

이온교환 수지를 이용한 Xylose로부터 젖산의 추출발효

김기복·신광순·*권윤중

경기대학교 식품생물공학과

(접수 : 2002. 12. 2., 게재승인 : 2002. 12. 26.)

Lactic Acid Production from Xylose by Extractive Fermentation using Ion-Exchange Resin

Ki-Bok Kim, Kwang-Soon Shin, and Yun Joong Kwon†

Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 442-760, Korea

(Received : 2002. 12. 2., Accepted : 2002. 12. 26.)

In lactic acid fermentation, the end product inhibition by lactic acid causes several problems. The most important of which are low lactate formation rate and its recovery from fermentation broth. To overcome these problems, extractive lactic acid fermentation was carried out in a bioreactor, which was connected to a column packed with anion exchange resin (Amberlite IRA-400, 250 g). The system was started as a batch process, and then the separation process was started when the lactic acid concentration reached 10 g/L, 20 g/L or 30 g/L. In each case, total lactic acid concentration was reached to 48.6, 53.6, 52.6 g/L with its productivity of 1.2 g/L · h, 1.6 g/L · h, and 1.3 g/L · h, respectively. Especially, in the case of the 20 g/L recycling-initiation process, extractive fermentation reduced the fermentation time (17 hrs) by 34% in comparison with the conventional batch process. The direct consequence of this time reduction was shown by a 1.8 fold increase in overall lactic acid productivity.

Key Words : lactic acid, xylose, extractive fermentation

서론

젖산(Lactic acid)은 주로 식품의 보존제, 의약품, 화장품산업, 화학산업, 피혁산업 등에 널리 이용되고 있는 대표적인 유기산으로 식품산업에서 특히 수요가 큰 화합물이다. 최근에 석유계 합성고분자의 내구성과 비분해성으로 인하여 야기되는 환경문제의 해결책으로써 생분해성 고분자의 사용에 많은 관심이 집중되고 있으며, 그 원료로써 젖산이 주목을 받고 있다. 여러 생분해성 고분자들 가운데 고순도의 젖산으로부터 중합과정을 통해 얻어지는 poly-lactic acid는 생체 적합성과 생분해성을 가지고 있어 석유계 합성고분자의 대체물질로써 뿐만 아니라, 수술용 봉합사, 약물전달시스템, 신체내 뼈의 고정 등 많은 의약품 분야에 응용 가능하므로 젖산의 용도와 요구량은 계속 증가하고 있다(1,2).

젖산발효는 생성물에 의한 저해를 받는 생물전환의 대표적인 예로서 화학공정에 비하여 상대적으로 낮은 생산성을 나

타내며 생산 후의 생성물 분리 및 정제에 높은 비용이 든다. 추출 생물전환(extractive bioconversion) 또는 *in situ* 생성물 분리는 생물공정의 특성인 생성물 저해와 낮은 생산성을 극복하기 위하여 제안된 기술로써 생산 후 공정(downstream processing)의 첫째 단계인 추출과정을 발효과정에 접목시키는 공정으로(3), 젖산발효의 생산성을 높이기 위한 다양한 추출전환 공정들이 응용되어 왔다. 대표적 예로 막분리를 이용한 세포 재순환공정(4-6), 유기용매에 의한 추출(7-9), 수성 이상계에서의 추출전환(10-12) 및 고체 흡착제를 이용한 추출(13-16) 등의 추출 생물전환공정들이 검토되고 있다. 특히 최근에 이온교환 수지 등의 흡착제를 이용하여 젖산을 발효 중에 제거함으로써, 젖산의 축적으로 인한 생성물 저해를 효과적으로 줄이는 방법들에 관한 많은 연구결과가 보고되고 있다. 이 방법은 용매를 이용한 추출법에 비해 효율은 약간 떨어지지만 단백질이나 효소의 활성저해와 생물에 대한 독성의 문제가 거의 없다는 장점을 가지고 있다. Srivastava 등(13)은 100 g/L의 sucrose로부터 이온교환수지를 이용한 젖산 추출발효를 *Lactobacillus delbreuckii*에 의해 수행한 결과 1.66 g/L · h의 높은 생산성을 얻어 일반 회분발효에 비해 생산성을 5배 증가시켰다. Kaufman 등(15)은 젖산균을 젤라틴에 고정화시켜서 반응기내에 유동시키면서 발효를 시킴과 동시에, 이온교환 수지를 반응기내에 주입하여 젖산 제거에 의한 pH

† Corresponding Author : Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, San 94-6, Ieui-dong, Suwon 442-760, Korea

Tel : +82-31-249-9651, Fax : +82-31-253-1165

E-mail : yjkwon@kyonggi.ac.kr

조절로 젖산의 생산성을 증가시키는 연속 유동층반응기를 개발하기도 하였다.

