

## 저온 · 알칼리성 Protease를 생산하는 *Pseudomonas* sp. RP-222의 분리 및 조효소의 특성

노종수\* · 정영철 · 박석규<sup>1</sup> · 성낙계

경상대학교 식품공학과

<sup>1</sup>순천대학교 식품영양학과

## Isolation of Alkalopsychrotrophic Protease-Producing *Pseudomonas* sp. RP-222 and Properties of Its Crude Enzyme

Roh, Jong-Soo\*, Young-Chul Chung, Seok-Kyu Park<sup>1</sup> and Nack-Kie Sung

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University,  
Chinju 660-701, Korea

<sup>1</sup>Department of Food and Nutrition, Suncheon National University, Suncheon 540-740, Korea

**Abstract** — In order to produce alkaline protease, psychrotrophic bacterium which have high enzyme activity at low temperature, was isolated by using enrichment culture from various samples and identified as genus alkalopsychrotrophic *Pseudomonas* sp. RP-222. The optimal culture conditions for enzyme production were pH- 10.0, temperature- 20°C and culture time- 4 days. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were pH 10.5 and 40°C, respectively and the enzyme was relatively stable at pH 7.0~13.0 and below 50°C. The enzyme was inhibited by ethylenediaminetetraacetate and phenylmethylsulfonylfluoride, indicating that the enzyme was a serine metalloenzyme, but considerably stable in the presence of surface active agents. Activity of the enzyme was increased by the addition of 0.05% Na- $\alpha$ -olefin sulfonate.

강알칼리, 고온 및 저온 등의 극한 환경조건에서 잘 증식하는 미생물은 상온, 약산성 또는 중성에서 잘 증식하는 미생물보다는 그 내성기작과 구조가 상이함으로 여러가지 배양학적 특성 및 대사산물의 이용면이 상이할 것이다(1, 2). 그 가운데 저온성 세균은 일반적으로 성장이 느리고 취급하는데 어려움이 있기 때문에 연구가 미흡하며(3), 특히 열에 안정한 protease를 분리하여 단백질로부터 고미(bitter substance), 응고 및 액화현상 등을 나타내어 낙농제품에 좋지 못한 영향을 주므로 주로 오염원 대상균주로 보고되었을 뿐(4) 산업적 이용측면에서는 연구가 거의 되어 있지 않다. 만약 저온성 세균이 생산하는 효소가 저온 · 알칼리성 범위에서 최적활성을 나타내

면서 비교적 넓은 온도범위에서 효소활성이 유지되는 특성을 가지고 있다면 산업적 이용가능성이 증가될 것이다.

알칼리성 protease에 관한 연구는 Horikoshi 등(5)이 호알칼리성 *Bacillus* sp.를 분리하여 효소학적 특성을 발표한 이래, Aunstrup 등(6)과 Tube 등(7)은 *Bacillus* sp.에서 알칼리성 protease의 분리를 보고한 바가 있고, Willadsen 등(8)은 세제용으로 적합한 효소를 *Bacillus pumilus*로부터 생산한 바 있다. Patel 등(9)과 Kobayashi 등(10)은 *Pseudomonas* sp.에서, Richard 등(11)은 *neurospora crassa*에서, Nakanishi 등(12)은 *Streptomyces* sp.에서 생산된다고 보고하였다.

최근 알칼리성 protease는 효소세제와 피혁공업의 탈모공정 등에 대량으로 사용되고 있는데, 효소세제는 하천의 오염에 중요한 인자로 알려져 있는 합성세제

**Key words:** Alkalopsychrotrophic protease, *Pseudomonas* sp. RP-222

\*Corresponding author

와는 달리 환경오염의 위험을 줄일 수 있는 잇점이 있다. Protease를 알칼리성 세제용으로 사용하기 위해서는 알칼리성이면서 계면활성제에 내성이 있는 protease가 대량생산되어야 한다. 또한, 현재 시판되는 효소세제는 비교적 고온인 60°C에서 효소활성이 최적이기 때문에 세탁시 물을 가열하여야 함으로 에너지가 소비되는 단점이 있으므로 낮은 온도에서도 효소활성을 나타내고, 비교적 넓은 온도범위에서 활성을 가지면서 계면활성제에 내성이 있는 알칼리성 효소를 생성하는 미생물의 분리가 필요하다고 본다.

따라서 본 연구자는 미살균 우유, 저온냉장 단백질 함유식품 및 토양으로부터 저온·알칼리 및 계면활성제 내성의 protease 생산균주를 분리한 다음, 효소의 최적 생산조건 및 특성에 대한 실험결과를 보고하는 바이다.

## 재료 및 방법

### 사용배지

저온에서 효소활성이 우수하고 계면활성제에 내성이 있는 알칼리성 protease를 생성하는 미생물을 분리하기 위하여 일반 분리용 배지인 plate counter agar (PCA : bacto tryptone 5g ; yeast extract 2.5g ; dextrose 1g ; agar 15g per liter)에 0.1% SDS, 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 및 5% skim milk powder를 첨가하여 사용하였다.

