

Angiotensin Converting Enzyme(ACE) 저해제를 생성하는 방선균 분리주의 동정 및 최적 발효조건

문성훈 · 하상철¹ · 이동선 · 김종국 · 홍순덕*
경북대학교 미생물학과, ¹한국과학기술연구원 부설 생명공학 연구소

Identification and Culture Condition of an Actinomycetes Strain Producing an Angiotensin Converting Enzyme Inhibitor

Seong-Hoon Moon, Sang-Chul Ha¹, Dong-Sun Lee,
Jong-Guk Kim and Soon-Duck Hong*

Department of Microbiology, College of Natural Science, Kyungpook National University,
Taegu 702-701, Korea

¹Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology, KIST, P.O. BOX 115,
Yusong, Taejeon 305-600, Korea

Abstract — Identification of Actinomycetes isolate strain SH-8002, a producer of ACE inhibitor, based on procedures employed in the international Streptomyces project. The strain, designated as SH-8002, was identified as *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002 based on its morphological, physiological, biochemical and chemotaxonomic characteristics. The ACE inhibitor produced by the strain was highly achieved in fermentation medium condition that was 1% soluble starch, 0.5% tryptone, 0.2% K₂HPO₄, 0.2% CaCO₃, 0.1% NaCl, pH 8.0 at 30°C for 144 hrs.

체내에 널리 분포되어 있는 ACE(1)(angiotensin converting enzyme : kininase II. EC 3.4.15.1)는 renin-angiotensin aldosterone계의 angiotensin I을 생리적 혈압상승 물질인 angiotensin II로 전환시키고, 혈관 이완작용이 있는 bradykinin을 분해시키는 효소이다. angiotensin II가 증가되면 catecholamine 값이 증가되고, 혈관이 수축되며 동시에 항이뇨 호르몬인 aldosterone의 분비가 촉진된다. 이에 따라 Na⁺ 및 수분배설이 억제되어 순환 혈액량이 증가되어 혈압상승을 일으킨다. 그러므로 ACE 작용억제는 혈관 수축을 막고 체내 수분저류를 막아 혈압을 낮추는 효과를 나타낸다(2). 최근 급속한 산업화와 경제발전으로 생활수준이 향상되어 현대사회가 점차 노령화 사회가 되면서 각종 성인병 인구가 증가하고 있다. 성인병중에서도 암과 순환기 계통의 고혈압, 심장병과 당뇨병 등의 질환이 점차 증가하고 있는 추세이며, 특히 순환기 계통의 질환중 고혈압은 온갖 성인병의 근원이 되고 있다. 오래전부터 선진국에서는 새로운

고혈압 치료제를 탐색하기 위하여 ACE(angiotensin converting enzyme) Inhibitor에 대한 연구가 활발히 진행되어, 이 효소에 대한 저해제로 Captopril, Enalapril 등이 개발되어 현재까지 광범위하게 사용되고 있다. 특히 국내에서 식물유래(3), 인위적인 합성(4, 5) 등으로 ACE 저해제 탐색에 힘써고 있으나, 미생물 유래의 ACE 저해제 탐색에 관한 연구가 별로 행하여지지 않았다. 대구 근교에서 수집한 토양으로부터 ACE 저해활성을 나타내는 균주를 분리, 동정하였으며, 저해물질을 생산하는 배양 최적조건을 확립하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

방선균의 분리

멸균 생리 식염수 10 ml에 토양시료 1 g을 넣고 20 분 동안 교반한 다음 멸균수로 10⁻⁴~10⁻⁵배로 희석하여 0.1 ml를 분리용 배지(modified starch-nitrate agar와 humic acid-vitamin agar)에 도말한 후 30°C에서 2~4주간 배양하여 나타난 colony을 순수분리하였다(6). 본 연구에 사용된 균주는 inorganic starch agar와 modified bennett agar medium에 보관하였다.

Key words: Angiotensin converting enzyme inhibitor, identification, *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002, optimum fermentation condition

*Corresponding author

분리주 SH-8002의 배양학적 및 형태학적 특성

분리주 SH-8002를 glucose asparagine agar, Czapek sucrose agar, bennett's agar와 international Streptomyces project(ISP) medium 등에서 14~21일간 배양하면서 성장의 정도, 균사와 배면의 색깔, melanin 색소를 포함한 가용성 색소 생성 여부 등을 관찰하였다(7). 특히 inorganic salt starch agar medium(ISP medium 4)에서 균사의 분지 형태와 포자의 모양, 크기 및 배여 상태를 inclined cover-slip method로 30°C에서 21일 동안 배양하면서 일정 시간별로 위상차 현미경과 주사형 현미경으로 검정하였다(8, 9).

분리주 SH-8002의 생리학적 특성

분리주 SH-8002에 대한 탄소원 이용성은 Priddyham과 Gottlieb 방법(10)에 따라 이용성을 조사하였고, 젤라틴 액화력, 전분 분해력과 질산염 환원력은 Gordon과 Mihn방법을 사용하여 조사하였다.

화학적 동정(chemotaxonomic identification)을 위한 특성 분석

분리균주의 세포벽내 diaminopimelic acid(DAP) isomers와 세포벽 아미노산을 분석하기 위하여, 건조 균체를 6N HCl로 100°C에서 18시간 가수분해한 다음, filter paper로 거른 여액을 분석용 시료로 사용하여 cellulose Thin layer chromatography를 하였다(11, 12).

