Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 19, No. 2, 128-134 (1991)

호알칼리성 *Bacillus* sp.의 Lactose 투과와 이용성

윤성식[1]* · 김창민[2] · 양 융 · 유주현
연세대학교 공과대학 식품공학과, [1]부천전문대학 식품영양학과,
[2]국립보건원 생물공학과

Transport and Utilization of Lactose by Alkalophilic *Bacillus* sp.

Yoon, Sung-Sik[1]*, Chang-Min Kim[2], Ryung Yang and Ju-Hyun Yu
Department of Food Engineering, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea
[1]Department of Food Science and Nutrition, Pucheon Junior College, Pucheon, Kyounggi-do 421-735, Korea
[2]Division of Biotechnology, National Institute of Health, Seoul 122-020, Korea

Abstract — To study the reduced growth and synthesis, previously reported, of β-galactosidase of alkalophilic *Bacillus* sp. YS-309 at the higher lactose concentration of 0.5% (w/v) in the medium, lactose transport and utilization were examined. The results showed that lactose transport was influenced by the addition of four kinds of antibiotics, and tetracycline stimulated most but not valinomycin. PEP-potentials of the cells grown on lactose was estimated lower than the cells on glucose and on galactose. Thus, the transport of lactose was independent of intracellular PEP and phosphorylation reactions, and was thought to be uptaked directly or oxidized in part in the transport process. In the other hand, once lactose was uptaked into the cells, it was hydrolyzed by β-galactosidase to glucose and galactose. The former was metabolized fast but the latter was accumulated. Galactose and lactose were not utilized until glucose was mostly depleted in the medium. The β-galactosidase synthesis decreased in the presence of glucose over 0.2% and galactose over 0.05 to 0.1%, respectively. In conclusion, it was considered for glucose as a repressor and galactose as a inducer for β-galactosidase synthesis even though the mechanisms were not elucidated. Catabolite repression of glucose on the enzyme synthesis was not relieved by the addition of exogeneous cAMP.

Lactose(유당)은 우유 중에 다량 함유되어 있는 이당류로서 미생물이 자화하려면 β-galactosidase(EC 3.2.1.23)를 생산하여 glucose와 galactose로 분해하여야 한다(1). β-galactosidase를 생산하는 미생물은 lactic acid bacteria 이외에도 여러 종이 보고되어 있다(2). 일반적으로 β-galactosidase 활성을 나타내는 미생물은 lactose에 의해 효소생산이 유도되는 반면 glucose에 의해 효소생산이 억제되는 현상으로부터 이들 탄수화물이 β-galactosidase 유전자 발현의 조절물질로 작용한다고 생각되고 있다(3). Inducer가 존재할 때 β-galactosidase 합성속도는 배지에 함유된 탄소원의 종류에 영향을 받으며 glucose 및 그 대사산물의 세포축적은 고농도의 inducer가 존재함에도 불구하고 효소합성을 억제한다. 이와 같은 현상은 Neidhart와 Magasanik에 의해 catabolite repression으로 정의되었다(4, 5). Chassy와 Thompson(6)은 *Lactobacillus casei*의 lactose 투과는 lactose-phosphotransferase system(Lac-PTS)을 통하여 이루어지며 세포내에서 phospho-galactosidase로 분해된다고 보고하였으며, 이 균의 starved cell은 고농도의 phosphoenolpyruvate(PEP)를 함유하였다고 보고한 바 있다.

일반적으로 미생물의 disaccharide 투과와 대사과정에는 다음 세 가지 mechanism이 알려져 있다(7, 8).

Key words: Alkalophilic *Bacillus* sp., β-galactosidase, lactose transport and utilization, catabolite repression
*Corresponding author

