

## *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74에 의한 $\delta$ -Aminolevulinic acid 생합성의 C<sub>5</sub>-전구물질의 영향

최경민 · 임왕진<sup>1</sup> · 황세영\*  
고려대학교 생물공학과, <sup>1</sup>생물공학연구소

### Influence of C<sub>5</sub>-Precursors on $\delta$ -Aminolevulinic Acid Biosynthesis in *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74

Choi, Kyung-Min, Wang-Jin Lim<sup>1</sup> and Se-Young Hwang\*

Department of Biotechnology, Korea University, Chochiwon, ChungNam 339-800, Korea  
<sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Korea University, 1, Anam-dong, Sungbuk-Ku, Seoul 136-701, Korea

**Abstract** — Aminolevulinic acid (ALA) was shown to be synthesized via active pathways of either C<sub>4</sub> or C<sub>5</sub> ALA biosynthesis in cells of a photosynthetic bacterium, *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74, where the C<sub>5</sub> pathway was appeared to be preferentially expressed in the cells. It was strongly suggested that L-glutamine might be utilized more effectively than L-glutamate to synthesize ALA via C<sub>5</sub> pathway in this bacterium from the fact of relationship between the cellular uptake rates of glutamate and its  $\gamma$ -derivatives and corresponded ALA productivities *in vitro* and *in vivo*.

$\delta$ -Aminolevulinic acid(ALA)는 생체내에서 hemes  
이나 chlorophylls 등, porphyrin 계 화합물의 주된  
전구물질로써(1, 2), 감광성의 기능을 갖고 있어서 빛  
의 존재하에서 pchlide 형태로 전환, 세포내의 인지  
질을 파괴 함으로 인하여 야기되는 세포의 사멸 속  
도가 쌍자엽식물 세포나 암 세포의 경우 각각 단자  
엽식물 세포나 정상 세포의 그것과 비교하여, *in*  
*vivo* 상에서 전자에만 선택적으로 강력한 항생 활성을  
나타낼 정도로 빠른 것으로 알려져 있다(3, 4). ALA는  
현재까지 비교적 복잡한 유기 합성법에 의존, 공급  
되고 있기 때문에 단가가 높아 fine chemical 로써만  
사용되고 있을 뿐, 의약이나 농약으로 응용되고 있지  
않다(5). 최근에 와서 미생물을 이용한 ALA의 대량  
생산법이(6, 7) 시도되고 있으나, 세포내의 ALA의 생  
합성 조절 기구가 명확히 밝혀져 있지 않기 때문에  
위의 방법을 합리적으로 이용하지 못해서 체계적으로  
ALA를 생산해 내지 못하고 있다. 세포내 ALA의 농도  
조절을 위하여 ALA의 전구물질(C<sub>4</sub> 경로: glycine,

succinyl-CoA; C<sub>5</sub> 경로: L-glutamate)(8, 9)과 cyclic  
tetrapyrrole의 농도(10), 혹은 ALA dehydratase 활성  
(11)이 중요한 요인으로 추정되고 있다. 이러한 관점  
에서, 본 연구는 *Rhodocyclus gelatinosus* 균주의 균  
체로부터 C<sub>5</sub> ALA 생합성 경로를 이용한 ALA의 효  
과적인 생산을 위하여 L-glutamine을 비롯한 gluta-  
mate 및  $\gamma$ -유도체의 전구물질로써의 가능성을 검토한  
것으로, 그 결과를 종합, 기술한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배양조건

토양으로부터 분리한 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-  
74(12)를 사용하였다. L-Glutamate가 제외된 Lascel-  
les의 기본배지(13)(D,L-malic acid 2.7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5  
g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O  
0.1 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 27 mg, MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.2 mg, ni-  
cotinic acid 1 mg, thiamine 1 mg, biotin 0.01 mg,  
중류수 1l, pH 6.8) 10 ml를 culture tube(2×20 cm)에  
넣고 rotary evaporator를 이용하여 air phase를 질  
소가스로 치환한 후, 균주를 접종하여, glass water

**Key words:**  $\delta$ -Aminolevulinic acid, C<sub>5</sub>-precursor,  
*Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74

\*Corresponding author

bath상에서 30°C, 4 Klux 조도의 조건으로 혐기적으로 정치 배양하였다. 배양 3일 후 전 배양액( $A_{660}=1.5$ ) 20 ml를 상동 배지 2l(2l용 Erlenmyer flask)에 주입 후 전 배양법과 동일한 조건으로 정치 배양하였다. 조도는 Illuminometer(SPI-5)로 조정하였으며, 균체의 증식도는 spectrophotometer(Hitachi Model 100-30)를 이용하여 660 nm에서의 흡광도로 나타내었다.

### In vitro ALA 생합성

前報에서와 동일한 방법(14)으로 대수 증식기의 배양액 2l( $A_{660}=0.9$ )를 4°C에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 수거한 균체를 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세정하였다. 세정된 균체를 농축하여 동일 buffer로 현탁, 4°C에서 French press (16000~18000 psi)로 균체를 파쇄한 후 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol/10 mM phosphate buffer(pH 7.0)를 첨가하여 최종 40 ml 용량의 세포 추출액이 되도록 하였다. Cell-free 반응액 2 ml(in 10 mM phosphate buffer, pH 7.0)에  $C_4$  경로를 이용한 ALA 생합성을 위하여 50 mM glycine, 50 mM Na-succinate, 370  $\mu$ M coenzyme A, 300  $\mu$ M ATP, 270  $\mu$ M pyridoxal phosphate 및 5 mM levulinate(LA)의 조성으로,  $C_5$  경로를 이용한 ALA 생합성을 위해서는 50 mM 혹은 100 mM의 Na-L-glutamate나 그  $\gamma$ -유도체, 300  $\mu$ M ATP, 500  $\mu$ M NADPH, 270  $\mu$ M pyridoxal phosphate 및 5 mM LA의 조성으로 한 후, 각각 30°C에서 반응하여, 적정 시간 단위로 100  $\mu$ l씩 취하여 실온에서 10% trichloroacetic acid 0.1 ml를 가하여 반응을 종결, 10,000 rpm으로 10분간 원심분리한 상등액 내의 ALA 양을 측정하였다.

