

## 광합성세균 균체대사산물의 자원화에 대한 기초적 연구

최 경 민, 양 재 경, 박 응 로  
배 진 우, 서 용 기,\* 이 성 택

한국과학기술원 생물과학과, \*계명대학교 식품가공학과

### A Fundamental Study on Utilization of Photosynthetic Bacteria Metabolites

Kyung-Min Choi, Jae-Kyung Yang, Eung-Roh Park  
Jin-Woo Bae, Yong-Ki Seo,\* Sung-Taik Lee

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

\*Department of Food Science and Technology, Keimyung University

#### ABSTRACT

The role of L-glutamic acid, a precursor of C<sub>5</sub> ALA biosynthetic pathway, on the production of 5-aminolevulinic acid (ALA) has been described in cells of *Rhodospirillum rubrum* N-1. To the Lascelles basal medium the addition of both 30 mM L-glutamic acid and 20 mM levulinic acid (LA) provided to increase the extracellular ALA yield up to 40 fold (76 mg/l). By the addition of both 60 mM glycine and succinic acid, precursors of C<sub>4</sub> ALA biosynthetic pathway, at middle log phase of cell growth ALA yield was increased 27 fold (52 mg/l) although the cell growth was inhibited to a certain extent.

**Key words** : 5-Aminolevulinic acid, *Rhodospirillum rubrum* N-1, levulinic acid, C<sub>5</sub> pathway, C<sub>4</sub> pathway

#### 초 록

5-Aminolevulinic acid (ALA) 생합성의 C<sub>5</sub> 경로의 전구물질인 L-glutamic acid가 *Rhodospirillum rubrum* N-1 세포내에서 ALA 생산의 역할을 검토하였다. Lascelles의 기본배지에 L-gluta-

mic acid와 levulinic acid (LA)를 각각 30, 20 mM 첨가배양으로써 균체의 ALA 생산성이 40배 증가(76 mg/l)하였다. 한편 C<sub>4</sub> 경로의 기질인 glycine과 succinic acid를 대수기 증기에 각각 60 mM 첨가함으로써, 균의 증식은 억제되었으나 균체외의 ALA는 52 mg/l에 달하였다.

핵심용어 : 5-Aminolevulinic acid, *Rhodospirillum rubrum* N-1, levulinic acid, C<sub>5</sub> 경로, C<sub>4</sub> 경로

### 1. 서 론

유기폐수의 각종 생물학적 정화법에서 최근에 이르러 특히 광합성세균에 의한 폐수처리법이 주목을 받고 있다(Kobayashi 등, 1979). 광합성세균에 의한 폐수처리는 부산물로 발생하는 슬러지를 균체로 이용함으로써 슬러지의 폐기물화를 막고 유용물질로서 재 자원할 수 있는 장점을 가지고 있다. 광합성세균의 성분은 단백질 함량이 높고 각종 아미노산이 고르게 분포되어 있어 수산 및 축산사료원으로서 실용성이 크다고 알려져 있다(小林達治, 1970; 小林達治, 1985).

한편, 광합성균체의 이용은 제조제, 토양개선훈제의 기능을 갖는 고부가가치성 유기질 비료로 개발되고 있는 점이다(kobayashi 등, 1985). 광합성세균 균체 중에는 심근경색증 치료제로 알려진 Ubiquinone Q<sub>10</sub> 이외 비타민 B<sub>12</sub>를 비롯한 각종의 비타민과 색소가 대량 함유되고 있다(Hirotani 등, 1990). 최근에는 항바이러스성 물질이 추출되어 구조가 밝혀진 바 있고 porphyrin을 포함하는 tetrapyrrole계 화학물질인 heme 함유물질의 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다(Hirotani 등, 1991). 이들 균체내 물질들의 일부는 균체외로 분비되고 있으며 세포배양의 제한 영양성분 및 제조 활성의 기능을 갖는 5-aminolevulinic acid (ALA)가 대표적인 물질이라 할 수 있다. 폐수처리 산물

의 재자원화는 균체의 이용에 국한되지 않고 이 같은 균체의 물질의 이용 즉 폐수 처리한 처리수의 이용까지 확대될 수 있을 것으로 기대된다.

