تحضير إسترات الحموض الدسمة للسكريات إنزيمياً

محمود مصري و محمد ماجد الصباغ و أحمد مالو

قسم الكيمياء – كلية العلوم – جامعة دمشق – سورية

تاريخ الإيداع 2010/07/29

قبل للنشر في 2010/11/29

الملخّص

تعد إسترات الحموض الدسمة للسكريات من المواد ذات الفعالية السطحية اللاشاردية، وتستخدم في العديد من مستحضرات التجميل، كما تدخل كمستحلبات في التطبيقات الغذائية. حاز الاصطناع الإنزيمي لإسترات الحموض الدسمة للسكريات في السنوات الأخيرة، على اهتمام واسع كطريقة مستقبلية لتصنيع هذه المركبات. درست بعض العوامل المؤثرة في تفاعل الأسترة المتقطع المحفز بالليباز في وسط من المذيبات العضوية ووجد أن الشروط المثلى لإجراء هذا التفاعل باستخدام الليباز من كانديدا –انراكتيكا من النوع B بنسبة 10% من وزن الركيزة في درجة الحرارة $60C^o$. وعند اختبار المذيب المثالي حقق الأسيتون المردود الأعلى (93%). كما درست النسب ما بين 1:3 إلى 7:1 باستخدام العديد من السكريات بهدف تحديد النسبة المثلى حمض : سكر حيث حققت النسبة 1:5 المردود الأعلى عند استخدام الفركتوز.

الكلمات المفتاحية: إسترات الحموض الدسمة للسكريات، الإنزيم، الليباز، الأسترة الإنزيمية، المستحلبات الغذائية

Enzymatic Preparetion of Sugar Fatty Acid Ester

M. Masri; M. M. Sabbagh and A. Malao
Department of Chemistry, Faculty of science, Damascus university, Syria

Received 29/07/2010
Accepted 29/11/2010

ABSTRACT

Sugar fatty acid esters are nonionic surfactants, which are used for personal care products, cosmetic applications, and as emulsifiers for food. In recent years, enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters is attracting keen attention as a new manufacturing method for future application. Some Reaction parameters of lipase-catalyzed synthesis of SFAE in organic solvent were optimized in a batch reactor. Optimum conditions for reaction performed were 10% (w/w of substrates) of lipase from Candida antarctica B, at 60°C. Among the solvents tested in this study, the highest yield (93%) was obtained when Aceton was used as a solvent,. The optimal sugar-to-fatty acid ratio was tested in the range from 3:1 to 1:7 and verious sugars were used. A high conversion was obtained when the ratio of Sugar: Fatty acid (1:5) and Froctuse were used as substrat, respectively.

Key words: Sugar Fatty Acid Ester, Enzyme, Lipas, Enzymatic esterification, Food surfactants.

المقدمة

تدخل إسترات الحموض الدسمة للـسكريات SFAE(Sugar Fatty Acid Esters) وخصوصاً الإسترات الأحادية منها في العديد من التطبيقات، فهي تؤدي دور مواد مساعدة على الاستحلاب في الصناعات الغذائية (المايونيز، المثلجـات، الحـساء) والـصناعات الدوائية ومستحضرات التجميل (الشامبو وكريمات الترطيب وأحمر الشفاه) والمنظفـات، وتعرف تجارياً تحت الرمز الصناعي E 473 (Abeder, *et al.*, 2005). تمتازSFAE بفعاليتها السطحية في مختلـف قـيم HLB (Hydrophilic Lipophilic Balance)، فضلاً عن فعاليتها كمضاد البكتريا (Adamopoulos، 2006). في حين تستخدم SFAE ذات درجات الاستبدال العالية كبدائل للدسم. تعزى فعالية SFAE إلى بناها الكيميائية، إذْ يمكن التحكم بالاستخدام التطبيقي لهذه المركبات بتغيير نوع كلٍ مـن الـسكر والحمـض الدسم المستخدم، فضلاً عن التغيير في درجة الاستبدال ونوع زمر الهيدروكسيل المتفاعلة (Afach، 2007).

تمتاز SFAE بكونها مركبات عديمة الطعم و الرائحة ولا تسبب الحساسية وغير قابلة للاشتعال، فضلاً عن قابليتها للتحلل الحيوي، واعتمادها على مواد أولية متجـددة طبيعيـاً (Natural Renewable) وغير سامة منخفضة التكاليف (Yan, *et al.*, 2001).

يمكن تحضير SFAE عن طريق الأسترة المباشرة أو الأسـترة التبادليـة باسـتخدام الحفازات الكيميائية (الحمضية أو القلوية)، إلا أن استخدام هذه الحفازات يؤدي إلى تشكل العديد من النواتج الثانوية غير المرغوب فيها مع ضياع طاقي يزيد من تكاليف الإنتـاج الصناعي. وهذا ما دعا إلى البحث عن طرائق جديدة لتحضير SFAE بشروط تـشغيلية معتدلة من (حرارة، ضغط...) وذات انتقائية أعلـى (In Sang Yoo، 2007) للمنـتج المطلوب. تمكن العالم Klibanov عام 1989 من اسـتعمال الليبـاز لتحـضير SFAE وعدتْ تجاربه خطوة كبيرة في طريق تحديث التقانات المستخدمة لتصنيع هذه المركبـات بالاعتماد على الانتقائية العالية للإنزيمات في الحصول علـى منتجـات محـددة بدقـة والتخلص من تشكل النواتج الثانوية غير المرغوب فيها عند استخدام الحفازات الكيميائية.

