

## 패류로부터 분리된 젖산균에 의한 젖산의 생산

강창호, 정호진, 구자룡, 소재성\*

# Production of Lactic Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from Shellfish

Chang-Ho Kang, Ho Geon Jung, Ja-Ryong Koo, and Jae-Seong So\*

Received: 25 June 2015 / Revised: 3 August 2015 / Accepted: 10 August 2015

© 2015 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Lactic acid and its derivatives are widely used in the food, pharmaceutical, and cosmetic industries. It is also a major raw material for the production of poly-lactic acid (PLA), a biodegradable and environmentally friendly polymer and a possible alternative to synthetic plastics derived from petroleum. For PLA production by new strains of lactic acid bacteria (LAB), we screened LAB isolates from shellfish. A total of 51 LAB were isolated from 7 types of shellfishes. Lactic acid production of individual isolates was examined using high-performance liquid chromatography using a Chiralpak MA column and an ultraviolet detector. *Lactobacillus plantarum* T-3 was selected as the most stress-resistant strain, with minimal inhibition concentrations of 1.2 M NaCl, 15% ethanol, and 0.0020% hydrogen peroxide. In a 1 L fermentation experiment, D-lactic acid production of 19.91 g/L fermentation broth was achieved after 9 h cultivation, whereas the maximum production of total lactic acid was 41.37 g/L at 24 h.

**Keywords:** Lactic acid bacteria, Poly-lactic acid, Isolation, Fermentation

### 1. INTRODUCTION

젖산 (Lactic acid)은 오래 전부터 식품과 연계된 다양한 분야

에서 사용되고 있으며, 최근 생분해성 플라스틱 (biodegradable plastic) 생산과 같은 다양한 산업에도 사용되고 있다 [1]. 기존의 산업적 이용에 있어서 젖산 생산량의 85%는 식품과 식품과 연계된 산업에 대부분 사용되고 있으며, 나머지 15% 정도가 식품과 관련되지 않은 산업에 사용되고 있었다. 유연필름 (flexible film)과 경질용기 (rigid container)와 같은 플라스틱 포장재의 경우, 플라스틱 수지 (resin)의 수요가 증가하면서 미국 내에서만 포장재로 약 35조원에 달하는 시장으로 성장하고 있다 [2]. 플라스틱 포장재의 시장이 성장하면서 석유화학계 플라스틱 (petrochemical plastics)의 대안으로 환경친화적인 플라스틱의 사용이 증가하면서 젖산의 수요 또한 꾸준히 증가하고 있다. 젖산 중합체 (lactic acid polymer)는 생분해성, 열가소성과 고강도성의 장점을 가지고 있으며, 이러한 장점은 플라스틱 분야의 사용에 있어서 잠재적인 시장 가능성을 가지게 된다 [3].

젖산발효에 있어서 생물공학적인 생산의 가장 큰 장점은 당밀, 탄수화물, 셀룰로오스와 같은 발효공정에서의 원부자재의 가격이 매우 저렴하다는 데 있다 [4,5]. 젖산은 화학적 전환기술로 중합 중간체인 락타이드 (lactide)나 아크릴산 (acrylic acid) 등의 유용 화학물질로 변환된다. L형 젖산과 D형 젖산을 같이 사용한 경우, 폴리 젖산 (poly lactic acid)의 용점이 높아지고 결정화도가 증가되는 현상을 보여 결과적으로 소재의 높은 열안정성 확보가 가능하다 [6,7]. L형 젖산의 경우 식품산업에서 대부분의 응용분야에 사용되기에 많은 연구가 이루어져 있는 반면, D형 젖산의 경우 응용성이 낮아 연구가 거의 이루어지지 않았다.

