

**CATALYZED ESTERIFICATION REACTIONS BY LIPASE LIPASE
ENCAPSULATED IN SODIUM BIS (2-ETHYLHEXYL) PHOSPHATE
(NADEHP) REVERSE MICELLES**



Ms. Pichasiree Thientaworn

A Thesis Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
and Case Western Reserve University

2003

ISBN 974-17-2292-3

Thesis Title : Catalyzed Esterification Reactions by Lipase Encapsulated in Sodium Bis (2-Ethylhexyl) Phosphate (NaDEHP) Reverse Micelles

By: Ms. Pichasiree Thientaworn

Program: Petrochemical Technology

Thesis Advisors: Asst. Prof. Pomthong Malakul
Assoc. Prof. Chintana Saiwan
Prof. Erdogan Gulari

Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science

K. Bunyakit.

College Director

(Assoc. Prof. Kunchana Bunyakit)

Thesis Committee:

Pomthong Malakul

(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Chintana Saiwan

(Assoc. Prof. Chintana Saiwan)

Erdogan Gulari

(Prof. Erdogan Gulari)

Sumaeth Chavadej

(Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej)

Boonyarach Kitiyanan

(Dr. Boonyarach Kitiyanan)

ABSTRACT

4471019063 : PETROCHEMICAL TECHNOLOGY PROGRAM

Ms. Pichasiree Thientaworn: Catalyzed Esterification Reactions by Lipase Encapsulated in Sodium Bis (2-Ethylhexyl) Phosphate (NaDEHP) Reverse Micelles.

Thesis Advisors: Asst. Prof. Pomthong Malakul, Assoc. Prof. Chintana Saiwan and Prof. Erdogan Gulari, 48 pp. ISBN 974-17-2292-3

Keywords : Esterification/ Encasulated-lipase/ Reverse micelle/ Rice bran lipase/ Microemulsion

The use of reverse micelle as a reaction medium for reactions catalyzed by enzymes has received increasing attention in recent years since it can enhance the activity of the enzyme and its interaction with substrate. In this study, esterification reactions of two fatty acids (caprylic and oleic acid) and hexanol catalyzed by Thai rice bran lipase (TRBL) encapsulated in reverse micelles formed by bis(2-ethylhexyl) phosphate (NaDEHP) in isooctane were investigated. It was found that the enzymatic activity of TRBL depended strongly on the reverse micellar structure, water content (W_0), type and concentration of the substrate. In this reverse micellar system, Thai rice bran lipase was showed to have a preference towards long chain fatty acid which is expected to be due to the localization of enzyme molecules in the reverse micelle microstructure and the availability of substrates. Furthermore, the optimum W_0 for TRBL in this system was found to be approximately 8. Under specific conditions, the conversion of nearly 90% could be obtained from the esterification reaction catalyzed by a freshly extracted TRBL. The reaction rate and conversion appeared to be influenced by a combined effect of several factors such as salt concentration, type and concentration of substrate and water content.

บทคัดย่อ

นางสาว พิชาสิริ เขียวถาวร: การศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์รีฟิเคชันโดยไลเปสที่ถูก
เอนแคปซูลเลตในรีเวอร์สไมเซลล์ของโซเดียมบิสทูลเฮกซิลฟอสเฟส (โซเดียมดีอีเฮกซี)
Catalyzed Esterification Reactions by Lipase Encapsulated in Sodium Bis (2-
Ethylhexyl) Phosphate (NaDEHP) Reverse Micelles อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. ปมทอง มาลา
กุล รศ. ดร. จินตนา สายวรรณ และ ศ. ดร. เออร์โดแกน กุลาริ 48 หน้า ISBN 974-17-2292-3

