

LIMONÉN A JEHO OXIDOVANÉ DERIVÁTY: VLASTNOSTI, APLIKÁCIE A BIOTECHNOLOGICKÁ PRODUKCIA

**KATARÍNA KANIAKOVÁ, HELENA HRONSKÁ,
DOMINIKA ŠILHÁROVÁ a MICHAL
ROSENBERG**

Ústav biotechnológie, Fakulta chemickej a potravinárskej
technológie, Slovenská technická univerzita, Radlinského
9, 812 37 Bratislava, Slovenská republika
helena.hronska@stuba.sk

Došlo 26.4.21, prijaté 10.1.22.

Kľúčové slová: limonén, oxidované deriváty, aplikácie,
biotransformácia, biologická aktivita

● <https://doi.org/10.54779/chl20220301>

Obsah

1. Úvod
2. Limonén
 - 2.1. Vlastnosti
 - 2.2. Aplikácie
 - 2.3. Zdroje limonénu
 - 2.4. Biotechnologická produkcia limonénu
3. Oxidované deriváty limonénu
 - 3.1. Perilylalkohol a kyselina perilová
 - 3.2. Karveol a karvón
 - 3.3. Limonén-1,2-epoxid a limonén-1,2-diol
 - 3.4. α -Terpineol
 - 3.5. Izopiperitenol a limonén-8,9-epoxid
4. Záver

1. Úvod

Jedným z najčastejšie sa vyskytujúcich monoterpénov v prírode je cyklický monoterpén limonén. Existuje v dvoch enantiomérnych formách, *R*-(+)- a *S*-(-)-limonén. Spomedzi nich sa častejšie vyskytuje (+)-limonén, ktorý je majoritnou zložkou citrusových esenciálnych olejov. V súčasnosti sa získava ako vedľajší produkt pri výrobe citrusových štiav. Jeho ročná produkcia dosahuje 60 000 t a predpokladá sa, že do roku 2023 narastie na viac ako 65 000 t/rok (cit.^{1,2}).

Limonén je atraktívnym substrátom pre produkciu cenných terpenoidných zlúčenín, akými sú napr. α -terpineol, perilylalkohol, karveol, karvón a mentol. Regiošpecifické vnesenie hydroxylovej alebo karbonylovej skupiny do štruktúry limonénu pomocou chemických me-

tód je veľmi náročné. Aj preto sa biotransformáciami (+)-limonénu vedci zaoberajú už od šesťdesiatych rokov minulého storočia. Odvtedy bolo identifikované veľké množstvo mikroorganizmov schopných transformovať limonén na enantioméne čisté produkty s aplikačným alebo syntetickým potenciálom v rôznych priemyselných odvetviach.

2. Limonén

2.1. Vlastnosti

Limonén je bezfarebná až do žltá sfarbená, olejovitá kvapalina s nízkou rozpustnosťou vo vode, ktorá je americkou Správou potravín a liečiv (Food and Drug Administration, FDA) všeobecne považovaná za bezpečnú (Generally Recognized as Safe, GRAS)³. Vyskytuje sa v dvoch enantiomérnych formách, (*R*)- a (*S*)-limonén. Pravotočivý izomér, (*R*)-(+)-limonén, má typickú pomarančovú arómu a vyskytuje sa v rôznych rastlinách, najmä v kôre plodov *Citrus spp.*, akými sú napr. pomaranče, citróny a mandarínky. Druhý izomér, (*S*)-(-)-limonén sa vyznačuje terpentínovou vôňou a je prítomný v esenciálnych olejoch z rastlín rodu *Mentha spp.* a *Pinus spp.*^{4,5}. Okrem toho existuje limonén aj vo forme racemickej zmesi, označovanej ako dipentén⁶. Základné fyzikálne a chemické vlastnosti izomérov limonénu sú zhrnuté v tab. I.

Limonén je málo toxický pri orálnom požití, nie je genotoxický ani teratogénny⁷. Čistý limonén pri kontakte s pokožkou je iba minimálne dráždivý, avšak jeho alergénosť súvisí s procesom jeho oxidácie. Oxidatívne produkty – hydroperoxydy a karvón sú silné kontaktné alergény⁸.

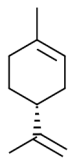
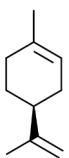
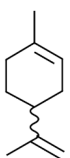
2.2. Aplikácie

(+)-Limonén je bežne využívaný v potravinárstve ako aróma a ochucovadlo v cukrovinkách, žuvačkách, nealko nápojoch či zmrzlínach. Je tiež jednou z najčastejšie používaných aromatických látok v kozmetike. Bežne sa vyskytuje ako súčasť mydiel, sprchových gélov, šampónov, kondicionérov a parfúmov⁴. Je tiež súčasťou rôznych čistiacich prostriedkov a osviežovačov vzduchu⁹.

