

**TOMASZ BORUCZKOWSKI**  
**HANNA BORUCZKOWSKA**  
**MACIEJ BIENKIEWICZ**  
**WIOLETTA DROŹDŹ**  
**EWA TOMASZEWSKA-CIOSK**  
**PIOTR REGIEC**

Katedra Technologii Rolnej i Przechowalnictwa  
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu

## Wybrane właściwości fizyczne niskoacetylowanej skrobi estryfikowanej kwasem oleinowym \*

### Chosen physical properties of low acetylated starch esterificated with oleic acid

W niniejszej pracy przeprowadzono enzymatyczną estryfikację skrobi niskoacetylowanej kwasem tłuszczowym z użyciem enzymów w środowisku rozpuszczalnika organicznego. Analizom zostały poddane zarówno substancje wyjściowe jak i produkty powstałe w reakcji estryfikacji. W wyniku reakcji estryfikacji przy zastosowaniu lipazy z drożdży *Candida antarctica* oraz dwóch wyodrębnionych na drodze przemysłowej frakcji tego enzymu (A i B) powstały 3 estry skrobi acetylowanej i kwasu oleinowego. Ich stopień podstawienia oznaczony za pomocą analizy spektrum  $^1\text{H NMR}$  wynosił od 0,07 do 0,12 i był zależny od frakcji zastosowanego enzymu. Analiza termiczna przy użyciu różnicowego kalorymetru skaningowego wykazała, że ciepło właściwe przemiany fazowej produktów estryfikacji było wyższe niż ciepło właściwe przemiany fazowej skrobi acetylowanych. Istotny wpływ na zbadane właściwości fizyczne otrzymanych związków miał stopień acetylacji skrobi.

**Słowa kluczowe:** estryfikacja, kwas oleinowy, lipaza, skrobia

In this study, we conducted an enzymatic esterification of low acetylated starch by fatty acid using enzymes in an organic solvent. We analyzed both the starting materials and reaction products formed in the esterification. The reaction of esterification using lipase from *Candida antarctica* and two separate enzyme fractions (A and B) formed three acetylated starch esters of oleic acid. The degree of substitution determined by  $^1\text{H NMR}$  spectrum analysis ranged from 0.07 to 0.12, and was dependent on the applied fraction of the enzyme. Thermal analysis using differential scanning calorimeter showed that the products' heats of phase transition were higher than the acetylated starch heat of phase transition. A degree of substitution of acetylated starch had a significant impact on the physical properties of investigated compounds.

---

\* Praca wykonana w ramach grantu MNiSW, umowa nr 2338/B/P01/2009/36 o realizację projektu badawczego nr NN312233836

**Key words:** esterification, lipase, oleic acid, starch

## WSTĘP

Hydrofilowy charakter skrobi jest główną przyczyną ograniczeń w wykorzystaniu jej w przemyśle (Singh i in., 2004). Problem ten jest możliwy do rozwiązania poprzez modyfikowanie skrobi natywnej (Yan i in., 2010) nadające jej pożądane właściwości fizykochemiczne i funkcjonalne (Fortuna i in., 2002).

W wyniku niektórych modyfikacji skrobi wprowadzone do niej podstawniki, np. grupy estrowe, tworzą skrobie, które zapewniają trwałość przechowalniczą produktów, szczególnie o dużej zawartości wody, dzięki stabilności żeli i kleików skrobiowych. W wyniku tego, obok występujących wiązań wodorowych, powstają dodatkowe wiązania chemiczne pomiędzy sąsiednimi łańcuchami skrobi. Taka usieciowana skrobia staje się bardziej odporna na oddziaływania chemiczne i mechaniczne (Leszczyński, 2006).

Stosunkowo nową grupą modyfikatorów skrobiowych są estry sacharydów i kwasów tłuszczowych (Ward i in., 1997). Zaliczane są one do naturalnych biosurfaktantów niejonowych (Kołakowski i in., 2005), znajdujących zastosowanie zarówno w przemyśle spożywczym, chemicznym, kosmetycznym, jak i farmaceutycznym czy biomedycznym (Degn i in., 2001). Sacharydy, należąc do związków polihydroksylowych, stwarzają możliwość estryfikacji wolnych grup hydroksylowych obecnych w ich cząsteczce. Dzięki temu możliwe jest otrzymanie kompleksów różniących się diametralnie właściwościami fizykochemicznymi (Lortie, 1997; Kołakowski i in., 2005). Estry kwasów tłuszczowych i sacharydów są związkami wykazującymi właściwości stabilizujące i emulgujące (Ye i in., 2010). Wykorzystaniem estrów sacharydów i kwasów tłuszczowych zainteresował się również przemysł kosmetyczny. Znaleźć je można w kremach do ciała, pastach do zębów, pomadkach do ust, szamponach, odżywkach do włosów a także w płynach do mycia naczyń, czy detergentach piorących. Charakteryzują się one właściwościami zmiękcżającymi, niwelują problem twardej wody oraz wykazują właściwości antibakteryjne (Ye i in., 2010). Zwiększa się również wykorzystanie estrów sacharydów w przemyśle farmaceutycznym i biomedycznym. Ułatwiają one rozpuszczanie w tłuszczach witamin i antybiotyków, nie podrażniając śluzówki jamy ustnej podczas ich przyjmowania. Ponadto mogą zostać użyte jako wypełniacze ubytków w kościach a nawet jako ich całkowite zamienniki (Rajan i in., 2006, 2008).

