

Chitinase를 생산하는 *Streptomyces lydicus* G-23의 동정 및 배양 특성

이 상 만*
청주대학교 생물학과

Identification and Cultural Characterization of *Streptomyces lydicus* G-23 for Producing Chitinase

Lee, Sang-Mahn

Department of Biology, Chongju University, Chongju 360-764, Korea

Abstract — Among 294 *Actinomycetes* isolated from soil, a strain that had appeared to produce the highest level of chitinase selected for further studies. The selected strain was identified as a *Streptomyces lydicus* based on the data obtained from the morphological, biochemical and cultural experiments. The cultural conditions for the enzyme production were also examined, and the results obtained were as follows: the maximal enzyme production was attained when the cells were cultured at 30°C for 6 days in the medium supplemented with 2% of colloidal chitin. The optimum initial pH of the medium was observed to be 8. It was also found that the most effective carbon and nitrogen sources were soluble starch and ammonium oxalate, respectively.

지구상에 많이 존재하는 biopolymer를 이용한 식량자원 및 에너지원의 개발이 현실적으로 요구되는 실정이다. 그 중 chitin은 β -(1,4) N-acetyl-D-glucosamine의 다량체로서 각종 갑각류의 외피, 곰팡이 세포벽의 구성성분이다. 이러한 chitin을 분해하여 유용한 산물을 얻기 위하여 chitin 분해효소인 chitinase [poly(1,4-N-acetyl- β -D-glucosaminide) glycanohydrolase; EC 3.2.1.14], chitinase (N-acetyl- β -glucosaminidase; EC 3.2.1.30) 등이 사용된다(1).

Chitinase를 생산하는 미생물은 *Serratia*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Streptomyces*, *Vibrio*, *Aeromonas* 등이 있으며, 이들로부터 생산되는 chitinase의 효소학적 성질 및 발현시키는 유전자의 구조 등이 규명되었다(2-13). *Trichoderma*, *Mucor*, *Myrothecium*, *Candida*, *Saccaromyces* 등이 생산하는 chitinase는 영양소로서의 chitin의 이용, 균사의 성장, 포자의 형성, 세포 분열시의 역할 등에 관련이 있으며(14-18), 새우, 뱀장어 등의 동물과 옥수수, 강낭콩, 맥아, 울무 등의

식물에서 chitinase의 존재가 확인되었으며(19-25) 본 효소는 곰팡이의 생육을 억제하며 식물의 곰팡이에 대한 저항성에 관련이 있다고 보고되었다(26-27). 또한 곰팡이의 세포벽, 계, 새우의 외피 등에 chitinase를 작용시켜 single cell protein 또는 ethanol을 생산하는 연구가 진행되었다(16, 28).

그러나 chitin을 첨가한 배지에서 미생물을 생육시키면 endo- 또는 exochitinase가 생성되는데, 이때 관련된 효소의 종류, 효소의 작용 기구, 유도 작용에 관련된 조절인자의 분석 등이 아직 확실히 밝혀지지 않고 있다. 따라서 본 실험은 이와같은 부분을 해결하고, chitin을 산업적으로 이용하고자 하는 연구의 일환으로 토양으로부터 chitinase의 생산성이 높은 균주를 분리하여 동정하고 chitinase의 생산성을 검토하였다.

재료 및 방법

Chitinase 생산균의 분리

월악산, 대둔산, 청주 등 충청북도 일대의 토양을 분리원으로써 chitinase 생산균을 분리하였다. 채취

Key words: *Streptomyces lydicus* G-23, chitinase
*Corresponding author

된 토양을 생리 식염수에 현탁하여 glucose-asparagine 배지에 도말하고 30°C 에서 배양하면서 기균사의 생성, 배면의 색, 색소의 생성 등을 관찰하여 방선균이라고 생각되는 균을 분리하였으며 colloidal chitin이 탄소원으로 함유된 기본 고체 배지에 분리균을 이식하여 균체 주위에 생성된 투명환의 유무로서 chitinase 생산을 확인하였으며, 투명환이 가장 크게 형성된 균주를 chitinase 고 생산성 균주로 선택하여 순수 분리하였다.

배지 및 균의 배양

본 실험에 사용된 배지는 방선균 분리용 배지로서 glucose-asparagine 배지를 사용하였으며, 균주 동정용 배지는 tryptone-yeast extract agar, yeast-malt extract agar, Benett's agar 등이었으며, 기본 고체 배지는 이 등이 사용한 배지(13)를 이용하였으며 배지의 조성은 colloidal chitin 0.6%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.05%, KH_2PO_4 0.03%, K_2HPO_4 0.07%, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.001%, $ZnSO_4$ 0.0001%, $MnCl_2$ 0.0001%(pH 7.0)이었고 효소 생산용 배지는 기본 고체 배지에 tryptone 0.5%, yeast extract 0.3%를 가하였으며, colloidal chitin은 상법에 따라 조제하였다(29). Chitinase 생산균의 배양은 30°C 에서 정치 또는 진탕 배양(stroke 120 rpm)을 하였으며 효소 생산 용 액체 배지에 시험균을 접종 배양하여 원심분리한 후 얻어진 배양 여액을 조 효소원으로하여 효소 생산을 검정하였다.

Chitinase 활성 측정

Chitinase 활성은 0.02 M phosphate buffer(pH 7.2)에 용해한 colloidal chitin 용액(1%) 100 μ l와 생산균 배양 여액 100 μ l를 혼합하여 37°C 에서 1시간 동안 반응시키고 100°C 에서 10분간 처리하여 반응을 정지시킨 후 유리된 환원당을 DNS법으로 측정하여 효소 활성을 검토했다. Chitinase 1 unit는 1시간 동안 1 μ mole의 N-acetyl D-glucosamine을 생산하는 효소량으로 결정하였다.

