

형질전환 균체로부터 생산된 δ -aminolevulinic acid의 대량 정제 조건

김두상, 배문철*, 강도영, 성한기, 오명주**, 김형락*
(주)엔바이로젠 · *부경대학교 · **여수대학교

서론

δ -Aminolevulinic acid (ALA)는 대부분의 생물에 필수적인 tetrapyrroll 화합물의 생합성 전구체로 최근 들어 다양한 의학적 용도 (피부암 치료제, 화상치료제, 면역증강제 등)가 밝혀짐에 따라 이의 생산 및 사용범위에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다 (Elfsson, 1998).

또한 양식어의 사육시 그 피해가 심각한 바이러스 (이리도바이러스, 버나바이러스, 및 새우의 백점바이러스 등)와 원생충에 의한 감염성질병에 대하여 탁월한 예방 및 치료 효과를 나타내었으며, 저 농도의 경구투여에 의하여 항바이러스성 및 면역활성 유발 기능이 확인되어지는 등, 질병 관리를 위한 새로운 기능이 확인되었다. ALA의 직접적인 항바이러스 및 항균성 효과는 hemoprotein의 합성 향상에 기인하며, 간에서 합성된 heme의 약 65%는 cytochrome P450의 합성에 이용이 되고 약 15%는 catalase, peroxidase, phosphodiesterase, nitric oxide synthase, tryptophan pyrrolase, guanylate cyclase와 같은 hemoprotein의 합성에 이용이 된다. 이러한 이유로 생체의 oxygen transport, metabolism 및 nutrient transport의 향상 등 생리적인 효과를 향상시켜 대사의 활성화를 통한 질병 저항력 및 성장 향상 효과를 기대할 수 있다

ALA의 산업적 생산을 위한 대부분의 연구는 배지조성과 미생물의 선별 및 발효조건 개선의 개선을 통한 ALA의 생산성 향상을 위하여 *Rhodobacter*속 외에도 혐기성 광합성 미생물들인 *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Agnemellum quadruplicum*, *Anacystis marina* 및 *Chlorella*속 등의 발효에 의한 ALA의 생산성이 연구되었다.

본 연구진은 최근 유전자 조작을 통한 형질전환 균체의 배양조건을 개선시킴으로써 생산성 증가를 이룰 수 있었다. ALA의 광범위한 용도를 확립하기 위하여 보다 고순도의 제품이 필요함에 따라 일련의 정제방법을 시도하였기에 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

1) 재료: 본 실험에 사용된 ALA 정제용 시료는 *Bradybacterium*으로부터 분리된 유전자로 형질전환된 균체로부터 생산된 배양액을 사용하였다.

2) 방법:

① ALA 함량 측정 : Shemin 등의 방법 (1955)에 따라 시판 ALA·HCl을 표품으로 하여 작성한 표준곡선에 의하여 ALA 함량을 결정하였다.

② 분별침전에 의한 ALA의 분획 : 형질전환된 균체 배양액을 한외여과하여 균체

및 고분자물질을 제거한 후 동결건조한 분말을 95% ethanol에 녹여 ALA를 추출하여 여과하였다. 추출된 여액을 회전식 진공 증발기를 이용하여 1/5 부피로 농축한 후 acetone을 정량적으로 가하면서 생성된 결정들을 각각 분리하여 ALA 함량을 측정 한 후 비교적 순도가 높은 분별침전 획분을 얻었다.

③ Ion-exchange chromatography (IEC)에 의한 ALA의 분리 : 분별침전된 ALA 획분을 Na-citrate buffer, pH 3.0에 녹여 동일 완충액으로 미리 평형화된 이온교환 칼럼 (Dowex 50W 1X4, 200-400 mesh, ϕ 50 X 600 mm)에 흡착시켜 ALA를 용출시키기 위한 pH와 염농도를 구하였다.

④ HPLC에 의한 ALA의 순도 검증 : Elfsson 등 (1998)의 방법에 따라 HPLC를 이용하여 ALA의 순도를 검증하였다.

결과 및 요약

형질전환 균주 배양액 중의 ALA를 회수하기 위해 한외여과 (MWCO, 50 kDa)하여 균체 및 고분자물질을 제거하고 액상의 미정제 ALA (함량; 0.45%)를 동결건조하였다. 동결건조품 (ALA 함량; 10%)을 95% ethanol에 녹여 미용해 부분을 여과 후, 이 여액에 acetone을 정량적으로 가하면서 생성된 결정들을 분석한 결과 9 ~ 15배량의 acetone에 의해 침전된 획분에서 ALA가 분리되었으며, 이를 건조 후 ALA의 함량을 측정한 결과 35%의 순도였다.

분별침전된 ALA 함유물을 IEC를 행한 결과 ALA는 pH 4.0이하에서는 염농도가 1.0 M 까지도 용출되지 않았으나, pH 4.5에서는 150 mM의 염농도에서, pH 5.0에서는 50 mM의 염농도에서도 용출되었다. 또한 ALA와 공존하는 색소성 물질과의 완전한 분리를 위해서도 저농도의 염 농도 (50 mM)와 높은 pH (5.0)가 효과적이었다.

IEC에 의해 분리된 ALA를 다시 동결건조하여 ethanol로서 염을 제거하고 용매를 회수한 후 얻어진 건조물을 HPLC로 ALA의 순도를 분석한 결과 ALA의 순도는 95% 이상이었다.

참고문헌

Elfsson, B., I. Walin, S. Eksborg, K. Rudaeus, A.M. Ros, and H. Ehrsson. 1998. Stability of 5-aminolevulinic acid in aqueous solution. *Eur. J. of Pharm. Sci.* 7, 87-91.

Bunke, A., O. Zwrbe, H. Schmid, G. Burmeister, H.P. Merkle, and B. Gander. 2000. Degradation mechanism and stability of 5-aminolevulinic acid. *J. of Pharm. Sci.* 89, 1335-1341.

Takebayashi T., K. Omae, and K. Hosada. 1993. Evaluation of delta-aminolevulinic acid in blood of workers exposed to lead. *Br. J. Ind. Med.* 50, 49-54.

Shemin, D., C. S. Russell, and T. Abrarnsky. 1955. The succinate-glycine cycle. *J. Biol. Chem.* I. 212:613.