

Rhodospirillum rubrum N-1의 휴지균체를 이용한 균체 대사산물의 생산 조건 연구

최경민 · 양재경*

(주)일류기술 기업부설연구소, *청양대학 환경관리과

Study of metabolite production conditions by using the resting cells of *Rhodospirillum rubrum* N-1

Kyung-Min Choi · Jae-Kyung Yang*

Affiliated research center, Global Tech. Co. Inc.

*Dept. of Enviromental Management of Chong Yang college

Abstract

The effectiveness of resting cells of a photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum* N-1, was investigated on the production of extracellular δ -aminolevulinic acid(ALA). The ALA generating system required 3hr-incubation in the presence of 10 mg of resting cells per ml to obtain the maximal yield of extracellular ALA. And also, under this condition the effect of ALA inducers, i.e., 30 mM levulinic acid(LA) and L-glutamic acid(C_5 pathway precursor) was relatively higher than that of produced extracellular ALA(83 μ M). The volume of system and proper cell density appeared to be important factors for the effective production of extracellular ALA.

I. 서 론

인류의 건강 및 자연 생태계 환경을 적극 고려한 새로운 농약의 개발은 고도로 성장한 과학기술의 축적에도 불구하고 현재 세계적으로 가장 관심이 집중되고 있는 분야중의 하나로써 보다 선택적이고 잔류독성이 적은 생물농약의 개발이 계속적으로 요구되고 있다¹⁾. 현재 사용되고 있는 제초제 중에서 유기합성법에 의해 생산되는 농약의 대부분은 인체독성 및 토양잔류 독성등 많은 문제점을 안고 있다. 이러한 난제의 해결책의 일환으로써, 최근의 제초제 개발동향은 식물의 생리·생태적 특

성을 이용한 식물고유의 생명현상을 선택적으로 제어하는 제초제 연구에 역점을 두고 있으며, 특히 미생물 대사산물을 이용한 생물합성 제초제 개발에 대한 연구가 활발히 진행중에 있다²⁾.

또한, 유기폐수의 각종 생물학적 정화법에서 최근에 이르러 특히 광합성 세균에 의한 폐수처리법이 주목을 받고 있다³⁾. 광합성 세균에 의한 폐수처리는 부산물로 발생하는 슬러지를 균체로 이용함으로써 슬러지의 폐기물화를 막고 자원으로서 재이용할 수 있는 장점을 가지고 있다. 광합성 세균의 성분은 단백질 함량이 높고 각종 아미노산이 고르게 분포되어 있어 수산 및 축산사료원으로서

실용성이 크다고 알려져 있다^{1,5)}.

광합성균체의 이용은 유기성 폐수의 처리 및 제초제, 토양개선편제의 기능을 갖는 고부가가치성 유기질 비료로 개발되고 있는 집³⁾뿐만 아니라 균체 중에는 심근경색증 치료제로 알려진 Ubiquinone Q₁₀ 이외 비타민 B₁₂ 를 비롯한 각종의 비타민과 색소가 대량 함유되고 있다⁶⁾. 최근에는 항바이러스 성 물질이 추출되어 그 구조가 밝혀진바 있고 porphyrin을 포함하는 tetrapyrrole계 화합물질인 heme 함유물질의 항암효과에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다⁷⁾. 이들 균체내 물질들의 일부는 균체외로 분비되고 있으며 세포배양의 제한 영양 성분 및 제조 활성의 기능을 갖는 δ-aminolevulinic acid(ALA)가 대표적인 물질이라 할 수 있다. 폐수처리 산물의 자원화는 균체의 이용에 국한되지 않고 이와 같은 균체의 물질의 이용 즉 폐수 처리한 처리수의 이용까지 확대될 수 있을 것으로 기대된다.

