

Természetes hexénalok előállítása biokatalízissel

SZ. NÉMETH Ágnes^{a*}, SZ. MÁRCZY Judit^a, SZAJÁNI Béla^a, SAMU Zsuzsa^b és

HÁGER-VERESS Ádám^b

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

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

1. Bevezetés

A természetes aromák világszerte növekvő piacából kb. 20 – 40 millió USD/év értéket képvisel a gyümölcskészítmények „zöld” aromája¹. Ennek fő összetevői illékony aldehidek – hexanal, *cisz*-3-hexénal és *transz*-2-hexénal. Ezek a 6 szénatomos aldehidek előállíthatók növényekből történő extrakcióval, fermentációval, vagy biokatalitikus úton. Ez utóbbi két lépésben történik a megfelelő telítetlen zsírsavból kiindulva. Az első lépés, amelyet a lipoxigenáz-1 izoenzim (Lox-1, linoleát:oxigén oxidoreduktáz, EC 1.13.11.12) katalizál, a zsírsav hidroperoxidációja. A második lépésben a zsírsav hidroperoxidja a hidroperoxid liáz enzim hatására egy aldehiddé és egy oxosavvá hasad.

A hexénal izomerek előállíthatók linolénsavból (*cisz*-9,*cisz*-12,*cisz*-15-oktadekatriénsav). A hidroperoxidáció során eből 13-hidroperoxi-*cisz*-9,*transz*-11,*cisz*-15-oktadekatrién-sav (a továbbiakban 13-HPOT) keletkezik. Ennek a reakciónak a ko-subsztrátja a molekuláris oxigén. A második lépésben a 13-HPOT *cisz*-3-hexénallá és 12-oxo-*cisz*-9-dodekénsavvá hasad². A *cisz*-3-hexénal nem stabil és könnyen izomerizálódik *transz*-2-hexénallá. Az izomerizáció vagy a *cisz*-3:*transz*-2-enal izomeráz enzim, vagy hő hatására következik be³.

Munkánk célja az volt, hogy a hexénal izomereket, mint aroma összetevőket, olcsó ipari nyersanyagból, lenolajból, növényi enzimek segítségével állítsuk elő. Ennek érdekében meghatároztuk a hidroperoxidáció és a hasítási reakció optimális körülményeit⁴. Jelen közleményünkben az eljárás laboratóriumi megvalósításáról számolunk be.

2. Kísérleti módszerek

2.1. Lipoxigenáz-1 izoenzim izolálása

Az enzim izolálásához petroléterrel zsírtalanított szójalisztet használtunk. A szójalisztet (McCall fajta) a szegedi Gabonatermesztési Kutató Kht-tól kaptuk. Az izolálás az általunk kidolgozott módszerrel, az alábbiak szerint történt⁵. 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 hőkezeltük, 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. A készítmény fajlagos aktivitása 125 ± 10 nkat/mg fehérje volt.

2.2. Hidroperoxid liáz izolálása

A hidroperoxid liáz enzimet zöldpaprikából izoláltuk az alábbiak szerint⁴.

A terméseket tömegükhöz viszonyítva 1 térfogat 0,05 M nátrium-foszfát pufferben (pH 7,0), 0 – 5 °C-on homogenizáltuk, majd a homogenizátumot 4 rétegű gézen szűrtük. A szűrletet térfogatához viszonyítva 2 % 1 M kalcium-klorid oldattal 2 óra hosszat kevertettük. Ezután a szuszpenziót centrifugáltuk (4400 g, 45 perc, 4 °C). A csapadékot kis mennyiségű 0,05 M nátrium-foszfát pufferben (pH 7,0) vettük fel és a továbbiakban ezt használtuk a hasítási reakciókhoz. A készítmény 4 °C-on egy hétig tárolható.

Az így nyert hidroperoxid liáz enzimkivonat aktivitása 88,3 ± 23,3 nkat/ml volt.

2.3. Az enzimaktivitások meghatározása

A lipoxigenáz aktivitásának meghatározását Axelrod és munkatársai⁶ Márczy és munkatársai⁷ által módosított módszere szerint végeztük úgy, hogy 234 nm-es hullámhosszon mértük a képződő konjugált dién elnyelését. 1 kat az az enzimmennyiség, amely másodpercenként 1 mol 13-HPOT keletkezését katalizálja 20 °C-on.

