การผลิตกรดแล็กติกของแบคทีเรียเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพ

Bacterial Lactic Acid Production for Bioplastic Industry

วาสนา โตเลี้ยง[1]* ณัฏฐา ทองจุล[1] และ สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์[2]

Vasana Tolieng[1]* Nuttha Thongchul[1] and Somboon Tanasupawat[2]

[1]*สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

[2]*ภาควิชาชีวเคมีและจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*

[1]*Institute of Biotechnology and Genetic Engineering, Chulalongkorn University*

[2]*Department of Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University*

Received : 15 May 2017

Accepted : 13 December 2017

Published online : 5 January 2018

บทคัดย่อ

ความตื่นตัวต่อผลกระทบด้านสิ่งแวดล้อมและเศรษฐกิจได้สร้างกลไกการนำพลาสติกย่อยสลายได้มาใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมี พอลิแล็กติกแอซิด หรือ PLA สังเคราะห์จากกระบวนการพอลิเมอไรเซชั่นของกรดแล็กติกเป็นพลาสติกย่อยสลายได้ทางธรรมชาติที่มีความเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม พอลิแล็กติกแอซิดสามารถนำไปประยุกต์ใช้งานได้หลากหลายด้าน ได้แก่ บรรจุภัณฑ์ การแพทย์ การเกษตร การขนส่ง การก่อสร้าง และอิเล็กทรอนิกส์ จากที่กล่าวมาข้างต้น จะเห็นได้ว่าการนำพอลิแล็กติกแอซิดมาใช้ในอุตสาหกรรมพลาสติกทำให้ความต้องการทางการตลาดของกรดแล็กติกเพิ่มขึ้น กรดแล็กติกผลิตได้จากกระบวนการทางเคมีหรือกระบวนการหมัก อย่างไรก็ดีกรดแล็กติกที่นำมาใช้ในการสังเคราะห์เป็นพอลิแล็กติกแอซิดจำเป็นต้องมีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง ดังนั้นจึงต้องมีการเลือกใช้สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีความสามารถจำเพาะดังกล่าว จากข้อมูลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ามีรายงานเกี่ยวกับสายพันธุ์ที่ใช้ในการผลิตกรดแล็กติกทั้งแอลและดีไอโซเมอร์ทั้งสายพันธุ์ที่คัดแยกได้จากธรรมชาติ และสายพันธุ์ที่ผ่านการดัดแปลงทางพันธุกรรม เช่น แบคทีเรียกรดแล็กติก (lactic acid bacteria : LAB) *Escherichia coli* และ *Corynebacterium glutamicum* พบว่า สายพันธุ์ของ *Bacillus* และ *Sporolactobacillus* มีอัตราการผลิตกรดแล็กติกและให้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง ในรายงานนี้คณะผู้เขียนได้รวบรวมข้อมูลสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการผลิตกรดแล็กติกเพื่อการนำไปใช้ในอุตสาหกรรม นอกจากนี้ ยังได้รายงานวิจัยการคัดแยกจุลินทรีย์ที่จำเพาะต่อการผลิตกรดแล็กติกรวมถึงวิธีการหมักที่มีประสิทธิภาพสูงไว้ด้วย

คำสำคัญ : กรดแล็กติก แบคทีเรียกรดแล็กติก พลาสติกชีวภาพ พอลิแล็กติกแอซิด

***Corresponding author. E-mail** : vasanato@hotmail.com

Abstract

The environmental and economic challenges have provoked the society to partially substitute the petrochemical-based polymers with the biodegradable ones. Polylactic acid (PLA), made from polymerization of lactic acid, is an eco-friendly biodegradable plastic. PLA has potential for use in a wide range of applications. Those include packaging, medical, agriculture, transportation, building, and electronics. As aforementioned, the substituting PLA in the plastic industry has generated the market demand for lactic acid, the PLA building block. Lactic acid can be produced either by chemical synthesis or microbial fermentation. Nonetheless, an optical purity of lactic acid is mandatory in PLA synthesis; therefore, microbial fermentation with the certain strains is considered suitably. Many wild-type and engineered microbes that were capable of producing lactic acid both D- and L-isomers have long been reported in many literatures. Those, for example, include lactic acid bacteria (LAB), *Escherichia coli*, and *Corynebacterium glutamicum*. Among those, *Bacillus* and *Sporolactobacillus* showed the great potential to produce lactic acid with high production rate and optical purity. Herein, we summarized the list of lactic acid producing microbes that showed the industrial potential. Also, the screening and selection of the industrial strains and the fermentation methods that provided the improved lactic acid production performance were addressed.

Keywords : lactic acid, lactic acid bacteria, bioplastic, polylactic acid

บทนำ

พลาสติกได้ตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคทั้งด้านราคาและคุณภาพมายาวนาน ขยะพลาสติกใช้แล้วเป็นปัญหาที่หลายประเทศกำลังเผชิญอยู่จากการย่อยสลายได้ช้า วิธีกำจัดโดยการเผาปล่อยก๊าซพิษและก๊าซเรือนกระจก หรือ GHG (Green House Gas) สู่บรรยากาศก่อให้เกิดโรคภัยไข้เจ็บและเพิ่มมลภาวะโลกร้อน การคัดแยกขยะและการรณรงค์ลดการใช้ถุงพลาสติกเป็นเพียงมาตรการหนึ่งที่ช่วยลดปัญหาดังกล่าว พลาสติกชีวภาพหรือ Bioplastic ผลิตได้จากชีวมวล (biomass) หรือ วัตถุดิบทางการเกษตรที่สามารถปลูกทดแทนใหม่ (renewable resources) กระบวนการผลิตโดยวิธีทางชีวภาพใช้พลังงานและปลดปล่อยความร้อนออกสู่สิ่งแวดล้อมน้อยกว่าวิธีทางเคมี ย่อยสลายด้วยจุลินทรีย์ในสภาวะเหมาะสมได้น้ำ คาร์บอนไดออกไซด์ และอินทรียวัตถุกลับคืนสู่ธรรมชาติจึงเป็นความหวังที่จะช่วยลดปัญหาสิ่งแวดล้อมและเป็นแรงผลักดันให้ภาครัฐและเอกชนหันมาสนใจร่วมมือใช้พลาสติกชีวภาพเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งสินค้ากลุ่มบรรจุภัณฑ์ชนิดถุง หลอดดูด ภาชนะบรรจุอาหารและเครื่องดื่มที่ถูกใช้ปริมาณมากและมีอายุการใช้งานสั้นใช้ครั้งเดียวทิ้ง (disposable packaging) ประเทศในกลุ่มยุโรปและอเมริกาให้ความสำคัญทั้งด้านนโยบายการวิจัยพัฒนาอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพเพื่อทดแทนการใช้พลาสติกจากปิโตรเคมีซึ่งนับวันจะลดลงและก่อปัญหามลภาวะ สำหรับประเทศไทยคณะรัฐมนตรีได้เห็นชอบแผนที่นำทางการพัฒนาอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพแห่งชาติระยะที่ 1 (2553-2555) และระยะที่ 2 (2555-2559)

