

# 以反應曲面法探討左旋丁酸薄荷酯之最優化酵素合成

陳芳怡、謝淳仁

E-mail: 9417923@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

中文摘要 左旋薄荷醇在食品、香料、醫藥、和化妝品上應用廣泛，是少數以純光學活性型態加以應用的香料，目前在世界上每年的需要量約12,000噸。左旋乙酸薄荷酯為一種清涼、具有果味薄荷香的透明液體，可由左旋薄荷醇和醋酸酐經酯化反應而成，應用在非水溶性系統中提供薄荷香氣。目前左旋薄荷酯類主要以化學方式合成，但其步驟繁複、費時、危險性高。故本研究利用具有特殊立體選擇性的Candida rugosa脂解酵素 (Lipase AY-30)，在無水有機溶劑中催化左旋薄荷醇與丁酸酐之直接酯化反應合成左旋丁酸薄荷酯，再利用反應曲面法 (Response surface methodology, RSM)及五階層四變數之中心混層實驗設計 (Central composite rotatable design, CCRD)實驗設計法來探討反應變數：反應時間 (2 – 10 hr)、反應溫度 (25 – 65 °C)、酵素用量 (10 – 50%)、基質莫耳數比 (1:1 – 1:3)對莫耳轉換率之影響，並藉由等高線圖 (Contour plots)的分析找出左旋丁酸薄荷酯之最優化合成條件。研究結果顯示，反應時間、反應溫度和酵素用量對左旋丁酸薄荷酯之莫耳轉換率有顯著影響。於左旋丁酸薄荷酯的最優化合成反應中，當反應時間8.7 小時，反應溫度37.1 °C，酵素用量31.7% (左旋薄荷醇之重量)，基質比1:2.6 (左旋薄荷醇:丁酸酐)，可得最高轉換率為72.6%。

關鍵詞：左旋薄荷酯類、脂解酵素、反應曲面法、最優化

## 目錄

目錄封面內頁 簽名頁 授權書.. iii	中文摘要... iv	英文摘要 v	誌謝 vii	目錄 viii	圖目錄 xi	表目錄 xii																
第一章 緒論 1	第二章 文獻回顧 4	2.1 薄荷醇 4	2.1.1 左旋薄荷醇的應用 4	2.1.2 薄荷酯類 5	2.2 鏡像異構物 6	2.2.1 對掌化合物組態標示法 7	2.2.2 對掌化合物之相關知識 8	2.3 酵素 9	2.3.1 酵素催化之優點 10	2.3.2 酵素在光學異構物的應用 11	2.3.3 酵素於有機溶劑之催化作用 12	2.3.4 有機溶劑之最適化選擇 14	2.3.5 脂解酵素於酯類合成之重要性 15	2.3.6 Candida rugosa脂解酵素 16	2.4 薄荷酯類合成之國內外相關研究 19	2.5 反應曲面法 (Response Surface Methodology; RSM)應用於脂解酵素合成探討 22	2.5.1 反應曲面法之原理 23	2.5.2 中心混層設計 (Central Composite Design) 24	2.6 回應曲面模式適切性之統計檢驗 25	2.7 正則分析 (Canonical Analysis) 26		
