

## *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74의 분리 및 $\delta$ -aminolevulinic acid 생산의 특성

황세영 · 최경민 · 임왕진\* · 홍범식\* · 조홍연\* · 양한철\*

고려대학교 생물공학과, \*생물공학연구소

**초록 :** 토양으로부터  $\delta$ -aminolevulinic acid(ALA)의 생산성이 우수한 광합성세균 KUP-74균주를 분리하여 균학적 성질을 검토한 결과 이 균주는 *Rhodocyclus gelatinosus*로 동정되었다. 균의 배양은 30 °C, pH 6.8, 4 Klux 텡스텐 광조도하에서 혐기적 정치배양하였으며, 배양 10일 후의 균체의 ALA 생산량은 5 mg/l이었다. L-Glutamic acid를 제외한 Lascelles의 기본배지에 glycerol 0.5%(v/v)를 첨가 배양함으로써 ALA는 8 mg/l까지 증가하였으며, glycine과 succinic acid를 각 10 mM 첨가 배양함으로써 12 mg/l의 ALA가 생산되었다. 30 mM glutathione(reduced)의 첨가배양에 의하여 ALA 생산은 저하 되었으며, D,L-glutamic acid 및 D,L-glutamine에 의하여 ALA 생산이 late induction 되어 최고 21 mg/l에 이르렀다. ALA의 최대 생산량에 소요되는 배양시간은 ALA 생합성에 관한 C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> pathways의 precursors 첨가시 각각 107 시간과 262시간이었다. 기본배지에 10 mM levulinic acid(LA)와 10 mM glycine을 동시에 첨가 배양함으로써 ALA 생산량은 40 mg/l로 증가하였다(1992년 4월 10일 접수, 1992년 5월 29일 수리).

Vitamin B<sub>12</sub>, porphyrins, chlorophylls, hemes 등의 골격구조를 형성하는 tetrapyrroles의 precursor metabolite인  $\delta$ -aminolevulinic acid(ALA)<sup>1)</sup>는 최근 조직배양이나 porphyrin 골격구조 합성에 직접 이용되고 있으며, 특히 단자엽, 복자엽 식물에 선택적으로 작용할 뿐만 아니라, 무독성인 새로운 개념의 photodynamic herbicide로 주목을 받고 있다.<sup>2,3)</sup> 현재 ALA의 공업적 생산을 위하여 aminotransferase를 이용한 4,5-dioxovalerate-alanine계의 효소합성법<sup>4)</sup>과 *Methanobacterium thermoautotrophicum*,<sup>5)</sup> *Chlorella vulgaris*,<sup>6)</sup> *Rhodobacter sphaeroides*<sup>7)</sup> 등을 사용한 발효법의 개발이 시도되어 왔으며 S. Nagai 등,<sup>8)</sup> K. Sasaki 등<sup>9)</sup>은 생산량에 미치는 배양 첨가물의 첨가 시기, 농도 등의 영향에 대하여 보고한 바 있으나 아직 공업적 생산단계에는 이르지 못하고 있는 실정이다. 생물계의 ALA는 glutamic acid(C<sub>5</sub> pathway)나, glycine과 succinyl CoA(C<sub>4</sub>: Shemin pathway)로부터 각각 aminotransferase와 ALA synthase에 의하여 생합성되는 것으로 알려져 있다.<sup>10)</sup> C<sub>5</sub> pathway는 주로 식물,<sup>11,12)</sup> algae,<sup>13,14)</sup> 원시·혐기성 세균류<sup>15,16)</sup> 등에서, C<sub>4</sub> pathway는 동물,<sup>17,18)</sup> 진균,<sup>19)</sup> 호기성 세균<sup>20)</sup> 등에서 발견되어 왔으며 이들 생합성 경로에 의한 tetrapyrroles의 세포내 농도 조절은

ALA의 합성속도와 가장 밀접한 관계가 있는 것으로 보고되고 있다. 한편 광합성세균의 ALA 생합성 경로는 *Rhodobacter sphaeroides*,<sup>21)</sup> *Cyanobacteria*<sup>22)</sup>가 각각 C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub>에 의존하는 것으로 보고됨으로써 특정 species로부터 ALA의 효율적 생산 유도를 위해서는 먼저 ALA생합성 조절기구에 관한 연구가 요구되고 있다. 본 연구에서는 ALA의 공업적 생산을 위한 기초연구의 일환으로 자연계의 광합성 세균류로부터 ALA의 생산성이 우수한 균주를 분리 동정하고 균의 배양 및 precursors에 의한 ALA 생산 유도 조건을 확립하였으며 동시에 glutamic acid 및 관련 화합물에 의한 ALA 생산의 late induction 현상 등에 관한 연구를 수행하였다.

