

단백질분해효소를 생성분비하는 호알칼리성 Coryneform bacterium TU-19의 분리 및 동정

최명철¹ · 양재섭² · 강선철*

¹대구대학교 생물학과, ²분자생물학과, 생물공학과

Isolation and Identification of an Alkalophilic Coryneform bacterium TU-19 Producing Extracellular Protease(s). Myoung-Chul Choi¹, Jae-Sub Yang² and Sun-Chul Kang*. ¹Department of Biology, ²Department of Molecular Biology, Department of Biotechnology, Taegu University, Taegu 712-714, Korea — An alkalophilic bacterium producing alkaline protease(s) was isolated from soil. It was a Gram-positive, non-sporulating, immobile, irregular rod, strictly aerobic, and weak acid-forming bacterium. The morphological, physiological, and biochemical characteristics of the isolate resembled those of the Coryneform bacteria. However, there was not any species within this genera to which this microorganism can be closely matched. Therefore, it is provisionally identified as a Coryneform bacterium TU-19.

단백질분해효소는 1913년에 Boidin과 Effront에 의해서 *Bacillus subtilis*로부터 열안정성이 높은 α -amylase와 더불어 발견되었다. 그 후 1947년 Linderstrom과 Othesen이 *Bacillus licheniformis*로부터 알칼리성 단백질분해효소 Subtilisin Carlsberg를 발견하였고, 1967년에는 Werker와 Campbell가 *Bacillus amyloliquefaciens*로부터 Subtilisin Novo(Subtilisin BPN)를 발견하였다. 1971년에 호알칼리성 세균인 *Bacillus* sp.로부터 알칼리성 단백질분해효소(1)가 발견된 후부터 대부분 연구진들은 세제, 연육가공, 탈모공정 등에 있어 알칼리성 단백질분해효소의 탁월한 유용성(2) 때문에 활성이 높고, 안정된 성질을 갖는 새로운 균주 선별에 많은 노력(3-5)을 기울여 왔으며, 또한 이들 효소에 대한 분비기작(6), 삼차원적 구조(7), 불활성 기작(8), 단백질공학적인 방법에 의한 구조적 안정화(9), 면역학적 비교연구(10), amino acid 배열순서 및 비교분석(11), 저해물질(12), 유전자 조작 및 발현(13) 등에 관하여 폭 넓은 연구가 이루어 졌다.

한편 국내에서도 알칼리성 단백질분해효소에 관한 연구가 효소세제의 첨가물로서 관심이 점차 증가되어져 새로운 균주 선별에 각별한 노력을 기울여 왔다. 그러나 연구 대상 균주는 대부분 *Bacillus* sp.에 국한(14, 15)되어 있고 그외 *Alteromonas* sp., *Xanthomonas* sp., *Pseudomonas* sp., *Streptomyces* sp.(16-19) 등이 연구되고 있다. 따라서 균주의 선별과정에서 *Bacillus* sp.만 제외하더라도 독특한 성질을 갖는 새로운 균주를 분리할 기회가 훨씬 증가될 것이다.

본 논문에서는 이러한 전략에 따라 강알칼리 조건에서 성장하면서 단백질분해효소를 다량 생성분비하는

미생물을 토양으로부터 분리하고 이 균주의 형태적, 생리생화학적 특징에 기초한 동정결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

토양시료 및 미생물 분리용배지

실험에 사용한 미생물은 경상북도 일대의 축사주변의 폐수, 퇴비, 채소밭, 과수원 등의 토양으로부터 균을 분리하여 사용하였다. 호알칼리성 미생물을 분리하는데 사용한 선별배지는 liter당 glucose 10 g, tryptone 10 g, yeast-extract 5 g, K_2HPO_4 1 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.2 g으로 조성하였다. 배지의 pH는 별도로 멸균한 Na_2CO_3 를 첨가하여 10.5로 맞추었다. 또한 단백질분해효소를 생성분비하는 미생물의 분리를 쉽게 하기 위하여 선별배지에 5% skim milk(W/V)를 첨가하여 사용하였다.

미생물의 분리 및 선별

토양시료 1 g을 멸균증류수 5 ml에 현탁시킨 후 적절한 농도로 희석하여 한천평판배지에 도말하여 30°C에서 24~72시간 배양하였다. 단백질분해효소를 생성분비하는 미생물의 선별은 균체의 생육이 좋고 투명대가 큰 것으로 정하였다. 일차선별된 균체는 최종선별을 위하여 사면배지에 옮겨 4°C에 보관하였다. 균주의 이차선별은 일차적으로 분리된 균주를 액체배지에 재접종하여 30°C에서 48시간 진탕배양한 후 배양상등액에 존재하는 단백질분해효소의 활성을 측정해서 상대적으로 효소활성도가 높은 균주를 선별하였다.

