

## 분리균 *Pseudomonas* sp. LBC-505에 의한 천연섬유소의 당화

이병천 · 고희룡 · 문종상 · 정영철 · 성낙계\*

경상대학교 식품공학과

### Saccharification of Natural Cellulosic Materials by the Isolated *Pseudomonas* sp. LBC-505

Lee, Byeong-Chun, Hack-Ryong Ko, Jong-Sang Mun,  
Young-Chul Chung and Nack-Kie Sung\*

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

**Abstract** — In order to utilize natural cellulosic materials as a fermentative substrate, saccharification of a various kind of native cellulosic materials was performed by using cellulase from the isolated strain, *Pseudomonas* sp. LBC-505 which potently produced cellulase complex and xylanase. Cellulase complex production was repressed by the low concentration of glucose, induced by cellulosic compounds such as CMC, wheat bran and rice straw *et al.* and showed to be highest on the PY-CMC medium containing 5% (w/v) wheat bran instead of CMC. Optimal temperature for enzyme reactions of CMCase and xylanase was 50°C, and 55°C for β-glucosidase. Optimal pH for these enzyme reaction was 6.6. Rate of saccharification for natural cellulose was low by the treatment of crude enzyme. Among their substrates, rice straw was the most effective substrate of enzymatic reaction in this work. After treating rice straw with 5% (v/v) HCl and hydrolysing with crude enzyme, rate of saccharification was 18.4% (w/w) on dry substrate. Sugars of cellulosic hydrolyzate mainly contained glucose, xylose and cellobiose.

식물의 광합성 작용에 의해 대량 생산되고 있는 섬유성 biomass를 대체에너지 자원 및 식량자원으로 개발하여 그 이용성을 높이고자 많은 연구가 이루어지고 있다(1-3). 천연 섬유기질에 대한 종래의 당화 방법이 대체로 강산, 강알칼리 처리와 고온 고압하에서 이루어지므로 열손실 및 고가의 설비비 등이 요구되어 경제적으로 비효율적이며, 또한 미생물의 성장 및 효소작용을 저해하는 가수분해물 등이 부수적으로 생성되어 효율성을 저하시키게 된다(1,4). 따라서 최근에는 효소적 가수분해의 장점인 당화액 회수의 용이성, 반응의 특이성과 저에너지 소비 및 비오염성 등 때문에 효소당화법에 대한 연구가 많이

이루어지고 있으나(5), 섬유성 biomass의 효소적 전환공정에서 가장 큰 장애요인은 섬유소의 결정성과 효소의 생산단가가 높고 활성이 낮으며 대량 당화의 처리가 곤란한 점 등에 있다. 그러므로 섬유성 물질을 효소당화시켜 효율적인 발효기질로서 이용할려면 우선 천연기질의 결정형 부위를 물리화학적 방법으로 무정형으로 전환시켜 효소작용을 위해 기질표면 이용성을 증가시켜야 하며(6,7), 다음으로 섬유성 biomass의 가수분해를 촉매하는 xylanase와 cellulase complex를 동시에 강력하게 분비하는 미생물을 꾸준히 탐색하여야 한다.

본 연구에서는 이와 같은 점을 고려하여 자연계로부터 섬유성 물질의 분리 관련 효소를 강력히 분비하는 *Pseudomonas* sp. LBC-505를 분리한 다음, 효소의 생성조건 및 반응특성을 검토하였고, 각종 천연기질에 대한 당화율 및 당의 조성을 조사하였다.

**Key words:** Saccharification, cellulosic materials, cellulase and xylanase

\*Corresponding author

## 재료 및 방법

### 사용균주의 기질

Cellulase 생성균주로는 본 실험실에서 분리 보관 중인 *Pseudomonas* sp. LBC-505를 사용하였으며, 배지는 PY-CMC(CMC 10g, yeast extract 5g, poly peptone 5g, NaCl 5g, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1g, D.W 1000 ml, pH 7.0)를 이용하였다. 효소생산 및 반응의 천연기질은 2일 동안 자연건조시킨 밀기울, 왕겨, 벧짚(1 mm), 커피박, 폐신문지(1.5×1.5 cm)를 사용하였다.