Estry skrobi i kwasów tłuszczowych można m.in. wytwarzać metodami chemicznymi, w reakcji skrobi z kwasami tłuszczowymi. Proces ten ze względu na niewielką rozpuszczalność kwasów tłuszczowych w wodzie i sacharydów w rozpuszczalnikach hydrofobowych, musi być prowadzony w środowisku rozpuszczalników organicznych jak pirydyna, sulfotlenek dimetylu (DMSO) czy NN- dimetyloformamid (DMF). Rozpuszczalniki te są toksyczne dla zdrowia człowieka i środowiska. Poza tym proces przy użyciu katalizatorów chemicznych z reguły przebiega w sposób niekontrolowany. Alternatywnym rozwiązaniem wydaje się być prowadzenie syntezy przy udziale enzymów, w szczególności lipaz. Właściwy proces przebiega w niższej temperaturze (30–60°C) a otrzymany produkt posiada określoną budowę chemiczną, jest pozbawiony barwnych

zanieczyszczeń i co równie ważne, jest naturalny (Dubreucq i in., 2000). Obecnie znane są już mechanizmy estryfikacji sacharydów kwasami tłuszczowymi, nie ma natomiast żadnych doniesień poruszających tematykę transestryfikacji estrów sacharydów i kwasów tłuszczowych. Powstaje zatem potrzeba zbadania ewentualnych możliwości syntezy tych estrów przy zastosowaniu tego typu reakcji. Biorąc pod uwagę duże możliwości wykorzystania estrów sacharydów praktycznie we wszystkich gałęziach przemysłu, zasadnym jest przeprowadzenia badań nad nowymi możliwościami ich syntezy z zachowaniem nurtów proekologicznych.

Celem niniejszej pracy było otrzymanie estru skrobi ziemniaczanej niskoacetylowanej z kwasem oleinowym na drodze enzymatycznej estryfikacji przy użyciu różnych frakcji immobilizowanej lipazy pochodzenia mikrobiologicznego, a także porównanie właściwości uzyskanych produktów.

#### MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy stanowiły: skrobia niskoacetylowana, wyprodukowana w 2010 przez Lyckeby Culinar AB, MICROLYS 52, stopień podstawienia deklarowany przez producenta wynosił 0,01–0,2; sito molekularne 4Å firmy Sigma-Aldrich, kwas oleinowy firmy Fluka Chemika, tert-Butanol firmy Riedel-de Haën, preparaty immobilizowanej na żywicy akrylowej lipazy zewnątrzkomórkowej pochodzącej z drożdży *Candida antarctica* o nazwie handlowej Nowozym 435 oraz frakcje A i B tego enzymu, firmy Sigma-Aldrich.

##### **Enzymatyczna estryfikacja**

Przygotowano mieszaniny reakcyjne o następującym składzie: skrobia acetylowana, kwas oleinowy, tert-butanol, sito molekularne oraz enzym (lipaza A i B oraz Novozym 435). Równocześnie sporządzono próby zerowe — nie zawierające dodatku enzymu.

Skład mieszanin reakcyjnych: na 1 mol równoważnika glukozy odważono 1 mol kwasu oleinowego, tert-butanol stanowił podwójny ekwiwalent masowy kwasu oleinowego oraz skrobi niskoacetylowanej, preparaty immobilizowanej lipazy (Novozym 435 oraz jej frakcje A i B) — 1 g, sito molekularne (absorpcja powstałej, podczas reakcji, wody) — 0,2-krotny ekwiwalent masowy skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego. Mieszaniny były poddawane reakcji, która przebiegała w systemie ciągłego mieszania (350 obr./min) przez okres 10 dni w temperaturze 60°C, po czym nadmiar kwasu tłuszczowego ekstrahowano acetonem w ilości 150 ml w temperaturze 35°C przez 1 godzinę. Otrzymany osad przesączano w celu oddzielenia sita molekularnego oraz przemywano acetonem w celu usunięcia pozostałości wolnego kwasu oleinowego. Preparaty po przemyciu suszono w temperaturze pokojowej (20–25°C). Dodatkowo sprawdzono wpływ przetrzymywania skrobi acetylowanej z kwasem tłuszczowym w sposób identyczny, jak opisany powyżej, jednak bez dodatku enzymu.

##### **Analiza wiązań chemicznych obecnych w preparatach — metoda rezonansu magnetycznego <sup>1</sup>H NMR**

Przygotowano próby zawierające 10 mg badanych preparatów oraz 1 ml deuterowanego dimetylosulfotlenku (DMSO). Mieszaninę ogrzewano w łaźni wodnej w temperaturze 70°C przez 7 dni. Następnie pobrano 0,6 ml próby i przeniesiono do

próbówek NMR. Analiza  $^1\text{HNMR}$  została przeprowadzona w temperaturze  $70^\circ\text{C}$  za pomocą spektrometru AVANCE AMX 300 firmy Bruker. Stopień podstawienia kwasem octowym oraz oleinowym obliczono zgodnie z metodyką przedstawioną przez Hui i in. (2008) oraz Kapuśniaka i Siemiona (2005).

Analiza grup funkcyjnych występujących w preparatach przy pomocy absorpcyjnej spektroskopii FTIR

Odważono po 0,2 g badanych prób, które sprasowano w pastylkę KBr. W celu określenia grup funkcyjnych wykonano analizę na spektrometrze Mattson FTIR-300.

Wyznaczenie charakterystyk termicznych substancji przy użyciu różnicowego kalorymetru skaningowego DSC — Mettler-Toledo model 822e.

