

미생물을 이용한 D형 유산 생산 기술 현황

홍채환¹, 김시환¹, 서지연¹, 한도석¹, 김용환^{2*}

The Current State of D-lactic Acid Production Technology Using Microorganism

Chae Hwan Hong¹, Si Hwan Kim¹, Ji Yeon Seo¹, Do Suck Han¹, and Yong Hwan Kim^{2*}

접수: 2011년 9월 9일 / 게재승인: 2011년 12월 21일

© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

Abstract: There has been a growing attention on PDLA (poly D-lactic acid) since stereocomplex PLA, a kind of polymer alloy between PLLA and PDLA was known much thermally stable compared PLLA. Superior characteristics of stereocomplex PLA result in the elevated demand for D-lactic acid. Although many research works have been reported for L-lactic acid production especially food industry, however there are relatively few research works for D-lactic acid production since D-lactic acid cannot find any applications in food industry. Most imminent issue for D-lactic acid is the economic production process that requires low cost medium, efficient lactic acid producing microorganism and finally large scale-up design. In this review, current status of D-lactic acid production process will be summarized and discussed for the further improvement of D-lactic acid production process.

Keywords: D-lactic acid, stereocomplex, PLA

1. 서론

유산 (Lactic Acid)은 산미제, 식품과 제약의 부패균 억제제,

화장품, 중합을 통한 바이오 플라스틱등으로 다양하게 이용되고 있는 중요한 화학 물질이다. 미생물을 이용하여 녹말질, 당질류를 원료로 하여 발효를 통해 유산을 얻을 수 있다. 유산은 두가지의 광학이성질체가 존재하며 이를 그 구조에 따라서 L형 유산, D형 유산으로 분류된다. 대부분의 응용 분야에서 사용되는 유산은 L형 유산으로 앞서 언급된 다양한 분야에서 응용되고 있다. 따라서 값싼 유산 제조를 위해 L형 유산의 발효 제조에 대해 많은 연구가 이루어져왔다. 반면, D형 유산의 경우 식품산업에서의 응용성이 낮아 L형 유산 발효에 비해 D형 유산 발효에 대한 연구가 거의 이루어지지 않았다.

최근 원유가의 강세, 이산화탄소와 같은 온난화기체의 배출 억제와 같은 환경적 문제 등으로 인하여 바이오매스를 기반으로 하는 바이오 플라스틱의 수요가 증가하고 있다. 이러한 바이오 플라스틱은 바이오매스를 기반으로 하는 원료상의 공통점을 가지고 있으며, 미생물에 의하여 분해가 가능한 생분해성 플라스틱과 미분해성 플라스틱으로 나뉘어진다. 여러 생분해성 고분자 중 유산을 중합하여 만든 폴리유산은 기존의 석유계 기반 플라스틱을 대체할 수 있는 고분자 소재로 가장 유망하며, 미래 사회에 꼭 필요한 소재로 인식되고 있다. 하지만, 열안정성, 충격안정성 문제로 인해 폴리유산의 응용 범위가 한정되고 있다. 이를 극복하는 기술로서 광학이성질체인 L형 유산을 중합한 폴리 유산 (PLLA)과 D형 유산을 중합한 폴리유산 (PDLA)을 블렌드하는 경우 스테레오 콤플렉스 결정화가 이루어지는 현상이 몇몇 연구자들에게 의하여 밝혀졌으며 이를 산업적으로 응용하고자 하는 연구 개발이 매우 활발하다 [1]. 폴리유산의 스테레오 콤플렉스 결정화가 형성되는 경우 용점이 약 50°C 이상 높아지는 현상이 발생하며, 결정화도도 약 30% 이상 향상되는 현상이 발생되어 결과적으로 소재의 높은 열안정성 확보가 가능하게 된다.