เสนอโดยสำนักงานนวัตกรรมแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อกำหนดทิศทางในการพัฒนาและส่งเสริมให้ประเทศไทยเป็นศูนย์กลางอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพในอนาคต จากความได้เปรียบในด้านวัตถุดิบชีวมวลและผลผลิตทางการเกษตรที่มีความอุดมสมบูรณ์ให้สามารถสร้างมูลค่าและเพิ่มขีดความสามารถของประเทศในการแข่งขันด้านผลิตภัณฑ์ที่เป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม (NIA, 2553) พอลิแล็กติกแอซิด (Polylactic acid: PLA) เป็นพลาสติกชีวภาพที่ผลิตใช้มากที่สุดในปัจจุบัน (Saini *et.al*., 2016) ผลิตได้จากการพอลิเมอไรเซชั่น (polymerization) ของกรดแล็กติก (lactic acid) กรดแล็กติกที่ผลิตโดยวิธีทางเคมีจะอยู่ในรูปไอโซเมอร์ผสม(racemic) ส่วนวิธีทางชีวภาพสามารถเลือกผลิตกรดแอลหรือดีแล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสง (optical purity) สูงได้เมื่อใช้จุลินทรีย์ที่เหมาะสม (Martinez *et al.,* 2013) ความบริสุทธิ์เชิงแสงของกรดแล็กติกที่ใช้เป็นมอนอเมอร์ (lactic acid monomer) มีผลต่อการเรียงตัวเชิงโครงสร้างผลึก (stereocomplex) และอุณหภูมิในการหลอมผลึก (melting temperature, Tm) ส่งผลโดยตรงต่อการขึ้นรูปและคุณสมบัติของพลาสติก (Södergård & Stolt, 2002) พอลิแล็กติกแอซิดเป็นพลาสติกชีวภาพที่ใช้ประโยชน์ได้หลากหลายทางการแพทย์ บรรจุภัณฑ์ การเกษตร การขนส่ง การก่อสร้าง อิเล็กทรอนิกส์ และอุตสาหกรรมต่างๆ ด้วยกระแสอนุรักษ์ธรรมชาติและความตระหนักต่อปัญหาสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะปัญหาภาวะโลกร้อนที่ทั่วโลกกำลังเผชิญร่วมกันส่งผลให้พลาสติกชีวภาพกลายเป็นวัสดุแห่งอนาคตมีแนวโน้มความต้องการขยายตัวอย่างต่อเนื่อง การผลักดันให้เกิดเทคโนโลยีพัฒนาองค์ความรู้การผลิตพอลิแล็กติกเป็นโอกาสของประเทศไทยให้ก้าวจากประเทศผู้ส่งออกวัตถุดิบตั้งต้นราคาถูกสู่การเป็นศูนย์กลางการผลิตพลาสติกชีวภาพในภูมิภาคตอบสนองความต้องการทั้งในประเทศและต่างประเทศ

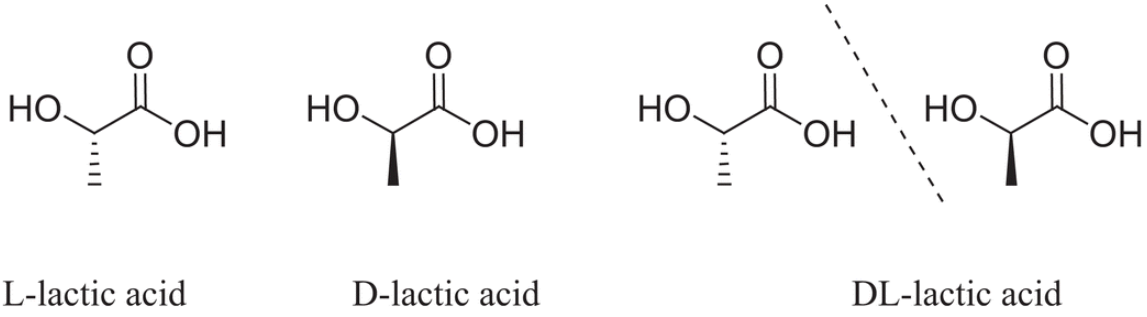
พอลิแล็กติกแอซิด

พอลิแล็กติกแอซิดเป็นพอลิเมอร์ชนิดสายโซ่ตรง (aliphatic polymer) ประเภทเทอร์โมพลาสติก (thermoplastic) คือจะอ่อนตัวและหลอมเหลวเมื่อได้รับความร้อน และจะแข็งตัวเมื่อทำให้เย็นลงจึงเหมาะสมสำหรับการขึ้นรูปเป็นผลิตภัณฑ์ต่างๆ สังเคราะห์ได้จากกรดแล็กติกโดยปฏิกริยาพอลิเมอไรเซชั่นแบบควบแน่นโดยตรง(direct polymerization) วิธีนี้มีต้นทุนต่ำแต่ได้พอลิแล็กติกแอซิดที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำและเปราะ หรือการพอลิเมอไรเซชั่นผ่านแลคไทส์โดยการเปิดวง (ring opening polymerization) โดยการสังเคราะห์ผ่านแลคไทด์ได้พอลิแลคไทด์ (polylactide) หรือนิยมเรียกกันว่าพอลิแล็กติกแอซิด การสังเคราะห์โดยวิธีนี้ได้พอลิเมอร์น้ำหนักโมเลกุลสูงส่งผลต่อคุณสมบัติของพอลิเมอร์ เช่น สมบัติเชิงกล ความแข็งแรงขณะหลอม ความหนืด สมบัติด้านการไหล อุณหภูมิในการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้ว (Tg) อุณหภูมิในการหลอมผลึก (Tm) เป็นต้น (Södergård & Stolt, 2002) จากการที่กรดแล็กติกประกอบด้วย 2 ไอโซเมอร์ จึงสามารถสังเคราะห์พอลิแล็กติกแอซิดได้ทั้งแบบโฮโมพอลิเมอร์ (homopolymer) คือพอลิแอลแล็กติกแอซิด (poly(L-lactic acid) : PLLA) พอลิดีแล็กติกแอซิด (poly(D-lactic acid) : PDLA) และพอลิเมอร์ผสมชนิดพอลิดีแอลแล็กติกแอซิด (poly(DL-lactic acid) : PDLLA) โดยสัดส่วนของกรดดีและแอลแล็กติกมอนอเมอร์ (monomer) ส่งผลต่อคุณสมบัติทางกายภาพ (physical properties) ของพอลิเมอร์เช่นกัน พอลิแอลแล็กติกแอซิดชนิดโฮโมพอลิเมอร์มีความเป็นผลึก (crystalline) สูง ทนต่อการเปลี่ยนสถานะหรือเสียรูปเมื่อโดน

