

Gluconacetobacter sp. JH232의 Bacterial Cellulose 생성 특성연구

안영희¹ · 박재효¹ · 고상희² · 전홍기^{2*}

동아대학교 환경공학과, ¹㈜마이코바이오테크, ²부산대학교 생명과학부

Received October 23, 2007 / Accepted November 19, 2007

Characterization of Bacterial Cellulose Production by *Gluconacetobacter* sp. JH232. Yeonghee Ahn, Jai-Hyo Park¹, Sang-Hee Go² and Hong-Ki Jun². Department of Environmental Engineering, Dong-A University, Busan 604-714, Korea, ¹Microbiotech Co., Ltd., 1033 Sangok-ri Musan-eum Jinju city Gyeongnam Korea, ²Division of Biological Sciences, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea - Previous study (J. of Chem. Technol. Biotechnol. 2004, 79, 79-84) showed that bacterial cellulose (BC) produced by a bacterial strain JH232 has potential as a source for environmentally friendly ion exchange membranes. In this study, strain JH232 was investigated for phylogenetic classified and characterized for BC production. Comparative analysis of 16S rRNA gene revealed that the strain belongs to the genus *Gluconacetobacter*. Maximum production of BC was observed when JH232 was cultured in CSL medium (pH 5.5) at 30°C as determined by flask experiment. When batch and fed-batch cultures of JH232 were performed in the fermenter experiment to compare BC productivity of the strain, BC productivity of fed-batch culture was 1.56 times higher than that of batch culture.

Key words : bacterial cellulose, fed-batch culture, *Gluconacetobacter*, pH, temperature

서 론

생물기원 고분자 중합체(biopolymers)는 다양한 분야의 산업에 응용될 수 있는 잠재력이 있고 실제 응용되고 있다. 이러한 Biopolymers 중에서도 cellulose는 자연계에서 가장 풍부한 biomass로 알려져 있으며 식물체뿐만 아니라 세균에 의해서도 생산된다[6,14]. *Azotobacter*, *Gluconacetobacter* 속 등의 세균들이 cellulose를 생산하는 것으로 보고되었다. Cellulose를 생산하는 대부분의 세균들은 세포표면에서 cellulose를 배출하는 것으로 알려졌다.

여러 종류의 식물과 나무로부터 생산되는 cellulose는 lignin이나 hemicellulose 등을 함유하는 이질 다당(heteropolysaccharide)인 반면에 세균에 의해 생산된 cellulose (bacterial cellulose, BC)는 동질 다당(homopolysaccharide)이다. 이질 다당인 식물성 cellulose를 사용할 경우 cellulose만을 회수하는 과정은 복잡할 뿐만 아니라, 회수한다 하더라도 식물성 cellulose는 기계적 성질이 약해 산업적 응용이 제한된다[17]. 반면에 BC는 높은 결정도(crystallinity)와 더불어 친수성 화학적 성질을 가지고 있으므로 높은 함유능(water-holding capacity)을 나타내고 인장강도가 높은 것으로 알려졌다.

BC는 그 물리화학적 성질과 cellulose 순도로 인해 식품, 생물산업, 그리고 의학 분야에 다양하게 응용되고 있다[6, 14]. 최근에는 막 분리[3,11]와 연료전지[7]에도 응용되었다. 또한 세균 JH232가 생산한 BC를 원료로 하여 화학적 변형을

통해 이온 교환막(ion exchange membranes, IEM)을 제조함으로써 BC의 친환경적 IEM 자원으로서의 사용가능성도 보고되었다[5]. BC로 IEM을 제조할 경우 높은 결정도에 의한 기계적 성질(예, 인장강도) 개선과 더불어 생분해성 재질을 사용함에 따라 생산된 제품이 환경친화적이란 장점을 가진다. 친환경적 IEM 제조의 원료로 사용되기 위해서는 BC의 생산을 최적화하여 BC 생산량을 증가시킬 필요가 있다. 그래서 본 연구에서는 감식초로부터 분리한 BC 생산균인 세균 JH232를 동정하였으며 이 균주에 의한 BC 생산 특성에 대한 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