미생물의 동정

분리된 균주의 동정은 Microbiology, a laboratory manual(20) 및 Bergey's manual of determinative bac-

*Corresponding author.

Key words: Alkalophilic bacterium, alkaline protease, Coryneform bacterium TU-19

teriology(21)에 기재된 방법에 따라 실시하였다. 형태적 특징은 광학 및 전자현미경(Hitachi H-600)으로 관찰하였다. Komagata 등(22)이 제안한 화학적 분류방법에 따라 menaquinone 분석, fatty acid methyl esters(FAMES) 분석, diaminopimelic acid 분석 등을 행하였다.

단백질분해효소의 활성측정

단백질분해효소의 활성은 Yanagida 등(23)의 방법을 변형하여 측정하였다. 기질용액(0.6% Hammerstein casein 용액)은 50 mM sodium bicarbonate 완충용액(pH 10.5) 100 ml에 casein 0.6 g을 녹이고, 5분간 중탕가열하여 제조하였다. 효소반응은 적절히 희석한 효소용액(최대 120 μl)을 기질용액(600 μl)과 혼합하여 30°C에서 30분간 반응시켰다. 이후에 TCA 혼합용액(0.11M Trichloroacetic acid, 0.22M Sodium acetate, 0.33M Acetic acid, glacial) 600 μl를 첨가하여 반응을 중지시켰다. 이때 효소역가는 이 효소반응물을 30분동안 실온에 방치한 뒤 원심분리하여(15,000 rpm, 15분) 상등액에 대한 흡광도(A₂₇₅)를 측정함으로써 결정되었다. 효소활성도 1 unit는 30°C에서 30분간 효소를 기질과 반응시켰을 때 흡광도(A₂₇₅)가 1.0 증가하는 효소의 양으로 정하였다.

결과 및 고찰

분리균주의 형태적 특징

일차 선별과정에서 분리된 균주는 대부분 Gram 양성이며 포자를 형성하고 간균의 형태를 지니며, 운동성이 있고, catalase 양성으로서 *Bacillus* sp.에 속하는

Table 1. Morphological and cultural characteristics of the strain TU-19.

Tests	Characteristics
Gram staining	+
Form	Irregular rod
Size	0.3~0.7 μm × 0.4~3.0 μm
Rod-coccus cycle	+
Motility	-
Spore	none
Cell division	bending type
Pleomorphism	not distinctive
Gross growth appearance	entire, smooth, convex and circular
Major pigment produced	yellow orange
Optimum growth pH	10.0
Optimum growth temperature	30°C
Growth in 2.0% NaCl	+

Symbols: +: positive, -: negative

균이었다. 앞서 언급한 바와같이 *Bacillus* sp.에서 생성되는 단백질분해효소에 대한 연구는 폭 넓게 이루어졌으므로, Gram 염색 및 전자현미경적 형태관찰을 기초로 하여 *Bacillus* sp.를 동정과정에서 제외하고 그 이외의 새로운 균주를 선별하였다. 이와같은 선별기준에 따라 분리된 균들 중에서 가장 효소활성이 높은 TU-19 균주를 최종적으로 선별동정하였다. 분리된 TU-19 균주는 알칼리성 배지에서만 성장이 가능하므로 일반적으로 중성배지에서 확립된 분류방법으로는 균주의 동정이 매우 어려웠다.

본 균주는 Gram 양성이며, 포자를 형성하지 않고, 불규칙적인 간균형태를 지니고 있는 세균으로서(Table 1, Fig. 1), Bergey's manual of Systematic Bacteriology Vol. 2의 section 15에 속하였다. Fig. 1에 보여진 바와같이 이 균은 간균-구균의 생활사를 하며 bending