ความร้อนได้ดี มีสมบัติด้านการซึมผ่านของก๊าซและไอน้ำ เปราะ ไม่ยืดหยุ่น มีคุณสมบัติทางกลคล้ายพอลิสไตรีน (polystyrene) สมบัติทางความร้อนเช่น อุณหภูมิในการเปลี่ยนสถานะคล้ายแก้วและอุณหภูมิในการหลอมผลึกที่ 60-70 และ 175-180 องศาเซลเซียสตามลำดับ พอลิแล็กติกแอซิดเริ่มใช้ในทางการแพทย์และเภสัชกรรมเช่นไหมละลาย (sutures) การปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ อุปกรณ์การแพทย์ หรือการนำส่งยา (drug delivery) เนื่องจากเข้ากันได้กับร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมและสลายได้ แต่ราคาสูงเป็นข้อจำกัดในการนำมาใช้ในบางวัตถุประสงค์ เมื่อมีการพัฒนาการผลิตกรดแล็กติกโดยกระบวนการหมักและการพอลิเมอร์ไรเซชั่นของกรดแล็กติกทำให้พอลิแลกติกแอซิดถูกใช้ทดแทนพลาสติกจากปิโตรเคมีมากขึ้น การปรับปรุงคุณสมบัติพอลิแล็กติกแอซิดโดยเติมสารเติมแต่ง (additive) การผสมกับพอลิเมอร์ชนิดอื่นหรือระหว่างพอลิแอลแล็กติกแอซิดกับพอลิดีแล็กติกแอซิดได้ผลิตภัณฑ์ที่ทนต่อความร้อน ลดความเปราะ มีความยืดหยุ่น ทนต่อแรงกระแทก และมีคุณสมบัติหลากหลายรองรับความต้องการใช้งานได้กว้างขึ้นโดยยังรักษาสมบัติการย่อยสลายได้ทางชีวภาพ (Jamshidian *et al*., 2010) ปัจจุบันมีการนำพอลิแล็กติกแอซิดไปใช้ในหลายด้าน เช่น บรรจุภัณฑ์สำหรับอาหารและเครื่องดื่ม เภสัชกรรม ผลิตภัณฑ์อุปโภคบริโภค (consumer products) เส้นใยในงานเสื้อผ้า การเกษตร การขนส่ง การก่อสร้าง และอิเล็กทรอนิกส์ เป็นต้นโดยได้รับการยอมรับจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกาว่าเป็นสารที่มีความปลอดภัย (Generally Recognized As Safe GRAS) ที่จะใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร (Jamshidian et al., 2010; Masutani & Kimura, 2014) ในปีพศ. 2541 บริษัทคาร์กิล (Cargill) ร่วมมือกับบริษัทดาวเคมิเคิล (Dow Chemical Co., Ltd) จัดตั้งบริษัทเนเจอร์เวอร์ก (NatureWorks® LLC) ผู้นำการผลิตพอลิแล็กติกแอซิดในตลาดโลกในปัจจุบันโดยมีกำลังผลิต 34,000 ตันต่อปี ต่อมาในปี 2545 โรงงานผลิตพอลิแล็กติกแอซิดกำลังผลิต 140,000 เมตริกตันต่อปีก็ได้ถูกสร้างขึ้นในสหรัฐอเมริกา และได้ขยายความร่วมมือระหว่างบริษัทคาร์กิลล์กับบริษัทเทยิน (Teijin) ในการผลิตพอลิเมอร์ชนิดนี้ไปยังประเทศญี่ปุ่น อุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิแล็กติกแอซิดได้ก้าวหน้าและมีความต้องการเพิ่มมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งเพื่อเป็นบรรจุภัณฑ์ คาดว่าในปี 2568 จะมีมูลค่าถึง 6.5 พันล้านเหรียญสหรัฐโดยระหว่างปี 2560-2568 อัตราการเติบโตเฉลี่ยต่อปี (CAGR) ร้อยละ 20.9 (Grand view research, 2017) ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรมมีวัตถุดิบทางการเกษตรหลากหลายและอุดมสมบูรณ์เช่น อ้อย น้ำตาล มันสำปะหลังเหมาะสำหรับเป็นฐานการผลิตในอุตสาหกรรมทางชีวภาพ ในปี 2548 บริษัทพูแรค (ประเทศไทย) จำกัด (Purac (Thailand) Co., Ltd) ได้เริ่มก่อตั้งโรงงานผลิตกรดแล็กติก และสารอนุพันธ์ของกรดแล็กติกขึ้นในจังหวัดระยอง เป็นโรงงานแห่งแรกในภูมิภาคเอเชียและแห่งที่ 5 ของโลกด้วยกำลังการผลิตกรดแอลแล็กติก และสารอนุพันธ์ของกรดแอลแล็กติกกว่า 100 และ 150 กิโลตันต่อปีตามลำดับ และได้วางแผนผลิตกรดดีแล็กติกเพิ่มขึ้นอีกด้วย กลุ่ม ปตท. โดยบริษัท พีทีที โกลบอลเคมิคอล (PTT Global Chemical : PTTGC) ร่วมลงทุนด้านพลาสติกชีวภาพกับบริษัทเนเจอร์เวิร์กในสหรัฐอเมริกาด้วยกำลังผลิตพอลิแลกติกปีละ 150 กิโลตันและกำลังพิจารณาจัดตั้ง และก่อสร้างโรงงานในประเทศไทย (Weerathaworn, 2013)

กรดแล็กติก

กรดแล็กติก มีชื่อทางเคมี 2-hydroxypropanoic acid มี 2 ไอโซเมอร์ คือ กรดแอลแล็กติก (L-lactic acid) และกรดดีแล็กติก (D-lactic acid) ซึ่งแตกต่างกันที่การวางตัวของหมู่ไฮดรอกซีตรงตำแหน่งของไครัลคาร์บอน ดังภาพที่ 1 กรดแล็กติกมีน้ำหนักโมเลกุล 90.08 เป็นสารที่คงทนทางชีวภาพและละลายน้ำได้ดี การผลิตโดยวิธีทางเคมีจะได้กรดแล็กติกในรูปไอโซเมอร์ผสม (racemic) ของแอลและดีแล็กติก ส่วนวิธีทางชีวภาพสามารถเลือกผลิตกรดแอลหรือดีแล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงได้เมื่อเลือกใช้จุลินทรีย์สายพันธุ์ที่เหมาะสม (Martinez *et al*., 2013) และวิเคราะห์ไอโซเมอร์ของกรดด้วยเอนไซม์แล็กเตทดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase) ต่างชนิดกัน ขณะนี้อาจจะกล่าวได้ว่าการผลิตกรดแล็กติกเกือบทั้งหมดใช้วิธีการหมักโดยจุลินทรีย์ได้กรดแล็กติกความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงเหมาะสมที่จะใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพชนิดพอลิแล็กติกแอซิด ก่อนที่จะมีการผลิตกรดแล็กติกปริมาณมากเพื่อรองรับอุตสาหกรรมการผลิตพลาสติกชีวภาพมีการใช้กรดชนิดนี้ในอุตสาหกรรมต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในอุตสาหกรรมอาหารและเภสัชกรรม ในธรรมชาติจะพบกรดแอลแล็กติกเป็นส่วนใหญ่หรือผสมระหว่างแอลและดีแล็กติก (racemic) ส่วนกรดดีแล็กติกพบในปริมาณน้อย ทั้งนี้ระบบเมแทบอลิซึมในร่างกายมนุษย์มีความจำเพาะต่อเฉพาะกรดแอลแล็กติกเท่านั้น กรดดีแล็กติกที่เกิดและดูดซึมเข้าสู่ร่างกายของมนุษย์หากไม่สามารถถูกกำจัดและตกค้างอยู่ภายในร่างกายในปริมาณมากอาจก่อให้เกิดอันตรายได้ (Martinez *et al*., 2013) ความต้องการกรดแล็กติกสูงขึ้นตามการเจริญเติบโตของอุตสาหกรรมการผลิตพอลิแล็กติกแอซิด คาดว่าในปี 2563 มูลค่าการตลาดของกรดแล็กติกจะสูงถึง 9.8 พันล้านเหรียญสหรัฐโดยระหว่างปี 2560-2568 มีอัตราการเติบโตเฉลี่ยร้อยละ 16.2 ต่อปี (Grand view research, 2017)



ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างของกรดแล็กติก (Masutani & Kimura, 2014)

แบคทีเรียที่ผลิตกรดแล็กติก

แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติก (lactic acid bacteria : LAB) ประกอบไปด้วยสกุล *Lactobacillus, Carnobacterium, Lactococcus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus, Aerococcus, Enterococcus, Oenococcus, Tetragenococcus, Vagococcus* และ *Weissell*a แต่ที่สำคัญคือสกุล *Lactobacillus* ซึ่งมีมากถึง 80 สปีชีส์ (species) พบได้ทั่วไปตามแหล่งธรรมชาติ เช่น ดิน เปลือกไม้ อาหารหมักดอง เครื่องในสัตว์ นม และร่างกายมนุษย์ แบคทีเรียกลุ่มนี้มีทั้ง

