

Rhodocyclus gelatinosus KUP-74의 휴지균체를 이용한 δ -Aminolevulinate의 생산

이소희 · 안영철 · 임왕진¹ · 황세영*

고려대학교 자연과학대학 생물공학과, ¹생물공학연구소

초록 : 광합성세균인 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74의 휴지균체에 의한 균체의 δ -aminolevulinate(ALA) 생산 효율성에 관하여 검토하였다. 균체의 ALA의 최대 생산치를 위하여 1 ml ALA 생산계는 1.05 mg의 휴지균체로 6시간의 배양을 필요로 하였다. 또한, 이 조건에서 ALA 생산의 유도물질인 levulinate나 L-glutamate 등은 균체의 ALA 생산에 있어서 비교적 낮은 효과를 나타내었다. 반면에, ALA 생산계의 부피와 이에 적합한 균체밀도가 효과적인 ALA 생산을 위하여 중요한 요인으로 나타났다. 휴지균체의 안정한 ALA 생산유지를 위한 수명은 휴지균체를 고정화 시키므로써 크게 연장되었다(1994년 9월 12일 접수, 1994년 11월 17일 수리).

서 론

현재 사용되고 있는 제조제 중에서 유기합성법에 의해 생산되는 농약의 대부분은 인체독성 및 토양잔류 독성 등, 많은 문제점을 안고 있다. 이러한 난제의 해결책의 일환으로서, 최근의 제조제 개발동향은 식물의 생리 생태적 특성을 이용하여 식물고유의 생명현상을 선택적으로 제어하는 제조제 연구에 역점을 두고 있으며, 특히 미생물의 대사산물을 이용한 생물합성 제조제 개발에 대한 연구가 활발히 진행 중에 있다.¹⁾

δ -Aminolevulinate(ALA)는 생물계에 보편적으로 존재하여 세포내에서 cyclic tetrapyrrole을 골격구조로 하는 화합물의 중요한 전구물질로 알려져 있으며,^{2,3)} 한편으로는 감광성의 기능을 갖고 있어 빛의 존재 하에 활성화되면 protochlorophyllide로 전환되며, 이 물질에 의한 일련의 산화반응이 피부 암세포나 쌍자엽 식물 등에만 선택적으로 일어나서, 세포막 등의 인지질이 파괴되어 결국 고사되는 이른바 특정 생리활성의 전구물질로서도 보고되어 최근 ALA의 응용에 관한 연구가 시도되고 있다.⁴⁻⁶⁾

최근에 와서 미생물을 이용한 ALA의 대량 생산법^{7,8)}이 시도되고 있으나, 공업적 수준에서의 생산효과는 거두지 못하고 있는 실정이다. 이러한 관점에서 저자들은 前報⁹⁾에서 토양에서 분리한 광합성세균인 *Rhodocyclus gelati-*

nosus KUP-74의 저밀도 휴지균체를 이용해서 ALA생산을 위한 최적조건을 확립한 바 있다. 본 연구에서는 동 균주를 사용, 고밀도의 휴지균체를 조제하여 균체의 ALA생산을 위한 최적조건을 검토하였으며, 고정화균체를 이용한 생산계와 비교하여 효율적 ALA생산의 가능성을 고찰하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

토양에서 분리한 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74⁹⁾를 사용하였다. L-glutamate가 제외된 Lascelles¹⁰⁾의 기본배지(D,L-malic acid 2.7g, KH₂PO₄ 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, (NH₄)₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, CaCl₂·2H₂O 27 mg, MnSO₄·5H₂O 1.2 mg, nicotinic acid 1 mg, thiamine 1 mg 및 biotin 0.01 mg: 증류수 1L, conc. NH₄OH로 pH 6.8 보정) 10 ml를 culture tube(2×20 cm)에 넣고 rotary evaporator를 이용하여 감압, air phase를 질소가스로 치환한 후 멸균주사기로 균주를 집중하여 조제용 glass water-bath(30°C)상에서 4 Klux 조도아래 혐기적으로 정치, 배양하였다. 조도는 Illuminometer(SPI-5)로 조정하였다.

