



Effect of 850 nm near-infrared light emitting diode irradiation on the production of 5-aminolevulinic acid in *Rhodobacter sphaeroides*

SangJoon Mo^{1,2}

*Rhodobacter sphaeroides*에서 5-aminolevulinic acid 생산에 대한 850 nm 근적외선 발광다이오드 조사 효과

모 상 준^{1,2}

Received: 21 May 2021 / Accepted: 12 July 2021 / Published Online: 30 September 2021
© The Korean Society for Applied Biological Chemistry 2021

Abstract 5-aminolevulinic acid (ALA) is a representative photosensitizer used in numerous fields including cancer diagnosis and treatment. In this study, experiments were conducted to optimize the growth of *Rhodobacter sphaeroides* and production of ALA through LED irradiation of various wavelengths, addition of organic acid precursors of ALA, and changes in glucose concentration. After 72 h cultivation, the 850 nm wavelength LED irradiated at the same light intensity as the incandescent lamp increased the growth of *R. sphaeroides* and the production of ALA about 1.5- and 1.8-fold as compared with the control, respectively ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$). As a result of culturing *R. sphaeroides* by irradiating an LED with a wavelength of 850 nm after adding organic acid to the final concentration of 5 mM in culture medium, the production of ALA was increased about 2.8-fold in medium supplemented with pyruvic acid compared with the control ($p < 0.0001$). In addition, the growth of the strain and the production of ALA were increased about 2.9- and 3.4-fold in

medium supplemented with 40 mM glucose compared to the control which added only 5 mM pyruvic acid, respectively ($p < 0.0001$ and $p < 0.0001$). The yield of ALA per cell dry mass was about 1.4 folds higher than that of the control in 20 and 40 mM glucose, respectively ($p < 0.001$). In conclusion, the growth of *R. sphaeroides* and production of ALA were increased by 850 nm wavelength LED irradiation. It also optimized the growth of *R. sphaeroides* and production of ALA through organic acid addition and glucose concentration changes.

Keywords 5-aminolevulinic acid · Near-infrared light emitting diode · Photosensitizer · *Rhodobacter sphaeroides* · Photodynamic therapy

서 론

인류는 오래전부터 빛을 이용하여 각종 질환을 치료하던 중 특정한 화학물질과 빛의 상호작용이 정상세포에 해를 끼친다는 사실을 발견하였다[1]. 1903년 von Tappeiner과 Jesionek는 eosin을 피부 종양 주위에 바른 후 빛을 쬐어 종양 치료에 최초로 사용하였다. 1904년 von Tappeiner와 동료는 광 과민반응에 산소의 중요성을 입증하였고, 이를 산소의존 광감작(oxygen-dependent photosensitization) 현상으로 증명하면서 광역학치료(photodynamic therapy)라는 용어를 정립하였다[2]. 광감작제(photosensitizer)는 그 자체로는 무독성이지만 특정 파장의 빛을 조사할 경우 활성화된 광감작제로 변환되어 산소분자에 에너지를 전달하고 결과적으로 일중항산소(singlet oxygen)와 같은 활

SangJoon Mo (✉)
E-mail: sjmo1107@dankook.ac.kr

¹Medical Laser Research Center, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

²Center for Bio-Medical Engineering Core Facility, Dankook University, Cheonan 31116, Republic of Korea

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

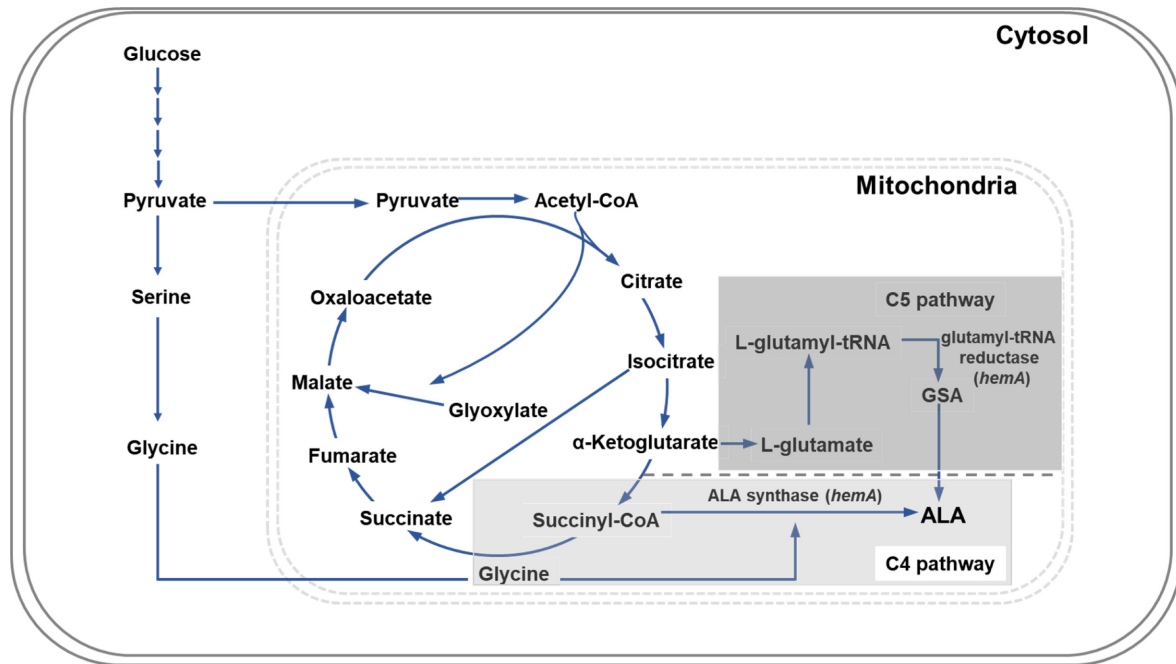


Fig. 1 C4 and C5 pathways for ALA biosynthesis. The enzymes encoded by the corresponding genes are: *hemA*, glutamyl-tRNA reductase (in C5 pathway); *hemA*, 5-aminolevulinic acid synthase (in C4 pathway). GSA; glutamate-1-semialdehyde

