

## *Pseudomonas* sp. JH007에 의한 DL-2-Chloropropionic Acid로부터 D-Lactic Acid의 생산

정자현 · 황인균 · 방원기\*  
고려대학교 농화학과

**Production of D-Lactic Acid from DL-2-Chloropropionic Acid by *Pseudomonas* sp. JH007. Ja-Hun Jung, In-Gyun Hwang and Won-Gi Bang\*.** Department of Agricultural Chemistry, Korea University, Seoul 136-701, Korea — For the production of D-lactic acid from DL-2-chloropropionic acid, about 80 strains of bacteria capable of assimilating DL-2-chloropropionic acid as a sole carbon and energy source were isolated from the soil. JH-007 strain that showed the highest productivity of D-lactic acid and didn't produce L-lactic acid from DL-2-chloropropionic acid was selected from them and identified as *Pseudomonas* sp. The optimal conditions for the production of D-lactic acid from DL-2-chloropropionic acid were examined. The resting cells of JH-007 cultured in LB medium containing 3 g/l of DL-2-chloropropionic acid were used as an enzyme source. The reaction mixtures for the maximal production of D-lactic acid were consist of 10 g/l of resting cells and 3 g/l of DL-2-chloropropionic acid in 125 mM sodium carbonate buffer. The optimal pH for the reaction was 10.0 and the optimal temperature was 30°C. When 1 g/l of DL-2-chloropropionic acid was added intermittently to the reaction mixture under the above condition, 5.72 g/l of D-lactic acid was produced after incubation of 5 hrs. This amount of D-lactic acid corresponded to a 98.4% yields and the optical purity was 99.8%.

D-Lactic acid는 (R)-2-hydroxypropanoic acid로서 광학활성이 있는 의약품과 농약을 생산하는데 유용한 비대칭탄소 출발물질로서 이용된다. 의약품 생산의 경우, D-lactic acid는 3-chlorolactic acid와 glycidic acid의 생산에 출발물질로 사용되며, 이 물질들은 prostaglandin,  $\beta$ -adrenergic blocking agent, leukotrienes와 같이 생물학적으로 활성이 있는 비대칭성 물질의 합성에 이용된다(1). 또한, D-lactic acid는 kanamycin과 paromomycin과 같은 aminoglycoside계 항생물질의 합성 원료인 (S)-isoserine의 생산을 위한 출발물질로 이용된다(2). 농약 생산의 경우 D-lactic acid는 생물학적으로 활성을 지니는 제조제의 원료인 L-2-chloropropionic acid의 생산을 위한 전구체로서 사용된다. 최근에는 의료용 물질로서 무정형인 racemic poly-DL-lactic acid에 비해 기계적 성질이 우수한 poly-L-lactic acid나 poly-D-lactic acid를 인공 피부 및 마이크로캡슐의 제조에 이용하려는 방안이 검토되고 있어 D-lactic acid의 생산에 대한 연구가 더욱 활발하게 진행되고 있다(3, 4).

D-Lactic acid는 화학적 방법과 생물학적 방법으로 생산될 수 있다. 화학적인 방법으로는 DL-lactic acid를 morphine과 같은 광학활성이 있는 아민으로 처리하여 부분 입체 이성체로 전환한 후 크로마토그래피 방법으로 분리하는 방법으로, 모든 공정에 사용되는 반응물질들이 비싸고 공정 자체도 복잡한 단점이 있으며, 반응 원료로 D-2-chloropropionic acid를 사용할 경우 순도가

높은 D-2-chloropropionic acid를 얻기 힘든 단점이 있는 것으로 보고되어 있다(5, 6).

이러한 화학적인 방법의 단점을 극복하기 위해 미생학적 방법이 이용된다. 미생물을 이용한 D-lactic acid의 제조방법으로는 발효법과 광학분할법, 전구물질로부터의 전환법등이 보고되어 있다. 첫째로, 발효법으로는 glucose로부터 homofermentative pathway를 경유하는 lactic acid bacteria를 이용, D-lactic acid를 생산하는 것이며(7-9), 두번째로, DL-lactic acid의 분할에 의하여 D-lactic acid를 생산하는 것이다(10). 세번째로는 입체 특이적 효소를 갖는 미생물을 이용하여 전구물질로부터 선택적으로 D-lactic acid만을 생산하는 방법으로 전구물질로서는 1,2-propanediol(11, 12), DL-lactonitrile(3), DL-2-chloropropionic acid(13, 14) 등을 이용할 수 있다. DL-2-chloropropionic acid를 기질로 사용한 경우 Motosugi 등(13)은 DL-2-chloropropionic acid로부터 100 ml당 44 mmole의 D-lactic acid를 생산하였으며, 특히 Hansan 등(14)은 DL-chloropropionic acid로부터 D-lactic acid를 생산하고, 반응액속에 남은 D-2-chloropropionic acid는 65 mM NaOH를 첨가한 후, 95°C에서 3시간동안 반응시켜 D-lactic acid로 전환하였을 때 87%의 수율로 94%의 enantiomeric excess를 나타내는 D-lactic acid가 생산됨을 보고하였다.

여기서 2-chloropropionic acid와 같은 2-halogenated alkanolic acid의 탈할로젠화 반응을 촉매하는 효소는 2-haloacid dehalogenase[EC 3.8.1.2]라 하며, 반응 양식에 따라 L-체 혹은 D-체의 기질에만 작용하거나 DL-체의 기질에만 작용하여 D-와 L-의 configuration을

\*Corresponding author.

Key words: D-lactic acid, DL-2-chloropropionic acid, *Pseudomonas* sp.

각각 반전시키는 것과 DL-체의 기질에 작용하여 configuration을 유지하는 효소의 4가지 형태로 나뉜다 (15-20).

본 연구에서는 광학활성 D-lactic acid를 생산하기 위하여 비교적 값이 싼 DL-2-chloropropionic acid를 탄소원 및 에너지원으로 이용하며, L-chloropropionic acid에만 작용하여 D-lactic acid만으로 전환할 수 있는 L-2-haloacid dehalogenase만을 지닌 균주를 토양으로부터 분리, 선별한 후 분리 균주의 균체를 효소원으로 이용하여 DL-2-chloropropionic acid로부터 D-lactic acid를 생산하기 위한 최적반응조건을 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주

본 실험에서는 경기도 안성군 소재의 하천토양으로부터 DL-2-chloropropionic acid 자화성 균주를 분리, 선별하여 사용하였다.

### 사용배지

분리 및 선별용 배지로는 1 g/l의 DL-2-chloropropionic acid를 함유하는 최소배지를 사용하였다. 또한 분리균주의 전배양 및 균체를 수확하기 위한 본배양 배지로는 3 g/l의 DL-2-chloropropionic acid를 함유하는 Luria-Bertani(LB) 배지를 사용하였다.

### D-Lactic acid 생산 균주의 분리 및 선별

토양으로부터 DL-2-chloropropionic acid으로부터 D-lactic acid를 생성할 수 있는 균주를 분리하기 위하여 유일한 탄소원 및 에너지원으로서 1 g/l의 DL-2-chloropropionic acid를 함유하는 최소배지에 토양 현탁액을 가하고 30°C에서 48시간 진탕배양(200 rpm)으로 2회 농화배양한 후, streak-plate 법으로 DL-2-chloropropionic acid 자화성 균주를 순수분리하였다.

