

纖維質 資化性菌의 分子育種에 관한 研究

—*Cellulomonas*속균의 β -glucosidase gene의 *E. coli*에의 cloning—

裴 武·李 在 汶*

(梨花女子大學校 自然科學大學 生物學科 · *韓國科學技術院 生物工學研究部)

Studies on Molecular Improvement of Cellulose Utilizing Bacterial Strain

—Molecular cloning of β -glucosidase gene of *Cellulomonas* sp. in *E. coli*—

Bae, Moo and Jae-Moon Lee*

(College of Natural Science., Ewha Womans University, *Department of Biotechnology, Kaist, Seoul)

Abstract

The cellbiase (β -glucosidase) gene in a *Cellulomonas* sp. CS1-1 was cloned into *E. coli* HB101 using the vector plasmid pBR322, and the expression of the gene in *E. coli* studied. The chromosomal DNA of the cellulomonas was digested by several restriction enzymes, each of which has only one cleaving site in plasmid pBR322. The recombinant plasmid, pSB2, created with Sal I fragment, was expressed for the cellobiase gene in *E. coli*. The recombinant plasmid was estimated to contain 6.4 Kb foreign DNA at the Sal I site of plasmid pBR322 and the inserted DNA was mapped by single and double digestion with several enzymes. *E. coli* HB101(pSB2) has slowly grown in a mineral liquid medium containing cellobiose as a sole carbon source. The cellobiase activity in the transformed *E. coli* was 132 units per liter, which is equivalent to one twenty fifth of that in doner strain *Cellulomonas* sp. CS1-1. The transformed cell with plasmid containing cellulase gene grow well in the LB mediuns. The synthesis of cellobiase in the strain, *E. coli* HB101 (pSB2), was inhibited by glucose and at high concentration of cellobiose, and induced by cellobiose at low concentration.

緒 論

Cellulase 遺傳子의 遺傳學의 研究는 아직 미답 상태라 할수있다. 그러나 최근에 와서 纖維質의 資源化와 때를 맞추어 cellulase gene의 研究가 개시되고 있으며 그 研究의 관심은 gene cloning에 맞추어지고 있으나 아직 cellulase gene自體에 대한 研究나 gene regulation에 관한 研究에는 이르지 못하고 있다.

cellulase gene의 cloning을 처음 성공한 것은 1981년 cincinnati大學의 Armentrout 및 Brown (1981)등에 의해서였다. 이들은 *E. adecarboxylata*의 cellobiase gene을 같은屬인 *E. coli*에 clo-

ning시켰다. cloning된 *E. coli*의 cellobiase活性은 낮았으나 여기서 cellulase gene이 同一屬간에 cloning될수있다는 可能性을 제시하였다.

한편 Canada의 Whittle등(1982)은 *Cellulomonas fimi*의 cellulase gene을 *E. coli*에 cloning시키는 데 성공하였다. 이들은 cellulomonas의 chromosomal gene을 Bam HI制限酵素로 절단하여 이를 plasmid pBR 322에 연결시켜 *E. coli*에 傳換시키고 면역학적방법으로 cellobiase活性을 확인하였다.

本 研究에서는 *Cellulomonas* sp. CS1-1의 DNA를 각종 制限酵素로 切斷한 결과 Sal I制限酵素에 의한 切斷 DNA斷片을 *E.coli*에 效率있게 cloning시키는 데 성공하여 cellobiase(β -glucosidase)

gene의 形質發現을 보았으므로 이를 보고 하는 바이다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

Cellulase生産菌으로는 호주의 Richard 및 Ide (1981)가 사용한 *Cellulomonas* sp. CS1-1菌株를 사용하였고 再組合 plasmid의 transformation에 사용된 受容菌 및 vector plasmid(pBR322)의 宿主菌으로는 *E. coli* K12, HB101(pro⁻, leu⁻, thi⁻, lac Y⁻ hsd R⁻, end A⁻, rps L20, ara⁻14, gal K2, xyl⁻5, mtl⁻1, sup44로서 이것은 proline, leucine, thiamine auxotroph이다(Ray, 1979).

