

# Chirality in the context of flavors and fragrances

Compounds that find widespread application in food, beverages, cosmetics, detergents and pharmaceutical products

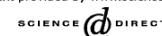
world-wide industrial size estimated at US\$ 16 billion



Review

TRENDS in Biotechnology Vol.23 No.4 April 2005

Full text provided by [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)



## Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances

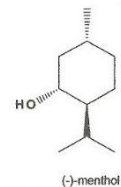
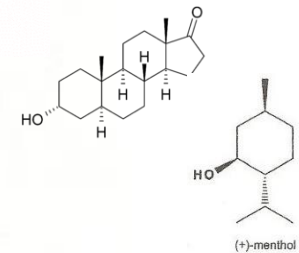
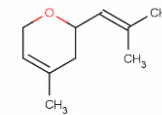
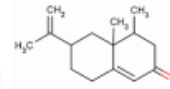
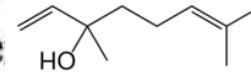
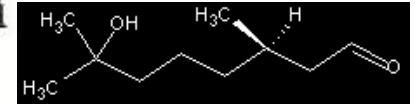
Stefano Serra<sup>1</sup>, Claudio Fuganti<sup>2</sup> and Elisabetta Brenna<sup>2</sup>

<sup>1</sup>C.N.R. Consiglio Nazionale delle Ricerche, Istituto di Chimica del Riconoscimento Molecolare, Sezione A. Quilico' (Institute of Chemistry of Molecular Recognition, A. Quilico section), Via Mancinelli 7, I-20133 Milano, Italy

<sup>2</sup>Dipartimento di Chimica, Materiali ed Ingegneria Chimica 'Giulio Natta' del Politecnico (G. Natta Department of Chemistry, Materials and Chemical Engineering), Via Mancinelli 7, I-20133 Milano, Italy

# Chirality and odor

Compound	Odour description
7-Hydroxy-6,7-dihydro-citronellal	(+): Lily of the valley with green minty notes (-): Sweet lily of the valley note
Linalool	(+): Sweet, petigrain (-): Woody, lavende
Nootkatone	(+): Grapefruit (-): Woody, spicy
Nerol oxide	(+): Green, floral (-): Green, spicy, geranium
Androstenone	(+): Odourless (-): Sweaty, urine, strong, musky
Menthol	(-): Sweet, fresh, minty, strong cooling effect (+): Dusty, vegetable, less minty, less cooling



# 'Natural' flavours

Recent US and European legislations have meant that 'natural' flavour substances can only be prepared either by **physical processes (extraction from natural sources)** or by **enzymatic or microbial processes**, which involve precursors isolated from nature.

This classification created a dichotomy in the market because compounds labelled 'natural' become profitable products whereas other flavours that occur in nature but are produced by chemical methods must be called '**natureidentical**' and are less appreciated by consumers.

These differences have stimulated much research aimed at developing new biotechnological processes for these valuable compounds.

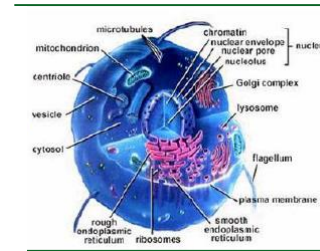
**CE 1334/2008**

**EC Flavor directive 88/388/EEC**

**US Code of Federal Regulation 21 CFR 101.22**

## The 'natural' routes for flavour production are:

- the bioconversions of natural precursors using biocatalysis,
- de novo synthesis (fermentation) and isolation from plants and animals.

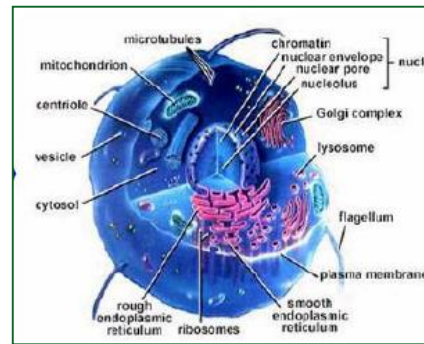


Although from the chemist's point of view there is no difference between a compound synthesized in nature and the molecule produced in the laboratory (i.e. **nature identical**) the price of a flavour sold as **natural** is often significantly higher than a similar one prepared by chemical synthesis.



# Biotechnological methods for the synthesis of natural fragrances and flavors

- Biocatalysis
  - Enzymes
  - Whole cells



- Biosynthesis and fermentation
  - Fungi,
  - moulds,
  - bacteria



# Biotechnological methods for the synthesis and production of flavors and fragrances

*Some examples*

➤ **Vanillin**



➤ **Menthol**



➤ **Grey Amber (Ambergris)**



➤ **Irones**





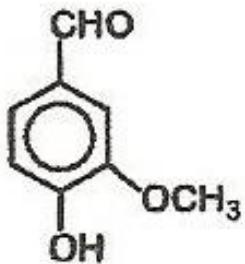
# Vanilla planifolia, Orchidaceae

This compound occurs in the pods of tropical Vanilla orchids (mostly *Vanilla planifolia*) at levels of 2% by weight, but less than 1% of the global market is covered by the extracted compound.

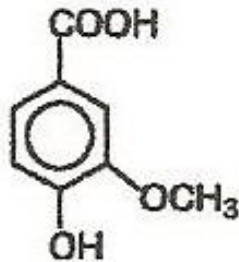


## Principal NATURAL COMPONENTS

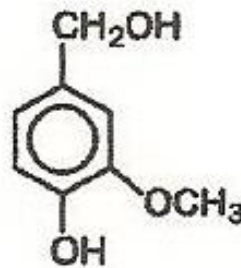
Vanillin



Vanillic acid



Vanillyl alcohol



Consumed: 12.000 t

Request: 15.000 t

Produced by extracton: 20 t

Produced by biotechnology: 1-10 t

The rest obtained by chem. synthesis

Cost

\$1200-4000/kg

\$1000/kg

\$15/kg

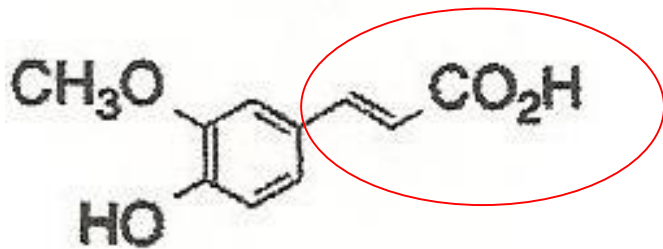
# Examples of studies for the production of vanillin via biotechnological routes