D-Lactic acid의 생산성이 우수하며, L-lactic acid를 생산하지 않는 균주를 선별하기 위하여 상기 순수 분리한 균주들을 1 g/l의 DL-2-chloropropionic acid를 함유하는 최소배지를 10 ml씩 함유하는 50 ml 삼각플라스크에 한 백금이씩 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양하였으며, 이 배양액을 최소배지 100 ml씩 함유하는 500 ml 삼각플라스크에 1%(v/v) 되도록 접종한 다음 14 시간동안 진탕배양하였다. 배양한 균체를 수확한 후, 동일한 균체량으로 DL-2-chloropropionic acid가 함유된 반응액 10 ml로 30°C에서 30분 반응시킨 다음, 0.5M HCl을 첨가하여 반응을 정지시킨 후, 상온에서 5분간 원심분리하여 상등액을 얻었으며, 반응액내의 D-lactic acid 및 L-lactic acid의 생성량을 조사하여 가장 많은 D-lactic acid를 생산하며 L-lactic acid는 생산하지 않는 균주를 최종 선별하였다.

### 균주의 배양

선별된 균주는 3 g/l의 DL-2-chloropropionic acid를 포함하는 Luria-Bertani 한천평판배지로부터 한균락을 백금으로 취하여 전배양배지 10 ml을 함유하는 50 ml 삼각플라스크에 접종하여 30°C에서 9시간 진탕배양(200 rpm)한 후, 동일한 조성의 본배양배지 100 ml를 함유하는 500 ml 삼각플라스크에 접종하여 30°C에서 16시간 진탕배양(200 rpm)하였다. 이렇게 배양한 균체를 4°C에서 10분간 원심분리(8000×g)하여 0.85%(w/v) 생리 식염수로 2회 세척한 후, D-lactic acid의 생산을 위한 효소원으로 사용하였다.

### 휴지세포에 의한 전환반응

DL-2-Chloropropionic acid로부터 D-lactic acid로의 전환반응은 1 g/l의 DL-2-chloropropionic acid와 효소원으로서 균체를 함유하는 25 mM sodium carbonate buffer(pH 10.0)의 반응 혼합액 10 ml를 50 ml 삼각플라스크에 넣고 30°C에서 30분간 진탕 반응하였다.

### 분석방법

D-Lactic acid 및 L-lactic acid의 분석은 Gawehn와 Bergmeyer의 방법(21)에 따라 NAD 의존성 D-lactate dehydrogenase[EC 1.1.1.28] 및 L-lactate dehydrogenase[EC 1.1.1.27]를 이용한 흡광도법을 사용하여 수행하였다.

2-Haloacid dehalogenase[EC 3.8.1.2]의 활성은 Gawehn과 Bergmeyer의 방법(21) 및 Noll(22)의 방법을 약간 변형하여 DL-2-chloropropionic acid로부터 형성된 D-lactic acid의 양을 측정하였다. 상기 배양조건에서 16 시간 배양한 균체를 수확한 다음, sonicator (Schoellerschall사)로 4°C에서 8 KHz로 30초 간격으로 10초씩 10회 처리한 후 원심분리(12,000×g, 15 min)하여 상등액을 효소원으로 사용하였다. 반응 혼합액은 10 ml에 100 μmole의 sodium carbonate buffer(pH 10.0)와 50 μmole의 DL-2-chloropropionic acid 및 상기 효소액 1 ml을 함유하며, 반응은 30°C에서 진탕하면서 30분간 수행하였고, 0.5M HCl을 1 ml 가하여 반응을 중지시켰다. 반응액내에 형성된 D-lactic acid는 상기 반응액을 원심분리(12,000×g, 5 min)한 후 상기의 정량분석 방법과 동일하게 측정하였다.

2-Haloacid dehalogenase의 활성 1 unit는 1분당 1 μmole의 DL-2-chloropropionic acid로부터 1 μmole의 D-lactic acid를 생성하는 것으로 정의하였으며, 비활성은 unit을 mg 단백질로 나눈 것으로 정의하였다.

생성된 D-lactic acid의 광학순도는 Kosaki 등(9)의 방법에 따라 측정하였다.

단백질의 양은 표준물질로 bovine serum albumin (Sigma)을 이용하여 Lowry 등(23)의 방법에 의하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

균체의 생육은 분광광도계를 사용하여 600 nm에서 배양액의 혼탁도(optical density, O.D.)를 측정하여 구하였다.

**균주의 동정**

분리 및 선별된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(24)에 의거하여 수행하였다.

**결과 및 고찰**

**D-Lactic acid 생산 균주의 분리**

DL-2-Chloropropionic acid로부터 D-lactic acid를 생산하기 위하여 재료 및 방법에 따라 80여종의 균주를 토양으로부터 순수 분리하였으며, 그 중 D-lactic acid는 생산하지만, L-lactic acid는 생산하지 않는 균주 6종을 일차로 선별하였다.

Table 1의 결과와 같이 JH-007이 균체의 생육 및 D-lactic acid 생산량도 우수하였으며, L-lactic acid는 생산하지 않았다. 따라서 D-lactic acid 생산 균주로서 JH-007을 선정하여 사용하였다.

**선별 균주의 생육 및 효소적 특성**

선별된 JH-007 균주의 DL- 및 D-, L-체의 기질에 대한 생육 특성을 관찰하기 위하여 DL- 및 D-, L-2-chloropropionic acid를 각각 함유하는 최소배지에서 배양하여 생육되는 정도를 측정하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 선별된 균주는 DL- 및 L-2-chloropropionic acids에서는 생육하였으나 D-2-chloropropionic acid에서는 기질을 첨가하지 않은 대조구와 비슷한 생육정도를 보였다. 따라서 선별균주는 L-2-chloropropionic

**Table 1. Comparison of growth and D-lactic acid production by microorganisms.**

Strains	Growth (O.D. 600 nm)	D-Lactic acid (g/l)	L-Lactic acid (g/l)
JH004	0.175	0.08	—
JH007	0.420	0.23	—
JH008	0.148	0.11	—
JH037	0.393	0.06	—
JH054	0.229	0.08	—
JH073	0.400	0.05	—

\*Cultivations were carried out at 30°C for 14 hrs in the medium containing 1 g/l DL-2-chloropropionic acid, 0.5 g/l yeast extract, 5 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, and 0.1 g/l MgSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (pH 7.0).

Reaction was carried out for 30 mins at 30°C in the reaction mixture containing 2.5 g/l (wet weight) of cell, 1 g/l of DL-2-chloropropionic acid, and 25 mM sodium carbonate buffer (pH 10.0).

acid만을 이용함을 알 수 있었다.

또한 DL-2-chloropropionic acid를 함유하는 최소배지에서 배양하여 수확한 균체를 이용하여 기질로서 DL- 및 D-, L-2-chloropropionic acid를 1 g/l 함유하는 반응액내에서 2시간 반응시킨 결과 Table 3과 같이 1 g/l의 DL-2-chloropropionic acid로부터 전환율 49.8%로 0.41 g/l의 D-lactic acid가 생성되었으며, L-2-chloropropionic acid로부터는 0.83 g/l의 D-lactic acid가 생성되었고, D-2-chloropropionic acid로부터는 D-lactic acid가 생성되지 않았다. 따라서 선별한 균주는 L-체의 2-chloropropionic acid에만 작용하여 lactic acid를 생성하며 L-configuration을 D-로 반전시켜 D-lactic acid를 생성하는 L-2-haloacid dehalogenase의 활성만을 유도하는 것으로 확인할 수 있었다.