한편 현재 생산되는 젖산의 절반 이상은 미생물에 의한 발효에 의한 것으로, 주원료로는 glucose, whey, lactose, starch, sucrose 등이 이용되고 있는데 이들 기질은 식품으로 사용될 수 있으므로 가격이 비싸 젖산의 생산가를 높이는 원인이 되고 있다. 따라서 최근에 자연계에 가장 많이 존재하고 재생 가능한 섬유질 바이오매스(lignocellulosic biomass) 자원을 이용한 젖산생산에 많은 관심이 모아지고 있다(17-19). 섬유질 바이오매스의 주요 구성성분은 glucose와 xylose로, glucose를 기질로 이용한 젖산생산에 관한 연구는 오래전부터 수행되어 많은 결과가 보고되어 그 우수성이 이미 검증되었으나 xylose를 기질로 이용한 젖산 생산과 xylose와 glucose 혼합배지에서 젖산생산에 대한 연구는 아직 부족한 실정이다. 최근에 *Lactobacillus xylosus*(20)와 homolactic 젖산 생산균주인 *Lactococcus lactis* IO-1(21,22)을 이용하여 glucose 및 xylose로부터 젖산생산에 관한 연구가 보고된 바 있는데, 특히 *L. lactis* IO-1의 경우 섬유질바이오매스의 주 가수분해물인 glucose와 xylose 또는 그 혼합물을 젖산으로 효율적으로 전환할 수 있어, 저렴한 기질에 의한 경제적인 젖산생산이 가능할 것으로 판단되어 기대가 모아지고 있다.

본 연구에서는 glucose나 lactose와 같은 값비싼 기질 대신에 저렴한 섬유질 바이오매스를 가수분해함으로써 얻어질 수 있는 xylose를 젖산 생산의 기질로 이용하고 발효 중 생산되는 젖산의 농도를 낮춰 최종산물 저해를 최소화할 목적으로 음이온 교환수지(Amberlite IRA-400)로 충전된 컬럼을 이용한 추출발효를 수행하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 실험의 사용균주 *Lactococcus lactis* IO-1(JCM 7638)은 일본의 Kyushu University로부터 분양받아 MRS 배지에서 계대배양을 하며 사용하였다. 발효배지의 조성은 yeast extract 10 g/L, bactopectone 5 g/L, NaCl 5 g/L, CH₃COONa · 3H₂O 3 g/L, MgSO₄ · 7H₂O 0.6 g/L, K₂HPO₄ 0.5 g/L, KH₂PO₄ 0.5 g/L, (NH₄)₂SO₄ 0.5 g/L, FeSO₄ · 7H₂O 0.03 g/L, MnSO₄ 0.03 g/L였으며, 기질로 사용되는 xylose는 50 g/L와 100 g/L로 각각 구분하여 실험하였고 갈변의 우려 때문에 별도 살균하여 배양 전에 혼합하였다.

회분발효

젖산생산을 위한 회분발효는 2 L 발효조(B. Braun 00197, Germany)에 배지 1 L를 넣고 교반속도 100 rpm, pH 4.5, 37℃에서 배양하였다. 종균은 MRS 배지 10 mL에 접종하여 37℃에서 24시간 배양한 후, 재차 동일배지에서 배양하여 10% (v/v) 수준으로 접종하였다. 발효 시작 후 일정 시간간격으로 3-5 mL 정도의 배양액을 채취하여 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 다음 상등액은 당과 젖산분석을 위해 냉동실에 보관하고 침전물은 균체량 측정에 이용하였다. 더 이상의 젖산생산이 이루어지지 않아 pH가 감소하지 않을 경우 발효를 중단했다.

