

Streptomyces sp. S56 의 Endo 형 Inulase 생산

하영주 · 최언호¹ · 김수일*

서울대학교 농과대학 농화학과, ¹서울여자대학교 식품과학과

Production of Endo-Type Inulase from *Streptomyces* sp. S56

Ha, Young-Ju, Eon-Ho Choi¹ and Su-Il Kim*

Department of Agriculture Chemistry, Seoul National University, Suwon, Korea

¹Department of Food Science, Seoul Woman's University, Seoul, Korea

A strain producing extracellular endo-type inulase was selected from *Actinomycetes* isolated from soil, and identified as *Streptomyces* sp. The maximum inulase production was obtained with medium containing inulin 1.0%, yeast extract 1.0%, (NH₄)₂HPO₄ 0.4%, NH₄H₂PO₄ 0.8%, KCl 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, FeSO₄·7H₂O 0.001% at 96 hours culture in jar fermentor. The endo-type inulase was considered to be an inducible enzyme produced by inulin only.

Inulase 는 기질에 대한 효소활성의 차이나 효소작용의 차이에 따라 다음 두 가지로 분류된다(1). 첫째는 β -D-fructofuranosidase로 알려진 β -D-fructofuranosidefructohydrolase(EC 3.2.1.26)로서 inulin 뿐만 아니라 sucrose 에도 상당히 높은 활성을 나타내는, inulin 의 말단으로부터 β -2,1 결합을 fructose 단위로 가수분해하는 exo 형 inulase 이다. 곰팡이(2-4), 효모(5-13), 세균(14) 등 대부분의 미생물이 생산하는 inulase 가 exo 형인 것으로 알려졌다. 둘째는 inulinase 로 알려진 2,1- β -D-fructanfructanohydrolase(EC 3.2.1.7)로서 inulin 에는 활성이 높으나 sucrose 에는 활성이 거의 없는, inulin 내부의 β -2,1 결합을 가수분해하는 endo 형 inulase 이다. 식물체 내에서 얻어지는 대부분의 inulase(15, 16)와 *Aspergillus niger*(12,17), *Streptomyces chibaensis*(18, 19), *Pseudomonas* sp.(20, 21)에서 생산되는 극히 일부 미생물의 inulase 만이 이에 속하는 것으로 보고되었다.

미생물이 생산하는 exo 형 및 endo 형 inulase 는 대부분이 탄소원으로 inulin 을 사용할 때 생산되는 유도효소이나 inulase 중 *Bacillus subtilis*(14)와 *Kluyveromyces fragilis*의 돌연변이체(9)의 inulase 만이 구성효소로 알려져 있다.

한편, 재배가 용이하고 수확량이 많은 돼지감자(*Helianthus tuberosus* L.)로부터 쉽게 대량으로 얻을 수 있는(22) inulin 은 인체 내에 이를 분해하는 효소가 없기 때문에 직접 식용으로 사용되지 못하고 일부 시료로 사용될 뿐 용도가 거의 없다. 그러나 최근 inulin 을 이용한 ethanol 생산(23, 25)과 fructose 생산(26, 27)에 대한 관심이 높아지면서 inulin 의 이용에 관한 많은 연구가 진행되고 있다. 특히 감미료로서 그 사용량이 증가하고 있는 fructose 는 inulase 로 inulin 을 가수분해시켜 얻을 경우 매우 효율적이고 경제적이라고 예상되기 때문에(22) 많은 주목을 받고 있으며 이를 위한 inulase 생산균주의 선발, 효소의 정제 및 성질규명(6, 8, 13, 19, 21), 효소의 고정화 연구(28, 29)가 활발하게 이루어지고 있다.

본 연구에서는 일부 미생물에서만 보고된 endo 형 inulase 를 생산하는 균주를 토양에서 분리한 방선균으로부터 선발하여 효소생산을 위한 최적조건을 찾아보고 배양특성을 알아보았다.

