

以反應曲面法探討酵素合成辛酸十六酯及異辛酸十六酯之最優化條件 = Response surface methodological approach for ...

陳信宏、吳建一;謝淳仁

E-mail: 9706902@mail.dyu.edu.tw

摘要

蠟酯是由長鏈脂肪酸與長鏈醇類結合而成，蠟酯類具有生物可分解、生物相容及無毒等特性。海鳥羽毛油為一種天然性蠟酯混合物，存在於自然界海鳥羽毛中。海鳥羽毛油主要成分為辛酸十六酯(包含辛酸十六酯及異辛酸十六酯)，並廣泛的用於化妝品工業，其具有潤滑、保溼、無毒等特性，因此，常做為化妝品中的基底油。海鳥羽毛油是由辛酸及十六醇經由直接酯化結合而成的長鏈蠟酯產物，辛酸十六酯與異辛酸十六酯通常由化學合成法或直接油天然物質萃取取得，近年來健康環保的意識抬頭，許多商品都講究天然，因此使用酵素催化合成法合成海鳥羽毛油，在近十年內被廣泛研究。本研究以兩種固定化脂解酵素(Lipozyme[®] RMIM和Novozym[®] 435)將辛酸(Octanoic acid)或異辛酸(2-Ethyl hexanoic acid)與十六醇(Cetyl alcohol)以直接酯化方式合成辛酸十六酯和異辛酸十六酯，並且利用反應曲面法(Response surface methodology, RSM)、中心混成實驗設計法(Central composite rotatable design, CCRD)分別探討合成各反應參數對產率之影響，再以脊型分析(analysis of ridge max)以詳細探討酵素合成的最優化條件。實驗結果顯示，Novozyme[®] 435對於直鏈型海鳥羽毛油(Cetyl octanoate)的合成效率較Lipozyme[®] RMIM高，最優化反應條件在反應時間3.75 hr、反應溫度48.32 °C、基質莫耳比2.26 : 1和酵素用量41.77%時得到最高預估產率99.93 ± 2.74%，而經由實際實驗產率為98.24 ± 0.11 %；另外，使用Novozym[®] 435合成支鏈型海鳥羽毛油(Cetyl 2-ethylhexanoate)的最優化條件在反應時間2.65 day、反應溫度56.18 °C、基質莫耳比2.55 : 1和酵素用量251.39%時得到最高預估產率91.95 ± 4.30%，而經由實際實驗產率為89.75 ± 1.06 %。以上最優化反應條件結果可提供業界量化的參考，並且評估酵素合成法之可行性。