¹현대자동차 중앙연구소 기반기술연구팀

¹Central Research Institute, Hyundai Motors

²광운대학교 화학공학과

²Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Korea

Tel: +82-2-940-5675, Fax: +82-2-941-1785

e-mail: metalkim@kw.ac.kr

Table 1. The effect of carbon source on the production of lactic acid

Microorganism	Carbon source	Lactic acid concentration (g/L)	Yield $Y_{LA/tot}$ (g/g)	References
<i>L. rhamnosus</i> ATCC1863	Glucose	17	0.86	[13]
	Fructose	14	0.71	
	Glucose + fructose	16	0.81	
	Sucrose	15	0.73	
<i>L. plantarum</i> NRRL B-813	Glucose	7.3	0.73	[15]
	Galactose	4.7	0.47	
	Mannose	8.3	0.73	
<i>L. delbrueckii</i> sp.	Glucose	56	2.80	[14]
	Cellobiose	32	1.60	
<i>Bulgaricus</i> CNRZ 369	Xylose	41	2.10	

이러한 상승 효과는 특히 내열성 100°C 이상이 요구되는 자동차 부품을 비롯한 산업용 소재로 적용이 가능한 특징이 있다. 결과적으로 이러한 연구결과들은 폴리유산의 보다 넓은 응용을 위하여 그 동안 L형 유산에 비하여 연구 관심이 낮았던 D형 유산의 발효 제조가 매우 중요한 이슈가 되고 있다 [2]. 본 논문에서는 현재 진행되고 있는 D형 유산의 발효 기술을 정리하고 향후 기술 발전 방향에 대해 예측해 보고자 한다.

2. 일반적인 유산 발효 기술에 미치는 요소

일반적인 유산의 경제적인 생산을 위하여 발효 과정의 각 요소가 유산 발효에 미치는 영향을 살펴보면 다음과 같다. 유산 발효는 미생물의 종류와 탄소원, 질소원 그리고 발효 방법에 따라 생성되는 유산의 양과 부산물이 달라진다 [3]. Fig. 1에서는 공급된 탄소원을 이용하여 유산이 생산되는 방식을 크게 3가지로 나누어서 보여주고 있다. 이중 유산 생산의 수율 측면에서 가장 유리한 것은 공급되는 탄소원을 대부분 유산으로만 전환하는 동형발효균주 (homofermentative strain)이다 [3].

유산발효에 관여하는 미생물에 대하여 살펴보면 탄수화물을 유산으로 전환시킬 수 있는 미생물은 *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, 그리고 *Weissella* 속 미생물 등이다 [4]. 이 미생물들은 대부분 혐기성이며 운동 능력은 거의 없으며, 비타민 B와 아미노산과 같은 세포 필수 요구 성분을 자체적으로 합성할 수 없다. 따라서 이들 유산 생산 미생물을 이용하여 유산 생산 발효를 위해서는 다양한 필수 요구 성분의 공급이 필요하다. 이 미생물들 중 D형 유산을 주로 생합성하는 미생물 중 대표적인 것은 *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus belveticus*, *Sporolactobacillus inulinus* 등이 알려져 있다 [5,6]. 이들 중 *L. delbrueckii*와 *S. inulinus*는 생산된 유산 중에서 D형 유산의 비율이 상당히 높기 때문에 야생종 및 이 균주들의 변이체를 이용한 D형 유산 발효 연구가 많이 수행되고 있다 [6-10]. 이외에 대장균도 D형 유산을 생산하는 것으로 알려져 있다. 대장균은 pyruvate를 lactate로 전환하는데 관여하는 lactate dehydrogenase 유전자를 오직 한 종류 D-형 특이형 lactate dehydrogenase 유전자만을 보유하고 있는 것

