

Biotechnologická produkcia aromatických látok

DUŠAN VANDÁK - ERNEST ŠTURDÍK

Súhrn. Článok podáva prehľad o možnostiach využitia biotechnologických postupov pri produkcii aromatických látok pre potravinárstvo. Hlavná pozornosť je venovaná trom základným biotechnologickým systémom, ktoré sú používané na tento účel, a to enzýmom, mikroorganizmom a rastlinným bunkovým, resp. kalusovým kultúram. Okrem toho sú diskutované technologicke a komerčné aspekty biotechnologickej produkcie aromatických látok. Takáto príprava arómu by mohla byť vhodným kompromisom medzi chemickou syntézou a izoláciou z prírodných zdrojov. Jej výhodou je nezávislosť od klimatických podmienok a prísna stereospecificita enzýmových reakcií. Dôvodom, prečo sa doteraz biotechnológie širšie neuplatňujú pri výrobe aromatických látok sú väčšinou nízke výťažky existujúcich postupov. Systematické štúdium možností nadprodukcie však prináša žiadané pozitívne výsledky.

Aromatické látky, od jednoduchých zlúčenín po vysokokomplexné zmesi, boli oddávna izolované z rastlinných materiálov, alebo produkované fermentáciou. Rozvoj analytickej a organickej chémie umožnil identifikáciu a následnú chemickú výrobu substancií zodpovedných za arómu. Organickí chemici sú dnes schopní synteticky pripraviť drvivú väčšinu aromatických látok izolovaných z prírody. Navyše dokážu syntetizovať nové arómy, ktoré sa v prírode nenachádzajú. Trh aromatických látok je doslova zaplavený syntetickými prípravkami, pretože tieto sú vo väčšine prípadov oveľa lacnejšie ako prírodné. V posledných rokoch však môžeme badať obrovské zvýšenie dopytu po prírodných látkach, a to aj napriek ich vyššej cene. Tento jav je podnietený hlavne obavami verejnosti z možných nepriaznivých účinkov niektorých chemicky syntetizovaných potravinárskych aditív na ľudské zdravie.

Ing. Dušan Vandák, doc. Ing. Ernest Šturdík, CSc., Katedra biochemickej technológie, Chemickotechnologická fakulta STU, Radlinského 9, 812 37 Bratislava.

So vzrastajúcim záujmom o prírodné arómy sa viac pozornosti upriamuje na ich surovínové zdroje, ktorými sú najmä poľnohospodárske produkty. Tieto však majú v niektorých prípadoch aj určité nevýhody. Často obsahujú nízku koncentráciu požadovanej vonnej, resp. chuťovej látky, a preto extrakcia môže byť príliš drahá. Ako poľnohospodárske produkty podliehajú klimatickým výkyvom, ktoré výrazne determinujú výťažok a kvalitu arómy. Nakoniec je tu problém sociálnopolitickej stability toho-ktorého produkčného regiónu. Tieto nevýhody klasického získavania prírodných aróm odstraňujú biotechnologické procesy, ktoré sú alternatívnym zdrojom týchto látok. Ich prednosti možno zhrnúť do nasledujúcich bodov:

1. Produkty biotechnologických výrobn sú legislatívne uznávané ako prírodné látky.
2. Vysoká substrátová a reakčná špecifita enzýmovej katalýzy garantuje definovanú stereochemiu.
3. Optimalizované reakčné podmienky v bioreaktoroch zaručujú komplexne uniformné produkty a konštantnú produktivitu.
4. Reakcie prebiehajú za miernych podmienok.
5. Produkcia je nezávislá od klimatických podmienok.

Principiálne je možné použitie troch rôznych systémov pre biogeneráciu aróm, ktoré sa líšia typom použitého katalyzátora. Ide o:

- a) enzýmy, alebo zmesi enzýmov,
- b) mikroorganizmy,
- c) rastlinné bunky rôzneho typu.

Tieto systémy uskutočňujú syntézu aromatických látok *de novo*, alebo jedno-, prípadne niekoľkokrokovou biotransformáciou vhodného prekursora.

Enzymatická syntéza vonných látok

Mikrobiálne enzýmy, tak ako mikroorganizmy samotné, sú integrovanou súčasťou modernej potravinárskej technológie. Neustále sa rozrastajúce pole aplikácií zahrňuje aj tvorbu aróm. Okrem enzýmov mikrobiálneho pôvodu je možné použiť na biosyntézu vonných látok aj rastlinné, prípadne živočíšne enzýmy. Niektoré príklady použitia enzýmov pri tvorbe aromatických látok sú uvedené v tab.1.