Strain JH232의 분리

BC 생산균인 세균 JH232는 BSH 배지[16]를 사용하여 감식초로부터 분리하였다. BSH 배지 50 ml를 포함하는 250 ml Erlenmeyer flask에 감식초 0.5 ml를 첨가하여 30°C에서 7일간 정지 배양하였다. Pellicle이 형성된 flask의 배양액을 BSH 평판배지에 도말하여 30°C에서 7일간 배양하여 colony를 분리하였다. 분리된 colony는 BSH 평판배지를 이용하여 2번 이상 분리과정을 거쳐 순수 분리하였다[5]. 이렇게 분리된 균 중에서 JH232는 비교적 성장이 빠르고 pellicle 형성을 잘 하였으므로 본 연구에 사용되었다. JH232는 BSH 배지에서 3일 정도 정지 배양하면 배지표면에 pellicle을 형성하였다.

*Corresponding author

Tel : +82-51-510-2270, Fax : +82-51-513-4532

E-mail : hkjun@pusan.ac.kr

16S rRNA를 이용한 균주의 동정

JH232로부터 Total genomic DNA를 추출하여 PCR로 16S

rRNA 유전자를 증폭하는데 사용하였다[8]. Oligonucleotide 들로는 27f와 1492r [9]를 사용하여 total DNA로부터 약 1.5 kb의 16S rRNA 유전자를 증폭하였다. 이 PCR 산물은 부산 대학교 기초과학연구소의 Applied Biosystems model 373A DNA sequencer (Foster City, CA)를 사용하여 부분적으로 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 BLASTN (version 2.2.10) [1]을 이용하여 GenBank database에서 가장 비슷한 염기서열을 찾는데 사용하였다.

배양 조건 및 배지

BSH 한천 사면배지에 배양한 JH232를 한 백금이 취해 50 ml CSL 배지를 포함하는 250 ml Erlenmeyer flask 에 접종하여 30°C에서 2일간 진탕 배양(200 rpm) 하였다. CSL 배지는 BC 생산을 증가하기 위해 BSH 배지 성분을 수정한 것이다. CSL 배지(pH 5.5)의 조성은 다음과 같다 (per liter) 15 g glucose (산업용, ㈜삼양제넥스), 20 g corn steep liquor, 2.7 ml acetic acid, 1.15 g K_2HPO_4 , 0.5 g $MgSO_4 \cdot 4H_2O$. 배양 후 10분간 강하게 진탕하여 균체를 BC pellicles로부터 유리시켰다. BC pellicles은 멸균된 거즈로 여과하여 균 현탁액을 회수하였다. 회수된 균 현탁액은 본 배양에 접종균으로 사용하였으며, 접종농도는 2%(v/v)로 사용하였다.

JH232을 7일 동안 여러 조건(온도, 초기 pH, 정치배양과 진탕배양, 정치배양시 배지 표면적, 부피, 및 깊이)하에서 배양하여 BC 생산을 비교 분석하였다. JH232의 배양은 달리 명시하지 않는 한 30°C에서 CSL 배지(50 ml)가 들어 있는 250 ml Erlenmeyer flask에서 진탕 배양하였다. Time course 실험을 위해서는, 총 16 flasks를 사용하여 실시하였으며 시간대별로 각 flask를 사용하여 배양액과 생산된 BC를 분석에 사용하였다.

교반기가 장착된 발효조(5 l, B. Braun Biotech Intl. GmbH, Melsungen, Germany)를 이용하여 JH232를 회분식 또는 유가식으로 배양함에 따른 BC 생산을 분석하였다. 발효조 실험을 위한 전배양을 준비하기 위해 1 ml의 균 현탁액을 CSL 배지(150 ml)를 포함하는 500 ml Erlenmeyer flask에 접종하여 2일간 진탕 배양하였다. 균 현탁액은 위에 기술한 것과 같이 준비하여 2 l CSL 배지를 포함하는 발효조에 접종균(5%, v/v)으로 사용하였다. 발효조의 운전조건은 다음과 같다: 진탕속도, 500 rpm 공기유속, 0.5 vvm; CSL 배지 (pH, 5.5), 배양기간, 7 일. 회분 배양에서 초기 glucose 농도는 20 또는 40 g/l이었고, 유가 배양에서는 초기 glucose 농도는 20 g/l이었으며 동량의 glucose(20 g/100 ml)를 배양 1일 후 추가적으로 공급해주었다. 배양이 끝난 뒤에는 BC pellicles을 아래에 기술한 것과 같이 수확하였다.

