

НОВИ ПОДХОДИ ПРИ СИНТЕЗА НА БИОЛОГИЧНО АКТИВНИ СУКРОЕСТЕРИ

Радка Грудева, Надежда Петкова, Пантелей Денев

*Университет по хранителни технологии,
катедра „Органична химия, бул. „Марица“ 26, 4002 Пловдив,
e-mail: radka_grudeva@outlook.com, petkovanadejda@abv.bg*

РЕЗЮМЕ

Сукроестерите представляват нейногенни повърхностноактивни вещества с важно значение в растителната защита, медицината, козметиката и хранителната промишленост. Освен регламентираното им приложение като добавки в храните (емулгатори), те се утвърдиха и като вещества с потенциална антимикробна активност. Настоящият преглед има за цел да разгледа новите подходи, прилагани при синтеза на естери на захарозата, характеризиращи се с повишена биологична активност. Химичният синтез на сукроестери (каприлати, лаурати, миристати и палмитати) обикновено се осъществява в DMSO чрез преестерификация на винилови или етилови естери на съответните мастни киселини в присъствие на алкални катализатори. В настоящия обзор е направена сравнителна характеристика на новите химични и ензимни методи за естерификация на захароза. Подробно са разгледани ускореният ултразвуков химичен синтез на сукроестери, както и ензимна модификация, осъществена в присъствие на липаза, проведена под микровълново, ултразвуково въздействие и реакционната среда със суперкритичен въглероден диоксид. Представените нови подходи за получаване на биологично активни сукроестери имат за крайна цел

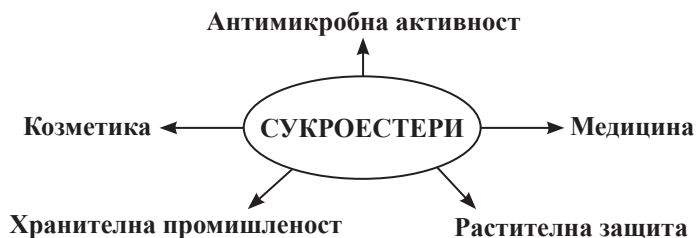
преимущественото натрупване на моноестери, отличаващи се с най-висока антимикробна активност. Оценен е потенциалът на приложението на ултразвуковото въздействие при интензифициране на естерификационния процес.

Ключови думи: *сукроестери, ултразвуков синтез, микровълнов синтез, ензимен катализ, антимикробна активност*

ВЪВЕДЕНИЕ

Нарастващият интерес към сукроестерите и широкото им приложение обуславят необходимостта от нови, подобрени, бързи и ефективни методи за тяхното получаване. В настоящия обзор са представени класически и нови подходи при синтеза на биологично активни сукроестери. Естерите на захарозата с висши мастни киселини намират широко приложение в хранително-вкусовата промишленост [31, 43], в козметичната индустрия, в стоматологичните и медицинските консумативи (**Фиг. 1**). Във фармацията сукростеаратът и сукропалмитатът се използват като пълнители за лекарствените формули, за да се контролира скоростта на разтваряне и освобождаване на активната субстанция [32]. Изследвано е действието им като антибиотични препарати [27] и способността им да проявяват антитуморни [33, 41] и инсектицидни свойства [6].

Сукроестерите са легализирани за употреба в храните през 1959 г. в Япония [35]. В европейското хранително законодателство са класифицирани като добавка в храните – Е 473. Поради ниската им токсичност е прието те да се влагат като емулгатори с концентрация, не по-висока от 10 mg/mL. Максималният допустим дневен прием на сукроестерите е сравнително висок – до 20 mg/kg телесна маса [12].



Фигура 1. Приложение на сукроестерите

Количеството на остатъците от мастни киселини от моно- до окта-замествания в захарозата, дължината на ацилната верига и нейната ненаситеност и степента на заместване [16] определят хидрофилно-липофилния баланс HLB на продукта.

