

Természetes aromaanyagok biokatalitikus előállítása

Biocatalytic Production of Natural Flavour Compounds

SZ. NÉMETH Ágnes¹, SZ. MÁRCZY Judit, SAMU Zsuzsa², HÁGER-VERESS Ádám²,
Dr. SZAJÁNI Béla, Dr. SISAK Csaba¹

¹Pannon Egyetem, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, H-8200 Veszprém, Egyetem u. 2., Magyarország
Tel.: +36 88 624040, Fax: +36 88 624038, e-mail: szemes@mukki.richem.hu, www.richem.hu/rice/new/

²Aroma Bázis Kft., H-2141 Csömör-lparterület, Határ u. 1., Magyarország

ABSTRACT

Soybean lipoxygenase was used to produce 13-hydroperoxy-octadecadienoic- and 13-hydroperoxy-octadecatrienoic acid from hydrolysed sunflower- and linseed oil with yields of 72 % and 62 %, respectively. Then 13-hydroperoxy-octadecadienoic- and 13-hydroperoxy-octadecatrienoic acid were cleaved by spinach leaf and green bell pepper hydroperoxide lyase enzymes resulting hexanal (yield: 54 %), 3(Z)- and 2(E)-hexenal (yield: 37 %). The aldehydes were isolated by steam distillation.

1. BEVEZETÉS

Az élelmiszer- és kozmetikai ipar részéről folyamatosan növekszik az igény az aroma- és illatanyagok iránt. A természetes aromák világszerte növekvő piacából a kilencvenes években kb. 20 – 40 millió USD/év értéket képviselt a gyümölcskészítmények „zöld” aromája [1]. Ennek fő összetevői illékony aldehidek – hexanal, *cisz*-3-hexenal és *transz*-2-hexenal. Ezek a hat szénatomos aldehidek előállíthatók növényekből történő extrakcióval, fermentációval, vagy biokatalitikus úton. Az ép növényi sejtekben csak nyomnyi mennyiségben fordulnak elő, 18 szénatomos telítetlen zsírsavakból keletkeznek két lépésben, abban az esetben, amikor a sejtstruktúrák megsérülnek, és a sejt tartalmát oxigén éri [2]. A bioszintézis első lépése, amelyet a lipoxigenáz-1 izoenzim (Lox-1, linoleát:oxigén oxidoreduktáz, EC 1.13.11.12) katalizál, a zsírsavak hidroperoxidációja. A második lépésben a zsírsavak hidroperoxidjai a hidroperoxid liáz enzim hatására egy aldehiddé és egy oxosavvá hasadnak.

A növényekben a hexanal linolsavból (*cisz*-9,*cisz*-12-oktadekadiénsav), a hexenal izomerek pedig linolénsavból (*cisz*-9,*cisz*-12,*cisz*-15-oktadekatriénsav) képződnek. A hidroperoxidáció során a linolsavból 13-hidroperoxi-*cisz*-9,*transz*-11-oktadekadiénsav (a továbbiakban 13-HPOD), a linolénsavból pedig 13-hidroperoxi-*cisz*-9,*transz*-11,*cisz*-15-oktadekatriénsav (a továbbiakban 13-HPOT) keletkezik [3,4]. Ezeknek a reakcióknak a ko-szubsztrátja a molekuláris oxigén. A második lépésben a 13-HPOD hexanallá és 12-oxo-*cisz*-9-dodekénsavvá, míg a 13-HPOT *cisz*-3-hexenallá és 12-oxo-*cisz*-9-dodekénsavvá hasad [5]. A *cisz*-3-hexenal nem stabil és hő- vagy enzimikus hatásra könnyen izomerizálódik *transz*-2-hexenallá [6].

