

Pseudomonas sp.에 의한 DL-lactonitrile로부터 D-lactic acid의 생산

김현수 · 황인균 · 정남현 · 방원기*

고려대학교 생명환경과학대학 생명유전자원공학과

Production of D-Lactic Acid from DL-Lactonitrile by *Pseudomonas* sp. Kim, Hyun-Soo, In-Gyun Hwang, Namhyun Chung, and Won-Gi Bang*. Department of Biotechnology and Genetic Engineering, College of Life and Environmental Sciences, Korea University, Seoul 136-701, Korea – By using DL-acetonitrile as enzyme inducer, 90 bacteria were isolated from a field soil. Among the isolated strains, the strain WJ-003 showed the highest activity for production of D-lactic acid from DL-lactonitrile, and was partially identified as *Pseudomonas* sp. The production condition of D-lactic acid from DL-lactonitrile using resting cells as an enzyme source was optimized as follows: the reaction mixture contained 10 mM of DL-lactonitrile, 20 g of wet cells in 1 l of 20 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0) and the reaction was carried out at 30°C. After 18 h of reaction, 0.843 g/l of D-lactic acid was produced which corresponded to a conversion ratio of 93.7% and an optical purity of 99.8%. Additionally, when 10 mM of DL-lactonitrile was added once more to the reaction mixture at 14 h, 1.64 g/l of D-lactic acid was produced after 28 h. In this experiment, the conversion ratio was 91.1% and optical purity 99.8%.

Key words: D-(-)-lactic acid, DL-lactonitrile, nitrile asymmetric hydrolysis, *Pseudomonas* sp.

D-Lactic acid는 (R)-2-hydroxypropanoic acid로서 광학활성이 있는 의약품과 농약을 생산하는데 유용한 비대칭탄소 출발물질로서 이용될 수 있다. 의약품 생산의 경우, D-lactic acid는 3-chlorolactic acid와 glycidic acid의 생산에 출발물질로서 사용되며, 이 물질들은 prostaglandin, β -adrenergic blocking agent, leukotrienes와 같이 생물학적으로 활성이 있는 비대칭성 물질의 합성에 이용된다[8,10]. 또한, D-lactic acid는 kanamycin과 paromomycin과 같은 aminoglycoside 계 항생물질의 합성원료인 (S)-isoserine의 생산을 위한 출발물질로 이용된다[10]. 농약생산의 경우에 있어서도 광학활성 제초제의 중간체인 L-2-chloropropionic acid의 생산을 위한 전구물질로 이용되며, 최근에는 의료용 물질로서 racemic poly-DL-lactic acid에 비해 기계적 성질이 우수한 poly-L-lactic acid나 poly-D-lactic acid를 인공피부 및 마이크로캡슐의 제조에 이용하려는 방안이 검토되어 D-lactic acid의 생산에 대한 연구가 활발하게 진행되고 있다[10,11].

D-lactic acid만을 생산하기 위해서는 화학적인 방법과 생물학적 방법이 있다. 우선 화학적인 방법으로는 DL-lactic acid를 광학활성이 있는 아민으로 처리하여 부분입체이성체로 전환한 후 크로마토그래피방법으로 분리하는 공정으로, 반응물질이 비싸고 공정 자체가 복잡한 단점이 있다[5]. 이

러한 화학적인 방법의 단점을 극복하기 위해 미생물학적 방법이 이용될 수 있다. 미생물을 이용한 D-lactic acid 제조 방법으로는 발효법, 광학분할법, 전구물질로부터의 전환법 등이 보고되었다. 발효법은 유산균을 이용하여 homo-, heterofermentative pathway를 경유하여 D-lactic acid를 생산하는 것인데 배양학적으로 어렵고 연속생산시 다른 미생물들의 오염을 방지하기가 쉽지 않은 단점이 있다[1, 2]. 광학분할법으로는 DL-lactic acid의 광학분할에 의하여 L-lactic acid를 자화할 수 있는 미생물을 효소원으로 하여 D-lactic acid를 생산하는 방법이 보고되었고[12] 전구물질로부터의 전환법으로는 입체 특이적 효소를 지닌 미생물을 이용하여 선택적으로 D-lactic acid를 생산하는 것으로 여러 예가 보고되었다[7]. DL-lactonitrile로부터 D-lactic acid를 생산하는 방법은 극성용매 하에서 nitrile compounds를 비대칭적으로 가수분해할 수 있는 특이적인 미생물을 이용하여 D-lactic acid를 생산하는 것으로서 DL-lactonitrile로부터 D-lactic acid로의 전환시, L-lactonitrile은 극성용매 하에서 다시 DL-lactonitrile로 되돌아오는 라세미화가 일어난다[11]. 즉, 원하는 광학 활성의 D-lactic acid가 미생물에 의해 생산된 nitrile 비대칭 가수분해효소와 racemization system과의 조합에 의하여 DL-lactonitrile로부터 생산되며 모든 전구물질을 원하는 D-lactic acid로 전환시킬 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서는 nitrile compounds를 비대칭적으로 가수분해하여 DL-lactonitrile로부터 D-lactic acid를 생산하는 균주를 토양으로부터 분리하였고 D-lactic acid만을 생산하는 균주를 최종 선별하였으며, 그 균주를 직접 효소원으로 사용하여 DL-

