

CHỌN LỌC DÒNG VI KHUẨN VÀ TỐI ƯU HÓA PHẢN ỨNG TỔNG HỢP TINH CHẤT BẠC HÀ (*L-MENTHOL*) TỪ HỖN HỢP RACEMIC MENTHYL BENZOATE

Ngô Thị Minh Thu^{1,2*}, Zheng Gaowei², Xu Jianhe²

¹Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học Huế

²Viện nghiên cứu Chất xúc tác Sinh học và Kỹ thuật Sinh học, Trường Đại học Khoa học và Công nghệ

Hoa Đông, Thượng Hải, Trung Quốc

*Email: minhthu8863@gmail.com

TÓM TẮT

L-menthol (tinh dầu bạc hà) do có hương thơm độc đáo, đặc tính làm mát và công dụng tốt nên được sử dụng rộng rãi trong ngành công nghiệp hương liệu. Công nghệ sản xuất *L-menthol* bằng phương pháp sinh học như quy trình xúc tác sinh học được các nhà khoa học trên thế giới chú ý. Mục tiêu nghiên cứu của đề tài này là phân lập từ đất chúng vi khuẩn có thể tổng hợp *L-menthol* từ *dl-menthyl benzoate* với hiệu suất và tính chọn lọc đối quang cao. Từ môi trường đất, chúng tôi đã phân lập và chọn lọc được dòng vi khuẩn thể hiện hoạt tính và tính chọn lọc đối quang tốt hơn so với các dòng vi khuẩn khác. Dòng vi khuẩn này được định danh thuộc loài *Acinetobacter* sp. và đặt tên là *Acinetobacter* sp. ECU2040. Ảnh hưởng của pH, nhiệt độ và chất hoạt động bề mặt lên quá trình phản ứng cũng được khảo sát. Kết quả cho thấy: pH, nhiệt độ và chất hoạt động bề mặt tối ưu phù hợp cho dòng vi khuẩn này lần lượt là 7,5; 37°C và Tween-80 nồng độ 0,5%.

Từ khóa: chọn lọc đối quang, *L-menthol*, phân lập vi khuẩn, xúc tác sinh học

1. MỞ ĐẦU

L-menthol (tinh dầu bạc hà) là một chất tạo hương cực kỳ phổ biến và quan trọng. Nhờ đặc tính làm mát và hương thơm độc đáo, tinh dầu bạc hà được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp dược phẩm, thực phẩm, sản phẩm thuốc lá, mỹ phẩm và các sản phẩm răng miệng [1].

Hiện nay, việc tổng hợp *L-menthol* thường theo ba hướng chính: chiết xuất từ thực vật tự nhiên, tổng hợp hóa học và tổng hợp thông qua con đường sinh học. Sự chiết xuất hương liệu đặc biệt là tinh dầu bạc hà từ nguồn thực vật tự nhiên đã bắt đầu từ thời cổ đại. Đến khoảng năm 1970, do sự mất mùa của cây bạc hà đồng thời nhu cầu sử dụng ngày càng tăng cao tạo nên sự thiếu hụt nghiêm trọng và đẩy giá tinh dầu bạc hà lên rất cao [2]. Cũng trong thời gian này nhờ sự tiến bộ nhanh chóng của ngành công nghiệp tổng hợp hóa hữu cơ, hai nhà sản xuất lớn Haarmann và Reimer (H&R) và Takasago International Co. đạt được bước đột phá trong việc sản xuất *L-menthol* bằng phương pháp tổng hợp hóa học và đã đầu tư đáng kể để sản xuất hương liệu này trên quy mô lớn [2].

Tuy nhiên do sự thiếu ổn định của nguồn cung cấp tự nhiên và sự ô nhiễm môi trường do quá trình tổng hợp bằng phương pháp hóa học gây ra, việc sản xuất các chất bằng phương pháp xanh, sạch – tổng hợp bằng phương pháp xúc tác sinh học (biocatalytic methods) được các nhà khoa học trên thế giới chú ý, nghiên cứu và sử dụng ngày càng rộng rãi [2, 3]. Tổng hợp bằng phương pháp xúc tác sinh học với những đặc điểm như thân thiện với môi trường, tiêu thụ năng lượng thấp, chi phí thấp, ít chất thải, lộ trình đơn giản hơn và chọn lọc hóa học cao đã làm cho phương pháp này chiếm lợi thế hơn hẳn và ngày càng thu hút được sự chú ý của giới khoa học cũng như các nhà sản xuất [3-5].