Do aluminiowego naczynka o pojemności 100  $\mu\text{l}$  naważono 5 mg badanej substancji, w przeliczeniu na suchą masę oraz uzupełniano wodą do masy 15 mg. Próbę kondycjonowano w czasie 30 minut w temperaturze  $20\text{--}25^\circ\text{C}$  a następnie umieszczono w komorze różnicowego kalorymetru skaningowego. Próbę ogrzewano od temperatury  $25$  do  $100^\circ\text{C}$  z prędkością  $4^\circ\text{C}/\text{minutę}$ . W oparciu o otrzymane wyniki wyznaczono ciepło właściwe przemian fazowych, temperatury początkowe i końcowe przemian fazowych oraz temperatury ekstrapolowanych środków pików.

Uzyskane wyniki badań poddano interpretacji statystycznej za pomocą jednokierunkowej dwuczynnikowej analizy wariancji. Grupy jednorodne wyznaczono testem Duncana dla poziomu istotności  $\alpha = 0,05$  w programie Statistica 9.1.

#### OMÓWIENIE WYNIKÓW

W tabeli 1 przedstawiony został stopień podstawienia kwasem oleinowym oraz kwasem octowym skrobi niskoacetylowanej i jej pochodnych otrzymanych w trakcie reakcji trwającej dziesięć dni. W tym wypadku, najwyższą aktywnością w prowadzeniu reakcji estryfikacji wykazała się frakcja B stosowanego enzymu. Wartość stopnia podstawienia kwasem oleinowym wyniosła  $\text{DS.} = 0,12$  natomiast kwasem octowym —  $\text{DS.} = 0,07$ . Najniższą skutecznością estryfikacji wykazała się frakcja A enzymu, pozwalając na uzyskanie stopnia podstawienia  $\text{DS.} = 0,1$  — kwasem oleinowym oraz  $\text{DS.} = 0,08$  — kwasem octowym.

Zastosowanie enzymu N poskutkowało jednoczesnym przyłączeniem do łańcucha skrobiowego kwasu oleinowego w ilości  $\text{DS.} = 0,11$  oraz częściowym odłączeniem, obecnych w nim już, grup pochodzących od kwasu octowego (deacetylacja). Stopień podstawienia czystej skrobi niskoacetylowanej kwasem octowym wynosi  $\text{DS.} = 0,11$  i potwierdza dane producenta. Na widmach  $^1\text{HNMR}$  znaleźć można sygnały od protonów grupy  $\text{CH}_3$  kwasu tłuszczowego w zakresie  $0,79\text{--}0,87$  ppm, sygnały od grupy  $\text{CH}_3$  kwasu octowego w przedziale od  $2,01$  do  $2,10$  ppm oraz piki pochodzące od pierścienia glukozowego w zakresie  $5,0\text{--}5,5$  ppm.

Tabela 1

**Stopnie podstawienia (DS) skrobi niskoacetylowanej i jej pochodnych, otrzymanych w reakcji prowadzonej przez 10 dni**  
**The degrees of substitution (DS) of low acetylated starch and its derivatives, obtained by the reaction conducted for 10 days**

Preparat Preparation	Stopień podstawienia (DS) The degree of substitution	
	kwasy octowe acetic acid	kwasy oleinowe oleic acid
Skrobia niskoacetylowana Low acetylated starch	0,11	-
Kompleks skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego Complex of low acetylated starch and oleic acid	0,11	0,02
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu A Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme A	0,08	0,10
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu B Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme B	0,07	0,12
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu N Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme N	0,07	0,11

Analizę grup funkcyjnych obecnych w badanych preparatach wykonano za pomocą spektroskopii FTIR. Skrobia niskoacetylowana, skrobia niskoacetylowana przetrzymywana z kwasem oleinowym a także produkty estryfikacji skrobi niskoacetylowanej z kwasem oleinowym z zastosowaniem enzymów, wykazały drgania rozciągające pochodzące od reszt kwasu octowego oraz oleinowego.

W tabeli 2 zamieszczono wartości ciepła właściwego przemiany fazowej (Qw), oznaczonego w trakcie ogrzewania do 100°C w środowisku wody. W przypadku skrobi niskoacetylowanej największym ciepłem przemiany fazowej (-8,46J/g) charakteryzowała się skrobia niskoacetylowana, która stanowi odrębną grupę jednorodną. Najmniejszym ciepłem właściwym przemiany fazowej (-3,85J/g) charakteryzuje się produkt estryfikacji skrobi niskoacetylowanej z kwasem oleinowym powstały w wyniku przeprowadzonej reakcji z użyciem enzymu N. Wartości ciepła właściwego przemiany fazowej produktów estryfikacji skrobi niskoacetylowanej z kwasem oleinowym powstałych w wyniku przeprowadzonej reakcji z użyciem enzymu A oraz B nie różnią się statystycznie

W tabeli nr 3 przedstawiono początkowe temperatury przemian fazowych oznaczone w trakcie ogrzewania preparatów do 100°C w środowisku wody. Podobnie jak w przypadku ciepła właściwego najwyższą temperaturą początkową przemiany fazowej (46,4°C) charakteryzowała się skrobia niskoacetylowana.

