

ЗАСТОСУВАННЯ ПОПЕРЕДНИКІВ АРОМАТУ В ХАРЧОВІЙ РОСЛИННІЙ СИРОВИНІ: БІОТЕХНОЛОГІЧНИЙ АСПЕКТ

Г.Є. Дубова^{1,2*}, А.Т. Безусов³, О.К. Білошицька¹, Н.Л. Поєдинок¹

¹КПІ ім. Ігоря Сікорського, Київ, Україна

²Полтавський державний аграрний університет, Полтава, Україна

³Одеський національний технологічний університет, Одеса, Україна

*Corresponding author: hdubova16@gmail.com

Received 27 October 2022; Accepted 25 November 2022

Стаття присвячена аналізу основних факторів, які супроводжують використання попередників аромату, зокрема ліпідної природи, в харчовій сировині. Розглянуто передумови впливу на попередники аромату застосуванням рослинних ферментів. Метою статті є аналіз біотехнологічного аспекту, в основі якого лежать ферментативні реакції з попередниками аромату і ферментами саме рослинного походження. Висвітлено особливості механізму дії попередників ліпідної природи, проаналізовано їхню різноманітність, яка обумовлює перебіг різних характерних реакцій, зазначено можливі кінцеві продукти реакцій із певними запахами. Розкрито питання статусу натуральності попередників аромату в харчових продуктах, який обговорюється в різних країнах. Розроблено схему факторів, що впливають на формування аромату попередників ліпідної природи. Розглянуто вплив пігментів каротиноїдної природи на аромат, а саме: наведено приклади миттєвої зміни кавунового аромату на гарбузовий унаслідок ізомеризації каротиноїдів. Узагальнені основні чинники ферментативного утворення аромату з попередників поліненасичених жирних кислот задля їх ефективного застосування шляхом створення мікроміцел. Обґрунтований шлях подолання бар'єра взаємодії між ліпідними попередниками, які мають гідрофобну природу, та ферментами, які є гідрофільними за своєю природою. Запропоновано для пришвидшення ферментативних реакцій в умовах *in vitro* і для подолання бар'єра між ферментами та попередниками використовувати дію розрідження. Проаналізовано поняття розклинювального тиску та обґрунтовано доцільність його застосування для пояснення дії розрідження в системі з ферментами. Складено принципову технологічну схему для відновлення аромату, втраченого під час технологічної обробки сировини, в якій зазначено фактори забезпечення умов міжфазової активації для ферментів і попередників аромату.

Ключові слова: попередник аромату; харчові рослини; прекурсори ліпідної природи; утворення аромату; ферменти рослинного походження; поліненасичені жирні кислоти; біотрансформація попередників аромату; ароматичні речовини.

Вступ

Сприйняття запахів є найтоншим із відчуттів людини, що може перевершувати навіть смакові відчуття. Упродовж багатовікової еволюції запахи відігравали в житті людей і тварин важливу роль (для пошуку їжі, попереджали про небезпеку тощо). Людство здавна використовує рослинні аромати як засіб, що приносить задоволення і сприяє покращенню здоров'я. Багатовіковою історією підтверджено, що аромати є важливою частиною функціонування людського організму. Знання про важливість сприйняття запахів для формування когнітивних і емоційних відповідей на продукти харчування та напої може допомогти в розробленні превентивних заходів щодо запобігання захворюванням, наприклад завдяки зменшенню солі в рецептурі й одночасному посиленню ароматичного профілю [1, 2].

На основі розуміння стимулів, необхідних для формування сприйняття, базується процес ароматизації продуктів зниженої калорійності для збереження якості їх сприйняття. Нині ароматизатори становлять більше чверті світового ринку харчових добавок. Попит на натуральні ароматизатори постійно зростає, тоді як синтетичні все менше затребувані [3]. Людина оцінює аромат суб'єктивно, більшою мірою ірраціонально, але обізнаність щодо походження та природи ароматизатора є важливим фактором при виборі продукту харчування. Поява таких напрямів, як аромакологія, нейрогастрономія, "білий запах", метаболоміка, свідчить про те, що наукові розробки з розвитку ароматехнологій є затребуваними та перспективними.

Прекурсор, або попередник, являє собою речовину, яка бере участь у реакції, що приво-

дить до утворення цільової речовини. Нова категорія ароматизаторів – “прекурсори”, або попередники, затверджена відносно нещодавно, у 2008 р., Регламентом ЄС № 1334/2008 Європейського Парламенту та Ради “Про смако-ароматичні добавки та деякі харчові інгредієнти зі смако-ароматичними властивостями, призначені для використання в та на харчових продуктах” (далі – Регламент ЄС № 1334/2008) [4]. У різних умовах у рослинній сировині попередниками аромату можуть бути амінокислоти, вуглеводи, ліпіди [5]. Наразі визначено та досліджено попередники ароматичних речовин м'яса, сирів, риби, пива, шампанського, бананів, яблук, кави, арахісу й інших продуктів. У деяких плодах природа попередників аромату досі не визначена [6]. Багато ароматів існують у вигляді попередників аромату, які є стабільнішими, ніж активний аромат [5]. Наприклад, багато ароматів (особливо в рослинній їжі) існують як глікозидні попередники, що є набагато стабільнішими, ніж утворений аромат, і не мають властивостей смаку. Попередники аромату відрізняються від ароматизатора і можуть додаватися в харчові продукти для утворення і/або модифікації ароматів, вони являють собою окремі компоненти або суміші, які при додаванні до харчового продукту генерують аромат унаслідок реакції або із самими собою, або з компонентами харчової матриці, або з тими й іншими під час обробки їжі. В Регламенті ЄС № 1334/2008 поняття “попередник смаку” визначено як продукт, який сам по собі не обов'язково має смакові властивості, навмисно доданий до їжі з єдиною метою – створення смаку шляхом руйнування або реакції з іншими компонентами під час обробки їжі.

Зазначимо, що велика кількість робіт присвячена дослідженню механізмів теплового впливу на попередники аромату (насамперед у контексті реакцій меланоїдиноутворення Майяра [7]). Натомість роль інших факторів, зокрема ферментів рослинного походження, наразі вивчена недостатньо.

Метою цієї статті є огляд і аналіз біотехнологічного аспекту застосування попередників аромату, в основі якого лежать реакції з ферментами рослинного походження. Особливістю цього огляду є те, що, на відміну від виноробної галузі, де також застосовується ферментативний вплив на попередники аромату, мова йде про ферменти рослинного походження, а не мікробного чи штами дріжджів.

Загальна характеристика попередників аромату

Передумови застосування рослинних ферментів і попередників аромату

Застосування рослинних ферментів і попередників аромату розпочалось у другій половині ХХ ст. Група американських дослідників отримала замовлення від військових стосовно покращення ароматичного профілю страв із сушених овочів. Проблема полягала в тому, що під час сушіння овочі значно втрачали аромат і це негативно позначалося на якості готових страв із них. Науковці в одній із перших робіт, присвячених цьому питанню, вивчили природу особливої речовини в сировині, яку позначили як попередник аромату [8]. Було встановлено, що у свіжих овочах попередниками можуть бути тіоглікозиди із сімейства капустяних. Науковці висунули гіпотезу, що основний потенціал аромату з попередників може бути перетворений на свіжий аромат під дією власного ферменту, який був інактивований тепловою обробкою. Таким чином, у термообробленій сировині залишався попередник аромату, для якого не вистачало відповідного ферменту, щоб відновити свіжий аромат. Пізніше був виділений рослинний фермент зі свіжих капустяних овочів, який додавали в харчовий продукт для відновлення втраченого аромату в овочевих відварах [9]. Також була вивчена можливість відновлення аромату сушеної капусти у такий самий спосіб. Так, було показано, що бланшовані та висушені або консервовані квасоля, горох, броколі, морква, томати, капуста змінюють аромат під дією ферментів, виділених зі свіжої сировини генетично споріднених овочів (наприклад, родини капустяних) або гірчиці [10]. У рамках зазначених робіт було сформульовано ідею можливого відновлення свіжого аромату їжі в оброблених харчових продуктах, засновану на ферментативних процесах. Згідно з цією ідеєю відновлення аромату залежить від наявності попередників і доступності ферментів, які специфічно утворюють із цих попередників природні аромати [11].

Надалі цей напрям, на нашу думку, не був розвинений з декількох причин: труднощі з виділенням рослинних ферментів, подолання енергетичного бар'єра між попередником і ферментами, стрімкий розвиток спочатку індустрії синтетичних ароматизаторів, а потім генетично модифікованої сировини, яка б не втрачала аромату під час теплової обробки тощо.

На сьогодні актуальність питання відновлення втраченого аромату власними рослинними ферментами знову зростає. Це певним чином пов'язано також і з розвитком такої науки, як метаболоміка. Основна ідея використання метаболоміки у фізіології рослин полягає у виявленні метаболічних змін після впливу різних чинників, які можуть бути пов'язані з відомою або гіпотетичною ферментативною зміною [12]. Розвиток технології дає можливість змодельовати умови, наближені до природних, і використати досягнення метаболоміки як основу для подальшого застосування природних процесів у галузі харчової біотехнології.