성산소종(reactive oxygen species, ROS)을 생성하게 된다[3]. 활성산소종은 세포내 생체분자나 소기관을 산화시킴으로써 치료 효과를 나타내며, 목적하는 국소 부위에만 빛을 조사하여 외과적 수술없이 치료를 할 수 있어 부작용을 최소화할 수 있다. Tetrapyrrole 구조의 porphyrin, heme, vitamin B₁₂ 그리고 chlorophyll의 전구체인 5-aminolevulinic acid (ALA)는 인간을 비롯한 생물체에서 중요한 생리적 기능을 가지며[4], ALA의 경우 중앙 국소화 및 광역학 치료에 효과적인 물질로 보고되었다[5,6]. 생체내에는 일반적으로 두 가지 ALA 합성 경로가 알려져 있는데 동물, 효모, 진균 및 일부 세균에서 succinyl-CoA와 glycine을 기질로 하여 ALA 합성 효소(ALA synthase, ALAS)에 의해 합성되는 C4 경로와 식물 및 cyanobacteria 등 일부 세균에서 glutamic acid를 전구물질로 사용하여 합성되는 C5 경로이다(Fig. 1)[4,7]. 광합성세균은 광합성에 의해 합성되는 색소에 따라 green bacteria와 purple bacteria로 구별되고 purple bacteria는 다시 홍색유황 광합성세균과 홍색비유황 광합성세균으로 나뉜다[8]. 홍색비유황 광합성세균의 ALA 합성은 Fig. 1에서와 같은 C4 경로에 의해 주로 합성되며 pyridoxal phosphate dependent 효소인 ALAS에 의해 촉매되는 반응이다. C4 경로에서 succinyl-CoA는 TCA 회로에서 제공되지만 methylmalonyl-CoA 합성에 의해 제공되는 propionyl-CoA로부터 합성되는 경우도 있다[9,10]. *Rhodobacter sphaeroides*의 경우 빛을 조사하는 혐기적 조건 아래에서 ALA dehydratase 억제제인 levulinic acid를 첨가한 배양, 또는 호기적조건 아래에서 *R. sphaeroides*의 돌연변이를 이용한 ALA의 생산이 널리 알려진 방법이다[11-13]. 특히, 1998년 Miyachi 등은 호기적 암흑배양 시스템을 이용하여 상업적인 ALA의 생산을 확립하였다[14]. 광합성세균 배양에 빛을 조사해야 하는 단점을 극복하기 위해 Yang

과 Lou는 대장균에서 ALA 합성 유전자(*hemA*)를 발현하여 최적 생산조건을 통해 ALA를 생산하였고[15,16], Yu는 유전자 조작된 대장균에서 chaperone과 코돈 최적화된 ALA 합성 유전자의 공동 발현을 통해 ALA를 생산하였다[17]. 최근에는, 인공조명을 이용한 인공배양기를 고안하여 광합성세균을 배양하여 다양한 유용물질을 생산하고 있다[18,19]. 인공 조명 중 하나인 LED는 고효율, 친환경, 긴 교체기간, 효율적 공간 이용 등의 장점과 단점이던 낮은 광출력과 높은 가격 문제의 해소로 널리 사용되고 있다[20]. 특히, 전력소비량은 백열등의 20% 수준이며, 100 lm/W 정도로 형광등과 비슷한 광원 효율 값을 보인다. LED 조명의 수명은 약 8만 시간으로, 약 1천 시간인 백열등보다는 약 80-100배, 약 2만 시간인 형광등보다는 약 4배의 긴수명을 가지고 있어 경제성을 가진다[21].

본 연구에서는 800 nm와 850-870 nm의 적외선 파장 쪽에서 흡수극대파장(λ_{max})을 나타내는[22] 홍색 비유황 광합성 세균 *R. sphaeroides*에 850 nm의 파장의 LED를 조사하며 배양액에 다양한 유기산과 glucose를 첨가하여 ALA 생산을 증가시키기 위한 최적 배양조건을 확립하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 연구에 사용한 *R. sphaeroides* KCTC 1434은 한국생물자원센터(Korean Collection for Type Cultures, Jeongeup, Korea)로부터 분양을 받아 실험을 진행하였다. 본 배양을 위해 단일 *R. sphaeroides* 콜로니를 10 mL 액체 SIS 배지에 접종하였다[23]. 액체 배양액을 660 nm 파장의 분광광도계에서 측정하여 -1.5의

OD (optical density) 값을 갖는 대수성장 단계에 도달하는 72 시간 동안 호기적으로 배양하였다. 150 mL의 serum bottle 배양기에 glutamate가 미 첨가된 멸균된 기본배지(D,L-malic acid 2.7 g, KH₂PO₄ 0.5 g, (NH₄)₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, CaCl₂·2H₂O 27 mg, nicotinic acid 1 mg, vitamin B-1 HCl 1 mg, MnSO₄·5H₂O 1.2 mg, biotin 0.01 mg, 증류수 1 L, pH 6.8)를 50 mL 씩 분주 한 후 혼합가스(N₂/H₂/CO₂; 90:5:5)로 치환된 혐기성 배양기(Thermos Forma, Marietta, OH, USA)에서 7일간 혐기적 상태로 치환시킨 후, 호기적으로 배양한 *R. sphaeroides*를 초기 균체농도가 660 nm에서 흡광도 0.5가 되도록 접종하였다. 균주를 접종한 serum bottle을 실리콘마개와 알루미늄 캡으로 밀폐한 뒤 호기적 상태에서 magnetic stirrer로 80-100 rpm 속도로 교반해가며 30 °C에서 배양하였다. 광원의 광도는 serum bottle이 받는 선단부에서 100 W 백열등과 LED가 100-120 μmol/m²/s 되도록 광원의 위치를 조절하였다. 광도 측정용 휴대용 광도계(DELTA HD2101.2, Italy)를 사용하였다.