ساعدت قدرة الإنزيم على العمل في شروط معتدلة مـن درجـات حـرارة وضـغط وغيرها في إنهاء مشكلة الاستهلاك العالي للطاقة مقارنةً بطرائق التـصنيع الكلاسـيكية، فضلاً عن السمية المنخفضة للحفازات البروتينية (Afach، 2004)، محققةً بذلك معظـم البنود الاثني عشر للكيمياء البيئية (ملحق I) Green Chemistry المقـررة فـي عـام 1998؛ مما دفع بالعديد من الباحثين لتبني هذه الطريقة في الاصـطناع (Yan, *et al.*, 2001).

يصنف الليباز مع إنزيمات الحلمهـة EC3 (Enzyme Classes)، بـسبب المهمـة

الأساسية التي يقوم بها في الأوساط الطبيعية ضمن الكائن الحي (in vivo) تفكيك الغليسريدات الثلاثية إلى حموض دسمة حرة وغليسيرول بتفاعل متسلسل. إلا أنه عند وجود اللبياز خارج الكائن الحي (in vitro) وبتعديل الشروط السائدة في عمل الإنزيم يمكن استخدامه في تنشيط التفاعل المعاكس لاصطناع العديد من الإسترات والأميدات المختلفة (Gandhi, *et al.*, 2000). كما يتميز اللبياز عن غيره من الإنزيمات بسهولة استخلاصه وعزله، فلم تعد عصارة بنكرياس بعض الحيوانات (الكلاب والخنازير) المصدر الوحيد له، بل تعد الجراثيم حالياً المصدر الأغنى والأوفر لهذه الطائفة من الإنزيمات.

نظراً إلى أهمية تحضير SFAE وفق الطرائق الإنزيمية والتحديات التي تعيقها متمثلة، في حساسيتها تجاه شروط التفاعل (الحرارة، تركيز المتفاعلات وغيرها)، كذلك احتواء مزيج التفاعل على العديد من الأطوار الصلبة والسائلة وتأثيرها في سير التفاعل من خلال عمل الإنزيم وسرعة تثبيطه وكمية الإستر المتشكلة، هدف البحث إلى دراسة تأثير بعض هذه العوامل مثل كمية الإنزيم ونسب المتفاعلات وتأثير درجة الحرارة ونوع المذيب.

مواد البحث و طرائقه

مواد البحث

اسم المادة	الشركة المصنعة	بلد التصنيع
الحموض الدسمة المستخدمة		
Palmitic Acid	BDH	England
السكاكر المستخدمة		
L(+) Arabinose LR	S.D Fine –chem	India
Sucrose	BDH	England
D(+) Xylose	BDH	England
D(-) Fructose	Merck	Germany
D(-) Mannitol	Riedel De Haen AG	Germany
D(+)Glucose	Merck	Germany
الإنزيمات المستخدمة		
Novozyme 435[1]	Novozyme	Denmark
المواد الماصة للماء:		
Molecular Sieve 0.3 nm	Merck	Germany
كيماويات أخرى		
2-Met But-2	Merck	Germany
NaOH	BDH	England
Ethanol	Hopin &Williams	England

[1]- الشكر لشركة Novozyme وشركة Syriachem على تقديم كميات الأنزيم المستخدمة في هذا البحث مجاناً (هذا الإنزيم هو ليباز مستخلص من Aspergillus niger مثبت على أكريليك رزين فعاليته 10000PLU/g).

اصطناع إسترات الحموض الدسمة مع السكريات بالأسترة المباشرة

استخدم في الاصطناع طريقة (Abeder, *et al.*, 2005) بعد تعديلها بإنجاز التفاعل ضمن أنابيب (Ependorf) سعة (1500µl) مع إضافة كميات متكافئة (0.125mmol) من الحمض الدسم والسكر [المجفف عند الدرجة (40°C) مدة 24 ساعة، أضيف (700µL) من مذيب 2-ميتل البوتانول-2 [المجفف بإضافة حبيبات MS (3Å) المنشطة] كوسط في التفاعل. حضن مزيج التفاعل مدة 24 ساعة في الحاضنة الهزازة (GFL 3031) بعد ضبط درجة التفاعل (60°C) وسرعة التحريك (250rpm). حسب زمن التفاعل من بدء زمن إضافة الإنزيم إلى وسط التفاعل.

تحديد مردود التفاعل

حسبت كمية الإستر المتشكل ومردود التفاعل بإجراء معايرة حجمية لكمية الحمض المتبقية في الوسط بعد انتهاء التفاعل. حيث ثُفل مزيج التفاعل بواسطة المثفلة (BOECO U-32R) في درجة الحرارة (-10°C) لفصل حبيبات الإنزيم والسكر غير المتفاعل أضيف إلى (350µl) من الرشاحة (10ml) من محلول الفينول فتالئين في الغول الإيتيلي (0.1g/100 ml)، يؤدي هذا المحلول دور مشعر ومذيب للعينة بآنٍ واحدٍ، وعوير المزيج بمحلول NaOH (0.01N) (Abeder, *et al.*, 2005; Foresti, *et al.*, 2008).