Limonén bol jednou z prvých schválených prírodných prípravkov v pesticídoch (v USA bol registrovaný už v roku 1958). Insekticídne vlastnosti boli popísané napr. voči hmyzu z nadčelade *Coccoidea*¹⁰. U parazitického prvoka spôsobujúceho maláriu, *Plasmodium falciparum*, limonén inhibuje izoprenyláciu proteínov a zastavuje tak jeho rast¹¹. Nízka orálna a dermálna toxicita voči cicavcom umožnila jeho použitie v prípravkoch proti kliešťom a blchám, aj v repelentoch proti hmyzu⁵. Limonén vykazu-

Tabuľka I

Vlastnosti izomérov limonénu^{61–65}

Vlastnosť	(+)-Limonén	(-)-Limonén	Racemický limonén
Štruktúra			
Iné používané názvy	D-limonén (<i>R</i>)-limonén	L-limonén (<i>S</i>)-limonén	dipentén <i>rac</i> -limonén
IUPAC názov	(<i>R</i>)-1-metyl-4-prop-1-én-2-yl- -cyklohexén	(<i>S</i>)-1-metyl-4-prop-1-én-2-yl- -cyklohexén	1-metyl-4-prop-1-én-2-yl- -cyklohexén
CAS číslo	5989-27-5	5989-54-8	138-86-3
Molekulová hmotnosť, g mol ⁻¹	136,23	136,23	136,23
Teplota topenia, °C	-74,0 (cit. ⁶²)	-74,0 (cit. ⁶³)	-86,4 (cit. ⁶⁴)
Teplota varu, °C	177,0 (cit. ⁶²)	177,0 (cit. ⁶³)	176,0 (cit. ⁶⁴)
Teplota vzplanutia, °C	44,8 (cit. ⁶²)	44,9 (cit. ⁶³)	45,1 (cit. ⁶⁴)
Hustota, g ml ⁻¹ (pri 20 °C)	0,8411	0,8422	0,8402
Tlak pár, Pa (pri 20 °C)	190	190	190
Rozpustnosť vo vode, mg l ⁻¹ (pri 25 °C)	13,8 (cit. ⁶⁵)	–	–
Koeficient prestupu oktanol/ voda, Log K _{OW}	4,23	4,57 (cit. ⁶³)	4,83

je bakteriostatické a baktericídne účinky voči viacerým patogénnym baktériám, ako napr. *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae* a *Listeria monocytogenes*. Toxicita limonénu je pravdepodobne spojená s jeho lipofilitou a ovplyvňuje tak membránový transport a metabolizmus buniek⁶.

Z medicínskeho hľadiska je limonén zaujímavý pre svoje chemoterapeutické a chemopreventívne vlastnosti, ktoré boli popísané voči viacerým druhom nádorových buniek spôsobujúcich napr. rakovinu pľúc, prostaty alebo prsníka¹². (+)-Limonén je súčasťou komerčných výživových doplnkov deklarujúcich podporu metabolizmu a detoxifikáciu organizmu.

V chemickom priemysle predstavuje ekologickú alternatívu k toxickým organickým rozpúšťadlám získavaných z fosílnych palív. Limonén je potenciálnou náhradou za rozpúšťadlá ako napr. hexán, toluén a dichlórmetán⁵.

2.3. Zdroje limonénu

V priemyselnom meradle sa (+)-limonén získava predovšetkým ako vedľajší produkt pri spracovaní odpadu z citrusov. Ročne sa vyprodukuje približne 25–30 miliónov ton pomarančových šupiek ako odpad pri výrobe pomarančových džúsov¹³. Biomasa z citrusov je cenným zdrojom pektínu a dá sa tiež použiť ako substrát na biotechnologickú výrobu etanolu, metánu, alebo kyseliny citrónovej¹⁴. Na to, aby bolo možné biomasu takto využiť,

je nutné z nej najprv odstrániť limonén, ktorý inhibuje mikroorganizmy používané v týchto procesoch¹⁵. Limonén pritom predstavuje až 3,8 % zo sušiny citrusového odpadu¹⁴.

Racemický limonén je možné pripraviť z terpentínu (produkcia 450 t/rok v USA), ale aj pyrolýzou starých pneumatík¹⁵. Takto produkovaný limonén je vhodný iba na technické účely.

Dopyt po limonéne každým rokom narastá, pričom jeho cena je priamo závislá na sezónnej produkcii citrusov a kvality suroviny použitej na extrakciu. Chemicky získaný limonén nie je opticky čistý, a preto ho nemožno označiť kvalitou „food-grade“¹⁶. Z uvedených dôvodov je otázka biotechnologickej prípravy (+)-limonénu veľmi atraktívna. Doposiaľ neboli objavené mikroorganizmy s prirodzenou nadprodukciou limonénu, preto sa štúdium zameriava na metabolické inžinierstvo. Výhodou je jeho enantiošpecifická syntéza a možnosť zakomponovať do biosyntetickej dráhy limonénu aj jeho následnú oxidáciu na jeden z jeho viacerých cenných oxidatívnych derivátov¹⁵.

2.4. Biotechnologická produkcia limonénu

Biosyntéza všetkých terpenov v organizmoch môže prebiehať jednou z dvoch dráh, mevalonátovou (MVA) dráhou alebo metylerytritol-4-fosfátovou (MEP) dráhou. MVA dráha sa vyskytuje zvyčajne u živočíchov,

v kvasinkách, archaebaktériách, a niektorých G⁺ baktériách, zatiaľ čo MEP dráha je prítomná predovšetkým v baktériách¹⁷. Rastliny si syntetizujú terpeny oboma dráhami, pričom MEP dráha prebieha v plastidoch a MVA dráha v cytosole¹⁵. Posledným krokom biosyntézy limonénu u rastlín je reakcia katalyzovaná limonénsyntázou (LS). V závislosti od zdroja sa tvorí zvyčajne iba jeden izomér limonénu. Nakoľko sa tento enzým nevyskytuje v mikroorganizmoch, pri mikrobiálnej produkcii limonénu je nutná jeho heterológna expresia v host'ovskom organizme¹⁵.

Hlavnými problémami mikrobiálnej produkcie limonénu je komplikovaná metabolická a regulačná sústava obmedzujúca tvorbu izoprenoidov a predovšetkým cytotoxicita samotného produktu. Zatiaľ najčastejšie využívaným a najefektívnejším spôsobom je fermentácia s *in situ* extrakciou produktu pomocou organického rozpúšťadla netoxického pre produkčný organizmus¹⁶.