2. 培地

Cellulomonas sp. 菌株의 保存 및 種培養은 potato-cellulose medium(potato extract 5.0g, yeast ext 0.2g, NaNO₃ 2.0g, MgSO₄·7E₂O 0.5g, KH₂PO₄ 1.0g FeSO₄·7H₂O 0.01g, Avicel, CMC or cellobiose 5.0g per liter)에 固體培地の 경우 agar 15g를 첨가하여 사용하였다. 本培養은 mineral salt solution(MS medium)으로서 (NH₄)₂SO₄ 4.0g, NaCl 3.0g, K₂HPO₄ 0.5g, K₂HPO₄ 0.5g, MgSO₄·7H₂O 0.1g, CaCl₂·2H₂O 1.0g per liter와 thiamine 1mg, biotine 0.1mg를 membrane 여과법으로 除菌시켜 첨가하고 炭素源으로서 Avicel, CMC, cellobiose 또는 glucose를 0.5%를 각각 첨가하여 pH 7.0으로 調製하였다. *E. coli*는 LB medium(tryptone 1%, yeast ext, 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.5)에서 培養하였고, mineral liquid medium(ML medium)은 Na₂HPO₄ 6g, KH₂PO₄ 3g, NaCl 0.5g, NH₄Cl 1g, 1M MgSO₄·7H₂O, 1ml 0.1M CaCl₂ 1ml를 1 liter에 含有시키고 cellobiose 또는 glucose를 0.5% 첨가한 것이다. 抗生物質첨가는 ampicillin 25μg/ml, tetracycline 12.5mg/ml로 하였다.

3. 酵素 및 試藥

Lysozyme, DNase I, RNaseA 및 agarose type IV는 Sigma製품을 사용하였다. 制限酵素 EcoRI, BamHI, Pst I, Hind III, Sal I, Pvu II와 T₄ DNA ligase는 Takara Biomedicals製품을 구입사용하였고, plasmid pBR 322는 Bethesda Research Lab. Inc.로 부터 구입 사용하였다. λ

DNA는 Ray Wu등의 方法에 따라 *E. coli* W 1485(λc 1857S7)에서 λ phage를 분리시킨후 여기서 추출·정제하여 사용하였다.

4. DNA의 抽出·分離

Cellulomonas sp. CS 1-1菌株를 0.5% CMC-MS medium 50ml에서 배양하여 Armentrout 및 Brown(1981)의 方法에 따라 chromosomal DNA를 추출·분리하였다.

이때 3번 抽出한후 TE buffer(10mM Tris, pH 7.4, 1mM EDTA)에 투석하여 50ml배양액에서 집균한 菌體로부터 250μg의 chromosomal DNA를 얻었다.

*E. coli*에서 plasmid DNA의 抽出·分離는 Holmes 및 Quigley(1981)의 boiling method로 하였다. *E. coli*의 plasmid를 증폭시키기 위해서는 LB medium에서 A₅₉₀=0.6에서 170μg/ml되도록 chloramphenicol을 가하고 다시 37°C에서 18시간 배양하였다. *Cellulomonas* sp. CS1-1菌株의 plasmid存在여부를 알기위해서는 Kado 및 Liu(1981)에 의한 alkaline-SDS 방법으로 하였다. DNA정량은 260nm에서 흡광도로 하였다(Davis 등, 1980).

5. Recombinant DNA의 作成 및 transformation

Plasmid DNA pBR322 5μg을 10~20 units의 制限酵素와 함께 50μl反應液에서 Takara社의 反應條件에 따라 反應시켰다. 反應後 水包和 phenol로 3번, chloroform으로 3번 抽出하고 NaCl을 0.25M 되도록 가한후 2倍容量의 cold ethanol(-20°C)을 가하여 섞고 dry ice-methanol bath에서 30분간 침전시켰다. microcentrifuge에서 遠心分離후 침전된 DNA는 5분간 진공건조하여 0.2μg/μl가 되도록 TE buffer에 녹였다.

*Cellulomonas*의 chromosomal DNA 30μg을 制限酵素 30units로 反應시키면서 전기영동으로 확인하여 部分分解시켰다. 위와 같은 方法으로 추출 沈澱시켜 0.4μg/μl되게 TE buffer에 녹였다. 同一制限酵素로 절단한 vector DNA와 chromosomal DNA를 각각 2μg와 4μg을 취하여 30μl反應液에서 T₄ DNA ligase 存在下에서 反應시켰다. 反應條件은 Goodman 및 MacDonald의 方法에 따랐다.

