

광합성균주에 의한 제초활성 물질의 생산

최 경 민, 이 성 택

한국과학기술원 생물과학과

Production of Photodynamic Herbicide by Photosynthetic Bacteria

Kyung-Min Choi, Sung-Taik Lee

Department of Biological Science, Korea Advanced Institute of
Science and Technology, Taejon, Korea

ABSTRACT

The effect of levulinic acid (LA) and biosynthetic precursors of δ -aminolevulinic acid (ALA) on the production of extracellular ALA was examined for the cells of soil derived *Rhodospirillum rubrum* N-1 belonged to the genus *Rhodospirillaceae*. The extracellular yield of ALA was increased to 23 fold (45 mg/l) from the basal condition (Lascelles' medium without L-glutamate) by successive addition of LA at initial (10 mM) and mid-log stage (30 mM) of cell cultivation. In addition to initial/mid-log mutual supplementations of LA (10 mM/30 mM) and glutamate (30/30 mM), respectively, by means of alternative feeding 10 mM C₄-precursors at mid-log phase of culture the extracellular ALA content was reached to 75 mg/l (40 fold)

Key words : Levulinic acid, δ -aminolevulinic acid, *Rhodospirillum rubrum* N-1, C₄-precursors, C₅-precursor

초 록

토양에서 분리한 광합성 세균인 *Rhodospirillum rubrum* N-1 균주에 의한 δ -aminolevulinic acid (ALA) 생산에 있어서 levulinic acid (LA) 및 ALA 생합성 경로의 첨가효과를 검토하였다.

Glutamate를 제외한 Lascelles의 기본배지에 LA를 배양초기에 10mM, 이후 대수기 중기에 30 mM을 첨가한 결과 균체외의 ALA 생산성은 최고 45 mg/l에 도달, LA 미첨가 대비 23배 증가하였다. ALA 생합성의 전구물질인 glycine-succinate (C₄) 및 glutamate (C₅)의 feeding 효과는 배양초기/대수기 중기에 LA 10/30 mM을, glutamate 30 mM/30 mM을 각각 첨가하는 한편, 대수기 중기에 10 mM 농도의 C₄ 전구물질을 별도로 첨가배양함으로써 미첨가 대비의 ALA 생산성이 약 40배 (75 mg/l) 증가하였다.

핵심용어 : Levulinic acid, δ -aminolevulinic acid, *Rhodospirillum rubrum* N-1, C₅ 전구물질, C₄ 전구물질

1. 서 론

인류의 건강 및 자연 생태계 환경을 적극 고려한 새로운 농약의 개발은 고도로 성장한 과학기술의 축적에도 불구하고 현재 세계적으로 가장 관심이 집중되고 있는 분야 중의 하나로써 보다 선택적이고 잔류 독성이 적은 생물농약의 개발이 계속적으로 요구되고 있다(Tomoo 등 1981). 현재 이용되고 있는 제초제의 대부분은 유기합성에 의해 생산되는 농약으로 인체 독성 및 토양 잔류 독성이 많은 문제점들을 안고 있다. 이러한 문제점의 해결 방법의 하나로 미생물 대사 산물을 이용한 생물 유래의 제초제 개발에 대한 연구 성과가 많이 보고되고 있으나(Gills 등, 1983; Beale, 1970; Mau 등, 1988; Rhee 등, 1987), 이들의 대부분은 인체에 대한 독성이 비교적 강한 것으로 알려져 있다.

δ -Aminolevulinic acid (ALA)는 porphyrins, chlorophylls, hemes, vitamin B₁₂ 등 tetrapyrroles 유도체의 key intermediate로 작용하여, ALA 합성속도는 이들 유도체에 의해서 feedback 저해를 받는다(Nandi 등, 1968). 세포 내에서의 ALA 생합성은 현재까지 species에 따라서 C₅나 C₄(shemin) 경로 중 일방에 의