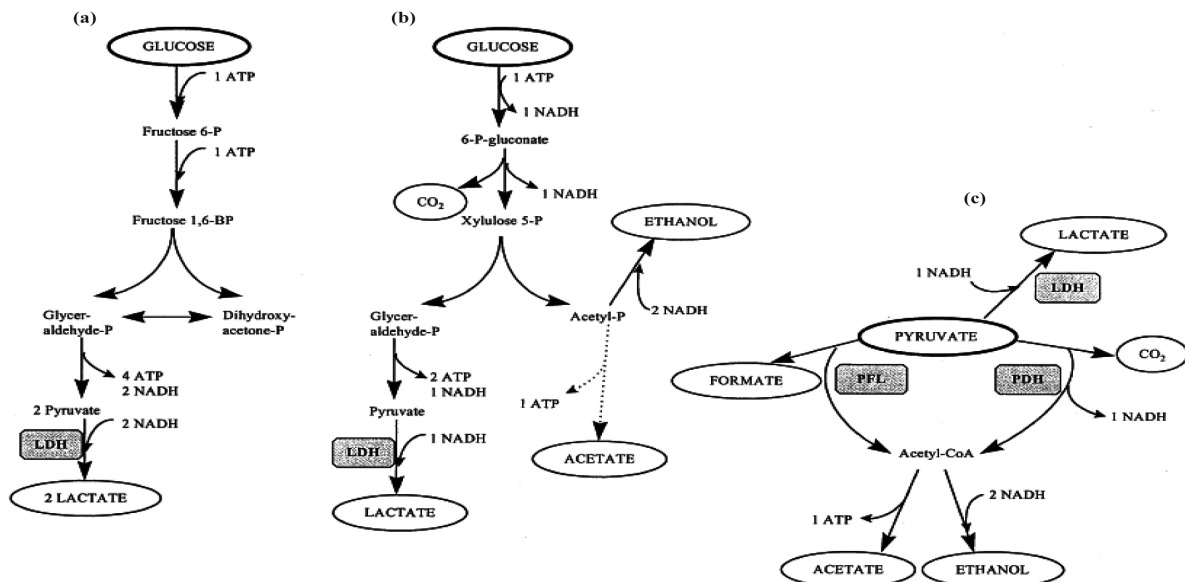
**Fig. 1.** Metabolic pathway for the production of lactic acid (a) Homofermentation, (b) heterofermentation, (c) mixed acid fermentation [3].

Table 2. Fermentation for D-lactic acid production [6]

Microorganism strain	D-lactic acid purity (%)	Microorganism strain	D-lactic acid purity (%)
<i>L. delbrueckii</i> IFO 3534	98.5	<i>S. inulinus</i> ATCC15538	98.9
<i>L. delbrueckii</i> IFO 3202	99.4	<i>L. lactis</i> ATCC8000	1.0
<i>L. delbrueckii</i> AHU1056	3.4	<i>L. lactis</i> AHU1101	1.6
<i>L. delbrueckii</i> IAM1197	1.1	<i>L. lactis</i> IFO 3434	4.4
<i>L. helveticus</i> LH0030	50.5	<i>L. lactis</i> IFO 3443	2.9

으로 알려져 있다 [11,12]. 대장균은 유전자 조작이 상당히 용이한 균으로 빠른 성장 속도 및 높은 생산성을 보이는 장점이 있으나, 반면 유산 외에 다른 대사부산물(초산)이 다량 생산되는 문제점도 역시 있다.

미생물의 발효를 위한 탄소원과 질소원 역시 발효 산물에 영향을 주게 된다. 일반적으로 유산 발효를 위한 당은 포도당 (glucose), 과당 (fructose), 젖당 (lactose) 등이 있다. 연구 결과에 따르면 일반적으로 유산 발효에서 포도당을 사용할 경우 효율적인 발효를 할 수 있다 (Table 1) [13-15]. 앞서 언급하였듯이 유산 발효 균은 스스로 아미노산을 합성할 수 없기 때문에 질소원 역시 유산 발효에 있어서 중요한 영양소이다. 유산 발효에 있어서 질소원으로 효모추출물, 펩톤이 주로 사용 된다. 질소원 자체가 유산 발효 과정에 직접적인 영향을 주지는 않지만, 균의 성장에 있어서 중요하기 때문에 부족할 경우 유산 생산에 어려움이 있다. 훌륭한 질소원 중의 하나인 효모 추출물 (yeast extract)의 경우 경제성을 확보하기에 어렵기 때문에 다른 질소원, 예를 들면 옥수수의 침지공정에서 배출된 약 6%의 침지액을 약 50%로 농축한 corn steep liquor 등으로 대체하려는 연구 또한 이루어지고 있다 [16].

발효 공정 측면에서 유산 발효는 혐기성 발효이기 때문에 산소는 필요 없으며 유산 생산에 영향을 주는 다른 주요한 공정 요소는 pH와 온도이다. 미생물마다 활성화 되는 pH가 다를 뿐 아니라 생성되는 유산으로 인해 발효물의 pH가 변화하여 유산 생산에 영향을 미치게 된다. 특히 균주의 외부 환경 산성도 내성에 따라 중화제의 사용여부가 달라질 수 있으며, 중화제 사용여부에 따라 후속 공정인 분리공정의 경제성이 달라질 수 있다. 따라서 발효 중 최적화된 pH를 찾고 생성된 유산에 의해 변화하는 pH를 조절하는 적절한 중화제를 사용하는 것이 중요하며, 동시에 내산성 특성이 높은 균주를 발굴하는 것도 기술적으로 돌파해야 할 매우 중요한 과제 중 하나이다. 일반적으로 대부분의 유산 발효에 사용되는 미생물은 5.0에서 7.0 사이의 최적 pH를 보인다. 특히 *Lactobacillus* 균주의 경우 낮은 pH에서 활성화되는 것으로 알려져 있다 [17,18]. 온도 역시 유산 발효 공정에 영향을 주는 하나의 요소이다 [19,20]. *Lactobacillus casei* NRRL

