

PREPARATION, CHARACTERIZATION, AND APPLICATIONS OF
RHAMNOLIPIDS FROM *Pseudomonas aeruginosa* SP4



Orathai Pornsunthorntawe

A Dissertation Submitted in Partial Fulfilment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Philosophy
The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University
in Academic Partnership with
The University of Michigan, The University of Oklahoma,
and Case Western Reserve University

2010

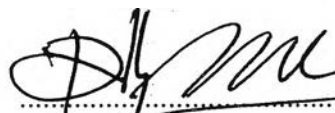
530008

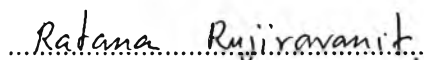
Thesis Title: Preparation, Characterization, and Applications of Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* SP4
By: Orathai Pornsunthorntawee
Program: Polymer Science
Thesis Advisors: Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit
Prof. Masahiko Abe

Accepted by The Petroleum and Petrochemical College, Chulalongkorn University, in partial fulfilment of the requirements for the Degree of Doctor of Philosophy.

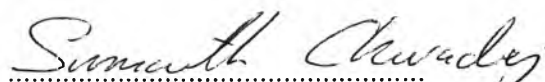

..... College Dean
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)

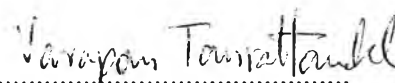
Thesis Committee:


.....
(Asst. Prof. Pomthong Malakul)


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


.....
(Prof. Masahiko Abe)


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


.....
(Assoc. Prof. Varaporn Tanrattanakul)

ABSTRACT

4882004063: Polymer Science Program

Orathai Pornsunthorntawee: Preparation, Characterization, and Applications of Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* SP4.

Thesis Advisors: Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit and Prof. Masahiko Abe 207 pp.

Keywords: Biosurfactant/ Glycolipid/ Rhamnolipid/ Adsorption/ Silk fibroin/ Chitosan

Pseudomonas aeruginosa SP4, isolated from petroleum-contaminated soil in Thailand, was used to produce a biosurfactant from a nutrient broth with palm oil as the carbon source. The biosurfactant extracted from the culture medium was a mixture of eleven rhamnolipid species, and the major component in the biosurfactant product was mono-rhamnolipid. Compared to synthetic surfactants—Pluronic F-68 and sodium dodecyl sulfate, the biosurfactant showed comparable surface activities, emulsification activities, and stabilities. The biosurfactant self-assembled to form spherical vesicles of various sizes (ranging from 50 nm to larger than 250 nm) at a concentration greater than its critical micelle concentration. To study the potential use of the biosurfactant vesicles in either delivery systems or other dispersed systems, the encapsulation experiment was done by using Sudan III, a water-insoluble dye, as a model substance. The encapsulation efficiency of the biosurfactant vesicles was slightly influenced by the addition of sodium chloride, but was significantly enhanced in the presence of either ethanol or cholesterol. To find the utilization in the biomedical field, the biosurfactant was used to modify the surface characteristics of two types of polymeric films, including silk fibroin and chitosan, via the adsorption process. The silk fibroin and chitosan films showed more hydrophobicity after the biosurfactant adsorption, but the surface topographies of both substrates was not significantly modified. The adsorbed biosurfactant layer was also found to differently affect the growths of the test cells—human dermal fibroblasts and human dermal keratinocytes.

บทคัดย่อ

อรรถย พรสุนทรทวิ : การเตรียม การวิเคราะห์คุณลักษณะ และการนำไปใช้งานของสารแรมโนลิพิดจาก *Pseudomonas aeruginosa* SP4 (Preparation, Characterization, and Applications of Rhamnolipids from *Pseudomonas aeruginosa* SP4) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. รัตนา รุจิรวนิช และ ศ. ดร. มาซาฮิโกะ อาเบะ 207 หน้า