재료 및 방법

Endo 형 Inulase 생산균주의 분리

Key words: Endo-inulase production, *Streptomyces* sp.

*Corresponding author

서울대학교 농과대학 주변에서 채취한 토양을 방선균 선별을 위하여 Tsao 등(30)의 방법으로 처리하였다. 처리토양을 살균수로 1,000 배 희석하고 그 현탁액을 전분 대신 inulin 을 사용한 inulin-casein medium(31)에 dilution pour plate method 로 접종하여 30°C에서 7 일간 배양한 후 방선균으로 보이는 단일 colony 들을 선별하였다. 토양에서 분리한 방선균을 inulase 생산 기본배지(18) 5 ml 에 접종, 30°C 에서 5 일간 진탕배양한 후 소량의 배양상징액을 여과지에 점적하고 urea-metaphosphoric acid(32)로 발색시켜 배지 내의 inulin 이나 fructose oligomer 를 완전히 소모한 것으로 보이는 균주를 1 차 선별하였다.

Endo 형 inulase 생산균주는 1 차 선별된 균주의 배양상징액과 2% inulin 용액을 35°C에서 6 시간 반응시킨 후 분해산물을 TLC 에 의해 Collins 등(33)의 방법으로 검정하여 TLC plate 상에서 fructose 와 fructose-oligomer 등을 나타내는 것을 endo 형 inulase 생산균주로 선별하였다.

균주동정

선별된 endo 형 inulase 생산균주의 동정은 yeast extract-malt extract agar(34)에서 30°C로 15 일간 배양한 균주의 포자 및 균사 형태를 주사전자현미경으로 관찰한 방법과 균사의 세포벽 성분 중 diaminopimelic acid(DAP)의 meso 형 또는 LL 형 검정을 하는 Lechevalier(35) 방법을 사용하였다.

효소 생산조건 실험

탄소원의 영향은 inulase 생산 기본배지 중 탄소원을 inulin, glucose, sucrose, soluble starch 로 변경, 각각 1% 씩 첨가하여 만든 액체배지를 사용하였으며 유기질소원의 영향은 inulase 생산 기본배지의 유기질소원을 0.5% yeast extract 의 조단백질량과 동등한 수준으로 peptone, 대두박, beef extract, corn steep liquor 를 각각 첨가한 액체배지를 사용하여 균을 접종한 후 30°C에서 5 일간 진탕배양하면서 시간 별로 배양상징액의 inulase 활성을 측정 비교하였다.

무기질소원의 영향은 inulase 생산 기본배지의 무기질소원의 질소 함량과 동등한 수준으로 $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, NH_4NO_3 를 각각 첨가한 액체배지를 사용하였고, 무기염류의 영향은 KCl 및 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 0.01-0.25% 로, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 를 0-0.01% 로 첨가농도를 달리한 액체배지를 사용하였으며, 각 액체배지에 균을 접종하여 30°C에서 5 일간 진탕배양한 후 배양상징액의 inulase 활성을 측정 비

교하였다.

효소의 생산

발효조의 접종은 inulase 생산 최적배지 100 ml 가 든 삼각 flask 에 균주를 접종하여 30°C에서 3 일간 진탕배양한 액을 사용하였다. 발효조는 용량 4l 의 용기를 사용하였으며 2l 의 최적배지 용액에 접종균주 배양액 20 ml 를 첨가하여 30°C에서 300 rpm 으로 교반하면서 96 시간 배양하였다. 통기조건은 1.5 vvm(the volumetric rate of air flow per unit volume) 이었고, AZ 20R 0.01% 을 antifoam agent 로 사용하였다.

분석방법

Inulase 활성은 김 등(6)의 방법에 따라 효소에 의해 inulin 이 분해되어 생성되는 환원당량을 DNS 법(36)으로 측정함으로써 결정하였고, 효소단위는 1 분간 1 μmole 의 환원당이 생성되는 것을 1 단위로 하였다. 총 당정량은 Phenol-sulfuric acid 법(37)으로 glucose 를 표준으로 하여 측정하였으며, 균체량은 배양액 약 25 ml 를 사용하여 건조질량법(38)으로 균체무게를 측정하여 건조질량(g/l)으로 표시하였다.

