

D- α -Amino- ϵ -Caprolactam 자화균의 분리 및 특성

최선택*·박희동·이인구

경북대학교 농화학과

Isolation and Characterization of D- α -Amino- ϵ -Caprolactam Utilizing Bacteria

Choi, Sun Taek*, Heui Dong Park and In Koo Rhee

Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 635, Korea

A bacterium which grows on D- α -amino- ϵ -caprolactam as sole carbon, energy and nitrogen source was isolated from the sludge of industrial areas in Taegu, and identified as *Alcaligenes eutrophus*. The optimum pH, temperature and concentration of D- α -amino- ϵ -caprolactam for the growth were 6.0, 30°C and 0.2% respectively. The bacteria could utilize glucose and fructose as a carbon source, and utilize ammonium chloride, ammonium nitrate, ammonium sulfate and sodium nitrate as a nitrogen source, and utilize L-lysine and L-glutamate as a carbon and nitrogen source. It was found with thin layer chromatography and polarimeter that D- α -amino- ϵ -caprolactam was converted to L-lysine by the cell-free extracts of *Alcaligenes eutrophus* A52.

L-Lysine은 대부분의 곡류단백질에 결핍되기 쉬운 뿐만 아니라 필수 아미노산 중 열에 가장 불안정하기 때문에 미생물에 의한 L-lysine의 생산에 관한 많은 연구 보고가 있다. 1889년 Drechsel에 의해 처음으로 casein 분해액에서 L-lysine이 확인된 이후 화학적합성법(1, 2), 발효법(3-5) 등에 의한 L-lysine 생산법이 개발되었으나 산업적으로는 주로 발효법에 의존하고 있는 실정이다. L-Lysine의 생산을 위하여 좀더 효율적인 방법을 찾기 위해 많은 연구가 진행되어 왔으며 특히 근년에는 석유화학공업의 부산물인 ϵ -caprolactam, cyclohexane, dihydropyran 등으로부터 합성 가능한 D- α -amino- ϵ -caprolactam (DAC) 및 L- α -amino- ϵ -caprolactam (LAC)으로부터의 L-lysine 생산이 시도되었다(6). LAC로부터 L-lysine으로 전환시킬 수 있는 미생물로서는 *Aspergillus ustus*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida humicola*, *Trichosporon cutaneum* 등이 알려져 있다(7, 8). 그 후 Fukumura는 DAC에서 생육이 가능한 *Achromobacter obae*, *Achromobacter cyclo-*

clastes, *Alcaligenes faecalis*, *Flavobacterium arborescens* 등(9)을 분리한 후 *Cryptococcus laurentii*의 hydrolase와 *Achromobacter obae*의 racemase를 사용하여 DAC로 부터 L-lysine으로의 전환을 시도한 바 있다(10). 이와같이 DAC로 부터 L-lysine으로의 전환에 관하여는 효모와 세균을 이용한 2단계법이 알려져 있을 뿐 한 균에 의한 보고는 없는 실정이다. 본 연구에서는 DAC로 부터 L-lysine으로의 전환능이 우수한 세균을 분리한 후 그 특성을 조사하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

배 지

D- α -Amino- ϵ -caprolactam (DAC) 자화균의 분리 및 배양조건을 검토하기 위한 배지로는 DAC 0.2%, K₂HPO₄ 0.2%, KH₂PO₄ 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, FeCl₃·6H₂O 0.01%, yeast extract 0.05%를 증류수에 녹여 pH를 6.0으로 조절한 후 120°C인

Key words: D- α -Amino- ϵ -caprolactam, L-lysine, *Alcaligenes eutrophus*

* Corresponding author

데 15분간 멸균한 액체배지(이하 DAC 배지라 약함)를 사용하였다. 균의 보존은 DAC 배지에 1.5%의 한천을 가한 고체배지에 1개월마다 계대배양하면서 4°C에서 보관하였다.

DAC 자화균의 분리

100 ml 삼각플라스크에 DAC 배지 20 ml를 넣고 대구 신천 하상의 오니 및 주위 토양에서 채취해 온 시료 0.1g을 접종하여 30°C에서 1주일간 DAC 자화균을 집식시킨 후 평판배양법에 의해 순수분리하였다.

분리균의 동정

분리균의 형태 및 생리학적 성질을 조사한 것을 기초로 하여 Bergey's manual에 따라 분류 동정하였다(11).

생육도 측정

균의 생육도는 Bausch & Lomb사의 Spectronic 20으로 600 nm에서의 흡광도를 측정하였으며 건조균체 중량은 배양액의 세척균체를 105°C에서 항량이 될때 까지 건조한 중량과 흡광도와의 관계로 부터 환산하였다. 600 nm에서의 흡광도가 1.0인 배양액은 건조균체 0.62 mg/ ml에 상당하였다.