Các phương pháp thường dùng để tổng hợp *l*-menthol bằng tổng hợp xúc tác sinh học là ester hóa chọn lọc chất đồng phân đối hình (enantioselective esterification), chuyển ester chọn lọc chất đồng phân đối hình (enantioselective transesterification) của hợp chất bạc hà (racemic menthol) hoặc bằng phương pháp thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối hình (enantioselective hydrolysis) từ các racemic menthyl ester (racemic menthyl esters). Các nghiên cứu về những phương pháp này đã được công bố với số lượng khá lớn và một số đã được đưa thành quy trình sản xuất [6-10].

Mục tiêu của nghiên cứu của chúng tôi là tìm ra chủng vi khuẩn có thể xúc tác cho quá trình thủy phân của *dl*-menthyl benzoate cho ra *l*-menthol với các hoạt động thủy phân và tính chọn lọc đối quang (enantioselectivity) cao. Đề tài nghiên cứu của chúng tôi cũng mong muốn tìm ra các thông số phản ứng khác nhau ảnh hưởng đến quá trình thủy phân chọn lọc đối quang *dl*-menthyl benzoate, bao gồm cả độ pH, nhiệt độ, chất hoạt động bề mặt, để từ đó có thể đưa ra quy trình sản xuất *l*-menthol tối ưu với hiệu suất cao và tính chọn lọc đối quang tốt.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Các dòng vi khuẩn được phân lập từ đất có khả năng thủy phân chọn lọc đối quang đối với hỗn hợp menthyl benzoate triền quang

2.2. Phương pháp nghiên cứu

2.2.1. Hóa chất và trang thiết bị nghiên cứu

- Hóa chất: *dl*-Menthol, *dl*-Menthyl benzoate, *dl*-Menthyl chloroacetate, *dl*-menthyl acetate, *dl*-menthyl propionate, *dl*-menthyl butyrate and *dl*-menthyl succinate, acetic anhydride, peptone, DMSO (Dimethyl sulfoxide), Tween-80, Gum arabic, Triton X100, PEG-400 (Polyethylene glycol 400), SDS (Sodium dodecyl sulfate), KH_2PO_4 , NaCl, MgSO_4 , Na_2SO_4 , tryptone, yeast extract và một số hóa chất khác.

- Trang thiết bị chủ yếu: Sắc kí bản mỏng (Thin layer chromatography (TLC)); Sắc kí khí (Gas chromatography (GC)); điện di, hệ thống Real-time PCR, phá vỡ tế bào bằng sóng siêu âm và một số thiết bị khác.

2.2.2. Các bước tiến hành nghiên cứu

(1) Thu thập mẫu đất: mẫu đất được thu thập từ nhiều vùng, nhiều điều kiện môi trường khác nhau, mẫu đất phải được lấy ở dưới bề mặt đất khoảng 20 cm.

(2) Xác định mẫu đất có vi khuẩn có khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate tạo *l*-menthol. Mẫu đất sau khi được thu thập về sẽ được lắc trong môi trường chọn lọc, trong đó *dl*-menthyl benzoate là nguồn carbon. Quá trình này được lặp lại 2 vòng đối với mỗi mẫu đất. Sản phẩm được tách chiết bằng ethyl acetate và kiểm định bằng phương pháp sắc kí bản mỏng TLC [4]. Dựa vào màu sắc và độ đậm nhạt của điểm menthol trên bản sắc kí sẽ kết luận mẫu đất nào có vi khuẩn có khả năng tổng hợp tinh chất bạc hà. Môi trường chọn lọc: *dl*-menthyl benzoate 10 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2 g/L, KH_2PO_4 2 g/L, MgSO_4 0,5 g/L, NaCl 1 g/L, DMSO 5% (v/v), trace element 1 mL/L, pH 7,0 [3].

(3) Phân lập vi khuẩn bằng phương pháp hộp trái: Mẫu đất sau khi được kiểm định có khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate tiếp tục sử dụng kỹ thuật hộp trái để phân lập các dòng vi khuẩn đơn. Dựa trên màu sắc, độ lớn bé của khuẩn lạc để lựa chọn nhiều dòng vi khuẩn đơn khác nhau. Những dòng vi khuẩn đơn này được tiếp tục cấy lên đĩa agar để kiểm tra độ thuần của dòng vi khuẩn và sau cùng sẽ được nuôi trong môi trường giàu dinh dưỡng để thu sinh khối. Môi trường: Tryptone 15 g/L, Yeast extract 5 g/L, NaCl 1 g/L, KH_2PO_4 0,5 g/L, MgSO_4 0,2 g/L, Agar agar 1,5 g/L pH 7,0, hấp trong nồi áp suất ở 121°C trong 20 phút [11].

