymania tego terpenoidu z łatwo dostępnych materiałów, tylko dwa procesy, Haarmanna i Reimera [H&R] oraz Takasago znalazły przemysłowe zastosowanie. Jedynie w pierwszym z tych procesów wykorzystywane są po części metody biotechnologiczne, tj. lipaza (np. z *Candida rugosa*) do enancjoselektywnej hydrolizy, wcześniej zsyntetyzowanego chemicznie, racemicznego benzoesanu mentolu (44). Spośród monoterpenu *S*(+)-karwon jest najbardziej efektywnym inhibitorem kiełkowania ziemniaków (18). Alkohol perylowy i kwas peryllicowy wykorzystywane są jako przeciwbakteryjne dodatki do produktów spożywczych i farmaceutycznych.

Często wskazuje się na korzystny udział naturalnych monoterpenu roślinnych w bioremediacji ksenobiotyków (46). Hernandez, wzbogacając glebę skórkami pomarańczy, liśćmi bluszczu, igłami sosny lub liśćmi eukaliptusa zwiększył 100 000 razy utylizację toksycznego bifenyli (47). Gilbert i Crowley badając wpływ czystych terpenoidów na biodegradację polichlorowanych difenyli (PCB) przez *Arthrobacter*, wykazali, że związkiem indukującym ten proces jest karwon. Karwon i limonen sty-

mulowały biodegradację mieszaniny komercyjnych PCB przez *Pseudomonas stutzeri*. W innym doświadczeniu stwierdzono, że R(-)-karwon w stężeniu 50 ppm indukował ekspresję genu 2,3-dihydroksybifenylu 1,2-dioxygenazy u *Ralstonia entrophae* (46). Monoterpeny mogą także stymulować degradację innych ksenobiotyków, tj. toluenu, fenolu oraz trichloroetanu. Indukują też mikrosomalne enzymy wątrobowe u szczura, zaangażowane w biotransformację ksenobiotyków, co udokumentowano w przypadku kamfory, mentolu, pinenu, limonenu, borneolu i 1,8-cineolu (48). Nowe możliwości walki z kornikami i innymi szkodnikami drzew iglastych stwarza wykorzystanie werbenolu, werbenonu i pinokarwonu jako składników ich feromonów agregacyjnych (49).

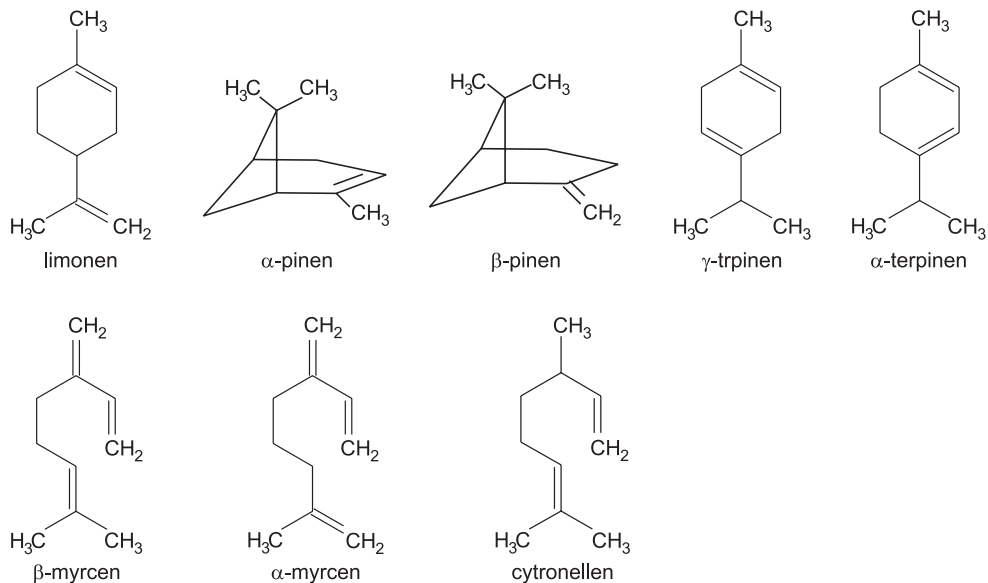
W przemyśle farmaceutycznym z terpenoidowych prekursorów produkowane są leki steroidowe i inne związki o znaczeniu farmakologicznym, np. terpenoidowe nienasycone 1,4-dialdehydy, utlenione diterpenoidy, nowe chiralne fenole czy silatry (18).

#### 4. Biotransformacje monoterpénów

Celowość badań nad biotechnologiczną metodą wytwarzania produktów terpenoidowych z niedrogich monoterpénów wiąże się z ich wysoką wartością rynkową i wynika z braku odpowiednio wydajnej metody ich produkcji.

Niektóre z monoterpénów o unikatowych właściwościach zapachowych powstają w naturalnych warunkach na drodze transformacji odpowiednich prekursorów. Jako przykład wymienić należy R(+)-limonen, który w roślinach z rodzaju *Mentha* jest utleniany, np. do R(-)-karwonu (*M. spicata*) i (-)-mentolu (*M. piperita*), zaś S(+)-karwon powstaje w drodze oksydacji S(-)-limonenu w owocach kminku (*Carum carvi*). Związki tego typu – będące składnikami olejków eterycznych – występują jednak w przyrodzie w małych ilościach, a ograniczony dostęp do materiałów roślinnych, z których są otrzymywane dodatkowo zwiększa koszty i decyduje o ich dużej wartości rynkowej. Ponadto, wydajność procesu destylacji olejków eterycznych jest stosunkowo niewielka: np. z 100 kg kwiatu lawendy otrzymuje się 2 kg olejku lawendowego (50). Najniższa cena czystego enancjomerycznie R(+)-limonenu waha się w granicach 1-2 USD/kg (51). Dla porównania hurtowa cena mentolu oraz enancjomerów karwonu wynosi 30-60 USD/kg, a ceny (-) i (+) alkoholu perylowego są co najmniej dziesięciokrotnie wyższe (52). Podobnie, duże różnice w cenach występują między  $\alpha$ -pinenem (0,75 USD/kg) a werbenonem (ok. 3000 USD/kg) (53).

