ไพลิน บุญทาวัน : การพัฒนากระบวนการผลิตกรดแล็คติคจากมันสำปะหลังโดยแบคทีเรียกรด แล็คติค (DEVELOPMENT OF LACTIC ACID PRODUCTION PROCESS FROM CASSAVA BY USING LACTIC ACID BACTERIA) อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุนทร กาญจนทวี, 204 หน้า.

งานวิจัยนี้ได้ดำเนินการศึกษาการคัดแยกและการระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแล็คติค จากกากของเสียจากการหมักมันสำปะหลังในประเทศไทย การศึกษาลักษณะทางฟีโนไทป์และจีโนไทป์ของประชากรแบคทีเรียกรดแล็คติค มีการใช้ลำดับยีน 16S rDNA เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ที่คัดแยกพร้อมกับทำการระบุชนิดได้ คือ *Pediococcus pentosaceus* ถูกเลือกมาใช้เป็นหัวเชื้อในกระบวนการหมักในขั้นตอนต่อไป เชื้อสายพันธุ์นี้มีความสามารถในการผลิตกรดแล็คติคเป็นผลผลิตเพียงอย่างเดียว ที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดแล็คติคชนิด L ได้ สำหรับกระบวนการเพื่อที่จะลดต้นทุนแหล่งสารอาหารในกระบวนการหมักกรดแล็คติค เพื่อที่จะพัฒนาสารอาหารที่มีราคาถูกลง จึงมีการใช้แป้งมันสำปะหลังที่ทำการย่อยด้วยเอนไซม์สองชนิด คือ เอนไซม์อะไมเลส และกลูโคอะไมเลส เป็นสารอาหารที่เป็นแหล่งคาร์บอนหลัก ขณะที่ สารสกัดยีสต์ที่ได้จากยีสต์เหลือทิ้งจากโรงงานผลิตเบียร์ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจน สำหรับรูปแบบการหมักต่างๆ แบ่งออกเป็น กระบวนการหมักแบบกะ ที่มีและไม่มีการควบคุมค่าความเป็นกรด-ด่าง แบบกึ่งกะที่แบ่งออกเป็น การป้อนอาหารเป็นระยะๆ แบบกึ่งกะที่มีอัตราการป้อนอาหารคงที่ และแบบกึ่งกะที่มีการป้อนอาหารแบบเอกซ์โปเนนเชียล ตามลำดับ ผลการศึกษา พบว่า การหมักแบบกึ่งกะที่มีการป้อนอาหารแบบเอกซ์โปเนนเชียล โดยสามารถผลิตกรดแล็คติคได้ที่ความเข้มข้นสูงสุด 150 กรัมต่อลิตร ระยะเวลาดำเนินการ 72 ชั่วโมง โดยที่กระบวนการหมักดังกล่าวแสดงค่าผลผลิตที่สูงมากกว่า 0.9 (กรัมของผลผลิตต่อกรัมของซับสเตรต) จากการทดลองผลิตผลของกรดแล็คติคกระบวนการหมักแบบกึ่งกะ ที่มีการป้อนอาหารแบบเอกซ์โปเนนเชียล มีค่าสูงกว่าการป้อนอาหารเป็นระยะๆ แต่อย่างไรก็ตาม ค่าผลผลิตของการป้อนอาหารเป็นระยะๆ มีค่ามากกว่า ดังนั้นในการทดลองต่อไป จึงทำการแยกกรดแล็คติคออกจากกระบวนการหมักจึงเลือกการป้อนอาหารเป็นระยะๆ การแยกผลิตภัณฑ์กรด-L-แล็คติค หรือแล็คเตต นั้นมีการใช้เทคนิคอิเลคโตรดิไอออนไนเซชัน ที่มีการศึกษาค่าความเข้มข้นเริ่มต้นของแล็คเตตที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ จากการคำนวณทางคณิตศาสตร์ของการยับยั้งโดยผลิตภัณฑ์สามารถอธิบายได้ว่า แล็คเตตที่ค่าความเข้มข้นประมาณ 80 กรัมต่อลิตร มีผลโดยตรงต่อเซลล์ จึงทำให้เกิดการศึกษาทดลองกระบวนการแยกผลิตภัณฑ์ออกจากระบบเพื่อป้องกันการยับยั้งดังกล่าว ซึ่งระบบจะมีการควบคุมสภาวะต่างๆของระบบอิเลคโตรดิไอออนไนเซชัน และดำเนินการแยกแล็คเตตออกจากน้ำหมักในระหว่างการหมัก เพื่อลดความเข้มข้นของแล็คเตตในถังหมัก ทำให้ค่าอัตราการตายจำเพาะของเซลล์ มีค่าลดลงจาก 0.026 ต่อชั่วโมง เป็น 0.0054 ต่อชั่วโมง ค่าครึ่งชีวิตของเซลล์ดีขึ้น อีกทั้ง ความเข้มข้นสูงสุดของแล็คเตตที่ถูก