(4) Chọn lọc sơ cấp: Sau khi thu sinh khối, tiếp tục sử dụng môi trường chọn lọc để thực hiện phản ứng chọn ra những dòng vi khuẩn đơn có khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate tạo *l*-menthol. Kết quả được kiểm định bằng sắc kí bản mỏng TLC.

(5) Chọn lọc thứ cấp: Sau khi xác định được dòng vi khuẩn nào có hoạt tính đối với *dl*-menthyl benzoate, sản phẩm sẽ được tách chiết ra khỏi môi trường nuôi cấy bằng ethyl acetate và kiểm tra hiệu suất (Conversion %) cũng như có lượng dư đối quang của sản phẩm ee_p (enantiomeric excess of product) bằng phương pháp sắc kí khí (GC) [12].

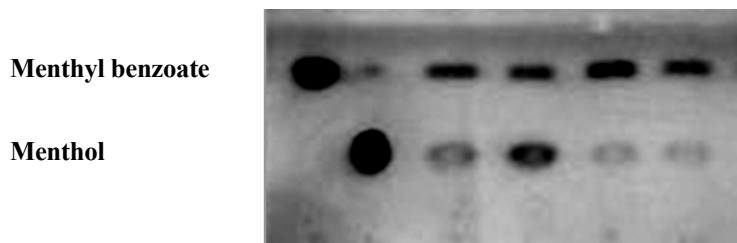
(6) Định danh dòng vi khuẩn: Khảo sát vùng gen 16S rDNA để định danh dòng vi khuẩn. Vùng gen 16S rDNA sau khi được tách xuất ra khỏi tế bào bằng "genomic DNA extraction kit" sẽ được khuếch đại bằng phương pháp PCR và chuyển vào *E. coli* DH5 α . Trình tự vùng 16S rDNA được phân tích bởi công cụ Basic Local Alignment Search Tool trên website National Center for Biotechnology Information (NCBI). Các trình tự gen tham khảo được lấy từ cơ sở dữ liệu GenBank và được tiến hành so sánh bằng phần mềm CLUSTAL W phiên bản 1.81. Cây phả hệ được xây dựng bởi MEGA phiên bản 3.1 [13].

(7) Tối ưu hóa phản ứng: Ảnh hưởng của pH (5,0 – 8,5), nhiệt độ (20–50°C) và 6 loại hóa chất hoạt động bề mặt (DMSO, Tween-80, Gum arabic, Triton X100, PEG-400, và SDS) lên độ phân giải *dl*-menthyl benzoate được khảo sát để xác định môi trường phản ứng tối ưu đối với dòng vi khuẩn đã chọn.

2.3. Xử lý số liệu: bằng phương pháp thống kê và sử dụng phần mềm SPSS.

3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Phân lập vi khuẩn từ đất và chọn lọc sơ cấp



Hình 1. Phương pháp sắc ký bản mỏng xác định sự tồn tại của tinh chất bạc hà sau khi sử dụng các dòng vi khuẩn để thủy phân *dl*-menthyl benzoate

Bảng 1. Kết quả phân lập vi khuẩn dòng đơn và chọn lọc sơ cấp

Khả năng thủy phân <i>dl</i> -menthyl benzoate của các dòng vi khuẩn đã phân lập	Số lượng dòng vi khuẩn
Hoạt tính cao (+++)	32
Hoạt tính trung bình (++)	41
Hoạt tính thấp (+)	56
Không xác định (-)	212

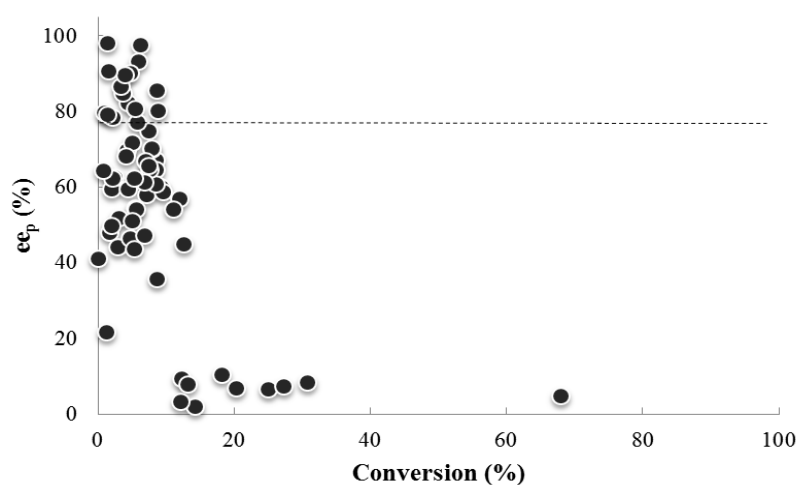
Từ hơn 200 mẫu đất lấy ở nhiều vùng khác nhau, thông qua hai vòng nuôi cấy bằng môi trường giàu dinh dưỡng đã phân lập được 341 dòng vi khuẩn. Sau khi chọn lọc sơ bộ bằng môi trường chất nền là 10 mM *dl*-menthyl benzoate và xác định hoạt độ bằng phương pháp sắc ký bản mỏng (TLC), dựa vào điểm đậm nhạt trên bản sắc ký để xem xét khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate của các dòng vi khuẩn trên (Hình 1). Kết quả cho thấy rằng, đã phát hiện ra 129 dòng có khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate cho ra tinh dầu bạc hà trong đó: Hoạt tính cao (32 dòng), hoạt tính trung bình (41 dòng), hoạt tính thấp (56 dòng); Không xác định (212 dòng) (Bảng 1).