균주의 동정

Chitinase 생산균의 동정을 위하여 균의 배양학적, 형태학적, 생화학적 특성을 조사하였다. 배양학적 성상은 주로 International *Streptomyces* Project(ISP)에 표기된 배지를 사용하여 30°C 에서 10일간 배양하면서 균의 생육도, 기균사 형성 유무 및 색조, 배면의 색조 및 가용성 색소의 생성 유무 등을 관찰하였고

균주의 형태 및 포자의 표면은 Benett's agar 배지에서 생육한 균주를 전자현미경으로 관찰하였으며 탄소원의 이용은 Pridham과 Gottlieb의 방법에 따랐다(30). 시험균주의 동정은 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(31)의 색인에 따라 검색하였다.

결과 및 고찰

Chitinase 생산균의 분리

방선균은 단백질 및 여러가지 고분자 당류를 분해하는 효소를 많이 생성 분비하며 chitin은 방선균의 우수한 탄소 및 질소원으로 이용하는 것으로 알려져 있기 때문에 충청북도 일대에서 약 300점의 토양으로부터 방선균이라고 생각되어지는 균주를 249종 분리하였다. 분리된 균을 colloidal chitin이 함유된 기본 배지에 이식하여 30°C 에서 7일간 생육시켜 생성된 colony 주위에 투명환이 가장 크고 선명하게 만들어진 균 1주를 선택하였다(Fig. 1). *Bacillus circulans*에서 chitinase A1의 C-terminal 부분이 chitin과 결합하여 chitin을 완전히 분해시킨다는 보고(32)에 의거하여 살펴보면 본 시험균의 colony 주위에 형성된 투명환의 주변부가 선명하게 나타난 것은 본 균이 생산하는 chitinase도 colloidal chitin을 완전히 분해한다고 보여진다.

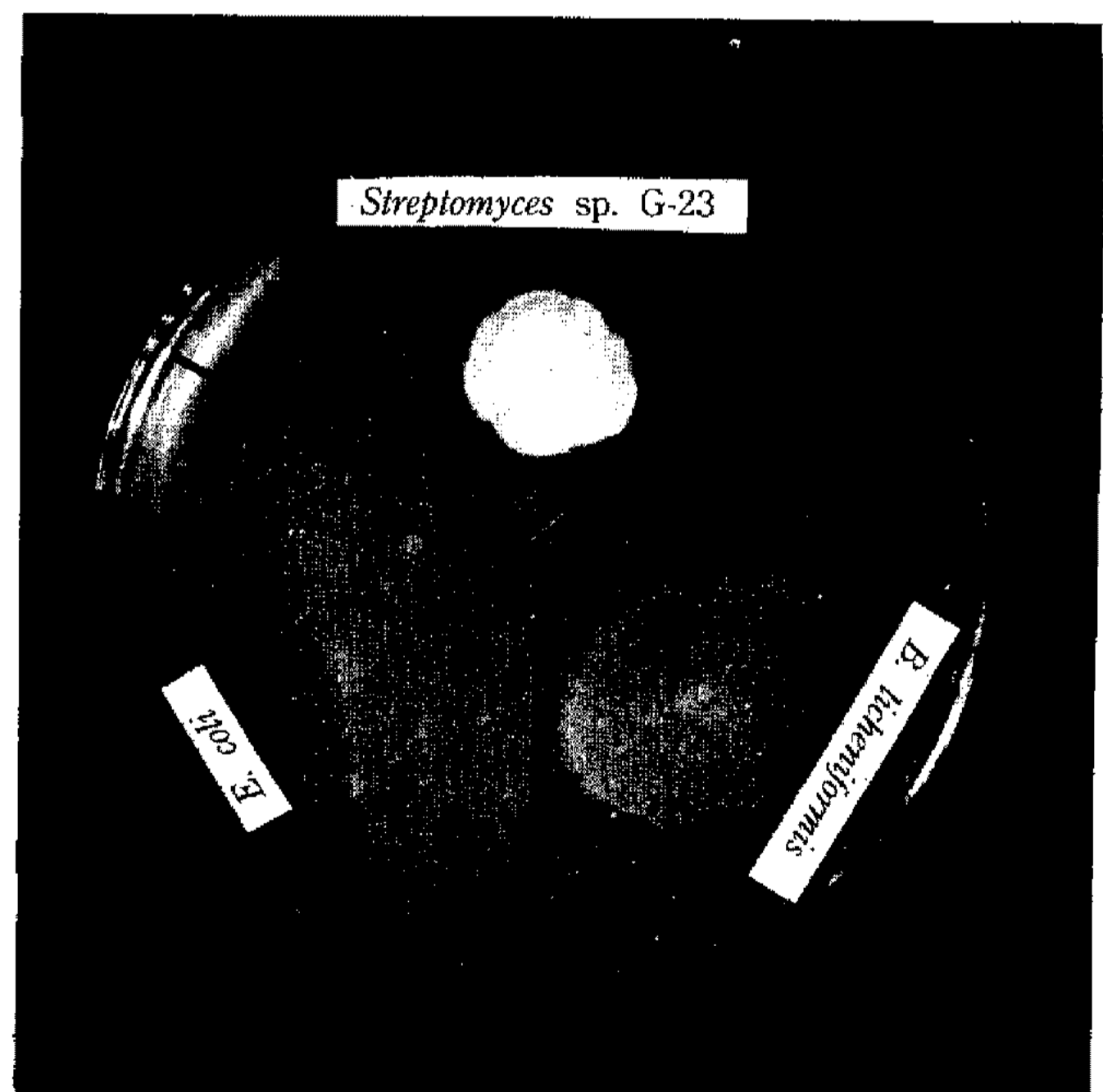


Fig. 1. Clear zone formation by *Streptomyces* sp. G-23 strain.

The strain was incubated at 30°C for 7 days on swollen chitin agar medium.

Table 1. Cultural characteristics of *Streptomyces* sp. G-23

Culture media	Growth	Sporulation	Color of aerial mycelium	Reverse side
Tryptone-yeast ex. agar	good	fair	white	white-yellow
Yeast ex.- malt ex. agar	good	fair	white	white-yellow
Inorganic salt starch agar	good	fair	white	white-yellow
Glycerol-asparagine agar	good	good	gray-white	white-yellow
Benett's agar	good	fair	white	white-yellow
Czapeck's agar	poor	none	none	white-yellow
Peptone-yeast ex. agar	good	good	gray-white	white-yellow
Tyrosine agar	good	none	none	white-yellow
Luria broth agar	good	none	none	white-yellow

The strain was incubated at 30°C for 10 days.

