A NOVEL LIPASE CATALYSIS SYSTEM FOR ESTERIFICATION AND POLYESTERIFICATION

Mr. Attapon Phraephrewngarm

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

1999

ISBN 974-331-918-2

Thesis Title : A Novel Lipase Catalysis System for Esterification and

Polyesterification

By : Mr. Attapon Phraephrewngarm

Program : Polymer Science

Thesis Advisors: Professor Erdogan Gulari

Dr. Suwabun Chirachanchai

Dr. Ratana Rujiravanit

Dr. Rath Pichayakura

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

(Prof. Somchai Osuwan)

Thesis Committee:

(Prof. Erdogan Gulari)

(Dr. Suwabun Chirachanchai)

Rehme Rummmil

(Dr. Ratana Rujiravanit)

(Dr. Rath Pichayakura)

ABSTRACT

972004 : POLYMER SCIENCE PROGRAM

KEYWORDS: POLYESTER/ LIPASE-CATALYZED POLYESTER

SYNTHESIS/ RICE BRAN LIPASE/ LIPASE CATALYST

ATTAPON PHRAEPHREWNGARM: A NOVEL

LIPASE CATALYSIS SYSTEM FOR

ESTERIFICATION AND POLYESTERIFICATION

THESIS ADVISORS: PROF. ERDOGAN GULARI,

DR. SUWABUN CHIRACHANCHAI, DR. RATANA

RUJIRAVANIT, AND DR. RATH PICHAYAKURA

34 pp ISBN 974-331-918-2

The rice bran lipase was extracted from the Thai rice bran in the condition of 1:3 W/V of rice bran to 10 mM calcium chloride in the stirrer system for 3 hours at 4°C. The obtained rice bran lipase shows specific activity about 70 mU/mg. By applying rice bran lipase as a catalyst in esterification of adipic acid and 1,4-butanediol in diisopropyl ether at 35°C for 24 hours, the molecular weight of oligoester for 1022 is obtained as determined by GPC technique. However, when the reaction proceeds for 2-7 days, the molecular weight is decreased to 233-398. The product shows an alternating ester with hydroxy-terminated chain as observed from the OH peak by FT-IR.

บทคัดย่อ

อรรถพล แพรพริ้วงาม: การใช้ไลเปสชนิคใหม่ในการสังเคราะห์เอสเทอร์และพอลิ เอสเทอร์ (A Novel Lipase Catalysis System for Esterification and Polyesterification) อ.ที่ปรึกษา: ศ. เออ โดแกน กูลารี่, คร.สุวบุญ จิรชาญชัย, คร.รัตนา รุจิรวนิช และ คร.รัฐ พิชญางกูร 34 หน้า ISBN 974-331-918-2

ไลเปสจากรำข้าวไทยสามารถสกัดจากรำข้าวไทยโดยใช้อัตราส่วนของรำข้าว 1 ส่วนต่อ สารละลายแคลเซียมคลอไรด์เข้มข้น 10 มิลลิโมลาร์ 3 ส่วนในระบบการกวนเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียล และไลเปสที่สามารถสกัดได้มีแอคติวิตี้จำเพาะประมาณ 70 มิลลิยูนิตต่อ มิลลิกรัม ไลเปสจากรำข้าวที่สกัดได้ถูกนำไปศึกษาความสามารถในการเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาใน ปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเอสเทอร์ระหว่าง กรดอะดิปิคและบิวเทนไดออล ในตัวทำละลายไดไอ โซโพรพิลอีเทอร์ ที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเกิดผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ที่ มีมวลโมเลกุล 1022 โดยตรวจสอบได้จากการวิเคราะห์ด้วยเจลเพอมิเอชั่นโครมาโตกราฟฟี การ ศึกษาผลของเวลาในการทำปฏิกิริยาต่อมวลโมเลกุลของเอสเทอร์ พบว่าที่เวลา 2-7 วันผลิตภัณฑ์ เอสเทอร์ที่มีมวลโมเลกุลลดลงเหลือประมาณ 233-398 จากการตรวจสอบโครงสร้างด้วยเทคนิค อินฟราเรคสเปกโตรสโฟโตมิเตอร์ พบว่าผลิตภัณฑ์เอสเทอร์ที่ได้มีหมู่ไอดรอกซิลเป็นหมู่ปิดท้าย สายพอลิเมอร์

ACKNOWLEDGMENTS

The author gratefully gives special thanks to his U.S. advisor, Prof. Erdogan Gulari for his idea and the recommendations on the research. He is also deeply indebted to his Thai advisors, Dr. Suwabun Chirachanchai, Dr. Ratana Rujiravanit, and Dr. Rath Pichayakura who not only originated the thesis work, but also gave the intensive suggestion, invaluable guidance, constructive advice and vital help throughout this research work.

He greatly appreciates all professors who have tendered invaluable knowledge to him at the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University.