B-441 균의 최대 유산 생산을 위한 온도는 30~35°C로 균의 활성화와 관련되어 있다.

3. D형 유산 발효를 위한 미생물

D형 유산은 L형 유산에 비해 응용 가능 분야가 한정적이기 때문에 D형 유산 발효에 대한 많은 연구가 이루어지지 않았다. 하지만, 최근 스테레오 콤플렉스 폴리 유산의 열안정성으로 인해 D형 유산 제조에 대한 연구가 이루어지고 있다. 일본 Kimura 연구팀은 스테레오 콤플렉스 폴리유산과 스테레오 블록 폴리유산 개발 [21-23]을 위해 D형 유산의 발효 생산에 대한 연구 또한 수행하고 있다. D형 유산 발효가 가능한 유산균의 후보균에 대해 발효 산물에서 D형 유산의 함유량을 고속 액체 크로마토그래피 (HPLC)를 이용하여 분석하였다. Kimura 연구팀의 연구 결과에 따르면 *Lactobacillus delbrueckii*와 *Sporolactobacillus inulinus*를 이용하면 발효 반응으로 생산된 유산 중 D형 유산의 함유량이 98%이상 고순도로 나타났다 (Table 2). D형 유산과 L형 유산의 분리는 고비용을 요구하기 때문에 최대한 높은 광학순도의 D형 유산의 생산은 후처리 비용을 줄여 경제적인 D형 폴리유산을 얻는데 있어서 매우 중요하다. 앞서 언급된 1개 포도당을 전환하여 2개의 유산을 발효하는 동형 발효균을 사용할 경우 부산물을 단순화하고 높은 수율의 유산을 얻을 수 있다 [3]. D형 유산의 경제적 생산을 위해 돌연변이 미생물도 개발되고 있다 [10,24-27]. 자외선 및 방사선 조사와 화학적 돌연변이 유도에 의한 돌연변이에 대한 연구가 진행되고 있으며 돌연변이 미생물은 초기 발효균에 비해 2-4배의 D형 유산 생산을 보여주고 있다 (Table 3).

대장균을 배양 균주로 이용하여 발효 산물로 D형 유산을 얻기도 한다 [11,12]. 대장균의 경우 혼합 유기산 발효를 주로 하여 포도당으로부터 분해된 피루프산염으로부터 유산이나 아세트산 그리고 에탄올을 발효하게 된다. 즉 아세트산 발효를 억제하면 D형의 유산을 얻을 수 있으며 배지 조건과 발효 환경에 따라 D형 유산 생산을 증가시킬 수도 있다 [11,12]. 대장균은 유전자 조작이 쉬워 대사 공학에 분야의 발달로

Table 3. Enhancement of D-lactic acid production using *L. lactis* mutant [10,25]

Microorganism	D-lactic acid concentration (g/L)	Microorganism	D-lactic acid concentration (g/L)
<i>L. lactis</i> NCIM 2368 (wild)	26	<i>Sp. inulinus</i> ATCC15538 (wild)	42
<i>L. lactis</i> M1-2	47.5	<i>Sp. inulinus</i> F1-3	78
<i>L. lactis</i> RM2	49	<i>Sp. inulinus</i> F2-32	82
<i>L. lactis</i> RM2-24	81	<i>Sp. inulinus</i> F3-4	94

다양한 발효 산물을 얻을 수 있는 대장균을 개발하기도 하여 D형 유산의 순도와 수율을 만족시킬 수 있는 신균주 개발도 가능할 것으로 예측된다.

