

여러가지 탄소원에 의한 *Hansenula polymorpha*의 Alcohol-oxidase 합성

이명숙^{1*} · 장동석² · 최위경³

¹부산수산대학 미생물학과 ²식품공학과 ³태창기업주식회사

Synthesis of Alcohol-oxidase in *Hansenula polymorpha* on Various Carbon Sources

Lee, Myung-Suk^{1*}, Dong-Suk Chang² and Wi-Kyung Choi³

¹Department of Microbiology, ²Department of Food Science and Technology,
National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

³Tae-Chang Co. Ltd., Pusan 609-320, Korea

The regulation of the synthesis of alcohol-oxidase [E.C. 1.1.3.13.] was investigated in the methanol-utilizing yeasts during growth on different carbon sources. For this experiment, *Hansenula polymorpha* CBS 4732, *Hansenula polymorpha* CBM 11 and *Hansenula polymorpha* Cooney were cultured in mineral salt medium by changing its carbon sources.

The production of alcohol-oxidase was varied by the carbon sources. For example, alcohol-oxidase was undetectable in all strains submitted to the test in the medium with glucose, but its production was rapidly increased when the carbon source was changed from glucose to methanol after 30 hrs of incubation.

Moreover, this enzyme was not synthesized during growth on the primary aliphatic alcohols alone (ethanol, propanol, butanol or pentanol) or on the mixed substrates (0.5% methanol + 0.5% primary aliphatic alcohols). When cells were grown on the various carbon sources (glucose, xylose, lactose, glycerol, galactose, saccharose, sorbose, lactic acid or acetic acid), the alcohol-oxidase was about one-tenth of the activity found in cells grown on methanol alone. These carbon sources together with methanol yielded far better synthesis of alcohol-oxidase than in case of carbon sources alone. Especially, the alcohol-oxidase activity of the cells grown on lactose or lactic acid together with methanol was far better or similar than that of cells grown on methanol alone.

The synthetic activity of alcohol-oxidase of *Hansenula polymorpha* CBS 4732 was the strongest among the three strains tested in every respect.

Alcohol-oxidase [EC 1.1.3.13]는 직쇄 alcohol을 분해하여 aldehyde와 과산화수소를 생성하는 반응을 촉매하는 효소로서(1) 1965년 Janssen 등(2)에 의해 methanol을 탄소원 또는 에너지원으로 이용하는 곰팡이의 일종인 *Basidiomycetes* 균체 내에서 처음 발견, 분리되었다.

그 후 곰팡이 뿐만 아니라 methanol 자화성이 있는 다수의 효모에서도 이 효소가 분리 보고되었고(3, 4) 여러 연구자들에 의해 alcohol-oxidase의 생산균

주(3-5), 생성조건(6-8), 정제방법(9-11), 활성측정법(12-14), 그리고 일반특성(9, 10, 15)에 관한 보고가 있을 뿐 alcohol-oxidase를 대량 생성하는 방법과 이를 산업적으로 이용하고자 하는 연구보고는 거의 없는 실정이다.

따라서 본 연구자 등은 효모를 이용하여 alcohol-oxidase를 대량생산할 수 있는 방법과 이를 이용한 방향성물질 생성, 주류 중에 소량 포함되어 있는 methanol의 분해, 그리고 alcohol 정량 등 산업적으

Key words: Alcohol-oxidase, *Hansenula polymorpha*, catabolite repression

*Corresponding author

로 이용할 수 있는 방법을 모색하기 위하여 우선 탄소원에 따른 alcohol-oxidase의 생성에 관하여 실험하였다.

