



## Występowanie, rola biologiczna oraz biotransformacja limonenu

Mariusz Trytek, Patryk Kowalski, Jan Fiedurek

Zakład Mikrobiologii Przemysłowej  
Uniwersytet Marii-Curie Skłodowskiej, Lublin

### Presence, biological role and biotransformation of limonene

#### Summary

Monoterpenes, widely distributed in nature, constitute suitable precursor substrates for potential production of valuable natural flavour and fragrance compounds. Among various monoterpenes, limonene is a cheap and readily available starting material, utilized for e.g. biotransformation into more valuable compounds like carvone and  $\alpha$ -terpineol. This review presents properties, application, and possibilities, as well as trials of biotechnological conversion of limonene using some microorganisms.

#### Key words:

limonene, monoterpenes, biotransformation.

### 1. Wprowadzenie

Terpeny są największą klasą wtórnych metabolitów roślin (1). Od dawna wiadomo, że destylując z parą wodną wiele materiałów roślinnych można otrzymać ciekłą mieszaninę, znaną jako roślinne olejki eteryczne. W przyrodzie zidentyfikowano ponad 400 różnych monoterpenu (2). Każdego roku w lasach produkowanych jest  $1,4 \times 10^9$  ton terpenów (3-5), z czego duża część wyparowywana jest do atmosfery. Przeciętne stężenie monoterpenu w powietrzu w lasach iglastych wynosi  $1-10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ . Monoterpeny występują głównie w tkankach roślinnych, zaś wyższe terpeny zarówno w roślinach jak i organizmach zwierząt. Odgrywają one ważne role biologiczne, np. plastochinony, ubi-

#### Adres do korespondencji

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

**biotechnologia**

2 (61) 206-217 2003

chinony, karotenoidy, sterole, fitoaleksyny, saponiny i inne związki o działaniu toksycznym, oraz hormony roślinne takie jak: gibereliny, kwas abscysynowy, a także żywice (6).

## 2. Występowanie

Limonen, monocykliczny monotерpen jest obok  $\alpha$ -pinenu najbardziej rozpowszechnionym w przyrodzie terpenoidem, wytwarzanym przez ponad 300 roślin. Najważniejsze właściwości fizykochemiczne limonenu umieszczono w tabeli 1. Jest on głównym składnikiem olejków eterycznych (90-98%), otrzymywanych ze skórek owoców cytrusowych. Ponadto występuje w tkankach kopru, kminku, orzecha włoskiego, pistacji i selera. Pełni on funkcję odstrasżającą wobec owadzich szkodników drzew cytrusowych, jest emitowany do atmosfery głównie w czasie wiosny i jesieni (7). Limonen występuje w dwóch odmianach enancjomerycznych: 4R(+) i 4S(-). Najczęściej spotykanym izomerem optycznym jest 4R(+)-limonen (1). Niektóre rośliny produkują mieszaninę obu izomerów – skórki cytryny zawierają w mieszaninie enancjomerycznej ok. 98% formy 4R(+) i 2% 4S(-), skórki grejpfruta i pomarańczy ok. 99,5% izomeru 4R(+), a tylko 0,5% 4S(-), inne zaś (np. kminek) wytwarzają tylko enancjomer 4S(-), a owoce cedratu zawierają także 4% 4R(+)-limonenu. 4R(+)-limonen posiada zapach cytrynowo-pomarańczowy, podczas gdy jego forma 4S(-) miętowo-terpentynowy (8). Rocznie przemysł ekstrahuje około 73 000 ton 4R(+)-limonenu ze skórek owoców cytrusowych (5), co czyni go tanim i łatwo dostępnym substratem. Warto wspomnieć też o innych monotерpenach, które można uzyskać w drodze biotransformacji limonenu. S(+)-karwon o zapachu koperkowym jest głównym składnikiem olejku z kminku zwyczajnego, zawiera go również koper i jego nasiona, R(-)-karwon charakteryzuje się miętowo-pieprzowym zapachem, obok mentolu wchodzi w skład olejku miętowego. Alkohol perillilowy jest głównym komponentem zapachowym lawendy i mleka matki.

Tabela 1

Właściwości fizykochemiczne limonenu

Numer CAS*	d-Limonen	l-Limonen	Dipenten
1	2	3	4
nazwa chemiczna	5989-27-5 (R)-4-izopropenylo-1-metylo-cykloheksen	5989-54-8 (S)-4-izopropenylo-1-metylo-cykloheksen	138-86-3 4-izopropenylo-1-metylo-cykloheksen
wzór empiryczny	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>	C <sub>10</sub> H <sub>16</sub>
masa cząsteczkowa	136,23	136,23	136,23
temperatura topnienia (°C)	-74,35	-74,35	-95,9
temperatura wrzenia (°C)	175,5-176,0	175,5-176,0	175,5-176,0
gęstość (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>x</sup>	0,8411	0,8422	0,8402
prężność pary (Pa) <sup>x</sup>	190	190	190

1	2	3	4
rozp. w wodzie (mg/l) <sup>y</sup>	13,8	13,8	13,8
stała Henry'ego (kPa·m <sup>3</sup> /mol) <sup>y</sup>	34,8	34,8	34,8
Log P	4,23	4,23	4,83

\* – numer katalogowy; <sup>x</sup> – w temperaturze 20°C; <sup>y</sup> – w temperaturze 25°C.