### 효소활성도의 측정

PY-CMC 액체배지 15 ml를 L-형 시험관에 넣고 균을 접종하여 진탕배양(37°C, 36 hr, 180 strokes/min)시킨 다음, 원심분리하여 상청액을 조효소액으로 하였다. 효소활성도는 조효소액 0.3 ml와 1% 기질용매(50 mM citrate phosphate buffer, pH 6.8) 0.7 ml를 혼합하고 50°C 진탕수조에서 10분간 반응 후 3.5% DNS 용액 1 ml를 가하여 5분간 끓인 다음 냉각하여 흡광도(510 nm)를 측정하여 D-glucose를 정량하였으며, 효소 1 unit는  $\mu\text{M D-glucose/ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 로 표시하였다. Avicelase(50°C), xylanase(60°C) 및  $\beta$ -glucosidase(50°C)도 동일한 방법으로 측정하였으며 xylanase는 D-xylose를 정량하였고  $\beta$ -glucosidase는 p-nitrophenyl- $\beta$ -D-glucopyranoside를 기질로 사용하여 400 nm에서 흡광도를 측정하여 유리된  $\beta$ -nitrophenol을 정량하였다. 이때 효소 1 unit는  $\mu\text{M pNP/ml}\cdot\text{min}^{-1}$ 로 표시하였다.

### 조효소액의 조제

500 ml 진탕플라스크에 밀기울 5% 첨가한 PY-CMC 배지를 가압살균(121°C 1 kg/cm<sup>2</sup>, 20 min)하여 전배양균을 접종시킨 뒤 진탕배양(37°C, 2 day, 1207 strokes/min)하였다. 배양액을 원심분리(4°C, 15 min, 10,000×g)한 후 상청액 중의 효소단백질을 아세톤(1 : 1, v/v)으로 침전시킨 다음, 재원심분리하여 하룻밤 냉장고에서 투석한 후 동결건조(-70°C)하여 분말화시킨 다음 필요시 50 mM citrate phosphate buffer (pH 6.8)에 용해하여 조효소액으로 사용하였다.

### 기질의 전처리

섬유성 기질 5%에 NaOH를 각각 0.5, 1, 2, 3% (w/v)되게 첨가하고, 35% 농축 HCl을 1, 3, 5, 7% (v/v)되게 첨가하여 실온에서 24시간 침지시킨 후 10% HCl과 2 N-NaOH로 각각 중화하였다.

### 효소반응 및 당 분석

천연 섬유성 기질을 300 ml 삼각플라스크에 5g씩 넣고 50 mM citrate phosphate buffer(pH 6.8)를 각각 100 ml 가하고 조효소액을 1% 농도로 첨가하였다. 시간, 온도 및 기질농도별로 반응시켜 원심분리(10,000×g, 20 min)한 다음 그 상청액 중의 환원당량을 DNS법으로 측정하여 glucose량으로 나타내었다. 또한 반응액 일부에 5% trichloro acetic acid를 첨가하여 단백질을 제거하고 C<sub>18</sub> Sep-pak cartridge를 통과시켜 색소를 제거한 다음 0.45  $\mu\text{M}$  membrane filter로 여과시킨 후 HPLC용 주입시료로 사용하였다. HPLC 분석조건은 carbohydrate column(3.9 mm i.d.×30 cm)에 acetonitrile-H<sub>2</sub>O(63 : 35, v/v)을 전개용매로서 flow rate를 1 ml/min하였고, differential refractometer detector를 사용하였으며, 표준물질로는 glucose, cellobiose, celotriose, xylose, xylobiose, xylotriose, mannose, arabinose를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 섬유소 분해관련효소의 생산

분리균 *Pseudomonas* sp. LBC-505는 중온(37°C)·중성(pH 7.0) 세균으로서 곰팡이와는 달리 cellulase 관련효소(특히  $\beta$ -glucosidase) 뿐만 아니라 xylanase의 활성도 동시에 높게 나타나 천연 섬유성 물질의 분해에 적합한 균주로 최종 선정하여 다음 실험을 행하였다.

