

Enzimaska sinteza i primena askorbil-estara masnih kiselina

Marija M. Stojanović, Milica B. Carević, Mladen D. Mihailović, Zorica D. Knežević-Jugović, Slobodan D. Petrović, Dejan I. Bezbradica

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, Srbija

Izvod

Askorbil-estri masnih kiselina su liposolubilna antioksidativna jedinjenja koja se pod blagim reakcionim uslovima mogu dobiti u reakcijama acilovanja vitamina C pomoću lipaza. Kao reakcione sredine do sada su bili uspešno korišćeni polarni organski rastvarači, jonske tečnosti i natkritični fluidi. Na ravnotežnu konverziju, pozitivan efekat pokazala je kontrola sadržaja vode kao i upotreba aktiviranih acil donora, a negativan efekat je poskupljenje i/ili smanjenje produktivnosti procesa. U ovom radu prikazan je kratak pregled do sada opisanih postupaka enzimske sinteze askorbil-estara masnih kiselina sa navođenjem njihove potencijalne primene kao aditiva u prehrambenoj, kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji.

Ključne reči: vitamin C, masne kiseline, askorbil-estri, lipaze, antioksidativno dejstvo.

Dostupno na Internetu sa adrese časopisa: <http://www.ache.org.rs/HI/>

STRUČNI RAD

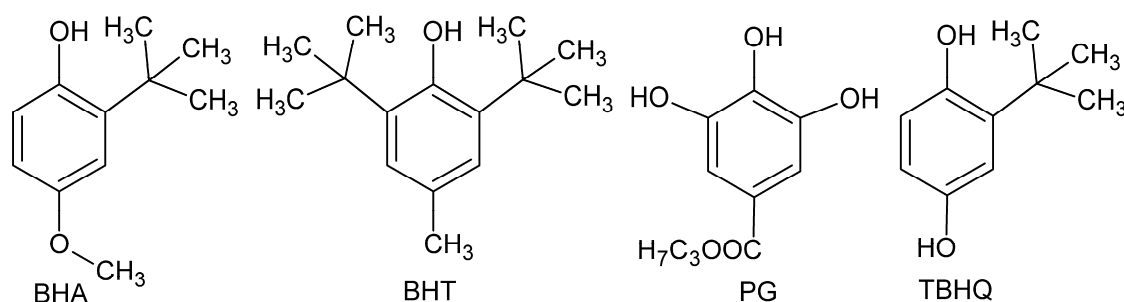
UDK 66.095.1:547.915

Hem. Ind. 67 (2) 239–247 (2013)

doi: 10.2298/HEMIND120522079S

Prehrambeni i kozmetički proizvodi sa visokim sadržajem lipida, naročito mono- i polinezasićenih masnih kiselina, podložni su kvarenju izazvanom oksidativnim procesima. Autooksidacija lipida je lančani proces napada slobodnih radikala na lipide u kome nastaju lipidni hidroperoksidi čijim se daljim razlaganjem formiraju jedinjenja kao što su peroksidi, aldehidi, ketoni, niže masne i oksidne kiseline. Navedene klase jedinjenja su odgovorne za užeglost namirnica. Produžavanje roka upotrebe i očuvanje nutritivne vrednosti lipofilnih proizvoda može se postići korišćenjem prirodnih i sintetskih aditiva sa antioksidativnim dejstvom [1,2]. Antioksidansi mogu biti jedinjenja različite hemijske strukture – fenoli, hinoni, organske kiseline, sumporna jedinjenja i enzimi, i njihovo dejstvo može biti zasnovano na različitim mehanizmima – inaktivaciji lipidnih slobodnih radikala, sprečavanju razlaganja hidroperoksida na slobodne radikale, sinergističkom dejstvu sa drugim anti-

oksidansima, itd. [3]. Osnovni preduslovi za korišćenje nekog prirodnog ili sintetskog jedinjenja sa antioksidativnim dejstvom kao aditiva u kozmetičkim proizvodima ili hrani su da ne menja boju, miris i ukus proizvoda u koji se dodaje, da je liposolubilno, netoksično i stabilno tokom dužeg vremenskog perioda i na povišenim temperaturama [3]. Hemijski sintetisani antioksidansi (butil-hidroksi-anizol (BHA), butil-hidroksi-toluen (BHT), propil-galat (PG) i *terc*-butil-hidrohinon (TBHQ), slika 1), koji se uglavnom primenjuju u ove svrhe, pod fiziološkim uslovima se razlažu do toksičnih supstanci, pa je opravdanost njihove upotrebe pod znakom pitanja [4,5]. Osim toga, u reakcijama njihove sinteze upotrebljavaju se rastvarači i katalizatori koji nisu biokompatibilni, a zbog izostanka regioselektivnosti i niskih prinosa, izolovanje i prečišćavanje proizvoda je komplikovano. Iz tih razloga, nameće se potreba za pronalazanjem novih, savremenijih antioksidanasa koji će zado-



Slika 1. Sintetski antioksidansi koji se upotrebljavaju u lipofilnim prehrambenim i kozmetičkim proizvodima.

Figure 1. Synthetic antioxidants used in lipophilic food and cosmetics.

Prepiska: D.I. Bezbradica, Tehnološko–metalurški fakultet, Karnegi-jeva 4, 11000 Beograd, Srbija.

E-pošta: dbez@tmf.bg.ac.rs

Rad primljen: 22. maj, 2012

Rad prihvaćen: 21. jun, 2012

voljavati uslov lipofilnosti i biti bezbedni za upotrebu [6]. L-Askorbinska kiselina je prirodna supstanca poznata po visokoj efikasnosti u vezivanju slobodnih radikala, međutim nije je moguće upotrebljavati u proizvodima sa visokim sadržajem lipida s obzirom na njenu

hidrosolubilnost (rastvara se 33 g na 100 ml vode) [7]. Askorbil-estri masnih kiselina su derivati prirodnih proizvoda koji zadovoljavaju sve uslove potrebne za korišćenje u takvim prehrambenim, kozmetičkim i farmaceutskim proizvodima. Neki od njih imaju kapacitet za vezivanje slobodnih radikala veći od same L-askorbinske kiseline, a pojedinicima se pripisuje i delotvornost u lečenju kancera i prevenciji bolesti izazvanih oksidativnim stresom [8].