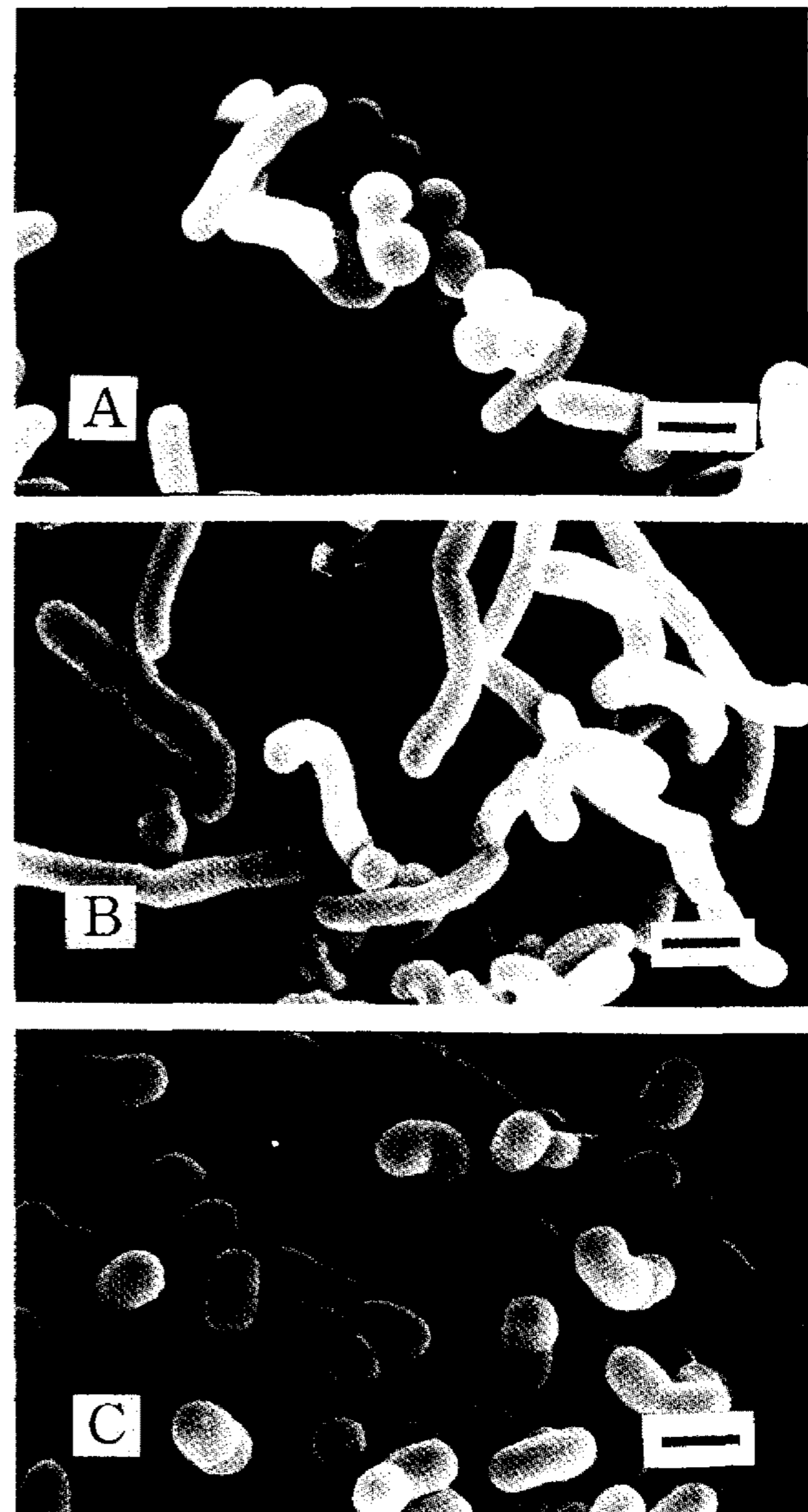


Fig. 1. Scanning electron micrographs of the strain TU-19. (Bar: 1 μm). A: 8 hours, B: 16 hours, C: 60 hours culture.

Table 2. Biochemical and physiological characteristics of the strain TU-19.

Tests	Characteristics
Oxygen requirement	strictly aerobic
Catalase	+
Urease activity	+
Lipid hydrolysis	w
Casein hydrolysis	+
Gelatin liquefaction	+
Starch hydrolysis	-
production of H ₂ S	-
production of indole	-

Symbols: +: positive, -: negative, w: weak (7~20 days)

type의 세포분열을 하여 간혹 V자형으로 관찰되며 branching은 관찰되지 않았다. 배양상 특징은 오래된 균체의 세포는 구균형태로 보이며 pleomorphism이 뚜렷하지는 않으나 드물게 관찰되기도 하였다. 본 균주의 평판배지상에서의 형태적 특징은 circular, opaque, smooth, entire, yellow orange 색상을 나타내었다. 생리학적 특징은 Table 2와 같으며 catalase(+), urease (+) 등의 특징을 나타내었다. 또한 분리균주는 탄소원으로 glucose, sucrose 및 raffinose를 이용하지만, lactose 등은 이용하지 못하였으며, 산의 생성은 매우 느리게 일어났다(Table 2, 3).