*Corresponding author

Tel: 82-02-3290-3022, Fax: 82-02-923-8183

E-mail: agrchem@korea.ac.kr

lactonitrile로부터 D-lactic acid를 생산하기 위한 최적반응조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 선별

균주의 분리 및 선별을 위하여 glycerol 20 g/l, yeast extract 3 g/l, K₂HPO₄ 3 g/l, MgCl₂ 0.2 g/l, CaCl₂ 40 mg/l, MnSO₄·4H₂O 4 mg/l, FeCl₂·7H₂O 0.7 mg/l, ZnSO₄·7H₂O 0.1 mg/l와 nitrile 비대칭 가수분해효소를 유도하기 위하여 1 g/l(v/v)의 DL-acetonitrile를 함유하는 분리배지(pH 7.2)를 사용하여 다음과 같이 실험을 수행하였다. 채취한 토양을 멸균된 0.9% 생리식염수에 잘 현탁시킨 후, 여과지를 사용하여 거르고 여과액을 분리배지에 1%(v/v)가 되도록 접종한 다음 30°C에서 24시간 진탕배양(200 rpm)하였다. 이 과정을 3번 반복한 후, 배양액의 균체수를 10²~10⁴ cell/ml이 되도록 생리식염수에서 희석하였다. 희석액을 분리배지의 한천 평판배지에 0.2 ml씩 도말한 후, 30°C에서 48시간 배양하여 생육된 균락을 순수분리하였다. 상기의 순수분리한 균주들을 분리배지를 5 ml씩 함유하는 시험관에 각각 한 백금이씩 접종한 후 30°C에서 24시간 배양하였다. 이 배양액을 상기의 배지 100 ml씩 함유된 500 ml Erlenmeyer flask에 1%가 되도록 접종한 다음 36시간동안 진탕배양(200 rpm)하였다. 배양한 균체를 수확한 후, 5 g/l(wet weight)의 동일한 균체량으로 10 mM의 DL-lactonitrile이 함유된 30 mM 인산완충액(pH 7.0) 2 ml에 가하여 30°C에서 24시간 반응시킨 다음 상온에서 5분간 원심분리하여 상등액을 얻었다. 반응액 내의 D-lactic acid의 생성량을 조사하기 위하여 상기 상등액에 NAD⁺의존성 D-lactate dehydrogenase[EC 1.1.1.28]를 가하여 NAD⁺의 환원에 따른 흡광도의 증가변화를 측정하여 증가폭이 큰 균주를 선별하였다. 또한, L-lactic acid의 생성량을 조사하기 위하여 NAD⁺의존성 L-lactate dehydrogenase[EC 1.1.1.27]를 상기 반응액에 가하여 흡광도의 증가변화를 측정하여 증가하지 않는 균주를 최종 선별하였다.

선별균주의 배양 및 반응조건

선별된 균주를 2%(w/v) 한천이 함유된 분리배지에 한 백금을 접종하여 30°C에서 36시간 평판배양한 후, 상기의 배지를 함유하는 시험관에 한 백금을 접종하여 30°C에서 24시간 진탕배양(200 rpm)하였다. 균체수확을 위한 본배양은 배지 100 ml을 함유하는 500 ml Erlenmeyer flask에 상기의 전배양액을 1%(v/v)가 되도록 접종한 후, 30°C에서 36시간 진탕배양(200 rpm/min)하였다. 이렇게 배양한 균체를 4°C에서 15분간 원심분리하여 30 mM 인산완충액으로 2회 세척한 후, D-lactic acid의 생산을 위한 효소원으로 사용하였다. 상기에서 수확한 균체는 10 mM의 DL-lactonitrile을 지닌 30

mM의 인산완충액(pH 7.0)를 사용하여 D-lactic acid를 생산하는 최적 반응조건을 검토하였다. 전환반응시에는 상기 조성의 반응액 및 효소원으로서 균체를 함유하는 반응혼합액 2 ml을 cap tube(φ 22 mm)에 넣고 30°C에서 24시간 반응한 후, 반응액 시료를 5분간 원심분리하여 상등액을 분석용 시료로 사용하였다.