### ALA의 정량 분석

ALA 분석은 Mauzerall 등의 방법(15)에 따랐으며, 생성된 착색 물질의 흡광도를 556 nm에서 측정 후 ALA standard curve ( $\epsilon_{556}=9,300 M^{-1}cm^{-1}$ )를 이용해서 ALA 양을 분석하였다.

### 아미노산의 세포막 투과 속도 측정

균체의 대수기 배양액( $A_{660}=0.9$ ) 30 ml를 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 분리한 균체를 10 mM phosphate buffer(pH 7.0) 10 ml로 현탁을 2회 반복 후 동 buffer로 균체를 희석 현탁, 현탁액 900  $\mu$ l에 10 mM의 L-glutamate, D-glutamate, L-glutamine, D-glutamine, glutathione-reduced(GSH),  $\gamma$ -L-glutamyl

ethylester( $\gamma$ -L-Glu-OEt) 및  $\gamma$ -L-glutamyl-p-nitroanilide( $\gamma$ -L-Glu-pNA) 각 100  $\mu$ l를 개별 혼합하여 반응액의 최종  $A_{660}$ 을 1.0으로 보정하였다. 30°C에서 uptake rate를 직접 측정하기 위하여 前報와 동일한 요령으로 반응액 100  $\mu$ l상의 균체 외에 잔존해 있는 아미노산을 5% sodium borate 용액(pH 9.5)내에서 2, 4, 6-trinitrobenzene-sulfonate(TNBS)와 반응, 30°C에서 30분 후 형성된 pycryl adduct에 의한 yellow color의 흡광도를 420 nm에서 측정하였다( $\epsilon_{420}=10,000 M^{-1}cm^{-1}$ )(16).

### 시약

ALA, LA, coenzyme A, ATP, pyridoxal phosphate, NADPH, *p*-dimethyl-aminobenzaldehyde, GSH,  $\gamma$ -L-Glu-OEt,  $\gamma$ -L-Glu-pNA, TNBS,  $\gamma$ -mercaptoethanol, L-glutamate 및 L-glutamine은 Sigma Chem. Co. (USA)로부터, D-glutamate는 Kokusan Chem. Co.(Japan), D-glutamine은 Nakarai Chem. Co.(Japan), trichloroacetic acid, 70% perchloric acid, glycine 및 Na-succinate는 Junsei Chem. Co.(Japan), glacial acetic acid는 Duksan Pharmaceutical Co.(Korea)로부터 각각 구입하였다.

## 결 과

### ALA 생합성 양식

생체내에서 glycine과 succinyl CoA가  $C_4$  ALA 생합성 전구 물질로써, L-glutamate가  $C_5$  ALA 생합성 전구 물질로써 각각 사용되고 있는 사실은 보편적으로 인식되고 있다(8, 9). 인위적으로 이 화합물 들의 세포내 농도를 증가시키면 비례적으로 ALA의 생합성 속도가 영향을 받게 되며, 세포외로의 ALA 분비량도 증가한다(10). 이 경우에 있어서 필수 요건은 ALA dehydratase의 활성을 억제시키는 것으로, 이 효소의 강력한 저해제인 levulinic acid(LA)는 세포내에서 ALA의 정상 half-life를 보전시키는 중요한 요인으로 작용한다(17). 토양에서 분리한 비 유황 광합성 세균류의 일종인 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 균주는 ALA 생합성을 위하여 일반적으로  $C_5$  경로를 이용하는 것으로 알려져 있으나(18), 前報에서 언급한 바와 같이 본 균주의 세포내에서는  $C_4$ 와  $C_5$  경로가 함께 발현하고 있다(12). 균의 증식 상태와는 관계없이 배양법에 의한 균체외로 분비되는 ALA 농도의 최대치만으로 비교 해보면 Table 1에서와 같이  $C_5$  전구물질

