

Természetes hexanal előállítása biokatalízissal*

SZ. MÁRCZY Judit^{a,*}, SZ. NÉMETH Ágnes^a, SZAJÁNI Béla^a,

SAMU Zsuzsa^b és HÁGER-VERESS Ádám^b

^aKaposvári Egyetem Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Egyetem u. 2., 8200 Veszprém, Magyarország

^bAroma Bázis Kft., Határ u. 1., 2141 Csömör-Iparterület, Magyarország

1. Bevezetés

Az élelmiszer- és kozmetikai ipar részéről növekszik az igény az aroma- és illatanyagok iránt. Ezen anyagok természetes forrásai korlátozott mértékben állnak rendelkezésre, ezért fontos ipari méretű, mesterséges előállításuk. A szerves szintézis a lehetséges mellékreakciók során keletkező nemkívánatos szennyezések miatt hátrányokkal jár. Ezzel szemben az enzimek nagyfokú fajlagosságuk révén biztosítják a megfelelő termékminőséget, és lehetővé teszik az eljárás enyhe körülmények közötti végrehajtását.

A gyümölcskészítmények „zöld” aromájának előidézői az olyan illékony aldehidek, mint a hexanal, a *cisz*-3-hexenal és a *transz*-2-hexenal^{1,2}. A 6 szénatomos aldehidek az ép növényi sejtekben csak nyomnyi mennyiségben fordulnak elő. 18 szénatomos zsírsavakból keletkeznek abban az esetben, amikor a sejtstruktúrák megsérülnek, és a sejt tartalmát oxigén éri³⁻⁶. A gyümölcsök szöveteiben a hexanal és a hexenal izomerek prekursorai a linolsav (*cisz*-9,*cisz*-12-oktadekadiénsav) illetve a linolénsav (*cisz*-9,*cisz*-12,*cisz*-15-oktadekatriénsav)^{3,7}. A biotranszformációban részt vevő enzimek a lipoxigenáz és a hidroperoxid liáz.

Az első, a lipoxigenáz által katalizált lépés a zsírsavak hidroperoxidációja, melynek 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^{8,9}. A lipoxigenáz (linoleate:oxygen oxidoreductase, EC 1.13.11.12) egy vastartalmú enzim, amely a *cisz*,*cisz*-1,4-pentadién rendszert tartalmazó telítetlen zsírsavak és észterek hidroperoxidációját katalizálja. Gazdag forrása a szójaliszt, amelyben három izoenzime, a Lox-1, Lox-2 és Lox-3 formájában van jelen. Ezek termék- és szubsztrátspecifitásukban, pH-optimumukban, hőstabilitásukban és izoelektromos pontjukban különböznek egymástól¹⁰⁻¹². Hexanal előállításához az alkalikus pH-optimumú izoenzimre, a Lox-1-re van szükség. A semleges pH-optimumú Lox-2 és Lox-3 izoenzim jelenléte hátrányos, melléktermékek képződése miatt. Ezért vizsgáltuk a fajta- és évjáratí különbségeket, hogy kiválasszuk azt a fajtát, amely a legnagyobb Lox-1 izoenzim aktivitást tartalmazza, kis Lox-2 és Lox-3 izoenzim tartalom mellett¹³. A szójaliszt kivonat szelektív hőkezelésére alapozva, egyszerű és gyors módszert dolgoztunk ki a Lox-1 izoenzim izolálására¹⁴.

A biotranszformáció második lépésében a hidroperoxid liáz a telítetlen zsírsavak hidroperoxidjainak egy aldehiddé és egy oxosavvá történő hasítását katalizálja. A 13-hidroper-

oxid liáz fajlagosan a 13-HPOD illetve a 13-HPOT hasítását katalizálja, amelynek során hexanal illetve hexenal és 12-oxo-*cisz*-9-dodekénsav keletkezik¹⁵. A hidroperoxid liázok a mikroalgákban szabad, a magasabb szerveződésű növényekben membránhoz kötött formában fordulnak elő^{16,17}. A szolubilizált enzim szilárdfázisú hordozóra rögzítve stabilizálható¹⁸, de a rögzítés során olyan nagymértékű az aktivitásvesztés, hogy a rögzített enzim alkalmazása ipari szempontból nem gazdaságos.

A Lox-1 izoenzim és a 13-hidroperoxid liáz eredményesen használható a hexanal linolsavból, illetve napraforgóolaj hidrolizátumból való előállítására¹⁹. Jelen közleményben az eljárás laboratóriumi méretű megvalósításáról számolunk be.