이상의 형태적, 생리생화학적 특징들(Fig. 1, Table 1~3)은 Coryneform bacteria의 분류학적 특징과 대부분 일치하였다(24). Coryneform 세균은 동, 식물의 병원균이 되기도 하지만, 여러가지 아미노산이나 핵산 등의 발효생산에 사용되는 산업적으로 매우 중요한 균주이다(25). 여기에 속하는 것들은 *Corynebacterium*, *Microbacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* 및 *Brevibacterium* 등이 있지만, 알칼리성 환경하에서 성장하는 Coryneform bacteria에 대한 연구는 거의 이루어져 있지 않고 있다. Yamada 등(26)은 Coryneform bacteria의 세포분열방식, 세포벽의 amino acid 조성, DNA의 guanine-cytosine 함량 및 다양한 생화학적, 생리학적 특징을 기초로 한 분류법을 도입하고 있다.

한편 Komakata 등(22)은 세포벽의 menaquinone 성분분석을 통하여 화학적인 균주동정 방법을 시도하였는데 분리균주를 이 방법에 따라 조사해 보면, 이 균은 menaquinone-7(MK-7)과 menaquinone-8(MK-8)이 각각 50%씩 존재하였다(Table 4). *Bacillus* sp.는 주로 MK-7을 가지고 있고, MK-8, 9, 11 등은 Coryneform 세균에 존재하는 것으로 알려져 있다(22). 그러나 분리균주는 위 성분을 2가지 모두 가지고 있는 것으로 나타났기 때문에 위의 두 group과 일치하지 않았다. 또한 세포벽의 peptidoglycan 성분 중에서 2,6-Diaminopimelic acid(DAP)의 존재유무가 Gram 양성 세균의 세포벽

Table 3. Assimilation of various carbon sources by the strain TU-19.

Carbon sources	
α-Cyclodextrin	+
Dextrin	V
Inulin	+
Tween 40	V
N-acetyl-D-glucosamine	+
N-acetyl-D-mannosamine	V
D-arabitol	V
Cellobiose	+
L-fucose	+
D-galacturonic acid	+
D-gluconic acid	+
m-inositol	V
α-methyl-D-mannoside	+
Psicose	+
Rhamnose	+
Salicin	+
D-sorbitol	+
Sucrose	V
D-trehalose	+
Xylitol	+
Acetic acid	+
β-hydroxybutyric acid	+
Lactamide	+
α-ketoglutaric acid	+
L-lactic acid	+
D-malic acid	+
methyl pyruvate	+
Propionic acid	+
Succinamic acid	+
Alaninamide	+
D-alanine	+
L-alanyl-glycine	+
L-glutamic acid	+
L-pyroglutamic acid	+
Putrescine	+
Glycerol	V
2-deoxyadenosine	V
Thymidine	V
Glucose-1-phosphate	+
Glucose-6-phosphate	+
Fructose-6-phosphate	+
β-Cyclodextrin	+
Glycogen	V
Mannan	+
Tween 80	V
Amygdalin	V
L-arabinose	V
Arbutin	+
D-fructose	+
D-galactose	+

Table 3. Continued

Carbon sources	
Gentiobiose	+
α-D-glucose	V
α-D-lactose	-
Galatinose	+
Raffinose	+
D-ribose	+
Sedoheptolosan	+
Stachyose	V
D-tagatose	+
Turanose	+
D-Xyrose	+
α-hydroxybutyric acid	+
γ-hydroxybutyric acid	+
ρ-hydroxyphenyl acetic acid	+
α-ketovaleric acid	+
D-lactic acid methyl ester	+
L-malic acid	+
mono-methyl succinate	+
Pyruvic acid	+
Succinic acid	V
N-acetyl-L-glutamic acid	V
L-alanine	+
L-asparagine	+
Glycyl-L-glutamic acid	+
L-serine	+
2,3-butanediol	V
Adenosine	V
Inosine	V
Uridine	+
Adenosine-5'-monophosphate	+
Thymidine-5'-monophosphate	+
Uridine-5'-monophosphate	+

Symbols: +: positive, -: negative, V: variable

Table 4. Chemotaxonomic analysis of the strain TU-19.

Test	Characteristics
Quinone type	Menaquinone-7 (50%) Menaquinone-8 (50%)
Diaminopimelic acid	none

분석에 매우 중요한 변수(22)인데 이 균은 DAP가 존재하지 않았다. 그러나 *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Corynebacterium*, *Nocardia*, *Mycobacterium* 등에서는 meso-DAP가 발견된다.

