

Chitinase와 항진균성 항생물질을 생산하는 방선균 *Promicromonospora* sp. KH-28의 선발과 동정

한길환 · 김상달*
영남대학교 응용미생물학과

Selection and Identification of *Promicromonospora* sp. KH-28 Producing Chitinase and Antifungal Antibiotic. Han, Kil-Hwan and Sang-Dal Kim*. Department of Applied Microbiology, College of Natural Resources, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea - A multifunctional antagonistic bacterium, producing both antifungal antibiotic and chitinase that could be used as biocontrol agents against fungal plant pathogens was isolated from the plant-disease suppressive soil. The isolate was identified as *Promicromonospora* sp. KH-28 from various morphological, biochemical and physiological tests. The antifungal antibiotic produced by *Promicromonospora* sp. KH-28 was soluble in *n*-butanol, methanol, toluene, *n*-hexane, ethanol but insoluble in H₂O, acetone, chloroform, ethylacetate and ethylether. It inhibited the growth of fungal plant pathogens of *Fusarium solani*, *F. oxysporum*, *Alternaria mali* and *Phytophthora capsici*. The antagonistic *Promicromonospora* sp. KH-28 produced optimally the antifungal antibiotic when it was cultivated at pH 7, 30 °C for 5 days.

Key words : *Promicromonospora* sp., multifunctional biocontrol, chitinase and antibiotic

산업의 발전으로 인한 환경오염문제가 심각해지고 있으며 특히 관행농업의 발전은 화학비료 및 화학농약의 사용을 증가시켜 더욱 심각한 환경문제를 야기하고 있다. 화학농약의 과다사용으로 인하여 식물병원균의 화학농약에 대한 저항성 획득, 잔류독성, 토양의 산성화, 인축의 독성, 천적에 미치는 영향과 식수원의 오염 및 생태계 파괴 등 그 피해가 날로 심각해지고 있다. 따라서 이와 같은 화학농약에 의한 극심한 부작용으로부터 벗어나기 위한 대체방법의 하나로 토양내의 길항미생물에 의한 식물병원균의 발병억제방법인 생물방제법이 활발히 연구되고 있다[9].

길항미생물을 이용한 생물방제법으로는 진균성 식물병원균의 세포벽 구성성분인 chitin, β -1,3-glucan, mannan 등의 외막구성 물질을 분해할 수 있는 chitinase, glucanase, mannanase 등의 가수분해효소를 이용하는 기작[5, 10, 11]과 길항미생물이 특이적 대사산물인 항생물질을 분비하여 식물성 병원균의 생육을 직접 억제하는 항생기작이 있다[2, 12]. 또한 토양환경내에서 식물병원균의 생육에 필요한 철이온(Fe²⁺)을 경쟁적으로 결합(chelating)하는 siderophore를 생산함으로써 병원성 진균의 생육을 저해하는 기작을 이용하는 생물방제법도 연구하고 있다[6, 13]. 이 중에 항진균성 항생물질들은 대부분 *Streptomyces* 속에 의하여 생산되며 의학용 항생제 개발에 많이 활용되고 있으나, 농업용 미생물농약제제로서의 산업화에도 많은 가능성을 가지고 있다. 그러나 지금까지 길항미생물을 이용한 생물학적 방제법

으로서 외막가수분해효소나 항생물질을 별도로 생산하는 길항균주는 실제 토양실험에서 큰 효과를 거두지 못했던 것이 사실이다. 따라서 외막가수분해효소인 chitinase와 항진균성 항생물질을 동시에 생산하는 다기능 길항균주를 선발한다면 매우 효과적인 생물방제법이 가능할 것이다.

본 연구에서는 토양전염성의 병원성진균을 특이적으로 강력하게 저해하는 길항미생물을 저병해 경작지 토양으로부터 분리하여 *Fusarium oxysporum* 등의 토양전염성 식물병원균을 방제하는데 이용하였으며, 이를 위해 외막가수분해효소인 chitinase 생산과 항진균성 항생물질 생산의 두가지 길항능력을 가진 복수 기능성 토양방선균을 선발하고 이를 동정하였다. 선발된 길항균주가 생산하는 항생물질의 최적생산조건을 확인하여 차후 대량생산 및 토양 적용에도 활용하고자 하였다.