МЕТОДИ ЗА ПОЛУЧАВАНЕ НА СУКРОЕСТЕРИ

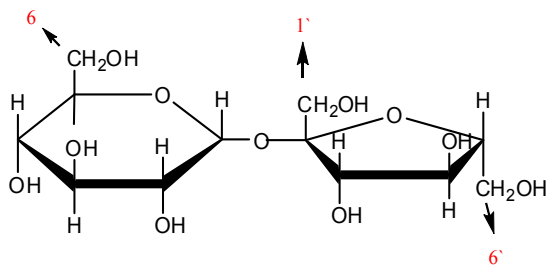
1. Конвенционален химичен синтез

Химичният синтез на естери на захарозата е осъществен за първи път от Херцфелд [18]. При него реакциите на естерификация и преестерификация протичат при висока температура в присъствието на алкален катализатор [13]. Алкоксиди на алкалните метали често се използват за катализатори – натриев метилат (CH_3ONa), и дават много високи добиви (>98%) за кратко реакционно време (30 мин.), дори при ниски моларни концентрации (0.5 mol %). Хидроксидите на алкалните метали (KOH и NaOH) са по-малко активни от металните алкоксиди, но са добра алтернатива поради високите добиви чрез увеличаване на концентрацията на катализатора с 1 или 2 mol %. Също така трябва да се има предвид, че в системата ще се отдели малко вода, която ще хидролизира част от произведения естер с последващо образуване на сапун.

Използването на калиев карбонат в концентрация от 2 или 3 mol % намалява образуването на сапун и дава възможност за повишени добиви. В действителност добавянето му дава възможност за образуване на гидрогенкарбонати вместо вода и естерите не се хидролизират. По време на преестерификация на захароза с метилови естери на мастните киселини се образува метанол, който може да бъде отстранен чрез дестилация или вакуум по време на реакцията. Това променя равновесието в полза на получения сукроестер и подобрява добива на желания продукт. Spuces et al. [10] съобщават за 72% добив от 2-О-лаурил захароза, като използват за катализатор Na_2HPO_4 при 40°C в продължение на 5 часа в DMF с виниллауринат като донор.

Реакцията на трансестерификация не позволява региоселективност и контрол относно степента на заместване на хидроксилните групи на захарозата [34, 38, 39]. Въпреки това реакцията може да бъде насочена към конкретна форма на заместване чрез внимателен

избор на катализатор и условия на реакцията. Повечето изследвания са показали, че добивът на захарни моно- и диестери се увеличава в зависимост от моларното съотношение захароза : мастна киселина. Това се дължи на повишената реакционна способност на първичните хидроксилни групи в захарозата, която се променя в следната последователност: 6-OH \geq 6'-OH > 1'-OH > вторични -OH (Фиг. 2) [1, 30].

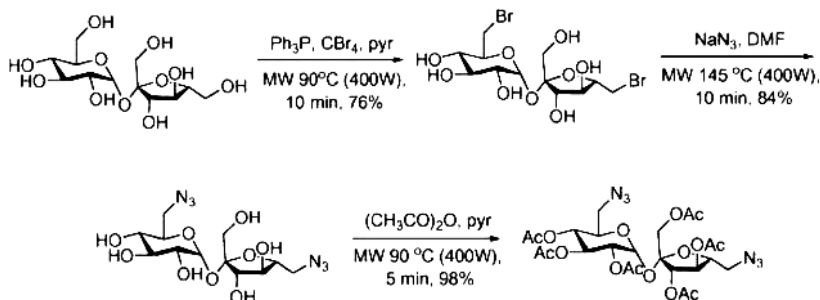


Фигура 2. Реакционни групи в захарозната молекула

2. Синтез чрез микровълново въздействие

Микровълновият синтез се използва в почти всички области на химичната наука, включително и във въглехидратната химия [8, 26]. Този метод позволява значително намаляване на времето за реакция и получаване на желаните захарни производни в сравнение с класическите методи за синтез [11, 30].

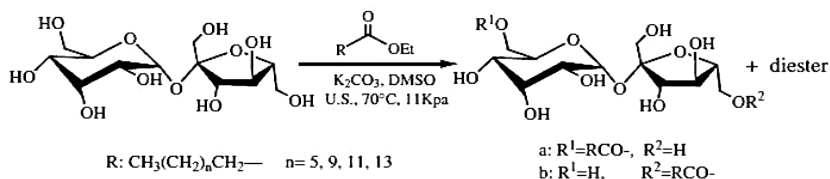
Ключовият момент за успешния синтез при микровълново облъчване е специално проектираното за химически лаборатории оборудване. То разполага с много прецизен контрол върху условията – температура и налягане, в сравнение с домашните микровълнови фурни. Софтуерът осигурява опростен процес на наблюдение и контрол, което води до по-точни и по-надеждни условия за реакция. При микровълновото облъчване преносът на енергия е невероятно бърз. Чрез контрол на температурата се избягва разграждането на субстратите и се получават сравнително високи добиви за кратко реакционно време. При този метод, когато температурата достигне стойността на входа, мощността се намалява, така че реакционната смес не надвишава зададената точка. След това остава на по-ниско ниво, за да се поддържа зададената температура през цялата реакция.



