

Rhodopseudomonas sp. KCTC1437에서의 Polyhydroxyalkanoates와 5-Aminolevulinic Acid의 생합성

김형석 · 최강국 · 문명님¹ · 양영기^{1*} · 이영하^{*}
충남대학교 미생물학과, ¹조선대학교 생명과학부

Rhodopseudomonas sp. KCTC1437 균주를 이용하여 polyhydroxyalkanoate (PHA)와 5-aminolevulinic acid (ALA)를 생산하기 위한 배양조건과 이들 생합성 조건의 상호관련성에 대하여 조사하였다. PHA 생합성을 위한 탄소원으로는 acetic acid가 가장 효과적이었으나, succinic acid를 보조 탄소원으로 사용하였을 때의 세포건체량은 2.5 g/l, PHA 함량은 건체량의 73%로서 주 탄소원만을 사용할 때에 비하여 크게 증가하였다. 조사된 탄소원으로부터 생합성된 PHA는 모두 polyhydroxybutyrate 단일중합체이었으나, valeric acid로부터는 3-hydroxybutyrate와 3-hydroxyvalerate로 구성된 공중합체가 생산되었다. ALA의 생합성을 위하여서는 환원제인 sodium thioglycolate를 첨가하여 혐기적 조건을 만들고, 탄소원인 acetic acid와 propionic acid 이외에 전구물질인 levulinic acid, succinic acid와 glycine을 반복적으로 공급해주었을 때 가장 좋았으며, 약 400 mg/l의 ALA를 생산할 수 있었다. 그러나 ALA 생합성의 필수물질인 glycine, levulinic acid와 환원제는 세포생장과 PHA의 생합성을 저해하는 것으로 나타났다. 이러한 실험 결과, *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437 균주로부터 PHA와 ALA를 동시에 생산할 수 있으나, 두 가지 유용산물을 효율적으로 생합성하기 위한 각각의 배양조건이 상호 배타적임을 확인하였다.

Key Words □ 5-aminolevulinic acid, polyhydroxyalkanoate, polyhydroxybutyrate, *Rhodopseudomonas* sp.

Polyhydroxyalkanoates (PHAs)는 미생물들이 불균형 생장조건, 즉 과량의 탄소원 존재하에 질소, 인, 황과 같은 영양원이 결핍되어 있는 배양조건에서 세포 내에 탄소 및 에너지원으로 축적하는 저장성 고분자물질로서, 세포 내 환원적 평형 (reducing equivalents)을 유지하기 위한 수단으로도 이용될 수 있다(3,14). PHAs는 그 구성에 따라 다양한 물성을 지니며 또 자연계에서 쉽게 분해될 수 있는 환경친화적 생분해소재이기 때문에, 환경오염 문제를 야기하고 있는 화학합성 플라스틱을 대체할 수 있는 유용한 물질로 많은 주목을 받고 있다. 그러나 합성 플라스틱에 비하여 생산비가 높다는 단점 때문에 PHAs의 산업화는 아직까지 제한적으로만 이루어지고 있는 실정이다. 따라서 최근에는 PHA 생산비를 낮추기 위한 방법으로 PHA 합성과 동시에 다른 유용산물을 합성할 수 있는 시스템을 개발하거나(23), 농업·축산 폐수 또는 폐기물을 이용하여 PHA를 생산할 수 있는 방안들이 모색되고 있다(5).

한편, five-carbon amino acid인 5-aminolevulinic acid (ALA)는 porphyrin, heme, vitamin B12와 같은 tetrapyrroles의 전구물질로서, 대부분의 생명체에서 생합성될 수 있는데 이 화합물의 세포내 농도는 feed-back 조절에 의해 엄격하게 유지된다(17,19). ALA는 잡초와 같은 쌍자엽 식물에만 선택적 저해를 할 뿐 단자엽 식물이나 인간을 비롯한 대부분의 동물에는 해가 없는 생분해성 제초제로 매우 유용한 물질이다(15). 또한 옥수수, 보리, 감

자와 같은 식용작물에는 성장 촉진 효과가 있는 것으로 보고되어 있으며(7), 최근에는 피부암에 대한 photodynamic therapy로서도 응용되어지고 있다(9). 동물과 식물에서의 ALA 생합성 대사 과정이 상대적으로 복잡하고 생산량이 매우 적은데 반하여, 미생물로부터의 ALA 생합성량은 비교적 높기 때문에 미생물을 이용한 ALA 생산에 대한 연구가 주로 이루어지고 있다(19, 22).

Rhodobacter, *Rhodopseudomonas*, *Rhodospirillum* 등의 속에 포함되는 홍색 비유황 세균(purple non-sulfur bacteria)들은 다양한 탄소원을 이용하여 polyhydroxybutyrate (PHB), poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) [poly(3HB-co-3HV)] 등의 PHAs를 축적할 수 있으며(1,2,11,14), 유기성 폐수의 혐기적 소화 시 생성되는 acetic acid 등의 저분자량 휘발성 지방산을 이용하여 ALA를 효율적으로 생산할 수 있는 것으로 알려져 있다(19). 본 실험의 목적은 이들 홍색 비유황 세균에서 세포내 축적물질인 PHA와 세포의 분비물질인 ALA의 생합성 조건이 동시에 충족될 수 있는가를 규명하는데 있다. 이를 위하여 본 실험에서는 *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437을 이용하여 PHA와 ALA의 생합성을 위한 배양조건을 확인하고, 이 두 가지 유용물질의 생합성 조건의 상호관련성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지

본 연구에서는 예비실험을 통하여 PHA 및 ALA 생합성능이

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 042-821-6413, 062-234-4326, Fax: 042-822-7367
E-mail: yhrhee@cnu.ac.kr, ygyang@mail.chosun.ac.kr

확인된 *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437 균주를 사용하였다. 균주 배양을 위한 기본배지로 사용된 glutamate-malate (GM)배지는 1 l의 증류수에 sodium-L-glutamate 3.8 g, D,L-malic acid 2.7 g, yeast extract 2.0 g, KH_2PO_4 0.5 g, K_2HPO_4 0.5 g, $(\text{NH}_4)_2 \cdot 5\text{HPO}_4$ 0.8 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, mineral solution 10 ml을 첨가하여 만들었다(pH 7.0). Mineral solution은 증류수 1 l에 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 5.3 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 120 mg, thiamine-HCl 100 mg, nicotinic acid 100 mg, biotin 1 mg을 첨가하여 제조하였다. 균주의 보존을 위해서는 2% agar가 포함된 GM배지를 사용하였으며, PHA와 ALA의 합성을 위해서는 GM배지 내 yeast extract 농도를 0.5 g/l로 변형하여 사용하였다.