재료 및 방법

길항성 방선균의 선발

전국 각지의 저병해 경작지 토양을 대상으로 길항성 방선균을 선발하기 위해 각지에서 채취한 근권(rhizosphere) 토양시료 1g 씩을 80 °C에서 30분 정도 열처리 한 후 멸균 생리식염수 10 ml에 넣고 20분 동안 교반한 다음 멸균수로 10⁻³에서 10⁻⁵ 배로 희석하여 0.1 ml를 방선균 분리용 배지 starch-nitrate agar 배지에 도말한 후 28 °C에서 2내지 4 주간 배양하여 나타난 사상 형태의 방선균 집락(colony)을 분리 배양하였다. 분리 배양한 균주의 집락 형태 및 광학현미경상에서 전형적인 방선균 형태를 나타낸 500여 균

*Corresponding author

Tel. 82-53-810-2395, Fax. 82-53-811-4319
E-mail: sdkim@yucc.yeungnam.ac.kr

주를 1차로 선발하여 동결 건조하여 보관하였다[14].

항진균성 chitinase 생산성 확인 및 활성도 조사

선발된 방선균을 대상으로 chitinase를 생산하는지의 여부를 조사하기 위하여 chitinase 생산배지(colloidal chitin 4 g, K₂HPO₄ 0.7 g, MgSO₄ · 5H₂O 0.5 g, KH₂PO₄ 0.3 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.01 g, MnCl₂ 1.0 mg, ZnSO₄ 1.0 mg, agar 20 g, pH 7.0)의 plate 상에 분리된 균주를 접종 한 후 colloidal chitin 이 분해되어 clear zone을 형성하는지의 유무로 조사하였다. 또한 환천을 첨가하지 않은 chitinase 생산배지에 4 일간 배양시켜 원심분리한 후 배양상등액을 황산암모늄으로 침전시키고 membrane sack(M.W. 12,000)으로 투석하여 조정된 chitinase 효소를 얻어 효소활성도를 측정하였다.

효소활성측정은 0.1 M citrate buffer(pH 6.0) 2.0 ml과 0.5%의 colloidal chitin 1.0 ml을 넣고 효소액의 2.0 ml을 넣어 40 °C에서 1시간 동안 진탕반응시킨 후 1 ml의 반응액을 100 °C에서 15분간 가열하여 효소반응을 정지시켰다. 그 반응액에서 분해가 되지 않은 chitin과 분리하기 위해 5000 rpm으로 원심분리시킨 후 상등액 내의 생산된 N-acetylglucosamine의 양을 Reissig 등의 방법[7]에 따라 측정하였으며, chitinase 활성의 1 unit는 1 μM의 N-acetylglucosamine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

항진균성 항생물질 생산균주의 선발

선발된 chitinase를 생산하는 방선균 중에서 항진균성 항생물질을 생산하는 균주를 선발하기 위해 Bennett's 배지 (glucose 10 g, peptone 2 g, yeast extract 1 g, beef extract 1 g, pH 7.0)에서 28 °C, 5일간 배양시킨 배양액을 membrane sack (Sigma, Co., M.W. 12,000)으로 여과하여 저분자와 고분자물질을 분리한 후 시들음병균인 *F. oxysporum*을 대상으로 paper disk 법에 의해 항균력을 조사하였다.

길항방선균주의 분류학적 동정

선발된 길항균주의 분류학적 동정을 위해서는 Bergey's manual of systematic bacteriology와 Manual of methods for general bacteriology의 기준에 준하여 동정하였으며[4], 특히 선발방선균의 경우 International Streptomyces Project, numerical taxonomy 방법에 의해 동정하였다[8, 5]. 형태학적 특성은 International Streptomyces Project 배지에서 배양한 후 광학현미경 및 전자현미경으로 관찰하였으며, 생화학적 동정은 세포벽 내의 diaminopimelic acid 분석, 세포의 당 분석 등으로 확인하였다. 또한 생리학적 특성은 탄소원과 질소원의 이용성, 항균활성시험, 기질분해 여부 등을 조사하였다[3,16]. 이와 같은 41가지 단위형질 실험결과를 Ward 등에 의해 개발된 computer program인 TAXON program을 이용하여 속(genus) 및 종(species) 단계로 확률적 수리 동정을 하였다[5].