### 균주의 분리 및 선정

미살균우유, 토양 및 저온 냉장 단백질 함유 식품 등의 각종 시료를 멸균수에 균일하게 현탁한 다음 PC액체 배지에 4°C에서 7일간 연속적으로 3회 이상 반복하여 집적배양하였다. 이 배양액을 희석하여 PCA 고체배지에 도말하여 10°C 저온 배양기에서 4일간 배양한 후 halo size에 따라 1차 선발하고 PC액체 배지에서 10°C, 4일간 진탕배양한 다음 균체를 제거한 (10,000 rpm, 15 min) 배양액 중의 효소활성을 30°C에서 측정하여 활성이 높은 알칼리성 protease 생성 균주를 최종 선정하였다.

### 균학적 성상

선정된 균주의 형태학적, 배양학적, 생화학적 특성 및 당 자화성은 API 20 NE kit, *Bergey's manual of*

*determinative bacteriology*(13) 및 Jean 등(14)의 방법에 따라 조사하였다.

### Protease의 활성도 측정

Protease 활성은 Hull 등(15)의 방법을 변형하여 사용하였다. 즉, 조효소액 1 ml를 0.6% casein이 포함된 NaOH-borate buffer 5 ml를 가하고 30°C에서 10분간 반응시킨 후 TCA 용액 5 ml를 가하여 37°C에서 20분간 처리시킨 후 생성된 침전물을 여과 (Whatman No. 2)하여 투명여과액 중에 포함된 방향족 아미노산의 양을 280 nm에서 분광광도계로 측정하여 흡광도로 표시하였다. 이때 protease의 1 unit는 1분 동안 tyrosine 1 µg을 생성하는 효소의 양으로 하였다.

### SDS-Polyacrylamide gel 전기영동

효소단백질의 생성패턴을 Trudel 등(16)의 방법에 따라 실시하였다. 즉, 1% SDS, 10% polyacrylamide와 기질로서 0.1% casein이 함유된 gel을 사용하여 Hoefer Scientific Instrument의 kit로 22°C에서 25 mA로 12시간 전개시킨 후 gel을 renaturation buffer(12.5 mM sodium borate, pH 10.3, 1% triton X-100)에 2시간 renaturation시킨 후 다시 coomassie brilliant blue로 염색, 탈색과정을 거쳐 최종 확인하였다.

### 조효소의 성질

20°C에서 4일간 진탕배양하여 원심분리한 후 얻은 상정액을 조효소액으로 하여 최적온도 및 열안정성, 최적 pH 및 안정성 등을 조사하였고, 분리된 알칼리성 protease의 특이성을 파악하고자 각종 저해제와 계면활성제에 반응시켜 조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 저온·알칼리성 protease 생성균주의 분리 및 선정

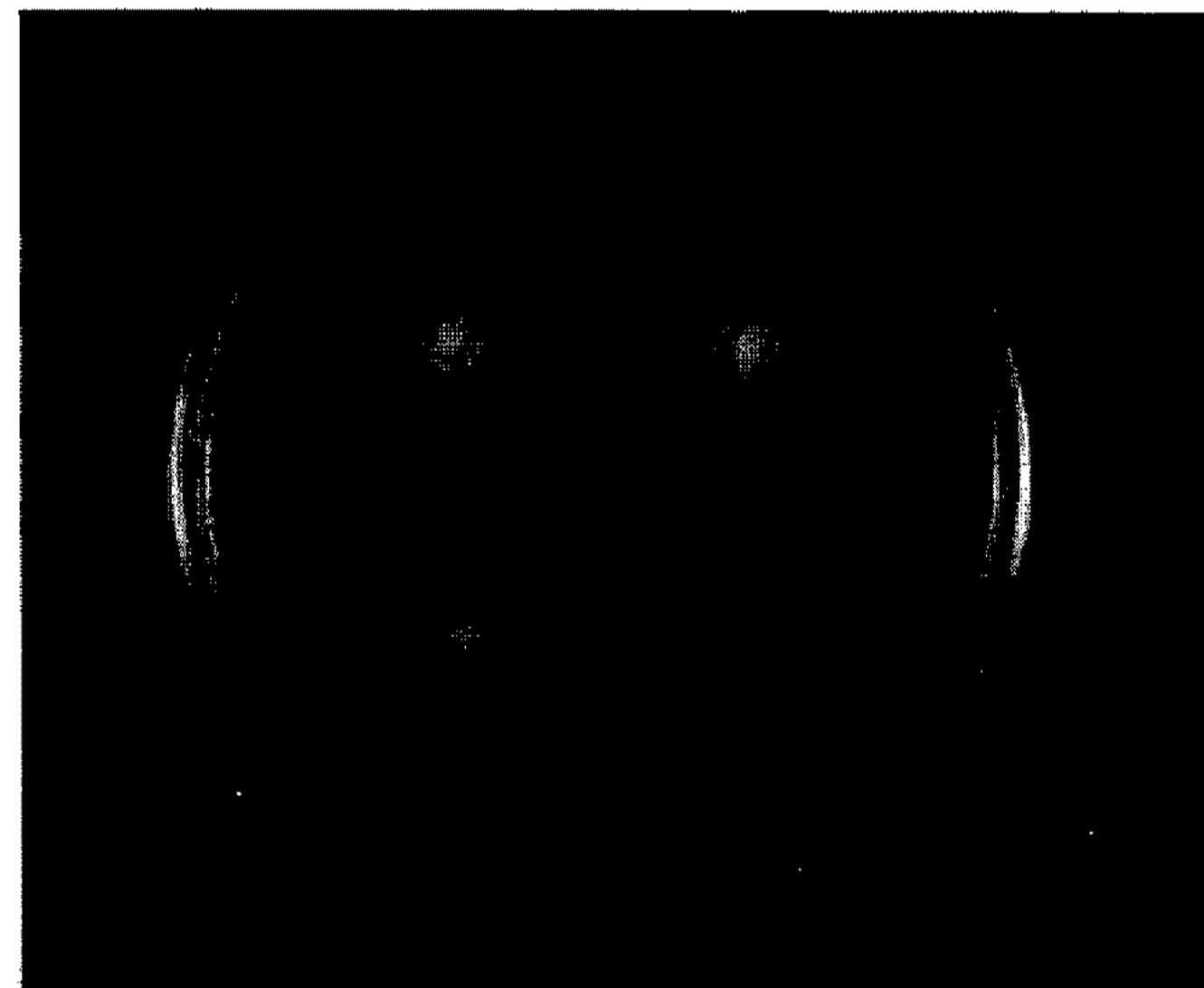
각종 균원시료를 PC 액체배지에서 4°C, 7일간 3회 이상 연속으로 집적배양하여 저온에서 생육이 우수한 균주의 수를 증가시킨 후, PCA 고체배지에 도말하여 4°C에서 4일간 배양했을 때 skim milk powder의 분해로 나타나는 halo size가 큰 colony를 선별하였다. 4°C에서 비교적 큰 halo를 형성하는 530여개 균주를 다시 PCA 고체배지에서 10°C와 37°C로 각각 3일간

