The Korean Journal of Microbiology, Vol. 43, No. 4, December 2007, p. 304-310
Copyright©2007, The Microbiological Society of Korea

Bacillus cereus 1-1 균주의 5-Aminolevulinic Acid (ALA) 생산

안경준
서원대학교 과학교육과

***Bacillus cereus* 1-1 균주는 광이 없는 호기적 환경에서 levulinic acid와 같은 저해제 처리 없이도 5-aminolevulinic acid (ALA)를 2 mM까지 생산하였다. *B. cereus* 1-1 균주는 TCY 배지에서 전 배양과 본 배양을 18시간 동안 지속하고, 배지의 pH가 6.8에 도달하는 대수기 후기에 acetic acid를 비롯한 유기산들을 16 mM 첨가하였을 때 많은 ALA를 생산하였으며, 본 배양 시작시 0.3% glucose를 첨가하는 것이 효과적이었다. Acetic acid 대신 glutamic acid를 첨가하였을 때 ALA 생산이 8시간 이상 지속되었고, 40 μM의 gabaculine을 첨가하면 생산이 현저히 저해되는 것으로 보아 *B. cereus* 1-1 균의 ALA 생산은 C-5 경로에 의함을 알 수 있었다.**

Key words □ **5-aminolevulinic acid (ALA), *Bacillus cereus*, C-5 pathway**

현재 사용되고 있는 제초제 중에서 auxin계, triazine계, diphenylether계의 광 민감성 화합물은 제조 과정이 복잡하고 인간을 비롯한 동물에게 유해할 뿐만 아니라 쉽게 분해되지 않아 환경오염의 문제를 안고 있다. 이와는 달리 5-aminolevulinic acid (ALA)는 엽록소, heme, 비타민 B_{12}와 같은 거의 모든 생물에게 필수적인 tetrapyrrole 화합물의 생합성과정에서 기본적인 중간산물로 여러 생물에서 합성되는데, 작물, 인간 또는 다른 동물에게 해가 없고 광엽성 잡초와 유충만을 선택적으로 죽이는 선택적 제초제 및 살충제로 기대를 모으고 있으며(1, 25, 27, 28, 36, 37), 미생물에 의해 쉽게 분해되어서 환경에 미치는 피해도 거의 없다. 그러나 화학적인 ALA 합성의 어려움으로 인하여 실용화가 어려웠으며, 따라서 세균을 활용한 적은 비용의 ALA 생산 연구에 관심이 모아지고 있다(30, 42).

ALA는 tetrapyrrole의 전구물질이므로 거의 모든 생물들이 합성할 수 있으며, 고등생물의 경우 그 생산량은 미미하지만 미생물을 활용할 경우 많은 양을 생산할 수 있을 것으로 기대하고 있다. 여러 종류의 algae나 화학유기종속세균들은 ALA 생산이 경제적이지 못한 것으로 알려져 있으며(37), 산소비발생형의 광합성세균은 산업적인 응용이 가능한 수준으로 ALA를 생산한다. 그러나 광합성세균을 이용한 ALA 생산은 광을 요구하며 산소에 민감하다. 최근 *Bradyrhizobium japonicum*과 *Rhodobacter sphaeroides*의 ALA synthase 유전자를 *Escherichia coli*에 재조합시킨 경우 ALA 생산량은 20 mM에 이르지만, 배양과정에서 영양분을 다량으로 요구한다(6, 20).

생물학적으로 ALA를 생산하는 경로는 2가지가 알려져 있는데 succinyl CoA와 glycine으로부터 합성되는 C-4 경로(Shemin pathway)와 glutamate로부터 시작하여 glutamyl t-RNA를 거쳐 glutamate 1-semialdehyde로 되고 다시 transamination 과정을 거쳐서 ALA를 합성하는 C-5 경로이다. 두 가지 경로 중에서 C-4 경로를 통해 ALA를 생산하는 생물로는 홍색비황세균(24, 41), 화학유기종속세균(38), rhizobia (19, 40) 같은 세균들과, 진핵생물 중에서 fungi (4, 43, 45), 그리고 포유동물 세포(21) 등이 알려져 있다.

C-5 경로를 수행하는 생물로는 고등식물(3, 8), algae (39, 46, 47), *E. coli* (7, 9, 17, 18, 44), *Bacillus subtilis* (10, 26), *Xanthomonas* (2, 23), 그리고 *Propionibacterium* (22)이 보고된 바 있다.

한편, tetrapyrrole 생합성 과정에서 ALA dehydratase의 경쟁적 억제제인 levulinic acid를 배양액에 첨가할 때 광합성세균들은 ALA를 과량 생산하여 세포외부로 분비한다는 것이 알려져 있다(29).

