

藉由混合反應曲面法探討劑極性對酵素催化甘油解產物選擇性之影響

蔡維娟、謝淳仁

E-mail: 9301935@mail.dyu.edu.tw

摘要

本研究利用溶劑工程 (solvent engineering), 使用脂解酵素IM 77 及Novozym 435於甘油解及直接酯化反應中, 探討不同極性的溶劑組成對合成單醯基甘油酯和雙醯基甘油酯產物選擇性的影響, 採用三種不同極性的有機溶劑系統包括n-hexane、2-methyl-2-butanol (2M2B) 及octane, 各溶劑組成從0~3mL, 利用混合反應曲面法(Mixture Response Surface Methodology), 配合三角輪廓圖來觀察溶劑極性對酵素催化甘油解產物選擇性之影響。利用反應曲面法(Response surface methodology; RSM)及五階層五變數之中心混層設計法(Central composite rotatable design; CCRD), 分別探討反應時間(10-50 min)、反應溫度(25-65OC)、莫耳數比(alcohol : acyl donor = 1:2-1:4)、酵素用量(20-100%)及酵素pH值(5-9)等反應參數對莫耳轉換率之影響及求得1,3-雙酯之最優化合成條件。研究結果顯示, 於溶劑工程中, 在偏極性有機溶劑(2M2B及n-hexane)反應系統下, 單酯為主要的合成產物, 產率達65.00%以上。而在非極性的有機溶劑反應系統中(n-hexane及octane), 反應產物的選擇性都較傾向於雙酯的合成。對Troilein之甘油解反應而言, 當溶劑組成n-hexane:octane 為1:1時, 求得1,3-雙醯基甘油酯的最高產率為40.00%, 而在直接酯化反應方面, 也得到於相同溶劑組成下 (n-hexane : octane 為1:1)求得1,3-丙二醇雙止的最高產率為55.00%。在1,3-丙二醇雙酯的最優化合成反應中, 於反應時間40 min、溫度55 OC、酵素用量80%、基質莫耳數比1.0:2.5 (alcohol : acyl doner)及酵素pH值6, 可得到最高產率為47.03%。

