

Staphylococcus xylosus SC-22가 생산하는 lipase의 정제 및 특성

성찬기¹ · 갈상완² · 이상원² · 최영주*

신라대학교 자연과학대학 식품영양학과
¹한국전통발효식품연구소
²진주산업대학교 미생물공학과

Purification and Characterization of Extracellular Lipase from *Staphylococcus xylosus* SC-22

Chan Ki Sung¹, Sang Wan Gal², Sang Won Lee² and Young Ju Choi*

Department of Food and Nutrition, Silla University, Pusan 617-736, Korea

¹Korea Fermented Food Research Institute, Sancheong 666-962

²Department of Microbiological Engineering, Chinju National University, Chinju 660-758

Abstract

A bacterial strain SC-22 which produced alkaline lipase was isolated from salt-fermented shrimps. Strain SC-22 was identified as *Staphylococcus xylosus*. An alkaline lipase excreted by *Staphylococcus xylosus* SC-22 was purified by ammonium sulfate precipitation and column chromatography on Sephadex G-100 and DEAE-Sephacel. The specific activity of purified lipase was 756U/mg of protein with 17.2% yield. The approximate molecular weight of the purified enzyme was 47 kDa. The partially purified lipase preparation had an optimum temperature of 40°C, an optimum pH of 8.0, and a stable pH range of 5~10. Lipase activities were enhanced by salt ions such as Ca²⁺, Mg²⁺, Na⁺ while inhibited remarkably by heavy metal ions, Cu²⁺ and Pb²⁺.

Key words – alkaline lipase, *Staphylococcus xylosus*, salt-fermented shrimp

서 론

Lipase(glycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.3)는 triacylglycerol를 가수분해하여 glycerol과 fatty acid의 생성을 촉진한다[16]. Lipase는 식물, 동물 및 미생물에 널리 분포하며, 또한 미생물 중에서도 source에 따라 그 특성이 다양하다[10]. Lipase는 다양한 기질특이성을 가지는데 지방의 모

든 위치에서 반응을 촉매하는 비특이적 lipases는 별다른 가치가 없으나, 산업적인 측면에서 중요한 것은 regiospecific lipases (sn-1,3-specific lipases)로서 화학, 약리학, 의학, 화장품 및 가죽산업 등에 널리 이용되고 있다[9]. 또한 lipases는 화학요법제 및 항암제에 대한 키랄 약품 중간체 합성을 위해서도 사용되며[21], 특히 lipases는 소화제, 향기 합성 및 oil의 가공을 위해서 사용되고 있다[11,17]. Fungal lipase는 식품기능성, 임상화학 및 industrial chemistry 같은 생명공학분야에 폭넓게 이용되고 있으며, 또한 많은 산업적인 응용을 위해서 새로운 lipases 자원개발에 대한 요

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 051-309-5459, Fax : 051-309-5176
E-mail : yjchoi@silla.ac.kr

구가 증대되고 있다[27].

식생활에서 가장 중요한 발효식품 중의 하나인 새우젓은 식단에서 가장 많이 식용되고 있는 젓갈로서, 새우젓에는 핵산 분해산물들과 glutamate 등의 정미성분들이 다량 포함되어 있어 감칠맛을 낸다[6]. 이러한 새우젓에 관한 연구는 주로 새우젓의 휘발성 향기성분에 대한 연구[3-5], 단백질분해효소에 대한 연구[1,8,12,20], N-nitrosamine의 생성에 미치는 영향[14] 등에 관해서 주로 수행되었으며, 새우젓에 존재하는 미생물의 특징이나 지질분해효소에 대한 연구는 거의 없는 실정이다. 미생물에 대한 lipase 연구는 주로 *Pseudomonas* [15,19,25,28-30]에 집중되었으며 *Staphylococcus xylosum* 균에 대한 연구[24]는 거의 없다.

