

Izabela Stolarzewicz^{1*}, Agata Kapturowska¹, Ewa Białęcka-Florjańczyk¹

¹Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Wpłynęło w marcu 2012 r.

1. Wstęp. 2. Barwniki syntetyczne. 3. Barwniki naturalne. 3.1. Barwniki identyczne z naturalnymi otrzymywane na drodze syntezy chemicznej. 4. Mikrobiologiczna produkcja barwników. 4.1. Grzyby jako potencjalne źródło barwników w technologii żywności. 4.2. Mikroalgi w produkcji barwników. 4.3. Bakterie i drożdże jako producenci związków o charakterze barwników. 5. Podsumowanie

Microbiological sources of colorants in food technology

Abstract: Recent years have brought intensive discussions concerning harmful influence of synthetic colorants used in food industry. It has focused the interest of both the food producers and the consumers on natural dyes. The aim of this review is to present novel methods of biosynthesis of natural colorants. The scope of the paper is not limited to those substances which are currently in use, but includes also some other compounds potentially useful in such applications are described. New sources of food colorants has been discovered among such organisms as algae (*Dunaliella* producing β -carotene), fungi (poliketides pigments), yeast (*Ashbya gossypii* producing riboflavin), bacteria. The highest expectations are connected with carotenoids, which are currently being intensively investigated. Their structural diversity opens up a wide range of potential new colorants. The most important method of their modification is cloning of *crt* genes and their expression in *E. coli* cells.

1. Introduction. 2. Synthetic colorants. 3. Natural colorants. 3.1. Nature-identical colorants produced by chemical synthesis. 4. Microbiological production of colorants. 4.1. Fungi as a potential source of colorants in food technology. 4.2. Microalgae in the production of colorants. 4.3. Bacteria and yeast as producers of coloring compounds. 5. Conclusion

Słowa kluczowe: barwniki, źródła mikrobiologiczne, modyfikacje genetyczne
Key words: colorants, microbial sources, genetic modifications

1. Wstęp

Rozwój przemysłu spożywczego, nowych źródeł i sposobów pozyskiwania surowców, a także wzrost świadomości społeczeństwa powoduje, że oczekiwania konsumentów wobec żywności ulegają ciągłym zmianom. W ostatnich latach rozgorzała dyskusja nad szkodliwością, stosowanych w żywności sztucznych barwników, co przyczyniło się do gwałtownego wzrostu zainteresowania zarówno producentów żywności jak i konsumentów barwnikami naturalnymi. Kolory pełnią podstawową rolę w identyfikacji produktów spożywczych oraz są czynnikiem podwyższającym ich walory smakowe. Zatem barwienie żywności jest ważnym procesem mającym na celu:

- odtworzenie pierwotnej barwy utraconej w wyniku przetwarzania,
- nadanie barwy produktom spożywczym zazwyczaj naturalnie bezbarwnym lub czasowo bezbarwnym,
- wzmocnienie istniejącej barwy,
- podkreślenie aromatu (smaku) środka spożywczego związanego z konkretną barwą, co czyni go łatwiejszym do rozpoznania.

Barwniki spożywcze możemy podzielić na barwniki pochodzenia naturalnego oraz syntetyczne lub na

barwniki rozpuszczalne w wodzie (antocyjany, betacyjany i chlorofile) oraz rozpuszczalne w tłuszczach i rozpuszczalnikach organicznych (karotenoidy). Barwniki naturalne otrzymywane są na drodze wieloetapowego procesu ekstrakcji z materiału biologicznego, którego źródłem mogą być rośliny lub owady, natomiast te identyczne z naturalnymi pozyskuje się na drodze syntezy chemicznej.

Dotychczas Rada Unii Europejskiej (Council of European Union) zatwierdziła 43 barwniki stosowane jako dodatki do żywności, w tym 16 naturalnych, którym zostały wyznaczone identyfikatory numeryczne z literą E [14]. Jednak w 2007 roku Parlament Europejski przyjął zapis zaostrzający możliwość zastosowania niektórych barwników syntetycznych, a mianowicie tych oznaczonych numerami 102 (tetrAZYNA), 104 (żółcień chinolinowa), 110 (żółcień pomarańczowa), 122 (azorubina), 124 (czerwień koszenilowa) i 129 (czerwień allurowa). Przyczyną takich zaostrzeń były wyniki badań naukowych dotyczących potencjalnego niekorzystnego wpływu wymienionych dodatków na zdrowie człowieka, w tym wzrost ryzyka występowania alergii, nowotworów czy nadpobudliwości u dzieci. Wielu producentów żywności, między innymi Heinz, McDonald's czy Tesco dobrowolnie zrezygnowały ze stosowania tych substancji.

* Autor korespondencyjny: Katedra Chemii, Wydział Nauk o Żywności, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego, ul. Nowoursynowska 159 C, 02-776 Warszawa; tel: (+ 48 22) 59 37 621; e-mail: izabela_stolarzewicz@sggw.pl

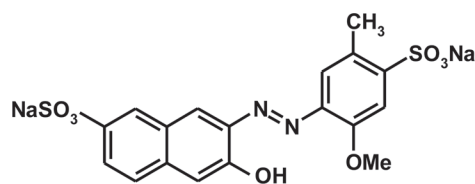
Obecnie barwniki naturalne stanowią 31% rynku substancji barwiących [44]. W związku z wycofywaniem barwników sztucznych przewiduje się, że ich produkcja będzie wzrastała rocznie jedynie o 3–5%, zaś produkcja barwników naturalnych o 5–10% [43].

Z uwagi na niską wydajność procesu ekstrakcji i małą stabilność dotychczas otrzymywanych barwników naturalnych poszukuje się nowych możliwości pozyskiwania związków mogących pełnić rolę substancji barwiących żywność. Pomimo dużego zainteresowania naturalnymi pigmentami nasza wiedza o ich występowaniu, możliwościach wykorzystania i właściwościach jest ograniczona. Wiele źródeł nowych barwników kryje się w bioróżnorodności świata roślin i mikroorganizmów występujących w niezbadanych dotychczas ekosystemach, zarówno lądowych jak i wodnych.

W pracy przedstawiono potencjalne mikrobiologiczne źródła barwników mogących znaleźć zastosowanie w przemyśle spożywczym.

