

최 종
연구보고서

미생물의 형질전환에 의한 수산가공공장
배출수의 효과적인 이용

The Efficient Utilization of Waste Water from
Fishery Processing Plants with Genetically
Modified Microorganism

고 려 대 학 교

해 양 수 산 부

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물의 형질전환에 의한 수산가공공장 배출수의 효과적인 이용”과제의 최종보고서로 제출합니다.

2000년 12월 20일

주관연구기관명 : 고려대학교

총괄연구책임자 : 성 하 진

연 구 원 : 김 재 호

연 구 원 : 김 형 락

연 구 원 : 홍 범 식

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 이 흥 식

협동연구기관명 : 여수대학교

협동연구책임자 : 오 명 주

요 약 문

I. 제 목

미생물 형질전환에 의한 수산가공공장 배출수의 효과적 이용

II. 연구개발의 목적 및 중요성

최근 식생활의 고급화와 더불어 어류의 국내 소비가 늘고 선호되는 대상종도 다양화됨에 따라 어류양식산업이 급속도로 증가하고 있으며, 이에 호응하여 인공종묘 생산기술 확립과 더불어 고밀도 양식을 가능하게 하는 여과시스템의 연구, 개발 등으로 양식기술의 선진화에 다가가고 있다. 그러나 수요에 따른 공급 충족을 위한 양식어종의 다양화, 과밀양식, 저단가를 위한 사료의 저급화 및 수계환경 악화 등의 원인으로 양식생물의 질병은 계속적으로 그 종류가 다양해지고 피해범위가 확산되며, 양식장 단위별 어류질병에 의한 피해액의 규모도 날로 증가되어 어병에 대한 대책이 중요한 과제로 대두되고 있다. 그 중에서도 넙치의 스쿠우치카 감염증은 원충류의 섬모충문 (siliophora)내의 소막강 (oligophymenophora)에 부착, 기생하는 스쿠우치카 섬모충 (*scuticociliatida*)이 양식넙치의 종묘로부터 성어에 이르기까지 전 성장단계에 걸쳐 어체 표면 및 체내장기에까지 침입하여 기생하므로 넙치의 폐사를 유발하는 질병으로, 국내의 넙치 양식장에 있어 1990년 대에 들어와 가장 심각하게 문제시되어지는 기생충성 질병이다. 따라서, 어체내 뿐만 아니라 수중환경 수계에서 서식 및 증식되는 스쿠우치카충의 구제를 위한 목적을 달성하고, 환경계에 미치는 영향을 최소화할 수 있는 구제법의 개발을 위하여, 새로운 환경친화성 예방 및 치료 약재의 검색 및 개발이 요구되고있다.

우리나라의 수산물 이용 현황을 보면 94년도 총 어획량은 350 만톤으로 이중 선어유통이 65 만톤인 반면에 282 만톤이 가공원료로 이용되었다. 어종에 따라 다소 차이는 있으나 가공원료 중 40-60% 가량이 가공부산물이며, 이러한 수산 가공 부산물중 고품질 부산물은 주로 국내의 어분가공공장에서 단미사료로 가공되어 가축 또는 양어용 사료로 이용되고 있다. 그러나 다량의 유기물을 함유하고 있는 수용성의 가공 배출수는 활성오니 등의 폐수처리 공정에 의해 처리되나 고농도의 유기물과 염류 때문에 이들의 효과적인 처리가 미진한 상태이다. 따라서 연안에 위치한 대부분의 수산가공공장에서는 가공 배출수를 다량의 해수로 희석하여 유기물의 농도를 저하시킨 후에 직접 바다 또는 하구에 배출하고 있다. 이러한 가공공장의 비합법적인 배출수 처리로 해양오염은 물론 특정해역에서의 부영양화를 초래하여 연안의 적조현상 등의 생태계 변화 유발 원인이 되고 있다. 이에 대한 보다 능동적인 해결 방법으로 배출수를 미생물의 배지원으로 이용하여 유용한 균주를 배양하여 보다 부가가치가 높은 미생물 대사산물을 생산함으로써 수질 및 해양환경에 대한 오염문제를 적극적으로 대처해 나갈 수 있다.

III. 연구개발 내용 및 범위

본 연구에서는 유용 신소재를 과량으로 생산하는 미생물을 유전공학적 방법을 이용하여 개발을 하고, 폐자원을 개발된 미생물의 배지로 하여 신소재의 최적 생산 조건을 확립하며 마지막으로 이 신소재를 활용하여 스쿠치카층의 예방 및 치료 효과에 대한 검증을 통하여 최종적으로 사업화를 위한 경제성 평가를 그 목표로 하였다. 이를 위하여 본 연구에서는 먼저 ALAS, ALAD metB 및 rrnB 유전자들의 cloning을 통하여 *E. coli*, *Corynebacterium* 및 광합성 균주에서의 ALA, methionine등 유용 소재의 과 발현 균주의 개발하는데 있다. 개발된 형질 전환 미생물의 LB에서의 최적 발현을 위한 발효 조건을 확립하여 추후 폐자원

을 이용한 생산 가능성을 평가하였다. 또한 수산가공장 폐수의 성분분석을 통하여 이의 유용소재의 생산을 위한 배지로서의 활용 가능성의 분석, 유용 소재의 최적 생산조건을 확립하였다. 이와 함께 개발된 광합성 균체의 사료첨가제로의 부수적 효과의 확인을 위하여 균체의 분리, 치어의 초기사료에 배양된 광합성 세균을 첨가를 통한 사육효과를 검정을 실시하였다

이를 바탕으로 수산 가공 공장 폐자원을 활용한 유용 소재의 최적 생산조건을 확립하였다. 이를 위하여 형질 전환 미생물을 이용하여 수산 가공 폐수의 활용시 배지조성 조건, 최적 발효조건 확립 및 생산성의 향상을 위한 조건을 개발하여 산업화 가능성을 평가하였다. ALA의 생산을 위하여는 levulinic acid (ALAD inhibitor)의 첨가를 통하여 생산량의 향상이 이루어졌는데 이의 첨가로 인하여 균의 생육이 저해로 인한 경제적 생산의 한계를 극복하기 위하여 본 연구를 통하여 개발된 형질전환 미생물의 이용시 이의 첨가 효과를 검토하였다.

본 과제의 궁극적인 목표는 고 부가가치 신소재의 개발로 양식어장에서 특별한 구제 방법이 없는 스쿠치카의 치료 및 예방제의 개발에 일차 목표를 두었다. 스쿠치카 감염증에 대한 예방 및 치료제로의 활용을 위하여 *in vitro*상에서의 기생충 감염 단계인 테론트 및 생체내에서 방출 단계의 충체인 프로토몬트를 대상으로 불활성화 효과를 검정, 조직학적으로 체내의 충체 감염에 따른 병리학적 변화 유무를 확인, 어체의 방출 기생체의 이차적 불활성화 효과 확인, 어체독성 검사, *in vivo* test 효과 검증 및 최종적으로 field test를 통한 효과 확인을 실시하였다. 본 연구를 통하여 생산된 ALA의 스쿠치카의 치료 및 예방에 탁월한 효과가 있는 것으로 밝혀졌으므로 이의 사업화 가능에 대하여 평가를 하였다

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

본 과제의 최종 목표는 수산공장 가공 폐수를 활용하여 고 부가가치 신소재의

개발 및 이의 산업화에 있다. 그러므로 본 과제 of 진행 중 연구의 방향은 산업적 활용에 초점을 맞추어서 진행을 하였다. 이런 관점에서 신소재의 생산성, 경제적 가치 및 시장성등을 고려하여 이에 부합하는 개발 소재를 선별하여 최종 제품화를 위한 연구에 주력을 하였다. 본 과제 of 기대 이상의 연구성파로 최종 제품화에 성공을 하여 현재 시판에 들어갔다. 연구 결과를 요약하면 본 과제 of 중점 개발 목표인 ALA는 대장균의 형질전환에 의하여 수산가공 폐자원으로부터 약 3.8g/liter/12hour 이상의 생산성으로 생산에 성공하였다. 이는 기존의 변이 광합성 균에 의하여 생산되는 1.5g/liter/72hour에 비하여 약 15배 이상의 생산성을 보였으며 본 과제에서 시도된 형질전환 광합성 균주에 의하여 생산량에 비하여도 (3g/liter/72 hour) 약 6배 이상의 높은 생산성을 가졌다. 또한 광합성 균주 발효시 levulinic acid의 첨가, 광 조건의 유지등 산업적 생산시 공정상의 문제점도 해결 할 수 있었다.

본 연구의 핵심은 형질전환에 의하여 양산에 성공한 소재의 산업화를 통한 현장에서의 활용에 있다. 이를 위하여 실험실내에서의 한정된 실험조건을 벗어나서 광범위한 field test를 실시하여 생산된 발효 신소재(ALA)가 양식어장의 고질적인 질병 스쿠치카 감염증에 대하여 탁월한 예방 및 치료 효과가 있음을 증명하였다. 현재 이외에 다양한 효과에 대한 연구를 계속 진행하고 있다. 본 연구 결과를 바탕으로 현재 약 100 liter/12hour 규모로 실험실 공장으로부터 생산이 되고 있다. 본 연구의 결과를 소비자 가격으로의 공급을 위하여는 scale-up을 통한 양산 체제의 구축이 필요하며 수산 약제로의 인허가를 위한 부수적인 연구가 필요하므로 이에 대한 지원이 요구되고있다.

S U M M A R Y

The aquaculture and its related industries expand rapidly with growing demand of consumer in Korea. To meet with this demand, techniques in this area, such as artificial hatching and water filtration system for high density aquaculture culture, have been developed rapidly. At the same time, however, the loss of aqua-farms have been increased because of year round diseases attack caused by environmental contamination. Since early 1990's *Scuticocilatida* is one of the major pathogenic parasite which cause serious damage to flounder of aqua-farm in Korea. Therefore, the development of the new biological weapon, which is environmentally favorable as well as can control this parasite effective, are required urgently to reduce the increasing loss of aqua-farm.

At the same time, the source of sea pollution should be reduced to improve the aquatic environment, which is essential for disease free aquaculture. In Korea, about 3 million M/T of fishery products were processed in 1994. However, most of waste water from processing plants are dumped out to the nearby sea without proper purification process. The high organic contents of this dumped wastes water definitely destroy the ecological system around the aqua-farms, which might be closely related to the increasing disease problem of aquaculture. Therefore, the researches for the effective utilization of waste water, especially from fishery processing plants, are required to reduce the diseases caused by environmental contamination. In these respects, it

might be the best solution against these problems if we can developed the microbiological system which can utilize the waste water as culture media while producing valuable biological compounds at the same time.

In this research, we developed microorganism using genetic technology to meet with this demand. Extracellular accumulation of 5-aminolevulinic acid (ALA) by an *E. coli* overexpressing ALA synthase (ALAS) was achieved by inserting a *hemA* gene from *Bradyrhizobium japonicum*. With proper fermentation condition, ALA could reached up to about 4.0g/L in a jar fermenter without an addition of levulinic acid to the cultures. The productivity is about 15 times higher, comparing with the phothosynthetic bacterium, which is usually used for the production of ALA. Also, we found that ALA could be applied as a effective protective as well as therapeutic agent against *Scuticocilatida* in the aqua-farm.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	1
Chapter 2. Utilization of waste water from fishery processing plants	8
Chapter 3. Genetic manipulation of microorganism for the expression of bio-active compounds	29
Chapter 4. Optimization for the production of bio-active compounds	76
Chapter 5. Application of new bio-active compounds in the aqua-farm	109

목 차

제 1 장 서 론	1
제 1 절 연구개발의 목적과 범위	1
제 2 절 연구내용 요약	3
1. 형질전환 미생물의 개발	3
2. 형질전환 미생물을 이용한 수산가공 폐수로부터 유용소재의 생산 ..	3
가. 생산량 및 생산성의 향상	3
나. Levulinic acid의 첨가	3
다. 광합성균주를 이용한 발효조건의 확립	3
라. Methionine 생산을 위한 유전자원확보 및 수산가공 폐수를 이용한 생산	4
3. 개발 소재의 스키투치카 감염증 예방 및 치료제로의 현장 활용	4
가. 스키투치카 감염증 예방제로의 응용	4
나. 스키투치카 감염증 치료제로의 응용	5
다. 광합성균체의 사료 첨가제로서의 효과	5
4. 개발된 소재의 경제적 생산을 통한 산업화 평가	5
제 3 절 연구결과 요약	6
제 2 장 수산폐자원의 활용	8
제 1 절 수산가공공장의 폐수	9
1. 어분제조시 증자액의 이용	9
2. 어분증자액 처리과정중 일반성분의 변화	12
가. 수분 함량	12
나. 조단백질 함량	12

다. 조지방 함량	12
라. 회분함량	15
3. 어분증자액과 오징어 증자액의 년중 일반성분	15
제 2 절 오징어 증자액의 성분분석	21
1. 일반성분분석	21
제 3 절 폐수의 미생물 배양조건 확립	25
1. 오징어증자액에 대한 배양조건	25
2. pH에 따른 배양조건	25
제 3 장 신소재 생산을 위한 유전자원의 확보 및 발현 system 구축	29
제 1 절 유전자원 cloning 및 분석	29
1. <i>Bradyrhizobium japonicum</i> 으로부터 hemA 유전자의 cloning 및 sequencing	29
2. ALAD 유전자 분리 및 sequencing을 통한 분석	32
3. <i>rrnB</i> promoter의 cloning 및 염기서열 분석	32
4. <i>Corynebacterium glutamicum metB</i> 유전자의 분리 및	36
제 2 절 발현 system 구축 및 발현	47
1. <i>E. coli</i> 발현 vector의 구축 및 발현	47
2. ALAD 변이주 선별과 ALAS의 <i>E. coli</i> chromosome integration 을 통한 발현	50
3. 발효조건의 변화에 따른 ALA 생산량 확인	52
가. Glycine과 Succinic acid의 첨가 효과	54
나. Levulinic acid 첨가 효과	58
다. Jar Fermentor를 이용한 ALA 생산 조건의 검토, pH에 의한	62
라. Mineral, 금속이온 및 cofactor 효과 등 분석	62

마. pH의 변화에 따른 생산성 분석	64
바. <i>hemA</i> gene을 cloning한 pET23a의 transformant에 plasmid stability	64
4. <i>R. sphaeroides</i> 의 발현	67
제 4 장 균주의 안정성 및 폐자원으로부터 최적 생산조건의 결정	76
제 1 절 Plasmid vector 및 용액에서 ALA의 안정성 검토	76
제 2 절 발효조건에 따른 폐자원을 이용한 균주의 최적 증식조건 결정	81
1. 오징어 내장 폐수농도에 따른 균의 증식	81
2. Minimal salt media에서 배양한 균의 증식	82
3. Sluge 유무에 따른 균의 증식	84
4. 지질층 유무에 따른 균의 증식	87
5. Molasses 첨가에 따른 균의 증식	87
제 3 절 폐자원을 이용한 최적 ALA 생산조건 결정	89
1. Glycine의 첨가 농도에 따른 효과	89
2. Succinic acid의 첨가 농도에 따른 효과	92
3. Glycine과 Succinic acid 첨가 농도에 따른 효과	96
4. Levulinic acid의 첨가 효과	98
제 4 절 폐자원을 이용한 Jar Fermentor에서의 ALA 생산	103
1. pH 변화에 따른 ALA 생산	103
제 5 장 신소재의 양식어장에서의 활용	109
제 1 절 ALA에 의한 어체 독성 확인	109
1. ALA의 어류주화세포 및 초대배양어류세포에의 독성	109

2. ALA (δ -Aminolevulinic acid)의 어류주화세포에 대한 독성	112
3. ALA의 어류에의 독성 (넙치, 참돔, 조피볼락 치어에의 독성)	114
제 2 절 광합성세균의 분리 및 치어의 사료에 배양된 광합성세균의 첨가에 의한 사육효과를 검정	116
1. 연속원심분리에 의한 균체의 분리	116
2. 한외여과에 의한 균체의 분리	119
3. 광합성세균의 첨가에 의한 사육효과를 검정	119
제 3 절 In vitro상에서의 어류 병원체 불활성화	124
1. 스킨카충의 분류학적 고찰	124
2. 광조건에 따른 스킨카충의 배양 특성	125
3. 어류병원 기생충류인 스킨카충에 대한 효과 (<i>in vitro</i>)	127
4. 스킨카충의 어체 인위감염에 대한 예방 및 치료효과 (<i>in vivo</i>)	130
가. 스킨카충의 어체 인위감염에 대한 예방효과	130
나. 실험사육수조내 스킨카 인위감염어에 대한 치료효과	132
제 4 절 현장 적용 및 치료에	134
제 5 절 사업화 검토	137
1. 사업화 핵심 기술 분야	137
2. 국내외 기술 개발 현황 및 사업화 필요성	138
3. 경쟁사와의 기술적 비교	140
4. 국내외 시장 규모 및 전망	141
5. 국내 양식어장 (수요처) 현황 사업화 경제성 평가	143
참 고 문 헌	144

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

최근 식생활의 고급화와 더불어 어류의 국내 소비가 늘고 선호되는 대상종도 다양화됨에 따라 어류양식산업이 급속도로 증가하고 있으며, 이에 호응하여 인공종묘 생산기술 확립과 더불어 고밀도 양식을 가능하게 하는 여과시스템의 연구, 개발 등으로 양식기술의 선진화에 다가가고 있다. 그러나 수요에 따른 공급 충족을 위한 양식어종의 다양화, 과밀양식, 저단가를 위한 사료의 저급화 및 수계환경 악화 등의 원인으로 양식생물의 질병은 계속적으로 그 종류가 다양해지고 피해범위가 확산되며 양식장 단위별 어류질병에 의한 피해액의 규모도 날로 증가되어 어병에 대한 대책이 중요한 과제로 대두되고 있다. 그 중에서도 넙치의 스쿠우치카 감염증은 원충류의 섬모충문(siliophora)내의 소막강 (oligophymenophora)에 부착, 기생하는 스쿠우치카 섬모충(scuticociliatida)이 양식넙치의 종묘로부터 성어에 이르기까지 전 성장단계에 걸쳐 어체 표면 및 체내장기에까지 침입, 기생하여 넙치의 폐사를 유발하는 질병으로 국내의 넙치 양식장에 있어 1990년 대에 들어와 가장 심각하게 문제시되어지는 기생충성 질병이다. 따라서 어체내 뿐만 아니라 수중환경 수계에서 서식 및 증식되는 스쿠치카충의 구제를 위한 목적을 달성하고 환경친화성 예방 및 치료 약제의 검색 및 개발이 요구되고있다.

우리나라의 수산물 이용 현황을 보면 94년도 총 어획량은 350 만톤으로 이중 선어유통이 65 만톤인 반면에 282 만톤이 가공원료로 이용되었다. 어종에 따라 다소 차이는 있으나 가공원료 중 40-60% 가량이 가공부산물이며 이러한 수산 가공 부산물 중 고형 부산물은 주로 국내의 어분가공공장에서 단미사료로 가공되어 가축 또는 양어용 사료로 이용되고 있다. 그러나 다량의 유기물을 함유하고

있는 수용성의 가공 배출수는 활성오니 등의 폐수처리 공정에 의해 처리되나 고농도의 유기물과 염류 때문에 이들의 효과적인 처리가 미진한 상태이다. 따라서 연안에 위치한 대부분의 수산가공공장에서는 가공 배출수를 다량의 해수로 희석하여 유기물의 농도를 저하시킨 후에 직접 바다 또는 하구에 배출하고 있다. 이러한 가공공장의 비합법적인 배출수 처리로 해양오염은 물론 특정해역에서의 부영양화를 초래하여 연안의 적조현상 등의 생태계 변화 유발 원인이 되고 있다. 이에 대한 보다 능동적인 해결 방법으로 배출수를 미생물의 배지원으로 이용하여 유용한 균주를 배양하여 보다 부가가치가 높은 미생물 대사산물을 생산함으로써 수질 및 해양환경에 대한 오염문제를 적극적으로 대처해 나갈 수 있다.

따라서 본 연구에서는 유용 신소재를 과량으로 생산하는 미생물을 유전공학적 방법을 이용하여 개발을 하고 폐자원을 개발된 미생물의 배지로 하여 신소재의 최적 생산조건을 확립하며 최종적으로 이 신소재를 활용하여 스쿠치카층의 예방 및 치료 효과에 대한 검증을 통하여 사업화를 위한 경제성 평가를 그 목표로 한다.

본 연구의 세부 연구 개발 목표 및 범위

- ALAS, ALAD *metB* 및 *rrnB* 유전자 등의 cloning을 통하여 이의 *E. coli*, *Corynebacterium* 및 광합성균주에서의 ALA, methionine 등 유용 소재의 과 발현 균주의 개발
- 수산가공장 폐수의 성분분석을 통하여 이의 유용소재의 생산을 위한 배지로서의 활용 가능성의 분석, 광합성세균 균체의 분리 및 이의 이용 효과의 분석
- 폐자원의 pH, aeration 및 첨가물의 보강을 통한 유용 소재의 최적 생산조건 확립과 LA 등의 첨가를 지양하여 산업적 생산을 가능
- 생산된 ALA의 스쿠치카의 예방 및 치료 효과 분석

제 2 절 연구내용 요약

1. 형질전환 미생물의 개발

본 연구에서 미생물의 형질전환을 위하여 ALAS, ALAD, *rrnB* promoter, *metB*, *C* 유전자 등의 다양한 유전 자원의 확보 및 분석을 통하여 이의 최적 발현을 위한 발현 system 및 host의 개발을 하였다. 개발된 형질전환 미생물의 LB에서의 최적 발현을 위한 발효조건을 확립하기 위하여 pH, aeration, mineral의 첨가 및 기타 기질의 보강등을 통하여 경제적 생산 가능성을 평가하였다.

2. 형질전환 미생물을 이용한 수산가공 폐수로부터 유용소재의 생산

가. 생산량 및 생산성의 향상

형질전환 미생물을 이용하여 수산 가공폐수의 활용시 배지조성 조건, 최적 발효조건을 확립 및 생산성의 향상을 조사하여 산업화 가능성을 평가하였다. 또한 수산 가공 폐자원을 활용 할 경우 기질내 succinate, glycine 등 ALA 생합성 전구체의 최적 첨가량을 결정하였다.

나. Levulinic acid의 첨가

ALA의 생산을 위한 levulinic acid (ALAD inhibitor)의 첨가를 통하여 생산량의 향상이 이루어졌는데 그 가격이 높으며 이의 첨가로 인하여 균의 생육이 저해되므로 결과적으로 생산성이 저해되었다.

본 연구를 통하여 개발된 형질전환 미생물의 이용시 이의 첨가 효과를 검토하였다.

다. 광합성균주를 이용한 발효조건을 확립

*Rhodobacter*에서의 ALAS의 발현을 위하여 *rrnB* promoter를 이용하여

vector system을 개발하였다. 광합성균주의 수산가공 폐수에서 생육 조건, ALA의 암 조건 아래서 생산 및 균체의 사료화 가능성을 조사하였다.

라. Methionine 생산을 위한 유전자원 확보 및 수산가공 폐수를 이용한 생산

본 과제를 통하여 methionine 유전자들의 확보를 하여 이의 발현 vector system을 구축 *Corynebacterium* system에서 성공적으로 발현을 하였다. 또한 수산가공 폐수를 이용하여 methionin의 생산 가능성, 이의 화학적 합성법에 의한 생산성과 비교 검토와 추후 추가개발을 위한 유전자 자원으로 활용 가능성을 판단하였다.

3. 개발 소재의 스쿠치카 감염증 예방 및 치료제로의 현장 활용

본 연구를 통하여 개발된 ALA의 스쿠치카 감염증에 대한 예방 및 치료제로의 활용을 위하여 *in vitro*상에서의 기생충 감염 단계인 테론트 및 생체내에서 방출 단계의 충체인 프로토몬트를 대상으로 불활성화 효과를 검증, 조직학적으로 체내의 충체 감염에 따른 병리학적 변화 유무를 확인, 어체의 방출 기생체의 이차적 불활성화 효과 확인, 어체독성 검사, *in vivo* test 효과 검증 및 최종적으로 field test를 통한 효과 확인을 실시하였다.

가. 스쿠치카 감염증 예방제로의 응용

20미의 25g전후의 넙치를 실험구 2구 및 대조구 1구로하여 순환여과 시스템에서 사육하면서 실험 1구는 수조 사육수 중에 실험개시 매 3일에 1회 10ppm의 농도로 ALA를 처리하여 3주간 사육하고, 실험 2구는 인공배합사료(EP, 어체중 3%: 15g)에 10mM의 ALA용액을 1ml 씩 분무 후 (1.67mg/day) 건조시켜 투여하면서 3주간 사육하였다. 이 기간 동안 실험 2구를 제외한 실험 1구 및 무처

리구는 실험 2구의 사료량과 동일한 양으로 시판인공배합사료를 ALA 처리 없이 그대로 사용하여 사육하였다. 인위감염은 FHM 세포상에서 순수 배양되어진 증체를 이용하여 인위적인 감염실험을 행하였다. 증체의 인위감염은 투여 실험 사육 3주 후에 시행하였고, 인위공격 방법은 배양중액 (1,000개체/ml)에 직접 침지하여 폭기 상태에서 30분간 노출하는 방법으로 행했다. 인위 감염시킨 후, 각각의 실험구별 실험어는 관찰용 수조로 옮겨 2주간 그 감염 및 감염에 따른 폐사를 관찰하였다.

나. 스쿠치카 감염증 치료제로의 응용

넙치 치어 평균체중 2g을 각 실험구 30미씩 플라스틱 사육수조에 수용, 1주일간 예비사육을 행하여 안정화 시켰다. 스쿠치카 기생충 *Scuticocilicida*을 감염병원체로서 사용, 인위감염방법은 침지법으로 행하였다. 감염병원체의 감염량은 세균은 10^4 CFU/ml, 스쿠치카충은 1,000cell/ml이 되게 하여 각각을 1시간동안 침지하여 감염시키고 침지시간 종료 후, 사육조로 옮겨서 3일간 감염기간을 준 후, 감염 4일 후 되는 날에 ALA를 사육수조수량에 20ppm되게 처리하여 환수 없이 1일간 에어레이션 조건으로 사육 후, 깨끗한 물로 환수하여 2주일간 사육하면서 감염에 따른 어체의 폐사를 확인하였다.

다. 광합성균체의 사료 첨가제로서의 효과

개발된 광합성 균체의 사료첨가제로서의 효과를 확인하기 위하여 폐자원을 이용한 최적 발효조건의 확립, 한외여과, 연속원심분리에 의한 균체의 분리, 치어의 초기사료에 배양된 광합성세균을 첨가하여 사육효과를 검정을 실시하였다

4. 개발된 소재의 경제적 생산을 통한 산업화 평가

본 연구의 핵심은 수산가공 폐자원을 이용하여 생산된 신소재, 특히 ALA의

현장에서의 활용 가능성 확인 및 이의 산업화에 있다. 본 연구를 통하여 생산된 ALA의 스킨케어의 치료 및 예방에 탁월한 효과가 있는 것으로 밝혀졌으므로 이의 사업화 가능성에 대하여 평가를 하였다

제 3 절 연구결과 요약

본 과제의 최종 목표는 수산공장 가공폐수를 활용하여 고 부가가치 신소재의 개발 및 이의 산업화에 있다. 그러므로 본 과제의 진행 중 연구의 방향은 산업적 활용에 초점을 맞추어서 진행을 하였다. 이런 관점에서 신소재의 생산성, 경제적 가치 및 시장성 등을 고려하여 이에 부합하는 개발소재를 선별하여 최종 제품화를 위한 연구에 주력을 하였다. 본 과제의 기대 이상의 연구성과는 최종 제품화에 성공을 하여 현재 시판에 들어갔다.

그 연구 결과를 요약하면 아래와 같다.

- 본 과제의 중점 개발 목표인 ALA는 대장균의 형질전환에 의하여 수산가공 폐자원으로부터 약 3.8g/liter/12hour 이상의 생산성으로 생산에 성공하였다. 이는 기존의 변이 광합성균주에 의하여 생산되는 1.5g/liter/72hour에 비하여 약 15배 이상의 생산성을 보였으며 본 과제에서 시도된 형질전환 광합성균주에 의한 생산량에 비해서 (3g/liter/72 hour) 약 6배 이상의 높은 생산성을 가졌다. 또한 광합성균주 발효시 levulinic acid의 첨가, 광 조건의 유지 등 산업적 생산시 공정상의 문제점도 해결 할 수 있었다.
- 현재 화학적 합성법에 의하여 생산이 되고 있는 methionine을 수산가공 폐수를 이용한 산업적 생산을 위하여 형질전환된 *Corynebacterium*를 이용한 발효가 시도되었다. 이를 위하여 *metB* 및 *metC* 유전자의 cloning 및 이의 발현 vector의 개발 등을 통하여 형질전환된 *Corynebacterium*을 개

발하였다. 본 연구를 통하여 확보된 유전자원과 발현 system의 추후 개선을 통하여 산업적 생산이 가능하게 할 수 있는 가능성을 제시하였다.

- 본 연구의 핵심은 형질전환에 의하여 양산에 성공한 소재의 산업화를 통한 현장에서의 활용에 있다. 이를 위하여 실험실내에서의 한정된 실험조건을 벗어나서 광범위한 field test를 실시하여 생산된 발효 신소재(ALA)가 양식어장의 고질적인 질병 스쿠치카 감염증에 대하여 탁월한 예방 및 치료 효과가 있음을 증명하였다. 현재 이외에 다양한 효과에 대한 연구를 계속 진행하고 있다. 본 연구 결과를 바탕으로 현재 약 100 liter/12hour 규모로 실험실 공장으로부터 생산이 되고 있다.

제 2 장 수산폐자원의 활용

근년 생활수준의 향상으로 식생활의 간편화, 다양화 및 고급화에 수반하여 인스턴트 가공식품의 수요가 증대하고 있으며, 그 중 통조림이나 레토르트 파우치 식품과 같은 고온 가열 처리한 식품이 가공식품의 발전을 주도하고 있다. 어육연제품과 같은 경우는 종류나 크기에 관계없이 넓은 범위의 어종을 원료로 사용할 수 있고 제품의 형상, 맛 및 식감 등이 생선과는 다르고 그대로 먹을 수 있다는 특징이 있어 해마다 그 생산량이 늘어나고 있다. 이 같은 사실은 1997년도 총어획량은 330여 만톤이고 여기에 수입 및 재고량을 합치면 총공급량은 470여 만톤이다. 이중 가공원료로 이용된 것은 총 공급량의 82%를 차지함으로써 상대적인 부산물 내지는 폐기물의 량이 증가하고 있는 실정이다. 이처럼 가공율이 높아감에 따라 수산가공공장에서 나오는 폐기물의 량이 많아져 환경문제뿐만 아니라 이의 효율적인 이용이 절실한 실정이다.

수산물 가공공장에서부터 파생되는 가공부산물은 대부분이 어분제조 공장으로 이송되어 증자, 압착, 분리 및 건조과정을 거쳐 수분함량 12-15% 정도의 어분을 생산하고 있으며, 생산된 어분은 국내의 사료회사에 판매되고 있다. 그러나 어분 제조시 압착공정 또는 증자공정 후에 파생되는 증자액은 다량의 수용성단백질, 펩타이드, 아미노산 및 유기물질이 함유되어 있으므로 폐기할 경우 환경문제와 직접적으로 연관되어 있기 때문에 이의 효율적인 처리 및 활용방안이 모색되어야 한다.

따라서 본 연구에서는 오징어내장 어분공장과 단미 사료공장에서 어분제조시에 부산물로 얻어지는 증자액을 이용하여 생물 소재의 생산을 위한 발효용 배지로서 이용하기 위한 기초연구로써 그 활용도를 평가하였다.

제 1 절 수산가공공장의 폐수

1. 어분제조시 증자액의 이용

전남 여수시 만흥동 소재 우남수산에서는 수산가공공장에서 얻어지는 부산물을 원료로 어분을 제조하는 회사로 그림 1과 같은 공정으로 어분을 만들고 있다. 그림 1에서 나타난 바와 같이 먼저 원료를 전처리 (절단, 마쇄, 분쇄 등) 한 다음 130°C의 증기로 증자한다. 이때 시간당 7 - 8톤 정도의 원료가 처리된다. 이어서 증자 처리된 원료를 screw press로 압착하며 압착에 의해 상당량의 수분과 유지분이 제거되어 유지산화에 의한 제품의 품질변화를 막고 건조공정을 용이하게 한다. 다음으로 압착 후 생성되는 압착박을 건조시켜 수분함량 12% 이하의 어분을 제조한다. 이와 같은 어분제조공정에서 문제시되는 것은 원료의 종류에 따른 증자 및 압착조건이나 건조시 표면경화 등 여러 가지가 있으나 현실적으로 가장 문제가 되는 부분은 그림 1에도 나타낸 바와 같이 압착 후 생성되는 액즙, 소위 증자액(stick water)의 처리문제이다. 증자액을 효율적으로 이용하기 위한 증자액 처리공정도는 그림 2와 같다. 압착처리 후 생성되는 증자액은 비교적 고형분이 많기 때문에 이를 회수하기 위해 원심탈수기를 이용해 고형분은 제거되고 연속원심분리기를 통과한 증자액은 어분제조공정 중 건조공정에서 사용하고 나오는 폐열을 이용하여 농축된다. 그리고 동우산업에서도 유사한 공정을 거쳐 오징어내장 증자액이 파생된다. 이러한 증자액을 효과적으로 이용하기 위하여 목적균주의 발효배지로 이용하기 위한 미생물발효조건을 확립하였다.

