

Lactobacillus sporogenes 에 의한 젖산칼슘 생산

Ⅱ. 젖산 칼슘 제조

이계근 · 김영만 · * 민경찬

일동제약(주) 중앙연구소
* 신흥전문대학 식품영양과

The Production of Calcium Lactate by *Lactobacillus sporogenes*

Ⅱ. Production of Calcium Lactate

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

Production of calcium lactate very useful for medical supplies of Ca-therapy was obtained by lactic acid fermentation of *Lactobacillus sporogenes*, a spore forming lactic acid bacterium. Corn steep liquor 1%, soybean enzyme hydrolysate 3%, yeast extract powder 2% can substitute for yeast extract and peptone as nutrient sources in fermentation medium using 10% glucose concentration.

In the calcium lactate production medium containing yeast extract powder 2%, glucose 18%, CaCO₃ 12%, the lactic acid fermentation was carried out at 45°C for 4days with continuous agitation of 100 rpm. As results, fermentation yield was 97.5%. The five steps such as protein coagulation, decolorizing evaporating, crystallizing, and drying were carried out to harvest calcium lactate from 10ℓ of supernatant of fermented medium to be removed cell and CaCO₃. As results, 2065.0g of white crystal calcium lactate dihydrate was recovered and a yield of 84.9% was obtained.

I. 서 론

젖산⁽¹⁾은 보존성과 신맛을 주기 때문에 식품공

업에서 음료, 향료, 과일쥬스 등과 제빵, 양조등의 산성화에 이용되며, 제혁공업에서 가죽의 탈석회 및 부드럽게 하는데 이용되며, 방직공업에서는

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

매염조제, plastic 공업에서는 보조원료로 사용되며 특히 Ca-lactate와 Fe-lactate는 Ca요법, 빈혈치료제의 의약품^(2,3)으로 이용되고 있다.

본 실험에 사용한 유포자 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*는 *Lactobacillus*와 *Bacillus*의 중간형 성질을 가진 균종으로 catalase 양성이다. 이것은 homolactic acid fermentation을 하여 L(+)-lactic acid를 생성하는 고온성균으로, energy를 얻은 물질대사를 배양조건에 따라 발효와 호흡의 두가지 기작을 행하는 특이한 균종이다. 즉 발효성 당이 풍부한 배지에서 혐기적 조건으로 배양하면 발효에 의한 물질대사를 하여 발효성 당에 대한 발효능과 소모한 당에 대한 유산생성능이 90% 이상이다. 당이 적고 yeast extract와 peptone 같은 단백질 분해물에서 호기적 조건으로 배양하면 호흡에 의한 물질대사를 하며 terminal 또는 subterminal 위치에 포자를 90%이상 형성하는 내성이 우수한 유포자 유산균이다.

본 실험에서는 의약품의 Ca요법에 널리 사용되고 있으나 수입에만 의존하는 젖산칼슘을 생산하고자 *Lactobacillus sporogenes*의 젖산발효를 이용하여 국내의 값싼 원료로 대체한 생산용 발효 배지를 선정하고, 젖산칼슘 생산시험을 하여 그 결과를 보고한다.

II. 재료 및 방법

재료

glucose : 선일포도당(주)
 탈지대두분 : 개미산업(주)
 corn steep liquor(고형분 50%) : 서울미원(주)
 yeast extract powder : 조흥화학(주)
 pancreatin : 중성 protease 80,000 unit/g,
 日本 近畿 yakult(주)

사용균주

유포자 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*는 일동제약 중앙연구소에 보존된 균주를 사용하였다.

젖산칼슘생산

30ℓ용 jar-fermenter(L.E.Marubishi, Co., Ltd. Ja-

pan)에 20ℓ의 18% glucose발효시험용 배지를 주입, 살균 냉각후 전보의 방법으로 배양한 전배양액을 3%(60ml)접종하여 45℃에서 5일간 혐기배양하였다 (발효중 생성된 젖산은 100rpm으로 교반하여 첨가된 CaCO₃로 중화하였다).

발효율 및 생성 젖산량 정량 전보에 상술한 방법⁽⁴⁾에 준하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 생산용 배지

전보의 발효용 E배지의 yeast extract와 peptone대신 값싼 corn steep liquor와 soybean enzyme hydrolysate 또는 공업적으로 용이하게 생산하는 yeast extract powder를 이용한 젖산칼슘을 생산하기 위하여 배지시험을 하였다.

