

Cellulomonas sp. CS1-1으로 부터의 β -Glucosidase의 합성조절과 그의 효소학적 성질

이희순¹·민경희^{1*}·배 무²

¹숙명여자대학교 생물학과 ²이화여자대학교 생물학과

Biosynthetic Regulation and Enzymatic Properties of β -Glucosidase from *Cellulomonas* sp. CS 1-1

Lee, Hee-Soon¹, Kyung-Hee Min^{1*}, and Moo Bae²

¹ Department of Biology, Sookmyung Women's University, Seoul 140-742, Korea

² Department of Biology, Ewha Women's University, Seoul 120-750, Korea

β -Glucosidase of *Cellulomonas* sp. CS1-1 in cellular compartment was localized with cell-bound form while Avicelase and carboxymethylcellulase (CMCase) were appeared with extracellular enzyme. Cell growth on cellulose or CMC minimal broth was increased by glucose addition. β -Glucosidase production on cellobiose or CMC minimal broth was repressed by the addition of glucose. However, on CMC minimal broth, the enzyme production was specially stimulated by cellobiose addition. β -Glucosidase production was also induced by CMC, starch and maltose compared with glycerol, arabinose, xylose and trehalose. From the above results, it was concluded that glucose effect on β -glucosidase biosynthesis showed catabolite repression, but enzyme production was induced by cellobiose, CMC, and starch, indicating that β -glucosidase is inducible enzyme. Yeast extract stimulated β -glucosidase production more than peptone and ammonium sulfate. β -Glucosidase activity was increased with 50mM MgCl₂ in 10mM potassium phosphate buffer (pH 7.0). Optimum conditions for enzyme activities were pH 6.0 and 42°C. Km value of β -glucosidase for *p*-nitrophenyl- β -D-glucosidase was 0.256mM and Ki for β -D(+)-glucose was 9.0mM.

β -Glucosidase (β -D-glucoside glucohydrolase, E.C. 3. 2. 1. 21)는 하나의 cellulase compound로서 cellulose를 최초로 endoglucanase(C_x)가 절단하고 그 다음 cellobiohydrazase(C₁)가 작용하고 마지막으로 β -glucosidase가 작용하여 최종산물인 glucose를 생성하게 된다(2-10). Cellulase에 의한 가수분해 기작에 관한 C₁-C_x의 개념은 Reese 등(1)에 의해 처음 제기되었다. 이 개념은 어떤 cellulolytic microorganisms의 culture filtrates에 의해 천연 섬유소가 가수분해 되는 것을 관찰함으로써 발견된 것이다. 그 후 *Trichoderma viride*, *Trichoderma koningii* 등을 재료로 한 많은 연구(20, 21, 22)가 이루어짐으로써 cellulase는 3가지 성분으로 구성되어 있고 이들 세 성분들의 협동에 의하여 cellulose를 가수분

해 한다는 가설이 성립되어, 지금까지 통용되고 있다.

β -Glucosidase는 식물, fungi, yeasts, bacteria와 동물의 조직 등에 분포되어 있다. Fungi로 부터 생성되는 β -glucosidase는 *Trichoderma viride*와 *Trichoderma koningii*의 cellulase의 구성요소 중의 하나로 알려지고 있다(11-15).

*Clostridium thermocellum*으로 부터 분리된 cell-bound β -glucosidase의 분자량은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis와 gel filtration에 의해 43,000으로 측정되었다. 이 효소의 최적 pH는 6.0~6.5이며 PNPG(*p*-nitrophenyl- β -D-glucoside)에 대한 친화력이 cellobiose보다 높은 것으로 알려지고 있다. 그리고 이 효소는 CMC와

Key words: β -Glucosidase, *Cellulomonas* sp. catabolite repression

* Corresponding author

cellulose를 가수분해하지 못하나, cellooligosaccharide를 가수분해 할 수 있으며 D-glucono- δ -lactone에 의해 억제됨이 보고되었다(16).

