

Lactobacillus sporogenes 에 의한 젖산칼슘 생산

I. 젖산발효

이계근 · 김영만 · 민경찬*

일동제약(주) 중앙연구소
* 신홍전문대학 식품영양과

(1988. 12. 26 수리)

The Production of Calcium Lactate by *Lactobacillus sporogenes*

I. Lactic acid Fermentation

Gye-Keun Lee, Young-man Kim and *Kyung-Chan Min

Research Laboratories, Il Dong Pharm. Co., Ltd.

* Department of Food and Nutrition, Shin-Heung College

(Received December 29, 1988)

Abstract

In order to produce lactic acid and calcium lactate very useful for foods and medical supplies, lactic acid fermentation was studied by *Lactobacillus sporogenes*, a spore forming lactic acid bacterium. When this bacterium was cultured aerobically in the spore forming medium, the spore forming rate was 96.0% as total cell number $20 \times 10^8/\text{ml}$, spore number $19.2 \times 10^8/\text{ml}$.

One minute agitating every 1 hour in the flask culture, or agitation of 100rpm in the fermenter was most efficient to continue to ferment at 45°C for 4 days in the fermentation medium containing 10% glucose as carbohydrate and CaCO_3 as a neutralizing agent. This homofermentative lactic acid bacterium showed fermentation yield of 99.3% and more than 98.2% of the yield was L(+)-lactic acid.

I. 서 론

젖산은 동물, 식물과 미생물등 생물⁽¹⁾에 의해 자연계에서 널리 생성된다. 이 젖산은 1780년 Sweden의 화학자 Scheele에 의해 sour milk에서 처음으로 발견되었고, 1847년 Blondeau⁽²⁾가 발효의

최종산물로서 젖산을 확인하였다.

이 젖산발효는 미생물 특히 유산균의 종류에 따라서 homolactic fermentation과 heterolactic fermentation의 두가지⁽³⁾로 나누어진다. 유산균은 *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Lactobacillus*와 *Leuconostoc*의 4군속⁽⁴⁾으로 이루어졌으며 이외에 wild la-

Key words : *Lactobacillus sporogenes*, calcium lactate, lactic acid fermentation.

ctobacillus genus로서 유포자 유산균^(5,6)이 있다. Homolactic acid fermentation은 발효성 당의 85% 이상을 젖산으로 전환하고 부산물로서 소량의 acetic acid, ethanol, formic acid와 CO₂가 생성된다. Hetero lactic acid fermentation은 젖산과 부산물을 동량 생성한다^(4,7).

생성된 젖산은 부제탄소원자를 갖고 있기 때문에 dextrorotatory, L(+)-lactic acid와 levorotatory, D(-)-lactic acid의 두가지 광학활성형과 불활성형인 racemate, DL-lactic acid로 만들어진다. 이러한 이유⁽¹⁾는 lactate dehydrogenase의 형태에 따라서 pyruvic acid로 부터 L-lactate dehydrogenase는 L(+)-lactic acid를 만들고 lactate racemase는 DL-lactic acid의 racemate를 만들기 때문이다. Lactic acid의 광학활성형은 영양학적으로 중요⁽³⁾하며 다량의 D(-)-lactic acid나 DL-lactic acid를 흡수하면 혈액에 D(-)-lactic acid가 풍부하여 오줌에 과산증(hyperacidity)이 발생하므로 세계보건기구(World Health Organization)에서 D(-)-lactic acid의 소비를 100mg/kg/day이하로 제한하고 있다.

이 젖산⁽⁸⁾은 보존성과 신맛을 주기 때문에 식품공업에서 음료, 향료, 과일주스 등과 제빵, 양조등의 산성화에 이용되며, 제혁공업에서 가죽의 탈석회 및 부드럽게 하는데 이용되며, 방직공업에서는 매염조제, plastic 공업에서는 보조원료로 사용되며 특히 젖산칼슘과 Fe-lactate는 Ca요법, 빈혈치료제의 의약품^(1,7)으로 이용되고 있다.

본 실험에서는 젖산과 의약품의 Ca요법에 널리 사용되는 젖산칼슘을 생산하고자 유산균 정장제로 사용되는 유포자 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*에 의한 젖산발효시험을 하여 보고한다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주

유포자 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*는 일동 제약 중앙연구소에 보존된 균주를 사용하였다.