흔히 발견되는 호알칼리성균으로는 *Bacillus*, *Arthrobacter*, *Staphylococcus*, *Micrococcus* 등이 있는데 이들 세균에 대한 지방산(FAMES) 분석자료를 보면 branched type 특히 Anteiso- C_{15:0}, C_{17:0}가 주요 성분으로

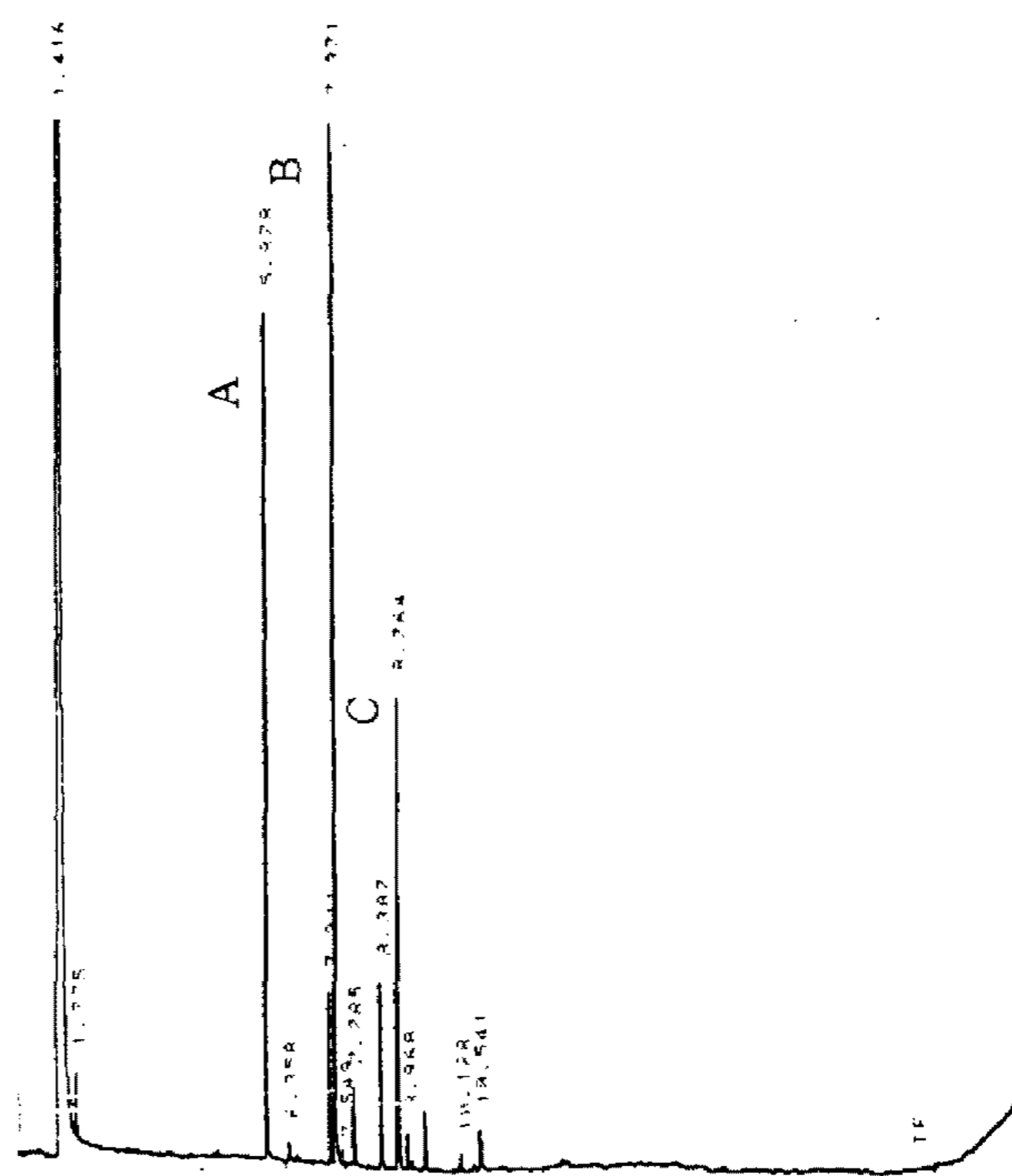


Fig. 2. GC spectrum of membrane fatty acid of the strain TU-19.