LED 파장에 따른 *R. sphaeroides*의 성장변화 측정

LED 파장별 *R. sphaeroides*의 성장 변화를 측정하기 위해 실험군으로는 각각 126개의 다이오드가 설치된 450, 550, 650, 750 및 850 nm 파장의 LED를 5일간 조사하며 매 6시간 또는 12시간 마다 배양액을 취한 후 UV-VIS 분광광도계(Libra S22, Biochrom, England)를 사용하여 660 nm에서 흡광도(OD_{660 nm})를 측정하여 균주의 성장을 확인하였다. 필요에 따라 배양 시료를 분광 광도계 측정 범위 내에 있는 밀도로 희석하였다. 정량적 평가를 위해 3회 반복 실험하여 최종 성장률을 결정하였다.

배양액의 ALA 농도 및 건조체 질량당 ALA 생산량 측정

배양액 시료 1 mL을 분취 후 15분간 13,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 회수한 다음, Mauzerall과 Granick의 방법에 따라[24], 시료 0.75 mL에 1 M acetate buffer (pH 4.6) 1 mL 및 acetyl acetone 40 μL을 혼합하고, 열 중탕으로 15분간 반응시킨 후 냉각시킨다. 상기용액 1.75 mL와 Ehrlich's 시약(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 1.75 mL을 넣고 잘 섞은 후 20분간 상온에서 방치시키고, 분광광도계를 이용하여 556 nm에서 흡광도를 측정 한 후 ALA 표준곡선($\epsilon_{556}=9,300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)을 이용하여 배양액에 포함된 ALA의 농도를 분석하였다[25]. *R. sphaeroides* 건조체 질량당 ALA의 생산량을 측정하기 위해 상등액이 제거된 원심분리 tube를 50 °C의 dry oven에서 24시간 건조시킨 후 정밀전자저울(OHAUS, Parsippany, NJ, USA)에서 무게를 측정하여 원심분리 되기 전에 미리 질량을 재어둔 원심분리 tube의 무게를 빼어 *R. sphaeroides*의 건조 질량을 산출하였다. 필요에 따라 ALA의 농도는 ALA 표준곡선 선형 범위 내에 있는 농도로 희석하였다. 정량적 평가를 위해 3회 반복 실험하여 최종 농도를 결정하였다.

다양한 유기산 전구체 첨가에 따른 ALA의 생산량 분석

ALA 생합성 전구체로 사용되는 다양한 유기산(acetic acid, butyric acid, propionic acid, pyruvic acid, succinic acid, sulfuric acid)을 Sigma-Aldrich사(St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 기본배지에 최종 농도가 5 mM (v/v) 되게 첨가한 후 1 N NaOH를 이용하여 pH 7.2까지 보정한 후 *R. sphaeroides*

를 660 nm에서 흡광도 0.5가 되도록 접종하였다. 배지의 최종 pH는 pH paper (Sigma Aldrich, St. Louis, USA)를 사용하여 확인하였다. 접종 후, 72시간 배양하여 배양액의 ALA의 농도와 건조체 질량당 ALA 생산량 측정하기 위하여 위에서 기술한 방법대로 건조체 질량을 측정하였다. 배양하는 동안 동일한 광도로 850 nm 파장의 LED 빛을 조사하였다. 정량적 평가를 위해 3회 반복 실험하여 최종 ALA 생산량을 결정하였다.

Glucose 농도에 따른 *R. sphaeroides*의 성장변화와 ALA 생산량 분석

1 M glucose 용액을 vacuum filter system (pore size: 0.22 μm, Corning, Glendale, AZ, USA)을 통해 멸균 후 최종농도가 5, 10, 20, 40, 80 및 160 mM이 되도록 기본배지에 넣고, 5 mM의 pyruvic acid 첨가 후 1 N NaOH로 pH를 7.2로 보정하였다. Glucose 및 pyruvic acid 첨가와 pH 보정이 모두 끝난 기본배지에 *R. sphaeroides*를 660 nm에서 흡광도 0.5가 되도록 접종한 다음 72시간 배양하고 그 배양액 2 mL를 분취하여 1 mL는 UV-VIS 분광광도계(Libra S22)를 사용하여 균주의 성장을 위의 방법으로 측정하였다. 나머지 배양액 1 mL는 원심분리 후 상등액을 분취하여 위에서 언급한 방법대로 ALA의 농도를 측정하였다. 건조체 질량을 측정하기 위해 상등액을 제거한 원심분리 tube를 위에서 언급한 대로 dry oven에서 건조한 후 질량을 측정하여 *R. sphaeroides*의 건조체 질량을 측정하였다. 배양하는 동안 동일한 광도로 850 nm 파장의 LED 빛을 조사하였고 정량적 평가를 위해 3회 반복 실험하여 *R. sphaeroides* 성장력과 ALA 생산량을 최종 결정하였다.

통계 분석

Graphpad Prism 7.0 프로그램(GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA, USA)을 통해 실험 결과 분석을 수행하였고 분석 자료는 평균 ± 표준오차(mean ± SE)로 나타났다. 실험에서 얻은 결과에 대해 일원배치 분산분석(one way ANOVA) 또는 이원배치 분산분석(two way ANOVA)로 수행하였으며, 대조군과 실험군 간의 유의성은 Tukey test를 사용하여 $p < 0.05$ 수준에서 사후 확인하였다. 또한 균주 성장값과 ALA 농도값 결과를 근거로 선형상관 분석을 통해 상관성을 확인하였다.