D형 유산 발효 연구에 있어서 미생물의 역할은 매우 크다. 이론적으로 1 mol의 포도당을 이용하면 2 mol의 유산을 얻을 수 있다. 동형 발효의 경우 85%이상의 유산을 포도당으로부터 얻을 수 있다. 반면, 이형 발효가 되면 1 mol의 포도당을 이용하여 1 mol의 유산을 얻고 1 mol의 아세트산이나 에탄올을 얻기 때문에 발효를 동형 발효로 유도하도록 미생물을 조작하면 보다 높은 유산 생산량을 얻을 수 있다 [11]. L형 유산과 달리 D형 유산은 D형 폴리 유산 생산을 전제로 하기 때문에 단순한 유산의 생산량이 아니라 생산된 D형 유산의 순도 역시 후처리 비용을 줄일 수 있기 때문에 미생물 개발에 있어서 중요하게 고려되어야 한다. 상업화에 사용된 미생물의 경우 각 회사의 영업 비밀로 공개되고 있지 않고 있기 때문에 실제 상업화를 위해서 자체 미생물을 보유하는 것이 중요하다고 할 수 있다.

4. D형 유산 발효 공정 기술

4.1. D형 유산 발효 배지

D형 폴리 유산 개발을 전제로 하고 있는 D형 유산 발효는 발효 산물의 경제성 확보가 중요하기 때문에 저가 배지를 이용하는 발효 연구에 일본, 중국을 중심으로 이루어지고 있다. 포도당 외에 미생물 생장에 필요한 무기물을 포함하고 있기 때문에 탄소원으로 쌀과 쌀겨 등이 연구되고 있다 [2,6,8,28]. 실제 앞서 언급된 D형 유산을 발효하는 미생물의 경우 포도당, 과당, 젖당과 같은 설탕을 발효하기 때문에 실제 쌀로부터 당을 추출하는 과정을 거쳐야 한다. 당을 추출하는 방법으로 황산을 이용한 가수분해와 아밀라제와 같은 촉매를 이용한 추출 방법이 있다. 당화와 발효를 동시에 진행하는 공정(simultaneous saccharification and fermentation: SSF)을 통한 유산 제조 연구 결과가 일본 니가타 농업기술센터에 의해 보고된 바 있다 [8]. 이 연구에서는 농업 부산물로 대량 발생하는 쌀겨(rice bran)를 활용하여 아밀라제 및 셀룰라제로 당화를 하면서 이후 연속 발효를 통한 SSF 공정 기술로 광학순도 95% 이상의 D형 유산이 제조 가능함으로 보고하고 있다. SSF 공정기술 개발에 있어서 주요 사항은 당화 조건과 발효 조건이 매우 다르기 때문에 공정 조건이나 사용되는 미생물의 최적화에 대한 연구가 필요하며, 일본, 중국 및 태국을 중심으로 연구가 활발히 진행 중이다.

한편, 당화와 발효를 분리하여 발효에서 D형 유산의 수율을 높여 경제성을 확보할 수도 있다. 사용될 수 있는 당으로 포도당, 갈락토오스, 과당, 젖당 등이 있다. 과당과 젖당 등 이당류의 경우 탄소원 자체의 경제성이 있으나 정제 과정이 복잡해 분리 정제에 많은 비용을 소모하게 된다 [29]. 이로 인해 상업적으로 단당류의 탄소원을 많이 이용하게 된다. 배지 조건이 달라지면 발효 산물 또한 달라지기 때문에 안정적인 탄소원의 공급이 중요하다. 따라서 많은 유산 발효 업체들과 연구업체는 중국, 인도, 동남아시아 지역의 값싼 재배

작물에 관심을 갖고 협력 관계를 맺고 있다.

유산 발효 미생물은 생장을 위한 아미노산을 합성 할 수 없기 때문에 당원과 무기질 질소원으로는 생장할 수 없다. 따라서 생장에 필요한 아미노산과 비타민을 외부로부터 공급해야만 한다. 현재 유산 발효를 위한 질소원으로 효모추출물, 웨이, 엿기름, 소고기 추출물, 카세인, 콩 등이 사용되고 있다 [16,19,30]. 이 중 효모추출물이 가장 효율적인 것으로 알려져 있다 [19]. 효모추출물을 첨가하지 않은 경우 균체의 증가가 이루어지지 않고 결과적으로 유산 생산량도 저조하다. 그러나 효모추출물을 발효공정에 투입하는 경우 균체의 증가와 유산의 생산량이 증가하며, 특정 함량에서 최적값을 보임을 보고하고 있다. 효모추출물은 고가이기 때문에 가격이 유산 발효물의 경제성에 문제가 되고 있고, 이를 대체하기 위한 경제성 있는 질소원 연구가 진행되고 있다. 하지만, 질소원 자체의 경제성 뿐만 아니라 발효 전 멸균 과정과 발효 후 분리 정제에 영향을 고려하여야 경제적 D형 폴리 유산을 생산할 수 있다.