3.2. Chọn lọc thứ cấp và xác định dòng đích

Từ 129 dòng có khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate đã qua chọn lọc sơ bộ, chúng tôi tiếp tục chọn lọc thứ cấp để chọn ra các dòng vi khuẩn đích tốt nhất (Hình 2). Chúng tôi sử dụng sắc ký khí (GC) để làm công cụ cho việc xác định lượng dư đối quang của sản phẩm ee_p và hiệu suất. Kết quả cho thấy chỉ có 13 dòng có lượng dư đối quang của sản phẩm ee_p trên 80% và hiệu suất khoảng 8%.

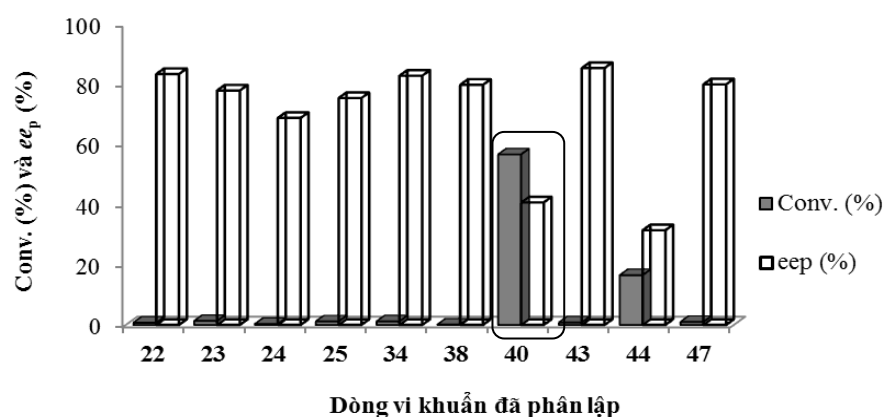
Sau khi thu được 13 dòng vi khuẩn trên, chúng tôi tiến hành tách chiết enzyme thô từ 13 dòng này và tiếp tục lặp lại phản ứng cho đến khi tìm được dòng vi khuẩn với hiệu suất cao và tính chọn lọc đối quang tốt nhất (Hình 2). Phản ứng được tiến hành với 10 mM *dl*-menthyl benzoate và 25 g/L enzyme thô trong môi trường đệm sodium phosphate (2 mL, pH 7,0, 100 mM) trong ống nghiệm 10 mL ở điều kiện 180 rpm, 30°C, 24 h. Kết quả cho thấy dòng vi khuẩn được

đánh dấu số hiệu 40 có hiệu suất và khả năng chọn lọc đối quang tốt nhất so với những dòng khác. Dòng vi khuẩn này được chúng tôi đặt tên ECU2040 để phục vụ cho việc nghiên cứu sau này.



Hình 2. Kết quả chọn lọc thứ cấp

Conversion (%): hiệu suất, ee_p (%): lượng dư đối quang của sản phẩm



Hình 3. Kết quả chọn lọc thứ cấp lần 2 để xác định dòng đích

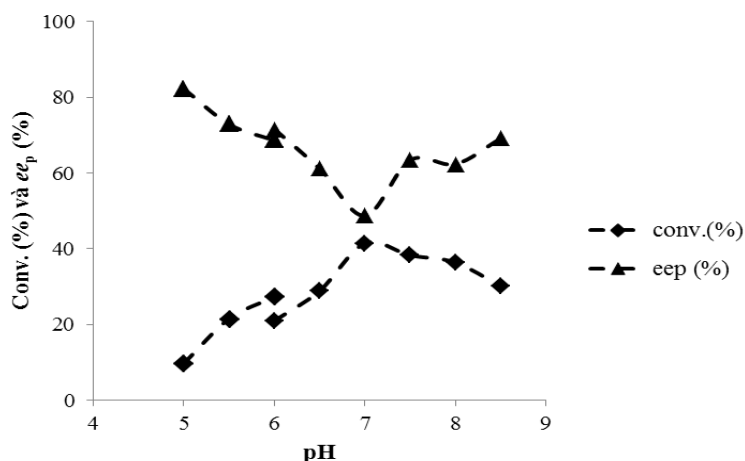
3.3. Khảo sát vùng gen 16S rDNA để định danh dòng vi khuẩn

Dòng ECU2040 đã được xác định là loài *Acinetobacter* sp. dựa trên sự giống nhau 99% của trình tự 16S rDNA với một số loài *Acinetobacter* đã được đăng ký tại cơ sở dữ liệu NCBI.