關鍵詞：溶劑工程、雙醯基甘油酯、混合曲面法、反應曲面法

目錄

第一章 緒論.....	1	第二章 文獻回顧.....	6	2.1 油脂生物之應用.....	6	2.2 雙甘油酯之合成.....	6	2.3 酵素催化反應之優點.....	7	2.4 酵素於有機溶劑之催化作用.....	8	2.5 酵素合成之研究.....	13	2.5.1 合成方法.....	13	2.6 脂解酵素之來源.....	14	2.7 脂解酵素在工業上應用之研究.....	16	2.8 反應曲面法.....	17	2.8.1 因子選擇及階層.....	17	2.8.2 實驗設計.....	18	2.8.3 數據分析.....	19	2.8.4 最適範圍搜尋.....	19	2.9 國內外相關研究.....	20	第三章 藉由混合曲面法探討溶劑極性對酵素催化甘油解產物選擇性之影響.....	24	3.1 前言.....	24	藉由混合曲面法探討溶劑極性對酵素催化甘油解產物選擇性之影響.....	24	3.2 實驗材料.....	26	3.2.1 儀器設備.....	26	3.2.2 藥品.....	26	3.3 實驗設計與方法.....	27	3.3.1 實驗設計.....	27	3.3.2 酵素最初含水量校正.....	27	3.3.3 甘油解合成反應.....	27	3.3.4 萃取與分析.....	28	3.3.5 統計分析.....	28	3.4 結果與討論.....	28	藉由混合曲面法探討溶劑極性對酵素催化合成 1,3-丙二醇雙酯產物選擇性之影響.....	36	3.5 實驗材料.....	36	3.6 實驗設計與方法.....	36	3.6.1 實驗設計.....	36	3.6.2 直接酯化合成反應.....	37	3.6.3 萃取與分析.....	37	3.6.4 統計分析.....	37	3.7 結果與討論.....	37	第四章 藉由反應曲面法研究酵素合成1,3-丙二醇雙酯之最優化.....	41	4.1 實驗材料.....	41	4.2 實驗設計與方法.....	41	4.2.1 實驗設計.....	41	4.2.2 酵素pH值之調整.....	42	4.2.3 1,3-丙二醇雙酯之酯化方法.....	42	4.2.4 萃取與分析.....	42	4.2.5 統計分析.....	42	4.3 結果與討論.....	43	4.3.1 時間對莫耳轉換率的影響.....	44	4.3.2 溫度對莫耳轉換率的影響.....	45	4.3.3 酵素用量對莫耳轉換率的影響.....	45	4.3.4 基質莫耳數比對莫耳轉換率的影響.....	46	4.3.5 酵素pH值對莫耳轉換率的影響.....	46	4.3.6 最優化合成之研究.....	47	第五章 結論.....	60	參考文獻.....	62	附錄一 HPLC操作方法.....	67	附錄二 Karl-Fischer 操作方法.....	68	附錄三 雙甘油酯之相關研究.....	70	圖目錄 頁次 圖 1-1 以脂解酵素催化三醯基甘油酯和甘油之甘油解反應.....	4	圖 1-2 以脂解酵素催化三醯基甘油酯和1,3-丙二醇之酯化反應.....	5	圖 2-1 酵素活性與 log P 值之關係.....	12	圖 3-1液相層析儀分析雙甘油酯標準圖譜.....	31	圖 3-2 以三角輪廓圖表示溶劑組成對合成單醯基甘油酯之影響..	
-------------	---	---------------	---	------------------	---	------------------	---	--------------------	---	-----------------------	---	------------------	----	-----------------	----	------------------	----	------------------------	----	----------------	----	--------------------	----	-----------------	----	-----------------	----	-------------------	----	------------------	----	--	----	-------------	----	------------------------------------	----	---------------	----	-----------------	----	---------------	----	------------------	----	-----------------	----	----------------------	----	--------------------	----	------------------	----	-----------------	----	----------------	----	---	----	---------------	----	------------------	----	-----------------	----	---------------------	----	------------------	----	-----------------	----	----------------	----	-------------------------------------	----	---------------	----	------------------	----	-----------------	----	---------------------	----	---------------------------	----	------------------	----	-----------------	----	----------------	----	------------------------	----	------------------------	----	--------------------------	----	----------------------------	----	---------------------------	----	---------------------	----	-------------	----	-----------	----	-------------------	----	----------------------------	----	--------------------	----	--	---	---------------------------------------	---	-----------------------------	----	---------------------------	----	----------------------------------	--

.....32	圖 3-3 以三角輪廓圖表示溶劑組成對合成雙甘油酯之影響.....	33	圖 3-4 以三角輪廓圖表示溶劑組成對合成1,3-雙醯基甘油酯之影響.....	34
.....38	圖 3-6 以三角輪廓圖表示溶劑組成對合成1,3-丙二醇單酯莫耳轉換率之影響.....	39	圖 3-7 以三角輪廓圖表示溶劑組成對合成1,3-丙二醇雙酯莫耳轉換率之影響.....	40
.....40	圖 4-1 液相層析儀分析1,3-丙二醇雙酯標準圖譜.....	49	圖 4-2 反應時間對1,3-丙二醇雙酯酵素合成產率之影響，反應條件分別為：基質莫耳數比 1:2、酵素用量 100%、反應溫度 55 OC.....	50
.....50	圖 4-3 反應時間對1,3-丙二醇雙酯莫耳轉換率影響之反應曲面圖.....	51	圖 4-4 反應溫度與酵素用量對1,3-丙二醇雙酯莫耳轉換率影響之反應曲面圖.....	52
.....52	圖 4-5 基質莫耳數對1,3-丙二醇雙酯莫耳轉換率影響之反應 曲面圖.....	53	圖 4-6 酵素pH值對1,3-丙二醇雙酯莫耳轉換率影響之反應 曲面圖.....	54
.....54	圖 4-7 在酵素pH值為7下，1,3-丙二醇雙酯莫耳轉化率之等高線圖。酵素用量是利用1,3-丙二醇重量百分比加以計算。在等高線圖內之數字是用來表示不同的反應條件下之莫耳轉換率.....	55	表目錄 頁次 表 2-1 常用有機溶劑之 log P 值.....	11
.....30	表 4-1 五階層五變數中心混層實驗設計反應參數實驗值之範圍.....	56	表 4-2 1,3-丙二醇雙酯之五階層五變數中心混層實驗設計與實驗數據.....	57
.....57	表 4-3 1,3-丙二醇雙酯合成變數之聯合檢測分析.....	58	表 4-4 利用脊形分析評估合成1,3-丙二醇雙酯莫耳轉換率之最大値.....	59

