

산업용 효모에서 *Bacillus subtilis* Endo- β -1,4-Glucanase의 생합성 및 분비

박용준 · 이영호 · 강현삼¹ · 백운화*

두산종합기술원, ¹서울대학교 미생물학과

Synthesis and Secretion of the Endo- β -1,4-Glucanase from *Bacillus subtilis* in Industrial Yeast Strain

Park, Yong-Joon, Young-Ho Lee, Hyen-Sam Kang¹ and Un-Hua Pek*

Doosan Technical Center, Yoido P.O. Box 80, Seoul 150-010, Korea

¹Department of Microbiology, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — DNA segment encoding β -1,4-glucanase of *Bacillus subtilis* was fused in frame to mouse α -amylase signal sequence behind the alcohol dehydrogenase isoenzyme I gene (*ADHI*) promoter of the yeast expression vector pMS12. To enhance the expression level of the β -glucanase gene in yeast, transcription terminator sequence iso-1-cytochrome c gene (*CYCI*) was inserted into the recombinant plasmid. The transformants harbouring such recombinant plasmids secreted β -glucanase into the culture medium. The expression level of the β -glucanase gene was increased about 2-fold caused by inserting the terminator. The amount of the secreted β -glucanase in culture medium was approximately 60% of the total quantity synthesized.

*Saccharomyces cerevisiae*에서의 단백질 분비기작은 동물세포의 단백질 수송기작을 연구하는데 있어서 중요한 모델이 되어 왔으며 유용단백질의 생산수단으로서 연구되어 왔다. 효모에서 분비되는 단백질에는 고등한 진핵세포와 마찬가지로 소수성을 띠는 분비 신호서열이 있는데, 이는 분비과정의 첫번째 단계인 단백질의 소포체로의 전위에 중요한 역할을 한다. 효모에서 원하는 단백질을 세포밖으로 분비시키기 위해 효모자체의 분비신호서열이나 동물세포의 분비 신호서열을 이용하려는 많은 연구들이 수행되었다. 1980년대 이 후 *Saccharomyces cerevisiae*의 α -mating factor의 분비신호서열(1)과 *Kluyveromyces lactis*의 killer toxin 분비신호서열(2)이 효모에서의 이종단백질 분비에 효과적이라는 사실이 보고되었다(3-8). 1983년 Thomsen(9)은 *Saccharomyces cerevisiae*에서

mouse salivary α -amylase 유전자를 발현시키고 그 유전자가 갖고 있는 분비신호서열에 의해 배양상등액으로 상당량의 α -amylase가 분비된다는 것을 확인하였고 1986년 Jackson 등(10)은 mouse α -amylase의 분비신호서열을 이용하여 보리의 endo- β -1,3-1,4-glucanase를 효모밖으로 분비시키는데 성공하였다. Human α -amylase는 그 자체의 분비신호서열로 *Saccharomyces cerevisiae*에서 분비되었으며(11) human serum albumin도 자체의 분비신호서열에 의해 효모밖으로 분비되었다고 보고되었다(8). 효모의 분비신호서열이나 고등한 진핵세포의 분비신호서열을 이용하여 여러 종류의 이종단백질들을 효모에서 발현, 분비시키는 연구들이 수행되었는데(12-16) 단백질의 분비여부 및 그 정도는 분비신호서열에 의해서만 결정되는 것이 아니라 어떤 단백질이 어떤 분비신호서열과 결합되었는가가 더욱 중요한 것 같다. 즉, 단백질 분비기작에 관여하는 여러 가지 요인들이 복합적으로 작용하여 분비의 효율성이 결정된다는 것이다.

Key words: β -Glucanase, secretion, industrial yeast
*Corresponding author

본 연구에서는 *Bacillus subtilis*의 β -1,4-glucanase 유전자(17)에 *Saccharomyces cerevisiae*의 alcohol dehydrogenase isoenzyme I 유전자(ADHI) promoter를 연결시키고 원래의 분비신호서열 대신에 mouse salivary α -amylase 유전자의 분비신호서열을 접합시켜서 산업용 알콜 생산 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 54에서의 분비를 시도하였으며 발현을 증대시키기 위해 *Saccharomyces cerevisiae*의 iso-1-cytochrome c 유전자(CYC1)의 전사종결신호를 부가한 후 그 효과를 비교 측정하였다.

재료 및 방법

균주와 플라스미드

실험에 사용한 산업용 알콜 생산 효모와 플라스미드는 Table 1과 같다.

효소 및 시약

제한효소 및 그 밖의 효소들은 BRL Life Tech.사와 Sigma사에서 구입하였으며, 배지용 시약은 Difco Lab.의 제품을 사용하였다. 그 외 시약들은 일급 이상의 분석용 시약을 사용하였다.

배지

효모를 순수배양하기 위해서 YPD 배지(yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%)를 이용하였으며

β -glucanase 역가를 측정하기 위해 효모를 배양할 때에는 SD 배지(yeast nitrogen base without amino acid 0.67%, glucose 2%)에 0.2 mM의 CuSO_4 를 첨가하여 사용하였다. 형질전환체의 1차 선별배지로는 SD 배지에 2%의 agar와 0.4 mM의 CuSO_4 가 첨가된 것을 사용하였으며 2차 선별 때에는 BSDC 배지(yeast nitrogen base without amino acid 0.67%, glucose 2%, carboxymethyl cellulose 1%, 50 mM sodium phosphate buffer, pH 6.4)에 역시 2%의 agar를 첨가하여 사용하였다.

