

## *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74의 고정화균체로부터 $\delta$ -Aminolevulinat의 연속생산

이소희 · 김현호 · 윤순규 · 임왕진<sup>1</sup> · 황세영\*

고려대학교 생물공학과, <sup>1</sup>생물공학 연구소

**초록** : *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74의 고농도 휴지균체로부터  $\delta$ -aminolevulinat(ALA)를 연속적으로 생산하기 위한 최적조건을 검토하였다. 균체의 ALA양은 20 mg cells/ml의 균체농도까지는 농도 증가에 따른 rectangular hyperbola의 증가양식을 보였으나, 그 이상의 균체농도는 ALA 생산에 전혀 증가효과를 보이지 않았다. 20 mg cells/ml의 반응계에서, 균체의 ALA의 효과적 생산을 위한 첨가물질의 최적농도는 levulinate 4 mM과 L-glutamate 5 mM로 나타났으며, 배양 3시간후 ALA 양의 최대치를 보였다. 한편, Ca-alginate를 이용한 포괄법으로 고정화시킨 균체로부터 효과적으로 ALA를 생산하기 위한 첨가물질의 최적농도는 levulinate 6 mM과 L-glutamate 10 mM로 나타났으며, 배양 6시간째에 균체의 ALA 양의 최대치를 보였다. 또한, 이 조건 하에서 고정화균체와 고농도의 휴지균체에 의한 ALA의 연속생산성을 검토한 결과, 이들 균체에 의한 50% ALA 생산성은 각각 185시간과 100시간에서 나타났으며, 생산된 균체의 ALA의 회수를 위해서는 균체를 고정화시키는 방법이 효과적이었다(1994년 10월 26일 접수, 1994년 12월 13일 수리).

### 서 론

$\delta$ -Aminolevulinat(ALA)는 hemes, chlorophylls 등의 형성을 위한 구성 골격물질인 cyclic tetrapyrrole 생합성의 prime intermediate로서,<sup>1,2)</sup> 감광(感光)의 성질을 갖고 있어서 광조사에 의하여 강력한 산화물질인 pchlide로 전환되어, 이 물질에 의한 일련의 산화반응이 쌍자엽 식물이나 피부 암세포 등에서 특히 치명효과를 나타내는, 이른바 선택적이며 무독성의 새로운 전구 항생물질로 알려져 있다.<sup>3,4)</sup> 그럼에도 불구하고, 현재까지 ALA 생산의 공업화가 안되고 있어서 fine chemical로써만 사용되고 있을 뿐, 의약이나 농약에의 응용이 실현되지 못하고 있다.<sup>5)</sup> 이러한 관점에서, 최근에 생물공학기법을 이용한 ALA의 대량생산 조건이 검토되고 있다.<sup>6,7)</sup> 저자 등은 전보(前報)에서 토양으로부터 분리한 광합성 세균인 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74의 휴지균체를 이용하여 균체의 ALA 생산에 관한 최적조건을 보고하였다.<sup>8)</sup> 본 논문에서는 동 균주의 고농도 균체로부터 ALA를 연속적으로 생산하기 위하여 요구되는 균체의 효과적 취급법과 아울러 ALA 생산증가를 위한 첨가물질의 최적 첨가시기 및 농도를 결정하였으며 이 방법을 발효법과 비교, 그 의의를 고찰한다.

### 재료 및 방법

#### 사용균주 및 배양조건

전보(前報)의 *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74<sup>9)</sup>를 공시 균주로 하여 L-glutamate가 제외된 Lascelles의 기본배지<sup>10)</sup>

(D,L-malic acid 2.7 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.5 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 27 mg, MnSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 1.2 mg, nicotinic acid 1 mg, thiamine·HCl 1 mg 및 biotin 0.01 mg : 증류수 1 mg, conc. NH<sub>4</sub>OH, pH 6.8) 10 ml를 culture tube (2×20 cm)에 넣고 감압으로 air phase를 질소로 치환 후 균주를 접종, 조제용 glass water bath(30°C)상에서 4Klux 조도아래 3일간 혐기적으로 정치, 배양하여 전배양액(A<sub>660</sub>=1.5)으로 사용하였다. 본 배양은 5l Erlenmyer flask에 상동배지 5l로써 전배양과 동일한 방법으로 행하였다. 조도는 illuminometer (SPI-5)로 조정하였으며, 균체의 증식도 및 농도는 spectrophotometer (Shimadzu : Model 2101PC)를 이용하여 660 nm에서의 흡광도로부터 분석하였다.