وحسب مردود التفاعل وفق العلاقة الآتية:

$$X\ \% = \frac{(M_{FA}^{0} - M_{FA}^{t}) \times 100}{M_{Ls}^{0}}$$

ولما كان:

M_{FA}^{0} عدد مولات الحمض الابتدائية　　M_{Ls}^{0} عدد مولات الابتدائية للركيزة الأقل تركيزاً

M_{FA}^{t} عدد مولات الحمض عند الزمن t　　X% مردود التفاعل كنسبة مئوية

ضبط العملية

ضبطت عملية تحضير العينات والمعايرة بتحضير 40 عينة بأربعة تراكيز مختلفة؛ عشر عينات من كل تركيز. أجريت دراسة إحصائية وعينت كفاءة العملية والانحراف المعياري فكان مجال خطأ التجربة ضمن (±1%)، وكان الانحراف المعياري لكل تركيز من مرتبة 10^{-4}، أما خطية السلسلة المرسومة فهي ($R^2 = 0.95$).

النتائج والمناقشة

تأثير تركيز الإنزيم

درس تأثير تركيز الإنزيم في مردود تفاعل الأسترة باستخدام تراكيز مختلفة من الإنزيم تتراوح من 0% إلى 35% نسبة إلى وزن كامل الركيزة المستخدمة. استخدم لهذا

الغرض كل من سكر المانيتول وحمض البالمتيك بنسب مولية متكافئة بوسط تفاعلي يحوي (1500µl) من2-ميتيل البوتانول-2 (الجدول 1).

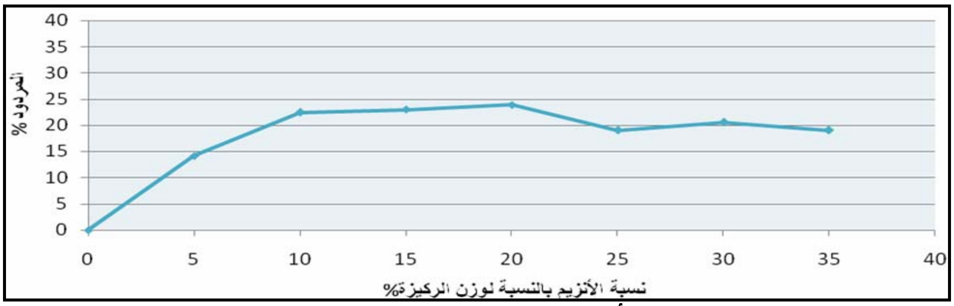
الجدول (1) تغير مردود تفاعل الأسترة (بثبات كلٍ من كمية الركيزة و المذيب) بتغير كمية الإنزيم. (تحسب نسبة الإنزيم كنسبة مئوية وزنية من كامل وزن الركيزة).

تركيز الإستر mmol/g × 10^{-2}	المردود (%)	كمية الإنزيم (g)	نسبة الإنزيم (%)	التجربة
0.000	0	0.000	0	1
32.273	14.2	0.003	5	2
50.909	22.4	0.006	10	3
52.273	0.32	0.008	15	4
54.318	23.9	0.011	20	5
43.182	19	0.014	25	6
46.591	20.5	0.017	30	7
43.182	19	0.019	35	8

يلاحظ من الجدول ازدياد مردود التفاعل ابتداء من التركيز 5% إلى 20% ليصل إلى% 23.9. يتبعه تناقص محققاً نسبة تحول 19% عند تركيز الإنزيم % 35.

يفُسر ازدياد مردود التفاعل بازدياد تركيز الإنزيم من (0% إلى 20%) وفق آلية البينغ- بونغ (Gandhi, *et al.*, 2000). فيبدأ التفاعل بارتباط زمرة الأسيل المانحة للبروتون مع الإنزيم مشكلةً المعقد إنزيم – أسيل. أما في التركيز الأعلى من 20% فإن الإنزيم الفائض والحر يقوم بتنشيط تفاعل الحلمهة العكسي، ويزيد تراكم الماء الناتج عن التفاعل من سرعته (Tarahomjoo, *et al.*, 2003; Abeder, *et al.*, 2005).

ومن الجدير بالذكر أن استخدام كميات كبيرة من الإنزيم يسبب مشكلة ميكانيكية لعدم امتزاج المتفاعلات في وسط الحضن، مما يؤثر سلباً في سير التفاعل (Abeder, *et al.*, 2005).



الشكل (1) تغير مردود تفاعل الأسترة (بثبات كلٍ من كمية الركيزة و المذيب) بتغير كمية الإنزيم. (تحسب نسبة الإنزيم كنسبة مئوية وزنية من كامل وزن الركيزة).

