

การเลือกทำปฏิกิริยาเพื่อแยกสารเรซิมิกเมนทอลโดยไลเปส  
ในระบบของตัวทำละลายน้ำ/ตัวทำละลายอินทรีย์

นาย อานนทพัฒน์ กัลปพงศ์



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี  
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-639-662-5

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**SELECTIVE RESOLUTION OF RACEMIC MENTHOL BY LIPASES  
IN THE AQUEOUS/ORGANIC SOLVENT SYSTEM**



**Mr. Anontapat Kalapaphongse**

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Engineering in Chemical Engineering**

**Department of Chemical Engineering  
Graduate School**

**Chulalongkorn University**

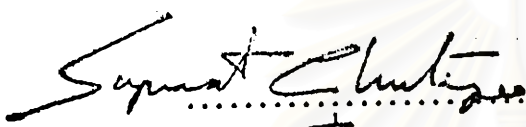
**Academic year 1998**

**ISBN 974-639-662-5**

Thesis Title      Selective Resolution of Racemic Menthol by Lipases  
                          in the Aqueous/Organic Solvent System  
By                    Mr. Anontapat Kalapaphongse  
Department        Chemical Engineering  
Advisor            Dr. Seeroong Prichanont


---


Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.


 ..... Dean of Graduate School  
(Professor Supawat Chutivongse, M.D.)

The thesis committee

 ..... Chairman  
(Professor Wiwut Tanthapanichakoon, Ph.D.)

 ..... Thesis Advisor  
(Seeroong Prichanont, Ph.D.)

 ..... Member  
(Associate Professor Chirakarn Muangnapoh, Dr.Eng.)

 ..... Member  
(Suyanee Nachaiyasit, Ph.D.)

อานนทพัฒน์ กัลปพงศ์ : การเลือกทำปฏิกิริยาเพื่อแยกสารเรซิมิกเมนทอลโดยไลเปสในระบบของตัวทำละลายน้ำ/ตัวทำละลายอินทรีย์ (SELECTIVE RESOLUTION OF RACEMIC MENTHOL BY LIPASES IN THE AQUEOUS/ORGANIC SOLVENT SYSTEM) อ.ที่ปรึกษา : อ.ดร.สิริรุ่ง ปริษานนท์, 107 หน้า, ISBN 974-639-662-5

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาการเลือกทำปฏิกิริยาเพื่อแยกสารเรซิมิกเมนทอลโดยไลเปสในระบบของตัวทำละลายน้ำ/ตัวทำละลายอินทรีย์ โดยสามารถแบ่งการทดลองออกเป็น 2 ส่วนใหญ่ๆ คือ หนึ่ง การทดลองเพื่อเลือกองค์ประกอบของระบบที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยาดังกล่าว โดยพบว่า เอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea*, เฮกซิลอะซิเตต, และไอโซออกเทน เป็นชนิดของเอนไซม์, ตัวให้หมู่เอซิล, และตัวทำละลายอินทรีย์ที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังพบว่าการใช้ระบบตัวทำละลายอินทรีย์มีความเหมาะสมกว่าการใช้ระบบตัวทำละลายน้ำ/ตัวทำละลายอินทรีย์ เนื่องจากความยุ่งยากในการแยกผลิตภัณฑ์อันเกิดจากอิมัลชันที่เสถียรซึ่งเกิดขึ้นในระบบชนิดหลัง และสอง การทดลองโดยอาศัยวิธีการออกแบบการทดลองเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมและจลนพลศาสตร์ สำหรับการเกิดปฏิกิริยาทรานเอสเทอร์ฟิเคชันของเรซิมิกเมนทอลและเฮกซิลอะซิเตต โดยเอนไซม์ไลเปสจาก *Candida cylindracea* ในไอโซออกเทน จากการทดลองพบว่าสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการเกิดปฏิกิริยา คือ ความเข้มข้นของสารผสมเรซิมิกเมนทอลเท่ากับ 73 มิลลิโมลาร์ ความเข้มข้นของเฮกซิลอะซิเตตเท่ากับ 360 มิลลิโมลาร์ อุณหภูมิเท่ากับ 66 องศาเซลเซียส และอัตราการกวนเท่ากับ 110 รอบต่อนาที มีคอนเวอร์ชัน (conversion) สุดท้ายเป็น 27.12 เปอร์เซ็นต์ เมื่อใช้เรซิมิกเมนทอลเป็นฐานการคำนวณ สำหรับการศึกษาด้านจลนพลศาสตร์ พบว่ากลไกการเกิดปฏิกิริยาเป็นแบบ แรนดอม ไซโบ ซึ่งสามารถคำนวณค่าตัวแปรทางจลนพลศาสตร์ได้คือ  $V_{max} = 100.28 \mu\text{mol/hr}\cdot\text{g}\cdot\text{enz}$ ,  $\alpha K_A = 33.92 \text{ mM}$ ,  $\alpha K_B = 8.42 \text{ mM}$ ,  $K_A = 248.22 \text{ mM}$ ,  $K_B = 60.92 \text{ mM}$ ,  $K_{11} = 51.19 \text{ mM}$ , และ  $K_{12} = 481.98 \text{ mM}$  และมีสมการอัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็นดังนี้