A: C_{14:0}, B: C_{15:0}, C: C_{16:0}

되어 있다. 그러나 Fig. 2에서 보여주는 바와 같이 분리균주의 FAMES 성분은 C_{15:0} Anteiso(36.57%), C_{14:0} Iso(26.08%), C_{16:0} Iso(16.91%) 등이 혼재하는 것으로 나타났다. 이상의 결과로부터 이 균주는 형태적인 특징은 *Coryneform* 세균에 속하나, menaquinone 분석 결과는 *Bacillus* sp., *Arthrobacter* sp.에 근접해 있다. 그러나 포자를 형성하지 않고, 운동성이 없다는 점에 있어서는 *Bacillus* sp.와 상당한 차이를 나타내었다. 또한 분리균주가 DAP 성분이 존재하지 않았기 때문에 *Coryneform* 세균 중에서 DAP 성분이 존재하지 않는 *Microbacterium*, *Arthrobacter*, *Cellulomonas* 등과 유사하다고 볼 수 있다. 이 중에서도 특히 이 균주는 세포 분열방식이나, 형태적 특징 등에서 *Arthrobacter* sp.와 매우 유사하였다. 그러나 화학적 분석법에 의한 결과 (Table 4)는 여러가지 분류기준에 비추어 가장 유사성이 큰 것으로 판명된 *Coryneform* bacteria에 속한 genus들조차 전혀 일치하지 않았으며, 또한 선별된 균주가 알칼리성 배지에서만 생장이 가능하였기 때문에 일반적인 *Coryneform* bacteria의 균주동정기준들과도 부분적으로 상이한 결과를 가져다 주었다.

이상의 결과를 종합적으로 판단해 보면 이 균주가 비록 분류학적으로 몇가지 점에 있어서는 불일치가 있지만 대부분의 분류기준에서는 *Coryneform* bacteria와 일치하기 때문에 잠정적으로 이 균주를 *Coryneform* bacterium TU-19로 동정하였다. 이 균주가 *Coryneform* bacteria에 속하는 새로운 genus로 인정받기 위해서는 분자진화학적 분석방법에 기초한 기존의 *Coryneform*

