

ELJÁRÁS LINANOL-OKID VAGY LINALOL-OKID TARTALMÚ ELEGYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

KIVONAT

A találmány tárgya eljárás linalool-oxid vagy linalool-oxid tartalmú elegyek előállítására. Az eljárás során linaloolt vagy linalool tartalmú elegyet enzimek jelenlétében oxidálnak.



2002. 06. 07.

J. L. C. a/la o/la

ELJÁRÁS LINALOOL-OXID VAGY LINALOOL-OXID TARTALMÚ ELEGYEK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

A találmány tárgya eljárás linalool-oxid vagy linalool-oxid tartalmú elegyek előállítására.

A linalool-oxid régóta ismert aromaanyag, amely aromák egész sorában szerepel. A linalool-oxid egyrészt ötös gyűrű alakjában, a furanoid formában [2-metil-2-vinil-5-(α -hidroxi-izopropil)-tetrahydrofuran, CAS 60047-17-8; cisz és transz: CAS 5989-33-3 és 34995-77-2), másrészt hatos gyűrűként, a piranoid formában fordul elő (2,2,6-trimetil-6-vinil-tetrahydro-2H-pirán-3-ol, CAS 14049-11-7; cisz és transz: CAS 14009-71-3 és 39028-58-5). A természetben illóolajokban, így rózsafaolajban és *Osmanthus abs.*-ban, valamint gyümölcsökben fordul elő (Volatile Compounds in Food, Qualitative és Quantitative Data, 7. kiadás, 1996, TNO Nutrition and Food Research Institute, Zeist, Holland), szaga virágos-föld jellegű, enyhén bergamota szerű (Bauer, Garbe, Surburg, Common Fragrance and Flavour Materials, 2. kiadás, VCH, Weinheim 1990, 114. old.). A linalool-oxid íz-benyomása citrus, sárgabarack, áfonya, virág irányú benyomás.

Az aromák tartományában a szakember három területet különböztet meg: természetes, természetazonos és mesterséges aromák. A mesterséges aromának nincs túl nagy jelentősége, tekintettel arra, hogy a fogyasztók nem nagyon kedvelik azokat. Természetazonos aroma előállítására példát találhatunk a JP A 59225176 sz. közzétett szabadalmi bejelentésben. E publikáció tárgya a linalool-oxid termelése, amelynek során nem természetes kiindulási anyagok erős ásványi savak alkalmazása mellett kémiai szintézis során linalool-oxiddá reagáltatnak. Egy ilyen termék csak a „természetazonos” kategóriába sorolható, nem mondható természetesnek, ezért természetes aromák előállítására nem használható fel.



A legértékesebb aromák a természetes aromák és az ezekben található természetes aromaanyagok. Ez a természetes aromák lényegesen magasabb áraikban is tükröződik. Ezen túlmenően a fogyasztók érdeklődése egyre inkább a természetes termékek felé, így e termékek előállítására szükséges természetes aromák felé is fordul.

A fentiek miatt az aromaipar célja, hogy természetes aromák természetes alkotóelemei megfelelő mennyiségben és megfelelő minőségben rendelkezésre álljanak. Ezeknek az egyes alkotóelemek természetes kivonatokból történő elkülönítése azonban rendszerint nem valósítható meg gazdaságosan.

A linalool-oxid fermentációs úton történő előállításának egy példája Demyttenaere publikációjából ismert (Demyttenaere, J. C. R., 1998, Biotransformation of terpenes by fungi for the production of bioflavors, Meded. – Fac. Landbouwk. Toegepaste Biol. Wet., 63 (4a), 1321-1324, és Demyttenaere, J. C. R.; Willemen, H.M., 1998, Biotransformation of linalool to furanoid and pyranoid linalool oxides by *Aspergillus niger*, *Phytochemistry*, 47 (6), 1029-1036). A szerzők terpénalkoholok *Aspergillus niger* és *Penicillium* törzsek segítségével végzett biotranszformálását írják le. Ezen eljárás kivitelezése azonban igen bonyolult, lassú, és a linalool-oxid hozama csupán 20-33 %.