항생물질 생산성의 조건조사

선발된 항진균성 길항균주의 항생물질 생산에 미치는 최적의 배양시간을 조사하기 위하여 각각의 항생물질 생산 배지에 종배양시킨 선발 방선균을 1% 되게 접종하여 30 °C에서 배양하면서 시간별로 균의 성장 및 배양 상등액에서의 *F. oxysporum*에 대한 길항능을 각각의 분석 방법에 의해 조사하였다.

선발된 항진균성 길항균주의 항생물질 생산에 미치는 최적의 배양온도 및 pH의 영향을 조사하기 위하여 항생물질 생산배지(glucose 10 g, peptone 2 g, yeast extract 1 g, beef extract 1 g, pH 7.0)에 균주를 접종하고 각 배양온도별로 배양하면서 항진균성 항생물질의 생산력을 분석 조사하였다. 또한 항생물질 생산배지의 초기 pH를 3에서 10까지 조절하여 항생물질 생산율을 분석하였다.

결과 및 고찰

항진균성 길항방선균의 선발 및 Chitinase 생산성 확인

환경친화적인 생물학적 방제균을 선발하기 위해 토양내 토착생육력이 강하고 병원성진균에 대해 억제력을 가진 길항성 토양방선균 500 여주를 저병해 경작지 토양으로부터 분리하였다. 분리된 균주 중 시들음병의 원인균인 식물병원균 *F. oxysporum*에 다기능성 생육 억제력을 가진 균주를 분리 선발하기 위하여 분리된 토양 방선균주를 대상

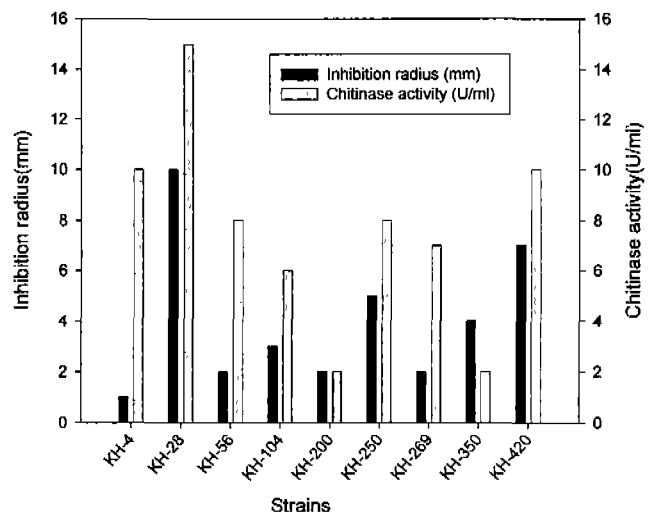


Fig. 1. Selection of antifungal strains which can produce chitinase from the rhizosphere of suppressive cultivated soil.

The isolates were examined for the inhibition distance with filtrate extracted by *n*-butanol after incubation at 28 °C for 5 days on Bennett's medium. The isolates incubated at 28 °C for 3 days on colloidal chitin medium was assayed for chitinase activity by Reissig methods. One unit of chitinase activity was defined as the amount of enzyme that catalysed the release of 1 μM of N-acetylglucosamine.

