

Optimization of Enzymatic Synthesis of Hexyl Laurate by Response Surface Methodology

謝至涵、謝淳仁

E-mail: 9417947@mail.dyu.edu.tw

ABSTRACT

The definition of the emollient on the cosmetics is that "toiletry consisting of any of various substances resembling cream that have a soothing and moisturizing effect when applied to the skin". The emollient is often added in the products for skin protection, which makes the skin feel gentle and comfortable. The skin protection are very important in the cosmetics, and it has wide applications. At present, the fatty acid, alcohol and ester used in the cosmetics were hydrolysed from the oil and wax of animals and plants origin. The ester can be produced by resting fatty acid and an alcohol of low molecular weight. For example, isopropyl myristate and hexyl laurate have the characteristic of emollient. According to currently available references, most of them used esterification of the short chain fatty acid with alcohol using lipase. The esterification of the long chain fatty acid with the lipase is quite limited in the literature. Currently, industries carried out esterification of the long chain fatty acid through chemical processes. The ability for immobilized lipase from *Rhizomucor miehei* (Lipozyme IM77) to catalyze the direct esterification of lauric acids and 1-hexanol in solvent-free environment was investigated in this study. Response surface methodology (RSM) and 5 – level – 4 – factor central composite rotatable design (CCRD) were employed to evaluate the effects of synthesis parameters, such as reaction time (10 – 50 min), temperature (45 – 85 °C), enzyme amount (10 – 30 mg), pH memory(5 – 9) on percentage molar conversion of hexyl laurate by the direct esterification. The results showed that temperature and enzyme amount significantly affected the percent molar conversion of hexyl laurate in the solvent system. Based on ridge max analysis, the optimum synthesis conditions with 90.0% molar conversion were: reaction time 74.8 min、 47.8 °C、 enzyme amount 45% and substrate molar ratio (1.5:1). In solvent-free system, results showed that percent molar conversion of hexyl laurate affected by temperature、 time and enzyme amount. Based on ridge max analysis, the optimum synthesis conditions with 69.7% molar conversion in the solvent-free were: reaction time 40.6 min, temperature 58.2 °C, enzyme amount 25.4 mg, and pH memory 5.9.

Keywords : hexyl ester ; emollient ; the direct esterification ; lipase ; optimization ; response surface methodology