ALA는 porphyrins, chlorophylls, hemes, vitamin B₁₂ 등 tetrapyrroles 유도체의 중요대사물질(key intermediate)로 작용하여, 생체 내에서의 tetrapyrroles의 생합성은 1차대사물질(primary intermediate)인 ALA의 세포내 농도에 의해 조절된다. ALA 합성속도는 이들 유도체에 의해서 feedback 저해를 받는다⁸⁾. 생물계의 ALA는 glutamic acid(C₅경로)나 glycine과 succinyl CoA(C₄경로)로

부터 각각 aminotransferase 와 ALA synthase에 의하여 생합성(Fig. 1) 되는 것으로 알려져 있다⁹⁾. C₅ 경로는 식물¹⁰⁻¹¹⁾, algae¹²⁻¹³⁾, 일부세균류¹⁴⁻¹⁵⁾ 등에서 발견되어, glutamic acid를 전구물질로 한 glutamic semialdehyde의 아미노 치환(transamination)에 의해서 ALA가 합성되는 반면, C₄ 경로는 주로 동물¹⁶⁻¹⁷⁾, 진균¹⁸⁾, 호기성세균¹⁹⁻²⁰⁾ 등에서 발견되어 전구물질인 glycine과 succinyl-CoA의 condensation에 의해서 ALA가 생합성 되는 것으로 보고되고 있다. 한편, ALA는 감광성 물질으로써 태양광선에 의해서 강력한 산화물질인 pchlide로 전환되고 이 물질에 의한 일련의 산화반응이 쌍자엽 식물에만 선택적으로 일어나 잎의 인지질이 파괴되어 고사되는 일종의 제초활성물질로 입증됨으로써 최근 ALA의 경제적 응용을 위한 연구가 시도되고 있다²¹⁾.

저분자 화합물인 ALA는 약효성, 선택성, 무독성 등 제초제로서의 조건을 구비한 생물 활성 물질로 보고되어 있으며, 기질 analogue인 levulinic acid(LA) 및 succinyl acetone은 ALA 탈수효소의 저해제로 작용하고 있어 LA의 첨가에 의해서 ALA가 균체외로 분비됨이(Fig. 2) *Methanobacterium thermoautotrophicum*²²⁾, *Chlorella vulgaris*²³⁾, *Methanosarcina backerl*²⁴⁾ 등에서 검토했었고, aminotransferase를 이용한 4,5 dioxovalerate-alanine계의 효소합성법이²⁵⁾ 보고되고 있다.

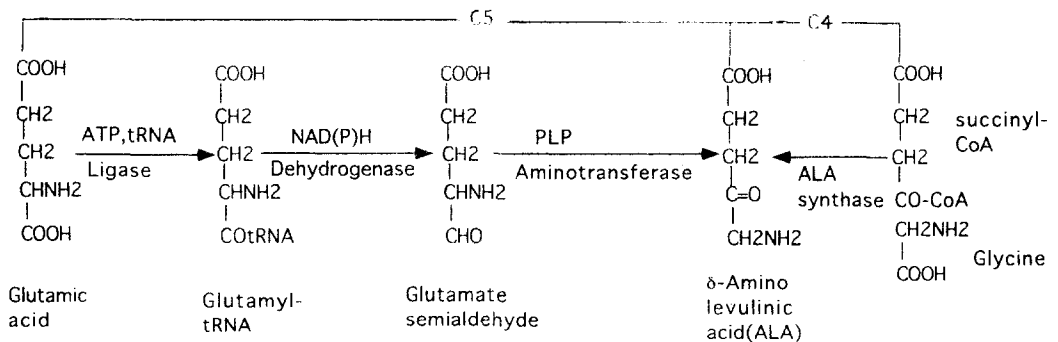


Fig. 1. C₄ and C₅ biosynthetic pathway of δ-ALA

ALA는 사람과 동물 그리고 농작물에 피해를 주지 않으면서 잡초를 선택적으로 고사시킨다²¹⁾ 한편, ALA는 Trichppusia ni를 비롯한 여러 곤충에 대한 살충제로서도 작용함이 보고되고 있다²⁵⁾.

최근에 와서 미생물을 이용한 ALA의 대량 생산법이²⁷⁾ 시도되고 있으나, 공업적 수준에서의 생산효과는 거두지 못하고 있는 실정이다. 본 연구에서는 토양에서 분리, 동정한 *Rhodospirillum rubrum* N-1 균주²⁸⁾를 사용하여 휴지균체를 조제하여 균체의 ALA 생산을 위한 최적조건을 검토하였다.

