(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0034539
(43) 공개일자 2016년03월30일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/14 (2006.01) *C12P 7/56* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2014-0125310
(22) 출원일자 2014년09월19일
심사청구일자 2014년09월30일

(71) 출원인
포항공과대학교 산학협력단
경상북도 포항시 남구 청암로 77 (지곡동)
경상대학교산학협력단
경상남도 진주시 진주대로 501 (가좌동)
(72) 발명자
김만주
경상북도 포항시 남구 지곡로 155 6동 1405 (지곡동, 교수아파트)
정영륜
경남 진주시 진주대로815번길 11, 102동 502호 (주약동, 주약현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
박상훈

전체 청구항 수 : 총 17 항

(54) 발명의 명칭 **신규 효소를 사용한 D형 젖산의 제조**

(57) 요 약

본 발명은 젖산 제조 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 D형 젖산을 생화학적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에 따른 생산 방법은 아세트알데히드와 시안화염을 반응시켜 젖산을 제조하는 반응에 있어서, 효소를 이용하여 반응시키는 것을 특징으로 한다.

본 발명의 효소를 이용한 젖산 제조 방법에 의해 무난한 반응 조건에서 간단한 반응 과정을 통해 D형 이성질체가 우세한 젖산을 제조할 수 있다.

본 발명의 효소를 이용한 젖산 제조 방법에 의해 반응 시간을 조절함으로써 제조한 젖산의 D형과 L형 이성질체의 비율을 조절할 수 있다.

본 발명의 효소 재사용 방법에 의해 본 반응에 대하여 최소 5회 이상 효소를 재사용 할 수 있어 저렴한 비용으로 젖산을 제조할 수 있다.

(72) 발명자

오연옥

경기도 안양시 만안구 박달로 453 102동702호 (박달동, 한라아파트)

정유진

경상남도 진주시 상평동 솔밭로 75 극동빌 303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	PJ009494
부처명	농촌진흥청
연구관리전문기관	농생명바이오식의약소재개발사업단
연구사업명	차세대바이오그린21사업
연구과제명	신규 효소의 분리 정제, 대량 생산 및 특성 조사
기 여 율	1/1
주관기관	경상대학교산학협력단
연구기간	2014.01.01 ~ 2014.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

아세트알데히드와 시안화염을 반응시켜 젖산을 제조하는 반응에 있어서, 효소를 이용하여 반응시키는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 효소는 니트릴기 가수분해 능을 가지는 효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 젖산은 D형 젖산의 함량이 L형 젖산의 함량보다 높은 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 시안화염은 시안화칼슘, 시안화나트륨, 시안화수소에서 하나 이상 선택되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 효소는 균주인 YC6258 (KCCM 43015), *Lysobacter capsici* YC5194^{T} (KCTC 22007^{T}=DSM 19286^{T}), *Martelella endophytica* YC6887^{T} (KCCM 43011^{T}=NBRC 109149^{T}), 또는 *Hoeflea suaedae* YC6898^{T} (KACC 14911^{T}=NBRC 107700^{T})에서 유래된 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 효소는 균체의 배양액을 원심분리하여 세포체를 얻고, 세포체를 파쇄한 뒤, 원심분리하여 상등액을 얻고, 이를 동결 건조하여 얻어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 7

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 효소는 효소막 형태로 사용되는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 8

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 효소는 재조합 유전자에 의해서 발현되는 효소인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 9

제1항 내지 제2항에 있어서, 기질로 알데히드를 더 포함하는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 10

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 반응 온도는 25°C에서 40 ^{o}C에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 11

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 반응은 pH6~8의 범위에서 일어나는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 12

제1항 또는 제2항에 있어서, 상기 반응은 24시간 이하에서 이루어지는 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 13

아세트알데히드와 시안화염 반응시켜 젖산을 제조하는 효소에 있어서, 상기 효소는 YC6258 (KCCM 43015),

Lysobacter capsici YC5194^T (KCTC 22007^T=DSM 19286^T), *Martelella endophytica* YC6887^T (KCCM 43011^T=NBRC 109149^T), *Hoeflea suaedae* YC6898^T (KACC 14911^T=NBRC 107700^T)로 이루어진 그룹에서 하나 이상 선택되는 균주에서 유래되는 효소를 포함하는 포함하는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 14

제13항에 있어서, 상기 효소 촉매는 효소는 균체의 배양액을 원심분리하여 세포체를 얻고, 세포체를 파쇄한 뒤, 원심분리한 상등액을 포함하는 것을 특징으로 하는 효소.