**Table 1. Alkalopsychrotrophic protease activity of the isolated strains**

Isolated strains	Halo size <sup>a)</sup>	Protease activity (U) <sup>b)</sup>						
		5°C	10°C	15°C	20°C	25°C	30°C	37°C
RP-77	++	210	890	1870	1650	1030	950	-
RP-101	++	250	870	1090	1635	1328	910	-
RP-103	+++	450	940	1010	2042	1920	790	-
RP-222	+++	470	976	1680	2280	2020	825	57
RP-1090	+++	310	450	1100	1870	1950	935	-
RP-2109	+++	405	820	1890	1680	1070	240	-
RP-SJ-1	++	205	610	1040	1820	1071	510	-
RP-5103	+	145	870	1050	1125	970	580	-

a) Strains were cultivated on PCA medium (pH 10.0) at 20°C for 4 days (+: low, ++: medium, +++: large).

b) Strains were aerobically cultivated on PC medium (pH 10.0) at indicated temperature for 4 days.



**Fig. 1. Formation of clear zone on PCA medium contained 5% skim milk powder.**

Strains were incubated at 20°C for 4 days.

1: RP-222, 2: RP-103, 3: RP-SJ-1, 4: *E. coli* JM109

배양하여 10°C에서 생육이 양호하고 casein 분해능이 우수하지만 37°C에서 생육이 억제되는 저온·알칼리성 protease 생성균 200여 균주를 선별하여 PC 액체배지에서 효소활성을 측정된 결과 protease 활성이 높은 8개 균주는 Table 1과 같다. 특히 저온성 분리 균주 중에서 RP-222는 효소활성도가 가장 우수하여 최종 균주로 선정하였으며, PCA 고체배지상에서의 clear zone은 Fig. 1과 같다.

**Table 2. Taxonomical characteristics of the isolated strain RP-222**

Characteristics	RP-222
<b>Morphological characteristics</b>	
Form	Rod
Size (µm)	0.7~1.0
Length (µm)	2.5~2.3
Motility	+
Gram staining	-
Spore	-
Aerobe	+
<b>Cultural characteristics</b>	
Growth on MacConkey agar	+
Growth on medium for <i>Pseudomonas</i> isolation	+
Temp. range for growth	5~30°C
Optimum temperature	20°C
pH for growth	7.0~10.3
Optimum pH	10.0
<b>Physiological characteristics</b>	
<b>Fluorescent pigment</b>	
King A	-
King B	+
F agar	+
P agar	-
Urease	-
NO <sub>3</sub>	+
Tryptophen	-
Glucose	+
Arginine	+
Gelatin	+
PNPG(P-nitrophenyl-β-D-galactopyranoside)	-
Arabinose	-
Mannitol	+
NAG(N-acetyl-glucosamine)	+
Maltose	+
Gluconate	+
Caprate	-
Adipate	-
Maltate	+
Citrate	-
Phenyl-acetate	-
Oxidase	+

**선정균의 균학적 성상**

알칼리성 protease를 생성하는 저온성 RP-222의 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성은 Table 2와 같다.

RP-222은 Gram 음성, 간균으로 운동성이 있고,

**Table 3. Effect of temperature on growth and protease activity of RP-222**

Temperature (°C)	Cell growth (O.D at 660 nm)	Protease activity (Unit)
5	0.89	470
10	0.95	976
15	1.24	1680
20	1.42	2280
25	1.30	2020
30	0.80	825
37	0.10	57
40	—	—

King B와 F agar 배지에서 푸른 형광색소를 생성하는 호기성균으로서 *Bergey's manual of determinative bacteriology*(13) 및 Jean 등(14)의 방법에 따라 비교하면 *Pseudomonas fluorescens*와 거의 유사하였고, 최적생육온도도 기존에 보고된 *Pseudomonas sp.*(10)의 30°C보다 10°C 낮았으며, 최적 생육 pH도 10.0인 것이 특징으로 나타나 RP-222를 저온·알칼리성 *Pseudomonas sp.*으로 동정하였다.