**분리 균주의 동정**

**Table 2. Effect of 2-chloropropionic acid form on cell growth of strain JH-007.**

Substrates	Concentration (g/l)	Cell Growth (O.D. 600 nm)
Control <sup>a)</sup>		0.170
DL-2-Chloropropionic acid	1	0.420
L-2-Chloropropionic acid	1	0.737
D-2-Chloropropionic acid	1	0.166

\*Cultivations were carried out at 30°C for 14 hrs in the medium containing 1 g/l substrate, 0.5 g/l yeast extract, 5 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, and 0.1 g/l MgSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (pH 7.0).

All substrates were autoclaved separately.

<sup>a)</sup>The control didn't contain 2-chloropropionic acid.

**Table 3. Comparison of D-lactic acid conversion from DL-, D-, and L-2-chloropropionic acids.**

Substrates	Substrate concentration (g/l)	D-Lactic acid (g/l)	Conversion yield (%)
DL-2-Chloropropionic acid	1.0	0.41	49.8
D-2-Chloropropionic acid	1.0	—	—
L-2-Chloropropionic acid	1.0	0.83	99.6

\*Cultivations were carried out at 30°C for 14 hrs in the medium containing 1 g/l DL-2-chloropropionic acid, 0.5 g/l yeast extract, 5 g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 1 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O, and 0.1 g/l MgSO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (pH 7.0).

Reaction was carried out for 2 hrs at 30°C in the reaction mixture containing of 2.5 g/l (wet weight) of cell and 25 mM sodium carbonate buffer (pH 10.0).

**Table 4. Physiological and biochemical characteristics of the isolated strain JH-007.**

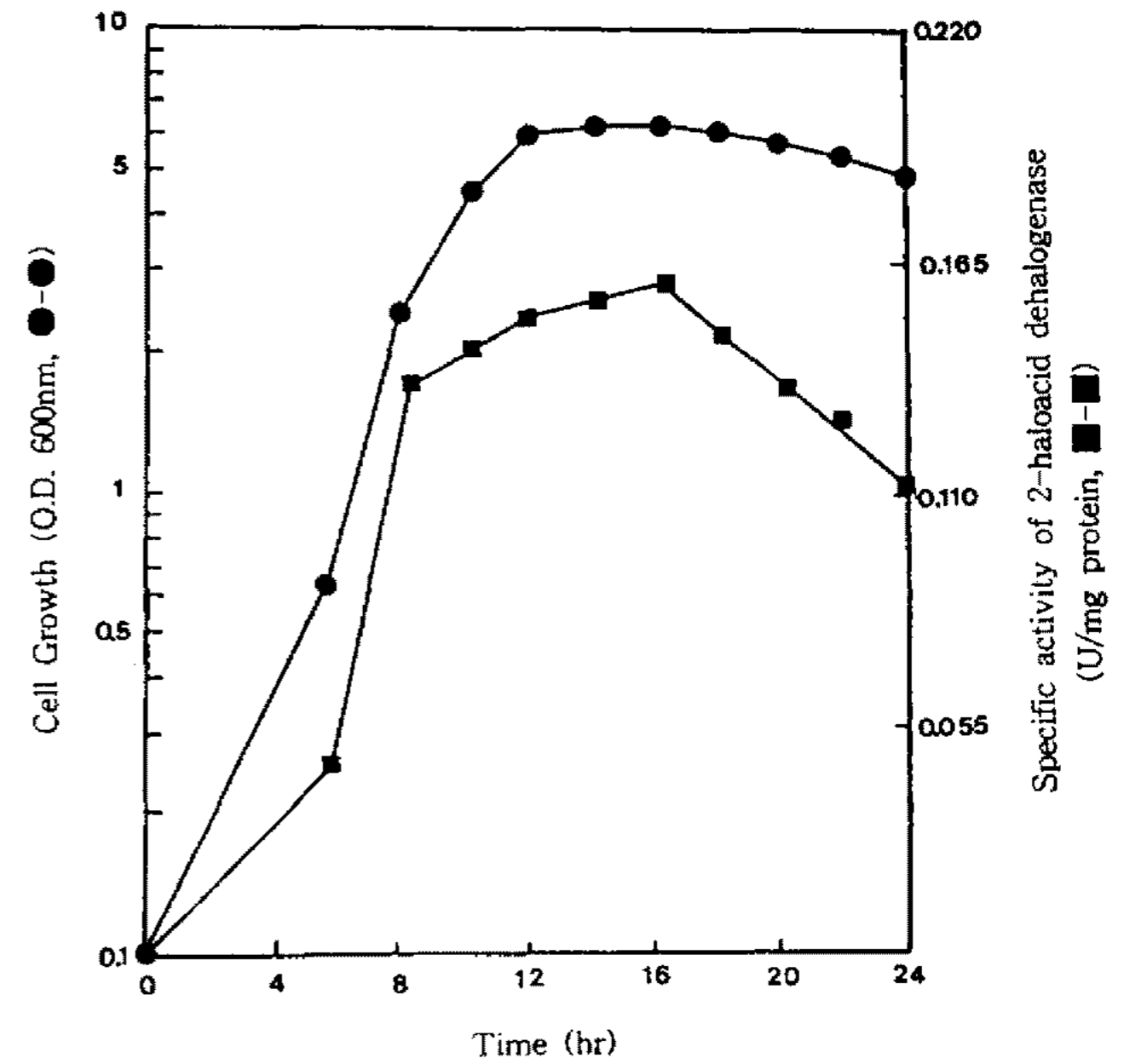
Characteristics	JH-007
<b>Morphological characteristics</b>	
Motility	+
Gram test	-
Shape	rod
<b>Assimilation of carbon compounds</b>	
D-glucose	+
D-mannose	+
L-sorbose	-
D-melibiose	-
lactose	+
sucrose	+
D-fructose	+
L-arabinose	+
D-ribose	+
D-arabinose	+
citrate	+
succinate	+
D-gluconate	+
<b>Physiological characteristics</b>	
Oxidase	+
Catalase	+
Oxygen requirement	strictly aerobe
O/F test	oxidative
Reduction of nitrates to nitrites	-
Methyl red test	-
Starch hydrolysis	-
Gelatin hydrolysis	-
Indole production	-
Glucose acidification	+

\*Symbols: +, positive; -, negative

순수 분리한 JH-007은 Gram 음성의 극성 편모를 가진 간균으로, 생리학적 및 생화학적 성질을 관찰한 결과 Table 4와 같았으며, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(24)에 의하여 *Pseudomonas* sp.로 부분 동정하였다.

#### 증식 세포의 생육 및 2-haloacid dehalogenase 활성의 경시적 변화

2-Haloacid dehalogenase의 활성이 높은 균체를 다량으로 수확하기 위하여 재료 및 방법에서 기술한 바와 같이 3 g/l의 DL-2-chloropropionic acid가 함유된 LB 배지상에서의 시간의 경과에 따른 균체의 생육 및 2-haloacid dehalogenase의 비활성의 변화를 조사하였다. Fig. 1에서와 같이 균체의 생육은 16시간 후에 정지기에 도달하였으며, 또한 2-haloacid dehalogenase의 활성은 배양 초기부터 유도되기 시작하여 16시간 후에 최대치인 0.163 U/mg protein에 도달하였으나, 16시간 이



**Fig. 1. Growth curve of *Pseudomonas* sp. JH-007 and change in 2-haloacid dehalogenase activity.**

Cultivation of *Pseudomonas* sp. JH-007 was carried out at 30°C in LB medium containing 3 g/l of DL-2-chloropropionic acid.

