

東海大學食品科學系研究所
Graduate Institute of Food Science
Tunghai University

食品科技組
Food Technology Section

碩士論文
Master Thesis

藉由反應曲面法及類神經網路探討 α -胰凝乳蛋白酶催化合成具
降血壓活性的二肽衍生物(*N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂)之最適化研究

Optimization of α -chymotrypsin-synthesized dipeptide derivative
(*N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂) with blood pressure-lowering activity by response
surface methodology and artificial neural network

指導教授：江文德 博士

謝淳仁 博士

Advisor : Wen-Dee Chiang, Ph. D.

Chwen-Jen Shieh, Ph. D.

研究生：胡世浩 撰

Graduate Student : Shih-Hao Hu

中華民國一百零一年六月

June, 2012

碩士論文指導教授推薦書

食品科學研究所科技組 胡世浩 君所提之論文

藉由反應曲面法及類神經網路探討 α -胰凝乳蛋白酶催化合成具降血壓活性的二肽衍生物(N -Ac-Phe-Tyr-NH₂)之最適化研究

係由本人指導撰述，同意提付審查

此致

食品科學研究所所長：胡世浩

指導教授：胡世浩

中華民國一百零一年六月七日

碩士論文考試委員審定書

食品科學碩士班食品科技組 胡世浩 君所提之論文

藉由反應曲面法及類神經網路探討胰凝乳
蛋白酶催化合成具降血壓活性的二肽衍生
物(N-Ac-Phe-Tyr-NH₂)之最適化研究

經本委員會審定通過，特此證明。

論文考試委員會

委員：

蔣政堯 弘光科技大學食品科學系副教授

賴進成 食品工業發展研究所資深研究員

蔡正宗 珍果生技股份有限公司研發長

指導教授：

Dr. 文浩
謝清仁

中華民國一百零一年六月七日

謝誌

兩年的碩士生涯這段期間裡受到許多人的幫助，因為有大家我才順利完成論文，在此由衷的感謝大家。首先要感謝的是指導教授 江文德博士及謝淳仁博士，這兩年的時間裡，不論是研究上、做人處事或演講口才方面皆從您們身上學到了不少，使得學生在研究與生活上受益良多！謝謝老師們這兩年來的包容、指導及照顧，在此學生深深感謝兩位老師。

接下來要感謝幫我審閱論文的口試委員 - 食品工業發展研究所 賴進此博士、弘光科技大學食品科技系 蔡政志博士以及珍果生技股份有限公司 蔡正宗博士，謝謝您們抽出時間審閱我的論文，還抽空來幫我口試，委員們在論文上給予相當多的寶貴建議，因為您們的建議，使得本論文內容更加地豐富與完整，非常感謝，辛苦各位口試委員了。

然後我要感謝恆儀學長教我實驗及儀器使用方法，在實驗設計方面也給了我不少意見，儘管畢業了也常常幫我解決許多實驗問題，和家宏學長在實驗上大力相助以及手稿撰寫上的指導，還有玉旻，我們一起畢業了，在這段期間妳也辛苦了，也謝謝妳幫我解圖譜還有一些化學上的問題，當然還有抱元、俐婷以及助理晟毅、小瑩、文欣及心汝，謝謝你們幫我處理一些實驗以外的事情，讓我能專心做實驗。也要感謝書涵學長、志剛學長、敬哲學長、豪駿學長、怡樺學姐、佑年學姐、巧馨學姐、芄萱學姐及瀟菽學姐，真的很謝謝你們在研究生生活中除了給予我研究上許多的建議和幫助，也帶給我許多難忘的回憶如送舊餐會和出遊。感謝可愛的慈樺和超正的惠旻，因為我常不在東海，許多計劃妳們都幫我分擔了，辛苦妳們也非常感謝妳們，我才能順利畢業。敏純、依旻及虹每，在這段期間謝謝你們帶給實驗室許多歡笑，以後江家就靠妳們了，好險今年老師收了兩名壯丁。感謝我許多的羽球伙伴們，在我低潮時陪我打球，消除壓力，還有兩名帥哥室友飛碟哥和修明哥，謝謝你們願意跟我一起同住一個屋簷下，以及許多親愛的朋友，常常關心我的近況如何，給我許多支持和鼓勵，謝謝大家如此關心及照顧小弟我，在此深深感激各位。

最後我要感謝我父母的支持，我的爸爸及媽媽，給予我生活上所需的一切，在這段期間，我比較少回家，對爸媽感到很抱歉，非常非常感謝你們的栽培及愛護，沒有你們就沒有今天的我，兒子未來必定會好好孝順及照顧你們。

胡世浩 謹至於
東海大學食品科學研究所
中華民國一百零一年七月

目錄

目錄.....	i
圖目錄.....	iv
表目錄.....	vii
中文摘要.....	viii
Abstract.....	x
壹、前言.....	1
貳、文獻回顧.....	4
一、胜肽.....	4
二、酵素在有機溶劑之表現行為.....	6
三、胜肽合成.....	10
(一)化學合成.....	10
(二)酵素合成.....	12
四、 α -chymotrypsin 及其相關研究.....	15
(一) α -chymotrypsin 水解及相關研究.....	15
(二) α -chymotrypsin 合成及相關研究.....	18
五、ACE 及其抑制劑.....	20
(一)ACE 生化特性.....	20
(二)ACE 抑制原理.....	21

六、實驗設計(Experimental Design).....	22
(一)單體形心設計(Simplex Centorid Design).....	22
(二)反應曲面法(Response Surface Methodology; RSM).....	22
(三)中心混成實驗設計(Central Composite Design; CCD)....	24
七、類神經網路.....	26
(一)神經元模型.....	26
(二)類神經網路之架構.....	29
(三)倒傳遞類神經網路.....	32
參、材料與方法.....	40
一、實驗架構.....	40
二、實驗藥品及材料.....	42
(一)藥品.....	42
(二)試劑.....	42
三、儀器設備.....	43
四、實驗方法.....	43
(一)最適化溶劑混合實驗.....	43
(二)最適化生產條件實驗.....	46
(三)合成產物之分析方法.....	47
(四)產率計算.....	48

(五)類神經網路.....	49
肆、結果與討論	52
一、溶劑選擇.....	52
二、最適化溶劑探討	52
三、最適化生產條件探討	60
(一)單一因子探討.....	61
(二)多因子及其交互作用探討.....	66
四、類神經網路	77
(一)循環次數	77
(二)轉換函數	81
(三)神經元個數及訓練模式	81
(四)倒傳遞類神經網路分析	84
伍、結論.....	93
陸、參考文獻.....	94

圖目錄

圖 1、氨基酸的一般構造式	5
圖 2、固相勝肽合成法	11
圖 3、Chymotrypsin 的催化水解機制	17
圖 4、酵素催化合成及水解反應機制	19
圖 5、單體形心設計	23
圖 6、中心混成實驗設計	25
圖 7、生物神經元之結構圖	27
圖 8、人工神經元構成圖	31
圖 9、前饋式網路	33
圖 10、回饋式網路	34
圖 11、最適化溶劑混合實驗設計架構圖	40
圖 12、最適化生產條件實驗設計架構圖	41
圖 13、(a) 等高線圖 及 (b) 曲面圖分析對合成 <i>N</i> -Ac-Phe-Tyr-NH ₂	58
圖 14、最適化比例及預測產率之分析	59
圖 15、反應時間對 Phe-Tyr 產率之影響	62
圖 16、反應溫度對 Phe-Tyr 產率之影響	63
圖 17、酵素用量對 Phe-Tyr 產率之影響	65

圖 18、基質莫耳數比值對 Phe-Tyr 產率之影響	67
圖 19、在基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.5、酵素用量 100 U 下 反應溫度與反應時間對 <i>N</i> -Ac-Phe-Tyr-NH ₂ 產率之影 響	72
圖 20、在基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.5、反應時間 8 min 下 反應溫度與酵素用量對 <i>N</i> -Ac-Phe-Tyr-NH ₂ 產率之影 響	74
圖 21、在反應時間 8 min、酵素用量 100 U 下反應溫度與基 質莫耳數比值對 <i>N</i> -Ac-Phe-Tyr-NH ₂ 產率之影響 ...	75
圖 22、 <i>N</i> -Ac-Phe-Tyr-NH ₂ 產率之等高線圖	76
圖 23、二胜肽產率之最大反應脊型評估	78
圖 24、循環次數與隱藏層神經元數對(a)R ² (b)RMSE(c)AAD 之影響	80
圖 25、轉換函數與隱藏層神經元數對(a)R ² (b)RMSE(c)AAD 之影響	82
圖 26、訓練模式與隱藏層神經元數對(a)R ² (b)RMSE(c)AAD 之影響	83
圖 27、倒傳遞類神經網路架構	86
圖 28、在 Neuralpower [®] 中基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.5、酵	

	素用量 100 U 下反應溫度與反應時間對 <i>N</i> -Ac-Phe-Tyr-NH ₂ 產率之影響	88
圖 29、	在 Neuralpower [®] 中基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.5、反 應時間 8 min 下反應溫度與酵素用量對 <i>N</i> -Ac-Phe-Tyr-NH ₂ 產率之影響	89
圖 30、	在 Neuralpower [®] 中反應時間 8 min、酵素用量 100 U 下反應溫度與基質莫耳數比對 <i>N</i> -Ac-Phe-Tyr-NH ₂ 產 率之影響	90
圖 31、	在 Neuralpower [®] 中不同變數對於二肽產率的重要性 百分率	91

表目錄

表 1、常用有機溶劑之 log P 值	9
表 2、三變數混合溶劑實驗設計	45
表 3、二胜肽衍生物產率之四變數五階層的中心混成實驗設計	50
表 4、溶劑選擇性對 α -chymotrypsin 合成 N -Ac-Phe-Tyr-NH ₂ 之產率影響	53
表 5、溶劑組成對 α -chymotrypsin 合成 N -Ac-Phe-Tyr-NH ₂ 之產率影響	55
表 6、最適化混合溶劑之變異數分析	56
表 7、最適化混合溶劑之單一因子及其交互作用分析	57
表 8、四變數五階層之中心混成實驗設計之二肽產率	68
表 9、二肽產率變數之變異數分析	70
表 10、二胜肽合成變數之聯合檢測分析	71
表 11、在類神經網路中 4 個獨立變數的實驗設計	79
表 12、類神經網路和反應曲面法之預測產率與實際產率的絕對偏差	85
表 13、類神經網路與反應曲面法最適化條件比較	92

中文摘要

本研究主要目的為利用 α -chymotrypsin 催化合成具有降血壓活性的二肽 Phe-Tyr，所使用的基質為 *N*-乙醯-苯丙胺酸乙酯 (*N*-Ac-Phe-OEt) 及 L-酪胺酸胺 (L-Tyr-NH₂)。首先挑選三種不同介質包括三羥甲基鹽酸鹽緩衝液 (tris-HCl buffer)、二甲基亞砜 (DMSO)、乙腈 (acetonitrile)，利用混合實驗設計法進行探討，結果顯示最大產率為 71.82%，溶劑比例為 acetonitrile、DMSO 及 tris-HCl buffer 各佔 25%、25% 及 50%，可得最適化。將上述溶劑比例配合五階層四變數之中心混層實驗設計法及反應曲面法，探討反應時間 (2~10 min)、反應溫度 (20~40°C)、酵素用量 (25~125 U) 及基質莫耳數比值 (Tyr/Phe=1~3) 對二肽產率之影響，結果指出反應時間、酵素用量和基質莫耳數比值對於二肽產率皆影響顯著，其中以反應時間影響最大；藉由脊型分析得知，最適化合成反應條件為反應時間 7.4 min，反應溫度 28.1°C，酵素用量 98.9 U 及基質莫耳數比值 (Tyr/Phe) 2.78，所得到的預測產率和實際產率分別為 87.6% 和 85.5%。最後利用類神經網路將 CCRD 數據代入分析，在倒傳遞式類神經網路下，以循環次數 10000 次、轉換函數為 Gaussian、訓練模式為 increment 及 10 個隱藏層神經元的條件下，其最適化反應條件為反應時間 7.11 min，合成溫度 27.1°C，酵素用量

118.9 U 及基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.83，而最佳產率為 89.7%(預測值)與 89.1%(實際值)。Absolute average deviation (AAD)的值愈低代表此模式預測愈精確，artificial neural network(ANN)的 AAD 值為 0.9601%更優於 RSM 的 2.5281%，因此倒傳遞類神經網路比反應曲面法更適合解釋本研究之數據。

Abstract

The purpose of this study was to synthesize a dipeptide, Phe-Tyr, with ACE (angiotensin I-converting enzyme) inhibitory activity from N-acetyl phenylalanine ethyl ester (*N*-Ac-Phe-OEt) and L-tyrosinamide (L-Tyr-NH₂) via α -chymotrypsin biocatalysis. The mixture response surface methodology was applied to determine the optimum solvent for *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ synthesis. At first three kinds of solvents including tris-HCl buffer (80 mM, pH 9.0), dimethyl sulfoxide (DMSO), and acetonitrile were used in this study. The result showed the optimum solvent percentage for tris-HCl buffer, DMSO and acetonitrile were 25%, 25% and 50%, respectively. The maximum 71.82% of molar production of *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ could be achieved in the mixture solvent. The selected mixture solvent was then used to synthesize *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂. Response surface methodology (RSM) and five-level-four-factor central composite rotatable design (CCRD) were employed to evaluate the effect of synthesis parameters, such as reaction time (2~10 min), temperature (20~40°C), enzyme activity (25~125 U) and substrate molar ratio (Tyr/Phe= 1~3), on percentage molar conversion of *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂. Based on a ridge max analysis, the optimum synthesis condition included an incubation time of 7.4 min, a reaction temperature of 28.1°C, an enzyme activity of 98.9 U, and substrate molar ratio(Tyr/Phe) of 2.78. The predicted and the actual (experimental) yields were 87.6 and 85.5%, respectively. Finally, CCRD data were analyzed by the back-propagation artificial neural networks with the conditions including cycle number of

10,000 times, Gaussian transfer function, Increment training mode and 10 hidden layer neurons . The optimal reaction conditions were reaction time of 7.11 min, the synthesis temperature of 27.1°C, the enzyme amount of 118.9 U and the substrate mole ratio of (Tyr/Phe) 2.83. The predicted and the actual yields were 89.7% and 89.1%, respectively. The absolute average deviation (AAD) value of artificial neural network(ANN) was 0.9601% better than 2.5281% of RSM. The lower the AAD value represents the more precise prediction of yield. Therefore, the back-propagation neural network is more suitable than the response surface methodology to explain the data of this study.

壹、前言

機能性胜肽是由兩種或兩種以上相同或不同的胺基酸，以胜肽鍵連結而具有生物活性的分子。依胺基酸殘基的數量和種類決定胜肽的組成和特性，這些胜肽可應用於醫藥作為血管收縮素轉化酶 (angiotensin-I-converting enzyme；ACE)抑制劑(Suetsuna *et al.*, 2004; Narai-Kanayama *et al.*, 2009)，應用於食品作為甜味劑(Mazur *et al.*, 1969)，其他應用尚包括化妝品、成長因子、荷爾蒙、農業化學及聚合物原料等方面(Duke Stephen and Abbas Hamed, 1994; Korhonen and Pihlanto, 2006; Vlieghe *et al.*, 2010)。

ACE 是一種含鋅離子的金屬蛋白酶 (metalloprotease)，主要存在於人體的血管內皮細胞、肺部、腎臟及腦部，能夠將不具活性的 Angiotensin I，切除碳端的兩個胺基酸 His-Leu 生成具有活性的 Angiotensin II，造成血管收縮、血壓上升，因此若要使血壓降低，就必需抑制 ACE，以避免 Angiotensin I 轉變成 Angiotensin II，許多研究指出從蛋白水解物分離之二肽 Phe-Tyr 具有抑制 ACE 的功能，可達到降低血壓的效果(Maruyama and Suzuki, 1982; Suetsuna, 1998; Suetsuna *et al.*, 2004)。

胜肽在各方面的應用相當廣泛，其合成方式的研究及改進一直都受到學者的重視。目前常被使用的合成方式為固相胜肽合成法(solid-phase peptide synthesis, SPPS)，可以將想要的胺基酸序列準確及絕對的依序接上(Merrifield, 1963)，另一種為酵素合成法利用酵素對基質的特殊專一性(specificity)進行胜肽合成如將 Phe 和 H-Phe-NH₂ 於緩衝液及 DMSO 混合溶液以 α -chymotrypsin 催化可得 Phe-Phe(Salam *et al.*, 2006)。另外分別於磷酸鈉緩衝溶液及二甲基亞砷和磷酸鈉緩衝混合溶液中反應，利用 α -chymotrypsin 成功催化得到 Tyr-Tyr(Narai-Kanayama and Aso, 2009)。此外，酵素合成的優點包括可大幅減少有機溶劑的使用，降低環境汙染，可加快催化反應速率及在溫和條件下進行反應(Faber, 1992)，所以本研究選擇酵素合成胜肽法將 Phe 和 Tyr 以 α -chymotrypsin 催化合成二肽。

溶劑工程在過去的研究顯示出改變反應介質中的許多因子，諸如反應介質的極性、水活性、額外添加少量的冠狀醚類、胺類等等，都會明顯提升酵素的反應性以及選擇性。Liao 等人利用三種不同的反應溶劑，配合單體形心設計，探討溶劑對合成單醯基甘油酯和雙醯基甘油酯產率的影響，結果顯示原本在單一溶劑的反應系統中雙酯的產率只有10%，經由混合溶劑反應系統下可提升到55%(Liao *et al.*, 2003)。本研究參考其方式來探討溶劑對於酵素合成胜肽產率的影響，並配合

單體形心實驗設計方式，有效地降低實驗次數及得到最適的反應條件與產率。

本研究主要以胰凝乳蛋白酶(α -chymotrypsin) 進行催化 *N*-乙醯苯丙胺酸乙基酯 (*N*-acetyl-phenylalanine ethyl ester) 和 *L*-酪氨酸胺 (*L*-Tyrosinamide) 合成具有 ACE 抑制作用的二胜肽衍生物 (*N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂)，再利用混合實驗設計 (mixture design)，配合三角輪廓圖，探討溶劑組成對合成產物選擇性之影響，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)，分析反應變數對合成二胜肽衍生物 (*N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂) 之影響，並配合等高線圖 (contour plots)，求得反應之最適化合成條件。最後利用類神經網路 (artificial neural network; ANN) 代入五階層四變數之中心混層實驗設計法的實驗數據，先找出訓練停止的條件，再分別找出轉換函數、訓練模式及神經元個數，以這些條件探討合成二肽最適化條件與反應曲面法比較兩者之差異。

貳、文獻回顧

一、胜肽

胜肽是由兩種或兩種以上相同或不同胺基酸所組成，每一胺基酸的結構都以 α -碳原子為中心，一端接胺基(-NH₂)，一端接羧基(-COOH)，一端是氫原子(-H)，另一端則接不同化學官能基的支鏈(side chain)，其一般構造式以圖 1 表示。兩個胺基酸以羧基與胺基脫水鍵結後形成胜肽鍵(又稱醯胺鍵)而連結起來。胜肽可依胺基酸殘基的數量分成雙胜肽、寡胜肽(oligopeptide)、多胜肽(polypeptide)及蛋白質(protein)。其中寡胜肽指的是 2~10 個胺基酸殘基以胜肽鍵連結而成，其應用廣泛如二肽的阿斯巴甜應用在食品作為甜味劑(Mazur *et al.*, 1969)、許多 2~4 肽應用於醫藥作為 ACE 抑制劑(Suetsuna *et al.*, 2004; Narai-Kanayama *et al.*, 2009)，其他應用尚包括化妝品、成長因子、荷爾蒙、農業化學及聚合物原料等方面(Duke Stephen and Abbas Hamed, 1994; Korhonen and Pihlanto, 2006; Vlieghe *et al.*, 2010)。由於在實驗研究、臨床醫學、藥物治療、人工抗體製造等各方面的應用均相當廣泛，胜肽的合成長久以來一直受到相當的重視。近十年來胜肽合成技術的發展不斷的進展，即是為了達到開發較快速及低污染易合成之短鏈胜肽(Huang *et al.*, 2006; Guzmán *et al.*, 2007; Vlieghe *et al.*, 2010)。

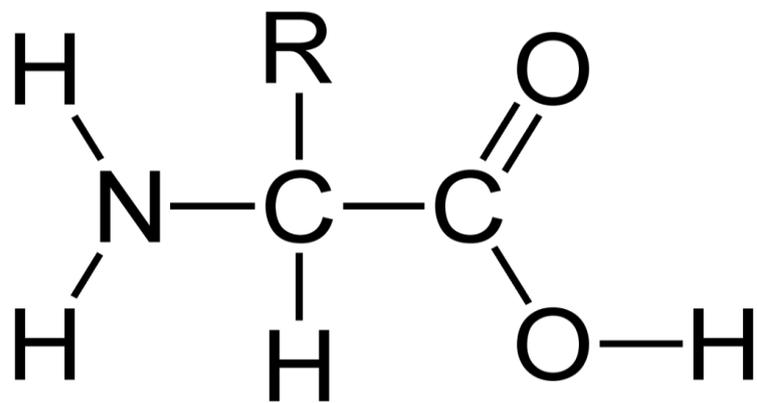


圖 1、氨基酸的一般構造式

Figure 1.The common structure of amino acid (R represents side chain)

二、酵素在有機溶劑之表現行為

長久以來，酵素被視為僅適合在水溶液中進行反應，而有機溶劑易使酵素失活，所以對酵素的應用範圍造成了很大的限制。但是在水溶液中進行反應的缺點如水解、消旋、聚合和分解等副反應容易在有水的環境中發生以及基質溶解度不高導致反應速率降低。直至 1966 年 Dastoli 等人發現酵素於有機溶劑中仍可維持催化活性(Dastoli *et al.*, 1966)； 1987 年 Klibanov 指出酵素只需微量的水單層地覆蓋於酵素分子周圍，就能維持酵素的活性，並可在有機環境中進行反應(Klibanov, 1987)。

一般而言，在有機溶劑環境下進行酵素反應有以下優點(Laane *et al.*, 1987; Klibanov, 1997)：

- 1.因酵素不溶於有機溶劑中，所以容易分離及回收。
- 2.可在有機溶劑中進行水相所不易進行的反應，如：酯化、轉酯。
- 3.可避免不必要的副反應。
- 4.酵素的選擇性可藉，調控有機溶劑的組成來改變，甚至反向選擇。
- 5.提高酵素的熱穩定性。
- 6.大多數反應基質在有機溶劑的溶解度較高。
- 7.使用低沸點的有機溶劑，易於產物的分離。
- 8.可避免微生物污染，增加酵素穩定性。

過去的專家學者努力嘗試著提高酵素在有機溶劑中的反應活性和選擇性的表現，歸納如下所示，並分別就酵素、反應基質、與反應溶劑等三個部分進行討論。

1. 酵素工程(enzyme engineering)：可以藉由物理吸附或形成化學鍵結的方式將酵素固定於一些擔體上，給予酵素的結構一些額外的支撐，因而增加酵素在有機溶劑中對熱的穩定性(Villeneuve *et al.*, 2000)，此外亦可藉由改變酵素結構而影響其功能的觀點切入，嘗試著運用定位突變(site-directed mutagenesis)，DNA 重組或是定向演化等基因工程的技術，將酵素的構成氨基酸序列做不同程度的改變，甚至創造出符合需求的新酵素(Bornscheuer and Pohl, 2001)。
2. 基質工程(substrate engineering)：當了解酵素的結構與其催化的機制後，藉由分子模擬的計算或是經驗上的判斷，對於反應基質進行修飾，因而影響酵素與基質之間結合的位向，而改變選擇性或反應活性(Berglund *et al.*, 1998)。
3. 介質工程(media engineering)：改變反應介質中的許多因子，諸如反應介質的極性、水活性、額外添加少量的冠狀醚類、胺類等等，都可明顯提升酵素的反應性以及選擇性(Gupta and Roy, 2004)。

文獻中針對反應介質極性大小的定量上，常以有機溶劑在正辛醇與水兩相間之分配係數(partition coefficient) P 值之對數值即 $\log P$ 為指標，其中

$$P = \frac{\text{【有機溶劑】}_{\text{正辛醇}}}{\text{【有機溶劑】}_{\text{水}}} \quad (1)$$

此外，各種溶劑之 $\log P$ 值可經由查表 1 獲得。

分配係數對於活性的影響，大致可以分成三區(Laane *et al.*, 1987)：

1. $\log P < 2$ ，有機溶劑與水分子之間的作用力大於水分子與酵素之間的作用力，故酵素表面的水分子容易被有機溶劑穿透或被移開，而造成水與酵素間的作用力扭曲，最終造成酵素微觀的構形改變而失去活性。
2. $\log P > 4$ ，有機溶劑與水分子之間的作用力小於水分子與酵素之間的作用力，所以酵素周圍的水分子不易脫離，因此酵素殘餘活性較高。
3. $2 < \log P < 4$ ，介於兩個極端區域的中間，因此酵素殘餘活性介於兩者之間。