배양조건

GM평판배지에서 배양 중인 *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437 균주를 백금기를 이용하여 250 ml 플라스크(working volume 100 ml)에 접종한 후, 30°C에서 반험기적 광조건(3 klux)으로 3일 동안 배양한 것을 종균으로 사용하였다. 회분식 배양은 GM배지 300 ml이 들어 있는 500 ml 플라스크에 10% (v/v) 종균 배양액을 접종한 후 종균배양과 동일조건에서 5일 동안 배양하였다.

균체수득 및 PHA의 추출과 정제

배양을 마친 배양액을 12,000×g로 15분간 원심분리하여 균체를 얻었으며, 수득한 균체들은 냉동실에서 얼린 후 동결건조하였다. PHA를 추출하기 위하여 일정량의 sea sand에 동결된 세포를 넣고, 막자 사발로 갈고 분쇄된 세포를 thimble filter (Advantec Co., USA)에 넣고 soxhlet extractor를 사용하여 chloroform으로 PHA를 추출하였다(8). 추출된 PHA는 10배 부피의 ethanol에 침전시킨 후 filtration으로 고분자만 수회하여 건조시켰다. 건조된 고분자를 diethylether로 세척하여 색소를 빼내었으며, 침전과 세척을 수회 반복하여 정제하였다.

분석방법

균의 생장은 분광광도계(V-550 UV/VIS Spectrophotometer, JASCO Co., JAPAN)를 이용하여 파장 660 nm에서 측정하였으며, 세포 건체량(dry cell weight, DCW)은 동결건조한 균체로 측정하였다. ALA의 농도는 원심분리(12,000×g, 10 min)된 세포 배양액의 상등액을 이용하여 Mauzerall와 Granick의 방법(13)에 의해서 측정하였다. 상등액 7 ml에 acetate buffer (pH 4.6) (glacial acetic acid 57 ml에 sodium acetate trihydrate 136 g을 넣은 후, 증류수를 공급하여 전체 부피가 1 l되게 함) 2.8 ml과 0.2 ml의 acetylacetone을 첨가한 후 15 분간 100°C에서 가열하고 다시 냉각하여 2 ml을 분취하였다. 여기에 동량의 modified Ehrlich reagent (ρ -dimethylaminobenzaldehyde 1 g을 glacial acetic acid 42 ml과 70% perchloric acid 8 ml에 녹여 제조)를 가하여 15분 동안 실온에서 반응시킨 후 착색된 화합물의 양을 553 nm에서의 흡광도로 측정하였으며, ALA standard curve로부터 ALA 농도를 환산 정량하였다(13). 세포내 축적된 PHA의 정량 및 정성분석은 Kim 등(8)의 방법에 따라 동결건조한 균체와 표준시료

에 내부 표준물질로 0.2% benzoic acid를 첨가하여 각각 methanolysis한 후 gas chromatography를 이용하여 측정하였다. 본 실험에서의 PHA 및 ALA의 정량은 3회 반복하여 측정하였다.

결과 및 고찰

PHA 생합성

탄소원에 따른 균체 성장과 PHA 생합성에 미치는 영향을 알아보기 위하여 몇 가지 유기산(acetic acid, propionic acid, valeric acid, malic acid)을 탄소원으로 이용하여 *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437를 배양하였다. 조사된 탄소원 중에는 acetic acid가 균체 성장 및 PHA 생합성에 가장 좋은 탄소원으로 나타났으며, acetic acid로부터 생성된 PHA는 3-hydroxybutyrate 단량체만으로 이루어진 PHB 단일중합체이었다(Table 1). 일반적으로 흡수개의 탄소수를 갖는 propionic acid와 valeric acid는 poly(3HB-co-3HV)를 생합성 할 수 있는 기질 (혹은 보조 기질)로 잘 알려져 있다(3,6,10,11). 그러나 본 실험에 사용된 *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437 균주는 valeric acid로부터 3HV 함량이 40 mol%를 상회하는 poly(3HB-co-3HV)를 생산할 수 있었으나, propionic acid로부터는 PHB 단일중합체만을 생성하였다. 이러한 결과는 KCTC1437 균주의 경우, valeryl-CoA와는 달리 propionyl-CoA가 보다 쉽게 acetyl-CoA로 전환되기 때문인 것으로 보여진다(11). 즉 valeryl-CoA를 거쳐 생성되는 3-hydroxyvaleryl-CoA로부터 3HV를 함유하는 poly(3HB-co-3HV)를 합성할 수 있으나, propionyl-CoA는 쉽게 acetyl-CoA로 전환되어져 propionyl-CoA와 acetyl-CoA가 3-ketothiolase의 촉합반응에 의한 3-ketovaleryl-CoA, 3-hydroxyvaleryl-CoA로의 반응이 이

Table 1. Biosynthesis of PHAs by *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437 from different carbon sources

Carbon Source (mM)	Incubation Time (days)	D.C.W (g/l)	PHA Content (% wt)	PHA Composition		
				3HB (%)	3HV (%)	
Malic acid	(10)	4	1.63	6	100	.
	(20)	4	1.93	18	100	.
	(30)	4	2.01	21	100	.
Acetic acid	(50)	4	1.64	45	100	.
	(70)	5	1.94	53	100	.
	(80)	6	2.02	57	100	.
	(100)	7	2.42	60	100	.
Valeric acid	(120)	7	2.67	69	100	.
	(10)	4	1.45	21	55	45
	(20)	6	1.52	30	59	41
Propionic acid	(30)	8	0.78	51	56	44
	(15)	6	1.21	4	100	.
	(30)	6	1.19	10	100	.
	(40)	6	1.07	13	100	.