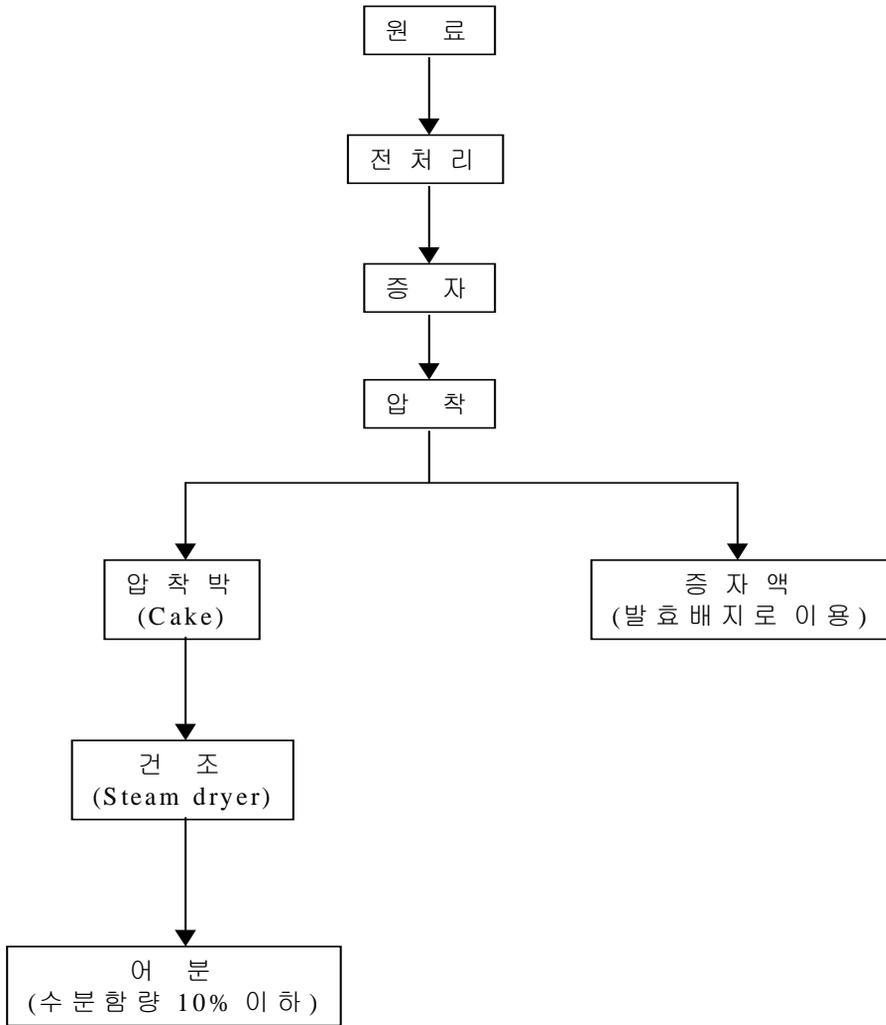


그림 1. 어분 제조 공정도

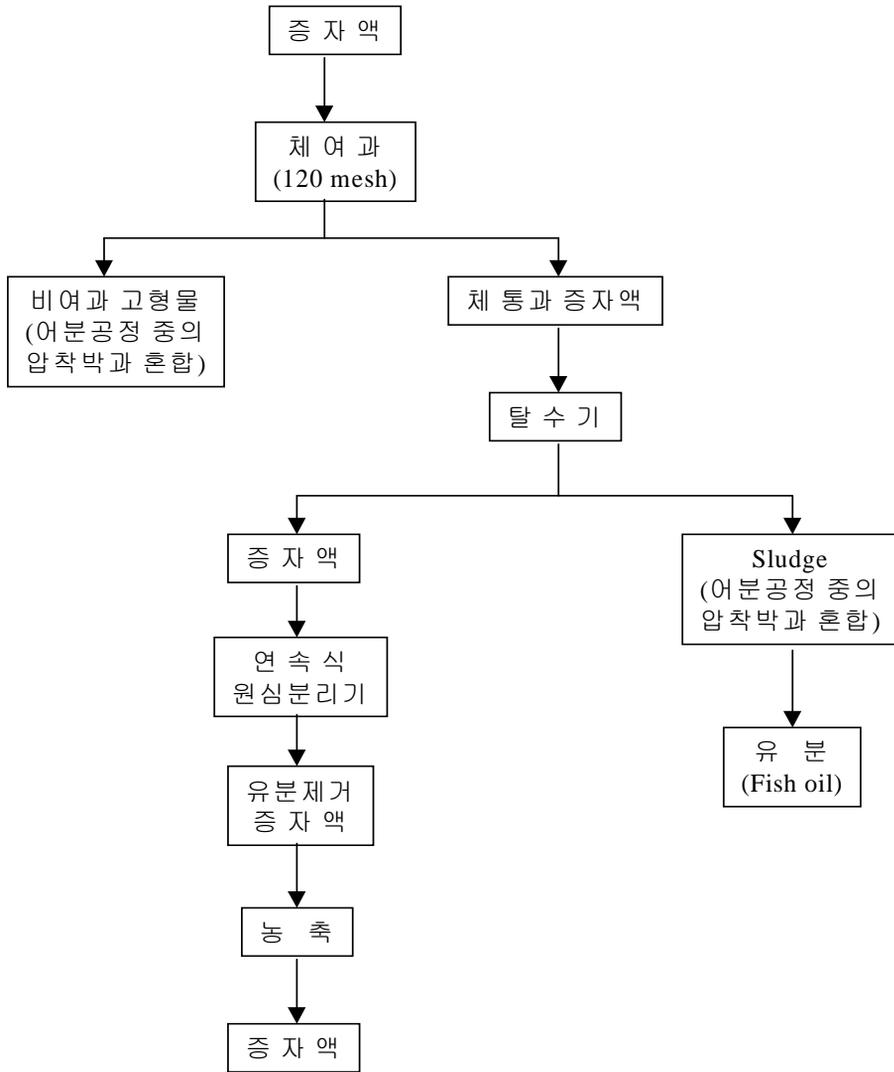


그림 2. 증자액 처리 공정도

2. 어분증자액 처리과정중 일반성분의 변화

가. 수분 함량

수분함량은 그림 3에 나타난 바와 같이 증자액처리 공정을 거침에 따라 점차 증가하는 경향이였다. 수분함량의 증가는 각 공정에서 단백질이나 지방이 제거됨에 따른 상대적 증가라고 여겨진다. 초기 증자액의 수분함량은 59.7%였으나 연속식 원심분리 후 90.3%까지 증가하였다. 그 후 농축으로 인해 수분함량은 39.8%로 낮아졌다.

나. 조단백질 함량

증자액 처리과정중 어분의 품질지표로서 가장 중요한 조단백질의 변화는 그림 4와 같다. 최초 증자액의 조단백질 함량은 21.3% 였으나 체 여과 후 17.5%으로 감소하였다. 이는 증자액중의 고형물이 체를 통과하지 못하고 걸러졌기 때문이다. 원심탈수기로 처리된 증자액은 조단백질 함량이 5%로 급격히 떨어졌는데 그 이유는 원심탈수로 인해 탈수기 벽면에 부착된 sludge가 제거되었기 때문이다. 이 sludge는 단백질 함량이 매우 높아 어분으로서의 이용가치가 높아 어분 건조시에 회수되어 이용된다. 그리고 최종 농축액의 조단백질 함량은 42.2%로 상당히 높아 어분뿐만 아니라 발효용 배지로서의 이용도가 높을 것으로 판단되었다.

다. 조지방 함량

증자액의 처리에서 가장 중요한 관건이 되는 것은 지방의 제거이다. 지방은 연속원심분리기를 통하여 현장에서는 제거되며 최초 증자액의 조지방함량은 15.4%였고, 원심탈수 후 조지방함량은 20.4%로 증가하였는데 이는 조단백질 함량의 감소로 인한 상대적인 증가로 판단된다. 지방은 연속식 원심분리 후 0.3%

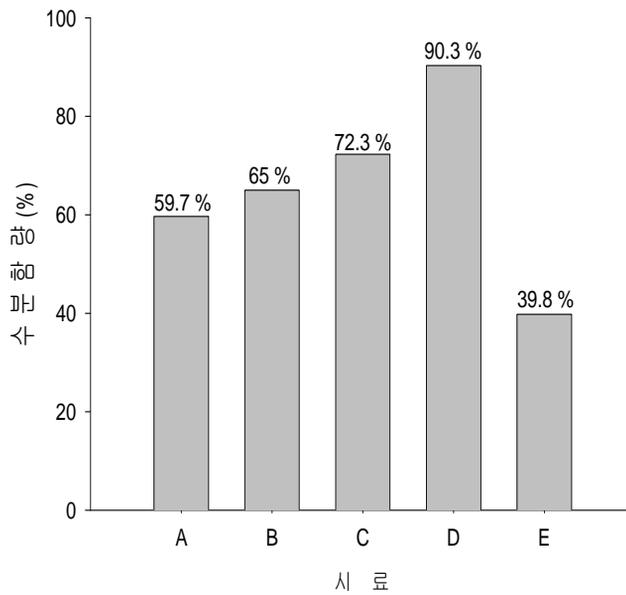


그림 3. 증자액 처리시 각 공정에서의 수분 함량

A, 최초증자액; B, 체여과 증자액; C, 원심탈수 후 증자액;

D, 연속식 원심분리 후 증자액; E, 최종 농축액

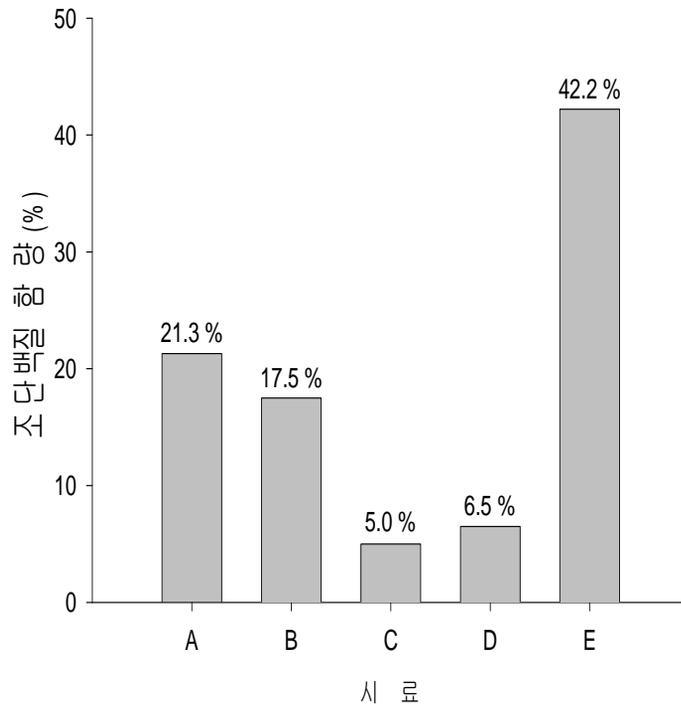


그림 4. 증자액 처리시 각 공정에서의 조단백질 함량

A, 최초증자액; B, 체여과 증자액; C, 원심탈수 후 증자액;

D, 연속식 원심분리 후 증자액; E, 최종 농축액

로 감소되어 원심분리로 인한 지방제거효과는 탁월하였다. 최종적으로 농축액의 지방함량은 2.3%였다(그림 5).

라. 회분함량

회분함량은 그림 6에 나타난바와 같이 초기증자액의 경우 3.1%였으며 처리과정 중 큰 변화가 나타나지 않았으나 최종농축액의 경우 농축으로 인해 15.3%로 증가하였다.

3. 어분증자액과 오징어 증자액의 년중 일반성분

97년 11월부터 98년 8월까지 10개월간 포항의 동우산업과 여수의 우남수산에서 수거한 오징어내장 증자액과 어분증자액의 일반성분을 분석하였다. 표 1에 나타난 바와 같이 포항의 동우산업에서 채취한 시료인 오징어 내장 증자액은 수분함량 63-73%, 조지방은 10-20%, 조단백질은 14-21%의 범위를 나타내고 있었다. 그리고 염도는 비교적 일정한 농도를 나타내었으며 년중 증자액의 성분은 비교적 고른 비율을 나타내고 있었다.

그리고 우남수산에서 수거한 어분증자액의 일반성분 중 수분은 36-51%의 범위를 나타내고 있었으며, 조지방은 2-4%의 범위로 비교적 낮은 수치를 나타내었으며, 단백질은 36-46%의 범위로 높은 수치를 나타내었다(표 2). 표 3은 어분증자액과 오징어 증자액을 비교, 분석한 것으로 어분 증자액은 오징어 내장 증자액과 달리 농축과정을 거치기 때문에 비교적 낮은 수분함량과 높은 염도를 지니고 있었으며, 이를 발효용배지로 사용할 경우 오징어 내장 증자액 보다는 높은 배율의 희석이 요구되었다.

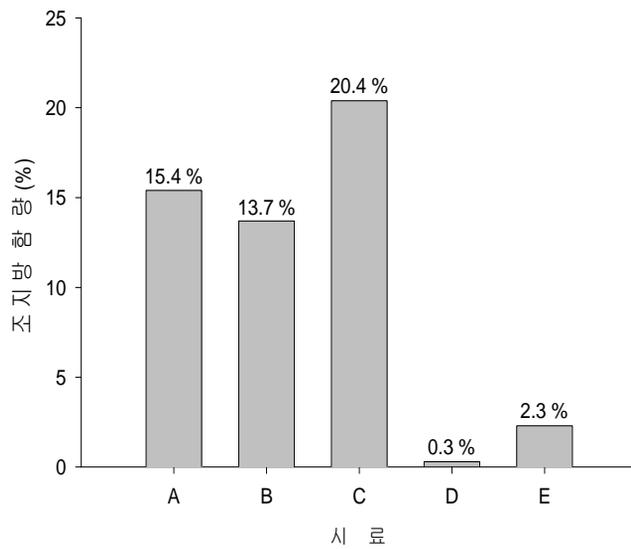


그림 5. 증자액 처리시 각 공정에서의 조지방 함량

A, 최초증자액; B, 체여과 증자액; C, 원심탈수 후 증자액;

D, 연속식 원심분리 후 증자액; E, 최종 농축액.

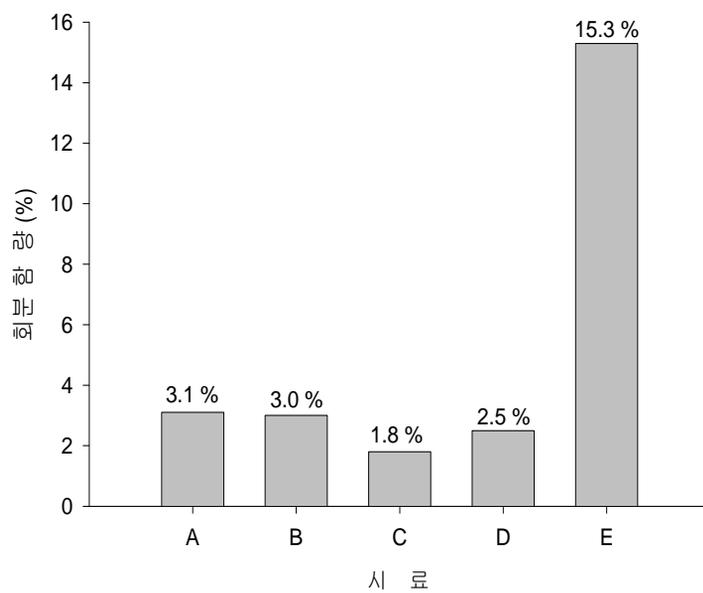


그림 6. 증자액 처리시 각 공정에서의 회분 함량

A, 최초증자액; B, 체여과 증자액; C, 원심탈수 후 증자액;

D, 연속식 원심분리 후 증자액; E, 최종 농축액.

표 1. 월별 오징어내장 증자액의 일반성분

Unit : %

	수분	조지방	회분	조단백	염도
11월 3주	71.1	11.3	1.82	14.4	0.63
12월 1주	67.2	13.4	1.93	15.3	0.71
12월 3주	65.8	14.2	1.88	16.6	0.68
1월 1주	68.4	13.2	1.68	17.3	0.64
1월 3주	63.5	19.5	1.57	21.0	0.65
2월 1주	67.6	13.2	1.67	17.3	0.70
2월 3주	72.3	10.8	1.55	16.3	0.69
3월 1주	70.3	12.1	1.67	14.1	0.65
3월 3주	71.2	11.8	1.67	13.4	0.59
4월 1주	67.3	13.1	1.58	14.3	0.61
4월 3주	71.2	14.3	1.67	12.6	0.58
5월 1주	69.3	14.5	1.63	15.6	0.71
5월 3주	64.3	20.1	1.65	15.3	0.73
6월 1주	67.2	14.3	1.59	15.6	0.73
6월 3주	64.9	18.6	1.54	20.3	0.64
7월 1주	69.8	13.4	1.46	21.3	0.61
7월 3주	73.4	12.3	1.56	14.3	0.56
8월 1주	68.4	13.6	1.44	15.8	0.61
8월 3주	65.4	14.5	1.78	18.2	0.62
평균	68.3	14.1	1.65	16.3	0.64

표 2. 월별 어분 증자액의 일반성분

Unit : %

	수분	조지방	회분	조단백	염도
11월 3주	39.8	2.32	15.3	42.2	4.31
12월 1주	42.4	3.43	16.3	40.3	5.22
12월 3주	50.8	3.20	13.8	36.6	5.81
1월 1주	38.4	2.22	16.8	37.3	4.32
1월 3주	43.5	2.51	15.7	41.0	4.53
2월 1주	37.6	3.24	16.7	44.3	3.76
2월 3주	40.3	3.82	15.5	43.3	3.69
3월 1주	40.3	2.19	16.7	41.0	4.45
3월 3주	41.2	1.89	16.7	41.4	4.28
4월 1주	37.3	2.43	14.8	42.1	5.16
4월 3주	41.3	2.37	12.9	42.3	4.93
5월 1주	39.1	2.81	14.6	41.9	4.67
5월 3주	44.3	2.19	15.3	41.2	4.62
6월 1주	37.7	2.44	15.8	42.6	4.79
6월 3주	44.1	3.62	16.3	40.9	4.46
7월 1주	39.4	3.50	14.7	41.3	4.64
7월 3주	37.3	2.33	15.6	44.7	4.64
8월 1주	38.6	3.32	16.3	45.2	4.16
8월 3주	36.7	2.63	17.0	42.3	4.13
평균	40.5	2.76	15.6	41.7	4.55

표 3. 어분증자액과 오징어 증자액의 일반성분

Unit : (%)

	어분증자액	오징어증자액
수분	40.5(±3.4)	68.3(±2.8)
조지방	2.76(±0.58)	14.1(±2.6)
회분	15.6(±1.1)	1.65(±0.13)
조단백질	41.7(±2.1)	16.3(±2.5)
염도	4.6(±0.50)	0.65(±0.1)
N	6.75	3.36
C	82.4	81.6
H	9.88	9.44
S	0.12	-

제 2 절 오징어 증자액의 성분분석

오징어의 내장의 65 %가 염장저장인 젓갈류 식품으로 유통되며 Squid liver, 혈압육, 자숙액 등은 오징어 부산물로 남는다. 이의 효율적인 이용가공을 위해서 안전한 저장성이 요구되고 있으나 내장내의 단백질 분해효소나 유해 미생물의 번이로 인한 기생충 생장이 우려되어 왔다. 이를 해결하기 위한 방책으로 오징어 부산물 사료공장에서는 부산물을 수집하여 가열 탱크조에 넣은 후, 120 - 150 °C에서 6시간 동안 가열한다. 이 공정으로 원료의 오염이나 수분 증발로 인한 부피 감소, 오징어 내장의 장기보관이 가능하게 되며 이 공정에서 온도 상승으로 인한 지방분리, 가용성 단백질 유출, 부산물 등으로 나뉘게 되고 생성된 슬러지를 사료화 사용하기 위해서는 불필요한 자숙액과 지질층은 원심분리 공정을 거치면서 제거해야 하며 가열공정 후, 원료의 부피가 클 경우에는 전력자원 낭비와 기계 작동의 어려움이 있으므로 가열 시 생긴 증자된 폐수를 유출하게 된다.

1. 일반성분분석

오징어 내장 폐수의 경우 가공공정시 유출되는 순서에 따라 폐수의 일반성분이 다르다. 가열공정 후 원심분리하기 전의 증자된 폐액인 최초의 오징어 내장 증자 폐기물 (Original Squid intestine screw drip, OSD) 과 증자된 폐액 내의 마쇄 되지 않은 나머지 내장육과 점질물 등은 체여과를 통과하여 유출된 체여과 오징어 내장 증자 폐기물 (Filtration Squid intestine screw drip), 두 종류로 분리되며 이들의 일반성분은 표 4에 명기하였다. 최초의 오징어 내장 증자 폐액 (OSD)은 수분이 54.72 % 로써 유기물의 함량은 45.9 %정도의 비교적 농도가 높은 편이었으며 조단백질이 21.31%, 내장 성분에서 유출된 조지방이 20.44 %, 회분 및 염도가 각각 3.14 % 및 2.11 %로 나타났다. 체여과 오징어 내장 증자폐액(FSD)의 경우 수분이 60.22 % 정도로 늘어남과 동시에 여과를 통해서 유기물의 함량은 39 % 감소하여 조단백질이 17.94 %,

**☒ 4. The chemical composition in screw drips
obtained from squid waste**

(Unit : %)

Portion	% Of total squid drip content (mean \pm AR _a)	
	OSD ₍₂₎	FSD ₍₃₎
Total solids	45.29 \pm 0.01	39.81 \pm 0.01
Moisture	54.71 \pm 0.01	60.22 \pm 0.01
Crude Protein	21.32 \pm 0.03	17.94 \pm 0.02
Crude Lipid	20.44 \pm 0.03	17.53 \pm 0.02
NaCl	2.102 \pm 0.03	1.359 \pm 0.01

Squid₍₁₎: liver, vicera, and muscle tissue etc

OSD₍₂₎ : Original squid intestine drip products by press in squid intestine waste

FSD₍₃₎ : Filtration squid intestine drip products by filtrate in original drip

AR_a : An acceptable error range

조지방이 17.53 %, 회분과 염도의 경우 2.5 %, 1.36 %로 감소하였다. 본 실험에 사용된 오징어 내장 폐액의 경우 *E. coli*가 성장하는데 필요한 영양분인 탄소원, 질소원, 무기질 및 비타민류 등의 영양원들이 상당량 풍부하다는 보고가 있으나 *E. coli*가 성장하는데 필요로 하는 탄소원이 0.46 % 정도로 다른 영양원에 비해서 낮은 농도를 가지고 있었다. 각각의 함량측정은 상법에 따라 수분은 상압가열건조법, 조단백질은 semimicro Kjeldahl법, 조지방은 Bligh & Dyer법 그리고 회분은 건식회화법으로 분석하였다. 원소분석은 자동원소분석기(CE Instrument, EA1110)로 정량을 하였다.

2. 아미노산 성분분석

전처리 과정을 거친 오징어 내장 폐액배지의 유리 아미노산 조성을 표 5에 명기하였다. 아미노산의 유리아미노산의 함량이 많은 순서대로 보면 Leucine (10.501 %mol), Glutamic acid (10.239 %mol), Alanine (9.956 %mol), Lysine (8.99 %mol)의 순이었고, Valine (7.705 %mol), Aspartic acid (129 %mol), Proline (6.095 %mol) 등의 여러 종의 아미노산이 비교적 고르게 분포되어 있었다. 오징어육에 관한 보고서에 따르면 glutamic acid, aspartic acid, lysine 그리고 leucine 순으로 유리 아미노산이 포함되어 있다는 보고가 있다.

**Æ 5. Free amino acid composition analysis of
pretreated squid wate.**

(Unit : mol %)

Composition	(% mol) Of total free amino acid content
	(mean±SD _b)
ASP	7.1297 ± 0.0010
GLU	10.2394 ± 0.0001
SER	4.9711 ± 0.0001
HIS	0.9039 ± 0.0002
GLY	4.7741 ± 0.0011
ARG	2.8142 ± N.D _b
THR	4.0657 ± 0.0003
ALA	9.9565 ± 0.0006
PRO	6.0955 ± 0.0021
TYR	2.5513 ± 0.0004
VAL	7.7054 ± 0.0002
MET	3.7054 ± N.D
CYS ₂	0.1354 ± 0.0001
ILE	5.4231 ± 0.0014
LEU	10.5011 ± 0.0006
PHE	5.0874 ± 0.0002
TRP	4.9135 ± N.D
LYS	8.9908 ± 0.0003
Totals_c	99.999 ± 0.0001

PSD_a : Pretreated squid waste drip

ND_b : Not determined

Totals_c : Free amino acid totals

제 3 절 폐수의 미생물 배양조건 확립

폐수의 일반성분 및 염도를 측정하여 목적균주의 배양여부를 확인 가공공장 폐수의 조지방, 조단백, 회분 등을 분석하였으며 목적균주인 *E. coli*, 광합성세균 및 *Corynebacterium*의 최적배양을 위한 희석 및 보강 조건을 확립하였다. 오징어내장 어분공장 (동우산업)으로부터 배출되는 내장 증자액과 단미 사료공장 (우남수산)에서 배출되는 배출수를 주기적으로 수거하여 이들의 일반성분을 분석하였으며, *Escherichia coli*, *Rhodobacter*, 및 *Corynebacterium*의 배지로써의 적합성을 검토하였다.

1. 오징어증자액에 대한 배양조건

오징어내장 증자액을 목적세균의 발효용 배지로 활용하기 위하여 증자액을 가압 멸균한 후, 50 ml당 100 cell을 접종한 후 37°C에서 48시간 진탕배양을 하였다. 진탕배양 후의 배양액을 단계적으로 희석하여 평판배지에 도말한 후 생균수를 측정한 결과를 표 6에 나타내었다. 표 6에 나타난 바와 같이 원액, 2배 및 4배로 희석된 오징어내장 증자액의 경우 *E.coli*와 *Rhodobacter*의 증식은 영향이 없었으나, 8배 이상으로 희석된 경우 증식도가 떨어짐을 알 수 있었다. 그리고 *Corynebacterium*의 경우 *E. coli*와 *Rhodobacter*에 비해 증식도가 상당히 느린 것으로 나타났다.

2. pH에 따른 배양조건

오징어내장 증자액을 물로 2배로 희석한 후 pH를 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 및 9.0으로 조정된 후, 배지 100 ml에 10^4 의 *E.coli*, *Rhodobacter* 및 *Corynebacterium*을 접종하고 48시간 배양 후, 생균수를 측정하였다. 그림 7에 나타난 바와 같이 pH

표 6. 오징어내장 증자액 희석배수에 따른 *E.coli*, *Rhodobacter* 및 *Corynebacterium*의 증식

희석비	<i>E. coli</i> (x 10 ⁶)	<i>Rhodobacter</i> (x 10 ⁶)	<i>Corynebacterium</i> (x 10 ²)
1배	21	7	41
2배	22	7	70
4배	21	7	41
8배	9	6	9
16배	5	5	4

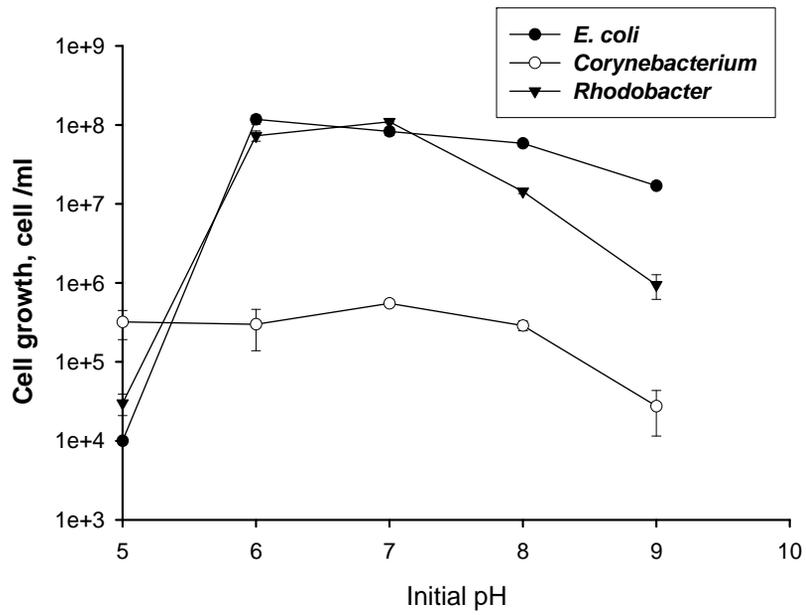


그림 7. 2배 희석한 오징어 증자액을 이용한 배지의 pH에 따른 *E. coli*, *Rhodobacter sphaeroides* 및 *Corynebacterium glutamicum*의 증식도

6-8까지의 범위에서는 균의 증식도에 영향이 없는 것으로 나타났다.
따라서 오징어내장 증자액을 배지로 사용할 경우 인위적인 pH 조정이 불필요
한 것으로 판단되었다.

제 3 장 신소재 생산을 위한 유전자원의 확보 및 발현 system 구축

제 1 절 유전자원 cloning 및 분석

1. *Bradyrhizobium japonicum*으로부터 *hemA* 유전자의 cloning 및 sequencing

*Bradyrhizobium japonicum*으로부터 *hemA* 유전자의 cloning하기 위해 PCR을 실시하였다. Chromosomal DNA로부터 *hemA* 유전자를 증폭하기 위하여 합성한 primer ALA 1과 ALA 2는 GeneBank database로부터 얻은 *hemA* 유전자 염기서열을 분석하여 합성하였다(그림 8). 추후 용이한 subcloning 및 expression vector에서의 발현을 위하여 5' primer는 *Bam*H I, *Nde* I 그리고, 3' primer에는 *Eco*R I site를 첨가하였다. 위의 실험방법에 기술된 것과 같이 *hemA* gene을 PCR로 증폭 후, 1.0% agarose gel 전기영동을 이용하여 확인한 결과 예측된 것과 같이 약 1.2 kb 근처에서 뚜렷한 유전자의 증폭을 확인하였다(그림 9).

ALAS1 : gggatccatATGGATTACAGCCAGTTCTT

(BamH I)(Nde I)
ALAS2 : ggggaattcCTACTCCGCCGCCAGCGA

EcoR I)

그림 8. PCR primers for ALA synthase

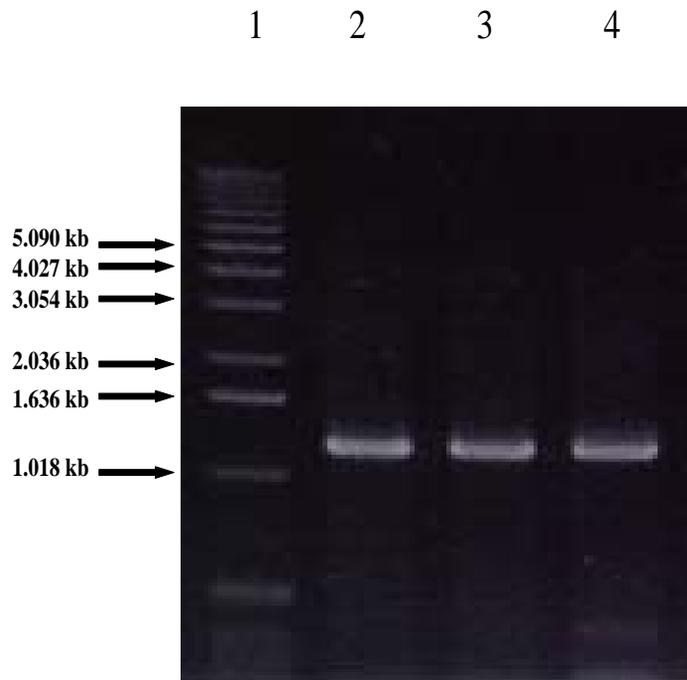


그림 9. PCR 증폭에 의하여 생산한 ALA synthase 유전자의
Gel Electrophoresis

(# 1. 1 kb size marker ladder, # 2, 3, 4 PCR product)

PCR로 증폭된 *hemA* gene을 expression vector에 삽입하기 전에 PCR product에 삽입한 *Bam*H I 과 *Eco*R I 을 이용하여 pUC 18에 subcloning을 행하였다. Ligation 후, *E.coli* 균주에 transformation을 하여 ampicillin, X-Gal 과 IPTG를 첨가한 LB 배지에 배양하고 푸른색을 나타내지 않는 균을 5 ml LB (amp 50 μ g/ml) 배지에 배양하였다. mini-prep을 통해 추출한 DNA를 제한 효소 처리 (*Bam*H I , *Eco*R I) 를 하여 1.0% agarose gel 전기영동으로 분리한 결과, pUC18과 *hemA* gene 크기의 band (pUC18 - 2.69 kb, *hemA* gene - 1.2 kb)를 확인하였다. 확인된 *hemA* 유전자는 sequencing을 통하여 그 염기서열을 규명하였다(그림 10).

2. ALAD 유전자 분리 및 sequencing을 통한 분석

E. coli(BL21DE3)의 *hemB*(ALAD) gene을 PCR로 증폭하기 위하여 gene bank에서 sequence가 밝혀진 *E. coli*(K-12)의 *hemB* gene sequence를 토대로 하여 primer를 제작하였다. Primer들의 GC 함량을 맞추기 위하여 3' primer는 *hemB* gene보다 조금 뒤에 있는 gene을 증폭하였으며, 합성된 primer 및 유전자의 sequence는 그림 11와 같다.

3. *rrnB* promoter의 cloning 및 염기서열 분석

본 연구에서 *Rhodobacter sphaeroides*에서 ALAS를 과 발현을 시키기 위하여, pRK415 vector의 polycloning site에 강력한 promoter인 *rrnB* promoter, RBS (ribosomal RNA binding site), 그리고 *hemA* gene의 첨가가 계획되었다. 이를 위하여 *rrnB* promoter의 cloning 및 sequencing을 실시하였다. 이를 위한 *rrnB* promoter의 cloning은 먼저 *rrnB*로부터 primer를 이용하여 약 450 bp fragment를 증폭한 후 (그림 12) *Pst*I-*Bam*HI 으로 digestion을

60 ATGGATTACA GCCAGTTCTT TAATTCCGCC CTCGATCGCC TCCACACTGA ACGGCGTTAC
120 CGCGTGTTTC CCGATCTGGA ACGCATGGCG GGCCGATTTC CGCATGCGAT CTGGCACTCG
180 CCCAAGGGCA AGCGCGACGT CGTGATCTGG TGCTCCAACG ACTATCTCGG CATGGGTCAG
240 CATCCGAAGG TCGTCGGCGC CATGGTCGAG ACCGCAACGC GCGTCGGCAC CGGCGGGGC
300 GGCACCCGCA ACATCGCCGG CACGCATCAT CCGCTGGTGC AGCTCGAGGC CGAGCTCGCC
360 GATCTCCACG GCAAGGAAGC CGCGCTGCTG TTCACCTCGG GCTATGTCTC GAACCAGACC
420 GGCATCGCGA CCATCGCAA GCTCATTCGG AACTGCCTGA TCCTGTCCGA CGAGCTCAAC
480 CACAATTCAA TGATCGAGGG CATCCGCCAG TCCGGCTGCG AGCGGCAAGT GTTCCGCCAC
540 AACGATCTCG CCGACCTCGA AGCGCTGTTG AAGGCGGCGG GTGCGAACC GCCGAAGCTG
600 ATCGCCTGCG AGAGCCTCTA TTCCATGGAC GCGGACGTCG CTCGCTCGC CAAGATCTGC
660 GATCTCGCCG AGAAATATAA CGCGATGACC TATGTCGACG AAGTCCACGC GGTCGGCATG
720 TACGGCCCCG GCGGCGGCGG CATCGCCGAG CGTGACGGCG TCATGCATCG CATCGACATT
780 CTCGAAGGCA CGCTGGCAA GCGTTCGGC TGCCTCGGCG GCTACATCGC CGCCAACGGC
840 CGGATCATCG ACGCCGTGGG CTCCTATGCG CCGGGCTTCA TCTTACCAC CGCGCTGCCG
900 CCGGCGATCT GCTCGCCGC GACCGCCGC ATCAAGCACC TGAAGACCTC GAGCTGGGAG
960 CGGAGCGCC ACCAGGACCG CGCCGCCCG GTCAAGGCGA TCCTCAACGC CGCCGGTCTC
1020 CCGGTGATGT CGAGCGACAC CCACATCGTG CCGCTGTTCA TCGGCGATGC CGAGAAGTGC
1080 AAGCAGGCCT CCGACCTGCT GCTCGAAGAG CACGGCATCT ACATCCAGCC GATCAACTAT
1140 CCGACCGTCG CCAAGGGCTC CGAGCGCTG CGCATCACGC CCTCGCCCTA TCACGATGAC
1200 GGCCTGATCG ATCAGCTCGC CGAAGCCCTG TTGCAAGTGT GGGACCGCCT CGGCCTGCCG
1230 CTCAAGCAAA AGTCGCTGGC GGCGGAGTAG

그림 10. Sequence of *Bradyrhizobium japonicum hemA* Gene

5' Primer : CCCCATATGCCCTCGATTCCAC

Total Base : 23

Nde I

3' Primer : CCCGATCCCCCTTCTGAGAGG

Total Base : 23

BamH I

60 ATGCCCT CGATTCCACA AACATCAGGC AGACCATGAC AGACTTAATC CAACGCCCTC
120 GTCGCCGCG CAAATCTCCT GCGTGCCGC GTATGTTGA AGAGACAACA CTTAGCCTTA
180 ACGACCTGGT GTTGCCGATC TTTGTTGAAG AAGAAATTGA CACTACAAA GCCGTTGAAG
240 CCATGCCAGG CGTGATGCGC ATTCAGAGA AACATCTGGC ACGCGAAATT GAACGCATCG
300 CCAACGCCGG TATTCGTTCC GTGATGACTT TTGGCATCTC TCACCATACC GATGAAACCG
360 GCGAGCGAGC CTGGCGGAA GATGACTGG TGGCGGTAT GTCGCCGATC TGCAAGCAGA
420 CCGTGCCAGA AATGATCGTT ATGTCAGACA CCTGCTTCTG TGAATACACT TCTCACGGTC
480 ACTGCGGTGT GCTGTGCGAG CATGGCGTCG ACAACGACGC GACTCTGGAA AATTAGGCA
540 AGCAAGCCGT GGTTCAGCT GCTGCAGGTG CAGACTTCAT CGCCCCTTCC GCCGCGATGG
600 ACGGCCAGGT ACAGGCGATT CGTCAGGCGC TGGACGCTGC GGGATTTAAA GATACGGCGA
660 TTATGTCGTA TTCGACCAAG TTCGCCTCCT CCTTTTATGG CCCGTTCCGT GAAGCTGCCG
720 GAAGCGCATT AAAAGGCGAC CGAAAAGCT ATCAGATGAA CCAATGAAC CGTGCTGAGG
780 GCATTGCTGA ATACCTGCTG GATGAAGCC AGGGCCAGA CTGCCTGATG GTTAAACCTG
840 CTGGAGCGTA CCTCAACATC GTGCGTGAGC TGCCTGAACG TACTGAATTG CCGATTGGCG
900 CGTATCAGGT GAGCGGTGAG TATGCGATGA TTAAGTTCGC CGCGCTGGCG GGTGCTATAG
960 ATGAAGAGAA AGTCGTGCTC GAAAGCTTAG GTTCGATTAA GCGTGCGGGT GCGGATCTGA
1020TTTTCAGCTA CTTTGCGCTG GATTTGGCTG AGAAGAAGAT TCTGCGTTAA

그림 11. Sequence of *Bradyrhizobium japonicum* hemA gene

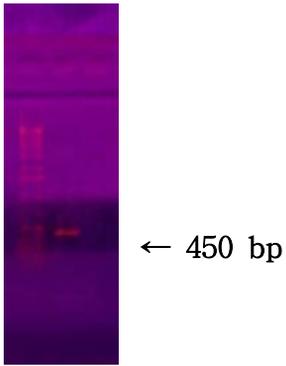


그림 12. PCR에 의하여 증폭된 *rrnB* promoter (450bp)

실시하였다. 이 fragment를 pRK415의 *Pst*I- *Bam*HI site에 cloning을 하였다. Cloning이 된 pRK-*rrnB*를 다시 *Bam*HI-*Eco*RI으로 digestion을 실시한 후 *HemA* 의 *Bam*HI-*Eco*RI fragment를 cloning을 실시하였다. 이를 위하여 *rrnB* gene을 PCR로 증폭하면서, 3' primer 합성 시 RBS sequence를 첨가하여 *rrnB* promoter와 RBS가 같이 증폭되도록 하였다. 합성된 oligo-nucleotide는 그림 13과 같다.

