

**BIOSURFACTANT PRODUCTION FROM PALM OIL USING
SEQUENCING BATCH REACTORS**



Onsiri Huayyai

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
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
Case Western Reserve University and Institut Français du Pétrole
2008

512001

Thesis Title: Biosurfactant Production from Palm Oil Using Sequencing
Batch Reactors
By: Onsiri Huayyai
Program: Petrochemical Technology
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej
Prof. Masahiko Abe
Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit

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

Nantaya Yanumet
..... College Director
(Assoc. Prof. Nantaya Yanumet)

Thesis Committee:

Sumaeth Chavadej
.....
(Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej)

Ratana Rujiravanit
.....
(Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit)

Masahiko Abe
.....
(Prof. Masahiko Abe)

Suntud Sirianuntapiboon
.....
(Assoc. Prof. Suntud Sirianuntapiboon)

T. Sreethawong
.....
(Dr. Thammanoon Sreethawong)

บทคัดย่อ

อริศรี ห้วยใหญ่ : การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากน้ำมันปาล์มโดยเครื่องปฏิกรณ์แบบกะต่อเนื่อง (Biosurfactant Production from Palm Oil Using Sequencing Batch Reactors) อ.ที่ปรึกษา : รศ. ดร.สุเมธ ชวเดช ศ. ดร.มะชะฮิโกะ อะเบะ และ รศ. ดร.รัตนา รุจิรวนิช 93 หน้า

งานวิจัยนี้ได้ศึกษาการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปีดจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* SP4 ซึ่งทำการคัดแยกมาจากแหล่งปีโตรเลียมที่มีดินปนเปื้อนน้ำมันเป็นเวลานานในประเทศไทย โดยใช้เครื่องปฏิกรณ์แบบกะต่อเนื่องจำนวน 2 ชุด ที่มีลักษณะเหมือนกัน ซึ่งเครื่องปฏิกรณ์นี้ถูกดำเนินการทดลองโดยใช้หลักการของการเติมและการดึงสารออกในสภาวะควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่ปลอดเชื้อ หน่วยของเครื่องปฏิกรณ์แบบกะต่อเนื่องมีปริมาตรในการทำงานคือ 1,500 มิลลิลิตร ปริมาตรในการเติมสารคือ 500 มิลลิลิตร และปริมาตรในการดึงสารผลิตภัณฑ์คือ 500 มิลลิลิตร โดยมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนและสารอาหารแร่ธาตุเป็นแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรีย งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาหาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ โดยศึกษาผลของระยะเวลาในการผลิตที่มีปริมาณการป้อนน้ำมัน 2 กิโลกรัมต่อลูกบาศก์เมตร. วัน คือ 1 วันต่อวัฏจักร 2 วันต่อวัฏจักร และ 3 วันต่อวัฏจักร จากการทดลองพบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ 2 วันต่อวัฏจักร โดยมีค่าการลดลงของแรงตึงผิวมากที่สุดคือ 59 เฮอร์เซ็นต์ และมีค่าแรงตึงผิวน้อยที่สุดคือ 28.82 มิลลินิวตันต่อเมตร สามารถผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพที่มีความเข้มข้น 1.05 เท่าของซีเอ็มซี ซึ่งสอดคล้องกับการย่อยสลายซีไอดีสูงสุดคือ 89.8 เฮอร์เซ็นต์ และการย่อยสลายน้ำมันสูงสุดคือ 96.7 เฮอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ระยะเวลา 2 วันต่อวัฏจักรยังส่งผลให้ค่าความเป็นกรดเป็นด่างของระบบมีค่าเฉลี่ยเป็น 6.04 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียด้วย เมื่อศึกษาผลของอัตราส่วนของธาตุคาร์บอนต่อธาตุไนโตรเจนพบว่า มีผลต่อจำนวนของชีวมวลในระบบ ค่าความเป็นกรดเป็นด่าง และการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพ อย่างไรก็ตามอัตราส่วนของธาตุคาร์บอนต่อธาตุไนโตรเจนที่เหมาะสมที่สุดต่อการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจากเชื้อแบคทีเรียชนิด *Pseudomonas aeruginosa* SP 4 คือ 16/1

ABSTRACT

4971009063: Petrochemical Technology Program

Onsiri Huayyai: Biosurfactant Production from Palm Oil Using Sequencing Batch Reactors.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Sumeath Chavadej, Prof. Masahiko Abe and Assoc. Prof. Rattana Rujiravanit, 93 pp.