Maximálna mikrobiálna produkcia limonénu ((-)-izomér) bola zatiaľ popísaná v *E. coli* (3,63 g l⁻¹). Ako zdroj uhlíka slúžil glycerol a biosyntéza prebiehala pomocou heterológne exprimovanej MVA dráhy a LS z *Mentha spicata*¹⁸. Na to, aby tento spôsob produkcie limonénu bol schopný konkurovať súčasnému spôsobu výroby limonénu, je nutné, aby produktivita procesu bola minimálne na úrovni 0,7 g l⁻¹ h⁻¹ a špecifický výťažok uhlíka v procese predstavoval minimálne 45 % (cit.²). V súčasnosti maximálna produktivita procesu dosahuje len 0,15 g l⁻¹ h⁻¹ a konverzia uhlíka na produkt predstavuje menej ako 1 % (cit.¹⁸).

Alternatívnou možnosťou biosyntézy limonénu sú enzýmové systémy, avšak vzhľadom na vysokú cenu kofaktorov a purifikovaných enzýmov je priemyselne ekonomicky nevýhodná. Takýto systém navrhli Korman a spol.¹⁹ a pozostával z 27 enzýmov umožňujúcich konver-

ziu glukózy až na limonén, pričom v systéme dochádzalo aj k regenerácii potrebných kofaktorov (ATP a NAD(P)H). Produkcia limonénu dosiahla až 12,5 g l⁻¹ (výťažok 88,4 %), pričom systém bol stabilný po dobu 5 dní pri jednom prídavku glukózy¹⁹.

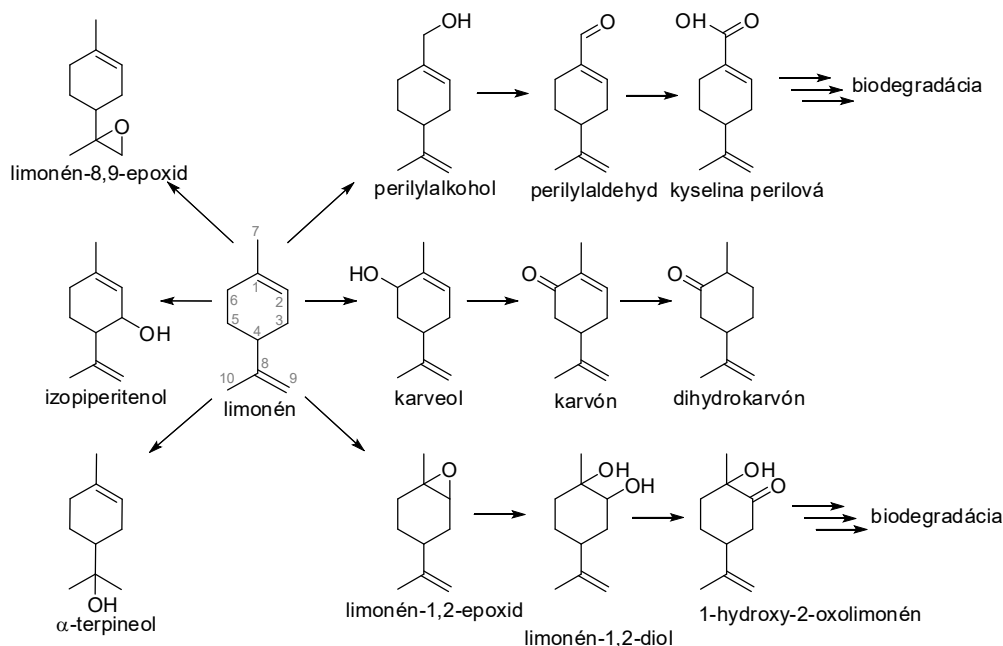
3. Oxidatívne deriváty limonénu

Regiošpecifickou oxidáciou izomérov limonénu je možné získať produkty s vysokou pridanou hodnotou. Ako príklad môžeme uviesť oxidáciu (+)-limonénu na perilylalkohol, karveol, karvón alebo limonén-1,2-diol, ktorých cena preyšuje hodnotu substrátu aj viac ako 10násobne^{20,21}. V literatúre bolo doteraz popísaných 6 základných dráh jeho biotransformácie v mikroorganizmoch (obr. 1).

Vo všeobecnosti katalyzuje prvý krok oxidácie limonénu hydroxyláza alebo monooxygenáza, ktoré majú zvyčajne rôznu špecifitu v závislosti od zdroja/producenta. Pri hľadaní mikrobiálnych producentov sa kladie dôraz na získavanie enantioselektívnych enzýmov, nakoľko rozdielne enantioméry derivátov limonénu môžu mať rozdielne senzorické vlastnosti, ako je to napr. u izomérov karvónu, ktorého (*R*)-izomér má vôňu mäty, zatiaľ čo (*S*)-karvón má rascovú arómu²².

3.1. Perilylalkohol a kyselina perilová

Oxidáciou metylovej skupiny (+)- alebo (-)-limonénu na uhlíku C₇ vzniká príslušný stereoizomér perilylalkoholu, perilylaldehydu a kyseliny perilovej. Perilylalkohol a kyselina perilová sú zaujímavé najmä kvôli svojim chemopreventívnym a chemoterapeutickým vlastnostiam voči viacerým typom rakovinových buniek^{23,24}.