3.4. Tối ưu hóa quá trình phản ứng sinh học

3.4.1. Ảnh hưởng của pH

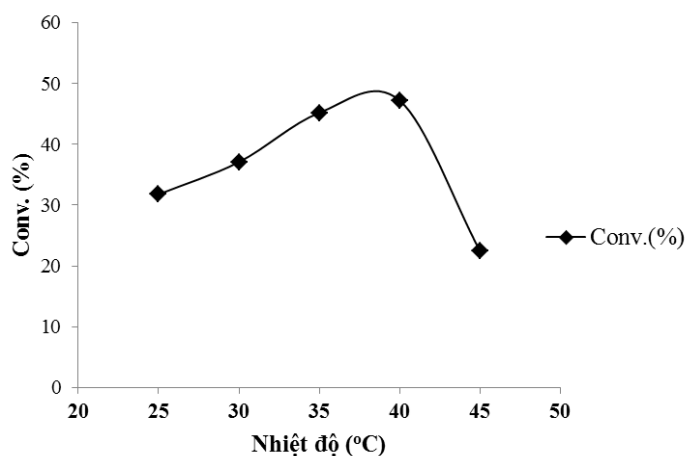
Ảnh hưởng của pH lên sự phân giải *dl*-menthyl benzoate cũng được nghiên cứu (Hình 4). Theo những báo cáo trước đây về sự phân giải các menthyl ester đối quang, pH và nhiệt độ có ảnh hưởng nghiêm trọng đối với hiệu suất và lượng dư đối quang ee [4, 12].



Hình 4: Ảnh hưởng của pH lên sự phân giải *dl*-menthyl benzoate của vi khuẩn

Theo hình 5, hiệu suất của phản ứng tăng lên rõ rệt (khoảng 40%) khi pH ở phạm vi 7,0-8,0. Ở pH 7,0 hiệu suất phản ứng là cao nhất (41,5%) nhưng ee_p khá thấp (48%), tuy nhiên, ở pH 7,5, hiệu suất phản ứng khoảng 38,5% và ee_p đã đạt đến 63%, hiệu suất phản ứng đạt được rất thấp ở $pH \leq 6,5$ hoặc $pH \geq 8,0$. Vì vậy, pH 7,5 được chọn là pH tối ưu cho các nghiên cứu về sau.

3.4.2. Ảnh hưởng của nhiệt độ



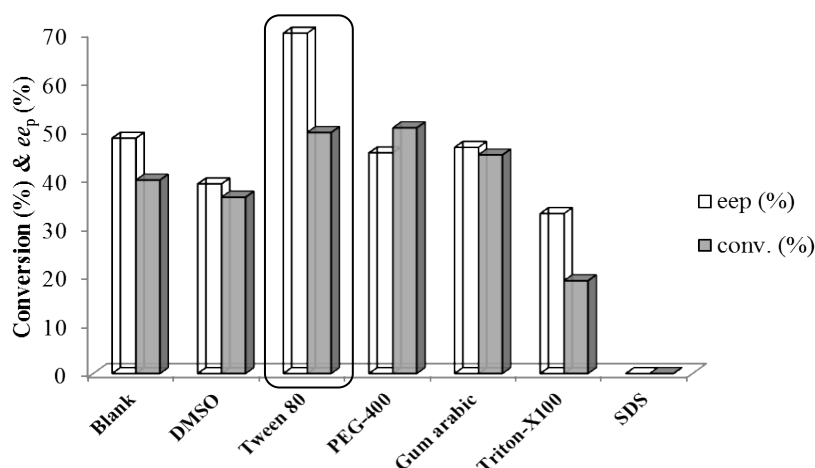
Hình 5. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên sự phân giải *dl*-menthyl benzoate của vi khuẩn

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến phản ứng ở nhiệt độ khác nhau (25, 30, 35, 40 và 45°C) cũng được nghiên cứu (Hình 5). Theo hình 5 cho thấy hiệu suất đã tăng gấp 1,6 lần với sự gia tăng nhiệt độ từ 25 đến 40°C. Hiệu suất tăng từ 35% đến 47% với sự gia tăng nhiệt độ từ 25°C đến 35°C, và không thay đổi đáng kể từ 35°C đến 40°C. Tuy nhiên, hiệu suất nhanh chóng giảm với sự gia tăng của nhiệt độ lên đến 45°C. Để hạn chế ảnh hưởng của nhiệt độ lên cấu trúc của enzyme và phù hợp với điều kiện hiện tại của phòng thí nghiệm, nhiệt độ 37°C được chọn là nhiệt độ tối ưu cho hệ thống phản ứng này ở các nghiên cứu tiếp theo.