Tabela 2

**Ciepło właściwe przemiany fazowej (Qw) skrobi niskoacetylowanej i jej pochodnych oznaczone w trakcie ogrzewania w środowisku wody do 100°C**  
**The heat of phase transition of low acetylated starch and its derivatives measured in water during heating to 100°C**

Preparat Preparation	Ciepło właściwe przemiany fazowej Qw (Jg <sup>-1</sup> ) The heat of phase transition			NIR LSD
	powtórzenia repetitions		średnia average	
	I	II		
Skrobia niskoacetylowana Low acetylated starch	-8,74	-8,18	-8,46	
Kompleks skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego Complex of low acetylated starch and oleic acid	-4,07	-4,44	-4,26	
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu A Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme A	-4,86	-5,65	-5,26	1,08
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu B Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme B	-5,36	-5,62	-5,49	
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu N Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme N	-4,24	-3,45	-3,85	

Tabela 3

**Temperatura początkowa przemiany fazowej skrobi niskoacetylowanej i jej pochodnych oznaczona w trakcie ogrzewania w środowisku wody do 100°C**  
**Initial temperature of phase transition of low acetylated starch and its derivatives measured in water during heating to 100°C**

Preparat Preparation	Temperatura początkowa przemiany fazowej (°C) Initial temperature of phase transition			NIR LSD
	powtórzenia repetitions		Średnia average	
	I	II		
Skrobia niskoacetylowana Low acetylated starch	46,1	46,6	46,4	
Kompleks skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego Complex of low acetylated starch and oleic acid	41,5	39,5	40,5	
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu A Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme A	42,4	42,6	42,5	1,79
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu B Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme B	42,5	43,0	42,8	
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu N Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme N	40,4	40,7	40,5	

Najniższą (40,5°C) charakteryzowała się skrobia niskoacetylowana przetrzymywana z kwasem oleinowym, która z produktem transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej z kwasem oleinowym powstałym w wyniku przeprowadzonej reakcji z użyciem enzymu N stanowi grupę jednorodną. Drugą grupę jednorodną stanowią produkty estryfikacji skrobi niskoacetylowanej z kwasem oleinowym powstałym w wyniku przeprowadzonej reakcji z użyciem enzymu A i B.

Kolejnym parametrem opisującym charakterystykę termiczną badanych preparatów jest temperatura końcowa przemiany fazowej, której wartości zebrano w tabeli 4.

Tabela 4

**Temperatura końcowa przemiany fazowej skrobi niskoacetylowanej i jej pochodnych oznaczona w trakcie ogrzewania w środowisku wody do 100°C**  
**Ending temperature of phase transition of low acetylated starch and its derivatives measured in water during heating to 100°C**

Preparat Preparation	Temperatura końcowa przemiany fazowej (°C) Ending temperature of phase transition		średnia average	NIR LSD
	powtórzenia repetitions			
	I	II		
Skrobia niskoacetylowana Low acetylated starch	59,4	59,6	59,5	
Kompleks skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego Complex of low acetylated starch and oleic acid	54,1	52,7	53,4	
Skrobia niskoacetylowana z kwasem oleinowym i enzymem A Low acetylated starch with oleic acid and the enzyme A	55,7	55,7	55,7	1,54
Skrobia niskoacetylowana z kwasem oleinowym i enzymem B Low acetylated starch with oleic acid and the enzyme B	55,9	56,2	56,1	
Skrobia niskoacetylowana z kwasem oleinowym i enzymem N Low acetylated starch with oleic acid and the enzyme N	55,4	54,1	54,8	

Najwyższą temperaturą końcową przemiany fazowej charakteryzowała się skrobia niskoacetylowana (59,5°C), najniższą skrobia niskoacetylowana przetrzymywana z kwasem oleinowym (53,4°C). Wartości temperatury końcowej przemiany fazowej produktów transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej z kwasem oleinowym powstałych w wyniku przeprowadzonej reakcji z użyciem enzymu A i B, nie różnią się statystycznie.

Temperatury ekstrapolowanego środka piku przemiany fazowej skrobi niskoacetylowanej, skrobi niskoacetylowanej przetrzymywanej z kwasem oleinowym oraz powstałych estrów przedstawiono w tabeli 5. Najwyższa temperatura ekstrapolowanego środka piku (52,6°C) została zarejestrowana w analizie termicznej skrobi niskoacetylowanej. Wartość tej temperatury stanowi osobną grupę jednorodną. Skrobię niskoacetylowaną przetrzymowaną z kwasem oleinowym cechowała najniższa wartość (46,3°C) temperatury ekstrapolowanego środka piku. Stanowi ona wraz ze skrobią niskoacetylowaną estryfikowaną z użyciem enzymu N grupę jednorodną. Spośród powstałych estrów najwyższą temperaturą ekstrapolowanego środka piku przemiany fazowej charakteryzował się produkt estryfikacji skrobi niskoacetylowanej z kwasem oleinowym powstały w wyniku przeprowadzonej reakcji z zastosowaniem enzymu B (48,8°C).

Tabela 5

**Temperatura ekstrapolowanego środka piksu przemiany fazowej skrobi niskoacetylowanej i jej pochodnych oznaczona w trakcie ogrzewania w środowisku wody do 100°C**  
**Temperature of extrapolated peak of phase transition of low acetylated starch and its derivatives measured in water during heating to 100°C**

Preparat Preparation	Temperatura ekstrapolowanego środka piksu przemiany fazowej (°C) Temperature of extrapolated peak of phase transition			NIR LSD
	powtórzenia repetitions		średnia average	
	I	II		
Skrobia niskoacetylowana Low acetylated starch	52,5	52,7	52,6	
Kompleks skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego Complex of low acetylated starch and oleic acid	47,2	45,4	46,3	
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu A Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme A	47,9	48,4	48,2	1,57
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu B Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme B	48,5	49,0	48,8	
Produkt transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego otrzymany przy użyciu enzymu N Product of transesterification of low acetylated starch by oleic acid obtained with use of enzyme N	46,4	46,9	46,7	

