

내열성 제한효소인 Svi I을 생성하는 *Streptomyces* 분리균주의 수리 동정

배 무* · 윤미섭 · 김형태¹ · 이계준¹
이화여자대학교 생물과학과, ¹서울대학교 미생물학과

Numerical Identification of a *Streptomyces* Strain Producing a Thermotolerable Restriction Endonuclease Svi I

Bae Moo*, Mi-Sub Yun, Hyung-Tae Kim¹ and Kye-Joon Lee¹

Department of Biological Science, College of Natural Science,
Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

¹Department of Microbiology and Reserch Center for Molecular Microbiology
Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract — Numerical identification was carried out for an isolate of *Streptomyces* D2-5 producing a new restriction endonuclease Svi I. Fifty taxonomic unit characters were tested and the data were analyzed numerically using the TAXON program. The isolate was best matched to *Streptomyces violochromogenes* in the major cluster 18 of *Streptomyces*. Therefore, it was concluded that the isolate was identified to be a member of *Streptomyces violochromogenes*.

방선균은 obligately aerobes로써 그람 양성균에 속하며 균사체로 증식하는 토양 미생물이다. 방선균은 세균이면서도 균사를 형성하며 곰팡이와 같은 형태로 자라고 포자를 형성하는 등 형태적 특징이 현저하다. 이에 속하는 균주들은 2차 대사산물의 생합성능력이 다양하며 형태 분류학적 특성이 많아 생태적 연구나 다양한 대사 산물 연구에 많이 이용되어지고 있으며 관심이 증대되는 균주이다.

그러나 방선균은 형태적 차이나 배양적 차이에 의해서 만으로도 새로운 속이나 종으로 동정되어 수년 동안 분류학자들에게 방선균의 체계적인 분류방법이 하나의 과제였다. Silvestris *et al.*(8)에 의해 수리 분류 데이터로부터 확률동정키(probabilistic identification key)가 최초로 만들어졌으며 최근 Williams *et al.*(9)에 의해 분류 데이터를 기본으로 새로운 computer program을 이용하여 확률 동정 행렬을 만드는 것을 기본으로 하는 수리 동정 방법이 제안되었다.

본 연구는 새로운 제한효소인 Svi I(13)의 활성을 나타내는 내열성 *Streptomyces* strain을 선별하여 영

국의 Ward 박사에 의해 개발된 TAXON program을 이용, 그 균주를 동정하고 평가하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

본 연구에 사용된 균주는 제한효소의 활성을 나타내는 내열성 토양 분리균인 *Streptomyces* D2-5이다. 균주는 Inorganic starch agar 사면 배지에 보관하였으며 spore는 glass wool을 통과시켜 분리하여 Glycerol-nutrient broth에 현탁시켜 -70°C 에 보관하였다. 배양적 특징과 형태적 특징을 관찰하기 위해 International *Streptomyces* Project(ISP)의 media(6)를 이용하였고 고체 배지는 agar 배지에서 submerged culture는 액체 배지에서 rotary shaking incubater를 이용하여 50°C 와 28°C 에서 관찰하였다.

화학적 동정(chemotaxonomic identification)을 위한 특성 분석

Starch-casein-nitrate 배지에서 3일간 배양한 균체를 회수하여 ice bath에서 초음파 처리(Braun sonic, 1510, 100W for 3 min) 후 원심분리(15000×g, for

Key Word: Numerical identification, restriction endonuclease, Svi I, *Streptomyces violochromogenes*
*Corresponding author

Table 1. Taxonomic unit characters used in the identification of an isolate of using the probability matrix of the *Streptomyces* major cluster and using TAXON program