플라스미드의 구성

재조합 플라스미드를 구성하는데 필요한 모든 실험방법은 주로 Maniatis 등(18)의 방법을 따랐으며, 제한효소 및 그 밖의 DNA 변형효소들은 제조회사에서 명시한 방법에 따라 사용하였다.

효모의 형질전환 및 형질전환체의 선별

본 실험실에서 이미 보고하였던 방법(19)에 따라 실시하였으며 1차 선별배지에서 자라난 colony들을 2차 선별배지 위에 toothpicking한 후 30°C에서 1~2일간 배양하고 자라난 colony들을 멸균 증류수로 세척한 후 0.2%의 Congo Red 용액을 가하였다. 5분 정도 방치한 뒤에 1 M NaCl 용액으로 2~3회 세척하여 균체가 자랐던 부위에 clear zone이 형성된 colony를 선별하였다. 이를 0.2 mM의 CuSO_4 가 첨가된

Table 1. Yeast strain and plasmids

Strain or plasmid	Genotype or phenotype	Reference or source
Yeast strain		
<i>S. cerevisiae</i> 54	wild type, triploid	Doosan Culture Collection
Plasmid		
pUC19	Ap ^r , lacZ	New England Biolabs, Inc., USA
pGEM-5Zi(+)	Ap ^r , lacZ	Promega Co., USA
YEp36	CUP1, LEU2, Ap ^r , 2 μ ori	Butt, T.R. <i>et al.</i> (23)
pMS12	ADHI promoter, mouse α -amylase gene Trp1, 2 μ ori, Ap ^r	Olsen, O. (24)
YEpGCU	GAL1-GAL10 promoter, CYC1 terminator, URA3, 2 μ ori, Ap ^r	DR. Kang, Hyen Sam
pBAG3	β -glucanase gene from <i>B. subtilis</i> , Ap ^r	Seo, Y.S. <i>et al.</i> (25)

SD 배지에서 5×10^6 cells/ml이 되게 배양하고 Holm 등(21)의 방법에 따라 전체 DNA를 회수하여 이를 다시 *Escherichia coli*에 도입시킨 다음 플라스미드를 확인하였다. 원하는 재조합 플라스미드가 확인된 경우 이를 형질전환된 효모로 선별하였다.

β -Glucanase 역가 측정

0.2 mM의 CuSO_4 가 첨가된 SD 배지에서 정지기까지 성장시킨 균체를 회수하여 다시 신선한 배지로 옮긴 후 30°C 에서 24시간 동안 진탕 배양하였다.

효모가 배양액으로 분비해낸 효소역가를 측정하기 위해서는 배양상등액을 효소원으로 이용하였으며, 분비되지 않은 세포내 효소의 역가를 측정하는데에는 세포 조효소액을 이용하였다. 세포 조효소액을 제조하기 위해서 배양이 끝난 배양액 5 ml을 원심분리한 후 균체를 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride와 5 mM mercaptoethanol이 포함된 50 mM sodium phosphate 완충용액으로 세척하고 동일부피의 완충용액에 현탁한 후 glass bead를 이용하여 세포를 파괴시켰다. 현미경 관찰을 통해 세포가 충분히 파괴되었는가를 확인한 후 원심분리하여 상등액을 효소원으로 이용하였다. 반응 혼합액은 pH 6.4의 100 mM sodium phosphate 완충용액에 녹인 1% CMC 용액 $500 \mu\text{l}$ 와 효소액 $500 \mu\text{l}$ 으로 만들었으며 이들을 잘 섞은 후 40°C 에서 30분 동안 반응시키고 반응액속의 환원당을 DNS법으로 측정하였다(26). 이 때 효소 1 unit는 1분당 $1 \mu\text{mole}$ 의 glucose를 생성시킬 수 있는 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

분비신호서열과 β -glucanase 유전자의 연결

*Bacillus subtilis*의 β -1,4-glucanase 유전자는 87개의 염기로 구성된 자체의 분비신호서열을 갖고 있으며 signal peptidase의 인식 가능 부위가 27번째의 아미노산 Ala에서 시작되고 작용 가능 부위는 29번째 아미노산인 Ala와 30번째 아미노산인 Val의 결합 부위라고 보고된 바 있는데 제한효소 *PstI*(염기서열+88)으로 처리하면 분비신호서열이 잘려 나가게 된다(20). 한편 mouse salivary α -amylase 유전자는 45개의 염기로 이루어진 분비신호서열을 갖고 있으며 제한