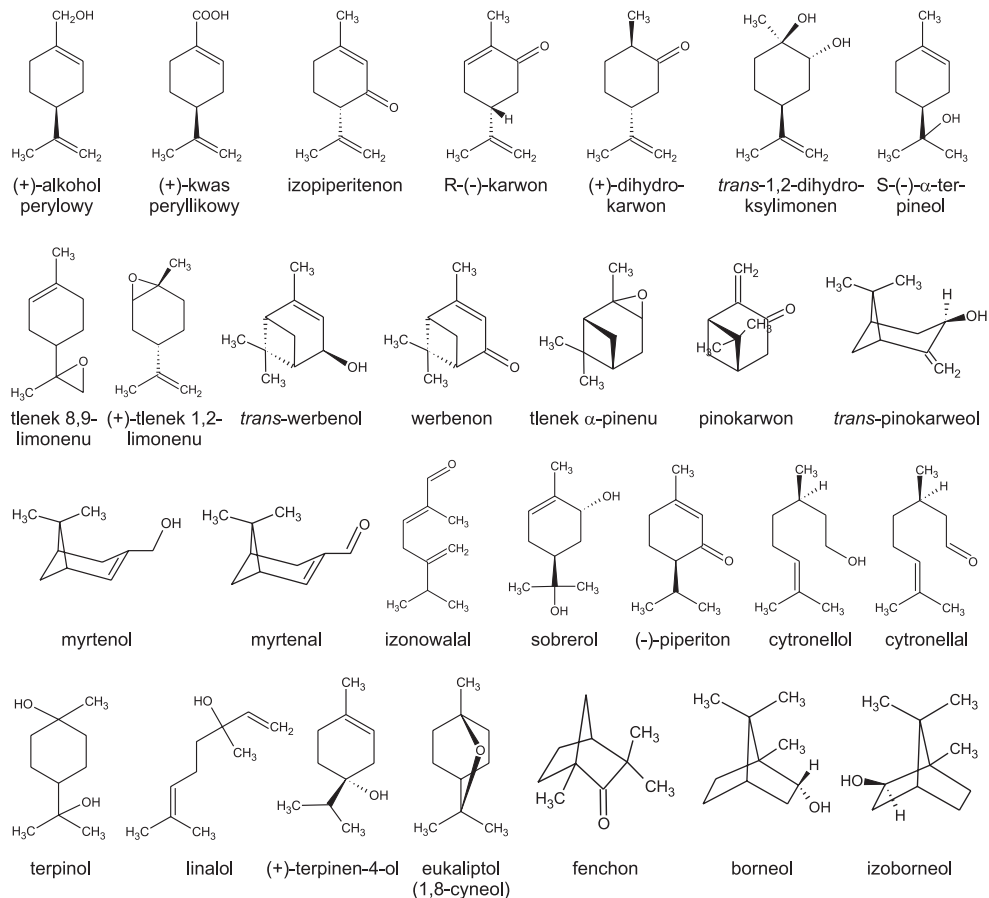
Inną możliwość pozyskiwania naturalnych związków zapachowych z roślin mogą stanowić metody chemiczne albo biotechnologiczne. Istnieje znaczna różnica w wartości rynkowej między związkami otrzymywanymi ze źródeł naturalnych, a ich analogami otrzymywanymi tymi metodami. Opracowanie biotechnologicznej metody produkcji  $\gamma$ -dekalaktonu (składnika odpowiadającego za walory smakowo-zapachowe brzoskwiń) z kwasów rycenolowych przyczyniło się do spadku jego ceny



Rys. 2. Struktury monoterpenów stosowanych jako prekursorzy w otrzymywaniu wartościowych terpenoidów.

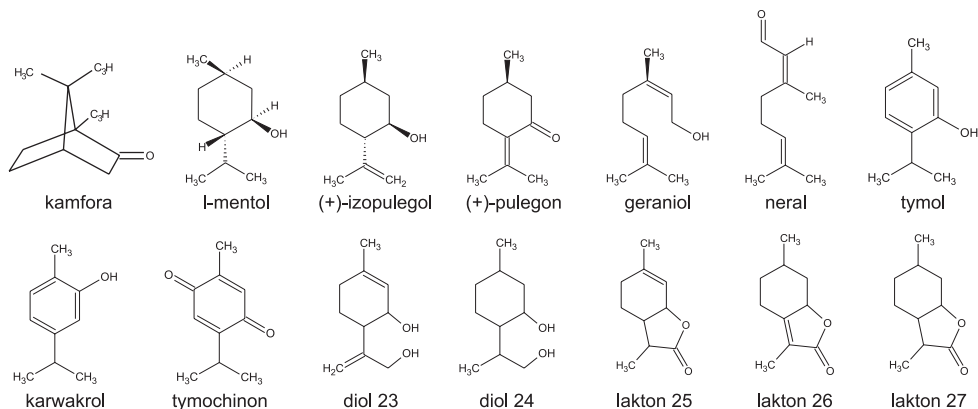
z 12 000 USD/kg w 1986 r. do 500 USD/kg w roku 1998 (54). Z kolei cena syntetycznej waniliny wynosi 12 USD/kg, a ekstrahowanej ze strączków *Vanilla* sp. uzyskuje cenę nawet 4000 USD/kg (55). Istnieje jednak tendencja do pozyskiwania wartościowych komponentów żywności metodami biotechnologicznymi, do których należy m.in. biotransformacja. Polega ona na inkubacji tanich i łatwo dostępnych substratów w obecności biokatalizatorów (wolne enzymy lub zawierające je komórki, czy tkanki). Metody te charakteryzują się wysoką stereospecyficznością, enancjo- i regioselektywnością oraz specyficznością w zakresie typu reakcji. Sprzyja to powstawaniu czystych enancjomerów o pożądanym właściwościach organoleptycznych, bez potrzeby stosowania drogich i skomplikowanych metod rozdzielania mieszanin racemicznych. Procesy biotechnologiczne umożliwiają także znaczną redukcję liczby etapów syntezy chemicznej prowadzącej do czystego końcowego produktu. Poza tym, odpowiadają one rozwijającemu się trendowi zdrowego i naturalnego stylu życia, ponieważ związki otrzymane przy użyciu drobnoustrojów i enzymów mogą być klasyfikowane przez legislaturę USA i krajów europejskich jako produkty naturalne (GRAS, ang. *Generally Regarded As Safe*). Warto także wspomnieć o często pomijanym aspekcie czystości składników żywnościowych otrzymywanych z roślin. Izolowane produkty nierzadko są zanieczyszczone naturalnie występującymi w roślinach toksynami i alergenami, które wpływają na pogorszenie walorów jakościowych produktów spożywczych (56).

