

ENZYMOVÁ PŘÍPRAVA DERIVÁTŮ MASTNÝCH KYSELIN S ANTIMIKROBIÁLNÍ AKTIVITOU A JEJICH VYUŽITÍ

LENKA POLÁKOVÁ, TEREZA KARLOVÁ, JAN
ŠMIDRKAL a VLADIMÍR FILIP

*Ústav technologie mléka a tuků, Fakulta potravinářské
a biochemické technologie, Vysoká škola chemicko-
technologická, Technická 5, 166 28 Praha 6
jan.smidrkal@vscht.cz*

Došlo 16.7.09, přijato 25.8.09.

Klíčová slova: enzymová syntéza, deriváty mastných kyselin, acylfruktosy, antimikrobiální aktivita, kosmetické emulze

Úvod

Potravinářské a kosmetické výrobky podléhají mikrobiální zkáze. Z hlediska bezpečnosti a kvality je použití konzervačních látek nevyhnutelné. Spotřebitelé však požadují, aby tyto výrobky obsahovaly co nejméně syntetických aditiv. Současným trendem je snaha co nejvíce snížit obsah syntetických aditiv a nahradit je látkami přírodními. Jedním z možných řešení je nahrazení konzervantů sloučeninami na bázi mastných kyselin a jejich derivátů. Estery mastných kyselin s polyoly patří mezi neionické tenzidy a jsou běžně používány v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu. Mají vysoké emulgační, stabilizační a detergenční účinky a zároveň projevují antimikrobiální aktivitu vůči širokému spektru mikroorganismů^{1,2}. Tyto estery se běžně vyskytují v přírodních produktech a v lidském těle se působením hydrolas rozkládají na stejné látky jako běžně konzumované potraviny¹. Možnostem jejich využití je nyní věnována velká pozornost.

Antimikrobiální vlastnosti mastných kyselin a jejich derivátů jsou již dlouho známé. Mechanismus inhibičních účinků těchto látek na mikroorganismy není dosud přesně objasněn. Studie pomocí elektronové mikroskopie ukazují, že dochází k rozrušení buněčných membrán. Povrchově aktivní látky ve vyšších koncentracích způsobují poškození cytoplazmatických membrán, které mohou vést k usmrcení buňky³. K inhibici růstu mikroorganismů dochází důsledkem změny buněčné permeability⁴. Antimikrobiální efekt je způsoben inkorporací mastných kyselin a jejich esterů do buněčných membrán, což způsobuje neuspořádanost okolních lipidů a vede ke zvýšení membránové fluidity⁵. Lipidová dvojvrstva membrán mikroorganismů je tedy primárním cílem účinku mastných kyselin a jejich derivátů^{5,6}.

Estery mastných kyselin jsou běžně připravovány chemickou syntézou. Méně náročnou alternativou, z hlediska ekologického i z hlediska použitých podmínek, je jejich enzymová příprava. Tento způsob umožňuje získat chemicky čisté produkty. Enzymová katalýza probíhá za mírných podmínek (teplota, tlak), které minimalizují konkurenční reakce probíhající při chemické syntéze esterů⁷. Kromě toho enzymová syntéza umožňuje použití méně toxických, případně netoxických rozpouštědel^{8,9}. Použití lipas umožňuje přípravu široké řady esterů mastných kyselin. Enzymovou syntézou je možné připravit chemicky čisté látky za jednoduchých podmínek přípravy a izolace.

Využití derivátů mastných kyselin je potenciálně velmi výhodné, jelikož při jejich použití jako emulgátorů lze zároveň uplatnit jejich antimikrobiální vlastnosti. Tyto látky je proto s úspěchem možné využít jako konzervanty v potravinářském i kosmetickém průmyslu.

