

# 以反應曲面法探討植物固醇酯類之最優化酵素合成

余玉博、謝淳仁

E-mail: 9417981@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

植物固醇(Phytosterol)為一植物內生性之三萜類(Triterpenes)，自然界中的三萜類有4000多種，而植物固醇就占了100種以上。近年來，植物固醇酯類被發現能藉由抑制小腸中膽固醇的吸收而降低血清膽固醇的含量，因此被應用在食用油脂以及機能性的食品中。植物固醇酯類的來源在傳統上除了萃取之外還能用化學合成法製造，但在講求天然與健康的現代飲食觀念下，以生物催化法所合成的植物固醇酯類更能符合這個要求。故本研究主要是選用脂解酵素Lipase AY (from *Candida rugosa*) 催化飽和之穀固醇(Sitostanol)與丁酸酐(Butyric anhydride)進行酯化反應，合成植物固醇酯類(Sitostanyl butyrate)，並利用反應曲面法(Response surface methodology; RSM)及五階層四變數之中心混層實驗設計法(Central composite rotatable design; CCRD)，分別探討反應時間(2–10 h)、反應溫度(25–65 oC)、基質莫耳比(1.0–3.0; Acyl noner/Alcohol)及酵素用量(10–50%w/w, by wt. of sitostanol)等反應參數對莫耳轉換率之影響及求得植物固醇酯類之最優化合成條件。研究結果顯示，在有機系統下，脂解酵素Lipase AY可成功地催化植物固醇酯類之合成，在反應時間6.2小時、溫度28.8 oC、酵素用量41.6%及基質莫耳數比為2.0時可得到54.5%的最優化產率。

關鍵詞：反應曲面法；生物催化；脂解酵素；植物固醇酯類；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	5
2.1 植物固醇之簡介	5
2.2 植物固醇酯類	6
2.2.1 植物固醇酯類之簡介與現況	6
2.2.2 植物固醇酯類之生理效應	7
2.2.3 植物固醇酯類之降膽固醇機制	10
2.2.4 植物固醇酯類之安全性	11
2.2.5 植物固醇酯類之合成	12
2.3 脂解酵素	15
2.3.1 Lipase AY之簡介	16
2.3.2 脂解酵素之專一性	16
2.3.3 影響酵素活性之環境因子	18
2.4 反應曲面法之應用	19
2.4.1 反應曲面法之原理	19
2.4.2 中心混層設計	20
2.4.3 回應曲面模式適切性之統計檢驗	21
第三章 材料與方法	28
3.1 實驗材料	28
3.1.1 儀器設備	28
3.1.2 藥品	28
3.2 實驗設計與方法	29
3.2.1 實驗設計	29
3.2.2 酵素活性測定	29
3.2.3 酵素含水量測定	30
3.2.4 Sitostanyl butyrate的合成方法	30
3.2.5 萃取與分析	31
3.2.6 統計分析	31
第四章 結果與討論	36
4.1 實驗結果	36
4.1.1 時間對莫耳轉換率之影響	37
4.1.2 溫度對莫耳轉換率之影響	37
4.1.3 酵素用量對莫耳轉換率之影響	38
4.1.4 基質莫耳數比對莫耳轉換率之影響	39
4.2 最優化合成之研究	40
4.3 綜合討論	41
4.3.1 時間對反應之影響	42
4.3.2 溫度對反應之影響	42
4.3.3 酵素用量對反應之影響	43
4.3.4 有機溶劑之選擇	44
第五章 結論	53
參考文獻	54
附錄一 DL50自動電位滴定儀操作方法	60
附錄二 Karl Fischer操作方法	62
附錄三 植物固醇酯類合成之相關文獻	64
附錄四 SAS之input數據	65
圖目錄	
圖 1-1以脂解酵素催化氫化穀固醇與丁酸酐之酯化反應.....	4
圖 2-1常見之植物固醇與膽固醇之結構.....	25
圖 2-2三甘油脂以sn-命名之代表分子.....	26
圖 2-3中心混層設計法之星點及中心點補充實驗圖.....	27
圖 3-1氣相層析儀分析sitostanyl butyrate之標準圖譜.....	35
圖 4-1反應時間對sitostanyl butyrate合成產率之影響，反應條件為：反應溫度45 °C、酵素用量30% sitostanol重以及基質莫耳數比為2.0(Acyl donor/Alcohol).....	48
圖 4-2酵素用量與反應時間對sitostanyl butyrate莫耳轉換率影響之反應曲面圖.....	49
圖 4-3酵素用量與反應溫度對Sitostanyl butyrate莫耳轉換率影響之反應曲面圖.....	50
圖 4-4酵素用量與反應溫度對sitostanyl butyrate莫耳轉換率影響之反應曲面圖.....	51
圖 4-5 Sitostanyl butyrate百分比莫耳轉換率之等高線圖。在等高線圖內之數字是用來表示不同的反應條件下之重量轉換率.....	52
表目錄	
表 2-1植物固醇相關上市產品一覽表.....	23
表 2-2中心混層設計之補充實驗.....	24
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.....	33
表 3-2 Sitostanyl butyrate之五階層四變數中心混層實驗設計數據.....	34
表 4-1 Sitostanyl butyrate百分比莫耳轉換率對合成變數之變異數分析.....	45
表 4-2 Sitostanyl butyrate合成變數之聯合檢測分析.....	46
表 4-3利用脊形分析評估合成sitostanyl butyrate莫耳轉換率之最大值.....	47