청구항 15

D형 젖산과 L형 젖산을 포함하는 젖산 혼합물을 벤질 락테이트(benzyl lactate) 로 변환시켜, HPLC를 이용하여 분석하는 방법.

청구항 16

제16항에 있어서, 상기 HPLC는 키랄 컬럼을 가지는 HPLC인 것을 특징으로 하는 방법.

청구항 17

제15항에 있어서, 상기 젖산 혼합물은 아세트알데히드와 시안화염을 반응시켜 얻어지는 혼합물인 것을 특징으로 하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 젖산 제조 방법에 관한 것으로서, 보다 상세하게는 D형 젖산을 생화학적으로 생산하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 젖산은 식품, 의약 분야의 원료로 널리 사용되며 생체플라스틱의 원자재인 다중젖산의 단위체로 활용 된다 [1) C. Akerberg, K. Hofvendahl, G. Zacchi, B. Hahn-Hagerdal, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1998, *49*, 682-690; 2) K. Hofvendahl, B. Hahn-Hagerdal, *Enzyme Microb. Technol.* 2000, *26*, 87-107.]. 최근 생체플라스틱의 수요가 급증함에 따라 친환경 플라스틱이 주목받고 있는 가운데 다중젖산은 생분해성이자 탈석유 고분자로 각광 받고 있다. 다중젖산을 원자재로 사용하여 자동차, 가전, 하우징, 일회용 플라스틱 용기 등 생분해성 플라스틱을 제조할 수 있으며 젖산 이성질체의 비율에 따라 플라스틱의 가공성과 기계적 강도를 조절할 수 있다. 다중젖산의 활용성이 증가함에 따라 그 단위체인 젖산의 합성에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있다.

[0003] 젖산은 화학적 방법과 생화학적 방법을 통해 제조할 수 있다. 대표적인 화학적 방법은 락토니트릴의 가수 분해 반응을 통해 젖산을 제조하는 것이다 [1) R. Datta, S. P. Tsai, P, Bonsignore, S. H. Moon, J. R. Frank, *FEMS Microbiol. Rev.* 1995, *16*, 221-231; 2) Y. J. Wee, J. N. Kim, H. W. Ryu, *Food Technolo. Biotechnol.* 2006, *44*, 163-172]. 락토니트릴은 염기 촉매 하에서 시안화수소와 아세트알데히드의 첨가 반응에 의해 10분 이내에 99% 이상의 전환율로 합성된다. 합성된 락토니트릴은 증류를 통해 분리와 정제 과정을 거친 뒤 황산 촉매를 사용한 가수 분해 반응을 거쳐 젖산으로 전환된다. 이 때 전환율은 99% 이상이지만 생성된 젖산은 하기와 같은 두 개의 이성질체 (D형 젖산과 L형 젖산)가 동일하게 혼합된 라세미 젖산이다.

[0004] (1)

[0005] 또 다른 화학적 방법은 철이나 코발트 등의 금속을 실리카 겔 지지체에 흡착시킨 촉매를 사용하여 아세트알데히드와 일산화탄소, 그리고 물 존재 하에서 젖산을 제조하는 것이다 [S. K. Bhattacharyya, S. K. Palit, A. R.

Das, *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Develop.* **1970**, *1*, 92-95.]. 5.5 g의 아세트알데히드로부터 13 g의 촉매를 사용하여 3시간 반응을 진행한 결과 44%의 전환율로 젖산이 생성되었지만 고온고압 조건 (230℃, 350 기압)에서 반응을 진행해야 하며 촉매로 가격이 비싼 금속 촉매를 사용해야 하는 등 경제적으로 한계점이 있다.