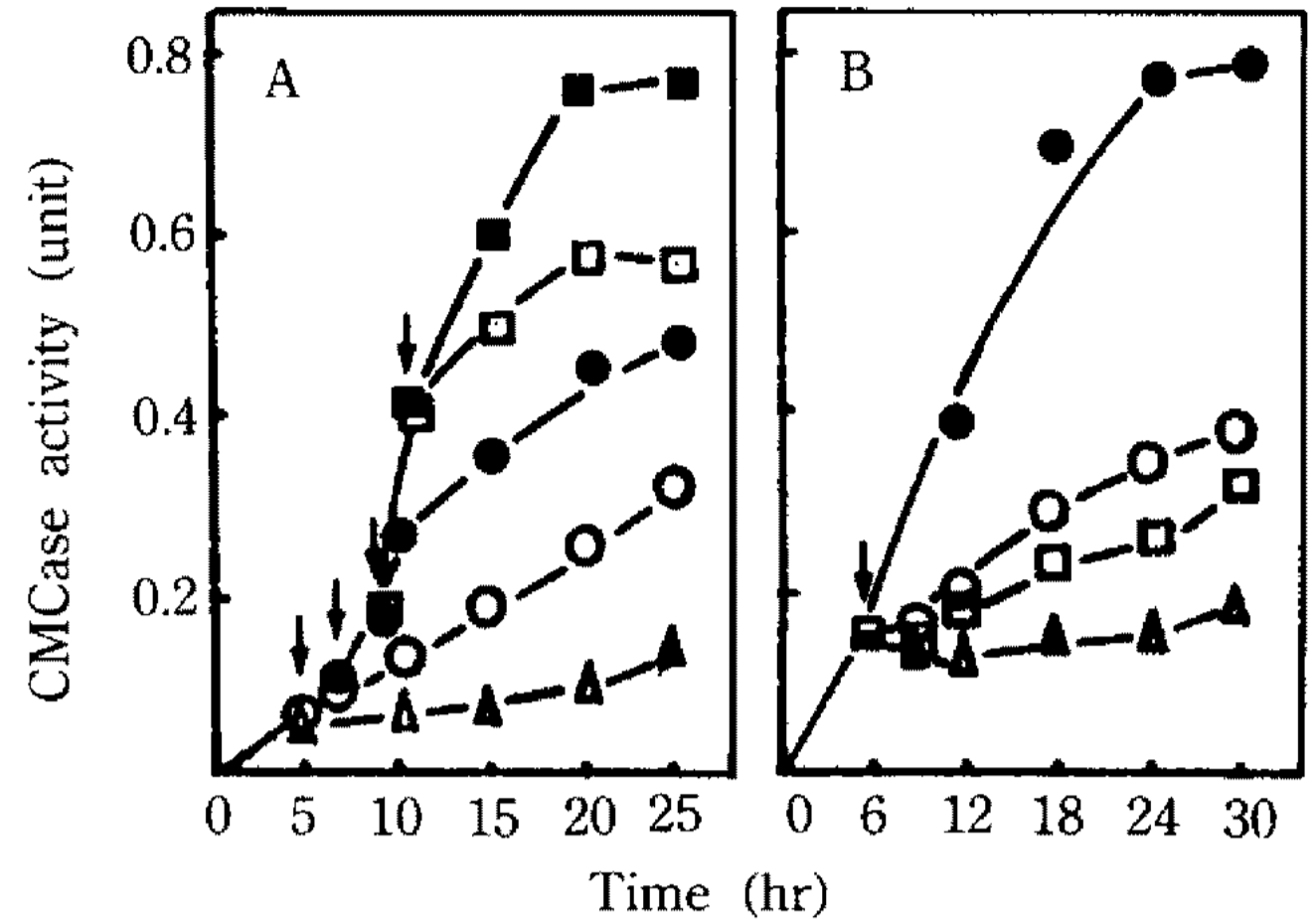
**각종 탄소원의 영향**: 탄소원의 성분을 제거한 PY-CMC 액체배지에 탄소원 종류별로 각각 첨가하여 seed culture액 1%를 접종 배양한 다음 그 배양액 중의 효소활성을 측정한 결과(Table 1),  $\beta$ -1,4-linkage를 가지는 CMC, cellobiose, xylan, avicel 및 천연 섬유소자원은 유도물질로서 작용되어 효소생성이 높게 나타났으나, glucose는 농도가 증가할수록 효소생성이 현저히 감소하므로 효소생성을 억제하는 repressor로 작용하는 것으로 생각된다. 이는 *Trichoderma* sp.(8), *Candida wickerhamii*(9) 및 *Sporotrichum* sp.