효소 *ApaI*으로 처리하면 분비신호서열 바로 다음이 잘려 나가게 된다(10). Mouse α -amylase 유전자의 분비신호서열과 자체의 분비신호서열이 제거된 β -glucanase의 유전자를 reading frame이 맞도록 접합하기 위해서 multiple cloning site를 보유하고 있는 두 종류의 플라스미드 벡터를 이용하였다. 먼저 pUC 19의 *PstI* 인식부위에 pBAG3를 *PstI*으로 절단하여 얻은 2.4 kb 크기의 DNA 단편을 도입한 후 원하는 삽입방향을 갖는 재조합 플라스미드를 선별하여 pUC 19B라고 명명하였다(Fig. 1, 2). pGEM-5Zf(+)를 제한효소 *SalI*과 *SphI*으로 동시에 절단한 후 pUC19B를 역시 제한효소 *SalI*과 *SphI*으로 동시에 절단했을 때 생기는 약 2.4 kb 크기의 DNA 단편과 접합시켜서 β -glucanase 유전자의 5'쪽 말단에 *ApaI* 인식부위가 도입되도록 하였으며 이를 pGEMB라고 명명하였다(Fig. 1, 2). 한편 *ADHI* 유전자의 promoter와 mouse salivary α -amylase 구조유전자가 결합되어서 포함되어 있는 재조합 플라스미드 pMS12에 산업용 효모의 우성 선별인자로 이용할 수 있는 copper metallothionein 유전자(*CUP1*)를 도입하기 위해 YEp36을 제한효소 *BamHI*으로 절단하여 얻은 1.35 kb 크기의 DNA 절편을 pMS12의 *BamHI* 인식부위에 삽입시켰다(Fig. 1). 이렇게 얻어진 재조합 플라스미드 pAMC1을 제한효소 *ApaI*과 *HindIII*로 동시 절단하여 α -amylase의 coding region을 제거한 후 남아있는 분비신호서열 뒤에 역시 pGEMB에서 잘라낸 1.77kb 크기의 *ApaI*-*HindIII* 절편을 접합시켰다. pAMC1을 *HindIII*로 처리했을 때 효모의 2μ DNA가 함께 잘려 나가게 되므로 1차로 완성된 pAMBA 2μ 의 *HindIII* 인식부위에 pAMC1에서 회수해 두었던 2μ DNA 절편을 올바른 방향으로 삽입시켜서 재조합 플라스미드 pAMB1을 완성하였다(Fig. 1).

벡터를 제조하는 과정에서 β -glucanase의 5'쪽 말단인 *PstI* 인식부위의 앞쪽으로 제한효소 *AstII*와 *SphI* 인식부위가 추가로 만들어 졌다(Fig. 2). 비록 분비신호서열과 β -glucanase 유전자 사이에 여분의 서열이 부가되었더라도 stop codon 등과 같이 단백질의 구조 및 유전자의 발현에 결정적인 역할을 할 수 있는 codon이 존재하지 않기 때문에 재조합 플라스미드가 제대로 작용할 수 있을 것이다. *ADHI* promoter와 분비신호 서열 그리고 β -glucanase 유전자의 연결

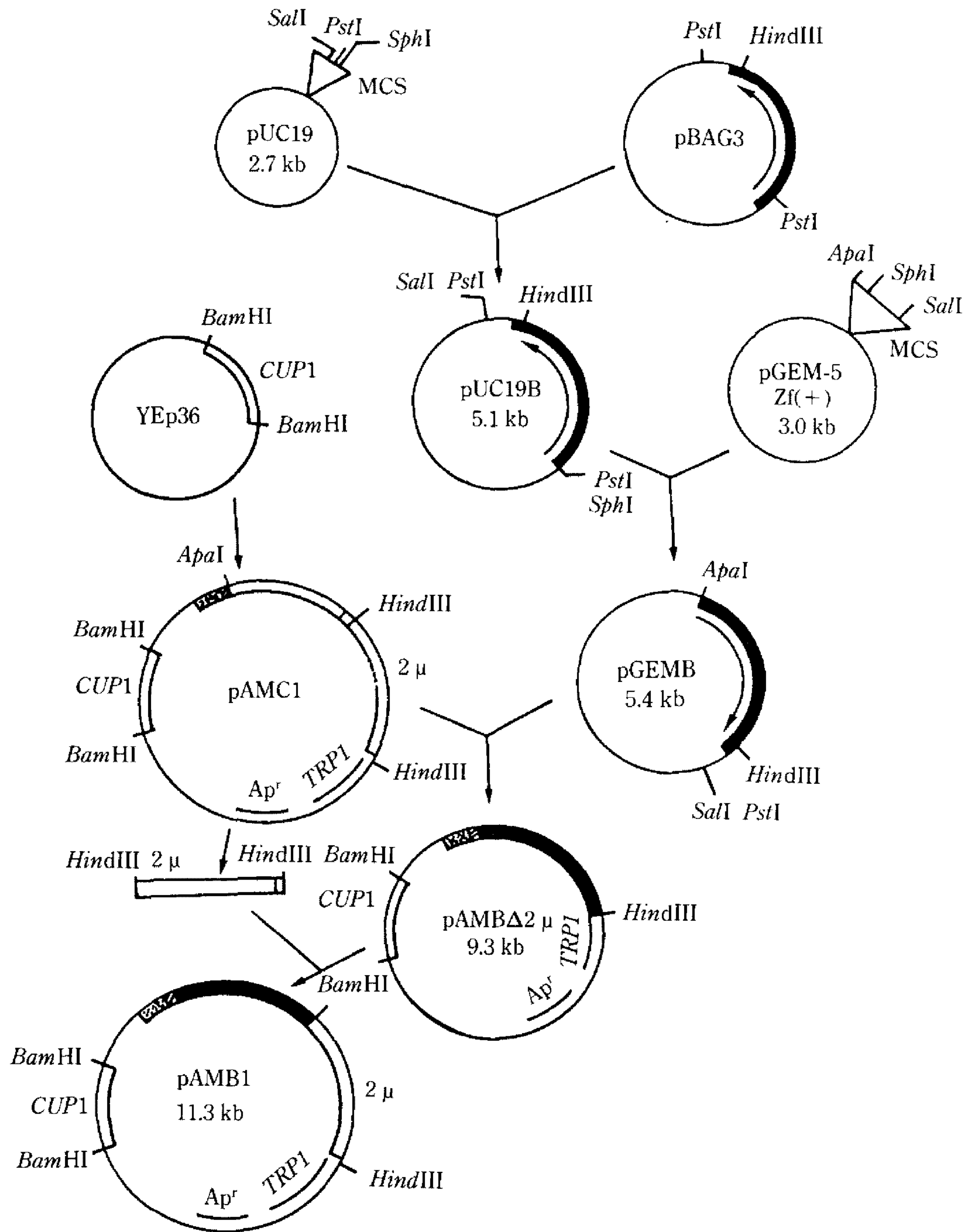


Fig. 1. Construction of the recombinant plasmid pAMB1.