Table 1. Cultural characteristics of the isolate KH-28 strain

Media	Growth	Aerial mycelium	Soluble pigment
Trypton yeast extract broth (ISP1)	M	pale yellow	pale yellow
Yeast malt extract agar (ISP2)	G	grey	brown
Oatmeal agar (ISP3)	G	grey	brown
Inorganic salts starch agar(ISP4)	G	grey	pale brown
Glycerol asparagine agar(ISP5)	G	greyish white	yellow
Peptone-yeast extract iron agar(ISP6)	P	pale yellow	pale brown
Tyrosine agar(ISP7)	P	grey	none
Starch agar	G	grey	yellowish pale brown
Nutrient agar	M	white	pale brown
Potato dextrose agar	G	grey	brown
Glucose peptone agar	M	yellowsh white	pale brown
Czapeck agar	G	grey	pinkish brown

G: good, M: moderate, P: poor

으로 chitinase와 항생물질을 동시에 생산하는 길항균주를 조사해 본 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 항진균성 활성이 가장 강하고 세포외막 가수분해 효소인 chitinase 생산성이 강한 KH-28 균주를 선발하였다. 이 선발 길항균주에 의한 *F. oxysporum*에 대한 생육억제력은 두 균간의 거리를 측정하는 대치배양에 의하여 조사하였으며[1], chitinase 생산여부는 colloidal chitin 배지에서 clear zone 형성으로 chitin이 분해되는 것을 확인하였다. 또한 선발된 길항균주의 배양여액을 황산암모늄으로 처리하여 조효소 단백을 얻은 후 기질인 colloidal chitin에 반응시켜 chitinase 활성도를 측정하였다.

길항방선균의 동정

식물병원성 *F. oxysporum*의 생육을 강하게 억제하는 길항균주로 토양으로부터 분리한 방선균주 KH-28을 동정하기 위해, 선발 균주의 배양학적 특징은 International Streptomyces Project(ISP)배지에서 배양한 후 균주의 생육특성을 관찰하였다. 그 결과 Table 1에서 나타난 바와 같이 12가지의 배지에서 대체로 생육이 좋았으나 ISP6와 ISP7 배지에서는 생육이 좋지 못하였다. 기균사는 회색이었으며, 배지 내의 색소는 대체로 갈색을 형성하였고, ISP1과 ISP5 배지에서는 황색을 나타내었다(Table 2). 형태적 특징은 ISP4 배지에서 성장한 집락을 이용하여 주사전자현미경(SEM)상

Table 2. Morphological characteristics of the isolate KH-28 strain

Formation	Morphological characteristics
Colony surface	powdery
Spore chain	spirales
Spore surface ornamentation	rugose
Colony size	—
Other soluble pigment	none
Reverse side color	pale yellow-brown
Aerial mass color	grey
Melanoid pigment	none

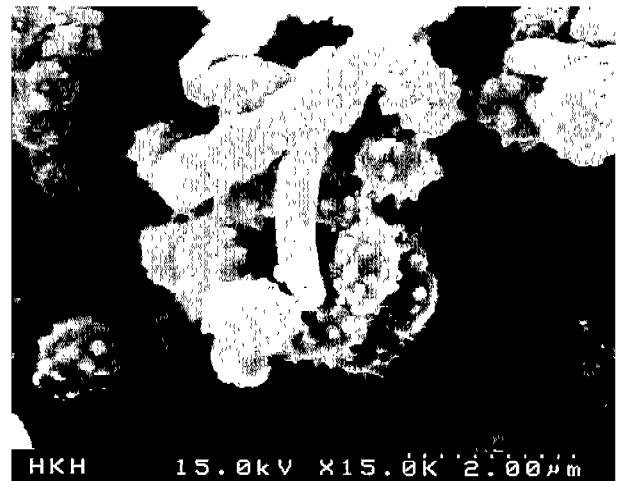


Fig. 2. Scanning electron micrography of isolate KH-28 cultured on ISP 4 media for 14 days.

에서 포자의 형태를 관찰한 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 포자 형태는 rugose하고, 포자의 사슬은 spirales하게 나타났다. 방선균 내의 세포벽 성분인 LL, meso 및 3-OH diaminopimelic acid(DAP)의 구성을 확인한 결과 Fig. 3에 나타난 바와 같이 diaminopimelic acid를 구성하고 있지 않음을 확인할 수 있었다. 또한 세포내의 총당 분석은 Fig. 4에 나타난 것과 같이 어떠한 당도 확인할 수 없었다. 이러한 분석 결과로 *Streptomyces* 속의 특징인 LL-DAP를 함유하고 있지 않는 결과로 나타났으며, *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*의 volume 4의 방선균동정기준에 의해 확인 동정한 결과 *Promicromonospora* 속에 가장 적합한 것으로 추정하였다. 또한 본 균주의 배양, 생리적 특징 등을 확인한 결과 최적성장온도는 30°C이며 45°C에서도 생육이 가능하였으며, 또한 pH 10에서도 생육이 가능하였으나 10°C와 pH 4.3에서는 생육하지 않았다(Table 3). Lecithinase, lipolytic enzyme 등의 지방분해효소는 생산하지 않았으나, chitin 및 pectin의 분해력은 강하게 나타났다. 항생제인 neomycin, rifampicin과

