

제조합 *Escherichia coli*에 의한 5-Aminolevulinic acid (ALA) 생산 연구

서 국 화, 이 종 일

전남대학교, 물질·생물화학공학부, 화학공학부

전화 (062)530-0847, FAX (062)530-1847

Abstract

5-Aminolevulinic acid (ALA) can be used as a photodynamic herbicide / insecticide and also applied to photodynamic therapy for malignant skin tumor. In this study we developed recombinant *E. coli* system for the high productivity of ALA and for the on-line monitoring of fusion protein (EGFP::ALAS) by a fluorescence sensor.

서론

5-Aminolevulinic acid (ALA)는 5개의 탄소로 이루어진 아미노산으로 잡초들만 선택적으로 죽이는 생분해성 제초제 또는 *Trichopusioni*와 같은 다양한 곤충들을 죽이는 살충제로 사용되고 있을 뿐만 아니라, 최근 ALA의 대사물질인 tetrapyrrol 유도체가 피부암, 폐암, 방광암 등의 광역학적치료 (photodynamic therapy)에 사용되어 매우 선택적으로 암세포를 사멸시킨다고 알려져 있다. ALA의 화학적 생산 공정은 매우 복잡할 뿐만 아니라 경제성이 낮다. 그러나 미생물을 이용한 ALA 생합성 공정은 단순하며 환경친화적이다. 본 연구에서는 ALA를 생물학적으로 대량 생산하기 위해 ALA synthase (ALAS) 유전자를 재조합하여 *E. coli*에 도입하였다. 특히, ALA 합성을 온라인 모니터링하기 위해 green fluorescent protein (GFP)를 ALAS와 융합하여 *E. coli*에 도입하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

본 실험에서 사용된 숙주는 *E. coli* BL21(DE3)와 DH5 α 이고, 재조합 단백질을 발현시키기 위한 vector로는 pET-28b(+) (Novagen, *Kan^r*)와 pEGFP (Clontech, *Amp^r*)를 사용하였다. 종자배양에서는 각각 50 mg/L의 ampicillin과 20 mg/L의

kanamycin이 포함된 Luria Broth(LB)배지와 MS8 배지(6 g/L Glucose, 1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.2 g/L NH_4HCl , 2 g/L $(NH_4)_2SO_4$, 13 g/L KH_2PO_4 , 10 g/L K_2HPO_4 , 6 g/L $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$, 4 ml/L Trace element, 4 ml/L Vitamin solution)를 사용하였다. 또한 ALA는 glycine과 succinyl-CoA를 기질로 사용하여 ALAS에 의해 합성되므로 MS8 배지에는 30 mM glycine과 30 mM succinate를 별도로 첨가하였다.

2. 사용한 Plasmid

ALAS (*Bradyrhizobium Japonicum*dpt에서 분리)의 유전자를 pET-28b(+)에 삽입하여 pET-28b/ALAS를 만들었다(1). pET-28b(+)에 삽입된 ALAS유전자를 Polymerase Chain Reaction (PCR)을 이용하여 증폭시킨 후 온라인 모니터링에 유용한 GFP 생산유전자를 지닌 pEGFP vector에 재조합하고 이를 pFLS45라 명명하였다 (Fig.1).

3. 배양방법

종균배양은 냉동 보관된 종균을 우선 5ml LB에서 12시간 배양하여 활성화시킨 다음 100ml 배지에 1%의 종균배양액을 접종한 후 37 °C, 180rpm 조건의 진탕배양기에서 배양하였다. 배지와 배양온도에 따른 ALA 생산량을 조사하기 위해 30 °C와 37 °C의 조건 하에서 LB 배지와 MS8 배지에 배양하여 IPTG에 의한 ALA 유도발현정도를 조사하였다.

4. 분석방법

분비된 ALA양과 세포 내 ALAS를 정량하기 위해 Mauzerall & Granick의 방법(2)을 사용하였고, ALA dehydratase (ALAD)는 Sato의 방법(3)으로 정량하였다.

결과 및 고찰

1. 재조합 *E. coli*에서 EGFP::ALAS fusion protein의 발현

Fig.2는 재조합 플라스미드로 형질전환 시킨 *E. coli*에서 EGFP::ALAS fusion protein의 발현정도를 2차원 형광센서로 측정된 것이다. Fusion protein이 emission 510nm, excitation 480nm에서 측정됨을 볼 수 있고 온라인 모니터링에 이용할 수 있다.