[0006] 화학적 방법은 반응이 간단하고 시간이 비교적 짧다는 장점이 있지만 산업적으로 활용하기에 경제적인 측면에서 한계가 있으며, 또한 생성물로 두 개의 이성질체가 동일하게 혼합된 라세미 젖산만 제조가 가능하다는 단점이 있다.

[0007] 생화학적 방법은 세균이나 곰팡이 등의 미생물을 사용한 탄수화물의 발효 과정을 통해 젖산을 제조하는 것으로, 사용하는 탄수화물은 수크로스, 락토스, 전분, 덱스트린 등 매우 다양하다. 생화학적 방법으로 젖산을 제조하면 사용하는 미생물이나 탄수화물에 따라서 D형 젖산과 L형 젖산을 각각 순수하게 얻을 수 있다 1) Y. J. Wee, J. N. Kim, H. W. Ryu, *Food Technol. Biotechnol.* **2006**, *44*, 163-172]..

[0008] 일반적으로 젖산을 제조하는 데에는 세균 발효방법이 주로 사용된다. 락토바실러스 델브루키 LD 0025 (*Lactobacillus delbrueckii*)와 LD 0028이 생산하는 아밀라아제 (α-amylase, β-amylase), 풀루라나아제 (pullulanase)와 같은 효소들의 가수분해 작용을 이용하여 쌀가루(rice powder)를 발효하여 높은 순도의 D형 젖산을 생산한 바 있다 [K. Fukushima, K. Sogo, S. Miura, Y. Kimura, *Macromol. Biosci.* 2004, *4*, 1021-1027]. 또한 L형 락테이트 디하이드로지나아제 유전자(L-lactate dehydrogenase gene)가 소실된 락토바실러스 플란타룸 (*Lactobacillus plantarum*)에 스트렙토코커스 보비스 148 (*Streptococcus bovis* 148)의 알파형 아밀라아제(α-amylase)를 해독하는 플라스미드를 도입하여 옥수수 전분으로부터 광학적으로 순수한 D형 젖산을 제조하였다 [K. Okano, Q. Zhang, S. Shinkawa, S. Yoshida, T. Tanaka, H. Fukuda, A. Kondo, *Appl. Environ. Microbiol.* **2009**, *75*, 462-467]. 락토바실러스 델브루키 NBRC 3534 (*Lactobacillus delbrueckii*) 균주는 스팀 처리한 사탕수수 찌꺼기를 탄소원으로 이용하여 다량의 D형 젖산을 제조한 결과도 보고된 바 있다 [C. Sasaki, R. Okumura, A. Asakawa, C. Asada, Y. Nakamura, *J. Phys. Conf. Ser.* **2012**, 352-361].