Table of Contents

目錄	封面內頁	簽名頁	授權書..	iii	中文摘要	iv	英文摘要	vi	誌謝	viii	目錄	ix	圖目錄	xii	表目錄	xiii	第一章	緒言	1	第二章	文獻回顧	4	2.1	化妝品之簡介	4	2.1.1	護膚製品的發展現況	4	2.1.2	柔膚劑在護膚製品上的應用	5	2.2	酵素催化之重要性	6	2.2.1	酵素催化反應之優點	6	2.2.2	LipozymeR IM77 之簡介	8	2.3	酯類合成國內外之相關研究	8	2.3.1	國外相關研究	9	2.3.2	國內相關研究	12	2.4	反應曲面法之應用	15	2.4.1	中心混層設計	17	2.4.2	反應曲面模式適切性之統計檢驗	18	第三章	材料與方法	24	以反應曲面法探討己醇酯類之最優化酵素合成	24	3.1	實驗材料	24	3.1.1	儀器設備	24	3.1.2	藥品	24	3.2	實驗設計與方法	25	3.2.1	實驗設計	25	3.2.2	月桂酸己酯之合成方法	26	3.2.3	萃取與分析	26	3.2.4	統計分析	27	在無溶劑系統中，以反應曲面法探討己醇酯類之最優化酵素合成	28	3.3	實驗材料	28	3.3.1	儀器設備	28	3.3.2	藥品	28	3.4	實驗設計與方法	28	3.4.1	實驗設計	28	3.4.2	月桂酸己酯之合成方法	29	3.4.3	萃取與分析	29	3.4.4	統計分析	29	第四章	結果與討論	36	4.1	最優化合成之研究	36	4.1.1	有機溶劑下月桂酸己酯合成	36	4.1.2	在無溶劑下月桂酸己酯合成	38	4.2	時間對莫耳轉換率之影響	40	4.3	溫度對莫耳轉換率之影響	41	4.4	酵素用量對莫耳轉換率之影響	41	4.5	酵素pH記憶值對莫耳轉換率之影響	42	4.6	基質比對莫耳轉換率之影響	43	4.7	水分對莫耳轉換率之影響	43	4.8	綜合討論	44	4.8.1	時間對反應之影響	45	4.8.2	溫度對反應之影響	45	4.8.3	有機溶劑之選擇	46	第五章	結論	64	參考文獻	66	附錄 一	71	附錄 二	73	圖目錄	圖 1-1	以脂解酵素催化月桂酸與1-己醇之直接酯化反應	3	圖 2-1	反應曲面圖	20	圖 2-2	反應曲面進行步驟流程圖	21	圖 2-3	中心混層設計法之星點及中心點補充實驗圖	22	圖 3-1	氣相層析儀分析月桂酸己酯(直接酯化)標準圖譜	30	圖 3-2	在無溶劑下，氣相層析儀分析月桂酸己酯(直接酯化)標準圖譜	31	圖 4-1	月桂酸己酯百分比莫耳轉換率之等高線圖	47	圖 4-2	時間對月桂酸己酯合成產率之影響	48	圖 4-3	反應時間對月桂酸己酯莫耳轉換率影響之反應曲面圖	49	圖 4-4	反應溫度對月桂酸己酯合成產率之影響	50	圖 4-5	酵素用量對月桂酸己酯莫耳轉換率影響之反應曲面圖	51	圖 4-6	酵素用量對TON值影響	52	圖 4-7	酵素pH記憶對月桂酸己酯合成產率之影響	53	圖 4-8	在無溶劑下，pH 記憶值與酵素用量對月桂酸己酯莫耳轉換率影響之反應曲面圖	54	圖 4-9	基質比與酵素用量對月桂酸己酯莫耳轉換率影響之反應曲面圖	55	圖 4-10	反應過程加入分子篩，探討時間對月桂酸己酯合成產率之影響	56	圖 4-11	在無溶劑的條件下，月桂酸己酯百分比重量轉換率之等高線圖	57	表目錄	表 2-1	中心混層設計之補充實驗	23	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	32	表 3-2	五階層四變數中心混層實驗設計與實驗數據	33	表 3-3	在無溶劑條件下，五階層四變數中心混層實驗設計反應參數實驗值之範圍	34	表 3-4	在無溶劑條件下，五階層四變數中心混層實驗設計	
----	------	-----	-------	-----	------	----	------	----	----	------	----	----	-----	-----	-----	------	-----	----	---	-----	------	---	-----	--------	---	-------	-----------	---	-------	--------------	---	-----	----------	---	-------	-----------	---	-------	--------------------	---	-----	--------------	---	-------	--------	---	-------	--------	----	-----	----------	----	-------	--------	----	-------	----------------	----	-----	-------	----	----------------------	----	-----	------	----	-------	------	----	-------	----	----	-----	---------	----	-------	------	----	-------	------------	----	-------	-------	----	-------	------	----	------------------------------	----	-----	------	----	-------	------	----	-------	----	----	-----	---------	----	-------	------	----	-------	------------	----	-------	-------	----	-------	------	----	-----	-------	----	-----	----------	----	-------	--------------	----	-------	--------------	----	-----	-------------	----	-----	-------------	----	-----	---------------	----	-----	------------------	----	-----	--------------	----	-----	-------------	----	-----	------	----	-------	----------	----	-------	----------	----	-------	---------	----	-----	----	----	------	----	------	----	------	----	-----	-------	------------------------	---	-------	-------	----	-------	-------------	----	-------	---------------------	----	-------	------------------------	----	-------	------------------------------	----	-------	--------------------	----	-------	-----------------	----	-------	-------------------------	----	-------	-------------------	----	-------	-------------------------	----	-------	-------------	----	-------	---------------------	----	-------	--------------------------------------	----	-------	-----------------------------	----	--------	-----------------------------	----	--------	-----------------------------	----	-----	-------	-------------	----	-------	--------------------------	----	-------	---------------------	----	-------	----------------------------------	----	-------	------------------------	--

與實驗數據 35 表 4-1 月桂酸己酯百分比莫耳轉換率對合成變數之變異數分析 58 表 4-2 月桂酸己酯合成變數之聯合檢測分析 59 表 4-3 利用脊形分析評估合成月桂酸己酯莫耳轉換率之最大值 60 表 4-4 在無溶劑條件下，月桂酸己酯百分比莫耳轉換率對合成變數之變異數分析 61 表 4-5 在無溶劑條件下，月桂酸己酯合成變數之聯合檢測分析 62 表 4-6 在無溶劑的條件下，利用脊形分析評估合成月桂酸己酯莫耳轉換率之最大值 63