因此，當水、酵素和有機溶劑三者之間能夠達到最適化時，酵素就能在此環境中反應催化加速，縮短反應時間。

表 1、常用有機溶劑之 log P 值

Table 1. The log P of common organic solvent

Solvents	log P	Solvents	log P	Solvents	log P
Dimethylsulfoxide	-1.3	m-phthalic acid	1.5	cyclohexane	3.2
Dioxane	-1.1	triethylamine	1.6	benzophenone	3.2
N,N-dimethylformamide	-1.0	benzylacetate	1.6	propoxybenzene	3.2
Methanol	-0.76	butylacetate	1.7	diethylphyhalate	3.3
Acetonitrile	-0.33	chloropropane	1.8	nonanol	3.4
Ethanol	-0.24	acetophenone	1.8	decanone	3.4
Acetone	-0.23	Hexanol	1.8	hexane	3.5
Acetic acid	-0.23	nitrobenzene	1.8	propylbenzene	3.6
Ethoxyethanol	-0.22	Hepanone	1.8	butylbenzoate	3.7
Methylacetate	0.16	benzoic acid	1.9	methylcyclohexane	3.7
Propanol	0.28	dipropylether	1.9	ethyloctanoate	3.8
Propionic acid	0.29	hexanoic acid	1.9	dipentylether	3.9
Butanone	0.29	Chloroform	2.0	benzylbenzoate	3.9
Hydroxybenzylethanol	0.40	Benzene	2.0	decanol	4.0
Tetrahydrofuran	0.49	methylcyclohexanol	2.0	heptane	4.0
Diethylamine	0.64	methoxybenzene	2.1	cymene	4.1
Ethylacetate	0.68	methylbenzoate	2.2	pentylbenzoate	4.2
Pyridine	0.71	propylbutylamine	2.2	diphenylether	4.3
Butanol	0.80	pentylacetate	2.2	octane	4.5
Pentanone	0.80	dimethylphthalate	2.3	undecanol	4.5
Butyric acid	0.81	Octanone	2.4	ethyldecanoate	4.9
Diethylether	0.85	Heptanol	2.4	dodecanol	5.0
Benzylethanol	0.90	Toluene	2.5	nonane	5.1
Cyclohexanone	0.96	ethylbenzoate	2.6	dibutylphthalate	5.4
Methylpropionate	0.97	ethoxybenzene	2.6	decane	5.6
Dihydroxybenzene	1.0	dibutylamine	2.7	undecane	6.1
Methylbutylamine	1.2	pentylpropionate	2.7	dipentylphthalate	6.5
Propylacetate	1.2	chlorobenzene	2.8	dodecane	6.6
Ethylchloride	1.3	Octanol	2.9	dihexylothalate	7.5
Pentanol	1.3	Nonanone	2.9	tetradecane	7.6
Hexanone	1.3	dibutylether	2.9	hexadecane	8.8
Benzylformate	1.3	Styrene	3.0	dioctylphthalate	9.6
Phenylethanol	1.4	tetrachloromethane	3.0	butyloleate	9.8
Cyclohexanol	1.5	Pentane	3.0	didecylphthalate	11.7
Methylcyclohexanone	1.5	ethylbenzene	3.1	dilaurylphthalate	13.7
Phenol	1.5	Xylene	3.1		

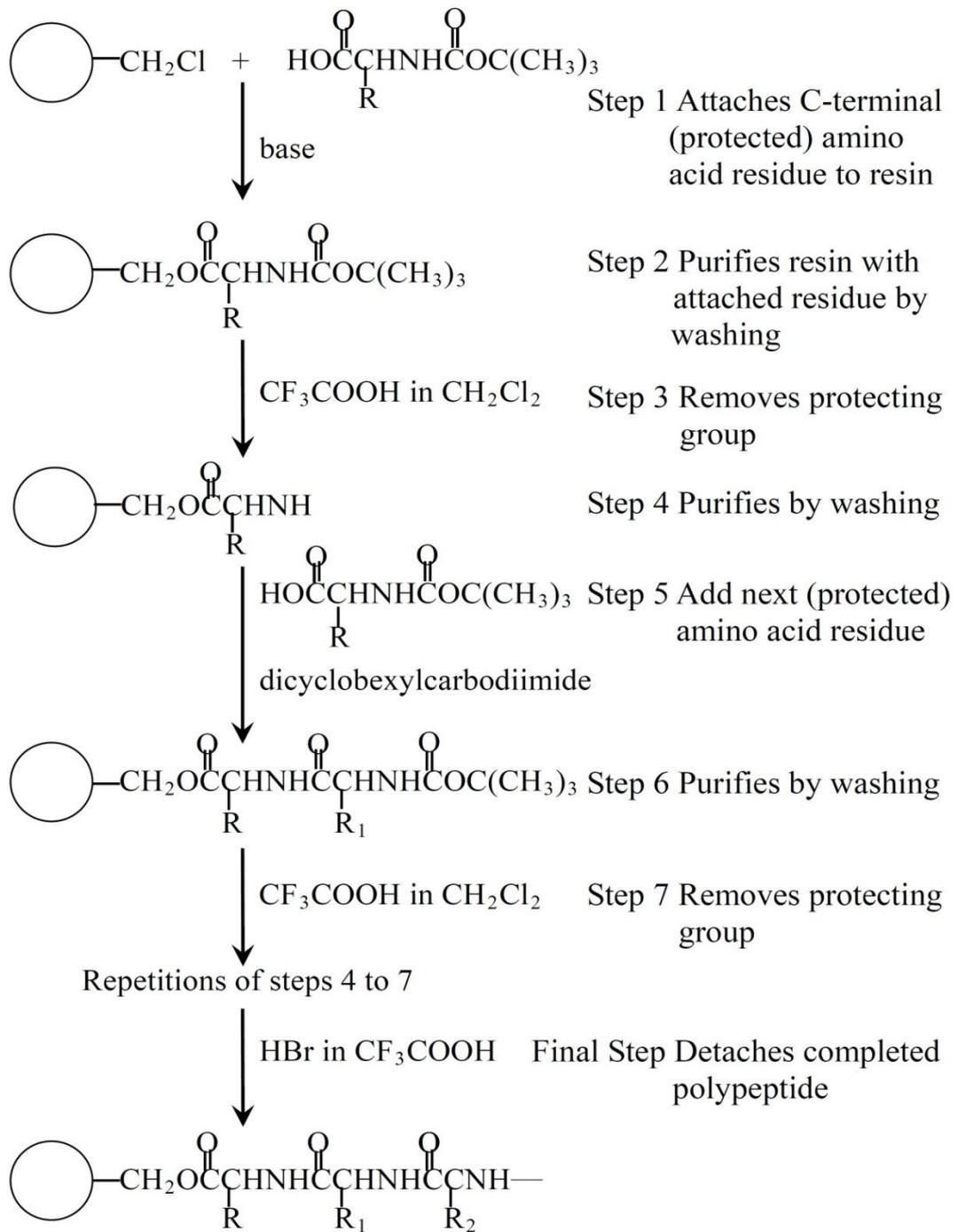
(Laane *et al.*, 1987)

三、胜肽合成

(一)化學合成

最早將胺基酸合成胜肽的方式，是以液相胜肽合成法(Curtius, 1881; Vigneaud *et al.*, 1953)，但產量不佳且可能得到不想要的胜肽產物，所以使用受到限制。在 1963 年時，由 Merrifield 提出了一個新的胜肽合成方式即固相胜肽合成法(solid-phase peptide synthesis, SPPS)，如圖 2(Merrifield, 1963)。其胜肽合成方式乃利用共價鍵結方式將第一個胺基酸結合到有機溶劑不溶的載體上如氯甲基樹酯、聚苯乙烯、聚丙烯醯氨等，再與第二個胺基酸進行縮合反應(condensation)，形成胜肽鍵，最後經有機溶劑清洗與過濾即可得到最終的胜肽產物。從合成方法看來，能準確的將下一個胺基酸接在上一個胺基酸的後面，也進一步證明有效的取代了先前的液態胜肽合成法，成為目前業界常用的胜肽合成之方式。這是一個突破性的發展，因為這方法具有快速、簡單及高產率等多項優點，所以這個合成方式一直廣為業界所使用。

目前胜肽合成方式，大多以化學法(Merrifield 法)來進行，除了化學法在合成步驟上較為繁瑣外，Sergeeva 等(Sergeeva *et al.*, 1997)也提出對於化學法合成胜肽之幾個缺點需要去克服，包含胺基酸上的官能基需要進行保護與去保護，在此過程需使用到有機溶劑較多，且程



(Merrifield, 1963)

圖 2、固相胜肽合成法

Figure 2. Solid-Phase Peptide Synthesis

序繁瑣，易對環境造成汙染，使成本提高；另外，可能會產生外消旋作用(racemization)及立體選擇性(stereoselective)的缺乏。

(二) 酵素合成

由於有機合成上的需要，酵素已被研究擴展至非天然基質反應之應用上。為了改善化學合成的缺點，酵素(生物觸媒)與化學觸媒相較之下擁有更多的優點如催化效率高，增快原有反應速率 10^8 - 10^{12} 倍；可在溫和條件(溫度、pH、壓力等)下進行高效率的催化反應；酵素具有高基質之特異性，製程簡單，且反應過程單純，可簡化分離及純化所需之步驟；酵素具有生物可分解特性，可被環境所接受；酵素分子結構具有基質特異性，包括基質選擇性(substrate selectivity)可對複雜樣品中特定基質進行反應；位置選擇性(regionselectivity)可辨認不同位置之相同官能基進行反應；立體選擇性(stereo selectivity)可區分鏡像異構物(Faber, 1992)。

基於以上酵素催化所特有的優點，酵素催化反應已被廣泛的應用於化學製程、醫療保健、廢水處理、農牧業、食品工業等等，再加上近幾年環境保護意識越來越強烈，推廣節省能源、發展替代能源、綠色化學、資源回收等觀念，因此酵素催化的開發及研究就顯得更重要(Narai-Kanayama *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2011)。

酵素進行胜肽的催化合成反應中，其所處的反應環境形式有以下幾種：

1. 水相：於硼酸緩衝溶液中加入 *Empedobacter brevis* ATCC 14234，成功催化得到產率為 80% 的 L-alanyl-L-glutamine 二胜肽產物 (Yokozeki and Hara, 2005)。於磷酸鈉緩衝溶液中加入 α -chymotrypsin，成功催化得到 Tyr-Tyr、Tyr-Tyr-Tyr、Tyr-Tyr-Tyr-Tyr 及 Tyr-Tyr-Tyr-Tyr-Tyr 等寡胜肽，但產率相當的低 (Narai-Kanayama *et al.*, 2009)。由此可知酵素種類影響產率相當大。
2. 有機相：為了促使胺基酸的基質能完全溶在溶劑中與酵素接觸反應，需利用各式親水性溶劑來當作反應環境，如：甲醇(methanol)、乙醇(ethanol)、丙酮(acetone)、乙腈(acetonitrile)或乙酸乙酯(ethyl acetate)等。例如將固定化的酵素 α -chymotrypsin 和 papain 在乙酸乙酯中合成二胜肽(Zhang *et al.*, 1996)。以固定化 α -chymotrypsin 在乙腈環境中催化合成寡胜肽(Barros *et al.*, 1999)。然而，為了比較出可溶性與不溶性的酵素在有機溶劑中的催化能力，將可溶性的酵素 α -chymotrypsin 和 Subtilisin Carlsberg (serine protease from *Bacillus licheniformis*, EC 3.4.21.14)分別放入含有 30% (v/v)四氫呋喃(tetrahydrofuran)的異辛烷(isooctane)及乙酸乙酯進行催化；發現可溶性的酵素較不溶性的酵素所催化合成的產率高出三倍

(Sergeeva *et al.*, 1997)。此外將固定化 subtilisin 72 (Serine proteinase)

於乙腈中催化合成 Z-Ala-Ala-Leu-Phe-pNA 可得到 80-90%的轉化

率(Bacheva *et al.*, 2005)。

3. 水與有機相共存：於兩相系統(water-ethyl acetate system)，利用固定 α -chymotrypsin 催化合成 *N*-acetyl-L-tryptophanyl-L-leucine amide，耗費兩天的反應時間，產率可高達 100%(Khmel'Nitski *et al.*, 1984)。以 α -chymotrypsin 進行催化 24h，所處的環境為乙醇或乙腈，水分的添加為 10% (v/v)時，可以得到 40%的二肽產物 (*N*-acetyl-L-tyrosine-glycine-NH₂) (Kisee *et al.*, 1988)。也有針對不同保護基形式做研究的學者發現以 Ac (acetyl)、For (formyl)、Z (zyloxycarbonyl)、Alloc (allyloxycarbonyl)、Fmoc (fluorenylmethoxycarbonyl)和 Boc (butoxycarbonyl)為保護基的胺基酸在 α -chymotrypsin 的催化下，所使用的溶劑為親水性的 acetonitrile 和 ethyl acetate，可得到高產率分別為 92%與 99%的肽(Calvet *et al.*, 1993)。為了合成出具特殊功能性的肽，利用 thermoase 在含有微水的甲苯(toluene)溶劑下，可將 *N*端保護的特殊胺基酸 (L-Orn, L-Cit, α -aminobutyric acid 和 phenylalanine homologues)進行催化三天，可得到最高產率為 86%(Shen *et al.*, 2005)。此外於二甲基亞砷和磷酸鈉緩衝溶液中反應時間為 1h，利

用 α -chymotrypsin 催化合成 Tyr-Tyr-NH₂，產率可接近 100%(Narai-Kanayama *et al.*, 2010)。

4. 冷凍溶液環境：以 CBZ(benzyloxycarbonyl)為保護基的胺基酸和 H-Phe-NH₂、H-Leu-NH₂ 與 H-Ala-NH₂ 於緩衝液及 DMSO 混合溶液以 α -chymotrypsin 催化，在-24°C 下進行縮合反應 2h，產率可達到 90%(Salam *et al.*, 2006)。
5. 超臨界環境：將 α -chymotrypsin 分別置於臨界狀態和乙酸乙酯之溶液中進行催化反應，發現在超臨界二氧化碳(10.1 MPa)所得到的產率大於液態二氧化碳(6.1 MPa)及乙酸乙酯(Mishima *et al.*, 2003)。

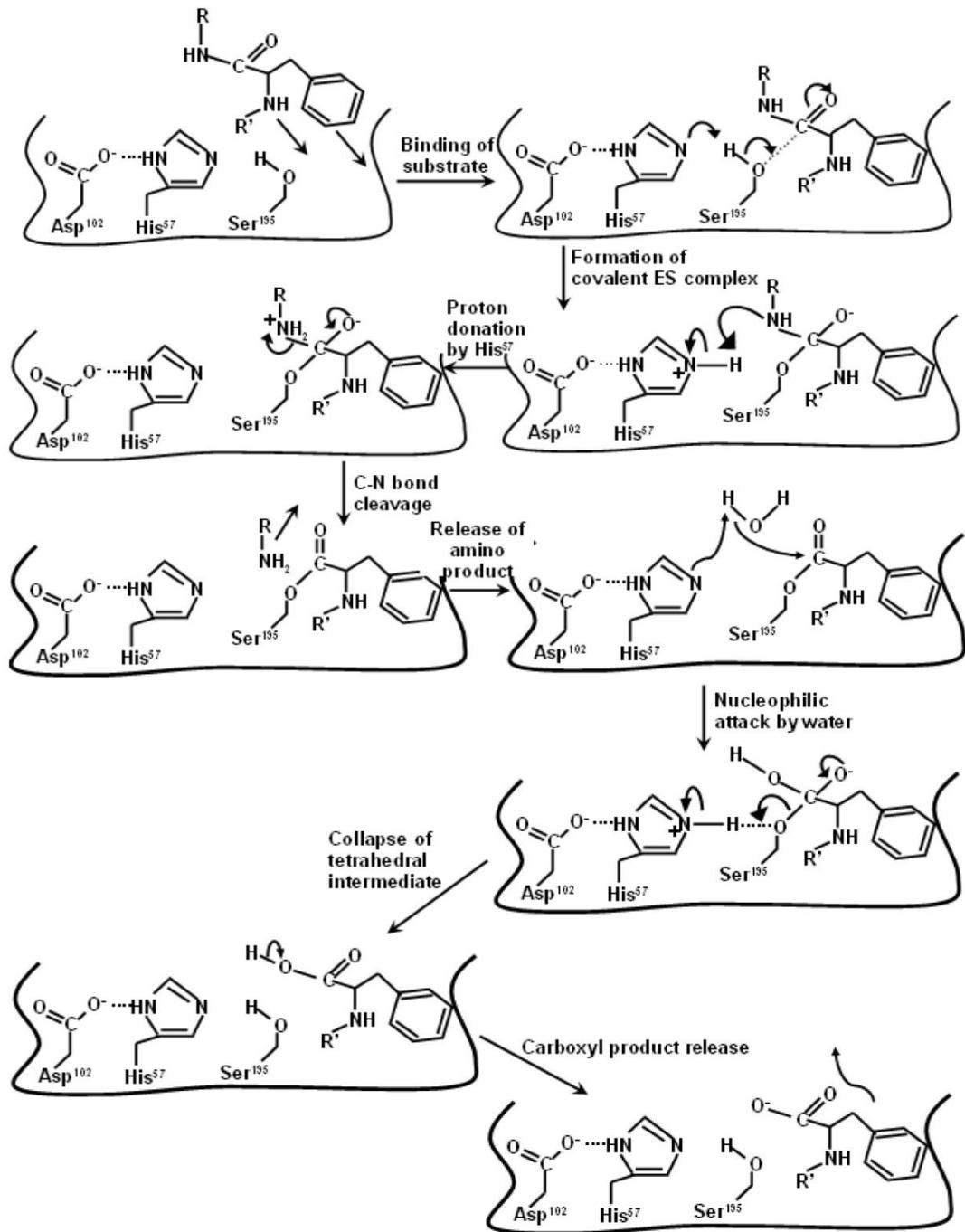
四、 α -chymotrypsin 及其相關研究

1961 年國際生物化學聯盟酵素委員會法定以其所催化之反應性質來作為分類與命名之依據，依催化反應類型可分成六大類包括氧化還原酶、轉移酶、水解酶、解離酶、異構酶和聯結酶。

(一) α -chymotrypsin 水解及相關研究

α -chymotrypsin 來自於牛胰臟中的酵素，屬於水解酶為蛋白水解酶的一種，是一個含有 241 個胺基酸殘基的蛋白質，由三條胜肽鏈所構成，A 鏈有 13 個胺基酸殘基，B 鏈有 131 個胺基酸殘基以及 C 鏈有 97 個胺基酸殘基。在催化能力上， α -chymotrypsin 在水解胜肽鏈時，

對於 tyrosine、leucine、tryptophan 及 phenylalanine 的 C 端位置有較高的選擇性 (Sweeney and Walker, 1993)。在 α -chymotrypsin 的催化機制中顯示酵素活性區與基質有專一性結合(圖 3)，且主要的活性區域為 His⁵⁷、Asp¹⁰²、Ser¹⁹⁵，利用凡得瓦爾力(Van Der Waals force)、疏水鍵(hydrophobic bond)、氫鍵(hydrogen bond)或離子鍵(ionic bond)等與基質進行結合並進行催化作用(Garrett, 2005)。為了讓含有苯環的胺基酸基團進入酵素活性區中進行催化，先藉由疏水鍵方式與基質結合，再以凡得瓦爾力、氫鍵等方式進行水解。 α -chymotrypsin 催化水解步驟分成 Acylation 和 Deacylation，首先 Substrate peptide 進入活性區後，酵素檢查專一性位置，確定水解位置 (aromatic amino acid)，然後 Ser-O⁻ 攻擊 peptide 上面的 carbonyl 碳，形成第一個過渡狀態，接著 Peptide bond 斷裂，His 57 供給氫離子，放出 free peptide C (C-端那一半)，最後 Peptide N 以 acylation 接在 Ser 195 上，成為中間產物。再來水分子會進入酵素活性區，結合在 His 57 上，然後水分子的氧攻擊上述 carbonyl 碳，形成第二個過渡狀態，並把一個氫留在 His，接下來 Ser 195 放出所連結的 N peptide，酵素回復原來的活化狀態。



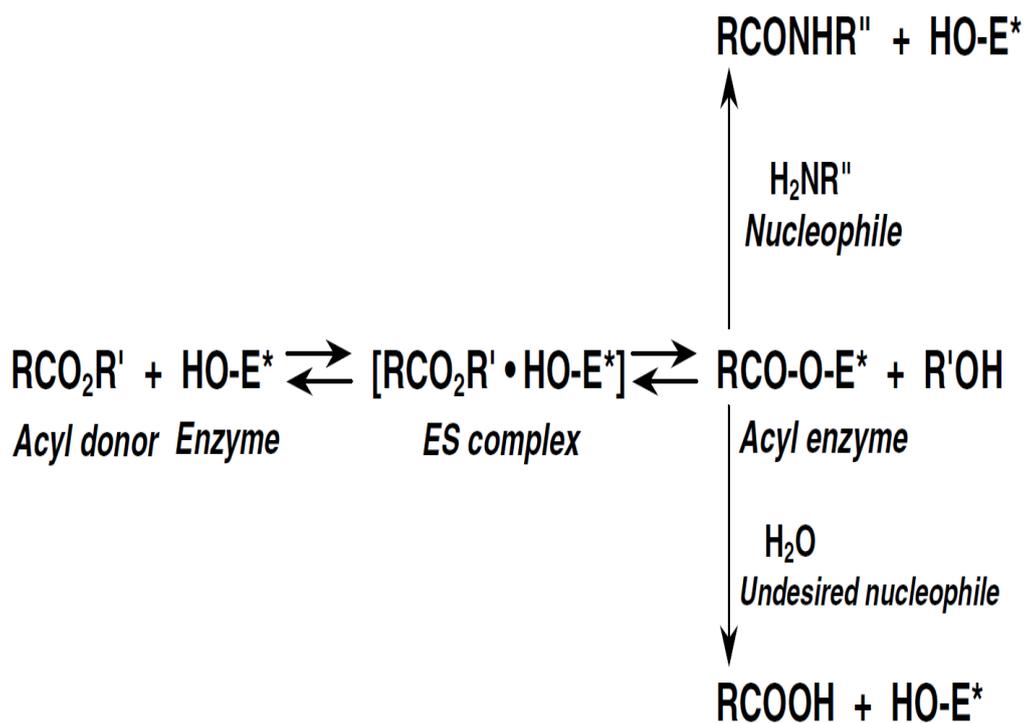
(Garrett, 2005)

圖 3、Chymotrypsin 的催化水解機制

Figure 3. The Catalytic hydrolysis mechanism of Chymotrypsin

(二) α -chymotrypsin 合成及相關研究

Miyazawa 等人於 2001 提出酵素合成的機制如圖 4，首先酵素會先與胺基酸形成複合物，再根據反應環境中的水份含量決定反應是往合成方向或水解方向進行，若水份含量較低，則反應會往合成方向進行，與另一胺基酸中間形成胜肽鍵，而結合成胜肽，反之，則往水解方向進行 (Miyazawa *et al.*, 2001)。接下來有許多學者利用 α -chymotrypsin 進行合成胜肽研究，如以 CBZ(benzyloxycarbonyl) 為保護基的胺基酸 Phe 和 H-Phe-NH₂ 於緩衝液及 DMSO 混合溶液以 α -chymotrypsin 催化，在 -24°C 下進行縮合反應 2h，產率可達到 90% (Salam *et al.*, 2006)。另外分別於磷酸鈉緩衝溶液及二甲基亞砷和磷酸鈉緩衝混合溶液中反應，利用 α -chymotrypsin 成功催化得到 Tyr-Tyr，在單純緩衝溶液環境下反應，因水份含量較多，所以反應幾乎往水解方向進行，Tyr-Tyr 產率相當得低，但在 DMSO 與緩衝混合溶液下反應，因 DMSO 屬極親水溶劑會與酵素競爭水分子，所以反應環境中水份含量就大幅減少，可得產率接近 100% (Narai-Kanayama and Aso, 2009; Narai-Kanayama *et al.*, 2009)。



(Miyazawa *et al.*, 2001)

圖 4、酵素催化合成及水解反應機制

Figure 4. The enzyme catalytic synthesis and hydrolysis mechanism

在本研究中之所以選用 α -chymotrypsin 做為反應酵素，一方面延續研究室之前合成胜肽的研究，所合成的 Phe-Gly 具有抗發炎功能(Ju *et al.*, 2009)。另一方面，找尋具有抑制 ACE 功能的胜肽，此 ACE 抑制劑在其末端胺基酸需為芳香族胺基酸 (aromatic amino acid)，如 tryptophan、tyrosine、phenylalanine 或 proline(Cheung, 1980)，從文獻中蒐尋到 Phe-Tyr 具有抑制 ACE 的作用(Suetsuna, 1998; Suetsuna *et al.*, 2004)，而 α -chymotrypsin 主要是針對含有苯環的 tyrosine、leucine、tryptophan 及 phenylalanine 其 C 端位置有較高的專一性。

五、ACE 及其抑制劑

(一)ACE 生化特性

ACE(dipeptidyl carboxypeptidase I, EC 3.4.15.1)是一種含鋅離子的金屬蛋白酶 (metalloprotease)，主要存在於人體的血管內皮細胞、肺部、腎臟及腦部，能夠將不具活性之十胜肽 Angiotensin I，切除碳端的兩個胺基酸 His-Leu 生成具有活性之八胜肽 Angiotensin II，造成血管收縮、血壓上升(Maruyama and Suzuki, 1982)。

Angiotensin II 為體內最強的血管收縮劑，其作用包括使小動脈收縮，而提高收縮壓和舒張壓；促使心臟平滑肌收縮，造成心臟血液輸出量增大；促使醛固酮自副腎皮質釋出，促使腎小管對鈉離子的再吸

收，體內鈉離子總量逐漸上升，水分隨之被留在體內，細胞外液容積增加，造成腎動脈壓隨之上升，而引起血壓增加；可能作用於中樞神經系統的血管運動中樞，而造成交感神經活性增加，造成血壓上升；促使 catecholamine 自副腎髓質及交感神經結後纖維釋出，助於血管收縮。

(二) ACE 抑制原理

ACE 抑制劑 (ACE inhibitor, ACEI) 是一種與酵素活性區域親和力較強的競爭性抑制物，可與 ACE 結合，影響 ACE 活性，這些抑制物對 ACE 的親和度比 Angiotensio I 或緩激肽 (bradykinin) 還要強，且較不易從 ACE 結合區釋放，因此可有效的產生抑制作用。

ACEI 結構包括碳端 (C-terminal) 胺基酸與氮端 (N-terminal) 胺基酸；前者為 ACEI 與 ACE 作用部位結合的關鍵，一般具有 ACEI 功能的胜肽，其末端胺基酸皆為芳香族胺基酸 (aromatic amino acid)，如 tryptophan、tyrosine、phenylalanine 或 proline。後者最具活性的是具有分支的支鏈疏水性胺基酸，如 leucine、isoleucine、valine(Cheung, 1980)。

六、實驗設計 (Experimental Design)

(一)單體形心設計(Simplex Centroid Design)

