

Acinetobacter calcoaceticus C10에서 Cyclohexanol Dehydrogenase의 생합성 억제

朴喜東 · 朴鍾聲 · 李麟九

慶北大學校 農科大學 農化學科

Repression of Cyclohexanol Dehydrogenase in *Acinetobacter calcoaceticus* C10

Park, Heui Dong · Park, Jong Sung · Rhee, In Koo

Dept. of Agric. Chem., Coll. of Agric., Kyungpook Natl. Univ.

Summary

The growth of *A. calcoaceticus* C10 in CL medium was not increased by the addition of 0.5% ϵ -caprolactone or succinate, but increased by 0.2% adipate, xylose or even glucose which was not metabolized as a carbon source. The addition of 0.2% glucose after culture in CL medium for 6 hours increased the growth of *A. calcoaceticus* C10 twice as much as that in CL medium after culture for further 10 hours. Biosynthesis of cyclohexanol dehydrogenase in *A. calcoaceticus* C10 was not repressed by ϵ -caprolactone, succinate, xylose and glucose, but repressed by adipate which is endproduct of cyclohexanol metabolism. The induction of dehydrogenase by cyclohexanol in CL medium was not repressed completely by 0.1% adipate, but repressed almost completely by 0.2% adipate in *A. calcoaceticus* C10.

서 론

나일론의 중간원료로서 널리 이용되고 있는 사이클로헥사놀(cyclohexanol)은 독성이 강하여 실험적으로 동물의 간, 혈관 및 신장 장애를 일으킨다¹⁾. 그래서 사이클로헥사놀 및 그 유도체를 분해할 수 있는 미생물에 관하여는 많은 연구보고가 있으며^{2), 3), 4), 5), 6)}, *Nocardia globerula* CL1⁷⁾, *Acinetobacter* sp.⁸⁾ 및 *Pseudomonas* sp.⁹⁾에 있어서 사이클로헥사놀이 사이클로헥사논(Cyclohexanone), ϵ -caprolactone, β -hydroxycaproic acid를 거쳐 adipic acid로 대사되는 경로가 이미 밝혀져 있다.

李¹⁰⁾에 의하여 분리된 *Acinetobacter calcoaceticus* C10 역시 사이클로헥사놀, 사이클로헥사논, ϵ -caprolactone 및 adipate를 잘 이용하는 것으로 보아 이와 유사한 경로로서 사이클로헥사놀을 대사할 것으로 추정하고 있다¹¹⁾. 사이클로헥사놀 대사경로의 첫단계 효소인 cyclohexanol dehydrogenase (CDH)는 균에 따라 NAD^{++} ^{12), 13)} 또는 $NADP^{+}$ ¹⁴⁾를 조효소로 하며 사이클로헥사놀에 의해 유도되는 유도효소일 것¹⁵⁾이라는 보고가 있을 뿐 깊은 연구가 되어 있지 않다. 본인 등은 전보¹⁶⁾에서 *A. calcoaceticus* C10이 생산하는 비특이적인 glucose dehydrogenase (GDH)와 CDH

의 차이를 비교하여 이들이 서로 다른 것임을 규명하였고 CDH의 생산패턴 및 유도특성에 관하여 조사한 바 있다. *A. calcoaceticus*는 탄소원으로서는 포도당을 이용할 수 없음에도 불구하고 이 균이 생산하는 GDH에 의하여 포도당을 산화할 수가 있으며^{10,11}, 완전배지와 최소배지에서 포도당을 첨가하지 않아도 항상 GDH를 생산하였다.¹² 그래서 본 실험에서는 포도당이 *A. calcoaceticus* C10의 생육에 미치는 영향과 CDH의 억제 특성에 대하여 조사하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배지

본 실험에 사용한 균은 *A. calcoaceticus* C10으로서 한천 사면배지에 1개월마다 계대배양하면서 4°C에 보관하였고, 배지로는 (NH₄)₂HPO₄ 0.33%, KH₂PO₄ 0.05%, K₂HPO₄ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.02%, yeast extract 0.05%를 121°C에서 15분간 가열살균 후 사이클로헥사놀을 0.2%로 첨가한 액체배지(이하 CL배지)와 tryptone 1%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%의 LB배지를 사용하였다.

