



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TRIESTE

Dipartimento di Scienze Chimiche e Farmaceutiche

Corso di Laurea in Tecniche Erboristiche

Tesi di Laurea in

**CHIMICA ORGANICA E CHIMICA DELLE SOSTANZE
ORGANICHE NATURALI**

Metodi biotecnologici per la sintesi di aromi e fragranze

Laureanda:

Meghan Nicole Scherlich

Relatore:

Prof. ssa *Lucia Gardossi*

Anno Accademico 2014-2015

A mamma

CAPITOLO 1: Introduzione

1.1 Differenze fra metodi sintetici e metodi biotecnologici	1
1.2 Olfatto e gusto, brevi accenni di anatomia e di fisiologia	2
1.2.1 Olfatto	2
1.2.2 Gusto	3
1.2.3 <i>Odour detection threshold</i> (ODT)	3
1.3 Cosa determina chimicamente l'odore di una molecola?	3
1.4 Il ruolo della chiralità in aromi e fragranze	4

CAPITOLO 2: La normativa della classificazione degli aromi naturali

2.1 Aromi naturali e aromi “ <i>nature-identical</i> ”	7
2.2 Aromi naturali	7
2.3 Aromi “ <i>nature-identical</i> ”	8

CAPITOLO 3: Principi di biocatalisi, vantaggi e svantaggi

3.1 La biocatalisi	9
3.2 Enzimi	10
3.3 Procedure biocatalitiche: enzimi isolati o cellule intere?	12
3.4 Provenienza dei biocatalizzatori	13
3.5 Lipasi: potenziale biotecnologico	14
3.6 Vantaggi	15
3.7 Svantaggi	15

CAPITOLO 4: Esempi di metodi produttivi di aromi e fragranze

4.1 Vanillina e metodi per la sintesi	16
4.1.1 <i>Vanilla planifolia</i> , Orchidacea	17
4.1.2 Estrazione tradizionale dai baccelli	18
4.1.3 La glucovanillina come precursore per la sintesi di vanillina	18
4.1.4 Via dello shikimato: vanillina naturale	19
4.1.5 Azione di microorganismi sull'acido ferulico: produzione di biovanillina	21
4.1.6 Altre vie biosintetiche	22
4.1.7 Possibilità di utilizzo di cellule e tessuti vegetali per sintetizzare biovanillina	25
4.1.8 Vanillina sintetica	25

4.1.9 Nuove opportunità di sintesi: recupero di “agro wastes”	27
4.1.9.1 Biovanillina da rifiuti agricoli	27
4.2 Mentolo	29
4.2.1 Genere <i>Mentha</i> , Lamiaceae	29
4.2.2 Mentolo, un monoterpene	31
4.2.3 Metodi naturali	33
4.2.4 Metodi sintetici	34
4.2.5 Metodi biotecnologici	36
4.2.6 Rizobatteri influenzano la produzione di olio essenziale in menta piperita	37
4.2.7 <i>p</i> -Mentano	39
4.3 Ambra grigia, estrazione vs. metodi sintetici	41
4.3.1 Composti dell’ambra grigia e la loro biosintesi	41
4.3.1.1 Ambrox®	42
4.3.1.2 α -Ambrinolo	44
4.3.1.3 Scoperta di una nuova classe di composti con odorazione dell’ambra grigia	44
4.3.2 Acido labdanolico, precursore di (-)-Ambrox®	45
4.3.3 Altri composti chimici per la sintesi di Ambrox®	47
4.4 Ironi, principi odorosi di varie specie di Iris	48
4.4.1 Specie di <i>Iris</i> , Iridaceae	48
4.4.2 Preparazione classica dell’olio di iris	49
4.4.3 Biogenesi degli ironi	50
4.4.4 Produzione sintetica	51
4.4.5 Metodi enzimatici brevettati per la sintesi degli ironi	52
4.4.6 Ulteriori biotrasformazioni	53
CAPITOLO 5: Conclusioni	55
Bibliografia/Riferimenti	56

CAPITOLO 1

INTRODUZIONE

1.1 Differenze fra metodi sintetici e metodi biosintetici

Al giorno d'oggi la richiesta e la produzione di aromi e fragranze è considerevole ed il loro impiego è vastissimo nella farmaceutica, nella cosmesi, nell'industria alimentare (sia nei cibi che nelle bevande) e nell'industria tessile, solo per citare alcuni dei loro utilizzi. Questi composti possono essere ricavati tramite metodi sintetici o biotecnologici. Una delle differenze fra queste tecniche è la preferenza dei clienti per aromi alimentari di origine naturale, quindi l'attenzione dei chimici organici si è rivolta allo sviluppo di vie biosintetiche e al loro miglioramento per ottenere aromi e fragranze naturali. Un altro aspetto molto importante che ha indirizzato l'interesse verso metodi biotecnologici è il concetto di "Green Chemistry", che mira a ridurre l'impatto ambientale dei processi sintetici, basato sull'utilizzo di materie prime rinnovabili, sulla diminuita formazione di sottoprodotti indesiderati e rifiuti e sull'impiego di reagenti e solventi che siano meno tossici e dannosi possibili.¹ La produzione biotecnologica di aromi è una disciplina matura dell'industria chimica con più di 100 molecole commerciali prodotte tramite processi enzimatici o microbici.² L'industria degli aromi e delle fragranze è suddivisa in quattro settori differenti ma collegati fra di loro:

- gli olii 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 olii 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.

Molte fragranze sono accumulate e biosintetizzate in strutture anatomiche specializzate, come le cellule secretorie: l'isolamento di queste cellule ha permesso la caratterizzazione di molti degli enzimi e dei geni coinvolti nella formazione di molti prodotti naturali, che possono essere sfruttati nelle reazioni biocatalitiche.³ Inoltre bisogna tenere in considerazione anche i costi: usualmente la biocatalisi è più costosa in confronto alle stesse reazioni chimiche di sintesi e in alcuni casi non è conveniente il suo utilizzo su scala industriale. Si è stimato che il prezzo di un aroma di origine

microbica deve aggirarsi attorno \$200 e \$2000 per essere competitivo. ⁴ In tal caso, determinati composti, come alcuni carboidrati, terpeni ed alcaloidi, sono economici perché derivano dal “chiral pool”, concetto che si riferisce a prodotti enantiomericamente puri con prezzi che si aggirano dai 2 ai 100 \$ per kg, che sono direttamente disponibili in natura ed estratti dalle piante o da processi fermentativi in quantità annue fra 10^2 e 10^5 tonnellate. Si calcola che la richiesta mondiale di aromi e fragranze, incluse le loro miscele e di olii essenziali, nel 2014 ha raggiunto i 23.5 milioni di \$, mentre previsioni future ipotizzano che l'industria biotecnologica produrrà almeno il 20% dei prodotti chimici mondiali, compresi aromi e fragranze, con un mercato di circa \$2290 milioni. ⁵

1.2 Olfatto e gusto, brevi accenni di anatomia e di fisiologia

I sensi dell'olfatto e del gusto sono collegati fra di loro per quanto riguarda la percezione: la sensibilità gustativa è infinitamente più recettiva se gli organi olfattivi sono stimolati e perfettamente funzionanti. ⁶ Composti odorosi vengono recepiti principalmente con l'olfatto, ma alcuni sono capaci di interagire con i recettori del gusto. Sono composti chimici volatili, trasportati dall'aria inalata all'epitelio olfattivo localizzato nelle cavità nasali. Gli odoranti devono possedere particolari proprietà molecolari per causare una risposta sensoriale: devono avere un certo grado di lipofilia ed un'elevata pressione di vapore per essere trasportati al sistema olfattivo, una certa solubilità in acqua per permeare il sottile strato di muco e devono essere in concentrazioni abbastanza alte per interagire con uno o più recettori olfattivi. ³ Sono state formulate varie teorie che cercassero di spiegare l'interazione fra un composto odoroso e il recettore nasale. Una di queste, chiamata “teoria vibrazionale”, propone che i recettori olfattivi sono capaci di percepire la vibrazione delle molecole odorose. Il cervello interpreta questa sensazione come odore, però tale teoria non spiega come un recettore possa captare la vibrazione. Successivamente il biofisico Luca Turin ha suggerito la presenza di un *gap* nelle proteine del recettore al quale corrisponde una differenza di potenziale, con NADPH e ioni di zinco come “elettrodi”. Gli elettroni non possono attraversare lo spazio, a meno che una molecola odorosa non si piazzasse fra questi elettrodi. Gli elettroni perdono energia, causando dei moti vibrazionali eccitatori. ⁷

1.2.1 Olfatto

I responsabili del senso dell'olfatto sono i recettori olfattivi, contenuti nell'epitelio olfattivo: una piccolissima percentuale dell'aria inspirata raggiunge gli organi olfattivi. Le sostanze idrosolubili e liposolubili stimolano i recettori olfattivi, che sono specifici per ogni odore, causando la depolarizzazione della membrana e l'inizio del potenziale d'azione. Bastano 4 molecole odorose per stimolare il recettore, ma non sempre si ha una sensazione cosciente. Se invece si percepisce una

sostanza odorosa, questa scatena una forte componente emozionale e speciali risposte comportamentali. Il sistema nervoso centrale interpreta l'odore in base al recettore stimolato e finora sono stati individuati 50 odori "primari".⁶

1.2.2 Gusto

L'organo principalmente coinvolto nella percezione gustativa è la lingua, sulla cui superficie sono presenti i recettori gustativi. Questi recettori si comportano alla stessa maniera di quelli olfattivi: le sostanze chimiche, entrando a contatto con i recettori, provocano un cambiamento del potenziale di membrana con conseguente generazione del potenziale d'azione. Le sensazioni gustative primarie sono dolce, salato, aspro ed amaro e la capacità di stimolare il loro specifico recettore è intrinseca del gusto; inoltre è stato dimostrato che i recettori vengono stimolati più facilmente da una sensazione sgradevole piuttosto che da una piacevole, dolce o salata che sia.⁶

1.2.3 Odour detection threshold (ODT)

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).

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). Esistono pure la determinazione in soluzione secondo la procedura di Guadagni oppure il test triangolare, che sono utili per determinare l'intensità odorosa di diversi enantiomeri che differiscono per qualità olfattive.⁸

1.3 Cosa determina chimicamente l'odore di una molecola?

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 etero oppure una varietà limitata di omologhi eteroatomici. Comunque la presenza del gruppo funzionale non è un requisito necessario per provocare l'odore. Quindi l'osmoforo dovrebbe essere un elemento substrutturale piuttosto che il gruppo funzionale. 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. Per esempio, il β -ionone presenta il caratteristico odore di violetta, mentre il β -damascone alle stesse concentrazioni esprime un profilo odoroso completamente diverso e complicato, in cui predominano elementi fruttati-floreali, esotici-speziati e simili al crisantemo. 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.⁷

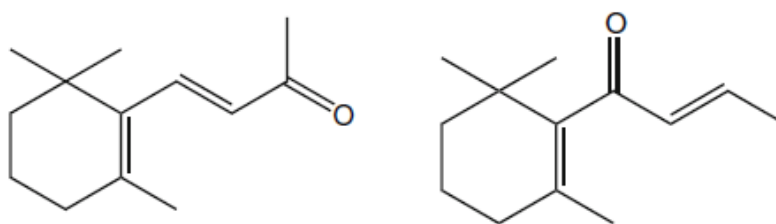


Figura 1. Le strutture di β -ionone e β -damascone. (Riadattato da ref 7)

1.4 Il ruolo della chiralità in aromi e fragranze

Le molecole odorose interagiscono con il corpo umano e se queste sono chirali, l'interazione dipende dalla loro configurazione assoluta.⁹ Un esempio concreto è la differenza dal punto di vista olfattivo fra il (+)-limonene e il (-)-limonene: il primo ha un odore caratteristico di arancia, mentre il secondo è tipico dei limoni ed entrambi i composti possono essere ritrovati nella *Mentha piperita* (Labiatae). Mentre il (+)-carvone (*Carvum carvi*, Umbelliferae) ha l'odore tipico del cumino e il suo enantiomero, estratto dalla *Mentha spicata* (Labiatae), ha l'odore della menta verde.^{1, 10} Il (+)- β -

citronellolo ha l'odore della citronella ma il suo enantiomero ricorda il geranio. Pure gli aminoacidi hanno gusti diversi: le forme L- sono amare e quelle D- sono dolci.^{8, 11}

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, lavender
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

Tabella 1. Esempi di enantiomeri con diverse proprietà olfattive. (Riadattato da **ref 8**)

Quindi dal punto di vista chimico è importante sviluppare correttamente la formulazione, che può contenere un unico enantiomero oppure una combinazione bilanciata degli enantiomeri. Infatti i chimici organici hanno studiato le proprietà odorose di fragranze chirali enantiomericamente pure per definire i parametri strutturali necessari per evocare una certa impressione odorosa e per stabilire le relazioni fra struttura e odore. A proposito di enantioselettività della percezione odorosa, Frater e Kraft hanno teorizzato i seguenti punti: (I) se entrambi gli enantiomeri presentano la stessa soglia olfattiva, è probabile che gli elementi stereogenici siano localizzati nella regione idrofobica dell'odorante, la cui geometria non ha influenza sul processo di riconoscimento dell'odore, (II) quando gli elementi stereogenici si trovano nella porzione della molecola che lega il recettore, allora un enantiomero è inodore e l'altro ha un odour threshold molto basso, (III) se non sussistono esempi di enantioselettività per una certa classe di odoranti, allora è probabile che non sia ancora stato scoperto il composto più odoroso di quella famiglia.⁸ Quindi posizionando elementi stereogenici in porzioni differenti della molecola, potrebbe essere possibile determinarne il sito che lega il recettore. Ammesso che si determinino le strutture che comportano una percezione odorosa, non è detto che un composto che risponda a quelle determinate caratteristiche strutturali abbia l'odore della classe di appartenenza, ma potrebbe essere inodore. Quindi si è riconosciuto che i dettagli configurazionali sono rilevanti nella determinazione del profilo e della potenza odorosa.⁸ Inoltre bisogna prestare attenzione quando si trattano i dati sperimentali sugli odori, perché questi dipendono dalla descrizione soggettiva di chi annusa un composto odoroso, dalla fonte d'origine (che può comportare una variazione significativa del carattere di un odore) e dalla purezza. A proposito dell'ultimo fattore, è

stato dimostrato che piccole tracce di impurità caratterizzate da un'odorazione forte possono trasformare un odore. Anche con purezza enantiomerica pari al 98% si ottengono risultati sbagliati, se un enantiomero è significativamente più forte (cioè con una soglia pari a 0.0002 ppm): il carattere odoroso di quello più debole può essere facilmente dominato da una piccola frazione del componente più forte. Quindi si dovrebbero prendere in considerazione dati ottenuti tramite gas cromatografia, oltre ad esserci controlli sulla presenza di un unico enantiomero nel campione (almeno 99% puro).¹¹ Diverse nuove molecole odorose sono state scoperte in seguito al disegno razionale della loro struttura basato sulla forma, sui gruppi funzionali e sulle caratteristiche stereo-elettroniche delle molecole guida con sviluppo di procedure ed intensa ricerca.⁵ Poiché la maggior parte degli aromi naturali è presente in una forma enantiomericamente arricchita, i chimici hanno studiato la loro configurazione assoluta e hanno cercato di trovare una correlazione fra l'origine geografica o il cultivar e l'eccesso enantiomerico di un certo aroma. Da questi studi derivano metodi analitici, che valutano l'autenticità dei materiali naturali.⁸

CAPITOLO 2

LA NORMATIVA DELLA CLASSIFICAZIONE DEGLI AROMI NATURALI

2.1 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.¹² Infatti la vanillina prodotta tramite trasformazione di acido ferulico da microorganismi è definita dalla normativa europea ed americana come “aroma naturale”.¹³ 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.¹

2.2 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) 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.¹² 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. I principali metodi “naturali” per la produzione di aromi sono:

- la biocatalisi, vedi capitolo 3 “Principi di biocatalisi, vantaggi e svantaggi”;
- la biosintesi *de novo*, cioè la fermentazione, che viene sfruttata fin dai tempi antichi per la produzione di alimenti. Molti microorganismi sono noti per la loro capacità di produrre aromi e fragranze partendo da semplici nutrienti: essi duplicano in qualche maniera il metabolismo secondario delle piante e così si ottengono composti classificati come “naturali” dalla legislazione europea ed americana.⁴ Per la maggior parte di queste fermentazioni è importante fornire un intermedio o un precursore, in carenza o in assenza dei quali la produzione sarebbe limitata.

Ecco alcuni esempi di microorganismi impiegati per la sintesi di aromi e fragranze:

- Funghi: specie di *Ceratocystis* producono un ampio spettro di terpeni caratterizzati da un profumo fruttato o floreale. *Trichoderma viride* e *Trichoderma harzianum* producono il 6-pentil- α -pirone (6-PP), odorazione tipica di cocco.
- Lieviti: *Kluyveromyces lactis* forma citronellolo, linalolo, geraniolo, terpeni dall'aroma floreale. *Williopsis saturnus* sintetizza quantità significative di acetati ramificati volatili, in particolare il 3-metil-butil-acetato, caratteristico dell'aroma di banana.
- Batteri: precursore di comuni esteri di fragranze è l'acido metilbutirrico, che è prodotto da diverse specie di *Acetobacter*. Le pirazine sono responsabili dell'aroma di cibi arrostiti, come la carne cotta, le noci e i chicchi di caffè tostati e si formano durante la normale cottura degli alimenti. Si è scoperto che pure *Corynebacterium glutamicum* produce questi composti e possono essere aggiunti in quei prodotti in cui non si formano le pirazine (cottura nel microonde). ¹²
- l'estrazione da piante ed animali.