2. Barwniki syntetyczne

Syntetyczne związki barwiące mogą mieć dwojaki charakter w zależności od ich budowy i właściwości chemicznych, a więc mogą zaliczać się do grupy związków organicznych lub nieorganicznych. Dopuszczalne do stosowania organiczne barwniki syntetyczne to przede wszystkim związki azowe o wzorze ogólnym $R_1N=NR_2$, np. Czerwień Allura (E129) (rys. 1). Barwniki te posiadają wiele zalet w porównaniu z ich naturalnymi zamiennikami, cechuje je mianowicie standardowa moc barwienia definiowana jako zależność między ilością dodanej substancji barwiącej a uzyskanym odcieniem. Są czystymi, jednorodnymi związkami chemicznymi, posia-

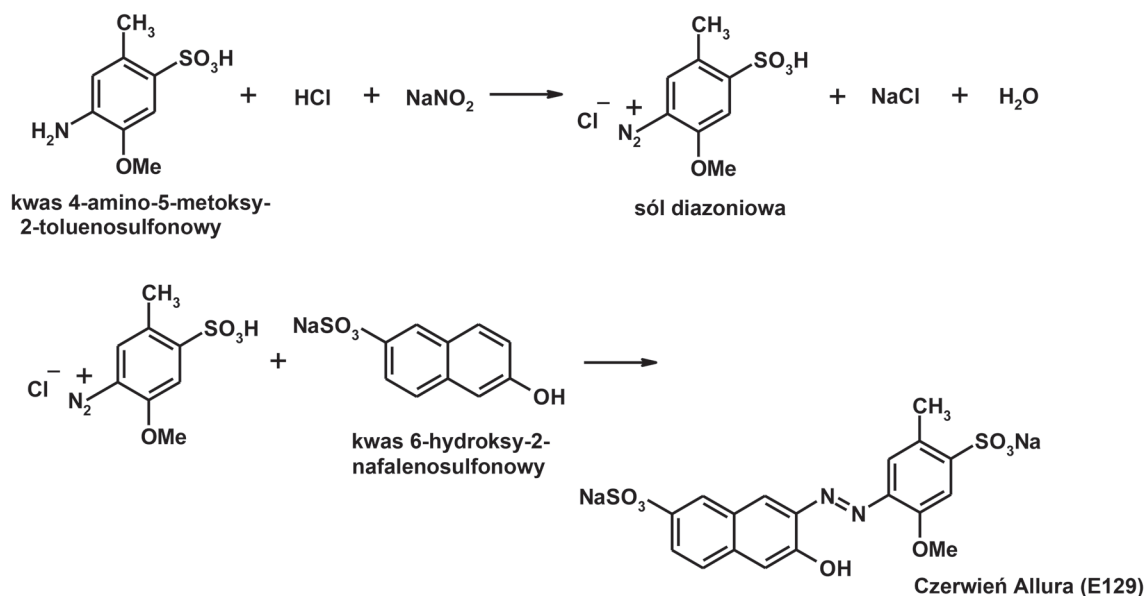


Rys. 1. Syntetyczny barwnik azowy – Czerwień Allura (E129)

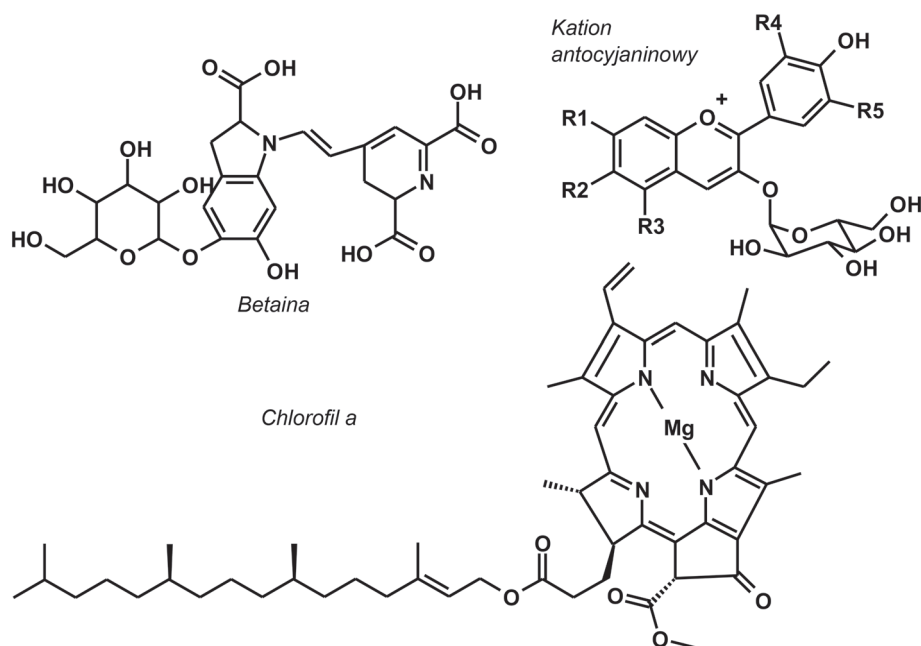
dającymi większą odporność na warunki środowiska, a ich formy handlowe są łatwiejsze do stosowania w produkcji żywności. Ponadto barwniki syntetyczne są tańsze w porównaniu do ich naturalnych odpowiedników. Z drugiej strony stosowanie tych związków budzi wiele kontrowersji z powodu ich domniemanej szkodliwości dla zdrowia człowieka [30].

Barwniki azowe powstają w reakcji sprzęgania soli diazoniowych z pochodnymi fenolu lub amin aromatycznych. Ponieważ oba składniki mogą być znacząco modyfikowane, w rezultacie można uzyskać ogromną liczbę barwników, szczególnie wtedy, gdy cząsteczki wyjściowe są łatwo dostępne i tanie. Synteza barwników azowych jest prowadzona w niskich temperaturach, a co za tym idzie nie wymaga dostarczania energii. Ponadto szkodliwy wpływ procesu na środowisko jest niewielki, ponieważ wszystkie reakcje zachodzą w środowisku wodnym. Dlatego z uwagi na wymienione powyżej czynniki koszt produkcji tej grupy barwników syntetycznych jest stosunkowo niewielki [45]. Pierwszym otrzymanym w ten sposób barwnikiem w 1958 roku była żółcień anilinowa, natomiast przykładem syntezy związku używanego do barwienia żywności jest reakcja otrzymywania Czerwieni Allura (E129) (związek monoazowy niesymetryczny) [7] (rys. 2).

Barwniki nieorganiczne odgrywają stosunkowo niewielką rolę w barwieniu żywności. Najczęściej sto-



Rys. 2. Synteza Czerwieni Allura



Rys. 3. Przykłady barwników naturalnych

sowane są metale, których atrakcyjne właściwości kolorystyczne sprawiają, iż wykorzystywane są one głównie do barwienia powierzchniowego [30].

3. Barwniki naturalne

Barwniki naturalne uzyskuje się z materiału biologicznego pochodzenia roślinnego, zwierzęcego i mikrobiologicznego oraz z minerałów (rys. 3). W niniejszej pracy zostaną przedstawione barwniki, których źródło stanowią mikroorganizmy.

Związki barwiące pochodzenia naturalnego w przeciwieństwie do syntetycznych barwników azowych mają mniej intensywną barwę, a co za tym idzie mają mniejszą zdolność barwienia. Ponadto są znacznie bardziej wrażliwe na działanie czynników utleniających, podwyższonej temperatury oraz zmian pH. Pomimo tych wad są pożądane przez producentów żywności, ponieważ budzą zaufanie konsumentów w odniesieniu do bezpieczeństwa ich stosowania. W przemyśle spożywczym barwniki naturalne stosowane są w postaci ekstraktów i koncentratów otrzymanych z surowców naturalnych pochodzenia roślinnego, a w zależności od ich struktury, można je podzielić na następujące grupy:

- izoprenoidowe – karotenoidy,
- porfiryne – chlorofile,
- flawonoidowe – antocyjany,
- betalainowe – betainy i betaksantyny,
- chinoidowe – koszenila,
- inne barwniki – ryboflawina, kurkumina.