Experimentální část

Příprava a izolace esterů mastných kyselin
s fruktosou

Fruktosa (90 mmol) a mastná kyselina – C10, C12, C14 a C16 (45 mmol) byly rozpuštěny ve 2-methyl-2-buthanolu (100 ml). Směs dále obsahovala 12,1 % (w/w reaktantů; Fru+MK) molekulových sít (3 Å). Jako katalyzátor byl použit imobilizovaný enzym, NOVOZYM 435 z *Candida antarctica* B, (10 % w/w reaktantů; Fru+MK). Reakce probíhala na vodní lázni při teplotě 60 °C za stálého míchání na magnetickém míchadle. Po 90 min byl odfiltrován imobilizovaný enzym, čím byla reakce ukončena. Rozpouštědlo bylo odpařeno na vakuové rotační odparce. Produkt byl přečištěn chromatografií na koloně (60 g silikagelu; 3,7×35 cm). Byla použita eluční směs – ethylacetát:methanol:voda (86:10:4) Celkový objem eluční směsi byl 1,2 l. Tímto způsobem byl získán čistý bílý krystalický prášek – ester dané mastné kyseliny s fruktosou.

Průběh reakce byl sledován metodou TLC (Kieselgel 60F₂₅₄, Merck) za použití eluční směsi – ethylacetát:methanol:voda (86:10:4). Jako detekční činidlo byl použit 5% roztok kyseliny sírové v methanolu. Destička byla po namočení vysušena proudem horkého vzduchu.

Z důvodu zvýšení celkového výtěžku reakcí byly použity následující modifikace postupu přípravy esterů cukrů.

Opětovné použití enzymu

Tuhý podíl po filtraci (směs imobilizovaného enzymu, molekulových sít a nerozpuštěné fruktosy) je možné opětovně použít k reakci. K filtračnímu koláči bylo opět přidáno rozpouštědlo a mastná kyselina. Reakce pokračovala za stejných podmínek (teplota, čas) a produkt byl zpracován obdobným způsobem.

Postupný přidavek mastných kyselin

Zvýšit výtěžek reakce je možné i postupným přidáním mastné kyseliny. Mastná kyselina byla přidávána do reakční směsi postupně, a to v čase 0, 15, 30, 45 a 60 min. Celkový čas reakce byl opět 90 min. Reakce probíhala za stejných podmínek (teplota, čas) a produkt byl zpracován obdobným způsobem.

Stanovení antimikrobiální aktivity acylfruktos

Ke stanovení antimikrobiální aktivity byly použity enzymově připravené acylfruktosy C10, C12, C14 a C16 o koncentracích 0,31; 0,62; 1,25; 2,5 a 5,0 mmol l⁻¹. Jako rozpouštědlo inhibičních látek byl použit ethanol, který měl výslednou koncentraci v médiu 2 %, což neovlivnilo růst mikroorganismů.

Antimikrobiální vlastnosti použitých látek byly zkoumány na čtyřech kmenech mikroorganismů: *Bacillus cereus* DMF 2001, *Escherichia coli* DMF 7503, *Saccharomyces cerevisiae* DMF 2880 a *Fusarium culmorum* DMF 0103; u bakterií a kvasinky byla absorbance inokula upravena na 0,1; u plísně byla koncentrace spor v inokulu 1·10⁵ ml⁻¹.

Ke stanovení antimikrobiální aktivity testovaných látek byla použita spektrofotometrická metoda. Inokulum, resp. suspenze spor, bylo zaočkováno do sady zkumavek obsahujících médium (Nutrient broth – bakterie, Malt extract broth – kvasinka a plíseň) s danou koncentrací testovaných látek. Z těchto zkumavek byly naplněny sterilní mikrotitrační destičky (96 jamek), ve kterých probíhala kultivace i měření absorbance. Po určitých časových intervalech byla proměřována absorbance na přístroji PowerWave XS (650 nm – bakterie, 630 nm – kvasinka a plíseň). Ke zvýšení přesnosti měření byla absorbance v každé jamce měřena 25× a výsledná absorbance byla vyjádřena jako průměr. Výsledky byly poté statisticky zpracovány. Pro vyloučení odlehlých hodnot byl použit Dixonův test s hladinou významnosti 0,05 (cit.¹⁰). Data byla vyhodnocena počítačovým programem Microsoft Excel. Výstupem byly křivky závislosti absorbance na čase (72 h – bakterie, 240 h – kvasinka a plíseň).