<i>Micro-organism</i>	<i>Substrate</i>	<i>Product</i>	<i>Author</i>
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Ferulic acid	Vanillin	Falconnier <i>et al</i> 1994
<i>Aspergillus niger</i>	Ferulic acid	Vanillin	Lesage-Meessen <i>et al</i> 1996
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>			
<i>Pseudomonas acidovorans</i>	Ferulic acid	Vanillin	Toms and Wood 1970
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Ferulic acid	Vanillin	Labuda <i>et al</i> 1993
<i>Paecilomyces variotii</i>	Ferulic acid	Vanillin	Rahouti <i>et al</i> 1989
<i>Pestalotia palmarum</i>			
<i>Spirulina platensis</i>	Ferulic acid	Vanillin	Ramachandra Rao <i>et al</i> 1996
<i>Haematococcus pluvialis</i>	Ferulic acid	Vanillin	Usha Tripathi <i>et al</i> 1999
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Ferulic acid	Vanillic acid	Andreoni <i>et al</i> 1995
<i>Escherichia coli</i>	Ferulic acid	Vanillin	Otuk 1985
<i>Alcaligenes paradoxus</i>	Ferulic acid	Vanillin	Krishnamohan and Khanna 1994
<i>Streptomyces setonii</i>	Ferulic acid	Vanillin	Sutherland <i>et al</i> 1983
<i>Fomes fomentarius</i>	Ferulic acid	Vanillin	Ishikawa <i>et al</i> 1963
<i>Polyporus versicolor</i>	Ferulic acid	Vanillin	Rosazza <i>et al</i> 1995
<i>Rhodotorula rubra</i>	Ferulic acid	Vanillic acid	Huang <i>et al</i> 1993
<i>Corynebacterium glutamicum</i>	Eugenol	Vanillin	Tadasa and Kayahara 1983
<i>Pseudomonas spp</i>	Eugenol	Vanillin	Rabenhorst 1996
<i>Serratia spp</i>	Eugenol &	Vanillin	Rabenhorst 1991
<i>Enterobacter spp</i>	Isoeugenol		
<i>Arthobacter globiformis</i>	Eugenol	Vanillin	Cooper 1987
<i>Serratia marcescens</i>	Vanillin	Vanillin acid	Prestelo <i>et al</i> 1989
<i>Streptomyces viridosporus</i>	Vanillin	Vanillic acid	Pomento and Crawford 1983
<i>Aspergillus niger</i>	Vanillylamine	Vanillin	Yoshida <i>et al</i> 1997
<i>Escherichia coli</i>	Vanillylamine	Vanillin	
<i>Pycnoporus cinnabarinus</i>	Vanillic acid	Vanillin	Lesage-Meessen <i>et al</i> 1997
<i>Proteus vulgaris</i>	<i>m</i> -Methoxytyrosine	Vanillin	Casey and Dobb 1992
Stilbene dioxygenase	Isorhaponin	Vanillin	Hagedorn and Kaphammer 1994
Lipoxygenase	Coniferyl aldehyde	Vanillin	Markus <i>et al</i> 1992
	Ferulic acid	Vanillin	Mane and Zucca 1992
<i>Brettanomyces anomalus</i>	Ferulic acid	Vanillin	Edlin <i>et al</i> 1995
	Caffeic acid		
	Coumaric acid		
<i>Penicillium simplicissimum</i>	Vanillyl alcohol	Vanillin	Fraaije <i>et al</i> 1997

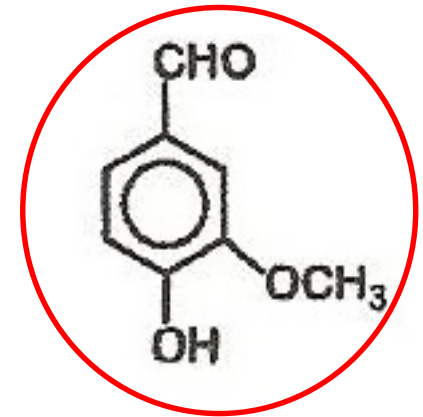
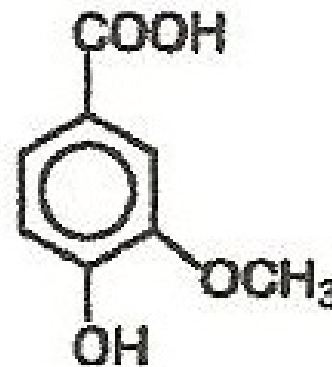


# Production of vanillin through bioconversion of lignin components

**Ferulic acid**  $\xrightarrow{\text{P. cinnabarinus}}$  **vanillic acid**  $\longrightarrow$  **Vanillin**



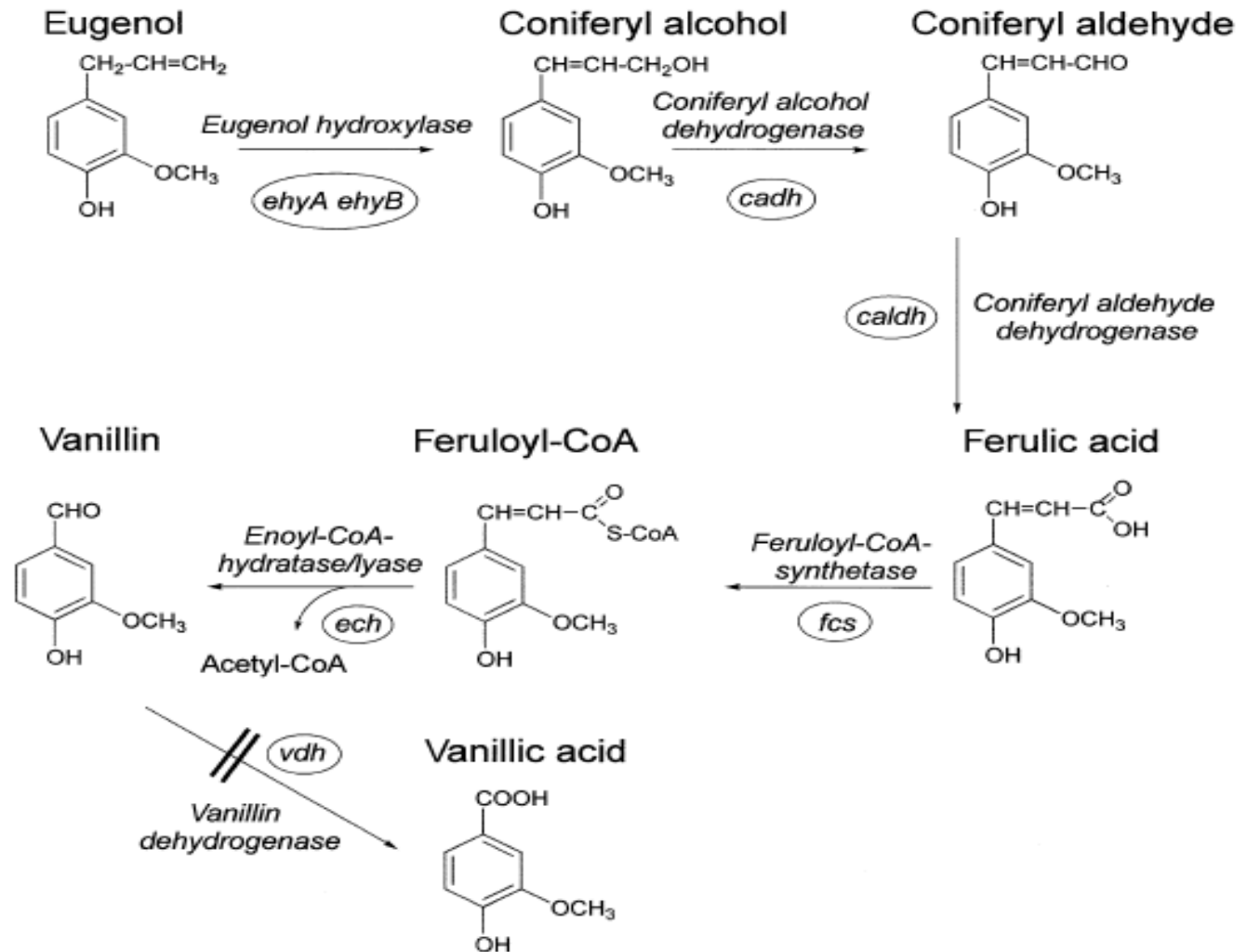
Building block of lignin



• *Pycnopus cinnabarinus* degrades side chain of ferulic acid to obtain vanillic acid that is then reduced to vanillin

