

# 超臨界二氧化碳環境下以酵素法合成辛酸十六酯之最優化研究

朱炫威、謝淳仁；顏裕鴻

E-mail: 9805612@mail.dyu.edu.tw

## 摘要

酯類化合物現今已被廣泛應用在食品、化妝品及製藥等工業上，但目前業界多以化學合成法進行酯化反應，其反應需添加有機溶劑及較高的反應溫度，且副產物除了會造成分離純化的困難外，亦有環境汙染的問題。而使用酵素法其反應條件溫和、產物單純，也不會造成環境汙染。但在一般的酵素反應系統中仍會使用到有機溶劑，而超臨界二氧化碳具有高擴散性、低黏性、無汙染、不燃性以及高選擇性等良好溶劑之特性，且可利用溫度與壓力的變化來調整流體之性質，因此超臨界二氧化碳代替一般有機溶劑則能克服以上缺點。此外，在超臨界流體中，反應物的質傳快，可提高酵素反應之速度，且反應後易與溶劑分離，因此超臨界流體近年來逐漸成為生物科技之研究重點。本研究利用超臨界二氧化碳做為溶劑，並以固定化脂解酵素做為催化劑，以辛酸(Octanoic acid)與十六醇(Cetyl alcohol)以直接酯化方式合成辛酸十六酯，並且利用反應曲面法(Response surface methodology, RSM)及三階層三變數之Box-Behnken實驗設計分別探討各合成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。實驗結果顯示反應溫度與酵素用量對於產率有顯著的影響，相較之下反應壓力對於產率的影響並不明顯，而其中反應溫度的影響又比酵素用量大。根據脊型分析得到的最優化反應條件；為在反應時間20分鐘下，反應壓力1482.44 psi、反應溫度63.70 °C及酵素用量11.20%時預估出最優化產率97.55 ± 1.11%，而實際以此條件所進行之反應數據為99.47 ± 0.05%。在本研究中証明了在超臨界二氧化碳系統中可提高酯化反應的速率，且對於辛酸十六酯可縮短相當多的反應時間，而酵素用量也大幅的減少，相對於一般有機溶劑系統節省了相當多的成本，若能結合生物反應器，設計出連續式的大量生產系統，相信對於工業化的量產必定能有助於節省成本及提高產量。

關鍵詞：超臨界二氧化碳；辛酸十六酯；酯化反應；脂解酵素；反應曲面法

## 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	xi	表目錄	xii	1. 緒論	1	2. 文獻探討	5	2.1 海鳥羽毛油	6	2.2 酵素	7	2.2.1 脂解酵素	8	2.2.2 固定化酵素之優點	8	2.2.3 NovozymR 435簡介	9	2.2.4 LipozymeR RMIM簡介	10	2.3 酵素反應溶劑的選擇	10	2.4 超臨界流體(SCF)系統	11	2.4.1 技術原理	12	2.4.2 超臨界流體的特性	13	2.5 脂解酵素在超臨界流體中之酵素酯化反應	17	2.5.1 超臨界二氧化碳的溶解能力	17	2.5.2 脂解酵素在超臨界二氧化碳中酯化反應的影響因子	18	2.6 反應曲面法之應用	19	2.7 相關研究	23	3. 材料與方法	28	3.1 材料與儀器	28	3.1.1 藥品	28	3.1.2 儀器設備	28	3.2 實驗方法	29	3.2.1 初步實驗	29	3.2.2 實驗設計	30	3.2.3 合成與分析方法	30	3.2.4 產率計算	33	3.3 統計分析	35	4. 結果與討論	36	4.1 初步實驗	36	4.1.1 壓力對三種不同固定化脂解酵素反應產率的影響	36	4.1.1.1 壓力對使用NovozymR 435催化合成之產率影響	36	4.1.1.2 壓力對使用LipozymeR RMIM催化合成之產率影響	37	4.1.1.3 壓力對使用Lipase IM-77催化合成之產率影響	38	4.1.1.4 壓力對脂解酵素之綜合比較	38	4.1.2 溫度對使用NovozymR 435催化合成之產率影響	39	4.2 使用NovozymR 435合成辛酸十六酯之反應曲面分析	43	4.3 使用NovozymR 435合成辛酸十六酯最優化探討	52	5. 結論	57	5.1 酯化反應在超臨界二氧化碳中反應的影響因子	58	5.1.1 基質溶解度之影響	58	5.1.2 壓力之影響	58	5.1.3 溫度之影響	59	5.2 結論與未來展望	59	參考文獻	61
------	-----	-----	-----	------	----	------	----	----	------	----	----	-----	----	-----	-----	-------	---	---------	---	-----------	---	--------	---	------------	---	----------------	---	----------------------	---	------------------------	----	---------------	----	------------------	----	------------	----	----------------	----	------------------------	----	--------------------	----	------------------------------	----	--------------	----	----------	----	----------	----	-----------	----	----------	----	------------	----	----------	----	------------	----	------------	----	---------------	----	------------	----	----------	----	----------	----	----------	----	-----------------------------	----	------------------------------------	----	--------------------------------------	----	------------------------------------	----	----------------------	----	----------------------------------	----	----------------------------------	----	--------------------------------	----	-------	----	--------------------------	----	----------------	----	-------------	----	-------------	----	-------------	----	------	----

