# การตรึงเซลล์ *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 บนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อการหมักกรดแลคติก

นางสาวรัตน์ฉัตร ฉันทวงศ์วุฒิ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรดุษฎีบัณฑิต
สาขาวิชาวิศวกรรมเคมี ภาควิชาวิศวกรรมเคมี
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# IMMOBILIZATION OF *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 ON AGRICULTURAL RESIDUES FOR LACTIC ACID FERMENTATION

Miss Ratchat Chantawongvuti

A Dissertation Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Doctor of Engineering Program in Chemical Engineering
Department of Chemical Engineering
Faculty of Engineering
Chulalongkorn University
Academic Year 2008
Copyright of Chulalongkorn University

512127

| | |
|---|---|
| Thesis Title | IMMOBILIZATION OF *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 ON AGRICULTURAL RESIDUES FOR LACTIC ACID FERMENTATION |
| By | Miss Ratchat Chantawongvuti |
| Field of Study | Chemical Engineering |
| Advisor | Associate Professor Chirakarn Muangnapoh, Dr.Ing. |
| Co-Advisor | Assistant Professor Phimchanok Jaturapiree, Dr. nat. techn. |

---

Accepted by the Faculty of Engineering, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Doctoral Degree

..... Dean of the Faculty of Engineering
(Associate Professor Boonsom Lerdhirunwong, Dr.Ing.)

THESIS COMMITTEE

..... Chairman
(Associate Professor Sarawut Rimdusit, Ph.D.)

..... Advisor
(Associate Professor Chirakarn Muangnapoh, Dr.Ing.)

..... Co-Advisor
(Assistant Professor Phimchanok Jaturapiree, Dr. nat. techn.)

..... Examiner
(Assistant Professor Vichitra Chongvisal, Ph.D.)

..... Examiner
(Associate Professor Seeroong Prichanont, Ph.D.)

..... External Examiner
(Assistant Professor Sirikul Chunsawang, D.Eng.)

รัตน์ฉัตร ฉันทวงศ์วุฒิ : การตรึงเซลล์ *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 บนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อการหมักกรดแลคติก. (IMMOBILIZATION OF *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 ON AGRICULTURAL RESIDUES FOR LACTIC ACID FERMENTATION) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. ดร.จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : ผศ.ดร.พิมพ์ชนก จตุรพิริย์, 94 หน้า.

วิธีการตรึงเซลล์สามารถเพิ่มปริมาณเซลล์และอัตราการผลิตในกระบวนการหมัก ทำให้เซลล์มีเสถียรภาพมากขึ้น การนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรกลับมาใช้ใหม่ช่วยลดปัญหาทางด้านสิ่งแวดล้อม ดังนั้นการตรึงเซลล์ *Lactobacillus salivarius* บนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเป็นทางเลือกใหม่ที่น่าสนใจ วัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ ใยบวบ ชานอ้อย เส้นใยจากมะขามและเส้นใยมะพร้าว ในการเตรียมเส้นใยสำหรับการตรึงเซลล์พบว่า เส้นใยจากมะขามมีวิธีการเตรียมที่ต้องใช้น้ำล้างเป็นจำนวนมาก อีกทั้งต้องใช้แรงงานและเวลาในการล้างให้สะอาด จึงไม่เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในอุตสาหกรรม หลังจากนั้น นำเส้นใยทั้งสามชนิดไปตรึงเซลล์พบว่า เซลล์เกาะอยู่บนใยบวบและชานอ้อย ในขณะที่แทบจะไม่พบเซลล์บนเส้นใยมะพร้าว ดังนั้น ในงานวิจัยต่อจากนี้จะศึกษาการตรึงเซลล์บนวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรสองชนิด คือ ใยบวบและชานอ้อย เพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของเส้นใยสำหรับการตรึงเซลล์ จึงใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และไคโตซาน โดยมวลโมเลกุลของไคโตซานที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ 83,000 185,000 380,000 และ 800,000 Da และ ร้อยละ DD อยู่ในช่วง 90 – 92 การทดลองหมักทำในระบบขวดเขย่าที่อัตราการหมุนรอบ 100 รอบต่อนาที และควบคุมอุณหภูมิหมักที่ 37 องศาเซลเซียส จากผลการทดลองการดัดแปรพื้นผิววัสดุตรึงด้วยไคโตซานเข้มข้นร้อยละ 1 โดยมวลต่อปริมาตรในสารละลายกรดอะซีติกเข้มข้นร้อยละ 2 โดยปริมาตรที่มีมวลโมเลกุลต่างกัน พบว่าผลได้ผลิตภัณฑ์ และอัตราการผลิตผลิตภัณฑ์ของเซลล์บนวัสดุตรึงที่ใช้ไคโตซานมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยยะสำคัญ จากการศึกษากระบวนการหมักแบบกะที่ทำซ้ำพบว่า การตรึงเซลล์บนใยบวบให้ค่าความเข้มข้นของกรดแลคติก อัตราการผลิต และจำนวนรอบการนำกลับมาใช้ซ้ำสูงกว่าการตรึงเซลล์บนชานอ้อยเล็กน้อย สำหรับการตรึงเซลล์บนใยบวบและชานอ้อยได้ค่าผลได้สูงสุดของผลิตภัณฑ์เท่ากับ 0.56 และ 0.53 ค่าอัตรการผลิตที่สูงสุดเท่ากับ 0.94 และ 0.80 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง และจำนวนรอบการนำกลับมาใช้ซ้ำเท่ากับ 5 และ 3 รอบ ตามลำดับ

ภาควิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่อนิสิต .....รัตน์ฉัตร ฉันทวงศ์วุฒิ.....

สาขาวิชา.....วิศวกรรมเคมี..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....จิรกานต์ เมืองนาโพธิ์.....

ปีการศึกษา.....2551..... ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....พิมพ์ชนก จตุรพิริย์.....

## 4771821321: MAJOR CHEMICAL ENGINEERING

KEYWORDS : CELL IMMOBILIZATION/ LACTIC ACID FERMENTATION/ AGRICULTURAL RESIDUES/ *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741

RATCHAT CHANTAWONGVUTI: IMMOBILIZATION OF *Lactobacillus salivarius* ATCC 11741 ON AGRICULTURAL RESIDUES FOR LACTIC ACID FERMENTATION. ADVISOR: ASSOC. PROF. CHIRAKARN MUANGNAPOH, Dr.Ing., CO-ADVISORS: ASST. PROF. PHIMCHANOK JATURAPIREE, Dr. nat. techn., 94 pp.

Cell immobilization method can maintain high cell concentration; enhanced fermentation productivity and cell stability. Reusing agricultural residues can minimize the environmental problems associated with their build-up reducing the use of noble materials. Hence, immobilization of *Lactobacillus salivarius* on agricultural residues is a challenging alternative. Agricultural residues used in this study were loofa sponge, sugarcane bagasse, tamarind fruit fibre, and coconut fibre. In the preparation step, large portion of water was needed in order to clean the tamarind fruit fiber thoroughly. In addition, this process was labour-and-time consuming. Therefore, it was not applicable for the industrial scale. After that *L. salivarius* ATCC 11741 was immobilized on untreated fibres. Cells could well adhere on loofa sponge and sugarcane bagasse but not on coconut fibre. As a result, agricultural residues that would be selected for further study were loofa sponge and sugarcane bagasse. In order to increase the surface area of the fibre for cell immobilization, $H_2O_2$ and chitosan were introduced as a surface modified reagent. Four molecular weights of chitosan used in this research were 83,000 Da, 185,000 Da, 380,000 Da, and 800,000 Da with the 90 – 92% DD. All experiments were conducted in shaking flask mode at 100 rpm shaking speed and 37°C. At 1% w/v chitosan in 2% v/v acetic acid, it was found that product yield and productivity of various molecular weights chitosan were insignificant different. In repeated batch mode, immobilization using loofa sponge was found to exhibit a little higher lactic acid concentration, productivity, and number of repeated batch than sugarcane bagasse. The highest values for cell immobilized on loofa sponge and sugarcane bagasse were 0.56 and 0.53 in product yield, 0.94 and 0.80 g/L.h in productivity, and 5 and 3 in reusability, respectively.

| | |
|---|---|
| Department……Chemical Engineering… | Student's Signature…R. Chantawongvuti…… |
| Field of Study…Chemical Engineering… | Advisor's Signature……C. Muangnapoh…… |
| Academic Year……2008…….. | Co-Advisor's Signature…P. Jaturapiree…….. |

# ACKNOWLEDGEMENTS

This thesis will not finish without the help and support from many persons. Firstly, I would like to express my sincere gratitude to Associate Professor Dr. Chirakarn Muangnapoh, my advisor, and Assistant Professor Dr. Phimchanok Jaturapiree, my co-advisor, for her valuable suggestions, guidance and warm encouragement throughout my doctoral programme. I am also appreciated to Associate Professor Dr. Sarawut Rimdusit, chairman of the committee, Assistant Professor Dr. Vichitra Chongvisal, Associate Professor Dr. Seeroong Prichanont, and Dr. Sirikul Chunsawang for their valuable comments and suggestions.