A hidroperoxid liáz aktivitásának mérésénél a konjugált dién fogyasztát követtük 234 nm-en⁸. 1 kat az az enzimmennyiség, amely másodpercenként 1 mol 13-HPOT hasítását katalizálja 20 °C-on.

A mérésekhez Biochrom 4060 spektrofotométert használtunk (Pharmacia, Uppsala, Svédország).

2.4. Fehérjetartalom meghatározása

A fehérjetartalom meghatározását Lowry és munkatársai⁹ szerint végeztük. A kalibrációs görbe felvételéhez marha szérumalbumint (Sigma) használtunk.

2.5. Lenolaj hidrolízise

1 kg lenolajat 500 cm³ 40 %-os nátrium-hidroxid oldattal 100 – 120 °C-on 1 órán át kevertettük. Ezután az elegyet 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 savmentesre mostuk. Ezt követően vákuumban (60 Hgmm) a vizet eltávolítottuk, és a zsírsavelegyet vízmentes nátrium-szulfát felett szárítottuk. Ily módon 0,74 kg zsírsavelegyet kaptunk, amelynek savszáma 186,6 volt, és amely 56 % linolénsavat, 16 % linolsavat, 18 % olajsavat és 10 % telített zsírsavat tartalmazott.

2.6. Analízisek

A lenolaj hidrolizátum zsírsav összetételének, valamint a *cisz*-3-hexénal, a *transz*-2-hexénal és a hexanal koncentrációjának meghatározása gázkromatográfiásan történt, egy lángionizátorral ellátott HP 5890 Series II. gázkromatográffal (Hewlett Packard). Vívógázként 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, 220 °C-on, izotermális körülmények között. Az olajsav retenciós ideje 7,8 perc, a linolsavé 9,1 perc, a linolénsavé pedig 11,0 perc volt.

A *cisz*-3-hexénal és *transz*-2-hexénal koncentrációk meghatározásához a mintákat a gázkromatográfiás méréshez dietiléterrel extraháltuk. Az elválasztás 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-hexénal retenciós ideje 6,1 perc, a *transz*-2-hexénalé 10,1 perc, a hexanalé pedig 5,8 perc volt.

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.

3. Kísérleti eredmények és értékelésük

3.1. A linolénsav hidroperoxidációja

A hidroperoxidációs reakciót az általunk optimalizált körülmények között végeztük⁴.

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

0,2 M nátrium-borát puffer (pH=9)	400 cm ³
lenolaj hidrolizátum	24,9 g
(linolénsav tartalma 13,94 g)	

5 N nátrium-hidroxid	20 cm ³
lipoxigenáz-1 izoenzim (Lox-1) (aktivitása 1,1 µkat/cm ³)	57 cm ³

A reakciót az enzim hozzáadásával indítottuk. Az elegyet külső, jeges vizes hűtés mellett, mágneses keverővel kevertettük. A molekuláris oxigént, amely a reakcióban ko-szubsztrátként vesz részt, levegőárammal biztosítottuk. A reakció előrehaladtával a kezdeti emulzió fokozatosan feltisztult. Egy óra múlva a reakcióelegyhez 25 cm³ 5 N kénsavat adtunk (pH 3,0). A sav hatására az oldatban levő termék kicsapódott és az enzim irreverzibilisen inaktiválódott. 10 perc állás után 22,5 cm³ 5 N nátrium-hidroxidot adtunk az elegyhez (pH 7,0) és 20 percig kevertettük, hogy a kicsapódott 13-HPOT feloldódjon. Az így nyert reakcióelegy közvetlenül alkalmazható volt a következő lépéshez, az enzimátikus hasításhoz.