รูปแท่ง หรือกลม ย้อมติดสีแกรมบวก ไม่สร้างสปอร์ ไม่ผลิตคะตะเลส(catalase) ไม่มีระบบไซโตโครม (cytochrome) เจริญในสภาวะออกซิเจนต่ำ สามารถทนภาวะค่าความเป็นกรดด่างได้ดีแต่ช่วงที่เหมาะสม คือ 5.5-6.5 ส่วนใหญ่เจริญได้ที่อุณหภูมิไม่สูงทำให้อาจเกิดปัญหาในการปนเปื้อนได้ง่ายในระหว่างการหมัก ต้องการอาหารที่สมบูรณ์ รวมถึงวิตามิน กรดอะมิโน เปปไทด์ กรดนิวคลีอิก ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง เกิดปัญหาในขั้นตอนการแยกให้กรดแล็กติกบริสุทธิ์ แบคทีเรียกลุ่มนี้เช่น *Lactobacillus rhamnosus, L. lactis* และ *L. casei* ผลิตกรดแล็กติกความเข้มข้นสูงแต่มักผลิตเป็นกรดในรูปไอโซเมอร์ผสมไม่เหมาะที่จะใช้เป็นมอนอเมอร์สำหรับพลาสติกชีวภาพ (Dworkin *et al*., 2006) ส่วนใหญ่ใช้ในอาหารหมักและผลิตภัณฑ์นม เดิมมีรายงานว่าไม่สามารถใช้น้ำตาลเพนโทสเช่นไซโลส (xylose) และอะราบิโนส (arabinose) ในการผลิตกรดแล็กติก ต่อมาพบว่า *L. lactis, L. pentosus, L. brevis* สามารถใช้น้ำตาลไซโลสในการผลิตกรดแล็กติกได้ (Okano *et al*., 2010) แต่ยังให้ผลผลิตไม่สูง และ Abdel Rahman *et al*. (2011) คัดแยก *Enterococcus mundtii* QU25 จากมูลวัวซึ่งสามารถผลิตกรดแอลแล็กติกความเข้มข้นและมีคุณสมบัติเชิงแสงสูงถึง 99.99 % โดยใช้น้ำตาลจากเซลลูโลสิก (cellulosic) และไซโลส แต่ไม่เหมาะที่จะนำมาใช้ในการผลิตเนื่องจากต้องการอาหารที่สมบูรณ์ด้วยกรดอะมิโน วิตามินและให้ผลผลิตไม่สูงพอ นอกจากนี้แบคทีเรียสกุล *Bacillus* ได้แก่ *B. coagulans, B. stearothermophilus, B. licheniformis, B. subtilis*, *Bacillus* sp. และ *Sporolactobacillus* ได้แก่ *S. inulinus* , *S. laevolacticus* (Li *et al*., 2013; Thamacharoensuk *et al*., 2017; Wang *et al*., 2011) มีศักยภาพในการผลิตกรดแล็กติกในระดับอุตสาหกรรมเนื่องจากสามารถผลิตกรดแล็กติกความเข้มข้นและความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง บางสายพันธุ์สามารถเจริญได้ในอาหารที่มีค่าความเป็นกรดด่างสูงถึง 9.0 หรืออุณหภูมิสูงกว่า 50 องศาเซลเซียส (Ma *et al*., 2016; Meng *et al*., 2012) หรือใช้น้ำตาลเฮกโซสและเพนโทสจากวัตถุดิบชีวมวลพวกลิกโนเซลลูโลส (lignocellulosic biomass) ในการผลิตกรดแล็กติกได้อีกด้วย (Patel *et al*., 2006)

สำหรับ *Escherichia coli* เป็นจุลินทรีย์ที่สามารถใช้น้ำตาลเฮกโซส (hexose) และเพนโทส (pentose) ในการผลิตกรดอินทรีย์ทั้งแล็กติก อะซิติก (acetic) ซัคซินิก(succinic) ฟอร์มิก (formic) และเอทานอล (ethanol) ต้องการสารอาหารต่ำ มีรายงานการศึกษาการตัดต่อพันธุกรรม *E.coli* เพื่อผลิตกรดแอลและดีแล็กติกที่มีความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงจากแหล่งคาร์บอนชนิดต่างๆ พบว่าได้ความเข้มข้นของกรดแล็กติกและความทนต่อกรดต่ำกว่าแบคทีเรียกลุ่มอื่น (Wang *et al.,* 2012; Tian *et al.,* 2013; Zhao *et al*., 2013) ส่วน *Corynebacterium glutamicum* (Okino *et al.,* 2008) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็วในสภาวะที่มีอากาศ ผลิตกรดแล็กติกได้โดยใช้อาหารที่ไม่ซับซ้อนแต่ให้ผลผลิตต่ำและมีกรดอื่นเจือปน และมีรายงานการค้นพบแบคทีเรียสกุลใหม่คือ *Terrilactibacillus laevilacticus* ที่สามารถผลิตกรดดีแล็กติกแบบโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Prasirtsak *et al*., 2016) สายพันธุ์ที่คัดแยกได้มีศักยภาพสูงพอที่จะใช้ในการผลิตกรดดีแล็กติกเชิงพาณิชย์ในอนาคต

แบคทีเรียผลิตกรดแล็กติกสามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มตามการกระบวนการหมักน้ำตาลคือ โฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (homofermentative) และเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) แบคทีเรียกลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟเปลี่ยนกลูโคสหรือไซโลส 1 โมลเป็นกรดแล็กติก 2 โมลหรือ 1.67 โมลตามลำดับ โดยสังเคราะห์ผ่านวิถีไกลโคไลซิส (glycolysis pathway)หรือวิถี

เพนโทสฟอสเฟตไกลโคไลติก (pentosephosphate glycolytic) ได้พลังงานในรูปของ ATP 2 โมล ส่วนแบคทีเรียกลุ่มเฮเทอโรเฟอร์เมนเททีฟ (heterofermentative) เปลี่ยนกลูโคสหรือไซโลส 1 โมลเป็นกรดแล็กติก 1 โมลผ่านวิถีเพนโทสโมโนฟอสเฟต (pentosemonophosphate pathway) หรือฟอสโฟคีโตเลส (phosphoketolase pathway) ตามลำดับ ได้คาร์บอนไดออกไซด์ อะซิติก เอทานอลและพลังงานในรูปของ ATP 1 โมลเท่านั้นจึงทำให้อัตราการเจริญของแบคทีเรียกลุ่มนี้ต่ำกว่ากลุ่มโฮโมเฟอร์เมนเททีฟ (Abdel-Rahman *et al* ., 2011a)