Enzýmy nachádzajú uplatnenie hlavne pri jedno- alebo niekoľkokrokových transformáciách. Ich výhodou je, že pri nimi realizovaných konverziách prakticky nevznikajú žiadne vedľajšie produkty. Čistota použitých

enzýmových preparátov závisí od procesu, pri ktorom sa majú použiť. Pohybuje sa od vysokopurifikovaných foriem (napr. stereošpecifické rozdelenie D,L-mentolu) po hrubé prípravky (napr. rastlinné homogenáty pri produkcii hexanolu a hexenolov). Druh procesu určuje takisto aj spôsob aplikácie enzýmu. Pri niektorých transformáciách postačuje použitie voľného enzýmu (napr. degradácia RNA 5'-fosfodiesterázou, esterifikácia prchavých mastných kyselín pribudlinovými alkoholmi prasačou pankreatickou lipázou), pri iných, ako napr. oxidácia benzylalkoholu na benzaldehyd pomocou alkoholoxidázy, sú využívané v imobilizovanej forme (napr. viazanie do agarózového gélu). Pri transformácii hydrofóbných substrátov (napr. terpénov) sú s výhodou využívané multifázové systémy [9].

Nevýhodou aplikácie enzýmových preparátov pri produkcii vonných látok je ich zložitá a často aj ekonomicky náročná izolácia z vhodného zdroja. Ďalej, pri enzýmových reakciách vyžadujúcich kofaktor je potrebné zabezpečiť jeho regeneráciu, čo je často spojené s problémami (napr. oxidácia geraniolu na geranial pomocou alkoholdehydrogenázy [10]). Viackroková syntéza aromatických látok v bunkách je často spojená s multienzymovými komplexami, ktoré zaručujú potrebnú konformáciu enzýmov, prenos intermediátov a regeneráciu kofaktorov. Realizácia týchto *in vivo* podmienok

Tabuľka 1. Produkcia aromatických látok pomocou enzýmov.
Table 1. Flavour matters production by means of enzymes.

ENZÝM ¹	SUBSTRÁT ²	PRODUKT ³	LITERATÚRA ⁴
lipáza z <i>Candida cylindracea</i>	nižšie mastné kyseliny + nižšie alkoholy	estery	[1]
lipáza z <i>Mucor miehei</i>	kyselina maslová + geraniol	geranylbutyrát	[2]
lipáza z <i>Candida lipolytica</i>	D,L-mentol + kyselina laurová	L-mentyllaurát	[3]
prasačia pankreatická lipáza	kyselina maslová + butanol	butylbutyrát	[4]
alkoholdehydrogenáza/NAD ⁺	etanol	acetaldehyd	[5]
alkoholdehydrogenáza/NAD ⁺	benzylalkohol	benzaldehyd	[6]
rastlinná lipoxigenáza a hydroperoxidlyáza	kyselina linolová kyselina linolénová	hexanol hexenaly	[7]
kvasničná 5' fosfodiesteráza	mikrobiálna RNA	5'nukleotidy	[8]

1 - Enzyme, 2 - Substratum, 3 - Product, 4 - Literature.

s jednotlivými izolovanými enzýmami by bola ťažko zvládnuteľná, preto biotechnologická produkcia komplexnejších aróm býva založená na využití enzýmovej aktivity intaktných buniek.

Mikroorganizmy ako producenti aróm

Mikrobiálne bunky v intaktnej podobe môžeme považovať za veľmi prirodzenú formu imobilizácie enzýmov. Empirické mikrobiálne biotechnológie boli používané odpradáva pri výrobe potravín a nápojov na zlepšenie ich stráviteľnosti, trvanlivosti, ale aj vône a chuti (pivo, víno, kvasená zelenina, orientálne fermentované potraviny). Modernými analytickými metódami bolo dokázané, že mikroorganizmy sú schopné produkovať *de novo* všetky významné triedy aromatických látok (tab.2).

Jednou z najdôležitejších skupín vonných látok sú estery prchavých mastných kyselín, ktoré sa široko využívajú v potravinárskom priemysle ako zložky ovocných aromatických kómpozícií. Pre potreby potravinárskeho priemyslu sú vyrábané hlavne chemickou syntézou, prípadne izoláciou z prírodných materiálov. Produkcia týchto esterov bola zistená tiež v niektorých druhoch mikroorganizmov, hlavne vlákňitých húb (rody *Geotrichum*, *Ceratomyces*, *Cladosporium*), ale aj v mliečnych baktériách a pseudomonádach.

Laktóny sú vo všeobecnosti veľmi príjemné a intenzívne voňajúce látky, ktoré sú bohato zastúpené v prírode. Boli izolované zo všetkých hlavných druhov potravín ako sú zelenina, ovocie, orechy, mäso, mliečne a pekárenské výrobky. Ich aróma je opisovaná ako ovocná, kokosová, sladká, maslová alebo orechová. Sú vyrábané väčšinou chemicky, ale použitie mikroorganizmov prináša výhody hlavne pre možnosť produkcie opticky aktívnych foriem. Typickými producentmi sú z vlákňitých húb napr. druhy *Polyporus durus*, *Tyromyces sambucus*, *Monilia fructicola*, z kvasiniek *Sporobolomyces odorus* a *Pityrosporum ovale*.