### 재료 및 방법

#### ALA 고생산균주의 분리

강원도 지방에서 채취한 토양, 연못, 논 등으로부터의 시료들을 Lascelles<sup>23)</sup>의 기본배지(Na-L-glutamate 0.5g, D,L-malic acid 2.7g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 27 mg, nicotinic acid 1 mg, vitamin B-1·HCl 1 mg, MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.2 mg, biotin 0.01 mg

Key words :  $\delta$ -Aminolevulinic acid, C<sub>4</sub>-pathway, C<sub>5</sub>-pathway, *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74, photodynamic herbicide  
Corresponding author : S. Y. Hwang

in 1/ ddH<sub>2</sub>O, pH 6.8)중 glutamic acid를 제외한 20 ml를 50 ml의 vial에 주입한 후, 채취한 시료의 saline 상등액 1 ml를 첨가하고, air phase를 질소 가스로 치환하여 30 °C, 조도 4 Klux하에서 3회 집적배양한 다음 Lascelles의 기본 agar plate 배지에 접종, 동일 배양조건에서 3일간 배양하여 colony를 분리하였다. 분리된 균주는 각각 5 ml용 vial을 이용하여 3일간 혐기적으로 정치배양하여, 배양 여과액 중의 ALA 농도를 정량분석하였다.

### 분리균주의 균학적 성질

분리된 균주 중 ALA생산성이 가장 우수한 KUP-74 균주를 혐기적 광조건(30 °C, 4 Klux)하에서 3일간 배양한 균체를 potassium phosphotungstate로 처리한 후 10,000 × 2.2, 4,000 × 2.2 배율의 electron microscope로 세포의 형태학적 특징 및 점성에 의한 세포의 응집현상을 관찰하였다. Gram 염색 및 포자 염색은 배양액을 원심분리(10,000 rpm × 10 min)한 균체를 saline액으로 현탁한 후 Hucker변법과 Dorner법을 이용하였다.<sup>24)</sup> 균체내 bacteriochlorophyll의 조사는 1 ml 배양액을 원심분리한 균체를 60% sucrose 용액 1 ml에 현탁한 시료 및 acetone-methanol(7 : 2) 1 ml로 추출한 시료의 흡광도를 각각 spectrophotometer(UVIKON 930, Japan)로 측정하였다. 0.4% Gelatin과 1% starch를 각각 함유한 평판 기본배지상에 분리균주를 접종하여 3일간 배양 후, HgCl<sub>2</sub>-HCl 용액과 요오드 용액으로 처리하여 이들의 분해능력을 검토하였다. 그 외의 동정법은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"에 준하였다.<sup>25)</sup>

### 배양조건

30 °C, 4 Klux 조도 하에서 3일간 혐기 배양(5 ml vial)한 전배양액 1 ml를 70 ml 배지(100 ml vial)에 접종하여, 동일한 배양 조건에서 정치 배양하였다. Anaerobic light 배양시 광원은 60 W 텡스텐 백열전구를 사용하였으며 조도의 조정은 Illuminometer(SPI-5)를 사용하였다. 균체의 증식속도는 배양액을 660 nm(spectrophotometer, Hitachi Model 100-30)에서의 흡광도로 나타내었다.

### ALA 분석

배양 여과액 0.5 ml에 Mauzerall, D. 등의 방법<sup>26)</sup>에 따라 1 M Na-Acetate buffer(pH 4.7) 0.5 ml와 0.05 ml의 acetyl acetone을 첨가한 후 15분간 boiling, 냉각하고 Modified Ehrlich reagent(1g p-dimethylaminobenzaldehyde in 42 ml glacial acetic acid plus 70% perchloric acid 8 ml) 3.5 ml를 가하여 20분간 실온에서 방치, 형성된

2-methyl-3-acetyl-5-propionic acid pyrrole<sup>27)</sup>을 556 nm에서 측정된 다음 ALA standard curve( $\epsilon_{556} = 9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )로부터 ALA를 환산 정량하였다.