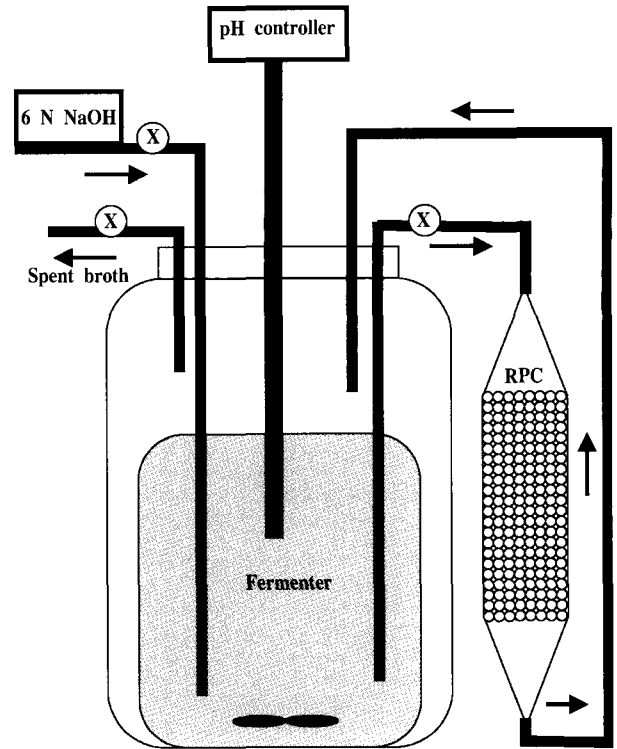


Figure 1. Schematic diagram of extractive lactic acid fermentation.

수지의 전처리 및 젖산의 흡착특성

젖산의 분리에는 음이온교환수지인 Amberlite IRA-400(gel type, strong basic anion exchanger, matrix active group; polyamine, Sigma, USA)를 사용하였으며, lactate의 분리가 용이하도록 다음과 같이 전처리를 하여 전기음성도가 젖산이온에 비해 강한 Cl⁻를, 이보다 상대적으로 약한 OH⁻로 치환하였다. Amberlite IRA-400을 증류수에 포화시킨 후, glass column (φ4.0×30 cm)에 기포가 생기지 않게 충전한 후, 증류수로 세척하고 수지의 4배 부피에 해당하는 2.5 N NaOH를 컬럼내로 재차 용출시켜 수지에 부착된 Cl⁻ 이온을 OH⁻로 치환시켰다. 이후 다시 증류수로서 세척함으로써 잔존 알칼리를 제거하였다. 이온교환 수지에 대한 젖산 흡착능력을 알아보기 위해 40 g/L의 젖산용액을 5 mL/min의 속도로 수지가 채워진 컬럼을 통과시키면서 10분마다 컬럼을 통해 나오는 용액중의 젖산농도를 측정하여 환산하였다. 또한 배지성분에 의한 젖산의 흡착 저해정도를 알아보기 위해 발효시 사용된 배지조성에 젖산을 첨가한 용액으로 반복 실험을 하여 비교하였다.

추출발효

젖산의 추출발효는 Figure 1에 나타난 바와 같은 resin packed column(RPC)이 연결된 발효조를 이용하여 실시하였다. 발효 초기에는 일반적인 회분발효에서와 같이 배양하다가 발효조 내 젖산농도를 측정하여 각각 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L가 되었을 때 RPC에 연결된 펌프를 작동하여 배양액을 RPC로 통과시킴으로써 추출발효를 시작하였다. 컬럼을 통과한 발효액은 젖산이온이 제거되어 발효조로 재순환되므로 발효조 내 젖산의 농도는 감소하게 되고 따라서 pH는 증가한다.