Munkánk célja az volt, hogy – a növényekben lejátszódó bioszintézist alapul véve – az iparban alkalmazható eljárást dolgozzunk ki a hexanal, valamint a hexenal izomerek előállítására. Kiindulási anyagként olcsó ipari nyersanyagokat (napraforgóolaj és lenolaj hidrolizátumot), biokatalizátorként pedig növényekből kivont lipoxigenáz és hidroperoxid liáz enzimeket alkalmaztunk.

2. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

2.1. Anyagok

A szójalisztet a szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht.-től kaptuk, a linolsavat, a linolénsavat és a Tween 20-at a Sigma-tól, a napraforgóolajat és a lenolajat az Aldrich-től szereztük be. A paraj levelet és a zöldpaprikát a helyi piacon vásároltuk. Az összes többi felhasznált vegyszer analitikai minőségű volt. A lipoxigenáz aktivitás méréséhez használt nátrium-linoleátot Axelrod és munkatársai [7] módszere szerint készítettük el.

2.2. Módszerek

2.2.1. Az enzimaktivitások meghatározása

A lipoxigenáz aktivitásának mérését Axelrod és munkatársai [7] Márczy és munkatársai [8] által módosított módszere szerint végeztük úgy, hogy 234 nm-es hullámhosszon mértük a képződő konjugált dién elnyelését. A hidroperoxid liáz aktivitásának mérésénél a konjugált dién fogyását követtük 234 nm-en [9]. A mérésekhez Biochrom 4060 spektrofotométert használtunk (Pharmacia, Uppsala, Svédország). 1 U az az enzimmenyiség, amely 1 μmol szubsztrátot alakít át percenként.

2.2.2. A napraforgó- és a lenolaj hidrolízise

1 kg olajat 500 cm^3 40 %-os nátrium-hidroxid oldattal 100 – 120 °C-on 1 óráig kevertettünk. Ezután az elegyhez 3 dm^3 desztillált vizet adtunk, és 40 °C-ra hűtöttük. Az elegyhez folyamatos keverés mellett 600 g 96 %-os kénsavat adagoltunk, és 30 °C-ra hűtöttük. A fázisokat elválasztottuk, és a zsírsavakat tartalmazó felső fázist desztillált vízzel mostuk. Ezután vákuumban (60 Hgmm) a vizet lepároltuk róla, és vízmentes nátrium-szulfát felett szárítottuk.

Gázkromatográfiás vizsgálataink szerint az így nyert napraforgóolaj hidrolizátum 66 % linolsavat, 20 % olajsavat és 11 % egyéb, telített zsírsavat, a lenolaj hidrolizátum pedig 56 % linolénsavat, 16 % linolsavat, 18 % olajsavat és 10 % egyéb, telített zsírsavat tartalmazott.

2.2.3. A zsírsav-hidroperoxidok koncentrációjának meghatározása

A 13-HPOD koncentrációját Weber és munkatársai szerint [10], ferrometriásan határoztuk meg. A módszer azon alapul, hogy a 13-HPOD a Fe(II) iont Fe(III) ionná oxidálja. Ebből KSCN hozzáadására $\text{Fe}(\text{SCN})_3$ képződik, melynek koncentrációja 480 nm-en fotometriásan mérhető.

A 13-HPOT koncentrációját HPLC módszerrel mértük UV detektort használva 234 nm-en. A minták elúcióját izokratikusan, tetrahidrofurán/metanol/víz/ecetsav eleggyel (25:30:45:0,1) végeztük, 1 ml/perc átfolyási sebességgel.

2.2.4. Gázkromatográfiás mérések

A napraforgó- és a lenolaj hidrolizátum zsírsav összetételének analízise, valamint a hexanal, a *cisz*-3-hexenal és a *transz*-2-hexenal koncentrációjának meghatározása gázkromatográfiásan történt, egy lángionizátorral ellátott HP 5890 Series II. gázkromatográf (Hewlett Packard) segítségével. Vivőgázként nitrogént használtunk. A csúcsok alatti területet és a koncentrációkat HP 3394A integrátor (Hewlett Packard) segítségével számítottuk.

