

**EFFECT OF COSURFACTANT ON EXTRACTION AND ACTIVITY OF  
 $\alpha$ -CHYMOTRYPSIN IN NaDEHP MICROEMULSION**



Mr. Viput Phanawadee

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,  
and Case Western Reserve University

2003

ISBN 974-17-2314-8

**Thesis Title:** Effect of Cosurfactant on Extraction and Activity of  
 $\alpha$ -Chymotrypsin in NaDEHP microemulsion  
**By:** Mr. Viput Phanawadee  
**Program:** Petrochemical Technology  
**Thesis Advisors:** Asst. Prof. Pomthong Malakul  
Assoc. Prof. Chintana Saiwan  
Prof. Erdogan Gulari

---

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

*K. Bunyakiat.*

College Director

(Assoc. Prof. Kunchana Bunyakiat)

**Thesis Committee:**

*Pomthong Malakul*

(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

*Chintana Saiwan*

(Assoc. Prof. Chintana Saiwan)

*Erdogan Gulari*

(Prof. Erdogan Gulari)

*Sumaeth Chavadej*

(Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej)

*Boonyarach Kitiyanan*

(Dr. Boonyarach Kitiyanan)

## ABSTRACT

4471037063 : PETROCHEMICAL TECHNOLOGY PROGRAM

Viput Phanawadee : Effect of Cosurfactant on Extraction and Activity of  $\alpha$ -Chymotrypsin in NaDEHP Microemulsion.

Thesis Advisors: Asst. Prof. Pomthong Malakul, Assoc. Prof.

Chintana Saiwan and Prof. Erdogan Gulari, 50 pp.

ISBN 974-17-2314-8

Keywords : Extraction/ Activity/  $\alpha$ -Chymotrypsin/ NaDEHP Microemulsion/ Cosurfactant.

Liquid–liquid extraction using microemulsion has gained increasing interest from various industries for its potential applications in the separation and purification of biomolecules such as proteins and antibiotics. In this research, the extraction and activity of  $\alpha$ -chymotrypsin using two different microemulsion systems of sodium bis (2-ethylhexyl) phosphate (NaDEHP)/isooctane/brine were studied with an emphasis on the effect of cosurfactant. Two cosurfactants used in this study were tributylphosphate (TBP) and a bile salt cosurfactant, 3-[(3-cholamidyl-propyl)dimethyl ammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS). At near neutral pH and low salt concentration, an extraction efficiency of more than 70% was obtained using the microemulsion with TBP as a cosurfactant whereas only about 30% was achieved in the system with CHAPS as a cosurfactant. Subsequent recovery of the extracted protein using divalent metal ions showed that almost 75% of extracted protein in the system with TBP could be recovered and approximately 4% was recovered from the system with CHAPS. The enzymatic activities of the recovered proteins from these two systems were compared to fresh protein and found to be quite different. The protein recovered from the NaDEHP system with CHAPS as a cosurfactant was shown to retain approximately twice activity than that of the system with TBP as a cosurfactant.

## บทคัดย่อ

นาย วิพุธ พรรณวดี: ผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวร่วมต่อการสกัดและแอกติวิตีของ แอลฟาดีโมทรูปซินในไมโครอิมัลชันของโซเดียมบิสทุเอทิลเฮกซิลฟอสเฟส (โซเดียมดีอีเอสพี) Effect of Cosurfactant on Extraction and Activity of  $\alpha$ -Chymotrypsin in the NaDEHP Microemulsion อ. ที่ปรึกษา: ผศ. ดร. ปมทอง มาลากุล รศ. ดร. จินตนา สายวรรณ และ ศ. ดร. เออร์โดแกน กุลาริ 50 หน้า ISBN 974-17-2314-8

