

δ -Aminolevulinic Acid 생산 광합성세균의 분리 및 배양특성

정대열¹ · 최양문 · 조홍연* · 양한철

¹오뚜기 종합연구소, 고려대학교 생명공학연구소, 고려대학교 생명공학원

초 록: 광합성세균을 이용하여 생물체초제의 하나인 δ -aminolevulinic acid(ALA)를 생산할 목적으로 자연계로부터 ALA 생산능력이 우수한 균주를 분리하고 ALA의 최적생산에 미치는 일부 배양특성을 검토하였다. 선정균주 KK-10을 동정한 결과 홍색비유황세균에 속하는 *Rhodobacter capsulatus*로 판명되었다. 본 균주의 ALA 생산성을 높이기 위하여 ALA 탈수효소의 저해제인 levulinic acid(LA)를 15 mM 농도로 배양중기에서 배양액에 첨가함으로써 ALA의 생산량은 약 20배(28 mg/l) 증가되었다. ALA의 전구물질인 glycine과 succinate를 각각 30 mM 복합첨가할 때 약 50배(73 mg/l) 생산량을 나타내었고 전구물질의 첨가에 의해 ALA 합성효소의 생합성량은 2배 증가하였다. 분리균주는 전구물질 함유 배지에 15 mM LA를 대수기 중기부터 4회 연속첨가함으로써 85 mg/l의 균체의 ALA를 생산하였다.(1997년 10월 13일 접수, 11월 21일 수리)

서 론

ALA는 porphyrin, heme, vitamin B₁₂ 등과 같은 cyclic tetrapyrrole 화합물 생합성계의 중간대사 물질로 C₄ pathway나 C₅ pathway에 의해 생합성되는 것으로 알려져 있다.¹⁾ C₄ pathway는 glycine과 succinyl-CoA로부터 ALA 합성효소(ALAS, ALA synthase)에 의한 축합반응으로 주로 동물, 진균, 광합성세균 등에서 발견되고 있으며²⁻⁵⁾ C₅ pathway는 glutamate의 intact five-carbon chain으로부터 aminotransferase에 의한 생합성경로로 식물, 조류 등의 세포내에서 발견되어지고 있다.⁶⁻⁹⁾ 생물체초제로서 주목을 받아온 ALA는 저분자의 아미노산 유도체임에도 불구하고 비교적 복잡한 단계를 거쳐 유기합성되어지므로 체초제로 이용하기에는 현재 생산단가가 높은 실정에 있다. 또한 미생물을 이용한 고농도 배양방법, ALA의 균체의 최대 분비조건 및 분비된 ALA의 침전조건 등이 *Metanobacterium thermoautotrophicum*,¹⁰⁾ *Chlorella vulgaris*,⁸⁾ *Chlamydomonas reinhardtii*,¹¹⁾ *Rhodobacter sphaeroides*¹²⁾ 등을 대상으로 검토되었고, aminotransferase를 이용한 4,5-dioxovalerate-alanine계의 효소 합성법이 보고된 바 있으나¹³⁾ 아직 실용화되지 못하고 있다.

광합성세균은 광합성 색소의 성질에 따라 green bacteria와 purple bacteria로 크게 구별되는데, 홍색 비유황 광합성세균(Rhodospirillaceae)은 각종 유기물을 탄소원 및 광합성 반응의 전자 공여체로 이용하는 광합성 종속 영양균으로 혐기성, 호기성의 조건에서도 생육하는 특성을 지니고 있다.¹⁴⁾ 홍색 비유황 광합성세균의 ALA 생합성 경로는 C₄ pathway(Shemin pathway)로 기질 analogue인 LA 및 succinyl acetone은 ALA 탈수효소의 저해제로 작용하여 levulinic acid의 첨가에 의해서 ALA가 균체외로 분비됨이 보고되고 있다.¹⁵⁾

본 연구에서는 최근 고농도 유기폐수처리공정에 도입되고 있는 광합성세균을 ALA 생산균주로 이용함으로써 폐수의 정화처리와 동시에 폐수를 배양기질로 한 발효적 ALA 생산법을 개발할 목적으로 자연계로부터 ALA의 균체의 생산능이 우수한 광합성세균을 분리 선정하고 ALA 생산성에 미치는 일부 배양특성을 검토하였다.