이에 본 연구에서는 다양한 패류에서 분리한 젖산균의 젖산생산량을 분석하고, 선별된 균주의 다양한 환경 스트레스에 대한 내성을 확인하도록 한다. 또한 발효과정에서 선별 균

인하대학교 생물공학과  
Department of Biological Engineering, Inha University, Incheon 22212, Korea  
Tel: +82-32-860-7516, Fax: +82-32-872-4046  
e-mail: sjaeseon@inha.ac.kr

주의 젖산생산 변화를 확인하여 생분해성 플라스틱 산업에서의 미생물 사용에 있어서 기초 자료로 이용하고자 한다.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. 균주의 분리

2011년 5월부터 12월까지 인천 서해안의 양식어장에서 채취한 패류(굴, 바지락, 진주담치, 돌조개, 백합, 소라, 동죽)를 냉장상태를 유지하면서 실험실로 운반하여 균주 분리실험을 진행하였다. 패류시료 중 패각이 손상되지 않은 것을 골라 멸균된 칼로 내용물을 200 g이 될 때까지 탈각하여, 멸균된 비커에 넣은 후 phosphate buffered saline (PBS; 2.5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.2) 200 mL를 부어 혼합한다. 혼합 후에 멸균된 blending cup에 넣어 blender (7011S, Waring, Torrington, CT)를 이용하여 90초 (18,000 rpm으로 30초, 22,000 rpm으로 60초)동안 갈아준다. PBS로  $10^{-1}$ ~ $10^{-2}$ 까지 희석한 용액 100  $\mu\text{L}$ 를 Rogosa SL (Difco, MD, USA)고체배지에 도말한 후 [8],  $\text{CO}_2$  치환하여 37°C에서 2일간 배양한다. 생성된 콜로니는 0.1% bromocresol purple (BCP)가 들어있는 Lactobacilli MRS (Difco, MD, USA) 평판배지에 배양하여 실험 균주로 사용하였다. 순수분리된 균주는 MRS 액체배지에서 배양한 후 25% glycerol로 조성하여 -70°C에서 보관하며 동정과 생화학적 특성 시험에 사용하였다.

### 2.2. 분리균주의 동정

분리된 균주는 MRS 액체배지에서 37°C에 24시간 배양한 후 그람염색 [8]을 실시하여 위상차 현미경으로 형태학적 특성을 관찰하였다. 또한 분리한 균주의 생화학적 특성은 Cappuccino [9]와 Ruoff [10]의 방법을 참고하여 실험을 실시하였다. Catalase test는 배양 평판에 3% hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )를 첨가한 후  $\text{O}_2$  발생 유무를 관찰하였고, oxidase test는 콜로니를 비금속성 막대를 사용하여 슬라이드에 올려놓고 Kovac's reagent를 한 방울 떨어뜨려 변색여부를 관찰하였다. 분리된 균주 중 높은 D형 젖산 생산량을 보이는 균주에 대해서 API 50CHL kit을 사용하여 배지의 색변화를 관찰한 후, API web program (<http://apiweb.biomerieux.com>, Biomerieux, Grenoble, France)을 이용하여 동정하였다.

### 2.3. 환경 스트레스 실험

환경스트레스에 높은 내성을 갖는 젖산균을 선별하기 위한 방법으로 2단계에 걸쳐 실험을 진행하였다. 1단계는 D형 젖산 생산량이 높은 균주를 1차적으로 선별하고, 선별된 균주에 대해서 2단계로 염농도, 에탄올, 과산화수소에 대한 환경스트레스에 대한 최소억제농도 (MIC, minimum inhibitory concentration) 실험을 진행하였다. 염농도 (1.0~2.0 M), 에탄올 (5~20%), 과산화수소 (0.0010~0.0020%)의 조건에서 선별된 젖산균의 환경스트레스 내성을 비교하였다. 모든 스트레스 내성 실험은 96 well microtiter plate에서 진행하였다. 24시간

배양한 젖산균을 5,500×g에서 5분간 원심분리하여, 새로운 MRS 액체배지로  $\text{OD}_{600}=1.0$ 이 되도록 현탁하였다. 해당 stress 조건이 처리된 plate에 현탁액을 10% 접종하여, 37°C에서 24시간 배양한 후,  $\text{OD}_{600}$ 에서 흡광도를 측정하였다.

### 2.4. 선별된 젖산균의 배양

최종 젖산 발효에 사용된 균주는 최종 선별된 *Lactobacillus plantarum* T-3를 사용하였다. Seed culture는 300 mL flask에서 MRS 액체배지 50 mL로 하여 36시간 동안 배양하였다. 젖산 발효는 3 L 발효조 (PharmswellBio Co., Ltd., Seoul, Korea)에서 MRS 액체배지 1 L로 하여 단계적으로 젖산발효를 수행하였다. 발효과정 중 pH는 5.0~5.5 사이로 50% 수산화암모늄으로 조절하면서 3시간 마다 시료를 채취하여 pH와 흡광도를 측정하고, HPLC (Younglin, Korea)를 이용하여 생성된 L형 및 D형 젖산을 분석하였다.