การหมักกรดแอลแล็กติก

แบคทีเรียหลายสายพันธุ์โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มแบซิลลัสเช่น *B. coagulans* มีอัตราการผลิตกรดแอลแล็กติกและให้ค่าความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง ทนต่อค่าความเป็นกรดด่างและเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50-60 องศาเซลเซียส ช่วยลดความเสี่ยงในการปนเปื้อน (contamination) จากเชื้ออื่นในระหว่างการหมัก และสามารถหมักในระบบเปิด (open fermentation) โดยไม่ต้องอบฆ่าเชื้ออาหาร (medium sterilization) ลดค่าใช้จ่ายด้านเครื่องมือ พลังงาน แรงงาน และปัญหาอาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสีหรือคุณภาพจากปฏิกริยาเมลลาร์ด (Mailard reaction) (Qin *et al.,* 2009; Meng *et al*., 2012; Ouyang *et al*., 2013; Ma *et al*., 2014) ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง เพิ่มโอกาสแข่งขันกับวัสดุชนิดอื่น นอกจากชนิดของจุลินทรีย์การใช้วัตถุดิบราคาถูกเช่นรำข้าว เซลล์ยีสต์ กากถั่วเหลือง เกลือแอมโมเนียมเป็นแหล่งไนโตรเจนทดแทนการใช้สารสกัดจากยีสต์รวมทั้งน้ำตาลเพนโทสและเฮกโซสจากการย่อยวัสดุดิบชีวมวลพวกลิกโนเซลลูโลสิกโดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบที่ไม่ใช่อาหาร (non-food substrates) ซึ่งมีอยู่มากมายและไม่ถูกนำมาใช้ประโยชน์เป็นวัตถุดิบการผลิต (Ong *et al*., 2016; Poudel *et al.,* 2015; Wang *et al*., 2015) เป็นอีกช่องทางในการพัฒนาการผลิตกรดแอลแล็กติก สำหรับกระบวนการหมักกรดแล็กติกได้มีรายงานวิจัยการผลิตกรดแอลแล็กติกความเข้มข้นสูงในระบบแบช(Batch) และเฟดแบช (fed batch) จาก ซังข้าวโพด ชานอ้อย ต้นถั่ว (Ou *et al*., 2011; Meng *et al*., 2012; Ouyang *et al*., 2013; Peng *et al*., 2014; Wang *et al*., 2015) Litchfield, 2009 กล่าวไว้ว่า สายพันธุ์จุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตกรดแล็กติกควรผลิตกรดได้มากกว่า 100 กรัมต่อลิตรโดยมีคุณสมบัติเชิงแสงสูงกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ และสามารถเปลี่ยนน้ำตาลเป็นกรดใกล้เคียงกับทฤษฎีโดยใช้อาหารราคาถูก ตัวอย่างของจุลินทรีย์ที่มีคุณสมบัติดังกล่าวแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการผลิตกรดแอลแล็กติกคุณสมบัติเชิงแสงสูง

จุลินทรีย์	กรดแอล-แลติก (กรัมต่อลิตร)	ความบริสุทธิ์เชิงแสง (%)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	ผลิตภาพ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	อ้างอิง
Bacillus sp.2-6	182.0	99.4	0.97	3.03	Qin *et al.,* 2010
Bacillus sp.WL-S20	154.0	100.0	0.99	1.61	Meng *et al*., 2012
Bacillus sp. P38	125.0	100.0	0.98	3.79	Jiang *et al*., 2016
Bacillus sp P38	185.0	100.0	0.99	1.93	Peng *et al*., 2014
B. coagulans XZL4	134.0	99.0	0.96	2.50	Wang *et al*., 2013
B. coagulans WCP10-4	210.0	99.8	0.95	3.50	Zhou *et al*., 2013
B. coagulans C106	215.7	99.6	0.95	4.00	Ye *et al*., 2013
Enterococcus mundtii QU 25	132.0	100.0	0.85	6.99	Abdel Rahman *et al*., 2013
Exiguobacterium sp. 8-11-1	125.0	100.0	0.98	3.79	Jiang *et al*., 2013
L. paracasei subsp. *paracasei* CHB2121	192.0	96.6	0.96	3.99	Moon *et al*., 2012
B. subtilis MUR1	183.2	99.5	0.99	3.52	Gao *et al*., 2012

การหมักกรดดีแล็กติก

ในการผลิตพอลิเมอร์จากกรดแล็กติกเพื่อใช้เป็นพลาสติกชีวภาพพบว่าการผสมพอลิแอลแล็กติกกับพอลิดีแล็กติกมีผลต่อการเรียงตัวโครงสร้างผลึก (stereocomplex) ของพอลิแล็กติกได้พอลิแล็กติกที่มีคุณสมบัติทางกายภาพและความทนต่ออุณหภูมิ (thermal tolerance) สูงขึ้นกว่าการใช้พอลิเมอร์เดี่ยวโดยอุณหภูมิหลอมเหลวสูงขึ้นจาก 170-180 องศาเซลเซียสเป็น 230 องศาเซลเซียสซึ่งมีความสำคัญต่อคุณสมบัติของพลาสติก (Jamshidian *et al*., 2010) ทำให้ความต้องการกรดดีแล็กติกเพิ่มมากขึ้นและมีราคาแพง การศึกษาการผลิตกรดดีแล็กติกยังมีน้อยเมื่อเทียบกับแอลแล็กติก อย่างไรก็ตามมีรายงานว่าแบคทีเรียหลายสายพันธุ์สามารถผลิตดีแล็กติกทั้งสายพันธุ์ที่แยกจากธรรมชาติเช่น *B. laevolacticus*, *Sporolactobacillus* sp. และ *Lactobacillus* sp.เช่น *L.coryniformis, L. delbrueckii, L. bulgaricus, L. lactis, L. plantarum* (Singhvi *et al*., 2010; Zhao, *et al*., 2010) รวมทั้ง *S. cerevisiae, E. coli* และ *C. Glutamicum* (Okino *et al*., 2008) ที่ผ่านการตัดต่อพันธุกรรม สายพันธุ์ *Sporolactobacillus* เป็นจุลินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพและผลิตกรดดีแล็กติกคุณสมบัติเชิงแสงสูงดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แบคทีเรียที่มีศักยภาพสูงในการผลิตกรดดีแล็กติกคุณสมบัติเชิงแสงสูง

จุลินทรีย์	กรดดีแล็กติก (กรัมต่อลิตร)	ความบริสุทธิ์เชิงแสง (%)	ผลผลิต (กรัมต่อกรัมน้ำตาล)	ผลิตภาพ (กรัมต่อลิตรต่อชั่วโมง)	อ้างอิง
S. inulinus CASD	207.0	99.3	0.93	3.8	Wang *et al.,* 2011
S. inulinus Y2-8	120.0	99.1	-	1	Zheng *et al*., 2012
S. leavolacticus DSM442	144.4	99.3	0.96	4.13	Li *et al*., 2013
S. inulinus Y2-8	218.8	> 99.0	0.98	1.62	Zhao *et al.,* 2014
S. inulinus Y2-8	125.0	99	-	1.39	Sun *et al.,* 2015
	127.0	-	-	1.72	
Sporolactobacillus sp. YBS1-5	107.2	99.2	0.85	1.19	Bai *et al.,* 2016