Питання безпечності ароматизаторів, попередників аромату та їх маркування

Ароматичні попередники, як-от вуглеводи, олігопептиди й амінокислоти, надають продукту харчування аромату через хімічні реакції, які відбуваються під час обробки продуктів харчування. У Регламенті ЄС № 1334/2008 зазначено, що ароматичні прекурсори, виготовлені з продуктів харчування, не потребують процедури оцінювання чи схвалення для використання в продуктах харчування, якщо тільки не існує сумнівів стосовно їх безпечності. Затребуваними ці сполуки є у виноробстві, виробництві сиру та інших галузях харчової промисловості. З набуттям чинності Регламенту ЄС № 1334/2008 з 2011 р., терміни “ідентичний натуральному” та “синтетичний” у маркуванні більше не вказують [4]. Технічний регламент України щодо правил маркування харчових продуктів від 11.02.2011 р. також визначає застосування терміна “натуральний” тільки до ароматизаторів виключно натурального походження. Чинне законодавство ЄС та України не передбачає встановлення максимальних рівнів використання ароматизаторів, а визначає тільки орієнтовні рівні їх концентрації. Можна констатувати, що втрата аромату в оброблених продуктах призводить до інтенсивного застосування підсилювачів аромату, які можуть завдати шкоди здоров'ю людини, особливо здоров'ю дітей [13, 14]. У зв'язку з частим уживанням ароматизаторів ведуться роботи щодо зменшення їх кількості на основі нових методик підрахунку. Для подальшого просування наукового підходу до оцінки хімічної дії продуктів харчування в Європі Європейська комісія в 2008 р. фінансувала проєкт FACET (*Flavours, Additives and Food*

Contact Materials Exposure Task), що зорієнтований на харчові добавки в продуктах харчування і ароматичних речовинах [15]. Оцінюючи безпеку нових ароматизаторів, Комітет експертів ЄС із харчових добавок вважав за необхідне вивчення шляхів метаболізму та біотрансформації їх у речовини з відомими токсикологічними властивостями. Також був встановлений рівень використання ароматизаторів у різних харчових продуктах, порівняна хімічна структура ароматизаторів із відомими сполуками та їхніми токсикологічними й біохімічними властивостями. Запропоновані нові підходи до оцінки безпеки харчових ароматизаторів полягають у визначенні “порогів” токсичності, канцерогенності та впливу на метаболізм [16]. Під час використання деяких ароматичних сполук у високих дозах в експерименті на тваринах був виявлений канцерогенний ефект. Метилевгенол базилика, естрагол (міститься в насінні фенхеля), кумарин кориці, ментофуран м'яти вилучені з реєстру ароматизаторів (Регламент ЄС 1321/2013), зважаючи на генотоксичні властивості. В жовтні 2018 р. FDA США (*Food and Drug Administration, USFDA* – Управління з санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів США) заборонило використовувати метилевгенол у харчових продуктах, оскільки з'явилися данні щодо захворювання на рак у лабораторних тварин, на яких тестувався цей ароматизатор. Із 2021 р. продукти, що містять понад 0,01 % метилевгенолу, повинні мати відповідне маркування. Актуальність питання безпечності ароматизаторів спонукає до оновлення існуючих і розробки нових оригінальних комп'ютерних програм, аналітичних підходів до оцінки порогів канцерогенності для ароматизаторів, що використовуються в харчовій промисловості і тестуються на тваринах [17, 18].

Влучним є порівняння попередників аромату із відомим героєм уявного експерименту Ервіна Шредінгера, в якому кіт повинен був перебувати рівночасно у двох станах – живому та мертвому [19]. Ця аналогія стосувалася того, що статус попередників аромату може бути одночасно як “натуральний”, так і “ненатуральний”. Єдиними ароматизаторами, які можуть отримати статус натурального, є ароматичні речовини, що відповідають певним критеріям. Отже, прекурсори ароматизаторів не можуть бути “натуральними” і в цьому відношенні можуть розглядатися як ароматизатори “другого

класу”, що поступаються своїм натуральним аналогам. Ця думка аргументувалася так: якщо, наприклад, виготовити амінокислоту гліцин, яка є ароматичною речовиною за номером Flavis 17.034 і номером FEMA 3287, щоб задовольнити всі вимоги, тобто зробити її “натуральною в ЄС” (отриманою з натуральних вихідних матеріалів і виготовленою методами та в умовах, які задовольняють традиційні процеси приготування їжі відповідно до Додатку II Регламенту ЄС 1334/2008), то її можна вважати натуральним ароматизатором. Однак якщо додати гліцин до їжі, яка буде оброблена таким чином, що спричинить його реакцію, це вже не ароматична речовина, а попередник смаку, і він втрачає свій природний статус. Звичайно, якщо ароматична сполука є природною, то це властивість цього матеріалу, аналогічна його температурі плавлення, показнику заломлення тощо, і її не можна довільно видалити. Продукти розпаду цього природного гліцину також будуть природними, оскільки атоми вуглецю, азоту, кисню та водню, що утворюють молекулу гліцину, походять із природних джерел і є природними за своєю суттю. У цьому випадку гліцин схожий на квантово-механічний об’єкт, який займає суперпозицію станів, де він є як природним, так і неприродним залежно від того, де він знаходиться – у їжі, яку потрібно нагрівати, чи в їжі, яка не буде нагріватися. Автори схиляються до думки, що продукти, в яких аромат утворився з попередників, неправильно маркувати за складом, що містять ароматизатор натуральний.

Відмінності у визначеннях натурального статусу в різних країнах, насамперед у США та ЄС, призводять до того, що одні й ті самі смакоароматичні речовини, отримані одним і тим самим способом, матимуть різний статус. Визначення натуральної речовини як у США, так і в ЄС дає змогу називати натуральними продукти, отримані внаслідок ферментно-каталізованих біохімічних реакцій за умови, що вихідні реагенти мали натуральний статус. Однак у ЄС це можливо тільки в разі, якщо синтезована речовина була раніше виявлена в якомусь натуральному продукті. Отже, застосування ферментів рослинного походження із заздалегідь відомими механізмами реакції з попередниками, прогнозованими кінцевими продуктами, відпрацьованими в умовах *in vivo* в рослинах, дає можливість стверджувати про натуральність і безпечність отриманих ароматів.

Біотехнологічні основи використання попередників аромату

Механізм дії попередників аромату в рослинній сировині

Вуглеводи, жирні кислоти й амінокислоти є природними попередниками для запашних сполук, що впливають на формування і регулювання летких ароматичних сполук для яблук, полуниць, томатів, бананів, динь [20, 21]. Більшість способів біосинтезу летких ароматичних речовин є визначеними. Обмін речовин жирних кислот і амінокислот із розгалуженим ланцюгом може слугувати попередником для біосинтезу летких ароматичних компонентів у більшості плодів. Жирні кислоти відіграють важливу роль у синтезі ефірів, що складаються із 2-, 4- і 6-вуглецевих ланцюжків, які виникають переважно в-окисненням жирних кислот [22]. *De novo* синтезовані вільні жирні кислоти сприяють утворенню ефірів у багатьох плодах [23]. Доведено, що ліпоксигенази (ЛОГ, лінолеат:кисень:оксидоредуктази КФ 1.13.11.12) та гідропероксидліази роблять свій внесок у розщеплення довголанцюгових жирних кислот до C_6 -альдегідів, які далі можуть перетворюватись альдегіддегідрогеназами до спиртів [22–24] і мають характерні аромати фруктів, плодів. Аромат є одним із найбільш важливих якісних показників баштанних культур. Найпотужнішими запахами дині є складні ефіри, утворені з амінокислот. У свіжій дині ідентифіковано 18 амінокислот із домінуючими аспарагіновою кислотою, глутаміновою кислотою, аргініном і аланіном. О. Ламікарна та співавтори показали, що загальний вміст амінокислот свіжозрізаної дині швидко зменшується за температури 20 °C [25]. Запобігання втраті компонентів аромату дині було пов’язане із температурними режимами, які вплинули на збереження амінокислот як попередників аромату.

Запах свіжих плодів розглядають як результат фермент-субстратних взаємодій. При подрібненні такі взаємодії багаторазово посилюються, тому чим тонше подрібнення, тим більш відчутно проявляється аромат [26]. Особливість свіжого запаху полягає в перебігу реакцій за участю ліпоксигеназ і поліненасичених жирних кислот (ПНЖК) рослинної клітини. Дослідження, спрямовані на зміну активності клітинних ліпоксигеназ, підтверджують роль окисних реакцій в утворенні аромату. Наприклад, результати високоефективної газо-рідин-

ної хроматографії базилика після інактивації ліпоксигеназ бланшуванням у воді показали відсутність компонентів свіжого запаху [27]. Спочатку формування ароматичних компонентів здійснюється окисненням лінолевої та ліноленової кислот ліпідного бішару клітинних мембран. Шляхом каскадних ферментативних реакцій із первинних продуктів окиснення утворюються спирти, кетони, альдегіди, кислоти, ефіри. Раніше вважалося, що окисгеновані продукти мають тільки негативний вплив, особливо через наявність у них транс-ізомерів. Останнім часом накопичуються дані про ростостимулювальну, фунгіцидну, репелентну, протипухлинну та інші властивості оксипінів [28]. Початком ліпідних перетворень вважають отримання гідроперекисів вільних жирних кислот (НРО – lipid hydroperoxide), які зазнають подальших перетворень унаслідок реакцій, що каталізуються ферментами. Внаслідок гідропероксидіаційних реакцій утворюються 6-, 9-, 12-вуглецеві похідні гідропероксиформ ПНЖК. Ланцюжок перетворень – від активації ліпаз до утворення інших летких речовин відбувається в рослинах із високою швидкістю. Механізми утворення аромату шляхом ліпідної деградації в рослинах ґрунтуються на реакціях α -, β -окиснення або оксигеназних перетворень. Оксигенування, або ліпоксигеназний шлях, приводить до появи гідропероксидного радикала (-ООН). Якщо гідропероксид (ГП) локалізований на 9 або 13-му атомі вуглецю, а β -розщеплення відбувається з боку метильного кінця молекули, то ГП спершу розкладається з утворенням алкоксильного радикала, а потім – з утворенням двох продуктів реакції – 9-оксоноаноату (ethyl 9-oxononanoate) та вінілового радикала на 9-му атомі вуглецю (олефінового радикала, olefin radical). Ці вінілові радикали в багатьох випадках взаємодіють із гідроксильними радикалами з утворенням альдегідів, утворюючи таким чином 3-ноненаль [29].