在一個 q 種成份的混合實驗設計中，共有 $2^q - 1$ 個實驗點，包括一元混合、二元混合、三元混合： $(1/3, 1/3, 1/3, 0, 0, \dots, 0)$ ， $(1/3, 1/3, 0, 1/3, 0, \dots, 0)$ 等由 $1/3$ 與 0 組成的設計及 q 元混合。許多混合比例或產品是混合二種或更多的成分，使其特性優於單一成分。傳統的混合方式，只能根據實驗的混合比例得知功能性，無法得知所有不同組成比例的混合物與功能性之間的關係。在單體形心設計中，將混合成分的比例以體積、重量或莫耳百分比表示，這些混合成分比例的總和等於一，適當的運用單體形心設計可以得到最適混合比例或產品組成(Cornell, 2000; Cornell, 1973; Kowalski *et al.*, 2000)。在本研究中運用三元混合實驗設計探討三種溶劑最適化混合比例，如圖 5 所示， X_1 、 X_2 及 X_3 代表是三種不同的溶劑，依不同混合比例分為七個實驗點。

(二)反應曲面法 (Response Surface Methodology; RSM)

當尋求自變數與因變數之間的最適條件時，傳統的實驗設計是先針對一個自變數作變動，固定其他的自變數，求得此自變數的最適條件，之後再固定此條件，逐一求得其它自變數的最適條件。但是這個

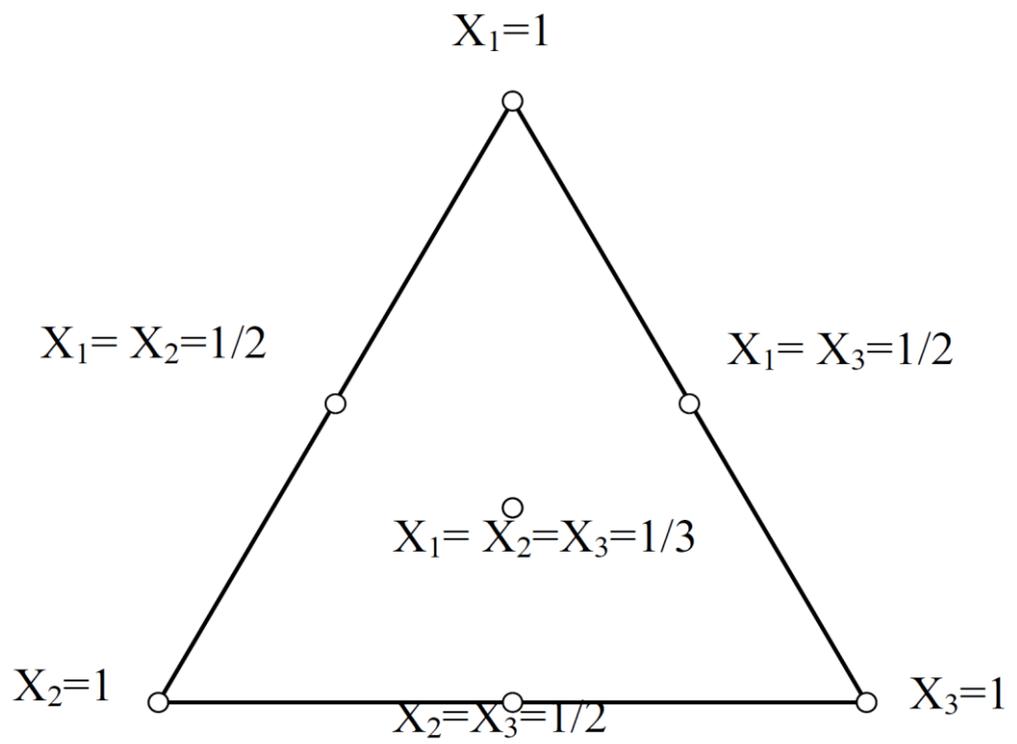


圖 5、單體形心設計

Figure 5. Simplex Centroid Design ($q=3$)

方法的缺點為耗費時日、忽略了自變數彼此之間的交互影響、無法獲得真正的最適條件以及無法建立自變數之間的關係式。

RSM 乃是用來解決多個自變數對某一個因變數影響的一種實驗設計，以反應曲面或反應曲線來表示這些自變數的型式。RSM 主要用於尋找最適條件，實驗設計的目的在於利用最少的觀測結果，獲得反應曲面的最高點或最低點(Box and Wilson, 1951)，因此，可以改正傳統實驗設計的缺點。

(三)中心混成實驗設計(Central Composite Design; CCD)

在二階模式的實驗設計有很多種，最常見的是中心混成設計。此設計是一個二階(second-order)的完整或部分因子設計，再加上選取實驗範圍的配方實驗，其包含因子點(或角點)、軸點(或星點)及中心點三部份實驗所構成，而星點之延伸距離 d 等於 $N^{1/4}$ ，其中 N 為因子設計(含完整或部分因子設計)之總實驗點數(Thompson, 1982)。對於多變數因子系統而言，中心點實驗是在原點進行重覆實驗，目的除了提供二階模式回歸計算所需之數據外，另一方面則可利用重覆實驗來測量儀器或人為操作所造成的實驗誤差。根據此設計，各成分因子的測試範圍涵蓋了中心點、軸延伸點(星點)及頂點等，如圖 6。依照實驗結果，藉由統計軟體 statistical analysis system(SAS)之多重迴歸分析進行二階

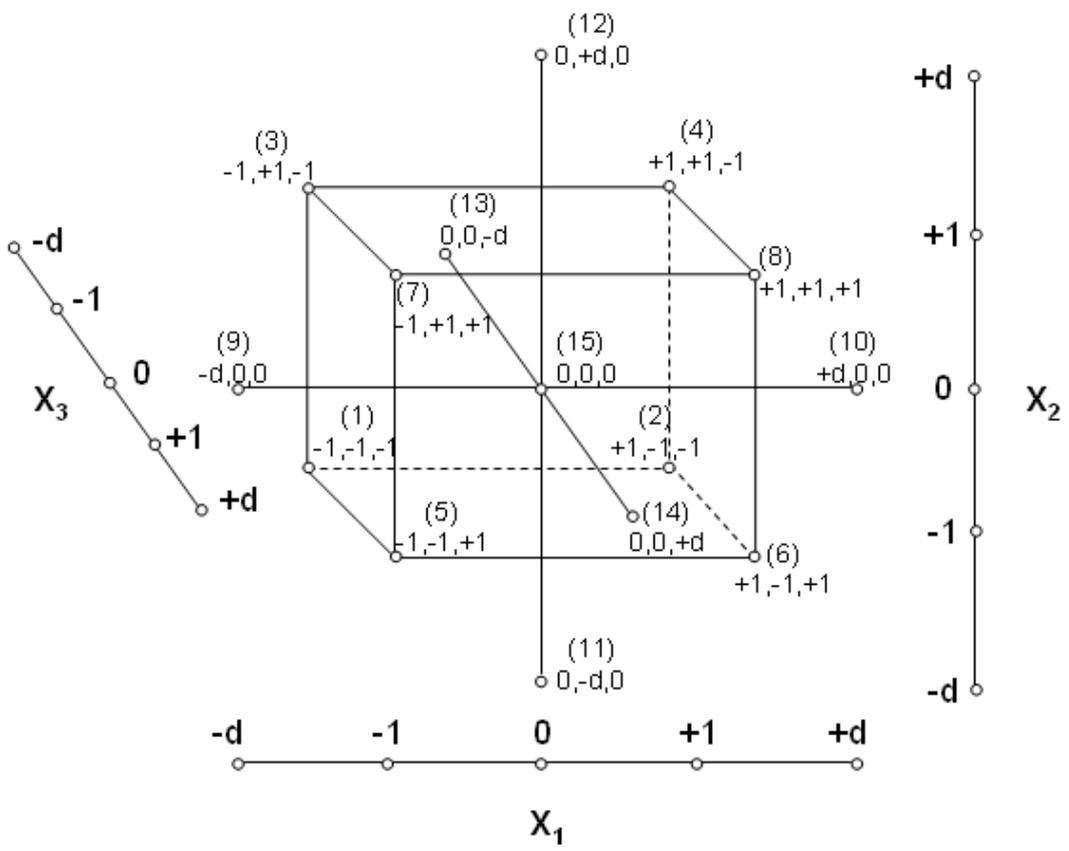


圖 6、中心混成實驗設計

Figure 6. Central composite design

模式的契合分析及繪圖軟體 sigmaplot 的繪製，以此模式與圖形來描述反應曲面的變化。

七、類神經網路

近年來類神經網路(Artificial Neural Network, ANN)的資訊處理系統已被視為是非常有效的非線性模型建構工具，而較精確的類神經網路可定義為是一種計算系統，包括軟體與硬體，它使用大量簡單的相連人工神經元來模仿生物神經網路的能力。人工神經元是生物神經元的簡單模擬，它從外界或其它人工神經元取得資訊，加以非常簡單的運算，並輸出其結果到外界或其它人工神經元(葉,2009)。

(一)神經元模型

類神經網路的基本組成單元為人工神經元(Artificial Neuron)或處理單元。以扇狀輸出，成為其它單元的輸入，每一個人工神經元是仿效生物神經元的狀態如圖 7 所示，它包含以下幾個部份(葉,2009)：

1. 神經核(Soma)：由細胞膜、細胞質與細胞核所建構而成，當受到外部刺激，會造成細胞的電位變化。
2. 軸突(Axon)：神經細胞外部的軸索狀分布，主要用來將細胞的訊息傳遞給其它神經元。

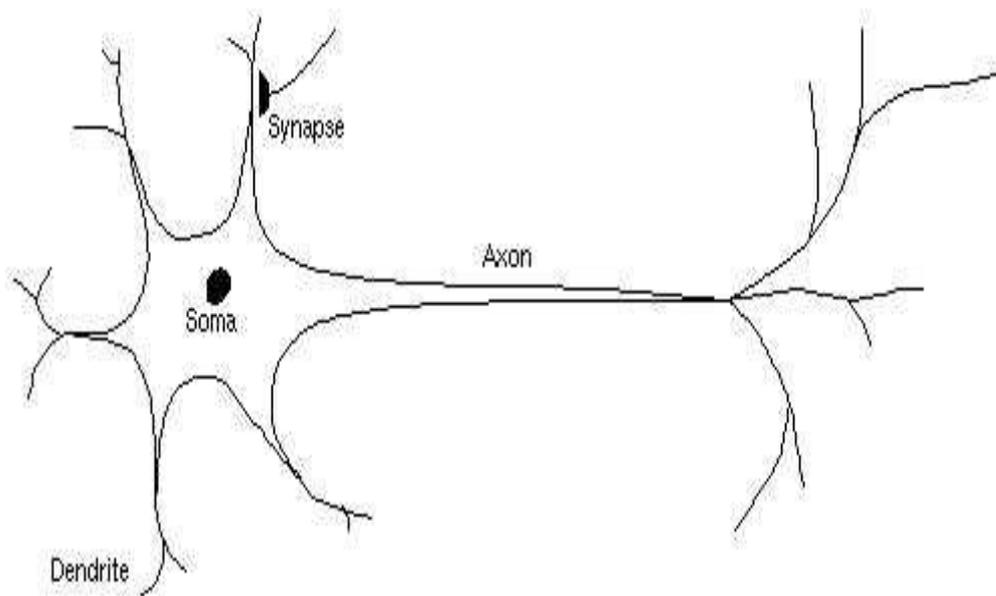


圖 7、生物神經元之結構圖

Figure 7. Structure of a biological neuron

3. 樹突(Dendrite)：神經細胞外部的樹枝狀分布，主要用來接受其他神經元傳遞來的訊息。
4. 突觸(Synapse)：電位變化沿著樹突與軸突傳遞，最後在突觸釋放
5. 神經傳導物質。突觸表示神經元連結強度，突觸越多代表神經網路間信息交換越頻繁，當神經網路開始學習時，刺激神經元所產生的電流會改變連結強度，經反覆變化後趨於穩定，此時即表示完成學習。

類神經網路主要是對生物神經結構連動模擬所衍生出來的一種學理。透過各相互連結的人工神經元而組成人工類神經網路；人工神經元是模仿生物神經元，成為其它單元的輸入，又稱處理單元。處理單元其輸出值與輸入值之間的關係式，一般可用輸入值的加權乘積和之函數來表示，其基本構成單位可分為以下幾個部份如圖 8，而每一個處理單元的輸出以扇形狀送出，成為其它許多處理單元的輸入。而生物神經元的動作原理可以利用一個簡單的結構以及運算規則來模擬其運作，可利用下式所表示(葉,2009)：

$$net_j = \sum_{i=1}^n (W_{ij} \cdot X_i) - \theta_j \quad (2)$$

$$Y_j = f(net_j) \quad (3)$$

其上式中， net_j 為神經元 j 的總輸入， Y_j 是為類神經網路模仿生物神經元模型的輸出訊號。而 f 為類神經網路模仿生物神經元模型之轉換函數 (Transfer Function)，此轉換函數的功能是將其它處理單元所接收的輸入值之加權乘積和轉換成處理單元輸出值的數學公式。至於 W_{ij} 則是為類神經網路模仿生物神經元模型的神經節強度，又稱連結權值；用以表示第 i 個處理單元對第 j 個處理單元的影響強度。而 X_i 是為類神經網路模仿生物神經元模型的輸入訊號。 θ_j 則是為類神經網路模仿生物神經元模型之閾值。在本研究中 Y_j 及 X_i 分別代表的是二肽產率及各變因的條件。

(二)類神經網路之架構

類神經網路是由許多的人工神經元所組成的。一般來說，其基本架構可分為「處理單元」、「層」以及「網路」三個層次(葉,2009)：

1. 處理單元(Processing Element)

處理單元或稱之為人工神經元，為組成類神經網路之基本單元，依作用不同分為集成函數 (Summation Function)、作用函數 (Activity Function)、轉換函數 (Transfer Function)。其中最常使用及討論的是轉換函數，此函數直接影響了網路的學習結構，透過不同的轉換函數會使網路產生不同的特性。

(1) 集成函數：在網路中扮演訊息加總的功能，將其他處理單元透過網路

所傳遞來的計算結果加以綜合。

(2) 作用函數：將集成函數的值與網路狀態加以綜合。

(3) 轉換函數：將作用函數的輸出值轉換成處理單元的輸出值，在本研究中使用到的分別為Gaussian、Sigmoid及Hyperbolic tangent (Tanh)。

高斯函數(Gaussian)

$$f(net) = \exp\left[-\frac{(\|net-w\|)^2}{\sigma^2}\right] \quad (4)$$

其中 σ^2 為 $\|net-w\|$ 之變異數(variance)

雙彎曲函數(Sigmoid)

$$f(net) = \frac{1}{1+e^{-\beta \cdot net}} \quad (5)$$

雙曲正切函數(Hyperbolic Tangent, Tanh)

$$f(net) = \tanh(\beta \cdot net) = \frac{e^{\beta \cdot net} - e^{-\beta \cdot net}}{e^{\beta \cdot net} + e^{-\beta \cdot net}} \quad (6)$$

2. 層(Layer)

若干具有相同作用的處理單元集成「層」，而類神經網路通常為三層，層本身有三種形式即輸入層、隱藏層與輸出層等。其中輸入層用以表示網路之輸入變數，其處理單元依問題而定。而隱藏層則用以表示輸入處理單元間的交互影響，其處理單元數目並無標準方法可決定，通常須以試驗方法決定其最佳的數目，使用非線性轉換函數。至於輸出層則用以表現網路的輸出變數，其處

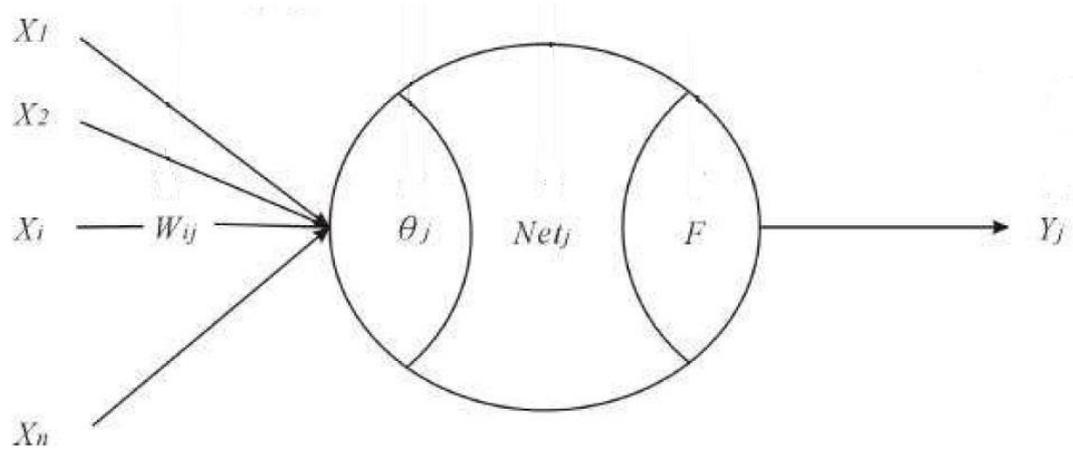


圖 8、人工神經元構成圖

Figure 8. Structure of an artificial neuron

理單元數目依問題而定，使用線性轉換函數。

3. 網路(Network)

通常一個完整的類神經網路是由數個不同作用的層架構而成，層與層之間的關係則由轉換函數來定義，而每一個層的結構又包含許多處理單元，透過這些單元與關聯即可建構出一個擁有學習能力的智慧型系統。網路的學習能力與其系統架構的形態與大小有關，神經元數目若太少則無法處理複雜問題，而太多則效果不彰，因此，網路大小需由問題的複雜度、訓練次數及所需的精確度(RMSE)等因素來決定，但若要找出最佳化的網路大小是得經由不斷的試驗來決定。一般來說，類神經網路可由其連結架構分類。

依連結架構可分為：

- (1)前饋式網路：此類型之神經元是為階層式排列，形成輸入層、隱藏層及輸出層。各變因條件由最左邊的輸入層進入，透過處理單元的作用，往右傳遞下去，直至最右邊的輸出層(產率)為止。本研究所使用之倒傳遞類神經網路即屬於此架構，如圖 9 所示。
- (2)回饋式網路：此類型之輸出會透過另一組鍵結值而回饋於網路本身的輸入層或隱藏層，如圖 10 所示。

(三)倒傳遞類神經網路

倒傳遞網路屬於前饋式多層網路，是目前應用最普遍且廣泛的類

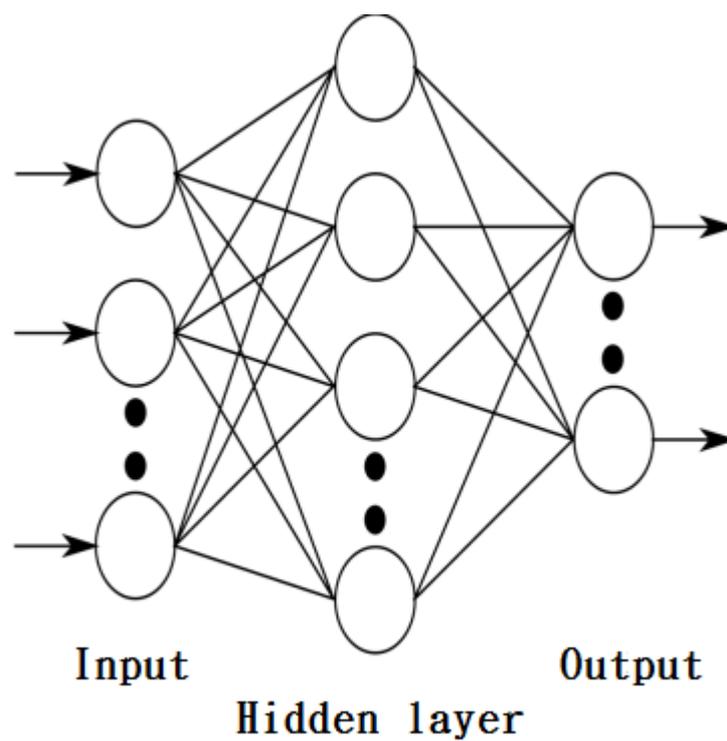


圖 9、前饋式網路

Figure 9. Feed-forward Network

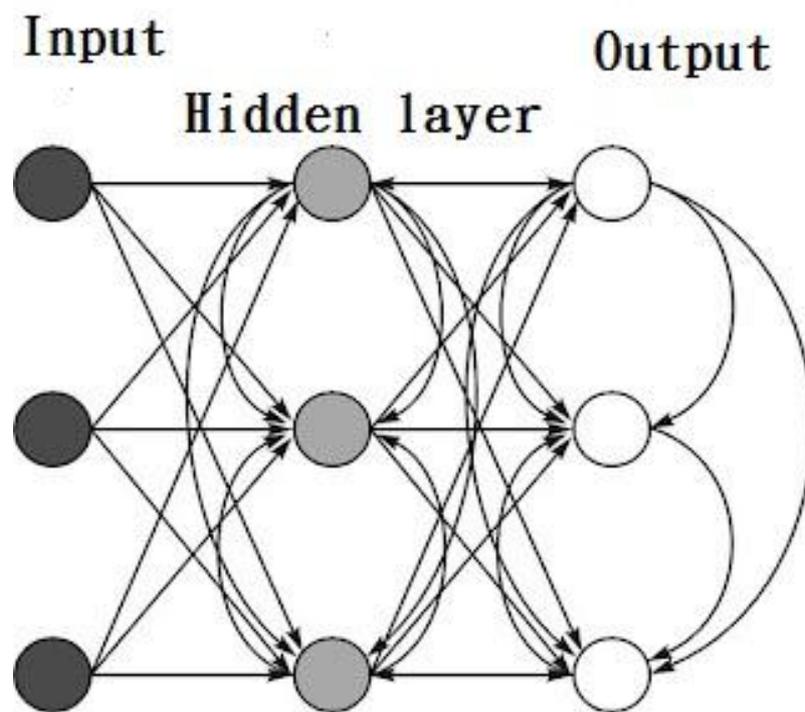


圖 10、回饋式網路

Figure 10. Feed-back Network

型，將變因條件從輸入層開始向前傳遞直到輸出層輸出產率，接著將其結果誤差向後傳遞直至輸入層，藉此修改連接權重值將誤差予以最小化。下面將推導倒傳遞演算法運算過程。網路第 n 層的第 j 個節點的輸出值為第 $n-1$ 層節點輸出值的非線性函數(Lee *et al.*, 2001)：

$$net_j^n = \sum_i W_{ij} Y_i^{n-1} - \theta_j \quad (7)$$

$$Y_j^n = f(net_j^n) \quad (8)$$

其中 net_j^n ：第 n 層第 j 個節點的總輸入

W_{ij} ：第 $n-1$ 層第 i 個節點第 n 層第 j 個節點的權重值

θ_j ：第 n 層第 j 個節點的偏權值

Y_j^n ：第 n 層第 j 個節點的輸出值

$f(net)$ ：轉移函數 (Gaussian、Sigmoid 及 Tanh)

對於一組訓練範例，我們定義一個誤差函數來表示學習的品質，一般定義如下：

$$E = \frac{1}{2} \sum_j (T_j - Y_j)^2 \quad (9)$$

其中 T_j 為輸出層目標值，即為實際產率

Y_j 為輸出層推論值，即為預測產率

倒傳遞類神經網路的學習過程即是利用梯度遞減法使誤差函數最小化。為了使權重值和偏權值收斂，讓權重值的變化量和誤差函數對權重值的靈敏度成正比，即與誤差函數對權重值的偏微分大小成正比，如下式所示：

$$\Delta W_{ij} = -\eta \frac{\partial E}{\partial W_{ij}} \quad (10)$$

其中 η ：學習速率(learning rate)，依照軟體中的設定

而 $\frac{\partial E}{\partial W_{ij}}$ 用連鎖律(chain rule)可以推導如下

$$\frac{\partial E}{\partial W_{ij}} = \frac{\partial E}{\partial net_j^n} \cdot \frac{\partial net_j^n}{\partial W_{ij}} \quad (11)$$

$$= \frac{\partial E}{\partial Y_j^n} \cdot \frac{\partial Y_j^n}{\partial net_j^n} \cdot \frac{\partial net_j^n}{\partial W_{ij}} \quad (12)$$

由(7)、(8)可得

$$\frac{\partial net_j^n}{\partial W_{ij}} = \frac{\partial}{\partial W_{ij}} (\sum_i W_{ij} Y_j^{n-1} - \theta_j) = Y_i^{n-1} \quad (13)$$

$$\frac{\partial Y_j^n}{\partial net_j^n} = \frac{\partial}{\partial net_j^n} f(net_j^n) = f'(net_j^n) \quad (14)$$

而 $\frac{\partial E}{\partial Y_j^n}$ 可分為兩種情形

1. 第 n 層是輸出層：

由(9)可得

$$\frac{\partial E}{\partial Y_j^n} = \frac{\partial}{\partial Y_j^n} \left(\frac{1}{2} \sum_j (T_j - Y_j^n)^2 \right) = -(T_j - Y_j^n) \quad (15)$$

2. 第 n 層是隱藏層之一：由連鎖律得

$$\frac{\partial E}{\partial Y_j^n} = \sum_k \frac{\partial E}{\partial net_k^{n+1}} \cdot \frac{\partial net_k^{n+1}}{\partial Y_j^n} \quad (16)$$

將(7)代入上式可得

$$\frac{\partial net_k^{n+1}}{\partial Y_j^n} = \frac{\partial}{\partial Y_j^n} (\sum_j W_{ij} Y_j^n - \theta_k) = W_{jk} \quad (17)$$

將差距量 δ 定義為

$$\delta_k^n = -\frac{\partial E}{\partial net_k^n} \quad (18)$$

將(17)、(18)式代入(16)式得

$$\frac{\partial E}{\partial Y_j^n} = -\sum_k \delta_k^{n+1} W_{jk} \quad (19)$$

最後 $\frac{\partial E}{\partial W_{ij}}$ 分為以下兩種情況：

1. W_{ij} 位於隱藏層和輸出層之間

將(13)、(14)、(15)式代入(12)式得

$$\frac{\partial E}{\partial W_{ij}} = -(T_j - Y_j^n) f'(net_j^n) Y_i^{n-1} \quad (20)$$