### 3. Biosynteza

Podczas biosyntezy terpenów cząsteczki pirofosforanu dimetyloallilu i pirofosforanu izopentenyłu zostają połączone w reakcji substytucji nukleofilowej typu drugiego, w wyniku której powstaje pirofosforan geranylu. Jest to dziesięciowęglowa jednostka, będąca prekursorem dla wszystkich monotrpenów (na przykład limonenu – który powstaje w plastydach z prekursora poprzez izomeryzację *cis-trans* wiązania podwójnego, następnie wewnątrzcząsteczkowe podstawienie grupy pirofosforanowej i utratę protonu) (6,9).

### 4. Zastosowania

Limonen oraz  $\alpha$ -pinen, związki niedrogie i łatwo dostępne znalazły zastosowanie jako rozpuszczalniki m.in. w laboratoriach histologicznych i w przemyśle farbiarskim. Limonen jest używany w przemyśle do usuwania tłuszczów z powierzchni metali przed malowaniem oraz jako środek czyszczący w drukarstwie i przemyśle elektronicznym. Służy jako dodatek aromatyczny do produktów spożywczych, środków czystości, perfum, oraz w medycynie do rozpuszczania kamieni cholesterolowych i żółciowych u ludzi (5). Największe zapotrzebowanie spośród terpenoidowych związków smakowo-zapachowych w przemyśle spożywczym mają R(-)-karwon oraz mentol, gdyż odpowiadają za orzeźwiający aromat miętowy. S(+)-karwon jest efektywnym inhibitorem kiełkowania ziemniaków (10). Terpenoidy te w przyrodzie występują w ograniczonych ilościach, stąd uwaga wielu biotechnologów skoncentrowana jest na pozyskiwaniu tych związków. Dodatki aromatyczne odgrywają coraz większą rolę w dobie wysoko przetworzonych produktów spożywczych, które swój naturalny smak lub zapach utraciły w trakcie procesu technologicznego. Powstaje coraz większy rynek zbytu dla aromatów naturalnych, bądź identycznych z naturalnymi; niebagatelne znaczenie ma także naturalne pochodzenie, gdyż tak właśnie klasyfikuje się produkcję mikrobiologiczną w przemyśle (11).

W przemyśle farmaceutycznym z terpenoidowych prekursorów produkowane są leki steroidowe. Prowadzone są także badania nad antykancerogennym działaniem monotrpenów (alkoholu peryllilowego, limonenu). Wielu autorów wskazuje, że hamują one rozwój nowotworów piersi, wątroby, jelit, płuc, indukowanego promieniowaniem ultrafioletowym raka skóry, a także sutka i trzustki, nawet w zaawanso-

wanych stadiach choroby. Ostatnio udokumentowano właściwości przeciwrakowe mirry – wysuszonego soku żywicznego drzewa balsamowego. W ramach szeroko zakrojonych poszukiwań nowych środków przeciwnowotworowych zbadano właściwości wyciągów z żywicy drzewa *Commiphora myrrha*. Stwierdzono, że po potrakowaniu ekstraktem hodowli opornych na leczenie komórek raka sutka, wszystkie giną. Aktywną substancją okazał się nie znany wcześniej związek z grupy seskwiterpenów. Aktywność chemoterapeutyczna monoterenów polega na indukcji enzymów metabolizujących karcynogeny, zmniejszeniu różnicowania się komórek, indukcji apoptozy populacji nieśmiertelnych linii komórek, zapobieganiu metastazie komórek rakowych. W niektórych przypadkach zastosowanie doustnej kuracji terpenami pozwoliło na niemal całkowite cofnięcie się nowotworu, w innych – zatrzymały rozwój choroby odpornej na działanie tradycyjnych metod terapii (12-16). Opiszano także inhibicyjne działanie limonenu na prenylację białek zarodźca malarii (4).

Obecnie limonen jest dostępny w szerokiej gamie produktów od odczynników chemicznych, poprzez formę przemysłową aż do preparatów „farmakologicznych” sprzedawanych jako swoiste panaceum – środek oczyszczający organizm, mający działanie prozdrowotne.

Terpeny, będące składnikami olejków eterycznych odgrywają ważną rolę w aromaterapii. Ze względu na toksyczność i bioaktywność terpenów, można wykorzystać je w zwalczaniu wielu patogenów. Jedne z możliwych produktów biotransformacji  $\alpha$ -pinenu (głównego składnika żywicy produkowanej przez świerk): werbenol i werbenon są składnikami feromonów agregacyjnych kornika. Zwiększające się populacje kornika na świerkach w Beskidach, tłumaczy się zainfekowaniem ich przez opieńkę, która katalizuje transformację  $\alpha$ -pinenu do tych związków.

Takie właściwości terpenów są znane nie tylko człowiekowi, świat zwierząt również „posiada wiedzę” na ten temat np. sikory modre wijąc gniazda, wplatają w nie gałązki aromatycznych roślin – lawendy, krwawnika pospolitego i mięty – by zapachem odstraszyć pasożyty. Dzięki temu pozbywają się uciążliwych dla piskląt bakterii, wirusów, grzybów i drobnych owadów. Ponadto sikory wyczuwają, kiedy należy wymienić zwiędłe gałązki.

