

유전자 재조합 대장균에 의한 5-Aminolevulinic Acid (ALA)의 생산 및 공정 모니터링 I. ALA의 생산 특성

^{1,3}정 상 윤 · ^{1,3}서 국 화 · ^{1,3}한 경 아 · ²조 성 호 · ⁴백 경 환 · ^{2,3†}이 종 일
전남대학교, ¹물질·생물화공과, ²응용화학공학부, ³생물공정기술연구실, ⁴응용생물공학부
(접수 : 2003. 9. 27., 게재승인 : 2004. 2. 24.)

Production and Process Monitoring of 5-Aminolevulinic Acid (ALA) by Recombinant *E. coli* I. Characteristics of ALA Production

Sang-Yun Chung^{1,3}, Kook-Hwa Seo^{1,3}, Kyung-Ah Han^{1,3}, Sung-Hyo Cho², Kyung Hwan Bak⁴, and Jong Il Rhee^{2,3†}
¹Department of Materials and Biochemical Engineering, ²Faculty of Applied Chemical Engineering, ³BioProcess
Technology Lab., ⁴Faculty of Applied Biotechnology, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
(Received : 2003. 9. 27., Accepted : 2004. 2. 24.)

In this study the extracellular production of 5-aminolevulinic acid (ALA) by recombinant *E. coli* BL21 (DE3) pLysS harboring the plasmid pFLS45 are investigated. Optimum concentrations of succinic acid and glycine for cell growth and ALA production were found to be 30 mM and 15 mM, respectively. Levulinic acid (LA) as an inhibitor of ALAD was added to the culture medium in the end of exponential cell growth phase and its optimum concentration was 30 mM. Growth of recombinant *E. coli* BL21 (DE3) pLysS [pFLS45] was largely dependent upon the pH value of culture medium. When the pH of culture medium was in the range of 6.0 and 6.5, high cell mass and ALA production were obtained. IPTG induction for the expression of the fusion gene did not enhance the production of ALA. Recombinant cell grew at 30°C faster than at 37°C, but ALA productivity was lower than at 37°C. Repeated addition of glycine, succinic acid, and LA increased the production of ALA and the inhibition of intracellular ALA dehydratase activity, with up to 1.3 g/L ALA having been produced in the cultivation.

Key Words : ALA production, glycine, succinic acid, LA, recombinant *E. coli*

서 론

5-aminolevulinic acid (ALA)는 C-5의 지방족 화합물로서 각종 유기체의 tetrapyrrole 생합성 (porphyrin, chlorophyll, heme 및 vitamin B12 등) 과정에서 발견되는 중간물질의 하나이다(1). ALA는 heme 구조를 가진 각종 효소나 porphyrin 중간물질, 비타민 등의 제조에서 전구물질(intermediates)로 사용되기도 한다. 또한 ALA는 환경 친화적이면서 부작용이 적은 생체물질로서 식물의 광합성 증대나 효소작용 및 각종 대사 조절을 가능하게 하므로 생

분해성 농약 (제초제, 살충제, 식물성장 촉진제)이나 암 진단/치료제로서 폭넓은 응용 가능성이 제시되고 있다(1-3). ALA의 다양한 응용성과 수요 증가로 ALA의 합성에 대한 연구가 1980년대 후반부터 활발하게 진행되고 있다. ALA의 화학적 합성은 합성단계가 복잡하고 생산 비용이 높으며 수율이 낮기 때문에 (50% 미만) 각종 박테리아나 조류를 이용하여 ALA를 생물학적으로 생산하려는 노력이 꾸준히 이루어지고 있다(2, 4). ALA의 생물학적 생산을 위해 고효율 균주의 탐색 및 분리, 고성능 생물공정의 개발에 대한 연구가 이루어지고 있다. 야생 균주를 이용하여 3-5 mM 정도의 ALA를 생산할 수 있었으나 ALA의 대량생산을 위해 많은 공정상의 제약 (빛의 조사, 고가의 전구체 투여)이 뒤따른다(3, 5-9). 그러나 최근, 유전자 재조합 기술을 이용하여 ALA를 생산하는 균주를 개발하여 ALA를

† Corresponding Author : Faculty of Applied Chemical Engineering,
Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea
Tel : +82-62-530-1847, Fax : +82-62-530-0846
E-mail : jirhee@chonnam.ac.kr

대량으로 생산하고자 하는 노력이 활발히 진행되고 있다 (10-12).

ALA의 생합성

ALA의 생합성은 succinyl-CoA와 glycine으로부터 합성되는 C-4 경로 (Shemin pathway) 또는 glutamate를 전구체로 이용하는 C-5 경로로부터 이루어지는데, 생산된 ALA는 5-aminolevulinic acid dehydratase (ALAD, PBG synthetase)에 의해 빠르게 porphobilinogen (PBG)으로 전환된다(Fig. 1). 우선, C-4 경로에 의한 ALA 생산은 주로 홍색 비유황 광합성 세균 (purple non-sulphur photosynthetic bacteria), 영양 생물 (chemotrophs), 근류(根瘤) 박테리아 (rhizobia), 곰팡이 그리고 동물 세포 등에 의해 이루어지는데, *hemA* 또는 *hemT* 유전자에 의해 조절되는 ALA synthetase (ALAS)가 ALA 합성의 율속 단계 효소로 관여한다. 한편, C-5 경로에 의한 ALA의 생합성은 고등 식물, 조류, 대장균 그리고 *Xanthomonas* sp., *Propionibacterium* sp. 등의 박테리아에서 이루어지는데 ① *gltX* 유전자에 의해 조절되는 glutamyl-tRNA synthetase의 glutamyl-tRNA 합성 단계, ② *hemA*나 *hemM* 유전자에 의해 조절되는 glutamyl-tRNA reductase의 glutamate-1-semialdehyde (GSA) 생성 단계, ③ *hemL* 유전자에 의해 조절되는 GSA aminotransferase의 ALA 생합성 단계로 구분된다(1-3). 두 경로에 의해 생합성된 ALA는 *hemB* 유전자에 의해 조절되는 ALAD에 의해 PBG로 생합성됨으로 ALA의 대량 생산을 위해서는 ALAD의 작용을 저해할 필요가 있다. ALAD의 저해제로는 경쟁적 저해제인 levulinic acid (LA), gabaculine (GA) 등이 알려져 있으며, 포도당이 ALAD의 기질 저해제로써 효과가 있다고 최근 발표되었다(13, 14).

ALA의 생산 및 응용

ALA의 생물학적 생산을 위해 *Clotidium regularis*와 같은

혐기성 박테리아나 *Chlorella* sp.와 같은 조류 그리고 *Rhodobacter sphaeroides*와 같은 광합성 박테리아 등이 이용되고 있으며, Table 1에 각종 미생물에 의한 ALA의 생산 연구를 요약하였다. 야생 균주에 의한 ALA의 생산은 낮은 수율 또는 광 반응기 (photo-bioreactor)를 이용하고 혐기 배양을 해야 한다는 어려움으로 인해 최근 순차돌연변이 기술 (sequential mutation technology)을 이용하여 호기적이고 암조건에서도 ALA를 대량 생산할 수 있는 균주를 개발하는 연구가 수행되었다(10, 15). 한편, *Rb. sphaeroides* 등과 같은 ALA 생산 균주로부터 *hem A* 유전자를 얻은 후 이를 *Propionibacterium freudenreichii*나 *Escherichia coli*에 도입하여 재조합 균주를 개발하려는 연구도 활발하게 이루어지고 있다(11, 12, 16, 17).