2. Kísérleti módszerek

2.1. Lipoxigenáz-1 izoenzim izolálása

Az enzim izolálásához petroléterrel zsírtalanított szójalisztet használtunk. A különböző évjáratú szójafajták szójalisztjeit a szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht-tól kaptuk. A szójalisztet tömegére számolva 5 térfogat 0,05 M ecetsavval, mechanikus kevertetés mellett 1 óráig 0 – 5 °C-on extraháltuk. A szuszpenziót centrifugáltuk (4500 g, 40 perc). A felülúszót 5 percig 70 °C-on inkubáltuk, majd lehűtöttük. Ezután a kapott szuszpenziót 20 °C-on centrifugáltuk (4500 g, 40 perc). A felülúszót, amely a Lox-1 izoenzimet tartalmazza, a felhasználásig -60 °C-on tároltuk.

Az ezzel a módszerrel nyert Lox-1 mennyisége átlagosan 3,3 µkat/g zsírtalanított szójaliszt volt. A kinyerhető enzim mennyisége nagymértékben függ a felhasznált szójaliszt fajtájától és évjáratától.

2.2. Hidroperoxid liáz izolálása

A hidroperoxid liáz izolálása parajlevelekből (Matador fajta), Gardner és munkatársai²⁰ módszere szerint történt, csekély módosítással. A parajleveleket tömegükhöz viszonyítva ötszörös térfogatú 0,05 M foszfát pufferben (pH 7,0) homogenizáltuk, majd a homogenizátumot 6 rétegű gézen szűrtük. Ezután a szűrletet 30 percig 4 °C-on centrifugáltuk (6000 g). A felülúszót kiöntöttük és a kloroplaszt tartalmú csapadékot háromszoros térfogatú, 2 mM etilén-diamin-tetraecetsav tartalmú pufferben homogenizáltuk. A kapott homogenizátumot, amely a kloroplasztok membránjához kötött hidroperoxid liáz enzimet tartalmazza, felhasználásig 4 °C-on tároltuk. Az így nyert enzim mennyisége átlagosan

8,7 nkat/g parajlevél volt. A kinyerhető enzim mennyiségét nagymértékben befolyásolja a felhasznált paraj fajtája.

2.3. Az aktivitásmérésekhez használt szubsztrátok előállítása

A nátrium-linoleátot Axelrod és munkatársai¹¹ módszere alapján készítettük el. A 13-HPOD előállításához a linolsav oldatot szója lipoxigenázzal kezeltük²¹.

2.4. Az enzimaktivitások meghatározása

A lipoxigenáz aktivitásának meghatározását Axelrod és munkatársai¹¹ Márczy és munkatársai¹³ 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-en²². A mérésekhez Biochrom 4060 spektrofotométert használtunk (Pharmacia, Uppsala, Svédország).

2.5. Napraforgóolaj hidrolízis

1 kg napraforgóolajat 500 cm³ 40 %-os nátrium-hidroxid oldattal 100 – 120 °C-on 1 óráig kevertettünk. Ezután az elegyhez 3 dm³ 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.

A hidrolizátum 66 % linolsavat, 20 % olajsavat és 11 % telített zsírsavat tartalmazott.

2.6. Analízisek

A 13-HPOD koncentrációját Weber és munkatársai szerint²³, ferrometriásan határoztuk meg. A módszer azon alapul, hogy a 13-HPOD a Fe(II) iont Fe(III) ionná oxidálja. Ebből KSCN hozzáadására Fe(SCN)₃ képződik, melynek koncentrációja 480 nm-es hullámhosszon fotometriásan mérhető ($\epsilon = 14000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$).

A napraforgóolaj hidrolizátum zsírsav összetételének analízise és a hexanal 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 kolonnater 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 méréséhez PERMABOND OV-1701-DF-0,50 oszlopot (25 m x 0,32 mm, Macherey-Nagel) alkalmaztunk, a kolonnater 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.

3. Kísérleti eredmények és értékelésük

3.1. A linolsav hidroperoxidációja

A hidroperoxidációs reakciót az általunk optimalizált körülmények között, 100 mM linolsav- és 83 nkat/cm³ enzim koncentráció mellett végeztük¹⁹.