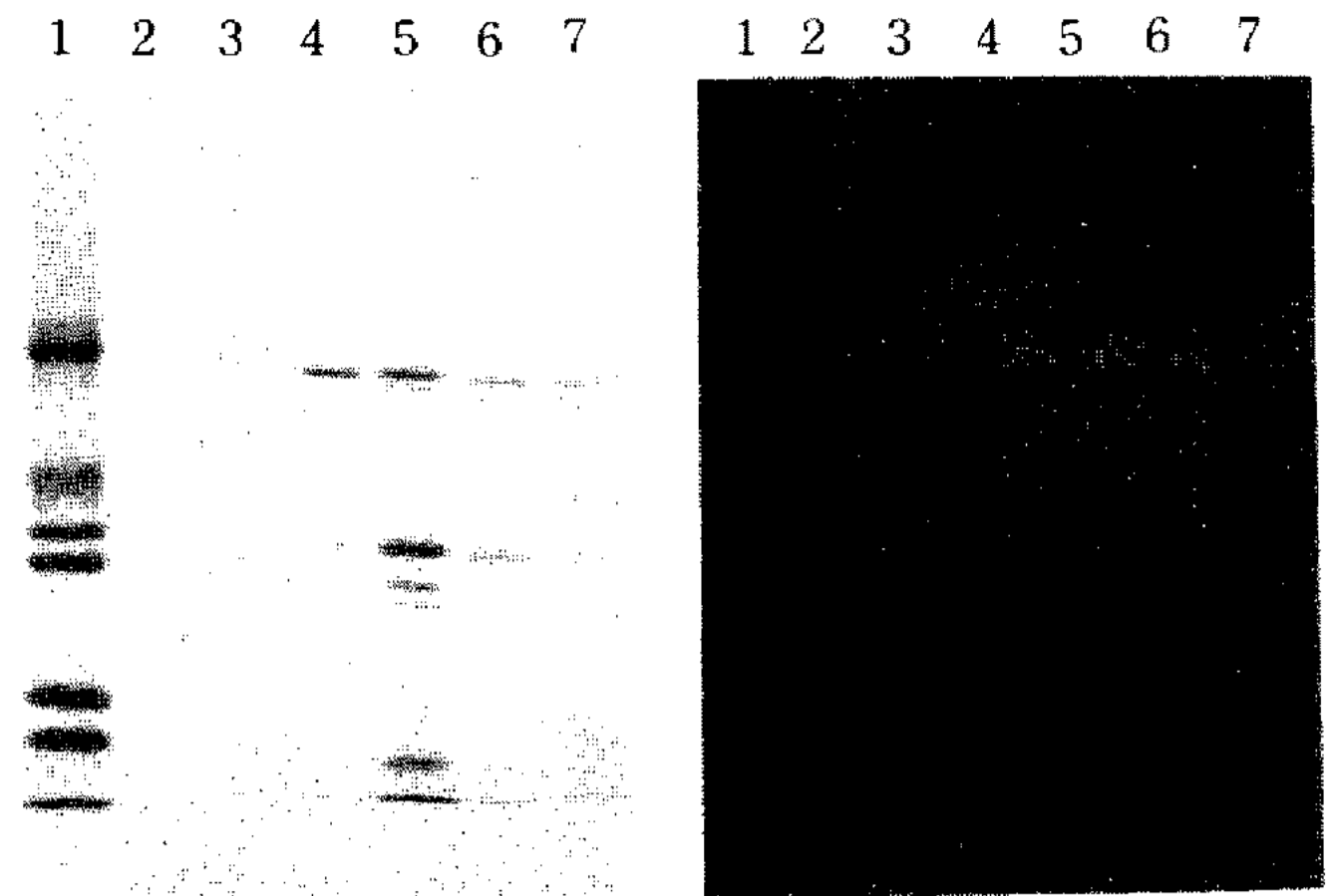
#### 배양온도의 영향

분리된 저온·알칼리성 *Pseudomonas sp.* RP-222를 PC 액체배지에서 5, 15, 20, 25, 30, 37, 40°C로 4일간 진탕배양하여 생육도와 원심분리한 상청액으로 protease 활성을 측정된 결과는 Table 3과 같다.

*Pseudomonas sp.* RP-222은 20°C에서 생육 및 효소활성이 가장 높았으며 37°C에서는 생육이 현저히 억제되었고 40°C 이상에서는 생육과 효소활성이 완전히 억제되는 저온성 세균의 특성을 나타내었다.

이런 결과는 저온·알칼리성 *Micrococcus sp.*의 amylase와 pullulanase 생성 최적온도가 17~20°C였다고 보고한 Kimura 등(17)의 결과와 비슷하였으며, Barach 등(18)과 Olsen 등(19)이 보고한 저온성 *Pseudomonas sp.*의 최적 생육온도가 4°C와 5°C인 것에 비하면 비교적 높았다. 그리고 각 온도 구간에서 4일간 배양하여 60% ammonium sulfate로 침전시켜 투석한 다음 SDS-PAGE와 0.1% casein이 함유된 SDS-PAGE를 동시에 행하여 gel상에서 배양온도에 따른 효소활성도를 비교한 것은 Fig. 2와 같다.