Estri masnih kiselina i vitamina C nastaju u reakciji acilovanja, pri čemu acil donori (slika 2) mogu biti različiti (masne kiseline, njihovi metil-, etil- i vinil-estri i trigliceridi), a reakcija hemijski ili enzimski katalizovana. Hemijska sinteza podrazumeva korišćenje kiselih ili baznih katalizatora, izvođenje procesa na visokim temperaturama i upotrebu isparljivih organskih rastvarača pri ekstrakciji i hromatografiji. Pod takvim uslovima reakcija nije regioselektivna, postižu se niski prinosi, pa je i dalje prečišćavanje proizvoda otežano, a dolazi i do degradacije vitamina C [9,10]. I pored toga, danas se na industrijskom nivou askorbil-estri masnih kiselina (palmitinske, laurinske i stearinske) uglavnom proizvode na ovaj način.

ENZIMSKA SINTEZA ASKORBIL-ESTARA MASNIH KISELINA

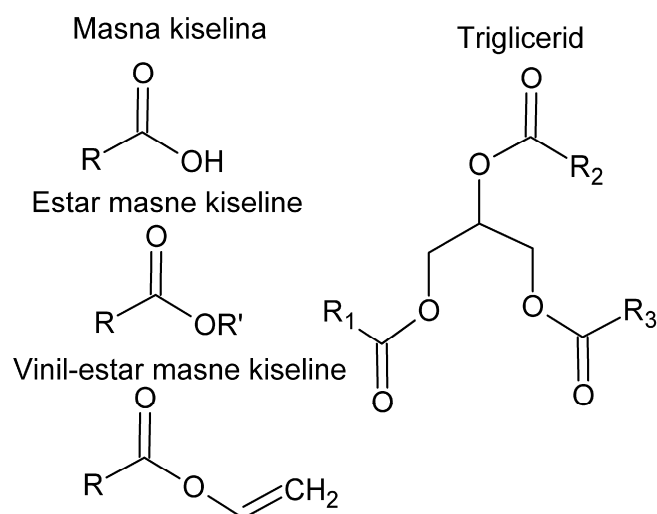
Predmet mnogih istraživanja je u poslednjih deceniju i po bila enzimska sinteza askorbil-estara masnih kiselina u efikasnom i ekološki prihvatljivom procesu (slika 3). Lipaze (E.C.3.1.1.3.), pored svoje osnovne uloge u katalizovanju hidrolize triacilglicerola, primenjuju se i u reakcijama esterifikacije, transesterifikacije i interesterifikacije u brojnim industrijskim procesima proizvodnje kozmetičkih, prehrambenih i optički čistih farmaceutskih sirovina i proizvoda [11,12]. Međutim,

na putu komercijalizacije biosinteze askorbil-estara masnih kiselina, i pored mogućnosti snižavanja troškova proizvodnje i dobijanja viših prinosa čistijeg proizvoda pod blažim reakcionim uslovima, stoje prepreke kao što su duga reakciona vremena, visoka cena komercijalnih enzimskih preparata i, u nekim opisanim postupcima, upotreba rastvarača koji nisu biokompatibilni [8]. Takođe, najveći broj istraživanja posvećen enzimskoj sintezi askorbil-estara masnih kiselina izvođen je šaržno, dok je samo nekoliko radova posvećeno kontinualnoj proizvodnji [13–15]. Iz tih razloga razvoj biokatalizovanih postupaka koji bi bili konkurentni klasičnim hemijskim metodama je od velikog značaja.

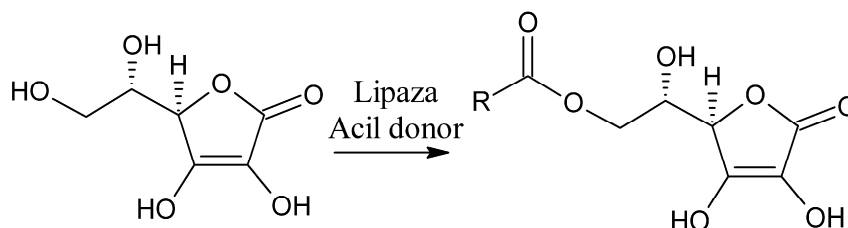
Uticaj vrste i koncentracije lipaze na biosintezu askorbil-estara masnih kiselina

Kao biokatalizatori u reakcijama nastajanja askorbil-estara masnih kiselina u do sada objavljenoj literaturi navode se lipaze čiji su producenti *Candida antarctica* (uglavnom izoenzim B) [16–19], *Thermomyces lanuginosus* [20], *Bacillus stearothermophilus* (SB1 lipaza) [21] i *Rhizomucor miehei* [22]. Enzimi koji su uspešno primenjeni većinom su komercijalni imobilisani preparati, dok su šira upotreba sirovih enzimskih preparata i rad na razvoju pogodnih tehnika imobilizacije izostali.

Burham i saradnici ispitali su uticaj vrste i koncentracije lipaze na reakciju transesterifikacije palminog ulja i vitamina C u *t*-butanolu. Utvrđeno je da je redosled aktivnosti upotrebljenih komercijalnih enzimskih preparata sledeći: Novozyme 435 (lipaza tipa B iz *Candida antarctica* imobilisana na akrilnoj jonoizmenjivačkoj smoli) > Lipozyme TL IM (lipaza iz *Thermomyces lanuginosus* imobilisana na silika gelu) > Lipozyme RM IM (lipaza iz *Rhizomucor miehei* imobilisana na silika gelu) i da je optimalni sadržaj lipaze sa aspekta koncentracije proizvoda, 12 mas.% (izraženo na masu sup-



Slika 2. Strukture acil donora (R , R_1 , R_2 , R_3 – alkil-grupa, R' – metil- ili etil-grupa).
Figure 2. Structures of acyl donors (R , R_1 , R_2 , R_3 – alkyl group, R' – methyl- or ethyl group).