1. Morphology and pigmentation	
Spore chain morphology :	rectiflexible(RFS), spiral(SPI)
Color of spore mass :	red(RED), grey(GRY)
Mycelial pigment :	red/orange(ROS)
Diffusible pigment :	production(PIG), yellow/brown(YBP)
Melanin production on :	PYI medium(MPI), tyrosine medium(MTY)
2. Antimicrobial activity	
<i>Bacillus subtilis</i> (SUB)	<i>Micrococcus luteus</i> (LUT)
<i>Candida albicans</i> (ALB)	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (CER)
<i>Streptomyces murinus</i> (MUR)	<i>Aspergillus niger</i> (NIG)
3. Biochemical tests	
Lecithinase(LEC)	Lipolysis(LIP)
Pectin hydrolysis(PEC)	Nitrate reduction(NO3)
H ₂ S production(H2S)	Hippurate hydrolysis(HIP)
4. Degradative tests	
Elastin(ELA)	Xanthine(XAN)
Arbutin(ARB)	
5. Antibiotic resistance	
Neomycin(NEO)	Rifampicin(RIF)
Oleandomycin(OLE)	Penicillin G(PEN)
6. Growth test	
45°C (45C)	NaCl(7NA)
Sodium azide(01Z)	Phenol(PHN)
Potassium tellurite(01T)	Thallos acetate(T01)
7. Compounds as sole source of nitrogen(0.1%, w/v)	
DL- α -amino-n-butyric acid(BUT)	L-Cysteine(CYS)
L-Valine(VAL)	L-Phenylalanine(PHE)
L-Histidine(HIS)	L-Hydroxyproline(HYD)
8. Organic compounds as sole source of carbon(1%, w/v)	
Sucrose(SUC)	myo-Inositol(INO)
Mannitol(MAN)	L-Rhamnose(RHA)
Raffinose(RAF)	D-Melezitose(MEZ)
Adonitol(ADO)	Dextran(DEX)
D-Melibiose(MEB)	Xylitol(XYT)

*Characters parenthesis is the code name for computer.

15 min)하여 동결 건조를 실시하였다. 가수분해후 Thin layer chromatography를 이용하여 diaminopimelic acid와 전체 세포내 당을 분석하였다(4).

종의 수리 동정을 위한 특성과 동정 스코어(identification score)

*Streptomyces*의 주군집(major cluster)의 수리 동정에 이용되는 단위 형질(unit character)은 Williams *et al.*(9, 10)에 따라 시험하였다(Table 1). TAXON

program을 이용하여 분리주의 동정 스코어를 결정하였으며 그 각각은 다음과 같다.

Willcox probability : (9) 분리주의 Taxon J에 대한 유사정도(likelihood)를 모든 분류군(U)에 대한 분리주의 유사정도의 합으로 나눈 값을 말한다. 1.0에 가까운 값이 나올수록 그 matrix의 group과 잘 맞는다는 것을 의미한다.

분류학적 거리(Taxonomic distance) : 분리주와 비교되는 group의 중심(centroid)으로부터의 거리를

나타낸다. 낮은 값일수록 그 group과 높은 상관관계를 나타내며 이 값은 다음 식으로 계산할 수 있다.

$$[\sum(U_i - P_{ij})^2/m]^{1/2}$$

이때 m은 형질의 수이고 U_i 는 형질 i에서 나온 U의 점수(positive일 때 1이거나 negative일 때 0), P_{ij} 는 특성 i에서 Taxon J의 strain에 의해 주어지는 positive의 비율을 의미한다.

95% 분류군 반경(95% Taxon radius) : 이는 분류군(Taxon) J의 95%의 구성군이 포함되는 분류군의 반경을 나타낸다.

% Probability of Strain Further Away : 동정된 미지의 시험균주 밖에 존재하는 균주가 확률적으로 몇 %에 해당하는가를 나타낸다.

