

Rhodobacter sphaeroides에 의한 δ -aminolevulinic acid생산에 있어서 glutamic acid 및 감마 유도체의 영향

최경민 · 임왕진⁺ · 황세영*

고려대학교 생물공학과, ⁺생물공학연구소

초록 : *Rhodobacter sphaeroides* 균주가 생산하는 δ -aminolevulinic acid(ALA)의 생산성에 관하여 *in vivo*, *in vitro* 상에서 기질 및 관련 화합물을 이용하여 검토하였다. C_5 ALA 생합성계에 의한 ALA yield 대비의 C_4 생합성계에 의한 비율은 *in vivo* 상에서 0.78인 반면, *in vitro* 상에서의 비율은 1.37이었다. C_4 , C_5 각 계의 기질 첨가 배양에 의한 cell-free system의 C_4 , C_5 계의 발현도는 미첨가 배양에 의한 system과 비교하여 각각 1.35, 1.52로 증가하였으나, 증가한 계에 대한 상대계의 발현도가 억제되어, C_4 와 C_5 계가 각각 0.91, 0.83으로 나타났다. γ -Glutamyl derivatives의 세포내 uptake rates는 L-glutamic acid를 기준으로 비교해서 D-glutamic acid, 0.55; D-glutamine, 0.5; L-glutamine, 0.4; γ -L-glutamyl ethylester, 0.3; GSH 및 Glu-pNA, 0의 순서를 보였다. Uptake rate와 관계없이 *in vivo* 상에서 L-과 D-glutamine이 L-, D-glutamic acid보다 균체 외 ALA의 생산에 있어서 각각 높은 yield의 효과를 보였다(1993년 4월 8일 접수, 1993년 5월 30일 수리).

δ -Aminolevulinic acid(ALA)는 생체 내에서 hemes, chlorophylls 등의 형성을 위한 구성 골격 물질인 cyclic tetrapyrrole의 prime intermediate로 작용하며,^{1,2)} 이 화합물의 세포내 농도는 Feed-back 제어 기구에 의하여 엄밀히 조절되는 것으로 알려져 있다.³⁾ 두 종류의 ALA 생합성계가 보고되고 있는데, 동물,⁴⁻⁶⁾ 진균,⁷⁾ 호기성 세균류⁸⁻¹⁰⁾ 등에서 주로 발견되는 C_4 계는 ALA synthase에 의하여 glycine과 succinyl-CoA로부터 직접 ALA가 합성되는 반면, 식물,¹¹⁻¹³⁾ 조류,¹⁴⁻¹⁶⁾ 일부 원시 세균류¹⁷⁻¹⁹⁾ 등에서 보고되어 온 C_5 계는 대장균이나 고초균²⁰⁾ 및 비유황 광합성 세균^{21,22)} 등에서도 그 존재가 입증되고 있는 것으로, glutamic acid로부터 3종의 효소가 관여한, 즉, ATP와 Mg^{++} 의존성 glutamyl-tRNA synthetase, NADPH 의존성 glutamyl-tRNA synthetase, NADPH 의존성 dehydrogenase 및 pyridoxal phosphate 의존성 aminotransferase에 의한 sequential ALA 생합성법으로써, 이들 ALA 생합성계는 서로 진화상의 연계성이 제기되어, 분류학적 측면에서의 의의가 논의되고 있다.^{20,23)} 한편, ALA는 감광성의 물질로써 쌍자엽 식물에만 선택적으로 작용, 빛 에너지에 의한 pchlide의 형성으로 인한 잎의 인지질 파괴로 잎의 고사를 촉진케 하는 새로운 개념의 제초 활성 물질²⁴⁾로 주목 받고 있다.

생물학적 측면에서 경제성을 고려한 ALA의 생산을 위해서는 이들 ALA 생합성계의 발현 양식 및 조절 기구에 대한 검토가 이루어져야 한다. 일부 비유황 광합성 세균류에 의한 ALA 생산에 있어서 C_5 계의 전구물질로 알려진 glutamic acid가 그 효율을 증가시키는 사실은 이미 보고한 바 있다.²²⁾ 이 논문에서는 지금까지 ALA 생합성에 C_4 계를 주로 이용한다고 보고되어 온 *Rhodobacter sphaeroides* 균주²⁵⁻²⁷⁾가 L-glutamic acid 및 이의 유도체로부터 C_5 계를 이용하여 ALA를 생합성하는 양상을 C_4 계에 의한 ALA 생산성과 비교, 고찰한다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