ALA의 제초 기작은 광의 존재 하에서 야기된다. 식물 잎 표면에 살포된 ALA가 식물에 흡수되어 porphyrin과 같은 광 민감성 화합물로 합성되고, 이 화합물이 빛을 받으면 광산화효과에 의해 산소와 반응하여 일 중항 산소를 생성한다. 일 중항 상태의 산소($^1O_2$, singlet oxygen)는 강력한 산화제로서 자유라디칼 연쇄반응에 의해 주로 광엽성의 쌍떡잎식물의 세포막에 존재하는 인지질을 산화시켜 식물의 세포막을 파괴하며, 1~4시간 내에 잡초를 말라죽게 만든다(27). 이와 같은 제초제로서의 역할 뿐 아니라 비슷한 기작으로 살충제로서도 이용이 가능하며, 낮은 농도로 처리하면 오히려 식물성장 촉진 효과도 보이고(35), 염분 농도나 저온 등의 환경 스트레스에 대한 작물의 저항성을 향상시키는 효과도 실용화 단계에 있다(11, 16). 최근에는 ALA의 의학적 활용으로 중금속 오염의 진단(42)이나, Kennedy 등(14)이 예견한 것처럼 광역학적 암 치료제(cancer drug for photodynamic therapy)로의 적용을 위한 광범위한 응용이 시험되고 있다(13, 35).

본 연구에서는 광합성 세균이 아닌 호기성 세균을 이용하여 환경에 해를 주지 않는 무공해 미생물 제초제를 생산하기 위하

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-43-299-8403, Fax: 82-43-299-8400
E-mail: kjahn@seowon.ac.kr

여 *Bacillus cereus* 1-1 균주의 ALA 생산을 조사하였다. *B. cereus* 1-1 균주는 기존의 미생물을 이용한 ALA 생산에서 많이 사용되었던 광합성세균에 비해 배양과정에 광이 필요하지 않으며 ALA 과량생산을 위한 저해제 levulinic acid를 넣지 않아도 비슷한 수준으로 ALA를 다량으로 생산할 수 있어 훨씬 경제적이고 배양시간이 짧아 오염의 우려 또한 적다. 본 연구는 ALA의 미생물학적 생산을 위하여 *B. cereus* 균주를 이용한 최초의 시도이며 ALA를 가장 효율적으로 생산할 수 있는 최적조건을 찾는데 중점을 두었다.

재료 및 방법

균주, 배지 및 배양조건

ALA를 생산하는 호기성 세균에 대한 연구를 위하여 본 실험에서 사용된 균주는 *B. cereus* 1-1 균(KCTC 11067BP)으로 충북 청주시 서원대학교 주변 토양 시료에서 분리되었다.

그람 양성이며 포자를 형성하고 배양 결과 천연의 친환경 제초제 성분인 ALA의 생산을 확인하였다.

기존의 ALA 생산에 사용되었던 광합성세균 *Rhodobacter* 속 균주들에 비해 광을 요구하지 않으며 생육이 빠르고 ALA 생산 원료인 glycine과 succinate, 그리고 저해제인 levulinic acid를 첨가할 필요가 없다.

보다 정확한 분류를 위해서 API 50 CHB kit (France, Biomerieux)를 사용하였으며 아울러서 Motility test medium (Difco)을 이용하여 운동성 여부를 조사하였다.

본 실험에서 사용한 기본 배지는 전 배양과 본 배양 모두 TCY 액체 배지(tryptone 1%, casamino acid 1%, yeast extract 1%, glucose 0.3%)를 사용하였다. Glucose는 *B. cereus* 1-1 균 접종 직전에 첨가하였으며 생육 중간에는 유기산 중에서 주로 acetic acid를 첨가하여 pH의 변화와 ALA 생산을 조사하였다.

전 배양시 *B. cereus* 1-1 균을 접종하여 호기적인 상태에서 하룻밤 진탕 배양하였다. 본 배양은 TCY 배지에 전 배양균 1%를 가하였으며 진탕속도는 200 rpm, 온도는 30~33°C로 조절하여 배양하였다. 사용균주의 ALA 생산이 최대가 되는 조건을 찾기 위해 배양조건을 변화시켰다. 진탕 배양하면서 600 nm 파장에서 optical density를 측정하여 균 생장을 보았으며, 배양시간에 따른 배지 pH의 변화를 조사하였고, 배양 과정 각 시기에 acetic acid를 16 mM 첨가하면서 ALA 생산을 비교하였으며, acetic acid 첨가량과 본 배양 시작 시 첨가하는 glucose를 농도 별로 조절하여 ALA 생산의 최적 조건을 찾았다. 대수기 후기에 첨가하는 산의 종류(acetic acid, glutamic acid, lactic acid, propionic acid, pyruvic acid, sulfuric acid)를 달리하여 비교하였으며, 배양 시간과 배지 종류(TCY, LB, PCA, NB)에 따른 ALA 생산을 보았다.

Gabaculine의 첨가에 따른 ALA 생산 저해

ALA를 생산하는 경로 중에서 glutamic acid로부터 시작하는 C-5 경로는 gabacuine (3-amino-2,3-dihydrobenzoic acid)에 의해서 ALA 생성의 전단계가 저해를 받는다(12). *B. cereus* 1-1 균주의 ALA 생합성 경로가 C-5 경로인지 알아보기 위하여 glutamic acid를 첨가한 배양에서 gabaculine을 40 μM 가하여 ALA 생산이 저해되는지 조사하였다.