#### 휴지균체 조제법

균체의 대수기 후기 배양액(A<sub>660</sub>=0.9)을 10,000 rpm으로 10분간 원심분리하여 균체를 수거, 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 현탁·원심분리를 2회 반복하여 세척한 후 2% glycerol이 함유된 동 buffer로 고밀도의 균체 현탁액(100 mg cells/ml)을 조제하여 냉동 보존(-70°C)하였으며, 필요시 30°C의 water bath 내에서 녹인 후 직접 사용하였다.

#### 균체의 고정화

Ca-alginate를 이용한 포괄법<sup>11)</sup>에 준하여 균체 40 mg을 1 ml의 생리식염수에 현탁시키고, 여기에 2%(w/v) Na-alginate 1 ml를 넣어 혼합한 후, 이 혼합액의 주사기를 이용한 liquid drop을 1%(w/v) CaCl<sub>2</sub> 용액 내에서 고정화

찾는말 : *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74,  $\delta$ -aminolevulinat, immobilized cells

\*연락처자

(4°C, 1 hr), 형성된 고정화 균체의 bead를 10 mM phosphate buffer (pH 7.0)로 3회 세척해서 실험에 사용하였다.

### ALA의 정량분석

Mauzerall 등의 방법<sup>12)</sup>에 따라서, 시료 0.5 ml에 1 M Na-acetate buffer (pH 4.7) 0.5 ml와 acetyl acetone 0.05 ml를 첨가한 후 15분간 가열하고, 실온에서 냉각 후 Ehrlich reagent (42 ml glacial acetic acid와 70% perchloric acid 8 ml의 혼합액에 *p*-dimethyl aminobenzaldehyde 1 g이 함유된 용액) 3.5 ml를 첨가, 20분 후에 형성된 2-methyl-3-acetyl-5-propionic acid pyrrole의 양을 556 nm에서의 흡광도로 측정, ALA standard curve( $\epsilon_{556}=9300 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ )를 이용하여 ALA를 환산 정량하였다.<sup>13)</sup>

### 시약

$\delta$ -Aminolevulinate, levulinate, *p*-dimethylaminobenzaldehyde, L-glutamate, Na-alginate는 Sigma Chem. Co. (USA)로부터, 70% perchloric acid는 Junsei Chem. Co. (Japan), glacial acetic acid는 덕산약품에서 각각 구입하였으며 그 외의 시약은 시판 1급 이상품을 사용하였다.

## 결 과

### 균체농도가 균체외 ALA 생산에 미치는 효과

*Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74균주의 대수기 후기의 균체 배양액( $A_{660}=0.9$ )으로부터 조제한 휴지균체의 농도가 균체외 ALA생산에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 1에서와 같이 균체외 ALA의 생산은 1.05 mg/ml의 균체

농도 이내에서는 비례적으로 증가하였다. 또한, 1 ml당 1~20 mg의 균체농도 범위내에서는 균체농도가 증가함에 따라 ALA생산의 rectangular hyperbolic형의 증가양상을 보였으며, 그 이상의 균체밀도는 ALA생산에 영향을 나타내지 않았다. 전보(前報)에서는 ALA생산의 비례적 증가를 위한 한계 균체농도인 1.05 mg/ml를 최적 조건으로 설정하였으나,<sup>8)</sup> ALA의 생산효과만을 고려한 경우는 휴지균체 20 mg cells/ml의 반응계를 이용하는 것이 바람직한 것으로 판단되어 이와 같은 균체의 고농도 하에서의 효과적인 ALA생산에 관한 제반 조건을 검토하였다.

