

부레옥잠을 이용한 *Lactobacillus* spp.의 젖산 생산

Randy Jullihar, 노용호, 박혜민, 윤현식*

Production of Lactic Acid from Water Hyacinth by *Lactobacillus* spp.

Randy Jullihar, Yong Ho Noh, Hye Min Park, and Hyun Shik Yun*

Received: 23 February 2016 / Revised: 15 March 2016 / Accepted: 22 March 2016

© 2016 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: Lactic acid fermentations were conducted using water hyacinth. It is known that the pretreatment and enzyme hydrolysis process optimize the potential of water hyacinth. Lactic acid produced by using lactic acid bacteria. All cells were grown at 37°C and initial pH 5.5. Lactic acid production was measured by HPLC. All *Lactobacillus* strains could produce lactic acid from pretreated water hyacinth. The highest lactic acid was achieved when lactic acid fermentation was carried out by *L. delbrueckii* for D-form and *L. helveticus* for L-form lactic acid production. The lactic acid concentration was 10.70 g/L by *L. delbrueckii* and it converted glucose in the medium to lactic acid, almost perfectly. Lactic acid production became higher when fermentation was carried out at a controlled pH 5.5. Lactic acid yield and productivity were 0.52 g/g and 0.19 g/L/h for *L. helveticus*, while *L. delbrueckii* was 0.64 g/g and 0.27 g/L/h. This study showed that water hyacinth medium could be alternative medium which can replace the complex and expensive medium for growing *Lactobacillus* strains in production of lactic acid.

Keywords: Water hyacinth, Lactic acid, Alternative medium, *Lactobacillus*

1. INTRODUCTION

젖산은 산업적으로 중요한 물질이며 섬유 산업에서 첨가제와 기초화학물질로 사용이 되고 있으며 [1], 식품 산업에서 젖산은 식품 보존 및 맛을 위한 첨가제의 목적으로 사용이 되고 있다. 식품 산업의 젖산 소비는 전체 젖산 사용량의 85%에 이른다. 또한, 젖산을 이용해 생분해 특성을 지니고, 생체 적합성이 우수한 다중 구조를 생산하는 원료로 사용할 수 있다. 미국에서는 이미 젖산을 사용한 다중 구조 (PLA, poly lactic acid)를 이용한 생분해성 플라스틱을 제조하고 있다 [2]. 다양한 용도로 젖산이 사용되면서, 세계적인 사용량이 2001년 86,000톤에서 2010년 500,000톤으로 빠르게 증가하였다 [3]. 이러한 젖산 생산은 석탄, 석유 및 천연가스를 원료로 화학적 생산을 하거나 탄수화물, 농작물과 산업 폐기물, 식물체 바이오 매스를 이용해 생물학적 생산을 하고 있다.

생물학적으로 생산된 젖산은 L (+) - 혹은 D (-) - 형의 광학 이성질체로 나타난다 [4-6]. 생물학적 젖산 생산을 위한 효과적인 방법들 중에 하나는 미생물의 일종인 *Lactobacillus*를 이용한 발효이다. 젖산 생산 박테리아는 당류에서 젖산만을 생산하는 정상 발효성 (homofermentative) 박테리아와 젖산 생산을 포함하고 에탄올, 포름산염, 아세트, 아세트 산 등의 다른 탄소화합물을 생성하는 혼합 발효성 (heterofermentative) 박테리아로 구분한다. 박테리아에서 생산되는 젖산은 영양적 측면과 저장 수명의 장점을 지니고 있고 젖산 생산 박테리아 (LAB, lactic acid bacteria)의 일종인 *Lactobacillus*는 오랜 기간 동안 발효 식품 산업에 적합한 균주로 이용되고 있다 [7,8].

부레옥잠 (water hyacinth, *Eichhornia crassipes*)은 탈수 건조를 실행하였을 때 생물학적 변환을 위한 셀룰로스 및 헤미셀룰로스 당질 함량이 높은 수생 식물이다 [9]. 부레옥잠은

인하대학교 생물공학과
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Korea
Tel: +82-32-860-7517; Fax: +82-32-872-4046
e-mail: hyunshik@inha.ac.kr