1) Corn steep liquor

glucose 10%와 CaCO₃ 7%배지에 corn steep li-

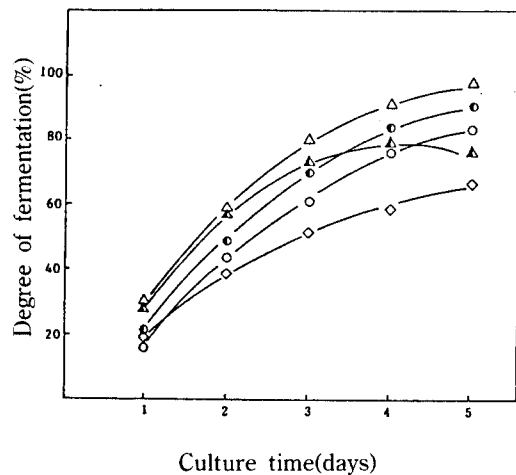


Fig. 1 Effect of corn steep liquor concentration on lactic acid fermentation by *L. sporogenes*. Symbols used : ○, 0.5% ; ◐, 0.75% ; △, 1% ; ◓, 1.25% ; ◇, 1.5%.

quor를 0.5-1.5%(w/v)에서 4일후에 발효율 90% 이상으로 발효속도가 가장 빠른 것으로 나타났다 (Fig. 1).

2) Soybean enzyme hydrolysate

다음은 spore형성조건에 가장 좋은 단백질원인 soybean enzyme hydrolysate를 발효시험에 이용하기 위하여 glucose 10%와 CaCO₃ 7%배지에 Fig.2와 같이 조제한 soybean enzyme hydrolysate를 1-4%(w/v) 농도로 첨가한 결과 Fig.3과 같이 3% (w/v)를 첨가한 농도에서 발효속도가 가장 빠른 것으로 나타났다.

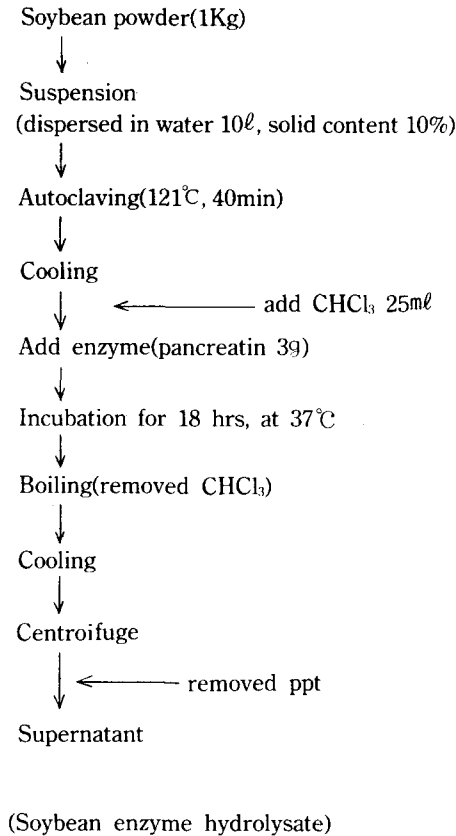


Fig. 2 Preparation of soybean enzyme hydrolysate product.

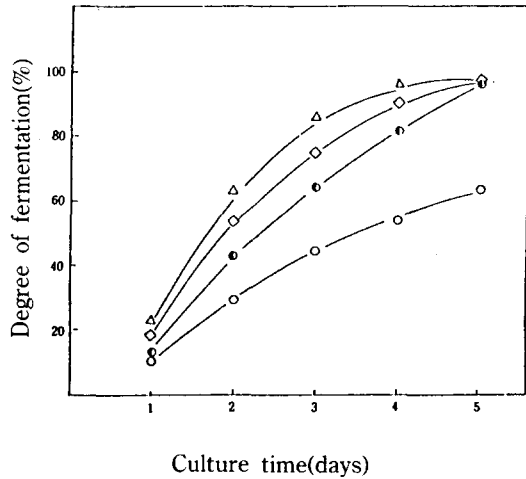


Fig. 3 Effect of soybean enzyme hydrolysate cocentration on lactic acid fermentation by *L. sporogenes*.

Symbols used : ○, 1% ; ◐, 2% ; △, 3% ; ◊, 4%.

