

α -1,3-glucanase를 생산하는 미생물의 분리, 동정 및 배양조건

김명섭 · 신원철*

강원대학교 발효공학과 및 생물산업소재연구센터

Isolation, Identification and Culture Conditions for an α -1,3-glucanase Producing Microorganism.
Myoung-Sup Kim and Won-Cheol Shin*. Department of Fermentation Engineering, Kangwon National University and Bioproducts Research Center, Chuncheon 200-701, Korea — A strain producing α -1,3-glucanase was isolated from soil samples. The strain has a grey aerial mycelium and showed brown color from the other side. The temperature and pH range for growth were from 10°C to 42°C and from 4 to 10, respectively. Arabinose, dextrin and mannose were utilized for growth. Analysis of cell wall components revealed that the strain was classified as type I. From the results, the strain was identified as *Streptomyces* sp. By using this strain, the maximum production of 0.65 units/ml for α -1,3-glucanase was achieved at 37°C for 48 hrs.

치아 우식증(dental caries)은 치아 경조직의 국소적인 탈회 현상으로 구강내 세균의 치태(dental plaque) 형성에 기인한다고 보고되었다(1-3). 특히 구강내 세균 중 streptococci의 치아 우식에 미치는 영향은 돼지(4, 5)와 사람의 구강(6)에서 분리된 streptococcal strain이 쥐의 치아 우식을 발생시킴으로서 입증되었다. 치아 우식증에 관여하는 대표적인 세균인 *Streptococcus mutans*는 쥐, 돼지 등 실험 동물 뿐만 아니라 사람에서 치아 우식의 발생 원인인 치태를 형성하는 세균으로 치태 형성에 필수적인 불용성 다당류를 합성한다고 알려져 있다(2, 7). 이러한 *Streptococcus mutans*가 생산하는 불용성 다당류의 치아 표면 부착성과 유산균의 산 생성 능력이 치아 우식증을 결정한다고 보고되었다(8).

현재까지 충치 원인균으로 알려진 *Streptococcus mutans*는 a~g 7개의 serotype이 있으며(9), glucan의 합성 과정을 통하여 구강내 *Lactobacillus* 등의 다른 세균들과 함께 치아 표면에 치태라 불리는 치면 세균막을 형성하여 혐기적 조건의 plaque 내에서 각종 당으로부터 lactic acid를 비롯한 여러가지 산을 생성함으로써 치아의 enamel질을 탈회, 부식시킨다(2, 3). 이 때 형성된 치태는 산의 확산을 저해하며 타액의 산 중화 능력을 차단시킨다(10). 이와 같이 발생하는 치아 우식증의 예방법으로는 충치 유발성 세균인 *Streptococcus mutans*의 구강으로부터 제거, sucrose의 섭취 방지 및 대체 감미료 등의 개발, 불용성 glucan의 합성 효소인 glucosyltransferase의 저해제 개발 및 *Streptococcus mutans*의 치면 부착을 촉진하는 불용성 glucan을 분해하는 방법 등이 있으며 이에 대한 많은 연구가 진행되어 왔다(2, 11, 12-23).

따라서 본 연구는 치아 우식 예방의 측면에서 *Streptococcus mutans*가 생산하는 불용성 glucan을 분해하는

미생물을 분리하여 분리 균주의 동정과 α -1,3-glucanase 생산 조건을 검토하였다.

재료 및 방법

균주의 분리

춘천시 근교에서 채취한 토양을 분리용 액체배지(Insoluble glucan 0.1%, beef extract 0.3%, bacto peptone 0.5%, yeast extract 0.5%, NaCl 0.5%, pH 7.0)에 백금이로 1회 접종하여 37°C에서 5~7일간 진탕배양한 후 이 배양액을 분리용 고체배지에 도말하여 37°C에서 5~7일간 배양하여 균주를 분리하였다. 분리한 균주를 분리용 액체배지에 백금이로 1회 접종하여 37°C에서 진탕배양한 다음, 원심분리한 후 α -1,3-glucanase 활성을 측정하여 활성이 가장 높은 균주를 본 실험에 사용하였다.

균주의 동정

형태학적 특성 균사의 형태는 yeast extract, malt extract 고체배지(ISP No. 2)에 1회 접종하고 30°C에서 14일간 배양한 후 현미경으로 관찰하였다.

배양학적 특성 각 살균된 배지에 3일간 배양한 분리 균주를 접종하여 성장도, 기균사의 색, 배면의 색 및 가용성 색소 등 배양상 특성을 ISP(International Streptomyces Project) system에 준해서 배양 7일, 14일, 21일째 관찰하였고, 필요한 경우 3일, 5일, 10일째도 관찰하였다(23).

생리학적 특성 분리 균주의 생육온도, 당 이용성 및 산 생성 여부를 관찰하였다(24-26). 또한 이 외의 여러가지 생리학적 특성을 검토하였다.

세포벽 구성 성분의 분석 분리 균주의 2,6-diaminopimelic acid, 아미노산 및 당 분석은 방선균의 동정실

*Corresponding author.

Key words: α -1,3-glucanase, *Streptomyces* sp.

험법(25), Pridham과 Lyons(27)의 방법에 따라 행하였다.