2. 포자형성 배양방법

사면배양한 종균 1백금이를 Table 1의 전배양용 A배지(배지주입량; 150ml/500ml용 진탕후라스크)에 접종하여 45°C에서 7시간 진탕배양(진탕속도, 140strokes/min; 진폭 7cm)한 전배양액을 포자형성용 D배지(배지주입량; 150ml/500ml용 진탕후라스크)에 배지량의 3%(4.5ml)접종한다.

포자형성용 D배지는 전배양과 동일한 호기조건으로 45°C에서 24시간 진탕배양하였다. 생균수 측정은 Table 1의 C배지를 이용한 plate count method로 45°C에서 2일 배양하여 CaCO₃를 투명하게 액화시키고 BCP(Brom cresol purple)를 황변시킨 colony를 계측하여 생균수를 측정하였고, 포자수는 생균수 측정시의 최종희석액을 75°C에서 30분간 열처리한 후 동일하게 plate count하여 나타난 생균수를 포자수로 하고 생균수에 대한 포자형성을 구하였다.

Table 1. Composition of culture media

Medium for	Yeast extract(%)	Peptone (%)	Glucose (%)	CaCO ₃ (%)	BCP (%)	Agar (%)	pH
Multiplication(A)	0.5	0.5	0.2				6.8
Agar slant(B)	0.5	0.5	0.2			1.5	6.8
Plating(C)	0.5	0.5	1.0	0.1	0.003	1.5	6.8
Formation of spores(D)	1.0	0.5					5.0
Production of lactic acid(E)	0.5	0.25	10	7			6.8

3. 젖산발효 방법

상기 전배양액을 젖산발효용 E배지(배지주입량 : 200ml/300ml용 삼각후라스크)에 배지량의 3% (6ml)를 접종한다. 젖산발효는 45°C에서 5일간 정치발효를 하였으며, 발효 18시간후 부터 매 1시간마다 발효중인 배양액을 1분간 흔들어서 생성된 젖산을 첨가된 CaCO₃로 중화하였다.

4. 발효율 및 젖산생성율의 측정

Table 1의 E배지로 45°C에서 5일간 정치발효한 후 원심분리하여 균체와 과잉의 CaCO₃를 제거한 여액중의 잔당, 총산, 휘발산의 생성량을 측정하여 발효율은 초기 당량에 대한 소비당으로, 젖산 생성율은 소비한 당에 대해 생성한 젖산량으로 구하였다. 잔당분석은 Lehmann-Schoorl법⁽⁹⁾으로 측정하였고, 총산은 발효액중 용존된 Ca량을 EDTA적정법⁽¹⁰⁾으로 측정하였으며, 휘발산은 발효액을 황산으로 처리하여 유리된 산을 수증기로 증류하여 얻은 증류액을 0.1N NaOH로 적정하여 acetic acid로 계산하였고, 총산에서 휘발산을 제외한 비휘발산은 젖산으로 계산하였다. 또한 발효여액중의 생성된 젖산 확인은 효소학적방법에 의한 젖산 정량법⁽¹¹⁾으로 확인하였다.

5. 젖산의 선풍성 측정

(1) Zn-lactate를 만들어 선풍성을 측정하는 방법

발효용 E배지의 배양액중 젖산칼슘을 황산으로 분해한 후 ether로 침출하여 얻은 비휘발산을 탄산아연으로 중화하고 감압 농축시켜 얻은 젖산아연을 소량의 냉수로 세척하고, CaCl₂상에서 건조시켰다. 이 결정 젖산아연을 toluene으로 110°C 부근에서 감압하에 탈수시켜 젖산아연의 5%수용액의 선풍도를 20cm 선풍관에서 측정하였다. 이 조건에서 얻은 반대의 선풍성을 나타내므로 좌선성(-)lactic acid는 positive ($[\alpha]_{20}^D = +7 \sim 8^\circ$), 우선성(+)lactic acid는 negative value ($[\alpha]_{20}^D = +7 \sim -8^\circ$)를 나타낸다.

