

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



Mr. Theera Anukunprasert

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment 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

2002

ISBN 974-03-1576-3

Thesis Title : Esterification Reactions Catalyzed by Lipase
Encapsulated in Sodium Bis (2-Ethylhexyl) Phosphate
(NaDEHP) Reverse Micelles
By : Theera Anukunprasert
Program : Petrochemical Technology
Thesis Advisors : Dr. Pomthong Malakul, Assoc. Prof. Chintana Saiwan
and Prof. Erdogan Gulari

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

K. Bunyakiat.
..... College Director
(Assoc. Prof. Kunchana Bunyakiat)

Thesis Committee:

Pomthong Malakul
.....
(Dr. 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

4371026063 : PETROCHEMICAL TECHNOLOGY PROGRAM

Mr. Theera Anukunprasert: Esterification Reactions Catalyzed by Lipase Encapsulated in Sodium Bis (2-Ethylhexyl) Phosphate (NaDEHP) Reverse Micelles.

Thesis Advisors: Dr. Pomthong Malakul, Assoc. Prof. Chintana Saiwan and Prof. Erdogan Gulari, 76 pp. ISBN 974-03-1576-3

Keywords : Esterification/ Encapsulated-lipase/ Reverse Micelles/ Microemulsions

Lipases have increasingly been used transformation of water insoluble substrates such as hydrolysis of triglycerides to glycerol and fatty acids, and esterification reactions. This catalytic process is heterogeneous and can be favored by the use of water-in-oil microemulsions or reverse micelles due to their low water content. In this study, the catalytic activity of *Rhizomucor delemar* lipase encapsulated in reverse micelles formed by sodium bis (2-ethylhexyl) phosphate (NaDEHP) in isooctane was investigated using various alcohols with fatty acids. The effects of nature of substrates and various system parameters such as salt concentration and water to surfactant ratio (W_o) on activity of encapsulated lipase were examined in relation to the reverse micellar structure and selectivity. *R. delemar* lipase showed selectivity with regard to a structure of substrates used. Long chain fatty acids and alcohols were better catalyzed as compared to the short chain ones. The observed results may be related to the enzyme localization in the reverse micellar microstructure resulting from the liophilic character of protein and the availability of substrates. The results also showed that W_o has a strong impact on the enzyme activity. Maximum reaction rate was observed at $W_o \sim 6$ and the rates obtained were found to be 50-100 times those obtained in general oil/water media.

บทคัดย่อ

นาย ชีระ อนุกุลประเสริฐ: การศึกษาปฏิกิริยาเอสเตอริฟิเคชันโดยไลเปสที่ถูกเอนแคปซูลเลตในรีเวอร์สไมเซลล์ของโซเดียมบิสทูลอเพทิลเฮกซิลฟอสเฟส (โซเดียมดีอีเอสพี) Esterification Reactions Catalyzed by Lipase Encapsulated in Sodium Bis (2-Ethylhexyl) Phosphate (NaDEHP) Reverse Micelles อ. ที่ปรึกษา: ดร. ปมทอง มาลากุลรศ. ดร. จินตนา สายวรรณ และ ศ. ดร. เออร์โดแกน กุลารี 76 หน้า ISBN 974-03-1576-3