결과 및 고찰

Endo 형 inulase 생산균주의 분리

토양시료로부터 분리한 74 개의 방선균을 inulase 생산 기본배지에서 배양한 후 urea-metaphosphoric acid 방법으로 inulin 소모도를 알아 본 결과 16 개 균주가 inulin 을 완전히 소모한 것으로 나타나서 이들을 inulase 생산균주로 1 차 선별하였다.

상기 16 개 균주의 inulase 생산 기본배지 배양상징액을 2% inulin 과 반응시키고 반응물을 TLC 로 분석한 결과는 Fig.1 에 나타내었다. Exo 형 inulase 는 inulin 의 말단으로부터 fructose 를 가수분해하므로 분해산물에는 분해되지 않은 inulin 과 fructose 만 나타날 것이며, endo 형 inulase 는 불규칙적으로 inulin 내부의 β -2,1 결합을 가수분해하므로 분해산물에는 fructose 이외에 여러가지 중합도를 가진 fructose-oligomer 가 나타날 것이다. 효소분해산물의 분석결과 TLC 상에서, No.7, 1-14, 16, 17, 51, 56, 63, 74 는 fructose 이외에 여러가지 중합도를 가진 fructose-oligomer 가 나타나서 이들 11 개 균주는 endo 형 inulase 를 생산하는 균주로 확인되었다.

Endo 형 inulase 를 생산하는 11 개 균주 중 효소생

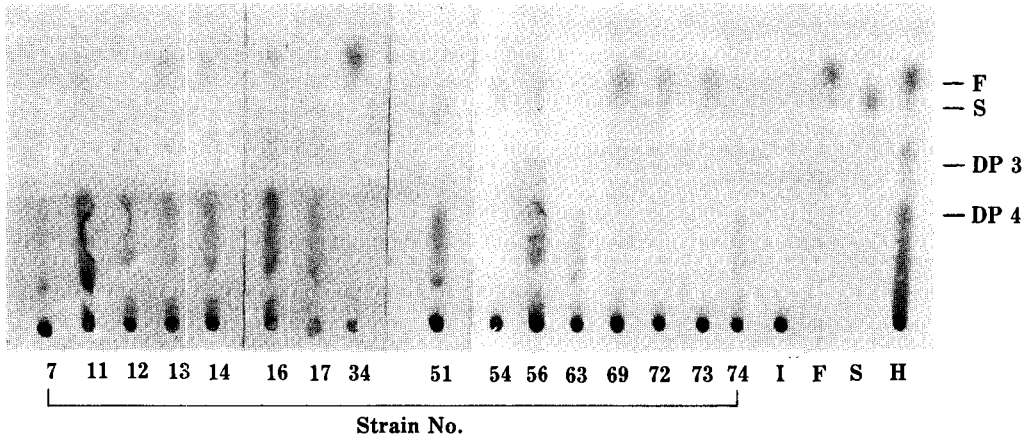


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of inulin hydrolysate.

Inulin was hydrolyzed for 6 hours at 35°C with culture broth of 16 strains.

I: Inulin, S: Sucrose, F: Fructose, H: Inulin hydrolysate, DP: Degree of polymerization

산능이 가장 높은 균주를 선별하기 위하여 순수분리한 각 균주를 inulase 생산 기본배지에서 배양, 배양액의 inulase 활성을 측정해 본 결과 No.56 균주가 0.5 units/ml 로 가장 높은 inulase 활성을 나타내었다. 따라서 다음의 endo 형 inulase 에 대한 연구실험은 No.56 균주를 사용하여 행하였다.