或是將(13)、(18)式代入(11)式得

$$\frac{\partial E}{\partial W_{ij}} = -\delta_j^n Y_i^{n-1} \quad (21)$$

由以上兩式相比可得

$$\delta_j^n = (T_j - Y_j) f'(net_j^n) \quad (22)$$

2. W_{ij} 位於兩個隱藏層之間

將(13)、(14)、(19)式代入(12)式得

$$\frac{\partial E}{\partial W_{ij}} = (-\sum_k \delta_k^{n+1} W_{jk}) f'(net_j^n) Y_i^{n-1} \quad (23)$$

或是將(13)、(18)式代入(11)式得

$$\frac{\partial E}{\partial W_{ij}} = -\delta_j^n Y_i^{n-1} \quad (24)$$

由(23)、(24)式相比得

$$\delta_j^n = (\sum_k \delta_k^{n+1} W_{jk}) f'(net_j^n) \quad (25)$$

綜合以上兩種情況可得到一個通式

$$\frac{\partial E}{\partial W_{ij}} = -\delta_j^n Y_i^{n-1} \quad (26)$$

其中 Y_i^{n-1} ：為 W_{ij} 所在前一層節點之輸出

δ_j^n ：為 W_{ij} 所在後一層節點之差距量

若 W_{ij} 所在後一層為輸出層則

$$\delta_j^n = (T_j - Y_j) f'(net_j^n) \quad (27)$$

否則

$$\delta_j^n = (\sum_k \delta_k^{n+1} W_{jk}) f'(net_j^n) \quad (28)$$

將(26)式代入(10)式得

$$\Delta W_{ij} = \eta \delta_j^n Y_i^{n-1} \quad (29)$$

此為倒傳遞演算法之關鍵公式

在此將 θ_j 想像成特殊的權重值，其連接的前一層網路節點輸出

值皆為 1，因此同理可證

$$\Delta \theta_j = \eta \delta_j^n \quad (30)$$

倒傳遞類神經網路的學習模式可分為三種，第一種是增進模式 (increment mode)；此種學習模式在網路權重值的修正上，每一組訓練資料的產生的差距量都即時修正網路的權重值。此種學習模式是最常用的，但是學習過程中可能會有較大的誤差是其缺點。第二種是批次

模式(batch mode)；此種學習模式和增進模式不同之處在於網路權重值不是即時修正，而是累積一定數量的修正量才更新修正量。第三種是快速模式(quick mode)；此種模式跟前兩種不一樣的是屬於啟發式修改網路權重值，比前兩者的處理速度要更快，但缺點是誤差會比較大。

參、材料與方法

一、實驗架構

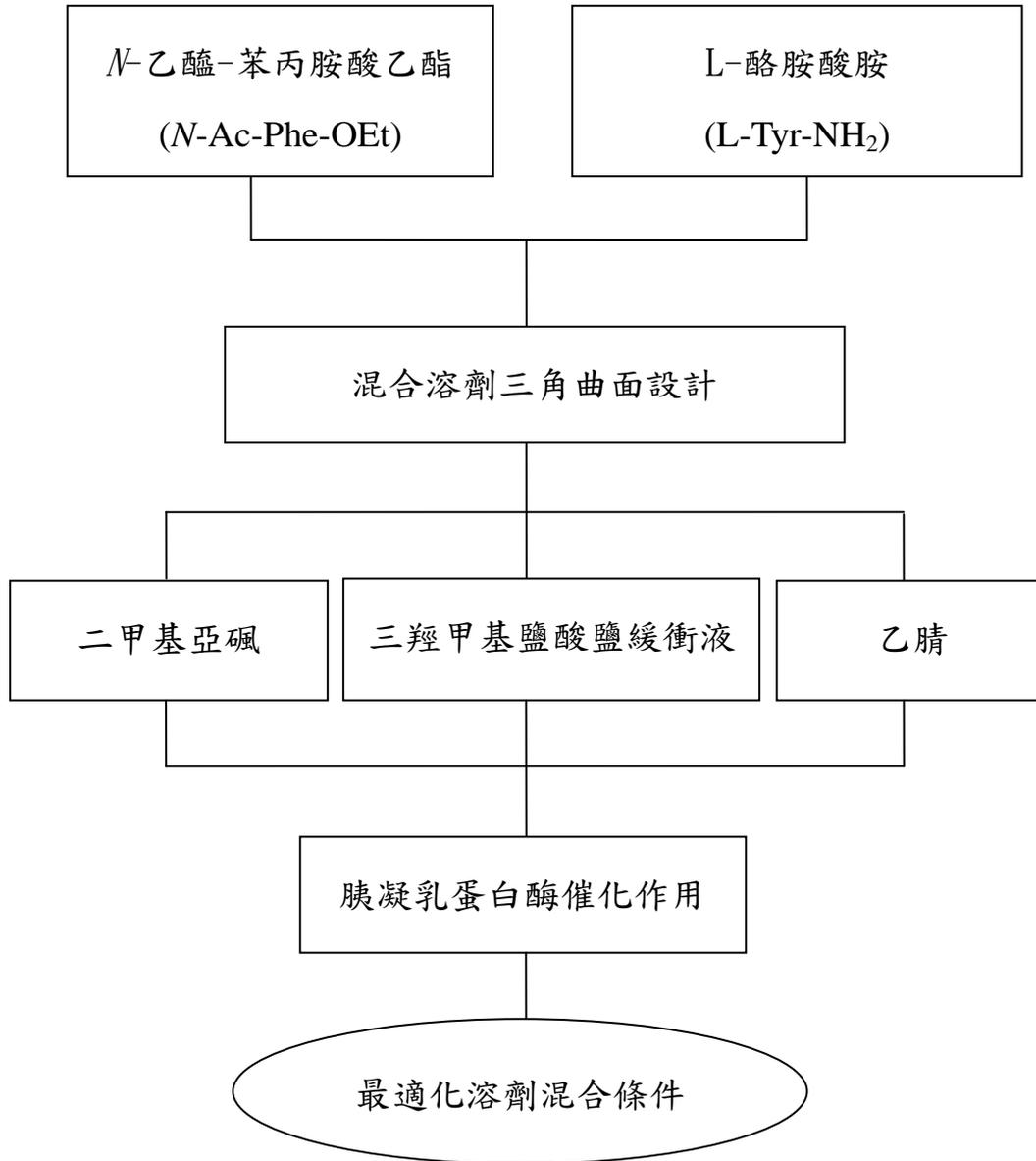


圖 11、最適化溶劑混合實驗設計架構圖

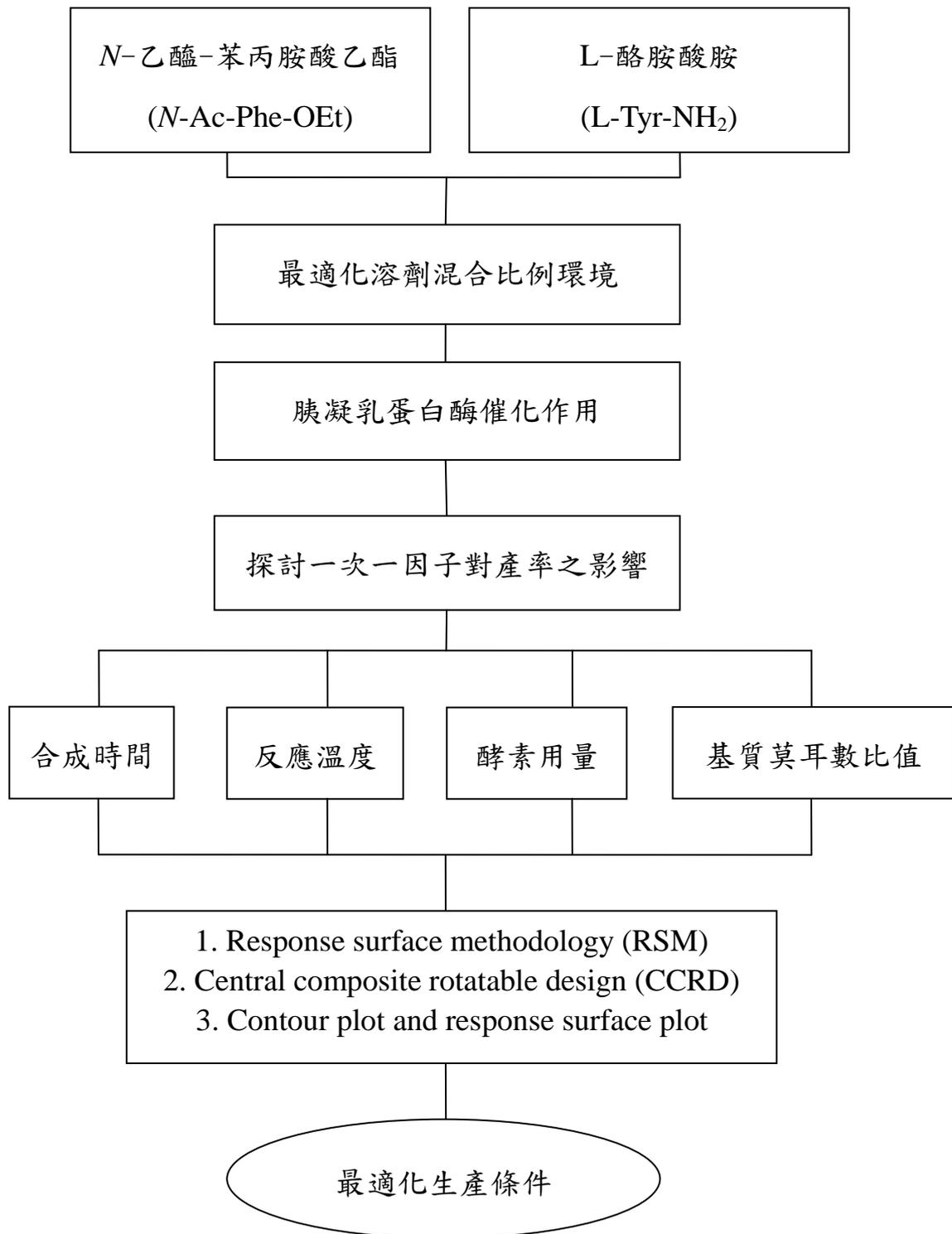


圖 12、最適化生產條件實驗設計架構圖

二、 實驗藥品及材料

(一) 藥品

胰凝乳蛋白酶 (α -chymotrypsin)

from bovine pancreas type II, EC 3.4.21.1, 55 units/mg

N-乙酰-苯丙氨酸乙酯(*N*-acetyl-phenylalanine ethyl ester,

N-Ac-Phe-OEt)

L-酪胺酸胺(L-Tyrosinamide, L-Tyr-NH₂)

以上等均購自 Sigma-Aldrich 在台代理商友和股份有限公司(台中)。

(二) 試劑

二甲基亞砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)

乙腈(Acetonitrile, ACN)

四氫呋喃(Tetrahydrofuran, THF)

二甲基甲醯胺(Dimethylformamide, DMF)

三氟醋酸(Trifluoroacetic acid, TFA)

三羥甲基鹽酸鹽(Tris hydrochloric acid, Tris-HCl)

醋酸(Acetic acid)

以上等均購自 Sigma-Aldrich 在台代理商友和股份有限公司(台中)。

三、儀器設備

往復式震盪水槽(B603, Firstek Scientific Co., Taipei)

桌上型酸鹼度計(Cyber Scan pH510)

電子天平(XS225A, Precisa)

高效能液相層析儀(High Performance Liquid Chromatography, HPLC)：

管柱：ODS-2 C18 5 μ m column (250 \times 4.6mm), Thermo Scientific；

幫浦：322 pumps, Gilson(USA)；

收集器：FC 203B

紫外/可見光檢測器：UV/vis-152, Gilson(USA)。

四、實驗方法

(一)最適化溶劑混合實驗

1.初步實驗

取反應基質 *N*-acetyl-phenylalanine ethyl ester (*N*-Ac-Phe-OEt)和 *L*-Tyrosinamide (*L*-Tyr-NH₂)之莫耳數比 50mM：50mM，加入 0.5 mL 的二甲基亞砷、乙腈、四氫呋喃或二甲基甲醯胺將 *N*-Ac-Phe-OEt 溶解，再加入 0.5 mL 的緩衝液(80 mM tris-HCl buffer, pH 9)，混合均勻後，添加蛋白質酵素 α -chymotrypsin 進行催化合成，於恆溫震盪水槽中進

行特定條件的反應。反應後加入 4 倍體積量的終止劑終止酵素反應，而終止劑的成分為醋酸和乙腈(50:50, v/v)；經由過濾，可得二胜肽衍生物(*N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂)，所得的產物再藉由 HPLC 進行定量和定性分析並挑選適合的溶劑進行實驗設計。(Ju *et al.*, 2009)

2. 實驗設計

採用一個三變數三角圖形設計(simplex centroid design)，實驗次數為 $2q-1$ ， q 為變數數目(Cornell, 1973; Shieh *et al.*, 1996)。此實驗設計七組不同比例的溶劑混合物如表 2，各溶劑組成從 0-1 mL。

3. 統計分析

利用統計分析系統 SAS 分析數據和 STATISTICA 軟體，使用多重回歸分析(Scheffé, 1958) 以契合下列之二次標準多項式：

$$Y = \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{23} x_2 x_3 \quad (31)$$

Y 是雙胜肽產物（產率）， β_1 、 β_2 、 β_3 、 β_{12} 、 β_{13} 、 β_{23} 為模型中預測的線性及對應參數之係數， X_1 為溶劑 ACN， X_2 為溶劑 tris-HCl buffer， X_3 為溶劑 DMSO。根據 Cornell 等(Cornell, 1973) 的描述，從模式中移除截距及二次項，在分析中沒有截距是因為混合物的成分是完全混合的。

表 2、三變數混合溶劑實驗設計

Table 2 .Three-variable simplex centroid design for mixture solvent response surface analysis.¹

Treatment Number	Components of Solvent (%)		
	Acetonitrile	Tris-HCl buffer	DMSO
1	100	0	0
2	100	0	0
3	0	100	0
4	0	100	0
5	0	0	100
6	0	0	100
7	50	50	0
8	50	50	0
9	50	0	50
10	50	0	50
11	0	50	50
12	0	50	50
13	33.33	33.33	33.33
14	33.33	33.33	33.33

¹Mixture design results in seven formulations

(二)最適化生產條件實驗

1.初步實驗

參照最適化溶劑混合實驗步驟及結果，取反應基質 *N*-acetyl-phenylalanine ethyl ester (*N*-Ac-Phe-OEt) 和 *L*-Tyrosinamide (*L*-Tyr-NH₂)，加入 0.25 mL 的二甲基亞砷及乙腈將 *N*-Ac-Phe-OEt 溶解後，再加入 0.5 mL 的緩衝液(80 mM tris-HCl buffer, pH 9)，混合均勻後，添加蛋白質酵素 α -chymotrypsin 進行催化合成，於恆溫震盪水槽中進行特定條件的反應。反應後加入 4 倍體積量的終止劑終止酵素反應，而終止劑的成分為醋酸和乙腈(50:50, v/v)；經由過濾，可得二胜肽衍生物(*N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂)，所得的產物再藉由 HPLC 進行定量和定性分析。生物催化合成二胜肽衍生物之反應條件包括：反應時間(2-10 min)、合成溫度(20-40 °C)、酵素用量(25-125 U)及基質莫耳數比 -Phe:Tyr(1:1-1:3)，實驗先以一次一因子之方式進行，在所有的實驗中，皆進行二重覆，以降低實驗誤差。

2.最適條件的探討

藉由初步的實驗後找出對產率影響較為顯著的反應條件與範圍，再套用反應曲面法的中心混成實驗設計(central composite rotatable design, CCRD)方式進行實驗，其設計如表 2 所示。所選取之條件與

範圍分別為：反應時間(2-10 min)、合成溫度(20-40 °C)、酵素用量(25-125 U)及基質莫耳數比-Phe:Tyr(1:1-1:3)。依照初步實驗步驟方式進行二胜肽產物合成的實驗。所得到之產物也透過高效能液相層析儀(high performance liquid chromatography, HPLC)進行分析。

3.統計分析

利用反應曲面迴歸 (RSREG) 的程序進行實驗數據-產率分析如表 3，以契合下列之二次多項方程式：

$$Y = \beta_0 + \beta_1 x_1 + \beta_2 x_2 + \beta_3 x_3 + \beta_4 x_4 + \beta_{11} x_1^2 + \beta_{22} x_2^2 + \beta_{33} x_3^2 + \beta_{44} x_4^2 + \beta_{12} x_1 x_2 + \beta_{13} x_1 x_3 + \beta_{14} x_1 x_4 + \beta_{23} x_2 x_3 + \beta_{24} x_2 x_4 + \beta_{34} x_3 x_4 \quad (32)$$

Y 為反應值 (%產率)； β_k 為係數常數， X_i ， X_j 是未標準化的獨立變數。而正則分析 (Canonical analysis) 是屬於反應曲面迴歸分析結果的一部分；另外 Ridgemax (脊形分析) 是用來評估從原始設計的中心增加半徑所得到的最大反應值。利用 Sigma plot 繪圖軟體，使四變數中的兩變數固定為常數項，進行等高線圖之繪製。

(三)合成產物之分析方法

參考 Hen-Yi Ju 等(Ju *et al.*, 2009)的鑑定方式，使用的沖提液為已加入 0.1% 三氟醋酸(TFA)的乙腈和水，體積比 30：70 混合後做沖提。

流速維持在 1.0 min/mL。在本研究中以高效能液相層析儀(HPLC)來分析樣品，使用 ODS-2 C₁₈ 層析管柱。沖提液為含 0.1% 三氟醋酸(TFA)的水和乙腈(70：30 v/v)，全部分析時間為 15 min；沖提方式為：一開始為 0 到 5 min，水和乙腈比為 70：30 (v/v)，接著，從 5 到 7 min，水和乙腈比更改為 30：70 (v/v)，之後維持相同的比例直到 15 min。在 UV 254 nm 下檢測其吸光值。

(四)產率計算

參考 Boeriu、Barros 及 Clapes 等(Clapés *et al.*, 1995; Barros *et al.*, 1999; Boeriu *et al.*, 2010)的產率計算方式，利用反應後基質及產物的 HPLC 波峰面積進行產率計算。在本研究中以基質(*N*-Ac-Phe-OEt)、二肽衍生(*N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂)及水解物(*N*-Ac-Phe-OH)的波峰面積進行運算，以下列公式表示之：

$$\text{Yield(\%)} = \frac{(\text{peak area of } N\text{-Ac-Phe-Tyr-NH}_2) \times 100}{(\text{peak area of } N\text{-Ac-Phe-OEt} + N\text{-Ac-Phe-Tyr-NH}_2 + N\text{-Ac-Phe-OH})} \quad (33)$$

(五)類神經網路

實驗過程以Neuralpower[®] (CPC-X Software, 2004)類神經網路軟體建立，將表3的RSM數據隨機分為兩組：訓練及學習，輸入層神經元個數4個，隱藏層1層，輸出層神經元個數1個，步驟如下：

步驟一：分別輸入訓練及學習的 input 和 output 數據。

步驟二：接著設定其轉換函數(Gaussian、Sigmoid 與 Tanh)、學習模式 (increment、batch 與 quick)、循環次數(1000、10000、100000 次)及隱藏層神經元個數(5-20)。

步驟三：挑選一種其均方根誤差值(RMSE)及絕對平均標準差(absolute average deviation)最小且檢定係數(R^2)最高的組合。計算公式如下(Ghaffari *et al.*, 2006; Basri *et al.*, 2007; Moghaddam *et al.*, 2010)：

均方差(MSE)：

$$\frac{1}{n} \sum_{i=1}^n (y_i - y_{di})^2 \quad (34)$$

均方根誤差值(RMSE)：

$$(\text{MSE})^{\frac{1}{2}} \quad (35)$$

絕對平均標準差(Absolute Average Deviation, AAD)：

$$\text{AAD} = \{[\sum_{i=1}^n (|y_i - y_{di}| / y_{di})] / n\} \times 100 \quad (36)$$

檢定係數(R^2)：

表 3、二胜肽衍生物產率之四變數五階層的中心混成實驗設計

Table 3.4-factor-5-level Central composite design of dipeptide derivative yield

Treatment ^a No.	Time (min) X ₁	Temperature (°C) X ₂	Enzyme amount (U) X ₃	Substrate molar ratio (Tyr/Phe) X ₄
1	1 (8) ^b	-1 (25)	-1 (50)	1 (2.5)
2	0 (6)	0 (30)	0 (75)	0 (2)
3	0 (6)	0 (30)	0 (75)	0 (2)
4	1 (8)	1 (35)	1 (100)	1 (2.5)
5	-1 (4)	1 (35)	1 (100)	-1 (1.5)
6	-2 (2)	0 (30)	0 (75)	0 (2)
7	1 (8)	1 (35)	1 (100)	-1 (1.5)
8	0 (6)	2 (40)	0 (75)	0 (2)
9	-1 (4)	1 (35)	1 (100)	1 (2.5)
10	-1 (4)	1 (35)	-1 (50)	-1 (1.5)
11	1 (8)	-1 (25)	1 (100)	1 (2.5)
12	0 (6)	-2 (20)	0 (75)	0 (2)
13	0 (6)	0 (30)	0 (75)	-2 (1)
14	-1 (4)	-1 (25)	-1 (50)	1 (2.5)
15	0 (6)	0 (30)	-2 (25)	0 (2)
16	-1 (4)	-1 (25)	-1 (50)	-1 (1.5)
17	1 (8)	1 (35)	-1 (50)	-1 (1.5)
18	1 (8)	-1 (25)	-1 (50)	-1 (1.5)
19	-1 (4)	-1 (25)	1 (100)	1 (2.5)
20	-1 (4)	1 (35)	-1 (50)	1 (2.5)
21	1 (8)	-1 (25)	1 (100)	-1 (1.5)
22	-1 (4)	-1 (25)	1 (100)	-1 (1.5)
23	0 (6)	0 (30)	0 (75)	2 (3)
24	0 (6)	0 (30)	2 (125)	0 (2)
25	1 (8)	1 (35)	-1 (50)	1 (2.5)
26	2 (10)	0 (30)	0 (75)	0 (2)
27	0 (6)	0 (30)	0 (75)	0 (1:2)

^a Treatments were run in a random order.