A zsírsavak azonosításához HP-FFAB (crosslinked FFAB) típusú oszlopot (30 m x 0,53 mm x 1,0 μm , Hewlett Packard) alkalmaztunk. Az injektor és a detektor hőmérséklete 250 °C, a kolonnatér hőmérséklete 220 °C, a nitrogén nyomása 70 kPa volt. Ezen körülmények között az olajsav retenciós ideje 9,2 perc, a linolsavé 10,7 perc, a linolénsavé pedig 13,0 perc.

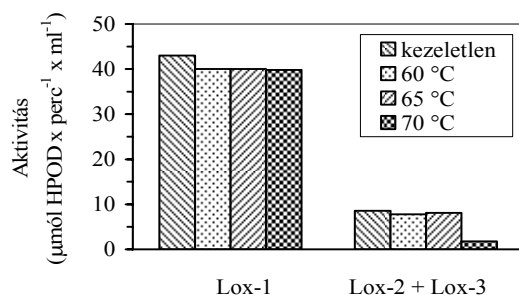
A hexanal koncentrációjának méréséhez PERMABOND OV-1701-DF-0,50 oszlopot (25 m x 0,32 mm, Macherey-Nagel) alkalmaztunk, a kolonnatér hőmérséklete 80 °C, az injektoré 220 °C, a detektoré 250 °C volt. A nitrogén nyomása 76 kPa volt. Ezen körülmények között a hexanal retenciós ideje 4,4 perc.

A hexanal, a *cisz*-3-hexenal és *transz*-2-hexenal elválasztása OPTIMA 1701 oszlopon (25 m x 0,32 mm x 0,5 μm) történt. A programozott hőmérséklet 50 °C-tól (10 perc) 80 °C-ig, 5 °C/perc sebességgel változott, a mintákat 80 °C-on 4 percig tartottuk. Ezen körülmények között a *cisz*-3-hexenal retenciós ideje 6,1 perc, a *transz*-2-hexenalé 10,1 perc, a hexanalé pedig 5,8 perc.

3. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

3.1. A lipoxigenáz enzim kinyerése

A lipoxigenáz enzim legnagyobb mennyiségben a szójalisztben fordul elő, melyből extrakcióval könnyen kinyerhető. A szójakivonatban három lipoxigenáz izoenzim van jelen (Lox-1, Lox-2 és Lox-3) amelyek szubsztrát- és termékspecifitásukban, pH optimumukban és hőérzékenységükben különböznek egymástól [7, 11]. A 13-HPOD és a 13-HPOT előállításánál a Lox-2 és Lox-3 izoenzim jelenléte hátrányos, mivel mellékreakciókat katalizálnak. Ezért – kihasználva az izoenzim eltérő hőérzékenységét – kidolgoztunk egy egyszerű hőkezelési módszert a nemkívánatos izoenzim eltávolítására [12]. Vizsgáltuk a pH, az ionerősség, a hőkezelési idő és a hőmérséklet hatását. A legjobb eredményt az enyhén savas (pH 5 körül) közegben, alacsony ionerősségnél 5 percig végzett hőkezelések adták. Az 1. ábrán az optimális hőkezelési hőmérséklet meghatározását mutatjuk be.



1. ábra

A hőkezelési hőmérséklet kiválasztása

Látható, hogy a 70 °C-on végzett hőkezelésnél a Lox-2 és Lox-3 izoenzimek aktivitása lecsökkent anélkül, hogy a Lox-1 izoenzim inaktiválódott volna, míg ennél alacsonyabb hőmérsékleten mindhárom izoenzim stabilnak bizonyult. Az így nyert, lipoxigenáz-1 izoenzimből dúsított szójakivonattal végeztük mind a linolsav, mind pedig a linolénsav hidroperoxidációját.