정성 및 정량분석

D-Lactic acid의 정성 및 정량 분석은 Francis[3]의 방법에 따라 NAD⁺ 의존성 D-lactate dehydrogenase[EC 1.1.1.28]를 이용한 흡광도법을 사용하여 수행하였다. 즉, 상기의 반응액 1 ml에 1 N HClO₄ 1 ml을 첨가하고 상온에서 원심분리하여 균체를 제거한 후, 1 N KOH를 첨가하여 중화시킨 후, D-lactic acid의 정성 및 정량분석용 시료로 하였다. 시료와 D-lactic acid 표준물질용액을 상기 방법에 제시된 반응혼합액에 가한 다음 바로, 분광광도계(LKB Novaspec II)를 사용하여 340 nm에서 흡광도(E₁)를 측정한 후, D-lactate dehydrogenase를 첨가하여 약 1시간 반응시킨 다음 흡광도의 변화가 없을 때 증가된 흡광도(E₂)를 측정하여 그 차이로 D-lactic acid의 양을 결정하였다. 또한, L-lactic acid의 정성 및 정량분석은 NAD⁺ 의존성 L-lactate dehydrogenase[EC 1.1.1.27]를 이용한 흡광도법을 사용하여 상기의 D-lactic acid의 분석과 동일한 방법으로 수행하였다. 정성분석은 3회를 반복하였으며 표 및 그림에 표시된 값은 이들 값의 평균으로 표시하였다.

D-Lactic acid 생산효소 활성의 정의

DL-Lactonitrile로부터 D-lactic acid를 생산하는 균체의 활성 1 unit는 1시간당 DL-lactonitrile로부터 1 μmole의 D-lactic acid를 생성하는 것으로 정의하였으며, 비활성은 unit 수를 mg(wet weight) 균체량으로 나눈 것으로 정의하였다(μmole/hr·mg cell). 균체량 측정은 분광광도계를 사용하여 600 nm에서의 흡광도로 측정함으로써 행하였다.

D-Lactic acid의 광학순도 측정

D-Lactic acid의 광학순도는 Hasan 등[4]의 방법에 의하여 D-lactic acid 및 L-lactic acid의 양을 D- 및 L-lactate dehydrogenase로 측정된 후 다음의 계산식을 이용하여 측정하였다.

$$\text{광학순도(\%)} = \frac{((D\text{-Lactic acid} - L\text{-Lactic acid}) \div (D\text{-Lactic acid} + L\text{-Lactic acid})) \times 100(\%)}$$

균주의 동정

분리 및 선별된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[9]에 의거하여 수행하였다.

결과 및 고찰

D-Lactic acid 생산 균주의 분리

DL-Lactonitrile로부터 D-lactic acid를 생산하기 위하여 DL-acetonitrile을 함유하는 분리배지를 사용하여 90여종의 균주를 토양으로부터 순수분리하였다. 이들 균주들을 분리배지가 각각 5 ml씩 함유된 시험관에 접종하여 30°C에서 36 시간 배양하였다. 배양한 균체를 수확한 후, 10 mM의 DL-lactonitrile을 함유하는 반응액에서 반응을 수행하였다. 이들 균주들을 직접 효소원으로 사용하여 반응액에 생성된 D-lactic acid 및 L-lactic acid를 각각 정량하였다. 이때 D-lactic acid는 생산하지만, L-lactic acid는 생산하지 않는 균주 5종을 선별하여, 각각 WJ-003, WJ-010, WJ-036, WJ-044, WJ-088로 명명하였다. Table 1은 상기의 실험결과로서 상기 5종의 선별균주의 상기의 배지에서의 36시간 생육 및 효소원으로서 5 g/l (wet/weight)의 균체를 사용하여 24시간 반응시켰을 때의 D-lactic acid 및 L-lactic acid의 생성량을 나타내고있다. Table 1에서 알 수 있는 바와 같이, 균주의 생육은 WJ-003의 경우가 다른 균주에 비하여 별 차이는 없었으나 반응액 내의 D-lactic acid의 생산량은 다른 균주에 비하여 가장 좋았다. 따라서, 본 실험에서는 WJ-003을 DL-lactonitrile로부터 D-lactic acid를 생산하기 위하여 다음 실험에 사용하였다.

분리 균주의 동정

상기의 순수분리한 WJ-003은 그람음성으로 극편모를 지니는 간균으로 관찰되었으며 생리학적 특성으로 분리균주는 생육에 산소를 요구하는 호기성이었으며, oxidase, catalase, gelatin 및 starch 가수분해 실험은 양성으로 나타났고 nitrate 환원의 실험은 음성으로 나타났다. 그 외의 생리학적 및 생화학적 특성들은 Table 2에 요약하였다. 이상의 결과들을 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[9]로 비교한 결과 분리균주 WJ-003은 *Pseudomonas* sp.로 부분 동정하였다.

Table 1. Growth and D-lactic acid production by isolated microorganisms.