Table 1. Production of ALA by several microorganisms

Microorganisms	C & N sources	ALA (mM)	Reference (year)
<i>Metanobacterium barkeri</i>	methanol & 2-oxoglutamate	0.4	5 (1989)
<i>Chlorella regularis</i> .	glucose & yeast extract	3.8	6 (2000)
<i>Chlorella</i> sp.	glucose & glycine	2	7 (1995)
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	swine waste	4.2	8 (1990)
<i>Rb. sphaeroides</i> CR-720 (sequential mutant)	glucose, glycine & yeast extract	27.5	10 (2000)
<i>Propionibacterium freudenreichii</i> (cloned with <i>hemA</i> in <i>Rb. sphaeroides</i>)	glucose	8.6	11 (2001)
<i>E. coli</i> (cloned with <i>hemA</i> in <i>Rb. sphaeroides</i>)	succinyl-CoA & glycine	20	12 (1996)
<i>E. coli</i> (cloned with <i>hemA</i> in <i>Br. japonicum</i>)	succinate & glycine	20	16 (1999)

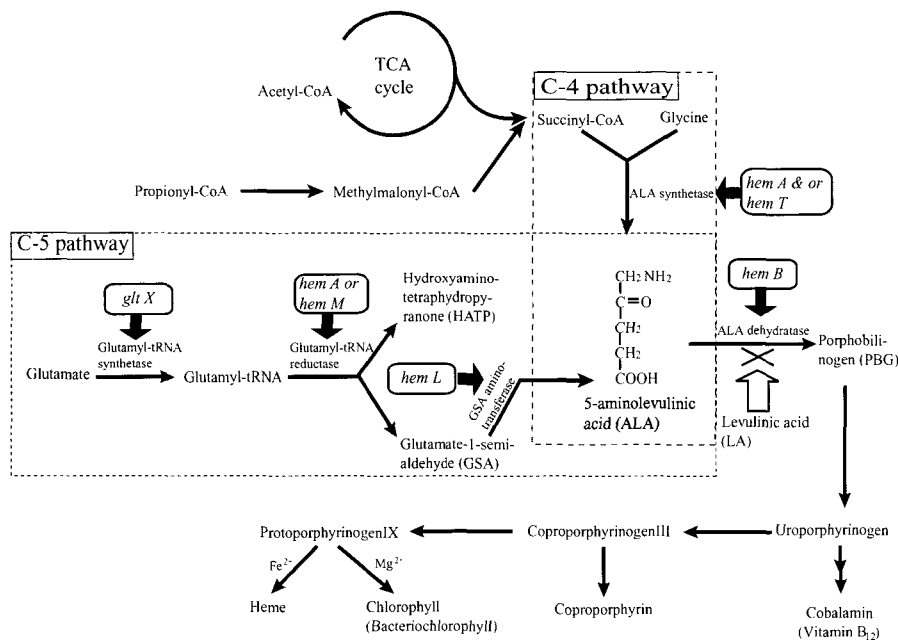


Figure 1. Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid (ALA) and tetrapyrrole compounds.

ALA는 광역학적 반응 (photodynamic reaction), 즉 ALA로부터 합성되는 구조물 중에서 각종 염록소 중간물질 (protochlorophyllide, protoporphyrin IX (PPIX))에 빛이 조사되면 활성 산소가 발생하여 세포를 사멸시키는 효과가 있으므로 농학/의약학 분야에 적용이 가능하다. Heme 합성과정에 관여하는 효소 중 ferrochelatase나 PBG deaminase 등의 효소 활성은 특이적이며 몇몇 세포나 상황에 따라 선택적으로 작용할 수 있으므로 ALA는 매우 선택적으로 사용될 수 있다. 그리고 ALA를 기질로 사용하여 생성되는 PPIX는 형광 (395-415 nm)을 발하는 특성을 가지고 있으므로 각종 진단분야에도 ALA의 응용이 가능하다(1, 18-21).

Table 2. Applications of ALA

Field	Applications	Stage of development	Reference (year)
Agriculture	Biodegradable herbicide	Field test	18 (1984)
	Biodegradable insecticide	Laboratory	19 (1988)
	Plant growth regulator	Field test	22 (1999)
	Cold temperature tolerance	Field test	23 (1998)
	Salt tolerance	Field test	24 (2000)
Medical	Photodynamic therapy	Clinic	20, 21 (1990)
	Diagnosis of lung cancer	Clinic	21 (1996)
	Diagnosis of oral cancer	Laboratory	25 (2001)
	Diagnosis of heavy-metal poisoning	Clinic	15, 27 (1996)
	Diagnosis of porphyria	Clinic	15 (1997)
Fishing industry	Prevention & healing the fish disease	Laboratory	26 (2001)

Table 2에는 농업, 의약 등의 분야에서 ALA의 응용 예를 보였다. 먼저 농업분야에서 ALA는 잡초만을 선택적으로 제거하는 기술 즉, '광역학적 제초제'로써의 사용 가능성뿐만 아니라 작물, 사람 및 동물 등에는 무해하며 해충의 약제 저항성 번이가 적은 살충제로써 사용 가능성이 제시되었다(18, 19). 그리고 환경친화적 식물성장촉진제 개발(22) 또는 냉해, 염에 대한 저항성을 증대시키므로 식물 개량 분야에도 ALA를 사용한다는 연구가 보고 되고 있다(23-24). Kennedy 등이 1990년에 ALA의 광역학적 암치료의 효능을 발표한(20) 이후 의약분야에서도 ALA의 사용이 꾸준히 연구되어 오고 있다. 최근 ALA관련 제품 중에서 기저세포암 (基底細胞癌, basal cell carcinoma, 피부암)과 액틴각질섬유 (actinic keratose)로 불리는 전암(前癌)의 치료용으로 DRAXIS Health 사 (USA)의 Levulan® (ALA : HCl 20% 용액, 1999. 12)이 미국 FDA (The Food and Drug Administration)의 승인을 받는데 이어 ALA를 이용한 피부암 치료분야에서 PhotoCure 사 (Norway)에서 개발한 Metvix 제품 (ALA와 광민감 크립의 혼합품) 또한 2002년 9월에 FDA승인을 얻어 그 안전성과 효능이 입증된 바 있다. 그리고 ALA가 암조직에만 선택적으로 PPIX의 축적을 유도하므로 광역학적 진단분야에도 적용되고 있다(21,

25). 그밖에 ALA의 항균효과를 이용하여 어류의 세균성 질병의 예방과 치료에 사용하거나(26), 각종 중금속 누적 지표로 사용하는 등(15, 27) 다양한 분야에 ALA를 이용하고자 하는 연구가 지속적으로 이루어지고 있다.

본 연구에서는 ALA의 생산에 관여하는 *Bradyrhizobium japonicum* 균주에서 분리한 *hemA* 유전자를 *egfp* (enhanced green fluorescent protein) 유전자와 융합한 플라스미드 (pFLS45)를 제조한 후 대장균에 도입한 재조합 대장균에 의한 ALA의 생산 특성을 연구하고자 한다. 특히 ALA의 전구체로 사용되는 글리신과 숙신산 그리고 ALAD의 저해제로 사용되는 LA (levulinic acid)의 첨가에 따른 균체 성장과 ALA 생산 특성을 살펴보고자 한다. 그리고 배양액의 온도, pH 및 재조합 유전자의 유도 발현에 따른 ALA 생산 특성을 연구하여 ALA의 최적 생산 조건을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 연구에서 ALA의 생산을 위해 사용한 유전자는 *Bradyrhizobium japonicum* 균주에서 분리한 *hemA* 유전자로써 pET-28b(+) (Novagen Co., USA, Kan^R)에 삽입하여 재조합 플라스미드, pET-28b/ALAS를 제조하였다. ALA의 생합성 특성을 2차원 형광센서로 모니터링하기 위해 pEGFP (Clontech Co.,USA, Amp^R) 벡터에 존재하는 *egfp* (from *Aequorea victoria*) 유전자를 pET-28b/ALAS에서의 *hemA* 유전자와 융합하여 재조합 플라스미드 pFLS45를 제조하였다(Fig. 2).

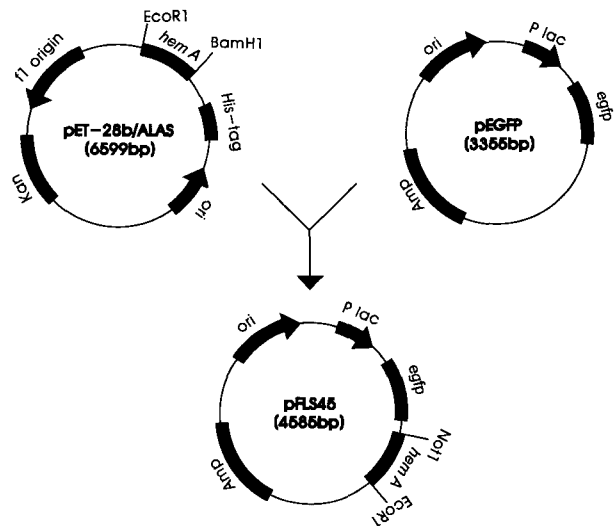


Figure 2. Structure of recombinant plasmid pFLS45.