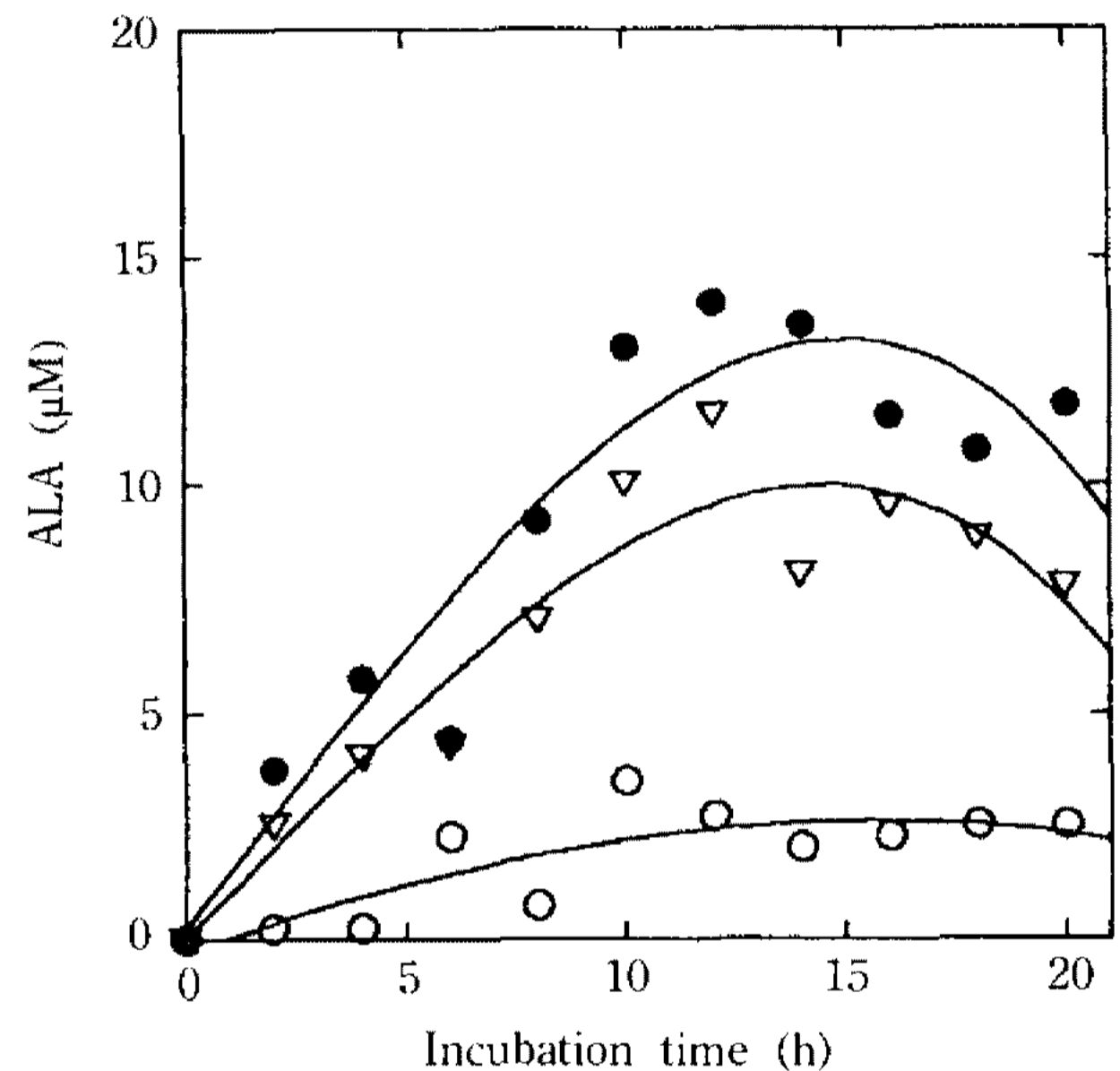
**Table 1. Increases in extracellular ALA production by supplementation of the C<sub>4</sub> and C<sub>5</sub> precursors during cultivation of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74**

Precursors	(mM)	Growth (O.D at 660 nm) by supplying at		ALA ( $\mu$ M) by supplying at	
		Initial	Mid-log	Initial	Mid-log
None		1.42	1.42	8	8
Glycine, Succinate	(10, 10)	1.25	1.14	21	183
L-Glutamate	(30)	1.40	1.42	144	204

Each precursors were added initially, or at the mid-log phase (72 h) of cell growth, to basal medium containing 10 mM LA. Determination of cell growth and extracellular amount of ALA was carried out after 96 h of cultivation.

첨가 배양으로 C<sub>4</sub> 전구물질 첨가 배양에 의한 ALA 양보다 배양 초기에의 첨가로써 약 7배, 대수기에의 첨가로써 약 1.1배의 생산의 유도 효과를 보였다. 반면에, 세포 추출물을 이용한 *in vitro* 계에 의한 양 경로 활성이 C<sub>4</sub> 경로가 전구물질 미첨가 대비로써 5.4배, C<sub>5</sub> 경로가 4.8배를 나타내었으나(Fig. 1), *in vitro* 반응계에서 관련 효소들의 안정성이 고려되지 않았으므로 위의 활성비는 배양법에 의한 그것과는 직접적인 연관성이 결여되어 있는 것으로 생각된다. 한편, 균체의 mid-log phase 배양시기에 전구물질 첨가가 본 균주의 ALA 생합성에 관련하고 있는 각 효소계의 활성을 증가시키는가에 관하여 *in vitro*와 *in vivo*를 연계시켜 검토해 본 결과, 각 전구 물질의 첨가 배양에 의하여 야기된 *Rhodobacter sphaeroides*의 균체내 ALA 생합성계의 활성 증가 효과(14)와 유사한 결과를 보였다(Table 2). 또한, C<sub>4</sub> 및 C<sub>5</sub>의 전구물질들을 동시에 첨가한 경우, 오히려 어느 한편의 전구물질 첨가에 의한 것보다도 양계의 활성도가 모두 낮아짐으로써, *Rhodobacter sphaeroides*의 균체내 C<sub>4</sub> 및 C<sub>5</sub> ALA 생산계의 발현이 서로 밀접한 억제 조절 상태에 있는 양상과 매우 흡사한 것으로 판단 되었다.

