

Gyors módszer D-galakturonsav előállítására

FEHÉR LÁSZLÓ és SZABÓ IMRE J.
Budapesti Műszaki Egyetem Élelmiszerkémia Tanszék

Érkezett: 1956. június 11.

A legutóbbi években igen nagy érdeklődés tapasztalható pektinanyagokból töltendő D-galakturonsav előállítása iránt. Ennek oka az, hogy nem sokkal előbb módszert dolgoztak ki D-galakturonsavból kiindulva, C-vitamin előállítására (1).

Az eljárás lényege az, hogy a D-galakturonsavat katalitikus hidrogénezéssel L-galakturonsavvá redukálják, s a terméket laktonná alakítják. Az így kapott L-galakturonsav laktont nátrium hipoklorittal 2-keto-L-galakturonsavvá oxidálják, majd laktont képeznek belőle, és enolositják. E műveletek eredményeképpen L-aszkorbinsavat kapnak.

A szintézis gazdaságosságának előfeltétele: olcsó D-galakturonsav. Galakturonsav előállítása pektinekből hidrolizissel történik, mivel azoknak fő alkotórésze. A pektinek hidrolízise a gyakorlatban savas vagy enzimes módszerrel végezhető el. A savas hidrolízis ma már ritkán használatos, mivel nagy hőmérsékleten, nyomás alatt történik, saválló edényzet szükséges hozzá, azonkívül a hidrolízis alatt képződő furanoid anyagok nagyon megnehezítik a galakturonsav elkülönítését. A fenti hátrányokhoz még a csekély kitermelés is hozzájárul (2).

1932 óta a pektinhidrolizisekhez csaknem kizárólag pektinbontó enzim-készítményeket használnak. *F. Ehrlich* volt az első kutató, aki ismertette pektináz-készítményének előállítását és a pektin enzimes bontásának módszerét (3). Enzimkészítményét *Penicillium Ehrlichii* nevű penészből készítette.

A pektináz-készítményeket kezdetben nem galakturonsav előállítására használták, hanem borok derítésére, folyékony gyümölcs előállításánál, gyümölcslevek sűrítésénél, a len és kender áztatásánál stb. A kérdés ipari fontosságát tekintve, a kutatók nem közölték, hogy milyen mikroorganizmusokat használtak fel preparátumukhoz, eljárásukat szabadalmaztatták, a gyárak pedig fantázia

néven hozták forgalomba készítményeiket. (Pektinol, Filtragol, Filtrazym stb.)

A pektinhidrolízis kérdése még fontosabbá vált, amikor kidolgozták a C-vitaminnak galakturonsavból történő szintézisét. A galakturonsav enzimes előállítására vonatkozóan a különböző szerzők által nyilvánosságra hozott eljárások csaknem azonosak, közös tulajdonságuk az, hogy kereskedelmi pektináz-készítménnyel dolgoztak, amelyek előállításánál felhasznált penész adatai, ill. tenyésztési körülményei ismeretlenek.

Hazánkban jelenleg még nem állítanak elő iparilag pektináz-készítményeket, csupán a *Konzerv-, Hús- és Hűtőipari Kutató Intézet* foglalkozik kísérleti méretekben pektináz-készítmények (4) és galakturonsav előállításával (6). A mikrobiológiai enzim-készítmények gyártása általában nem bonyolult művelet. Előfeltétele: megfelelő, gyorsan fejlődő és sok enzimet tartalmazó törzs kitenyésztése, a legkedvezőbb táptalajösszetétel és tenyésztési körülmények felkutatása és a nyerstenyészet feldolgozása ipari alkalmazhatóság szempontjából.

Munkánk egyik célja D-galakturonsav készítésére alkalmas enzim-készítmény előállítása volt. A *Mezőgazdasági Kémiai Technológiai tanszékről* kapott mikroorganizmusok közül előzetes pektinbontó aktivitásvizsgálatok alapján legalkalmasabbnak az *Aspergillus Oryzae* bizonyult. A megfelelő spóramennyiség előállítása céljából a kémcsőkultúrából Petri-csészébe áttöltést végeztünk. Táptalajnak normál malátás agar-agart alkalmaztunk. A spóráztatást 30 °C-on 4 napig végeztük. 4 nap elteltével a spórákat steril vízzel, csíramentesített búzakorpa-táptalajra mostuk, s jól elkevertük. A korparéteg vastagsága kb. 2 cm volt. A korpás táptalajt 300 g 70%-os kiörlésű búzakorpából és 150 ml fémsókat tartalmazó 0,2 n HCl-ből készítettük. (4). A penészeket 30 °C-os nagy páratartalmú térben 5 napig szaporítottuk, majd ezután 38 °C-os szárító-szekrényben megszáritottuk. A teljes kiszáradás után a tenyészetet ötszörös mennyiségű 70%-os alkohollal 30 percig kezeltük, az alkoholt szűrővel eltávolítottuk, és a maradékot újból megszáritottuk. A készítményt ezután finom porrá őröltük.