생산된 ALA 농도 측정

배양 균주가 생산하는 ALA의 양을 측정하기 위하여 배양액을 12,000 rpm으로 10분간 원심분리한 후, 증류수 900 μl와 원심분리용액 100 μl를 sample vial에 넣고 1 M acetate buffer (pH 4.6) 1 ml와 acetyl acetone 40 μl를 첨가하여 10분 정도 끓여 식힌다. 상기 용액 1 ml와 신선한 Ehrlich 시약(1 g p-dimethylaminobenzaldehyde, 42 ml glacial acetic acid, 8 ml 70% perchloric acid) 1 ml를 넣고 잘 섞은 다음 10분 후 556 nm에서 흡광도를 측정하였으며(5), ALA (Sigma Co.)의 표준곡선을 이용하여 농도를 결정하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정 결과

B. cereus 1-1 균주는 그람 양성이며 내생포자를 생산하고 OF test에서 oxidation에 의하여 생장하였다. 1-1 균주를 LB 평판에서 하룻밤 배양하고 API 50 CHB kit를 이용하여 2일 간에 걸쳐 1-1 균주의 다양한 탄수화물에 대한 이용 여부를 판독한 결과는 Table 1과 같다. 전형적인 *B. cereus* 균과 비교해 본 결과 mannose, sucrose, cellobiose에 대한 이용능에서 차이가 나는 것으로 나타났으며, 이 자료를 Biomerieux 회사(www.biomerieux.com)에서 제공하는 Apiweb을 통하여 분석한 결과 *B. cereus*의 가능성은 51.9%로, 그리고 *B. mycoides*는 46.6%로 나타났다. *B. cereus* 균과 *B. mycoides* 균은 많은 생화학적 공통점을 갖고 있어서 구분이 쉽지 않으나 전자는 운동성을 지니고 있기 때문에 구별이 가능하다.

Motility test medium에 균을 천자배양하여 2일 내지 3일간에 걸쳐서 배양하면서 운동성 여부를 조사해 본 결과 1-1 균주는 운동성이 있는 것으로 나타났으며, 따라서 1-1 균주를 *Bacillus cereus*로 동정하였다.

배지 조건에 따른 ALA 생산 비교

B. cereus 1-1 균을 TCY 배지에서 전 배양하고, 이 배양액을 1% 농도로 접종하여 새 TCY 배지에 본 배양을 시작하였으며, 배양시간에 따른 균 생장을 측정하였고 배지의 pH 변화를 알아보았다(Fig. 1). 접종 13시간 만에 최대 생장을 보이며 접종 후 1시간에서 6시간에 걸쳐 대수적 생장을 보이는 것으로 나타났다. 균이 생장하면서 배지의 pH는 7.0에서 시작하여 대수기 초기부터 낮아지기 시작하여 접종 3시간 후에는 pH 5.6까지 떨어졌으며 이후 상승하기 시작하여 대수기 말기에는 pH 7.0에 도달하였으며 지속적으로 증가하여 접종 16시간 후에는 pH 8.0을 넘었다. 대수기 동안에 pH가 감소하는 것은 첨가된 glucose를 소모하여 산을 생산하기 때문이며 대수기 말부터 pH가 상승하는 것은 glucose가 고갈되면서 균들이 단백질을 주된 에너지원으로 사용

Table 1. Biochemical characteristics (carbohydrates) of *Bacillus cereus* 1-1

Carbohydrate source	Result	Carbohydrate source	Result
Glycerol	-	Salicin	+
Erythritol	-	Cellobiose	+
D-Arabinose	-	Maltose	+
L-Arabinose	-	Lactose	-
Ribose	+	Melibiose	-
D-Xylose	-	Sucrose	-
L-Xylose	-	Trehalose	+
Adonitol	-	Inulin	-
β-Methyl-D-xyloside	-	Melezitose	-
Galactose	-	Raffinose	-
Glucose	+	Starch	+
Fructose	+	Glycogen	+
Mannose	-	Xylitol	-
Sorbose	-	Gentiobiose	-
Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
Mannitol	-	D-Fucose	-
Sorbitol	-	L-Fucose	-
α-Methyl-D-mannoside	-	D-Arabitol	-
α-Methyl-D-glucoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetyl glucosamine	+	Gluconate	-
Amygdalin	-	2-Keto-gluconate	-
Arbutin	+	5-Keto-gluconate	-
Esculin	+		

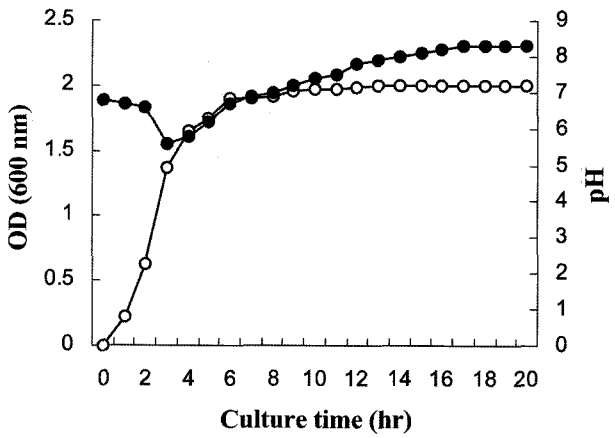

Fig. 1. Optical density (○) of *B. cereus* 1-1 in TCY medium and pH change (●) of culture broth during the culture time.