II. 실험 방법

1. 사용균주 및 배양조건

토양에서 분리한 *Rhodospirillum rubrum* N-1²⁸⁾를 사용하였다. Lascelles³⁰⁾의 기본배지 (D,L-malic acid 2.7 g, KH₂PO₄ 0.5 g, K₂HPO₄ 0.5 g, (NH₄)₂HPO₄ 0.5 g, MgSO₄·7H₂O 0.1 g, CaCl₂·2H₂O 27 mg, MnSO₄·5H₂O 1.2 mg, nicotinic acid 1 mg, thiamine 1 mg 및 biotin 0.01 mg in 1ℓ ddH₂O, pH 6.8) 100 ml를 전 배양액 30 ml를 주입한 후 30℃, 4 Klux 조도 하에서 혐기적으로 정지 배양하였다. 혐기성 명소 배양시의 광원은 100 W 텡스텐 백열전구를 사용하여 조사하였다. 균체의 증식도 및 밀도는 Spectrophotometer (Beckman

DU-68)를 이용하여 660nm에서 분석하였으며, 균체의 밀도는 O. D. 대비 건체중량의 표준곡선으로 환산 정량하였다.

2. 휴지균체 조제법

4 Klux의 조도하에서 혐기적으로 배양한 대수기 후기 배양액(2.5 × 10⁸cells · ml⁻¹)을 4℃에서 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 균체를 수거, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 2회 세척 후, 같은 buffer 1 ml내에 건조균체 10 mg이 함유되어 있는 균체 현탁액을 조제하여 균체의 ALA 생산 조건을 위한 휴지균체로 사용하였다³⁰⁾.

3. ALA 정량분석

ALA의 정량 분석은 시료 0.5ml에 Mauzerall³¹⁾ 등의 방법에 따라 1 M Na-acetate buffer (pH 4.7) 0.5 ml와 0.05 ml acetyl acetone을 가한 후 15분간 가열하였다. 실온에서 냉각 후 Ehrlich reagent³²⁾ (42ml glacial acetic acid와 70% perchloric acid 8 ml에 1g p-dimethylamino-benzaldehyde가 함유된 용액) 3.5 ml를 첨가, 20분 후에 형성된 2 methyl-3-acethyl 5 propionic acid pyrrole의 양을 556 nm에서의 흡광도로 부터 ALA 표준곡선 ($\epsilon_{556} = 9,300 M^{-1}cm^{-1}$)³³⁾를 이용하여 ALA를 환산 정량하였다.

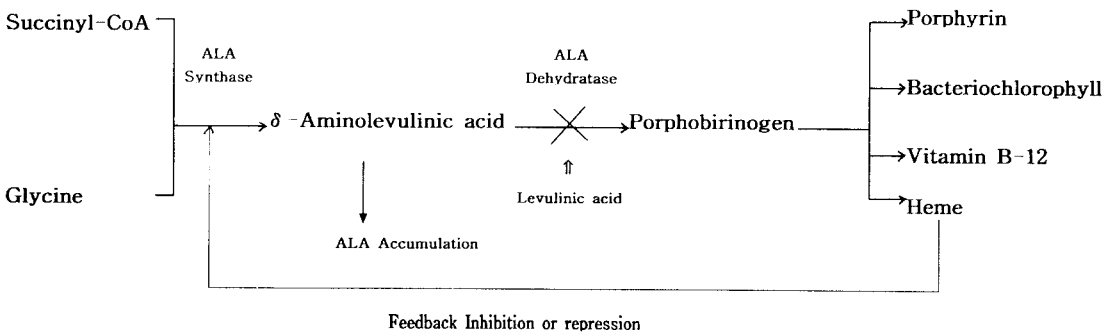


Fig. 2. Schem for the production of ALA on the biosynthetic pathway of tetrapyrroles

III. 결과 및 고찰

1. ALA 생산성과 휴지균체의 관계

광합성 세균의 휴지균체로 부터 ALA의 생산을 위해서는 균체의 영양 증식기간이 중요한 요인으로 작용하는 것으로 알려져 있다³⁴⁾. 본 실험에 사용한 균주 *R. rubrum* N-1의 ALA 생산은 전보³⁵⁾에서 검토된 것과 같이 우수한 생산활성을 보여준 균주로써 대수기 후기에서의 균체가 균체외로 ALA 생산에 가장 적합한 것으로 나타났다. 따라서, 대수기 후기의 균체 배양액으로 부터 조제한 휴지 균체의 농도 변화에 따른 휴지균체 ALA 생산에 미치는 영향을 검토하였다(Table. 1).