แยกออกมา ทำให้ในสารละลายมีค่า 185 กรัมต่อลิตร โดยมีค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดแล็คติคชนิด L มากกว่า 95 เปอร์เซ็นต์ ที่ได้จากการวิเคราะห์ด้วยคอลัมน์ไครัล จากผลการทดลองที่ได้นี้ แสดงให้เห็นว่า *Pediococcus pentosaceus* เป็นแบคทีเรียสายพันธุ์หนึ่งที่สามารถพัฒนาเพื่อนำไปสู่การผลิตกรดแล็คติคทางการค้า พบว่า สามารถผลิต และสามารถนำไปใช้ร่วมกับกระบวนการหมักที่มีประสิทธิภาพสูง เพื่อนำไปสู่การพัฒนาการ ทั้งนี้สรุปได้ว่าแป้งมันสำปะหลังที่ผ่านการย่อยแล้ว เสริมด้วยสารสกัดยีสต์จากโรงงานผลิตเบียร์ สามารถลดต้นทุนของสารอาหารได้ถึง 80 เปอร์เซ็นต์ และอาจใช้เป็นประโยชน์สำหรับกระบวนการผลิตกรดแล็คติคขนาดใหญ่ต่อไปได้

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม_____

PAILIN BOONTAWAN : DEVELOPMENT OF LACTIC ACID PRODUCTION PROCESS FROM CASSAVA BY USING LACTIC ACID BACTERIA. THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUNTHORN KANCHANATAWEE, Ph.D. 204 PP.

L-(+)-LACTIC ACID/ LACTIC ACID BACTERIA/ PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION/ CASSAVA STARCH/ SPENT BREWER'S YEAST EXTRACT/ FERMENTATION PROCESSES/ ELECTRODEIONIZATION

Isolation and identification of lactic acid bacteria from fermented cassava waste in Thailand were performed in this work. The phenotypic and genotypic characterizations using 16S rDNA gene sequences on lactic acid bacteria population were investigated. The most efficient strain identified was *Pediococcus pentosaceus*, and it was used as the starter culture in subsequent fermentation processes. The strain showed homo-fermentative characteristic with high optically pure L-(+)-lactic acid. In order to develop cheaper nutrient sources, cassava starch was treated with α-amylase and gluco-amylase before being used as the main carbon source whereas spent brewer's yeast extract was used as a supplementary nitrogen source. Different fermentation modes were attempted, including the batches with non-controlled and controlled pH, intermittent fed-batch, constant feed rate fed-batch, and exponential fed-batch, respectively. The experimental result was obtained from exponential fed-batch system with the highest lactic acid concentration of approximately 150 g/L within 72 h of the operating time. The fermentation performance also exhibited a high production yields ($g_{product}/g_{substrate}$) of more than 0.90. The lactic acid productivity of exponential feeding showed a high value; however, the production yield of intermittent fed-batch was higher. As a result, this

feeding strategy was chosen for *in situ* lactic acid recovery process. Extractive fermentation of L-(+)-lactic acid (lactate) was carried out using the electrodeionization (EDI) technique. The effect of initial lactate concentrations on microbial growth was initially investigated. A mathematical simulation of the product inhibition was successfully illustrated. It was found that the critical lactate concentration at which the cell growth severely hampered was approximately 80 g/L. Various operating conditions were investigated to assess the EDI performance. The system was subsequently applied for *in situ* removal of lactate from the fermentation broth. Specific deactivation constant (k_d) was substantially reduced from 0.026 h^{-1} to 0.0054 h^{-1} resulting in much improved half life of the biocatalyst. The highest lactate concentration in the receiving solution was obtained at 185 g/L. More than 95% optical purity of L-(+)-lactic acid was obtained using a chiral HPLC column. This finding revealed that *P. pentosaceus* was one of the most promising strain for commercial L-(+)-lactic acid production. In conclusion, hydrolyzed cassava starch supplemented with spent brewer's yeast extract can be effectively used to reduce the nutrients cost by 80%, and it might provide substrate for a large scale lactic acid production.

School of Microbiology

Academic Year 2010

Student's Signature _____

Advisor's Signature _____

Co-advisor's Signature _____