배양방법

종배양은 DAC 배지에 한천사면으로 부터 한 백금이의 균을 접종하여 30°C에서 20시간 120 strokes/min의 속도로 진탕배양하였으며 본 배양은 DAC 배지에 종배양액을 1%되게 접종한 후 48시간 종배양과 동일한 방법으로 행하였다.

DAC의 정량

DAC의 정량은 Kinoshita, Fukumura 등(7, 12)의 방법에 따라 다음과 같이 행하였다. n-propanol : 28% NH₄OH(7 : 3, v/v)를 전개용매로 하여 종이 크로마토그래피한 후 ninhydrin으로 발색되어진 DAC 부위를 잘라내어 CuSO₄로 포화시킨 75% ethanol 5 ml에 10분간 용출시켜 517 nm에서의 흡광도를 측정한 후 표준물질을 사용한 검량선에 의해 정량하였다.

무세포 추출액의 조제

배양액을 원심 집균하고 50 mM Tris-HCl 완충액

(pH 8.5)으로 2회 세척한 후 현탁시켜 영국 ultrasonics사의 초음파 파쇄기로 90 μA에서 8분간 처리시킨 다음 27,000×g로 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 -20°C에 보관하면서 무세포 추출액으로 사용하였다.

효소반응 생성물의 동정 및 선광도 측정

2.0% DAC 0.25 ml와 50 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.5) 0.65 ml에 무세포 추출액 0.1 ml를 혼합하여 55°C에서 12시간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 원심분리한 상등액을 20 mM Tris-HCl 완충액 (pH 8.5)으로 10시간 투석한 것을 시료로 하였다. 시료중의 반응생성물은 n-propanol : 28% NH₄OH(7 : 3, v/v)를 전개용매로 하여 silica gel 박층 크로마토그래피 하였으며 (7, 12, 13) digital 선광계 (Jasco DIP-360)로서 선광도를 측정하여 동정하였다. 표준 L-lysine과 DAC의 선광도는 각각 $[\alpha]_D^{25} = +19.5^\circ$, $+31^\circ$ (C=0.5, 20 mM Tris-HCl 완충액 pH 8.5)이었다.

시 약

DAC, L-lysine 및 ninhydrin은 Fluka사 silica gel TLC plate는 Sigma사의 것을 사용하였으며 기타 시약은 시판 특급을 사용하였다.

결 과

D-α-Amino-ε-caprolactam(DAC) 자화균의 분리 및 동정

대구 근교의 공업단지 주위의 토양과 오니로 부터 집식배양에 의해 DAC를 질소원 및 탄소원으로 자화할 수 있는 세균 6주를 분리하여 그 중에서 DAC의 자화능이 우수하고 증식속도가 빠른 1주(A 52)를 택하여 공시균으로 하였다. 공시균(A 52)은 Gram 음성균으로 생육과정 중 균의 형태는 변화가 없었으며 반고체배지에서 운동성이 있었다. 고체 DAC 배지에서 장시간 배양에 의하여 배지가 연한 갈색으로 착색되었고 gelatin, starch, tween 80은 가수분해할 수 없었다. Nitrate를 환원시켰으며 catalase 및 oxidase를 생산하였고 glucose, galactose, mannose, maltose, sucrose, lactose, trehalose, mannitol 등에 대한 발효성 및 산 생성능력이 없었다. 그 외 여러가지 특성으로 부터 A 52는 *Alcaligenes eutrophus* 유연균으로 동정하였다(Table 1).

Table 1. Morphological and physiological characteristics of the isolated bacteria

Gram staining	-
Motility	+
Morphology	straight rod
Colonies	circular, entire, convex or pulvinate opaque and white or cream colored
Gelatin hydrolysis	-
Starch hydrolysis	-
Tween 80 hydrolysis	-
Nitrate reduction	+
Catalase	+
Citrate utilization	+
MR test	-
Oxidase	+
Indole production	-
VP test	-
Nutrient broth	turbid
Anaerobic growth with nitrate	+
Anaerobic growth with nitrite	-
Sugar fermentation	Neither acid nor gas was produced from glucose, galactose, mannose, maltose, sucrose, lactose, trehalose, and mannitol

Symbols are: +, positive and -, negative. The bacterium (A52) was identified as *Alcaligenes eutrophus* according to the characteristics.