2. 배양방법

종배양은 LB 배지에 한천사면으로부터 1백금이를 접종하여 30°C에서 120 strokes/min의 속도로 진탕시키면서 15시간 배양하였다. 이 때 A₆₀₀은 4.0정도이다. 본 배양액은 종배양액을 1%로 첨가하여 일정한 시간동안 종배양 방법과 동일하게 배양하였다.

3. 생육도 측정

균의 생육도는 Bausch & Lomb사의 Spectronic 20으로 600nm 또는 650nm에서의 흡광도를 측정하여 그 값에 상당하는 건조균체의 중량으로 나타내었다. 세척한 균체를 100°C에서 건조한 건조균체 중량과의 관계는 A₆₀₀ 1.0이 0.63mg/ml, A₆₀₀ 1.0이 0.72mg/ml에 상당한다.

4. 무세포 추출액의 조제

배양액을 원심집균하고 50mM 인산 완충액(pH

8.0)으로 2회 세척한 후 동일 완충액에 현탁시켜 영국 Ultrasonics사의 초음파 파쇄기로 5분간 처리시킨 다음 27,000×g로 30분간 원심분리하여 얻은 상등액을 -20°C에 보관하면서 무세포 추출액으로 사용하였다.

5. 효소활성의 측정

Rodriguez¹³의 방법에 따라 톨루엔으로 처리한 균체 현탁액을 사용하여 다음과 같이 행하였다. 즉 배양액을 원심집균하고 100mM triethanolamine-HCl 완충액(pH 7.5)으로 세척한 후 1ml의 동일 완충액에 현탁시켜 650nm에서의 흡광도를 측정하고 여기에 10μl의 톨루엔을 첨가하여 37°C에서 30분간 진탕시킨 후 ice bath에서 냉각시킨 액에 70μl의 1M diethanolamine을 가하여 pH를 8.6으로 조절한 다음 활성을 측정하였다. 100mM의 기질(포도당 혹은 사이클로헥사놀) 0.2ml에 3.2mg/ml의 2-p-iodophenyl-3-p-nitrophenyl-5-phenyl tetrazolium chloride (INT), 0.4mg/ml의 phenazine methosulphate (PMS), 20mg/ml의 NAD 5:1:1 혼합액(pH 7.5) 0.5ml 및 톨루엔으로 처리한 균체 현탁액 0.8ml를 첨가하여 37°C에서 10분간 반응시킨 후 이 반응액에 0.2N HCl 1.5ml를 가하여 반응을 중지시킨 후 520nm에서 흡광도를 측정하였다. 무세포 추출액을 사용하여 활성을 측정할 때에는 동일한 반응 혼합액에 톨루엔으로 처리한 균체현탁액 대신에 무세포 추출액을 적당히 희석한 것 0.8ml를 가하여 같은 방법으로 측정하였다. 효소의 활성은 건조균체 혹은 단백질 mg당 1분간에 520nm에서의 흡광도 증가로 환산하여 표시하였다.

6. 단백질의 정량

Bradford¹⁴의 방법에 따라 Coomassie Brilliant Blue G-250을 사용하여 측정하였으며, 표준물질로는 소의 혈청 알부민(BSA)을 사용하였다.

7. 시 약

NAD⁺, NADP⁺, INT, NBT 및 BSA는 시그마제, 사이클로헥사놀, 사이클로헥사논 및 이들의 유도체는 東京化成製, PMS, barbital은 일본 牛井製의 특급시약을 사용하였고, 그 외의 시약은 시판

특급을 사용하였다.