### 고농도 균체로부터의 균체외 ALA생산

휴지균체의 농도를 20 mg cells/ml로 한 반응계에서 ALA dehydratase의 저해제인 levulinate<sup>14)</sup>가 균체외 ALA생산에 미치는 영향을 검토하였다(Fig. 2). 그림과 같이 균체외 ALA는 levulinate농도 4 mM까지 첨가 농도에 비례하여 증가한 후 그 이상의 levulinate농도는 오히려 ALA생산에 저해효과를 보였으며, 배양 3시간 후 균체외의 ALA농도가 감소하는 양상을 나타내었다. 한편, C<sub>5</sub>-ALA 생합성 경로의 initial precursor로 알려진 L-glutamate<sup>15)</sup>의 첨가배양이 균체외 ALA생산에 미치는 효과를 검토한 결과, 5 mM의 L-glutamate에서 ALA생산의 최대치를 보였으며, levulinate의 과다 첨가에 의한 ALA생산의 역효과 현상과 유사한 결과를 보였다(Fig. 3). 4 mM Levulinate와 5 mM L-glutamate의 초기농도 하에서의 ALA생산은 배양 3시간까지 증가하는데 그쳤으며, 그 이후의 계속적인 배양으로 균체외 ALA양은 점진적 감소현상을 보였다(Fig. 4).

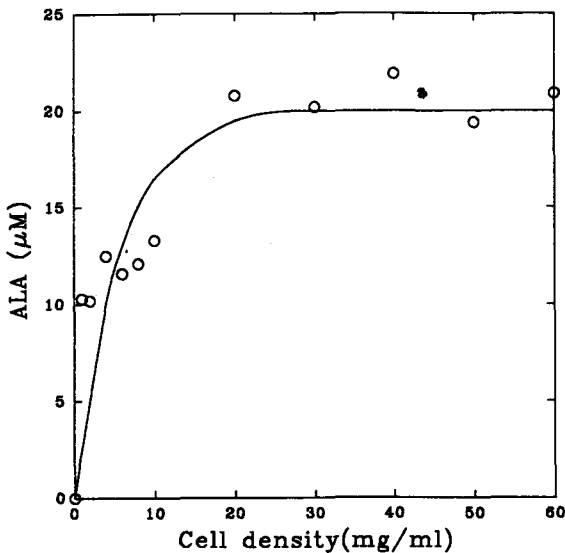


Fig. 1. Relationship between cell concentration and the productivity of extracellular ALA from *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74. The reaction was carried out at 30°C for 9 hr in the presence of 20 mM levulinate under various concentrations of resting cells prepared from a late-logarithmic culture broth.

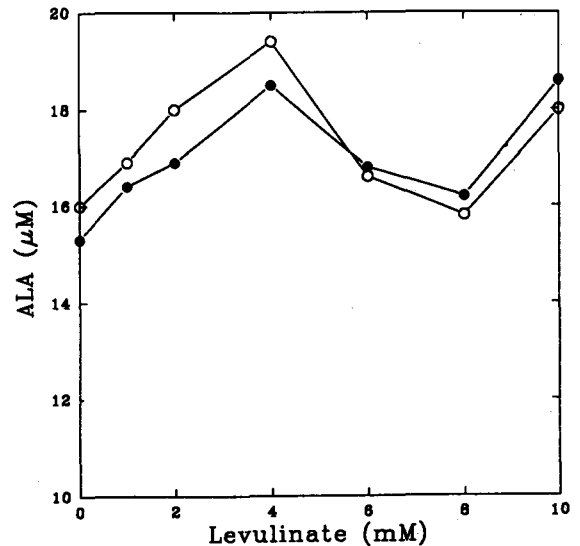


Fig. 2. Effect of levulinate concentration on the extracellular ALA production from resting cells. 1 ml of the reaction mixture containing 20 mg cells and 10 mM phosphate buffer, pH 7.0, was incubated with each levulinate concentrations at 30°C for 3 hr (○) and 6 hr (●).