공시균의 배양조건

DAC 농도의 영향 : DAC의 농도가 균의 생육에 미치는 영향을 조사하기 위하여 배지의 DAC 농도를 0.5%까지 조절하여 48시간 배양한 후 균의 생육도를 측정한 결과 0.2% 농도에서 가장 좋은 생육도를 나타내었다(Fig. 1).

온도 및 pH의 영향 : 배양온도를 20°C에서 40°C로 조절하여 DAC 배지에서 48시간 배양한 후 균의 생육도를 측정한 결과 30°C에서 가장 생육이 좋았다(Fig. 2).

DAC 배지의 초기 pH를 5.0에서 8.0까지 조절하여 48시간 배양한 후 균의 생육도를 측정한 결과 최

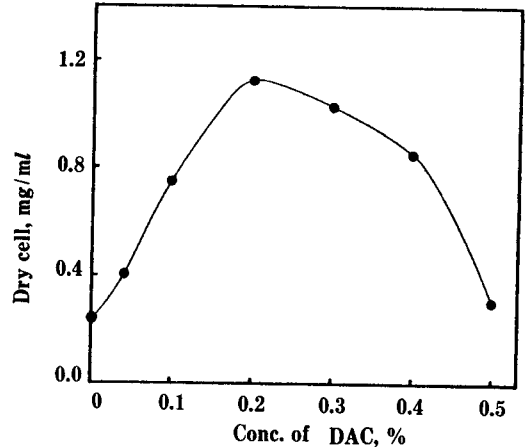


Fig. 1. Effect of the concentration of DAC on the growth of *Alcaligenes eutrophus* A52.

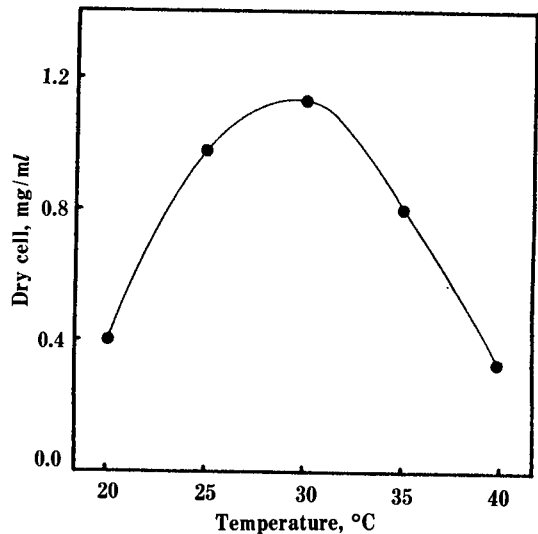


Fig. 2. Effect of temperature on the growth of *Alcaligenes eutrophus* A52.

적 pH는 6.0부근이었다(Fig. 3).

배양시간에 따른 공시균의 생육 및 기질자화 : DAC 배지에 30°C에서 균을 진탕배양하면서 경시적으로 생육도와 DAC의 잔존량을 측정하였다(Fig. 4). 균의 생육은 대수증식기를 거친 다음 50시간 배양 후 부터 정지기에 도달하였다. DAC의 잔존량은 균의 증식에 반비례하여 감소하였으며 50시간 후에는 거의 소모되었다. 배양과정 중 pH는 초기의 6.0에서 점차 상승하여 50시간 후에는 7.0으로 되었다.

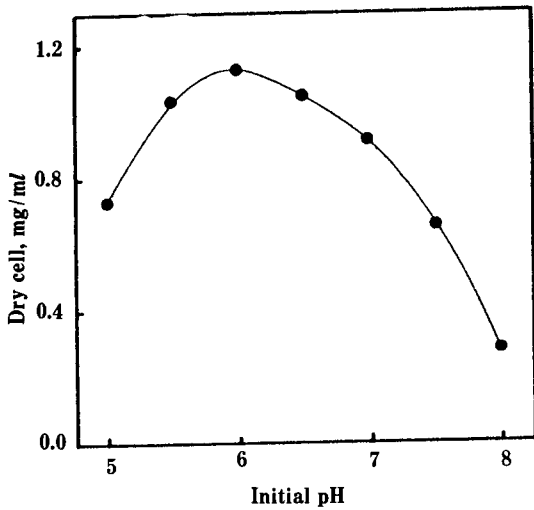


Fig. 3. Effect of pH on the growth of *Alcaligenes eutrophus* A52.