I processi fisici citati nel regolamento si riferiscono all'estrazione, alla distillazione, alla concentrazione e alla cristallizzazione da sorgenti animali, come ad esempio pollame e frutti di mare. Vanno citati le fonti vegetali (frutta e spezie) e funghi. ¹² Però spesso accade che le operazioni di lavorazione degli alimenti (raccolta prematura, conservazione a lungo termine ed uso di trattamenti fisici) possono causare una perdita di aroma. ⁴

2.3 Aromi “nature-identical”

I composti preparati tramite sintesi chimica sono definiti “nature-identical” (EC Flavour Directive 88/388/EEC), mentre quelli che non corrispondono ad un aroma isolato in natura sono denominati “artificiali” (US Code of Federal Regulations 21 CFR 101.22). I metodi di produzione sia delle fragranze nature-identical che delle fragranze artificiali sono influenzati da stringenti limitazioni economiche. ¹ Si è notato una predilezione della clientela per i composti “natural-identical” rispetto a quelli artificiali, perché l'uso di procedure chimiche conduce alla formazione di prodotti indesiderati e di impurità nei colori, da cui ne consegue un impiego limitato di tali sostanze nelle industrie delle bevande ed alimentari. ⁵ Inoltre gli aromi artificiali derivano da precursori petrolchimici. ³

CAPITOLO 3

PRINCIPI DI BIOCATALISI, VANTAGGI E SVANTAGGI

3.1 La biocatalisi

La biocatalisi è una qualsiasi trasformazione di composti, naturali e non, da parte di enzimi. Questi hanno la capacità di agire su sostanze che non sono loro substrati naturali e su sostanze sintetiche con strutture molto differenti rispetto a quelle presenti in natura. Offre vantaggi nella produzione di prodotti chimici fini, in particolare di farmaci, perché sfrutta l'enantioselettività e la regioselettività comportando un aumento dell'ecosostenibilità dei metodi produttivi. Questo tipo di processo può fornire un unico enantiomero attivo per aromi, fragranze e cosmetici.¹² La minore tossicità delle reazioni biocatalitiche in confronto ai convenzionali processi chimici ha attirato gli studi dei chimici organici, interessati a trovare metodi biosintetici che consentono un maggior rispetto per l'ambiente e la salute dell'uomo. Inoltre la biocatalisi permette la trasformazione di materie prime bio-rinnovabili e in alcuni casi è l'unica scelta possibile per la sintesi di alcuni composti. Un valore indicativo per la produttività del biocatalizzatore è il “*turnover number*”, che corrisponde al numero massimo di moli di substrato che un enzima può convertire a prodotto nel sito catalitico nell'unità di tempo. Le catalisi enzimatiche possono essere usate al posto delle catalisi chimiche nella risoluzione cinetica di racemati e nella sintesi asimmetrica, se si è in presenza di un composto prochirale. La seconda reazione è basata sulla formazione selettiva di una configurazione attorno ad uno o più centri chirali. È importante distinguere i metodi di biotrasformazione dalla biosintesi, nella quale prodotti relativamente complessi sono sintetizzati de novo da cellule intere, tessuti, organi oppure da organismi partendo da semplici substrati. La biotrasformazione riguarda infatti la trasformazione microbica di composti inorganici oppure organici.¹⁴ Oltre agli aspetti chimici, ci sono anche altri fattori che influenzano la produzione biotecnologica. In particolare bisogna considerare gli aspetti tecnologici ed economici.⁴

'Market pull'	'Technical push'
Increasing consumers' demand for 'organic', 'bio', 'healthy', 'natural'	High chemo-, regio- and stereo-selectivities of biocatalytic systems
Industrial dependence on distant (frequently overseas) raw materials, undesired/limited raw materials	Sustainability of bioprocesses
Search for natural character-impact compounds	Improved biocatalysts by evolutionary and rational enzyme engineering and metabolic engineering
Search for natural flavour compounds with additional functionalities (e.g. antimicrobial properties)	Improved downstream processing, especially in situ product-recovery techniques

Tabella 2. Fattori che influenzano la scelta di sfruttare processi biotecnologici per la produzione di aromi. Si suddividono in “spinta del mercato” (sinistra) e “spinta tecnologica (destra). (Riadattato da ref 2)

3.2 Enzimi

Gli enzimi sono sostanze proteiche, che catalizzano reazioni biologiche, abbassando l'energia di attivazione e quindi aumentando la velocità di reazione (**Figura 2**). Ciò si spiega con l'abilità dell'enzima di diminuire l'energia dello stato di transizione della reazione.

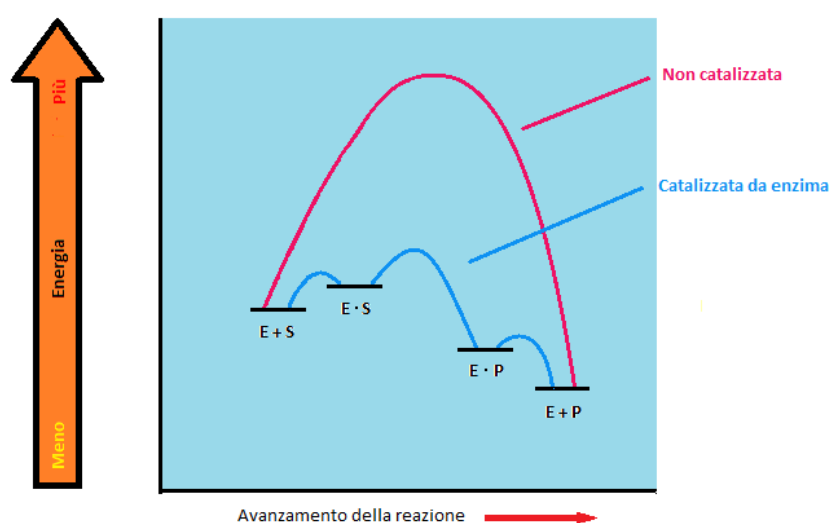


Figura 2. Azione dell'enzima sulla reazione. (Riadattato da ref 15)

Inoltre possono agire su un unico composto oppure agire su molteplici substrati, catalizzando la trasformazione (ad esempio idrolisi, reazioni redox, isomerizzazione, addizione/eliminazione di piccole molecole a/da un substrato) di molti tipi di legami chimici. Possono contenere piccole porzioni non proteiche, chiamate cofattori, se si tratta di ioni inorganici oppure coenzimi, se sono piccole molecole organiche, come ad esempio NAD (nicotinammide adenina trifosfato) o ATP (adenosina trifosfato). Gli enzimi vengono classificati in base al tipo di reazione che catalizzano secondo l'NC-IUMB (Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology). Ecco le varie classi con alcuni esempi:

- **EC 1. Ossidoreduttasi.**

Enzimi: deidrogenasi (introduzione di doppi legami), ossidasi (ossidazione), riduttasi (riduzione), perossidasi (ossidazione ed epossidazione).

- **EC 2. Transferasi.**

Enzimi: chinasi (trasferimento di gruppo fosfato), transaminasi (trasferimento di gruppo amminico), glicosiltransferasi (formazione del legame glicosidico).

- **EC 3. Idrolasi.**

Enzimi: lipasi (idrolisi di esteri), glicosidasi (formazione/idrolisi del legame glicosidico), proteasi (sintesi/idrolisi del legame peptidico).

- **EC 4. Liasi.**

Enzimi: aldolasi (reazione aldolica), decarbossilasi (perdita di CO_2).

- **EC 5. Isomerasi.**

Enzimi: epimerasi (isomerizzazione di centro di chiralità), glucosio isomerasi (isomerizzazione di carboidrati).

- **EC 6. Ligasi.**

Enzimi: carbossilasi (addizione di CO_2), sintetasi (formazione di un nuovo legame).

I fattori che influenzano le reazioni enzimatiche sono molteplici, in particolare: a) l'attività specifica, indicata come k_{cat} (costante di velocità di primo ordine per la conversione di ES, ES*-stato di transizione ed EP), b) la specificità verso un substrato, che si identifica con k_{cat}/K_M , c) la selettività, cioè la capacità di distinguere fra due o più possibili substrati oppure tra due o più reazioni su un unico substrato. L'enantioselettività invece riguarda la selettività dell'enzima nei confronti dell'enantiomero S o R, quindi per ricavarla è importante conoscere i valori di specificità (k_{cat}/K_M) di ciascun enantiomero. ¹⁵

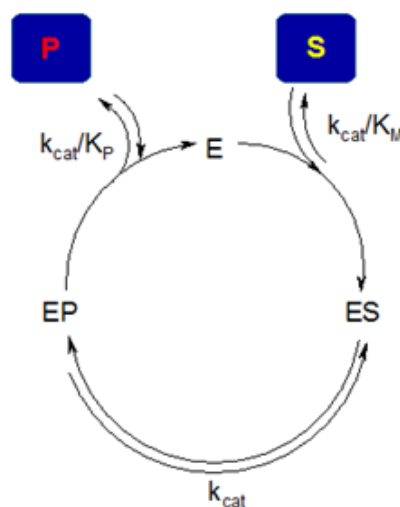


Figura 3. Fattori che influiscono sulle reazioni enzimatiche. (Riadattato da **ref 15**)

3.3 Procedure biotecnologiche: enzimi isolati o cellule intere?

Gli enzimi isolati sono preferibili per il basso numero di reazioni collaterali e di metaboliti, che devono altrimenti essere separati dal prodotto di reazione, ma spesso non è facile sfrutarli su scala industriale. Un miglioramento è stato ottenuto immobilizzando gli enzimi su supporti solidi: le conseguenze più importanti implicano un incremento della stabilità, un uso prolungato o continuato, una facilitata separazione dai composti della reazione, la prevenzione di contaminazione proteica e di contaminazione microbica. Un numero di reazioni enzimatiche richiedono coenzimi organici costosi (per esempio ossiriduttasi e aldolasi), che precludono il loro uso come reagenti stechiometrici (non-rigenerati). Quindi la rigenerazione del cofattore è necessaria per il processo per essere possibile economicamente ed industrialmente. Generalmente le cellule intere sono utilizzate per target complessi o per miscele di prodotti, mentre gli enzimi isolati effettuano processi in un unico passaggio.⁴ Quindi, in base al tipo di reazione, si può decidere se utilizzare un metodo oppure l'altro. Inoltre la scelta si effettua considerando i pro e i contro di entrambi i metodi.

La cellula intera è meno costosa perché non sussiste il problema dell'isolamento dell'enzima, fornisce un'efficiente sistema rigenerativo del cofattore *in situ* e la presenza di numerosi enzimi permette una chimica multi-step. Però le cellule non tollerano alte concentrazioni di substrato o di prodotto e sono poco compatibili con solventi organici e possono formare composti indesiderati, derivanti dall'azione di molteplici enzimi. Accade spesso che aromi influenzino negativamente la fisiologia cellulare incrementando la fluidità di membrana. Ciò può comportare un collasso dei gradienti transmembrana e quindi la perdita della vitalità cellulare.² Per evitare alcuni di questi problemi, le condizioni di reazione devono essere manipolate per minimizzare la produzione di sottoprodotti o la degradazione del prodotto o, alternativamente, l'attività dell'enzima indesiderato deve essere ridotta oppure eliminato tramite inibizione della sintesi dell'enzima, mutazione cellulare o denaturazione degli enzimi non voluti. I sistemi di biotrasformazione cellulare sono vantaggiosi quando i cofattori degli enzimi partecipano alle biocatalisi e necessitano di essere rigenerati. Le condizioni metaboliche possono promuovere la loro rigenerazione, evitando la fase di riciclo.¹⁶ Un altro aspetto positivo è la capacità delle cellule, ad esempio vegetali, di produrre un ampio spettro di aromi e fragranze tipici della loro matrice di provenienza e questa caratteristica deriva dalla loro particolare abilità genetica e biochimica.¹⁷

Characteristics	Biotechnological strategy
Formation of unwanted by-products owing to complex metabolic pathways	Overexpression of key genes of the synthetic pathways Heterologous gene expression/use of engineered enzymes Knockouts of genes involved in product degradation 'Precursor approach' instead of de novo biosynthesis Screening; enrichment cultures Subsequent biotransformation converting a by-product to the desired product
Toxic properties of the flavour compounds produced	In situ product recovery by: Adsorption, e.g. on XAD resins Stripping and adsorption Extraction (two-phase bioprocess) Membrane-based processes Resting cells instead of growing ones Product-tolerant strains
Toxic properties of the precursor molecules	Sequential precursor feeding On line monitoring of precursor/bioactivity Immobilisation of microorganisms Two-phase bioprocess with an organic solvent as the precursor reservoir Resting cells instead of growing ones Precursor-tolerant (solvent-tolerant) strains Fungal spores instead of mycelia

Tabella 3. Principali problemi durante la produzione microbiologica di aromi e strategie biotecnologiche per affrontarli e superarli. (Riadattato da ref 2)

3.4 Provenienza dei biocatalizzatori

Biocatalizzatori attivi sono stati ottenuti dallo screening di una vasta gamma di microorganismi, che spazia dagli archea ai sistemi fungini, spesso isolati da ambienti estremi. Oltre agli organismi già sequenziati e ampiamente sfruttati nei processi biocatalitici, ci sono molteplici funghi e batteri che possono essere fonti di enzimi utilizzabili nella produzione di alimenti e di aromi: *Bacillus subtilis* (vedi paragrafo 4.2.5), *Brevibacterium linens*, *Corynebacterium glutamicum*, *Gluconobacter oxydans*, *Lactococcus lactis*, *Pseudomonas putida*, *Streptococcus thermophilus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Yarrowia lipolytica* e *Aspergillus niger* (vedi paragrafi 4.1.3 e 4.1.7.1).² Alcuni studi hanno promosso la ricerca di enzimi provenienti da organismi marini, come funghi, batteri, alghe, spugne, pesci, gamberi e rettili, i quali hanno mostrato proprietà biocatalitiche interessanti: alta tolleranza salina, ipertermostabilità, barofilicità e adattabilità al freddo. A questo proposito, si è scoperto che *Aspergillus sydowii* CBMAI 934 e specie di *Botryosphaeria*, di *Eutypella* e di *Xylaria* presentano ossidoreduttasi attive, che catalizzano l'idrossilazione regioselettiva di (-)-Ambrox®, di (-)-sclareolo e (+)-sclareolide.¹⁸ L'uso del lievito di birra è ampiamente documentato per trasformazioni di aromi di origine naturale, perché trasforma molte sostanze chimiche con alta selettività chimica, oltre ad essere economico, sicuro e facilmente reperibile. Inoltre è stato sfruttato

per la sintesi di intermedi chimici, che utilizzati in altre reazioni producono aromi e fragranze nature-identical o artificiali.¹

3.5 Lipasi: potenziale biotecnologico

Le lipasi, triacil glicerol acil idrolasi (EC 3.1.1.3), appartengono alla classe delle idrolasi e la loro azione principale è l'idrolisi del legame estereo e le reazioni di acilazione in condizioni blande, cioè a temperatura ambiente ed a pressione atmosferica. La sintesi di esteri lipasi-catalizzata avviene tramite reazioni di esterificazione o di trans-esterificazione: nel primo caso l'acqua è rilasciata come prodotto secondario, che ha la capacità di invertire l'equilibrio della reazione (reversibilità), quindi è importante rimuoverla dall'ambiente di reazione. Invece nelle reazioni di trans-esterificazione l'alcol rappresenta il prodotto secondario.⁵ Comunque le lipasi presentano molte caratteristiche vantaggiose: sono chemo-, regio- ed enantioselettivi nei confronti di un ampio range di substrati, sono stabili, rimangono enzimaticamente attivi in solventi organici¹ (scoperta avvenuta grazie al chimico A. Klibanov¹⁹) e in solventi neoterici (liquidi ionici e fluidi supercritici) e non necessitano di cofattori. Sono disponibili in grandi quantità, perché vengono prodotti tramite espressione genica in vari microorganismi: in particolare si ottengono da batteri (specie di *Bacillus* e *Pseudomonas*), da lieviti (specie di *Candida*) e da muffe (specie di *Aspergillus*). Altri aspetti importanti sono l'assenza di reazioni collaterali e nella maggior parte dei casi le lipasi possono essere recuperate e riutilizzate nuovamente senza perdita di attività.¹ Il sito attivo è costituito da tre residui amminoacidici diversi: serina, istidina ed aspartato o glutammato, analogamente alle serin-idrolasi. Alcuni enzimi di origine batterica sono la lipasi porcina pancreatica (PPC) e lipasi *Candida cylindracea*, che in solventi organici catalizzano esterificazioni regio- e stereoselettive del gruppo alcolico primario in vari dioli alifatici ed aromatici tramite transesterificazione.¹⁹ Questi enzimi sono stati sfruttati anche per produrre i composti attivi di fragranze artificiali, perché altrimenti le fragranze artificiali sono preparate ed usate come una miscela di isomeri. Ad esempio gli alcoli muguesia®, pamplefleur® e mugetanol® sono preparati partendo dagli alcoli racemici (in alto a destra nella **Figura 4**), che sono stati risolti tramite la catalisi effettuata da una lipasi. I precursori di Floropal® e magnolan® vengono risolti grazie ad una lipasi partendo dall'idrossi-chetone (38) e dal diolo (39) rispettivamente (in basso a destra nella **Figura 4**).¹

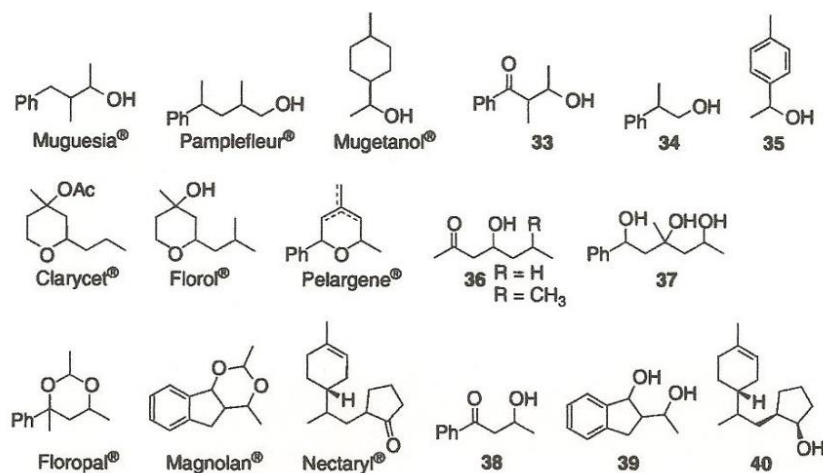


Figura 4. Alcuni esempi di fragranze artificiali ottenute tramite azione di lipasi dai loro corrispettivi precursori. (Riadattato da **ref 1**)

3.6 Vantaggi

Sono stati riscontrati notevoli vantaggi nell'utilizzo di biocatalizzatori. Innanzitutto si riducono le fasi totali del processo chimico con conseguente diminuzione del costo. Dal punto di vista strettamente chimico, le condizioni di reazione sono blande: pH neutro e spesso si lavora a temperatura ambiente. Un aspetto, che ha giocato un ruolo importante nel progresso della biocatalisi, è l'evoluzione direzionata degli enzimi in vitro, che impiega mutazioni genetiche casuali e ricombinazione, seguita da screening o selezione di una specifica attività enzimatica. Gli enzimi che derivano da questa tecnica sono caratterizzati da alterate specificità per il substrato, enantioselettività, stabilità termica e tolleranza ai solventi organici. Un esempio è l'incremento dell'eccesso enantiomerico fino al 90% nell'idrolisi di esteri catalizzata dalla lipasi ricombinante proveniente dal batterio ubiquitario *Pseudomonas aeruginosa*.¹

3.7 Svantaggi

Accanto ai vari vantaggi, ci sono pure gli svantaggi: i biocatalizzatori sono spesso meno stabili in confronto ai catalizzatori convenzionali, lo sviluppo di processi biocatalitici adatti alla produzione industriale è più lungo, esiste un numero ridotto di catalizzatori in commercio e se il biocatalizzatore non è un enzima commerciale è richiesto un lungo lavoro di tipo microbiologico. La produzione enzimatica deve essere aumentata grazie ad un adeguato sviluppo biotecnologico; in natura l'enzima lavora su quantità millimolari di substrato; l'ambiente acquoso di reazione determina una bassa concentrazione di certi prodotti, che sono poco solubili in acqua. L'innalzamento dei costi dipende anche dai processi fermentativi per produrre i biocatalizzatori e dall'immobilizzazione di questi per il loro recupero e riutilizzo.