[0009] L형 젖산도 D형 젖산과 마찬가지로 다양한 균주를 사용하여 순수하게 제조할 수 있다. 폐당밀을 기질로 하여 엔터로코커스 패카리스 (*Enterococcus faecalis*)를 사용한 발효 과정을 통해 높은 광학 순도를 갖는 L형 젖산을 제조한 결과가 보고된 바 있으며 [Y. J. Wee, J. N. Kim, J. S. Yun, H. W. Ryu, *Enzyme Microb. Technol.* **2004**, *35*, 568-573.], 스트렙토코커스 보비스 148 (*Streptococcus bovis* 148)을 사용한 생전분의 발효과정을 통한 L형 젖산의 제조도 보고되었다 [J. Narita, S. Nakahara, H. Fukuda, A. Kondo, *J. Biosci. Bioeng.* **2004**, *97*, 423-425.]. 또한 세균뿐만 아니라 곰팡이인 리조퍼스 종 (*Rhizopus* species)에 속하는 리조퍼스 오리재 (*Rhizopus oryzae*)를 사용하여 포도당으로부터 L형 젖산 생산에 미치는 영양분의 효과를 조사하여 대량 생산을 위한 적정 조건을 제시한 바 있으며, 섬유상 생물반응기를 개발하여 면 조각에 곰팡이 균사를 고정시켜 발효시키는 방법을 이용하여 라이조푸스 오리재(*Rhizopus oryzae*)에 의해 포도당과 옥수수 전분으로부터 L형 젖산을 생산한 바 있다 [1) Y. Zhou, J. M. Dominguez, N. Cao, J. Du, G. T. Tsao, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **1999**, *78*, 401-407;. 2) A. Tay, S. T. Yang, *Biotechnol. Bioeng.* **2002**, *80*, 1-12; 3) Y. Kosakai, Y. S. Park, M. Okabe, *Biotechnol. Bioeng.* **1999**, *55*, 461-470]. 최근에는 생산 단가를 낮추기 위하여 가격이 싼 배양원료인 글리세롤을 이용할 수 있는 유전자조작 세균으로 L-젖산을 생산하는 방법이 개발되었다 [S. Mazumdar, M. D. Blankschien, J. M. Clomburg, R. Gonzalez, *Microb. Cell Fact.* **2013**, *12*, 1-7]. 또한 자연에 가장 많이 존재하는 바이오매스인 셀루로즈로부터 납이온(2가) 촉매 하에 젖산을 합성하는 방법이 부분적으로 성공되었음이 보고되었다 [Y. Wang, W. Deng, B. Wang, Q. 코뭉, X. Wan, Z. Tang, Y. Wang, C. Zhu, Z. Cao, G. Wang, H. Wan, Nature Commun., **2013**, *7*, doi:10.1038/ncomms3141].

[0010] 생화학적 방법은 젖산을 광학적으로 순수하게 제조할 수 있다는 장점이 있지만 반응 과정이 화학적 방법보다 비교적 복잡하고 반응 시간이 오래 걸린다는 문제점이 있다. 또한 사용하는 세균이나 곰팡이가 혐기성일 경우 반응 과정이 산소에 민감하여 주의가 필요하다. 그리고 반응 과정 중 세균의 영양소로 반드시 필요한 효모 추출물이나 펩톤의 가격이 높기 때문에 경제적인 측면에서 한계점이 있다 [A. W. Schepers, J. Thibault, C. Lacroix, *Enzyme Microb. Technol.* **2002**, *30*, 176-186.].

발명의 내용

해결하려는 과제

[0011] 본 발명에서 해결하고자 하는 과제는 반응 시간이 짧으며 반응 조건이 간단하고, 반응 조건이 무난하며 높은 수율로 젖산을 얻을 수 있고, 광학 순도가 높은 젖산을 얻을 수 있는 D형 젖산 제조 공정을 제공하는 것이다.

[0012] 본 발명에서 해결하고자 하는 다른 과제는 D-젖산의 함량을 분석하는 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 본 발명에서 해결하고자 하는 또 다른 과제는 D형 젖산 제조용 효소를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명은 상기와 같은 과제를 해결하기 위해서, 아세트알데히드와 시안화염을 이용하여 젖산을 제조하는 반응에 있어서, 효소를 이용하는 것을 특징으로 한다.

[0015] 본 발명에 있어서, 상기 효소는 아세트알데히드와 시안화염의 반응으로 형성되는 락토니트릴의 니트릴기를 가수분해할 수 있는 니트릴기 가수분해 능을 가지는 효소를 이용하는 것을 특징으로 한다.

[0016] 이론적으로 한정된 것은 아니지만, 상기 효소는 아세트알데히드와 시안화염의 반응으로 생성된 락토니트릴(lactonitrile) 가수 분해 반응 촉매로 작용하며, 상기 시안화 염은 칼슘, 나트륨, 수소일 수 있다.

[0017] 본 발명에 있어서, 상기 효소는 니트릴기 가수분해능을 가지면서, 가수 분해 반응을 통해서 D-젖산의 생성량이 L-젖산에 비해서 높은 효소이다.