이와 같이 제조된 재조합 플라스미드 pFLS45를 CaCl₂ 방법을 이용하여 *E. coli* BL21 (DE3) pLysS에 삽입하였다(28). 재조합 플라스미드 pFLS45의 안정성을 유지하기 위해 고체 및 액체배지에는 ampicillin 용액 (75 µg/mL)을 첨가하였다. 균주의 활성화를 위해 LB agar 배지 (Yeast extract: 5 g/L, Tryptone: 10 g/L, NaCl: 10 g/L)를 사용하였으며 종균배양 및 전 배양에는 LB 배지 (pH 7.2)를 사용하였다. 본 배양에

는 복합배지인 LB 배지나 최소 배지인 MS8 배지 (29, Glucose: 6 g/L, MgSO₄·7H₂O: 1 g/L, NH₄Cl: 0.2 g/L, KH₂PO₄: 13 g/L, K₂HPO₄: 10 g/L, NaH₂PO₄: 6 g/L, Trace elements stock solution: 0.4 mL/mL, Vitamin stock solution: 0.4 mL/mL)에 ALA의 전구체로 사용되는 글리신과 숙신산을 첨가하였다. 배양액 및 반응기는 121°C, 14 psi에서 최소 20 분 이상 멸균하였으며, 최소 배지의 탄소원과 가용성 염은 분리하여 멸균한 후 혼합하였다.

발효 실험

냉동 보관중인 재조합 *E. coli* 균주는 전배양 하루 전에 ampicillin을 포함한 LB agar 배지에 도말하여 37°C에서 활성화시켰다. 고체 배지에서 얻은 활성화된 colony를 진탕배양기 (Jeiotech Co., Korea)에서 37°C, 180 rpm으로 12시간 종균 배양 (배양부피; 5 mL)한 후 1% (v/v)를 전배양 배지 (배양 부피; 50 mL)에 접종하였다.

진탕배양 실험은 본배양 배지 100 mL에 전배양액의 1% (v/v)를 접종하여 진탕배양기에서 37°C, 180 rpm으로 배양하였다. ALA 생산 전구체인 글리신과 숙신산의 농도, LA (levulinic acid)의 최적 주입농도 및 첨가시간에 따른 균체의 성장 및 ALA의 생산성을 조사하였다. 생물반응기 실험을 위해 2.5 L 또는 7 L 생물반응기 (KoBiotech Co. Korea)를 사용하였는데 반응기내의 본배양 배지 (working vol.; 1 L or 5.5 L)에 전배양액의 1%를 접종하였다. 반응기의 운전 조건은 37°C, 400 rpm (or 370 rpm), 통기량 1 vvm으로 하였으며, 발효액의 pH 조절에는 3 N NaOH와 3 N HCl을 사용하였다. 글리신, 숙신산 및 LA 농도와 첨가시간 등은 진탕 배양의 실험 결과를 이용하였다. 재조합 *hemA* 유전자의 유도발현 정도를 연구하기 위해 미생물의 지수 성장기 후반에 0.4 mM의 isopropyl-β-D-thio-galactopyranoside (IPTG)를 첨가하였다. 또한, 배양 온도에 따른 *hemA* 유전자의 발현 정도를 조사하기 위해 재조합 균주를 30°C와 37°C에서 배양한 후 IPTG를 첨가하였다. 생물반응기 내의 각종 공정변수들 즉 pH, 용존산소 농도, 배가스 등을 모니터링하기 위해 pH 전극 (pH electrode, Mettler Co., Germany), 용존산소센서 (O₂ sensor, Mettler Co., Germany), O₂/CO₂ 가스 분석기 (LOKAS Co., Korea) 등을 사용하였다. 실시간 모니터링된 자료를 수집하기 위해 데이터 수집보드 (PCI 6024E DAQ board, National Instrument Co., USA)를 사용하였으며 LabVIEW ver. 6.1 (National Instrument Co., USA)를 이용하여 프로그래밍하였다.

분석 방법

발효액의 상등액 내 포도당 농도는 GOD-POD (glucose oxidase-peroxidase)와 ABTS (2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid))를 이용한 비색법으로 측정하였다 (37). 건조 균체량의 측정은 1.5 mL의 시료를 원심 분리 (13000 rpm, 5 min)한 후 수집된 균체를 멸균수 세척과 원심분리 과정을 세 번 반복한 후 80°C에서 하루 동안 건조하여 무게를 측정하였다. 배양 중 세포농도는 600 nm 파장에서 흡광도 (OD₆₀₀)를 측정하였는데 건조균체량과 좋은 선형관계를 보였다(37, DCW = 0.3457 * OD₆₀₀ + 0.1757, R² =

0.9983, 0.0 < OD₆₀₀ < 5.0). 한편, 균체 중 colony를 형성할 수 있는 세포수 (CFU, colony forming unit)를 측정하기 위해 배양 중 채취한 시료를 고체 LB 배지에 50~100개 정도의 colony가 형성되도록 멸균수로 적절히 희석하여 도말한 후 37°C에서 하루동안 배양하였다. 발효액 중 세포의 ALA 농도와 세포내 효소, ALAS (ALA synthetase)의 활성측정은 Mauzerall와 Granick의 방법(30)을 사용하였으며 ALAD (ALA dehydratase)의 활성은 Sato의 방법(31)으로 측정하여 수행하였다. 단백질의 정량은 ALAD와 ALAS의 효소 활성측정을 위해 얻은 효소 상등액을 Bradford 법(32)에 의해 595 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 정량을 위한 표준물질로 BSA (bovine serum albumin, Sigma Co., USA)를 사용하였다.

결과 및 고찰

전구물질 및 LA 첨가에 따른 ALA 생산 특성

본 연구에서 재조합한 플라스미드 pFLS45는 glycine과 succinyl-CoA를 기질로 사용하여 C-4 경로를 통해 ALA를 생합성하므로 전구물질인 글리신과 숙신산의 농도에 따른 균체 성장 및 ALA 생산성을 조사하였다. 그리고 ALAD의 저해제인 LA의 첨가 농도 및 시간을 다르게 하여 균체 성장과 ALA 생산 특성을 조사하였다.

우선, 글리신 농도에 따른 ALA 생산특성을 조사하기 위해 숙신산 (30 mM)이 첨가된 MS8 배지를 사용하였고 글리신의 농도를 0에서 30 mM까지 5 mM 간격으로 각각 다르게 하고 배양액의 초기 pH를 6.8로 조절하여 진탕배양 실험을 하였다. Fig. 3a에 글리신 농도에 따른 균체성장과 ALA의 생산량을 나타내었다. 최종 균체량은 모든 실험에서 유사하므로 균체 성장을 비교하기 위해 접종 후 12시간일 때 비성장 속도 μ (specific cell growth rate, $\mu = \frac{1}{t} \ln(\frac{X}{X_0})$)를 계산하였다. 균체의 성장은 글리신이 첨가된 배지에서 빨랐으며, 낮은 글리신 농도에서 성장이 촉진되는 것을 볼 수 있었다. 이는 일정한 농도 (6-12 mM)의 글리신이 대장균의 초기 및 지수성장에서 세포성장 촉진 효과가 있다고 보고한 Han 등의 연구와 일치한다(33). ALA의 생산 농도는 보통 균체량이 최고점에 이르는 시간 즉, 18-22시간 사이에서 최대 농도를 보였으며 최대 생산 시간이 지나면 ALAD에 의해 빠르게 분해되었다. 글리신 농도에 따른 ALA 생산성은 글리신 농도가 15 mM일 때 최대 600 mg/L까지 증가하였으며, 15 mM보다 높은 농도에서 ALA 생산성은 다시 감소하는 경향을 보였다. 이는 균체량이 많을수록 발현된 ALAS 활성이 높아져 많은 ALA가 생산되지만 글리신 농도가 너무 높을 경우 오히려 균체에 독성 작용을 일으켜 ALA 생산이 중지되었다. 본 실험을 통해 회분 배양에서 배양액에 첨가하는 글리신 농도는 15 mM이 적절한 것으로 생각된다.