Table 1.에서 나타낸 바와 같이 대수기 후기의 균체를 이용하여 조제한 휴지균체 현탁액 (10 mM LA, 10 mM phosphate buffer, pH 7.0)을 이용하여 30℃, 3시간 반응 후의 휴지균체의 ALA 양을 분석한 결과, 1 ml당 10 mg의 휴지균체량까지는 ALA의 생산성이 휴지균체 밀도에 비례하여 증가하는 경향을 보였으나, 1 ml당 12 mg의 휴지균체 이상의 밀도에서는 증가하지 않았다. 따라서 본 연구에서는 1 ml당 10 mg 휴지균체로 구성된 반응계

Table 1. Effect of cell density on the production of extracellular ALA from reating cell system of *R. rubrum* N-1

Cell density(mg/ml)	ALA(μM)
2	5
4	9
6	14
8	19
10	25
12	25
14	24
20	24

The reaction was carried out at 30 °C for 3hr in the presence of 10 mM LA under the standard conditions by using the listed range of the resting cells prepared from a late-logarithmic culture broth.

를 이용하여 균체의 ALA 생산의 최적 조건을 검토하였다.

2. 휴지균체외의 ALA 생산에 미치는 요인

통성 혐기성 홍색 비유황 세균은 온도, pH, 조도 등 여러 환경 조건에 따라 성장과 ALA 생산에 대하여 영향을 받는다고 보고되어 있다³⁶⁾. 본 연구에 사용된 *R. rubrum* N-1 균주의 성장에 대하여도 온도, pH, 조도가 균체의 성장과 ALA생산에 영향을 미친다는 결과를 보고하였다²⁸⁾. 따라서 본 연구에서는 광합성 세균 *R. rubrum* N-1 휴지균체를 이용한 휴지균체외의 ALA생산에 있어 온도, pH, 조도의 최적 조건에 대하여 검토하였다(Table 2).

Table 2. Effects of reaction condition on the production of extracellular ALA from the resting cells

Reaction conditions	ALA(μM)	
Temperature(°C)	20	21
	30	25
	40	22
	50	13
	Initial pH	5
6		24
7		26
8		21
9		18
Illumination intensity(lux)	500	12
	1,000	15
	2,000	19
	3,000	22
	4,000	25
	5,000	24

The reacton was carried out at 30℃ for 3hr in the presence of 10mM phosphate buffer with 10 mM LA.

Table 2.에서 나타낸바와 같이 휴지균체에 의한 ALA의 최대생산농도는 30°C에서 25 μM 로서 가장 높았으며, 조도의 효과는 4 Klux에서 25 μM 로서 최대 값을 나타내었으나 5 Klux에서는 약간 감소하는 경향을 나타내었다. 이러한 결과는 발효법에서 보여준 ALA의 생산성에 대하여 조도가 민감한 요인으로 작용한다고 알려진 것과는 다른 결과를 보였으며 휴지균체외에 의한 ALA 생산에 미치는 pH의 영향에서도 pH 6~7에서 최대 생산성을 보이는 결과를 나타냄으로서 발효법에서 나타난 pH의 의존성과는 다른 결과를 나타내었다. Lim³⁴⁾등이 발표한 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP 74 균주의 휴지균체계에 의한 휴지균체의 ALA 생산에 있어서 혐기적 조건으로 배양한 경우, 호기적 조건보다 약 2배의 ALA생산효과를 나타냈으며, 또한, 그 외의 물리적 요인으로써 pH 7.0, 30°C, 4 Klux의 광도가 최적조건으로 보고된 바 있다. 본 연구에서도 광합성 세균 *R. rubrum* N-1 휴지균체를 이용한 ALA의 생산 조건은 pH 7.0, 30°C, 4 Klux의 물리적 조건하에서 생성된 ALA가 25 μM 로서 최대값을 나타내었다. 이는 통상 혐기성 홍색 비유황 세균이 온도, pH, 조도등 여러 환경 조건에 따라 성장하는 차이가 있는 것과 같이 휴지균체의 배양에서도 온도, pH, 조도의 적절한 조정이 필요한 것으로 판단된다.