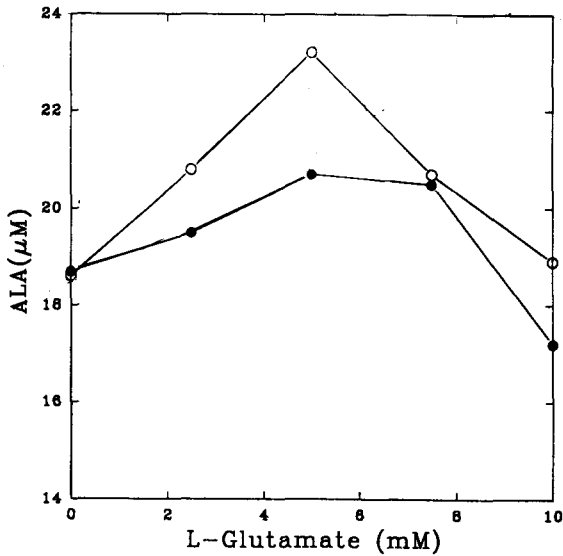


Fig. 3. Effect of L-glutamate concentration on the extracellular ALA production from resting cells  
1 ml of the reaction mixture containing 20 mg cells was incubated in the presence of initial concentrations of 4 mM levulinate and each concentrations of L-glutamate. Symbols indicate the incubation time at 30°C for 3 hr(○) and 6 hr(●).

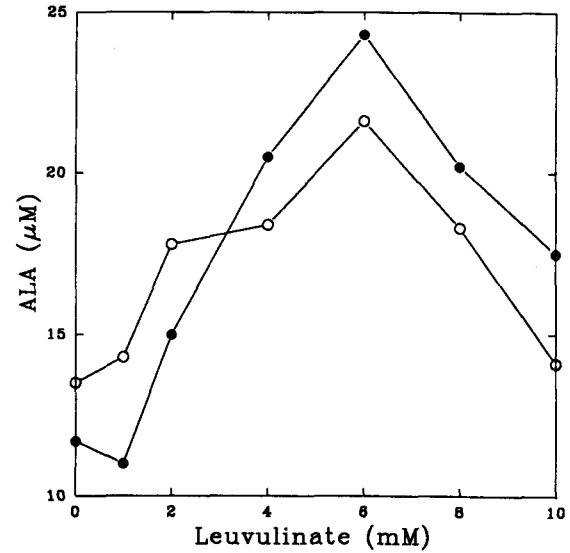


Fig. 5. Effect of levulinate concentration on the extracellular ALA production from immobilized cells  
The immobilized cells(20 mg/ml) in 10 mM phosphate buffer, pH 7, were incubated with each concentrations of levulinate at 30°C for 3 hr(○) and 6 hr(●), and the aqueous phase was collected using a 1-cm diameter filter funnel.

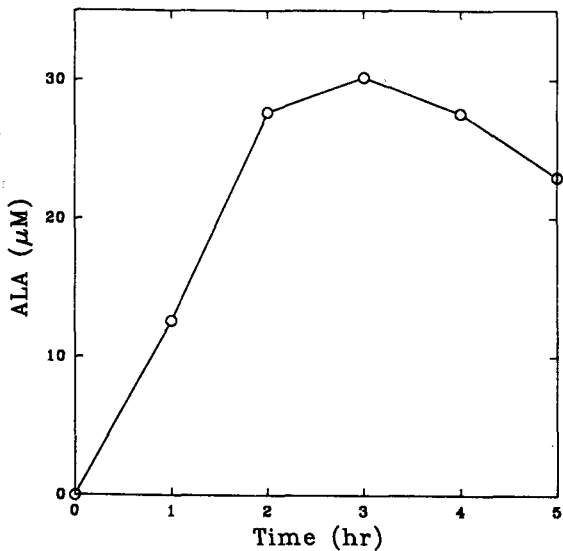


Fig. 4. Determination of feeding time of the additions in resting cells  
1 ml of the resting cell system contained initial concentrations of both 4 mM levulinate and 5 mM L-glutamate.