Obr. 1. Mikrobiálne dráhy biotransformácie limonénu

Mikrobiálna transformácia limonénu na kyselinu perilovú zahŕňa jeho oxidáciu v troch krokoch. Najprv nastáva oxidácia limonénu na perilylalkohol pomocou monoxygenázy. Po nej nasleduje dehydrogenácia na perilylaldehyd a nakoniec je aldehyd oxidovaný na kyselinu perilovú pomocou aldehyddehydrogenázy²⁴.

Pri produkcii perilylalkoholu je dôležité použiť mikroorganizmus schopný selektívne oxidovať limonén na uhlíku C₇, pričom nemôže dochádzať k preoxidácii až na kyselinu perilovú. Spomedzi bakteriálnych izolátov degradujúcich *n*-alkány bolo identifikovaných viacero kmeňov schopných tejto regiošpecifickej oxidácie limonénu. Technikami génového inžinierstva boli postupne zvýšené výťažky perilylalkoholu rekombinantných producentov z 2,3 g l⁻¹ u *Pseudomonas putida* GPO12 (cit.²⁵) až na 5,96 g l⁻¹ pri expresnom systéme *E. coli* W3110 (cit.²⁶).

Transformácia limonénu, pri ktorej sa ako hlavný produkt tvoril perilylalkohol, bola popísaná u mikroorganizmov ako napr. *Aspergillus niger*, *A. cellulosa*, *Mortierella alpina*, *M. minutissima* alebo *Yarrowia lipolytica*²⁷.

Okrem biotransformačnej produkcie perilylalkoholu z limonénu je aj snaha o jeho *de novo* biosyntézu pomocou metabolického inžinierstva. Pomocou *E. coli* boli takto produkované oba jeho izoméry, (*R*)-(+)-perilylalkohol²⁸ aj (*S*)-(-)-perilylalkohol²⁹.

Produkcja kyseliny perilovej je dobre popísaná u *P. putida* GS1 (DSM 12264). Tvorbu kyseliny umožňuje prítomná degradačná dráha *p*-cyménu, aromatickej zlúčeniny štruktúrne podobnej limonénu. Prvé tri enzýmy tejto dráhy sú schopné transformovať aj limonén, pričom vzniká kyselina perilová, ktorú baktéria ďalej nie je schopná metabolizovať a akumuluje sa. Na efektívnejšiu biokonverziu limonénu *P. putida* GS1 vyžaduje ko-substrát, pričom ako najvhodnejší sa ukázal glycerol. Produkcia kyseliny perilovej bola popísaná v prítokovom reaktore s kontinuálnym prídavkom limonénu a glycerolu³⁰, v reaktore s integrovaným *in situ* odstraňovaním produktu na báze iónovej výmeny a prítokom substrátu²⁴, ako aj v kontinuálnom biofilmovom reaktore so segmentovaným tokom média³¹. Poslednou menovanou metódou sa dosiahla maximálna objemová produktivita reaktora až 34 g l⁻¹ d⁻¹.

Kyselina perilová bola produkovaná aj kvasinkou *Y. lipolytica*, pričom okrem limonénu bol použitý ako substrát aj pomarančový olej³².

3.2. Karveol a karvón

Oxidáciou uhlíka C₅ v molekule vzniká karveol a karvón. Karveol sa vyskytuje vo forme 4 stereoizomérov: (1*R*,5*R*)-karveol ((-)-*cis*-izomér), (1*S*,5*R*)-karveol ((-)-*trans*-izomér), (1*R*,5*S*)-karveol ((+)-*trans*-izomér) a (1*S*,5*S*)-karveol ((+)-*cis*-izomér); a karvón vo forme dvoch izomérov, (4*S*)- a (4*R*)-karvónu, označovaných aj (-)- a (+)-karvón. Obe tieto zlúčeniny sú využívané ako aromatické látky v kozmetike a potravinárstve. Tiež boli popísané ich antimikrobiálne vlastnosti, potenciálne aplikácie ako substrát v chemickej syntéze a v medicíne^{33–35}.

Karveol aj karvón sú častými produktmi biologickej

oxidácie limonénu, avšak vo väčšine prípadov sú len jednými z mnohých reakčných produktov. Je to v dôsledku nešpecifickej oxidácie katalyzovanej mikrobiálnymi monoxygenázami a hydroxylázami. Väčšiu regiošpecificitu vykazujú rastlinné enzýmy, napr. limonén-6-hydroxyláza z *Mentha* spp.³⁶. Problémom však je ich veľmi nízka aktivita a problematická aplikácia v priemyselnej praxi.

Regiošpecifická oxidácia limonénu na *trans*-karveol je katalyzovaná kuméndioxygenázou (EC 1.14.13.48) a bola popísaná u baktérii *Rhodococcus opacus*³⁷, viacerých kmeňov *Pseudomonas* sp.³⁸ a *Cellulosimicrobium cellulans*³⁹. Bunky *R. opacus* a *Pseudomonas* sp. boli schopné transformovať (+)-limonén na (+)-*trans*-karveol iba keď boli počas kultivácie indukované parami toluénu alebo naftalénu, zatiaľ čo u *C. cellulans* to bola prítomnosť etylbenzenu. Doteraz najvyššia popísaná produkcia *trans*-karveolu je popísaná práve u *C. cellulans*, a to 13,4 mM po 10 h biotransformácii³⁹.

Gén pre kuméndioxygenázu z *P. putida* bol identifikovaný a naklonovaný do expresného vektora *P. putida* P12 (cit.⁴⁰). Následne bola navrhnutá enzýmová kaskáda na produkciu chirálnych karvolaktónov z (+)-limonénu s potenciálnou aplikáciou vo výrobe biopolymérov⁴¹.

