

**CATALYTIC ESTERIFICATION OF *CANDIDA ANTARCTICA* LIPASE B  
AND *THERMOMYCES LANUGINOSA* LIPASE ENCAPSULATED IN  
SODIUM BIS (2-ETHYLHEXYL) PHOSPHATE  
REVERSE MICELLAR SYSTEM**

Ms. Kusawadee Sagulpugdee

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  
Case Western Reserve University, The University of Michigan,  
The University of Oklahoma, and Institut Français du Pétrole  
2004  
ISBN 974-9651-27-8

I 2161 8409

**Thesis Title:** Catalytic Esterification of *Candida antarctica* Lipase B and *Thermomyces lanuginose* Lipase Encapsulated in Sodium Bis (2-Ethylhexyl) Phosphate Reverse Micellar System

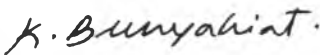
**By:** Ms. Kusawadee Sagulpugdee

**Program:** Petrochemical Technology

**Thesis Advisor:** Assoc. Prof. Chintana Saiwan

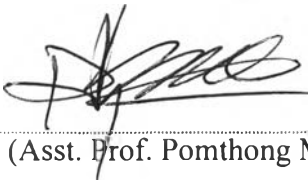
---

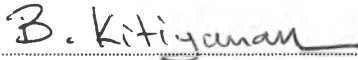
Accepted by the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Master of Science.

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

**Thesis Committee:**

  
.....  
(Assoc. Prof. Chintana Saiwan)

  
.....  
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

  
.....  
(Asst. Prof. Boonyarach Kitiyanan)

**ABSTRACT**

4571006063: PETROCHEMICAL TECHNOLOGY PROGRAM

Kusawadee Sagulpugdee: Catalytic Esterification of *Candida antarctica* Lipase and *Thermomyces lanuginose* Lipase Encapsulated in Sodium Bis (2-Ethylhexyl) Phosphate Reverse Micellar System

Thesis advisor: Assoc. Prof. Chintana Saiwan, 51 pp.

ISBN 974-9651-27-8

Keywords: Encapsulation/ Lipases/ *Candida antarctica* lipase B/ *Thermomyces lanuginosa* lipase

*Candida antarctica* lipase B (CALB) and *Thermomyces lanuginosa* lipase (TLL) encapsulated in reverse micelles of sodium bis(2-ethylhexyl) phosphate (NaDEHP) were used to investigate the role of different enzymes, effects of water-to-surfactant molar ratio ( $W_o$ ) and fatty acids (caprylic acid and oleic acid) in catalytic activity of esterification of fatty with hexanol. The reverse micellar system consisted of NaDEHP, hexanol, fatty acid in isooctane and 1.0M NaCl aqueous system. In the NaDEHP reverse micellar system, the optimum  $W_o$  of CALB was 6.67 and 7.08 for oleic acid and caprylic acid, while the optimum  $W_o$  of TLL was 8.44 for oleic acid and 9.12 for caprylic acid, respectively. The water-to-surfactant molar ratio, type and concentration of substrate have strong effects to the specific activity of both lipases and the conversion of the reactions. Both CALB and TLL showed the selectivity regarding to long chain fatty acid, however, encapsulated CALB gave higher specific activity and conversion than the encapsulated TLL.

## บทคัดย่อ

กุสาวดี สกุลภักดี: การเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชัน โดยแคนดิดา แอนทราคทิก้า ไลเปส บี และ เทอร์โมไมซิส ลานูจินา ไลเปส เอนแคปซูลที่อยู่ในรีเวอร์สไมเซลล์ของโซเดียมบิส(2-เอทิลเฮกซิล)เอทิลเฮกซิลฟอสเฟต Catalytic Esterification of *Candida Antarctica* Lipase B and *Thermomyces lanuginosa* Lipase Encapsulated in Sodium Bis(2-Ethylhexyl) Phosphate Reverse Micellar System อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. จินตนา สายวรรณ