งานวิจัยนี้ นำแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* SP4 ซึ่งทำการคัดแยกออกมาจากดินที่ปนเปื้อนน้ำมันปิโตรเลียมในประเทศไทย มาใช้ในการผลิตสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียและน้ำมันปาล์มเป็นแหล่งคาร์บอน สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่สกัดออกมาจากอาหารเลี้ยงเชื้อประกอบไปด้วยสารแรมโนลิพิดจำนวน 11 ชนิด โดยส่วนประกอบที่มีมากที่สุดในการลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ คือ สารโมโนแรมโนลิพิด เมื่อเปรียบเทียบกับสารลดแรงตึงผิวสังเคราะห์ อันได้แก่ พลูโรนิค เอฟ-68 และ โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต พบว่า สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพมีความสามารถในการลดแรงตึงผิว ความสามารถในการทำให้เกิดอิมัลชัน และเสถียรภาพที่ดีเทียบเท่ากับ สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพรวมกลุ่มกันเอง และก่อให้เกิดเวสิเคิลที่มีรูปร่างกลมหลายขนาด (ตั้งแต่ 50 นาโนเมตร ถึง มากกว่า 250 นาโนเมตร) เมื่อมีความเข้มข้นมากกว่าความเข้มข้นวิกฤติที่ทำให้เกิดไมเซลล์ นอกจากนี้ งานวิจัยนี้ยังได้ใช้สียูเราน III เป็นตัวแทนของสารที่ไม่สามารถละลายได้ในน้ำในการทดลองการห่อหุ้ม เพื่อศึกษาถึงศักยภาพในการนำไปใช้งานของเวสิเคิลของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพ ทั้งในระบบนำส่งสารออกฤทธิ์หรือระบบของสารแขวนลอยอื่นๆ ประสิทธิภาพในการห่อหุ้มของเวสิเคิลได้รับผลกระทบเพียงเล็กน้อยจากการเติมโซเดียมคลอไรด์ แต่มีค่าเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากเมื่อเติมเอทานอลหรือคลอเรสเตอรอล สารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพยังได้รับการนำไปใช้ในการตัดแปรคุณลักษณะทางพื้นผิวของฟิล์มพอลิเมอร์ 2 ชนิด อันได้แก่ ไนโพรอิน และ โคลิโชน ด้วยกระบวนการดูดซับ เพื่อศึกษาถึงการนำไปใช้งานในทางการแพทย์ พื้นผิวของไนโพรอินและโคลิโชนมีความไม่ชอบน้ำเพิ่มมากขึ้น ภายหลังจากกระบวนการดูดซับ แต่กระบวนการดูดซับไม่ได้ตัดแปรลักษณะทางพื้นผิวของฟิล์มพอลิเมอร์ทั้ง 2 ชนิดอย่างมีนัยสำคัญ ชั้นของสารลดแรงตึงผิวทางชีวภาพที่ดูดซับอยู่บนพื้นผิวของฟิล์มพอลิเมอร์มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ที่นำมาทดสอบ อันได้แก่ เซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์เคราติโนไซต์จากผิวหนังของมนุษย์ แตกต่างกัน

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, the author wishes to express her gratefulness to her advisors—Assoc. Prof. Ratana Rujiravanit and Prof. Masahiko Abe—for their useful advices and supports. The author would like to thank Asst. Prof. Pomthong Malakul, Assoc. Prof. Nantaya Yanumet, and Assoc. Prof. Varaporn Tanrattanakul for being her prelim/thesis committees, and for giving valuable comments and suggestions. The author would like to show her sincere appreciation to Assoc. Prof. Sumaeth Chavadej for his scientific guidance, and for reviewing and improving the original manuscripts. The author is so grateful to Asst. Prof. Kenichi Sakai and Assoc. Prof. Hideki Sakai for their assistances during her short term research in Japan. The author also thanks Dr. Panya Wongpanit for his inspiration, discussion, and encouragement throughout this work.

This work is financially supported by the National Excellence Center for Petroleum, Petrochemicals, and Advanced Materials (Thailand); the Thailand Research Fund under an RGJ Ph.D. scholarship and an BRG 5080030 Grant; and the Research Unit of Applied Surfactants for Separation and Pollution Control, under the Ratchadapisek Somphot Fund, Chulalongkorn University.

Queen Sirikit Sericulture Center (Thailand) and Surapon Foods Public Co., Ltd. (Thailand) are acknowledged for supplying the raw silk fiber and shrimp shells, respectively. The author would like to give her thankfulness to Assoc. Prof. Mongkol Sukwattanasinitt for the MS analysis, and to Mr. Kazunori Matsushashi and Mr. Yuki Imaizumi for their assistances in the QCM-D experiment. The author acknowledges Meditop Co., Ltd (Thailand) for providing the Brookhaven ZetaPALS instrument used in conductivity, zeta potential, and DLS measurements.

The author wishes to thank all faculty and staff members at the PPC for their kindnesses. The deepest gratitude goes to Mr. Robert Right, an English specialist at the PPC, for checking and improving the English of all manuscripts. The author also appreciates the supports from her friends at the PPC.