먼저 균주선택을 고려해보면, 곰팡이의 경우는 생산균주가 극히 제한되어 있고 효소생성량도 적은 반면 탄소원에 제한을 받지 않고 효소를 생산한다(7, 10). 이에 비하여 효모의 경우는 생산균주가 다양하고 효소생성량도 많은데 탄소원으로 methanol만 이용하여 효소를 생성하고 다른 탄소원에 의해 catabolite repression 현상이 일어나 효소생성이 감소된다(9, 11). 이상의 보고에서 산업적으로 이용 가치가 있는 정도의 alcohol-oxidase의 양은 효모를 methanol을 함유한 배지에서 배양할 때만 생성되므로 본 실험균주로는 효모 중 비교적 고온성균으로 알려져 있는 *H. polymorpha* 를 선택하였다. 그리고 최근에는 methanol 이외의 탄소원이 함유된 배지에 효모를 배양하여 alcohol-oxidase의 생성능에 관한 보고가 있는데 실제 glucose, glycerol, sorbitol, 그리고 ethanol 등의 탄소원에 의해 catabolite repression이 일어나 균체 내 효소함량이 저해된다고 하였을 뿐(16, 17), 다양한 탄소원에 대한 연구나 catabolite repression 현상의 원인과 그 기구에 대하여서는 거의 연구되어 있지 않다.

본 연구는 효모 균체 내에서 탄소원에 의한 catabolite repression 현상의 원인을 규명하여 alcohol-oxidase의 생성을 증가시키기 위한 진단적 실험으로 3 종류의 *Hansenia polymorpha* 를 공시균으로 여러 가지 탄소원에서 배양시간에 따른 효소생성능을 실험한 것으로 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 사용된 균주는 *Hansenia polymorpha* CBS 4732, *H. polymorpha* CBM 11, 그리고 *H. polymorpha* Cooney 였다.

배지 및 배양조건

균체의 증식에 사용된 배지는 mineral salt medium (8)에 탄소원으로 1% glucose를 첨가한 것이었다. 효소유도는 mineral salt medium에 methanol 혹은 다른 탄소원을 1% 첨가한 것을 사용하였다.

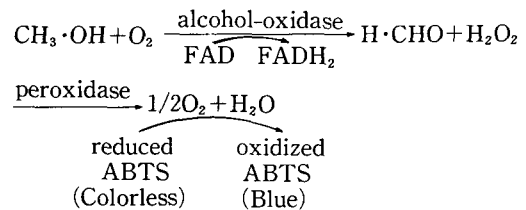
각 배지의 pH를 7.5로 조정하여 500 ml용 삼각 flask에 250 ml씩 분취 멸균한 다음 접종하여 35°C, 250 rpm의 배양기(WTR, INFORS)에서 일정시간 배양하였다.

조효소액의 조제

Alcohol-oxidase 유도배지에서 일정시간 배양된 균체를 무균적으로 원심분리(3000×g, 15분)하여 인산완충액(10 mM, pH 7.5)으로 2~3회 세척한 다음 ϕ 0.45 mm의 glass beads를 첨가하여 high-pressure homogenizer(MSK BRAUN)으로 5분간 균체를 파쇄하였다. 이 액을 15,000×g, 30분 동안 저온(4°C) 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 하였다.

비활성의 측정

Alcohol-oxidase가 methanol을 분해하여 생성한 과산화수소를 peroxidase의 첨가로 분해시켜 생성한 산소에 의한 ABTS(2,2'-azino-di(3-ethyl benzthiazolene 6-sulfonic acid))의 산화 정도를 spectrophotometer로 측정하는 방법(8)에 따라 그 활성을 측정하였다. 이 원리를 도식화하면 아래와 같다.



즉 ABTS 3 μ moles, peroxidase 10 UI, methanol 0.5 mM, 미리 준비한 조효소액 그리고 인산완충액(10 mM, pH 7.5)을 첨가하여 최종 용량을 3 ml로 조정하여 30°C에서 30분간 반응시킨 후 0.2 ml HCl(2 N)로 반응을 중지시킨 다음 410 nm에서 흡광도(UNIKON, 860)를 측정하였다. 이 때 표준곡선은 과산화수소 표준용액으로 흡광도를 측정하여 나타내었고 효소의 비활성(specific activity)은 단백질 mg 당 1분 동안 생성된 과산화수소의 μ mole수로 표시하였다. 이 때 단백질량은 Markwell 등(18)에 의해 수정된 Lowry법(19)에 따라 정량하였다.