### Chemicals

$\delta$ -Aminolevulinic acid, levulinic acid, L-glutamic acid, L-glutamine, L- $\gamma$ -glutamylethylester 및 glutathione(reduced)은 Sigma Chem. Co.(USA)로부터, D-glutamine과 D-glutamic acid는 각각 Koksan Chem. Co.(Japan), Nakarai Chem. Co.(Japan)로부터 구입하였다.

## 결 과

### ALA 고생산 분리균주의 동정

분리한 세균 KUP-74균주는 형태학적으로 간균(직경 0.5  $\mu\text{m}$ )으로, 편모를 가지고 있었으며(Fig. 1(a), (b)), Lascelles의 기본배지를 이용한 혐기적, 광조건(4 Klux)하에서 30 °C, 3일 배양 후의 colony는 직경 3 mm 원형의 붉은색으로 점성을 나타내었다. Gram 염색 결과 음성으로 포자는 형성하지 않았다. 60% sucrose로 처리한 균체는  $\lambda_{\text{max}}$  370, 590, 810, 870 nm(Fig. 2(a))를, 균체의 acetone-methanol(7 : 2) 추출물은 360, 460, 490, 600, 700 nm에서 흡광 최대치를 나타내었다(Fig. 2(b)). 이  $\lambda_{\text{max}}$  spectrum은 purple nonsulfur bacteria에 공통된, 전형적인 bacteriochlorophyll a의 spectrum으로 확인되었다. 한편 Bergey's Manual에 의하면 *Rhodocyclus gelatinosus*만이 purple nonsulfur bacteria species 중에서 gelatin의 액화가 가능한 균종으로 알려져 있는데,<sup>25)</sup> KUP-74 균은 gelatin test에서 positive 결과를 나타내었다. 기타 생리학적 성질을 검토한 결과 KUP-74 균주는 *Rhodocyclus gelatinosus*와 동일한 생리학적 특징을 나타내었다(Table 1).

### Glycerol의 효과

균의 증식과 ALA 생산성에 미치는 glycerol의 영향을 검토하였다. 그 결과 균의 증식에는 glycerol이 유의할 만한 영향을 나타내지 않았으나, ALA의 생산성은 glutamic acid를 제외한 기본배지에 glycerol을 0.5~1%(v/v) 범위 내에서 첨가하여 배양하였을 때 최대 약 40% 증가하였고 그 외의 농도에서는 효과가 없었다(Fig. 3).

### Glycine과 succinic acid의 효과

광합성세균의 C<sub>4</sub>(Shemin) pathway에 의한 ALA 생합성에 있어 precursors인 glycine과 succinic acid의 첨가

배양이 ALA 생성에 미치는 영향을 검토하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 10 mM glycine과 10 mM succinic acid의 동시 첨가로 균생육 stationary phase에서 ALA 생산이 무 첨가의 경우보다 약 2배 증가하였으며 그 후 ALA의 농도가 감소하는 경향을 보였으며, 그 이상의 농도에서는 균의 증식 및 ALA 생산성이 급격히 저하되는 현상을 나타내었다. 균의 증식은 succinic acid 첨가에 의해서는 별 다른 영향을 받지 않았으나 glycine 10 mM 이상을 첨가하였을 경우 크게 억제됨을 보였다.

**Glutamic acid와 그 유도체의 효과**

ALA 생합성의 C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> pathway와 관련하여 Lascelles 기본배지에 함유된 glutamic acid의 생리적 역할을 알

아보기 위하여 glutamic acid 농도가 균의 증식과 ALA 생산에 미치는 영향을 검토하였다. Glutamic acid 30 mM 농도까지는 균의 증식속도가 비례적으로 증가하였으나, 그 이상의 농도에서는 증가하지 않았다. ALA 생산 역시 30 mM까지의 glutamic acid 첨가에 의하여 점진적으로 증가하였고 그 이상의 첨가는 ALA 생산에 별다른 영향을 보이지 않았으나 배양후기(150시간)에 ALA의 생산이 유도되기 시작하는 현상(late induction)은 흥미로운 결