1) lactose가 균체 내부로 직접 투과되어 균체내 효소인 β-galactosidase의 작용을 받아 구성 단당류로 분해되는 과정으로 *E. coli*와 *Saccharomyces fragilis*은 대체로 이 과정을 통하여 이당류를 획득한다. 2) *Pseudomonas saccharophila*나 Lactic streptococci에서 보고된 바와 같이 glucose의 대사산물인 PEP의 존재하에서 disaccharide가 인산화되어 투과되는 과정이다. 이 과정은 group translocation이라고 불리우며, 투과과정 중 용질의 화학적 변화가 수반되는 특징이 있다. 가장 잘 알려진 것은 phosphoenolpyruvate dependent sugar phosphotransferase(PTS)이다(9, 10). 이 과정은 몇 종류의 membrane binding protein(permease)과 Mg^{2+}이 필요한 것으로 알려져 있다(11). PTS-system은 특히 procaryote에 널리 분포하고 있는 투과과정으로 여기에 속하는 미생물은 Entner-Doudoroff pathway를 가지는 strict anaerobes와 대부분의 facultative anaerobes 등이다(6). 이 경우 sucrose는 sucrose-1-phosphate로 투과된 다음 glucose-1-P와 fructose로 분해되며, lactose는 lactose-6-P로 투과된 다음 균체 내부에서 glucose와 galactose-6-P로 대사된다(12). 3) 산화과정으로 lactose가 lactose dehydrogenase에 의해 lactobionate로 투과되어 gluconate와 galactose로 대사되는 것으로 *Pseudomonas graveolens*에서 보고되었다(8).

전보(13)에서 저자들은 호알칼리성 세균 *Bacillus* sp. YS-309를 유일한 탄소원으로 lactose를 배지 중에 첨가하여 균체생육과 효소생산을 측정한 결과 lactose 함량이 0.5%(w/v)까지는 첨가농도가 높을수록 균체생육과 β-galactosidase 생산량이 모두 증가하였으나 그 이상의 농도에서는 오히려 감소함을 관찰하고 이 현상을 lactose 또는 그 분해물이 lactose의 세포막 투과를 저해하거나 균체생육 또는 β-galactosidase 생합성을 억제한 결과로 보고한 바 있다. 따라서 본 연구는 고농도 lactose의 균체생육 및 β-galactosidase 생성 억제현상을 파악하고자 lactose 투과성 및 이용성을 연구한 결과이다.

재료 및 방법

균주의 배양과 생육 측정

β-Galactosidase를 생산하는 *Bacillus* sp. YS-309주는 전보(13, 15)에 기술한 바와 같이 진탕 배양하였으며, 균체생육을 550 nm에서 측정하였다.

당 정량

배지 중에 함유된 glucose, galactose 및 lactose의 양은 Nickerson 등의 방법(14)에 준하여 각각 425 nm, 710 nm 및 540 nm에서의 흡광도로 표시하였다.

효소활성 측정

균체 내에 존재하는 몇 종류의 효소활성을 측정하였다. 배양이 끝난 균체를 원심분리하여 100 mM Na-phosphate buffer(pH 7.5)로 2회 세척하였다. 동일 완충액에 균체를 현탁시키고 Ice-bath 중에서 Sonicator(Fischer)로 10초 간격으로 3~5회 초음파 처리하여 완전히 파쇄한 다음 15,000 rpm으로 1분간 원심분리하여 얻은 상징액을 조효소액으로 하였다. Lactose dehydrogenase는 2,6-dichlorophenol indophenol을 조효소액, lactose와 반응시켜 환원되는 양을 590 nm에서 측정하였으며(8), β-galactosidase 활성은 전보(15)에 따라서 PNPG를 기질로 사용하였고, lactose phosphorylase 활성(8)은 p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside phosphate(PNPG-P)를 기질로 사용하여 37℃에서 반응시킨 후 405 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Permeabilized cell의 조제

당에 대한 membrane의 영향을 최소화하기 위하여 permeabilized cell을 cold toluene-acetone 혼합용액(1 : 9)을 처리하여 Chassy와 Thompson의 방법(6)으로 제조하였다.

PEP-potential 측정

PEP-potential은 phosphoenolpyruvate(PEP), 2-phosphoglycerate(2-PG), 3-phosphoglycerate(3-PG)의 세포 내 합으로 ONPG-hydrolysis법(16)으로 측정하였다.

Galactosidase의 세포내 분포

효소의 균체내 분포는 Cornelis 등의 방법(17)을 따라서 실시하였다.