본 실험에서는 아직 연구가 되어있지 않은 *Cellulomonas* sp. CS1-1가 생성하는 β -glucosidase의 합성에 미치는 glucose와 몇가지 당의 영향을 고찰함으로써 catabolite repression과 inducible enzyme 인지를 검토하고자 하며, 또한 기질 농도에 따른 β -glucosidase 활성 및 그의 효소학적 특성을 조사하고자 한다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용한 균주는 cellulase 생산균인 *Cellulomonas* sp. CS1-1(한국과학기술원 응용미생물 제공)을 이용하여 β -glucosidase 생성균으로 사용하였다.

배 지

β -Glucosidase 생산균의 보존 및 배양 : β -glucosidase 생산균을 보존하기 위해서 potato-cellulose agar 배지를 121°C에서 15분동안 가압 살균한 후 균을 접종하여 30°C에서 2일간 배양하여 보관하였다(17).

β -Glucosidase 생산균의 배양은 CMC를 첨가한 minimal agar 배지에 vitamin을 첨가한 배지에서 하였다. 배양용 배지의 조성은 다음과 같다.

CMC minimal medium은 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2.0g, KCl 0.5g, MgSO_4 0.5g, K_2HPO_4 1.2g, KH_2PO_4 0.14g, $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 0.01g, CMC 10.0g을 1l의 증류수에 용해하여 살균한 후 vitamin solution을 1ml 첨가하였다.

Vitamin solution은 thiamine 10 mg/ 10 ml 과 biotin 1 mg/ ml을 녹인 용액을 멸균한 membrane filter로 여과하여 사용하였다.

균 배양

Cellulomonas sp. CS1-1의 culture slant로부터 1 loop를 멸균한 CMC 배양용 배지에 접종하여 30°C에서 2일간 진탕배양하여 이것을 seed culture로 사용하였다(17).

균 배양을 위해 CMC 배양용 배지에 seed culture를 1% 접종하여 30°C에서 진탕 배양하였다.

효소의 세포내외의 분포위치

균체 배양과 같은 방법으로 멸균된 CMC 배양용 배지에 seed culture 1%를 접종하고 30°C에서 진탕 배양하여 시간별로 일정한 배양액을 취하여 원심분리하였다. 여기서 얻은 균체를 10 mM potassium phosphate buffer, pH 7.0의 현탁액을 만들어 다시 원심분리하였다. 균체 침전물을 10 mM potassium phosphate (pH 7.0)에 5 mM MgCl_2 를 첨가한 buffer로 현탁액을 만든다. 이 용액을 cellbound- β -glucosidase 조효소로 사용하였다.

β -Glucosidase의 sonicated extract는 다음과 같은 방법으로 제조하였다. Seed culture 1%를 접종한 CMC 배양용 배지를 30°C에서 배양한 후 원심분리하고 (10,000 rpm, 30분, Hitachi 20 PR-52) 침전된 균체를 모아 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)으로 두 번 세척하고 동일 buffer로 농축되도록 현탁시킨 후 sonicator (Blacktone Ultrasonicator BP 5)로 30분 (18) 동안 처리하고 다시 원심분리하여 상등액은 β -glucosidase 용액을 사용하였다.

β -Glucosidase의 효소학적 특성을 조사하기 위하여 사용된 효소용액은 위의 용액을 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 70%로 포화시켜서 침전시킨 후 침전물을 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)으로 충분히 투석하여 사용하였다.

효소반응

β -Glucosidase 측정법 : β -Glucosidase의 활성은 PNPG (*p*-nitrophenyl- β -D-glucoside, Sigma 제품)를 기질로 사용하여 Wood(19)의 방법을 수정하여 측정하였다. PNPG (4 mg/ ml)용액 0.2 ml에 효소용액 1.0 ml를 섞어 30°C에서 30분 또는 노란색이 나타날 때까지 반응시키고 난 후 0.5 ml의 1 M Na_2CO_3 를 넣어 효소반응을 정지시켰다. 유리되어 생성된 *p*-nitrophenol (PNP)의 양을 420 nm에서 측정하였다.

효소 활성도의 1 unit는 1분동안 1 μ mole의 PNP 혹은 glucose를 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

CMCase 측정

Wood(19)의 방법에 따라 CMC (Carboxymethyl cellulose, Sigma 제품)를 기질로 사용하여 CMCase activity를 측정하였다.