Strains	Growth (O.D., 600 nm)	D-Lactic acid (g/l)	L-Lactic acid (g/l)
WJ-003	8.38	0.270	N.D. ^a
WJ-010	7.90	0.201	N.D.
WJ-036	7.82	0.195	N.D.
WJ-044	8.04	0.212	N.D.
WJ-088	7.33	0.177	N.D.

*Reaction was carried out for 24 h at 30°C in the reaction mixture containing 5 g/l (wet/weight) of cell, 10 mM of DL-lactonitrile and 30 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0).

^aN.D., not detected.

D-Lactic acid 생산 효소활성에 미치는 각종 nitrile compounds의 영향

DL-Lactonitrile로부터 D-lactic acid를 생산시 효소원으로 사용되는 균체의 효소활성에 미치는 nitrile compounds의 영향을 조사하기 위하여 각종 nitrile compounds를 배지에 1 g/l(v/v)를 첨가하여 그 효과를 조사하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 DL-acetonitrile을 사용한 경우가 다른 nitrile

Table 2. Physiological and biochemical characteristics of the strain WJ-003.

Characterization	WJ-003
Morphological characteristics	
Motility	+
Shape	rod
Gram test	-
Assimilation of carbon compounds:	
D-Glucose	+
D-Mannose	+
Sucrose	+
Succinate	-
D-Arabinose	-
Citrate	-
D-Fructose	-
D-Ribose	+
L-Rhamnose	-
Lactate	+
Physiological characteristics	
Oxidase test	+
Catalase test	+
Reduction of nitrates to nitrites	-
Methyl red test	-
Starch hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+
Indol test	-
O/F test	Oxidative

*Symbols: +, positive, -, negative.

Table 3. Effect of various nitrile compounds on enzyme activity.

Nitrile compounds (g/l)	Growth (O.D ₆₀₀)	Enzyme activity (μmole/h · mg cell)
DL-Acetonitrile	8.38	0.024
DL-2-Chloropropionitrile	7.46	0.020
DL-Benzionitrile	7.36	0.010
DL-Propionitrile	7.35	0.009
DL-Butyronitrile	7.20	0.010
DL-Benzyl cyanide	6.10	0.014
DL-3-Cyanonitrile	5.75	0.014
DL-Isobutyronitrile	0.02	N.D. ^a

*Reaction was carried out for 24 h at 30°C in the reaction mixture containing 5 g/l (wet/weight) of cell, 10 mM of DL-lactonitrile and 30 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0).

^aN.D., not detected.

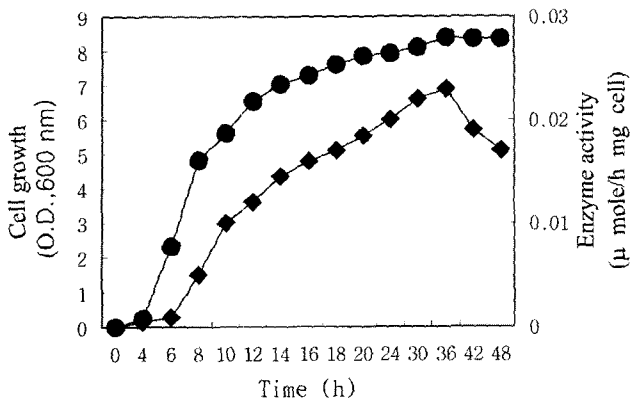


Fig. 1. Growth curve of *Pseudomonas* sp. WJ-003 and change of D-lactic acid production enzyme activity. Cultivation of *Pseudomonas* sp. WJ-003 was carried out at 30°C in medium containing 10 mM of DL-lactonitrile. -●- indicates cell growth, and -◆- indicates enzyme activity.

compounds를 사용하였을 때에 비하여 생육이 우수하였고 D-lactic acid 생산 효소활성도 가장 높았다. 따라서, 다음 실험에서는 DL-acetonitrile을 첨가하여 사용하였다.

생육속도 및 D-lactic acid 생산 효소활성의 경시적 변화

D-Lactic acid 생산 효소활성이 높은 균체를 얻기 위하여 분리배지에서 시간의 경과에 따른 균체의 생육 및 D-lactic acid 생산 효소활성의 변화를 조사하였으며 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에 나타난 바와 같이 균체의 생육은 36시간 후에 정지기에 도달하였으며, D-lactic acid 생산 효소활성도 36시간 후에 최대치에 도달한 후, 감소하기 시작하였다. 따라서, 이후의 실험에서는 균체량 및 효소활성이 가장 높은 36시간동안 배양한 균체를 수확하여 DL-lactonitrile로부터 D-lactic acid를 생산하기 위한 효소원으로 사용하였다.

D-Lactic acid 생산에 미치는 세포의 처리효과

세포의 처리에 따른 D-lactic acid의 생산을 검토하기 위하여 수확된 균체를 Table 4와 같이 처리하여 그 처리효과를 검토하였다. 그 결과 생균체를 사용했을 때 D-lactic acid

Table 4. Effect of cell treatment on D-lactic acid production.