분석 방법

배양액의 glucose 농도는 균체와 BC를 4°C에서 원심분리

(12,000 rpm, 10 분)하여 제거한 후 Somogyi-Nelson 방법 [13]에 의해 결정하였다. 한편 Acetan의 농도는 문헌[4]에 기술된 것과 같이 phenol-sulfuric method로 결정하였으며, Gluconic acid 농도는 배양액의 상등액을 0.2 μ m syringe filter로 여과 후 HPLC로 분석하였다. 사용된 HPLC는 Nova-pak C18 (3.9×150 mm, WATO 086344, Waters) 칼럼이 장착되었고, UV-detector (Waters)를 사용하여 210 nm에서 측정하였다[15]. 이동상은 0.1% H_3PO_4 를 사용하여 유속을 0.5 ml/min로 하였다.

BC의 정제 및 농도결정

배양액을 4,000 rpm, 4°C에서 20 분간 원심 분리하여 BC를 침전시키고 증류수로 세척하였다. 세척된 BC는 80°C에서 0.1 N NaOH로 1 h 처리하여 불순물을 제거하였다. pH가 중성이 될 때까지 BC는 증류수로 더 세척한 후 gel dryer (Model 583, Bio-Rad; Richmond, CA)로 80°C에서 더 이상 무게 변화가 없을 때까지 건조하고 무게를 측정하여 원래 배양액에서의 농도(g/l)를 결정하는데 사용하였다 [10].

결과 및 고찰

16S rRNA 유전자의 비교분석

PCR로 증폭된 JH232의 16S rRNA 유전자는 GenBank database에 있는 세균들과의 계통발생학적 관계를 조사하기 위해 사용되었다. JH232의 16S rRNA 유전자는 부분적으로 염기서열을 결정하여 결국 499 염기들(*E. coli* numbering에 따른 위치 926에서 1406에 해당)[2]의 서열을 결정하였다. 이 서열은 GenBank database에서 *Gluconacetobacter oboediens* [12, 18]의 16S rRNA 유전자의 염기서열(accession no. AJ001631)과 가장 비슷한(99%) 것으로 나타났다. *G. oboediens*는 α -*Proteobacteria*에 해당하며, 적포도주 식초발효 과정에서 원래 분리된 바 있다[12]. 16S rRNA 유전자 분석결과를 근거로 JH232는 *Gluconacetobacter* sp. JH232로 명명하였다.

배지조성에 따른 BC 생성

BSH 배지로 JH232를 분리하였으나 BC 생성을 증가하기 위해 배지 성분을 수정한 CSL 배지를 본 연구의 최적 배지로 사용하였다. Flask 실험결과 JH232는 CSL배지에서 BC를 1.7 - 2.1 배 더 생성하였다(Fig. 1). 같은 배지를 사용하더라도 정치 배양한 경우 진탕 배양에서 보다 1.1 - 1.4 배 더 BC 생성량이 높은 것으로 나타났지만, 전반적으로 두 배양 방법 상에서 많은 차이를 유발하지는 않는 것으로 나타났다.

배양온도와 초기 pH 에 따른 BC 생성

JH232의 배양온도에 따른 BC 생성량을 조사하기 위해 10 - 55°C 범위에서 각 온도 별로 7일간 배양 후 생성된 BC를

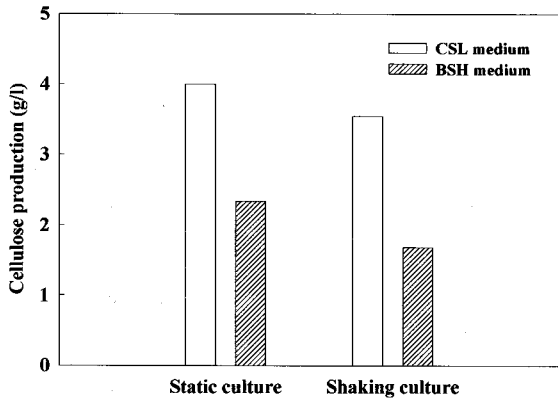


Fig. 1. Cellulose production by *Gluconacetobacter* sp. JH232 in BSH and CSL media. JH232 was grown in each medium at 30°C for 7 days under the conditions indicated in the Figure.