Avicelase 측정

Wood and McCrae(7)의 방법에 의하여 Avicelase activity를 측정하였다.

결과 및 고찰

Cellulomonas sp. CS1-1의 cellulase 세포내외의 분포

Cellulomonas sp. CS1-1을 CMC(Carboxymethyl cellulose) 배양용 배지에 seed culture 1% 접종하여, 30°C에서 2일간 진탕배양하여 원심분리하였다. 여기서 얻은 상등액과 균체 현탁액을 효소원으로 사용하여 filter paper, Avicel, CMC 및 PNPG를 기질로 하여 FPase, Avicelase, CMCCase, β -glucosidase의 활성을 측정하였다(Table 1).

위의 결과에서 β -glucosidase는 cell-bound form으로만 생성되었으며, cell-free supernatant에는 전혀 활성이 없었다. 반대로 CMCCase, FPase, Avicelase 활성은 cell-bound 되어있지 않았으며 전부 extracellular form으로만 생성되었다. 이 결과로 보아 거대분자를 분해하는 효소는 세포외로 분비되나, 세포내로 수송될 수 있는 저분자 기질을 분해하는 효소는 cell-bound form으로 존재함을 알 수 있었다.

균체생장에 미치는 당의 영향

Cellulomonas sp. CS1-1의 균체생장을 0.5% cellobiose 배양용 배지와 CMC 배양용 배지에서 시간별로 배양하여 비교 검토하였다.

세균의 생장은 cellobiose 0.5% 배양용 배지보다 동일 배지에 glucose를 첨가한 배지에서 높게 나타났다. 또한 CMC 최소배지에 하루 배양한 후 glucose를 첨가하였더니 현저하게 균의 생장이 증가하였다.

이상의 결과로서 glucose는 cellobiose나 CMC보다 균생장에 가장 적합한 당류임은 다른 생물의 생리

Table 1. Cellular distribution of cellulolytic enzymes from Cellulomonas sp. CS1-1.

Enzyme	Extracellular activity (unit)	Cell-bound activity (m unit)
Avicelase	0.014	0
CMCase	0.162	0
β -Glucosidase	0	2.5

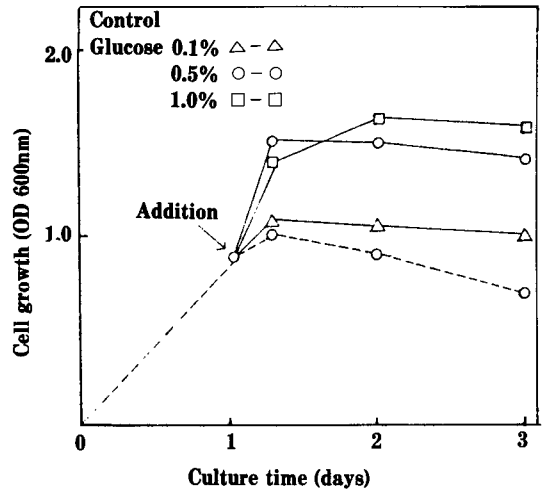


Fig. 1. Effect of glucose addition on the growth of Cellulomonas sp. CS1-1 in cellobiose (0.5%) minimal broth.

와 동일함을 알 수 있었다(Fig.1과 Fig.2).

β -Glucosidase 합성과 catabolite repression

CMCase 생성이 glucose나 다른 대사산물을 배양액에 첨가하였을 경우 catabolite repression 현상이 나타났음이 보고 되었으므로(20, 21), 본 연구에서는 β -glucosidase 합성에도 이같은 영향을 받는지를 검토하고자 하였다.