REFERENCES

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. 李昌憲、洪哲穎及熊光濱。1992。利用反應曲面法進行以 *Streptococcus faecalis* 生產酪胺酸脫羧酶之培養基最適化研究。中國農業化學會誌 30:264 – 272。
3. 李冠汝及蕭介夫。2001。脂肪?在生物產業之應用。生物產業12:181 – 186。
4. 李根永及李孟修。1998。Corynebacterium glutamicum 在高濃度鹽份培養基脯胺酸發酵之研究。中國農業化學會誌36:57 – 64。
5. 余哲仁。1996。利用超臨界二氧化碳為溶劑以酵素法製造食品中酯類及香氣成分。行政院國家科學委員會科學技術資料中心。
6. 余哲仁及詹國靖。1997。利用超臨界二氧化碳為溶劑以Candida cylindracea 脂解酶合成己酸乙酯之研究。中國農業化學會誌 35:413 – 421。
7. 邱郁雯、廖怡禎及孫璐西。1999。水分含量對於連續式超臨界二氧化碳下之酵素性酯化反應的影響。中國農業化學會誌 37: 87 – 94。
8. 洪哲穎。1998。回應曲面品質工程技術。工業局八十八年度人才培訓計畫研習班講義。
9. 洪偉章及陳榮秀。1996。化妝品科技概論。第5 – 8頁。高立圖書有限公司。台北，台灣。
10. 高馥君。1992。反應曲面法在食品開發上的應用。食品工業月刊24:32 – 41。
11. 許德發、鄭智交、楊濟華、李仰川、溫慧萍及許照紅。2002。化妝品概論。第107 – 120頁。華格那企業有限公司。台中，台灣。
12. 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:第64頁。彰化，台灣。
13. 張曉莉及黃世佑。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。
14. 張麗卿。1998。現代化妝品概論。第173 – 174頁。高立圖書有限公司。台北，台灣。
15. 蕭介夫。1996。酵素工技與蛋白質工程研究之新發展。生物產業7:29 – 35。
16. Bommarius, Riebel. 2004. Biocatalysis. p. 34. Wiley, New York, USA.
17. Bourg-Grros, S., Razafindramboa, N., and Pavia, A. A. 1997. Synthesis of (Z)-3-hexen-1-yl butyrate in hexane and solvent-free medium using *Mucor miehei* and *Candida antarctica* lipases. J. Am. Oil Chem. Soc. 74: 1471 – 1475.
18. Box, G. E. P. and Wilson, K. B. 1951. On the experimental attainment optimum conditions. J. Roy. Statist. Soc. 13: 1 – 45.
19. Carvalho, C. M. L., Serralheiro, M. L. M., Cabral, J. M. S., and Aires-Barros, M. R. 1997. Application of factorial design to the study of transesterification reactions using cutinase in AOT - reversed micelles. Enzyme Microb. Tech. 21:117 – 123.
20. Chaabouni, K. M., Pulvin Sylviane, T. D., and Thomas, D. 1998. Parameters affecting the synthesis of geranyl butyrate by esterase 30,000 from *Mucor miehei*, J. Am. Oil Chem. Soc. 75: 1201 – 1206.
21. Chen, J. P. 1996. Production of ethyl butyrate using gel-entrapped *Candida cylindracea* lipase, J. Ferment. Bioeng. 82: 404 – 407.
22. Claon, P. A. and Akoh, C. C. 1993. Enzymatic synthesis of geraniol and citronellol esters by direct esterification in n-hexane. J. Am. Oil. Chem. Soc. 71: 575 – 578.
23. Himmelblau, D. M. 1970. Process analysis by statistical methods. p.230 – 292. John Wiley and Sons, New York.
24. Jogiekar, A. M. and May, A. T. 1987. Product excellence through design of experiments. Cereal Food World. 32: 857 – 868.
25. Langrand, G., Rondot, N., Triantaphylides C. and Baratti, J. 1990. Short chain esters synthesis by microbial lipases. Biotechnol. Lett. 12: 581 – 586.
26. Liaquat, M. and Owusu Apenten, R. K. 2000. Synthesis of low molecular weight flavor esters using plant seedling lipases in organic media. J. Food Sci. 65: 295 – 299.
27. Liu, K. J. and Shaw, J. F. 1998. Lipase – catalyzed synthesis of kojic acid esters in organic solvents, J. Am. Chem. Soc. 75: 1507 – 1511.
28. Marlot, C., Langrand, G., Triantaphylides, C., and Baratti, J. 1985. Ester synthesis in organic solvent catalyzed by lipases immobilized on hydrophylic supports. Biotechnol. Lett. 9: 647 – 650.
29. Mestri, S. D. and Pai, J. S. 1995. Effect of moisture on lipase catalyzed esterification of geraniol of palmarosa oil in non-aqueous system. Biotechnol. Lett. 17: 459 – 461.
30. Okumura, S., Lwai, M., and Tjujiska, Y. 1979. Synthesis of various kinds of esters by four microbial lipases. Biochem. Biophys. Acta. 575:156-165.
31. Razafindralambo, H., Blecker, H. C., Lognay, G., Marlier, M., Wathelet, J. P. and Severin, M. 1994. Improvement of enzymatic synthesis yields of flavour acetates: the example of the isoamyl acetate. Biotechnol. Lett. 16: 247 – 250.
32. Shieh, C. J., Akoh, C. C., and Lee, L. N. 1996. Optimized enzymatic synthesis of geranyl butyrate with lipase AY from *Candida rugosa*. Biotechnol. Bioeng. 51: 371 – 374.
33. Shieh, C. J. and Chang, S. W. 2001. Optimized synthesis of lipase-catalyzed hexyl acetate in n-hexane by response surface methodology. J. Agric. Food Chem. 49: 1203 – 1207.
34. Thomson, D. 1982. Response surface experimentation. J. Food Process. Pres. 6: 155 – 188.
35. Yee, L. N., Akoh, C. C. and Phillips, R. S. 1997. Lipase PS-catalyzed transesterification of citronellyl butyrate and geranyl caproate: effect of reaction parameters. J. Am. Oil Chem. Soc. 74: 255 – 260.