PCR을 통한 확인 결과, 약 450 bp에서 증폭이 되었음을 확인하였으며 이 product를 pUC18에 subcloning을 통하여 sequencing을 실시 확인되었다.

4. *Corynebacterium glutamicum metB* 유전자의 분리 및 확인

E. coli-Corynebacterium shuttle vector인 pMT1을 이용해 제작된 *C. glutamicum* AS019 genomic library를 *E. coli metB* mutant인 *E. coli* CGSC4896 (*E. coli* Genetic Stock Center; *metB1*, *arg*)에 transformation 시킨 결과 약 6,000 recombinant (transformation frequency $\rightarrow 1.6 \times 10^5$ cell/ μ g DNA)중 methionine을 함유하지 않는 M9 최소 배지 상에서 자라는 2개의 colony를 확인할 수 있었다. 이들 colony를 분석한 결과 두 종류의 plasmid를 확인할 수 있었고 이들을 각각 plamid pSL68과 pSL69로 명명하였다. Library의 평균 insert의 길이가 4-13 kb이고 *C. glutamicum*의 평균적인 genome 크기가 약 2,000 kb인 점에 비교해 볼 때 이론적으로 약 2,500 transformant에 한 개의 빈도로 평균적인 크기의 유전자들이 확인되어야 하고 본 연구에서 확인한 1/3,000은 이와 같은 이론값에 근접함을 알 수 있었다. 즉 이러한 사실을 제작된 library가 성공적으로 각 유전자들을 대변하는 것으로 볼 수 있다. 얻어진 두 종류의 클론을 *E. coli metB* mutant인 *E. coli* CGSC4896에 재도입하여 complementation 여부를 재확인하였고 그 결과를 그림 14에 나

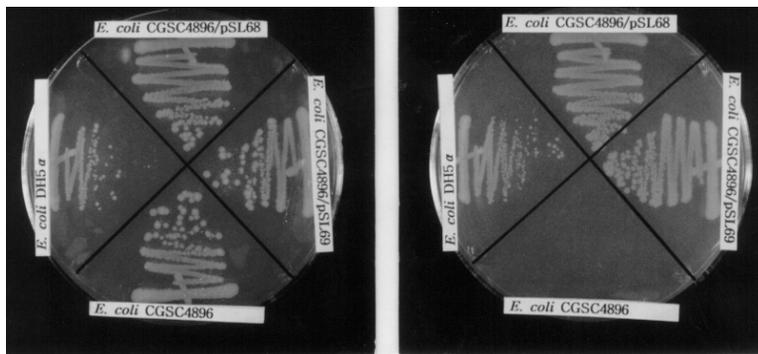


그림 14. Plasmid pSL68과 pSL69에 의한 *E. coli metB* 변이균의 complementation

metB 변이균으로는 *E. coli* CGSC4896균을 이용하였다.

Panels: 좌, methionine을 함유하는 M9 배지; 우, methionine을 함유하지 않는 M9 배지.

Panel내 설명: 좌상, *E. coli* CGSC4896/pSL68, 좌좌, *E. coli* DH5α, 좌우, *E. coli* CGSC4896/pSL68, 좌하, *E. coli* CGSC4896, 우상, *E. coli* CGSC4896/pSL69, 우우, *E. coli* CGSC4896/pSL69, 우하, *E. coli* CGSC4896, 우좌, *E. coli* DH5α.

타내었다. 즉 wild type인 *E. coli* DH5a의 경우 methionine의 존재 여부에 상관없이 좋은 성장을 나타내었지만 *metB* 변이균인 *E. coli* CGSC4896균의 경우 methionine이 함유되지 않은 배지에서는 전혀 성장할 수 없었다. 분리된 DNA인 plasmid pSL68과 pSL69이 변이균에 도입된 경우 methionine을 함유하지 않는 배지에서도 좋은 성장을 나타내었다.

Plasmid pSL68과 pSL69를 *EcoRI*, *HindIII*, *XhoI* 등의 제한효소로 절단한 후 전기영동을 실시하여 제한지도를 작성한 결과 일정 부위에서 서로 겹치는 모습을 나타내었다. plasmid pSL68과 pSL69는 각각 4.5 kb와 4.6 kb의 DNA 절편을 갖는 것으로 확인되었다. 제한효소 지도를 기초로 subcloning을 통해 *metB* 유전자의 발현에 필요한 최소한의 DNA를 subcloning을 통해 결정하였다. 그 결과 plasmid pSL68의 3 kb fragment을 지닌 pSL123은 성공적으로 *E. coli* 변이균을 complementation을 할 수 있었는데 반해 이보다 작은 단편을 지닌 pSL139와 pSL140은 complementation을 할 수 없는 것에 비추어 *metB* 유전자의 위치를 개략적으로 지정할 수 있었다(그림 15). 현재 다양한 형태의 subclone을 제작해 염기서열 분석을 위한 준비단계에 있다.

DNA의 염기서열 분석 결과 1,161 base pair의 길이를 갖는 open reading frame이 발견되었다. 탐지된 ORF는 386 아미노산으로 구성된 분자량이 41,655 Dalton인 단백질을 발현하는 것으로 유추되었다 (그림 16). 이는 현재까지 알려진 *Mycobacterium tuberculosis*, *E. coli*, *Haemophilus influenzae* 및 *Bacillus* 등 다른 균들의 *metB* 유전자들의 산물과 크기가 거의 일치하는 것으로 밝혀졌다. 아미노산 서열로부터 유추된 등전점 pI는 4.8로서 다른 종에서 발견된 *metB* 유전자의 산물과 유사한 값을 나타내었다(그림 17). Codon preference를 분석하여 본 결과 이미 알려진 *C. glutamicum* 유전자들의 codon 이용 유형과 높은 유사성을 보였다. 유전자내의 GC의 함량은 55.5%로

Clones and subclones of metB:

**Complementation of
E. coli metB mutant
(E. coli CGSC 4896)**

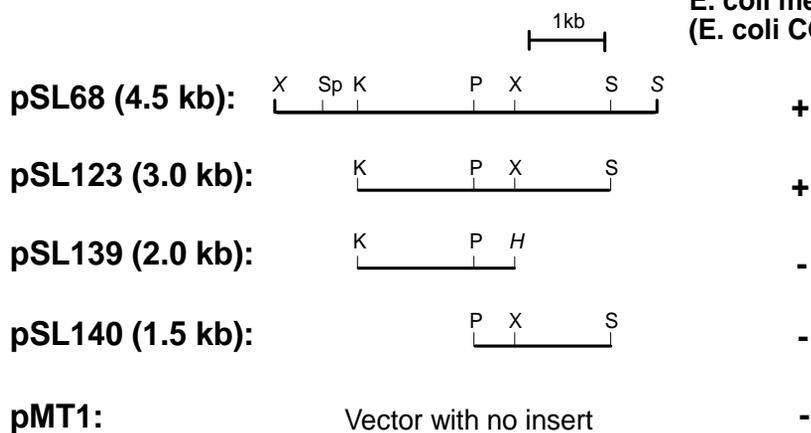


그림 15. Plasmid pSL68과 pSL69의 제한효소지도 및 subclone에 의한 complementation 유무

Complementation 유무는 *E. coli metB* 변이균인 CGSC4896 균에 각각의 클론을 도입한 후 M9 배지에서의 성장유무를 분석하여 나타내었다.

약어: X, *Xho*I; Sp, *Sph*I; S, *Sal*I; K, *Kpn*I; P, *Pst*I.

```

1 ATCCTCATGATCAAGGACGCCCGCATACTGGCTCGGGGACTGTTTCAGAAGTGATGACTCC 62
63 TGAAAATTTGGGCGCGCTGTATGACATGTCGGTGTCTGTTGGAACCTGTGCGCAGCCGGTGGT 124
125 TCGCGTTTCGATGCTCTGCATTAAGAGGGGCTAGTTTTACACAAAAGTGGACAGCTTGGTCTA 186
187 TCATTGCCAGAAGACCGGTCTTTTAGGGCCATAGAATTCTGATTACAGGAGTTGATCTACC 248
RBS
249 TTG TCT TTT GAC CCA AAC ACC CAG GGT TTC TCC ACT GCA TCG ATT CAC 296
M S F D P N T Q G F S T A S I H
297 GCT GGG TAT GAG CCA GAC GAC TAC TAC GGT TCG ATT AAC ACC CCA ATC 344
A G V E P D D V V G S I N T F I I
345 TAT GCC TCC ACC ACC TTC GCG CAG AAC GCT CCA AAC GAA CTG CGC AAA 392
V A S T T T F A Q N A P N E L R K
393 GGC TAC GAG TAC ACC CGT GTG GGC AAC CCC ACC ATC GTG GCA TTA GAG 440
G Y E V T R V G N P T I V A L TCC
441 CAG ACC GTC GCA GCA CTC GAA GGC GCA AAG TAT GGC CGC GCA TTC TCC 488
Q T V A A L E G A K Y G R A F S
489 TCC GGC ATG GCT GCA ACC GAC ATC CTG TTC CGC ATC ATC CTA AAG CCG 536
S G M A A T D I L F R I L K P
537 GGC GAT CAC ATC GTC CTC GGC AAC GAT GCT TAC GGC GGA ACC TAC CGC 584
G D H I V L G N D A V G G A T V R
585 CTG ATC GAC ACC GTC TTC ACC GCA TGG GGC GTC GAA TAC ACC GTT GTT 632
L I D T V F T A W G V E V T V V
633 GAT ACC TCC GTC GTG GAA GAG GTC AAG GCA GCG ATC AAG GAC AAC ACC 680
D T V S V E E K A T K N T
681 AAG CTG ATC TGG GTG GAA ACC CCA ACC AAC CCA GCA CTT GGC ATC ACC 728
K L I W V E T P N F A L G A T T
729 GAC ATC GAA GCA GTA GCA AAG CTC ACC GAA GGC ACC AAC GCC AAG CTG 776
D I E A V A K L T E G T N A K L
777 GTT GTT GAC AAC ACC TTC GCA TCC CCA TAC CTG CAG CAG CCA CTA AAA 824
V V D N T F A S Y L Q P L K G
825 CTC GGC GCA CAC GCA GTC CTG CAC TCC ACC ACC AAG TAC ATC GGA GGA 872
L G A H A V L H S T T K Y I G G
873 CAC TCC GAC GTT GTT GGC GGC CTT GTG GTT ACC AAC GAC CAG GAA ATG 920
H S D V V V G L V V T N D Q E M
921 GAC GAA GAA CTG CTG TTC ATG CAG GGC GGC ATC GGA CCG ATC CCA TCA 968
D E E L L F M Q G G I S P I P S
969 GTT TTC GAT GCA TAC CTG ACC GCC CGT GGC CTC AAG ACC CTT GCA GTG 1016
V F D A V I T A R G I A T I V
1017 CGC ATG GAT CGC CAC TGC GAC AAC GCA GAA AAG ATC GCG GAA TTC CTG 1064
R M D R H C D N A E K I A E F L
1065 GAC TCC CGC CCA GAG GTC TCC ACC TG C TC CCA GGT CTG AAG AAC 1112
D S R R P E V S T V L Y P G L K N
1113 CAC CCA GGC CAC GAA GTC GCA GCG AAG CAG ATG AAG CGC TTC GGC GGC 1160
H P G H E V A A K Q M K R F G G
1161 ATG ATC TCC GTC CGT TTC GCA GGC GGC GAA GAA GCA GCT AAG AAG TTC 1208
M I S V R F A G G E E A A K K F
1209 TGT ACC TCC ACC AAA CTG ATC TGT CTG GCC GAG TCC CTC GGT GGC GTG 1256
C T S T K L I C L A E S L G G V
1257 GAA TCC CTC CTG GAG CAC CCA GCA ACC ATG ACC CAC CAG TCA GCT GCC 1304
E S L L E H P A T M T H Q S A A
1305 GGC TCT CAG CTC GAG GTT CCC CGC GAC CTC GTG CGC ATC TCC ATT GGT 1352
G S Q L E V P R D L V R I S I G
1353 ATT GAA GAC ATT GAA GAC CTG CCA GAT GTC GAG CAG GCC CTC AAT 1400
I E D I E D I L A D V E Q A L N
1401 AAC CTT TAG AA*ACTATTGGCGGCAAGCAGCTTTTCAATATAAGCAATGCGAGCCTCCAC 1460
N L *
1461 CATGTAGCCGAAGAGTTTCGTGAGAGTGTAGACGGACTCTTCGACTGCTTTACGGGTCAGTGG 1523
CGCTTCCACATCTGGGTTCTCATCAAGCCATGGCTTAGGAACCGGAGCAAAACACATCCGGCTT 1586
1587 TTCGCCCTCTGGACGATTGTCAAAGTGTAGTCAGAAGTCAGGGTGAAGCTG 1638

```

그림 16. *C. glutamicum* AS019E12의 *metB* 염기서열.

염기서열로부터 예측된 아미노산 서열은 염기서열 아래에 single letter code로 나타내었음.

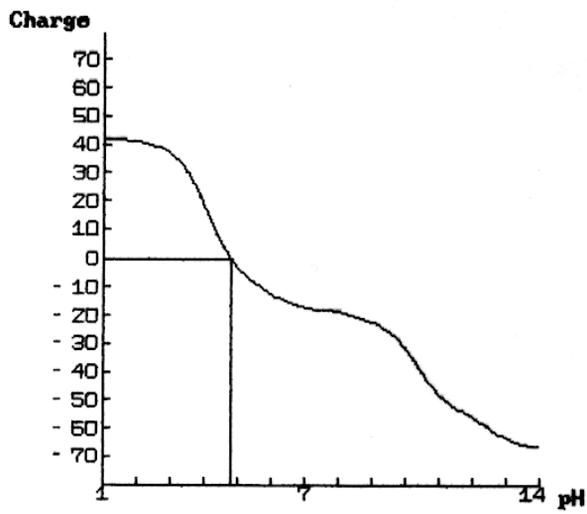


그림 17. *C. glutamicum* CGS의 isoelectric point.

Corynebacterium spp.의 전형적인 모습을 보였다.

염기서열로부터 유추된 아미노산서열을 Altschul et al.의 algorithm을 이용한 Blast program을 이용하여 분석하였다. 유전자 database로는 internet상의 Genebank를 이용하였다. *E. coli metB* 유전자의 산물과의 전체적인 유사성은 낮았고 *Mycobacterium tuberculosis*, *Haemophilus influenzae* 및 *Bacillus subtilis*의 *metB* 유전자의 산물과의 유사성이 상대적으로 높게 나타났다. *Mycobacterium tuberculosis*와의 비교를 그림 18과 19에 나타내었다.

*E. coli*로부터 *C. glutamicum*으로의 transconjugation을 통하여 야생형 *C. glutamicum* ASO19E12의 *metB* 유전자를 site-specific disruption시켰다. Disruption은 *tra* 유전자를 가진 *E. coli* S17-1과 *Corynebacterium*에서는 복제가 불가능한 mobilizable plasmid pSL18을 사용하였다. 복제가 불가능한 pSL18은 *Corynebacterium* chromosome에 integration되어야만 존재할 수 있다. pSL18에 *metB* 유전자의 internal fragment를 삽입한 뒤 transconjugation시킨 재조합 plasmid pSL158의 제조 방법과 그 disruption 과정을 그림 20에 나타내었다. 획득한 *metB*-disrupted mutant를 HL345로 명명하였고 Southern hybridization을 통해 disruption 여부를 확인하였다. Southern hybridization에 사용된 DNA probe는 pSL158 제조에 사용된 0.5 kb *Pst*I-*Xho*I fragment를 이용하였다. *C. glutamicum* ASO19E12와 HL345의 chromosomal DNA를 제한효소 *Pst*I과 *Xho*I으로 double digestion한 뒤, 전기영동 후 Southern hybridization을 실시하였다. 야생형인 *C. glutamicum* ASO19E12인 경우에는 *metB* 유전자의 internal 부위인 0.5 kb fragment가 나타난 반면, *metB*-disrupted mutant인 HL345는 pSL158의 integration에 의해 0.5 kb와 3.1 kb 두 가지 fragment가 나타남을 확인하였다.

	1	10	20	30	40	50	60
C. glutamicum	MSFDPNT--QGFS---T-ASIHAGYEPDDYGSINTPIYASTTFAQNAPNELRKGVEYTR						
M. tuberculosis	MSEDR-TGHQGISGPATRA-IHAGYRPPDPATGAVNVPIYASSTFAQDGVGGLRGGFEYAR						
	61	70	80	90	100	110	120
C. glutamicum	VGNPTIIVALEQTVAALE-GAKYGRAFSSGMAATDI-LFRIILKPGDHIVLGNDAYGGTYR						
M. tuberculosis	TGNPTRAALEASLAAVEEGAFRA-RAFSSGMAATDCAL-RAMLRPGDHVVIPDDAYGGTFR						
	121	130	140	150	160	170	180
C. glutamicum	LIDTVFTAWGVEYTVV---DTSVVEEVKAAIKDNTKLIWVETPTNPALGITDIEAVAKLT						
M. tuberculosis	LIDKVFTRWDVQYTPVRLADLDAVG---AAITPRTRLIWVETPTNPLLSIADITAI AEL-						
	181	190	200	210	220	230	240
C. glutamicum	EGTN--AK-LVVDNTFASPYLQQPLKLGAAHVLHSTTKYIGGHSVVGG-LVVTNDQEMD						
M. tuberculosis	-GTRSAKVLV-DNTFASPALQQPLRLGADVVLHSTTKYIGGHSVVGGALV-TNDEELD						
	241	250	260	270	280	290	300
C. glutamicum	EELLFMQGGIG--PIPSVFDAYLTARGLKTLAV-RMDRHCDNAEKIAEFL-DSRPEVSTV						
M. tuberculosis	EEFAFLQNGAGAVPGP--FDAYLTMRGLKTL-VLRMQRHSENACAVA EFLADH-PSVSSV						
	301	310	320	330	340	350	360
C. glutamicum	LYPGLKNHPGHEVA AKQMKR-FGGMISVRF-AGGEEAAKKFCTSTKL-ICLAESLGGVES						
M. tuberculosis	LYPGLPSHPGHEIAARQM-RGFGGMVSVRM RAGRR-AAQDLCAKTRVFI-LAESLGGVES						
	361	370	380	390	400		
C. glutamicum	LLEHP-ATMTHQSAAGSQLEVPRDLVRISIGIEDIEDLLADVEQALNNL						
M. tuberculosis	LIEHPSA-MTHASTAGSQLEV PDDLVRLSVGI EDIADLLGDLEQALG..						

그림 18. *C. glutamicum* AS09E12의 *metB* 염기서열로부터 유추된 아미노산 서열과 *Mycobacterium tuberculosis*의 *metB* 유전자 산물과의 비교.

두 개의 점으로 표시된 부분은 동일한 아미노산을 의미함.

```

          10          20          30          40          50          60
C. glu  -----MSFD-PNTQGFS---TASIHAGVEPDDYVGSINTPIYASTTFAQNAPNELRKGY
M. tub  -----MSEDRTGHGQISGPATRAIHAGYRDPATGAVNVPIYASSTFAQDGVGGLRGGF
H. pyl  -----MRMQ---TKLIHGGISEDATTGAVSVPIYGTSTYRQDAIGR-HKGY
H. inf  MRSIFSLFLEDVMTQQYA-IDTLAQAGNRSDERTGAVSAPIFLSTAYGHCGIGE-STGF
E. col  -----MTRKQA---TIAVRSGLNDDEQYGCVPPIHLSSTYNFTGFNE-PRAH
          *   :.*   *   *   :   **   : : :
          70          80          90          100         110         120
C. glu  EYTRVGNPTIVALEQTVAALEGAKYGRAFSSGMAATDILFRIILKPGDHIVLGNDAYGGT
M. tub  EYARTGNPTRAALASLAAVEEGAFARAFSSGMAATDCALRAMLRPGDHVVPDDAYGGT
H. pyl  EYSRSGNPTRFALEELIADLEGGVKGFAFASGLAGIHAVF-SLLQSGDHVLLGDDVYGGT
H. inf  DYTRTKNPTRTVLEETIAKLENGDRGF AFSSGMAAIQVLM-TLFTAPDEWIVSSDVYGGT
E. col  DYSRRGNPTRDVVQRALAELEGGAGAVLNTNGMSA IHLVTTVFLKPGDLLVAPHCYGGG
          : * * * : : * * : : * * : : * * : : * * * :
          130         140         150         160         170         180
C. glu  YRLIDTVFTAWG-VEYTVVDTSVVEEVKAAIKDNTKLIWVETPTNPALGITDIEAVAKLT
M. tub  FRLIDKVFTRWD-VQYTPVRLADLDVAGAAITPRTRLIWVETPTNPLLSIADITAI AELG
H. pyl  FRLFNQVLVKNG-LSCTIIDTSDISQIKKAIKPNTKALVLETSPNPLLKITDLAQCASVA
H. inf  YRLLDFSYKNNNSVKPVYVNTASASAI EAAINPNTKAIF IETPSNPLMEECDVVEIAKLA
E. col  YRLFDSLAKRGC-YRVLFDQGDQEQALRAALAEKPKLVLVESPSNPLLRVVDIAKICHLA
          : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
          190         200         210         220         230         240
C. glu  EGTNAKLVVDNTFASPYLQQPLKLGAAHVLHSTTKYIGGHSDDVVGGLVVTNDQEMDEELL
M. tub  TDRSAKVLVDNTFASPALQQPLRLGADVVLHSTTKYIGGHSDDVVGGLVVTNDDEELDEEFA
H. pyl  KDHGLLTIVDNTFATPYQNPPLLGADIVAHSGTKYLGGHSDDVAVGLVTTNNEALAQEIA
H. inf  KKHNLMLIVDNTFLTPVLSRPLDLGADVVIHSGTKYIAGHNDALVGLIVAKGQELCDRIA
E. col  REVGAVSVVDNTFLSPALQNPLALGADLVLHSC TKYLNHSDVAVAGVVIKDPDVVTELA
          : * * * * : * * * * * * * * * * * * * * : : : :
          250         260         270         280         290         300
C. glu  FMQGGIGPIPSVFDAYLTA RGLKTLAVRMDRHCDAEKIAEFLDSRPEVSTVLYPGLKNH
M. tub  FLQNGAGAVPGPFDAYLTM RGLKTLVLRMRHSENA CAVAEFLADHPSVSSVLYPGLPSH
H. pyl  FFOQNAIGGVLGPQDSWLLQRGIKTLGLRMEAHQKNALCAEFLKHPKVERVYYPGLPTH
H. inf  YIQNGAGAVLSPFDSWLTIRGMKTLSLRMKRHQENAAQIAEFLKAQPQVESVLYP----N
E. col  WWANNIGVTGGAFD SYLLLRGLRTLVP RMELAQRNAQAI VKYLQTQPLVKKLYHPSLPEN
          : * * * * * * * * * * * * * * : : * * * * : : * * : :
          310         320         330         340         350         360
C. glu  PGHEVAAKQMKRFGGMISVRFAGGEEAAKKFCTSTKLI CLAESLGGVESLLEHPATMTHQ
M. tub  PGHEIAARQMRGFGMVSRMRAGRRAAQDLCAKTRVFI LAESLGGVESLIEHPSAMTHA
H. pyl  PNYELAKQMRGFSMLSFTLKN DSEAVA-FVESLKLFI LGESLGGVESLVGIPAFMTHA
H. inf  K-----GGMLSFRLQDEAWNT-FLKSIKLITFAESLGGTESFITYPATQTHM
E. col  QGHEIAARQQKGF GAML SFELDGDEQTLRRFLGGLSLFTLAESLGGVESLISHAATMTHA
          : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : : * * : :
          370         380         390         400
C. glu  SAAGSQLE---VPRDLVRISIGIEDIEDLLADVEQALNNL---
M. tub  STAGSQLE---VPDDLVRLSVGI EDIADLLGDLEQALG----
H. pyl  CIPKTQREAAGIRDGLVRLSVGIEHEQD LLEDLEQAFKIG--
H. inf  DIPESERVARGITNLLRFSVGI EDVEDIKADLLQAFANLK--
E. col  GMAPEARAAAGISETLLRISTGIEDGEDLIADLENGFRAANKG
          : * * * * * * * * * * * * * * : : * * : :

```

그림 19. *C. glutamicum* CGS와 *M. tuberculosis*, *E. coli*, *H. influenzae*, *H. pylori*의 CGS와의 multiple sequence alignment.

Perfect matches, *
 High similarity, :
 Low similarity, .

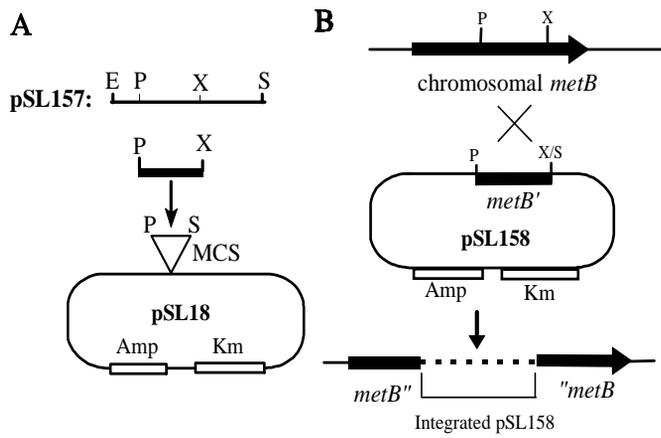


그림 20. *metB* 유전자 disruption 과정

A, Disruption 용 재조합 plasmid 제조 과정.

B, *C. glutamicum* ASO19E12 내에서의 disruption mechanism

제 2 절 발현 system 구축 및 발현

1. E. coli 발현 vector의 구축 및 발현

hemA gene을 *E.coli* 균주에서 발현시키기 위하여 expression vector인 pET23a vector에 cloning을 실시하였다. pET 계열의 발현 vector는 T7 RNA polymerase 유전자 (λ DE3 lysogen)를 함유한 host에 transformation을 시키면 target 유전자를 발현을 시키는데 T7 RNA polymerase가 *lac* promoter에 의하여 그 발현이 조절이 되므로 궁극적으로 IPTG에 의하여 target 유전자의 발현이 조절될 수 있다(그림 21, 22).

본 실험에서 DNA 조작을 이용하여 pET23a expression vector에 cloning한 ALA synthase를 *E. coli*에 형질전환을 시켜 고농도의 ALA 생성을 위한 발효 조건을 조사하였다. ALA 생성을 위해 사용된 *E. coli*균주는 T7 RNA Polymerase를 생성하는 균주인 BL21DE3를 사용하였다. cloning 된 DNA를 균주에 형질전환시킨 결과, IPTG의 첨가 없이도 배양액이 붉게 변하고, 많은 양의 ALA가 축적되는 것이 관찰되었다. 이것은 균의 T7 RNA Polymerase의 생성이 많은 것으로 생각된다. 따라서 본 실험은 IPTG의 첨가 없이 ALA를 생성하는 방향으로 실험을 진행하였다. 최적 ALA의 합성을 위한 발효 조건의 접근 방식은 *E. coli*를 이용한 발효 조건이 보고가 되어있지 않으므로 기존 발표된 *Rhodobacter sphaeroides*의 발효 조건을 기준으로 하여 실험을 실시하였다.

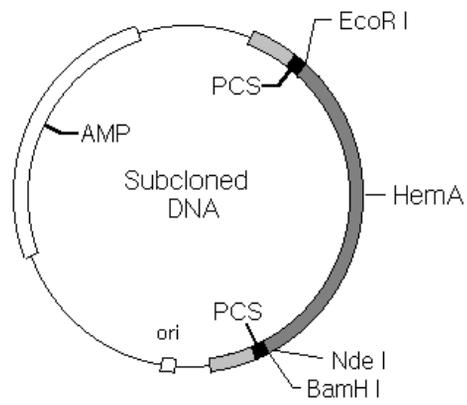


그림 21. Map of subcloned DNA

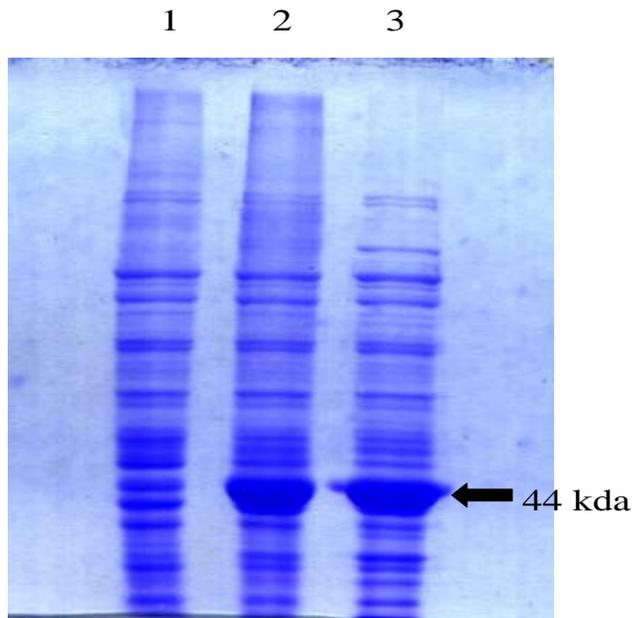


그림 22. pET 발현 system a) 및 이에 의하여 생산된 ALA synthase b)

a) Subcloned DNA (pUC 18 + *hemA* gene) PCS : polycloning site,
AMP : Ampicillin resistance gene

b) IPTG의 induction이 되지않은 균주에서도 (lane 2) T7 promoter의
leaky expression에 의하여 ALA synthase가 발현이 되었다

1 : pET23a,

2 : pET 3a + *hemA* gene,

3 : pET23a + *hemA* gene (IPTG dinduction)

2. ALAD 변이주 선별과 ALAS의 E. coli. chromosome integration을 통한 발현

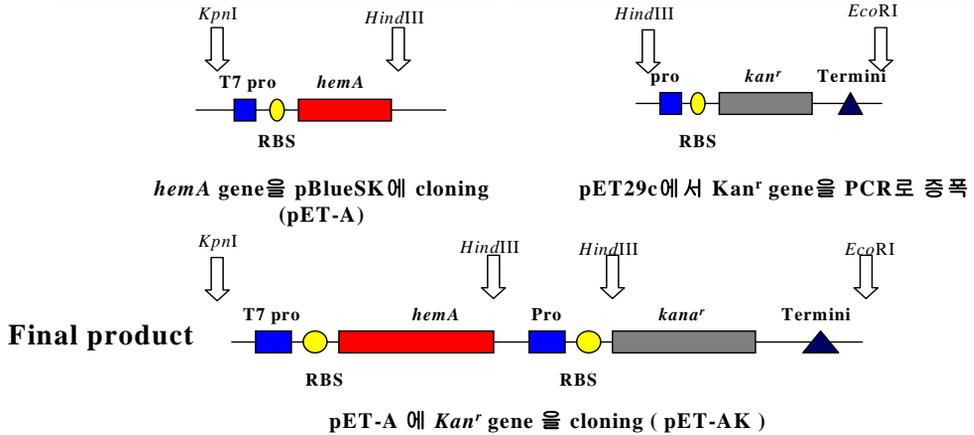
*E. coli*에서 ALAD (5-aminolevulinic acid dehydratase) 활성이 저하된 mutant를 screening 하기 위하여 gentamicin을 이용한 mutation method를 사용하였다. Gentamicin은 여러 미생물에서 heme biosynthesis pathway에 mutation을 유도하여 respiratory deficiency를 유도하며, 특히 mutation에 hot-spot인 *hemB* gene에 90%이상 유도된다고 보고되었다. 따라서, ALAD mutant screening을 위하여 gentamicin을 첨가한 TSA(tryptic soy agar) 배지에 균을 plating 하여 mutation을 유도하여 실험을 행하였다.

Restriction mapping 및 sequencing을 통한 분석결과 선별된 ALAD 변이주들은 ALAD 외에도 광범위한 deletion으로 인하여 균의 성장 속도가 wild type transformed 균에 비하여 3-4배 이상 길어지므로 결과적으로 기존 개발된 wild type transformed 균주에 비하여 생산성이 낮아지는 것으로 판명이 되었다. 그러므로 Gene disruption에 의한 ALAD mutation 및 ALAS가 chromosome에 integration된 균주의 개발을 시도하였다. 이를 위하여 아래와 같은 cloning 과정을 통하여 ALAD mutant-chromosomally ALAS integrated strain의 개발을 하였다.

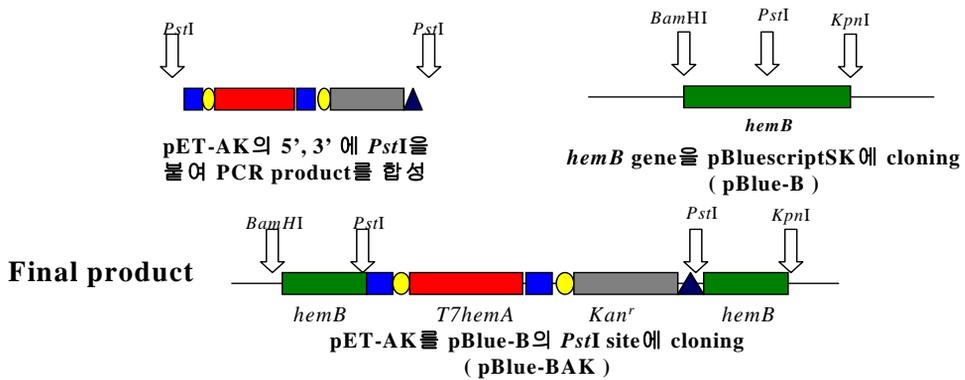
ALAD mutant-chromosomally ALAS integrated strain의 개발을 위하여 PJQ200mp18 vector에 T7 promoter, *hemA*, *hemB*, *Kan^r* gene cloning을 통한 안정한 균주의 개발을 시도하였다. *E.coli* BL21DE3의 *hemB* gene을 insertional inactivation하고 *hemA* gene을 발현시켜 ALA 생성증가 및 ALA 생성 후 heme으로의 전환을 막기 위하여 T7 promoter, *hemA* gene을 *hemB* gene 중간에 cloning 하여 integrational vector인 pJQ200mp18에 cloning하였다. 또한 integration marker인 *Kan^r* gene을 사이에 첨가하였다(그림 23).

Integration에 의하여 개발된 strain은(pJQ-BAK), wild type transformed

Step 1. *hemA* gene과 kanamycin^r gene을 pBluescriptSK vector에 cloning



Step 2. pET-AK를 *hemB* 에 insertion



Step 3. pBlue-BAK을 integration vector pJQ200mp18 에 cloning

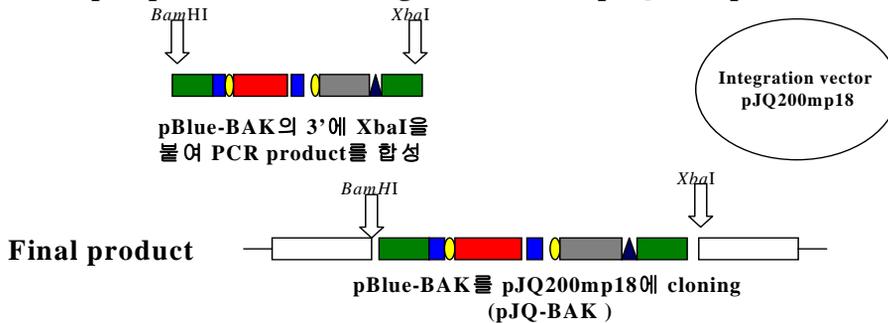


그림 23. ALAD mutant chromosomally ALAS integrated strain의 method

균주 (pET-ALAS)와 유사한 생육이 관찰되었다. 그러나 chromosome integration으로 인하여 유전자의 copy number가 pET-ALAS에 비하여 낮으므로 동일 조건에서 약 50% 수준의 발현을 (ALA의 생산) 관찰 할 수 있었다.