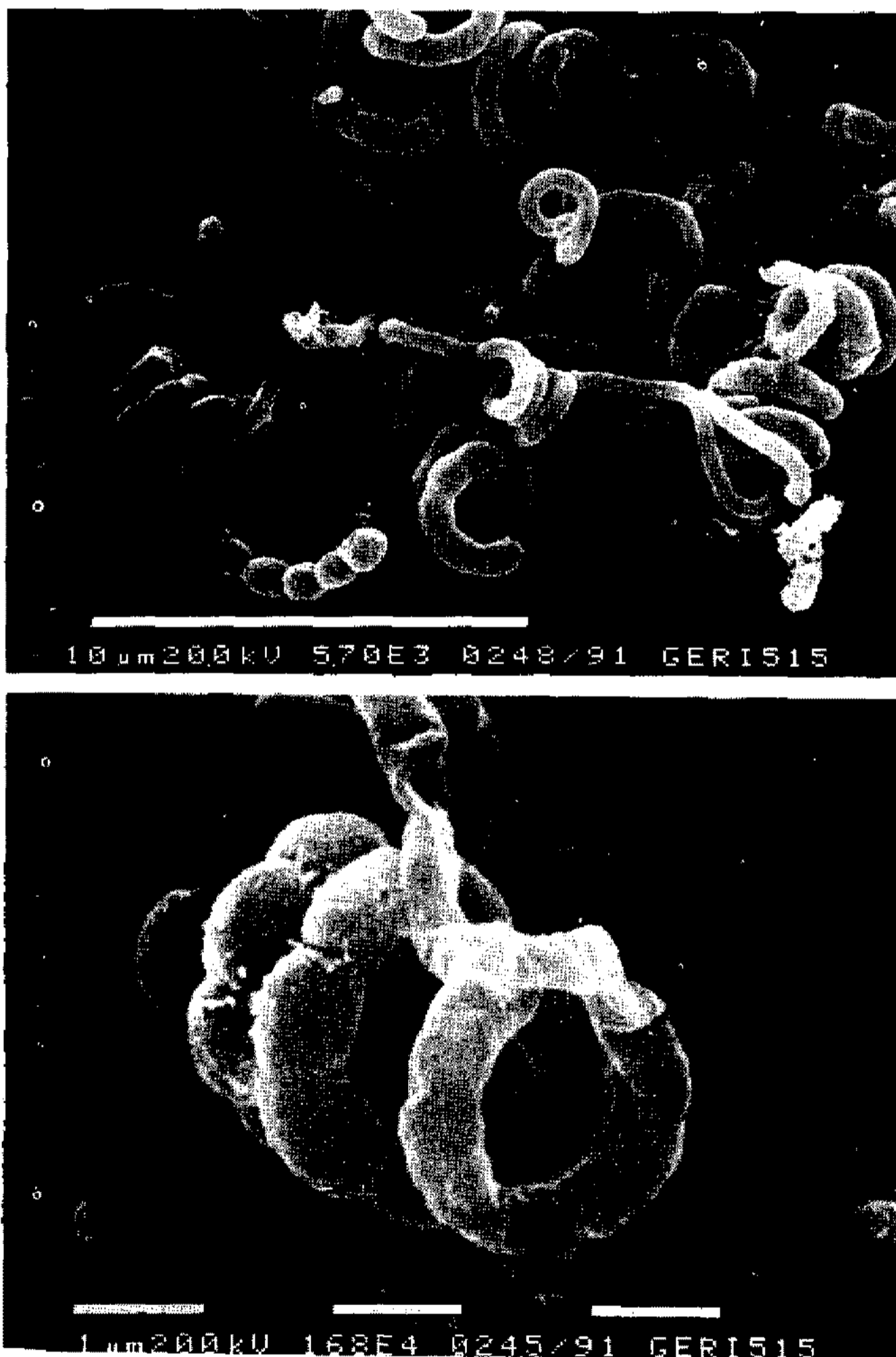


Fig. 2. Electron microphotograph of *Streptomyces lydicus* G-23 grown on Benett's agar medium.

균주의 동정

시험균을 ISP에 표기된 여러가지의 고체 배지에 생육시켜 생육도, 기균사의 형성 유무 및 색, 배지 배면의 색, 가용성 색소 생성 등을 조사하였는 바, Table

1에 나타난 바와 같이 본 분리균은 tryptone-yeast extract agar, Benett's agar 등의 배지에서 잘 생육하였으며, 기균사의 색은 white 또는 gray white이었고 배면의 색은 white yellow 이며 가용성 색소, melanin은 생성되지 않았으며 gelatin을 액화시키지 못하였다. 여러가지의 탄소원을 1% 첨가한 Pridham & Gottlieb 최소 배지에서 시험균을 14일까지 생육시킨 결과 dextrin, glucose, sucrose, xylose 등을 유일한 탄소원으로 이용할수 있었으며 시험균의 전자 현미경 사진은 Fig. 2와 같이 포자 쇄의 형태는 spirales이며 포자 표면은 smooth로 나타났다. 이상의 결과를 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology에 의하여 검색하여 볼 때 시험균은 *Streptomyces lydicus*와 가장 유사한 균으로 동정되었다. 따라서 본균을 *Streptomyces lydicus* G-23으로 명명하였으며 분리균의 배양학적, 생화학적 특성은 Table 2에 나타나 있다.