#### DYSKUSJA WYNIKÓW

Skrobia stanowi niezastąpiony surowiec niemal we wszystkich gałęziach gospodarki. Uniwersalność zastosowania tego materiału jest główną przyczyną ciągłego wzrostu zapotrzebowania na ten surowiec. Głównym powodem niepełnego wykorzystania skrobi w przemyśle jest jej hydrofilowy charakter (Singh i in., 2004; Kapuśniak i in., 2007). W celu uzyskania odpowiednich właściwości, takich jak rozpuszczalność, tekstura, konsystencja czy też wysoka odporność na działanie różnych czynników zewnętrznych, poddaje się ją modyfikacjom (Fortuna i in., 2002). Skrobia jako związek polisacharydowy posiada trzy wolne grupy hydroksylowe, przy czym podstawieniu może ulegać jedna, dwie lub wszystkie z grup. Stwarza to dogodne warunki do estryfikowania sacharydów na przykład kwasami tłuszczowymi.

Obecnie większość syntetyzowanych estrów sacharydów otrzymywana jest przy użyciu katalizatorów chemicznych. Metoda ta zastała opisana już w 1956 roku przez Osipowa i in. (1956). Jej zaletą jest fakt, iż przeprowadzona w odpowiednich warunkach nie skutkuje zniszczeniem gałązek skrobiowych a zmiany w obrębie cząsteczki skrobi są niewielkie. Niestety bardzo niewielka rozpuszczalność sacharydów w rozpuszczalnikach hydrofobowych wymusza stosowanie podczas reakcji organicznych rozpuszczalników polarnych, szkodliwych dla zdrowia człowieka. Są nimi sulfotlenek dimetylu (DMSO),



toluen, pirydyna. Dodatkowo, proces ten jest egzotermiczny co skutkuje powstawaniem barwnych zanieczyszczeń (Kořakowski i in., 2005).

Reakcje estryfikacji prowadzić można z powodzeniem na drodze biotechnologicznej, wykorzystując do tego celu enzymy pochodzenia mikrobiologicznego (Saxena i in., 2003; Adamczak i in., 2004). Zastosowanie znalazły tutaj głównie lipazy, które uzyskuje się z drożdży *Candida antarctica*, *Candida cylindracea*, *Candida rugosa*, pleśni *Rhizomucor miehei* oraz bakterii *Bacillus subtilis* (Kennedy i in., 2006). Mogą być one wykorzystywane w reakcji estryfikacji, transestryfikacji i interestryfikacji (Bornscheuer, 1999), a ich podstawowym zadaniem jest katalizowanie reakcji hydrolizy tłuszczów do wolnych kwasów tłuszczowych (Debreucq i in., 2000).

Wymienione lipazy drobnoustrojowe zostały „przetestowane” przez Seino i in. (1984) pod kątem przydatności do syntezy estrów sacharydów. Prowadzili oni szereg reakcji, w których udział brały: sacharoza, glukoza, fruktoza i sorbitol oraz kwasy tłuszczowe: oleinowy, stearynowy i linolowy. Środowiskiem reakcji był bufor fosforanowy. Najwyższą aktywnością w syntezie estrów wykazał się enzym z *Candida cylindracea*.

W niniejszej pracy, jako biokatalizator reakcji estryfikacji skrobi naturalnej oraz reakcji transestryfikacji skrobi niskoacetylowanej kwasem oleinowym, wykorzystano enzym z *Candida antarctica*, a także frakcje A i B tego enzymu. Ward i in. (1997) w swoich badaniach, jako czynnik katalizujący reakcje syntezy estrów sacharydów kwasem arachidonowym, zastosowali osiem różnych enzymów, w tym również ten pochodzący z *Candida antarctica*. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń stwierdzili, iż najlepsze rezultaty uzyskano w przypadku lipazy pochodzącej właśnie z *Candida antarctica* (Ward i in., 1997). Obserwacje te potwierdził Tsitsimpikou i in. (1997). Zastosowali oni lipazę z *Candida antarctica*, a także z *Candida rugosa* w trakcie syntezy estrów sacharydów. Przeprowadzona acylacja arabinozy, mannozy, fruktozy oraz glukozy kwasem laurynowym w środowisku heksanu pozwoliła stwierdzić, iż *Candida antarctica* wykazała się wyższą aktywnością w syntezie estrów sacharydów niż *Candida rugosa* (Tsitsimpikou i in., 1997).

W niniejszej pracy określono właściwości: produktów otrzymanych w wyniku estryfikacji, estrów sacharydów przetrzymywanych z kwasem oleinowym, a także związków wyjściowych. Razem przebadano 5 preparatów.

Pierwsza analiza jakościowa wykonana została z wykorzystaniem magnetycznego rezonansu jądrowego. Widma <sup>1</sup>HNMR, oprócz potwierdzenia zajścia reakcji estryfikacji kwasem oleinowym, posłużyły do obliczenia wartości stopnia podstawienia (DS). Stopień podstawienia kwasem octowym został obliczony jako stosunek powierzchni protonów metylowej reszty kwasowej estru — od 1,97 do 2,10 ppm do powierzchni sygnałów protonów pierścienia glukozy w łańcuchu skrobi w zakresie od 5,0 do 5,5 ppm. W przypadku podstawienia kwasem oleinowym szukano sygnału w zakresie od 0,80 do 0,87 ppm należącego do końcowej grupy metylowej kwasu oleinowego (w niektórych przypadkach sygnał ten przesunął się w kierunku wyższych wartości -1,09 ppm i mieścił się w granicach standardowych przesunięć), a także sygnałów protonów pierścienia glukozy w łańcuchu skrobi w zakresie od 5,0 do 5,5 ppm.