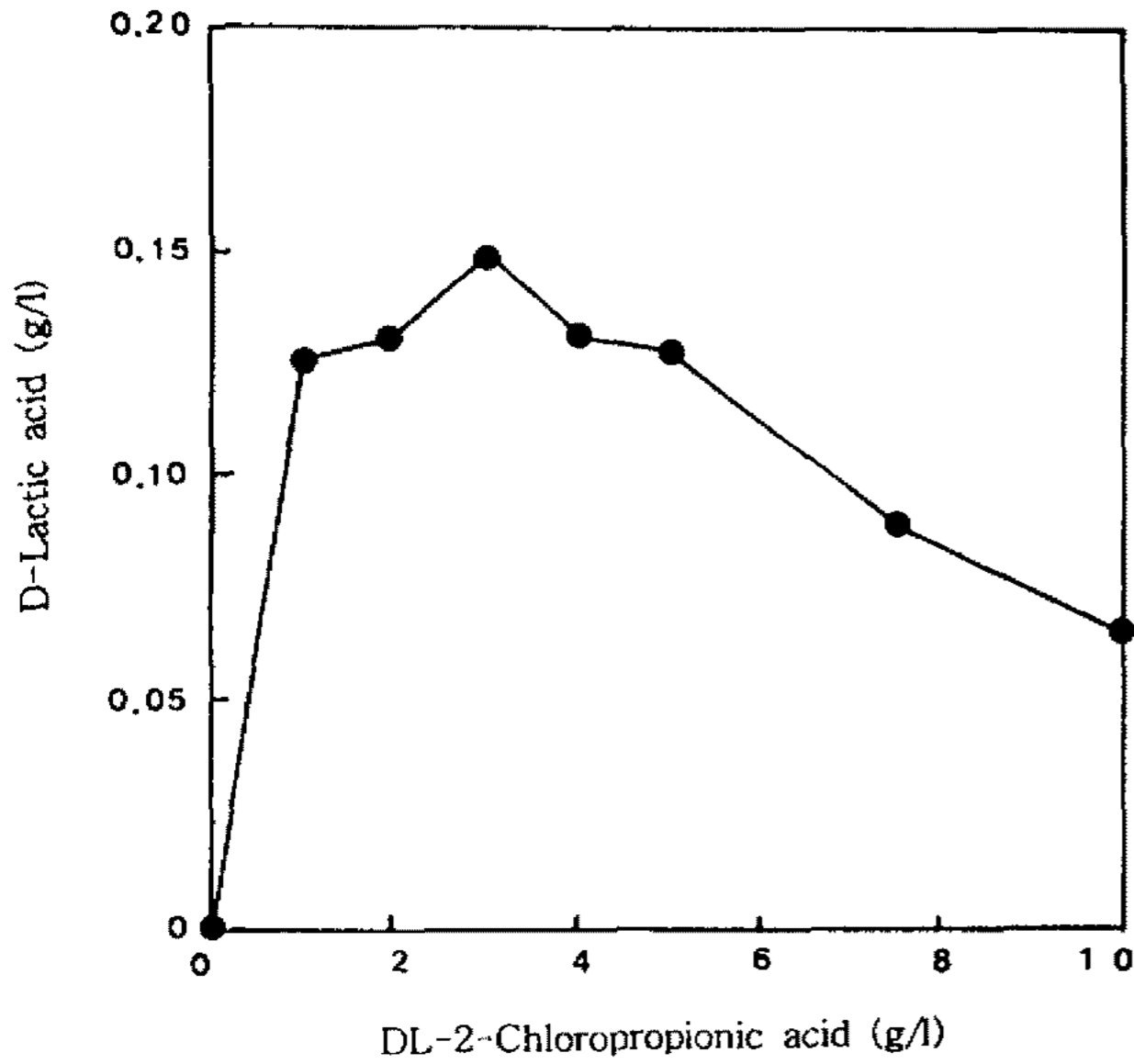
후에는 조금씩 감소하기 시작하였다. 따라서 이후의 실험에서는 균체량 및 비활성이 가장 높은 16시간 동안 배양한 균체를 수확하여 DL-2-chloropropionic acid로부터 D-lactic acid를 생산하기 위한 효소원으로 사용하였다.

#### 휴지세포에 의한 DL-2-chloropropionic acid으로부터 D-lactic acid의 생산

본 실험에서는 상기와 같이 수확한 *Pseudomonas* sp. JH-007의 균체를 2-haloacid dehalogenase의 효소원으로 이용하여 DL-2-chloropropionic acid로부터 D-lactic acid를 생산하기 위한 반응의 최적 조건을 검토하였다.

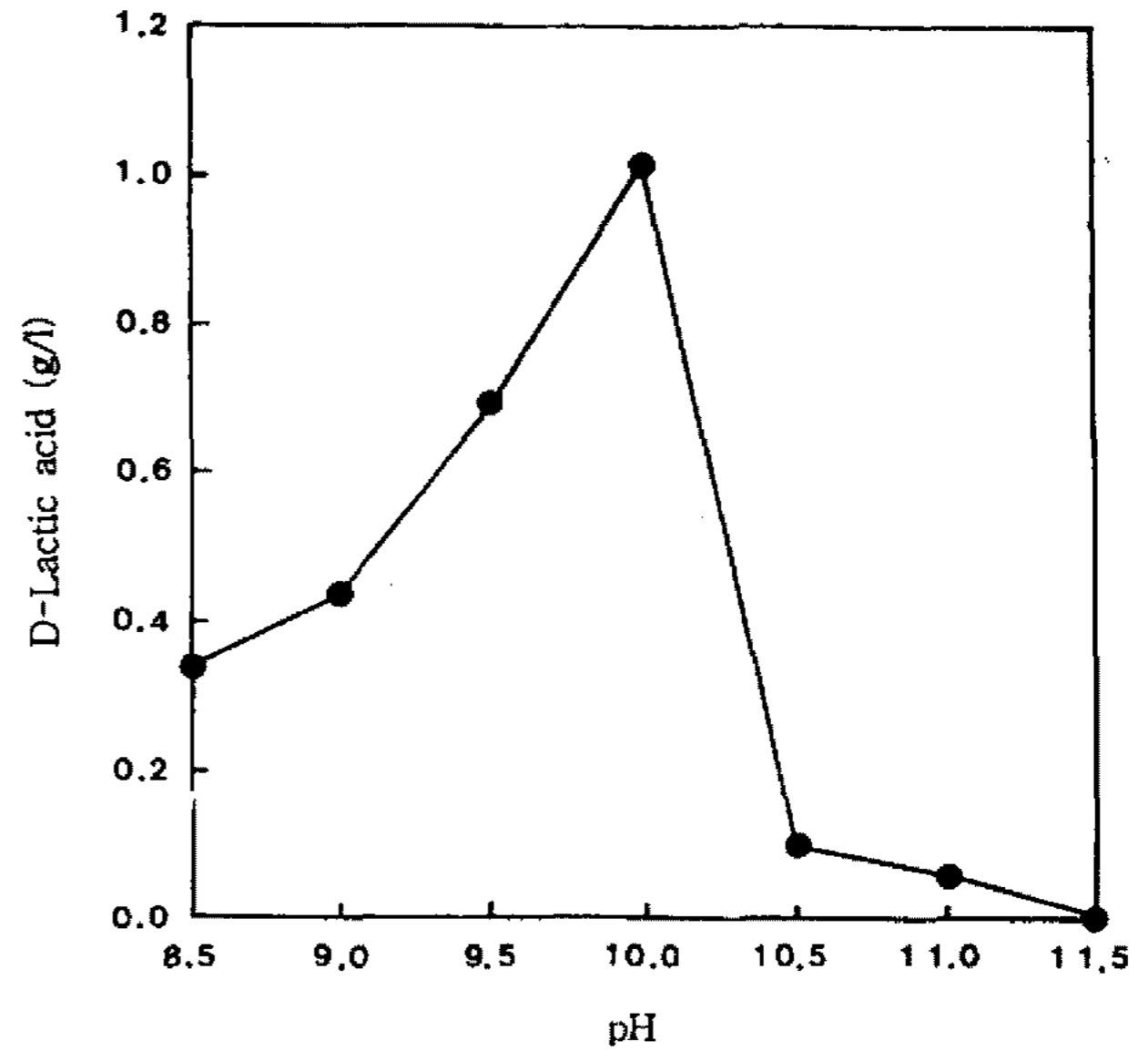
휴지세포에 의한 D-lactic acid 생산시 기질인 DL-2-chloropropionic acid 농도가 D-lactic acid 생산에 미치는 영향을 검토한 결과, Fig. 2와 같이 DL-2-chloropropionic acid의 농도가 3 g/l에 이르기까지는 D-lactic acid의 생산량이 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 기질에 의한 저해 효과로 인하여 D-lactic acid의 생산량이 감소하였다.