3.2. A linolsav hidroperoxidációja

Az optimalizálási kísérletek során tiszta linolsav szubsztrát alkalmazásával, 20 ml-es térfogatban vizsgáltuk a szubsztrát- és enzimkoncentráció, valamint az oxigénellátottság hatását. A reakciókat pH 9-en, 4 °C-on végeztük. A legjobb eredményt 100 mmól/l szubsztrátkoncentráció és 12 U/ml enzimkoncentráció alkalmazásával érték el, miközben a szükséges oxigént tiszta oxigénnel, 2 bar nyomáson biztosítottuk (1. táblázat).

1. táblázat

Az oxigénellátás módjának hatása a linolsav hidroperoxidációjának hozamára

| Oxigénbevitel módja | Kiindulási anyag | Enzimkoncentráció (U/ml) | Hozam (%) |
|----------------------------|-----------------------------|--------------------------|------------|
| oxigén, 2 bar | linolsav | 12 | 82,5 ± 4,2 |
| sűrített levegő, 2 bar | linolsav | 12 | 58,2 ± 5,4 |
| sűrített levegő, 2 bar | linolsav | 5 | 77,2 ± 8,3 |
| sűrített levegő, rávezetés | linolsav | 5 | 70,7 ± 5,4 |
| sűrített levegő, rávezetés | napraforgóolaj hidrolizátum | 5 | 68,1 ± 7,2 |

Biztonságtechnikai megfontolások szükségessé tették azonban az oxigénnek levegővel történő helyettesítését, és azt, hogy lehetőleg ne alkalmazzunk túlnyomást a reakció során. Mint az 1. táblázatban feltüntetett adatokból látható, amikor az oxigén helyett sűrített levegőt alkalmaztunk, a hozam jelentősen csökkent. Feltételezésünk szerint ez az elégtelen oxigénellátás miatt lejátszódó mellékreakciók következménye volt, ezért az enzim mennyiségének csökkentésével lassítottuk a reakciót. Ekkor a hozam valóban megnőtt, bár nem érte el a tiszta oxigénnel végzett reakció hozamát. Ennek ellenére a levegő alkalmazása mellett döntöttünk, hiszen üzemi körülmények között ez sokkal biztonságosabb. A nyomás helyett sűrített levegő rávezetéssel végzett reakciók hozama kissé alacsonyabb volt.

Ezután megvizsgáltuk, helyettesíthető-e a linolsav a jóval olcsóbb napraforgóolaj hidrolizátummal, amely kb. 67 % linolsavat tartalmaz, olajsav és különböző telített zsírsavak mellett. Napraforgóolaj hidrolizátumból kiindulva a hozam gyakorlatilag ugyanannyi volt, mint tiszta linolénsav esetén, gazdasági szempontból tehát nyilvánvalóan előnyösebb a napraforgóolaj alkalmazása. A méretnövelést már napraforgóolaj hidrolizátum felhasználásával végeztük, az 500 ml-es térfogatú reakciók átlagos hozama 72 % volt.

3.3. A linolénsav hidroperoxidációja

Az enzim- és a szubsztrátkoncentráció hatásának vizsgálatát lenolaj hidrolizátumból kiindulva, 10 ml-es reakciókkal végeztük, pH 9-en, 4 °C-on (2. táblázat). Mint az a táblázat adataiból látható, az enzimmennyiség növelése valamelyest növelte az elért hozamot, így a méretnövelést 100 mmól/l linolsav- és 7,5 U/ml enzim-koncentráció alkalmazásával végeztük el. A méretnövelt, 500 ml térfogatú reakciók átlagos hozama 62 % volt.