## 參考文獻

參考文獻 1. 王騰旭。2000。由大豆油脫臭蒸餾物分離植物固醇之研究:第5–21頁。國立台灣大學農業化學研究所碩士論文。台北，臺灣。 2. 王正方、王惠珠、李嘉展、孫芳明、陳政雄、劉世銓、駱錫能、韓建國及蘇正德。2001。新編食品化學。第345–347頁。華格

那企業有限公司。台中，臺灣。3. 江文德。1999。脂肪酶在油脂加工上的應用。食品工業月刊。31:10 – 19。4. 行政院衛生署。2004。民國九十三年臺灣地區死亡原因統計。行政院衛生署衛生統計資訊網。 <http://www.doh.gov.tw/statistic/data/死因摘要/93年/表1.xls> 5. 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。6. 李根永和李孟修。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。7. 洪佃玠。2003。利用幾丁聚醣固定脂肪分解酵素之研究:第2 – 8頁。國立清華大學化學工程研究所碩士論文。新竹，臺灣。8. 楊宗熙。2000。植物固醇與降低膽固醇之應用。食品工業月刊。32:7 – 11。9. 董志宏。1991。植物固醇及其生理活性介紹。食品工業月刊。36:3 – 11。10. 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83 – 84頁。大葉大學食品工程研究所碩士論文。員林，臺灣。11. 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。12. 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), 13. Andriamiarina, R., Laraki, L., Pelletier, X. and Debry, G. 1989. Effects of stigmasterol-supplemented diets on fecal neutral sterols and bile acid extraction in rats. *Ann. Nutr. Metab.* 33: 297 – 303. 14. Bommarius, A. S. and Riebel, B. R. Biocatalysis. p. 7 – 11. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co, KGaA, Weinheim. 15. Bowman, L. and Geiger, E. 1984. Optimization of fermentation conditions of alcohol production. *Biotechnol. Bioeng.* 26: 1492 – 1497. 16. Box, G. E. P. and Wilson, K. B. 1951. On the experimental attainment optimum conditions. *J. Roy. Statist. Soc.*, B13: 1 – 45. 17. Box, G. E. P., Hunter, W. and Hunter, J. S. 1978. *Statistics for experimenters*. John Wiley and Sons, New York, USA. 18. Cheynier, 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. 19. Clifton, P. 2002. Plant sterol and stanols-comparison and contrasts. *Sterols versus stanols in cholesterol-lowering: is there a difference*. *Atherosclerosis. Supplements.* 3: 5 – 9. 20. Hallikainen, M., Sarkkinen, E., Wester, I. and Uusitupa, M. 2002. Short-term LDL cholesterol-lowering efficacy of plant stanol esters. *BMC. Cardiovasc. Disord.* 2: 1 – 14. 21. Himmelblau, D. M. 1970. *Process analysis by statistical methods*. p. 230 – 292. John Wiley and Sons, New York, USA. 22. Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G. and Gallo, L. L. 1988a. Inhibition of cholesterol absorption in rats by plant sterols. *J. Lipid Res.* 29: 1573 – 1582. 23. Ikeda, I., Tanaka, K., Sugano, M., Vahouny, G. and Gallo, L. L. 1988b. Discrimination between cholesterol and sitosterol for absorption in rats. *J. Lipid Res.* 29: 1583 – 1591. 24. Jogiekar, A. M. and May, A. T. 1987. Product excellence through design of experiments. *Cereal Food World.* 32: 857 – 868. 25. Li, Z. Y. and Ward, O. P. 1994. Synthesis of monoglyceride containing omega-3 fatty acid by microbial lipase in organic solvent. *J. Ind. Microbiol.* 13: 49 – 52. 26. Ling, W. H. and Jones, P. J. H. 1995. Dietary phytoosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci.* 57: 195 – 206. 27. McKee, T. and McKee, J. R. 2003. *Biochemistry: The molecular basis of life*, third edition. p. 402 – 411. McGraw-Hill, New York, USA. 28. Miettinen, T. A., Tilvis, R. S. and Kesaniemi, Y. A. 1990. Serum plant sterols and cholesterol precursors reflect cholesterol absorption and synthesis in volunteers of a randomly selected male population. *Am. J. Epidemiol.* 131: 20 – 31. 29. Miettinen, T. A. and Vanhanen, H. 1994. Dietary sitosterol related to absorption, synthesis and serum level of cholesterol in different apolipoprotein E phenotypes. *Atherosclerosis.