Cell treatment	D-Lactic acid (g/l)
Whole cell	0.270
Freezing thawing	0.159
5%(v/v) Benzene ^a	0.010
5%(v/v) Toluene ^b	0.015

*Reaction was carried out for 24 h at 30°C in the reaction mixture containing 5 g/l (wet/weight) of cell, 10 mM of DL-lactonitrile and 30 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0).

^aThe cell was treated with 5% (v/v) benzene for 30 min.

^bThe cell was treated with 5% (v/v) toluene for 30 min.

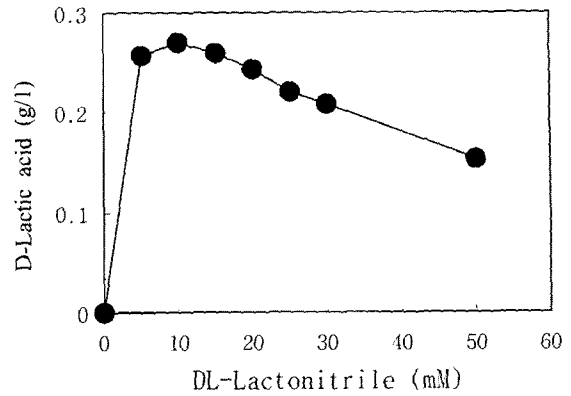


Fig. 2. Effect of DL-lactonitrile concentration on D-lactic acid production with resting cells. Reaction was carried out for 24 h at 30°C in reaction mixture containing 5 g/l (wet weight) of cell and 30 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0).

의 생산량이 가장 높았다. 수확한 균체를 1회 얼렸다 녹여 사용했을 때는 생산량이 감소하였고 5%(v/v)의 toluene과 benzene으로 30분간 처리한 경우에는 현저하게 감소하였다. 따라서, 이후의 반응에서는 생균체를 효소원으로 사용하여 실험하였다.

D-Lactic acid 생산에 미치는 DL-lactonitrile 농도의 영향

휴지세포에 의한 D-lactic acid 생산시 기질인 DL-lactonitrile 농도의 증가가 D-lactic acid의 생산에 미치는 영향을 검토하였다. 그 결과 Fig. 2에 나타난 바와 같이 DL-lactonitrile의 농도가 10 mM이었을 때 D-lactic acid 생산량이 0.270 g/l로서 가장 높았으며 그 이상의 농도에서는 기질에 의한 저해효과로 인하여 생산량이 감소하였다. 따라서, 이후의 실험에서는 10 mM의 DL-lactonitrile을 사용하였다.

D-Lactic acid 생산에 미치는 생균체량의 영향

효소원으로 사용되는 생균체량의 변화함에 따라 기질인

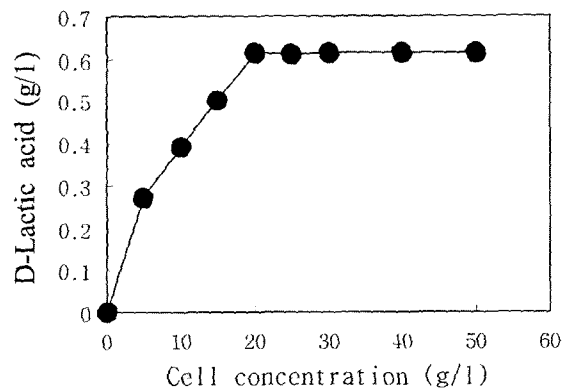


Fig. 3. Effect of cell concentration on D-lactic acid production with resting cells. Reaction was carried out for 24 h at 30°C in reaction mixture containing 10 mM of DL-lactonitrile and 30 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0).

Table 5. Effect of different polar solvents on D-lactic acid production with resting cells.

Solvent (pH 7.0)	D-Lactic acid (g/l)
Potassium phosphate (30 mM)	0.614
Tris-HCl (30 mM)	0.586
Imidazol-HCl (30 mM)	0.548
Distilled Water	0.386
0.85% (w/v) Saline	0.380

*Reaction was carried out for 24 h at 30°C in the reaction mixture containing 20 g/l (wet/weight) of cell and 10 mM of DL-lactonitrile.

DL-lactonitrile로부터 생산되는 D-lactic acid의 생산량이 영향을 받을 것으로 생각되어 생균체량과 D-lactic acid 생산량과의 관계를 검토하였다. Fig. 3에서 보는 바와 같이 생균체량이 증가함에 따라 D-lactic acid의 생산량이 증가함을 알 수 있었고, 생균체량이 20 g/l(wet weight)에 이르기까지는 D-lactic acid의 생산량이 증가하는 경향을 보였으며 이때의 D-lactic acid의 생산량은 0.614 g/l이었다. 그러나, 그 이상의 균체량에서는 D-lactic acid 생산량이 크게 증가하지 않음을 알 수 있었다. 따라서, 이후의 실험에서는 20 g/l(wet weight)의 생균체를 사용하였다.