SDS-PAGE상에서 20°C 배양액의 것은 다른 온도

**Fig. 2. Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of alkaline protease according to cultural temperature.**

A: SDS-polyacrylamide gel electrophoresis

B: 0.1% Casein-polyacrylamide gel electrophoresis

Lane 1: Standard protein markers, 2: Culture broth at 37°C, 3: Culture broth at 30°C, 4: Culture broth at 25°C, 5: Culture broth at 20°C, 6: Culture broth at 15°C, 7: Culture broth at 10°C

에서 보다는 각종 단백질 band가 많았는데 이것은 생육이 가장 우수하다는 것을 나타낸다. 특히 casein이 함유된 전기영동상에서 protease 활성이 있는 부분은 negative staining되어 흰색 band를 확인할 수 있었는데, 15~25°C에서 band의 크기가 큰 것으로 보아 이 온도범위가 protease 생성에 적합하다는 것을 알 수 있었다.

#### pH의 영향

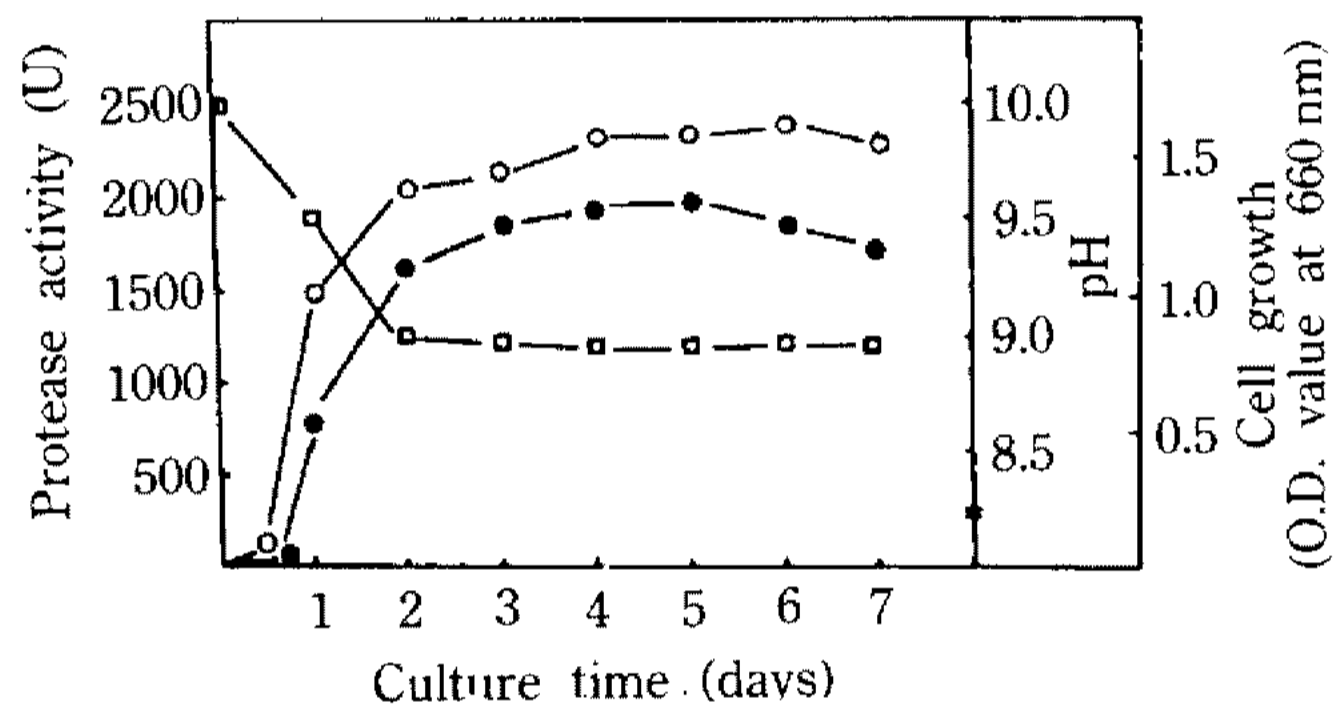
PC 액체배지에 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>를 농도별로 첨가하여 초기 pH에 따른 *Pseudomonas sp.* RP-222의 생육 및 효소활성을 측정한 결과 알칼리성 범위인 pH 9.0~10.3에서 양호하였고 pH 7.0과 pH 10.5 이상에서 효소생성능이 억제되는 특성을 보였다(Table 4). 이런 결과는 Horikoshi 등(1)이 보고한 *Bacillus sp.*와 Kimura 등(17)이 보고한 *Micrococcus sp.*에서 최적 pH가 10.3과 9.7인 것에 비교하면 비슷한 경향이었다. 그리고 생육 및 효소활성을 최적 pH인 10.0에서 배양시간에 따른 pH 변화와 효소활성의 관계를 조사하였다(Fig. 3). pH가 9.5 이하로 감소되는 배양 24시간 이후부터 효소합성이 시작되어 pH 9.0 부근에서 효소활성이 가장 높게 나타났다.

#### 배양시간의 영향

**Table 4. Effect of initial pH on growth and protease activity of RP-222**

pH	Final pH	Cell growth (O.D at 660 nm)	Protease activity (Unit)
6.0	7.92	0.52	145
7.0	8.15	0.91	1150
8.0	8.37	1.21	1500
9.0	8.60	1.27	1910
9.5	8.90	1.40	2300
10.0	8.90	1.40	2300
10.3	9.10	1.29	2180
10.5	9.45	0.95	1920

Strain was cultured on PC medium at 20°C for 4 days.