Фигура 3. Микровълново въздействие при синтез на сукроестери

3. Синтез чрез ултразвуково въздействие

Ултразвуковото облъчване е полезен метод за емулгиране на несмесващи се течности. Този метод предизвиква образуване на кавитационни мехурчета, които намаляват фазовата граница, причиняват емулгиране и молекулите попаднат от една течност в друга [29]. Престерификацията на захароза с естери на мастни киселини може да бъде ускорена чрез ултразвуково облъчване. Получена е хомоложна серия захарозни моноестери с N-ацилни вериги от 8, 12, 14 и 16 въглеродни атома чрез ултразвуково облъчване с добър добив (73%) и висок процент на моноестери (92%). Експерименталните условия, които влияят на добива, са видът и концентрацията на катализатора, времето за реакция и системата за налягане [19].



Фигура 4. Реакционна схема на синтез на сукроестери при ултразвуково въздействие [19]

Особено важна е ролята и на катализатора при синтеза на сукроестери (Табл. 1).

Таблица 1. Връзка между катализатор и крайния добив [19]

Катализатор	Mol (%)	Налягане (кПа)	Време (h)	Добив (%)
Без	0	11	5	0
NaH ₂ PO ₄	200	100	4	0
NaH ₂ PO ₄	200	11	3	2
K ₂ CO ₃	10	100	2	10.5
K ₂ CO ₃	8	11	2	63.6
K ₂ CO ₃	10	11	2	67.7
K ₂ CO ₃	13	11	2	74.8
K ₂ CO ₃	16	11	2	68.1
K ₂ CO ₃	20	11	2	60.4
K ₂ CO ₃ +PEG-400	10	100	3	0
K ₂ CO ₃ +PEG-400	10	11	2.5	10.1

4. Ензимен синтез

Ензимите са успешно прилагани за региоселективни синтези на моно- и олигозахариди, включително ацилиране, деацилиране и окислителни реакции. Синтезът на сукроестери посредством ензимна катализа осигурява регио- и стереоселективни продукти (Табл. 2).

Таблица 2. Ацилиране на захароза в органичен разтворител чрез ензимен катализатор [5, 35, 37]

Ензим	Разтворител	Ацилиращ агент	Място на ацилиране
Протеаза N	DMF	Винилов естер (C ₈)	1'
Протеаза N	DMF	Метилов естер (C ₈ -C ₁₂)	1'
Субтилисин	DMF	2,2,2-трихлороетил бутират	1'
Субтилисин BPN'	Пиридин	Винилов естер (C ₂ -C ₁₀)	1', 6
Субтилисин Carlsberg	Пиридин	Винилов естер(C ₂ -C ₁₀)	1', 6
Субтилисин	Пиридин	Винилов естер(C ₁₂ -C ₁₈)	1'

Термолизин	DMSO	Винил лауреат (C ₁₂)	2
Алкална протеаза AL 89	DMF:DMSO (1:1 v/v)	Винилов естер (C ₁₀ -C ₁₈)	2
Липаза В от <i>C. antarctica</i>	<i>t</i> -бутанол	Етилов бутират (C ₄)	6, 6'
Липаза В от <i>C. antarctica</i>	<i>t</i> -пентанол-пиридин (11:9 v/v)	Винил стеарат (C ₁₈)	6, 6'

Условията, при които протича синтезът, са по-меки в сравнение с химичния, което ограничава нежеланите странични реакции [3, 15]. Обаче за оптимизирането на реакцията на ензимна катализа е необходимо да се съобразят голям брой параметри [9, 23]:

- 1. Водна активност:** Минималното съдържание на вода е необходимо за поддържане на ензима в активна форма [2, 14, 25].
- 2. Природата на органичния разтворител:** Трябва да се вземе предвид как органичният разтворител влияе на ензима и субстрата, ефективността, рентабилността на реакцията, спазването на законодателството относно областта на приложение на разтворителите и тяхната токсичност в храните.
- 3. Условия на реакцията:** температура, рН, време за реакция и молно съотношение, полярност на средата [4, 9]. Разтворители като пиридин, диметилформамид и *t*-бутилов алкохол [24, 34, 44] разтварят захарозата и мастните киселини, но само няколко ензима запазват своята активност в тези разтворители [3]. Освен това използването на разтворители, които са съвместими с прилагането на захарни естери като хранителни добавки, се ограничава от Директива 96/77/ЕО. Установено е, че суперкритичният въглероден диоксид (SCCO₂) може да се използва като алтернативен разтворител. Той е незапалим, нетоксичен и по време на ензимен синтез не образува странични продукти [28,42].