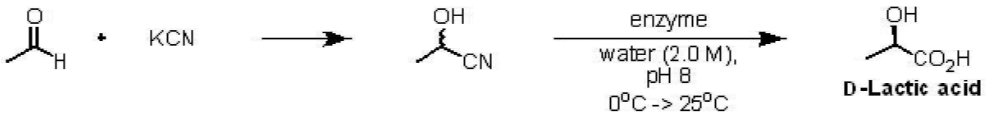
[0018] 본 발명에 있어서, 상기 효소는 바람직하게는 생산된 전체 젖산에서 D-젖산의 비율이 60 몰% 이상, 바람직하게는 65 몰%이상, 보다 바람직하게는 70몰%이상, 가장 바람직하게는 80 몰% 이상인 효소이다.

[0019] 본 발명에 있어서, 상기 효소는 미생물, 식물 또는 동물 유래로부터 유래될 수 있는 효소이다. 상기 효소 라는 용어는 효소 자체뿐만 아니라, 효소가 발현된 세포, 효소가 발현된 세포의 파쇄물 또는 이로부터 순수 분리된 효소, 및 이의 유전학적 처리물, 일예로 재조합 DNA 기술에 의해 대장균등의 다른 숙주에서 생산효소를 이용한 유전학적 생성물을 포함하는 것으로 이해된다.

[0020] 본 발명의 실시에 있어서, 상기 효소는 균체의 배양액을 원심분리하여 세포체를 얻고, 세포체를 파쇄한 뒤, 원심분리하여 상등액을 얻고, 이를 동결 건조하여 얻어질 수 있다.

[0021] 본 발명의 다른 실시에 있어서, 상기 효소는 정제 효소를 역상 크로마토그래피로 추가로 정제하여 단백질의 아미노산서열을 결정하고, 그 아미노산서열을 토대로 프로브를 작성하여 균체의 DNA 단편으로부터 니트릴기 가수분해 효소의 활성본체를 코드하는 DNA를 클로닝한다. 이어서 이것을 PCR로 증폭하여 재조합 플라스미드를 조제하고, 대장균 등으로의 도입, 해당 대장균 등을 배양하여 목적 효소를 얻을 수 있다.

[0022] 본 발명에 있어서, 상기 효소는 염생 식물인 천일사조에서 분리한 균주인 YC6258 (KCCM 43015)에서 추출하였으며, 추출한 효소를 사용하여 락토니트릴 (lactonitrile)의 가수 분해 반응을 하기 반응식 1과 같이 진행하였다. 1일 동안 75%의 분리 수율로 D형 이성질체의 비율이 높은 젖산을 제조할 수 있었다 ($[\alpha]^{26}$ =-1.14 (c=1.0 in water), 참고값: L형 젖산, $[\alpha]^{21-22}$=+2.60 (c=2.5 in water)).



[0023] (반응식 1)

[0024] 본 발명에 있어서, 상기 다른 효소는 *Lysobacter capsici* YC5194^T (KCTC 22007^T=DSM 19286^T), *Martelella endophytica* YC6887^T (KCCM 43011^T=NBRC 109149^T), *Hoeflea suaedae* YC6898^T (KACC 14911^T=NBRC 107700^T)에서 추출하였다.

[0025] 본 발명의 실시에 있어서, 반응 온도는 25°C와 40°C 모두 가능하며, 바람직하게는 25°C에서 진행하는 것이 좋다.

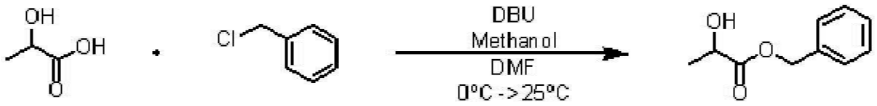
[0026] 본 발명의 실시에 있어서, 신규 효소는 pH 6, 7, 8에서 활성이 높게 유지되며 바람직하게는 pH 8이 젖산의 제조에 좋다.

[0027] 본 발명에 있어서, 생성물인 D형과 L형 젖산은 화학식 (1)의 구조를 가지며 본 반응 방법을 통해 D형과 L형 젖산의 비율을 조절하여 생성물을 제조할 수 있다.