^b Numbers in parentheses represent actual experimental values.

$$R^2 = 1 - \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - y_{di})^2}{\sum_{i=1}^n (y_{di} - y_m)^2} \quad (37)$$

y_i 代表預測產率

y_{di} 代表實際產率

y_m 代表實際產率的平均值

n 代表實驗數目

步驟四：將此組合利用軟體應用分析得知最適化條件及預測產率，再將所得到的條件及產率做驗證實驗。另外一些參數如 learning rate、momentum 等將會依照軟體內設定的，不會再做更改。

肆、結果與討論

本研究首先利用混合實驗設計探討最適化溶劑混合比例合成二肽衍生物，接著利用此結果結合中心混成實驗設計與反應曲面法(RSM)探討其最適生產條件，最後比較類神經網路和反應曲面法的分析結果並且評估彼此間的差異，以判斷何種方法較為適合解釋本研究之實驗數據。

一、溶劑選擇

表 4 為探討不同溶劑對 α -chymotrypsin 合成二肽之產率影響，產率高低依序為 DMSO>ACN>THF>DMF，因此挑選產率最高的兩種溶劑進行後續試驗且因 THF 及 DMF 無法完全溶解基質，同時在與其他溶劑混合時不能均勻混合，最終挑選 DMSO 和 ACN 為實驗反應的媒介(Noritomi *et al.*, 2009)。

二、最適化溶劑探討

表 5 為利用混合實驗設計模擬 7 組不同混合比例的 ACN、tris-HCl buffer 和 DMSO，對 α -chymotrypsin 合成 N -Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響，結果顯示當只有單一種溶劑的環境下，以 tris-HCl buffer 產率最高達 16.44%。若使用兩種溶劑混合時，其中 ACN 和 DMSO 混合使酵素

表 4、不同溶劑對 α -chymotrypsin 合成 N -Ac-Phe-Tyr-NH₂ 之產率影響

Table 4. The effect of solvent composition on the yield of N -Ac-Phe-Tyr-NH₂ using α -chymotrypsin synthesis.¹

Solvent	Yield(%)
DMSO	69.27
ACN	69.04
THF	68.62
DMF	68.09

¹The reaction was carried out with a reaction temperature of 36°C, a substrate molar ratio of Phe : Tyr= 1:1, an enzyme amount of 165U, and a mixture solution (tris-HCl buffer : solvent=1:1)

完全沒有反應其產率為 0%，可能原因為這兩種溶劑皆為 $\log P < 2$ 極親水有機溶劑，故酵素表面的水分子易被有機溶劑穿透或被移開，而造成酵素微觀的構形改變而失去活性(Laane *et al.*, 1987)；當使用三種溶劑混合時，其反應產率較各別來得高可達 73.36~73.73%，以 SAS 統計軟體中的多元迴歸進行分析，可得一組二次多項式

$$Y=3.548X_1+13.948X_2+3.443X_3+253.058X_1X_2+3.648X_1X_3+253.208X_2X_3 \quad (38)$$

其中， X_1 表示 acetonitrile， X_2 表示 tris-HCl buffer， X_3 表示 DMSO，其檢定係數(R^2)為 0.9876，且此二次多項式(model)經 F-test 顯示具有顯著影響 ($p < 0.001$)，表示此二次多項式具有顯著重要性，並可適當呈現產率與各溶劑之間實際關係如表 6。在這三種溶劑中呈現顯著差異的是 X_2 -buffer ($p < 0.05$)，而在 X_1X_2 (ACN 與 buffer 混合)及 X_2X_3 (DMSO 與 buffer 混合)更具有顯著影響($p < 0.001$)，表示 ACN 或 DMSO 與 buffer 混合使用都具有顯著影響如表 7，只使用 buffer 反應時，效果較混合時差，最後藉由 STATISTICA 軟體繪出三角輪廓圖及其等高線圖表示由預測模式獲得的產率如圖 13，從三角曲面圖可看到最大產率在顏色最深的區域，大約是 70% 左右，再從上方的等高線圖搭配最適化比例及預測產率之分析可得如圖 14，從此估算出產率最高在 70% 左右，而溶劑比例及組成在 acetonitrile 佔約 25%、tris-HCl buffer 佔約 50%、DMSO 佔約 25% 時達到最高產率。

表 5、溶劑組成對 α -chymotrypsin 合成 N -Ac-Phe-Tyr-NH₂ 之產率影響

Table 5. The effect of solvent composition on the yield of N -Ac-Phe-Tyr-NH₂ using α -chymotrypsin synthesis. ¹

Treatment number	Components of Solvent (%)			Yield (%)
	acetonitrile	tris-HCl buffer	DMSO	
1	100	0	0	5.26
2	100	0	0	4.04
3	0	100	0	16.44
4	0	100	0	13.66
5	0	0	100	2.78
6	0	0	100	6.31
7	50	50	0	66.58
8	50	50	0	68.63
9	50	0	50	0
10	50	0	50	0
11	0	50	50	71.75
12	0	50	50	63.43
13	33.33	33.33	33.33	73.36
14	33.33	33.33	33.33	73.73

¹Mixture design results in seven formulations;

表 6、最適化混合溶劑之變異數分析

Table 6. Analysis of variance for variables pertaining to the response of *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ yield

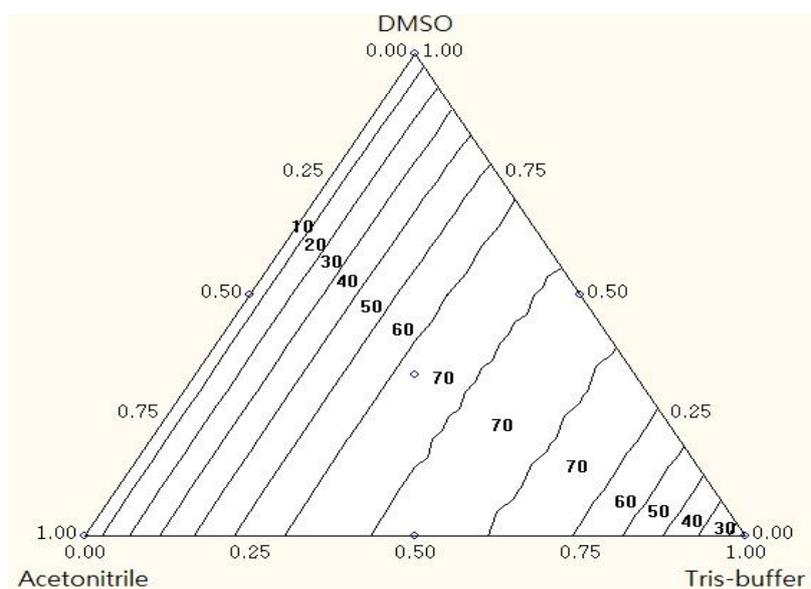
Source	Degree of freedom	Sum of Squares	Mean Square	F Value	Pr > F	R ²
Model	6	29312	4885.386	106.12	<.0001	0.9876
Error	8	368.285	46.035			
Uncorrected Total	14	29681				

表 7、最適化混合溶劑之單一因子及其交互作用分析

Table 7. Analysis of single factor and its interaction to the response of *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ yield

Variable	Regression Coefficient	t Value	Pr > t
X ₁ ACN	3.548	0.74	0.4791
X ₂ tris-HCl buffer	13.948	2.92	0.0193
X ₃ DMSO	3.443	0.72	0.4918
X ₁ X ₂	253.058	11.52	<.0001
X ₁ X ₃	3.648	0.17	0.8722
X ₂ X ₃	253.208	11.52	<.0001

(a)



(b)

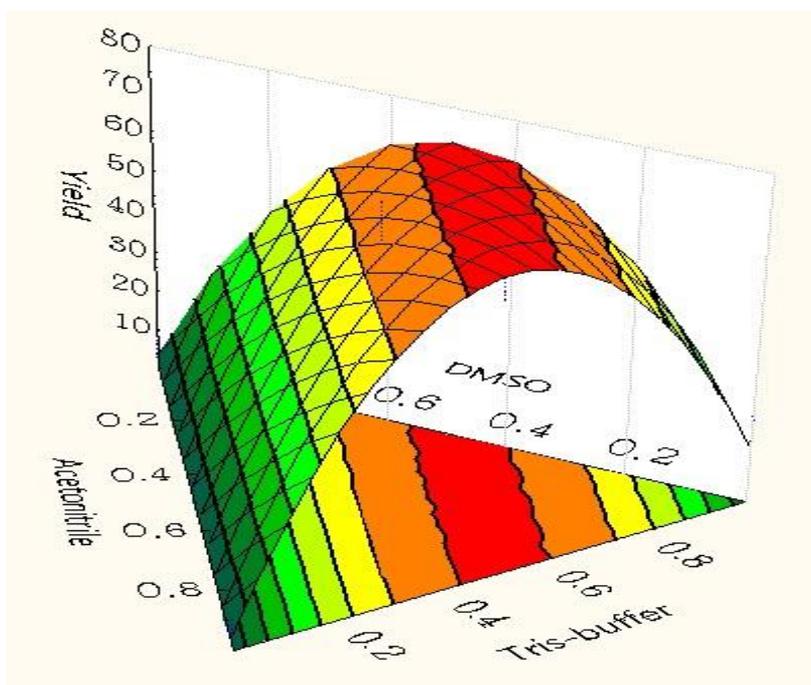


圖 13、(a)等高線圖 及(b) 曲面圖分析對合成 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響

Figure 13.(a)Contour plot and (b)Surface plot for influence of synthesis *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ in blends solvent.

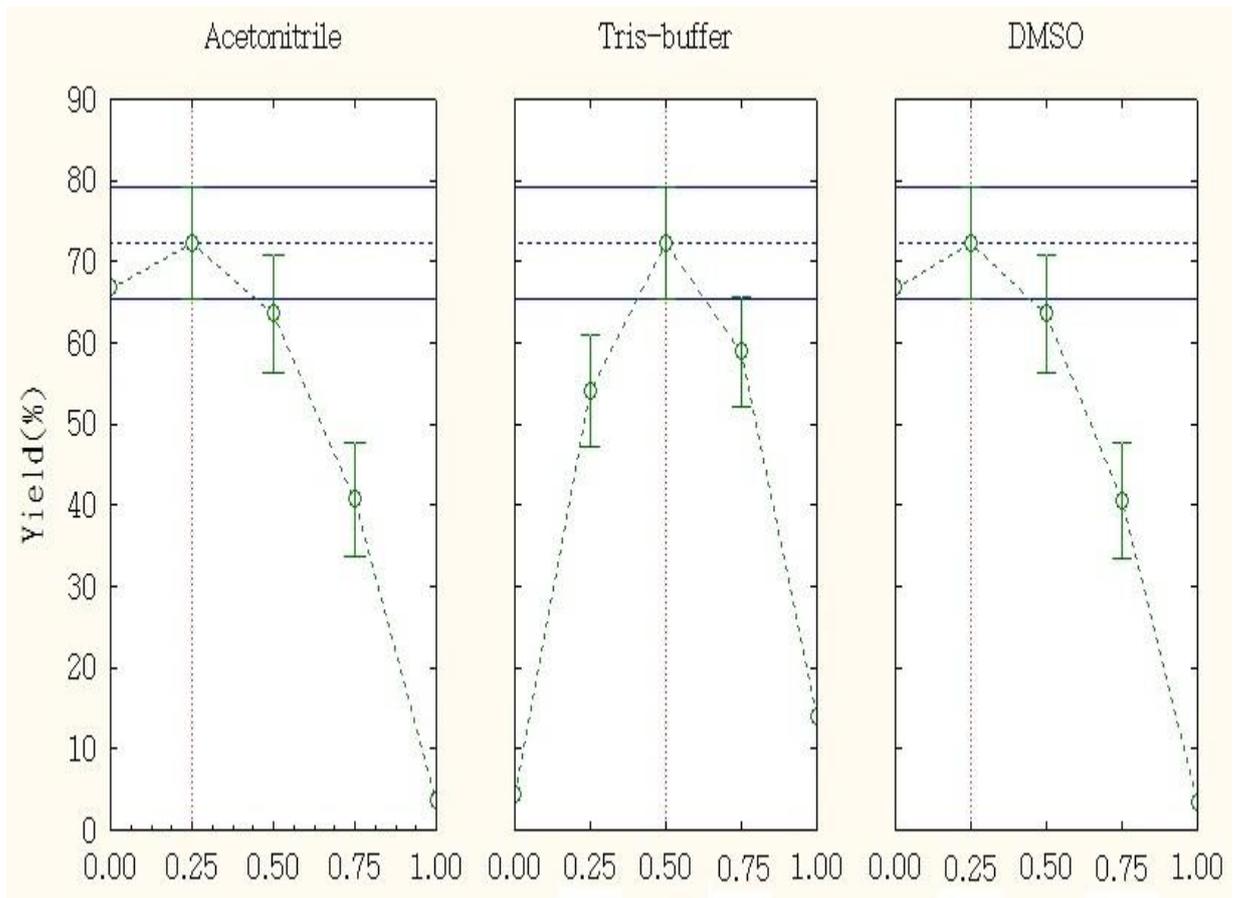


圖 14、最適化比例及預測產率之分析

Figure 14. Analysis of the optimum solvent ratio and the predicted yield

接著利用 STATISTICA 軟體分析其最適化比例，得知最佳的預估產率為 72.22%，最適化的混合比例為 acetonitrile 佔 25%、DMSO 佔 25%、tris-HCl buffer 佔 50%。依照上述所得最適化混合比例進行實驗，結果顯示 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 的實際產率為 71.82%，表示依照最適化混合比例進行二肽衍生物生產確實與預測結果相符。後續將以混合設計所得之最適化混合比例，更進一步的探討四種變因包括反應時間、反應溫度、酵素用量及基質莫耳數比值 Tyr/Phe 對於 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響。

三、最適化生產條件探討

反應曲面法結合了實驗設計與統計分析，當應用在不同程序的最優化時，可一次處理多因子；可將原本複雜的實驗簡單化，不但可以節省時間且能評估實驗的準確性，如今已成為科學技術常用的方法之一。接下的實驗採用上述最適化溶劑比例進一步探討影響 α -chymotrypsin 催化合成二肽衍生物的反應條件，採用四變數五階層之中心混成實驗設計(CCRD)，有效縮短的實驗次數及時間，藉由各種統計檢定評估與等高線圖推斷，可清楚的建立反應條件變數與產物(二肽衍生物)產率之關係。

(一)單一因子探討

1. 不同時間對產率之影響

圖 15 利用 α -chymotrypsin 催化合成二胜肽產物，探討不同時間對產率之影響。所固定的反應條件為酵素用量 165 U，反應溫度 30°C，*N*-Ac-Phe-OEt 和 Tyr-NH₂ 的基質莫耳數比 1:1 以及 pH 9.0 的緩衝液 (tris-HCl buffer: DMSO:ACN = 2:1:1 (v/v))。α-chymotrypsin 能在短時間內將 *N*-Ac-Phe-OEt 與 Tyr-NH₂ 快速催化合成二胜肽衍生物 (*N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂)，在反應時間 5 min 可達最高的產率 75%。

2. 不同溫度對產率之影響

圖 16 在探討不同溫度對產率之影響，所固定的反應條件為酵素用量 165 U，反應時間 30 min，*N*-Ac-Phe-OEt 和 Tyr-NH₂ 的基質莫耳數比 1:1 以及 pH 9.0 的緩衝液 (tris-HCl buffer: DMSO:ACN = 2:1:1 (v/v)) 的情況下進行反應。當溫度在 20°C 至 30°C 時，因酵素活性的提升，其產率有提高的趨勢，在此範圍裡有較高的合成產率；但是，當溫度漸漸升高時，酵素本身的蛋白質慢慢受到高溫的破壞，漸漸造成酵素結構改變，活性喪失，使得產率降低，這樣的結果明顯的在圖中呈現出來；較佳的溫度為 30°C，可得 75% 左右的產率。此結果與 Salam 等人的研究利用 α -chymotrypsin 合成 Phe-Phe 二肽在反應溫度 30°C 時，

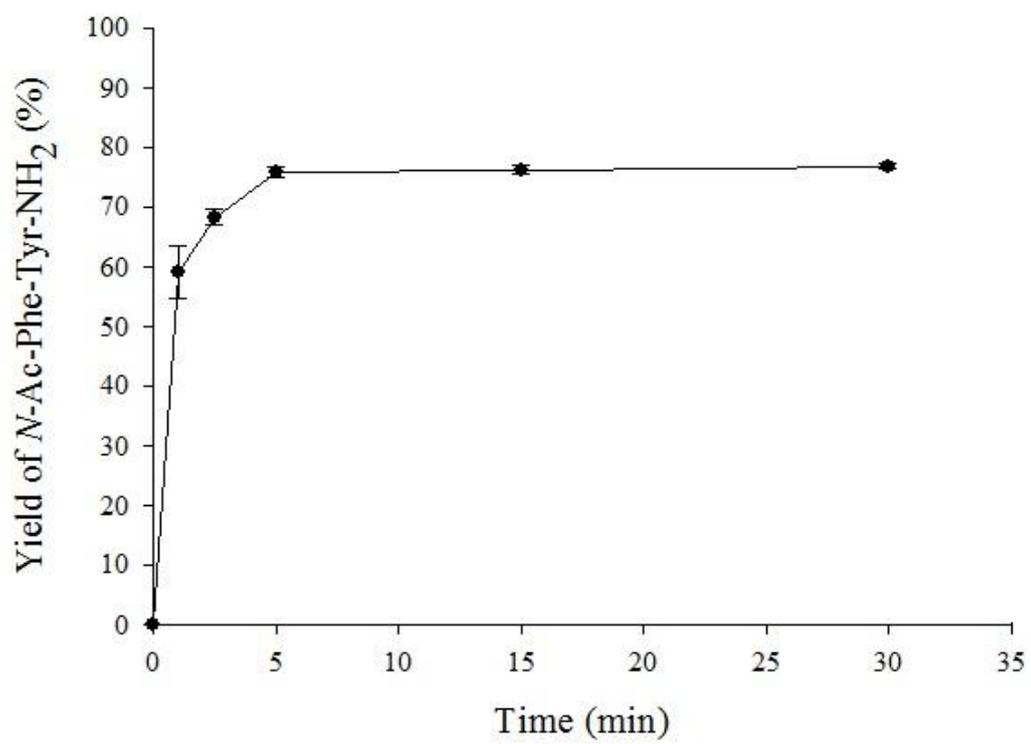


圖 15、反應時間對Phe-Tyr產率之影響

Figure 15. Effect of reaction time on Phe-Tyr yield

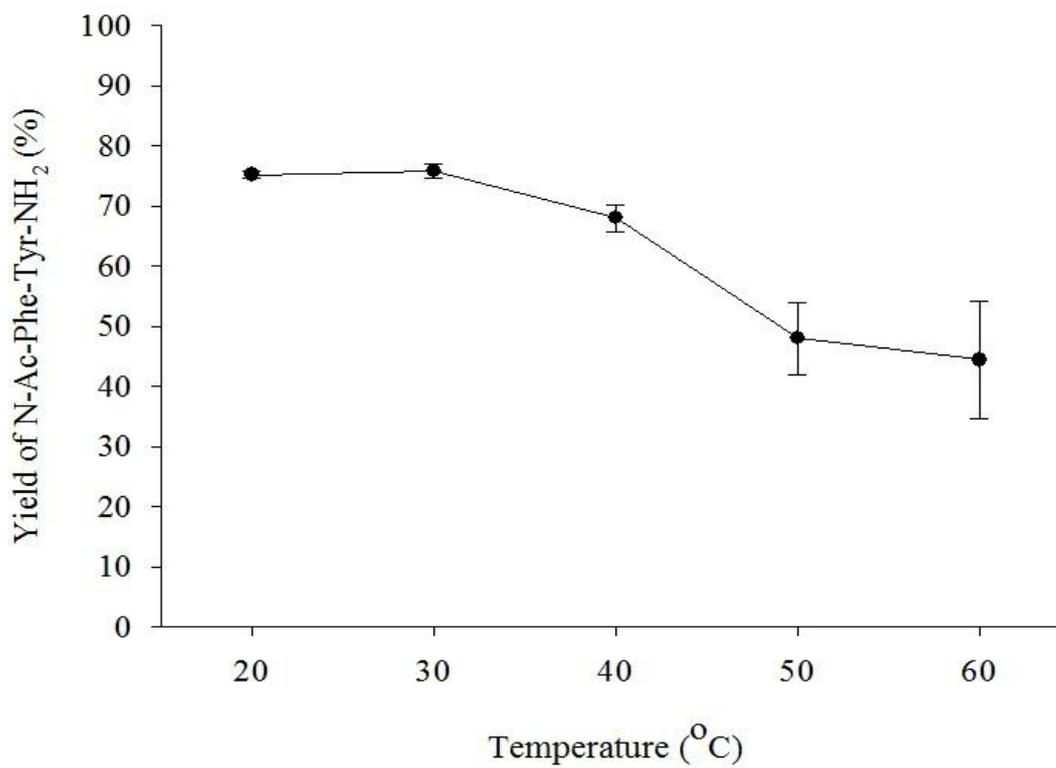


圖 16、反應溫度對 Phe-Tyr 產率之影響

Figure 16. Effect of reaction temperature on Phe-Tyr yield

可達最高 84.6% 的產率，與本研究的結論相似(Abdus Salam *et al.*, 2006)。

3. 不同酵素用量對於產率之影響

不同的酵素用量當然對於整個反應的進行是有很大的影響，當酵素用量增加時，反應速率與產率都有明顯的增加，如圖 17 所示。但是，在固定用量的反應基質中，當反應物幾乎形成產物時，就算酵素用量增加，產率依舊無法提升，所以有適當的酵素用量在經濟效益上將有顯著的影響。本實驗發現，酵素用量為 75 U 時，就可得到較高產率的產物(約 75%)，但是酵素用量持續增加時，發現產物的產率並無明顯的提升。

4. 不同基質莫耳數比值對於產率之影響

圖 18 為探討不同基質莫耳數比值對於產率之影響，結果顯示 Tyr/Phe 比值在 1 至 3 的產率均無顯著差異，其可能原因是在此受質比值範圍，酵素催化反應時，基質濃度足夠使酵素結合達飽和，即基質與每個可用的酵素分子已形成複合體，其總反應速率已達最大，此範圍的基質無法再提高反應速率。相反的，在很低的基質濃度下，酵素尚未被飽和，反應之總速率則受酵素與基質反應產生複合體時的速率所控制，當酵素濃度一定時，基質濃度越高，反應速率亦隨之提高。

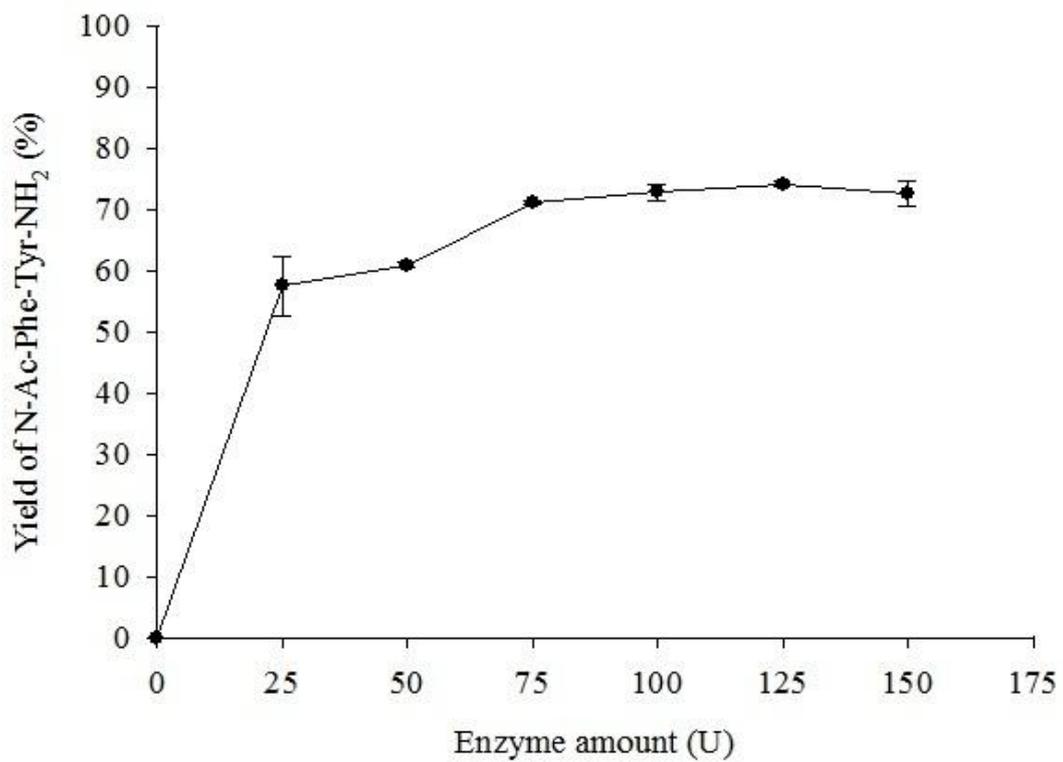


圖 17、酵素用量對 Phe-Tyr 產率之影響

Figure 17. Effect of enzyme activity on Phe-Tyr yield

本研究採用(Tyr/Phe) 1~3 之基質莫耳數比值，配合實驗設計以獲得最適之基質莫耳數比值。也有文獻同樣指出基質莫耳數比若愈高其產率也會隨之提升(Narai-Kanayama *et al.*, 2009)。

(二)多因子及其交互作用探討

藉由單一因子探討所得到較佳的反應條件，進一步篩選出適合的實驗範圍，並進行四變數五階層的中心混成實驗設計，探討以溶劑 Acetonitrile : DMSO : Tris-HCl buffer=1 : 1 : 2 比例混合的二十七個實驗點對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響，其實驗設計條件參數為：反應時間 2~10 min、合成溫度 20-40°C、酵素用量 25-125 U 及基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 1~3。套用實驗設計方法將實驗次數大幅的減少以利實驗進行及藥品用量的節約。將表 8 中二十七個實驗點以統計分析軟體 SAS 中的反應曲面回歸分析(RSREG)，可得到一組二次迴歸方程式，如下：

$$Y=-13.2871+11.6235x_1+2.9431x_2+0.3566x_3-17.2025x_4-0.3883x_1^2-0.049x_2^2-0.0002x_3^2+2.3571x_4^2-0.1334x_1x_2-0.0212x_1x_3+0.4456x_1x_4-0.0035x_2x_3+0.3208x_2x_4+0.0265x_3x_4 \quad (39)$$

其中， X_1 表示反應時間， X_2 表示合成溫度， X_3 表示酵素用量， X_4 表示基質莫耳數比。再將上述的迴歸方程式經由計算後，

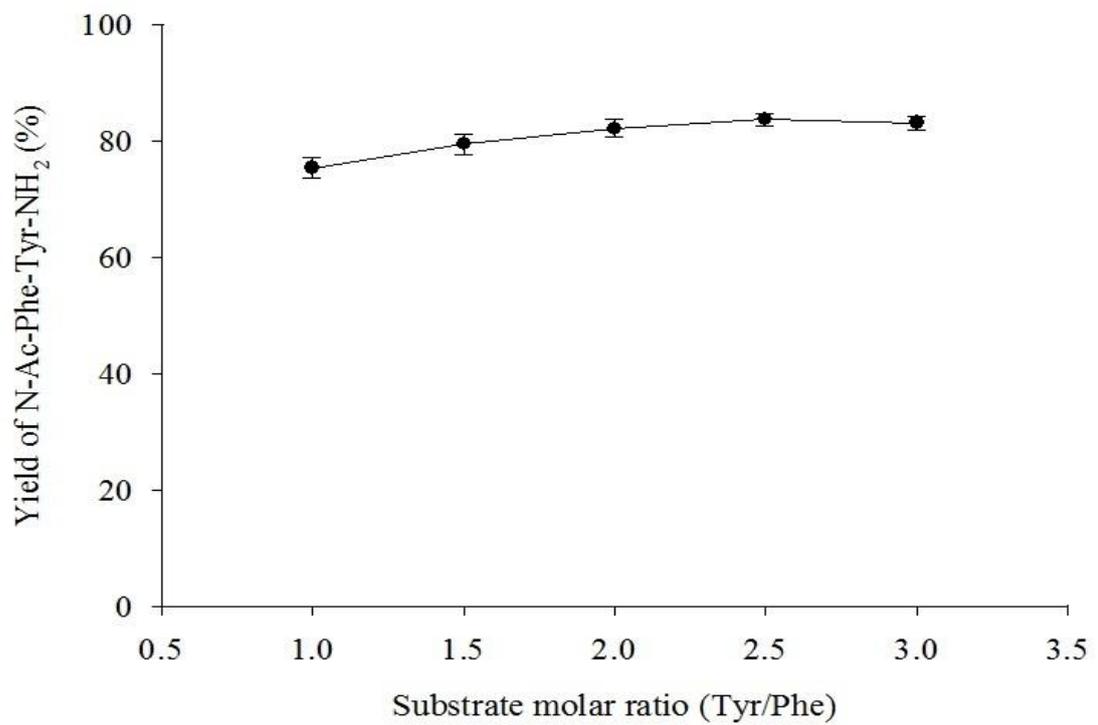


圖 18、基質莫耳數比值對 Phe-Tyr 產率之影響

Figure 18. Effect of substrate molar ratio (Tyr/ Phe) on Phe-Tyr yield

表 8、四變數五階層之中心混成實驗設計之二肽產率

Table 8.4-factor-5-level Central Composite Design for dipeptide yield

Treatment No.	Time (min) X ₁	Temperature (°C) X ₂	Enzyme amount (U) X ₃	Substrate molar ratio (Tyr/Phe) X ₄	Yield ² (%) Y
1	1 (8) ¹	-1 (25)	-1 (50)	1 (2.5)	75.10±0.09
2	0 (6)	0 (30)	0 (75)	0 (2)	73.43±0.46
3	0 (6)	0 (30)	0 (75)	0 (2)	72.53±2.02
4	1 (8)	1 (35)	1 (100)	1 (2.5)	80.64±0.18
5	-1 (4)	1 (35)	1 (100)	-1 (1.5)	71.61±0.70
6	-2 (2)	0 (30)	0 (75)	0 (2)	53.88±1.60
7	1 (8)	1 (35)	1 (100)	-1 (1.5)	69.23±0.12
8	0 (6)	2 (40)	0 (75)	0 (2)	64.00±1.53
9	-1 (4)	1 (35)	1 (100)	1 (2.5)	73.34±1.30
10	-1 (4)	1 (35)	-1 (50)	-1 (1.5)	60.84±1.12
11	1 (8)	-1 (25)	1 (100)	1 (2.5)	84.33±2.09
12	0 (6)	-2 (20)	0 (75)	0 (2)	75.06±0.18
13	0 (6)	0 (30)	0 (75)	-2 (1)	69.56±0.86
14	-1 (4)	-1 (25)	-1 (50)	1 (2.5)	65.74±2.45
15	0 (6)	0 (30)	-2 (25)	0 (2)	67.71±0.24
16	-1 (4)	-1 (25)	-1 (50)	-1 (1.5)	61.02±0.29
17	1 (8)	1 (35)	-1 (50)	-1 (1.5)	63.68±0.34
18	1 (8)	-1 (25)	-1 (50)	-1 (1.5)	75.74±1.04
19	-1 (4)	-1 (25)	1 (100)	1 (2.5)	78.99±2.64
20	-1 (4)	1 (35)	-1 (50)	1 (2.5)	67.61±0.80
21	1 (8)	-1 (25)	1 (100)	-1 (1.5)	78.04±0.25
22	-1 (4)	-1 (25)	1 (100)	-1 (1.5)	71.20±2.22
23	0 (6)	0 (30)	0 (75)	2 (3)	84.02±0.39
24	0 (6)	0 (30)	2 (125)	0 (2)	80.14±2.47
25	1 (8)	1 (35)	-1 (50)	1 (2.5)	74.76±0.11
26	2 (10)	0 (30)	0 (75)	0 (2)	82.56±0.36
27	0 (6)	0 (30)	0 (75)	0 (2)	77.09±0.89

¹ Actual experimental values.

