

제한효소인 Sdi I을 생성하는 *Streptomyces* 분리 균주의 수리동정

배 무* · 서원나 · 송은숙 · 이계준¹

이화여자대학교 자연과학대학 생물학과, ¹서울대학교 미생물학과

Numerical Identification of a *Streptomyces* Strain Producing Restriction Endonuclease Sdi I

Bae, Moo*, Won-Na Suh, Eun-Sook Song and Kye-Joon Lee¹

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

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

Abstract— Numerical identification was applied for *Streptomyces* sp.264, an isolate producing a new restriction endonuclease Sdi I. The restriction enzyme would appear to be an isoschisomer of Xho I. Fifty taxonomic unit characters were tested and the data obtained were analyzed numerically by using the TAXON program. The isolate was identified to be the major cluster 19 of *Streptomyces* and best matched to *S. diastatochromogenes*. It was, therefore, concluded that the isolate was identified to be a member of *Streptomyces diastatochromogenes*.

*Streptomyces*속 세균은 편성 호기성 균으로서 그람 양성균에 속하는 토양 미생물이다. *Streptomyces*속은 세균이면서도 균사체로 증식하고 포자를 형성하여 곰팡이와 같은 형태로 자라는 등 형태학적 특이성이 현저하다(1). 이에 속하는 균주들은 2차 대사 산물의 생합성 능력이 다양하며 형태분류학적 특성이 많아 생태적 연구나 다양한 대사 산물 연구에 많이 이용되어지고 있어 미생물학 분야에서 연구 대상으로 점점 부각되고 있다.

그러나 방선균은 형태적 차이나 배양적 차이에 의해서만으로도 새로운 속이나 종으로 동정되어, 수년 동안 분류학자들에게 방선균의 체계적인 분류 방법이 하나의 과제였다(2-4). Silvestri 등(5)에 의해 수리분류 데이터로부터 확률 동정키(probabilistic identification key)가 최초로 만들어졌으며 1983년 Williams 등(6)에 의해 분류데이터를 기본으로 하는 수리동정 방법이 제안되었다.

본 연구는 새로운 제한효소인 Sdi I(7)의 활성을 나타내는 *Streptomyces* 균주를 선별하여 Ward에 의해 개발된 TAXON program을 이용하여 그 균주를 동정하고 평가하였다.

Key words: Numerical identification, restriction endonuclease, Sdi I, *Streptomyces diastatochromogenes*
*Corresponding author

재료 및 방법

균주 및 배양 조건

본 연구에 사용된 균주는 제한효소의 활성을 나타내는 토양 분리균인 *Streptomyces* sp.264이다. 균주는 inorganic starch agar 사면배지에 보관하였으며, 포자는 glass wool을 통과시켜 분리하여 glycerol-nutrient broth에 현탁시켜 -70°C에 보관하였다. 배양적 특징과 형태적 특징을 관찰하기 위해 International *Streptomyces* Project(ISP) 배지(4)를 이용하였고, 액체배양은 rotary shaking incubator를 이용하여 30°C에서 배양하였다.

효소액 준비를 위한 균의 배양은 nutrient broth (nutrient broth 0.5%, yeast extract 0.2%, NaCl 0.8%, glucose 0.5%(pH 7.2))(1)에서 하였으며, 사면 배지에서 자란 균체를 위의 배지에서 진탕 배양한 종 배양액을 본 배양액에 4%가 되도록 접종하여 30°C에서 48시간 동안 배양하였다.

화학적 동정(chemotaxonomic identification)을 위한 특성 분석

Starch-casein-nitrate 배지에서 3일간 배양한 균체를 회수하여 ice bath에서 초음파 처리(Braun sonic, 1510, 100 W)를 3분 동안 한 후 15분 동안 원심 분리

(15000×g)를 하여 침전된 균체를 동결 건조시켰다. 동결 건조된 균사체 20 mg과 6 N-HCl 5 ml를 섞고 100°C 에서 18시간 동안 가수분해 후 thin layer chromatography를 이용하여 diaminopimelic acid와 전체 세포내 당을 분석하였다(9-12).

종의 수리 동정을 위한 특성과 동정 스코어(identification score)

*Streptomyces*의 주군집(major cluster)의 수리 동정에 이용되는 단위 형질(unit character)은 Williams 등(6, 10, 13)의 방법에 따라 시험하였다(Table 1). TA-

XON program을 이용하여 분리주의 동정 스코어를 결정하였으며 그 각각은 다음과 같다.

Willcox probability(13) : 분리주의 Taxon J에 대한 유사 정도(likelihood)를 모든 분류군(taxa)에 대한 분리주(U)의 유사 정도의 합으로 나눈 값을 말한다(6). 1.0에 가까운 값이 나올 수록 그 matrix의 group과 잘 맞는다는 것을 의미한다.