### 2.5. HPLC를 이용한 젖산 생산량 분석

분리된 젖산균은 MRS 액체배지 5 mL에서 48시간 동안 정지 배양한 후, 배양액을 0.22  $\mu\text{m}$  filter (Minisart, Satorius)를 사용하여 필터링하여 HPLC를 통해 L형과 D형의 젖산 생산량과 총 젖산 생산량을 분석하였다. 분석에 사용된 컬럼은 Chiralpak® MA(+) (reverse phase type, 4.6×50 mm, 5  $\mu\text{m}$ , Daicel Chemicals Industries Ltd., Tokyo, Japan), 이동상으로는 2 mM  $\text{CuSO}_4$ 를 1.0 mL/min의 유속으로 이용하였고, UV 검출기로 254 nm에서 검출하였으며, 시료 주입량은 10  $\mu\text{L}$ 였다. L형과 D형 젖산의 표준용액은 L-(+)-Lactic acid와 D-(-)-Lactic acid (analytical standard, Sigma-Aldrich, SL, USA)를 사용하였다.

## 3. RESULTS AND DISCUSSION

### 3.1. 패류에서 젖산균의 분리

일반적으로 젖산균은 해양환경에서의 주요 미생물군에 포함되지 않으나, 해수 및 어류 등에서 *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* 속 등이 발견되기도 한다 [11]. 자연생태계에서의 미생물의 분리 및 특성연구는 미생물을 산업적으로 사용하는데 있어서 안정적이고 효율적으로 사용할 수 있는 중요한 기초 연구가 되고 있다 [12]. 본 연구에서는 서해안에서 양식되는 굴 (*Crassostrea gigas*), 바지락 (*Tapes philippinarum*), 진주담치 (*Mytilus edulis*), 돌조개 (*Arca avellana Lamarck*), 백합 (*Meretrix meretrix*), 소라 (*Turbo cornutus*), 동죽 (*Macrura veneriformis Reeve*) 등 총 7종에서 분리한 51개의 분리균주에 대해서 형태학적 및 생리 화학적 특성을 조사하였다. 총 51개의 균주 중 굴에서 18개 균주가 분리되어 전체의 35.3%의 분리비율을 보였다. 그 외에는 바지락에서 10개 (19.6%), 소라에서 7개 (13.7%), 진주담치에서 6개 (11.8%), 돌조개에서 5개 (9.8%), 동죽에서 3개 (5.9%), 백합에서 2개 (3.9%)가 분리되었다. 그람 염색을 실시하여 위상차

현미경으로 관찰한 결과, 분리균주 모두 그람 양성으로 확인되었다. 또한 catalase와 oxidase는 음성이었고, BCP가 들어있는 MRS 배지에서 산을 생산하여 생성된 콜로니 주변이 노란색으로 변하는 젖산균의 일반적인 특징과 일치하였다. 젖산균은 일반적으로 다양한 동물의 장내 [13]와 해산물 [14] 등에서 발견되고 있다. 산업에서 사용하는 일반적인 미생물은 공정상에서의 다양한 스트레스 변화에 적응하지 못하는 것이 일반적이나, 자연생태계에서의 미생물은 생존을 위해 스트레스에 즉각적으로 반응하는 능력을 갖추고 있다 [15]. 최근 연구에 따르면 자연상태에서 분리한 젖산균이 다양한 환경 스트레스에 높은 저항성을 보이고 있으며, 이는 젖산균의 산업적인 적용에 있어서 가장 중요한 부분이 되기도 한다 [16].