Унаслідок реакції оксигенування в рослинній сировині утворюються сполучені дієни (подвійний зв'язок зсувається на одне положення), а якщо відбувається подвійне оксигенування ліноленату, то можливе утворення сполученого триєну ($-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}-$). Чим більша кількість подвійних зв'язків у ПНЖК, тим інтенсивніше відбувається процес окиснення та виникає більше продуктів реакції, здатних бути основою для майбутніх ароматів. Однак при створенні стресових умов, таких як дія ультразвукових коливань, магнітних

полів, знижених температур, ароматичні компоненти накопичуються в непропорційно великих кількостях. Описані різні підходи до посилення аромату в плодах і напоях шляхом послідовної ультразвукової обробки з урахуванням впливу такої обробки на ферменти [30, 31]. У наших роботах був виявлений ефект посилення аромату, що досягається в мікрохвильовому полі [32]. Ч. Чжан і Ш. Тянь показали, що під впливом низьких температур відбуваються ліпідні перетворення плазматичних мембран і цей процес супроводжується адаптивною зміною їх біофізичних властивостей [33].

Дослідження ролі нелетких попередників аромату в сирому, сушеному, вареному, запеченому та смаженому часнику показали існування не однієї, а декількох груп, що утворюють специфічний аромат. Леткі сполуки були розділені на чотири групи: отримані внаслідок термічної деструкції нелетких попередників аромату часнику; генеровані шляхом теплових взаємодій цукрів та енергонезалежних попередників аромату часнику; отримані внаслідок теплових взаємодій ліпідів і енергонезалежних попередників аромату; отримані внаслідок теплових взаємодій цукрів, ліпідів і енергонезалежних попередників аромату [34]. Був визначений вклад кожної групи у формування кінцевого аромату, але загальним висновком є те, що участь ліпідів сировини у формуванні ароматичного профілю часнику є досить значною.

Практичні аспекти біотехнології попередників аромату

Утворення ароматів плодів може бути досягнуте завдяки швидкому формуванню ароматичних компонентів, отриманих із ферментів і прекурсорів безпосередньо перед їжею. Такий підхід був реалізований у композиціях, що виділяють аромат і містять мікроемульсії та/або гідратовані зворотні міцели [35]. Ці композиції придатні не лише для використання як ароматизатори в харчових продуктах, але і для ферментативного синтезу різних смаків і попередників аромату *in vitro*. Типовий склад містить 80 % рослинної олії, 15 % поверхнево-активної речовини (фосфатидилхолін, фосфатидилетаноламін, моногліцерид, складний ефір сорбітану), 3 %-вий етанол, понад 3 % води, 1 % попередника та 0,5 % ферменту. Попередник аромату та фермент містяться в ядрі мікроемульсії, яке під час гідратації або підвищення активності води чи порушення мікрокрапель бере участь у реакції отримання бажаного аромату.

Мікроемульсії можуть бути використані для стабільної підтримки попередників аромату до вживання їжі, одночасно забезпечуючи швидке формування ароматичних фрагментів із попередників у ротовій порожнині або незадовго до вживання їжі. Описано ароматизуючі композиції, що містять крапельки мікроемульсії вода-в-олії і/або гідратовані оборотні міцели, що містять латентні ароматизатори. Такі композиції можна використовувати як ароматизуючі системи для харчових продуктів, у яких активний аромат утворюється під дією ферментів. Оптимальне молярне співвідношення води до поверхнево-активної речовини становить значення менше 10, бажано – менше 5. У зв'язку з цим зазначені системи правильніше кваліфікувати як гідратовані оборотні міцели, а не як мікроемульсії. Лише в одному прикладі описується отримання мікроемульсії, що містить 3 % води [36].

Ароматичні сполуки можуть бути представлені в плодах у вільному стані та/або у формі глікозидів [37]. Значна частина важливих ароматів у більшості фруктів накопичується у вигляді нелеткої фракції, що відома як глікозидний попередник аромату, який був виявлений у різних частинах рослин: зелені частини, коріння і насіння. Завдяки використанню екзогенних глікозидаз стало можливим підвищити інтенсивність аромату фруктових соків, вина. Глікозидазам часто відводилась роль ферментів, які сприяють лише кращому екстрагуванню ароматичних речовин, що перебували у зв'язаній формі. Сьогодні викликає зацікавленість використання специфічної β -глікозидази (β -прімаверозидази) як фермента, що може вплинути на формування ароматичних сполук, а не лише на їх екстрагування. Наприклад, монотерпенові спирти знаходяться як диглікозидні попередники в солодкій картоплі. В дослідженні [38] кількість монотерпенових спиртів, вироблених із обробленого ферментами картопляного пюре, різко збільшилася – в 2–9 разів – порівняно з необробленим контролем; рівні метилсаліцилату, 1-октен-3-олу та етилбензоату були підвищені під час обробки ферментами. Ці результати вказують на те, що велика кількість монотерпенових спиртів та інших летких ароматичних сполук зберігається у формі дисахаридних β -глікозидів, таких як β -прімаверозиди, у солодкій картоплі. Обробка мускатного вина біокаталізацією упродовж двадцяти днів привела до значного збільшення кількості вільних монотерпенів (від 1 119 до 2 132 г/л) [39].

Певну роль відіграють сполуки, що відносяться до норізопреноїдів – це каротиноїдні метаболіти, що відповідають переважно за аромат квітів і фруктів, що описані як попередники аромату чайного листа і мало досліджені в інших рослинних об'єктах [40].

Інноваційний шлях для отримання ароматизаторів, заснований на мікробному біосинтезі або біоконверсії прекурсорів аромату, описаний у роботах М. Гаргорі, який використовував відходи переробки оливи на олію для подальшого виробництва ароматизаторів [41, 42]. Біотехнологічні підходи можуть бути розділені на два класи: мікробіологічні та ферментативні. Мікробіологічні методи, що використовуються для синтезу натуральних ароматів, поділяють на синтез *de novo* і біотрансформацію. Перший метод полягає в отриманні ароматичних сполук після метаболізму клітин за допомогою простих засобів культивування, тоді як біотрансформація відноситься до використання мікробних клітин із перетворенням прекурсору на бажаний продукт. Синтез *de novo* має бути використаний для складних сумішей або сумішей продуктів, тоді як біотрансформація може виконуватися в однокроковому процесі. М. Гаргорі зі співавторами визначили вузькі місця, пов'язані із застосуванням біотрансформації попередників ліпідної природи в ароматизатори [42].

Умови дії попередників аромату ліпідної природи

Механізм дії рослинних попередників аромату ліпідної природи

Насичені та ненасичені жирні кислоти слугують прекурсорами для багатьох рослинних летких сполук. Похідні жирних кислот зазвичай значно модифікуються (окиснюються, метилюються, етерифікуються тощо), продукуючи багато запахів, зокрема кавуновий, огірковий, гарбузовий, скошеної трави. Так само і “зелений запах”, подібний до зеленого листа, виникає з летких альдегідів і спиртів C_6 – C_9 сполук, синтезується із ліноленової та лінолевої кислот через відповідні гідроперокси [21]. У рослинах ПНЖК і ЛОГ відіграють визначену роль у процесах утворення аромату свіжих плодів завдяки дослідженому ліпоксигеназному шляху [43]. Первинні продукти ліпоксигеназної реакції, гідроперокси жирних кислот швидко метаболізуються в аромати двома головними шляхами: за ліпоксигеназним каскадом і пероксигеназним каскадом. Як було зазначено вище, ліпок-

сигеназний шлях утворення ароматів достатньо відомий, а пероксигеназний — вивчений недостатньо. Суть пероксигеназного каскаду полягає в утворенні гідрокси- й епоксипохідних. Утворення цих похідних каталізоване гідропероксидзалежною оксигеназою (пероксигеназою), яка переносить один атом кисню від гідроксипероксидних радикалів жирних кислот на подвійний зв'язок олеату або лінолеату з утворенням епоксиду [44]. Ймовірно, саме це пояснює виявлення понад 15 невідомих раніше похідних лінолевої та ліноленової кислот [45]. Крім того, поруч із загальновідомими реакціями утворення ароматичних сполук безпосередньою дією на ліпіди існує багато реакцій непрямої дії, коли вільні радикали від продуктів розщеплення інших сполук атакують ліпіди або їхні похідні гідроперокси. Відносно недавно описані механізми впливу продуктів окиснення ліпідів на розкладання амінокислот. Самі по собі α -дікарбонільні сполуки не є головними окисниками ліпідів, однак у процесі ліпідного окиснення багато сполук, подібних до α -дікарбонілу, продукують сполуки, які розщеплюють амінокислоти. Також розщеплення ліпідів з утворенням вільних радикалів або карбонільних сполук може ініціювати утворення ароматичних компонентів із амінокислот [46].

Ініціюють або прискорюють окиснення ліпідів прооксиданти, наприклад, синглетний кисень перетворюється на гідропероксид, а іон заліза переходить в окиснений стан. Прооксиданти можуть прискорювати окиснення ліпідів або завдяки прямим взаємодіям із ПНЖК із утворенням гідропероксидів (наприклад, ліпоксигенази чи синглетного кисню), або шляхом стимулювання утворення вільних радикалів (наприклад, розкладання гідропероксиду, активованого перехідним металом або УФ-випромінюванням). Ліпідні гідроперокси не беруть участі в утворенні неприємних присмаків і запахів [47]. Водорозчинні продукти процесу переокиснення ліпідів чинять інгібувальний вплив на активність ферментів [48]. Структурні перебудови у біологічних мембранах, що відбуваються під час переокиснення ендогенних мембранних ліпідів, сприяють зміні активності мембранозв'язаних ферментів, регулюючи реакції ароматоутворення.