[0028] 본 발명의 실시에 있어서, 상기 효소는 투석막을 사용하여 5회 이상 재사용 가능하다.

[0029] 본 발명은 일 측면에 있어서, D형 젖산과 L형 젖산을 포함하는 젖산 혼합물을 벤질 락테이트(benzyl lactate)로 변환시켜, HPLC를 이용하여 분석하는 방법을 제공한다.

[0030] 본 발명에 있어서, 상기 벤질 락테이트의 합성은 하기와 같은 반응식 (2)에 의해서 진행되었다.



[0031] (반응식 2)

[0032] 본 발명에 있어서, D형과 L형 벤질 락테이트는 화학식 (2)의 구조를 가지며 키랄 컬럼을 사용한 고성능 액체 크로마토그래피를 통해 D형과 L형 벤질 락테이트 각각의 면적비를 계산하고 이로부터 제조한 젖산의 광학 순도를 계산하였다.

발명의 효과

[0033] 본 발명의 효소를 이용한 젖산 제조 방법에 의해 무난한 반응 조건에서 간단한 반응 과정을 통해 D형 이성질체가 우세한 젖산을 제조할 수 있다.

[0034] 본 발명의 효소를 이용한 젖산 제조 방법에 의해 반응 시간을 조절함으로써 제조한 젖산의 D형과 L형 이성질체의 비율을 조절할 수 있다.

[0035] 본 발명의 효소 재사용 방법에 의해 본 반응에 대하여 최소 5회 이상 효소를 재사용 할 수 있어 저렴한 비용으로 젖산을 제조할 수 있다.

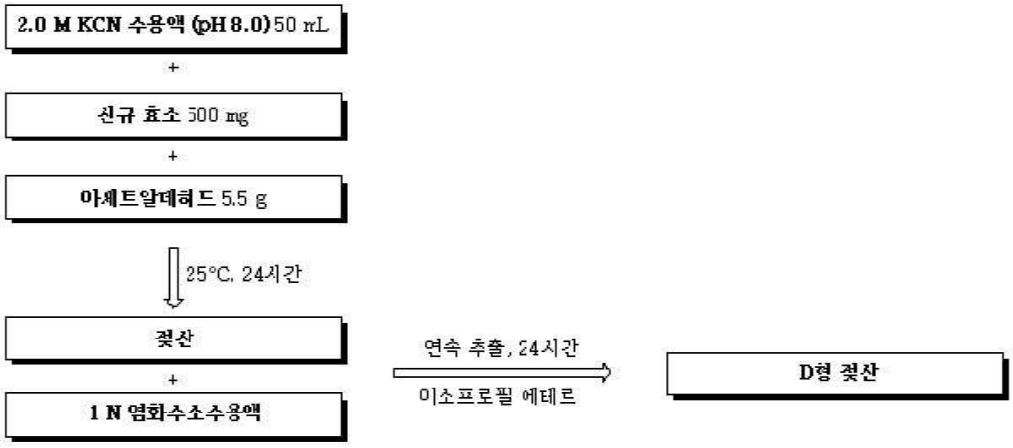
발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0036] <u>실시예1. YC6258 균주와 그 외 균주들의 효소액 제조방법</u>

[0037] 신규 균주인 YC6258을 대량배양용 액체배지(sucrose 1 g, yeast extract 2 g, casein 5 g, $MgSO_4$ 4 g, $MgCl_2$ 2 g/L)에서 28℃, 120 rpm 조건으로 72시간 진탕 배양한다. 배양액을 8000 rpm, 20분간 원심 분리하여 세포체를 얻고, pH 6.5의 50 mM 인산완충액으로 현탁한다. 현탁액을 얼음에 둔 상태로 초음파 처리하여 세포를 파쇄한 뒤, 12000 rpm에서 30분간 원심 분리하여 상등액을 얻었다. 상등액은 동결 건조하여 각 반응에 사용하였다. $YC5194^T$, $YC6887^T$, $YC6898^T$의 효소액 만드는 방법 또한 위에서 기술한 YC6258의 방법과 같다. 단, $YC5194^T$, $YC6887^T$, $YC6898^T$의 배양배지는 각각 50% Trytic soy broth, M10 broth(yeast extract 10 g, $MgSO_4$ 4 g, $MgCl_2$ 2 g, NaCl 5 g, K_2HPO_4 1 g, Sucrose 10 g/L), Marine broth를 사용하여 배양하였다.