A 13-HPOT koncentrációja a reakcióelegyben 57,0 ± 2,1 mM, a hozam 61,9 % volt. Korábbi kísérleteinkben, melyeket hasonló körülmények között, 10 cm³-es térfogatban, tiszta linolénsav és oxigén gáz alkalmazásával, 4 bar nyomáson végeztünk, 56,5 ± 1,5 mM 13-HPOT koncentrációt és 60,7 % hozamot értünk el⁴. Az eredmények igazolják a linolénsav helyett a lényegesen olcsóbb lenolaj hidrolizátum, valamint oxigén gáz helyett a biztonságosabb levegő alkalmazását a hidroperoxidáció ipari megvalósításában.

3.2. A 13-HPOT enzimátikus hasítása

A hasítási reakció kiindulási anyagként a lenolaj hidrolizátum hidroperoxidációja során (3.1. pont) kapott elegyet használtuk. A hasítást az általunk előzetesen optimálisnak talált körülmények között végeztük⁴.

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

0,2 M nátrium-foszfát puffer (pH 7,0)	356 cm ³
hidroperoxidációs reakcióelegy (13-HPOT tartalma 49,8 mmól)	305 cm ³
hidroperoxid liáz enzimkivonat (aktivitása 88,3 nkat/cm ³)	100 cm ³

A reakciót az enzim hozzáadásával indítottuk. A reakcióelegyet 10 percen át szobahőmérsékleten (20 – 25 °C) kevertettük. Ezután 18,5 cm³ 5 N kénsav hozzáadásával leállítottuk a reakciót.

A képződött aldehidek koncentrációja a reakcióelegyben 1,6 ± 0,1 mM *transz*-2-hexénal, illetve 5,9 ± 0,2 mM *cisz*-3-hexénal volt, amely 37,1 %-os hozamnak felel meg. Melléktermékként – a lenolajban jelenlévő linolsav hidroperoxidációja során képződött 13-HPOT-ból – 0,7 ± 0,05 mM hexanal keletkezett. Összehasonlításként megemlítjük, hogy Rehbock és munkatársai¹⁰ mungbab csíranövényekből izolált hidroperoxid liáz enzim alkalmazásával hasonló eredményt értek el, de az eljárás ipari méretre nem tűnik nagyíthatónak. Noordermeer és munkatársai¹¹ egy rekombináns hidroperoxid liáz felhasználásával 43 %-os hexénal hozamot értek el, annak ellenére, hogy enzimkészítményük a szennyező fehérjétől mentes volt.

A hexénalt a reakcióelegyből ismételt vízgőzdesztillációval nyertük ki. A *transz-2*-hexénal forráspontja légköri nyomáson 147 °C. Vízrel azeotróp elegyet alkot, melynek forráspontja 95,1 °C, és 51,4 % *transz-2*-hexénalt tartalmaz¹². A hasítási reakcióban elsődlegesen képződő *cisz-3*-hexénal döntő része a vízgőzdesztilláció körülményei között *transz-2*-hexénallá izomerizálódik³. Az első desztillációs lépésben kapott megoszlásokat az 1. táblázatban mutatjuk be.

1. Táblázat. A 13-HPOT enzimátikus hasítása során kapott reakcióelegy vízgőzdesztillációja

Frakció	Térfogat (cm ³)	<i>Transz-2</i> -hexénal (mM)	<i>Cisz-3</i> -hexénal (mM)	Hexanal (mM)
1	50	35,8	10,6	5,8
2	50	4,2	1,4	4,2
3	25	1,1	0,9	1,9
4	25	0,7	0,2	0,8

Látható, hogy az aldehidek döntő része az első frakcióban jelenik meg. Míg a hasítási reakcióelegyben a *transz-2*-hexénal : *cisz-3*-hexénal mólarány 1:3,7 volt, addig a víz-gőzdesztilláció során ez az első frakcióban 3,4:1-re módosult. Több reakcióelegy első desztillációjából nyert tömény (1) frakciók újradesztillálásával külön fázisként a következő összetételű aromaanyagot kaptuk:

<i>transz-2</i> -hexénal	78,6 %
<i>cisz-3</i> -hexénal	10,0 %
hexanal	11,4 %

Ebben az elegyben az izomer arány – a desztillációnál alkalmazott hő hatására – még inkább a *transz-2*-hexénal javára tolódott el. Az első desztillációs lépés hexénalra (*transz-2*- és *cisz-3*- izomer együttesen) vonatkoztatott hozama 78,3 %, a második lépésé 66,4 % volt. A tiszta *transz-2*-hexénal előállítása – amennyiben szükséges – frakcionált desztillálással oldható meg. Aromaanyagként való felhasználása ezt nem feltétlenül teszi indokolttá.