Антимикробна активност на сукроестери

Поради добрите си повърхностноактивни свойства естери на мастните киселини със захароза се използват като ПАВ. Тези естери представляват възобновяем ресурс и имат широк спектър на приложение в ХВП [12]. Бактерицидната им активност зависи от тяхната приро-

да – дължина на алкилната верига, както и от щама микроорганизми. По принцип грам-положителните бактерии са по-чувствителни от грам-отрицателните. Това явление може би се дължи на разликата в строежа на външната мембрана на клетъчната стена на бактериите [40]. Все още не е напълно изяснен механизмът, чрез който сукроестерите унищожават микроорганизмите. Електронномикроскопски изследвания показват, че липидните молекули имат способността да разрушават клетъчните мембрани [20]. Сукроестерите проявяват тенденция за понижаване на антимикробния ефект на дадения естер с повишаване дължината на веригата [7]. Сукроестерите са неактивни към развитието на грам-отрицателни бактерии, обаче проявяват активност към грам-положителни. По-голямата молекулна структура води до химични и структурни промени, които повлияват понижаването на инхибиращата активност на активната субстанция спрямо тествания микроорганизъм. Установено е, че средноверижните мастни киселини на захарозните естери са най-активни [21]. Дори сукролауринатът има по-висока активност срещу *E. coli* от самата лауринова киселина [7], като инхибиращата концентрация е 1 mg/mL [22]. С висока активност се отличават и захарозни моноестери с 10-ундециленовата киселина, което показва потенциалното им приложение като антигъбични, антибактериални и антивирусни препарати в козметиката, медицината и храните [36]. Търговските сукроестери се влагат като антимикуробни агенти в консервирани храни и напитки главно в Япония с цел стабилизиране на емулсиите по време на стерилизационния процес и за инхибиране развитието на спори на бактерии [17].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получаването на сукроестери може да протече по химичен или по ензимен начин. При ензимния подход може да се използват като биологични катализатори различни видове липази. Основното предимство на ензимния синтез е високата му региоселективност, което може да доведе до получаване на високоефективен биологично активен естер. Освен това ензимният метод може да се извършва при меки реакционни условия. Така денатурирането на субстрата и/или продуктите може да бъде избегнато. Въпреки че химическият синтез се характеризира с ниска селективност и води до смес от захарни естери с различна степен на естерификация, той осигурява високи добиви и ниска себестойност. Той все още е предпочитаният метод за продукти с определени

функционални свойства. Съпътстващите проблеми – токсични органични разтворители и високи температури, което води до оцветяване на крайните продукти и карамелизиране на захарозата, могат да се избегнат при използването на нови технологични подходи: суперкритичен въглероден диоксид, ултразвуково поле и високочестотно облъчване. Полученият краен продукт от моноестери или смес от моно-, ди- и полиестери се характеризира с повишена биологична активност с широко приложение в различни области на хранителната и фармацевтичната индустрия.

ЛИТЕРАТУРА

1. Allen, D. K., Tao, B. Y., Carbohydrate-alkyl ester derivatives as biosurfactants. *J. Surfact. Deterg.*, 1999, 2, 383 – 390.
2. Blecker, C., La catalyse en milieu organique: potentialité d'utilisation des lipases. *Bull. Rech. Agron. Gembloux*, 1993, 28, 51 – 85.
3. Cao, L., Fischer, A., Bornscheuer, U. T., Schmid R. D., Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid ester, *Biocatal. Biotransform.*, 1997, 14, 269 – 283.
4. Carrea, G., Ottolina, G., Riva S., Role of solvent in the control of enzyme selectivity in organic media. *Trends Biotechnol.*, 1995, 13, 63 – 70.
5. Chamouleau, F., Coulon, D., Girardin, M., Ghoul, M., Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media, *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, 2001, 11, 949 – 954.
6. Chortyk, O. T., Pomonis, J. G., Johnson, A. W. Synthesis and characterization of insecticidal sucrose esters. *J. Agric. Food Chem.*, 1996, 44, 1551 – 1557.
7. Conley, A., Kabara, J., Antimicrobial action of esters of polyhydric alcohols, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 1973, 4(5), 501 – 506.
8. Corsaro, A., Chiacchio, U., Pistara, V., Romeo, G., Microwave-assisted Chemistry of Carbohydrates, *Curr. Org. Chem.*, 2004, 8, 511 – 538.
9. Coulon, D., Ghoul, M., The enzymatic synthesis of non ionic surfactants: the sugar esters – an overview., *Agro. Food Ind. Hi Tech.*, 1998, 9, 22 – 26.