Potencjalnie użyteczne związki, które można otrzymać w procesie utleniania  $\alpha$ -pinenu to, m.in. tlenek pinenu, werbenol (3500 USD/kg), werbenon, myrtenol,



Rys. 3. Przykłady cennych monoterpenu otrzymanych w procesie biotransformacji odpowiednich prekursorów.

myrtenal, sobrerol, nowalal, 2-metylo-5-izopropylloheksa-2,5-dienal (izonowalal) czy kwas 2-metylo-5-izopropylloheksa-2,5-dienowy (tab. 1). Werbenon jest ważnym komponentem zapachowym truskawek, malin, kopru, rozmarynu oraz zapachu mięty zielonej. Wspólnie z werbenolem posiadają nutę przypominającą zapach kamfory i mięty. Związki te otrzymywane są obecnie z sosny i eukaliptusa (53). Izonowalal odznacza się leśno-cytrynowo-korzennym zapachem natomiast nowalal – leśno-aldehydowym (57). Z  $\beta$ -pinenu można otrzymać pinokarweol i pinokarwon. Jednymi z ważniejszych związków powstających w wyniku oksydatywnej modyfikacji limonenu są: alkohol perylowy (komponent zapachowy lawendy), aldehyd perylowy, kwas perylikowy, karweol, karwon, dihydrokarwon,  $\alpha$ -terpineol, izopiperitenol, izopiperitenon i tlenek 8,9-limonenu (tab. 2). S-(+)-karwon o zapachu koperkowym jest głównym składnikiem olejku z kminku zwyczajnego. Zawiera go również koper i je-



Rys. 4. Inne monoterpeny o unikatowych właściwościach smakowo-zapachowych i terapeutycznych.

go nasiona. R(-)-karwon charakteryzuje się miętowo-pieprzowym zapachem, który obok mentolu wchodzi w skład olejku miętowego. R(+)- $\alpha$ -terpineol posiada zapach podobny do bzu, zaś S(-)- $\alpha$ -terpineol przypomina zapach drzew iglastych i estragonu.  $\alpha$ -Terpineol tworzy kompozycje zapachowe różnych produktów spożywczych, np. jagód, cytryn, lim, gałek muszkatałowych, pomarańczy, imbiru, anyżu oraz brzoskwiń. Tlenek 8,9-limonenu spotykany jest we frakcjach lotnych imbiru i mandarynek (58). Z kolei izopiperitenol i piperitol są wartościowymi substratami w produkcji mentolu. Dalsza hydroksylacja tych substratów może prowadzić do uzyskania dioli **23** i **24**, które są użytecznymi prekursorami *p*-menta-laktonów **25**, **26**, **27** (rys. 4) – związków o bardzo intensywnych, a zarazem zależnych od ich formy enancjomerycznej zróżnicowanych zapachach mięty, kumaryny i kopru (44). Podobnie jak limonen oraz  $\alpha$ -pinen stosunkowo tanimi prekursorami są również: myrcen,  $\alpha$ - i  $\gamma$ -terpinen oraz cytronellen. Potencjalnymi produktami utleniania cytronellenu są cytronellal oraz cytronellol. W wyniku biotransformacji  $\alpha$ - i  $\gamma$ -terpinenu otrzymać można terpinen-4-ol (składnik olejku cyprysowego i jałowcowego) i terpinen-1-ol oraz odpowiednie 1,2-diole (59,60). Produkty biotransformacji myrcenu to, m.in. kwas myrcenowy (61,62), linalol (63) i 2-metylo-6-metyleno-2,7-oktadien-1-ol (myrcen-8-ol) (64). Linalol w 78% wchodzi w skład olejku białej frezji, a wraz z octanem linalylu odpowiada za charakterystyczny aromat lawendy i kolendry.

Badania nad biotransformacją monoterpenów prowadzone są na świecie od początku lat sześćdziesiątych ubiegłego wieku. Mikrobiologiczna transformacja monoterpenów, przebiega w warunkach tlenowych przy udziale licznych drobnoustrojów. Niektóre gatunki bakterii, grzybów oraz drożdży zdolnych do katalizy oksydatywnej transformacji monoterpenów w kierunku wspomnianych terpenoidów przedstawiono w tabeli 1 i 2. W wielu przypadkach uruchamiane są alternatywne szlaki transformacji monoterpeny prowadzące do powstawania mieszaniny jego utlenionych analogów. Przyjmuje się, że enzymy biorące udział w transformacji mo-

noterpenów należą do grupy izoenzymów zaliczanych do monoooksygenaz, a określanych wspólną nazwą – cytochrom P-450. Główną rolę odgrywa w nim żelazoproporfiryna IX. Zasadę działania enzymów tej grupy opisano na przykładzie cytochromu P-450 wyizolowanego z *Pseudomonas putida* hydroksylującego kamforę do 5-*exo*-hydroksykamfory. Jest to kompleks współdziałających enzymów, w skład którego wchodzi: dehydrogenaza flawoproteinowa, która katalizuje reakcję utleniania NADPH, putidaredoksyna – enzym zawierający nie związane w układzie hemowym żelazo i katalizujący odtworzenie utlenionego flawoenzymu oraz hemoproteina – cytochrom P-450, która wiąże i uaktywnia cząsteczkę tlenu.

Monoooksygenazy są enzymami niestabilnymi. Trudno jest je wyizolować i oczyścić, a w konsekwencji zidentyfikować kodujące je geny. Wymienić można jedynie nieliczne, częściowo oczyszczone enzymy biorące udział w transformacji terpenów, np. dehydrogenaza alkoholu perylowego, dehydrogenaza aldehydu perylowego (88,89) oraz pochodzące z *Rhodococcus erythropolis* DCL14 NAD(H)-zależną dehydrogenazę karweolu (nikotynoprotina) (90), i hydrolazę epoksydową katalizującą hydroлизę tlenku 1,2-limonenu do 1,2 dihydroksy-limonenu (91). Wśród wymienionych enzymów trzy pierwsze odznaczają się szerszą specyficznością substratową, katalizując oksydacyjną transformację innych terpenów.