受容菌 *E. coli* HB 101의 形質轉換은 CaCl₂처리 및 heat shock에 의한 표준방법으로 하였다.

마지막으로 抗生物質을 넣은 LB agar medium에 도말하여 transformation efficiency를 계산하고, replica에 의하여 recombination 정도를 확인하였다.

6. Cellobiase gene 導入 clone의 分離

Ligation된 DNA를 *E. coli* HB101에 形質轉換한후 cellobiase gene이 도입된 clone을 선별하기 위하여 形質轉換된 *E. coli* HB 101을 集菌, 이를 cellobiase ML liquid medium에서 3日 培養한후 다시 cellobiose ML agar medium에 도말하여 4~5日간 培養한후 자라난 colony를 抗生物質耐性試驗을 거쳐 확인하였다. 각 colony를 cellobiase MS medium에 배양하여 生長이 좋은것을 선택하여 이들 菌體로부터 plasmid를 재분리 시키고 制限酵素에 의한 處理확인 및 再 形質轉換으로 최종 확인하였다.

7. 酵素力價의 測定

E. coli HB 101의 cellobiase gene이 도입된 clone이 지닌 cellobiase역가를 측정하기 위해서는 이 recombinant 菌株을 LB broth에서 stationary phase까지 배양후 集菌하여 生理食鹽水로 두번 세척한후 定量的 PM buffer(10mM Sodium phosphate pH7.0, 3mM $MgCl_2$)에 현탁시키고 이 현탁액 1ml에 PNPG(p-nitrophenyl- β -D glycopyranoside)의 0.4mg/ml용액 0.2ml를 가하고 30°C에서 反應시켰다. 일정시간후 1M Na_2CO_3 용액 0.5ml를 가한후 遠心上澄液을 420nm에서 吸光度를 측정하였다. 이조건에서 A_{420} 이 1일때 PNP(p-nitrophenal)는 1, 107 μ mole에 해당된다. cellobiase 1unit는 PNPG를 분해하여 1분동안 1 n mole PNP를 생성하는 酵素의 量으로 정했다.

結果 및 考察

1. 遺傳子再組合 및 transformation

먼저 cellulomonas의 plasmid 존재여부를 조사하였으나 plasmid는 검출되지 않았다. 이어서 *Cellulomonas* sp. CS1-1에서 抽出정제한 chromosomal(ch-) DNA를 plasmid pBR322의 한 位置에만 절단部位를 가진 制限酵素인 Eco RI, Bam HI, Pst I, Hind III, Sal I, 및 Pvu II로 각각 절단하여 ch-DNA의 分解程度를 보았다(Fig. 1). 그 결과 Eco RI, Hind III 및 Pvu II로 절

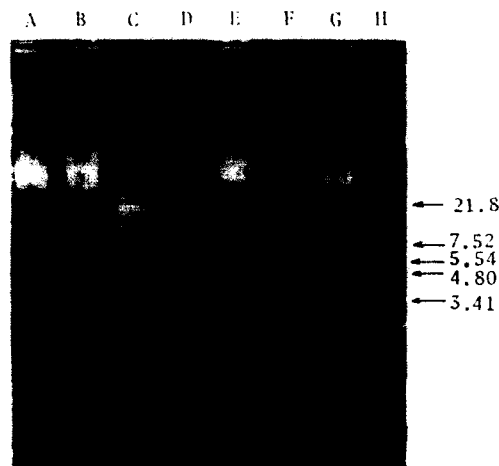


Fig. 1. Agarose Gel Electrophoresis of *Cellulomonas* sp. CS1-1 Chromosome DNA Digested by Various Restriction Enzymes, Lane A; chr. DNA, B; chr. DNA digested by EcoRI, C; Bam HI, D; Pst I, E; Hind III, F; Sal I and G; Pvu II. Lane H is EcoRI-digested λ DNA as a molecular weight marker.