[0038] <u>실시예2. 신규 효소를 사용한 다양한 D형/L형 비율의 젖산 제조</u>

[0039] 100 mL 둥근바닥 플라스크에 2.0 M 시안화칼륨 수용액 (1.0 당량, 50 mL, pH 8)을 넣고 신규 효소 YC6258 (200-500 mg)를 넣은 다음 아세트알데히드 (100 mmol)를 가하여 상온에서 교반시킨다. 1 노르말 농도 염화수소 용액 (2.5 당량)을 넣어 산성화시킨 다음 이소프로필 에테르로 24시간 연속 추출한 후 유기 용매를 제거하여 액체 생성물을 얻었다. 젖산 제조는 하기와 같은 [반응식 3]에 의해서 진행되었다.



(반응식 3)

[0040]

[0041] 제조한 젖산의 광학 순도를 확인하기 위하여 [반응식 2]에 제시된 벤질 락테이트 합성 반응을 수행하였다. 4 mL 유리병에 제조한 젖산 (1.0 mmol)과 메탄올 (0.5 mL)을 넣고 1,8-다이아자바이사이클로운데-7-켄 (1,8-diazabicycloundec-7-ene; DBU) (1.0 당량)을 적가한 후 상온에서 30분 간 교반한다. 그 후 메탄올을 제거하고 다이메틸폼아마이드 (dimethylformamide; DMF) (0.5 mL)를 넣고 벤질 클로라이드 (1 당량)를 적가한 뒤 상온에서 24시간 교반시킨다. 유기 용매를 제거하고 에틸아세테이트로 추출하여 농축한 뒤 에틸아세테이트와 헥산 (1:4 부피비)을 이용하여 컬럼 크로마토그래피로 액체 생성물을 얻었다 (134 mg, 74% 수율). 합성한 벤질 락테이트의 광학 순도를 HPLC를 사용하여 측정하였다 (분석 조건; 컬럼: Chiralcel-OD, 전개용매: 헥산/이소프로필 알코올=98/2, 유속=1.0 mL/분, UV = 217 nm, 머무름 시간: 16.2분 (L형 벤질 락테이트), 17.5분 (D형 벤질 락테이트)). 결과는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0042]

순서	효소양 (mg/mmol)	반응 시간 (h)	젖산 전환율 (%)	분리 수율 (%)	광학순도 (ee %)	D형/L형 젖산 (%)
1	2	1	52	38	72	45/7
2	2	1	48	41	84	44/4
3	5	1	60	53	65	49/11
4	5	3	80	68	51	60/20
5	5	24	93	75	40	65/28
6	5	24	92(시안화나트륨)	73	39	64/28

[0043] 본 발명에서 젖산 전환율은 NMR을 통해 측정된 반응물에서의 생성된 락토니트릴과 젖산의 면적비로부터 계산하였으며, 분리 수율은 연속 추출을 통해 정제한 뒤의 젖산의 무게를 측정하여 사용한 아세트알데히드의 양에 따른 생성물의 이론적 수득량으로부터 계산하였다.

[0044] 제조한 젖산의 D형/L형 젖산의 비율은 젖산을 벤질 락테이트로 전환한 뒤 HPLC를 사용하여 D형 벤질 락테이트와 L형 벤질 락테이트의 면적비를 측정하고 이것을 젖산 전환율을 고려하여 계산하였다. 젖산의 광학 순도는 ((D형 벤질 락테이트 면적비 - L형 벤질 락테이트 면적비)/(D형 벤질 락테이트 면적비 + L형 벤질 락테이트 면적비)x100)의 식을 통해 계산하였다.