휴지균체 조제법

균체의 대수기 후기 배양액을 10,000 rpm으로 10분간

Key words : *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74, δ -aminolevulinate, resting cells

*Corresponding author : S.-Y. Hwang

원심분리하여 균체를 수거, 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 2회 세척 후, 동 buffer 1 ml내에 건조균체 1.05 mg이 함유되어 있는 고밀도 균체현탁액($A_{660}=3.0$)을 조제하여 균체의 ALA생산을 위한 휴지균체로 사용하였다.

휴지균체의 고정화

Ca-alginate를 이용한 포괄법¹¹⁾에 준하여 휴지균체 2.1 mg을 1 ml의 생리식염수에 현탁시키고, 여기에 2%(w/v) sodium alginate 1 ml를 넣어 혼합한 후, 이 혼합액의 주사기를 이용한 liquid drop을 1%(w/v) calcium chloride 용액내에서 고정화(4°C, 1 hr)하여, 형성된 고정화 균체를 10 mM phosphate buffer(pH 7.0)로 3회 세척해서 실험에 사용하였다.

정량분석

ALA의 정량분석은 치료 0.5 ml에 Mauzerall¹²⁾ 등의 방법에 따라서 다음과 같이 행하였다. 1M Na-acetate buffer(pH 4.7) 0.5 ml와 0.05 ml acetylacetone을 가한 후 15분간 가열하였다. 실온에서 냉각 후 Ehrlich reagent¹³⁾ (42 ml glacial acetic acid와 70% perchloric acid 8 ml에 1g의 *p*-dimethylaminobenzaldehyde가 함유된 용액) 3.5 ml를 첨가하여, 20분 후에 형성된 2-methyl-3-acetyl-5-propionic acid pyrrole의 양을 556 nm에서의 흡광도로 측정 한 후, ALA standard curve($\epsilon_{556}=9.3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁴⁾를 이용하여 ALA를 환산 정량하였다. Primary amine 정량은 휴지균체 현탁액을 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 상등액 일부에 2,4,6-trinitrobenzene sulfonate(TNBS)¹⁵⁾ 1 μmole 이 함유된 5% Na-borate 용액을 첨가하여 1 ml로 한 후, 30°C에서 30분 반응으로 형성된 yellow picryl-adduct 양을 420 nm에서의 흡광도로 분석하였다($\epsilon_{420}=1.0 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$). 균체의 증식도 및 밀도는 Spectrophotometer (Shimadzu: Model 2101PC)를 이용하여 660nm에서 분석하였으며, 균체밀도는 O.D. 대비 전체중량의 표준 곡선으로부터 계산하였다.

시약

δ -Aminolevulinat, levulinat, *p*-dimethylaminobenzaldehyde, L-glutamate, sodium alginate 및 TNBS는 Sigma Chem. Co.(USA)로부터, 70% perchloric acid는 Junsei Chem. Co.(Japan), glacial acetic acid는 Duksan Pharmaceutical Co.(Korea)로 부터 각각 구입하였으며 그 외의 시약은 1급 이상품을 사용하였다.

결 과

휴지균체 밀도와 균체의 ALA 생산성의 관계

공시균주의 균체밀도가 균체의 ALA 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 대수기 후기의 균체 배양액으로부터 조제한 휴지균체 현탁액(20 mM levulinate, 10 mM phosphate buffer, pH 7.0)을 이용하여 30°C, 9시간 배양 후의 균체의 ALA양을 분석한 결과 균체의 ALA의 생산성은 균체 밀도에 비례하여 1 ml당 1.05 mg의 균체량까지는 ALA 생산성에 있어 비례적으로 증가하였으나, 그 이상의 균체량에 있어서는 균체량의 증가에 따른 ALA 생산량의 linearity를 보이지 않았다(Fig. 1). 따라서 1 ml당 1.05 mg 휴지균체의 현탁액 및 이 농도에 준한 고정화 균체로된 반응계를 이용하여 균체의 ALA생산의 최적조건 확립을 위한 이하의 실험을 행하였다.