關鍵詞：蠟酯;辛酸十六酯;異辛酸十六酯;酯化反應;脂解酵素;反應曲面法;中心混成實驗設計

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 | xiv | 1. 緒論 | 1 | 2. 文獻探討 | 6 | 2.1 化妝品柔膚劑 | 6 | 2.1.1 化妝品基底油 | 7 | 2.1.2 海鳥羽毛油 | 7 | 2.1.3 辛酸與十六醇 | 8 | 2.2 酵素 | 8 | 2.2.1 酵素催化之優點 | 9 | 2.2.2 脂解酵素 | 9 | 2.2.3 固定化酵素之優點 | 10 | 2.2.4 Lipozyme [®] RMIM簡介 | 11 | 2.2.5 Novozym [®] 435簡介 | 12 | 2.3 相關研究 | 12 | 3. 材料與儀器 | 16 | 3.1 材料與方法 | 17 | 3.1.1 藥品 | 17 | 3.1.2 儀器設備 | 17 | 3.2 實驗設計與方法 | 18 | 3.2.1 合成與分析方法 | 19 | 3.2.2 產率計算 | 20 | 3.3 酵素活性分析 | 21 | 4. 結果與討論 | 29 | 4.1 以Lipozyme [®] RMIM催化辛酸與十六醇合成海鳥羽毛油 | 29 | 4.1.1 時間對使用Lipozyme [®] RMIM合成辛酸十六酯產率之影響 | 29 | 4.1.2 分子篩對使用Lipozyme [®] RMIM合成辛酸十六酯產率之影響 | 29 | 4.1.3 使用Lipozyme [®] RMIM合成辛酸十六酯之分析 | 33 | 4.1.4 使用Lipozyme [®] RMIM合成辛酸十六酯最優化探討 | 42 | 4.2 以Novozym [®] 435催化辛酸與十六醇合成海鳥羽毛油 | 46 | 4.2.1 使用Novozym [®] 435合成辛酸十六酯之分析 | 46 | 4.2.2 使用Novozym [®] 435合成辛酸十六酯最優化探討 | 56 | 4.3 使用Lipozyme [®] RMIM與Novozym [®] 435合成辛酸十六酯之比較 | 59 | 4.4 以Novozym [®] 435催化異辛酸與十六醇合成海鳥羽毛油 | 62 | 4.4.1 酵素用量與分子篩對於異辛酸十六酯產率之影響 | 62 | 4.4.2 使用Novozym [®] 435合成異辛酸十六酯之分析 | 66 | 4.4.3 使用Novozym [®] 435合成異辛酸十六酯最優化探討 | 76 | 4.5 直鏈與支鏈海鳥羽毛油最優化條件化比較 | 77 | 5. 結論 | 81 | 參考文獻 | 83 | 圖目錄 | 圖1-1以辛酸做為基質，經脂解酵素催化合成辛酸十六酯 | 3 | 圖1-2以異辛酸做為基質，經脂解酵素催化合成異辛酸十六酯 | 4 | 圖1-3實驗架構圖 | 5 | 圖3-1辛酸十六酯(Cetyl octanoate)之氣相層析儀標準圖譜 | 27 | 圖3-2異辛酸十六酯(Cetyl 2-ethylhexanoate)之氣相層析儀標準圖譜 | 28 | 圖4-1時間對使用辛酸合成辛酸十六酯之產率影響 | 31 | 圖4-1分子篩對使用辛酸合成辛酸十六酯之產率影響 | 32 | 圖4-3使用Lipozyme [®] RMIM合成辛酸十六酯之產率實驗值與觀測值比較模型 | 37 | 圖4-4反應時間及反應時間及酵素用量對辛酸十六酯產率影響之反應曲面圖 | 39 | 圖4-5反應時間及分子篩用量對辛酸十六酯產率影響之反應曲面圖 | 40 | 圖4-6反應溫度及基質莫耳比對辛酸十六酯產率影響之反應曲面圖 | 41 | 圖4-7使用Lipozyme [®] RMIM合成辛酸十六酯之等高線曲線圖 | 44 | 圖4-8使用Novozym [®] 435合成辛酸十六酯之產率實驗值與觀測值模型 | 50 | 圖4-9反應時間及基質莫耳比對辛酸十六酯產率影響之反應曲面圖 | 53 | 圖4-10反應時間及酵素用量對辛酸十六酯產率影響之反應曲面圖 | 54 | 圖4-11反應溫度及酵素用量對辛酸十六酯產率影響之反應曲面圖 | 55 | 圖4-12使用Novozym [®] 435合成辛酸十六酯之等高線曲線圖 | 57 | 圖4-13酵素用量與分子篩對於使用Novozym [®] 435合成異辛酸十六酯之產率影響 | 64 | 圖4-14酵素用量對於使用Novozym [®] 435合成異辛酸十六酯之產率影響 | 65 | 圖4-15使用Novozym [®] 435合成異辛酸十六酯之產率實驗值與觀測值模型 | 69 | 圖4-16反應時間及反應溫度對異辛酸十六酯產率影響之反應曲面圖 | 73 | 圖4-17反應溫度及基質莫耳比對異辛酸十六酯產率影響之反應曲面圖 | 74 | 圖4-18反應溫度及酵素用量對異辛酸十六酯產率影響之反應曲面圖 | 75 | 圖4-19使用Novozym [®] 435合成異辛酸十六酯之等高線曲線圖 | 78 | 表目錄 | 表3-1辛酸十六酯合成之實驗設計反應參數實驗值之範圍 | 22 | 表3-2五階層五變數之中心混層實驗設計 | 23 | 表3-3辛酸十六酯合成之實驗設計 | |
|------|-----|-----|-----|------|----|------|----|----|------|----|----|-----|-----|-----|-----|-------|---|---------|---|------------|---|--------------|---|-------------|---|--------------|---|--------|---|---------------|---|------------|---|----------------|----|------------------------------------|----|----------------------------------|----|----------|----|----------|----|-----------|----|----------|----|------------|----|-------------|----|---------------|----|------------|----|------------|----|----------|----|--|----|---|----|--|----|--|----|--|----|--|----|--|----|--|----|---|----|---|----|-----------------------------|----|---|----|---|----|------------------------|----|-------|----|------|----|-----|----------------------------|---|------------------------------|---|-----------|---|--------------------------------------|----|--|----|-------------------------|----|--------------------------|----|---|----|------------------------------------|----|--------------------------------|----|--------------------------------|----|--|----|---|----|--------------------------------|----|--------------------------------|----|--------------------------------|----|---|----|--|----|--|----|---|----|---------------------------------|----|----------------------------------|----|---------------------------------|----|--|----|-----|----------------------------|----|---------------------|----|------------------|--|