## 5. Toksyczność

W przeciwieństwie do obszernej listy opublikowanych danych na temat olejków eterycznych i wyższych, głównie roślinnych terpenoidów, wiedza o toksyczności czystych monoterenów jest dość ograniczona (17). Zostały przebadane pod tym kątem tylko nieliczne, najbardziej rozpowszechnione w przyrodzie terpeny; oprócz limonenu, zalicza się do nich także  $\alpha$ -pinen,  $\beta$ -pinen i terpinolen (18). Posiadają one hamujący wpływ na wzrost i oddychanie mikroorganizmów (*S. cerevisiae*, *B. thuringiensis*) (17). Oporność bakterii i grzybów na toksyczne działanie limonenu zależy od rodzaju mikroorganizmów. Ponadto aktywność biologiczna zależy od formy enancjo-

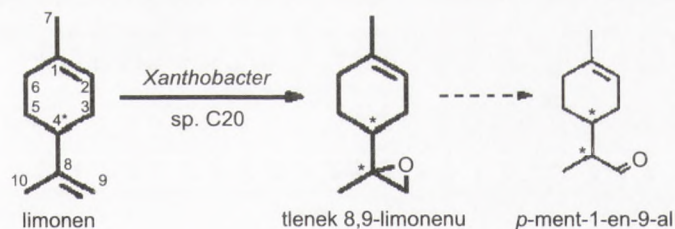
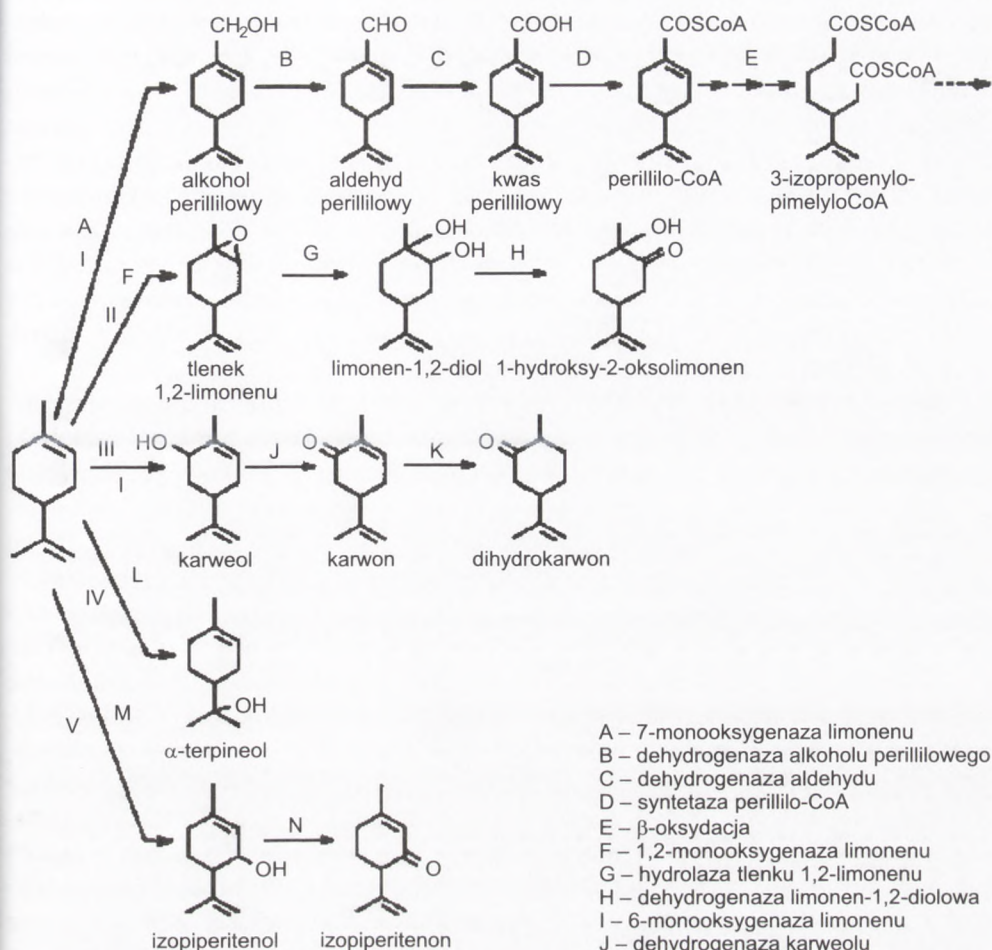
meru. R(+)-limonen wykazuje zdecydowanie większą aktywność przeciwbakteryjną, ale toksyczność enancjomerów w stosunku do grzybów nitkowatych nie jest już tak bardzo zróżnicowana (19). Badając całe komórki oraz wyizolowane mitochondria, stwierdzono, że terpeny wykazały zaburzający wpływ na integralność błon oraz proces oddychania. Efekt toksyczny zależy od stężenia terpenów i biomasy drobnoustrojów. Ich dodatek obniża translokację jonów oraz protonów przez błony, choć nie stwierdzono bezpośredniego wpływu na aktywność ATP-azy. Komórki tracą kontrolę nad oddychaniem, w ostatecznym stadium proces ten zostaje zahamowany. Przepuszczalność efekt ten wywołuje destabilizacja cytochromu B w łańcuchu oddechowym. Wartość logP (logarytm współczynnika podziału substancji w układzie oktanol : woda) limonenu wynosi 4,23 (5). Stawia się go obok najbardziej toksycznych dla mikroorganizmów rozpuszczalników organicznych, np. toluenu, którego (logP równy 2,5) dodatek 1% v/v zabija 99% mikroorganizmów (20). Nie bez wpływu na toksyczność terpenów pozostaje wielkość ich kropeł w emulgacji; efekt toksyczności zwiększa się wraz ze zwiększeniem dyspersji (21).