본 연구에 사용한 균주 *Rhodobacter sphaeroides* IFO 12203은 KIST 유전자 은행으로부터 분양받았다. Culture tube(2×20 cm)를 이용하여 glutamic acid가 제외된 Lascelles의 기본배지²⁸⁾ (D, L-malic acid 2.7 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $(NH_4)_2HPO_4$ 0.5 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.1 g, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 27 mg, nicotinic acid 1 mg, vitamin B-1 · HCl 1 mg, $MnSO_4 \cdot 5H_2O$ 1.2 mg, biotin 0.01 mg, 증류수 1l, pH 6.8) 10 ml의 air phase를 질소가스로 치환,

Key words : δ -aminolevulinic acid, glutamic acid, γ -glutamyl derivatives, *Rhodobacter sphaeroides*
Corresponding author : S.-Y. Hwang

균주를 접종, 30°C의 glass water bath 상에서 텅스텐 백열전구를 사용한 4 Klux의 조도로 조사하여 3일간 혐기적 정치 배양한 전 배양액 2 ml를 동일배지 2l(2l用 Erlenmyer flask)에 주입 후 전 배양법과 동일하게 혐기적으로 정치 배양하였다. 조도는 Illuminometer(SPI-5)로 조정하였으며, 균체의 증식도는 660 nm(spectrophotometer, Hitachi Model 100-30)에서의 흡광도로 나타내었다.

In vitro ALA 생합성

대수 증식기의 배양액 2l(5.0×10⁷ cells/ml)를 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 수거한 cell pellets을 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세정 후, 농축하여 동일 buffer로 현탁, 4°C에서 French press(16,000~18,000 psi)로 균체를 파쇄한 후 1 mM β-mercaptoethanol/50 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 첨가하여 최종 40 ml 용량의 세포 추출액이 되도록 하였다. Cell-free 반응액 2 ml에 C₄ 계를 이용한 ALA 생합성²⁹⁾을 위하여 50 mM glycine, 50 mM succinic acid, 370 μM coenzyme A, 300 μM ATP, 270 μM pyridoxal phosphate 및 5 mM levulinic acid(LA)가, C₅ 계를 이용한 ALA 생합성³⁰⁾을 위해서는 50 mM Na-L-glutamate, 300 μM ATP, 500 μM NADPH, 270 μM pyridoxal phosphate 및 5 mM LA가 각각 존재한 조건 하에서 반응 37°C in 50 mM phosphate buffer, pH 7.0) 후, 시간 단위로 100 μl씩 취하여 실온에서 10% trichloroacetic acid 0.1 ml를 가하여 1시간 정치 후 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한 상등액 내의 ALA양을 측정하였다.

ALA의 정량 분석

상등액을 Mauzerall 등의 방법³¹⁾에 준하여 1 M Na-acetate buffer(pH 4.7) 0.5 ml와 0.05 ml의 acetyl acetone을 첨가한 후 15분간 가열하여, 형성된 2-methyl-3-acetyl-5-propionic acid pyrrole²⁷⁾을 Modified Ehrlich

reagent³²⁾ (1 g p-dimethylaminobenzaldehyde in 42 ml glacial acetic acid with 8 ml of 70% perchloric acid) 3.5 ml를 가하여 20분간 실온에서 반응, 생성된 착색 물질의 흡광도를 556 nm에서 측정 후 ALA standard curve²¹⁾ (ε₅₅₆ = 9,300 M⁻¹cm⁻¹)를 이용해서 ALA양을 분석하였다.

아미노산의 세포막 투과 속도 측정

균체의 대수기 배양액(O.D. 0.9 at 660 nm) 30 ml를 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 분리한 cell pellet을 10 mM phosphate buffer(pH 7.0) 10 ml로 현탁, 세정작업을 2회 반복한 후 active transport system의 활성화³³⁾를 위한 이하의 반응계를 조성하였다. 1% D-glucose가 함유된 10 mM phosphate buffer, pH 7.0에 660 nm에서의 O.D.가 1.0으로 보정된 cell 현탁액 900 μl에 L-glutamic acid, D-glutamic acid, L-glutamine, D-glutamine, glutathione, reduced(GSH), γ-L-glutamyl ethylester 및 γ-L-glutamyl-p-nitroanilide(Glu-pNA) 각 10 mM를 각각 혼합하였다. Uptake rate의 직접 측정을 위하여 균체 외에 잔존해 있는 primary amino group을 5% sodium borate 용액(pH 9.5) 상에서 2, 4, 6-trinitrobenzenesulfonate(TNBS)³⁴⁾와 반응, 30°C에서 30분 후 형성된 pycryl adduct에 의한 yellow color의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다(ε₄₂₀ = 10,000 M⁻¹cm⁻¹)³⁵⁾.