균주동정

Endo 형 inulase 생산균주 No.56 의 포자와 균사를 주사전자현미경으로 관찰한 사진은 Fig.2 와 같다. No.56 균주는 기균사가 많았으며 50 개 정도의 포자가 simple 형의 spiral(S) 형태로 spore chain 을 형성하는 smooth 형 포자를 가지는 것으로 나타났다 (Fig.2). 한편 No.56 균주의 영양균사는 액체배양시 광학현미경으로 관찰한 결과 분절화되지 않는 것으로 나타났다.

방선균의 분류에 있어서 영양균사가 분절화되지 않는 경우에는 균사의 세포벽 성분이 LL-DAP 를 포함하면 *Streptomyces* 속, meso-DAP 를 포함하면 *Actinomadura* 속, meso 및 LL-DAP 를 포함하면 *Kitasatosporia* 속으로 분류할 수 있다 (39, 40). 따라서 No.56 균주의 분류학상의 위치를 알아보기 위해 균주의 배양균사체를 가수분해하여 세포벽 성분을 TLC 로 알아 본 결과는 Fig.3 에 나타내었다. No.56 균주의 구성물질 중 DAP 는 모두 LL 형으로 나타났다 (Fig.3).

이상의 결과를 종합해보면 No.56 균주는 첫째 연쇄상의 포자를 가지고 있고, 둘째 영양균사가 분절

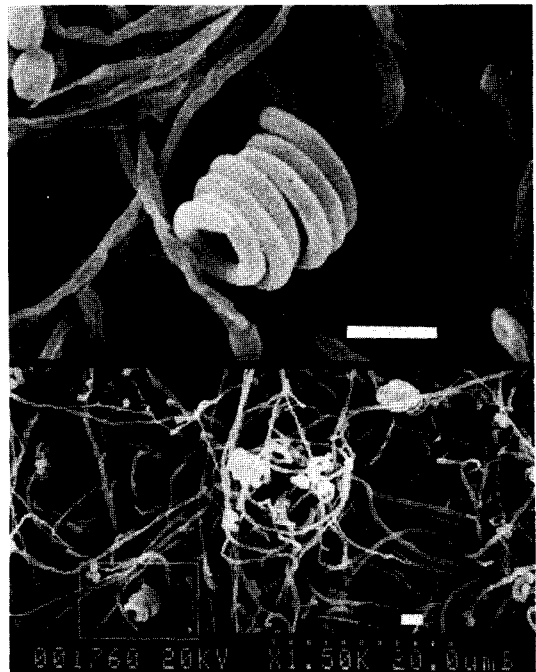


Fig. 2. Scanning electron micrograph of strain No. 56.
The bar denotes 2µm.

화되지 않았으며, 셋째 세포벽 성분 중 DAP 가 LL 형이므로 *Streptomyces* 속에 포함되는 것으로 추정되었다. 따라서 본 균주는 *Streptomyces* sp. S56 으로 명명하였다.

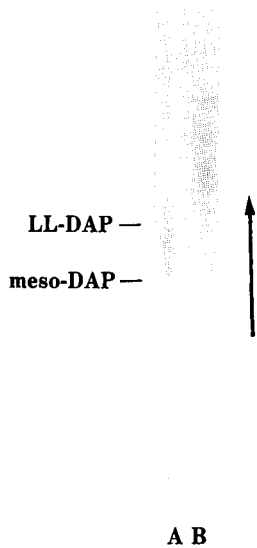


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of diaminopimelic acid (DAP) extracted from strain No. 56.

A: DL-DAP (meso-and LL-DAP)
 B: Cell wall extract from strain No. 56

효소 생산조건 검토

탄소원의 영향 : 탄소원으로 inulin, glucose, soluble starch 또는 sucrose 를 각각 1% 농도로 배지에 첨가하여 배양 시간별로 inulase 활성을 측정 한 결과는 Fig.4 에 나타내었다. Endo 형 inulase 의 생산은 inulin 을 탄소원으로 사용했을 때만 배양 96 시간에 0.5 units/ml 로 가장 높고 sucrose, glucose, soluble starch 를 사용했을 때는 inulase 가 거의 생산되지 않는 것으로 나타났 다(Fig.4). 그러므로 본 endo 형 inulase 는 탄소원으로 inulin 을 사용할 때에만 생산 되는 유도효소인 것으로 추정되었다. *Streptomyces chibaensis* (18), *Pseudomonas* sp.(20)에서 발견된 endo 형 inulase 로 모두 유도효소로 보고되었 으며 구성효소는 아직 발견된 바가 없다.