ALA 생산에 미치는 glutamate 및  $\gamma$ -유도체의 효과  
균체 배양의 대수기에 10 mM LA의 존재하에서 30 mM L-glutamate를 첨가하는 방법이 ALA 생산에 있어서 가장 효과적이었으므로(Table 1), 관련 화합물들을 이와 동일 요령으로 첨가 배양 해본 결과 L-glutamine이 L-glutamate보다 ALA 생산성에서 약간 증가하는 특이적인 결과를 보인 것 이외에는 기타 화합물의 첨가로 인하여 균체의 증식이 억제 됨은 물론, 균체의 ALA의 농도를 결정하는 요인으로도 작용하지 않았다(Fig. 2a, 2b). 이 결과는, 단백질을 구성하는



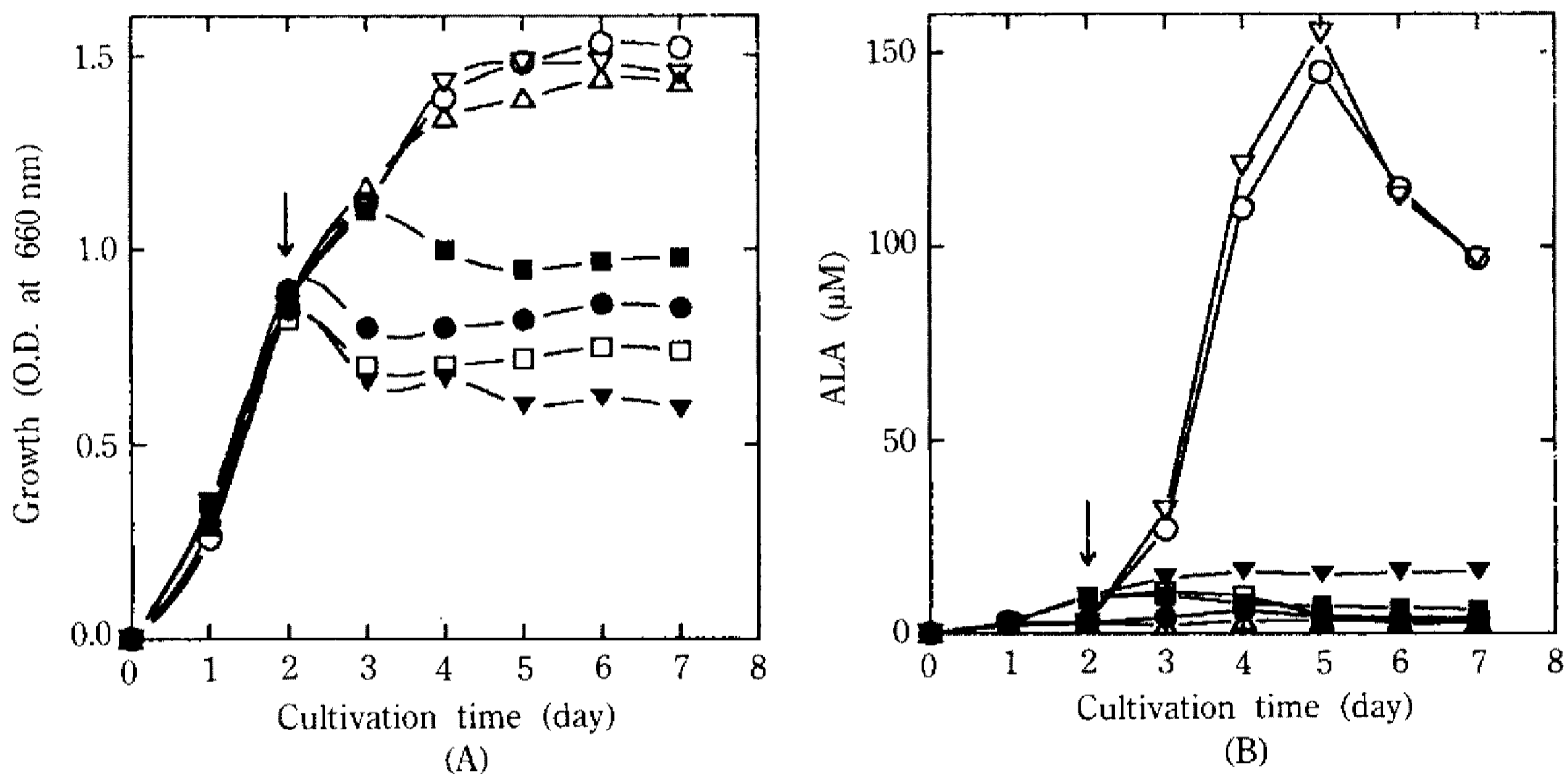
**Fig. 1. Precursor dependent ALA biosynthesis in the cell-free extracts of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74.** Time course analysis of ALA generation *in vitro* was carried out in the absence (○) or presence of 50 mM C<sub>4</sub> (●) or C<sub>5</sub> (▽) precursors. Cell-free extracts were prepared from the concentrated cell suspension (O.D. 3.0 at 660 nm) by French press as described in the text. For other conditions, see 'Materials and Methods'.