D-Lactic acid 생산에 미치는 반응용매의 영향

휴지세포에 의한 D-lactic acid 생산 시 반응액에 사용되는 각종 반응용매에 따른 영향을 검토하였다. pH 7.0으로 조정된 30 mM의 3가지 완충액과 증류수, 0.85%(w/v) 생리식염수에 대한 D-lactic acid의 생산량을 조사하였으며 그 결과는 Table 5에 나타내었다. Table 5에서 보는 바와 같이 인산완충액이 D-lactic acid의 생산에 가장 좋은 것으로 나타났으며, 다음으로 Tris-HCl 완충액이 좋았다. 따라서, 이후의 실험에서는 반응 혼합액의 반응용매로서 인산완충액을 계속적으로 사용하였다.

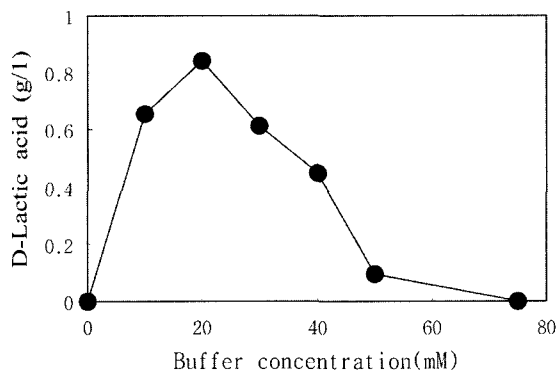


Fig. 4. Effect of buffer concentration of D-lactic acid production with resting cells. Reaction was carried out for 24 h at 30°C in reaction mixture containing 20 g/l (wet weight) of cell, 10 mM of DL-lactonitrile, and the reaction buffer was 20 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0).

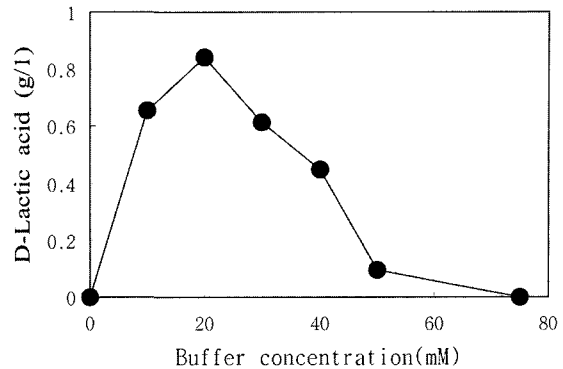


Fig. 5. Effect of initial pH on D-lactic acid production with resting cells. Reaction was carried out for 24 h at 30°C in reaction mixture containing 20 g/l (wet weight) of cell, 10 mM of DL-lactonitrile and 20 mM of potassium phosphate buffer.

D-Lactic acid 생산에 미치는 완충액농도의 영향

휴지세포에 의한 D-lactic acid 생산에 미치는 완충액 농도의 영향을 조사하기 위하여 인산완충액의 농도를 10 mM에서 75 mM까지 변화하면서 D-lactic acid의 생성량을 조사하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 인산완충액의 농도가 20 mM이었을 때 0.843 g/l로서 최대의 생산량을 보였으며 그 이상의 농도에서는 점차 감소하다가 75 mM 이상에서는 전혀 생성되지 않았다. 따라서, 이후의 실험에서는 반응액의 완충액은 20 mM의 인산완충액을 사용하였다.

D-Lactic acid 생산에 미치는 완충액 pH의 영향

휴지세포에 의한 D-lactic acid 생산에 미치는 완충액의 pH의 영향을 조사하기 위하여, 반응액의 초기 pH를 5.0에서 9.0까지 변화시키면서 D-lactic acid의 생산량을 검토하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 pH 7.0 부근에서 0.843 g/l로서 최대의 생산량을 보였으며 pH 7.0 이상에서는 생산량이 감소하는 경향을 나타내었다. 따라서, 이후의 실험에서는 반응액의 초기 pH를 7.0으로 조정하여 수행하였다.

D-Lactic acid 생산에 미치는 반응온도의 영향

휴지세포에 의한 D-lactic acid의 생산에 있어서 온도가 미치는 영향을 조사하기 위하여 반응액의 반응온도를 25°C에서 45°C까지 변화시키면서 D-lactic acid의 생산량을 검토하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이 30°C 전후에서 생산량이 가장 높았으며 그 이상의 온도에서는 온도가 증가함에 따라 생산량이 감소하는 결과를 나타내었다. 30°C에서 24시간 반응시켰을 때 0.843 g/l의 D-lactic acid가 생성되었다.