Terpény sú látky tvoriace hlavnú zložku éterických olejov, pričom sú zodpovedné za ich typickú vôňu. Skladajú sa z izoprénových jednotiek a môžu byť cyklické, acyklické, nasýtené, nenasýtené, oxidované atď. K mikroorganizmom produkujúcim terpény patria vlákňité huby (hlavne rod *Ceratomyces*), avšak ich tvorba bola dokázaná aj u niektorých druhov kvasiniek (*Kluyveromyces lactis*, *Ambrosiozyma monospora*, *Eremothecium ashbyi*).

Pyrazíny sú heterocyklické, dusík obsahujúce zlúčeniny, ktoré dodávajú charakteristickú "pečenú" alebo orechovú vôňu tepelne spracovaným potra-

Tabuľka 2. Príklady *de novo* produkcie aromatických látok mikroorganizmami.
Table 2. Instances of *de novo* production of flavour matters by microorganisms.

MIKROORGANIZMUS ¹	PRODUKOVANÉ LÁTKY ²	LITERATÚRA ³
<i>Geotrichum penicillatum</i> ATCC 42397	etyl-2-metylbutyrát, etyl-3-metylbutyrát, etylizobutyrate, etylbutyrát	[11]
<i>Polyporus durus</i>	4-butanolid, 4-pentanolid, 3-pentén-4-olid, 4-hexanolid, 2-hexén-4-olid, 5-hexanolid, 5-hexén-4-olid, 4-heptanolid, 2-heptén-4-olid, 4-oktanolid, 2-,5-én-6-oktén-4-olid, 2-nonén- 4-olid, 2-dekén-4-olid, 4-dekanolid	[12]
<i>Agaricus bisporus</i>	3-metylbutanal, 3-oktanón, 1-oktén-3-ón, 3-oktanol, 1-oktén-3-ol, furfural, benzaldehyd, benzylalkohol, fenylacetaldehyd	[13]
<i>Ceratocystis maniliformis</i>	3-metylbutylacetát, geraniol, citrónelol, nerol, linalol, α -terpineol, geranial, neral, citroneyl- acetát, geranylacetát	[14]
<i>Bjerkandera adusta</i>	anizaldehyd, veratraldehyd, veratrol	[15]
<i>Kluyveromyces lactis</i>	citrónelol, linalol, geraniol	[16]
<i>Pseudomonas fragi</i>	etylbutyrát, 3-metylbutylacetát, etylhexanoát, etyl-2-hexenoát, etylkrotonát, etyl-2- metylhexenoát	[17]
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	tetrametylpyrazín	[18]
<i>Clostridium butyricum</i>	kyselina maslová	[19]
<i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>diacetylactis</i>	diacetyl	[20]

1 - Microorganism, 2 - Produced matters, 3 - Literature.

vinám ako sú kakaové bôby, káva, pražené orechy, pekárenské a mäsové výrobky. Pyrazíny sa v týchto potravinách tvoria v procese neenzýmového hnednutia. Boli tiež izolované z niektorých druhov zeleniny. Pyrazíny môžu byť tvorené takisto niektorými druhmi mikroorganizmov. Napríklad baktérie *Corynebacterium glutamicum* dokážu za 5 dní naprodukovať 3 g pyrazínov na 1 liter fermentačného média.

Až na niektoré výnimky sú vyššie uvádzané látky produkované za bežných podmienok vo veľmi malých množstvách (rádovo mg.l⁻¹). Výberom produkčného kmeňa, jeho mutačným šľachtením a optimalizáciou kultivačných podmienok sa však dajú tieto nízke výťažky rapídne zvýšiť. Napríklad produkcia diacetylmutovaným kmeňom *Streptomyces lactis* var. *diacetyl-lactis* sa zvýšila oproti parentálnemu typu takmer päťnásobne (z pôvodných 30 mg.l⁻¹ na 140 mg.l⁻¹ [21]). V inom prípade sa po pridaní lipofilného

polystyrénového adsorbenta XAD-2 do kultivačného média zvýšila produkcia terpenov vláknitou hubou *Ceratocystis variispora* viac ako šesťnásobne (z 35 mg.l⁻¹ na 220 mg.l⁻¹) [22]. Produkčný kmeň môže byť získaný zo zbierok na základe informácií dostupných z literatúry, alebo môže byť izolovaný z prírody pomocou selektívnych skríningových techník, kedy ide o cieľenú aplikáciu špecifických postupov na detekciu a izoláciu mikroorganizmu schopného produkovať požadovaný metabolit. Pri identifikácii a charakterizácii izolátov je potrebné sledovať také vlastnosti ako je produkcia žiadaného metabolitu, patogénnosť pre rastliny, zvieratá alebo človeka a špeciálne požiadavky na úchovu. Mikroorganizmus použiteľný v priemyselnom meradle by mal spĺňať také vlastnosti, akými sú genetická stabilita, konštantná produkčná schopnosť, prijateľná rastová rýchlosť, odolnosť voči kontaminácii a minimálna produkcia nežiadúcich látok.