아미노산으로서의 L-glutamine을 제외하고는 영양 증식 상태의 세포가 L-glutamate를 대사하는 과정에서 이 화합물 들이 길항 저해 효과를 나타내거나, 이들의 misreading에 기인하고 있는 것으로 사료된다. 이와같은 관점으로부터 균 증식의 억제가 직접적으로 ALA 생산 저하 효과를 초래하는가의 여부를 확인하기 위하여 영양이 결여된 휴지 상태의 intact cells을 이용하여 위 화합물 들이 cell mass와 ALA 생산에 미치는 효과를 검토하였다(Fig. 3). Intact cells이 D-glutamine에 의하여 현저한 용균 현상을 보인 반면, D,L-

**Table 2. Effect of precursors supplemented cultivation on the ALA forming rates in cell-free extracts of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74**

Precursors	Conc. (mM)	ALA forming rates( $V_0$ ) <sup>a)</sup> by using		
		C <sub>4</sub> pathway	C <sub>5</sub> pathway	Control <sup>b)</sup>
None		1.2(1.7)	1.0(1.3)	0.2(0.5)
Glycine + Succinate	10(60)	1.8(2.3)	1.2(1.1)	0.3(0.5)
L-Glutamate	30(30)	1.1(1.6)	1.7(2.0)	0.3(0.5)
C <sub>4</sub> +C <sub>5</sub> precursors	10 + 30(60 + 30)	1.5(1.7)	1.3(1.8)	0.3(0.5)

a) The values of initial velocity ( $V_0$ ) indicating moles of ALA formed in 1 ml of cell-free extract per hour were estimated by the method of extrapolation of rate decreases in the ALA biosynthesis followed by time course plotting of extracellular ALA contents in the course of the reactions as described in 'Materials and Methods'. Conditions of the systems in which ALA was synthesized *in vitro* were in 'Materials and Methods' except the control, b) that the system contained no cofactors for enzyme activities involved in both pathways. For comparison, the above experiment was performed simultaneously using the cell-free extracts of *Rhodobacter sphaeroides* and the resulted data were presented in parentheses.

**Fig. 2. Effect of glutamate and its  $\gamma$ -derivatives on the growth and ALA production of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74.**

A, Cell growth; B, Extracellular ALA production.

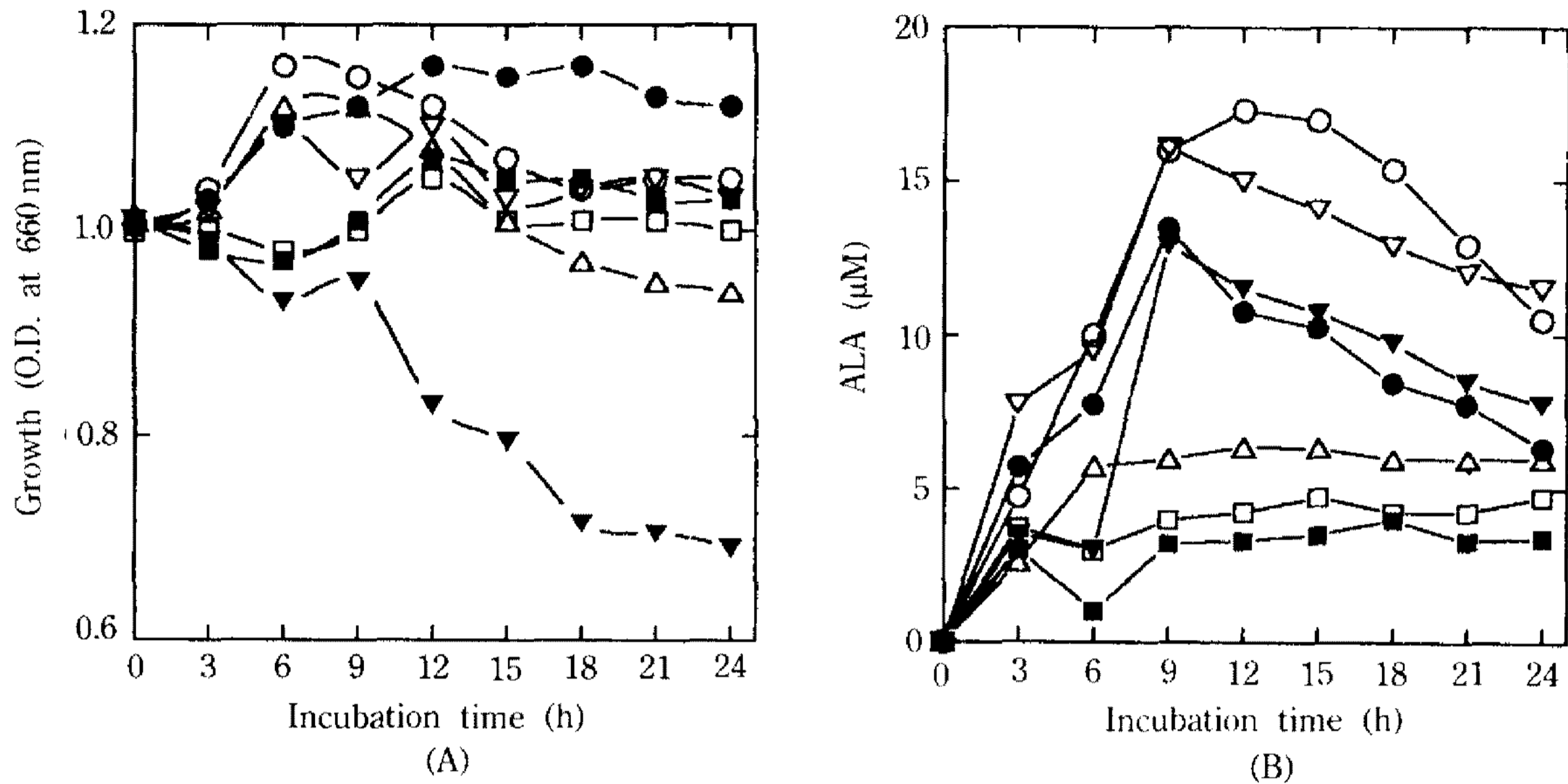
Arrows indicate the time to add 30 mM of each compounds along with 30 mM LA. Symbols used for L-glutamate, (○); D-glutamate, (●); L-glutamine, (▽); D-glutamine, (▼); GSH, (□);  $\gamma$ -L-Glu-OEt, (■); no addition, (△).