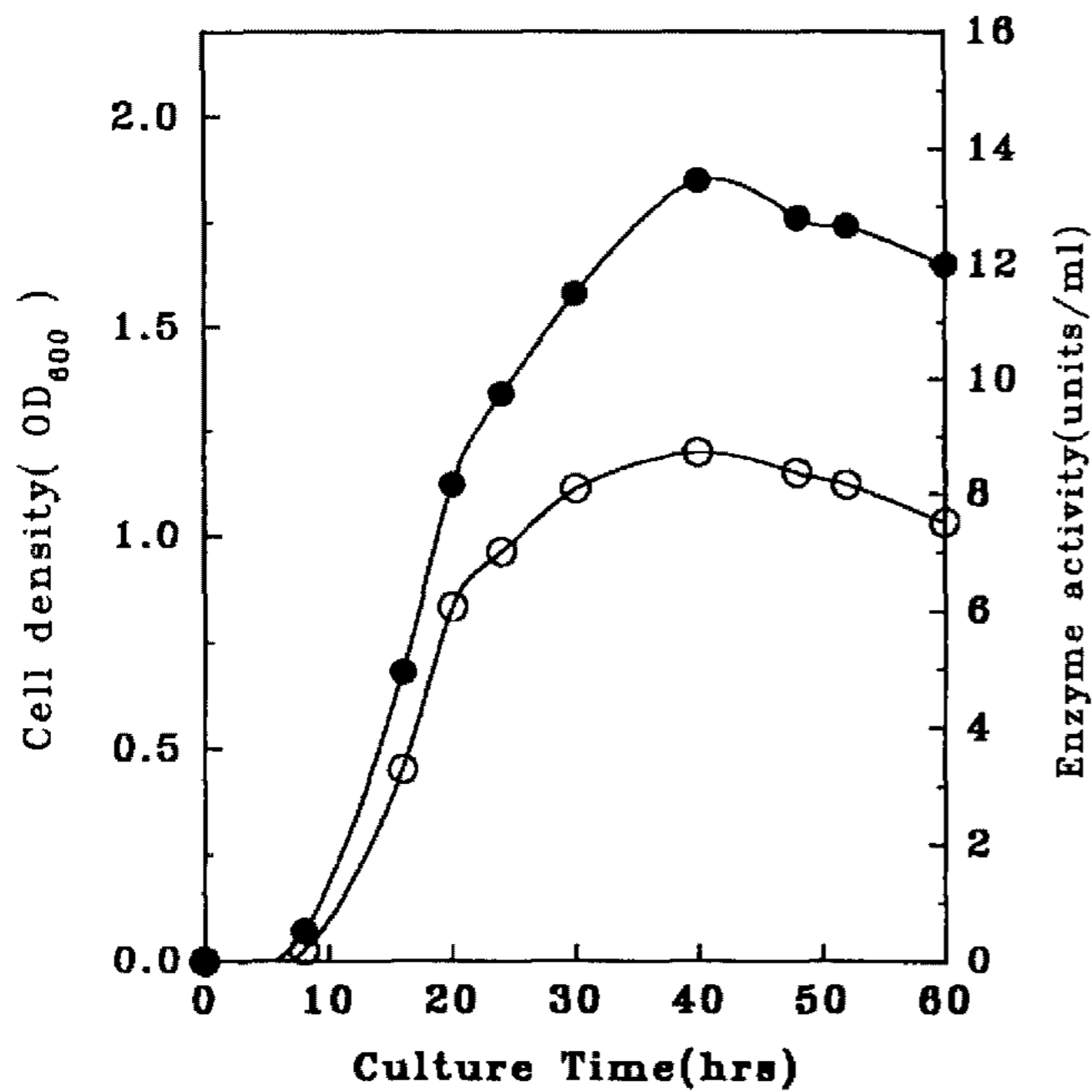


Fig. 3. Growth curve and protease activity of Coryneform bacterium TU-19.

Symbols: ●: Cell growth, ○: Protease activity

bacteria 균주와의 비교검토가 필요하다. 나아가 이 균주에 대한 보다 정확한 생리생화학적 특징들을 규명하기 위해서는 호알칼리성 미생물에 대한 분석방법의 체계화가 선행되어야 한다.

균주의 배양특성

분리균주를 알칼리성 배지(pH 10.5)에서 배양한 결과 다량의 단백질을 분해효소를 생성분비하였다. 균체의 생육 정도와 효소의 활성도는 Fig. 3에 나타내었다. 이 결과에 따르면 배양 8시간부터 OD₆₀₀이 급격히 증가하여 배양 40시간 때에 최고에 도달하여 48시간 이후에 서서히 감소하기 시작하였다. 효소의 분비시기도 균체의 생육 정도에 비례하였으며 배양 40시간 때에 최고활성을 나타내었다. 따라서 본 균주의 단백질 분해효소의 생성과 관련된 배양적 특성은 세포의 성장이 이루어지면서 동시에 효소의 생성이 이루어진다고 판단된다. 이와는 달리 *Bacillus* sp.의 배양적 특징은 대수증식기 말기경에 효소를 다량분비하며 또한 이때부터 포자형성이 시작되므로 *Bacillus* sp.에서는 효소의 분비시기가 포자의 형성과 상당히 관련되어 있을 것으로 추정하고 있다(1, 3). 그러나 본 균주는 포자를 형성하지 않는다는 점과 효소분비 양상이 균체의 성장과 더불어 증가된다는 결과에 비추어 볼 때 이 효소의 기능이 세포의 성장에 필요한 영양성분 즉 질소원을 체내로 공급하기 위한 주요 수단으로써 이용되고 있다는 것을 설명해 주고 있다(27).

요 약

토양으로부터 알칼리성 단백질 분해효소를 생성분비하는 호알칼리성 미생물을 분리하였다. 이 균의 형태적 특징은 Gram 양성이었으며, 포자를 형성하지 않고, 운동성이 없으며, 불규칙적인 간균의 형태를 하고 있는 호기성 미생물이었다. 또한 기타 다른 형태적, 생리생화학적 특징과 종합적으로 비교해 볼 때 이 균주는 *Coryneform* 세균과 매우 유사하였다. 따라서 본 분리균주는 *Coryneform* bacterium TU-19로 잠정적으로 동정하였다. 그러나 화학적 분석 결과 및 부분적인 생리생화학적 특징들에 있어서는 *Coryneform* bacteria의 어느 종과도 정확히 일치하지 않았다.

감사의 말

본 연구는 대구대학교 기초과학연구소의 일부 재정 지원에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다. 또한 균주동정을 위해서 도움을 주신 KIST 생명공학연구소 유전자원센터의 박용하 박사님과 이정숙씨에게도 감사를 드립니다.

참고문헌

- Horikoshi, K. 1971. Production of alkaline enzymes by alkalophilic microorganisms. Part I. Alkaline protease produced by *Bacillus* sp. No. 221. *Agric. Biol. Chem.* **35**: 1407-1414.
- Ward, O.P. 1986. Proteolytic enzymes. *Comprehensive Biotechnology*, vol. III. 789-818.
- Durham, D.R., D.B. Stewart, and E.J. Stellwag. 1987. Novel alkaline and heat-stable serine proteases from alkalophilic *Bacillus* sp. strain GX 6638. *J. Bacteriol.* **169**: 2762-2768.
- Kobayashi, T., A. Ogasawara, S. Ito, and M. Saitoh. 1985. Purification and some properties of alkaline proteinase produced by *Pseudomonas maltophilia*. *Agric. Biol. Chem.* **49**: 693-698.
- Nakadai, T., S. Nasuno, and N. Iguchi. 1973. Purification and some properties of alkaline proteinase from *Aspergillus oryzae*. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2685-2694.
- Delepelaire, P. and C. Wandersman. 1989. Protease secretion by *Erwinia chrysanthemi*. *J. Biol. Chem.* **264**: 9083-9089.
- Wright, C.S., R.A. Alden, and J. Kraut. 1969. Structure of subtilisin BPN' at 2.5 Å resolution. *Nature*. **221**: 235-242.
- Diermayr, P., S. Kroll, and H. Klostermeyer. 1987. Mechanisms of a proteinase from *Pseudomonas fluorescens* biotype I. *J. Dairy Res.* **54**: 51-60.
- Pantoliano, M.W., R.C. Ladner, P.N. Bryan, M.L. Rollence, J.F. Wood, and T.L. Poulos. 1987. Protein engineering of subtilisin BPN': enhanced stabilization through the introduction of two cysteines to form a disulfide bond. *Biochemistry* **26**: 2077-2082.
- Hugenholtz, J., F. Exterkate, and W.N. Konings. 1984.

