ENHANCEMENT OF *CANDIDA RUGOSA* LIPASE VIA IMMOBILIZATION ONTO BENZYLTRIETHYL AMMONIUM CHLORIDE-MODIFIED SUPPORTS FOR THE SYNTHESIS OF NONYL-HEXANOATE

Hana Meftah Elgubbi

Thesis submitted in fulfilment for the degree of

DOCTOR OF PHILOSOPHY IN

SCIENCE AND TECHNOLOGY

UNIVERSITI SAINS ISLAM MALAYSIA

May 2022

AUTHOR DECLARATION

I hereby declare that the work in this thesis is my own except for quotations and summaries which have been duly acknowledged.

Date: 30th May 2022

Signature:
Name: Hana Meftah Elgubbi
Matric No: 4150256
Address: block A-10-02 Pearl Avenue condominium, Jalan Wan Siew, off Jalan in Taman Sepakat Indah, Kajang, Selangor. Malaysia.

ACKOWLEDGEMENTS

In the name of Allah, the Beneficent, the Merciful. Alhamdulillah, praise to Allah S.W.T., the Lord of the world and the sequel is for those who kept their duty onto Him, further, there will be no hostility except against wrongdoers. Also, blessing and salutation be upon the most honorable Prophet Muhammad S.A.W., his family, companions and those who follow all the messages, brought by him till the Day of Judgment.

This thesis would not have been accomplished without the wise and extra careful guidance of my supervisors. I am greatly indebted to Professor Siti Salhah Binti Othman for her persistent efforts, advises and encouragement in guiding me and supervised me in doing my thesis. Thanks to Prof Farah Wahida Binti Harun for her willingness to help anytime, for her important suggestion and constructive discussions.

Special thanks are extended to the laboratory staffs of the Faculty of Science and Technology (USIM), Electron Microscopy Unit (UPM) and Physical Characterization Laboratory (CRIM-UKM), who were resourceful, helpful and cooperative in many ways during the course of the study. I truly appreciate their willingness in helping and guiding me even though they were held with other endeavors.

My sincere gratitude to my husband for his endless support all the time to finish up my research work. Big thanks to my beloved parents, and to my siblings, for their never-ending prayers, encouragement, strong support, valued advices, understanding and love.

Last but not least, my acknowledgement is due to all my friends especially to my research group members for the bond of friendship, the wholesome working environment and assistance throughout the days in the laboratory and for making my stay in USIM a bearable one with many sweet memories and experiences. Thank you for being a great companion and friends in need.

I wish all the best to FST and USIM in bringing the name of Islam to the world through the extra ordinary combination of Islamic value and scientific research.

Thank you.