Moreover, special thanks should be made for all members in the Biochemical Engineering Laboratories for their warm and friendly support.

Beyond everything, I am deeply indebted to **my beloved family** for everything.

# CONTENTS

Page

**ABSTRACT (THAI)** ..... iv
**ABSTRACT (ENGLISH)** ..... v
**ACKNOWLEDGEMENTS** ..... vi
**CONTENTS** ..... vii
**LIST OF TABLES** ..... x
**LIST OF FIGURES** ..... xii
**NOMENCLATURE** ..... xv

**CHAPTER**

**I INTRODUCTION** ..... 1
1.1 Objectives ..... 3
1.2 Working scopes ..... 3
1.3 Expected benefits ..... 4

**II BACKGROUND AND LITERATURE REVIEW** ..... 5
2.1 Theory ..... 5
2.1.1 Lactic acid ..... 5
2.1.2 Lactic acid fermentation ..... 7
2.1.3 Lactic acid bacteria ..... 8
2.1.4 Cell immobilization ..... 10
2.1.4.1 Type of immobilized cell carriers ..... 11
2.1.4.2 Immobilization techniques ..... 13
2.1.5 Chitosan ..... 16
2.1.6 Fermentation ..... 17
2.2 Literature review ..... 24
2.2.1 Lactic acid bacteria selection ..... 24
2.2.2 Lactic acid production by suspended cell ..... 24
2.2.3 Production of lactic acid by immobilized cell system ..... 28
2.2.4 Immobilization carriers in adsorption technique ..... 34

**CHAPTER** **Page**

**III MATERIALS AND METHODS** ..... 41
3.1 Chemicals ..... 41
3.2 Equipments ..... 41
3.3 Methods ..... 42
3.3.1 Stock cell suspension ..... 42
3.3.2 Carrier preparation ..... 42
3.3.3 Adsorption of cell to support material ..... 43
3.3.4 Lactic acid fermentation ..... 43
3.3.5 Sample analysis ..... 43

**IV RESULTS AND DISCUSSION** ..... 44
4.1 Lactic acid fermentation by *L. salivarius* ..... 45
4.1.1 Growth curve of *L. salivarius* ..... 45
4.1.2 Effect of $CaCO_3$ percentages on lactic acid production ..... 46
4.1.3 Effect of initial glucose concentration on lactic acid production ..... 47
4.2 Immobilization materials ..... 48
4.2.1 Physical appearance of the materials ..... 49
4.2.2 Preliminary study of cell immobilization on untreated fibre ..... 51
4.2.3 $H_2O_2$ treatment of loofa sponge ..... 53
4.2.4 Cell immobilization on $H_2O_2$-treated loofa sponge ..... 57
4.3 Cell immobilization ..... 58
4.3.1 Cell immobilization on loofa sponge ..... 59
4.3.2 Cell immobilization on sugarcane bagasse ..... 64
4.3.3 Comparison of lactic acid production via various fermentation systems ..... 69
4.3.4 Comparison of loofa sponge and sugarcane bagasse as Immobilization materials ..... 72

**CHAPTER** **Page**

**V CONCLUSIONS** ..... 76
5.1 Conclusions ..... 76
5.2 Recommendation ..... 77

**REFERENCES** ..... 78

**APPENDICES** ..... 85
APPENDIX A: Calibration curve ..... 86
APPENDIX B: Experimental data ..... 87

**VITA** ..... 94

# LIST OF TABLES

**TABLE** **Page**


2.1 Physical properties of lactic acid ..... 6

2.2 Advantages and disadvantages of immobilized cell system ..... 11

2.3 The lactic acid production ..... 25

4.1 Kinetic parameters of lactic production by *L. salivarius* ..... 45

4.2 Zeta potential of agricultural residues in medium ..... 50

4.3 Characteristics of chitosan used in this research ..... 59

4.4 List of samples and labels for loofa sponge fermentation ..... 59

4.5 List of samples and labels for sugarcane bagasse fermentation ..... 64

4.6 Yield and productivity of various fermentation conditions with Initial glucose concentration at 50 g $L^{-1}$ ..... 71