4.2. D형 유산 발효 방법

발효 방법은 크게 배치 발효와 연속 발효로 나눌 수 있다. 배치 발효는 한번에 일정량을 발효하는 공정으로 장비가 단순하고 공정 제어가 쉬우며 배지의 낭비가 없고 D형 유산의 수율이 매우 높다. 반면, 연속 발효는 배지를 연속적으로 공급하고 발효 산물을 계속 얻어내는 공정으로 D형 유산을 연속적으로 분리하는 설비가 필요하고 공정 제어가 어려운 반면 생산성이 높은 장점이 있다 [31]. 생산성 외의 다른 모든 부분에서 배치 발효가 우수하기 때문에 생산성을 확보하기 위해 배치 발효의 균주를 다음 배치에서 사용하는 반복적 배치 발효법으로 생산량을 증가시킬 수 있다 [9,32]. 반복적 배치 발효법의 경우 반복된 발효에서 일정한 발효 결과를 얻어야 한다. 이에 중국 과학원은 *Sporolactobacillus sp.* 미생물을 이용하여 발효가 반복되어도 D형 유산 생산 수율이 일정하게 유지되는 공정 연구 결과를 발표한 바 있다 [9]. 이 연구결과에 의하면 4회 배치 발효를 연속적으로 수행하는데, 선행 배치에서 약 10% 부피의 발효액을 다음 배치 공정에서 사용하는 방법으로 발효시간의 단축 및 노동력의 감소가 가능함을 보고하고 있다. 배치 발효법의 경우 발효에 의해 생성된 유산이 미생물의 유산 생성을 방해하여 유산 수율을 감소시키는 것을 극복하여야 높은 수율을 얻을 수 있다. 이를 극복하는 방법은 생산되는 유산을 연속적으로 반응기 외부로 추출해내는 방법으로 발효 반응기내 산성도를 제어할 수 있다.

연속 발효는 발효에 과정에서 나오는 유산을 연속적으로 분리 정제하여야 생성된 유산에 의해 미생물의 유산 발효가 영향을 받지 않는다. L형 유산 발효에 대해 연속 발효에 대한 연구결과가 발표된 바 있으며, 발효 산물인 유산의 분리 정제의 방법으로 전기투석법을 사용하였다 [33,34]. 이 연구결과에 의하면 발효반응기와 전기투석 장비를 온라인으로 연결하여 발효반응이 진행됨에 따라 생성되는 유산을 전기투석 방법으로 회수하게 되어 발효반응기내 유산의 농도를 최저로 유지시키는 방법으로 높은 생산성을 달성할 수 있음

을 보고하고 있다. 상기 방법으로 회수된 유산은 바이폴라 물분해 전기투석 방법으로 정제가 가능할 것으로 예상된다. 폴리유산 합성을 위한 유산의 경우 수율 및 순도가 중요하기 때문에 연속 발효 공정을 적용하여 생산성을 향상시키고 동시에 전기투석과 같은 방법을 사용하여 고순도의 유산을 정제하는 기술개발은 앞으로 매우 중요한 기술이 될 것으로 예측된다. 또한 미생물의 성장은 연속 발효 공정의 발효 산물에 영향을 준다 [35]. 미생물이 성장하게 되면 개체수가 많아지게 되고 배양액의 유동에 악영향을 주게 된다. 게다가 오래된 미생물 개체는 발효 산물에 악영향을 미쳐 유산 생산을 감소시킨다. 따라서 연속 발효 공정은 미생물의 접종과 배양의 효과적인 기술을 요구할 것으로 예측된다.