저분자 화합물인 ALA는 약효성, 선택성, 무독성 등 제조제로서의 조건을 구비한 생물활성물질로 보고되어 있으며, 기질 analogue인 levulinic acid (LA) 및 succinyl acetone은 ALA 탈수효소의 저해제로 작용하고 있어 LA의 첨가에 의해서 ALA가 균체외로 분비됨이 *Methanobacterium thermoautotrophicum* (Gills 등, 1983), *Chlorella vulgaris* (Beale, 1970), *Methanosarcina backerl* (Mau 등, 1988) 등에서 검토되었고, aminotransferase를 이용한 4, 5-dioxovalerate-alanine계의 효소합성법이(Rhee 등, 1987) 보고되고 있다. ALA는 사람과 동물 그리고 농작물에 피해를 주지 않으면서 잡초를 선택적으로 고사시키는(Fig. 1)(Rebeiz 등, 1984) 한편, ALA는 *Trichppusia ni*를 비롯한 여러 곤충에 대한 살충제로서도 작용함이 보고되고 있다(Rebeiz 등, 1988).

생체 내에서의 tetrapyrroles의 생합성은 prime intermediate인 ALA의 세포내 농도에 의해 조절된다. 생물계의 ALA는 glutamic acid (C<sub>5</sub> 경로)나 glycine과 succinyl CoA (C<sub>4</sub>경로)로 부터 각각 aminotransferase와 ALA synthase에 의하여 생합성 되는 것으로 알려져 있다(Chen 등, 1981; Burnham, 1970).

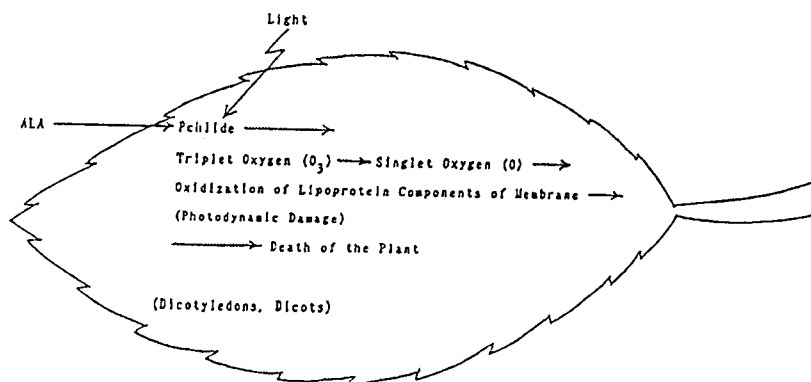


Fig. 1. Photodynamic Action of 5-aminolevulinic acid in dicotyledons.

본 연구에서는 유기폐기물을 탄소원으로 하여 증식이 용이하고 증식속도가 비교적 빠르며 유기성 폐수처리수를 배지원으로 한 ALA의 지속적인 생산이 이루어질 때 폐수처리수로 부터 직접적으로 fertilizer 또는 herbicides를 생산 가능할 것으로 사료되어 전보(Choi 등, 1997)에서 이용한 균주를 배양시의 생산효율성을 극대화하기 위하여 LA의 존재 하에서 ALA 생합성의 전구물질로 작용하는 glycine과 succinate (C<sub>4</sub>) 및 glutamate (C<sub>5</sub>)의 분리 첨가 배양에 의한 ALA의 생산성 변화를 검토하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

### 2.1 사용균주 및 배양조건

본 실험에 사용한 균주는 토양에서 분리한 *Rhodospirillum rubrum* N-1 (Choi 등, 1997) 로써 glutamate를 제외한 Lascelles (1956)의 기본배지 (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>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.8 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 27 mg, nicotinic acid 1 mg, thiamine-HCl 1 mg, MnSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O 1.2 mg, biotin 0.01 mg in

1/ ddH<sub>2</sub>O, 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 텡스텐 백열전구를 사용하였으며 glass water bath의 측면에서 조사하였다. 균의 증식은 배양액의 흡광도를 660 nm (spectrophotometer beckman DU-68)에서 나타내었다.