Slika 3. Enzimaska sinteza askorbil-estara masnih kiselina.
Figure 3. Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters.

strata) [22]. Enzimi Lipozyme TL IM i Novozyme 435 upoređeni su kao biokatalizatori u reakciji transesterifikacije vitamina C i triglicerida [20]. Lipozyme TL IM je, i pored toga što su pri njegovom korišćenju postignuti nešto niži prinosi, okarakterisan kao enzim koji proces čini ekonomičnijim, s obzirom na deset puta nižu cenu, i zato je pri daljoj optimizaciji procesnih parametara korišćen ovaj preparat. U istraživanju posvećenom biosintezi askorbil-oleata upotrebljena je lipaza iz *Candida antarctica* tipa A imobilisana na nosač tipa 1 (Chirazyme L-5; C1) i tipa B imobilisana na nosače tipa 1, 2 i 3 (Chirazyme L-2; C1, C2 i C3) i Novozyme 435, kao i sirova lipaza istog producenta [23]. Značajno bolji rezultati postignuti su kada je korišćen izoenzim B u odnosu na one dobijene sa izoenzimom A (10–20% veće konverzije), a prinosi su u tom slučaju bili za 10–15% viši i od onih postignutih sa sirovim enzimskim preparatom. Za enzim koji je korišćen u daljim eksperimentima, Chirazyme L-2 C2, upotrebom u konsektivnim reakcionim ciklusima, određena je operaciona stabilnost – poluživot imobilizovanog preparata iznosio je deset dana. Lerin sa saradnicima je pri optimizaciji enzimske sinteze askorbil-palmitata varirao koncentraciju biokatalizatora (Novozym 435) u opsegu od 1 do 20 mas.% (izraženo prema koncentraciji supstrata), pri čemu su maksimalne vrednosti konverzije i početne brzine postignute sa 15 mas. % lipaze [19]. Pad prinosa pri daljem povećanju sadržaja enzima u reakcionoj smeši objašnjen je pojavom agregata koji aktivni centar enzima čine teže dostupnim molekulima supstrata. Sličan rezultat je u svojoj studiji posvećenju biosintezi askorbil-linolata dobio i Song sa saradnicima – vreme za koje je postizana ravnoteža opadalo je sa porastom koncentracije enzima do 80 g L^{-1} , dok je dalje povećanje sadržaja lipaze dovelo do pada početne brzine reakcije [24].

Uticaj prirode acil donora na biosintezu askorbil-estara masnih kiselina

Reakcija enzimske sinteze askorbil-estara izvodi se sa masnim kiselinama, njihovim metil-, etil- i vinil-estrima i uljima kao acil donorima (slika 2). U najširoj upotrebi su do skoro bili gotovo isključivo zasićeni acil donori, čija je primena ograničena s obzirom na nepotpunu rastvorljivost njihovih askorbil-estara u mastima i

uljima, pa je predmet novijih istraživanja uglavnom sinteza estara vitamina C sa nezasićenim acil donorima.

Najčešće sintetisani askorbil-estar sa zasićenim acil ostatkom je askorbil-palmitat [16,20,25,26]. U studiji posvećenju biosintezi askorbil-palmitata i askorbil-oleata kao acil donori korišćeni su palmitinska kiselina, etil-palmitat, vinil-palmitat i metil-oleat, pri čemu su ostvarene konverzije od 20, 20, 10 i 50%, redom [20]. S obzirom na visoku cenu vinil-estara viših masnih kiselina sa kojima su postignuti maksimalni prinosi i brzine reakcije, dalje istraživanje bilo je usmereno na ulja kao donore acil ostatka. Konverzije postignute sa trioleinom su bile nešto više od onih postignutih sa tripalmitinom i značajno veće nego sa maslinovim uljem. Autori su uporedili emulgujuće sposobnosti palmitata i oleata pri čemu je askorbil-oleat pokazao veću efikasnost. Antioksidativne aktivnosti oba estra bile su nešto niže u poređenju sa samim vitaminom C, ali i dalje zadovoljavajuće. Pri ispitivanju uticaja dužine lanca masne kiseline na esterifikaciju L-askorbinske kiseline utvrđeno je da sa porastom broja C atoma, početna brzina reakcije i ostvareni prinosi rastu [24]. Ustanovljeno je i da se sa nezasićenim C18 masnim kiselinama (oleinska i linolna), postižu više konverzije nego sa zasićenom stearinskom kiselinom. U daljem radu posvećenom optimizaciji sinteze askorbil-linolata sa metil-linolatom kao acil donorem postignut je prinos od 33,5%, dok je u reakciji esterifikacije sa linolnom kiselinom dobijeno 21,8% estra.

Nekoliko autora, detaljnije je optimizovalo molaski odnos supstrata. Generalno, kako pri korišćenju masnih kiselina, tako i pri upotrebi aktiviranih acil donora, najbolji rezultati su postizani kada je limitirajući supstrat bio vitamin C. U istraživanju posvećenom biosintezi askorbil-palmitata, variran je sadržaj metil-palmitata kao acil donora u širokom opsegu (od 1:1 do 1:11) i utvrđeno je da se maksimalni prinosi proizvoda dobijaju pri molaskom odnosu supstrata 1:9 [18]. Takođe je i Lerin sa saradnicima, koristeći metodu odzivnih površina (*response surface methodology* – RSM) i centralni kompozitni dizajn (*central composite design* – CCD), odredio da je molaski odnos vitamina C prema palmitinskoj kiselini od 1:9 optimalan [19]. Pri optimizaciji molaskog odnosa askorbinske kiseline prema metil-oleatu, u studiji posvećenju biosintezi askorbil-oleata ustanovljeno je da povećanje sadržaja acil donora do odnosa 1:4 dovodi

do naglog, a preko toga do neznatnog porasta stepena konverzije [23]. U radu, čiji je cilj takođe bio određivanje optimalnih reakcionih uslova za enzimsko dobijanje askorbil-oleata, utvrđeno je da povećanje koncentracije oleinske kiseline kao acil donora do 250 mmol dm⁻³ (sadržaj vitamina C je bio konstantan – 150 mmol dm⁻³) dovodi do povećanja početne brzine i prinosa reakcije [27]. Nasuprot tome, Viklund i saradnici su konverziju od 87% postigli sa viškom vitamina C (molski odnos oleinske prema askorbinskoj kiselini 1:2) u slučaju sinteze askorbil-oleata, dok je sa palmitinskom kiselinom kao acil donorom stepen konverzije bio 86% kada je u višku bio acil donor (molski odnos askorbinske prema palmitinskoj kiselini 1:2) [16]. Askorbil-oleat je, pri tom, pokazao snažnije antioksidativne efekte od askorbil-palmitata, što je verovatno posledica njegove bolje rastvorljivosti u uljima.

S obzirom na značajnu ulogu polinezasićenih masnih kiselina (*Polyunsaturated Fatty Acids* – PUFA) u razvoju i funkcionisanju centralnog nervnog sistema, ali i njihovu sklonost autooksidaciji, tema brojnih istraživanja je sinteza derivata koji bi posedovali isto fiziološko dejstvo, ali veću stabilnost od odgovarajućih PUFA [28–31]. U studiji posvećenoj sintezi askorbil-estara katalizovanoj lipazom Chirazyme L-2 u acetonu kao reakcionoj sredini korišćen je veliki broj PUFA (γ -linolenska, α -linolenska, linolna, dokosaheksaenska i arahidonska kiselina) [32]. Molski odnos supstrata je u svim eksperimentima bio 1:5 (acil donor u višku). Ustanovljeno je da su askorbil-estri PUFA, pored toga što su liposolubilni, znatno otporniji na autooksidaciju od odgovarajućih kiselina.