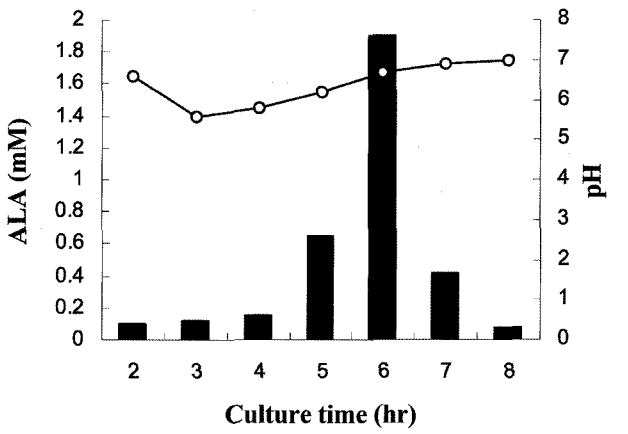

Fig. 2. Comparison of ALA concentration (■) produced at the culture time of 18 hr according to the addition time of 16 mM acetic acid and the change of pH (○) from the beginning to the late log phase of the culture.

하기 때문일 것이다.

B. cereus 1-1 균을 접종하고 대수기까지 배양한 뒤 acetic acid를 첨가하면 배지의 pH가 어느 정도 낮아지며 이것이 균주 생육 환경의 변화를 야기하여 배양 18시간 경에 이르러 배양액을 취하여 측정한 결과 ALA 생산이 급격히 증가하는 것을 발견하였으며, 특히 접종 6시간 후인 대수기 말에 acetic acid를 첨가하면 생산량이 최대치를 나타냈다(Fig. 2).

접종 후 18시간이 경과하면 이미 균은 정지기를 넘어 사멸기에 이를 것으로 판단되며, 세포내에 농축되었던 ALA가 배양액으로 용출되거나, 세포내에서 비정상적으로 과량의 ALA가 생산되어 배지로 방출되는 것으로 보인다. 실제로 광합성 세균 *R. sphaeroides*에서는 ALA가 생산이 되면서 세포 외부로 빠져나오지만 *Bacillus* 속을 비롯한 다른 균에서는 아직 확실하지 않다.

한편 acetic acid를 첨가하는 시점에 따른 배양액 pH와 이 배양액에서의 ALA 생산을 연관시켜 보면, 균 생장의 대수기 초기에 acetic acid를 넣었을 때에는 낮은 농도의 ALA가 생산되었으며, 배지의 pH가 떨어졌다가 상승하여 pH 6.8에 해당하는 대수기 후기인 접종 후 6시간에 acetic acid를 넣는 경우 ALA가 2 mM로 가장 많이 생산되었고, 첨가시기가 이르거나 늦어지면 생산량은 급격히 감소하였다. 따라서 *B. cereus* 1-1 균 배양을 시작하여 대수기 후기에 이르렀을 때 배지의 pH를 측정하면서 pH 6.8에 이르렀을 때 acetic acid를 첨가하는 것이 효과적이라고 판단된다.

Sasaki 등(29)에 의하면 산소비발생형 광합성을 하는 홍색비황세균인 *R. sphaeroides*에서 ALA를 효과적으로 생산하기 위해서 기질인 succinic acid, glycine을 첨가하고, ALA가 다음 단계로 이용되는 과정을 촉매하는 효소인 ALA dehydratase (ALAD)를 저해하는 경쟁적 저해제인 levulinic acid 첨가시기를 대수기 중기로 하였을 때 가장 많은 ALA 농도가 생산이 되었으며 초기와 후기에 넣어주었을 경우 매우 저조하게 나타났다는 보고(29)가 있었는데 저해제로서의 역할도 중요하였지만 배지의 pH를 변화

Table 2. Effect of acetic acid concentration on the ALA production

Acetic acid (mM)	ALA (mM)
15	0.52
16	1.95
17	0.95
18	0.43

Table 3. Effect of glucose concentration on the ALA production

Glucose (%)	ALA (mM)
0.1	0.83
0.2	1.1
0.3	2.1
0.4	2.0
0.5	2.0

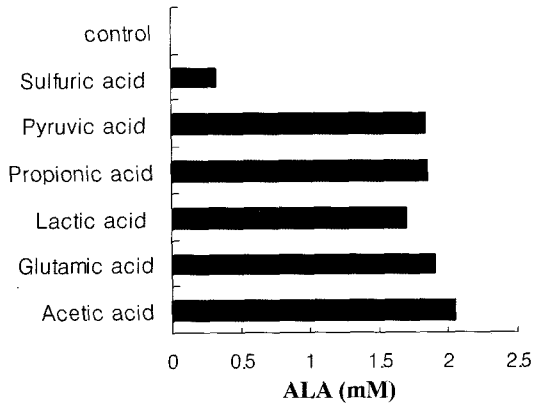

Fig. 3. Production of ALA according to the addition of several acids (16 mM) at the late log phase of the culture.

시키는 효과도 있었을 것으로 사료된다. 또한 저해제인 levulinic acid를 주기적을 배양액에 첨가하면 ALA 생산이 증가하여 배양 2~3일 만에 4 mM에 도달하였다고 보고한 바 있다(32, 33).

대수기 후기 배양액에 첨가하는 acetic acid의 양에 따른 ALA 생산을 비교한 결과는 Table 2와 같다.

대수기 후기에 16 mM acetic acid를 첨가하고 배양을 계속하면서 최초 접종 후 18시간 만에 측정하였을 때 2 mM의 ALA가 생산되었으며 acetic acid의 첨가량이 적거나 많으면 생산량은 급격히 감소하였다. 미세한 pH의 차이나 첨가된 유기산의 농도 차이가 ALA 합성에 큰 영향을 주는 것으로 추정된다.