ปัจจัยที่มีผลต่อการผลิตกรดแล็กติก

ในระหว่างการหมักกรดแล็กติกที่เกิดขึ้นจะทำให้ค่าความเป็นกรดด่างลดต่ำลงต่ำกว่า 4.5 กรดแล็กติกจะผ่านเซลล์เมมเบรนไปยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ (Pieterse *et al*., 2005) ดังนั้น จึงต้องเติมสารไปสะเทินกรดแล็กติกที่เกิดขึ้น (neutralization agent) เช่นแคลเซียมคาร์บอเนต แคลเซียมไฮดรอกไซด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ หรือแอมโมเนียน้ำ เพื่อควบคุมค่าความเป็นกรดด่างให้อยู่ระหว่าง 5.5-6.5 (Qin *et al*., 2010; Wang *et al*., 2017; Nakano *et al*., 2012) อุณหภูมิเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการผลิตกรดแล็กติก แบคทีเรียกรดแล็กติกเจริญที่อุณหภูมิ 28-45 องศาเซลเซียส เช่น *L. casei* และ *Sporolactobacillus* ผลิตกรดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ส่วน *Bacillus* เจริญและผลิตกรดแล็กติกที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส (Qin *et al*., 2010) การให้อากาศมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหมัก *Lactobacillus* จะผลิตกรดได้ดีในสภาวะที่ไม่มีอากาศ(anaerobic) (Dworkin *et al*., 2006) สำหรับ *Bacillus* สามารถเจริญเติบโตได้ทั้งในสภาวะที่มีอากาศ (aerobic) และไม่มีอากาศ แต่ถ้าให้อากาศในช่วงการผลิตจะส่งเสริมด้านการเจริญเติบโตผลผลิตกรดแล็กติกลดลง (Ohara & Yahata, 1996) Qin (2010) รายงานว่าในการผลิตกรดแล็กติกโดย *Bacillus* sp. 2-6 ในถังหมักขนาด 5 ลิตร ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียสในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการฆ่าเชื้อ การให้อากาศเพียงเล็กน้อย (0.5 ปริมาตรอากาศต่อปริมาตรอาหารต่อนาที) ได้ผลผลิตกรดแอลแล็กติกเพิ่มขึ้นเท่าตัวเมื่อเทียบกับการไม่ให้อากาศ การผลิตกรดแล็กติกในอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ใช้แป้ง น้ำตาล และแหล่งไนโตรเจนราคาแพง ราคาของวัตถุดิบคิดเป็นร้อยละ 70 ของค่าใช้จ่ายในการผลิตทั้งหมด (Yadav *et al*., 2011) งานวิจัยส่วนใหญ่ขณะนี้ได้มีความพยายามศึกษาผลิตกรดแล็กติกโดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชีวมวลพวกลิกโนเซลูลลูโลสิกเช่น ต้นถั่ว ต้นข้าวสาลี กากมัน ชานอ้อย ซังข้าวโพด รำข้าว กากเมล็ดฝ้ายเป็นแหล่งคาร์บอน (Bai *et al*., 2016; Jiang *et al*., 2016; Li *et al*., 2013; Yadav *et al*., 2011) และจากการที่จุลินทรีย์ผลิตกรดแล็กติกส่วนใหญ่ต้องการสารสกัดจากยีสต์ เปปโตน เป็นแหล่งไนโตรเจน กรดอะมิโน และวิตามินในการเจริญและผลิตกรดแล็กติกส่งผลต่อต้นทุนผลิต งานวิจัยใช้แหล่งไนโตรเจนอื่นๆเช่น น้ำแช่ข้าวโพด(corn steep liquor) เมล็ดฝ้ายและเกลืออนินทรีย์เช่น เกลือแอมโมเนียม (Hofvendahl & Hagerdal, 2000; Li *et al*., 2013) ทดแทนได้มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง นอกจากนี้กระบวนการหมักกรดแล็กติกสามารถผลิตได้ทั้งในการหมักแบบแบช เฟดแบช แบบต่อเนื่อง(continuous fermentations) การหมักแบบเปิดเพื่อผลิตกรดแล็กติกที่อุณหภูมิสูง 50-60 องศาเซลเซียสของ *B. coagulans* สามารถใช้เทคนิคการหมักโดยไม่มีการอบฆ่าเชื้ออาหาร(non-sterilized fermentation)(Jiang *et al*., 2013; Ma *et al*., 2014) ช่วยลดค่าใช้จ่ายด้านเครื่องมือ พลังงานและค่าแรง

สรุป

ประเทศต่างๆ ทั่วโลกได้ตระหนักถึงปัญหามลภาวะจากขยะพลาสติกที่นับวันจะทวีความรุนแรงได้ช่วยผลักดันให้มีการใช้พลาสติกชีวภาพเพิ่มมากขึ้นและได้รับการยอมรับจากผู้บริโภคอย่างกว้างขวาง ทำให้อุตสาหกรรมการผลิตกรดแล็กติกและพอลิแล็กติกแอซิดมีแนวโน้มขยายตัวอย่างต่อเนื่อง สำหรับประเทศไทยอุตสาหกรรมการผลิตพอลิแล็กติกแอซิดยังอยู่ในช่วงเริ่มต้น ด้วยความพร้อมทางด้านวัตถุดิบและเทคโนโลยีการขึ้นรูปรวมทั้งการที่ภาครัฐบาลได้กำหนดกลยุทธ์ต่างๆ เพื่อการสร้างความพร้อมในการพัฒนาอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพทั้งทางด้านวัตถุดิบ เทคโนโลยี อุตสาหกรรมและนวัตกรรมการผลิตเพื่อเพิ่มศักยภาพของประเทศไทยในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพตั้งแต่ต้นน้ำ กลางน้ำ และปลายน้ำ ราคาของพอลิ

แล็กติกแอซิดซึ่งเป็นพลาสติกชีวภาพที่เป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมยังสูงเมื่อเทียบกับพลาสติกจากปิโตรเคมี จากบทความนี้จะเห็นได้ว่างานวิจัยการหมักกรดแล็กติกเพื่ออุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์ผลิตกรดแอลหรือดีแล็กติกความเข้มข้นและความบริสุทธิ์เชิงแสงสูง สายพันธุ์ของ *Bacillus* และ *Sporolactobacillus* มีศักยภาพสูงในการผลิตกรดแอลแล็กติกและดีแล็กติก ตามลำดับ กลุ่มนักวิจัยได้คัดแยกและพบจุลินทรีย์ผลิตกรดแล็กติกอย่างต่อเนื่องได้แก่ *Terrilactibacillus laevilacticus* (Prasirtsak *et al*., 2016) แบคทีเรียสกุลใหม่แยกจากดิน แบคทีเรียสปีชีส์ใหม่ในสกุล *Sporolactobacillus* เช่น *S. shoreae*, *S. spathodeae* (Thamacharoensuk *et al*., 2017) และ *S. shoreicorticis* (Tolieng *et al*., 2017a) และ *B. coagulans* จากเปลือกไม้ (Tolieng *et al*., 2017b) สายพันธุ์ที่ได้สามารถผลิตกรดแอลหรือดีแล็กติกความเข้มข้นและความบริสุทธิ์เชิงแสงสูงและอยู่ระหว่างการศึกษาสภาวะที่เหมาะสมเพื่อพัฒนากระบวนการผลิตกรดแล็กติกและนำมาพัฒนากระบวนการผลิต และความต้องการสารอาหาร รวมทั้งการใช้เทคนิคในการทำกรดให้บริสุทธิ์ การวิจัยพัฒนาการผลิตกรดแล็กติกเพื่อเป็นสารตั้งต้นในอุตสาหกรรมพลาสติกชีวภาพนอกจากการคัดแยกสายพันธุ์เดิมหรือสายพันธุ์ใหม่ศักยภาพสูง ทนต่อสภาวะต่างๆได้ดี การใช้สารอาหารราคาถูกทดแทนการใช้สารสกัดจากยีสต์ซึ่งเป็นแหล่งกรดอะมิโนเปบไทด์และวิตามินที่จำเป็น (Abdel Rahman *et al*., 2011a; Wang *et al*., 2011) และวัสดุชีวมวลลิกโนเซลลูโลสิกโดยเฉพาะอย่างยิ่งวัตถุดิบที่ไม่ใช่อาหาร (Okano *et al*., 2010; Bai *et al*., 2016) รวมทั้งพัฒนาสายพันธุ์จุลินทรีย์ให้สามารถผลิตกรดที่อุณหภูมิสูงสำหรับใช้ในหมักแบบไม่ต้องผ่านการฆ่าเชื้อ และทนต่อสารยับยั้ง(inhibitor) ที่เกิดขึ้นจากการเตรียมน้ำตาลจากลิกโนเซลลูโลสิก (Sun *et al*., 2015) เพื่อลดต้นทุนด้านวัตถุดิบและปรับปรุงกระบวนการผลิตเป็นแนวทางการวิจัยที่ควรมีการศึกษาต่อไป องค์ความรู้จากงานวิจัยและพัฒนาเหล่านี้เป็นการเพิ่มโอกาสการก้าวเข้าสู่ประเทศผู้ผลิตกรดแล็กติกและพอลิแล็กติกด้วยเทคโนโลยีในประเทศต่อไปในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Zendo, T., Hanada, K., Shibata, K. & Sonomoto, K. (2011a). Efficient homofermentative l-(+)-lactic acid production from xylose by a novel lactic acid bacterium, *Enterococcus mundtii* QU 25. *Applied and Environmental Microbiology*, *77*, 1892–1895.