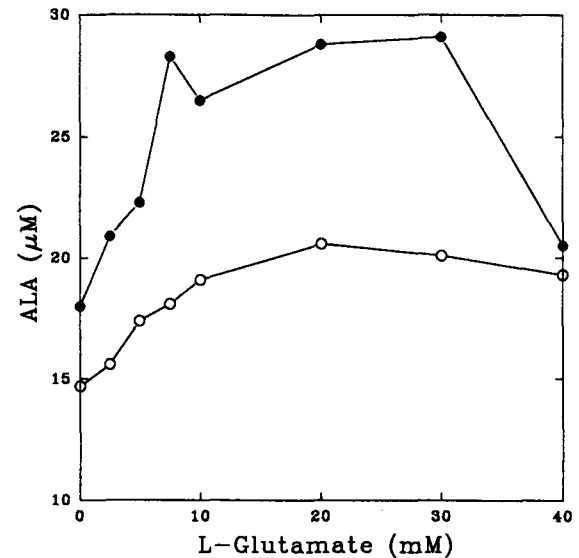


Fig. 6. Effect of L-glutamate concentration on the extracellular ALA production from immobilized cells  
The immobilized cells(1 ml; 20 mg cells) were incubated at 30°C for 3 hr(○) and 6 hr(●) in the presence of 6 mM levulinate with each concentrations of L-glutamate.

#### 고정화균체에 의한 균체외 ALA의 생산

Ca-alginate로 고정화시킨 균체에 의해서 분비된 균체외 ALA는 intact cells로부터 분비된 것보다 용액 내에서 안정한 것으로 밝혀졌으며, 또한 ALA 생산을 위한 고정화균체의 안정성은 30°C에서 5일 후 약 85% 정도의 ALA 생산성을 유지하는 등, ALA의 연속 생산에 필요한 기본조건이 갖추어진 생산계로 보고된 바 있다.<sup>8)</sup> 이 고정화균체의 농도를 1 ml의 고정화용 용액에 휴지균체

20 mg이 함유된 고밀도의 고정화균체로부터 첨가물질을 연속적으로 feeding하므로써 지속적으로 ALA를 생산, 회수하기 위하여 우선적으로 검토되어야 할 것은 첨가되는 물질의 양을 가능한 최소화하는 것으로 생각된다. 균체를 고정화 시킨 후의 고정화효율은 90% 정도로 확인되었다. 첨가물질로서 levulinate와 L-glutamate의 농도가 배양시간에 따른 균체외 ALA의 초기 생산량에

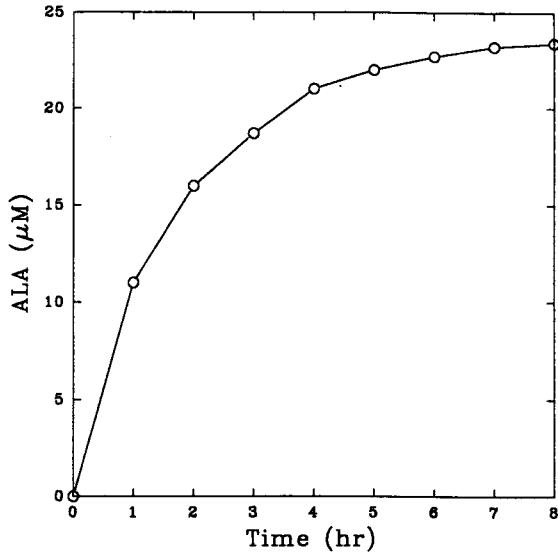


Fig. 7. Determination of feeding time of the additions in immobilized cells

Each of the immobilized cell systems (1 ml; 20 mg cells) containing initial concentrations of 6 mM levulinate and 10 mM L-glutamate were incubated at 30°C for above hours.