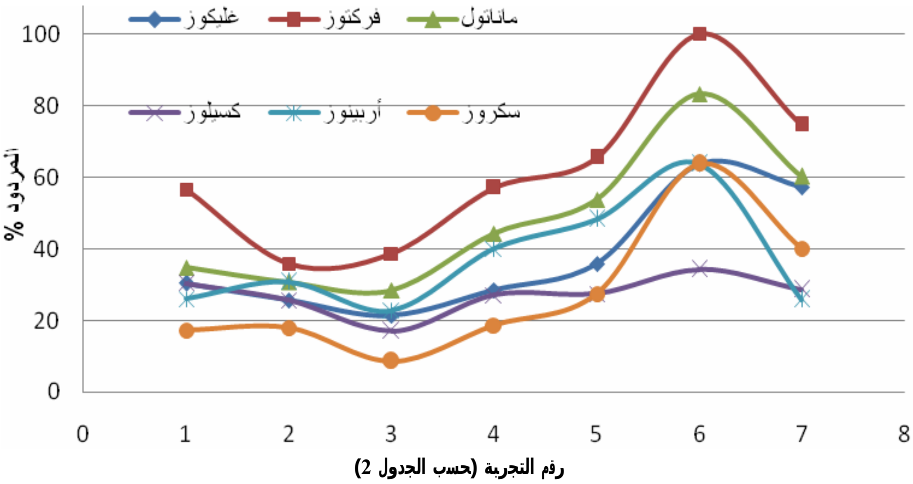
لما كان فرق المردود بين النسبتين 10% و20% فرقاً ظاهرياً غير معنوي -بناء على الدراسة الإحصائية بالاعتماد على برنامج SPSS الإحصائي- يمكن الاستنتاج أن النسبة 10% من وزن الركيزة هي النسبة المثلى للإنزيم، واعتُمدت النسبة 10% في باقي التجارب. تتوافق هذه النسبة المستخدمة من الإنزيم مع العديد من الدراسات والبحوث المنشورة سواء التي استخدمت الإنزيم نفسه، كتحضير غلوكوز سترات في ميتيل إيتيل كيتون MEK (Methyl Ethyl Kenton) (Yan, *et al.*, 2001) وتحضير فركتوز بالميتات في 2-ميتيل البوتانول-2 (Abeder, *et al.*, 2005) أو غلوكوز بالميتات بالأسيتون (Arcos, *et al.*, 2001)، وتحضير غلوكوز سترات في MEK (Yan, *et al.*, 2001)، أو الدراسات التي استخدمت إنزيماً آخر مثل ليباز البالتاز M في تحضير غلوكوز سترات باستخدام نظامي الهكسان (Tarahomjoo, *et al.*, 2003). مما يؤكد أن العامل المحدد لكمية الإنزيم المثلى لا يتعلق بنوع الركيزة أو المذيب أو الإنزيم وإنما يتعلق بالنسبة ما بين الأسيل المانح للبروتون والإنزيم.

تأثير نسب المتبادلات (حمض – سكر) في مردود التفاعل الإنزيمي

تؤثر النسبة (حمض – سكر) في مردود التفاعل الإنزيمي، فيؤدي تغير هذه النسبة إلى تغير كبير في مرود التفاعل. ولإيجاد النسبة المثلى أجريت أسترة لسكريات مختلفة مع حمض النخل وفق النسب الموضحة في الجدول (2) ثم حسب المردود في كل حالة.

الجدول (2) تأثير نسبة المتفاعلات في مردود التفاعل (كمية الإنزيم: 5.5 mg، حجم المذيب (2-ميتيل البوتانول-2): 700µ l، درجة الحرارة: 58°C، زمن التفاعل: 24 ساعة، نوع السكر:الغلوكوز-الفركتوز-المانيتول-الأربينوز-الكسيلوز- السكروز).

التجربة	حمض:سكر mol:mol	المردود (%)					
		سكر الغلوكوز	سكر الفركتوز	سكر المانيتول	سكر الأربينوز	سكر الكسيلوز	سكر السكروز
1	(3:1)	30.3	56.6	34.8	26.1	30.6	17.3
2	(2:1)	25.6	35.9	30.7	30.8	25.7	18.0
3	(1:1)	21.4	38.6	28.4	22.9	17.0	8.7
4	(1:2)	28.6	57.1	44.3	40.0	27.1	18.6
5	(1:3)	35.9	65.6	53.8	48.3	27.4	27.6
6	(1:5)	63.8	100.0	83.3	63.8	34.2	63.8
7	(1:7)	57.3	74.6	60.2	25.8	28.6	40.0



الشكل (2) تغير المردود تبعاً لتغير نسب المتفاعلات حمض- سكر باختلاف نوع السكريات المستخدمة.

عند استخدام كمية مولية ثابتة من السكر مع عدد مولات متزايدة من الحمض الدسم (في التجارب من 3 إلى 7)، لوحظ ازدياد مردود التفاعل طرداً حتى الوصول إلى النسبة حمض: سكر (1:5) باختلاف نوع السكر المستخدم. ثم ينخفض المردود عند النسبة حمض: سكر(1:7) (الجدول 2). يفسر انخفاض مردود التفاعل بوصول تركيز الحمض إلى حد الإشباع في المذيب بعد النسبة (1:5)، كما تبين في تجربة استطلاعية أجريت على سكر الفركتوز تصلب المزيج تلقائياً في درجة حرارة الغرفة وعدم عودته إلى الحالة السائلة إلا بعد التسخين إلى درجة حرارة التفاعل. يعزى هذا الانخفاض إلى اكتساب المذيب خواص هيدروفوبية في هذه الشروط.