분리 균주의 동정 분리 균주의 동정은 주로 Bergey's manual of systematic bacteriology(28), Bergey's manual of determinative bacteriology(29), ISP strain key (27, 30, 31), Shirling과 Gottlieb(32)의 방법에 수록되어 있는 일반적인 동정법에 따라 행하였다.

α -1,3-glucanase 활성 측정법

조 등(22)의 변법을 이용하여 다음과 같이 α -1,3-glucanase의 활성을 측정하였다.

기질의 조제법 Sucrose가 2%(w/v) 첨가된 heart infusion broth(Difco Co.)에 *Streptococcus mutans*(NCTC 10449, serotype c)를 백금이로 1회 접종한 후 37°C에서 48시간 동안 정치배양하였다. 플라스크 벽면에 부착된 glucan을 0.5N NaOH에 용해시켜 원심분리한 후 상등액에 ethanol을 가하여 불용성 glucan을 분리시켰다(9). 침전된 glucan은 증류수로 1~2회 수세 후 동결건조하여 사용하였으며 기질은 0.2%(w/v) glucan(0.01M phosphate buffer, pH 7.0)을 사용하였다.

활성 측정법 기질 3 ml에 배양상등액 2 ml를 넣고 반응 초기의 O.D.₅₅₀를 측정한다 다음 30°C에서 20분간 반응시킨 후 O.D.₅₅₀를 측정하였다. 대조구는 기질 3 ml에 증류수 2 ml를 넣어 위의 방법과 동일하게 행하였으며 효소의 1 unit는 1분간에 흡광도가 0.001 감소하는 효소의 양으로 하였다.

종균 배양

분리된 균주를 분리용 액체배지에 백금이로 1회 접종한 후 37°C에서 1일간 진탕배양시킨 것을 종균으로 사용하였다.

효소생산 조건검토

시간의 영향 분리용 액체배지에 종균 배양액을 0.1% (v/v) 접종한 후 37°C에서 진탕배양하면서 24시간 간격으로 배양액을 취하여 효소의 활성을 측정하였다.

온도의 영향 분리용 액체배지에 종균 배양액을 0.1% (v/v) 접종하고 온도를 달리하여 일정시간 배양시킨 후 효소의 활성을 측정하였다.

Table 1. Morphological characteristics of the isolated strain

Factor	Characteristic
Colony surface	Velvety, powdery
Spore chain	<i>Retinaculiaperti</i>
Spore surface	Smooth
Spore size	0.5×0.9 μm
Aerial mycelium color	Gray series
Substrate mycelium color	Brown

초기 pH의 영향 초기 pH를 각각 달리 조절한 분리용 액체배지에 종균 배양액을 0.1%(v/v) 접종하고 일정시간 배양시킨 후 효소의 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

분리 균주의 동정

형태학적 특성 토양으로부터 분리된 균주의 형태적 특성을 검토한 결과를 Table 1에 나타내었다. 포자의 표면은 매끄러운 상태이었고 크기는 0.5×0.9 μm이었으며, 기균사는 회색을 나타내었다. 또한 분리 균주의 전자현미경 사진은 Fig. 1과 같다.

배양학적 특성 전배양한 분리 균주를 각 배지에 접종 배양하면서 생육정도, 기균사의 색, 배면의 색 및 가용성 색소 등을 관찰하였다(Table 2). Colony의 성장은 대부분의 배지에서 비슷하였으나 tyrosine agar, salt starch agar와 glucose asparagine agar에서는 다른 배지에 비해 저조한 생육을 보였다. 기균사의 색깔은 전체적으로 회색 계통이었으며 배면 색깔은 적갈색을 나타내었고 대부분 적갈색의 색소를 생성하였다.

생리학적 특성 분리 균주의 생리학적 특성을 검토한 결과는 Table 3과 같다. 생육온도 범위는 10~42°C이었고, 생육 pH 범위는 pH 4~10이었다. 또한 염농도가 11%까지 생육이 가능하였으며, catalase 양성, esculin, gelatin 및 casein 분해능이 있었다. 또한 당의 이용성과 산 생성 여부를 검토한 결과(Table 4), arabinose, dextrin 및 mannose에서 강한 이용성을 나타내었으나, inositol을 비롯한 일부 당의 이용성은 저조하였고, cellulose를 비롯한 일부 당으로부터 산이 생성되었다.

세포벽 구성 성분의 분석 세포벽 중의 2,6-DAP와 아미노산 분석을 TLC를 이용하여 행한 결과는 Fig. 2에서와 같이 R_f=0.36 위치에서 LL-DAP를 확인하였으며, alanine, glutamic acid 및 glycine이 존재함을 알



Fig. 1. Scanning electron micrograph of the isolated strain. The isolated strain was grown on yeast ext., malt ext. agar medium (ISP No. 2) at 30°C for 14 days.