또한 효소원으로 사용되는 생균체량이 변화에 따른 D-lactic acid의 생산량과의 관계를 조사한 결과 Fig. 3과 같이 생균체량이 10 g/l(wet weight)에 이르기까지는 D-lactic acid 생산량도 비례적으로 증가하는 경향을 보였으며, 그 이상의 생균체량에서는 D-lactic acid 생산량이 증가하지 않음을 알 수 있었다. 또한 효소원으로 사용되는 생균체를 freezing 및 detergent 처리 등의 방법으로 처리한 결과 D-lactic acid 생산에는 효과가



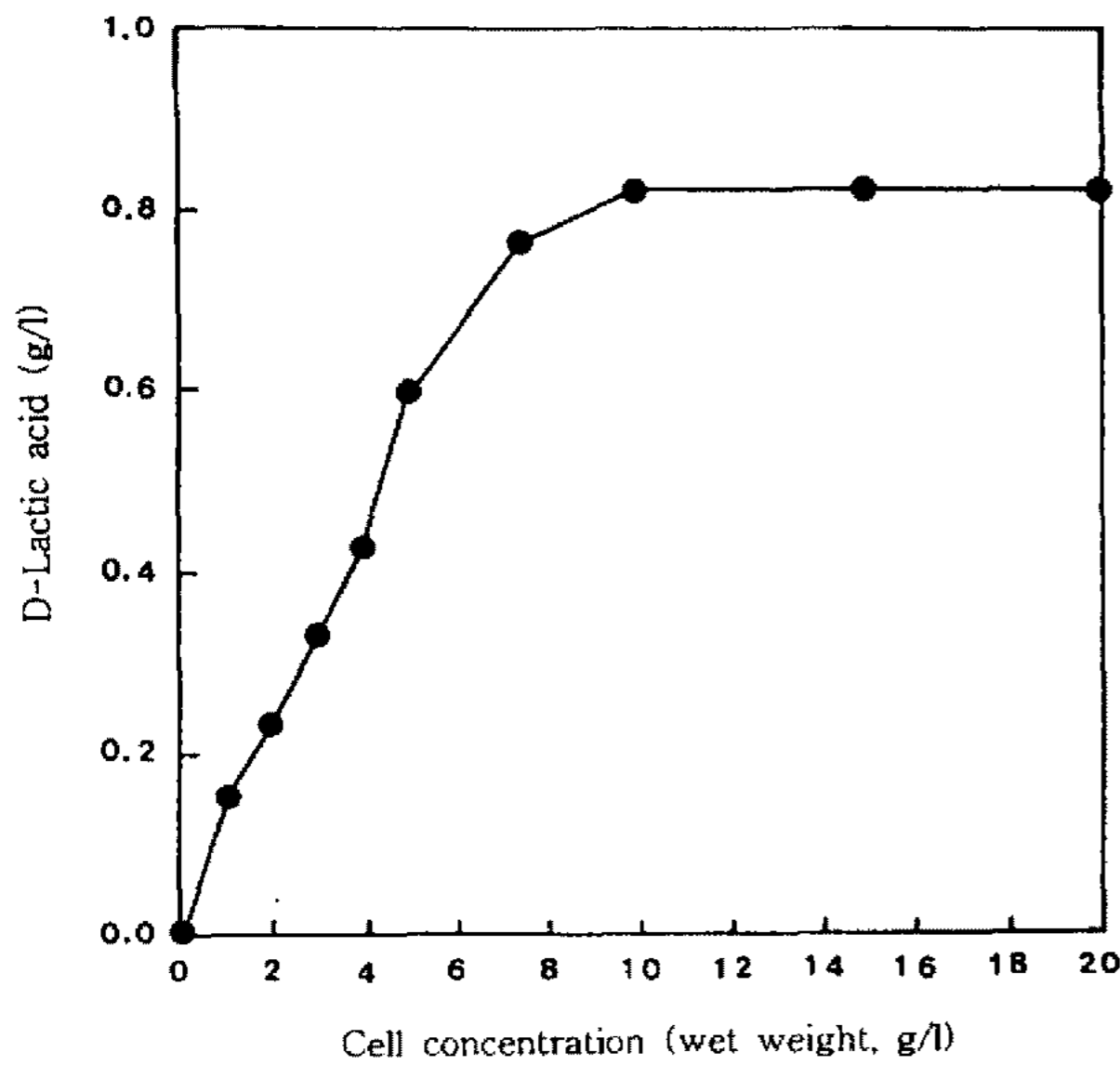
**Fig. 2.** Effect of DL-2-chloropropionic acid concentration on D-lactic acid production by resting cells of *Pseudomonas sp. JH-007*.

Reaction was carried out for 30 mins at 30°C in reaction mixture containing 1 g/l (wet weight) of cell mass and 25 mM of sodium carbonate buffer (pH 10.0).



**Fig. 4.** Effect of initial pH on D-lactic acid production by resting cells of *Pseudomonas sp. JH-007*.

Reaction was carried out for 30 mins at 30°C in reaction mixture containing 10 g/l (wet weight) of cell mass, 3 g/l of DL-2-chloropropionic acid and 125 mM of sodium carbonate buffer.



**Fig. 3.** Effect of cell concentration on D-lactic acid production by resting cells of *Pseudomonas sp. JH-007*.

Reaction was carried out for 30 mins at 30°C in reaction mixture containing 3 g/l of DL-2-chloropropionic acid and 25 mM of sodium carbonate buffer (pH 10.0).