3. ALA 생합성 전구물질 및 LA 첨가효과

광합성 세균은 일반적으로 증식속도가 느린 반면에, 진정세균에 비하여 ALA 생합성 전구물질 첨가로 인한 균체의 ALA 유도 효과가 큰 장점이 있다. 또한, 광합성 세균인 *Rhodobacter sphaeroides*³⁷⁾와 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP 74²⁷⁾ 균주들은 ALA dehydratase의 길항 저해제의 일종인 LA 및 C₅-ALA 생합성 경로의 전구물질로 알려진 L-glutamic acid와 C₄-ALA 생합성 경로의 전구물질로 알려진 glycine과 succinyl CoA를 ALA생산에 이용한다는 연구결과가 있다. 이러한 이유로 본 균주의 휴지균체를 이용한 LA와 C₅, C₄ ALA 생합성 경로 전구물질의 첨가가 ALA 생산에 미치는

Table 3. Effect of C₄, C₅ precursors and LA concentrations on the production of extracellular ALA from the resting cells

Concentration (mM)	ALA (μM)		
	LA	C ₄ precursors + LA ^{a)}	C ₅ precursor + LA ^{a)}
0	14	40	40
10	25	46	57
20	37	59	64
30	42	57	83
40	41	40	77
50	ND	28	70
60	ND	16	67

LA, C₄ precursors(glycine and succinate) and C₅ precursor(L glutamic acid) were added to resting cell suspensions containing 10 mg cells per ml as at 30°C for 3hr. a), 30mM LA was used in combined supplementation with C₄, C₅ precursors. ND : Not determination.

효과를 검토하였다.

Table 3.에서 보는 바와 같이 LA의 농도변화가 휴지 균체의 ALA생산성에 미치는 영향으로 30 mM LA의 조건에서 42 μM 로 최대 값을 나타내었다. 이와 같은 결과는 tetrapyrroles 생합성계에서 ALA dehydratase의 길항저해제인 LA의 첨가배양함으로써 균체의 ALA 분비가 촉진되는 현상이 *Methanobacterium thermoautotrophicum*, *Rhodobacter sphaeroides*와 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP 74 등에서 보고된 것과 일치하였다^{22, 27, 37)}. 또한 본 연구에서는 50mM 이상 고농도의 LA첨가는 균주의 성장을 억제하기 때문에 제외하였다.

한편, C₄, C₅ ALA 생합성 전구물질들을 30mM LA를 첨가한 후 농도별로 휴지균체외의 ALA 생산성을 조사한 결과 Table 3.에서 나타난 바와 같이 C₄ ALA생합성 전구물질인 glycine과 succinic acid는 20~30 mM의 농도 첨가에 의하여 최적의 ALA 생산성을 관찰되었다. glycine이 30mM 이상으로 첨가된 고농도의 조건에서 균체량이 증가하지 않은 이유는 Lascelles²⁰⁾에 의하여 제시된 바가

Table 4. Effects of the resting cell volume on the extracellular productivity of ALA under the condition of constant cell density

System volume(ml)	ALA(μM)
2	84.5
10	92.3
20	107.1
40	113.5

The systems containing 30mM LA and 30mM L-glutamic acid were incubated 30°C for 3hr under the constant cell density (10mg cells per ml)

있다. 따라서 본 연구에서도 glycine이 40 mM 이상의 고농도로 첨가된 조건에서는 균체가 증가하지 않았으며 ALA생산성의 감소를 초래하였다. 이러한 연구결과는 glycine이 ALA를 생산하는 균체에 대하여 성장 저해제로서 작용한 것으로 판단되었다. C₅ ALA 전구물질인 L-glutamic acid가 30 mM이 첨가된 조건의 ALA생산성은 대조구와 비교하여 200%까지 증가하는 경향을 나타내었다. 이상의 결과를 정리하여 보면 본 균주 *R. rubrum* N-1는 ALA 생합성 경로중 C₄, C₅ 경로를 모두 이용하지만 C₅경로를 선호하는 것을 판단되어진다. 또한 휴지균체외의 효과적인 ALA의 생산성을 위해서는 LA와 L-glutamic acid를 각각 30mM씩 첨가하였을 때 가장 최대로 높아짐을 알았다. 이러한 결과는 휴지균체를 통하여 생산된 ALA의 순수 분리 과정이 간편하게 이루어 질 것으로 기대된다.