결과 및 고찰

LED 조사 파장별 *R. sphaeroides*의 성장변화

R. sphaeroides 최적성장 파장을 선정하기 위해 450, 530, 630, 750, 850 nm 파장의 LED 빛을 조사하여 시간에 따른 *R. sphaeroides*의 성장변화를 조사하였다. Fig. 2A는 조사한 빛의 파장에 따른 *R. sphaeroides*의 성장을 시간별로 나타낸 그래프이다. 850 nm 파장의 LED만 조사한 *R. sphaeroides*의 성장이 대조군 대비 36시간부터 120시간까지 유의성 있게 증가하였다 ($p < 0.0001$). 특히, 72시간의 경우 *R. sphaeroides*의 성장이 대조군 (OD_{660 nm}=0.833±0.015) 대비 약 1.5배 증가하였다. 450 nm 파장의 경우 가장 낮은 성장을 보였으며 48시간 이후 530 nm 파장은 630 nm 파장 보다 *R. sphaeroides*의 성장률이 높았다. 또한, 각 LED 파장에서 *R. sphaeroides*의 최고 성장값과

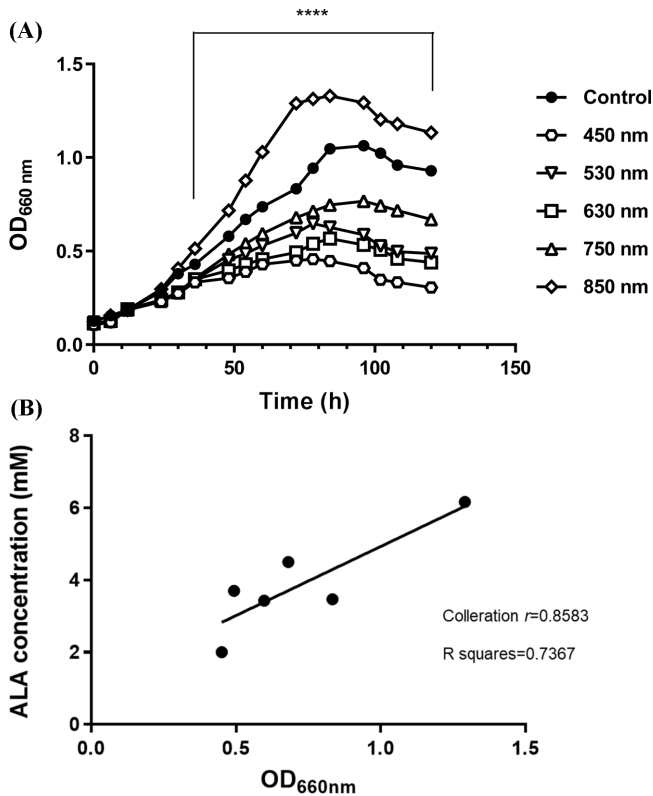


Fig. 2 Growth rate of *R. sphaeroides* by LED wavelength over time and correlation between strain growth and ALA productivity. (A) Time course analysis of growth rate of *R. sphaeroides* by the irradiation of LEDs with difference wavelengths. Three samples from each LED irradiation were collected every 6 or 12 h for 120 h. (B) Analysis of the correlation between ALA productivity and maximum growth at each wavelength. $r=0.8583$ and $R^2=0.7367$. Each experiment was repeated three times

ALA의 농도 사이의 상관관계를 분석한 결과, 이 둘 사이의 상관관계수는 $r=0.8583$ 로 계산되었다. 이 결과는 두 변수간에 유의미한 높은 상관관계를 가지고 있고($p < 0.05$), OD_{660 nm}의 값을 통해 ALA의 농도를 예측 할 수 있다는 결론을 얻었다(Fig. 2B). 김 등도 880 nm 파장의 LED를 조사하여 본 연구 결과보다 약 3.8배 높은 4.9 (OD_{660 nm})의 OD값을 보이는 결과를 보고하였으나, ALA의 생산량에 대한 결과는 보고하지 않았다[25]. 이러한 결과는 균주 부유상태에서 800 nm와 850-870 nm의 최대 흡수대를 나타내는 *R. sphaeroides*의 특징으로 인한 것으로 추측된다[22].

LED 조사 파장별 ALA의 생산량 변화

Fig. 3A는 *R. sphaeroides*가 최대 성장 시간일때 조사한 LED 빛의 파장에 따른 광합성세균 *R. sphaeroides*에서 생산되는 ALA의 농도를 보여주는 그래프이다. 각 시간대별 성장 변화를 분석하기 위해 배양액을 분취하여 660nm에서 흡광도를 측정 후 다시 회수하여 원심분리 후 상층액을 이용하여 ALA의 농도를 측정하여었다. *R. sphaeroides*를 배양할때 조사한 LED의 파장에 따라 *R. sphaeroides*에서 생산된 ALA의 농도가 달랐고,