**3.2. HPLC에 의한 젖산 생산량 확인 및 동정**

젖산균의 발효는 일반적으로 동형발효 (homo fermentation) 와 이형발효 (hetero fermentation) 2가지로 구분된다. 젖산균의 발효는 미생물의 종류와 탄소원, 질소원 그리고 발효방법에 따라 생성되는 젖산의 양과 부산물이 달라진다 [17]. 본 연구를 통해 분리한 51개의 잠재적인 젖산균을 MRS 배지에서 배양하여, 대사물질로 배양액에서 생산되는 L형과 D형 젖산을 확인해 보았다 (Table 1). D형 젖산생산량을 보면, T-3 균주가 16.5015 g/L로 가장 높은 생산량을 보였으며, M-3 균주는 15.6392 g/L로 다음으로 높은 생산량을 보였다. 그 외에 T-1, D-3, D-4 균주가 각각 12.8280, 12.3631, 11.9710 g/L의 D형 젖산을 생산되는 것을 확인하였다. 분리균주 중 D형 젖산량이 높은 상위 5개 균주를 동정한 결과, 모두 *Lactobacillus plantarum*으로 동정되었다.

**3.3 환경스트레스 (염농도, 에탄올, 과산화수소) 실험**

총 51개의 분리균주 중 D형 젖산 생산량이 우수한 5개 균주 (D-3, D-4, M-3, T-1, T-3)를 선별하여 각 환경스트레스에 따른 MIC를 확인하였다 (Table 2). 염농도에 대한 MIC는 T-3과 D-4 균주가 1.2M로 가장 높은 저항력을 보였으며, 2 균주를 제외한 선별균주는 1.0 M 이하의 염농도에 대한 MIC 결과를 보였다. 에탄올에 대한 MIC 결과를 보면, T-3와 D-4 균주가 15%로 가장 높은 MIC 결과를 보였다. 과산화수소 실험에서는 5개 선별 균주 모두 0.0020%로 높은 MIC 결과를 보였다. D형 젖산 생산량과 각 환경스트레스에 대한 MIC 결과를 토대로 *Lactobacillus plantarum* T-3 균주가 산업적으로 사용 가능한 가장 적합한 균주로 사료된다. *L. plantarum*은 소시지나 오이피클, 사일리지 (silage) 등과 같은 발효식품을 만드는 데 있어서 종균배양 균주로 주로 사용되고 있다 [18]. 여러 연구를 통해 *L. plantarum*은 pH 3.0에서도 생존이 가능한 균주 [19,20]로 젖산 발효공정에서의 낮은 pH에서 다른 젖산균에 비해 큰 장점을 갖게 된다.