Ekstrakcja substancji naturalnych, w tym barwników, polega na ich izolacji z komórek, tkanek bądź orga-

nów roślinnych (korzenie, rozłogi, kwiaty, owoce) oraz przeprowadzeniu do roztworu [14]. Wydajność takiego procesu oscyluje najczęściej na poziomie 20%.

W przypadku barwników związanych z procesem fotosyntezy zlokalizowanych głównie w chloroplastach takich jak np. chlorofil, konieczne jest zniszczenie struktur komórkowych przed rozpoczęciem procesu ekstrakcji. Dezintegrację ściany komórkowej przeprowadza się najczęściej metodami fizycznymi (homogenizacja, zmiany temperatury, sonifikacja) i/lub chemicznymi (działanie rozpuszczalnikami lub enzymami). Otrzymane ekstrakty są zagęszczane i oczyszczane odpowiednio dobraną metodą [14].

3.1. Naturalne barwniki otrzymywane na drodze syntezy chemicznej

Wzrost świadomości proekologicznej społeczeństwa powoduje, iż przemysł w tym także przemysł spożywczy poszukuje nowych przyjaznych środowisku źródeł i sposobów pozyskiwania surowców.

Jednym z najczęściej otrzymywanych na drodze syntezy chemicznej barwnikiem naturalnym jest β -karoten. Obok β -karotenu syntetyzuje się również jego pochodne m.in. kantaksantynę (ciemnoczerwona), β -apo-8'-karotenal i kwas β -apo-8'-karotenowy oraz jego estry: metylowy i etylowy (dające kolor od żółtego do pomarańczowego w zależności od stężenia związku). Te syntetyczne karotenoidy, przygotowane w odpowiedniej formie aplikacyjnej w celu uzyskania pożądanej barwy oraz satysfakcjonującej stabilności, mają szerokie zastosowanie w przemyśle spożywczym.

Karotenoidy otrzymywane są w postaci słabo rozpuszczalnych kryształów, zaś preparaty użytkowe przyjmują postać koncentratów olejowych lub zostają zdyspergowane w wodzie. Formy olejowe dodawane są do takich artykułów jak jaja (barwnik dodawany jest do pasz dla kur), pieczywo oraz artykuły mleczne, natomiast barwniki zdyspergowane w wodzie wykorzystuje się do barwienia napoi bezalkoholowych [7].

4. Mikrobiologiczna produkcja pigmentów

Mikroorganizmy produkują szereg związków o właściwościach barwiących, jednakże z powodu trudności związanych z wprowadzeniem takich substancji na rynek wynikających między innymi z możliwości skażenia mikotoksynami, tylko niewielką liczbę pigmentów pochodzenia mikrobiologicznego produkuje się na skalę przemysłową.

Najstarszym źródłem barwników produkowanych przez grzyby i stosowanych przez człowieka jest red koji (angkak), ryż fermentowany przez rodzaj *Monascus*, tradycyjnie używany w Azji od wieków do barwienia czerwonego ryżowego wina, czerwonego sera sojowego, mięsa czy też produktów rybnych. Ten od dawna używany w krajach azjatyckich pigment jest ciągle niedopuszczony do produkcji w USA z uwagi na mikotoksyny, jakie mogą produkować niektóre gatunki pleśni z rodzaju *Monascus*.

Pierwszym europejskim sukcesem w dziedzinie mikrobiologicznej produkcji pigmentów było wykorzystanie pleśni z rodzaju *Blakeslea* w produkcji β -karotenu. Europejska Dyrekcja Generalna do spraw Zdrowia i Ochrony Konsumentów zatwierdziła β -karoten produkowany w ten sposób jako identyczny z tym syntetyzowanym chemicznie, a tym samym dopuszczalny do barwienia żywności. Gatunek *Blakeslea trispora* jest obecnie wykorzystywany również do produkcji likopenu [9].

Komercyjna produkcja likopenu, czyli pomarańczowo-czerwonego barwnika (E160d), opiera się na syntezie chemicznej (p. 3.1) lub ekstrakcji z naturalnych źródeł np. pomidorów (*Lycopersicon esculentum*). Z uwagi na rosnące znaczenia tego związku oraz fakt, że rośliny i algi produkują jedynie mieszanki karotenoidów, a nie pojedynczy barwnik, zostały podjęte próby znalezienia alternatywnych dróg produkcji, gwarantujących otrzymywanie z dużą wydajnością czystego likopenu. Szlak biosyntezy β -karotenu, w którym produktem przejściowym jest likopen, został zbadany i opisany w komórkach *Phaffia balesleeanus*, *Mucor circinelloides* i *Blakeslea trispora*. Produkcja wspomnianego barwnika u wyżej wymienionych gatunków grzybów odbywa się dzięki wyeliminowaniu aktywności genu cyklazy likopenu lub chemicznemu jej zahamowaniu poprzez dodatek do podłoża hodowlanego amin trzeciorzędowych,

aminometylopirydyny lub heterocyklicznych związków azotowych, takich jak np. imidazol, pirydyna. U *B. trispora* wydajność syntezy likopenu sięga ok. 5% suchej masy [20].

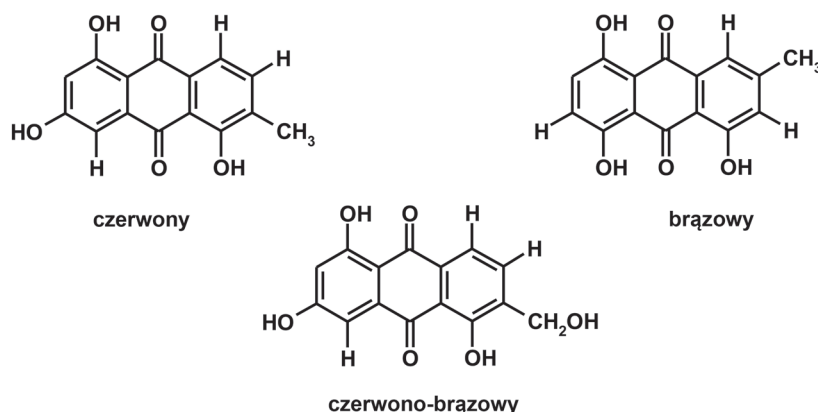
Kolejnym przykładem syntezy mikrobiologicznej jest produkcja żółtego barwnika – ryboflawiny (witaminy) przez drożdże *Eremothecium ashbyii* i *Ashbya gossypii*, które należą do tzw. „mocnych” producentów (syntezują 1 g barwnika/dm³ podłoża hodowlanego) oraz przez drożdże *Candida guilliermudii* lub *Debaryomyces subglobosus* nazywane „umiarkowanymi” producentami tej witaminy (ponad 600 mg/dm³ podłoża hodowlanego). Gatunkiem bakterii produkującym ryboflawinę z niewielką wydajnością jest *Clostridium acetobutylicum* (100 mg/dm³ podłoża hodowlanego) [9].