Lactose의 투과

Lactose의 투과는 lactose 유사체인 PNPG를 이용

하여 측정하였다. 0.1%의 lactose가 함유된 배지에 공시균주를 접종하고 충분히 배양하여 starved cell을 얻었다. 균체를 원심분리하여 회수한 다음 100 mM Na-phosphate buffer(pH 7.5)으로 2회 세척하고 Tris-maleate 완충액(pH 7.5)에 재현탁시켰다. 이것을 PNPG가 함유된 동일 완충액과 혼합하여 O.D.값을 조정한 다음 30℃에서 일정시간 반응시키고 반응액과 동량의 0.4 M Na_2CO_3를 첨가한 다음 즉시 Sonicator로 세포막을 파괴하였다. 원심분리로 cell debris를 제거한 시료를 405 nm에서 흡광도를 측정하였다. Lactose 투과에 미치는 해당 저해제 및 항생제의 영향은 미리 이들 시약을 PNPG가 함유된 Tris-maleate 완충액에 용해하여 상기와 같은 방법으로 실시하였다.

시약

Valinomycin, p-chloromercuribenzoate(p-CMB), sodium azide, sodium fluoride, iodoacetate, ampicillin, streptomycin sulfate, tetracyclin은 Sigma 제품을 PNPG, PNPG-P, 2,6-dichlorophenol indophenol 등 chromogen substrate는 Fluka 제품을, 그리고 기타 시약은 특급 시약을 각각 사용하였다.

결과 및 고찰

Lactose의 세포막 투과성

항생물질의 영향 : Lactose 배지상에서 자란 균체에 4종의 대표적 항생물질을 이용하여 기질인 PNPG의 투과에 미치는 영향을 검토한 결과(Table 1), ampicillin, streptomycin, tetracyclin은 기질의 세포막 투과를 상승시켰으며 특히 tetracycline이 가장 크게 기질투과를 촉진시켰다. 또한, ionophore인 valinomycin을 첨가한 시험구에서는 기질의 세포막 투과가 대조구와 거의 비슷한 정도로 나타났다. 이 결과로부터 lactose 투과는 phosphorylation과 무관하게 이루어진다고 생각되었다.

Table 1. Effect of antibiotics on the permeability of lactose into *Bacillus* sp. YS-309

Antibiotics	Enzyme activity (Units/ml)	Permeability(%)
Control	6.87	100
Ampicillin	8.0	110
Streptomycin sulfate	7.07	103
Tetracycline	8.78	127
Valinomycin	7.21	105

Lactose induced cells were harvested at logarithmic growth and washed twice by 100 mM Na-phosphate buffer containing 1 mM $MgCl_2$ and Washed cells and PNPG were reacted in the presence of each antibiotics (10 μg/ml) at 37℃ for 15 min.

해당 저해제의 영향 : PNPG의 세포막 투과에 미치는 해당 저해제의 영향을 검토한 결과는 Fig. 1과 같다. 균체농도를 변화시키면서 PNPG의 투과성을 조사한 결과 NaF, NaN_3, iodoacetate(IAA)는 투과에 영향을 미치지 않았다. 즉 해당 저해제의 존재하에서도 대조구와 비슷한 양이 투과된다는 점은 PNPG나 lactose같은 기질의 투과에 ATP와 해당 중간체들이 직접 관여하지 않는다고 생각되었다. 단, p-chloromercuribenzoate(p-CMB)는 1 mM 농도에도 whole cell의 기질투과를 강력하게 억제하였는데 이것은 p-CMB가 lactose나 PNPG의 투과를 담당하는 carrier protein의 activity를 저해하기 때문이며, 이 protein의

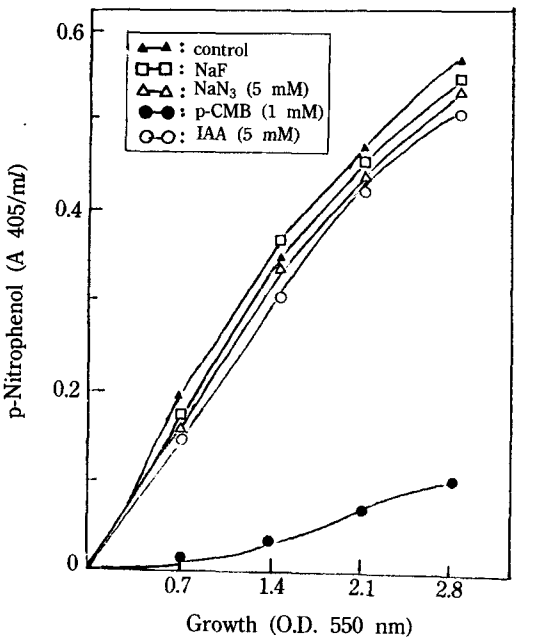

Fig. 1. Effect of glycolytic inhibitors on PNPG uptake by *Bacillus* sp. YS-309.
The cells were suspended at some densities in 50 mM Tris-maleate buffer (pH 7.5) containing 0.2 ml of PNPG (mg/ml) at 37℃ for 30 min.