Abdel-Rahman, M.A., Tashiro, Y., Zendo, T., Shibata, K. & Sonomoto, K. (2011b).Isolation and characterisation of lactic acid bacterium for effective fermentation of cellobiose into optically pure homo L-(+)-lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, *89*, 1039-1049.

Abdel-Rahman, M. A., Tashiro, Y., Zendo, T., & Sonomoto, K. (2013). Improved lactic acid productivity by an open repeated batch fermentation system using *Enterococcus mundtii* QU 25. *RSC Advances*, *3*(22), 8437-8445.

Bai, Z., Gao, Z., Sun, J., Wu, B. and He, B. (2016). d-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* YBS1-5 with simultaneous utilization of cottonseed meal and corncob residue. *Bioresource Technology*, *207*, 346-352.

Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H. & Stackebrandt, E. (Eds.)(2006). *The prokaryotes : A Hand Book on the Biology of Bacteria*. vol. 4 (3rd ed.). New York: Springer.

Gao, T., Wong, Y., Ng, C. & Ho K. (2012). L-Lactic acid production by *Bacillus subtilis* MUR1. *Bioresource Technology*, *121*, 105–110.

Grand view research. (2017). *Lactic Acid Market & Polylactic Acid (PLA) Market, Industry Report 2025* Retrieved September 8, 2017, from http://www.grandviewresearch.com/industry-analysis/lactic-acid-and-poly-lactic-acid-market

Hofvendahl, K., & Hahn–Hägerdal, B. (2000). Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and microbial technology*, *26*(2), 87-107.

Jamshidian, M., Tehrany, E. A., Imran, M., Jacquot, M. & Desobry, S. (2010). Poly-Lactic Acid: production, applications, nanocomposites, and release studies. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 9*, 552-571.

Jiang, T., Qiao, H., Zheng, Z., Chu, Q., Li, X., Yong, Q. & Ouyang, J. (2016). Lactic acid production from pretreated hydrolysates of corn stover by a newly developed *Bacillus coagulans* strain. *PloS one*, *11*(2), p.e0149101.

Jiang, X., Xue, Y., Wang, A., Wang, L., Zhang, G., Zeng, Q. & Yu, B. (2013). Efficient production of polymer-grade L-lactate by an alkaliphilic *Exiguobacterium* sp. strain under nonsterile open fermentation conditions. *Bioresource Technology*, *143*, 665–668.

Li, Y., Wang, L., Ju, J., Yu, B. & Ma, Y. (2013). Efficient production of polymer-grade D-lactate by *Sporolactobacillus laevolacticus* DSM442 with agricultural waste cottonseed as the sole nitrogen source. *Bioresource Technology*, *142*,186-191.

Litchfield, JH. (2009). Lactic acid, microbially produced. In: Schaechter Mosel O, (Eds.), *Encyclopedia of microbiology*. (362–372) Oxford: Academic Press.

Ma, K., Maeda, T., You, H. & Shirai, Y. (2014). Open fermentative production of L-lactic acid with high optical purity by thermophilic *Bacillus coagulans* using excess sludge as nutrient. *Bioresource Technology,151*, 28-35

Martinez, F.A.C., Balciunas, E.M., Salgado, J.M., González, J.M.D., Converti, A. & de Souza Oliveira, R.P. (2013). Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in Food Science and Technology*, *30*, 70-83.

Masutani, K. & Kimura, Y. (2014). PLA synthesis. From the monomer to the polymer. In Jiménez, A., Peltzer, M., and Ruseckaite, R. (Eds.), *Poly(lactic acid) Science and Technology: Processing, Properties, Additives and Applications*.(pp.1–36). Oxfordshire: The Royal Society of Chemistry.

Moon, S.K., Wee, Y.J. and Choi. & G.W. (2012). A novel lactic acid bacterium for the production of high purity l-lactic acid, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* CHB2121. *Journal of Bioscience Bioengineering*, *114*, 155–159.

Meng, Y., Xue, Y., Yu, B., Gao, C. & Ma, Y. (2012). Efficient production of L-lactic acid with high optical purity by alkaliphilic *Bacillus sp*. WL-S20. *Bioresource Technology*, *116*, 334–339.

Ma, K., Hu, G., Pan, L., Wang, Z., Zhou, Y., Wang, Y., Ruan, Z. & He, M. (2016). Highly efficient production of optically pure l-lactic acid from corn stover hydrolysate by thermophilic *Bacillus coagulans. Bioresource Technology*, *219*, 114-122.

Nakano, S., Ugwu, C. U., &Tokiwa, Y. (2012). Efficient production of d-(-)-lactic acid from broken rice by *Lactobacillus delbrueckii* using Ca $(OH)_2$ as a neutralizing agent. *Bioresource Technology*, *104*, 791-794.

Ohara, H., & Yahata, M. (1996). L-Lactic acid production by *Bacillus* sp. in anaerobic and aerobic culture. *Journal of fermentation and Bioengineering*, *81*(3), 272-274.

Okano, K., Tanaka, T., Ogino, C., Fukuda, H. & Kondo, A. (2010). Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *85*, 413-423.

Okino, S., Suda, M., Fujikura, K., Inui, M. & Yukawa, H. (2008). Production of D-lactic acid by *Corynebacterium glutamicum*under oxygen deprivation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *78*, 449-454.

Ong, S. A., Ng, Z.J. & Wu, J.C. (2016). Production of high concentration of L-lactic acid from cellobiose by thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4. *Applied microbiology and biotechnology*, *100*, 6501-6508.

Ou, M.S., Ingram, L.O. & Shanmugam, K.T. (2011). L (+)-Lactic acid production from non-food carbohydrates by thermotolerant *Bacillus coagulans*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *38*, 599-605.

Ouyang, J., Ma, R., Zheng, Z., Cai, C., Zhang, M. & Jiang, T. (2013). Open fermentative production of l-lactic acid by *Bacillus sp*. strain NL01 using lignocellulosic hydrolyzates as low-cost raw material . *Bioresource Technology*, *135*, 475–480.

Patel, M.A., Ou, M.S., Harbrucker, R., Aldrich, H.C., Buszko, M.L., Ingram, L.O. & Shanmugam, K.T., (2006).Isolation and characterization of acid-tolerant, thermophilic bacteria for effective fermentation of biomass-derived sugars to lactic acid. *Applied and Environmental Microbiology*, *72*, 3228-3235.