Оскільки ліпідні попередники мають гідрофобну природу, а ферменти — гідрофільну, ферментативні реакції в умовах *in vitro* перебігають за дуже низької швидкості. У водно-ліпідних системах використовують поверхнево-

активні речовини для збільшення площі поверхні контакту в ліпід-субстратних реакціях і зменшення товщини водної оболонки. Площа поверхні є чинником, що впливає на швидкість окиснення ліпідів. Збільшення площі поверхні жирової фази підвищує швидкість окиснення ліпідів, оскільки збільшується площа їх контакту з киснем і прооксидантами. Кінетика окиснення ліпідів у харчових продуктах часто характеризується деякою фазою затримки (лаг-фазою), після якої починається експоненціальне збільшення швидкості окиснення [23]. Окиснюватись можуть як вільні жирні кислоти, так і ацильні групи. У більшості харчових продуктів після лаг-фази проходить швидке експоненціальне збільшення вмісту продуктів окиснення. Це свідчить про те, що існує декілька реакцій окиснення ліпідів, за яких утворюються додаткові вільні радикали [49]. Оскільки в ланцюгах ПНЖК існують численні позиції для утворення гідропероксидів, то внаслідок реакцій розщеплення утворюється багато різних продуктів із властивостями попередників аромату.

Узагальнимо основні чинники, які потенційно впливають на утворення аромату з попередників ліпідної природи та їх різноманітня (рис. 1). На нашу думку, на механізм дії попередників аромату ПНЖК впливають місце розташування подвійних зв'язків, метиленової групи, гідропероксидного радикала, кількість подвійних зв'язків у ПНЖК, ізомерні форми ПНЖК тощо. Внаслідок перетворень попередників ліпідної природи з ПНЖК, які мають 18 або 20 вуглецевих атомів, утворюються сполуки із 6-ма атомами вуглецю (мають аромат зелені, "свіжоскошеної трави"), з 9-ма (запах огірків і діни) та з 8-ма (грибів, листя фіалки та герані). У роботі М. Гаргорі [41] показаний ефективний синтез специфічних летких C_6 – C_9 сполук із використанням чистого субстрату (вільних ПНЖК) (див. рис. 1). Альдегіди та кетони, що утворюються під дією ліпоксигенази, перетворюються на відповідні спирти, які переважно характеризуються вищим порогом виявлення і більш насиченим запахом, ніж початкові карбонільні сполуки. З лінолевої та ліноленової кислот після ферментативного окиснення утворюються різні ароматичні компоненти, залежно від того, по якому вуглецевому атому здійснене окиснення [41]:

— при окисненні по 13-му атому вуглецю утворюються гексаналь (жирний запах, зелений, фруктовий), гексан-1-ол (свіжий аромат, зелений), 3Z-гексенал (нестабільний), 2E-гексенал

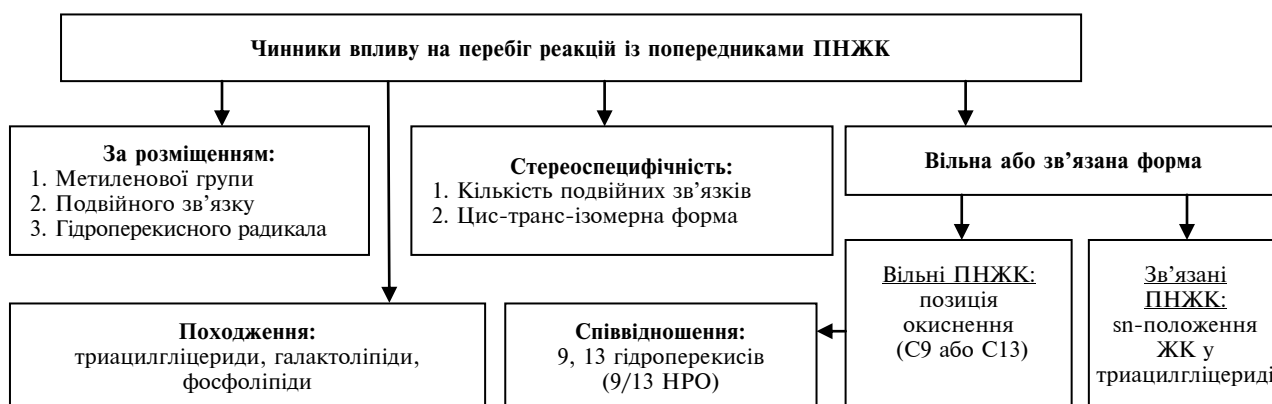
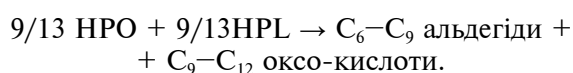


Рисунок 1: Узагальнені основні чинники ферментативного утворення аромату з попередників поліненасичених жирних кислот: ПНЖК – поліненасичені жирні кислоти, НРО – гідроперекиси ліпідів, ЖК – жирні кислоти

(зелене листя, фруктовий), 3Z-гексен-1-ол (зелена трава, свіжий), 2E-гексенол (фруктовий, зелений);

– при окисненні по 9-му атому вуглецю утворюються 3Z-ноненаль (огірковий запах), 2E-ноненаль (цитрусові відтінки), 3Z-ноненол і 2E-ноненол (диня, восковий), 3Z, 6Z-нонадіеналь (диня, огірок, перець), 2E, 6Z-нонадіеналь (зелені овочі, огірок), 3Z, 6Z-нонадіенол (кавун), 2E, 6Z-нонадіенол (зелений трав'яний, гарбуза).

Початок каталізу гідроперексидів у подальші ароматичні сполуки можна представити як реакції гідроперексидів із гідропероксид ліазами (HPL – hydroperoxide lyase, НРО – lipid hydroperoxide) [50]:



Гідропероксид ліази можуть бути класифіковані на групи відповідно до особливостей субстрату. Кількість таких груп остаточно не встановлено, в цілому можна виділити такі [50–52]:

– 13-HPL, яка специфічно розщеплює 13-НРО жирних кислот, щоб сформувати C₆-альдегіди (полігексанальні або (Z)-3-гексеналь) і 12-оксо-(Z)-9-додеценову кислоту;

– 9/13 HPL, що можуть розщеплювати 13-НРО і 9-НРО практично з однаковою ефективністю;

– 9-HPL, що специфічно розщеплює 9-НРО, із ПНЖК (C₁₈) утворюються C₉-альдегіди ((Z)-3-ноненаль або (Z, Z)-3,6-нонадіеналь) і 9-оксо-нонанова кислота.

Наприклад, хоча основним продуктом дії ліпоксигенази в плодах томатів є 9-HPL, специфічність гідропероксидліази (відношення

швидкостей її взаємодії з 9- і 13-HPL становить 1:62) призводить до того, що в пошкоджених тканинах переважно утворюються C₆- і C₁₂-фрагменти. І навпаки, гідропероксидліаза огірків має малу специфічність (відношення швидкостей її взаємодії з 9- і 13-HPL становить 2:1), і домінування C₉-фрагмента серед продуктів окиснення жирних кислот визначається насамперед селективністю ліпоксигенази [52]. Внутрішньоклітинна локалізація HPL залишається остаточно не зрозумілою, але існує припущення, що цей фермент існує як профермент, який активується відщепленням N-кінцевої послідовності. Це було запропоновано через підвищену активність HPL люцерни після видалення перших 22 N-кінцевих амінокислот [51]. На нашу думку, для активації HPL-залежних реакцій утворення аромату *in vitro* необхідно створити особливі фізичні умови, такі як розрідження.

Варто зазначити, що продукти реакцій перетворень попередників ліпідної природи надалі також можуть піддаватись численним змінам. Так, наявні цис-транс-ізомерази перетворюють цис-зв'язки утворених альдегідів на транс-зв'язки, унаслідок цих структурних змін змінюється запах альдегідів. Механізми синтезу інших альдегідів переважно залишаються невідомими [53].

Розклинювальний тиск як вірогідний фактор впливу на реакції з попередниками аромату ліпідної природи

Динамічні властивості ліпідного матриксу мембрани рослинної клітини забезпечують конформаційну рухливість ферментів. Ферменти *in vivo* функціонують в умовах тісного контакту

з різними клітинними структурами, передусім із клітинними мембранами. Ліпідний біпрошарок між мембранами рослинних клітин є неоднорідною системою, яка містить три ділянки: 1) об'ємної води; 2) контактів гідрофільних голів і поверхневої води; 3) ліпідних хвостів (центральна частина біпрошарку). Гідратація ліпідної мембрани є важливою характеристикою, що визначає її структурну організацію та макроскопічні властивості. Кількість води в міжмембранному просторі залежить від заряду і розміру ліпідної молекули та зовнішніх умов [54]. У ліпідних частинах мембран завдяки ван-дер-ваальсівським силам зчеплення при взаємодії між частинками та молекулами через прошарки води (дисперсійного середовища) утворюються коагуляційні структури. Товщина шару води відповідає мінімуму вільної енергії системи та певною мірою залежить від умісту дисперсійного середовища.

Усі дисперсні системи термодинамічно нестійкі, оскільки мають високорозвинену поверхню. Отже, такі системи характеризуються високими значеннями вільних поверхневих енергій Гіббса G_0 і Гельмгольца F_0 [55]. Тіла, що мають надлишок поверхневої енергії, прагнуть зменшити її, мимоволі агрегують або коалесцюють (зливаються). Рухливість ліпідних молекул у бішарі одна відносно одної може змінюватись унаслідок двох процесів: латеральної дифузії та трансбіпрошаркової міграції (фліп-флопа) [56, 57]. Ці процеси дуже відрізняються за швидкістю. Швидкість трансбіпрошаркової міграції фосфоліпиду здебільшого визначається енергією активації (близько 40 ккал/моль) перенесення його полярної головки через гідрофобну ділянку біпрошарку. На швидкість фліп-флоп-міграції впливає різниця осмотичного тиску, рН або іонної сили по різні боки ліпідної мембрани. Проведений нами аналіз доводить необхідність досліджень щодо доступності попередників ліпідної природи до реакцій ароматоутворення за участю ферментів.