2. táblázat

Az enzim- és a szubsztrátkoncentráció hatása a linolénsav hidroperoxidációjára

| Enzimkoncentráció (U/ml) | Linolénsav koncentráció (mmól/l) | Hozam (%) |
|--------------------------|----------------------------------|------------|
| 2,5 | 75 | 58,8 ± 3,8 |
| | 100 | 48,9 ± 2,0 |
| 5,0 | 75 | 65,7 ± 1,1 |
| | 100 | 55,8 ± 0,7 |
| 7,5 | 75 | 66,1 ± 1,3 |
| | 100 | 63,0 ± 2,0 |
| 10,0 | 75 | 54,1 ± 0,9 |
| | 100 | 55,4 ± 1,0 |

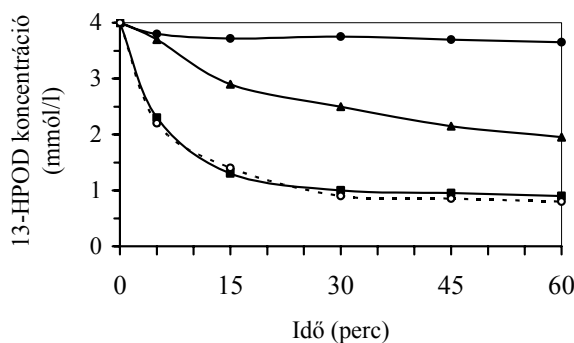
3.4. A hidroperoxid liáz enzim kinyerése

Az aldehidek előállításának második lépését katalizáló hidroperoxid liáz enzim levelekben, gyümölcsökben és zöldségekben fordul elő nagyobb mennyiségben, levelekben a kloroplasztok, zöldségekben és gyümölcsökben pedig egyéb sejtalkotórészek membránjaihoz kötött formában. Érzékeny enzim, a membránról leoldva könnyen inaktiválódik, kinyerése ezért lényegesen nehezebb, mint a lipoxigenázé.

A zsírsav-hidroperoxidok hasításához szükséges liázt többféle növényből próbáltuk kinyerni. A 13-HPOD hasítására a paraj levélből, membránkötött formában kinyert hidroperoxid liáz bizonyult a legalkalmasabbnak. Ez lényegében törött és ép kloroplasztokat tartalmazó szuszpenzió, amelyet úgy készítettünk, hogy a 0,02 M nátrium-foszfát pufferben homogenizált paraj levelekből centrifugálással kinyertük, majd kis mennyiségű pufferben felszuszpendáltuk a kloroplasztokat. A 13-HPOT hasításához alkalmazható enzimet pedig zöldpaprikából nyertük ki, szintén membránkötött formában úgy, hogy az elhomogenizált sejtalkotórészek membránjait kalcium-kloriddal kicsaptuk, majd centrifugálás után kevés pufferoldatban felszuszpendáltuk.

3.5. A 13-HPOD hasítása

A hasítás időbeli lefolyását 4 mmól/l szubsztrátkoncentrációval, különböző mennyiségű enzimmel, pH 9,0-en, 25 °C-on, 4 ml-es reakciókkal vizsgáltuk (2. ábra). Mint az ábrán látható, 0,375 U/ml – vagy nagyobb – enzimmennyiség esetén a hasítás kb. 30 perc alatt lejár, a megmaradt szubsztrát több enzim alkalmazásakor sem alakul át. Ezután megpróbáltuk növelni a szubsztrátkoncentrációt változatlan enzimmennyiség mellett, de ez jelentősen csökkentette a hozamot, amint azt a 3. táblázatban feltüntetett adatok mutatják. Ahhoz, hogy megfelelő hozamot tudjunk elérni, a szubsztrátkoncentráció növelésével együtt az enzimmennyiséget is arányosan növelnünk kellett.