การใช้รีเวอร์สไมเซลล์เป็นตัวกลางในการทำปฏิกิริยาที่ถูกเร่งด้วยเอนไซม์ได้รับความ
สนใจเพิ่มมากขึ้น เนื่องจากรีเวอร์สไมเซลล์สามารถช่วยเพิ่มเอนไซม์แอกติวิตีและการสัมผัส
ระหว่างเอนไซม์กับซับสเตรต การวิจัยนี้ศึกษาปฏิกิริยาเอสเทอร์รีฟิเคชันของกรดไขมัน 2 ชนิด
(กรดคาปริลิกและโอลิก) และเฮกซานอล โดยใช้ไลเปสที่สกัดจากร้าข้าวไทย (TRBL) และถูก
เอนแคปซูลเลตอยู่ในรีเวอร์สไมเซลล์ของโซเดียมบิสทูลเฮกซิลฟอสเฟส (โซเดียมดีอีเฮกซี)
ในสารละลายไอโซออกเทน จากผลการทดลองพบว่าโครงสร้างของรีเวอร์สไมเซลล์ อัตราส่วน
ของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว ชนิดและความเข้มข้นของซับสเตรตมีผลต่อแอกติวิตีของไลเปสอย่าง
เห็นได้ชัด ในระบบนี้ ไลเปสจากร้าข้าวแสดงความจำเพาะต่อโครงสร้างของซับสเตรต โดยพบ
ว่าไลเปสเร่งปฏิกิริยาของกรดไขมันที่มีสายโซ่ยาวได้ดีกว่ากรดไขมันที่มีสายโซ่สั้น ซึ่งคาดว่าเป็น
ผลมาจากตำแหน่งของไลเปสภายในโครงสร้างของรีเวอร์สไมเซลล์และการนำมาใช้ได้ของซับส
เตรต นอกจากนี้ อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดเมื่ออัตราส่วนของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิวมีค่า
ประมาณ 8 อัตราเร็วและการเปลี่ยนแปลงของปฏิกิริยา ขึ้นอยู่กับอิทธิพลของหลายปัจจัย
ประกอบกัน ได้แก่ ความเข้มข้นของเกลือ ชนิดและความเข้มข้นของซับสเตรต และอัตราส่วนของ
น้ำต่อสารลดแรงตึงผิว

ACKNOWLEDGEMENTS

First I would like to express my sincere appreciation to my advisors. Under their guidance, I successfully overcame many difficulties. I also extend my appreciation to all staff members of the Petroleum and Petrochemical College and all of my friend for their assistance. I also want to thank Dr.Rath Pichvankurat (Department of Biochemical Technology Chulalongkorn University) for kindly taught me about the extraction of lipase.

I am grateful for the partial funding of thesis work provided by Postgraduate Education and Research Programs in Petroleum and Petrochemical Technology (PPT Consortium). Finally, I would like to express my deepest gratitude to my family for the constant support, understanding and love.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE	
Title Page	i	
Abstract (in English)	iii	
Abstract (in Thai)	iv	
Acknowledgements	v	
Table of Contents	vi	
List of Tables	ix	
List of Figures	x	
List of Schemes	xii	
CHAPTER		
I	INTRODUCTION	1
II	BACKGROUND AND LITERATURE SURVEY	2
	2.1 The Function of Lipase as an Enzyme	2
	2.2 Rice Bran Lipase (RBL)	2
	2.3 Lipase-Catalyzed Reaction	3
	2.4 Encapsulated Enzyme Using Microemulsion	5
	2.5 Lipase-Catalyzed Esterification in Reverse Micelle	7
III	EXPERIMENTAL	9
	3.1 Materials	9
	3.2 Methodology	9
IV	RESULTS AND DISCUSSION	15
	4.1 Microemulsion Studies for Esterification Reaction	15
	4.1.1 Phase Transition: Effect of Salt and Cosurfactant	15
	4.1.2 Water content and micellar size in NaDEHP <i>W/O</i> microemulsion	17

CHAPTER		PAGE
IV	4.1.3 Determination of Water content	17
	4.1.3.1 Effect of salt and cosurfactant concentration on water content	17
	4.1.3.2 Effect of substrate concentration on water content	19
	4.2 Stability of Thai Rice Bran Lipase	21
	4.2.1 Storage Stability of the Extract Lipase at 4°C	21
	4.2.2 Stability of lipase encapsulated in reverse micelle	22
	4.2.3 Effect of Temperature on Stability of Lipase	22
	4.3 Lipase-Catalyzed Esterification	23
	4.3.1 Effect of W_0	24
	4.3.2 Effect of Fatty Acid Chain Length	25
	4.3.3 Effect of Fatty Acid Concentration	26
	4.3.4 Effect of Hexanol Concentration	27
	4.3.5 Water content after reaction	28
	4.4 Chemical Analyses	30
	4.4.1 Determination of Fatty Acid Concentration by Spectrophotometric Method	30
	4.4.2 Identification of Ester Product by IR	30
V	CONCLUSIONS	33
	REFERENCES	34
	APPENDICES	37
	Appendix A Water Content and Size of Microemulsion	37
	Appendix B Calibration Curve	38
	Appendix C Determination of Lipase	39
	Appendix D Esterification Reaction	40
	Appendix E FT-IR Spectra	43