D-Lactic acid 생산에 미치는 각종 계면활성제의 영향

일반적으로 계면활성제는 미생물의 막 투과성을 증가시키는 것으로 알려져 있기 때문에 [6] 반응혼합액에 각종 양

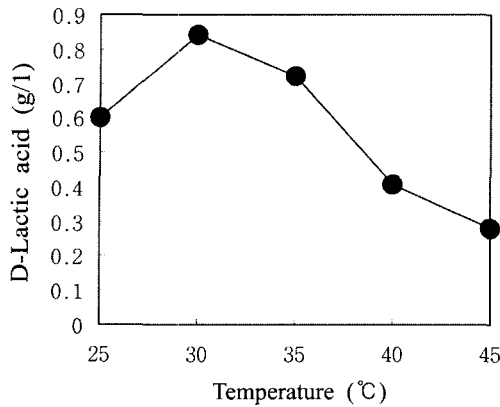


Fig. 6. Effect of reaction temperature on D-lactic acid production with resting cells. Reaction was carried out for 24 h in the reaction mixture containing 20 g/l (wet weight) of cell, 10 mM of DL-lactonitrile, and 20 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0).

Table 6. Effect of various surfactants on D-lactic acid production with resting cells.

Surfactant (0.01%)	D-Lactic acid (g/l)
None	0.843
Triton X-100	0.423
Tween 40	0.423
Tween 60	0.409
Tween 80	0.417
CTAB ^a	0.409
CPC ^b	0.345

*Reaction was carried out for 24 h at 30°C in the reaction mixture containing 20 g/l (wet/weight) of cell, 10 mM of DL-lactonitrile and 20 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0).

^aCTAB: Cetyltrimethyl ammonium bromide.

^bCPC: Cetyl pyridium chloride.

이온성, 음이온성 및 비이온성 계면활성제를 첨가하여 휴지세포에 의한 D-lactic acid의 생산에 있어서의 첨가효과를 검토하였으며 그 결과를 Table 6에 나타내었다. Table 6에서와 같이 무처리한 대조구에 비하여 각종 계면활성제를 0.01%(w/v) 첨가하였을 때 D-lactic acid가 적게 생산되었다.

D-lactic acid의 생산의 경시적 변화

상기의 실험결과로부터 얻어진 최적조건하에서 *Pseudomonas* sp. WJ-003의 휴지세포에 의한 DL-lactonitrile로부터 생산된 D-lactic acid의 경시적 변화를 조사하여 Fig. 7에 나타내었다. Fig. 7에서 나타낸 바와 같이 반응시간 18시간에 이르러 최대의 생산량을 보였으며 그 이후에는 더 이상 증가하지 않았다. 18시간 반응시켰을 때 D-lactic acid의 생산량은 0.843 g/l이었으며, DL-lactonitrile로부터의 전환율은 93.7%(mole base)였다. 또한, 상기의 최적반응조건 하에서 생성된 D-lactic acid의 광학순도는 99.8%였다.

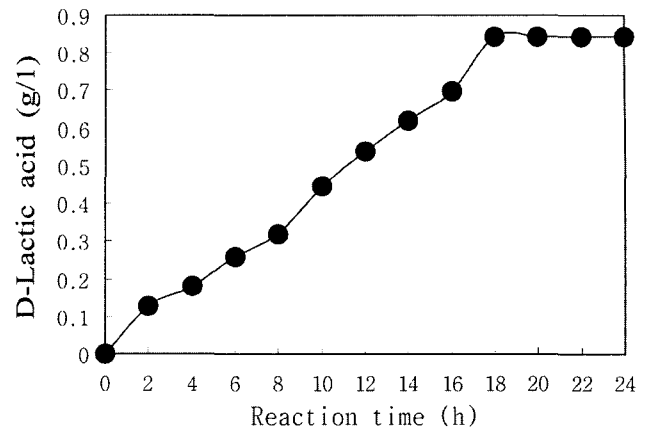


Fig. 7. Time course of D-lactic acid production with resting cells. Reaction was carried out at 30°C in reaction mixture containing 20 g/l (wet weight) of cell, 10 mM of DL-lactonitrile, and 20 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0).