### 2.2 ALA 분석

배양여과액 0.5 ml에 Mauzerall (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 ρ-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 측정할 후 ALA standard curve (ε 556 = 9300 M<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>) (Choi 등, 1992A)로부터 ALA를 환산 정량하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 LA의 효과

LA는 ALA dehydratase의 저해제로 알려져 있으며, 이의 첨가 배양으로 균체의 ALA 농도가 증가한다고 보고된 바 있다(Gills 등, 1983; Beale, 1970; Mau 등, 1988). 실험에 사용한 균주 *Rhodospirillum rubrum* N-1는 기본배지 상에서는 배양 여과액 중의 ALA 농도가 2.0 mg/l로써 낮아 spectrophotometer에

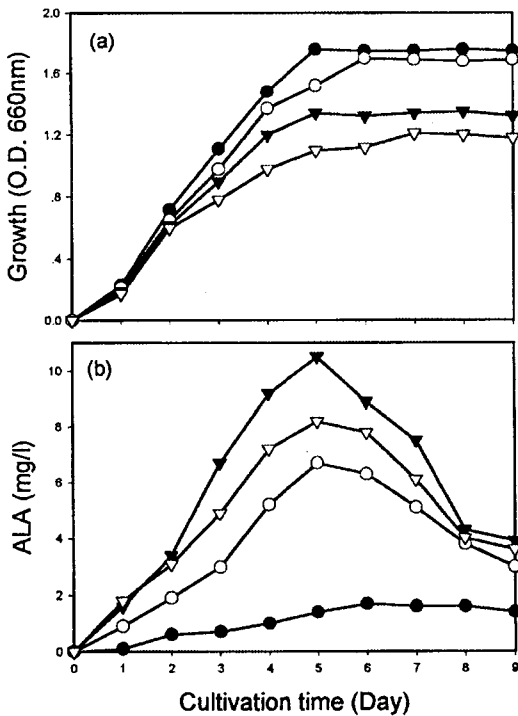


Fig. 2. Effect of levulinic acid concentrations on cell growth and ALA production of *Rhodospirillum rubrum* N-1. Levulinic acid was added at the beginning of cultivation in range of 0 mM (●), 10 mM (○), 20 mM (▼), 30 mM (▽). (a) Growth, (b) Extracellular ALA production.

의한 ALA 농도 측정이 곤란하였다. 전구물질 첨가에 의한 ALA 생합성 조절기구에 관한 기초연구를 위해서는 우선 균체의 ALA 농도를 향상시켜야 하는 것으로 사료되었다. 따라서 LA를 0~30 mM 농도로 배양 초기에 첨가한 후 균의 증식과 ALA 생산성의 변화를 검토하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 LA를 첨가 배양한 결과 균의 증식에는 변화가 없었으나 ALA의 생산성은 20 mM 농도에서 가장 높은 수율을 보여 10.5 mg/l에 이르렀다. 이상의 결과는 전보(Choi 등, 1992B)에 발표한 *Rhodobacter sphaeroides* 균주보다 본 연구에 사용한 *Rhodospirillum rubrum* N-1 균주가 LA의 낮은 첨가시에 높은 ALA 생산성을 보여 전보의 *Rhodobacter sphaeroides* 균주보다 ALA의 생산성이 우수한 균주로 사료된다.

#### 3.2 C<sub>4</sub> 경로 전구물질 효과

ALA 생산에 관여하는 C<sub>4</sub> 경로와 관련하여 Lascelles (1956)의 기본배지에 본 균주를 배양 시 glycine과 succinic acid의 동시 첨가에 의한 균의 증식과 ALA 생산의 변화를 조사하였다. Fig. 3a에서 보는 바와 같이 glycine과 succinic acid를 배양 초기에 각각 60 mM을 첨가했을 때 균의 증식이 강력히 억제되는 경향을 보였다. 한편, glycine과 succinic acid를 각각 60 mM을 균의 배양 대수기 중기에 첨가한 이후 균의 증식은 억제되었으나 균체의 ALA는 52 mg/l 이상 증가하였다(Fig. 3b). Lascelles (1956)에 의하면 제시된 growth inhibitor로서의 glycine에 의하여 본 균주의 증식도 저해되었지만 대수기 중기에 glycine을 첨가 배양함으로써 ALA 농도가 급격히 증가한 결과로부터 glycine이 ALA 생합성을 위한 C<sub>4</sub> 경로의 전구체로 작용하는 것으로 사료된다.