Keywords: Biosurfactant/ Rhamnolipid/ *Pseudomonas aeruginosa*/ Sequencing Batch Reactor/ Palm oil

Pseudomonas aeruginosa SP4, which was isolated from a petroleum-contaminated soil in Thailand, was used to produce rhamnolipid-type biosurfactants in this study. This research was performed by using two identical units of continuous sequencing batch reactors (SBRs), which were operated on a fill-and-draw basis at a constant temperature of 37°C under aseptic conditions with 1,500 ml working volume, 500 ml feeding volume, and 500 ml decanting volume. Palm oil and a mineral medium were used the sole carbon source and nutrient source, respectively. The effect of cycle time on biosurfactant production performance was investigated at an oil loading rate of 2 kg/m³d. The results showed that 2 d/cycle was the optimum cycle time for biosurfactant production to provide the highest surface tension reduction of 59% and the lowest surface tension of 28.82 mN/m with a critical micelle concentration of 1.05 times CMC, corresponding to the highest COD and oil removal of 89.8% and 96.7%, respectively. Moreover, this cycle time also gave a stable and suitable pH for microbial growth, which was found to be around 6.04. The C/N ratio (16/0.57, 16/1 and 16/3) was found to significantly affect on biomass, pH and biosurfactant production. Nevertheless, the C/N ratio of 16/1 was an optimum ratio for the biosurfactant production by the strain SP4.

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to thank to all those who gave me the possibility to complete this thesis. This thesis work was funded by the National Excellence Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials and The Research Unit of Applied Surfactants for Separation and Pollution Control under The Ratchadapisak Somphot Fund, Chulalongkorn University.

First of all, I would like to express my gratitude to all of my advisors, Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej, Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit and Prof. Masahiko Abe for their advice and support through this research work.

I would like to thank all technical staffs of the Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University for their assistance and instrumental improvement.

Furthermore, I have to thank Ms. Sasiwan Maksung who is the previous student in this research to provide useful information and instruction for this project. Especially, I would like to thank Ms. Orathai Pornsunthorntawee for her valuable suggestion, and encouragement in all the time of research as well as to help writing of this thesis.

Exceptional, I also want to thank all of my friends for their friendship, understanding, and liveliness along my work.

Finally, I would like to give special thanks to my family whose encouragement enabled me to complete this research work.

TABLE OF CONTENTS

	PAGE
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Contents	vi
List of Tables	x
List of Figures	xi
Abbreviations	xiv
CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
II LITERATURE REVIEW	3
2.1 Biodegradation of Contaminated Petroleum Hydrocarbon in Environment	3
2.2 Background on Surfactants and Biosurfactants	4
2.2.1 Surfactants	4
2.2.2 Biosurfactants	7
2.2.2.1 Types of biosurfactants	7
2.2.2.1.1 Glycolipids	7
2.2.2.1.2 Lipoproteins or lipopeptids	10
2.2.2.1.3 Phospholipids and Fatty acids	11
2.2.2.1.4 Polymeric biosurfactants	11
2.3 Factors Affecting biosurfactants Production	14
2.3.1 Carbon Sources	14
2.3.2 Nitrogen Sources	16
2.3.3 Nutrition Sources	17
2.3.4 Environmental Factors	17