Cellulose 배양용 배지에서 하루 배양한 후

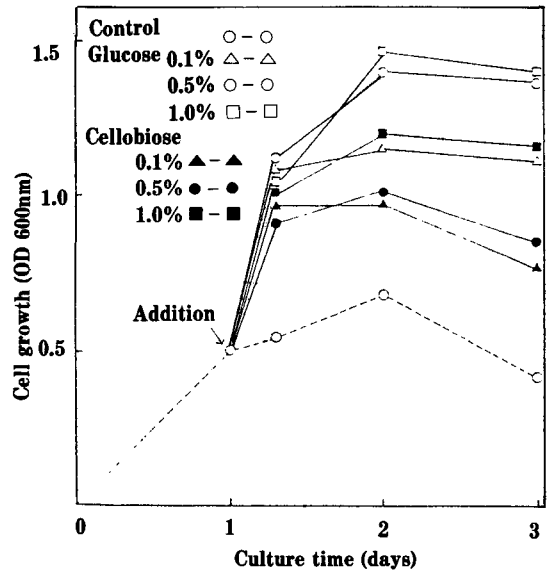


Fig. 2. Additional effect of glucose and cellobiose on the growth of Cellulomonas sp. CS1-1 in CMC (0.5%) minimal broth.

glucose를 0.1%, 0.5%, 1%로 첨가하여 세균으로부터 β -glucosidase 생성을 측정 한 결과는 Fig. 3에서 보여주고 있다. 또한 0.5% CMC 최소배지에 하루 균을 배양한 후 glucose와 cellobiose를 각각 0.1%, 0.5%, 1%를 첨가하여 시간별로 배양하면서 β -glucosidase의 생성을 측정하였다(Fig. 4).

그 결과 β -glucosidase의 생성이 cellobiose를 첨가하였을 경우는 증가하였지만, glucose를 첨가했을 경우는 균의 성장과는 정반대로 효소의 합성은 현저히 억제되었다.

이상의 cellobiose나 CMC 최소배지에 glucose 첨가에 의하여 β -glucosidase 생성이 억제된 결과는 galactosidase의 경우와 동일하게 glucose에 의한 catabolite repression을 받는다는 사실이 확인되었다.

반면에 cellobiose는 inducer로 작용하여 β -glucosidase 합성이 증가하였음은 β -glucosidase 역시 inducible enzyme이 증명된 것으로 사료된다.

*Trichoderma viride*의 경우는 cellulase의 생성은 sophorose에 의해 유도되었으며 glucose를 농도별로 첨가하였을 때보다 glucose를 넣지않은 배지에서 cellulase 생성이 많은 것으로 알려졌다(Nisizawa 등, 21).

이 본결과에서도 β -glucosidase 합성이 glucose에 의하여 억제된 것은 *Trichoderma viride*의 cellulase 합성이 억제되는 결과와 일치하였다.

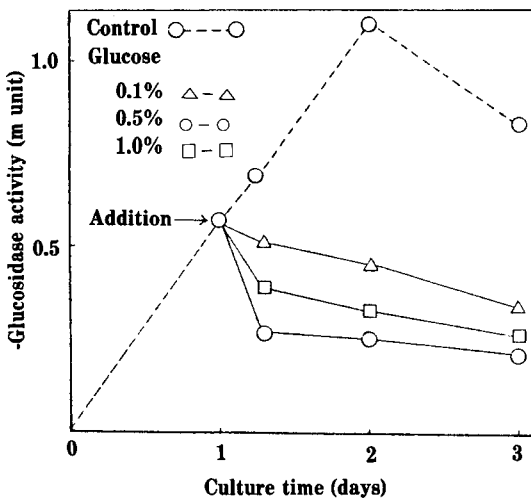


Fig. 3. Effect of glucose addition on the production of β -glucosidase from *Cellulomonas* sp. CS1-1 in cellobiose (0.5%) minimal broth.

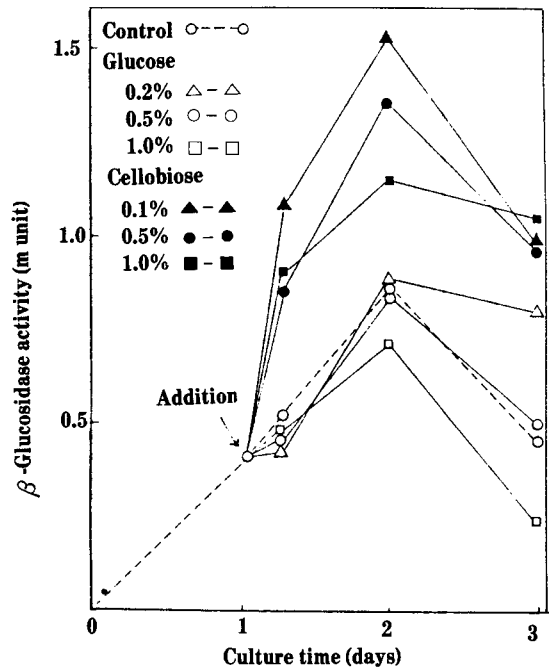


Fig. 4. Additional effect of glucose and cellobiose on the production of β -glucosidase from *Cellulomonas* sp. CS1-1 in CMC minimal broth.

