

CHỌN LỌC DÒNG VI KHUẨN CÓ KHẢ NĂNG TỔNG HỢP TINH CHẤT BẠC HÀ (*L*-MENTHOL) TỪ HỖN HỢP RACEMIC MENTHYL BENZOATE

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

Khoa Sinh học, Trường Đại học Khoa học, Đại học Huế

Viện 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

Tóm tắt:

Đặt vấn đề: Tinh dầu bạc hà (*l*-menthol) có những đặc tính làm mát tốt và hương thơm độc đáo, chính vì vậy mà nó được sử dụng rộng rãi trong các ngành công nghiệp hương liệu và công nghệ sản xuất *l*-menthol bằng quy trình xúc tác sinh học được các nhà khoa học trên thế giới chú ý. Mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi là phân lập từ đất chúng vi khuẩn có thể tổng hợp *l*-menthol từ *dl*-menthyl benzoate với các hoạt động thủy phân và tính chọn lọc đối quang (enantioselectivity) cao. **Đối tượng và phương pháp:** Từ môi trường đất, chúng tôi đã phân lập và chọn lọc được dòng vi khuẩn 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 lên men được tiến hành nghiên cứu sơ bộ và kết quả của quá trình lên men thu được 130 g tế bào, tiếp tục đem đi sấy khô thu được 18 g tế bào khô. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên quá trình phản ứng cũng được tiến hành khảo sát, kết quả cho thấy pH và nhiệt độ tối ưu phù hợp cho dòng vi khuẩn này thực hiện phản ứng lần lượt là 7.5 và 37°C. **Kết quả và kết luận:** 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.

Từ khóa: *l*-menthol, chọn lọc đối quang, phân lập vi khuẩn

Abstract

SELECTING OF STRAINS FOR ENANTIOSELECTIVE HYDROLYSIS OF RACEMIC MENTHYL BENZOATE TO PRODUCE *L*-MENTHOL

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

Faculty of Biology, Hue Science University

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

Background: Menthol and mint oils are widely used in the flavor industry and biocatalytic processes for production of *l*-menthol. Due to the pleasant flavor and aroma as well as cooling-anesthetic effect. 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. **Methods:** From soil samples, we isolated one strain exhibited the best hydrolytic activity and excellent enantioselectivity as compared to others. 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 fermentation process was studied and the fermentation gave about 130 g wet cell, which was equivalent to 18 g dry cell. The catalytic properties of *Acinetobacter* sp. ECU2040 were also studied. The results showed that the optimum pH and temperature of reaction

were 7.5 and 37°C, respectively. **Results and conclusion:** The strain *Acinetobacter* sp. ECU2040 strain exhibited the production of *l*-menthol ability with the best hydrolytic activity and excellent enantioselectivity.

Key words: *l*-menthol, enantioselective, isolated strain.

1. ĐẶT VẤN ĐỀ

l-menthol, (1R, 2S, 5R) - (-)-menthol hoặc 1-methyl-4-(1-metyletyl) cyclohexan-3-ol, là một trong những mono-terpenes rất phổ biến, nó là thành phần chủ yếu và đặc trưng của tinh dầu cây bạc hà (*Mentha x piperita*) [1]. Công thức phân tử của *l*-tinh dầu bạc hà là $C_{10}H_{20}O$.

l-menthol là một chất tạo hương cực kỳ phổ biến và quan trọng. Nhờ đặc tính làm mát tuyệt vời 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^[2].

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 cũng ngày càng tăng cao tạo nên sự thiếu hụt nghiêm trọng và đẩy giá tinh dầu bạc hà lên rất cao [3]. 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 and 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 [3].

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, thì 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 [3,4]. Tổng hợp bằng phương pháp xúc tác sinh học với những đặc điểm như thân thiện với môi trường, tiêu thụ năng lượng thấp hơn, chi phí thấp hơn, 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 [4-6].

Các phương pháp thường dùng để tổng hợp *l*-menthol bằng trong tổng hợp xúc tác sinh học là este hóa chọn lọc chất đồng phân đối hình (enatioselective esterification), chuyển este chọn lọc chất đồng phân đối hình (enatioselective transesterification) của hợp chất bạc hà triền quang (racemic menthol) hoặc bằng phương pháp thủy phân chọn lọc chất đồng phân đối hình (enantioselective hydrolysis) từ các menthyl este triền quang (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 [7-11].

Mục tiêu nghiên cứu của chúng tôi là để 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, nồng độ chất nền và quy mô của quá trình xúc tác.