參考文獻

- 陳國誠 (1989) 酵素工程學。pp. 1-57, 藝軒圖書出版社, 臺北。
- 張曉莉、黃世佑 (1997) 生物轉換法-有機溶劑中維持酵素活性之研究。化工。44: 71-84.
- 鍾玉明、李敏雄 (1994) 油脂替代品。科學與技術。26 (1):19-25
- 江文德 (1999) 脂肪?在油脂加工的應用。食品工業月刊。31: 10-19.
- 朱文深 (1999) 酵素在食品加工上之應用。食品特刊。6: 94-103.
- 王誌宏 (2001) 1,3-二脂肪甘油酯之製備方法之研究。台灣大學農業化學研究所碩士論文
- 賴昱甫 (2000) 脂肪替代品甲基葡萄糖多酯的最優化合成條件探討及物理特性之研究。大葉大學食品工程研究所碩士論文
- 張淑微 (2002) 以反應曲面法研究酵素合成己醇酯類之最優化。大葉大學食品工程研究所碩士論文
- 池田郁男 (1996) 構造脂質?開發?機能性。食品?開發。31(6):13-16.
- Archer Daniels Midland Co. (2001). Lost weight with a new vegetable oil. <http://www.admworld.com>
- Akoh, C. C. (1995). Structured lipids-enzymatic approach. INFORM. 6: 1055-1061.
- Akoh, C. C. (1998). Structured lipids. In "Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology." ed. C.C. Akoh and D. B. Min, Marcel Dekker, New York. 701-727.
- Akho, C. C., and Swanson, B. G. (1987). One-stage synthesis of raffinose fatty acid polyesters. J. Food. Sci. 52:1570-1576
- Barton, M. J., Heamman, J. P., Fichter, K. C., and Calton, G. J. (1990). Enzymatic resolution of (R,S)-2-(4-hydroxyphenoxy) propionic acid. Enzyme Microb. Tech. 12: 577-583.
- Battistel, E., Biznchi, D., Cesti, P., and Pina, C. (1991). Enzymatic resolution of (S)-(+)-naproxen in a continuous reactor. Biotechnol. Bioeng. 38: 659-664.
- Box, G. E. P., and Behnken, D.W. (1960). Some new three level designs for the study of quantitative variables. Technometrics. 2:455-475.
- Cornell, J. A. (1983). How to run mixture experiments for product quality. American Society for Quality, Milwaukee, WI.
- Chen, C. S. and Sih, C. J. (1989). General aspects and optimization of enantioselective biocatalysis in organic solvents: the use of lipases. Angew. Chem. Int. ed. Engl., 28: 695-707.
- Edmundo, C., Valerie, D., Didier, C., and Alain, M. (1998). Efficient lipase-catalyzed production of tailor-made emulsifiers using solvent engineering coupled to extractive processing. J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 309-313.
- Engel, K. H. (1991). Lipase-catalyzed enantioselective esterification of 2-methylalkanoic acids. Tetrahedron: Asymmetry. 2: 165-168
- Faber, K. (1992). Biotransformation in organic chemistry. Springer-Verlag, Germany. 2-4.
- Hare, L. B. (1974). Mixture designs applied to food formulation. Food Technol. 28:50-62.
- Kao Co. (2000). Us. research shows dietary diacylglycerol helps reduce body weight and body fat. http://www.kao.co.jp/e/corp_e/pressreleases/2000/n20001018_01.html.
- Karra-Chaabouni, M., Pulvin, S., Touraud, D., and Thomas, D. (1998), Parameters affecting the geranyl butyrate by esterase 30,000 form *Mucor miehei*. J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 1201 - 1206.