따라서 본 연구에서는 새우젓의 품질 개선을 위한 starter를 개발하기 위하여 새우젓에서 분리된 미생물로부터 lipase활성이 높은 균주인 *Staphylococcus xylosum* SC-22를 선별하였고 이 균주에 의하여 생산되는 lipase를 분리·정제하여 그 특성을 조사하여 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시약

시약으로 p-nitrophenyl palmitate (PNPP), p-nitrophenol (PNP), sephadex G-100, DEAE-Sephacel, bovine serum albumin 등은 Sigma Chemical Co. (St. Louis, U.S.A) 제품을, Sodium deoxycholate (Na-DOC)은 Fluka제품을 사용하였다. 균주 배양 및 보존용 시약은 Difco 사 제품을 사용하였으며 기타 다른 시약은 특급을 사용하였다.

균주의 분리 및 동정

새우젓으로부터 분리된 미생물 중 지질 분해균의 선별을 위한 기질로 tributyrin을 사용하였으며 plate assay 법 [13]으로 lipase 활성이 높은 균주를 선별하였다. 지질분해균 선별배지에 균을 접종하여 colony 주위에 clear zone을 형성하는 것을 lipase 활성 양성균으로 하였으며, 이중 HC ratio(clear zone의 크기/colony의 크기)가 높은 균을 선별하여 사용하였다. 분리된 미생물 중에서 효소의 활성이 높은 SC-22 균주의 동정은 Microbial Identification System을 이용하여 분석하였다. SC-22 균주를 TSBA배지 [Trypticase soy broth (BBL사, 미국), 30g; granulated agar (BBL사, 미

국), 15g; 증류수1000ml]에 생육시킨 후 Manual Instructor에 따라 처리하여 gas chromatography에 의하여 지방산을 분석하고 분석된 chromatogram을 data base와 비교하여 균주를 동정하였다.

균주배양 및 조효소액 조제

균주의 보존 및 효소활성 측정을 위한 배지는 Bactotryptone 5g, Bacto-peptone 5g, yeast extract 3g, NaCl 30g의 고체 및 액체배지(TPY, g/ℓ)를 사용하였다. 조효소 생산은 효소 생산배지(TPY)에서 37℃, 24시간 진탕배양(200 rpm)한 다음, 배양액을 원심분리(6,000 rpm, 10min)하여 균체를 제거하고 그 상등액을 조효소로 사용하였다.

Lipase 활성측정 및 단백질 정량

효소 활성측정은 표준물질로서 p-nitrophenyl palmitate를 사용한 colorimetric 방법[25]에 의하여 수행되었다. p-nitrophenyl palmitate (PNPP) 30mg을 2-propanol 10ml에 녹인 용액과, sodium deoxycholate (Na-DOC) 207mg 및 gum arabic 100mg을 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 90ml에 녹인 용액을 혼합한 용액 2ml에 효소액 0.1ml을 가하여 37℃에서 15분간 반응시킨 다음 2M Na₂CO₃용액 0.9ml를 가하여 반응을 중지시켰다. Lipase 활성은 생성된 p-nitrophenol의 양을 410nm에서 측정하였으며, 효소활성은 37℃에서 1분 동안 1μmole의 유리 palmitic acid를 생성하는 효소량을 1 unit로 나타내었다.

단백질 정량은 Bradford의 방법[2]에 따라 측정하였으며, 이때 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하였으며 595nm에서 흡광도를 측정하였다.

Lipase 정제

배양액을 30% ammonium sulfate로 포화시켜 4℃에서 24시간 방치시킨 후 원심분리(8,000g, 10min)하였다. 상등액을 다시 80% ammonium sulfate로 포화시켜 4℃에서 24시간 방치시킨 다음 원심분리(10,000g, 30min)한 후 침전물을 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 녹여 조효소로 사용하였다.

Sephadex G-100을 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 상온에서 72시간 동안 포화시킨 후 column (15x1,200mm)에 충전시키고 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 평형시

킨 다음 ammonium sulfate (30~80%)로 포화시켜 부분 정제된 조효소를 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 용출시켰다. 유출속도는 21.6ml/h 이었고 분획한 용액은 280nm에서 단백질을 확인한 후 410nm에서 효소 활성도를 측정하였다. 활성이 높은 분획만을 모아 냉동건조기로 농축시킨 다음 이온교환 chromatography에 의하여 효소를 정제하였다. DEAE-Sephacel을 1mM sodium phosphate buffer (pH 6.7)로 씻은 다음 column (30×250mm)에 충전시키고 Sephadex G-100에 의하여 정제된 시료를 column에 흡착시킨 후 1mM과 0.5M sodium phosphate buffer로 농도구배시켜 활성이 높은 분획을 모아 정제된 효소액으로 사용하였다.