균체의 ALA생산에 미치는 요인

前報⁹⁾에서 당 균주의 휴지균체계에 의한 균체의 ALA생산에 있어서 혐기적 조건으로 배양한 경우, 호기적 조건보다 약 2배의 ALA 생산효과를 나타냈으며, 또한, 그외의 물리적 요인으로써 pH 7.0, 30°C, 4 Klux의 광도가 최적조건으로 보고된 바 있다. 이와같은 물리적 조건

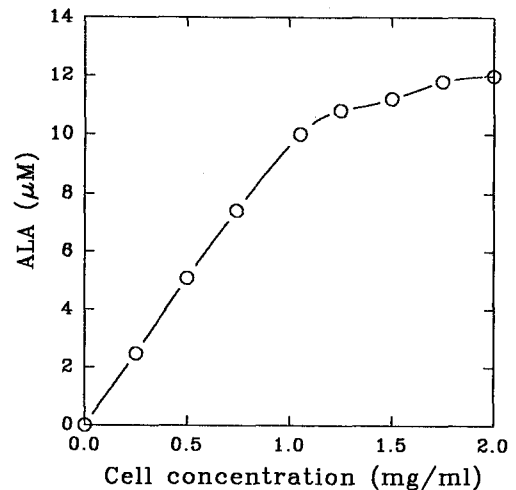


Fig. 1. Effect of cell concentration on the production of extracellular ALA from *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74.

The reaction was carried out at 30°C for 9 hr in the presence of 20 mM levulinate under the standard conditions by using the listed range of the resting cells prepared from a late-logarithmic culture broth. After incubation, each supernatant was allowed to measure the ALA concentration as described in 'Materials and Methods'.

하에서 휴지 균체가 고밀도로써 존재하는 경우는 균체 외로 ALA를 생산함에 있어서 ALA생산의 화학적 유도 인자에 의하여 크게 영향을 받지않는 것으로 밝혀졌다. 즉, Table 1은 ALA dehydratase의 길항저해제의 일종인 levulinate 및 C₅-ALA 생합성 경로의 initial precursor로 알려진 L-glutamate의 첨가 배양이 휴지 균체에 의한 ALA 생산에 미치는 효과를 나타낸 것으로서, 이들 물질의 고농도 하에서도 균체의 ALA생산은 20~40%의 증가에 그쳐, 발효법에 의한 효과와 대조적 결과를 보였다. 전구물질 첨가 효과가 비교적 낮은 이유를 알아 보는 방법으로서 L-glutamate의 균체내 uptake rate를 분석하였다. 1 mM L-glutamate가 함유되어 있는 휴지 균체 현탁액(A₆₆₀=3.0)을 30°C 에서 배양하여 시간에 따른 균체의 L-glutamate의 잔존량을 TNBS로 측정해본 결과, 1.05 mg의 휴지균체가 수용할 수 있는 최대량은 불과 0.008 μ moles 밖에 미치지 못하였다(data 생략). 이결과는 前報⁹⁾에서 밝힌바 있는 0.35 mg cells/ ml(A₆₆₀=1.0)에 의한 최대 uptake량인 0.017 μ moles의 약 50%에 해당 된다. 한편, levulinate의 낮은 첨가 효과가 직접적으로 균체내 uptake rate에 기인되는가를 확인하기 위하여 이 화합물의 UV흡수 peaks인 196 nm, 265 nm에서 상동의 균체 여과액의 흡광도를 측정해 보았으나, 이 화합물의 균체내 uptake rate를 분광학적 방법으로는 정확히 산출할 수 없었다. 배양시간에 따른 균체의 ALA농도를