Table 1. Effect of substrate concentration on growth rate and product formation of *Lactococcus lactis* IO-1

	Xylose 50 g/L	Xylose 100 g/L
Final cell mass (g/L)	3.5	3.6
Final product (g/L)	25.0	45.0
Residual substrate (g/L)	0.0	15.6
Total fermentation time (h)	20.0	50.0
μ_{max}	0.64	0.40
% theoretical	83.3	75.0
Productivity (g/L · h)	1.25	0.90

반면 순환펌프의 가동이 중단되면 발효조 내 젖산축적에 의해 pH가 떨어지게 된다. 따라서 순환펌프를 pH controller에 연결함으로써 발효조 내 pH를 6.0 ± 0.05 로 조절하였다. 순환의 종료는 펌프가 작동되어도 pH가 계속 떨어질 때 즉, RPC의 젖산 흡착능력이 한계에 도달하여 더 이상 젖산을 흡착하지 않아 pH가 계속해서 감소하는 시점으로 하였으며, 이때 순환펌프의 작동을 중단하고 다시 6 N NaOH로 pH를 6.0 ± 0.05 로 조절하고 이후에는 일반적인 회분발효로 진행하였다. 발효 후 수지에 흡착된 젖산은 1 L의 증류수로 세척하여 비흡착된 젖산을 제거하고 1 L의 2.5 N HCl 용액을 RPC에 용출시켜 수지에 흡착된 젖산을 제거, 회수하였다. 증류수 용출획분과 2.5 N HCl 용액 중에 존재하는 젖산의 함량을 발효액 중의 젖산량에 합하여 총량으로 하였다. 이후 수지는 다음 사용을 위해 수지 전처리과정을 실시하여 보관하였다.

분석 방법

균체의 건조중량은 일정량의 발효액을 10,000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 얻어진 균체를 생리 식염수로 적절히 희석하고 600 nm에서 OD를 측정하여 미리 작성된 OD에 대한 균체량의 표준곡선을 이용하여 건조중량으로 환산하였다. Xylose 함량은 dinitrosalicylic acid법(23)을 사용하여 측정하였다. 젖산의 농도는 lactate oxidase가 고정화된 membrane sensor를 장착한 Biochemistry Analyzer(YSI 2700, SELECT, USA)를 이용하여 측정하였다.

결과 및 고찰

기질농도에 따른 회분발효

젖산발효는 최종 생성물에 의하여 저해를 받는 대표적인 생물공정이다. 따라서 초기 기질농도가 발효특성에 미치는 영향을 검토하기 위하여 xylose의 농도 50 g/L와 100 g/L에서 회분발효를 각각 수행하여 그 결과를 비교하여 Table 1에 요약하였다. 초기 기질의 양에서 생산될 수 있는 이론적 젖산 생산량에 대한 실제 생산량의 비율인 % theoretical, 최대 비증식속도 (μ_{max}) 및 생산성 등을 비교한 결과, xylose 50 g/L에서 젖산발효를 행한 경우, 정상적인 발효의 진행으로 20시간내에 기질이 대부분 소비되어 83.3%의 이론수율, μ_{max} 는 0.6 g/h, 생산성은 1.25 g/L · h로 나타났다. 반면 xylose 100 g/L에서 젖산발효를 수행한 결과 젖산축적에 따른 최종산물의 저해를 받아 50시간 경과 후에도 약 15 g의 기질이 소비되지 못했으며 75%의 이론수율, μ_{max} 는 0.4 g/h, 생산성은 0.9 g/L · h로 감소하였다.

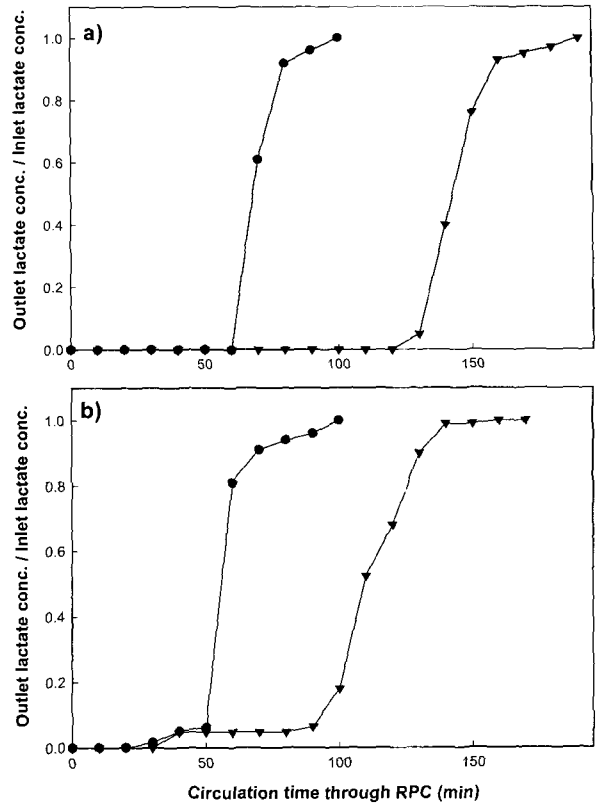


Figure 2. Breakthrough curve for lactic acid adsorption on IRA-400. a) Lactic acid solution, b) Medium plus lactic acid (●: resin 100 g, ▼: resin 250 g).