# Production of vanillin by means of *Pseudomonas* sp. (engineered)

From essential oil of clove, nutmeg, cinnamon, basil



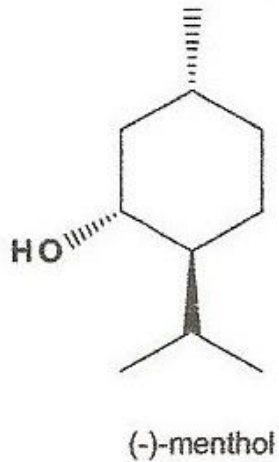
**L'ingegneria genetica è stata applicata con successo per produrre vanillina tramite diretta conversione di eugenolo usando ceppi metabolicamente ingegnerizzati di *Pseudomonas*.**

**Però questo processo non è sfruttato in Europa a causa della negativa percezione pubblica dell'uso di microorganismi geneticamente modificati per la sintesi di composti ad uso alimentare.**

**A proposito di *Pseudomonas*, l'intera via da eugenolo ed acido ferulico a vanillina è stata sequenziata: inibendo il gene *vdh* (*vanillin dehydrogenase* – vanillina deidrogenasi), tale microorganismo può essere utilizzato per produrre vanillina partendo da eugenolo, composto naturale economico.**

# Menthol

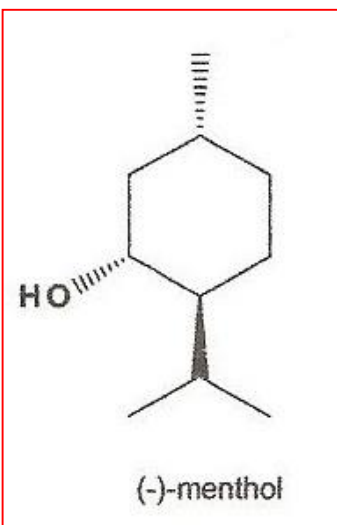
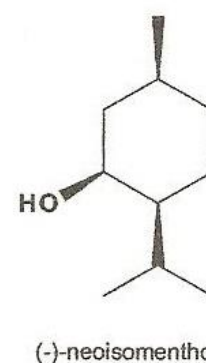
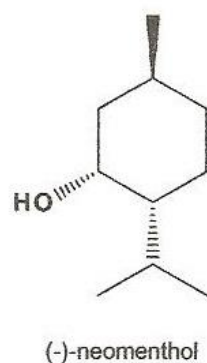
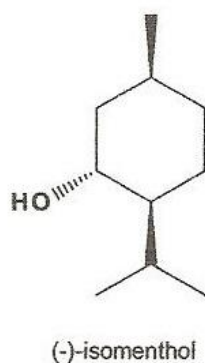
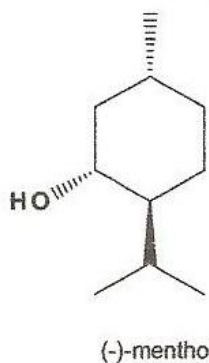
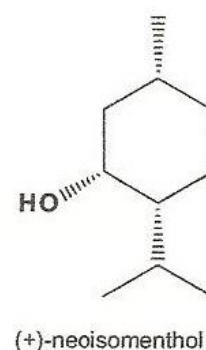
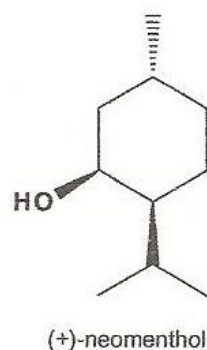
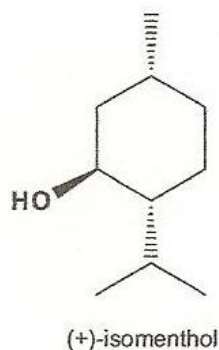
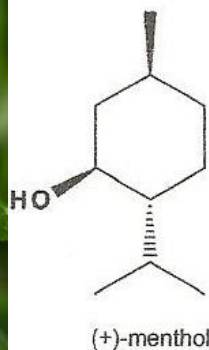
## Genus *Mentha*, *Lamiaceae*



*Mentha piperita*, *M. arvensis*, *M. spicata*  
*main specie used for extraction*

estimated world  
production of menthol:  
11 800 tons.





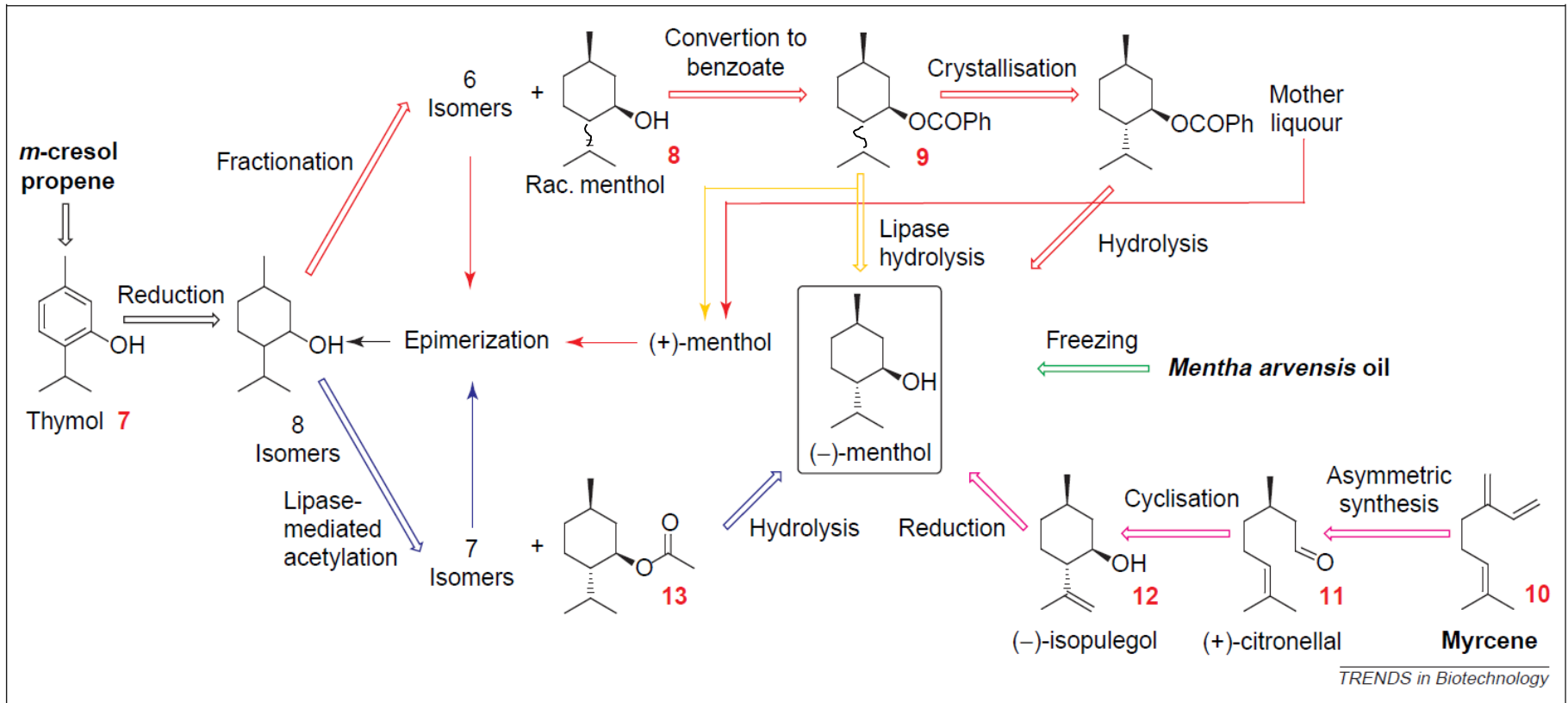
The desired organoleptic properties of this monoterpene are related to its absolute configuration and from the eight possible isomers, only the natural (-)-(1R,3R,4S) isomer is suitable as a flavourant. In 1998, the estimated world production of menthol was **11 800 tons**.





