SEPARATION AND PARTIAL PURIFICATION OF BIOSURFACTANTS BY FOAM FRACTIONATION TECHNIQUE

Thitima Sarachat

A Dissertation 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
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
and Case Western Reserve University
2009

Thesis Title:	Separation and Partial Purification of Biosurfactants by Foam Fractionation Technique
By:	Thitima Sarachat
Program:	Polymer Science
Thesis Advisors:	Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit Prof. Masahiko Abe Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej

---

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

..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

Thesis Committee:

....
(Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit) (Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej)

....
(Prof. Masahiko Abe) (Asst. Prof. Manit Nithitanakul)

.....
(Dr. Manisara Phiriyawirut)

ABSTRACT

5072025063: Polymer Science Program

Thitima Sarachat: Separation and Partial Purification of Biosurfactants by Foam Fractionation Technique

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit, Prof. Masahiko Abe, and Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej 93 pp.

Keywords: Biosurfactants/ Foam Fractionation/ Biosurfactant recovery

Pseudomonas aeruginosa SP4, isolated from petroleum-contaminated soil in Thailand, was used to produce a biosurfactant from nutrient broth supplemented with palm oil. Normally, crude biosurfactant has been extracted from culture broth by organic solvent extraction. Owing to high cost and toxicity to environment and human health of organic solvents, foam fractionation, a surfactant-based separation, was used in this study to concentrate and remove the biosurfactant from cell-free nutrient broth solution. The effects of the air flow rate, column height, pore size of sinter glass disk, solution volume and the collecting time on enrichment ratio and percentage of biosurfactant recovery were investigated to determine the optimum condition for separating the biosurfactant from nutrient broth solution. It was found that increasing of either column height or pore size of sinter glass disk resulted in higher enrichment ratio but lower percentage of biosurfactant recovery. On a contrary, increasing of air flow rate resulted in a decrease in enrichment ratio but an increase in the percentage of biosurfactant recovery. The initial biosurfactant solution and biosurfactant in collapsed foam from foam fractionation process were fractionated by using HPLC-ELSD technique. The HPLC patterns of both biosurfactant samples are identical. However, the peak intensities of the biosurfactant in the collapsed foam were higher than those of the initial biosurfactant solution, indicating the higher biosurfactant concentration.

บทคัดย่อ

ฐิติมา สารชาติ : การคัดแยกและทำสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้บริสุทธิ์โดยวิธีการทำให้เกิดโฟม (Separation and Partial Purification of Biosurfactants by Foam Fractionation Technique) อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.รัตนา รุจิรวนิช, ศ.ดร.มาซาฮิโกะ อาเบะ และ รศ.ดร.สุเมธ ชวเดช 93 หน้า

การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพสามารถผลิตได้จากแบคทีเรียชนิด *Pseudomonas aeruginosa* SP4 ซึ่งทำการคัดแยกมาจากแหล่งปิโตรเลียมที่มีดินปนเปื้อนน้ำมันเป็นเวลานานในประเทศไทย โดยมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนและสารอาหารแร่ธาตุเป็นแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรียในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ ซึ่งโดยปกติแล้วจะใช้สารเคมีอินทรีย์ในการสกัดสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ นอกจากจะมีราคาแพงแล้วยังก่อให้เกิดปัญหามลพิษและปัญหาสุขภาพจากการใช้สารเคมี ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้นำการสกัดวิธีใหม่คือการทำให้เกิดโฟมมาใช้โดยนำมาคัดแยกและตึงสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากอาหารเลี้ยงเชื้อจนมีความเข้มข้นขึ้น

งานวิจัยนี้ได้มีการศึกษาถึงผลกระทบของตัวแปรต่างๆ ต่อการดึงสารลดแรงตึงผิวชีวภาพออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ตัวแปรเหล่านั้นคืออัตราการไหลของอากาศ, ความสูงของคอลัมน์, ขนาดรูพรุนของตัวเป่าอากาศ, ปริมาณของสารละลายในคอลัมน์ และเวลาในการเก็บโฟมออกจากคอลัมน์ ในแต่ละการทดลองอัตราการดึงสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ และอัตราส่วนของความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวที่แยกออกมาจากโฟมต่อที่อยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเริ่มต้น จะถูกคำนวณเพื่อวิเคราะห์ถึงความสามารถและประสิทธิภาพของกระบวนการคัดแยก และจากการทดลองพบว่าเมื่อเพิ่มความสูงของคอลัมน์หรือขนาดรูพรุนของตัวเป่าอากาศ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในโฟมจะเพิ่มขึ้นแต่อัตราการดึงสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจะต่ำลง และในทางกลับกันการเพิ่มอัตราการไหลของอากาศส่งผลให้ ความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพในโฟมลดลงแต่อัตราการดึงสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาถึงส่วนประกอบของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเริ่มต้น และสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่ได้จากกระบวนการคัดแยกโดยทำให้เกิดโฟม โดยเครื่อง HPLC-ELSD และพบว่ารูปแบบกราฟมีลักษณะเหมือนกัน แต่ความสูงของกราฟในสารลดแรงตึงผิวที่ถูกคัดแยกแล้วจะมีความสูงของกราฟมากกว่าบ่งบอกได้ว่า สารลดแรงตึงผิวที่ถูกคัดแยกโดยวิธีทำให้เกิดโฟมจะมีความเข้มข้นสูงกว่าสารเริ่มต้น

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all I would like to sincerely thank Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit and Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej, and Professor Masahiko Abe served as my thesis advisors, for their patient guidance, understanding and constant encouragement throughout the course of this research. Their positive attitude contributed significantly to inspiring and maintaining my enthusiasm in the field. I will always be proud to have been their student. I also would like to thank all of my teachers at the Petroleum and Petrochemical College for their generous help.

I am grateful for the partial scholarship and partial funding of the thesis work provided by the Petroleum and Petrochemical College; the Research Unit of Applied Surfactants for Separation and Pollution Control under the Ratchadapisek Somphot Fund, Chulalongkorn University; the Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials; and the faculty of engineering, Mahanakorn University of Technology.

I would like to thank all staff of the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for their assistance.

I feel fortunate to have spent 2 years with collection of graduated students who not only made the experience bearable, but also quite pleasant. Therefore, I simply say thanks to friends who made the two years such a memorable experience.

Finally, I would like to thank my family for their love, spirit and understanding during my studies and research work.

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER **PAGE**

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**

FIGURE **PAGE**

ABBREVIATION

CMC	Critical micelle concentration
C/N	Carbon per nitrogen ratio
NB	Nutrient broth
BM	Basal medium
DM	Defined medium
DO	Dissolved oxygen
HPLC	High performance liquid chromatography
GC–MS	Gas chromatography–mass spectroscopy
DADS	Dialkylated disulfonate
SDS	Sodium dodecyl sulphate
CPC	Cetylpyridinium chloride
$OPEO_{10}$	Octylphenol polyethyoxylate
CGA	Colloidal gas aphron
ELSD	Evaporative light scattering detector