W przypadku skrobi niskoacetylowanej analiza rezonansu magnetycznego potwierdziła zgodność stopnia podstawienia kwasem octowym ( $DS = 0,01-0,2$ ) podanym przez producenta Lyckeby Culinar AB, MICROLYS 52 — Szwecja. W literaturze można znaleźć źródła, w których określone są konkretne granice stopnia podstawienia skrobi niskoacetylowanej; według Bello-Perez i in. (2010) skrobia niskoacetylowana ma stopień podstawienia  $DS < 0,1$ , jest ona używana w przemyśle spożywczym do nadania produktom odpowiedniej konsystencji, stabilności oraz tekstury Natomiast Elomaa i in. (2004) podają, że zakres stopnia podstawienia tej skrobi mieści się w granicach 0,01–0,2. Wartości stopnia podstawienia produktów estryfikacji skrobi niskoacetylowanej kwasem oleinowym, uzyskanych na drodze syntezy dziesięciodniowej wynosiły odpowiednio: skrobia niskoacetylowana przetrzymywana z kwasem oleinowym (0,02 — kwas oleinowy, 0,11 — kwas octowy); produkt estryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego z wykorzystaniem frakcji A enzymu (0,10 — kwas oleinowy, 0,08 — kwas octowy); produkt estryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego z wykorzystaniem frakcji B enzymu (0,12 — kwas oleinowy, 0,07 — kwas octowy) oraz produkt estryfikacji skrobi niskoacetylowanej i kwasu oleinowego z wykorzystaniem enzymu N (0,11 — kwas oleinowy, 0,07 — kwas octowy). Uzyskany wynik stopnia podstawienia skrobi niskoacetylowanej kwasem oleinowym po 10 dniach przetrzymywania substratów w środowisku rozpuszczalnika organicznego bez dodatku enzymu może świadczyć o utworzeniu kompleksu skrobia — kwas tłuszczowy. Świadczy o tym też niemożność wypłukania kwasu tłuszczowego acetonem z tak powstałego kompleksu. Kapuśniak i in. (2007) prowadząc reakcję termicznej estryfikacji skrobi ziemniaczanej kwasem linolowym, uzyskali stopień podstawienia w zakresie od 0,09 do 0,68. Rajan i in. (2006) w przedstawiają stopień podstawienia skrobi z kassawy i kukurydzy, uzyskany w różnych warunkach prowadzenia reakcji. Najwyższy stopień podstawienia uzyskali w trakcie syntezy skrobi kukurydzianej kwasami tłuszczowymi pochodzącymi z oleju kokosowego przy udziale lipazy z *Thermomyces lanuginosa* w środowisku mikrofal ( $DS = 1,55$ ). Najniższy stopień podstawienia ( $DS = 0,07$ ) uzyskali w przypadku 36 godzinnej reakcji skrobi z kassawy z kwasem tłuszczowym. W publikacji z 2008 roku donoszą natomiast, iż możliwym jest uzyskanie estrów skrobi z kassawy z kwasem palmitynowym z udziałem lipazy AYS i dimetylosulfotlenkiem w roli środowiska reakcji. Powstały związek charakteryzował się stopniem podstawienia równym 1,05 (Rayan i in., 2006, 2008).

Boruczkowska i in. (2008) prowadząc reakcję enzymatycznej estryfikacji skrobi i jej pochodnych kwasem laurynowym, uzyskali stopnie podstawienia od 0,22 do 1,00. Wskazali oni, iż różnice w ilości przyłączonych grup kwasu tłuszczowego związane są z rodzajem produktu wyjściowego i zastosowanym rozpuszczalnikiem.

Najniższym stopniem podstawienia odznaczała się skrobia niskoacetylowana przetrzymywana z kwasem oleinowym ( $DS 0,02$ ), zaś najwyższym stopniem podstawienia czynnikiem estryfikującym charakteryzował się produkt reakcji estryfikacji skrobi niskoacetylowanej z kwasem oleinowym przy zastosowaniu frakcji B enzymu ( $DS = 0,12$ ). Oznacza to, że co najmniej 1 grupa hydroksylowa w co 8 cząsteczce glukozy w skrobi niskoacetylowanej została zestryfikowana kwasem oleinowym (Leszczyński, 2006). Zastosowanie enzymów w reakcji estryfikacji kwasem tłuszczowym, przeprowadzonej w

niniejszej pracy wpłynęło na wydajność uzyskanych produktów, które charakteryzowały się wyższym stopniem podstawienia kwasem oleinowym, niż skrobia niskoacetylowana przetrzymywana z kwasem oleinowym. Prawdopodobnym może być również, że większe ilości enzymu zastosowanego w reakcji estryfikacji zwiększyłyby wydajność uzyskanych produktów. Na aktywność enzymu w środowisku reakcji mogła wpłynąć również zawartość wody. Częściowo rozdrobnione sito molekularne mogło bowiem nie wiązać dostatecznie powstałej w wyniku reakcji syntezy estrów wody i równowaga reakcji mogła przesunąć się w kierunku rozpadu powstałych produktów. Zdolność szybkiego prowadzenia reakcji jest wielce pożądana ze strony przemysłu, jednak należy być świadomym tego, iż otrzymywanie enzymów na skalę przemysłową jest wciąż bardzo kosztowe.