3.4.3. Ảnh hưởng của chất hoạt động bề mặt

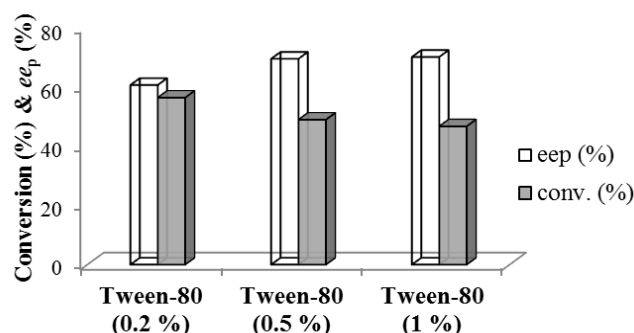
Chất nền *dl*-menthyl benzoate là chất không hòa tan trong nước nên gây khó khăn trong quá trình thực hiện phản ứng thủy phân do những enzyme của dòng vi khuẩn này hòa tan trong nước khó tiếp xúc mật độ cao với chất nền. Vì vậy chúng tôi đã có những nghiên cứu sử dụng thêm chất hoạt động bề mặt trong quá trình phản ứng nhằm gia tăng hiệu suất của phản ứng.

Chất hoạt động bề mặt thường là các hợp chất hữu cơ amphiphilic (hợp chất mang cả hai tính chất ưa nước và kỵ nước). Chất hoạt động bề mặt được dùng giảm sức căng bề mặt của một chất lỏng bằng cách làm giảm sức căng bề mặt tại bề mặt tiếp xúc (interface) của hai chất lỏng. Nếu có nhiều hơn hai chất lỏng không hòa tan thì chất hoạt động bề mặt làm tăng diện tích tiếp xúc giữa hai chất lỏng đó [14]. Chất hoạt động bề mặt có thể thúc đẩy sự hòa tan các chất kỵ nước vào trong nước [15, 16].



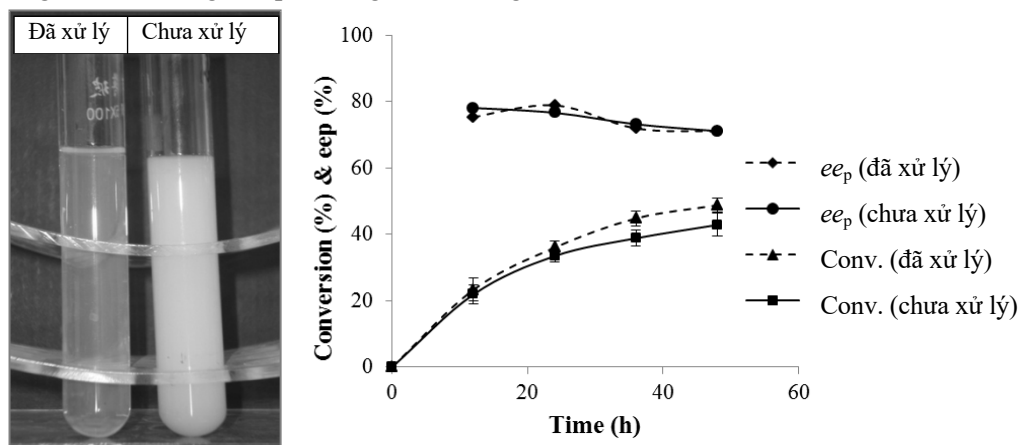
Hình 6. Ảnh hưởng của chất hoạt động bề mặt lên sự phân giải *dl*-menthyl benzoate của vi khuẩn

Trong thí nghiệm này, 6 loại hóa chất hoạt động bề mặt (DMSO, Tween-80, Gum arabic, Triton X100, PEG-400, và SDS) đã được chọn làm phụ gia cho các hệ thống phản ứng thủy phân. Ảnh hưởng của chất hoạt động bề mặt trong phản ứng thủy phân *dl*-menthyl benzoate được nghiên cứu và trình bày ở hình 6. Qua đồ thị ta có thể thấy hiệu suất (conversion %) của phản ứng sử dụng Tween-80, Gum arabic, PEG-400 cao hơn so với mẫu đối chứng (phản ứng không sử dụng các chất hoạt động bề mặt), trong đó ee_p đạt kết quả cao nhất (70%) khi sử dụng Tween-80. Các phản ứng sử dụng DMSO, Triton X100 và SDS đều có hiệu suất và ee_p thấp hơn mẫu đối chứng, đặc biệt ở phản ứng sử dụng SDS hiệu suất và ee_p là 0%. Vì vậy, Tween-80 được chọn làm chất hoạt động bề mặt cho các nghiên cứu tiếp theo.