**3.4. 젖산 발효**

여러 생분해성 고분자 중 젖산을 중합하여 만든 폴리 젖산은

**Table 1.** Production of D- and L-lactic acid by lactic acid bacteria isolated from shellfish

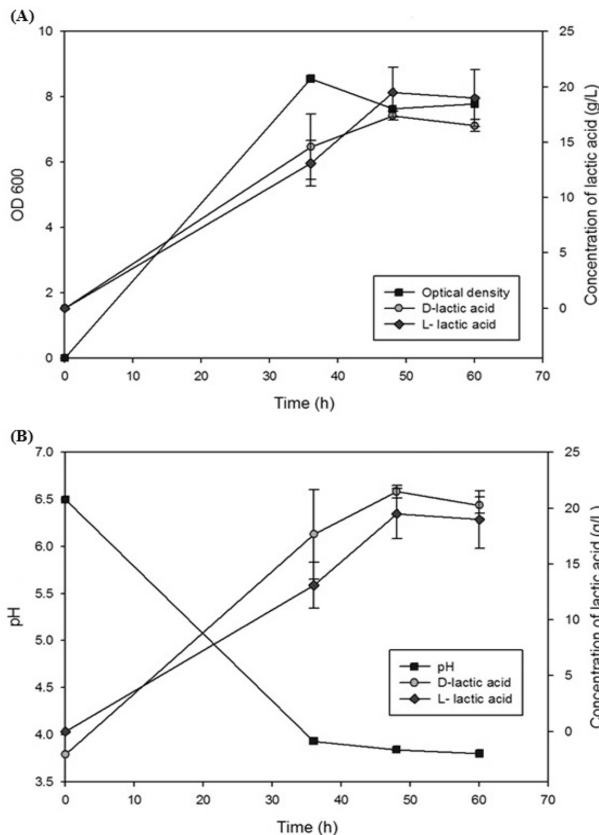
Origin	Strains	D-lactic acid (g/L)	L-lactic acid (g/L)
<i>Turbo cornutus</i>	B-1	ND <sup>1)</sup>	ND
	B-2	3.9395	ND
	B-3	5.2065	ND
<i>Macraa veneriformis</i> Reeve	C-3	0.3678	4.2802
	C-4	0.5237	5.2838
	C-5	ND	2.046
<i>Arca avellana</i> Lamarck	D-1	4.3065	6.5673
	D-3	12.3631	13.6927
	D-4	11.971	14.6778
	D-5	1.2601	1.1846
	D-6	4.4348	8.8213
<i>Meretrix meretrix</i>	H-1	8.9418	7.9151
	H-2	0.9685	-0.1335
<i>Mytilus edulis</i>	M-1	9.5042	-1.0698
	M-3	15.6392	18.5243
	M-4	6.4138	25.8938
	M-5	3.8314	29.0796
	M-6	8.3324	5.4795
	M-7	0.5653	19.9733
	<i>Tapes philippinarum</i>	S-1	ND
S-2		10.4217	-0.9074
S-3		ND	ND
S-4		0.0805	0.3186
S-5		0.5021	0.5851
S-6		4.2832	11.4643
S-7		0.4986	1.0009
S-8		0.839	1.114
S-9		1.2941	6.8979
S-10		1.2943	-0.2262
<i>Turbo cornutus</i>	T-1	12.828	14.6405
	T-2	2.8856	17.8032
	T-3	16.5015	21.547
	T-4	5.1612	26.9722
<i>Crassostrea gigas</i>	O-2	7.015	19.9454
	MH-5	ND	33.6856
	MH-6	ND	ND
	MH-8	11.6641	12.0955
	MH-15	ND	38.315
	MH-19	10.9012	12.0504
	MH-21	11.296	13.2163
	MH-22-1	ND	42.8432
	MH-22-2	ND	42.6857
	MH-33	11.4294	12.66
	MH-44	ND	19.8449
	MH-49	ND	39.3701
	MH-51	ND	38.9455
	MH-53	11.8035	12.9316
	MH-55	ND	34.3772
	MH-58	11.4345	12.7371
	MH-62	11.3901	10.1061
MH-67	ND	43.6287	

<sup>1)</sup>ND: not detected.

**Table 2.** Minimum inhibitory concentrations of various environmental stresses

Strain	Identification	Salt (M)	EtOH (%)	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (%)
T-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.2	15	0.0020
M-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.0	5	0.0020
T-1	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Below 1.0	10	0.0020
D-3	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.0	10	0.0020
D-4	<i>Lactobacillus plantarum</i>	1.2	15	0.0020

기존의 석유계 기반 플라스틱을 대체할 수 있는 고분자 소재로 각광받고 있다. 기존의 연구를 통해서 폴리 젯산의 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 [21]. 실험실규모의 발효실험으로 *L. plantarum* T-3의 200 mL MRS 액체배지에서 젯산발효 결과는 Fig. 1과 같다. 배양 후 36시간까지 OD가 급격히 증가하였으며, D형 젯산생산량은 48시간까지 증가하는 것을 확인할 수 있었다 (Fig. 1A). 발효과정 중 pH는 36시간까지 약 3.8까지 급격히 낮아지다가 36시간 이후로는 변화가 없는 것을 확인할 수 있다 (Fig. 1B). 여러 연구를 통해 젯산발효에 있어서 pH나 기질과 같은 요인들이 발효과정에서의 다양한 역학과

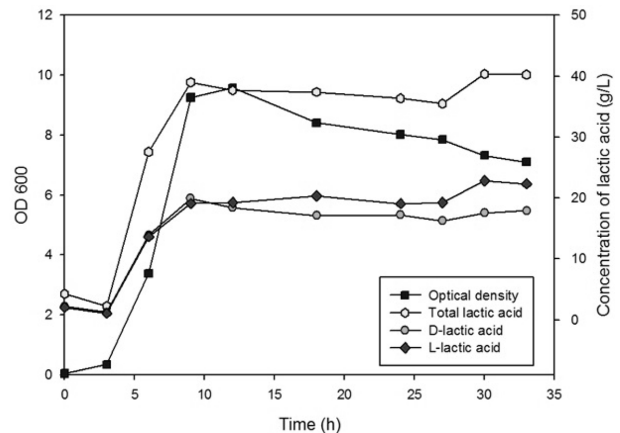


**Fig. 1.** Lactic acid production with growth and pH change of *Lactobacillus plantarum* T-3 in a 200-mL fermentation. (A) Lactic acid production with growth, (B) Lactic acid production with pH change.

