

**THAI RICE BRAN LIPASE-CATALYSED POLYESTERIFICATION:
A DEVELOPMENT FOR PRACTICAL APPLICATIONS**



Ms. Nonsee Nimitsriwat

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

2000

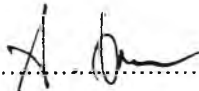
ISBN 947-334-183-8

31 FEB 2000


I193C0244


Thesis Title : Thai Rice Bran Lipase-Catalysed Polyesterification:
A Development for Practical Applications
By : Ms. Nonsee Nimitsiriwat
Program : Polymer Science
Thesis Advisors : Asst. Prof. Suwabun Chirachanchai
Dr. Rath Pichyangkura
Dr. Ratana Rujiravanit
Prof. Gulari Erdogan


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

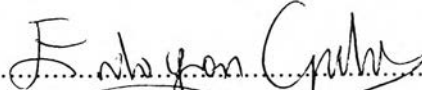

..... College Director
(Prof. Somchai Osuwan)

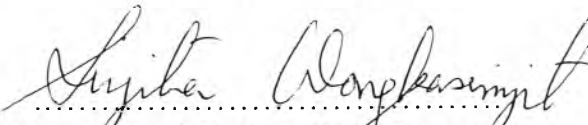
Thesis Committee:


.....
(Asst. Prof. Suwabun Chirachanchai)


.....
(Dr. Rath Pichyangkura)


.....
(Dr. Ratana Rujiravanit)


.....
(Prof. Erdogan Gulari)


.....
(Assoc. Prof. Sujitra Wongkasemjit)

บทคัดย่อ

นนทรี นิมิตศิริวัฒน์ : การใช้ไลเปสจากรำข้าวไทยในการสังเคราะห์พอลิเอสเทอร์: การพัฒนาเพื่อใช้ในภาคปฏิบัติ (Thai Rice Bran Lipase-Catalysed Polyesterification: A Development for Practical Applications) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุวบุญ จิระชาญชัย, ดร.รัฐ พิษฉายกูร, ดร.รัตนา รุจิรวนิช และ ศ. เออโดแกน กุลารี่ 49 หน้า ISBN 947-334-183-8

การสังเคราะห์อะลิฟาติกพอลิเอสเทอร์โดยใช้ไลเปสจากรำข้าวไทยเป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในสารละลายโทลูอีน 2 ระบบ ได้แก่ กรดอะซิติกและบิวเทนไดออล และ กรดอะซิติกและพอลิเอทธิลีนไกลคอล ที่มีมวลโมเลกุล 200 ได้ถูกทำขึ้นในอัตราส่วนทางปริมาณสารสัมพันธ์ พบว่าระดับการเกิดปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์มีค่าหน่วยซ้ำบนสายโมเลกุลเป็น 4 และ 9 ในกรณีแรก และ 2 และ 6 ในกรณีหลัง ปฏิกิริยาการสังเคราะห์พอลิเมอร์ถูกเร่งโดยอุณหภูมิ ที่ 80 ถึง 100 องศาเซลเซียส และใช้เวลาในการทำปฏิกิริยา 7 วัน ไลเปสจากรำข้าวไทยถูกตรึงโดยวิธีการทางกายภาพและวิธีการใช้พันธะโควาเลนต์ เพื่อปรับปรุงแอกติวิตี้ของเอนไซม์ การตรึงทางกายภาพของไลเปสจากรำข้าวไทยบนพุ่มซิลิกาในสถานะที่เหมาะสมคือ การใช้อัตราส่วนระหว่างพุ่มซิลิกาต่อเอนไซม์ เท่ากับ 1 ส่วนต่อ 40 ส่วน ซึ่งให้ปริมาณการตรึงเท่ากับ 38 % โดยมีแอกติวิตี้เท่ากับ 21 มิลลิวินิตต่อมิลลิกรัม สำหรับวิธีการตรึงด้วยพันธะโควาเลนต์ของไลเปสจากรำข้าวไทยบนพุ่มซิลิกา พบว่า ให้ปริมาณการตรึงเท่ากับ 50 % ซึ่งมีแอกติวิตี้เท่ากับ 9 มิลลิวินิตต่อมิลลิกรัม การใช้เอนไซม์ที่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์ในการตรึงด้วยวิธีการยึดติดทางกายภาพและวิธีการพันธะโควาเลนต์ พบว่า แอกติวิตี้มีค่าสูง 3 เท่า โดยเปรียบเทียบจากการใช้เอนไซม์ที่ยังไม่ผ่านกระบวนการทำให้บริสุทธิ์