정량 하였다. JH232는 30°C에서 4.2 g/l의 BC를 생성하여 조사한 온도범위에서 가장 많이 BC를 생성하였으므로 30°C가 BC생성에 최적임을 알 수 있었다(Fig. 2). 균체 성장이 15°C에서는 극히 느려 biomass량은 적었으나 어느 정도(2.7 g/l)의 BC를 생성하였다. 그러나 37°C이상과 10°C이하에서는 균체가 증가하지 않아 BC도 생성되지 않았다. 한편 배지의 초기 pH에 따른 BC생성량을 조사하기 위해 pH를 3.0 - 9.0로 조절하여 7일간 배양 후 생성된 BC를 정량 하였다. 약산성인 pH 범위(4.0 - 6.0)에서 BC생성이 양호하였으며, 특히 pH 5.5에서 최대 생성을 나타내었다.

BC 생성의 time course 실험

위 실험들을 통해 도출된 JH232의 최적 BC 생성조건에서

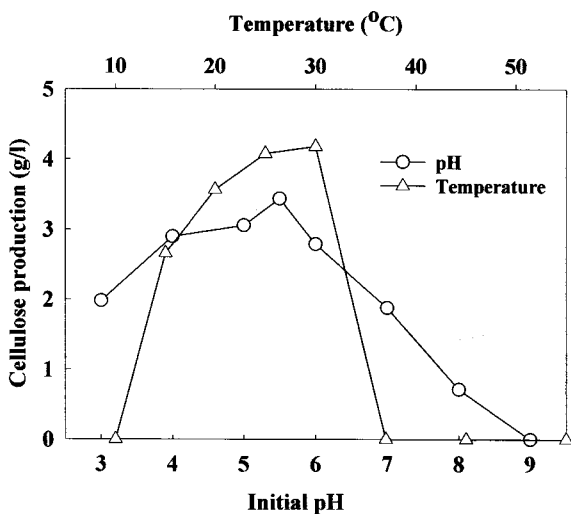


Fig. 2. Effects of initial pH and growth temperature on cellulose production by *Gluconacetobacter* sp. JH232. The JH232 was grown at 30°C for 7 days with shaking culture.

정치배양과 진탕 배양을 각각 실시하여 배양시간에 따른 BC의 생성량, 배지의 pH, 탄소원(glucose)의 농도, glucose로부터 전환된 gluconic acid의 농도를 조사하였다.

정치배양을 한 경우(Fig. 3A)에는 진탕 배양(Fig. 3B)보다 BC 생성을 시작하는 시간이 빠른 것으로 나타났으며 최대 BC 생산(4.4 g/l)은 5일째 관찰되었다. 배지의 탄소성분인 glucose 농도가 급격히 감소하는 동안 BC의 생성은 급격히 증가하였다. Glucose 농도가 감소함에 따라 gluconic acid의 생성도 증가하는 것으로 나타났다. 생성된 gluconic acid는 배지의 pH 감소와 관련이 있는 것으로 여겨진다. 배양액의 초기 pH 5.5는 점차 감소하여 배양 2일에는 pH 4.2를 나타내었다가 시간이 지남에 따라 서서히 증가하여 배양 7.5일째는 pH 5.4를 나타내었다. 정치배양의 경우에 BC는 배양액 표면에 막 형태로 생성되었다. Fig. 4A는 배양액으로부터 회수한 BC를 Petri dish로 옮긴 것 이다.