Van der Werf a spol.⁴² však popísali metabolickú dráhu degradácie karveolu u baktérie *Rhodococcus erythropolis* DCL14. Táto baktéria schopná rásť na limonéne začína degradáciu karveolu jeho dehydrogenáciou na karvón, ktorý karvóndehydrogenáza transformuje na dihydrokarvón. Baktéria je touto metabolickou dráhou schopná metabolizovať všetky 4 stereoizoméry karveolu⁴².

Pri biotransformácii zmesi (-)-*cis* a (-)-*trans*-karveolu za použitia buniek *R. erythropolis* DCL14 dochádza iba k transformácii *cis*-izoméru na (-)-karvón, zatiaľ čo *trans*-karveol zostáva v reakčnej zmesi nezreagovaný. Touto biotransformáciou je teda možné získať vzácnu čistú *trans*-formu karveolu⁴³.

3.3. Limonén-1,2-epoxid a limonén-1,2-diol

Degradačná dráha limonénu začínajúca epoxidáciou dvojitej väzby medzi uhlíkmi C₁-C₂ bola prvýkrát identifikovaná a popísaná u baktérii *R. erythropolis*. Reakcia je katalyzovaná FAD- a NADH- závislými monoxygenázami, pri čom vzniká limonén-1,2-epoxid. Ten je následne hydrolyzovaný na limonén-1,2-diol enzýmom limonén-1,2-epoxidhydrolázou. Limonén-1,2-diol je ďalej transformovaný na 1-hydroxy-2-oxolimonén nešpecifickými alkoholdehydrogenázami⁴⁴.

Pozornosť púta predovšetkým enzým limonén-1,2-epoxidhydroláza (LEH, EC 3.3.2.8), ktorý je niekoľkonásobne aktívnejší ako ostatné enzýmy tejto metabolickej dráhy, čím bráni v akumulácii potenciálne toxického epoxidu. Enzým bol purifikovaný a exprimovaný v *E. coli*. Svojou štruktúrou a reakčným mechanizmom sa líši od ostatných epoxidhydroláz a bol preto zaradený do samostatnej skupiny^{44,45}. LEH vykazuje voči svojmu prirodzenému substrátu vysokú stereoselektivitu, pričom je schopná hydrolyzovať všetky 4 stereoizoméry limonén-1,2-diolu⁴⁶. Vďaka svojej vysokej stereoselektivitě, úzkej

substrátovej špecifikite, dobre popísanej štruktúre a reakčnému mechanizmu je LEH z *R. erythropolis* často používaná ako modelový enzým pre rôzne stratégie enzýmového inžinierstva^{47,48}.

Mikrobiálna transformácia limonénu až na limonén-1,2-diol je veľmi dobre charakterizovaná aj u viacerých druhov vláknitých húb. Molina a spol.⁴⁹ popísali biotransformáciu (–)-limonénu na limonén-1,2-diol pomocou vláknitej huby *Fusarium oxysporum*, pričom tvorba epoxidu nebola zaznamenaná, autori však predpokladajú, že táto huba metabolizuje limonén analogickým spôsobom ako baktérie *R. erythropolis*. Maximálna produkcia limonén-1,2-diolu bola 3,7 g l⁻¹ (cit.⁴⁹).

Z hľadiska aplikácie v praxi je zaujímavá transformácia (+)-limonénu na limonén-1,2-diol pomocou vláknitej huby *Colletotrichum nymphae*. Huby z rodu *Colletotrichum* sp. patria medzi fytopatogény a je predpoklad, že v porovnaní s inými mikroorganizmami sú odolné voči toxicite terpenov a vedia ich aj transformovať. Rozsiahlou optimalizáciou kultivačných a reakčných podmienok sa dosiahla maximálna koncentrácia produktu 7,1 g l⁻¹ resp. 7,8 g l⁻¹ po 72 h pri použití 20 g l⁻¹ (+)- alebo (–)-limonénu. Ako substrát mohol byť tiež použitý pomarančový olej^{50,21}.

Produkcia limonén-1,2-epoxidu bola popísaná pomocou enzýmového systému skladajúceho z imobilizovanej lipázy z *Candida antarctica* (frakcia B), karboxylovej kyseliny, peroxidu vodíka a substrátu (+)-limonénu. Optimalizáciou reakčných podmienok a prenesením procesu do 600ml reaktora s postupným prítokom roztoku H₂O₂ sa dosiahol maximálny výťažok limonén-1,2-epoxidu na úrovni 78 % po 60 min (cit.⁵¹).

Limonén-1,2-diol vykazuje inhibičný efekt voči prozápalovým aktivitám CD4+ a CD8+ T-lymfocytov a potenciálne protirakovinové vlastnosti. Môže však byť použitý aj ako atraktant pre hmyz alebo ochucovadlo v potravinárstve²¹. Limonén-1,2-epoxid má veľký aplikačný potenciál ako substrát pre chemickú syntézu a výrobu biopolymérov⁵¹.

3.4. α -Terpineol

Hydroxyláciou limonénu na dvojitej väzbe medzi uhlíkmi C₈-C₉ vzniká terciárny monoterpénoid, α -terpineol. Tento alkohol je hlavnou zložkou viacerých rastlinných esenciálnych olejov, ako napr. majoránu (*Origanum majorana* L.), borovice prímorskej (*Pinus pinaster* Aiton) alebo šalvie muškátovej (*Salvia sclarea* L.). α -Terpineol existuje v dvoch enantiomérnych formách, (R)-(+)- α -terpineol a (S)-(–)- α -terpineol. (R)-(+)- α -terpineol sa vyznačuje príjemnou orgovánovou vôňou, zatiaľ čo (S)-(–)- α -terpineol má jemnú vôňu ihličia. Pre svoju príjemnú vôňu je často používaný v kozmetike. Okrem toho má tiež viaceré zaujímavé biologické účinky. Vykazuje antihypertenzívny a antiproliferačný efekt na erytroleukemické bunky, má protizápalové vlastnosti, inhibuje produkciu superoxidov a viaceré štúdie popísali aj jeho protirakovinové účinky^{53–55}.