수분 함량이 전체 부피의 93-95%를 차지할 정도로 많아 바이오매스로 이용을 하기 전에 탈수 과정이 필요하지만 탈수 과정을 마친 부레옥잠은 휘발성 고형물로 측정되는 유기물 (volatile solids)이 총 부유물질 (TSs, total suspended solid)의 80-82%를 차지해 생물학적 변환을 위한 원료 물질이 풍부하다. 부레옥잠의 바이오매스는 24% 셀룰로스, 10% 자일란, 11% 리그닌 및 그 밖의 물질로 이루어져있다. 연구된 결과에 따라 주요 성분들의 양이 많은 차이를 보이지만, 셀룰로스와 헤미셀룰로스의 양이 풍부하고 리그닌의 양이 매우 적은 것으로 보고된다 [10]. 또한 부레옥잠은 성장속도가 빠르고 수질정화능력이 우수하다는 경제적인 사용에 대한 다양한 장점을 가지고 있어 바이오매스로 활용될 때 이점이 많다 [11].

젖산을 이용한 PLA 생산에 있어서 물성 개선을 위하여 L-젖산과 D-젖산의 혼합이 필요하며 이를 위하여 순도 높은 L-젖산 및 D-젖산의 확보가 요구된다. 또한 젖산발효를 통한 젖산생산에 있어서 원료물질의 가격은 경제성에 크게 영향을 미친다. 본 연구에서는 바이오매스로서 부레옥잠의 *Lactobacillus*에 의한 L-젖산 및 D-젖산 생산을 위한 원료 물질로 사용 가능성을 확인하였다.

2. MATERIALS AND METHOD

2.1. 전처리

본 연구에 사용된 부레옥잠은 경기도 수원시 신갈 저수지에서 확보하였다. 부레옥잠의 뿌리는 제거하고 줄기와 잎 부분을 105°C에서 2일 동안 건조하였다. 건조한 부레옥잠은 분말 형태로 만들고, 일정한 분말 입자 크기 분류를 위하여 체 (USA Standard Testing Sieve no. 30)를 이용하여 0.6 mm 이하의 크기로 만들었다. 바이오매스 전처리를 위해서 NaOH/H₂O₂ 수용액을 처리하는 알칼리/산화 전처리 (A/O pretreatment) 방법을 사용하였다. 바이오매스를 7% (w/v) NaOH 수용액과 함께 2시간 동안 100°C에서 가수분해 반응을 하고 가수분해된 샘플은 황산 용액을 넣어 황산의 최종 농도가 1% (w/v)가 되게 하였다. 12시간 동안 반응을 하고 전처리 과정을 마친 샘플은 75 mm 체를 이용해 세척하였다. 세척과정에서 배수된 물의 pH가 7.0이 될 때까지 세척하였다. 세척을 마친 샘플은 동결건조 과정을 거치고 Celluclast 1.5 L (Novozymes, Franklinton, USA)와 Viscozyme 1.5 L (Novozymes, Franklinton, USA)을 전체 부피의 1%의 양을 첨가한 후 96 시간 동안 50°C로 유지하였다. 위와 같은 과정의 전처리를 마친 부레옥잠 샘플을 고형분과 액상으로 나누었다. 액상 부분을 pH 5.5로 적정하고 미생물 배지로 사용하였다.

2.2. 젖산 생산 균주

젖산 생산 균주는 *Lactobacillus*를 사용하였다. 연구에 사용한 균주들은 *Lactobacillus casei* ATCC 393, *L. crispatus* KLB 46 [12], *L. delbrueckii* ATCC 9649, *L. fermentum* ATCC 23271, *L. helveticus* ATCC 55163, *L. paracasei* KLB 58 [13], *L. planta-*

rum ATCC 14917, *L. reuteri* ATCC 23272, *L. rhamnosus* ATCC 10864 이다. 모든 균주들은 37°C, MRS 배지에서 전 배양하였다. 본 배양은 30 mL의 부레옥잠 배지를 포함한 유리 시험관에서 이루어졌다. 배양 후 균주가 생산한 젖산을 정량 분석하였고, L-젖산과 D-젖산을 가장 많이 생산하는 균주들을 선정해 발효기에서 배양하였다.

2.3. 배양

L-젖산과 D-젖산을 많이 생산하는 두 균주들은 전처리 과정을 마친 1 L의 부레옥잠 배지에서 회분식 배양 (batch fermentation)을 진행하였다. 이 때 사용한 발효조의 부피는 2.5 L (Kobiotech, Incheon, Korea)이다. 발효는 혐기 상태에서 이루어졌으며 30 rpm의 교반 속도를 유지하였다. 젖산 생산에 적합한 37°C, pH 5.5을 유지하였으며 배양은 젖산 농도의 증가하지 않을 때까지 진행되었다.