Blackened box shows the β -glucanase gene, hatched box shows the mouse α -amylase signal sequence and dotted box shows the promoter region of *ADHI* gene. Arrows indicate the reading direction of β -glucanase gene. Abbreviations: MCS, multiple cloning site; *CUP1*, copper metallothionein gene; *Ap^r*, β -lactamase gene; *TRP1*, RP-anthranilate isomerase gene; 2μ , yeast 2μ sequence.

부분은 Fig. 3에 나타나 있다.

전사종결 신호의 부가

도입된 β -glucanase 유전자의 발현을 증대시키기 위해, 효모에서 효과적인 전사종결을 할 수 있는 것

으로 알려진 *CYC1* locus의 전사종결 신호를 pAMB1의 β -glucanase 유전자 3' 쪽 말단에 부가 하기로 하였다. pUC19의 multiple cloning site에 있는 *SmaI*에 인식부위에 YE pGCU의 *EcoRV-ScaI* 절편(57 bp)을 삽입시킨 후 원하는 방향으로 구성된 재조합

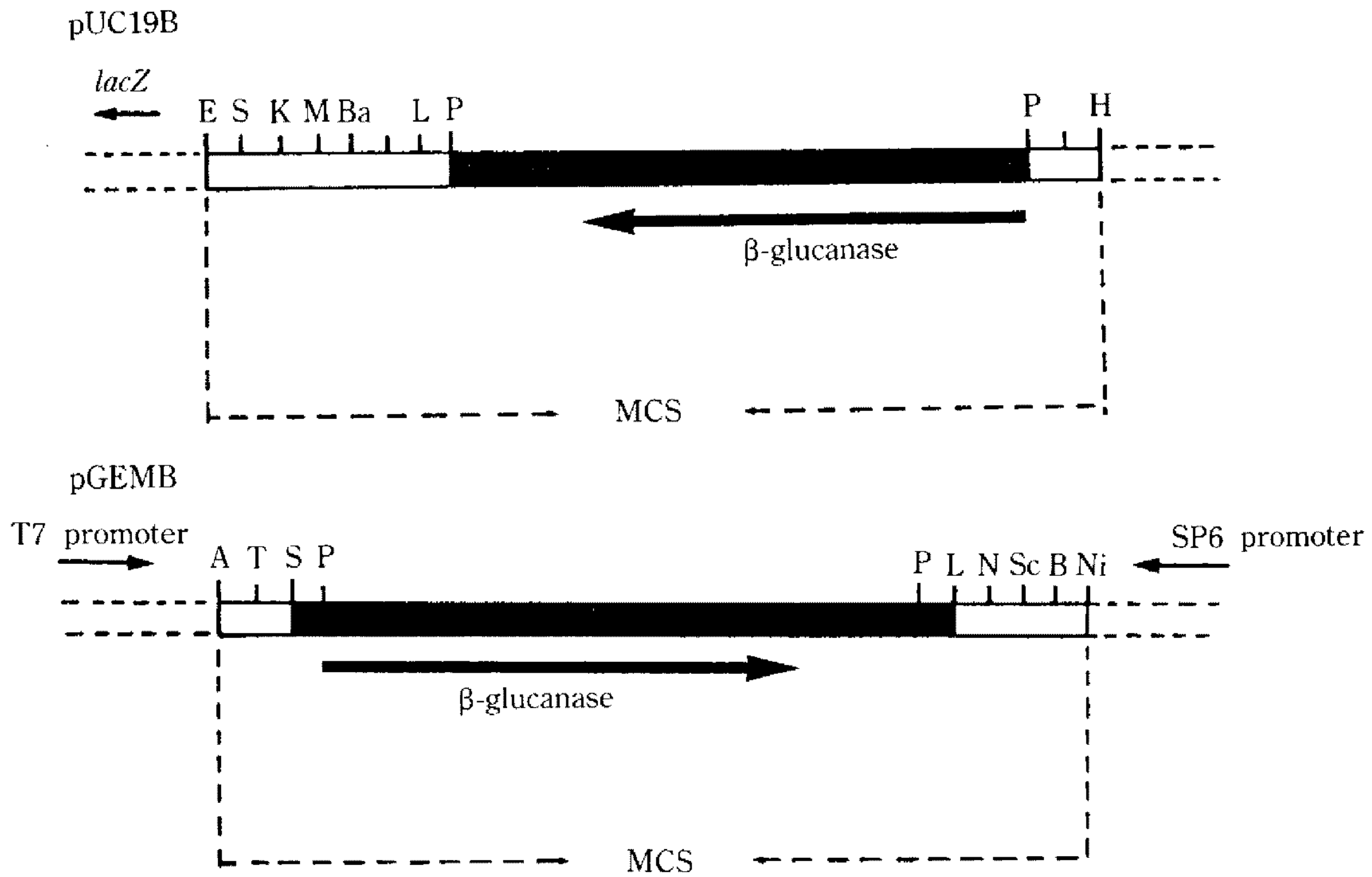


Fig. 2. Inserted region of multiple cloning site (MCS) in pUC19B and pGEMB. Blackened box shows the inserted region. Arrows indicate the reading direction of β -glucanase gene. Abbreviations: MCS, multiple cloning site; A, *Apa*I; B, *Bst*XI; Ba, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hind*III; K, *Kpn*I; L, *Sal*I; M, *Sam*I; N, *Nde*I; Ni, *Nsi*I; P, *Pst*I; S, *Sph*I; Sc, *Sac*I; St, *Sst*I; T, *Aat*II; X, *Xba*I.