Результати попередніх досліджень реакції ліпідів мембран *in vitro*, проведених нами [58], свідчать про умови, які уможливили подолання бар'єра взаємодії між гідрофільними ферментами (ліпоксигеназами) та гідрофобним субстратом (ліпідною частиною мембран). Тобто ми показали, що при розрідженні в системі до 10 кПа змінюються ζ -потенціал і розподіл частинок за розмірами (PSD — particle size distribution) ліпідних екстрактів. Подальші дослідження припускають існування певної законо-

мірності, в якій, окрім ζ -потенціалу і PSD-профілю, фігурує чинник прикладеної сили до системи, де відбуваються гідрофільно-гідрофобні ферментативні реакції. На наш погляд, таким чинником може бути розклинювальний тиск — Π , дія якого забезпечується саме розрідженням у системі до 10 кПа. Чимало авторів описали в умовах *in vivo* явища осмотичного й тургорного тиску, які до того ж використовуються для виміру водного обміну рослин [59, 60].

Так само як осмотичний і тургорний тиск в умовах *in vivo*, розклинювальний тиск в умовах *in vitro* може бути умовою подолання гідрофільно-гідрофобного бар'єра. Розклинювальний тиск є одним із основних факторів теорії Дерягіна, Ландау, Фервея, Овербека (ДЛФО), яка наразі є фундаментом для усіх досліджень у сфері стійкості дисперсних систем. Основними факторами, які визначають поведінку частинки у коагульованій структурі, є такі: крупність частинки, гідрофільно-гідрофобний баланс поверхні частинок, загальний та електрокінетичний потенціали цієї поверхні. Розклинювальний тиск виникає в разі сильного зменшення товщини плівки (прошарку) між частинками дисперсної фази при зближенні внаслідок перекривання поверхневих шарів. Стійкість дисперсних систем визначається балансом енергії тяжіння та енергії відштовхування частинок. Згідно з теорією ДЛФО, за досить низького значення потенціалу ϕ_0 має зникнути енергетичний бар'єр між частинками. Внаслідок зменшення заряду електричні сили відштовхування між частинками слабшають, частинки при зближенні злипаються. Ми не розраховували значення розклинювального тиску (Π), тому що, за даними [61, 62], за різних значень товщини гідратного шару (h) він регулюється різними складовими, а саме: за $h > 5$ нм переважно електростатичною складовою (Π_e). Зі зменшенням h під дією певного технологічного впливу (розрідження, вихровий шар феромагнітних частинок, заморожування) розклинювальний тиск регулюється здебільшого структурною (Π_s) та молекулярною (Π_m) складовими. Збільшення або зменшення Π приводить до переважання сил відштовхування в системі прекурсор-ферменти над силами тяжіння або навпаки — до взаємодії між ферментами та ліпідними попередниками [58].

Згідно з проведеними нами дослідженнями [50, 58], глибина вакууму в гідрофільно-гідрофобній системі впливає на:

- розклинювальний тиск і реакції взаємодії між ферментами та ліпідними попередниками, які оцінюються за утворенням кількості продуктів реакції, таких як гідроперекиси, альдегіди, спирти, кислоти – похідні ПНЖК;

- ζ -потенціал, який є частиною загального стрибка потенціалу ϕ_0 і свідчить про рухливість частинок. Експериментально доведено, що значення ζ -потенціалу для свіжої та обробленої сировини відрізняються від значень ζ -потенціалу після обробки при розрідженні;

- збільшення площі поверхні взаємодії завдяки зменшенню розміру ліпідних частинок.

Аналіз умов подолання гідрофільно-гідрофобного бар'єра *in vitro* з теоретичного та практичного погляду свідчить про доцільність фізичного впливу на систему, яка містить ліпідні попередники і водорозчинні ферменти для максимального досягнення взаємодій із прекурсорами аромату шляхом збільшення площі поверхні взаємодії завдяки зменшенню розміру ліпідних частинок, зниженню ζ -потенціалу, посиленню фліп-флоп-міграції. Далі ми підібрали відповідні технологічні операції, завдяки яким можна реалізувати ці підходи до взаємодії фермент-субстрат.

Результати досліджень системи, в якій здійснюється вакуумна обробка і відбувається відновлення втрачених ароматів або утворення нових, дають змогу припустити, що на кінцевий результат впливають не тільки ті фактори, про які йшлося вище. Імовірно, під дією розрідження до реакцій вступають індукційні ферменти природного походження, які внаслідок дії розрідження отримують сигнал від відповідних індукторів. Також, можливо, індукторами можуть бути новоутворені ароматичні компоненти. Тобто в системі починає діяти ланцюгова реакція зі збільшенням кількості ароматичних компонентів. У дослідженнях М. Гаргори описані результати ферментативних реакцій, у яких новоутворені ароматичні компоненти як кінцеві продукти реакції не активують, а навпаки, інгібують дію гідроперексидіаз мікробного походження [42]. Це пояснюється, на нашу думку, саме відмінністю ферментів природного походження від мікробного.

Вплив пігментів на реакції з попередниками ліпідної природи

Більшість ароматичних сполук виникають унаслідок реакцій розпаду та внутрішньої реорганізації клітинних стінок рослин у процесі

дозрівання [20]. Процеси розвитку аромату відбуваються не в період раннього формування плодів, а нестримно під час клімактеричного підйому дихання, коли обмін речовин плоду змінюється на катаболізм. Незначна кількість ліпідів, вуглеводів, білків і амінокислот ферментативно перетворюються на прості цукри або кислоти та леткі сполуки. Швидкість утворення аромату в плодах із клімактеричним дозріванням досягає максимуму в постклімактеричній фазі [63], коли відбувається взаємодія трьох факторів: ферментативних реакцій, формування пігментації та накопичення цукрів. Процеси утворення аромату *in vitro* з попередників ліпідної природи (ПНЖК), на наш погляд, також залежать від наявності в системі пігментів і їхніх властивостей (у каротиноїдах можуть переважати гідрофільні або гідрофобні властивості). Для ілюстрації ми провели простий експеримент щодо впливу цис-транс-ізомеризації каротиноїдів на зміну аромату. Предметом дослідження вибрали кавунову м'якоть, яка містить лікопін у концентрації 4,5 мг/100 г. Кавунову м'якоть відокремили від кісточок і клітинного соку, залишивши лише частково зневоднену м'якоть. Розділили її на два зразки – термооброблений (рис. 2а) і свіжий (рис. 2б). У кожен зразок внесли 0,5–1,0 % олії для розчинення лікопіну та його ізомеризації. У зразку зі свіжим кавуном спостерігали зміну забарвлення, що відбулась швидко внаслідок дії клітинних ендегенних ЛОГ.

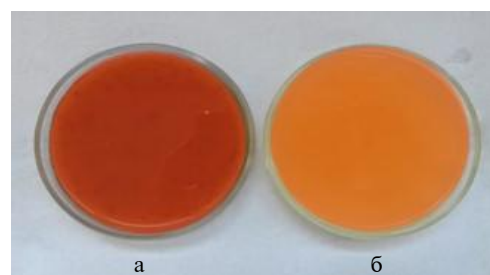


Рисунок 2: Зміни кольору кавунової м'якоті внаслідок цис-транс-ізомеризації лікопіну: (а) термооброблена кавунова м'якоть, (б) м'якоть зі свіжого кавуна після ізомеризації лікопіну

Відомо, що ЛОГ викликають знебарвлення каротиноїдів [64], тому, можливо, зміна забарвлення відбулась також і за їх участю. Аромат у зразку зі свіжою м'якоттю після знебарвлення змінився до інтенсивного, характерного для свіжого гарбуза. Тобто внаслідок трансформації лікопіну та ендегенних ферментів кавуновий аромат перетворився на гарбузовий.

Наведений результат зі зміною аромату є наслідком синергетичної дії ендогенних ферментів та ізомеризації лікопіну. Підтвердженням цього є те, що в увареній м'якоті кавуна додавання олії привело до несуттєвої зміни кольору й аромату, а ферменти в цьому випадку були інактивовані тепловою дією. Слід зазначити, що, крім ізомеризації лікопіну та дії ферментів, результат зміни аромату може бути також пов'язаний зі зміною антиоксидантної активності (АОА), яка впливає на гальмування окисних реакцій за участю ЛОГ. У наведеному експерименті після додавання олії відбувся перехід лікопіну в ліпідну частину, де АОА менш виражена відносно ЛОГ.

Вивченню деградації чистого лікопіну були присвячені дослідження, у яких із лікопіну в твердому стані був виділений у леткій фракції 2-метил-2-гептен-6-он. Подальші кроки показали, що за термічної обробки водної суспензії лікопіну ідентифіковані 2-метил-2-гептен-6-он, геранераль і нераль. Серед летких сполук, отриманих термічним розкладанням лікопіну, були й інші сполуки — 5-гексен-2-он, гексан-2,5-діон, 6-метил-3, 5-гептадієн-2-он, геранілацетат і псевдоіонон [65, 66]. Окрім цього, різноманіття отримуваних ароматичних сполук залежить від задіяних у реакції цис-транс-ізомерних форм лікопіну [67]. Ферменти каталізують утворення ароматів, пов'язаних із молекулами попередника при визначених цис-транс положеннях каротиноїдів. У роботі А.І. Тенетка [68] встановлено, що пігменти з АОА позитивно впливають на збереження основних ароматичних речовин, а саме вищих спиртів, основних складних ефірів. Застосування антиоксидантів у технології рожевих виноматеріалів позитивно впливає на інтенсивність їх аромату.