Mikrobiálna transformácia (+)-limonénu vedie k produkcii (R)-(+)- α -terpineolu, z (–)-limonénu naopak vzniká (S)-(–)- α -terpineol. Prvá biokonverzia limonénu na α -terpineol bola publikovaná už koncom 60. rokov minulého storočia pomocou *Cladosporium* sp., pričom od vtedy bola popísaná u mnohých mikroorganizmov, napr. *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Aspergillus* sp. alebo *Sphingobium* sp.⁵⁴.

Zaujímavá je predovšetkým biotransformácia limonénu pomocou *F. oxysporum* 152b, pri ktorej sa v aeróbných podmienkach tvorí limonén-1,2-diol⁴⁹, zatiaľ čo v systéme bez prístupu kyslíka vzniká α -terpineol⁵⁵.

Najlepšie výsledky sa dosiahli s baktériou *Sphingobium* sp. kultivovanej na limonéne ako jedinom zdroji uhlíka v médiu. Biotransformáciou (+)-limonénu v dvojfázovom systéme, kde ako organická fáza slúžil slnečnicový olej, vzniklo 130 g l⁻¹ (R)-(+)- α -terpineolu⁵⁶. Ďalšou optimalizáciou podmienok biotransformácie (pH, koncentrácia biomasy, teplota a miešanie) a použitím sójového oleja ako organickej fázy sa produkcia zvýšila až na takmer 240 g l⁻¹ (cit.⁵⁷). Enzým tejto vláknitej huby je navyše enantiošpecifický. Z (+)-limonénu sa tvoril (R)-(+)- α -terpineol v enantiomérnom nadbytku (ee) ≥ 99 %, zatiaľ čo z jeho (–)-izoméru vznikal majoritne (S)-(–)- α -terpineol, ktorého bolo približne 60 % (cit.⁵⁶).

V súčasnosti je α -terpineol produkovaný chemickou syntézou z α -pinénu, terpentínu alebo iných im podobných zlúčenín. Biotechnologická výroba je alternatívna možnosť produkcie, vhodná predovšetkým na produkciu čistých enantiomérov α -terpineolu.

3.5. Izopiperitenol a limonén-8,9-epoxid

Trans-izopiperitenol je derivát limonénu, ktorý vzniká hydroxyláciou na uhlíku C₃. V prírode vzniká ako medziprodukt pri biosyntéze (–)-mentolu v mäte (*Mentha* sp.). Z biotechnologického hľadiska je zaujímavý najmä ako substrát pre chemickú prípravu (–)-mentolu, aromatickej látky používanej v potravinárstve a parfumoch. Biotransformácia (+)-limonénu na *trans*-izopiperitenol v mikroorganizmoch bola dlho popísaná len u huby *Hormonema* sp. UOFS Y-0067. Maximálna produkcia bola 0,5 g l⁻¹, ale výsledky experimentov bolo ťažké reprodukovat⁵⁸. Nedávno boli popísané dve limonén-3-hydroxylázy z *Aureobasidium pullulans* a *Hormonema carpentarium*. Oba enzýmy boli naklonované do expresného vektora *Pichia pastoris* pre zvýšenie produkcie *trans*-izopiperitenolu, avšak jeho maximálna koncentrácia dosiahla hodnotu len 165 mg l⁻¹ (cit.⁵⁹).

Regiošpecifická epoxidácia limonénu na dvojitej väzbe medzi uhlíkmi C₈-C₉ bola popísaná len u baktérie *Xanthobacter* sp. kultivovanej na cyklohexáne. Túto reakciu katalyzuje cytochróm P-450 monoxygenáza. Z experimentov sa zistilo, že (+)-limonén ((4R)-izomér) je transformovaný na (4R)-limonén-8,9-epoxid, a z (–)-limonénu ((4S)-izomér) sa tvorí zmes izomérov (4S,8R)- a (4S,8S)-limonén-8,9-epoxidu v pomere 78:22. Optimalizáciou reakčných podmienok bolo možné získať 0,8 g l⁻¹

limonén-8,9-epoxidu, pri vyšších koncentráciách sa prejavila výrazná inhibícia produktom⁶⁰.

4. Záver

Terpény sú vďaka svojej unikátnej štruktúre dobrým východiskovým materiálom pre syntézu veľkého počtu špeciálnych chemikálií s využitím v potravinárskom, farmaceutickom, kozmetickom či materiálovom priemysle. (+)-Limonén je najviac zastúpený monocyklický monoterpen v prírode a jeho najväčším zdrojom je olej z citrusovej kôry. Výrobu limonénu a následne jeho biotransformáciu na oxidatívne deriváty možno považovať za biotechnologické procesy v súlade s hodnotami trvalo udržateľného rozvoja. Medzi výhody spojené s týmito bioprocesmi patrí použitie vedľajších produktov ako surovín, mierne reakčné podmienky, vysoká regio- a stereoselektivita a výroba produktov s pridanou hodnotou. Táto štúdia predstavuje nové metódy prípravy a perspektívne aplikácie menej známych látok, ktoré je možné pripraviť biotechnologickými transformáciami limonénu s využitím mikroorganizmov.

Práca bola finančne podporená prostriedkami z grantu VEGA č. 2/0130/20.