유기질소원의 영향 : 유기질소원으로 corn steep liquor (CSL), yeast extract, 대두박, beef extract 또는 peptone 을 각각 사용하여 배양한 후 배양 시간별로 inulase 활성을 측정 한 결과는 Fig.5 에 나타내었다. Endo 형 inulase 의 생산은 유기질소원으로 yeast extract 를 사용했을 때 84 시간 배양에 0.6 units/ml 로 가장 높았고, 대두박과 beef extract 의 경우 108 시간 배양에 0.3 units/ml, 0.35 units/ml, CSL 의 경우 132 시간 배양에 0.3 units/ml, peptone 의 경우 156 시간 배양에 0.4 units/ml 로 나타나서 (Fig.5) 유기질소원으로 yeast extract 를 사용할 때

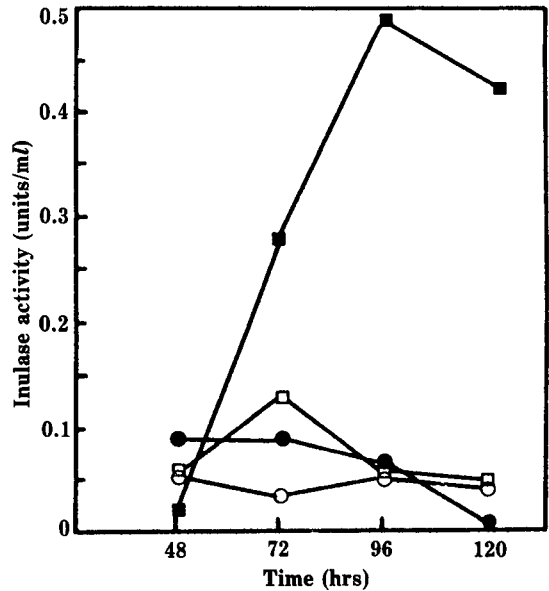


Fig. 4. Effect of carbon sources on endo-type inulase production from *Streptomyces* sp. S56.

■: Inulin, ●: Soluble starch, □: Sucrose, ○: Glucose

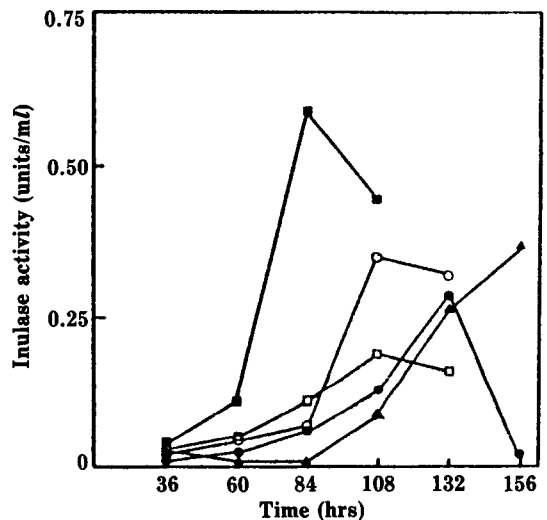


Fig. 5. Effect of organic nitrogen sources on endo-type inulase production from *Streptomyces* sp. S56.

■: Yeast extract, ●: Corn steep liquor, □: Soybean meal, ○: Beef extract, ▲: Peptone

endo 형 inulase 는 가장 빨리 유도되고 가장 높은 생산능을 나타내었다. 한편 yeast extract 농도에 따른 효소생산능은 Table 1 에 나타내었다. Endo 형 inulase 생산은 yeast extract 1.0% 첨가시 가장 효

Table 1. Effect of yeast extract concentration on endo-type inulase production by *Streptomyces* sp. S56.