2. ábra

A 13-HPOD hasításának időbeli lefolyása különböző enzimmennyiségek esetén
Jelölések: ● 0,125 U/ml, ▲ 0,25 U/ml, ■ 0,375 U/ml, ○ 0,5 U/ml enzimmennyiség

3. táblázat

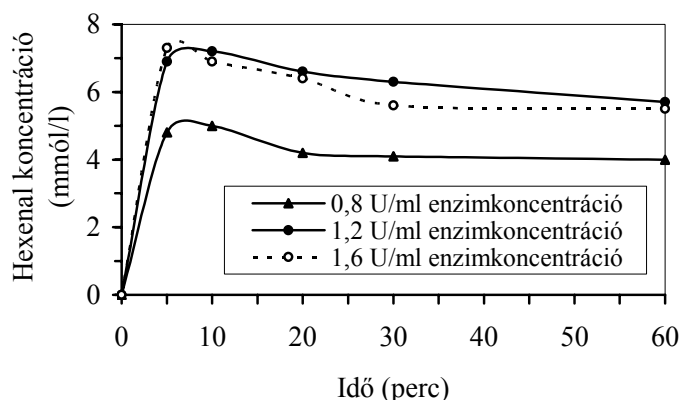
A szubsztrátkoncentráció növelésének hatása a 13-HPOD hasításának hozamára

| 13-HPOD koncentráció (mmól/l) | Enzimkoncentráció (U/mL) | Hozam (%) |
|-------------------------------|--------------------------|-------------|
| 4 | 0,375 | 84,6 ± 9,8 |
| 7 | 0,375 | 39,7 ± 4,2 |
| 7 | 0,658 | 87,7 ± 6,3 |
| 10 | 0,934 | 71,0 ± 4,3 |
| 12 | 1,125 | 73,2 ± 8,7 |
| 15 | 1,408 | 81,0 ± 12,0 |

Amikor 13-HPOD helyett a napraforgóolaj hidrolizátum hidroperoxidációs reakcióegyét használtuk kiindulási anyagként, a hozam 55%-ra csökkent. Ennek oka valószínűleg az, hogy a napraforgóolaj hidrolizátumban jelenlevő egyéb zsírsavak gátolják a hidroperoxid liáz enzimet. Ennek ellenére indokolt a napraforgóolaj hidrolizátum használata, mivel sokkal olcsóbb. A méretnövelés már nem befolyásolta a hasítási reakció hozamát, az 500 ml-es reakciók átlagos hozama 54 % volt.

3.6. A 13-HPOT hasítása

A 13-HPOT hasításának időbeli lefolyását 15 mmól/l szubsztrátkoncentráció mellett, különböző mennyiségű enzim alkalmazásával, pH 7-en, 25 °C-on vizsgáltuk. Azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy a keletkezett hexenal koncentrációja a tizedik percben a legmagasabb, majd ezután folyamatosan csökken (3. ábra).



3. ábra

A 13-HPOT hasításának időbeli lefolyása

Ebből arra következtettünk, hogy az enzimkivonatban egy számunkra hátrányos, a terméket tovább alakító enzim is jelen van, amelyet megpróbáltunk egyszerű módon (ammónium szulfátos frakcionálással ill. ioncserélő kromatográfiával) eltávolítani, de ez nem sikerült. A nemkívánatos enzim jelenlétével tehát számolnunk kellett, és ennek figyelembevételével az optimális reakcióidőt tíz percben határoztuk meg.

A hasítási reakció optimális szubsztrát- és enzimkoncentrációjának meghatározásához kiindulási anyagként lenolaj hidrolizátum hidroperoxidációs reakcióegyét alkalmaztuk (4. táblázat).

4. táblázat

A 13-HPOT hasításának optimalizálása

| Enzimkoncentráció (U/ml) | 13-HPOT koncentráció (mmól/l) | Hexenal koncentráció (mmól/l) | Hozam (%) |
|-----------------------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------|
| 0,4 | 10 | 5,6 ± 0,9 | 56,0 |
| | 15 | 6,2 ± 1,5 | 41,3 |
| | 20 | 5,6 ± 1,4 | 28,0 |
| 1,2 | 10 | 6,8 ± 0,6 | 68,0 |
| | 15 | 8,7 ± 1,1 | 58,0 |
| | 20 | 8,8 ± 0,9 | 44,0 |
| 2,0 | 10 | 6,1 ± 0,2 | 61,0 |
| | 15 | 8,5 ± 1,4 | 56,7 |
| | 20 | 9,5 ± 1,0 | 47,5 |