2.4. 분석

포도당과 젖산 분석을 위하여 배양액을 0.2 µm RC-membrane syringe filter (Satorious, Gottingen, Germany)로 거른 후에 사용하였다. 포도당과 젖산 분석은 RI 검출기 (Younglin, Anyang, Korea)를 장착한 Acme 9000 HPLC 시스템을 이용해 분석하였으며 분석에 사용한 컬럼은 Aminex HPX87H (Bio-Rad, Hercules, USA)이다. 완충제 (buffer)는 5 mM 황산 용액을 0.06 mL/min의 유속으로 사용하였다. 생산된 젖산의 이성질체 분석을 위하여, Chiralpak[®] MA (+) (Daicel, Osaka, Japan) 컬럼과 UV detector (Younglin, Anyang, Korea)를 장착한 HPLC 시스템을 이용하였다. 완충제는 2 mM 황산구리 (II) 무수물을 0.5 mL/min 유속으로 사용하였다.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. 부레옥잠 배지를 사용한 젖산 생산

젖산 생산 박테리아들은 부레옥잠 배지에 포함된 셀룰로스로부터 Celluclast와 Viscozyme을 이용한 효소당화과정에서 얻어지는 포도당을 젖산으로 전환하였다. 배양을 시작하고 8시간 후, 지수기부터 젖산이 생산되는 것을 관찰할 수 있었다. 정체기 동안에도 포도당을 소비와 함께 젖산 생산을 확인할 수 있었으며 사멸기에 이르러 젖산 생산량이 점차 낮아지는 것을 관찰할 수 있었다 (data not shown). 이는 박테리아가 포도당의 이화작용으로 새로운 원형질을 형성하는 것과 동시에 신진대사 활동에 필요한 에너지를 얻는 과정에서 젖산을 생산하기 때문이다. 이와 같은 이유로, 젖산 생산 박테리아의 생장은 당의 양이나 젖산의 생산 또는 다른 성장 요소의 고갈에 의하여 저해 받는다 [14]. *Lactobacillus* 균주들의 젖산 생산량은 Table 1과 같다. 본 연구에서 이용한 9종의 *Lactobacillus* 균주는 모두 부레옥잠 배지에서 성장하였다. 젖산 생산과정에서 포도당 농도의 감소는 부레옥잠 전처리 및 당화 과정에서 셀룰로스로부터 얻어진 포도당이 젖산 생

Table 1. Production of lactic acid by *Lactobacillus* spp. on water hyacinth medium

| Strains | Yield (g lactic acid/g biomass) | L-lactic acid (g/L) | D-lactic acid (g/L) | Culture type |
|-----------------------|---------------------------------|---------------------|---------------------|--------------|
| <i>L. crispatus</i> | 0.01 | 0.65 | 0.76 | |
| <i>L. fermentum</i> | 0.19 | 2.30 | 1.42 | |
| <i>L. casei</i> | 0.12 | 2.13 | 0.28 | |
| <i>L. plantarum</i> | 0.18 | 1.53 | 1.99 | |
| <i>L. helveticus</i> | 0.23 | 4.23 | 0.26 | test tube |
| <i>L. paracasei</i> | 0.51 | 5.51 | 4.42 | |
| <i>L. delbrueckii</i> | 0.54 | 0.52 | 9.99 | |
| <i>L. reuteri</i> | 0.25 | 2.44 | 2.43 | |
| <i>L. rhamnosus</i> | 0.22 | 4.19 | 0.11 | |
| <i>L. helveticus</i> | 0.52 | 11.32 | 1.43 | fermenter |
| <i>L. delbrueckii</i> | 0.64 | 1.76 | 13.86 | |

산을 위한 원료로써 사용되고 있다는 것을 보여준다. 젖산 생산 효율이 가장 높은 균주는 *L. delbrueckii*이며 수율 (yield)은 0.54 g/g (젖산/바이오매스)이고 이 때, 포도당의 젖산 전환율은 88%이다.