2. ĐỐI TƯỢNG VÀ PHƯƠNG PHÁP NGHIÊN CỨU

2.1. Đối tượng nghiên cứu

Là 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. Thiết kế nghiên cứu: Là phương pháp nghiên cứu phòng thí nghiệm

2.2.2. 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, Dimethyl sulfoxide (DMSO), 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.

2.2.3. 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 lãc trong môi trường chọn lọc, trong đó *dl*-menthyl benzoate là nguồn cacbon. 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 [5]. 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, (NH₄)₂SO₄ 2 g/L, KH₂PO₄ 2 g/L, MgSO₄ 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 trải: Mẫu đất sau khi được kiểm định có khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate tiếp tục sử dụng kỹ thuật hộp trải 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 gia phú để thu sinh khối. Môi trường gia phú của đĩa agar và bình tam giác thu sinh khối: Tryptone 15 g/L, Yeast extract 5 g/L, NaCl 1 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, MgSO₄ 0.2 g/L, Agar agar 1.5g/L pH 7.0, hấp trong nồi áp suất ở 121°C trong 20 phút [12].

(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 cũng như có lượng dư đối quang của sản phẩm

eep (enantiomeric excess of product) bằng phương pháp sắc kí khí (GC) [13].

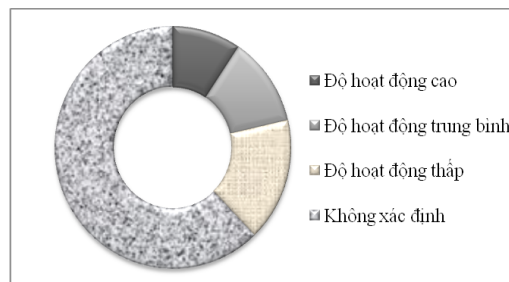
(6) Định danh dòng vi khuẩn: Khảo sát vùng gen 16S rDNA để định danh dòng vi khuẩn. Vùng gen 16S rDNA sau khi được tách xuất ra khỏi tế bào bằng “genomic DNA extraction kit” sẽ được khuếch đại bằng phương pháp PCR và chuyển vào *E. coli* DH5α. Trình tự vùng 16S rDNA được phân tích bởi công cụ Basic Local 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 [14].

(7) Tối ưu hóa phản ứng: Ảnh hưởng của pH (5.0 – 8.5) và nhiệt độ (20–50°C) 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

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



Tổng số 341 dòng vi khuẩn

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

Từ hơn 200 mẫu đất lấy ở nhiều vùng khác nhau, thông qua hai vòng nuôi cấy bằng môi trường gia phú chúng tôi 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 kí bản mỏng (TLC), dựa vào điểm đậm nhạt trên bản sắc kí để xem xét khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate của các dòng vi khuẩn trên. Kết quả cho thấy rằng chúng tôi đã phát hiện ra 129 chủng có khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate cho ra tinh dầu bạc hà trong đó: Độ hoạt động cao (32 dòng), hoạt động trung bình

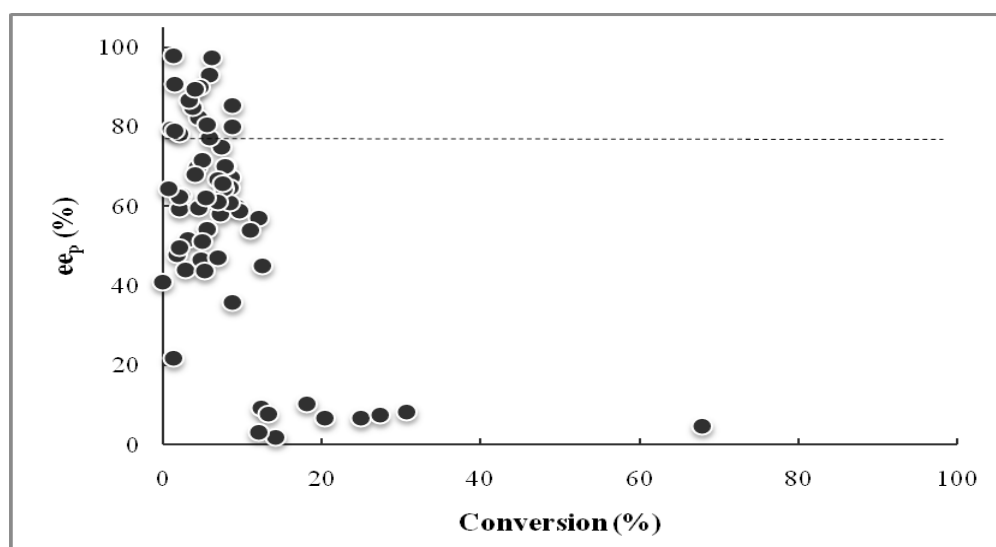
(41 dòng), hoạt động thấp (56 dòng); Không xác định (212 dòng).