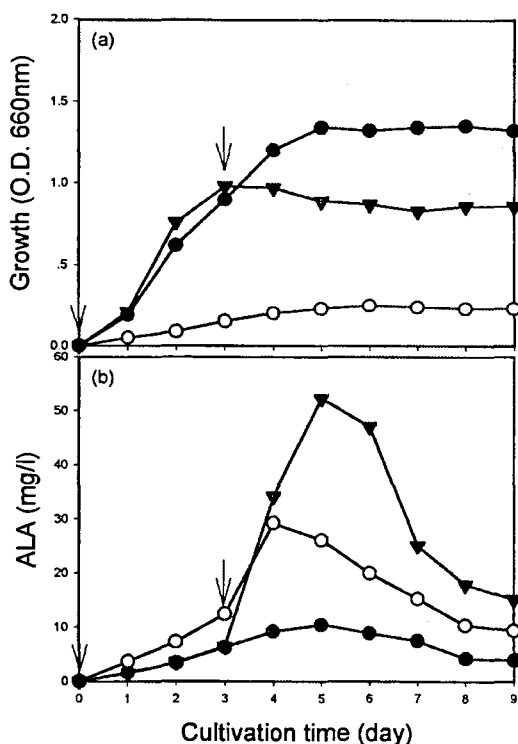


Fig. 3. Effect of glycine and succinic acid supplements with LA on cell growth and ALA production of *Rhodospirillum rubrum* N-1. Glycine and succinic acid concentrations were simultaneously adjusted to 60 mM at the beginning (○), at the middle log phase (▽), of cell cultivation, and basal medium alone (●). All the basal media contained 20 mM LA. (a) Growth, (b) Extracellular ALA production.

### 3.3 C<sub>5</sub> 경로 전구물질 효과

ALA 생합성의 C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> 경로와 관련하여 Lascelles의 기본배지에 함유된 L-glutamic acid가 *Rhodospirillum rubrum* N-1에의 생리적 역할을 검토하기 위하여 glutamic acid를 10, 30, 50 mM 농도로 변화시켜 균의 증식과 ALA 생합성에 미치는 영향을 검토하였다.

Fig. 4a에서 보는 바와 같이 glutamic acid 30 mM까지는 균의 증식율이 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 증가하지 않았다. ALA생산

성은 30 mM 이하의 glutamic acid 첨가 배양시, 대수기 중기에서 급격히 증가한 후 감소하는 현상을 나타내었다 (Fig. 4b). Glutamic acid 30 mM에서 ALA 생산의 최대치는 76 mg/l로써 glycine과 succinic acid의 첨가 배양시의 최대 ALA 생산량 (52 mg/l) 보다 1.5 배의 증가를 보여 *Rhodospirillum rubrum* N-1의 경우 ALA 생합성은 glutamic acid를 우선적인 전구물질로 이용하는 C<sub>5</sub> 경로를 경유하는 것으로 사료된다.

이상의 결과는 Choi (1992B) 등이 발표한

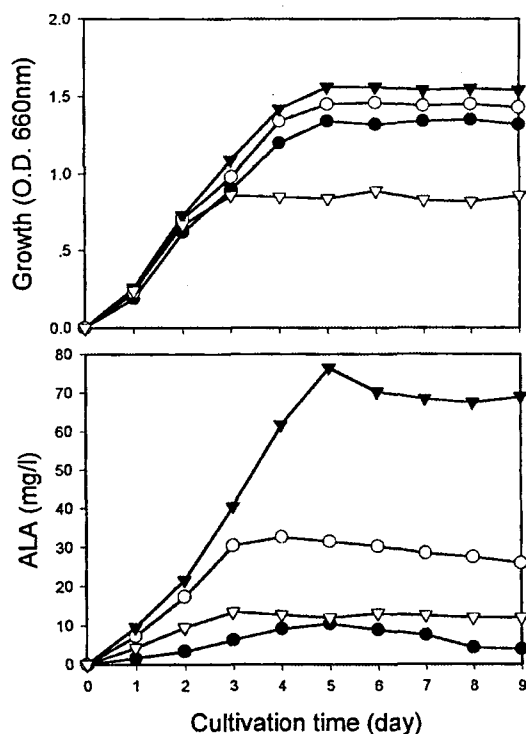


Fig. 4. Effect of L-glutamic acid supplements with LA on cell growth and ALA production of *Rhodospirillum rubrum* N-1. The basal media contained initial concentrations of 20 mM LA and following individual concentrations of L-glutamic acid: 0 mM (●), 10 mM (○), 30 mM (▽), 50 mM (▽). (a) Growth, (b) Extracellular ALA production.