m-Glucosidase 생성에 미치는 탄소원의 영향

여러가지 탄소원 즉 L-arabinose, maltose, starch, D-xylose, cellobiose, trehalose, glycerol, CMC, glucose 등을 0.5% 넣은 배양용 배지에서 2일간 진탕 배양하여 일정한 배양액을 채취하고, β -glucosidase 생성을 비교하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 균의 생장은 maltose, D-xylose, cellobiose, trehalose, glycerol, glucose에서 좋았으나, β -glucosidase의 생

Table 2. Effect of various carbon sources on production of β -glucosidase

Carbon sources	Growth (O.D. 600nm)	β -Glucosidase (m unit)
Starch	0.08	0.322
L-Arabinose	0.57	0.044
Maltose	1.43	0.289
D-Xylose	1.06	0.011
Cellobiose	1.05	0.756
Glycerol	1.34	0.089
Trehalose	1.07	0.011
CMC	0.082	0.500
Glucose	1.04	0.010

성은 CMC와 cellobiose를 탄소원으로 사용한 경우에 서만 많이 생성되었다.

이상의 결과를 고찰하여 보면, *Cellulomonas* sp. CS1-1의 m-glucosidase 합성에 미치는 탄소원의 영향이 *Trichoderma viride*의 경우(Nisizawa 등, 22, Gang 등, 9)와 일치하는 것으로 보아, *Cellulomonas* sp. CS1-1의 β -glucosidase 합성도 inducer에 의해 유도됨을 알 수 있었다.

β -Glucosidase 생성에 미치는 질소원의 영향

질소원은 유기질소원과 무기질소원을 사용하였다. 유기질소원으로는 yeast extract, peptone을 사용하였고 무기질소원으로는 sodium nitrate, ammonium sulfate를 사용하였다. 이들 각각을 0.2% 농도로 CMC 배양용 배지에 넣고 seed culture 1% 접종하여 균의 성장과 β -glucosidase의 생성을 측정하였다 (Table 3).

유기질소원이 무기질소원을 사용한 경우보다 균의 성장이 좋았으며 특히 yeast extract에 의한 균의 성장이 가장 좋았고, 무기질소원인 ammonium sulfate에서는 성장이 좋지않았다. 효소의 생성은 yeast extract에 사용하였을 경우가 ammonium sulfate를 사용할 때 보다 많이 생성되었다. 다른 실험 보고에 의하면(Hitcher 등, 23), 질소원으로 ammonium bisulfate, ammonium bicarbonate, ammonium nitrate, sodium nitrate, urea를 사용하여 측정한 결과 urea를 사용한 경우에서 최대의 성장을 나타냈다.

β -Glucosidase의 특성

MgCl₂의 영향 : 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)와 10 mM potassium phosphate bufer(pH 7.0), 그리고 potassium phosphate buffer 용액에 5 mM MgCl₂를 넣은 완충용액을 사용하였다. 각각의 완충용액에 적당히 희석한 용액 1 ml에 β -glucosidase과

Table 3. Effect of various nitrogen sources on β -glucosidase production by *Cellulomonas* sp. CS1-1.

Nitrogen sources	Growth (O.D. 600nm)	β -Glucosidase (m unit)
Yeast Extract	1.25	0.114
Peptone	1.16	0.071
NaNO ₃	0.62	0.029
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.38	0.029

Table 4. Effect of buffer solution and Mg⁺⁺ ions on the hydrolysis of PNPG by β -glucosidase.

Buffer	unit
10mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)	1.96
10mM Potassium phosphate	1.79
10mM Potassium phosphate + 5mM MgCl ₂	2.56

* Buffer pH was adjusted to 7.0.

