

Analyse og syntese af fedtsyrestre af sukrose

En nyligt afsluttet ph.d.-afhandling havde udvikling af kvantitative analysemetoder til væskekromatografi og undersøgelse af enzymkatalyseret syntese af sukroselaurat som hovedtemaer. Her beskrives arbejdet.

Af Aleksander Lie, postdoc, Lars Haastrup Pedersen, lektor og ph.d.-vejleder, Sektion for Bioteknologi, Institut for Kemi og Bioteknologi, Aalborg Universitet

Ph.d.-arbejdet blev udført som del af et samarbejdsprojekt, støttet af Det Frie Forskningsråd, mellem Sektion for Bioteknologi, AAU, DTU Kemiteknik, Center for Bioprocess Engineering ved professor Anne S. Meyer, og Aalborg Universitetshospital, Mikrobiologisk Afdeling ved professor Henrik C. Schønheyder.

Metoder til kvantitativ analyse af regioisomerer af sukrosekaprat af sukroselaurat ved omvendt-fase væskekromatografi (RP-HPLC) med *charged aerosol detection* (CAD) blev undersøgt og udviklet. Undersøgelserne analyserede en række

Fedtsyrestre af sukrose – egenskaber og brug

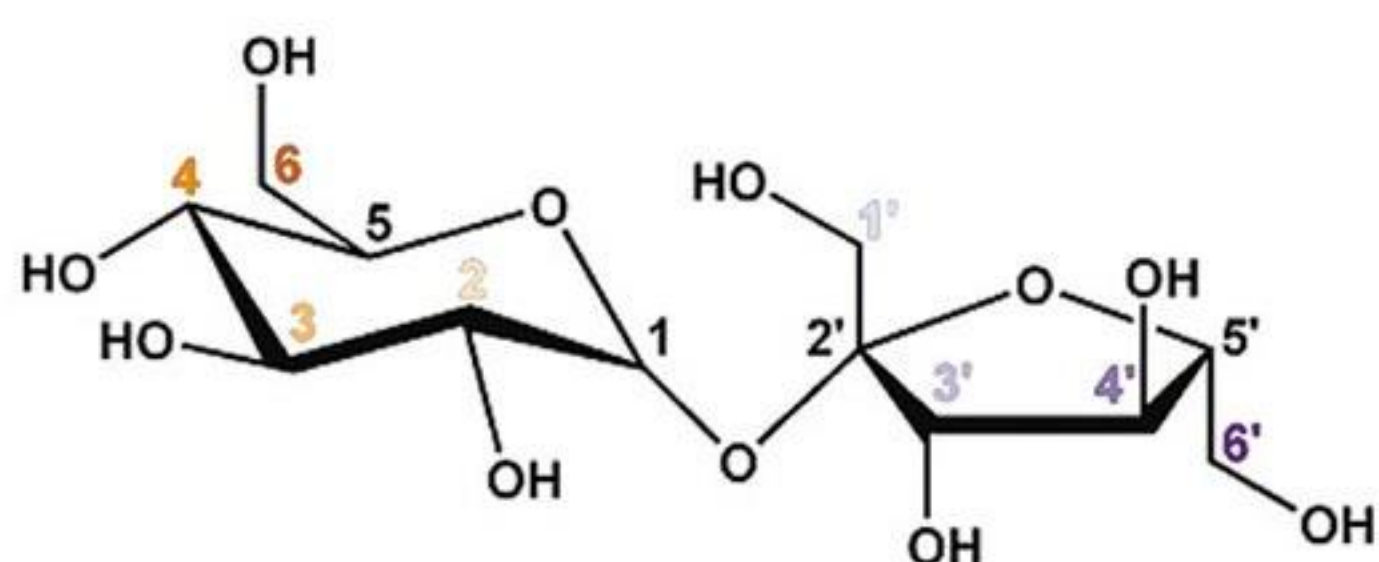
Fedtsyrestre af sukrose finder udstrakt brug i fødevarer, kosmetik og lægemidler. Disse forbindelser er særligt interessante pga. deres emulgerende, dispergerende og organoleptiske egenskaber, kombineret med lav toksicitet, lav grad af immunstimulerende effekt og biologisk nedbrydelighed.