Table 2. Cultural characteristics of the isolated strain

Medium	Growth	Aerial mass color	Reverse side color	Soluble pigment
Bennett's agar	+++	Yellowish gray	Reddish brown	Yellowish brown
Glucose asparagine agar	+	Whitish gray	Yellowish brown	Pale yellowish
Glycerol asparagine agar (ISP No. 5)	++	Yellowish white	Pale brown	Pale yellowish
Nutrient agar	+++	Yellowish gray	Reddish brown	Reddish brown
Salt starch agar (ISP No. 4)	+	Yellowish white	Yellowish brown	Brown
Sucrose nitrate agar (Czapek-Dox agar)	++	Yellowish gray	Yellowish brown	Reddish brown
Tyrosine agar (ISP No. 7)	+	Gray	Brown	Brown
Yeast extract agar (ISP No. 1)	+++	Yellowish gray	Reddish brown	Reddish brown
Yeast ext., malt ext. agar (ISP No. 2)	+++	Gray	Reddish brown	Reddish brown

Growth; +: Poor, ++: Moderate, +++: Good

Table 3. Physiological characteristics of the isolated strain

Factor	Characteristic
Gram staining	positive
Oxygen requirement	positive
Catalase production	positive
Growth temperature	10~42°C
Growth pH	4~10
NaCl tolerance	≤11%
Melanoid pigment	negative
Antibiotics resistance:	
Dimethylchlorotetracycline (500 µg/ml)	negative
Gentamycin (100 µg/ml)	negative
Lincomycin (100 µg/ml)	positive
Rifampicin (50 µg/ml)	negative
Streptomycin (100 µg/ml)	negative
Degradation activity:	
Casein	positive
Cellulose	negative
DNA	negative
Esculin	positive
Gelatin	positive
Hypoxanthine	positive
Starch	positive
Tween 80	positive
Urea Enzyme activity:	
H ₂ S production	positive
Indole production	negative
Coagulation of milk and milk peptonization	positive
Nitrate reduction	negative
Lysozyme resistance	negative
Acid from carbohydrates	positive

Table 4. Utilization of carbohydrates and acid formation by the isolated strain

Carbohydrate	Utilization	Acid formation
None	-	-
Arabinose	++	-
Cellobiose	+	-
Cellulose	-	+
Dextrin	++	-
Fructose	+	-
Galactose	+	-
Glucose	+	-
Glycerol	+	-
Inositol	±	+
Inulin	-	-
Lactose	+	-
Maltose	+	-
Mannitol	+	-
Mannose	++	-
Raffinose	-	+
Soluble starch	+	-
Sorbitol	-	-
Sucrose	-	-
Xylose	+	-

Utilization: ++; strong utilized, +; utilized, ±; very slight utilization, -; not utilized

Acid formation: +; formation, -; not formation

수 있었다.

또한 TLC를 이용하여 세포벽에 존재하는 구성 당의 분석을 행한 결과, Fig. 3에서와 같이 R_f=0.49 위치에서 xylose를, R_f=0.38 위치에서 glucose의 검출을 확인할 수 있었다.

동정 분리 균주의 세포벽 구성 성분의 분석 결과 LL-DAP와 glycine을 함유한 세포벽 type I으로 분류되었다. 세포벽 type I을 나타내는 균속으로는 *Strepto-*

myces, *Kineosporia*, *Sporichthya*, *Intrasporangium*, *Streptoverticillium*, *Kitasatosporia* 및 *Norcardioides* 속이 있으며, 세포벽 구성 아미노산 중 glycine과 alanine의 존재, 기균사의 형성, 수용성 색소 형성, melanoid 색소