결과 및 고찰

배양시간에 따른 alcohol-oxidase의 생성

*H. polymorpha*의 배양시간에 따른 효소생성을 알아보기 위하여 먼저 균체를 1% glucose가 함유된 배지에서 정상기까지 배양한 다음 분리하여 1% methanol이 함유된 배지에 재접종하여 배양한 경우(I)와 1% methanol이 첨가된 배지에 직접 균체를 접종 배양한 경우(II)에서 배양시간에 따른 균체의 증식과 효소생성을 비교하였다.

H. polymorpha CBS 4732를 시험균으로 한 결과를

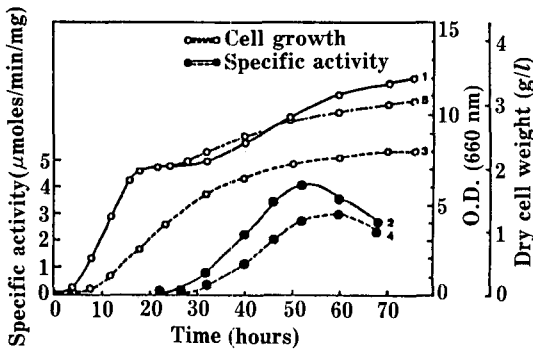


Fig. 1. Growth and production of the alcohol-oxidase of *Hansenula polymorpha* CBS 4732 in mineral salt medium containing glucose or methanol.

1 and 2: Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose and later transferred to the medium containing 1.0% methanol.

3 and 4: Cells were cultivated in the medium containing 1.0% methanol.

5 : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose.

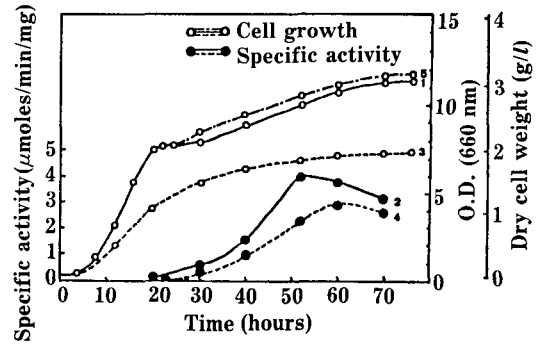


Fig. 3. Growth of cells and production of the alcohol-oxidase of *Hansenula polymorpha* Cooney in mineral salt medium containing glucose or methanol.

1 and 2: Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose and later transferred to the medium containing 1.0% methanol.

3 and 4: Cells were cultivated in the medium containing 1.0% methanol.

5 : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose.

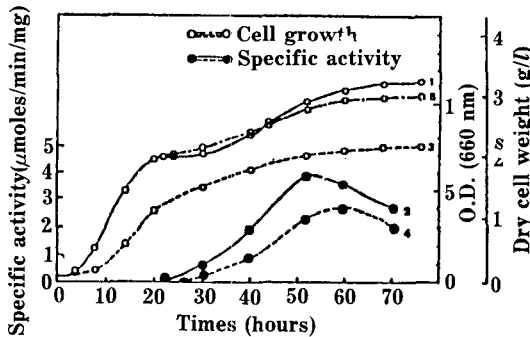


Fig. 2. Growth of cells and production of the alcohol-oxidase of *Hansenula polymorpha* CBM 11 in mineral salt medium containing glucose or methanol.

1 and 2: Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose and later transferred to the medium containing 1.0% methanol.

3 and 4: Cells were cultivated in the medium containing 1.0% methanol.

5 : Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose.

Fig.1에 나타내었다. (I)의 경우(곡선 ①과 ②), alcohol-oxidase 활성은 glucose 배지에서는 생성되지 않았으나 methanol 배지로 이식 후에는 서서히 생성되기 시작하여 이식 후 30시간경에 최대활성(4.1 μmoles/min/mg)에 도달한 후 서서히 감소하였다. (II)의 경우(곡선 ③과 ④)에서는 alcohol-oxidase 활성의 증가와 균체증식이 (I)의 경우에 비해 완만하여

배양 30시간경부터 활성이 나타났으며 배양 60시간경에 최대활성(3.02 μmoles/min/mg)을 나타낸 후 감소하였다.