진탕 배양에서 JH232의 BC 생성은 24시간의 잠복기를 거쳐 대수적 생산시기로 도입하였다 (Fig. 3B). 배지의 glucose 농도가 급격히 감소함에 따라 BC 생성과 gluconic acid의 생성도 증가하였다. 최대 BC 생성(4.6 g/l)은 5.5일째 관찰되었으며, 정치배양의 경우보다 gluconic acid가 빨리 생성되는 것으로 나타났다. 증가된 gluconic acid의 농도가 서서히 감소하는 것으로 보아 배지중의 glucose농도가 낮은 상태에서 축적된 gluconic acid를 소비되면서 BC가 생성되는 것으로 여겨진다. 배지의 pH는 배양 2.5일까지 감소하다가 3.5까지 떨어진 후에는 서서히 증가하여 최종적으로 배양이 끝난

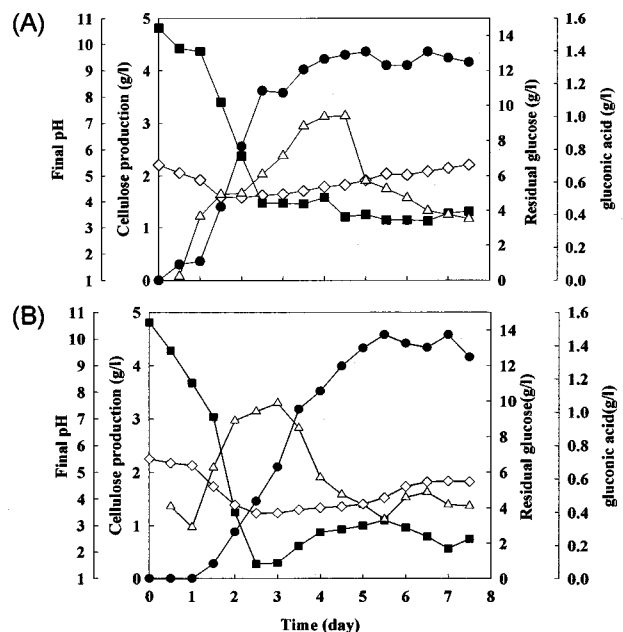


Fig. 3. Time course of the cellulose production by *Gluconacetobacter* sp. JH232 in the (A) static and (B) shaking cultures. Symbols: ■, residual glucose; ●, BC; △, gluconic acid; ◇, final pH.

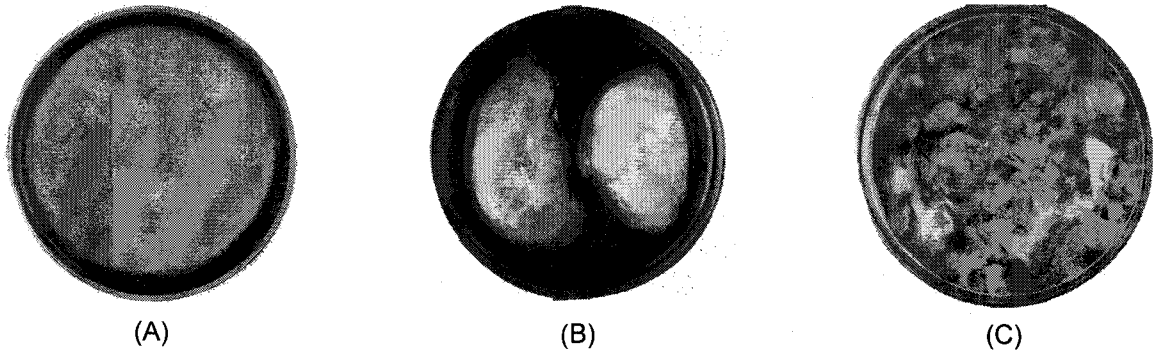


Fig. 4. Different shape of BC pellets produced by *Gluconacetobacter* sp. JH232 under static culture (A) and shaking culture (B) using Erlenmeyer flask. BC shown at the picture (C) was produced while the strain was cultured in the jar fermenter. The strain was grown in CSL broth (pH 5.5) at 30°C for 7 days for the experiments. The BC pictures were taken after BC was transferred onto Petri dish for the presentation.

7.5일에는 pH 4.7을 나타내었다. 정치배양의 경우 배양액 표면에 막 형태로 BC가 생성되었으나 진탕 배양의 경우 생성된 BC는 뭉쳐진 난형의 덩어리를 형성하였다(Fig. 4B).

배양방법에 따른 BC생성의 효과

JH232의 배양 방법에 따라 배양액에 생성된 BC pellet의 형태가 다르게 나타났다. 정치배양의 경우 배양액 표면에 막 형태로 BC가 생성되었으나(Fig. 4A), 진탕 배양의 경우 생성된 BC가 뭉쳐져 난형의 큰 덩어리를 형성하였으며(Fig. 4B), 발효조를 이용한 배양일 경우는 BC로 된 펄프 형태의 현탁액을 형성하였다(Fig. 4C).