Yeast extract conc. (% w/v)	Relative activity (%)
0.5	69
1.0	100
1.5	100
2.0	18
2.5	5

Table 2. Effect of inorganic nitrogen sources on endo-type inulase production by *Streptomyces* sp. S56.

(NH ₄) ₂ HPO ₄	51
NH ₄ H ₂ PO ₄	84
NH ₄ NO ₃	10
(NH ₄) ₂ HPO ₄ + NH ₄ H ₂ PO ₄	100

과적이었으며 그 이상의 농도에서는 균체증식은 활발하나 효소생산능은 감소하는 것으로 나타났다 (Table 1). Endo형 inulase를 생산하는 *Streptomyces chibaensis* (18), *Pseudomonas* sp.(20)는 유기질소원으로 CSL을 사용할 때 inulase 생산을 현저하게 증가시키는 것으로 알려져 본 실험에서 yeast extract를 유기질소원으로 사용할 때 inulase 생산이 높은 것과는 차이를 나타내었다.

무기질소원 및 무기염류의 영향: 무기질소원으로 (NH₄)₂HPO₄와 NH₄H₂PO₄, (NH₄)₂HPO₄, NH₄H₂PO₄, NH₄NO₃를 첨가한 액체배지에서 균주를 배양 후, inulase 활성을 측정된 결과는 Table 2에 나타내었다. Endo형 inulase 생산은 무기질소원으로 (NH₄)₂HPO₄ 0.4%와 NH₄H₂PO₄ 0.8%를 함께 사용했을 때 효과적인 것으로 나타났다 (Table 2). Endo형 inulase를 생산하는 *Streptomyces chibaensis* (18), *Pseudomonas* sp.(20)는 무기질소원으로 (NH₄)₂HPO₄를 단독으로 사용하는 것이 효과적인 것으로 보고되어 본 실험의 결과와 차이를 보였다. 무기염류인 KCl, MgSO₄·7H₂O, FeSO₄·7H₂O의 농도를 변화시켜 첨가한 배지에서 균주를 배양한 후 inulase 활성을 측정하여 얻은 결과는 Table 3에 나타내었다. KCl과 MgSO₄·7H₂O는 각각 0.05%, FeSO₄·7H₂O는 0.001%를 사용했을 때 inulase 생산이 가장 높은 것으로 나타났다 (Table 3). *Pseudomonas* sp.(20)는 FeSO₄·7H₂O 0.003%를, *Streptomyces chibaensis* (18)는 KCl 0.01%, FeSO₄·7H₂O

Table 3. Effect of metallic salts concentration on endo-type inulase production by *Streptomyces* sp. S56.

Metallic salts	Concentration (% w/v)	Relative activity (%)
KCl	0.01	74
	0.05	100
	0.25	79
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.01	62
	0.05	100
	0.25	47
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0	62
	10 ⁻⁴	74
	10 ⁻³	100
	10 ⁻²	45

Table 3. Optimum composition of medium for endo-type inulase production by *Streptomyces* sp. S56.

Inulin	1.0 %
Yeast extract	1.0 %
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.4 %
NH ₄ H ₂ PO ₄	0.8 %
KCl	0.05 %
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05 %
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001%
pH	7.0

0.0001%를 사용했을 때 endo형 inulase 생산이 증가되는 것으로 알려져 본 실험과는 다르게 나타났다.

이상의 결과를 종합하여 Table 4에 endo형 inulase 생산균주 *Streptomyces* sp. S56의 최적배지 조성을 표시하였다.

배양시간에 따른 효소생산

Endo형 inulase 생산균주 No.56을 최적배지 (Table 4) 2l가 든 4l 발효조에서 배양시키면서 시간에 따른 균체량, 총당 및 환원당량과 inulase 생산과의 상관관계는 Fig.6에 나타내었다.