W badaniach przeprowadzonych przy użyciu mitochondriów z wątroby szczura wskazuje się na bierny wpływ jonów potasu i spadek transmembranowego potencjału elektrycznego, ponadto wykazano w ATP-azie zwiększoną aktywność wymuszoną przepływem protonów przez błony. W badaniach przy użyciu liposomów wskazuje się na membranowe usadawianie się i akumulację cyklicznych terpenów, co powoduje utratę integralności membrany i spadek siły protono-motorycznej (17,22).

Prowadzono także badania nad toksycznością limonenu wobec ssaków. Wywołuje on podrażnienia skóry i oczu. Tlenki limonenu przy kontakcie z powierzchnią skóry powodują alergię. Efekt toksyczny zależy od gatunku ssaków wystawionych na działanie tego związku. Wyjątkowo wrażliwymi na limonen ssakami są samce szczurów. Charakteryzuje je wyjątkowo wysoki poziom białka alfa<sub>2</sub>μ-globuliny, które wiążąc się z limonenem powoduje powstawanie złogów w kanalikach nerkowych, hiperplazmię i w konsekwencji guzy. W przypadku człowieka podobny mechanizm nie jest jednak możliwy. Populacją najczęściej narażoną na kontakt z wysokimi stężeniami limonenu są grupy zawodowe pracowników plantacji roślin emitujących limonen, oraz zakładów wykorzystujących ten monotерpen jako rozpuszczalnik. Przeciętny człowiek styka się z limonenem głównie w pożywieniu (96% kontaktu). Szacuje się, że przeciętny Amerykanin spożywa d-limonen dziennie w ilości 0,27 mg/kg wagi ciała (5). Limonen został sklasyfikowany jako substancja o bardzo niskiej toksyczności dla człowieka, przy stężeniach spotykanych w żywności i środowisku naturalnym (5,23).

## 6. Biotransformacja

Biotransformacja jest jedną z biotechnologicznych metod wytwarzania związków organicznych. Jest to proces chemiczny zachodzący przy użyciu biokatalizatorów: wolnych enzymów lub zawierających je komórek czy tkanek. Transformacja li-



Rys. 1. Szlaki mikrobiologicznej biotransformacji limonenu.

monenu do karwonu jest procesem zachodzącym w naturalnych warunkach w przyrodzie. R(+)-limonen jest utleniany do R(-)-karwonu i mentolu przez rośliny z rodzaju *Mentha*, zaś S(+)-karwon powstaje w drodze oksydacji S(-)-limonenu w owocach kminku (*Carum carvi*). Mikrobiologiczna biodegradacja bądź transformacja limonenu jako związku szeroko rozpowszechnionego w przyrodzie, przebiega przy udziale licznych drobnoustrojów, zarówno zdolnych do wzrostu na limonienie, jak i niezdolnych do wykorzystania go jako źródło węgla. Degradacja limonenu jest procesem tlenowym. Wykazano, że bakterie beztlenowe nie są zdolne do metabolizowania tego związku (5). Limonen jest dość niestabilnym substratem, niektóre z produktów identyfikowanych w płynie hodowlanym mogą powstać w wyniku autooksydacji czy samorzutnej izomeryzacji (1). Dotąd przedstawiono sześć różnych szlaków mikrobiologicznej biotransformacji limonenu (rys. 1).