미치는 효과를 검토하였다. Fig. 5에서 보는 바와 같이 6 mM의 levulinate 농도 하에서 균체의 ALA생산의 최대효과를 보였으며, 휴지균체로부터 생산되는 균체의 ALA양이 배양 3시간 이후 감소하는 결과를 보인 것과는 달리, 고정화균체의 균체의 ALA양은 배양 6시간까지 지속적으로 증가하였다. 한편, L-glutamate의 최적 초기 농도는 휴지균체에서의 농도보다 2배 높은 10 mM로 나타났으며 고정화균체의 이 전구물질 첨가에 의한 균체의 ALA의 생산속도는 배양 3시간까지는 levulinate만에 의한 것과 비슷하였으나 그후 3시간동안 초기생산 속도와 유사한 양상의 결과를 보이므로써, ALA 생산량의 이와같은 증가는 첨가된 L-glutamate의 일부가 C<sub>5</sub>-ALA 생합성 경로를 통한 ALA의 생합성에 사용되었기 때문인 것으로 판단되었다(Fig. 6). 또한, 고정화균체로부터의 균체의 ALA생산의 최대치는 배양 후 6시간째에 도달, 그 이후의 배양으로써 균체의 ALA농도의 평형상태를 유지하였다(Fig. 7).

#### 균체의 ALA의 연속 생산 및 회수

균체의 대수증식기부터 ALA 생산유도물질들 (levulinate 및 ALA생합성 전구물질들)을 가능한 연속적으로 첨가하므로써 균체의 ALA의 생산이 증가하는 것으로 보고되고 있다.<sup>5-7)</sup> 그러나, 이 방법은 첨가물질의 양이 많이 요구되는 결점이 있으며 균체배양의 특성 상 첨가횟수에 한계가 있는가 하면, 영양증식으로 기인된 배양여과액내의 다종의 불순물로부터 ALA의 효과적인 정제가 문제점으로 지적되어 왔다.<sup>16)</sup> 이에 비하여 휴지균체가 ALA 생산을 위하여 비교적 낮은 농도의 첨가물질을 요구하는 점<sup>16)</sup>에 착안, 위의 결과를 종합하여

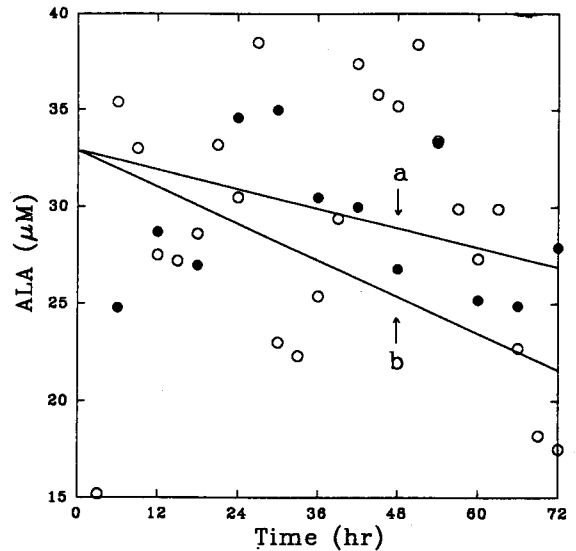


Fig. 8. Effectiveness of the immobilized cell system for continuous production of ALA

Repeating fed-batch production of ALA by the immobilized cell system (●) was compared to that found by the resting cell system (○). Both systems (10 ml; 200 mg cells) were incubated in the presence of optimal concentrations of additives (see the 'text') up to the points indicated by circles, and each of supernatants were harvested. Both systems were then reconstituted as initial conditions, respectively, followed by post-incubation until 2nd points of circles, and the harvest-reconstitution process was repeated as above method. This process was successively carried out for 72 hr. Dashed lines of *a* and *b* indicate the decreases in the ALA productivities of the immobilized and resting cell systems, respectively.