Właśnie z produkcją mikrobiologiczną, a co za tym idzie z pozyskiwaniem substancji barwiących w hodowli takich mikroorganizmów jak bakterie, grzyby czy też algi, wielu naukowców wiąże nadzieje na otrzymywanie barwników do żywności konkurencyjnych w stosunku do barwników sztucznych zarówno pod względem ich właściwości jak i ceny.

4.1. Grzyby jako potencjalne źródło barwników w technologii żywności

Produkcja wielu obecnie akceptowanych barwników żywności wiąże się z kilkoma ograniczeniami, do których należą m.in. zależność producenta od zapasów surowca czy też zmienność metod ekstrakcji pigmentów ze względu na zróżnicowanie składu surowców wykorzystywanych do ekstrakcji substancji barwiących. Przeprowadzone ostatnio autoryzacje produkowanych przez grzyby barwników stosowanych w żywności zdołały naukowców do badań nad chemiczną i biologiczną różnorodnością świata grzybów w celu pozyskania nowych pigmentów dla przemysłu. Badania te wymagają stosowania metod chemotaksonomicznych oraz wiedzy *a priori* dotyczącej metabolizmu tych organizmów [22].

Grzyby charakteryzują się dużą wydajnością produkcji biomasy, a ich wtórne metabolity wykazują małą wrażliwość na ciepło i zmienne pH. Dlatego właśnie te organizmy wydają się być warte dalszych badań jako alternatywne źródła naturalnych barwników [22]. Niektóre pigmenty pozyskiwane z komórek grzybów strzępkowych były znane już od dawna i wykorzystywane jako narzędzie taksonomiczne w identyfikacji gatunków. Nie badano ich jednak pod kątem potencjalnego zastosowania w technologii żywności [28]. Znaczna część wcześniejszych prac dotyczących otrzymywania barwników pochodzenia mikrobiologicznego skupiała się na związkach karotenoidowych, których to produkcja została już skomercjalizowana [1].



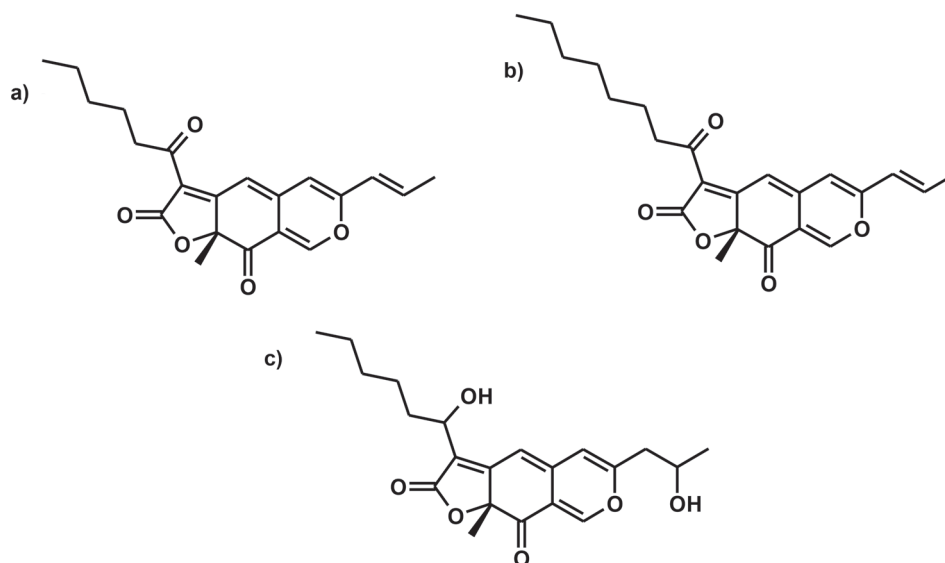
Rys. 4. Barwniki antrachinonowe

Podobnie jak rośliny, grzyby syntetyzują pigmenty, które w zależności od typu związku pełnią różne funkcje w komórce, począwszy od ochrony przed fotoutlenianiem (karotenoidy) i stresem środowiska (melaniny), a skończywszy na kofaktorach w katalizie enzymatycznej (flawiny) [22].

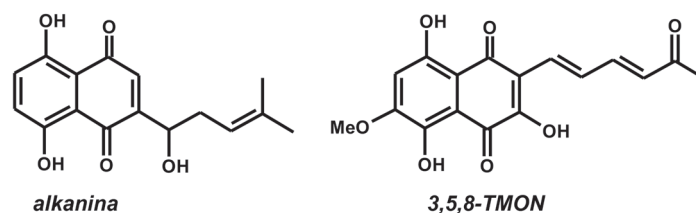
Pigmenty grzybów wykazują unikatową różnorodność chemiczną i strukturalną połączoną z szerokim zakresem kolorów. Są to między innymi chinony takie jak antrachinony [10] i naftochinony [4,11,18], kompleks dihydroksynaftalenu i melaniny [5] oraz pochodne flawiny takie jak np. ryboflawina [4]. Przykładowe barwniki antrachinonowe produkowane przez *Eurotium* spp., *Fusarium* spp., *Curvularia lunata* oraz *Drechelera* spp. [24], zostały przedstawione na rysunku 4.

Jednym z najlepiej poznanych grzybów pod kątem produkcji pigmentów jest *Monascus* spp., który wytwarza takie barwne związki jak monaskorubryna i rubropunktatyna (rys. 5 a, b). Oba pigmenty posiadają charakterystyczną strukturę odpowiedzialną za wysokie

powinowactwo do pierwszorzędowych grup aminowych, stąd nazywane są aminofilami [17]. W obecności różnych aminokwasów pleśń z rodzaju *Monascus* może produkować pigmenty o barwach od pomarańczowo-żółtej do fioletowo-czerwonej. Obok wymienionej monaskorubraminy i rubropunktaminy ostatnio wyizolowano i opisano trzeci z czerwonych barwników *Monascus* spp. różniący się od pozostałych podstawnikami w pozycji C3 i C9 w ich strukturze chemicznej (rys. 5 c). Nowoodkryty pigment wykazuje właściwości antybakteryjne w szczególności w stosunku do bakterii Gram-dodatnich, co predestynuje go do zastosowań zarówno w przemyśle spożywczym jak i farmaceutycznym [26]. Niestety w ryżu poddanym fermentacji prowadzonej przez pleśnię *Monascus* spp., wykryto miotoksynę, cytryninę [19]. Fakt ten ogranicza zastosowanie grzybów z rodzaju *Monascus* jako potencjalnego producenta naturalnych barwników spożywczych i uniemożliwia wprowadzenie takiego produktu na rynek w USA i Europie. Obiecujące mogą być tu


 Rys. 5. Pigmenty *Monascus* sp.

a) rubropunktatyna, b) monaskorubryna, c) nowoodkryty barwnik czerwony



Rys. 6. Barwniki naftochinonowe

jednak ostatnie doniesienia świadczące o tym, iż cytrynina jest produkowana tylko przez nieliczne szczepy pleśni z rodzaju *Monascus* [39].