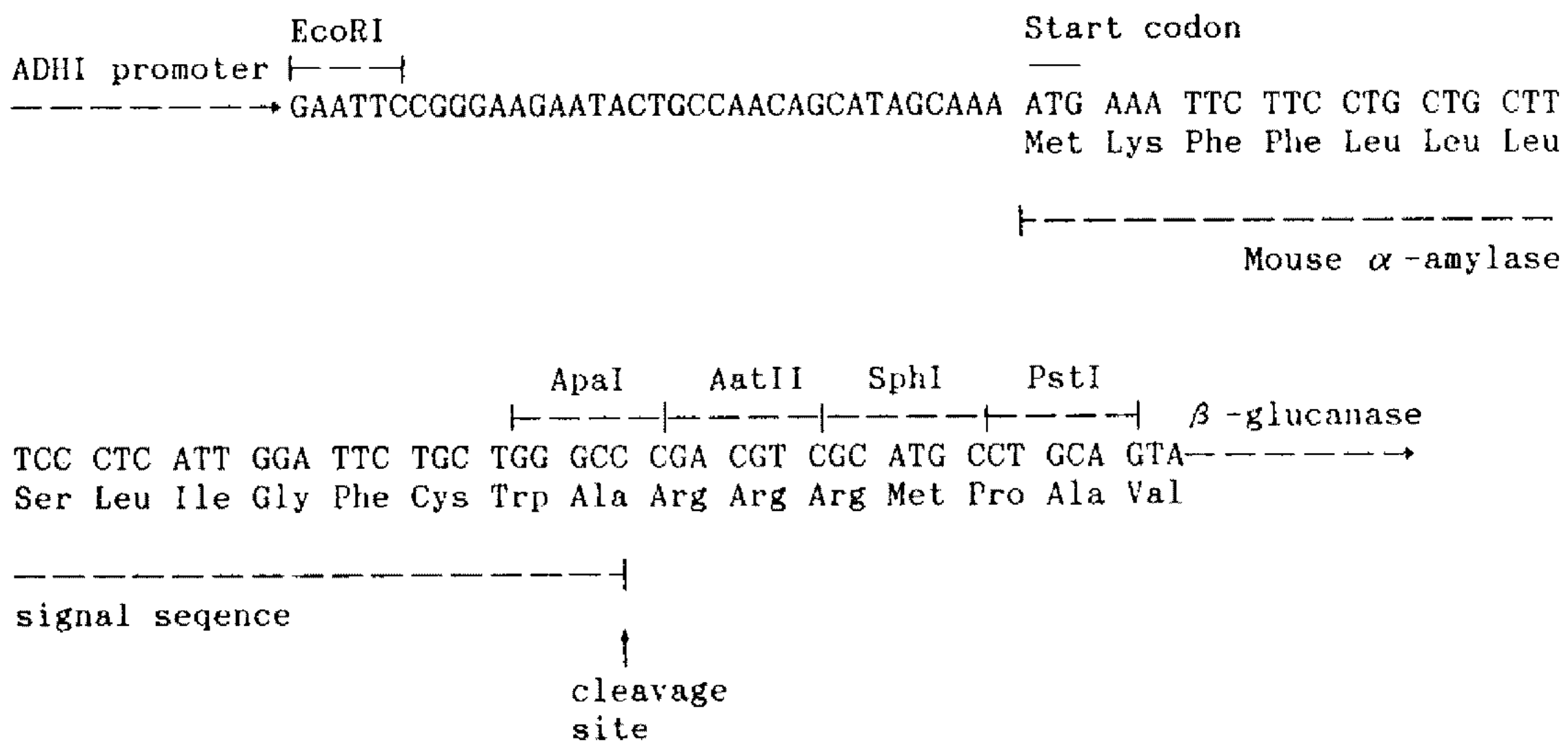


Fig. 3. Sequence of the signal peptide coding region of recombinant plasmid pAMB1.

플라스미드를 선별하여 pUC19T라고 명명하였다(Fig. 4). 도입된 *EcoRV-ScaI* 절편 안에는 *CYC1* 유전자의 전사종결에 필요한 부위가 모두 들어있다(21). pAMB Δ 2 μ 를 제한효소 *Hind*III로 절단한 후 klenow fragment로 처리하고 이곳에 pUC19T의 *Eco*RI-*Sal*I 절편(610 bp)을 역시 fill-in 시켜서 삽입시켰다. 전사

종결신호가 β -glucanase의 전사방향과 동일방향으로 삽입된 재조합 플라스미드를 선별하여 pAMB Δ 2 μ -T라고 명명하였다(Fig. 4). 한편 *Sal*I과 *Hind*III 인식 부위가 fill-in 되어서 접합된 자리에는 *Hind*III 인식 부위가 그대로 남게 되므로 pAMB Δ 2 μ -T의 *Hind*III 인식부위에 pAMC1으로부터 회수한 2 μ 절편을 정