Table 2. Effect of glucose and galactose on the intracellular PEP-potentials of *Bacillus* sp. YS-309 pre-grown on lactose

Sugars added (20 mM)	PEP-potential[a)]
Glucose	0.19
Galactose	0.10
None (lactose0	0.05

[a)] Each sugars was added to the culture at 18 hr after inoculation and PEP-potentials were determined for the starved cells.

catalytic site에는 -SH group를 가지는 cysteine 잔기가 관여한다고 생각되었다. Thompson(16)은 cysteine이 관여하는 permease를 보고한 바 있다.

PEP-의존성 : PEP는 glycolytic pathway의 중간대사산물로서 세균에 있어서 세포막 투과에 대한 당류의 translocation에 관여하는 고에너지 인산화합물이다. 균체내의 PEP 함량은 PEP-potential을 측정하는데 이것은 phosphoenolpyruvate, 2-phosphoglyceric acid 및 3-phosphoglyceric acid 농도의 합으로 정의된다. Table 2는 starved cell 내부에 존재하는 PEP-potential을 측정하여 glucose, galactose 및 lactose의 투과에 대한 PEP의 영향을 조사한 것이다. 실험결과 PEP는 glucose와 galactose 배지에서 배양한 균체 내부에서 PEP 함량이 높았으며, lactose 배지에서 자란 균체는 함량이 낮게 측정되었다. 따라서 glucose와 galactose의 투과에는 PEP가 관여하여 인산화된다고 생각되었으나 lactose의 투과는 PEP의 존재와 거의 관계없이 이루어지며, 이것은 valinomycin을 첨가하여 얻은 결과와 일치된 결과로 생각되었다. Thompson(16), Egan과 Morse(18)은 각각 *Streptococcus lactis*와 *Staphylococcus aureus*에서 lactose의 PEP-dependent phosphotransferase system (PEP-Lac-PTS)을 보고한 바 있다.

Lactose 분해효소 : Table 3은 세포 내부에 존재하는 lactose 대사와 관련된 효소의 활성을 검토한 결과이다. YS-309주는 lactose dehydrogenase와 β-galactosidase를 모두 생산하였으나 phospho-β-D-galactosidase는 생산하지 않았다. 따라서 배지 중의 lactose는 직접 투과되거나 혹은 lactose dehydrogenase에 의해 산화되면서 부분적으로 lactobionate로 투과된 다음 분해된다고 생각되었다. 대조구로 사용한

Table 3. Detection of enzyme activities related to lactose utilization by *Bacillus* sp. YS-309 and *Escherichia coli* HB101

Enzyme	Substrates	Enzyme activity	
		HB101	YS-309
Lactose dehydrogenase	Lactose	−	−
β-Galactosidase	PNPG	+	++
Phospho-β-galactosidase	PNPG-P	−	−

Symbol; −: negative, +: weak, ++: strong
PNPG: p-Nitrophenyl-β-D-galactopyranoside
PNPG-p: p-Nitrophenyl-δ-D-galactopyranoside phosphate

Table 4. Distributions of β-galactosidase in *Bacillus* sp. YS-309 and *Escherichis coli* HB101

Strain	Total enzyme activity(Units/ml)	Distributions(%)			
		Ex	Peri	Cyto	Total
YS-309	4.62	17.4	0	82.6	100
HB101	0.57	5.2	0.9	93.9	100

Ex: extracellular, Peri: periplasmic, Cyto: cytosolic

E. coli HB101은 β-galactosidase 활성만 존재하였다. Table 4는 β-galactosidase의 세포내 분포를 나타낸 것이다. 분리균은 전체 효소의 80% 이상이 세포질에 존재하였으며 일부는 세포 밖으로 분비되었다. 한편, *E. coli*의 효소는 93.9%가 세포질에 존재하는 것으로 나타났으며, 이것은 다른 연구자들(19)의 결과와 일치하였다. 두 균주의 상대적 효소활성도 YS-309주는 *E. coli* HB101의 효소활성의 약 8배 정도의 높은 활성을 가짐이 확인되었다.