لوحظ أيضاً في التجارب من 1 إلى 3 أن مردود التفاعل يزداد بازدياد نسبة السكر إلى الحمض الدسم حتى يصل إلى النسبة (1:3). يلاحظ هنا اختلاف ظاهري مع آلية البينغ بونغ المقترحة للتفاعل التي تتحدث عن الأثر السلبي لتركيز الزمرة الهيدروكسيلية في المردود (Gandhi, *et al.*, 2000)، إذْ أدى ازدياد كمية السكر إلى ازدياد مردود التفاعل الإنزيمي، يفسر هذا الارتفاع بالانحلالية المنخفضة للسكر التي تجعل المذيب العضوي يصل إلى درجة الإشباع مباشرةً فتبقى الكمية الكبرى من السكر في حالتها الصلبة ولا تنحل إلا تباعاً لتعويض كمية السكر المتحولة إلى استر. ومن ثم فإن ازدياد تركيز السكر في أثناء التفاعل لم يؤثر في فعالية الإنزيم، و ينحصر تأثيره في إزاحة التوازن نحو تشكيل المزيد من الإستر.

أما النسبة حمض :سكر أعلى من (3:1) فلم تختبر نظراً إلى المردود المنخفض الذي

تم الحصول عليه اختبار النسبة (4:1) على الفركتوز، إذْ حالت كمية السكر الكبيـرة دون امتزاج المتفاعلات.

وبمقارنة جميع النتائج المبينة أعلاه والمتعلقة بتركيز المواد المتفاعلة، يمكن القول: إن المردود الأعظمي يتفق مع النسبة حمض: سكر (1:5)، وهو ما يتوافـق مـع الدراسـة (Yan, *et al.*, 2001) التي أجريت على أسترة الغلوكوز مـع حمـض الـشمع ومـع المعطيات المتعلقة بأسترة الفركتوز مع حمض النخل (Sakaki, *et al.*, 2006)، وكذلك تفاعل الفركتوز مع العديد مـن الحمـوض الدسـمة المـشبعة مـن $C_{8:0}$ إلـى $C_{18:0}$ (Soultani, *et al.*, 2001).

أما من الناحية التطبيقية فتعد النسبة حمض: سكر (3:1) هي النسبة المثلى، وذلك لأن زيادة نسبة الحمض الدسم في وسط التفاعل تؤدي إلى تزايد درجة الاستبدال نحو تـشكيل الإسترات الثنائية والثلاثية (Sakaki, *et al.*, 2006) والذي يؤثر سـلباً فـي الخـواص التطبيقية للمنتج النهائي حيث تعد الإسترات الأحادية هـي الفُـضلى كمـستحلبات مـن الإسترات ذات درجات الاستبدال الأعلى.

يعزى تغير المردود تبعاً لتغير نوع السكر إلى ثلاثة عوامل أساسية؛ أما العامـل الأول: فهو اختلاف انحلالية كلٍ من السكر المستخدم والإستر الموافق في المذيب المستخدم. ورغم اعتماد العديد من المراجع (K.Sakaki, *et al.*,2006;Y.Yan; 1999;D.Schmid, 2001) على هذا العامل في تفسير تابعية المردود لنوع السكر، إلا أن هذا العامل لـيس الوحيـد، ففي دراسة أجريت على يد Sang Yoo وزملائه 2007 وجد أن مردود تفاعـل سـكر السوربيتول مع حمض الزيت أعلى من مردود تفاعل الفركتـوز مـع الحمـض نفـسه وبوساطة من ليباز CAL B علماً أن انحلالية الفركتوز أعلى بحوالي أربعة أضعاف من انحلالية السوربيتول في الأسيتون، وهو المذيب المستخدم في التجربة.

أما العامل الثاني فهو يتعلق بالبنية الكيميائية للسكر وعدد زمر الهيدروكسيل الأوليـة الموجودة وذلك نظراً إلى قدرتها العالية نسبياً -مقارنة بزمر الهيدروكسيل الثانوية- على الخضوع لتفاعل الأسترة، فبالرجوع إلى البنية الكيميائية لكل من السكريات المدروسة في التجربة الأولى نلاحظ ما يأتي: يحوي كل مـن الفركتـوز والمـانيتول علـى زمرتـي هيدروكسيل أوليتين في حين يحوي كل من الغلوكوز والأربينوز على زمرة هيدروكـسيل أولية واحدة. في حين لا يحوي الكسيلوز على أي زمرة هيدروكسيل أوليـة، وبـسهولة يمكن ملاحظة التناسب الطردي ما بين عدد زمر الهيدروكسيل الأولية ومردود التفاعـل. إلا أن هذا العامل ليس هو الفصل بل هناك تأثير كبير للعامل الثالث.

بعكس كلٍ من العاملين الأول والثاني، يتعلق العامل الثالث بنوع الإنزيم وبنيته الفراغية، وخصوصاً البنية الفراغية الخاصة بالمركز الفعال والتي تحدد ميل الإنزيم تجاه ركيزة مـا دون الأخرى، ويمكن من ثم تفسير المردود المنخفض لتفاعل السكروز مع حمض النخيـل

مقارنة بالكسيلوز رغم احتواء الأول على زمرة هيدروكسيل أولية في حين لا يحوي بنيـة الكسيلوز أي زمرة هيدروكسيل أولية. أي يمكن القول: إن عامل الإعاقة الفراغيـة الناتجـة عن حجم الكبير للسكروز الذي قد يؤثر في دخوله في المركز الفعال للإنزيم.