- Klibanov, A. M. (1990). Asymmetric transformations catalyzed by enzymes in organic solvents. Acc. Chem. Res.23: 114-120.
- Klibanov, A. M. (1986). Enzymes that work in organic solvents. Chem. Tech. 354-359.
- Klibanov, A. M. (1985). Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. Proc. Natl. Acad. 82: 3192-3196
- Laane, C., Boneren, S., Vos, K., and Veeger, C. (1987). Rules for optimizations of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol. Bioeng. 30: 81-87.
- Lee, K. T. and Akoh, C. C. (1998). Structured lipids: synthesis and applications. Food Rev. Int. 14: 17-34.
- Li, Z. Y. and Ward, O. P. (1994), Synthesis of monoglyceride containing omega-3 fatty acid by microbial lipase in organic solvent. J. Indus. Microbio. 13: 49-52.
- Matsuo N., and Tokimitsu I. (2001). Metabolic characteristics of diacylglycerol. INFORM. 12: 1098-1102.
- Mukherjee, K. D. (1998). Lipid biotechnology. In "Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology" ed. C. C. Akoh and D. B. Min, Marcel Dekker, New York. 589-640.
- Otero, C., Pastor, E., Rua, M. L., Fernandez, V. M., and Ballesteros, A. (1990). Influence of the support on the reaction course of tributyrin hydrolysis catalyzed by soluble and immobilized lipases. Appl. Biochem. Biotechnol. 23: 237-247.
- Plou, F. J., Baranidaran, M., Calvo, M. V., Ballesteros, A. and Pastor, E. (1996). High-yield production of mono- and di-oleylglycerol by lipase-catalyzed hydrolysis of triolein. Enzyme Microb. Tech. 18: 66-71.
- Rend?n, X., L?pez-Munguia, A., and Castillo, E. (2001). Solvent engineering applied to lipase-catalyzed glycerolysis of

triolein. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 78:1061-1066

36. Schuch, R. and Muckherjee, K. D. (1987). Interesterification of lipids using an immobilized sn-1,3-specific triacylglycerol lipase. *J. Agric. Food Chem.* 35 : 1005-1008.

37. Nagao, T., Watanabe, H., Goto, N., Onizawa, K. Taguchi, H., Matsuo, N., Yasukawa, T., Tsushima, R., Shimasaki, H. and Itakura, H. (2000). Dietary diacylglycerol suppresses accumulation of body fat compared to triacylglycerol in men in a double-blind controlled trial. *J. Nurt.* 130: 792-797.

38. Vulfson, E. N. (1994). In: *Lipases, Their structure, biochemistry and application* (Petersen, S. B. and Woolley, P., eds). Cambridge University Press, Cambridge. 271-288.

39. Wandrey, C. and Wichmann, R. (1987). Production of L-amino acids in the membrane reactor. *Biotechnol.* 1: 85-92.

40. Yamane T., Kang, S. T., Kawahara, D., and Koizumi, Y. (1994). High-yield diacylglycerol formation by solid-phase enzymatic glycerolysis of hydrogenated beef tallow. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 71: 339-342.