A bemutatott kísérleti eredmények alapján a hexénalok (*transz-2*- és *cisz-3*- izomer) „természetazonos” aromaanyagként előállíthatók biokatalitikus úton, lenolaj hidrolizátumból kiindulva növényi enzimek, azaz a szójából

Preparation of 'natural' hexenals

Hexenal (*cis-3*- and *trans-2*- isomers) are components of the “green” flavour of fruit products. They were produced biocatalytically from hydrolyzed linseed oil containing linoleic acid. In the first step 13-hydroperoxyoctadeca-*cis-9,trans-11,cis-15*-trienoic acid (13-HPOT) was formed from linoleic acid by soybean lipoxigenase-1 isoenzyme (Lox-1) with dioxygen as co-substrate. Oxygen was

nyert lipoxigenáz-1 izoenzim és a zöldpaprikából kivont hidroperoxid liáz alkalmazásával. A hidroperoxidációs reakcióban ko-szubsztrátként résztvevő molekuláris oxigén levegőárammal biztosítható. A módszer, hasonlóan az ugyancsak „zöld” aromakomponens hexanal előállításához^{13,14} egyszerű, gazdaságos és alkalmas ipari megvalósításra.

Köszönetnyilvánítás

A kutatási munka az Országos Műszaki Fejlesztési Bizottság támogatásával készült (szerződésszám: 02326/2000).

Hivatkozások

- Whitehead, I. M.; Muller, B. L.; Dean, C. *Cereal Foods World* **1995**, *40*, 193.
- Hatanaka, A.; Sekyia, J.; Kajiwara, T. *Phytochemistry* **1978**, *17*, 869.
- Stone, E. J.; Hall, R. M.; Kazeniac, S. J. *J. Food Sci.* **1975**, *40*, 1138.
- Németh, Á. Sz.; Márczy, J. Sz.; Samu, Zs.; Háger-Veress, Á. *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *34*, 667.
- Németh, Á. Sz.; Szajáni, B.; Márczy, J. Sz.; Simon, M. L. *Biotechnol. Tech.* **1998**, *12*, 389.
- Axelrod, B.; Cheesbrough, T. M.; Laakso, S. *Methods Enzymol.* **1981**, *71*, 441.
- Márczy, J. Sz.; Simon, M. L.; Mózsik, L.; Szajáni, B. *J. Agric. Food Chem.* **1995**, *43*, 313.
- Vick, B. A.; Zimmermann, D. C. *Plant Physiol.* **1987**, *85*, 1073.
- Lowry, C. H.; Rosebrough, N. J.; Farr, L.; Randall, R. J. *J. Biol. Chem.* **1951**, *193*, 265.
- Rehbock, B.; Gansser, D.; Berger, R. G. *Food Chem.* **1998**, *63*, 161.
- Noordermeer, M. A.; Groot, W.; Kooij, A. J.; Veldsink, J. W.; Veldink, G. A.; Vliegthart, J. F. G. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 4270.
- Harsley, L. H. *Azeotropic Data II.*, Am. Chem. Soc.: Washington, **1965**.
- Márczy, J. Sz.; Németh, Á. Sz.; Samu, Zs.; Háger-Veress, Á.; Szajáni, B. *Biotechnol. Lett.* **2002**, *24*, 1673.
- Márczy, J. Sz.; Németh, Á. Sz.; Szajáni, B.; Samu, Zs.; Háger-Veress, Á. *Magyar Kémiai Folyóirat* **2004**, *109-110*, 34.

supplied by air flow. In the second step 13-HPOT was cleaved by green bell pepper hydroperoxide lyase resulting in *trans-2*- and *cis-3*-hexenal. Hexenals were isolated from the reaction mixture using repeated steam distillation. During distillation the *trans-2*-hexenal : *cis-3*-hexenal isomer ratio was shifted into the direction of *trans-2*- isomer as an effect of heat. The procedure was realized on laboratory scale.