검토한 결과, 휴지균체 배양 직후 6시간 동안은 균체의 ALA의 생산량이 시간에 비례하는 증가현상을 보였으나, 배양 6시간 이후 곧 ALA 생산의 정체성을 나타내었다(Fig. 2). 이 반응계에 2% glycerol을 첨가 배양함으로써 6시간 이후 균체외 ALA양이 약 30% 증가하였다. Glycerol을 휴지균체 현탁액에 미리 첨가하여 냉동 보존(-20 °C)하였을 때 보존기간에 관계없이 배양시 첨가한 경우와 동일하게 균체의 안정한 ALA 생산 효과를 나타내었다(data 생략). 휴지균체 밀도를 일정하게 조정한 ALA 생산 반응계의 부피에 따른 ALA생산성을 검토하였다(Table 2). 일정한 균체밀도 하에서의 균체외 ALA의 농도는 반응계의 부피에 영향을 받는 것으로 나타나, 부피증가에 따른 생산성의 증가현상이 관찰되었으나, 균체외 ALA 생산의 최대치는 부피의 변화에 관계없이 배양 후 약 6시간에서 관찰되었다. 반응계의 부피를 1/로 증폭시킨 경우의 ALA 생산성은 2 ml 부피의 반응계보다 약 3배의 효과를 나타내었으며, ALA농도의 최대치는 역시 배양 6시간째에서 관찰되었다(Fig. 3). 즉, 휴지균체가 1 ml 당 1.05 mg 존재하는 ALA 생산계를 이용하게 되면, 대량 생산을 위한 반응계의 scale을 자유롭게 조절할 수 있는 것으로 판단되었다. 또한, 시험관 scale에서 flask scale로 바꾼 경우의 휴지균체 밀도는 균체외 ALA 생산을 위하여 중요한 요인으로 작용하는 것으로 나타났다. 즉, 40 mg의

Table 1. Effect of L-glutamate and levulinate concentrations on the extracellular ALA production by resting cells

conc. (mM)	ALA (μ M)	
	Levulinate	Levulinate ^a +L-glutamate
0	17.9	29
10	18.9	31
20	21	34
30	22	37
40	23	41
50	ND	47
60	ND	45

Levulinate and L-glutamate were added to resting cell suspensions containing 1.05 mg cells per milliliter as above concentrations and incubations were followed at 30°C for 9 hr. a), 40 mM levulinate was used in combined supplementation with L-glutamate. The ALA contents in the supernatants were measured as described in 'Materials and Methods'. ND, not determined

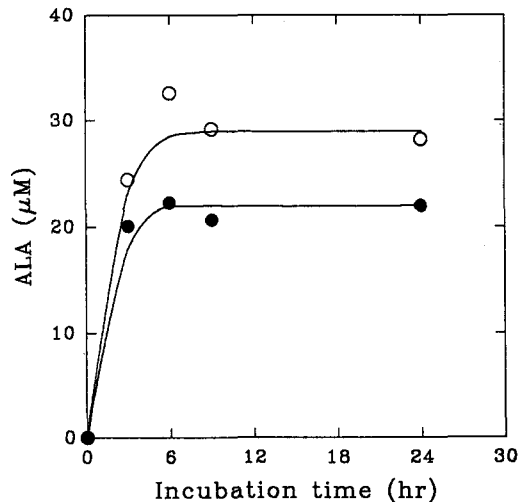


Fig. 2. Effect of glycerol on the extracellular ALA production by resting cells.

1 ml of the resting cell system containing 1.05 mg cells was incubated at 30°C in the presence of initial concentrations of 40 mM levulinate and 50 mM L-glutamate with (○), or without 2% glycerol (●).

휴지균체를 부피가 다르게 현탁시킨 후의 균체의 ALA 생산효과를 검토해 본 결과, 위의 균체량이 32 ml에 현탁되어 있는 경우에 가장 높은 yield를 보였다(Fig. 4).

ALA의 연속적 생산을 위한 균체의 고정화

ALA의 연속적 생산과 함께 용이한 회수를 위하여 Ca-alginate를 이용한 포괄법으로 고정화 균체를 조제, 이를 이용하여 균체의 ALA의 생산성을 검토하였다. 휴지균체를 사용한 ALA생산성과 비교하여 yield의 최대치에의 도달 소요시간은 동일하였으나 생산효과는 균체를 고정화시키므로써 오히려 증가하는 결과를 보여, 균체외로 분비된 ALA가 균체의 고정화로 인하여 보다 안정하게 보존되는 것으로 추정되었다(Fig. 5). 고정화 균체로부터

Table 2. Effect of increasing volume of the resting cell system on the extracellular productivity of ALA under the constant cell density