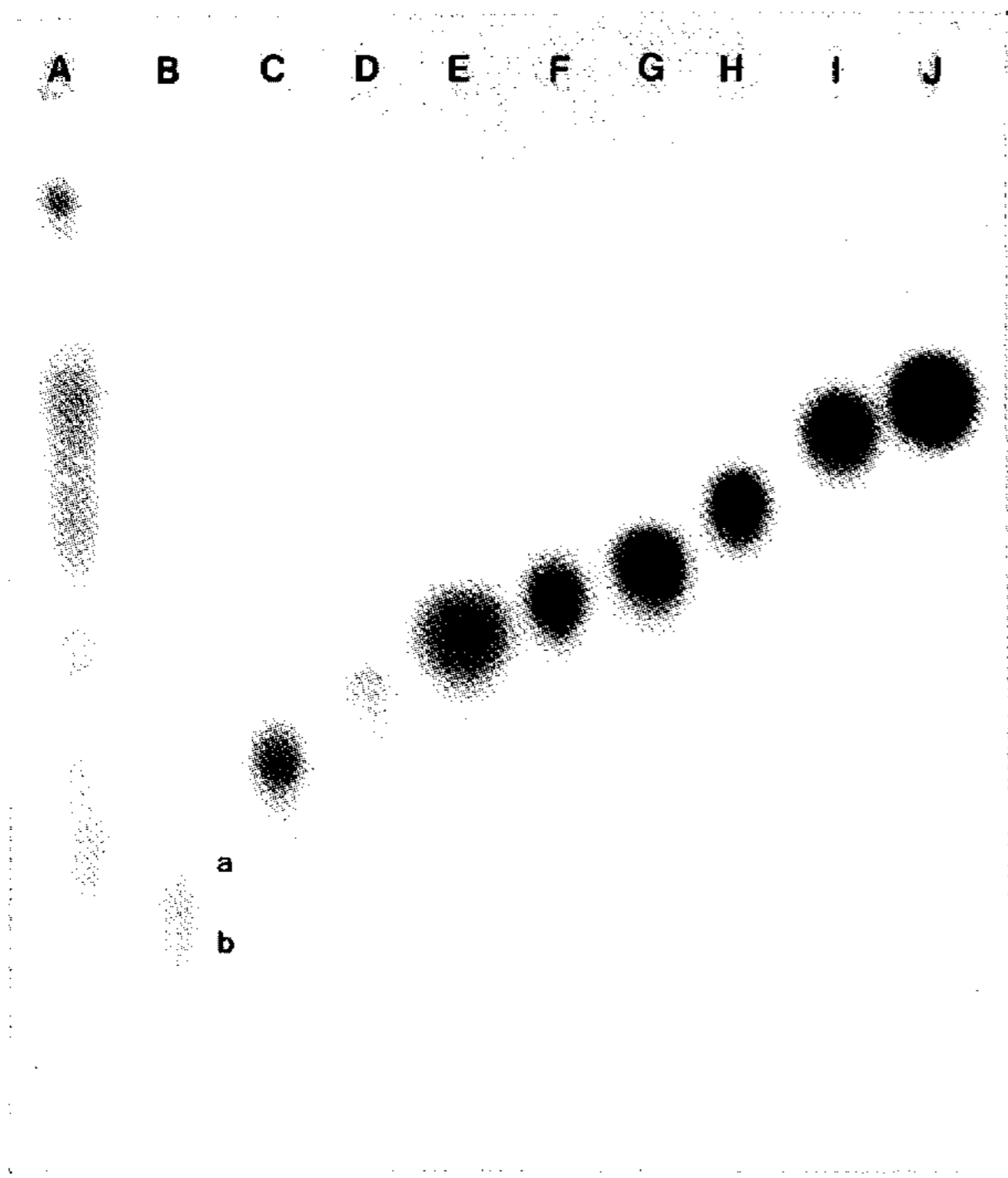


Fig. 2. Thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid isomers and amino acids of the isolated strain.

A: Isolated cell wall hydrolysate

B: Standard 2,6-diaminopimelic acid isomers; a: LL-DAP, b: meso-DAP

C: Histidine, D: Aspartic acid, E: Glycine, F: Lysine, G: Serine, H: Glutamic acid, I: Threonine, J: Alanine



Fig. 3. Thin layer chromatogram of whole cell sugars from the isolated strain.

A: Isolated cell wall sugars, B: Galactose, C: Glucose, D: Arabinose, E: Xylose, F: Rhamnose

Table 5. Comparison of taxonomic characteristics of the isolated strain with other related *Streptomyces* strains

Characteristic	Isolated strain	<i>S. aureofaciens</i>	<i>S. galbus</i>	<i>S. ramulosus</i>
Spore chain	<i>Retinaculiaperti</i>	<i>Retinaculiaperti</i>	<i>Retinaculiaperti</i> /Spirales	<i>Retinaculiaperti</i>
Spore surface	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth
Color of aerial mycelium	Gray series	Gray series	Gray series	Gray
Reverside color	Brown	Orange yellow-brown	Yellow brown	Yellow brown-red orange
Soluble pigments	Brown	—	Yellow	Red orange
Melanin pigment production	—	—	+	—
Carbon utilization:				
Arabinose	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Galactose	+	+	+	+
Glucose	+	+	+	+
Inositol	±	—	+	—
Mannitol	+	—	+	+
Raffinose	—	—	—	+
Sucrose	—	+	—	—
Xylose	+	+	+	+