تأثير نوع المذيب في مردود تفاعل الأسترة

رغم أن وضع التوازن لا يتأثر بنوع الليباز المستخدم في تفاعل الأسترة إلا أن الأمر يختلف بالنسبة إلى المذيبات العضوية في وسط التفاعل. حيث تؤثر قطبية المـذيب فـي وضع التوازن في آلية تفاعل الأسترة المنشطة بالليباز كما بين(Gandhi, *et al.*, 2000)، حيث وجد أن فعالية إنزيمات الليباز عند تحفيز تفاعل الأسـترة عمومـاً فـي المـذيبات اللاقطبية أعلى من فعاليتها في المـذيبات القطبيـة، أكـد(Habulin, *et al.*, 2008) أن فعالية الإنزيم ترتبط بقيمة Log P، و تعرف بأنّها اللوغاريتم العـشري لثابـت تـوزع partition coefficient (P) أي مادة بين طورين عضوي و مائي (أي نـسبة تركيـز المادة في الطور العضوي إلى نسبة تركيزها المادة في الطور المائي)، فوجد أن فعاليـة الليباز التحفيزية تكون أفضل ما يمكن عند قيم (Log P = 2- 4).

$$\mathbf{Log\ P = Log\ \frac{[\text{عضوي}]}{[\text{مائي}]}}$$

أما في حالة السكريات ذات الانحلالية المنخفضة في أغلب المذيبات العـضوية فـلا تكون قيمة Log P هي الحكم في اختيار المذيب المثالي، بل يجب أن يتمتع المذيب المثـالي في تحضير SFAE بـثلاث صـفات (Yan, *et al.*, 1999; Abeder, *et al.*, 2006): أولاً: أن يكون قادراً على إذابة كمية أكبر من الركيزة. ثانياً: أن تكون انحلالية منتجـات التفاعل منخفضة. ثالثاً: أن تكون ثباتية الإنزيم عالية في ذاك المذيب.

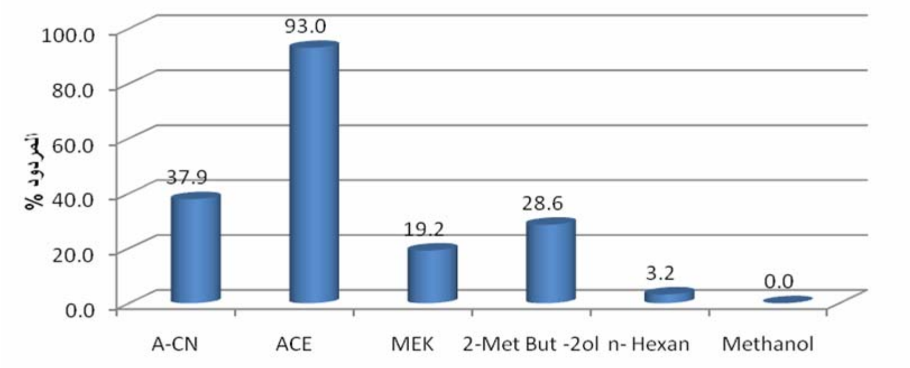
أشار (Gandhi, *et al.*, 2000) إلى أن المذيبات المستخدمة في تفاعـل الأسـترة تؤثر أيضاً في انتقائية الإنزيم تجاه الركازات. وبهدف دراسة هذه الخاصة على الركازات المستخدمة، حضن سكر المانيتول مع حمض الزيت باستخدام العديد من المـذيبات عنـد الدرجة (40°C) (الجدول 3).

الجدول (3) تغير المردود التفاعل الإنزيمي تبعاً لنوع المذيب المستخدم.

التجربة	نوع المذيب	Log P	المردود (%)	تركيز الإستر $mmol/g \times 10^{-2}$
1	نظامي الهكسان (n-Hexan)	3.868	3.2	7.27273
2	2-ميتيل البوتانول-2 (2-Met But-2)	1.4	28.6	3.38863
3	ميتيل إيتيل كيتون (MEK)	0.27	19.2	3.17881
4	أسيتون (ACE)	-0.208	93.0	17.7481
5	أسيتونتريل (A-CN)	-0.394	37.9	5.54094
6	ميتانول (Methanol)	-0.764	0.0	0.000

حقق الأسيتون المردود الأعلى والموافق لـ (93%) بـين بـاقي المـذيبات الـستة المستخدمة في حين كان المردود الأقل (3.2%) من نصيب نظامي الهكسان، أما في حالة الميتانول فعلى الرغم من قدرته العالية نسبياً على إذابة السكريات فلم يظهر للإنـزيم أي فعالية في تحفيز التفاعل (الشكل3). و يمكن القول: إن ترتيب المذيبات المختبرة حـسب مردود التفاعل كانت كما يأتي:

أسيتـون>الأسيتونتـريل>2-ميتيل البوتانول-2>ميتيل إيثيل كيتون>نظامي الهكسان >الميتانول



الشكل (3) تغير مردود التفاعل تبعاً لنوع المذيب المستخدم.

ويمكن القول: إن ارتفاع المردود عند استخدام كـلٍ مـن الأسـيتون والأسـيتونتريل و2-ميتيل البوتانول-2 يعود إلى تحقق الصفتين الأولى و الثانية من متطلبات المـذيبات المذكورة أعلاه مقارنة بالمذيبات الأخرى (Cao, *et al.*, 1999). إلا أن الأسيتونتريل لا يتناسب مع التطبيقات الغذائية لسميته العالية، في حين من الممكـن اسـتخدام كـلٍ مـن الأسيتون و2-ميتيل البوتـانول-2 وMEK (Cao, *et al.*, 1999). ورغـم المـردود العالي الذي حققه الأسيتون مقارنة بباقي المذيبات لم يستخدم في التجارب اللاحقة لتبخره السريع، فضلاً عن تثبيط الإنزيم عند استعادته من وسط يحوي الأستون مما يمنع إعـادة استخدامه من جديد (Flores, *et al.*, 2002; Abeder, *et al.*, 2006). ومن ثـم عـد 2-ميتيل البوتانول-2 المذيب الأفضل لتحقيقه الشروط الثلاثة معاً. كذلك فقد أكدت بعض الدراسات المرجعية أنه الوسط الأفضل لثباتية الإنزيم (Flores, *et al.*, 2002).