Okrem kompletnej de novo syntézy môžu mikroorganizmy katalyzovať špecifickú konverziu prekursora pridávaného do kultivačného média (tab.3).

Výborným substrátom pre biokonverzie sú terpeny. Mikroorganizmy môžu byť využité jednak na transformáciu dostupných a lacných terpenov na vôňovo atraktívnejšie deriváty (z α -pinénu na L-karvón), alebo na optické rozdelenie racemických zmesí chemicky syntetizovaných terpenov (mentol).

Tabuľka 3. Príklady tvorby aromatických látok mikrobiálnymi transformáciami.
Table 3. Instances of flavour matters creation by microbial transformations.

MIKROORGANIZMUS ¹	PREKURZOR ²	PRODUKT ³	LITERATÚRA ⁴
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	α -, β -pinén	L-karvón	[23]
<i>Bacillus subtilis</i>	D,L-mentylsukcinát	L-mentol	[24]
<i>Hansenula anomala</i>	etanol	etylacetát	[25]
<i>Candida utilis</i>	etanol	acetaldehyd	[26]
<i>Candida lipolytica</i>	ricínový olej	4-dekalaktón	[23]
<i>Aspergillus niger</i>	izoeugenol	vanilín	[27]
<i>Aspergillus niger</i>	α -pinén	verbenol, verbenón, sobrerol	[28]
<i>Geotrichum fragrans</i>	izoleucín	etylizobutyrate, etyl-2-metylbutyrát, etylglát, izobutylvalerát	[29]
<i>Trichoderma viridae</i>	kyselina oktanová	2-heptenón	[30]
<i>Pseudomonas sp.</i>	kyselina škoricová	acetofenón	[31]

1 - Microorganism, 2 - Precursor, 3 - Product, 4 - Literature.

Niektoré kvasinky a vláknité huby (napr. *Candida lipolytica*, *Candida petrophylum*, *Aspergillus oryzae*) sú zasa schopné degradovať kyselinu ricínolejovú, ktorá predstavuje až 87 % podiel mastných kyselín ricínového oleja, na kyselinu 4-hydroxydekánovú. Táto potom pri zníženom pH laktonizuje na 4-dekalaktón, látku poskytujúcu broskyňovú arómu.

C₅-C₁₁ 2-alkanóny sú látky zodpovedné za typickú arómu syrov typu Roquefort. Vznikajú konverziou tukov, olejov alebo mastných kyselín plesňou *Penicillium roqueforti*, prípadne niektorými inými vláknitými hubami. V procese β -oxidácie sa tvoria β -ketomastné kyseliny, z ktorých po dekarboxylácii vznikajú príslušné 2-alkanóny. Výsledný koncentrát môže byť použitý napr. na aromatizáciu syrov, v ktorých došlo k strate arómy počas tepelného opracovania.

S ohľadom na obrovský počet a variabilitu mikrobiálnych kmeňov, ich metabolickú flexibilitu pri zmenených podmienkach a značné bioinžinierske skúsenosti pri práci s nimi, dá sa predpokladať, že mikroorganizmy zohrajú v budúcnosti dôležitú úlohu pri produkcii aromatických látok.

Produkcia aromatických látok rastlinnými bunkami

Rastlinné bunky kultivované *in vitro* reprezentujú najslubnejší bunkový systém pre prípravu aromatických látok. Schopnosť kultúr rastlinných buniek produkovať sekundárne metabolity (vrátane aróm) bola popísaná viacerými autormi (tab.4).

Už mnoho rokov je známe, že kalusové alebo suspenzné bunkové kultúry, pozostávajúce zo somatických buniek s komplexným genómom, sú schopné uskutočňovať reakcie primárneho metabolizmu. Avšak produkty sekundárneho metabolizmu, vrátane aromatických látok, takéto kultúry vo väčšine prípadov nie sú schopné syntetizovať napriek tomu, že na to majú genetické predpoklady. Táto strata schopnosti produkovať sekundárne metabolity je pripisovaná absencii diferencovaných buniek v kultúrach. Iným vysvetlením je strata aktivity jedného alebo viacerých enzýmov dráh sekundárneho metabolizmu [33]. A nakoniec je tu možnosť, že v takýchto bunkách dochádza k degradácii vzniknutého produktu *in situ* [34].

Samozrejme, že absencia koncového produktu určitej metabolickej dráhy nevyklučuje syntetickú aktivitu jedného kroku tejto dráhy. Preto sa suspenzné kultúry najčastejšie používajú pri uskutočňovaní špecifických transformácií. Hlavné kofaktor-dependentné konverzie terpenov v suspenzných kultú-

Tabuľka 4. Produkcia aromatických látok kalusovými, prípadne suspenznými kultúrami rastlín [32].