² Yield was the average (±SD) of duplicated experiments.

以繪圖軟體 SigmaPlot 分別繪製出反應曲面圖(response surface plot)與等高線圖(contour plot)。經由 SAS 所統計出來的結果，除了二次迴歸模式外，還可得到變異係數分析表(ANOVA)、檢定係數(R-square, R^2)、獨立變數聯合檢定(joint test)、最大反應脊型分析(ridge of maximum response) 等，而這些檢定結果分別在表 9 和 10 中呈現出來。

經統計分析結果得知二次迴歸方程式的 R^2 值為 0.90 且二次多項式的變異數分析(ANOVA)如表 9，其 total model 於 F-test 顯示具有顯著影響($p < 0.001$)，由此說明二次模型多項式對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率有高度相關性，其中又以一次式(linear)具最顯著影響($p < 0.001$)，表示獨立變數(一次式)對產率的影響非常的重要。總誤差(total error)分析中，此二次多項式適缺性(lack of fit)不顯著($p > 0.05$)，亦可得知此二次多項式所呈現的誤差無顯著影響，總誤差來源多來自實驗誤差(pure error)。此外，進一步以聯合檢測分析瞭解個別變數對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之整體影響如表 10，結果顯示反應時間(X_1)、酵素用量(X_3)及基質莫耳數比值(X_4)皆對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率有顯著的影響($p < 0.05$)，其中又以反應時間最為顯著($p < 0.001$)。

根據上述二次模型多項式，分別固定其中一變數，以其餘兩變數繪製出一系列曲面圖，以了解各變數與 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之間的關係。圖 19 為固定酵素用量 100U 及基質莫耳數比(Tyr/Phe) 2.5 時，

表 9、二肽產率變數之變異數分析

Table 9. Analysis of variance for variables pertaining to the response of dipeptide yield

Source	Degree of freedom	Sum of squares	Mean square	Prob. > F ¹
Linear	4	1172.1	293.0	<0.0001
Quadratic	4	108.3	27.1	0.1450
Cross-product	6	64.8	10.8	0.5662
Total model	14	1345.2	96.1	0.0007
Lack of fit	10	143.7	14.3	0.3232
Pure error	2	11.6	5.8	
Total error	12	155.3	12.9	

¹Prob. > *F* = level of significance

表 10、二胜肽合成變數之聯合檢測分析

Table 10. Analysis of dipeptide synthesis for joint test

Factor	Degrees of freedom	Sum of squares	Prob >F ¹
Time (X ₁)	5	591.913834	0.0009
Temperature(X ₂)	5	180.472429	0.0676
Enzyme amount (X ₃)	5	344.016529	0.0084
Substrate molar ratio (X ₄)	5	276.577362	0.0183

¹Prob. > F = level of significance

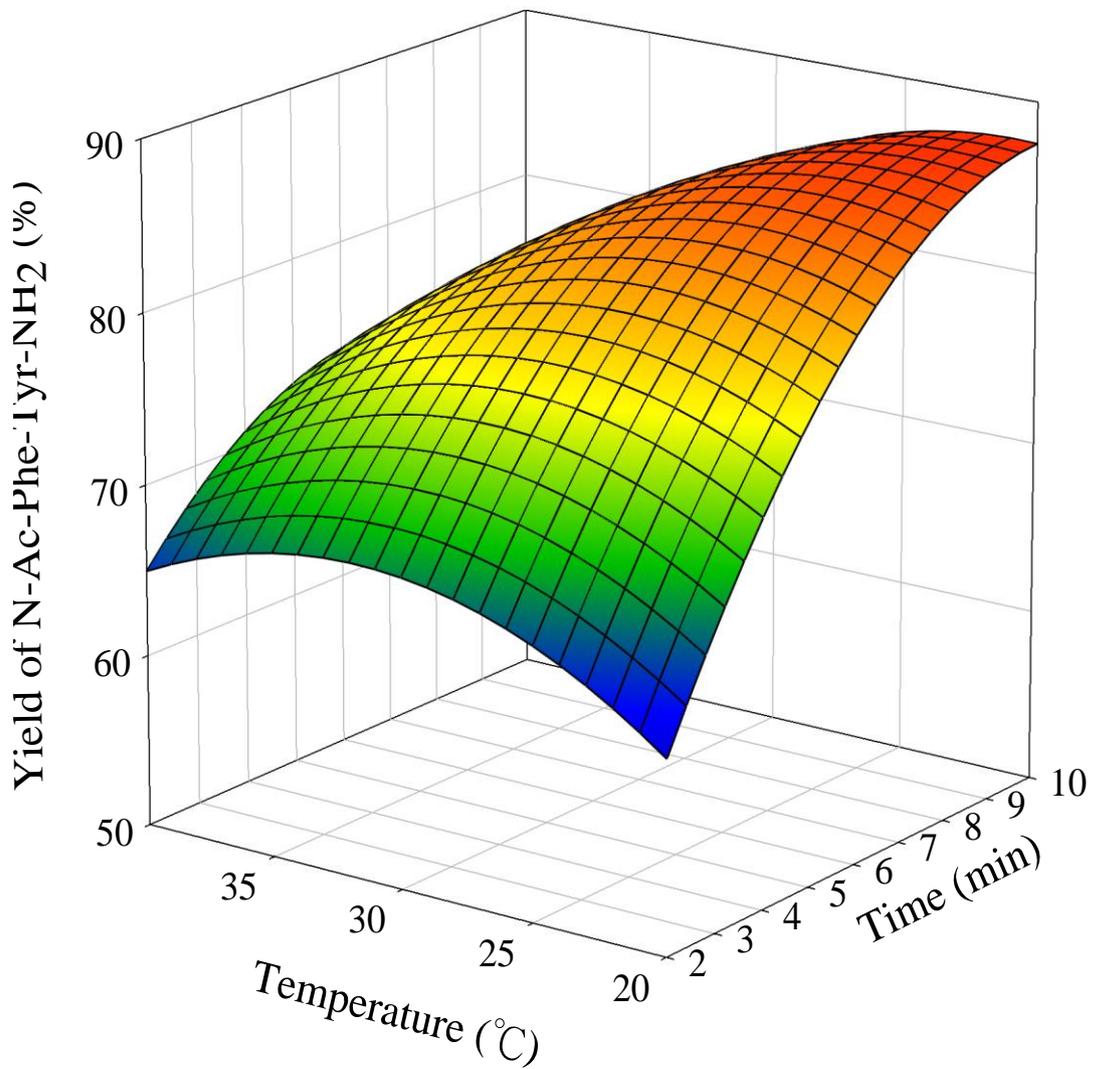


圖 19、在基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.5、酵素用量 100 U 下反應溫度與反應時間對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響

Figure 19. Effect of reaction temperature and reaction time on Phe-Tyr yield at substrate molar ratio (Tyr/Phe) 2.5 and enzyme amount 100 U

反應溫度與反應時間對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響，結果顯示反應時間在 8~9 min 與反應溫度 25~30°C，具有最高的產率，從反應時間的曲線與反應溫度相比之下，可發現反應時間越久對產率具有提升的作用，而當溫度超過 30°C 後產率就會開始下降，與酵素活性有關。圖 20 為固定反應時間 8 min 及基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.5 時，反應溫度與酵素用量對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響，反應溫度在 25~30°C 與酵素在 125 U 有最高的產率，酵素用量越多對產率具有提升作用，溫度一樣超過 30°C 後產率就會開始下降。圖 21 為固定反應時間 8 min 及酵素用量 100 U 時，反應溫度與基質莫耳數比對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響，反應溫度介於 25-30°C 與基質莫耳數比值 Tyr/Phe 為 3 時具有最高的產率，基質莫耳數比中對 Tyr 含量越高產率具有提升的作用，與 Narai-Kanayama 等人(2009)基質莫耳數比對於產率影響有相似的趨勢。在圖 22 中表示各反應條件與 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之等高線圖。從這九張等高線圖指出，以 α -chymotrypsin 催化合成 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 之最佳反應在 125 U 的酵素用量及基質莫耳數比值 Tyr/Phe 為 3 的環境下，其二肽產率可得到 85% 或更高；然而，如果在 25 U 的酵素用量及基質莫耳數比值 Tyr/Phe 為 1 的環境下反應，所得到的產率最高只有 45% 左右。

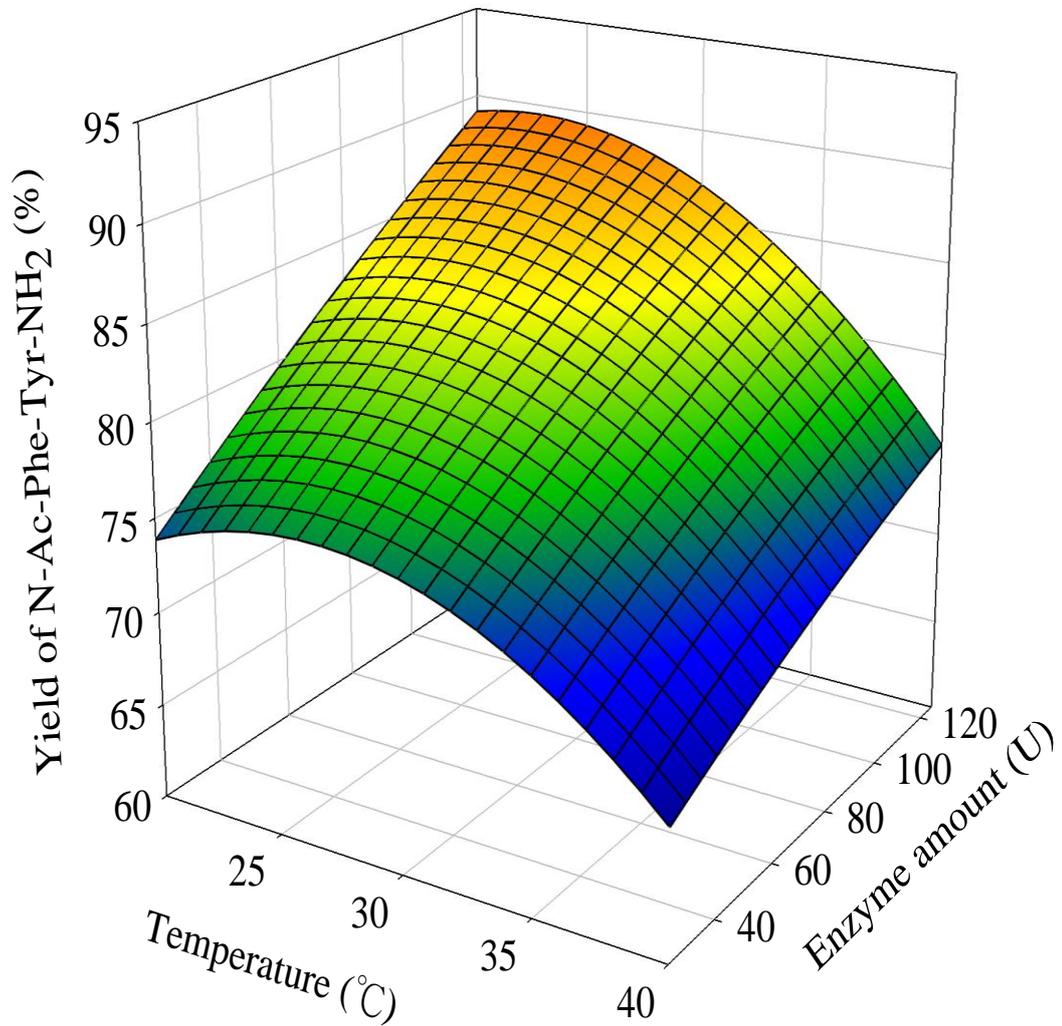


圖 20、在基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.5、反應時間 8 min 下反應溫度與酵素用量對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響

Figure 20. Effect of reaction temperature and enzyme dosage on Phe-Tyr yield at substrate molar ratio(Tyr/Phe) 2.5 and reaction time 8 min

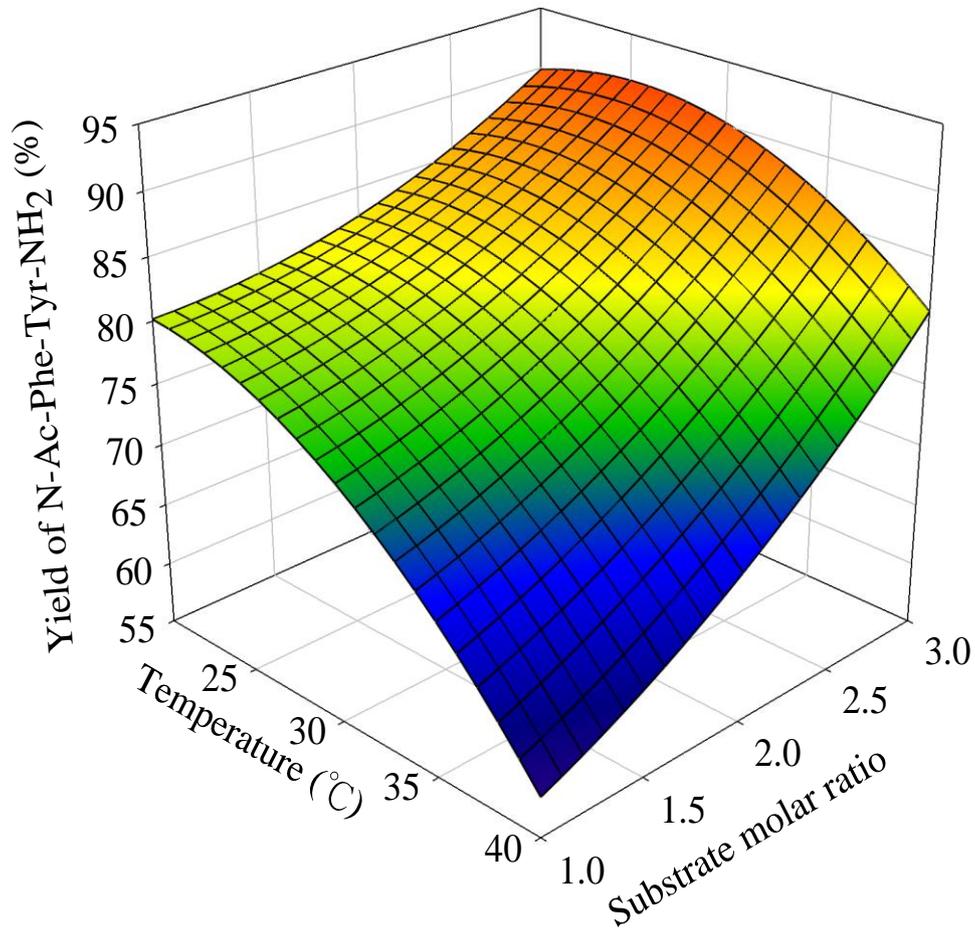


圖 21、在反應時間 8 min、酵素用量 100 U 下反應溫度與基質莫耳數比值對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響

Figure 21. Effect of reaction temperature and substrate molar ratio on Phe-Tyr yield at reaction time 8 min and enzyme dosage 100 U

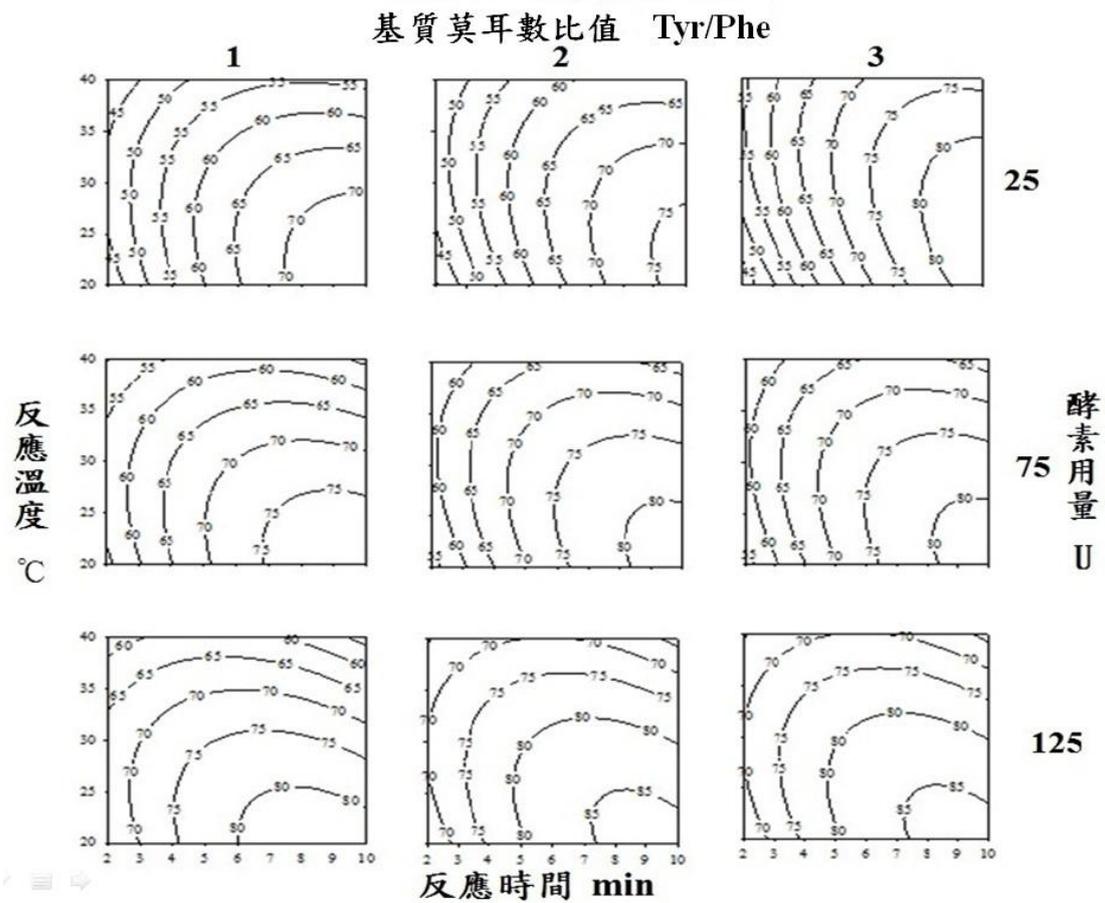


圖 22 、 $N\text{-Ac-Phe-Tyr-NH}_2$ 產率之等高線圖

Figure 22. Contour plots for yield of $N\text{-Ac-Phe-Tyr-NH}_2$

最後利用 SAS 分析最大反應脊形評估如圖 23 所示，結果顯示理論值和實際值在編碼 1.0 之前，在 95% 信心區間內，在編碼 1.1 之後，則否。因此挑選編碼 1.0 之前且其產率最高者為最適化條件，最適化反應條件為反應時間 7.4 min、反應溫度 28.1°C、酵素用量 98.9U 和基質莫耳數比值 Tyr/Phe 為 2.78，所得到的產率為 85.5% 與預測值 87.6% 的比較結果互相呼應；表示藉由驗設計與統計軟體分析的方法，能準確且有效的應用在本次實驗中。

四、類神經網路

本節利用前一節 RSM 實驗數據代入類神經網路分析，將數據隨機分為訓練及學習兩組其實驗設計如表 11，使用 Neuralpower[®] 此軟體進行分析，首先需先判斷停止條件為循環多少次，接著需判斷該使用何種轉換函數，最後則需知道該使用何種訓練模式及最適神經元數，上述判斷依據為檢定係數(R^2)最大、RMSE 值與 AAD 值最小(Basri *et al.*, 2007; Moghaddam *et al.*, 2010)。

(一) 循環次數

圖 24 固定轉換函數為 Gaussian 及訓練模式為 Batch，探討循環次數與隱藏層神經元數對預測產率之影響，當訓練達到設定的循環次數即停止分析，圖 24(a)測定檢定係數(R^2)的結果指出在循環次數 1,000~

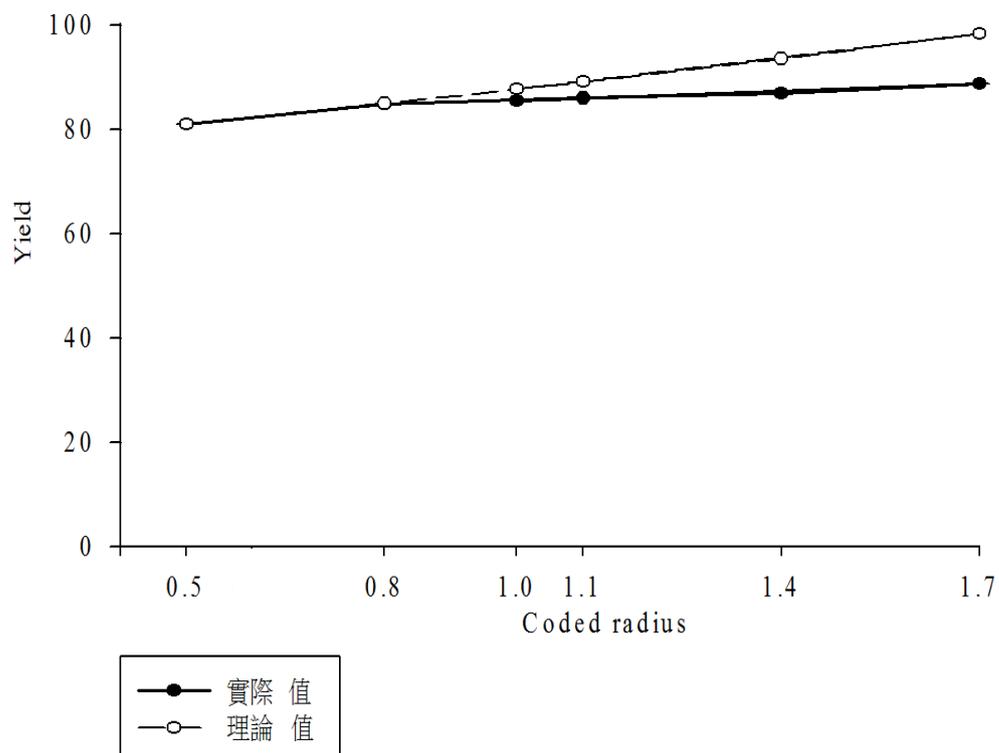


圖 23、二胜肽產率之最大反應脊型評估

Figure 23. Estimated ridge of maximum response for dipeptide yield

表 11、在類神經網路中 4 個獨立變數的實驗設計

Table 11. Experimental design for four independent variables in ANN

ANN	Time (min)	Temperature ($^{\circ}$ C)	Enzyme amount (U)	Substrate molar ratio (Tyr/Phe)	Yield (%) Y
	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	
Training set	1 (8)	-1 (25)	-1 (50)	1 (2.5)	75.10±0.09
	1 (8)	1 (35)	1 (100)	1 (2.5)	80.64±0.18
	-1 (4)	1 (35)	1 (100)	-1 (1.5)	71.61±0.70
	-2 (2)	0 (30)	0 (75)	0 (2)	53.88±1.60
	1 (8)	1 (35)	1 (100)	-1 (1.5)	69.23±0.12
	0 (6)	2 (40)	0 (75)	0 (2)	64.00±1.53
	-1 (4)	1 (35)	1 (100)	1 (2.5)	73.34±1.30
	-1 (4)	1 (35)	-1 (50)	-1 (1.5)	60.84±1.12
	1 (8)	-1 (25)	1 (100)	1 (2.5)	84.33±2.09
	0 (6)	-2 (20)	0 (75)	0 (2)	75.06±0.18
	0 (6)	0 (30)	0 (75)	-2 (1)	69.56±0.86
	-1 (4)	-1 (25)	-1 (50)	1 (2.5)	65.74±2.45
	0 (6)	0 (30)	-2 (25)	0 (2)	67.71±0.24
	-1 (4)	-1 (25)	-1 (50)	-1 (1.5)	61.02±0.29
	1 (8)	1 (35)	-1 (50)	-1 (1.5)	63.68±0.34
	1 (8)	-1 (25)	1 (100)	-1 (1.5)	78.04±0.25
	0 (6)	0 (30)	0 (75)	2 (3)	84.02±0.39
	0 (6)	0 (30)	2 (125)	0 (2)	80.14±2.47
1 (8)	1 (35)	-1 (50)	1 (2.5)	74.76±0.11	
2 (10)	0 (30)	0 (75)	0 (2)	82.56±0.36	
0 (6)	0 (30)	0 (75)	0 (2)	74.35±1.12	
Testing set	1 (8)	-1 (25)	-1 (50)	-1 (1.5)	75.74±1.04
	-1 (4)	-1 (25)	1 (100)	1 (2.5)	78.99±2.64
	-1 (4)	-1 (25)	1 (100)	-1 (1.5)	71.20±2.22
	-1 (4)	1 (35)	-1 (50)	1 (2.5)	67.61±0.80