시 약

ALA, LA, coenzyme A, ATP, pyridoxal phosphate, NADPH, p-dimethylaminobenzaldehyde, GSH, γ-L-Glu-pNA, TNBS, β-mercaptoethanol, L-glutamic acid 및 L-glutamine은 Sigma Chem. Co. (USA)로부터, D-glutamic acid는 Kokusan Chem. Co. (Japan), D-glutamine은 Nakarai Chem. Co. (Japan), trichloro acetic acid, 70% perchloric acid, glycine 및 succinic acid는 Junsei Chem. Co. (Japan), glacial acetic acid는 Duksan Pharmaceutical

Table 1. Alterations in extracellular ALA yields by precursor supplementations during the cell cultivation of *Rhodobacter sphaeroides*

Precursors	(mM)	Growth (O.D. at 660 nm)		ALA (μM)	
		Initial	Mid-log	Initial	Mid-log
None		1.78	1.78	50	50
Glycine + Succinic acid	(60)	0.35	0.72	12	69
L-Glutamic acid	(30)	1.75	1.81	58	89

Each precursors were added initially, or at the mid-log phase (64 h) of cell growth, to basal medium containing 30 mM LA, separately (data from Choi, *et al.*²²⁾). Determination of cell growth and extracellular amount of ALA was performed after 112 hours of cell cultivation.

Co. (Korea)로부터 각각 구입하였다.

결 과

전구물질 첨가배양 효과

*Rhodobacter sphaeroides*의 배양 중 C₄, C₅ ALA 생합성계의 전구물질 첨가 시기가 균체 외 ALA 생성에 미치는 영향을 검토한 결과 ALA의 생산성 증가를 위해서는 C₄, C₅ 생합성계의 전구물질들을 대수기 증기에 첨가하는 것이 배양 초기 첨가에 의한 것 보다 효과적인 것으로 나타났다(Table 1). C₄ 생합성계의 전구물질인 glycine과 succinic acid를 배양 초기 및 대수기 증기에 첨가 배양 함으로 인한 균 증식의 억제 효과는 각각 80%, 60%에 달하였으나 C₅ 생합성계의 전구물질인 L-glutamic acid에 의해서는 첨가 시기에 관계없이 균의 증식에 변화가 보이지 않았다. ALA 생합성을 위하여 거의 대부분 C₄ 계에 의존하는 것으로 알려진 본 균종이 C₅ 계의 전구물질인 L-glutamic acid를 초기 및 대수기 증기에 첨가 배양하므로써 C₄ 전구물질 첨가 배양에 의한 것보다 균체 외 ALA 양에 있어서 오히려 각각 4.8배, 1.3배의 yield를 나타내었다.

In vitro ALA 생합성 속도

Cell-free system 상에서의 전구물질 첨가에 의한 ALA 생합성 속도 변화는 전구물질의 *in vivo* 첨가 배양으로 인한 세포 외 ALA 양의 변화 양상(Table 1)과 상이한 결과를 나타내었다(Fig. 1). 즉, *in vivo* 첨가 배양시 C₅ 전구물질의 대수기 증기에서의 첨가 배양 대비 C₄ 전구물질에 의한 ALA yield 비율이 0.78인 반면 Fig. 1의 결과로부터 ALA yield의 *in vitro* 비율(C₄/C₅)은 1.37이었다. 따라서, *in vivo* 상에서 C₄ 전구물질에 의한 균체 외 ALA yield가 C₅ 전구물질 첨가 대비로써 낮은 것이 균체의 증식 억제 현상에 상당히 기인하고 있는 것으로 해석된다. 또한 이들 C₄, C₅ 전구물질들이 *in vitro* 상에서의 ALA 생합성 반응계에 각각 이용되므로써, 미첨가 대비의 ALA 생합성 초속도가 각각 4배, 3배의 증가 현상을 보였다. Cell-free system 상에서의 ALA 생합성의 최대치에 도달하는데 소요된 시간은 약 12시간인 반면, *in vivo* 상에 기질 첨가 배양으로 인한 세포 외 ALA 양의 최대치에 도달하기 위하여 약 48시간이 소요되어 (data 생략), *in vitro*와 *in vivo* 계에 의한 최대 ALA 양에의 도달 소요 시간이 무려 4배의 차이를 나타내었다. *In vivo* 계의 이와 같은 현상은 각 전구물질들이 균체의 배양액 중에 고농도로 존재하여도 세포가 전구물질을 수용함에 있어서 생리적 항상성을 유지하는 한편, 합성된

ALA가 배지상으로 분비되는 과정 상의 조절기구에 기인하는 것으로 해석된다.