Table 4. Flavour matters production by calluse or suspense culture of plants [32].

RASTLINNÝ DRUH ¹	PRODUKTY ²	TYP KULTÚRY ^{*3}
<i>Perilla frutescens</i>	limonén, linalol, perillaketón ai.	k/s
<i>Citrus lemon</i>	β-pinén, myrcén	k
<i>Malus sylvestris</i>	estery kyseliny maslovej	s
<i>Vitis vinifera</i>	α-terpineol, nerol ai.	s
<i>Allium cepa</i>	sírne zlúčeniny	k
<i>Pipminella anisum</i>	anetol	k
<i>Ocimum basilicum</i>	estragol, tymol ai.	k/s
<i>Thuja occidentalis</i>	γ-tujaplicín, terpinén-4-ol ai.	k
<i>Tanacetum vulgare</i>	sabinén, tujón ai.	k
<i>Medicago sativa</i>	3-(Z)-hexenal	k
<i>Andrographis paniculata</i>	farnezol, γ-bisabolén	s

* k - kalusová, s - suspenzná.

1 - Plant type, 2 - Products, 3 - Type of culture: * k - calluse, s - suspense.

Tabuľka 5. Biotransformácie terpenoidných substrátov rastlinnými bunkovými kultúrami [32].

Table 5. Biotransformations of terpene substrates by plant cell cultures [32].

RASTLINNÝ DRUH ¹	SUBSTRÁT ²	PRODUKT ³
<i>Cannabis sativa</i>	(E)-, (Z)-verbenol	verbenón
<i>Nicotiana tabacum</i>	borneol	gáfor
<i>Mentha sp.</i>	pulegón	izomentón
<i>Mentha sp.</i>	mentón	izomentol
<i>Vitis vinifera</i>	geranial, neral	geraniol, nerol
<i>Melissa sp.</i>	citronelal	citronelol
<i>Citrus sp.</i>	valencén	nootkatón

1 - Plant type, 2 - Substratum, 3 - Product.

nach aromatických rastlín môžu byť uskutočnené vo vysokých výťažkoch so zanedbateľným množstvom vedľajších produktov (tab.5).

Zdá sa, že akumulácia väčších množstiev aromatických látok kultúrami rastlinných buniek zostane ešte určitý čas iba vedeckým problémom. Aby sa však rastlinná biotechnológia mohla stať konkurencieschopným zdrojom arómy, bude potrebné vynaložiť úsilie odborníkov z oblasti pletivových kultúr, biochemikov, chemikov a bioinžinierov.

Technologické aspekty

Pre priemyselné využitie mikrobiálnych, prípadne rastlinných buniek (enzýmy sa vo väčšom meradle používajú ojedinele) na produkciu aromatických látok treba technologické zariadenia, ktoré zohľadňujú biochemické, fyziologické a morfológické špecifiká produkčných buniek a vlastnosti produktov.

Väčšina bunkových systémov produkujúcich arómu je kyslík-dependentná. Preto v týchto procesoch nachádzajú uplatnenie bioreaktory s rôznym spôsobom miešania a vzdušnenia. Priemyselné procesy, ktoré sú založené na kultivácii jednoduchých jednobunkových organizmov (predovšetkým baktérií) vo všeobecnosti využívajú reaktory, v ktorých sa zabezpečuje aerácia miešadlom alebo čerpadlom (napr. mechanicky miešaný reaktor kotlového typu, jet-loop reaktor). Reaktory s turbulentnou vrstvou (airlift reaktor, airlift loop reaktor) sa využívajú pri kvasinkách. Pre vyššie huby sú vhodné okrem submerzných aj povrchové kultivácie. Reaktory používané na takéto účely sú považované za menej efektívne vďaka limitovanému difúznemu prenosu kyslíka, substrátu i produktu. Niektoré výsledky však naznačujú, že práve pri týchto podmienkach dochádza k zvýšenej produkcii sekundárnych metabolitov [34].

V bioprocessoch využívajúcich suspendované rastlinné bunky je najdôležitejšia otázka ochrany proti kontaminácii mikroorganizmami. Navrhnutých bolo niekoľko typov bioreaktorov, napr. jednoduchý miešateľný vsádzkový reaktor a modifikovaný airlift reaktor. Zdá sa však, že najlepšie sa osvedčujú reaktory s imobilizovanými bunkami a zariadenia s rotujúcim filtrom [35]. Výhoda prvého z nich spočíva v ochrane rastlinných buniek pred strižnými silami v dôsledku ich zakomponovania do gélového matrixu (Ca-alginát, polyakrylamid, agaróza). Imobilizované bunky majú respiračné a biokonverzné rýchlosti veľmi podobné bunkám v suspenznej kultúre. Dôležité je