Узагальнені реакції формування аромату баштанних плодів, на наш погляд, більше, ніж інші плоди, демонструють залежність від пігментів. А саме, на основі базового розчину, якій містить необхідні концентрації цукристих речовин, кислот й амінокислот, притаманних клітинному соку, можна сформувати аромат, додаючи відповідний пігмент: лікопін — для кавунового аромату, різновиди каротину — для динного та гарбузового (в базовому розчині дині більше цукрів), хлорофіл — для огіркового аромату. Реакції ароматоутворення в системі клітинний сік—пігменти регулюються АОА, а прекурсори і ферменти утворюють характерні для свіжозірваних плодів леткі компоненти. Розуміння механізму утворення аромату необ-

хідне, на наш погляд, для його подальшого відновлення після втрат у технологічних процесах переробки. У такому випадку, після термообробки плодів залишаються базовий розчин і попередники аромату, а інші компоненти — пігменти і ферменти — піддаються ізомеризації та інактивації. Тому внесення до термооброблених плодів, які втратили аромат, джерела ферментів є важливою умовою нових реакцій утворення аромату. Оскільки пігменти можуть зазнавати зміни цис-транс-положення, то використання ферментів класу ізомераз може забезпечити умови повернення до їх природної форми і, відповідно, до відновлення аромату. В деяких випадках пігменти мають прооксидантні властивості, як-от каротиноїди та хлорофіл, і сприяють скороченню лаг-періоду у ферментативних реакціях в умовах *in vitro*.

Відновлення аромату плодів, утраченого після термообробки

Під час технологічної теплової обробки аромат деяких плодів значно руйнується. Були також описані успішні спроби відновлення аромату малини додаванням компонентів із білої серцевини цих ягід. Причини, з якої теорія відновлення аромату більше не вивчалася, — важка доступність ферментів або попередників у реакціях відновлення природних ароматів [69]. На нашу думку, забезпечення умов достатньої міжфазової взаємодії фермент—субстрат може відновити інтерес до втрачених ароматів. Іноді у продукті достатньо відновити або додати “ключову” речовину аромату: гексаналь для пшеничного хліба та яблучного соку, гексеналь для подрібненої суниці, бананів, наонадієналь для огірків і декадієналь для хрусткої картоплі. У такому разі ефективним є використання природних попередників аромату та ферментів із рослинної сировини, які забезпечують вузький, але важливий спектр ароматів, притаманних свіжим плодам. Так, наприклад, змішуванням перцю та полуниці можливо посилювати смак і запах у продуктах [70]. Потенційними джерелами ферментів є рослинні гомогенати — однорідні тонкоподрібнені суспензії рослинної сировини. Завдяки активності ферментів у такій суспензії можна проводити операції ароматизації без трудомісткого виділення та очищення ферментів із рослинної сировини, без енерговитрат на діаліз або ліофілізацію. Великою перевагою в цьому випадку є натуральність і доступність компонентів, недолік —

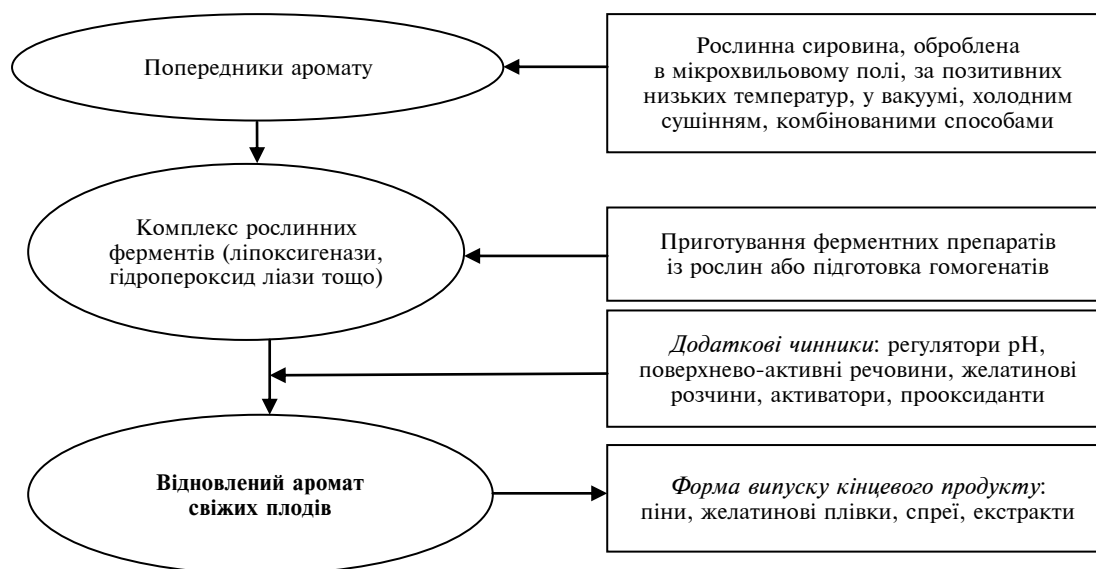


Рисунок 3: Принципова схема відновлення втраченого аромату плодів після термообробки

нетривалий ефект, який триває буквально декілька годин. У деяких запатентованих процесах такого способу ароматизації як гомогенати використовують суничне листя, соєві боби, гриби [71]. Ферментативна природа процесів утворення свіжих ароматів із прекурсорів ліпідної природи підтверджується невеликою кількістю внесених гомогенатів і коротким часом перебігу реакції утворення аромату.

Для отримання відновленого аромату необхідно забезпечити умови міжфазової активації – велику поверхню стикання між субстратом і ферментами, а для цього використати (рис. 3):

- розчин желатину, що має поверхнево-активні властивості, забезпечує максимальну доступність субстрату цитоплазматичних мембран до активних центрів ферментів. Вірогідність збільшення активності ферментів у желатиновому розчині досить висока, оскільки молекули білків у ньому представляють природні поверхнево-активні наночастинки, що мають властивості, притаманні наносистемам;
- утворення піни (спінення) механічним шляхом та із застосуванням поверхнево-активних речовин;
- застосування розрідження при обробці рідких систем.

Технологічний процес відновлення аромату з прекурсорів із залученням комплексу рослинної сировини впливає не на смак харчових продуктів, а тільки на їхній аромат. Але доведено, що, змінивши запах страви, можна легко змінити і смак [72]. Прикладом цього є желе,

безалкогольні напої та цукерки з різними ароматизаторами, які, хоч і зроблені з основ зі схожим смаком, різняться через використання різних ароматизаторів. Саме ця обставина спонукає розглядати принципи ароматизації шляхом впливу на попередники аромату для покращення сприйняття дієтичних страв із різноманітним смаком.

Висновки

Ферменти рослинного походження і попередники ароматів ліпідної природи мають значний потенціал для практичного застосування в галузі ароматизації харчових продуктів. Аналіз основних природних реакцій синтезу аромату з використанням попередників аромату, зокрема ліпідної природи, доводить можливість отримання різноманітних летких сполук. Тому повторення таких природних реакцій *in vitro* дає змогу переглянути та доповнити технології ароматизації харчової продукції. Оскільки попередники аромату розщеплюються під час відповідних реакцій, розглянуто питання статусу їх натуральності в харчових продуктах. Застосування ферментів рослинного походження із заздалегідь відомими природними механізмами реакції з попередниками є обґрунтуванням щодо їх натуральності в харчових продуктах. Встановлено, що особливості механізму дії попередників ліпідної природи та їх різноманітність обумовлюють перебіг багатоваріантних реакцій із можливими кінцевими продуктами

реакції утворення аромату від “зеленого, трав’яного” до “огіркового, кавунового”. Узагальнені основні чинники ферментативного утворення аромату з попередників ПНЖК задля їх подальшого ефективного застосування. Встановлено, що різноманітні ароматичні сполуки утворюються внаслідок специфічності ферментів до похідних із попередників ліпідної природи.

Аналіз застосування попередників аромату і рослинних ферментів у минулому доводить необхідність подальшої розробки умов їх ефектної взаємодії. Такими умовами є заходи для подолання бар’єра між гідрофільними ферментами і попередниками ліпідної природи без застосування поверхнево-активних речовин, які додають у мікроемульсії. Шляхи подолання бар’єра взаємодії між ліпідними попередниками та рослинними ферментами полягають у використанні дії розрідження. Пояснення ефекту розрідження в системі з попередниками та ферментами може надати поняття розклинювального тиску, який враховує фактор гідрофільно-гідрофобного балансу поверхні части-

нок. Аналіз біотехнологічних принципів утворення аромату баштанних плодів доводить необхідність урахування впливу пігментів на перебіг реакцій ароматоутворення. Показано, що пігменти каротиноїдної природи можуть чинити суттєвий вплив на зміни аромату кавунової м’якоті внаслідок ізомеризації. Сформульовано принципову схему для відновлення аромату, втраченого під час технологічної обробки сировини, в якій зазначено фактори забезпечення умов міжфазової активації для ферментів і попередників аромату.

Розкриття інтересів

Наталія Поєдинок є членом редакційної колегії журналу “Innovative Biosystems and Bio-engineering”, не брала участі у редакційному оцінюванні статті та ухваленні рішення про її публікацію. Інші автори не мають конфліктів інтересів, які слід розкрити.