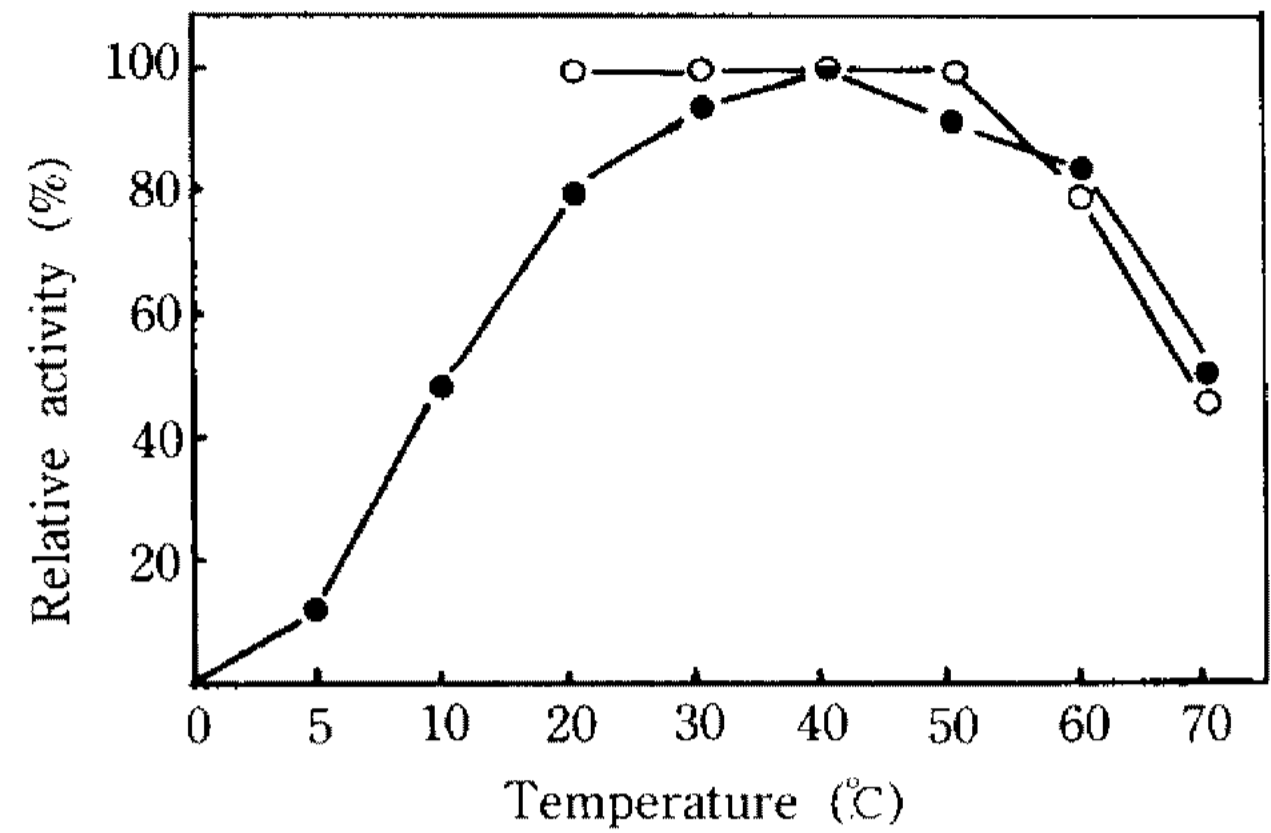
**Fig. 3. Changes of alkalopsychrotrophic protease production, pH and cell growth by *Pseudomonas* sp. RP-222.**

\*Symbols: ●—●; Cell, O.D., ○—○; Enzyme activity, □—□; pH

*Pseudomonas* sp. RP-222를 PC 액체배지에서 20°C로 배양하면서 시간의 경과에 따른 효소활성은 Fig. 3에서 보는 바와 같이 중온, 고온성 미생물보다 비교적 늦은 4일 이후에 최대로 나타났다. 배양시간 12시간까지는 protease 생성이 억제되다가 24시간 이후부터 효소생성이 시작되어 4일째에 거의 최대에 도달했다. Patel 등(9)이 보고한 저온성 세균인 *Pseudomonas* sp.은 4~5일이었고 Kimura 등(17)이 보고한 *Micrococcus* sp.은 4일로 나타난 것과는 비슷하였으나, 최적 생육온도가 0~5°C인 다른 *Pseudomonas* sp.의 경우, 7일 이상 배양하였을 때 효소활성이 최대였다는 Barach 등(18)의 결과와는 약간 상이하였다.

**조효소의 성질**

**최적온도 및 열안정성** : 조효소액과 기질을 혼합하



**Fig. 4. Effect of temperature on the activity and stability of the alkaline protease.**

●—●; optimal temperature, ○—○; thermal stability

여 각 온도에서 10분간 반응시켜 효소활성을 측정 한 결과 protease 활성은 40°C에서 최적이었으며, 20~30°C에서도 80% 이상의 효소활성이 인정되었으며 특히 10°C에서 효소활성이 검출되는 특성으로 보아 세제용 효소로서 이용가능성이 충분히 있다고 생각된다.