**Table 1. Effect of carbon sources on the production of cellulase and xylanase from *Pseudomonas* sp. LBC-505**

| C-source            | Conc. (5) | CMC-ase | Avicelase | $\beta$ -glucosidase | Xylanase |
|---------------------|-----------|---------|-----------|----------------------|----------|
| CMC                 | 0.5       | 3.5     | 1.7       | 4.1                  | 2.5      |
|                     | 1.0       | 3.9     | 2.4       | 6.3                  | 3.0      |
|                     | 2.0       | 5.7     | 3.7       | 7.1                  | 4.3      |
|                     | 2.5       | 5.8     | 3.8       | 7.2                  | 4.1      |
|                     | 2.5       | 5.8     | 3.8       | 7.2                  | 4.1      |
| Xylan               | 0.5       | 0.7     | 0.3       | 0.1                  | 4.2      |
|                     | 1.0       | 1.1     | 0.5       | 0.1                  | 6.7      |
|                     | 1.5       | 1.4     | 0.6       | 0.2                  | 10.5     |
|                     | 2.0       | 1.9     | 0.9       | 0.2                  | 11.1     |
|                     | 2.5       | 2.0     | 0.8       | 0.2                  | 10.8     |
| $\alpha$ -Cellulose | 1.0       | 0.4     | 0.1       | —                    | 0.3      |
|                     | 2.5       | 0.5     | 0.1       | —                    | 0.5      |
|                     | 3.0       | 0.5     | 0.2       | —                    | 0.5      |
|                     | 4.0       | 0.6     | 0.2       | —                    | 0.4      |
|                     | 5.0       | 0.5     | 0.1       | —                    | 0.4      |
| Wheat bran          | 1.0       | 1.6     | 1.1       | 1.8                  | 2.7      |
|                     | 2.5       | 2.4     | 2.0       | 3.7                  | 4.2      |
|                     | 5.0       | 3.8     | 2.5       | 4.6                  | 7.3      |
|                     | 7.5       | 4.5     | 2.9       | 4.5                  | 10.3     |
|                     | 10.8      | 4.1     | 3.0       | 4.5                  | 10.4     |
| Rice husk           | 1.0       | 0.9     | 0.4       | 0.7                  | 1.2      |
|                     | 2.5       | 1.8     | 0.7       | 0.9                  | 1.7      |
|                     | 5.0       | 2.6     | 1.7       | 1.2                  | 2.3      |
|                     | 7.5       | 3.2     | 2.0       | 1.3                  | 3.5      |
|                     | 10.0      | 3.0     | 2.1       | 1.3                  | 3.6      |
| Rice straw          | 1.0       | 1.0     | 0.5       | 0.9                  | 1.5      |
|                     | 2.5       | 1.8     | 0.6       | 1.2                  | 1.9      |
|                     | 7.5       | 2.5     | 1.3       | 1.5                  | 2.5      |
|                     | 10.0      | 3.2     | 2.0       | 2.3                  | 3.2      |
| News paper          | 1.0       | 0.7     | 0.3       | 0.2                  | 0.9      |
|                     | 2.0       | 1.4     | 0.9       | 0.5                  | 1.6      |
|                     | 3.0       | 1.8     | 1.3       | 1.2                  | 2.9      |
|                     | 4.0       | 2.7     | 2.4       | 1.9                  | 4.7      |
|                     | 5.0       | 2.9     | 2.1       | 2.0                  | 4.6      |
| Avicel              | 0.1       | 0.5     | 0.7       | 0.5                  | 0.8      |
|                     | 0.5       | 1.8     | 1.1       | 0.9                  | 2.2      |
|                     | 1.0       | 3.3     | 1.8       | 1.0                  | 4.2      |
| Glucose             | 0.1       | 0.04    | 0.02      | —                    | 0.02     |
|                     | 0.5       | —       | —         | —                    | —        |
|                     | 1.0       | —       | —         | —                    | —        |
| Cellobiose          | 0.1       | 0.7     | 0.3       | 1.0                  | 0.2      |
|                     | 0.5       | 1.1     | 0.8       | 2.6                  | 0.3      |
|                     | 1.0       | 1.9     | 1.2       | 4.7                  | 0.3      |

(10) 등 대부분의 cellulase complex 생성균의 결과와 일치하였다.