Příprava modelové kosmetické emulze (o/v)

Antimikrobiální aktivita kaprinoylfruktosy byla ověřena v reálném prostředí – modelové kosmetické emulzi. Byly připraveny dvě sady emulzí: I – s přidavkem kaprinoylfruktosy místo konzervační látky, II – bez přidavku konzervační látky (viz tabulka I).

Do dvou kádinek byla navážena příslušná množství složek vodné a olejové fáze. Obě kádinky byly zahřáty na teplotu 80 °C. Kádinka s vodnou fází byla umístěna pod míchadlo. Do již míchané vodné fáze (otáčky míchadla st. 8, motor typu LM III; Dioptra u. p. Turnov) byla přidána fáze olejová. Po dosažení teploty 65 °C byla směs homogenizována za použití homogenizačního míchadla (otáčky 17 000 min⁻¹; typ T 25 basic, IKA LABORTECHNIK) po dobu 1 min. Následně byla směs míchána na st. 1 (ot. 180 min⁻¹) do zchlazení na teplotu 28 °C. Poté bylo do poloviny emulze přidáno inokulum bakterie *Bacillus cereus* DMF 2001 a emulze byla naplněna do sterilních plastových zkumavek a kultivována při 30 °C.

Stanovení růstu mikroorganismů v modelové emulzi

Ke stanovení růstu *B. cereus* v modelové emulzi byla použita plotnová metoda s detekcí nárůstu kolonií na pevné půdě. Pro stanovení počtu mikroorganismů byla použita technika počítání kolonií. Po 3, 5, 7, 14 a 30 dnech kultivace byl odebrán 1 ml emulze, naředěn desítkovým ředěním a přelit agarem. Výstupem byla závislost log JTK na čase.

Stanovení počtu mikroorganismů

Počty *B. cereus* byly stanoveny na půdě Nutrient agar pH 7,2 při teplotě 30 °C, aerobně, 24 h.

Počet mikroorganismů *N* přítomných ve zkoumaném vzorku byl spočten jako vážený průměr dvou po sobě následujících ředění v 1 ml vzorku. U stanovení počtu mikroorganismů byly zařazeny do výpočtu všechny plotny s koloniemi od počtu 10 až do 300 JTK ml⁻¹.

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1 \cdot n_2) \cdot d}$$

kde $\sum C$ je součet kolonií na všech plotnách použitých pro výpočet; n_1 počet ploten použitých pro výpočet z prvního zvoleného ředění; n_2 počet ploten použitých pro výpočet

Tabulka I
Receptura emulze o/v

	Složení [%]				
	olejová fáze			vodná fáze	
	I	II		I	II
Cetiol LC	12	12	glycerin	3	3
Cetylalkohol	2	2	kaprinoylfruktosa	0,5	–
Brij 72	3	3	sterilní destilovaná voda	77,5	78
Brij 721	2	2			

z druhého zvoleného ředění; *d* ředění odpovídající pro první zvolené ředění.