재료 및 방법

생산균주의 분리

ALA 생산성이 우수한 균주의 분리는 1차로 토양, 연못, 논 등에서 채취한 시료로부터 Lascelle¹⁶⁾의 glutamate-malate 한천배지를 사용, 배양온도 30°C, 혐기적 광조건(3,000 lux)에서 광합성세균을 분리한 후 동일한 배양조건에서 액체배양에 의해 생육활성이 높은 65균주를 2차로, ALA생산능을 보인 21균주를 3차로 분리하였다. 최종균주는 액체배지에 ALA 탈수효소 저해제인 LA를 배양초기와 중기에 첨가하여 안정적인 ALA 생산능과 높은 생육활성을 나타내는 균주를 선별하였다.

분리균주의 동정

분리균주의 동정은 "Bergey's Manual of Systematic Bacteriology"¹⁷⁾와 "Manual of Methods General Bacteriology"¹⁸⁾에 준하여 실시하였으며 균주동정을 위한 배지는 Ormerod medium¹⁹⁾을 사용하였다. 혐기적 광조건 배양은 15 ml screw captube와 회전진탕배양기를 사용하여 3,000 lux, 30°C, 50 rpm에서 배양하였다.

배양방법

균의 분리시 사용한 glutamate-malate 최소배지를 기본

찾는말 : δ -aminolevulinic acid, *Rhodobacter capsulatus*, 광합성 세균
*연락처

배지로 상기의 액체배양과 같이 전배양을 실시한 후 50 ml Rhoux bottle 또는 70 ml의 screw captube를 사용하여 전배양액 2%(v/v)를 접종, 전배양과 동일하게 본배양하였다. 배양장치는 100 W 텅스텐 전구가 부착된 growth chamber 또는 회전진탕배양기를 사용하였으며 조도는 광도계로 조정하였다.

ALA의 정량

Mauzerall 등²⁰⁾의 방법에 준하여 다음과 같이 정량하였다. 배양액을 원심분리하여 얻은 상등액 0.5 ml에 1 M Na-acetate buffer(pH 4.7) 0.5 ml와 acetyl acetone 50 ml를 첨가하고 15 분간 water bath 상에서 100°C 가열한 후 실온까지 냉각하고 Erlich's Reagent(1 g의 ρ -dimethylamino-benzaldehyde을 42 ml의 빙초산과 8 ml의 70% perchloric acid에 녹인 용액) 3.5 ml를 가하여 20 분간 실온에서 방치하였다. 냉각시 형성된 2-methyl-3-acetyl-3-propionic acid pyrrole과 Erlich's reagent에 의해 생성된 착색물의 흡광도를 556 nm에서 측정하여 다음 작성된 ALA의 검량선으로부터 환산 정량하였다.

균체량 및 bacteriochlorophyll의 측정

균체량은 whole cell의 bacteriochlorophyll a 흡수 spectra로부터 가장 작은 간섭을 갖는 파장인 660 nm에서 측정하였으며 균주의 bacteriochlorophyll은 acetone : methanol = 7 : 2의 용매로 추출한 후 770 nm에 흡광도를 측정하였다.

ALA합성효소의 활성측정

균체내 ALA 합성효소의 활성은 Burnham 등²¹⁾의 방법에 따라 다음과 같이 측정하였다. 효소반응계는 glycine 100 μ mol, succinate 100 μ mol, pyridoxal phosphate 0.5 μ mol, CoA 0.5 μ mol, ATP 10 μ mol, Tris-HCl buffer(pH 7.0) 50 μ mol에 조효소액을 가하여 total volume 1 ml로 구성하였다. 조효소액은 0.04 M Tris-HCl buffer로 균체를 현탁시켜 19 KHz에서 20 분간 초음파처리(Seiko-Biom'c 7500 Ultrasonic Oscillator)로 균체를 파쇄한 후 14,000 x g에서 원심분리에 의해 얻은 상등액으로 하였다. 효소활성은 상기 반응계를 37°C에서 60 분간 반응시키고, 10% trichloroacetic acid 0.1 ml를 첨가하여 반응을 종결시킨 후 반응 상등액 중의 ALA를 상기의 Mauzerall²⁰⁾ 방법을 사용하여 측정하였다. ALA 합성효소 1 unit는 60분 동안에 1 μ mol의 ALA를 생성시킬 수 있는 효소의 양으로 정의하였다. 효소의 비활성을 위한 단백질은 bovine serum albumin을 표준 물질로 하여 Lowry 등²²⁾의 방법에 따라 정량하였다.