Przykładem barwnika produkowanego przez pleśnię i dopuszczonego do barwienia żywności jest Aprink Red™ produkowany przez ASCOLOR BIOTEC w Czechach. Ten czerwony barwnik jest pozakomórkowym metabolitem z klasy antrachinonów, produkowanym przez *Penicillium oxalicum* var. *Armeniacum* CCM 8242. Po 3–4 dniowej hodowli szczepu pleśni uzyskuje się od 1.5 do 2.0 g/dm³ tego związku. Barwnik Aprink Red™ jest stabilny w pH wyższym niż 3.5, zaś w pH neutralnym zachowuje kolor nawet po 30 minutach gotowania [46]. Dzięki tym własnościom i pozytywnym wynikom testów toksykologicznych barwnik ten został zatwierdzony przez Komisję Codex Alimentarius. Z kolei pleśnię z gatunku *Penicillium aculeatum* i *P. pinophilum* produkują poliketydowe barwniki azofilne tzw. „*Monascus* – like pigments”. Zaletą produkcji tych barwników jest brak toksyczności dla człowieka oraz fakt, iż produkcji tej nie towarzyszy wydzielanie cytryniny i innych mikotoksyn [23].

Kolejną grupę pigmentów o znaczeniu komercyjnym stanowią naftochinony (rys. 6), które wykazują szeroką paletę barw oraz są rozpuszczalne w wodzie. Nie wymagają chemicznej modyfikacji ani stosowania nośników i stabilizatorów w celu rozpuszczenia się w żywności, co wynika ze struktury chemicznej zbliżonej do struktury barwników roślinnych czy zwierzęcych. Naftochinony znajdują się nawet w tak egzotycznych gatunkach pleśni jak *Cordyceps unilateralis*, który jest patogenem mrówek, a jego spory odżywiają się miękkimi tkankami insekta. *C. unilateralis* produkuje pięć czerwonych barwników pozakomórkowych: erytostominon, deoksyerytostominon, 4-O-metylostominon, epierytostominol, deoksyerytostominol i 3,5,8-trihydroksy-6-metoksy-2-(5-oksoheksa-1,3-dienylo)-1,4-naftochinon (3,5,8-TMON), przy czym szczególnym zainteresowaniem cieszy się ten ostatni, ze względu na niską cytotoxyczność oraz intensywny krwisty kolor. Chemiczna struktura naftochinonów produkowanych przez *C. unilateralis* jest podobna do komercyjnie dostępnych czerwonych barwników takich jak szikonina i alkanina (rys. 6), będących odpowiednio metabolitami korzeni roślin *Alkanna tinctoria* i *Lithospermum erythrorhizon*. Szikonina znajduje szerokie zastosowanie począwszy

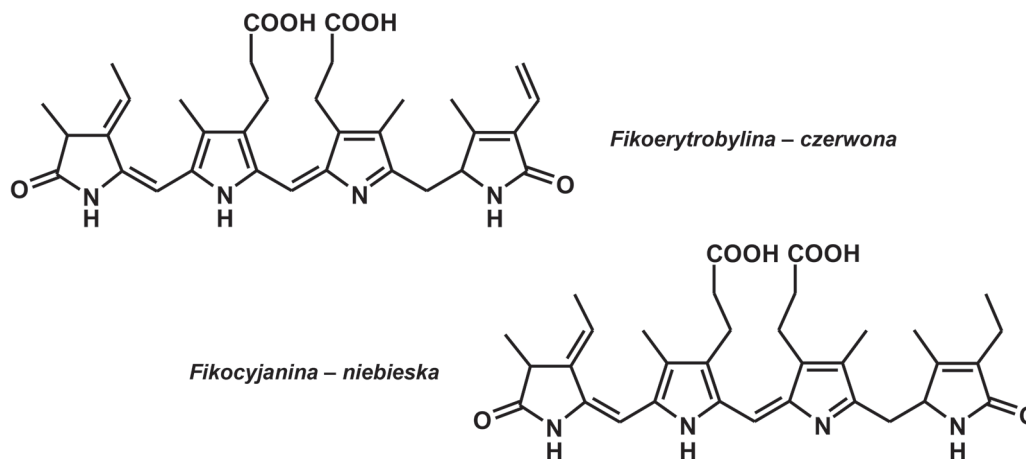
od przemysłu farmaceutycznego jako dodatek o silnym działaniu antybakteryjnym i antymalarycznym poprzez przemysł włókienniczy, kosmetyczny i spożywczy, gdzie może być wykorzystywana w roli barwnika [38].

4.2. Mikroalgi w produkcji barwników

Algi należą do grupy nieunaczynionych organizmów autotroficznych i produkują wiele związków takich jak węglowodany, białka, aminokwasy, witaminy oraz kwasy tłuszczowe [27]. Głównymi pigmentami alg są chlorofile a, b i c, β-karoten, fikocyjanina, ksantofile i fikocytryna. Wszystkie te pigmenty mają dużą szansę na wykorzystanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym. Rosnący popyt na barwniki naturalne, które mogą być stosowane w wymienionych gałęziach przemysłu, stał się powodem szerokich badań nad tymi organizmami. W 2007 roku szacowano roczną produkcję alg na 5000 ton suchej masy. Największym zainteresowaniem cieszą się: *Spirulina* produkująca niebieską fikocyjaninę, *Dunaliella* syntetyzująca β-karoten oraz rodzaj *Haematococcus* wytwarzający czerwoną astaksantynę [8,29].

Karotenoidy są obecne w chloroplastach alg w postaci złożonej mieszaniny charakterystycznej dla każdej z ich klas. Na przykład, czerwona alga *Rhodophyta* posiada α i β-karoten oraz ich hydroksylowe pochodne, *Chloromonadophyta* zawiera diadynoksantynę i heteroksantynę, natomiast dla *Chlorophyta* charakterystyczne są acetylenowe pochodne karotenoidów nazywane allokoksantyną, monadoksantyną i krokoksantyną. *Spirulina* akumuluje β-karoten w stężeniach 0,8–1,0% suchej masy, *Haematococcus* 1,5–3%, a *Dunaliella* nawet 14%, co czyni ją największym jego producentem [8,36].

Do rodzaju *Dunaliella* należą gatunki halotolerancyjne, jednokomórkowe, mające wyjątkową budowę morfologiczną oraz specyficzne właściwości fizjologiczne. Gromadzenie dużych ilości β-karotenu następuje głównie w odpowiedzi na duże natężenie światła, w optymalnych warunkach 25–30 luksów. *Dunaliella salina* potrafi wytworzyć nawet 400 mg β-karotenu/m² pola uprawy i może być bezpiecznie używana w przemyśle spożywczym, gdyż posiada status GRAS (ang. Generally Recognized As Safe) [8, 42]. Naturalny β-karoten z alg *Dunaliella* dostępny jest na wielu rynkach pod



Rys. 7. Fikobiliproteiny

trzema postaciami: ekstraktu β -karotenu w postaci emulsji o stężeniach od 1 do 20%, sproszkowanej biomasy alg oraz suszonej biomasy [8, 36].