이온교환 수지의 젖산 흡착능력

이온교환 수지(IRA-400)가 채워진 컬럼에 40 g/L의 젖산용액과 배지에 젖산농도를 40 g/L로 조절된 용액을 각각 5 mL/min의 속도로 통과시켜 시간에 따른 이온교환 수지의 젖산 흡착정도를 검토하였다(Figure 2). 100 g의 수지가 채워진 컬럼으로 순수 젖산용액만을 통과시킨 경우, 60분 이후에 수지의 젖산 흡착능력이 급격히 저하되어 90분 이후에는 전혀 젖산을 흡착하지 못하는 한계수준을 나타내었고 total capacity는 13.48 g로 수지 g당 150 mg의 젖산을 흡착하는 것으로 나타났다. 한편 배지에 젖산을 첨가한 용액을 통과시키면 50분 이후에 수지의 흡착능력이 급격히 저하되었고 역시 90분 이후에는 젖산을 거의 흡착하지 못했으며 total capacity는 11.1 g이고 수지 g당 110 mg의 젖산을 흡착하는 것으로 나타나 배지 성분 중 일부가 수지에 흡착하여 젖산의 흡착을 저해하는 것으로 판단되었다. 젖산의 흡착량을 증가시키기 위해서 수지의 양을 250 g으로 늘려서 실험을 반복한 결과, 순수 젖산용액만 통과시킨 경우 120분 이후에 수지의 젖산 흡착능력이 감소하여 180분 이후에는 젖산을 전혀 흡착하지 못하였으며, total capacity는 29.3 g으로 수지 g당 117 mg의 젖산을 흡착하였다. 동일조건에서 배지성분과 젖산이 혼합된 용액을 컬럼에 통과시킨 경우, 100분 정도까지는 어느 정도 젖산을 흡착하지만 그 이후에는 흡착능력이 감소하여 170분 이후에는 흡착능력을 상실하였고 total capacity는 20 g, 수지 g당 80 mg의 젖산을 흡착하는 것으로 나타났다. 많은 양의 수지를 사용할 경우 수지 단위 질량당의 흡착량은 감소

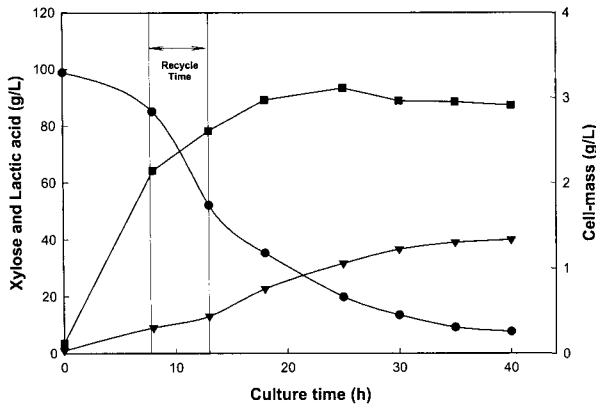


Figure 3. Extractive lactic acid fermentation where separation process started at 10 g/L of lactate concentration(●: Residual sugar, ▼: Lactic acid, ■: Cell mass). Arrow indicates the recycling period of culture broth through the RPC.