Chitinase 생산

배양시간의 영향 : *Streptomyces lydicus* G-23을 colloidal chitin이 0.6% 함유된 효소 생산용 배지에 2×10^6 spore/ml 비율로 접종하여 30°C 에서 10일까지 진탕배양하면서 배양시간에 따른 균의 생육도와 효소의 생산을 살펴본 결과(Fig. 3) 3일 이후부터 chitinase가 생산되기 시작하여 약 6일이 경과할 때 효소 생산이 가장 많았고 이때의 효소 생산량은 19 unit/ml이었다. 균의 생육에 비례하여 효소가 생산되었으며 액체 진탕배양의 경우 5일 이후에는 균이 급격히 사멸하는 것을 관찰할 수 있었다. Ueno 등이 발표한 *Streptomyces* sp. S-84의 chitinase 생산성을 보면 2일 이후부터 효소가 생성되기 시작하여 4일 후에 효소

Table 2. Morphological and physiological characteristics of the *Streptomyces* sp. G-23

Characteristics	<i>Streptomyces</i> sp. G-23
Color of spore mass	gray-white
Spore chain	spirales
Surface of spore	smooth
Hydrolysis of starch	positive
Melanin formation	negative
Production of sol. pigment	negative
Liquefaction of gelatin	negative
Temp. range of growth (°C)	10~40
Optimum temp. (°C)	30
pH range of growth	4~9
Optimum pH	8
Utilization of	
Arabinose	+
Dextrin	++
Galactose	+
Glucose	++
Lactose	±
Maltose	+
Mannose	+
Raffinose	±
Sucrose	++
Xylose	++
Sorbose	-
Chitin	+
Cellulose	±
Agarose	-
None	-

Symbol: - negative, + positive, ± negative or positive

생산이 180 mU/ml로 최대치에 도달하였으며(9), *Trichoderma harzianum*의 경우는 chitin이 함유된 배지에서 생육시켰을 때 chitinase는 배양시작 후 2일 후, chitobiase는 4일 후에 효소 생산이 가장 많았고(14), *Serratia marcescens*와 *Bacillus circulans*는 배양 시작 후 약 3일 후에 효소 생산이 최대로 나타났다 (5,33). 또한 식물체 종자의 발아시에는 발아 후 2일 후에 chitinase 생산이 가장 많았다(22). 이상으로 살펴볼 때 본 균주는 다른 균주에 비하여 효소 생산이 늦게 이루어지는 것으로 나타났다. 따라서 효소 생산에 미치는 조건을 검토하였다.

탄소원의 영향: 본 균주의 chitinase 생산에 미치는 탄소원의 영향을 알아보기 위하여 효소 생산용 배지에

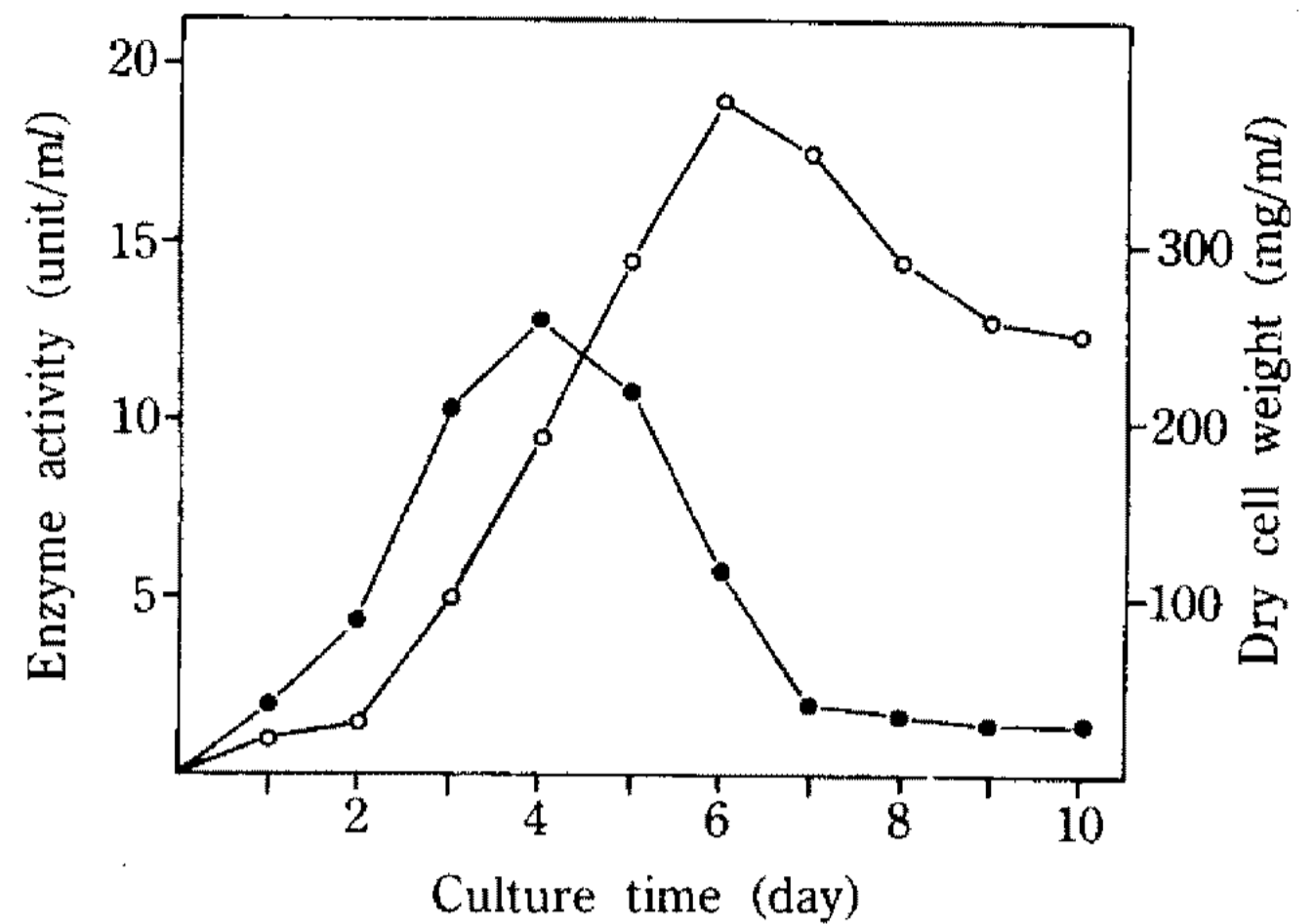


Fig. 3. Time course of changes in chitinase activity and the growth pattern of *Streptomyces lydicus* G-23.