Fedtsyrestre af sukrose er godkendt som tilsætningsstof i fødevarer (E473) i store dele af verden, og lav-substituerede sukrosealkanoater produceres som emulgatorer til fødevarer og kosmetik. Antimikrobielle egenskaber er påvist for monoestere med fedtsyrekædelængder på 10-16 kulstofatomer. Især sukroselaurat, kondensationsproduktet af sukrose og laurinsyre, har vist antimikrobielle egenskaber mod en række bakteriefamilier.

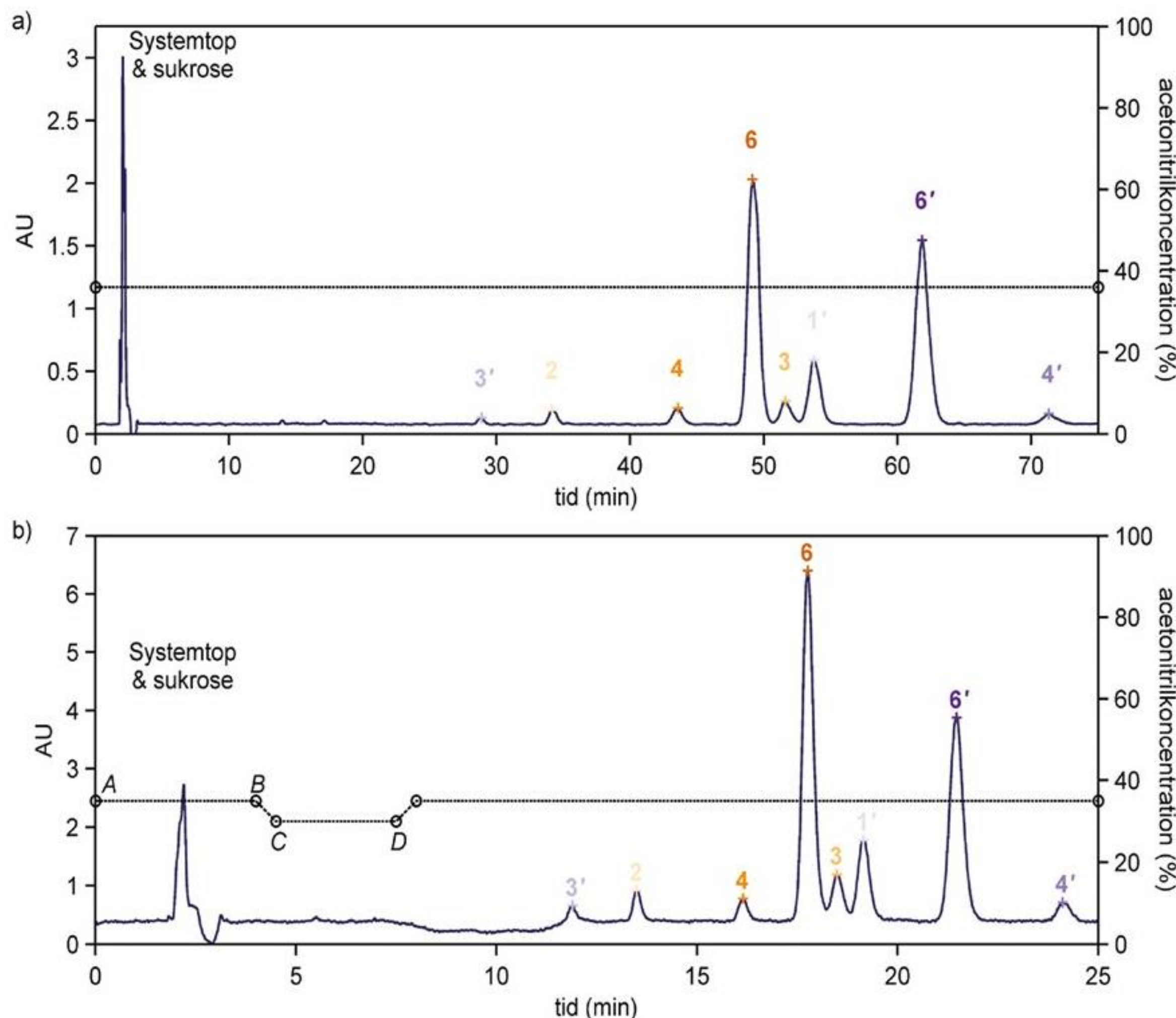
Regioisomeri

Forbindelser med ens kemisk sammensætning, men med forskelle i position af funktionelle grupper eller substituenten på molekylets hovedstruktur, kaldes regioisomerer.