System volume (ml)	ALA (μ M)
2	23.4
4	24.7
8	34.3
32	35.6

Resting cell systems containing 40 mM levulinate and 50 mM L-glutamate were incubated at 30°C for 9hr under the constant cell density (1.05 mg cells per ml)

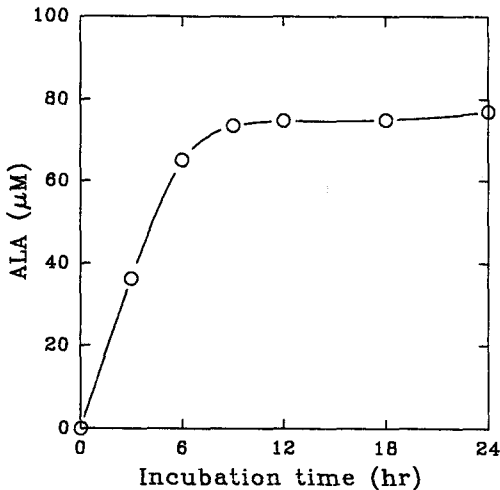


Fig. 3. Significance of incubation time on the production of extracellular ALA from the enlarged system. The volume of reaction system was adjusted to 1l, and contained 1.05g of resting cells with 40 mM levulinate and 50 mM L-glutamate.

안정적인 ALA 생산을 위한 이용 한계기간을 검토하여 Fig. 6에 나타내었다. 고정화 균체를 이용한 반응계를 1일 1회씩 filter funnel을 이용하여 watery phase를 회수한 후 초기 조성분의 반응계로 재보정하여 5일간에 걸쳐 ALA생산성의 변화를 관찰한 결과, 배양 3일째부터 ALA

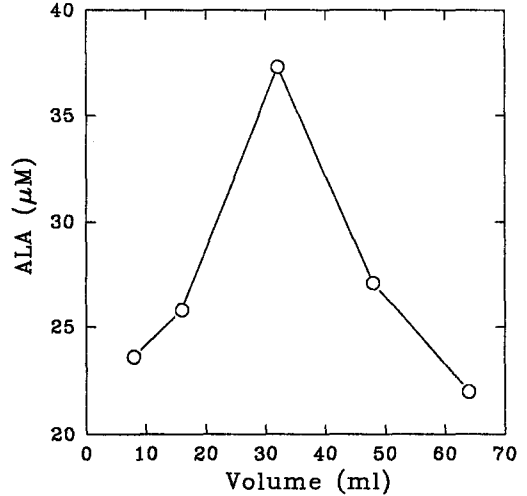


Fig. 4. Effect of the resting cell concentration and the reaction volume on the production of extracellular ALA.

All of the reaction systems contained 40 mg of resting cells and the necessary compounds as shown in Fig. 3.

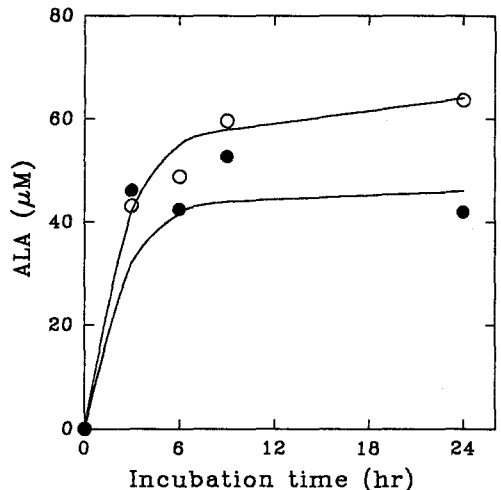


Fig. 5. Effect of immobilization of the resting cells on the extracellular productivity of ALA. The reactions were carried out under the standard conditions as described in 'Materials and Methods'. Symbols used : ○, immobilized cells; ●, resting cells.