숙신산 농도에 따른 ALA 생산 특성을 조사하기 위해 15 mM의 글리신을 포함한 MS8 배지를 사용하였으며 숙신산의 농도를 0에서 90 mM까지 15 mM 간격으로 다르게 첨가한 후 배양액의 초기 pH 값은 6.8로 조절하여 진탕배양 실험을 수행하였다. Fig. 3b에는 숙신산 농도에 따른 비성장속도 (μ_{12})와 ALA의 최대생산농도를 나타내었다. 숙신산 농도에 따

른 균체 성장은 숙신산의 농도가 증가할수록 성장속도는 감소하였다. 특히 숙신산 농도가 45 mM 이상 첨가될 경우 성장이 지연되어 최종 균체량은 숙신산 농도가 30 mM일 때의 절반 수준밖에 이르지 못하였다. 숙신산이 30 mM 첨가된 실험에서 ALA가 최대 600 mg/L까지 생산되었지만 45 mM 이상 첨가될 경우 균체 성장이 지연되어 ALA 생산에는 효율적이지 못하였다. 따라서 회분배양에서 최적 숙신산의 농도는 균체의 성장을 촉진시키면서 ALA 생산량이 가장 높은 30 mM로 하였다.

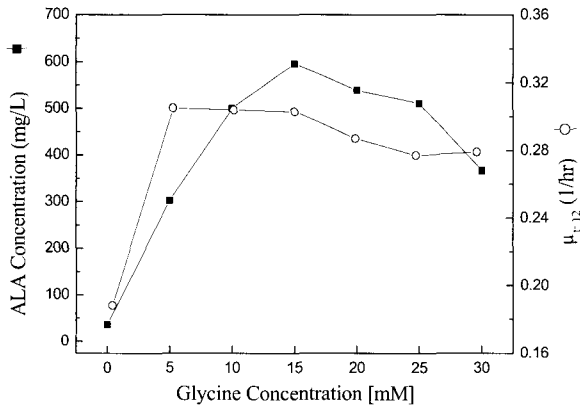


Figure 3a. Effects of glycine concentrations on cell growth rate and ALA production during cultivation of recombinant *E. coli* harboring pFLS45.

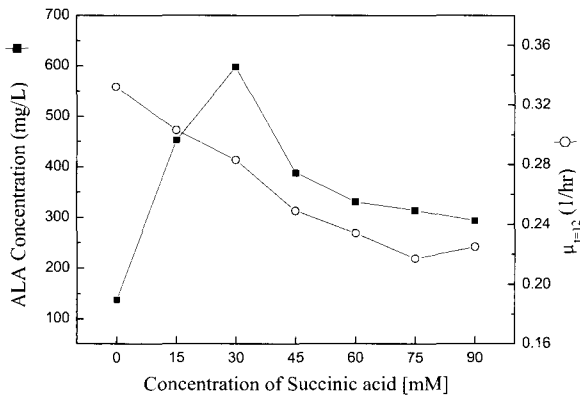


Figure 3b. Effects of concentrations of succinic acid on specific cell growth rate and ALA production during cultivation of recombinant *E. coli* harboring pFLS45.

LA (levulinic acid)는 ALA의 유사체로서 ALAD의 경쟁저해제로 작용하며 ALA의 생산성 증대를 위한 첨가물로 사용된다. 그러나 과량의 LA 첨가는 세포 성장에 영향을 주며 heme의 생합성을 완전히 중단시킬 수도 있으므로 적절한 시간에 적정량을 첨가할 필요가 있다(1, 2, 6, 9). 따라서 본 실험에서는 LA의 첨가 시간과 첨가량을 다르게 하여 균체 성장 및 ALA 생산성을 조사하였다. 먼저 LA 첨가 시간에 따른 ALA 생산특성을 조사하기 위해 15 mM 숙신산과 30 mM 글리신이 첨가된 MS 8배지에 접종 후 0시간, 14시간, 16시간, 18시간 및 20시간에 각각 30 mM LA를 첨가하여 실험

하였다. LA를 첨가하지 않은 경우와 비교, 고찰하였다.

Fig. 4a에는 LA 첨가 시간에 따른 pH 및 균체 성장 특성의 변화 그리고 ALA 생산량의 변화를 나타내었다. LA를 첨가한 후 배양액의 pH를 조절하지 않았는데 배양액의 pH 변화는 최소 1.8에서 2.2까지 감소하였다. LA의 첨가시간이 늦을수록 pH 변화가 컸으며 LA 첨가 이후 배양액의 pH 값이 감소하여 균체의 성장이 지연되거나 일부 실험에서는 균체량이 감소하였다. 또한 지수성장기에 LA를 첨가했을 때 LA가 최종 균체량에 크게 영향을 미치는 것을 볼 수 있다. LA 첨가 시간에 따른 ALA 생산은 균체량의 변화와 거의 유사하게 나타났으며, 접종 후 20시간 이전에 LA를 첨가한 경우 균체의 성장 지연으로 LA를 첨가하지 않았을 때보다 ALA 생산량이 감소하였다. 한편, 접종 후 20시간에 LA를 30 mM 첨가했을 때 균체 성장에는 큰 영향이 없었으며 ALA 생산성은 LA를 첨가하지 않았을 때보다 30% 가량 증가하였다. 그리고 ALAD의 활성이 저해되어 생합성 된 ALA가 크게 감소하지 않고 일정 농도를 유지하였다. 따라서 회분 배양에서 LA는 균체 성장이 정지되는 시간에 첨가하는 것이 ALA 생산에 효과적이라고 할 수 있다.

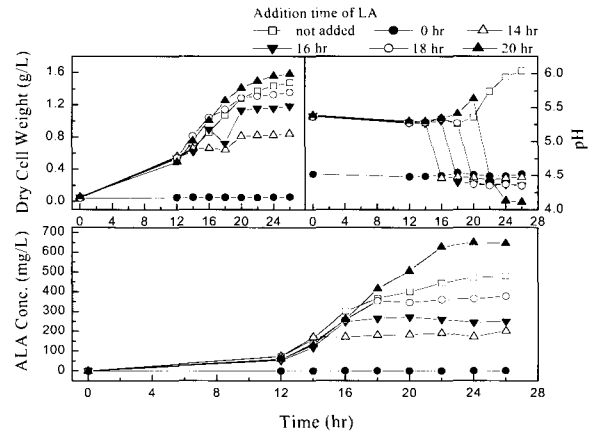


Figure 4a. Time courses of ALA concentration, dry cell weight and pH with different addition time of 30 mM LA during cultivation of recombinant *E. coli* harboring pFLS45.

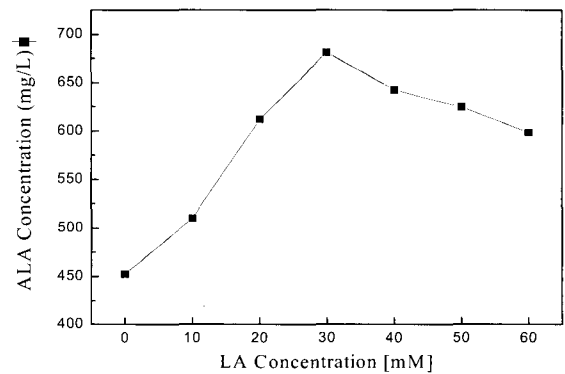


Figure 4b. Effects of LA concentrations on ALA production during cultivation of recombinant *E. coli* harboring pFLS45.

한편, LA 첨가 농도에 따른 ALA 생산특성을 조사하였다 (Fig. 4b). 배양 조건은 LA 첨가 시간에 따른 ALA 생산량을 비교한 실험과 같게 하였으며 LA의 첨가 농도는 0에서 60 mM까지 10 mM 간격으로 하고 균체성장이 정지되기 시작하는 시간인 접종 후 20시간에 첨가하였다. 균체의 성장이 거의 끝날 무렵에 LA를 첨가하므로 균체 성장속도는 LA 농도에 따라 큰 차이가 없었으며 최종 pH값도 큰 차이를 보이지 않았다. LA 농도에 따른 ALA 생산농도는 30 mM LA가 첨가 되었을 때 670 mg/L 정도 생산되었으므로 향후 배양실험에서는 30 mM LA를 배양액에 첨가하였다.