5. 결론

D형 유산 발효는 L형 유산 발효와 달리 응용 범위가 폴리유산 합성의 범위로 한정되어 있기 때문에 경제성 확보를 위해서는 고수율, 고순도를 요구한다. 일반적인 미생물을 이용하여 다양한 배지에 대한 D형 유산 연구가 이루어졌으나, 최근에는 유전자 조작을 이용한 고수율의 D형 유산을 생산하는 미생물에 대한 연구가 이루어지고 있다. 특히 자동차 업체인 일본 토요타자동차 중앙연구소를 비롯한 일본 학계 및 산업계의 공동 연구개발이 매우 활발하다. D형 유산 발효는 D형 폴리 유산의 경제성 확보라는 측면에서 접근되어야 하기 때문에 균주 발굴, 유전자 조작, 발효공정 및 분리 정제가 고려되어야 통합적으로 고려 되어져야 한다. 이러한 측면에서 낮은 pH에서 활성화되는 균주와 같이 멸균 처리 없이 발효를 할 수 있는 미생물에 대한 연구가 향후 매우 중요한 이슈가 될 것으로 예측된다. 멸균 처리는 배지의 조건에도 영향을 주기 때문에 멸균 문제로 사용하지 못하는 탄소원과 질소원을 배지로 사용 가능하게 할 것으로 예측된다.

대량 생산을 위한 D형 유산 발효 공정은 D형 유산의 수율과 비교적 높은 가격의 배지로 인해 반복적 배지 발효가 많이 사용될 것으로 예측된다. 동시에 급증할 것으로 예측되는 바이오 플라스틱의 수요로 인해 연속 발효 공정 및 그에 따른 연속 후처리 분리정제 기술 개발의 필요성이 매우 높아질 것으로 예측된다.

References

1. Ikada, Y., Y. Ikada, K. Jamshidi, H. Tsuji, and S. H. Hyon (1991) Stereocomplex formation between enantiomeric poly (lactides). *Macromolecules* 20: 904-906.
2. Lu, Z., M. Lu, F. He, and L. Yu (2009) An economical approach for d-lactic acid production utilizing unpolished rice from aging paddy as major nutrient source. *Bioresource Technology* 100: 2026-2031.
3. Hofvendahl, K. and B. Hahn-Hagerdal (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme and Microbial Technology* 26: 87-107.
4. Stiles, M. and W. Holzappel (1997) Lactic acid bacteria of foods

and their current taxonomy. *International Journal of Food Microbiology* 36: 1-29.

5. Benthin, S. and J. Villadsen (1995) Production of optically pure d-lactate by *Lactobacillus-Bulgaricus* and purification by crystallization and liquid-liquid-extraction. *Applied microbiology and Biotechnology* 42: 826-829.
6. Fukushima, K., K. Sogo, S. Miura, and Y. Kimura (2004) Production of d-lactic acid by bacterial fermentation of rice starch. *Macromolecular Bioscience* 4: 1021-1027.
7. Demirci, A. and A. Pometto (1992) Enhanced production of d (-)-lactic acid by mutants of *Lactobacillus delbrueckii* ATCC 9649. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology* 11: 23-28.
8. 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 Technology* 97: 211-217.
9. Zhao, B., L. Wang, F. Li, D. Hua, C. Ma, Y. Ma and P. Xu (2010) Kinetics of d-lactic acid production by *Sporolactobacillus* sp. strain CASD using repeated batch fermentation. *Bioresource Technology* 101: 6499-6505.
10. Zheng, H., J. Gong, T. Chen, X. Chen, and X. Zhao (2010) Strain improvement of *Sporolactobacillus inulinus* ATCC 15538 for acid tolerance and production of d-lactic acid by genome shuffling. *Applied Microbiology and Biotechnology* 85: 1541-1549.
11. Pan, J. G. and H. C. Jung (1997) A novel microorganism producing d-lactic acid and a process for producing d-lactic acid by using the same. *Korea Pat.* 1001224280000.
12. Zhou, S., T. B. Causey, A. Hasona, K. T. Shanmugam, and L. O. Ingram (2003) Production of optically pure d-lactic acid in mineral salts medium by metabolically engineered *Escherichia coli* W3110. *Applied and Environmental Microbiology* 69: 399-407.
13. Aksu, Z. and T. Kutsal (1986) Lactic acid production from molasses utilizing *Lactobacillus delbrueckii* and invertase together. *Biotechnology letters* 8: 157-160.
14. El-Sabaeny, A. (1996) Influence of medium composition on lactic acid production from dried whey by *Lactobacillus delbrueckii*. *Microbiologia* 12: 411-416.
15. McCaskey, T., S. D. Zhou, S. N. Britt, and R. Strickland (1994) Bioconversion of municipal solid waste to lactic acid by *Lactobacillus* species. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 45: 555-568.
16. Bustos, G., A. B. Moldes, J. L. Alonso, and M. Vázquez (2004) Optimization of d-lactic acid production by *Lactobacillus coryniformis* using response surface methodology. *Food Microbiology* 21: 143-148.
17. Kashket, E. (1987) Bioenergetics of lactic acid bacteria: cytoplasmic pH and osmotolerance. *FEMS Microbiology Letters* 46: 233-244.
18. Ye, K., S. Jin, and K. Shimizu (1996) Performance improvement of lactic acid fermentation by multistage extractive fermentation. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 81: 240-246.
19. Hujanen, M. and Y. Linko (1996) Effect of temperature and various nitrogen sources on L-(+)-lactic acid production by *Lactobacillus casei*. *Applied Microbiology and Biotechnology* 45: 307-313.
20. Yumoto, I. and K. Ikeda (1995) Direct fermentation of starch to L-(+)-lactic acid using *Lactobacillus amylophilus*. *Biotechnology letters* 17: 543-546.
21. Furuhashi, Y., Y. Kimura, and H. Yamane (2007) Higher order structural analysis of stereocomplex-type poly (lactic acid)