LITERATÚRA

- Lange B. M., v knihe: *Biotechnology of Isoprenoids* (Schrader J., Bohlmann J., ed.), kap. 11, str. 63. Springer International Publishing, Cham 2015.
- Sun C., Theodoropoulos C., Scrutton, N. S.: *Bioresour. Technol.* **300**, 122666 (2019).
- [https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=94972716e6befdccc1c3606666829f4e5&ty=HTML&h=L&mc=true&n=pt21.6.582&r=PART](https://www.ecfr.gov/cgi-bin/retrieveECFR?gp=1&SID=94972716e6befdccc1c3606666829f4e5&ty=HTML&h=L&mc=true&n=pt21.6.582&r=PART, stiahnuté 19. 4. 2021), stiahnuté 19. 4. 2021.
- Vieira A. J., Baserra F. P., Souza M. C., Totti B. M., Rozza A. L.: *Chem.-Biol. Interact.* **283**, 97 (2018).
- Ciriminna R., Lomeli-Rodriguez M., Demma Cará P., Lopez-Sanchez J. A., Pagliaro M.: *Chem. Commun.* **50**, 15288 (2014).
- Erasto P., Viljoen A. M.: *Nat. Prod. Commun.* **3**, 1193 (2008).
- Kim Y. W. a 13 spoluautorov: *J. Toxicol. Environ. Health, Part B* **16**, 17 (2013).
- De Groot A.: *Dermatitis* **30**, 331 (2019).
- Nazaroff W. W., Weschler C. J.: *Atmos. Environ.* **38**, 2841 (2004).
- Hollingsworth R. G.: *J. Econ. Entomol.* **93**, 772 (2005).
- Cruz Moura I., Wunderlich G., Uhrig M. L., Couto A. S., Peres V. J., Katzin A. M., Kimura E. A.: *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**, 2553 (2001).
- Pereira C. V., Silva J. M., Rodrigues L., Reis R. L., Paiva A., Duarte A. R. C., Matias A.: *Sci. Rep.* **9**, 14926 (2019).
- Calabrò P. S., Pontoni L., Porqueddu I., Greco R., Pirozzi F., Malpei F.: *Waste Manage. (Oxford, U. K.)* **48**, 440 (2016).
- Pourbafrani M., Forgács G., Sárvári Horváth I., Niklasson C., Taherzadeh M. J.: *Bioresour. Technol.* **101**, 4246 (2010).
- Jongedijk E., Cankar K., Buchhaupt M., Schrader J., Bouwmeester H., Beekwilder J.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 2927 (2016).
- Ren Y., Liu S., Jin G., Yang X., Zhou Y. J.: *Biotechnol. Adv.* **44**, 107628 (2020).
- Mikš-Krajník M., Zoglowek M., Buron-Moles G., Forster J., v knihe: *Consequences of Microbial Interactions with Hydrocarbons, Oils, and Lipids: Production of Fuels and Chemicals* (Lee S., ed.), kap. 12, str. 403, Springer, Cham 2017.
- Rolf J., Julsing M. K., Rosenthal K., Lütz S.: *Molecules* **25**, 1881 (2020).
- Korman T. P., Opgenorth P. H., Bowie J. U.: *Nat. Commun.* **8**, 15526 (2017).
- Felipe L. de O., Oliveira A. M., Bicas J. L.: *Trends Food Sci. Technol.* **62**, 141 (2017).
- Sales A., Moreira R. C., Pastore G. M., Bicas J. L.: *Process Biochem.* **78**, 8 (2019).
- De Carvalho C. C. C. R., da Fonseca M. M. R.: *Biotechnol. Adv.* **24**, 134 (2006).
- Chen T. C., da Fonseca C. O., Schönthal A. H.: *Am. J. Cancer Res.* **5**, 1580 (2015).
- Mirata M. A., Heerd D., Schrader J.: *Process Biochem.* **44**, 764 (2009).
- Van Beilen J. B., Holtackers R., Lüscher D., Bauer U., Witholt B., Duetz W. A.: *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 1737 (2005).
- Cornelissen S., Julsing M. K., Volmer J., Riechert O., Schmid A., Bühler B.: *Biotechnol. Bioeng.* **110**, 1282 (2013).
- Prieto G. A. S., Perea Y. A. V., Ortiz C. L.: *Biotechnol. Sect. Agropecu. Agroind.* **12**, 36 (2014).
- Sun C., Dong X., Zhang R., Xie C.: *BMC Biotechnol.* **21**, 3 (2021).
- Alonso-Gutierrez J., Chan R., Batth T. S., Addams P. D., Keasling J. D., Petzold C. J., Lee T. S.: *Metab. Eng.* **19**, 33 (2013).
- Mars A. E., Gorissen J. P. L., van den Beld I., Eggink G.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 101 (2001).
- Willrodt C., Hala B., Karthaus L., Rehdorf J., Buehler K., Schmid A.: *Biotechnol. Bioeng.* **114**, 281 (2016).
- Tappin M. R. R., Knopp F. M., Cardoso I. C., Santos R. T., Drummond B. S., Siani A. C., Bon E. P. S., Ferrara M. A.: *Green Sustainable Chem.* **7**, 172 (2017).
- De Carvalho C. C. R., da Fonseca M. M. R.: *Food Chem.* **95**, 413 (2006).
- Nesterkina M., Barbalat D., Konovalova I., Shishkina S., Atakay S., Salih B., Kravchenko I.: *Nat. Prod. Res.* **35**, 4978 (2020).
- De Cássia da Silveira e Sá N., Arande L. N., de Sousa D.: *Molecules* **18**, 1227 (2013).
- Lupien S., Karp F., Wildung M., Croteau R.: *Arch. Biochem. Biophys.* **368**, 181 (1999).