정치배양의 경우 BC가 배양액 표면에 막 형태로 형성되므로 사용된 배지의 부피, 깊이, 그리고 표면적이 BC 생성에 미치는 영향을 조사하였다. 사용된 배지의 부피가 일정(100 ml)하고 표면적과 깊이가 다를 때, 표면적이 어느 정도까지 증가할수록 단위 부피당 BC 생성량도 증가하는 것으로 나타났다(Table 1). 반면에 사용된 배지가 일정한 표면적(19.63 cm²)을 가지나 부피와 깊이가 다를 때는 부피가 증가할수록 BC 생산이 증가하는 추세를 나타내었다. 단위부피당 생성되는 BC의 양에 대해서는 본 실험이 실시된 조건하에서 배지 표면적이 배지부피보다 더 영향을 주는 것으로 나타났다.

발효조를 이용한 배양에서 탄소원인 glucose를 공급하는 방식을 달리한 회분배양 및 유가배양을 실시하여 BC 생성량(productivity)을 비교하였다(Table 2). 회분배양을 통해 초기 glucose 농도에 따른 BC 생성량과 수율을 비교하여 최적의 초기 glucose 농도를 결정하였다. 그래서 BC 생산량과 수율을 고려하여 20 g glucose/l를 초기 농도로 선정하였다.

배양시간에 따른 잔존하는 glucose 농도를 조사하여 추가적으로 glucose 공급하였다. 한편 유가배양에 사용된 총 glucose 양과 동일한 양의 glucose를 공급한 회분 배양을 실시하여 BC 생산량을 비교하였다. 즉 회분 배양에서 glucose는 초기에만 40 g/l 농도로 공급해주었다. 유가배양이 종결된 후

Table 1. Effects of volume, surface-area, and depth of medium on cellulose production by *Gluconacetobacter* sp. JH232.

	Depth (cm)	Cellulose (g/l)	Final pH
Surface area* (cm ²)	40.7	2.50	4.32
	80	3.19	4.48
	109.3	5.87	4.58
	188.6	3.60	5.04
Volume** (ml)	30	0.74	4.34
	60	1.53	4.30
	90	1.85	4.38
	120	1.97	4.56

*Constant volume (100 ml) of medium was used for the experiments.

**Constant surface-area (19.63 cm²) of medium was employed for the experiments.

Table 2. Kinetic parameters of cellulose production by *Gluconacetobacter* sp. JH232 in batch and fed-batch culture.

Parameters	Batch culture		Fed-batch culture*
	S ₀ = 20 g/l	S ₀ = 40 g/l	(S ₀ = 20 g/l)
X (cell mass, g/l)	ND [§]	4.25	3.52
P (cellulose, g/l)	2.30	3.00	4.69
Final pH	ND	4.85	3.95

*Initial concentration of glucose was 20 g/l for the fed-batch culture and the same amount of glucose was additionally provided on the second day of incubation. Culture conditions: 30°C, initial pH 5.5, 500 rpm, 0.5 vvm, culture vol. = 2 l.

[§]ND, not determined.

최대 BC 생산량은 4.69 g/l이었으며 이는 동일량의 glucose를 투입한 회분 배양에서 생산된 BC의 양(3.0 g cellulose/l)보다 1.56배 큰 것으로 나타났다.

요 약

균주 JH232가 생성한 bacterial cellulose (BC)는 이온교환막 생산을 위한 환경친화적 재료로서 잠재능이 있다는 것이 전 연구(*J. of Chem. Technol. Biotechnol.* 2004, 79, 79-84)를 통해 보고되었다. 본 연구를 통해 JH232를 동정하였으며 BC 생성 특성을 조사하였다. 16S rRNA 유전자의 비교분석을 통해 JH232는 *Gluconacetobacter* sp.인 것을 밝혀냈다. 플라스크 실험 결과 이 균주는 초기 pH 5.5로 조절된 CSL 배지에서 온도가 30°C인 조건하에 배양하였을 때 BC 생성량이 최대를 나타내었다. 발효조 실험을 통해서 회분식 배양보다 유기배양에 의해 JH232의 BC 생성량이 1.56배 더 높게 나타났다.