3. 발효조건에 따른 ALA 생산량 확인

Transformed 된 *E. coli*에서의 *hemA* 유전자의 안전성을 조사하기 위하여 계대배양을 실시한 후 안정적으로 ALA의 발현이 지속되는가를 검토하였다. 실험결과 transformed된 *E. coli*에서 *hemA* 유전자는 안정적으로 유지가 되는 반면 과도한 ALA의 생산으로 인한 자발적 변이로 ALA의 생산이 감소되는 현상을 발견하였다. 이러한 결과는 이미 본 연구 계획시 예측이 되었는데 추후 연구 계획에 의거 ALA dehydratase의 변이 균주의 선별 및 이를 이용한 발현으로 개선이 될 수 있다. 그럼에도 불구하고 *E. coli* srarin BL21에서는 다른 strain에 비하여 비교적 안정적으로 ALA의 생산이 유지되는 것으로 관측이 되었다.

Recombinant *E. coli*에 의해 생성된 ALA 양을 측정하기 위하여 Mauzerall, D 등의 방법에 준하여 배양 여과액 10 μ l에 1 M Sodium - acetate buffer (pH 4.7) 0.5 ml, D.W 0.5 ml, acetyl acetone 50 μ l를 첨가한 후, 10 분간 가열하고, 실온에서 냉각하여 형성된 2-methyl-3-acetyl-5-propionic acid pyrrole 량을 Modified Ehrlich Reagent (p-dimethylamino benzaldehyde 1 g, Glacial acetic acid 30 ml, 70% Perchlonic acid 8 ml and Acetic acid 12 ml) 3 ml을 가하여 15 분간 실온에서 방치 후 착색된 화합물 양을 555 nm에서 측정함 다음 ALA standard curve (그림 24)로부터 ALA를 환산하여 정량 하였다. 또한 농도가 2.5 g / L를 초과하였을 경우, 배양액을 1/2 배로 희석하여 반응하여 정량 하였다.

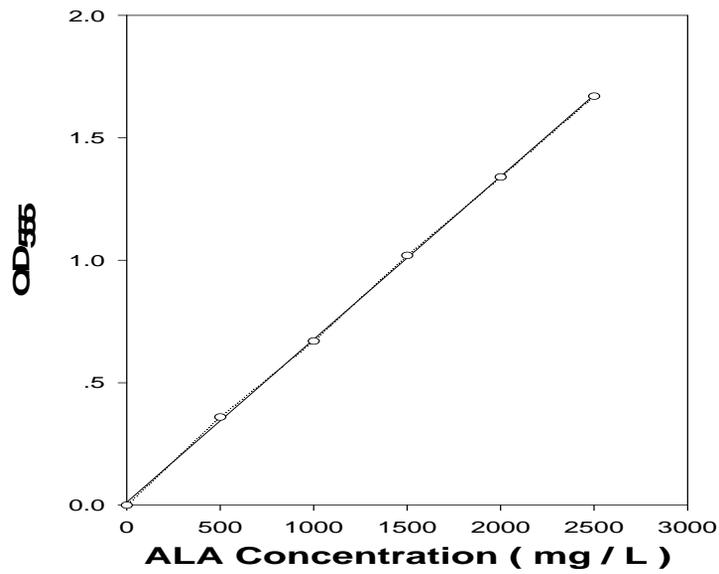
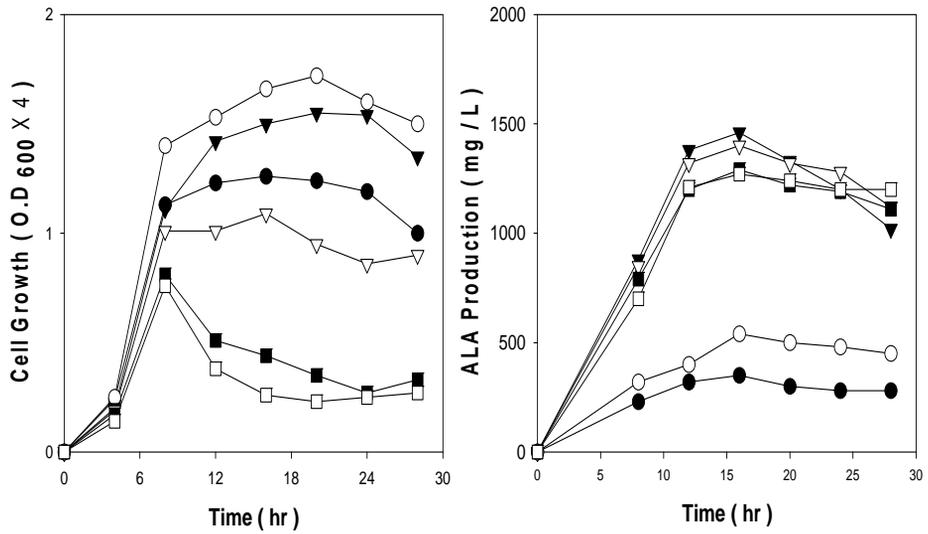


그림 24. The standard curve of ALA Concentration by using colormetric method

가. Glycine과 Succinic acid의 첨가 효과

C₄ (Shemin) 계에 의한 δ -Aminolevulinic acid 생성에 있어 전구물질인 Glycine과 Succinic acid의 첨가 배양이 *hemA* gene을 넣어준 *E. coli*의 생육과 ALA 생성에 미치는 영향을 조사하였다. *E. coli*는 C₅ 계에 의하여 ALA가 생성이 되므로 glutamate 를 그 전구물질로 사용을 하지만 non - transformed *E. coli*를 이용한 기초 실험을 실시한 결과 ALA의 합성에 미치는 영향이 적으므로 glycine과 succinate에 의한 *hemA* 유전자가 ALA 합성에 미치는 영향을 중점적으로 관찰을 하였다.

Glycine은 고 농도에서는 미생물의 생육저해 물질로 보고되어 있으며, 이는 그림 25에서 보이는 것과 같이 *E.coli* 에서도 30 mM 이상의 Glycine을 첨가하였을 경우, Glycine의 농도가 증가 될수록 균의 성장이 크게 억제됨을 보였다. 또한, Succinic acid를 첨가한 배양과 첨가하지 않은 배양을 비교하여 본 결과, 최대 생육점이 Succinic acid를 첨가한 배양에서 증가되는 것을 관찰하였다. 이것은 ALA 생성을 위하여 첨가한 Succinic acid가 균의 생육에 상당히 많은 부분이 소모되기 때문이다. 본 배양 후 ALA 생성량에 있어서는 그림 25에서 보는 것과 같이, 60 mM Succinic acid를 첨가한 경우, Glycine의 무첨가시 보다 Glycine을 30 mM 이상을 첨가하였을 때 약 3 배 (1.5 g / L)의 증가를 보였으며, 30 mM 이상 첨가시 균의 성장은 심하게 억제되었으나 ALA의 생성량에서는 큰 변화는 없었다. 또한, ALA의 생성량은 균의 대수성장기 말기에서 ALA 생성량도 최대를 나타내므로, ALA의 생성은 균의 생육과도 상당히 밀접한 관련이 있다는 것을 알 수 있었다. 그러나, 30 mM이상의 Glycine의 첨가 시, 균의 생육은 상당히 억제되어도 ALA의 생성량이 크게 증가되는 것은 발현된 ALA synthase의 활성이 상당히 크기 때문에 상대적으로 균의 생육은 떨어져도 이미 발현된 ALA synthase에 의해 상당히 많은 양의 ALA가 생성되는 것으로 보인다. 균 배양 후 20 시간이 지난 후부터는 *hemA*과 Bacteriochlorophyll의



60 mM Succinic acid and Glycine were added at the beginning of cultivation.
 Symbols used for Glycine concentration were : ●— LB medium, ○— Glycine 0 mM,
 ▼— Glycine 30 mM, ▽— Glycine 60 mM, ■— Glycine 90 mM, □— Glycine 120 mM.

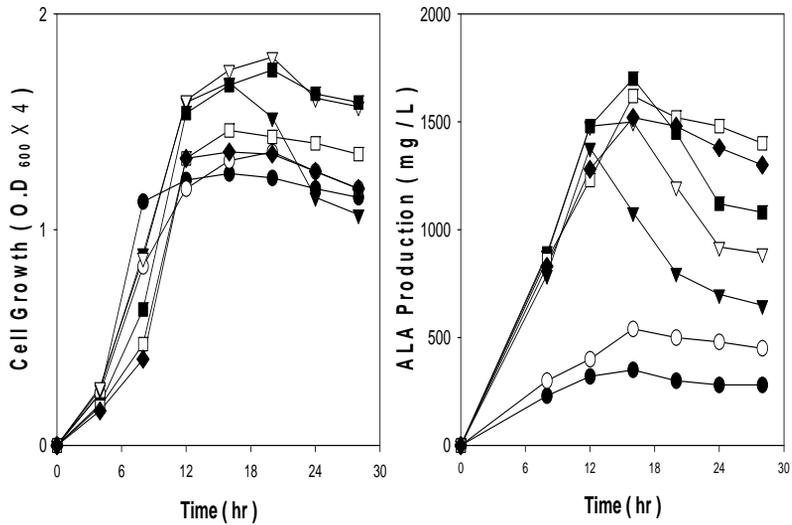
그림 25. Glycine 첨가량에 따른 cell growth 및 ALA 생산량의 변화

생성으로 인해 배양액이 붉게 변하기 시작하였으며, 40 시간이 경과 후에는 배양액이 완전히 붉은 색으로 변화하였다(그림 26).



그림 26. Recombinant *E. coli*의 배양시간에 따른 배지 색의 변화

Succinic acid의 첨가에 의한 효과를 관찰한 결과, Glycine과는 반대로 첨가 농도를 증가 시켰을 경우, 균의 성장이 증가를 보이다가 120 mM 이상에서는 균의 증식이 억제됨이 관찰되었다(그림 27). 균의 최대 성장 시간은 Succinic acid가 30 mM 일 때는 16 시간에서 최대를 나타내었으나 그 이상 첨가하였을 경우에는 20 시간에서 최대 생육점을 나타내었다. 이것은 Succinic acid가 균의 생육에 상당히 많은 부분 사용된다는 것을 다시 한번 나타내는 것이다. ALA 생성량에 있어서는 그림 28에서 보이는 것과 같이, 30 mM Glycine을 첨가한 경우, Succinic acid의 무첨가시 보다 90 mM 첨가시 약 3 배 (1.7 g / L)의 증가량을 보였다. 이것은 위의 Glycine첨가 효과 실험과 거의 같은 결과로서,



30 mM Glycine and Succinic acid were added at the beginning of cultivation.
 Symbols used for Succinic acid concentration were : -●- LB medium, -○- Succinic acid 0 mM,
 -▼- Succinic acid 30 mM, -▽- Succinic acid 60 mM, -■- Succinic acid 90 mM,
 -□- Succinic acid 120 mM, -◆- Succinic acid 150 mM .

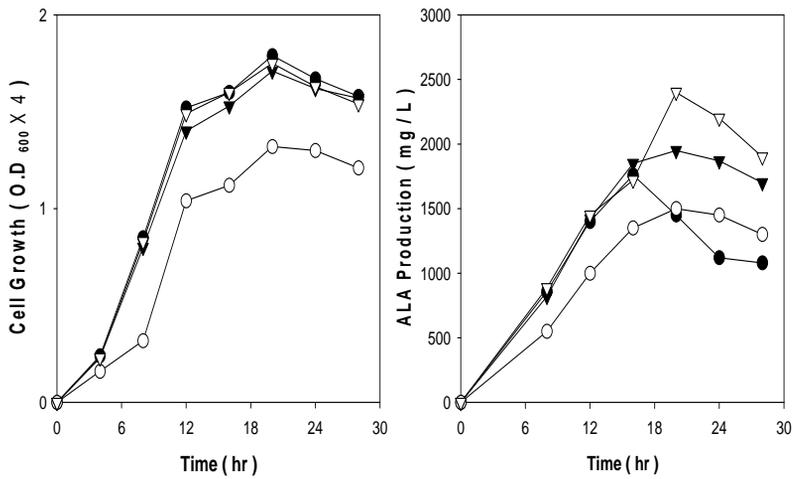
그림 27. Succinate 첨가에 따른 cell growth 및 ALA의 생산량의 변화

Succinic acid나 Glycine 중 한 성분만 없어도 ALA 생성량이 상당히 감소된다는 것을 확인하였다. 배양액 중 남아있는 ALA의 양이 최대 생산 시간 이후 급격히 떨어지는 것은 Succinic acid와 Glycine 등의 ALA 생성을 위한 기질의 고갈로 인해 ALA 생성량이 소비량보다 작아졌거나, 아니면 균의 2 차 대사산물의 생성을 위해 생성된 ALA가 탄소원으로 사용되어져 일어난 현상으로 생각된다. 120 mM 이상의 Succinic acid 첨가시, 균의 생육이 억제되고 ALA 최대 생성량도 떨어지지만, ALA의 양의 감소가 그보다 낮은 농도에서보다는 적게 일어나는 것이 관찰되었다. 이것은 고농도의 substrate에서는 삼투압에 의하여 균의 생육을 억제하므로, 균의 생육에 지장을 주지 않을 정도의 substrate 연속 첨가 배양에 의해서 더욱 ALA 생성량을 증가시킬 수 있는 가능성을 보여 주었다. 한편 IPTG첨가에 의하여 ALA 합성량에는 변화가 없었는데 이는 *lac* promoter leak에 의하여 충분한 ALA synthase가 합성이 되는 것으로 protein gel에 의하여 확인이 되었다.

나. Levulinic acid 첨가 효과

ALA에서 porphyrins를 생성하는 생합성 경로에서 ALA를 porpho-bilinogen 으로 전이시키는 효소인 ALA dehydratase 의 활성을 저해시키는 물질로 알려진 Levulinic acid (LA)를 첨가하여 생성된 ALA의 소비를 억제하고, 축적시키기 위하여 최적 첨가 시기와 적정 첨가 농도를 조사하였다. *Rhodobacter sphaeroides*의 경우, LA의 첨가에 의해 ALA synthase 활성의 증가가 보고되었는데, 이는 ALA dehydratase 의 활성 저하로 인해 tetrapyrrol의 생성이 저해되고, 이것은 tetrapyrrol에 의한 ALA synthase의 feed-back inhibition을 억제하게 된다. 또한, LA의 첨가 효과로는 ALA의 세포 밖으로의 분비를 촉진시키는 것으로도 보고되었다.

균의 생육(그림 28)에 맞추어 배양초기, 대수증식기 중기, 대수증식기

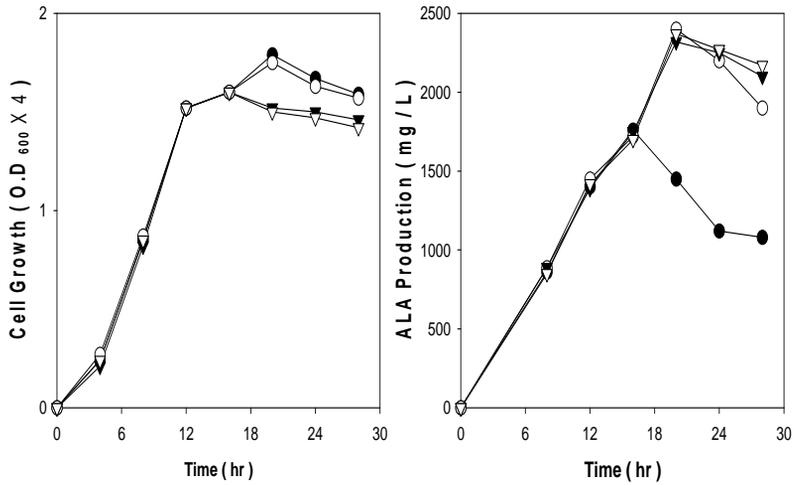


30 mM Glycine and 90 mM Succinic acid were added at the beginning of cultivation.
 Symbols used for addition time were : ● No addition, ○ At the Initial Phase (0 hr) ,
 ▼ At the middle log Phase (8 hr) , ▽ At the late log phase (16 hr) .

그림 28. Levulinic acid 첨가 시간이 cell growth 및 ALA 생산량에 미치는 영향

말기에 각각 30 mM의 LA를 첨가하여 관찰한 결과, 그림 29에서 보이는 것과 같이, 배양초기나 대수 증식기에 LA를 첨가하였을 경우에는 무첨가시와 비교하여 ALA의 축적이 크게 관찰되지 않았고, 대수증식기 말기에 첨가시에 약 0.5 배 (2.4 g / L)의 ALA 축적이 관찰되었다. 특히, 초기에 LA를 첨가하였을 경우에는 균의 생육이 현저히 저해되었으며, 대수 증식기 중기에 첨가 시에는 균의 생육은 조금 떨어졌으나 ALA의 축적에는 큰 효과가 나타나지 않았다. 대수 증식기 중기에 다시 농도를 높여 60 mM, 90 mM 의 LA를 첨가하였으나, 마찬가지로 ALA의 축적량이 크게 증가하지는 않았다. 이는 *Rhodobacter sphaeroides* 등의 다른 ALA 생성균들 보다 빠르게 생육하는 *E. coli*에서는 LA가 성장원으로 사용되어 대수 증식기 중기에 첨가시에는 크게 효과를 보이지 못하는 것으로 생각되어진다. 따라서, 균의 생육이 거의 일어난 대수 증식기 말기에 첨가하였을 때 LA의 효과가 나타난 것으로 생각되어진다.

대수증식기 말기에 0 mM, 30 mM, 60 mM, 90 mM LA를 첨가하여 적정 농도를 조사한 결과, 그림 29에서 보이는 것과 같이, 균의 성장은 30 mM을 첨가하였을 경우, 무첨가시와 비교하여 균의 생육은 거의 영향을 받지 않았으나 그 이상의 농도를 첨가하였을 경우에는 균의 생육이 억제되었다. ALA의 축적량에 있어서는 30 mM, 60 mM, 90 mM 의 LA를 첨가시 무첨가시 보다 약 0.5 배의 증가를 보였으나, 30 mM이상의 농도를 첨가시 30 mM과 축적량의 변화는 거의 없었다.



30 mM Glycine and 90 mM Succinic acid were added at the beginning of cultivation.
 Symbols used for addition time were : ● No addition, ○ Levulinic acid 30 mM,
 ▼ Levulinic acid 60 mM, ▽ Levulinic acid 90 mM .

그림 29. levulinic acid 첨가량이 cell growth 및 ALA 생산에 미치는 영향

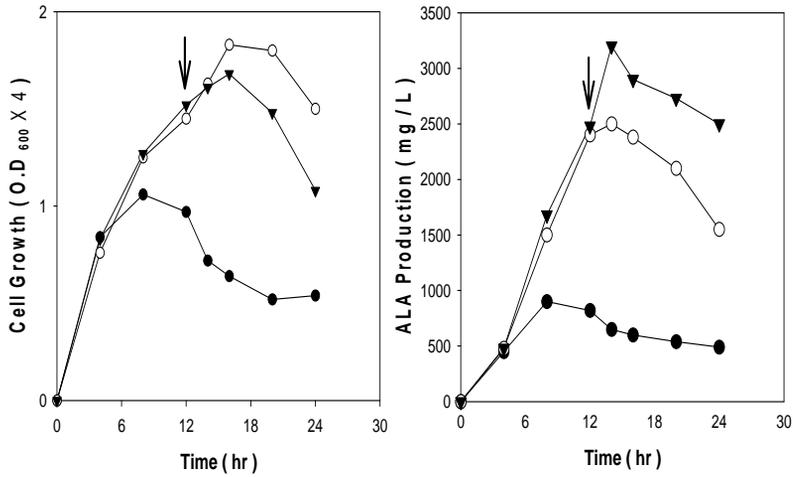
다. Jar Fermentor를 이용한 ALA 생산 조건의 검토, pH에 의한 영향

산업적 생산의 검토를 위해 기본적인 적용 실험인 Jar Fermentor를 이용하여 실험을 행하였다. Substrate 첨가 농도는 위의 flask를 이용한 실험에서 결정된 30 mM Glycine, 90 mM Succinic acid를 첨가하여 배양하였으며, Levulinic acid 첨가 시기, 첨가 농도의 결정도 역시 위의 실험에서 결정된 대수 증식기 말기에 30 mM의 Levulinic acid를 첨가하여 배양하였다.

그림 30에서 관찰된 바와 같이, Jar Fermentor에서 균 배양시, 어떤 이유인지는 아직 밝히지 못 했지만, flask 배양보다도 더 적은 생육과 ALA 생성량 (0.9 g / L)을 보였다. 중성 pH의 유지를 행한 결과, 균의 생육과 ALA 생성량이 현저히 증가되어 pH 유지를 하지 않은 조건과 비교하여 약 2.5 배 (2.5 g / L)의 ALA 생성량을 보였다. 이를 통해 Jar Fermentor 배양 시, pH와 밀접한 문제에 기인하여 pH 조절을 하지 않았을 경우, 균의 생육과 ALA 생성량에 문제를 일으키는 것으로 보인다. 또한, 중성 pH를 유지하며 대수 증식기 말기에 30 mM의 LA를 첨가하여 배양하였을 경우, 균의 생육은 감소하였으나, ALA 생성량은 상당히 증가하여 약 3.2g / L의 생성을 보였다.

라. Mineral, 금속이온 및 cofactor 효과 등 분석

L/B media를 사용하여 mineral 및 cofactor의 농도에 의한 ALA의 생산량에 미치는 영향을 조사하였으나 이들에 의한 ALA의 생산량에서의 변화는 없는 것으로 관찰되었다



30 mM Glycine and 90 mM Succinic acid were added at the beginning of cultivation. 30 mM Levulinic acid was added at the late log phase of the cell growth. Symbols indicated :

- No pH control & No LA supplement, ○ pH control (pH 7.0) & No LA supplement,
- ▼ pH control (pH 7.0) & 30 mM LA supplement (12 hr).

그림 30. Jar fermentor에서 일정 pH (7.0) 유지 및 levulinic의 첨가에 따른 cell growth 및 ALA 생산량의 변화

마. pH의 변화에 따른 생산성 분석

일정 pH 유지에 의한 효과를 관찰한 결과, pH 6.3을 유지하여 배양하였을 경우, LA 첨가 없이 ALA의 생성량이 4.3 g/l까지 증가되었다(그림 31, 32). 이는 1차년도에 pH 7.0 에서의 생산량에 (LA 첨가시 약 3.5g/liter) 비하여 월등히 향상이 되었으며 이 pH에서는 LA에 첨가에 의한 생산량의 증가를 관찰 할 수 없었다. 다시 말해 이 발효 조건에서는 LA첨가가 필요하지 않은 것으로 판명이 되었다. LA는 ALAD의 competitive inhibitor로서 wild type 광합성 균주에서는 이의 첨가로 약 4-5배의 생산량의 증가를 보였으나 *E. coli* 개량균주에 의하여 생산되는 ALA의 생산량이 상대적으로 ALAD의 활성을 훨씬 증가하였기 때문에 competitive inhibitor의 효과가 없는 것으로 해석이 된다. 이러한 pH control에 의한 증가의 이유는 확실히 실험을 통해서 확인되지는 않았으나, ALAS의 optimal pH는 6.5 정도이고, *E. coli*의 ALAD의 optimal pH는 Zn^{2+} 존재 시 8.5이므로, 낮은 pH에 의해서 활성이 저해된 것일 지도 모른다. 그러나, 너무 낮은 pH에서는 ALAS의 활성이 떨어지므로, pH 6.3에서 가장 많은 ALA의 축적이 가능하였다.

바. *hemA* gene을 cloning한 pET23a의 transformant에 plasmid stability

Plasmid stability 측정은 5 ml LB 에 *hemA* transformant를 접종 후, 37 °C, 200 rpm에서 배양하여 O.D₆₀₀ - 0.8 (1/4 dilution)까지 배양하고 50 ml LB 및 50 ml substrate 첨가 LB (succinic acid 90 mM, glycine 30 mM 첨가)에 각각 1 % 전배양균을 접종하여 비교실험을 행하였다. Plasmid stability를 측정하기 위하여 Amp 50 µg/ml 첨가 LB 와 LB에 serial dilution 하여 plating 하고, 18 hr 정치배양 후 colonies를 counting하여 plasmid harboring cell과 non-harboring를 비교하였다.

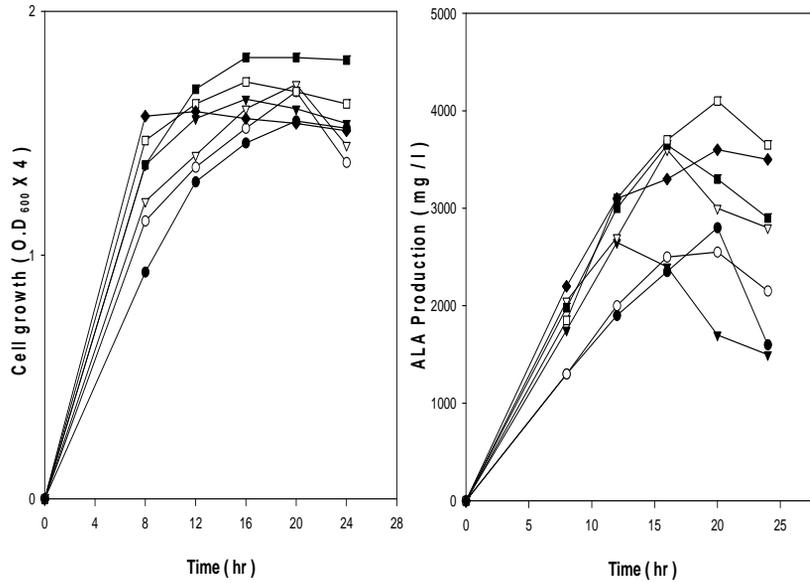


그림 31. Jar fermenter에서 pH 조절에 의한 transformant의 생육 및 ALA production

- pH 7.5 유지, ○ pH 7.1 유지, ▼ pH 6.9 유지,
- ▽ pH 6.7 유지, ■ pH 6.5 유지, □ pH 6.3 유지,
- ◆ pH 6.1 유지.

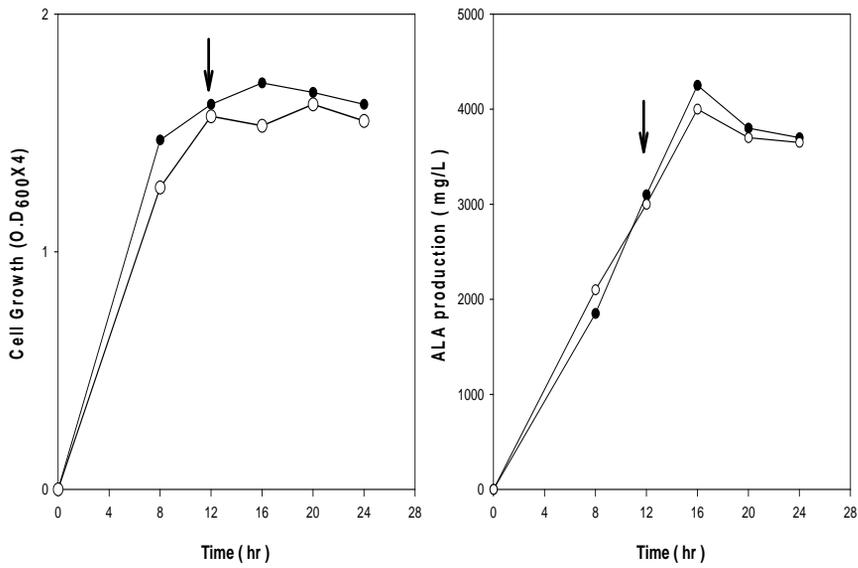


그림 32. Jar fermenter에서 pH 6.3 유지 및 Levulinic acid 첨가에 의한 transformant의 생육 및 ALA production
 ● pH 6.3 유지, ○ pH 6.3 유지 및 Levulinic acid 첨가,
 ↓ Levulinic acid 첨가 시기

LB 배지에서는 cell death나 plasmid harboring cell 수와 non-harboring cell 수의 차이가 크지 않은 반면, substrate LB 배지에서 배양 시에는 cell death 증가와 plasmid loss cell 수가 상당히 차이가 났다. 이 결과를 토대로 유추되는 사실은 ALA의 과생산시 cell death와 plasmid loss가 두드러지게 증가되었다(그림 33, 34).

한편 pET23a transformant를 이용하여 위와 동일한 실험을 행하였다(그림 35, 36). pET23a 의 경우 *hemA* transformant와는 달리 substrate 첨가 LB에서 급격한 cell death가 보이지 않았으며, LB보다 substrate 첨가 LB 시 succinic acid 첨가 때문에 생육이 더욱 좋았다. 위의 실험과 비교시 ALA에 의해 cell의 생육에 상당히 떨어지는 것으로 밝혀졌다.

4. *R. sphaeroides*의 발현

본 연구에서 *Rhodobacter sphaeroides*에서 ALAS를 과 발현을 시키기 위하여, pRK415 vector의 polycloning site에 강력한 promoter인 *rrnB* promoter, RBS (ribosomal RNA binding site) 그리고 *hemA* gene의 첨가가 되었다. 이를 위하여 분리된 *rrnB* promoter를 primer를 이용하여 약 450 bp fragment를 증폭한 후 *PstI*-*BamHI* 으로 digestion을 실시하였다. 이 fragment를 pRK415의 *PstI*-*BamHI* site에 cloning을 하였다. Cloning이 된 pRK-*rrnB*를 다시 *BamHI*-*EcoRI*으로 digestion을 실시한 후 *HemA*의 *BamHI*-*EcoRI* fragment를 cloning을 실시하였다(그림 37, 38).

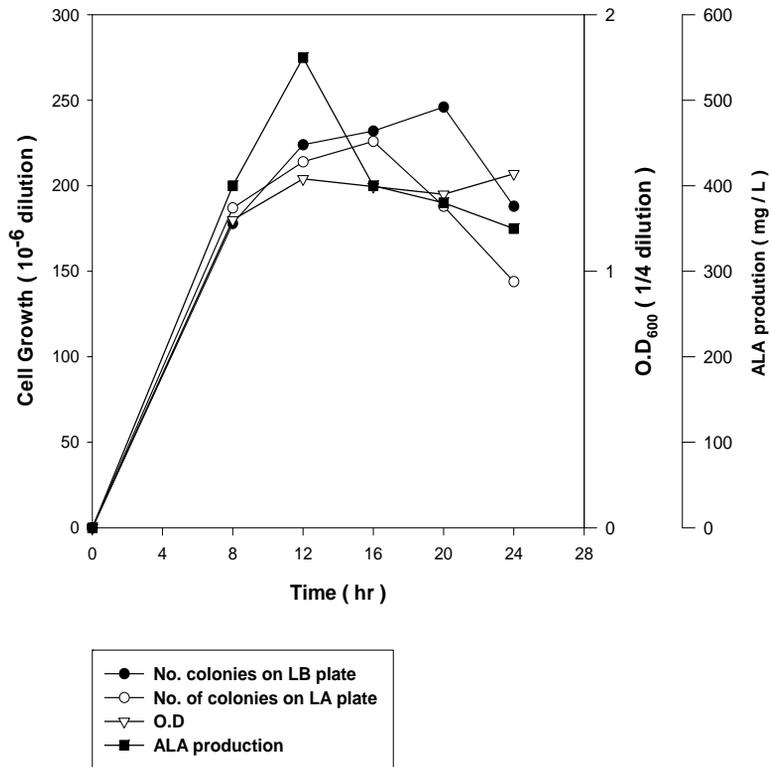


그림 33. Cultivation with LB medium

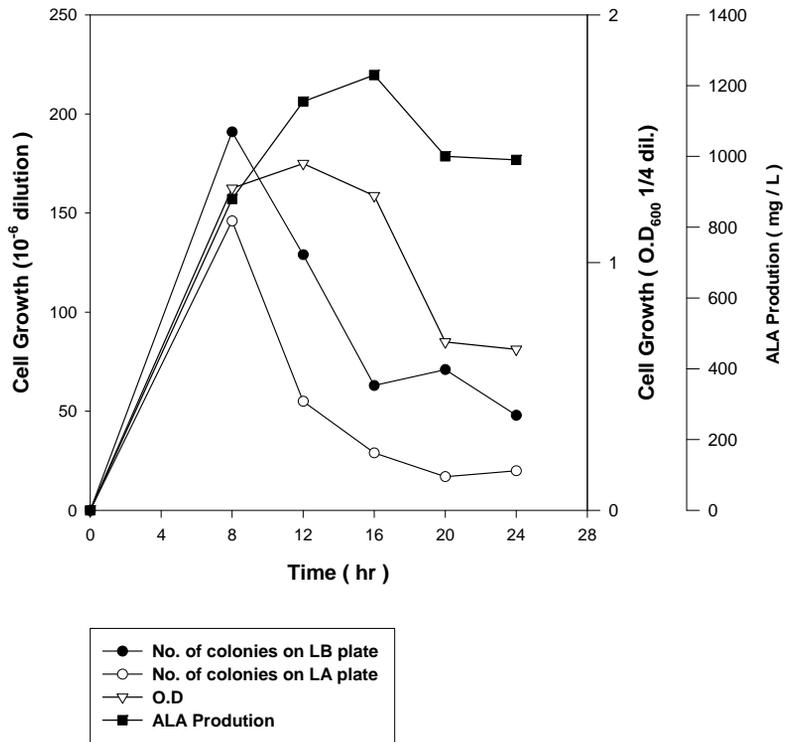


그림 34. Cultivation with substrate LB medium

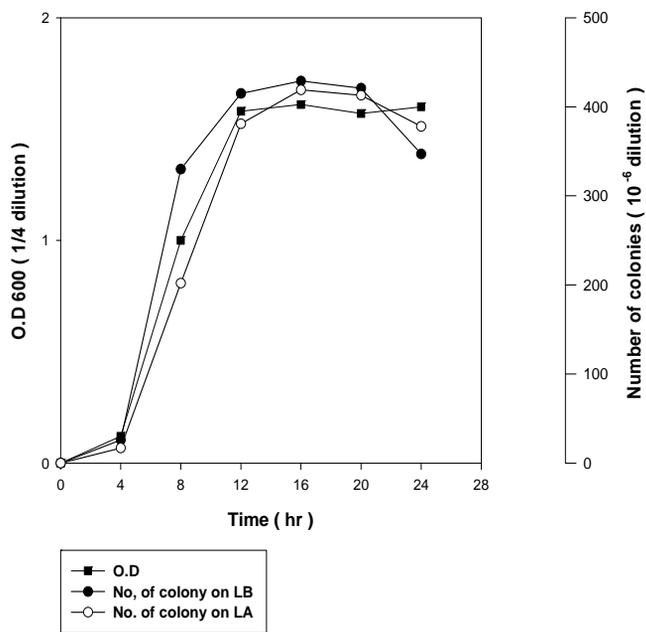


그림 35. Cultivation with substrate supplemented LB using pET23a transformant

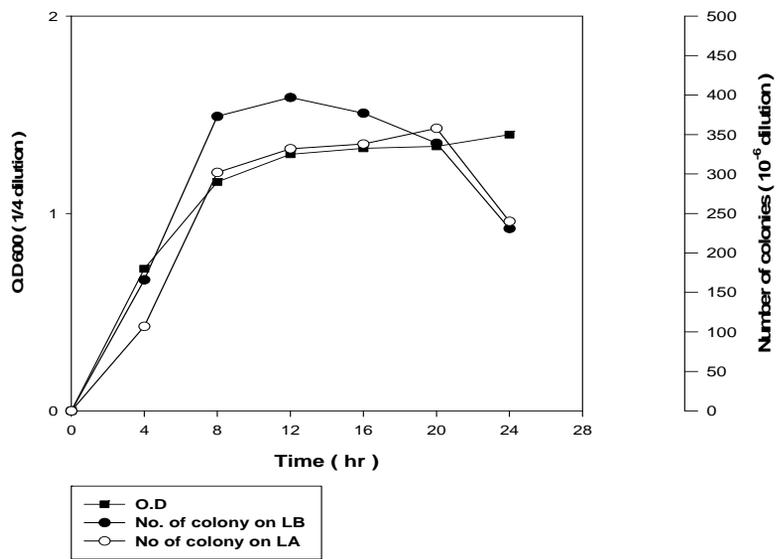


그림 36. Cultivation with LB medium using pET23a transformant



그림 37. pRK 415-*rrnB* vector에 hemA 유전자의 cloning을
*Bam*HI-*Eco*RI digestion에 의한 확인

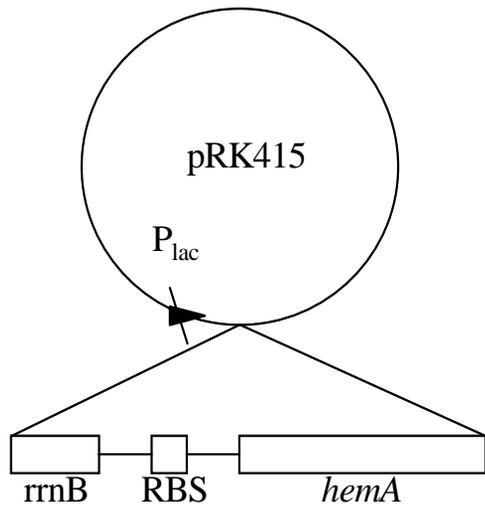


그림 38. *rrnB* promoter를 이용한 *hemA* gene cloning 모식도

Construction이 완료된 발현 vector는 tri-parental mating에 의하여 *R. sphaeroides*에 transformation을 시킨 후 ALA의 생산량을 측정하였다(그림 39). 형질전환 광합성균주로부터 ALA의 최대 생산량은 72시간에서 얻을 수 있었는데 (3g/L) 이는 위에서 개발된 형질전환 *E. coli*의 생산성에 비하여 약 1/6 수준이다. 그러나 wild type 혹은 변이 광합성 균주의 발효시 필수적인 levulinic acid의 첨가 및 광 조건에서의 발효 방법과는 달리 *E. coli* 에서와 마찬가지로 암 조건에서의 발효가 가능하므로 균체의 활용 효과를 감안할 때 이의 유용성이 증가 될 것으로 예측이 된다.