ABSTRAK

Kajian menunjukkan bahawa tanah liat kaolin mempunyai potensi besar untuk digunakan sebagai penyerap dan penyokong yang baik untuk biopemangkin kerana ianya menepati keperluan dan kehendak mesra alam industri moden masakini. Tambahan pula, ianya berpatutan, tahan mikrob, stabil secara terma dan mempunyai kekuatan mekanikal yang baik. Walau bagaimanapun, penggunaannya sebagai penyokong sekatgerak biopemangkin adalah terhad disebabkan sifat hidrofiliknya. Bagi mengatasi masalah tersebut, kation yang boleh ditukarganti (Na^+) dalam struktur telah digantikan dengan kation ammonium kuartenari melalui proses penukargantian ion. Dalam kajian ini, keupayaan penukargantian kation (CEC) kaolin asli dan kaolin yang telah dirawat pada 650 ^oC (metakaolin) telah ditentukan melalui kaedah methilin biru dan didapati berada pada nilai 2.5 meq/100g tanah liat and 1.5 meq/100g tanah liat, masing-masing. Klorida benziltriethilamonium (BTEA-Cl) pada kepekatan berbeza (0.5 - 2.0x CEC kaolin asli dan metakaolin) telah digunakan dalam penyediaan kaolin termodifikasi-organo dan metakaolin termodifikasi-organo. Pencirian kaolin termodifikasi-organo dan metakaolin termodifikasi-organo telah dilakukan menggunakan difraktometer sinar-X (XRD), spectrometer Fourier transform inframerah (FTIR), mikroskop pengimbas elektron (SEM) dan pengalisa luas permukaan dan keporosan. Kejayaan modifikasi-organo terhadap kaolin asli telah dipamerkan melalui peningkatan dalam nilai d_{001} dari 7.12 Å kepada di antara 7.20 - 7.34 Å dalam corak belauan XRD. Begitu juga dengan perubahan kaolin kepada metakaolin sebagai hasil rawatan haba telah disahkan melalui kehilangan puncak kaolinit pada 12.46°. Corak belauan XRD terhadap kaolin dan metakaolin asli dan termodifikasi didapati serupa menujukkan struktur tanah liat yang tidak terubahsuai setelah modifikasi-organo dilakukan menggunakan BTEA-Cl. Kejayaan modifikasi terhadap kaolin and metakaolin juga dapat dilihat melalui kemunulan puncak utama pada spektra FTIR di 2800–3000 cm^{-1} and 1474 cm^{-1} yang mewakili CH stretching and aromatic C=C dalam $BTEA^+$. Mikrograf SEM bagi kaolin and metakaolin termodifikasi-organo menunjukkan peningkatan kepingan dan ampaian berbanding kaolin dan metakaolin yang tidak termodifikasi. Bukti modifikasi-organo ke atas kaolin asli and metakaolin juga dapat diperhatikan melalui pengurangan drastik luas permukaan tanah liat dari 25.34 m^2/g tanah liat asli kepada di antara 5.90 - 13.11 m^2/g tanah liat termodifikasi-organo, dan dari 19.91m^2/g untuk metakaolin kepada di antara 9.04- 18.14m^2/g untuk metakaolin termodifikasi-organo. Kaolin asli, metakaolin dan tanah liat yang termodifikasi-organo kemudiannya telah digunakan sebagai penyokong dalam proses sekatgerak lipase dari *Candida rugosa* (CRL) melalui kaedah penjerapan fizikal. Metakaolin termodifikasi-organo sebanyak 2.0x CEC menunjukkan penjerapan protein tertinggi sehingga 14.83 ± 1.37 mg protein/g tanah