glutamate 등에 의해서는 cell mass가 약간 증가 하였다(Fig. 3b). 한편, GSH와  $\gamma$ -L-Glu-OEt는 ALA 생산에 있어서 억제 효과를 나타내었으나 그 외의 화합물에 의하여 일률적으로 ALA 생산이 증가하는 결과를 보였다(Fig. 3a).

#### Glutamate 및 $\gamma$ -유도체의 세포막 투과 속도

Glutamate 및  $\gamma$ -유도체가 ALA 생산에 미치는 위의 결과는 직접 균체를 사용한 관계로, 단위 시간내에

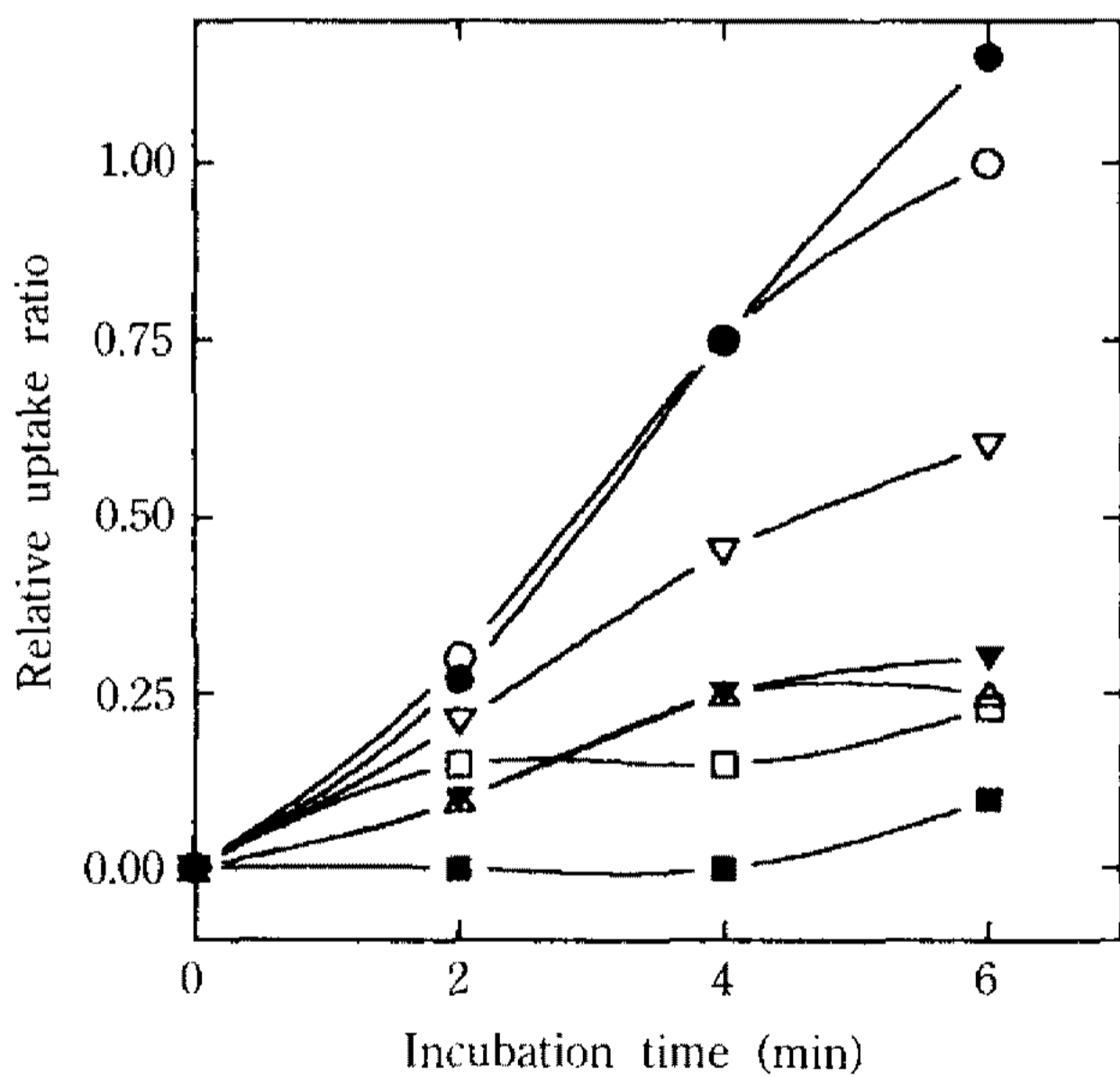
이 화합물 들의 세포내 수용 능력이 고려되지 않았으므로 이들 각 화합물의 세포내 ALA 생합성에 관련한 전구물질로써의 가능성 여부를 명확히 분석하기 위하여 세포막 투과 속도를 측정하였다(Fig. 4). 이 결과에서 단위 시간내의 세포내 pool은 D-glutamate가 가장 높았으며,  $\gamma$ -L-Glu-OEt의 세포내 진입은 전혀 확인할 수 없었다. L-Glutamine이 L-glutamate에 비교하여 약 60%의 세포내 pool을 형성 함에도 불구하고 Fig. 2b, Fig. 3b 등의 결과에서와 같이 L-gluta-



**Fig. 3. Effect of glutamate and its  $\gamma$ -derivatives on the growth and ALA production in intact cell system of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74.**

A, Cell growth; B, Extracellular ALA production.