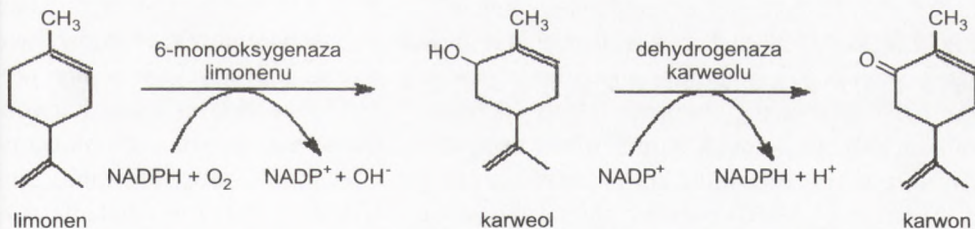
Degradacja limonenu biegnąca pierwszym szlakiem zapoczątkowana jest hydroksylacją C-7 atomu węgla grupy metylowej, co prowadzi do powstania alkoholu perillilowego, który ulega konwersji do aldehydu i kwasu perillikowego. Następnie kwas perillikowy może zostać utleniony przy udziale koenzymu A (CoA) i ATP w reakcji  $\beta$ -oksydacji do odpowiedniego acyklicznego kwasu (24-33). W drugim szlaku zachodzi najpierw epoksydacja wiązania podwójnego w pozycji 1-2 pierścienia limonenu z utworzeniem epoksydu (tlenku 1,2-limonenu). Epoksyd ten następnie ulega konwersji do 1,2-diolu i 1-hydroksy-2-oksolimonenu, który w reakcji Baeyer-Villigera utleniany jest do przejściowego laktonu, ten zaś spontanicznie przegrupowuje się do kwasu 3-izopropenylo-6-oksokseptanowego, który w obecności CoA i ATP degradowany jest dalej szlakiem  $\beta$ -oksydacji (2,24,28,29,31,33-37). W efekcie oksydacji C-6 pozycji pierścienia cyklicznego limonenu powstaje karweol, dalsze reakcje prowadzą do karwonu i dihydrokarwonu (szlak III) (24,27-29,31,38-41). Drogą utlenienia pozycji ósmej szkieletu limonenu powstaje  $\alpha$ -terpineol, posiadający zapach podobny do bzu. Tworzy on kompozycje zapachowe różnych produktów spożywczych, np. jagody, cytryny, limy, gałki muszkatołowe, pomarańcze, imbir, anyż oraz brzoskwinie. Szlak ten (IV) opisany został w publikacjach innych badaczy (25,26,42-46). Piąty szlak, rozpoczynający się hydroksylacją węgla w pozycji 3 daje jako produkty: izopiperitenol i izopiperitenon (31,33,40,47). W szóstym szlaku przedstawionym w 2000 r. (2) zachodzi epoksydacja wiązania podwójnego między węglami 8, 9; w efekcie tworzy się tlenek 8,9-limonenu. Związek ten spotykany jest we frakcjach lotnych wielu artykułów spożywczych, tj. imbir, mandarynki (48).

Tabela 2

## Mikroorganizmy, dla których opisano szlaki biotransformacji limonenu

Szlak I	Szlak II	Szlak III	Szlak IV	Szlak V	Szlak VI
<i>Arxula adenivorans</i>	<i>Armillariella mellea</i>	<i>Aspergillus cellulosa</i>	<i>Bacillus stearotermophilus</i>	<i>Aspergillus cellulosa</i>	<i>Xanthobacter</i> sp. C20
<i>Aspergillus cellulosa</i>	<i>Aspergillus cellulosa</i>	<i>Pleurotus sapidus</i>	<i>Cladosporium</i> sp.	<i>Hormonema</i> sp.	
<i>Bacillus stearotermophilus</i>	<i>Corynespora cassiicola</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Hormonema</i> sp.	<i>Penicillium digitatum</i>	
<i>Penicillium digitatum</i>	<i>Pseudomonas</i> sp.	<i>Rhodococcus opacus</i> PWD4	<i>Penicillium digitatum</i>		
<i>Pseudomonas gladioli</i>	<i>Rhodococcus erythropolis</i>		<i>Pseudomonas gladioli</i>		
<i>Pseudomonas incognita</i>	DCL 14				
<i>Pseudomonas putida</i>					
<i>Yarrowia lipolytica</i>					

Na rysunku 1 przedstawiono enzymy biorące udział w biotransformacji limonenu (46). Pochodzą one z różnych szczepów mikroorganizmów, niektóre z nich zawarte są w tabeli 2 (2,39,41). Większość enzymów zależnych jest od cytochromu P-450. Enzymy takie dzięki swojej szerokiej specyficzności substratowej uczestniczą w oksydatywnej transformacji terpenów, policyklicznych węglowodorów aromatycznych, steroidów i innych lipofilowych związków (49-52). Najlepiej poznany cytochromem P-450 jest wyizolowany z *Pseudomonas putida* enzym hydroksylujący kamforę. Współdziała on z dwoma innymi enzymami tworząc z nimi kompleks. W skład tego kompleksu wchodzi: dehydrogenaza flawoproteinowa, która katalizuje reakcję utleniania NADPH, putidaredoksyna – enzym zawierający nie związane w układzie hemowym żelazo i katalizujący odtworzenie utlenionego flawoenzymu oraz hemoproteina – cytochrom P-450, która wiąże i uaktywnia cząsteczkę tlenu (11). Na rysunku 2 przedstawiono przykładowy mechanizm utleniania limonenu do karwonu, przy współudziale fosforanu dinukleotydu nikotynamidoadeninowego (NADPH).