Angiotensin-Converting Enzyme(ACE) 조제

Rabbit lung acetone powder(Sigma 社)를 10배 volume의 50 mM sodium borate buffer(pH 8.3)로 현탁하고, 4°C에서 homogenation 한 다음, 40,000×g에서 40분간 원심분리하여 ACE 활성이 약 0.2~0.24 unit/ml 정도 포함된 상등액을 ACE 활성측정에 사용하였다(13).

ACE 활성 측정

ACE 활성 측정은 Cushman과 Cheung 방법(14)을 개량하여 실험하였다. 효소반응의 기질로는 hippuryl-L-histidyl-L-leucine(HHL)을 사용하였으며, 반응은 eppendroff tube(1.5 ml)에서 실시하였다. 300 mM NaCl, 50 mM sodium borate buffer(pH 8.3)을 함유한 3 mM HHL 150 μl, Rabbit lung acetone powder extract 50 μl(약 0.1~0.12 unit)와 시료용액 50 μl을 함유한 반응액을 37°C에서 30분간 반응시킨 다음, 1N HCl 250 μl를 가하여 반응을 중지시킨다. 반응액을 보정한 후 1 ml ethylactate를 넣어 30초 동안

vortex한 후 3,000 rpm 15분간 원심분리한 다음 상등액인 ethylacetate 900 μl를 취하여 감압농축 하였다. 농축한 시험구에 남은 hippuric acid에 1 ml 50 mM sodium borate buffer(pH 8.3)를 첨가하여 완전히 녹인 다음, 228 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성의 1 unit는 37°C에서 1분 동안에 1 μmol의 hippuric acid를 HHL로부터 생성시키는 효소의 양으로 정의하였다(13).

ACE 저해제 탐색

발효액 0.5 ml에 동량의 ethylacetate를 첨가하여 추출한 후 각각의 층을 효소활성 측정에 이용하였으며, C(enzyme control)는 ACE와 HHL를 반응시킨 것이고, T(sample)는 ACE, HHL와 시료액을 반응시킨 것이고, B(enzyme blank)는 ACE에 반응정지액을 첨가한 것으로 사용하였다. 저해률은 아래식에서 구하였다.

$$\text{저해률(\%)} = \frac{C-T}{C-B} \times 100$$

최적 발효조건 결정

최적 탄소원을 결정하기 위하여 기본배지 A(0.2% (NH₄)₂SO₄, 0.1% NaCl, 0.1% K₂HPO₄, 0.2% CaCO₃, pH 7.0)에 최종농도가 1% 되도록 각종 탄소원(D-fructose, D-galactose, D-glucose, lactose, maltose, D-mannitol, raffinose, L-rhamnose, soluble starch, sorbitol, sucrose, D-xylose)을 첨가하여 배양하였다. 질소원의 경우 기본배지 B(1% soluble starch, 0.1% NaCl, 0.1% K₂HPO₄, 0.2% CaCO₃, pH 7.0)에 유기, 무기 질소원(asparagine, beef extract, casein, malt extract, polypeptone, tryptone, soybean flour, yeast extract, NH₄Cl, NH₄NO₃, (NH₄)₂HPO₄, (NH₄)₂SO₄, KNO₃, NaNO₃)의 최종농도가 각각 0.5%, 0.2% 되도록 첨가하여 배양하였다. 금속염의 영향을 알아보기 위해서 각종 금속염(MnCl₂, ZnSO₄, CaCl₂, CoCl₂, CuSO₄, MgSO₄, ZnCl₂, HgCl₂)을 기본배지 C(1% soluble starch, 0.5% tryptone 0.1% NaCl, 0.1% K₂HPO₄, 0.2% CaCO₃, pH 7.0)에 최종농도가 0.5 mM 되도록 첨가하여 저해물질의 생산에 미치는 영향을 알아보았다.

최적 발효배지의 pH를 2.0~11.0으로 각각 조정하여 균을 배양한 후 저해물질의 생산정도를 조사하였으며, temperature gradient shaking incubator(model-TN-3, ToYo KAGAKU SANG YO 社)를 이용하여 15~55°C 온도범위에서 최적 배양 온도를 조사하였다.

배양시간에 따른 ACE 저해제 생산능을 조사하기 위하여 접종 후 일정시간 간격으로 배양액을 분취 채취하여 균의 증식(Dried cell weight, DCW), pH 변화 및 저해활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

방선균 SH-8002의 분리

수집된 토양은 방선균 분리용 배지에서 집락의 형태와 크기, 기균사의 착색 상태, 균사의 형태적인 특성이 다르게 나타나는 500균주를 분리하여 저해 활성을 나타내는 균주를 10여개 분리하였다. 그 10여 균주 가운데 강한 저해 활성을 나타내는 균주를 SH-8002로 표시하였다.

배양학적 특성 및 형태학적 특성

여러가지 ISP배지에서 분리주 SH-8002를 동시에 30°C에서 14, 21일간 배양하면서 생육정도, 기균사의 색깔, 배면 색깔, 가용성 색소 생성유무 등의 배양학적 특성을 Williams 방법(15, 16)에 준하여 관찰하였으며, 그 결과 tyrosine agar(ISP medium 7) 배지를 제외한

대부분의 배지에서 균의 생육은 양호하였으며, yeast extract-malt extract agar(ISP medium 2), oatmeal agar(ISP medium 3), inorganic salts-starch agar(ISP medium 4)에서 기균사의 생육 및 포자 형성이 좋았다. ISP medium 4에서의 기균사의 색깔은 대개 회색 계통이며, glycerol-asparagine agar(ISP medium 5) 배지에서 배면 색깔은 grayish yellow 계통이며, melanin 색소 생성 판정은 Williams 방법에 따라 ISP medium 6, 7에서만 관찰하므로, ISP medium 6에서만 관찰되었다(Table 1, 2). 그리고 soluble pigment 생성은 Williams 방법에 의해 ISP medium 5에서만 관찰하였으므로 negative로 판정되었다(Table 3).