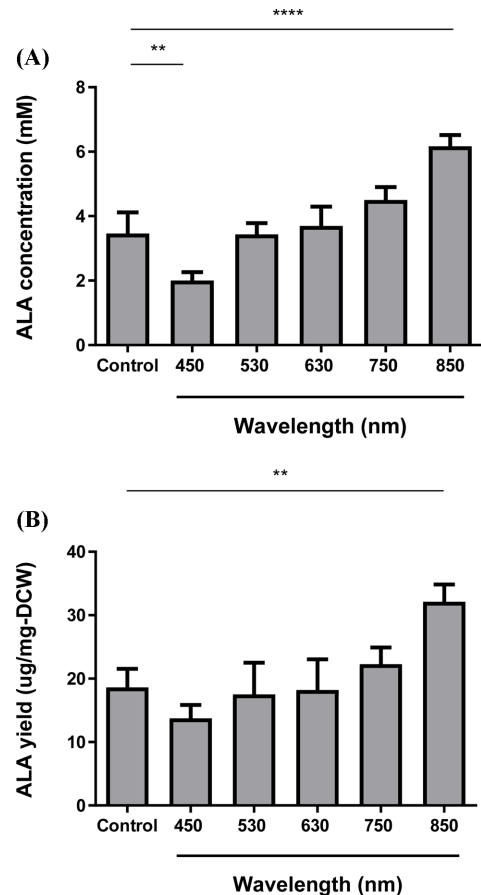


Fig. 3 Wavelength dependency of ALA production in culture medium of *R. sphaeroides* and ALA production per dry cell weight. (A) When *R. sphaeroides* showed maximum growth under each LED irradiated culture condition, ALA production was measured at 556 nm according to Mauzerall and Granick's method. (B) The centrifugation tube from which the culture solution was removed was dried in a dry oven, and the mass of the dried cell was measured to calculate the amount of ALA per unit mass of the dried cell. Control and each LED luminous intensity are constant. $**p < 0.01$, $****p < 0.0001$ compared to control. Each experiment was repeated three times. Data are means \pm SDs ($n=3$)

특히 850nm 파장의 LED를 조사한 경우에 *R. sphaeroides*에서 생산된 ALA의 농도가 대조군(3.47 ± 0.63 mM) 대비 약 1.8배 높았다($p < 0.0001$). 그러나, 450 nm 파장의 LED를 조사 할 경우 대조군 대비 약 40.0 \pm 3.0% 낮았고($p < 0.01$) Fig. 2A의 결과와 다르게 530 nm보다 630 nm에서 ALA의 생산량이 높았으나 유의성은 없었다. 또한 건조 균체당 ALA의 생산량을 측정하기 위해 상층액이 제거된 원심분리 tube를 dry oven에서 건조 후 *R. sphaeroides* 건조체 질량을 측정하여 Fig. 3B에 건조체 질량당 ALA의 생산량을 나타냈다. 그 결과 850 nm에서 대조군 (18.6 ± 3.1 ug/mg-DCW) 대비 ALA 생산량 값이 약 1.7배 증가된 결과를 얻었다($p < 0.01$). ALA의 생산량은 배양액과 건조체 질량 모두 동일하게 850 nm 파장의 LED를 조사한 실험군에서 가장 높은 결과를 보였다. 결론적으로, 적외선 파장 빛 부분에서 최대 흡수대를 갖는 *R. sphaeroides*의 고유한 특징을 이용하

면 *R. sphaeroides*의 광합성 능력을 촉진하여 균의 성장증진 및 ALA의 생합성 양을 높일 수 있다는 결론을 얻었다[22,26].

유기산 전구체에 따른 ALA의 생산량 변화

위의 결과를 바탕으로 850 nm 파장의 LED를 조사하며 *R. sphaeroides*를 5 mM의 유기산이 함유된 각각의 기본배지에서 72시간 성장시킨 후 ALA의 농도를 측정하였다. Fig. 4A에서 보여주듯, 유기산 전구체에 따라 *R. sphaeroides*의 ALA 생산량이 다양하게 변화됨을 확인하였고, acetic acid, pyruvic acid, succinic acid을 첨가한 배지를 사용한 경우 특히 대조군(6.30±0.30 mM) 보다도 *R. sphaeroides*의 ALA 생산량이 각각 2.6, 2.8 및 2.3배 증가하였으며($p < 0.0001$), pyruvic acid를 첨가한 배지를 사용할 경우 대조군 대비 ALA의 생산량이 가장 높음을 알 수 있었다. 건조체 질량당 ALA의 생산량 역시 acetic acid, pyruvic acid, succinic acid에서 대조군(34.2±4.9 µg/mg-DCW) 대비 각각 약 1.2배, 1.4배 및 1.4배 증가를 보였으나, pyruvic acid와 succinic acid에서만 유의성을 확인할 수 있고($p < 0.05$) sulfuric acid를 첨가한 배양액의 균체에서 생산된 ALA의 양은 대조군 대비 약 63.5% 감소한 결과를 보였다($p < 0.001$) (Fig. 4B). 고농도의 glycine은 본 연구에서 *R. sphaeroides*의 성장 및 ALA 생산에 명백한 영향을 미치지 않았다(미공개 데이터). 이것은 아마도 과도한 glycine 첨가가 glycine 자체 및 glycine 대사의 결과로 생성된 암모니아에 의해 세포 성장을 억제하고 또한 알칼리성 조건에서 ALA의 화학적 불안정성 때문인 것으로 추측된다[4]. 본 연구에서는 다양한 유기산 중 acetic acid, pyruvic acid 및 succinic acid에서 ALA의 생산이 매우 높았다. 특히 pyruvic acid에서 가장 높았는데 pyruvic acid가 glycine과 succinyl-CoA의 전구체 역할을 하여 ALA의 생산을 증가시키는 것으로 추측되며, acetic acid의 경우 acetyl-CoA 합성효소에 의해 acetyl-CoA로 전환되어 TCA 회로를 통해 succinyl-Co를 합성한 후 ALA의 생산을 증가시키는 것으로 추측된다. Succinic acid의 경우에도 succinyl-CoA 합성효소에 의해 바로 succinyl-CoA로 전환되어 ALA의 생산을 증가시킨 것으로 판단된다[27,28] (Fig. 1). 이것은 고농도의 glycine을 직접 배지에 첨가하여 ALA에 의해 직접 ALA의 생산을 유도하는 것보다 pyruvic acid가 serine을 통해 glycine을 합성 후 ALA를 생산하거나, pyruvic acid, acetic acid 그리고 succinic acid가 직접 혹은 CoA 합성 후 미토콘드리아로 유입되어 TCA 회로를 통해 succinyl-CoA를 합성한 후 이 중 일부가 ALA에 의해 간접적으로 ALA를 생산하는 것이 더 안정적인 결과를 보여주는 결과이다(Fig. 1).