존하는 것으로 알려져 있다(Burnham 등, 1963). C₅ 경로는 식물(Beale 등, 1975; Beale 등, 1974), algae (Avisar, 1980; Huang 등, 1986), 일부세균류(Avisar 등, 1989; Hollriegel 등, 1982) 등에서 발견되어, glutamic acid를 전구물질로 한 glutamic semialdehyde의 transamination에 의해서 ALA가 합성되는 반면, C₄ 경로는 주로 동물(Kikuchi 등, 1958; Masayaki 등, 1985), 진균(Leong 등, 1982), 호기성세균(Sasaki 등, 1987; Wright 등, 1987) 등에서 발견되어 전구물질인 glycine과 succinyl-CoA의 condensation에 의해서 ALA가 생합성 되는 것으로 보고되고 있다. 한편, ALA는 감광성물질로써 태양광선에 의해서 강력한 산화물질인 pchlide로 전환되고 이 물질에 의한 일련의 산화반응이 쌍자엽 식물에만 선택적으로 일어나 잎의 인지질이 파괴되어 고사되는 일종의 photodynamic herbicide(제초활성물질)로 입증됨으로써 최근 ALA의 경제적 응용을 위한 연구가 시도되고 있다(Rebeiz 등, 1984). 저자는 전보(Choi 등, 1997B)에서 *Rhodospirillum rubrum* N-1이 ALA 생합성을 위하여 C₄ 및 C₅ 경로를 겸용하는 사실을 보고한 바 있다. 본 연구에서는 *Rhodospirillum rubrum* N-1 균주를 이용하여 균체외 ALA 생산성에 미치는 LA 및 ALA 전구물질의 첨가

배양 효과를 검토하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 사용균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 토양에서 분리한 *Rhodospirillum rubrum* N-1 (Choi 등, 1997A)로써 glutamate를 제외한 Lascelles (1956)의 기본배지(D, L-malic acid 2.7 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $(\text{NH})_2\text{HPO}_4$ 0.8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 27 mg, nicotinic acid 1 mg, thiamine-HCl 1 mg, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1.2 mg, biotin 0.01 mg in 1 l ddH₂O, pH 6.8) 30 ml (2×20 cm culture tube 사용)에 전 배양액 0.1 ml을 주입한 후 30°C, 4 Klux 조도 하에서 혐기적으로 정치 배양하였다. 혐기명 배양시의 광원은 100 W 텅스텐 백열전구를 사용하였으며 glass water bath의 측면에서 조사하였다. 균의 증식은 배양액의 흡광도를 660 nm (spectrophotometer beckman DU-68)에서 나타내었다.

2.2 ALA분석

세포내의 ALA의 농도를 분석하기 위하여 균 배양액을 10,000 rpm, 10분간 원심 분리한 후, cell pellet을 2회 세척하고 증류수 5 ml로 현탁시킨 후 3분간 sonication (10sec intervals)하여 10,000 rpm, 20분간 원심 분리하여 상등액을 분석시료로 사용하였다. 상등액과 배양여과액 각 0.5 ml에 Mauzerall, D (1956) 등의 방법에 따라 1 M Na-acetate buffer (pH 4.7) 0.5 ml과 0.05 ml acetyl acetone을 가한 후 15분간 boiling하였다. 실온에서 냉각 후 Ehrlich reagent (1 g 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 pyrrole양을 556 nm에서 측정된 후 ALA standard curve ($\epsilon_{556}=9300 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)(Choi 등, 1992A)로부터 ALA를 환산 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 LA 첨가의 최적시기

LA를 50 mM 이하의 범위 내에서 각 농도 별로 배양 초기 및 대수기 중기에 첨가 배양하여 균의 증식 속도와 ALA 생산성의 변화를 조사하였다. Table 1에서 보는 바와 같이 균의 증식 속도는 첨가시기에 관계없이 LA 농도에 의하여 비례적으로 경감하는 양상을 보였으나, ALA 생산성은 비교적 저 농도의 LA 존재 하에서, 특히 배양 초기에의 첨가(10 mM)가 가장 효과적이었다. 이 결과로부터 본 균주에 의한 ALA 생합성 조절기구에 관련하여 그 생리적 특성이 LA의 대수기 중기 첨가가 ALA 생산에 있어서 가장 효율적으로 보고한 *Rhodobacter* sp.(Choi 등, 1992B) 균종과는 상이한 것으로 판단되었다.

Table 1. Effect of LA concentration on growth of *Rhodospirillum rubrum* N-1 and ALA production.