결과 및 고찰

Lipase의 정제

Staphylococcus xylosus SC-22균주는 TPY 배지에서 24 시

간 동안 배양하였으며 배양액을 ammonium sulfate(30~80%) 침전, Sephadex G-100 및 DEAE- Sephacel column chromatography (Fig. 1)과정을 거쳐 효소를 정제하였다. 정제된 효소의 specific activity는 756.6units/mg으로 19.3배 정제되었으며 회수율은 17.2% 였다(Table 1). 정제된 lipase의 SDS-전기영동 결과 분자량이 약 47kDa의 band를 얻었다(data not shown). 이러한 결과는 *Staphylococcus haemolyticus* [18] 및 *Staphylococcus warneri* [26]가 생산하는 lipase의 분자량(45kDa)과 비슷하게 나타났다. 특이하게 균주 배양액이나 ammonium sulfate 침전물에서는 lipase와 lipopolysaccharide(LPS)로 구성된 큰 분자량의 응집물로 존재하다가 gel filtration과 ion exchange 크로마토그래피에 의하여 LPS와 분리되어 47kDa 크기의 단일 band를 나타냈다. *Staphylococcus warneri*[26]와 *Pseudomonas aeruginosa* PACIR[25] 균 배양액에서 단백질과 LPS가 응집물로 존재하는 것으로 보고되었으며 이러한 응집물은 Tris-EDTA