1 ml of intact cell systems were consisted of initial concentrations of 50 mM each of compounds along with 10 mM LA and 0.35 mg dry cells ( $A_{660}=1.0$ ) in 10 mM phosphate buffer, pH 7.0, and incubated at 30°C. Symbols used for L-glutamate, (○); D-glutamate, (●); L-glutamine, (▽); D-glutamine, (▼); GSH, (□);  $\gamma$ -L-Glu-OEt, (■); no addition, (△).



**Fig. 4. Discrimination of cellular uptake rates of glutamate and its  $\gamma$ -derivatives in intact cell system of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74.**

Relative uptake rates were shown by percent ratios of uptake rates of the compounds relative to that of 1 mM L-glutamate. Uptake rates were calculated from the residual amounts of primary amino groups in extracellular spaces as described in 'Materials and Methods'. Symbols used for L-glutamate, (○); D-glutamate, (●); L-glutamine, (▽); D-glutamine, (▼); GSH, (□);  $\gamma$ -L-Glu-OEt, (■);  $\gamma$ -L-Glu-pNA, (△).

**Table 3. Effect of glutamate and its  $\gamma$ -derivatives on the ALA forming rate in cell-free extracts of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74**

Compound	Conc. (mM)	Maximum ALA yield at (h)	ALA forming rates ( $V_0$ ) (nmole/ml/h)
L-Glutamate	100	10	1.1
D-Glutamate	100	10	0.95
L-Glutamine	100	8	1.21
D-Glutamine	100	8	0.81
GSH	100	8	0.9
$\gamma$ -L-Glu-OEt	100	8	1.0

For condition, see Table 2.

mate와 동등한 정도의 ALA 생산의 증가 효과를 보인 점은 특기할 만한 것으로 생각되었다. 즉, ALA 생합성의 C<sub>5</sub> 전구물질로써 L-glutamine이 L-glutamate에 우선하는 것으로 추정되었다.

**Glutamate 및  $\gamma$ -유도체에 의한 *in vitro* ALA 생합성 유도**

前報에서 *Rhodobacter sphaeroides*의 *in vivo*상에서 glutamyl t-RNA synthetase가 축합 반응 활성 이외에 가수분해 활성도 갖고 있는 것으로 보고한 바 있다

(14). 이 효소의 성질에 관해서 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 균주의 결과도 위에서 언급한 것과 같이 같은 양상을 보였다. 이러한 관점에서 이 효소의 기질 특이성을 한층 구체적으로 알아보기 위하여 세포 추출물이 glutamate 및  $\gamma$ -유도체를 이용하여 ALA를 생합성하는 속도를 검토한 결과를 Table 3에 요약하였다. 표에서와같이 L-glutamine에 의한 ALA 생합성의 초기 속도가 가장 빨랐으며, ALA 농도의 최대치에의 도달 소요 시간도 D,L-glutamine에 의해서 8시간, D,L-glutamate에 의해서 10시간으로 나타났다.

## 고 찰

본 연구에 사용한 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 균주의 세포내 ALA 생합성은 C<sub>4</sub>와 C<sub>5</sub> ALA 생합성 경로가 각각 switch on 상태로 병존하고 있으므로(12), levulinic acid의 존재하에서 해당 전구물질 농도의 인위적 증가로 ALA의 세포외 분비가 비례적으로 유도되는데(Table 1), 양 경로에 속하는 전구물질들의 세포내 농도를 동시에 증가시키면 ALA의 분비 유도 현상에 있어서 yield의 상승 현상은 관찰 되지 않았다. 따라서, 본 균주를 이용한 ALA의 생산을 효과적으로 행하기 위해서 양 경로에 관여하는 전구물질 중 발현도가 보다 높은 C<sub>5</sub> 경로의 전구물질에 관하여 검토하게 되었다. 저자들은 이미, ALA의 생산성을 결정하는 우선적인 요인인 전구물질 즉, L-glutamate 이외의 가능한 전구물질에 관하여 *Rhodobacter sphaeroides*를 사용하여 검토한 바 있는데(14), L-glutamine이 L-glutamate보다 높은 ALA의 생산 유도효과를 나타내었다. 동 실험을 배양계와 intact cell계로부터 본 균주에 의한 균체의 ALA 생산성을 조사해 본 결과, 위 두 종류의 아미노산에 의하여 동등한 효과를 나타낸 반면(Fig. 2, 3), 단위 시간 내의 세포내 pool에 있어서 현격한 차이를 나타냄으로써(Fig. 4) 본 균주의 C<sub>5</sub> 경로에 의한 ALA 생합성계가 전구물질로써 보편적으로 인식되고 있는 L-glutamate 이외에 L-glutamine과 같은 기타의 5-carbon 골격 화합물을 직접 이용할 것으로 추정된다. 이와같은 추측은 Table 1에서와 같이 cell-free extract 상의 ALA 생합성 초속도가 L-glutamine에 의한 것이 가장 빠르며, 이 경우 ALA 양의 최대치에의 도달 소요 시간(8시간)도 L-glutamate에 의한 것보다 2시간 빠른 사실로부터 한층 강하게 제기되고 있다. 따라서 C<sub>5</sub> 경로에 속하는 3종의 효소 중 제 1효소로 알려져 있는 glutamyl t-