루어지지 않아 poly(3HB-co-3HV)를 합성하지 못하고 PHB 단일 중합체만을 생합성하는 것으로 추정된다.

Table 1에서 보듯이 *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437의 균체 성장과 PHA 생합성량은 acetic acid의 초기 농도가 높아질수록 효과적이었으며, 초기 acetic acid의 농도가 120 mM이었을 때의 최대 PHA 축적량은 전체량의 69%에 달하였다. 이러한 PHA 생성능은 지금까지 알려진 다른 종류의 purple non-sulfur bacteria에 비하여 매우 높은 수준이다. 또한 대부분의 PHA 생산 균주의 경우 세포 증식 후 PHA 축적이 본격적으로 이루어지는데 반하여(12), *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437 균주는 특이하게도 배양 초기부터 PHA 축적과 세포 성장이 동시에 이루어졌다. 질소고정 세균인 *Azotobacter chroococcum* (20) 등의 균주에서도 발견된 이러한 현상은, 다량의 탄소원이 존재하는 조건에서 명반응 과정 중 생성된 ATP와 NADPH가 암반응 대신 PHA 생합성 대사에 이용되기 때문인 것으로 추정된다.

Rhodococcus 속의 광합성 세균들의 경우, succinic acid를 보조 기질로 첨가하였을 때 methylmalonyl-CoA를 거쳐 propionyl-CoA로 전환시킬 수 있기 때문에 poly(3HB-co-3HV) 공중합체를 생산할 수 있다(24). 다른 종류의 여러 미생물들의 경우에도 보조 기질로서 levulinic acid (4), propionic acid (6,10,11) 등과 같은 유기산이나, 또는 threonine, valine, isoleucine과 같은 아미노산(25,26)을 첨가해 주었을 때 3HV의 함량이 높은 poly(3HB-co-3HV) 공중합체를 생산할 수 있다. 본 실험에서는 ALA 합성에 전구물질 또는 필수적인 첨가물질로 사용되는 glycine, succinic acid, levulinic acid, L-glutamic acid를 비롯하여 propionic acid를 보조 기질로 첨가하였을 때, PHA 생합성량 및 생성되는 PHA의 조성에 미치는 영향을 알아보았다(Table 2). 먼저 ALA 합성의 전구 물질로 사용되는 아미노산인 L-glutamic acid와 glycine의 첨가 효과를 확인하기 위하여 GM배지에 acetic acid를 주 탄소원으로 하고 L-glutamic acid와 malic acid가 배제된 배지를 대조

구로 하였다. GM 배지에 L-glutamic acid를 10 mM에서 40 mM까지 보조 기질로서 첨가해 준 결과, L-glutamic acid의 농도가 높아질수록 전체량은 증가하였으나 PHA 축적량은 감소하는 양상을 보였다. 이는 L-glutamic acid에 질소 성분이 포함되어 있어 PHA 생산에 부정적 영향을 주었기 때문이라 생각된다. L-glutamic acid의 첨가와 함께 glycine이 보조 기질로서 첨가되었을 때에는 균체 성장에 저해를 주었지만 PHA 합성은 대조구보다 좋았다. 하지만 glycine의 농도가 높은 경우 균체 성장과 PHA 합성 모두 저해받는 것으로 나타났다. 반면에 succinic acid가 보조 기질로 이용되었을 때에는 세포 성장이 촉진되었으며, PHA 합성도 주목할 만큼 증가하였다. 특히 30 mM의 succinic acid가 첨가되었을 경우에는 2.5 g/l의 전체량을 얻었으며 전체량의 73%가 PHB로 축적되어 1.8 g/l의 PHB가 합성되었다. 그러나 valeric acid와 비슷한 구조를 가지며, *Ralstonia eutropha* 균주에서 3HV의 전구물질로 작용하여 3HV의 함량이 높은 poly(3HB-co-3HV) 공중합체 생산에 효과적인 것으로 알려진 levulinic acid (4)는 균체 성장과 PHA 생산에 저해를 주었으며, 생합성된 PHA의 조성에도 아무런 변화를 주지 않았다.

홍색 비유황 세균들은 빛과 산소의 존재 유무 등에 따른 다양한 배양조건에서 성장할 수 있다. 본 실험에서는 빛과 산소의 공급 여부가 *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437의 성장과 PHB 생합성에 어떠한 영향을 줄 수 있는지에 대하여 조사하였다. 이를 위하여 배양액 내 탄소원과 질소원으로 30 mM의 acetic acid와 0.5 g/l의 yeast extract를 공통적으로 첨가하여 동일하게 하였으며, 대수기에 해당되는 배양 3일째에 배양조건을 변화하였다. Fig. 1에서 보듯이 혐기적 광조건에서 혐기적 암조건으로의 배양 조건 변화는 세포의 성장을 정지시켰으며, 세포 내에 축적되었던 PHB도 점차적으로 감소되는 양상을 보였다. 혐기적 명조건에서 호기적 암조건으로 배양조건을 바꾸었을 경우에는 뚜렷한 세포 성장의 변화가 일어나지 않았으나, 배양 6일 후의 세포 내 PHB

Table 2. Biosynthesis of PHAs from mixtures of acetic acid and co-substrates by *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437

Carbon Source (mM)	Incubation Time (days)	D.C.W (g/l)	PHA Content (% wt)	PHA Composition	
				3HB (%)	3HV (%)
Acetic acid (70)	5	1.94	53	100	.
Acetic acid (70) + L-glutamate (10)	5	1.77	40	100	.
Acetic acid (70) + L-glutamate (20)	5	1.95	40	100	.
Acetic acid (70) + L-glutamate (30)	6	2.19	36	100	.
Acetic acid (70) + L-glutamate (40)	6	2.29	31	100	.
Acetic acid (70) + L-glutamate (30) + Glycine (10)	5	1.38	57	100	.
Acetic acid (70) + L-glutamate (30) + Glycine (20)	5	1.24	52	100	.
Acetic acid (70) + L-glutamate (30) + Glycine (30)	5	1.20	49	100	.
Acetic acid (70) + Levulinic acid (10)	4	2.03	49	100	.
Acetic acid (70) + Levulinic acid (30)	4	1.73	39	100	.
Acetic acid (70) + Succinic acid (10)	5	2.37	71	100	.
Acetic acid (70) + Succinic acid (30)	6	2.50	73	100	.
Acetic acid (70) + Propionic acid (30)	4	1.30	21	100	.