CAPITOLO 4

ESEMPI DI METODI PRODUTTIVI DI AROMI E FRAGRANZE

4.1 Vanillina e metodi per la sua sintesi

La vanillina è uno dei più importanti aromi in commercio ed è contenuta nei baccelli di *Vanilla planifolia*, una Orchidacea, in quantità che si aggirano attorno al 2% del peso totale.¹² La vanillina si trova sotto forma di cristalli bianchi acuminati (0.5-1 cm in lunghezza) che si accumulano sulla parte esterna dei baccelli durante la conservazione dopo il processo di indurimento e si riscontra anche disciolta in secrezioni oleo-resinose che circondano i semi del baccello.²⁰ Il consumo annuale ammonta a circa 12000 tonnellate, di cui solo 20 tonnellate sono ottenuti tramite l'estrazione dai baccelli, mentre il resto deriva da sintesi chimica. In particolare nel 2010 la richiesta superava le 15000 tonnellate e la scarsità di fonti naturali di vanillina continua ad essere pressante.¹³ Il costo della vanillina estratta si aggira fra \$1200/kg e \$4000/kg, mentre la vanillina sintetica costa meno di \$15/kg.¹² Ciò si spiega facilmente: c'è una limitata quantità di baccelli di vaniglia che non soddisfano la richiesta del mercato e la loro produzione dipende dalle condizioni climatiche, dal terreno e dal lavoro di coltivazione, che consiste in impollinazione (ciascun fiore è impollinato dall'uomo), raccolta e processi di indurimento.² La coltivazione della vaniglia in poche aree limitate non può esaudire l'elevata richiesta. È stato quindi necessario trovare altri metodi sintetici naturali: la produzione di vanillina può avvenire in culture contenenti tessuto di *Vanilla* oppure in cellule vegetali o microbiche. Il costo della vanillina naturale derivante da processi microbici è di 1000\$/kg e la sua quantità nel mercato mondiale è stimata a 1-10 tonnellate.⁵

I principali costituenti dell'aroma di vaniglia sono la vanillina, l'acido vanillico, l'alcol vanillico, il *p*-idrossibenzaldeide, l'acido *p*-idrossibenzoico e l'alcol *p*-idrossibenzilico.¹⁷

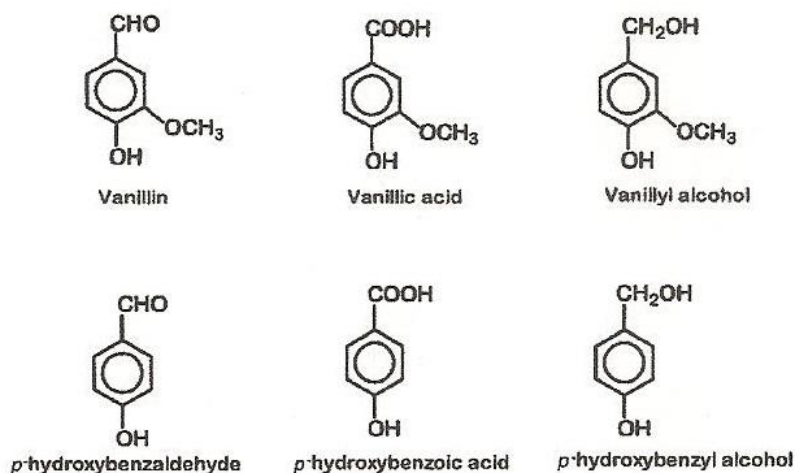


Figura 5. Strutture di vanillina, acido vanillico ed alcool vanillico, *p*-idrossibenzaldeide, acido *p*-idrossibenzoico ed alcol *p*-idrossibenzilico. (Riadattato da **ref 17**)

4.1.1 *Vanilla planifolia*, *Orchidaceae*

Le Orchidaceae sono una famiglia di monocotiledoni molto vasta (si conoscono circa 20000 specie), che si concentrano principalmente nelle regioni tropicali, in cui le orchidee epifite (piante non parassite che vivono su un'altra per sostenersi) sono le più abbondanti. Il nome “orchidea” deriva dalla presenza di organi di riserva accoppiati, che assomigliano a due testicoli, in greco “*orchis*”. I generi principali sono *Ophrys* e *Orchis*.²¹ Sono state scoperte e descritte 50 specie di *Vanilla*, ma solo *V. planifolia* Andrews, *V. pompona* Schiede e *V. tahitensis* J. W. Moore sono commercialmente importanti.

Descrizione botanica: è una pianta tropicale rampicante con uno stelo semplice o ramificato e con radici aeree avventizie tramite le quali si aggrappa ad alberi o ad altri supporti. Le foglie sono succulente, quasi sessili, di forma oblunga-ellittica praticamente lanceolata, di dimensioni pari a 9-23 cm in lunghezza e 2-8 cm in larghezza. I fiori sono composti da 3 sepal, 3 petali e da un organo centrale definito “colonna” (cioè pistillo e stame uniti assieme) con uno dei petali modificato ed allargato per formare il labbro. I sepal e i petali sono da lineari a quasi oblunghi-lanceolati, di 4-7 cm in lunghezza e 1-1.5 cm in larghezza. Il frutto è una capsula (nota come “baccello”) avente forma cilindrica, con lunghezza pari a 10-25 cm e larghezza pari a 8-14 mm. Proviene da: Messico, Guatemala, Honduras, Nicaragua, Costa Rica, El Salvador, Panama, Venezuela, Colombia, Guiana francese e britannica, Ecuador, Perù e Bolivia.²⁰



Figura 6. Fiore di *Vanilla planifolia* - https://en.wikipedia.org/wiki/Vanilla_planifolia

4.1.2 Estrazione tradizionale dai baccelli

Il processo di maturazione dei baccelli è fondamentale per la formazione dell'aroma tipico di vaniglia, perché questo aroma non è presente nei baccelli verdi. Al loro interno i componenti odorosi sono sotto forma di glicosidi, che vengono trasformati nelle molecole responsabili dell'odore di vaniglia tramite un processo fermentativo ad opera di una β -glicosidasi. Il metodo comunemente utilizzato per ottenere una vaniglia commercialmente adatta prevede quattro fasi:

- blocco delle funzioni vegetative tramite immersione in acqua bollente e esposizione alla luce solare per rompere la struttura cellulare e consentire agli enzimi di entrare in contatto con i substrati;
- disidratazione, fase cruciale in cui avviene il rilascio della vanillina;
- asciugatura per ridurre l'umidità dei baccelli (minor rischio di deterioramento microbico);
- stagionatura in casse per parecchi mesi.²²

In seguito a questo trattamento i baccelli di vaniglia induriti presentano un aroma e una fragranza, che non possono essere completamente duplicati nella vanillina sintetica.²⁰

4.1.3 La glucovanillina come precursore per la sintesi di vanillina

Molti chimici hanno studiato le reazioni che stanno alla base della sintesi della vanillina ed è stato confermato che nei baccelli verdi sono presenti vari componenti, in particolare la glucovanillina e in minor quantità l'alcol glucovanillico. Due processi sono stati ipotizzati:

- l'idrolisi di coniferina (alcol coniferilico glicosidato) da parte di una glicosidasi che libera l'alcol coniferilico, che poi è ossidato a vanillina.¹⁷
- la biosintesi di glucovanillina, un glicoside fenolico. Il precursore è l'alcol coniferilico che per azione dell'alcol coniferilico glucosil transferasi (β -glucosidasi) è glicosidato a coniferina. La sua trasformazione ad acido ferulico glicosidato dovrebbe avvenire grazie ad un'ossidasi. Il passo successivo è una β -ossidazione, seguita da una riduzione con utilizzo di NADPH₂ quale cofattore per formare glucovanillina. Quest'ultima nei baccelli è convertita a vanillina grazie ad una β -glucosidasi.

La trasformazione enzimatica dei glicosidi da parte della β -glucosidasi endogena non è molto efficiente, mentre se si utilizza una β -glucosidasi esogena si può ottenere un incremento del 24% nel contenuto di vanillina in baccelli induriti di provenienza diversa (Madagascar, Tahiti e Tonga).²²

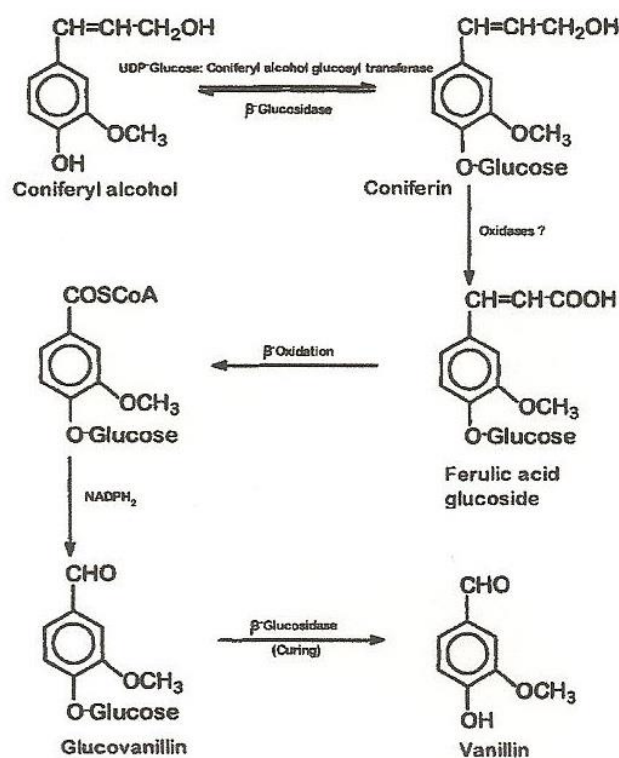


Figura 7. Ipotetica biosintesi di glucovanillina nei baccelli non maturi. (Riadattato da **ref 17**)

Per quanto riguarda la glucovanillina, questa può essere biotrasformata in vanillina grazie ad enzimi di origine batterica. In uno studio sono stati utilizzati due prodotti enzimatici commerciali: Viscozyme, che è un insieme di arabinasi, cellulasi, emicellulasi, xilanasi e pectinasi da *Aspergillus* e Celluclast cellulasi ottenuta da *Trichoderma reesei*. La quantità di vanillina trasformata dai baccelli immaturi usando questi due enzimi commerciali è più elevata rispetto alla quantità di vanillina estratta dai baccelli induriti nel processo tradizionale. Inoltre si è scoperto che utilizzando Viscozyme e Celluclast in un sistema enzimatico a due stadi l'estrazione di glucovanillina e la sua conversione a vanillina può incrementare di circa 3 volte.²²

4.1.4 Via dello shikimato: vanillina naturale

La via dello shikimato, tipica delle piante e di microorganismi ma non degli animali, fornisce amminoacidi aromatici, in particolare L-fenilalanina, L-tirosina e L-triptofano e fenilpropanoidi. L'intermedio centrale è l'acido shikimico, isolato da piante del genere *Illicium* (in giapponese "shikimi"), e grazie a ceppi mutanti di *Escherichia coli*, si è scoperto che la via comincia con l'accoppiamento del fosfoenolpiruvato con il D-eritrosio 4-fosfato.

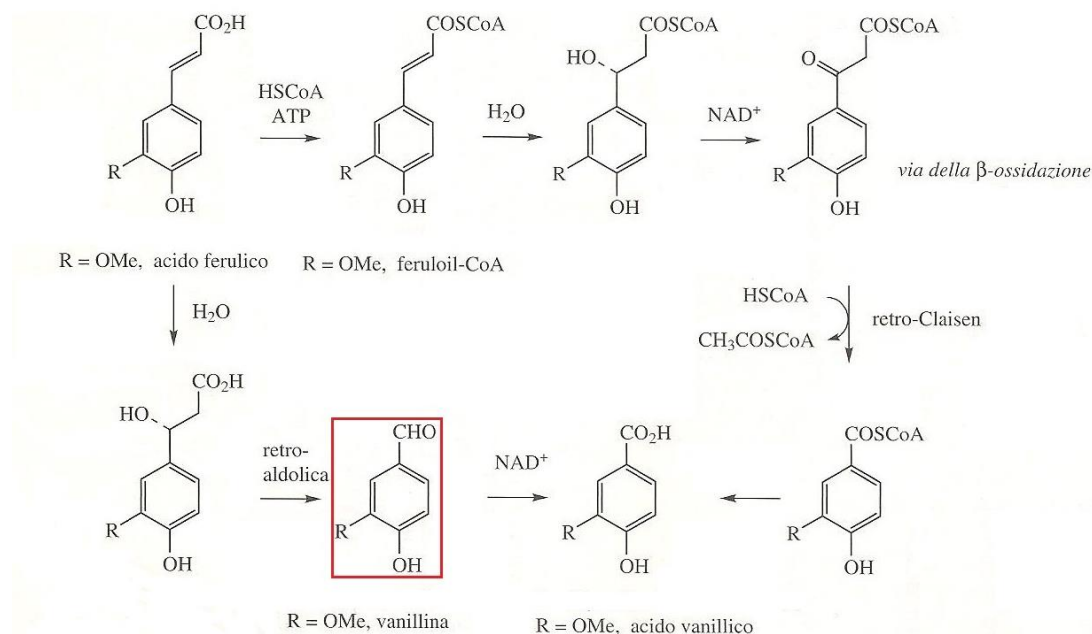


Figura 9. Sintesi della vanillina per degradazione dell'acido ferulico, un derivato cinnamico.
(Riadattato da **ref 23**)

4.1.5 Azione di microorganismi sull'acido ferulico: produzione di biovanillina

Alcuni funghi bianchi (*white rot fungi*) e batteri sono in grado di trasformare l'acido ferulico in vanillina. Poiché la vanillina è molto reattiva, questa è tossica per la maggior parte dei microorganismi, quindi è rapidamente degradata durante le biotrasformazioni. I processi fermentativi sono ottimizzati usando due approcci biotecnologici.

1. La metabolizzazione dell'acido ferulico in acido vanillico avviene in un primo microorganismo e la successiva riduzione a vanillina in un secondo microorganismo. Il primo passaggio può essere ottenuto da *Aspergillus niger* e il secondo da basiomiceti, come *Pycnoporus cinnabarinus* o *Phanerochaete chrysosporium*.
2. La vanillina ottenuta può essere adsorbita su resine, ad esempio resine Amberlite XAD-2, diminuendo la tossicità e contemporaneamente aumentando la produzione.¹²

Molti altri organismi sono responsabili della trasformazione di acido ferulico in vanillina. Sutherland *et al.* hanno confermato che pure *Streptomyces setonii* metabolizza l'acido ferulico in vanillina.^{13, 14} Alcuni studi mirano ad utilizzare un unico microorganismo per ottenere vanillina: *Pycnoporus cinnabarinus* metabolizza l'acido ferulico degradando la catena laterale dell'acido propanoico in acido vanillico. Tale acido può essere ridotto a vanillina e poi ad alcol vanillico.¹⁴

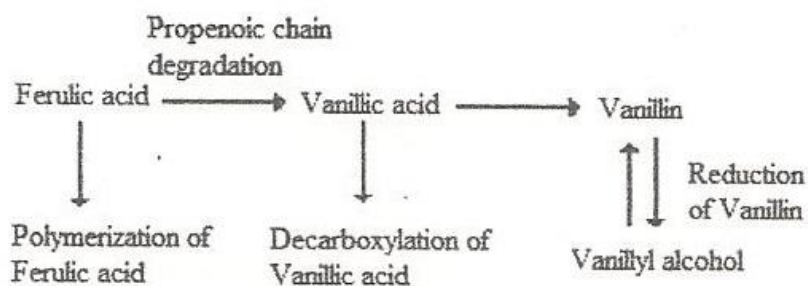


Figura 10. Biotrasformazione di acido ferulico in vanillina. (Riadattato da **ref 14**)

Uno studio con *Pycnopus cinnabarinus* ha permesso di controllare ciascun effetto che influenza la biosintesi: a pH 6.5 si ha la massima produzione di vanillina e se si lavora a livelli di pH differenti rispetto a tale valore si ha una diminuzione quantitativa del prodotto finale. Quindi il controllo del pH è un elemento importante nella sintesi di vanillina, perché l'enzima decarbossilasi, responsabile della bioconversione di acido ferulico, ha attività massima in un range di pH di 4.5-7.5.¹⁴ In generale per produrre vanillina a partire da acido ferulico, che è presente in abbondanza nelle pareti cellulari, è importante che questo composto venga rilasciato dalle materie prime tramite trattamento enzimatico ed estrazione. In seguito potrà essere sottoposto ad azione microbica (batteri e funghi) per trasformarlo in vanillina, acido vanillico e acido protocatechico.¹³

Micro-organism	Substrate	Product	Author
<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</i> spp	Eugenol	Vanillin	Rabenhorst 1996
<i>Serratia</i> spp	Eugenol &	Vanillin	Rabenhorst 1991
<i>Enterobacter</i> spp	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

Tabella 4. Biotrasformazioni che portano alla produzione di vanillina e derivati con i microorganismi e i substrati coinvolti. (Riadattato da **ref** 17)

4.1.6 Altre vie biosintetiche

Per produrre biovanillina è importante trovare precursori a basso costo, che assomiglino chimicamente alla vanillina e che siano presenti in grandi quantità per rendere il processo di produzione economicamente valido.¹³ Il risultato è stato ottenuto tramite le bioconversioni di eugenolo o di isoeugenolo, che sono propilbenzeni economici, estraibili da svariate materie prime in commercio, sebbene presentino una limitazione a causa della loro tossicità per molti microorganismi.