결과 및 고찰

ALA 고생산균주의 선정

무독성과 선택적 제초성의 아미노산 유도체 ALA를 균체외로 다량 생산하는 광합성세균을 분리하기 위해 ALA 생산능을 보인 후보균주 21주를 대상으로 ALA탈수효소

Table 1. ALA production of photosynthetic bacteria isolated in the synthetic medium

Strains	ALA (mg/L)			
	Addition of LA at initial log phase		Addition of LA at middle log phase	
	5 days	5 days	5 days	5 days
NUP	3.2	5.3	6.2	11
NO-34	3.0	5.7	13	18
KK-16	5.8	8.2	5.1	0.5
KK-14	3.1	6.0	0.1	6.0
NDR	2.2	5.9	0	2.8
DY-6	4.6	4.9	1.4	7.3
DY-32	3.8	5.0	1.0	0.6
DY-31	13	8.1	7.2	4.4
DY-27	0	5.9	2.7	14
KK-10	4.6	11	19	21
HY-5	0.9	12	3.4	7.6
DY-33	6.0	11	0	8.0
JU-1	0.5	6.2	3.0	10
HAP	9.3	10	0.7	13
B-2	5.3	8.0	0	8.1
JU-2	5.1	9.0	4.6	4.4
J-3	8.8	11	3.7	14
DY-7	14	13	2.6	8.4
DY-5	5.3	0.8	7.6	20
NO-24	1.3	9.7	0.4	12
DY-9	1.9	5.4	5.0	20

LA was added with a concentration of 10 mM.

저해제인 LA를 배양중에 첨가하여 ALA의 생산활성을 검토하였다. Table 1에서와 같이 대수기 초기와 중기에 각각 10 mM LA를 첨가한 후 배양 5일과 7일에서의 ALA 생산능을 조사한 결과 두 비교군 모두 7일 배양시 높았으며 초기보다는 중기 첨가시기가 우수하였다. 20 ml 이상의 생산량을 보인 5균주의 ALA 생산특성은 LA의 초기 또는 중기 첨가에 따라 큰 생산량 차이를 보임으로써 LA의 첨가시기에 의존적임을 알 수 있었다. 최종균주의 선정을 위해 5균주를 대상으로 LA 무첨가시, LA의 생육기별 첨가 및 농도별 첨가에 의한 ALA의 생산능과 생산안정성, 균체의 생육도 등을 검토하였으며 이들 중 가장 우수한 KK-10 균주를 선정하였다.

선정균주의 동정

선정균주 KK-10의 형태적 특성은 편모를 갖는 그람음성 무포자 간균(직경 1.2 μ m)으로 2분열에 의해 증식하였고 운동성과 점성을 나타내었다(Fig. 1). 또한 혐기적, 호기적 조건에 관계없이 모두 성장하였으며, 혐기적 조건에서는 진한 선흘색을 띄었으나 암조건에서는 희미한 갈색을 나타내었고 혐기적 명조건에서 생육한 균체는 purple nonsulfur bacteria의 공통적인 색소, bacteriochlorophyll a를 갖고 있었다. Catalase는 양성이었으며, nitrate를 환원시켰으나 전분이나 casein을 가수분해시키지는 못하였고 gelatin을 액화시키지 않음을 알 수 있었다(Table 2). Ormerod medium의 yeast extract를 vitamin free의 casamino acid로 대체한 후 growth factor로서 비타민의 요구성을 검토한 결과

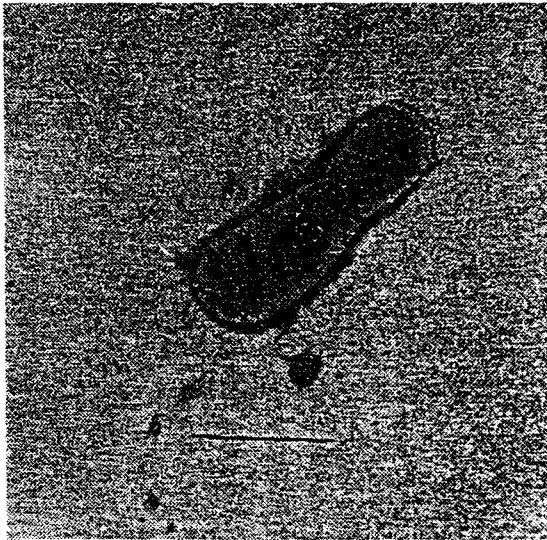


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the isolated strain KK-10 (bar : 1 μm).