정에 영향을 미친다고 알려져 있다 [22]. 플라스크상의 결과를 토대로 *L. plantarum* T-3의 3L 발효조에서의 배양 결과는 Fig. 2와 같다. 50% 수산화암모늄을 통해 배양 중 pH는 5.0~5.5 사이로 조절하였으며, pH 5.5에서의 총 젯산의 생산량은 OD의 증가곡선과 유사하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. D형 젯산은 배양 9시간 때 19.91 g/L의 가장 높은 생산량에 도달하였다. 반면에 총 젯산 생산량은 배양 24시간 때 41.37 g/L의 생산량을 보였다. 동형 젯산발효의 경우, 1 M의 글루코스 (glucose)에서 2 M의 젯산을 생산할 수 있지만, 실제적으로 100% 전환은 매우 어렵다 [22]. 기존의 연구를 통해서 최초 글루코스의 농도가 200g/L 이상일 때 최종 젯산 생산량이 증가하는 것으로 알려져 있다 [23,24]. Yun [23]의 연구결과에서는 최초 글루코스의 농도가 200g/L 일 때 92%의 수율로 185 g/L의 젯산을 생산하였으며, Goncalves [24]의 연구에서는 70%의 수율로 140 g/L의 젯산을 생산한 것으로 알려져 있다. 또한 배양과정에서의 최적 pH는 5~6으로 알려져 있으며, 글루코스를 모두 소비하는데 15~30시간 정도 소요되는 것으로 알려져 있다. 이러한 결과를 토대로 추후 *L. plantarum* T-3 균주의 대량배양 과정에서 젯산생산에 있어 높은 수율을 기대할 수 있을 것이라 사료된다.

#### 4. CONCLUSION

본 연구는 서해안에서 양식되는 총 7종의 패류로부터 젯산



**Fig. 2.** Lactic acid production with cell growth at pH 5.5 of *Lactobacillus plantarum* T-3 in a 1-L fermentation.

을 생산하는 균주를 분리하고, HPLC를 통해 생산되는 L형과 D형 젖산의 생산량과 환경스트레스에서의 내성을 확인하고자 하였다. 분리된 51개 균주는 MRS 배지에서 배양되었으며, 형태학적 관찰 및 생화학적 특성을 통해 젖산균의 일반적인 특성을 나타내는것을 확인하였다. HPLC를 통해 D형 젖산생산량이 높은 상위 5개 균주를 선별하여, 다양한 환경스트레스 (염농도, 에탄올, 과산화수소)에서의 내성을 확인하여, 최종적으로 *L. plantarum* T-3 균주를 선별하여 발효과정에서의 젖산생산량을 확인해보았다. 3L 발효조에서의 배양과정 중 pH 5.5에서의 총 젖산 생산량은 OD의 증가곡선과 유사하게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. D형 젖산은 배양 9시간 때 19.91 g/L로 가장 높은 생산량을 보였으며, 총 젖산 생산량은 배양 24시간 때 41.37 g/L의 생산량을 보였다. 차후 본 연구를 통해 선별된 *L. plantarum* T-3 균주에 대해서 유전공학적인 방법으로 L형 젖산을 만드는 L-lactate dehydrogenase gene을 knockout하거나, D형 젖산을 만드는 D-lactate dehydrogenase gene을 과발현시켜 순수한 D형 젖산의 생산량을 높여 산업적인 사용가능성을 확인해 볼 것이다.