곡선 ⑤(Fig.1)는 균체를 glucose 함유배지에서 계속 배양하였을 때의 균체증식을 나타낸 것이며 이때 전배양기간을 통하여 alcohol-oxidase는 생성되지 않았다.

마찬가지로 *H. polymorpha* CBM 11와 *H. polymorpha* Cooney의 실험결과를 Fig.2와 3에 각각 나타내었다.

위의 결과들은 *H. polymorpha* CBS 4732의 결과와 거의 비슷하였고, 3균주에 의해 (I)과 (II)의 경우에 생성된 총 alcohol-oxidase의 활성을 상세히 비교하여 Table 1에 나타내었다. 3균주 모두 생성된 총 alcohol-oxidase 활성은 (I)의 경우에 비해 약 2배 정도 높았고, 균체증식량도 많았다. 그리고 3균주 중 *H. polymorpha* CBS 4732가 효소생성능이 가장 좋은 것으로 나타났다.

이상의 결과로 미루어 *H. polymorpha* 균체 내의 alcohol-oxidase 생성은 glucose에 의해 억제됨을 알 수 있는데 이는 glucose에 의한 catabolite repression에 기인하는 것으로 사료되고 methanol을 탄소원으로 하여 효소를 생성할 때는 균체를 glucose 배지에서 증식시킨 뒤 methanol 배지에 이식, 배양하는 2단계 배양법이 methanol 배지에 균체를 직접, 접종 배양하는 경우보다 좋은 결과를 얻을 수 있었다.

Table 1. Comparison of the maximum production of the alcohol-oxidase in *Hansenula polymorpha*.

	<i>H. polymorpha</i> CBS 4732		<i>H. polymorpha</i> CBM 11		<i>H. polymorpha</i> Cooney	
	I	II	I	II	I	II
Specific activity (μ moles/min/mg)	4.10	3.02	3.96	2.68	4.02	2.88
Dry cell weight (g/l)	2.85	2.23	2.78	2.12	2.68	2.03
Amount of protein (mg/g)	86	79	89	82	88	81
Total activity (units/l)	1004	533	986	468	954	468

I, Cells were cultivated in the medium containing 1.0% glucose and later transferred to the medium containing 1.0% methanol.

II, Cells were cultivated in the medium containing 1.0% methanol.

Table 2. Influence of the primary aliphatic alcohols for the production of alcohol-oxidase in *Hansenula polymorpha* CBS 4732.

Substrates	Induction times (hrs)			
	12	24	30	48
Methanol 0.5%(v/v)		3.07*	3.53	3.11
1.0%(v/v)		3.50	4.10	3.63
2.0%(v/v)		3.16	3.75	3.12
Ethanol 1.0%(v/v)	N.D	N.D	N.D	N.D
Propanol 1.0%(v/v)	N.D	N.D	N.D	N.D
Butanol 1.0%(v/v)	N.D	N.D	N.D	N.D
Pentanol 1.0%(v/v)	N.D	N.D	N.D	N.D

*, Specific activity (μ moles/min/mg-protein)

N.D, none detected

탄소원에 따른 alcohol-oxidase의 생성

지금까지 연구된 바로는 탄소원으로 methanol을 사용한 경우 alcohol-oxidase 생성이 가장 좋았고(8, 19, 20) 그외 다른 탄소원의 영향에 대해서는 많이 보고되어 있지 않다. 본 항목에서는 균체를 glucose 배지에서 정상기까지 배양한 다음 methanol 혹은 다른 탄소원이 함유된 유도배지에 재접종, 배양하면서 생성된 alcohol-oxidase의 활성을 측정, 비교하였다.

직쇄 alcohols: Alcohol-oxidase의 생성은 methanol을 탄소원으로 한 경우에 가장 좋았으며 이에 의해 생성된 효소는 methanol에 가장 잘 작용하며 효소기질의 탄소수가 많아질수록, 탄소쇄의 길이가 길어질수록 활성이 감소되어 탄소수 5개 이하인 직쇄 alcohol에만 작용하여 활성을 나타내고 그의 방향족 alcohol, 2급 alcohol 등에는 전혀 작용하지 못하는

Table 3. Influence of the mixed primary aliphatic alcohols for the production of alcohol-oxidase in *Hansenula polymorpha* CBS 4732.