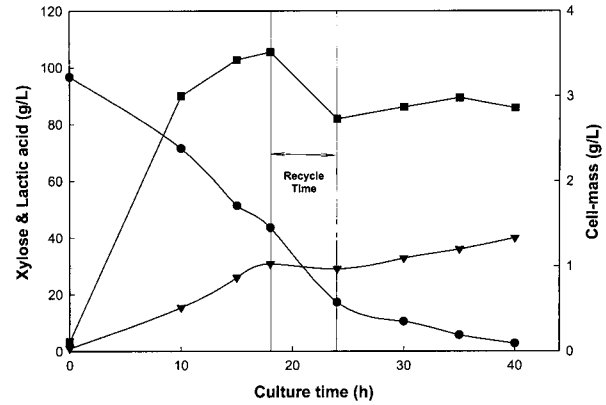


Figure 5. Extractive lactic acid fermentation where separation process started at 30 g/L of lactate concentration(●: Residual sugar, ▼: Lactic acid, ■: Cell mass). Arrow indicates the recycling period of culture broth through the RPC.

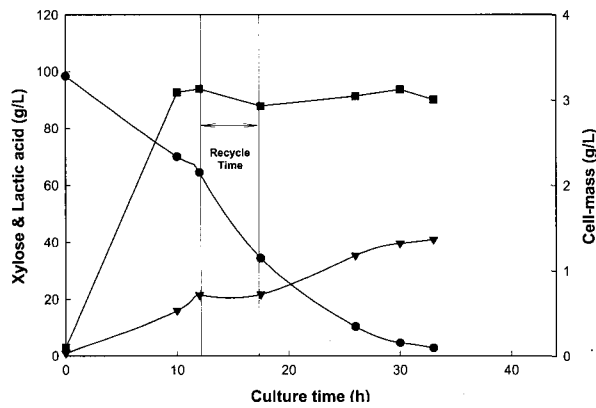


Figure 4. Extractive lactic acid fermentation where separation process started at 20 g/L of lactate concentration(●: Residual sugar, ▼: Lactic acid, ■: Cell mass). Arrow indicates the recycling period of culture broth through the RPC.

하였지만 오랜 시간 흡착능력을 유지할 수 있어 전체 흡착량은 증가하였다. 따라서 젖산 추출발효시 사용되는 이온교환수지의 양은 배지성분 및 일부 균체의 흡착과 젖산의 흡착량을 고려하여 250 g으로 결정하였으며 이후의 실험에 사용하였다.

발효조내 젖산농도에 따른 추출발효 및 젖산의 회수

추출발효는 일반적인 회분발효로 시작하여 발효조내 젖산의 농도가 어느 정도가 되면 RPC와 연결된 순환펌프를 작동시켜 추출발효를 일정 시간 진행시킨 다음 펌프를 멈추고 다

시 회분발효를 수행한다. 본 실험에서는 초기 xylose의 농도는 100 g/L로 하고 추출발효를 시작하는 시점을 각각 발효조내 젖산의 농도가 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L일 때 순환펌프를 작동하여 추출발효를 실시함으로써 최적 운전조건을 검토하고자 하였다(Figure 3-5). 발효조내 젖산의 농도가 10 g/L이 되었을 때 추출발효를 실시하였을 경우, 총발효시간은 40시간이 소요되었고 기질은 약 7.6 g/L가 잔존하였으며 총젖산 생산량은 48.6 g/L로 이는 발효조내 젖산생산량 40 g/L와 컬럼내 수지에 흡착된 젖산량 8.6 g/L를 합한 양이다. 재순환기간은 발효시작 후 8시간에서부터 13시간까지 약 5시간 소요되었다. 또한 젖산농도 20 g/L일 때 추출발효를 실시한 경우, 총발효시간은 33시간이고 기질은 약 2.7 g/L가 잔존하여 대부분 소모되었음을 확인할 수 있었으며 젖산은 53.6 g/L가 생산되었다. 재순환기간은 발효 시작 후 12시간에서부터 약 5.5시간 소요되었다. 발효조내 젖산농도가 30 g/L일 때 추출발효를 실시한 경우, 총발효시간은 40시간, 잔존 기질량은 약 2.7 g/L이었으며 52.6 g/L의 젖산이 생산되었다. 재순환 기간은 발효개시 시점 18시간이 지난 후부터 약 6시간 실시하였다. Figure 4와 5에서 보여주는 바와 같이 추출발효시 재순환을 실시할 경우 발효조내 균체가 감소하는 것을 볼 수 있는데 이는 발효조에서 컬럼으로 유입된 균체가 수지에 흡착하거나 정제함으로써 제대로 회수되지 않아 어느 정도 균체 감소가 나타낸 것으로 판단된다.