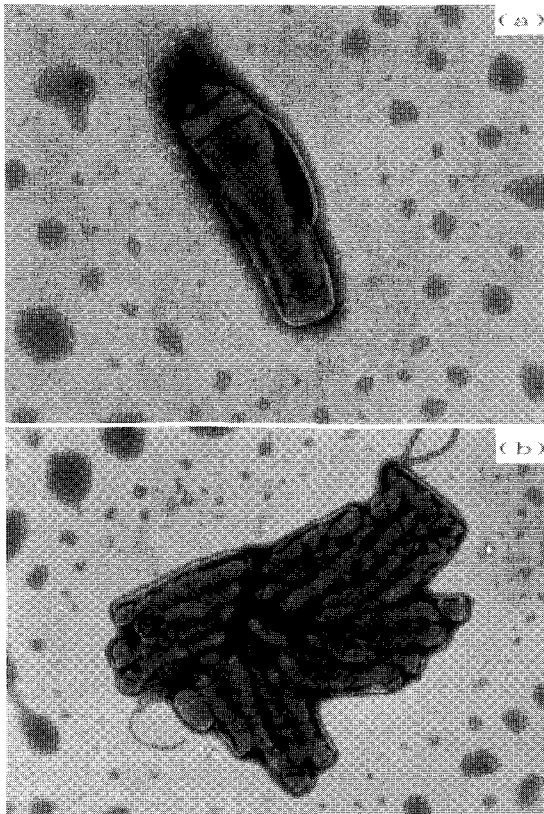


Fig. 1. Electron micrographs of *Rhodocyclus gelatinosus* strain KUP-74. Cells grown for 5 days were negatively stained by phosphotungstic acid. (a) The cell was magnified 2.2×10,000 times. A flagellum was seen in the right hand of the cell envelope. Notes the thin rod cell shape with mucus production. (b) The cells were clumpy together because of mucosity (magnitude 2.2×4,000 times).

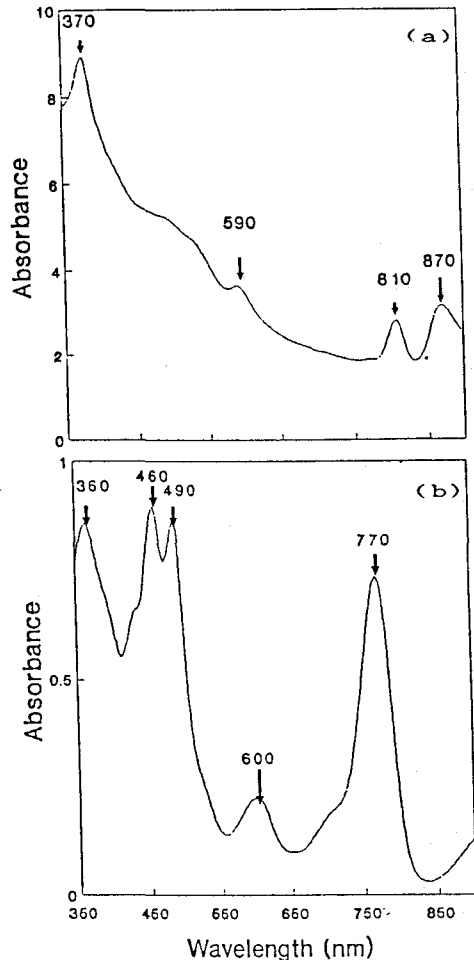


Fig. 2. Absorption spectra of bacteriochlorophylls from *Rhodocyclus gelatinosus* strain KUP-74. (a) Full grown culture broth 1 ml was centrifuged(10,000 rpm×10 min), and the cell pellet was suspended in 60% sucrose solution and measured the absorbance by UV-visible spectrophotometer(Hitachi Model 100-30). (b) The obtained cell pellet by same procedure described in (a) was suspended in 1 ml acetone-methanol(7 : 2). After centrifugation (10,000 rpm×10 min) the supernatant was used for analysis.

