ยุบล พิกุลเงิน : ศักยภาพของแบคทีเรียกรดแล็กติกในการผลิตกรดแอล-แล็กติกจากแป้งมันสำปะหลัง (POTENTIALITY OF LACTIC ACID BACTERIA FOR L-LACTIC ACID PRODUCTION FROM STARCH) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง, 190 หน้า.

กรดแอล-แล็กติกเป็นสารเคมีที่ละลายน้ำได้ดีและใช้ประโยชน์ทั้งในอุตสาหกรรมอาหาร เครื่องดื่ม เครื่องสำอาง และยา รวมถึงการผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพซึ่งต้องการกรดแอล-แล็กติกความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงมากกว่าร้อยละ 99 จึงเป็นกรดชนิดที่มีความต้องการสูงในปัจจุบัน แต่การผลิตกรดแอล-แล็กติกที่คุ้มทุนยังคงอาศัยกระบวนการทางชีวภาพที่ใช้น้ำตาลกลูโคสเป็นวัตถุดิบหลัก การใช้แป้งซึ่งมีราคาถูกกว่าน้ำตาลเป็นวัตถุดิบสามารถช่วยลดต้นทุนการผลิตได้ แต่ต้องค้นหาจุลินทรีย์ที่มีศักยภาพในการใช้แป้งและผลิตกรดได้ด้วย การศึกษานี้จึงเน้นการคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกที่สามารถผลิตกรดแอล-แล็กติกได้โดยตรงจากแป้งมันสำปะหลัง และศึกษาสภาวะที่เหมาะสมในการผลิตกรดแอล-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงจากอาหารแป้งมันสำปะหลัง จากการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดแอล-แล็กติกของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกได้จากแหล่งที่พบเชื้อตามธรรมชาติจำนวน 280 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 128 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตกรดแล็กติกได้ในความเข้มข้นช่วง 0.91-8.60 กรัมต่อลิตร ที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดแอล-แล็กติกมากกว่าร้อยละ 95 เมื่อเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลกลูโคสร้อยละ 2 แบคทีเรียเหล่านี้ไม่สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์จากกระบวนการหมัก จึงได้เลือกแบคทีเรีย 2 ไอโซเลท (CAR134 และ SUT513) ที่ผลิตกรดแอล-แล็กติกได้สูงเท่ากับ 7.89 และ 8.60 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และสามารถย่อยแป้งมันสำปะหลังได้ เมื่อศึกษาเพื่อระบุชนิดของแบคทีเรียด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rDNA พบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท จัดอยู่ในสกุล *Streptococcus* ที่ต่างสายพันธุ์กัน ซึ่งเมื่อศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดแอล-แล็กติกจากแป้งมันสำปะหลัง พบว่าส่วนประกอบหลักของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดของไอโซเลท CAR134 และ SUT513ประกอบด้วยแป้งมันสำปะหลัง 30 และ 30 กรัมต่อลิตร ยีสต์แห้งเหลือจากอุตสาหกรรมการผลิตเบียร์ 3.0 และ 5.0 กรัมต่อลิตร และทริปโตน 4.0 และ 2.5 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ ที่ค่าความเป็นกรด-ด่างเริ่มต้นของอาหารเลี้ยงเชื้อเท่ากับ 7.0 เมื่อทดลองผลิตกรดแอล-แล็กติกในถังหมักที่บรรจุอาหารปริมาตร 5 ลิตร ควบคุมสภาวะให้เหมาะสมต่อการเจริญที่ 35 องศาเซลเซียส แบคทีเรียไอโซเลท CAR134 และ SUT513 สามารถผลิตกรดแอล-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงมากกว่าร้อยละ 99 ได้ความเข้มข้นสูงสุดที่ 32.70 และ 38.90 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 38 และ 28 ชั่วโมง ตามลำดับ คิดเป็น