## REFERENCES

- Ozeki, E. (1996) Characteristics of poly (L-lactide) as biodegradable plastics. *Shimadzu Rev.* 53: 1-8.
- Anonymous. (1999) Resins report. pp.72-80. In: *Modern Plastics*, McGraw-Hill Co, NY, USA.
- Datta, R., and M. Henry (2006) Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies - A review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 81: 1119-1129.
- Anuradha, R., A. K. Suresh, and K. V. Venkatesh (1999) Simultaneous saccharification and fermentation of starch to lactic acid. *Process. Biochem.* 35: 367-375.
- Vishnu, C., G. Seenayya, and G. Reddy (2000) Direct conversion of starch to L (+) lactic acid by amylase producing *Lactobacillus amylophilus* GV6. *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 23: 155-158.
- Rojan, P. J., K. M. Nampoothiri, A. S. Nair, and A. Pandey (2005) L(+)-lactic acid production using *Lactobacillus casei* in solid-state fermentation. *Biotechnol. Lett.* 27: 1685-1688.
- Rojan, P. J., G. S. Anisha, K. M. Nampoothiri, and A. Pandey (2009) Direct lactic acid fermentation: Focus on simultaneous saccharification and lactic acid production. *Biotechnol. Adv.* 27: 145-152.
- Gerhardt, P., R. G. E. Murray, W. A. Wood, and N. R. Krieg (1994) *Methods for general and Molecular Bacteriology*. pp. 31-32. American Society for Microbiology, Washington DC, USA.
- Cappuccino, J. G. and N. Sherman (1992) Biochemical activities of microorganisms. In: *Microbiology, A Laboratory Manual*. 2nd ed., pp. 125. The Benjamin Cummings Publishing Company, San Francisco, CA, USA.
- Ruoff, K. L. (1993) The genus *Streptococcus*-medical. In: *The Prokaryotes*. 2nd ed., pp. 1450. Springer, New York, NY, USA.
- Ghanbari, M., M. Jami, K. J. Domig, and W. Kneifel (2013) Seafood biopreservation by lactic acid bacteria - A review. *LWT-Food Sci. Technol.* 54: 315-324.
- Sobrun, Y., A. Bhaw-Luximon, D. Jhurry, and D. Puchooa (2012) Isolation of lactic acid bacteria from sugar cane juice and production of lactic acid from selected improved strains. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 3: 398-407.
- Tannock, G. W. (1988) The normal microflora: new concepts in health promotion. *Microbiol. Sci.* 5: 4-8.
- Nikoskelainen, S., A. Ouwehand, G. Bylund, S. Salminen, and E. M. Lilius (2003) Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). *Fish Shellfish Immunol.* 15: 443-452.
- Storz, G. and R. Hengge-Aronis (2000) *Bacterial Stress Responses*. pp. 485. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA.
- Mergeay, M. (2000) Bacteria adapted to industrial biotopes: Metal-resistant ralstonia. pp.403-414. In: G. Storz, and R. Hengge-Aronis (eds.). *Bacterial stress responses*. American Society for Microbiology Press, Washington DC, USA.
- Hofvendahl, K. and B. Hahn-Hagerdal (2000) Factors affecting the fermentative lactic acid production from renewable resources. *Enzyme Microb. Technol.* 26: 87-107.
- Vescovo, M., S. Torriani, F. Dellaglio, and V. Bottazzi (1993) Basic characteristics, ecology and application of *Lactobacillus plantarum*: A review. *Ann. Microbiol. Enzymol.* 43: 261-284.
- Daeschel, M. A. and I. F. Nes (1995) *Lactobacillus plantarum*: physiology, genetics, and applications in foods. In: Y. H. Hui, and G. G. Khachatourians (eds.). *Food Biotechnology: Microorganisms*. VCH Publishers, Inc., New York, NY, USA.
- McDonald, L. C., H. P. Fleming, and H. M. Hassan (1990) Acid Tolerance of *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus plantarum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2120-2124.
- Takaaki, 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. *Biore-sour. Technol.* 92: 211-217.
- Buchta, K. (1983) Lactic acid. In: H. J. Rehm, and G. Reed (eds.). *Biotechnology*. VCH Publishers, Inc., New York, NY, USA.
- Yun, J. S., Y. J. Wee, and H. W. Ryu (2003) Production of optically pure L(+)-lactic acid from various carbohydrates by batch fermentation of *Enterococcus faecalis* RKY1. *Enzyme Microb. Technol.* 33: 416-423.
- Goncalves, L. M. D., A. N. R. B. Xavier, J. S. Almada, and M. J. T. Corronodo (1991) Concomitant substrate and product inhibition kinetics in lactic acid production. *Enzyme Microb. Technol.* 13: 314-319.