과이었다(Fig. 4). Glutamic acid에 의한 ALA의 late induction 현상을 규명하기 위하여 glutamic acid 관련 화합물을 각각 glutamic acid를 제외한 Lascelles의 기본배지에 30 mM 농도로 첨가 배양하여 이들이 균의 증식 및 ALA 생산에 미치는 영향을 검토하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 유도체 첨가 배양에 의하여 증식

속도는 변화하지 않았으나, ALA 생산성은 glutathione (reduced) 첨가에 의하여 저하된 반면 D,L-glutamic acid 및 D,L-glutamine에 의하여 late induction 현상을 뚜렷이 나타내며 ALA 생산성이 현저히 증가되었다. 특히 D-glutamic acid, D-glutamine의 경우 134시간부터 262시간까지의 무첨가 배양에 비교할 때 ALA 증가율(Induction

Table 1. Physiological properties of the isolated strain KUP-74

Characteristics	Strain KUP-74	<i>Rhodocyclus gelatinosus</i>
<b>Morphology</b>		
Shape	Rod	Rod
Motility	Motile	Motile
Spore formation	Negative	
Gram staining	Negative	Negative
<b>Growth</b>		
Anaerobic, light	Positive	Positive
Anaerobic, dark	Positive	Positive
Aerobic, light	Positive	Positive
Aerobic, dark	Positive	Positive
$\lambda_{\max}$ of living cell	370, 590, 810, 870 nm	
$\lambda_{\max}$ of cell free extract	360, 460, 490, 600, 770 nm	
Gelatin liquefaction <sup>a)</sup>	Positive	Positive
Starch hydrolysis	Negative	
Casein utilization	Negative	
Catalase	Positive	Positive
<b>Utility of carbon source or electron donors<sup>b)</sup></b>		
Glucose	+	+
Fructose	+	+
Glycerol	+	+
Sorbitol	-	-
Manitol	-	-
Ethanol	+	+
Glutamate	+	+
Aspartate	+	+
Arginine	-	NT
Fumarate	+	+
Tartarate	+	+
Succinate	+	+
Benzoate	-	-
Acetate	+	+
Propionate	+	±
Citrate	+	+
Malate	+	+
Lactate	+	+
Thiosulfate	-	-

<sup>a)</sup> It has been known that only the *Rhodocyclus gelatinosus* can liquefy gelatin among the genera of purple nonsulfur bacteria.

<sup>b)</sup> Substrates were added to a concentration of 0.1%(w/v).

<sup>c)</sup> Symbols : +, growth; ±, substrate utilized by some strains; -, no growth; NT, not tested.

ratio)이 300~400%에 달하는 결과를 나타내었다.

**Levulinic acid(LA)의 효과**

ALA dehydratase의 저해제<sup>28)</sup>의 하나인 LA를 광합성 세균 배양기간중(middle log phase)에 첨가하면 세포내외의 ALA 농도가 증가한다고 보고된 바 있다.<sup>29)</sup> KUP-74 균주는 균의 배양 middle log phase에 30 mM 농도가 되도록 LA를 첨가했을 때 ALA 생산량은 균체량의 증감없이 첨가 후 50시간에서 2배 증가하였다(data 생략). LA를 기본배지에 첨가하여 배양할 경우 균의 증식 및 ALA 생산성은 억제되었으나, LA와 glycine을 동시에 첨가하여 배양하면 Fig.5에서 보는 바와 같이 각각 10 mM 첨가시 균체량은 증감이 없고 ALA 생산량은 4일째 8배까지 증가하였다.

**고찰**

δ-Aminolevulinic acid(ALA) 생합성 경로는 현재까지 C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> pathway가 알려져 있으며 C<sub>5</sub>가 C<sub>4</sub>보다 원시형으로

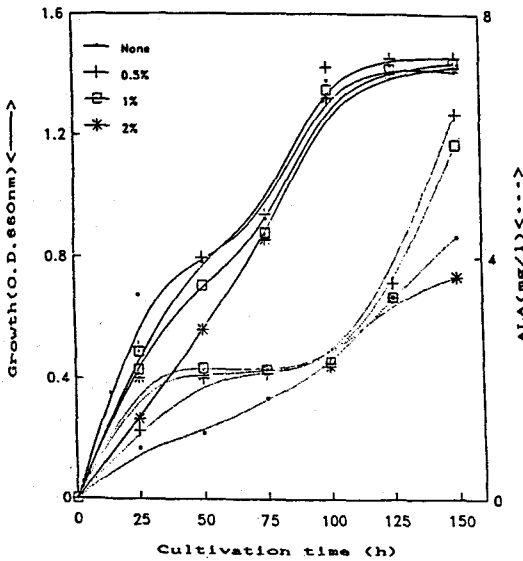


Fig. 3. Effect of glycerol concentration on growth and ALA production of *Rhodocyclus gelatinosus* strain KUP-74.