การใช้ไลเปสเพื่อการถ่ายโอนซับสเตรทที่ไม่สามารถละลายน้ำได้มีเพิ่มมากขึ้น เช่น กลีเซอรอลและกรดไขมันที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของไตรกลีเซอไรด์กับน้ำและสารที่ได้จากปฏิกิริยาเอสเตอริฟิเคชัน กระบวนการเร่งนี้เป็นปฏิกิริยาแบบไม่เป็นเนื้อเดียวกันและสามารถทำให้ปฏิกิริยาเกิดขึ้นได้โดยการใช้ไมโครอิมัลชันของน้ำในน้ำมันหรือรีเวอร์สไมเซลล์เนื่องจากมีปริมาณน้ำต่ำ การวิจัยนี้ศึกษาแอกติวิตีที่เกิดจากการเร่งปฏิกิริยาของกรดไขมัน และแอลกอฮอล์ชนิดต่าง ๆ โดยใช้ไลเปสชนิดไรโซมูคอร์เดเลมาร์ที่ถูกเอนแคปซูลเลตอยู่ในรีเวอร์สไมเซลล์ของโซเดียมบิสทูลอเพทิลเฮกซิลฟอสเฟส (โซเดียมดีอีเอสพี) ในสารละลายไอโซออกเทนโดยศึกษาธรรมชาติของซับสเตรท และตัวแปรอื่น ๆ ในระบบ เช่น ความเข้มข้นของเกลือ อัตราส่วนของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว ที่มีผลต่อแอกติวิตีของไลเปสที่สัมพันธ์กับโครงสร้างของรีเวอร์สไมเซลล์และความจำเพาะของเอ็นไซม์ไลเปสในการเร่งปฏิกิริยา จากการศึกษาความจำเพาะของไลเปสชนิดไรโซมูคอร์เดเลมาร์ต่อโครงสร้างของซับสเตรทที่ใช้พบว่าไลเปสเร่งปฏิกิริยาของกรดไขมันและแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่ยาวได้ดีกว่ากรดไขมันและแอลกอฮอล์ที่มีสายโซ่สั้น ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับตำแหน่งของไลเปสในโครงสร้างของรีเวอร์สไมเซลล์เนื่องจากโปรตีนมีความชอบน้ำมันและเมื่อมีซับสเตรทอยู่ด้วย อัตราส่วนของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิวมีผลต่อแอกติวิตีของเอ็นไซม์อย่างมาก อัตราการเกิดปฏิกิริยาสูงสุดเมื่ออัตราส่วนของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิวมีค่าเท่ากับ 6 และพบว่าอัตราการเกิดปฏิกิริยาเป็น 50-100 เท่าของปฏิกิริยาที่เกิดในตัวกลางโดยทั่วไปที่เป็นน้ำกับน้ำมัน

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my special thanks to professors and all staff of the Petroleum and Petrochemical College, CU, for all contribution and assistance. Furthermore, I would like to take this important opportunity to thank all of my friends for their unforgettable friendship and hospitality. Finally, I would like to dedicate my deepest appreciation to my beloved family who plays the greatest role in my success.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Figures	ix
List of Tables	xiii
List of Schemes	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE SURVEY	3
2.1 Enzymes and Their Catalytic Functions	3
2.2 Lipase and Lipase-Catalyzed Reactions	4
2.3 Lipase-Catalyzed Reactions in Low Water Systems	7
2.4 Catalyzed Esterification Reactions by Lipase Encapsulated in Microemulsions	9
III EXPERIMENTAL	13
3.1 Chemicals	13
3.2 Equipment	13
3.3 Methodology	14

CHAPTER		PAGE
IV	RESULTS AND DISCUSSION	17
4.1	Microemulsion Studies for Esterification Reaction	17
4.1.1	Effect of Salt	17
4.1.1.1	Micellar size in W/O microemulsion	18
4.1.1.2	Water content in W/O microemulsion	19
4.1.2	Effect of Alcohol as a Cosurfactant	
4.1.3	Determination of Water Content	19
4.1.3.1	Effect of NaDEHP on water content	20
4.1.3.2	Effect of alcohol on water content	21
4.1.3.3	Effect of fatty acid on water content	21
4.1.4	Determination of Water to Surfactant Ratio (W_o)	22
4.2	Esterification Reactions	23
4.2.1	Effect of Lipase Concentration on Reaction Rate	23
4.2.2	Effect of Type of Fatty Acid Substrates	24
4.2.2.1	Esterification of caprylic acid with hexanol	24
4.2.2.2	Esterification of oleic acid with hexanol	26
4.2.2.3	Esterification of palmitic acid with hexanol	27
4.2.3	Effect of Type of Cosurfactant	30
4.2.3.1	Esterification of caprylic acid with propanol	30
4.2.3.2	Esterification of oleic acid with propanol	31
4.2.3.3	Esterification of palmitic acid with propanol	31