Galakturonsav készítése céljából ezután répapektinből 4%-os oldatot készítettünk, melynek pH-ját 3,6-ra állítottuk be. Az oldathoz 1% enzimkészítményt és a fertőzés megakadályozására toluoltadtunk. Az elegyet 36 °C-os térbe helyeztük. Az 5. nap után vizsgáltuk a redukáló képesség változását és az alkohollal kicsapható pektin mennyiségét. Bár a redukáló képesség nőtt az idő függvényében, azonban még a 17. nap után is találtunk az oldatban alkohollal kicsapható pektint. A fentiekből azt a következtetést vontuk le,

hogy készítményünk aktivitása csekély és ezért nem is kíséreltük meg a reakcióelegyből a galakturonsav elkülönítését.

A következő elméleti megfontolások után enzim-készítményünkkel mégis sikerült D-galakturonsavat előállítani: Pektinek enzimes bontásánál először nagyobb láncdarabok keletkeznek, melyek a további bontás folyamán galakturonsavra bomlanak le. Híg ásványi savakkal szemben is hasonlóan viselkednek a pektinek. (5). *Ehrlich* szerint 4 molekula galakturonsavból álló ún. tetragalakturonsavak keletkeznek, enyhe savas hidrolízis hatására. A legújabb kutatások szerint ez a felfogás helytelen (2). Annyi bizonyos, hogy ásványi savak elbontják a pektin-molekulákat, feltehetően a molekulák demetilálódnak is és valószínű, hogy kisebb polimerizációs fokú termékek keletkeznek, végső fokon pedig D-galakturonsav. A lebontás foka a sav koncentrációjától és a hőmérséklettől függ. Kíméletes savas hidrolízissel elérhető a pektinmolekula megfelelő lebontása, ill. átalakítása s ezzel a gyorsabb enzimes hidrolízisre való előkészítése.

A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy az előzetes savas hidrolízis és az ezt követő enzimes bontás együttesen kisebb időt vesz igénybe, mint a csupán enzimmel történő kezelés. Ennek megfelelően úgy jártunk el, hogy 100 g légszáraz répacektint 500 ml 5%-os HCl-lel vízfürdőn (80—85 °C) 8 óráig melegítettünk. A barna folyadékból 1 órai melegítés után már sötét színű csapadék vált le, mennyisége gyorsan nőtt, és csakhamar az oldat egész térfogatát kitöltötte. A csapadékkiválás valószínűleg a molekulák demetilálásának következménye volt. Éjjelen át való állás után a csapadékot leszűrtük, előbb híg sósavval, utána vízzel mostuk a szennyezések eltávolítása céljából.

A nedves, szürke színű terméket 1500 ml desztillált vízben szuszpendáltuk, pH-ját 3,6-ra állítottuk be, majd hozzáadtunk 1% enzim-készítményt és 5 ml toluolt. A keveréket 36 °C-os termosztába helyeztük, naponként felkevertük, és ellenőriztük a redukálóképesség változását, valamint az alkohollal kicsapható anyagok mennyiségét. 3 nap múlva az oldhatatlan anyag legnagyobb része feloldódott, és a tisztára szűrt próba alkohollal nem adott csapadékot. 5 nap után a redukáló képesség nem nőtt tovább, vagyis a bontás foka elérte a maximumot. A 6. napon az oldatot tisztára szűrtük és a 38—40 °C-on, vákuumban szirupsűrűségűvé bepároltuk. Titrálással megállapítottuk az oldat savasságát, és a savtartalom 2/3 részét CaCO_3 -mal, 1/3 részét pedig Na_2CO_3 -mal közömbösítettük. 3 napi állás után a galakturonsav Ca-Na kettős sója kristályos formában kivált. A kristályokat leszívattással elkülönítettük az anyalúgtól, majd kevés vízzel mostuk és vákuumban megszáritottuk. Kitermelés: 26 g 6 kristályvizet tartalmazó kettős só volt.