tiež, že imobilizácia buniek umožňuje uskutočnenie kontinuálnej kultivácie pri zriedľovacích rýchlostiach vyšších ako je maximálna rýchlosť rastu kultúry. Reaktor s rotujúcim filtrom bol pôvodne vyvinutý pre kultiváciu cicavčích buniek. Filter umožňuje odstraňovať opotrebované médium a jeho náhradu čerstvým bez vymývania bunkovej hmoty. Rotácia filtra zabraňuje zanášaniu jeho pórov, avšak je dosť pomalá na to, aby sa v nádobe nevytvárali strižné sily. Medzi nevyriešené problémy pri kultivácii rastlinných buniek patrí limitácia substrátového transportu, kontrola teploty v osvetlených kultúrach, efekty kyslíkového šoku počas inokulácie a niektoré ďalšie.

Izolácia naprodukovaných aromatických látok z fermentačného média patrí k najdôležitejším a často ekonomicky najnáročnejším operáciám výrobného procesu. Zvolená technika závisí od toho, či bunka žiadaný metabolit akumuluje intracelulárne, alebo ho vylučuje do prostredia. Prvý prípad je pomerne zriedkavý. Vyskytuje sa napríklad pri produkcii 1-oktén-3-olu hubou *Agaricus bisporus* [36]. Jednoduchou separáciou (centrifugácia, filtrácia) a vysušením biomasy sa získa preparát s intenzívnou hubovou arómou.

Pri produkcii aróm do extracelulárneho priestoru je už izolácia náročnejšia. Treba si totiž uvedomiť, že koncentrácia týchto látok dosahuje v lepších prípadoch niekoľko gramov na liter fermentačného média. Niekedy nie je potrebné získavať aromatické látky v čistej forme. Tak je to napr. v prípade produkcie 2-alkanónov (roquefortová aróma) pomocou *Penicillium roqueforti*. Fermentačné médium sa pasterizuje a po pridaní určitého množstva kukuričného škrobu sa vysuší v rozprašovacej sušiarňi. Takto vzniknutý preparát sa dá potom využiť pri výrobe syrov [37].

Vo väčšine prípadov je potrebné izolovať aromatické látky v čistej forme (hlavne vzhľadom na spôsob ich aplikácie). Pri zlúčeninách s nízkym bodom varu sa s výhodou používa destilácia s vodnou parou, prípadne za zníženého tlaku (diacetyl, acetaldehyd, alkoholy). Keďže väčšina aromatických látok sú nepolárne, hydrofóbne zlúčeniny, najvyužívanejšou separačnou technikou je extrakcia organickým rozpúšťadlom.

Veľmi výhodným sa javí spojenie produkčnej a separačnej fázy do jedného kroku. Pribežným odťahovaním produktu počas fermentačného procesu dochádza k posunu rovnováhy v prospech jeho ďalšej tvorby, čím sa v konečnom dôsledku dosiahne zvýšenie výťažku. Ako príklad môžeme uviesť on-line extrakciu kyseliny maslovej s využitím kvapalných membrán počas kontinuálnej fermentácie kmeňom *Clostridium sp.* [38].

Výrobné a komerčné možnosti

V prírodných zdrojoch bolo identifikovaných už 4300 aromatických látok, pričom sa predpokladá, že ich existuje 5 až 10 tisíc. Z 3000 vyrábaných aromatických zlúčenín iba asi 400 dosahuje ročnú produkciu vyššiu ako 1 tona. Je známych okolo 3000 rastlinných esenciálnych olejov, z ktorých je 150-200 komerčne významných. Svetový trh aromatických látok má ročný obrat asi 6 miliárd dolárov s ročným nárastom 6 %. Potravinárske arómy reprezentujú 10-15 % hmotnosti a 25 % hodnoty svetového trhu potravinárskych aditív [39].

Z hľadiska ceny biotechnologicky vyrábaných aromatických prísad je dôležité, či sú tieto legislatívou považované za prírodné, alebo nie. Trhová cena prírodných aromatických látok je totiž oveľa vyššia ako umelých (tab.6). V Spojených štátoch definuje CFR (Code of Federal Regulations) prírodné aromatické látky ako éterické oleje, esencie, extrakty, proteínové hydrolyzáty, destiláty alebo iné produkty pečenia, zahrievania, enzymolýzy, ktoré obsahujú aromatický základ odvodený od korenín, ovocia a ovocných štiav, zeleniny a zeleninových štiav, jedlých kvasníc, rastlín, kôry, koreňov, bylín, kvetov, listov alebo podobného materiálu, mäsa, rýb, hydiny, vajec, mliečnych výrobkov alebo ich fermentačných produktov. Táto definícia teda zahŕňa aj produkty, ktoré vznikli pôsobením živých buniek alebo enzýmov, pričom sa ale musí vychádzať z prírodnej suroviny a koncový produkt musí byť takisto identický s látkou, ktorá bola už nájdená v prírode.