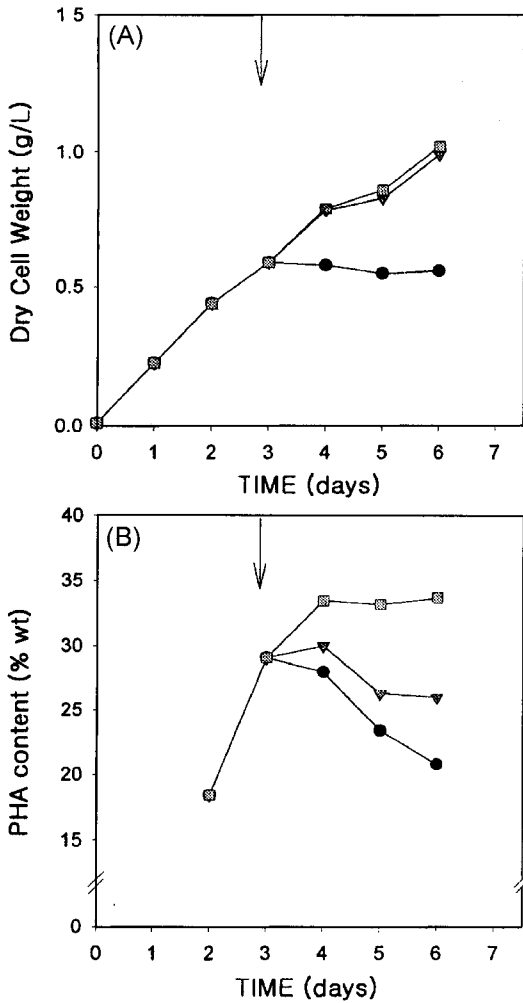


Fig. 1. The influence of light and aeration on cell growth (A) and polymer formation (B) during the batch culture of *Rhodopseudomonas* sp. in GM medium. When the dry cell weight of the strain grown under anaerobic light culture conditions reached about 0.5 g/l at 3 days (arrows), the culture condition was changed to anaerobic/dark (●) or aerobic/dark (▼). A control experiment in which anaerobic/light culture condition was unchanged was also conducted (■).

합량이 혐기적 명조조건이 6 일간 지속적으로 이루어진 경우에 비하여 약 20% 감소하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 혐기적 광조건이나 호기적 암조건이 세포 성장에는 영향을 미치지 않으나, 호기적 암조건에서는 보다 많은 탄소원을 요구하기 때문에 PHB가 분해되어 탄소원으로 사용되는 것으로 생각된다.

ALA 생합성

ALA의 합성은 glycine과 succinic acid가 전구물질로 작용하는 C4 pathway와 L-glutamic acid를 전구물질로 하여 ALA를 합성하는 C5 pathway가 있다(17,19,22). C4 pathway에서는 succinyl-CoA와 glycine으로부터 5-aminolevulinic acid synthase에 의해 ALA가 생합성되며, 이 경로를 통한 ALA 합성은 동물, 곰팡이, 몇몇 chemotrophs와 홍색 비유황 광합성세균 등의 미생물에서

관찰된다. C5 pathway에서는 glutamic acid로부터 ATP와 Mg⁺⁺ dependent glutamyl-tRNA synthetase, NADPH dependent dehydrogenase 및 pyridoxal phosphate dependent aminotransferase에 의한 연속적인 반응을 통해 ALA가 합성된다. 이 합성과정을 통한 ALA 합성은 식물, 조류 및 일부의 세균에서 발견되고 있다. 따라서 세포외로의 ALA 생산량을 증가시키기 위해서는 ALA의 전구물질인 glycine/succinate (또는 glutamic acid)의 공급이 매우 중요한 것으로 알려져 있다.

C5 pathway와 관련된 glutamic acid가 *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437의 성장과 ALA 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 glutamic acid의 농도를 달리하여(10-80 mM) 첨가한 후 배양한 결과, glutamic acid 농도가 증가할수록 세포의 증식은 증가하

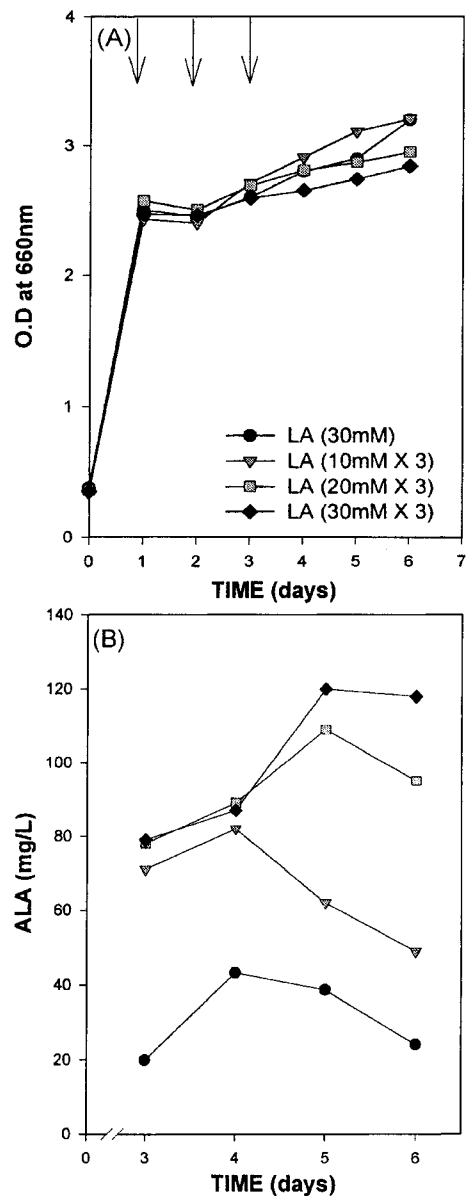


Fig. 2. Effect of repeated addition of LA on cell growth (A) and ALA production (B). Arrows indicate LA addition times.