$$v = \frac{100.28[A][B]}{2066.4 + 8.42[A](1 + \frac{[A]}{481.98}) + 33.92[B](1 + \frac{[B]}{51.19}) + [A][B]} \mu\text{mol/hr}\cdot\text{g}\cdot\text{enz}$$

ภาควิชา ..... วิศวกรรมเคมี  
 สาขาวิชา ..... วิศวกรรมเคมี  
 ปีการศึกษา ..... 2541

ลายมือชื่อผู้สมัคร ..... อานนทพัฒน์ กัลปพงศ์  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ..... สิริรุ่ง  
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

## C816951 : MAJOR CHEMICAL ENGINEERING DEPARTMENT  
 KEY WORD: RACEMIC MENTHOL / LIPASE / ORGANIC SYSTEM / EXPERIMENTAL  
 DESIGN

ANONTAPAT KALAPAPHONGSE : SELECTIVE RESOLUTION OF  
 RACEMIC MENTHOL BY LIPASES IN THE AQUEOUS/ORGANIC SOLVENT  
 SYSTEM. THESIS ADVISOR : DR. SEEROONG PRICHANONT, Ph.D., 107  
 pp., ISBN 974-639-662-5.

This project involved the resolution of menthol by lipase in an aqueous/organic system. The study was divided into two main experimental parts. First, experiments concerning selection of suitable system components for this specific reaction. It was found that *Candida cylindracea* lipase, hexyl acetate, and iso-octane were the suitable types of enzyme, acyl donor, and solvent for the reaction. Moreover, an organic system was discovered to be more suitable than an aqueous/organic system due to the more complex downstream separation process the latter system required owing to its stable emulsions formed. Second, experiments regarding the determination of optimum conditions and kinetics of the transesterification of racemic menthol and hexyl acetate by *Candida cylindracea* lipase in iso-octane using experimental designs. The optimum conditions found were racemic menthol concentration 73 mM, hexyl acetate concentration 360 mM, temperature 66 °C, and stirring speed 110 rpm. The final conversion were 27.12% calculated base on racemic menthol. The reaction was found to follow random bi bi mechanism which kinetic parameters were determined as  $V_{max} = 100.28 \mu\text{mol/hr-g.enz}$ ,  $\alpha K_A = 33.92 \text{ mM}$ ,  $\alpha K_B = 8.42 \text{ mM}$ ,  $K_A = 248.22 \text{ mM}$ ,  $K_B = 60.92 \text{ mM}$ ,  $K_{i1} = 51.19 \text{ mM}$ , and  $K_{i2} = 481.98 \text{ mM}$  and the rate equation can be expressed as

$$v = \frac{100.28[A][B]}{2066.4 + 8.42[A](1 + \frac{[A]}{481.98}) + 33.92[B](1 + \frac{[B]}{51.19}) + [A][B]} \mu\text{mol/hr-g.enz}$$