## Synthetic processes «1» for the production of (-)-menthol

The **Haarmann and Reimer** process is based on a classical resolution procedure and starts from inexpensive **m-cresol** and propylene to produce thymol (7). This compound is **hydrogenated** to give the mixture of the eight isomers of menthol. **Fractional distillation** gives racemic menthol (8) (two isomers) which is converted to the corresponding **benzoate** (9) and resolved by **fractional crystallization**. Hydrolysis produces (-)-menthol whereas the mother liquor gives (+)-menthol. The (+)-menthol and the other six isomers are recycled in a separate racemization step.



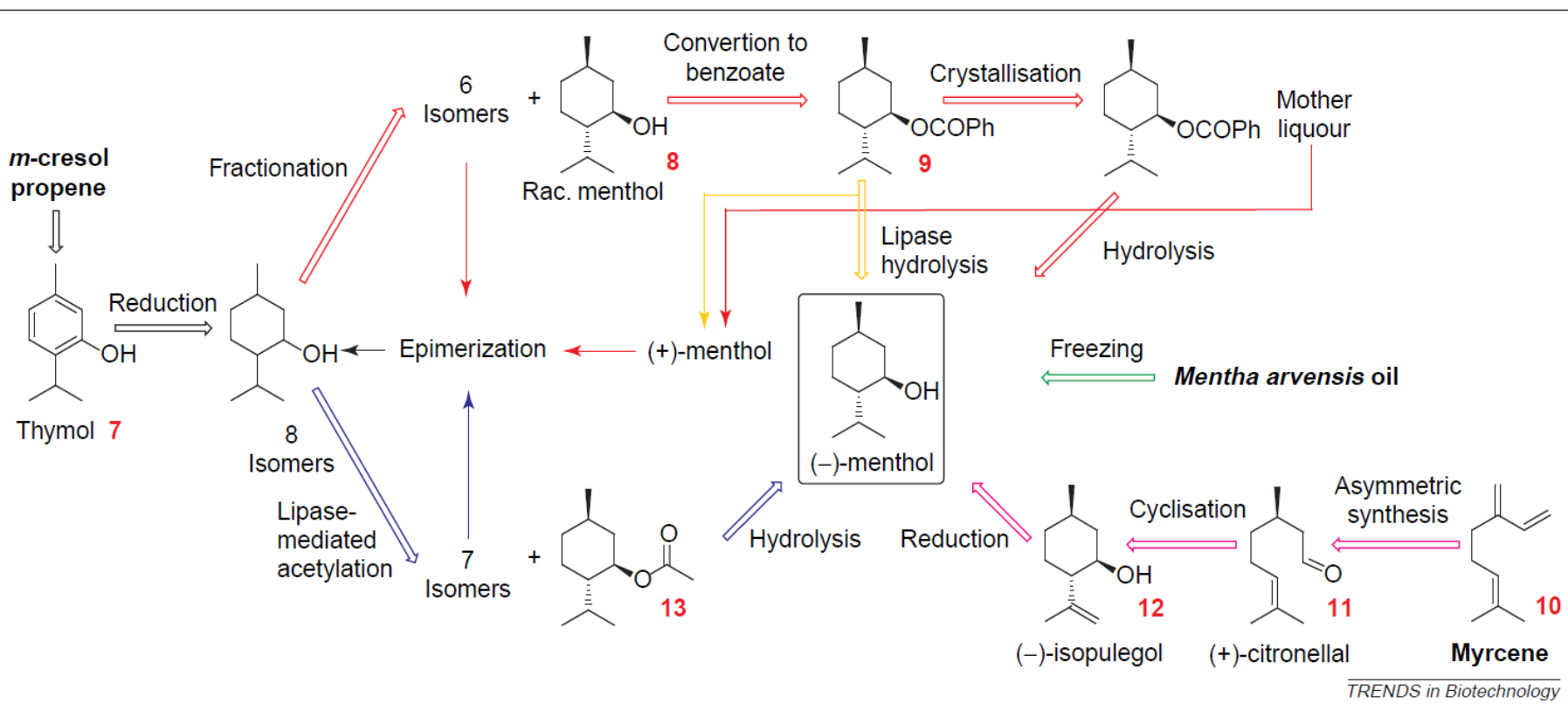




## Biocatalytic route “2” of AECI Ltd



Process starts directly from the mixture of the **eight isomers of menthol**. The **enantio- and diastereoselective acylation** of this mixture using **lipases** yields menthyl acetate (13) in at least **96% enantiomeric excess**. The ester is separated from the unreacted isomers by **distillation** and then hydrolysed to yield (-)-menthol. Undesired isomers are recycled by isomerisation.





# Fragrances for parfumes

## ➤ Grey Amber (Ambergris)



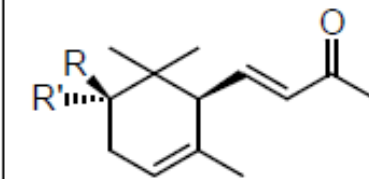
## ➤ Iris (Irones)



Although these natural products are expensive, they are still used in fine formulations because they give better results compared with the corresponding synthetic materials.

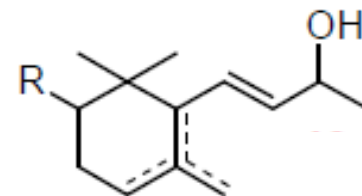
The odorous principles components of these raw materials are the norterpenoid **ionones** and **irones**.

This superiority is due to the complexity of the natural isomeric mixture in which each component might show different olfactory features.



$R=R'=H$   $\alpha$ -ionone

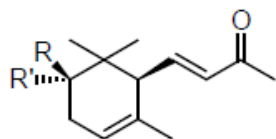
$R=Me, R'=H$  *cis*- $\alpha$ -irone



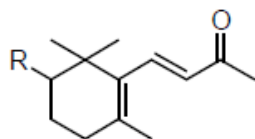
These compounds occur in nature as a mixture of regioisomers ( $\alpha$ ,  $\beta$  and  $\gamma$ ) and enantiomers.

Overall, **five ionone** and **ten irone stereoisomers** are possible. Thanks to the use of chemical synthesis and enzyme-mediated reactions, all these isomers were prepared and submitted to olfactory evaluation.

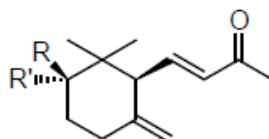
The key steps in these syntheses were the **enantioselective lipase-mediated acetylation** of suitable alcohols.