He would like to express his thanks to Mr. Phirat Piriyawirut and Thanyacharoenkij Rice Mill for transportation and supporting rice bran.

He wishes to extend his appreciation to Dr. Sanong Ekasit for his advice about ATR technique in FT-IR and Mr. Hiroshi Hirano from the Osaka Municipal Technical Research Institute, Japan for NMR and GPC analysis.

In addition, he would like to thank Mr. Apirat Laobuthee who gave invaluable guidance and suggestion throughout this research work. He would like to extend his appreciation the college members, staff, and all his best friends at the Petroleum and Petrochemical College who gave him warm supports throughout the working period.

Finally, the sincerest appreciation is for his family for the love, understanding, encouragement and financial support.

TABLE OF CONTENTS

		PAGE
	Title Page	i
	Abstract (in English)	iii
	Abstract (in Thai)	iv
	Acknowledgements	v
	List of Tables	ix
	List of Figures	x
	List of Schemes	xi
CHAPTER I	INTRODUCTION	1
II	LITERATURE SURVEY	
	2.1 The Function of Lipases as an Enzyme	3
	2.2 Lipase for the Artificial Applications	4
	2.3 Lipase Catalyst Polyester Synthesis	5
	2.3.1 An Approach for Biodegradable Polymer	5
	2.3.2 The History and Development	6
	2.4 Rice Bran Lipase as an Enzyme Catalyst	
	Polyester Synthesis	8
	2.5 Thai Rice Bran Lipase and the Potential of the	
	Present work	9
Ш	EXPERMENTAL SECTION	
	3.1 Materials	10

CHAPTER			PAGE
	3.2 Equip	oment	10
	3.2.1	Fourier Transform Infrared	
		Spectrophotometer (FT-IR)	10
	3.2.2	Ultraviolet-Visible Spectrophotometer	
		(UV-VIS)	11
	3.2.3	Gel Permeation Chromatography (GPC)	11
	3.2.4	High Speed Refrigerated Centrifuge	11
	3.2.5	Lypholizer	11
	3.2.6	Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	
	3.3 Meth	odology	12
	3.3.1	Preparation of Rice Bran	12
	3.3.2	Specific Activity of Rice Bran Lipase	
		Solution	12
	3.3.3	Purification of Rice Bran Lipase	13
	3.3.4	Specific Activity of Rice Bran Lipase	
		Solid	14
	3.3.5	Purification of Monomers and Solvents	14
	3.3.6	Rice Bran Lipase-Catalyzed Esterification	14
		and Polyesterification	
IV	RESULT	S AND DISCUSSION	
	4.1 Rice I	Bran Lipase Extraction, Purification, and	
	Activ	ity	15
	4.1.1	Lipase Extraction Method	15
	4.1.2	Solvent System in Extraction	16
	4.1.3	Ratio of Rice Bran Amount to 10 mM	
		Calcium chloride Solution	17
	4.1.4	Effect of Extraction Time	18

CHAPTER	t control of the cont	PAGE
	4.1.5 Re-extraction Procedure	19
	4.2 Activity of Rice Bran Lipase as an Esterification	
	and Polyesterification	20
	4.2.1 Qualitative Analysis	20
	4.2.2 Quantitative Analysis	23
	4.3 Effect of the Reaction Time	23
	4.4 Effect of solvent and temperature	24
V	CONCLUSIONS	26
	REFERENCES	27
	CURRICULUM VITAE	34

LIST OF TABLES

TABL	E	PAGE
4.1	Specific activity of rice bran lipase in blender and	
	stirrer systems in phosphate pH 7 and 10 mM calcium	
	chloride solvents	16

LIST OF FIGURES

FIGURE		PAGE
2.1	Structure of lipase from Rhizomucor miehei binding	
	with substrate (PDB entry 5TGL)	7
2.2	Three dimension image of lipase from Rhizomucor miehei	
	binding with substrate (PDB entry 5TGL)	8
4.1	Specific activity of rice bran lipase solution in various ratio	
	of rice bran amount to 10 mM calcium chloride	17
4.2	Specific activity of the extracted rice bran lipase solution in	
	various extraction time	18
4.3	Specific activity of rice bran lipase solution in various	
	re-extraction time	19
4.4	FT-IR spectrum of adipic acid	21
4.5	FT-IR spectrum of 1,4-butanediol	22
4.6	FT-IR spectrum of the product from the reaction of adipic	
	acid and 1,4-butanediol in the presence of rice bran lipase	22
4.7	Chromatogram of the product from the reaction of adipic	
	acid and 1,4-butanediol in the presence of rice bran lipase	
	for 3 days	23
4.8	Molecular weight of the obtained product at various	
	reaction time	24

LIST OF SCHEMES

SCHEME	PAGE
2.1 Lipase acts as a catalyst in lipid metabolism	4
2.2 Lipase catalyst ester synthesis	4
4.1 Polyesterification of diacids and diols	20