การสกัดของเหลวด้วยของเหลวโดยใช้ไมโครอิมัลชันได้รับความสนใจจากอุตสาหกรรมต่างๆมากขึ้นเพราะมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้กับกระบวนการแยกและการทำให้บริสุทธิ์ของสารชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น โปรตีน และ สารปฏิชีวนะ งานวิจัยนี้ศึกษาการสกัดและแอกติวิตีของแอลฟาดีโมทรูปซินโดยใช้ระบบไมโครอิมัลชันที่แตกต่างกันสองระบบของโซเดียมบิสทุเอทิลเฮกซิลฟอสเฟส (โซเดียมดีอีเอสพี) ในสารละลายไอโซออกเทนที่มีเกลือเป็นส่วนประกอบ โดยเน้นที่ความสำคัญของผลกระทบของสารลดแรงตึงผิวร่วม สารลดแรงตึงผิวร่วมสองชนิดที่ใช้ในการศึกษานี้คือ ไตรบิวทิลฟอสเฟส (ทีบีพี) และ สารลดแรงตึงผิวร่วมที่เป็นเกลือในน้ำดี 3-[(3-โคลามิديل-โพรพิล)ไดเมทิลแอมโมเนียม]-1-โพรเพนซัลโฟเนต (ซีเอสเอพีเอส) จากการศึกษาพบว่าที่สภาวะเกือบจะเป็นกลางและความเข้มข้นเกลือต่ำ ประสิทธิภาพในการสกัดเอนไซม์มากกว่า 70 เปอร์เซ็นต์ ได้มาโดยการใช้ไมโครอิมัลชันที่ใช้ทีบีพีเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม ในขณะที่ระบบไมโครอิมัลชันที่ใช้ซีเอสเอพีเอสเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมนั้นให้ประสิทธิภาพในการสกัดเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ การนำโปรตีนที่ถูกสกัดกลับมาโดยใช้ไอออนของโลหะที่มีประจุบวกสองแสดงให้เห็นว่า ประมาณ 75 เปอร์เซ็นต์ของโปรตีนที่ถูกสกัดในระบบที่มีทีบีพีสามารถนำกลับคืนมาได้ และประมาณ 4 เปอร์เซ็นต์ถูกนำกลับคืนมาได้ในระบบที่ใช้ซีเอสเอพีเอส เอนไซม์แอกติวิตีของโปรตีนที่ถูกนำกลับคืนมาจากสองระบบนี้ถูกนำมาเปรียบเทียบกับแอกติวิตีของโปรตีนที่ยังไม่เคยถูกสกัดซึ่งพบว่ามีค่าแตกต่างกัน โดยที่โปรตีนที่นำกลับคืนมาจากระบบโซเดียมดีอีเอสพีที่ใช้ซีเอสเอพีเอสเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วมนั้น แสดงให้เห็นว่าแอกติวิตีที่ถูกรักษาไว้มีค่าประมาณสองเท่าของค่าที่ได้จากระบบที่ใช้ทีบีพีเป็นสารลดแรงตึงผิวร่วม

## ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis could not have been completed without help of following people. First of all, I would like to express my sincere appreciation to my advisors, Asst. Prof. Pomthong Malakul, Assoc. Prof. Chintana Saiwan and Prof. Erdogan Gulari. Without them, this thesis might not be occurred. Their suggestion and comments are very valuable to this thesis.

I would like to extend my sincere thanks to all of the Professors who guided me through their courses, establishing the need in this thesis. I would like to thank Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej and Dr. Boonyarach Kitiyanan for serving on my committee.

I also extend my appreciation to all staff members of the Petroleum and Petrochemical College and all of my friend for their assistance.

My greatest appreciation is reserved for my family who gives me their love, support and understanding.

This thesis work is partially funded by Postgraduate Education and Research Programs in Petroleum and petrochemical Technology (PPT Consortium).