PNPG 용액 0.2 ml을 넣어 30°C에서 반응시키고 p-nitrophenol의 활성을 비교하였다 (Table 4).

위 결과에서 10 mM Tris-HCl buffer(pH 7.0)과 10 mM potassium phosphate buffer(pH 7.0)보다, potassium phosphate buffer 용액에 5 mM MgCl₂를 첨가한 경우 β -glucosidase의 활성이 더욱 높았다. 그러므로 이 *Cellulomonas* sp. CS1-1 유래의 β -glucosidase 활성은 5 mM Mg⁺⁺ 이온의 존재 하에서 크게 증가함을 알 수 있었다.

pH의 영향 : β -Glucosidase의 최적반응 pH를 알기 위하여 각각의 pH가 5.0, 6.0, 6.5, 7.0, 7.5, 8.0인 10 mM potassium phosphate에 5 mM MgCl₂를 첨가한 완충용액을 사용하였다. 각 pH 완충용액으로 β -glucosidase를 적당히 희석한 용액 1.0 ml에 PNPG 0.2 ml을 넣고 30°C에서 반응시켜 유리된 PNP의 양을 측정하여 β -glucosidase의 활성을 비교하였다 (Fig. 5).

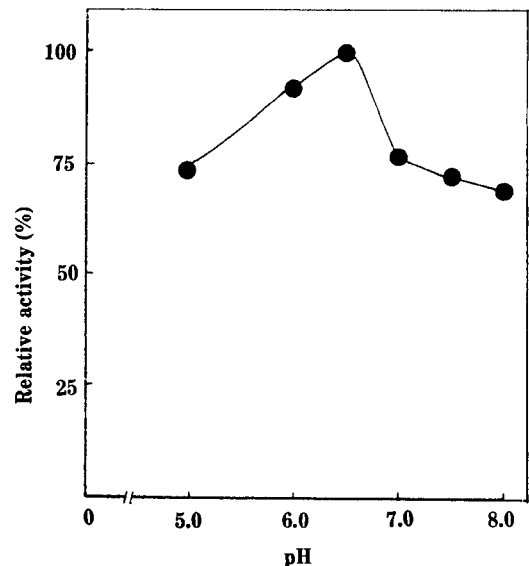


Fig. 5. Effect of pH on the rate of hydrolysis of p-nitrophenyl-β-D-glucoside (PNPG) by β -glucosidase.

일반적으로 약간 산성쪽에서 β -glucosidase 활성이 높았으나, 최적 pH는 6.5이고, pH 7.0 이상에서는 효소활성이 오히려 감소하였다.

온도의 영향: β -Glucosidase의 최적 반응온도를 알기 위하여 10 mM potassium phosphate에 5 mM $MgCl_2$ 를 첨가한 완충용액 (pH 7.0)에 β -glucosidase를 적당히 희석한 용액 1.0 ml에 PNPG 0.2 ml을 넣고 20°C, 24°C, 30°C, 37°C, 42°C, 50°C의 각 온도에서 반응시켰다. 유리된 PNP의 양으로 β -glucosidase의 활성을 비교하였다 (Fig. 6).

β -Glucosidase 활성의 최적 반응온도는 42°C 이었다. 20°C에서부터 42°C까지는 완만히 증가하는 경향이었으나 그보다 높은 50°C에서는 β -glucosidase 활성이 급격히 떨어졌다.

Kinetic Analysis: PNPG의 농도에 따른 β -glucosidase의 활성을 측정하였다. PNPG의 최종 농도는 각각 2.78 mM, 2.2 mM, 1.11 mM, 0.56 mM, 0.278 mM, 0.056 mM인 것을 사용하여 β -glucosidase의 활성을 측정하여 K_m 값을 구했다 (Fig. 7).

β -Glucosidase의 활성으로부터 Michaelis-Menten equation에 의하여 K_m 값을 구하였다.

그 결과 Fig. 8에서 보여주는 바와 같이 K_m value는 0.256 mM 이었다.