는 양상을 보였으나 ALA의 생산량은 농도에 관계없이 공통적으로 낮은 수준이었다(미제시 자료). 이에 반하여 C4 pathway와 관련된 전구물질 glycine과 succinic acid의 공급은 ALA 생합성에 큰 영향을 주었다. 배양 24 시간 이후 공급된 glycine과 succinic acid는 세포 성장을 억제하였으며, 첨가 농도의 증가에 의해 그 억제 현상이 두드러졌다. 그러나 ALA의 생산은 각각의 전구물질을 30 mM씩 공급하였을 때 44 mg/l로 가장 효과적이었다. 한편, 이러한 전구물질을 배양 초기에 공급하였을 때에는 세포 생장이 거의 이루어지지 않았으며, 배양 대수기 후기에 공급하였을 때에는 ALA 생합성이 거의 이루어지지 않았다. 이러한 결과로부터 *Rhodospseudomonas* sp. KCTC1437에서의 ALA 생합성은 C4 pathway에 의해 이루어짐을 확인하였다.

Levulinic acid는 5-aminolevulinic acid synthase에 의해 합성된 ALA를 porphobilinogen으로 전환하는 ALA dehydratase (ALAD)의 활성을 저해함으로써 ALA 농도 증가에 큰 영향을 줄 수 있다(16). 본 실험에서는 배양 1일째에 서로 다른 농도의 levulinic acid를 첨가하고, 세포 성장과 ALA 생합성량의 변화를 조사하였다. 공급된 levulinic acid에 의하여 세포 증식은 급격히 억제되었으나, levulinic acid의 농도가 30 mM에 이르기까지 농도 증가에 따라 ALA의 생산량은 크게 증진됨으로써 KCTC1437 균주에서의 ALA 생산 역시 공급된 levulinic acid의 농도에 의해 큰 영향을 받고 있음을 확인하였다(미제시 자료). 또한 배양 1일째에 30 mM levulinic acid를 공급하고 24 시간 간격으로 각각 30 mM levulinic acid를 2회 더 연속하여 공급한 경우, ALA의 생산량은 120 mg/l에 달할 수 있었다(Fig. 2).

탄소원의 종류와 농도에 따른 *Rhodospseudomonas* sp. KCTC1437로부터 ALA 생산량의 변화를 조사한 결과, acetic acid

를 단일 기질로 사용했을 때 보다 malic acid가 ALA 생산을 위한 기질로 효과적이었다(미제시 자료). 그러나 PHA 생산과 연계하여, 축산폐수의 혐기적 소화에 의해 생산될 수 있는 acetic acid (70 mM)와 propionic acid (40 mM)를 혼합 탄소원으로 사용하였을 때, ALA 생산량은 최대 140 mg/l 이상으로서 malic acid를 단일 탄소원으로 사용하였을 때에 비하여 20% 이상 증가하였다(미제시 자료). 이는 propionic acid도 levulinic acid와 마찬가지로 ALAD의 억제제로 작용할 수 있다는 결과와 관련 있을 것으로 생각된다(21). 하지만 acetic acid의 농도와 상관없이 ALA 합성은

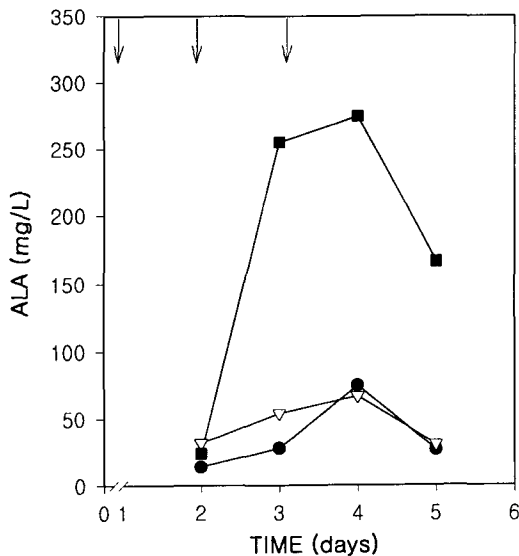


Fig. 3. Effect of repeated addition of LA, succinic acid and glycine on the production of ALA by *Rhodospseudomonas* sp. KCTC1437. Symbols: ●, LA only (30 mM X 3); ▽, a mixture of LA and succinic acid (30 mM X 3); ■, a mixture of LA, succinic acid and glycine (30 mM X 3). Arrows indicate addition times.