反應參數實驗值之範圍24 表3-4五階層四變數之中心混層實驗設計25 表3-5異辛酸十六酯合成之實驗設計反應參數實驗值之範圍26 表4-1使用Lipozyme? RMIM合成辛酸十六酯之實驗值與預測值35 表4-2使用Lipozyme? RMIM合成辛酸十六酯之產率對合成變數之變異分析36 表4-3使用Lipozyme? RMIM合成辛酸十六酯變數之聯合檢測分析38 表4-4利用脊型分析評估使用Lipozyme? RMIM合成辛酸十六酯之產率最大值45 表4-5使用Novozym? 435合成辛酸十六酯之實驗值與預測值49 表4-6使用Novozym? 435合成辛酸十六酯之產率對合成變數之變異分析51 表4-7使用Novozym? 435合成辛酸十六酯變數之聯合檢測分析52 表4-8利用脊型分析評估使用Novozym? 435合成辛酸十六酯之產率最大值58 表4-9使用Lipozyme? RMIM與Novozym? 435合成辛酸十六酯之最優化比較62 表4-10使用Novozym? 435合成異辛酸十六酯之實驗值與預測值68 表4-11使用Novozym? 435合成異辛酸十六酯之產率對合成變數之變異分析70 表4-12使用Novozym? 435合成異辛酸十六酯變數之聯合檢測分析71 表4-13辛酸十六酯合成變數之聯合檢測分析比較72 表4-14利用脊型分析評估使用Novozym? 435合成異辛酸十六酯之產率最大值79 表4-15支鏈型與直鏈型海鳥羽毛油之最優化條件比較80