결과 및 고찰

1. CDH의 억제물질

A. calcoaceticus C10이 생산하는 CDH의 유도 물질을 조사하기 위하여 CL base (CL 배지에서 탄소원인 사이클로헥사놀의 유사물질을 0.2% 되 게 첨가한 배지에서 균을 16시간 배양한 후 CDH 활성을 조사한 결과는 표 1과 같다. CDH는 cyclohexan-1,2-diol, cyclohexene oxide 및 사이클로헥사논에 의해 유도되었으나 cyclohexane, n-hexane, 포도당 및 xylose에 의해서는 유도되지 않았다. 이 중 cyclohexan-1,2-diol과 사이클로헥사논이 CDH의 유도효과가 높았다(표 1).

Table 1. Induction of cyclohexanol dehydrogenase (CDH) by cyclohexanol analogs in *A. calcoaceticus* C10 grown in CL base and LB media for 16 hours.

Cyclohexanol analogs	CDH (Units/mg of protein)	
	CL base*	LB
None	ND**	0.003
Cyclohexanone	0.230	0.328
Cyclohexan-1,2-diol***	0.273	0.342
Cyclohexane	ND	0.028
n-Hexane	ND	0.041
Cyclohexene oxide	0.214	0.178
Glucose	ND	0.042
Xylose	0.021	0.038

* CL medium without cyclohexanol; ** Not determined; *** *trans, cis* mixture

CDH의 유도에 대한 몇가지 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 CL 배지에 0.2%의 탄소원을 첨가한 배지에서 16시간 균을 배양한 후 생육도와 CDH 활성을 조사한 결과는 표 2와 같다. 균의 생육도에 있어서 ϵ -caprolactone 및 succinate의 영향은 거의 없었으나 adipate, xylose 또는 포도당을 첨가하였을 때는 생육도가 크게 증가하였다. 사이클로헥사놀에 의한 CDH의 유도에 있어서는 ϵ -caprolactone, succinate 및 xylose는 거의 영향을 주지 않았으나 포도당에 의해서는 CDH의 활성이 오히려 증가하였으며 adipate를 첨가한 경우에는 CDH의 활성이 크게 감소하였다(표 2).

Table 2. The growth and CDH activity of *A. calcoaceticus* C10 grown in CL medium added 0.2% carbon sources for 16 hours.

Carbon sources	Growth (mg/ml)	CDH (Units/ of protein)
None	1.472	0.291
ϵ -Caprolactone	1.748	0.269
Adipate	2.876	0.075
Succinate	1.560	0.308
Xylose	2.161	0.286
Glucose	2.234	0.433

이와 같이 adipate에 의해 CDH 활성이 감소하는 현상이 사이클로헥사놀 대사경로의 최종산물인 adipate에 의한 효소의 활성 저해인 지 또는 생합성 억제인 지를 알아보기 위하여 CL 배지에서 균을 배양한 후 초음파 처리하여 얻은 무세포 추출액에 0.2%의 adipate를 첨가하여 4°C에서 4시간 방치한 후 CDH 활성을 조사한 결과는 표 3과 같다. Adipate를 처리한 것의 CDH와 GDH의 활성은 처리하지 않은 것과 거의 차이가 없었다. 이로 보아 CDH는 최종산물인 adipate에 의해 저해를 받지 않으므로 adipate에 의한 CDH 활성의 감소 현상은 생합성이 억제되기 때문인 것으로 생각된다(표 3).

Table 3. Effect of adipate on GDH and CDH activities of *A. calcoaceticus* C10.

Adipate treatment*	Activity (Units/mg of protein)	
	GDH	CDH
No	0.330	0.295
Yes	0.336	0.284

* Cell-free extracts added 0.2% adipate were incubated at 4°C for 4 hours.