Substrates	Induction time(hrs)				
	10	14	24	30	48
Methanol 0.5% + Ethanol 0.5%(v/v)	0.018*	0.021	0.006	N.D	N.D
Propanol 0.5%(v/v)	0.058	0.064	0.057	0.001	N.D
Butanol 0.5%(v/v)	0.043	0.063	0.056	0.007	N.D
Pentanol 0.5%(v/v)	0.021	0.016	0.006	N.D	N.D

*, Specific activity (μ moles/min/mg-protein)

N.D, none detected

것으로 보고되고 있다(1, 10, 11).

여기에서 직쇄 alcohol인 ethanol을 탄소원으로 하여 생성된 효소는 효소기질로 ethanol을 가장 잘 이용할 것이라는 가정하에 alcohol-oxidase의 유도 탄소원으로 ethanol, propanol, butanol, 그리고 pentanol을 사용하여 각각의 효소생성을 비교하였다.

Table 2는 *H. polymorpha* CBS 4732를 시험균으로 한 결과로서 먼저 methanol을 농도별로 달리 사용한 경우 1.0%에서 30시간 배양에 최대활성을 나타내었고 0.5%와 2.0%의 경우는 효소생성능이 약간 감소하였다.

다른 alcohol의 경우, 배양 48시간 동안 효소활성이 전혀 나타나지 않았다. 한편 이들을 methanol과 혼합 사용한 경우, 효소생성을 비교하여 보았는데 (Table 3) 어떤 경우에서도 배양초기에는 alcohol-oxidase 활성이 아주 약하게 나타났지만 배양 30

Table 4. Influence of the methanol for the production of alcohol-oxidases in *Hansenula polymorpha*.

Microorganisms	Substrates	Induction time (hrs)		
		24	30	48
<i>H. polymorpha</i>	methanol 0.5%(v/v)	2.27*	3.75	2.63
CBM 11	1.0%(v/v)	2.46	3.96	2.85
	2.0%(v/v)	2.02	3.10	2.42
<i>H. polymorpha</i>	methanol 0.5%(v/v)	2.32	3.61	2.72
COONEY	1.0%(v/v)	2.61	4.02	3.10
	2.0%(v/v)	2.27	3.48	2.57

*, Specific activity (μ moles/min/mg-protein)

시간을 전후하여 거의 소실되었다.

이상의 결과로 미루어 탄소수 2개 이상의 직쇄 alcohol을 기질로 할 때 glucose와 마찬가지로 alcohol-oxidase 합성은 catabolite repression을 받았고 이들을 methanol과 혼합 사용하여도 직쇄 alcohol에 의해 일어난 catabolite repression은 derepression되지 않아 alcohol-oxidase 합성은 일어나지 않았으므로 나머지 2균주에 대하여서는 위의 실험을 행하지 않았다.

Table 4는 *H. polymorpha* CBM 11와 *H. polymorpha* Cooney를 methanol을 농도별로 조정하여 배지에서 alcohol-oxidase 생성능을 비교한 것으로 *H. polymorpha* CBS 4732와 거의 비슷한 결과를 나타내었다.

균체 내 alcohol-oxidase의 합성은 catalase, form-

aldehyde, dehydrogenase, formate dehydrogenase 등 다른 효소보다 methanol 농도에 민감하다는 보고 (21)와 본 실험결과로 미루어 균주별 최적농도를 규정할 필요가 있을 것으로 사료된다.

여러가지 탄소화합물 : Alcohol-oxidase 합성은 탄소원에 크게 영향을 받는 것으로 보고된 바 있으므로 (17) 본 연구에서는 여러가지 탄소화합물 (glucose, xylose, lactose, glycerol, galactose, saccharose, sorbose, lactic acid, acetic acid)을 탄소원으로 사용한 후 alcohol-oxidase의 활성을 비교하여 Fig.4에 나타내었다.