배양액의 pH 변화에 따른 ALA 생산 특성

생물반응기를 이용한 배양실험에서 배양액의 pH를 5.0, 6.0, 7.0로 조절한 경우와 pH를 조절하지 않는 경우의 균체 성장 및 ALA 생산 특성을 조사하였다. Fig. 5a에 배양공정에서 균체량 및 기질농도의 변화를 나타내었다. 배양액의 pH를 조절하지 않았을 경우 배양액의 초기 pH값이 6.2였고 균체 성장에 따른 pH 변화는 0.5 이내로 크지 않았다(최저 pH 6.1과 최고 pH 6.6 사이에서 변화). 배양액의 pH를 조절한 경우 균체 성장은 중화제 (3 N HCl/3 N NaOH)가 첨가된 시간대에 성장 시간이 지연되거나 생존 균체량이 감소하는 것을 볼 수 있었다. 특히 배양액 pH를 5.0으로 조절한 실험에서는 지수성장기에 해당하는 8-10 시간대에 배양액의 pH 조절을 위해 3 N NaOH가 첨가되었는데 이 때 균체량 증가폭이 현저하게 감소하였으며 살아있는 세포수 즉, CFU (colony forming unit) 또한 크게 증가하지 못하였다(37). 배양액의 pH를 6.0으로 조절한 경우 지수성장기 이후 (접종 후 12 시간 이후)부터 pH 조절을 위해 3 N HCl이 첨가되었는데 균체량 및 CFU가 다소 감소하였지만 pH를 조절하지 않은 실험과 거의 유사하게 성장하였다. 배양액의 pH를 7.0으로 조절한 경우 균이 거의 성장하지 못하였는데 일반적으로 유전자 재조합 대장균 (*E. coli* BL21)의 배양을 위해 배양액의 pH값을 7.0으로 조절하는 것과는(29, 34) 다른 특성을 보였다. 본 연구에서 사용한 재조합 균주는 도입된 유전자로 인해 대장균의 형질이 변화하여 균체가 배양액의 pH 조절에 민감하게 작용하는 것으로 생각된다. Fig. 5b에는 배양액의 pH에 따른 발효공정에서 생산된 이산화탄소 생성 속도 (carbon dioxide production rate, CPR) 및 산소 소비속도 (oxygen uptake rate, OUR) 그리고 생물반응기 내의 용존 산소농도 변화를 나타내었다. 발효공정에서 pH를 조절하지 않았을 경우 지수성장기 중반 (접종 후 11-13시간)에 용존산소 농도는 최저 55%까지 감소하며, CPR과 OUR도 같은 시간대에서 각각 0.5와 0.6 mmol/L/min까지 증가하였다. 따라서 pH 조절을 하지 않은 발효실험에서 균체 성장 및 호흡이 원활하게 이루어지는 것을 알 수 있다. 그러나 pH를 5.0 또는 6.0으로 조절하기 위해 중화제 (3 N HCl/3 N NaOH)를 첨가한 경우 중화제가 첨가되지 않은 경우와 비교할 때 용존 산소 농도가 높았으며 CPR과 OUR은 낮아지는 경향을 보였다. 또한 지수성장기에 3 N NaOH가 첨가된 경우 균체의 성장과 대사가 지연되었으며 (pH 5.0), pH 7.0으로 배양한 경우에는 pH 값이 균체 성장에 적절하지 않아 미생물의 성장 및 호흡이 거의 이루어지지 않았다. 이 결과로 미루어볼 때 배양액의 pH를 조절한 경우

가 배양액의 pH를 조절하지 않은 경우보다 세포 성장 및 호흡 등의 대사과정이 원활하지 못하였음을 알 수 있다. 배양액의 pH 변화에 따른 ALA 생산성을 Fig. 5c에 나타내었다.

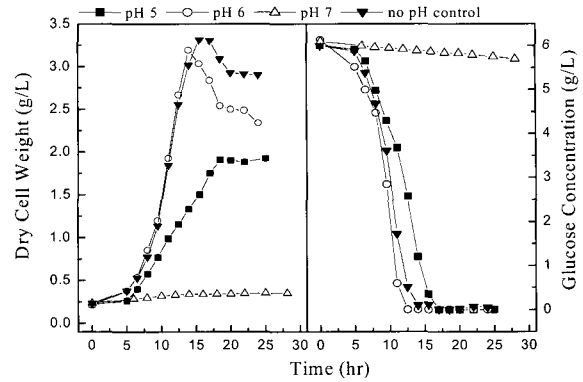


Figure 5a. Time courses of dry cell weight and glucose concentrations in a bioreactor during cultivation of recombinant *E. coli* [pFLS45] with different pH value.

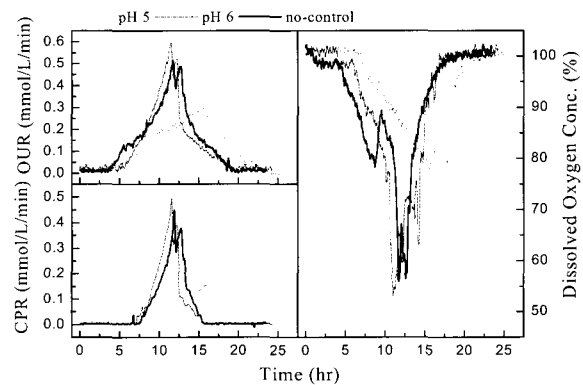


Figure 5b. Time courses of carbon dioxide production rate (CPR), oxygen uptake rate (OUR) and dissolved oxygen concentration in a bioreactor during cultivation of recombinant *E. coli* [pFLS45] with different pH value.

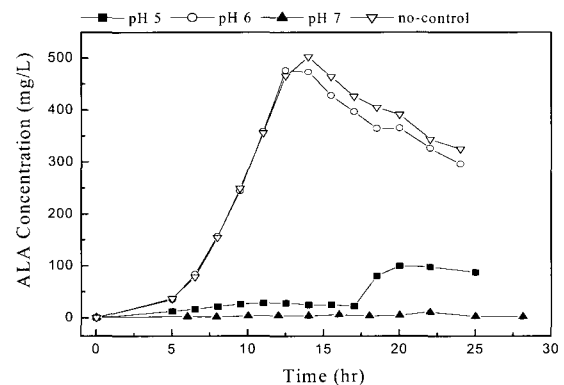


Figure 5c. Time courses of extracellular ALA concentration during cultivation of recombinant *E. coli* [pFLS45] with different pH value.

배양액의 pH를 조절하지 않은 경우 세포생장이 원활하여 기질 소모 속도가 가장 빨랐는데 ALA 생산량도 503 mg/L로 가장 높았다. 배양액의 pH를 5.0으로 조절한 경우에는 17시간까지 포도당이 완전히 소비되지 않았으며 ALA 생산량도 미미한 수준이었다. 그리고 포도당이 완전히 소모되고 균체량이 일정해지는 시간 즉, 접종 후 17시간 이후부터 일정량의 ALA (100 mg/L)가 생산되는 것을 볼 수 있다. 배양액의 pH를 6.0으로 조절한 경우에는 pH 조절이 거의 이루어지지 않았던 접종 후 14시간 이전에는 pH를 조절하지 않은 실험과 비슷하게 포도당이 소모되었으며 ALA 생산량도 476 mg/L까지 생산되었으나 14시간 이후부터 첨가된 HCl의 영향으로 ALA 생산량이 다소 감소하였다. 한편, 배양액의 pH를 7.0으로 조절한 경우 균체가 성장하지 않으므로 ALA 생산이 거의 이루어지지 않았다. 본 실험에 사용된 재조합 대장균은 회분배양에서 지속적으로 성장하는 단계에 배양액의 pH를 임의로 5.0 또는 6.0으로 조절하면 균체 성장 및 대사가 저해되므로 배양액의 pH를 조절하지 않는 것이 세포성장 및 ALA의 생산을 증대시키는데 유리할 것으로 생각된다.