Finally, the author would like to thank her family for their love and supports during her study at the PPC.

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
 CHAPTER	
I INTRODUCTION	1
 II LITERATURE REVIEW	 4
 III EXPERIMENTAL	 28
 IV STRUCTURAL AND PHYSICOCHEMICAL CHARACTERIZATION OF CRUDE BIOSURFACTANT PRODUCED BY <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4 ISOLATED FROM PETROLEUM-CONTAMINATED SOIL	 44
4.1 Abstract	44
4.2 Introduction	44
4.3 Experimental	46
4.4 Results and Discussion	50
4.5 Conclusions	55
4.6 Acknowledgements	56
4.7 References	56

CHAPTER		PAGE
V	SOLUTION PROPERTIES AND VESICLE FORMATION OF RHAMNOLIPID BIOSURFACTANTS PRODUCED BY <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	66
	5.1 Abstract	66
	5.2 Introduction	67
	5.3 Experimental	69
	5.4 Results and Discussion	72
	5.5 Conclusions	83
	5.6 Acknowledgements	84
	5.7 References	84
VI	PREPARATION AND CHARACTERIZATION OF RHAMNOLIPID VESICLES AS POTENTIAL NANOCARRIER SYSTEMS	97
	6.1 Abstract	97
	6.2 Introduction	97
	6.3 Experimental	99
	6.4 Results and Discussion	103
	6.5 Conclusions	107
	6.6 Acknowledgements	108
	6.7 References	108

CHAPTER	PAGE
VII SURFACE-MODIFIED POLYMERIC FILMS BY RHAMNOLIPID BIOSURFACTANT FROM <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4 FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS	119
7.1 Abstract	119
7.2 Introduction	119
7.3 Experimental	121
7.4 Results and Discussion	128
7.5 Conclusions	135
7.6 Acknowledgements	136
7.7 References	136
VIII CONCLUSIONS AND RECOMMENDATIONS	149
REFERENCES	151
APPENDICES	165
Appendix A Structural and Physicochemical Characterization of Crude Biosurfactant produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4 isolated from Petroleum-contaminated Soil	165
Appendix B Solution Properties and Vesicle Formation of Rhamnolipid Biosurfactants produced by <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4	181
Appendix C Preparation and Characterization of Rhamnolipid Vesicles as Potential Nanocarrier Systems	193
Appendix D Surface-modified Polymeric Films by Rhamnolipid Biosurfactant from <i>Pseudomonas aeruginosa</i> SP4 for Biomedical Applications	196

CHAPTER**PAGE****CURRICULUM VITAE**

205

LIST OF TABLES

TABLE		PAGE
CHAPTER II		
2.1	Rhamnolipid production by <i>Pseudomonas</i> strains using different substrates	10
CHAPTER IV		
4.1	Chemical structures of the isolated fractions of the crude biosurfactant produced by <i>P. aeruginosa</i> SP4	61

LIST OF FIGURES

FIGURE	PAGE
CHAPTER II	
2.1	The four general chemical structures of rhamnolipid biosurfactants produced by certain species of <i>Pseudomonas</i> . 5
2.2	Biosynthetic pathway of rhamnolipid biosurfactants and the involved enzymes. 8
2.3	Adsorption of surfactants by ion exchange (Rosen, 2004). 17
2.4	Adsorption of surfactants by ion pairing (Rosen, 2004). 17
2.5	Adsorption via hydrogen bond formation (Rosen, 2004). 17
2.6	Adsorption via Lewis acid-Lewis base interaction (Rosen, 2004). 18
2.7	Adsorption via dispersion forces on non-polar surface (Rosen, 2004). 18
2.8	Adsorption from aqueous solution via hydrophobic bonding on an uncharged surface (Rosen, 2004). 18
2.9	Schematic illustrations of typical tissue engineering approaches (Lee and Mooney, 2001). 20
CHAPTER IV	
4.1	Diameter of the clear zones on the oil surface obtained from oil displacement testing with the crude biosurfactant produced by <i>P. aeruginosa</i> SP4 and its fractions compared with Pluronic F-68 and SDS at a surfactant concentration of 20 mg/ml. 62
4.2	Surface tension versus concentrations of the crude biosurfactant produced by <i>P. aeruginosa</i> SP4 compared with Pluronic F-68 and SDS. 63