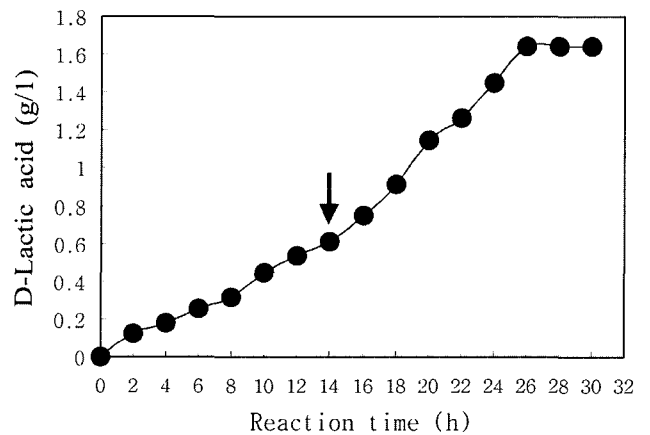


Fig. 8. Time course of D-lactic acid production with resting cells with 10 mM DL-lactonitrile feeding on the production of D-lactic acid. Reaction was carried at 30°C in reaction mixture containing 20 g/l (wet weight) of cell, and 20 mM of potassium phosphate buffer (pH 7.0). The arrow indicates the feeding point of 10 mM DL-lactonitrile.

기질의 첨가에 의한 D-lactic acid의 생산

상기의 실험결과로부터 얻어진 최적조건하에서 *Pseudomonas* sp. WJ-003의 휴지세포를 이용하여 14시간 반응 후, 10 mM의 DL-lactonitrile을 첨가하여 D-lactic acid의 생산량의 경시적 변화를 조사하여 Fig. 8에 나타내었다. Fig. 8에서 나타낸 바와 같이 반응시간 28시간에 이르러 최대의 생산량을 보였으며, 이때 생산된 D-lactic acid의 양은 1.64 g/l이었고, 전환율은 91.1%, 광학순도는 99.8%이었다.

본 실험에서는 산업적으로 유용한 D-lactic acid를 생산하는데 있어서 생물축매로서 선별된 균주의 휴지세포를 이용한 최적반응조건을 확립하였으며, nitrile 비대칭 가수분해효소와 racemization system과의 조합을 통하여 독성화합물인 nitrile compounds를 D-lactic acid로 전환시킨 환경친화적인

생산공정을 제시한데 의의가 있다. 따라서, D-lactic acid를 경제적으로 생산하는 방법으로서 산업적으로 효용가치가 매우 클 것으로 기대된다.

요 약

Nitrile 비대칭 가수분해효소를 지닌 미생물을 이용하여 DL-lactonitrile로부터 D-lactic acid를 생산하기 위하여, DL-acetonitrile을 효소유도제로 이용할 수 있는 균주를 분리하였다. 분리한 균주들 중 WJ-003균주가 D-lactic acid의 생산능력이 가장 우수하였고, *Pseudomonas* sp.로 부분동정하였다. DL-lactonitrile로부터 D-lactic acid를 생산하기 위한 최적 반응조건을 검토하였으며 결과들을 요약하면 다음과 같다. 반응혼합액은 10 mM의 DL-lactonitrile과 20 g(wet weight)의 균체를 포함한 1 l의 20 mM 인산완충액(pH 7.0)이었으며, 이때 반응온도는 30°C이었다. 또한, 18시간 반응이 진행되는 동안 0.843 g/l의 D-lactic acid가 생산되었고, 이때의 전환율은 93.7%, 광학순도는 99.8%이었다. 한편, 10 mM의 DL-lactonitrile을 14시간 후에 다시 첨가했을 때 28시간에 1.64 g/l의 D-lactic acid가 생산되었으며 이때의 전환율은 91.1%, 광학순도는 99.8%이었다.

REFERENCES

1. De boer, J. P., M. J. Teixeira de mattos, and O. M. Neijssel. 1990. D-(-)-Lactic acid production by suspended and aggregated continuous culture of *Bacillus laevolacticus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 149-153.
2. 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**: 332-337.
3. Francis, S. 1970. Carbohydrate Metabolism, pp. 278-294. In Willis A. Wood (ed.), *Methods in Enzymology*, vol. 9. Academic Press, New York.
4. 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**: 481-482.
5. Hansan, A. K. M. Q., H. Takada, N. Esaki, and K. Soda. 1991. Catalytic action of L-2-haloalkanoic acids in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **38**: 1114-1117.
6. Helenius, A. and K. Simons. 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochem. Biophys. Acta.* **415**: 29-79.
7. Maomichi, 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**: 1095-1100.
8. 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 by halo acid dehalogenase. *Agric. Biol. Chem.* **54**: 3031-3033.
9. Sneath, P. H. A., N. S. Nair, M. E. Shape, and J. G. Holts. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 9th ed. The Williams and Wilkins Co., Baltimore.
10. Vickroy, T. B. 1985. Lactic acid, pp. 761-776. In M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology*, vol. 3, Pergamon Press, New York.
11. Yamagami, T. and E. Kobayash. 1993. Biological process for preparing optically active lactic acid. *U.S. Pat.* 5,234,826.
12. Yamamoto, K. and N. S. Miyazaki. 1989. Process for producing optically active alfa-substituted organic acid and microorganism and enzyme used therefor. *Eur. Pat.* 348901A2.

(Received Aug. 28, 2002/Accepted Nov. 26, 2002)