第三章 材料與方法 33	3.1 實驗材料 33	3.1.1 藥品 33	3.1.2 器材 33	3.1.3 儀器設備 34	3.2 實驗設計 35	3.3 實驗步驟 35	3.3.1 酵素水分含量之測定 35	3.3.1.1 卡氏水份滴定儀 (Karl-Fischer)之原理 35	3.3.1.2 水含量測定步驟 36	3.3.2 酵素活性測定 36	3.3.2.1 活性測定步驟 37	3.3.3 合成方式 37	3.3.4 萃取與分析 38	3.3.5 產率計算公式 38	3.3.6 數據分析 38	3.3.6.1 SAS方程式編輯 39						
第四章 結果與討論 46	4.1 反應時間對莫耳轉換率的影響 47	4.2 酵素用量對莫耳轉換率的影響 48	4.3 溫度對莫耳轉換率的影響 48	4.4 基質莫耳數比對莫耳轉換率的影響 49	4.5 最優化合成之研究 50	4.6 相關研究之?合討論 51																
第五章 結論 59	參考文獻 60	附錄一 相關研究整理表格 67	附錄二 SAS之INPUT數據 72	圖目錄 72	圖 1-1 以脂解酵素催化左旋薄荷醇與丁酸酐之直接酯化反應 3	圖 2-1 三甘油酯以sn-命名的代表分子 30	圖 2-2 回應曲面進行步驟流程圖 31	圖 2-3 中心混層設計法之星點及中心點補充實驗圖 32	圖 3-1 左旋丁酸薄荷酯氣相層析儀之標準圖譜 45	圖 4-1 反應時間對左旋丁酸薄荷酯合成莫耳轉換率之影響，反應條件分別為：基質莫耳數比1:1、酵素用量50%和反應溫度35 °C 54	圖 4-2 反應時間對左旋丁酸薄荷酯莫耳轉換率影響之反應曲面圖 55	圖 4-3 反應溫度與酵素用量對左旋丁酸薄荷酯莫耳轉換率影響之反應曲面圖 56	圖 4-4 基質莫耳數比對左旋丁酸薄荷酯莫耳轉換率影響之反應曲面圖 57	圖 4-5 左旋丁酸薄荷酯 (直接酯化)百分比莫耳轉換率之等高線圖。酵素用量是利用左旋薄荷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 58	表目錄 27	表 2-1 常用於分割消旋物的脂解酵素 27	表 2-2 常用有機溶劑之log P值 28	表 2-3 中心混層設計之補充實驗 29	表 3-1 五階層四變數中心混層實驗設計反應參數實驗值之範圍. 43	表 3-2 左旋丁酸薄荷酯之五階層四變數中心混層實驗設計與實驗數據 44	表 4-1 左旋丁酸薄荷酯合成變數之聯合檢測分析 52	表 4-2 利用脊行分析評估合成左旋丁酸薄荷酯百分比莫耳轉換率之最大值 53