(2) L(+)lactate의 효소학적 정량법

발효시험용 E배지의 배양여액을 효소학적 L(+)lactic acid정량법⁽¹¹⁾ (L(+) lactate procedure No, 826-UV, Sigma diagnostics kit)에 의해 NAD

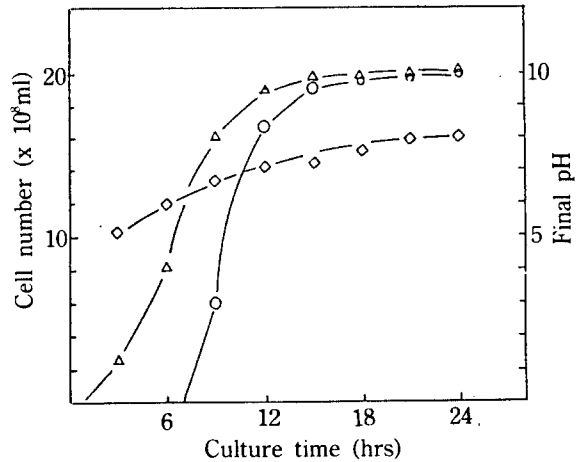


Fig. 1 Time course of the aerobic culture in shaker flask.

Symbols used : △, total cell number ; ○, spore number ; □, final pH.

(Nicotinamide adenine dehydrogenases)의 환원을 340nm에서 흡광도를 측정하여 L(+)-lactic acid를 정량 확인하였다.

Ⅲ. 결과 및 고찰

1. 포자형성능

유포자 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*는 *Lactobacillus*와 *Bacillus*의 중간형 성질을 가진 균종으로 energy를 얻는 물질대사를 발효와 호흡이 두가지 형태를 하는 특이한 균종으로서 알려져있다. 호기적 조건하에서는 Table 1의 spore형성용 D배지로 실험방법에 따라 45°C에서 24시간 진탕 배양하였다. 그 결과 Fig.1과 같이 대수증식기를 지나 12시간에 증균이 완료되면서 spore를 형성하여 15시간 이후에 spore수 19.2 x 10⁸/ml로 spore형성율이 96.0%이었다.

2. 젖산발효능

(1) 젖산발효

Table 1의 발효용 E배지로 젖산발효 방법에 따라 45°C에서 5일간 혐기적으로 발효한 결과 10% glu-

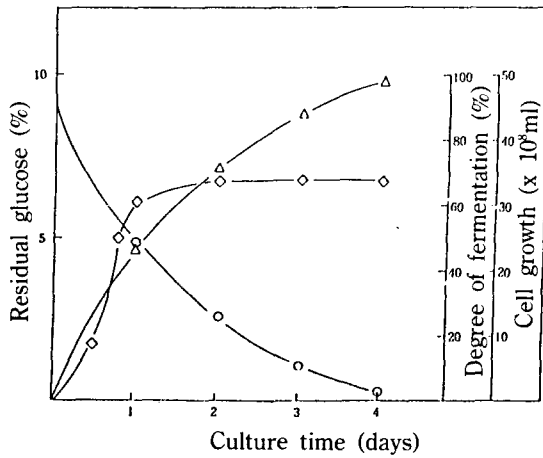


Fig. 2 Time course of lactic acid fermentation. Symbols used : ○, residual glucose ; △, degree of fermentation ; ◇, cell growth.

cose 발효용 배지에서 Fig.2와 Table 2같이 4일간에 glucose를 97.7% 발효하여 소비한 당중 98.2%의 젖산을 생성하는 homolactic acid 발효를 하였다. 그러므로 Kitahara⁽¹²⁾가 발표한 유포자성 유산균은

호기적 조건으로는 *Bacillus*와 같은 특징을 나타내고 혐기적 조건으로는 유산균의 특징을 나타내는 발효와 호흡의 두가지 물질대사를 행하는 균종임이 확인되었다.

다음 몇가지 당질에 대한 발효시험을 조사한 결과 Table 3과 같이 glucose와 lactose에서는 발효율 및 젖산생성율이 90%이상으로 좋으나 sucrose와 soluble starch에서는 발효율이 상당히 떨어지는 것으로 보아서는 lactose를 분해하는 β-galactosidase의 효소활성은 높으나⁽¹³⁾ sucrose와 soluble starch를 가수분해하는 효소활성이 낮기 때문인 것으로 사료된다.