FIGURE	PAGE
CHAPTER IV	
4.3 Emulsification activity (E_{24}) of the crude biosurfactant produced by <i>P. aeruginosa</i> SP4 compared with Pluronic F-68 and SDS.	64
4.4 Stability of the crude biosurfactant as compared with Pluronic F-68 and SDS. (a) Surface tension of surfactants after heat treatment at 90°C with different heating times. (b) Effect of pH on surface activity of surfactants.	65
CHAPTER V	
5.1 Chemical structures of rhamnolipid biosurfactants.	88
5.2 Chemical structure of Sudan III.	89
5.3 Surface tension <i>versus</i> rhamnolipid biosurfactant concentration. (a) PBS solution, (b) PBS solution containing NaCl, and (c) PBS solution containing C ₂ H ₅ OH.	90
5.4 Turbidity (absorbance at 600 nm) of the biosurfactant solution at different concentrations prepared in (a) a PBS solution, (b) a PBS solution containing NaCl, and (c) a PBS solution containing C ₂ H ₅ OH.	91
5.5 Electrical conductivity of the biosurfactant solution at different concentrations prepared in (a) a PBS solution, (b) a PBS solution containing NaCl, and (c) a PBS solution containing C ₂ H ₅ OH.	92
5.6 Scattered light intensity of the biosurfactant solution at different concentrations prepared in (a) a PBS solution, (b) a PBS solution containing NaCl, and (c) a PBS solution containing C ₂ H ₅ OH.	93

FIGURE	PAGE
CHAPTER V	
5.7 Contribution of the various-sized biosurfactant vesicles at different concentrations prepared in (a) a PBS solution, (b) a PBS solution containing 0.4 M NaCl, and (c) a PBS solution containing 0.4 M C ₂ H ₅ OH.	94
5.8 TEM micrographs of the biosurfactant vesicles formed at a concentration of (a) 320 mg/l in a PBS solution and (b) 2560 mg/l in a PBS solution, and (c) a PBS solution containing 0.4 M NaCl, and (d) a PBS solution containing 0.4 M C ₂ H ₅ OH.	95
5.9 Encapsulation efficiency (<i>E</i> %) of the biosurfactant vesicle formed in a PBS solution in the absence and presence of the additives at a biosurfactant concentration of 1,280 mg/l.	96
CHAPTER VI	
6.1 Chemical structures of rhamnolipid biosurfactants.	113
6.2 Chemical structure of cholesterol.	114
6.3 Chemical structure of Sudan III.	115
6.4 Characteristics of the rhamnolipid solution prepared in a PBS solution (pH 7.4) at a biosurfactant concentration of 0.13 wt.% at different cholesterol concentrations: (a) Solution turbidity (absorbance at 600 nm), (b) Zeta potential, and (c) Vesicle size.	116
6.5 TEM micrographs of the rhamnolipid vesicles formed in a PBS solution (pH 7.4) at a biosurfactant concentration of 0.13 wt.% and a cholesterol concentration of (a) 0 μM, (b) 25 μM, (c) 50 μM, (d) 100 μM, (e) 200 μM, and (f) 400 μM.	117

FIGURE		PAGE
CHAPTER VI		
6.6	Encapsulation efficiency ($E\%$) of the rhamnolipid vesicles formed in a PBS solution (pH 7.4) at a biosurfactant concentration of 0.13 wt.% at various cholesterol concentrations and initial Sudan III concentrations.	118
CHAPTER VII		
7.1	Chemical structures of (a) rhamnolipid biosurfactants, (b) silk fibroin, and (c) chitosan.	141
7.2	Adsorption isotherms of the rhamnolipid biosurfactant onto either silk fibroin or chitosan films from (a) the SPR analysis and (b) the QCM-D experiment.	142
7.3	The changes in the third overtone of the resonance frequency and the dissipation from the QCM-D experiment as a function of the biosurfactant concentration: (a) silk fibroin and (b) chitosan.	143
7.4	Water content percentages within the adsorbed layers of either silk fibroin or chitosan films as a function of the biosurfactant concentration.	144
7.5	Water contact angles of either silk fibroin or chitosan films as a function of the biosurfactant concentration.	145
7.6	Topography AFM micrographs (scan are of $1 \mu\text{m}^2$) of (a) unmodified silk fibroin, (b) surface-modified silk fibroin films, (c) unmodified chitosan, and (d) surface-modified chitosan.	146
7.7	Growth of human dermal fibroblasts on unmodified and surface-modified polymeric films.	147

FIGURE		PAGE
	CHAPTER VII	
7.8	Growth of human dermal keratinocytes on unmodified and surface-modified polymeric films.	148