LA(mM) ^a	Initial stage		Mid-log stage ^b	
	Growth (660 nm)	ALA(mg/l)	Growth (660 nm)	ALA(mg/l)
0	1.74	1.71	1.74	1.71
10	1.50	7.30	1.68	3.10
20	1.23	4.24	1.32	2.89
30	0.91	1.52	0.81	3.01

a LA was added independently at each stages of cell growth.
 b The addition time at mid-log stage was 3 day cultivation.
 The value for cell growth and ALA were obtained after 4 day cultivation.

Table 2. Increase in ALA secretion by LA supplementation from the cells of *Rhodospirillum rubrum* N-1.

Time (day)	Absence LA			Presence LA		
	extra ALA (mg/l)	intra ALA (mg/l)	Growth (660 nm)	extra ALA (mg/l)	intra ALA (mg/l)	Growth (660 nm)
0	0	0	0	0	0	0
1	1.7	2.6	0.34	2.6	12.7	0.37
2	2.6	4.7	0.76	3.7	17.4	0.81
3	4.7	7.4	1.42	5.4	23.7	1.47
4	4.5	7.1	1.43	5.4	21.6	1.46

Cell cultivation was carried out on a glass-water bath with in Lascelles basal medium containing 30 mM L-glutamic acid in the presence or absence of 10 mM LA at 30°C, pH 6.8, under anaerobic light condition (4 klux).

Extra ALA : Extracellular ALA production

Intra ALA : Intracellular ALA production

3. 2 균체 내외의 ALA 농도 조절

Gills (1983) 등은 C₄와 C₅ 생합성계로부터 각각 합성된 ALA는 ALA dehydratase에 의하여 porphobilinogen으로 전환되나 이 효소 합성의 강력한 저해제인 LA의 첨가 배양으로 세포내의 ALA 농도가 증가한다고 보고하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 기본배지에서 10 mM LA를 첨가 배양하여 균체 내외의 ALA 생산성 변화를 조사한 결과, LA 미첨가의 경우는, 균체 내외에서의 ALA 농도가 거의 동등하였으나, LA를 첨가함으로써 ALA 농도의 extra/intra 비율이 LA 미첨가 대비의 비율보다 약 4~6배 증가하였다. 이 결과는 ALA의 분비 기구가 단순 확산에 의하지 않고 특정 transport system에 의존하고 있음을 강하게 암시하고 있으며, 또한 세포내 ALA 농도의 항상성이 유지되게 하는 조절기구가 존재하는 것으로 사료된다. 이와 같은 현상은 LA 첨가배양으로 *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Gills 등, 1983), *Chlorella vulgaris* (Beale, 1970), *Methanosarcina barkeri* (Mau 등, 1988) 등에서도 보고된바 있으며 ALA 농도의 조절기구에 대한 연구의 필요성이 제기되고 있다.

Table 3. Effect of levulinic acid feeding periods on growth of *Rhodospirillum rubrum* N-1 and ALA production.

LA conc. (mM)	Growth (660 nm)	ALA (mg/l)
0	1.52	7.43
10	1.47	17.4
20	1.42	26.5
30	1.27	45.4
40	1.08	32.1

10 mM LA (initial) and fixed range of concentrations of LA (mid-log phase) were added separately at the 3 day cultivation. The value for cell growth and ALA were obtained after 4 day cultivation.

3. 3 LA의 연속 feeding 효과

10 mM LA를 배양 초기에 첨가한 이후 균 증식의 대수기 중기에 LA 10, 20, 30, 40 mM을 각각 feeding하여 ALA 생산성의 변화를 검토하였다. Table 3에서 보는 바와 같이 LA 첨가배양에 의하여 균의 증식은 첨가한 LA 농도 범위 내에서는 미첨가시의 maximal growth에 비교하여 30%까지 저하되는 결과를 보였다. ALA 생산성에서는 대수기 중기에서 LA 첨가 농도에 비례하여 증가, 30 mM LA의 첨가로 최대치인 45.4 mg/l에 달하였다. 그러나 30 mM 이상의 LA 농도에서는 균의 증식이 억제되어 ALA의 생산성이 저하됨을 보였다. 따라서 LA에 대한 내성 균주의 개량 등의 기법을

이용하여 균체외의 ALA yield를 증가시키기 위한 검토가 현재 진행 중에 있다.