การศึกษาบทบาทของเอนไซม์ต่างชนิดในการเร่งปฏิกิริยาเอสเทอร์ริฟิเคชันของกรดไขมันและแอลกอฮอล์ โดยใช้แคนดิดา แอนทราคทิก้า ไลเปส บี (ซีเอแอลบี) และ เทอร์โมไมซิส ลานูจินา ไลเปส (ทีแอลแอล) ที่เอนแคปซูลอยู่ในรีเวอร์สไมเซลล์ของโซเดียมบิส(2-เอทิลเฮกซิล)ฟอสเฟต (โซเดียมดีอีเอสพี) ระบบรีเวอร์สไมเซลล์ประกอบด้วยโซเดียมดีอีเอสพี เฮกซานอล และกรดไขมันในสารละลายไอโซออกเทน และ 1.0 โมลาร์ โซเดียมคลอไรด์ การศึกษาผลกระทบของอัตราส่วนของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว และกรดไขมัน (กรดโอเลอิกและกรดคาปริลิก) พบว่า ค่าอัตราส่วนของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมของซีเอแอลบีคือ 6.67 และ 7.08 เมื่อใช้กรดโอเลอิกและกรดคาปริลิกเป็นสารตั้งต้น ตามลำดับ ค่าอัตราส่วนของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิวที่เหมาะสมของทีแอลแอลคือ 8.44 เมื่อใช้กรดโอเลอิกและ 9.12 เมื่อใช้กรดคาปริลิกเป็นสารตั้งต้น อัตราส่วนของน้ำต่อสารลดแรงตึงผิว ชนิดและความเข้มข้นของสารตั้งต้นมีผลอย่างมากต่อค่ากิจกรรมเฉพาะของทั้งสองไลเปส และ ต่อการแปลงของปฏิกิริยา ทั้งซีเอแอลบีและทีแอลแอลเลือกที่จะเร่งสารตั้งต้นเป็นกรดไขมันสายโซ่ยาวมากกว่าสายโซ่สั้น อย่างไรก็ตามเอนแคปซูลของซีเอแอลบีให้ค่ากิจกรรมเฉพาะ และ การแปลงของปฏิกิริยาได้มากกว่าเอนแคปซูลของทีแอลแอล

## ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I would like to express my appreciation to my advisor and all staff of the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University and East Asia Co.,Ltd. (EAC) for providing the two enzymes from Novozymes, Denmark.

This thesis work is partially funded by Postgraduate Education and Research Programs in Petroleum and Petrochemical Technology (PTT Consortium). Finally, I also would like to thank my entire friends for their assistance and friendship.

I would like to indicate my deepest gratitude to my family for the support, understanding and love.

## TABLE OF CONTENTS

	<b>PAGE</b>
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
<b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEWS</b>	<b>3</b>
2.1 The Function of Lipase as an Enzyme	3
2.1.2 Enzyme	3
2.1.3 Lipase	3
2.2 Lipase-Catalyzed Reaction	3
2.2.1 Lipase-Catalyzed Esterification and Hydrolysis	4
2.2.2 Lipase-Catalyzed Tranesterification	5
2.2.3 Lipase-Catalyzed Interesterification	5
2.3 Microemulsion and Microemulsion-based Biocatalysis	6
2.3.1 Formation of Microemulsion	6
2.3.2 Type of Microemulsion	6
2.3.3 Encapsulation of Enzyme in Reverse Micelle	7
2.3.4 Lipase-Catalyzed Esterification in Reverse Micelles	7

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
<b>III EXPERIMENTAL</b>	<b>10</b>
3.1 Chemicals	10
3.2 Equipment	10
3.3 Methodology	11
3.3.1 Preparation of Microemulsion	11
3.3.2 Measurement of Lipase Activity	11
3.3.3 Identification of Products	12
3.3.4 Determination of Water Content	12
3.3.5 Measurement of Reverse Micelle Size	12
3.3.6 Determination of Lipase Concentration	13
3.3.7 Determination of Fatty Acid Concentration	13
<b>IV RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>15</b>
4.1 Microemulsion Studies	15
4.1.1 Phase Behavior	15
4.1.2 Water-to-surfactant Molar Ratio	17
4.2 Esterification Reaction	18
4.2.1 Effect of Lipase Concentration on Catalytic Activity	18
4.2.2 Effect of Water Content on Catalytic Activity	20
4.2.3 Effect of Types of Substrate and Substrate Concentrations on Catalytic Activity	25
4.3 Identification of Ester Product by FTIR	28
<b>V CONCLUSIONS</b>	<b>31</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>32</b>
<b>APPENDICES</b>	<b>35</b>
<b>Appendix A</b> Microemulsion studied	35