ABSTRACT

4172018063 : POLYMER SCIENCE PROGRAM

KEYWORD : Lipase-catalysed polyesterification/ Degree of polymerization/ Physisorption/ Covalent bonding/ Fumed silica/ Immobilized lipase/ Immobilization/ Thai rice bran lipase

Nonsee Nimitsiriwat: Thai Rice Bran Lipase-Catalysed Polyesterification: A Development for Practical Applications. Thesis Advisors: Asst. Prof. Suwabun Chirachanchai, Dr. Rath Pitchyangkura, Dr. Ratana Rujiravanit, and Prof. Erdogan Gulari, 49 pp. ISBN 947-334-183-8

Two systems of Thai rice bran lipase (Thai RBL)-catalysed aliphatic polyester synthesis in toluene, i.e., adipic acid and 1,4-butanediol, and adipic acid and poly(ethylene glycol) MW. 200, were carried out at stoichiometric ratio. The degree of polymerization was found to be 4 and 9 in the former case and 2 and 6 in the latter case. The polymerization was accelerated by the reaction temperature at 80° to 100°C and long reaction time for over 7 days. Thai RBL was immobilized via physisorption and covalent bonding to improve enzyme activity. The physisorption of Thai RBL onto fumed silica was optimized at 1:40 for carrier:crude enzyme (g/mL) to give 38% immobilization with hydrolytic activity of 21 mU/mg. The covalent bonding of Thai RBL onto fumed silica was achieved at 50% immobilization with hydrolytic activity of 9 mU/mg. The utilization of purified enzyme to immobilize by physisorption and covalent bonding improved the hydrolytic activity for three times comparing to that of crude enzyme.

ACKNOWLEDGEMENTS

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

She greatly appreciates all professors for invaluable knowledge to her at the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University.

She would like to express her thanks to the Development and Promotion of Science and Technology Talent Project for financial support.

She wishes to extend her appreciation to Prof. Tanaka Yasuyuki and Dr. Sanong Ekasit for their advice about Drift FTIR technique and Prof. Kohji Tashiro from Osaka University, Japan for elemental analysis.

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

Finally, the sincerest appreciation is for her family for the love, understanding, and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

		PAGE
	Title Page	i
	Abstract (in English)	iii
	Abstract (in Thai)	iv
	Acknowledgements	v
	List of Tables	x
	List of Figures	xi
	List of Schemes	xiii
CHAPTER		
I	INTRODUCTION	1
II		
	LITERATURE SURVEY	
2.1	Traditional Polyesterification	3
2.2	Lipase-Catalysed Polyesterification	4
2.3	Lipase Immobilization	6
2.4	Immobilized Lipase-Catalysed Polyesterification	8
2.5	Rice Bran Lipase-Catalysed Polyesterification	9
2.6	The Scope of the Present Work	10
III		
	EXPERIMENTAL	
3.1	Materials	11
3.2	Equipment	11
3.2.1	Fourier Transform Infrared Spectrophotometer (FTIR)	11
3.2.2	Ultraviolet-Visible Spectrophotometer (UV-Vis)	12

CHAPTER	PAGE
3.2.3 Gel Permeation Chromatography (GPC)	12
3.2.4 High Speed Refrigerated Centrifuge	12
3.2.5 Lyophilizer	12
3.2.6 Nuclear Magnetic Resonance (NMR)	12
3.2.7 Elemental Analysis	13
3.3 Methodology	13
3.3.1 Preparation of Rice Bran	13
3.3.2 Purification of Rice Bran Lipase	13
3.3.2.1 Extraction of Lipase from Rice Bran (Step I)	13
3.3.2.2 Fractionation with Ammonium Sulfate (Step II)	13
3.3.2.3 Diethylaminoethyl (DEAE)-cellulose Column Chromatography (Step III)	14
3.3.3 Rice Bran Lipase Immobilization	14
3.3.3.1 Rice Bran Lipase Immobilization via Physisorption	14
3.3.3.2 Rice Bran Lipase Immobilization via Covalent Bonding	15
3.3.4 Hydrolytic Activity of Rice Bran Lipase	15
3.3.4.1 Hydrolytic Activity of Rice Bran Lipase Solution	15
3.3.4.2 Hydrolytic Activity of Rice Bran Lipase Solid	16
3.3.4.3 Hydrolytic Activity of Immobilized Rice Bran Lipase	16
3.3.5 Percent Immobilization of Rice Bran Lipase onto Carrier	16