**CMC의 경시적 첨가효과 :** CMC-최소배지에 seed



**Fig. 1. Effect of CMC (A) and glucose (B) on CMCase synthesis induced by CMC in *Pseudomonas* sp. LBC-505. Cells were cultivated in CMC minimal medium containing 0.1% CMC.**

A: ■; 0 hr, □; 7 hrs, ○; 9 hrs, △; 11 hrs

B: ○; 0.2%, □; 0.4%, △; 0.8%, ●; control

culture액 1%를 접종하여 42°C에서 5시간 배양한 후, 2시간 간격으로 0.1% CMC를 첨가하여 경시적인 유도실험을 해본 결과(Fig. 1(a)), 배양 중에 CMC가 첨가되면 CMCase의 생합성이 현저히 증가하는 전형적인 유도효소의 양상을 나타내었는데, 이는 *Cellulomonas* sp.(11)와 *Trichoderma* sp.(8, 9)의 경우와 일치하는 경향이였다.

**Glucose의 첨가효과 :** CMC-최소배지에 glucose를 농도별로 첨가하여 CMCase 활성을 조사한 결과(Fig. 1(b)), 농도가 증가할수록 대조구에 비하여 현저히 저해효과를 나타내었는데, 이는 *Pseudomonas* sp. LBC-505의 cellulase 및 xylanase 생성이 carbon catabolite repression 조절하에 있다는 것을 증명하는 것으로 Table 1과 일치하는 결과이다. 배양 30시간 경과 후 활성이 약간 증가하는 것은 균체가 증식하므로 배지내의 glucose를 거의 소비하였기 때문인 것으로 사료된다.

**조효소의 반응조건**

**온도의 영향 및 안정성 :** 최적 효소활성 온도는 조효소액과 기질(50 mM citrate phosphate buffer, pH 6.8)을 혼합하여 30~70°C로 하여 각각 10분간 반응시켜 측정하였으며, 열안정성은 효소와 완충액을 혼합하여 각 온도별로 30분간 방치한 후 잔존활성을 측정하여 상대 효소활성도로 나타낸 결과(Fig. 2(a)), CMCase 및 xylanase 활성의 최적온도는 50°C이고

$\beta$ -glucosidase는 55°C였는데 다른 보고자들(12, 13)의 경우와는 약간 차이가 있었다. 열안정성은 30~60°C까지는 안정하였으며, 그 이상에서는 급격히 감소하

였는데 *Pseudomonas fluorescence*가 약 50°C 이상에서 실행되는 것(14)에 비하면 비교적 안정하였다.

**pH의 영향 및 안정성** : 효소의 최적 pH는 기질을 pH 4.0~10.0으로 조절한 후 조효소액을 10분간 반응시켜 측정하였고, pH 안정성은 조효소액의 pH를 달리하여 55°C에서 30분간 방치한 후 최적 pH로 조절하여 그 상대 효소활성을 구한 결과(Fig. 2(b)), 세 가지 효소의 최적 pH는 6.6 부근이었으며 6~8범위에서 비교적 높은 활성을 나타내었는데 *Thermonospora*속(15), *Streptomyces*속(16) 및 다른 *Pseudomonas*속(14)과는 대개 비슷하였다. pH 안정성은 5~9범위에서 본래의 효소활성도로 유지되었는데, 다른 *Pseudomonas*속(14)과는 거의 비슷하였으나 알칼리성 *Bacillus*속(17)의 경우보다는 좁았다.