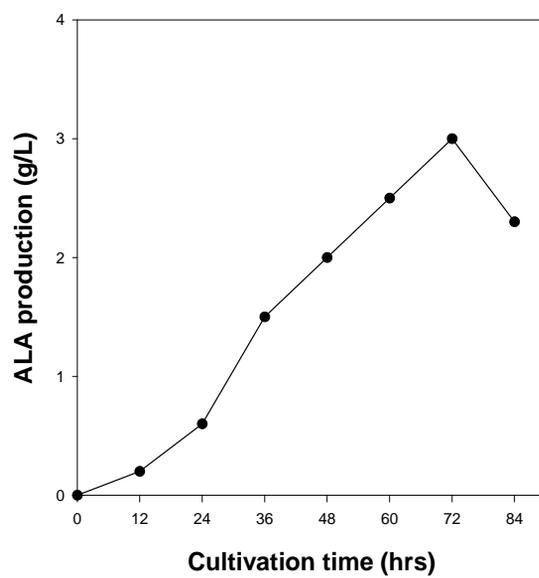


그림 39. Transformation을 시킨 *R. sphaeroides*의 ALA의 생산량

제 4 장 균주의 안정성 및 폐자원으로부터

최적 생산조건의 결정

제 1 절 Plasmid vector 및 용액에서 ALA의

안정성 검토

Transformed 된 *E. coli*에서의 *hemA* 유전자의 안전성을 조사하기 위하여 계대배양을 실시한 후, 안정적으로 ALA의 발현이 지속되는가를 검토하였다(그림 40, 41). 실험결과 transformed된 *E. coli*에서 *hemA* 유전자는 안정적으로 유지가 되는 반면 과도한 ALA의 생산으로 인한 자발적 변이로 ALA의 생산이 감소되는 현상을 발견하였다. 이러한 결과는 이미 본 연구 계획서 예측이 되었는데, 추후 연구계획에 의거 ALA dehydratase의 변이 균주의 선별 및 이를 이용한 발현으로 개선이 될 수 있다. 그럼에도 불구하고 *E. coli* srarin BL21에서는 다른 strain에 비하여 비교적 안정적으로 ALA의 생산이 유지되는 것으로 관측이 되었다.

Jar fermenter에서 pH 변화에 따른 ALA 생산 및 plasmid stability 측정은 50 ml LB에 *hemA* transformant를 접종 후, 37°C, 200 rpm에서 배양하여 O.D₆₀₀ - 0.8 (1/4 dilution)까지 배양하고 1 L substrate 첨가 LB (succinic acid 90 mM, glycine 30 mM 첨가)에 각각 5 % 전배양균을 접종하였다. Jar fermenter의 배양조건은 37 °C, 400 rpm air flow(1 L/min)로 하여 pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0으로 유지하였다. Jar fermenter에서 pH에 의한 효과를 관찰한 결과, pH가 증가될수록 O.D의 차이는 거의 없었으나 생균수는 증가되는

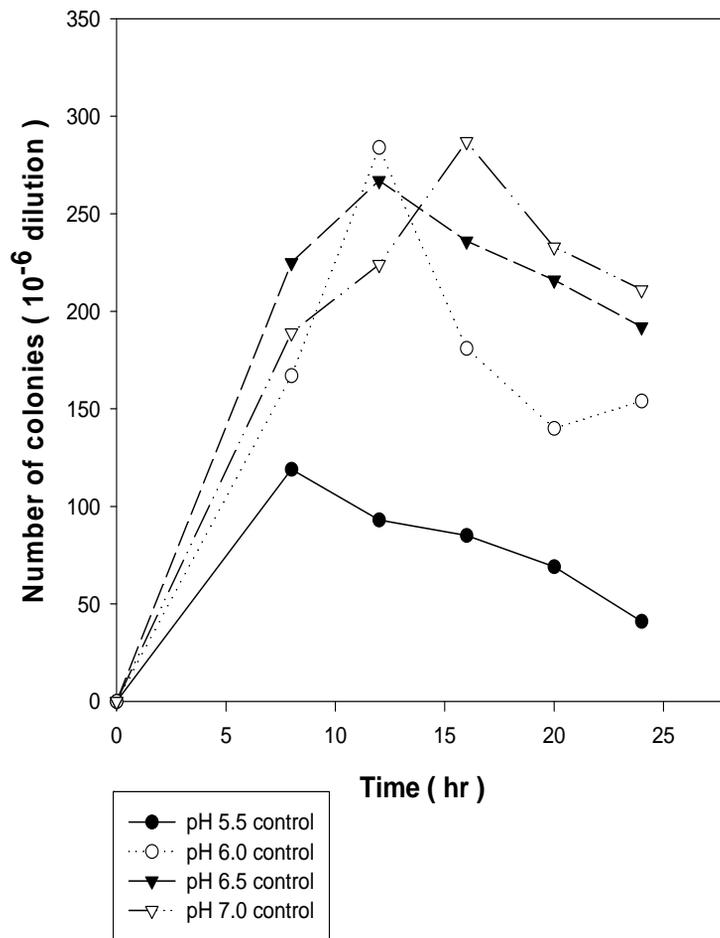


그림 40. Plasmid non-haboring cell의 수

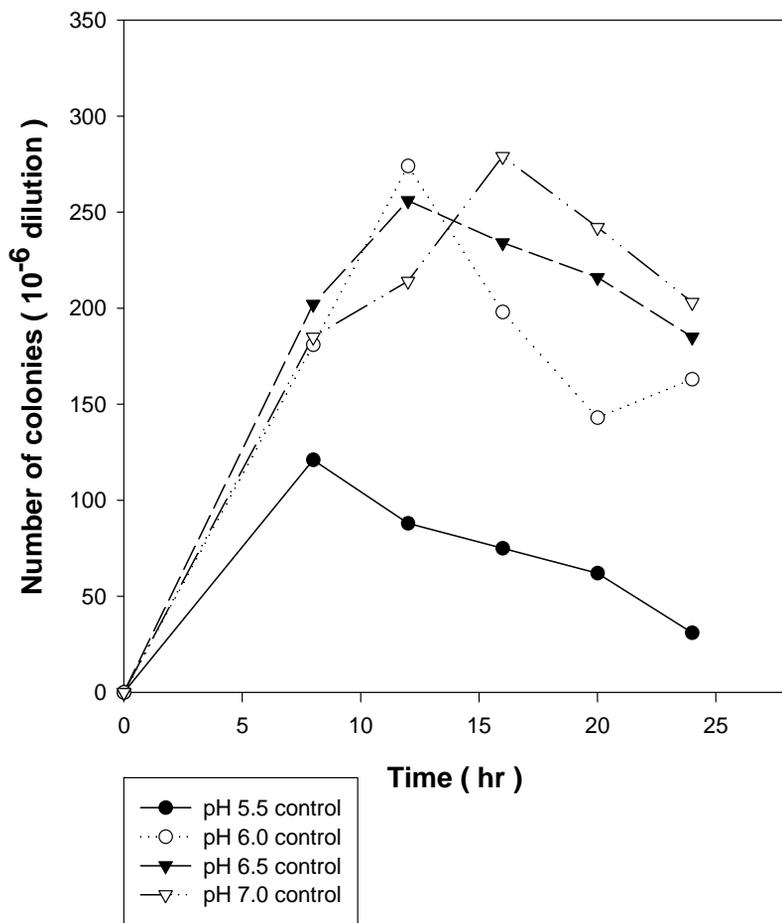


그림 41. Plasmid harboring cell의 수

것을 알 수 있었으며, plasmid stability는 거의 80 % 이상으로 상당히 안정되는 것이 관찰되었다. flask와 비교하여 볼 때 이러한 결과로 plasmid stability는 pH가 높을수록 감소되는 것으로 생각되어진다.

ALA production의 경우 pH가 감소될수록 증가되는 것이 관찰되었는데 특히, pH 5.5에서는 생균수의 감소에도 불구하고 높은 농도 (3.9 g/L)의 생산을 보였다. 이 결과로 ALA stability가 pH에 영향을 받는다는 보고가 있으므로 낮은 pH에서 ALA의 안정성 때문에 높은 농도로 존재하는 것이 아닐까하는 의문점이 야기되었다. 이를 확인하기 위하여 solution 상태에서의 ALA stability를 측정하였다

LB 배지에서 pH에 따른 ALA stability를 측정함으로써 ALA 생산에 적절한 pH를 확인하였다. ALA 0.15 g을 LB 50 ml에 녹이고, NaOH로 pH 5.5, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5로 적정하며 10 ml tube로 옮겼다. 최종 ALA 농도는 3.2 g/L 였으며, contamination 방지를 위하여 amp 200 μ g/ml을 첨가하였다. 이를 배양조건과 비슷하게 반응하기 위하여 37 $^{\circ}$ C incubator에서 200 rpm으로 반응시키면서 시간별로 sampling 하며 ALA 농도를 확인하였다. 실험결과 pH가 증가할수록 ALA의 stability가 감소하였으며, 특히 pH 7.5에서는 24 hr 후 약 40 %의 감소가 관찰되었다. 이를 토대로 분석한 결과, pH가 낮은 조건에서 ALA의 안정성으로 인하여 많은 양의 ALA가 축적되었음을 알 수 있었으며, 균의 생육 및 ALA의 안정성을 고려하였을 경우, pH 6.3이 가장 좋은 조건임을 알 수 있었다 (그림 42).

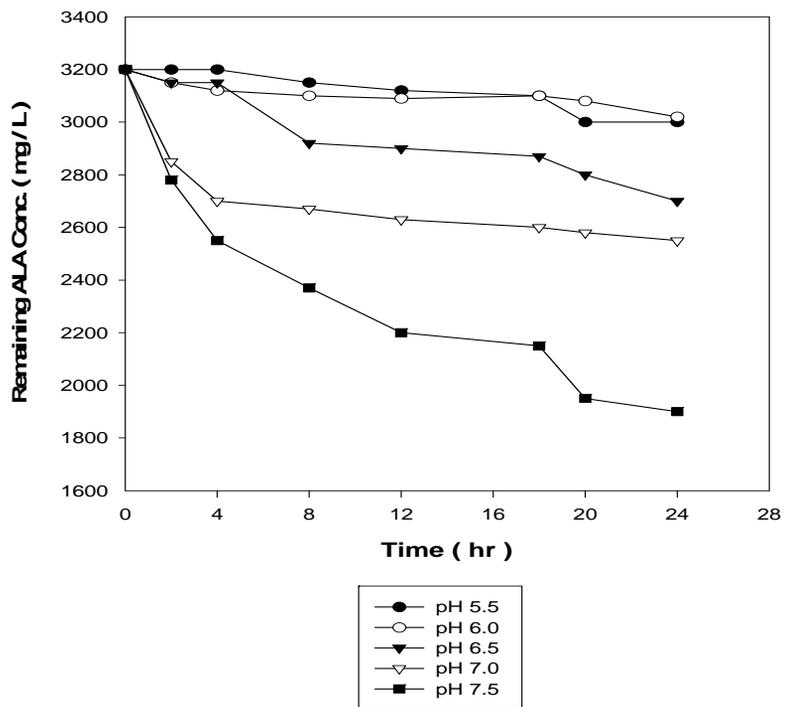


그림 42. ALA stability at LB medium

제 2 절 발효조건에 따른 폐자원을 이용한 균주의 최적 증식조건 결정

1. 오징어 내장 폐수농도에 따른 균의 증식

어폐수에서 균주의 최적 성장조건의 결정 및 succinate, glycine 및 mineral 첨가에 따른 ALA 생산의 변화를 측정하였다. 먼저 동일 조건 (flask배양시 pH 무조정 조건)에서 succinate, glycine 및 mineral을 첨가하지 않았을 경우 wild type *E. coli*는 0 mg, 변이 균주는 300 mg/liter의 ALA 생산을 보인 반면 어폐수(10% w/v)를 사용할 경우 약 600 mg의 합성이 관찰되었다. 또한 변이균주를 이용하여 LB 배양액에 succinate, glycine을 첨가하였을 경우 (flask배양시 pH 무조정 조건) 최대 1800 mg/liter의 ALA가 생산 된 것과 비교하여 볼 때 어폐수 희석액에서 약 30%의 생산량을 보였다. 일반적으로 과량의 glycine 및 succinate를 첨가하였을 때 오히려 ALA 생산량이 감소되는 것을 관찰하였는데, 오징어 증자액 희석액에 기존 확립된 glycine 및 succinate를 첨가하였을 때 이와 같은 현상이 관찰된 것으로 보아서 이의 농도를 기존의 첨가량보다 줄여서 ALA의 측정을 실시하였다.

수분함량이 적은 폐액을 희석하여 균이 성장 가능한지를 확인하는 실험과 폐액 희석배수에 따른 균의 성장에 미치는 영향을 검토하는 실험을 행하였다. 폐액에 대한 증류수의 희석배수는 그램 단위로 계산하였다. 농도는 5%, 10%, 20%, 30%(W/V)에서 검토하였다. 균의 증가율은 16 hr에서 각각 20%, 30%에서는 5%, 23 cfu/ml 의 경우보다 약 1.78 배(41 cfu/ml), 1.65 배(38 cfu/ml) 증가하였으며, 20 hr에서는 5%(48 cfu/ml) 의 경우보다 약 1.41 배(68 cfu/ml), 1.35 배(65 cfu/ml) 의 증가율을 보였다. LB(Luria-berteni) media에서 배양한 recombinant *E. coli* 의 성장곡선을 initial phase, log phase, stationary

phase별로 비교해 보면 initial phase에서는 순수 정제되지 않은 증자액의 경우에는 균이 배지에서 적응하는 시간이 지연되는 경향을 보였으나, LB Media의 경우는 log phase(12-16 hr) 전까지 완만한 성장곡선을 보였다. 균의 적응기(initial phase)와 활발한 균의 증식기(log phase)에서 증자액 배지의 경우 LB media에 비해 4-6 hr 정도로 균의 성장이 지연됨을 보였다(그림 43). 이러한 영향은 폐액 배지의 경우 균주가 사용할 수 있는 glucose나 당당류의 함량이 LB media에 비하여 적은 함량을 보유하고 있다고 추측되며, 슬러지 성분과 지질 성분들로 인해서 균주가 이용할 수 있는 산소요구성이 감소될 수 있다는 추측도 보였다. 이의 결과에서 희석한 폐액 배지에서의 균의 증식이 가능하였으며, 폐액 내에 미생물 성장에 필요한 영양물질로 질소와 인이 풍부하다는 보고가 있으며, 질소는 세포의 protein, enzyme, RNA 및 DNA 등의 합성에 요구되며 인의 경우도 ATP, RNA 및 DNA 등의 합성에 요구된다. 각각의 필요량은 질소의 경우 약 0.11 A정도이고 인은 0.02 A정도이다.

2. Minimal salt media에서 배양한 균의 증식

증류수에 폐액을 희석하여 균의 증가를 검토한 후 희석액을 달리하여 균을 배양하였다. 희석액으로는 균이 성장하는데 growth factor로 작용하는 K_2HPO_4 는 1.55g/l, NaH_2PO_4 0.65 g/l, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ g/l 과 Salt solution 10 ml/l 을 첨가하여 검토하였다. 증류수에 희석한 폐액 배지에서 균의 성장곡선과 비교하여 initial phase에서 완만한 곡선을 보였으며 12 hr 에서는 증류수에 희석한 폐액 20%(21 cfu/ml)에 비해 minimal salt media의 경우는 약 2.5배(53 cfu/ml)의 증가를 보였다. 증류수에 희석한 같은 농도별로 실험을 행하였으며 배양 후 16 hr에서 5%(39 cfu/ml)와 비교하여 20%와 30%는 각각 1.74배 (68 cfu/ml), 약 1.43배 증가하였으며 20 hr에는 5%(47 cfu/ml)에 비해 20%, 30%는

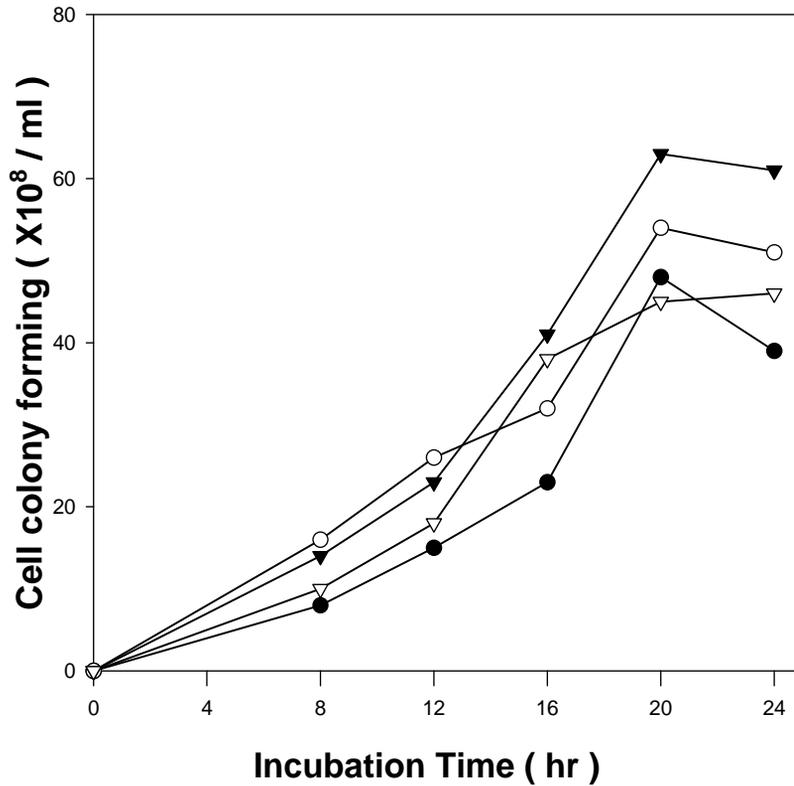


그림 43. Effect of concentrations of squid waste on the cell growth of recombinant *E. coli*.

Squid intestine waste concentrations ;

● squid waste 5%, ○ squid waste 10%,

▼ squid waste 20%, ▽ squid waste 30%

약 1.4배(66 cfu/ml)와 1.1배(52 cfu/ml)의 증가율을 보였으나 큰 영향은 보이지 않았다(그림 44). Growth factor를 다량 함유한 minimal salt media의 경우, 균의 증식에서는 증류수의 약 1.5배 가량의 증가율을 보였으나, salt media에서 ALA 생산의 경우, 균의 증가에 비례해서 ALA 생산은 증가되지 않았다. 배지 내에 ALA dehydrogenase(ALAD)의 activity의 활성을 촉매하는 Mg, Zn, Fe 등의 성분 첨가로 인한 ALA 생산시 급속히 분해되어 Porphobilinogen(PBG)로 가는 mechanism을 빠르게 진행하는 것으로 추정된다.

3. Sluge 유무에 따른 균의 증식

Flask 배양 시 많은 유기물질 또는 무기물질들은 일정한 수준의 농도를 넘게 되면 독성을 띠거나 균의 생육의 저해를 유발하게 된다. 일반적으로 독성이란 매우 상대적인 의미를 내포하고 있으며 그 농도 역시 물질에 따라 몇 분의 일 mg/l에서 수천 mg/l까지 다양하다. 독성물질과 저해물질을 적절히 조절하는 것이 바람직하며 이를 위한 해결방안으로는 크게 네 가지로 분류할 수 있다. 1) 원폐수로부터 독성물질을 제거한다. 2) 독성 한계농도 이하로 희석한다 3) 불용성 화합물을 형성하거나 침전시킨다. 4) 다른 물질을 첨가하여 독성을 상쇄한다. 위의 방법들이 항상 적용되어 질 수 없으므로 한가지 그 이상의 방법을 병행하여 사용함으로써 저해요인을 해결할 수 있으며, 본 실험에서는 2) 와 3)의 방법을 병행하여 실험에 준하였다. 20 % 증류수에 희석한 오징어 내장 폐액을 기준으로 sluge 성분은 원심분리로 제거한 후 실험하였다. 12 hr 배양후 sluge 성분을 제거한 배양액의 경우 sluge가 있는 배양액(21 cfu/ml)보다 약 1.61배 (34 cfu/ml) 증가하였으며, 16 hr 시간 배양 후에는 약 1.41배 (58 cfu/ml)의 증가를 보였다(그림 45).

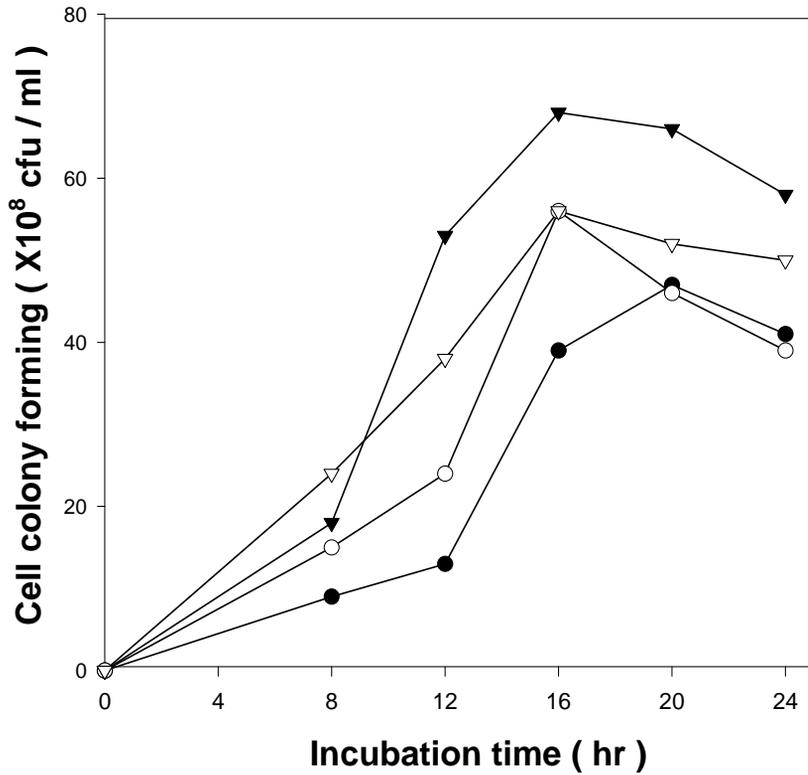


그림 44. Effect of concentrations of squid waste in minimal salt medium on the cell growth of recombinant *E. coli*.

● squid waste 5%, ○ squid waste 10%,

▼ squid waste 20%, ▽ squid waste 30%

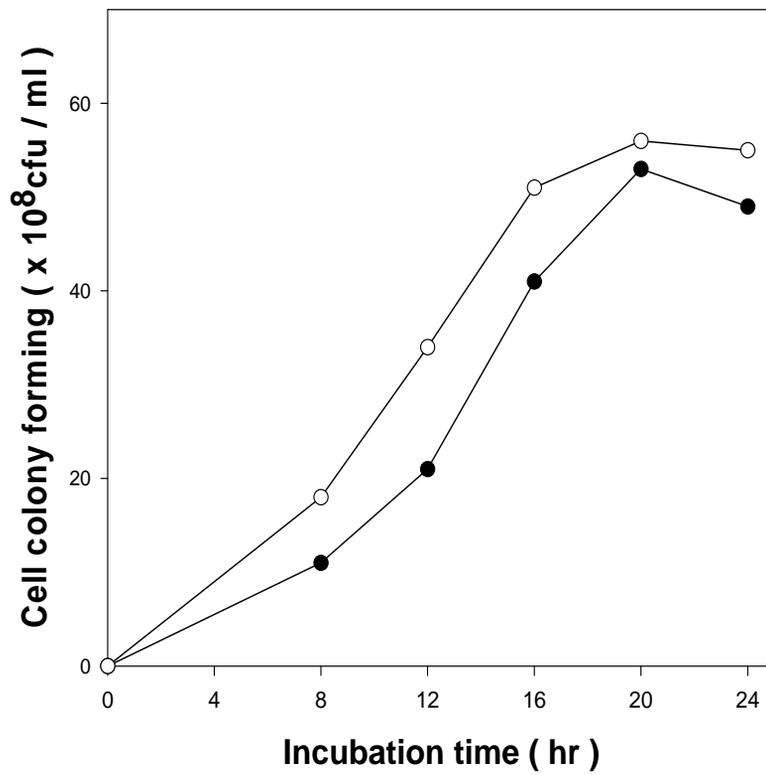


그림 45. Effect of the remove of the sluge from squid waste on the cell growth of recombinant *E. coli*.

● squid intestine wastewater, ○ remove of the sluge

4. 지질층 유무에 따른 균의 증식

원폐수 내에는 고급 지방산(glycerol, ester 와 결합하여 기질로 존재)과 저급 지방산(acetic acid, propionic acid, butyric acid 등 휘발산이라고도 칭한다.)이 고르게 분포되어 있다는 보고된 바가 있다. 지방산 중 고급 지방산은 여러 종류의 세균을 포함하여 메탄 생성균에도 독성을 미치는 것으로 알려져 있다. 그 독성은 고급 지방산이 세포막에 흡착되어 막의 투과성을 변형시키기도 하고 막 중의 단백질의 움직임에 영향을 미치기 때문에 나타나는 현상이라 생각되어진다. 고급 지방산에 의해 독성을 받는 세균은 복잡하게 분포하며 호기성 세균과 혐기성 세균이 함께 포함된다. 독성의 정도는 포화 지방산에 비해 불포화 지방산 쪽이 더 강하다는 보고가 있으며 오징어 내장폐액의 경우 14 %의 지방층을 보유한 상태이므로 본 실험에서는 균의 증식에 저해가 되는 요인으로 지방을 검토하기 위해서 지질을 제거한 폐액 배지로 배양하는 실험을 하였다. Sluge 성분을 제거한 오징어 폐액배지에서 분별 깔때기를 2회 사용하여 지질층을 제거하여 실험하였다. Sluge 성분만을 제거한 배지에서 12 hr, 16 hr 배양 후 균수는 각각 34 cfu/ml 와 50 cfu/ml인 반면 sluge와 lipid 두 성분을 제거한 배지는 52 cfu/ml, 67 cfu/ml 로 약 1.2배의 증가를 보였다. 그림 46에서 보는 바와 같이 LB media와 비교할 때 initial phase 와 log phase도 3-4 hr 정도로 단축되었다.

5. Molasses 첨가에 따른 균의 증식

오징어 내장 폐액 내에는 N source 4.84%로 비교적 풍부하게 있으나, C source는 0.45 % 로 일반적인 세균이 증식 시 0.5-3 %를 필요로 하는 양의 약 4.4배 가량이 부족하였다. 배지의 산업적 목적을 고려하여 부가의 glucose를 첨가 할 수는 없었으므로 폐수 중 당 성분을 함유한 molasses를 첨가하여 그 효과를 검토하여 molasses는 농축된 상태의 고농도 폐수였으므로 첨가량의 정확성을 위해서 희석하여 사용하였으며, 당 성분을 첨가 시 균의 증식율과

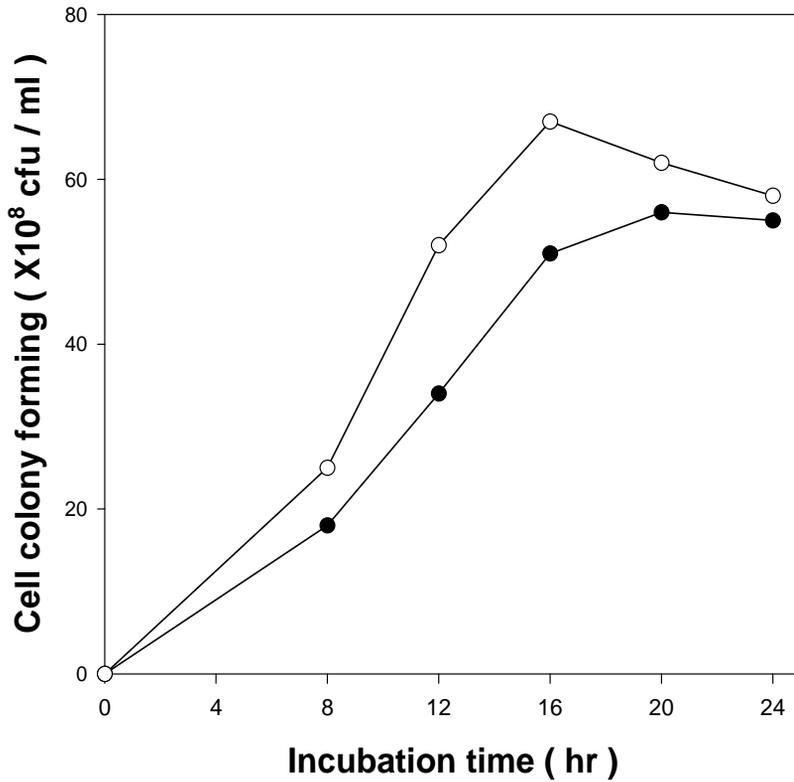


그림 46. Effect of the remove of the sluge and the lipid from squid waste on the cell growth of recombinant *E. coli*.

● Remove of the sluge,

○ Remove of the sluge and the lipids

ALA 생산성의 경우 molasses를 4% 첨가했을 때 약 1.23배(63 cfu/ml)의 증가를 보였다(그림 47). 6%, 8% 첨가 시에는 균의 증식이 차이가 없거나 균의 성장이 지연됨을 볼 수 있었다.

제 3 절 폐자원을 이용한 최적 ALA 생산조건 결정

본 실험에서는 recombinant *E. coli*을 균주로 오징어 내장폐액에서 고농도의 ALA 생성을 위한 조건을 조사하였다. Nutrient media의 투명 색이 아닌 불투명의 흙색에 가까운 폐액배지의 경우 배양시간이 20 hr 경과한 뒤에는 붉은 색으로 변하고 ALA가 축적되는 것을 알 수 있었다. 최적의 ALA 생산을 위한 발효조건은 기존의 발표된 *Bradyrhizobium japonicum hemA* gene을 포함한 recombinant *E. coli*와 *Rhodobacter sphaeroides*의 발효조건을 기준으로 실험하여 ALA 생산성 변화를 검토하였다. ALA 생합성시 *Rhodobacter sphaeroides*는 C₅ 계의 glutamate와 C₄ 계의 glycine, succinic acid를 모두 사용하지만 *E. coli*의 경우 C₅ 계를 사용하여 ALA를 생산하는 영향이 적다는 보고가 있으므로 본 실험에서는 recombinant *E. coli*세균의 C₄(Shemin pathway)계에 의한 ALA 생합성에 있어 전구물질인 glycine과 succinic acid의 첨가 배양이 ALA 생성에 미치는 영향을 검토하였다.

1. Glycine의 첨가 농도에 따른 효과

전처리 과정을 거친 오징어 내장 폐기물의 기본배지에 실험균인 recombinant *E. coli* 배양시 glycine 첨가에 의한 균의 증식과 ALA 생산의 변화를 검토하였다. Glycine은 고 농도에서는 미생물의 생육 저해물질로 보고되어 있으며, 그림 48에서 보는 바와 같이 glycine을 배양초기에 각각 30 mM, 40 mM 첨가했을 때 균의 증식이 억제되며, glycine 50 mM을 첨가 했을 때 균의 증식이 극심하

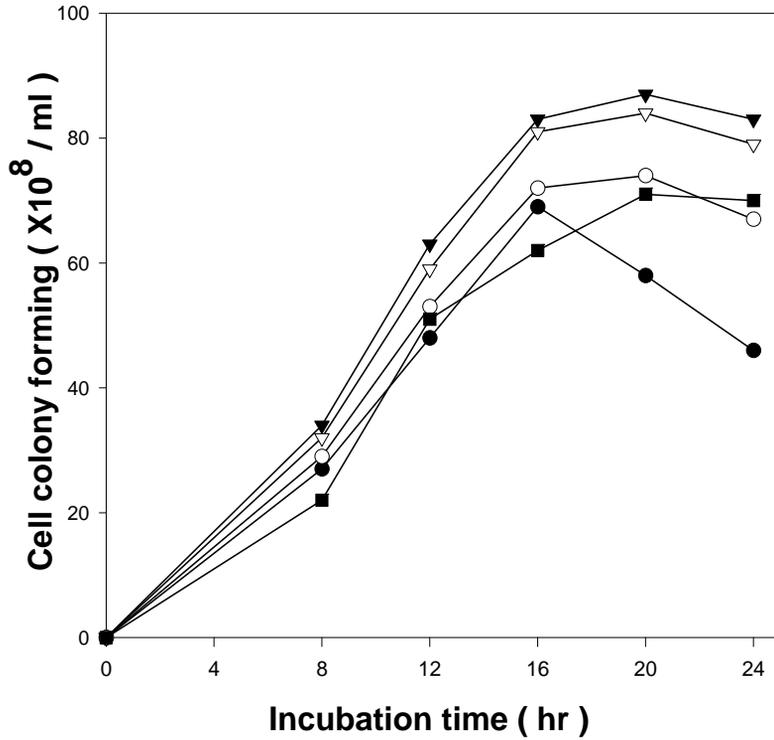


그림 47. Effect of molasses concentrations on the cell growth of recombinant *E. coli*.

Molasses was added at the beginning of culture.

● Control (molasses 0%), ○ molasses 2%,

▼ molasses 4%, ▽ molasses 6%,

■ molasses 8%,

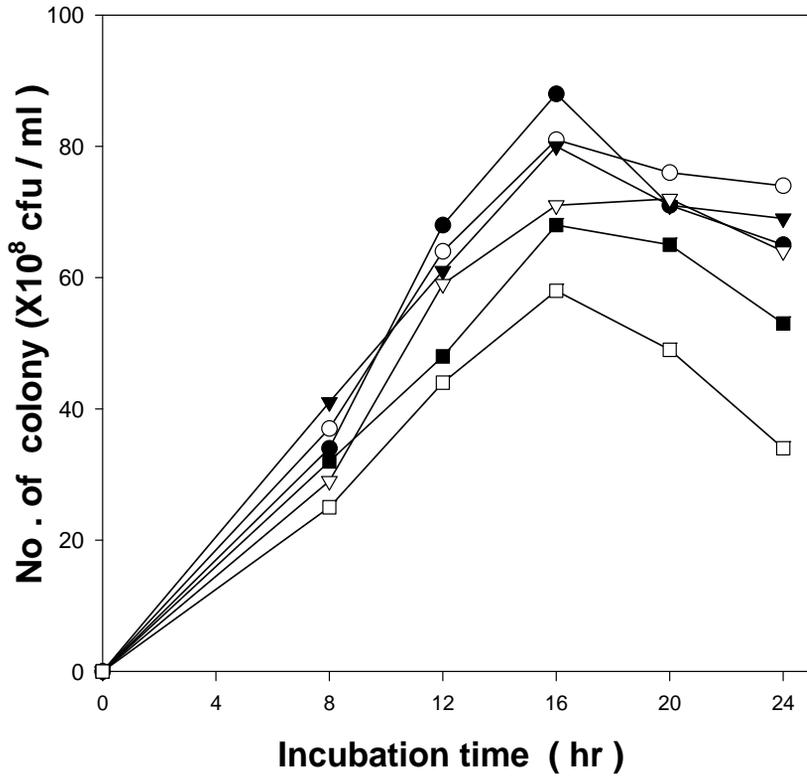


그림 48. Effect of glycine concentrations on the cell growth of recombinant *E. coli*.