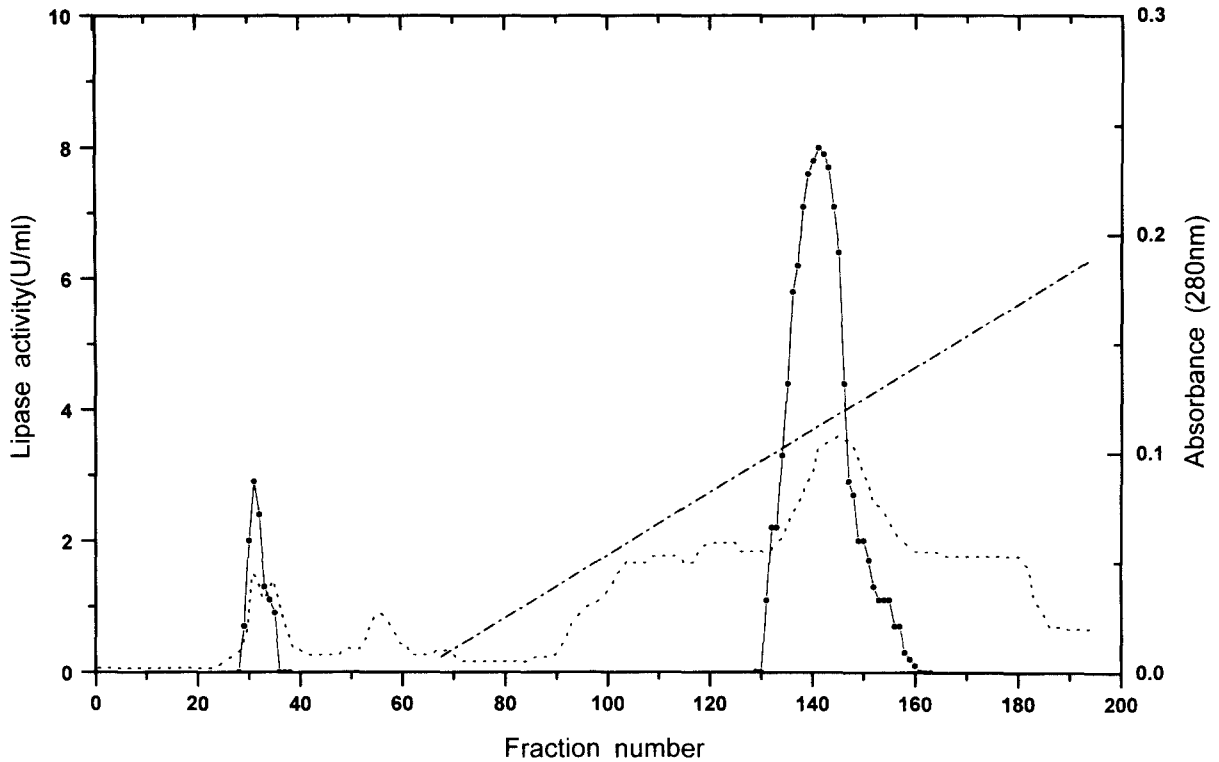


Fig. 1. Elution pattern of lipase by DEAE-Sephacel.

The enzyme solution that partially purified by ammonium sulfate precipitation and Sephadex G-100 was put on a DEAE-Sephacel column (30x250mm) equilibrated with 1mM sodium phosphate buffer(pH 6.7). The column was washed with same buffer and the enzyme was eluted with a linear gradient formed of 1mM and 500mM buffers, pH 6.7.

●—●, Lipase activity; ----, Absorbance at 280nm; - · - ·, linear gradient

Table 1. Purification of lipase from culture supernatant of *S. xylosum* SC-22

Purification step	Vol (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)	Purification (fold)	Yield (%)
Culture supernatant	1,850	157.3	6,160.5	39.2	1.0	100
Ammonium sulfate ppt	11.6	67.9	4,993.8	73.5	1.9	81.1
Sephadex G-100	38.0	30.4	3,546.5	116.7	3.0	57.6
DEAE-Sephacel	70.1	1.4	1,059.2	756.6	19.3	17.2

Lipase activity was determined with p-NPP as the substrate

buffer나 여러 가지 detergent에 의하여 LPS로부터 lipase가 분리되었다. Lipase에 대한 연구는 주로 *Pseudomonas*에서 이루어 졌으며 분리된 lipase의 분자량은 약 30kDa~70kDa까지 다양하게 존재하는 것으로 밝혀져 있다[25,28,29]. 곰팡이 lipase는 식품공업이나 임상 및 화학공업에 많이 사용되고있으며, *Fusarium oxysporum*의 lipase는 분자량이 30kDa으로 specific activity가 6.10 U/mg으로 38.1배 정제정도가 보고되었다[7].

Lipase의 활성에 미치는 온도 및 pH의 영향

Lipase의 활성에 미치는 온도효과를 측정하기 위하여 colorimetric 방법[25]에 따라 온도를 20~60℃까지 변화시키면서 정제된 효소액을 가하여 활성을 측정하였다. 본 연구에서 분리된 lipase는 20~50℃에서 비교적 높은 활성을 유지하였으며 40℃에서 최대 활성을 나타내었다(Fig. 2). *S. warneri*, *S. haemolyticus*의 lipase는 각각 25℃, 28℃에서 최적온도를 나타내었으며, *S. xylosum*를 이용한 돼지의 lipolysis에서는 37℃에서 최적활성을 나타내었다[25]. 이러한 결과는 *Staphylococcus* 속의 lipase의 최적 온도는 균주 및 사

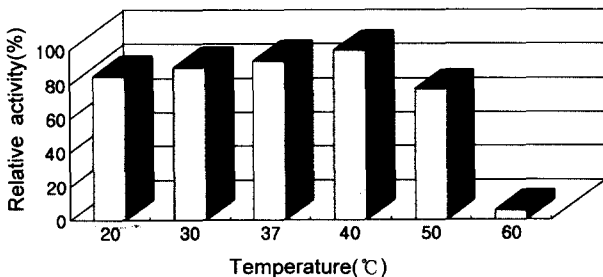


Fig. 2. Effect of temperature on alkaline lipase activity. Conditions excepts for temperature were the same as the standard assay method.

용한 기질에 따라서 차이가 있음을 나타내고 있다. *Fusarium oxysporum*에서 생산된 lipase는 42℃에서 최적활성을 나타내었으며, *Pseudomonas aeruginosa* YS-7 균주는 본 연구에서 분리된 효소와 유사하게 20~50℃에서 lipase 활성이 높게 유지되었다[22]. *Pseudomonas*의 lipase 활성은 넓은 범위의 최적온도를 나타내는 것으로 알려져 있다.