CHAPTER	PAGE
2.3.4.1 The pH	17
2.3.4.2 Temperature	17
2.3.4.3 Agitation and aeration	18
2.4 Advantages and disadvantages of biosurfactants	18
2.4.1 Advantages	18
2.4.2 Disadvantages	19
2.5 Sequencing Batch Reactors on Biosurfactants Production	19
2.5.1 The cyclic process of SBR	20
2.5.1.1 Fill	20
2.5.1.2 React	21
2.5.1.3 Settle	21
2.5.1.4 Draw (Decant)	21
2.5.2 Advantages and disadvantages of SBRs	23
2.5.2.1 Advantages	23
2.5.2.2 Disadvantages	24
2.6 The potential application of biosurfactants in industries	24
2.6.1 Microbially-enhanced oil recovery (MEOR)	25
2.6.2 Biosurfactants Oil Storage Tank Clean-Up	25
2.6.3 Oil Spill Dispersants	26
2.6.4 Heavy metal removal from sediments by biosurfactants	27
III EXPERIMENTAL	28
3.1 Materials and Equipments	28
3.1.1 Equipments and Apparatus	28
3.1.2 Chemicals and Solvents	29
3.2 Methodology	30
3.2.1 Microorganism	30
3.2.2 Inoculums Preparation	30
3.2.3 Carbon Sources and Nutrients	30

CHAPTER	PAGE
3.2.4 Sequencing Batch Reactors (SBRs) set up and operation	31
3.2.4.1 Experimental set up	31
3.2.4.2 SBRs operation	33
3.3 Chemical Analysis and Measurement Method	35
3.3.1 pH measurement	35
3.3.2 Suspended Solids (SS) Measurement	35
3.3.3 Mixed Liquor Suspended Solids (MLSS) Measurement	36
3.3.4 Biosurfactant Productivity Measurement	36
3.3.4.1 Surface Tension Measurement	36
3.3.4.2 Biosurfactant Concentration Measurement	36
3.3.5 Chemical Oxygen Demand (COD) Measurement	36
3.3.6 Total Organic Carbon (TOC) Measurement	37
3.3.7 Total Nitrogen (TN) and Total Phosphorous (TP) Measurement	37
3.3.8 Palm Oil Quantification	37
 IV RESULTS AND DISCUSSION	 38
4.1 Characterization of Mineral medium and Palm Oil	38
4.2 Effect of Cycle Time on Biosurfactant Production	39
4.2.1 Effect of Cycle Time on COD removal	39
4.2.2 Effect of Cycle Time on Oil removal	42
4.2.3 Effect of Cycle Time on Surface Tension (ST) and Surface Tension Reduction	42
4.2.4 Microbial Concentration	44
4.2.4.1 Mixed Liquor Suspended Solid (MLSS)	44
4.2.4.2 Suspended Solid (SS)	45
4.2.5 The effluent pH	46

CHAPTER	PAGE
4.3 Measurement of Biosurfactant Concentration	48
4.4 The Influence of C/N Ratio on Microbial Growth and Biosurfactant Production	50
V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	53
REFERENCES	55
APPENDICES	61
Appendix A Experimental Data of Characterization of Mineral medium and Palm Oil	61
Appendix B Experimental Data of Biosurfactant Production at an Oil Loading Rate of 2 kg/m ³ d with Different of Cycle Times at C/N 16/1 and C/P 14/1	69
Appendix C Experimental Data of Biosurfactant Production at an Oil Loading Rate of 2 kg/m ³ d with Different C/N ratio of 16/0.57 and 16/3 at 2 d/cycle	85
CURRICULUM VITAE	92

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
2.1	Microbial source and properties of important types of Biosurfactants	13
3.1	Six ports in the SBR lid	32
3.2	The operating conditions of SBRs	34
3.3	SBRs operating conditions with the effect of cycle time	35
4.1	Characterization of mineral medium (MM) and palm oil	38
4.2	The average effluent pH with an oil loading rate of 2 kg/m ³ d at 1 d/cycle, 2 d/cycle, and 3 d/cycle.	47