(2) 생성 젖산의 광학적 성질

생성 젖산의 광학적 성질은 실험방법중이 젖산 선관성 측정방법에 따라 조사한 결과 결정수의 양이 dihydrate(2H₂O)로 12.8%, 염의 선광도가 [α] D = -6.85로, L(+)-lactic acid의 효소학적 정량 방법에 의하여서도 L(+)-lactic acid임이 확인되었다(Table 4). 이것은 Hanaoka 등⁽⁶⁾이 *delbrueckii* J II를 발효시켜 얻은 젖산과 매우 유사한 결과이다.

Table 2. Fermentation products from glucose in buffered condition by *L. sporogenes*.

Initial glucose	Residual glucose	Degree of fermentation	Volatile acid 1)	Non-Volatile acid 2)	Yield of lactic acid
9.10	0.21	97.7	0.040	8.73	98.2

Table 3. Fermentation test by various sugars

Sugars	Intitial sugars (%)	Residual sugars (%)	Degree of fermentation (%)	Volatile acid 1) (%)	Non-Vola- acid 2) (%)	Yield of lactic acid (%)
Glucose	10.00	0.74	92.67	0.097	8.85	95.38
Lactose	10.00	0.66	93.55	0.079	8.80	93.98
Sucrose	10.00	1.28	87.11	0.210	5.54	63.66
Soluble strch	10.00	4.57	54.45	0.127	5.11	79.17

1) as acetic acid. 2) as lactic acid.

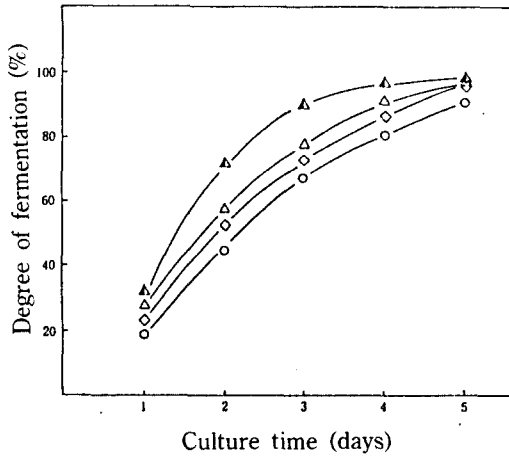


Fig. 3 Influence of temperature on lactic acid fermentation by *L. sporogenes*.

Symbols used : ○, 37°C ; △, 40°C ; ◇, 45°C ; □, 50°C

3. 젖산 발효조건

(1) 발효온도

Table 1의 발효용 E배지로 발효에 적합한 배양 온도를 37°C, 40°C, 45°C, 50°C로 시험한 결과 Fig.3과 같이 45°C에서 4일에 발효율 97.4%이상으로 발효 속도가 가장 빠른 것으로 나타났으므로 발효시 최적온도는 45°C임을 알 수 있었다.

(2) 발효시 교반 중화속도

발효시 glucose로 부터 생성된 젖산은 CaCO₃를 이용하여 젖산칼슘으로 중화하여야 계속 발효를 진행하므로 첨가한 CaCO₃와 생성된 젖산을 중화시키는 교반시험을 후라스크에서는 매 1시간, 2시간, 4시간, 24시간마다 교반시킨 결과, 발효중 매 1-2시간마다 1분씩 교반중화시키면 충분히 중화되어 발효를 계속하고, 또한 fermenter에서도 100 rpm의 저속교반으로도 중화가 충분한 것으로 나타났다. 그러므로 다음 젖산발효시 후라스크에서는 매 1시간마다 1분씩, fermenter에서는 100rpm

Table 4. Optical characteristics of lactic acid produced

Bacterium	Zinc lactate water of crystallization (%)	$[\alpha]_D^{25C}$	Type of lactic acid
<i>L.sporogenes</i> .	12.80	-6.85	L(+)-lactic acid

Table 5. Influence of agitation on lactic acid fermentation by *L. sporogenes*

A) In flask

* Condition	Period of fermentation(day)			
	Degree of fermentation(%)			
	1	2	3	4
every 1 hr.	33.2	72.8	93.8	99.3
every 2 hrs.	32.9	71.9	92.8	99.0
every 4 hrs.	27.4	55.3	83.1	92.3
every 24 hrs.	24.2	45.6	64.7	80.1

* Condition : agitation of one minute per every 1-24hrs.