Výsledky a diskuse

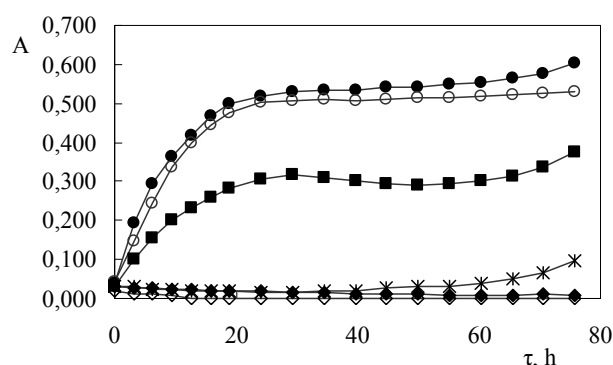
Byly připraveny estery mastných kyselin (C10, C12, C14 a C16) s fruktosou. V tab. II jsou uvedeny výtěžky jednotlivých reakcí. Pomocí TLC analýzy byly připravené estery porovnány se standardem. Podle TLC analýzy se jedná o monoestery. Jelikož obě hydroxylové skupiny (v poloze 1 i 6) jsou primární, a tedy stejně reaktivní a použitý enzym specificky esterifikuje primární hydroxylovou skupinu, jedná se o směs 1-monoacylfruktosy a 6-monoacylfruktosy. Oba estery mají podobné vlastnosti, a proto lze na testování antimikrobiálních vlastností použít jejich směs.

Vznik diesterů je podmíněn časem (čím delší čas, tím vyšší produkce diesterů) a molárním poměrem reaktantů (čím vyšší poměr kyseliny k fruktoze, tím vyšší tvorba diesterů). Aby se v případě esterifikace fruktosy kyselinou zabránilo vzniku diesterů, byl molární poměr reaktantů 2:1 (fruktosa:MK) a čas reakce byl 1,5 hodiny. Jelikož voda vznikající po dobu reakce by vedla k hydrolyze produktu a z důvodu posunu reakční rovnováhy, byla do reakční směsi k jejímu odstranění přidána molekulová síta (3 Å). Možnost zvýšení celkového výtěžku reakce byla ověřena modifikací postupu, a to opětovným použitím imobilizovaného enzymu (tuhého podílu po filtraci) a pomocí postupného přidavku mastné kyseliny. Tato metoda se příliš neosvědčila a celkové množství produktu se nezvýšilo podle očekávání.

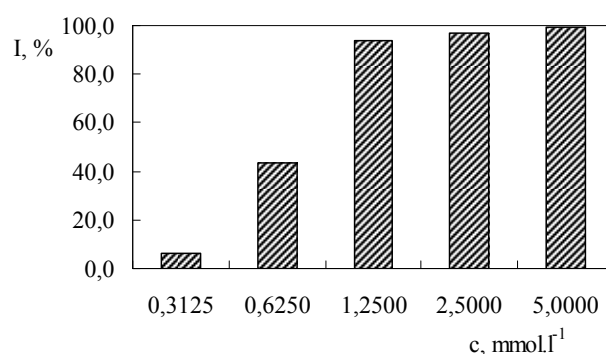
Z výsledků je zřejmé, že enzymovou syntézou je možné připravit estery fruktosy jako čisté látky za jednoduchých podmínek přípravy a izolace.

Byly změřeny růstové křivky testovaných kmenů kultivovaných v tekutém médiu v mikrotitračních destičkách s přidávkou inhibičních látek po dobu 3 dnů (72 h), resp. 10 dnů (240 h). Výsledky měření byly graficky vyjádřeny jako růstové křivky *B. cereus* a *E. coli*, resp. *S. cerevisiae* a *F. culmorum*.

Z obr. 1 je patrné, že v přítomnosti kaprinoylfruktosy dochází k prodloužení lag fáze růstu *B. cereus* a ke snížení nárůstu kultury. Při použití vyšších koncentrací byl růst kultury prakticky potlačen. Při použití nejvyšší koncentrace nebyl zaznamenán žádný nárůst kultury. Obdobné křiv-



Obr. 1. Růstové křivky *B. cereus* v přítomnosti různých koncentrací kaprinoylfruktosy; ○ 0,3, ■ 0,6, × 1,3, ◆ 2,5 a ◇ 5,0 mmol l⁻¹, ● K – kontrola bez inhibiční látky a rozpouštědla



Obr. 2. Inhibice růstu *B. cereus* v přítomnosti různých koncentrací kaprinoylfruktosy; I – procentuální inhibice nárůstu kultury

ky byly získány i pro ostatní kmeny použitých mikroorganismů.