분리주 SH-8002를 inorganic salt starch agar 배지에서 14일 배양한 후 위상차 현미경과 주사형 전사현미경 관찰한 결과, 약 0.58×0.91 μm 크기의 cylindrical형 포자로서 표면은 smooth형이며, 포자사슬의 배열은 rectiflexible 하였다(Fig. 1, Table 2).

생리학적 특성

분리주 SH-8002의 당이용성을 살펴 본 결과 xylose, cellobiose, rhamnose, arabinose는 잘 이용하며, fruc-

Table 1. Cultural characteristics of the isolated strain SH-8002

Medium	Growth	Sporulation	Aerial mycelium (Aerial mass color)	Substrate mycelium (Reverse color)	Soluble pigment
Yeast extract-malt extract agar (ISP No.2)	Good	Good	Whitish Gray	Brown	None
Oatmeal agar (ISP No.3)	Good	Good	White	Brown	None
Inorganic salts-starch agar (ISP No.4)	Moderate	Poor	Whitish Gray	Grayish Yellow	None
Glycerol-asparagine agar (ISP No.5)	Good	Moderate	Whitish Gray	Grayish Yellow	None
Peptone-yeast extract-iron agar (ISP No.6)	Moderate	Poor	Yellowish white	Yellowish white	None
Tyrosine agar (ISP No.7)	Poor	Poor	Whitish Gray	Yellowish white	None
Arginine-glycerin agar	Good	Good	White	Yellowish white	None
Nutrient agar	Moderate	Poor	Whitish Gray	Yellowish white	None
Peptone-beef extract agar	Good	Moderate	White	Yellowish white	None
Glucose-asparagine agar	Moderate	Moderate	Whitish Gray	Grayish Yellow	None
Czapek sucrose agar	Good	Good	White	Yellowish white	None
Bennett's agar	Good	Good	White	Grayish Yellow	None

*Good>Moderate>Poor, **Cultured at 30°C for 2 weeks

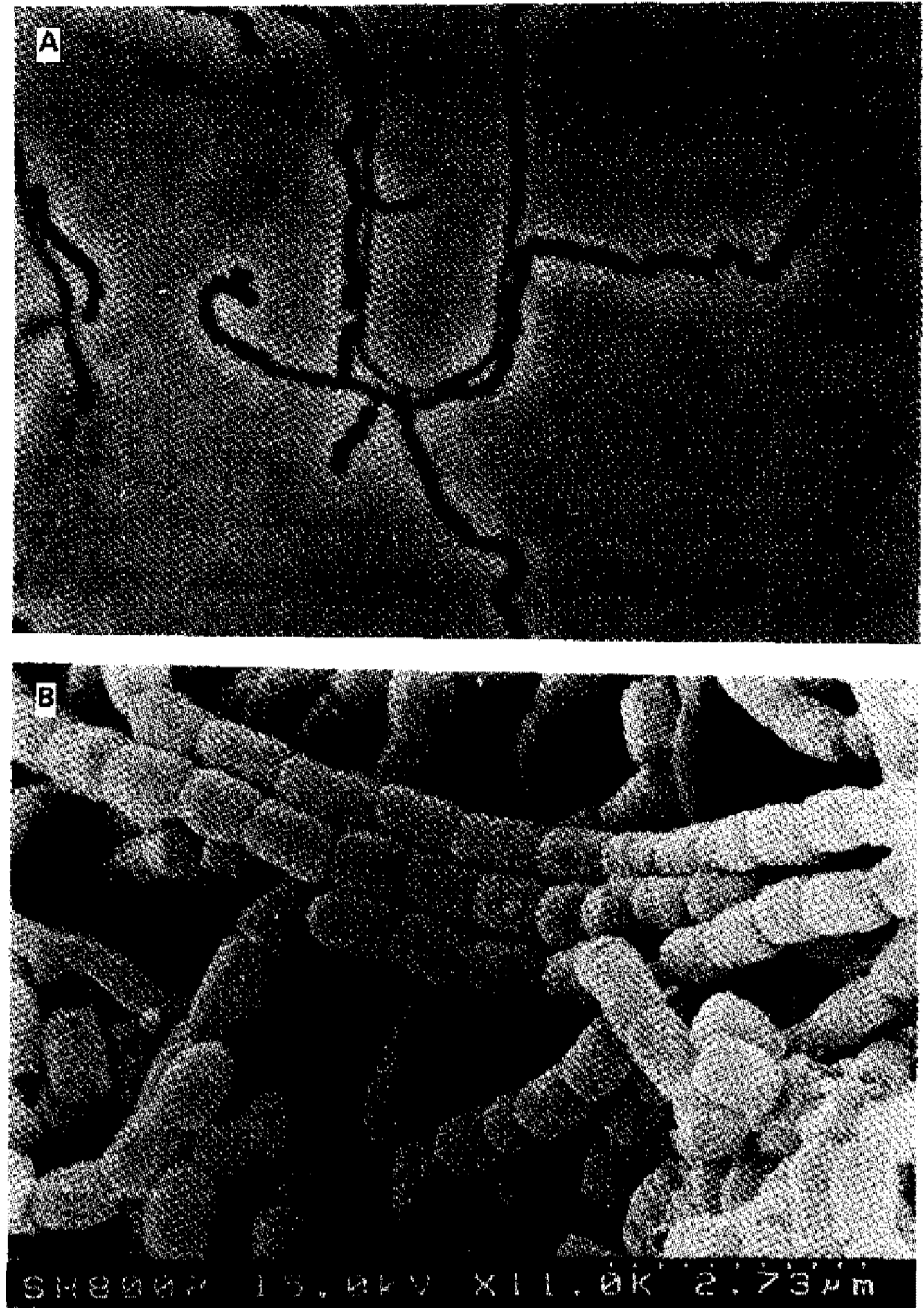
Table 2. Morphological characteristics of the isolated strain SH-8002