CHAPTER	PAGE
3.3.6 Thermal Stability of Rice Bran Lipase Solid in Toluene	17
3.3.7 Rice Bran Lipase-Catalysed Polyesterification	17
3.3.7.1 Rice Bran Lipase-Catalysed Polyesterification	17
3.3.7.2 Rice Bran Lipase-Catalysed Polyesterification via Polyol	18
 IV RESULTS AND DISCUSSION	
4.1 Rice Bran Lipase Extraction, Purification, and Activity	19
4.2 Rice Bran Lipase Immobilization	21
4.2.1 Rice Bran Lipase Immobilization via Physisorption	21
4.2.2.1 Effect of Fumed Silica:RBL Ratio	21
4.2.1.2 Effect of Carrier Types	22
4.2.2 Rice Bran Lipase Immobilization via Covalent Bonding	22
4.2.3 Comparison of Rice Bran Lipase Immobilization via Physisorption and Covalent Bonding	26
4.2.4 Effect of Rice Bran Lipase Purity on Immobilization	29
4.3 Thermal Stability of Rice Bran Lipase Solid in Toluene	29
4.4 Rice Bran Lipase-Catalysed Polyesterification	33
4.4.1 Rice Bran Lipase-Catalysed Polyesterification	33

CHAPTER		PAGE
	4.4.2 Rice Bran Lipase-Catalysed Polyesterification via Polyol	36
V	CONCLUSION	40
	REFERENCES	41
	CURRICULUM VITAE	49

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
4.1	Typical Data in RBL Preparation Process, Using 1 000 g of Rice Bran as a Starting Material	19

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
4.1 Presence of RBL and the Hydrolytic Activity of the Fractions Purified from DEAE-Cellulose Column Chromatography	20
4.2 Percent Immobilization of Fumed Silica and Crude RBL at Various Ratios	21
4.3 a) Percent Immobilization of RBL and b) Hydrolytic Activity of Immobilized RBL, onto Various Types of Carriers	23
4.4 FTIR Spectra of (a) Fumed Silica, (b) APTES, and (c) Si-APTES by DRIFT-FTIR	25
4.5 FTIR Spectra of (a) Si-APTES, (b) Glutaraldehyde, and (c) Si-APTES-Glu by DRIFT-FTIR	27
4.6 a) Percent Immobilization of RBL and b) Hydrolytic Activity of Immobilized RBL onto Fumed Silica via Physisorption and Covalent Bonding	28
4.7 Percent Immobilization of Crude and Purified RBL onto Fumed Silica via a) Physisorption and b) Covalent Bonding	30
4.8 Hydrolytic Activity of Immobilized RBL Obtained from Immobilization when Using Crude and Purified RBL in the Cases of a) Physisorption and b) Covalent Bonding	31
4.9 Thermal Stability of Two Types of Lipase in Toluene: ○) Free RBL Solid; and ●) PPL	32
4.10 FTIR Spectra of (a) Adipic Acid, (b) 1,4-Butanediol, and (c) the Obtained Product	34
4.11 ¹ H-NMR Spectrum of Poly(1,4-Butyl Adipate)	34
4.12 GPC Chromatogram of Poly(1,4-Butyl Adipate)	35

FIGURE	PAGE
4.13 Molecular Weight Ratio of the Obtained Product when the Reaction Proceeded at Various Reaction Temperatures: ○) 30°C; ●) 40°C; △) 60°C; ▲) 80°C; and □) 100°C	35
4.14 FTIR Spectra of (a) Adipic Acid, (b) Poly(Ethylene Glycol), and (c) the Obtained Product	38
4.15 ¹ H-NMR Spectra of Poly(Poly(Ethylene Glycol) Adipate)	38
4.16 GPC Chromatogram of Poly(Poly(Ethylene Glycol) Adipate)	39
4.17 Molecular Weight Ratio of the Obtained Product when the Reaction Proceeded at Various Reaction Temperatures: ○) 30°C; ●) 40°C; △) 60°C; ▲) 80°C; and □) 100°C	39

LIST OF SCHEMES

SCHEME	PAGE
2.1 Triglyceride Hydrolysis by Lipase at the Position of a) Nonspecific, b) 1,3-Specific, and c) Fatty Acid-Specific	5
4.1 Preparation of Si-APTES-Glu	24
4.2 Schematic Draw of RBL Immobilization via Covalent Bonding	24
4.3 Elemental Analysis of Si-APTES-Glu	27
4.4 Polymerization of Adipic Acid and 1,4-Butanediol	33
4.5 Polymerization of Adipic Acid and Poly(Ethylene Glycol)	36