결과 및 고찰

형태적 특성과 화학적 분류학적 특성

분리주 D2-5는 고체배지에서 전형적인 *Streptomyces*의 mycelia와 spore를 형성하였다. 기균사의 색깔은 붉은 갈색이었으며 Glycerol-Asparagine배지에서 갈색의 수용성 색소가 생성되었다. 배면의 색깔은 Tyrosine agar(ISP medium 7)를 제외하고는 모두 붉은 갈색이었으며 melanin 색소의 생성은 Peptone-Yeast extract Iron agar(ISP medium 6)에서 관찰되었으며 포자색은 흰색이었다. 상기 배지에서 배양할 때 colony는 질기고(tough), 가죽질(leathery)이었으며 가장 자리는 불규칙한 것으로 나타났다. D2-5는 최적 성장온도가 50°C 이므로 50°C 와 30°C 에서 각각 실험하여 비교해 본 결과 30°C 에서는 상당히 성장속도가 낮았

으나 50°C 에서 배양할 때와 거의 동일한 배양적 특징을 나타내었다. D2-5를 Inorganic salts starch agar (ISP medium 4) 배지에서 14일간 배양한 후 광학 현미경을 이용하여 rectiflexible인지 spiral인지 관찰하여 본 결과 기층균사에서 뻗어나온 기균사에서 기균사 포자가 형성되었고 포자사슬의 형태는 spiral이었다. 주사전자현미경 관찰 결과 D2-5의 포자는 타원형에 가까운 원형이었으며 표면은 smooth이며 포자사슬은 분절된 상태였다(Fig. 1, Fig. 2).

액체 배지에서 5일간 배양한 균체의 가수분해물 중 세포벽의 DAP 이성질체는 LL-DAP(LL-2,6-diamino-

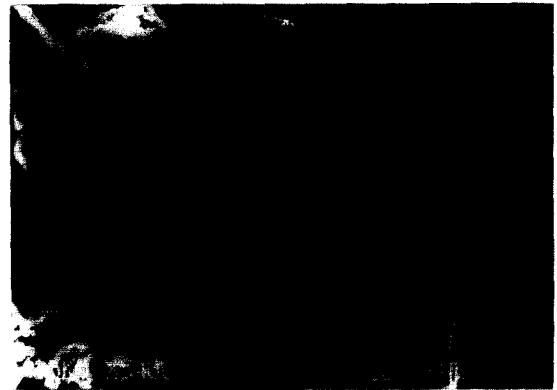


Fig. 2. Vegetative hyphae of isolate D2-5 cultured in Nutrient broth liquid medium (by scanning electron microscope).



Fig. 1. Spore chain of the isolate cultured on Bennett's agar medium (by scanning electron microscope).

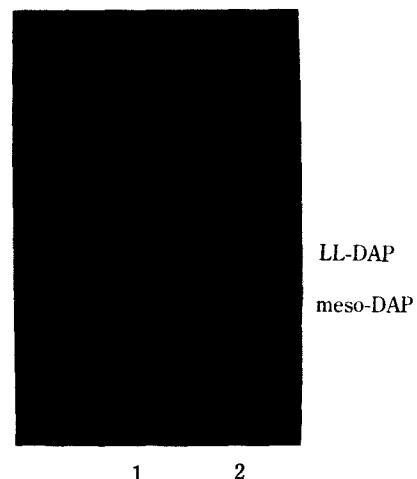


Fig. 3. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid(DAP) isomer of the isolate D2-5. Lane 1: Cell wall hydrolysate, lane 2: DAP isomers.

pimelic acid)이며(Fig. 3) 또 세포내의 특징적인 당은 관찰되지 않았다(Fig. 4). 분리주 D2-5의 세포벽 DAP isomer와 아미노산은 방선균의 wall chemotype과 peptidoglycan type(4)과 비교하여 볼 때 세포벽 chemotype I에 해당되고 세포내에 어떤 특징적인 당이 나타나지 않는 sugar pattern C에 해당하는 것을 알 수 있다(3, 4). 배양특성, 형태적 특성, 세포벽의 DAP와 아미노산 및 당 분석 등의 결과로 D2-5를 *Streptomyces*속으로 분류할 수 있다.