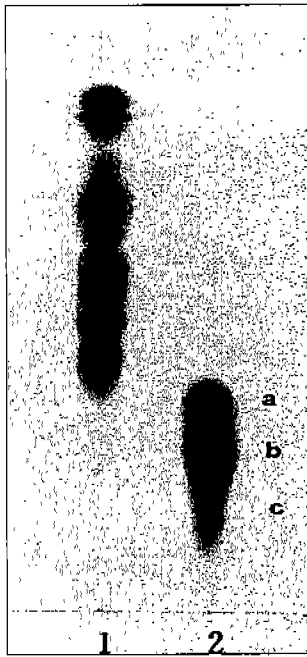


Fig. 3. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid (DAP) isomers and amino acids of the isolate KH-28.

1. Cell wall hydrolysate, 2. DAP isomers (a; LL-DAP, b; meso-DAP, c; 3-OH DAP

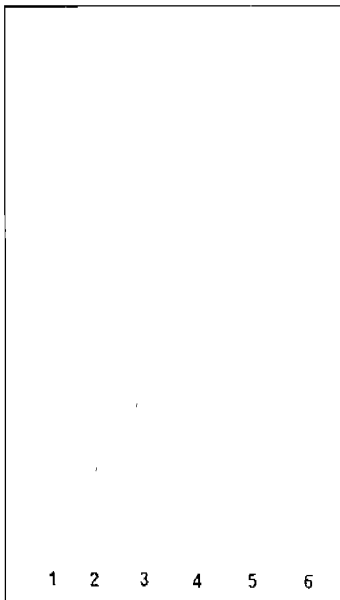


Fig. 4. Cellulose thin layer chromatogram of sugar patterns for whole-cell extract of the isolate KH-28.

1. Whole cell wall extract, 2. Glucose, 3. Arabinose, 4. Rhamnose, 5. Galactose, 6. Mannose

NaCl, sodium azide, phenol 등의 저해제에서는 저항성이 없었다. Hydro-gen sulfide 생산 및 xanthine 분해에서는 양성을 나타내었으나, nitrate 생산 및 allantoin, arbutin 분해에서

Table 3. Physiological, biochemical and antimicrobial properties of the isolate KH-28 strain

Properties	Results
Optimal growth temp. range	28-35 °C
growth at 10 °C	no growth
growth at 45 °C	growth
Optimal pH range	6.8-7.0
growth at pH 4.3	no growth
growth at pH 10	growth
Lecithinase	negative
Lipolytic enzyme	negative
Chitin lysis	positive
Pectin lysis	positive
Neomycin(50 µg/ml)	no growth
Rifampicin(50 µg/ml)	no growth
NaCl(7% w/v)	no growth
Sodium azide (0.01% w/v)	no growth
Phenol(0.1% w/v)	no growth
Nitrate reduction	negative
Hydrogen sulfide production	positive
Xanthine	positive
Allantoin	negative
Arbutin	negative
Bacillus subtilis	inhibited
Pseudomonas fluorescense	inhibited
Aspergillus niger	uninhibited

는 음성을 나타내었다. *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas fluorescense* 균주에 대해서는 항균력을 나타내었으나 *Aspergillus niger*에 대한 항진균성 항균력을 나타내지는 않았다. 또한 당 이용성 실험에서는 대체로 이용하는 편이었으나 D-fructose, ado-nitol, cellobiose에서는 생장력이 약하게 나타났다. 질소원 이용성에서는 L-histidine에서 생육력이 낮게 나타났다. 이와 같은 분석 결과로 *Promicromonospora* 속으로 재차 확인할 수 있었다. 또한 이와 같은 분석자료와 Ward에 의해 개발된 TAXON computer program을 이용한 *Streptomyces* 속에 대한 연관성의 분류학적 동정을 시도하였으며 그 결과 본 균주 KH-28은 50% 이하의 유의 수준 확률로서 *Streptomyces* 속에 속하지 않음을 확인할 수가 있었으며, 지방산 분석 결과 또한 *Streptomyces* 속의 그것과는 다른 결과를 나타내었다.