R=R'=H  $\alpha$ -ionone



R=H  $\beta$ -ionone

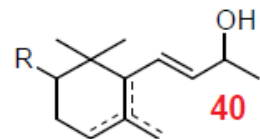


R=R'=H  $\gamma$ -ionone

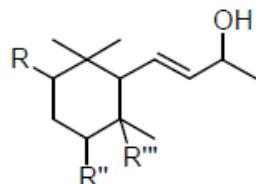
R=H, R'=Me *trans*- $\alpha$ -irone  
R=Me, R'=H *cis*- $\alpha$ -irone

R=Me  $\beta$ -irone

R=H, R'=Me *trans*- $\gamma$ -irone  
R=Me, R'=H *cis*- $\gamma$ -irone

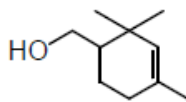


**40**



**42** R''=OH, R'''=H

**43** R''=H, R'''=OH



**44**

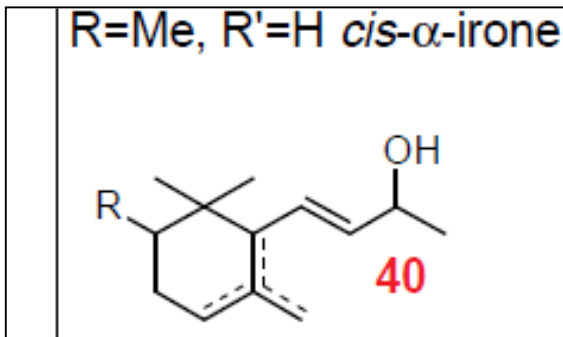
Racemic ionols and irols **40** their corresponding  $\alpha$ -epoxy-derivatives **41** and the diols **42** and **43**, were resolved by lipase from *Pseudomonas* specie.

Moreover enantiopure alcohol **44** was used in irone synthesis and was prepared from the racemic alcohol by sequential porcine pancreatic lipase (PPL)-mediated acetylation and hydrolysis.

# *Iris, Iridaceae*

(rhizomes: modified subterranean stem)

Ionones have been found in several plants, whereas **irones** were formed during ageing and manufacturing of the iris rhizomes.



*Iris absolute*: 40000-50000 €/kg

Chanel No. 19

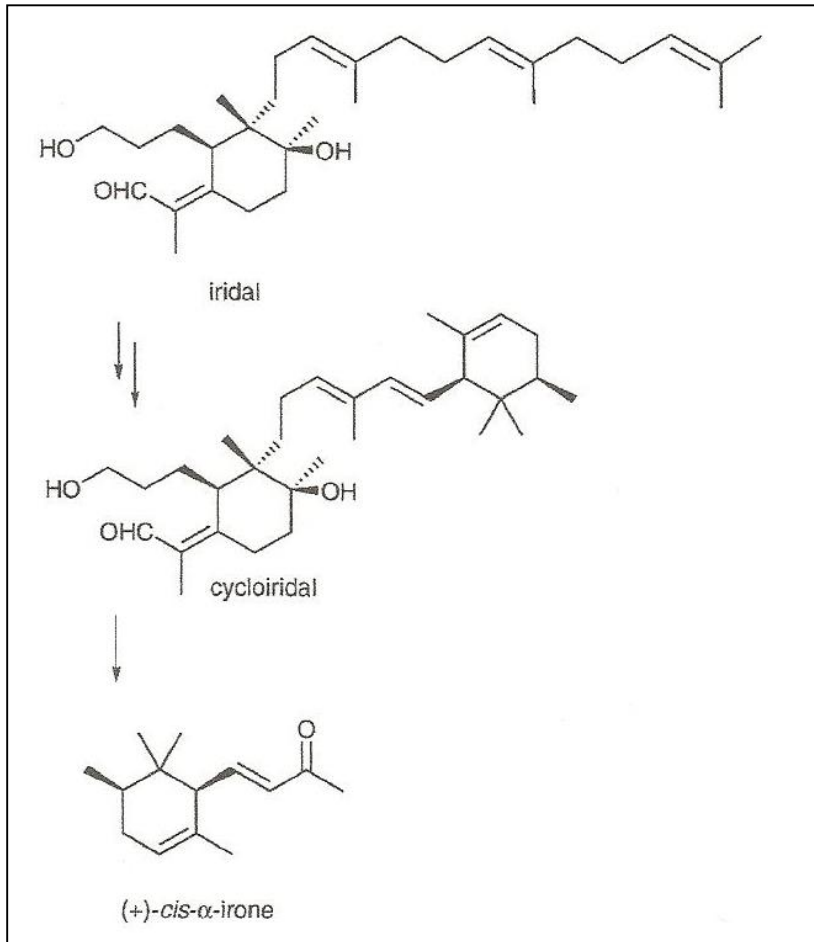


Traditional method: 400  
mg/ kg after 3 years  
drying

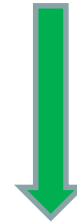


# Patented biotechnological method

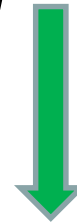
Traditional method: 400 mg/ kg after 3 years drying