## 參考文獻

1. 王浩昱。2002。在超臨界二氧化碳流體中以脂解酵素催化合成乙酸己酯之研究。第13 - 15頁；第42 - 43頁。大葉大學食品工程學系研究所碩士論文。彰化，台灣。
2. 田蔚城。1997。生物技術概論。生物技術的發展與應用。1:2。
3. 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。
4. 金順志、陳政群。1999。『難處理廢棄物超臨界處理技術』報告。工研院環安中心科專計畫報告。第二章。
5. 邱郁雯。1997。脂肪酵素在超臨界流體中之酵素反應。食品工業月刊。第29卷第6期。第18 - 25頁。
6. 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。
7. 陳惠晴。1998。超臨界二氧化碳中酵素催化反應機理的研究。第87 - 89頁。清華大學化學工程學系研究所碩士論文。北京，中國。
8. 陳惠晴、楊基礎。1999(a)。超臨界二氧化碳中脂肪酵素催化反應的研究。清華大學學報(自然科學版)。第39卷第6期。第28 - 31頁。
9. 陳惠晴、楊基礎。1999(b)。超臨界二氧化碳的溶劑特性對脂肪酵素催化反應的影響。清華大學學報(自然科學版)。第39卷第6期。第31-34頁。
10. 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。
11. 陳信宏。2008。以反應曲面法探討酵素合成辛酸十六酯之最優化條件。第7 - 8頁；第46 - 48頁。大葉大學生物產業科技研究所碩士論文。
12. 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。
13. 曾