Ismert enzimek alkalmazása zsírsavak és alkének kettőskötéseinek epoxidálására is (1. PCT WO 91/04333. 2 Jarvie, A.W.P.; Overton, N.; Pourcain, C.B., 1998, Enzymatic epoxidation of polybutadiene, *Chem. Comm.* 177-178, 3. Lemoult, S.C.; Richardson, P.F.; Roberts, S.M., 1995, Lipase catalysed Baeyer-Villiger Reactions, *J. Chem. Soc. Perkin Trans. I*, 89-91. 4. Rüsch, M.; Warwel, S., 1996, Peroxy fatty acids: lipase catalysed preparation and epoxidation, *Lipid Technology*, 7, 77-80. 5. Miurra, Y.; Yamane, T., 1997, Epoxidation of alkanes and cycloalkanes by microbial lipases immobilized with photo crosslinkable resin



prepolymer, *Biotechnol. Lett.*, 19, 7, 611-613). Ennek során a kettőskötés epoxidálódik, peroxikarbonsavakon át végbemenő kémiai reakcióra analóg módon. A lipáz enzim (E.C. 3.1.1.3, Cas-szám: 9001-62-1, például *Pseudomonas cepacia*, DSM 3959, *Candida antarctica* DSM 3855, DSM 3908, DSM 3909, *Humicola lanuginosa*, DSM 3819, DSM 4109, *Humicola brevispora*, DSM 4110, *Humicola brevis* var. *thermoidea*, DSM 4111, *Humicola isolens*, DSM 1800 mikroorganizmusokból származó lipáz) hidrogén-peroxid jelenlétében katalizálja a peroxikarbonsav közbenső termékkénti képződését (WO 91/04333).

Lipáz enzimek laboratóriumban vagy termelő üzemben történő alkalmazása – lényegében észterezésre vagy átészterezésre - számos publikációból ismert. Furanoid vagy piranoid linalool-oxid enzimes úton történő előállítását azonban a sok publikáció közül egy sem írja le.

A jelen találmány feladata olyan linalool-oxid vagy linalool-oxidtartalmú elegy előállítása volt, amely természetesnek minősíthető és természetes aromák előállítására alkalmazható. További cél az volt, hogy a hozam határozottan nagyobb legyen, mint a technika eddigi állása szerinti hozamok. Különösen azt a célt tűztük ki, hogy a hozam meghaladja a 90 %-ot.

Eljárást találtunk linalool-oxid vagy linalool-oxid-tartalmú elegyek előállítására, mely eljárásra jellemző, hogy linaloolt vagy linaloolt tartalmazó elegyet enzim jelenlétében oxidálunk.

A találmány szerinti eljárásban mind a D-linaloolból, mind az L-linaloolból indulhatunk ki. Ezek az anyagok tiszta formában vagy elegy alakjában alkalmazhatók. Linalool további anyagokkal alkotott elegyeit szintén alkalmazhatjuk.

Az ilyen további anyagokként illóolajok, abszoluek vagy kivonatok jöhetnek számításba. A találmány egy előnyös kiviteli módja szerint a linalool illóolajok, így rózsafaolaj, korianderolaj, bazsalikomolaj, levendulaolaj alkotórésze. Ez esetben is D-



linaloolt vagy L-linaloolt tiszta anyagként lehet a reakcióelegyben, de természetesen D-linalool és L-linalool elegye lehet jelen a reakcióelegyben

A találmány szerint alkalmazott enzimek előnyösen hidrolázok, különösen lipázok vagy proteázok. A találmány értelmében különösen alkalmasok a lipázok. Az immobilizált lipázok előnyben részesítjük, például Chirazym C2 L2 (Roche Diagnostics, Penzberg, Németország) vagy Novozym 435 (Novo Nordisk, Dánia).

Előnyösen az alábbi mikroorganizmusok segítségével nyerhető enzimeket alkalmazzuk: *Pseudomonas cepacia*, például DSM 3959, *Candida antarctica*, például DSM 3855, DSM 3908, DSM 3909, *Humicola lanuginosa*, például DSM 3819, DSM 4109, *Humicola brevispora*, például DSM 4110, *Humicola brevis* var. *thermoidea*, például DSM 4111, *Humicola isolens*, például DSM 1800.

Enzimtermelőként különösen élesztők előnyösek. Különösen előnyösek *Candida*-fajták, az ilyenek tista tenyésztete vagy kevert tenyésztete alakjában. Igen előnyös a *Candida antarctica*. A találmány szerinti eljárás szempontjából tehát különösen előnyösen *Candida antarctica*-ból származó lipázok.