Iris rhizomes



*Serratia liquefaciens* +  
*Pseudomonas maltophilia*



irones

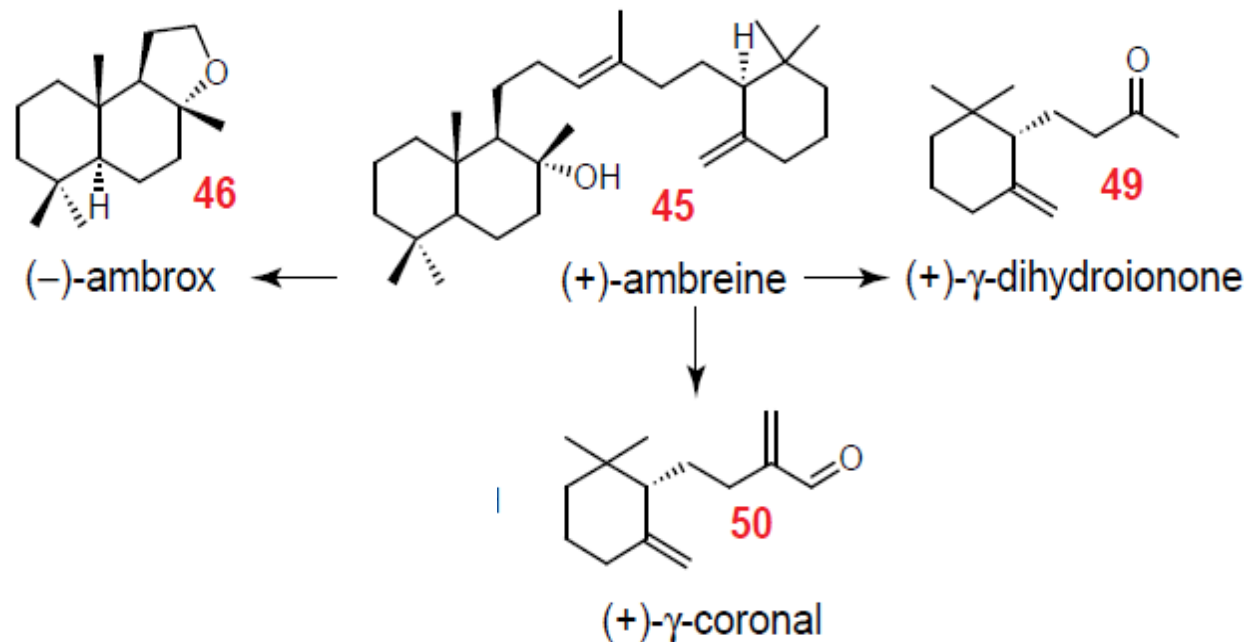
1 g/kg after 8 days

# Grey amber (ambergris)



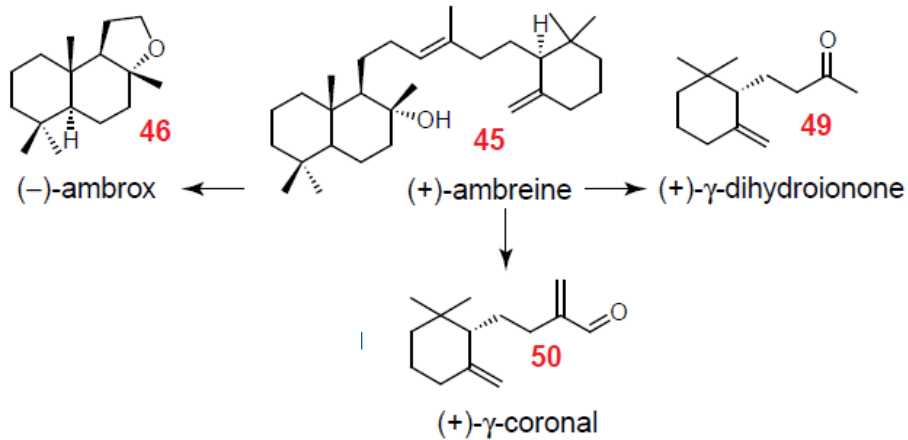
Ambergris is a secretion found in the intestinal tract of the sperm whale. (*Physeter catodon macrocephalus*)

This secretion contains the odourless triterpene **ambreine** (45) that on exposure to sunlight, air and seawater, undergoes a degradative process deriving compounds that are responsible for the complex odour of ambergris.

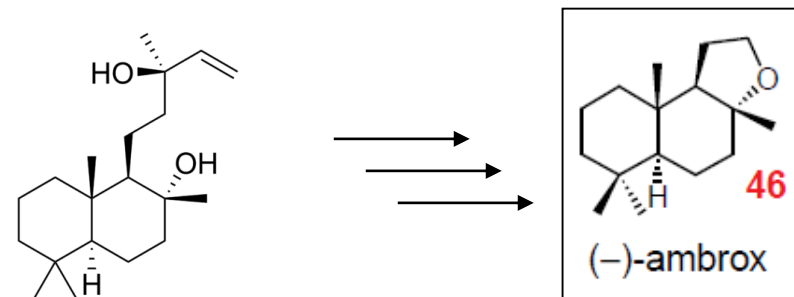




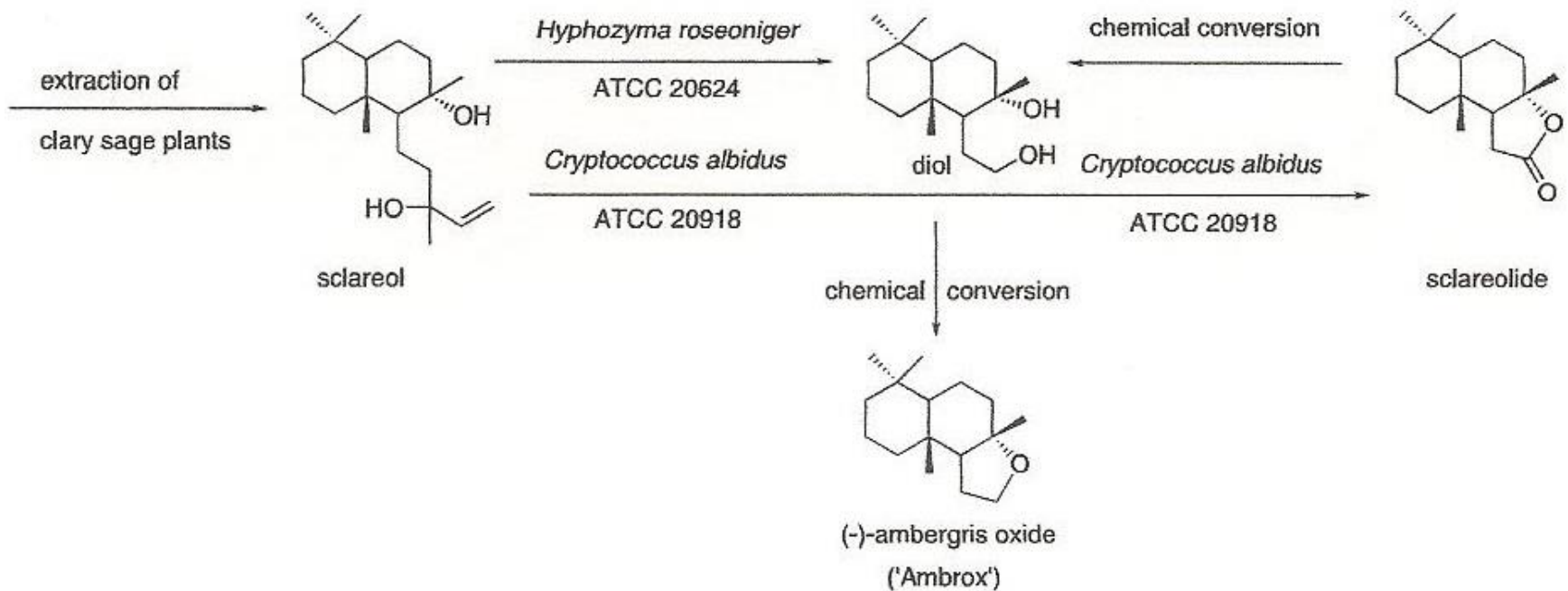
# Grey amber (ambergris)



The most appreciated one is the tricyclic ether **(-)-ambrox (46)**, which is currently produced by **semisynthesis** from **sclareol**, a diterpene present in clary sage.