없었다.

휴지세포에 의한 D-lactic acid 생산시 반응 혼합액에 사용되는 반응액의 buffer pH를 8.5에서 11.5까지 변화시키면서 D-lactic acid의 생산량을 검토하였다. 그 결과, Fig. 4에서와 같이 pH 10.0에 이르기까지는 pH가 높아짐에 따라 D-lactic acid의 생산량도 꾸준히 증가하여 pH 10.0에서 생산량이 1.01 g/l로서 최대가 되었

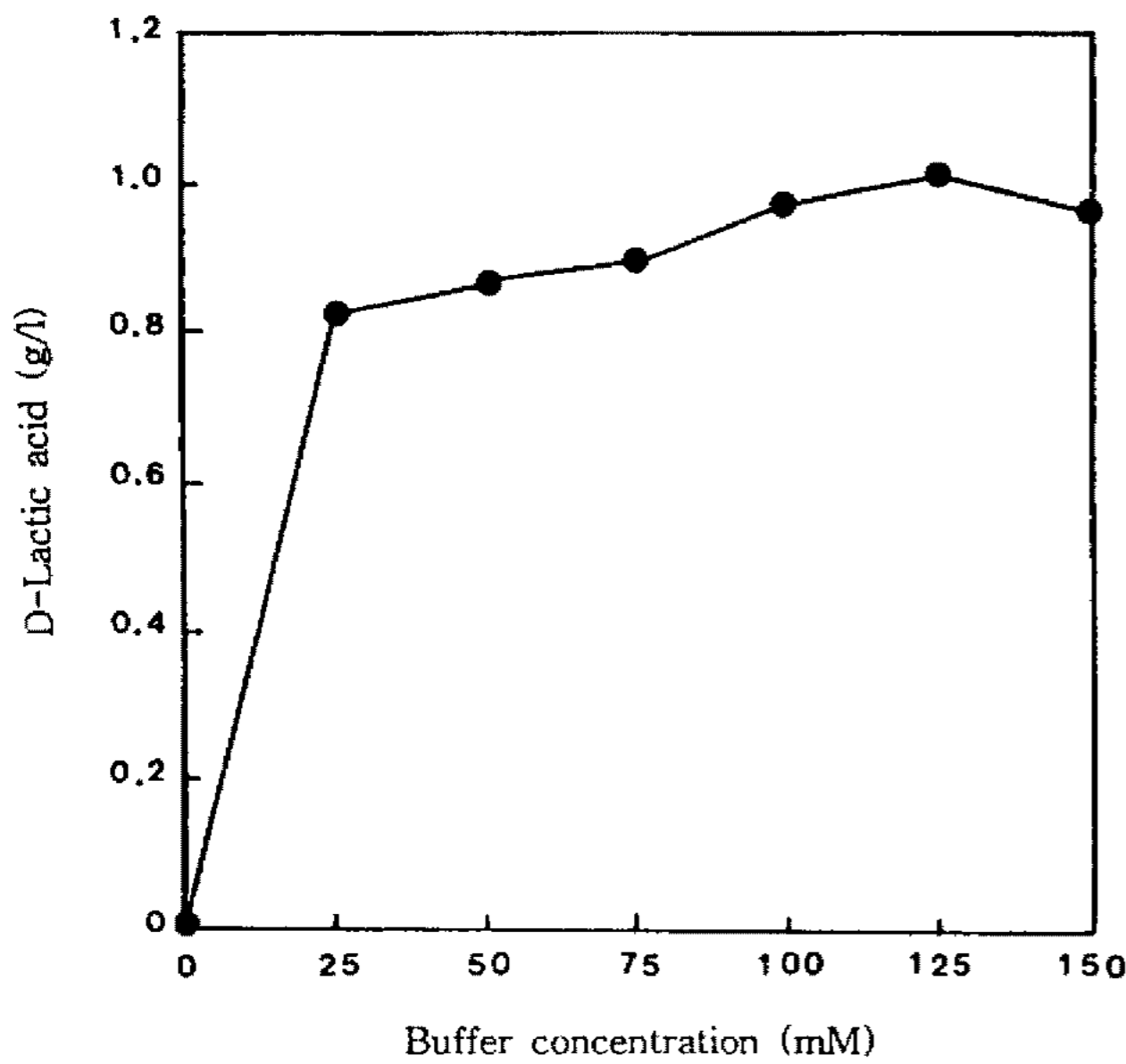
**Table 5.** Effect of different buffers on D-lactic acid production with resting cells.

Buffers (25 mM)	D-Lactic acid (g/l)
Sodium carbonate	0.82
Glycine	0.71
Tris-HCl	0.30
Sodium phosphate	0.24

\*Reaction was carried out 30 mins at 30°C in the reaction mixture containing 10 g/l (wet weight) of cell, 3 g/l of DL-2-chloropropionic acid and 25 mM of various buffers (pH 10.0).

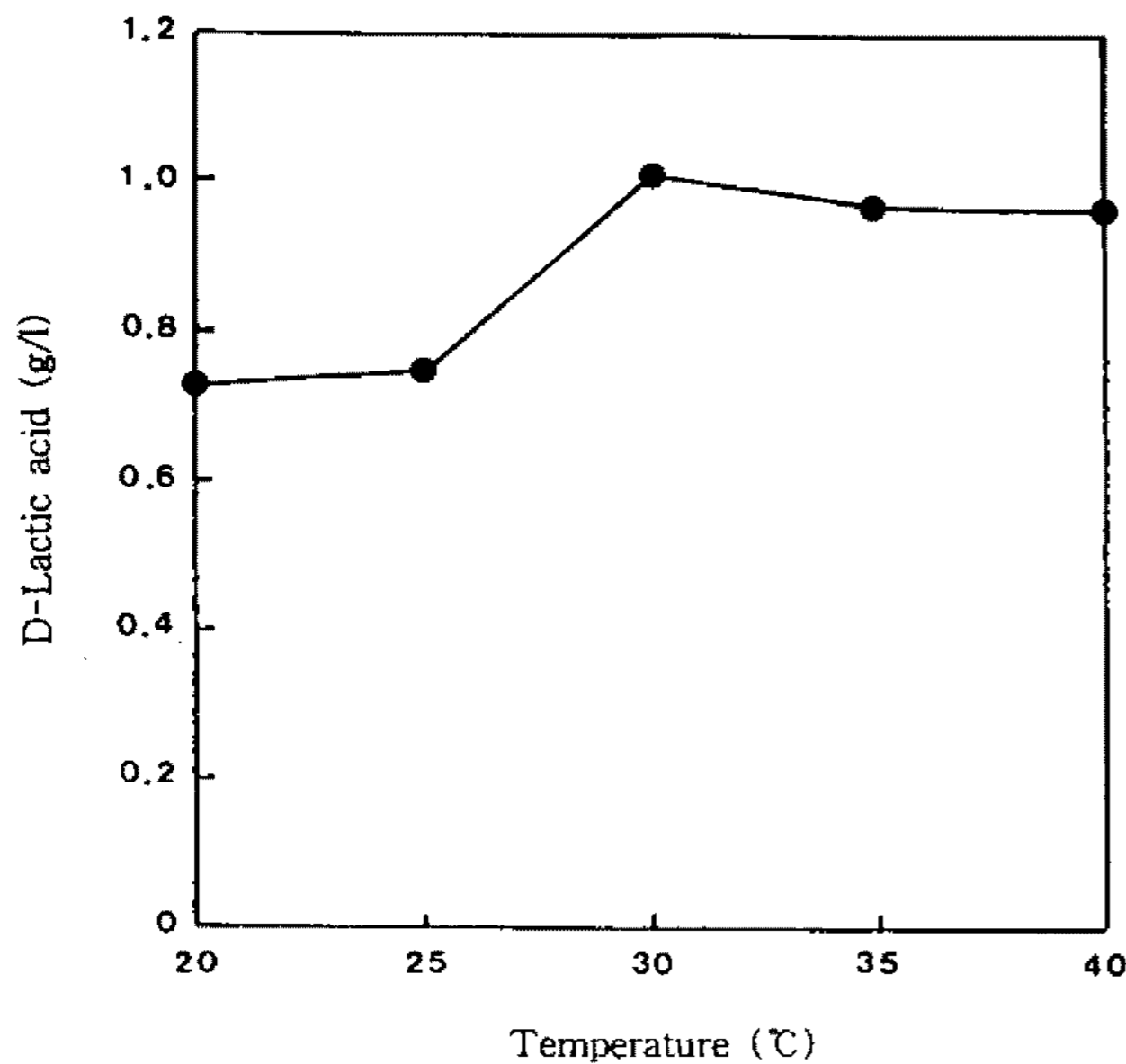
으나, pH가 10.0 이상에서는 D-lactic acid의 생산량이 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 또한 반응액에 사용되는 buffer의 종류 및 농도의 효과도 검토하였다. Table 5에서와 같이 pH 10.0으로 조정된 25 mM의 4가지의 buffer에 대하여 조사한 결과 sodium carbonate buffer가 D-lactic acid의 생산에 가장 좋은 것으로 나타났으며, sodium carbonate buffer의 농도는 Fig. 5와 같이 125 mM에 이르기까지 D-lactic acid의 생산량이 증가하였고, 그 이상의 농도에서는 감소하는 경향을 보였다.