12

I chimici hanno evidenziato che l'eugenolo, principale costituente dell'olio dei chiodi di garofano, è convertito in coniferil aldeide e/o in acido ferulico, che successivamente vengono degradati a vanillina ed acido vanillico da varie specie di *Arthrobacter*, *Corynebacterium* o *Pseudomonas*. L'ingegneria genetica è stata applicata con successo per produrre vanillina tramite diretta conversione di eugenolo usando ceppi metabolicamente ingegnerizzati di *Pseudomonas* o *Rhodococcus*. 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.² 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.²⁴

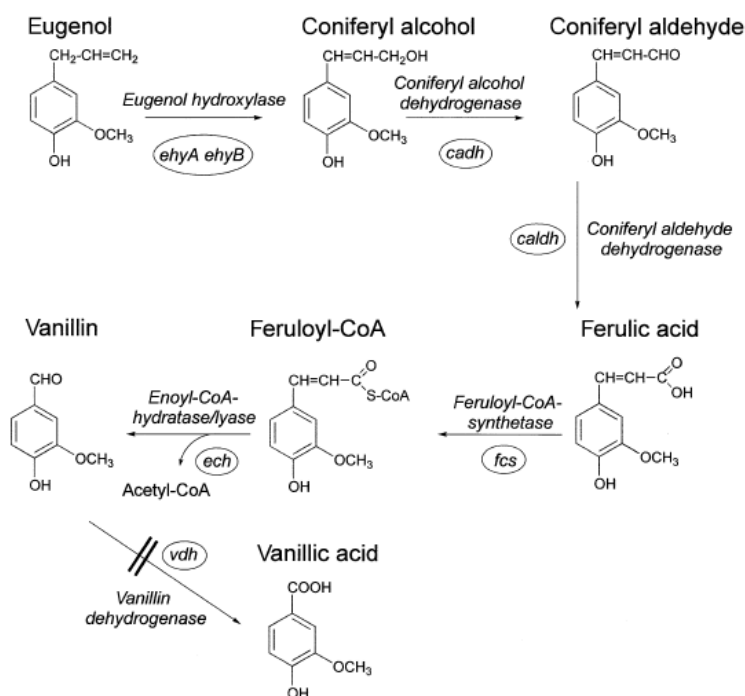


Figura 11. Sintesi della vanillina da eugenolo grazie a *Pseudomonas* sp. HR 199 geneticamente ingegnerizzato. (Riadattato da **ref 24**)

L'isoeugenolo tramite un intermedio epossidico è trasformato a vanillina ed acido vanillico. Un'altra via si basa sull'ossidazione di *isorharpontin*, che si trova nella corteccia dell'abete rosso, da parte di alcuni ceppi di *Pseudomonas*, i quali rompono il doppio legame del stilbene naturale, tramite una stilbene diossigenasi, originando la vanillina.¹²

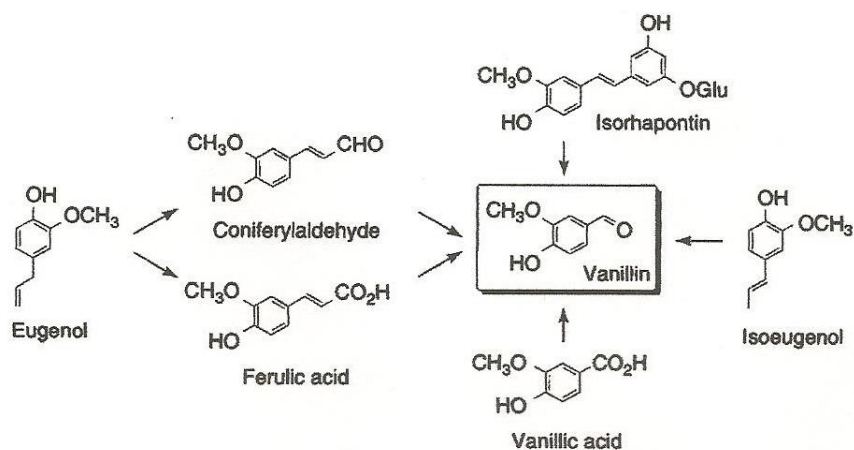


Figura 12. Principali vie biotecnologiche per la sintesi della vanillina.

4.1.7 Possibilità di utilizzo di cellule e tessuti vegetali per sintetizzare biovanillina

Per la sintesi di vanillina sono stati studiati ulteriori processi, che utilizzano culture tissutali di *Vanilla planifolia*, poiché le sue cellule mantengono l'espressione genetica per produrre gli aromi tipici della vaniglia oppure i loro precursori.

A culture cellulari in sospensione sono stati aggiunti acido cinnamico ed acido ferulico con conseguente formazione di acido *p*-idrossibenzoico ed acido vanillico; in particolare si è visto che l'aggiunta di 1 mM di acido ferulico incrementava la concentrazione di vanillina di 1.7 volte.¹⁷

Westcott *et al.* hanno sviluppato una tecnica in cui l'acido ferulico è il precursore. Si usa del carbone assorbente per la vanillina e si utilizzano le radici aeree di *V. planifolia*, separate e messe in cultura con un mezzo nutriente. Questo metodo porta ad una buona bioconversione del precursore: si è notato un incremento della quantità di vanillina di 5-10 volte rispetto al baccello di vaniglia e rispetto alle radici a cui non era stato aggiunto il precursore. Altra conseguenza positiva è il rapporto *p*-idrossibenzaldeide/vanillina nell'aroma finale: nelle culture di radici aeree è di 7.8:1, mentre nei baccelli è di 12.8:1, quindi ne deriva una nota odorosa superiore.¹⁷

4.1.8 Vanillina sintetica

I prezzi elevati della vanillina naturale e la richiesta commerciale considerevole hanno spinto i chimici organici a sviluppare tecniche sintetiche per la produzione di questo aroma così desiderato. Però le legislazioni europee e degli USA non considerano la vanillina sintetica come un componente naturale degli alimenti. Il problema della vanillina derivante da sintesi chimica è che si formano miscele racemiche indesiderate.¹³ Sono stati identificati vari precursori che, tramite metodi chimici, permettono la sintesi della vanillina sintetica.

- Coniferina: tale composto è ossidato in presenza di una miscela di dicromato di potassio e acido solforico per ottenere la vanillina, ma il processo è molto costoso.
- Eugenolo: sono possibili tre metodi che coinvolgono l'eugenolo.
 1. L'eugenolo è isomerizzato a isoeugenolo con idrossido di potassio in glicole dietilenico. L'isoeugenolo è isolato e convertito in acetato, il quale è ossidato da tetrossido di osmio/*meta*-periodato di sodio. La vanillina è isolata tramite acidificazione.
 2. L'isoeugenolo è ossidato direttamente a vanillina con un reagente a base di pentossido di vanadio e H₂O₂ in alcol *tert*-butilico.
 3. L'eugenolo viene fatto reagire con nitrobenzene in una soluzione basica di dimetil solfossido (DMSO).

- **Lignina:** si trova nelle acque di scarto che derivano dall'industria della cellulosa. Questi reflui sono trattati con agenti alcalini a temperature e pressione elevati in presenza di agenti ossidanti. La vanillina è separata dai sottoprodotti tramite estrazione, distillazione e cristallizzazione. La lignina è degradata con una soluzione di idrossido di sodio oppure una soluzione contenente idrossido di calcio e simultaneamente è ossidata da un catalizzatore (ad esempio ossido di nitrobenzene oppure ossido di rame). Al termine della reazione i rifiuti solidi sono rimossi. La fase seguente consiste in due estrazioni: 1) la vanillina è estratta dalla soluzione acida con un solvente, per esempio butanolo o benzene; 2) la seconda estrazione si effettua grazie ad una soluzione di disolfito sodico. La riacidificazione con H_2SO_4 seguita da una distillazione sottovuoto produce vanillina con una purezza di livello inferiore (*technical-grade*). Questa deve essere ricristallizzata svariate volte per ottenere la vanillina adatta all'uso alimentare.
- **Guaiacolo:** è un composto derivante dall'industria petrolchimica¹³ ed è sintetizzato a partire dal catecolo, che è preparato a sua volta da un'idrossilazione acido-catalizzata di fenolo con H_2O_2 . L'acido gliossilico (*glyoxilic acid*) è un sottoprodotto dell'ossidazione di gliossale con acido nitrico. La condensazione di guaiacolo con l'acido gliossilico avviene a temperatura ambiente e in ambiente debolmente alcalino. La soluzione alcalina contenente l'acido 4-idrossi-3-metossimandelico è ossidata all'aria con un catalizzatore finché la quantità di ossigeno è consumata. La vanillina grezza è ottenuta da acidificazione e decarbossilazione della soluzione di acido (4-idrossi-3-metossifenil)gliossilico. La vanillina commerciale è ricavata da distillazione e ricristallizzazione.¹⁷

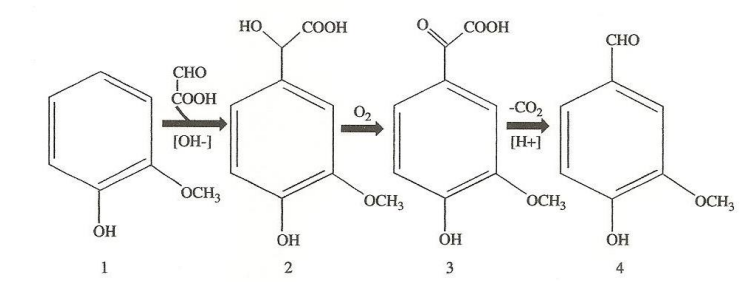


Figura 13. Sintesi della vanillina da guaiacolo. Guaiacolo (1), acido vanillilmandelico (2), acido 4-idrossi-3-metossifenilgliossilico (3) e vanillina (4). (Riadattato da ref 13)

4.1.9 Nuove opportunità di sintesi: recupero di “agro wastes”

I rifiuti agricoli, cioè rifiuti derivanti da biomasse vegetali, sono rifiuti a base di lignocellulosica (LCW-lignocellulose wastes), vale a dire un insieme di cellulosa, emicellulosa e lignina. Sono risorse rinnovabili naturali, ma anche la più abbondante fonte di composti organici sulla Terra, sono

economici e facilmente recuperabili. Questi rifiuti possono essere divisi in categorie in base alla provenienza: (i) agricoli, (ii) dal legno e (iii) domestici, come ad esempio possono essere le bucce, le pannocchie ed i gusci. La possibilità di poterli usare come substrati di partenza ha avvicinato i chimici al loro impiego per produrre enzimi, zuccheri riducenti, cibo e mangimi, metaboliti secondari, surfactanti e fertilizzanti. Si è provato ad adoperarli come substrati in molti processi biotecnologici per produrre aromi e fragranze, anche per diminuire i costi che derivano dall'impiego di processi microbiologici.

4.1.9.1 Biovanillina da rifiuti agricoli

È stato dimostrato che rifiuti agricoli contengono l'acido ferulico, un precursore della vanillina. Quindi queste sostanze possono essere utilizzate come composti di partenza per sintetizzare biovanillina usando una conversione microbica piuttosto che tramite reagenti chimici convenzionali, riducendo così i costi di produzione. Le principali fonti di acido ferulico da rifiuti agricoli sono:

- Crusca di cereali: è un sottoprodotto di trasformazione agricola. In particolare la crusca di frumento, oltre ad essere mangime per gli animali, è stata impiegata come substrato per la conversione microbica di acido ferulico a vanillina usando *E. coli* ingegnerizzato, al quale sono stati aggiunti geni funzionali di *Pseudomonas fluorescens*.
- Polpa di barbabietola: deriva dall'industria di raffinazione dello zucchero e al suo interno sono stati identificati vari composti, fra cui acido ferulico. Una pectinasi di *Aspergillus niger* è stata usata per facilitare l'estrazione.
- Olio di crusca di riso: la crusca di riso è un sottoprodotto dell'industria di raffinazione del riso. Nel suo olio sono stati ritrovati l'acido ferulico ed una miscela di alcoli. *A. niger* e *P. cinnabarinus* sono capaci di produrre vanillina da un residuo di tale olio. Alcuni studi hanno riportato che è possibile ottenere una quantità di biovanillina pari a 1.1g/L in un bioreattore da 25L dopo 54h di fermentazione.
- Biomassa di olio di palma: prodotto di seconda scelta dell'industria dell'olio di palma, invece di essere impiegata come carburante a basso costo, potrebbe essere utilizzata per produrre vanillina, poiché contiene acido ferulico.¹³

4.2 Mentolo

Il (-)-mentolo, anche *p*-mentan-3-olo, è uno degli aromi più importanti in commercio. Il suo uso è vasto: come additivo alimentare, in farmaceutica, nella cosmetica, nei dentifrici, nei pesticidi, nelle gomme da masticare e quasi un quarto delle sigarette in commercio contiene mentolo, da quando fu aggiunto come additivo in svariati prodotti a base di tabacco negli anni '20. La richiesta per questo composto è elevata: infatti il consumo annuo è stimato fra 30 e 32 tonnellate.²⁵ Le sue caratteristiche organolettiche si possono attribuire solamente all'isomero naturale (1R, 3R, 4S)¹ ed assieme a mentone, isomentone ed ad altri composti determina il gusto e l'odore fresco di menta nelle piante appartenenti al genere *Mentha*. Il mentolo presenta tre atomi di carbonio asimmetrici, che comportano i seguenti stereoisomeri: (+)- e (-)-isomentolo, (+)- e (-)-mentolo, (+)- e (-)-neomentolo e (+)- e (-)-neoisomentolo. Come altri alcoli saturi, il mentolo può essere ossidato a chetone.¹³ Il (-)-mentolo è predominante rispetto ai suoi isomeri, infatti questo alcol ed i suoi esteri acetati superano il 50% dell'olio essenziale maturo.²⁶ Questo è costituito principalmente da monoterpeni della famiglia del *p*-mentano ed è biosintetizzato dai peli ghiandolari di *Mentha piperita*.³

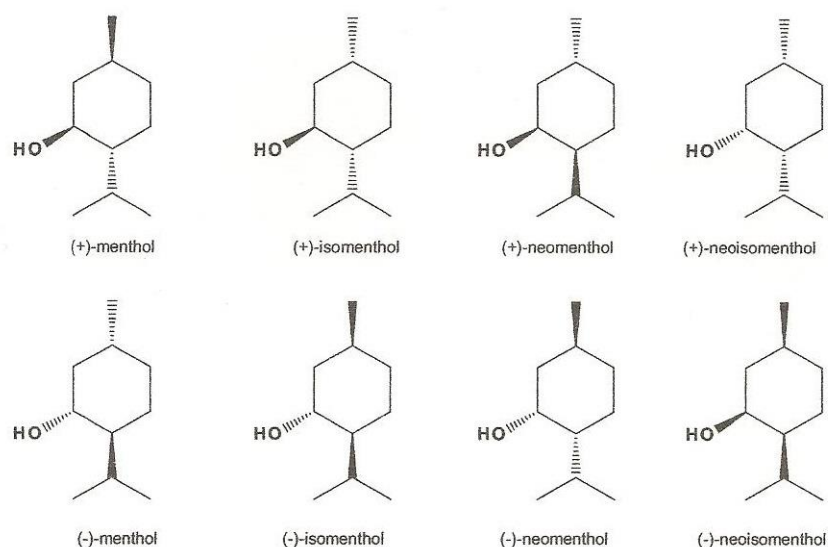


Figura 14. Stereoisomeri di mentolo. (Riadattato da ref 25)

4.2.1 Genere *Mentha*, *Lamiaceae*

Le Lamiaceae sono piante prevalentemente erbacee diffuse in tutto il mondo, però si riscontrano principalmente nel Mediterraneo. Le specie di questa classe sono anche conosciute con il nome di labiate, a causa della forma irregolare (corolla bilabiata) del fiore. Questa famiglia è caratterizzata da foglie opposte, sezione del fusto quadrangolare, simmetria floreale bilaterale (tranne in *Mentha*, in cui la simmetria è raggiata) e il frutto è un tetrachenio. Gli esempi più famosi sono il rosmarino

(*Rosmarinus officinalis*), la salvia (*Salvia officinalis*), la lavanda (*Lavandula* spp.) e l'origano (*Origanum vulgare*).²¹

Mentha piperita

Questa pianta perenne di origini europee è un ibrido fra la *Mentha aquatica* e la *Mentha spicata* ed esiste praticamente solo allo stato coltivato. In Italia viene coltivata al Nord e al Centro della Penisola. Le foglie sono ovali, spesso acute e le infiorescenze sono in spiga con tonalità tendenti al rosso e al lilla.²⁷



Figura 15. Infiorescenza della menta piperita. -

<http://dbiodbs1.univ.trieste.it/quint/carso/foto/TSB13904.jpg>

Mentha arvensis

Questa specie è caratterizzata da un odore acre. I fiori sono prostrati o ascendenti, irsuti, fogliosi fino all'apice. Le foglie sono picciolate, dentate o crenate con dimensioni intorno a 1-3×2-5 cm. La corolla è di colore rosa o lilla. Si ritrova nell'Italia settentrionale.²⁷



Figura 16. *Mentha arvensis*. - <http://dbiodbs.univ.trieste.it/quint/carso/foto/TS155171.jpg>

Mentha spicata

La pianta è di tipo erbaceo perenne e presenta un odore aromatico caratteristico di menta. Cresce fino a raggiungere 90 cm in altezza. Le foglie, le brattee, i peduncoli e i calici sono pelosi e in particolare le foglie sono acute all'apice con dimensioni pari a 1.5-3×5-9 cm. Si ritrova in tutti i continenti, anche se è di origine euro-asiatica.²⁷



Figura 17. *Mentha spicata*. - <http://dbiodbs1.univ.trieste.it/quint/carso/foto/TSB14334.jpg>

4.2.2 Mentolo, un monoterpene

La pianta *Mentha piperita* (Labiatae) produce una miscela di diastereoisomeri: principalmente (-)-mentolo e in minor quantità (+)-neomentolo, (+)-isomentolo e (+)-neoisomentolo. Questi composti sono dei monoterpeni, cioè molecole contenenti dieci atomi di carbonio (C₁₀) e in generale vengono classificati nella famiglia dei terpenoidi. Questa famiglia di sostanze chimiche deriva da unità isopreniche C₅ unite secondo una geometria testa-coda.

Nelle piante, la via biogenetica che porta alla formazione dei monoterpeni è la via del mevalonato: l'acido mevalonico è precursore dell'isopentenil difosfato (IPP), un emiterpene (C₅) attivo che viene isomerizzato a dimetilallil difosfato (DMAPP), un altro emiterpene. L'IPP e il DMAPP reagiscono per dare i monoterpeni e le altre classi di terpeni.¹⁰ Questi due composti sono sintetizzati tramite due vie parallele: 1) via del mevalonato, attivo nel citosol, che produce sesquiterpeni, fitosteroli ed ubiquinone; 2) via del metileritritolo 4-fosfato (MEP), che sintetizza monoterpeni, gibberelline,

carotenoidi e tocoferolo nei plastidi. I terpenoidi sono sintetizzati enzimaticamente *de novo* da acetilCoA e piruvato, che deriva da pool di carboidrati nei plastidi e nel citoplasma. Gli enzimi terpene sintetasi sono responsabili della produzione di:

- emiterpeni (C_5) da DMAPP;
- monoterpeni (C_{10}) da geranyl difosfato (GPP o GDP);
- sesquiterpeni (C_{15}) da farnesil difosfato (FPP o FDP);
- diterpeni (C_{20}) da geranylgeranyl difosfato (GGPP o GGDP).