고농도 휴지균체는 3시간, 고정화균체는 6시간 단위로써 levulinate와 L-glutamate의 농도를 전자의 경우는 각각 초기농도 4 mM과 5 mM로써, 후자의 경우는 각각 6 mM과 10 mM로써 반복적인 첨가 및 회수를 행한 결과를 Fig. 8에 나타내었다. 휴지균체의 균체의 ALA 생산은 배양 후 63시간까지는 비교적 안정하였으나 (Fig. 8; slope *b*) 그 이후에는 ALA 생산에 있어서 계속적인 감소경향을 보이므로써, 휴지균체의 life-span의 한계가 시사되었다 (data 생략). 측정치의 extreme을 배제하면 10 μM의 ALA 편차로서 *a, b*의 각 slope가 형성될 수 있었다. 한편, 고정화균체의 경우는 보다 더 안정된 ALA의 생산효과를 보였으며 (Fig. 8; slope *a*), 휴지균체에 의한 ALA의 생산성이 낮아지는 63시간 이후에도 휴지균체에 의한 ALA 생산성과 비교하여 볼때 보다 안정한 생산성을 나타내었으며, feeding개시 후 5일까지 사용이 가능하였다.

#### 고찰

Intact cells의 농도가 비교적 낮은 ALA의 생산계, 예를 들어 0.35 mg cells/ml ( $A_{660}=1.0$ )의 ALA 생산계<sup>16)</sup>는 ALA 생산성의 50% 저하기간 (half-life)이 12시간밖에 되지 않기 때문에, 특히 광합성세균과 같이 균체 조제가 쉽지

않은 독립영양세균의 경우는 intact cells계가 비록 순도 높은 ALA를 생산할 수 있는 장점이 있어도, 비효율적인 것으로 사료된다.<sup>17)</sup> 저자들은 균체농도가 ALA 생산을 위한 균체의 안정성에 크게 영향을 미치는 사실을 발견하였다(data 생략). 따라서, 전보(前報)<sup>8)</sup>에서의 1.05 mg cells/ml( $A_{660}=3.0$ )의 ALA 생산을 위한 휴지균체계의 균체농도를 높여 고농도의 휴지균체계(20 mg cells/ml)로써 ALA 생산을 위한 첨가물질의 최저농도, 첨가시기 및 균체의 안정성을 검토한 결과, 반복첨가 기법에서 중요한 levulinate와 L-glutamate의 최저 첨가농도가 각각 결정되었다(Fig. 2, 3, 5, 6). 이 농도로써 반복적인 첨가배양 및 회수를 통하여 균체의 ALA의 생산량은 Fig. 8의 slope로써 계산하면 고농도 휴지균체계는 약 100시간 후 50%의 생산성 감소현상을 나타내며, 동 농도로 고정화된 균체가 50%의 ALA 생산의 감소를 보이는 배양기간은 배양 후 185시간으로 산출된다. 이 결과는 균체농도가 안정한 ALA의 생산을 위하여 특히 중요한 요인이라는 사실을 시사하고 있다. 또한, 휴지균체계는 ALA 회수시 원심분리를 요하는 반면에 고정화균체로부터의 crude ALA의 회수는 간단한 여과법으로 가능하므로, ALA 생산의 공업화에 있어서의 효과적인 응용이 기대된다.

## 사 사

이 논문은 1993년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의한것으로 이에 감사드립니다.

## 참 고 문 헌

1. Shemin, D. and C. S. Russell (1953)  $\delta$ -Aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Amer. Chem. Soc.* **75**, 4873-4874.
2. Gibson, K. D., W. D. Laver, and A. Neuberger (1958) Initial stages in the biosynthesis of porphyrins: Formation of  $\delta$ -aminolevulinic acid from glycine and succinyl-coenzyme A by particles from chicken erythrocytes. *Biochem. J.* **61**, 618-620.
3. Rebeiz, C. A., A. Montazer-Zouhoor, H. Hopen, and S. M. Wu (1984) Photodynamic herbicide: Concept and phenomenology. *Enz. Microb. Technol.* **6**, 390-401.
4. Chakraborty, N. and B. C. Tripathy (1992) Involvement of singlet oxygen in 5-aminolevulinic acid induced photodynamic damage of cucumber (*Cucumis sativus* L.) chloroplasts.