liat dan hampir 70% sekatgerak. Pencirian lipase tersekatgerak menggunakan XRD menunjukkan peningkatan jarak d_{001} dari 7.12 hingga 7.22 Å untuk kaolin, sementara jarak d_{001} kaolin yang diubah suai organo menurun sekitar 2%. Imej SEM menunjukkan dengan jelas, permukaan luar yang tebal dan kasar sebagai bukti kewujudan lipase pada permukaan kaolin and metakaolin. Puncak-puncak pada 1656 cm^{-1}, 1540 cm^{-1} adalah berkaitan dengan kewujudan CRL apabila ditentukan menggunakan FTIR. Kejayaan sekatgerak CRL ke atas kaolin and metakaolin asli dan termodifikasi-organo juga dapat dilihat di mana luas permukaan, isipadu pori-pori juga dapat dilihat di mana luas permukaan, isipadu pori-pori menurun sekitar 46% -72% dan 1% -52%, sementara saiz liang liat meningkat sekitar 42% -53%setelah sekatgerak terhadap CRL dilakukan. CRL tersekatgerak, bersama-sama dengan CRL asli kemudiannya telah diuji untuk aktiviti esterifikasi dalam tindakbalas di antara nonanol and asid heksanoik. CRL tersekatgerak ke atas kaolin asli termodifikasi-organo 2.0x CEC (CRL-2.0 NK) dan CRL tersekatgerak ke atas metakaolin termodifikasi-organo 2.0x CEC (CRL-2.0 MK) menunjukkan peningkatan aktiviti sebanyak 1.5 kali ganda berbanding CRL asli. FTIR dan kromatografi gas-spektrometer jisim (GC-MS) telah digunakan untuk mengesahkan kejayaan sintesis nonil heksanoat menggunakan CRL tersekatgerak ke atas tanah liat termodifikasi-organo. CRL-2.0 NK dan CRL-2.0 MK juga turut menunjukkan kestabilan terma yang tinggi di antara 57.67% - 51.39% walaupun setelah inkubasi pada suhu 70 °C. CRL-2.0 MK mempamerkan kebolehan guna semula tertinggi di mana ia mengekalkan 65.15 % daripada aktiviti asal (5.24×10^{-3} mmol ester/min/mg protein) walaupun setelah 10 ulangan penggunaan. Keupayaan lipase tersekatgerak yang terpilih (CRL-2.0 NK dan CRL-2.0 MK) untuk mensisntesis nonil heksanoat telah dikaji dari sudut kinetik, di mana parameter kinetik, K_m and V_{max}, telah ditentukan menggunakan model kinetik Michaelis-Menten dan dapat diterangkan dengan tepat melalui mekanisma Ping-Pong Bi-Bi. Nilai $K_{m(Hex)}$ yang rendah mencadangkan bahawa CRL, CRL-2.0 NK dan CRL-2.0 MK mempamerkan kecenderungan yang lebih tinggi terhadap asid heksanoik (Hex) berbanding terhadap nonanol (Non), $K_{m(Non)} > K_{m(Hex)}$. Lipase tersekatgerak yang terpilih juga menunjukkan nilai V_{max} yang lebih tinggi (2.1786-2.3504 mmol/L/min) berbanding CRL (1.5810 mmol/L/min) dalam tindakbalas berenzim. Kajian ini telah mengupas secara terperinci ciri fiziko-kimia pelbagai jenis terbitan kaolin untuk manfaat penggunaannya sebagai penyokong biopemangkin. Aktiviti dan kestabilan lipase yang telah disekatgerak ke atas tanah liat termodifikasi yang terpilih didapati meningkat, mencadangkan bahawa penyediaan biopemangkin tersekatgerak yang berfungsi tersebut adalah lebih sesuai dan praktikal bagi menggantikan pemangkin asid berbahaya, yang lazim digunakan dalam penghasilan nonil heksanoat.