공시균의 기질자화성

DAC 대신에 0.2% ammonium nitrate와 탄소원으로 1.0%의 각종 당을 첨가한 DAC 배지에서 48시간 배양한 결과(Table 2) glucose, fructose를 잘 자화하였으며, mannose, galactose, sucrose, maltose도 자화할 수 있으나 ribose, rhamnose, raffinose, xylose, lactose, trehalose는 거의 자화하지 못하였다. DAC 대신에 1.0%의 glucose와 각종

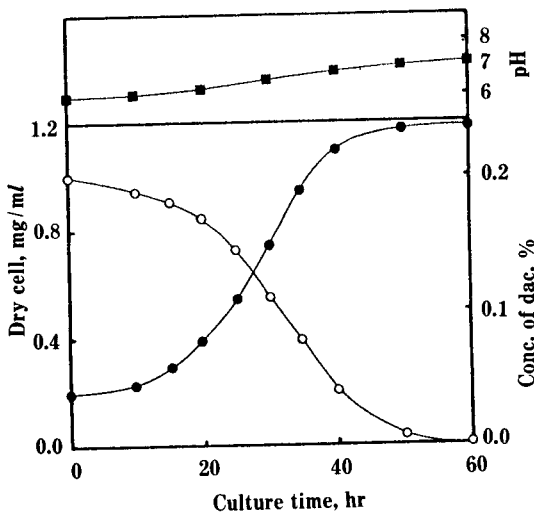


Fig. 4. Time course of the bacterial growth and substrate consumption.

● - ●: dry cell weight, ○ - ○: concentration of DAC, ■ - ■: pH

Table 2. Effect of sugars on the growth of *Alcaligenes eutrophus* A52

Sugars	Dry cell weight(mg/ml)
None	0.25
Glucose	1.28
Fructose	1.25
Mannose	0.70
Galactose	0.70
Ribose	0.44
Rhamnose	0.44
Raffinose	0.37
Xylose	0.50
Sucrose	0.62
Maltose	0.70
Lactose	0.50
Trehalose	0.40

The sugar (1.0%) was added to DAC medium containing 0.2% ammonium nitrate instead of DAC.

무기질소원을 0.5%되게 첨가한 DAC 배지에서 NH₄Cl, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄, NaNO₃를 잘 자화하였으며 NaNO₂는 거의 자화하지 못하였다(Table 3).

DAC 대신에 0.2% 아미노산을 첨가한 DAC 배지에서 균을 48시간 배양한 결과 glutamate, lysine은 잘 자화하였으며 histidine, proline, threonine도 조금 자화하였으나 그 밖의 대부분의 아미노산은 거의 자화하지 못하였다(Table 4)

효소반응 생성물의 동정 및 선광도 측정

자화균에 의한 DAC로 부터 L-lysine으로의 전환을 확인하기 위하여 DAC에 균체로 부터 추출한 무

Table 3. Effect of nitrogen sources on the growth of *Alcaligenes eutrophus* A52

Nitrogen sources	Dry cell weight(mg/ml)
None	0.31
NH ₄ Cl	1.15
NH ₄ NO ₃	1.35
(NH ₄) ₂ SO ₄	1.20
NaNO ₂	0.37
NaNO ₃	1.12
(NH ₂) ₂ CO	0.56

Nitrogen sources(0.5%) was added to DAC medium containing 1% glucose instead of DAC.

Table 4. Effect of amino acids on the growth of *Alcaligenes eutrophus* A52

Amino acids	Dry cell weight(mg/ml)
None	0.13
Arginine	0.33
Aminocaproate	0.26
Asparagine	0.34
Glutamate	1.12
Histidine	0.75
Lysine	1.24
Leucine	0.35
DL-Methionine	0.14
Proline	0.62
Phenylalanine	0.18
Threonine	0.50
Tryptophan	0.13
Tyrosine	0.14
Valine	0.14

Amino acid (0.2%) was added to DAC medium instead of DAC.

세포 추출액으로 12시간 반응시킨 생성물을 박층 크로마토그래피 한 결과 lysine으로 확인되었다. 생성물의 선광도는 $[\alpha]_D^{25} = +19.10^\circ$ ($c=0.5$, 20mM Tris-HCl 완충액 pH 8.5)로서 약 98% L-lysine이었다(Fig. 5).

고 찰

대구 근교 공업단지 주위의 토양과 하상 오히려로부터 D- α -amino- ϵ -caprolactam(DAC)을 탄소원, 에너지원 및 질소원으로 잘 이용할 수 있는 *Alcaligenes eutrophus* A 52를 분리하였다. 본 균을 초음파 파쇄기로서 처리시켜 얻은 무세포 추출액을 사용하여 DAC로부터 L-lysine으로의 전환을 박층 크로마토그래피와 선광계로서 확인하였다(Fig. 5). D- α -Amino- ϵ -caprolactam으로부터 L-lysine으로의 전환에 관하여는 몇몇 보고가 있다(6-10). L- α -Amino- ϵ -caprolactam(LAC)을 자화할 수 있는 미생물로서는 *Aspergillus ustus*, *Cryptococcus laurentii*, *Candida humicola* 및 *Trichosporon cutaneum* 등의 곰팡이(6)와 효모(7)가 알려져 있으며 DAC를 자화할 수 있는 미생물로서는 *Achromo-*