TCY 배지에 첨가하는 glucose가 초기 배양 과정에서 배지의 pH를 좌우하므로 농도를 0.1%, 0.2%, 0.3%, 0.4%, 0.5%로 변화시켜 첨가하여 ALA 생산량을 비교하여 보았다. glucose의 농도가 0.1%부터 0.3%까지 높아질수록 ALA 생산이 증가하였지만 0.4% 이상이 되면 생산이 더 이상 증가하지 않았다(Table 3). 초기 배지 내에 적어도 0.3%의 glucose가 포함되어 있어야 배양과정에서 ALA 생산에 적절한 pH 조건이 맞게 되는 것으로 보인다. *B. cereus* 1-1 균의 ALA 생산에는 배양 초기에 glucose를 첨가하는 것이 효과적이며, 균이 생장하여 대수기 후기에 이르렀을 때 acetic acid를 16 mM 첨가하여 배양을 계속하면 ALA가 최대 2 mM까지 생산되었는데 이는 C-5 경로를 통하여 glutamic acid로부터 ALA를 생산하는 다른 세균들(36)에 비하면 대단히 많은 양이며, C-4 경로를 통하여 ALA를 생산하는 광합성세균의 배양조건을 최적화시킨 경우(32, 33)의 절반에 해당하는 농도를 생산한 것으로 더 이상의 유전적 재조합을 거치지 않고도 산업적으로 ALA를 생산할 수 있는 정도이다. ALAD의 저해제인 levulinic acid를 추가로 첨가한다면 더욱 많은 양의 ALA를 생산할 것으로 기대한다.

ALA를 최대로 생산할 수 있는 조건을 찾기 위해 본 배양 5시간 만에 첨가하는 산(acetic acid, glutamic acid, lactic acid, propionic acid, pyruvic acid, sulfuric acid)의 종류를 달리하여 같은 농도로 첨가하였다. 산을 첨가하지 않은 대조군에서는 ALA가 전혀 생산되지 않았으며, 유기산인 acetic acid 등을 넣었을 때 sulfuric acid를 첨가한 경우보다 5배 이상 많은 양의 ALA가 생산되었다(Fig. 3). 이 결과로 보아 배지의 pH도 중요한 변수가 되지만 유기산이 효과적임을 알 수 있었고, 이는 *B. cereus* 1-1 균주가 C-5 경로를 통해 ALA를 생산한다고 가정하였을 때, C-5 경로의 처음 단계에서 필요한 glutamic acid를 공급해 주는 과정에서 aminotransferase의 기질로 유기산이 이용됨을 시사하는 결과이다.

광합성 세균 *R. sphaeroides*의 경우에는 ALA를 효과적으로 생산하기 위해 지속적으로 빛을 비추어주고, 비교적 고가인 저해제 levulinic acid를 주기적으로 넣어주어야 했지만, *B. cereus* 1-1 균주의 경우에는 acetic acid를 비롯한 유기산을 16 mM 정도로 1회만 넣어주면 절반 수준의 ALA가 생산되며 배양기간도 1/2 내지 1/3만 소요되었다.

B. cereus 1-1 균주의 배지 종류에 따른 ALA 생산을 알아보기 위하여 TCY, LB, PCA, NB 배지에 각각 접종하여 18시간 전배양한 다음 동일배지에서 본 배양하면서 배양시간에 따른 ALA 생산량을 측정하였다.

모든 배지에서 배양 18시간 만에 최대 ALA 생산을 나타냈으며, TCY 배지로 배양하였을 때 농도는 2 mM에 이르렀다(Fig. 4). TCY 배지는 LB 배지의 거의 2배, 또한 LB 배지는 PCA 배지에 비해 2배에 해당하는 유기물을 함유하고 있는데 유기물이 풍부한 배지일수록 농도에 비례하여 ALA 생산이 증가함을 볼 수 있었으며, 이는 ALA 생산에 많은 에너지가 필요하기 때문이다(6, 20).

배양이 지속되면 배지의 pH가 상승하면서 ALA의 양이 다시 감소하는 데, *R. sphaeroides*를 이용한 ALA 생산에서 Sasaki 등(34)이 조사한 바로는 중성 범위에서는 ALA synthetase (ALAS)의 활성이 높으며 반면에 ALA dehydratase (ALAD)의 활성은 낮게 나타났다. 그러나 pH가 8.0에 이르면 반대의 결과를 보이는데 ALAD의 활성이 증가하여 ALA가 tetrapyrrole 생합성에 이용되어 소모되며, 또한 배양액의 pH가 8.0을 넘게 되면 ALA 성

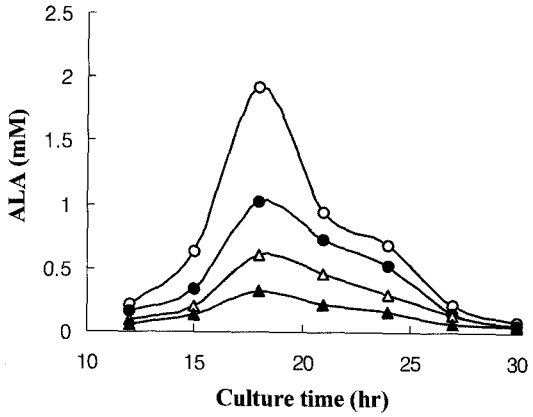

Fig. 4. ALA production according to the culture time and the main culture medium TCY (○), LB (●), PCA (△), and NB (▲).