배양 온도 및 유도 (induction) 발현에 의한 ALA 생산 특성

대장균에서 *gfp* 유전자를 재조합하여 발현할 때 낮은 온도에서 발현률이 높으므로 배양온도를 30°C로 조절하여 유도발현 시킬 수 있다(35). 본 실험에서 배양온도를 30°C와 37°C로 변화시키고 발효공정 중에 유도발현 물질인 IPTG (0.4 mM)와 ALAD 저해제인 LA (30 mM)를 첨가하여 ALA 생산 특성을 비교하였다. IPTG는 균체가 OD₆₀₀ 5-6.5 정도로 성장했을 때 그리고 LA는 균체가 OD₆₀₀ 7-8 정도로 성장하여 휴지기에 도달하였을 때 일회용 주사기를 이용하여 각각 첨가하였다. LA 첨가 이후에는 pH를 6.5로 조절하였다.

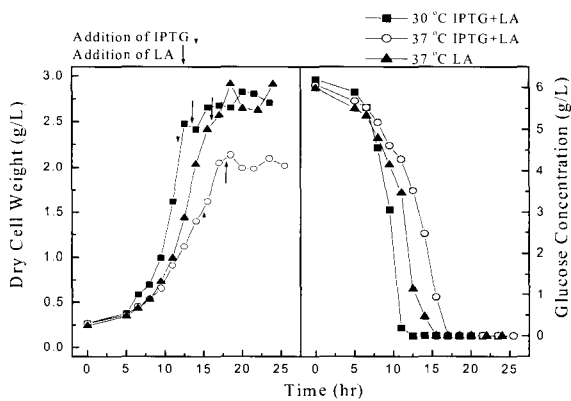


Figure 6a. Time courses of dry cell weight and glucose concentrations in the ALA production process with IPTG induction.

Fig. 6a에는 배양온도 및 유도 발현에 따른 균체량과 포도당의 변화를 나타내었다. 배양액의 온도를 30°C로 하였을 경우 37°C에서 배양할 때보다 균체 성장이 빨랐다. IPTG와 LA는 접종 후 11시간과 13시간에 각각 첨가되었으며 유도발현 이후 균체량의 증가폭이 줄거나 CFU 값이 감소하지 않았다(37). 또한 LA 첨가에 따라 CFU의 최고값은 pH를 조절하지

않았던 실험보다 다소 감소하였는데 이는 LA 첨가로 인한 순간적인 pH 변화에 따른 영향으로 생각된다. 배양액의 온도가 37°C인 경우 IPTG와 LA는 접종 후 15시간과 18시간에 각각 첨가되었다. 30°C 배양에서와는 달리 유도발현 이후 균체량은 증가폭이 감소하였으며 CFU는 거의 증가하지 않고 일정하게 유지되었으므로 IPTG가 균체 성장에 유해하게 작용함을 알 수 있다. LA는 기질이 모두 소모되고 성장이 끝나는 시간에 첨가되어 균체량에는 크게 영향을 미치지 않았다. 한편, 37°C에서 배양할 때 IPTG 첨가에 의한 유도발현을 수행하지 않고 접종 후 16시간에 LA만을 첨가하여 유도발현 실험결과와 균체성장 및 ALA 생산성을 비교하였다. 접종 후 16시간까지 균체는 정상적인 성장을 하였으며 LA의 첨가 이후 균체량은 감소하지 않았다.

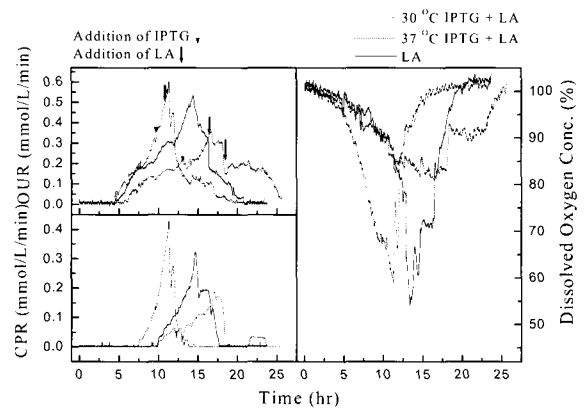


Figure 6b. Time courses of carbon dioxide production rate (CPR), oxygen uptake rate (OUR) and dissolved oxygen concentration in the ALA production process with IPTG induction.

Fig. 6b에는 배양 온도와 IPTG 및 LA 첨가에 따른 이산화탄소 생성속도 (CPR)과 산소 소비속도 (OUR) 그리고 생물반응기내 용존 산소 농도를 모니터링 하였다. 각 발효 실험에서 LA 첨가시 pH 값이 낮아져 CPR 및 OUR이 감소하고 용존 산소농도는 증가하는 것을 볼 수 있었다. 또한 IPTG의 첨가로 성장이 지연되고 대사과정도 원활하지 못하였음을 알 수 있었다. 배양 온도를 30°C로 조절하여 배양한 경우 OUR은 11시간대에서 약 0.6 mmol/L/min 속도로 소비됐으며 CPR은 같은 시간대에서 최고 약 0.4 mmol/L/min까지 증가하였다. 반응기내 용존산소 농도는 11시간 내외에서 최저값인 60%까지 감소한 후 16시간에는 100%까지 포화되었다. 배양 온도가 30°C일 때 성장 속도 및 대사가 37°C 배양에서 보다 빠르게 진행되었으며 IPTG와 LA의 첨가는 성장 및 호흡에 별다른 영향을 주지 않았다. 한편, 37°C에서 배양할 때 유도발현 시간 (15시간)에서부터 균체생장이 지연되었으며 OUR과 CPR의 최대점은 각각 0.4와 0.2 mmol/L/min 정도이었으며 LA가 첨가된 18시간에서 OUR 및 CPR은 다시 감소하였고 용존 산소 농도는 10% 이상 증가하였다. 그러나 IPTG에 의한 유도발현을 수행하지 않고 37°C에서 배양하여 16시간에 LA만을 첨가한 경우 LA 첨가 직후 OUR과 CPR이 약 0.1 mmol/L/min 정도씩 감소하였으며 용존 산소 농도는 15% 정도 증가하였다.

Fig. 6c에는 배양온도와 유도 발현이 ALA 생산에 미치는 영향을 나타내었다. 30°C에서 배양할 경우 균체 성장이 다른 발효 실험에서 보다 빠르게 되었으나 높은 균체량과 원활한 대사와는 무관하게 ALA의 생산량은 200 mg/L 정도밖에 되지 않았다. 배양온도를 37°C로 하여 IPTG를 첨가하였을 때 포도당 소비 속도가 감소하여 발효액 중 포도당은 18시간 전후까지 존재하였으나 ALA는 650 mg/L 정도 생산되었다. 한편, 배양온도를 37°C로 조절하고 단지 LA만을 첨가한 경우 (IPTG로 유도발현하지 않은 경우) 16시간대에서 포도당은 대부분 소모되었다. LA 첨가로 생산된 ALA는 더 이상 분해되지 않았고 생산농도가 증가하여 800 mg/L이 이르렀다. 이러한 실험 결과로부터 본 연구에서 사용한 재조합 대장균에 의한 ALA 생산 공정에는 IPTG를 첨가하지 않고 LA 만을 첨가한 경우가 ALA 생산에 효과적이며 배양온도는 30°C보다 37°C가 더 적절함을 알 수 있었다.

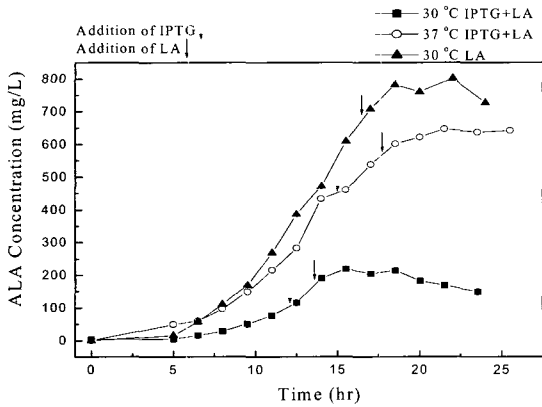


Figure 6c. Time courses of extracellular ALA concentration in the ALA production process with IPTG induction.