## TABLE OF CONTENTS

	<b>PAGE</b>
Title Page	i
Abstract (in English)	iii
Abstract (in Thai)	iv
Acknowledgements	v
Table of Content	vi
List of Table	x
List of Figures	xii
 <b>CHAPTER</b>	
<b>I INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
 <b>II BACKGROUND AND LITERATURE SURVEY</b>	 <b>4</b>
2.1 Proteins and Antibiotics	4
2.1.1 Proteins	4
2.1.2 Antibiotics	4
2.2 Protein Separation	4
2.3 Microemulsion	5
2.3.1 Microemulsion formation	5
2.3.2 Microemulsion structure	6
2.3.3 Applications	7
2.4 Transfer of Protein into Reverse Micelles	8
2.4.1 Factors affecting protein solubilization	8
2.4.1.1 Effect of pH	9
2.4.1.2 Effect of ionic strength	9
2.4.1.3 Effect of salt	9
2.4.1.4 Effect of solvent	9

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
2.4.1.5 Effect of surfactant	10
2.4.1.6 Effect of cosurfactant	10
2.5 Extraction of Protein Using Microemulsion	10
<b>III EXPERIMENTAL</b>	<b>14</b>
3.1 Chemicals	14
3.2 Experimental Methods	14
3.2.1 Microemulsion formation of NaDEHP system	14
3.2.1.1 Microemulsion formation of NaDEHP system in the absence of cosurfactant	14
3.2.1.2 Microemulsion formation of NaDEHP system using TBP as a cosurfactant	15
3.2.1.3 Microemulsion formation of NaDEHP system using CHAPS as a cosurfactant	15
3.2.1.4 Effect of salt concentration on water content and microemulsion size	15
3.2.1.5 Effect of CHAPS concentration on water content and microemulsion size	16
3.2.2 Forward extraction	16
3.2.3 Backward extraction	16
3.2.4 Activity test of $\alpha$ -chymotrypsin after backward transfer	17
3.3 Analytical and Characterization Techniques	17
3.3.1 Analytical equipment	17
3.3.2 Characterizations	18
<b>IV RESULTS AND DISCUSSION</b>	<b>19</b>
4.1 Formation of NaDEHP Microemulsions	19
4.1.1 NaDEHP microemulsion formation in the absence of cosurfactant	19

<b>CHAPTER</b>	<b>PAGE</b>
4.1.2 NaDEHP microemulsion formation with tributylphosphate (TBP) as a cosurfactant	20
4.1.3 NaDEHP microemulsion formation with 3-[(3-cholamidyl-propyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS) as a cosurfactant	20
4.2 Water Content in the NaDEHP Microemulsion	22
4.2.1 $\omega_0$ of NaDEHP system with tributylphosphate (TBP) as a cosurfactant	22
4.2.2 Effect of CHAPS as a cosurfactant on $\omega_0$ of NaDEHP system	23
4.3 Size of the NaDEHP microemulsion systems	25
4.3.1 Effect of NaCl concentration on the size of NaDEHP microemulsion using TBP as a cosurfactant	25
4.3.2 Effect of CHAPS on the size of the NaDEHP microemulsion	25
4.4 Extraction of $\alpha$ -Chymotrypsin Using NaDEHP Microemulsion Systems with Different Cosurfactants	26
4.4.1 Forward extraction	27
4.4.2 Backward extraction	28
4.5 Enzymatic Activity Test	31
<b>V CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS</b>	<b>34</b>
5.1 Conclusions	34
5.2 Recommendations	35
<b>REFEERENCES</b>	<b>36</b>
<b>APPENDICES</b>	
<b>Appendix A</b> Calibrations	<b>38</b>
<b>Appendix B</b> Forward and Backward Extractions	<b>39</b>



	<b>PAGE</b>
<b>Appendix C</b> Activity Test	41
<b>Appendix D</b> Water Content	43
<b>Appendix E</b> Dynamic Light Scattering	47
<b>CURRICULUM VITAE</b>	50