Table 2. Cultural and physiological characteristics of the selected strain KK-10

	Stain KK-10	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
Growth		
anaerobic, light	+	+
anaerobic, dark	+	+
aerobic, light	+	+
aerobic, dark	+	+
Pigment		
anaerobic, light	purple red	purple red
anaerobic, dark	pale brown	pale brown
aerobic, light	pale red	pale red
aerobic, dark	pale brown	pale brown
Bacteriochlorophyll of living cells	a (866, 806, 590 nm)	a (866, 806, 590 nm)
Gelatin liquefaction	-	-
Starch utilization	-	-
Catalase activity	+	+
Hydrogen sulfide formation	+	+
Casein utilization	-	-
Nitrate reduction	-	-

thiamin과 nicotinic acid를 첨가하였을 때 높은 균체생육을 보였으며 thiamin과 nicotinic acid의 복합첨가시 이들 비타민의 단독첨가시 보다 균체생육에 있어 상승효과를 보임으로써 선별균주의 growth factor는 thiamin과 nicotinic acid로 판단되었다. 본 균주는 Ormerod medium에서 thiosulfate를 비롯한 유황화합물의 첨가에 의해 생육저해 현상을 보임에 따라 비유황세균으로써 Rhodospirillaceae과에 속함을 알 수 있었으며 thiamin과 nicotinic acid를 growth factor로 요구하고 있는 점, gelatin을 액화하지 못하는 점과 앞서 검토한 형태학적 배양학적 성질로 보아 1차로 *Rhodobacter*속으로 동정하였다. 분리균 KK-10을 Bergy's Manual상의 *Rhodobacter*속과 탄소원 및 전자공여체의 이용성을 비교한 결과 분리균주 KK-10은 glycerol과 tartarate 이용성에서 *Rhodobacter capsulatus*와 상이한 결과

Table 3. Utilization of electron donors and organic compounds by the selected strain KK-10

Carbon source or electron donors ^{a)}	Stain KK-10	<i>Rhodobacter capsulatus</i>
Arginine	+	NT
Citrate	+	+
Fructose	+	+
Glucose	+	+
Glycerol	+	-
Sorbitol	+	±
Tartarate	+	-
Methanol	±	-
Mannitol	+	+
Formate	+	+
Ethanol	+	±
Benzoate	-	-
Lactate	+	+
Pyruvate	+	+
Acetate	+	+
Butyrate	+	+
Malate	+	+
Succinate	+	+
Propionate	+	+
Sulfur	-	-

^{a)} Substrate were added with a concentration of 0.1% (w/v) +, Growth; ±, Substrate utilized to a some degree; -, No growth; NT, Not tested.

를 나타내었을 뿐 앞서 검토한 형태학적, 배양학적 성질이 *Rhodobacter capsulatus*이거나 근연의 변종인 것으로 동정하였다(Table 3).

ALA탈수효소 저해제의 첨가효과

LA는 ALA탈수효소의 저해제로서 광합성세균의 필수 세포구성성분인 bacteriochlorophyll, vitamin B₁₂ 등 tetrapyrrole 생합성경로를 조절하는 기능을 갖는다.¹⁵⁾ 합성배지에서 ALA의 생산성을 증가시키기 위해 10 mM 농도의 LA를 배양초기, 대수기 중기, 대수기 말기에 각각 첨가하여 첨가시기에 따른 균의 생육과 ALA 생산량의 변화를 검토한 결과 균체량은 모두 LA의 첨가에 의해 낮아졌으며 균체외로 분비되는 ALA의 생산량은 대수기 중기 첨가시 무첨가시에 비해 높은 생산량을 나타내었다(Fig. 2). 이는 ALA 탈수소효소 저해제인 LA의 첨가가 ALA의 균체외 생

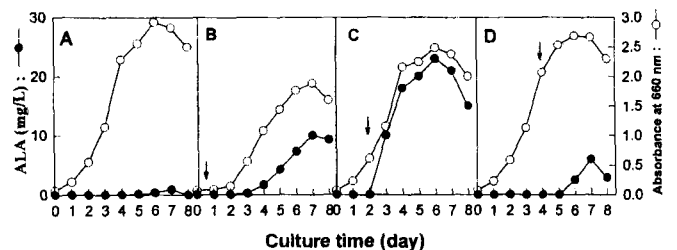


Fig. 2. Effects of LA addition time on cell growth and ALA production by *Rhodobacter capsulatus* KK-10. Cultivation was anaerobically carried out at 30°C under 3,500 lux. Arrow indicates the addition time of 10 mM LA. A, No addition; B, LA addition at beginning of culture; C, LA addition at middle log phase; D, LA addition at late log phase.