Egy 1,5 dm³-es két csomakkal ellátott reakcióedénybe az alábbiakat mértük be:

0,2 M nátrium-borát puffer (pH=9)	440 cm ³
napraforgóolaj hidrolizátum (linolsav tartalma 13,95 g)	21,13 g
5 N nátrium-hidroxid	10 cm ³
lipoxigenáz-1 izoenzim (Lox-1) (aktivitása 1,43 $\mu\text{kat}/\text{cm}^3$)	29 cm ³

A reakciót az enzim hozzáadásával indítottuk. A szükséges oxigént – amely a reakció ko-szubsztrátja – levegőárammal biztosítottuk. A reakció kivitelezése szobahőmérsékleten történt, intenzív kevertetés mellett. A reakció előrehaladásával a kezdeti emulzió fokozatosan feltisztult. Egy óra múlva a reakcióelegyhez 26 cm³ 5 N kénsavat adtunk. A sav hatására az oldatban levő termék kicsapódott és az enzim irreverzibilisen inaktíválódott. 10 perc állás után 28,5 cm³ 5 N nátrium-hidroxidot adtunk a reakcióelegyhez és 20 percig kevertettük, hogy a kicsapódott 13-HPOD-t visszaoldjuk. Az így nyert reakcióelegy közvetlenül alkalmazható a következő lépéshez, az enzimatis hasításhoz.

A 13-HPOD koncentrációja a reakcióelegyben 68,7 mM, a hozam 72,3 % volt. Korábbi kísérleteinkben, melyeket azonos körülmények között, 20 cm³-es térfogatban, tiszta linolsav és 2 bar oxigén alkalmazásával végeztünk, $82,5 \pm 4,2$ mM 13-HPOD koncentrációt és 83 % hozamot értünk el¹⁹. Bár a napraforgóolaj hidrolizátummal és a levegővel végzett reakció eredménye ennél gyengébb, ipari megvalósítás esetén gazdaságossági és biztonságtechnikai szempontból mégis indokolt a lényegesen olcsóbb napraforgóolaj hidrolizátum és a levegő alkalmazása.

3.2. A 13-HPOD enzimatis hasítása

A hasítási reakció kiindulási anyagként a napraforgóolaj hidrolizátum hidroperoxidációs reakcióelegyét alkalmaztuk. A hasítást az általunk előzőleg optimálisnak talált körülmények között, 15 mM szubsztrát- és 23,4 nkat/cm³ enzim koncentráció mellett végeztük¹⁹. A reakcióelegy pH-ja 8 - 9 között volt, mivel a parajlevélből kivont hidroperoxid liáz enzim aktivitása ebben a pH-tartományban a legnagyobb, míg a jelenlévő egyéb, a 13-HPOD-t ugyancsak fogyasztó enzimek aktivitása itt a legkisebb²².

Egy 1 dm³-es csiszolatos Erlenmeyer-lombikba az alábbiakat mértük be:

0,2 M nátrium-borát puffer (pH 9)	132 cm ³
hidroperoxidációs reakcióelegy (13-HPOD tartalma 7,5 mmól)	117 cm ³
hidroperoxid liáz enzim (kloroplaszt szuszpenzió; aktivitása 46,6 nkat/cm ³)	251 cm ³

A reakciót az enzim hozzáadásával indítottuk. A reakcióelegyet szobahőmérsékleten egy órán át mágneses keverővel kevertettük. Ezután 7 cm³ 5 N kénsav hozzáadásával leállítottuk a reakciót.

A hexanal koncentrációja a reakcióelegyben 8,16 mM, a hozam 54,4 % volt. Azonos körülmények között 4 cm³-es térfogatban korábban végzett kísérleteinkben, tiszta linolsavból előállított 13-HPOD-t alkalmazva, az elért hexanal koncentráció $12,2 \pm 1$ mM, a hozam 81 % volt¹⁹. Tehát a napraforgóolaj hidrolizátumból előállított 13-HPOD hasításakor lényegesen kevesebb hexanal képződik, mint a tiszta linolsavból kapott 13-HPOD-ból. Ugyanakkor fotometriás mérési adatok szerint a 13-HPOD 82,6 %-a elfogyott. Ebből arra lehet következtetni, hogy mellékreakciók is lejátszódnak, amelyek fogyasztják a 13-HPOD-t, de termékük nem a hexanal. Ezenkívül a napraforgóolaj hidrolizátummal bevitt, el nem reagált zsírsavak zavarják a hidroperoxid liáz enzim működését. Ezt olajsav esetén kísérletileg bizonyítottuk is. Annak ellenére, hogy a napraforgóolaj hidrolizátumból készült 13-HPOD hasítási reakciója alacsonyabb hozamú, gazdasági szempontokat mérlegelve, ipari méretű alkalmazása mégis indokolt.

A hexanalt a reakcióelegyből ismételt vízgőzdesztillációval nyertük ki. Az első desztillációs lépésben a reakcióelegy 25 %-ának megfelelő térfogatú desztillátumot szedtünk, négy frakcióban. Több reakcióelegyet desztilláltunk ily módon és a hasonló töménységű frakciókat összeöntöttük. A töményebb frakciók újradesztillálásával a hexanalt már külön fázisként kaptuk. A hígabb frakciókat újradesztillálással töményítettük. A desztilláció kihozatala 63,2 % volt, ami a fent részletezett reakció esetén 258 mg hexanalt jelent.