Hình 7. Ảnh hưởng của nồng độ chất hoạt động bề mặt lên sự phân giải *dl*-menthyl benzoate của vi khuẩn

Ảnh hưởng của nồng độ Tween-80 (0,2%, 0,5%, 1,0%) trong hợp chất phản ứng đến hiệu suất phản ứng (Conv.%) và ee_p (%) cũng đã được tiến hành nghiên cứu (Hình 7). Qua đồ thị cho thấy, hiệu suất phản ứng dưới ảnh hưởng của nồng độ 0,2% Tween-80 là 56% và giảm ở các nồng độ tiếp theo lần lượt là 49% và 46%. Trong khi đó ee_p tại nồng độ 0,2% Tween-80 là 60% và tăng lên 70% ở hai nồng độ tiếp theo. Qua kết quả như trên nồng độ 0,5% Tween-80 được chọn làm nồng độ để bổ sung vào phản ứng ở các thí nghiệm sau.



Hình 8. Ảnh hưởng của độ hòa tan của chất nền sau khi được xử lý bằng sóng siêu âm đến hiệu suất (Conv. %) và lượng dư đối quang của sản phẩm ee_p (%).

Việc gia tăng mức độ hòa tan trong nước của chất nền *dl*-menthyl benzoate là rất quan trọng đối với hiệu suất của phản ứng, vì vậy phương pháp dùng sóng siêu âm đồng hóa chất nền vào trong nước cũng được tiến hành khảo sát (Hình 8). Hỗn hợp bao gồm *dl*-menthyl benzoate, Tween-80 (0,5%) và dung dịch đệm được xử lý bằng sóng siêu âm trong vòng 20 phút sau đó ngay lập tức được đưa đi làm phản ứng. Kết quả được trình bày ở hình 8. Hỗn hợp trước khi được xử lý bằng sóng siêu âm có màu trắng sữa, biểu đạt cho độ hòa tan kém của các hợp chất tồn tại trong đó; hỗn hợp sau khi đã được xử lý bằng sóng siêu âm chuyển sang màu trong hơn cho thấy độ hòa tan các chất trong hỗn hợp đó được cải thiện đáng kể. Độ hòa tan của chất nền ảnh hưởng nhẹ đến hiệu suất của phản ứng. Phản ứng có chất nền được xử lý bằng sóng siêu âm cao hơn so với chưa được xử lý là 49% so với 42%.

5. KẾT LUẬN

Từ môi trường đất, đã phân lập được 341 dòng vi khuẩn dòng đơn, phát hiện ra 129 dòng có khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate cho ra tinh dầu bạc hà. Sau khi tiến hành chọn lọc thứ cấp dòng vi khuẩn được đánh số 40 hiển thị hoạt tính và tính chọn lọc đối quang tốt hơn so với các dòng vi khuẩn khác. Dòng vi khuẩn này đã được định danh thuộc loài *Acinetobacter* sp. và đặt tên là *Acinetobacter* sp. ECU2040.