항진균성 길항 spectrum 조사

선발된 길항균주 *Promicromonospora* sp. KH-28가 12 종류의 식물병원성 진균류에 대한 항균력범위를 확인하기 위하여 *in vitro* 상에서 12종류의 식물병원성 진균을 대치배양에 의하여 저해력을 확인하였으며, 또 다른 방법으로 길항균주 *Promicromonospora* sp. KH-28을 배양시킨 배양여액을 *n*-butanol층에 추출하여 농축한 조정제 길항물질을 paper disk법을 이용하여 억제력을 조사하였다. 그 결과 Table 4에서와 같이 *F. solani*, *F. oxysporum*, *Alternaria mali*,

Table 4. Antifungal spectrum of *Promicromonospora* sp. KH-28 against various plant pathogenic fungi

Test fungi	Antifungal activity	
	Paring culture	Crude antibiotic*
<i>Pythium ultimum</i> (갈록병)	-	-
<i>Fusarium solani</i> (뿌리 썩음병)	+	+
<i>Fusarium oxysporum</i> (시들음병)	+	+
<i>Rhizoctonia</i> sp.(모갈록병)	-	-
<i>Fusarium moni</i> (시들음병)	-	-
<i>Alternaria kiki</i> (점무늬낙엽병)	+	+
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> (일탄저병)	-	-
<i>Penicillium expansum</i> (푸른곰팡이병)	-	-
<i>Stemphylium</i> sp.(잎마름병)	+	+
<i>Septoria solani</i> (둥근무늬병)	-	-
<i>Puccinia adenophora</i> (녹병)	-	-
<i>Phytophthora capsici</i> (역병)	+	+

+: inhibited, -: uninhibited

*The crude antibiotic extracted with *n*-BuOH from culture filtrates, concentrated 100 times and examined by paper disk method

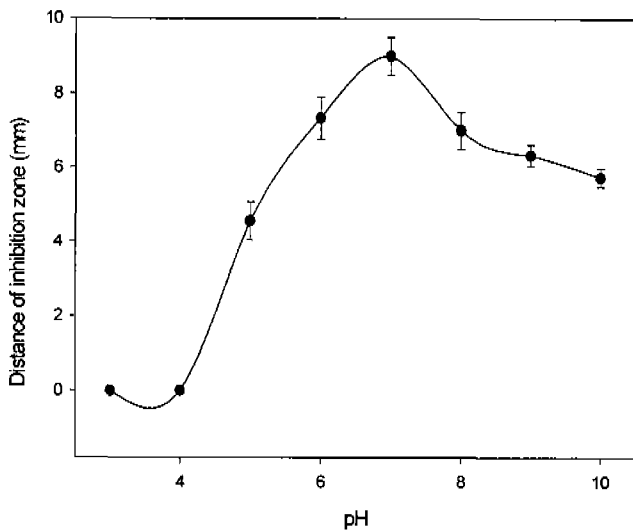


Fig. 5. Effects of pH on the production of the antibiotics by KH-28.

The *Promicromonospora* sp. KH-28 incubated on the Bennett's medium for 5 days. The culture filtrate was extracted with *n*-BuOH and the solvent layer was tested by paper disk method.

Phytophthora capsici, *Alternaria kiki* 등의 진균에 억제력을 나타내었으며, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium expansum*, *F. lini*, *Rhizoctonia* sp. 등의 병원성진균에는 저해력을 나타내지 않았다.