Tabuľka 6. Porovnanie cien niektorých ekonomicky významných prírodných aróm a ich syntetických analógov [40,41].

Table 6. Cost comparison of some economically significant natural aromas and their sythetic analogues [40,41].

ARÓMA	CENA ¹ [\$/kg]	
	PRÍRODNÁ ²	SYNTETICKÁ ³
Vanilkový extrakt	50*	5*
mentol	29	11
etylbutyrát	180	4
4-dekalaktón	6000	150

* - \$/galón

1 - Price, 2 - Natural aroma, 3 - Synthetic aroma.

Aj keď bolo doteraz publikované veľké množstvo prác zaoberajúcich sa biotechnologickou produkciou aromatických látok, počet priemyselných aplikácií je zatiaľ obmedzený. Dôvodom sú jednak nízke výťažky produktov, jednak časovo zdĺhavé udeľovanie štatútu prírodnej aromatickej látky. Ako príklad priemyselného využitia možno spomenúť firmu Fritzsche Dodge & Olcott (dcérska spoločnosť nemeckého koncernu BASF K&F Corp.), ktorá začala s výrobou 4-dekalaktónu z ricínového oleja pomocou kvasinky *Yarrowia lipolytica*, pričom koncentrácia produktu vo fermentačnom médiu dosahuje 6 g.l^{-1} [40].

Britská firma Unilever vyrába (R)-5-dodekalaktón transformáciou kyseliny 5-ketododekánovej pomocou pekárskeho kvasiniek *Saccharomyces cerevisiae*. Proces prebieha v 30 000 l fermentore a produkovaný laktón sa pridáva do margarínov ako maslová aróma [40].

Americká spoločnosť Hercules Inc. ponúka prírodnú kyselinu maslovú produkovanú baktériou *Clostridium butyricum* z glukózy. Táto kyselina sa používa na aromatizovanie niektorých druhov syrov [42].

Firma Stattford Speciality Ingredients (Veľká Británia) vyrába 2-alkanóny z kokosového oleja pomocou kmeňa *Aspergillus niger*. Počas fermentácie na tuhom živnom médiu dochádza ku konverzii asi 40 % kokosového oleja, pričom 60 % výsledného produktu tvorí 2-undekanón [40].

Záver

Výskum v oblasti biotechnologických systémov uplatňujúcich sa pri produkcii aróm zaznamenal v posledných rokoch výrazný pokrok a všetko nasvedčuje tomu, že sa do tejto oblasti sústreďí ešte väčší výskumno-vývojový potenciál. Tento smer si našiel miesto aj na našom pracovisku, pričom z vedeckého hľadiska je kladený dôraz na štúdium regulácie membránového transportu a enzýmovej katalýzy z hľadiska nadprodukcie aromatických mikrobiálnych metabolitov a aplikačné zámery sú orientované na vývoj biotechnologickej produkcie kyseliny maslovej a jej esterov a na mikrobiálne transformácie terpenoidných zlúčenín.