Appendix F Example of Calculation	46
CURRICULUM VITAE	48

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
4.1	Effects of caprylic acid and oleic acid on water content of <i>W/O</i> microemulsion formed by 100 mM NaDEHP/50 mM hexanol as a cosurfactant in isooctane/0.5 M NaCl (aq)	19
4.2	Effect of hexanol on water content of <i>W/O</i> microemulsion formed by 100 mM NaDEHP/50 mM hexanol as a cosurfactant in isooctane/0.75 M NaCl (aq)	19
4.3	Water content (W_0) of <i>W/O</i> microemulsion formed by 100 mM NaDEHP/50 mM hexanol as a cosurfactant in isooctane/0.5 M NaCl (aq) before and after injecting lipase.	20
4.4	Effect of fatty acid concentration on water content	26
4.5	Water content (W_0) before and after reaction in the esterification of 50 mM oleic acid with 75 mM hexanol	29

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Schematic of ternary phase diagram for typical water/nonionic surfactant/oil system at HBL temperature. Microemulsion structure is shown in the normal regions of occurrence; left to right: <i>O/W</i> globular microemulsions (L1), bicontinuous microemulsion (L3), and <i>W/O</i> microemulsion (L2).	6
3.1	The schematic diagram for the preparation of rice bran lipase.	11
4.1	Phase behaviors of NaDEHP/isooctane/NaCl aqueous solution with hexanol as a cosurfactant at various concentrations (35 ⁰ C, pH 7.4).	16
4.2	The relation between W_0 and the hydrodynamic radius, R_h for 100 mM NaDEHP/isooctane reverse micelles at 35 ⁰ C.	17
4.3	Effects of NaCl and hexanol as a cosurfactant on water content of 100 mM NaDEHP/20-50 mM hexanol as a cosurfactant in isooctane/0.5-4.0 M NaCl (aq).	18
4.4	Effect of storage time on the activity of the extracted rice bran lipase kept at 4 ⁰ C assayed in reverse micelle.	21
4.5	Effect of incubation time of lipase in reverse micelles on lipase activity in the esterification of 75 mM hexanol with 50 mM oleic acid in 100 mM NaDEHP/50 mM cosurfactant in isooctane/0.5 M NaCl microemulsion; lipase concentration 0.010mg/ml, $W_0=8.3$, pH 7.4, T=35 ⁰ C.	22
4.6	The effect of temperature on the stability of lipase; (◆,○) the stability of lipase in aqueous solution assayed in reverse micelle, (●,▲) the stability in reverse micelle.	23
4.7	The effect of W_0 on the activity of lipase; 0.025 mg/ml in the esterification of 75 mM hexanol with (a) 50 mM caprylic acid; (b) 50 mM oleic acid.	24

FIGURE		PAGE
4.8	Effect of fatty acid chain length on the activity of lipase in the esterification of 75 mM hexanol with 25 mM fatty acid; enzyme concentration 0.010 mg/ml (■), 50 mM fatty acid; enzyme concentration 0.017 mg/ml (□).	25
4.9	Effect of fatty acid concentration on the activity of lipase in the esterification of 75 mM hexanol with 15-60 mM oleic acid; W_0 9.37-6.9, enzyme concentration 0.010 mg/ml, (□) and 20-65 mM caprylic acid; W_0 9.15-6.73, enzyme concentration 0.017 mg/ml (■).	26
4.10	Effect of hexanol concentration on the activity of lipase in the esterification of 40 mM fatty acid with 20-120 mM hexanol; W_0 7.80-7.29, enzyme concentration 0.020 mg/ml.	28
4.11	Spectra of before and after esterification of 50 mM caprylic acid with 75 mM hexanol in microemulsion system of 100 mM NDEHP/isooctane/50 mM cosurfactant/0.5 M NaCl.	31
4.12	Spectra of before and after esterification of oleic acid with 75 mM hexanol in microemulsion system of 100 mM NDEHP/isooctane/ 50 mM cosurfactant/0.5 M NaCl: oleic acid (a) 50 mM and (b) 100 mM.	31
4.13	Spectra of before and after esterification of 150 mM oleic acid with 100 mM hexanol in microemulsion system of 150 mM NDEHP/isooctane/ 50 mM cosurfactant/0.25 M NaCl.	32
4.14	Spectra of before and after esterification of 200 mM oleic acid with 150 mM hexanol in microemulsion system of 200 mM NDEHP/isooctane/ 50 mM cosurfactant/0.25 M NaCl.	32

LIST OF SCHEMES

SCHEME		PAGE
2.1	(1) Fatty-acid-alcohol esterification, (2) Glyceride synthesis.	4
2.2	The production of biodiesel or methyl ester by transesterification.	4
2.3	Conversion of palm oil into cocoa butter fat.	5