Monoterpeny są w zasadzie utleniane przez drobnoustroje na drodze konwersji kometabolicznej. Mogą być metabolizowane w szlaku cymentowym, kamforowym, jak również przez drobnoustroje rosnące na cykloheksanie jako jedynym źródle węgla, oraz posiadające szlaki kataboliczne alkanów, toluenu, naftalenu, krezolu i kwasu cytrynowego. Na podstawie tych obserwacji można przypuszczać, że w początkowej fazie utleniania terpenów dochodzi raczej do niecałkowitej regiospecyficzności pojedynczego enzymu niż do jednoczesnej ekspresji kilku enzymów katalizujących reakcję utleniania monoterpenów (52).

Nie udało się, jak dotąd, opracować efektywnej metody biotechnologicznej, pozwalającej wykorzystać tego typu substraty do przemysłowego otrzymywania związków smakowo-zapachowych. Żaden z dotychczas badanych katalizatorów nie spełniał wymagań aplikacyjnych. Uzyskiwano niewielkie wydajności i niskie stężenia produktów wynikające zarówno z toksyczności substratu i produktów, ich dużej lotności i niskiej rozpuszczalności w wodzie, jak również z niestabilności stosowanych biokatalizatorów. Często drobnoustroje nie akumulujążądanego produktu, lecz metabolizują go w dalszych etapach prowadząc ostatecznie do jego degradacji. Ponadto, pewne ograniczenia związane są z barierą dyfuzyjną dla substratu, która jest przyczyną jego ograniczonego dostępu do centrum aktywnego enzymu, co z kolei przekłada się na długi czas biokonwersji. Czas biotransformacji limonenu przy użyciu *Pleurotus sapidus* wynosił aż 10-12 dni (83), biokonwersja  $\alpha$ -pinenu przez *Aspergillus niger* trwała znacznie krócej, bo wyjątkowo tylko 6 godzin, lecz przebiegała z małą wydajnością (53). Immobilizacja biokatalizatorów również nie dawała oczekiwanej poprawy wydajności. Ciekawym usprawnieniem częściowo rozwiązującym problem nadmiernej lotności terpenów jest zastosowanie do ich biotransformacji psychro-

troficznych kultur grzybów nitkowatych. Pozwala to obniżyć temperaturę procesu do 15°C (79). Najlepsze wyniki uzyskiwano przy zastosowaniu emulgatorów zwiększających biodostępność terpenów. Tym sposobem otrzymano aż 3 g/l kwasu peryllikowego (61), natomiast w 96-godzinnej hodowli bioreaktorowej grzybnicy *Corynespora* otrzymano 900 g (1S,2S)-trans-diolu z limonenu (81). Obiecujące są także wyniki badań nad bakteriami z rodzaju *Mycobacterium* i *Rhodococcus*, które posiadają kataboliczne szlaki alkanów i węglowodorów aromatycznych. Przy ich udziale uzyskano zadowalającą wydajność alkoholu perylowego oraz karweolu w wyniku działania dioksygenazy naftalenowej i toluenowej (76,84). Na uwagę zasługują biotransformacje: stereoselektywnej redukcji geraniolu do cytronellolu przez drożdże piekarniane *Saccharomyces cerevisiae* (92), (L)-cytronellalu do (L)-cytronellolu (3,5 g/l) z udziałem immobilizowanych drożdży *Rhodotorula minuta* (93), oraz wysoko wydajna transformacja tlenu  $\alpha$ -pinenu do izonowalalu przez liazę permeabilizowanych komórek *Pseudomonas rhodesiae* (400 g/l w ciągu 2,5 h z 25 g biomasy/l) (94).

Tabela 1

Niektóre przykłady biotransformacji  $\alpha$ -pinenu i  $\beta$ -pinenu

Mikroorganizm	Główne produkty	Literatura
<b>Substrat: <math>\alpha</math>-pinen</b>		
<i>Armillariella mellea</i>	<i>trans</i> -werbenol, werbenon, myrtenol, sobrerol, $\alpha$ -terpineol, karweol, karwakrol	(67)
<i>Aspergillus niger</i>	werbenol, werbenon	(53)
<i>Aspergillus</i> sp., <i>Penicillium</i> sp.	<i>trans</i> -werbenol, werbenon, <i>trans</i> -pinokarweol, sobrerol	(65)
<i>Bacidiomyces</i> sp.	<i>trans</i> -werbenol, myrtenol, werbenon, myrtenal, <i>trans</i> -pinokarweol, sobrerol, $\alpha$ -terpineol, karweol, karwon	(66)
<i>Candida tropicalis</i>	$\alpha$ -terpineol, <i>p</i> -ment-2-en-1,2-diol	(70)
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	myrtenol, tlenek $\alpha$ -pinenu, tlenek limonenu, limonen, alkohol perylowy	(68)
<i>Pseudomonas fluorescens</i> NCIMB 11671	myrtenol, myrtenal, tlenek $\alpha$ -pinenu, nowalal, 2-metylo-5-izopropylloheksa-2,5-dienal (izonowalal), kwas 2-metylo-5-izopropylloheksa-2,5-dienowy.	(71)
<i>Pseudomonas maltophilia</i>	limonene, borneol, kamfora, kwas peryllikowy, kwas 2-(4-metylo-3-cykloheksenylo-dieno)-propionowy	(69)
<b>Substrat: <math>\beta</math>-pinen</b>		
<i>Armillariella mellea</i>	pinokarwon, 5-hydroksypinokarweol, alkohol perylowy, hydroksy- $\alpha$ -terpineol, <i>trans</i> -pinokarweol, myrtenol	(67)
<i>Aspergillus niger</i> NCIM 612	<i>trans</i> -pinokarweol	(72)
<i>Pleurotus flabellatus</i>	<i>trans</i> -pinokarweol, pinokamfon, eukaliptol, myrtenol, myrtenol, myrtenal, alkohol perylowy, 1,4-cyneol, karweol, fenchon	(66)
<i>Pseudomonas</i> sp.	myrtenol, borneol	(73)