GPP, FPP e GGDP sono prodotti dall'azione di tre prenil transferasi, che accettano DMAPP come substrato iniziale. In particolare sono monoterpeni (C_{10}) e sesquiterpeni (C_{15}) a causare le fragranze nella maggior parte dei frutti e il profumo nei fiori.³

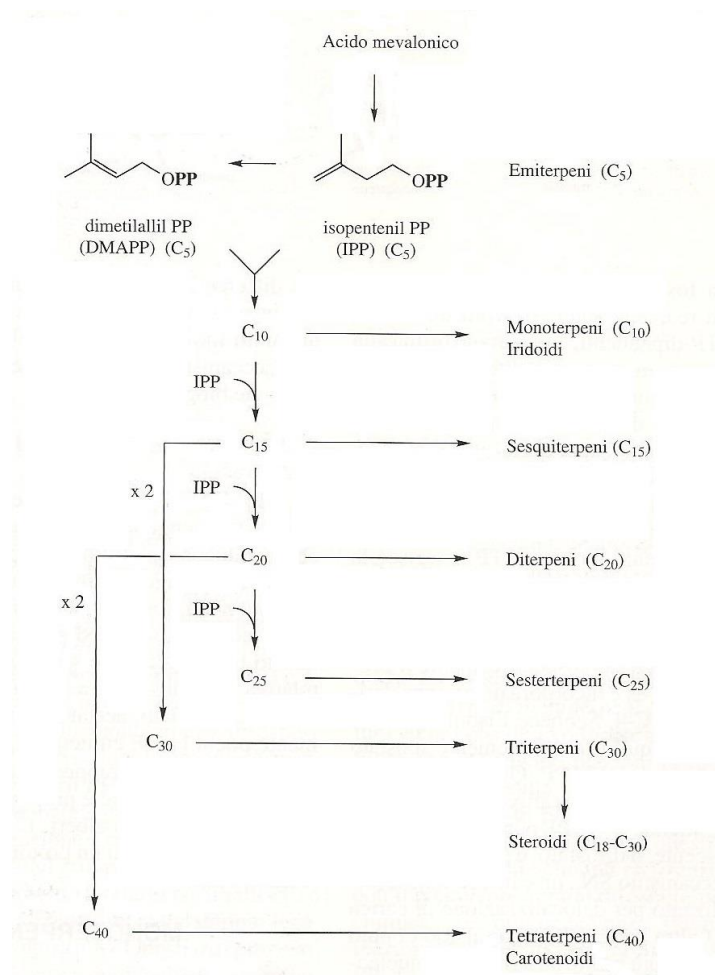


Figura 18. Classificazione dei terpenoidi. (Riadattato da ref 10)

4.2.3 Metodi naturali

Il metodo di ottenimento più sfruttato è la cristallizzazione del (-)-mentolo recuperabile dall'olio congelato di *Mentha arvensis* (contenuto in mentolo pari al 55-85%), ottenuto tramite centrifugazione e rimozione dal liquido surnatante, cioè dall'olio dementolizzato (*corn-mint*). I cristalli di mentolo, che si ottengono da questa tecnica, sono caratterizzati da un aroma tipico di menta piperita, perché presentano impurità residue derivanti dall'olio di *Mentha arvensis* (proveniente dalla Cina).^{1, 25, 28} Il mentolo naturale è maggiormente apprezzato rispetto al (-)-L-mentolo di sintesi, perché l'essenza di quest'ultimo è influenzata da contaminanti che si formano durante il processo di cristallizzazione.

Nelle piante il precursore del (-)-mentolo è il (-)-limonene e i principali enzimi coinvolti nei passaggi centrali della biosintesi del (-)-mentolo sono il (-)-isopiperitone reduttasi e il (+)-pulegone reduttasi.

²⁶ La via biosintetica comincia con un precursore universale aciclico, il geranil difosfato, il quale si genera da isopentenil difosfato e dimetilallil difosfato per azione di un enzima. Il geranil difosfato subisce quindi ciclizzazione con formazione del (-)-limonene, che è precursore per la sintesi dei terpeni oleosi sia della menta verde (*Mentha spicata*) che della *Mentha piperita*. Nella pianta un citocromo P450 microsomiale introduce un atomo di ossigeno in una posizione allilica per sintetizzare il (-)-*trans*-isopiperitenolo. Questo passaggio è fondamentale perché fornisce la funzione ossigenata a tutti i successivi derivati. Una deidrogenasi NAD-dipendente ossida l'alcol al corrispondente chetone, cioè l'(-)-isopiperitenone. Esso subisce una riduzione del doppio legame grazie ad una reduttasi NADPH-dipendente, che è stereo- e regiospecifica per formare il (+)-*cis*-isopulegone. Successivamente una isomerasi sposta il doppio legame rimanente per coniugarlo con il gruppo carbonilico, producendo (+)-pulegone. Reduttasi NADPH-dipendenti convertono il (+)-pulegone a (+)-isomentone e (-)-mentone, fra i quali il secondo è predominante. L'ultimo passaggio avviene per azione di due reduttasi NADPH-dipendenti stereoselettive: il (-)-mentone è convertito a (+)-neomentolo e (-)-mentolo, mentre il (+)-isomentone è trasformato in (+)-isomentolo e (+)-neoisomentolo.^{25, 26}

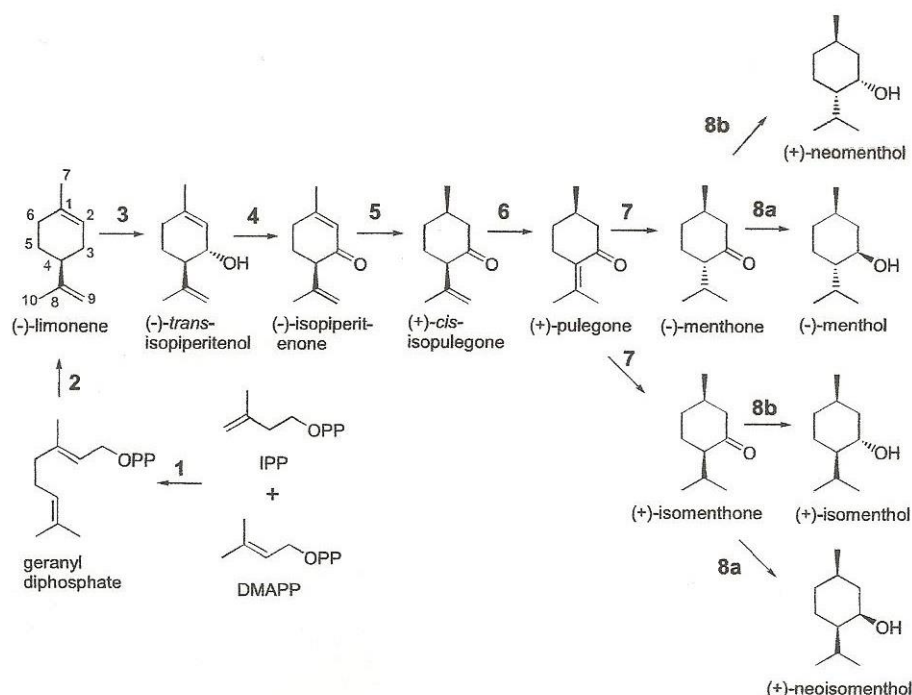


Figura 19. Sintesi degli isomeri della *Mentha piperita*. Gli enzimi sono: **1.** geranyl difosfato sintasi; **2.** (-)-limonene sintasi; **3.** citocromo P450 (-)-limonene-3-idrossilasi; **4.** (-)-*trans*-isopiperitenolo deidrogenasi; **5.** (-)-isopiperitenone reduttasi; **6.** (+)-*cis*-isopulegone isomerasi; **7.** (+)-pulegone reduttasi; **8°.** (-)-mentanone:(-)-mentolo reduttasi e **8b.** (-)-mentone:(+)-neomentolo reduttasi.

(Riadattato da **ref 26**)

La sequenza enzimatica di reazioni, che prevede una ossidazione alilica accoppiata ad una riduzione coniugata, è tipica nel metabolismo dei terpenoidi. La via biosintetica nella menta piperita rappresenta un'importante variazione rispetto allo schema generale, in cui si susseguono due riduzioni coniugate, cioè quella di (+)-isopiperitone e di (+)-pulegone.²⁶

4.2.4 Metodi sintetici

Sono stati studiati molti metodi per la produzione sintetica di (-)-mentolo, usando diversi precursori, fra cui (-)- β -pinene, (+)-limonene, (+)-citronellale, (+)-pulegone, (-)-piperitone, timolo, β -fellandrene, δ -3-carene, citrale o *m*-cresolo.²⁵ Esistono solo due tecniche efficaci per la sintesi del mentolo a livello industriale: il processo di Haarmann & Reimer (H&R) e quello di Takasago.

- **Metodo di Haarmann & Reimer:** precursori sono l'economico *m*-cresolo e il propilene, che producono timolo. Dall'idrogenazione catalitica del timolo si ottiene la miscela degli otto isomeri del mentolo, da cui si ricava il mentolo racemico con una distillazione frazionata. Questo è successivamente convertito nel corrispondente benzoato. Il processo industriale consiste nella formazione di cristalli di (-)-mentil benzoato a partire da una soluzione satura di

benzoato racemico raffreddato a temperature molto basse. Il materiale cristallino ottenuto viene quindi idrolizzato in ambiente basico e si forma il (-)-mentolo, mentre nelle acque madri si ritrova il (+)-mentolo, che viene riciclato assieme agli altri sei isomeri in una fase separata di racemizzazione.

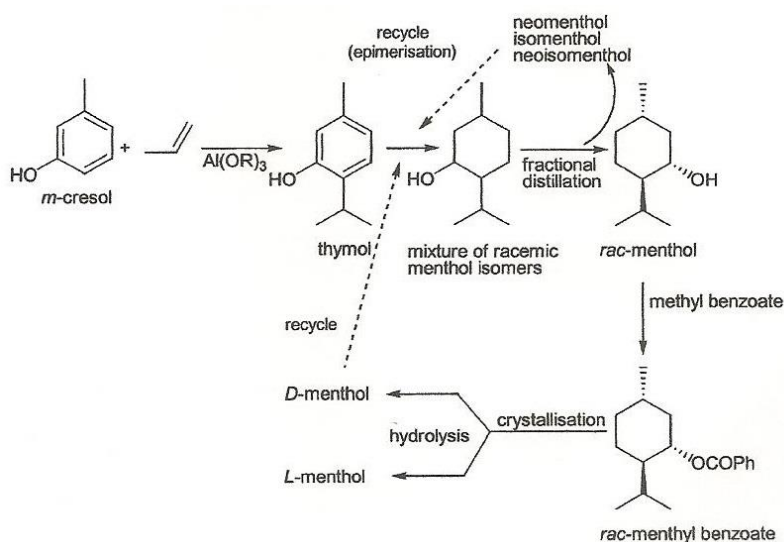


Figura 20. Metodo di Haarmann & Reimer. (Riadattato da **ref 28**)

- Metodo di Takasago: questa industria giapponese produce più di 2000 tonnellate annue di L-mentolo sintetico tramite sintesi asimmetrica. Si parte dal β -pinene, che subisce pirolisi e forma il mircene. La dietilammina è aggiunta in presenza di una quantità catalitica di una base forte per ottenere N,N-dietilgeranilammina. L'enammina del δ -citronellale è prodotta tramite isomerizzazione con un complesso di rodio e subisce poi l'idrolisi a δ -citronellale. Tale composto ciclizza a L-isopulegolo puro, grazie alla chiralità del citronellale. Quindi L-isopulegolo è idrogenato a mentolo.^{1,25}

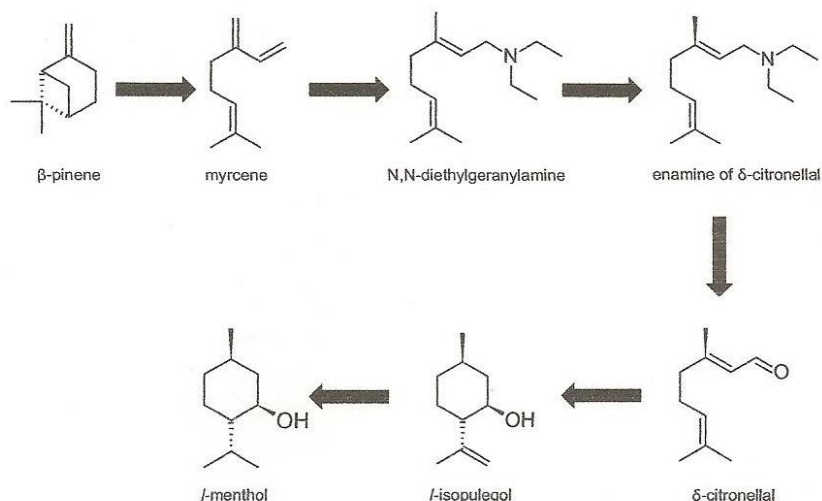


Figura 21. Versione semplificata del metodo di Takasago. (Riadattata da ref 25)

4.2.5 Metodi biotecnologici

Sono stati identificati due nuovi metodi biotecnologici per la sintesi del mentolo. Haarmann & Reimer hanno ottenuto il (-)-mentolo dal mentolo benzoato racemico con un'idrolisi enantioselettiva catalizzata da una lipasi di *Candida rugosa*.¹

Un altro processo, usato dall'industria AECI Ltd (African Explosives and Chemical Industries, ZA), parte direttamente dalla miscela degli otto isomeri del mentolo. L'acilazione enantio- e diastereoselettiva della miscela tramite lipasi produce mentil acetato con un eccesso enantiomerico (ee) del 96%. A questo punto l'estere è separato dagli isomeri non reattivi tramite una distillazione e poi idrolizzato per formare (-)-mentolo.¹

Entrambi i processi permettono il riciclo degli isomeri che non hanno reagito tramite isomerizzazione. Quindi è un aspetto concorde con la Green chemistry. Sfortunatamente nessuna di queste due tecniche è ancora stata commercializzata a livello industriale.¹

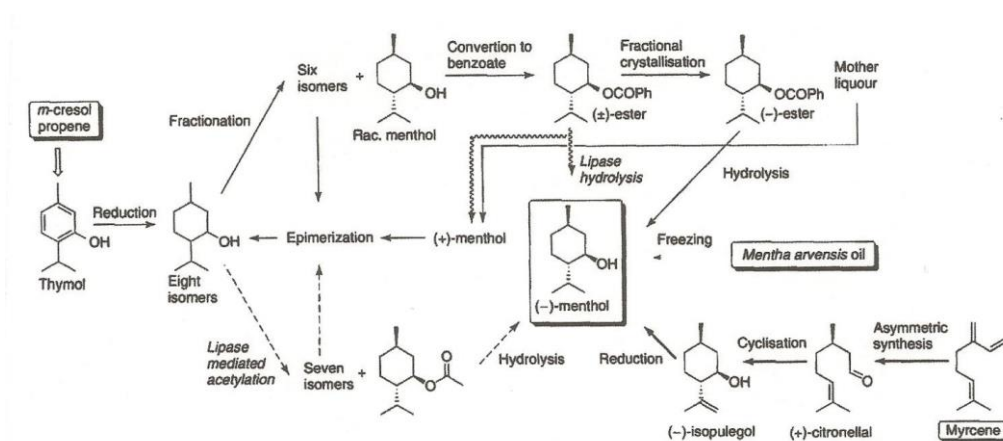


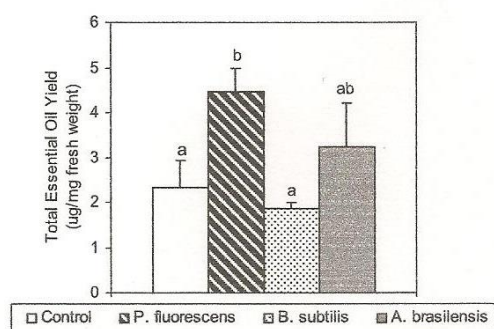
Figura 22. Scherma riassuntivo della produzione di (-)-mentolo. (Riadattato da ref 1)

4.2.6 Rizobatteri e loro ruolo nella produzione di olio essenziale in *menta piperita*

I rizobatteri colonizzano la rizosfera e quelli che sono capaci di produrre ormoni, che stimolano la crescita delle piante, sono definiti “*plant growth-promoting rhizobacteria*” (PGPR). Hanno pure la capacità di produrre composti organici volatili (“*volatile organic compounds*”-VOCs), caratterizzati da bassa massa molecolare e da proprietà lipofiliche. Vari studi hanno cercato di utilizzare questi particolari batteri per migliorare colture agricole economicamente importanti, sia alimentari che di quelle specie caratterizzate dalla produzione di metaboliti secondari, utili per le loro qualità terapeutiche o aromatiche. Costituenti oleosi di alcune specie sono utilizzate come “pool chirale” nella chimica organica di sintesi e nella trasformazione microbica di composti comuni per produrre sostanze altamente funzionali e di interesse economico.

Per comprendere se effettivamente i rizobatteri e in particolare i loro VOCs influenzano la produzione di olio essenziale nella *Mentha piperita*, piante e batteri (le specie *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis* ed *Azospirillum brasilense*) sono stati fatti crescere nella stessa capsula di Petri, ma divisi da una separazione fisica in modo che solo i VOCs e non i soluti batterici potessero raggiungere la pianta.