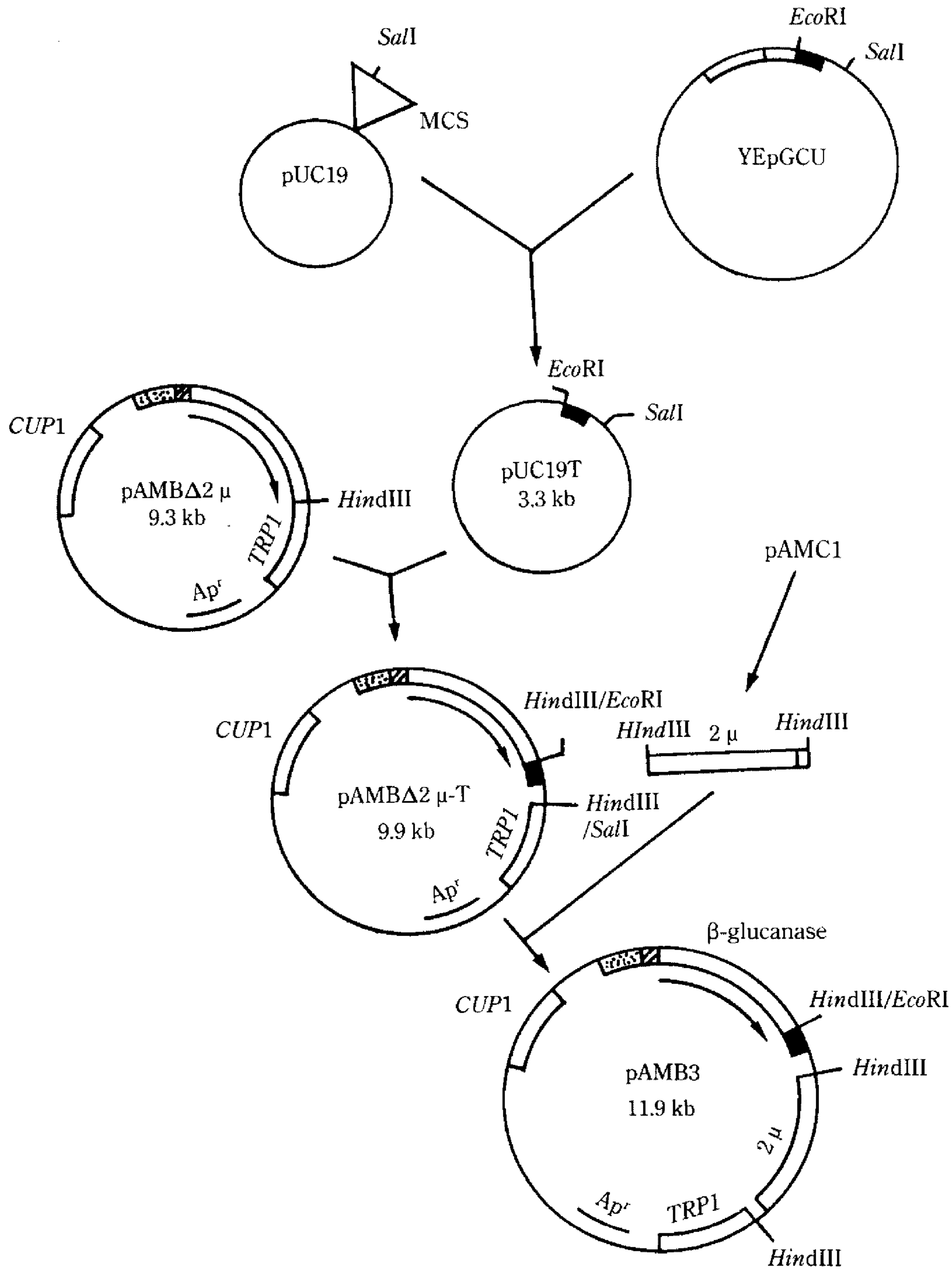


Fig. 4. Construction of the recombinant plasmid pAMB3.

Blackened box shows the *CYC1* terminator, hatched box shows the mouse α -amylase signal sequence and dotted box shows the promoter region of ADHI gene. Arrows indicate the reading direction of β -glucanase gene. Abbreviations: MCS, multiple cloning site; *CUP1*, copper metallothionein gene; *Ap^r*, β -lactamase gene; *TRP1*, RP-anthranilate isomerase gene; 2μ , yeast 2μ sequence.

상방향으로 도입하여 재조합 플라스미드 pAMB3를 완성하였다(Fig. 4).

형질전환체의 선별

산업용 주정생산 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 54는 어떠한 auxotrophic marker도 갖고 있지 않은 다배체의 야생형 효모이지만 구리내성 유전자인 *CUP1* 유전자와 YEp 계열의 벡터를 이용하면 형질전환