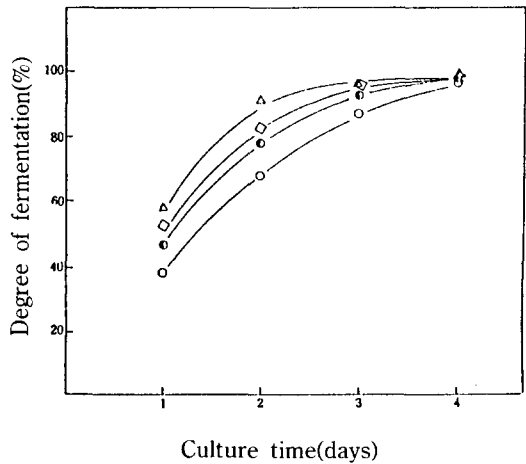


Fig. 4 Effect of yeast extract powder cocentration on lactic acid fermentation by *L. sporogenes*.

Symbols used : ○, 0.5% ; ◐, 1% ; △, 2% ; ◊, 3%.

3) Yeast extract powder

효모를 자가소화시킨 yeast extract powder를 glucose 10%와 CaCO₃ 7%배지에 0.5-3%(w/v)농도로 첨가하여 발효시험한 결과 yeast extract powder

2%(w/v)를 첨가한 농도에서 발효속도가 가장 빠른 것으로 나타났다(Fig. 4).

4) Glucose 농도

Corn steep liquor 1%(w/v)와 soybean enzyme hydrolysate 3%, yeast extract powder 2%의 최적 농도에 Table 1과 같이 glucose를 각각 10%, 12%, 16%, 18%, 20%농도로 첨가하여 45°C에서 4일간 발효시킨 결과 corn steep liquor 1%와 soybean enzyme hydrolysate 3% 배지에서는 glucose 10%까지 발효시켰으나 yeast extract powder 2% 배지에서는 18%의 glucose를 97.5%의 젖산으로 발효시킬 수 있는 결과를 얻었다.

따라서 유포자 유산균에 의한 젖산칼슘 생산용

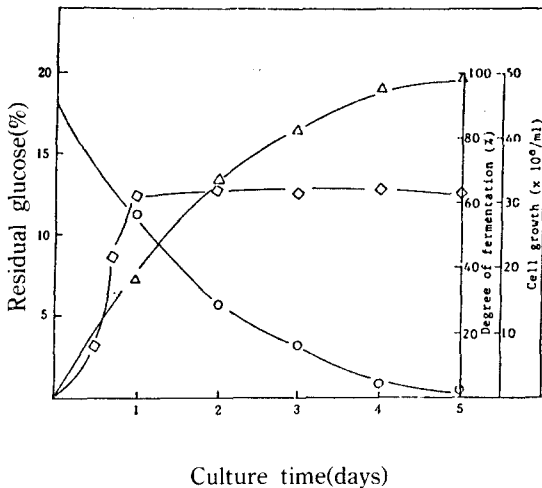


Fig. 5 Production of calcium lactate and decrease in glucose during flask fermentation.

Symbols used : ○, residual glucose ; △, degree of fermentation ; ◇, cell growth.

배지를 Table 2와 같이 확정하여 이후의 젖산칼슘 생산용배지 실험에 이용하였다.

2. 젖산칼슘 생산

1) 삼각후라스크와 fermenter 발효

젖산칼슘 생산용 배지인 Table 2의 배지를 사용하여 300ml용 삼각후라스크에 200ml씩 첨가하고 전배양액 6ml를 접종하여 45°C에서 5일간 발효시킨 결과 Fig.5와 같이 증균은 1일에 충분히 되었고 잔당량이 감소하면서 젖산칼슘은 1일에 36.7%, 2일에 67.5%, 3일에 82.8%, 4일에 95.0%, 5일에 98.1%로 나타났다.

또한 30ℓ용 fermenter에 동일한 생산용배지 20ℓ를 주입하고 실험방법의 jar-fermenter배양방법에 따라 45°C에서 100rpm으로 교반중화하면서 5일간 발효시킨 결과 삼각 후라스크의 발효양상과 유사한 경향으로 나타나고 있으나 삼각 후라스크와 비교해서 젖산발효 속도가 빨라 45°C에서 4일만에 97.5% 이상 발효가 종료되었다(Fig. 6).

2) 젖산칼슘 생산

Fermenter 발효액에서 균체와 과잉의 CaCO₃를

Table 2. Composition of the main culture medium for lactic acid production.