ผลผลิตกรดแอล-แล็กติก ร้อยละ 92.15 และ 99.74 อัตราการผลิตกรดแล็กติกสูงสุดเท่ากับ 1.41 และ 1.61 กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดเท่ากับ 0.27 และ 0.51 ต่อชั่วโมง ตามลำดับ กรดแอล-แล็กติกในน้ำหมัก (อาหารแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการเลี้ยงเชื้อ) สามารถทำบริสุทธิ์ได้ง่ายด้วยการตกผลึกด้วยการเติมเกลือแคลเซียมคลอไรด์ และได้ความเข้มข้นของกรดบริสุทธิ์ที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงร้อยละ 100 เท่ากับ 57.0 และ 64.2 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ กรดแอล-แล็กติกความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงที่ผลิตได้นี้เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการใช้เพื่อผลิตพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพ

สาขาวิชาจุลชีววิทยา
ปีการศึกษา 2553

ลายมือชื่อนักศึกษา ชุบล ฟักุลเงิน
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

YUBON PIKUL-NGOEN : POTENTIALITY OF LACTIC ACID BACTERIA FOR L-LACTIC ACID PRODUCTION FROM TAPIOCA STARCH. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUREELAK RODTONG, Ph.D. 190 PP.

LACTIC ACID BACTERIA/L-LACTIC ACID/TAPIOCA STARCH/BIOPOLYMER

L-Lactic acid is a water soluble chemical widely used in food, beverage, cosmetic, and pharmaceutical industries. The high optical purity (>99%) of the acid is also desired for biodegradable plastics production. Thus, the high demand of L-lactic acid is currently faced but the economical production of the acid is still relied on bioconversion of sugars, particularly glucose. Starchy materials, low-cost substrates compared to sugars, are an alternative raw material but the suitable microorganism capable of both utilizing starch and producing L-lactic acid has to be applied. This study emphasized on screening of potential lactic acid bacteria for producing L-lactic acid with high optical purity from tapioca starch and optimizing the acid production conditions. A total of 280 lactic acid strains isolated from their natural habitats were tested for L-lactic acid production using liquid medium containing 2% glucose. One hundred and twenty-eight were found to producing lactic acid at concentrations in the range of 0.91-8.60 g/l with >95% optical purity of L-lactic acid. These bacteria were homofermentative. Two starch-utilizing isolates (CAR134 and SUT513) producing L-lactic acid at concentrations of 7.89 and 8.60 g/l respectively, were then selected for the acid production from tapioca starch. The two strains were identified as belonging to different strains of the genus *Streptococcus* according to their morphological and

physiological characteristics, and 16S rRNA gene sequence. For optimization of its growth and lactic acid production conditions, the suitable media for both growth and L-lactic acid production of isolates CAR134 and SUT513 were found to composed of main ingredients as follows: 30 and 30 g/l (dry weight) of tapioca starch, 3.0 and 5.0 g/l of spent brewer's yeast, and 4.0 and 2.5 g/l of tryptone, respectively, at the initial pH of 7.0. When lactic acid fermentation was performed in a bioreactor containing 5 l of the optimized media under optimal temperature at 35°C, the strains CAR134 and SUT513 could produce the maximum L-lactic acid concentrations of 32.70 and 38.90 g/l with >99% optical purity after cultivation for 38 and 28 h, respectively. The two strains (CAR134 and SUT513) could produce L-lactic acid yield ($Y_{LA/S}$) of 92.15 and 99.64% with productivity of 1.41 and 1.61 g/l.h, and specific growth rates (μ_{max}) of 0.27 and 0.51 h^{-1}, respectively. The acid product could be simply purified from the inexpensive optimized tapioca starch media by crystallization using calcium chloride, which resulted in purified L-lactic acid (100% optical purity) of 57.0 and 64.2 g/l for isolates CAR134 and SUT513 respectively. L-Lactic acid with high optical purity is very useful for the production of biodegradable plastics.

School of Microbiology

Academic Year 2010

Student's Signature Yuban Pikul-ngoen

Advisor's Signature Sureelak Rodtong