Protease의 열안정성은 효소액을 각 온도별(30~70°C)로 30분간 반응시킨 후 기질을 첨가하여 잔존활성을 측정 한 결과, 50°C에서 30분간 안정하였으나 60°C 이상에서는 불안정하였다(Fig. 4). 일반적으로 알칼리성 protease의 경우 효소반응의 최적온도는 효소 분리원에 따라 약간씩 다르지만 60°C 내외에서 가장 활성이 높는데, 본 효소는 40°C로서 Barach 등(18)이 보고한 *Pseudomonas* sp.의 protease(45°C)와 거의 비슷하였으나 Kobayashi 등(10)이 보고한 *Pseudomonas maltophilia*의 55°C와 西嶋涉 등(20)의 균체의 저온성 protease(55°C) 경우보다는 비교적 낮은 온도에서 활성이 높다는 것을 알 수 있었다.

**최적 pH 및 안정성**

기질의 pH를 각종 buffer로 조절 한 후 조효소를 첨가하여 40°C에서 10분간 반응시켜 효소활성을 측정 한 결과, pH 10.5에서 최적 활성을 나타내었으며 pH 9.0~12.0에서도 효소활성이 높게 나타나는 특징을 보였다. pH안정성은 protease 조효소액을 여러 buffer 용액과 혼합하여 40°C에서 30분간 방치하고 최저 반응 pH로 조절 한 다음 기질을 첨가하여 잔존활성을 측정 한 결과 pH 7.0~13.0까지는 30분간 안정하였고 pH 6.0 이하에서는 활성이 감소하였다(Fig. 5). Kobayashi 등(10)이 보고한 알칼리성 protease의 최적

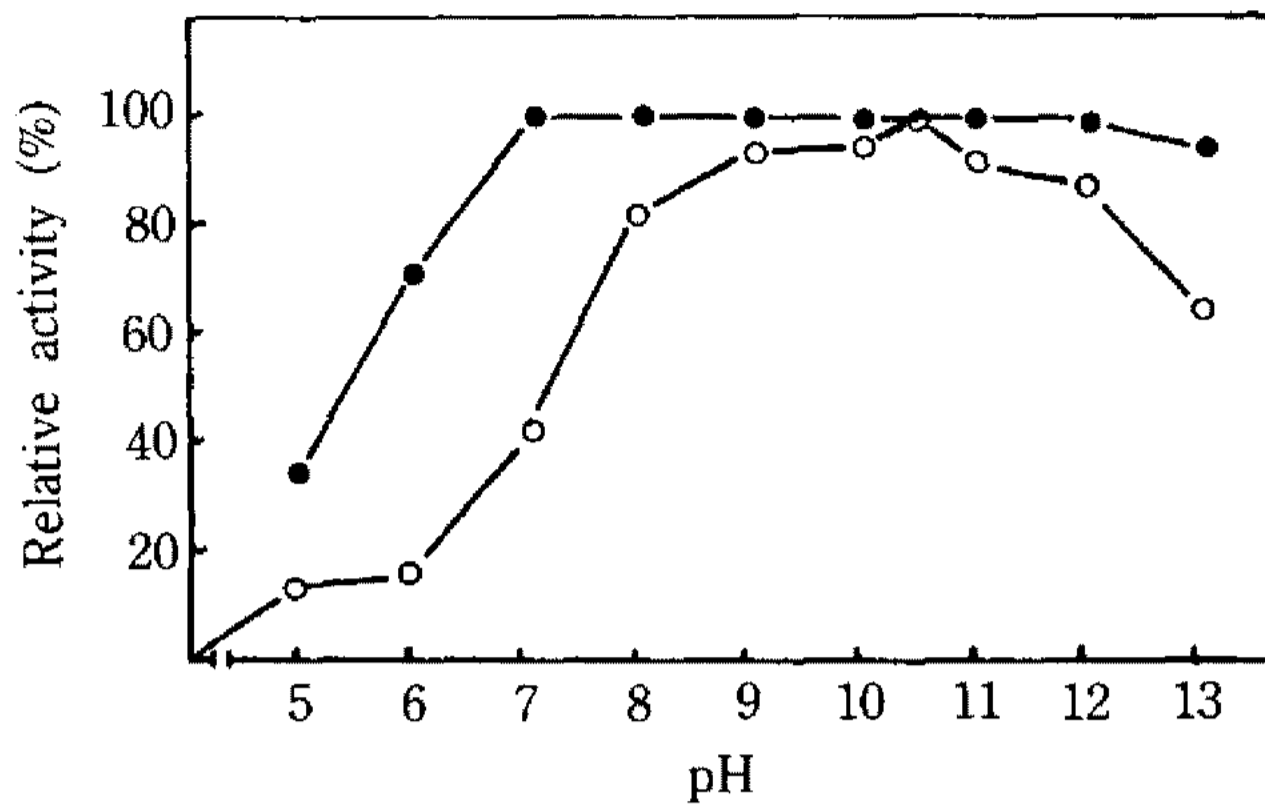


Fig. 5. Effect of pH on the activity and stability of the alkaline protease.