Lactose 이용성과 β-galactosidase 생성

Lactose의 이용성 : 일단 세포 내부로 들어온 lactose가 *Bacillus* sp. YS-309의 세포질에서 대사되어 β-galactosidase 생성에 어떠한 영향을 미치는가를 검토하였다. 0.5% lactose를 단일 탄소원으로 사용한 배지에서 균체를 배양하면서 배지 중에 존재하는 잔당량을 경시적으로 측정한 결과는 Fig. 2와 같았다. Glucose의 잔당량은 배양 후부터 빠르게 감소하였고 lactose는 배양 후 10시간이 경과한 다음부터 감소하는 경향을 나타냈으나, galactose는 배양 후 4시간이 지난 후부터 서서히 증가하여 배지 중에 축적되는

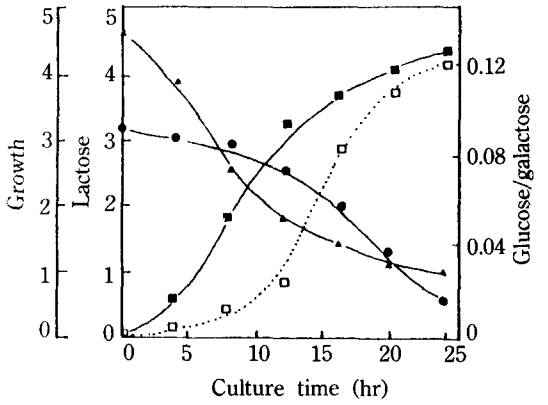

Fig. 2. Time course of residual carbohydrate concentrations in the medium containing lactose, 0.5%.
●—●: lactose at 540 nm, ▲—▲: glucose at 425 nm, ■—■: galactose at 710 nm, □—□: growth at 550 nm

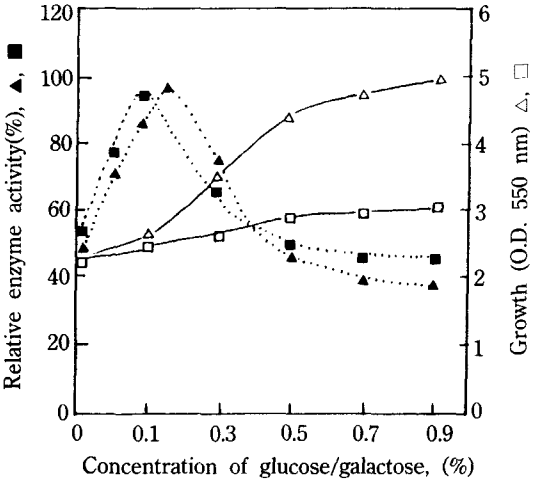

Fig. 3. Effect of glucose and galactose concentrations on the cell growth (—) and β-galactosidase production (---).
▲, △: Glucose, ■, □: Galactose

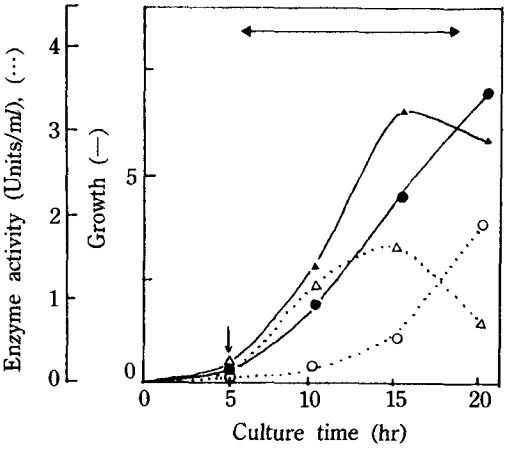

Fig. 4. Effect of galactose addition on the β-galactosidase production of *Bacillus* sp. YS-309 in the medium containing lactose.
▲, △: lactose, ●, ○: lactose plus galactose (40 mM)