Colony surface	Powdery
Colony shape	Convex
Spore shape	Cylindrical
Sporulation	Poor
Color of aerial spore mass	Whitish Gray
Reverse side color	Brown, Grayish yellow
Spore chain morphology	<i>Rectiflexibiles</i> , 20~25개
Spore surface	Smooth
Spore size	약 0.58×0.91 μm

Cells were inoculated at 30°C for 14 days in inorganic salts-starch agar (ISP medium 4) and glycerol-asparagine agar (ISP medium 5).

Table 3. Comparison of taxonomic characteristics of the isolated strain SH-8002 with *Streptomyces zoamyceticus*

Charateristics	strain SH-8002	<i>Streptomyces zoamyceticus</i>
Spore chain	<i>Rectiflexibiles</i>	<i>Rectiflexibiles</i>
Spore surface	Smooth	Smooth
Sporulation	Poor	Poor
Aerial mass color	Whitish gray	Whitish gray
Reverse side color	Brown, Grayish yellow	Brown, Grayish yellow
Cell wall constituent	LL-DAP	LL-DAP
Soluble pigment	-	-
Melanin pigment	+	+
Fragmentation of mycelium	-	-
Hydrolysis of casein	+	+
Degradation of aesculin	+	+
Degradation of urea	+	+
Carbon utilization		
Fructose	+	-
Xylose	+	+
Sucrose	-	-
Cellobiose	+	+
Arabinose	+	+
Rhamnose	+	-
Raffinose	-	-
Adonitol	-	-
meso-Inositol	-	-
Mannitol	+	-

**Fig. 1. Morphology of the strain SH-8002.**

A: The light micrograph of aerial mycelium and spore chains of the isolated strain SH-8002 cultured on the inorganic salts-starch agar (ISP No.4) at 30°C (×1000) for 2 weeks.

B: The scanning electron micrograph of spore chain of the isolated strain SH-8002 on cultured on the inorganic salts-starch agar (ISP No.4) at 30°C (×11k) for 2 weeks.

tose, raffinose, meso-inositol, sucrose, mannitol 등은 이용하지 못하였다. 또한 분리주 SH-8002는 비교적 넓은 pH(4~11)와 15~35°C의 온도에서 잘 생육하는 것으로 나타났다. casein hydrolysis, aesculin, urea, 전분 분해능 결과가 양성으로 나타났으며, melanin 색소생성은 positive로 나타났고, 가용성 색소는 생성하지 않았다(Table 3).

화학적 분류학적 특성

액체배지에서 5일간 배양한 균체의 가수분해물중 세포벽의 DAP type은 LL-DAP(LL-2,6-diaminopimelic acid)이며, 또 세포벽의 아미노산 성분으로는 glycine, glutamic acid, alanine을 함유하였으며, 특징적인 당은 관찰되지 않았다. 분리주 SH-8002의 세포벽 DAP isomer와 아미노산은 방선균의 wall chemot-



Fig. 2. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid (DAP) isomer and amino acids of the strain SH-8002.

A: Standard DAP (a; LL-DAP, b; meso-DAP), B: sample, C: Glycine, D: Glutamic acid, E: Alanine

ype와 peptidoglycan type과 비교하여 볼때 세포벽 chemotype I에 해당함을 알 수 있었다(Fig. 2).

분리주 SH-8002의 배양학적, 형태학적, 생리 생화학적, 화학분류학적 특성 모두를 종합하여 Bergey' Manual of Systematic Bacteriology(17)와 International Streptomyces Project(7)에 준하여 볼 때 *Streptomyces*속으로 밝혀졌다.

ACE inhibitor를 생산하는 분리주 SH-8002의 포자형태, 각종 배지에서의 생육상태 및 색깔과 생리적 특성등의 관점에서 ISP에 수록된 *Streptomyces*속의 균주들과 비교할 때 *Streptomyces zoamyceticus*와 유사함을 알 수 있었다(Table 3).

따라서 분리주 SH-8002를 *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002로 명명하였다.

저해물질의 최적 발효 조건

Streptomyces zoamyceticus SH-8002로부터 ACE 저해제 생성을 위한 최적 발효조건을 500 ml 삼각 flask에서 조사한 결과, 분리주가 저해물질을 생산하는데 있어서의 최적 배지 성분은 다음과 같이 나타났다. 탄소원의 경우 균의 생육은 maltose, L-rhamnose, soluble starch를 사용하였을 때 가장 좋았고,

Table 4. Effect of carbon sources on the production of ACE inhibitor by *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002

Carbon source (1%)	Final pH	DCW (mg/ml)	Inhibition percent (%)
None	6.4	0.1	29.7
D-Fructose	5.4	1.8	54.1
D-Galactose	5.4	2.1	44.2
D-Glucose	6.2	3.1	55.0
Lactose	6.4	0.9	9.5
Maltose	6.0	2.7	2.7
D-Mannitol	6.0	2.2	8
Raffinose	6.6	1.2	28.7
L-Rhamnose	5.6	2.4	62.3
Soluble starch	5.6	2.3	77.2
Sorbitol	6.4	0.6	20.7
Sucrose	6.4	1.0	36.7
D-Xylose	5.8	2.0	47.3