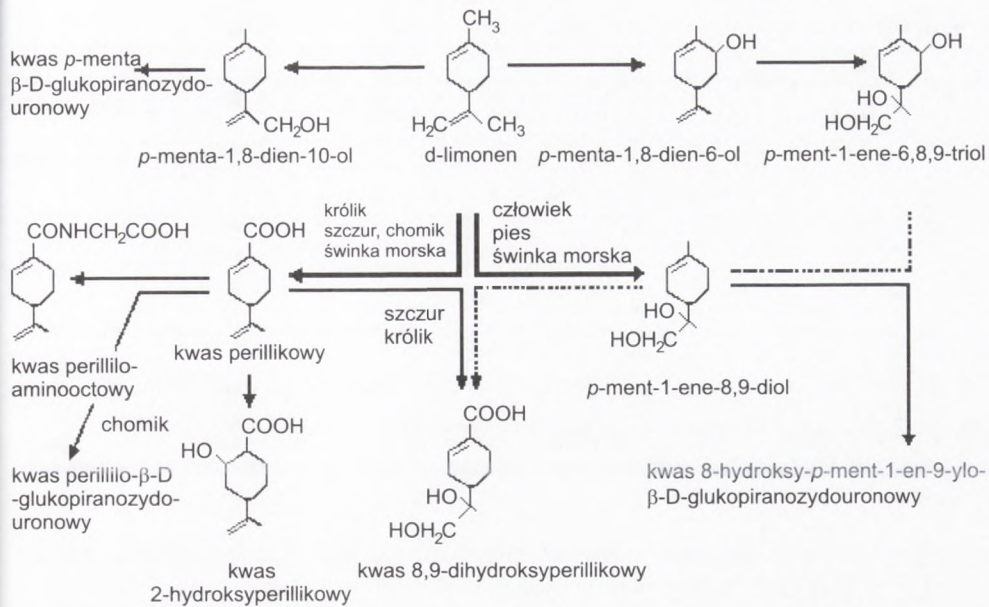
Rys. 2. Mechanizm utleniania limonenu do karwonu z udziałem kofaktora NADPH.



Aktywności cytochromu P-450 w trakcie biotransformacji limonenu obserwowano np. w komórkach *Penicillium digitatum* – synteza  $\alpha$ -terpineolu (44), u podstawczaka *Pleurotus sapidus* – wytwarzanie karweolu i karwonu (41), czy w komórkach *Xanthobacter* sp. 20, które katalizowały epoksydację wiązania podwójnego między węglami 8,9 limonenu (1). Stwierdzono jednak, że w przypadku utleniania limonenu w pozycji 1,2 pierścienia przez *Rhodococcus erythropolis* cytochrom P-450 nie jest aktywny, a 1,2-monooksygenaza limonenu zależna jest od FAD i NADH (8). Monooksygenazy są enzymami raczej niestabilnymi. Zgodnie z naszą wiedzą, do tej pory wyizolowano i oczyszczono tylko dwa enzymy spośród przedstawionych na rysunku 1 – dehydrogenazę alkoholu perillilowego i dehydrogenazę aldehydu perillilowego (53-55).

Limonen zwiększa płynność membrany komórkowej; powoduje to utratę integralności błony komórkowej, co w konsekwencji może prowadzić do osłabienia połączeń kompleksów enzymatycznych z membraną np. kompleksu złożonego z monooksygenazy P-450 cytochromowej i reduktazy P450-NADPH cytochromowej (56), uczestniczących m.in. w oksydatywnej transformacji terpenów (49-52). W tym świetle ważna jest adaptacja komórek do związku poddawanego biotransformacji – w naszym przypadku do limonenu. Po pierwsze następuje indukcja odpowiednich enzymów utleniających terpeny, a poza tym wytworzenie mechanizmów adaptacyjnych polegających przede wszystkim na zmniejszeniu płynności membrany, czyli na zwiększeniu oporności na rozpuszczalniki organiczne. Efekt taki np. w komórkach bakteryjnych można osiągnąć zwiększając zawartość nasyconych kwasów tłuszczowych w membranie fosfolipidowej lub stosując enzymatyczną *cis-trans* izomeryzację kwasów tłuszczowych (41). Przez wprowadzenie do membrany innych usztywniających składników takich jak specjalne białka, sterole, karotenoidy czy kwasy dikarboksyłowe można także poprawić oporność mikroorganizmów na rozpuszczalniki organiczne (22). Po drugie należy liczyć się z barierą dyfuzyjną dla substratu, która jest przyczyną ograniczonego dostępu substratu do centrum aktywnego enzymu wewnątrzkomórkowego. Problem tego typu znika jeśli w biotransformacji stosuje się wydzielone preparaty enzymatyczne. Enzymatyczna modyfikacja związków terpenowych jest mało znana. Z najnowszych doniesień można przytoczyć przykład bioransformacji limonenu do karwonu z wykorzystaniem enzymatycznego systemu oksydaza glukozy/peroksydaza (57).

W badaniach nad mikrobiologiczną biotransformacją limonenu przy użyciu klasycznych, prostych metod uzyskiwano niewielkie wydajności produktów rzędu kilku mg/l (24,28,40,58-60). Przy zastosowaniu immobilizowanych komórek, układów dwufazowych (42,61), dodatku prekursora w fazie organicznej (62) uzyskano wyniki rzędu  $>0,1$  g/l dla metabolitów takich jak kwas peryllikowy (63), a także karwon, w koncentracji ponad kilkudziesięciu mg/l, gdzie stosowano grzybnie do biotransformacji (41). Także indukcja substratowa (41,44), obecność kosubstratów (62), surfaktantów (61,63-65) oraz użycie szczepów opornych na toksyczne działanie rozpuszczalników organicznych (63) zwiększały kilkakrotnie wydajność procesu. God-



Rys. 3. Główne szlaki metabolizmu limonenu w organizmach zwierząt.

ne odnotowania ilości produktów (13 g/l) dała biokonwersja limonenu za pomocą grzybów *Corynespora cassicola* i *Diplodia gossypina* (34).