A kettős-sót keverés közben számított mennyiségű $2n \text{ H}_2\text{SO}_4$ -be adagoltuk, a kivált CaSO_4 -ot leszűrtük, az oldatot vákuumban $38\text{--}40^\circ$ -on szirupsűrűvé töményítettük. A bepárlás közben kiváló szervesetlen kristályokat leszivatással eltávolítottuk, s a tiszta sűrű oldatot jégsekreényben kristályosítottuk. A kristályosítás időtartama 4 nap volt. A kristályos galakturonsavat leszivattuk, kevés jeges vízzel mostuk, és vákuumexszikkátorban kénsav felett megszáritottuk. Kitermelés: 19.6 g D-galakturonsav + H_2O , 90%-a a kettős sóból elméletileg kinyerhető mennyiségnek.

A készítmény vizes oldata a Fehling-oldatot hidegen redukálta, olvadáspontja és forgatóképessége alapján D-galakturonsavnak bizonyult.

A kombinált hidrolízis tehát kis aktivitású enzimkészítmények felhasználását is lehetővé teszi, sőt időszerűségele kisebb, mint a jó minőségű kereskedelmi enzimkészítményekkel, csak enzimés úton véghezvitt hidrolíziséké. Megfelelő minőségű enzimkészítmény felhasználása esetén kisebb enzimmenyiség szükséges a bontáshoz, vagy azonos enzimkoncentráció mellett a bontási idő csökken. Megjegyzendő, hogy a gyakorlatban a savas kezelés után kivált csapadékot nem szükséges leszűrni, hanem az oldat pH-jának a megfelelő értékre való beállítása után közvetlenül összekeverhető az enzimkészítménnyel.

Munkánk végén köszönetet mondunk Telegdy Kováts László professzor úrnak, értékes tanácsaiért és segítségéért, melyekkel munkánk eredményességét nagymértékben elősegítette.

БЫСТРЫЙ МЕТОД ДЛЯ ПРИГОТОВЛЕНИЯ D-ГАЛАОНОКТУРВОЙ КИСЛОТЫ

Л. Фегер и Й. И. Сабо

Авторы на место, до сих пор применяемого гидролиза, производимого энзимом, предлагают новый способ заключающийся в том, что сначала производится предварительная обработка кислотой а затем энзиматический гидролиз. Преимущество способа заключается в сокращении периода времени разрушения и в уменьшении расхода энзима.

EINE SCHNELL-METHODE ZUR HERSTELLUNG VON D- GALAKTURONSAURE

L. Fehér und I. J. Szabó

Die Verfasser empfehlen statt der bisherigen ausschliesslich enzymatischen Hydrolyse dieselbe nach vorangehender Säurebehandlung auszuführen. Durch dieses Verfahren wird die zeitdauer der Hydrolyse verkürzt, bzw. es kann die Menge des verwendeten Enzyms verringert werden.

A QUICK METHOD FOR THE PREPARATION OF D-GALACTURONIC ACID

L. Fehér and I. J. Szabó

In place of the method applied so far enzymatic hydrolysis of beet pectin), the authors recommend an enzymatic decomposition subsequent to an acid pretreatment. The new method has the advantage of necessitating a shorter time and requiring less enzyme than applied, in general, at the enzymatic hydrolysis.

MÉTHODE RAPIDE DE PRÉPARER L'ACIDE D-GALACTURONIQUE

L. Fehér et I. J. Szabó

Au lieu de l'hydrolyser seulement avec d'enzyme, les auteurs proposent la décomposition préalable des pectines de rave par acide et suivant l'hydrolyse d'enzyme. L'avantage de la méthode est, que le temps de la décomposition se raccourcit, ou bien la quantité nécessaire de l'enzyme est moins que celle, qui est nécessaire en hydrolysant avec enzyme seulement.

IRODALOM

- (1) *Isbell, H. S.*: J. of Res. Nat. Bureau of Standards 33, 45–61, 1944.
- (2) *Kertesz Z. I.*: The pectic substances. New-York. 1951.
- (3) *Ehrlich F.*: Biochem. Z. 250, 525, 1932; 251, 204, 1932.
- (4) *Kardos E. szerk.*: Pektinkutatások újabb eredményei (1950–52) Budapest. 1953.
- (5) *Klein G.*: Hdb. der Pflanzenanalyse. Wien. 1932.
- (6) *Kutz V.*: Személyes közlés. 1956.