繁銘。2002。超臨界流體與應用發展趨勢。工研院能環所。第二章。14.傅紅和裘愛泳。2004。超臨界酵素法酯交換合成結構脂質中酵素活力的研究。中國油脂。第29卷第2期。第59 - 63頁。15.萬忠民和雲志。2004。脂肪酸在超臨界二氧化碳中的平衡溶解度的測定。中國糧油學報。第19卷第1期。第75 - 78頁。16.廖怡禎。1996。超臨界流體在酵素反應上的應用。食品工業月刊。第28卷第1期。第21 - 26頁。17.廖怡禎。1997。超臨界流體技術在台灣食品工業之發展與未來應用的展望。第29卷第8期。第38 - 46頁。18.談駿嵩。2002。超臨界流體的應用。『科學發展』。359期。第12 - 17頁。19.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。20.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. 21.Box G.E.P. and Wilson K.B. 1951. On the experimental attainment optimum conditions. J. Roy. Statist. Soc., 13: 1-45. 22.Burgess K., Henderson I. Ho K.K. 1992. Biocatalytic resolution of sulfinylakanoates: a facile route to optically active sulfoxides, J. Org. Chem. 57: 1290-1295. 23.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 Chem. 7: 547-551. 24.Chiaa G.L., Maja H., ?eljko K. 2007. Immobilized lipase-mediated long-chain fatty acid esterification in dense carbon dioxide: bench-scale packed-bed reactor study. J. Supercrit. Fluid. 41: 74-81. 25.Ciafardini G., Zullo B.A., Iride A. 2006. Lipase production by yeasts from extra virgin olive oil. Food Microb. 23: 60-67. 26.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. J. Mol. Catal. B-Enzym. 45: 45-49. 27.Dordick J.S. 1989. Enzymatic catalysis in monophasic organic solvents. Enzyme Microb. Tech. 11: 194-221. 28.Ghamgui H., Miled N., Rebai A., Karra-chaabouni M., Gargouri Y. 2006. Production of mono-olein by immobilized Staphylococcus simulans lipase in a solvent-free system Optimization by response surface methodology. Enzyme Microb. Tech. 39: 717-723. 29.Gunawan E.R., Basri M., Abd. Rahman M.B., Salleh A.B., Abd. Rahman R.N.Z. 2005. Study on response surface methodology (RSM) of lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. Enzyme Microb. Tech. 37: 739-744. 30.Guncheva M.H., Zhiryakova D. 2008. High-yield synthesis of wax esters catalysed by modified Candida rugosa lipase. Biotechnol Lett. 30: 509 - 512. 31.Hadzi 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. J. Chem. Technol. and Biot. 76: 511-515. 32.Hajar S., Mahdi K., Hasan S.G., and Marzieh R. 2009 .Optimization of enzymatic synthesis of cocoa butter analog from camel hump fat in supercritical carbon dioxide by response surface method (RSM). J. Supercrit. Fluid 49: 209-215. 33.Himmelblau D.M. 1970. Process analysis by statistical methods. John Wiley and Sons, New York. 230-292. 34.Huan P.T. and Gerd B. 2008. Sugar fatty acid ester synthesis in high-pressure acetone - CO<sub>2</sub> system. J. Supercrit. Fluid 48: 36-40. 35.Isono Y., Nabetani H., Nakajima M. 1995. Lipase-surfactant complex as catalyst of interfacial and esterification in organic media. J. Ferment. Bioeng. 2: 170-175. 36.Joeng G.T., Park D.H. 2006. Response surface methodological approach for optimization of enzymatic synthesis of sorbitan methacrylate. Enzyme Microb. Tech. 39: 381-386. 37.Jogiekar A.M., May A.T. 1987. Product excellence through design of experiments. Cereal Food World. 32: 857-868. 38.Jones J.B. 1986. Enzymes in organic synthesis. Tetrahedron. 42: 3351-3403. 39.Kirchner G., Scollar M.P., Klibanov A.M. 1985. Resolution of racemic mixtures via lipase catalysis in organic solvents. J. Am. Chem. Soc. 107: 7072-7076. 40.Klibanov A.M., Samokhin G.P., Martinek K., Berezin I.V. 1977. A new approach to preparative enzymatic synthesis. Biotechnol. Bioeng. 19: 1351-1361. 41.Klibanov, A.M. 1983. Basic biology of new developments in biotechnology. Plenum. New York. 497-517. 42.Kraut J. 1988. How do enzymes work ?. Science 242: 533-540. 43.Maja H., Sa?a ?, Muzafera P., Mateja P., ?eljko K. 2007. Lipase-catalyzed esterification of citronellol with lauric acid in supercritical carbon dioxide/co-solvent media. J. Supercrit. Fluid 43: 199-203. 44.Maja H., Sa?a ?, Mijuel A., ?eljko K. 2008. Enzymatic synthesis of citronellol laurate in organic media and supercritical carbon dioxide. J. Biocheml. Eng. 42: 6-12. 45.Maja H., Sa?a ?, ?eljko K. 2008. Enzymatic synthesis of sugar fatty acid esters in organic solvent and in supercritical carbon dioxide and their antimicrobial activity. J. Supercrit. Fluid 45: 338-345. 46.Malcolm, D. L. 1994. Advances in biotransformation processes. Chem. Eng. Sci.49: 151-159. 47.Mukherjee K.D. 1998. Lipid biotechnology. In “ Food lipids: chemistry, nutrition, and biotechnology. ” C.C. Akoh and D.B. Min edited. Marcel Dekker, New York. 589-640. 48.Novo Nordisk company web site <http://www.novozymes.com> 49.Petersson A.E.V., Gustafsson L.M., Nordblad M., Borjesson P., Mattiasson B., Adlercreutz P. 2005. Wax esters produced by solvent-free energy-efficient enzymatic synthesis and their applicability as wood coatings. Green Chem. 7: 837-843. 50.Price, N.C. and Stevens, L. 1982. Fundamentals of enzymology. Oxford Univ., Oxford: 119-148, 414-429. 51.Salis A., Solinas V., Monduzzi M. 2003. Wax esters synthesis from heavy fraction of sheep milk fat and cetyl alcohol by immobilized lipase. J. Mol. Catal. B-Enzym. 21: 167-174. 52.Shieh C.J., Akoh C.C., Lee L.N. 1996. Optimized enzymatic synthesis of geranyl butyrate with lipase from Candida rugosa. Biotechnol. Bioeng. 51: 371-374. 53.Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas, M.J., 2000. Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. J. Mol. Catal. B-Enzym. 9: 113 - 148. 54.Vivek Rathore, Giridhar Madras. 2007. Synthesis of biodiesel from edible and non-edible oils in supercritical alcohols and enzymatic synthesis in supercritical carbon dioxide. Fuel. 86:2650-2659. 55.Wissing S.A., Muller R.H. 2002. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: in vivo skin penetration. J. Control. Release 81: 225-233.