전구물질에 의한 ALA 생합성계 발현의 유도

Table 1과 Fig. 1의 결과는 본 균주가 ALA의 생합성을 위한 C₄, C₅ 계를 공유하는 사실을 강하게 암시하고 있다. 균체 외 ALA 생산성의 증감 현상이 단지 전구물질 농도 변화에 기인하고 있는가, 혹은 ALA 생합성계의 세포내 활성 변화에도 기인하고 있는가, 혹은 ALA 생합성계의 세포내 활성 변화에서도 기인하고 있는가를 확인하기 위하여 균체 배양의 대수기 증기에 전구물질을 각각 feeding 후 24시간 배양한 균체의 추출액을 이용하여, ALA 생합성의 초속도(V₀)를 조사하였다(Table 2). C₄, C₅ 계의 전구물질을 각각 대수기 증기에 첨가한 후 24시간 배양한 균체로부터 조제된 cell extract의 양 생합성계의 V₀ 값은 미 첨가의 경우와 거의 동등한 결과를 나타내었다. 한편, 전구물질 첨가 배양에 의해 조제된 cell-free 반응계에 배양시의 첨가 물질과 동일한 전구물질이 반응하였을 때 C₄ 계와 C₅ 계의 V₀ 값은 기질의 미 첨가 배양에 의한 cell-free 반응계의 C₄, C₅ 계의 V₀ 값 대비로써 1.35와 1.52배씩 각각 증가한 반면, V₀ 값이 증가한 생합성계에 따른 타방계의 V₀ 값은 V₀C₄=0.91과 V₀C₅=0.83배로 감소한 양상을 나타내었다. 전구물질 첨가 배양에 의한

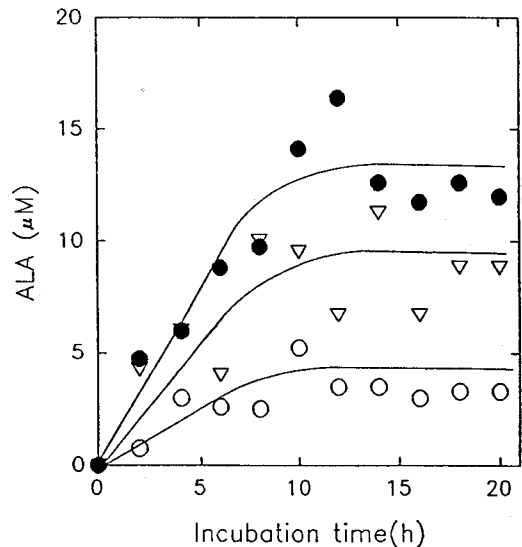


Fig. 1. Substrate dependency of the ALA biosynthetic rate in cell extracts of *Rhodobacter sphaeroides*. Time course analysis of *in vitro* ALA forming rate was carried out in the absence (○) or presence of 50 mM C₄ (●) or C₅ (▽) precursors. For other conditions, see Materials and Methods.

cell extract의 양방의 생합성계에 의한 V_0 값의 흡은 첨가 물질의 종류와 관계없이 미첨가 배양에 의한 cell extracts내의 그것 보다 15% 높은 값을 나타내었다. 또한 각 ALA 생합성계의 전구물질을 동시에 첨가하여 배양한 균체로부터 조제된 cell extract에 의한 각 효소계의 V_0 값의 합이 일방의 전구물질 첨가에 의한 그것과 전혀 차이를 보이지 않았다. 이상의 결과로부터 균체의 ALA 생산성의 증감 현상이 전적으로 세포 내외의 전구물질 농도에만 의존하고 있지 않으며, ALA 생합성계의 세포내 활성 변화에서도 비롯될 수 있는 것으로 사료된다.