A bemutatott kísérleti eredmények alapján a hexanal „természetazonos” aromaanyagként előállítható biokatalitikus úton, napraforgóolaj hidrolizátumból kiindulva két enzim, a szójából nyert lipoxigenáz és a parajból kivont hidroperoxid liáz alkalmazásával. Az eljárás egyszerű, gazdaságos és alkalmas ipari megvalósításra.

Köszönetnyilvánítás

A kutatási munka az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság támogatásával készült (szerződés szám: 96-97-43-1343).

Hivatkozások

- Schreier, P. In *Quality in Stored and Processed Vegetables and Fruits*; Goodenough, P. W.; Atkin, C., Eds.; Academic Press: London, **1981**; pp 355-371.
- Nursten, H. E.; Williams, A. A. *Chem. Ind.* **1967**, 486-497.
- Drawert, F.; Heimann, W.; Emberger, R.; Tressl, R. *Liebigs Ann. Chem.* **1966**, 694, 200-208.
- Drawert, F.; Tressl, R.; Heimann, W.; Emberger, R.; Speck, M. *Chem. Microbiol. Technol. Lebensm.* **1973**, 2, 10-22.
- Drawert, F. In *Aroma Research*; Maarse, H.; Groenen, P. J., Eds.; Pudoc: Wageningen, **1975**; pp 13-39.
- Jadhav, S.; Singh, B.; Salunkhe, D. R. *Plant Cell Physiol.* **1972**, 13, 449-459.
- Galliard, T.; Matthew, J. A. *Phytochemistry* **1977**, 16, 339-343.
- Galliard, T.; Matthew, J. A.; Wright, A. J.; Fishwick, M. J. *J. Sci. Food Agric.* **1977**, 28, 863-868.
- Axelrod, B. In *Food Related Enzymes*; Whitaker, J. R., Ed.; ACS: Washington, **1974**; pp 324-348.
- Christopher, J. P.; Pistorius, E. K.; Axelrod, B. *Biochim. Biophys. Acta* **1970**, 198, 12-19.
- Axelrod, B.; Cheesbrough, T. M.; Laakso, S. *Methods Enzymol.* **1981**, 71, 441-451.
- Siedow, J. N. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **1991**, 42, 145-188.
- Márczy, J. Sz.; Simon, M. L.; Mózsik, L.; Szajáni, B. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, 43, 313-315.
- Németh, Á. Sz.; Szajáni, B.; Márczy, J. Sz.; Simon, M. L. *Biotechnol. Tech.* **1998**, 12, 389-392.
- Kim, I. S.; Grosch, W. *J. Agric. Food Chem.* **1981**, 29, 1220-1225.
- Gardner, H. W. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 1084, 221-239.
- Blée, E.; Joyard, J. *Plant Physiol.* **1996**, 110, 445-454.
- Simon, M. L.; Márczy, J. Sz.; Kotormán, M.; Németh, Á. Sz.; Szajáni, B. In *Progress in Biotechnology*; Ballasteros, A.; Plou, F. J.; Iborra, J. L.; Halling, T. J., Eds.; Elsevier: Amsterdam, **1998**; pp 547-552.
- Márczy, J. Sz.; Németh, Á. Sz.; Samu, Zs.; Háger-Veress, Á.; Szajáni, B. *Biotechnol. Lett.* **2002**, 24, 1673-1675.
- Gardner, H. W.; Weisleder, D.; Plattner, R. O. *Plant Physiol.* **1991**, 92, 1059-1072.
- Vick, B. A. *Lipids* **1991**, 26, 315-320.
- Zimmerman, D. C.; Vick, B. A. *Plant Physiol.* **1970**, 46, 445-453.
- Weber, F.; Laskawy, G.; Grosch, W. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **1974**, 155, 142-150.

The biocatalytic preparation of 'natural' hexanal

Hexanal is a component of the „green” flavour of fruit products. It was produced biocatalytically from linoleic acid in two steps. In the first step catalyzed by lipoxigenase enzyme, 13-hydroperoxy-9(Z),11(E)-octadecadienoic acid (13-HPOD) was formed in the presence of oxygen as co-substrate. In the second step 13-HPOD was cleaved by hydroperoxide lyase into hexanal and 12-oxo-9(Z)-dodecenoic acid. Lipoxigenase was extracted from soybean meal

and hydroperoxide lyase from spinach leaves. It was justified that linoleic acid can be replaced by hydrolyzed sunflower oil which is much cheaper. Because of safety reasons compressed air was used instead of oxygen. Hexanal was isolated from the reaction mixture by repeated steam distillations.

Beérkezett: 2003. IX. 10.