단한 경우 큰 변화를 볼수 없었으나 Pst I과 Sal I로 절단한 경우 DNA의 크기는 대략 20kb에서 1kb이하까지 절단되는것을 알수있다. Bam HI이 경우는 상당히 큰 fragment가 생성되었다. cellulomonas는 DNA의 GC content가 71.7~72.7 moles%로 높기때문에(Bergey's Manual 1974) GC pair가 적은 認識序列을 갖는 制限酵素는 충분한 절단이 안될것으로 예상되고(Eco RI, Hind III) GC content가 높은 認識序列을 갖는 Bam HI, Pst I, Sal I의 경우 많은 절단과 fragment가 生成되는 것은 이러한 이치에 부합된다. 上記 6개의 制限酵素로 각각 절단한 pBR 322 DNA와 *Cellulomonas* sp. CS 1-1의 ch-DNA를 각각 ligation하고 *E. coli* HB 101에 형질전환하였다. ch-DNA의 경우 制限酵素처리를 부분적으로 하였으며, Bam HI, Sal I, Pat I의 경우 전기영동하여 확인하였다. *E. coli* HB 101에 형질전환한후 菌液 5 μ l을 LB+ampicilline, LB+tetracycline agar medium에 도말하여 배양하여 자란 colony는 amp 및 tet 培地에 각각 replica하였다. Bam HI, Sal I, Hind III 절단의 경우 ampicillin저항성만 남게 된다. 각각의 colony를 replica 한 경우 Pst I, Sal I에서 약 6%가 reumbinant plasmid를 가진것으로 나타났다.

2. Collobiase gene recombinant plasmid의 분리 및 安全性

Ligation한 recombinant DNA를 *E. coli* HB 101에 형질전환한후 菌을 遠心集菌하고 이를 生理食鹽水로 1회 세척한후 0.5% cellobiose ML medium에서 3~4일간 진탕 배양하였다. 그 결과 制限酵素 Sal I 처리후 ligation한 clone에서만 菌이 잘 자랐다. 이 clone을 다시 同一組成의 agar plate에 도달하여 37°C에서 4~5일간 배양하여 20개의 single colony를 얻었다. 이들 colony를 모두 ampicillin resistance 및 tetracycline sensitive함을 확인하고 0.5% cellobiose ML medium에서 가장 자라는 菌株를 선택하여 이 菌에서 plasmid를 抽出하고 전기영동으로 확인하여 plasmid이름을 pSB2로 명명하였다. Sal I 制限酵素의 다른 制限酵素에 의한 본군의 ch-DNA의 cloning의 경우 cellobiase gene이 도입된 recombinant plasmid를 지닌 clone을 분리할수가 없었다.

E. coli HB 101(pSB2)의 plasmid를 분리하여 Sal I 制限酵素로 처리하여 전기영동한 결과는 Fig. 2와 같다. 본 그림에서 pSB2를 Sal I으로 처리했을때 약 4.4kb의 pBR322 plasmid 由來 band외에 6.4kb정도의 insert DNA가 있음을 알 수있고 본 DNA의 크기는 Armentrout 및 Brown

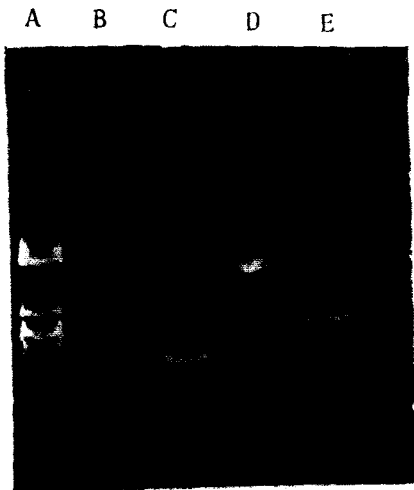


Fig. 2. Identification of Recombinant Plasmid by Agarose Gel Electrophoresis Lane B; pBR322, C; pBR322 digested by Sal I restriction enzyme, D; pSB2, and E; pSB2 digested by Sal I. Lane A is EcoRI-digested λ DNA as in legend in Fig. 2.

(1981)의 cloning에서본 25kb의 DNA斷片에 비해 훨씬 적은 것이다.

plasmid pSB2를 다시 *E. coli* HB 101에 형질전환시켜 ampicillin함유 LB medium에 生育시킨 colony를 조사한 결과 再現性을 확인하였고 plasmid pSB2가 매우 安全性이 높음을 확인할 수 있었다.

3. Recombinant plasmid pSB2의 restriction mapping

Vector pBR2 322에서 한자리만 認識切斷하는 Eco RI, Bam HI, Pst I, Hind III, Pvu II 등으로 recombinant plasmid pSB2를 처리하여 얻은 斷片의 전기영동사진은 Fig. 3과 같다.