- Plant Physiol.* **98**, 7-11.
5. Sasaki, K., Y. Nishizawa, and M. Hayashi (1987) Production of  $\delta$ -aminolevulinic acid by photosynthetic bacteria. *J. Ferment. Technol.* **65**, 511-515.
6. Sasaki, K., I. Tanaka, Y. Nishizawa, and M. Hayashi (1990) Production of a herbicide, 5-aminolevulinic acid by *Rhodobacter sphaeroides* using the effluent of swine waste from an anaerobic digester. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 727-731.
7. Choi, K. M., W. J. Lim, and S. Y. Hwang (1992) Production of  $\delta$ -aminolevulinic acid by *Rhodocyclus gelatinosus* strain KUP-74. *J. Inst. Biotechnol. Korea Univ.* **4**, 37-42.
8. Lee, S. H., Y. C. An, and S. Y. Hwang. (1994) Production of  $\delta$ -aminolevulinic acid by using the resting cells of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74. *Agric. Chem. Biotechnol.* submitted.
9. Hwang, S. Y., K. M. Choi, W. J. Lim, B. S. Hong, H. Y. Cho, and H. C. Yang (1992) Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 and its characteristic in  $\delta$ -aminolevulinic acid production. *J. Korean Agric. Chem. Soc.* **35**, 210-217.
10. Lascelles, J (1956) The synthesis of porphyrin and bacteriochlorophyll by cell suspensions of *Rhodospseudomonas sphaeroides*. *Biochem. J.* **62**, 78-93.
11. Kierstan, M. P. J. and M. P. Coughlan (1985) Immobilized Cells and Enzymes. ed. by Woodward, J., IRL press.
12. Mauzerall, D. and S. Granick (1956) The occurrence and determination of  $\delta$ -aminolevulinic acid and porphobilinogen in urine. *J. Biol. Chem.* **219**, 435-436.
13. Choi, K. M., W. J. Lim and S. Y. Hwang (1993) Influence of  $C_5$ -precursors on  $\delta$ -aminolevulinic acid biosynthesis in *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **21**, 527-533.
14. Gills, H., R. Jaenchen and R. K. Thauer (1983) Biosynthesis of 5-aminolevulinic acid in *Methanobacterium thermoautotrophicum*. *Arch. Microbiol.* **135**, 237-240.
15. Beale, S. I., S. P. Gough, and R. S. Granick (1975) Biosynthesis of  $\delta$ -aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **73**, 2719-2723.
16. Lim, W. J., K. M. Choi and S. Y. Hwang (1993) Optimization of an intact cell system of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74 for  $\delta$ -aminolevulinic acid production. *J. Microbiol. Biotechnol.* **3**, 244-251.
17. Choi, K. M., Y. C. An, W. J. Lim and S. Y. Hwang (1993) Characteristics of  $C_5$  precursors metabolism on the biosynthesis of bacterial  $\delta$ -aminolevulinic acid. *J. Inst. Biotechnol. Korea Univ.* **5**, 31-36.

---

**Continuous Production of  $\delta$ -Aminolevulinate from Immobilized Cells of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74**

So-He Lee, Hyun-Ho Kim, Sun-Kyu Yun, Wang-Jin Lim<sup>1</sup> and Se-Young Hwang\*(*Department of Biotechnology, Korea University, Chochiwon 339-800, Korea and <sup>1</sup>Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701, Korea*)

**Abstract :** An optimal condition for the continuous production of  $\delta$ -aminolevulinate(ALA) was investigated using high concentrated resting cells of *Rhodocyclus gelatinosus* KUP-74. The increase of the amount of extracellular ALA versus the concentration of resting cells showed rectangular hyperbolic pattern until 20 mg cells/ml, but no further increase in the ALA amount by increasing its concentration was occurred. The highest yield of the extracellular ALA was observed after 3 hr of incubation of 1 ml reaction system containing 20 mg cells, 4 mM levulinate and 5 mM L-glutamate. On the other hand, the immobilized cells prepared by Ca-alginate inclusive method needed to incubate for 6hr with 6 mM levulinate and 10 mM L-glutamate to give maximal yield of the extracellular ALA. In addition, under these conditions the resulted continuous productivities of the ALA by immobilized cells and highly concentrated resting cells were appeared 50 percent decreases after incubations for 185 hr and 100 hr, respectively, and the method of the cells to be immobilized was more efficient to recover the extracellular ALA produced.

---

\*Corresponding author