RNA synthetase가 촉합 반응 이외에 가수분해 활성을 함유하고 있는 것으로 판단된다(14). 본 연구로부터 제기된 C<sub>5</sub> ALA 생합성 경로의 전구물질인 L-glutamate 이외의 사용 가능한 전구물질에 관하여 현재까지 비유황 광합성 세균류에서만 확인되었으므로(14), 향후 다양한 생물 종에 걸친 검토가 요구된다. 또한, glutamate 및  $\gamma$ -유도체들의 적절한 활용은 C<sub>5</sub> 경로를 이용한 ALA의 대량 생산을 위하여 중요한 요인으로 작용할 것으로 사료된다.

## 요 약

광합성 세균인 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74에 의한  $\delta$ -aminolevulinic acid(ALA)의 생산을 위하여 C<sub>4</sub>와 C<sub>5</sub> ALA 생합성 경로가 활성형으로써, C<sub>5</sub> 경로가 C<sub>4</sub> 경로에 우선하였다. C<sub>5</sub> 경로 전구물질들의 세포막 투과 속도와 이들에 의한 균체의 ALA 생산성의 상관관계를 *in vitro* 및 *in vivo*계를 이용하여 검토한 결과, 본 균주의 C<sub>5</sub> 경로를 이용한 ALA 생합성을 위하여 L-glutamine이 L-glutamate보다 효과적인 전구물질로 판단되었다.

## 감사의 말

이 논문은 1993년도 한국 학술진흥재단의 공모과제 연구비의 일부에 의한 것으로 이에 감사드립니다. 본 연구 수행에 많은 도움을 준 이 항우 박사에게 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Shemin, D. and C.S. Russell. 1953.  $\delta$ -Aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Amer. Chem. Soc.* **75**: 4873-4874.
2. Gibson, K.D., W.D. Laver, and A. Neuberger. 1958. Initial stages in the biosynthesis of porphyrins: Formation of  $\delta$ -aminolevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. *Biochem. J.* **61**: 618-620.
3. Rebeiz, C.A., A. Montazer-Zouhoor, H. Hopen, and S.M. Wu. 1984. Photodynamic herbicide: Concept and phenomenology. *Enz. Microb. Technol.* **6**: 390-401.
4. Chakraborty, N. and B. C. Tripathy. 1992. Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid

- induced photodynamic damage of cucumber (*Cucumis sativus* L.) chloroplasts. *Plant Physiol.* **98**: 7-11.
5. Sasaki, K., Y. Nishizawa, and M. Hayashi. 1987. Production of  $\delta$ -aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Ferment. Technol.* **65**: 511-515.
  6. Sasaki, K., I. Tanaka, Y. Nishizawa, and M. Hayashi. 1990. Production of a herbicide, 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent of swine waste from an anaerobic digester. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**: 727-731.
  7. Choi, K.M., W.J. Lim, and S.Y. Hwang. 1992. Production of  $\delta$ -aminolevulinic acid by *Rhodocyclus gelatinosus* strain KUP-74. *J. Inst. Biotechnol., Korea Univ.* **4**: 37-42.
  8. Leong, S.A., G.S. Ditta, and D.R. Helinski. 1982. Heme biosynthesis in *Rhizobium*: Identification of a cloned gene coding for  $\delta$ -aminolevulinic acid synthase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* **257**: 8724-8730.
  9. Beale, S.I., S.P. Gough, and R.S. Granick. 1975. Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**: 2719-2723.
  10. Gills, H., R. Jaenchen, and R.K. Thauer. 1983. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **135**: 237-240.
  11. Beale, S.I. 1970. The biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid in *Chlorella*. *Plant Physiol.* **45**: 504-506.
  12. Hwang, S.Y., K.M. Choi, W.J. Lim, B.S. Hong, H.Y. Cho, and H.C. Yang. 1992. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 and its characteristic in  $\delta$ -aminolevulinic acid production. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **35**: 210-217.
  13. Lascelles, J. 1956. The synthesis of porphyrin and bacteriochlorophyll by cell suspensions of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem. J.* **62**: 78-93.
  14. Choi, K.M., W.J. Lim, and S.Y. Hwang. 1993. Effect of glutamic acid and its  $\gamma$ -derivatives on the production of  $\delta$ -aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **36**: 184-190.
  15. Mauzerall, D. and S. Granick. 1956. The occurrence and determination of  $\delta$ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* **219**: 435-436.
  16. Ryang, J.H. and S.Y. Hwang. 1992. Production mode of amidase and esterase in *Bacillus* sp. strain KUN-17. *J. Inst. Biotechnol., Korea Univ.* **4**: 43-47.
  17. Sasaki, K., I. Tanaka, Y. Nishizawa, and M. Hayashi. 1990. Enhanced production of 5-aminolevulinic acid by repeated addition of levulinic acid and supplement of precursors in photoheterotrophic culture of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Ferment. and Bioeng.* **71**: 403-406.
  18. Avissar, Y.J., J.G. Ormerod, and S.I. Beale. 1989. Distribution of  $\delta$ -aminolevulinic acid biosynthetic pathways among phototrophic bacterial groups. *Arch. Microbiol.* **151**: 513-519.

(Received November 1, 1993)