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี

ปีการศึกษา..... 2541

ลายมือชื่อนิสิต..... อานนท์ คาลาพงษ์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... Dr. Seerong

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

## ACKNOWLEDGEMENTS



The author would like to express his deepest gratitude to Dr. Seeroong Prichanont, his advisor, for her continuous guidance, enormous number of invaluable discussion, helpful suggestions and warm encouragement. He wishes to give his gratitude to Professor Dr. Wiwut Tanthapanichakoon who serves as the chairman of the thesis committee. In addition, he is also grateful to Associate Professor Dr. Chirakam Muangnapoh and Dr. Suyanee Nachaiyasit for serving as warm members whose comments are especially helpful.

Sincere thanks are made to Khun Sunee, technicians at the Scientific and Technological Research Equipment Center, Chulalongkorn University for their overwhelming help as analysis of the samples. In addition, the author would like to thank all members of Biochemical Engineering Laboratory for their collaborations.

Finally, the author would like to express his sincere thanks to his parents and everyone in his family for their unfailing understandings and affectionate encouragement.

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## CONTENTS

	Page
ABSTRACT IN THAI.....	iv
ABSTRACT IN ENGLISH .....	v
ACKNOWLEDGEMENT .....	vi
CONTENTS .....	vii
LIST OF TABLES .....	ix
LIST OF FIGURES .....	xi
CHAPTER	
1 INTRODUCTION .....	1
1.1 Thesis objectives .....	3
1.2 Scopes of the project .....	4
2 LITERATURE SURVEY .....	5
2.1 Effects of type of lipases and acyl donors.....	6
2.2 Effects of reaction conditions.....	9
3 THEORY .....	13
3.1 Lipase in aqueous/organic two phase media .....	13
3.2 Lipase in nonaqueous media .....	14
3.3 Selection of a suitable organic solvent .....	18
3.4 Enzyme kinetics .....	23
3.5 The influences on enzyme activity.....	26
4 MATERIALS AND METHODS .....	28
4.1 Materials .....	28
4.2 Experimental equipments .....	28

## CONTENTS (continue)

	Page
4.3 Experimental procedures .....	29
4.4 Determination of product concentrations .....	30
<b>5 RESULTS AND DISCUSSION .....</b>	<b>31</b>
5.1 Selection of suitable lipase and acyl donors for menthyl acetate	
Production .....	31
5.2 Selection of suitable organic solvent for menthyl acetate	
Production .....	37
5.3 Transesterification in aqueous-organic two phase system .....	41
5.4 Experimental design for the optimization of the system .....	47
5.5 Determination of kinetic parameters .....	58
<b>6 CONCLUSION AND RECOMMENDATION .....</b>	<b>71</b>
6.1 Conclusion .....	71
6.2 Recommendation .....	72
REFERENCES .....	73
APPENDICES .....	77
APPENDIX A .....	78
APPENDIX B .....	103
BIOGRAPHY .....	107



## LIST OF TABLES

		Page
Table 2.1	Ester formation by transesterification reaction of isoamyl alcohol with two types of acyl donors .....	5
Table 2.2	Transesterification of terpene alcohol (geraniol and citronellol) with tributyrin .....	6
Table 2.3	Interesterification of (-)-menthol with various acyl donors (triacylglycerol) after 20 hours .....	8
Table 3.1	Log P values of commonly used organic solvents. Log P values were calculated from hydrophobic fragmental constants according to Rekker (1979) .....	20
Table 5.1	Comparison of optimum temperatures obtained from various systems .....	55
Table 5.2	Comparison results between experiment and Lokotsch et al (1989) .....	57
Table A1	Experimental design planning.....	79
Table A2	Levels of experimental factors .....	80
Table A3	Experimental design planning, codified and uncoded levels for the central design (CCD) .....	81
Table A4	The initial rate of 2 <sup>4</sup> factorial design experiments from table A1 .....	82
Table A5	Yates's algorithm .....	83