# Ambrox®

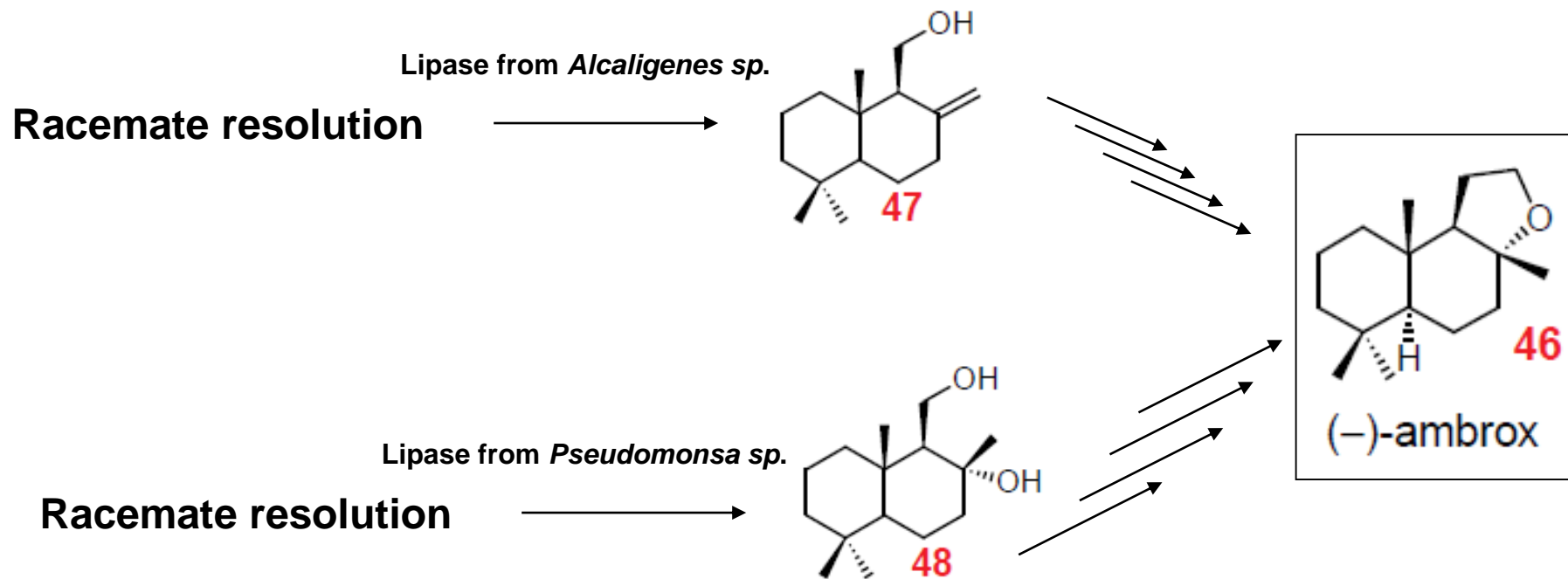


Some fungi and yeasts (*Hyphozyma roseoniger*, *Cryptococcus sp*) have been studied for the ability to use sclereol as unique C source and the convert it into sclareolide or a diol which are then transformed chemically into Ambrox®.

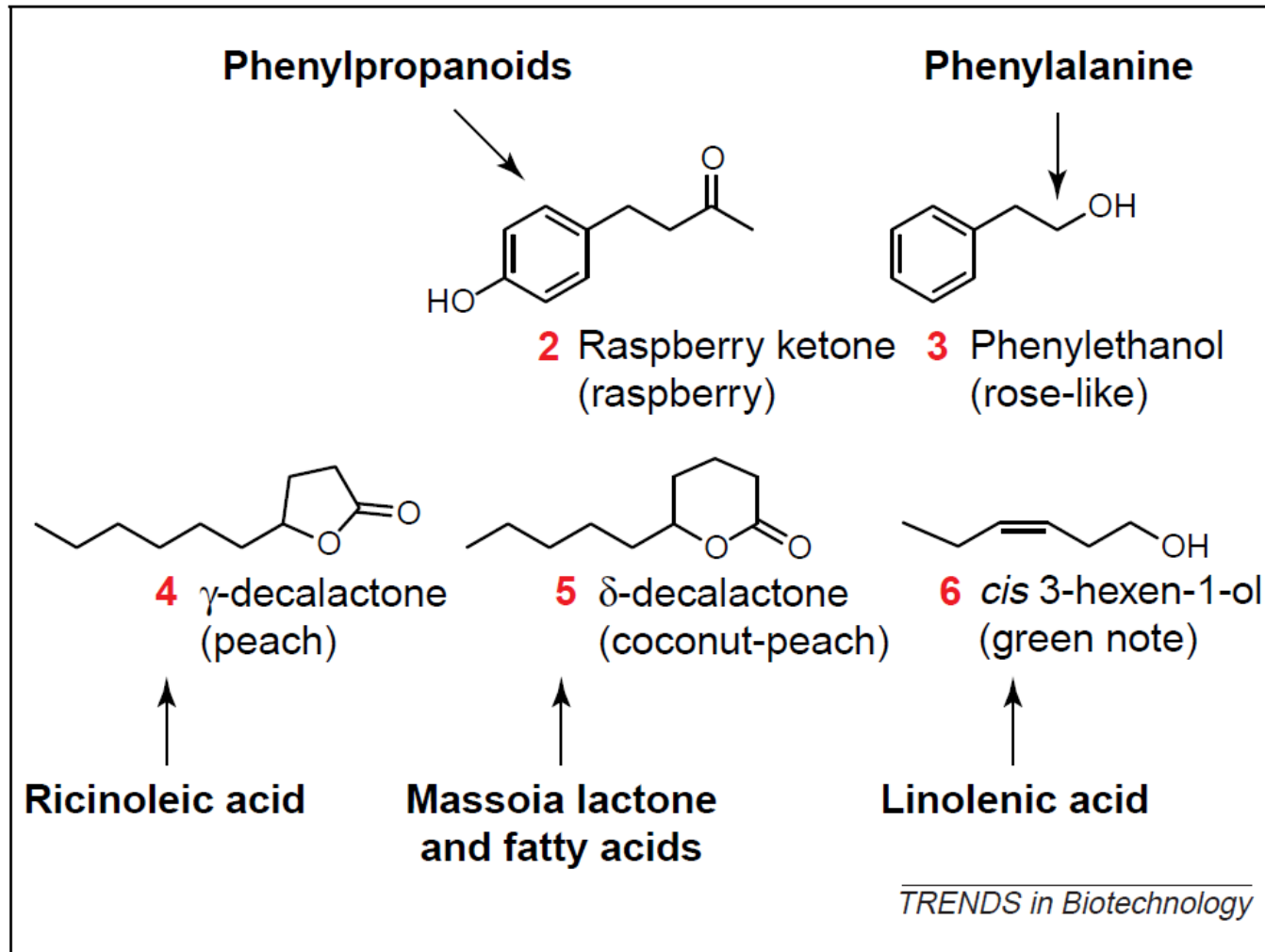
*Hyphozyma roseoniger* CBC 214.83, : one step with 75% yield in 12 days

Recently, (-)- ambrox **46** was obtained in several **chemical transformations** from enantiopure (+)-albicanol **47** and diol (+)-**48**.

These compounds were prepared by **kinetic resolution** of the corresponding racemic materials mediated by **lipase** from *Alcaligenes sp.* and lipase from *Pseudomonas sp.*



# Other Examples of relevant natural flavors prepared by biotransformations



# Microorganisms used for the production of flavors and fragrances:

## Fungi:

- *Ceratocystis* sp. : fruity of flowers terpenes with.
- *Trichoderma viride* e *Trichoderma harzianum*: 6-pentil- $\alpha$ -pirone (6-PP)  
corresponding to coconut flavor

## Yeasts:

- *Kluyveromyces lactis*: citronellol, linalol, geraniol (all terpenes)
- *Williopsis saturnus*: banana.

## Bacteria:

*Corynebacterium glutamicum*: pirazines responsible for the flavors of roasted meat

# **Annexes**



## *Aromi naturali ed aromi “nature-identical”*

La legislazione americana ed europea definiscono gli **aromi naturali** come molecole che vengono prodotte tramite processi fisici, ad esempio con un'estrazione da fonti naturali, oppure tramite reazioni **enzimatiche o microbiche che richiedono precursori di origine naturale**. Infatti la **vanillina** prodotta tramite trasformazione **di acido ferulico da microorganismi** è definita dalla normativa europea ed americana come **“aroma naturale”**. Il termine “naturale” è più apprezzato dalla clientela, quindi gli aromi “nature-identical” sono meno richiesti, perché sono ottenuti da processi chimici. Non ci sono differenze chimiche fra un composto isolato dalla natura e il corrispondente sintetizzato in laboratorio, però i prezzi sono più alti nel caso del primo tipo di sostanze.