Symbol: ○ chitinase activity, ● growth curve. The bacterium was grown at 30°C in basal medium (pH 7.0) with shaking. Cell growth was estimated as dry weight.

Table 3. Effect of carbon sources on the production of the enzyme by *Streptomyces lydicus* G-23

Carbon sources	Relative activity (%)
Lactose	100.0
Arabinose	87.5
Mannose	87.5
Xylose	71.9
Dextrin	159.3
Glucose	109.4
Sucrose	37.6
Maltose	131.2
Raffinose	28.2
Galactose	96.9
Sorbose	81.3
Soluble starch	218.6
Chitin	121.2
Agarose	96.9
Cellulose	100.0
None	100.0

Basal medium: colloidal chitin 0.6%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, KH₂PO₄ 0.03%, K₂HPO₄ 0.07%, FeSO₄·7H₂O 0.001%, ZnSO₄ 0.0001%, MnCl₂ 0.0001% (pH 7.0). Each carbon source was added to the basal medium on 1% level. The bacterium was cultured at 30°C for 7 days.

각종 탄소원을 최종농도 1%씩 첨가하여 30°C에서 10일간 정치 배양한 후 효소 활성을 살펴본 결과, soluble starch, dextrin을 탄소원으로 첨가하여 배양하였을 때 효소 생산이 많았으며, raffinose, sucrose는

Table 4. Effect of nitrogen sources on the production of the enzyme by *Streptomyces lydicus* G-23

Nitrogen sources	Relative activity (%)
NaNO ₃	84.4
(NH ₄)Cl	37.6
(NH ₄) ₂ C ₂ O ₄	159.1
(NH ₄) ₂ SO ₄	100.0
Mg(NO ₃) ₂	115.6
NaNO ₂	140.6
Casamino acid	146.8
Tryptone	146.8
Yeast extract	79.8
None	100.0

Basal medium and culture condition are the same described as in Table 3. Each nitrogen source was added to the basal medium at 0.2% level.

효소의 생산을 저해시키는 것으로 나타났다(Table 3). *Trichoderma harzianum*을 chitin이 첨가된 배지에서 생육시킬 때 chitinase의 생산이 최대가 된 사항(32)과 본 실험의 결과는 차이점을 보였다.

질소원의 영향: 효소 생산에 미치는 질소원의 영향을 알아보기 위하여 각종 무기 및 유기 질소원을 최종 농도 0.2%씩 첨가하여 균을 생육시킨 후 효소 생산을 살펴본 결과 ammonium oxalate, tryptone, casamino acid를 첨가하여 배양하였을 때 효소 생산이 많이 일어난 것으로 나타났다(Table 4).

Chitin 농도의 영향: colloidal chitin을 4%까지 일정한 비율로 첨가한 후 본 균을 접종 배양하여 chitinase의 생산을 살펴본 결과, Fig. 4에 나타난 바와 같이 colloidal chitin을 첨가하지 않은 구에 비하여 첨가하였을 때 chitinase의 생산이 증가하였으며 chitin을 2% 첨가하여 배양하였을 때 무 첨가구에 비하여 효소의 생산이 약 4배 높게 나타났다. 이는 *Trichoderma harzianum*을 chitin이 첨가된 배지에서 배양하였을 때 효소의 생산이 유도되어 chitin을 0.5% 첨가하여 배양하였을 때 효소 생산이 최대로 나타났고 (1), *Serratia marcescens*와 *Streptomyces plicatus*의 chitinase의 생산에 chitin이 유도작용을 한다는 보고(5, 11)와 유사하였다.

초기 pH 및 온도의 영향: 본 균주의 chitinase 생산에 대한 최적 초기 pH를 결정하기 위하여 효소 생산용 액체 배지를 pH 2에서 12까지 조절하여 시험균을 접종 배양한 후 효소의 생산성을 조사한 결