TAXON program을 이용한 수리 동정(Numerical identification)

종수준의 동정을 위하여 실시한 분리군 *Streptomyces* sp. D2-5의 단위특성을 기본으로 하여 현재까지 분류가 완성된 균주들의 특징을 database화하여 이를 수리 분류하도록 작성한 TAXON program을 이용,

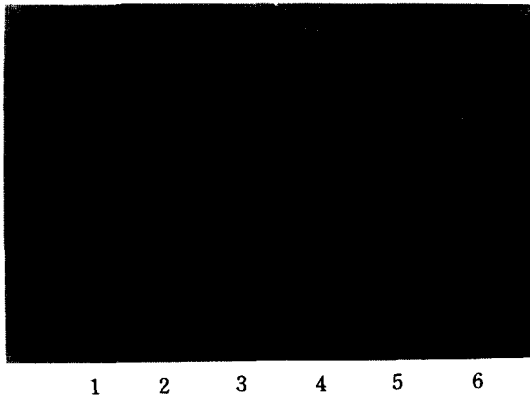


Fig. 4. Cellulose thin layer chromatogram of whole cell sugar extract from the isolate D2-5 and standard sugars.

Lane 1: Whole cell extract, lane 2: Ramnose, lane 3: Arabinose, lane 4: Glucose, lane 5: Galactose, lane 6: Mannose.

수리 동정을 실시하였다(9). TAXON program을 이용하여 정확한 동정이 되기 위해서는 Willcox probability가 높고(>0.85) 분류학적 거리가 짧고 될 수 있는 한 분류학적 거리가 95% 분류군 반경내에 들고 % Prob. of strain further away가 큰 것이 좋다고 할 수 있다(6).

분리주 D2-5를 *Streptomyces* 주군집(major cluster)을 대상으로 TAXON program을 이용하여 수리 동정(Numerical identification)을 한 결과 Table 2와 같이 Willcox probability(0.998852)를 나타냈는데 이는 주군집 15(*Streptomyces chromofuscus*)의 Willcox probability(0.001148)보다는 월등히 높으므로 주군집 18(*Streptomyces cyaneus*)에 속할 확률이 가장 높음을 알 수 있다. 본 분리군의 단위 형질의 특성은 주군집 Hypothetical Median Organism(HMO), centrotypic인 *S. coeruleus*와 본 분리군주와 가장 근접한(best match strain) *S. violochromogenes*와 outer-most strain인 *S. fumanus*의 TAXON unit character와 Willcox probability를 비교 분석한 결과 Table 3과 같았다. HMO의 분류군 거리(0.2688)가 95% 분류군 반경보다 작고 Willcox probability가 0.999992로 높다. 또 Centrotypic(*S. coeruleus*)과 HMO는 cluster에 포함될 확률(% probability of further away)이 높으므로 주군집 18은 매우 조밀한 군집이라고 생각된다.

본 분리군 D2-5의 주군집 18에서의 Taxon distance(0.5054)가 95% Taxon radius(0.4497)보다 크고 또한 cluster의 중심에 있다고 하는 확률(% of probability of strain further away)이 낮은 것으로 보아 본 분리군은 주군집 18에 속하기는 하나 주군집 중심으로 부터 떨어져 있다고 판단되었다. 결과적으로 주군집 18의 outer most strain인 *S. fumanus*보다 Taxon radius가 큰 것으로 보아 분리군은 주군집 18의 외각에 존재하는 것으로 판단된다.