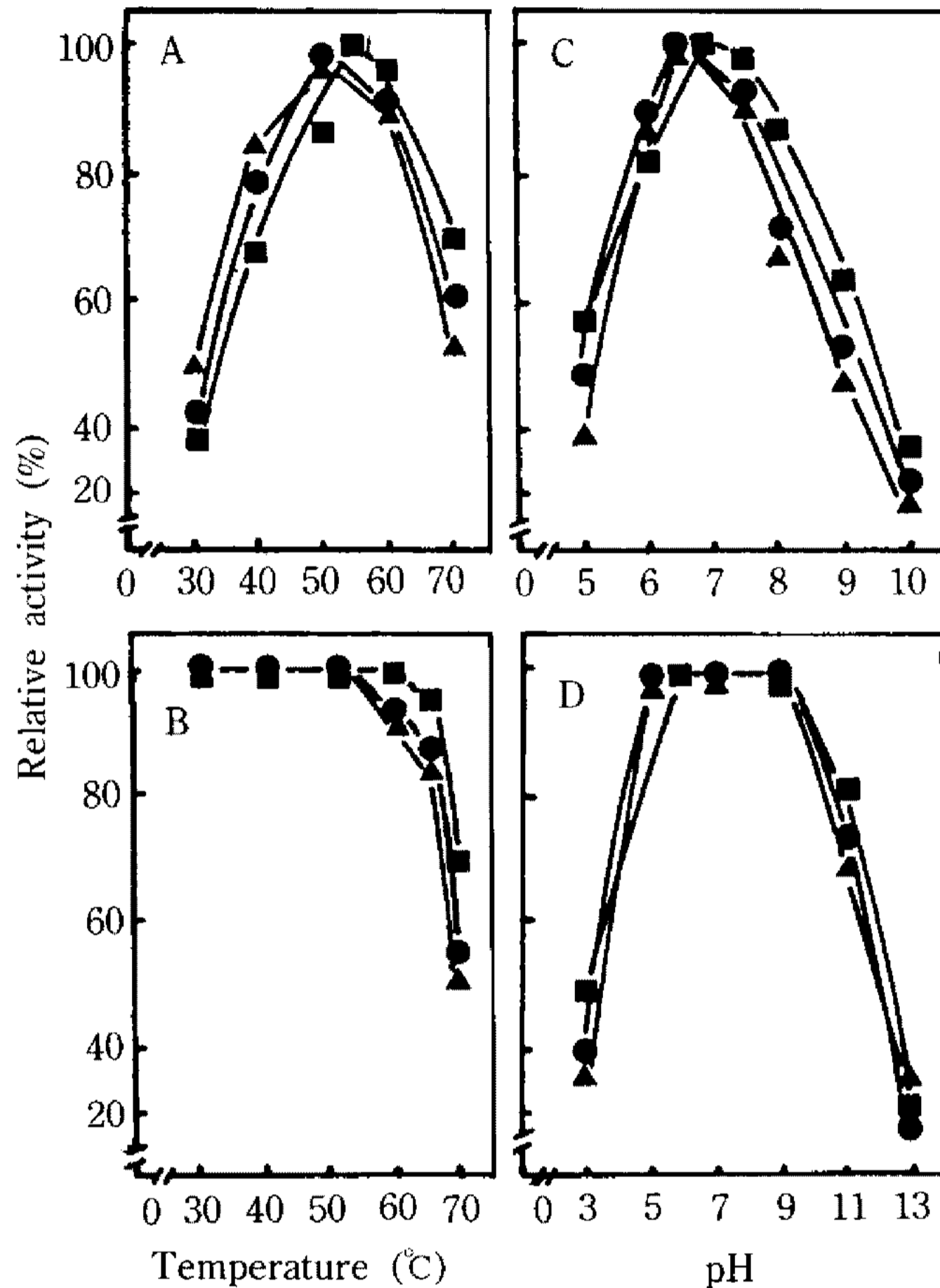


Fig. 2. Effects of temperature and pH on the activity of CMCase (●), xylanase (▲) and  $\beta$ -glucosidase (■) from *Pseudomonas sp. LBC-505*

A: Effect of temperature C: Effect of pH  
B: Thermal stability D: pH stability

#### 각종 섬유성 기질의 당화

**기질의 전처리** : 결정성인 섬유소는 효소적 가수분해시 조직의 견고성 때문에 분해율이 극히 낮으므로 결정형을 무정형으로 어느 정도 변화시켜 주는 swelling이 필요하다(1, 7). 따라서 효소에 의한 가수분해율을 높이고자 묽은 산과 알칼리 용액으로 실온에서 24시간 방치시킨 후 당화율을 조사한 결과(Table 2), 전체적으로 당화율이 극히 낮았고 NaOH보다는 HCl의 당화율이 다소 높은 것으로 나타났으며 농도에 따른 변화는 크게 영향이 없었으나 HCl이 약간씩 높게 나타나는 차이를 보였다. 한편 섬유성 물질의 산당화의 경우 2차 산물인 furfural 및 formic acid가 생성되어지나 묽은 산에 의해서는 거의 생성되지 않