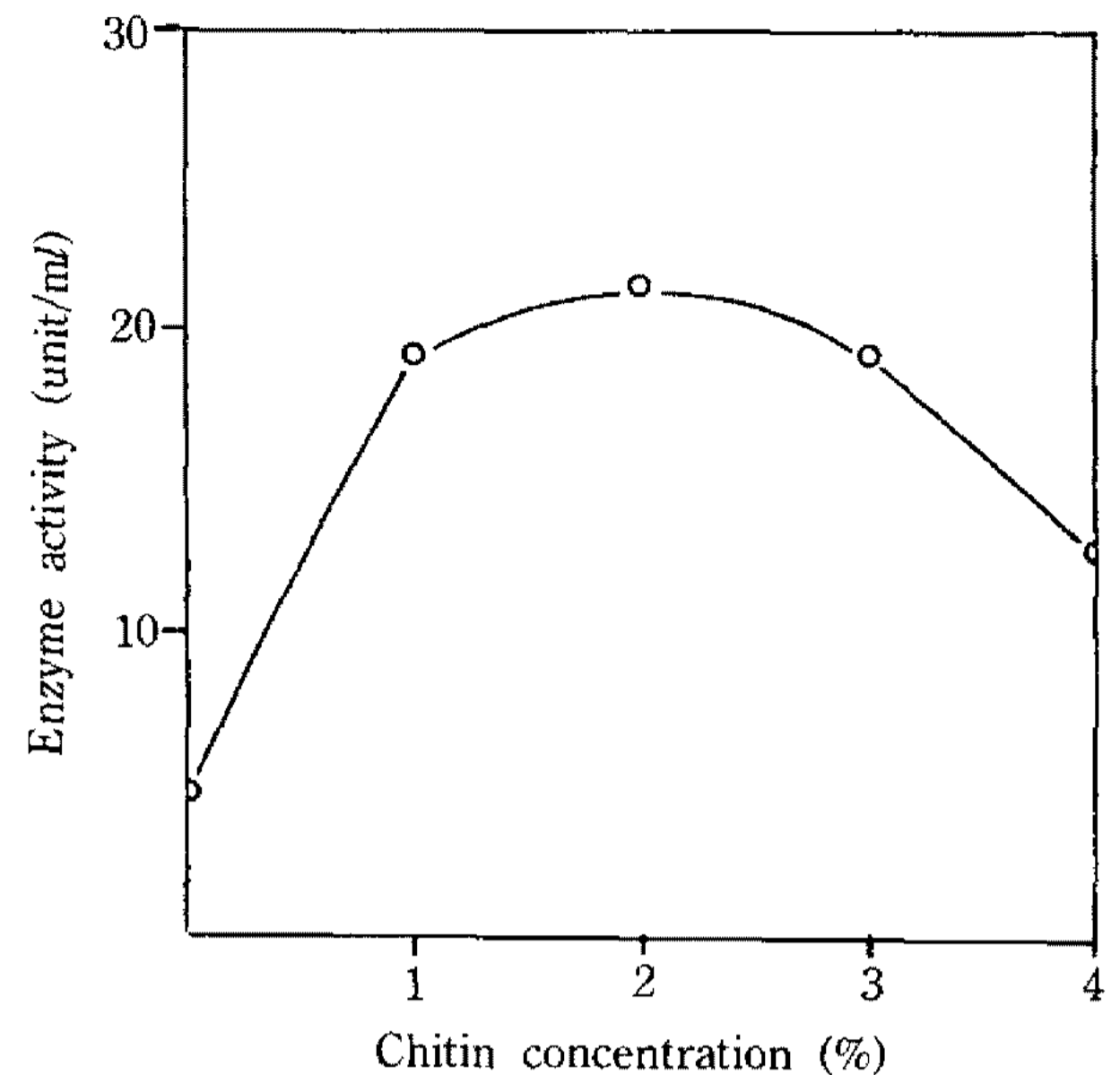


Fig. 4. Influence of chitin concentration on the production of chitinase by *Streptomyces lydicus* G-23.

Cultivation was carried out for 7 days at 30°C in the basal medium.

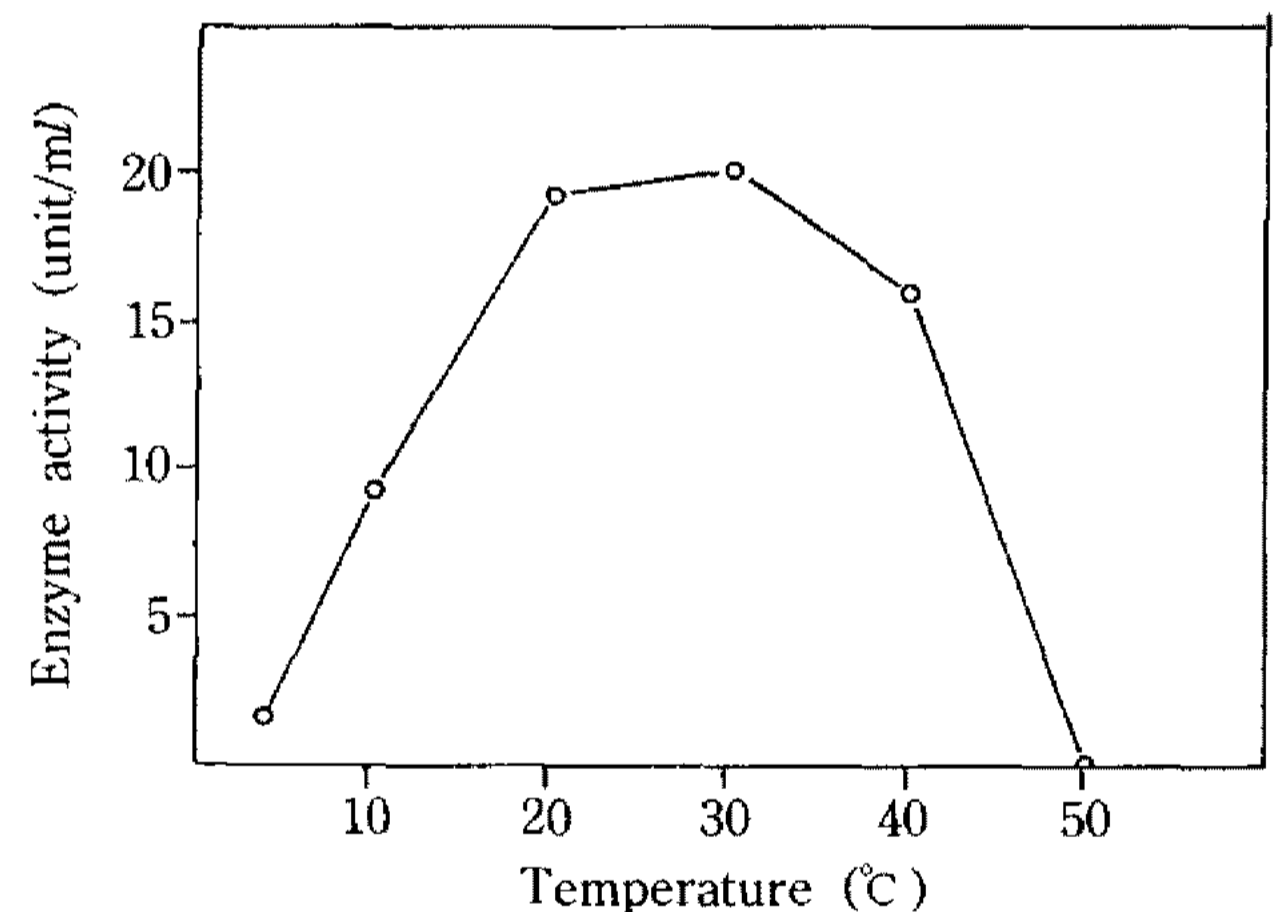


Fig. 5. Effect of temperature on the production of the enzyme by *Streptomyces lydicus* G-23.

Cultivation was carried out for 7 days at 30°C in the basal medium.