أما بالنسبة إلى المتانول فإنه يعمل على إزالة طبقة الماء الأحادية المحيطـة بـالإنزيم مما يؤدي إلى فقدانه الفعالية.

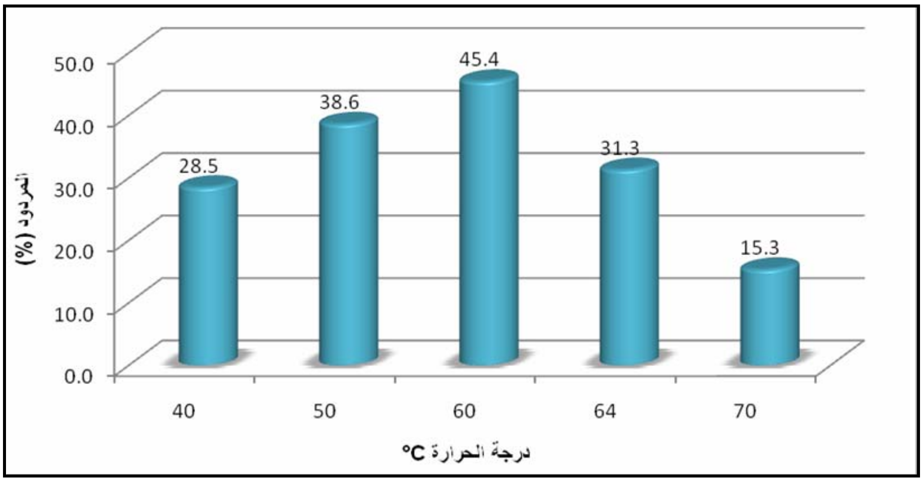
تتوافق هذه النتائج مع العديد من الدراسات المرجعية فـي تحـضير SFAE. فعنـد تحضير غلوكوز بالميتات باستخدام إنزيم CAL-B باستخدام العديد من المذيبات أعطـى الأسيتون المردود الأعلى بينمـا كـان 2-ميتيـل البوتـانول-2 فـي المرتبـة الثانيـة

(Yan, *et al.*, 1999)، كذلك كان للأسيتون في دراسة أخرى على الإستر نفسه المردود الأعلى (Cao, *et al.*, 1997) في حين حقق MEK المردود الأعلى ليحتـل الأسـيتون المرتبة الثانية عند تحضير بالميتات الفركتوز (Abeder, *et al.*, 2006)، وكذلك عنـد تحضير غلوكوز بالميتات (Yan, *et al.*, 1999).

تأثير درجة الحرارة

أشارت الدراسات المرجعية إلى تأثير درجة حرارة الوسط فـي الفعاليـة الإنزيميـة والمتعلقة مباشرة بالتركيب البنيوي للإنزيم و عدد الجسور الكبريتية فيـه وغيرهـا مـن العوامل المؤثرة في ثبات البنية الثالثية لهذا الإنزيم، فيأخذ المنحنى الذي يمثل العلاقة بين المردود ودرجة الحرارة شكلاً جرسياً تزداد فيه سرعة تفاعلات الأسترة الإنزيمية بارتفاع درجة الحرارة حتى تصل إلى نهاية عظمى تبدأ بعـدها بالانخفـاض، حيـث يتعـرض البروتين الإنزيمي في الدرجات العالية من الحرارة إلى التمسخ (Denaturation) فاقـداً بذلك بنيته الفراغية ومن ثم قدرته على تحفيز التفاعل.

ونظراً إلى تباين الدراسات في تحديد درجة الحرارة المثلـى؛ عـد بعـضهم درجـة الحرارة (60°C) هي درجة الحرارة المثلى (Abeder, *et al.*, 2005)، في حـين عـد آخرون أن (50°C) كافية للحصول على المردود الأعلى (Yan, *et al.*, 2001). درس تأثير درجة الحرارة في مردود التفاعل ضمن مجال التباين المذكور فكانت النتائج كما هو مبين (الشكل 4)، حيث استخدم سكر المانيتول مع حمض النخل بنـسب موليـة متكافئـة (1:1) ونسبة الإنزيم (10%).



الشكل (4) تغير المردود تبعاً لتغير درجة الحرارة.

يلاحظ ارتفاع مردود التفاعل بازدياد درجة الحرارة حتى (60°C)، لينخفض المردود بعد هذه الدرجة، وبالنتيجة حققت درجة الحرارة (60°C) المـردود الأعلـى مـن بـين درجات الحرارة الأخرى المدروسة. يعزى التناسب الطردي لمردود التفاعل مع درجـة الحرارة قبل النهاية العظمى إلى ارتفاع طاقة التفاعل إلى حد طاقة التنشيط ومن ثم ازدياد فعالية الإنزيم، في حين يعزى انخفاض المردود بعد النهايـة العظمـى إلـى التخريـب الحراري الحاصل للإنزيم (Abeder, *et al.*, 2005).