ABSTRACT

Studies have shown that kaolin clay has huge potentials to be utilized as excellent adsorbent and support for biocatalysts because they meet the requirement of today's increasing eco-friendly demands of modern industries. Furthermore, they are inexpensive, microbial resistant, thermally stable and possesses appreciable mechanical strength. However, their use as support for biocatalysts immobilization are limited due to their hydrophilic nature. To overcome this, exchangeable cations (Na^+) in their structures are replaced with quaternary ammonium cations (QACs) through ion exchange process. In this study, cation exchange capacity (CEC) by methylene blue method of natural kaolin and kaolin treated at 650 ^oC (metakaolin) were determined and found to be 2.5 meq/100g clay and 1.5 meq/100g clay, respectively. Benzyltriethylammonium chloride (BTEA-Cl) at varying concentrations (0.5 - 2.0x CEC of the natural kaolin and metakaolin) were used in the preparation of the organo-modified kaolin and organo-modified metakaolin. The organo-modified kaolin and metakaolin were characterized using X-ray diffractometer (XRD), Fourier transform infrared (FTIR) spectrometer, scanning electron microscope (SEM), and surface area and porosity analyzer. Successful organo-modifications of the natural kaolin were exhibited by the increase in d_{001} spacing from 7.12 Å to between 7.20 - 7.34 Å in XRD patterns. Similarly, successful conversion of kaolin to metakaolin as a result of thermal treatment was confirmed through the disappearance of kaolinite peak at 12.46°. XRD patterns of the modified and unmodified kaolin and metakaolin were found to be similar indicating the unchanged clay structures upon organo-modification with BTEA-Cl. Results of the successful modifications of kaolin and metakaolin were also exhibited by the appearance of major peaks in FTIR spectra at 2800–3000 cm^{-1} and 1474 cm^{-1} which represented the existence of CH stretching and aromatic C=C in $BTEA^+$. The SEM micrographs of the organo-modified kaolin and metakaolin exhibited increasing individualized platelets and agglomeration as compared to the unmodified kaolin and metakaolin. Evidence of the organo-modification on natural kaolin and metakaolin was also noticed as surface areas of the clays showed drastic decrease from 25.34 m^2/g natural clay to between 5.90 - 13.11 m^2/g organo-modified clay, and from 19.91m^2/g for metakaolin to between 9.04- 18.14m^2/g for organo-modified metakaolin clays. The natural kaolin, metakaolin and their organo-modified counterparts were then used as supports in the immobilization of *Candida rugosa* lipase (CRL) via physical adsorption method. Organo-modified metakaolin with 2.0x CEC showed highest protein loading of up to 14.83 ± 1.37 mg protein/g clay and almost 70% of immobilization. Characterization of the immobilized lipases using XRD showed increased d_{001} spacing from 7.12 to 7.22 Å for kaolin, while d_{001} spacing of organo-modified kaolin decreased about 2%. SEM images exhibited substantial, thick and rough external surface as evidence of the existence of lipase on the surface of the kaolin and metakaolin clay. The absorption bands at 1656 cm^{-1}, 1540 cm^{-1} were linked to the existence of CRL when identified using FTIR. Successful immobilization of CRL onto natural and organo-modified kaolin and metakaolin clay were also observed where surface areas and pore volumes decreased about 46%-72% and 1%-52%, respectively, while pore sizes of the clay increased about 42%-53% upon immobilization of CRL. The immobilized CRL, together with free CRL were then screened for esterification activities in the reactions which consisted of nonanol and hexanoic acid. CRL immobilized onto 2.0x CEC organo-modified natural kaolin (CRL-2.0 NK) and CRL immobilized onto 2.0x CEC organo-modified metakaolin (CRL-2.0 MK) showed 1.5 folds increased in activities as compared to free CRL. FTIR and gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) were used to confirm the successful synthesis of nonyl hexanoate using CRL immobilized onto the organo-modified clay. CRL-2.0 NK and CRL-2.0 MK also showed high thermal stabilities 57.67% and 51.39%, respectively even after incubation at 70 °C. CRL-2.0 MK exhibited highest reusability where it maintained 65.15% of the initial activity (5.24×10^{-3} mmol ester/min/µg protein) even after 10 cycles of continuous uses. The abilities of the selected immobilized lipases (CRL-2.0 NK and CRL-2.0 MK) to synthesis the nonyl hexanoate were kinetically studied where kinetic parameters, K_m and V_{max}, were determined by means of Michaelis-Menten kinetic model and were best explained by the Ping-Pong Bi-Bi mechanism. The lower $K_{m(Hex)}$ values suggested that the CRL, CRL-2.0 NK and CRL-2.0 MK displayed higher affinity towards hexanoic acid (Hex) than towards nonanol (Non), $K_{m(Non)} > K_{m(Hex)}$. The selected immobilized lipases also demonstrated considerably higher V_{max} values (2.1786-2.3504 mmol/L/min) compared to free CRL (1.5810 mmol/L/min) in the enzymatic reaction. The present study had extensively explored the structure and physico characteristics of the different types of kaolin derivatives for their beneficial use as support for biocatalyst. Activities and stabilities of lipase immobilized onto the selected organo-modified clay were improved, suggesting that the preparation of functional immobilized biocatalyst are more adapted and practical substitute to the hazardous acid catalyst commonly used for nonyl hexanoate production.