탄소원, 전구체 및 LA의 간헐적인 첨가에 따른 ALA생산

ALA의 생산 전구체인 숙신산과 글리신, 탄소원으로 사용되는 포도당 및 ALAD의 활성을 저해하기 위한 LA를 지수 성장기에 간헐적으로 첨가하면서 균체 성장 및 ALA 생산 특성을 살펴보았다(Fig. 7).

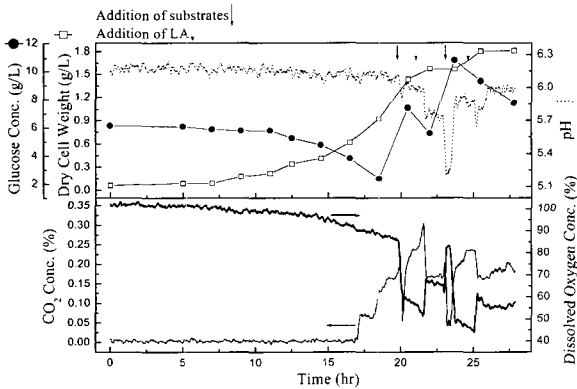


Figure 7a. Time courses of dry cell weight, glucose, culture pH, CO₂ and DO concentration in the ALA production process with intermittent addition of substrates (glucose + succinate + glycine) and LA.

배양 배지로는 MS8 배지를 사용하였으며 발효기로는 7 L 급 스테인리스 반응기를 이용하였으며 배양 부피는 5.5 L로 하였고 회분배양 조건은 2.5 L 생물반응기와 같게 하였다. 단, 교반속도는 반응기의 직경대비 동력비를 고려하여 370 rpm으로 하였다. 포도당 (30 mM)과 숙신산 (30 mM), 글리신 (15 mM)은 분리, 멸균한 후 혼합하여 기질로써 반응기에 첨가하였으며 첨가 시간 (20, 23시간)은 지수성장기에서 포도당의 소비속도 (최대 2.5 g/L/hr)를 고려하여 결정하였다. 한편, LA (30 mM)는 포도당 첨가 후 1.5시간 정도 (21.5, 25시간)에 첨가하였으며 첨가 이후 배양액의 pH는 첨가 이전의 pH와 동일하도록 조절하였다. 발효초기에 균체 성장이 원활하지 못하여 성장시간이 2.5 L 반응기에서보다 두 배 가까이 지연되었으며 기질 첨가 이후에도 균체량은 최대 1.8 g/L 정도 밖에 되지 않았다. 첫 번째 기질 첨가 이후 pH값이 감소하였으나 pH 값을 다시 6.3 정도로 조절하였는데 이에 따라 균체량과 ALA의 생산량이 크게 증가하였다. 한편, LA 첨가 직후 pH 조절에 필요한 NaOH 양이 많이 소모되어 pH 조절이 원활하지 못하였는데 두 번째 기질 첨가 이후 즉, 23.5시간 이후에는 낮아진 pH의 영향으로 균체 성장이 감소하였으며 CFU도 더 이상 증가하지 않았다. 포도당도 많이 소모되지 않아 배양액 중의 포도당 농도는 11 g/L 이상이었으나 배양 종결 시에는 8 g/L 정도의 포도당이 발효액 중에 존재하였다. ALA의 생산량은 기질 첨가 이후 1000 mg/L 이상 생산되었으며, 세포 성장이 원활하지 못한 23.5시간 이후에도 ALA 생산량은 증가하였으며 ALA의 최종 농도는 1300 mg/L 정도이었다. 세포내 효소, ALAS와 ALAD 활성은 세포성장과 함께 증가하였지만 LA와 포도당 첨가에 따라 ALAD의 활성은 감소하였는데 전반적으로 다른 실험과 비교할 때 30% 정도 낮은 ALAD 활성을 보였다. 한편, 배가스 중의 이산화탄소 농도와 반응기내 용존 산소 농도 변화는 기질이 첨가된 시간인 20-21.5시간대와 23-25시간대에서 이산화탄소 농도는 증가하고 용존산소의 농도는 10-25% 감소하여 균체 성장과 호흡 활성은 증가함을 볼 수 있다. 그러나 기질 및 LA의 첨가 직후 pH값이 낮아진 상태, 즉 배양액의 pH 조절이 원활하지 못한 시간대에서는 용존 산소의 농도는 급격히 증가하고 이산화탄소 농도는 급격히 감소하였다.

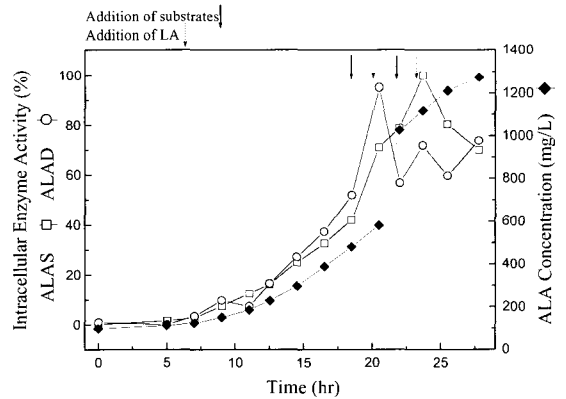


Figure 7b. Time courses of intracellular ALAS, ALAD and extracellular ALA in the ALA production process with intermittent addition of substrates (glucose + succinate + glycine) and LA.

본 실험에서 균체 성장, ALA 생산특성 그리고 세포내 효소 활성변화로 미루어 볼 때 배양액의 pH를 6.0 정도로 조절하고 기질, 즉 포도당 및 ALA 생산 전구체 (글리신, 숙신산)을 간헐적으로 첨가하면 ALA의 대량 생산이 가능할 것으로 생각되며 LA는 ALA가 PBG로 전환되는 것을 저해하기 위해 포도당이 완전히 소모되기 직전에 첨가하는 것이 가장 효과적일 것으로 생각된다.

요약

본 연구에서는 ALA의 생산 공정을 개발하기 위해 재조합 플라스미드, pFLS45를 도입한 재조합 대장균의 성장과 ALA 생산 특성을 조사하였다. 30 mM 숙신산과 15 mM 글리신이 첨가된 배양액에서 균체 성장이 원활하고 높은 ALA 생산성을 보였다. 그리고 LA는 균체성장이 거의 다 이루어진 정지기에 첨가될 때 균체 성장에 저해를 일으키지 않으면서 ALA 생산성을 높일 수 있었다. 또한 세포내 효소 ALAD의 활성은 30 mM LA가 첨가되었을 때 가장 효과적으로 저해되었다. 본 연구에서 사용한 재조합 대장균은 pH 조절을 위한 산이나 알칼리 첨가에 민감하여 pH를 조절하지 않은 경우에 균체의 성장이 가장 원활하였고 ALA 생산성도 높았다. 30°C에서 배양한 경우 균체의 성장은 원활하였지만 ALA의 생산성이 매우 낮았다. 그리고 일반적인 pET 계열의 재조합 대장균의 발현 양상과 달리 유도 발현하지 않고 LA만을 첨가했을 때 ALA 생산 농도는 800 mg/L 이상으로 매우 높았다. 7 L급 생물반응기를 이용하여 MS8 배지에 기질 (포도당, 숙신산, 글리신) 및 LA를 간헐적으로 첨가하여 균체 성장 및 ALA 생산 특성을 살펴보았다. 균체량은 높지 않았지만 기질 첨가 이후 ALA 생산량은 꾸준히 증가하여 기존의 ALA 생산량보다 두 배 이상 증가한 1300 mg/L 정도 생산되었으며 ALAD의 활성은 다른 실험결과와 비교할 때 30% 정도 낮았다. 한편, LA 및 숙신산의 첨가 이후 낮아진 배양액의 pH는 균체 성장을 저해하였는데 발효 중 기질을 첨가한 후 pH를 잘 제어하면서 유가식 또는 연속식 발효를 수행하면 ALA 생산성을 증대시킬 수 있을 것으로 생각된다. 그러나 고농도의 ALA 생산은 균체 생존에 영향을 주므로(37) 생산된 ALA를 적절히 분리하는 방법이 필요할 것으로 사료된다.