Peng, L., Xie, N., Guo, L., Wang, L., Yu, B. & Ma, Y. (2014). Efficient open fermentative production of polymer-grade L-lactate from sugarcane bagasse hydrolysate by thermotolerant *Bacillus* sp. strain P38. *PLoS one*, *9*(9), p.e107143.

Pieterse, B., Leer, R. J., Schuren, F. H., & van der Werf, M. J.(2005).Unravelling the multiple effects of lactic acid stress on *Lactobacillus plantarum* by transcription profiling. *Microbiology*, *151*(12), 3881-3894.

Poudel, P., Tashiro, Y. & Sakai, K. (2015). New application of *Bacillus* strains for optically pure l-lactic acid production: general overview and future prospects. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, *80*, 642–654

Prasirtsak, B., Thongchul, N., Tolieng, V. & Tanasupawat, S. (2016). *Terrilactibacillus laevilacticus* gen. nov., sp. nov., isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, *66*, 1311-1316

Qin, J., Zhao, B., Wang, X., Wang, L., Yu, B., Ma, Y., Ma, C., Tang, H., Sun, J. & Xu, P. (2009). Non-sterilized fermentative production of polymer-grade l-lactic acid by a newly isolated thermophilic strain *Bacillus* sp. 2–6. *PLoS one*, *4*(2), p.e4359.

Qin, J., Wang, X., Zheng, Z., Ma, C., Tang, H., & Xu, P. (2010).Production of L-lactic acid by a thermophilic *Bacillus* mutant using sodium hydroxide as neutralizing agent. *Bioresource technology*, *101*(19), 7570-7576.

Saini, P., Arora, M. & Kumar, M. N. V. R. (2016). Poly(lactic acid) blends in biomedical applications. *Advanced Drug Delivery Reviews*, *107*, 47-59.

Singhvi, M., Joshi, D., Adsul, M., Varma, A. & Gokhale, D. (2010). d-(-)-lactic acid production from cellobiose and cellulose by *Lactobacillus lactis* mutant RM2-2 4. *Green Chemistry*, *12*, 1106-1109.

Södergård, A. & Stolt, M. (2002). Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science*, *27*, 1123-1163.

Sun, J., Wang, Y., Wu, B., Bai, Z. & He, B. (2015). Enhanced production of d-lactic acid by *Sporolactobacillus* sp. Y2–8 mutant generated by atmospheric and room temperature plasma. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, *62*, 287-292.

Thamacharoensuk, T., Tolieng, V., Thongchul, N., Kodama. K. & Tanasupawat, S. (2017). Characterisation of lactic acid producing *Sporolactobacillus* strains from tree barks in Thailand. *Annals of Microbiology*, *67*, 215-218.

The National Innovation Agency (NIA). (2013). National roadmap for the development of bioplastics industry. Retrieved May 10, 2017, from www.nia/or.th/bioplastics/download/ROADMAP.pdf (in Thai)

Tian, K., Shi, G., Lu, F., Singh, S. & Wang, Z. (2013). High-efficiency L-lactate production from glycerol by metabolically engineered *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology*, *29*, 1268-1277.

Tolieng, V., Prasirtsak, B., Miyashita, M., Shibata, C., Tanaka, N. Thongchul, N. & Tanasupawat, S. (2017 a). *Sporolactobacillus shoreicorticis* sp.nov., a lactic acid producing bacterium isolated from tree bark. *International Journal of Systematic and Evolutionary microbiology*, *67*(7), 2363-2369.

Tolieng, V., Prasirtsak, B.,Sitdhipol, J.,Thongchul, N.& Tanasupawat, S. (2017 b). Identification and lactic acid production of bacteria isolated from soils and tree barks. *Malaysian Journal of Microbiology*, *13*(2), 100-108.

Wang, Y., Cai, D., He, M., Wang, Z., Qin, P. & Tan, T. (2015). Open fermentative production of L-lactic acid using white rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technology*, *198*, 664-672.

Wang, Y., Chang, J., Cai, D., Wang, Z., Qin, P., & Tan, T. (2017). Repeated-batch fermentation of L-lactic acid from acid hydrolysate of sweet sorghum juice using mixed neutralizing agent under unsterilized conditions. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, *92*(7) DOI 10.1002/jctb.5195.

Wang, Y., Tian, T., Zhao, J., Wang, J., Yan, T., Xu, L., Liu, Z., Garza, E., Iverson, A., Manow, R. & Finan, C. (2012). Homofermentative production of d-lactic acid from sucrose by a metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnology letters*, *34*, 2069-2075.

Wang, J., Wang, Q., Xu, Z., Zhang, W. & Xiang, J. (2015). Effect of fermentation conditions on L-lactic acid production from soybean straw hydrolysate. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *25*, 26-32.

Wang, L., Xue, Z., Zhao, B., Yu, B. & Xu, P. (2013). Jerusalem artichoke powder: a useful material in producing high-optical-purity l-lactate using an efficient sugar-utilizing thermophilic *Bacillus coagulans* strain. *Bioresource Technology*, *130*,174-180.

Wang, L., Zhao, B., Li, F., Xu, K., Ma, C., Tao, F., Li, Q. & Xu, P. (2011). Highly efficient production of D-lactate by *Sporolactobacillus* sp. CASD with simultaneous enzymatic hydrolysis of peanut meal. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *89*, 1009-1017.

Wang, Q., Zhao, X., Chamu, J. & Shanmugam, KT. (2011). Isolation, characterization and evolution of a new thermophilic *Bacillus licheniformis* for lactic acid production in mineral salts medium. *Bioresource Technology*, *102*, 8152–8158.

Weerathaworn, P. (2013).Trend of bioplastics industry in Thailand. *Plastics*, *8*(2), 45-46

Yadav, A. K., Chaudhari, A. B., & Kothari, R. M. (2011). Bioconversion of renewable resources into lactic acid: an industrial view. *Critical reviews in biotechnology*, *31*(1), 1-19.

Ye, L., Zhou, X., Hudari, M.S.B., Li, Z. & Wu, J.C. (2013). Highly efficient production of L-lactic acid from xylose by newly isolated *Bacillus coagulans* C106. *Bioresource Technology*, *132*, 38-44.

Zhao, B., Wang, L., Li, F., Hua, D., Ma, C., Ma, Y. & Xu, P. (2010). Kinetics of D-lactic acid production by *Sporolactobacillus* sp. strain CASD using repeated batch fermentation. *Bioresource Technology*, *101*, 6499-6505.

Zhao, J., Xu, L., Wang, Y., Zhao, X., Wang, J., Garza, E., Manow, R. & Zhou, S. (2013). Homofermentative production of optically pure L-lactic acid from xylose by genetically engineered *Escherichia coli* B. *Microbial Cell Factories*, *12*, 57.

Zhao, T., Liu, D., Ren, H., Shi, X., Zhao, N., Chen, Y. & Ying, H. (2014). D-Lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8 immobilized in fibrous bed bioreactor using corn flour hydrolyzate. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, *24*, 1664-1672.

Zheng, L., Bai, Z., Xu, T. & He, B. (2012). Glucokinase contributes to glucose phosphorylation in D-lactic acid production by *Sporolactobacillus inulinus* Y2-8. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *39*, 1685-1692.

Zhou, X., Ye, L. & Wu, J.C. (2013). Efficient production of L-lactic acid by newly isolated thermophilic *Bacillus coagulans* WCP10-4 with high glucose tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *97*, 4309-4314.