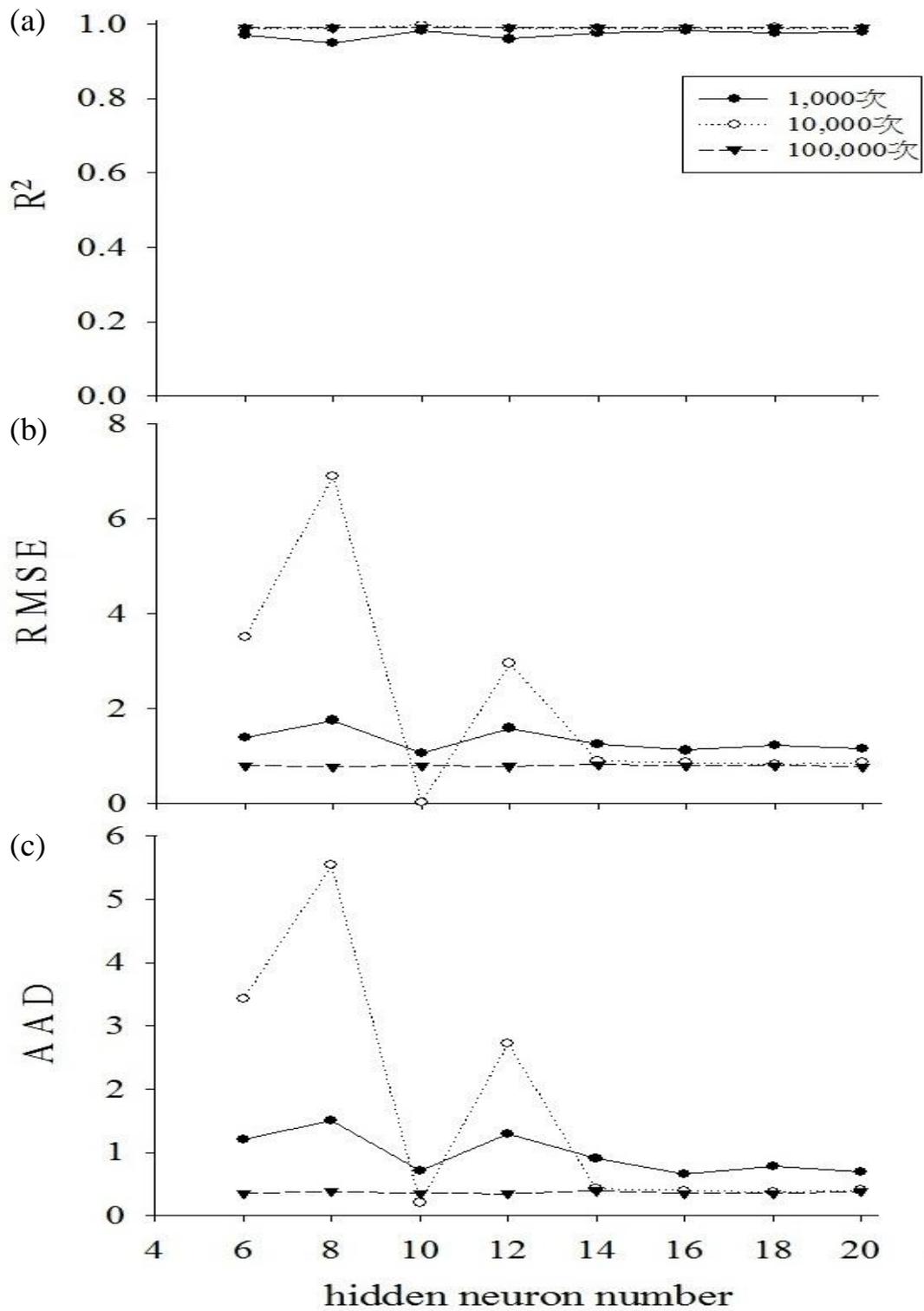


圖 24、循環次數與隱藏層神經元數對(a) R^2 (b)RMSE(c)AAD 之影響

Figure 24. Effects of cycle number and hidden neuron number on (a) R^2 (b)RMSE(c)AAD

100,000 及隱藏層神經元數 6~20 其 R^2 均趨近於 1，由此無法判別出何者較適合，圖 24(b)和(c)分別在 1,000 及 100,000 次時，其 RMSE 值與 AAD 值從隱藏層神經元數 6~20 時，幾乎沒有變動，推測可能原因為循環次數太少及太多，分別導致訓練不足及過度訓練等現象(Song *et al.*, 2004)，且因為在 10,000 次時出現最小的 RMSE 及 AAD 值，因此在接下來的分析中訂定 10,000 次為停止條件。

(二)轉換函數

圖 25 固定訓練模式為 Batch 及循環次數為 10000 次，探討轉換函數 Gaussian、Sigmoid 及 Tanh 對於隱藏層神經元數之影響，由圖 25(a) 檢定係數(R^2)結果顯示不論何種轉換函數其 R^2 均趨近於 1，以 Tanh 略低於其它者，在圖 25(b)與(c)中可決定 Gaussian 為最適轉換函數，因其在 10 個隱藏層神經元時 RMSE 值及 AAD 值低於 Sigmoid 及 Tanh，所以將 Gaussian 作為之後要用到的轉換函數，有文獻也同樣使用 Gaussian 為其轉換函數，進行類神經網路分析(Ebrahimpour *et al.*, 2008)。

(三)神經元個數及訓練模式

圖 26 固定轉換函數為 Gaussian 及循環次數為 10,000 次，探討隱藏層神經元數(5~20 個)與訓練模式 increment、batch 及 quick 對此實驗

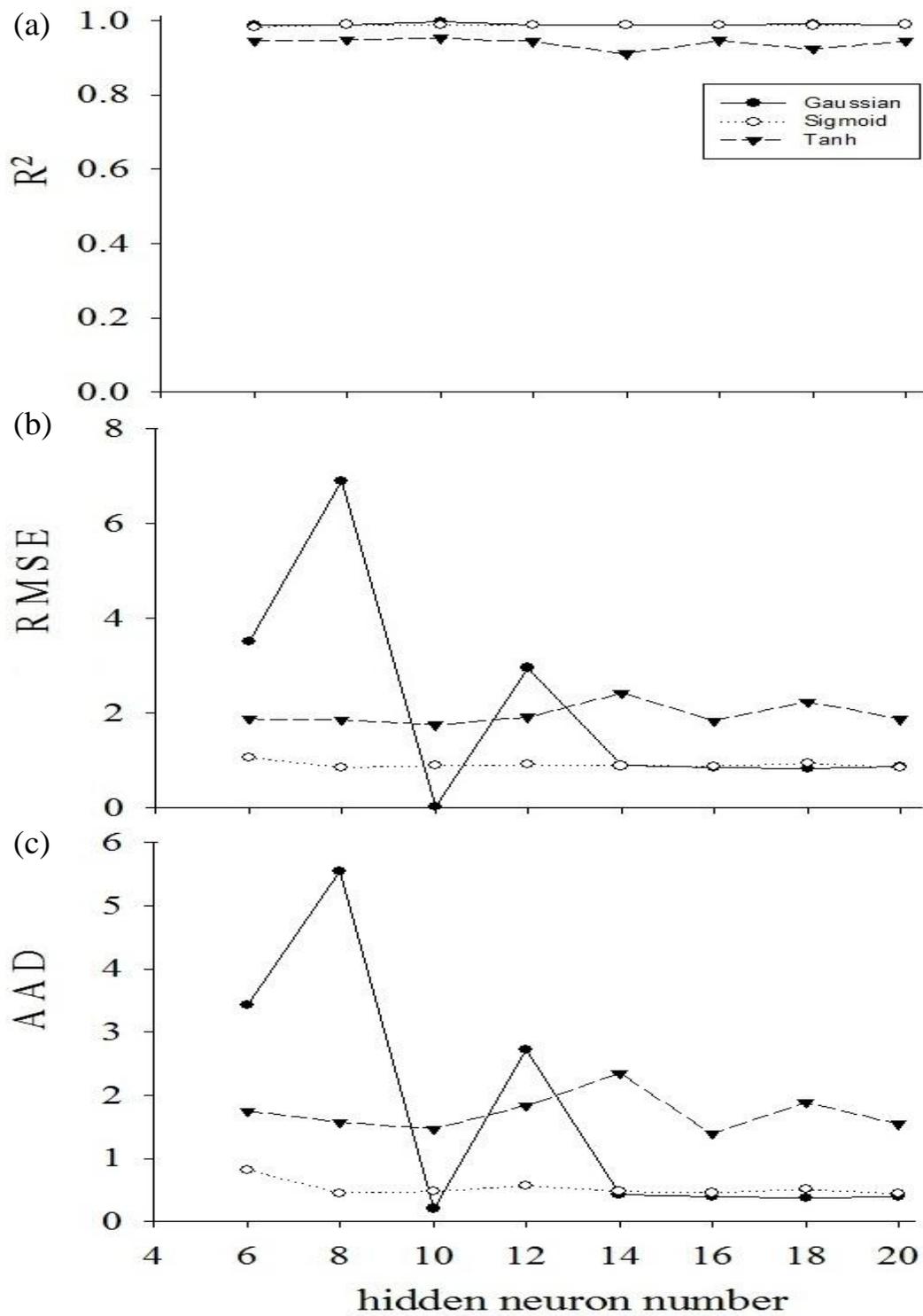


圖 25、轉換函數與隱藏層神經元數對(a)R²(b)RMSE(c)AAD 之影響

Figure 25. Effects of transfer functions and hidden neuron number on (a)R²(b)RMSE(c)AAD

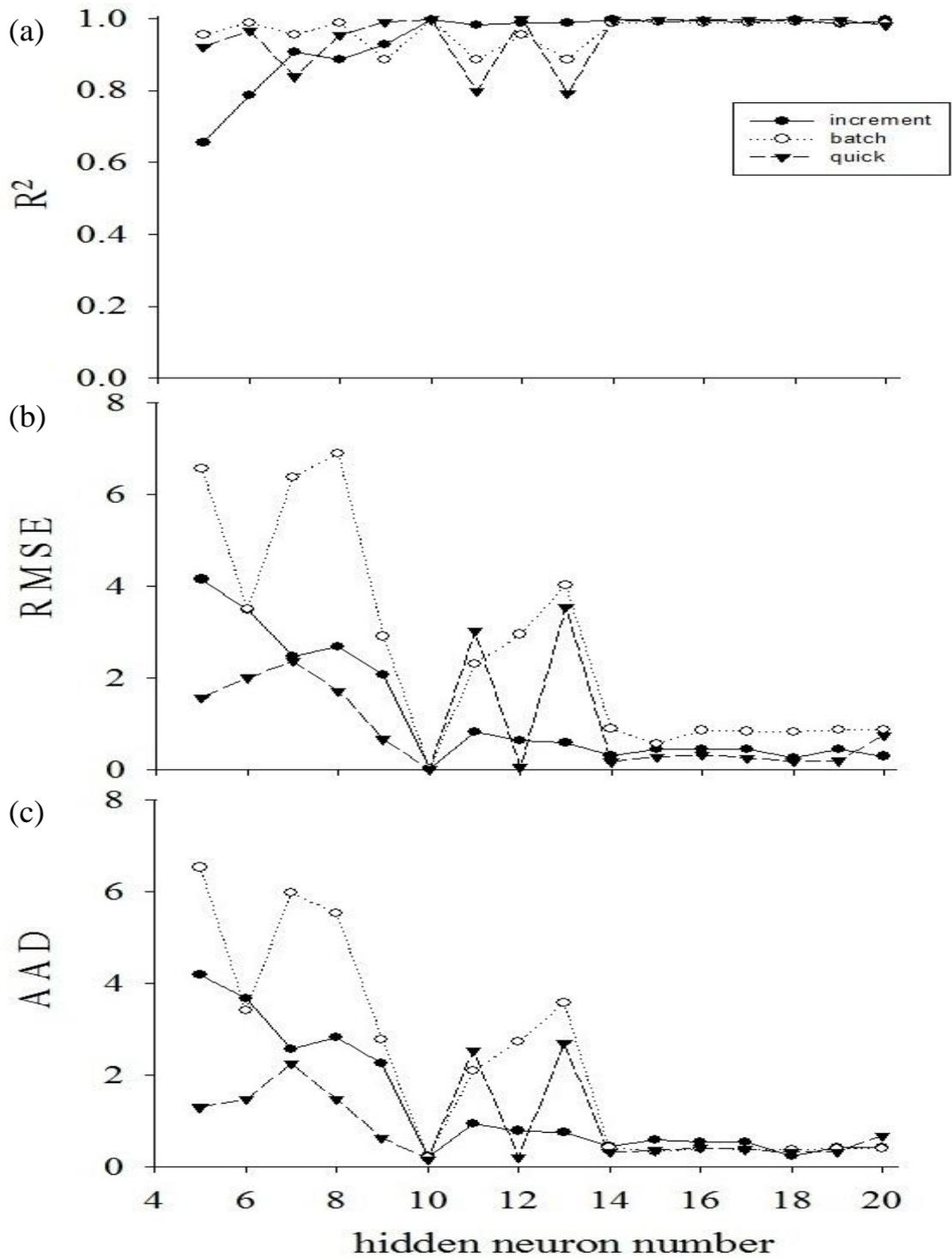


圖 26、訓練模式與隱藏層神經元數對(a) R^2 (b)RMSE(c)AAD 之影響

Figure 26. Effects of learning mode and hidden neuron number on (a) R^2 (b)RMSE(c)AAD

數據 R^2 、RMSE 及 AAD 之影響，由圖 26(a)結果指出，各組 R^2 都很相近，以 quick 的浮動較其它兩者大，因此 quick 較不適合，再以圖 26(b)與(c)來判斷，batch 的 RMSE 值與 AAD 值均比 increment 大得多，所以挑選 increment 為訓練模式，其中又以 10 個神經元時，RMSE 值與 AAD 值為最小以及 R^2 最高，因此決定以 10 個隱藏層神經元為分析條件。

(四)倒傳遞類神經網路分析

圖 27 為本節類神經網路架構圖，輸入層有 4 個神經元也就是 4 個不同變因包括反應時間、溫度、酵素用量及基質莫耳數比值，隱藏層是參考 Hush 等人研究而設計的(Hush and Horne, 1993; Shankar and Bandyopadhyay, 2007)，並根據圖 24、25 及 26 結果訂定隱藏層神經元為 10 個、轉換函數為 Gaussian、訓練模式為 Increment 及循環次數達到 10,000 次即停止。類神經網路 ANN 不同於反應曲面法 RSM，會產生一組多項式(Bas and Boyaci, 2007)，它如同人類的腦神經一般藉由輸入訓練資料產生預測的產率如表 12，比較 ANN 與 RSM 預測產率與實際產率的絕對偏差，可發現 ANN 的絕對偏差均遠小於 RSM 的，再經由個別的預測產率及絕對偏差可計算出 R^2 與 AAD 值，在表中 ANN 的 training set，其 R^2 等於 1 及其 AAD 值為 0.0045%，另外在 ANN 的 testing set，其 R^2 等於 0.9999 及其 AAD 值為 0.03%，比較 RSM 的數

表 12、類神經網路和反應曲面法之預測產率與實際產率的絕對偏差比較

Table 12. Comparison of absolute deviation between predicted yields and true yields in ANN and RSM models

	ANN Predicted yield (%)	ANN Absolute deviation	RSM Predicted yield (%)	RSM Absolute deviation
Training set	75.104	4.82077E-05	79.5279	0.05896
	80.645	6.44258E-05	80.1012	0.006682
	71.616	8.39198E-05	67.0763	0.063311
	53.88	4.85969E-06	59.0929	0.09675
	69.227	4.64798E-05	70.4392	0.017466
	63.996	6.93188E-05	65.2329	0.019264
	73.338	3.00014E-05	74.9558	0.022032
	60.839	1.40311E-05	59.1825	0.027244
	84.332	2.37602E-05	86.2592	0.022877
	75.057	4.50586E-05	73.6612	0.018636
	69.556	5.98893E-05	70.2012	0.009218
	65.742	2.63067E-05	64.8025	0.014261
	67.708	3.46965E-05	66.5296	0.017433
	61.019	1.27558E-05	61.4529	0.007094
	63.688	0.000119739	66.7879	0.048805
	78.041	1.10727E-05	79.8046	0.022611
	84.018	1.90395E-05	83.2129	0.009606
80.137	4.32643E-05	81.1546	0.01266	
74.756	4.76003E-05	75.1275	0.004916	
82.556	5.43084E-05	77.1812	0.06515	
74.357	9.33235E-05	74.35	0	
Testing set	75.659	0.001069	74.3958	0.017748
	78.982	0.000102	75.7762	0.040686
	67.611	1.72E-05	65.7396	0.027665
	71.199	1.62E-05	71.1042	0.001346

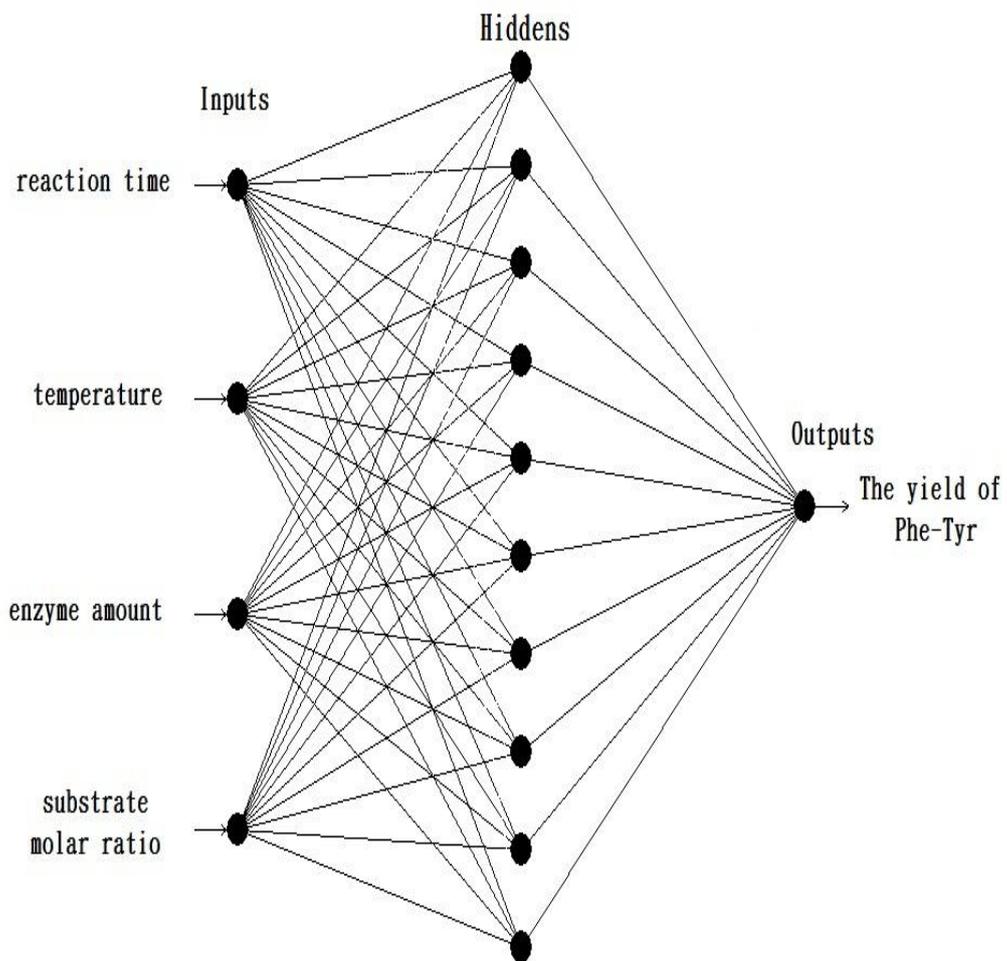


圖 27、倒傳遞類神經網路架構

Figure 27. Back propagation neural network structure

據，其 R^2 等於 0.9029 及其 AAD 值為 2.60%，以上述結果顯示 ANN 的 R^2 比 RSM 更趨近於 1 且其 AAD 值均遠小於 RSM，所以 ANN 比 RSM 更為適合解釋本研究 RSM 的數據，接下來 Neuralpower[®] 軟體也可繪製出曲面圖如圖 28 至 30，與利用 RSM 二次多項式所繪製出的曲面圖如圖 19 至 21 相互比較發現各因子間對於產率影響趨勢相似，再經由軟體分析得知更明確的影響趨勢，其 ANN 因子之間對於產率的重要性百分率如圖 31 與 RSM 的分析結果如表 10 比較，顯示出反應時間均為兩者最重要的影響因子，而溫度均為最不重要的因子，至於 ANN 中次要的影響因子依序為基質莫耳數比值與酵素用量，而 RSM 正好相反。表 13 為 ANN 與 RSM 的最適化條件比較，結果顯示 ANN 的 AAD 值 0.9601% 遠小於 RSM 的 2.5281%，且 ANN 的預測產率較 RSM 更接近實際產率，此外 ANN 實際產率也優於 RSM 產率，前者為 89.1%，後者為 85.5%，綜合以上結果顯示類神經網路分析較反應曲面法更加適合解釋本研究之實驗數據。

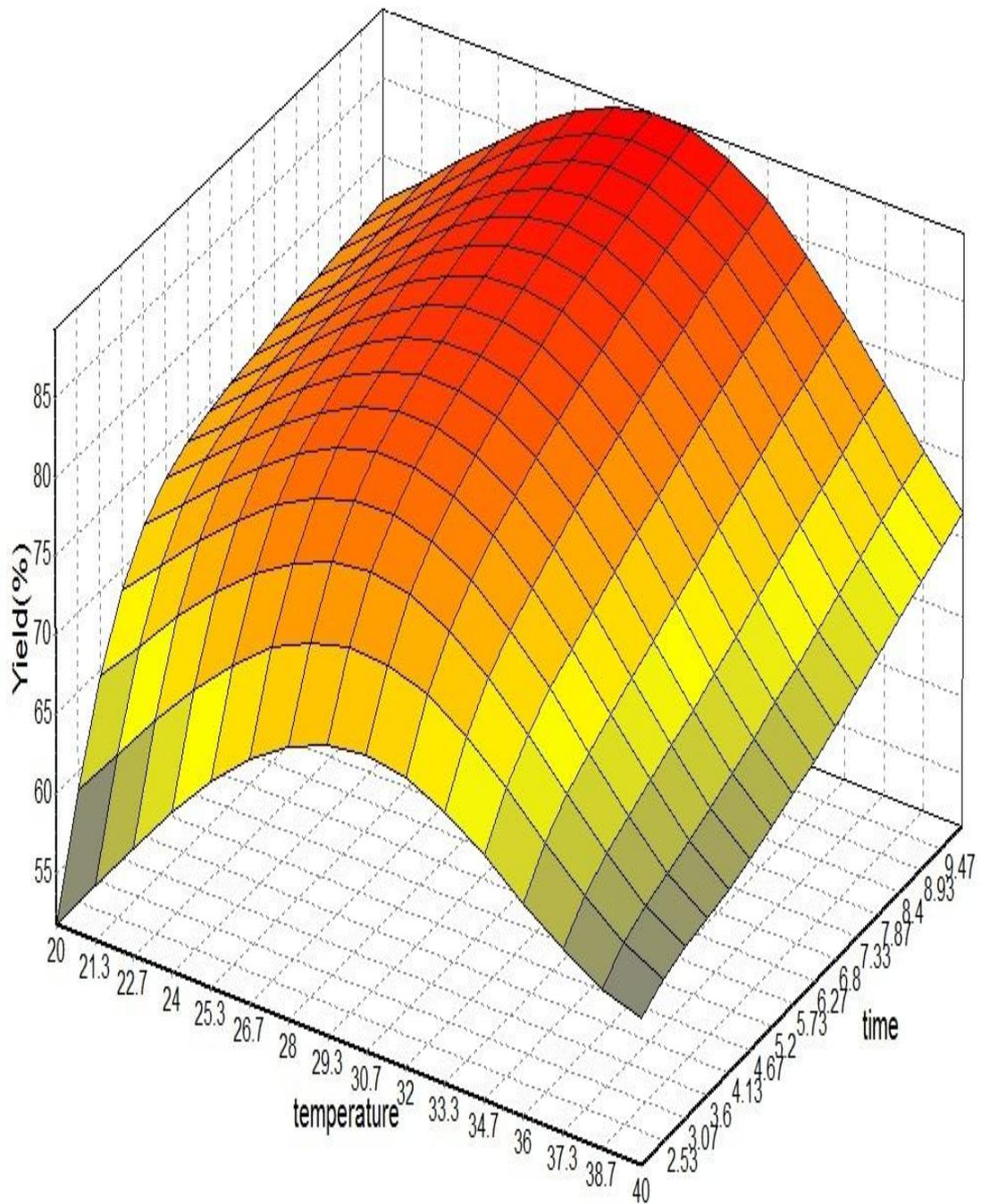


圖 28、在 Neuralpower[®] 中基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.5、酵素用量 100 U 下反應溫度與反應時間對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響