elueringsstrategier, som resulterede i metoder til effektiv separation og identifikation af alle regioisomerer af de to forbindelser [1,2]. Enzymkatalyseret syntese af sukroselaurat i det aprotiske polære solvent *N,N*-dimetylformamid (DMF) blev undersøgt mht. enzymaktivitet og -selektivitet af en række enzympræparater. Alle reaktioner viste selektivitet for dannelse af 2-*O*-lauroysukrose, og metalloproteasen termolysin viste den højeste aktivitet [3].



Figur 1. Struktur af sukrose. Haworth-projektion af sukrose med kulstofnummerering. Farverepræsentation er gennemgående i alle aktuelle figurer.



Figur 2. Kromatogrammer fra RP-HPLC-analyser af sukrosealkanoater. Profil af acetonitrilkoncentration i eluent –○–. Toppene er markeret med regioisomerernes substitutionspositioner.

a) Sukroselaurat analyseret med isokratisk eluering ved 36% acetonitrilkoncentration.

b) Sukrosekaprat analyseret med step-down-gradienteluering beskrevet af variablerne A, B, C og D:

A = 35%, B = 4 min, C = 30%, D = 3 min.

Fremstilling af sukroseestre

Sukrose er en polyfunktionel forbindelse med otte hydroxy-grupper som kan danne mange produkter ved enkle reaktioner (figur 1). Esterdannelse med en enkelt fedtsyre kan give ophav til otte regioisomerer, noget der gør selektiv esterificering af sukrose udfordrende, både ved brug af kemisk og enzymatisk katalyse. Kemisk katalyse udføres sædvanligvis ved høj temperatur, hvilket kan medføre lav selektivitet og misfarvede biprodukter. Betydelig højere selektivitet er påvist for enzymkatalyserede processer under mildere reaktionsbetingelser. Enzymer er effektive katalysatorer, der fungerer i moderate pH- og temperaturområder og har lavt miljøaftryk. Estersyntese kan katalyseres af hydrolytiske enzymer, som lipaser eller proteaser, ved lav vandaktivitet i organiske solventer. Varierende grad af selektivitet har været rapporteret for flere substituentpositioner i forbindelse med esterificering af sukrose. De mest favoriserede positioner er 2-, 6- og 1'-OH.

RP-HPLC-analyse

RP-HPLC er en velegnet analysemetode til direkte analyse af sukre og sukkerderivater. Kombineret med CAD – en detektionsmetode, der er uafhængig af bestemte fysisk-kemiske egenskaber ved de analyserede forbindelser og meget egnet til kulhydrater, fedtsyrer og lipider – kan både sukrose og sukroseestre separeres, detekteres og kvantificeres. Forskellige elueringsstrategier blev undersøgt med eksperimentel design og statistisk og multivariat analyse. Strategierne inkluderede isokratisk eluering, *step-down*-gradienteluering (figur 2b) og varieret *flow*-hastighed under isokratiske betingelser. De undersøgte faktorer for disse strategier var defineret som designvariable (tabel 1). De udviklede metoder til RP-HPLC-analyse af sukrosekapat og sukroselaurat resulterede i separation af alle otte regioisomerer af de to forbindelser, og identifikation af regioisomerne vha. NMR [1,2].

Variabel	Beskrivelse	Sukrosekapat	Sukroselaurat
<i>A</i> (%)	Initial acetonitrilkoncentration	30.0-40.0	38.0-46.0
<i>B</i> (min)	Varighed af <i>A</i>	2.0-6.0	0.0-6.0
<i>C</i> (%)	Påfølgende acetonitrilkoncentration	20.0-40.0	24.0-38.0
<i>D</i> (min)	Varighed af <i>C</i>	1.0-5.0	2.0-6.0
<i>F</i> (mL/min)	Flow-hastighed af eluent	-	1.0-2.0
<i>I</i> (%)	Isokratisk acetonitrilkoncentration	-	35.0-41.0

Tabel 1. Symboler, definitioner og værdier for designvariabler.