Endo형 inulase 생산은 배양 60시간부터 증가하여 배양 96시간에 0.79 units/ml로 최고를 나타내었고, 균체량은 배양 48시간부터 증가하여 배양 96시간에 6.65 g/l로 가장 높았다. 환원당량은 배양 60시간에 6.70 mg/ml로 최고치에 달한 후 배양 84시간에 0.40 mg/ml로 떨어졌다. 총당량은 배양 48시

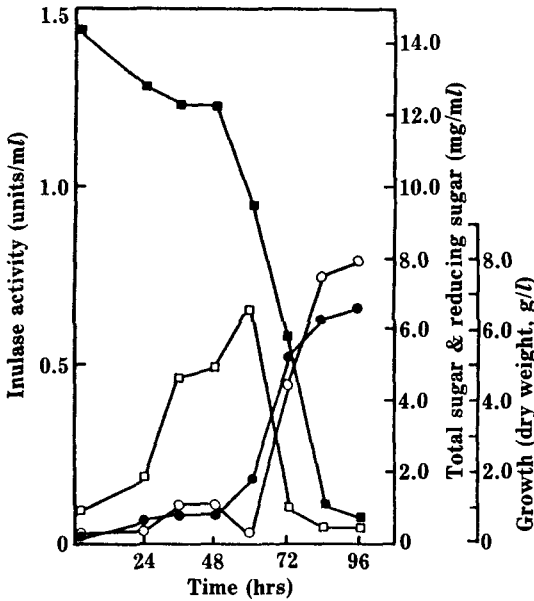


Fig. 6. Growth and endo-type inulase production of *Streptomyces* sp. S56 during fermentor culture.

●-●: Growth (dry weight, g/l)
 ○-○: Inulase activity (units/ml)
 ■-■: Total sugar (mg/ml)
 □-□: Reducing sugar (mg/ml)

간부터 감소하여 배양 96 시간에는 0.7 mg/ml 로 떨어졌다(Fig.6). 이상의 결과를 종합해보면 균체량 증가와 inulase 생산증가는 동일양상을 보였으며, inulase 생산이 증가함에 따라 총당량은 감소, 환원당량은 일시적인 증가 후 감소를 나타내었다. 한편 endo형 inulase를 생산하는 *Pseudomonas* sp.(20)의 경우 균체량이 최고에 달한 다음에 inulase 생산이 증가하기 시작하는데 이는 본 실험의 균체량 증가와 inulase 생산증가가 동일양상을 보이는 것과 차이를 보였다.

요 약

토양에서 분리한 방선균으로부터 endo형 inulase를 생산하는 균주를 선발, 동정하였으며 효소생산 최적조건을 검토하였다. 선발된 균주는 *Streptomyces* sp.로 동정되었다. 본 균주는 유기질소원으로 yeast extract 1.0%, 탄소원으로 inulin 1.0%, 무기질소원으로 (NH₄)₂HPO₄ 0.4%와 NH₄H₂PO₄ 0.8%, 무기염으로 KCl 0.05%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, FeSO₄·7H₂O 0.001%를 사용한 배지에서 96 시간 배양했을 때 최대 효소생산을 보였으며, 탄소원으로

inulin을 사용했을 때에만 효소생산이 높아 본 균주가 생산하는 endo형 inulase는 유도효소로 추정되었다.