參考文獻

1. 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。高雄，台灣。
2. 陳國誠。2000。生物固定化技術與產業應用。第121—155頁。茂昌圖書有限公司。台北，台灣。
3. 許德發，鄭智交，楊濟華，李仰川，溫慧萍，許照紅。2003。化妝品概論。第105—128頁。華格那企業有限公司。台中，台灣。
4. 張麗卿。1998。現代化妝品概論。高立圖書有限公司。第159頁，第173頁，第174頁。
5. 楊正剛。2006。已連續式填充床反應器探討月桂酸己酯之最優化酵素合成:第4—28頁。大葉大學生物產業科技研究所碩士論文。彰化，台灣。
6. 謝至涵。2005。以反應曲面法探討月桂酸己酯之最優化酵素合成。第4—8頁:第15—23頁。大葉大學生物產業科技研究所碩士論文。
7. 吳宗達。2007。以連續式填充床生物反應器探討脂解酵素催化生質柴油之最優化合成:第15—28頁。大葉大學生物產業科技研究所碩士論文。彰化，台灣。
8. Novo Nordisk company web site <http://www.novozymes.com>
9. Basri, M., Rahman, R. N. Z. R. A., Ebrahimpour, A., Salleh, A. B., Gunawan, E. R., Rahman, M. B. A. 2007. Comparison of estimation capabilities of response surface methodology (RSM) with artificial neural network (ANN) in lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. BMC Biotechnology 7, art. no. 53.
10. Berglund, P., Holmquist, M. and Hult, K. 1998. Reversed enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase supports different modes of binding enantiomers of a chiral acyl donor. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 5:283 – 287.
11. Bourg-Garros, S., Razafindramboana, N. and Pavia, A. A. 1998. Optimization of lipase-catalyzed synthesis of (z)-3-hexen-1-yl acetate by direct esterification in hexane and a solvent free medium. Enzyme and Microbial Technology 22:240-245.
12. Carri'n, M. E. and Crapiste, G. H. 2008. Enzymatic acidolysis of sunflower oil with a palmitic-stearic acid mixture. Journal of Food Engineering 84:243-249.
13. Ciafardini, G., Zullo, B. A., Iride, A. 2006. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. Food Microbiology 23:60-67.
14. Chang, H. M., Liao H. F., Lee C. C. and Shieh C. J. 2005. Optimized synthesis of lipase-catalyzed biodiesel by Novozym 435. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 80:307-312.
15. Chang, S. W., Shaw, J. F., Yang, K. H., Shih, I. L., Hsieh, C. H. and Shieh, C. J. 2005. Optimal lipase-catalyzed formation of hexyl laurate. Green Chemistry 7:547-551.
16. Chang, S.W., Shaw, J. F., Yang, C. K. and Shieh, C. J. 2007. Optimal continuous biosynthesis of hexyl laurate by a packed bed bioreactor. Process Biochemistry 42:1362-1366.
17. Chang, S. F., Chang, S. W., Yen, Y. H. and Shieh, C. J. 2007. Optimum immobilization of *Candida rugosa* lipase on Celite by RSM. Applied Clay Science 37:67-73.
18. Cheong, L. Z., Tan, C. P., Long, K., Yusoff, M. S. A., Arifin N., Lo S. K. and Lai O. M. 2007. Production of a diacylglycerol-enriched palm olein using lipase-catalyzed partial hydrolysis: Optimization using response surface methodology. Food Chemistry 105:1614-1622.
19. Daneshfar, A., Ghaziaskar, H.S., Shiri, L., Manafi, M.H., Nikorazm, M. and Abassi, S. 2007. Synthesis of 2-ethylhexyl-2-ethylhexanoate catalyzed by immobilized lipase in n-hexane: A kinetic study. Biochemical Engineering Journal 37:279-284.
20. Diano?czki, C., Recseg, K., Kova?ri, K and Poppe, L. 2007. Convenient enzymatic preparation of conjugated linoleic acid alkyl esters with C6 – C22 alcohols. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic 45:45-49.
21. Decagny, B., Jan, S., Vuilleumard, J. C., Sarazin, C., Seguin, J. P., Gosselin, C., Barbotin, J. N. and Ergon, F. Synthesis of wax ester through triolein alcoholysis: Choice of the lipase and study of the mechanism. Enzyme and Microbial Technology 22: 578-582.
22. Duan, Y., Du, Z., Yao Y., Li, R. and Wu D.. 2006. Effect of molecular sieve on lipase-catalyzed esterification of rutin with stearic acid. Agricultural and Food Chemistry 54:6219-6225.
23. Garcia, T., Coteron, A., Martinez, M. and Aracil, J. 2000. Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst. Chemical Engineering Science 55:1411-1423.
24. Ghamgui, H., Miled, N., Rebai", A., Karra-chaabouni, M. and Gargouri, Y. 2006. Production of mono-olein by immobilized *Staphylococcus simulans* lipase in a solvent-free system Optimization by response surface methodology. Enzyme and Microbial Technology 39:717-723.
25. Guncheva, M. H. and Zhiryakova D. 2008. High-yield synthesis of wax esters catalysed by modified *Candida rugosa* lipase. Biotechnology Letter 30:509 – 512.
26. Gunawan, E. R., Basri, M., Abd. Rahman, M. B., Salleh, A. B. and Abd. Rahman, R. N.Z. 2005. Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. Enzyme and Microbial Technology 37:739-744.
27. Gu"venc , A., Kapucua, N., Kapucub, H., Aydog(an a, O"., and Mehmetog(lu, U". 2007. Enzymatic esterification of isoamyl alcohol obtained from fusel oil: Optimization by response surface methodology. Enzyme and Microbial Technology 40:778-785.
28. Hadzir, N. M., Basri, M., Rahman, M. B. A., Razak, C. N. A., Rahman, R. N. Z. A., Salleh, A. B. 2001. Enzymatic alcoholysis of triolein to produce wax ester. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 76:511-515.
29. Isono, Y., Nabetani, H., Nakajima, M. 1995. Lipase-surfactant complex as catalyst of interfacial esterification in organic media. Journal of Fermentation and Bioengineering 2:170-175.
30. Joeng, G. T. and park, D. H. 2006. Response surface methodological approach for optimization of enzymatic synthesis of sorbitan