Carbon utilization; +: utilized, -: not utilized, ±: very slight utilization

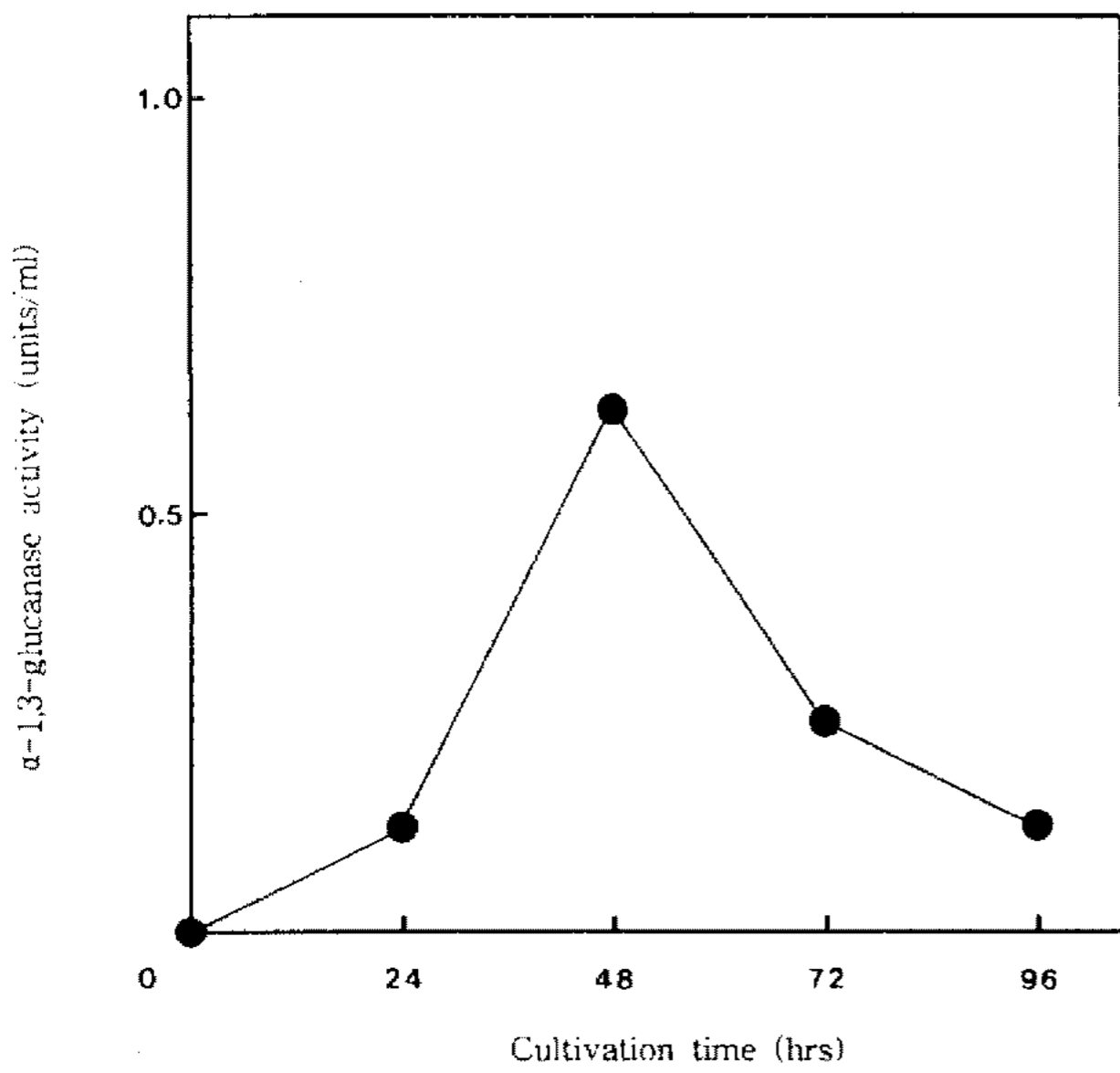


Fig. 4. Profiles of the α -1,3-glucanase production by *Streptomyces* sp. MS-7 during cultivation.

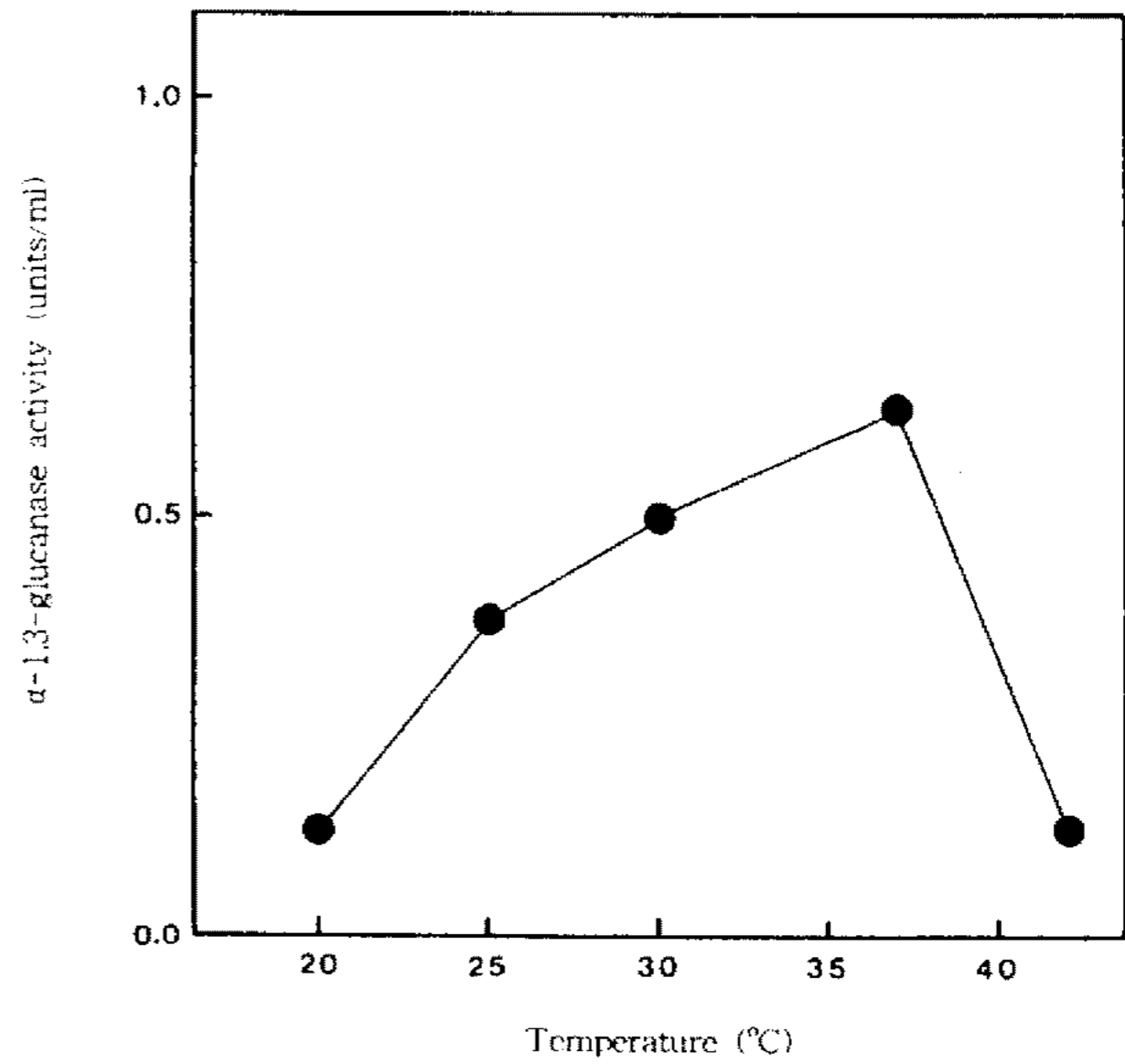


Fig. 5. Effect of temperature on the α -1,3-glucanase production by *Streptomyces* sp. MS-7.