경향이 나타났다. *Streptococcus thermophilus*는 lactose를 발효할 때 세포 내에 생성된 glucose는 빠르게 이용하지만 galactose는 거의 이용하지 않았으며 오히려 배지 중에 방출하였다고 한다(8). O'Leary와 Woychik(20)도 lactose 분해에 의한 galactose의 축적현상을 보고한 바 있다. 한편, 균체의 생육은 8시간이 경과한 때부터 대수기에 들어갔으며 배양 20시간이 지난 후에는 정상기가 되었다. 이상의 실험결과로부터 lactose는 세포내 β-galactosidase에 의하여 glucose와 galactose로 분해되면서 glucose는 미생물의 생육에 사용되고 galactose는 배지 중에 축적되는 것으로 나타났다. 따라서 glucose와 축적된 galactose가 균의 생육과 효소생산에 영향을 준다고 추정하였다.

Glucose와 galactose의 영향 : 이러한 추정을 확인하기 위하여 lactose에서 자란 YS-309 종배양액을 glucose 또는 galactose 배지에 접종하여 균체생육과 생산된 효소활성을 검토하였다. Fig. 3에 나타난 결과와 같이 효소생산은 0.05~0.1%의 galactose 농도에서 최대였고 그 이상에서는 당의 농도가 높을수록 감소하는 경향을 나타냈다. 균체생육은 당농도에 따라 근소하게 계속 증가하였다. Glucose를 배지에 첨가한 경우는 효소생산의 최적 당농도는 0.2%였다. 두 당의 효과를 비교하면 당의 함량이 대략 0.4%보다 높은 농도에서는 glucose가 galactose에 비하여 생육된 균체량이 많았으나 그와 반대로 생성된 효소량은 적었다. 즉, YS-309주는 galactose보다 glucose를 더 빨리 자화하여 생육하지만 효소생산에 대하여 galactose가 glucose보다 저농도에서 억제력이 크다는 것을 알 수 있었다.

Galactose 및 glucose의 첨가영향 : Fig. 4는 lactose가 0.2% 함유된 배지에 YS-309주를 5시간 동안 배양한 다음, galactose를 40 mM되게 첨가한 다음 경시적으로 균체생육과 효소활성을 조사한 결과이다. Galactose 첨가구는 대조구보다 약 12~13시간 동안

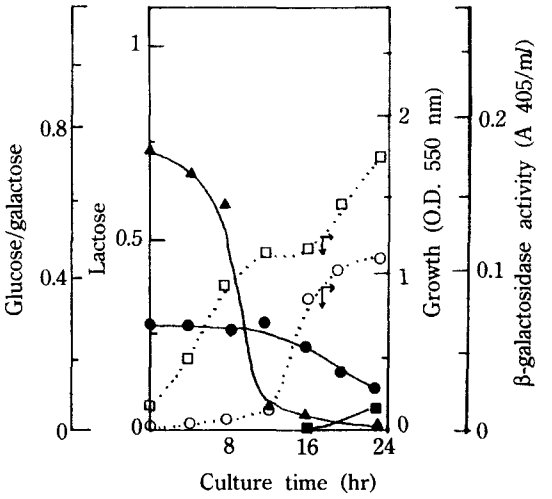

Fig. 5. Changes of carbohydrate concentrations in the spent medium and β-galactosidase productions of *Bacillus* sp. YS-309 in the medium containing of glucose (0.1%) and lactose (0.1%).
●—●: lactose at 540 nm, ▲—▲: glucose at 425 nm, ■—■: galactose at 710 nm, ○---○: β-galactosidase activity at 405 nm, □---□: cellular growth at 550 nm

균체생육 속도가 지연되었으며 효소생산도 억제되었다. 이와 같은 현상은 세포막에 존재하는 carrier protein에 대한 lactose의 결합을 galactose가 경쟁적으로 저해하기 때문으로 추측되었다. 따라서 lactose 대사에 따라 배지에 축적되는 galactose도 균체생육의 저해물질로 작용할 수 있다고 생각되었다.