3. 4 ALA 전구물질에 의한 생산

ALA 생합성의 C₄ 및 C₅ 경로에 속하는 전구물질의 첨가배양으로 인한 미첨가 배양 대비 증가 분의 균체외 ALA 농도를 분석함으로써 이들을 기질로 한 in vivo ALA 생합성 속도를 검토하였다(Fig. 1). 결과에는 나타나지 않았지만 glycine과 succinate의 최적 ALA 생산농도인 10 mM을 배양 초기 및 대수기 중기에 각

각 첨가하여 첨가시기에 따른 균의 생육도 및 ALA 생산성을 조사한 결과, 균의 증식은 배양 초기 및 대수기 중기에 첨가했을 때 각각 7%와 15%의 생육 저해 현상을 보였으나 균체외의 ALA 생산성은 이와 관계없이 대수기 중기에 첨가, 첨가 후 24시간만에 증가의 최대치에 도달하여 31 mg/l에 이르렀다. 한편 C₅ 경로의 전구물질인 glutamate를 배양 초기 및 대수기 중기에 각각 첨가하여 첨가시기에 따른 균의 생육도 및 ALA 생산성을 검토한 결과, 균의 생육도는 첨가시기에 관계없이 미첨가 배지 상에

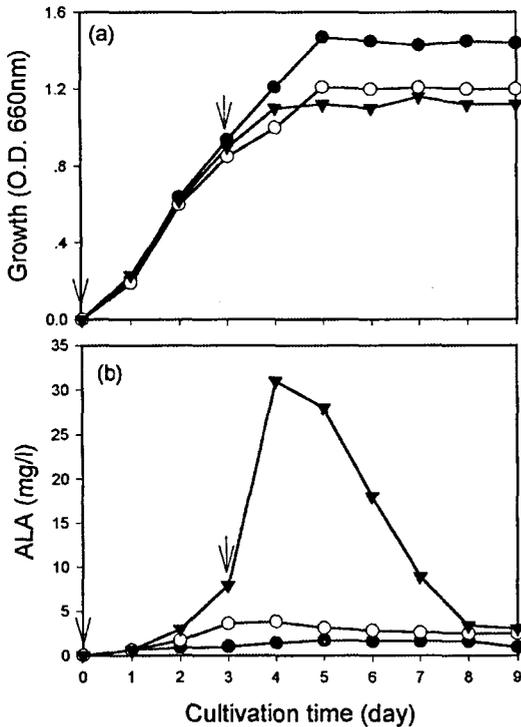


Fig. 1. Effect of glycine and succinate on growth of *Rhodospirillum rubrum* N-1 and ALA production. The concentration of each used were 10 mM. Arrows indicate the added points (at 0 and 3day of cultivation) : None (●), Initial phase (○), Mid-log phase (▼). (a) Growth (b) Ex-tracellular ALA production.

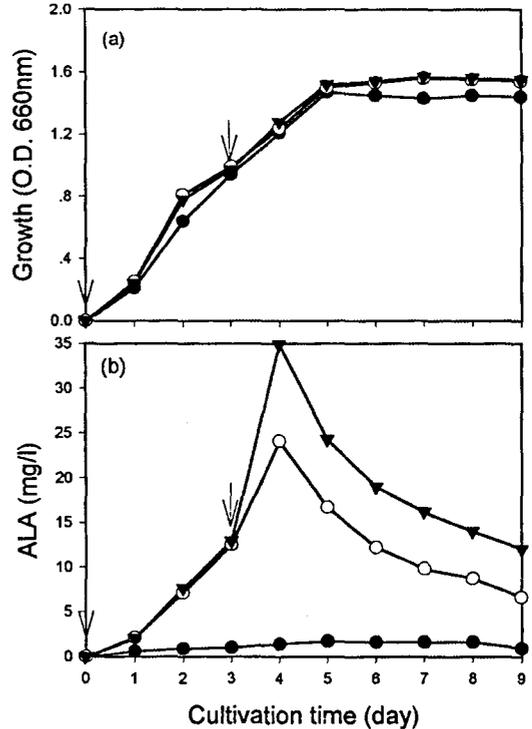


Fig. 2. Effect of glutamate feed on growth of *Rhodospirillum rubrum* N-1 and ALA production. 30 mM glutamate was used. Arrows indicate the added points (at 0 and 3 day of cultivation) : None (●), Initial phase (○), Initial and Mid-log phase (◐). (a) Growth (b) Extracellular ALA production.