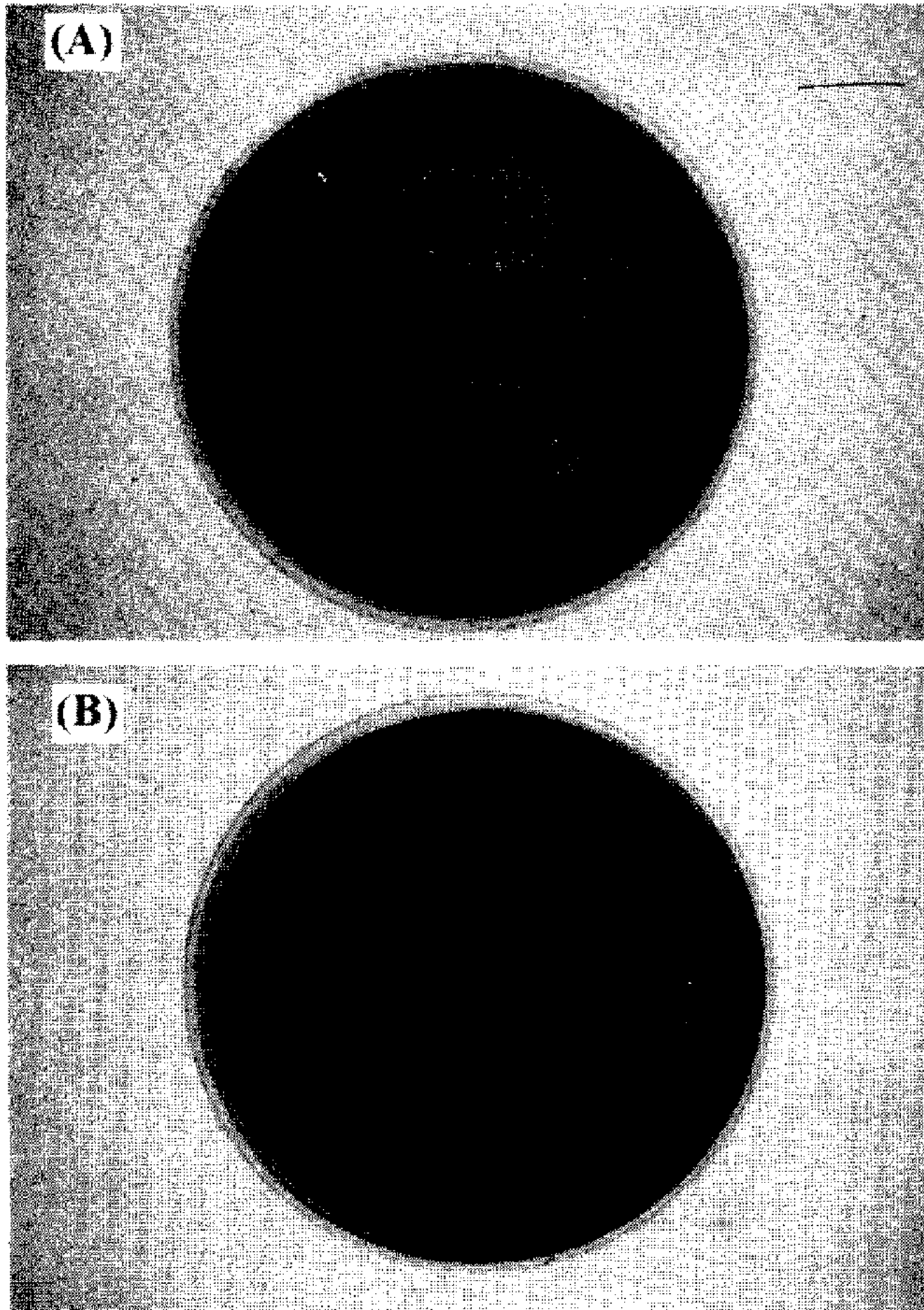


Fig. 5. Secretion of β -glucanase by transformants containing the plasmids pAMB1 or pAMB3.

A: Yeast was grown 1~2 days on selective medium containing 1% CMC. Cells were washed off before staining with a 2.0% solution of Congo Red.

B: Concentrated yeast culture supernatants were dropped in agar plate containing 1% CMC. After incubation, the plate was stained with 0.2% solution of Congo Red and washed with 1 M NaCl.

체를 쉽게 선별할 수 있다(19). CuSO_4 가 포함된 최소배지에서 비교적 커다랗게 자라나오는 colony들을 BSDC 배지에 toothpicking한 후 Congo Red test를 실시한 결과 형질전환된 효모의 colony가 있는 곳에는 clear zone이 형성된 것을 확인할 수 있었는데 이는 효모내에서 생합성된 β -glucanase가 세포밖으로 분비되어서 배지내의 CMC를 분해한 결과를 보여주는 것이다(Fig. 5A).

β -glucanase가 실제로 세포밖으로 분비되었는가를 좀 더 확인하기 위하여 형질전환체를 배양한 후 배양상등액을 10배 정도 농축하여 BSDC 배지위에 점적하고 하룻밤 동안 incubation한 결과 역시 clear zone이 형성된 것을 확인할 수 있었다(Fig. 5B).

Table 2. β -glucanase activities of yeast transformants

Transformant	β -glucanase activity (units/ml)	
	Extracellular	Intracellular
<i>S. cerevisiae</i> 54/pAMB1	0.30	0.20
<i>S. cerevisiae</i> 54/pAMB3	0.58	0.39

β -Glucanase의 발현 및 분비

β -glucanase의 역가를 확인하기 위해 carboxymethyl cellulose로부터 환원당을 생성시키는 능력을 측정하였다. Table 2에서 보듯이 pAMB1과 pAMB3가 도입된 형질전환체 모두에서 β -glucanase가 배양액으로 분비되었으며 전체 효소역가 중 세포밖으로 분비된 비율은 약 60% 정도였다. 효모의 α -pheromone 분비신호서열을 이용하여 *Bacillus subtilis*의 β -1,3-1,4-glucanase를 효모에서 분비시켰을 때에는 85%의 효소가 분비된 것으로 보고된 바 있으며(15), mouse α -amylase는 *Saccharomyces cerevisiae*에서 90% 정도가 세포밖으로 분비된다고 보고된 바 있는데(18) 이에 비하면 본 실험에서 구성된 재조합 플라스미드에 존재하는 분비 체계는 비효과적이라고 이야기할 수 있다. 그러나 효모에서 이종단백질이 분비되는 기작은 분비신호서열의 구조와 단백질의 분자량 그리고 숙주의 종류 등에 따라 복합적인 영향을 받는 것으로 알려져 있기 때문에 단순한 비교는 할 수 없으며 본 분비체계에 β -glucanase 이외의 다른 단백질의 유전자를 도입하였을 때에는 다른 결과가 나올 수도 있다. 한편 발현정도를 증대시키기 위해 전사종결신호를 추가하였을 때에는 전체 효소역가가 2배 가량 증가하였으며 분비 비율에는 변화가 없었다.