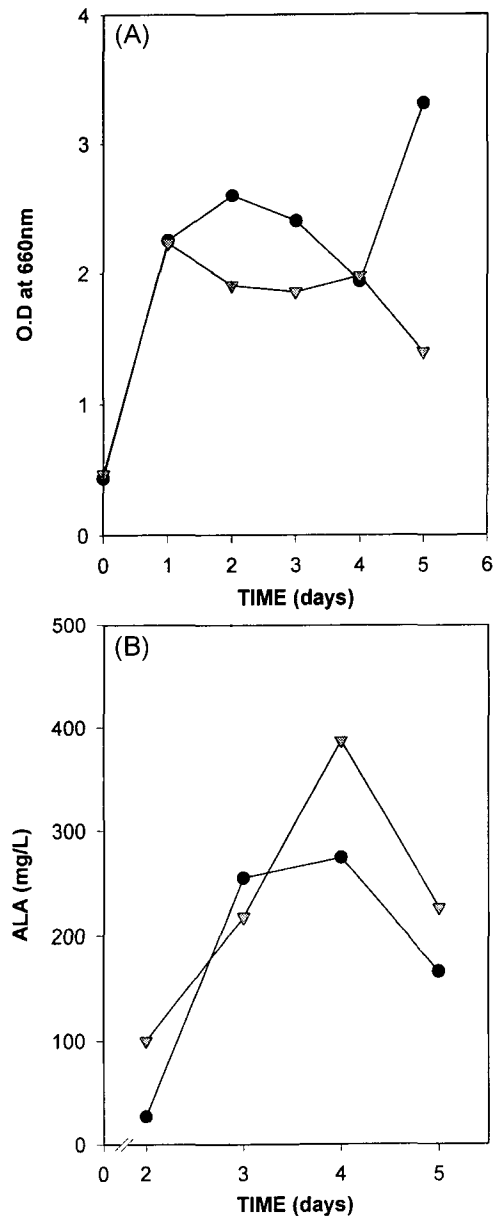


Fig. 4. Effect of sodium thioglycolate on cell growth (A) and ALA production (B). Symbols: ●, culture medium without sodium thioglycolate; ▽, culture medium with sodium thioglycolate (0.5 g/l). The mixture of LA, succinic acid and glycine was repeatedly added (30 mM X 3) as shown in Fig. 3.

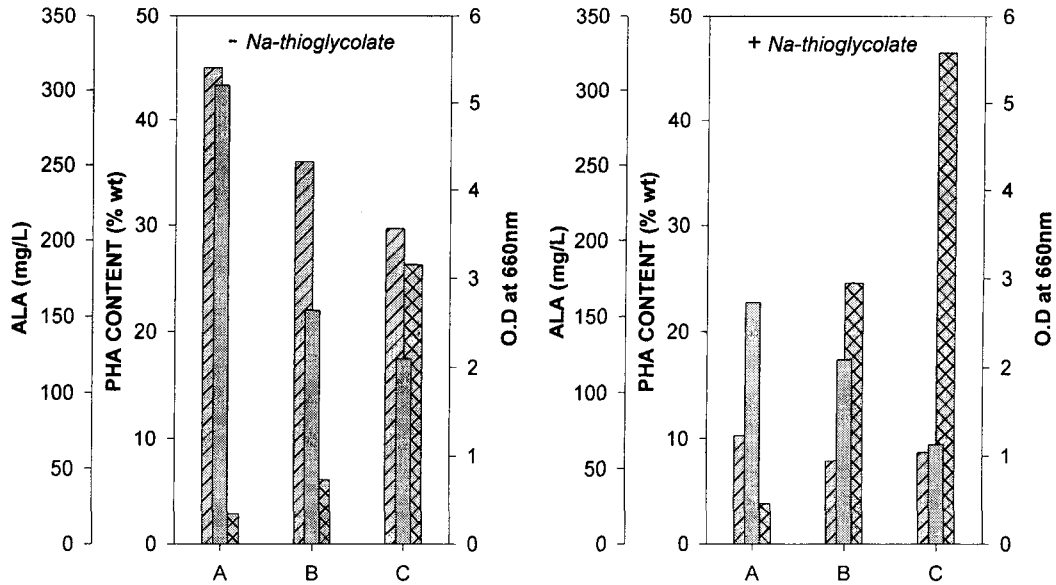


Fig. 5. Experimental results for the production of PHB and ALA by *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437 under different culture conditions with or without sodium thioglycolate. A, control (no addition of LA, succinic acid and glycine); B, repeated addition of LA (30 mM×3); C, repeated addition of a mixture of LA, succinic acid and glycine (30 mM×3). Symbols: ⊠, ALA concentration; □, OD at 660 nm; ▨, PHA content.

일정하였기 때문에 향후의 실험에서는 탄소원으로 acetic acid와 propionic acid를 각각 70 mM과 40 mM의 농도로 사용하였다.

ALA 생합성을 위한 보조기질인 succinic acid와 glycine의 연속 첨가가 ALA 생합성 증진에 미치는 영향을 조사하였다. 배양 1일째에 각각 30 mM의 succinic acid, glycine 및 levulinic acid를 공급하고 24 시간 간격으로 동일 농도의 succinic acid와 levulinic acid를 3회 공급한 경우, ALA의 생산량은 levulinic acid만 연속 공급한 경우와 비슷한 수준의 100 mg/l이었다. 그러나 succinic acid, glycine 및 levulinic acid를 각각 30 mM씩 반복적(24 시간마다 3회)으로 첨가하였을 때의 ALA 생산량은 280 mg/l로 크게 증진되었다(Fig. 3).

산소는 ALA synthase의 합성과 관련하여 ALA 생합성에 영향을 준다. 즉 호기적 조건에서 혐기적 조건을 변환하였을 때 ALA synthase 활성의 증가로 ALA의 합성은 증가한다고 밝혀졌다(19). 이에 혐기적 환원상태의 배양조건을 갖추기 위하여 환원제인 sodium thioglycolate (0.5 g/l)를 배양액에 첨가하였더니 succinic acid, glycine 및 levulinic acid를 연속 공급한 조건에서 ALA는 400 mg/l 수준까지 생합성되었다(Fig. 4).

PHA와 ALA 생합성의 상호 관련성

PHA와 ALA 생합성 조건의 상호 관련성을 알아보기 위하여 다양한 배양조건에서의 PHA와 ALA의 합성 양상을 비교하였다(Fig. 5). 탄소원으로는 70 mM acetic acid와 40 mM propionic acid를 사용하였다. ALA 전구물질을 첨가하지 않고 배양한 조건에서는 세포 성장에 영향을 주지 않기 때문에 전구물질을 첨가한 조건에서 배양한 것보다 균체의 생장은 좋았다. 이 때, PHA는 전체량의 45%가 생합성되었으나 ALA는 단지 20 mg/l만이 생합성되었다. Levulinic acid만 연속적으로 첨가되었을 때는

ALA의 전구물질이 첨가되지 않은 조건보다 ALA 생합성이 소량 증가하였으나 세포 성장과 PHA는 감소하였다. 반면에 levulinic acid, succinic acid와 glycine이 첨가되면 전체량이 낮아지고 PHA 생합성도 전체량의 30%로 감소하였으나, ALA는 170 mg/l 까지 생합성되었다. 또한 환원제인 sodium thioglycolate가 첨가된 경우 PHA는 모든 배양조건에서 모두 전체량의 약 10% 수준에 불과하였으나, 모든 전구물질이 첨가된 조건에서 약 326 mg/l의 ALA가 합성되었다. 하지만 sodium thioglycolate의 첨가는 세포 성장을 억제하는 결과를 보였다.