항진균성 항생물질 생합성의 조건

선발된 항진균성 길항균주인 *Promicromonospora* sp. KH-28의 항생물질 생산에 필요한 최적의 배양온도, pH 및 배양시간을 조사하기 위하여 변형 Bennett's 배지를 기본배

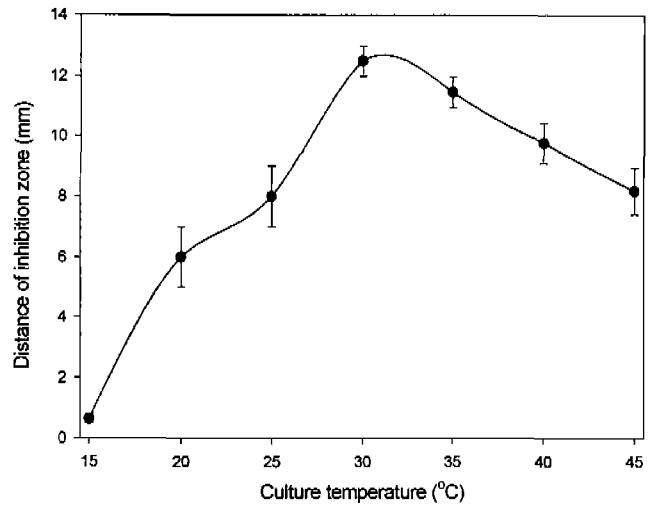


Fig. 6. Effects of culture temperatures on the production of the antibiotics by KH-28.

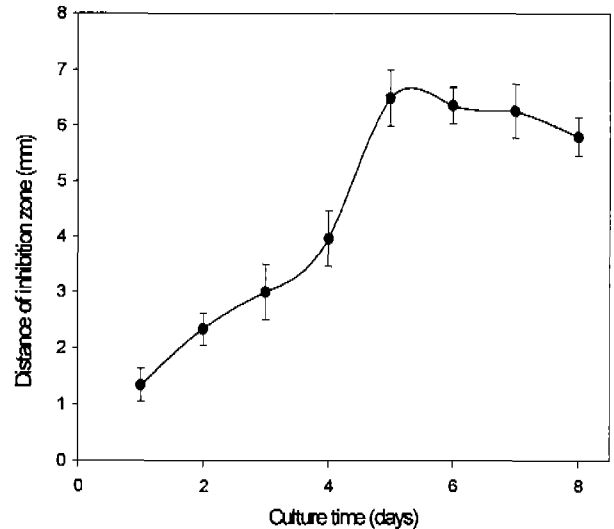


Fig. 7. Effect of culture time on the production of the antibiotics by KH-28.

지로 하여 조사하였다. 각 조사구의 배양여액을 *n*-butanol 로 추출 100배 농축시킨 후 paper disk법으로 inhibition zone 의 거리를 3회 반복 확인하여 평균 저해거리를 조사한 결과, pH에 따른 항생물질 생산은 Fig. 5에서 나타난 것과 같이 pH 7.0에서 가장 생산력이 높았다. 또한 *Promicromonospora* sp. KH-28 의 항생물질 생산에 미치는 생육온도에 의한 영향을 조사하기 위하여 15 °C에서 45 °C까지 각 온도별로 항생물질 생산능을 조사 한 결과 Fig. 6에 나타난 바와 같이 30 °C에서 배양시켰을 경우 생산력이 가장 높게 나타났다. 배양시간에 따른 항생물질 생산성을 조사하기 위하여 접종 후 배양시간 별로 7일간 배양시킨 결과 Fig. 7에 나타난 바와 같이 5일 배양시켰을 경우 생산력이

가장 높게 나타났으며 5일 이후 저해력의 변화가 없다가 7일 이후 저해력이 약간씩 떨어짐을 알 수 있었다. 본 항진균성 항생물질은 온도 80 °C 에서 활성이 떨어지는 물질로써 분자량이 503 dalton으로 된 항생물질인 것으로 추정되었으며 항생물질 구조에 관한 연구 및 토양내의 식물실험에 의한 *in vivo* 실험은 추후에 발표하도록 하겠다.