Ingredient	Content(%)
Glucose	18
Yeast extract powder	2
CaCO ₃	12

Sterilized by autoclaving at 121°C for 15 minutes

Table 1. Influence of lactic acid fermentation at various glucose concentration by *L. sporogenes*.

Nutrient source	Degree of fermentation (%)					
	10	12	14	16	18	20
Corn steep liquor(1%)	98.1	78.7	67.0	58.2	52.8	47.5
Soybean enzyme hydrolysate(3%)	98.5	87.0	75.3	65.1	53.3	53.0
Yeast extract powder(2%)	99.5	99.3	99.1	98.0	97.5	85.1

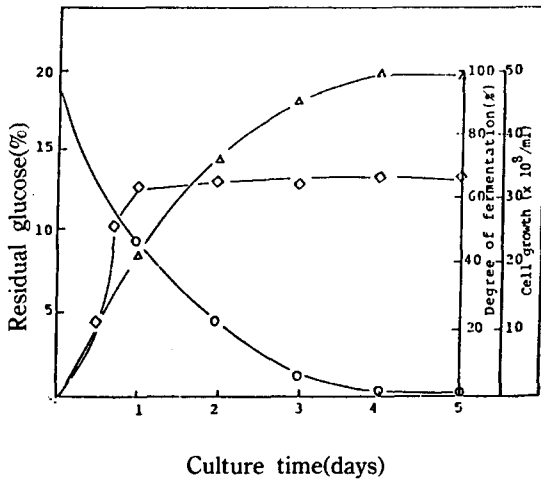


Fig. 6 Time course of lactic acid fermentation in Jar-fermenter.

Symbols used : ○, residual glucose ; △, degree of fermentation ; ◇, cell growth.

제거한 상등액 10ℓ를 Fig.7과 같은 과정(1)으로 젯산칼슘을 생산하였다.

(1) 발효 상등액 10ℓ

실험방법의 jar-fermentor 발효방법으로 발효시킨 액을 연속원심분리기(model : Marusan centrifuge 30 CFS, Sakuma Seikakusho Ltd., Japan)로 12,000rpm에서 균체와 과잉의 CaCO₃를 제거한 상등액 10ℓ로 젯산칼슘을 생산하였다.

(2) 단백질 제거

발효 상등액 10ℓ에 단백질을 응고 제거하기 위하여 Ca(OH)₂ 분말(90g)을 첨가하여 pH 11-12로 맞추어 끓는 수욕상에서 30분간 끓인 다음 여지로 감압여과하여 응고된 단백질을 여과 제거한 후 다시 젯산(90% 시판품) 70ml를 사용하여 pH7.0로 중화하였다.

(3) 탈색

단백질을 제거한 상등액에 활성탄을 500g(5%) 첨가하여 다시 30분간 끓인 후 여지로 감압여과하여 활성탄을 제거하여 투명한 여액을 얻었다.