Glucose 농도별 *R. sphaeroides*의 성장과 ALA의 생산량

850 nm 파장의 LED를 조사하며 5 mM의 pyruvic acid가 함유된 배지에 다양한 농도의 glucose를 첨가한 후 *R. sphaeroides*의 성장과 ALA의 생산량을 측정하였다. Fig. 5A에 나타난 결과처럼 배지에 첨가한 glucose의 농도에 따라 *R. sphaeroides*의 성장 뿐만 아니라 ALA 생산량의 증가를 확인하였다. *R. sphaeroides*의 성장은 20 mM glucose 농도부터 대조군($OD_{660\text{nm}} = 1.57 \pm 0.09$) 대비 유의성 있는 증가를 나타냈고 ALA의 농도는 10 mM glucose 농도부터 대조군(5.90 ± 0.30) 대비 유의성 있는 증가를 보였다. 특히, 배지 내에 glucose 농도를 40 mM 농도로

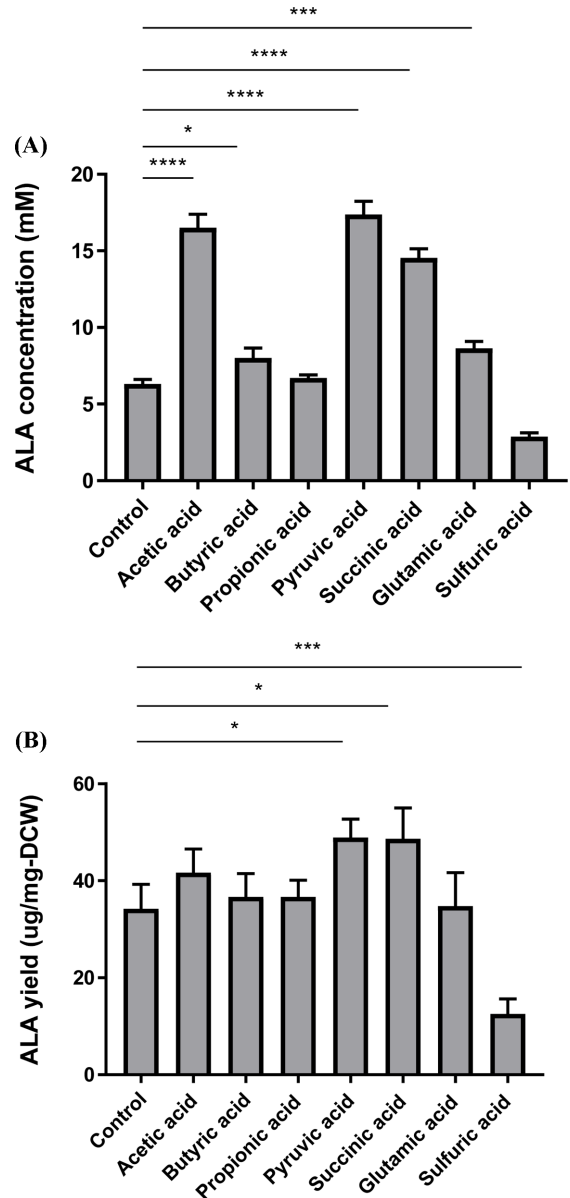


Fig. 4 Effect of organic acids on ALA production. (A) ALA production of *R. sphaeroides* was measured by adding an organic acid to the minimal medium to a final concentration of 5 mM and adjusting the pH, followed by incubation for 72 h. (B) After drying the centrifuge tube from which the culture medium has been removed, the ALA yield per mass of the dried cell was measured. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ and **** $p < 0.0001$ compared to control. Each experiment was repeated three times. Data are means ± SDs (n=3)

첨가하였을 때 대조군 대비 *R. sphaeroides*의 성장은 2.9배 증가하였고($p < 0.0001$), ALA의 농도는 약 3.4배 증가하였다($p < 0.0001$). 그러나, 80과 160 mM glucose 농도에서는 40 mM 대비 *R. sphaeroides*의 성장이 각각 약 $19.6 \pm 2.9\%$ 및 $33.4 \pm 2.4\%$ 감소하였고 ALA의 생산 농도 역시 각각 약 $17.1 \pm 3.5\%$ 및 $46.5 \pm 3.5\%$ 감소하였다. 건조체 질량당 ALA의 생산량은 20 mM과 40 mM glucose에서 대조군($51.6 \pm 4.3 \mu\text{g}$