Vector에 導入된 DNA에 대해서 EcoRI의 認識部位는 없는것으로 나타났으며, Bam HI과 Hind III 認識部位는 한자리만, Pvu II와 Pst I의 認識部位는 그자리임은 確認할수 있다. Pst I 制限酵素로 切斷했을때 斷片의 크기는 7.8kb, 2.2kb, 0.81kb로서 Vector Pst I site를 이미 알고있으므로 導入된 DNA의 Pst I site도 용이하게 알수있다.

導入된 DNA의 각 制限酵素의 切斷位置를 알기위하여 두가지 酵素를 혼합사용함으로써 斷片의 크기를 산출하고 Vector部位의 기존 制限酵素位置를 起點으로 算出하였다. Fig. 4에서 볼수있듯이 Bam HI과 Eco RI 혼합처리로 Bam HI

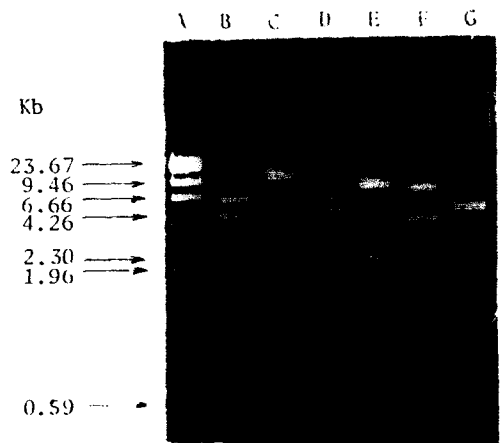


Fig. 3. Electrophoresis of Plasmid pSB2 DNA Digested by Various Restriction Enzymes Lane B; Sal I, C; EcoRI, D; Bam HI, E; Pst I, F; Hind III and G; Pvu II. Lane A is Hind III dgeisted λ DNA as molecular weight marker. (37)

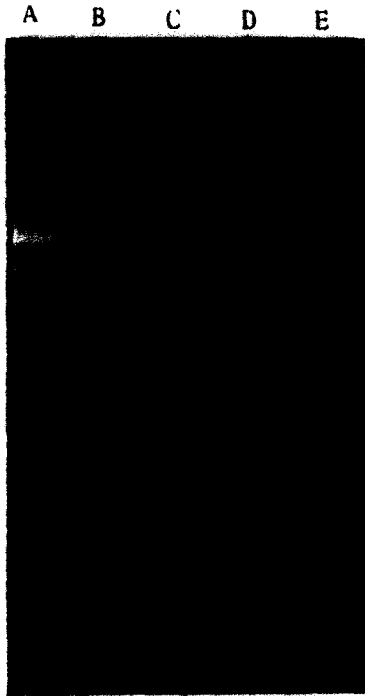


Fig. 4. Electrophoresis of Double Digested pSB 2 Lane B; EcoRI and Bam HI, C; Bam HI and Hind III, D; EcoRI and Pst I, E; EcoRI and Pvu II. Lane A is a molecular weight marker as in legend of Fig. 4.

의 部位를 알수 있고 Bam HI 및 Hind III 처리 결과로 Hind III의 位置를 그리고 Pvu II 및 EcoRI 처리결과로 Pvu II의 位置를 산출하였다. 또 EcoRI 및 Pst I 처리로서 Pst I의 位置를 再確認하였다. 이상의 결과를 종합하여 制限酵素地圖을 표시하면 Fig. 5와 같다.

4. Cellobiase gene의 Expression

E. coli HB 101 (pSB2)을 LB medium에서 배양하여 集菌하고 5배 농축하여 PM buffer에 현탁

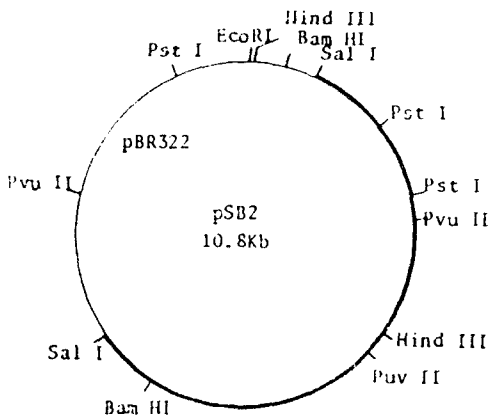


Fig. 5. Restriction Map of Plasmid pSB2

Table 1. μ -Glucosidase Activity of *Cellulomonas* sp CS1-1 and *E. coli* HB101 (pSB2)