الخاتمة و الخلاصة

أجريت تفاعلات تحضير SFAE في المذيبات العـضوية تحـت الـضغط الجـوي باستخدام إنزيم الليباز كحفاز حيوي، كان أداء الإنزيم الأمثل عند النسبة (10%) نسبةً إلى كامل وزن الركازة، في حين أثرت إضافة كميات أكبر منه سلباً فـي مـردود التفاعـل. حققت النسبة (حمض: سكر) (1:5) المردود الأعلى إلا أن ترافق هذه النسبة مع ظهـور إسترات ثنائية وثلاثية، أدى إلى اعتماد النسبة(1:3) كنسبة تطبيقية مثلى. شكل الفركتـوز من بين جميع السكريات المدروسة الإسترات بمردود أعلى تلاه المـانيتول، بينمـا كـان المردود أقل عند استخدام السكروز. أدى استخدام الأسيتون إلى ارتفاع كبير في مـردود تفاعل الأسترة مقارنة بباقي المذيبات المستخدمة يليه الأسيتونتريل ومـن ثـم 2-ميتيـل البوتانول-2 وذلك عند درجة الحرارة المثلى (60°C). وعلى الرغم من النتائج التي تـم التوصل إليها في هذا البحث، إلا أن فهم الموضوع بشكل أوسع يحتاج إلى العديـد مـن البحوث كدراسة تأثير المواد الماصة للماء و كمية المذيب المثلى وغيرها مـن العوامـل المؤثرة في تفاعل الأسترة.

REFERENCES المراجع

Abeder Sasˇa, Sˇ, Habulin Maja and Knez Zˇeljko. (2006). Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters; Journal of Food Engineering; Maribor, Slovenia; - 880–886 : Vol. 77.

Abeder Sasa Sÿ, Habulin Maja and Knez Zÿ eljko. (2005). Comparison of the Esterification of Fructose and Palmitic Acid in Organic Solvent and in Supercritical Carbon Dioxide; Ind. Eng. Chem. Res. - - pp. 44, 9631-9635.

Adamopoulos Lambrini. (2006). Understanding the Formation of Sugar Fatty; North Carolina State University. -

Afach Ghanwa. (2004). Enzymatic Synthesis of rare Sugar Esters; Biochemistry and food science; Kagawa University,

Afach Ghanwa. (2007). Enzymatic Synthesis, Characterizationand biological activity of rare sugar fatty acid ester; Biochemistry and food science; Kagawa University,

Arcos J. A., Hill C. G. and Otero C. (2001). Kinetics of the lipasecatalyzed synthesis of glucose esters in acetone; Biotechnol. Bioeng., - 104 : Vol. 73.

Cao L. *et al.,* (1997). Lipase catalyzed solid phase synthesis of sugar fatty acid ester; Biocatalysis and Biotransformation; - 269–283 : Vol. 14.

Cao L., Bornscheuer U. T. and Schmid R. D. (1999). Lipase-catalyzed solid phase synthesis of sugar esters Influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; - 279–285 : Vol. 6.

Flores M. V. *et al.,* (2002). Influence of glucose solubility and dissolution rate on the kinetics of lipase catalyzed synthesis of glucose laurate in 2-methyl 2-butanol; Biotechnology and Bioengineering; - 814–820 : Vol. 78.

Foresti M. L. *et al.*, (2008). Kinetic modeling of enzymatic ethyl oleate synthesis carried; Applied Catalysis A. - - 334, 65–72.

Gandhi Neena N. *et al.,* (2000). Lipase-Catalyzed Esterification; CATAL. REV.& SCI. ENG.; Mumbai; (4) 439–480 : Vol. 42.

Habulin Maja. *et al.,* (2008). Enzymatic synthesis of citronellol laurate in organic media and in supercritical; Maribor, Slovenia; Biochemical Engineering Journal, (1) 6-12 : Vol. 42.

In Sang Yoo Sang Joon Park, and Hyon Hee Yoon. (2007). Enzymatic Synthesis of Sugar Fatty Acid Esters; J. Ind. Eng. Chem.; - Vol. 13, No. 1,1-6.

Klibanov A. M. (1989). Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents; Trends in Biochemical Sciences; - (4):141-144 : Vol. 14.

Sakaki Keiji, *et al.,* (2006). Enzymatic synthesis of sugar esters in organic solvent coupled with pervaporation; Desalination; Tokyo- Japan; - 260-266 : Vol. 193.

Soultani S., Engasser J. M. and Ghoul M. (2001). Effect of acyl donor chain length and sugar/acyl donor molar ratio on enzymatic synthesis of fatty fructose esters; Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic; 725–731:Vol. 11.

Tarahomjoo S. and Alemzadeh I. (2003). Surfactant production by anenzymatic method; Enzyme and Microbial Technology;. - 33–37: Vol. 33 .

Yan Ing. Youchun and Schmid Rolf D. (2001). Enzymatic Production Of Sugar Fatty Acid Ester; Institut of Technical Biochemistry of University Stuttgart.

Yan Youchun, *et al.,* (1999). Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar fatty acid esters Removal of byproducts by azeotropic distillation; Enzyme and Microbial Technology; Stuttgart, Germany, 725–728 : Vol. 25.