Cell cultivation was carried out on glass-water bath with occasional shaking in basal medium not containing L-glutamic acid in the presence or absence of glycerol at 30 °C, pH 6.8 under anaerobic-light condition(4 klux). The amount of ALA is expressed as mg per liter of culture filtrate. For other conditions, see "Materials and Methods".

추측되고 있다.<sup>15)</sup> *Cyanobacteria*<sup>22)</sup>세균이 C<sub>5</sub>에 의존하고 있음에도 불구하고 보다 원시 세균인 일부 purple non-sulfur bacteria가 C<sub>4</sub> pathway를 이용한다는 사실<sup>21,28)</sup>은 광합성 세균류에 의한 ALA 생산에 있어 species에 따른 각각의 ALA 생합성 경로를 명백히 규명한 후 ALA의 생산을 효율적으로 유도해야만 할 필요성을 제시하고 있다.

Table 2. Addition effect of glycine and succinate on growth and ALA production of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74

Glycine (mM)	Succinate (mM)	Growth (O.D. 660 nm)		ALA (mg/l)	
		107 h	160 h	107 h	160 h
0	0	1.37	1.39	4.49	5.43
10	0	0.98	0.77	8.56	8.17
30	0	0.54	0.55	4.68	1.53
60	0	0.53	0.54	4.21	3.04
0	10	1.48	1.60	6.73	9.16
0	30	1.49	1.60	4.88	8.33
0	60	1.42	1.42	5.29	7.11
5	5	1.62	1.61	6.11	8.13
10	10	1.17	1.19	10.17	10.18
15	15	0.66	0.65	2.05	1.53
30	30	0.56	0.53	5.29	1.56
60	60	0.36	0.38	5.05	1.22

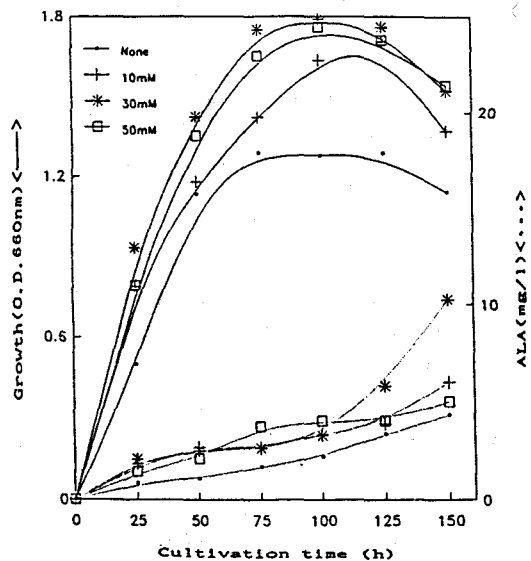


Fig. 4. Effect of glutamate supplementation on growth and ALA production of *Rhodocyclus gelatinosus* strain KUP-74.

Table 3. Induction of ALA secretion from *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 by the addition of glutamic acid and its derivatives

Additives (30 mM)	Growth (O.D. 660nm)		ALA (mg/l)		Induction ratio (%) <sup>a)</sup>
	134 h	262 h	134 h	262 h	
None	1.34	1.36	4.94	7.66	155
L-Glutamic acid	1.32	1.35	5.91	16.04	271
D-Glutamic acid	1.05	1.34	4.05	19.99	494
L-Glutamic acid	1.31	1.34	4.89	11.05	226
D-Glutamic acid	1.35	1.37	5.53	21.06	381
Glutathione(reduced)	1.18	1.35	1.27	3.99	314
L- $\gamma$ -Glutamylethylester	1.22	1.37	3.80	7.03	185

<sup>a)</sup> Induction ratio was expressed as percent increase of ALA yields in culture broth at 262 h versus 134 h.