과는 Fig. 5에 나타난 바와 같이 효소 생산을 위한 균의 배양 초기 최적 pH는 8이었으며 이때 균 생육이 가장 양호하였다. 본 시험균이 효소를 생산하는데 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 배양온도를 60°C 까지 조절하여 배양한 후 효소의 생산을 비교한 결과, Fig. 6에 나타난 바와 같이 30°C 에서 배양하였을 때 효소가 가장 많이 생산되었으며 50°C 이상의 온도에서는 본 균이 생육되지 못하였고 효소도 생산되지 않았다. *Trichoderma harzianum*의 chitinase 생산 최적 조건은 pH 6, 온도는 36°C 로 나타났는데(32) 이는

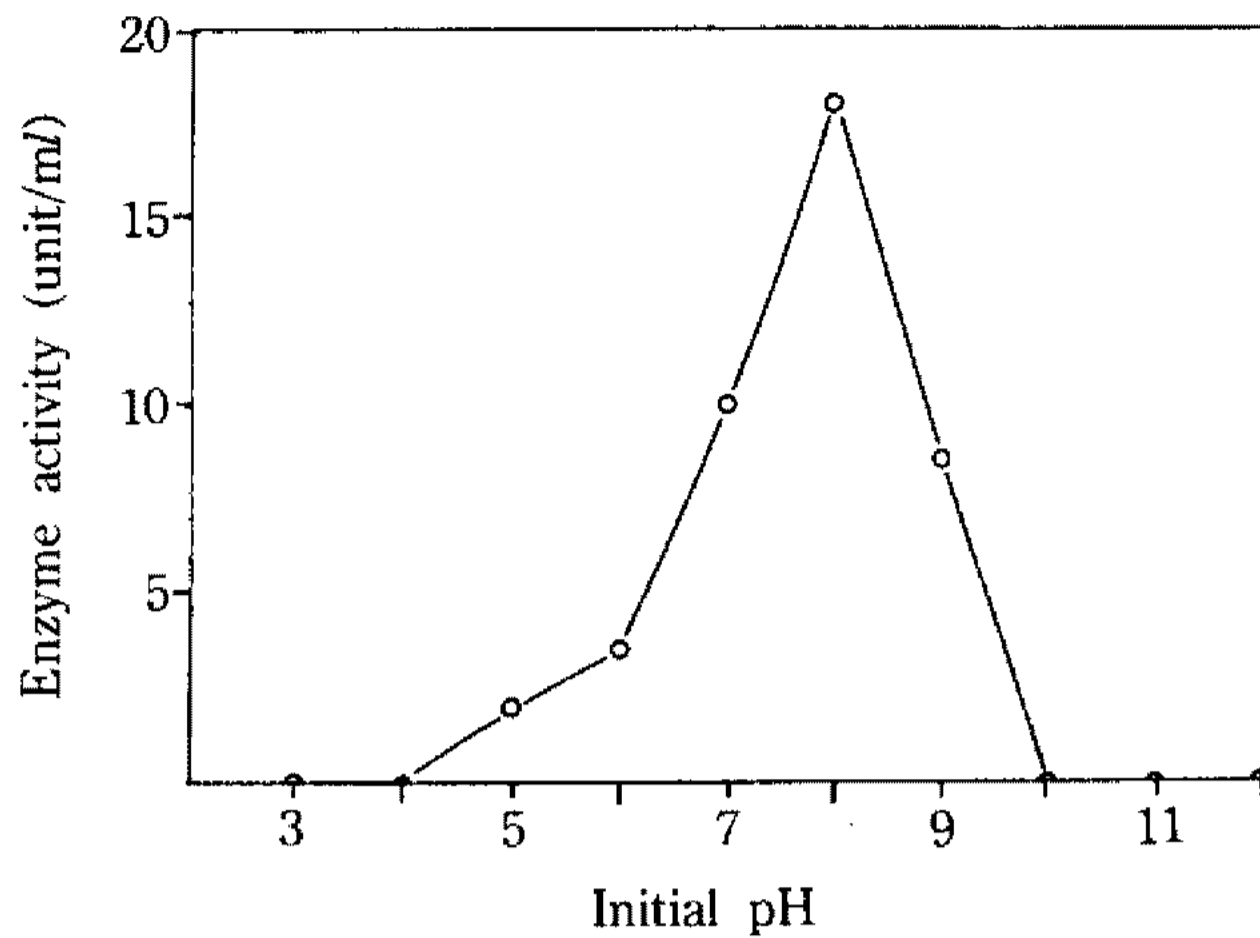


Fig. 6. Effect of initial pH on the production of the enzyme by *Streptomyces lydicus* G-23.

Cultivation was carried out for 7 days at 30°C in the basal medium.

효소 생산이 미생물의 일반적인 생육조건과 관련이 있다고 사료된다.

요 약

토양에서 분리한 294균주 중에서 chitinase 생산성이 우수한 균주를 선택하였으며 형태학적, 생화학적 및 배양학적 실험과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology의 색인을 통하여 *Streptomyces lydicus*로 동정하였다. 효소 생산의 최적 조건을 검토하여 본 결과 배양 후 6일이 경과하였을 때, 배지의 초기 pH는 8, 배양 온도는 30°C, 배지에 2%의 chitin을 첨가하여 배양하였을 때 효소가 가장 많이 생산되었다. 또한 soluble starch, dextrin을 탄소원으로 하여 배양하였을 때, ammonium oxalate, tryptone, casamino acid를 질소원으로 하여 배양하였을 때 효소 생산이 높게 일어났다.