먼저 탄소화합물을 단독사용한 경우 xylose, glycerol, lactic acid에서는 미량의 효소가 생성되었는데 이는 methanol에 의해 생성된 양의 1/10 정도에 해당되는 양이었고 saccharose, sorbose, acetic acid에서는 alcohol-oxidase가 전혀 생성되지 않았다.

위의 탄소화합물을 methanol과 혼합 사용한 경우, alcohol-oxidase 생성은 탄소화합물을 단독사용했을 때보다 월등히 증가하였고 특히 lactose와 lactic acid의 경우는 methanol 단독사용시 보다 오히려 증가하였다.

이 때 각 탄소원에서의 효소 최대생성에 필요한 시간 (Table 5)은 단독사용시 보다 혼합사용한 경우에 길었다. 이런 현상은 균체 내 alcohol-oxidase 합성은 glucose 등의 탄소원에 의해 catabolite repression 현상이 일어나 억제되어 있다가 균체가 이런 탄소원을 완전히 소모시키고 난 뒤 methanol에 의해

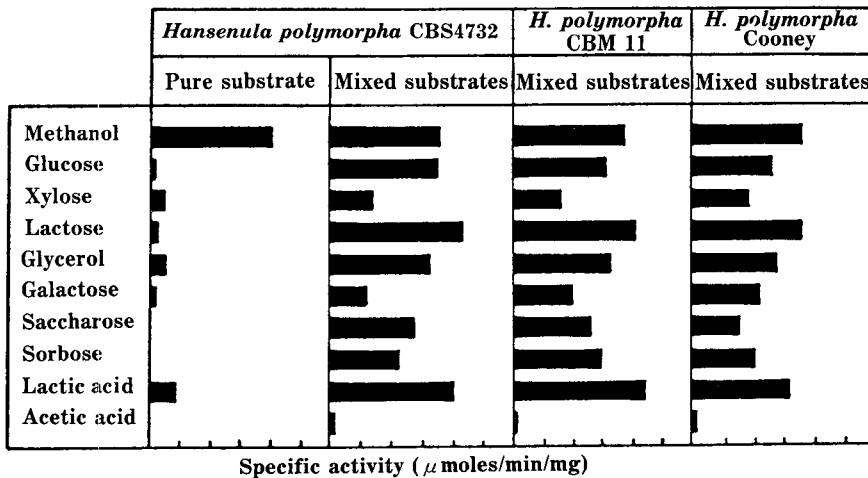


Fig. 4. Comparison of the production of alcohol-oxidase activity on various substrates in *Hansenula polymorpha*.

Pure substrate: 1.0% of substrate, mixed substrates: 0.5% of methanol + 0.5% of the other substrates

Table 5. Induction times of the alcohol-oxidase of *Hansenula polymorpha* on various substrates for obtention of the maximum specific activity.

Substrates	<i>H. polymorpha</i> CBS 4732		<i>H. polymorpha</i> CBM 11	<i>H. Polymorpha</i> Conney
	I	II	II	II
Methanol	30*	30	30	30
Glucose	48	72	72	72
Xylose	12	48	48	48
Lactose	24	48	48	48
Glycerol	30	30	30	30
Galactose	30	48	48	48
Saccharose	-	48	48	48
Sorbose	-	48	48	48
Lactic acid	24	48	48	48
Acetic acid	24	30	30	30

I, Pure substrate: 1.0% of substrate

II, Mixed substrates: 0.5% of methanol + 0.5% of other substrate

*, Induction time: hours

합성이 시작되는 것으로 사료된다. 덧붙여 van Dijken 등(22)은 alcohol-oxidase 합성은 배지 중 탄소원에 의해 일어난 catabolite repression에 의해 조절될 뿐 아니라 균체의 생리적인 필요에 의해 조절되기도 한다고 보고하였다.

요 약

*Hansenula polymorpha*의 배양조건과 배지의 탄소원에 따른 alcohol-oxidase의 생성능을 비교하기 위하여 *H. polymorpha* CBS 4732, *H. polymorpha* CBM 11, 그리고 *H. polymorpha* Cooney의 3균주에 대하여 실험하였다.