References

- [1] Sandri A, Cecchini MP, Riello M, Zanini A, Nocini R, Fiorio M, et al. Pain, smell, and taste in adults: a narrative review of multisensory perception and interaction. *Pain Ther.* 2021 Jun;10(1):245–68. DOI: 10.1007/s40122-021-00247-y
- [2] Berčnk J, Paluchová J, Neomániová K. Neurogastronomy as a tool for evaluating emotions and visual preferences of selected food served in different ways. *Foods.* 2021 Feb 7;10(2):354. DOI: 10.3390/foods10020354
- [3] Yuan B, Zhou S, Liu C, Zhang S, Li J, Liu A. Status of the application of exogenous enzyme technology for the development of natural plant resources. *Bioprocess Biosyst Eng.* 2021 Mar;44(3):429–42. DOI: 10.1007/s00449-020-02463-w
- [4] Regulation (EC) No 1334/2008 of the European Parliament and of the Council on 16 December 2008 on flavourings and certain food ingredients with flavouring properties for use in and on foods and amending Council Regulation (EEC) No 1601/91, Regulations (EC) No 2232/96 and (EC) No 110/2008 and Directive 2000/13/EC. *Off J Europ Union.* 2008 Dec;L354/34.
- [5] Varelis P, Melton L, Shahidi F. *Encyclopedia of food chemistry.* Amsterdam: Elsevier; 2018. 2194 p.
- [6] Ruiz J, Kiene F, Belda I, Fracassetto D, Marquina D, Navascués E, et al. Effects on varietal aromas during wine making: a review of the impact of varietal aromas on the flavor of wine. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019 Sep;103(18):7425–50. DOI: 10.1007/s00253-019-10008-9
- [7] Maasen K, Scheijen LJLM, Opperhuizen A, Stehouwer CDA, Van Greevenbroek MM, Schalkwijk CG. Quantification of dicarbonyl compounds in commonly consumed foods and drinks; presentation of a food composition database for dicarbonyls. *Food Chem.* 2021 Mar 1;339:128063. DOI: 10.1016/j.foodchem.2020.128063
- [8] Dateo GP, Clapp RC, Mackay DAM, Hewitt EJ, Hasselstrom T. Identification of the volatile sulfur components of cooked cabbage and the nature of the precursors in the fresh vegetable. *J Food Sci.* 1957;22(5):440–7. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1957.tb17501.x
- [9] Hasselstrom T, Bailey S, Reese ET. Regeneration of food flavors through enzymatic action. *Army Research Office Washington DC;* 1962. p. 285–94. Accession Number AD0286640.
- [10] Schwimmer S. Alteration of the flavor of processed vegetables by enzyme preparations. *J Food Sci.* 1963;28(4):460–6. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1963.tb00227.x
- [11] Fernandes P. Enzymes in food processing: a condensed overview on strategies for better biocatalysts. *Enzyme Res.* 2010 Sep 29;2010:862537. DOI: 10.4061/2010/862537
- [12] Puchkova TA, Babitskaya VG, Scherba VV, Bisko NA, Poyedinok N. Polysaccharides of medicinal caterpillar fungus, *Cordyceps militaris* (L.:Fr.) link (Ascomycetes): production and composition. *Int J Med Mushr.* 2010;12(4):419–25. DOI: 10.1615/IntJMedMushr.v12.i4.90

- [13] Savin M, Vrkatić A, Dedić D, Vlaški T, Vorgučin I, Bjelanović J, Jevtic M. additives in children's nutrition – a review of current events. *Int J Environ Res Public Health*. 2022 Oct 18;19(20):13452. DOI: 10.3390/ijerph192013452
- [14] Khandpur N, Neri DA, Monteiro C, Mazur A, Frelut ML, Boyland E, et al. Ultra-processed food consumption among the paediatric population: an overview and call to action from the European childhood obesity group. *Ann Nutr Metab*. 2020;76(2):109-13. DOI: 10.1159/000507840
- [15] Hearty Á. FACET: providing an integrated and holistic approach to the exposure assessment of food chemicals. *Nutrition Bull*. 2010;35(4):340-7. DOI: 10.1111/j.1467-3010.2010.01851.x
- [16] World Health Organization. Evaluation of certain food additives and contaminants. *World Health Organ Tech Rep Ser*. 2011;(966):1-136.
- [17] EFSA GMO Panel Working Group on Animal Feeding Trials. Safety and nutritional assessment of GM plants and derived food and feed: the role of animal feeding trials. *Food Chem Toxicol*. 2008 Mar;46 Suppl 1:S2-70. DOI: 10.1016/j.fct.2008.02.008.
- [18] Valerio LG Jr, Arvidson KB, Chanderbhan RF, Contrera JF. Prediction of rodent carcinogenic potential of naturally occurring chemicals in the human diet using high-throughput QSAR predictive modeling. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Jul 1;222(1):1-16. DOI: 10.1016/j.taap.2007.03.012
- [19] Flavour precursors and Shrodinger's cat. *Flavour Horizons Bull*. 2012;1:1-2.
- [20] Xu L, Zang E, Sun S, Li M. Main flavor compounds and molecular regulation mechanisms in fruits and vegetables. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2022 Jul 11:1-21. DOI: 10.1080/10408398.2022.2097195
- [21] Bayindirli A. *Enzymes in fruit and vegetable processing: chemistry and engineering applications*. Boca Raton: CRC Press; 2010. 405 p.
- [22] Kanter JP, Honold PJ, Lüke D, Heiles S, Spengler B, Fraatz MA, et al. An enzymatic tandem reaction to produce odor-active fatty aldehydes. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2022 Sep;106(18):6095-107. DOI: 10.1007/s00253-022-12134-3
- [23] Bangerth F, Song J, Streif J. Physiological impacts of fruit ripening and storage conditions on aroma volatile formation in apple and strawberry fruit: A review. *HortScience*. 2012;47(1):4-10. DOI: 10.21273/HORTSCI.47.1.4
- [24] Shahidi F, Hossain A. Role of lipids in food flavor generation. *Molecules*. 2022;27(15):5014. DOI: 10.3390/molecules27155014
- [25] Lamikanra O, Chen JC, Banks D, Hunter PA. Biochemical and microbial changes during the storage of minimally processed cantaloupe. *J Agric Food Chem*. 2000 Dec;48(12):5955-61. DOI: 10.1021/jf0000732
- [26] Deibler KD, Delwiche JM. *Handbook of flavor characterization sensory analysis, chemistry, and physiology*. Boca Raton: CRC Press; 2004. 520 p.
- [27] Dudai N, Chaimovitch D, Fischer R, Belanger F. Aroma as a factor in the breeding process of basil. *Acta Hort*. 2010;860:167-71. DOI: 10.17660/ActaHortic.2010.860.24
- [28] Paniuta OO, Shablīi VA, Belava VN. Jasmonic acid and its participation in defence reactions of plant organism. *Ukr Biokhim Zh*. 2009 Mar-Apr; 81(2):14-26.
- [29] Adams TB, Gavin CL, Taylor SV, Waddell WJ, Cohen SM, Feron VJ, et al. The FEMA GRAS assessment of alpha,beta-unsaturated aldehydes and related substances used as flavor ingredients. *Food Chem Toxicol*. 2008 Sep;46(9):2935-67. DOI: 10.1016/j.fct.2008.06.082
- [30] Sun Y, Zeng L, Xue Y, Yang T, Cheng Z, Sun P. Effects of power ultrasound on the activity and structure of β -D-glucosidase with potentially aroma-enhancing capability. *Food Sci Nutr*. 2019 May 15;7(6):2043-9. DOI: 10.1002/fsn3.1035
- [31] Sun Y, Xu Q, Peng W, Xue Y, Sun P. Synergistic effects of ultrasound and β -d-glucosidase in aroma of orange juice. *J Food Sci*. 2021 Jun;86(6):2374-86. DOI: 10.1111/1750-3841.15671
- [32] Dubova G, Bezusov A, Melnyk O. Features of food flavored salt technology. *Naukovm Pracr ONAHT*. 2013;44(2):33-8.
- [33] Zhang C, Tian S. Peach fruit acquired tolerance to low temperature stress by accumulation of linolenic acid and N-acylphosphatidylethanolamine in plasma membrane. *Food Chem*. 2010 Jun;120(3):864-72. DOI: 10.1016/j.foodchem.2009.11.029
- [34] Yu TH, Lin LY, Ho CT. Volatile compounds of blanched, fried blanched, and baked blanched garlic slices. *J Agricult Food Chem*. 1994;42(6):1342-7. DOI: 10.1021/jf00042a018
- [35] Gaonkar AG, Bagwe RP. Microemulsions in foods: challenges and applications. In: *Adsorption and aggregation of surfactants in solution*. Boca Raton: CRC Press; 2002. p. 389-409.
- [36] El-Nokaly M, Hiler GD, McGrady J. Food microemulsion. United States patent 5,045,337. 1991 Sep 3.
- [37] Pisaniello L, Watson F, Siebert T, Francis L, Hixson JL. The varietal influence of flavour precursors from grape marc on monoterpene and C13-norisoprenoid profiles in wine as determined by membrane-assisted solvent extraction (MASE) GC-MS. *Molecules*. 2022 Mar 22;27(7):2046. DOI: 10.3390/molecules27072046
- [38] Sato Y, Han J, Fukuda H, Mikami S. Enhancing monoterpene alcohols in sweet potato shochu using the diglycoside-specific β -primeverosidase. *J Biosci Bioeng*. 2018 Feb;125(2):218-23. DOI: 10.1016/j.jbiosc.2017.08.012
- [39] González-Pombo P, Fariña L, Carrau F, Batista-Viera F, Brena BM. Aroma enhancement in wines using co-immobilized *Aspergillus niger* glycosidases. *Food Chem*. 2014 Jan 15;143:185-91. DOI: 10.1016/j.foodchem.2013.07.107