3.2. L-/ D- 젖산 생산

젖산 생산 균주들은 젖산의 이성질체인 L- /D- 젖산을 각각 다른 비율로 생산하고, 이 젖산의 생산 비율은 젖산 생산 균주마다 다른 비율을 가진다 [15]. Otsuka 등의 젖산 형태에 따른 분류에 따르면, 미생물에서 생산한 젖산은 L, LD, D의 세 가지 형태로 나눌 수 있다 [16]. 두 종류의 젖산, L-젖산과 D-젖산은 물리화학적 성질이 다르기 때문에 서로 다른 분야에서 폭넓게 사용이 되고 있으며 젖산을 효율적으로 활용하기 위하여 두 이성질체를 분리하는 과정이 요구된다.

실험에 사용한 균주들이 생산한 젖산의 농도를 Table 1에 나타내었다. 분석 결과, 두 이성질체 중에서 한 종류만 생산하는 균주는 존재하지 않았다. 그러나 L-젖산이나 D-젖산을 주로 생산하는 균주가 관찰되었다. *L. delbrueckii*는 D-젖산이 전체 젖산 생산의 87.2%를 차지하였으며, *L. helveticus*는 생산한 전체 젖산 중에 90%가 L-젖산으로 분석되었다. 두 균주는 각각의 이성질체 형태에서 가장 높은 젖산을 생산하였다. 균주들이 생산한 젖산 함량의 특징을 살펴보면 *L. delbrueckii*가 D (-) -젖산을 주요 생산하는 반면에, *L. helveticus*, *L. casei*, *L. rhamnosus*는 L (+) -젖산을 주로 생산하였다. 다른 균주들은 두 종류의 젖산 생산량에 큰 차이가 없는 것을 알 수 있었다. Manome 등의 연구에서 *L. delbrueckii*에 의하여 생산된 109.7 mM의 젖산은 12.8%의 L (+) -젖산과 87.2%의 D (-) -젖산으로 구성되는 것을 보여주고 있다 [17]. 이러한 결과는 본 연구에서 얻은 *L. delbrueckii*의 젖산 생산 결과와 비슷한 수준인 것을 알 수 있다. 그러나 Hofvendahl 등의 연구 결과를 보면 같은 *L. delbrueckii* 균주도 아종 (subspecies)에 따라 같은 배지에 대한 젖산 생산 특성이 다른 것으로 나타나 균주의 영향이 큰 것으로 나타났다 [18].

3.3. 회분식 배양

시험관 배양에서 젖산 발효시 L-젖산 농도가 높은 *L. helveticus*

과 D-젖산 농도가 높은 *L. delbrueckii*를 회분식 배양을 위한 균주로 각각 선정하였다. 발효기에서 배양한 *L. helveticus*와 *L. delbrueckii*의 포도당 및 젖산 농도 결과는 pH 조절을 할 경우 젖산 생산이 증가하였다 (Figs. 1, 2). *L. delbrueckii*는 pH 조절을 하지 않았을 때 0.54 g/g (젖산/바이오매스)을 생산하였고 pH 조절을 하였을 때 0.64 g/g (젖산/바이오매스)으로 증가하였으며 생산성 (productivity)은 0.27 g/L/h 이었다. *L. helveticus* 도 0.23 g/g (젖산/바이오매스)에서 0.52 g/g (젖산/바이오매스)로 증가하였으며 생산성은 0.19 g/L/h이었다 (Table 1). 젖산 생산 농도의 차이로부터 발효기를 이용한 젖산 생산에서 pH 유지가 중요한 요소임을 확인하였다. 젖산 생산에 의해 pH가 낮아지는 경우에는 균주 사멸이 일어나기 때문이다 [19]. 젖산 생산 박테리아에서 에너지 생산에 중요한 점진적인 막 전위 pH가 젖산 축적에 의한 불활성화를 일으키고 균주 사멸의 원인이 된다 [20].

회분식 발효 결과, 배양 초기 당 농도가 높았음에도 불구하고 젖산 생산에는 영향을 미치지 않았다. 젖산 발효시 당근 기반 혼합물의 당이 높은 농도임에도 이용이 가능하였지만, 젖산 생산에는 영향을 미치지 않았다는 연구 결과가 보고되었다 [21]. 이와 같은 결과로부터 젖산 생산은 발효에 사용되는 당의 양보다 pH 조건에 많은 영향을 받는다는 것을 알 수 있다. *L. helveticus*와 *L. delbrueckii*는 부레옥잠 배지에서 성장을 하였으며 젖산 생산시 포도당의 농도 감소로부터 젖산 생산을 위해 셀룰로스로부터 얻어지는 포도당을 효과적으로 사용하고 있는 것을 확인하였다.