* 105: 217 – 226. 30. Miettinen, T. A., Puska, P., Gylling, H., Vanhanen, H. and Vartiainen, E. 1995. Reduction of serum cholesterol with sitostanol-ester margarine in a mildly hypercholesterolemic population. *N. Engl. J. Med.* 333: 1308 – 1312. 31. Miettinen, T. A., Vanhanen, H. and Wester, I. 1996. Use of stanol fatty acid ester for reducing serum cholesterol level. U.S. Patent 5,502,045. 32. Montgomery, D. C. 1984. *Design and analysis of experiments*. John Wiley and Sons, New York, USA. 33. Moreau, R. A., Whitaker, B. D. and Hicks, K. B. 2002. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: structural diversity quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid. Res.* 41: 457 – 500. 34. Moresi, M., Colicchio, A. and Sansovini, F. 1980. Optimization of whey fermentation in a jar fermenter. *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 9: 173 – 183. 35. Nestel, P., Cehun, M., Pomeroy, S., Abbey, M. and Weldon, G. 2001. Original Communication Cholesterol-lowering effects of plant sterol esters and non-esterified stanols in margarine, butter and low-fat foods. *Eur. J. Clin. Nutr.* 55: 1084 – 1090. 36. Normen, L., Dutta, P., Lia, A. and Andersson, H. 2000. Soy sterol esters and sitostanol ester as inhibitors of cholesterol absorption in human small bowel. *Am. J. Clin. Nutr.* 71: 908 – 913. 37. Piironen, V., Toivo, J. and Lampi, A. M. 2000. Natural sources of dietary plant sterols. *J. Food. Comp. Anal.* 13: 619 – 624. 38. Richard, E. and Ostlund, Jr. 2002. Phytosterols in human nutrition. *Annu. Rev. Nutr.* 22: 533 – 549. 39. 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. 40. Shimada, Y., Hirota, Y., Baba, T., Sugihara, A., Moriyama, S., Tominaga, Y. and Terai, T. 1999. Enzymatic synthesis of steryl esters of polyunsaturated fatty acids. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 76: 713 – 716. 41. Thomson, D. 1982. Response surface experimentation. *J. Food Process. Preserv.* 6: 155 – 188. 42. Villeneuve, P. and Foglia, T. A. 1997. Lipase specificities : potential application in lipid bioconversions. *INFORM.* 8: 640 – 651. 43. Weber, N., Weitkamp, P. and Mukherjee, K. D. 2001. Fatty acid steryl, stanyl, and steroid esters by esterification by esterification and transesterification in vacuo using *Candida rugosa* lipase as catalyst. *J. Agric. Food Chem.* 49: 67 – 71. 44. Weber, N., Weitkamp, P. and Mukherjee, K. D. 2001. Steryl and stanyl esters of fatty acids by solvent-free esterification and transesterification in vacuo using lipases from *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica*, and *Carica papaya*. *J. Agric. Food Chem.* 49: 5210 – 5216. 45. Weber, N., Weitkamp, P. and Mukherjee, K. D. 2002. Cholesterol-lowering food additives: lipase-catalysed preparation of phytosterol and phytostanol esters. *Food Res. Int.* 35: 177 – 181. 46. Weststrate, J. A. and Meijer, G. W. 1998. Plant sterol-enriched margarines and reduction of plasma total- and LDL-cholesterol concentrations in normocholesterolaemic and mildly hypercholesterolaemic subjects. *Eur. J. Clin. Nutr.* 52: 334 – 343. 47. Zertuche, L. and Zall, R. R. 1985. Optimizing alcohol production from whey using computer technology. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 547 – 554.