배양조건에 따른 효소생성은 glucose를 탄소원으로 첨가한 mineral salt medium에서 균체를 정상기까지 배양하여 methanol이 함유된 배지에서 재배양하는 2단계 배양법의 경우가 균체를 직접 methanol 배지에 배양한 경우보다 효율적이었으며 생성된 총 효소량은 전자의 경우가 후자에 비해 1.9배 정도 많았다.

다음 탄소원에 따른 효소생성능을 비교하였다. 먼저 직쇄 alcohol을 탄소원으로 사용한 경우 methanol을 제외한 ethanol, propanol, butanol, 그리고 pentanol에서는 효소가 생성되지 않았고 또한 이 직쇄 alcohol을 methanol과 혼합한 경우에도 극미량

의 생성에 그쳤다.

여러가지 탄소화합물 (glucose, xylose, lactose, glycerol, galactose, saccharose, sorbose, lactic acid acetic acid)을 탄소원으로 사용하면 methanol에 의해 생성된 효소량의 1/10 정도 생성되었고 이들을 methanol과 혼합사용하면 효소생성량은 급격히 증가하였고, 특히 lactose와 lactic acid의 경우는 methanol 단독사용시 보다 오히려 다량 생성되었다.

시험 3균주 중에서는 어떤 경우에서든지 *H. polymorpha* CBS 4732가 alcohol-oxidase 생성능이 가장 좋은 것으로 나타났다.

참고문헌

- Janssen F.W. and H.W. Ruelius: *Biochim. Biophys. Acta*, **151**, 330 (1968).
- Janssen F.W., R.M. Kerwin and H.W. Ruelius: *Biochim. Biophys. Acta*, **20**(5), 630 (1965).
- Fujii T. and K. Tonomura: *Agric. Biol. Chem.*, **36**(13), 2297 (1972).
- Fukuda D.S. and D.R. Brannon: *Appl. Microbiol.*, **21**(3), 550 (1971).
- Janssen F.W., R.M. Kerwin and H.W. Ruelius: *Methods in Enzymology*, Academic press, New York London, Vol.41, 364 (1979).
- Kato N., Y. Ormorl, Y. Tani and K. Ogata: *Eur. J. Biochem.*, **64**, 341 (1976).
- Kerwin R.M. and H.W. Ruelius: *Appl. Microbiol.*, **17**(3), 347 (1969).
- Sahm H., H. Schutte and M.R. Kula: *Methods in Enzymology*, Academic press, New York-London, Vol.89, 424 (1982).
- Allais J.J., A. Louktibi and J. Baratti: *Agric. Biol. Chem.*, **41**(11), 2547 (1983).
- Bringer S., B. Sprey and H. Sahm: *Eur. J. Biochem.*, **101**, 563 (1979).
- Couderc R. and J. Baratti: *Agric. Biol. Chem.*, **44**(10), 2279 (1980).
- Eggeling L. and H. Sahm: *Appl. Environ. Microbiol.*, **39**, 268 (1980).
- Guilbault G.G. and G.J. Lubrans: *Anal. Chimical Acta*, **69**, 189 (1974).
- Guilbault G.G., B. Danellsson, C.F. Mandenlus and K. Mosbach: *Anal. Chem.*, **55**, 1582 (1983).
- Tani Y., T. Miya and K. Ogata: *Agric. Biol. Chem.*, **36**(1), 76 (1972).
- Eggeling L. and H. Sahm: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **5**, 197 (1978).

17. Eggeling L. and H. Sahm: *Advances in Biotechnol.*, Pergamon Press, Vol.1, 267 (1985).
18. Markwell M.A.K., S.M. Hass, L.L. Bieben and N.E. Tolbert: *Analytical Biochemistry*, **87**, 206 (1978).
19. Lowry O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265 (1951).
20. Jara P., J.J. Allais and J. Baratti: *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 19 (1983).
21. Fujii T., T. Murakami, A. Ando and M. Yabki: *Agric. Biol. Chem.*, **48**(7), 1913 (1984).
22. Van Dijken J.P., R. Otto and W. Harder: *Arch. Microbiol.*, **111**, 137 (1976).

(Received August 14, 1989)