발효기에서 배양 결과, *L. helveticus*의 농도는 11.32 g/L 그리고 *L. delbrueckii*의 농도는 13.86 g/L으로 시험관 배양시 *L. helveticus*의 농도 4.23 g/L 그리고 *L. delbrueckii*의 농도 9.99 g/L 보다 크게 증가하였다. *L. helveticus*에 의하여 생산된 L-젖산과 *L. delbrueckii*에 의하여 생산된 D-젖산의 순도는 약 90% 정도로 높은 순도의 젖산이 얻어져 배양 과정에 이어지는 분리정제공정의 부담을 줄일 수 있다.

*L. helveticus*를 이용한 젖산 생산 결과는 거의 없는데 비하여 *L. delbrueckii*를 이용한 결과는 보고되었는데 Table 2에 여러 연구에 사용된 배지와 함께 젖산 생산 수율을 비교하였다. 본 연구에서 얻어진 *L. delbrueckii*의 젖산 생산 수율은 밀가

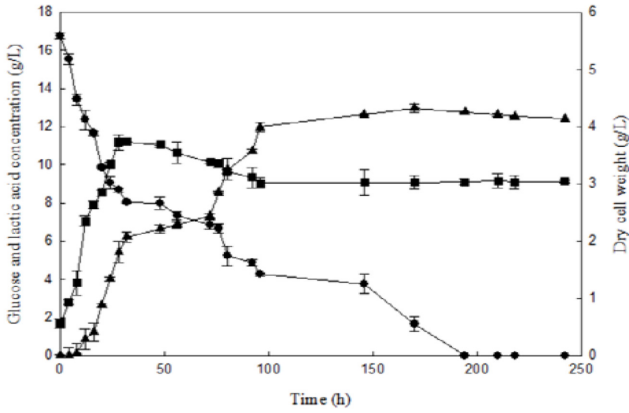


Fig. 1. Batch fermentation of *L. helveticus* (■: Dry cell weight (g/L), ●: Glucose concentration (g/L), ▲: Lactic acid concentration (g/L)).

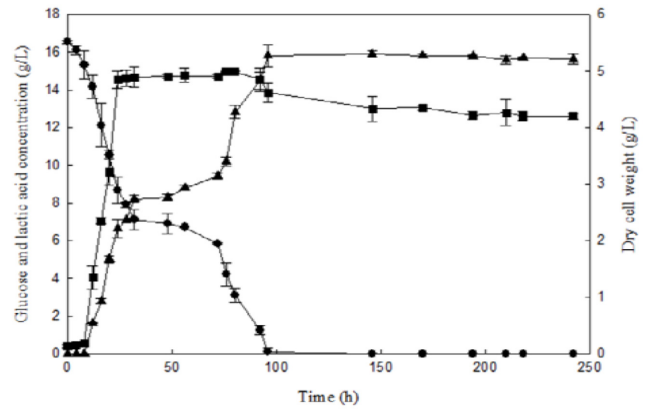


Fig. 2. Batch fermentation of *L. delbrueckii* (■: Dry cell weight (g/L), ●: Glucose concentration (g/L), ▲: Lactic acid concentration (g/L)).

Table 2. Summary of lactic acid production by *L. delbrueckii* grown on various sources

| Strains | Biomass | Lactic acid | | Reference |
|---|---|-------------|-----------------|-----------|
| | | Yield (g/g) | Type (L, LD, D) | |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgarius</i> | wheat flour hydrolyzate | 0.11 | L | [18] |
| | wheat flour hydrolysate + yeast extract | 0.18 | L | |
| <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Delbrueckii</i> | wheat flour hydrolyzate | 0.82 | L | [22] |
| | wheat flour hydrolysate + yeast extract | 0.91 | L | |
| <i>L. delbrueckii</i> NRRL B-445 | molasses | 0.81 | LD | [22] |
| <i>L. delbrueckii</i> Uc-3 | molasses + yeast extract + peptone | 0.70 | LD | [23] |
| | Molasses | 0.87 | L | [24] |
| <i>L. delbrueckii</i> | alfalfa extract | 0.55 | L | [24] |
| <i>L. delbrueckii</i> | alfalfa extract + yeast extract + polypeptone | 0.58 | LD | [24] |
| <i>L. delbrueckii</i> IFO 3202 | defatted rice bran | 0.28 | D | [25] |
| <i>L. delbrueckii</i> Uc-3 | cellobiose + cellotriose | 0.90 | L | [26] |
| <i>L. delbrueckii</i> | sugarcane juice | 0.95 | D | [27] |