## 參考文獻

參考文獻 1.江文德。1999。脂肪?在油脂加工上的應用。食品工業月刊31: 10 – 19。 2.李立群。2002。假絲酵母 (Lip2)重組基因之蛋白質表現、生化特性及應用:第7 – 8頁。海洋大學水產生物技術研究所碩士論文。基隆，台灣。 3.李昌憲、洪哲穎和熊光濱。1992。利用反應曲面法進行以 Streptococcus faecalis 生產酪胺酸脫胺酶之培養基最適化研究。中國農業化學會誌30: 264 – 272。 4.林景彬、謝慶良和鐘景光。1999。左旋薄荷醇對大鼠肝臟及血液中乙醯轉移?活性之影響。中國醫藥學院雜誌8 (2): 27 – 36。 5.洪哲穎和陳國誠。1992。回應曲面實驗設計法在微生物酵素生產上之應用酵素工程學。化工39: 3 – 18。 6.高龍君。1992。反應曲面在食品開發上的應用。食品工業

。24(3): 32 – 41。7.許人平。1994。生物催化劑(酵素)在對掌藥物與香料合成上的應用。科學與技術26: 19 – 28。8.陳建甫。2000。界面活性劑包覆脂解酵素於有機溶劑中催化油脂水解反應:第14頁。臺灣大學化學工程學研究所碩士論文。台北。台灣。9.張淑微。2002。以反應曲面法研究酵素合成己醇酯類之最優化:第58 – 66頁。大葉大學食品工程研究所碩士論文。彰化。台灣。10.張曉莉和黃世佑。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。11.莊嘉榮。2004。有機溶劑中以脂解酵素催化轉硫酯化動態動力分割製備(S)-Naproxen morpholinoalkyl酯類前驅藥:第1, 72頁。南台科技大學生物科技研究所碩士論文。台南, 台灣。12.楊忠倫。2004。以反應曲面法探討脂解酵素催化抗壞血酸月桂酸酯之最優化:第21 – 33頁。大葉大學生物產業科技研究所碩士論文。彰化, 台灣。13.劉繼賢。1993。脂肪之生產與應用。科學與技術25: 25 – 31。14.冀政勤和毛翰海。2001。有機化學。第139 – 157頁。五南圖書出版有限公司, 台北, 台灣。15.戴達夫、林萬寅、許清政、劉其琪、邱紫文、蘇宏晷、黃素禎。2001。酵素生化科技。第198 – 199頁。華榮圖書有限公司, 台北, 台灣。16.Amano enzyme company. 2005. Product information of Lipase AY. [http://www.amano-enzyme.co.jp/pdf/food\\_e/cat\\_food\\_LAY-30\\_e.pdf](http://www.amano-enzyme.co.jp/pdf/food_e/cat_food_LAY-30_e.pdf)。17.Athawale, V., Manjrekar N. and Athawale M. 2001. Enzymatic synthesis of chiral menthyl methacrylate monomer by pseudomonas cepacia lipase catalysed resolution of ( $\pm$ )-menthol. J. Mol. Catal. B Enzym. 16: 169 – 173。18.Azerad, R. 1995. Application of biocatalysis in organic synthesis. Bull. Soc. Chim. Fr. 132: 17 – 51。19.Babali B., Aksoy H. A., Tuter M. and Ustun G. 2001a. Enzymatic Esterification of (-)-menthol with fatty acids in solvent by a commercial lipase from *Candida rugosa*. J. Am. Oil Chem. Soc. 78: 53 – 56。20.Babali B., Aksoy H. A. and Tuter M. Ustun G. 2001b. Enzymatic esterification of (-)-menthol with lauric acids in isooctane by sorbitan monostearate-coated lipase from *Candida rugosa*. J. Am. Oil Chem. Soc. 78: 173 – 175。21.Bianchi, D., Cesti, P. and Battistel, E. 1988. Anhydrides as acylating agents in lipase-catalyzed stereoselective esterification of racemic alcohols. J. Org. Chem. 53: 531 – 5534。22.Bowman, L. and Geiger, E. 1984. Optimization of fermentation conditions of alcohol production. Biotechnol. Bioeng. 26: 1492 – 1497。23.Box, G. E. P. and Wilson, K. B. 1951. On the experimental attainment optimum conditions. J. Roy. Statist. Soc. B 13: 1 – 45。24.Burgess, K., Henderson, I. and Ho, K. K. 1992. Biocatalytic resolution of sulfinylakanoates: a facile route to optically active sulfoxides. J. Org. Chem. 57: 1290 – 1295。25.Chen, S. L. 1981. Optimization of batch alcoholic fermentation of glucose syrup substrate. Biotechnol. Bioeng. 23: 827 – 1836。26.Cheyrier, V., Feinberg, M., Chararas, C. and Ducauze, C. 1983. Application of response surface methodology to evaluation of bioconversion experimental conditions. Appl. Environ. Microbiol. 45: 634 – 639。27.Dordick, J. S. 1989. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. Enz. Microb. Technol. 11: 194 – 221。28.Dastoli, F. R., Musto, N. A. and Price, S. 1996. Reactivity of active sites of chymotrypsin suspended in an organic medium. Biochem. Biophys. 115: 44 – 47。29.Faber, K. 1992. Biotransformation in organic chemistry. p.2 – 4. Springer-Verlag, Berlin, Germany。30.Himmelblau, D. M. 1970. Process analysis by statistical methods. p.230 – 292. John Wiley and Sons, New York, USA。31.Jianhe, X., Jie, Z., Kawamoto, T., Tanaka, A. and Ying. H. 1998. Comparison of acid anhydrides with carboxylic acid in enantioselective enzymatic esterification of racemic menthol. Chin. J. Biotechnol. 