형성 및 spore chain의 형태 등을 비교한 결과 전형적인 *Streptomyces* 속임을 알 수 있었다. 그러나 세포벽 구성 당은 xylose와 glucose로 sugar pattern의 경우 특징적 조성을 이루고 있었다.

이상과 같은 결과를 종합하여 본 균주와 가장 유사한 3개의 균주를 골라 특성을 비교한 결과를 Table 5에 나타내었다. 비교 균주인 *Streptomyces aureofaciens*, *Streptomyces galbus* 및 *Streptomyces ramulosus* 등은 spore chain, spore surface, 기균사의 색 및 배면의 색 등이 분리한 본 균주와 같았으나 수용성 색소와 melanoid 색소 형성 등에서 약간의 차이를 보였다. 또한 탄수화물 이용성에 있어서도 본 균주와 유사하였으나 정확하게 일치되지 않아 *Streptomyces* 속으로 분류하고 *Streptomyces* sp. MS-7로 명명하였다.

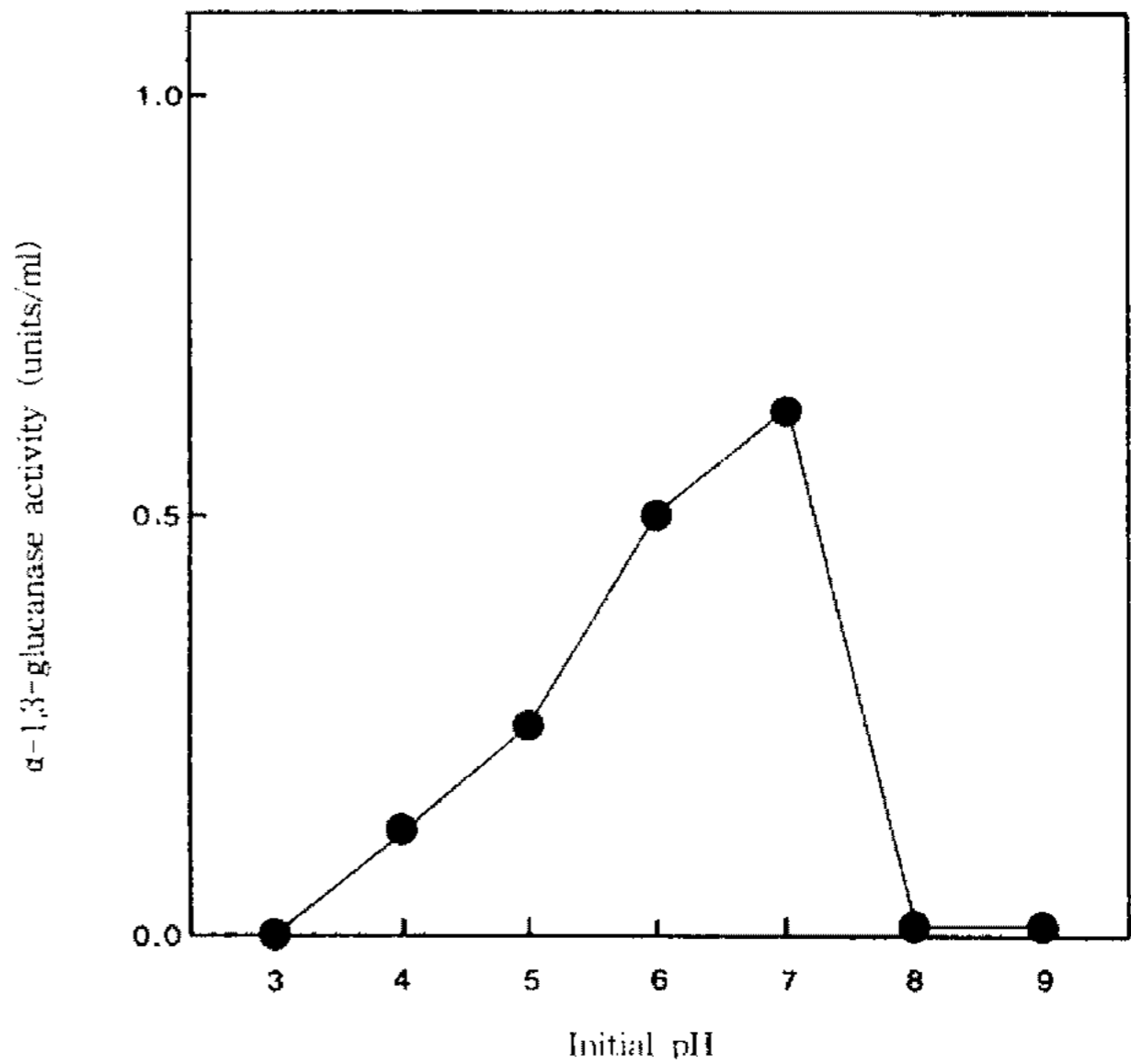


Fig. 6. Effect of initial pH on the α -1,3-glucanase production by *Streptomyces* sp. MS-7.