FOOD TECH

Processing & Packaging

28.-30. oktober 2014



Nordeuropas
største fagmesse
for fødevareteknologi



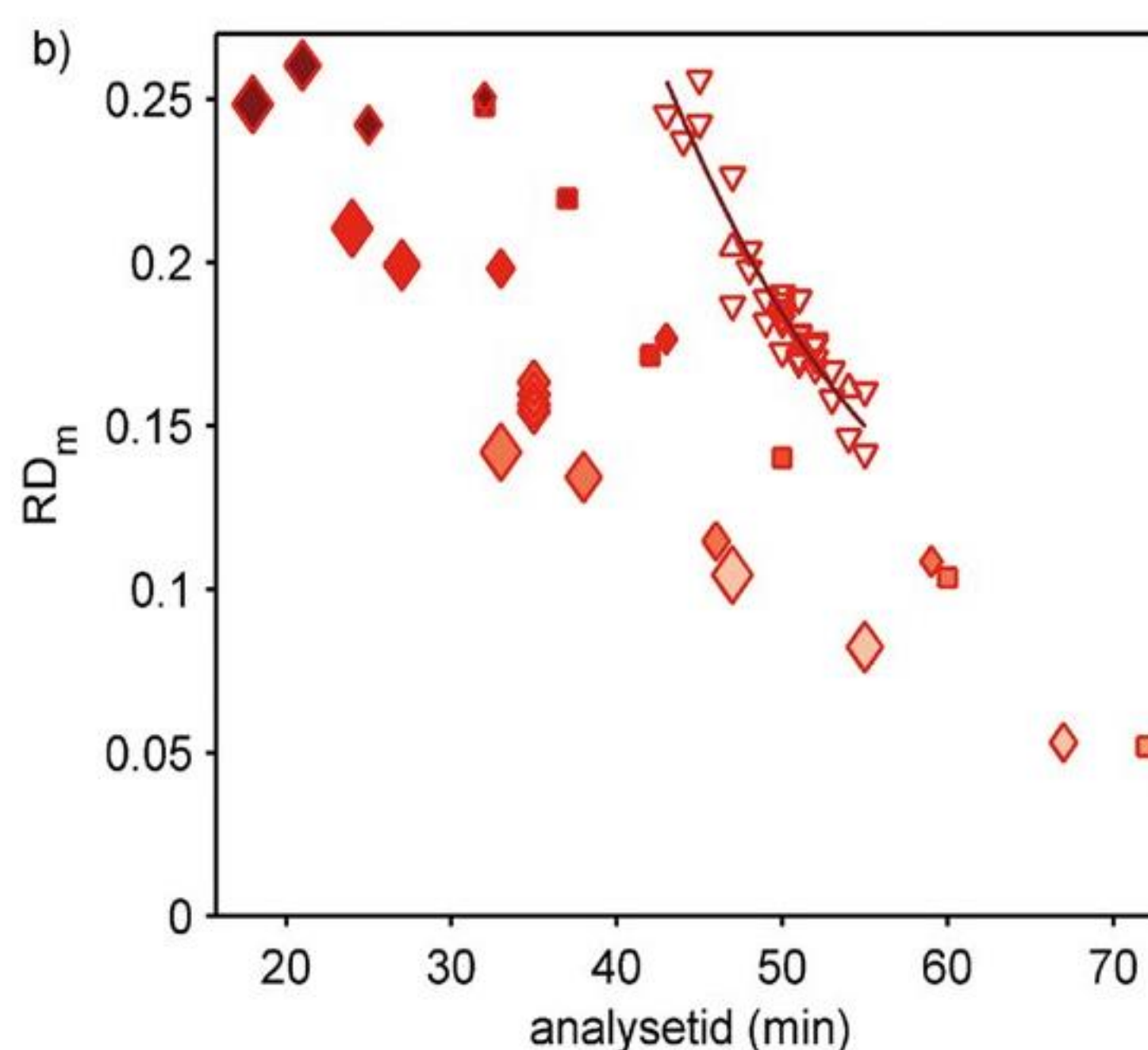
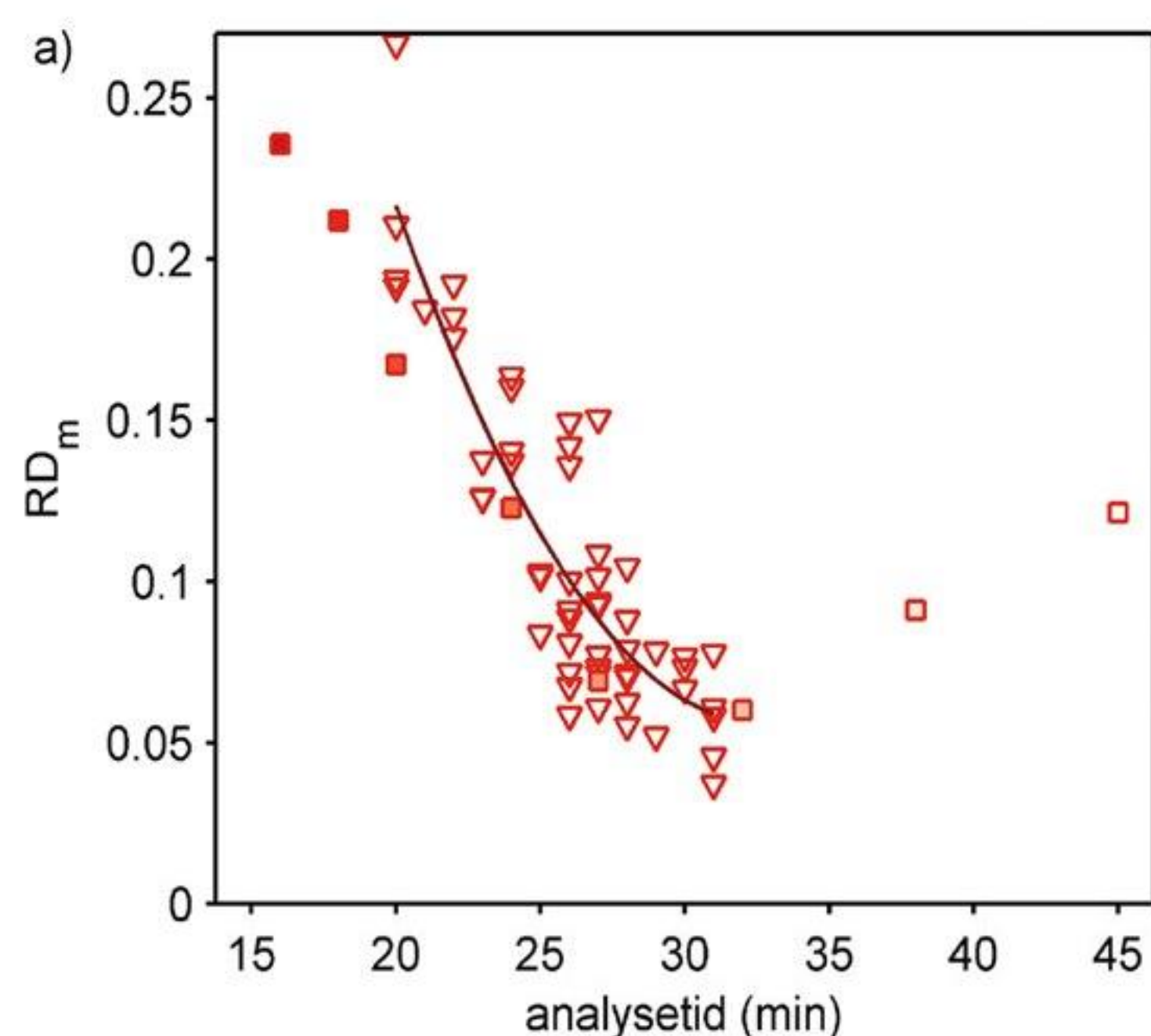