Pri optimizaciji enzimske sinteze askorbil-estara usmerenoj na dobijanje smeše proizvoda korišćeni su metil-estri jestivih ulja kao jeftini i dostupni donori acil grupe [33]. Sa metil-estrima palminog ulja, koje ima viši sadržaj zasićenih masnih kiselina u odnosu na sojino ulje, postignut je veći stepen konverzije, a i stabilnost enzima je u tom slučaju bila veća.

Uticaj reakcione sredine na biosintezu askorbil-estara masnih kiselina

U biokatalizovanom procesu sinteze askorbil-estara masnih kiselina razlika u rastvorljivosti supstrata sužava izbor pogodnog reakcionog medijuma na mali broj organskih rastvarača, jonske tečnosti i natkritične fluide. U biosintezama estara se uglavnom koriste organski rastvarači sa visokim log *P* (logaritam koeficijenta raspodele nejonizovanog jedinjenja između oktanol i vode) vrednostima, međutim hidrofилni karakter askorbinske kiseline čini ih nepogodnom reakcionom sredinom za dobijanje estara vitamina C i masnih kiselina [34–37]. U dostupnoj literaturi je najzastupljenija upotreba terciarnih alkohola (*t*-butanol – log *P* = 0,58 i *t*-amil-alkohol – log *P* = 1,15) u ovu svrhu (tabela 1). Veliki broj autora prijavljuje dobre rezultate u acetonu (log *P* = –0,208)

koji zbog GRAS statusa, niske cene i velike isparljivosti privlači sve veću pažnju [13,23,32,33]. U acetonitrilu čiji je Log *P* još negativniji (–0,394) uspešno je sintetisan askorbil-laurat [38]. Utvrđeno je i da dodavanje hidrofobnog rastvarača umesto jednog dela viška acil donora, dovodi do smanjenja prinosa [18].

Alternativni rastvarači, kao što su natkritični fluidi (nkF) i jonske tečnosti (JT), predstavljaju potencijalno pogodnu zamenu za organske rastvarače, ali u slučaju njihove upotrebe cena procesa značajno raste [14,39]. Jonske tečnosti su neisparljive supstance koje dobro rastvaraju jedinjenja različite hidrofobnosti. Mogu se lako podesiti njihova svojstva, a postoji i mogućnost ponovnog korišćenja. U biokatalizovanim reakcijama koriste se kao monofazni ili dvofazni (JT/organski rastvarač, JT/nkF, JT/H₂O) sistemi [8]. Nekoliko autora je upotrebilo jonske tečnosti u sintezi askorbil-estara masnih kiselina katalizovanoj lipazom [40,41]. Park i saradnici su među testiranim JT najveću molarnu konverziju (43%) postigli u 1-(1-metilpropil)-3-metilimidazolijum-tetrafluoroboratu (sBMIM-BF₄), a nadalje je u sintetisanom 1-(1-metilbutil)-3-metilimidazolijum-tetrafluoroboratu (2pentMIM-BF₄) koji poseduje jedan C atom više, i u kome je rastvorljivost palmitinske kiseline bila veća, postignut dalji rast prinosa askorbil-palmitata (74%). U reakciji izvedenoj takođe u BMIM-BF₄, pri kontrolisanoj aktivnosti vode 0,3 (NaI·2H₂O/NaI), dobio je prinos od 72% askorbil-oleata.

Mehanizam delovanja lipaza je vezan za njihovu aktivaciju na granici faza, pa je vodeni sloj oko molekula enzima bitan za očuvanje njegove katalitičke aktivnosti. Početna aktivnost vode uglavnom je, od strane većine autora, podešavana uravnotežavanjem reakcione smeše i enzima pre reakcije u prisustvu vodene pare zasićenih rastvora soli poznate aktivnosti vode, a_v [18,23,41]. Najbolji rezultati postizani su pri najmanjim početnim aktivnostima vode (LiBr – a_v = 0,07, LiCl – a_v = 0,11). S obzirom na to da je voda sporedni proizvod reakcije esterifikacije vitamina C i masnih kiselina, kontrola njenog sadržaja u reakcionom medijumu predstavlja jedan od načina za povećanje ravnotežne koncentracije estara. Odvođenje iz reakcione smeše, vode nastale u toku reakcije esterifikacije, kao i metanola nastalog transesterifikacijom vitamina C i metil-estara masnih kiselina, može se efikasno vršiti dodavanjem molekulskih sita veličine pora od 0,3 do 0,5 nm, međutim na taj način dolazi do smanjenja ukupnog prostorno-vremenskog prinosa procesa [13,14].

Uticaj temperature na biosintezu askorbil-estara masnih kiselina

Temperatura ima značajan uticaj na stabilnost i aktivnost enzima, ali i na ravnotežu reakcije biosinteze askorbil-estara masnih kiselina [27]. Lipaze A i B producenta *Candida antarctica*, koje su najčešće korišćeni biokatalizatori (tabela 1), spadaju u red lipaza sa viso-

Tabela 1. Pregled postupaka biosinteze askorbil-estara masnih kiselina; EPA – eikosapentaenska kiselina; DHA – dokosaheksaenska kiselina; MS – molekulska sita; w/v – masa/zapremina; w/w – masa/masa

Table 1. Overview of different procedures of the fatty acid ascorbyl esters biosynthesis