참고문헌

1. Ulhoa, C.J. and J.F. Peberdy. 1991. Regulation of chitinase synthesis in *Trichoderma harzianum*. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2163-2169.
2. Tom, R.A. and P.A. Carroad. 1981. Effect of reaction conditions on hydrolysis of chitin by *Serratia marcescens* QMB 1466 chitinase. *J. Food. Science.* **46**: 646-647.
3. 장규일, 김기석, 조무제, 이상열, 신용철. 1992. Molecular cloning of *Serratia marcescens* chitinase gene into *Escherichia coli*. *Kor. J. Appl. Micro. Biotechnol.*

- 20(2): 129-135.
4. Joshi, S., M. Kozlowski, G. Selvaraji, V.N. Iyer and R.W. Davies. 1988. Cloning of the genes of the chitin utilization regulon of *Serratia liquefaciens*. *J. Bacteriol.* **170**(7): 2984-2988.
5. Reid, J.D. and D.M. Ogrydziak. 1981. Chitinase-overproducing mutant of *Serratia marcescens*. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**(3): 664-669.
6. Yoshihara, K., J. Hosokawa, T. Kubo, M. Nishiyama and Y. Koba. 1992. Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-14. *Biosci. Biotech. Biochem.* **56**(2): 972-973.
7. Seino, H., K. Tsukada and Y. Shimasue. 1991. Properties and action pattern of a chitosanase from *Bacillus* sp. PI-7S. *Agric. Biol. Chem.* **55**(9): 2421-2423.
8. Watanabe, T., W. Oyanagi, K. Suzuki, K. Ohnishi and H. Tanaka. 1992. Structure of the gene encoding chitinase gene D of *Bacillus circulans* WL-12 and possible homology of the enzyme to other prokaryotic chitinases and class III plant chitinases. *J. Bacteriol.* **174**(2): 408-414.
9. Ueno, H., K. Miyashita, Y. Sawada and Y. Oba. 1990. Purification and some properties of extracellular chitinase from *Streptomyces* sp. S-84. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **36**: 377-392.
10. Romaguera, A., U. Menge, R. Breves and H. Diekmann. 1992. Chitinase of *Streptomyces olivaceoviridis* and significance of processing for multiplicity. *J. Bacteriol.* **174**(11): 3450-3454.
11. Robbins, P.W., K. Overbye, C. Albright, B. Benfield and J. Pero. 1992. Cloning and high-level expression of chitinase encoding gene of *Streptomyces plicatus*. *Gene.* **111**: 69-76.
12. Wortman, A.T., C.C. Somerville and R.R. Cotwell. 1986. Chitinase determinants of *Vibrio vulnificus*: gene cloning and applications of a chitinase probe. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**(1): 142-145.
13. 이강표, 김창남, 유주현, 오두환. 1990. *Aeromonas salmonicida* YA7-625에 의한 chitinase의 생산 및 정제. *한국산업미생물학회지.* **18**(6): 599-606.
14. Ulhoa, C.J. and F. Deberdy. 1992. Purification and some properties of the extracellular chitinase produced by *Trichoderma harzianum*. *Enzym. Microb. Technol.* **14**: 236-240.
15. Rast, D.M., M. Horsch, R. Furter and G.W. Goody. 1991. A complex chitinolytic system in exponentially growing mycelium of *Mucor rouxii*; properties and function. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 2797-2810.
16. Vyas, P. and M. Deshpande. 1991. Enzymatic hydrolysis of chitin by *Myrothecium verrucaria* chitinase complex and its utilization to produce SCP.

- J. Gen. Microbiol.* **37**: 267-275.
17. Dickinson, K., V. Keer, C.A. Hitchcock and D.J. Adams. 1991. Microsomal chitinase activity from *Candida albicans*. *Biochim. Biophys. Acta.* **1073**: 177-182.
 18. Elango, N., J.U. Correa and E. Cabib. 1982. Secretory character of Yeast chitinase. *J. Biol. Chem.* **257**(3): 1398-1400.
 19. Broglie, K.E., J.J. Gaynor and R.M. Broglie. 1986. Ethylene regulated gene expression; Molecular cloning of the genes encoding an endochitinase from *Phaseolus vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **83**: 6820-6824.
 20. Molano, J., I. Palacheck, A. Duran and E. Cabib. 1979. An endochitinase from wheat germ. *J. Biol. Chem.* **254**(11): 4910-4907.
 21. Zhe-fu, L., W. Danqi, L. Annuo and Z. Weiqin. 1992. Chitinase from seeds of *Zea mays* and *Coix lachryma-jobi L.* purification and some properties. *Process Biochem.* **27**: 83-88.
 22. Inui, H., H. Kosaki, Y. Uno, K. Tabata and S. Hirano. 1991. Induction of chitinases in rice callus treated with chitin derivatives. *Agri. Biol. Chem.* **55**(12): 3107-3109.
 23. Kono, M., T. Matsui, C. Shimizu and D. Koga. 1990. Purification and some properties of chitinase from the liver of a Prawn, *Penaeus japonicus*. *Agric. Biol. Chem.* **54**(8): 2145-2147.
 24. Jeuniaux, C. 1961. Chitinase; An addition to the list of hydrolases in the digestive tract of vertebrates. *Nature* **192**: 135-136.
 25. Kono, M., T. Matsui, C. Shimizu and D. Koga. 1990. Purification and some properties of chitinase from the stomach of Japanese eel, *Anguilla japonica*. *Agric. Biol. Chem.* **54**(4): 973-978.
 26. Ordentlich, A., Y. Elad and I. Chet. 1988. The role of chitinase of *Serratia marcescens* in biocontrol of *Sclerotium rolfsii*. *Phytopath.* **78**: 84-88.
 27. Schlumbaum, A., F. Mauch, U. Vogeli and T. Boker. 1986. Plant chitinase are potent inhibitors of fungal growth. *Nature.* **324**(27): 365-367.
 28. Cosio, I.G., R.A. Fisher and P.A. Carroad. 1982. Bioconversion of shellfish chitin waste; Waste pretreatment, enzyme production, process, design and economic analysis. *J. Food Sci.* **47**: 901-904.
 29. Hsu, S.C. and J.L. Lockwood. 1975. Powdered chitin agar as a selective medium for enumeration of *Actinomycetes* in water and soil. *Appl. Microbiol.* **29**(3): 422-426.
 30. Pridham, T.G. and D. Gottlieb. 1948. The utilization of carbon compounds by some *Actinomyces* as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56**: 107-114.
 31. Sneath, P.H.A., N.S. Mair, M.E. Sharpe and J.G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. William & Wilkins, Vol. 4, 2451-2491.
 32. Watanabe, T., W. Oyanagi, K. Suzuki and H. Tanaka. 1990. Chitinase system of *Bacillus circulans* WL-12 and importance of chitinase A1 in chitin degradation. *J. Bacteriol.* **172**(7): 4017-4022.

(Received December 26, 1992)