## LIST OF TABLES (continue)

	Page
Table A6	Main and interaction effects of ( $\pm$ )menthol concentration, hexyl acetate concentration, temperature, and stirring speed on the estimate value ..... 85
Table A7	In order of effects and probability ..... 86
Table A8	Comparison between initial rates from equation A.1 and experiments results ..... 89
Table A9	The initial rate of central composite design of factorial design experiments ..... 91
Table A10	Matrix from relation of four factors followed from Myers, 1979 ..... 94
Table A11	To replace a value from table A10 ..... 95
Table A12	Comparison between initial rates obtained experimentally and those calculated from the second order equation ..... 97
Table A13	ANOVA analysis of second order equation for predicting initial rate values ..... 99

## LIST OF FIGURES

		Page
Figure 1.1	The reaction of racemic menthol using acyl donor as ethyl acetate .....	3
Figure 2.1	Effect of temperature on the activity of <i>Candida cylindracea</i>	9
Figure 2.2	Relative activity of esterification of (-)-menthol and lauric acid .....	10
Figure 2.3	Relative activity of the esterification with ten kinds of organic solvents .....	11
Figure 3.1	A schematic model for lipase-catalyzed hydrolysis .....	13
Figure 3.2	Enzymes in organic solvents .....	15
Figure 3.3	The reaction of racemic menthol using acyl donor as phenylvaleric acid .....	16
Figure 3.4	Activity retentions of epoxidizing cells exposed to organic solvents versus log P .....	19
Figure 3.5	Schematic of rapid equilibrium random bi bi mechanism .....	24
Figure 3.6	Schematic of ordered bi bi mechanism .....	24
Figure 3.7	Schematic of ping pong bi bi mechanism .....	25
Figure 4.1	Drawing of the reactor .....	29
Figure 5.1	Comparison of types of lipases on menthyl acetate production from three types of acyl donors .....	34
Figure 5.2	Time-course reaction of transesterification by lipase from <i>Candida cylindracea</i> with various acyl donors .....	35

## LIST OF FIGURES (continue)

	Page	
Figure 5.3	Comparison of final conversions (calculated based on (±)menthol obtained from the transesterification with various acyl donors using lipase from <i>Candida cylindracea</i> .	37
Figure 5.4	Comparison of types of organic solvents on menthyl acetate production .....	39
Figure 5.5	Comparison of relative conversions between our Experimental results, and those of Goto et al, 1994 and Kamiya et al, 1995 of various organic solvents .....	40
Figure 5.6	The photographs of various aqueous-organic two phase systems .....	42
Figure 5.7	Demonstration of the characteristic of two phase system ....	43
Figure 5.8	Distribution of lipase among the two phases in various organic/buffer systems .....	44
Figure 5.9	Initial rates obtained from various of aqueous-organic two phase systems with various organic/buffer volume ratios ....	46
Figure 5.10	Steps in a heterogeneous catalytic reaction (Fogler, 1992)..	48
Figure 5.11	The relationship between initial rate and lipase concentration	49
Figure 5.12	The relationship between initial rate and stirring speed .....	50
Figure 5.13	Relationship of initial rate and racemic menthol concentration with temperature .....	52

## LIST OF FIGURES (continue)

	Page
Figure 5.14 Relationship of initial rate and hexyl acetate concentration with temperature .....	54
Figure 5.15 The relationship of initial rate with menthol and hexyl acetate concentration .....	58
Figure 5.16 Double reciprocal plot of initial rate and menthol concentration at fixed any hexyl acetate concentrations .....	59
Figure 5.17 Double reciprocal plot of initial rate and menthol concentration .....	61
Figure 5.18 Plot of the intercept determined in figure 5.18 (a) and reciprocal of hexyl acetate concentration .....	62
Figure 5.19 Plot of the slope determined in figure 5.18 (a) and (b) and hexyl acetate concentration .....	64
Figure 5.20 Double reciprocal plot of initial rate and hexyl acetate concentration and menthol concentration .....	67
Figure 5.21 Plot of the slope determined in figure 5.21 (a) and (b) and menthol concentration .....	68
Figure A1 Plot of effects with probability from $2^4$ factorial sets of the experiments .....	86
Figure A2 Plot of difference effects between the experiment of results and calculated results (from equation A.1 with probability paper).....	90