*Clostridium thermocellum*의 경우 cellopentose와 cellohexaose에 대한 K_m 값은 2.30 mM과 0.56 mM

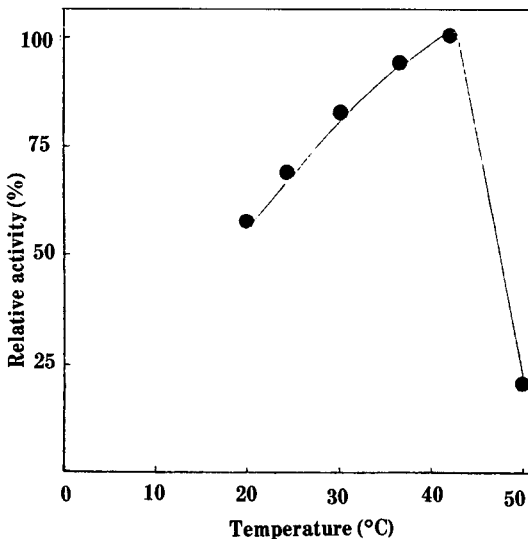


Fig. 6. Effect of temperature on PNPG hydrolysis by β -glucosidase.

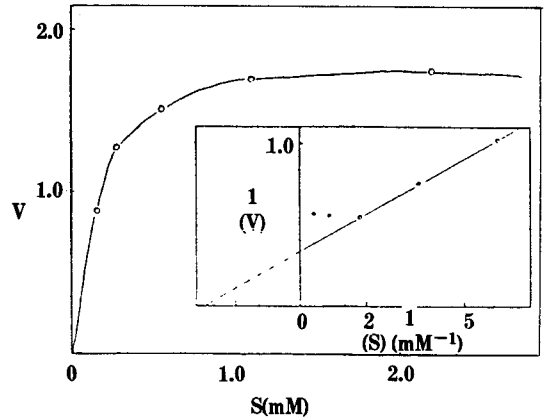


Fig. 7. Determination of K_m value for PNPG from Lineweaver burk plot. V is expressed as enzyme units per minute.

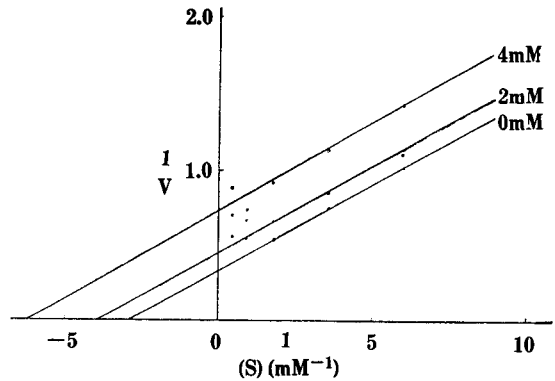


Fig. 8. Kinetic analysis of β -D(+)-glucose effect on the hydrolysis of PNPG by β -glucosidase. V is expressed as enzyme units per minute.

이라는 보고가 있다 (25).

β -D(+)-glucose에 의해 억제되는 정도를 알기 위해 기질인 PNPG의 농도가 2.78 mM-0.056 mM 사이의 β -glucosidase의 activity와 같은 기질 농도에 β -D(+)-glucose가 2 mM, 4 mM 첨가된 조건에서 β -glucosidase의 activity를 측정하고 Kinetic analysis 하여 억제되는 정도, 즉 K_i 값을 구하였다 (Fig. 8).

이 결과를 Michaelis-Menten equation으로 하여 graphic analysis를 한 결과 uncompetitive inhibition을 나타내었으며 이의 K_i 값은 9.0 mM 이었다.