한편, glucose와 lactose를 혼합한 배지(Fig. 5)에서는 glucose가 먼저 이용되었으며 glucose가 이용되고 있는 동안에는 lactose의 소모도 일어나지 않았고 galactose의 양도 축적되지 않았다. Lactose는 glucose가 전부 소모된 후에야 비로소 이용되기 시작하였으며 β-galactosidase도 lactose 이용과 함께 크게 증가하였다. 균체생육은 *E. coli*에서 보고된 catabolite repression의 전형적인 2단계 생육이 일어남을 관찰할 수 있었다. Glucose와 galactose가 각각 0.1%씩 함유된 배지에서도 lactose와 glucose 함유 배지의 경우와 매우 유사한 생육양상이 나타났다. 이 경우도 glucose가 대부분 소모된 시점인 배양 12시간 후 galactose가 이용되었으며 이 때 β-galactosidase 활성이 증가하는 것으로 보아 galactose는 유도효과가 있다고 생각되었다(Fig. 6).

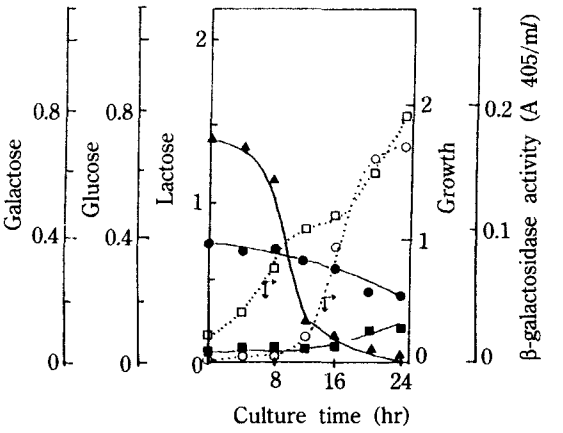

Fig. 6. Changes of carbohydrate concentrations in the spent medium and β-galactosidase production of *Bacillus* sp. YS-309 in lactose medium containing glucose (0.1%) and galactose (0.1%).
●—●: lactose at 540 nm, ▲—▲: glucose at 425 nm, ■—■: galactose at 710 nm, ○---○: β-galactosidase activity (A 405 nm/ml), □---□: growth at 550 nm

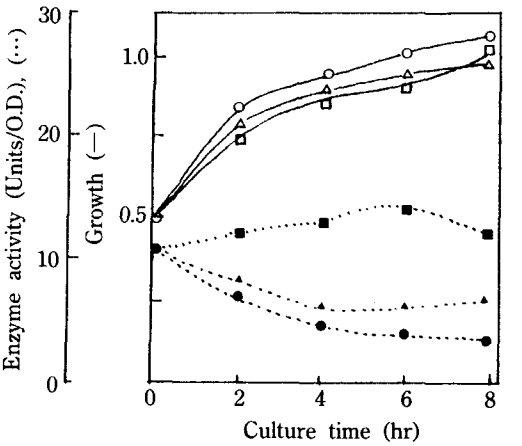

Fig. 7. Effect of cyclic AMP on the catabolite repression for *Bacillus* sp. YS-309 in the medium containing glycerol as a carbon source.
●, ○: addition of glucose (0.1%), ▲, △: addition of glucose (0.1%) plus cAMP (10 mM), ■, □: control

cAMP의 영향 : Fig. 7은 glucose 첨가에 의한 catabolite repression을 cAMP가 해소할 수 있는가 없는가의 여부를 조사한 결과이다. 유도기질인 lactose에서 자란 종배양액을 glycerol 배지에 접종한 다음 cAMP와 glucose를 첨가하고 균체당 생성되는 효소활성을 경시적으로 측정한 경우, glucose에 의한 catabolite repression을 해소시키지 못하였다. 이 결과는

외부에서 첨가한 cAMP는 catabolite repression을 해소시키지 못하였다는 Wanner 등(3)의 보고와 대략 일치하였다. Maksam과 Sutherland(21)는 glucose는 세균 균체내부의 cAMP 농도를 낮출 뿐만 아니라 inducer의 세포막 투과를 방해하여 유도효소의 합성을 저해한다고 보고하였고, Hasan과 Durr(22)는 *Lactobacillus plantarum*의 β-galactosidase 연구에서 cAMP 첨가가 glucose에 의한 catabolite repression을 해소하지 못할 뿐만 아니라 induction을 촉진하지도 못하였다고 주장한 바 있다.