W organizmach zwierząt limonen jest szybko wydalany lub metabolizowany. Na rysunku 3 przedstawiono możliwe szlaki metaboliczne wykorzystywane przez różne gatunki ssaków (23). U szczurów około 60% limonenu jest wydalane w moczu, 5% w kale, a 2% wyparowywane. Po 48 godzinach w krwiobiegu pozostają śladowe ilości metabolitów (23).

Limonen wyparowany do atmosfery ulega reakcjom z rodnikami hydroksylowymi, azotanowymi i ozonem. Oznaczony doświadczalnie czas trwania tego monoterpenu w atmosferze wynosi od 12 do 48 minut, powstające zaś z niego związki to m.in. aldehyd mrówkowy, octowy, aceton oraz glioksal (5).

Monoterpeny ze względu na swoje właściwości są bardzo ciekawą grupą związków o szerokim zastosowaniu. Niektóre z nich, jak limonen mogą być dobrymi prekursorami w otrzymywaniu innych cennych związków drogą biotechnologiczną. Jednak, aby wdrożyć do przemysłu i rozpowszechnić ten sposób produkcji należy pokonać trudności, jakie pojawiają się w trakcie biotransformacji terpenów przy użyciu drobnoustrojów. Są to przede wszystkim: toksyczność substratu i produktu, długi czas reakcji, lotność i niska rozpuszczalność substratów i produktów w wodzie, nieznaną sposob indukcji enzymatycznej i niestabilność biokatalizatora, czyli te czynniki, które utrudniają otrzymanie dużej wydajności procesu. Dlatego też szersza wiedza na temat monoterpenu, może okazać się konieczna w celu przezwyciężenia tych problemów.

## Literatura

1. van der Werf, Mariët J., Keijzer P. M., van der Schaft P. H., (2000), *J. Biotechnol.*, 84, 133-143.
2. Mariët J., van der Werf, Swarts H. J., de Bont J. A. M., (1999), *Appl. Env. Biol.*, 65, 2092-2102.
3. Mastalerz P., (1984), *Chemia organiczna*, PWN, Warszawa, 192-193.
4. Moura I. C., Wunderlich G., Uhrig M. L., Couto A. S., Peres V. J., Katzin A. M., Kimura E. A., (2001), *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 2553-2558.
5. International Programme on Chemical Safety. Concise International Chemical Assessment Document No. 5. Limonene. <http://www.inchem.org/documents/cicads/cicads/cicad05.htm>
6. Kopcewicz X., Lewak Y., (1997), *Podstawy fizjologii roślin*, PWN, Warszawa, 316-327.
7. Llusà J., Peñuelas J., (2000), *Am. J. Bot.*, 87, 133-140.
8. Fietzek C., Hermle T., Rosenstiel W., Schurig V., (2001), *Fresenius J. Anal. Chem.*, 371, 58-63.
9. Stryer L., (1999), *Biochemia*, PWN, Warszawa, 755-757.
10. Bouwmeester H. J., Konings M. C. J. M., Gershenzon J., Karp F., Croteau R., (1999), *Phytochem.*, 50, 243-248.
11. Kafarski P., Lejczak B., (1994), *Chemia bioorganiczna*, PWN, Warszawa, 480-531.
12. Crowell P. L., (1997), *Breast Cancer Research and Treatment*, 46, 191-197.
13. Hohl R. J., (1996), *Adv. Exp. Med. Biol.*, 401, 137-146.
14. Igimi H., Hisatsuga T., Nishimura M., (1976), *Dig. Dis.*, 21, 926-939.
15. Reddy B. S., Wang C. X., Samaha H., Lubet R., Steele V. E., Kelloff G. J., Rao C. V., (1997), *Cancer Res.*, 57(3), 420-425.
16. Stark M. J., Burke Y. D., McKinzie J. H., Ayoubi A. S., Crowell P. L., (1995), *Cancer Lett.*, 9, 15-21.
17. Sikkema J., de Bont J. A. M., Poolman B., (1995), *Microb. Rev.*, 59, 201-222.
18. Uribe S., Ramirez J., Peña A., (1985), *J. Bacteriol.*, 161, 1195-1200.
19. Lis-Balchin M., Ochocka R. J., Deans S., Asztemborska M., Hart S., (1996), *Med. Sci. Res.*, 24, 309-310.
20. Ramos J. L., Duqe E., (1997), *J. Biol. Chem.*, 272, 3887-3890.
21. Uribe S., Peña A., (1990), *J. Chem. Ecol.*, 16, 1399-1408.
22. Weber F. J., de Bont J. A. M., (1996), *Biochim. Biophys. Acta.*, 1286, 225-245.
23. International Programme on Chemical Safety, Limonene (WHO Food Additives Series 30), <http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v30je05.htm>
24. Bowen E. R., (1975), *Proc. Flo. State Hort. Soc.*, 88, 304-308.
25. Cadwallader K. R., Braddock R. J., Parish M. E., Higgins D. P., (1989), *J. Food Sci.*, 54, 1241-1245.
26. Chang H. C., Oriol P., (1994), *J. Food Sci.*, 59, 660-662.
27. Ciegler A., Laskin A. I., Lechevalier H. A., (1988), *Handbook of microbiology*, CRC Press, 449-458.
28. Dhavalikar R. S., Battacharyya P. K., (1966), *Indian J. Biochem.*, 3, 144-157.
29. Dhavalikar R. S., Rangachari P. N., Battacharyya P. K., (1966), *Indian J. Biochem.*, 3, 158-164.
30. Dhare S. G., Dhavalikar R. S., (1970), *Sci. Cult.*, 7, 292.
31. Noma Y., Yamasaki S., Asakawa Y., (1992), *Phytochem.*, 31, 2725-2727.
32. Rama Devi J., Bhattacharyya P. K., (1977), *Indian J. Biochem. Biophys.*, 14, 288-291.
33. van Rensburg E., Moleleki N., van der Walt J. P., Botes P. J., van Dyk M. S., (1997), *Biotechnol. Lett.*, 19, 779-782.
34. Abraham W. R., Hoffmann H. M. R., Kieslich K., Reng G., Stumpf B., (1985), *Ciba Foundation Symposium 111*, Pitman, London, 146-160.
35. Abraham W. R., Stumpf B., Kieslich K., (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 24-30.
36. Draczyńska-Lusiak B., Siewiński A., (1989), *J. Basic. Microbiol.*, 29, 269-275.
37. Mukherjee B. B., Kraidman K., Hill I. D., (1973), *Appl. Microbiol.*, 25, 447-453.
38. Bednarski W., Kowalewska-Piontas J., (1992), *Biotechnologia*, 2, 28-35.
39. Duetz W. A., Fja A. H. M., Shyou Ren, Jourdat C., Witholt B., (2001), *Appl. Env. Biol.*, 67, 2829-2932.
40. Kieslich K., Abraham W. R., Stumpf B., Thede B., Washausen P., (1986), in: Ed. Brunke H. J., *Progress in Essential Oil Research*, Walter de Gruyter, Berlin, 367-394.
41. Onken J., Berger R. G., (1999), *J. Biotechnol.*, 69, 163-168.