methacrylate. *Enzyme and Microbial Technology* 39:381-386. 31. Kiran, K. R., Manohar, B. and Divakar S. 2001. A central composite rotatable design analysis of lipase catalyzed synthesis of lauroyl lactic acid at bench-scale level. *Enzyme and microbial technology* 29 122-128. 32. Kim, B. H. and Akoh C. C. 2007. Modeling and optimization of lipase-catalyzed synthesis of phytosteryl ester of oleic acid by response surface methodology. *Food Chemistry* 102:336-342. 33. Kim, M. S., Kim, J. S., You, Y. H., Park, H.J., Lee, S., Park, J. S., and Hwang, S. J. 2007. Development and optimization of a novel oral controlled delivery system for tamsulosin hydrochloride using response surface methodology. *International Journal of Pharmaceutics* 341:97-104. 34. Palocci, C., Falconi, M., Chronopoulou L. and Cernia, E. 2008. Lipase-catalyzed regioselective acylation of tritylglycosides in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 45:88-93. 35. Petersson, A. E. V., Gustafsson, L. M., Nordblad, M., Borjesson, P., Mattiasson, B. and Adlercreutz, P. 2005. Wax esters produced by solvent-free energy-efficient enzymatic synthesis and their applicability as wood coatings. *Green Chemistry* 7:837-843. 36. Radzi, S. M., Basri, M., Salleh, A.B., Ariff, A., Mohammad, R., Abd. Rahman, M. B., and Abd. Rahman, R. N.Z.R. 2005. High performance enzymatic synthesis of oleyl oleate using immobilized lipase from *Candida antarctica*. *Electronic Journal of Biotechnology* 8:292-298. 37. Rajendran, A. and Thangavelu, V. 2007. Sequential optimization of culture medium composition for extracellular lipase production by *Bacillus sphaericus* using statistical methods. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 82:460-470. 38. Salis, A., Solinas, V. and Monduzzi, M. 2003. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 21:167-174. 39. Shih, I. L., Hung S. H., Chen, F. Y., Ju, H. Y., Shieh, C. J. 2007. Optimized synthesis of lipase-catalyzed L-menthyl butyrate by *Candida rugosa* lipase. *Food Chemistry* 100:1223-1228. 40. Torres, C. and Otero, C. 1999. Part I. Enzymatic synthesis of lactate and glycolate esters of fatty alcohols. *Enzyme and Microbial Technology* 25:745-752. 41. Villeneuve, P., Muderhwa, J. M., Graille, J., Haas, M. J., 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 9: 113 – 148. 42. Wissing, S.A. and Muller, R. H. 2002. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vivo skin penetration. *Journal of Controlled Release* 81:225-233.