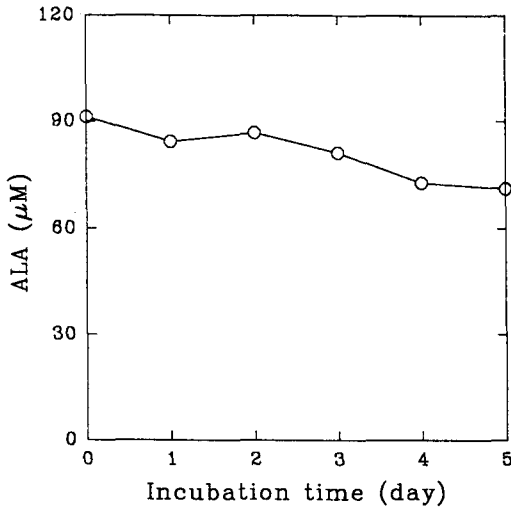


Fig. 6. Effect of the use of immobilized cells on the ALA production.

1 ml of the immobilized cell system containing 1.05 mg cells/1% Ca-alginate, 40 mM levulinate and 50 mM L-glutamate was incubated at 30°C for 24 hr, and the aqueous phase was harvested using a 1 cm diameter filter funnel. The system was then reconstituted by the initial condition, followed by repeating the above process.

생산의 감소경향이 나타났으나 5일 후의 생산성은 85% 정도를 유지하였다.

고 찰

광합성세균은 일반적으로 증식속도가 느린 반면에, 진정세균에 비해서 ALA 생합성의 전구물질 첨가에 인한 균체의 ALA 생산의 증가효과가 큰 장점이 있다. 토양에서 분리한 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74는 colony의 육안 관찰이 배양 3일후 가능할 정도로 증식속도가 느리므로, intact cells의 수명은 상대적으로 긴 성질을 갖고 있다(Fig. 7). 前報⁹⁾에서는 이와 같은 점에 착안하여 고전적 발효법을 배제한 intact cells 개념으로써 ALA의 선택적 생산을 시도하였다. 그러나, intact cells($A_{660}=1.0$)의 ALA 생산계 내에서의 밀도는 세포의 증식을 충분히 억제하지 못하므로, 배양기간 중에 균체량이 변화하는 문제가 제기되어 왔다. 본 연구는 반응계 내의 균체밀도를 가능한 최대화시키므로써 고 ALA 생산 효과 및 균체량 변화로 인한 가능한 균체의 유기 물질 증가의 억제효과를 동시에 충족케 하는 것을 목적으로 하였다.

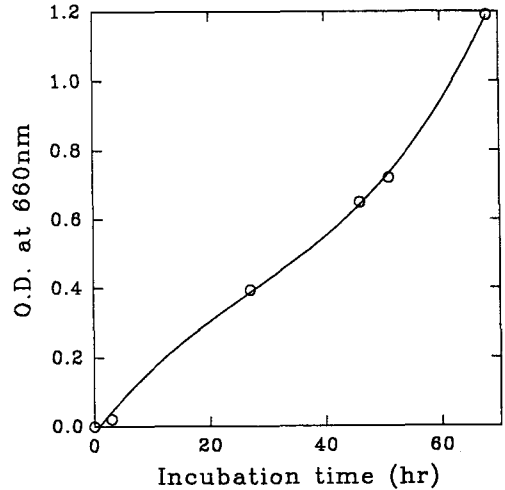


Fig. 7. Time course of the cell growth of the *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74

균체의 밀도가 1.05 mg per 1 ml 이상으로 계속 증가하면 균체의 ALA 생산은 균체 밀도와 비례 관계를 보이지 않았다. 이 결과로부터 ALA 생산의 최대 yield를 위한 휴지 균체의 밀도는 균종에 따라서 각각 다를 것으로 추정된다. 발효법⁹⁾이나 intact cell계⁹⁾에 의한 균체의 ALA 생산에 있어서 ALA의 전구물질(예: C₄, glycine과 succinate; C₅, L-glutamate)이나 ALA dehydratase의 길항제 해제로써 levulinate의 첨가는 필수적이었으나, 본 연구에서 사용한 휴지균체 개념의 ALA 생산계는 이들 물질의 첨가효과가 특히 괄목할 만큼 나타나지 않은 점은 의외의 결과로서 균체밀도가 증가하므로써 오히려 이 화합물들의 균체내 uptake가 저해되는 성질과 밀접한 관계가 있을 것으로 판단된다. 휴지균체를 이용한 균체의 ALA 생산성에는 오히려 균체의 밀도 및 반응계의 적절한 부피가 중요한 증감인자로 작용하는 것으로 나타났다. 한편, 균체를 고정화 시키므로써 ALA 생산을 위한 life-span을 연장할 수 있게된 것으로 판단되었으며, 고정화 균체의 이러한 장점을 이용하여 균체의 ALA 농도의 최대치에의 도달 소요시간(=6시간)을 고려하여 ALA 생산계의 aqueous phase를 연속적으로 회수 충전시키는 방법이 ALA의 효율적인 대량생산을 위하여 바람직할 것으로 사료된다.