Tabela 2

## Produkty transformacji limonenu przez wybrane mikroorganizmy

Produkty transformacji limonenu					
alkohol perylowy, aldehyd perylowy, kwas perylikowy	tlenek-1,2-limonenu, 1,2-dihydroksy-limonen	karweol, karwon, dihydro-karwon	$\alpha$ -terpineol	izopiperitenol, izopiperitenon	tlenek 8,9-limonenu
<i>Aspergillus cellulosa</i> M-77 (74)	<i>Armillariella mellea</i> (80)	<i>Aspergillus cellulosa</i> M-77 (74)	<i>Bacillus stearotermophilus</i> BR388 (85)	<i>Aspergillus cellulosa</i> M-77 (74)	<i>Xanthobacter</i> sp. C20 (58)
<i>Bacillus stearotermophilus</i> BR388 (75)	<i>Aspergillus cellulosa</i> M-77 (74)	<i>Pleurotus sapidus</i> (83)	<i>Cladosporium</i> sp. T12 (86)	<i>Hormonema</i> sp. UOFS Y-0067 (88)	
<i>Mycobacterium</i> sp. HXN-1500 (76)	<i>Corynespora cassiicola</i> DSM62474/5 (81)	<i>Rhodococcus opacus</i> PWD4 (84)	<i>Penicillium digitatum</i> NRRL 1202 (87)		
<i>Pseudomonas gladioli</i> (77)	<i>Rhodococcus erythropolis</i> DCL14 (82)		<i>Pseudomonas gladioli</i> (77)		
<i>Pseudomonas incognita</i> (78)			<i>Armillariella mellea</i> (80)		
<i>Mortierella minutissima</i> 01 (79)			<i>Aspergillus cellulosa</i> M-77 (74)		

Podejmowane są także próby zwiększenia regioselektywności i wydajności reakcji enzymatycznych metodami inżynierii genetycznej i białkowej. Jedną ze strategii inżynierii białkowej jest inżynieria metaboliczna, która zajmuje się modyfikowaniem, doskonaleniem enzymów oraz optymalizacją ich wydajności w wyniku ukierunkowanych zmian odpowiednich szlaków metabolicznych lub szlaków biosyntezy. Obejmują one ekspresję fragmentów genomu roślinnego i bakteryjnego odpowiedzialnego za proces biotransformacji. Zespół szwajcarskich i holenderskich naukowców, z bakterii *Mycobacterium* sp. degradujących alkany, wyizolował i oczyścił oxygenazę specyficzną katalizującą reakcję hydroksylacji w pozycji C-7 cząsteczki limonenu do czystego enancjomerycznie (-)-alkoholu perylowego, terpenoidu o włas-

ciwościach przeciwnowotworowych. Następnie, sklonowano fragment 6,2-kb ApT kodujący cytochrom P-450, ferredoksynę i reduktazę ferredoksyny i przy użyciu wektora pCom8 przeprowadzono udaną koekspresję w *Pseudomonas putida*. Otrzymany rekombinant transformował limonen do (-)-alkoholu perylowego w 2-litrowym bioreaktorze z wydajnością kilku gramów na litr podłoża hodowlanego (95). Innym podejściem do tego zagadnienia są próby ekspresji funkcjonalnych enzymów roślinnych (cytochromu P-450) w mikroorganizmach. Zabieg ten pozwala łączyć wysoką regio- i stereospecyficzność tych enzymów z zaletami i wysoką efektywnością drobnoustrojów w procesach przemysłowych, tj. fermentacji. W tym celu przeprowadzono izolację cDNA kodującego C6-hydroksylazę i C3-hydroksylazę limonenu odpowiednio z roślin *Mentha spicata* i *M. piperita*. Fragment genomu poddano nadekspresji w *Escherichia coli* i *Saccharomyces cerevisiae* w celu otrzymania kilku N-terminalnie zmodyfikowanych hydroksylaz (96). Inżynieria metaboliczna cytochromu P-450 obejmująca wprowadzenie genu kodującego specyficzny enzym biosyntezy monoterpenu do genomu bakteryjnego lub grzybowego wciąż pozostaje metodą zawodną.

Alternatywą dla klasycznej metody, w której wykorzystywane są żywe komórki do biotransformacji monoterpenu, może być użycie w tym celu układów porfirynewych, jako biokatalizatorów. Jednym z takich układów, ze związanym atomem żelaza, jest hem – podstawowy element hemoglobiny. Hem jest również niebiałkową grupą prostetyczną niezbędną do prawidłowego funkcjonowania cytochromów, peroksydaz i katalaz. Zastosowanie porfiryn w biotechnologii, w tym katalizatorów imitujących działanie cytochromu P-450, (określane mianem „katalizy biomimetycznej”) było przedmiotem osobnych opracowań (97,98). Z naszych wcześniejszych badań wynika, że peroksydaza, której aktywną grupę stanowi układ porfirynewy, katalizuje utlenianie limonenu przy udziale  $H_2O_2$  (99). Porfiryny mogą zatem służyć jako biokatalizatory w utlenianiu monoterpenu. Są stabilne wobec tego typu związków, a modyfikacja ich rdzenia pozwala otrzymać katalizatory o zwiększonej rozpuszczalności w środowisku organicznym. W światowej literaturze jest tylko kilka prac z zakresu transformacji monoterpenu przy użyciu porfiryn. Stosując tetra(4-N-benzylpirydyl)porfiryne manganu(III) podjęto próbę utlenienia  $\alpha$ -pinenu, (*R*)-(+)-limonenu, karwakrolu i tymolu. Po 24-godzinnej konwersji limonenu otrzymano tlenek 1,2- limonenu i 8,9-epoxy-*p*-ment-1-ene (tlenek 8,9-limonenu). W przypadku biokonwersji  $\alpha$ -pinenu głównymi produktami były tlenek- $\alpha$ -pinenu i aldehyd kamfolenowy. Konwersja karwakrolu i tymolu (komponentu olejku tymiankowego) przebiegała w kierunku powstawania tymochinonu jako końcowego produktu. Po unieruchomieniu porfiryny stwierdzono znaczną poprawę regioselektywności w utlenianiu limonenu do jego tlenku (100). Z kolei, immobilizowana *meso*-tetrapirydylporfiryne magnezu była efektywnym i selektywnym katalizatorem w reakcji epoksydacji *R*-(+)-limonenu za pomocą nadjodanu sodu. Reakcja trwała od 2 do 6 godzin. Odnotowano większą wydajność epoksydacji oraz wzrost regioselektywności immobilizowanej porfiryny w utlenianiu *R*-(+)-limonenu do jego dwóch możliwych epoksydów w porównaniu z porfiryne używaną w układzie homogenicznym (101).