산을 위해 필수적이지만 cyclic tetrapyrrole 생합성계의 조절시기에 따라 본 균주의 생육저해제로도 작용하고 있는 점과 대수기 말기 이후에는 균의 생육을 위한 ALA의 생합성 요구도가 저하됨으로써 균체외로 생산되는 ALA의 양이 감소되고 있음을 알 수 있었다. Gills 등²³⁾은 C₄와 C₅ pathway로부터 각각 합성된 ALA는 ALA탈수효소에 의하여 porphobilinogen으로 전환되어지나 이 효소의 저해제인 LA의 첨가로 세포내의 ALA농도 증가와 동시에 세포외로의 ALA 분비가 증가한다고 보고한 바 있다. 한편 LA의 농도가 ALA의 생산성과 균체생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 LA의 농도를 10~50 mM의 범위에서 대수기 중기에 첨가하여 검토한 결과 LA 15 mM 농도 첨가시 가장 높은 생산량(28 mg/l)을 나타내었으며 25 mM 첨가시에는 균체량의 급격한 감소와 더불어 ALA의 생산시기가 늦추어지는 현상이, 50 mM 농도에서는 균체생육 및 ALA 생산량의 현저한 감소현상이 관찰되었다(Fig. 3). 이상의 Fig. 2와 Fig. 3의 결과들은 효소저해제 첨가에 의한 물질생산시 효소합성법과는 달리 발효법에 있어서는 세포의 생육과 함께 대사물질의 생산을 최대화시키는 관련 생합성계의 조절이 필수적임을 나타내었다. 한편 대수기 중기인 배양 2일째부터 15 mM LA를 1일 간격으로 4회, 2일 간격으로 2회 연속 첨가한 후 조사한 ALA의 균체의 생산성은 4회 연속 첨가시 1회 첨가시에 비해 약 16% 증가하는 경향을 나타내었다. 또한 균체외로 분비되어진 ALA는 배양말기에 감소하는 경향을 보임으로써 culture broth에서 분해 또는 다른 물질로 전환됨을 알 수 있었다.

ALA 전구물질의 첨가 효과

Glycine과 succinyl-CoA는 C₄ pathway에서 ALA 생합성의 직접적인 전구물질로서 이들 전구체의 첨가는 ALA의 생합성을 증진시키는 것으로 보고되고 있다.¹⁶⁾ 균체외로 분비되는 ALA의 생산량을 증가시키기 위하여 15 mM LA의 대수기 중기 첨가조건에서 glycine과 succinate를 농도별 배양초기의 첨가효과를 조사하였다. Table 4에서와 같이 균체량은 합성배지에 glycine를 첨가함으로써 낮아지고 succinate의 첨가에 의해 다소 증가되는 결과를 보였으나 ALA의 생산은 glycine, succinate의 단독첨가 또는 두 물질의 복합첨가에 의해 증가함을 알 수 있었다. 첨가성분별

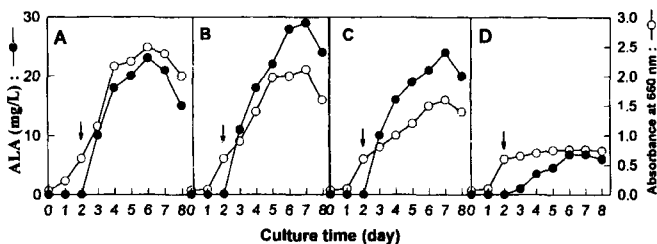


Fig. 3. Effect of LA concentration on cell growth and ALA production by *Rhodobacter capsulatus* KK-10.

LA with various concentrations (A, 10mM; B, 15 mM; C, 25 mM; D, 50 mM) was added into the culture broth at middle log phase.