Quá trình tối ưu hóa điều kiện phản ứng thông qua việc khảo sát sự ảnh hưởng của pH, nhiệt độ, chất hoạt động bề mặt lên quá trình phản ứng được khảo sát, kết quả cho thấy pH, nhiệt độ và chất hoạt động bề mặt tối ưu phù hợp cho dòng vi khuẩn này lần lượt là 7,5, 37°C và Tween-80 nồng độ 0,5%. Dòng vi khuẩn *Acinetobacter* sp. ECU2040 đã cho thấy khả năng tổng hợp được tinh chất bạc hà với hiệu suất và tính chọn lọc đối quang cao.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1]. Clark, G. (1988). Menthol, *Perfum flavor*, 13, tr. 37–46.
- [2]. Lawrence, B.M. (2006). *Mint-the genus mentha*, CRC Press.
- [3]. Serra, S., C. Fuganti, and E. Brenna (2005). Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances, *Trends in Biotechnology*, 23, 4, tr. 193–198.
- [4]. Zheng, G.W., H.L. Yu, J.D. Zhang, and J.H. Xu (2009). Enzymatic production of *l*-menthol by a high substrate concentration tolerable esterase from newly isolated *Bacillus subtilis* ECU0554, *Advanced Synthesis & Catalysis*, 351, 3, tr. 405–414.
- [5]. Nidetzky, B. and H. Schwab (2007). Special issue: Enzyme technology and biocatalysis, *Journal of Biotechnology*, 129, 1, tr. 1–2.
- [6]. Xu, J., T. Kawamoto, and A. Tanaka (1995). High-performance continuous operation for enantioselective esterification of menthol by use of acid anhydride and free lipase in organic solvent, *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, tr. 639–643.
- [7]. Kamiya, N., M. Goto, and F. Nakashio (1995). Surfactant-coated lipase suitable for the enzymatic resolution of menthol as a biocatalyst in organic media, *Biotechnology progress*, 11, tr. 270–275.
- [8]. Wu, W.H., C.C. Akoh, and R.S. Phillips (1996). Lipase-catalyzed stereoselective esterification of *dl*-menthol in organic solvents using acid anhydrides as acylating agents, *Enzyme and Microbial Technology*, 18, tr. 538–539.
- [9]. Babali, B., H.A. Aksoy, M. Tüter, and G. Ustun (2001). Enzymatic esterification of (–)-menthol with fatty acids in solvent by a commercial lipase from *Candida rugosa*, *Journal of the american oil chemists' society*, 78, tr. 53–56.
- [10]. Lü, Z., Y. Chu, Y. Han, Y. Wang, and J. Liu (2005). Enzymatic esterification of *dl*-menthol with propionic acid by lipase from *Candida cylindracea*, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 80, 12, tr. 1365–1370.
- [11]. Zheng, G.W., *Discovery of Bacillus subtilis esterase and enzymatic preparation of l-menthol*. 2010, East China University of Science and Technology: Shanghai.

- [12]. Yu, L., Y. Xu, X. Wang, and X. Yu (2007). Highly enantioselective hydrolysis of *dl*-menthyl acetate to *l*-menthol by whole-cell lipase from *Burkholderia cepacia* ATCC 25416, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 47, 3–4, tr. 149–154.
- [13]. Zheng, G.W., J. Pan, H.L. Yu, M.T. Ngo Thi, C.X. Li, and J.H. Xu (2010). An efficient bioprocess for enzymatic production of *l*-menthol with high ratio of substrate to catalyst using whole cells of recombinant *E. coli*, *Journal of Biotechnology*, 150, 1, tr. 108–114.
- [14]. Wikipedia, *the free encyclopedia*. Surfactant. <http://en.wikipedia.org/wiki/Surfactant>.
- [15]. Déziel, E., Y. Comeau, and R. Villemur (1999). Two-liquid-phase bioreactors for enhanced degradation of hydrophobic/toxic compounds *Biodegradation*, 10, 3, tr. 219–233.
- [16]. Van Hamme, J.D. and O.P. Ward (2001). Physical and metabolic interactions of *Pseudomonas* sp. strain JA5-B45 and *Rhodococcus* sp. strain F9-D79 during growth on crude oil and effect of a chemical surfactant on them, *Applied and Environmental Microbiology*, 67, 10, tr. 4874–4879.

SCREENING OF STRAINS FOR ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF RACEMIC MENTHYL BENZOATE TO PRODUCT L-MENTHOL AND OPTIMIZATION OF REACTION CONDITION

Ngo Thi Minh Thu^{1,2}, Gao-Wei Zheng², Jian-He Xu²

¹Faculty of Biology, Hue Science University

²Laboratory of Biocatalysis and Bioprocessing, State Key Laboratory of Bioreactor Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai, PR China

ABSTRACT

Menthol and mint oils are widely used in the flavor industry, because of their pleasant flavor and aroma as well as cooling-anesthetic effect, and biocatalytic processes for production of l-menthol are more interested nowadays. Herein, we attempted to develop a biocatalytic process for production of l-menthol through enantioselective hydrolysis of dl-menthyl benzoate using a strain newly isolated from soil. From soil samples, we were isolated one strain exhibited the best hydrolytic activity and excellent enantioselectivity as compared to others. So, it was selected as the best enzyme producer and subsequently identified as Acinetobacter sp. based on the 99% similarity of its 16S rDNA sequence, and named Acinetobacter sp. ECU2040. The catalytic properties of Acinetobacter sp. ECU2040 were also studied. The obtained results show that the optimum pH and temperature of reaction were 7.5 and 37°C, respectively. The optimum surfactant for helping the substrate dispersion was Tween-80 at 0.5% concentration (w/v), followed by homogenization of the mixture with ultrasonic wave.

Keywords: biocatalytic methods, enantioselective, isolated strain, l-menthol.