Table 5. Effect of nitrogen sources on the production of ACE inhibitor by *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002

Nitrogen sources (0.5%)	Final pH	DCW (mg/ml)	Inhibition percent (%)
None	7.6	1.7	28
Asparagine	8.8	4.8	73.8
Beef extract	8.8	6.3	27.6
Casein	8.8	7.7	61.4
Malt extract	7.3	3.7	69.5
Polypeptone	8.8	7.0	48.7
Tryptone	8.8	8.2	92.4
Soybean flour	8.6	8.0	28.6
Yeast extract	8.8	4.8	48.6
NH ₄ Cl	7.2	4.8	72.5
NH ₄ NO ₃	7.2	5.2	62.4
(NH ₄) ₂ HPO ₄	7.3	6.2	36.9
(NH ₄) ₂ SO ₄	7.3	7.3	10.3
KNO ₃	8.6	6.0	44.8
NaNO ₃	9.0	5.5	74.9

soluble starch, L-rhamnose 등에서 저해물질 생성이 잘 일어났다(Table 4). 질소원으로는 유기 질소원이 무기 질소원보다 균의 생육 및 저해물질 생산에 더 적합한 것으로 나타났으며, 특히 tryptone이 가장 좋은 활성을 보였다(Table 5). 금속염에 있어서는 금속염을 첨가하지 않은 것과 비교할 때 균의 생육 및 저해물질 생산에 큰 차이가 없으므로, 금속염에 의한 ACE 저해효과를 배제하기 위하여 금속염을 넣지 않

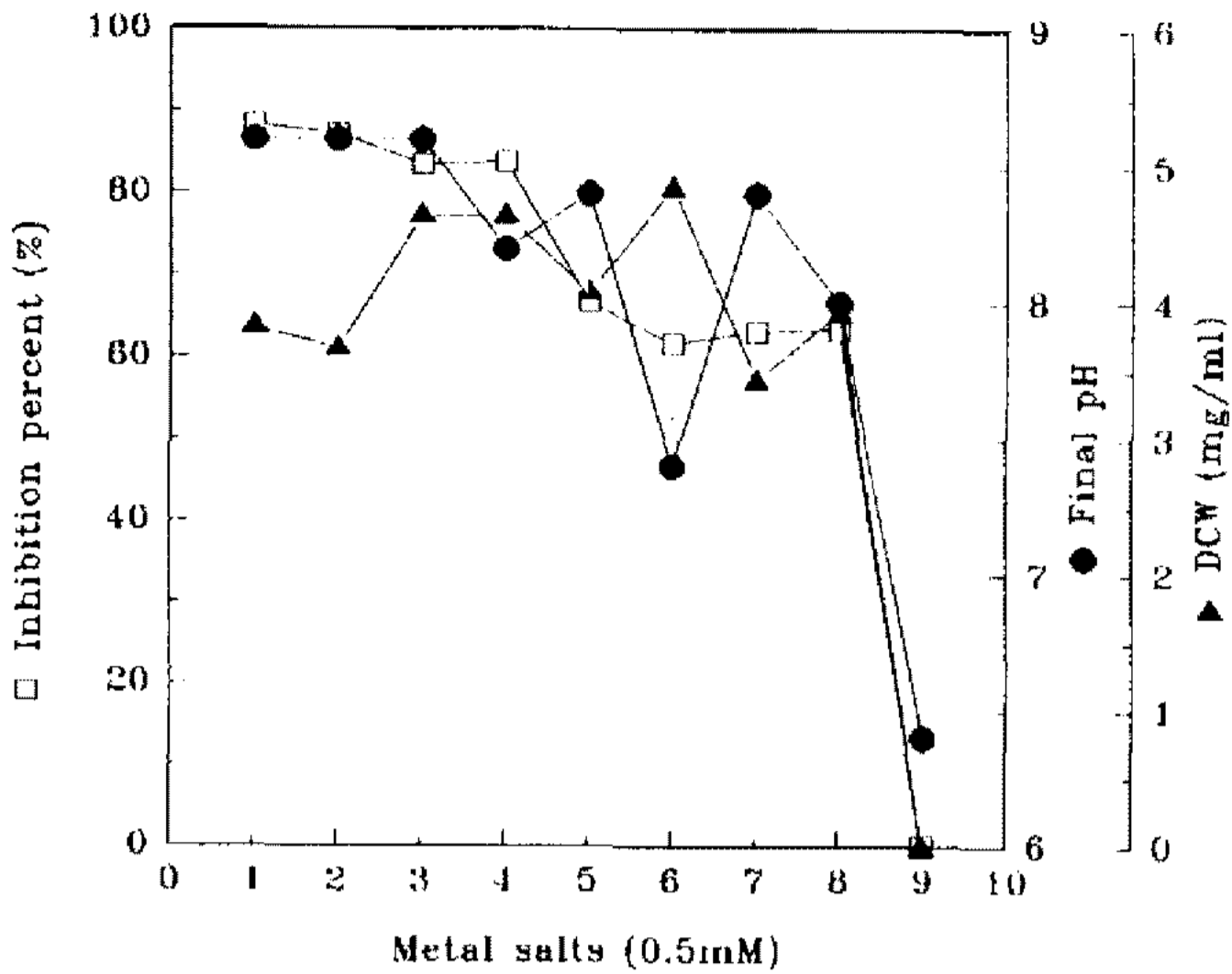


Fig. 3. The effect of metal-salts on the production of ACE inhibitor by *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002. □: Inhibition percent (%), ●: Final pH, ▲: DCW (mg/ml)
1: MnCl₂, 2: ZnSO₄, 3: None, 4: CaCl₂, 5: CoCl₂, 6: CuSO₄, 7: MgSO₄, 8: ZnCl₂, 9: HgCl₂