27



Treatment	(+)-Pulegone	(-)-menthone	(-)-Menthol	(+)-Menthofuran
Control	45.29 ± 9.90	1.65 ± 0.68	9.53 ± 2.80	1.16 ± 0.09
<i>P. fluorescens</i> WCS417r	59.95 ± 7.71	2.23 ± 0.78	6.11 ± 1.89	1.44 ± 0.31
<i>B. subtilis</i> GB03	50.07 ± 9.93	2.59 ± 1.13	11.3 ± 2.89	1.39 ± 0.35
<i>A. brasilense</i> SP7	56.48 ± 9.51	2.92 ± 1.05	5.91 ± 2.01	0.88 ± 0.25

Figura 23. Produzione di OE in *Mentha piperita* in seguito ad esposizione alle tre specie PGPR (a sinistra). Variazione nella percentuale relativa (R%) di OE in *M. Piperita* (a destra). (Riadattato da ref 29)

Nelle piante trattate con *Pseudomonas fluorescens* e *Azospirillum brasilense*, la produzione di OE è incrementata di due volte rispetto ai gruppi di controllo. In generale la produzione di (+)-pulegone, (-)-mentone, (-)-mentolo e (+)-mentofurano sono stati più elevati rispetto ai controlli. La concentrazione di pulegone è tre volte maggiore solo nel trattamento con *P. Fluorescens*. Il trattamento con *P. Fluorescens* ha aumentato di 15 volte la produzione di mentone, mentre la stessa

sostanza in presenza di *A. Brasilense* aumenta di 13 volte. Anche il mentofurano incrementa in seguito al trattamento con *P. Fluorescens*. Le uniche sostanze che hanno subito una riduzione sono mentolo e mentofurano in piante trattate con *A. Brasilense*. Anche le percentuali relative (valori nella tabella di destra nella **figura 23**) cambiano:

- il pulegone aumenta fino al 59.9% (*P. Fluorescens*) rispetto al 45.3% dei controlli;
- il mentone aumenta in tutti i casi;
- il mentolo diminuisce nei casi di trattamento con *P. Fluorescens* e *A. Brasilense* in confronto ai controlli, ma aumenta (11.3%) nelle piante trattate con *B. Subtilis*;
- il mentofurano è l'unico che mostra una significativa riduzione di R% in presenza di *A. Brasilense*.

In conclusione, l'effetto dei VOCs rizobatterici di *P. Fluorescens* raddoppia rispetto alle altre due specie e ai gruppi di controllo. I principali costituenti dell'OE di *M. Piperita* mostrano un accumulo maggiore in presenza di *P. Fluorescens*, ma non in presenza di *B. Subtilis*. Pure le percentuali relative subiscono dei cambiamenti in base ai VOC batterici: nelle piante trattate con *P. Fluorescens* il pulegone aumenta del 30% rispetto ai gruppi di controllo e il mentofurano è ridotto a 0.8% in confronto ai gruppi di controllo (1.16%) o alle piante trattate con *A. Brasilense*. La crescita dei livelli di OE non deriva da un aumento di biomassa, che suggerirebbe un incremento della sintesi di metaboliti secondari, ma piuttosto sembra che l'aumento dei monoterpeni derivi da un'induzione della resistenza sistemica (IRS), che si verifica dopo stimolazione dei meccanismi di difesa della pianta. Infatti è risaputo che i monoterpeni sono composti importanti nella difesa vegetale e aiutano nel recupero dell'apparato fotosintetico in seguito a breve esposizioni ad alte temperature. Inoltre, si osserva un aumento di OE anche come risposta difensiva alla colonizzazione da parte di microorganismi, poiché molti di tali composti hanno attività antimicrobiche.²⁷

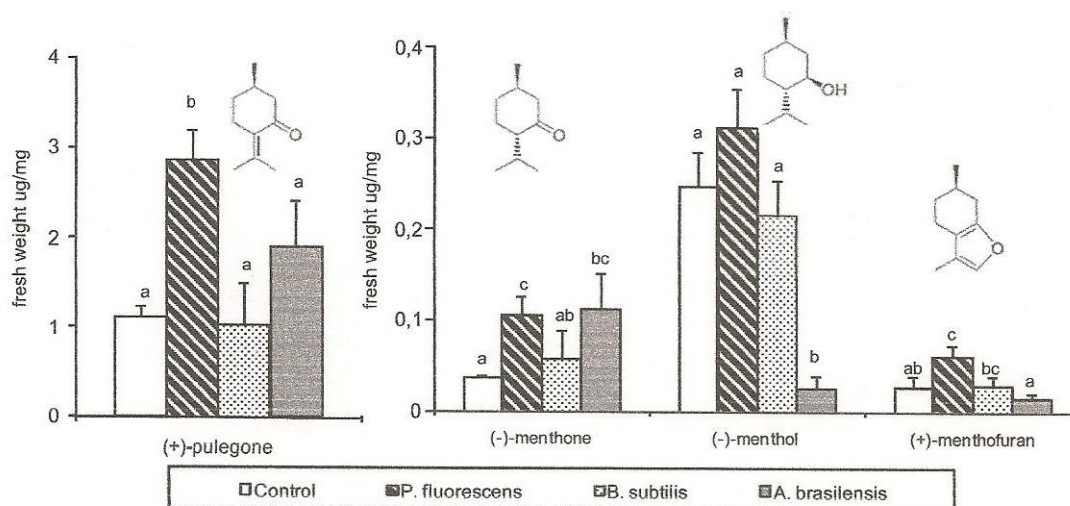


Figura 24. Concentrazione di OE in seguito ad esposizione alle tre specie di rizobatteri. (Riadattato da ref 29)

Inoltre si è notato un aumento di (+)-pulegone di 3 volte se esposto ai VOCs rizobatterici. Tale composto è un intermedio centrale nella sintesi di (-)-mentolo. In base alle condizioni ambientali, questo metabolita può essere ridotto a (-)-mentone e a (-)-mentolo dalla pulagone reduttasi, oppure essere ossidato a mentofurano tramite la mentofurano sintasi. Quindi i cambiamenti quantitativi di OE in *Mentha piperita* potrebbero indicare che i VOCs dei batteri del terreno, oltre ad indurre la biosintesi di metaboliti secondari, influenzano il flusso della via sintetica oppure specifici passaggi del metabolismo dei monoterpeni. Un maggior contenuto di pulegone potrebbe intensificare l'attività della pulagone reduttasi e favorire la riduzione a mentone invece che l'ossidazione a mentofurano.²⁷

4.2.7 *p*-Mentano

Il *para*-mentano è l'unico esempio di monoterpene (C₁₀) monociclico e la famiglia che ne deriva è stata usata per soddisfare le notevoli richieste commerciali di (-)-mentolo. Studi hanno dimostrato che diversi alcoli, lattoni ed eteri che sono collegati strutturalmente a tale composto presentano particolari proprietà organolettiche. Da ciò l'interesse dei chimici organici a scoprire processi biotecnologici per la loro sintesi: ad esempio il (-)-isopulegolo è stato ottenuto in forma otticamente pura dall'azione di lipasi di specie di *Pseudomonas*, che catalizzano un'acetilazione enantio- e diastereoselettiva della miscela commerciale dei suoi otto isomeri.¹ Molti lattoni di questa classe sono ottenuti dai loro rispettivi dioli, che derivano dall'acetilazione lipasi-mediata dei corrispondenti materiali racemici.⁵

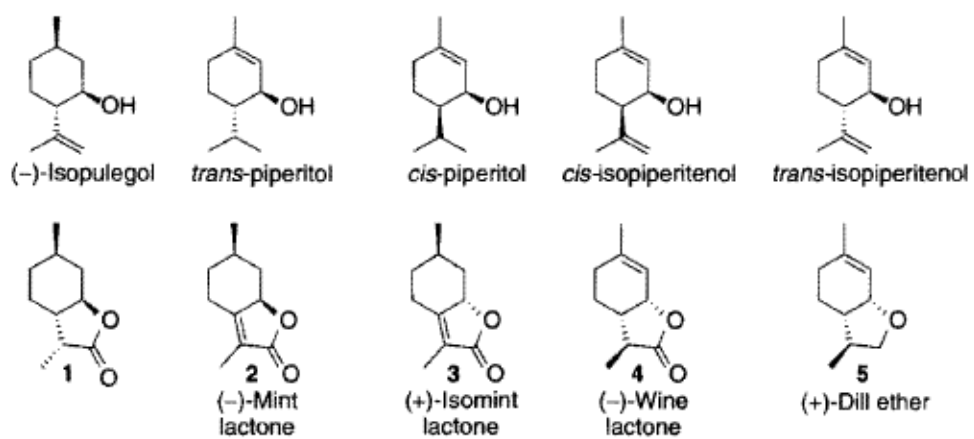


Figura 25. Monoterpeni naturali appartenenti alla famiglia del *p*-mentano (alcoli, lattoni ed eteri) preparati in forma enantiomericamente pura tramite biocatalisi. (Riadattato da **ref 1**)

4.3 Ambra grigia, estrazione vs. metodi sintetici

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.^{28, 30} Essa sembra essere costituita dalle parti indigeribili delle sue prede e da alcuni è considerata un metabolita patologico.⁸ 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.¹ 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.³⁰ Questa sostanza altamente profumata si usa per fissare l'essenza di profumi pregiati, permettendo loro una durata maggiore.²⁸ L'odore è descritto come esotico, legnoso, terroso, simile all'incenso, al tabacco, alla canfora e al muschio e ricorda l'odore dell'oceano.⁸ Il declino della caccia alle balene e la restrizione delle operazioni globali della caccia di questi animali 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.²⁸ 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.³⁰

4.3.1 Composti dell'ambra grigia e la loro biosintesi

La struttura principale della classe di composti aventi odorazione dell'ambra grigia è uno scheletro biciclo[4.4.0]decano, che presenta almeno un gruppo alcolico, etero oppure estereo come gruppo osmoforico e sostituenti alchilici in posizioni specifiche.⁸ Molti chimici hanno studiato questa classe di composti, specialmente G. Ohloff.⁷ Egli ha stabilito la “regola triassiale” della sensazione odorosa di composti di tipo decalino: odori simili all'ambra grigia provengono da sostanze aventi uno scheletro carbonioso *trans*-decalino e tre sostituenti assiali. Inoltre uno dei sostituenti Ri è un gruppo funzionale contenente ossigeno (o un gruppo simile localizzato su un carbonio legato ai radicali Ri).

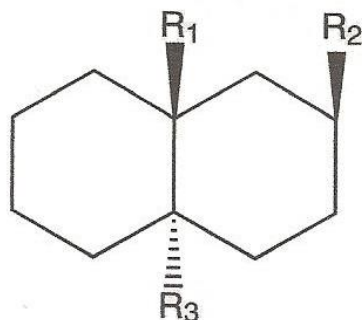


Figura 26. Arrangiamento ideale dei sostituenti per ottenere un odore tipico dell'ambra grigia.
(Riadattato da **ref 7**)

Grazie a questa regola si è scoperto che in posizione C8 è essenziale la presenza di un gruppo assiale per il legame con il recettore. Composti che mostrano questa caratteristica, in particolare quelli che hanno tre gruppi metilici assiali mostrano un'affinità molto forte per il recettore dell'ambra grigia.⁸ Però questa regola si è dimostrata inesatta, infatti ci sono alcuni composti *cis*-decalini e altri, che non contengono nemmeno il sistema decalino, che odorano di ambra grigia. Viceversa ci sono composti che rispettano la regola assiale, ma sono inodori. Quindi i chimici hanno cercato di capire quali altri requisiti dovessero avere le molecole per presentare l'odore tipico dell'ambra grigia. Una teoria si basa sul riconoscimento di un triangolo molecolare strutturalmente formato da un atomo di ossigeno e due atomi di idrogeno, che interagiscono elettronicamente con il recettore.⁷

4.3.1.1 Ambrox®

Il principio più importante è l'etere (furano) triciclico (-)-Ambrox®, che è sintetizzato a partire dal diterpene sclareolo, estratto dalla *Salvia sclarea* (Lamiaceae)¹, il cui costo e quantità disponibile dipende dalla raccolta annuale²⁹ ed è usato come fissativo nell'industria del profumo e come agente aromatizzante nell'industria del tabacco. L'ossidazione della catena laterale forma i γ -lattoni (+)-sclareolide e (-)-isosclareolide, che sono ridotti ad una miscela di dioli diastereoisomerici e a loro volta sono ciclizzati ad (-)-Ambrox® e il suo 8-*epi*-isomero.²⁸

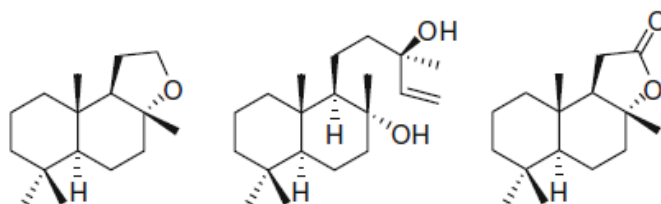


Figura 27. Strutture di (-)-Ambrox®, (-)-sclareolo e (+)-sclareolide. (Riadattato da **ref 28**)

L'enantiomero (+)-Ambrox® presenta un valore soglia più alto, 2,4 rispetto a 0,3 ppm con note legnose e manca della nota intensa e calda animale del (-)-Ambrox®. La nota esotica e speziata dell'enantiomero (+)- scompare nel racemato, che presenta un valore soglia di 0,5 ppm.⁸

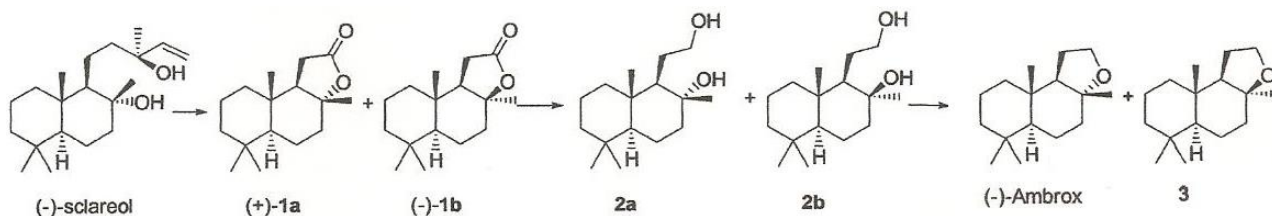


Figura 28. Sintesi di Ambrox® via sclareolide. (Riadattato da ref 28)

Alcuni funghi e lieviti (*Hyphozyma roseoniger*, specie di *Cryptococcus*) sono stati studiati per la loro capacità di usare sclerolo come unica fonte di carbonio e per accumulare sclareolide, che è convertito in Ambrox®.¹² Infatti il microorganismo *Hyphozyma roseoniger* CBC 214.83, che esiste sia in forma filamentosa che in forma di lievito, è stato isolato ed è abile a formare un diolo partendo da sclareolo. La conversione procede in un unico step tramite una cascata di reazioni con una resa >75% dopo 12 giorni di incubazione. Il lievito *Cryptococcus albidus* ATCC 20918 metabolizza sclareolo a lattone chetonico sclareolide con resa >100 g/L, successivamente quest'ultimo composto è riconvertito a diolo per produrre Ambrox®.²

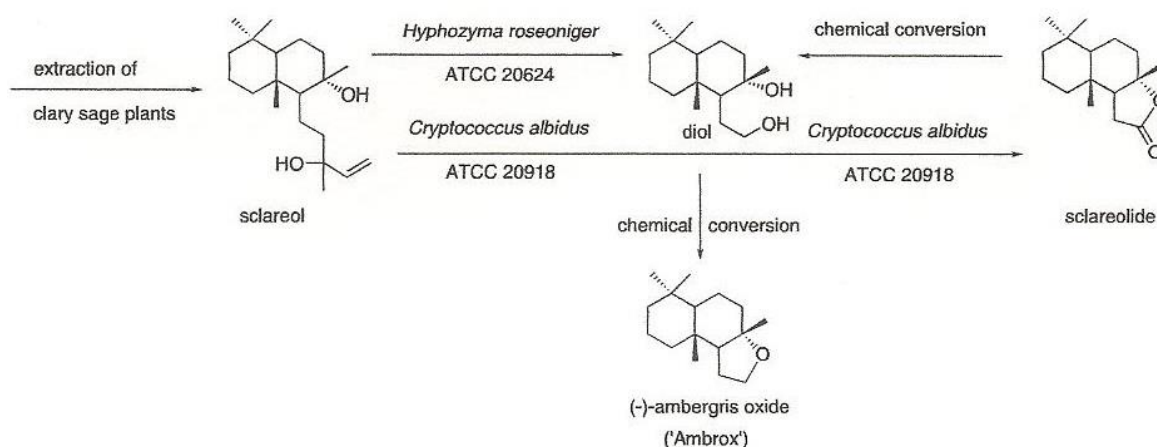


Figura 29. Biotrasformazione di sclareolo e sclareolide da *Hyphozyma roseoniger* e *Cryptococcus albidus*. (Riadattato da ref 2)

Un altro metodo è la trasformazione del (+)-albicanolo, nella forma enantiomericamente pura oppure tramite il diolo 27 (**figura 30**). Queste sostanze sono preparate tramite risoluzione cinetica dei materiali racemici ad opera della lipasi PE-266 (enzima appartenente a specie di *Alcaligenes*) e della

Il profumo è dato anche dalla presenza del (+)- γ -coronale: il suo precursore è il γ -cicloomogeraniolo racemico, che sottoposto ad un'acetilazione cinetica catalizzata dalla lipasi AK (deriva da *Pseudomonas* AK) dà l'enantiomero S usato come base strutturale per la sintesi di (+)- γ -coronale.¹

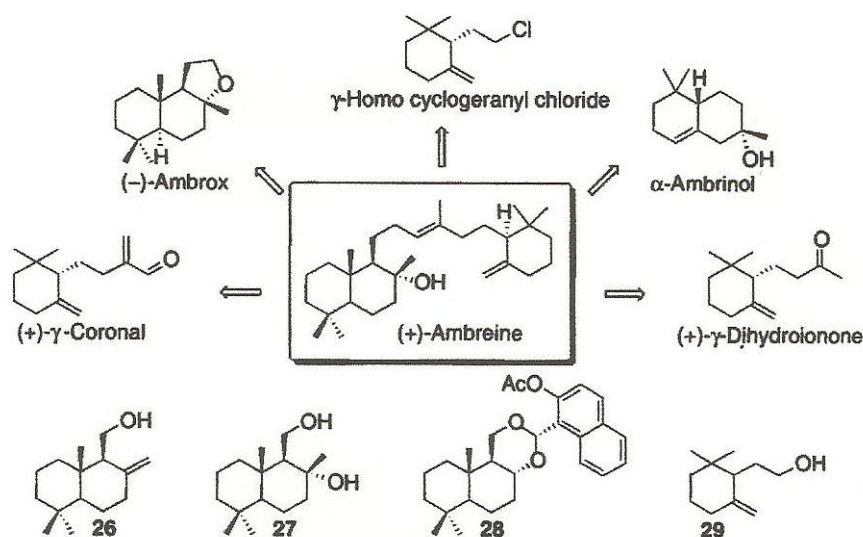


Figura 30. Preparazione di odoranti enantiomericamente puri dell'ambra grigia tramite risoluzione lipasi-mediata. I composti numerati sono degli intermedi chiave nella loro sintesi. (Riadattato da **ref 1)**

Fondamentale per l'odorazione dell'ambra grigia è pure α -ambrinololo, ottenuto dalla risoluzione della forma racemica tramite cristallizzazione frazionata di due esteri di acido 1S(-)-camfanico, seguita dalla riduzione dei diastereoisomeri chimicamente puri.