Glycine was added at the beginning of culture.

● Control, ○ glycine 10 mM, ▼ glycine 20 mM,

▽ glycine 30 mM, ■ glycine 40 mM,

□ glycine 50 mM

게 억제되는 경향을 볼 수가 있었으며 배양말기의 균의 증식 또한 glycine을 첨가하지 않은 배양액보다 급속한 균의 사멸을 검토할 수 있었다. 한편 glycine 50 mM을 배양초기에 첨가하였을 경우 균의 증식은 억제됨을 보였으나 균체 외 ALA는 약 2.9배(1.3 g/l)이상의 증가함을 보였으며, recombinant *E. coli*를 LB media에서 발효실험을 한 결과와 비교할 때 glycine 30 mM과 succinic acid 60 mM을 배양초기에 첨가했을 때의 ALA 생산량과 동량임을 알 수 있었다. 폐액의 경우, 부가의 succinic acid의 첨가 없이도 최대 1.32 g/l의 ALA 생산을 보여 주었으며, 본 배지내에 어느 정도의 유기산 성분이 존재한다고 추측된다(그림 49). Sasaki에 의해 glycine이 growth inhibitor로서 작용한다는 보고와 같이 균의 증식에는 저해를 보였으나 ALA 생합성을 위한 C₄ 계의 전구물질로 작용함을 알 수 있었다.

2. Succinic acid의 첨가 농도에 따른 효과

ALA 생합성의 C₄ 계의 전구물질 중 succinic acid만을 농도별로 첨가하여 균의 증식과 ALA 생산을 검토하였다. Succinic acid의 첨가효과를 검토한 결과, 배양초기에 고농도의 succinic acid 60 mM, 80 mM을 첨가했을 경우 균의 증식이 저해됨과 동시에 지연됨을 볼 수 있었으며, succinic acid 100 mM의 경우는 균의 증식이 크게 저해되었으며 log phase도 4 hr 정도 경과 후에 나타났다. ALA 생산에 있어서는 최대 생산점인 배양 후 12 hr이 아닌 16 hr - 20 hr이 최대 생산점 임을 보여주었다 (그림 50, 51). 이것은 succinic acid가 균의 생육에 많은 부분이 사용된다는 것을 보여주었다. Succinic acid 첨가에 따른 ALA 생산효과는 별 영향이 검토되지 않았다. 오히려 고 농도의 Succinic acid의 첨가 시에는 균의 생육이 억제되고, ALA 최대 생성량도 떨어진다는 점에서 고농도의 substrate에서는 삼투압에 의해서 균의 생육이 저해되므로, 적정의 substrate 첨가로 균의 성장에 지장을 주지 않을 정도로 첨가하여 연속 배양하

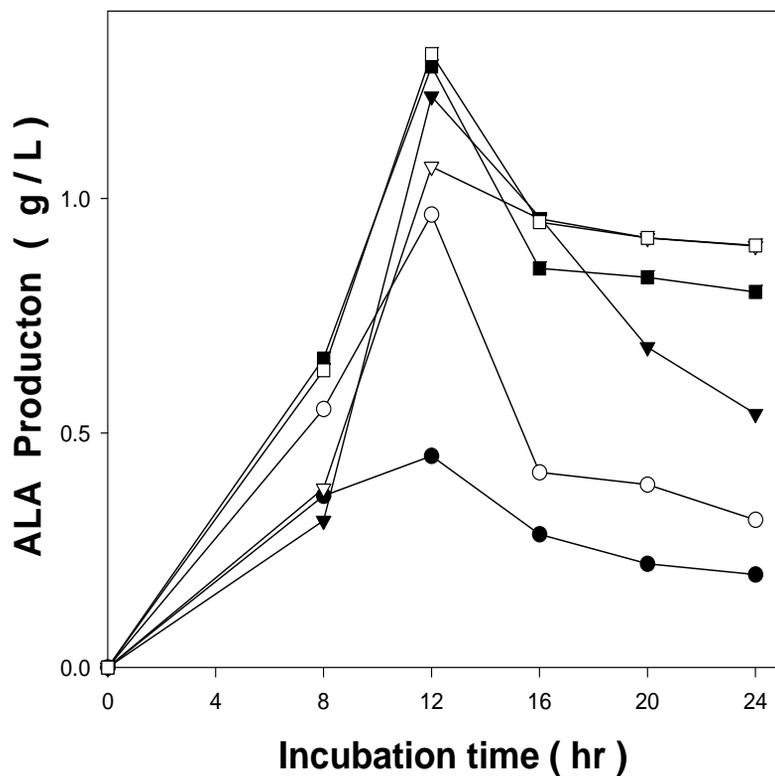


그림 49. Effect of glycine concentrations on the δ -aminolevulinic acid production by recombinant *E. coli*.

Glycine was added at the beginning of culture.

● Control (glycine 0 mM), ○ glycine 10 mM

▼ glycine 20 mM, ▽ glycine 30 mM,

■ glycine 40 mM, □ glycine 50 mM

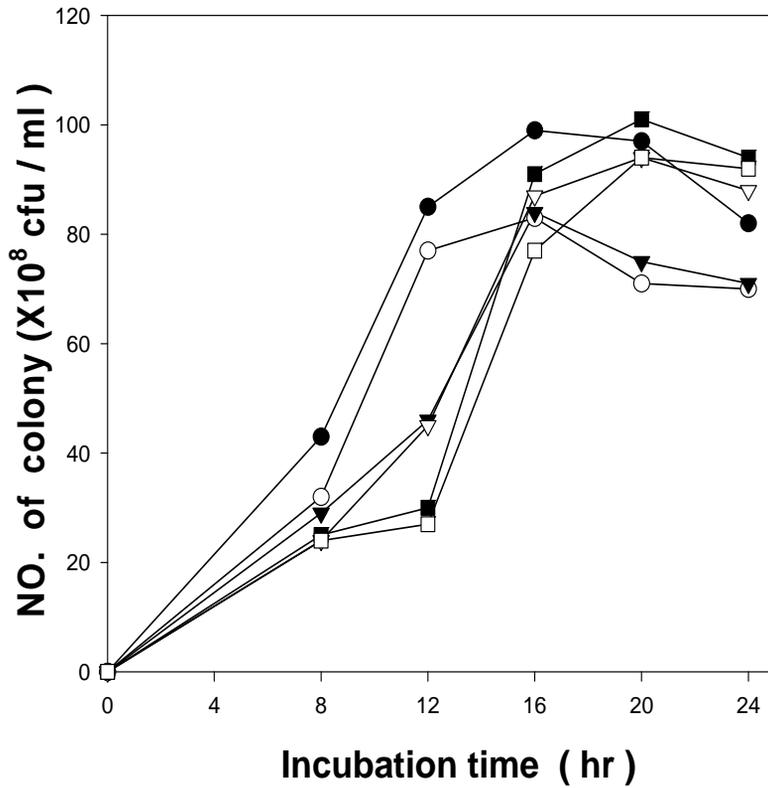


그림 50. Effect of succinic acid concentrations on the cell growth of recombinant *E. coli*.

Succinic acid was added at the beginning of culture.

- Control (succinic acid 0 mM), ○ succinic acid 20mM,
- ▼ succinic acid 40 mM, ▽succinic acid 60 mM,
- succinic acid 80 mM, □ succinic acid 100 mM

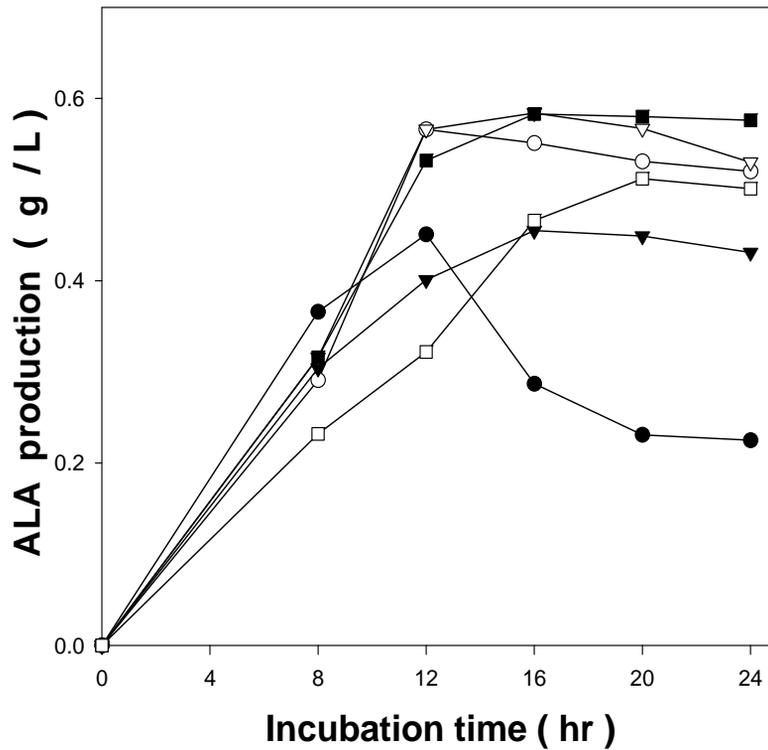


그림 51. Effect of succinic acid concentration on the δ -aminolevulinic acid (ALA) production by recombinant *E. coli*.

Succinic acid was added at the beginning of culture.

- Control, ○ succinic acid 20 mM,
- ▼ succinic acid 40 mM, ▽ succinic acid 60 mM,
- succinic acid 80 mM, □ succinic acid 100 m

는 실험을 검토하는 방향성을 제시 하였다.

유기물 폐수인 swine waste를 배지로 사용하여 *Rhodobacter sphaeroides*에서 ALA를 생산하는 연구 자료에서는 배지 내 저급 지방산 성분들이 *Rhodobacter sphaeroides*가 ALA를 생산하는 동안 carbon source나 energy source로 쓰이고, ALA가 균체 외로 생산되는 시간과 저급 지방산이 소모되는 시간이 거의 동일하다는 보고가 있었다. 이 연구자료에서는 배지 내의 저급 지방산들은 ALA 생산을 위해 succinyl-coA의 공급원이 될 수 있다는 추정이 있었으며, 이에 부가의 succinic acid는 첨가하지 않았다는 보고가 있었다. 이와 같은 실험을 토대로 전처리된 오징어 폐액 배지 내에는 여러 유기산들의 함량으로 ALA 생산량이 높은 것으로 추정된다.

3. Glycine과 Succinic acid 첨가 농도에 따른 효과

전처리된 오징어 폐액의 기본배지에 각각의 glycine과 succinic acid를 첨가하여 검토된 결과를 토대로 recombinant *E. coli* 배양 시 glycine과 succinic acid를 배양초기에 동시에 첨가하여 균의 증식과 ALA 생산의 효과를 검토하였다. 그 결과 균의 증식에 있어서는 저해됨을 보였으나 stationary phase에서 증식하는 균의 수는 증가하였다(그림 52). Succinic acid 60 mM 이상에서는 initial phase에서는 균의 생육이 저지되었으며, log phase가 아닌 late log phase에서 균의 증식을 보여주었다. 이 현상은 배지 내에 고농도의 succinic acid의 첨가로 인해 초기에는 균의 증식에 억제를 보이나 균이 성장하면서 배지 내의 Succinic acid를 소모하면서 균이 증식한다고 추측할 수 있었으며, ALA 생산 최대점도 배양 후 16-20 hr 으로 지연되었다. 배양초기에 glycine 50 mM을 첨가하고 succinic acid 90 mM을 첨가한 경우, succinic acid 무첨가(1.3 g/l)시 보다 약 2.2배(2.84 g/l)의 증가를 보였으며. LB media에서 glycine 30 mM , succinic acid 90 mM을 초기에 첨가하고 levulinic acid 30 mM을 중기에 첨가

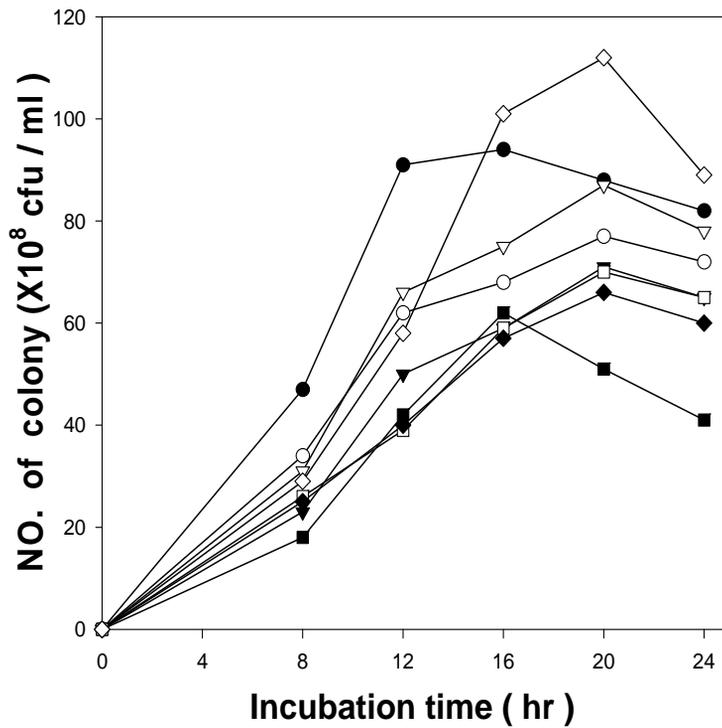


그림 52. Effect of glycine and succinic acid concentrations on the cell growth of recombinant *E. coli*.

Glycine 50 mM with various succinic acid concentrations

● Control, ○ glycine plus 15mM of succinic acid,

▼ glycine plus 30mM of succinic acid

▽ glycine plus 45 mM of succinic acid,

■ glycine plus 60 mM of succinic acid,

□ glycine plus 75 mM of succinic acid,

◆ glycine plus 90 mM of succinic acid,

◇ glycine plus 105 mM of succinic acid

하여 ALA 생산(2.5 g/L)을 한 경우와 비교시 약 1.13배 정도의 양이었다. ALA의 생합성을 위해서 첨가되는 전구 물질은 glycine 50 mM, succinic acid 90 mM을 첨가 한 배양 조건에서 2.84 g/l 가장 높은 ALA 생산을 보였다(그림 53).

4. Levulinic acid의 첨가 효과

Levulinic acid는 ALA pathway에서 ALA를 porphobilinogen으로 전이시키는 효소인 ALA dehydratase의 활성을 저해시키는 물질로써 tetrapyrrol의 생성이 저해되고, 이것은 tetrapyrrol에 의한 ALA synthase의 feed-back inhibition을 억제하게 된다. Levulinic acid를 광합성세균 배양 기간(middle log phase) 중에 첨가하면 균체의 ALA의 분비를 촉진시키며 생산된 ALA의 분해를 억제하여 배지 내에 ALA를 축적시키는 목적으로 LA를 첨가하여 최적 첨가시기와 첨가농도를 검토하였다. 배양 중 ALA 생합성을 위해서 levulinic acid 첨가효과를 검토하기 위해서 배양 중기(middle log phase)에서 LA(levulinic acid)을 농도별로 첨가하였으며, LA 45 mM, 60 mM 첨가 시 균의 증식이 LA를 첨가하지 않은 경우보다 35 cfu/ml가량이 감소하였으며 ALA의 생합성은 LA를 고농도로 첨가 시 생산이 저해됨을 볼 수 있었다(그림54). Recombinant *E. coli*를 LB media에서 배양 중 late log phase에서 LA 30 mM을 첨가 시 ALA 생산량이 증가한다는 보고가 있으므로 배양초기, 배양중기, 배양말기에 LA의 농도를 변화시켜 첨가해준 실험을 하였다. ALA 생합성의 경우 배양초기에 LA 15 mM을 첨가한 후 16 hr 배양하여 ALA 생산이 2.4 g/l 이었으며 20 hr 배양 후에는 최대 ALA 생산이 3.28 g/l 의 높은 생산을 보여 주었다(그림 55). 배양초기에 LA를 고 농도로 첨가하였을 경우, LA 30 mM이상 첨가시 균의 증식저해를 보였으며 LA 60 mM의 경우는 극심한 균의 생육 저해효과를 보였다(그림 56). 폐액 내에 LA를 첨가하지 않고 배양한 경우

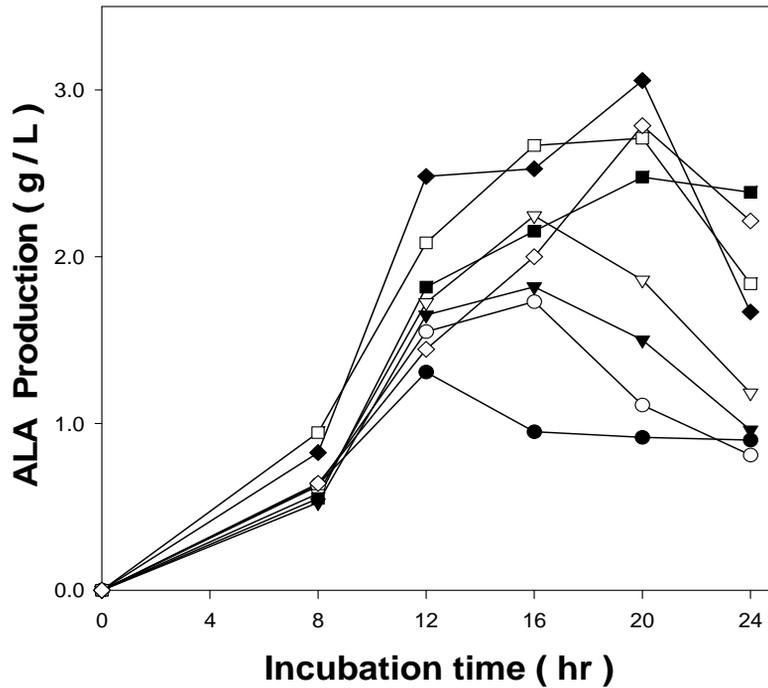


그림 53. Effect of glycine and succinic acid concentrations on ALA production by recombinant *E. coli*.

Glycine 50 mM with various succinic acid concentrations

● Control, ○ glycine plus 15mM of succinic acid,

▼ glycine plus 30mM of succinic acid,

▽ glycine plus 45 mM of succinic acid,

■ glycine plus 60 mM of succinic acid,

□ glycine plus 75 mM of succinic acid,

◆ glycine plus 90 mM of succinic acid,

◇ glycine plus 105 mM of succinic acid

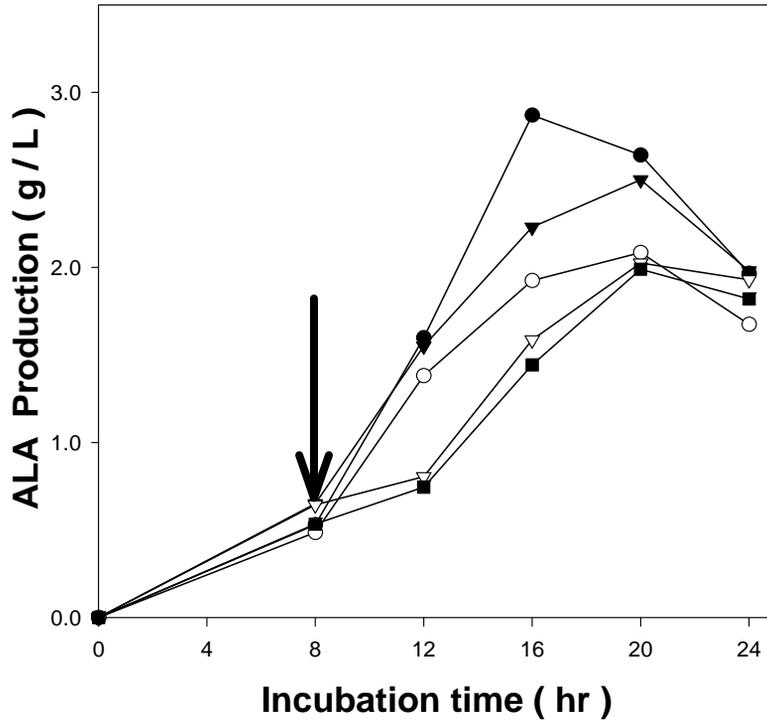


그림 54. Effect of levulinic acid with precursor supplements on ALA production by recombinant *E. coli*.

Glycine 50 mM, succinic acid 90 mM and various concentrations of LA were added in the middle log phase of cultivation.

- Control(without LA),
- precursor plus 15mM of LA,
- ▽ precursor plus 45mM of LA,
- precursor plus 60mM of LA

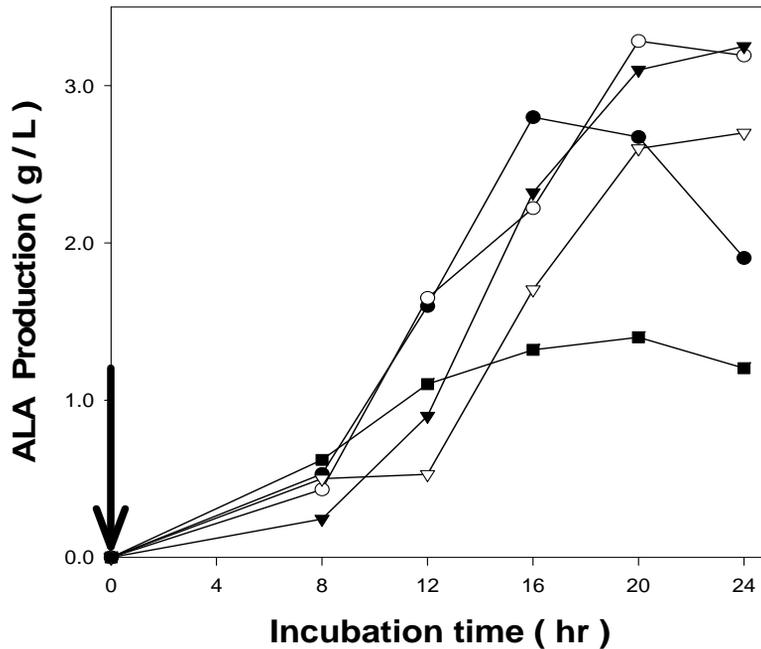


그림 55. Effect of levulinic acid with precursor (glycine and succinic acid) supplements on ALA product by recombinant *E. coli*.

Glycine 50 mM, succinic acid 90 mM and various concentrations of were added at the beginning of cultivation.

- Control(without LA),
- precursor plus 15 mM of LA,
- ▼ precursor plus 30 mM of LA,
- ▽ precursor plus 45m of LA,
- precursor plus 60mM of LA

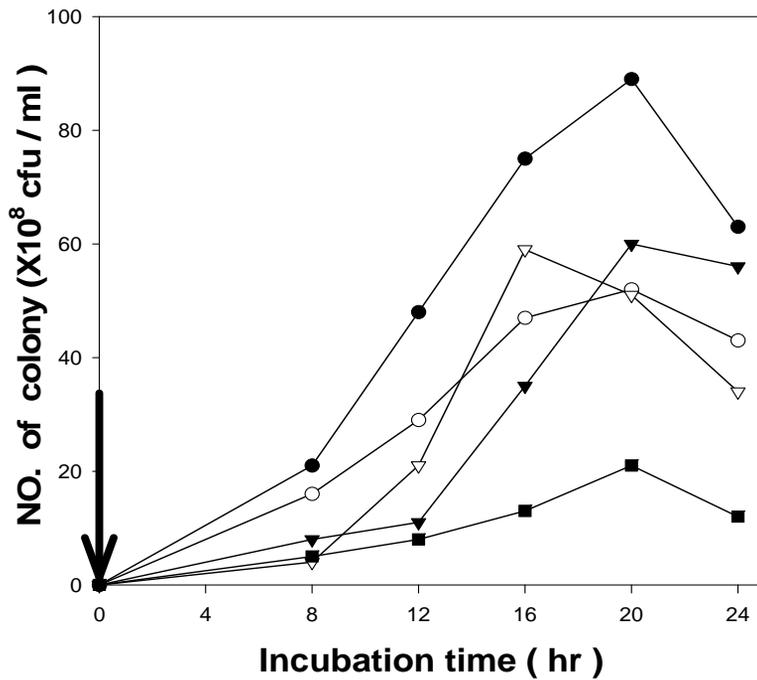


그림 56. Effect of levulinic acid with precursor (glycine and succinic acid) supplements on the growth of recombinant *E. coli*.

Glycine 50 mM, succinic acid 90 mM and various concentrations of were added at the beginning of cultivation.

- Control(without LA),
- precursor plus 15 mM of LA,
- ▼ precursor plus 30 mM of LA,
- ▽ precursor plus 45m of LA,
- precursor plus 60mM of LA

의 균의 증식과 비교 시 22 cfu/ ml 의 저해를 보였다. 배양중기에 LA를 농도별로 첨가시 전체적으로 46 cfu / ml 정도 균의 증식이 억제되었다(그림 57). ALA 생산성은 비교적 저농도(LA 15 mM)로 첨가했을 때 고농도의 첨가시 보다 효과적이었으며, 전체적으로 ALA 생산성에는 그림 54에서 같이 별 영향이 검토되지 않았다. 배양 말기에 LA를 농도별로 첨가한 후 균의 생균수와 ALA 생산을 검토하였다. LA 배양 말기 첨가는 배양 시간 14 hr 후에 첨가해 주었다. 그림 58에서 보는 바와 같이 LA를 첨가하지 않고 배양한 12 hr 전까지는 균의 증식이 왕성함을 보이고 있으나, LA를 첨가 한 후에는 급격한 균 수의 감소와 저해작용을 확인 할 수 있었다. 이는 LA가 균의 생육 저해를 가진다는 보고가 확실하다는 생각이다. LA는 ALA의 소비를 억제하고, 축적시키기 위해서는 반드시 필요하나 고농도의 첨가시에는 배지 내의 생균수가 급격히 감소되는 문제가 있으므로 적정한 양의 첨가가 중요하다는 추정이다. 즉 recombinant *E. coli* 균의 증식은 LA가 농도에 의하여 비례적으로 경감하는 양상을 보였으며, ALA 생산은 배양초기에 저농도(15mM)의 LA 첨가시 가장 높은 3.28 g / l 생산을 보였다. 이 결과로부터 오징어 내장 폐액배지에서는 배양 초기에 LA의 첨가가 ALA생산에 있어서 가장 효율적으로 검토되었다.

제 4 절 폐자원을 이용한 Jar Fermentor에서의

ALA 생산

1. pH 변화에 따른 ALA 생산

ALA의 경우 pH에 따라 많은 영향을 받는다는 보고가 있으며 이를 검토하기 위한 실험으로 Jar fermentor를 이용하여 일정한 pH를 유지하면서 초기 pH를 달리하여 호기적 조건에서 균의 증식과 ALA생산성

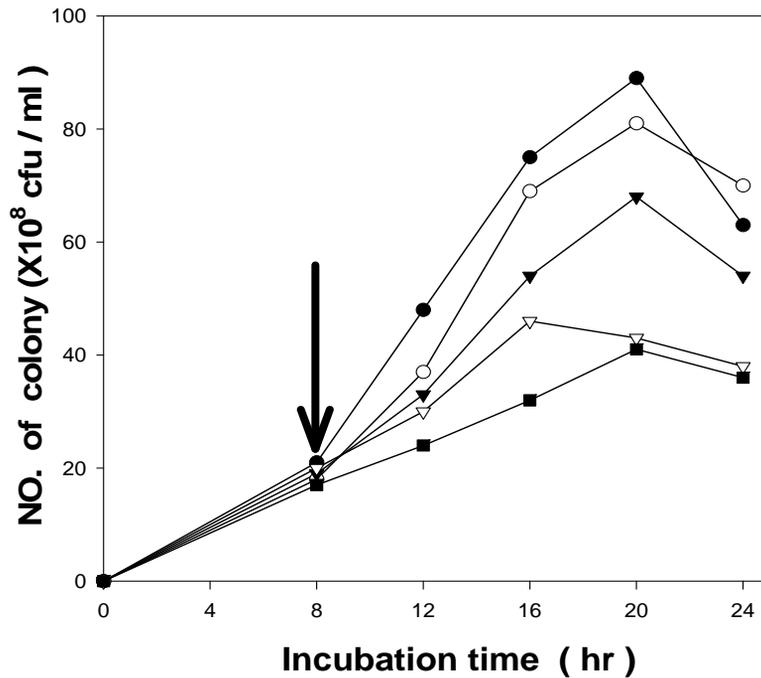


그림 57. Effect of levulinic acid with precursor supplements on the cell growth of recombinant *E. coli*.

Glycine 50 mM, succinic acid 90 mM and various concentrations of LA were added in the middle log phase of cultivation.

- Control(without LA) ,
- precursor plus 15mM of LA,
- ▼ precursor plus 30mM of LA,
- ▽ precursor plus 45mM of LA,
- precursor plus 60mM of LA

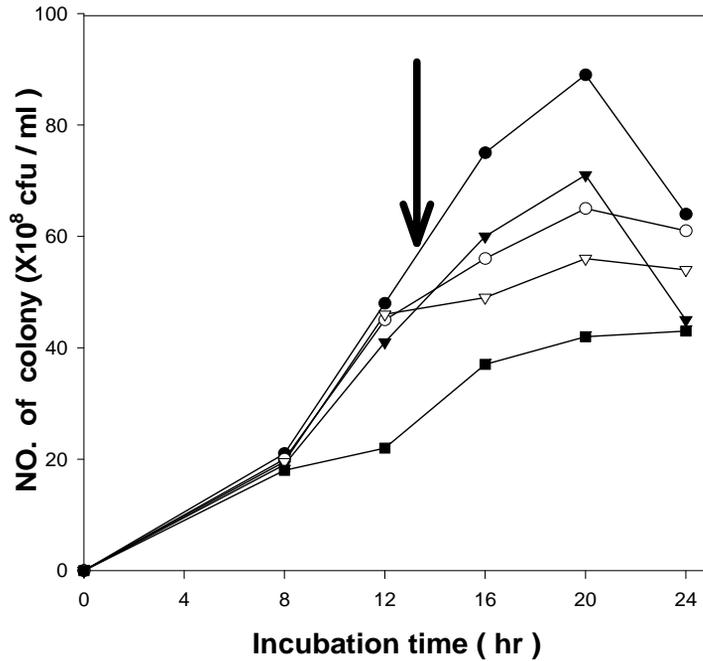


그림 58. Effect of levulinic acid with precursor (glycine and succinic acid) supplements on the cell growth of recombinant *E. coli*.

Glycine 50 mM, succinic acid 90 mM and various concentrations of LA were added at the late log phase of cultivation.

- Control,
- precursor plus 15mM of LA,
- ▼ precursor plus 30mM of LA,
- ▽ precursor plus 45mM of LA,
- precursor plus 60mM of LA

을 조사하였다. ALA는 pH가 산성일 경우에 안정하며 ALA synthatase의 activity가 높다는 보고가 있으나, pH가 중성에 가까운 약알칼리에서는 ALAD의 활성이 높으며 ALA가 생성시 porphobilinogen으로 전환하는 시간이 단축된다는 보고 또한 있었다. 이를 토대로 pH는 산성에서 중성(pH 5.5 - pH 7.0) 까지 실험을 하였다(그림 59, 60). 단 pH 5.5에서는 균이 배양 초기에는 증가하다가 12 hr 이후에는 사멸하는 결과가 초래되었으며 ALA 생산성도 극히 적은 양이었다. 이에 오징어 내장 폐액 배지에는 질소원이나 단백질 성분이 풍부하므로 pH가 5.5로 조정됨으로써 배양 중 아민류나 배지의 변성으로 균이 생육하는데 inhibition factor가 생성되는 것으로 추정된다. pH의 증가에 따라서 균의 증식은 약 1.28배 정도가 증가하였으나 ALA 생산성은 적정 pH를 제외하고는 거의 비슷하였다. pH 6.0에서는 균의 생성량은 flask 발효시험과 비교시 별 차이가 없었으며 배양 16 hr에서 ALA생산(3.09 g/ℓ)을 보였다. 한편 pH 6.3인 flask와 동일한 pH를 계속 유지하면서 실험한 결과 배양 12 hr에서 ALA 생산(3.64 g/ℓ)이 최대효율을 나타냈으며 균의 증식은 pH 6.0과 비교시 약 1.2배의 증가량을 보였다. pH 6.6에서는 배양 12 hr 후에 2.78 g/ℓ의 약 1.3배가 감소하였으나, 균의 증식에서는 약 1.2배의 증가를 보였다. pH 7.0 에서는 균의 증식은 눈에 띄게 증가하였으나, ALA의 생성량은 2.23 g/ℓ 정도에 그쳤다.

이와 같은 실험을 토대로 pH에 따른 ALA의 생산성은 큰 영향을 받으며 pH가 높아짐에 따라 균이 ALA를 사용하는 데 쓰이는 substrate가 균이 증식하는데 사용되는 것으로 추정되며 균체외로 생성된 ALA가 배지 내의 높은 pH에 의해서 불안정하여 급속히 분해되거나 ALAD의 활성이 높아져서 ALA생성이 억제된다.

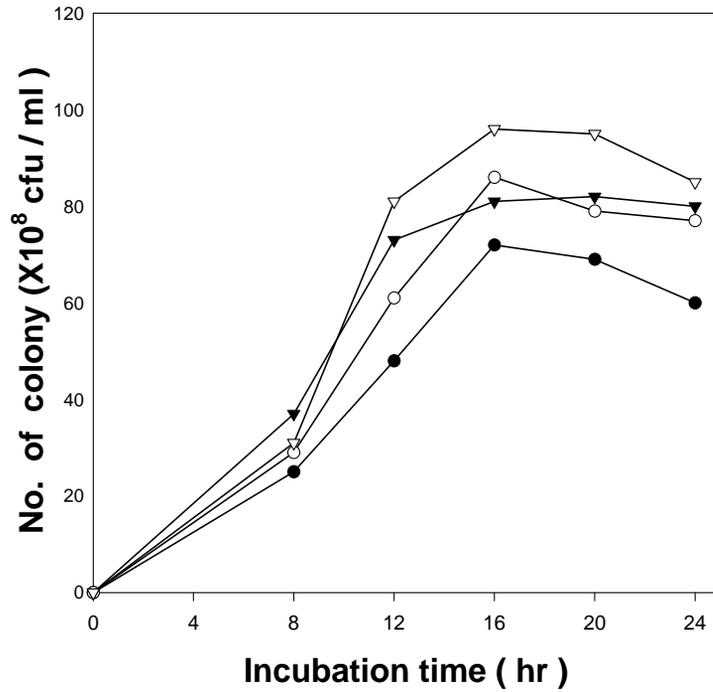


그림 59. Effect of pH on the cell growth of recombinant

E. coli.

Glycine 50 mM, succinic acid 90 mM and LA 15 mM were added at the beginning of cultivation.