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 lần 2 để chọn ra các dòng vi khuẩn đích tốt nhất. Chúng tôi sử dụng sắc kí 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

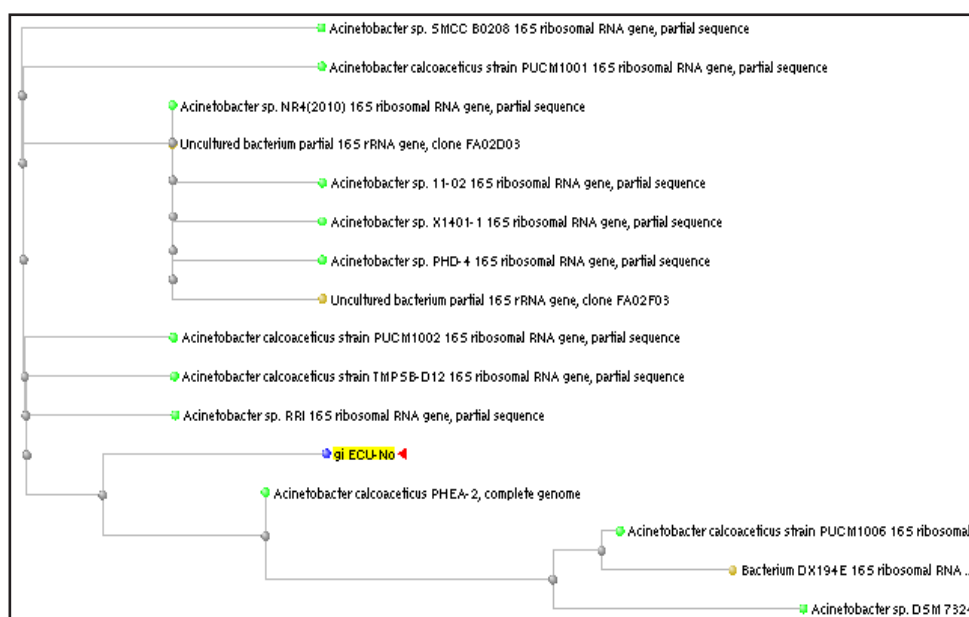
tôi tiến hành tách chiết enzyme thô từ 13 dòng này và tiếp tục lặp lại phản ứng cho đến khi tìm được dòng vi khuẩn ưng ý nhất. Phản ứng được tiến hành với 10 mM *dl*-menthyl benzoate và 25 g/L enzyme thô trong môi trường đệm sodium phosphate (2 mL, pH 7.0, 100 mM) trong ống nghiệm 10 mL ở điều kiện 180 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

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



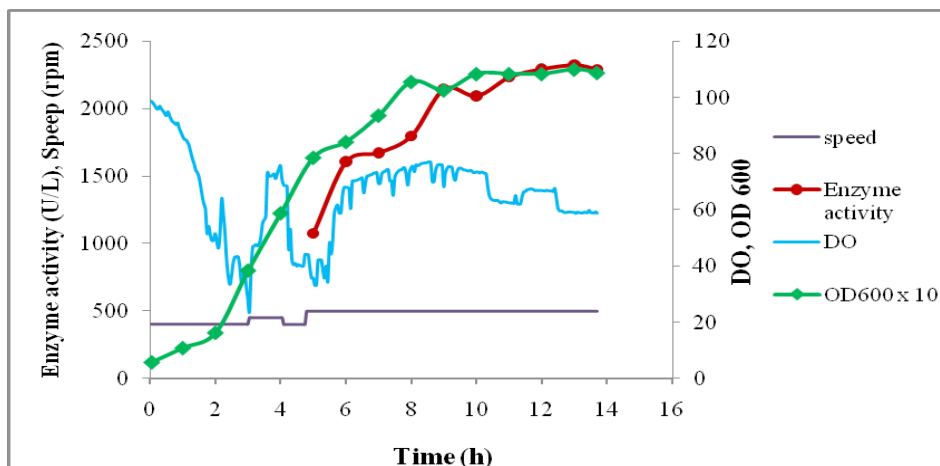
Hình 3. Cây phả hệ

Vùng gen 16S rDNA sau khi được tách xuất ra khỏi tế bào 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 trình tự 16S rDNA của vi khuẩn dòng ECU2040 được tiến hành so sánh bằng phần mềm CLUSTAL W phiên bản 1.81.