Lipaza	Sadržaj enzima	Acil donor	Rastvarač	Koncentracija vitamina C	t / °C	Molski odnos supstrata ^a	Kontrola sadržaja vode	Ref.
Novozym 435 CAL-B	0,5% (w/v)	Palmitinska kiselina	t-Butanol	0,057 mol dm ⁻³	60	1:1–1:2	MS (0,3 nm)	[16]
Novozym 435 CAL-B	0,3% (w/v)	Oleinska kiselina	t-Butanol	0,168 mol dm ⁻³	65	2:1	MS (0,3 nm)	[16]
Novozym 435 CAL-B	1,65% (w/v)	Metil-palmitat	t-Butanol	20 g l ⁻¹	70	1:1–1:11	–	[17]
Novozym 435 CAL-B	1,65% (w/v)	EPA etil-estar; DHA etil-estar	t-Butanol	12 g l ⁻¹	55	1:5	–	[17]
Novozym 435 CAL-B	1–20 mas.% supstrata	Palmitinska kiselina	t-Butanol	–	40–70	1:1–1:9	0,5–3,0 g l ⁻¹ vode (Karl Fišer)	[19]
Novozym 435 CAL-B	1–12% (w/v)	Linolna kiselina; metil-linoleat	t-Butanol	0,2 mol dm ⁻³	50	1:1,5	–	[24]
Novozym 435 CAL-B	3–15 mas.% supstrata	Palmino ulje	t-Butanol	3 mol dm ⁻³	40	1:8	MS (0,5 nm), 2,3–11,9% (w/v)	[22]
Novozym 435 CAL-B	4% (w/v)	Oleinska kiselina; palmitinska kiselina	Jonske tečnosti	0,2 mol dm ⁻³	60	1,2:1	–	[40]
Lipozyme TLIM	25 mg ml ⁻¹	Etil-palmitat; vinil-palmitat; palmitinska kiselina	t-Butanol	0,1 mol dm ⁻³	40	1:3	–	[20]
Lipozyme TLIM; Novozym 435 CAL-B	25 mg ml ⁻¹	Triolein; tripalmitin; maslinovo ulje	t-Butanol	0,1 mol dm ⁻³	40	1:3	–	[20]
Novozym 435 CAL-B	3% (w/v)	Metil-estri palminog i sojinog ulja	Aceton	0,1 mol dm ⁻³	50	1:4	–	[33]
sirova CAL; Chirazyme CAL-A i -B; Novozym 435 CAL-B	1 % (w/v)	Oleinska kiselina; metil-oleat	Aceton	30 mmol dm ⁻³	50	1:4	Zasićeni rastvori soli; MS (0,4 nm)	[23]
Chirazyme L-2 C2 CAL-B	20 g l ⁻¹	Oleinska kiselina; linolna, α-linolna i γ-linolna kiselina	Aceton	0,1–0,2 mol dm ⁻³	50	1:1–1:10	0–100 g l ⁻¹ MS (0,4 nm)	[13]
Novozym 435 CAL-B	16,5 g l ⁻¹	Metil-palmitat	t-Butanol	20 g l ⁻¹	70	1:1–1:11	Zasićeni rastvori soli	[18]
Chirazyme L-2 (slobodna, C1, C2 i C3) CAL-B	20–120 g l ⁻¹	Oleinska kiselina	Jonske tečnosti	0,2 mol dm ⁻³	60	1:1,2	MS (0,4 nm) zasićeni rastvori soli; parovi hidrata soli	[41]
Chirazyme L-2; C2 CAL-B	80 g l ⁻¹	Linolna, α-linolenska i γ-linolenska kiselina; arahidonska kiselina i DHA	Aceton	0,05 mol dm ⁻³	55	≈1:5	MS (0,5 nm)	[32]
Chirazyme L-2 C2 CAL-B	50 g l ⁻¹	Vinil-estar kaprilne, kaprinske, laurinske i palmitinske kiseline	t-Butanol; aceton	1 mol dm ⁻³	40	1:1–1:3	200 mg ml ⁻¹ MS (0,3 nm)	[25]
Novozym 435 CAL-B	10–50 mas.%	Laurinska kiselina	Acetonitril	30 mmol dm ⁻³	25–65	1:1–1:5	10 % (w/w) MS (0,4 nm)	[38]
Lipaza iz <i>Candida sp.</i> imobilisana adsorpcijom	30 g l ⁻¹	Oleinska kiselina	t-Amil-al-kohol	0,2 mol dm ⁻³	40–70	1,5:2	50 g l ⁻¹ MS (0,4 nm)	[27]

^aMolski odnos askorbinske kiseline prema acil donoru

kom termostabilnošću – ovi enzimi zadržavaju visoku aktivnost na temperaturama od 90 i 70 °C [42].

Pri ispitivanju uticaja temperature na enzimsku sintezu askorbil-oleata u *t*-amil-alkoholu temperatura je varirana u opsegu 40–70 °C i utvrđeno je da je optimum sa aspekta početne brzine 60 °C, dok je maksimalan prinos proizvoda nakon 24 h postignut na 55 °C [27]. U istraživanju posvećenom optimizaciji biokatalizovane sinteze askorbil-palmitata u *t*-butanolu, na osnovu statističkog modela (RSM i CCRD) u ispitivanom opsegu temperatura 40–70 °C, najveći prinos proizvoda postignut je na 70 °C [19]. Nasuprot tome, pri optimizaciji reakcionih uslova za biosintezu L-askorbil-laurata u acetonitrilu kao reakcionom medijumu metodom odzivnih površina, maksimalna molarna konverzija limitirajućeg supstrata dobijena je na 30,6 °C (ispitivan je opseg od 25 do 65 °C) [38]. Ovako velike razlike u vrednostima temperaturnih optimuma utvrđenim u nekoliko istraživanja verovatno su uzrokovane uticajem supstrata, proizvoda i organskog rastvarača na tok reakcije.

ANTIOKSIDATIVNA SVOJSTVA ASKORBIL-ESTARA MASNIH KISELINA

Askorbil-estri masnih kiselina spadaju u red jedinjenja sa velikim kapacitetom za vezivanje slobodnih radikala. Pored toga, pod fiziološkim uslovima hidrolizuju se do vitamina C i masnih kiselina bez formiranja štetnih ili toksičnih supstanci, pa su stoga preporučljivi za upotrebu u mastima, uljima i lipofilnim prehrambenim i kozmetičkim proizvodima [8]. Danas se u široj upotrebi u stabilizaciji masti i ulja, pored sintetskih antioksidanasa, nalazi jedino askorbil-palmitat, sam ili u smeši sa drugim antioksidansima (tokoferolom, oktilgalatom, itd.) [43]. S obzirom na to da je askorbil-palmitat čvrsta, voskasta supstanca čija rastvorljivost u uljima nije potpuna, a nezasićeni askorbil-estri tečnosti koje se sa mastima i uljima u potpunosti mešaju, sve više pažnje u novijim istraživanjima posvećuje se upravo njihovoj biosintezi. U skladu sa tim su i eksperimentalni rezultati do kojih je došao Viklund sa saradnicima kada je ispitivao antioksidativno dejstvo askorbil-palmitata i askorbil-oleata dodavanjem u ulje uljane repice po 600 mg estera na 1 kg ulja i merenjem peroksidnog broja tokom nekoliko nedelja na 30 i 40 °C [16]. Utvrđeno je da u slučaju korišćenja askorbil-oleata, do ubrzanog formiranja peroksida dolazi dva puta sporije na 40 °C i tri puta sporije na 30 °C nego sa askorbil-palmitatom kao antioksidansom. Takođe je utvrđeno da je u uzorcima u koje nije dodat askorbil-estara nakon deset nedelja na 40 °C koncentracija prirodno sadržanog tokoferola pala na nulu, dok su uzorci sa askorbil-palmitatom sadržali 3% γ -tokoferola, a uzorci sa askorbil-oleatom 57% γ -tokoferola i 86% δ -tokoferola. Ovo ukazuje na sinergizam estera askorbinske kiseline i toko-