Czerwona mikroalga z rodzaju *Porphyridium* stanowi źródło związków posiadających wartości odżywcze i terapeutyczne, w tym karotenoidów, głównie zeaksantyny, oraz fluorescencyjnych fikobiliprotein. Fikobiliproteiny należą do pigmentów uczestniczących w fotosyntezie, a gromadzone są w komórkach w postaci fikobilisomów związanych z błoną tylakoidów chloroplastów. Zbudowane są one z chromoforów – bilin, będących podstawionymi tetrapiolami połączonymi z apoproteinami [8] (rys. 7). Czerwona fikobiliproteina – fikoerytryna oraz niebieska fikocyjanina są rozpuszczalne w wodzie i mogą pełnić rolę naturalnych barwników w przemyśle spożywczym, kosmetycznym i farmaceutycznym [6].

Jeden z gatunków z rodzaju *Porphyridium* jest źródłem fluorescencyjnych różowych pigmentów należących do fikobiliprotein, a mianowicie B-fikoerytryny i b-fikoerytryny. Ta różowoczerwona fikoerytryna może być stosowana do nadawania barwy wyrobom cukierkowym, żelatynowym deserom i produktom mlecznym. Ilość wymagana do zabarwienia 1 kg różnych artykułów waha się od 50 do 100 mg/kg. Kolor tego barwnika jest stabilny w 60°C przez 30 minut i posiada długi czas trwania w pH 6–7. Okazał się on także bardzo stabilny w suchych preparatach przechowywanych w warunkach niskiej wilgotności. Oprócz właściwości barwiących, czerwona fikoerytryna wykazuje żółtą fluorescencję, co daje możliwość użycia jej w specjalnych produktach żywnościowych, między innymi w przeźroczystych lizakach, cukierkach, napojach bezalkoholowych i alkoholowych. Omawiany barwnik nie jest jeszcze stosowany w przemyśle spożywczym, pomimo że badania prowadzone na szczurach karmionych suchą masą alg *Porphyridium* nie ujawniły żadnego negatywnego wpływu na ich wzrost czy też histologię [8].

Źródłem niebieskiego barwnika zwanego Marine blue jest mikroalga *Porphyridium aeruginum*. Ten gatu-

nek różni się od innych czerwonych mikroalg brakiem czerwonej fikoerytryny, ekstrakt z komórek *P. aeruginum* jest niebieski [13]. *P. aeruginum* to alga jednokomórkowa, uprawiana w sztucznym lub w słonecznym świetle, w świeżej wodzie bogatej w dwutlenek węgla. Podczas badań nad optymalizacją procesu produkcji wymienionej wyżej niebieskiej fikocyjaniny udało się uzyskać wydajność wynoszącą ponad 60% suchej masy, zaś ilość wymagana do zabarwienia 1 litra napoju wynosiła 140–180 mg. Zaletę pigmentu produkowanego przez *P. aeruginum* stanowi stabilność wobec zmiennego pH oraz światła, natomiast wadę jego termowrażliwość. W pH 4–5 barwnik ten cechuje się stabilnością w temperaturze 60°C przez 40 minut, co jest istotne dla wykorzystania tego związku w przetwórstwie spożywczym. Pomimo swoich właściwości nie produkuje się go na skalę przemysłową, z uwagi na trwające jeszcze testy toksykologiczne [8].

4.3. Bakterie i drożdże jako producenci związków o charakterze barwników

Spośród mikrobiologicznych źródeł barwników bakterie i drożdże cieszą się mniejszym zainteresowaniem naukowców jako potencjalni producenci substancji wykorzystywanych do barwienia żywności w porównaniu z grzybami i algami. Jednak i w tej grupie mikroorganizmów znajduje się wiele gatunków zdolnych do produkcji pigmentów, które mogą pełnić rolę suplementów diety zarówno zwierząt jak i ludzi. W królestwie bakterii gatunkami zdolnymi do syntezy barwników są między innymi *Chromobacterium violaceum*, produkujący wiolocynę (o barwie purpurowo-fioletowej), *Flavobacterium* sp., który produkuje żółtą zeaksantynę z wydajnością do 190 mg/dm³ podłoża hodowlanego [9] czy *Agrobacterium aurantiacum* wytwarzający różowoczerwoną astaksantynę [40, 41]. Ponadto fotosyntetyzujące bakterie *Bradyrhizobium* sp. [21] i halofilne

Halobacterium sp. [3] są producentami ciemnoczerwonej kantaksantyny.

Drożdże produkują przede wszystkim astaksantynę i karotenoidy. Za najlepszego kandydata na komercyjnego producenta astaksantyny uważane są drożdże z gatunku *Xanthophyllomyces dendrorhous* (*Phaffia rhodozyma*), zaś karotenoidy są produkowane przez drożdże z rodzaju *Rhodotorula* [35]. Wydajność takiej syntezy w przypadku dzikich szczepów jest bardzo mała, dlatego w celu jej podniesienia stosuje się modyfikacje warunków hodowli i składu podłoża [31] oraz wykorzystuje techniki inżynierii genetycznej [37].

Bakterie i drożdże, których metabolity nie zawierają substancji barwnych mogą stać się ich producentami w wyniku modyfikacji genetycznych. W ciągu ostatnich kilku lat sklonowano znaczącą liczbę genów kodujących szlaki syntezy karotenoidów *crt* (dotychczas ponad 150 genów kodujących 24 enzymy). Heterologiczna ekspresja większości tych genów sprawiła, że stało się możliwe zaprojektowanie ścieżek biosyntezy karotenoidów w komórkach drożdży i bakterii m.in. *E. coli*, które nie produkują tej grupy związków. Ekspresja określonych kombinacji genów i łączenie ścieżek biosyntezy na poziomie molekularnym zaowocowały syntezą nowych, rzadkich i cennych karotenoidów, które mogą odznaczać się różnorodnością barw [33].

Geny kodujące wczesne enzymy szlaku biosyntezy karotenoidów: syntazę GGDP, syntazę fitoenu i desaturazę fitoenu stanowią ponad połowę wszystkich klonowanych genów *crt*. Przykładem enzymu o dużym znaczeniu w syntezie różnorodnych karotenoidów jest desaturaza fitoenu, która może tworzyć różne ilości podwójnych wiązań w fitoenie. U roślin, cyanobakterii oraz alg powstają dwa wiązania i syntezowany jest ζ -karoten, z kolei u bakterii z rodzaju *Rhodobacter* powstają trzy wiązania tworząc neurosporen. Powstawanie czterech wiązań skutkuje syntezą likopenu (głównie u eubakterii i grzybów), a pięciu wiązań 3,4-hydrolikopenu w komórkach *Neurospora crassa* [12].