## *Aromi naturali*

**Secondo il Regolamento CE N. 1334/2008, una sostanza aromatizzante naturale è una sostanza “ottenuta mediante appropriati procedimenti fisici, enzimatici o microbiologici da un materiale di origine vegetale, animale o microbiologica, che si trova allo stato grezzo o che è stato trasformato per il consumo umano mediante uno o più procedimenti tradizionali di preparazione degli alimenti (...). Le sostanze aromatizzanti naturali corrispondono a sostanze normalmente presenti e identificate in natura.”**

**([www.salute.gov.it/imgs/C\\_17\\_normativa\\_1887\\_allegato.pdf](http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_normativa_1887_allegato.pdf))** Moltissime di queste sostanze si ritrovano in natura solo in tracce, quindi la loro estrazione dalla matrice vegetale o animale sarebbe molto costosa o addirittura impossibile. Per questo motivo i chimici organici hanno iniziato a sviluppare vie microbiologiche per sintetizzarle. Ciò ha comportato un notevole incremento degli studi per trovare metodi biotecnologici adatti per la sintesi di aromi.

**La produzione biotecnologica di aromi è una disciplina matura dell'industria chimica con più di 100 molecole commerciali prodotte tramite processi enzimatici o microbici. L'industria degli aromi e delle fragranze è suddivisa in quattro settori differenti:**

- gli oli essenziali (OE) sono definiti come materiali aromatici ottenuti da fonti botaniche o animali tramite distillazione, pressione a freddo, estrazione con solventi o macerazione e sono una miscela complessa di centinaia di costituenti chimici,**
- gli aromi sono composti organici con una struttura chimica definita, sono ottenuti tramite sintesi organica o biocatalitica, o isolati da fonti animali, vegetali o da fermentazione microbica,**
- le miscele di fragranze e di aromi sono formulazioni complesse di materiali aromatici come oli essenziali e loro derivati naturali ma anche composti chimici,**
- gli aromi formulati sono usati nell'industria alimentare, del tabacco e farmaceutica, mentre le fragranze formulate sono usate per donare profumazione piacevole a profumi e a prodotti per la cura personale e per la pulizia della casa.**

**L'odore** di una molecola è influenzato da molti fattori, in particolare dalle caratteristiche strutturali e stereochimiche, dai gruppi funzionali e dalle proprietà elettroniche. È stato dimostrato che nessuna singola proprietà molecolare è sufficiente per determinare un odore. La qualità odorosa è multidimensionale, però è evidente che è associato esclusivamente a molecole volatili: il peso molecolare più alto riscontrato per un odorante è 294.

L'olfatto è considerato un processo bimolecolare, che coinvolge l'interazione fra una molecola aerotrasportata con il sito complementare di un sistema recettoriale. È risaputo che composti con strutture completamente diverse possono provocare lo stesso odore, poiché tali composti potrebbero interagire con i recettori causando simili impressioni sensoriali nei centri specializzati del cervello. Quindi il ruolo dei recettori, cioè il sito d'azione del composto, è di enorme importanza.

Le molecole odorose usualmente contengono sia una regione fortemente idrofobica che una porzione polare relativamente debole. Quest'ultima, definita "osmoforo", è associata ad un gruppo funzionale, che di solito è un gruppo carbonilico, idrossilico, occasionalmente eteroatomico oppure una varietà limitata di omologhi eteroatomici. Gli odoranti presentano una distinta relazione struttura-attività (SAR) e piccoli cambiamenti strutturali possono influenzare decisamente la forza e la qualità dell'odore. In questo contesto, l'ambiente molecolare del gruppo osmoforo sembra giocare un ruolo fondamentale: infatti una semplice trasposizione dell'osmoforo comporta un drastico cambiamento nelle proprietà odorose.

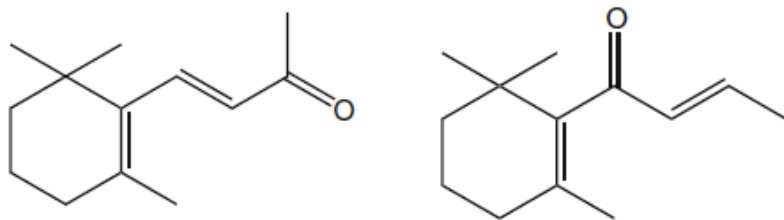
La **soglia di detenzione dell'odore** (ODT) è la più bassa concentrazione di una qualsiasi sostanza chimica specifica o miscela, alla quale è possibile accertare che un odore è presente, cioè il livello che produce la prima sensazione odorosa.

([www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment\\_data/file/290981/scho0307bmkt-e-e.pdf](http://www.gov.uk/government/uploads/system/uploads/attachment_data/file/290981/scho0307bmkt-e-e.pdf)).

È un dato utile per determinare la concentrazione di una sostanza odorosa e gli enantiomeri di un composto possono variarne il valore. L'unità di misura è **parti per milione (ppm)** ed esprime il volume di quel composto nell'unità di volume dell'aria, ma può essere espresso anche come  $Ou_E/m^3$ : **unità odorimetriche** o olfattometriche al metro cubo, che rappresentano il **numero di diluizioni necessarie affinché il 50% degli esaminatori non avverta più l'odore del campione analizzato** (definizione secondo la norma italiana UNI EN 13725:2004).

**Si può affermare che il carattere odoroso di un composto organico derivi dall'arrangiamento spaziale della molecola, ma anche dalle sue proprietà elettroniche ed idrofobiche.**

Per esempio, il  $\beta$ -ionone presenta il caratteristico odore di violetta, mentre il  $\beta$ -damascone alle stesse concentrazioni esprime un profilo odoroso completamente diverso e complicato, in cui predominano elementi fruttati-floreali, esotici-speziati e simili al crisantemo.



Structure of  $\beta$ -ionone and  $\beta$ -damascone.



L'ambra grigia è una secrezione solida che si forma nel tratto intestinale dei capodogli (*Physeter catodon macrocephalus*), contiene 25-45% di (+)-ambreina, un derivato del colesterolo. Essa sembra essere costituita dalle parti indigeribili delle sue prede e da alcuni è considerata un metabolita patologico. Quando è fresca, l'ambra grigia è morbida, nera e il suo odore è sgradevole, però quando è esposta al sole, all'aria e all'acqua marina, questa sostanza si indurisce e rilascia un piacevole profumo, che è dato dalla degradazione dell'inodoro triterpene ambreina. L'ambra grigia si ottiene dai capodogli catturati, galleggiante e dal rastrellamento delle spiagge, ma la quantità ricavata non è sufficiente, da cui ne deriva un costo notevolmente elevato. Questa sostanza altamente profumata si usa per fissare l'essenza di profumi pregiati, permettendo loro una durata maggiore. L'odore è descritto come esotico, legnoso, terroso, simile all'incenso, al tabacco, alla canfora e al muschio e ricorda l'odore dell'oceano.<sup>8</sup> Il declino della caccia alle balene ha comportato ad una riduzione repentina di ambra grigia. Per ovviare a questo problema, l'industria del profumo si è appoggiata alla sintesi organica, che ha permesso la produzione del più apprezzato odorante di ambra grigia, il (-)-Ambrox®, con un odour threshold pari a 0.3 ppm e caratterizzato da una struttura complessa con quattro carboni stereogenici. Questo composto odoroso, come ogni altro componente conosciuto dell'ambra grigia, non presenta l'odorazione tipica di questa sostanza se valutato come composto chimico isolato. Perciò solo una ricostruzione bilanciata e completa del materiale naturale può offrire una fragranza artificiale pregiata di ambra grigia.