2. 배지와 온도의 영향

Fig.3은 배지와 온도에 따른 ALA생산량을 나타내었다. *E.coli* BL21(DE3)는 MS8 배지에서, DH5a는 LB 배지에서 더 많은 양의 ALA를 생산하였다. LB 배지의 경우 12시간 배양 후, MS8 배지는 18시간 배양 후에 IPTG로 유도한 ALA생성량은

37 °C보다 30 °C에서 더 많았다.

3. ALA의 생산량 및 ALAS, ALAD 활성의 변화

Fig.4는 배양시간에 따른 ALA의 생산량 및 ALAS, ALAD 활성을 나타내었다. ALAS의 활성이 높아지면 ALA의 생산량이 증가하고, 시간이 지남에 따라 ALA를 분해하여 Porphobilinogen (PBG)을 생성하는 ALAD의 활성이 높아지는 것을 알 수 있었다.

요약

본 연구에서는 생분해성 제초제, 살충제, 광역학적 치료제로 이용되는 ALA의 대량 생산과 온라인 모니터링을 위하여 형질전환된 *E. coli* 시스템을 개발하고, ALA의 생산량에 영향을 미치는 배지, 온도 등의 배양조건을 살펴보았다.

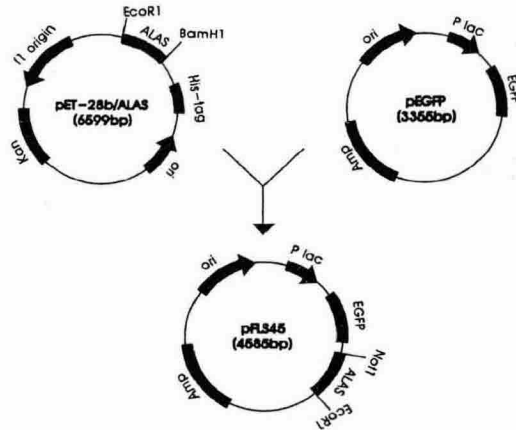


Fig.1 pFLS45 construction

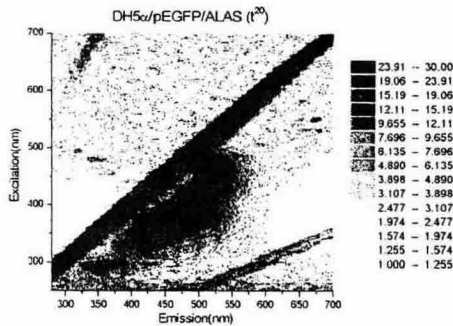


Fig.2 Spectrum of recombinant *E. coli* [pFLS45]

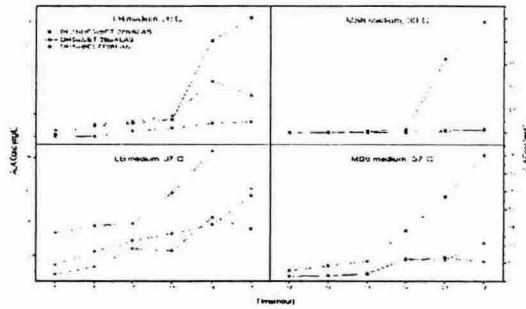


Fig.3 Extracellular ALA production of recombinant *E. coli*

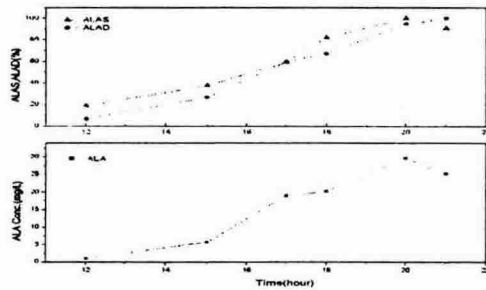


Fig.4 Extracellular ALA formation, ALAS and ALAD activity of recombinant *E. coli*

참고문헌

1. 백경환, private communication
2. Mauzerall, D. and S. Granick, "The Occurrence and Determination of δ -Aminolevulinic acid and Porphobilinogen in Urine"(1956), *J. Biol. Chem.*, **219**, 435-466.
3. Sato, K., K. Ishida, T. Kuno, A. Mizuno, and S. Shimizu, "Regulation of Vitamin B12 and Bacteriochlorophyll Biosynthesis in a Facultative Methylotroph, *Protaminbacter ruber*"(1981), *J. Nutr. Sci. Vitaminol.*, **27**, 439-447.
4. Chan Choi, Bum-Sik Hong, Ha-Chin Sung, Heung-Sik Lee & Jae-Ho Kim, "Optimization of extracellular 5-aminolevulinic acid production from *Escherichia coli* transformed with ALA synthase gene of *Bradyrhizobium japonicum*"(1999), *Biotech Lett.*, **21**, 551-554.