ferola. Nostro i saradnici su primenom DPPH (α,α -difenil- β -pikrilhidrazil) metode odredili redukcioni sposobnost vitamina C, njegovih estara i drugih prirodnih antioksidanasa (epikatehina, kofeinske kiseline, rutina, oleuropeina, tirozola, tokoferola i melatonina) [44]. Dobijeni rezultati su pokazali da askorbil-estri masnih kiselina poseduju antioksidativna svojstva uporediva sa ostalim ispitivanim jedinjenjima.

Askorbil-estri masnih kiselina su amfifilne supstance koje u vodenoj sredini formiraju micele čije je jezgro lipofilno, a površina hidrofilna [45]. U literaturi je već opisana mogućnost primene ovakvih sistema u stabilizaciji i solubilizaciji osetljivih farmaceutskih preparata [46]. Hidrofobni molekuli ostaju u jezgru micele zaštićeni od oksidacionih procesa, s obzirom na antioksidativno dejstvo spoljnih hidrofilnih glava. Poznata su još neka dejstva askorbil-estara masnih kiselina kao što je sprečavanje peroksidacije lipoproteina male gustine (LDL), antimutageni i antitumorni efekti [47,48].

ZAKLJUČCI

U mastima i uljima, kao i prehrambenim i kozmetičkim proizvodima koji ih u visokom procentu sadrže, kao aditivi se danas uglavnom koriste hemijski sintetisani antioksidansi čija su neželjena dejstva na fiziološki sistem dokazana. Stoga je rad na nalaženju alternativnih rešenja u vidu prirodnih antioksidanasa i njihovih derivata od izuzetnog značaja.

Vitamin C je široko dostupno jedinjenje poznato po svom antioksidativnom dejstvu, ali ga nije moguće upotrebljavati u lipofilnim supstancama s obzirom na njegov izrazito hidrofilni karakter. Iz tih razloga se poslednjih deceniju i po primenjuju lipaze kao biokatalizatori u sintezi liposolubilnih estara L-askorbinske kiseline. Do sada su, uglavnom, primenjivani komercijalni preparati lipaza iz *C. antarctica* (najčešće izoenzim B), *T. lanuginosus*, *B. stearothermophilus* (SB1 lipaza) i *R. miehei*. Enzimska sinteza, za razliku od klasičnih hemijskih metoda, ne samo da nudi regioselektivnost i mogućnost izvođenja reakcije pod blagim reakcionim uslovima, već bi kontinualno vođenje postupka i razvoj biokompatibilnih metoda prečišćavanja i novih, jeftinijih biokatalizatora učinili proizvodnju ekonomski isplativom, a proizvod ekološkim.

Reakcija enzimske sinteze askorbil-estara izvodi se sa masnim kiselinama, njihovim metil-, etil- i vinil-estrima i uljima kao acil donorima, pri čemu se, zbog jačeg antioksidativnog dejstva i velike nutritivne vrednosti, teži sintezi estara sa nezasićenim acil ostatkom. U ireverzibilnoj reakciji transesterifikacije između vitamina C i vinil-estara masnih kiselina postižu se značajno viši prinosi u poređenju sa povratnom reakcijom acilovanja sa masnim kiselinama i njihovim metil-estrima kao acil donorima. Međutim, ovaj proces je i dalje neisplativ i neispitan u većim razmerama, s obzirom na

to da je samo mali broj, i to zasićenih acil donora komercijalno dostupan u vidu svojih vinil-estara, a cene su im visoke. Takođe, rezultati najvećeg broja istraživanja ukazuju na pozitivan uticaj upotrebe donora acil ostatka u višku na ravnotežni stepen konverzije.

Velika razlika u rastvorljivosti supstrata utiče na izbor odgovarajućeg reakcionog medijuma. Kao reakcione sredine za biosintezu askorbil-estara masnih kiselina uglavnom se koriste organski rastvarači sa log *P* vrednostima bliskim nuli, poput tercijarnih alkohola i acetona. Dobri rezultati postizani su i u jonskim tečnostima, ali u tom slučaju proces je bio znatno skuplji. Važnu ulogu, imajući u vidu mehanizam delovanja lipaza i povratnu reakciju hidrolize, odigrava i sadržaj vode u reakcionom medijumu. Kontrola početnog sadržaja vode uglavnom se izvodi podešavanjem početne koncentracije vode uravnotežavanjem lipaze i reakcione smeše pre reakcije u zatvorenom sistemu sa zasićenim rastvorima soli male aktivnosti vode. Sa ciljem odvođenja vode nastale u toku esterifikacije, u reakcionu smešu su dodavana molekulska sita veličine pora od 3 do 5 nm, na početku ili u toku procesa. Temperaturni optimumi se, u zavisnosti od supstrata, proizvoda i reakcionog medijuma, u različitim studijama kreću od 30 do 70 °C, ali u većini radova najveći prinosi se postižu iznad 50 °C.

Komercijalizacija procesa enzimске sinteze askorbil-estara masnih kiselina je u velikoj meri neisplativa zbog visoke cene najčešće upotrebljivanih enzimskih preparata. Stoga je neophodno okrenuti se upotrebi sirovih enzimskih preparata i primeni pogodnih metoda imobilizacije. Postupci prečišćavanja proizvoda u kojima se koriste velike količine organskih rastvarača čija upotreba u prehrambenoj industriji nije dozvoljena, nameću potrebu za pronalaženjem pogodnijih metoda (npr. natkritična ekstrakcija). Pored toga, značajno je pažnju usmeriti na ulja sa visokim sadržajem mono- i polinezasićenih masnih kiselina kao jeftine i lako dostupne acil donore čiji su askorbil-estri jaki antioksidansi.

Zahvalnica

Autori se zahvaljuju Ministarstvu prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije na finansijskoj podršci (projekti III46010 i ON172013).