서의 증식보다 약 10% 높았다. ALA의 생산성은 이들을 배양 초기 혹은 대수기 중기에 각각 첨가 배양하여 약 40%의 동등한 증가효과를 나타내었다. 한편, 배양초기 및 대수기 중기에 연속 feeding함으로써 ALA 생산성은 34.8 mg/l에 달하였다(Fig. 2). 따라서, 세포내 ALA의 농도가 정밀하게 조절된다는 가정 하에서는 세포 외의 ALA 농도가 증가된 만큼 본 균주가 이들 전구물질을 이용하여 in vivo ALA 생합성을 수행한 것으로 해석된다. 이상의 결과로부터 본 균주는 ALA의 생합성을 위하여 C₄, C₅ 경로가 활성형으로 존재하는 것으로 판단된다.

3.5 ALA 전구물질의 복합 feeding 효과

배양 초기에 LA 10 mM과 glutamate 30 mM을 첨가한 후 대수기 중기에 LA 30 mM 및 glycine, succinate 및 glutamate를 농도 별로 재 feeding 함으로 인한 균의 생육도 및 ALA 생산성의 변화를 조사하였다. Table 4에서 보는 바와 같이 대수기 중기에 전구물질을 복합 첨가함으로써 균의 생육은 1일간 정체 현상을 나타내었으나, ALA의 생산성은 이 기간 동안에 급증하는 현상을 나타내었다. 즉 배양 3 일째 10 mM glycine-succinate, 30 mM glutamate, 및 30 mM LA를 복합첨가 함으로써, 배양 4일째 ALA양이 75 mg/l에 도달하여, 기본배지에 의한 ALA 생산성보다 약 40배의 생

산 증가효과를 보였다. 이 결과는 균체의 ALA 생합성이 C₄ 및 C₅ 경로에 의하여 동시에 진행되고 있음을 시사하는 것으로, 지금까지 보고되어온(Choi 등, 1992A, Choi 등, 1992B) 광합성 세균의 C₅가 C₄의 동시 진행을 확인할 수 있었다.

4. 결 론

토양에서 분리한 광합성 세균인 *Rhodospirillum rubrum* N-1 균주에 의한 δ -amino-levulinic acid (ALA) 생산에 있어서 levulinic acid (LA) 및 ALA 생합성 경로의 첨가효과를 검토하였다.

1. Glutamate를 제외한 Lascelles의 기본배지에 LA를 배양초기에 10 mM, 이후 대수기 중기에 30 mM을 첨가한 결과 균체 외의 ALA 생산성은 최고 45 mg/l에 도달, LA 미첨가 대비 23배 증가하였다.
2. ALA 생합성의 전구물질인 glycine-succinate (C₄) 및 glutamate (C₅)의 feeding 효과는 배양초기/대수기 중기에 LA 10/30 mM을, glutamate 30 mM/30 mM을 각각 첨가하는 한편, 대수기 중기에 10 mM 농도의 C₄ 전구물질을 별도로 첨가배양함으로써 미첨가 대비의 ALA 생산성이 약 40배 (75 mg/l) 증가하였다.

Table 4. Effect of combined feed of precursors on growth *Rhodospirillum rubrum* N-1 and ALA production.

Additives (mM)			Growth (660 nm)		ALA (mg/l)	
Glycine	Succinate	Glutamate	3 day ^a	4 day	3 day	4 day
0	0	0	1.28	1.65	17.2	26.1
5	5	15	1.25	1.08	19.4	45
10	10	30	1.27	1.13	18.3	75
15	15	45	1.29	0.92	17.9	52

^a Indicates day period of cell cultivation.

10 mM LA and 30 mM glutamate were supplemented initially to the medium prior to the additions of 30 mM LA and fixed ranges of concentrations of precursors at mid-log phase of cell growth.