Pierwsze eksperymenty mające na celu projektowanie syntezy karotenoidów były prowadzone poprzez usuwanie niektórych genów *crt* z kasety ekspresyjnej na drodze delecji. Takie podejście skutkowało ekspresją całkiem nowych enzymów i syntezą nieoczekiwanych karotenoidów u *Erwinia herbicola* i *Rhodobacter sphaeroides* [15].

Proces modyfikacji genów *crt* bazuje na losowej mutagenezie, rekombinacji i selekcji genów kodujących dane białka. Przykładem tego typu działania mogą być modyfikacje desaturazy fitoenu (*crtI*) i cyklazy likopenu (*crtY*) w kierunku syntezy nowych karotenoidów w komórkach *E. coli*. Oba enzymy odgrywają kluczową rolę na etapie rozgałęzienia ścieżki biosyntezy acyklicznych i cyklicznych karotenoidów. Zmiana specyficzności substratowej produktów genów *crtI* i *crtY*, modyfika-

cja właściwości katalitycznych lub tasowanie genów *crtI* i *crtY*, umożliwia syntezę różnorodnych karotenoidów [2]. Pomimo obiecujących wyników badań związanych z projektowaniem szlaków biosyntezy karotenoidów w *E. coli*, przeszkodą w komercyjnym wykorzystaniu tego gatunku bakterii do produkcji barwników jest fakt posiadania przez nią ograniczonego zasobu podstawowych prekursorów izoprenoidowych potrzebnych do biosyntezy karotenoidów. Poziom produkcji karotenoidów w rekombinowanych komórkach *E. coli* jest niski (10–500 $\mu\text{g/g}$ suchej masy) w porównaniu do komercyjnie wykorzystywanych drobnoustrojów takich jakich *Dunalliella* sp., *Haematococcus* sp. i *X. dendrorhous*, dla których poziom produkcji osiąga nawet 50 mg na gram suchej masy [16].

Ze względu na toksyczne działanie zbyt wysokiego stężenia prekursorów izoprenoidowych na komórki *E. coli* można stwierdzić, że prawdopodobnie maksymalny możliwy poziom produkcji karotenoidów w tej bakterii został już osiągnięty [32]. W przeciwieństwie do bakterii drożdże są zdolne do akumulowania dużych ilości izoprenoidowych pochodnych ergosterolu. Biosynteza ergosteroli w niekarotenoidowych drożdżach *Saccharomyces cerevisiae* i *Candida utilis* z sukcesem została skierowana w stronę produkcji karotenoidów [25]. Nadekspresja reduktazy 3-hydroksymetyloglutarylo koenzymu A i blokada syntezy ergosteroli spowodowała nadprodukcję likopenu w komórkach *C. utilis* (7,8 mg/g suchej masy) [34].

Pomyślne rezultaty składania genów *crt* i projektowania nowych ścieżek syntezy na poziomie molekularnym poszerzyło możliwości produkcji strukturalnie odmiennych karotenoidów. Ostatnie dokonania inżynierii genetycznej powinny pozwolić na produkcję nowych karotenoidów, znajdujących zastosowanie w przemyśle spożywczym, farmaceutycznym i kosmetycznym oraz medycynie.

5. Podsumowanie

Procesy pozyskiwania pigmentów pochodzenia naturalnego oparte na ekstrakcji są mało wydajne i wymagają dużego nakładu surowca, a co za tym idzie są kosztowne i nieoptymalne. Otrzymane w ten sposób barwniki wykazują małą odporność na działanie takich czynników środowiska jak i zmienne pH, temperatura, natlenienie czy działanie światła słonecznego. Aspekty te w znaczący sposób obniżają możliwości stosowania barwników naturalnych w przemyśle spożywczym. Alternatywę dla tych związków stanowią barwniki sztuczne czyli związki azowe, charakteryzujące się znacznie większą intensywnością kolorów i trwałością, a ich synteza jest prosta i tania. Okazuje się jednak, że substancje te w procesach *in vitro* ulegają redukcji do amin aromatycznych, co jest

zjawiskiem niekorzystnym z powodu wzrostu toksyczności powstających związków. Pomimo, że wszystkie związki azowe stosowane w przemyśle spożywczym zawierają grupy sulfonowe, zwiększające ich rozpuszczalność w wodzie i tym samym ułatwiające usunięcie ich samych lub ich metabolitów z organizmu, to niektóre z nich (np. tartrazyna) mogą powodować alergie lub wykazywać działanie kancerogenne. Dlatego zasadnym wydają się dalsze badania nad mikrobiologicznymi producentami barwników, cechujących się wysoką wydajnością syntezy związków o porównywalnej do pigmentów syntetycznych stabilnością. Ponadto duże możliwości niosą ze sobą modyfikacje genetyczne takie jak np. tasowanie genów *crt* i projektowanie nowych ścieżek syntezy na poziomie molekularnym, stwarzające nowe możliwości produkcji strukturalnie odmiennych karotenoidów. Być może rozwój metod mikrobiologicznych opartych na inżynierii genetycznej lub badania dotychczas niepoznanych, potencjalnych źródeł substancji barwiących przyniosą w przyszłości rozwiązanie problemów, z jakimi spotykają się technologowie i spowoduje całkowite wyparcie z rynku barwników sztucznych na rzecz barwników pochodzenia mikrobiologicznego, których różnorodność jest wciąż godna zainteresowania mikrobiologów, biochemików oraz genetyków.