Wszelkie modyfikacje dokonywane na skrobi i jej pochodnych bardzo często powodują zmiany w ich właściwościach fizykochemicznych. Analiza termiczna skrobi naturalnej, skrobi niskoacetylowanej i ich pochodnych, wykonana została przy użyciu różnicowego kalorymetru skaningowego (DSC). Pomimo, iż publikowane przez różnych autorów, rezultaty oznaczeń wykonanych na DSC nie zawsze się ze sobą pokrywają, postanowiono wyznaczyć temperatury: początkowe, końcowe, ekstrapolowanego środka pików i pików przemiany fazowej, a także ciepła właściwe przemian fazowych, otrzymanych preparatów.

Acetylacja skrobi a następnie poddanie jej reakcji estryfikacji z kwasem tłuszczowym, może powodować zmiany temperatury początkowej, końcowej i ekstrapolowanego środka pików przejść fazowych a także różnice w entalpii przemiany fazowej (Bello-Perez i in., 2010). W badaniach własnych prowadzonych przy użyciu kalorymetru skaningowego, podczas ogrzewania próbek do 100°C w środowisku wody uzyskano wyniki, które mogą wskazywać, iż stopień podstawienia skrobi acetylowanej wpłynął na jej właściwości termiczne. Ciepło właściwe przemiany fazowej skrobi niskoacetylowanej (-8,46 J/g) w trakcie ogrzewania do 100°C było niższe od produktów reakcji jej estryfikacji z kwasem oleinowym katalizowanej przez enzymy (A, B lub N). Zaobserwowany spadek ciepła właściwego przemiany fazowej w przypadku powstałych produktów może świadczyć, iż rozerwanie powstałego wiązania estrowego (z kwasem oleinowym) wymagało mniejszego nakładu energii w porównaniu do nakładu energetycznego potrzebnego do zniszczenia struktury produktu wyjściowego. Może to wynikać ze zwiększonej termostabilności powstałych produktów reakcji estryfikacji skrobi niskoacetylowanej z kwasem oleinowym katalizowanej przez enzymy (A, B lub N). Temperatury początkowe, końcowe oraz ekstrapolowanego środka pików różniły się pomiędzy badanymi związkami, najwyższe charakteryzowały produkt wyjściowy – skrobię niskoacetylowaną, a najniższe skrobię niskoacetylowaną przetrzymywaną z kwasem oleinowym. W literaturze znaleźć można doniesienia, iż w przypadku skrobi ryżowej, dodatek kwasów oleinowego i linolenowego, nie wpłynął znacząco na temperaturę kleikowania, temperaturę pików przemiany fazowej, ani na ciepło właściwe przemiany fazowej (Zhou i in., 2007). Częściej jednak publikowane są prace zaprzeczające wnioskowi Zhou i in. Rajan i współautorzy (2006, 2008) przeprowadzili szereg badań na preparatach zestryfikowanej skrobi z kassawy i kukurydzy. Twierdzili oni, iż stopień podstawienia skrobi kwasem tłuszczowym ma znaczący wpływ na temperatury przemian fazowych. Estryfikacja kwasami tłuszczowymi, według nich,

powoduje wzrost termoplastyczności skrobi. Rozkład termiczny skrobi związany jest z reakcją jej dehydratacji, w której głównym produktem dekompozycji jest woda. Wyższy stopień podstawienia to mniej wolnych grup hydroksylowych. Tak więc, zjawisko to skorelowane jest ze stopniem podstawienia skrobi. Następnie zmianom ulegają właściwości mechaniczne i termoplastyczne skrobi, dzięki czemu niemożliwym jest utworzenie wiązań pomiędzy jej grupami hydroksylowymi a wodą. Stwarza to możliwość wykorzystywania skrobi w produktach, gdzie absorpcja wody musi być minimalna (Rayan i in., 2006, 2008).

Metody enzymatycznej estryfikacji sacharydów są tematem nieustannych badań. Dość wyraźnie kreślą się nowe nurty w sposobach modyfikowania składników żywności. Prędzej czy później, metody biotechnologiczne (nastawione na ochronę środowiska) wyprą te wykorzystujące jako katalizatory czynniki chemiczne. Na podstawie wyników badań przeprowadzonych w niniejszej pracy stwierdzono, iż możliwym jest uzyskanie estrów skrobi na drodze syntezy z wykorzystaniem lipaz. Otrzymane produkty wymagają jeszcze bardziej dokładnych badań jednak już teraz stwierdzić można, że charakteryzują się zupełnie odmiennymi właściwościami w stosunku do substancji wyjściowych

#### WNIOSKI

1. Możliwe jest przeprowadzenie reakcji enzymatycznej estryfikacji skrobi niskoacetylowanej kwasem oleinowym z użyciem lipazy pochodzącej z drożdży *Candida antarctica* oraz frakcji A i B tego enzymu.
2. Reakcja enzymatycznej estryfikacji skrobi niskoacetylowanej kwasem oleinowym w obecności rozpuszczalnika organicznego tert-butanolu przy zastosowaniu lipazy z *Candida antarctica* oraz frakcji A i B tego enzymu, doprowadziła do powstania 3 estrów o różnym stopniu podstawienia
3. Temperatury przemian fazowych uzyskanych estrów skrobiowych różniły się od temperatur przemian fazowych prób wyjściowych, co świadczy o uzyskaniu zupełnie nowych produktów.
4. Przetrzywanie skrobi niskoacetylowanej w mieszaninie kwasu oleinowego i rozpuszczalnika prawdopodobnie spowodowało powstanie kompleksu skrobia acetylowana — kwas tłuszczowy.