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
<b>Appendix B</b> Esterification reaction	37
<b>Appendix C</b> Calibration curve	48
<b>Appendix D</b> FTIR spectra	50
<b>Appendix E</b> Examples of calculation	51
<b>CURRICULUM VITAE</b>	52



**LIST OF TABLES**

<b>TABLE</b>	<b>PAGE</b>
4.1 Effect of caprylic acid and oleic acid on water content of W/O microemulsion of 100mMNaDEHP /100Mm Hexanol/ 1.0M NaCl	17
4.2 CALB concentrations in the aqueous phase before and after encapsulation in 100mM NaDEHP/100mM hexanol/100mM caprylic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq) microemulsion system	18

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Two example of esterification reactions with lipase	4
2.2 The production of biodiesel or methyl ester by transesterification	5
2.3 Conversion of palm oil into cocoa butter fat	6
3.1 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: O/W globular microemulsion (L1), bicontinuous microemulsion (L3) and W/O microemulsion (L2)	7
4.1 Phase behavior of NaDEHP/isooctane/NaCl aqueous solution with hexanol as a co-surfactant	15
4.2 Effect of NaCl and hexanol on water-to-surfactant molar ratio of 100mM NaDEHP/50-150mM hexanol in isooctane/0.5-3.0M NaCl(aq)	16
4.3 Effect of lipase concentration on the catalytic activity in 100mM NaDEHP/100mM hexanol/100mM caprylic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/0.02-0.08 mg/ml CALB microemulsion system	18
4.4 Effect of lipase concentration on the catalytic activity in 100mM NaDEHP/100mM hexanol/100mM caprylic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/0.02-0.04 mg/ml TLL microemulsion system	19
4.5 Effect of water content on the catalytic activity in 25-150mM NaDEHP/100mM hexanol/100mM oleic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/0.04 mg/ml CALB microemulsion system	20

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
4.6 Effect of water content on the catalytic activity in 25-150mM NaDEHP/100mM hexanol/100mM oleic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/0.04 mg/ml TLL microemulsion system	20
4.7 Effect of water content on the catalytic activity in 25-150mM NaDEHP/100mM hexanol/100mM caprylic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/0.04 mg/ml CALB microemulsion system	21
4.8 Effect of water content on the catalytic activity in 25-150mM NaDEHP/100mM hexanol/100mM caprylic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/0.04 mg/ml TLL microemulsion system	21
4.9 Effect of water content on the specific activity of CALB and TLL in the esterification of 25-150mM NaDEHP/100mM hexanol/100mM oleic acid or 100mM caprylic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)	23
4.10 Effect of water content on the conversion of CALB and TLL in the esterification of 25-150mM NaDEHP/100mM hexanol/100mM oleic acid or 100mM caprylic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)	24
4.11 Effect of concentrations of oleic acid on the catalytic activity in 100mM NaDEHP/100mM hexanol/25-150mM oleic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/0.04 mg/ml CALB microemulsion system	25
4.12 Effect of concentrations of oleic acid on the catalytic activity in 100mM NaDEHP/100mM hexanol/25-150mM oleic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/0.04 mg/ml TLL microemulsion system	26

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
4.13 Effect of concentrations of caprylic acid on the catalytic activity in 100mM NaDEHP/100mM hexanol/25-150mM caprylic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/CALB microemulsion system	26
4.14 Effect of concentrations of caprylic acid on the catalytic activity in 100mM NaDEHP/100mM hexanol/25-150mM caprylic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/TLL microemulsion system	27
4.15 Effect of concentrations of oleic acid and caprylic acid on the initial rate of 100mM NaDEHP/100mM hexanol/25-150mM oleic acid and 25-150mM caprylic acid in isooctane/1.0M NaCl(aq)/CALB and TLL microemulsion system	27
4.16 Spectra of before and after esterification of oleic acid with hexanol in 100mM NaDEHP/100mM Hexanol/100mM oleic acid in isooctane/1.0M NaCl/CALB microemulsion system	28
4.17 Spectra of before and after esterification of oleic acid with hexanol in 100mM NaDEHP/100mM Hexanol/150mM oleic acid in isooctane/1.0M NaCl/CALB microemulsion system	29
4.18 Spectra of before and after esterification of oleic acid with hexanol in 100mM NaDEHP/100mM Hexanol/150mM oleic acid in isooctane/1.0M NaCl/TLL microemulsion system	29