2. *A. calcoaceticus* C10의 생육과 CDH 유도에 대한 포도당의 영향

표 2에서 보는 바와 같이 CL 배지에 0.2%의 adipate, xylose 또는 포도당을 첨가한 배지에서는 균의 생육도가 약간 증가하였다. *A. calcoaceticus*는 탄소원으로 포도당을 이용하지 못하나 adipate와 xylose는 이용할 수가 있다.^{10,11)} Adipate 또는 xylose를 첨가한 CL 배지에서 균의 생육도가 증가하는 현상은 이용 가능한 탄소원의 농도가

높기 때문인 것으로 생각된다. 탄소원으로 이용이 불가능한 포도당에 의해 CL 배지에서 생육도와 CDH의 생산이 증가하는 현상을 확인하기 위하여 CL 배지에 균을 접종한 직후와 6시간 배양한 후 0.2%의 포도당을 첨가한 다음 균을 배양하면서 경시적으로 생육도와 CDH 활성을 조사한 결과는 그림 1, 2와 같다. 포도당을 첨가하였을 경우 생육도 및 CDH의 생산이 CL 배지에서보다 증가하였다. 특히 CL 배지에서 6시간 균을 배양한 후 포도당을 첨가한 경우 16시간 후에는 CL 배지에서보다 약 2배의 생육도를 나타내었으며 CDH의 생산은 약 2.7배로 증가하였다. CL 배지와 0.2%의 포도당을 첨가한 CL 배지에서 균의 생육도가 12시간 배양시 최고에 달한 후 약간 감소하는 현상은 불안정한 세포가 용균되기 때문인 것으로 추측되며 CL 배지에서 6시간 배양한 후 포도당을 첨가한 경우에는 이러한 현상이 나타나지 않았다. 이러한 결과는 LB 배지와 LB 배지에서 4시간 균을 배양한 후 0.2%의 사이클로헥사놀을 첨가한 경우와 유사하였다." 이는 대수증식기에 첨가된 포도당이 이 균세포의 안정화에도 어떤 영향을 미칠 수 있을 가능성을 보여준다. 포도당에 의해

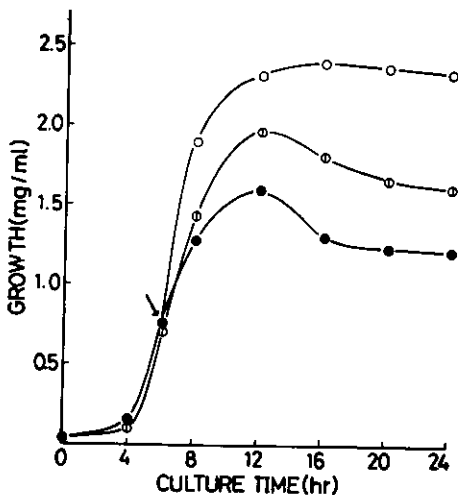


Fig. 1. Effect of glucose on the growth of *A. calcoaceticus* C10 in CL medium. ●—●, CL medium; ○—○, CL medium added 0.2% glucose; ○—○, Addition of 0.2% glucose after culture for 6 hours in CL medium ↓, Addition of 0.2% glucose.

생육도가 증가하는 현상은 포도당이 직접 탄소원으로 이용되지는 못하나 GDH에 의해 산화될 때 생성된 NADH가 에너지원으로 이용될 수 있기 때문인 것으로 생각된다(그림 1).