분 자체가 불안정해지는 것으로 생각된다.

Glutamic acid와 gabaculine 첨가에 따른 ALA 생산

B. cereus 1-1 균주에 의한 ALA 생산 경로가 C-4 경로보다는 C-5 경로일 가능성이 *B. subtilis*에서처럼 크고, 다른 유기산 첨가와 더불어서 glutamic acid를 첨가하여도 ALA가 2 mM 정도 생산되는 것으로 보아 C-5 경로를 통하여 합성하는 것으로 예상하였다. 이를 확인하기 위하여 acetic acid와 glutamic acid를 각각 첨가한 배양액을 배양시간에 따라 취하여 생산된 ALA의 양을 조사하였다. Glutamic acid가 직접적인 ALA 합성의 기질로 사용된다면 acetic acid를 첨가한 배양액보다 많은 양의 ALA를 지속적으로 생산할 것으로 예상하고 조사한 결과, Fig. 5에서와 같이 glutamic acid를 첨가한 경우 ALA의 최대생산량은 비슷하였지만 acetic acid를 첨가한 경우보다 지속적으로 8시간 이상 합성이 계속되는 것을 확인할 수 있었다.

아울러서 C-5 경로에서 glutamate 1-semialdehyde (GSA)로부터 ALA로 전환시키는 효소인 GSA aminotransferase를 특이적으로 저해하는 gabaculine (3-amino-2,3-dihydrobenzoic acid) 40 μM을 glutamic acid 16 mM과 동시에 첨가하였을 때 ALA 생산이 극히 저하됨을 알 수 있었다. 이것으로 볼 때 *B. cereus* 1-1 균주의 ALA 합성은 다른 *Bacillus* 속에서 보고된 것(10, 26)과 같이 C-5경로를 통하는 것으로 결론지을 수 있었다. 한편 광합성세균 *R. sphaeroides*의 경우에는 ALA 합성에 산소가 해로우며, 산소를 제거하였을 때 ALA 생산이 증가된다는 보고(15)와 배지 내에 Fe^{2+}의 농도가 높을 때는 적게 생산되다가, 균 배양에 의해 고갈된 시점에서 ALA가 많이 생산된다는 보고가 있었다(31). 저자들은 Fe^{2+}이 ALA synthetase를 직접적으로 저해하는 것으로 보았는데, 전체적으로 보면 Fe^{2+}이 배지 중의 용존산소를 줄였고 결국 ALA 생산에 산소가 저해요인이었음을 알 수 있다. 본 실험에 사용한 *B. cereus* 1-1 균주는 호기성 세균이며, 진탕배양을 통해서 ALA가 효율적으로 생산되는 것으로 미루어 보았을 때 광합성세균과는 달리 C-5 경로에 의하여 ALA를 합성함을 확인할 수 있었다.

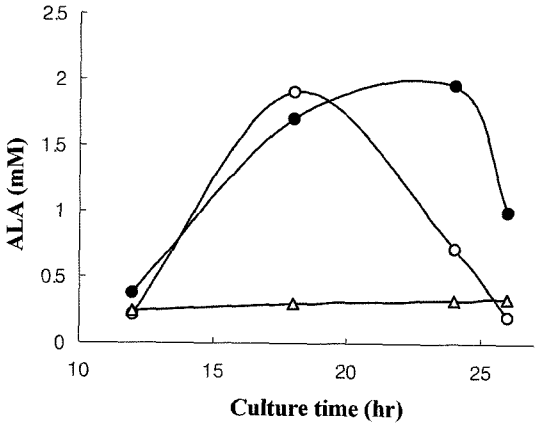

Fig. 5. Production of ALA in the culture broth containing 16 mM acetic acid (○) or glutamic acid (●), and glutamic acid with 40 μM gabaculine (△).

감사의 말

본 연구는 산업자원부의 서원대학교 친환경바이오소재 및 식품 지역기술혁신센터(RIC) 사업 연구비 지원에 의해 수행되었습니다.