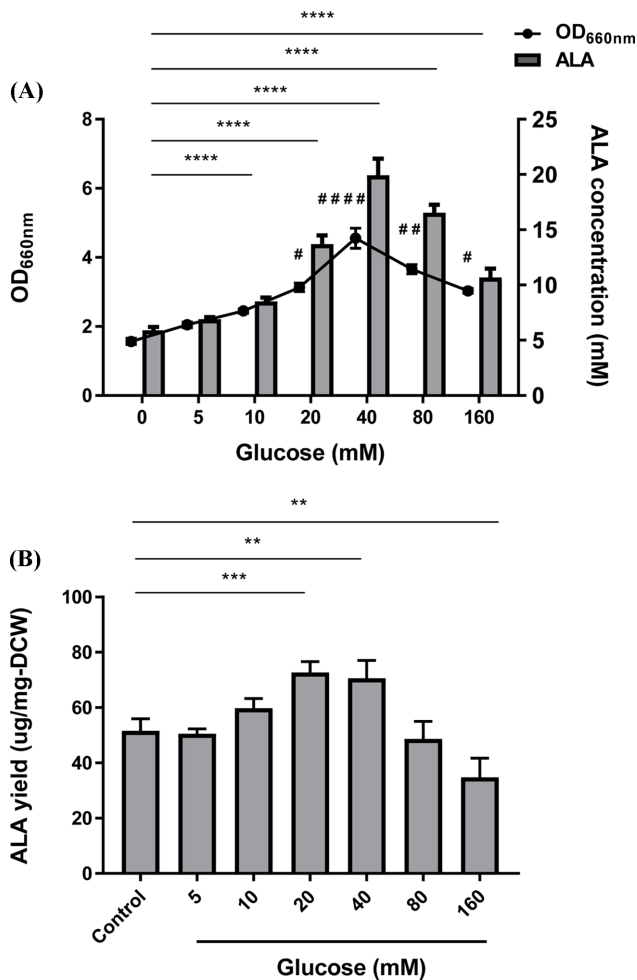


Fig. 5 Effect of glucose concentration on growth rate and ALA production of *R. sphaeroides*. (A) Glucose was added to pH-adjusted minimal medium supplemented with 5 mM pyruvic acid at a final concentration of from 0 mM to 160 mM and cultured for 72 h to measure cell growth and ALA production of *R. sphaeroides*. **** $p < 0.0001$ (ALA production), # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$, ### $p < 0.0001$ (cell growth) compared to 0 mM glucose. (B) After drying the centrifuge tube from which the culture medium has been removed, the ALA yield per mass of the dried cell was measured. ** $p < 0.01$ and *** $p < 0.001$ compared to control. Each experiment was repeated three times. Data are means \pm SDs ($n = 3$)

mg-DCW) 대비 모두 약 1.4배 유의성 있게 증가한 값을 보였고($p < 0.001$ 과 $p < 0.01$), 80 mM과 160 mM glucose에서는 배양액의 결과와 동일하게 감소하였다. 특히, 160 mM glucose에서는 대조군 대비 약 32.6 \pm 10.0% 감소된 유의성있는 결과를 보였다($p < 0.01$) (Fig. 5B). 이 결과는 50 mM의 glucose 농도에서 *R. sphaeroides* SH5 균주를 통해 균주의 성장과 ALA의 생산을 증가시킨 Tangprasittipap의 실험과 비슷한 결과를 보여준다 [29]. 그러나, 80 mM 또는 160 mM의 높은 glucose 농도에서는 오히려 균주의 성장과 ALA의 생산 농도가 감소하는 경향을 보였다. 이것은 높은 농도의 glucose가 균주 성장과 ALA 생산 농도의 증가 보다는 삼투압 현상을 촉진하여 균주의 성장을 억

제하고 이로 인해 ALA의 생산 농도를 감소시키는 것으로 판단된다.

결론적으로, 본 연구를 통해 서로 다른 파장을 가진 LED의 광원이 *R. sphaeroides*에 서로 다른 성장 효과를 나타내는 결과를 얻었다. 특히, 850 nm 근적외선 영역의 파장은 *R. sphaeroides*의 성장과 ALA의 생산을 증가시키는 결과를 보여 주었고 pyruvic acid의 첨가와 적정 농도의 glucose는 *R. sphaeroides*의 성장과 ALA의 생산을 더 증가시키는 결과를 보여주었다.

초 록

광감각제를 이용한 광역학 치료는 필요한 특정 부위에만 빛을 조사하여 치료 효과를 나타내는 부작용이 적은 방법이다. 5-aminolevulinic acid (ALA)는 다양한 생물체에서 합성되는 대표적인 광감제로 암진단과 치료를 포함하는 다양한 분야에서 사용되고 있다. 본 연구에서는 다양한 파장의 LED, 유기산 전구체 및 glucose 농도 변화를 통한 *Rhodobacter sphaeroides*의 최적 성장 조건과 ALA 생산 조건을 확립하기 위한 실험을 진행하였다. 백열등과 동일한 광도 아래에서 *Rhodobacter sphaeroides*에 850 nm LED 빛을 조사하면 대조군 대비 균주의 성장과 ALA의 생산 농도를 각각 1.5배 및 1.8배 증가시킬 수 있고, 전구체로 pyruvic acid를 첨가한 경우 850 nm 파장의 LED만 조사한 경우 보다 ALA의 생산 농도를 약 2.8배 증가시켰으며 동일 배양 조건에 40 mM glucose를 첨가하여 배양한 결과 *Rhodobacter sphaeroides*의 성장은 850 nm 파장의 LED 조사와 pyruvic acid를 첨가한 것에 비해 약 2.9배, ALA의 생산 농도는 약 3.4배 (20 mM) 증가되었다. 건조체 질량당 ALA의 생산은 20 mM과 40 mM glucose에서 대조군 대비 각각 약 1.4배 높은 결과를 나타냈다. 결론적으로 다양한 파장의 LED 중 850 nm 파장의 LED가 *Rhodobacter sphaeroides*의 성장을 및 ALA의 생산을 최대로 높였으며, 5 mM pyruvic acid와 40 mM glucose의 농도에서 최적의 *Rhodobacter sphaeroides* 성장과 ALA 생산을 확인하였다.

Keywords 5-아미노레블린산 · 광감각제 · 광역학치료 · 근적외선 · 로도박터 스페로이드

감사의 글 이 논문은 2020년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구 사업임(NRF-2020R1A6A1A03043283). 또한 한국기초과학원 국가연구시설장비진흥센터의 지원을 받아 수행된 연구임(과제관리번호: 2019R1A6C1010033).