## LIST OF TABLES

TABLE	PAGE
4.1 The NaDEHP microemulsion systems used to study the extraction of $\alpha$ -chymotrypsin	26
4.2 The %forward extraction by using NaDEHP microemulsion systems	27
A1 Calibration curve of $\alpha$ -chymotrypsin at $\lambda_{281\text{nm}}$	38
A2 Calibration curve of $p$ -nitroaniline at $\lambda_{365\text{nm}}$	38
B1 Concentration of $\alpha$ -chymotrypsin in aqueous phase of NaDEHP microemulsion system after forward extraction	39
B2 Concentration of $\alpha$ -chymotrypsin in aqueous phase of NaDEHP microemulsion system after backward extraction	40
C1 Activity of fresh $\alpha$ -chymotrypsin	41
C2 Activity of recovered $\alpha$ -chymotrypsin from NaDEHP microemulsion system with 0.1 M TBP	42
C3 Activity of recovered $\alpha$ -chymotrypsin from NaDEHP microemulsion system with 10.0 mM CHAPS	42
D1 Water content of microemulsion 0.1031 M NaDEHP/isooctane with 0.1 M TBP as a cosurfactant at pH 7.4, 25°C and various NaCl Concentrations	43
D2 Water content of microemulsion 0.1031 M NaDEHP/isooctane with CHAPS as a cosurfactant at pH 7.4, 25°C and various NaCl concentrations	44
D3 Water content of microemulsion 0.1031 M NaDEHP/isooctane at pH 7.4, 25°C after forward extraction	45
D4 Water content of microemulsion 0.1031 M NaDEHP/isooctane at pH 7.4, 25°C after backward extraction	46
E1 Hydradynamic radius ( $R_h$ ) of microemulsion 0.1 M NaDEHP/ isooctane at pH 7.4, 25°C and various NaCl and cosurfactants	47

<b>TABLE</b>	<b>PAGE</b>
E2 Hydradynamic radius (Rh) of microemulsion 0.1 M HDEHP/ isooctane after forward extraction	48
E3 Hydradynamic radius (Rh) of microemulsion 0.1 M HDEHP/ isooctane after backward extraction	49

## LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
2.1 Sequence of microemulsions encountered as temperature or salinity is scanned for nonionic or ionic surfactants	7
2.2 A schematic representation of the reverse micellar extraction of proteins	8
2.3 Structures of NaDEHP and AOT surfactants	11
4.1 Phase transition of the 0.1 M NaDEHP/isooctane/brine	19
4.2 Phase transition of the 0.1 M NaDEHP/0.1 M TBP/isooctane/brine	20
4.3 Phase transition of the 0.1 M NaDEHP/15 mM CHAPS/isooctane/brine	21
4.4 Phase transition of the 0.1 M NaDEHP/CHAPS/isooctane/0.2 M NaCl/0.1 M NaOH/aqueous solution	21
4.5 Effect of salt concentration on water content in the reverse micelles of NaDEHP/TBP/isooctane	23
4.6 Effect of CHAPS as a cosurfactant on water content in the microemulsion of 0.1 M NaDEHP/isooctane/4 M NaCl/0.1 M NaOH/aqueous solution system	24
4.7 Effect of CHAPS concentration on water content in the microemulsion system of NaDEHP/CHAPS/isooctane/0.2 M NaCl/0.1 M NaOH/aqueous solution	24
4.8 $\omega_0$ during the enzyme extraction using the microemulsion of 0.1 M NaDEHP/0.1 M TBP/isooctane/0.2 M NaCl/0.1 M NaOH/aqueous solution	29
4.9 $\omega_0$ during the enzyme extraction using the microemulsion of 0.1 M NaDEHP/10 mM CHAPS/isooctane/0.2 M NaCl/0.1 M NaOH/aqueous solution	30

<b>FIGURE</b>	<b>PAGE</b>
4.10 The activity of fresh $\alpha$ -chymotrypsin which is represented by the amount of <i>p</i> -nitroaniline (ppm) produced by hydrolysis reaction of GPNA	32
4.11 The activity of recovered $\alpha$ -chymotrypsin from System 2 (with 0.1 M TBP)	32
4.12 The activity of recovered $\alpha$ -chymotrypsin from System 6 (with 10.0 mM CHAPS)	33