Literatúra

1. WELSH, F.W. - ROSS, E.W. - DAWSON, K.H., *J. Food Sci.*, 55, 1990, s.1679.
2. MARLOT, C. - LANDRAND, G. - TRIANTAPHYLIDES, C. - BARATTI, J., *Biotechnol. Lett.*, 7, 1985, s.647.
3. LANGRAND, B. - SECCHI, M. - BUONO, G. - BARATTI, J. - TRIANTAPHYLIDES, C., *Tetrahed. Lett.*, 26, 1985, s.1857.
4. MURRAY, W.D. - DUFF, S.I.B. - LANTHIER, P.H. - ARMSTRONG, D.W. - WELSH, F.W. - WILLIAMS, R.E., *Natl. Res. Counc. Can. Publ.* 27800, 1987.
5. RAYMOND, W.R., *U.S. Pat.* 4481 292, 1984.
6. DUFF, S.J.B. - MURRAY, W.D., *Biotechnol. Bioeng.*, 34, 1989, s.153.
7. GROSCH, W., *Lebensmittelchem. Gerichth. Chem.*, 41, 1987, s.40.
8. OGATA, K. - NAKAO, Y. - IGARASHI, S. - OMURA, E. - SUGINO, Y. - KONEDA, M. - SUHARA, I., *Agr. Biol. Chem.*, 27, 1963, s.110.
9. KAMINSKA, J. - MARKOWICZ, L. - STOŁOWSKA, J. - GÓRA, J., *Enzyme Microb. Technol.*, 11, 1989, s.436.
10. LEGOY, M.D. - KIM, H.S. - THOMAS, D., *Process Biochem.*, 20, 1985, s.145.
11. JANSSENS, L. - De POOTER, H.L. - VANDAMME, E.J. - SCHAMP, N.M., In: *Bioflavour'87*, Schreier, P. (Ed.), Berlin, 1988, s.453.
12. BERGER, R.G. - NEUHÄUSER, K. - DRAWERT, F., *Z., Naturforsch.*, 41c, 1986, s.963.
13. PICARDI, S.M. - ISSENBERG, P., *J. Agric. Foo Chem.*, 21, 1973, s.959.
14. LANZA, E. - PALMER, J.K., *Phytochemistry*, 16, 1977, s.1555.
15. BERGER, R.G. - DRAWERT, F. - HÄDRICH, S., In: *Bioflavour'87*, Schreier, P. (Ed.), Berlin, 1988, s.415.
16. DRAWERT, F. - BARTON, H., *J. Agric. Food Chem.*, 20, 1978, s.765.
17. RAYMOND, Y. - MORIN, A. - CORMIER, F. - CHAMPAGNE, C.P. - Du BEAU, H., *Biotechnol. Lett.*, 12, 1990, s.931.
18. DEMAİN, A.L. - JACKSON, M. - TRENNER, N.R., *J. Bacteriol.*, 94, 1967, s.323.
19. MICHEL - SAVIN, D. - MARCHAL, R. - VANDECASTEELE, J.P., *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 32, 1990, s.387.
20. MIZUNOW, G. - JEZESKI, J.J., *J. Dairy Sci.*, 44, 1961, s.579.
21. KUILA, R.K. - RANGANATHAN, B., *J. Dairy Sci.*, 61, 1978, s.379.
22. SCHINDLER, J. - SCHMID, R.D., *Process Biochem.*, 17, 1982, s.2.
23. GATFIELD, I.L., *Food Technol.*, 42, 1988, s.110.
24. OMATA, T. - IWAMOTO, N. - KIMURA, T. - TANAKA, A. - FUKUJI, S., *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 1981, s.199.
25. WELSH, F.W. - MURRAY, W.D. - WILLIAMS, R.E., *Crit. Rev. Biotechnol.*, 9, 1989, s.105.
26. ARMSTRONG, D.W. - YAMAZAKI, H., *Trends Biotechnol.*, 4, 1986, s.264.
27. ABRAHAM, W.-R. - ARFMANN, H.-A. - STUMPF, B. - WASHAUSEN, P. - KIESLICH, K., In: *Bioflavour'87*, Schreier, P. (Ed.), Berlin, 1988, s.399.
28. PREMA, B.R. - BHATTACHARYYA, P.K., *Appl. Microbiol.*, 10, 1962, s.524.
29. FARBOOD, M.I. - MORRIS, J.A. - SEITZ, E.W., *Eur. Pat. Appl. EP* 170 243, 1986.
30. LARROCHE, C. - TALLU, B. - GROS, J.-B., *J. Ind. Microbiol.*, 3, 1988, s.1.
31. HILTON, M.D. - CAIN, W.J., *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 1990, s.623.
32. DRAWERT, F. - BERGER, R.G., In: *Symposium on Biotechnology*, EBC, Nutfield Surrey, 1984, s.128.
33. BOHM, H., *Plant Tissue Culture*, Fujiwara, A. (Ed.), Tokyo, 1982, s.327.
34. DRAWERT, F., In: *Bioflavour'87*, Schreier, P. (Ed.), Berlin, 1988, s.3.
35. WHITAKER, R.J. - EVANS, D.A., *Food Technol.*, 41, 1987, s.86.
36. DIJKSTRA, F.Y. - WIKEN, T.O., *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 160, 1976, s.263.

37. VAN GRINSVEN, A.M. - PETERS, A.L.J. - ROOS, R. - WIEG, A.J., Eur. Pat. 410 499, 1991.
38. NUCHNOI, P. - NISHIO, N. - NAGAI, S., J. Ferment. Bioeng., 67, 1989, s.195.
39. CHEETHAM, P.S.J., Opportunities in Biotransformation. Copping, L.G. (Ed.), London, 1990, s.177.
40. JANSSENS, L. - DE POOTER, H.L. - SCHAMP, N.M. - VANDAMME, E.J., Process Biochem., 27, 1992, s.195.
41. NEWELL, N. - GORDON, S.G., Biotechnology in Food Processing, Park Ridge, 1986, s.80.
42. DZIEZAK, J.D., Food Technol, 40, 1986, s.100.

Do redakcie došlo 12.2.1993.

Biotechnological production of flavour matters

Summary

The paper gives a survey about possibilities of biotechnologic processes utilization in flavour matters production for food industry. The main attention is given to three basic biotechnologic systems used for this purpose, namely enzymes, microorganisms and plant cell or callus cultures. Beside it technological and commerce aspects of flavour matters biotechnological production are discussed. Such preparation of flavours should may be suitable compromise between chemical synthesis and isolation from natural sources. Its advantage is the independence to climatic conditions and strong stereospecificity of enzyme reactions. The reason why the biotechnologies are not widely applied in flavour matters production are low yields of existing processes. But systematic study of over-production possibilities brings requested positive results.