참고문헌

- Vandamme, E.J. and D.G. Derycke: *Adv. Appl. Microbiol.*, **29**, 139 (1983).
- 김기철: 한국농화학지, **18**, 177(1975).
- Nakamura, T. and S. Hoashi: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **43**, 599 (1969).
- Nakamura, T., S. Hoashi and S. Nakatsu: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **52**, 105 (1978).
- 류연우, 김신제, 김수일: 한국농화학지, **27**, 45(1984).
- 김수일, 문항식: 한국농화학지, **30**, 169 (1987).
- Guiraud, J.P. and P. Galzy: *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 305 (1981).
- Choi, W.S., Y.K. Choi, S.I. Kim and S.M. Byun: *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **27**, 238 (1984).
- GrootWassink, J.W.D. and G.M. Hewitt: *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 31 (1983).
- Lam, K.S. and J.W.D. GrootWassink: *Enzyme Microb. Technol.*, **7**, 239 (1985).
- Negoro, H. and E. Kito: *J. Ferment. Technol.*, **51**, 96 (1973).
- Beluche, I., J.P. Guiraud and P. Galzy: *Folia Microbiol.*, **25**, 32 (1980).
- Guiraud, J.P., C. Viard-Gaudin and P. Galzy: *Agric. Biol. Chem.*, **44**, 1245 (1980).
- Uhm, T.B., J.S. Hong, H.S. Sohn, M.K. Park and S.M. Byun: *J. Korean Agric. Chem. Soc.*, **28**, 131 (1985).
- Edelman, J. and T.G. Jefford: *Biochem. J.*, **93**, 148 (1964).
- Rutherford, P.P. and A.C. Deacon: *Biochem. J.*, **126**, 569 (1972).
- Nakamura, T., T. Kurokawa, S. Nakatsu and S. Ueda: *Nippon Nogei Kagaku Kaishi*, **52**, 159 (1978).
- 정구영, 박성오, 이계호: 한국농화학지, **23**, 211(1980).
- 정구영, 박관화, 이계호: 한국식품과학지, **13**, 67(1981).
- 이태경, 상하진, 최용진, 양한철: 산업미생물학회지, **15**, 176(1987).
- 이태경, 최용진, 양한철: 산업미생물학회지, **16**, 259(1988).

22. Fleming, S.E. and J.W.D. GrootWassink: *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **12**, 1 (1979).
23. Guiraud, J.P., J. Daurelles and P. Galzy: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 1461 (1981).
24. Lee, H.J., S.I. Kim and Y.I. Mok: Alternative sources of Energy for Agriculture, FFTC Book Series No. 28, 309 (1985).
25. 류연우, 김철호, 김수일 : 산업미생물학회지, **12**, 51 (1984).
26. Byun, S.M. and B.H. Nahm: *J. Food Sci.*, **43**, 1871 (1978).
27. Bajpai, P. and A. Margaritis: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **31**, 305 (1985).
28. Kim, W.Y., S.M. Byun and B.H. Nahm: *Korean J. Food Sci. Technol.*, **11**, 283 (1979).
29. Kim, W.Y., S.M. Byun and T.B. Uhm: *Enzyme Microb. Technol.*, **4**, 239 (1982).
30. Tsao, P.H., C. Leben and G.W. Keitt: *Phytopathology*, **50**, 88 (1960).
31. Williams, S.T. and T. Cross: *Meth. Microbiol.*, **4**, 295 (1971).
32. Dawson, R.M.C., D.C. Elliott, W.H. Elliott and K.M. Jones: Data Book for Biochemical Research, 3ed, p475 Oxord Univ. Press, New York (1986).
33. Collins, F.W. and K.R. Chandorkar: *J. Chromatogr.*, **56**, 163 (1971).
34. Shirling, E.B. and D. Gottlieb: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **16**, 313 (1966).
35. Lechevalier, M.P. and H. Lechevalier: *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **20**, 435 (1970).
36. Melius, P.: *J. Chem. Educ.*, **48**, 765 (1971).
37. Dubois, M., K.A. Gilles, J.K. Hamilton, P.A. Rebers and F. Smith: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
38. Calam, C.T.: *Meth. Microbiol.*, **1**, 567 (1969).
39. Staneck, J.L. and G.D. Roberts: *Appl. Microbiol.*, **28**, 226 (1974).
40. Omura, S.: *Microbiol. Rev.*, **50**, 259 (1986).

(Received October 7, 1989)