A találmány szerinti eljárásban a linalool oxidálását előnyösen az említett enzimek és oxidálószer jelenlétében végezzük. Különösen előnyös oxidálószer a hidrogén-peroxid. Az oxidálószer az oxidálási folyamat előtt vagy alatt adagolhatjuk. A találmány értelmében lehetséges továbbá a közeg olyan összetétele és/vagy a reakció-körülmények olyan megválasztása, hogy a kívánt oxidálószer a találmány szerinti eljárás közben képződik. Az oxidálószer előnyösen enzimek alkalmazásával létrehozhatjuk, például oxidáz enzimek, mint amilyen például a glükózoxidáz. Nem-enzimes katalizátorok alkalmazása szintén elképzelhető a hidrogén-peroxid előállítására.

A találmány szerinti eljárás egyik változata szerint például a közeg és az enzimek összetételét úgy választjuk meg, hogy a hidrogén-peroxid az eljárás során *in*



situ képződik. A hidrogén-peroxid képződését az oxidálás elején indíthatjuk, de lehetséges az is, hogy a hidrogén-peroxid *in situ* képződését az oxidálás alatt játszadjuk le. A találmány értelmében a hidrogén-peroxid képződése például enzim útján történik oly módon, hogy vizes közegben glükózt a glükóz-oxidáz enzim segítségével oxidáljuk.

Az enzimek és oxidálószer alkalmazása mellett a reakcióoldathoz gyakran oldószert is adhatunk. Oldószerként a találmány értelmében ecetsavészterek jöhetnek számításba, az etil-acetátot előnyben részesítjük. Oldószerként továbbá olyan karbonsavakat is alkalmazhatunk, amelyek peroxi-karbonsav képzésére képesek, például ecetsavat, hangyasavat vagy benzoetsavat. Az ecetsavat előnyben részesítjük.

Előnyök az olyan oldószerek, amelyek az enzim segítségével hidrogén-peroxid jelenlétében persavat képeznek. Erre példa az etil-acetát, amely lipáz segítségével hidrogén-peroxid jelenlétében közbelső terméként perecetsavat képez.

A találmány szerinti eljárás egy különösen előnyös kiviteli módja szerint tehát az A) reakcióvázlalon feltüntetett reakció zajlik le.

A leírt találmány szerinti eljárás segítségével meglepő módon olyan linalool-oxid állítható elő, amely természetesnek minősíthető, így természetes aromák előállítására használható fel. Meglepő módon az is bebizonyosodott, hogy egyszerű módon természetes linalool-oxid a 90 %-ot is meghaladó hozamban állítható elő. Ezzel a találmány szerinti eljárásnak döntő előnye van az eddig ismert, mikroorganizmusokat alkalmazó fermentációs eljárásokhoz képest. A találmány szerinti eljárás alkalmas természetes linalool-oxid ipari előállítására.

A találmány szerint a linalool-oxid közvetlenül vagy aromákban alkalmazható a legkülönbözőbb élelmiszerek előállításában, különösen olyan esetekben, ahol a „citrus”, „sárgabarack” vagy „áfonya” ízhatás létrehozása a cél.



Példa

Tétel	Mennyiség	Kiindulási anyag
1	100,0 ml	etil-acetát, természetes
2	7,7 g	linalool, természetes
3	6,0 ml	hidrogén-peroxid, 30 %-os
4	0,1 g (245 egység)	Lipase Cgirazym C2 L2 (Roche Diagnostics, vagy Novozym 435 (Novo Nordisk))

Munkaleírás

Az etil-acetátot (1. tétel) szárnyas keverővel felszerelt, 2 liter térfogatú háromnyakú lombikba töltjük, és lassú keverés közben adagoljuk a linaloolt (2. tétel), a hidrogén-peroxidot (H_2O_2 30 %-os, 3. tétel) és az enzimet (4. tétel). Az elegyet szobahőmérsékleten lassan (100-120 fordulat/perc) keverjük. Az elegy összetételét 1-2 naponként gázkromatográfiásan elemezzük.

Eredmény:

A táblázatban feltüntetett GC-eredményekből az ecetsav felületszázalékait kivontuk (kivéve az ecetsav esetén)

	Linalool (GC-%)	Linalool-oxid F transz és cisz (GC-%)	Linalool-oxid P, transz és cisz, (GC-%)	Linalool- oxid-epoxi- dok (GC-%)	Ecetsav (GC- %)
Kezdet	99,3	--	--	--	--
1 nap	5,1	32,9	4,2	57,1	19,7
2 nap	0	56,5	6,5	36,3	22,1
5 nap	0	79,8	9,1	9,0	24,2
7 nap	0	83,3	9,6	5,6	25,4

F : furanoid

P: piranoid

A furanoid és piranoid linalool-oxid összhozama kb. 93 %.