LITERATURA

- [1] D.L. Madhavi, S.S. Deshpande, D.K. Salunkhe, Food Antioxidants: Technological, Toxicological and Health Perspectives. Food Science and Technology, New York, Basel, Hong Kong, Marcel Dekker, 1996, p. 68.
- [2] J. Pokorny, N. Yanishlieva, M. Gordon, Antioxidants in food – practical applications, Woodhead Publishing Limited, Cambridge, England, 2001, pp. 1–7.
- [3] N. Babović, Antioksidativne osobine frakcija dobijenih iz odabranih biljaka familije Lamiaceae postupkom natkritične ekstrakcije, doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko–metalurški fakultet, Beograd, 2010.
- [4] D.H. Watson, Food Chemical Safety, Vol. 2: Additives, Cambridge, England, 2002, pp. 283–299.
- [5] K.J. Kaitaranta, Control of lipid oxidation in fish oil with various antioxidative compounds, J. Am. Oil Chem. Soc. **69** (1992) 810–813.
- [6] F. Shahidi, P.K. Janitha, P.D. Wanasundara, Phenolic antioxidants, Crit. Rev. Food Sci. Nutr. **32** (1992) 67–75.
- [7] X.Y. Liu, F.L. Guo, Y.C. Liu, Z.L. Liu, Remarkable enhancement of antioxidant activity of vitamin C in an artificial bilayer by making it lipo-soluble, Chem. Phys. Lipids. **83** (1996) 39–43.
- [8] S.K. Karmee, Biocatalytic synthesis of ascorbyl esters and their biotechnological applications, Appl. Microbiol. Biotechnol. **81** (2009) 1013–1022.
- [9] K. Enomoto, T. Miyamori, A. Sakimae, R. Numazawa, Process for the preparation of organic esters of ascorbic acid or erythorbic acid, EP 401704 (1990).
- [10] K. Sakashita, S. Myamoto, A. Sakimae, Process for producing organic acid esters, EP 514694 (1992).
- [11] H.R. Hobbs, N.R. Thomas, Biocatalysis in supercritical fluids, in fluoruous solvents, and under solvent-free conditions, Chem. Rev. **107** (2007) 2786–2820.
- [12] A. Houde, A. Kademi, D. Leblanc, Lipases and their industrial applications, Appl. Biochem. Biotechnol. **118** (2004) 155–170.
- [13] K. Kuwabara, Y. Watanabe, S. Adachi, K. Nakanishi, R. Matsuno, Synthesis of 6-O-unsaturated acyl L-ascorbates by immobilized lipase in acetone in the presence of molecular sieve, Biochem. Eng. J. **16** (2003) 17–22.
- [14] K. Kuwabara, Y. Watanabe, S. Adachi, K. Nakanishi, R. Matsuno, Continuous production of acyl L-ascorbates using a packed-bed reactor with immobilized lipase, J. Am. Oil Chem. Soc. **80** (2003b) 895–899.
- [15] Y. Watanabe, K. Kuwabara, S. Adachi, K. Nakanishi, R. Matsuno, Production of saturated acyl L-ascorbate by immobilized lipase using a continuous stirred tank reactor, J Agric. Food Chem. **51** (2003) 4628–4632.
- [16] F. Viklund, J. Alander, K. Hult, antioxidative properties and enzymatic synthesis of ascorbyl FA esters, J. Am. Oil Chem. Soc. **80** (2003) 795–799.
- [17] C. Humeau, M. Girardin, B. Rovel, A. Miclo, Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters, J. Mol. Catal., B **5** (1998) 19–23.
- [18] C. Humeau, M. Girardin, B. Rovel, A. Miclo, Effect of the thermodynamic water activity and the reaction medium hydrophobicity on the enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate, J. Biotechnol. **63** (1998) 1–8.
- [19] L.A. Lerin, A. Richetti, R. Dallaro, H. Treichel, M.A. Mazutti, J.V. Oliveira, O.A.C. Anutnes, E.G. Oestreicher, D. de Oliveira, Enzymatic synthesis of ascorbyl palmitate in organic solvents: process optimization and kinetic evaluation, Food Bioprocess Technol. **5** (2012) 1068–1076.