참 고 문 헌

- Altschul, S. F., T. I. Madden, A. J. Schifer, J. Zhang, Z. Zhang, W. Miller and D. J. Lipman. 1997. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res.* **25**, 3389-3402.
- Brosius, J., H. L. Palmer, J. P. Kennedy and H. F. Noller. 1978. Complete nucleotide sequence of a ribosomal RNA gene from *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 4801-4805.
- Bubey, V., C. Saxena, L. Singh, K. V. Ramana and R. S. Chauhan. 2002. Pervaporation of binary water-ethanol mixtures through bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Tech.* **27**, 163-171.
- Chao, Y., T. Ishida, Y. Sugano and M. Shoda. 2000. Bacterial cellulose production by *Acetobacter xylinum* in a 50-L internal-loop airlift reactor. *Biotechnol. Bioeng.* **68**, 345-352.
- Choi, Y. J., Y. Ahn, M. S. Kang, I. S. Kim, H. K. Jun and S. H. Moon. 2004. Preparation and characterization of acyclic acid-grafted bacterial cellulose cation-exchange membrane using UV-graft polymerization. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **79**, 79-84.
- Czajaa, W., A. Krystynowiczca, S. Bieleckia and R. M. Brown, Jr. 2006. Microbial cellulose—the natural power to heal wounds. *Biomaterials.* **27**, 145-151.
- Evans, B. R., H. M. O'Neill, V. P. Malyvanh, I. Lee and J. Woodward. 2003. Palladium-bacterial cellulose membranes for fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics.* **18**, 917-923.
- Jung, G. Y., H. O. Jung, J. R. Kim, Y. Ahn and S. Park. 1999. Isolation and characterization of *Rhodospseudomonas palustris* P4 which utilizes CO with the production of H₂. *Biotechnol. Lett.* **21**, 525-529.
- Lane, D. J. 1991. 16S/23S rRNA sequencing, pp115-147. In Stackebrandt E. and M. Goodfellow (eds.), *Nucleic acid techniques in bacterial systematics*. John Wiley & Sons Ltd.
- Masanobu, M., T. Takaysu, M. Kazunobu, A. Osao and Y. Fumihiro. 1996. A synthetic medium for bacterial cellulose production by *Acetobacter xykinum* subsp. *sacrofermentans*. *Biosci. Biotech. Biochem.* **60**, 575-579.
- Pandey, L. K., C. Saxena and V. Dubey. 2005. Studies on pervaporative characteristics of bacterial cellulose membrane. *Separation and Purification Technol.* **42**, 213-218.
- Sokollek, S. J., C. Hertel and W. P. Hammes. 1998. Description of *Acetobacter oboediens* sp. nov. and *Acetobacter pomorum* sp. nov., two new species isolated from industrial vinegar fermentations *Int. J. Syst. Bacteriol.* **48**, 935-940.
- Somogyi, M. J. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chem.* **19**, 19-23.
- Sutherland, I. W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Trends Biotechnol.* **16**, 41-46.
- Tadao, O., M. Takafumi and A. Minoru. 1995. Production of cellulose from D-Arabitol by *Acetobacter xylinum* KU-1. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1564-1565.
- Toyosaki, H., T. Naritomi, A. Seto, M. Matsuoka, T. Tsuchida and F. Yoshinaga. 1995. Screening of bacterial cellulose-producing *Acetobacter* strains suitable for agitated culture. *Biosci. Biotech. Biochem.* **59**, 1498-1502.
- Vandamme, E. J., S. D. Baets, A. Vanbaelen, K. Joris and P. D. Wulf. 1998. Improved production of bacterial cellulose and its application potential. *Polym. Degrad. & Stabil.* **59**, 93-99.
- Yamada, Y. 2000. Transfer of *Acetobacter oboediens* Sokollek et al. 1998 and *Acetobacter intermedius* Boesch et al. 1998 to the genus *Gluconacetobacter* as *Gluconacetobacter oboediens* comb. nov. and *Gluconacetobacter intermedius* comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **50**, 2225-2227.