*Rhodobacter sphaeroides* 균주의 C<sub>5</sub> 경로의 경유하는 결과와 일치하였으나, *Rhodospirillum rubrum* N-1의 ALA C<sub>4</sub>, C<sub>5</sub> 경로에 관련한 연구 결과가 제시된 바 없으므로, in vivo 상에서의 ALA 생성율의 변화를 정밀 분석하는 등, ALA 생합성 조절기구를 명확히 규명하여 ALA의 생산성 증가에 대한 연구가 필요하다고 사료된다.

#### 4. 결 론

토양에서 분리한 광합성세균 *Rhodospirillum rubrum* N-1 균체를 이용한 균체 대사 산물인 5-aminolevulinic acid를 생산하는 C<sub>5</sub>경로의 전구물질인 L-glutamic acid, C<sub>4</sub> 경로의 기질인 glycine과 succinic acid를 첨가하여, 균체외의 ALA 생산성의 기초적인 연구를 하였다.

1) Lascelles의 기본배지에 L-glutamic acid와 levulinic acid (LA)를 각각 30, 20 mM 첨가배양으로써 균체의 ALA 생산성이 40 배 증가(76 mg/l)하였다.

2) C<sub>4</sub> 경로의 기질인 glycine과 succinic acid를 대수기 중기에 각각 60 mM 첨가함으로써, 균의 증식은 억제되었으나 균체외의 ALA는 52 mg/l에 달하였다.

3) *Rhodospirillum rubrum* N-1의 경우 ALA 생합성은 glutamic acid를 우선적인 전구물질로 이용하는 C<sub>5</sub> 경로를 경유하는 것으로 생각된다.

#### 참 고 문 헌

Bang, K.S. and Lee, S.T.(1997) Isolation of *Rhodospirillum rubrum* N-1 and its characteristic for use in treatment of

swine wastewater. Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.(submitted)

Beale, S.I.(1970) The biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *chlorella*. Plant. Physiol., 45, 504.

Burnham, B.F.(1970) 5-Aminolevulinic acid synthetase (*Rhodopseudomonas sphaeroides*), Methods in Enzymology., H. Tubor, and C.W. Tubor, eds. 17(A). 195, New York, Academic Press.

Chen, J., Miller, G.W. and Takemoto, J. Y.(1981) Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Arch. Biochem. Biophys. 208, 221.

Choi, K.M., Yang, J.K., Park, E.R., Lascelles, J.(1956) The synthesis of porphyrin and bacteriochlorophyll by cell suspensions of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. Biochem. J. 62, 78.

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.

Gills, H., Jaenchen, R. and Thauer, R. K.(1983) Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Methanobacterium Thermoautotrophicum*. Arch. Microbiol., 135, 237.

Hirotani, H., Agui, Y., Kobayashi, M. and Takahashi, E.(1990) Removal of

- coliphages from wastewater effluent by phototrophic bacteria. *Wat. Sci. Tech.* 22, 59.
- Hirotsu, H., Ohgishi, H., N.K., Koshimizu, K. and Takahashi, E.(1991) Inactivation of T5 phage by cis-vaccenic acid, an antiviral substance from *Rhodospseudomonas capsulata* and by unsaturated fatty acids and related alcohols. *FEMS Microbiol. Letters.* 77, 13.
- Kobayashi, M., Fujii, Shimamoto, J. and Maki, T.(1979) Treatment and re-use of industrial waste by phototrophic bacteria. *Prog. water Technol.*, 11, 249.
- Kobayashi, M., Suzuki, M., Yoshida, T., Katayama, H. and Imai, K.(1985) Soil biology and conservation of the biosphere: Role of soil microorganisms and the utilization, *Sopron* 27, August, (Hungary).
- 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.
- Rebeiz, C.A., Montazer-zouhoor, A., Hoppen, H.J. and Wu, S.M.(1984) Photodynamic herbicides (concept and phenomenology). *Enzyme Microb. Technol.*, 6, 300.
- Rebeiz, C.A. and Juvik, J.A.(1988) Porphyrin insecticides. *Pesticide. Biochem Physiol.*, 30, 11.
- 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.
- 小林達治 (1970) 光合成細菌による 廢液處理と 資源化. *化學と生物.* 8, 604.
- 小林達治 (1985) 光合成細菌による 濃厚有機排水の 資源化處理. *用水と廢水.* 27, 40.