- melt-spun fibers. *Journal of Polymer Science Part B: Polymer Physics* 45: 218-228.
22. Hirata, M. and Y. Kimura (2008) Thermomechanical properties of stereoblock poly (lactic acid) s with different PLLA/PDLA block compositions. *Polymer* 49: 2656-2661.
 23. Hirata, M., K. Kobayashi, and Y. Kimura (2010) Synthesis and properties of high-molecular-weight stereo di-block polylactides with nonequivalent D/L ratios. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* 48: 794-801.
 24. Bi, C., X. Zhang, J. D. Rice, L. O. Ingram, and J. F. Preston (2009) Genetic engineering of *Enterobacter asburia* strain JDR-1 for efficient d (-) lactic acid production from hemicellulose hydrolysate. *Biotechnology letters* 31: 1551-1557.
 25. Joshi, D., M. S. Singhvi, J. M. Khire, and D. V. Gokhale (2010) Strain improvement of *Lactobacillus lactis* for d-lactic acid production. *Biotechnology letters*, 32: 517-520.
 26. Kosaki, M. and K. Kawai (1995) Production of high optical purity d-lactic acid, *US Pat.* 5,466,588.
 27. Kishimoto, K. (2010) Method for Producing Lactic Acid, US Pat Application US 2010/0086980 A1.
 28. Lee, C. (2007) Production of d-lactic acid by bacterial fermentation of rice. *Fibers and Polymers* 8: 571-578.
 29. Kulozik, U. and J. Wilde (1999) Rapid lactic acid production at high cell concentrations in whey ultrafiltrate by *Lactobacillus helveticus*. *Enzyme and Microbial Technology* 24: 297-302.
 30. Yang, J., Y. Cao, Y. Cai, and F. Terada (2010) Natural populations of lactic acid bacteria isolated from vegetable residues and silage fermentation. *Journal of Dairy Science* 93: 3136-3145.
 31. Nomura, Y., M. Iwahara, and M. Hongo (1987) Lactic acid production by electro dialysis fermentation using immobilized growing cells. *Biotechnology and Bioengineering* 30: 788-793.
 32. Senthuran, A., V. Senthuran, R. Kaul, and B. Mattiasson (1996) Lactic acid fermentation using immobilized *Lactobacillus casei* cells. *Progress in Biotechnology* 11: 570-575.
 33. Hirata, M., M. Gao, E. Toorisaka, H. Takanashi, and T. Hano (2005) Production of lactic acid by continuous electro dialysis fermentation with a glucose concentration controller. *Biochemical Engineering Journal* 25: 159-163.
 34. Hongo, M., Y. Nomura, and M. Iwahara (1986) Novel method of lactic acid production by electro dialysis fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* 52: 314.
 35. Narayanan, N., P. Roychoudhury, and A. Srivastava (2004) L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology* 7: 167-178.