Table 6. Optimum Media condition for producing ACE inhibitor by *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002

Components (% w/v)	improved medium
Soluble starch	10.0 g
Tryptone	5.0 g
CaCO ₃	2.0 g
K ₂ HPO ₄	2.0 g
NaCl	1.0 g
pH	8.0
dH ₂ O	1 l

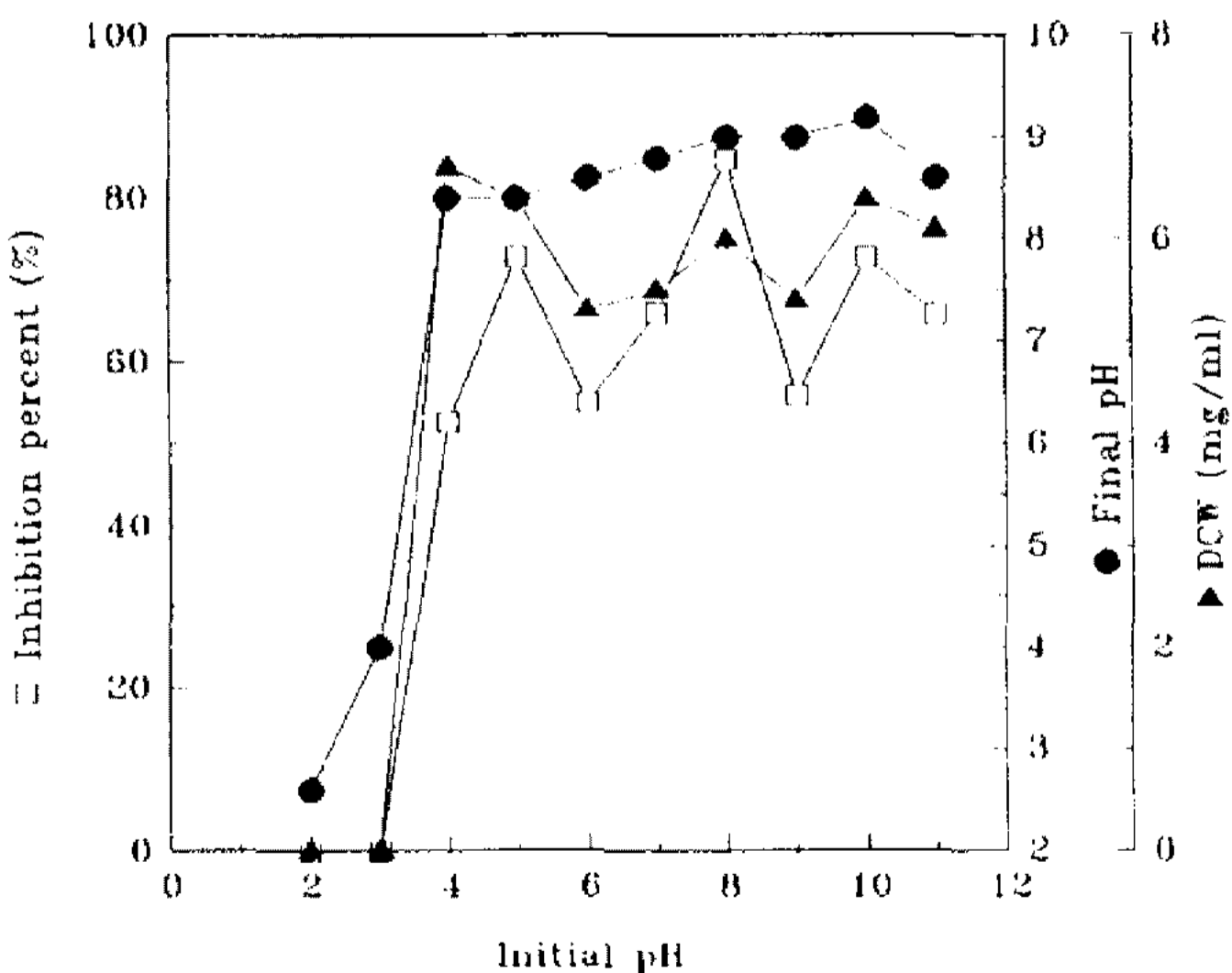


Fig. 4. The effect of initial pH on the production of ACE inhibitor by *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002. □: Inhibition percent (%), ●: Final pH, ▲: DCW (mg/ml)