요 약

Cellulomonas sp. CS1-1 생물의 β -glucosidase는

cell-bound 효소 이었으며, Avicelase와 Carboxymethyl-cellulase(CMCase)는 extracellular 효소로 존재함을 확인하였다. Cellobiose나 CMC 최소배지에서서의 균의 생장은 cellobiose보다 glucose 첨가시에 현저히 증가하였다. Cellobiose나 CMC 최소배지에서서의 β -glucosidase 생합성은 glucose 첨가로 현저히 억제되었으나, CMC 최소배지에 cellobiose를 첨가하였을 경우, glucose에 의한 억제 효과와는 반대로, 효소의 생성은 오히려 촉진되었다. 그 외의 탄소원에 관한 영향을 조사한 결과 CMC, 전분, maltose 등의 첨가도 glycerol, arabinose, xylose, trehalose의 첨가시 보다 효소의 생성이 증가되었다. 이상의 결과로 β -glucosidase 생합성은 glucose에 의하여 catabolite repression을 받았으며, cellobiose, CMC, starch 등은 다른 당류보다 효소생성을 현저히 유도하였으므로, 이 효소는 inducible enzyme임을 알 수 있었다. 효소생성에 미치는 질소원을 조사한 결과는 yeast extract가 peptone이나 ammonium sulfate보다 효소생성을 증가시켰다. 효소의 특성을 조사한 결과, 50 mM $MgCl_2$ 가 포함된 10 mM potassium phosphate buffer (pH 7.0)에서 효소의 역가가 증가하였고, 최적 pH는 6.0이었고 최적온도는 42°C 이었다. *p*-nitrophenyl- β -D-glucoside의 농도에 대한 glucose의 K_m 값은 0.265 mM 이었고 β -D(+)-glucose에 대한 K_i 값은 9.0 mM 이었다.

참고문헌

1. Reese, E.T., R.G.H. Siu, and H.S. Levinson, *J. Bacteriol.* **59**, 485 (1950).
2. Michael, C.F. *Biotech. Bioeng.* **22**, 27-47 (1980).
3. Selby, K. *Adv. Chem. Ser.* **95**, 34-52 (1969).
4. Petterson, L.G., *In Symp. Enz. Hydrolysis Cellulose* (M. Bailey et al. eds.). SITRA; Helsinki, pp. 255-261 (1975).
5. Erikson, K.E. *Special Publ. Soc. General Microbiol.* **3**, 285-296 (1979).
6. Wood, T.M. and S.I. McCrae. *Adv. Chem. Ser.* **181**, 181-207 (1979).
7. Virendra, S.B. and T.K. Ghose. *Enzyme Microb. Technol.* **3** (1981).
8. Daignesuit, N., Sylvestre, and D. Kluepfel. *Can. J. Microbiol.* **25**, 858-860 (1979).
9. Gang, C.S. and G.T. Tsae., *J. Ferm. Technol.* **13**, 41 (1979).
10. Tomita, Y., M. Nakayama, H. Suzuki and K. Nisizawa. *J. Biochem.* **79**, 955-966 (1976).
11. Selby, K. and C.C. Maitland. *Biochem. J.* **104**, 716-723 (1976).
12. Shin, S.B., Y. Kitagawa, K. Suga, and K. Ichikawa. *J. Ferment. Technol.* **56**, 396-402 (1978).
13. Dwivedi, C.F. and T.K. Ghose. *J. Ferment. Technol.* **57**, 15-24 (1979).
14. Mukhopadhyay, S.N. and R.K. Malik. *Bioeng.* **22**, 2237-2250 (1980).
15. Herr, D. *Bioeng.* **22**, 1601-1612 (1980).
16. Elander, R.P. *Biotechnol. Bioeng.* **22**, Suppl. 1. 49-61 (1980).
17. Kim, B.H. and J.W.T. Wimpenny. *Can. J. Microbiol.* **27**, 1260-1266 (1981).
18. Stoppok, W., P. Rapp, and F. Wagner. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**, 44-53 (1982).
19. Wood, T.M. *Biochem. J.* **109**, 217 (1968).
20. Yamane, K., H. Suzuki, and K. Nisizawa. *J. Biochem.* **67**, 19-35 (1970).
21. Nisizawa, T., H. Suzuki, and K. Nisizawa. *J. Biochem.* **71**, 999-1007 (1972).
22. Nisizawa, T., H. Suzuki, M. Nakayama, and K. Nisizawa. *J. Biochem.* **70**, 375-385 (1971).
23. Hitcher, E.V. and J.M. Leatherwood. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**, 382-386 (1980).
24. Thomas, K.N.G. and J.G. Zeikus. *Biochem. J.* **199**, 341-350 (1981).

(Received February 26, 1988)