Używając porfiryny żelaza przeprowadzono utlenienie  $\alpha$ -pinenu do werbenolu oraz 2,3-epoksydu. Związki te powstały w zbliżonych ilościach (102). W naszym laboratorium po raz pierwszy zastosowano biomimetyczny katalizator w formie wolnej tetrafenyloporfiryny w procesie fotoutleniania limonenu, w wyniku czego uzyskano nie zidentyfikowany dotąd monoterpren (6,0 g/l) oraz karwon z wydajnością 3,5 g/l (103). Jest to wydajność odpowiednio 80- i 700-krotnie wyższa w porównaniu z procesem prowadzonym w tym celu z zastosowaniem grzybni *Pleurotus sapidus* (83) lub układu enzymatycznego oksydaza glukozowa-peroksydaza (99).

Kataliza za pomocą układów porfiryńowych może przebiegać w środowisku bezwodnym, co zasadniczo odróżnia ją od stosowanych dotąd metod. Reakcję utleniania monoterprenów prowadzić można w niższych temperaturach niż 30-50°C, zbliżonych do stosowanych z użyciem psychrotroficznych drobnoustrojów. Pozwala to na ograniczenie strat substratu i produktu, zwiększoną rozpuszczalność tlenu, zmniejszenie kosztów związanych z nakładem energii w procesie biotransformacji (natlenianie, mieszanie) i kosztów przygotowania podłoża do hodowli mikroorganizmów. Pomimo wielu zalet, biokatalizatory tego typu nie są jeszcze praktycznie wykorzystywane w procesach przemysłowych. Przyczyną jest ich mała stabilność w obecności tlenu i innych czynników utleniających oraz trudność z reizolacją i powtórnym ich wykorzystaniem. Immobilizacja porfiryń może częściowo rozwiązać te problemy, a dodatkowo poprawić ich selektywność i aktywność, ze względu na środowisko nośnika (101). Korzystnym rozwiązaniem technologicznym byłoby zatem, prowadzenie procesu katalizy biomimetycznej z wykorzystaniem enzymów bądź porfiryń imitujących enzymy na kolumnie z unieruchomionym biokatalizatorem. W tych warunkach istnieje możliwość wielokrotnego wykorzystania biokatalizatora oraz jego regeneracji.

Z uwagi na fakt, że wiele utlenionych pochodnych limonenu, pinenu, terpinenu, czy myrcenu nie występuje w przyrodzie można sądzić, że ich biotransformacja za pomocą żywych komórek, enzymów czy porfiryń może przyczynić się do poszerzenia grupy terpenoidów o nowe biologicznie aktywne związki o nie spotykanych dotąd właściwościach smakowo-zapachowych i terapeutycznych.

## 5. Podsumowanie

Trwający od milionów lat proces koewolucji pomiędzy roślinami-drobnoustrojami-owadami, ukształtował szeroki zakres katabolicznych możliwości mikroorganizmów oraz dużą różnorodność związków lotnych. Duże zróżnicowanie właściwości monoterprenów pozwala na praktyczne wykorzystanie ich w wielu dziedzinach przemysłu. Olbrzymi potencjał monoterprenów tkwi w ich właściwościach smakowo-zapachowych, i terapeutycznych. Monoterpeny mają obecnie zastosowanie w przemyśle perfumeryjnym, spożywczym i farmaceutycznym. Ze względu na działanie przeciwnowotworowe, chemoprewencyjne, antydrobnoustrojowe, przeciwzapalne czy

immunomodulacyjne mogą znaleźć zastosowanie we współczesnej onkologii i innych gałęziach medycyny. Poszukuje się także nowych zastosowań dla znanych i nowo zidentyfikowanych monoterpenu. Równolegle prowadzone są badania nad wydajnymi sposobami ich produkcji. Metody biotechnologiczne stwarzają duże możliwości w otrzymywaniu cennych monoterpenu na drodze modyfikacji tanich prekursorów, tj. pinenu, limonenu czy myrcenu. Nadzieje na wdrożenie do przemysłu i rozpowszechnienie tego sposobu produkcji terpenów pokłada się w mikroorganizmach, enzymach i ostatnio w ich mimetykach jakimi mogą być porfiryny. Stanowi to bardzo interesujący obiekt badań, wiążący się z wieloma zagadnieniami natury chemicznej, biologicznej i fizykochemicznej. To, czy prawidłowo rozpoznamy potencjał dany nam przez naturę, zrozumiemy, a potem wykorzystamy w aplikacjach biotechnologicznych, teraz już zależy od nas.