A B C

Fig. 5. Identification of conversion of DAC into L-lysine by cell-free extracts of *Alcaligenes eutrophus* A52. A: Std. DAC, B: DAC + cell-free extracts, C: Std. L-lysine. $[\alpha]_D^{25}$ determined with polarimeter (Jasco DIP-360) was as follows; A: $+31^\circ$, B: $+19.1^\circ$, C: $+19.5^\circ$ ($c = 0.5$, 20mM Tris-HCl buffer pH8.5)

bacter obae, *Achromobacter cycloclastes*, *Alcaligenes faecalis*, *Flavobacterium arborescens* 등의 세균(9)이 알려져 있다. 그러나 이들 세균들은 DAC로부터 LAC로의 전환은 우수하였으나 LAC로부터 L-lysine으로의 전환은 아주 약하였다(9). 그래서 Fukumura는 *Achromobacter obae*의 D- α -amino- ϵ -caprolactam racemase(이하 racemase)와 *Cryptococcus laurentii*의 L- α -amino- ϵ -caprolactam hydrolase(이하 hydrolase)를 동시에 사용하여 DAC로부터 L-lysine으로의 전환을 시도하였으며 DAC \rightarrow LAC \rightarrow L-lysine의 전환 경로를 제안한 바 있다(10). 본 실험에서 분리한 *Alcaligenes eutrophus* A 52는 50시간 배양시 0.2% DAC를 거의 다 자화하였으며(Fig. 4) 0.5% DAC와 3.1mg의 단백질에 상당하는 무세포 추출액을 55 $^\circ$ C에서 12시간 반응시킨 결과 DAC가 거의 전부 L-lysine으로 전환되는 것으로 보아(Fig. 5) racemase와

hydrolase의 생성력이 우수한 것으로 생각된다. 앞으로 *Alcaligenes eutrophus* A 52 단일 미생물이 생성하는 racemase와 hydrolase를 사용하여 DAC로부터 L-lysine으로의 전환을 시도하고자 한다.

요 약

하상 오니 및 토양으로부터 D- α -amino- ϵ -caprolactam(DAC)의 자화능이 우수한 균을 분리하여 *Alcaligenes eutrophus*로 동정하였다. *Alcaligenes eutrophus* A 52의 생육을 위한 배양조건은 배양 초기 최적 pH가 6.0, 최적온도는 30°C, 최적 DAC 농도는 0.2%로서 50시간 배양으로 0.2% DAC를 거의 다 자화하여 정지기에 도달하였다. 본 균은 탄소원으로 glucose와 fructose, 질소원으로는 NH₄Cl, NH₄NO₃, (NH₄)₂SO₄ 및 NaNO₃를 잘 자화하였다. 탄소원 및 질소원으로 lysine, glutamate를 잘 이용하였으나 그밖의 아미노산 자화능은 낮았다. 균체로부터 추출한 3.1 mg의 단백질에 상당하는 무세포 추출액으로 0.5% DAC를 55%에서 12시간 반응시킨 생성물은 약 98% L-lysine으로 확인되었다.

참고문헌

1. Barrett, G.C.: *Chemistry and biochemistry of the*

amino acids, Chapman and Hall, London New York, (1985).

2. Ottenheym, H.H. and P.J. Jenneskens: *J. Agr. Food. Chem.*, **18**(6), 1010 (1970).
3. Nakayama, K., S. Kitada and S. Kinoshita: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **7**, 145 (1961).
4. Tosaka, O., K. Takinami and Y. Hirose: *Agric. Biol. Chem.*, **42**, 745 (1978).
5. Tosaka, O., K. Takinami and Y. Hirose: *Agric. Biol. Chem.*, **2**, 1181 (1978).
6. Seto, T.A.: US Patent 3056729 (1962).
7. Fukumura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**(9), 1687 (1976).
8. Fukumura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **40**(9), 1695 (1976).
9. Fukumura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**(8), 1321 (1977).
10. Fukumura, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **41**(8), 1327 (1977).
11. Krieg, N.R. and J.G. Holt: *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams and Wilkins, Baltimore, Vol. 1, (1984).
12. Fukumura, T.: *Plant & Cell Physiol.*, **7**, 105 (1966).
13. Chinard, F.P.: *J. Biol. Chem.*, **199**, 91 (1952).

(Received September 21, 1987)