الملخص

أظهرت الدراسات أن طين الكاولين لديه إمكانات هائلة لاستخدامه كممتاز ممتاز ودعم للمحفزات الحيوية لأنها تلبي متطلبات المتطلبات الصديقة للبيئة المتزايدة اليوم للصناعات الحديثة. علاوة على ذلك، فهي غير مكلفة، ومقاومة للميكروبات، ومستقرة حرارياً وتمتلك قوة ميكانيكية ملحوظة. ومع ذلك، فإن استخدامها كدعم لتثبيت المحفزات الحيوية محدود بسبب طبيعتها المحبة للماء. للتغلب على هذا، يتم استبدال الكاتيونات القابلة للتبديل (Na^+) في هياكلها مع كاتيونات الأمونيوم الرباعية (QACs) من خلال عملية التبادل الأيوني. في هذه الدراسة، تم تحديد سعة التبادل الكاتيوني (CEC) بطريقة الميثيلين الأزرق للكاولين الطبيعي والكاولين المعالجين عند 650 درجة مئوية (ميتاكولين) ووجد أنهما 2.5 ميقا / 100 جرام من الطين و1.5 ميقا / 100 جرام من الطين، على التوالي. تم استخدام كلوريد بنزيل تراي إيثيل الأمونيوم (BTEA-Cl) بتركيزات مختلفة (0.5 -CEC2.0 x من الكاولين الطبيعي والميتاكولين) في تحضير الكاولين المعدل عضويًا والميتاكولين المعدل عضويًا. تم تمييز الكاولين والميتاكولين المعدلين عضويًا باستخدام مقياس حيود الأشعة السينية (XRD) ومطياف فورييه للأشعة تحت الحمراء (FTIR) وميكروسكوب المسح الإلكتروني (SEM) ومساحة السطح ومحلل المسامية. تم عرض التعديلات العضوية الناجحة للكاولين الطبيعي من خلال زيادة تباعد d_{001} من 7.12 Å إلى ما بين 7.20 -7.34 في أنماط XRD. وبالمثل، تم تأكيد التحويل الناجح للكاولين إلى ميتاكولين نتيجة للمعالجة الحرارية من خلال اختفاء ذروة الكاولين عند 12.46 درجة. تم العثور على أنماط XRD للكاولين المعدلة وغير المعدلة والميتاكولين لتكون متشابهة مما يشير إلى أن هياكل الطين لم تتغير عند التعديل العضوي باستخدام BTEA-Cl. تم عرض نتائج التعديلات الناجحة للكاولين والميتاكولين أيضًا من خلال ظهور القمم الرئيسية في أطياف FTIR عند 2800-3000 سم $^{-1}$ و1474 سم $^{-1}$ مما يمثل وجود تمدد CH والعطرية C = C في $BTEA^+$. أظهرت الصور المجهرية SEM للكاولين والميتاكولين المعدلين عضويًا زيادة الصفائح الدموية الفردية والتكتل مقارنةً بالكاولين والميتاكولين غير المعدل. ولوحظ أيضًا دليل على التعديل العضوي على الكاولين الطبيعي والميتاكولين حيث أظهرت المساحات السطحية للطين انخفاضًا حادًا من 25.34 م ^{2} / جم من الطين الطبيعي إلى ما بين 5.90 -13.11 م ^{2} / جم من الطين المعدل عضويًا، ومن 19.91 م ^{2} / جم للطين ميتاكولين إلى ما بين 9.04 -18.14 م ^{2} / جم لطين الميتاكولين المعدل عضويًا. تم استخدام الكاولين الطبيعي والميتاكولين ونظرائهم المعدلة عضويًا كدعم في تثبيت المبيضات الليباز (CRL) عبر طريقة