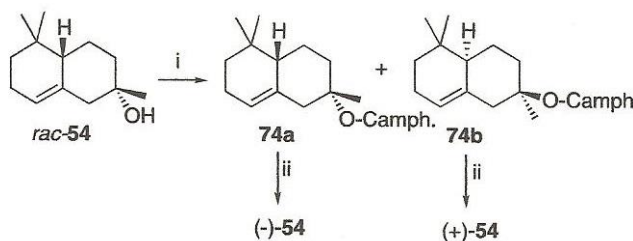


Figura 31. Sintesi di (+)- e (-)- α -ambrinolo. (Riadattato da **ref 8**)

Tramite questa serie di reazioni gli enantiomeri sono ottenuti con un eccesso enantiomerico pari al 99.5%. Il (+)- α -ambrinolo presenta una tonalità ammuffita, di terra asciutta, mentre l'enantiomero naturale mostra proprietà odorose naftaleniche simile all'indolo, le quali sembrano caratterizzare il racemato. La differenza di *odour threshold* è minima: 1.5 e 2 rispettivamente.⁸

4.3.1.3 Scoperta di una nuova classe di composti con odorazione dell'ambra grigia

Poco prima degli anni '90 è stata scoperta una nuova classe di odoranti di ambra grigia appartenenti alla famiglia del 2-cicloesenil-1,3-diossano, di cui il composto commerciale più famoso è Karanal®. Tale composto è una miscela di otto coppie di enantiomeri, di cui solo quattro sono attivi dal punto di vista organolettico: tre di forte intensità e uno più debole.⁸

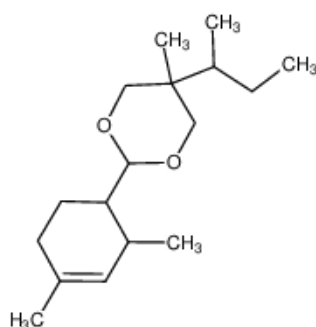


Figura 32. Struttura del Karanal® - <http://www.thsci.com/117933-89-8.html>

4.3.2 Acido labdanolico, precursore di (-)-Ambrox®

Il rilascio del profumo di ambra grigia è fortemente collegato agli elementi strutturali dello scheletro tetra-*nor*-labdanico. Poiché il prezzo di (-)-Ambrox® è relativamente alto, la sua produzione è sottoposta a continue ricerche per trovare nuovi metodi sintetici a partire da labdani economici e disponibili in abbondanza.

L'acido labdanolico è il principale costituente (~40%) della frazione acidica dell'estratto di *Cistus ladaniferus* L. Dopo la degradazione ossidativa della catena laterale C9 dell'acido labdanolico si ottengono sintoni adatti alla sintesi di (-)-Ambrox®.

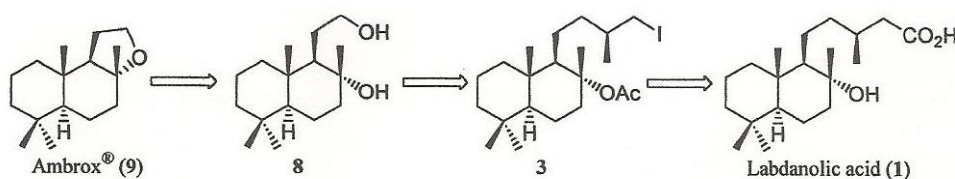


Figura 33. Collegamento strutturale fra Ambrox® ed acido labdanolico. (Riadattato da **ref 32**)

L'estratto commerciale di *C. Ladaniferus* L. si ottiene dopo aver imbevuto i ramoscelli e le foglie con *n*-esano e l'evaporazione del solvente forma una gomma appiccicosa. L'acido labdanolico grezzo si estrae dopo parziale purificazione e si ottiene l'acetato convertendo il gruppo idrossilico terziario in posizione C8. Questo derivato è sottoposto a iodiodedecarbossilazione con iodobenzenediacetato e iodio. Poiché è molto instabile, lo si fa reagire con potassio *tert*-butoossido (*t*BuOK) per ottenere la deidroidinazione e l'idrolisi del gruppo acetato. L'ozonolisi del doppio legame di questo derivato e la riduzione dell'intermedio ozonidico forma un metil chetone, che è immediatamente ciclizzato a ossido di sclareolo. Tale composto subisce ozonolisi con formazione di un intermedio di reazione contenente un gruppo aldeidico e un gruppo acetato. La riduzione dell'intermedio sintetizza un diolo, che in presenza di nitrometano e di acido *p*-toluenesolfonico produce il (-)-Ambrox®.³²

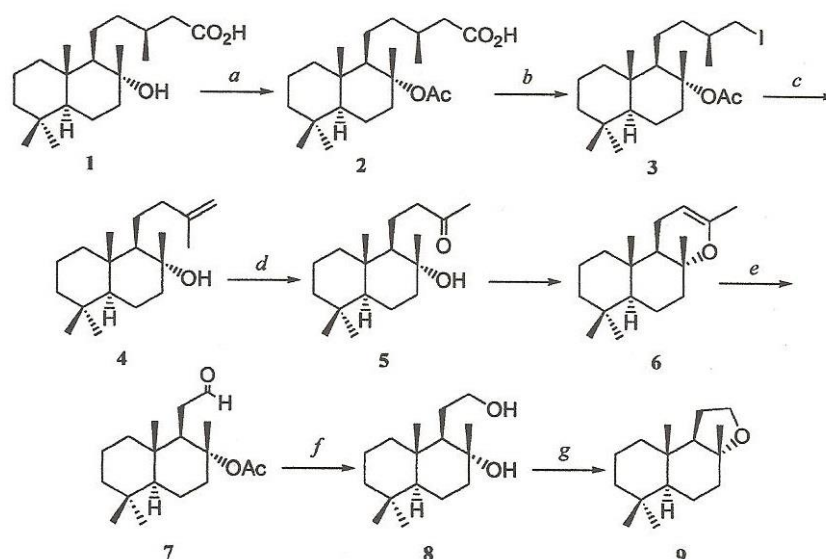


Figura 34. Passaggi della sintesi di Ambrox® (9) partendo da acido labdanolico (1). (Riadattato da **ref 32**)

4.3.3 Altri composti chimici per la sintesi di Ambrox®

- Acido oleanolico, o acido 3 β -idrossiolean-12-en-28-oico: è un triterpene pentaciclico ed è abbondante in natura, infatti è ampiamente ritrovabile nel regno vegetale e costa un terzo dello sclareolo.³¹ Gli anelli A/B e D/E costituiscono il sistema decalino e la struttura degli anelli A/B, una 3 β -idrossi-4,4,8,10-tetrametil*trans*-decalina, potrebbe essere utilizzata come precursore per un ampio numero di prodotti naturali, fra cui anche (-)-Ambrox® e (-)-9-*epi*-

ambrox, che è il suo isomero caratterizzato da l'odorazione più forte e dalla concentrazione soglia più bassa (0.15 ppm).³³ Dall'acido oleanolico si sintetizzano due diastereoisomeri: (2S,4aS,5S,6R)- e (2S,4aS,5R,6R)-5-(2-idrossietil)-1,1,4°,6-tetrametildecalin-2,6-diolo, da quest'ultimo è possibile sintetizzare il (-)-Ambrox®.³¹

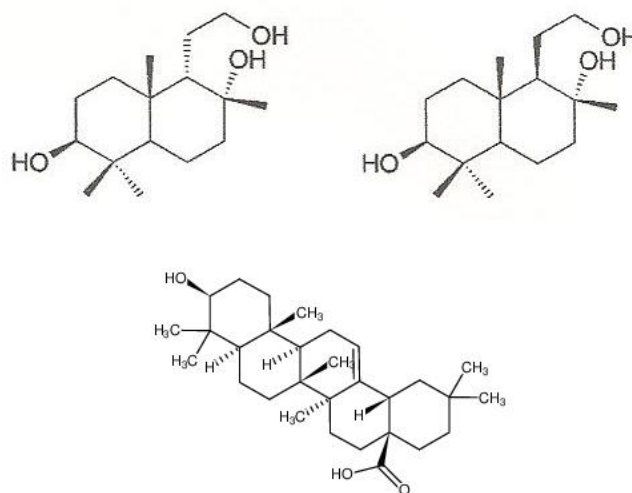


Figura 35. (Sopra) Strutture di: (2S,4aS,5S,6R)- e (2S,4aS,5R,6R)-5-(2-idrossietil)-1,1,4°,6-tetrametildecalin-2,6-diolo. (Sotto) Struttura dall'acido oleanolico.

<http://www.thsci.com/508-02-1.html>

- **Larixolo:** insieme al suo derivato acetato sono direttamente disponibili dalla natura, ma sono stati sfruttati poco come materiali di partenza in sintesi organica. L'ossidazione della catena laterale in C9 può fornire sintoni adatti alla sintesi di Ambrox®. Nel caso di larixolo, la sua catena laterale deve essere accorciata e il gruppo metilenico esocilico 8(17) deve essere modificato per permettere la costruzione dell'etere ciclico, tipico delle molecole che appartengono alla classe dell'Ambrox®.³⁴

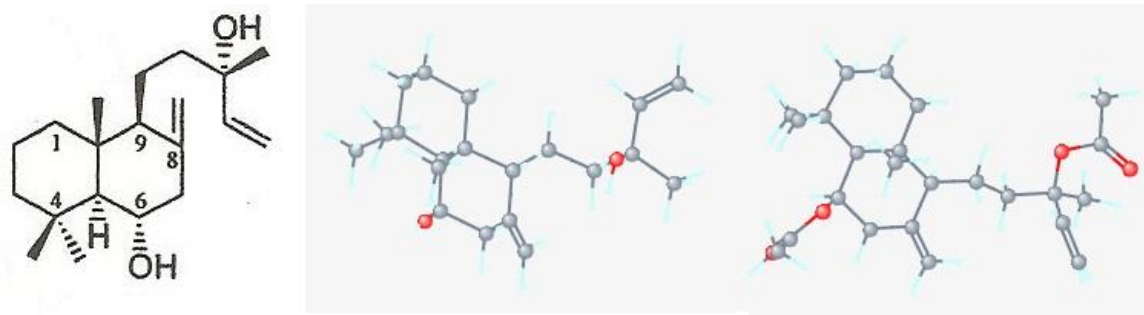


Figura 36. (Sinistra) Struttura del larixolo. (Centro) Conformer 3D di larixol. (Destra)
Conformer 3D del larixil acetato.

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/518935#section=3D-Conformer>

<http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/91746934#section=3D-Conformer>

4.4 Ironi, principi odorosi di varie specie di Iris

L'olio essenziale di iris è una delle fragranze storiche più importanti ed il suo uso è documentato addirittura al tempo dei Medici a Firenze. Tale sostanza è altamente costosa, ma nonostante ciò viene usata nelle formulazioni di profumi raffinati, come in Chanel No. 19,^{9, 28} perché presenta caratteristiche nettamente migliori rispetto ai corrispondenti composti sintetici. La superiorità delle molecole naturali è causata dalla complessità della miscela naturale isomerica, nella quale ciascun enantiomero presenta note olfattive differenti.¹ Infatti tutti e dieci i possibili isomeri sono stati sottoposti a valutazione olfattiva: l'uomo riesce a distinguerli tutti, ma il (-)-*cis*- α -irone è caratterizzato dalle più pregiate ed intense note di iris, mentre il *trans*- γ -irone ricorda l'odore del burro di iris. Di tutti gli isomeri, il 3-buten-2-one, o α -irone, è l'ingrediente utilizzato in molti prodotti odorosi e ha formula bruta C₁₄H₂₂O. Il *Council of Europe* ha aggiunto tale composto nella lista delle sostanze utilizzabili negli alimenti (COE No. 145) e la *Food and Drug Administration* (FDA) l'ha approvato come aroma (21 CFR 172.515). Può essere trovato nelle fragranze aggiunte nei cosmetici, nei profumi raffinati, negli shampoo, nei saponi, ma anche in prodotti per la cura della casa e il suo uso si aggira fra 1-10 tonnellate all'anno.²¹

4.4.1 Specie di Iris, Iridaceae

Le piante che appartengono alla famiglia delle Iridaceae assomigliano alle specie della famiglia delle Liliaceae (fanno parte di questa famiglia: la cipolla – *Allium cepa*, l'aglio – *Allium sativum* e l'asparago – *Asparagus officinalis*), ma differiscono per la struttura dell'ovario. È anche possibile distinguerla dalla famiglia delle Amarillidaceae, per la presenza di 3 stami invece di 6. L'iris (*Iris* spp.), il gladiolo (*Gladiolus* spp.) e lo zafferano (*Crocus sativus*) sono esempi tipici di Iridaceae.²¹ Il nome *Iris* deriva dal greco e vuol dire arcobaleno, poiché i fiori di queste piante hanno tinte varie e vivaci. Gli iris sono tipici della zona temperata, ma sono originali del Mediterraneo e dell'Asia centrale.³⁶ Gli iris sono delle erbe con rizomi, bulbi o bulbo-tuberi, con foglie alterne disposte su due file.³⁷

Iris germanica

La pianta è rizomatosa perenne e presenta foglie praticamente persistenti in inverno e le brattee dei fiori sono membranacee e scolorate, mentre i fiori sono tendenti al blu-violetto. Raggiunge i 120 cm in altezza ed è un ibrido di origini europee.³⁷



Figura 37. Dettagli della pianta *Iris germanica* –

<http://dbiodbs.univ.trieste.it/quint/carso/foto/TS170515.jpg>

Iris pallida

Questa specie è perenne ed è originaria delle coste croate, ma si è ampiamente diffusa. Le foglie di questa pianta sono ristrette in punta e sono acute. I fiori delle infiorescenze sono sessili e di colore blu pallido.³⁷



Figura 38. *Iris pallida* – <http://dbiodbs.univ.trieste.it/quint/carso/foto/TS118081.jpg>

4.4.2 Preparazione classica dell'olio essenziale di Iris

La ricetta originale spiega come procedere per la preparazione dell'olio essenziale: i rizomi decorticati di iris erano conservati in un luogo asciutto e aerato per 2-3 anni, trascorso questo tempo venivano polverizzati e ci si aggiungeva dell'acido solforico diluito. Successivamente si distillava tramite vapore per ottenere il burro di iris. Tolti gli acidi grassi per purificarlo, si otteneva *l'iris absolute*, il quale al giorno d'oggi è venduto a 40000-50000 €/kg.²⁸ Molti chimici hanno studiato la composizione di questo prodotto pregiato, finché sono stati scoperti dei composti chetonici dal profumo piacevole, a cui si assegnò il nome di ironi, che non sono ritrovabili nei rizomi appena

raccolti. Nell'olio naturale di iris si trovano almeno tre isomeri: α -, β - e γ -ironi. ⁹ Per valutare le caratteristiche odorose di ciascun isomero, molti studi riguardano la risoluzione delle forme racemiche tramite gas cromatografia e ciascun isomero è stato sottoposto alle tecniche GC-sniffing. Tutti i composti mostrano proprietà odorose differenti: alcuni sono inodori, altri hanno odore tipico di iris, mentre certi presentano profumazione simile agli iononi. ⁸

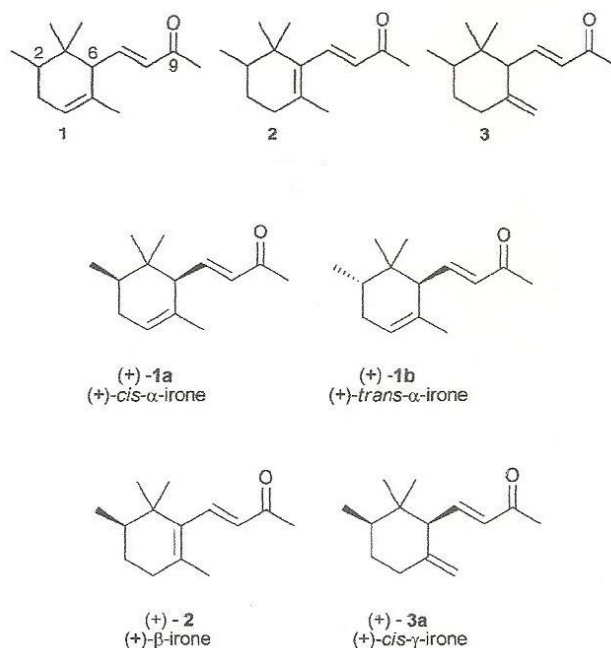


Figura 39. (Sopra) Isomeri degli ironi: (1) α -, (2) β - e (3) γ -irone. (Sotto) Stereochimica degli ironi contenuti in *Iris pallida*. (Riadattato da **ref 9**)

4.4.3 Biogenesi degli ironi

Le molecole di partenza sono degli iridali monociclici, ritrovati in radici e rizomi di molte specie di *Iris*, che subiscono una ciclizzazione per trasferimento di un gruppo metilico al doppio legame terminale della catena laterale aperta, formando i cicloiridali. Tali composti sono dei triterpenoidi biciclici metilati e subendo una degradazione ossidativa diventano ironi. Durante queste reazioni si formano tre regioisomeri α , β e γ e la configurazione relativa dei due centri stereogenici è principalmente *cis*, mentre le forme *trans* sono state ritrovate solo in tracce. La percezione odorosa di (+)-*cis*- α -irone e di (-)-*trans*- γ -irone è data dalla configurazione relativa ed assoluta degli stereocentri in C₂ e C₆. ⁸ Vari studi hanno dimostrato che oli di origine diversa sono caratterizzati da una differente composizione enantiomerica, ad esempio gli ironi destrogiri si trovano nelle varietà di *Iris pallida* di origine italiana mentre le forme levogire sono tipiche di *I. Germanica*, specie del Marocco. ^{8, 9, 28}

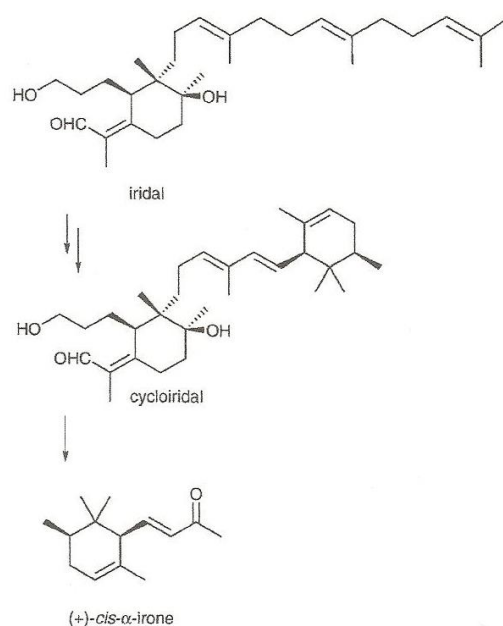


Figura 40. Sintesi di (+)-*cis*-α-irone da iridale. (Riadattato da **ref 9**)