Lipase 활성 및 안정성에 미치는 pH 효과를 측정하기 위하여 기질용액과 25mM sodium acetate buffer (pH 4.0~5.0), 25mM potassium phosphate buffer (pH 6.0), 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.0~9.0), 25mM sodium carbonate buffer (pH 10.0)를 각각 혼합한 용액에 정제된 효소액을 가하고 37℃에서 lipase 활성을 측정한 결과 pH 8.0에서 최대 활성을 가지는 alkaline lipase로 나타났다(Fig. 3A, 3B). 그런데 균주의 생육은 산성조건에서 오히려 생육이 촉진되었다(data not shown). *S. warneri*, *S. haemolyticus* 균주의 최적 pH는 각각 9.0과 8.5로 본 연구에서 분리된 효소와 유사한 최적 pH를 보여주고 있다[18,26].

pH 안정성은 정제된 효소액에 pH 4.0~10까지의 완충용액을 이용하여 pH를 달리한 후 37℃에서 1시간 처리한 후 잔존활성을 측정하여 pH 안정성을 조사하였다. Lipase의 활성은 pH 6.0~10 범위 내에서 90% 이상 효소활성을 유지하였다. *S. haemolyticus* 균주는 pH 5.0~11.0 범위에서 안정하였으며[26] *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111균은 pH 6.0~10 범위에서 안정하게 활성을 유지하여 본 효소와 유사한 경향을 나타냈다[15].

Lipase 활성에 미치는 금속이온의 영향

금속이온들이 lipase에 미치는 영향을 알아보기 위하여 기질을 25mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)에 녹인 후 각 금속이온들의 농도를 2mM 되게 하여 37℃에서 30분 동안 방

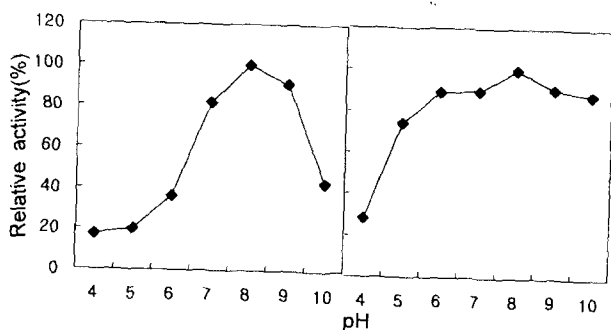


Fig. 3. Effect of pH on alkaline lipase activity [A] and stability [B].

[A] Enzyme activity was assayed in buffer of different pH values by colorimetric method as described in the text. [B] The enzyme was incubated in buffers of different pH values for 1h at 37°C, and the remaining activity was measured by colorimetric method. The buffer systems (25mM) used were sodium acetate buffer (pH 4.0 to 5.0), potassium phosphate buffer (pH 6.0), Tris-HCl (pH 7.0 to 9.0), and sodium carbonate buffer (pH 10.0).

치한 후 lipase 활성을 측정하였다(Fig. 4). Lipase 활성은 Cu^{2+} , Pb^{2+} 에 의해 현저히 저해되었으며, Fe^{3+} 에 의해 거의 50% 정도 저해되었으나, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ 에 의해서는 저해를 받지 않았다(Fig. 4).

Hoshino 등은 *Fusarium oxysporum* 이 생산한 lipase의 활성은 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ 이온에서 효소활성이 증가되었고, Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} 이온에서는 저해를 받는 것으로 보고하였다[7]. 박 등[19]은 *Pseudomonas* sp. S4-14이 생산하는 lipase는 Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ 이온에서 활성화되었지만 Cu^{2+} , Pb^{2+} , Fe^{3+} 이온에서는 Hoshino 등의 결과와 비슷한 저해 정도를

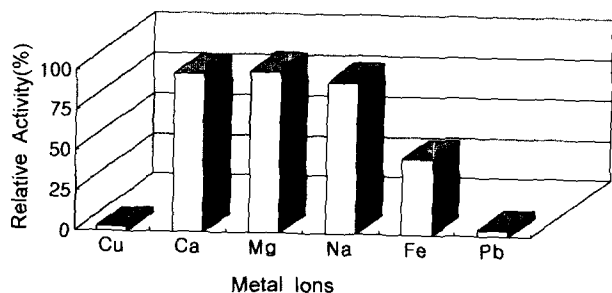


Fig. 4. Effect of metal ions on alkaline lipase activity. The enzyme dissolved in 25mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) was incubated with a metal ion for 30min at 37°C. After incubation, the remaining activity was measured by the colorimetric method.