الامتزاز الفيزيائي. أظهر الميتاكولين المعدل عضويًا مع2.0× CEC أعلى تحميل بروتين يصل إلى 14.83 ± 1.37 مجم بروتين / جم طين وما يقرب من 70 ٪ من التثبيت. أظهر توصيف الليباز الثابت باستخدام XRD زيادة تباعد d_{001} من 7.12 إلى 7.22 Å للكاولين، بينما انخفض تباعد d_{001} للكاولين المعدل عضويًا بنحو 2٪. أظهرت صور SEM سطحًا خارجيًا سميكًا وخشنًا كدليل على وجود الليباز على سطح طين الكاولين والميتاكولين. تم ربط نطاقات الامتصاص عند 1656 سم $^{-1}$ ، 1540 سم $^{-1}$ بوجود CRL عند تحديدها باستخدام FTIR. كما لوحظ التثبيت الناجح لـ CRL على الكاولين الطبيعي والمعدل عضويًا وطين ميتاكولين حيث انخفضت مساحات السطح وحجم المسام بحوالي 46٪ -72٪ و1٪ -52٪، بينما زادت أحجام مسام الطين بحوالي 42٪ -53٪ عند تجميد CRL. تم بعد ذلك فحص CRL المجمد، جنبًا إلى جنب مع CRL الحر من أجل أنشطة الأسترة في التفاعلات التي تتكون من حمض النونانول وحمض هيكسانويك. تم تثبيت CRL على الكاولين الطبيعي المعدل عضويًا2.0 ×CEC (CRL-2.0 NK) وCRL المثبت في 2.0 ×CEC ميتاكاولين المعدل عضويًا (CRL-2.0 MK) وأظهر زيادة 1.5 أضعاف في الأنشطة مقارنة بـ CRL المجاني. تم استخدام FTIR ومقياس طيف الكتلة اللوني للغاز (GC-MS) لتأكيد التوليف الناجح لهكسانوات النونيل باستخدام CRL المثبت على الطين المعدل عضويًا. أظهر CRL-2.0 NK وCRL-2.0 MK أيضًا ثباتًا حراريًا عاليًا حوالي 57.67٪ و51.39٪, على التوالي حتى بعد الحضانة عند 70 درجة مئوية. أظهر CRL-2.0 MK أعلى قابلية لإعادة الاستخدام حيث حافظ على 65.15.٪ من النشاط الأولي (5.24 × 10^{-3} ملي مول استر / دقيقة / مجم بروتين) حتى بعد 10 دورات من الاستخدامات المستمرة. تمت دراسة قدرات الليباز المحدد المعطل (CRL-2.0 NK و CRL-2.0 MK) لتخليق هيكسانوات النونيل بشكل حركي حيث تم تحديد المعلمات الحركية، K_m و V_{max}، عن طريق النموذج الحركي ميكاليس-مينتن وتم شرحها بشكل أفضل بواسطة آلية ثنائية بي البنق بونق .تشير قيم $K_{m\ (Hex)}$ المنخفضة إلى أن CRL و CRL-2.0 NK و CRL-2.0 MK أظهروا تقاربًا أعلى تجاه حمض هيكسانويك (Hex)من تجاه نونانول (Non) ، $K_{m(Non)} > K_{m(Hex)}$. أظهرت الليباز المختارة أيضًا قيم V_{max} أعلى بكثير (2.3504-2.1786 ملي مول / لتر / دقيقة) مقارنة بـ CRL (1.5810 ملي مول / لتر / دقيقة) في التفاعل الأنزيمي. استكشفت الدراسة الحالية على نطاق واسع التركيب والخصائص الفيزيائية لأنواع مختلفة من مشتقات الكاولين لاستخدامها المفيد كدعم للمحفز الحيوي. تم تحسين أنشطة واستقرار الليباز المثبت على الطين المختار المعدّل عضويًا، مما يشير إلى أن تحضير المحفز الحيوي

المثبت وظيفيًا يكون أكثر تكيفًا وبديلاً عمليًا لمحفز الحمض الخطير المستخدم بشكل شائع لإنتاج الهكسانويات نونيل.

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER 1: INTRODUCTION

CHAPTER 2: LITERATURE REVIEW

CHAPTER 3: RESEARCH METHODOLOGY

CHAPTER 4: RESULTS AND DISCUSSION

CHAPTER 5: CONCLUSION AND RECOMMENDATION

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

Figures **Page**

LIST OF SCHEMES

Scheme **Page**

LIST OF APPENDICES

Appendices **Page**

LIST OF EQUATIONS

LIST OF ABBREVIATIONS

CRL	*Candida rugosa* Lipase
EC	Enzyme Commission
QACs	Quaternary Ammonium Cations
BTEA-Cl	Benzyltriethylammonium-chloride
MB	Methylene-Blue
CEC	Cation Exchange Capacity
BSA	Bovine Serum Albumin
NK	Natural Kaolin
MK	Metakaolin
Rpm	Revolutions per minute
XRD	X-Ray Diffraction Analysis
FTIR	Fourier Transform Infrared Spectroscopy
SEM	Scanning Electron Microscopy
BET	Brunuer, Emmett and Teller
GC-MS	Gas Chromatography-Mass Spectrometry
V	Velocity
V_{max}	Maximum Velocity
K_m	Michealis-Menten Contant
K_i	Inhibition Constant
Å	Angstrom
m/z	mass-to-charge ratio