● pH 6.0, ○ pH 6.3, ▼ pH 6.6, ▽ pH 7.0

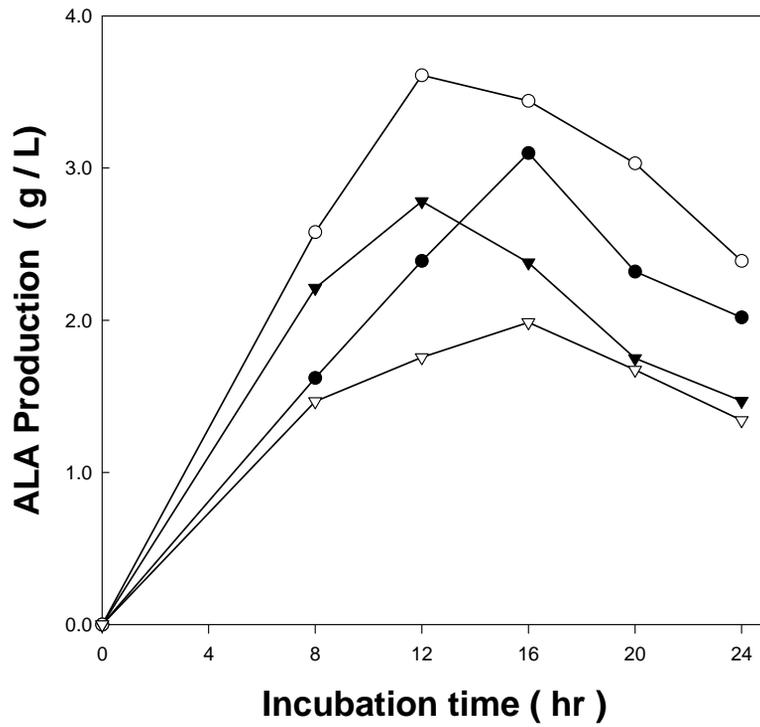


그림 60. Effect of pH on ALA production by recombinant *E. coli*.

Glycine 50 mM, Succinic acid 90 mM and LA 15 mM were added at the beginning of cultivation.

● pH 6.0, ○ pH 6.3, ▼ pH 6.6, ▽ pH 7.0

제 5 장 신소재의 양식어장에서의 활용

제 1 절 ALA에 의한 어체 독성 확인

1. ALA의 어류주화세포 및 초대배양어류세포에의 독성

어류 유래 세포주로서 어류 질병 연구에 사용되어지고 있는 종류 중에서 시판되는 CHSE-214 세포주, EPC 세포주, FHM 세포주를 대상으로 MTT법을 이용하여 ALA의 처리 농도에 따른 세포에의 영향을 조사하였다. 또한 본 연구실에서 직접 초대배양에 성공한 세포주인 넙치 지느러미 상피세포 (FFE, flounder fin epiterial cell), 참돔 비장세포 (SBS, sea bream spleen cell) 및 조피볼락 비장 세포 (LRS, land rock spleen cell)을 대상으로 ALA의 세포독성을 확인하였다. 실험용 세포는 100 U/ml의 penicillin (Sima), 100 µg/ml의 streptomycin (Sigma) 및 5 % FBS가 첨가된 MEM (Gibco) 세포배양용 배지를 사용하였다. 세포배양용 96well plate에 각 1×10^4 cells/well (90ul)되게 세포를 분주하여 1일간 배양한 후 사용하였다. 배양세포에의 ALA의 처리농도는 시판 ALA (Sigma)를 멸균증류수로 1 M 농도로 조제하여 실험용 ALA 저장액으로 사용하였다. 실험용 ALA 저장액을 10단계 희석법으로 희석하여 100 mM, 10 mM, 1 mM, 100 µM, 10 µM, 1 µM, 100 nM 및 10 nM 농도의 ALA 용액을 조제하였다. 각각 ALA희석액을 준비되어진 3종류의 어류주화세포에 농도별로 각 well당 10 µl 씩 분주한 후, 교반하고 20°C에서 1시간 반응시켰다. 반응이 끝난 세포 plate를 시판의 MTT Kit (Chemicon)를 사용하여 발색 처리한 후 ELISA reader를 사용하여 570 nm에서 흡광도를 측정하여 비반응 대조구의 흡광도를 기준으로 각각의 ALA처리농도에 따른 세포 생존율을 계산하였다.

MTT method는 세포의 독성확인을 위한 방법으로 개발되어진 실험법으로 어류의 주화세포를 대상으로 한 연구의 결과는 지금까지 보고된 바가 없다. 본 연구를 수행함에 있어 우선 각각의 어류 주화세포의 세포수에 따른 흡광도의 변화를 기준으로 검량선을 작성하고 어류 주화세포의 반응 조건을 설정하였다. 어류 유래의 배양세포를 제작함에 있어 필요시 되었던 어류 초대배양세포 독성확인을 위하여 본 MTT법을 최초로 도입하였다. 어류주화세포의 세포독성 검사법으로 MTT법을 도입한 점은 본 연구를 통하여 얻은 부수적인 성과이다. 어류 주화세포로 널리 연구에 사용되어지고 있는 CHSE-214, EPC 및 FHM세포주를 대상으로 ALA 농도별의 독성을 조사한 결과 1 mM에서 100 mM의 농도조건에서 1시간동안 노출되어진 조건에서도 이들 어류주화세포는 심각한 영향을 나타내지 않았으며, 본 연구실에서 현재 제작중에 있는 해산어 유래 세포인 FFE, SBS 및 LRS cell 또한 100 mM ALA 농도조건에서 약 30 %의 세포가 사멸하는 경향은 나타내었으나 그 이하의 농도에서는 전혀 영향을 받지 않았다. 이러한 결과로부터 초대배양단계의 어류의 세포는 생존어의 어체내의 세포 특성을 거의 100% 유지하고 있는 단계로서 생체내의 특정 장기 혹은 조직에 ALA를 직접 투여한 경우와 매우 일치하는 실험조건이라고 가정할 수 있다. 따라서 ALA의 체내 과량 투여에 의해서도 정상적 어체의 세포단위에서의 치명적인 손상은 없을 것으로 예상할 수 있다. 체내 감염 병원체의 치료를 위한 목적으로 사용하기 위하여 적정농도에서의 장시간의 ALA처리에 따른 어체내 생리적인 변동 특성에 대한 연구가 필요하다.

표 7. ALA의 농도별 처리에 따른 어류주화세포 및 초대배양세포의 생존율 조사에 의한 세포독성 확인

	100mM	10mM	1mM	100uM	10uM	1uM	100nM	10nM	1nM
CHSE	93*	97	91	100	95	99	93	92	97
EPC	90	94	89	94	95	91	100	93	93
FHM	95	97	92	86	94	94	91	89	92
FFE	78	89	95	89	93	90	88	79	90
SBS	73	90	96	91	90	94	93	96	91
LRS	69	86	78	83	91	82	79	93	88

* ALA 무처리 세포의 흡광도로 계산되어진 세포수에 비교한 생존율%

2. ALA (δ -Aminolevulinic acid)의 어류주화세포에 대한 독성

본 연구는 어류주화세포를 대상으로 ALA 처리 안정농도 및 독성농도를 확인하고, 어류에의 직접적인 노출에 의한 독성실험을 위해 필요한 처리농도의 자료를 얻을 목적으로 실시하였다. 본 연구를 통하여 생산 제조된 ALA를 1M이 되게 (0.167g/10ml HBSS)하여 10배 희석법으로 희석하고, 96 well plate에 2.5×10^5 cells/ml로 조정된 어류주화세포현탁액을 각 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 후, ALA 희석액을 희석단위당 4 well씩 각 $100\mu\text{l}$ 씩 첨가 반응시켜 실험을 실시하였다. ALA의 세포독성실험에는 어류 주화세포 RTG-2 (Rainbow trout gonad), FHM (Fathead minnow epithelioma) 및 CHSE-214 (Chinook salmon embryo) 사용하였다. 실험용 세포는 100 U/ml의 penicillin (Sima), $100\mu\text{g/ml}$ 의 streptomycin (Sigma) 및 5 % FBS가 첨가된 MEM (Gibco) 세포배양용 배지를 사용하였다.

ALA의 어류주화세포에 대한 독성은 MTT법에 의하여 측정을 하였다. 각각의 세포에 0mM, 1mM, 10mM, 50mM, 100mM의 ALA를 $100\mu\text{l}$ 씩 접종하고 난 후 18°C 에서 24시간동안 배양하였고 대조구는 ALA대신에 HBSS를 동량으로 넣었다. MTT 용액 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyl tetrazolium bromide)을 각 well에 $100\mu\text{l}$ 씩 넣은 후 0.04N HCl isopropanol을 $100\mu\text{l}$ 씩 넣고 ELISA reader로 570nm, 630nm에서 측정하였다.

ALA에 대한 어류주화세포의 독성검사 결과는 그림 61과 같다. 실험에 사용된 3개의 주화세포 모두 1mM, 10mM ALA를 처리하였을 때, 대조구와 비교하여 조금 더 높거나 비슷한 수치를 나타낸 반면, 50mM과 100mM의 ALA를 처리하였을 때는 대조구와 비교하여 절반정도의 낮은 수치를 나타내었다. ALA의 세포에 직접 노출에 의한 독성을 확인한 결과 세포배양조건의 well 내에 반응조건을 감안하여 그 독성안정범위 50mM 이하로 나타나, 바이러스 및 기생충의 배양조건하에서의 실험 적정 농도기준을 설정할 수 있었으며, 아울러 생물체내의

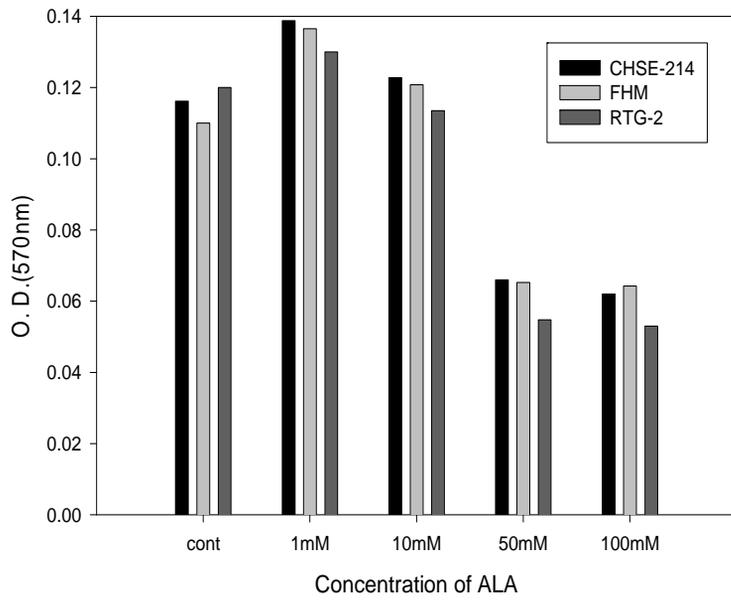


그림 61. ALA에 대한 어류 주화세포의 독성검사

본 물질의 적용에 따른 독성농도의 설정연구를 위한 기초자료로서 물질의 체내흡수 및 대사과정에 의한 목적장기 또는 세포단위까지의 전달 경로를 추정하였을 때 (일반적으로 어체내 물질의 흡수율은 10-20%), 본 물질의 어체 처리농도를 500mM 이하로 한다면 직접적인 독성은 어체내에서 발생되지 않을 것으로 판단되었다.

3. ALA의 어류에의 독성 (넙치, 참돔, 조피볼락 치어에의 독성)

ALA의 세포단위에서의 독성 실험의 결과 단시간의 체내 투입에 의한 어체의 독성위험은 낮은 것으로 판단하고, 일반적으로 어류 양식장에서의 다수의 어체를 대상으로한 질병치료용 약제의 투여법으로 가장 쉽게 적용되어지고 있는 침지법과 복강 주사법을 사용하여 넙치 (3g), 참돔 (1.5g) 및 조피볼락 (5g) 치어를 대상으로 독성 효과를 검사하였다.

ALA를 1000 ppm과 100 ppm의 농도로 조정된 해수에 10분, 30분, 60분, 120분 및 180분간 어체를 노출시킨 후, 사각수조 내에 수용하고 10일간 생리식염수처리 대조구의 어체와 비교하였다(그림 62).

ALA의 처리농도 및 방법은 500mM, 100mM, 50mM, 10mM의 ALA액을 제작하여 체내주사법으로 각 어체에 100 μ l양으로 복강내 주사하여 사육수조에 넣고 1주일간 관찰하였다. 또한 침지법에 의한 실험을 위하여 ALA를 30 liter 사육해수에 5.028g 녹혀 100mM 농도 (167.6ppm 농도), 같은 방법으로 10배 및 100배 희석농도인 10mM 및 1mM 농도의 ALA 희석 실험해수를 제작하여 각 희석수조에 실험어를 노출시켜 10분, 30분, 60분, 120분 및 180분 노출한 후 각 경과 시간마다 노출어를 각각 10미씩 채취하여 무침가 사육수조에 이동하여 1주일간 그 동태를 관찰하였다.

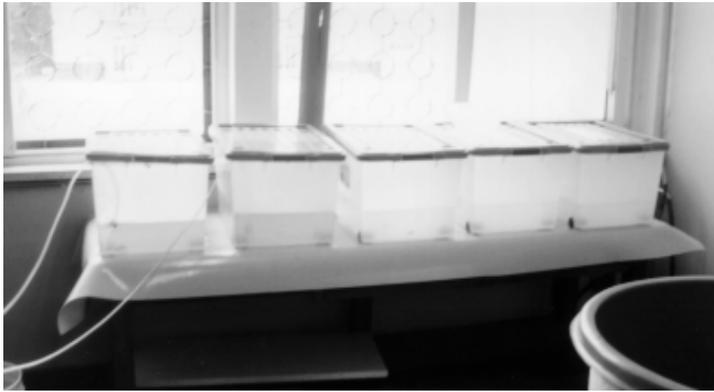


그림 62. 사각수조를 이용한 어종별, 침지조건별 어체독성실험

그 결과 주사법에 의한 ALA 처리실험군인 3g의 넘치치어 및 5g의 조피볼락 치어 어체 및 어종에서 ALA 처리농도와 관계없이 이상을 발현하지 않았다. 또한 ALA를 167 ppm, 16.7 ppm 및 1.67 ppm 농도로 조정된 해수에 10분, 30분, 60분, 120분 및 180분간 어체를 노출시킨 후, 사각수조 내에 수용하고 7일간 관찰한 침지법에 의한 처리 실험군 및 대조구의 어체들의 생존율이 100%로써 어종간 처리농도간, 침지시간간의 차이를 찾을 수 없었다. 그러므로 ALA의 어류에의 적용을 위한 현장 사용형태 및 경제성을 감안한 적용가능 농도 범위에서의 어체에 대한 직접적인 위해성은 없는 것으로 밝혀졌다(표 8, 9).

제 2 절 광합성세균의 분리 및 치어의 사료에

배양된 광합성세균의 첨가에 의한 사육

효과를 검정

1. 연속원심분리에 의한 균체의 분리

10 L 발효조에서 배양한 *E. coli*를 제거하기 위하여 연속원심분리기(한일원심분리기, Supra 22K, C1200 rotor))를 사용하였다. 원심분리 속도를 12,000, 10,000, 8,000 및 6,000 rpm으로 고정시킨 후 원료의 공급을 10 L/hr, 20 L/hr, 40 L/hr 및 60L/hr로 조정하여 원심 분리한 결과를 표 10에 나타내었다. 표 10에 나타난 결과와 같이 산업적으로 많이 적용되는 연속원심분리를 이용하여 대장균을 제거한 결과, 현재의 시스템으로는 완전하게 균체가 제거되지 않았다. 따라서 효과적인 균체 제거를 위하여 대용량의 연속원심분리기가 필요한 것으로 판단된다.

표 8. 넙치 및 조피볼락 치어의 ALA 복강주사법에 따른 생존율

어종	50mM	10mM	5mM	1mM	Control
넙치	100%	100%	100%	100%	100%
조피볼락	100%	100%	100%	100%	100%

표 9. 넙치, 참돔 및 조피볼락 치어의 ALA 침지법에 따른 생존율

어종	167ppm 10min - 180min	16.7ppm 10min - 180min	1.67ppm 10min 180min
넙치	100%	100%	100%
참돔	100%	100%	100%
조피볼락	100%	100%	100%

⌘ 10. Number of viable *E. coli* after centrifugation at different velocity and feed volume

(cfu/ml)

rpm \ feed supply	60 (L/hr)	40 (L/hr)	20 (L/hr)	10 (L/hr)
6,000	$>10^6$	$>10^5$	$>10^4$	1,200
8,000	$>10^5$	$>10^4$	$>10^4$	800
10,000	$>10^5$	$>10^4$	1,000	130
12,000	$>10^5$	$>10^4$	150	26

2. 한외여과에 의한 균체의 분리

선경 인더스트리에서 생산된 중공사막(5 x 60 cm) 4개를 병렬 연결하여 시간당 60 L의 여과능을 지닌 한외여과시스템을 설계, 제작하였다. 균체를 제거하기 위하여 제작된 시스템의 feed 압력을 2 기압으로 고정시킨 후 여과한 결과 높은 효율로 균체가 완전히 제거되었으며 ALA의 회수율 또한 95%이상을 나타내었다. 60 L의 대장균 배양액을 시스템으로 한외 여과한 결과 운전시간에 따라 투수율은 다소 감소하였으나 1시간내에 균체가 완전히 제거되었다.

표 11. Change of filtrated volume during ultrafiltration

Operating time	filtrated volume	Viable cell
0 분	2 L/hr	-
20 분	1.5 L/hr	-
40 분	1.0 L/hr	-
60 분	1.0 L/hr	-

3. 광합성세균의 첨가에 의한 사육효과를 검정

실험어는 외관상 질병의 증세가 없는 건강한 넙치 치어 (평균체중, 1 g; 평균 체장, 4.5 cm)를 선별하여 실험에 사용하였다. 실험용수조는 0.5 ton용 FRP 원형수조를 사용하였으며, 순환모래여과시스템으로 관리하였고, 매일 아침 약 10%의 사육수를 막분리여과된 해수로 교환하였다. 사육수조내의 물은 1회/1시간이 되도록 회전율을 설정하였다. 실험조의 구성은 광합성세균 (*Rhodobacter sphaeroid*) 첨가구 (A와 B) 및 무첨가 대조구로 행하였다. 각각의 실험 수조에 넙치 치어 300미씩을 수용하고 1주일간 실험사육조건에 적응시킨 후 실험에 사용하였다 (그림 63). 실험사료는 제일제당 시판용 넙치 치어사육용 크럼블을 사용하였다. 광합성세균인 *Rhodobacter sphaeroid*를 Lascelles medium으로 액체



그림 63. 광합성세균 첨가사료를 이용한 넙치 사육효과 실험수조

배양한 후 원심분리법 및 한외여과법으로 농축, 정제하여 시판 사료에 1% 농도의 첨가량이 되도록 분무하여 그늘에서 건조시킨 후, 5°C에 냉장보관 하여 광합성세균 첨가사료로 사용하였다. 실험중 10일 간격으로 사육어 30마리의 평균 어체중을 칭량하여 어체중 15%를 1일 사료 투여량으로 정하여, 냉장보관중인 첨가 및 무첨가사료를 10일간 동일량으로 매일 4회 투여하였다.

실험 개시 후 2개월간 수온 18-22°C, DO 6.3-6.8 ppm이 유지되도록 사육실 내 heat-pump 및 산소발생기로 관리하였다. 사육기간중의 수온, pH, 염분, DO는 매일 측정하였으며, 수중의 NH₄-N, NO₂-N, NO₃-N은 1주 1회 사육수교환전의 수조내 사육수를 채취하여 일본기상협회 간행 해양관측지침에 준하여 분석하였다.

이상의 실험 방법으로 광합성세균 첨가 사료의 넙치치어에 있어서의 영향을 사육어의 성장효과 및 사육수조내 수질 특성 측면에서 비교하여 표 12 및 표 13에 나타내었다. 60일의 사육기간동안 광합성 세균 첨가구 및 무첨가구의 어체생장율은 첨가구 A 및 B가 각각 83과 79%이었는데 비하여 무첨가구의 경우 시험개시시의 300마리에서 종료시 216마리가 남아 72%의 성장율을 나타내었다. 어류의 성장률에 있어서도 개시시 평균체중 1g 내외의 넙치 치어가 실험종료시인 60일경 첨가구의 경우 55.2와 54.7g으로 증육 되었으나 대조구의 경우 52.8g으로 첨가구에 비하여 마리당 2g 내외의 차이를 나타내었다. 사육기간 중에 조사되어진 사육수중의 질소화합물의 분석에서는 수중암모니아농도 및 아질산농도가 세균 첨가구의 경우 19~26 $\mu\text{g-at}/\ell$, 1~2 $\mu\text{g-at}/\ell$ 범위로 검출되어짐에 비하여 무첨가구의 경우 45 $\mu\text{g-at}/\ell$ 와 4.5 $\mu\text{g-at}/\ell$ 까지 검출되어져서 사료에 첨가되어 투여된 광합성 세균이 수중으로 노출, 증식되어 수중의 질소계 오염물질의 제거에 관여한 결과로 판단된다. 실험기간중의 실험어는 특별한 사고나 질병의 발생이 없이 안전하게 사육되어졌던 점에서 광합성세균의 첨가가 사육어체의 건강도 및 성장률의 향상에 기여하는 것으로 평가되었다. 이러한 결과는 ALA생

표 12. *Rodobacter* 첨가 및 무첨가사료 투여에 따른 넙치치어의 성장효과

항목	첨가구 A	첨가구 B	무첨가대조구
사육기간 (일)	60	60	60
개시시 미수	300	300	300
개시평균체중 (g)	1.13	1.20	1.16
30일째 평균전장 (mm)	126	131	127
30일째 평균체중 (g)	24.1	24.5	22.0
종료시 미수	249	237	216
생잔율 (%)	83	79	72
60일째 평균전장 (mm)	213	216	215
60일째 평균체중 (g)	55.2	54.7	52.8

표 13. 넙치 치어 사육기간중 실험사육수조내의 수질

조사항목	첨가구A	첨가구 B	무첨가대조구
수온(℃)	18.1~22.2	18.0~22.0	18.3~22.0
pH	8.2± 0.3	8.2± 0.4	8.4± 0.3
염분(‰)	33.2±0.5	33.2± 0.5	33.1± 0.4
DO(ml/ℓ)	6.8±0.5	6.7± 0.4	6.8± 0.5
NH ₄ -N(μg-at/ℓ)	19.1~24.3	22.7~26.0	20.5~45.3
NO ₂ -N(μg-at/ℓ)	1.3~2.5	1.1~ 2.3	1.3~4.5
NO ₃ -N(μg-at/ℓ)	3.8~9.3	4.3~8.2	3.1~23.5

산 세균의 직접적인 사료에의 도입시 형질전환 시킨 ALA함유 균체의 상품화의 가능성을 시사해 준다.

제 3 절 *In vitro*상에서의 어류 병원체 불활성화

효과 검정

1. 스키테카충의 분류학적 고찰

본 연구과제 수행을 위한 대상 어류병원충인 스키테카충은 그 분류학적 위치가 결정되어져 있지 않다. 본 세부과제의 연구수행 중 전국 각지의 넙치, 조피볼락 등의 해산어류에서 스키테카충으로 분리되어진 충체의 배양특성 및 형태적 관찰을 통하여 얻어진 결과를 종합한 결과, 본 원인충의 분류학적 위치는 다음과 같다.

스쿠티카 섬모충목은 2 아목으로 나뉘어 지는데, 본 섬모충의 파동막은 다른 섬모의 길이보다 짧고 채찍모양의 scutica를 영구적으로 가지고 있지 않는 것으로 관찰됨에 따라 *Philasterina* (필라스테리나) 아목에 속하였다. 본 아목에는 12개의 과가 있으며, 본 섬모충의 파동막과 소막이 장형의 몸통과 나란히 되어 있고, 체 전방의 앞 끝은 때때로 섬모가 없고 다소 납작한 형태를 지니고 있었다. 이상의 특징으로 *Uronematidae* (우로네마티테)과에 속하였다. 본 과에는 6개의 속이 있으며, 섬모충은 세포구가 항상 전방 적도 부근에 존재하였으며, 꼬리 섬모, 모포, 후방 끝에 수축포 존재하였다. 따라서 *Uromema* (우로네마속)에 속하였다. *Uronema* spp. 는 현재 약 25종이 자유 생활하는 섬모충으로 보고되어 있으며, 그중 10 종이 도염염색법에 의해 기재되어 있다. 넙치 스키테카는 크기 (30~50 μ m), somatic kinetics, 일직선의 꼬리섬모, 수축포의 후방끝 위치 및 세포구의 위치를 근거로 *Uronema marimum* 으로 분류될 수 있으나, 지금까지의 관찰 결과로서는 속 단위까지 결정하여 *Uronema* sp.로 분류하였다.

2. 광조건에 따른 스쿠치카충의 배양 특성

자연감염어로부터 수확한 충체의 배양을 위한 방법으로 보고되고 있는 요시나가의 액체배양법, 국내의 Lee 등이 제안한 실내배양법과 본 연구팀에 의해 확립된 배양세포를 이용한 충체 배양법을 사용하여, 배양을 행하고 각각에서 얻어진 충체를 생물학적인 분류기준을 적용하여 분석한 결과 일반적으로 감염어의 체표에서 확인되어지는 충체 및 적정 배양 조건에서의 충체는 모두 생물 life-cycle 중의 동일한 시기의 충체단계 (성충)로 판단되었다. 요시나가와 Lee의 배양법에 의한 충체의 배양에서는 충체 증식량은 배양세포법에 비하여 큰 차이는 나타나지 않았으나 ($\approx 10^5$ cells/ml), 생물배양에서 가장 중요하다고 할 수 있는 다른 미생물의 혼탁(contamination)이 심한 단점이 발견되었다. 따라서 본 연구 수행을 위해 필수적인 충체의 안정적 확보를 위한 배양법으로써 본 연구팀이 고안한 배양세포를 이용한 방법이 가장 우수한 것으로 확인되었다.

스쿠치카충의 증식 (분열) 속도와 스쿠치카충이 증식하는 광조건을 확립하기 위하여 어류주화세포에서 배양한 충체를 혈구 계산반으로 계수하여 10^3 cell/ml 가 되게 충체 희석액을 만들어 배양세포를 부착시킨 30개의 플라스크에 접종하였다. 접종된 각 10개씩의 플라스크를 암조건, 자연조건, 고조도조건 (20,000lux)으로 설정된 식물배양기에서 20℃에서 배양하면서 시간 경과에 따라 각 배양조건구에서 1개씩의 플라스크를 선발하여 플라스크내에 배양된 스쿠치카의 수를 혈구계산반을 이용하여 계수하였다. 이때 스쿠치카의 생사개체를 구별하여 계수할 목적으로 분별 염색법인 트리판 블루염색을 행하였다(표 14).

본 실험의 결과를 종합해보면 스쿠치카충은 증식 및 생존시 빛의 영향이 많이 받는 것을 알 수 있었다. 식물배양조건의 처리 조도에서의 성장은 전혀 나타나지 않았고 오히려 강한 빛의 처리에 의하여 그 생존에 심한 영향을 받음을 알 수 있었다. 또한 자연조건 (12: 12)에 있어서의 기생충의 증식량에 있어서도 차이가 나타나 자연광에 노출되어진 배양초기의 6 시간까지는 기생충의 증식에 따른 숫

표 14. 광조건과 배양시간에 따른 스쿠치카의 증식

배양시간(h)	암조건	자연조건	고조도조건
0	980	1000	1010
1	1000	1100	600
2	1150	1200	620
6	2010	1400	0
12	5200	1700	0
18	9700	2400	0
24	21000	6700	0
48	69500	70200	0
60	150000	210000	0

적 증가는 전혀 보이지 않아, 단지 생존하고 있는 정도였지만 암조건으로 설정 후 12시간에서 24시간 사이에는 약 6배 증가하였다. 완전한 암조건으로 처리한 후 18-24시간까지 총체는 약 3배로 양적 증가가 일어났다. 따라서 자연수중에서의 본 스쿠치카 총의 증식속도는 4시간에 1회씩 분열되어지는 것으로 생각된다. 이러한 점은 암조건 만으로 실험한 실험구에서도 비슷한 경향을 나타내었다.

따라서 본 스쿠치카총의 양식장 현장의 구제법을 강구함에 있어 광조건을 유지하여 스쿠치카의 증식을 억제시킨 상황에서 약육하는 방법으로서의 효과적인 치사농도를 설정한다면 매우 유효한 스쿠치카 치료법으로 활용되어질 수 있을 것으로 판단되어졌다.

3. 어류병원 기생충류인 스쿠치카충에 대한 효과 (*in vitro*)

- 스쿠치카충의 분리 및 배양 : 기생충의 감염어의 표피점액을 일정량 긁어내어 HBSS에 현탁시킨 후 부유액을 만들어 30분간 실온에 방치한 후, 800 rpm으로 10분간 원심분리시켜 상등액을 버리고, 침전물을 MEM-10 (minimum essential medium, 10% FBS, streptomycine, penicilin)에 현탁시켜 30분간 방치 후, 동일하게 원심분리한 상등액을 제거하고 총체만을 얻어, 혈구계수기로 계수하여 일정수의 총체 현탁액을 제조하였다. 제조된 총체 현탁액을 실험실내에서 계대하여 일정수 (2.5×10^5 cells/ml)로 미리 준비하여둔 FHM 세포에 접종하여 17°C에서 배양하였다
- 감염 단계의 총체를 대상으로 불활성화 효과 검증 : ALA 농도별, 반응시간 별에 따른 스쿠티카 살멸 효과를 측정하여 스쿠티카 구제를 위한 최적 AIA 농도와 처리시간을 검토하였다. FHM cell line에 배양된 스쿠티카 배양액을 3000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 버리고 PBS를 첨가하여 3회 세척하여 실험에 사용하였다. 멸균한 3차 증류수로 만든 1 M ALA 용액

을 원액으로 하고 2배씩 희석하여 1024배까지 희석하였다. 96 well microplates에 스쿠티카를 각 well에 50 μ l씩 넣고 2단계로 희석된 ALA 용액을 가하여 120분 동안 배양하면서 스쿠티카충의 생존 여부를 관찰하였다. 그리고 2단계로 희석된 ALA 용액에 10분 간격으로 스쿠티카충을 접종하여 각 농도에서의 스쿠티카충의 사멸시간을 측정하였다. 접종사이마다 5분은 stirring하였고 5분은 방치하였다. 반응이 끝난후 생체검사 염색액인 1% trypan blue를 각 wells에 100 μ l씩 동일하게 첨가하여 혼합한 후, ALA 희석액과 반응한 스쿠티카충을 시간대별로 그 수를 혈구계산판을 이용하여 측정하였다

연구 결과 ALA의 농도가 1 M에서 30 mM의 경우 처리시간 10분으로 스쿠티카를 완전히 사멸시킬 수 있었으며, 15 mM에서 8 mM의 농도범위에서는 30분 이상의 처리조건에서 50%이상의 스쿠티카가 사멸되었고, 4 mM의 농도조건일 경우 1시간의 처리로 구제 가능한 결과를 얻을 수 있었다. 1 M에서 4 mM의 농도범위의 처리조건에서 최소한 2시간의 처리에 의하여 스쿠티카의 구제가 가능한 것으로 나타났다. 그 이상의 희석율에서는 사멸개체의 빈도가 급격히 감소하여 유효한 수치를 얻을 수 없었다.

표 15. ALA처리 농도별, 반응시간별 스쿠치카층의 생존율 (%)

희석율	시간										
	10	20	30	40	50	60	70	80	90	110	120
원액	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/16	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/32	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
1/64	45	50	45	25	40	40	0	0	0	0	0
1/128	50	50	30	30	20	45	30	45	40	10	10
1/256	50	60	40	45	35	55	40	40	35	40	10

4. 스쿠치카층의 어체 인위감염에 대한 예방 및 치료효과 (*in vivo*)

가. 스쿠치카층의 어체 인위감염에 대한 예방효과

- 어류 사육 및 ALA의 처리 : 20미의 25g전후의 넙치를 실험구 2구 및 대조구 1구로하여 순환여과 시스템에서 사육하면서 실험구 1은 수조 사육수중에 실험개시 매 3일에 1회 10ppm의 농도로 ALA를 처리하여 3주간 사육하고, 실험구 2는 매일 먹이는 인공배합사료(EP, 어체중 3%: 15g)에 10mM의 ALA용액을 1ml 씩 분무 후 (1.67mg/day) 건조시켜 투여하면서 3주간 사육하였다. 이 기간동안 실험2구를 제외한 실험1구 및 무처리구는 실험2구의 사료량과 동일한 양으로 시판인공배합사료를 ALA 처리없이 그대로 사용하여 사육하였다.

인위감염은 FHM 세포상에서 순수 배양되어진 충체를 이용하여 인위적인 감염실험을 행하였다. 충체의 인위감염은 투여 실험사육 3주 후에 시행하였고, 인위공격 방법은 배양충액 (1000개체/ml)에 직접 침지하여 폭기 상태에서 30분간 노출하는 방법으로 행했다. 인위 감염시킨 후, 각각의 실험구별 실험어는 관찰용 수조로 옮겨 2주간 그 감염 및 감염에 따른 폐사를 관찰하였다. 실험전 기간동안의 수온은 20℃ 전후를 유지하였다. 실험 결과 ALA를 경구 투여 사육한 실험군의 충체 감염에 의한 생존율이 85-95%로 대조군의 45%에 비하여 월등히 향상시킬 수 있는 것으로 나타났다. 이 결과를 바탕으로 ALA의 경구투여에 의한 사료의 개발이 사업화가 가능한 것으로 판단이 되었다.

표 16. ALA처리에 따른 넙치의 사육실험 결과

ALA투여방법	실험어체수	사육중폐사	생존율(%)
침지법	20미	0	100
경구법	20미	0	100
무투여대조	20미	0	100

표 17. ALA처리 사육넙치의 스쿠치카충 인위 감염에 대한 예방 효과

ALA투여방법	실험 어체수	인위 감염 후 경과 일수에 따른 폐사미수								생존율 (%)
		0	1	3	5	7	10	12	14	
침지법	20미	0	0	0	1	0	0	2	0	85
경구법	20미	0	0	0	0	0	1	0	0	95
무투여대조	20미	0	0	0	1	3	2	4	1	45

나. 실험사육수조내 스쿠치카 인위감염어에 대한 치료효과

- 실험어 : 넙치 치어 평균체중 2g을 각 실험구 30미씩 플라스틱 사육수조에 수용, 1주일간 예비사육을 행하여 안정화 시켰다.
- 인위 감염 실험 : 스쿠치카 기생충 *Scuticocilicida*을 감염병원체로서 사용, 인위감염방법은 침지법으로 행하였다. 감염병원체의 감염량은 세균은 10^4 CFU/ml, 스쿠치카충은 1000cell/ml이 되게하여, 각 각을 1시간동안 침지하여 감염시키고, 침지시간 종료후 사육조로 옮겨서 3일간 감염기간을 준 후, 감염 4일 후 되는 날에 ALA를 사육수조수량에 20ppm되게 처리하여 환수 없이 1일간 에어레이션조건으로 사육 후, 깨끗한 물로 환수하여 2주일 간 사육하면서 감염에 따른 어체의 폐사를 확인하였다. 인위적인 감염 후 3일간의 경과가 감염 병원체의 조건에 따라 어체 감염단계에서 볼 때 아직 감염초기 일 경우도 있고 그렇지 않을 수도 있는데, 그러한 부분의 실험적 고려를 위해 감염 후 감염기간을 조정해 본다면 그 결과에 차이는 날 것으로 생각되지만, 그 치료 효과는 탁월한 것으로 밝혀졌다.

표 17. *Scuticociliatida* 감염 넙치의 ALA치리에 따른 치료효과

감염 어체수	인위 0 3	감염 후 처리(4)	경과 일수에 따른 폐사미수							생존율 (%)
			5	7	10	12	14	17		
처리구 30미	0	0	0	0	0	2	1	0	90	
대조구 30미	0	0	6	10	8	3	3	0	0	

제 4 절 현장 적용 및 치료예

● 치료예 1. 스쿠치카 감염 종묘생산장의 넙치에 대한 적용

넙치 종묘 생산장에서 생산 후, 판매 중에 스쿠치카 감염이 발생되어 그 판매를 중단하고 있는 종묘생산장의 넙치 치어를 대상으로 ALA를 처리하였다. ALA의 처리 방법은 감염 어군에 포함된 어체를 각 30미씩 3개의 수조에 격리 수용하고, ALA처리 A군 (10 ppm), ALA 처리 B군 (1 ppm) 및 ALA 무처리 대조군으로 나누어 경시적인 폐사율의 변화를 확인하였다. ALA 처리 각 실험구를 3일 간격으로 3회 처리하고 10일째까지의 결과를 정리하였다. 종묘 생산장에서 선별을 통하여 감염어 만을 모아놓은 수조에 수용되어져 있는 증증어가 치료 대상이었다.