Piśmiennictwo

- Adrio J.L., Demain A.L.: Fungal biotechnology. *Ind. Microbiol.* **6**, 191–199 (2003)
- Arnold F.H., Volkov A.: Directed evolution of biocatalysts. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **3**, 54–59 (1999)
- Asker D., Ohta Y.: Production of canthaxanthin by extremely halophilic bacteria. *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 617–621 (1999)
- Baker R.A., Tatum J.H.: Novel anthraquinones from stationary cultures of *Fusarium oxysporum*. *J. Ferment Bioeng.* **85**, 359–361 (1998)
- Butler M.J., Day A.W.: Fungal melanins: a review. *Can. J. Microbiol.* **44**, 1115–1136 (1998)
- Cohen Z.: Products from microalgae. Handbook for Microalgal Mass Cultur. In: Richmond, A.(Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL., USA, 1986, s. 421–454
- Delgado-Vargas F., Peredes-Lopez O.: Colorants for Food and Nutraceutical Uses. CRP Press LLC, 2003, s. 70–85, 149–151
- Dufosse L., Galaup P., Yaron A., Arad M., Blanc P., Kotamballi N., Murthy C., Ravishankar G.A.: Microorganisms and microalgae as sources of pigments for food use: a scientific oddity or an industrial reality? *Trends Food Sci. Technol.* **16**, 389–406 (2005)
- Dufossé L.: Microbial Production of Food Grade Pigments. *Food Technol. Biotechnol.* **44** (3), 313–321 (2006)
- Duran N., Tixeira M.F.S., de Conti R., Esposito E.: Ecological-friendly pigments from fungi. *Crit. Rev. Food Sci. Nutrition*, **42**, 53–66 (2002)
- Firn R.D., Jones C.G.: Natural products – a simple model to explain chemical diversity. *Nat. Prod. Rep.* **20**, 382–391 (2003)
- Garcia-Asua G., Lang H.P., Cogdell R.J., Hunter C.N.: Carotenoid diversity: a modular role for the phytoene desaturase step. *Trends Plant Sci.* **3**, 445–449 (1998)
- Glazer, A.N.: Phycobiliproteins. Chemicals from microalgae, Taylor and Francis, New York, 1999, s. 261–280
- Hendry G.A.F., Houghton J.D.: Natural food colorants, Blackie Academic & Professional, II ed., 1996, s. 135–139, 146–154
- Hunter C.N., Hundle B.S., Hearst J.E., Lang H.P., Gardiner A.T., Takaichi S., Cogdell R.J.: Introduction of new carotenoids into the bacterial photosynthetic apparatus by combining the carotenoid biosynthetic pathways of *Erwinia herbicola* and *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Bacteriol.* **176**, 3692–3697 (1994)
- Johnson E.A., Schroeder W.A.: Microbial carotenoids. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* **53**, 119–178 (1995)
- Jongrungruangchok S., Kittakoop P., Yongsmith B., Bavovada R., Tanasupawat S., Lartpornmatulee N., Thebtaranonth Y.: Azaphilone pigments from a yellow mutant of the fungus *Monascus kaoliang*. *Phytochemistry*, **65**, 2569–2575 (2004)
- Langfelder K., Streibel M., Jahn B., Haase G., Brakhage A.: Biosynthesis of fungal melanins and their importance for human pathogenic fungi. *Fungal Genet. Biol.* **38**, 143–158 (2003)
- Liu B.H., Wu T.S., Su M.C., Chung C.P., Yu F.Y.: Evaluation of citrinin occurrence and cytotoxicity in monascus fermentation products. *J. Agricult. Food Chem.* **53**, 170–175 (2005)
- López-Nieto M.J., Costa J., Peiro E., Méndez E., Rodríguez-Sáiz M., de la Fuente J.L., Cabri W., Barredo J.L.: Biotechnological lycopene production by mated fermentation of *Blakeslea trispora*. *Appl. Microbiol. Biotech.* **66**, 153–159 (2004)
- Lorquin J., Molouba F., Dreyfus B.L.: Identification of the carotenoid pigment canthaxanthin from photosynthetic *Bradyrhizobium* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 1151–1154 (1997)
- Mapari S., Nielsen K., Larsen T., Frisvad J., Meyer A., Thrane U.: Exploring fungal biodiversity for the production of water-soluble pigments as potential natural food colorants. *Curr. Opin. Biotech.* **16**, 231–238 (2005)
- Mapari S.A.S., Thrane U., Meyer A.S.: Fungal polyketide azaphilone pigments as future natural food colorants? *Trends Biotech.* **28**, 300–307 (2010)
- Medenstev A.G., Akimenko V.K.: Naphthoquinone metabolites of the fungi. *Phytochemistry*, **47**, 935–959 (1998)
- Misawa N., Shimada H.: Metabolic engineering for the production of carotenoids in non-carotenogenic bacteria and yeasts. *J. Biotechnol.* **59**, 169–181 (1998)
- Mukherjee G., Singh S.K.: Purification and characterization of a new red pigment from *Monascus purpureus* in submerged fermentation. *Process Biochem.* **46**, 188–192 (2011)
- Perez-Garcia O., Escalante F.M.A., de-Bashan L.E., Bashan Y.: Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Res.* **45**, 11–36 (2011)
- Pitt J.L.: The Genus *Penicillium* and its Teleomorphic States, *Eupenicillium* and *Talaromyces*. Academic Press, London, UK, 1979
- Raja R., Hemaiswarya S., Rengasamy R.: Exploitation of *Dunaliella* for β -karoten production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **74**, 517–523 (2007)
- Rutkowski A., Gwiazda S., Dąbrowski K.: Dodatki funkcjonalne do żywności, Agro & Ford Technology, Katowice, 1993, s. 205–215
- Sakaki H., Nakanishi T., Satonaka K.Y., Miki W., Fujita T., Komemushi S., Properties of a high-torularhodin mutant of *Rhodotorula glutinis* cultivated under oxidative stress. *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 203–205 (2000)
- Sandmann G., Albrecht M., Schnurr G., Knörzer O.: The biotechnological potential and design of novel carotenoids by gene combination in *Escherichia coli*. *Tibtech.* **17**, 233–137 (1999)
- Sandmann G.: Genetic manipulation of carotenoid biosynthesis: strategies, problems and achievements. *Trends Plant Sci.* **6**, 14–17 (2001)

34. Shimada H., Kondo K., Fraser P., Miura Y., Saito T., Misawa N.: Increased carotenoid production by the food yeast *Candida utilis* through metabolic engineering of the isoprenoid pathway. *Appl. Environment. Microbiol.* **64**, 2676–2680 (1998)
35. Simova E.D., Frengova G.I., Beshkova D.M.: Synthesis of carotenoids by *Rhodotorula rubra* GED8 co-cultured with yogurt starter cultures in whey ultrafiltrates. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **31**, 115–121 (2004)
36. Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran D., Isambert A.: Commercial Applications of Microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **101**, 87–96 (2006)
37. Tinoi J., Rakariyatham N., Deming R.L.: Simplex optimization of carotenoid production by *Rhodotorula glutinis* using hydrolyzed mung bean waste flour as substrate. *Process Biochem.* **40**, 2551–2557 (2005)
38. Unagul P., Wongsap P., Kittakoop P., Intamas S., Srikitikulchai P., Tanticharoen M.: Production of red pigments by the insect pathogenic fungus *Cordyceps unilateralis* BCC 1869. *Soc. Ind. Microbiol.* **32**, 135–140 (2005)
39. Vidyalakshim R., Paranthaman R., Muruges S., Singaravadi K.: Microbial Bioconversion of Rice Broken to Food Grade Pigments. *Global J. Biotech. Biochem.* **2**, 84–87 (2009)
40. Yokoyama A., Adachi K., Shizuri Y.: New carotenoid glucosides, astaxanthin glucoside and adonixanthin-producing glucoside, isolated from the astaxanthin – producing marine bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *J. Nat. Prod.* **58**, 1929–1933 (1995)
41. Yokoyama A., Miki W.: Composition and presumed biosynthetic pathway of carotenoids in the astaxanthin – producing bacterium *Agrobacterium aurantiacum*. *FEMS Microbiol. Lett.* **128**, 136–144 (1995)
42. Zhi-Wei Y., Jian-Guo J., Guang-Hong W.: Biosynthesis and regulation of carotenoids in *Dunaliella*: Progresses and prospects. *Biotech. Adv.* **26**, 352–360 (2008)
43. www.Foodnavigator-usa.com
44. www.Leatherheadfood.com
45. www.Organic-chemistry.org
46. www.Patentstorm.us/patents/6340586