4. 배양시간, 밀도 및 용량변화가 균체의 ALA의 생산에 미치는 효과

1 ml에 10 mg *R. rubrum* N-1 균주의 휴지균체에 LA와 L-glutamic acid를 각각 30mM씩 첨가하여 배양시간에 따른 휴지균체외 ALA 농도변화를 관찰한 결과, 휴지균체 배양 직후 3시간 동안은 균체외 ALA의 생산이 비례적으로 증가하였으나, 배양 3시간 이후 ALA 생산에 대한 큰 변화는 없었다(Fig. 3). 이러한 반응계에 2% glycerol을 첨가배

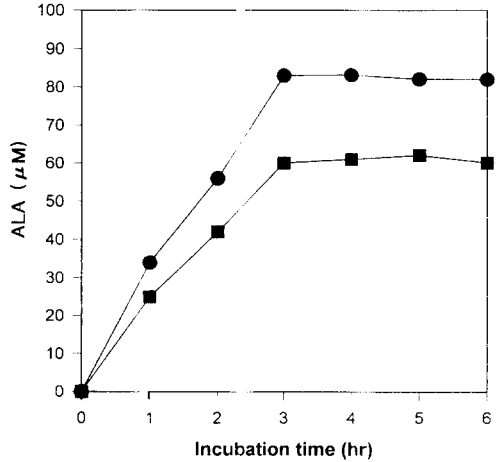


Fig. 3. Effect of glycerol on the extracellular ALA production by resting cells was added to the resting cell system

The time-course reaction was performed in the presence of initial concentrations of 30mM LA and 30mM L-gultamic acid with(●), or without 2% glycerol(■).

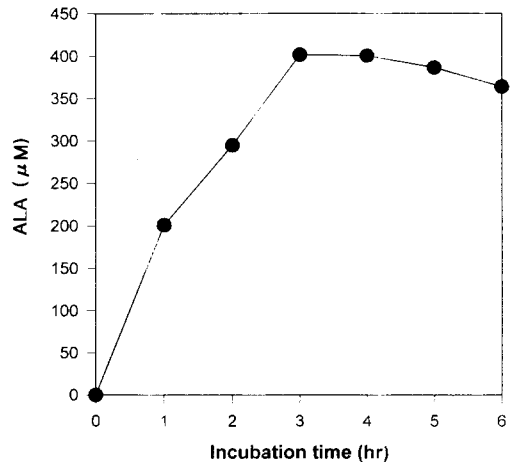


Fig. 4. Significance of incubation time on the production of extracellular ALA from the enlarged system.

The volume of reaction system was adjusted to 1 l containing 10g of resting cells with 30 mM LA and 30 mM L-glutamic acid.

양 3시간 이후에는 균체외 ALA 축적 양상이 정상적 곡선 양식을 나타내었다. Glycerol을 휴지균체

현탁액에 미리 첨가하여 냉동 보존(-20℃)하였을 때에도 보존기간에 관계없이 배양도중 첨가한 경우와 동일하게 균체의 안정한 ALA 생산 효과를 나타내었다.

휴지균체 밀도를 일정하게 조정하여 ALA 생산 반응계의 용량변화에 따른 ALA 생산성을 검토하였다(Table. 4). 일정한 휴지균체 밀도하에서 휴지균체의 ALA 농도는 반응계의 용량이 증가함에 따라 휴지균체외의 ALA 생산성도 상승하였다. 반응계의 용량을 1ℓ로 증가시킨 경우, ALA 생산성은 2mℓ 용량의 반응계보다 5배가 증가되었다. Fig. 4는 반응계의 용량을 1ℓ로 증가시킨 경우 배양시간에 따른 휴지균체외의 ALA 생산성을 조사한 결과를 나타내었는데 ALA의 최대 생산성은 배양후 3시간에서 관찰되었다. 이러한 결과는 실용화 단계에서 휴지균체가 1mℓ 당 10mg 존재하는 ALA 생산계를 이용하여 짧은 시간 내(약 3시간)에 대량생산을 위한 반응기의 규모를 자유롭게 조절할 수 있음을 의미한다.

IV. 결 론

본 연구는 반응계 내의 균체밀도를 가능한 최대로 증대시킴으로써 높은 ALA 생산 효과 및 균체량 변화에 의한 균체외 유기물질 증가의 억제효과를 동시에 충족케 하는 것을 목적으로 하였다.