4.4.4 Produzione sintetica

Il metil-3-pseudo ionone mediante una ciclizzazione acido catalizzata produce due distereoisomeri di α-irone e in minor quantità il β-regioisomero. Questa reazione è usata dalla compagnia Givaudan per la sintesi di Irone Alpha®, che è descritto avente carattere naturale, ricco e floreale e facente parte della composizioni di iris e di violetta e si ritrova in quelle composizioni, che è richiesto una tonalità esotica, poiché dona tenacità.⁹ Chimicamente tale composto è una miscela 55:45 dei racemi *trans*- e *cis*-α-irone con 5% dell'isomero β. Esistono sostituenti sintetici per l'olio essenziale di iris, che si basano su miscele racemiche di *trans*- e *cis*-α-irone e dell'isomero β impuro. Questi prodotti costano meno dell'estratto naturale, perché non presentano la sua fragranza e la sua raffinatezza.³⁸

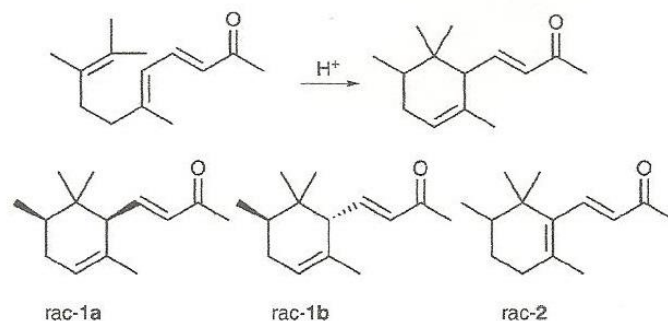


Figura 41. Sintesi degli ironi a partire da metil-3-pseudo ionone. (Riadattato da **ref 9**)

4.4.5 Metodi enzimatici brevettati per la sintesi degli ironi

Al momento esistono due procedure patentate che sfruttano l'azione degli enzimi e dei batteri per la biosintesi degli ironi:

- 1° metodo: tramite etanolo o metanolo i precursori terpenici sono estratti dai rizomi macinati o schiacciati e successivamente sottoposti a ossidazione enzimatica, che avviene in acqua in presenza di un surfattante o di un co-solvente per aumentare la dispersibilità delle molecole idrofobiche nell'acqua. L'ossidazione può essere condotta con una lipossidasi dei semi di soia in ambiente aerobio o con una perossidasi del rafano in presenza di perossido di idrogeno. I due metodi differiscono per le ore totali di distillazione e per la quantità finale di ironi estratti dal vapore di distillazione. Da tenere in considerazione è l'attività dell'acido linolenico nel seme di soia che aumenta la produzione di ironi. I vantaggi di questa tecnica sono vari: non sono necessari rizomi decorticati e neanche una conservazione prolungata, quindi i precursori sono estratti poco dopo la raccolta e la modalità di estrazione permette l'impiego degli ironi nell'industria alimentare.
- 2° metodo: si basa sul trattamento dei rizomi o di loro parti, dell'estratto o di scarti di iris con due specie batteriche in un mezzo di cultura cellulare vegetale. Le specie sono *Serratia liquefaciens* e *Pseudomonas maltophilia*, isolate dai rizomi di *Iris pallida* e coltivate sul terreno di Murashige e Skoog, che è usato specificatamente per culture cellulari vegetali. Dopo otto giorni la produzione di ironi tramite questa tecnica raggiunge 1 grammo per ogni chilo di rizomi essiccati, un risultato notevole in confronto alla preparazione tradizionale che forniva 400 mg/kg dopo 3 anni di essiccazione.⁹

4.4.6 Ulteriori biotrasformazioni

Irone Alpha® è ridotto con sodio boridruro in una soluzione di diclorometano/metanolo (2:1) per ottenere i quattro α -iroli (alcoli) racemici. La miscela ottenuta è stata sottoposta ad acetilazione biocatalizzata in una soluzione di *tert*-butil metil etere in presenza di vinil acetato come donatore acilico, usando due preparazioni enzimatiche diverse: una a base di *lipasi pancreatica porcina* e l'altra contenente *lipasi PS* da *Pseudomonas cepacia*. Quando la lipasi pancreatica porcina è utilizzata come catalizzatore, dopo 24h si ottiene una miscela 2:1 di *cis*- e *trans*- α -iroli acetati. Il maggior componente (60.2%) era il (2S,6R,9R)-*cis*- α -irolo e con questo enzima si ottengono ottimi valori diastereoselettivi. Mentre l'acetilazione mediata dalla lipasi PS procedendo rapidamente, fornisce una miscela praticamente equimolare dei quattro diastereoisomeri (9R) delle forme acetilate di *cis*- e *trans*- α -iroli. Questo enzima è enantioselettivo, ma non è completamente diastereoselettivo.^{28, 39}

Un altro metodo si basa sulla risoluzione della miscela di (+)- e (-)-2,2,4-trimetil-3-cicloesene-1-metanolo tramite una reazione asimmetrica di Diels-Alder, ma l'eccesso enantiomerico di (-)- è basso. Un'altra possibilità sintetica sfrutta enzimi idrolitici, come PPL (*Porcine Pancreatic Lipase*), ottenendo eccessi enantiomerici elevati (>90%). Per risolvere la miscela si parte dall'aldeide 2,2,4-trimetil-3-cicloesenale, che viene ossidata per ottenere il corrispondente acido carbossilico, a cui è aggiunto (-)-1-feniletilammina per formare (+)- e (-)-2,2,4-trimetil-3-cicloesene-1-metanolo. Risolta la miscela, ciascun enantiomero viene fatto reagire per ottenere (-)- e (+)-*cis*- α -irone.⁴⁰

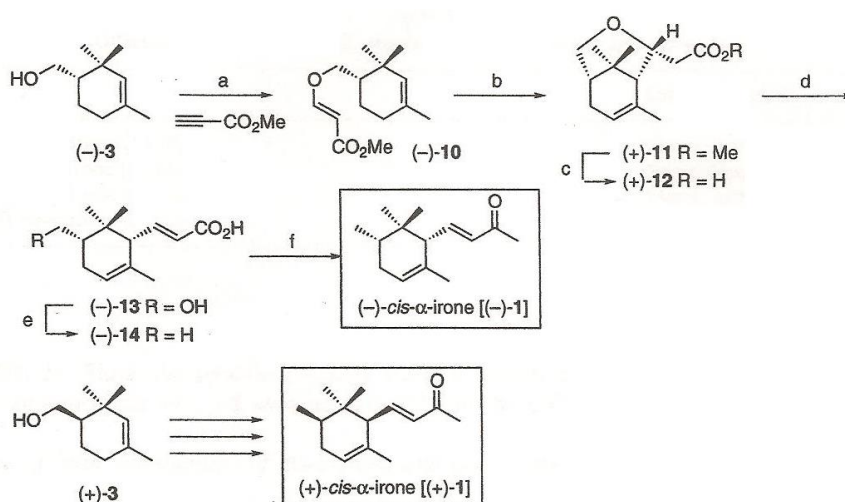


Figura 42. Sintesi di (+)- e (-)-ironi: (a) N-metilmorfolina, Et₂O. (b) acido metansolfonico, Et₂O. (c) NaOH, MeOH. (d) LDA, THF. (e) 1: MsCl, Py, CH₂Cl₂; 2: Zn, NaI, DME. (f) MeLi, Et₂O. (Riadattato da **ref 40**)

Funghi della specie *Botrytis* sono utilizzati come biocatalizzatori per la sintesi degli ironi. Estratti secchi di rizomi di iris immersi in un solvente organico sono stati aggiunti dopo 2 giorni alla cultura fungina come un'emulsione in acqua-acetone-Tween 80. Trascorse altre 48 h vengono prodotti 2.3 g/Kg di ironi, che successivamente sono isolati tramite distillazione a vapore.²

CAPITOLO 5

Conclusioni

Sfruttare gli enzimi e le cellule di svariati microorganismi è una possibilità promettente per produrre aromi e fragranze, che rispondano ai requisiti delle legislazioni europee ed americana, soprattutto in risposta alla richiesta della clientela di composti di origine naturale, sebbene questo termine non sia necessariamente sinonimo di “buono, salutare”. Basti pensare a molti principi attivi di prodotti galenici o di fitoterapici: tali sostanze possono causare degli effetti indesiderati o addirittura interagire sia farmacodinamicamente che farmacocineticamente con farmaci o altre sostanze. L’innovazione dei metodi biotecnologici ha comportato vari aspetti positivi. Infatti, questi permettono di rispettare maggiormente i principi di “Green chemistry” rispetto ai processi sintetici convenzionali. Inoltre, consentono di sintetizzare composti che sono difficili da recuperare dall’ambiente naturale, con il risultato di abbassare il prezzo di vendita di composti che altrimenti sarebbero molto elevati (l’*iris absolute* costa 40000€). La continua ricerca di nuovi metodi biocatalitici ha portato allo sviluppo di metodi, alcuni dei quali brevettati, che vengono utilizzati per sintetizzare aromi e fragranze su scala industriale, in particolare vanillina, mentolo, ambra grigia ed ironi. L’elevata domanda di mercato di questi composti ha spinto i chimici organici ad approfondire gli studi per scoprire nuove tecniche di sintesi con un notevole incremento di innovazioni utili per soddisfare la richiesta mondiale. Nonostante ciò sono necessari ulteriori sforzi per ottimizzare sia i metodi biotecnologici in modo da produrre aromi e fragranze in maniera sempre più efficiente e sostenibile.

Bibliografia

- ¹ S. Serra, *Opportunities for Biocatalysis in the Flavor, Fragrance and Cosmetic Industry*, J. A. Tao and R. Kazlauskas, *Biocatalysis for Green Chemistry and Chemical Process Development*, 1 edizione, John Wiley & Sons, Ltd, 2011, 223-254
- ² J. Schrader (2007), *Microbial Flavour Production*, *Flavours and Fragrances*, 507-574
- ³ W. Schwab, R. Davidovich-Rikanati, E. Lewinsohn (2008), *Biosynthesis of plant-derived flavor compounds*, *The Plant Journal*, 54:712-732
- ⁴ U. Krings, R. G. Berger (1998), *Biotechnological production of flavours and fragrances*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49:1-8
- ⁵ K. P. Dhake, D. D. Thakare, B. M. Bhanage (2013), *Lipase: A potential biocatalyst for the synthesis of valuable flavour and fragrance ester compounds*, *Flavour and Fragrance Journal*, 28:71-83
- ⁶ F. H. Martini, M. J. Timmons, R. B. Tallitsch, *Sistema nervoso Sensibilità generale e specifica*, F. H. Martini, M. J. Timmons, R. B. Tallitsch, *Anatomia umana*, 3 edizione, Napoli, EdiSES s.r.l., 2008
- ⁷ L. P. Cheng, L. Xu, H. F. Mao, G. L. Wang (2009), *Study of structural and electronic origin of ambergris odor of some compounds*, *J. Mol. Model.*, 15:1-8
- ⁸ E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra (2003), *Enantioselective perception of chiral odorants*, *Tetrahedron: Asymmetry*, 14:1-42
- ⁹ E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra (2008), *Applications of biocatalysis in fragrance chemistry: the enantiomers of α -, β - and γ -irones*, *Chem. Soc. Rev.*, 37:2443-2451
- ¹⁰ P. M. Dewick, *La via biogenetica del mevalonato: terpenoidi e steroidi*, P. M. Dewick, *Chimica, Biosintesi e Bioattività delle Sostanze Naturali*, Padova, Piccin Nuova Libreria S.p.A., 2001
- ¹¹ J. C. Brookes, A. P. Horsfield, A. M. Stoneham (2009), *Odour character differences for enantiomers correlate with molecular flexibility*, *J. R. Soc. Interface*, 6:75-86
- ¹² E. J. Vandamme, W. Soetaert (2002), *Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis*, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 77:1323-1332
- ¹³ N. A. Zamzuri, S. Abd-Aziz (2013), *Biovanillin from agro wastes as an alternative food flavour*, *J. Sci. Food Agric.*, 93:429-438
- ¹⁴ A. Tilay, M. Bule, U. Annapure (2010), *Production of Biovanillin by One-Step Biotransformation Using Fungus *Pycnoporus cinnabarinus**, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 58:4401-4405
- ¹⁵ J. McMurry, *Chimica Organica*, 7 edizione, Padova, Piccin Nuova Libreria S.p.A., 2009
- ¹⁶ P. Nikolova, O. P. Ward (1993), *Whole cell biocatalysis in nonconventional media*, *Journal of Industrial Microbiology*, 12:76-86

- ¹⁷ S. Ramachandra Rao, G. A. Ravishankar (2000), *Vanilla flavour: production by conventional and biotechnological routes*, Journal of the Science of Food and Agriculture, 80:289-304
- ¹⁸ M. P. Martins, J. Ouazzani, G. Arcile, A. H. Jeller, J. P. F. De Lima, M. H. R. Seleglim, A. L. L. Oliveira, H. M. Deboni, T. Venâncio, N. S. Yokoya, M. T. Fujii, A. L. M. Porto (2015), *Biohydroxylation of (-)-Ambrox®, (-)-Sclareol and (+)-Sclareolide by Whole Cells of Brazilian Marine-Derived Fungi*, Mar. Biotechnol., 17:211-218
- ¹⁹ M. S. Nair, A.T. Anilkumar (1994), *Lipase catalysed regioselective acylation: a facile method for the synthesis of commercially important ambrox® intermediate*, Biotechnology Letters, 16:161-162
- ²⁰ D. S. Correll (1953), *Vanilla-Its Botany, History, Cultivation and Economic Import*, Economic botany, 7:291-358
- ²¹ F. Venturelli, L. Virli, *Le spermatofite*, F. Venturelli, L. Virli, Invito alla Botanica, 13 edizione, Bologna, Zanichelli editore S.p.A., 2009
- ²² F. Ruiz-Terán, I. Perez-Amador, A. López-Munguia (2001), *Enzymatic Extraction and Trasformation of Glucovanillin to Vanillin from Vanilla Green Pods*, J. Agric. Food Chem., 49:5207-5209
- ²³ P. M. Dewick, *La via dello shikimato: amminoacidi aromatici e fenilpropanoidi*, P. M. Dewick, *Chimica, Biosintesi e Bioattività delle Sostanze Naturali*, Padova, Piccin Nuova Libreria S.p.A., 2001
- ²⁴ J. Schrader, M. M. W. Etschmann, D. Sell, J.-M. Hilmer, J. Rabenhorst (2004), *Applied biocatalysis for the synthesis of natural flavor compounds – current industrial processes and future prospects*, Biotechnology Letters, 26:463-472
- ²⁵ G. P.P. Kamatou, I. Vermaak, A. M. Viljoen, Brian M. Lawrence (2013), *Menthol: A simple monoterpene with remarkable biological properties*, Phytochemistry, 96:15-25
- ²⁶ K. L. Ringer, M. E. McConkey, E. M. Davis, G. W. Rushing, R. Croteau (2003), *Monoterpene double-bond reductases of the (-)-menthol biosynthetic pathway: isolation and characterization of cDNA encoding (-)-isopiperitone reductase and (+)-pulegone reductase of peppermint*, Archives of Biochemistry and Biophysics, 418:80-92
- ²⁷ S. Pignatti, 128. *Labiatae*, Flora d'Italia volume 2, 1 edizione, Bologna, Ediagricole
- ²⁸ E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra (2003), *From commercial racemic fragrances to odour active enantiopure compounds: the ten isomers of irone*, C. R. Chimie, 6:529-546
- ²⁹ M. V. Santoro, J. Zygodlo, W. Giordano, E. Banchio (2011), *Volatile organic compound from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (Mentha piperita)*, Plant Physiology and Biochemistry, 49:1177-1182
- ³⁰ S. Serra (2013), *An expedient preparation of enantio-enriched ambergris odorants from commercial ionone alpha*, Flavour Fragr. J., 28:46-52
- ³¹ Y-P. Xie, B-G. Li, Y-G. Luo, X-Z Chen, G-L. Zhang (2008), *Preparation of Two Diastereoisomeric Decalin Synthons and (-)-Ambrox*, Helvetica Chimica Acta, 91:734-740

- ³² M. G. Bolster, B. J. M. Jansen, A. de Groot (2001), *The synthesis of (-)-Ambrox® starting from labdanolic acid*, Tetrahedron, 57:5657-5662
- ³³ H-J. Yang, B-G. Li, X-H. Cai, H-Y. Qi, Y-G. Luo, G-L. Zhang (2006), *Chiral Decalins: Preparation from Oleanolic Acid and Application in the Synthesis of (-)-9-epi-Ambrox*, Journal of Natural Products, 69:1531-1538
- ³⁴ M. G. Bolster, B. J. M. Jansen, A. de Groot (2001), *The synthesis of Ambrox®-like compounds starting from (+)-larixol*, Tetrahedron, 57:5663-5679
- ³⁵ J. Lalko, A. Lapczynski, D. McGinty, S. P. Bhatia, C. S. Letizia, A. M. Api (2007), *Fragrance material review on α -irone*, Food and Chemical Toxicology, 45:S272-S275
- ³⁶ W. S. Judd, C. S. Campbell, E. A. Kellogg, P. F. Stevens, *Capitolo 8 Rapporti filogenetici delle angiosperme*, Botanica sistemica un approccio filogenetico, Piccin Nuova Libreria S.p.A., Padova, 2002
- ³⁷ G. Dalla Fior, 18. *Iridaceae*, La nostra flora, 3 edizione, Trento, Casa Editrice G. B. Monauni
- ³⁸ S. Pignatti, 127. *Iridaceae*, Flora d'Italia volume 3, 1 edizione, Bologna, Edagricole
- ³⁹ J. Aleu, B. Bergamo, E. Brenna, C. Fuganti, S. Serra (2000), *Acetylation of Racemic cis- and trans- α -Irols, Mediated by Porcine Pancreatic Lipase (PPL) – A New Route to (-) and (+)-cis- α -Irone*, Eur. J. Org. Chem., 3031-3038
- ⁴⁰ T. Inoue, H. Kiyota, T. Oritani (2000), *Synthesis of both enantiomers of cis- α -irone and cis- γ -irone, principal constituents of iris oil, via resolution of (\pm)-2,2,4-trimethyl-3-cyclohexene-1-carboxylic acid*, Tetrahedron: Asymmetry, 11:3807-3818

Foto:

Moro A., Nimis P.L., Martellos S. (ed.) 2003+ [continuously updated]: Il Cercapiante, published at <http://dbiodbs.units.it/carso/cercapiante01/> Author of the image - Licence [accessed DD/MM/YY] .