(4) 결정화

다시 결정화시키기 위하여 이 액을 끓는 수욕상에서 20 Be 정도까지 감압농축한 후 냉각시켜

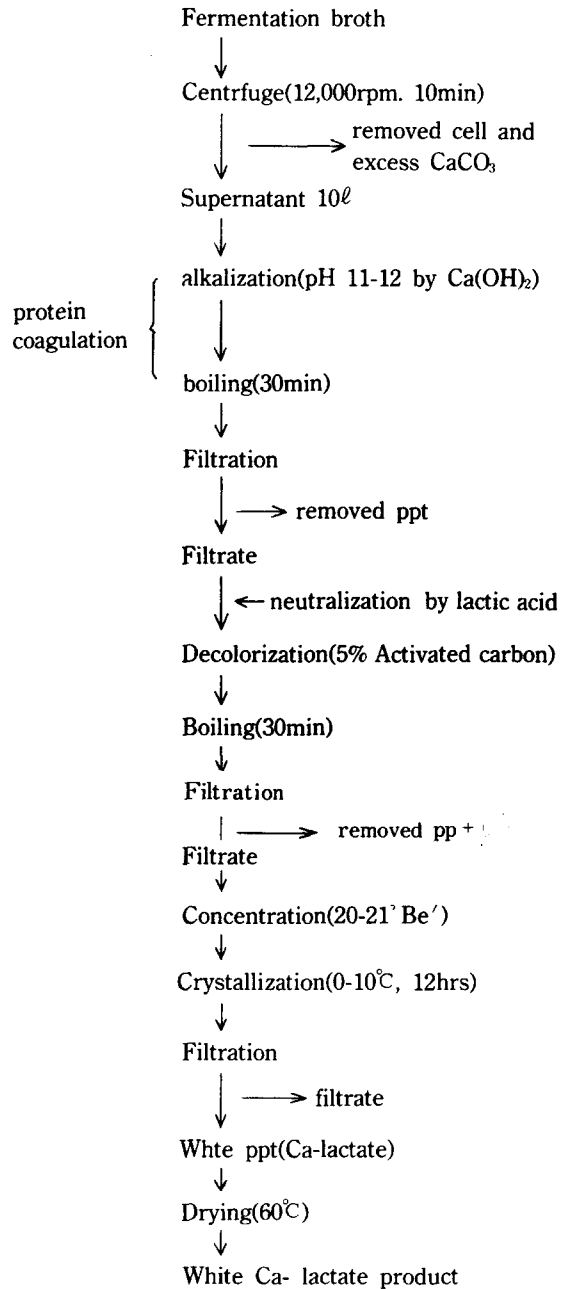


Fig. 7 Flow chart for the production of calcium lactate

저온실(5-10°C)에서 수시간(5-10시간) 방치하면 흰색의 젯산칼슘 결정이 형성된다.

이것을 다시 감압여과하여 얻어진 흰색 결정을

Table 3. Change of the fractions prepared from supernatant 10ℓ of fermentation broth.

A) Product by fermentation

Fermentation broth	Initial glucose	Residual glucose	Fermented glucose	Yield of lactic acid	Produced Ca-lactate
10ℓ	18% 1,800g	2.5% 45g	97.5% 1,755g	98.2% 1,723.4g (as lactic acid)	2,432.3g (as Ca-lactate · 2H ₂ O)

B) Yield of process

Steps Item	After filtration	After protein coagulation	After decolorization (except Ca-lactate * produced in neutralization)	Crystallization (except Ca-lactate * produced in neutralization)
	Ca-lactate · 2H ₂ O product(g)	2432.3	2356.9	2179.3
Yield (%)	100	96.9	89.6	84.9

* 88.91g as Ca-lactate · 2H₂O produced from 90% lactic acid 70 ml.

60°C에서 건조하여 흰색의 젖산칼슘 2065.0g을 얻었다. 이론적으로는 18% glucose액 10ℓ로부터 97.5%의 발효율과 98.2%의 젖산생성율을 고려하면 Ca-lactate · 2H₂O가 2432.3g 얻어져야 하나 단백질 제거시 사용된 Ca(OH)₂를 뺀 실제로 발효된 당에 의해서 생성된 Ca-lactate · 2H₂O의 생산율은 84.9%이었다(Table 3).

요 약

유포자 유산균인 *Lactobacillus sporogenes*에 의한 발효법으로 의약품의 Ca요법에 널리 사용되는 젖산칼슘을 생산하였다.

10% glucose 발효배지에서는 영양원으로 사용한 yeast extract와 peptone을 1% corn steep liquor, 3% soybean enzyme hydrolysate 또는 2% yeast extract powder로 대체 가능하였다.

젖산칼슘 생산용배지로 yeast extract powder 2%, glucose 18%, CaCO₃ 12%로 선정하고, 45°C에서 4일간 100rpm으로 젖산발효시킨 결과 발효율 97.5%였다.

젖산칼슘을 생산하기 위하여 18% glucose 발효

액으로부터 균체와 CaCO₃를 제거한 상등액 10ℓ로부터 단백질 제거, 탈색공정, 농축, 결정화 및 건조등의 5단계 공정을 거쳐 흰색 결정인 Ca-lactate 2H₂O 2065.0g이 회수되어 84.9%의 생산율을 얻었다.

IV. 참고문헌

1. Prescott, S. C. and C. G. Dunn, Industrial microbiology, 3rd ed., 303-331, McGraw-Hill Book Co., Inc., New York(1959).
2. Buchta, K., Lactic acid, In Biotechnology, Vol. 3, 409-417. Verlag Chemie, Weinheim(1983).
3. Franke, W., and K. Buchta, In "Handbuch der pflanzenphysiologie", Band XII/I(W. Ruhland, ed. 844-1008, Springer-Verlag, Berlin-Göttingen-Heidelberg(1960).
4. Gye-Keun Lee and Young-Man Kim, The production of calcium lactate by *Lactobacillus sporogenes* : lactic acid fermentation, Korean Journal of Food and Nutrition, in press.