Table 2. Identification of isolate *Streptomyces* sp. D2-5 to the major clusters of *Streptomyces* by TAXON program

Taxon Major cluster(Centrotypic member)	Taxon distance	95% Taxon radius	%Prob. of strain further away	Willcox Probability
18 (<i>Streptomyces cyaneus</i>)	0.5054	0.4497	0.1031	0.998852
15 (<i>Streptomyces chromofuscus</i>)	0.5388	0.4271	0.0001	0.001148
40 (<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>)	0.5479	0.3805	0.0000	0.000000
23 (<i>Streptomyces microflavus</i>)	0.5611	0.3931	0.0000	0.000000
32 (<i>Streptomyces violaceoniger</i>)	0.5660	0.3854	0.0000	0.000000

Table 3. Simple matching coefficient (SSM) of the isolate D2-5 to member organisms in *Streptomyces* cluster 18

Member of cluster 18	ISP No.	ATCC No.	SSM (%)	Member of cluster 18	ISP No.	ATCC No.	SSM (%)
<i>Streptomyces violochromogenes</i>	5207	15893	74.00	<i>Streptomyces iakyrus</i>	5482	15375	60.00
<i>Streptomyces bicolor</i>	5140	23614	70.00	<i>Streptomyces afgnaniensis</i>	5228	23871	58.00
<i>Streptomyces indigocolor</i>	5432	19842	70.00	<i>Streptomyces violatus</i>	5209	15892	58.00
<i>Streptomyces janthinus</i>	5206	15870	70.00	<i>Streptomyces chartreusis</i>	5085	14922	58.00
<i>Streptomyces longisporus</i>	5166	23931	68.00	<i>Streptomyces cyaneus</i>	5108	14923	58.00
<i>Streptomyces cinnabarinus</i>	5467	23617	66.00	<i>Streptomyces caelestis</i>	5084	15084	56.00
<i>Streptomyces purpurascens</i>	5310	25489	66.00	<i>Actinosporangium violaceum</i>	MAV	15813	56.00
<i>Streptomyces coeruleofuscus</i>	5144	23618	66.00	<i>Streptomyces azureus</i>	5106	14921	56.00
<i>Streptomyces coerulescens</i>	5146	19896	66.00	<i>Streptomyces griseorubiginosus</i>	5469	23627	56.00
<i>Streptomyces neyagawaensis</i>	5588	27449	66.00	<i>Streptomyces peruviansis</i>	5592	27459	56.00
<i>Streptomyces arenae</i>	5293	25428	62.00	<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	5499	14511	54.00
<i>Streptomyces</i> sp.	MI		62.00	<i>Streptomyces pallidus</i>	5531	27459	54.00
<i>Streptomyces coeruleorubidus</i>	5145	13740	60.00	<i>Streptomyces luteogriseus</i>	5483	15072	52.00
<i>Streptomyces collinus</i>	5129	19743	60.00	<i>Streptomyces echinatus</i>	5013	19748	52.00
<i>Streptomyces curacoi</i>	5107	13385	60.00	<i>Streptomyces violarus</i>	5205	25516	52.00
<i>Streptomyces hawaiiensis</i>	5042	12236	60.00	<i>Streptomyces bellus</i>	5185	14925	50.00
<i>Streptomyces pseudovenezuelae</i>	5212	23951	60.00	<i>Streptomyces lanatus</i>	5090	19775	50.00
<i>Streptomyces resistomycificus</i>	5133	19804	60.00	<i>Streptomyces thermotolerans</i>	5227	11416	50.00
<i>Streptomyces roseviolaceus</i>	5277	25493	60.00	<i>Streptomyces fumanus</i>	5154	19904	48.00

Table 4. Identification of HMO, centrotype, best match strain, outer-most member and isolate *Streptomyces* sp. D2-5 to the major cluster 18 of *Streptomyces* by TAXON program

Member of cluster 18	Taxon distance	95% Taxon radius	%Prob. of strain further away	Willcox Probability
HMO(hypothetical median organism)	0.2688	0.4497	99.8729	0.999992
Centrotype(<i>Streptomyces coerulescens</i>)	0.2878	0.4497	99.4307	0.999991
Best match strain (<i>Streptomyces violochromogenes</i>)	0.3709	0.4497	65.0928	0.999999
Outer-most member(<i>Streptomyces fumanus</i>)	0.4527	0.4497	4.2594	0.130991
Isolate(<i>Streptomyces</i> sp. D2-5)	0.5054	0.4497	0.1031	0.998852