γ -Glutamyl derivatives에 의한 균체 외 ALA yield의 변화

본 균주와 동일 Rhodospirillaceae科에 속하는 것으로 알려져 있는 토양 유래의 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74균주가 C₅ ALA 생합성계²¹⁾를 갖고 있으며, L-glutamic acid를 비롯한 γ -glutamyl derivatives를 초기에 첨가 배양하므로써, 균체 외 ALA 생산에서의 delayed induction 현상이 최근 보고된 바 있다.²¹⁾ γ -Glutamyl derivatives에

의한 균체 외 ALA yield에 있어서의 다양성이 ATP, Mg⁺⁺ 의존성 glutamyl-tRNA synthetase의 γ -glutamyl moiety에 대한 특이성에 주로 기인하고 있는가, 아니면 이 화합물들의 세포막 투과 속도의 차이에 의한 것인가를 확인하기 위하여 이 화합물들의 투과 속도를 측정할 결과, L-glutamic acid의 속도를 기준으로 비교한 비율은

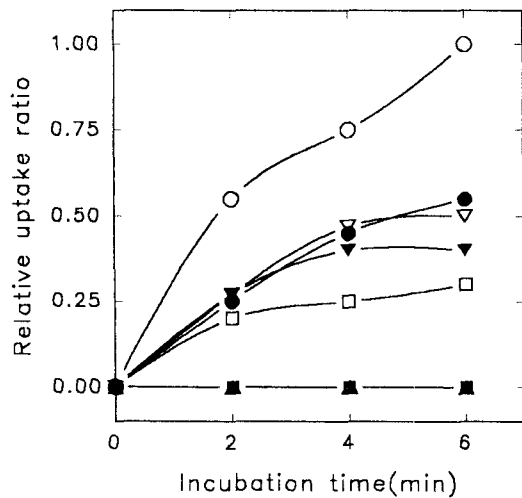


Fig. 2. Determination of cellular uptake rates of γ -glutamyl derivatives for the intact cells of *Rhodobacter sphaeroides*. Relative uptake rate indicates percent ratios of the uptake rates of compounds relative to that of 1 mM L-glutamic acid. Uptake rates were calculated from the residual amounts of primary amino groups in reaction mixtures using the method described in Materials and Methods. 6 minutes was required for 1 μ moles uptake of L-glutamic acid into cells as 1 ml/ cell suspension O. D. 1.0 at 660 nm. Symbols used for L-glutamic acid, (○); D-glutamic acid, (●); L-glutamine, (▽); D-glutamine, (▼); GSH, (□); γ -L-glutamyl ethylester, (■); Glu-pNA, (△).

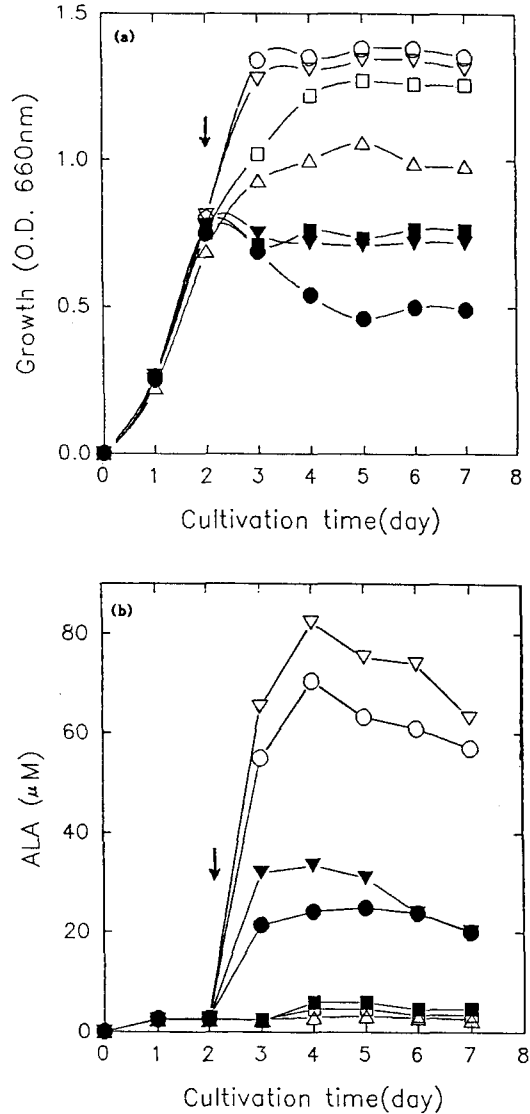


Fig. 3. Increases in extracellular production of ALA from the cells of *Rhodobacter sphaeroides* by supplemented cultivations with γ -glutamyl derivatives. (a), Cell growth; (b), ALA production. Arrows were indicated the addition of 30 mM of each compounds with 30 mM LA. Symbols used for L-glutamic acid, (○); D-glutamic acid, (●); L-glutamine, (▽); D-glutamine, (▼); GSH, (□); γ -L-glutamyl ethylester, (■).