효소생산 조건검토

배양시간에 따른 영향 분리용 배지에서 배양시간에 따른 *Streptomyces* sp. MS-7 균주의 α -1,3-glucanase 생산을 검토한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. α -1,3-glucanase의 생산은 48시간에서 0.65 units/ml로 최대를 나타내었으며 이 후부터는 점차적으로 감소하였다. Ebisu 등(18)은 *Flavobacterium* sp.는 24시간, Inoue 등(19)은 *Streptomyces werraensis*는 154시간, *Streptomyces chartreusis*는 72시간, Hasegawa와 Nordin(33)은 *Trichoderma viride*는 240시간, 조 등(22)은 방선균 SW-522는 72시간에서 α -1,3-glucanase 활성이 가장 높다고 보고하였다. 따라서 배양시간에 따른 효소생산에 있어서 *Streptomyces* sp. MS-7 균주는 *Flavobacterium* sp.보다는 늦으나 위의 다른 균주들보다 빠르다는 것을 알 수 있었다.

배양온도의 영향 α -1,3-glucanase 생산에 미치는 온도의 영향을 검토한 결과, Fig. 5에 나타낸 바와 같이 α -1,3-glucanase의 생산은 37°C에서 최대를 나타내었다. Ebisu 등(18)은 *Flavobacterium* sp.는 25°C, Inoue 등(19)은 *Streptomyces werraensis*, *Streptomyces chartreusis*는 30°C, Hasegawa와 Nordin(33)은 *Trichoderma viride*는 실온, 조 등(22)은 방선균 SW-522는 37°C에서 α -1,3-glucanase 생산이 높다고 보고하였다. 따라서 *Streptomyces* sp. MS-7 균주는 다른 α -1,3-glucanase 생산 균주와 비교하여 볼 때 조 등(22)의 보고와 같이 비교적 높은 온도에서 α -1,3-glucanase 생산이 좋다는 사실을 알 수 있었다.

초기 pH의 영향 α -1,3-glucanase 생산에 미치는 초기 pH의 영향을 검토한 결과를 Fig. 6에 나타내었다. 초기 pH를 3에서 9까지 변화시켜 검토한 결과 α -1,3-glucanase의 생산은 초기 pH가 7일 때 0.65 units/ml로 최대를 나타내었다. 이러한 결과는 Inoue 등(19)이 보고한 *Streptomyces werraensis*, *Streptomyces chartreusis*, 조 등(22)이 보고한 방선균 SW-522의 초기 pH와 유사한 결과를 나타내었다.

요 약

토양으로부터 α -1,3-glucanase를 생산하는 미생물을 분리하여 동정과 배양조건을 검토하였다. 분리 균주는 회색 계통의 기균사를 형성하였으며 배면 색깔은 적갈색을 나타내었다. 또한 분리 균주의 생육온도 범위는 10~42°C이었고 생육 pH 범위는 pH 4~10이었다. 그 외 catalase 양성, esculin, gelatin 및 casein 분해능이 있었다. 당의 이용성과 산 생성 여부를 검토한 결과 arabinose, dextrin 및 mannose에서 이용성을 나타내었고 cellulose를 비롯한 일부 당에서 산이 생성되었다.

분리 균주의 세포벽 구성 성분의 분석 결과 LL-DAP와 glycine을 함유한 세포벽 type I으로 분류되었다. 세포벽 구성 아미노산 중 glycine과 alanine의 존재, 기균사의 형성, 수용성 색소 형성, melanoid 색소 형성 및 spore chain 형태 등의 결과로부터 분리 균주는 새로운 *Streptomyces* 속임을 알 수 있었다.

분리 균주를 이용한 α -1,3-glucanase의 생산은 초기 pH 7, 37°C에서 48시간 배양하는 것이 약 0.65 units/ml로 가장 좋았다.

감사의 말

본 연구는 1994년도 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며 *Streptococcus mutans*를 분양해 주신 서울대학교 치과대학 최선진 교수님께 감사드립니다.

참고문헌

1. Scherp, H.W. 1971. Dental caries: Prospects for prevention. *Science* **173**: 1199-1205.
2. Hamada, S. and H.D. Salde. 1980. Biology, immunology, and cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Rev.* **44**: 331-384.
3. Keyes, P.H. 1968. Research in dental caries. *J. Am. Dent. Assoc.* **76**: 1357-1373.
4. Krasse, B. and J. Carlsson. 1970. Various types of streptococci and experimental caries in hamsters. *Archs. Oral Biol.* **15**: 25-32.
5. Fitzgerald, R.J. and P.H. Keyes. 1960. Demonstration