이상의 추출발효 결과를 Table 2에 요약한 바와 같으며 대조군은 추출발효를 진행하지 않은 일반적인 젖산의 회분발효

Table 2. Effect of recycling-initiation concentration of lactic acid on the growth rate and product formation of *Lactococcus lactis* IO-1 during extractive fermentation

	Control	Lactate 10 g/L	Lactate 20 g/L	Lactate 30 g/L	
Final cell mass (g/L)	3.6	3.1	3.1	3.5	
Residual substrate (g/L)	15.6	7.6	2.7	2.7	
Final product (g/L)	Media	45.0	40.0	41.0	40.0
	RPC	-	8.6	12.6	12.6
	Total	45.0	48.6	53.6	52.6
Total fermentation time (h)	50	40	33	40	
% theoretical	75.0	81.0	89.3	87.7	
Productivity (g/L · h)	0.9	1.2	1.6	1.3	

를 나타낸다. 먼저 % 이론수율을 비교해 보면 대조구 75.0%에서 젖산 20 g/L에서 재순환시켰을 경우, 89.3%로 현저히 증가하였음을 알 수 있다. 또한 생산성을 비교해 보면 회분발효시(0.9 g/L·h) 보다 배지내 젖산농도가 20 g/L일 때 추출발효를 행한 경우, 약 1.8배의 생산성 증가를 나타내어 추출발효가 젖산 생산에 양호하게 적용됨을 알 수 있었다. 한편 250 g의 이온교환수지를 사용하여 추출발효를 한 결과, 흡착된 젖산의 양은 젖산 10 g/L, 20 g/L, 30 g/L 일 때 각각 8.6 g/L, 12.6 g/L, 12.6 g/L로, 이온교환수지 1 g당 각각 34 mg, 50 mg, 50 mg의 젖산을 흡착하였다. 젖산의 흡착능이 낮은 결과를 보이는 이유는 이온교환수지의 breakthrough curve 실험에서 나타난 바와 같이 일부 배지성분에 의해 젖산의 흡착이 다소 저해되고 있기 때문이다. 또한 xylose 100 g/L를 사용하여 일반적인 회분발효를 실시하면서 배지내 젖산 농도가 20 g/L가 되었을 때 발효를 중지하고 배양액 1 L를 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액 1 L를 250 g의 수지가 채워진 컬럼에 5 ml/min의 속도로 흘려주었을 때 20 g의 젖산이 모두 수지에 흡착된 결과로 보아, 재순환되는 과정에서 젖산 대신 균체가 수지에 결합되거나 컬럼내에 잔존함으로써 제대로 회수되지 못하기 때문에 젖산의 흡착량이 낮은 것으로 판단된다. 이를 위해선 microfilter의 이용, upflow 형태로의 컬럼운전 등을 통하여 개선할 경우, 젖산의 보다 효율적인 흡착, 제거가 가능할 것으로 사료된다.

요 약

Lactococcus lactis IO-1를 이용하여 xylose로부터 젖산발효를 수행한 결과 기질농도가 50 g/L에서 100 g/L로 증가됨에 따라 생육저해 및 생산성감소가 일어났다. 따라서 이온교환수지(Amberlite IRA-400, 250 g)를 이용하여 젖산을 발효 중에 제거함으로써 최종산물저해를 완화시킬 수 있는 추출발효를 수행하였다. 초기 xylose 100 g/L에서 발효초내 젖산농도 20 g/L에서 추출발효를 시작한 결과 기질을 거의 모두 소비하여 총 53.6 g/L의 젖산을 생산하였으며 1.6 g/L·h의 생산성을 나타냈다. 이는 일반적인 회분발효에 비해 약 1.8배 향상된 결과로써 향후 수지에 젖산의 흡착을 저해하는 문제점을 개선함으로써 이온교환수지의 젖산 흡착량을 늘릴 수 있는 방안을 모색한다면 지금 보다 더 나은 생산성을 나타낼 것으로 사료된다.