B) In jar fermenter

Speeds of agitation	Period of fermentation(day)	Degree of fermentation(%)			
		1	2	3	4
100 rpm		38.6	75.1	96.3	99.5
200 rpm		38.3	74.8	96.8	99.7

Table 6. Effect of lactic acid fermentation a various glucose concentration by *L. sporogenes*

Day	Glucose concentration(%)	Degree of fermentation(%)		
		10	12	14
	1	37.8	29.9	21.3
	2	74.7	56.1	42.7
	3	95.3	87.6	64.5
	4	99.2	92.2	73.9

정도로 교반증화하였다(Table 5).

(3) Glucose농도

젖산발효용 E배지에 glucose농도를 10%, 12%, 14%로 달리하여 45°C에서 4일간 발효시킨 결과(Table 6), glucose 10%정도를 3-4일에 거의 젖산 발효시키므로 다음에 국내에서 값싼원료를 이용한 젖산발효 생산용 배질을 시험하여 젖산칼슘을 생산하고자 한다.

요 약

유포자 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*에 의한 발효법으로 식품과 의약품에 널리 사용되는 젖산과 젖산칼슘을 생산하고자 젖산발효 시험을 하였다.

이 균은 호기적으로 배양하면 포자형성용 배지에서 총균수 20×10^8 ml, 포자수 19.2×10^8 ml로 포자형성율이 96%이다. 10% glucose발효배지로 45°C에서 4일간 젖산발효시 생성되는 젖산을 중화제인 CaCO_3 로 중화시켜 발효를 지속시키기 위해서 후라스크에서는 매 1시간마다 1분씩 교반하고, fermenter에서는 100rpm정도로 교반시키는 방법이 가장 효과적이었다.

그 결과 발효율 99.3%, 젖산생성율 98.2%로 L(+)-lactic acid를 생산하는 정상 젖산발효 유산균이다.

IV. 참고문헌

1. Buchta, K., Lactic acid, In *Biotechnology*, Vol. 3, 409-417. Verlag Chemie, Weinheim(1983).
2. Rehm, H. J., *Industrielle Microbiologie*, 76-100. Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York(1969).
3. Kandler, O., Garungsmechanismen bei Milchsäurebakterien, *Forum Microbiol.*, 5, 16(1982).
4. Buchman, R. E., and Gubbons, N. D. : *Bergey's manual of determinative bacteriology 8th ed.* The Williams and Wilkins Company, Baltimore (1974).
5. Anderson, A. A., and Werkman, C. II. : Description of a dextro-lactic acid-forming organism of genus bacillus. *Iowa State Coll. J. Sci.*, 14, 187-194(1940).
6. Ilnaoka, A., and Nikuni, Z. : The production of lactic acid by aerobic spore forming lactic

- acid bacterium. *J. Agr. Chem. Soc. Japan*, **26**, 14-17(1952).
7. Franke, W., and K. Buchta, In *Handbuch der Pflanzenphysiologie*, Band XII/I(W. Ruhland, ed. 844-1008, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg(1960).
 8. Prescott, S. C. and C. G. Dunn, *Industrial microbiology*, 3rd ed., 303-331, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York(1959).
 9. Fehling-Lehmann Schoorl法 : 實驗農藝化學, 東京大學 農學部 農藝化學教室, 下卷, p.638 (朝倉書房) 第二版(1960).
 10. Missawa, Y., M. Matsubara and T. Inuzuka, Studies on the application of the spore-bearing lactic acid bacteria to foods, part I. Isolation and properties of the isolated strain, *J. Japan Soc. Food Sci. Technol.*, **19**, 14-20(1972).
 11. Marabach, E. P. and M. H. Well, Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate, *Clin. Chem.*, **13**, 314-325(1967).
 12. Kitahara, K. et. al., *Studies on the lactic acid bacteria*, Univ. of Tokyo press, Tokyo, 73-77, 501-506(1966).
 13. Kim, Y. M., J. C. Lee, P. K. Chung, Y. J. Choi and H. C. Yang, Studies on the production of β -galactosidase, *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **11**, 59-56(1983).