## Literatura

1. Ed. Buckingham J., (1998), *Dictionary of natural products*, on CD-ROM, vol 6.1. Chapman & Hall, London.
2. Devon T. K., Scott A. I., (1972), *The monoterpene*, 3-54, in: *Handbook of naturally occurring compounds*, vol. II. *Terpenes*, Academic Press, New York, N.Y.
3. Eisenrich W., Rohdich F., Bacher A., (2001), *Trends in Plant Science*, 6, 78-84.
4. Ohara K., Ujihara T., Endo T., Sato F., Yazaki K., (2003), *J. Exp. Bot.*, 54, 2635-2642.
5. McMurry J., (2005), *Chemia organiczna*, PWN, 5, 1035-1045.
6. Pleszczyńska M., (2001), *Żywność, Nauka, Technologia, Jakość*, 1, 14-25.
7. Rausher M. D., (2001), *Nature*, 411, 857-864.
8. Klimek R., (1957), *Olejki eteryczne*, Wydawnictwo Przemysłu Lekkiego i Spożywczego, Warszawa.
9. Kessler A., Baldwin I. T., (2002), *Annu. Rev. Plant Biol.*, 53, 299-328.
10. DeMoraes C. M., (1998), *Nature*, 393, 570-573.
11. Dicke M., (1994), *J. Plant Physiol.*, 143, 465-472.
12. Kappers I. F., Aharoni A., van Herpen T. W. J. M., Luckerhoff L. L. P., Dicke M., Bouwmeester H. J., (2005), *Science*, 309, 2070-2072.
13. Kopcewicz X., Lewak Y., (1997), *Podstawy fizjologii roślin*, PWN, Warszawa, 316-327.
14. Karl A. D. Swift (2004), *Topics in Catalysis*, 27, 143-155.
15. Plinius Secundus G., (77 AD) *Naturalis Historiae (Natural History (1952) Pliny the Elder, Trans.)*. Cambridge, USA: Harvard University Press, The Loeb Classical Library.
16. Wilson H., (1988), *Egyptian food and drink*, Aylesbury, UK: Shire Publishers.
17. Lorenzetti B. B., Souza G. E. P., Sarti S. J., Santos-Filho D., Ferreira S. H., (1991), *J. Ethnopharmacol.*, 34, 43-48.
18. de Carvalho C. C. R., da Fonseca M. M. R., (2006), *Food Chemistry*, 95, 413-422.
19. Gerhäuser C., Klímo K., Heiss E., Neumann I., Gamal-Eldeen A., Knauft J., Liu G-Y., Sitthimonchai S., Frank N., (2003), *Mutat. Res.*, 523-524, 163-167.
20. Paduch R., Niedziela P., (2004), *Onkol. Pol.*, 7, 19-23.
21. Bardon S., Foussard V., Fournel S., Loubat A., (2002), *Cancer Lett.*, 181, 187-194.
22. Crowell P. L., Ayoubi A. S., Burke Y. D., (1996), *Adv. Exp. Med. Biol.*, 401, 131-136.
23. Gupta A., Myrdal P. B., (2004), *Int. J. Pharm.*, 269, 373-383.
24. Stark M. J., Burke Y. D., McKinzie J. H., Ayoubi A. S., Crowell P. L., (1995), *Cancer Lett.*, 96, 15-21.
25. Ahn K-J., Lee Ch. K., Choi E. K., Griffin R., Song Ch. W., Park H. J., (2003), *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 57, 813-819.
26. Gelb M. H., Tamanoi F., Yokoyama K., Ghomashchi F., Esson K., Gould M. N., (1995), *Cancer Lett.*, 91, 169-175.

27. Hadcastle I. R., Rowlands M. G., Barber A. M., Grimshaw R. M., Mohan M. K., Nutley B. P., Jarman M., (1999), *Biochem. Pharmacol.*, 57, 801-809.
28. Karlson J., Borg-Karlson A. K., Unelius R., Shoshan M. C., Wilking N., Ringborg U., Linder S., (1996), *Anticancer Drugs*, 7, 422-429.
29. Vigushin D. M., Poon G. K., Boddy A., English J., Halbert G. W., Pagonis Ch., Jarman M., Coombes R. Ch., (1998), *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 42, 111-117.
30. Shi W., Gould M. N., (2002), *Carcinogenesis*, 23, 131-142.
31. Elegbede J. A., Flores R., Wang R. C., (2003), *Life Sci.*, 73, 2831-2840.
32. Crowell P. L., (1997), *Breast Cancer Res. Treat.*, 46, 191-197.
33. Burke Y. D., Stark M. J., Roach S. L., Sen S. E., Crowell P. L., (1997), *Lipids*, 32, 151-156.
34. Burke Y. D., Ayoubi A. S., Werner S. R., McFarland B. C., Heilman D. K., Ruggeri B. A., Crowell P. L., (2002), *Anticancer Res.*, 22, 3127-3134.
35. Kędzia B., Alkiewicz J., Han S., (2000), *Post. Fitoterapii*, 2, czytelnia Borgis on-line.
36. Lee S. S., Kai M., Lee M. K., (2001), *Phytother. Res.*, 15, 167-169.
37. Trombetta D., Castelli F., Sarpietro M. G., Venuti V., Cristani M., Daniele C., Saija A., Mazzanti G., Bisignano G., (2005), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 49, 2474-2478.
38. Hammer K. A., Carson C. F., Riley T. V., (2003), *J. Applied Microbiol.*, 95, 853-860.
39. Armaka M., Papanikolaou E., Sivropoulou A., Arsenakis M., (1999), *Antiviral Res.*, 43, 79-92.
40. Peana A. T., D'Aquila P. S., Chessa M. L., Moretti M. D. L., Serra G., Pippia P., (2003), *Eur. J. Pharmacol.*, 460, 37-41.
41. Juergens U. R., Dethlefsen U., Steinkamp G., Gillissen A., Repges R., Vetter H., (2003), *Respir. Med.*, 97, 250-256.
42. Thomas A. F., (1989), *Nat. Prod. Rep.*, 3, 291-309.
43. Ohloff G., (1994), *Scent and Fragrance*, Springer-Verlag, Berlin.
44. Serra S., Fuganti C., Brenna E., (2005), *Trends in Biotechnology*, 23, 193-198.
45. Demole E., Enggist P., Ohloff G., (1982), *Helv. Chim. Acta*, 65, 1785-1794.
46. Singer A. C., Crowley D. E., Thompson I. P., (2003), *Trends in Biotechnology*, 21, 123-130.
47. Hernandez B. S., (1997), *Biodegradation*, 8, 153-158.
48. de-Oliveira A. C. A. X., Ribeiro-Pinto L. F., Otto S. S., Goncalves A., Paumgarten F. J. R., (1997), *Toxicology*, 124, 135-140.
49. Schlyter F., Birgersson G., Byers J. A., Löfqvist J., Bergström G., (1987), *J. Chem. Ecol.*, 13, 701-716.
50. Kołodziejczyk A., (2004), *Naturalne związki organiczne*, PWN, Warszawa.
51. Mazzaro D., (2000), *Chem. Marketing Rep.*, 258, 18.
52. Duetz W. A., Bouwmeester H., van Beilen J. B., Witholt B., (2003), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 269-277.
53. Agrawal R., Joseph R., (2000), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 53, 335-337.
54. Waché Y., et al., (2003), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 61, 393-404.
55. Feron G., Bonnarame P., Durand A., (1996), *Trends Food Sci. Technol.*, 7, 285-293.
56. Wright J., (1995), *Food Flavorings*, 2<sup>nd</sup> ed., Ed. Ashurst P.R., Blackie Academic and Professional, Glasgow, U.K.
57. Hagedorn S., Kaphammer B., (1994), *Annu. Rev. Microbiol.*, 48, 773-800.
58. van der Werf M. J., Keijzer P. M., van der Schaft P. H., (2000), *J. Biotechnol.*, 84, 133-143.
59. Abraham W. R., Hoffmann H. M., Kieslich K., Reng G., Stumpf B., (1985), *Ciba Found Symp.*, 111, 146-60.
60. Furstoss R., Archelas A., (1995), *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Comprehensive Handbook*, Eds. Drauz K., Waldmann H., B.6.1.5.4., Wiley-VCH, Weinheim.
61. Speelmans G., Bijlma A., Eggink G., (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 538-544.
62. Busmann D., Berger R. G., (1994), *J. Biotechnol.* 37, 9-43.
63. King A., Dickinson R., (2000), John Wiley & Sons, Ltd, 16, 499-506.
64. Iurescia S., Marconi A. M., Tofani D., Gambacorta A., Paterno A., Devirgiliis C., van der Werf M. J., Zennaro E., (1999), *Appl. Environ. Microbiol.*, 65, 2871-2876.
65. Agrawal R., Deepika N. U. A., Joseph R., (1999), *Biotechnol. Bioeng.*, 63, 249-252.