Streptomyces 주군집 18은 38개의 strain으로 구성된 집단인데 본 분리균주는 이 중에서 *Streptomyces violochromogenes*에 가장 근접합(best match)을 알 수 있었다(Table 4). 본 분리균과 주군집 구성종간의 분류단위 특성을 Simple matching coefficient(SSM)로 비교한 결과 Table 4와 같았다. SSM 분석으로는 중심 균주인 *Streptomyces coerulescens*와는 66% S-level을 유지하였으나 *S. violochromogenes*와 74%의 S-level을 나타내어 본 분리균주는 SSM 분석 결과로는 *S. violochromogenes*와 가장 유사하다.

주군집을 동정하는데 필요한 50개의 단위 형질(unit

character) 중 morphology, 항균력, growth test 등의 37개의 단위 형질이 동일한 결과를 나타내었으며 주군집 18의 일반적인 특성이 아닌 즉 5% 이하의 positive value를 갖는 특성인 *Candida albicans*(ALB), *Saccharomyces cerevisiae*(CER)에 대한 항균력, Neomycin에 대한 내성(NEO), potassium tellurite에서의 생장성(TO1) 등이 동일하게 나타났다. 반대로 H2S 생성(H2S), Xanthine 분해능(XAN), Inositol 이용성(INO), Melibiose의 이용성(MEB) 등과 같이 높은 positive value를 갖는 character들이 차이를 나타내고 있다(Table 5).

Table 5. Comparison of taxonomic unit characters between member organisms in cluster 18 of *Streptomyces* and the Willcox probability calculated by TAXON program

Taxonomic unit characters	% value in cluster 18	HMO in cluster 18	Centrotype in cluster 18	Best matched strain	Isolate	Outer-most member
RFS	5	-	-	-	-	-
SPI	82	+	+	+	+	+
RED	32	-	-	+	-	+
GRY	29	-	-	-	-	-
ROS	21	-	-	+	+	-
PIG	34	-	-	+	+	-
YBP	13	-	-	-	+	-
MPI	97	+	+	+	+	-
MTY	84	+	+	+	-	-
SUB	45	-	-	-	-	+
LUT	34	-	-	-	-	+
ALB	3	-	-	-	-	-
CER	5	-	-	-	-	-
MUR	63	+	+	+	+	-
NIG	11	-	-	-	-	-
LEC	11	-	-	-	+	-
LIP	50	+	+	+	+	+
PEC	55	+	-	+	+	+
NO3	37	-	-	-	-	+
H2S	89	+	+	+	-	+
HIP	3	-	-	-	-	-
ELA	42	-	+	-	+	+
XAN	82	+	+	+	-	+
ARB	55	+	+	-	+	-
NEO	1	-	-	-	-	-
RIF	45	-	+	+	-	+
OLE	13	-	-	-	-	-
PEN	63	+	+	-	-	+
45C	42	-	+	-	+	+
7NA	18	-	-	-	-	-
01Z	16	-	-	-	-	-
PHN	63	+	+	-	-	+
01T	45	-	-	-	-	+
T01	1	-	-	-	-	-
BUT	32	-	-	+	+	-
CYS	74	+	+	-	-	+
VAL	71	+	+	+	+	-
PHE	66	+	+	+	+	-
HIS	84	+	+	+	-	+
HYD	29	-	-	+	+	-
SUC	92	+	+	+	+	-
INO	95	+	+	+	-	-
MAN	97	+	+	+	+	+
RHA	92	+	+	+	+	+
RAF	99	+	+	+	+	+
MEZ	76	+	+	+	+	+
ADO	84	+	+	+	+	+
DEX	61	+	+	+	+	+
MEB	97	+	+	+	-	+
XYT	21	-	-	-	-	+
MATCHED		33	33	37	50	24
MISMATCHED		17	17	13	0	26
SSM VALUE(%)		62	66	74	100	48
STRAIN		Hypothetical median Org.	<i>Streptomyces coeruleus</i>	<i>Streptomyces violochromogenes</i>	D2-5	<i>Streptomyces fumanus</i>
Willcox probability		0.999992	0.999991	0.999999	0.998852	0.778408

*% value: Percent positive value indicates the occurring percentage in cluster 18.