- Ny viden
- Ny teknologi
- Inspiration
- Networking

Læs mere på
foodtech.dk





Figur 3. General resolution deviation (RD_m) og analysetid fra elueringsstrategier for sukrosekaprat (a) og sukroselaurat (b). Eluering: Isokratisk ($\square$); ændret flowhastighed under isokratiske betingelser ($\diamond$); step-down-gradient (∇); step-up-gradient ($\triangle$). For isokratiske elueringer angiver symbolstørrelse stigende flowhastighed ($\diamond\diamond\diamond$) og symbolernes farvetæthed angiver stigende acetonitrilkoncentration (farvelegende).

Analyse og vurdering af kromatografisk separation af flere komponenter

Separation af komponenter ved RP-HPLC-analyse bliver typisk vurderet fra beregnede værdier for *resolution* (R_s), som angiver grad af overlap mellem to nærliggende toppe. I dette arbejde, hvor separation af otte komponenter var af interesse, opstod der et behov for at vurdere de resulterende syv R_s -værdier samlet. Til dette formål blev der udviklet en matematisk funktion til beregning af et måltal for total separation, benævnt *general resolution deviation for multiple peaks* (RD_m). Denne funktion var baseret på standardafvigelse for stikprøve, som giver nøjagtigheden af et sæt værdier sammenlignet med deres gennemsnit, dvs. målværdien. Værdien for optimal resolution ($R_s = 1.5$) blev brugt som målværdi, og funktionen blev gjort prøveafhængig ved at beregne topbredder for alle toppe fra toppen med størst areal, og sådan udligne toppenes størrelser. Ligning 1 viser den fuldstændige funktion:

$$RD_m(t_R) = a \times \sqrt{\frac{1}{n-1} \sum_{i=2}^n \min \left(\frac{(t_i - t_{i-1})}{4\bar{\omega}(t_i - t_0)} - 1.5, 0 \right)^2} \quad (1)$$

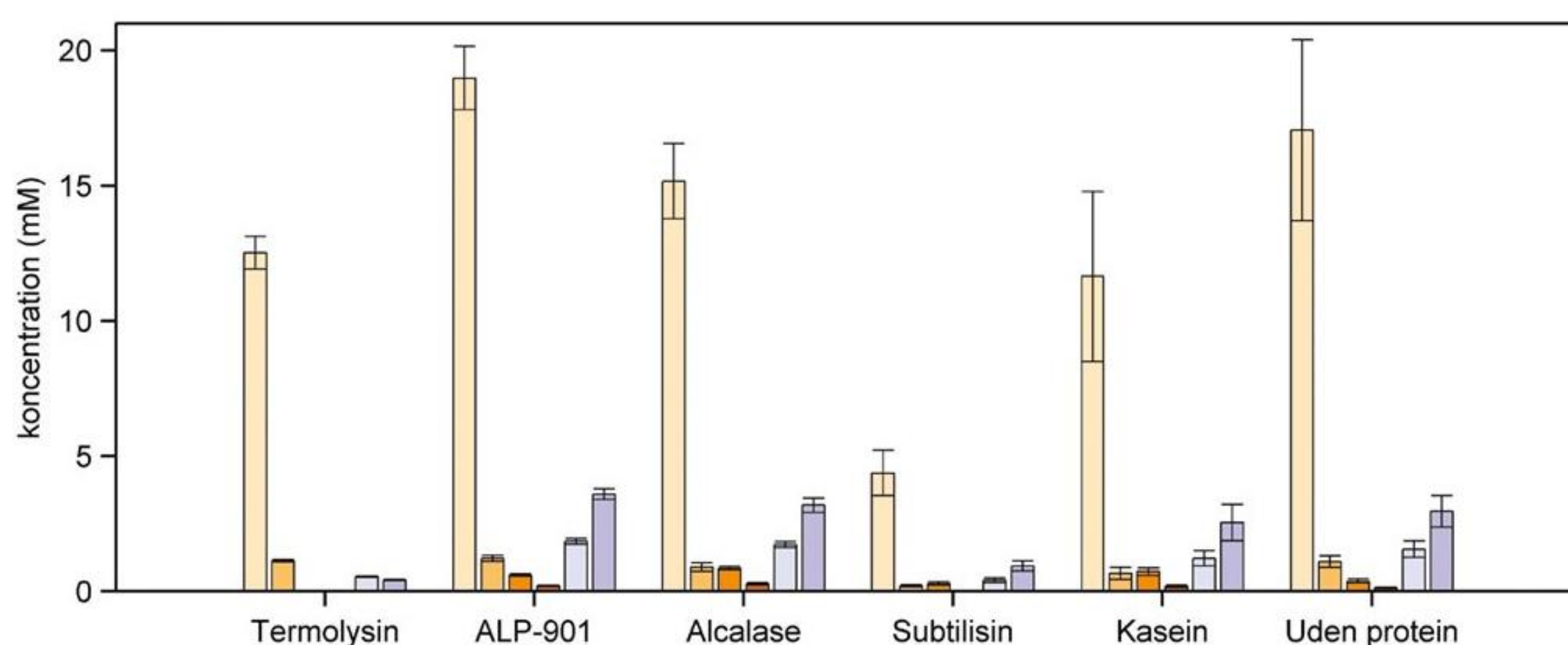
hvor t_R er retentionstid, $\bar{\omega}$ er hældningstal for topbredder, n er antal komponenter vurderet, $i \in [2, n]$, eftersom antallet resolution-værdier altid er $n-1$, og a er en skaleringskonstant. Ved at skalere med $a=1/1.5$ får funktionen en værdimængde fra 0 til 1, og værdien er omvendt proportional med summen af resolution-værdierne [2].