참 고 문 헌

- Avissar, Y.(1980) Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid from glutamate in *anaerobena variabilis*. Biochem. Biophys. Acta. 613, 220.
- Avissar, Y.J. and Beale, S.I.(1989) Identification of the enzymatic basis for 5-aminolevulinic acid auxotrophy in a hemA mutant of *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 171, 2919.
- Beale, S.I.(1970) The biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *chlorella*. Plant. Physiol., 45, 504.
- Beale, S.I. and Castelfranco, P.A.(1974) The biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in higher plants. Plant Physiol. 53, 297.
- Beale, S.I., Gough, S.P. and Granick, R. S.(1975) Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barely. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 2719.
- Burnham, B.F. and Lascelles, J.(1963) Control of porphyrin biosynthesis through a negative-feedback mechanism. Biochem. J. 87, 462.
- Choi, K.M., Yang, J.K., Park, E.R., Bang, K.S. and Lee, S.T.(1997A) Isolation of *Rhodospirillum rubrum* N-1 and its characteristic for use in treatment of swine wastewater. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol. (submitted)
- Choi, K.M., Lim, W.J. and Hwang, S. Y.(1992A) Production of 5-aminolevulinic acid by *Rhodocyclus gelatinosus* strain KUP-74. J. Inst. Biotechnol., Korea. Univ. 4, 37.
- Choi, K.M., Lim, W.J. and Hwang, S. Y.(1992B) Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Rhodobacter sphaeroides*. J. Sci. Technol., Korea Univ. 10, 49.
- Choi, K.M., Yang, J.K., Park, E.R., Bae, J.W., Seo, Y.K. and Lee, S.T. (1997B) A fundamental study on utilization of photosynthetic bacteria metabolites. J. of KOWREC. (submitted)
- Gills, H., Jaenchen, R. and Thauer, R. K. 1983. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Methanobacterium Thermoautotrophicum*. Arch. Microbiol., 135, 237.
- Hollriegel, V., Lamm, L., Rowold, J., Horig, J. and Renz, P. 1982. Biosynthesis of vitamin B-12: Different pathways on some aerobic and anaerobic microorganisms. Arch. Microbiol. 132, 155.
- Huang, D.D. and Wang, W.Y. 1986. Chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas starts* with the formation of glutamyl-tRNA. J. Biol. Chem. 261, 13451.
- Kikuchi, G., Kumer, A., Talmage, P. and Shemin, D. 1958. The enzymatic synthesis of 5-aminolevulinic acid. J. Biol. Chem. 223, 1214.
- Lascelles, J. 1956. The synthesis of porphyrin and bacteriochlorophyll by cell suspensions of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. Biochem. J. 62, 78.

- Leong, S.A., Ditta, G.S. and Heinski, D.R. (1982) Heme biosynthesis in *Rhizobium*: Identification of a cloned gene coding for 5-aminolevulinic acid synthase from *Rhizobium meliloti*. J. Biol. Chem. 257, 8724.
- Masayaki, Y., Yew, N.S., Federspiel, M., Dodgson, J.B., Hayashi, N. and Engel, J.D. (1985) Isolation of recombinant cDNAs encoding chicken erythroid 5-aminolevulinic acid synthase. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 82, 3702.
- Mau, Y.H. and Wang, W.Y. 1988. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Physiol. 86, 793.
- Mauzerall, D. and Granick, S. 1956. The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. J. Biol. Chem. 219, 435.
- Nandi, D.L., Baker-cohen, F. and Shemin, D. 1968. 5-Aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. J. Biol. Chem. 243, 1224.
- Rebeiz, C.A., Montazer-zouhoor, A., Hoppen, H.J. and Wu, S.M. (1984) Photodynamic herbicides (concept and phenomenology). Enzyme Microb. Technol., 6, 300.
- Rhee, H.I., Murata, K. and Kimura, A. (1987) Formation of the herbicide, 5-aminolevulinic acid, from L-alanine and 4, 5-dioxovalerate by *Pseudomonas riboflavina*. Agric. Biol. Chem. 51(6), 1701.
- Sasaki, K., Nishizawa, Y. and Hayashi, M. (1987) Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. J. Ferment. Technol. 65, 511.
- Tomoo, N. and Mori, R. (1981) Biosynthesis of porphyrin precursors in mammals. J. Biol. Chem. 256, 10335.
- Wright, M.S., Cardin, R.D. and Beale, S.I. (1987) Isolation and characterization of an 5-aminolevulinic acid-requiring *Rhodobacter capsulatus* mutant. J. Bacteriol. 169, 961.