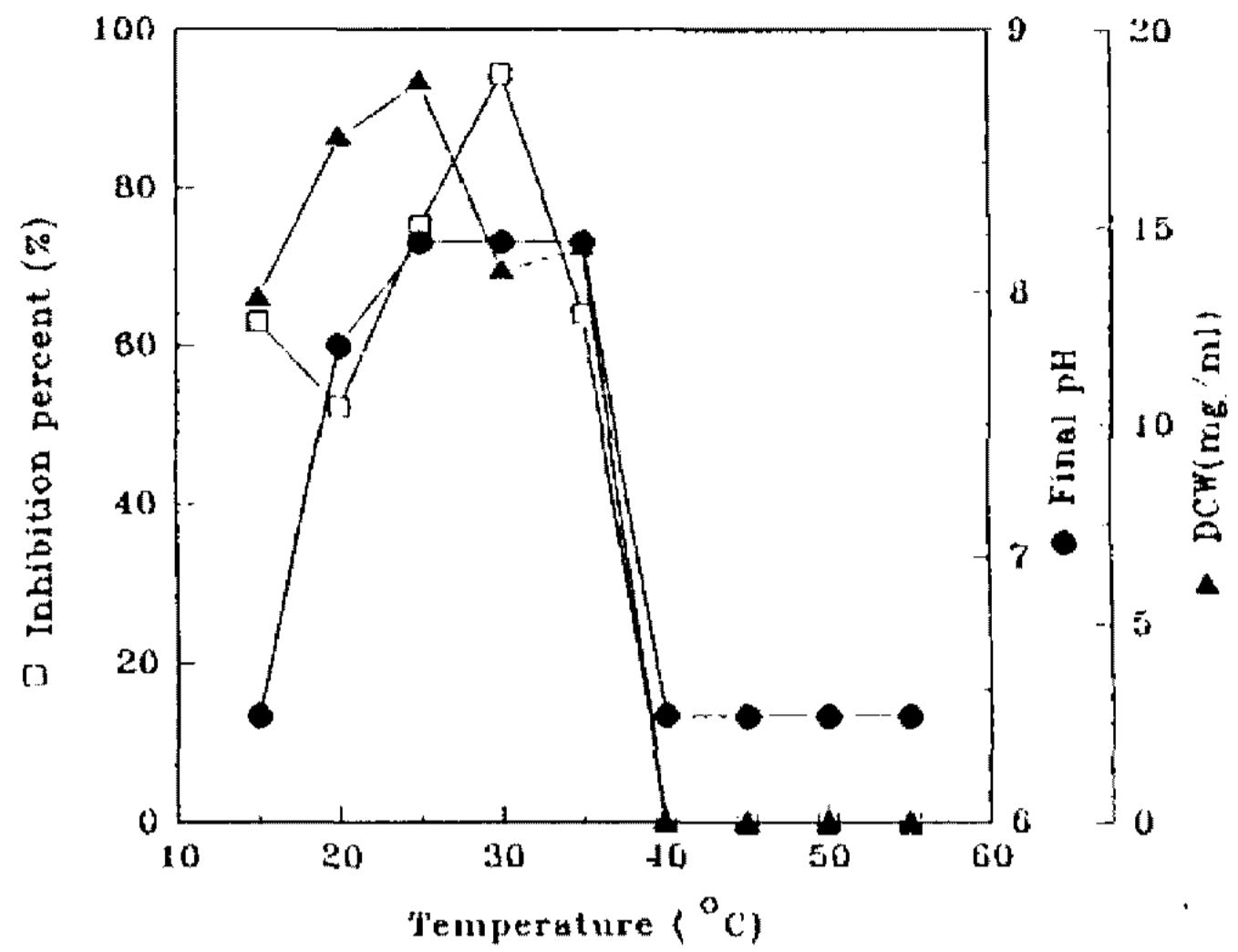


Fig. 5. The effect of temperature on the production of ACE inhibitor by *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002. □: Inhibition percent (%), ●: Final pH, ▲: DCW (mg/ml)