- 치료 결과 : 처리어의 활력이 처리 다음날부터 눈에 띄게 좋아졌으며, 종래에 계속되어지는 폐사가 현저히 줄어드는 경향을 보였다. 그 이후 사육용수중의 병원체 관리가 가능한 오존처리 시스템을 적용하고 있는 사육장의 사육수조에 수용하여 사육한 결과 정상적인 사육이 가능하였으며, 2주간의 사육기간 후, 어체의 샘플링을 통한 어체내 스쿠치카의 감염을 확인한 결과 그 감염이 확인되어지지 않았다. 저농도에서의 치료효과는 알려지지 않은 요인의 작용이 있는 것 같으며 1 - 3ppm의 현장 처리 조건에서 질병의 치료가 되어지는 결과를 얻었다. 본 물질의 현장 적용가능 농도 1 - 3ppm은, in vitro의 증식 억제실험결과에서 나타내는 증식저해 유효농도인 약 10 - 100 mM의 농도와 비교해 보았을 때 그 차이가 크게 나타나는데 이점은

- 1) 병원체 증식조건에 있어서의 *in vitro* 및 *in vivo*상의 차이
- 2) 병원체 생존에 미치는 *in vivo* 상의 생체내 억제 역할
- 3) *in vitro*와 달리 *in vivo*상에서 인위적인 관리를 초월하는 노출시간
 그 외 알 수 없는 면역 활성화등의 기작으로 그 농도가 훨씬 낮은 조건에서도 효과적인 결과를 나타내는 것으로 추정된다.

● 치료예 2. 스크치카 감염 넙치에 대한 적용

2000년 1월 중순, 전남 해남, 만나 수산, 넙치 양식
 150-200 g의 넙치가 수조당 3,000-4,000 미 사육
 수조당 수조수를 5 ton으로 조절한 후 ALA를 0.5 ppm으로 가하여 2시간 동안 약욕. 5 일간 5 회 처리

초기 폐사: 1일 수조당 250-300미의 폐사가 일어났으며 약 10일 경과 되었음

약욕 1일째: 200-250 미 사망 약욕 2일째: 약 80-90 미 사망

약욕 3일째: 약 40-50 미 사망 약욕 4일째: 약 10 미 사망

약욕 5일째: 스크치카충에 의한 폐사는 나타나지 않았다

약욕 5일째의 병흔이 남아있는 넙치 10 미를 수거하여 현미경으로 조직을 관찰한 결과 조직내의 스크치카충 99% 이상이 활력은 잃은 상태로 관찰되었었다

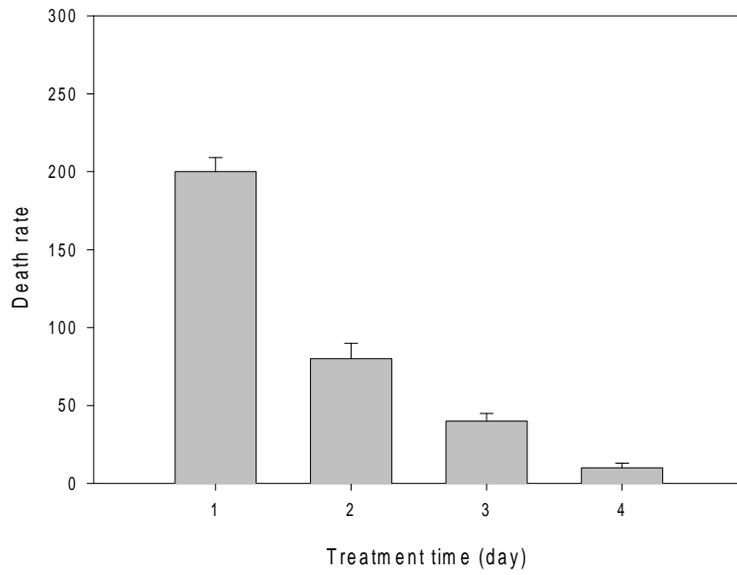


그림 64. ALA 약육처리 결과

● 치료예 3. 스키투치카 감염 넙치에 대한 적용

경남 통영시, 2000년 5월 6일, 진양수산. 넙치 양식
수조당 200 - 250 g의 넙치 약 8,000미를 수용하여 육성중이며 매일
10-15미의 넙치가 스키투치카충의 감염에 의해 폐사. 수조당 사육수를 25
ton으로 조정한 후 ALA를 0.2 ppm 또는 1 ppm으로 가하여 2 시간 동
안 3일간 3회 약욕 처리한 결과 1 ppm 처리구는 완전히 스키투치카 충으
로부터 구제되었으며, 0.1 ppm 처리구는 90%이상이 치유되었음

● 치료예 4. 스키투치카 감염 넙치에 대한 적용

제주시 북제주군, 2000년 4월 중순, 제주수산, 넙치 양식
수조당 200-250 g의 넙치 약 6,000미를 수용하여 육성중이며 매일 10미
정도의 넙치가 스키투치카충의 감염에 의해 폐사. 수조당 사육수를 20
ton으로 조정한 후 ALA를 0.1 ppm 또는 0.2 ppm으로 가하여 2시간
동안 5일간 5회 약욕 처리한 결과 두 처리구 모두 스키투치카충으로부터
구제되었다.

제 5 절 사업화 검토

1. 사업화 핵심 기술 분야

본 기술은 크게 1) ALA의 경제적 생산을 위한 균주 개량기술과 2) 이를 통하
여 생산된 ALA 의 현실적으로 수익성 높은 적용분야의 개발로 대분 할 수 있
다.

- **균주 개량기술** : ALA의 생산성 향상을 위하여 *Bradyrhizobium*으로부터 ALA synthase 유전자를 *E. coli*에 도입 기존 광합성 균주에 비하여 높은 생산성 (4.5g/liter) 및 폐자원 활용 발효를 통한 경제적 생산에 필수적인 암조건하의 발효를 가능하게 하였다.
- **활용분야의 개발** : 신물질의 개발을 통한 초기 창업시 안정적인 수요처의 확보가 필수적이다. 본 연구진은 양식어장에 대량폐사의 원인인 스쿠치카 감염에 의한 피해를 극적으로 감소시킬 수 있는 면역증강 및 항 미생물 제재 다시 말해 예방 및 치료효과를 갖는 신물질로서 ALA의 효능을 *in vitro*, *in vivo* 실험 결과 및 시제품의 field test를 통하여 검증하였다.

2. 국내외 기술 개발 현황 및 사업화 필요성

국내에서의 경우 ALA의 생산 광합성 균주의 screening 정도의 기술 수준으로 그 생산성이 현실적 활용에는 불가능하다. ALA의 생산, 응용 (제조제, 식물 성장 촉진, 의약분야 활용)에 대한 국제 특허는 최근 10년간 약 150건으로 특히 균주 개량 및 활용 분야에 대한 용도특허출원이 1998년 이후 급증하고있다. 가장 활발한 연구가 진행되는 나라는 일본으로 (Cosmo Oil Co.) 최근 특허출원의 약 50% 이상을 차지하고 있다. 연구 및 특허의 초점은 변이 광합성 균주의 screening을 통하여 공정의 개선, 생산성의 향상 및 새로운 활용분야의 개발에 맞추어져있다.

어병의 치료제로 수의 및 인체 약제를 이용한 수산약제로서의 활용이 다양하게 행해지고 있고, 국내외적으로 비브리오나 에드워드병의 백신 개발을 위한 연구도 행해진 바 있다. 그러나, 스쿠치카 감염증 및 바이러스의 경우 그 치료방법이 아직까지 어려운 실정에 있어 종묘 생산의 경우 진단법의 개발을 통하여 중

로 생산에 사용할 치어의 감염 상황을 미리 파악하여 감염이 되어있지 않은 치어를 이용하여 건강 어체의 생산을 위한 노력이나, 백신개발 또는 면역활성제의 투여에 따른 어체의 방어력을 강화시키는 예방적 차원의 방제법이 연구되고 있으나 현실적인 적용이 어려운 실정이다.

현재 ALA의 생산은 광합성 세균으로부터 생산이 되며 생산량을 높이기 위하여 Levulinic acid (LA) (ALA dehydratase의 competitive inhibitor)를 발효 중 첨가를 한다. 그러나 이로 인하여 cell growth가 저해되며 단가가 비싸므로 생산원가에서 차지하는 비중이 높다. 또한 광합성 세균을 이용한 발효는 약 120시간 정도 걸리므로 본 연구진의 12시간에 비하여 약 10배 이상의 생산성이 떨어진다. 또한 광합성 세균은 light (明) 조건에서 ALA를 생산하므로 원가절감에 필수적인 폐자원의 활용시 높은 혼탁도로 인하여 그 생산성이 더 떨어지므로 暗 (dark) 조건에서 ALA의 생산성을 높이기 위한 시도가 필요하다. 현재 일본의 기업의 경우 ALA의 생산은 정제를 통한 의약 (암치료등) 화장품 (sun blocker)등 고가 상품의 개발에 맞추어져 있으나 현 단계에서는 그 수요가 크지 않다. 또한 현재 시장성이 큰 환경 친화성 제초제로의 활용은 본 연구진의 상품화 목표인 양식어장의 질병 예방 (어체기준 0.01ppm) 치료제 (어체기준 0.2ppm)로의 활용시에 비하여 그 활성 농도 (mM 수준)가 높으므로 정제제품의 경우 그 경제성이 없다.

현재 양식어장의 항생제 및 포르말린등 화학 약제의 과남용으로 인한 환경오염 및 그 효과 또한 어체내에 침투한 원생충에 대하여는 없으므로 궁극적인 치료방법이 될 수 없다. 그럼에도 불구하고 원생충성 (예 스쿠치카)성 질병에 대한 예방 및 치료제가 없으므로 이의 개발 및 상품화를 통한 보급이 시급하다.

3. 경쟁사와의 기술적 비교

현재 국내에는 비교대상이 없으며 국외의 경우 이 분야의 선두인 일본의 Cosmo Co.와 항목별 비교하여 본 기술을 평가하면

	Cosmo co. (일본)	본 연구진	비 고	평 가
균 주	변이 <i>R. sphaeroid</i> (광합성세균)	형질전환 <i>E. coli</i>	자체분리	비교유보
원부자재 활 용	LA, succinate 배지사용	LA, succinate 불필요	해양 폐자원 이용 (고영양)	우위
생 산 성	발효소요시간 120시간 3 g/L 생산 (Sasaki 등의 논문)	발효소요시간 12시간 4.5 g/L 생산		우위
공 정	정제공정을 통한 고순도 제품, 광조건에 의한 발효	발효, 원심분리, 건조의 단순한 공정, 저순도 제품 암조건의 발효 저가제품		우위
Market	고가제품 정책	시장 (양식어 시장)	새로운 시장	우위

4. 국내외 시장 규모 및 전망

사료첨가제로 사용될 때 국내 시장 규모는 1999년 연간 양어용 배합사료 생산 (EP + MP 사료)은 약 100,000 M/T이므로 시제품 실험 결과 500mg ALA/1톤 사료 이하의 사용으로 충분히 에드워드, 비브리오 및 포도상구균의 감염에 대한 예방 효과가 있었으므로 연간 양식사료첨가제로서 약 50 Kg ALA 수요가 있다. 현재 많이 사용되는 면역 증강제로는 베타 글루칸, 키토산 함유제제가 많이 사용되고있는데 내부 기초 실험 결과 ALA의 바이러스, 병원성 세균 및 원생충에 대한 효과가 이들 제품에 비하여 탁월하다.

1999년 국내 양식어장의 치료제로서 양식어 약제 시장은 공장도 가격기준 연간 약 200억원 이며 전량 수입에 의존하고 있다. 치료제로 ALA는 어체 1톤당 1g (습식사료 첨가, 0.2g X 5일 기준)이 필요하므로 연간 50,000 M/T의 국내 양식어 생산량의 사용기준으로 약 50Kg의 수요가 있으며 기타 침지 치료 (0.2 ppm)시 소요량을 포함하여 도합 연간 약 60-80 Kg의 수요를 예측할 수 있다.

국외 시장규모는 국내 양식어류 생산량 (2000만톤) 및 사료 생산량 (1300만톤)과 비교시 국내 시장에 비하여 약 300-400배 정도가 되므로 약 20 - 30 M/T의 시장으로 예측된다. 특히 현재까지는 양식어장의 바이러스 질병에 대한 예방 및 치료 제제가 없으므로 이의 상품성이 높다. 또한 이 결과를 바탕으로 축산 사료 첨가제 (1,500만톤)로의 활용도 그 효과가 기대가 되는 등 다방면으로 수요가 급증 할 것으로 예측이 된다.

향후 3년간의 시장 동향은 최근 일본 중국과의 해양협정 조인결과 원근해 어장의 감소로 해양 목장화등 대형 양식사업이 요구되고있으며 자원의 고갈로 잡는 어업으로부터 기르는 양식업으로의 전환이 세계적 추세다. 이로 인하여 2010년 양식사료 생산량은 2000년 1300 만톤에서 3700 만톤으로 약 3배정도 증가 될 것으로 예측되고 있다. 또한 최근 환경유해 물질의 사용에 대한 규제가 강화되고있으며, 잔류 항생제에 대한 소비자의 거부감의 확산으로 이의 필요성이 더욱 증가

하고 있다. 특히 양식어장의 항생제 과남용에 의한 내성의 증가로 기존의 항생제의 사용량 및 기간이 2배 이상으로 급증하고 있으므로 ALA와 같은 천연 면역증강 및 항균 효과제에 대한 시장 요구가 증가하고 있다.

이러한 연구개발 및 시장 동향을 근거로 향후 3년간 형성 될 시장 규모를 예측하면

	1차년도	2차년도	3차년도
양식어 분야	80 kg	100 kg	120 kg
축산사료분야		200 kg	1,000 kg
기타 (제초제, 의약품 등)			80 kg (추정)
국외시장 (수출)			800 kg (추정)
계	80 kg	300 kg	2,000 kg

5. 국내 양식어장 (수요처) 현황 사업화 경제성 평가

국내 양어장은 육상 수조식 (광어), 가두리 (광어 우럭), 축제식 (광어, 농어, 송어) 노자식(새우, 송어)으로 구분이 되며 평균 양식면적은 800평 정도이며 (가두리는 1ha) 사료비용의 약 10% (평균 1500-2000만원)를 약제 구입비용으로 소비하고 있다. 현재 약 10,000개 내외의 양식장이 있는 것으로 추정되고 있으나 정확한 수는 확인이 되고 있지 않다. 많은 경우의 양식업자는 항생제를 치료는 물론 예방목적으로도 사용하고 있으므로 성어의 경우 내성 균주에 의하여 사용량 및 빈도가 잦아지므로 생산 비용상승 및 환경오염 문제가 심각하다.

ALA는 기존의 예방제, 화학제제 및 항생제에 비하여 그 예방 및 치료제로서 효과가 뛰어나며 환경 친화성, 생체 무독성 생물 신소재이며 또한 폐자원을 활용의 부수적인 효과가 있으므로 기존의 항생제, 합성 항균제 및 예방제와 가격을 기준으로한 단순 비교가 힘들다.

ALA의 제조원가는 실험실 시약 기준 (소량 구매, 고순도) ALA 1g 생산시 소요되는 원부자재 (LB 배지, succinate등) 비용은 약 700원이며 대량 구매시 1/3이하로 절감 할 수 있으므로 원가에 미치는 영향이 낮다. 또한 해양 폐자원 (ie, 오징어 내장) 활용시 그 단가는 훨씬 낮아질 수 있다. 생산 공정도 발효- 균체 제거 (광합성 세균 사용시 제거 공정 불필요) - 부용제 첨가 - 건조 - 포장의 단순한 공정이므로 인건비, 개발비, 시설 투자비 회수 (감가상각), utility 비용, 부용제 (400원/Kg), 포장비 (700원/Kg) 등이 주요 원가 구성 요소가 된다.

참 고 문 헌

- 1) Alanpovic, P. and Johnson, B.C. 1959. Relationship between Coenzyme Q and α -Tocopherol metabolites, *Arch. Biochem Biophys.*, 84; 247.
- 2) Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. 1989. Current protocols in molecular biology, **John Wiley & Sons, New York.**
- 3) Avissar, Y.J, Ormerod, J.G, and Beale, S.I, 1989, Distribution of delta-aminolevulinic acid Biosynthesis pathway among phototropic bacteria groups, *Arch. Microbiol.*, 151; 513.
- 4) Beale, S.I, and Castelfranco, P.A, 1974, The biosynthesis of delta-aminolevulinic acid in higher plant. II Formation of ^{14}C -5-aminolevulinic acid from labeled prequersors in greening plant tissue, *Plant Physiol.*, 53; 297.
- 5) Beale, S.I., Gold, M.H., and Granick, S., 1979, Chemical synthesis of 4,5,-dioxavaleric acid and its non-enzymatic transamination to 5-aminolevulinic acid, *Phytochemistry*, 18; 441.

- 6) Becerril, J.M. and Duke, S.O. 1989, Protoporphyrine IX content correlates with activity of photobleaching herbicides, *Plant Physiology*, 90; 1175
- 7) Cheung, R.J., Nigrelli, R.F. and Ruggieri, G.D. 1980. Studies on the morphology of uronema with a description of the infection in marine fishes, *J. Fish Disease*, 3; 295;
- 8) Drolet M., Peloguin L., Escelard Y., Cousineau L., and Sarsaman A., 1989. Isolation and nucleotide sequence of the hemA gene of *E. coli* K-12, *Mol. Gen. Genet*, 216; 347.
- 9) Ellen, N.L, and Kaplan S., 1993. 5-Aminolevulinic acid availability and control of spectral complex formation in hemA and hemT mutant of *R. sphaeroides*, *J. Bacteriol.*, 175; 2304.
- 10) Elliott T. 1989, Cloning, genetic characterization and nucleotide sequence of the *hemA-prfA* operon of *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriology* 171; 3948
- 11) Follettie, M.T., Peoples, O., Agoropoulou, C., and Sinskey,

- A.J. 1993. Gene structure and expression of the *Corynebacterium flavum* N13 *ask-asd* operon, *J. Bacteriol.*, 175; 4096.
- 12) Follettie, M.T., and Sinskey, A.J. 1986. Recombinant DNA technology for *Corynebacterium glutamicum*, *Food Technol.*, 40; 88.
- 13) Fukuda, H., Casas, A., Chueke, F., Paredes, S., and Batle, A.M. 1993. Photodynamic action of endogenously synthesized porphyrins from aminolevulinic acid, using a new model for assaying the effectiveness of tumoral cell killing, *Int. J. Biochem.*, 25; 1395.
- 14) Gloria, F.C, and Dailey A.H. 1993, Expression of mammalian 5-aminolevulinic acid synthetase in *E. coli*: overproduction, purification and characterization, *J. Biol. Chem.*, 278, 584-590.
- 15) Grimm, B., Bull, A., and Breu, V. 1991, Structural genes of glutamate 1-semialdehyde aminotransferase for porphyrin synthesis in a cyanobacterium and *E. coli*, *Mol. Gen. Genet.*, 225; 1.
- 16) Gubler, M., Park, S.M., Jetten, M., Stephanopoulos, G.,

and Sinskey, A.J. 1993. Effect of phosphoenolpyruvate carboxylase deficiency on metabolism and lysine production in *Corynebacterium glutamicum*, *Appl. Micro. Biotechnol.*, **40**; 409.

- 17) Hansson, M., Rutberg, L., Schroder, I. and Hederstedt L. 1991, The *Bacillus subtilis* hemAXCDBL gene cluster, which encodes enzymes of the biosynthetic pathway from glutamate to uroporphyrinogen III, *J. Bacteriol.*, **173**; 2590.
- 18) Hoffman, G.L. 1955. A disease of freshwater fishes caused by tetrahymena and a key for identification of holotrich ciliates of freshwater fishes, *J. Parasitol.*, **61**; 217.
- 19) Hirayama, O. 1968. Lipids and lipoprotein complex in photosynthetic tissues, *Agr. Biol. Chem.*, **32**; 34.
- 20) Hirotsani, H., Ohigashi, N. K., Koshimizu, K., and Takahashi, E. 1991. Inactivation of T5 phage by cis-vaccenic acid, and antiviral substance from *Rhodospseudomonas capsulata*, and by unsaturated fatty acids and related alcohols, *FEMS Microbiol. Letters.*, **77**; 13.

- 21) Hirotsu, H., Agui, Y., Kobayashi, M., and Takahashi, E. 1990. Removal of coliphages from wastewater effluent by phototrophic bacteria, *Wat. Sci. Tech.*, **22**; 59..
- 22) Hua, Z., Scott, L.G., Thomas, H.F., and Russell, H., 1995, Effectiveness of delta-aminolevulinic acid induced protoporphyrin as a photosensitizer for photodynamic therapy *in Vivo*, *Cancer Research*, **55**; 1723.
- 23) Ikemi, M., Hashimoto, M., and Murooka, Y. 1993, Cloning and expression of 5-aminolevulinate (ALA) synthetase gene of *E. coli*, *JPN. Kokai Tokyo Koho JP 05 227 976*.
- 24) Janschen, R., Harald, H.G., and Thauer, R.K. 1981, *FEMS Microb. Lett.*, **12**; 167.
- 25) Jetten, M.S.M. and Sinskey, A.J. 1995. Recent advances in the physiology and genetics of amino acid-producing bacteria, *Crit. Rev. Biotechnology*, **15**; 73.
- 26) Jetten, M.S.M. and Sinskey, A.J. 1993. Characterization of phosphoenolpyruvate carboxykinase from *Corynebacterium glutamicum*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **111**; 183.

- 27) Katayama, K., Takada, M., Yuzuriha, T., Abe, K., and Ikenoya, S. 1980. Simultaneous determination of ubiquinone-10 and ubiquinol-10 in tissues and mitochondria by high performance liquid chromatography, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **95**; 971.
- 28) Kini, R.M. and Evans, H.J., 1986. A common cytolytic region in mycotoxins, hemolysins, cardiotoxins and antibacterial peptide, *Int. J. Peptide Protein Res.*, **34**; 277.
- 29) Kipe-Nolt, J.A. and Steven, S.E., 1980, Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid from glutamate in *Agmenellium quadruplicatum*, *Plant Physiol.*, **65**; 126.
- 30) Kobayashi, M., and Mokondo. K. 1984. The Third International Symposium on our Environment, **Singapore, Mar., 27.**
- 31) Kobayashi, M., and Kurata, S.I. 1978. The mass culture and cell utilization of photosynthetic bacteria process, *Biochemistry*, **13**, NO. 9, 27.
- 32) Lee, H.-S. 1994. Metabolic control of aspartate-derived amino acid production in *Corynebacterium glutamicum*,

The Microorganisms and Industry, 20; 2.

- 33) Lee, H.-S. 1995. *Corynebacterium*의 분자유종과 산업적 이용, *The Microorganisms and Industry*, 21; 196.
- 34) Lee, H.-S. and Sinskey, A.J. 1994. Molecular characterization of *aceB*, a gene encoding malate synthase in *Corynebacterium glutamicum*, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 4; 256.
- 35) Lee, B.W. and Shin, D.H. 1982. Antimicrobial effects of some plant extracts and their fractionates for food spoilage microorganisms, *Kor. Food Soc. Technol.*, 23; 205.
- 36) Lee, M.G., Kobayashi, M., and Yasumoto, M. 1990. Hypocholesterolemic effect phototrophic bacterial cells in rats, *J. Nutr. Sci, Vitarninol.*, 36; 475.
- 37) Lee, N.-S., Park, J.H., Han, K.S., and Hur, M.D. 1994. Histopathological changes in fingerings of Japanese flounder with severe scuticociliatosis, *J. Fish Pathol.*, 7; 151.
- 38) Liebl, W. 1991. The genus *Corynebacterium*-nonmedical,

p. 1157-1171. In A. Balows, H. G. Trer, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (ed.), **The Prokaryotes**. Springer-Verlag, Berlin, FRG.

- 39) Madigan, M.T. and Gest, H. 1980. Growth of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata*, *J. Bacteriol.*, 148; 908.
- 40) Madigan, M.T. and Gest, H. 1970. Dark anaerobic dinitrogen fixation by a photosynthetic microorganism, *Science*, 204; 1429.
- 41) Madigan, M.T. and Gest, H. 1979. Growth of the photosynthetic bacterium *Rhodospseudomonas capsulata* chemoautotrophically in darkness with H₂ as the energy source, *J. Bacteriol.*, 137; 524.
- 42) Madigan, M.T., Cox, J.C., and Gest, H. 1982. Photopigments in *R. capsulata* cells grown anaerobically in darkness, *J. Bacteriol.*, 150; 1422.
- 43) Malumbres, M. and Martin, J.F. 1996. Molecular control mechanisms of lysine and threonine biosynthesis in amino acid-producing corynebacteria: redirecting carbon flow, *FEMS Microbiol. Lett.*, 143; 103.

- 44) Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. **Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.**
- 45) Martin, A.M. and Patel, T.R. 1991. Bioconversion of wastes from marine organism, in Bioconversion of waste materials to industrial products, (ed, A.M. Martin), **Elsevier, New York, P. 417.**
- 46) Matsumoto, H., Tanida, Y., and Ishizuka, K. 1994. Porphyrin Intermediate Involved in Herbicidal Action of delta-Aminolevulinic Acid on Duckweed, ***Pesticide Biochemistry, 48; 214.***
- 47) Matsumoto, T.H., Usui, K., and Ishizuka, K. 1992, Basis of Differential Tolerance of Plant Species to delta-Aminolevulinic Acid, ***Weed Research, 37; 60.***
- 48) Menduz, R., Sota, M., Vega, M.C. 1988. Management and treatment of wastewater from seafood canning-factories, in Processing of the Second national Congress of Biotechnology, **BIOTEC-88, Barcelona, Spain.**
- 49) Mizuno, Y., 1993. Control methods of diseased flounder

used in fish farm in Japan, *J. Fish Pathol.*, **6**; 219.

- 50) Murakami, K., Hashimoto, Y., and Murooka, Y. 1993a, Cloning and characterization of the gene encoding glutamate 1-semialdehyde aminomutase, which is involved in delta-aminolevulinic acid synthesis in *Propionibacterium freudenrichii*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**; 347.
- 51) Murakami, K., Korbsristate, S., Asahara, N., Hashimoto, Y., and Murooka, Y., 1993b. Cloning and characterization of the glutamate 1-semialdehyde aminotransferase gene from *Xanthomonas campestris pv. phaseoli*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **38**; 502.
- 52) Naritomi, T., Tanimoto, Y., Yamaguchi, M., Okamura, K., and Minami, K. 1993. Effect of glutamate on extracellular production by a thermophilic, methanol-utilizing methanogen, *Methanosarcina sp.* CHTI 55, *J. Ferment. Bioeng.*, **75**; 73.
- 53) Noparatanaraporn, N., Sasaki, K., Nishizawa, Y., and Nagai, S. 1986. Stimulation of vitamin B₁₂ formation in aerobically-grown *Rhodospseudomonas gelatinosa* under microaerobic condition, *Biotechnol. Lett.*, **8**; 491.

- 54) Noparatnaraporn, N., Nishizawa, Y., Hayashi, M., and Nagaai, S. 1983. Single-cell Protein production from cassava starch by *Rhodospseudomonas gelatinosa*, *J. Ferment. Technol.*, **61**; 515.
- 55) Ohmori, H., Ishitani, H., and Sato, K. 1974. Metabolism of glutamate in nonsulfur bacteria participation of vitamin B₁₂, *Agr. Biol. Chem.*, **38**; 359.
- 56) Old I. G., Girons, I.S., and Richaud, C. 1993. Physical mapping of the scattered methionine genes on the *Escherichia coli* chromosome, *J. Bacteriol.*, **175**; 3689.
- 57) O'Neil, G.P. and Soo, D. 1990. Transfer RNA and the formation of a heme and chlorophyll precursor, 5-aminolevulinic acid, *BioFactors*, **2**; 227.
- 58) O'Neil, G.P., Thorbjarnardottir, S., Michelsen, U., Palsson, S., Soll, D., and Eggertsson, G. 1991, 5-Aminolevulinic acid dehydratase deficiency can cause ALA auxotrophy in *E. coli*, *J. of Bacteriol.*, **173**; 94.
- 59) Orth, K., Konig, K., Genze, F. and Rusk, A. 1994. Photodynamic therapy of external colonic tumour with

5-aminolevulinic acid induced endogenous porphyrin, *J. Cancer Research*, 120; 657.

- 60) Osten, C.H. Gioannetti, C.V., and Sinkey. A.J. 1989. Design of a defined medium for growth of *Corynebacterium glutamicum* in which citrate facilitates iron uptake, *Biotechnol. Lett.*, 11; 11.
- 61) Rebeiz, C.A, Juvik, J.A., and Reibez, C.C. 1988. Porphyrin insecticides: Concept and phenomenology, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 30; 11.
- 62) Rebeiz, N., Rebeiz, C.C., Arkins, S., Kelly, K.W., and Rebeiz, C.A. 1995, Photodestruction of tumor cells by induction of endogeneous accumulation of protoporphyrin IX, *Photochem Photobiol.*, 55; 431.
- 63) Rebeiz, C.A., Montazer-Zouhoor, A., Hopen, H., and Wu, S.M., 1984. Photodynamic herbicides. Concept and phenomology, *Enzyme Microb. Technol.*, 6; 390.
- 64) Rebeiz, C.A. Juvik, J.K., and Rebeiz, C.C. 1988. Porphyrin insecticides. I concept and phenomenology, *Pesticide Biochem. Physiol.*, 30; 11.

- 65) Salasch, L.H., Kollias, N., Wimberly, J., Flotte, T., Mclean, D., and Anderson, R.R, 1995. Photodynamic therapy of nonmelanoma skin cancer with topical aminolevulinic acid: clinical and histologic study, *Archives of Dermatology*, **131**; 737.
- 66) Sasaki, K., and Noparatnaraporn, N. 1981. Single-cell protein production treatment of soybean wastes with *Rhodospseudomonas gelatinosa*, *J. Ferment. Technol.*, **59**; 472.
- 67) Sasaki, K., Watanabe, K., Tanaka, T., Hotta, Y., and Nagai, S. 1995. 5-aminolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**; 361.
- 68) Sasaki, K., Watanabe, K., Tanaka, T., Hotta, Y., and Nagai, S. 1995. 5-aminolevulinic acid production by *Chlorella* sp. during heterotrophic cultivation in the dark, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**; 361
- 69) Sawada, H. and Rogers, P.L. 1977. Photosynthetic bacteria in waste treatment : Mixed culture studies with *Rhodospseudomonas aupsulata*, *J. Ferment. Technol.*, **55**; 311.

- 70) Shipman, R.H., Kao, L.C., and Fan, L.T. 1975. Single-cell protein production by photosynthetic bacteria cultivation in agricultural by-products, *Biotech. Bioeng.*, **17**; 1561.
- 71) Smith, J.L., Scholler, J., Moore, H.W., Farley, T.M., and Folkers, K. 1966. Studies on the mechanism of vitamin-like activity of coenzyme Q, *Arch. Biochem. Biophys.*, **116**, 129.
- 72) Schäffer, A., Kalinowski, J., Simon, R., Seep-Feldhaus, A.H., and Pühler, A. 1990. High-frequency conjugal plasmid transfer from Gram-negative *Escherichia coli* to various Gram-positive Coryneform bacteria, *J. Bacteriol.*, **172**; 1663.
- 73) Schwarzer, A., and Pühler, A. 1991. Manipulation of *Corynebacterium glutamicum* by gene disruption and replacement, *Bio/Technology*, **9**; 84..
- 74) Solaiman, D. and Uffen, R.L. 1982. Pyruvate dependent diauxic growth of *R. rubrum* in light, *J. Bacteriol.*, **152**; 1175.
- 75) Suda, M., Nakagawa, H., and Kimura, H. 1971.

Cystathionine synthase, *Methods in Enzymol.*, 17B; 454.

- 76) Tanaka, T., Takahashi, K., Hotta, Y., Takeuchi, Y., and Konnai, M., 1992. 5-aminolevulinic acid as plant growth stimulator, *Eur. Pat. Appl.* EP514 776,
- 77) Tanaka, T., Sasaki, K., Noparatnaraporn, N., and Nishio, N. 1994. Utilization of volatile fatty acids from the anaerobic digestion liquor of sewage sludge for 5-aminolevulinic acid production by photosynthetic bacteria, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 10; 677.
- 78) Tanaka, T., Watanabe, K., Hotta, Y., Lin, D., Sasaki, K., and Nagai, S. 1991. Formation of 5-aminolevulinic acid under aerobic dark condition by mutant of *Rhodobacter sphaeroides*, *Biotechnol. Lett.*, 13; 589.
- 79) Tomioka, N., Shinozaki, K., and Sugiura, M. 1981. Molecular cloning and characterization of ribosomal RNA genes from a blue green alga, *Anacystis nidulans*. *Mol. Gen. Genet.*, 184; 359.
- 80) Uffen, R.L. and Wolf, R.S. 1980. Anaerobic growth of purple nonsulfur bacteria under dark condition, *J. Bacteriol.*, 104; 908.

- 81) Uffen, R.L., Sybesma, C., and Wolf, R.S. 1971. Mutants of *Rhodospillium rubrum* obtained after long-term anaerobic dark condition, *J. Bacteriol.* **108**; 1348.
- 81) Vrati, S. 1984. Single cell protein production by photosynthetic bacteria grown on the clarified effluents of biogas plant, *Appi Microbiol Biotechnol.*, **19**; 199.
- 82) Yanase, D. and Andoh, A. 1989. Porphyrin synthesis involvement in diphenyl ether-like mode of action of TNPP-ether, a novel phenylpyrazole herbicide, *Pestic. Biochem. Physiol.*, **35**; 70.
- 83) Yoshimizu, M., Hyuuga, S., Oh, M.-J., Ikoma, M., Kimura, T., Mori, T., Nomura, T., and Ezura, Y. 1993. Scuticociliatida infection of cultured hirame-characteristics, drug sensitivity and pathogenicity of cultured scuticocilliata, *J. Fish Pathol.*, **6**; 205.
- 84) Yoshinaga, T. and Nakazoe, J. 1993. Isolation and in vitro cultivation of an unidentified ciliate causing scuticociliatosis in Japanese flounder, *Fish Pathol.*, **28**; 131.

- 85) Ziminska, H. 1987. Fish processing plant effluents-characterization, treatment and utilization, *Chem Absta.* 107; 64143j.
- 86) 김진우, 박수일, 전세규, 1992. 양식넙치로부터의 lysozyme 정제와 어류병원성 세균에 대한 정균효과, *J. Fish Pathol.* 5; 87.
- 87) 손상규, 박명애, 정승희, 허문수, 1996. 넙치 치어의 바이러스 질병의 연구, *수진사업보고* 1995; 395.
- 88) 심두생, 이주석, 허문수, 김진우, 1996. 양식생물 질병진단 연구, *수진사업보고* 1995; 405.
- 89) 전임기, 손맹현, 1996. 해산어류 순화여과 양식 기술개발 실험, 3. 회전원판 여과조의 성숙 시기 조사, *수진사업보고* 1995; 284.
- 90) 전임기, 손맹현, 이종문, 1996. 해산어류 순화여과 양식 기술개발 실험, 1. 침지식 여과 재료별 여과 능력 조사, *수진사업보고* 1995; 269.
- 91) 전임기, 손맹현, 이종문, 1996. 해산어류 순화여과 양식 기술개발 실험, 2. 침지식 여과조의 깊이별 여과능력, *수진사업보고* 1995; 277.

- 92) 최혜승, 문태석, 박승렬, 1995. 해산어 병원 생물에 관한 연구, 국립수산진흥원 사업보고; 1995
- 93)金森正雄. 1978. 光合成細菌 の 菌體成分, 醱酵の工業, 36; 934.
- 94) 來野珍吉. 1978. 農魚飼料としての光合成細菌の利用, 醱酵の工業, 36; 836;
- 95) 박응력. 1991. 식품공장 폐수 처리와 단세포 단백질 생산, 한국 산업미생물학회. 4; 87.
- 96) 北村博. 1972. 光合成細菌 およひ 微細菌類 による 有機性 廢水の處理 ならひに 資源化 による 基礎的研究(II), 醱酵協會誌, 30; 153.
- 97) 北村博. 1972. 光合成細菌 およひ 微細藻類 による 有機性廢水の處理 ならひに 資源化による 基礎的研究(I), 醱酵協會誌, 30; 77
- 98) 小林癖治. 1990. 有機物の處理と資源化, エネルギホ資源, 11; 426.
- 99) 小林癖治. 1970. 光合成細菌 による 廢液處理 と 資源化, 化

學 と生物 8; 604.

- 100) 田中, 亮太郎. 1977. 光合成細菌利用の 實用化 に 關する 考察, 醱酵の工業, 36; 9.

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 수산특정 연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니됩니다.