Strains	μ -Glucosidase Activity (U/liter)
<i>Cellulomonas</i> sp CS1-1	3,200
<i>E. coli</i> HB101 (pSB2)	
whole cells	132
supernatant after sonication	87

시켜 cellobiase力價를 측정하였다. (Table 1) 이때 酵素活性은 liter당 132units였는데 *Cellulomonas*. sp CS 1-1와 비교할때 약 25대 1의 活性이었다. 그 理由로서 생각되는 要因에는 여러가지가 있을수있다. 즉 cellobiase gene의 크기와 위치 調節遺傳子의 機能, 生成된 cellobiase酵素의 安全性, 細胞內本酵素의 存在位置等等을 들수있다.

cellobiase gene이 導入된 *E. coli* HB 101 (pSB2)는 cellobiase를 sole carbon source로한 ML medium에서 生長하였으나, *E. coli* HB 101 (pBR 322)는 같은 培地에서 전혀 자라지 못하였다.

그러나 *E. coli* HB 101 (pSB2)를 glucose를 포함한 ML medium에서 生育시켰을때와 비교하면 성장속도가 낮게 나타난것은 분균주에서 생성되

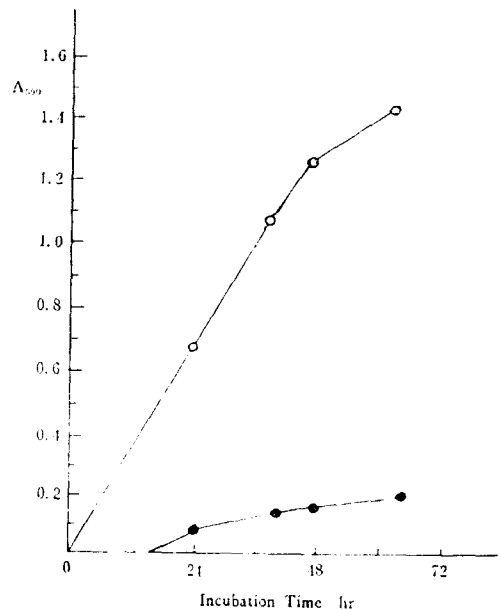


Fig. 6. Growth of *E. coli* HB101 (pSB2) on Minimal Medium Containing 0.5% Glucose or Cellobiose as a Sole Carbon Source
 ---○--- Glucose, ---●--- Cellobiose

는 cellobiase 활성이 낮았는데 기인함을 알수있다.

다음으로 導入된 DNA가 發現過程에서 宿主인 *E. coli* HB 101에 미치는 影響을 보기 위하여 *E. coli* HB 101 (pBR 322)와 *E. coli* HB 101 (pSB2)를 種培養을 거쳐 LB medium에서 生長 曲線을 조사해본결과 pSB2 plasmid를 가진 *E. coli*가 다소 늦게 자라긴 하였으나 큰 차이는 없었다. 이것은 導入된 外來의 cellulomonas의 遺傳子의 生成物이 *E. coli*에 차사적인 影響을 미치고 있지 않음을 뜻하고 있다.

5. Cellobiase gene發現 · 調節機作

Cellulase生合成의 調節機作에서 酵素合成은 glucose에 의해 repression을 받으며, cellulose나 cellobiose에 의해서도 誘導된다. 그러나 高濃度의 cellobiose에 의해서는 repression을 받는다. cellobiase의 生合成도 같은 조절기작이 적용된다. 본 실험에 사용된 *Cellulomonas* sp. CS 1-1의 cellobiase生合成에 대한 연구에서도 그현상은 확인되었다.