Table 4. Addition effects of glycine and succinate on growth and ALA production by *Rhodobacter capsulatus* KK-10

Glycine (mM)	Succinate (mM)	Growth(A _{660nm})		ALA(mg/L)	
		5 days	7 days	5 days	7 days
0	0	1.97	2.11	21.6	31.7
0	10	2.07	2.29	30.8	44.6
0	30	2.08	2.26	48.5	61.7
0	60	1.97	2.25	39.5	45.5
10	0	1.66	1.83	30.5	34.2
10	10	1.69	2.08	52.3	66.5
10	30	1.58	1.88	57.6	65.9
30	0	1.38	1.73	29.6	45.5
30	10	1.35	1.70	55.3	70.4
30	30	1.33	1.67	69.2	73.0
60	0	1.33	1.27	24.5	38.0
60	10	1.32	1.03	34.5	36.0
60	30	1.33	1.07	37.8	35.4

Levulinic acid was added at the middle log phase.

ALA의 생산성은 glycine+succinate, succinate, glycine의 순으로 높았으며 이들 농도에 따른 영향은 30 mM에서 양호한 결과를 나타내었고 복합첨가시 73 mg/l의 가장 높은 생산량을 나타냄으로써 LA의 단독첨가시에 비하여 약 2.7배 높은 생산량을 보였다. Glycine 첨가에 의한 균체량 감소는 glycine의 growth inhibitory effect에 기인한다는 Lascelle¹⁶⁾의 보고와 일치하였으며 succinate는 ALA의 전구물질로 이용될 뿐만 아니라 광합성세균의 탄소원으로 이용되고 있음을 알 수 있었다. 한편 광합성세균이 C₅ pathway에 일부 의존하여 ALA를 생합성한다는 보고^{8,9)}에 따라 C₅ pathway의 전구물질인 L-glutamic acid의 ALA 생합성에 미치는 영향을 glutamic acid 단독 또는 glycine, succinate와 복합 첨가한 후 검토하였으나 상기와 같은 생산량 증가는 나타나지 않았다. 따라서 본 균주의 ALA 생합성계가 C₄ pathway에 의존하고 있음을 시사하였다.

ALA와 ALA 합성효소의 생합성에 미치는 LA, glycine 및 succinate의 영향

ALA의 전구물질인 glycine, succinate와 ALA 탈수효소의 저해물질인 LA가 ALA 합성효소(ALAS, ALA syntase)의 생합성에 미치는 영향을 ALA의 생산량과 함께 검토하였다. Glycine과 succinate는 배양 초기 30 mM씩 단독 또는 복합첨가하고 LA는 대수기 중기인 배양 2일 후부터 1일 간격으로 15 mM을 연속 4회 첨가하면서 배양시간에 따라 균체의 증식, ALA 합성효소 및 ALA의 생산량을 추적하였다(Fig. 4). 전구물질을 첨가하지 않고 LA만을 첨가하였을 경우 ALA의 생산량은 첨가 1일 후부터 증가하였으나 ALA 합성효소의 활성은 2일 후부터 증가하여 4일 후 최대 활성을 나타내었다. 전구물질인 glycine과 succinate를 배양 초기에 단독 혹은 복합첨가하고 LA를 1일 간격으로 연속 투입한 결과 전구물질을 복합첨가하였을 때 가장 높은 ALAS의 생합성량(80 U/mg protein)과 ALA의 생산량(85 mg/l)을 나타내었다. 이 결과는 LA의 연속적 첨가와 동시에 glycine과 succinate의 복합첨가배양이 가장 증가된 생

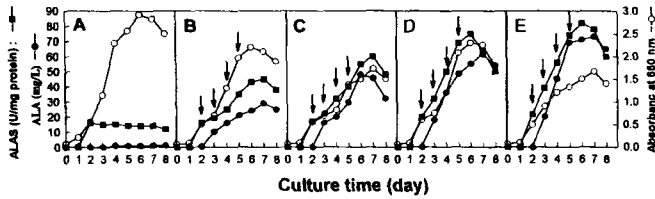


Fig. 4. Effects of serial addition of LA and supplementation of glycine and succinate on cell growth, ALA production and ALAS activity by *Rhodobacter capsulatus* KK-10.

Arrow indicates the addition time of 15 mM LA.

A, No addition of LA, glycine and succinate; B, No addition of glycine and succinate; C, Supplementation of 30 mM glycine; D, Supplementation of 30 mM succinate; E, Combined supplementation of 30 mM glycine and 30 mM succinate.