CHAPTER		PAGE
IV		
	4.2.4 Effect of W_o on Conversion and Reaction Rate	32 33
	4.2.5 Comparison Reverse Micelles with General Oil/Water Systems	
	4.3 Chemical analyses	
	4.3.1 Fatty Acid Determination by UV-VIS	38
	4.3.2 Ester Determination by FT-IR	38
V	CONCLUSIONS	49
	REFERENCES	50
	APPENDICES	51
	CIRRICULUM VITAE	76

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Schematic of ternary phase diagram for a typical water/nonionic surfactant/oil system at HLB temperature. Microemulsion structure is shown in the normal regions of occurrence; left to right: O/W globular microemulsions (W1), bicontinuous microemulsion (W3), and W/O globular microemulsions (W2).	10
4.1	Phase behavior of NaDEHP/isooctane/NaCl aqueous solution as a function of NaCl concentration.	17
4.2	Effect of NaCl concentration on the hydrodynamic radius of 100 mM NaDEHP/isooctane/NaCl microemulsion.	18
4.3	Effect of NaCl concentration on water content in isooctane phase.	19
4.4	Effect of alcohols as a cosurfactant of 100 mM NaDEHP/isooctane/0.1 M NaCl; (a) hexanol (b) 1-propanol, (c) 2-propanol.	20
4.5	Effect of NaDEHP on water content of 50-100 mM NaDEHP/isooctane/1.0-4.5 M NaCl (aq) microemulsion system.	21
4.6	Effect of lipase concentration on the rate of depletion of caprylic acid in 150 mM NaDEHP/150 mM hexanol/ 50 mM caprylic acid/ isooctane/1.0 M NaCl (aq).	24
4.7	Depletion of caprylic acid in 150 mM NaDEHP/150 mM hexanol/ isooctane/1.0 M NaCl. Caprylic acid concentration was 50-150 mM and W_o was 4.2 to 7.5.	25

FIGURE		PAGE
4.8	Conversion of caprylic acid in 150 mM NaDEHP/150 mM hexanol/ isooctane/1.0 M NaCl. Caprylic acid concentration was 50-150 mM and W_o was 4.2 to 7.5.	26
4.9	Depletion of oleic acid in 150 mM NaDEHP/150 mM hexanol/isooctane/1.0 M NaCl. Oleic acid concentration was 50-150 mM and W_o was 4.7 to 7.2.	28
4.10	Conversion of oleic acid in 150 mM NaDEHP/150 mM hexanol/isooctane/1.0 M NaCl. Oleic acid concentration was 50-150 mM and W_o was 4.7 to 7.2.	28
4.11	Depletion of palmitic acid in 150 mM NaDEHP/150 mM hexanol/isooctane/1.0 M NaCl. Palmitic acid concentration was from 50-100 mM and W_o was 5.6 to 6.8.	29
4.12	Conversion of palmitic acid in 150 mM NaDEHP/150 mM hexanol/isooctane/1.0 M NaCl. Palmitic acid concentration was 50-100 mM and W_o was 5.6 to 6.8.	29
4.13	Depletion of palmitic acid with 1-propanol and 2-propanol .	32
4.14	Effect of W_o on initial velocity of three fatty acids with hexanol in microemulsion media.	33
4.15	Effect of W_o on conversion of three fatty acids with hexanol in microemulsion media.	34
4.16	Depletion of caprylic acid in esterification with hexanol, 1-propanol, and 2-propanol in general water/oil media.	35
4.17	Depletion rate of oleic acid in esterification with hexanol, 1-propanol, and 2-propanol in general water/oil media.	35