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. Lên men



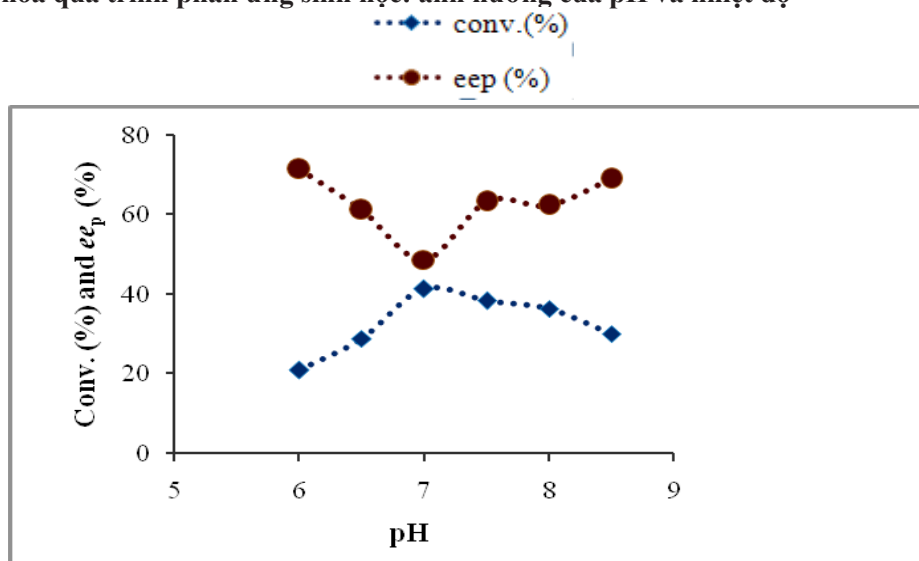
Hình 4. Quá trình lên men ở nồi lên men 5L của *Acinetobacter* sp. ECU2040
DO: oxy hòa tan, OD600: chỉ số OD đường cong sinh trưởng

Quá trình lên men cũng được tiến hành nghiên cứu sơ bộ nhằm mục đích tìm ra môi trường phù hợp và điều kiện nuôi cấy ở quy mô lớn để có thể tăng sinh khối, giảm giá của thành phẩm.

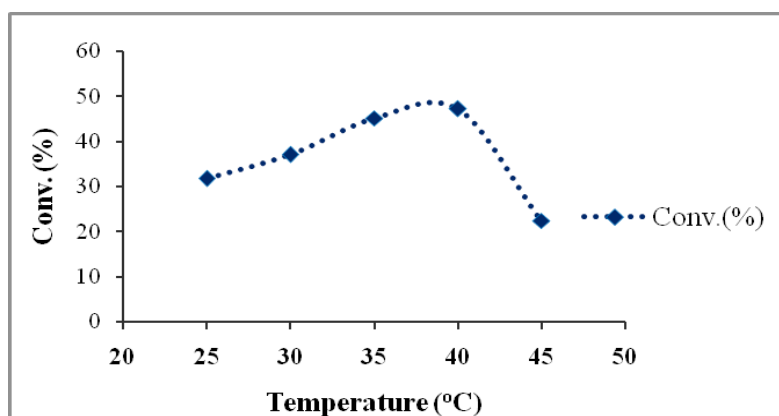
Môi trường bổ sung phù hợp cho quá trình lên men là hỗn hợp gồm Tryptone 60 g/L, Yeast extract 30 g/L, Glycerol 50% (w/v), được bổ

sung sau 4 giờ lên men. Quá trình lên men sẽ kết thúc sau 14h lên men, lúc này vi khuẩn đã sinh trưởng đến mức tối đa trong nồi lên men loại 5 lít. Sau khi ly tâm thu sinh khối, kết quả thu được 130 g tế bào, tiếp tục đem đi sấy khô thu được 18 g tế bào khô. Hoạt độ enzyme esterase khoảng 2400 U/L.

5. Tối ưu hóa quá trình phản ứng sinh học: ảnh hưởng của pH và nhiệt độ



Hình 5: Ảnh hưởng của pH lên hoạt tính của vi khuẩn



Hình 6. Ảnh hưởng của nhiệt độ lên hoạt tính của vi khuẩn

Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ trên độ phân giải *dl*-menthyl benzoate cũng được nghiên cứu (Hình 5 và Hình 6). Theo những báo cáo trước đây về sự phân giải các menthyl este đối quang, pH và nhiệt độ có ảnh hưởng nghiêm trọng đối với hiệu suất và lượng dư đối quang ee [5,13].