References

- Daniell MD, Hill JS (1991) A history of photodynamic therapy. *Aust N Z J Surg* 61: 340–348. doi: 10.1111/j.1445-2197.1991.tb00230.x
- Ackroyd R, Kelty C, Brown N, Reed M (2001) The history of photodetection and photodynamic therapy. *Photochem Photobiol* 74: 656–669. doi: 10.1562/0031-8655(2001)0740656THOPAP2.0.CO2
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW, Jori G, Kessel D, Korbelik M, Moan J, Peng Q (1998) Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90: 889–905. doi: 10.1093/jnci/90.12.889
- Sasaki K, Watanabe M, Tanaka T, Tanaka T (2002) Biosynthesis,

- biotechnological production and applications of 5-aminolevulinic acid. *Appl Microbiol Biotechnol* 58: 23–29
5. Zhang SJ, Zhang ZX (2004) 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in leukemia cell HL60. *Photochem Photobiol* 79: 545–550. doi: 10.1111/j.1751-1097.2004.tb01274.x
 6. Ma G, Ikeda H, Inokuchi T, Sano K (1999) Effect of photodynamic therapy using 5-aminolevulinic acid on 4-nitroquinoline-1-oxide-induced premalignant and malignant lesions of mouse tongue. *Oral Oncol* 35: 120–124. doi: 10.1016/S1368-8375(98)00066-9
 7. Sasaki K, Tanaka T, Nishizawa Y, Hayashi M (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
 8. Germaine C-B, Siström WR, Stainer RY (1957) Kinetic studies of pigment synthesis by non-sulfur purple bacteria. *J Cell Comp Physiol* 49: 25–68
 9. Neidle EL, Kaplan S (1993) Expression of the *Rhodobacter sphaeroides* *hema* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthase isozymes. *J Bacteriol* 175(8): 2292–2303. doi: 10.1128/jb.175.8.2292-2303.1993
 10. Kang Z, Ding W, Gong X, Liu Q, Du G, Chen J (2017) Recent advances in production of 5-aminolevulinic acid using biological strategies. *World J Microbiol Biotechnol* 33: 200
 11. Sasaki K, Watanabe M, Nishio N (1997) Inhibition of 5-aminolevulinic acid (ALA) dehydratase by undissociated levulinic acid during ALA extracellular formation by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol Lett* 19: 421–424
 12. Nishikawa S, Watanabe K, Tanaka T, Miyachi N, Hotta Y, Murooka Y (1999) *Rhodobacter sphaeroides* mutants which accumulate 5-aminolevulinic acid under aerobic and dark conditions. *J Biosci Bioeng* 87: 798–804. doi: 10.1016/S1389-1723(99)80156-X
 13. Kamiyama H, Hotta Y, Tanaka T, Nishikawa S, Sasaki K (2000) Production of 5-aminolevulinic acid by a mutant strain of a photosynthetic bacteria. *Seibutu-Kougaku* 78: 48–55
 14. Miyachi N, Tanaka T, Nishikawa S, Takeya H, Hotta Y (1998) Preparation and chemical properties of 5-aminolevulinic acid and its derivatives. *Porphyrins* 2: 342–347
 15. Yang D-S, Park M-W, Lim, MJ Kim SJ, Shin Y, Park CS, Hyun Y, Kang D-K (2009) Optimizing the production of 5-aminolevulinic acid by recombinant *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter capsulatus* *hema* Gene. *Kor J Microbiol Biotechnol* 37: 153–159
 16. Lou J-W, Zhu L, Wu M-b, Yang L-r, Lin J-p, Cen P-l (2014) High-level soluble expression of the *hema* gene from *Rhodobacter capsulatus* and comparative study of its enzymatic properties. *J Zhejiang Univ Sci B* 15: 491–499
 17. Yu T-H, Yi Y-C, Shih I-T, Ng I-S (2020) Enhanced 5-aminolevulinic acid production by co-expression of codon-optimized *hema* Gene with chaperone in genetic engineered *Escherichia coli*. *Appl Biochem Biotechnol* 191(1): 299–312
 18. Kim JK, Lee BK (2000) Mass production of *Rhodospseudomonas palustris* as diet for aquaculture. *Aqua Eng* 23: 281–293. doi: 10.1016/S0144-8609(00)00057-1
 19. Bertling K, Hurse TJ, Kappler U, Rakić AD (2006) Lasers—an effective artificial source of radiation for the cultivation of anoxygenic photosynthetic bacteria. *Biotechnol Bioeng* 94(2): 337–345. doi: 10.1002/bit.20881
 20. Bourget CM (2008) An introduction to light-emitting diodes. *Hort Sci* 43: 1944–1946. doi: 10.21273/HORTSCI.43.7.1944
 21. Carvalho AP, Silva S O, Baptista JM, Malcata FX (2011) Light requirements in microalgal photobioreactors: an overview of biophotonic aspects. *Appl Microbiol Biotechnol* 89: 1275–1288
 22. Kim YU, Kim KS (1981) Studies on the isolation and the application of photosynthetic bacteria. *J Kor Agr Chem Soc* 24: 132–138
 23. Siström WR (1962) The kinetics of the synthesis of photopigments in *Rhodospseudomonas spheroides*. *J Gen Microbiol* 28: 607–616. doi: 10.1099/00221287-28-4-607
 24. Mauzerall D, Granick S (1956) The occurrence and determination of delta-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J Biol Chem* 219: 435–446
 25. Hwang SY, Choi KM, Lim WJ, Hong BS, Cho HY, Yang HC (1992) Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 and characterization of δ -aminolevulinic acid production. *J Korean Agric Chem Soc* 35: 210–217
 26. Kim D, Chang SY, Ahn JC (2008) Effect of growth improvement in photosynthetic bacteria as a function of 880 nm light emitting diode luminosity. *J Exp Biomed Sci* 14: 91–96
 27. Bräsen C, Schönheit P (2001) Mechanisms of acetate formation and acetate activation in halophilic archaea. *Arch Microbiol* 175: 360–368
 28. Huang J, Fraser ME (2016) Structural basis for the binding of succinate to succinyl-CoA synthetase. *Acta Crystallogr D Struct Biol* 72(Pt 8): 912–921. doi: 10.1107/S2059798316010044
 29. Tangprasittipap A, Prasertsan P, Choorit W, Sasaki K (2007) Biosynthesis of intracellular 5-aminolevulinic acid by a newly identified halotolerant *Rhodobacter sphaeroides*. *Biotechnol Lett* 29(5): 773–778