1. 조제한 휴지균체 현탁액 (10 mM LA, 10 mM phosphate buffer, pH 7.0)을 이용하여 대수기 후기의 균체를 30℃에서 3시간 반응시켰을 때 휴지균체외의 ALA 양은 1 mℓ당 10 mg에서 최대의 ALA 생산 증가를 나타내었다.
2. *R. rubrum* N-1 휴지균체를 이용한 ALA의 생산을 위한 최적 조건은 pH 7.0, 30 °C, 4 Klux로 판명되었다.
3. LA와 L-glutamic acid의 첨가는 휴지균체외의 최적 ALA의 생산성 확보에 효과가 큰 것으로 밝혀졌다.
4. 본 연구결과를 실용화하는 단계에서 휴지균체가

반응물 1 mℓ 당 10 mg 존재하는 조건을 가진 ALA 생산시스템을 이용할 경우, 짧은 시간내(약 3시간)에 대량생산을 위한 반응기의 규모를 자유롭게 조절할 수 있다.

참 고 문 헌

- 1) Tomoo, N. and Mori, R. "Biosynthesis of porphyrin precursors in mammals". J. Biol. Chem. 256. 10335, 1981.
- 2) Hoagland, R. E. ed. "Microbes and Microbial products as herbicides". ACS symposium series, 439, 1990
- 3) Kobayashi, M., Fujii, Shimamoto, J. and Maki, T. "Treatment and re-use of industrial waste by phototrophic bacteria". Prog. water Technol., 11, 249, 1979.
- 4) 小林達治, "光合成細菌による 廢液處理 と 資源化". 化學と生物. 8. 604, 1970.
- 5) 小林達治, "光合成細菌による 濃厚有機排水의 資源化處理". 用水と廢水. 27. 40, 1985.
- 6) Hirotsani, H., Agui, Y., Kobayashi, M. and Takahashi, E. "Removal of coliphages from wastewater effluent by phototrophic bacteria". Wat. Sci. Tech. 22. 59, 1990.
- 7) Hirotsani, H., Ohigashi, H., N. K., Koshimizu, K. and Takahashi, E. "Inactivation of T5 phage by cis vaccenic acid, an antiviral substance from *Rhodopseudomonas capsulata* and by unsaturated fatty acids and related alcohols". FEMS Microbiol. Letters. 77. 13, 1991.
- 8) Nandi, D. L., Baker-cohen, F. and Shemin, D. "5-Aminolevulinic acid dehydratase of *Rhodopseudomonas sphaeroides*". J. Biol. Chem. 243. 1224, 1968.
- 9) Burnham, B. F. and Lascelles, J. "Control of porphyrin biosynthesis through a negative feedback mechanism". Biochem. J. 87. 462, 1963.
- 10) Beale, S. I. and Castelfranco, P. A. "The

- biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in higher plants". *Plant Physiol.* 53. 297, 1974.
- 11) Beale, S. I., Gough, S. P. and Granick, R. S. "Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley". *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73. 2719, 1975.
 - 12) Avissar, Y. "Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid from glutamate in *Anabaena variabilis*". *Biochem. Biophys. Acta.* 613. 220, 1980.
 - 13) Huang, D. D. and Wang, W. Y. "Chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas* starts with the formation of glutamyl-tRNA". *J. Biol. Chem.* 261. 13451, 1986.
 - 14) Avissar, Y. J. and Beale, S. I. "Identification of the enzymatic basis for 5-aminolevulinic acid auxotrophy in a hemA mutant of *Escherichia coli*". *J. Bacteriol.* 171. 2919, 1989.
 - 15) Hollriegel, V., Lamm, L., Rowold, J., Horig, J. and Renz, P. "Biosynthesis of vitamin B-12 : Different pathways on some aerobic and anaerobic microorganisms". *Arch. Microbiol.* 132. 155, 1982.
 - 16) Kikuchi, G., Kumer, A., Talmage, P. and Shemin, D. "The enzymatic synthesis of 5-aminolevulinic acid". *J. Biol. Chem.* 223. 1214, 1958.
 - 17) Masayaki, Y., Yew, N. S., Federspiel, M., Dodgson, J. B., Hayashi, N. and Engel, J. D. "Isolation of recombinant cDNAs encoding chicken erythroid 5-aminolevulinic acid synthetase". *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 82. 3702, 1985.
 - 18) Leong, S. A., Ditta, G. S. and Heinski, D. R. "Heme biosynthesis in *Rhizobium* : Identification of a cloned gene coding for 5-aminolevulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*". *J. Biol. Chem.* 257. 8724, 1982.
 - 19) Sasaki, K., Nishizawa, Y. and Hayashi, M. "Production of 5-aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria". *J. Ferment. Technol.* 65. 511, 1987.
 - 20) Wright, M. S., Cardin, R. D. and Beale, S. I. "Isolation and characterization of an 5-aminolevulinic acid-requiring *Rhodobacter capsulatus* mutant". *J. Bacteriol.* 169. 961, 1987.
 - 21) Rebeiz, C. A., Montazer-zouhoor, A., Hopen, H. J. and Wu, S. M. "Photodynamic herbicides (concept and phenomenology)". *Enzyme Microb. Technol.*, 6. 300, 1984.
 - 22) Gills, H., Jaenchen, R. and Thauer, R. K. "Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Methanobacterium thermoautotrophicum*". *Arch. Microbiol.*, 135. 237, 1983.
 - 23) Beale, S. I. "The biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Chlorella*". *Plant. Physiol.*, 45. 504, 1970.
 - 24) Mau, Y. H. and Wang, W. Y. "Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*". *Plant Physiol.* 86. 793, 1988.
 - 25) Rhee, H. I., Murata, K. and Kimura, A. "Formation of the herbicide, 5-aminolevulinic acid, from L-alanine and 4,5-dioxo-valerate by *Pseudomonas riboflavina*". *Agric. Biol. Chem.* 51(6). 1701, 1987.
 - 26) Rebeiz, C. A. and Juvik, J. A. "Porphyrin insecticides. Pesticide". *Biochem Physiol.*, 30. 11, 1988.
 - 27) Choi, K. M., Lim, W. J. and Hwang, S. Y. "Production of 5-aminolevulinic acid by *Rhodocyclus gelatinosus* strain KUP-74". *J. Inst. Biotechnol., Korea. Univ.* 4. 37, 1992.
 - 28) Choi, K. M., Yang, J. K., Park, E. R., Bang, K. S. and Lee, S. T. "Isolation of *Rhodospirillum rubrum* N-1 and its characteristic for use in treatment of swine wastewater". *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25(3). 322, 1997.
 - 29) Lascelles, J. "The synthesis of porphyrin and bacteriochlorophyll by cell suspensions

- of *Rhodopseudomonas sphaeroides*". Biochem. J. 62. 78, 1956.
- 30) Choi, K. M., Seo, H. C., Lim, W. J. and Hwang, S. Y. "Optimal conditions for the production of δ -aminolevulinic acid from the reating cells of *Rhodobacter sphaeroides*. J. Inst. Biotechnol. Koera Univ. 7. 76, 1995.
- 31) Mauzerall, D. and Granick. S. "The occurrence and determination of 5-aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine". J. Biol. Chem. 219. 435, 1956.
- 32) Warnick, G. R and Burnham, B. F." Regulation of porphyrin biosynthesis : Purification and characterization of δ -aminolevulinic acid synthase". J. Biol. Chem., 246. 6880, 1971.
- 33) Choi, K. M., Lim, W. J. and Hwang, S. Y. "Influence of δ -aminolevulinic acid biosynthesis in *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74", Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 21. 527, 1993.
- 34) Lim, W. J., Choi, K. M. and Hwang, S. Y. "Optimization of an intact cell system of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 for δ -aminolevulinic acid production". J. Microbiol. Biotechnol., 3. 244, 1993.
- 35) Choi, K. M. and Lee, S. T. "Production of photodynamic herbicide by photosynthetic bacteria". J. KOWRC. 5. 25, 1997
- 36) Cho, K. D., Kang, S. O., Lim, W. J., Cho, H. Y. and Yang, H. C. "Starter culture production of *Rhodospirillum rubrum* P17 for use in treatment of organic wastewater". J. Korean Agric. Chem. Soc. 36 : 488, 1993.
- 37) Choi, K. M., Lim, W. J. and Hwang, S. Y. "Effect of glutamic acid and its γ -derivatives on the production of δ -aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides*. J. Korean Agric. Chem. Soc. 36 : 184, 1993.