4.7 Comparison of average product yield, average productivity, and number of repeated batches using loofa sponge and sugarcane bagasse as immobilization materials ..... 72

4.8 Studies on lactic acid production of immobilized cells ..... 74

# LIST OF FIGURES

**FIGURE** **Page**


2.1 Lactic acid isomers. ..... 5

2.2 Diagram of the commercial uses and applications of lactic acid ..... 6

2.3 Catabolic pathways in lactic acid bacteria ..... 8

2.4 *L. salivarius*, rod-shaped bacteria ..... 9

2.5 Basic methods of cell immobilization ..... 14

2.6 Structure of chitin and chitosan ..... 16

2.7 Typical growth curve for bacteria ..... 18

2.8 Kinetic patterns of growth and product formation in batch Fermentations: a) growth-associated, b) mixed-growth-associated, and c) nongrowth-associated ..... 21

2.9 Schematic representation of a biofilm ..... 23

4.1 Growth curve of Lactobacillus salivarius ATCC 11741 at initial glucose concentration 50 g $L^{-1}$ ..... 46

4.2 Glucose and L(+)lactic acid concentration profiles at various %$CaCO_3$ .. 47

4.3 Effect of initial glucose concentration on L(+)lactic acid production ..... 48

4.4 (a) Loofa sponge: outer fibre (left) and inner fibre (right) (b) Sugarcane bagasse: inner fibre (top) and outer fibre (bottom) (c) Tamarind fruit fibre, and (d) Coconut fibre ..... 50

4.5 Cell immobilization on untreated loofa sponge (a) x1,500 and (b) x5,000 ..... 51

4.6 Cell immobilization on untreated sugarcane bagasse (a) x1,500 and (b) x5,000 ..... 52

4.7 Cell immobilization on untreated coconut fibre (a) x1,500 and (b) x5,000 ..... 52

4.8 Inner loofa sponge fibre (a) untreated, (b) 0.25% $H_2O_2$, (c) 0.5% $H_2O_2$, (d) 1.0% $H_2O_2$, and (e) 2.5% $H_2O_2$ ..... 54

4.9 Outer loofa sponge fibre (a) untreated, (b) 0.25% $H_2O_2$, (c) 0.5% $H_2O_2$, (d) 1.0% $H_2O_2$, and (e) 2.5% $H_2O_2$ ..... 55

**FIGURE** **Page**

4.10 Inner loofa sponge fibre (a) untreated, (b) 0.25% $H_2O_2$-treated at 20 minutes, (c) 0.25% $H_2O_2$-treated at 40 minutes, and (d) 0.25% $H_2O_2$-treated at 60 minutes ..... 56

4.11 Outer loofa sponge fibre (a) untreated, (b) 0.25% $H_2O_2$-treated at 20 minutes, (c) 0.25% $H_2O_2$-treated at 40 minutes, and (d) 0.25% $H_2O_2$-treated at 60 minutes ..... 57

4.12 Immobilized cells on (a) untreated loofa sponge and (b) $H_2O_2$-treated loofa sponge ..... 58

4.13 Glucose concentration profile of cell-immobilized loofa sponge for all cycles ..... 60

4.14 L(+)lactic acid concentration profile of cell-immobilized loofa sponge for all cycles ..... 61

4.15 Total Yp/s of cell-immobilized loofa sponge for all cycles (1 cycle = 24 hours) ..... 62

4.16 Productivity of cell-immobilized loofa sponge for all cycles (1 cycle = 24 hours) ..... 62

4.17 Cell-immobilized loofa sponge (a) L1 after main batch, (b) L2, (c) L3, (d) L4, and (e) L5 after repeated batch 5 ..... 63

4.18 Glucose concentration profile of cell-immobilized sugarcane bagasse for all cycles ..... 65

4.19 L(+)lactic acid concentration profile of cell-immobilized sugarcane bagasse for all cycles ..... 66

4.20 Total Yp/s of cell-immobilized sugarcane bagasse for all cycles (1 cycle = 24 hours) ..... 67

4.21 Productivity of cell-immobilized sugarcane bagasse for all cycles (1 cycle = 24 hours) ..... 67

4.22 Cell-immobilized sugarcane bagasse (a) B1 after main batch, (b) B2, (c) B3, (d) B4, and (e) B5 after repeated batch 4 ..... 68

4.23 L(+)lactic acid production of various fermentation conditions With initial glucose concentration at 50 g $L^{-1}$ ..... 70

4.24 Cells adhered on $CaCO_3$ ..... 71