10. Cruces, M. A., Otero, C., Bernabe, M., Martin-Lomas, M., Ballesteros, A. Enzymatic preparation of acylated sucroses. *Annals N. Y. Acad. Sci.*, 1992, 672, 436 – 443.
11. Crucho, C. C., Petrova, K. T., Pinto, R. C., and Barros, M. T., Novel Unsaturated Sucrose Ethers and Their Application as Monomers, *Molecules*, 2008, 13, 762 – 770.
12. Ferrer, M., Soliveri, J., Plou, F. J., Lopez-Cortes, N., Reyes-Duarte, D., Christensen, M., Copa-Patiño, J. L., Ballesteros A., Synthesis of sugar esters in solvent mixtures by lipases from *Thermomyces lanuginosus* and *Candida antarctica* B, and their antimicrobial properties. *Enzyme & Microb. Tech.*, 2005, 36, 391 – 398.
13. Fregapane, G., Sarney, D. B., Greenberg, S.G., Knight D. J., Vulfson E. N., Enzymatic synthesis of monosaccharide fatty acid esters and their comparison with conventional products., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1994, 71, 87 – 91.
14. Gorman, L. A. S., Dordick J. S., Organic solvents strip water off enzymes. *Biotechnol. Bioeng.*, 1992, 39, 393 – 397.
15. Gumel, A. M., Annuar, M. S. M., Lipase mediated synthesis of sugar fatty acid esters, *Process Biochemistry*, 2011, 46 (11), 2079 – 2090.
16. Gupta, R. K., Sucrose Esters and Sucrose Ester/Glyceride Blends as Emulsifiers, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1983, 60, 862 – 869.
17. Habulin, M., Šabeder, S., Knez, Ž., Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity, *Journal of Supercritical Fluids*, 2008, 45 (3), 338 – 345.
18. Herzfeld, A., Acetylierung einiger Kohlenhydrate nach dem LiebermannYschen Verfahren, *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*, 1880, 13 (1), 265 – 268.
19. Huang, D., Jiang, X., Improved synthesis of sucrose fatty acid monoesters under ultrasonic irradiation, *Ultrasonics Sonochemistry*, 2010, 17, 352 – 355.
20. Kabara, J., *Antimicrobials in Food*. Marcel Dekker, New York, 1993, 307 – 341.
21. Kabara, J., Marshall, D., *Medium-chain fatty acids and esters, Antimicrobials in food*, (Eds P. Davidson, J. Sofos, A. Branen), CRC press Taylor & Francis Group, New York, 2005, 328 – 336.