REFERENCES

- Lipinsky, E. S. and R. G. Sinclair (1986), Is lactic acid a commodity chemical?, *Chem. Eng. Prog.* **82**, 26-32.
- Rathin, A., S. T. Tsai, P. Bonsingore, S. H. Moon, and J. R. Frank (1995), Technological and economic potential of poly(lactic acid) and lactic acid derivatives, *FEMS Microbiol. Rev.* **16**, 221-232.
- Mattiasson, B. and O. Holst (1991), Extractive Bioconversions, p1-9, Marcel Dekker, New York.
- Mehaia, M. A. and M. Cheryan (1986), Lactic acid from acid whey permeate in a membrane recycle bioreactor, *Enz. Microbiol. Technol.* **8**, 289-292.
- Bibal, B., Y. Vayssier, G. Goma, and A. Pareilleux (1991), High-concentration cultivation of *Lactococcus cremoris* in a cell-recycle reactor, *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 746-754.
- Yoo, I. K., H. N. Chang, E. G. Lee, Y. K. Chang, and S. H. Moon (1997), By-product formation in cell-recycled continuous culture of *Lactobacillus casei*, *Biotechnol. Lett.* **19**, 237-240.
- Seevaratnam, S., O. Holst, S. Hjørleifsdottir, and B. Mattiasson (1991), Extractive bioconversion for lactic acid production using solid sorbent and organic solvent, *Bioprocess Eng.* **6**, 35-41.
- Yabannavar, V. M. and D. I. C. Wang (1991), Extractive fermentation for lactic acid production, *Biotechnol. Bioeng.* **37**, 1095-1100.
- Han, D. H. and W. H. Hong (1996), Reactive extraction of lactic acid with trioctylamine(TOA)/methylene chloride (MC)/n-hexane, *Sep. Sci. Technol.* **31**, 1123-1135.
- Katzbauer, B. (1994), Extractive Lactic Acid Fermentation, Ph.D. Dissertation, Graz University, Austria.
- Kwon, Y. J., R. Kaul, and B. Mattiasson (1996), Extractive lactic acid fermentation in poly(ethyleneimine)-based aqueous two-phase system, *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 280-290.
- An, H. K. and Y. J. Kwon (1998), Partitioning of *Lactobacillus helveticus* cells and lactic acid in aqueous PEI/HEC two-phase system, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26**, 55-60.
- Srivastava, A., P. K. Roychoudhury, and V. Sahai (1992), Extractive lactic acid fermentation using ion-exchange resin, *Biotechnol. Bioeng.* **39**, 607-613.
- Zihao, W. and Z. Kefeng (1995), Kinetics and mass transfer for lactic acid recovered with anion exchange method in fermentation solution, *Biotechnol. Bioeng.* **47**, 1-7.
- Kaufman, E. N., S. P. Cooper, M. K. Budner, and G. R. Richardson (1996), Continuous and Simultaneous fermentation and recovery of lactic acid in a biparticle fluidized-bed bioreactor, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **57-58**, 503-515.
- Kong, C. B., C. H. Woo, S. H. Choi, and H. H. Yoon (1999), Simultaneous saccharification and extractive fermentation for lactic acid production, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 212-219.
- Parajo, J. C., J. L. Alonso, and V. Santos (1995), Lactic acid from wood, *Proc. Biochem.* **31**, 271-280.
- Chen, R. and Y. Y. Lee (1997), Membrane-mediated extractive fermentation for lactic acid production from cellulosic biomass, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63-65**, 435-448.
- Iyer, P. V. and Y. Y. Lee (1999), Product inhibition in simultaneous saccharification and fermentation of cellulose into lactic acid, *Biotechnol. Lett.* **21**, 371-373.
- Tyree, R. W., E. C. Clausen, and J. L. Gaddy (1990), The fermentative characteristics of *Lactobacillus xyloso* on glucose and xylose, *Biotechnol. Lett.* **12**, 51-56.
- Ishizaki, A. and T. Ueda (1995), Growth kinetics and product inhibition of *Lactococcus lactis* IO-1 culture in xylose medium, *J. Ferment. Bioeng.* **80**, 287-290.
- Kanagachandran, K., P. F. Stanbury, S. J. Hall, and A. Ishizaki (1997), Glucose repression of xylose utilisation by *Lactococcus lactis* IO-1, *Biotechnol. Lett.* **19**, 923-925.
- Miller, G. A. (1954), Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar, *Anal. Chem.* **31**, 426-428.