요 약

호알칼리성 *Bacillus* sp. YS-309의 lactose 투과와 이용에 관하여 연구하였다. 실험결과 lactose의 투과는 항생물질의 종류에 따라서 영향을 받았으며 tetracycline이 촉진효과가 가장 우수하였고 valinomycin은 대조구와 비슷하였다. Lactose 배지에서 자란 starved cell의 PEP-potential도 glucose나 galactose를 이용할 때보다 낮게 측정되었다. 따라서 lactose 투과는 PEP의 존재나 phosphorylation과는 무관하게 일어나며 세포막에는 carrier protein이 존재하는 점이 시사되었다. 한편, 세포내로 들어온 lactose는 β-galactosidase에 의해 분해되어 glucose는 빠르게 이용되나 galactose는 세포내에 축적되었다. 또 세포내 축적된 galactose나 배지 중의 lactose 및 galactose는 glucose가 존재할 때는 이용되지 않고 glucose가 소모되면 비로소 이용되는 것으로 나타났다. Glucose와 galactose는 β-galactosidase 합성에 영향을 미쳤으며, glucose는 0.2%, galactose는 0.05~0.1% 이상의 농도로 배지에 존재할 때 효소합성을 저해하였다. 정확한 기전은 알 수 없으나 세포내 glucose와 galactose는 각각 β-galactosidase 생성의 repressor와 inducer로 작용하는 것으로 생각되며 glucose의 β-galactosidase 합성에 대한 catabolite repression은 cAMP 첨가에 의해 해소되지 못하였다.

References

1. Richmond, M.L., J.I. Gray and C.M. Stine: *J. Dairy Sci.*, **64**, 1759 (1981)
2. Wallenfels, K. and R. Weil: Beta-galactosidase; The enzymes, Vol. 7, Boyer ed, AP, pp. 616-663 (1972)
3. Wanner, B.L., R. Kodaira, and F.C. Neidhardt: *J. Bacteriol.*, **136**, 947 (1978)
4. Neidhardt. F.C. and B. Mogasanik: *Nature* (London), **178**, 801 (1956)
5. Paigen, K. and B. Williams: Advancesin Microbial physiology, Vol. 4, p. 254, Rose and Wilkinson eds, Academic press (1970)
6. Chassy, B.M. and T. Thompson: *J. Bacteriol.*, **154**, 1195 (1983)
7. Dills, S.S., A. Apperson, M.R. Schmidt, and M.H. Saier Jr.: *Microbiological Reviews*, **44**, 385 (1980)
8. Vakil, J.R. and K.M. Shahani: *J. Dairy Sci.*, **52**, 162 (1968)
9. McKay, L.L., A. Miller III, W.E. Sandine and P. R. Elliker: *J. Bacteriol.*, **102**, 804 (1970)
10. Thompson, J. and T.D. Thomas: *J. Bacteriol.*, **130**, 583 (1977)
11. Thompson, J.: *J. Bacteriol.*, **136**, 456 (1978)
12. Crow, V.L., G.P. Davey, L.E. Pearce and T.D. Thomas: *J. Bacteriol.*, **153**, 76 (1983)
13. Yoon, S.S., D.S. Min, and J.H. Yu: *Kor. J. Food and Nutrition*, **1**, 68 (1988)
14. Nickerson, T.A., I.F. Vujicic and A.Y. Lin: *J. Dairy Sci.*, **59**, 386 (1976)
15. Yu, J.H. and S.S. Yoon: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **17**, 587 (1989)
16. Thompson, J.: *J. Bacteriol.*, **140**, 774 (1979)
17. Cornelis, P., C. Digneffe and K. Willemot: *Mol. Gen. Genet.*, **186**, 507 (1982)
18. Egan, J.B. and M.L. Morse: *Biochim. Biophys. Acta.*, **122**, 63 (1966)
19. Craven, G.R., E. Jr. Steers and C.B. Anfinsen: *J. Biol. Chem.*, **240**, 2468 (1965)
20. O'Leary, V.S. and J.H. Woychik: *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 89 (1976)
21. Maksam, R.S. and E.W. Sutherland: *J. Biol. Chem.*, **240**, 1309 (1965)
22. Hasan, N. and I.F. Durr: *J. Bacteriol.*, **120**, 66 (1974)

(Received February 6, 1991)