66. Busmann D., Berger R. G., (1994), *Z. Naturforsch.*, 49, 545-552.
67. Draczyńska B., Cagara C., Siewiński A., Rymkiewicz A., Zabża A., Leufvèn A., (1985), *J. Basic Microbiol.*, 25, 487-492.
68. Best D. J., Floyd N. C., Magalhaes A., Burfield A., Rhodes P. M., (1987), *Biocatal.*, 1, 147-159.
69. Narushima H., Omori T., Minoda Y., (1982), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 16, 174-178.
70. Chatterjee T., De B. K., Bhattacharyya D. K., (1999), *Ind. J. Chem.*, 38, 515-517.
71. Colocousi A., Saqib K. M., Leak D. J., (1996), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 45, 822-830.
72. Devi J. R., Bhattacharyya P. K., (1978), *J. Indian Chem. Soc.*, 55, 1131-1137.
73. Shukla O. P., Mohalay M. N., Bhattacharyya P. K., (1968), *Indian J. Biochem. Soc.*, 5, 79-91.
74. Noma Y., Yamasaki S., Asakawa Y., (1992), *Phytochem.*, 31, 2725-2727.
75. Chang H. C., Oriol P., (1994), *J. Food Sci.*, 59, 660-662.
76. Duetz W. A., Jourdat C., Witholt B., (2001), Process for the preparation of perillyl alcohol, EP1236802.
77. Cadwallader K. R., Braddock R. J., Parish M. E., Higgins D. P., (1989), *J. Food Sci.*, 54, 1241-1245.
78. Rama D. J., Bhattacharyya P. K., (1977), *Indian J. Biochem. Biophys.*, 14, 288-291.
79. Trytek M., Fiedurek J., (2005), *Biotechnol. Lett.*, 27, 149-153.
80. Draczyńska-Lusiak B., Siewiński A., (1989), *J. Basic Microbiol.*, 29, 269-275.
81. Abraham W. R., Stumpf B., Kieslich K., (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 24-30.
82. van der Werf M. J., Swarts H. J., de Bont J. A. M., (1999), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 65, 2092-2102.
83. Onken J., Berger R. G., (1999), *J. Biotechnol.*, 69, 163-168.
84. Duetz W. A., Fja A. H. M., Ren S. Y., Jourdat C., Witholt B., (2001), *Appl. Env. Biol.*, 67, 2829-2832.
85. Kraidman K., Mukherjee B. B., Hill I. D., (1969), *Bacteriol. Proc.*, 69, 63-68.
86. Tan Q., Day D. F., Cadwallader K. R., (1998), *Proc. Biochem.*, 33, 29-37.
87. van Dyk M. S., van Rensburg E., Moleleki N., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 431-436.
88. Ballal N. R., Bhattacharyya P. K., Rangachari P. N., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 275-280.
89. Ballal N. R., Bhattacharyya P. K., Rangachari P. N., (1968), *Indian J. Biochem.*, 5, 1-6.
90. van der Werf M. J., van der Ven C., Barbirato F., Eppink M. H. M., de Bont J. A. M., van Berkel W. J. H., (1999), *J. Biol. Chem.*, 274, 6296-6304.
91. van der Werf M. J., Overkamp K. M., de Bont J. A. M., (1998), *J. Bacteriol.*, 180, 5052-5057.
92. Doig S. D., Boam A. T., Leak D. J., Livingston A. G., Stuckey D. C., (1998), *Biocatal. Biotransform.*, 16, 27-44.
93. Velankar H. R., Heble M. R., (2003), *Electronic J. Biotechnol.*, 6, 90-103.
94. Fontanille P., Larroche C., (2003), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 534-540.
95. Beilen J. B., Holtackers R., Lüscher D., Bauer U., Witholt B., Duetz W. A., (2005), *Appl. Env. Microbiol.*, 71, 1737-1744.
96. Haudenschild C., (2000), *Arch. Biochem. Biophys.*, 379, 127-136.
97. Trytek M., Makarska M., Polska K., Radzki S., Fiedurek J., (2005), *Biotechnologia*, 4, 109-127.
98. Trytek M., Fiedurek J., Polska K., Makarska M., Radzki S., (2005), *Biotechnologia*, 4, 128-141.
99. Trytek M., Fiedurek J., (2002), *Acta Microbiol. Polon.*, 51, 57-62.
100. Skrobot F. C., Valente A. A., Neves G., Rosa I., Rocha J., Cavaleiro J. A. S., (2003), *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 201, 211-222.
101. Moghadam M., Tangestaninejad S., Habibi M. H., Mirkhani V., (2004), *J. Mol. Catal. A: Chem.*, 217, 9-12.
102. Henning H., Lupp D., (1999), *J. Prakt. Chem.*, 341, 757-758.
103. Trytek M., Fiedurek J., Polska K., Radzki S., (2005), *Catal. Lett.*, 105, 119-126.