CL배지와 0.2% 포도당을 첨가한 CL배지의 경우 및 CL배지에서 6시간 배양한 다음 0.2% 포도당을 첨가한 경우 모두 CDH의 변화는 8시간 배양에서 최고를 나타내었고 그 이후에는 급작스런 감소현상을 나타낸 후 12시간 배양 후부터 거의 일정한 수준을 나타내었다. 이는 후기대수증식기까지는 분해할 사이클로헥사놀의 농도가 높기 때문에 CDH가 계속 유도되어 최고에 도달한 후 배지내에 사이클로헥사놀의 농도가 현저히 떨어지면서 세포내 사이클로헥사놀 대사산물이 축적되어 CDH 생산이 억제된 상태에서 세포분열에 의해 이미 합성된 효소가 희석되기 때문에 CDH가 감소하였다가 정지기에 도달한 후부터는 CDH 생산이 거의 중지된 상태에서 세포량의 증가가 없으므로 거의 일정한 수준을 나타내기 때문인 것으로 추측된다. CDH의 전체적인 수준을 보면 CL 배지에서 배양한 균에 비하여 0.2% 포도당을 첨가한 CL 배지에서는 약 1.7배, CL 배지에서 균을 6시간 배양한 후 0.2% 포도당을 첨가한 경우에는 약 2.7배로서 포도당을 첨가함으로써 CDH의 생산이 증가하였다. 포도당에 의한 이화물 억제에 대하여는 Epps와 Gale¹⁾에 의해 포도당이 amino acid deaminase의 생산을 억제한다고 보고된 이후 β -galactosidase, cellulase, tryptophanase 및 histidinase의 생산 역시 포도당에 의해 이화물 억제를 받는다고 알려져 있다." 그러나 *A. calcoaceticus* C10이 생산하는 CDH는 포도당에 의해 생합성이 억제되지 않았으며 오히려 CL 배지에 포도당을 첨가함으로써 사이클로헥사놀에 의한 CDH의 유도 생산이 증가하는 현상을 나타내었다. 포도당의 β -D-glucopyranose는 사이클로헥사놀과 공간구조가 비슷하나 CDH의 유도물질로서 작용하지 못한다(표 1). 그럼에도 불구하고 사이클로헥사놀과 공존할 경우 포도당이 사이클로헥사놀에 의한 CDH의 유도를 증가시키는 것은 생체내 복잡한 기구에 의한 것으로 생각되며 이는 앞으로 좀 더 규명해야 할 과제이다(그림 2).

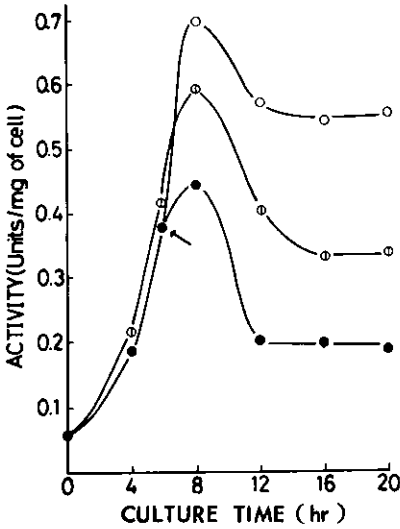


Fig. 2. Effect of glucose on CDH induction by cyclohexanol in *A. calcoaceticus* C10. The designations are the same as those used in Fig. 1.

3. CDH의 유도에 대한 최종생산물 억제

A. calcoaceticus C10의 생육과 CDH 유도에 대한 adipate 농도의 영향을 알아보기 위하여 CL 배지에 0.1%에서 0.5%의 농도로 adipate를 첨가한 배지에 균을 배양하면서 균의 생육도 및 CDH의 활성을 조사한 결과는 그림 3, 4와 같다. CL 배지에 adipate를 첨가한 경우 균의 생육도는 CL 배지에서보다 크게 증가하였다. 0.5% adipate 농도 이하에서 첨가농도가 높을수록 균의 최대 생육도는 증가하였다. 이는 이용 가능한 탄소원의 농도가 높기 때문으로 생각된다. 그러나 균의 생육 속도는 adipate 첨가농도가 높을수록 다소 지연되는 현상을 나타내어 최대 생육도를 나타내는 배양 시간은 0.1% adipate를 첨가한 때는 10시간 후로서 CL 배지에서의 12시간보다 오히려 빨랐으며, 0.2%의 adipate를 첨가한 경우는 18시간, 0.5% adipate를 첨가한 경우는 24시간 후로서 생육 속도가 지연되었다. 이러한 현상은 그림 4에서와 같이 CDH의 유도가 0.1% adipate를 첨가한 경우에는 CL 배지에 비하여 약 70%를 나타내어 adipate를 이용할 때에도 사이클로헥사놀의 분해가 이루어질 것으로 생각되나 0.2% 또는 0.5% adi-

pate를 첨가한 경우는 CDH 생산이 약 30%밖에 되지 않기 때문에 사이클로헥사놀의 분해가 늦어서 배지내에 남아 있는 독성의 사이클로헥사놀이 균의 생육을 저해하기 때문인 것으로 추측된다(그림 3).