13: 263 – 269。32.Jogiekar, A. M. and May, A. T. 1987. Product excellence through design of experiments. Cereal food world. 32: 857 – 868。33.Jones, J. B. 1986. Enzymes in organic synthesis. Tetrahedron. 42: 3351 – 3403。34.Kamiya, N. and Goto, M. 1997. How is enzymatic selection of menthol esterification catalyzed by surfactant-coated lipase determined in organic media? Biotechnol. Prog. 13: 488 – 492。35.Kloosterman, M., Elferink, V. H. M., Iersel, J., Roskam, J. H., Meijer, E. M., Hulshof, L. A. and Sheldon, R. A. 1998. Lipase in the preparation of  $\beta$ -blocks. Trends in Biotechnol. 6: 251 – 256。36.Laane, C., Boneren, S., Vos, K. and Veeger, C. 1987. Rules for optimizations of biocatalysis in organic solvents. Biotechnol. Bioeng. 30: 81 – 87。37.Maddox, I. S. and Richert, S. H. 1977. Use of response surface methodology for the rapid optimization of microbiological media. J. Appl. Bacteriol. 43: 17 – 204。38.Meijer, E. M., Boesten, W. H. J., Schoemaker, H. E. and Balken, J. A. M. V. 1985. Biocatalysts in organic synthesis. Elsevier. Amsterdam. 135 – 156。39.Moresi, M., Colicchio, A. and Sansovini, F. 1980. Optimization of whey fermentation in a jar fermenter. Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. 9: 173 – 183。40.Shieh, C. J., Akoh, C. C. and Yee, L. N. 1996. Optimized Enzymatic synthesis of geranyl butyrate with lipase AY from *Candida rugosa*. Biotechnol. Bioeng. 51: 371 – 374。41.Shimada Y., Hirota Y., Baba T., Kato S., Sugihara A., Moriyama S., Tominaga Y. and Terai T. 1999. Enzymatic synthesis of l-menthyl esters in organic solvent-free system. J. Am. Oil Chem. Soc. 76: 1139 – 1142。42.Thomson, D. 1982. Response surface experimentation. J. Food Process. Pres. 6: 155 – 188。43.Villeneuve P. and Foglia T. A. 1997. Lipase specificities: potential application in lipid bioconversions. INFORM. 8: 641 – 651。44.Wandrey, C. and wickmann, R. 1987. Production of L-amino acids in the membrane reactor. Biotechnol. 1: 85 – 92。45.Wang, D. L., Nag A., Lee G. C. and Shaw J. F. 2002. Factors affecting the resolution of dl-menthol by immobilized lipase-catalyzed esterification in organic solvent. J. Agric. Food Chem. 50: 262 – 265。46.Werkhoff, P., Brennecke, S., Bretshneider, W., Guntert, M., Hopp, R. and Surburg, H. 1993. Chiroselective analysis in essential oil, fragrance and flavor research. Z. Lebensm. Unters. Forsch. 196: 307 – 328。47.Wu, W. H., Akoh C. C. and Phillips R. S. 1997. Stereoselective acylation of dl-menthol in organic solvent by an immobilized lipase from *Pseudomonas cepacia* with vinyl propionate. J. Am. Oil Chem. Soc. 74: 435 – 439。48.Wu, W. H., Akoh C. C. and Phillips R. S. 1996. Lipase-catalyzed stereoselective esterification of dl-menthol in organic solvents using acid anhydrides as acylating agents. Enzyme Microb. Technol. 18: 536 – 539。49.Xu, J. H., Kawamoto, T. and Tanaka, A. 1995. High-performance continuous operation for enantioselective esterification of menthol by use of acid anhydride and free lipase in organic solvent. Appl. Microbiol. Biotechnol. 43: 639 – 643。50.Yori, J. C., Manuale, D. L., Marchi, A. J. and Grau, J. M. 2004. Liquid-phase hydrogenation of dementholized peppermint oil on Pt/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> catalysts Part I: A study of catalyst performance. Applied Catalysis A: General 275: 221 – 226。51.Zaks, A. and Klivanov, A. M. 1988. Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. J. Biol. Chem. 263: 3194 – 3201。52.Zertuche, L. and Zall, R. R. 1985. Optimizing alcohol production from whey using computer technology. Biotechnol. Bioeng. 27: 547 – 554。