D-glutamic acid, 0.55; D-glutamine, 0.5; L-glutamine, 0.4; γ -L-glutamyl ethylester, 0.3; GSH 및 Glu-pNA, 0의 순서로 L-glutamic acid가 가장 빠른 투과 속도를 보였다 (Fig. 2). 그러나, 이 화합물들의 대수기 증기 feeding에 의한 균체 외 ALA yield의 최대치는 투과 속도가 극미한 GSH와 Glu-pNA를 제외하고는 세포막 투과 속도와 ALA 생산성 간에 일관성이 결여되었다(Fig. 2, 3b). 특히, L-glutamine이 L-glutamic acid 보다, 그리고 D-glutamine이 D-glutamic acid 보다 각각 균체 외 ALA의 농도를 더 증가 시킨 결과는 이들 화합물의 세포막 투과 속도와 반대되는 양상을 나타내었다(Fig. 3b). 한편, 배양 대수기 증기에의 첨가로써, 균체의 증식은 L-glutamic acid, L-glutamine 및 GSH에 의하여 증가되는 효과를, D-glutamic acid, D-glutamine 및 γ -L-glutamyl ethylester에 의하여 억제되는 효과를 나타내었다(Fig. 3a).

고 찰

*Rhodobacter sphaeroides*의 ALA 생합성계에 관해서는 C₄ 계의 존재가 입증된 이래, 근간의 purple bacteria의 신분류 방법³⁶⁻³⁹에 의하면, C₄ ALA 생합성계를 이용하는 균종으로 분류되고 있으며 ALA 생합성계로 부터 설계된 'phylogenetic tree'⁴⁰에 의하면 광합성 세균 중 가장 진화된 균의 일종으로 사료되고 있다. ALA 생합성을 위하여 alanine-4,5-dioxovalerate transaminase⁴⁰가 관여하는 제 3의 계에 관한 연구 결과가 최근 보고되어 C₅ ALA 생합성계의 저해제인 gabaculin²⁰에 의하여 저해되지 않는 것으로 알려져 있으나, 이 합성계의 porphyrin 생합성을 위한 의의는 아직 밝혀져 있지 않고 있다.⁴¹

ALA dehydratase의 강력한 저해제인 LA⁴²가 함유된 기본 배지로 균체를 배양하는 과정에서 각 ALA 생합성계의 전구물질들을 배양의 대수기 증기에 첨가하는 조건으로 만든 균체 외 ALA yield가 기질 미첨가 배양에 의한 최대 yield로부터 C₄ 전구물질 첨가 배양으로 1.4배, C₅ 전구물질에 의하여 1.8배로 머물러 비교적 낮은 증가 효과를 보였으며, 한편 C₄ 전구물질 첨가 후의 균체 증식의 억제 현상을 고려하면 본 균주에 의한 ALA 생합성계는 어느 일방의 계에만 특히 의존하는 것으로는 판단할 수 없겠다(Table 1). 균체 외로 대수적 ALA 분비를 야기하는 시점의 균체 추출액의 ALA 생합성계를 이용한 ALA 생합성 속도의 분석 결과(Table 2)는 어느 일방의 전구물질 첨가 배양에 의한 균체의 추출액으로부터 발현하는 그 합성계의 induction은, 역으로 항상 그에 상응한 정도로 타방의 합성계가 repression되는 양상으로 나타남으로써 이로 인하여 향후의 특정 생물계에 항존하는^{40,43} 이들 ALA 생합성계의 발현 조절 기작 연구가 한층 흥미롭게 전개될 것으로 사료된다. L-Glutamic acid를 전구물질로 한 C₅ ALA 생합성계는 단백질 합성에 관여하는 glutamyl-tRNA synthetase가 직접 반응하여 γ -glutamyl group과 전사 후 변형된 tRNA^{Glu} 간의 esterification으로부터 시작하는 것으로 알려져 있다.⁴⁵ Fig. 2, 3에서와 같이 세포막 투과 속도가 L-glutamic acid에 비하여 40% 정도 밖에 안되는 L-glutamine에 의해서 *in vivo* 상의 균체 외 ALA 생산량이 L-glutamic acid에 의한 그것 보다 14% 증가한 결과로부터, glutamyl-tRNA synthetase가 synthetase 활성 이외에도 hydrolase 활성도 함유하고 있는 것으로 추정되며, 위에서 언급한 바와 같이 본 균주의 C₅ 계에 관여하는 glutamyl-