- The proteolytic systems of *Streptococcus cremoris*: an immunological analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 1105-1110.
11. Nedkov, P., W. Oberthur, and G. Braunitzer. 1985. Determination of the complete amino acid sequence of subtilisin DY and its comparison with the primary structures of the subtilisins BPN', Carlsberg and amylosacchariticus. *Biol. Chem. Hoppe-seyler.* **366**: 421-430.
 12. Tanizawa, K., S. Watanabe, and Y. Kanaoka. 1990. Fluorescence-labeled *Streptomyces* subtilisin inhibitor: analysis of the interaction with subtilisin and *Streptomyces griseus* protease. *Bioorganic Chem.* **18**: 318-329.
 13. Power, S.D., R.M. Adams, and J.A. Wells. 1986. Secretion and autoproteolytic maturation of subtilisin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **83**: 3096-3100.
 14. 안장우, 오태광, 박용하, 박관화. 1990. *Bacillus* sp.가 생산하는 호알칼리성 protease의 부분정제 및 특성. 한국산업미생물학회지 **18**: 344-351.
 15. 배무, 박필련. 1989. 알칼리성 *Bacillus* sp. No. 8-16의 내열·알칼리성 단백질 분해효소의 정제와 특성. 한국산업미생물학회지 **17**: 545-551.
 16. 여인옥, 최성현, 이재숙, 김찬조. 1995. *Alteromonas* sp.가 생산하는 alkaline protease의 특성. 한국농화학학회지 **38**: 106-110.
 17. 이창호, 권태종, 강상모, 서현효, 권기석, 오희목, 윤병대. 1994. 알칼리성 protease를 생산하는 *Xanthomonas* sp. YL-37의 분리 및 조효소의 성질. 한국산업미생물학회지 **22**: 515-521.
 18. 노종수, 정영철, 박석규, 성낙계. 1991. 저온·알칼리성 Protease를 생산하는 *Pseudomonas* sp. RP-222의 분리 및 조효소의 특성. 한국산업미생물학회지 **19**: 383-389.
 19. 정병철, 신현승, 이계준. 1988. 방선균 일주에서 포자형성과 호알칼리성 단백질분해효소의 생합성과의 관계성. 한국미생물학회지 **26**: 355-361.
 20. Cappuccino, J.C. and N. Sherman. 1987. Microbiology, a laboratory manual. 2nd ed. The Benjamin/Cummings publishing Co.
 21. Sneath, P.H.A., N.S. Mair., M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 2. Williams & Wilkins. Baltimore.
 22. Komagata, K. and K. Suzuki. 1987. Lipid and cell-wall analysis in bacterial systematics. *Methods in Microbiology. A.P.* **19**: 161-207.
 23. Yanagida, N., T. Uozumi, and T. Beppu. 1986 Specific excretion of *Serratia marcescens* protease through the outer membrane of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **166**: 937-944.
 24. Yamada, K. and K. Komagata. 1972a. Taxonomic studies on coryneform bacteria. IV. Morphological, cultural, biochemical, and physiological characteristics. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **18**: 399-416.
 25. Follettie, M.T. and A.J. Sinskey. 1986. Recombinant DNA technology for corynebacterium glutamicum. *Food technology.* **40**: 88-94.
 26. Yamada, K. and K. Komagata. 1972b. Taxonomic studies on coryneform bacteria. V. classification of coryneform bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **18**: 417-431.
 27. Sarner, N.Z., M.J. Bissell, M.D. Girolamo, and L. Gorini. 1971. Mechanism of excretion of a bacterial proteinase: Demonstration of two proteolytic enzymes produced by a *Sarcina* strain (coccus P). *J. Bacteriol.* **105**: 1090-1098.

(Received 18 October 1995)