- [40] Mizutani M, Nakanishi H, Ema J, Ma SJ, Noguchi E, Inohara-Ochiai M, et al. Cloning of beta-primeverosidase from tea leaves, a key enzyme in tea aroma formation. *Plant Physiol.* 2002 Dec;130(4):2164-76. DOI: 10.1104/pp.102.011023
- [41] Gargouri M, Akacha N, Kotti F, Rejeb I. Voie de la lipoxygénase: valorisation d'huiles végétales et biosynthèse de flaveurs. *Biotechnologie Agronomie Société et Environnement.* 2008 Jan;12(2):185-202.
- [42] Akacha N, Gargouri M. Microbial and enzymatic technologies used for the production of natural aroma compounds: synthesis, recovery modeling, and bioprocesses. *Food Bioprod Process.* 2015 Apr;94:675-706. DOI: 10.1016/j.fbp.2014.09.011
- [43] Shi Y, Mandal R, Singh A, Pratap Singh A. Legume lipoxigenase: Strategies for application in food industry. *Legume Sci.* 2020;2(3):e44. DOI: 10.1002/leg3.44
- [44] Andreou A, Feussner I. Lipoxigenases – structure and reaction mechanism. *Phytochemistry.* 2009 Sep;70(13-14):1504-10. DOI: 10.1016/j.phytochem.2009.05.008
- [45] Ni Z, Wu Q, Zhou Z, Yang Y, Hu Q, Deng H, et al. Effects of turning over intensity on fatty acid metabolites in postharvest leaves of Tieguanyin oolong tea (*Camellia sinensis*). *PeerJ.* 2022 Jun 13;10:e13453. DOI: 10.7717/peerj.13453
- [46] Zamora R, Hidalgo FJ. 2-Amino-1-methyl-6-phenylimidazo [4, 5-b] pyridine (PhIP) formation and fate: an example of the coordinate contribution of lipid oxidation and Maillard reaction to the production and elimination of processing-related food toxicants. *RSC Adv.* 2015 Jan;5(13):9709-21. DOI: 10.1039/C4RA15371E
- [47] Kontogianni VG, Gerathanassis IP. Analytical and structural tools of lipid hydroperoxides: present state and future perspectives. *Molecules.* 2022 Mar 25;27(7):2139. DOI: 10.3390/molecules27072139
- [48] Liavonchanka A, Feussner I. Lipoxigenases: occurrence, functions and catalysis. *J Plant Physiol.* 2006 Feb;163(3):348-57. DOI: 10.1016/j.jplph.2005.11.006
- [49] Magri A, Petriccione M, Cerqueira MA, Gutiérrez TJ. Self-assembled lipids for food applications: A review. *Adv Colloid Interface Sci.* 2020 Nov;285:102279. DOI: 10.1016/j.cis.2020.102279
- [50] Sukmanov V, Marynin A, Dubova H, Bezusov A, Voskoboinik V. Study of aroma formation from lipids of the fruit raw material. *Ukr Food J.* 2016;5(4):629-43. DOI: 10.24263/2304-974X-2016-5-4-3
- [51] Noordermeer MA, Veldink GA, Vliegthart JF. Fatty acid hydroperoxide lyase: a plant cytochrome p450 enzyme involved in wound healing and pest resistance. *Chembiochem.* 2001 Aug 3;2(7-8):494-504. DOI: 10.1002/1439-7633(20010803)2:7/8<494::AID-CBIC494>3.0.CO;2-1
- [52] Damodaran S, Parkin KL. Fennema's food chemistry. Boca Raton: CRC Press; 2008. 1214 p.
- [53] Hu Z, Shen YB, Luo YQ, Shen FY, Gao HB, Gao RF. Aldehyde volatiles emitted in succession from mechanically damaged leaves of poplar cuttings. *J Plant Biol.* 2008 Jul;51(4):269-275. DOI: 10.1007/BF03036126
- [54] Ryabova NY, Kiselev MA, Beskrovnyi AI, Balagurov AM. Investigation of the structure of multilayer lipid membranes by real-time neutron diffraction. *Phys Solid State.* 2010 May;52(5):1050-8. DOI: 10.1134/S1063783410050355
- [55] Shchukin ED, Zelenev AS. Physical-chemical mechanics of disperse systems and materials. Boca Raton: CRC Press; 2015. 341 p.
- [56] Parisio G, Sperotto MM, Ferrarini A. Flip-flop of steroids in phospholipid bilayers: effects of the chemical structure on transbilayer diffusion. *J Am Chem Soc.* 2012 Jul 25;134(29):12198-208. DOI: 10.1021/ja304007t
- [57] Liu J, Brown KL, Conboy JC. The effect of cholesterol on the intrinsic rate of lipid flip-flop as measured by sum-frequency vibrational spectroscopy. *Faraday Discuss.* 2013;161:45-61. DOI: 10.1039/c2fd20083j
- [58] Dubova HY. Advances in research on food aroma recovery. Poltava: PUET; 2017. 187 p.
- [59] Walker RP, Bonghi C, Varotto S, Battistelli A, Burbidge CA, Castellarin SD, et al. Sucrose metabolism and transport in grapevines, with emphasis on berries and leaves, and insights gained from a cross-species comparison. *Int J Mol Sci.* 2021 Jul 21;22(15):7794. DOI: 10.3390/ijms22157794
- [60] Koroleva OA, Tomos DA, Farrar J, Pollock CJ. Changes in osmotic and turgor pressure in response to sugar accumulation in barley source leaves. *Planta.* 2002 Jun;215(2):210-19. DOI: 10.1007/s00425-002-0744-2
- [61] Ding H, Rahman S. Experimental and theoretical study of wettability alteration during low salinity water flooding-an state of the art review. *Colloids Surf A Physicochem Eng Aspects.* 2017 May;520:622-39. DOI: 10.1016/j.colsurfa.2017.02.006
- [62] Klaassen A, Liu F, Mugele F, Siretanu I. Correlation between electrostatic and hydration forces on silica and gibbsite surfaces: an atomic force microscopy study. *Langmuir.* 2022 Jan;38(3):914-26. DOI: 10.1021/acs.langmuir.1c02077
- [63] Valpuesta V. Fruit and vegetable biotechnology. Woodhead Publishing; 2002. 352 p.
- [64] Jarén-Galán M, Minguez-Mosquera MI. β -carotene and capsanthin co-oxidation by lipoxigenase. Kinetic and thermodynamic aspects of the reaction. *J Agric Food Chem.* 1997;45(12):4814-20. DOI: 10.1021/jf970415c
- [65] Wampler B, Barringer SA. Volatile generation in bell peppers during frozen storage and thawing using selected ion flow tube mass spectrometry (SIFT-MS). *J Food Sci.* 2012 Jun;77(6):C677-83. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2012.02727.x
- [66] Xu Y, Barringer S. Effect of temperature on lipid-related volatile production in tomato puree. *J Agric Food Chem.* 2009 Oct 14;57(19):9108-13. DOI: 10.1021/jf902192r

- [67] Carmona-Cabello M, Zorpas AA, Dorado MP. Biorefinery concept for the industrial valorization of tomato processing by-products. In: *Tomato Processing by-Products: Sustainable Applications*. Elsevier; 2022. p. 371-420. DOI: 10.1016/B978-0-12-822866-1.00006-5
- [68] Tenetka A. Improving of rose table wine materials with antioxidants using [PhD thesis]. Kyiv: National University of Food Technologies; 2015. 22 p.
- [69] Nagodawithana T, Reed G, editors. *Enzymes in food processing*. 3rd edition. Academic Press; 1993. DOI: 10.1016/C2009-0-03282-6
- [70] Caporaso N. The impact of molecular gastronomy within the food science community. In: *Gastronomy and food science*. Academic Press; 2021. p. 1-18. DOI: 10.1016/B978-0-12-820057-5.00001-7
- [71] Yilmaz E, Baldwin EA, Shewfelt RL. Enzymatic modification of tomato homogenate and its effect on volatile flavor compounds. *J Food Sci*. 2002 Jul;67(6):2122-5. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2002.tb09512.x
- [72] Lavelle C, This H, Kelly A L, Burke R. *Handbook of molecular gastronomy: scientific foundations, educational practices, and culinary applications*. CRC Press; 2021. 867 p. DOI: 10.1201/9780429168703

.....
H.Ye. Dubova^{1,2}, A.T. Bezusov³, O.K. Biloshytska¹, N.L. Poyedinok¹

¹Igor Sikorsky Kyiv Polytechnic Institute, Kyiv, Ukraine

²Poltava State Agrarian University, Poltava, Ukraine

³Odessa National Technological University, Odessa, Ukraine

APPLICATION OF AROMA PRECURSORS IN FOOD PLANT RAW MATERIALS: BIOTECHNOLOGICAL ASPECT

The article is devoted to the analysis of the main factors accompanying the use of aroma precursors, in particular, of a lipid nature, in food raw materials. The prerequisites for the impact on the precursors of aroma with the help of plant enzymes are given. The purpose of the article is to analyze the biotechnological aspect, which is based on enzymatic reactions with aroma precursors and enzymes of plant origin. Features of the mechanism of action of lipid precursors are highlighted, their diversity causing various characteristic reactions is analyzed, and possible end products of reactions with certain odors are noted. The attention is paid to the issue of the status of the naturalness of flavor precursors in food products, which varies in different countries. A scheme of factors influencing the formation of aroma from lipid precursors has been developed. The influence of pigments of carotenoid nature on the aroma is considered, namely: examples of instantaneous change of watermelon aroma to pumpkin one due to isomerization of carotenoids are given. The main factors of enzymatic formation of aroma from precursors of polyunsaturated fatty acids for their effective use by creating micromicelles are summarized. A way to overcome the barrier of interaction between lipid precursors of a hydrophobic nature and hydrophilic enzymes has been substantiated. It is proposed to accelerate enzymatic reactions under *in vitro* conditions and use the vacuum effect to overcome the barrier between enzymes and precursors. To explain the effect of vacuum in a system with enzymes, ideas about disjoining pressure and the reasonable expediency of its use are considered. A schematic process flow diagram for the restoration of aroma lost during the technological processing of raw materials is given; it demonstrates the factors for ensuring interfacial activation conditions for enzymes and aroma precursors.

Keywords: aroma precursor; food plant; lipid precursors; aroma development; plant enzymes; polyunsaturated fatty acids; aroma precursor's biotransformation; aromatic substances.