Table 2. Effect of precursor supplemented cultivation on the ALA biosynthetic rate in the cell extract of *Rhodobacter sphaeroides*

Precursors supplied ^{a)}	(mM)	ALA forming rates (V ₀) ^{b)} under the proposed system ^{c)} for		
		C ₄ pathway	C ₅ pathway	no addition
None		1.71	1.30	0.50
Glycine + Succinic acid	(60)	2.30	1.08	0.50
L-Glutamic acid	(30)	1.56	1.97	0.45
C ₄ + C ₅ precursors	(60 + 30)	1.68	1.79	0.48

a) Each precursors were independently added with the fixed concentrations at the mid-log phase of cell growth and further cultivations were carried out for 24 h, prior to the preparation of cell-free extracts. b) The values of initial velocity (V₀) indicating μ moles ALA formed in 1 ml of cell-free extract per hour were estimated from the progress curve data obtained by time course plotting of ALA contents in cell-free reaction system described in Materials and methods. c) Conditions of the systems in which ALA was biosynthesized *in vitro* were in Materials and Methods.

tRNA synthetase가 단백질 합성에 직접 관여하는 glutamyl-tRNA synthetase와 동일한 효소로 알려진 기존의 보고⁴⁶⁾에 의문점이 제기된다. 이러한 관점에서 볼 때, *C.* ALA 생합성계를 발현하는 미생물계의 ALA 생합성에 있어서 γ -glutamyl derivatives에 의한 각 미생물 종의 ALA 생산 yield의 다양성을 충분히 검토 후, 이를 효율적 ALA 생산을 위한 관련 연구에 적용시켜야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1. Shemin, D. and Russell, C. S.: J. Amer. Chem. Soc., 75 : 4873(1953)
2. Shemin, D. and Brey, R. C.: Ann. N. Y. Acad. Sci., 112 : 615(1964)
3. Donglin, N. N. and Nagai, S.: J. Ferment. Bioeng., 68 : 88(1989)
4. Borthwick, I. A., Smoswell, M. A. and Elliott, W. H.: Eur. J. Biochem., 150 : 481(1985)
5. Maguire, D. J., Day, A. R. and Elliott, W. H.: Nucl. Acids Res., 14 : 1379(1986)
6. Gibon, K. D., Laver, W. D. and Neuberger, A.: Biochem. J., 70 : 71(1958)
7. Porra, R. J., Irving, E. A. and Tennick A. M.: Arch. Biochem. Biophys., 149 : 563(1972)
8. Leong, S. A. and Helinski, D. R.: J. Biol. Chem., 257 : 8724(1982)
9. Sasaki, K., Nishizawa, Y. and Hayashi, M.: J. Ferment. Technol., 65 : 511(1987)
10. Wright, M. S., Cardin, R. D. and Beale, S. I.: J. Bacteriol., 169 : 961(1987)
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. Ford, S. H. and Friedmann, H. C.: Biochim. Biophys. Acta., 569 : 153(1979)
14. Avissar, Y.: Biochim. Biophys. Acta., 613 : 220(1980)
15. Huang, D. D. and Wang W, Y.: J. Biol. Chem., 261 : 13451(1986)
16. Ohama, T., Seto, H. and Miyachi, S.: Arch. Biochem. Biophys., 246 : 192(1986)
17. Harald, G., Rolf, J. and Rudolf, K. T.: Arch. Microbiol., 135 : 237(1983)
18. Hollriegl, V., Lamm, L., Rowold, J., Horig, J. and Renz P.: Arch. Microbiol., 132 : 155(1982)
19. Friedmann, H. C. and Thauer, R. K.: FEBS Lett., 207 : 84(1986)
20. O'Neill, G. P., Chen, M. W. and Soll, D.: FEMS Microbiol. Lett., 60 : 255(1989)
21. Hwang, S. Y., Choi, K. M., Lim, W. J., Hong, B. S., Cho, H. Y. and Yang, H. C.: J. Korean Agric. Chem. Soc., 35 : 210(1992)
22. Choi, K. M., Lim, W. J. and Hwang, S. Y.: J. Sci. Technol., Korea Univ., 10 : 49(1992)
23. Choi, K. M., Lim, W. J. and Hwang, S. Y.: J. Inst. Biotechnol., Korea Univ., 4 : 37(1992)
24. Rebeiz, C. A., Abou Haidar, M., Yaghi, M. and Castelfranco, P. A.: Plant Physiol., 46 : 543(1970)
25. Sasaki, K., Nishizawa, Y. and Hayashi M.: J. Ferment. Technol., 65 : 511(1987)
26. Burnham, B. F.: Methods in Enzymol., 17A, 195 (1970)
27. Warnick, G. R. and Burnham, B. F.: J. Biol. Chem., 246 : 6880(1971)
28. Lascelles, J.: Biochem. J., 62 : 78(1956)
29. Chen, J., Miller, G. W. and Takemoto, Y.: Arch. Biochem. Biophys., 208 : 221(1981)
30. Li, J. M., Brathwaite, O., Cosloy, S. D. and Russell, C. S.: J. Bacteriol., 171 : 2547(1989)
31. Mauzerall, D. and Grannick S.: J. Biol. Chem., 219 : 435(1956)
32. Marver, H. S., Tschudy, D. P., Perlroth, M. G., Collins, A. and Hunther Jr, G.: Anal. Biochem., 14 : 53 (1966)
33. Kingsbury, W. D., Boehm, J. C., Perry, D. and Gilvarg, C.: Pro. Natl. Acad. Sci., U. S. A., 81 : 4573 (1984)
34. Ryang, J. H. and Hwang, S. Y.: J. Inst. Biotechnol., Korea Univ., 4 : 43(1992)
35. Binkley, F., Leibach, F. and King, N.: Arch. Biochem. Biophys., 128 : 397(1968)
36. Gibson, J., Stackebrandt, E., Zablén LB., Gupta, R. and Woese, CR.: Cur. Microbiol., 3 : 59(1979)
37. Ambler, R. P. Daniel, M., Hermoso, J., Meyer, T. E., Bartsch, R. G. and kamen, M. D.: Nature (London), 278 : 659(1979)
38. Dickerson, R. E.: in 'Biomolecular Structure, Conformation, Function, and Evaluation', Srinivasan R. (ed), Vol 1, p. 227, Pergamon, Oxford, (1980)
39. Woese, C. R.: Microbiol. Rev., 51 : 221(1987)
40. Avissar, Y. J., Ormerod, J. G. and Beale, S. I.: Arch. Microbiol., 151 : 513(1989)
41. Klein, O., Dormemann, D. and Senger, H.: Ber. Deutsch. Bot. Ges., 92 : 619(1979)
42. Nadi, D. L. and Shemin, D.: J. Bio. Chem., 243 : 1236(1968)
43. Gary, P. O. N., Chem, M. W. and Dieter, S.: FEMS Microbiol. Lett., 606 : 255(1989)