감사

본 연구는 2002년 과학재단 특정기초연구 (과제번호 R01-2002-000-00027-0)에 의해 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Sasaki, K., M. Watanabe, T. Tanaka, and T. Tanaka (2002), Biosynthesis, biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **58**, 23-29.
- Nishikawa, S. and Y. Murooka (2001), 5-Aminolevulinic acid : Production by fermentation, and agricultural and biomedical applications, *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **18**, 149-170.
- Sasikala, Ch., Ch. V. Ramana, and P. R. Rao (1994), 5-Aminolevulinic acid: A potential herbicide/insecticide from microorganism, *Biotechnol. Prog.* **10**, 451-459.
- Takeya, H., H. Ueki, S. Miyanari, T. Shimizu, and M. Kojima (1996), A new synthesis of 5-aminolevulinic acid via dye-sensitized oxygenation of N-furfurylphthalimide, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* **94**, 167-171.
- Lin, D., N. Nishio, and S. Nagai (1989), Production of 5-aminolevulinic acid by methanogens, *J. Ferment. Bioeng.* **68**, 88-91.
- Ano, A., H. Funahashi, K. Nakano, and Y. Nishizawa (2000), Effect of levulinic acid on 5-aminolevulinic acid biosynthesis in heterotrophic culture on *Chlorella regularis* YA-603, *J. Biosci. Bioeng.* **88**, 57-60.
- Sasaki, K., K. Watanabe, T. Tanaka, and Y. Hotta (1995), 5-Aminolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark, *World. J. Microbiol. Biotechnol.* **11**, 361-362.
- Sasaki, K., T. Tanaka, Y. Nishizawa, and M. Hayashi (1990), Production of a herbicide, 5-aminolevulinic acid, by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent waste from an anaerobic digester, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 727-731.
- Sasaki, K., T. Tanaka, Y. Nishizawa, and M. Hayashi (1991), Enhanced production of 5-aminolevulinic acid by repeated addition of levulinic acid and supplement of precursors in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Ferment. Bioeng.* **71**, 403-406.
- Kamiyama, H., Y. Hotta, T. Tanaka, S. Nishikawa, and K. Sasaki (2000), Production of 5-aminolevulinic acid by a mutant strain of a photosynthetic bacteria, *Seibutu-Kougaku* **78**, 48-55.
- Kiatpapan, P. and Y. Murooka (2001), Construction of an expression vector for propionibacteria and its use in production of 5-aminolevulinic acid by *Propionibacterium freudenreichii*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 144-149.
- VAN DER Mariet, J. W. and J. G. Zeikus (1996), 5-Aminolevulinic acid production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides* hem A gene, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 144-149.
- Kedy, P., P. Bruyant, and A. P. Balangé (1994), Inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase activity by gabaculine, *Phytochemistry* **36**, 1169-1175.
- Lee, D. H., W. J. Jun, K. M. Kim, D. H. Shin, H. Y. Cho and B. S. Hong (2002), Inhibition of 5-aminolevulinic acid dehydratase in recombinant *Escherichia coli* Using D-glucose, *Enzyme Microb. Technol.* **32**, 27-34.
- Takeya, H., T. Tanaka, T. Hotta, and K. Sasaki (1997), Production methods and applications of 5-aminolevulinic acid, *Porphyryns* **6**, 127-135.
- Choi, C., B. S. Hong, H. C. Sung, H. S. Lee, and J.H. Kim (1999), Optimization of extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthase gene of *Bradyrhizobium japonicum*, *Biotech. Lett.* **21**, 551-554.
- Ikemi, M., K. Murakami, M. Hashimoto, and Y. Murooka (1992), Cloning and characterization of genes involved in the biosynthesis of δ -aminolevulinic acid in *Escherichia coli*, *Gene* **121**, 127-132.
- Rebeiz, C. A., A. Montazer-Zouhool, H. Hopen, and S. M. Wu (1984), Photodynamic herbicides. I. Concepts and phenomenology, *Enzyme Microb. Technol.* **6**, 390-401.
- Rebeiz, C. A., J. A. Juvik, and C. C. Rebeiz (1988), Porphyrin insecticides. I. Concept and phenomenology, *Pestic Biochem. Physiol.* **30**, 11-27.
- Kennedy, J. C., R. H. Pottier, and D. C. Pross (1990), Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX: basic principals and present clinical experience, *J. Photochem. Photobiol.* **6**, 143-148.
- Schuitmaker, J. J., P. Baas, H. L. L. M. van Leengoed, F. W. van der Meulen, W. M. Star and N. van Zandwijk (1996), Photodynamic therapy: a promising new modality for the

- treatment of cancer, *J. Photochem. Photobiol.* **34**, 3-12.
22. Hotta, Y. and K. Watanabe (1999), Plant growth-regulating activities of 5-aminolevulinic acid, *Chemical Regulation of Plants* **34**, 85-96.
 23. Hotta, Y., T. Tanaka, L. Bingshan, Y. Tachechi, and M. Konnai (1998), Improvement of cold resistance in rice seeding by 5-aminolevulinic acid, *J. Pestic. Sci.* **23**, 29-33.
 24. Watanabe, K., T. Tanaka, Y. Hotta, H. Kuramochi, and Y. Takeuchi (2000), Improving salt tolerance of cotton seeding with 5-aminolevulinic acid, *Plant Growth Regulation* **32**, 97-101.
 25. Leunig, A., M. Mehlmann, C. Betz, H. Stepp, S. Arbogast, G. Grevers, and R. Baumgartner (2001), Fluorescence staining of oral cancer using a topical application of 5-aminolevulinic acid: fluorescence microscopic studies, *J. Photochem. Photobiol.* **60**, 44-49.
 26. Park, K. H. (2001), Antibacterial Effects of ALA against Fish Pathogenic Bacteria, MS Thesis, Yosu National University, Yosu, Korea.
 27. Subramanyam, V., D. M. Backyavathy, and R. Ramamurthi (1989), Inhibitory effects of lead on delta-aminolevulinic acid dehydratase enzyme in the fish *Tilapia mossambica*, *Environ. Ecol.* **7**, 740-742.
 28. Seo, K.-H. (2001), Production of 5-Aminolevulinic Acid by Recombinant *E. coli*, BS Thesis, Chonnam National University, Gwangju, Korea.
 29. Akesson, M., P. Hagander, and J. P. Axelsson (2000), Avoiding acetate accumulation in *Escherichia coli* cultures using feedback control of glucose feeding, *Biotechnol. Bioeng.* **73(3)**, 223-230.
 30. Mauzerall, D. and S. Granick (1956), The Occurrence and Determination of δ -Aminolevulinic acid and Porphobilinogen in Urine, *J. Biol. Chem.* **219**, 435-466.
 31. Sato, K., K. Ishida, T. Kuno, A. Mizuno, and S. Shimizu (1981), Regulation of Vitamin B12 and Bacteriochlorophyll Biosynthesis in a Facultative Methylotroph, *Protaminbacter ruber*, *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* **27**, 439-447.
 32. Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
 33. Han, L., M. Doverskog, S.-O. Enfors, and L. Haggström (2002), Effect of glycine on the cell yield and growth rate of *Escherichia coli*: evidence for cell-density-dependent glycine degradation as determined by ¹³C NMR spectroscopy, *J. Biotechnol.* **92**, 237-249.
 34. Noronha, S. B., H. J. C. Yeh, T. F. Spande, and J. Shiloach (2000), Investigation of the TCA cycle and the glyoxylate shunt in *Escherichia coli* BL21 and JM109 using ¹³C-NMR/MS, *Biotechnol. Bioeng.* **68(3)**, 316-327.
 35. DeLisa, M. P., J. Li, G. Rao, W. A. Weigand, and W. E. Bentley (1999), Monitoring GFP-operon fusion protein expression during high cell density cultivation of *Escherichia coli* using an on-line optical sensor, *Biotechnol. Bioeng.* **65(1)**, 54-64.
 36. Nitzan, Y. and M. Kauffman (1999), Endogenous porphyrin production in bacteria by δ -aminolevulinic acid and subsequent bacterial photoeradication, *Lasers Med. Sci.* **14**, 269-277.
 37. Chung, S. -Y. (2003), Production of 5-Aminolevulinic Acid by Recombinant *E. coli* and Process Monitoring, MS thesis, Chonnam National University, Gwangju, Korea.