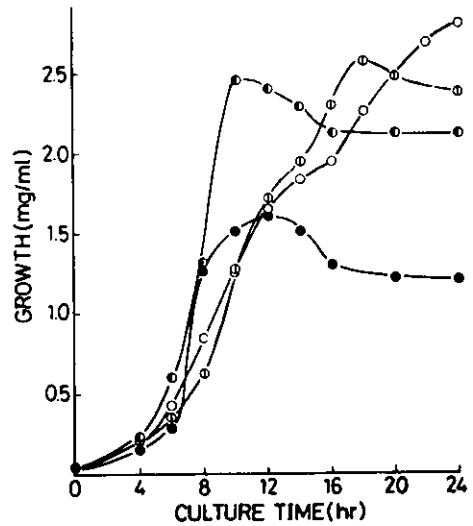


Fig. 3. Effect of adipate concentration on the growth of *A. calcoaceticus* C10 in CL medium. ●—●, CL medium; ●—●, CL medium added 0.1% adipate; ⊙—⊙, CL medium added 0.2% adipate; ○—○, CL medium added 0.5% adipate.

CDH의 유도는 CL 배지에 adipate를 첨가함으로써 현저하게 감소하여 0.1% adipate를 첨가한 경우에는 CDH가 다소 유도되었으나 0.2% 또는 0.5% adipate를 첨가한 경우에는 CDH의 유도가 거의 억제되었다. 그러나 0.2%의 adipate를 첨가한 CL 배지에서는 배양초기에 CDH가 아주 약하게 유도됨으로써 그림 3과 같이 생육속도의 차이에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 최종생산물 억제에 대하여는 Oxender¹⁹에 의해 처음으로 보고된 바 있다. *Escherichia coli*의 경우 세포내에 tryptophan의 농도가 높아지면 attenuation에 의해 chorismate에서 tryptophan을 생합성하는 경로의 효소들이 억제를 받는다고 하며 또 tryptophan이 corepressor로 작용하기 때문에 aporepressor와 결합하여 operator에 결합함으로써 전사를 방해하여 효소의 생합성을 억제한다

다고 한다. 그 후 phenylalanine, histidine, threonine 및 leucine의 합성경로에서도 attenuation의 기능이 보고된 바 있다.¹⁾ 이와 같이 아미노산 생합성 경로의 최종생산물 억제에 관하여는 많은 보고가 있으나 본 실험의 경우와 같이 분해 대사경로의 최종생산물에 의한 억제현상에 대하여는 거의 보고가 없는 실정이다. 배지내에 adipate의 농도를 증가시킴으로써 CDH의 유도가 거의 억제되

는 현상으로 보아 세포내에 adipate의 농도가 증가함에 따라 사이클로헥사놀로부터 adipate로의 전환을 방지하기 위하여 CDH의 생합성이 억제되는 것으로 추측된다 (그림 4).

척 요

A. calcoaceticus C10은 CL 배지에서 ϵ -caprolactone 및 succinate에 의해 생육에 아무 영향도 받지 않았으나 adipate와 xylose에 의해서 균의 생육도가 증가하였다. 특히 이 균이 탄소원으로 이용할 수 없는 포도당에 의해서도 생육도가 증가하였으며 6시간 배양 후 0.2%의 포도당을 첨가한 경우에는 16시간 후 CL 배지에서 생육한 것보다 약 2배의 생육도를 나타내었다. *A. calcoaceticus* C10이 생산하는 cyclohexanol dehydrogenase (CDH)는 ϵ -caprolactone, succinate, xylose 및 포도당에 의해 이화물 억제를 받지 않았으나 사이클로헥사놀 대사경로의 최종생산물인 adipate에 의하여 생합성 억제를 받았다. CL 배지에 0.1%의 adipate를 첨가한 배지에서는 CDH가 다소 유도되었으나 0.2%의 adipate를 첨가한 배지에서는 CDH가 거의 유도되지 않아 0.5%의 adipate를 첨가한 것과 비슷한 억제효과를 나타내었다.