- of the etiologic role of streptococci in experimental caries in the hamster. *J. Am. Dent. Assoc.* **61**: 9-19.
6. Edwardsson, S. 1968. Characteristics of caries-inducing human streptococci resembling *Streptococcus mutans*. *Archs. Oral Biol.* **13**: 637-646.
7. Gibbons, R.J. and R.J. Fitzgerald. 1969. Dextran-induced agglutination of *Streptococcus mutans*, and its potential role in the formation of microbial dental plaques. *J. Bacteriol.* **98**: 341-346.
8. 최선진. 1984. 사람의 치아우식 병인으로서의 세균. 대한치과의사협회지 **22**: 273-275.
9. Yakushii, T., M. Inoue, and T. Koga. 1984. Inter-serotype comparison of polysaccharides produced by extracellular enzymes from *Streptococcus mutans*. *Carbohydr. Res.* **127**: 253-266.
10. Hare, M.D., S. Svensson, and G.J. Walker. 1978. Characterization of the extracellular, water-insoluble α -D-glucans of oral streptococci by methylation analysis, and by enzymic synthesis and degradation. *Carbohydr. Res.* **66**: 245-264.
11. Ebisu, S., A. Misaki., K. Kato, and S. Kotani. 1974. The structure of water-insoluble glucans of cariogenic *Streptococcus mutans*, formed in the absence and presence of dextranase. *Carbohydr. Res.* **38**: 374-381.
12. Okami, Y., M. Takashio, and H. Umezawa. 1981. Ribocitrin, a new inhibitor of dextransucrase. *J. Antibiotics* **34**: 344-345.
13. Endo, A., O. Hayashida, and S. Murakawa. 1983. Mustastein, a new inhibitor of adhesive-insoluble glucan synthesis by glucosyltransferases of *Streptococcus mutans*. *J. Antibiotics* **36**: 203-207.
14. 오귀옥, 정동균. 1980. *Streptococcus mutans*에서의 세포외 다당류 합성효소의 활성에 미치는 수종약물의 영향. 대한구강생물학회지 **4**: 59-65.
15. 고재능, 정태영, 이종훈, 정동균, 김각균. 1980. 고추수침 엑스가 *Streptococcus mutans* B-13의 세포외 다당류 합성에 미치는 영향에 관한 전자현미경적 연구. 대한구강생물학회지 **4**: 31-36.
16. 유영선, 박기문, 김영배. 1993. 생약재 및 향신료의 *Streptococcus mutans* 증식 억제 효과. 한국산업미생물학회지 **21**: 187-191.
17. 손천배, 유미경, 김명희, 문숙경. 1991. 호알칼리성 *Bacillus* sp. No.4의 cyclodextrin glycosyltransferase에 의한 glycosyl sucrose의 생산과 저충치성 당으로서의 응용. 한국식품과학회지 **23**: 503-509.
18. Ebisu, S., K. Kato, S. Kotani, and A. Misaki. 1975. Isolation and purification of *Flavobacterium* α -1,3-glucanase-hydrolyzing, insoluble, sticky glucan of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **124**: 1489-1501.
19. Inoue, M., T. Egami, K. Yokogawa, H. Kotani, and T. Morioka. 1975. Isolation, identification and some cultural conditions of *Streptomyces* species that produce water-insoluble polyglucan hydrolase. *Agric. Biol. Chem.* **39**: 1391-1400.
20. Kelstrup, J., T.D. Funder-Nielsen, and E.N. Moller. 1973. Enzymatic reduction of the colonization of *Streptococcus mutans* in human dental plaque. *Acta. Odont. Scand.* **31**: 249-253.

21. 김윤석, 안재현, 정광례, 이기봉. 1989. *Streptococcus mutans*의 plaque 형성에 미치는 dextranase와 glucose-oxidase의 영향. 한국미생물학회지 **27**: 430-435.
22. 조효상, 허태련, 윤정원. 1993. 치면세균막 분해효소인 α -1,3 glucanase를 생산하는 미생물의 분리 및 효소 특성. 한국산업미생물학회지 **21**: 263-268.
23. Waksman, S.A. 1967. *The actinomycetes-A summary of current knowledge*. Ronald, New Jersey.
24. Cappuccino, J.G. and N. Sherman. 1992. *Microbiology-A laboratory manual*. Benjamin and Cummings, California.
25. 清野昭雄. 1985. 放線菌の同定實驗法. 日本放線菌研究會編.
26. Gerhardt, P., R.G.E. Murry, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips. 1981. *Manual of method for general bacteriology*, Pp. 410-441. American Society for Microbiology, Washington.
27. Pridham, T.G. and A.J. Lyons. 1969. Progress in clarification of the taxonomic and nomenclatural status of some problem actinomycetes. *Devel. Indust. Microbiol.* **10**: 183-221.
28. Williams, S.T., M.E. Sharpe, and J.G. Holt. 1989. *Bergey's manual of systematic bacteriology*, Vol. 4. Williams and Wilkins, Baltimore.
29. Buchanan, R. and N.E. Gibson. 1989. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
30. Kuster, E. 1972. Simple working key for the classification and identification of named taxa included in the International *Streptomyces* Project^{1,2}. *Intern. J. System. Bacteriol.* **22**: 139-148.
31. Nonomura, H. 1974. Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in ISP. *J. Ferment. Technol.* **52**: 78-92.
32. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* III., Additional species descriptions from first and second studies. *Intern. J. System. Bacteriol.* **18**: 279-392.
33. Hasegawa, S. and J.H. Nordin. 1969. Enzymes that hydrolyze fungal cell wall polysaccharides. *J. Biol. Chem.* **244**: 5460-5470.

(Received 28 December 1995)