Pro srovnání inhibičních účinků testovaných látek byly vypočteny plochy pod jednotlivými inhibičními křivkami pro jednotlivé koncentrace inhibičních látek a po srovnání s kontrolou byly vypočteny procentuální inhibice růstu kultury. Z obr. 2 je zřejmé, že nejvyšší koncentrace kaprinoylfruktosy způsobila 100% inhibici, tedy nebyl zaznamenán žádný růst *B. cereus*.

Tabulka II

Přehled vzniklých produktů jednotlivých reakcí

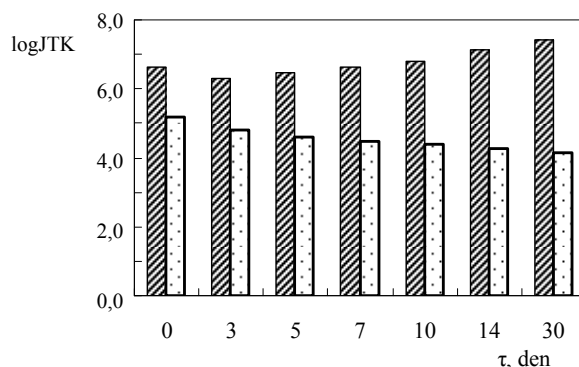
Použitá kyselina (MK)	Výtěžek reakce [%]	Celkový výtěžek reakce (opětovně použ. enzymu) [%]	Celkový výtěžek reakce (MK přidána postupně) [%]
Kyselina kaprinová	9,5	11,9	9,6
Kyselina laurová	8,5	–	–
Kyselina myristová	10,3	12,8	10,5
Kyselina palmitová	8,1	–	–

<i>Bacillus cereus</i> DMF 2001					
	c [mmol/l]				
Sloučenina	0,3	0,6	1,3	2,5	5,0
Fru C10					
Fru C12					
Fru C14					
Fru C16					
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DMF 2880					
	c [mmol/l]				
Sloučenina	0,3	0,6	1,3	2,5	5,0
Fru C10					
Fru C12					
Fru C14					
Fru C16					
<i>Escherichia coli</i> DMF 7503					
	c [mmol/l]				
Sloučenina	0,3	0,6	1,3	2,5	5,0
Fru C10					
Fru C12					
Fru C14					
Fru C16					
<i>Fusarium culmorum</i> DMF 0103					
	c [mmol/l]				
Sloučenina	0,3	0,6	1,3	2,5	5,0
Fru C10					
Fru C12					
Fru C14					
Fru C16					
Vyšší nárůst, %	Inhibice, %				
0 - 10	0 - 10	10 - 25	25 - 50	50 - 90	> 90

Obr. 3. Inhibiční působení jednotlivých koncentrací testovaných látek na použité mikroorganismy; Fru – acylfruktosa dané mastné kyseliny

Pro vzájemné porovnání působení jednotlivých koncentrací testovaných látek byly výsledky zpracovány do formy přehledných map (viz obr. 3). Je patrné, že zvýšení koncentrace vede k vyššímu inhibičnímu efektu. Některé použité látky mohou při nízkých koncentracích podporovat růst mikroorganismů. Nejvyšší antimikrobiální účinek vykazovala kaprinoylfruktosa. Palmitoylfruktosa růst některých mikroorganismů podporovala.

Byla připravena modelová kosmetická emulze typu olej ve vodě, ve které byl sledován růst *B. cereus* a ověřena inhibiční aktivita kaprinoylfruktosy. Byly změřeny růstové křivky testovaného kmene kultivovaného v emulzi s přidavkem inhibiční látky po dobu 30 dní. Výsledky měření byly graficky vyjádřeny jako růstové křivky *B. cereus*. Byly vypočteny plochy pod křivkami a po srovnání s kontrolou byla vypočtena procentuální inhibice růstu kultury. V emulzi byl inhibiční účinek kaprinoylfruktosy 37 %. Na obr. 4 jsou znázorněny počty bakterie *B. cereus*, kultivované v kosmetické emulzi s přidavkem kaprinoylfruktosy, v jednotlivých dnech.