이상의 결과를 종합하여 볼 때, *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437는 탄소원인 acetate, propionate 및 succinic acid로부터 ALA와 PHA를 합성할 수 있으며, 이들의 합성경로가 상호 연관되어 있을 것으로 판단된다(Fig. 6). 하지만 본 실험의 결과는 ALA와 PHA의 생합성을 위한 최적 조건이 상호 배타적임을 보여 주었다. 즉, ALA의 전구물질(glycine 등)이나 sodium thioglycolate가 첨가되지 않은 배양조건에서 탄소원인 acetic acid와 propionic acid는 주로 세포 성장 및 PHA 생합성에 이용되며, 중간에 첨가되는 succinic acid도 세포 성장과 methylmalonyl-CoA pathway를 통한 PHA 합성에도 관여하는 것으로 보여진다. 하지만 ALA의 전구물질이 첨가되지 않았기 때문에 ALA 합성량은 적으며, 합성되어진 ALA도 즉시 ALAD에 의해서 porphobilinogen (PBG)으로 전환되어진다. 반면 많은 양의 ALA를 합성하기 위해서는 필수 전구물질과 함께 ALA에서 porphobilinogen (PBG)으로의 전환을 막기 위한 levulinic acid의 첨가가 필수적이거나, 이들 물질들에 의해 성장이 억제되면서 탄소원의 이용이 적어지기 때문에 세포 내 PHA 생합성은 상대적으로 적어지고 propionic acid는 세포 성장 및 PHA 합성에 이용되는 대신 ALAD의 억제 작용으로 이용될 것으로 추측된다.

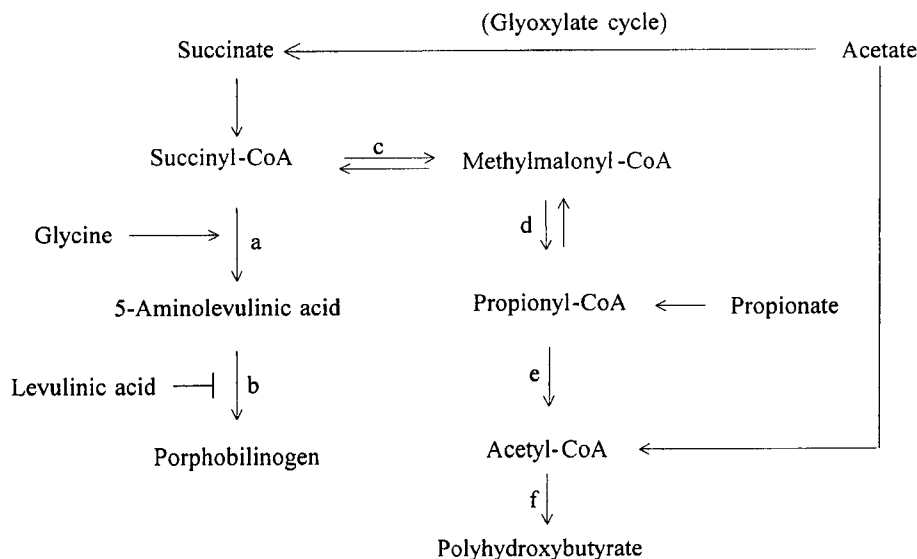


Fig. 6. A possible pathway for PHB and ALA synthesis in *Rhodospseudomonas* sp. KCTC1437. a, ALA synthase; b, ALA dehydratase; c, methylmalonyl-CoA mutase; d, propionyl-CoA carboxylase; e, acetyl-CoA transferase; f, PHA synthetic enzymes (β -keto thiolase, NADPH dependent acetoacetyl coenzyme A reductase, and PHA synthase).

감사의 글

본 연구는 2000학년도 조선대학교 학술연구비 지원으로 수행되었습니다.