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Structure of surfactant monomer	4
2.2 Schematic diagram of the variation of surface tension, interfacial and contaminant solubility with surfactant concentration.	5
2.3 The shape of micelle (a) circular micelles; (b) rod-shaped micelles; (c) micellar layer and (e) vesicle micelles.	5
2.4 Schematic representation of four different rhamnolipids produced by <i>P.aeruginosa</i> .	9
2.5 Trehalose dimycolate from <i>Rhodococcus erythropolis</i> , in which disaccharide trehalose is linked to two long-chain α -branched β -hydroxy fatty acids.	9
2.6 Sophorolipid from <i>Torulopsis bombicola</i> in which dimeric sophorose is linked to a long-chain (C18) hydroxy fatty acid.	10
2.7 Structure of cyclic lipopeptide surfactin produced by <i>Bacillus subtilis</i> .	11
2.8 Structure of phosphatidylethanolamine, a potent biosurfactant produced by <i>Acinetobacter</i> sp. R_1 and R_2 are hydrocarbon chains of fatty acids.	11
2.9 Structure of emulsan, produced by <i>Acinetobacter calcoaceticus</i> , in which fatty acids are linked to a heteropolysaccharide backbone.	12
3.1 Schematic diagram of SBR.	33
3.2 Sequencing batch reactors (SBRs).	33
3.3 SBR operation for each tank for one cycle for the four discrete time periods of Fill, React, Settle, and Draw.	35

FIGURE		PAGE
4.1	Effluent COD as a function of operation time and cycle time at an oil loading rate of 2 kg/m ³ d.	40
4.2	COD removal as a function of operation time and cycle time at an oil loading rate of 2 kg/m ³ d.	40
4.3	The average COD of influent and effluent during steady-state operation at an oil loading rate of 2 kg/m ³ d and different cycle times.	41
4.4	COD removal during steady-state operation at an oil loading rate of 2 kg/m ³ d and different cycle times.	41
4.5	Oil removal and effluent oil concentration as a function of cycle time during steady-state operation at an oil loading rate of 2 kg/m ³ d.	42
4.6	Profiles of surface tension and surface tension reduction at different cycle times with an oil loading rate of 2 kg/m ³ d.	43
4.7	Surface tension and surface tension reduction during steady-state operation at different cycle times with an oil loading rate of 2 kg/m ³ d.	44
4.8	MLSS during steady state operation with an oil loading rate of 2 kg/m ³ d at different cycle time.	45
4.9	Effluent SS during steady-state operation at 1 d/cycle (days 5-7), 2 d/ cycle (days 10-14), and 3 d/cycle (days 9-15) with an oil loading rate of 2 kg/m ³ d.	46
4.10	Effluent pH profiles with an oil loading rate of 2 kg/m ³ d at different cycle times.	47
4.12	The surface tension profile at 2 d/cycle time with an oil loading rate of 2 kg/m ³ d.	49
4.13	The surface tension of serial dilutions at different aeration times at 2 d/cycle and an oil loading rate of 2 kg/m ³ d.	49

FIGURE		PAGE
4.14	Effluent SS and MLSS at different C/N ratios of with an oil loading rate of 2 kg/m ³ d and 2 d/cycle.	51
4.15	Different thickness of the remaining palm oil layer at the top of liquid culture in the SBR reactor at different C/N ratio of 16/0.57 (a) and 16/3 (B) with an oil loading rate of 2 kg/m ³ d and 2 d/cycle time.	51
4.16	Surface tension and surface tension reduction at different C/N ratios using an oil loading rate of 2 kg/m ³ d with 2 d/cycle.	52
4.17	The average effluent pH at different C/N ratios using an oil loading rate of 2 kg/m ³ d with 2 d/cycle.	52

ABBREVIATION

CFU	Colony-forming unit
CMC	Critical micelle concentration
CMD	Critical micelle dilution
C/N	Carbon-to- nitrogen ratio
COD	Chemical oxygen demand
C/P	Carbon-to- phosphorus ratio
CSTR	Continuous-stirred-tank reactor
HRT	Hydraulic retention time
MLSS	Mixed liquor suspended solids
MM	Mineral medium
OLR	Oil loading rate
SBR	Sequencing batch reactor
TN	Total nitrogen
TOC	Total organic carbon
TP	Total phosphorous
SS	Suspended solids