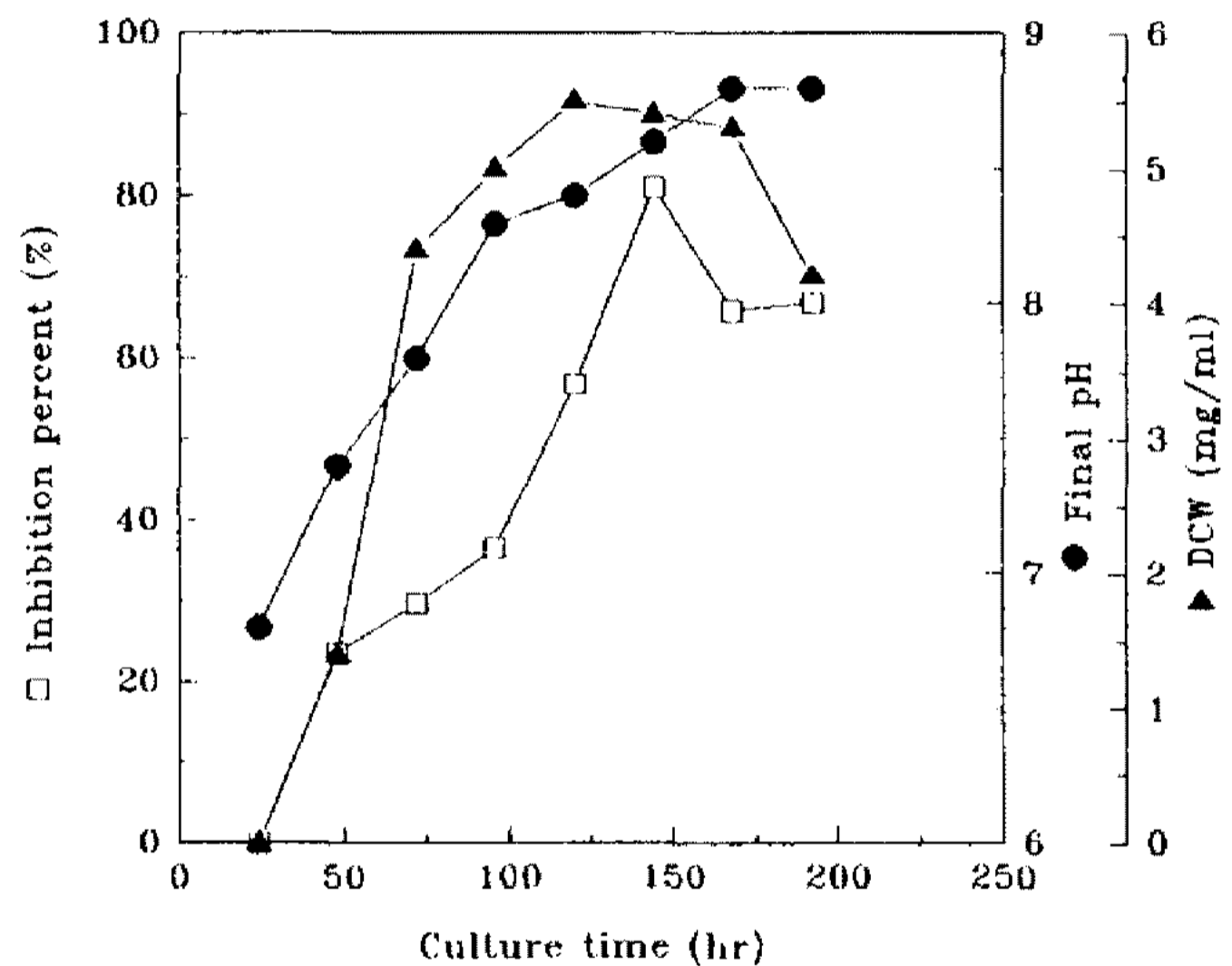


Fig. 6. The effect of culture time on the production of ACE inhibitor by *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002. □: Inhibition percent (%), ●: Final pH, ▲: DCW (mg/ml)

았다(Fig. 3). 이상의 결과를 종합하여 ACE 저해제 생성을 위한 최적 발효 배지 조성을 Table 6에 나타내었다.

배지의 초기 pH 및 배양온도 변화에 따른 균의 생육 및 저해물질 생산성을 조사한 결과 Fig. 4 및 5와 같이 나타났다. 배지의 초기 pH의 경우 pH 8.0일 때가 저해물질 생성이 최대로 나타났고, pH 2.0, 3.0에서는 균의 생육이 전혀 없었다. 배양온도에 있어서 30°C에서 최고로 나타났으며, 40°C 이상에서는 균생육이 전혀 없었다. 배양시간에 따른 균의 증식과 저해물질 생성의 변화는 Fig. 6과 같이 나타났다. 그 결과 균의

증식은 배양 1일째부터 증가하기 시작하여 4일째까지 급속도로 증가하였으나, 5일째부터 균의 생육이 차츰 감소하였다. 저해물질 생성은 배양 2일째부터 시작하여 6일째까지 증가하였다가 그 이후에는 감소하였다.

요 약

토양시료로부터 ACE 저해활성을 나타내는 방선균 분리주 SH-8002를 선별하였으며, 분리주 SH-8002의 포자배열은 rectiflexibles이였으며, 포자표면은 smooth형이였으며, 분리균 세포벽내 LL-type이 DAP을 갖는 wall chemotype I으로 결정되었으며, 형태학적 특성, 생리 생화학적 그리고 화학 분류학적 특성 등을 종합하여 볼 때 분리주 SH-8002는 *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002로 동정되었다.

이 균주 *Streptomyces zoamyceticus* SH-8002로부터 ACE 저해제 생산 최적 조건으로는 soluble starch 1%, tryptone 0.5%, K_2HPO_4 0.2%, $CaCO_3$ 0.2%, NaCl 0.1%, pH 8.0 배지조건으로 30°C에서 144시간이 가장 좋았다.

참고문헌

- Ondetti, M.A. and D.W. Cushman. 1982. Enzyme of the renin-angiotensin system and their inhibitors. *Ann. Rev. Biochem.* **51**: 283-308.
- Petrillo, E.W. and Ondetti, M.A. 1982. ACE inhibitors, Medicinal chemistry and biological actions. *Med. Res. Rev.* **3**: 1-50.
- 윤혜숙, 정성현, 한병훈. 1981. 식물생약의 안지오텐신 변환효소 억제 작용 검색. *한국생약학회지* **12**: 51-54.
- 윤혜숙, 이희주 외. 안지오텐신 변환효소 억제작용 물질의 합성. *약학회지* **28**: 313-319, 1984, **31**: 1-9, 1987.
- 이기호. Angiotensin converting enzyme 저해제의 합성 및 동력학적 연구. 강원대 대학원 발효공학과 공학박사 학위 논문, 1992, 12.
- Masayuki, H. and H. Nonomura. 1987. Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil Actinomycetes. *J. Ferment. Technol.* **65**: 501-509.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces species*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
- Booth, C. 1971. *Methods in microbiology*, Academic Press, In. (London Ltd) **4**: 320-321.
- Harrigan, W.F. and M.E. McCance. 1966. Laboratory method in Microbiology, Academic Press., New York and London.
- Gottlieb, D. and Pridham, T.G. 1948. The utilization of carbon compounds by some *Actinomycetes* as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* **56**: 101.
- Lechevalier, M.P. and H. Lechevalier. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic Actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **20**: 435-443.
- M. Goodfellow, and David, E.M. 1985. Chemical methods in Bacterial Systematics, Academic Press., London and New York.
- Koguchi, T., Yamada, K. and Kase, H. 1985. K-4, Novel inhibitor of angiotensin I converting enzyme produced by *Actinomadura spiculosospora*. *J. Antibiotics.* **39**: 364-371.
- Hayakar, M., Y. Konod, and H. Izumi. 1978. A rapid and simple spectrophotometric assay of angiotensin converting enzyme. *Anal. Biochem.* **84**: 361-369.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, and G. Alderson. 1983. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, and E.M.H. Wellington. 1983. A probability matrix for identification of some *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1815-1830.
- Williams, S.T., et al. 1989. In *Bergey's Manual of systemic bacteriology*, 4. Ed., 2452-2492, Williams and Wilkins Co.

(Received 23 January 1995)