루 가수분해물 (wheat flour hydrolysate) 같은 가수분해가 용이한 전분 (starch)을 주로 포함하거나 미생물이 이용하기 쉬운 사탕수수 즙 (sugarcane juice)이나 당밀 (molasses)과 같은 당 (sugar)을 주로 포함한 바이오매스를 사용한 젖산 생산 보다 다소 낮은 것으로 나타났다. 부레옥잠 추출물은 셀룰로스 와 헤미셀룰로스가 주로 포함된 바이오매스로 가용 탄소원 (carbon source)이 전분 및 당을 주로 포함한 바이오매스보다 적어 미생물의 젖산 전환율이 낮기 때문이다. 그러나 비교대상에서 바이오매스로서 사료원으로도 사용 가능한 콩과 식물인 자두개자리 추출물 (alfalfa extract)나 탈지 쌀겨 (defatted rice bran)의 젖산 생산 연구 결과보다 높은 것을 확인할 수 있었다. Table 2의 다른 연구결과로부터 바이오매스에 효모 추출물 (yeast extract), 펩톤 (peptone), 폴리 펩톤 (poly peptone)과 같은 첨가물을 이용한 경우 젖산 생산에서 수율 향상을 확인할 수 있었다. 부레옥잠배지에 효모 추출물과 같은 첨가물을 이용할 경우 수율 향상이 가능하다. 본 연구 결과는 부레옥잠 추출물이 *Lactobacillus*를 이용하여 젖산 생산을 위

한 생산 배지로 사용될 수 있음을 보여준다.

4. CONCLUSION

본 연구에서 부레옥잠 배지를 이용하여 여러 *Lactobacillus* 균주를 배양하여 젖산 생산을 비교하였다. 실험 결과로 L-젖산 생산 농도와 비율이 가장 높은 균주는 *L. helveticus*이었고, D-젖산 생산이 가장 높은 균주는 *L. delbrueckii*이었다. 높은 젖산 생산량을 위해서는 균주의 성장과 함께 배지의 pH가 중요한 요소였다. 발효기 배양에서 *L. helveticus*는 11.32 g/L의 L-젖산을 그리고 *L. delbrueckii*는 13.86 g/L의 D-젖산을 약 90% 비율로 각각 생산하였다. 부레옥잠의 전처리 후 당화 과정에서 발효에 필요한 당이 얻어지고 젖산 생산에 원료 물질로 사용되어 부레옥잠을 이용한 배지가 *Lactobacillus*의 성장 및 젖산 생산에 필요한 조성을 지닌 것으로 보여진다. 본 연구결과는 수질정화효과가 우수하고 성장속도가 빠른 부레옥

잠을 바이오매스로 생산된 배지가 젖산 생산을 위하여 활용될 수 있는 가능성을 보여준다.