요 약

전국의 저병해 경작지의 토양으로부터 식물병원성 진균 *Fusarium oxysporum*에 대한 생육억제력이 강한 chitinase와 항진균성 항생물질을 동시에 생산하는 방선균주 한 균주를 선발하였다. 선발된 길항방선균주 KH-28을 분류학적으로 동정하기 위해 세포벽 구성성분을 조사한 결과 diaminopimelic acid(DAP)을 함유하고 있지 않았으며, 세포의 총당 분석 결과 특징적인 당을 확인 할 수 없었다. 아울러 배양 및 생리학적 분석 결과 *Promicromonospora* 속에 속하는 방선균으로 확인하였다. 식물병원균 12 균주에 대한 항균력을 조사한 결과 *F. solani*, *F. oxysporum*, *Alternaria mali*, *Phytophthora capsici*, *Alternaria kiki*에서 저해력을 확인하였다. 길항성 *Promicromonospora* sp. KH-28의 항생물질 생산에 미치는 최적조건은 pH 7.0, 30 °C의 온도에서 5일간 배양시켰을 경우 항진균성 항생물질의 생산율이 가장 높게 나타났다.

감사의 글

이 연구는 농림특정 연구과제의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 연구비 지원에 감사 드립니다.

REFERENCES

1. Alam, R. P., Y. F. Peng, and A. H. Elling-boe. 1988. Genetics of antibiosis in bacterial strains suppressive to take-all. *Phytopathology* **78**: 426-432.
2. Brown, J. G. and A. M. Boyle. 1944. Effect of penicillin on plant pathogens. *Phytopathology* **34**: 760-761.
3. Chaplin, M. F. and J. F. Kennedy. 1986. TLC analysis of carbohydrates. *Carbohydrate Analysis*, p. 12. Oirl Press, Oxford.
4. Goodfellow, M., T. Cross, and H. A. Lechevalier. 1989. Suprageneric classification of Actinomycetes, pp. 2333-2450. In S. T. Williams, M. E. Sharpe, and J. G. Holt (eds.), *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore.
5. Julieta, U. C., N. Elango, I. Polacheck, and E. Cabib. 1982. Endochitinase, a mannan-associated enzyme from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **257**: 1392-1397.
6. Neilands, J. B. 1984. Siderophores of bacteria and fungi. *Microbiol. Sci.* **1**: 9-14.
7. Reissing, J. L., J. L. Strominger, and L. F. Leloir, 1955. A modified colorimetric method for the estimation of *n*-acetylaminosugars. *J. Biol. Chem.* **217**: 959-966.
8. Shirling, E. B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
9. Siegel, M. and H. D. Sisler. 1977. Antifungal compounds Vol 2. *Interactions in Ecological System*, p. 277. Marcel Dekker, Inc., New York.
10. Sivan, A. and I. Chet. 1989. Degradation of fungal cell wall by lytic enzymes of *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **135**: 675-682.
11. Skujus, J. J., H. J. Potgieter, and M. Alexander. 1965. Dissolution of fungal cell walls by a Streptomycete chitinase and β -(1 \rightarrow 3)glucanase. *Arch. Biochem. Biophys.* **111**: 358-364.
12. Takeuchi, S., K. Hirayama, K. Ueda, H. Sasaki, and H. Yonehara. 1958. Blastocidin S, a new antibiotic. *J. Antibiot.* **11**: 1-5.
13. Teintze, M., M. B. Hossain, C. L. Barnes, J. Leong, and D. V. Helm. 1981. Structure of ferric pseudobactin, a siderophore from a plant growth promoting *Pseudomonas*. *Biochemistry* **20**: 6446-6457.
14. Wellington, E. M. H. and S. T. Williams. 1978. Preservation of Actinomycetes inoculum in frozen glycerol. *Microbios Letters* **6**: 151-157.
15. Williams, S. T., M. Goodfellow, G. Alderson, E. M. H. Wellington, P. H. A. Sneath, and M. Sackin. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
16. Yadama, K. and K. Kamagatam. 1970. Taxonomical studies on coryneform bacteria. II. Principal amino acids in the wall and their taxonomic significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 103-113.

(Received March 15, 1999)