#### LITERATURA

- Adamczak M., Bednarski W. 2004. Enhanced activity of intercellular lipases from *Rhizomucor miehei* and *Yarrowia lipolytica* by immobilization on biomass support particles. *Process Biochemistry*: 39: 1347 — 1361.
- Bello-Pérez L. A., Agama-Acevedo E., Zamudio-Flores P. B., Mendez-Montealvo, G., Rodriguez-Ambriz, S. L. 2010. Effect of low and high acetylation degree in the morphological, physicochemical and structural characteristics of barley starch. *LWT — Food Science and Technology*, Vol. 43, Issue: 9: 1434 — 1440.
- Bornscheuer U. T., Kazalaukas R. J. 1999. *Hydrolyses in organic synthesis: region- and stereoselective biotransformation*. Wiley-VCH, Weinheim.

- Boruczowska H., Leszczyński W., Boruczowski T., Drożdż W., Żołnierczyk A. 2008. Wpływ zastosowanego rozpuszczalnika organicznego na stopień podstawienia skrobi i jej pochodnych kwasem laurynowym. *Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych*: 530: 459 — 468.
- Dubreucq E., Ducret A., Lortie R. 2000. Optimization of lipase-catalyzed sorbitol monoester synthesis in organic medium. *Journal of Surfactants and Detergents*: 3: 327 — 333.
- Degn P., Zimmermann W. 2001. Optimization of carbohydrate fatty acid ester synthesis in organic media by lipase from *Candida antarctica*. *Biotechnology and Bioengineering*: 74: 483 — 634.
- Elomaa M., Asplund T., Soiminen P., Laatikainen R., Peltonen S., Hyvarinen S., Urtti A. 2004. Determination of the degree of substitution of acetylated starch by hydrolysis, <sup>1</sup>HNMR and TGA/IR. *Carbohydrate Polymers*: 57: 261 — 267.
- Fortuna T., Różnowski J. 2002. Skrobie modyfikowane chemicznie, ich właściwości i zastosowanie. *Żywność*: 2 (31): 16 — 29.
- Hui C., Kun X., Xiuli W., Qiang C., Donghua X., Chunlei S., Wende Z., Pixiu W. 2008. Effect of acetylation on the properties of corn starch. *Food Chemistry*: 106: 923 — 928.
- Kapuśniak J., Siemion P. 2007. Thermal reactions of starch with long-chain unsaturated fatty acids. Part 2. Linoleic acid. *Journal of Food Engineering*: 78: 323 — 332.
- Kennedy J. F., Kumar H., Panesar P. S., Marwaha S. S., Goyal R., Parmar A., Kaur S. 2006. Enzyme-catalyzed regioselective synthesis of sugar esters and related compounds. *Journal of Chemical technology and Biotechnology*: 81: 866 — 876.
- Kołakowski E. W., Bielecki S. 2005. Enzymatyczne modyfikacja składników żywności. Wydawnictwo Akademii Rolniczej w Szczecinie.
- Leszczyński W. 2006. Zastosowanie skrobi modyfikowanych w przemyśle spożywczym (cz. I). *Przegląd piekarski i cukierniczy*: 5: 54 — 56.
- Leszczyński W. 2006. Zastosowanie skrobi modyfikowanych w przemyśle spożywczym (cz. II). Skrobie chemicznie modyfikowane. *Przegląd piekarski i cukierniczy*: 6: 6 — 8.
- Lortie R. 1997. Enzyme catalyzed esterification. *Biotechnology Advances*: 15: 1 — 15.
- Rajan A., Abraham T. E. 2006. Enzymatic modification of cassava starch by bacterial lipase. *Bioprocess and Biosystems Engineering*: 29: 65 — 71.
- Rajan A., Sudha J. D., Abraham T. E. 2008. Enzymatic modification of cassava starch by fungal lipase. *Industrial Crops and Products*: 27: 50 — 59.
- Saxena R. K., Sheoran A., Giri B., Davidson S. 2003. Purification strategies for microbial lipases. *Journal of Microbiological Methods*: 52: 1 — 18.
- Seino H., Uchibori T., Nishitani T., Inamasu S. 1984. Enzymatic synthesis of carbohydrate esters of fatty acid (I) esterification of sucrose, glucose, fructose and sorbitol. *Journal of the American Oil Chemists' Society*: 61: 1761 — 1765.
- Singh N., Chawla D., Singh J. 2004. Influence of acetic anhydride on physicochemical, morphological and thermal properties of corn and potato starch. *Food Chemistry*: 86: 601 — 608.
- Tsitsimpikou C., Daflos H., Kolisis F. N. 1997. Comparative studies on the sugar esters synthesis catalysed by *Candida Antarctica* and *Candida rugosa* lipases hexane. *Journal of Molecular Catalysis*: 3: 189 — 192.
- Ward O. P., Fang J., Li Z. 1997. Lipase-catalyzed synthesis of a sugar ester containing arachidonic acid. *Enzyme and Microbial Technology*: 20: 52 — 56.
- Yan H., Zhengbiao G. U. 2010. Morphology of modified starches prepared by different methods. *Food Research International*: 43: 767 — 772.
- Ye R., Pyo S. H., Hayes D. G. 2010. Lipase-catalyzed synthesis of saccharide-fatty acid esters using suspensions of saccharide crystals in solvent-free media. *Journal of the American Oil Chemists' Society*: 87: 281 — 293.