Mint látható, a szubsztrátkoncentráció növelésével a hozam mindhárom vizsgált enzimkoncentráció esetén csökkent. A méretnöveléshez az 1,2 U/ml enzimkoncentrációt és a 15 mmól/l szubsztrátkoncentrációt választottuk ki, tekintve, hogy ezek alkalmazásával viszonylag magas hexenal koncentráció érhető el és még a hozam is elfogadható. A méretnövelés hatására a hozam jelentősen csökkent, az 500 ml-es reakciók átlagos hozama 37 % volt.

3.7. Az aldehidek kinyerése a reakcióelegyből

A hasítási reakciókban keletkezett aldehideket a reakcióelegyből vízgőzdesztillációval nyertük ki, amit megkönnyített az, hogy vízzel viszonylag alacsony forráspontú azeotróp elegyet képeznek. A hexanal forráspontja 131 °C, azeotrópja, melynek forráspontja 90,6 °C, 75 % hexanalt tartalmaz, míg a *transz*-2-hexenal forráspontja 147 °C, azeotrópja 51,4 % *transz*-2-hexanalt tartalmaz és forráspontja 91,5 °C [13]. Laboratóriumi méretben nem tudtuk egy desztillálási lépésben külön fázisban kinyerni az aldehideket, ehhez ismételt vízgőzdesztillációkra volt szükség.

A kinyert hexenal 77 %-os tisztaságú volt. Az ismételt vízgőzdesztillációk során a *cisz*-3-hexenal nagy része *transz*-2-hexenallá izomerizálódott. Míg a 13-HPOT hasítási reakcióelegye 16 % *transz*-2- és 72 % *cisz*-3-hexenalt tartalmazott, a külön fázisban kapott nyers termékben 78,6 % volt a *transz*-2- és 10,0 % a *cisz*-3-hexenal.

IRODALOM

- [1] Whitehead, I. M., Muller, B. L., Dean, C. *Cereal Foods World* 1995, **40**, 193-197.
- [2] Drawert, F., Tressl R., Heimann, W., Emberger, R., Speck, M. *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.* 1973, **2**, 10-22.
- [3] Galliard, T., Matthew, J. A., Wright, A. J., Fishwick, M. J. *J. Sci. Food Agric.* 1977, **28**, 863-868.
- [4] Axelrod, B. *Food Related Enzymes*, Whitaker, J. R., Ed., ACS, Washington, 1974, pp 324-348.
- [5] Kim, I. S., Grosch, W. *J. Agric. Food Chem.* 1981, **29**, 1220-1225.
- [6] Stone, E. J., Hall, R. M., Kazeniak, S. J. *J. Food Sci.* 1975, **40**, 1138-1141.
- [7] Axelrod, B., Cheesbrough, T. M., Laakso, S. *Methods Enzymol.* 1981, **71**, 441-451.
- [8] Márczy, J. Sz., Simon, M. L., Mózsik, L., Szajáni, B. *J. Agric. Food Chem.* 1995, **43**, 313-315.
- [9] Zimmerman, D. C., Vick, B. A. *Plant Physiol.* 1970, **46**, 445-453.
- [10] Weber, F., Laskawy, G., Grosch, W. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* 1974, **155**, 142-150.
- [11] Matoba, T., Hidaka, H., Narita, H., Kitamura, K., Kaizuma, N., Kito, M. *J. Agric. Food Chem.* 1985, **33**, 852-855.
- [12] Németh, Á. Sz., Szajáni, B., Márczy, J. Sz., Simon, M. L. *Biotechnol. Tech.* 1998, **12**, 389-392.
- [13] Harsley, L. H. *Azeotropic Data II.*, Am. Chem. Soc., Washington, 1965.