본 실험에서는 고등한 진핵세포인 포유동물의 분비신호서열은 이용하여 원핵세포의 단백질을 진핵세포의 효모에서 분비시켰는데, 산업적으로 유용한 효모의 분비 벡터를 구성하기 위해서는 기존의 효모 자체의 분비신호서열 이외에 이종의 분비신호서열을 이용하는 방법 등도 포괄적으로 고려해야 될 것이다.

요 약

*Bacillus subtilis*의 β -1,4-glucanase 유전자와 *Saccharomyces cerevisiae*의 alcohol dehydrogenase isoenzyme I 유전자(ADHI)의 promoter와 mouse α -am-

ylase의 분비신호를 연결하여 분비형 플라스미드를 구성하였으며 이를 산업용 알콜생산 효모인 *Saccharomyces cerevisiae* 54에 도입하여 형질전환시켰다. 한편 β -glucanase 유전자의 발현정도를 증대시키기 위해 *CYC1* 유전자의 전사종결신호를 부가한 후 역시 *Saccharomyces cerevisiae* 54에 도입하였다. 형질전환체들은 carboxymethyl cellulose가 함유된 평판배지에서 β -glucanase를 분비하고 있음을 확인할 수 있었다. 전사종결 신호가 부가된 경우엔 전체역가가 2배 정도 증가하였다. 형질전환체들이 세포밖으로 분비한 효소역가는 전체의 60% 정도였다.

감사의 말

본 연구는 과학기술처인 특정연구 개발과제 연구비 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Kurjan, J. and I. Herskowitz: *Cell*, **30**, 933 (1982)
2. Hanes, S.D., V.E. Burn, S.L. Sturley, D.J. Tipper and K.A. Bostian: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **83**, 1675 (1986)
3. Singh, A., J.M. Lugovoy, N.J. Kohr and L.J. Porry: *Nucleic Acids Res.*, **12**, 8927 (1984)
4. Bitter, G.A., K.K. Chen, A.R. Banks and P. Lai: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**, 5330 (1984)
5. Miyajima, A., M.W. Bond, K. Otsu, K. Arai and N. Aria: *Gene*, **37**, 155 (1985)
6. Filho, S.A., E.V. Galembeck, J.B. Faria and C.S. Franscino: *BioTechnology*, **4**, 311 (1986)
7. Kanaya, E., T. Higashizaki, F. Ozawa, K. Hirai, M. Nishizawa, M. Tokunaga, H. Tsukui, H. Hatanaka and F. Hishinuma: *Gene*, **83**, 65 (1989)
8. Sleep, D., G.P. Belfield and A.R. Goodey: *BioTechnology*, **8**, 42 (1990)
9. Thomsen, K.K.: *Carlsberg Res. Commun.*, **48**, 545 (1983)
10. Jackson, E.A., G.M. Ballance and K.K. Thomsen: *Carlsberg Res. Commun.*, **51**, 445 (1986)
11. Nakamura, Y., T. Sato, M. Emi, A. Miyanohara, T. Nishide and K. Matsubara: *Gene*, **50**, 239 (1986)
12. Green, R., M.D. Schaber, D. Shields and R. Krainer: *J. Biol. Chem.*, **264**, 7559 (1986)
13. Kanaya, E., T. Higashizaki, F. Ozawa, K. Hirai, M. Nishizawa, M. Tokunaga, H. Tsukui, H. Hatanaka and F. Hishinuma: *Gene*, **83**, 65 (1989)
14. Jaconson, M.A., F.M. Forma, R.F. Buenaga, K.J. Hofmann, L.D. Schultz, R.J. Gould and P.A. Friedman: *Gene*, **85**, 511 (1989)
15. Zaworski, P.G., K.R. Marotti, U. Mackay, C. Yip and G.S. Gill: *Gene*, **85**, 545 (1989)
16. Livi, G.P., A. Ferrara, R. Roskin, P.L. Simon and P.R. Young: *Gene*, **88**, 297 (1990)
17. Seo, Y.S., Y.H. Lee and U.H. Pek: *Korean Biochem. J.*, **18**, 367 (1985)
18. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular cloning, a laboratory manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York (1982)
19. 박장서, 박용준, 이영호, 강현삼, 백운화: 한국 미생물학회지, **28**, 181 (1990)
20. Seo, Y.S., Y.H. Lee, U.H. Pek and H.S. Kang: *Kor. Jour. Microbiol.*, **24**, 236 (1986)
21. Zarek, K.S. and F. Sherman: *Cell*, **28**, 563 (1982)
22. Butt, T.R., S. Edmund, H. Jan and S.T. Crooke: *Gene*, **27**, 23 (1984)
23. Olsen, O.: *Carlsberg Res. Commun.*, **52**, 91 (1987)
24. Seo, Y.S., Y.H. Lee and U.H. Pek: *Korean Biochem. J.*, **18**, 367 (1985)
25. Miller, G.L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)

(Received May 22, 1991)