Table 2. Hydrolysis of native cellulosic materials by weak acid, alkali and crude enzyme

| Substrate <sup>a</sup> | Saccharification (%) <sup>b</sup> |      |      |      |             |      |      |      | Crude enzyme |
|------------------------|-----------------------------------|------|------|------|-------------|------|------|------|--------------|
|                        | NaOH (% w/v)                      |      |      |      | HCl (% v/v) |      |      |      |              |
|                        | 0.5                               | 1    | 2    | 3    | 1           | 3    | 5    | 7    |              |
| Wheat bran             | 0.14                              | 0.13 | 0.16 | 0.17 | 1.31        | 2.54 | 2.73 | 3.19 | 6.47         |
| Rice husks             | 0.21                              | 0.17 | 0.19 | 0.23 | 1.74        | 2.82 | 3.15 | 3.19 | 6.12         |
| Rice straw             | 0.45                              | 0.85 | 0.86 | 0.90 | 2.32        | 2.78 | 3.24 | 3.85 | 9.09         |
| Coffee hulls           | —                                 | —    | —    | —    | —           | —    | —    | —    | 1.21         |
| News paper             | 1.21                              | 1.34 | 1.33 | 1.40 | 0.49        | 1.15 | 1.90 | 2.13 | 2.73         |
| Saw dust               | —                                 | —    | —    | —    | 0.51        | 0.93 | 1.22 | 1.54 | 3.15         |

<sup>a</sup> Five percent of substrate was added.

<sup>b</sup> Saccharification =  $\frac{\text{Reducing sugar formed}}{\text{Weight of substrate used}} \times 100$

**Table 3. Hydrolysis of acid or alkaline-pretreated cellulose materials by cellulase from *Pseudomonas* sp. LBC-505**

| Substrate<br>(5%) | Saccharification (%) |       |       |              |       |       |
|-------------------|----------------------|-------|-------|--------------|-------|-------|
|                   | NaOH (% w/v)         |       |       | HCl (5, v/v) |       |       |
|                   | 1                    | 2     | 3     | 3            | 5     | 7     |
| Wheat bran        | 14.20                | 16.20 | 16.30 | 16.70        | 17.20 | 17.74 |
| Rice husk         | 8.40                 | 9.04  | 10.10 | 10.20        | 12.34 | 13.10 |
| Rice straw        | 15.20                | 15.80 | 16.20 | 17.40        | 18.40 | 21.20 |
| Coffee hull       | 6.20                 | 7.10  | 7.14  | 7.40         | 8.50  | 9.10  |
| News paper        | 10.23                | 11.25 | 13.50 | 12.50        | 12.80 | 13.10 |
| Saw dust          | 7.20                 | 7.80  | 8.20  | 13.20        | 13.40 | 13.60 |

으며 또한 중화시 알칼리에 의하여 제거되는 것으로 보고된 바(4) 있으므로 2차 산물에 의한 효소억제에 대해서는 염려할 필요가 없을 것으로 본다.

**효소당화** : LBC-505를 CMC 대신 밀기울 7.5%가 함유된 PY-CMC 배지에서 42°C, 36시간 배양하여 조효소액을 조제한 후 각 기질농도에 1% 첨가한 다음 55°C에서 2시간 반응시켜 당화율을 조사한 결과(Table 2), 볏짚이 가장 당화율이 좋았고 밀기울 왕겨 순서였으며, 5% HCl로 전처리만을 한 시료의 경우에 비해 3배 이상 당화율이 높았으나 여전히 충분하지 못하였다.

**전처리와 효소당화의 병행** : 천연 섬유성 기질을 묽은 산과 알칼리로 병행 처리한 결과(Table 4), 알칼리성보다 산으로 전처리하여 효소당화를 시킨 것이 당화율이 높게 나타났으며, 특히 볏짚을 5% HCl로 전처리하였을 때 당화율이 18.4%를 나타내어 효소처리만의 경우보다 2배 정도 높았다. 이는 볏짚을 전처리하므로써 고분자물질인 lignin이 다소 제거되고 섬유질이 팽창됨으로써 효소의 공격이 용이하게 되어 당화율이 현저하게 증가한 것으로 생각된다.