이상의 수리 동정과 Similarity level의 비교 결과 본 분리균은 주균집에서의 best match strain은 주균집 18의 *S. violochromogenes*이었으며 *Streptomyces violochromogenes*의 한 균주로 동정하였다.

요 약

새로운 제한효소인 Svi I을 생성하는 *Streptomyces*속 한 균주(D2-5)를 토양으로부터 분리하여 형태적 관찰 및 수리동정을 실시하였다. 50개의 분류 단위 형질을 분석하였고 이 실험결과를 TAXON program에 적용하여 종의 수리 동정을 실시하였다. 그 결과 분리균 D2-5는 *Streptomyces*의 제 18 주균집에 속하며 이 균집에 속하는 *S. violochromogenes*와 유사성이 가장 높은 것으로 나타났다. 따라서 분리주는 *Streptomyces violochromogenes*의 한 균주로 동정하였다.

감사의 글

본 연구는 교육부 연구조성비(1992년도 유전공학 연구비) 지원을 받아 수행되었으며 영국의 Ward 박사과 Goodfellow 박사에 의해 개발된 TAXON program을 이용하였으므로 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Keiser, C.J. Bruton, H.M. Kiedder, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward and H. Schrempf. 1985. (Editors) Genetic manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
- Langham, C.D. 1987. Aspects of the probabilistic identification of *Streptomyces*. Ph.D. Thesis, University of Liverpool, UK.
- Lechevalier, M.P., C. De Bievre and H.A. Lechevalier. 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* 5: 249-260.
- Lechevalier, M.P. and H.A. Lechevalier. 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 20: 435-443.
- Locci, R. 1989. *Streptomyces* and related genera. In *Bergey's manual of Systematic Bacteriology* Vol. 4. Ed. by S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt. Williams & Wilkins. Baltimore. Pp. 2451-2508.
- Rho, Y.T. 1993. Studies on the characteristics and the formation of submerged spores in *Streptomyces alvidofluvus* SMF301. Ph.D. Thesis, Seoul National University.
- Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for the characterization of *Streptomyces species*. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 16(3): 313-340.
- Silvestri, L.G., M. Turri, L.R. Hill and E. Gilardi. 1962. A quantitative approach to the systematics of *Actinomycetes* based on overall similarity. Symposium of the Society of General Microbiology 12, 333-360.
- Willcox, W.B., S.P. Lapage, S. Bascomb and M.A. Curtis, 1973. Identification of bacteria by computer: theory and programming. *J. Gen. Microbiol.* 77: 317-330.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Anderson, E. M.H. Welligton, P.H.A. Sneath and M. Sackin (1983A) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1743-1813.
- Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Anderson, E. M.H. Welligton, J.C. Vickers, G. Anderson, P.H.A. Sneath, M. Sackin and A.M. Mortimer. 1983b. Application of new theoretical concepts to the identification of *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* 129: 1815-1830.
- Yamada, K and K. Kamagata. 1970. Taxonomic studies on Coryneform bacteria II. Principle amino acids in the cell wall and their taxonomic significance. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 16: 103-113.
- Yun, M.S., Moo Bae. 1993. Studies on Purification and characterization of a new restriction endonuclease from thermotolerable *Streptomyces violochromogenes* D2-5. Thesis, Ewha Womans University.

(Received July 9, 1993)