산성을 보이며 glycine, succinate 단독 첨가시 생산성의 저하를 가져온다는 Sasaki 등²⁴⁾의 보고와 유사하였다. 또한 ALAS 활성과 ALA의 생산성이 낮은 전구물질 무첨가구 및 glycine 첨가구에서는 ALA의 최대생산시기보다 1일 늦게, ALAS와 ALA의 생산이 높은 succinate 단독첨가구 및 복합첨가구에서는 1일 빠르게 ALAS는 최대활성을 나타내었다. 이는 ALA의 세포내 합성과 균체외로의 분비를 최대화시키기 위해서는 ALA 합성효소의 활성화가 선행된 후 ALA 탈수효소의 저해를 유도하는 순서적 조절이 중요한 요소임을 알 수 있었다. 한편 ALAS는 기질들의 첨가에 의해 약 2배의 생산량이 증가하는 현상을 보였으나 무첨가시에도 상당량이 합성되는 구성효소에 속하였다.

ALA 생산에 미치는 금속이온과 환경인자들의 영향

일부 금속이온들이 광합성세균의 cyclic tetrapyrrole 생합성계의 조절인자로서 보고되고 있으며²⁴⁾ 특히 Co^{2+} 와 Fe^{3+} 은 각각 vitamin B₁₂와 heme 화합물의 생합성에 필수인자로 밝혀진 바 있다.²⁵⁾ Glutamate-malate배지에 ferric citrate와 cobalt chloride를 0.25~2.5 mg/l의 농도로 첨가한 후 ALA의 생산량에 미치는 영향을 검토한 결과 Fe^{3+} 은 0.5 mg/l에서 약 20%의 생산량 증가효과를 나타내었으나 Co^{2+} 의 경우는 생산을 감소시키는 경향을 보였으며 두 금속이온의 고농도 첨가시에는 균의 생육과 ALA의 생산량이 현저히 저해되었다. 이 결과들은 Lascelle 등²⁶⁾이 보고한 이들 이온에 의한 ALA 생산량 감소현상과 Fe^{3+} 에 의한 ALA 합성효소의 feedback inhibition 및 repression 조절기구에 대한 보고와는 상치되는 결과를 나타내었다.

ALA의 생산과 균생육에 미치는 광도의 영향은 3,500 lux 전후에서 생육과 생산성 모두 양호하였으며 2,500 lux 이하의 광조사시에는 생육과 생산의 최대치에 이르는 시간이 지연되면서 ALA의 생산량이 저조하였으며 4,500 lux에서는 균의 생육활성은 양호하였으나 ALA의 생산량이 감소하는 현상을 나타내었다. 홍색비유황세균의 생육특성인 혐기명 조건을 유지하면서 배양온도와 교반의 영향을 검토한 결과 본 균주는 30°C 부근에서 가장 높은 생육활성과 ALA 생산성을 보였으며 회전진탕배양기에서 조사한 균의 생육은 100 rpm까지 회전수가 높아질수록 증가하였으나 ALA의 생

산량은 30 rpm 부근에서 가장 높은 값을 나타내었다.