44. Kannangara, C. G., Gough, S. P., Oliver, R. P. and Rasmussen, S. K.: Carlsberg Res. Commun., 49 : 417(1977)
45. Avissar, Y. J. and Beale, S. I.: Plant Physiol., 88 : 879(1988)
46. Kannangara, C. G., Gough, S. P., Bruyant, D., Hooper, J. K., Khan, A. and Wettstein, D. V.: TIBS 13, Elsevier Publications Cambridge, April, 139 (1988)

Effect of glutamic acid and its γ -derivatives on the production of δ -aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides*

Kyung-Min Choi, Wang-Jin Lim⁺ and Se-Young Hwang* (Department of Biotechnology, Korea University, Chochiwon, Choong Nam 339-800 and ⁺Institute of Biotechnology, Korea University, 1, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea)

Abstract : The effect of δ -aminolevulinic acid (ALA) biosynthetic precursors and related compounds on the ALA productivity from a strain of *Rhodobacter sphaeroides* has been examined *in vivo* and *in vitro* systems. The relative ratios of ALA productivities by C₄-pathway to that by C₅-pathway *in vivo* and *in vitro* systems were 0.78 and 1.37, respectively. Although the expression rates of C₄- and C₅-pathways in cell-free systems prepared after precursors supplemented cultivations were increased 1.35 and 1.52 folds, respectively, the rate increase of C₄-pathway was accompanied by the rate decrease of the C₅-pathway, and vice versa, as that the rates of both C₄- and C₅-pathways were lowered to be 0.91, 0.83, respectively. The order of cellular uptake rates of γ -glutamyl derivatives relative to that found with L-glutamic acid were shown to be D-glutamic acid, 0.55: D-glutamine, 0.5: L-glutamine, 0.4: γ -L-glutamyl ethylester, 0.3: GSH and Glu-pNA, 0. L and D configurations of glutamine were indicated as better substrates *in vivo* for ALA yields than those of glutamic acid, respectively.