Obr. 4. Růst *B. cereus* v přítomnosti 0,5 % kaprinoylfruktosy v modelové emulzi; ■ K – kontrola bez inhibiční látky a rozpuštědla, □ Fru C10 – kaprinoylfruktosa

Závěr

Cílem této práce byla enzymová příprava acylfruktosy, testování jejich antimikrobiálních vlastností na vybraných kmech mikroorganismů a ověření jejich aktivity v připravené kosmetické emulzi. Bylo zjištěno, že enzymovou syntézou lze připravit estery fruktosy s antimikrobiálními vlastnostmi, které je možno použít i v reálném prostředí.

Seznam symbolů

JTK	jednotky tvořící kolonie
MK	mastná kyselina
C10	kyselina kaprinová
C12	kyselina laurová
C14	kyselina myristová
C16	kyselina palmitová
o/v	olej ve vodě

LITERATURA

- Bergsson G., Arnfinnsson J., Steingrímsson Ó., Thormar H.: Agents Chemother. 45, 3209 (2001).
- Šabeder S., Habulin M., Knez Ž.: J. Food Eng. 77, 880 (2006).
- Šilhánková L.: Mikrobiologie pro potravináře a biotechnologii. Victoria Publishing, Praha 1995.
- Kabara J. J., v knize: Antimicrobials in Food (Brannen A. R., Davidson P. M., ed.), Marcel Dekker, New York 1993.
- Gray S. N., Robinson P., Wilding N., Markham P.: FEMS Microbiol. Lett. 68, 131 (1990).
- Avis T. J., Bélanger R. R.: Appl. Environ. Microbiol. 67, 956 (2001).
- Yamamoto T., Morishita S., Kinami K., Nakamura S., Hotta H.: UK Patent Application GB, 2.081.266A (1982).
- Fregapane G., Sarney D. B., Greenberg S. G., Knight

- D. J., Vulfson E. N.: J. Am. Oil Chem. Soc. 71, 87 (1994).
9. Tarahomjoo S., Alemzadeh I.: Enzym. Mikrob. Technik. 33, 33 (2003).
10. Jaroš J., Pavlík J., Turzík D.: *Pravděpodobnost a statistika*. Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, Praha 1998.

T. Karlová, L. Poláková, J. Šmidrkal, and V. Filip
(Department of Dairy and Fat Technology, Faculty of Food and Biochemical Technology, Institute of Chemical Technology, Prague.): **Enzymatic Synthesis of Fatty Acid Derivatives with Antimicrobial Activity and Their Use**

A possibility of decreasing the amount of synthetic preservatives in cosmetic products and foodstuffs is their replacement with fatty acids and their derivatives, which

have shown a broad spectrum of antimicrobial activity. The fatty acid derivatives are biodegradable, odourless and tasteless. These surface-active compounds kill microorganisms by disrupting cell membranes. The aim of the project was to prepare fatty acid esters of fructose using enzymatic catalysis and to investigate their antimicrobial properties and activity in cosmetic products. *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Fusarium culmorum* strains as well as fructose caprate, laurate, myristate and palmitate esters were used in testing. The obtained results indicate that the tested compounds strongly reduce the number of viable microorganisms or show a microbiocidal effect. The inhibitory activity decreased rapidly as their carbon chain length increased; fructose caprate proved to be the most active. The antibacterial effect of fructose caprate was investigated in a cosmetic oil in water emulsion. The obtained results also indicate that enzymatic synthesis is a potential alternative method for preparing fatty acid esters of sugars.