สุดารัตน์ พราหมณ์แก้ว : การคัดเลือกแบคทีเรียกรดแล็กติกเพื่อการผลิตกรดดี-แล็กติกจากแป้งมันสำปะหลัง (SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA FOR D-LACTIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH)
อาจารย์ที่ปรึกษา : ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรีลักษณ์ รอดทอง, 185 หน้า.

กรดดี-แล็กติกเป็นมอนอเมอร์ที่มีความสำคัญในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ เนื่องจากใช้เพื่อผลิตพอลิดี-แล็กติกแอสิด เพื่อเป็นส่วนผสมในการปรับปรุงความเสถียรต่อความร้อนของพอลิแอล-แล็กติกแอสิด ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักของพลาสติกย่อยสลายได้ทางชีวภาพประเภทหนึ่ง การศึกษาครั้งนี้เพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่มีศักยภาพในการผลิตกรดดี-แล็กติกจากแป้งมันสำปะหลังซึ่งเป็นวัตถุดิบราคาถูก จากการทดสอบความสามารถในการผลิตกรดดี-แล็กติกของแบคทีเรียกรดแล็กติกที่แยกจากแหล่งธรรมชาติจำนวน 306 ไอโซเลท พบว่ามีจำนวน 121 ไอโซเลท ที่สามารถผลิตกรดแล็กติกในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีน้ำตาลกลูโคสปริมาณ 20 กรัมต่อลิตร เป็นแหล่งคาร์บอนที่ให้ค่าสภาพกรดทั้งหมดของอาหารภายหลังการเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในช่วงร้อยละ 0.053 ถึง 1.77 แบคทีเรียที่พบว่าสามารถผลิตกรดดี-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดมากกว่าร้อยละ 90 มีจำนวน 7 ไอโซเลท (รหัสไอโซเลท WR73 CWMC2-5 CWMC1-3 CWMR1-5 CWR2-16 LF1 และ PSMS1-5) ซึ่งผลิตกรดดี-แล็กติกได้ในปริมาณสูงเท่ากับ 2.00 17.94 15.88 15.84 15.16 10.42 และ 10.16 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ และมีเพียงไอโซเลท WR73 ที่สามารถใช้แป้งมันสำปะหลังเป็นแหล่งคาร์บอนสำหรับผลิตกรดดี-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดมากกว่าร้อยละ 99 ได้ ซึ่งเมื่อระบุชนิดของแบคทีเรียกรดแล็กติกไอโซเลท WR73 ด้วยลักษณะทางสัณฐานและสรีรวิทยาพบว่ามีความเหมือนกับ *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* ร้อยละ 97.1 และมีความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ของ 16S rRNA gene (1450 คู่เบส) ร้อยละ 77 เท่ากันเมื่อเทียบกับ *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074^{T} *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001^{T} *Carnobacterium* sp. MARL 15 และ *Carnobacterium pleistocenium* FTR 1 จากฐานข้อมูล GenBank สหรัฐอเมริกา จึงสามารถระบุได้เพียงว่าไอโซเลท WR73 เป็นแบคทีเรียในสกุล *Lactobacillus* และได้เลือกแบคทีเรียไอโซเลทนี้มาศึกษาสภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตกรดแล็กติก พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมต่อการผลิตกรดประกอบด้วยส่วนผสมหลักคือ แป้งมันสำปะหลัง ทริปโตน และกากยีสต์ที่เหลือจากการหมักเบียร์ที่ความเข้มข้น 30.0 3.0 และ 3.0 กรัมต่อลิตร ตามลำดับ มีค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเริ่มต้นเท่ากับ 7.0 และที่อุณหภูมิ 35 องศาเซลเซียส จากนั้นได้ทดลองผลิตกรดดี-แล็กติกในถังหมักที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อตามส่วนประกอบที่เหมาะสมจากการศึกษา ปริมาตร 5.0 ลิตร ภายใต้

สภาวะการเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม พบผลผลิตกรดดี-แล็กติกปริมาณสูงสุด 19.75 กรัมต่อลิตร เมื่อเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 48 ชั่วโมง อัตราการเจริญจำเพาะสูงสุดของแบคทีเรียมีค่าเท่ากับ 0.93 ต่อชั่วโมง กรดดี-แล็กติกที่ผลิตได้นี้ สามารถสกัดแยกจากอาหารเลี้ยงเชื้อแป้งมันสำปะหลังราคาถูกนี้ได้ง่าย ด้วยกรรมวิธีการตกผลึกให้ได้เกลือของแมกนีเซียม ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้เป็นแนวทางสำคัญในการผลิตกรดดี-แล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดมากกว่าร้อยละ 99 ซึ่งเป็นที่ต้องการสำหรับการผลิตพอลิดี-แล็กติกแอสิด ด้วยกรรมวิธีการผลิตกรดที่มีต้นทุนต่ำ

สาขาวิชาจุลชีววิทยา ลายมือชื่อนักศึกษา_____

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา_____

SUDARAT PRAMKAEW : SELECTION OF LACTIC ACID BACTERIA FOR D-LACTIC ACID PRODUCTION FROM CASSAVA STARCH.
THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUREELAK RODTONG, Ph.D. 185 PP.

D-LACTIC ACID PRODUCTION/LACTIC ACID BACTERIA/CASSAVA STARCH

D-Lactic acid is one of desirable monomers to be used for the production of poly(D-lactic acid), PDLA, in bioplastics industry. PDLA is useful for improving thermostability of poly(L-lactic acid), PLLA, which is the main component of poly(lactic acid), PLA, biodegradable plastics. In this study, three hundred and six isolates of lactic acid bacteria were screened for their capability to produce D-lactic acid. These bacteria were isolated from their natural habitats. One hundred and twenty one from the total of 306 isolates could produce lactic acid from glucose at total acidity ranging from 0.053-1.77%. Only seven isolates, codes WR73, CWMC2-5, CWMC1-3, CWMR1-5, CWR2-16, LF1, and PSMS1-5, were able to produce D-lactic acid with optical purity >90% at high concentrations of 2.00, 17.94, 15.88, 15.84, 15.16, 10.42, and 10.16 g/l, respectively. And only one isolate, WR73, could utilize a cheap raw material, cassava starch, and produce optically pure D-lactic acid. The isolate was identified as belonging to the genus *Lactobacillus* according to its morphological and physiological characteristics which had 97.1% identity to *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii*. Also its 16S rRNA gene sequence (1450 bp) had 77% homology compared to either *Lactobacillus delbrueckii* DSM 20074^{T}, *Lactobacillus coryniformis* DSM 20001^{T}, *Carnobacterium* sp. MARL 15 or

Carnobacterium pleistocenium FTR 1 from GenBank database, U.S.A. Isolate WR73 was then selected for optimization of its growth and lactic acid production conditions. The suitable medium for both growth and lactic acid production was found to composed of cassava starch, tryptone, and spent of brewery yeast sludge at concentrations of 30.0, 3.0, and 3.0 g/l, respectively, as main ingredients. Optimum pH and temperature were at 7.0 and 35°C. The isolate was tested for its D-lactic acid production from cassava starch using 5.0 l of the optimized medium in a controlled fermenter under optimum conditions. At 48 h of cultivation, the maximum D-lactic acid yield of 19.75 g/l ($Y_{LA/S}$, of 66.51%) with >99% optical purity were achieved. The strain had its specific growth rate (μ_{max}) of 0.93 h^{-1}. The acid product could be simply purified from the inexpensive optimized medium by crystallization as magnesium D-lactate. Data from this study are useful for optically pure D-lactic acid production from low-cost substrate, which is necessary for biopolymer production.

School of Microbiology Student's Signature_____

Academic Year 2010 Advisor's Signature_____