Theo Hình 5, hiệu suất phản ứng đạt được rất thấp ở pH $\leq 6,5$ hoặc pH $\geq 8,0$. 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%. Vì vậy, pH 7,5 được chọn là pH tối ưu cho các nghiên cứu về sau.

Ảnh hưởng của nhiệt độ đến phản ứng ở nhiệt độ khác nhau (25, 30, 35, 40 & 45°C) cũng được nghiên cứu (Hình 4). Theo bản trên 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, nó nhanh chóng giảm với tăng thêm 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.

4. KẾT LUẬN

Từ môi trường đất, chúng tôi đã phân lập được 341 dòng vi khuẩn dòng đơn, phát hiện ra 129 chủng có khả năng thủy phân *dl*-menthyl benzoate cho ra tinh dầu bạc hà trong đó: Độ hoạt động cao (32 dòng), hoạt động trung bình (41 dòng), hoạt động thấp (56 dòng); Không xác định (212 dòng).

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 lên men được tiến hành nghiên cứu sơ bộ nhằm mục đích tìm ra môi trường phù hợp và điều kiện nuôi cấy ở quy mô lớn để có thể tăng sinh khối, giảm giá của thành phẩm. Kết quả của quá trình lên men thu được 130 g tế bào, tiếp tục đem đi sấy khô thu được 18 g tế bào khô. Hoạt độ enzyme esterase khoảng 2400 U/L. Ảnh hưởng của pH và nhiệt độ lên quá trình phản ứng cũng được tiến hành khảo sát, kết quả cho thấy pH và nhiệt độ tối ưu phù hợp cho dòng vi khuẩn này thực hiện phản ứng lần lượt là 7.5 và 37°C.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

1. Croteau RB, Davis EM, Ringer KL, Wildung MR. (–)-Menthol biosynthesis and molecular genetics. *Naturwissenschaften*, 2005, 92 (12): 562–577.
2. Clark G. Menthol. *Perfum Flavor*, 1988, 13: 37–46.
3. Lawrence BM. Mint-the genus mentha. *CRC Press*, 2006.
4. Serra S, Fuganti C, Brenna E. Biocatalytic preparation of natural flavours and fragrances. *Trends in Biotechnology*, 2005, 23 (4): 193–198.
5. Zheng GW, Yu HL, Zhang JD, Xu JH. Enzymatic production of *l*-menthol by a high substrate concentration tolerable esterase from newly isolated

- Bacillus subtilis* ECU0554. *Advanced Synthesis & Catalysis*, 2009, 351 (3): 405–414.
6. Nidetzky B, Schwab H. Special issue: Enzyme technology and biocatalysis. *Journal of Biotechnology*, 2007, 129 (1): 1–2.
 7. Xu J, Kawamoto T, Tanaka A. High-performance continuous operation for enantioselective esterification of menthol by use of acid anhydride and free lipase in organic solvent. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 1995, 43: 639–643.
 8. Kamiya N, Goto M, Nakashio F. Surfactant-coated lipase suitable for the enzymatic resolution of menthol as a biocatalyst in organic media. *Biotechnology progress*, 1995, 11: 270–275.
 9. Wu WH, Akoh CC, Phillips RS. Lipase-catalyzed stereoselective esterification of *dl*-menthol in organic solvents using acid anhydrides as acylating agents. *Enzyme and Microbial Technology*, 1996, 18: 538–539.
 10. Babali B, Aksoy HA, Tüter M, Ustun G. Enzymatic esterification of (–)-menthol with fatty acids in solvent by a commercial lipase from *Candida rugosa*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 2001, 78: 53–56.
 11. Lü Z, Chu Y, Han Y, Wang Y, Liu J. Enzymatic esterification of *dl*-menthol with propionic acid by lipase from *Candida cylindracea*. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 2005, 80 (12): 1365–1370.
 12. Zheng GW. Discovery of *Bacillus subtilis* esterase and enzymatic preparation of *l*-menthol. Doctor's degree thesis. East China University of Science and Technology, Shanghai (2010).
 13. Yu L, Xu Y, Wang X, Yu X. 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*, 2007, 47 (3–4): 149–154.
 14. Zheng GW, Pan J, Yu HL, Ngo Thi MT, Li CX, Xu JH. 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*, 2010, 150 (1): 108–114.