Effektivitet af elueringsstrategier

De undersøgte elueringsstrategier blev sammenlignet mht. total separation udtrykt ved RD_m og total analysetid (figur 3), og effektiviteten blev optimeret ved minimering af de to værdier. Den mest effektive elueringsmetode til analyse af sukrosekaprat var step-down-gradienteluering, mens isokratisk eluering med øget flowhastighed gav bedre effektivitet for sukroselaurat [2].

Enzymkatalyseret syntese af sukroselaurat

En række enzympræparater af proteaser blev anvendt til esterificering af sukrose med vinylaurat i DMF. Reaktionen blev



Figur 4. Effekt af reaktionsbetingelser på koncentration af sukroselauratregioisomerer efter 48 timer. Regioisomerer: 2, 3, 4, 6, 1', 3'. Regioisomererne 4' og 6' blev kun detekteret i spormængder i reaktion uden protein. Standardafvigelser bestemt ud fra reaktioner udført i tre gentagelser ($n = 3$), bortset fra reaktion med termolysin ($n = 2$).

udført med præparaterne termolysin, ALP-901, subtilisin A og Alcalase 3.0T samt kontrolreaktioner med proteinet kasein og uden protein, for at undersøge præparaternes selektivitet og aktivitet. Alle udførte reaktioner gav dannelse af sukroselaurat, med 2-*O*-lauroylsukrose dannet i højest mængde. Udbytter af produkt varierede fra 12% til 53%. Højest aktivitet blev observeret for termolysin, efterfulgt af ALP-901, og kontrolreaktion uden protein. Regioisomerfordeling for reaktionerne efter 48 timer viste små variationer for alle reaktioner, bortset fra reaktionen med termolysin, der resulterede i en unik regioisomerfordeling (figur 4). Resultaterne viste, at solventen i høj grad inducerede selektiviteten i de undersøgte reaktioner [3].

E-mail:

Aleksander Lie: alie@bio.aau.dk

Ph.d.-afhandling forsvaret 10. april ved Institut for Kemi og Biologi på Aalborg Universitet (AAU).

Referencer

1. Lie, A., Wimmer, R., og Pedersen, L.H. *J. Chromatogr. A* 2013, 1281, 67-72.
2. Lie, A., og Pedersen, L.H. *J. Chromatogr. A* 2013, 1311, 127-133.
3. Lie, A., Meyer, A.S., og Pedersen, L.H. Appearance and distribution of regioisomers in metallo- and serine-protease-catalysed acylation of sucrose in *N,N*-dimethylformamide. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 2014. DOI: 10.1016/j.molcatb.2014.04.017