참고문헌

1. Andersen, T., T. Briseid, T. Nesbakken, J. Ormerod, R. Sirevag, and M. Thorud. 1983. Mechanisms of synthesis of 5-aminolevulinate in purple, green and blue-green bacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 19, 303-306.
2. Asahara, N., K. Murakami, S. Korbrisate, Y. Hashimoto, and Y. Murooka. 1994. Cloning and characterization of the *hemA* gene for synthesis of δ-aminolevulinic acid in *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40, 846-850.
3. Beale, S.J. and P.A. Castelfranco. 1984. The biosynthesis of δ-aminolevulinic acid in higher plants. II. Formation of ^{14}C δ-aminolevulinic acid from labeled precursors in greening plant tissues. *Plant Physiol.* 53, 297-303.
4. Bradshaw, R.E., S.W.C. Dixon, D.C. Raitt, and T.M. Pillar. 1993. Isolation and nucleotide sequence of the 5-aminolevulinic acid synthase gene from *Aspergillus nidulans*. *Curr. Genet.* 23, 501-507.
5. Burnham, B.F. 1970. δ-Aminolevulinic acid synthetase (*Rhodopseudomonas sphaeroides*). *Methods Enzym.* 17A, 195-204.
6. 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 synthetase gene of *Bradyrhizobium japonicum*. *Biotechnol. Lett.* 21, 551-554.
7. Drolet, M., L. Peloquin, Y. Eccjelard, L. Cousiineau, and A. Sasarman. 1989. Isolation and nucleotide sequence of the *hemA* gene of *Escherichia coli* K-12. *Mol. Gen. Genet.* 216, 347-352.
8. Grimm, B. 1990. Primary structure of a key enzyme in plant tetrapyrrole synthesis : glutamate 1-semialdehyde aminotransferase.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87, 4169-4173.
9. Grimm, B., A. Bull, and V. Btreu. 1991. Structural genes of glutamate 1-semialdehyde aminotransferase for porphyrin synthesis in cyanobacterium and *Escherichia coli*. *Mol. Gen. Genet.* 225, 1-10.
10. Hansson, M., L. Rutberg, I. Schroder, and L. Hederstedt. 1991. The *Bacillus subtilis hemAXCDBL* gene cluster, which encodes enzymes of the biosynthetic pathway from glutamate to uroporphyrinogen III. *J. Bacteriol.* 173, 2590-2599.
11. Hotta, Y. and K. Watanabe. 1999. Plant growth-regulating activities of 5-aminolevulinic acid. *Syokobutu-no-Kagaku-Tyou-seti* (Chemical regulation of plants). 34, 85-96.
12. Houghton, J.D., L. Turner, and S.B. Brown. 1988. The effect of gabaculine on tetrapyrrole biosynthesis and heterotrophic growth in *Cyanidium caldarium*. *Biochem. J.* 254, 907-910.
13. Kaneko, S., T. Aoki, H. Nanato, N. Miyoshi, S. Houki, and Y. Fukuda. 1998. Intraoperative photodynamic diagnosis of human glioma using 5-ALA induced protoporphyrin IX. *Iwamizawa-siritu Sougou Byouin-shi.* 24, 71-79.
14. Kennedy, J.C., R.H. Pottier, and D.C. Pross. 1990. Photodynamic therapy with endogenous protoporphyrin IX : basic principles and present clinical experience. *J. Photochem. Photobiol.* 6, 143-148.
15. Kim, H.S., G.G. Choi, M.N. Moon, Y.K. Yang, and Y.H. Rhee. 2002. Biosynthesis of polyhydroxyalkanoates and 5-aminolevulinic acid by *Rhodopseudomonas* sp. KCTC 1437. *Kor. J. Microbiol.* 38, 144-151.
16. Kuramochi, H., M. Konnai, T. Tanaka, and Y. Hotta. 1997. Method for improving plant salt tolerance. US patent 5-661-111.
17. Li, J.M., H. Umanoff, R. Proenca, and S.D. Russel. 1988. Cloning of the *Escherichia coli* K-12 *hemB* gene. *J. Bacteriol.* 170, 1021-1025.
18. Li, J.M., C.S. Russel, and D. Cosloy. 1989. Cloning and structure of the *hemA* gene of *Escherichia coli* K-12. *Gene* 82, 209-217.
19. MaClung, R., J.E. Somervill, M.L. Guerinot, and B.K. Chelm. 1987. Structure of *Bradyrhizobium japonicum* gene *hemA* encoding 5-aminolevulinic acid synthase. *Gene* 54, 133-139.
20. Mariet, J., V.D. Werf, and J.G. Zeikus. 1996. 5-Aminolevulinic acid production by *Escherichia coli* containing the *Rhodobacter sphaeroides hemA* gene. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 3560-3566.
21. May, B.K., I.A. Brothwick, G. Srivastava, A. Pirola, and W.H. Elliott. 1986. Control of 5-aminolevulinic acid synthase in animals. *Curr. Top. Cell Regul.* 28, 233-261.
22. Murakami, K., Y. Hashimoto, and Y. Murooka. 1993. Cloning and characterization of the gene encoding glutamate 1-semialdehyde 2,1-aminomutase, which is involved in δ-aminolevulinic acid synthesis in *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 347-350.
23. Murakami, K., S. Korbsrisate, N. Asahara, Y. Hashimoto, and Y. Murooka. 1993. Cloning and characterization of the glutamate 1-semialdehyde 2,1-aminomutase gene from *Xanthomonas campestris pv. phaseoli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 38, 502-506.
24. Neidle, E.L. and S. Kaplan. 1993. Expression of *Rhodobacter sphaeroides hemA* and *hemT* genes, encoding two 5-aminolevulinic acid synthetase isozymes. *J. Bacteriol.* 175, 2292-2303.
25. Nishikawa, S. and Y. Murooka. 2001. 5-Aminolevulinic acid : Production by fermentation, and agricultural and biomedical applications. *Biotech. Genet. Eng. Rev.* 18, 149-170.
26. Petricek, M., L. Rutberg, I. Schroder, and L. Hederstedt. 1990. Cloning and characterization of the *hemA* region of the *Bacillus subtilis* chromosome. *J. Bacteriol.* 172, 2250-2258.
27. Rebeiz, C.A., A. Montazer-Zouhoor, H.J. Hopen, and S.M. Wu. 1984. Photodynamic herbicide. I. Concept and phenomology. *Enzyme Microbial Technol.* 6, 390-401.
28. Rebeiz, C.A., J.A. Juvik, and C.C. Rebeiz. 1988. Photodynamic insecticide. I. Concept and Phenomology. *Pesticide Biochem. Physiol.* 30, 11-27.
29. Sasaki, K., S. Ikeda, Y. Nishizawa, and M. Hayashi. 1987. Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Ferment. Technol.* 65, 511-515.
30. Sasaki, K., N. Noparatnaraporn, Y. Nishizawa, M. Hayashi, and S. Nagai. 1988. Production of herbicide, 5-aminolevulinic acid by a photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides*. *Annual Reports of International Center of Cooperative Research in Biotechnology (Osaka University, Japan)* 11, 375-378.
31. Sasaki, K., S. Ikeda, T. Konishi, Y. Nishizawa, and M. Hayashi. 1989. Influence of iron on the excretion of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacterium, *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Ferment. Bioeng.* 68, 378-381.
32. 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 digestor. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 32, 727-731.
33. 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 photoheterotrophic culture of *Rhodobacter sphaeroides*. *J. Ferment. Bioengineer.* 71, 403-406.
34. Sasaki, K., T. Tanaka, N. Nishio, and S. Nagai. 1993. Effect of culture pH on the extracellular production of 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* from volatile fatty acids. *Biotechnol. Lett.* 15, 859-864.
35. Sasaki, K., T. Tanaka, and S. Nagai. 1998. Use of photosynthetic bacteria for the production of SCP and chemicals from organic waste. *In* A.M. Martin (ed.), Bioconversion of waste materials to industrial products, second edition. Blackie Academic and Professional. pp. 247-291.
36. 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.
37. Sasikala, C., C.V. Ramana, and R. Rao. 1994. 5-aminolevulinic acid : A potential herbicide/insecticide from microorganisms. *Biotechnol. Prog.* 10, 451-459.
38. Sato, K., K. Ishida, M. Shirai, and S. Shimizu. 1985. Occurrence and some properties of two types δ-aminolevulinic acid synthase in a facultative methylotroph, *Protaminobacter ruber*. *Agricul. Biol. Chem.* 49, 3423-3428.
39. Schneegurt, M.A. and S.I. Beale. 1988. Characterization of the RNA required for biosynthesis of δ-aminolevulinic acid from glutamate. Purification by anticodon-based affinity chromatography and determination that the UCC glutamate anticodon is general requirement for function in ALA biosynthesis. *Plant Physiol.* 86, 497-504.
40. Stanley, J., D.N. Dowling, and W.J. Broughton. 1988. Cloning of *hemA* from *Rhizobium* sp. NGR234 and a symbiotic phenotype of a gene-directed mutant in diverse legume genera. *Mol. Gen. Genet.* 215, 32-37.
41. Tai, T.N., M.D. Moore, and S. Kaplan. 1988. Cloning and characterization of the 5-aminolevulinic acid synthetase gene(s) from *Rhodobacter sphaeroides*. *Gene* 70, 139-151.
42. Takeya, H., T. Tanaka, T. Hotta, and K. Sasaki. 1997. Production