Figure 28. Effect of reaction temperature and reaction time on Phe-Tyr yield at substrate molar ratio (Tyr/Phe) 2.5 and enzyme amount 100 U in Neuralpower[®]

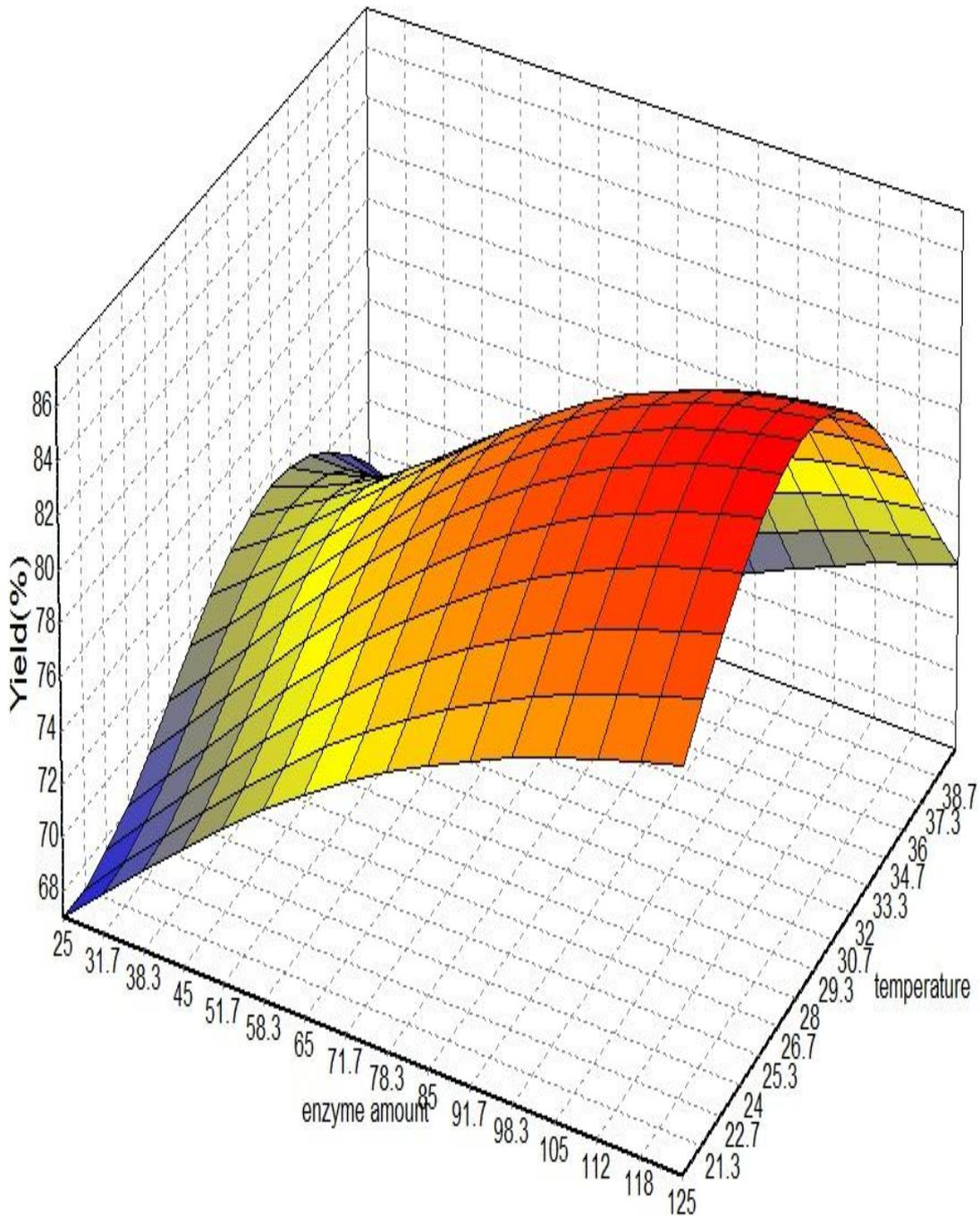


圖 29、在 Neuralpower[®] 中基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.5、反應時間 8 min 下反應溫度與酵素用量對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響

Figure 29. Effect of reaction temperature and enzyme dosage on Phe-Tyr yield at substrate molar ratio (Tyr/Phe) 2.5 and reaction time 8 min in Neuralpower[®]

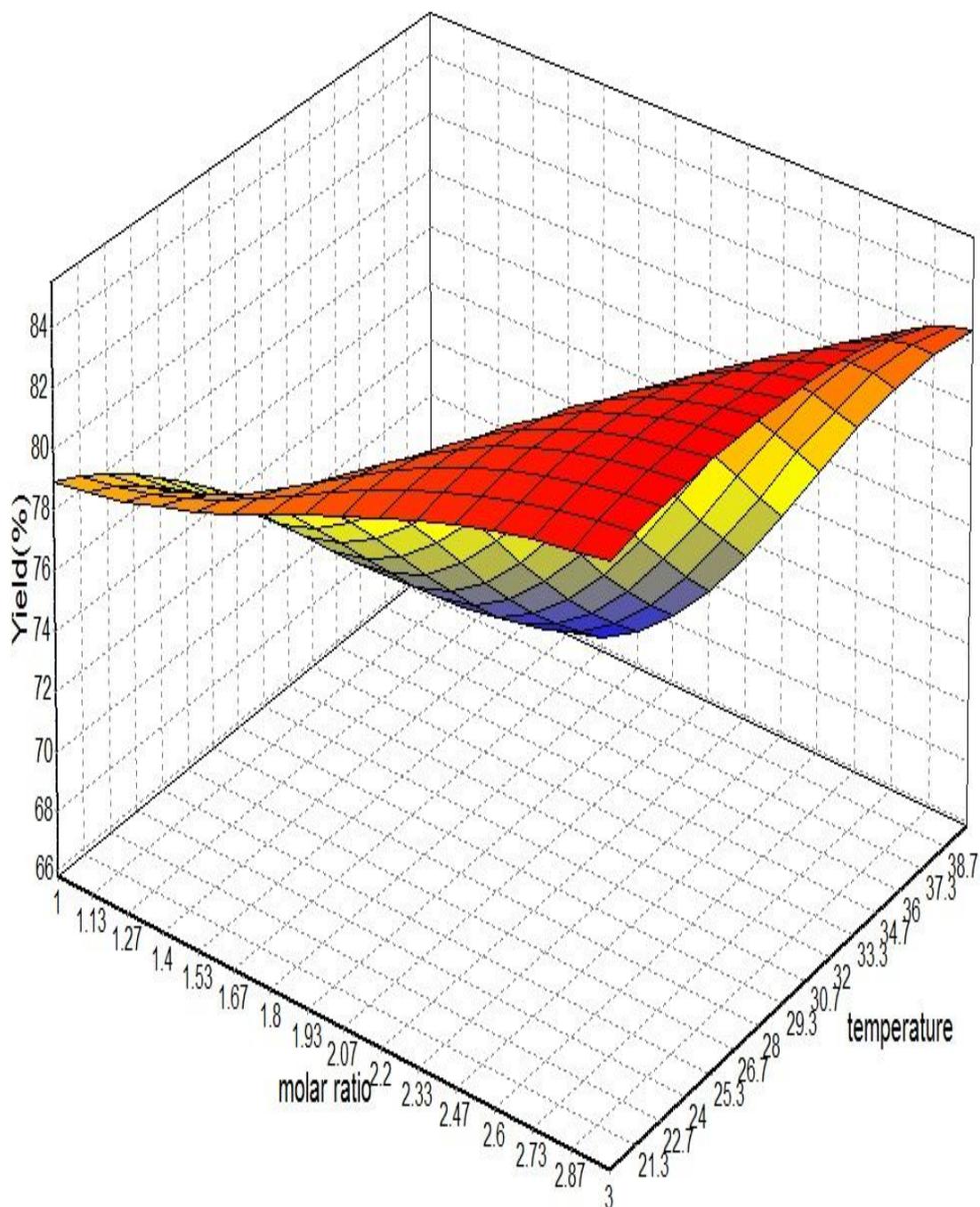


圖 30、在 Neuralpower[®] 中反應時間 8 min、酵素用量 100 U 下反應溫度與基質莫耳數比對 *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ 產率之影響

Figure 30. Effect of reaction temperature and substrate molar ratio on Phe-Tyr yield at reaction time 8 min and enzyme dosage 100 U in Neuralpower[®]

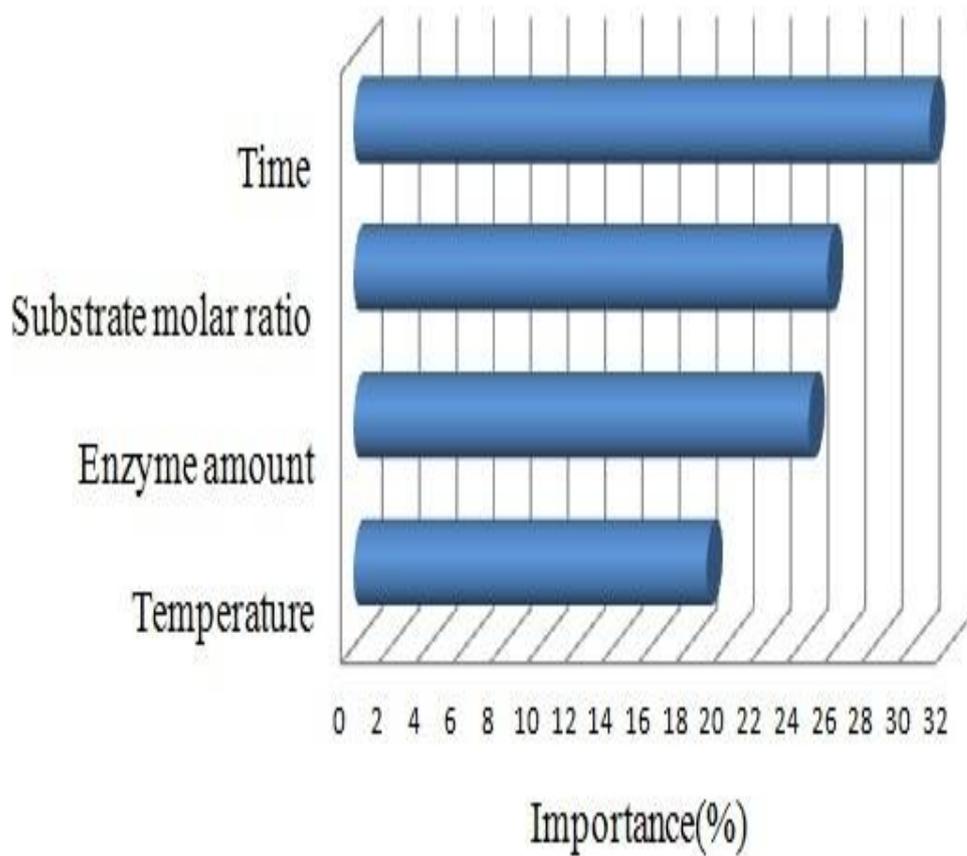


圖 31、在 Neuralpower[®] 中不同變數對於二肽產率的重要性百分率

Figure 31.Importance percentage of different parameters on the yield of *N*-Ac-Phe-Tyr-NH₂ in Neuralpower[®]

表 13、類神經網路與反應曲面法最適化條件比較

Table 13. Comparison of the optimum conditions between ANN and RSM

Method	ANN	RSM
Reaction time (min)	7.11	7.4
Reaction temp. (°C)	27.1	28.1
Enzyme amount (U)	118.9	98.9
Substrate molar ratio (Tyr/Phe)	2.83	2.78
Actual Yield (%)	89.1	85.5
AAD (%)	0.9601	2.5281
R²	0.99	0.90

伍、結論

本研究第一部份利用溶劑工程找出最適化溶劑比例生產 Phe-Tyr，其最適化結果 acetonitrile 佔 25%、DMSO 佔 25%、tris-HCl buffer 佔 50%，實際產率為 71.82%。第二部份以此最適化比例進一步探討影響 α -chymotrypsin 催化合成二胜肽衍生物的反應條件，採用四變數五階層之中心混成實驗設計(CCRD)，有效縮短的實驗次數及時間，藉由各種統計檢定評估與等高線圖推斷，可清楚的建立反應條件變數與產物(二胜肽衍生物)產率之關係。最佳產率預測值為 87.6%與實際值為 85.5%，其最適化反應條件為反應時間 7.4 min，合成溫度 28.1°C，酵素用量 98.9 U 及基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.78。最後第三部份以類神經網路與反應曲面法的分析結果評估彼此間的差異，以判斷何種方法較為適合解釋本研究之實驗數據，結果顯示在倒傳遞式類神經網路下，以循環次數 10,000 次、轉換函數為 Gaussian、訓練模式為 Increment 及 10 個隱藏層神經元的條件下，最佳產率預測值為 89.7%與實際值為 89.1%，其最適化反應條件為反應時間 7.11 min，合成溫度 27.1°C，酵素用量 118.9 U 及基質莫耳數比值(Tyr/Phe) 2.83，其 AAD 值為 0.9601%更優於 RSM 的 2.5281%，因此倒傳遞類神經網路比反應曲面法更適合解釋本研究之數據。

陸、參考文獻

- 葉怡成 (2009) 類神經網路模式應用與實作。台北市，五南圖書出版有限公司。
- Bacheva, A. V., Belyaeva, A. V., Lysogorskaya, E. N., Oksenoit, E. S., Lozinsky, V. I. &Filippova, I. Y. (2005). Biocatalytic properties of native and immobilized subtilisin 72 in aqueous-organic and low water media. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 32(5-6): 253-260.
- Barros, R. J., Wehtje, E. &Adlercreutz, P. (1999). Enhancement of immobilized protease catalyzed dipeptide synthesis by the presence of insoluble protonated nucleophile. *Enzyme and Microbial Technology* 24(8-9): 480-488.
- Bas, D. &Boyaci, I. H. (2007). Modeling and optimization II: Comparison of estimation capabilities of response surface methodology with artificial neural networks in a biochemical reaction. *Journal of Food Engineering* 78(3): 846-854.
- Basri, M., Rahman, N., Ebrahimpour, A., Bakar Salleh, A., Ryantin Gunawan, E. &Rahman, B. (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(1): 1-14.
- Berglund, P., Holmquist, M. &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(1-4): 283-287.
- Boeriu, C. G., Frissen, A. E., Boer, E., van Kekem, K., van Zoelen, D. J. &Eggen, I. F. (2010). Optimized enzymatic synthesis of C-terminal peptide amides using subtilisin A from *Bacillus licheniformis*. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 66(1-2): 33-42.
- Bornscheuer, U. T. &Pohl, M. (2001). Improved biocatalysts by directed evolution and rational protein design. *Current Opinion in Chemical Biology* 5(2): 137-143.
- Box, G. E. P. &Wilson, K. B. (1951). On the Experimental Attainment of Optimum Conditions. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 13(1): 1-45.
- Calvet, S., Clapés, P., Torres, J. L., Valencia, G., Feixas, J. &Adlercreutz, P.

- (1993). Enzymatic synthesis of X-Phe-Leu-NH₂ in low water content systems: Influence of the N- α protecting group and the reaction medium composition. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1164(2): 189-196.
- Cheung, H. S. (1980). Binding of peptide substrates and inhibitors of angiotensin-converting enzyme. Importance of the COOH-terminal dipeptide sequence. *J Biol Chem* 255: 401-407.
- Clapés, P., Torres, J.-L. & Adlercreutz, P. (1995). Enzymatic peptide synthesis in low water content systems: Preparative enzymatic synthesis of [Leu]- and [Met]-enkephalin derivatives. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 3(3): 245-255.
- Cornell, J. A. (1973). Experiments with mixtures: a review. *Technometrics*: 437-455.
- Cornell, J. A. (2000). DEVELOPING MIXTURE MODELS, ARE WE DONE? *Journal of Statistical Computation & Simulation* 66(2): 127.
- CPC-X Software, NeuralPower User Guide. Regsoft Inc., 2004. Available from Internet: <http://www.brothersoft.com/neuralpower-download-21356.html>
- Curtius, T. (1881). Ueber die Einwirkung von Chlorbenzoyl auf Glycocollsilber. *Journal für Praktische Chemie* 24(1): 239-240.
- Dastoli, F. R., Musto, N. A. & Price, S. (1966). Reactivity of active sites of chymotrypsin suspended in an organic medium. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 115(1): 44-47.
- Duke Stephen, O. & Abbas Hamed, K. (1994). Natural Products with Potential Use as Herbicides. In *Allelopathy*, Vol. 582, 348-362: American Chemical Society.
- Ebrahimpour, A., Abd Rahman, R. N., Ean Ch'ng, D. H., Basri, M. & Salleh, A. B. (2008). A modeling study by response surface methodology and artificial neural network on culture parameters optimization for thermostable lipase production from a newly isolated thermophilic *Geobacillus* sp. strain ARM. *BMC biotechnology* 8: 96.
- Faber, K. (1992). *Biotransformations in Organic Chemistry*.
- Garrett, R. H. a. G., C. M. (2005). Chap.14.7: Mechanisms of Enzyme Action. In *Biochemistry (3rd)*. p. 459 California. USA.: Thomson Books/Cole.
- Ghaffari, A., Abdollahi, H., Khoshayand, M. R., Bozchalooi, I. S., Dadgar,

- A. & Rafiee-Tehrani, M. (2006). Performance comparison of neural network training algorithms in modeling of bimodal drug delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 327(1–2): 126-138.
- Gupta, M. N. & Roy, I. (2004). Enzymes in organic media. *European Journal of Biochemistry* 271(13): 2575-2583.
- Guzmán, F., Barberis, S. & Illanes, A. (2007). Peptide synthesis: chemical or enzymatic. *Electronic Journal of Biotechnology* 10: 279-314.
- Huang, Y. B., Cai, Y., Yang, S., Wang, H., Hou, R. Z., Xu, L. & Zhang, X. Z. (2006). Chemo-enzymatic synthesis of precursor tetrapeptide Bz-RGDS-NH₂ of cellular adhesion motif in low-water organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 39(5): 1159-1165.
- Hush, D. R. & Horne, B. G. (1993). Progress in supervised neural networks. *Signal Processing Magazine, IEEE* 10(1): 8-39.
- Ju, H. Y., Too, J. R., Chang, C. & Shieh, C. J. (2009). Optimal alpha-Chymotrypsin-Catalyzed Synthesis of N-Ac-Phe-Gly-NH₂. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(2): 403-408.
- Khmel'Nitski, Y. L., Dien, F. K., Semenov, A. N., Martinek, K., Veruovič, B. & Kubánek, Y. (1984). Optimization of enzyme catalyzed peptide synthesis in a “water - water-immiscible organic solvent” biphasic system. *Tetrahedron* 40(21): 4425-4432.
- Kisee, H., Fujimoto, K. & Noritomi, H. (1988). Enzymatic reactions in aqueous-organic media. VI. Peptide synthesis by α -chymotrypsin in hydrophilic organic solvents. *Journal of Biotechnology* 8(4): 279-290.
- Klibanov, A. M. (1987). Enzyme-Catalyzed Processes in Organic Solvents. *Annals of the New York Academy of Sciences* 501(1): 129-129.
- Klibanov, A. M. (1997). Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechnology* 15(3): 97-101.
- Korhonen, H. & Pihlanto, A. (2006). Bioactive peptides: Production and functionality. *International Dairy Journal* 16(9): 945-960.
- Kowalski, S., Cornell, J. A. & Geoffrey Vining, G. (2000). A new model and class of designs for mixture experiments with process variables. *Communications in Statistics - Theory and Methods* 29(9-10): 2255-2280.
- Laane, C., Boeren, S., Vos, K. & Veeger, C. (1987). Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering* 30(1): 81-87.
- Lee, H.-M., Chen, C.-M. & Huang, T.-C. (2001). Learning efficiency

- improvement of back-propagation algorithm by error saturation prevention method. *Neurocomputing* 41(1–4): 125-143.
- Liao, H. F., Tsai, W. C., Chang, S. W. & Shieh, C. J. (2003). Application of solvent engineering to optimize lipase-catalyzed 1,3-diglycerols by mixture response surface methodology. *Biotechnology Letters* 25(21): 1857-1861.
- Maruyama, S. & Suzuki, H. (1982). A peptide inhibitor of angiotensin I converting enzyme in the tryptic hydrolysate of casein.
- Mazur, R. H., Schlatter, J. M. & Goldkamp, A. H. (1969). Structure-taste relationships of some dipeptides. *Journal of the American Chemical Society* 91(10): 2684-2691.
- Merrifield, R. B. (1963). Solid Phase Peptide Synthesis. I. The Synthesis of a Tetrapeptide. *Journal of the American Chemical Society* 85(14): 2149-2154.
- Mishima, K., Matsuyama, K., Baba, M. & Chidori, M. (2003). Enzymatic dipeptide synthesis by surfactant-coated alpha-chymotrypsin complexes in supercritical carbon dioxide. *Biotechnology Progress* 19(2): 281-284.
- Miyazawa, T., Nakajo, S., Nishikawa, M., Hamahara, K., Imagawa, K., Ensatsu, E., Yanagihara, R. & Yamada, T. (2001). alpha-chymotrypsin-catalysed peptide synthesis via the kinetically controlled approach using activated esters as acyl donors in organic solvents with low water content: incorporation of non-protein amino acids into peptides. *Journal of the Chemical Society-Perkin Transactions 1* (1): 82-86.
- Moghaddam, M. G., Ahmad, F. B. H., Basri, M. & Rahman, M. B. A. (2010). Artificial neural network modeling studies to predict the yield of enzymatic synthesis of betulinic acid ester. *Electronic Journal of Biotechnology* 13.
- Narai-Kanayama, A. & Aso, K. (2009). Angiotensin I-converting enzyme inhibitory oligo-tyrosine peptides synthesized by α -chymotrypsin. *Enzyme and Microbial Technology* 44(4): 235-241.
- Narai-Kanayama, A., Kawamura, Y., Hosono, M. & Aso, K. (2009). Availability of tyrosine amide for α -chymotrypsin-catalyzed synthesis of oligo-tyrosine peptides. *Enzyme and Microbial Technology* 45(6-7): 457-462.
- Narai-Kanayama, A., Shikata, Y., Hosono, M. & Aso, K. (2010). High level production of bioactive di- and tri-tyrosine peptides by

- protease-catalyzed reactions. *Journal of Biotechnology* 150(3): 343-347.
- Noritomi, H., Suzuki, K., Kikuta, M. & Kato, S. (2009). Catalytic activity of α -chymotrypsin in enzymatic peptide synthesis in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal* 47(1-3): 27-30.
- Qin, X., Xie, W. C., Su, Q., Du, W. Z. & Gross, R. A. (2011). Protease-Catalyzed Oligomerization of L-Lysine Ethyl Ester in Aqueous Solution. *Acs Catalysis* 1(9): 1022-1034.
- Salam, S. M. A., Kagawa, K.-i. & Kawashiro, K. (2006). α -Chymotrypsin-catalyzed peptide synthesis in frozen aqueous solution using N-protected amino acid carbamoylmethyl esters as acyl donors. *Tetrahedron: Asymmetry* 17(1): 22-29.
- Scheffé, H. (1958). Experiments With Mixtures. *Journal of the Royal Statistical Society. Series B (Methodological)* 20(2): 344-360.
- Sergeeva, M. V., Paradkar, V. M. & Dordick, J. S. (1997). Peptide synthesis using proteases dissolved in organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology* 20(8): 623-628.
- Shankar, T. J. & Bandyopadhyay, S. (2007). Prediction of Extrudate Properties Using Artificial Neural Networks. *Food and Bioprocess Processing* 85(1): 29-33.
- Shen, H. Y., Tian, G. L., Ye, Y. H. & Wang, J. B. (2005). Non-coded amino acids as acyl donor substrates for peptide bond formation catalyzed by thermoase in toluene. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 37(1-6): 26-29.
- Shieh, C. J., Akoh, C. C. & Koehler, P. E. (1996). Formulation and optimization of sucrose polyester physical properties by mixture response surface methodology. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 73(4): 455-460.
- Song, X., Mitnitski, A., MacKnight, C. & Rockwood, K. (2004). Assessment of Individual Risk of Death Using Self-Report Data: An Artificial Neural Network Compared with a Frailty Index. *Journal of the American Geriatrics Society* 52(7): 1180-1184.
- Suetsuna, K. (1998). Isolation and characterization of angiotensin I-converting enzyme inhibitor dipeptides derived from *Allium sativum* L (garlic). *The Journal of Nutritional Biochemistry* 9(7): 415-419.
- Suetsuna, K., Maekawa, K. & Chen, J.-R. (2004). Antihypertensive effects of *Undaria pinnatifida* (wakame) peptide on blood pressure in

- spontaneously hypertensive rats. *The Journal of Nutritional Biochemistry* 15(5): 267-272.
- Thompson, D. (1982). RESPONSE SURFACE EXPERIMENTATION1. *Journal of Food Processing and Preservation* 6(3): 155-188.
- Vigneaud, V. d., Ressler, C., Swan, C. J. M., Roberts, C. W., Katsoyannis, P. G. & Gordon, S. (1953). THE SYNTHESIS OF AN OCTAPEPTIDE AMIDE WITH THE HORMONAL ACTIVITY OF OXYTOCIN. *Journal of the American Chemical Society* 75(19): 4879-4880.
- 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(4-6): 113-148.
- Vlieghe, P., Lisowski, V., Martinez, J. & Khrestchatisky, M. (2010). Synthetic therapeutic peptides: science and market. *Drug Discovery Today* 15(1-2): 40-56.
- Yokozeki, K. & Hara, S. (2005). A novel and efficient enzymatic method for the production of peptides from unprotected starting materials. *Journal of Biotechnology* 115(2): 211-220.
- Zhang, X. Z., Wang, X., Chen, S. M., Fu, X. Q., Wu, X. X. & Li, C. H. (1996). Protease-catalyzed small peptide synthesis in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 19(7): 538-544.