- [20] D. Reyes-Duarte, N. Lopez-Cortes, P. Torres, F. Comelles, J.L. Parra, S. Peña, A.V. Ugidos, A. Ballesteros, F.J. Plou, Synthesis and properties of ascorbyl esters catalyzed by lipozyme TL IM using triglycerides as acyl donors, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **88** (2011) 57–64.
- [21] S. Bradoo, R.K. Saxena, R. Gupta, High yields of ascorbyl palmitate by thermostable lipase-mediated esterification, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **76** (1999) 1291–1295.
- [22] H. Burham, R.A.G.A. Rasheed, N.M. Noor, S. Badruddin, H. Sidek, Enzymatic synthesis of palm-based ascorbyl esters, *J. Mol. Catal. B* **58** (2009) 153–157.
- [23] M. Adamczak, U.T. Bornscheuer, W. Bednarski, Synthesis of ascorbyl oleate by immobilized *Candida antarctica* lipases, *Process Biochem.* **40** (2005) 3177–3180.
- [24] Q.X. Song, Y. Zhao, W.Q. Xu, W.Y. Zhou, D.Z. Wei, Enzymatic synthesis of L-ascorbyl linoleate in organic media, *Bioprocess Biosyst. Eng.* **28** (2006) 211–215.
- [25] Y. Yan, U.T. Bornscheuer, R.D. Schmid, Lipase-catalyzed synthesis of vitamin C fatty acid esters, *Biotechnol. Lett.* **21** (1999) 1051–1054.
- [26] M. Kidwai, P. Mothsra, N. Gupta, S.S. Kumar, R. Gupta, Green enzymatic synthesis of L-ascorbyl fatty acid ester, an antioxidant, *Synthetic Commun.* **39** (2009) 1143–1151.
- [27] Q.X. Song, D.Z. Wei, Study of Vitamin C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida* sp., *J. Mol. Catal., B* **18** (2002) 261–266.
- [28] K. Takahata, K. Monobe, M. Tada, P.C. Weber, The benefits and risks of n-3 polyunsaturated fatty acids, *BioSci. Biotechnol. Biochem.* **62** (1998) 2079–2085.
- [29] R. Terao, M. Otsuka, Y. Matsuda, Chemical Stability of ethyl icosapentaenoate against autoxidation I. Effect of temperature on oxidation kinetics, *Pharm. Res.* **9** (1992) 1673–1676.
- [30] S. Adachi, T. Ishiguro, R. Matsuno, Autoxidation kinetics for fatty acids and their esters, *J. Am. Oil Chem. Soc.* **72** (1995) 547–551.
- [31] Y. Watanabe, Y. Minemoto, S. Adachi, K. Nakanishi, Y. Shimada, R. Matsuno, Lipase-catalyzed synthesis of 6-Oeicosapentaenoyl L-ascorbic acid in acetone and its autoxidation, *Biotechnol. Lett.* **22** (2000) 637–640.
- [32] Y. Watanabe, S. Adachi, K. Nakanishi, R. Matsuno, Lipase catalyzed synthesis of unsaturated acyl L-ascorbate and its ability to suppress autooxidation of polyunsaturated fatty acid, *J. Am. Oil. Chem. Soc.* **78** (2001) 823–826.
- [33] H.J. Hsieh, J.W. Chen, R. Giridhar, W.T. Wu, Synthesis of mixed esters of ascorbic acid using methyl esters of palm and soybean oils, *Prep. Biochem. Biotechnol.* **35** (2005) 113–118.
- [34] M.H. Vermue, J. Tramper, Biocatalysis in non-conventional media: Medium engineering aspects, *Pure Appl. Chem.* **67** (1995) 345–373.
- [35] G.D. Yadav, P.S. Lathi, Synthesis of citronellol laurate in organic media catalyzed by immobilized lipases: Kinetic studies, *J. Mol. Catal., B* **27** (2004) 109–115.
- [36] H. Hirata, K. Higuchi, T. Yamahina, Lipase-catalyzed transesterification in organic solvent: effect of water and solvent, thermal stability and some applications, *J. Biotechnol.* **14** (1990) 157–167.
- [37] H. Zhao, Y. Zhang, F. Lu, X. Bie, Z. Lu, H. Ning, Optimized enzymatic synthesis of ascorbyl esters from lard using Novozym 435 in co-solvent mixtures, *J. Mol. Catal., B* **69** (2011) 107–111.
- [38] S.W. Chang, C.J. Yang, F.Y. Chen, C.C. Akoh, C.J. Shief, Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-ascorbyl laurate by Novozym® 435, *J. Mol. Catal., B* **56** (2009) 7–12.
- [39] S.K. Karmee, Lipase catalyzed synthesis of ester-based surfactants from biomass derivatives, *Biofuels Bioprod. Bioref.* **2** (2008) 144–154.
- [40] S. Park, F. Viklund, K. Hult, R. J. Kazlauskas, Vacuum-driven lipase-catalysed direct condensation of L-ascorbic acid and fatty acids in ionic liquids: synthesis of a natural surface active antioxidant, *Green Chem.* **5** (2003) 715–719.
- [41] M. Adamczak, U.T. Bornscheuer, Improving ascorbyl oleate synthesis catalyzed by *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids and water activity control by salt hydrates, *Process Biochem.* **44** (2009) 257–261.
- [42] D. Bezbradica, Sinteza estara katalizovana slobodnim lipazama i lipazama imobilisanim na polimernim nosačima, Doktorska disertacija, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2007.
- [43] N.V. Yanishlieva, E.M. Marinova, Stabilisation of edible oils with natural antioxidants, *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **103** (2001) 752–767.
- [44] L.P. Nostro, G. Capuzzi, A. Romani, N. Mulinacci, Self-assembly and antioxidant properties of octanoyl-6-O-ascorbic acid, *Langmuir* **16** (2000) 1744–1750.
- [45] Y. Watanabe, S. Adachi, T. Fujii, K. Nakanishi, R. Matsuno, Surface activity of 6-O-hexanoyl, octanoyl, decanoyl and dodecanoyl ascorbates, *Jpn. J. Food Eng.* **2** (2001) 73–75.
- [46] S. Palma, M.R. Hilario, D. Allemandi, L. Fratoni, L.P. Nostro, Solubilization of hydrophobic drugs in octanoyl-6-O-ascorbic acid micellar dispersions, *J. Pharm. Sci.* **91** (2002) 1810–1816.
- [47] Z.Q. Liu, L.P. Ma, Z.L. Liu, Making vitamin C lipophilic enhances its protective effect against free radical induced peroxidation of low density lipoprotein, *Chem. Phys. Lipids* **95** (1996b) 49–57.
- [48] C.V. Rao, A. Rivenson, G.J. Kelloff, B.S. Reddy, Chemoprevention of azoxymethane-induced colon cancer by ascorbylpalmitate, carbenoxolone, dimethylfumarate and *p*-methoxyphenol in male F344 rats, *Anticancer Res.* **15** (1995) 1199–1204.

SUMMARY

ENZYMATIC SYNTHESIS AND APPLICATION OF FATTY ACID ASCORBYL ESTERS

Marija M. Stojanović, Milica B. Carević, Mladen D. Mihailović, Zorica D. Knežević-Jugović, Slobodan D. Petrović, Dejan I. Bezbradica

University of Belgrade, Faculty of Technology and Metallurgy, Belgrade, Serbia

(Professional paper)

Fatty acid ascorbyl esters are liposoluble substances that possess good anti-oxidative properties. These compounds could be synthesized by using various acyl donors for acylation of vitamin C in reaction catalyzed by chemical means or lipases. The enzymatic process is preferred since it is regioselective, performed under mild reaction conditions, with the obtained product being environmentally friendly. Polar organic solvents, ionic liquids, and supercritical fluids have been successfully used as a reaction media, since commonly used solvents with high log *P* values are inapplicable due to ascorbic acid high polarity. Acylation of vitamin C using fatty acids, their methyl-, ethyl-, and vinyl esters, as well as triglycerides has been performed, whereas application of the activated acyl donors enabled higher molar conversions. In each case, the majority of authors reported that using excessive amount of the acyl donor had positive effect on yield of product. Furthermore, several strategies have been employed for shifting the equilibrium towards the product by water content control. These include adjusting the initial water activity by pre-equilibration of reaction mixture, enzyme preparation with water vapor of saturated salt solutions, and the removal of formed water by the addition of molecular sieves or salt hydrate pairs. The aim of this article is to provide a brief overview of the procedures described so far for the lipase-catalyzed synthesis of fatty acid ascorbyl esters with emphasis on the potential application in food, cosmetics, and pharmaceuticals. Furthermore, it has been pointed out that the main obstacles for process commercialization are long reaction times, lack of adequate purification methods, and high costs of lipases. Thus, future challenges in this area are testing new catalysts, developing continuous processes for esters production, finding cheaper acyl donors and reaction mediums, as well as identifying standard procedures for purification of products which will not require consumption of large amounts of non-biocompatible organic solvents.

Keywords: Vitamin C • Fatty acids • Ascorbyl esters • Lipases • Antioxidative properties