이와 같은 결과는 NaOH를 2% 농도되게 하여 증자처리한 볏짚에 *Trichoderma reesei*의 cellulase를 1% 농도로 병행처리한 경우(6)의 15% 당화율보다는 비교적 높은 수치였다.

#### 섬유성 분해산물의 당 조성

최적조건하에서 LBC-505의 조효소를 각 기질에 작용시켜 나타난 주요 분해산물의 당을 HPLC로 분

석한 결과, 볏짚에서는 glucose, xylose, cellobiose가 주로 생성되었고, 왕겨와 밀기울에서는 glucose, cellobiose, xylose가 주요 분해물이었고 그 외에 rhamnose, arabinose가 생성되었다. 이와 같은 결과로부터 *Pseudomonas* sp. LBC-505가 생산하는 CMCase, avicellase,  $\beta$ -glucosidase 및 xylanase는 천연 섬유성 물질에 작용하여 주로 glucose 및 cellobiose를 생성 시킴을 알 수 있었으며, CMC에 대해서는 glucose, cellobiose 및 cellotriose 단위로 분해시켰다.

## 요 약

섬유성 물질을 발효기질로서 사용하기 위하여, 분리균 *Pseudomonas* sp. LBC-505의 cellulase를 이용하여 여러 종류의 천연 섬유성 물질에 대한 당화실험을 행하였다. Cellulase 복합체의 생산은 glucose에 의하여 저해되었고 CMC, avicel, 밀기울, 볏짚 등의 섬유성 물질에 의해 유도되었으며, 5%(w/v) 밀기울 배지에서 최대 효소활성을 나타내었다. CMCase와 xylanase의 최적 효소 반응온도는 50°C였으며  $\beta$ -glucosidase는 55°C였다. 또한, 이들 효소의 최적 반응 pH는 모두 6.6이었다. 조효소 단독처리에 의한 천연 섬유소의 당화율은 낮게 나타났으나, 5%(v/v) HCl로 실온에서 24시간 전처리한 후 효소반응을 행한 결과가수분해율이 18.4%(w/w)로 볏짚이 가장 양호하였으며, 구성당은 주로 glucose, xylose 및 cellobiose였다.

## 감사의 글

본 연구를 위해 연구비('90년)를 지원해 주신 동력자원부 에너지 관리공단에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Mandels, M.: *Annual reports of fermentation process*, 7, 35 (1984)
2. Wood, T.M. and S. McCrae: *Adv. in Chemistry Series*, 181, 181 (1979)
3. Pibber, M. and J.C. Toha: *J. Ferment. Technol.*, 60, 247 (1982)
4. Sung, N.K. and J.K. Kim: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 4, 1 (1976)



5. Fan, L.T., Y.H. Lee and D.H. Beardmore: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 177 (1980)
6. Bisaria, V.S. and T.K. Ghose: *Enzyme Microbiol. Technol.*, **3**, 90 (1981)
7. Mandels, M., L. Hontz and J. Nystrom: *Biotechnol. Bioeng.*, **16**, 1471 (1974)
8. Kawamori, M., Y. Morikawa, Y. Shinsha and S. Takaswa: *Agric. Biol. Chem.*, **49**, 2875 (1985)
9. Freer, S.N. and R.W. Detroy: *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 152 (1985)
10. Canevascini, G., M.R. Coudray, J.P. Rey and H. Meier: *J. General Microbiol.*, **110**, 291 (1979)
11. Smith, D.J. and J.M. Leatherwood: *J. Bacteriol.*, **128**, 609 (1976)
12. Kanamoto, J., R. Sakamoto and S. Murao: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 163 (1979)
13. Kanamoto, J., r. Sakamoto and S. Murao: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 561 (1984)
14. Yamane, K., H. Suzuki and K. Nisizawa: *J. Biochem.*, **67**, 19 (1970)
15. Hageral, B., J.D. Fefchak and E.K. Pye: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1515 (1980)
16. Ishaque, M. and D. Kluepfel: *Can. J. Microbiol.*, **26**, 183 (1980)
17. Horikoshi, K. and Y. Atsukawa: *Agric. Biol. Chem.*, **37**, 2097 (1973)

(Received May 13, 1991)