42. Tan Q., Day D. F., (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 49, 96-101.
43. Kraidman K., Mukherjee B. B., Hill I. D., (1969), *Bacteriol. Proc.*, 69, 63-68.
44. Tan Q., Day D. F., Cadwallader K. R., (1998), *Proc. Biochem.*, 33, 29-37.
45. Teunissen M. J., de Bond J. A. M., (1995), in: Eds. P. Étievant, P. Schreier, *Bioflavour 95*, INRA, Paris, France, 329-337.
46. Tian S. © 2002, University of Minnesota (2001), March 15, Limonene pathway map, [http://umbbd.ahc.umn.edu/lim/lim\\_map.html](http://umbbd.ahc.umn.edu/lim/lim_map.html)
47. van Dyk M. S, van Rensburg E., Moleleki N., (1998), *Biotechnol. Lett.*, 20, 431-436.
48. Anonymus., (1999), 17<sup>th</sup> ed. *TNO and FSS B.V.*, Zeist, The Netherlands.
49. Bezalel L., Hadar Y., Cerniglia C. E., (1997), *Appl. Environ. Microbiol.*, 63, 2495-2501.
50. Masaphy S., Levanon D., Henis Y., Venkateswarlu K., Kelly S. L., (1995), *Biotechnol. Lett.*, 17, 969-974.
51. Venkateswarlu K., Marsh R. M., Faber B., Kelly S. L., (1996), *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 66, 139-144.
52. Zhang D., Yang Y., Leakey J. E. A., Cerniglia C. E., (1996), *FEMS Microbiol. Lett.*, 138, 221-226.
53. Ballal N. R., Bhattacharyya P. K., Rangachari P. N., (1966), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 23, 473-478.
54. Ballal N. R., Bhattacharyya P.K., Rangachari P.N., (1967), *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 29, 275-280.
55. Ballal N. R., Bhattacharyya P. K., Rangachari P. N., (1968), *Indian J. Biochem.*, 5, 1-6.
56. Osborne S.J., Leaver J., Turner M. K., Dunnill P., (1990), *Enzyme Microb. Technol.*, 12, 281-291.
57. Trytek M., Fiedurek J., (2002), *Acta Microbiol. Polon.*, 51, 57-62.
58. Rhodes P. M., Winskill N., (1985), (Pfizer, New York) USA Patent No. 4 495 284.
59. Takagi K., Mikami Y., Minato Y., Yajima I., Hayashi K., (1972), (Hasegawa Perfumery) Jpn Patent No. 72 38 998.
60. Wolf-Reiner A., Stumpf B., Kieslich K., Reif S., Hoffmann H. M. R., (1986), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 24, 13-34.
61. Tan Q., Day D. F., (1998), *Proc. Biochem.*, 33, 755-761.
62. Demytteraere J. R., van Belleghem K., de Kimpe N., (2001), *Phytochem.*, 57, 199-208.
63. Speelmans G., Bijlsma A., Eggink G., (1998), *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 50, 538-544.
64. Bromberg Lev E., Klivanov A. M., (1994), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 91, 143-147.
65. Goto M., Kamiya N., (1995), *Biotechnol. Bioeng.*, 45, 27-32.