FIGURE		PAGE
4.18	Depletion rate of palmitic acid in esterification with hexanol, 1-propanol, and 2-propanol in general water/oil media.	36
4.19	Comparison of the depletion of caprylic acid in microemulsion of 150 NaDEHP/150 mM hexanol/isooctane/1.0 M NaCl with general water/oil media.	36
4.20	Comparison of the depletion of oleic acid catalyzed with hexanol between microemulsions 150 NaDEHP/150 mM hexanol/isooctane/1.0 M NaCl and general water/oil media.	37
4.21	Comparison of the depletion of palmitic acid catalyzed with hexanol between microemulsions 150 NaDEHP/150 mM hexanol/isooctane/1.0 M NaCl and general water/oil media.	37
4.22	Spectra of before and after esterification of caprylic acid with hexanol in microemulsion system of 150 mM NaDEHP/isooctane/100 mM caprylic acid/0.1 M NaCl: (a) 0.02 ml sample and (b) 0.05 ml sample.	40
4.23	Spectra of before and after esterification of caprylic acid with hexanol in microemulsion system of 150 mM NaDEHP/isooctane/150 mM hexanol/1.0 M NaCl: caprylic acid (a) 70 mM (b) 100 mM and (c) 150 mM.	41
4.24	Spectra of before and after esterification of oleic acid with hexanol in microemulsion system of 150 mM NaDEHP/isooctane/150 mM hexanol/1.0 M NaCl: caprylic acid (a) 50 mM (b) 70 mM and (c) 100 mM (d) 150 mM.	42

FIGURE		PAGE
4.25	Spectra before and after esterification of palmitic acid with hexanol in microemulsion system 150 mM NaDEHP/isooctane/150 mM hexanol/1.0 M NaCl: palmitic acid (a) 50 mM (b) 70 mM and (c) 100 mM.	43
4.26	Spectra of before and after esterification of 70 mM caprylic acid with: (a) 120 mM NaDEHP/isooctane/200 mM 1-propanol /0.5 M NaCl and (b) 100 mM NaDEHP/isooctane/200 mM 2-propanol /0.5 M NaCl.	44
4.27	Spectra of before and after esterification of 70 mM oleic acid with: (a) 120 mM NaDEHP/isooctane/200 mM 1-propanol /0.5 M NaCl and (b) 100 mM NaDEHP/isooctane/200 mM 2-propanol /0.5 M NaCl.	44
4.28	Spectra of before and after esterification of 70 mM palmitic acid with: (a)120 mM NaDEHP/isooctane/200 mM 1-propanol /0.5 M NaCl and (b) 100 mM NaDEHP/isooctane/200 mM 2-propanol /0.5 M NaCl.	45
4.29	Spectrum of 70 mM diethyl L-tartrate (as standard ester).	45
4.30	Spectra of before and after esterification of 70 mM caprylic acid in general water/oil system with: (a) 150 mM hexanol (b) 200 mM 1-propanol and (c) 200 mM 2-propanol.	46
4.31	Spectra of before and after esterification of 70 mM oleic acid with hexanol in general water/oil system with: (a) 150 mM hexanol (b) 200 mM 1-propanol and (c) 200 mM 2-propanol.	47
4.32	Spectra before and after esterification of 70 mM palmitic acid in general water/oil system with: (a) 150 mM hexanol (b) 200 mM 1-propanol and (c) 200 mM 2-propanol.	48

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Classification of enzymes and their catalyzed reactions.	3
2.2	Properties of purified microbial lipases.	4
4.1	Effect of caprylic acid to water content of microemulsion with different types of alcohol.	22
4.2	Conditions for esterification reaction with 50 mM fatty acid.	23
4.3	Conversion and initial rate of esterification of caprylic acid with hexanol for 150 mM NaDEHP/isooctane/150 mM hexanol/1.0 M NaCl.	26
4.4	Conversion and initial rate of esterification of oleic acid with hexanol for 150 mM NaDEHP/150 mM hexanol/isooctane/0.5 M NaCl.	28
4.5	Conversion and initial rate of esterification of palmitic acid with hexanol for 150 mM NaDEHP/150 mM hexanol/isooctane/1.0 M NaCl.	30
4.6	Activity of <i>R. delemar</i> lipase from various fatty acids with hexanol for 150 mM NaDEHP/150 mM hexanol/isooctane.	30

LIST OF SCHEMES

SCHEME		PAGE
2.1	Lipase acts as a catalyst in lipid metabolism	4
2.2	Lipase-catalyzed esterification of fatty acid-alcohol	5
2.3	Lipase-catalyzed glycerolysis of triglyceride	6