사 사

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의한 것으로 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Hoagland, R. E. ed. (1990) 'Microbes and Microbial Products as Herbicides'. ACS symposium series, 439
2. Gibson, K. D., W. D. Laver and A. Neuberger (1958) Initial stages in the biosynthesis of porphyrins: Formation of δ -aminolevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes, *Biochem. J.*, **61**, 618-620
3. 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 barely, *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **73**, 2719-2723
4. Rebeiz, C. A., A. Montazer-Zouhoor, H. Hopen and S.M. Wu. (1984) Photodynamic herbicide: Concept and phenomenology, *Enz. Microb. Technol.* **6**, 390-401
5. Avissar, Y. (1980) Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid from glutamate in *Anabaena variabilis*, *Biochim. Biophys. Acta.*, **613**, 220-228
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 δ -aminolevulinic acid by *Rhodocyclus gelatinosus* strain KUP-74, *J. Inst. Biotechnol., Korea Univ.*, **4**, 37-42
8. 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 δ -aminolevulinic acid production, *Agric. Chem. Biotechnol.*, **35**, 210-217
9. Lim, W. J., K. M. Choi and S. Y. Hwang (1993) Optimization of an intact cell system of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 for δ -aminolevulinic acid production, *J. Microbiol. Biotechnol.*, **3**, 244-251
10. Lascelles, J. (1956) The synthesis of porphyrin and bacteriochlorophyll by cell suspensions of *Rhodospseudomonas sphaeroides*, *Biochem. J.*, **62**, 78-93
11. Kierstan, M. P. J. and M. P. Coughlan (1985) Immobilized Cells and Enzymes. by Woodward, J., IRL press
12. Mauzerall, D. and S. Grannick (1956) The occurrence and determination of δ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.*, **219**, 435-436
13. Warnick, G. R. and B. F. Burnham (1971) Regulation of porphyrin biosynthesis: Purification and characterization of δ -aminolevulinic acid synthase, *J. Biol. Chem.*, **246**, 6880-6885
14. Choi, K. M., W. J. Lim and S. Y. Hwang (1993) Influence of δ -aminolevulinic acid Biosynthesis in *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **21**, 527-533
15. Binkley, F., F. Leibach and N. King (1968) A new method of peptidase assay and the separation of three leucyl-glycinases of renal tissues, *Arch. Biochem. Biophys.*, **128**, 397-405
16. Choi, K. M., W. J. Lim and S. Y. Hwang (1992) Biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Sci. Technol., Korea Univ.*, **10**, 49-53

Production of δ -Aminolevulinate by Using the Resting Cells of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74

So-Hee Lee, Young-Chul An, Wang-Jin Lim¹ and Se-Young Hwang* (Department of Biotechnology, College of Science and Technology, ¹Institute of Biotechnology, Korea University)

Abstract : The effectiveness of the resting cells of a photosynthetic bacterium, *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74, was investigated on the production of extracellular δ -aminolevulinate (ALA). The ALA generating system with 1.05 mg cells per milliliter required 6 hr-incubation to obtain maximal yield of extracellular ALA. Under this condition ALA inducers, i.e., levulinate or L-glutamate showed relatively low effects to increase extracellular ALA production. Instead, the volume of the system and proper cell density appeared to be important factors for effective production of the ALA. The life-span of the resting cells was remarkably extended to maintain stable production of the ALA by immobilization of cells.