REFERENCES

1. Kharas, G. B., F. Sanchez-Riera, and D. K. Severson (1994) *Polymers of lactic acid*. pp. 93-137. In: D. P. Mobely (eds.). *Plastics from microbes: microbial synthesis of polymers and polymer precursors*. Carl Hanser Publishers, Munich, Germany.
2. Datta, R., S. P. Tsai, P. Bonsignore, S. H. Moon, and J. R. Frank (1995) Technological and economic potential of poly (lactic acid) and lactic acid derivatives. *FEMS Microbiol. Rev.* 16: 221-231.
3. Miura, S., T. Arimura, N. Itoda, L. Dwiarti, J. B. Feng, C. H. Bin, and M. Okabe (2004) Production of L-lactic acid from corn cob. *J. Biosci. Bioeng.* 97: 153-157.
4. Cheng, P., R. Mueller, S. Jaeger, R. Bajpai, and E. Iannotti (1991) Lactic acid production from enzyme-thinned corn starch using *Lactobacillus amylovorus*. *J. Industrial Microbiol.* 7: 27-34.
5. Konings, W. N., J. Kok, O. P. Kuipers, and B. Poolman (2000) Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. *Curr. Opin. Microb.* 3: 276-282.
6. Vickroy, T. B. (1985) *Lactic acid*. pp. 761-776. Pergamon Press New York, NY, USA.
7. Leroy, F. and L. D. Vuyst (2004) Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Sci. Technol.* 15: 67-78.
8. Wood, B. J. and W. Holzapfel (1995) *The genera of lactic acid bacteria*. pp. 1-6. Blackie Academic and Professional, London, UK.
9. Nigam, J. (2002) Bioconversion of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to motor fuel ethanol by xylose-fermenting yeast. *J. Biotechnol.* 97: 107-116.
10. Sharma, A. (1971) Eradication and utilization of water hyacinth, a review. *Curr. Sci.* 40: 51-55.
11. Tripathi, B. and S. C. Shukla (1991) Biological treatment of wastewater by selected aquatic plants. *Environ. Pollut.* 69: 69-78.
12. Chang, C. E., S. C. Kim, J. S. So, and H. S. Yun (2001) Cultivation of *Lactobacillus crispatus* KLB46 isolated from human vagina. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* 6: 128-132.
13. Chang, C. E., S. I. Pavlova, L. Tao, E. K. Kim, S. C. Kim, H. S. Yun, and J. S. So (2002) Molecular identification of vaginal *Lactobacillus* spp. isolated from Korean women. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 312-317.
14. Schepers, A. W., J. Thibault, and C. Lacroix (2002) *Lactobacillus helveticus* growth and lactic acid production during pH-controlled batch cultures in whey permeate/yeast extract medium. Part I. multiple factor kinetic analysis. *Enzyme Microb. Technol.* 30: 176-186.
15. Giraud, E., B. Lelong, and M. Raimbault (1991) Influence of pH and initial lactate concentration on the growth of *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 36: 96-99.
16. Otsuka, M., S. Okada, T. Uchimura, and K. Komagata (1994) A simple method for the determination of stereoisomers of lactic acid by HPLC using an enantiomeric resolution column, and its application to identification of lactic acid bacteria. *J. Fermentation Bioeng.* 77: 459.
17. Manome, A., S. Okada, T. Uchimura, and K. Komagata (1998) The ratio of L-form to D-form of lactic acid as a criteria for the identification of lactic acid bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 44: 371-374.
18. Hofvendahl K. and B. Hahn-Hagerdal (1997) L-lactic acid production from whole wheat flour hydrolysate using strains of *Lactobacilli* and *Lactococci*. *Enzyme Microb. Technol.* 20: 301-307.
19. Kumar, A., L. Singh, and S. Ghosh (2009) Bioconversion of lignocellulosic fraction of water-hyacinth (*Eichhornia crassipes*) hemicellulose acid hydrolysate to ethanol by *Pichia stipitis*. *Bioresource Technol.* 100: 3293-3297.
20. Kashket, E. R. (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiol. Lett.* 46: 233-244.
21. Gardner, N. J., T. Savard, P. Obermeier, G. Caldwell, and C. P. Champagne (2001) Selection and characterization of mixed starter cultures for lactic acid fermentation of carrot, cabbage, beet and onion vegetable mixtures. *Int. J. Food Microbiol.* 64: 261-275.
22. Aksu, Z., and T. Kutsal (1986) Lactic acid production from molasses utilizing *Lactobacillus delbrueckii* and invertase together. *Biotechnol. Lett.* 8: 157-160.
23. Dumbrepatil A., M. Adsul, S. Chaudhari, J. Khire, and D. Gokhale (2008) Utilization of molasses sugar for lactic acid production by *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* mutant Uc-3 in batch fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 333-335.
24. Sreenath H. K., A. B. Moldes, R. G. Koegel, and R. J. Straub (2001) Lactic acid production by simultaneous saccharification and fermentation of alfalfa fiber. *J. Biosci. Bioeng.* 92: 518-523.
25. Tanaka T., M. Hoshina, S. Tanabe, K. Sakai, S. Ohtsubo, and M. Taniguchi (2006) Production of D-lactic acid from defatted rice bran by simultaneous saccharification and fermentation. *Bioresource Technol.* 97: 211-217.
26. Adsul M., J. Khire, K. Bastawde, and D. Gokhale (2007) Production of lactic acid from cellobiose and cellotriose by *Lactobacillus delbrueckii* mutant Uc-3. *Appl. Environ. Microbiol.* 73: 5055-5057.
27. Calabia B. P., and Y. Tokiwa (2007) Production of D-lactic acid from sugarcane molasses, sugarcane juice and sugar beet juice by *Lactobacillus delbrueckii*. *Biotechnol. Lett.* 29: 1329-1332.