보였다. Shibata 등[23]은 *Pseudomonas aeruginosa* 균주에서 Ca^{2+} 이온이 lipase-modulator의 복합체 형성에 필수적이며, 또한 *Pseudomonas* lipase의 활성형태는 칼슘이온에 의하여 안정화된다고 보고하였다. 이러한 결과는 본 연구와 유사한 결과를 보여주고 있다

요 약

Staphylococcus xylosus SC-22으로부터 생성된 lipase를 분리·정제하여 특성을 조사하였다. *Staphylococcus xylosus* SC-22의 배양액을 ammonium sulfate (30~80%), Sephadex G-100 및 DEAE-Sephacel chromatography의 정제과정을 거친 결과, specific activity가 756.6 units/mg protein으로 19.3 배 정제되었으며 수율은 17.2%로 나타났다. 정제 효소의 분자량은 47kDa, 정제된 효소의 특성은 최적온도는 40°C, 최적 pH는 8.0이었으며, pH 안정성 범위는 pH 6.0~10.0부근에서 비교적 안정하였다. Alkaline lipase의 활성은 Cu^{2+} 와 Pb^{2+} 에 의해 완전히 저해되었으며, Fe^{3+} 에 의해 50% 효소활성이 저해되었으나, Ca^{2+} , Mg^{2+} , Na^+ 에 의해 저해를 받지 않았다.

감사의 말

본 연구는 2000년도 신라대학교 교내학술 연구비로 수행되었음을 감사 드립니다.

참 고 문 헌

- Ahn, D. H., T. H. Kim, J. I. Choi, S. N. Kim and S. Y. Park. 1998. Studies on the improvement of pork meat quality using salt-fermented shrimp. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **22**, 482-488.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Cha, Y. J. and K. R. Cadwallader. 1995. Volatile components in salt-fermented fish and shrimp pastes. *J. Food. Sci.* **60**, 19-24.
- Cha, Y. J., H. Kim, S. M. Jang and J. Y. Park. 1999. Identification of aroma-active compounds in Korean