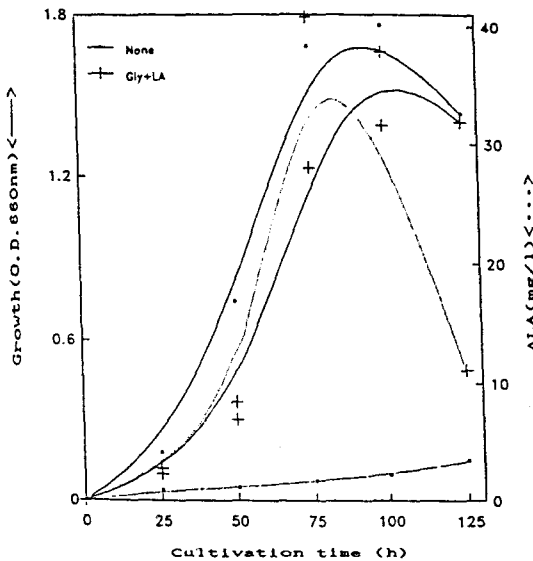


Fig. 5. Addition effect of levulinic acid and glycine on growth and ALA production of *Rhodocyclus gelatinosus* strain KUP-74.

분리된 KUP-74 균주는 호기적 암조건 하에서도 증식이 가능하였으나 red pigments 및 ALA의 생성이 현저히 저하되었다. 동 균주는 bacteriochlorophyll a 만을 함유하며 운동성인 간균으로서 cell envelope의 점성물질로 인한 세포의 aggregation을 나타내었으며(Fig. 1) 특히 gelatin 액화능을 가지는 특성을 고려하여 *Rhodocyclus gelatinosus*의 일종으로 판단하였다.

Table 3에서 glycine과 succinic acid 첨가에 의한 배양으로 ALA의 생산은 배양 107시간에서 최대치를 나타내는데 반해서, D,L-glutamic acid 및 D,L-glutamine의 첨가에 의하여 ALA는 배양 260 시간 이후에 생산 최

대치에 이르는 late induction 현상을 보였다(Table 4). 이 결과는 KUP-74 균주의 ALA 생합성이 C<sub>4</sub> pathway에만 의존하지 않고 glutamic acid를 precursor로 하는, 즉 C<sub>5</sub> pathway도 이용할 가능성을 암시하고 있다. Purple nonsulfur bacteria의 ALA 생합성이 C<sub>5</sub> pathway에 의해서도 진행될 수 있다는 보고가 아직 없기 때문에 KUP-74 균주는 ALA 생합성 경로 해석을 위한 흥미로운 광합성세균으로서, 이에 관련한 보다 상세한 검토가 요구된다.

Fig. 5에서 ALA의 최대생산에 소요되는 정상시간(100 시간 이상)보다 30시간 전에 최대치를 보인 결과는 LA에 의한 ALA의 세포의 분비 유도현상<sup>15)</sup>으로 해석된다. LA와 ALA precursors의 첨가농도가 *Rhodobacter sphaeroides*<sup>29)</sup>의 ALA 생산성에 결정적인 요인으로 작용하여, 각각 60 mM 첨가배양이 최적조건으로 보고된 반면, KUP-74 균주는 각 10 mM 이상의 농도에서 ALA 생산성이 저하되었다(Table 2). 이 결과는 KUP-74 균주의 ALA 생합성 조절기구가 *Rhodobacter sphaeroides*의 기구보다 정밀함을 내포하고 있는 것으로 사료된다.

KUP-74 균주는 C<sub>4</sub> 및 C<sub>5</sub> pathway에 관련한 모든 initial precursors의 첨가배양에 의하여 ALA 생산성이 증가하기 때문에 ALA의 공업적 생산에 적합한 균주로 판단, 현재 이 기질들의 복합 첨가 배양에 의해 배양액 중의 LA 농도를 일정하게 유지시킴으로써 ALA 생산성 향상의 극대화 가능성을 검토하고 있다.