휴지세포에 의한 D-lactic acid의 생산시의 최적 반응온도는 Fig. 6에 나타난 바와 같이 30°C 전후에서 가장 좋았으며 그 이상의 온도에서는 온도가 증가함에 따라 생산량이 감소하는 결과를 나타내었다. 이상의 결과에서 30°C에서 30분간 반응시켰을 때 3 g/l의 DL-2-chlorop-



**Fig 5.** Effect of buffer concentration on D-lactic acid production by resting cells of *Pseudomonas* sp. JH-007.

Reaction was carried out for 30 mins at 30°C in reaction mixture containing 10 g/l (wet weight) of cell mass, 3 g/l of DL-2-chloropropionic acid, and the reaction buffer was sodium carbonate buffer (pH 10.0).

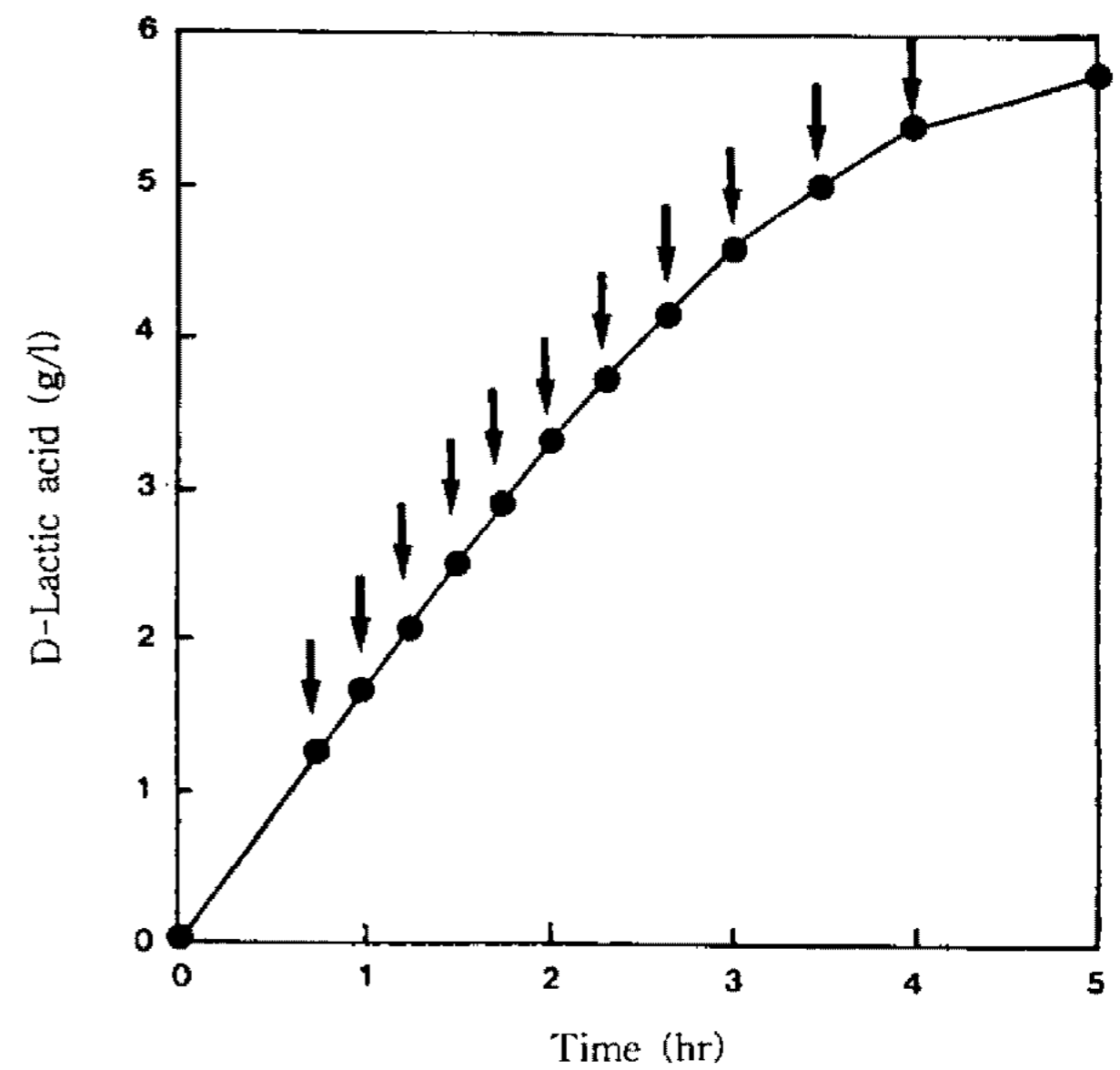


**Fig 6.** Effect of reaction temperature on D-lactic acid production by resting cells of *Pseudomonas* sp. JH-007.

Reaction was carried out for 30 mins in the reaction mixture containing 10 g/l (wet weight) of cell mass, 3 g/l of DL-2-chloropropionic acid, and 125 mM of sodium carbonate buffer (pH 10.0).

ropionic acid로부터 1.01 g/l의 D-lactic acid가 생성되었다.

상기의 실험 결과로부터 얻어진 최적조건하에서 *Pseudomonas* sp. JH-007의 휴지세포를 이용하여 간헐적으로 1 g/l의 DL-2-chloropropionic acid를 첨가하면서



**Fig 7.** Time course of D-lactic acid production by resting cells of *Pseudomonas* sp. JH-007.

Reaction was carried at 30°C in reaction mixture containing 10 g/l (wet weight) of cell mass and 125 mM sodium carbonate buffer (pH 10.0).