A linalool-oxidot tartalmazó szerves fázist 10 tányéros kolonnán desztillálva 99 % tisztaságú furanoid linalool-oxidot kapunk. Íz és illat irányú érzékszervi vizsgálat szerint a termék a természetazonos mintához hasonlítható.



Szabadalmi igénypontok

1. Eljárás linalool-oxid vagy linalool-oxid tartalmú elegyek előállítására, *azzal jellemezve*, hogy linaloolt vagy linaloolt tartalmazó elegyet enzim jelenlétében oxidálunk.
2. Az 1. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy kiindulási anyagként D-linaloolt, L-linaloolt vagy D-linaloolt vagy L-linaloolt tartalmazó illóolajat vagy a felsoroltak elegyét alkalmazzuk.
3. Az 1. vagy 2. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy élesztőből vagy baktériumból származó enzimet alkalmazunk.
4. Az 1-3. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy *Candida antarctica* fajtákból, *Pseudomonas* sp.-ből, *Humicola* sp.-ből, *Mucor miehei*-ből vagy ezeket az élesztőket tartalmazó keveréktenyészetekből származó enzimet alkalmazunk.
5. Az 1-4. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy *Candida antarctica*-ból származó enzimet alkalmazunk.
6. Az 1-5. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimként lipázt alkalmazunk.
7. Az 1-6. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az oxidálást egy vagy több oxidálószer jelenlétében végezzük.
8. Az 1-7. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az oxidálószer az eljárás előtt vagy alatt adagoljuk.
9. Az 1-8. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az eljárás előtt vagy alatt a reakcióközegben oxidálószer képzünk.
10. Az 1-9. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az oxidálószer az oxidálás előtt vagy alatt katalizátor jelenlétében képezzük.



11. A 10. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy katalizátorként enzimet alkalmazunk.

12. A 11. igénypont szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy enzimként glükóz-oxidázt (GOD) alkalmazunk.

13. A 7-12. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy az oxidálószer 0,1-80 % mennyiségben adjuk a reakcióközeghez.

14. Az 1-13. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oxidálószerként hidrogén-peroxidot alkalmazunk.

15. Az 1-14. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy a reakcióközeghez oldószert adunk.

16. Az 1-15. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oldószerként karbonsavat vagy karbonsavésztert alkalmazunk.

17. Az 1-16. igénypontok bármelyike szerinti eljárás, *azzal jellemezve*, hogy oldószerként etil-acetátot vagy ecetsavat alkalmazunk.

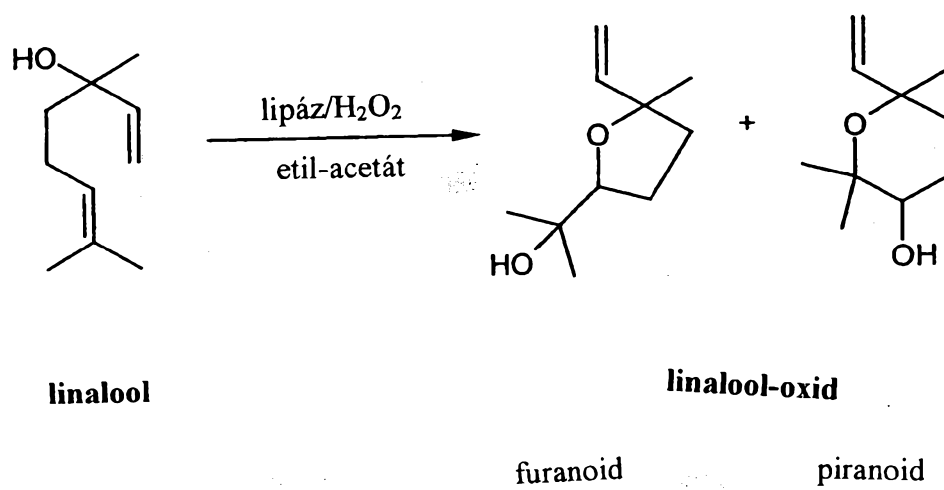
18. Linalool-oxid, előállítva az 1-15. igénypontok bármelyike szerint.

19. A 18. igénypont szerinti linalool-oxid alkalmazása aromaanyagként élelmiszerekben vagy illatanyagként.

A meghatalmazott:

9x1 = 10 oldal

2002.06.07.



A) reakcióvázlat