Cellulomonas sp. CS 1-1의 cellobiase gene을 가진 *E. coli*에서 같은 현상이 나타나는지의 여부를 확인하기 위하여 *E. coli* HB 101(pSB2)를 LB medium에 接種하고 late log phase에서 glucose 및 cellobiose를 각각 첨가하여 2시간 진탕 배양을 계속한후 酵素力價를 본 결과는 Table 2

Table 2. Effects of Glucose and Cellobiose on Expression of μ -Glucosidase in *E. coli* HB101 (pSB2)

Addition	Conc.	μ -Glucosidase Activity(U/liter)
None		42
Glucose	0.1%	37
	1.0%	25
Cellobiose	0.1%	44
	1.0%	41

와 같다. 여기서 *E. coli* HB 101(pSB2)의 cellulase發現이 *Cellulomonas* sp. CS 1-1와 비슷한 현상을 나타내었다. 이 현상은 導入된 cellulomonas의 遺傳子에 調節遺傳子가 함께 있음을 暗示하고 있다.

한편 *E. coli* HB 101(pSB2)을 glucose ML medium에서 培養했을때 cellobiase活性이 전혀 나타나지 않음으로서 調節機作的 한 단면을 알수 있었다.

謝 辭

本 研究은 科學技術處 特定研究開發費의 補助로 遂行되었으며 本 研究에 도움을 주신분들에게 감사를 드립니다.

摘 要

Cellulomonas sp. CS1-1의 cellobiase(β -glucosidase)遺傳子를 유전자 운반체인 plasmid pBR322에 結合시켜 *E. coli* HB101에 cloning시키고 그 形質體現을 研究하였다.

Cellulomonas sp. CS1-1의 限制체 DNA를 분리하여 EcoRI, BamHI, Pst I, Hind III, Pvu II, Sal I 등으로 切斷하여 pBR322를 Vector로 *E. coli* HB101에 형질전환 결과 制限酵素 Sal I으로 切리한 recombinant plasmid(pSB2)에서만 cellobiase gene의 形質이 發現되었다.

Recombinant plasmid(pSB2)는 cellulomonas由來 遺傳子를 plasmid pBR322의 Sal I 認識部位에 導入하고 있으며 그 크기는 6.4Kb임이 確認되었다. recombinant plasmid pSB2를 한가지 또는 두가지 制限酵素를 혼합처리 하므로서 外來 DNA의 制限酵素位置圖를 作成하였다. 본 recombinant plasmid pSB2가 *E. coli* HB101의 生長에 抑制效과를 크게 미치지 않는것은 β -glucosidase activity는 *E. coli*에서 모반의 25분의 1로 나타났다.

E. coli HB101(pSB2)의 cellobiase의 生合成은 glucose의 存在에 의해 抑制을 받으며 cellobiose에 의해 誘導되었다.

引 用 文 獻

- Armentrout, R.W. and R.D. Brown, 1981. Molecular cloning of genes for cellobiose utilization and their expression in *E. coli*. *Appl. and Envi. Microbiology*, 41(6), 1355-1362.
- Berkner, K.L. and Folk, W.R. 1977. EcoRI Cleavage and Methylation of DNAs Containing Modified Pyrimidines in the Recognition Sequence. *J. Biol.*

- Chem.*, 252(10) 3185, 1977.
- Bergey's Manual of Determining Bacteriology, 1974. 8th edition, p. 629.
- Davis, R.W., Botstein, D and J.R. Roth, 1980. A Manual for Genetic Engineering; Advanced Bacterial Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, p. 223.
- Davis, R.W. et al, 1980. Advanced Bacterial Bacterial Genetics Cold Spring Harbor, p. 234.
- Goodman, H.M., and R.J. MacDonald, Method in Enzymology, Vol. 68, p. 75-90.
- Holmes, D.S., and M. Quigley, 1981. A Rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids, *Analytical Biochemistry*, 114, 193-197.
- Kado, C.I., and S.T. Liu, 1981. Rapid Procedure for Detection and Isolation of Large and Small Plasmids. *J. of Bacteriol.*, 145(3), 1365-1373.
- Miller, J.H., 1972. Experiments in Molecular Genetics Cold Spring Harbor Lab., p. 352.
- Ray Wu, 1979. Recombinant DNA, Method in Enzymology, Vol. 68, p. 262.
- Ray Wu, R. Padmanabhan and R. Bambara, Methods in Enzymology, Vol. 29, p. 231-237.
- Richard, P.A.D. and J.A. Ide, 1981. *Biotechnology Letters*, 3(9), 487.
- Whittle, D.J., D.G. Kilburn and R.C. Miller, 1982. Molecular Cloning of a *Cellulomonas* Cellulase Gene in *Escherichia coli*. *Gene* 17, 139-145.
- Unpublished data by authors.