37. Duetz W. A., Fjällman A. H. M., Ren S., Jourdat C., Witholt B.: *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2829 (2001).
 38. Duetz W. A., Witholt B., Jourdat C.: *PCT Int. Appl. WO 02 38785*.
 39. Wang Z., Lie F., Lim E., Li K., Li Z.: *Adv. Synth. Catal.* 351, 1849 (2009).
 40. Groeneveld M., van Beek H. L., Duetz W. A., Fraaije M. W.: *Tetrahedron* 72, 7263 (2016).
 41. Oberleitner N., Ressmann A. K., Bica K., Gärtner P., Fraaije M. W., Bornscheuer U. T., Rudroff F., Mihovilovic M. D.: *Green Chem.* 19, 367 (2016).
 42. Van der Werf M. J., Boot A. M.: *Microbiology* 146, 1129 (2000).
 43. De Carvalho C. C. C. R., van Keulen F., da Fonseca M. M. R.: *Tetrahedron: Asymmetry* 13, 1637 (2002).
 44. Van der Werf M. J., Swarts H. J., de Bont J. A. M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 2092 (1999).
 45. Arand M., Hallberg B. M., Zou J., Bergfors T., Oesch F., van der Werf M. J., de Bont J. A. M., Jones T. A., Mowbray S. L.: *EMBO J.* 22, 2583 (2003).
 46. Van der Werf M. J., Orru R. V. A., Overkamp K. M., Swarts H. J., Osprian I., Steinreiber A., de Bont J. A. M., Faber K.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 52, 380 (1999).
 47. Zheng H., Reetz T. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 132, 15744 (2010).
 48. Sun Z., Wu L., Bocola M., Chan H. C. S., Lonsdale R., Kong X.-D., Yuan S., Zhou J., Reetz T. M.: *J. Am. Chem. Soc.* 140, 310 (2018).
 49. Molina G., Bution M. L., Bicas J. L., Dolder M. A. H., Pastore G. M.: *Food Chem.* 174, 606 (2015).
 50. Sales A., Pastore G. M., Bicas J. L.: *Process Biochem.* 86, 25 (2019).
 51. Melchioris M., Vieira T. Y., Pereira L. P. S., Carciofi B. A. M., de Araújo P. H. H., de Oliveira D., Sayer C.: *Ind. Eng. Chem. Res.* 58, 13918 (2019).
 52. Parrino F., Fidalgo A., Palmisano L., Ilharco L. M., Ciriminna R.: *ACS Omega* 3, 4884 (2018).
 53. Khaleel C., Tabanca N., Buchbauer G.: *Open Chem.* 16, 349 (2018).
 54. Sales A., Felipe L. de O., Bicas J. L.: *Food Bioprocess Technol.* 13, 1261 (2020).
 55. Bicas J. L., Barros F. F. C., Wagner R., Teixeira Godoy H., Pastore G. M.: *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 35, 1061 (2008).
 56. Bicas J. L., Fontanille P., Pastore G. M., Larroche C.: *Process Biochem.* 45, 481 (2010).
 57. Molina G., Pessôa M. G., Bicas J. L., Fontanille P., Larroche C., Pastore G. M.: *Bioresour. Technol.* 294, 122180 (2019).
 58. Van Dyk M. S., van Rensburg E., Moleleki N.: *Biotechnol. Lett.* 20, 431 (1998).
 59. Schempp F. M., Strobel M., Etschmann E., Bierwirth E., Panten J., Schewe H., Schrader J., Buchhaupt M.: *Appl. Environ. Microbiol.* 87, e02873 (2021).
 60. Van der Werf M. J., Keizer P. M., van der Schaft P. H.: *J. Biotechnol.* 84, 133 (2000).
 61. Filipsson A., Bard J., Karlsson S., World Health Organization, International Programme on Chemical Safety. (1998), <https://apps.who.int/iris/handle/10665/42039>, stiahnuté 20. 12. 2021.
 62. <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID1020778>, stiahnuté 20. 12. 2021.
 63. <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID6047078>, stiahnuté 20. 12. 2021.
 64. <https://comptox.epa.gov/dashboard/chemical/details/DTXSID2029612>, stiahnuté 20. 12. 2021.
 65. Massaldi H. A., King C. J.: *Chem. Eng. Data* 18, 393 (1973).
- K. Kaniaková, H. Hronská, D. Šilhárová, and M. Rosenberg** (*Institute of Biotechnology, Faculty of Chemical and Food Technology, Slovak University of Technology, Bratislava, Slovak Republic*): **Limonene and Its Oxidative Derivates: Properties, Applications and Biotechnological Production**
- In this review, we collected and presented evidence from the scientific literature regarding the biotechnological production and applications of limonene and its oxidative derivatives in various fields such as food, pharmaceutical, cosmetic or polymer industries. Limonene biotransformations may be regarded as biotechnological processes aligned to sustainable development. Advantages associated with these bioprocesses include the use of by-products as raw materials, mild reaction conditions, high regio- and stereoselectivity and the production of value-added products. The biological activities of limonene and its oxidative derivatives, such as carveol, carveone, limonene-1,2-diol, α -terpineol, or perillyl alcohol, suggest that the terpene biotechnology is becoming a promising and prosperous science.
- Keywords: limonene, oxidative derivatives, applications, biotransformation, biological activity
- Kaniaková K., Hronská H., Šilhárová D., Rosenberg M.: *Chem. Listy* 116, 301–307 (2022).
 - <https://doi.org/10.54779/chl20220301>
- Acknowledgements*
This work was supported by grant VEGA no. 2/0130/20.