Total substrate concentration was 14 g/l DL-2-chloropropionic acid.

The arrows indicate feeding points of 1 g/l of DL-2-chloropropionic acid.

D-lactic acid의 생산량의 경시적 변화를 조사하였으며, 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 생산량은 반응시간 5시간 후에 14 g/l의 DL-2-chloropropionic acid로부터 5.72 g/l(63.6 mM)의 D-lactic acid가 생산되었으며, 이때의 사용한 기질에 대한 이론적 전환율은 98.4%였다. 반응액내의 생성된 D-lactic acid의 광학순도는 99.8%이었다. 이와 같은 결과는 Kosaki 등(9)이 직접 발효법으로 생산하여 보고한 99%와 Shigeno와 Nakahara(11)가 1,2-propanediol로부터 생산하여 보고한 99%와 같은 수준의 광학 순도였다. 상기의 반응액중에 남아있는 D-2-chloropropionic acid는 Han-san 등(14)의 방법에 따라 chemical dehalogenation을 거치면 거의 모든 기질을 D-lactic acid로 전환시킬 수 있을 것으로 사료된다.

## 요 약

DL-2-chloropropionic acid로부터 D-lactic acid를 생산하기 위하여, 토양으로부터 DL-2-chloropropionic acid를 유일한 탄소원 및 에너지원으로 이용할 수 있는 균주 80여종을 분리하였으며, 분리균주들로부터 DL-2-chloropropionic acid로부터 D-lactic acid 생산성이 우수하며, L-lactic acid를 생산하지 않는 균주 JH-007을 선별하여 *Pseudomonas* sp.로 동정하였다. DL-2-chloropropionic acid로부터 D-lactic acid를 생산하기 위한

최적 조건을 조사하기 위하여 3 g/l의 DL-2-chloropropionic acid가 포함된 LB 배지에서 배양하여 수확한 후 수확된 균체를 효소원으로 사용하였다. D-Lactic acid 생산시의 최적 반응액 조건은 125 mM sodium carbonate buffer에서 휴지균체 10 g/l와 3 g/l의 DL-2-chloropropionic acid를 사용할 때였으며, 최적 반응 pH는 10.0, 최적반응 온도는 30°C이었다. 최적조건하에서 반응액에 1 g/l의 DL-2-chloropropionic acid를 간헐적으로 첨가하여 5시간 반응시켰을 때 5.72 g/l의 D-lactic acid가 생산되었으며, 전환율은 98.4%였으며, 광학순도는 99.8%이었다.

### 참고문헌

- Onda M., K. Motosugi, and H. Nakajima. 1990. A New approach for enzymatic synthesis of D-3-chlorolactic acid from racemic 2,3-dichloropropionic acid by halo acid dehalogenase. *Agric. Biol. Chem.* **54**(11): 3031-3033.
- 大橋武久. 1989. (S)-이소세린의 제조법. 公開特許公報. 平 2-262545.
- Yamagami T., E. Kobayashi, and T. Endo. 1992. Biological process for preparing optically active lactic acid. *Eur. Pat. Appl., EP 473328A2*.
- David B. 1991. Miscellaneous biomaterials. *Biomaterial*. Pp. 342-347. M stockton press.
- Hansan A.K.M.Q., H. Takada, N. Esaki, and K. Soda. 1991. Catalytic action of L-2-haloacid dehalogenase on long-chain L-2-haloalkanoic acids in organic solvents. *Biotechnology and Bioengineering* **38**: 1114-1117.
- 左右田健次, 田中則子, 今村伸三. 1984. 乳酸의 製造方法. 公開特許公報 (A). 昭61-91154.
- Fordyce A.M., V.L. Crow, and T.D. Thomas. 1984. Regulation of product formation during glucose or lactose limitation in nongrowing cells of *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**(2): 332-337.
- De boer J.P., M.J. Teixeira de mattos, and O.M. Neijssel. 1990. D-(-)-Lactic acid production by suspended and aggregated continuous cultures of *Bacillus laevolacticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 149-153.
- Kosaki M. and K. Kawai. 1991. Fermentation to D-lactic acid. *Eur. Pat. Appl., EP 458370A1*.
- 河合公利. 1987. D-乳酸의 製造. 公開特許公報(A). 昭63-173596.
- Shigeno T. and T. Nakahara. 1991. Production of D-lactic acid from 1,2-propanediol by *Pseudomonas* sp. strain TB-135. *Biotechnol. Lett.* **13**(6): 427-432.
- Nishio N., T. Kawagishi, and R. Matsuno. 1978. Metabolism of 1,2-propanediol by methanol utilizing bacteria and some properties of 1,2-propanediol dehydrogenating enzyme. *Agric. Biol. Chem.* **42**(6): 1095-1100.
- Motosugi K., N. Esaki, and K. Soda. 1984. Enzymatic preparation of D- and L-lactic acid from racemic 2-chloropropionic acid. *Biotech. Bioeng.* **26**: 805-806.
- Hasan A.K.M.Q., K. Motosugi, N. Esaki, and K. Soda. 1991. Total conversion of racemic 2-chloropropionic acid into D-lactate by combination of enzymatic and chemical dehalogenations. *J. Ferm. Bioeng.* **72**(6): 481-482.
- Kawasaki H., K. Miyoshi, and K. Tonomura. 1981. Purification, crystallization and properties of haloacetate halohydrolyase from *Pseudomonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* **45**(2): 543-544.
- Motosugi K., N. Esaki, and K. Soda. 1982. Purification and properties of 2-halo acid dehalogenase from *Pseudomonas putida*. *Agric. Biol. Chem.* **46**(3): 837-838.
- Motosugi K., N. Esaki, and K. Soda. 1982. Purification and properties of a new enzyme, DL-2-haloacid dehalogenase from *Pseudomonas* sp. *J. Bacteriol.* **150**(2): 522-527.
- Little M. and P.A. Williams. 1971. A bacterial halohydrolyase. *Eur. J. Biochem.* **21**: 99-109.
- Tsang J.S.H., P.J. Sallis, A.T. Bull, and D.J. Hardman. 1988. A monobromoacetate dehalogenase from *Pseudomonas cepacia* MBA4. *Arch. Microbiol.* **150**: 441-4.
- Weightman A.J., A.L. Weightman, and J.H. Slater. 1982. Stereospecificity of 2-mono chloropropionate dehalogenation by the two dehalogenases of *Pseudomonas putida*; Evidence for two different dehalogenation mechanisms. *J. Gen. Microbiol.* **128**: 1755-1762.
- Gawehn K. and H.V. Bergmeyer. 1974. Methods for determination of metabolites, *Methods of enzymatic analysis*, Pp. 1464-1495, Vol. 3. Academic press, New York.
- Noll F. 1984. In *method of enzymatic analysis*, Vol. 6. Metabolites, Carbohydrates. Pp. 588-592, 2nd ed., Academic press, New York.
- Lowry O.H., N.J. Rosebrough, and A.L. Farr. 1951. Protein measurement with folin reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Sneath P.H.A., N.S. Nair, M.E. Shape, and J.G. Holt. 1986. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 2., The Williams and Wilkins Co. Baltimore.

(Received 18 December 1995)