감사의 글

본 연구는 농진청 농업특정연구개발사업의 연구비에 의해 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Li, J. M., B. Ormond, S. D. Cosloy and C. S. C. S. Russell (1989) 5-Aminolevulinic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **171**, 2547-2551.
- Gibson, K. D., W. G. Laver and A. Neuberger (1958) Initial stage in the biosynthesis of porphyrins. *Biochim. J.* **70**, 71-81.
- Clark, W. G., B. Rittenberg and J. Lascelles (1967) Cytochrome synthesis and its regulation in *Spirillum iterosonii*. *J. Microbiol.* **29**, 99-109.
- Menon, I. A. and D. Shemin. (1967) Concurrent decrease of enzymic activities concerned with the synthesis of coenzyme B₁₂ and of propionic acid in *Propionibacteria*. *Arch. Biochem. Biophys.* **121**, 304-310.
- Granick, S. and S. I. Beale (1978) Hemes, chlorophylls and related compounds: biosynthesis and metabolic regulation. *Advances in Enzymology, A Meister, ed.*, **46**, 33-49.
- Beale, S. I., S. P. Gough and R. S. Granic (1975) Biosynthesis of δ-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **73**, 2719-2723.
- Biele, S. I. and R. Casteffranco (1974) The biosynthesis of δ-aminolevulinic acid in higher plants. *Plant Physiol.*, **53**, 297-303.
- Avissar, Y. and S. I. Beale (1988) Biosynthesis of tetrapyrrole pigment precursors formation and utilization of glutamyl tRNA for δ-aminolevulinic acid synthesis by isolated enzyme fraction from *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* **88**, 879-886.
- Oh-hama, T., N. J. Stolowich and A. I. Scott (1988) δ-Aminolevulinic acid formation from glutamate via the C₅ pathway in *Clostridium thermoaceticum*. *FEBS Lett.* **228**, 89-93.
- Gilles, H., R. Jaenchen and R. K. Thauer. (1983) Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch Microbiol.* **135**, 237-240.
- Beale, S. I., S. P. Gough and R. S. Granic (1970) Chemical synthesis of 4,5-diosovaleric acid and its nonenzymatic transamination to 5-aminolevulinic acid. *Plant Physiol.* **45**, 504-506.
- Sasaki, K., S. Ikeda, Y. Nishizawa and M. Hayashi (1987) Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Ferment. Technol.*, **65**, 511-515.
- Avissar, Y. J and S. I. Beale (1989) Oxyridoxal requirement of the aminotranferase step in the formation of 5-aminolevulinic acid from glutamate in extracts of *Chlorella vulgaris*. *Plant Physiol.* **89**, 852-859.
- Schlegel, H. G., J. Barneaand and K. G. Erlich-Goltze

- (1976) Microbial Energy Conversion, Gottingen, p.443-461.
15. Li, J. M., O. Brathwaite, S. D. Cosloy and C. S. Russell (1989) 5-Aminolevulinic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, **171**, 2547-2552.
 16. Lascelles, J. (1956) The synthesis of porphyrins and bacteriochlorophyll by cell suspension of *Rhodospseudomonas spheroides*. *J. Biochem.* **62**, 78-93.
 17. Johannes, F. I. and H. G. Truper (1989) *Bergey's manual of systemic bacteriology*, J. T. Stanley, ed., 3. p1658-659
 18. Pilipp Gerhardt et al. (1980) *Manual of Methods for General Bacteriology*.
 19. Ormerod, J. C., K. S. Ormerod and H. Gest (1961) Light-dependent utilization of organic compounds and photoproduction of molecular hydrogen by photosynthetic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.*, **94**, 449-463.
 20. Mauzerrall, D. and S. Granick. The occurrence and de-termination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* **219**, 435-437.
 21. Burnham, B. F. (1970) 5-Aminolevulinic acid synthetase. *Method in Enzymology*. Tuber, H. and Tubor, C. W. eds. **17(A)**, 195-196
 22. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
 23. Gilles, H., R. Jaench and R. K. Thauer (1983) Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **135**, 237-345.
 24. Sasaki, K., T. 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**, 727-732.

Isolation and Some Cultural Characteristics of δ -Aminolevulinic Acid - Producing Photosynthetic Bacteria

Dae-Yeol Cheong,¹ Yang-Mun Choi, Hong-Yon Cho* and Han-Chul Yang (¹Ottogi Research Center, Anyang 431-070, Korea, Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea, Graduate School of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea)

Abstract : Screening, Identification and some cultural characteristics of ALA(δ -aminolevulinic acid)-producing photosynthetic bacteria were carried out for the optimal production of ALA, one of the bioherbicides. Among photosynthetic bacteria isolated from soil, marsh, pond, etc., KK-10 was the best producer of ALA and identified to be *Rhodobacter capsulatus* belonging to a typical group of nonsulfur purple bacteria. By addition of 15 mM LA (levulinic acid), an inhibitor of ALA dehydrase in cyclic tetrapyrrole biosynthesis, into culture broth at middle log phase of cell growths, ALA production was considerably increased to about 20-fold (28 mg/l). The combined supplementation of glycine and succinate, each with a concentration of 30 mM also enhanced production of ALA and activity of ALA synthase to about 50-fold (73 mg/l) and 2-fold, respectively. The isolated strain was able to produce upto 80 mg/l under the cultural condition optimized by addition 15 mM LA into the synthetic medium at four different points starting middle log phase.

Key words : δ -aminolevulinic acid, *Rhodobacter capsulatus*, photosynthetic bacteria

*Corresponding author