[0045] 사용하는 신규 효소의 양과 반응 시간을 다르게 변화시켜 가면서 생성된 젖산의 광학 순도를 측정하였다. 그 결과 젖산 전환율이 낮을수록 생성된 젖산의 광학순도가 높게 나타났다. 본 방법을 통해 최고 84%의 광학순도를 갖는 D-젖산을 41%의 분리 수율로 생성할 수 있었으며, 40%의 광학순도를 갖는 D-젖산을 최고 75%의 분리 수율로 생성하였다.

[0046] 시안화칼륨 대신 시안화나트륨을 사용한 경우에도 동일한 반응 조건에서 39%의 광학 순도를 갖는 D-젖산을 73%의 분리 수율로 생성하였다.

[0047] 실시예3. 다양한 신규 효소를 사용한 젖산 제조

[0048] 100 mL 둥근바닥 플라스크에 2.0 M 시안화칼륨 수용액 (1.0 당량, 50 mL, pH 8)을 넣고 신규 효소 (500 mg)를 넣은 다음 아세트알데히드(100 mmol)를 가하여 상온에서 3시간 교반시킨다. 1 노르말 농도 염화수소용액(2.5 당량)을 넣어 산성화시킨 다음 이소프로필 에테르로 24시간 연속 추출한 후 유기 용매를 제거하여 액체 생성물을 얻었다. 결과는 하기 표 2와 같다.

표 2

[0049]

순서	효소의 종류	젖산 전환율 (%)	분리 수율 (%)	광학순도 (ee %)	D형/L형 젖산 (%)
1	YC6258	57	48	65	47/10
2	YC5194	56	50	64	46/10
3	YC6887	51	39	68	43/8
4	YC6898	54	41	66	45/9

[0050] 다양한 균주로부터 추출한 신규 효소를 사용하여 반응을 수행한 결과 본 반응에 대한 다양한 신규 효소들의 반응성은 유사했다. 3시간동안 반응을 수행하여 51-57%의 전환율로 젖산이 생성되었고 생성된 젖산의 광학 순도를 측정한 결과 64-68%로 나타났고 전체적으로 D형 이성질체가 우세한 젖산이 생성되었다.

[0051] 실시예4. 투석막을 사용한 신규 효소 재사용

[0052] 신규 효소 (500 mg)를 증류수 (5 mL)에 녹인 후, 분획 분자량 (molecular weight cut-off) 10,000인 투석막에 넣어 "효소막"을 만든 뒤, 100 mL 비이커에 넣고 2.0 M 시안화칼륨 수용액 (1.0 당량, 45 mL, pH 8)과 아세트알데히드(100 mmol)를 가하여 상온에서 24시간 교반시킨다. 1 노르말 농도 염화수소용액(2.5 당량)을 넣어 산성화시킨 다음 이소프로필 에테르로 24시간 연속 추출한 후 유기 용매를 제거하여 액체 생성물을 얻었다. 결과는 하기 표 3와 같다.

표 3

[0053]

순서	효소 사용 횟수	젖산 전환율 (%)	분리 수율 (%)	광학순도 (ee %)	D형/L형 젖산 (%)
1	1	91	70	40	64/27
2	2	91	70	40	64/27
3	3	92	71	40	65/27
4	4	90	71	39	63/27
5	5	90	70	40	63/27

[0054] 신규 효소를 효소 막을 제조하여 재사용한 결과 최소 5번 이상 효소의 재사용이 가능하다는 것을 확인하였다. 또한 반응의 젖산 전환율과 수율도 일정하게 유지되었으며 생성된 젖산의 광학순도도 유지되는 것을 확인하였다.

[0055] 발명은 상술한 특정의 실시 예에 한정되지 아니하며, 당해 기술 분야에 통상의 지식을 가진 자라면 본원 발명의 요지를 벗어남이 없이 다양한 변형 실시가 가능함은 물론이다. 따라서 본 발명의 범위는 위의 실시 예에 국한해서 해석되어서는 안 되며, 후술하는 특허 청구범위뿐만 아니라 이 특허 청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 할 것이다.