methods and applications of 5-aminolevulinic acid. *Porphyrins* 6, 127-135.
43. Urban-Grimal, D., V. Ribes, and R. Labbe-Bois. 1984. Cloning by genetic complementation and restriction mapping of a yeast *HEM1* gene coding for 5-aminolevulinate synthase. *Curr. Genet.* 8, 327-331.
44. Verkamp, E. and B.A. Chelm. 1989. Isolation, nucleotide sequence, and preliminary characterization of the *Escherichia coli* K-12 *hemA* gene. *J. Bacteriol.* 171, 4728-4735.
45. Volland, C. and F. Felix. 1984. Isolation and properties of 5-aminolevulinic acid synthetase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 142, 551-557.
46. Weinstein, J.D. and S.I. Beale. 1985. Enzymatic conversion of glutamate to δ-aminolevulinate in soluble extracts of the unicellular green algae, *Chlorella vulgaris*. *Archiv. Biochem. Biophy.* 237, 454-464.
47. Weinstein, J.D. and S.I. Beale. 1985. RNA is required for enzymatic conversion of glutamate to δ-aminolevulinate by extracts of *Chlorella vulgaris*. *Archiv. Biochem. Biophy.* 239, 87-93.

(Received November 24, 2007/Accepted December 14, 2007)

ABSTRACT: Production of 5-Aminolevulinic Acid (ALA) by *Bacillus cereus* 1-1
Kyung-Joon Ahn (Department of Science Education, Seowon University, Cheongju 361-742, Korea)

Bacillus cereus 1-1 strain produced 2 mM of ALA in the aerobic dark condition without any inhibitor like levulinic acid. The optimum culture conditions for the ALA production were that preculture and main culture were continued for 18 hr in TCY medium, and 16 mM of organic acids like acetic acid were added at the late log phase when the pH was 6.8. And the addition of 0.3% glucose was effective at the beginning of the main culture. ALA production was continued for more than 8 hr by the addition of glutamic acid instead of acetic acid, and was inhibited by addition of 40 μM gabaculine seriously. These results confirmed that *B. cereus* 1-1 strain produced ALA through C-5 pathway.