참고문헌

- Anderson, A.J., D.R. Williams, B. Taidi, E.A. Dawes, and D.F. Ewing. 1992. Studies on copolyester synthesis by *Rhodococcus ruber* and factors influencing the molecular mass of polyhydroxybutyrate accumulated by *Methylobacterium extroquens* and *Alcaligenes eutrophus*. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 93-102.
- Brandl, H., E.J. Knee Jr, and R.C. Fuller. 1989. Ability of the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* to produce various poly(3-hydroxyalkanoates): Potential sources for biodegradable polyesters. *Int. J. Biol. Macromol.* 11, 49-55.
- Braunegg, G., G. Lefebvre, and K.F. Genser. 1998. Polyhydroxyalkanoates, biopolyesters from renewable resources: Physiological and engineering aspects. *J. Biotechnol.* 65, 127-161.
- Chung, S.H., G.G. Choi, H.W. Kim, and Y.H. Rhee. 2001. Effect of levulinic acid on the production of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by *Ralstonia eutropha* KHB-8862. *J. Microbiol.* 39, 79-82.
- Hassan, M.A., Y. Shirai, A. Kubota, M.I.A. Karim, K. Nakanishi, and K. Hashimoto. 1998. Effect of oligosaccharides on glucose consumption by *Rhodobacter sphaeroides* in polyhydroxyalkanoate production from enzymatically treated crude sago starch. *J. Ferment. Bioeng.* 86, 57-61.
- Haywood, G.W., A.J. Anderson, D.F. Ewing, and E.A. Dawes. 1990. Accumulation of a polyhydroxyalkanoate containing primarily 3-hydroxydecanoate from simple carbohydrate substrates by *Pseudomonas* sp. strain NCIMB 40135. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 3354-3359.
- Hotta, Y., T. Yanaka, H. Takoka, Y. Takeuchi, and M. Konnai. 1997. New physiological effects of 5-aminolevulinic acid in plants: The increase of photosynthesis chlorophyll content, and plant growth. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61, 2025-2028.
- Kim, D.Y., Y.B. Kim, and Y.H. Rhee. 2000. Evaluation of various carbon substrates for the biosynthesis of polyhydroxyalkanoates bearing functional groups by *Pseudomonas putida*. *Int. J. Biol. Macromol.* 28, 23-29.
- Kloek, J. and G.M.J.B. van Henegouwen. 1996. Prodrugs of 5-aminolevulinic acid for photodynamic therapy. *Photochem. Photobiol.* 64, 994-1000.
- Lee, K.T., J.Y. Kim, Y.H. Rhee, K.S. Bae, and Y.B. Kim. 1995. Biosynthesis of poly- β -hydroxyalkanoates by *Bacillus thuringiensis* R-510. *J. Microbiol.* 33, 59-65.
- Liebergesell, M., E. Hustede, A. Timm, A. Steinbüchel, R.C. Fuller, R.W. Lenz, and H.G. Schlegel. 1991. Formation of poly(3-hydroxyalkanoates) by phototrophic and chemolithotrophic bacteria. *Arch. Microbiol.* 155, 415-421.
- Madison, L.L. and G.W. Huisman. 1999. Metabolic engineering of poly(3-hydroxyalkanoates): from DNA to plastic. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63, 21-53.
- Mauzerall, D. and S. Granick. 1956. The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* 219, 435-446.
- Philippis, R.D., A. Elba, M. Guastini, C. Sili, and M. Vincenzini. 1992. Factors affecting poly-hydroxybutyrate accumulation in cyanobacteria and in purple non-sulfur bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 103, 187-194.
- Rebeiz, C.A., A. Montazar-Zouhoor, H.J. Hopen, and S.M. Wu. 1984. Photodynamic herbicides: 1. Concept and phenomenology. *Enzyme Microb. Technol.* 6, 390-401.
- Sasaki, K., M. Wasanori, and N. Nishio. 1997. Inhibition of 5-aminolevulinic acid (ALA) dehydratase by undissociated levulinic acid during ALA extracellular formation by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol. Lett.* 19, 421-424.
- Sasaki, K., S. Ikeda, Y. Nishizawa, and M. Hayashi. 1987. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Fer-*

- ment. *Technol.* 65, 511-515.
18. 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, 727-731.
 19. Sasikala, C., Ch.V. Ramana, and P.R. Rao. 1994. 5-aminolevulinic acid: A potential herbicide/insecticide from microorganisms. *Biotechnol. Prog.* 10, 451-459.
 20. Savenkova, L., Z. Gercberga, Z. Kizhlo, and E. Stegantseva. 1999. Effect of phosphate supply and aeration on poly- β -hydroxybutyrate production in *Azotobacter chroococcum*. *Process Biochemistry* 34, 109-114.
 21. Tanaka, T., K. Watanabe, S. Nishikawa, K. Sasaki, N. Nishio, and S. Nagai. 1995. Inhibitory effect of propionic acid on the 5-aminolevulinic acid (ALA) dehydratase from *Rhodobacter sphaeroides* and ALA excretion. *Seibutsu-kogaku* 73, 21-25.
 22. Van der Werf, M.J., and G. Zeikus. 1996. 5-aminolevulinic acid production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides hemA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3560-3566.
 23. Vincenzini, M., A. Marchini, A. Ena, and R.D. Philippis. 1997. H₂ and polyhydroxybutyrate, two alternative chemicals from purple non sulfur bacteria. *Biotechnol. Lett.* 19, 759-762.
 24. Williams, D.R., A.J. Anderson, E.A. Dawes, and D.F. Ewing. 1994. Production of a co-polyester of 3-hydroxybutyric acid and 3-hydroxyvaleric acid from succinic acid by *Rhodococcus ruber* biosynthetic considerations. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 717-723.
 25. Yoon, J.S., J.Y. Kim, and Y.H. Rhee. 1995. Effects of amino acid addition on molar fraction of 3-hydroxyvalerate in copolyester of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate synthesized by *Alcaligenes* sp. SH-69. *J. Ferment. Bioeng.* 80, 350-354.
 26. Yoon, J.S., K.Y. Yun, J.Y. Kim and Y.H. Rhee. 1996. Effects of amino acid on the biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in *Alcaligenes* sp. K-912. *Microorganisms and Industry* 22, 13-19.

(Received June 1, 2002/Accepted June 5, 2002)

ABSTRACT: Biosynthesis of Polyhydroxyalkanoates and 5-Aminolevulinic Acid by *Rhodopseudomonas* sp. KCTC1437

Hyeong-Seok Kim, Gang-Guk Choi, Myeng-Nim Moon¹, Young-Ki Yang¹, and Young Ha Rhee (Department of Microbiology, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea, ¹Department of Biological Sciences, Chosun University, Kwangju 501-759, Korea)

For elucidating the relationship between the biosynthetic pathways for polyhydroxyalkanoates (PHAs) and 5-aminolevulinic acid (ALA), culture conditions for the production of these two biomaterials by *Rhodopseudomonas* sp. KCTC 1437 were investigated. Of the carbon substrates tested, acetic acid was the best carbon source for cell growth and PHA biosynthesis. When succinic acid was added as a co-substrate into culture medium, cell growth and PHA production were greatly increased up to 2.5 g/l and 73% of dry cell weight, respectively. The PHA obtained from the carbon substrates tested was homopolyester of 3-hydroxybutyrate, while valeric acid was only effective for the production of copolyester consisting of 3-hydroxybutyrate and 3-hydroxyvalerate. Anaerobic light culture condition was better for PHA production and cell growth than anaerobic dark or aerobic dark culture condition. The organism was capable of synthesizing ALA when glycine and succinic acid were added to the culture medium. ALA was produced to ca. 400 mg/l when levulinic acid, succinic acid, and glycine were repeatedly added with a reductant (sodium thioglycolate). However, the presence of glycine, levulinic acid and sodium glycolate inhibited the cell growth and the conversion of carbon substrates to PHA. From these results it is apparent that the production yields of PHA and ALA could not be increased simultaneously because the optimal conditions for the production of PHA and ALA are opposed to each other.