## 사 사

본 연구는 1990년도 교육부의 유전공학연구비 지원에 의한 결과의 일부로 이에 깊은 감사를 드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Shemin, D. and Russell, C. S. : J. Amer. Chem. Soc., 75 : 4873(1953)
2. Rebeiz, C. A., Montazer, Z. A., Hopen, H. J. and Wu, S. M. : Enz. Microb. Technol., 6 : 390(1984)
3. Rebeiz, C. A., Abou Haidar, M., Yaghi, M. and Castelfranco, P. A. : Plant Physiol., 46 : 543(1970)
4. Rhee, H. I., Murata, K. and Kimura, A. : Agric. Biol. Chem., 51 : 1701(1987)
5. Yamanishi, T. and Tuboi, S. : J. Biochem., 94 : 181 (1983)
6. Beale, S. I. : Plant Physiol., 45 : 504(1970)
7. Sasaki, K., Nishizawa, Y. and Hayashi, M. : J. Ferment. Technol., 65 : 511(1987)
8. Nagai, S. and Nisio, S. : JP 1-148193, 475(1989)
9. Sasaki, K. and Danaka, T. : JP 2-92293, 547(1990)
10. Li, J. M., Brathwaite, O., Cosloy, S. D. and Russell, C. S. : J. Bacteriol., 171(5) : 2547(1989)
11. Beale, S. I., Gough, S. P. and Granic, R. S. : Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A., 73 : 2719(1975)
12. Harel, E. and Neeman, E. : Plant Physiol., 72 : 1062 (1983)
13. Avissar, Y. : Biochim. Biophys. Acta., 613 : 220 (1980)
14. Huang, D. D. and Wang, W. Y. : J. Biol. Chem., 261 : 13451(1986)
15. Harald, G., Rolf, J. and Rudolf, K. T. : Arch. Microbiol., 135 : 237(1983)
16. Hollriegl, V., Lamm, L., Rowold, J., Horig, J. and Renz, P. : Arch. Microbiol., 132 : 155(1982)
17. Borthwick, I. A., Smoswell, M. A. and Elliott, W. H. : Eur. J. Biochem., 150 : 481(1985)
18. Maguire, D. J., Day, A. R. and Elliot, W. H. : Nucleic acid Res., 14 : 1379(1986)
19. Porra, R. J., Irving, E. A. and Tennick, A. M. : Arch. Biochem. Biophys., 149 : 563(1972)
20. Granick, S. and Beale, S. I. : Advances in Enzymology, A. Meister, ed., 46 : 33(1978)
21. Jordan, P. M. and Shemin, D. : The Enzymes, 7, Academic Press, New York, London, 339(1972)
22. Kipe-Nolt, J. A. and Steven, S. E. : Plant Physiol., 65 : 126(1980)
23. Lascelles, J. : Biochem. J., 62 : 78(1956)
24. Lilli, R. D. : "H. J. Conn's Biological Stains", 8th ed. (1969)
25. Johannes, F. I. and Truper, H. G. : Bergey's manual of systemic bacteriology, J. T. Stanley, ed., 3 : 1658 (1989)
26. Mauzerall, D. and Grannick, S. : J. Biol. Chem., 219 : 435(1956)
27. Marver, H. S., Tschudy, D. P., Perlroth, M. G., Collins, A. and Hunter, Jr, G. : Anal. Biochem., 14 : 53 (1966)
28. Nadi, D. L. and Shemin, D. : J. Biol. Chem., 243 : 1236(1968)
29. Sasaki, K., Tanaka, T., Nishizawa, Y. and Hayashi, M. : Appl. Microbiol. Biotechnol., 32 : 727(1990)

---

**Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 and its characteristic in  $\delta$ -aminolevulinic acid production**

Se-Young Hwang, Kyung-Min Choi, Wang-Jin Lim\*, Bum-Shik Hong\*, Hong-Yon Cho\* and Han-Chul Yang\*(Department of Biotechnology, Korea University, Chochiwon 339-800, Korea, \*Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

**Abstract** : A photosynthetic bacterium strain KUP-74 producing high amount of  $\delta$ -aminolevulinic acid(ALA) was isolated from soils, which was identified as *Rhodocyclus gelatinosus*. After 10 days cultivation under anaerobic-light condition at 30 °C, 4 Klux and pH 6.8, 5 mg/l of ALA was formed extracellularly. ALA productions were increased up to 8 mg/l and 12 mg/l in cell cultivations either by the addition of 0.5% glycerol (v/v) or 10 mM of glycine and succinic acid, respectively, using Lascelles basal medium eliminated L-glutamic acid. By cultivation in the presence of 30 mM each D,L-glutamic acids and D,L-glutamines the yield of ALA showing a late induction phenomenon was reached the maximum value of 21 mg/l. Different culture times were needed to generate maximum ALA yields by the addition of initial precursors of C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub> pathways in basal medium, as being 107 h and 262 h, respectively. 40 mg/l yield of ALA was observed by cell cultivation with the basal medium containing each 10 mM levulinic acid(LA) and glycine simultaneously.