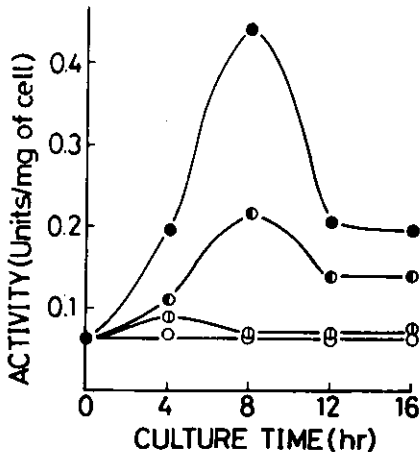


Fig. 4. Effect of adipate concentration on CDH induction by cyclohexanol in *A. calcoaceticus* C10. The designations are the same as those used in Fig. 3.

引用文献

1. 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.
2. Browning E., 1965, Toxicity and metabolism of industrial solvents, Elsevier N. Y., p385.
3. 田中秀和, 鹿田幸治, 小幡齋, 徳山泰, 上野照雄, 1977, ツクロヘキサノン資化性菌の分離の培養條件, 醱酵工學, 55, 57-61.
4. Davey J. F., and P. W. Trudgill, 1977, The metabolism of *trans*-cyclohexan-1, 2-diol by an *Acinetobacter* species, *Eur. J. Biochem.*, 74, 115-127.
5. Donoghue N. A., and P. W. Trudgill, 1975, The metabolism of cyclohexanol by *Acinetobacter* NCIB9871, *Eur. J. Biochem.*, 60, 1-7.
6. Epps H. M. R., and E. F. Gale, 1961, The influence of the presence of glucose during growth on the enzymic activities of *Escherichia coli*: Comparison

- of the effect with that produced by fermentation acids, *Biochem. J.*, 36, 619-623.
7. Johnston H. M., W. M. Barnes, F. G. Chumley, L. Bossi, and J. R. Roth, 1980, Model for regulation of the histidine operon of *Salmonella*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 77, 508-512.
 8. Keller E. B., and J. M. Calvo, 1979, Alternative secondary structures of leader RNAs and the regulation of the *trp*, *phe*, *his*, *thr*, and *leu* operons, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 6186-6190.
 9. 김경애, 박종성, 이인구, 1985. *Acinetobacter calcoaceticus* C15에 의한 cyclohexanol 의 이용 및 그 특성, 한국산업미생물학회지, 13, 71~77.
 10. Krieg N. R., and J. G. Holt, 1984, *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Williams & Wilkins, Baltimore / London, p305.
 11. Magasanik B., 1961, Catabolite repression, *CSH. Symp. Quant. Biol.*, 26, 249-256.
 12. Norris D. B., and P. W. Trudgill, 1971, The metabolism of cyclohexanol by *Nocardia globerula* CL1, *Biochem. J.*, 121, 363-370.
 13. Oxender D. L., G. Zurawski, and C. Yanofsky, 1979, Attenuation the *Escherichia coli* tryptophan operon : Role of RNA secondary structure involving the tryptophan codon region, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 76, 5524-5528.
 14. 박희동, 최선택, 이인구, 1986, *Acinetobacter calcoaceticus* C10에 의한 cyclohexanol dehydrogenase 의 유도, 한국농화학회지, 29, 304-310.
 15. 이인구, 1981, Cyclohexanone 자화균의 분리 및 그 특성, 효성여자대학교 연구논문집, 23, 1197-1210.
 16. Rodriguez R. L., and R. C. Trait, 1983, *Recombinant DNA techniques : An introduction*, Addison-Wesley publishing Co., Massachusetts, pp126-127.
 17. Strling L. A., R. J. Watkinson, and I. J. Higgins, 1977, Microbial metabolism of alicyclic hydrocarbons : Isolation and properties of a cyclohexane-degrading bacterium, *J. Gen. Microbiol.*, 99, 119-125.
 18. Yugari Y., 1961, Metabolism of cyclohexane-diol - (1, 2) - *trans* by soil bacterium. *Biken. J.*, 4, 197-207.