BIOSURFACTANT PRODUCTION BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* SP4 USING SEQUENCING BATCH REACTORS: EFFECT OF OIL-TO-GLUCOSE RATIO

Sira Pansiripat

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
2009

Thesis Title:	Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 Using Sequencing Batch Reactors: Effect of Oil-to-Glucose Ratio
By:	Sira Pansiripat
Program:	Petrochemical Technology
Thesis Advisors:	Asst. Prof. Boonyarach Kitiyanan
	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.

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

Thesis Committee:

..... (Asst. Prof. Boonyarach Kitiyanan)

..... (Prof. Masahiko Abe)

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

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

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

..... (Asst. Prof. Siriporn Jongpatiwut)

ABSTRACT

5071024063: Petrochemical Technology Program
Sira Pansiripat: Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 Using Sequencing Batch Reactors: Effect of Oil-to-Glucose Ratio.
Thesis Advisors: Asst. Prof. Boonyarach Kitiyanan, Assoc. Prof. Sumeath Chavadej, Prof. Masahiko Abe, and Assoc. Prof. Rattana Rujiravanit, 89 pp.
Keywords: Biosurfactant/ Rhamnolipid/ *Pseudomonas aeruginosa*/ Sequencing Batch Reactor/ Palm oil/ Glucose

Sequencing batch reactors (SBRs) were used for producing biosurfactants by *Pseudomonas aeruginosa* SP4, which was isolated from a petroleum-contaminated soil in Thailand. The studied SBRs were operated at a constant temperature of 37°C under aseptic conditions with a 1,500 ml working volume, 500 ml feeding volume, and 500 ml decanting volume. Palm oil and a mineral medium were used as the carbon source and the nutrient source, respectively. Glucose (another type of carbon source) was added to the mineral medium for the enhancement of microbial growth which, in turn, increases the biosurfactant production. The oil-to-glucose ratio was varied in this work in order to determine the optimum ratio of oil-to-glucose for a maximum yield of biosurfactant. The results showed that the optimum ratio for biosurfactant production was 40/1. It provided a surface tension reduction of 58.5% and a surface tension of 29.9 mN/m, corresponding to a highest COD and oil removal of 85.1% and 77.7%, respectively. The finding exhibited that the biosurfactant was produced after 6 h of the aeration step caused the sharply decrease of surface tension before constant at around 28 to 31 mN/m. From the critical micelle dilution (CMD) method results, that the biosurfactant concentration was found to be 1.11 times CMC.

บทคัดย่อ

ศิร พันศิริพัฒน์ : การผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพจาก *Pseudomonas aeruginosa* SP4 โดยเครื่องปฏิกรณ์แบบกะต่อเนื่อง: ผลของอัตราส่วนระหว่างน้ำมันและกลูโคส (Biosurfactant Production by *Pseudomonas aeruginosa* SP4 Using Sequencing Batch Reactors: Effect of Oil-to-Glucose Ratio) อ.ที่ปรึกษา : ผศ. ดร. บุนยรัชต์ กิติยานันท์ รศ. ดร.สุเมธ ชวเดช ศ. ดร.มะซะฮิโกะ อะเบะ และ รศ. ดร.รัตนา รุจิรวนิช 89 หน้า

เครื่องปฏิกรณ์แบบกะต่อเนื่องได้ถูกนำมาใช้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพชนิดแรมโนลิปิดจากเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ *Pseudomonas aeruginosa* SP4 ซึ่งทำการคัดแยกมาจากแหล่งปิโตรเลียมที่มีดินปนเปื้อนน้ำมันเป็นเวลานานในประเทศไทย ซึ่งเครื่องปฏิกรณ์นี้ถูกดำเนินการทดลองในสภาวะที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และในสภาวะที่ปลอดเชื้อ โดยมีปริมาตรในการทำงานคือ 1,500 มิลลิลิตร ปริมาตรในการเติมสารคือ 500 มิลลิลิตร และปริมาตรในการดึงสารผลิตภัณฑ์คือ 500 มิลลิลิตร โดยมีน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนและสารอาหารแร่ธาตุเป็นแหล่งอาหารให้กับแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังได้เติมกลูโคสซึ่งเป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนลงในสารอาหารแร่ธาตุเพื่อเพิ่มการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ทำให้ผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้มากขึ้น งานวิจัยนี้ได้ปรับเปลี่ยนอัตราส่วนระหว่างน้ำมันและกลูโคสเพื่อหาอัตราส่วนที่เหมาะสมในการผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพให้ได้มากที่สุด จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าอัตราส่วนที่เหมาะสมสำหรับผลิตสารลดแรงตึงผิวชีวภาพคือ 40/1 ที่อัตราส่วนนี้สามารถลดแรงตึงผิวได้ถึง 58.5 เปอร์เซนต์ โดยมีค่าแรงตึงผิวเท่ากับ 29.9 มิลลินิวตันต่อเมตร ซึ่งสอดคล้องกับการย่อยสลายซีโอดีสูงสุดคือ 85.1 เปอร์เซ็นต์ และการย่อยสลายน้ำมันสูงสุดคือ 77.7 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่าสารลดแรงตึงผิวชีวภาพได้ถูกผลิตหลังจากช่วงเป่าอากาศ (aeration time) ไปแล้ว 6 ชั่วโมง ส่งผลให้แรงตึงผิวลดลงอย่างรวดเร็วจนกระทั่งคงที่ในช่วง 28 ถึง 31 มิลลินิวตันต่อเมตร จากวิธีเจือจางวิกฤตของไมเซลล์ (Critical Micelle Dilution) ทำให้พบว่าความเข้มข้นของสารลดแรงตึงผิวชีวภาพเป็น 1.11 เท่าของความเข้มข้นวิกฤตที่เกิดไมเซลล์ (Critical Micelle Concentration)

ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis work was completed because the financial supported by the National Center of Excellence for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials; and The Research Unit of Applied Surfactants for Separation and Pollution Control, supported by Chulalongkorn University,

I would like to thank to all those who gave me the possibility to complete this thesis. All of my advisors, Asst. Prof. Boonyarach Kitiyanan, Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej, Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit and Prof. Masahiko Abe who advice and support through this research work.

All staffs of The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University who assist and improve the instruments.

The previous student in this research, Ms. Onsiri Hauyyai, who provided useful information and instruction about the thesis.

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

TABLE OF CONTENTS

CHAPTER PAGE

CHAPTER PAGE

LIST OF TABLES

LIST OF FIGURES

FIGURE **PAGE**

ABBREVIATION

CFU	Colony-forming unit
CMC	Critical micelle concentration
CMD	Critical micelle dilution
C/N	Carbon per nitrogen ratio
COD	Chemical oxygen demand
C/P	Carbon per phosphorus ratio
CSTR	Continuous-flow 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