22. Kato, A., Arima, K., Inhibitory effect of sucrose ester of lauric acid on the growth of *Escherichia coli*., *Biochemical & Biophysical Research Communications*, 1971, 42 (4), 596 – 601.
23. Krishna, S. H., Manohar, B., Divakar, S., Karanth, N. G., Lipase-catalysed synthesis of isoamyl butyrate: optimisation by response surface methodology., *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 1999, 76, 1483 – 1488.
24. Ku, M. A., Hang, Y. D., Enzymatic synthesis of esters in organic medium with lipase from *Byssoschlamys*, *Biotechnol. Lett.*, 1995, 17, 1081 – 1084.
25. Liaquat, M., Owusu Apenten R. K., Synthesis of low molecular weight flavour esters using plant seedling lipase in organic media., *J. Food. Sci.*, 2000, 65, 295 – 299.
26. Lidström, P.; Tierney, J.; Wathey, B.; Westman, J. *Tetrahedron*, 2001, 57, 9225.
27. Marshall, D. L., Bullerman, L. B., Antimicrobial properties of sucrose fatty acid esters, In: Akoh, C. C. and B. G. Swanson, B. G. (Eds.) Carbohydrate Polyesters as Fat Substitutes, Marcel Dekker, 1994, 149 – 167.
28. Marty, A., Combes, D., Condoret, J.-S., Continuous reaction–separation process for enzymatic esterification in supercritical carbon dioxide, *Biotechnol. Bioeng.*, 1994, 43, 497 – 504.
29. Mason, T. J., Practical Sonochemistry, Ellis Horwood Ltd., 1991.
30. Molinier, V., Fitremann, J., Bouchu, A., Queneau, Y., Sucrose esterification under Mitsunobu conditions: evidence for the formation of 6-O-acyl-3',6'-anhydrosucrose besides mono and diesters of fatty acids, *Tetrahedron: Asymmetry*, 2004, 15, 1753 – 1762.
31. Nakamura, S., Using sucrose esters as food emulsifiers, *Oleochemicals*, 1997, 8, 866 – 874.
32. Ntawukulilyayo, J. D., Demuyneck, C., Remon, J. P., Microcrystalline cellulose – sucrose esters as tablet matrix forming agents. *Int. J. Pharm.*, 1995, 121, 205 – 210.
33. Okabe, S., Saganuma, M., Tada, Y., Ochiai, Y., Sueoka, E., Kohya, H., Shibata, A., Plou F. J., M. A Cruces., M. Bernabe, M. Martin-Lomas, J. L. Parra, A. Ballesteros. Enzymatic synthesis of partially acylated sucroses, *Enzyme Eng. XII – Ann. N Y Acad. Sci.*, 1995, 750, 332 – 337.

34. Plou, F. J., Cruces, M. A., Ferrer, M., Fuentes, G., Pastor, E., Bernabe, M., Christensen, M., Comelles, F., Parra, J. L., Ballesteros, A., Enzymatic acylation of di- and trisaccharides with fatty acids: choosing the appropriate enzyme, support and solvent, *J. Biotechnol.*, 2002, 96 (1), 55 – 66.
35. Polat, T., R. J. Lindhardt, Syntheses and applications of sucrose-based esters. *Journal of Surfactants and Detergents*, 2001, 4(4), 407 – 414.
36. Raku, T., Kitagawa, M., Shimakawa, H., Tokiwa, Y., Enzymatic synthesis of hydrophilic undecylenic acid sugar esters and their biodegradability, *Biotech. Lett.*, 2003, 161, 161 – 166.
37. Riva, S., Nonini, M., Ottolina, G., Danieli, B. (1998) Subtilisin-catalyzed esterification of di- and oligosaccharides containing a D-fructose moiety, *Carbohydr. Res.*, 314, 259 – 266
38. Sin, Y. M., Cho, K. W., Lee, T. H. (). Synthesis of fructose esters by *Pseudomonas* sp. lipase in anhydrous pyridine, *Biotechnol. Lett.*, 1998, 20, 91 – 94.
39. Spiliotis, N., Voustas, E., Magoulas, K., Tassios, D. Recovery of fructose laurate produced through enzymatic esterification. *Separ. Purif. Technol.*, 2000, 19, 229 – 236.
40. Sun, C., O'Connor, C., Robertson, A., Antibacterial actions of fatty acids and monoglycerides against *Helicobacter pylori*, *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 2003, 36 (1 – 2), 9 – 17.
41. Takahashi, M., Mizutani, M., Matsuzaki, T. and Fujiki, H., Disaccharide esters screened for inhibition of tumor necrosis factor- α release are new anticancer agents. *Jpn. J. Cancer Res.*, 1999, 90, 669 – 676.
42. Tsitsimpikou, C., Stamatis, H., Sereti, V., Dafflos, H., Kolisis F. N., Acylation of glucose catalyzed by lipases in supercritical carbon dioxide, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1998, 71, 309 – 314.
43. Watanabe, T., Sucrose fatty acid esters-past, present and future., *Foods Food Ingredients Journal of Japan*, 1999, 180, 18 – 25
44. Woudenberg-van Oosterom, M., F. Van Rantwijk, R. A., Sheldon, Regioselective acylation of disaccharides in tert-butyl alcohol catalyzed by *Candida antarctica* lipase, *Biotechnol. Bioeng.*, 1996, 49, 328 – 333.