●-●; pH stability, ○-○; pH activity

Table 5. Effect of inhibitor and detergents on the alkaline protease activity

Inhibitor	Concentration	Relative activity (%)
None		100
PMSF <sup>1)</sup>	10 mM	18
Idoacetic acid	2.5 mM	69
SDS <sup>2)</sup>	0.2%	30
EDTA <sup>3)</sup>	10 mM	4
O-Phenanthroline	1 mM	120
Potassium cyanide	10 mM	0.8
L-Cysteine	1 mM	80
Tween 80	1 mM	139
LAS <sup>4)</sup>	0.05%	119
	0.1%	103
AOS <sup>5)</sup>	0.05%	130
	0.1%	128

<sup>1)</sup> Phenylmethanesulfonyl fluoride

<sup>2)</sup> Sodium dodesylsulfate

<sup>3)</sup> Ethylenediamine tetraacetic acid

<sup>4)</sup> Linear alkylbenzene sulfonate

<sup>5)</sup> Na- $\alpha$ -olefin sulfonate

pH와 유사하였으며 pH안정성은 알칼리 범위에서 약간 넓게 나타났다.

#### Protease 저해제와 계면활성제의 영향

조효소액에 각종 protease 저해제와 계면활성제를 첨가하여 효소활성을 측정된 결과는 Table 5와 같다.

저온·알칼리성 *Pseudomonas* sp. RP-222가 생성하는 protease는 PMSF와 EDTA에 의해 강하게 저해되는 것으로 보아 이 효소의 활성부위에 serine 잔기와 금속이온이 관여한다는 것을 알 수 있었다. 특히 효소활성에 영향을 미치는 계면활성제 중에

Tween 80에서는 40% 정도가 활성화되었다. Triton X-100, LAS 및 AOS 등의 물질에서는 강한 내성을 가지고 있었는데, 이와 같은 결과로 본 효소는 저농도의 계면활성제 첨가에 의해서 효소활성이 증가됨으로 세제와 혼합하여 충분히 사용할 수 있을 것으로 생각되었다.

## 요 약

저온에서 높은 활성을 나타내는 알칼리성 protease를 생산하기 위하여 여러가지 시료로부터 집적 배양에 의해 저온성 세균을 분리하였다. 분리된 세균은 저온·알칼리성 *Pseudomonas* sp.인 것으로 판명되었으며, 효소생산을 위한 균생육의 최적 pH는 10.0, 온도 20°C에서 4일간 배양하였을 때였다. 이 효소활성의 최적 pH 및 온도는 각각 pH 10.5 및 40°C였으며, pH 및 열안정성은 각각 pH 7.0~13.0, 온도 50°C 이하의 범위에서 비교적 안정하였다. 또한 이 효소는 PMSF와 EDTA에 의해서 저해되므로 활성부위에 serine기와 금속이온이 관여하는 것으로 추정되며 계면활성제의 존재하에서도 안정하였다. 효소의 활성은 0.05% Na- $\alpha$ -olefin sulfonate 첨가에 의해 약간 증가되었다.

## 감사의 말

본 연구는 한국과학재단에서 지원하여 주신 기초연구비의 일환으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Horikoshi, K. and T. Akiba: *Alkalophilic Microorganism: A New Microbial World*, Japan Scientific Press, Tokyo (1982)
- Brock, T.D.: *Thermophiles: General, Molecular and Applied Microbiology*, John Wiley & Sons, Inc., New York (1986)
- Morita, R.Y.: *Bacteriol. Rev.*, **39**, 144 (1975)
- Witter, L.D.: *J. Dairy Sci.*, **44**, 983 (1961)
- Horikoshi, K.: *Agric. Biol. Chem.*, **35**, 1407 (1971)
- Aunstrup, K., H. Outtrup, O. Anderson and C. Dambmann: *Proceeding of the 4th International Fermentation Symposium*, 229 (1972)
- Tube, K., Y. Hirose, Y. Nakamura and K. Mitugi:

- U.S. Patent No. 3871963 (1975)
8. Willadsen, K.J.S. and K.P. Vestberg: U.S. Patent No. 3960665 (1976)
  9. Patal, T.R., F.M. Bartlett and M.J. Hamid: *J. Food Protection* **46**, 90 (1983)
  10. Kobayashi, T., A. Ogasawa, S. Ito and M. Saito: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 693 (1983)
  11. Richard, A.L., L.D. Erich, J.S. Price, L. Wolfenbarger, Jr. and H. Drucker: *J. Biol. Chem.*, **256**, 811 (1981).
  12. Nakanishi, T., Y. Matsumura, N. Minamiura and T. Yamamoto: *Agric. Biol. Chem.*, **38**, 37 (1974)
  13. Buchanan, R.E. and V.E. Gibbons: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 8th ed. (1974)
  14. Jean, F.M.: *Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria*. 2nd ed., Williams and Wilkins Co. Baltimore U.S.A. (1980).
  15. Hull, F.M.: *J. Dairy Sci.*, **30**, 881 (1974)
  16. Trudel, T. and A. Asselin: *Anal. Biochem.*, **178**, 362 (1989)
  17. Kimura, T. and K.D. Horikoshi: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 2963 (1989)
  18. Barach, J.T., M. Adams and M.L. Speck: *J. Dairy Sci.*, **58**, 828 (1975)
  19. Olsen, R.H. and J.J. Jezeski: *J. Bacteriol.*, **86**, 429 (1963)
  20. 西嶋渉, 村上浩紀, 山田耕路, 三宅義章, 大村浩久: 日本農藝化學會誌 講演要旨集, **63**, 248 (1989)

(Received July 2, 1991)