- salt-fermented fishes by aroma extract dilution analysis: Aroma-active components in salt-fermented shrimp on the market. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **28**, 319-325.
5. Choi S. H. 1987. Cooked odor components of *Sergia lucens* and its fermented product. *Korean. J. Food Sci. Technol.* **19**, 157-163.
 6. Chung, S.-Y. and E.-H. Lee. 1976. The taste compounds of fermented acetes chinensis. *Bull. Korean. Fish Soc.* **9**, 79-110.
 7. Hoshino, T., T. Saaki, Y. Watanabe, T. Nagasawa and T. Yamane. 1992. Purification and characteristics of extracellular lipase from *Fusarium oxysporium* f. sp. Lini. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**, 660-664.
 8. Hur, S. H. 1996. Critical review on the microbiological standardization of salt-fermented fish product. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* **25**, 885-891.
 9. Iwai, M. and Y. Tsujisaka. 1984. *Fungal lipase*. In : *Lipases*, pp.443-469. Borgstrom, B. and H. L. Brockman. eds., Elsevier Science Publishers, Amsterdam.
 10. Jaeger, K.-E., S. Ransac, B. W. Dijkstra, C. Colson, M. van Heuvel and O. Misset. 1994. Bacterial lipases. *FEMS Microbiol. Rev.* **15**, 29-63.
 11. Jarvis, G. N. and J. H. Thiele. 1997. Quantitative rhodamine B assay which uses tallow as a substrate for lipolytic obligately anaerobic bacteria. *J. Microbiol. Methods* **29**, 41-47.
 12. Kim, B.-M. 1988. Changes in the properties of protein during the fermentation of salted shrimp. *Korean. J. Food Sci. Technol.* **20**, 883-889.
 13. Kouker, G. and K. E. Jaeger. 1987. Specific and sensitive plate assay for bacterial lipase. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 211-213.
 14. Kim, J. G., S. J. Lee and N. J. Sung. 1998. Influence of nitrite and ascorbic acid on N-nitrosamine formation during the fermentation of salt-fermented small shrimp. *J. Korean. Fish Sci.* **31**, 63-70.
 15. Lin, S. F., C. M. Chiou, C. M. Yeh and Y. C. Tsai. 1996. Purification and partial characterization of an alkaline lipase from *Pseudomonas pseudoalcaligenes* F-111. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1093-1095.
 16. Marangoni, A. G. and D. Rousseau. 1995. Engineering triacylglycerols. The role of interesterifications. *Trends Food Sci. Technol.* **6**, 329-335.
 17. Mojovic, L., S. Siler-MarinKovic, G. Kubic and G. Vunjak-Novakovic. 1993. *Rhizopus arrhizus* lipase-catalyzed interesterification of the midfraction of palm oil to a cocoa butter equivalent fat. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 25-37.
 18. Oh, B., H. Kim, J. Lee, S. Kang, and T. Oh. 1999. *Staphylococcus haemolyticus* lipase : biochemical properties, substrate specificity and gene cloning. *FEMS Microbiol. Lett.* **179**, 385-392.
 19. Park, S. H., S. C. Choi, J. S. Rhee and N. K. Sung. 1994. Purification and enzymatic properties of alkaline lipase from the *Pseudomonas* sp. S4-14. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**, 271-276.
 20. Park, G. H. and J. S. Ju. 1986. Proteolytic digestion of boiled pork by soured shrimp. *Korean J. Nutr.* **19**, 363-373.
 21. Patel, M. T., R. Nagarajan and A. Kilara. 1996. Hydrolysis of milk fat by lipase in solvent-free phospholipid reverse micellar media. *J. Food Sci.* **61**, 33-38.
 22. Shabtai, Y. and D. M. Neomi. 1992. Production, purification, and properties of a lipase from a bacterium (*Pseudomonas aeruginosa* YS-7) capable of growing in water-restricted environments. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 174-180.
 23. Shibata, H., H. Kato and J. Oda. 1988. Calcium ion-dependent reactivation of a *Pseudomonas* lipase by its specific modulating protein, LipB. *J. Biochem.* **123**, 136-141.
 24. Sorensen, B. B. and H. Samuelsen. 1996. The combined effects of environmental conditions on lipolysis of pork fat by lipases of the meat starter culture organism *Staphylococcus xylosus* and *Debaryomyces hansenii*. *Int. J. Food Microbiol.* **32**, 59-71.
 25. Stuer, W., K. E. Jaeger and U. Winkler. 1986. Purification of extracellular lipase from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **168**, 1070-1074.
 26. Talon, R., N. Dublet, M. C. Montel and M. Cantonnet. 1995. Purification and characterization of extracellular *Staphylococcus warneri* lipase. *Curr. Microbiol.* **30**, 11-16.
 27. Thomson, C. A., P. J. Delaquis and G. Mazza. 1999. Detection and measurement of microbial lipase activity: a review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **39**, 165-187.
 28. Toshiyuki, N., T. Chikano and M. Kaminura. 1987. Purification and some properties of lipase produced by *Pseudomonas fragi* 22.39B. *Agri. Biol. Chem.* **51**, 181-186.
 29. Watanabe, N., Y. Ota, Y. Minoda and K. Yamada. 1977. Isolation and identification of alkaline lipase

producing microorganisms, cultural conditions and some properties of crude enzymes. *Agric. Biol. Chem.* **41**, 1353-1358.

30. Wilhelm, S. W., J. Tommassen and K. E. Jaeger. 1999.

A novel lipolytic enzyme located in the outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* **181**, 6977-6986.

(Received July 4, 2001; Accepted August 11, 2001)