분류군 거리(Taxonomic distance) : 분리주와 비교되는 group의 중심(centroid)으로부터의 거리를 나타낸다. 낮은 값일 수록 그 group과 높은 상관 관계를 나타내며 이 값은 다음 식으로 계산할 수 있다.

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

1. Morphology and pigmentation	
spore chain morphology	rectiflexible (RFS), spiral (SPI)
color of spore mass	red(RED), gray(GRY)
mycelial pigment	red/orange (ROS)
diffusible pigment	production (PIG), yellow/brown (YBP)
melanin production	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 tests	
45°C (45C)	NaCl (7NA)
sodium azide (01Z)	phenol (PHN)
potassium tellurite (01T)	thallous 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.

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

이 때 m 은 형질의 수이고 U_i 는 형질 i 에서 나온 U 의 점수(+일 때 1, -일 때 0), P_{ij} 는 특성 i 에서 Taxon J 의 균주들에 의해 주어지는 +의 비율을 의미한다.

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

% Probability of strain further away: 동정된 미지의 시험균주 밖에 존재하는 그 군집의 균주가 확률적으로 그 군집 전체 균주의 몇 %에 해당하는가를 나타낸다.

Simple matching coefficient(S_{SM}): 시험균주의 형질에 관한 양의 값(+)과 부의 값(-)이 대상 군집에 속하는 균주의 형질과 일치하는 정도를 나타낸 비율(%)을 의미한다.

효소액의 준비

효소액은 streptomycin sulfate 침전, ammonium sulfate 침전, hydroxylapatite column chromatography, sephacryl S-200 HR column chromatography 및 제 2차 hydroxylapatite column chromatography의 단계로 정제하여 얻었다(7).

DNA의 전기영동

효소반응의 산물은 agarose gel에서 전기 영동하였으며 DNA의 band는 1 μ g/ml ethidium bromide 용액에서 10분간 염색한 후 자외선 아래서 관찰하였다. 염색한 gel의 사진은 자외선 아래서 polaroid type 667 흑백 film을 이용하여 촬영하였다(14).

결과 및 고찰

토양에서 분리된 방선균에서의 제한효소 검색

한국인삼연초연구소 유전생리부에서 분리되어 분양받은 방선균 30여 균주를 대상으로 DNA에 대한 제한효소의 활성 유무를 조사한 결과, 분리주 sp.264에서 효소 활성이 확인되었다.

형태적 특성과 화학적 동정을 위한 특성

분리주 sp.264는 고체배지에 단단히 결합되어 블록하고 둥근 colony를 형성하고, colony의 크기가 증가함에 따라 주름이 생기는 일부 *Streptomyces*의 특성을 보였다.

기균사의 색은 대부분의 ISP 배지에서 연한 노란



Fig. 1. Spore chain of the isolate cultured on Bennett's agar medium (scanning electron microscope, X4000).

색이었으며 tyrosine agar(ISP medium 7)에서는 녹회색의 기균사를 나타냈다. 배면의 색은 pepton-yeast extract iron agar(ISP medium 6)에서 연한 갈색, tyrosine agar(ISP medium 8)에서 검은색을 띠는 등 melanin 색소를 생성하는 것으로 관찰되었다. 분리주 sp.264는 포자가 드물게 형성되는 균주로 ISP 배지와 bennett 배지 등에서 2주 이상 배양하거나 15°C 이하의 낮은 온도에서 배양하면 흰색의 포자를 형성하였다. 분리주 sp.264를 inorganic salts starch agar(ISP medium 4) 배지에서 14일간 배양한 후, 광학 현미경을 이용하여 포자 사슬이 rectiflexible인지, spiral인지 관찰하여 본 결과, 기층 균사에서 뺀어 나온 기균사에서 기균사 포자가 형성되었고 포자 사슬의 형태는 rectiflexible이었다. 주사 전자 현미경 관찰결과 분리주 sp.264의 포자는 둥그스름한 원통형이었으며 표면은 smooth이고 포자 사슬은 분절된 상태였다(Fig. 1).

Starch-casein-nitrate 배지에서 3일간 배양한 균체의 가수분해물 중 세포벽의 DAP 이성질체는 LL-DAP(LL-2,6-diaminopimelic acid)이며(Fig. 2), 또 세포내의 특징적인 당은 관찰되지 않았다(Fig. 3). 분리주 sp.264의 세포벽 DAP isomer와 아미노산은 방선균의 세포벽 chemotype과 peptidoglycan type에 비교해 볼 때 세포벽 chemotype I에 해당되고 세포내에 특징적인 당이 나타나지 않는 sugar pattern C에 해당되는 것을 알 수 있었다. 배양특성, 형태적 특성, 세포벽이 DAP와 아미노산 및 당분석등의 결과로 분리주 sp.264를 *Streptomyces*속으로 분류할 수 있었다.

TAXON program을 이용한 수치 동정(numerical identification)

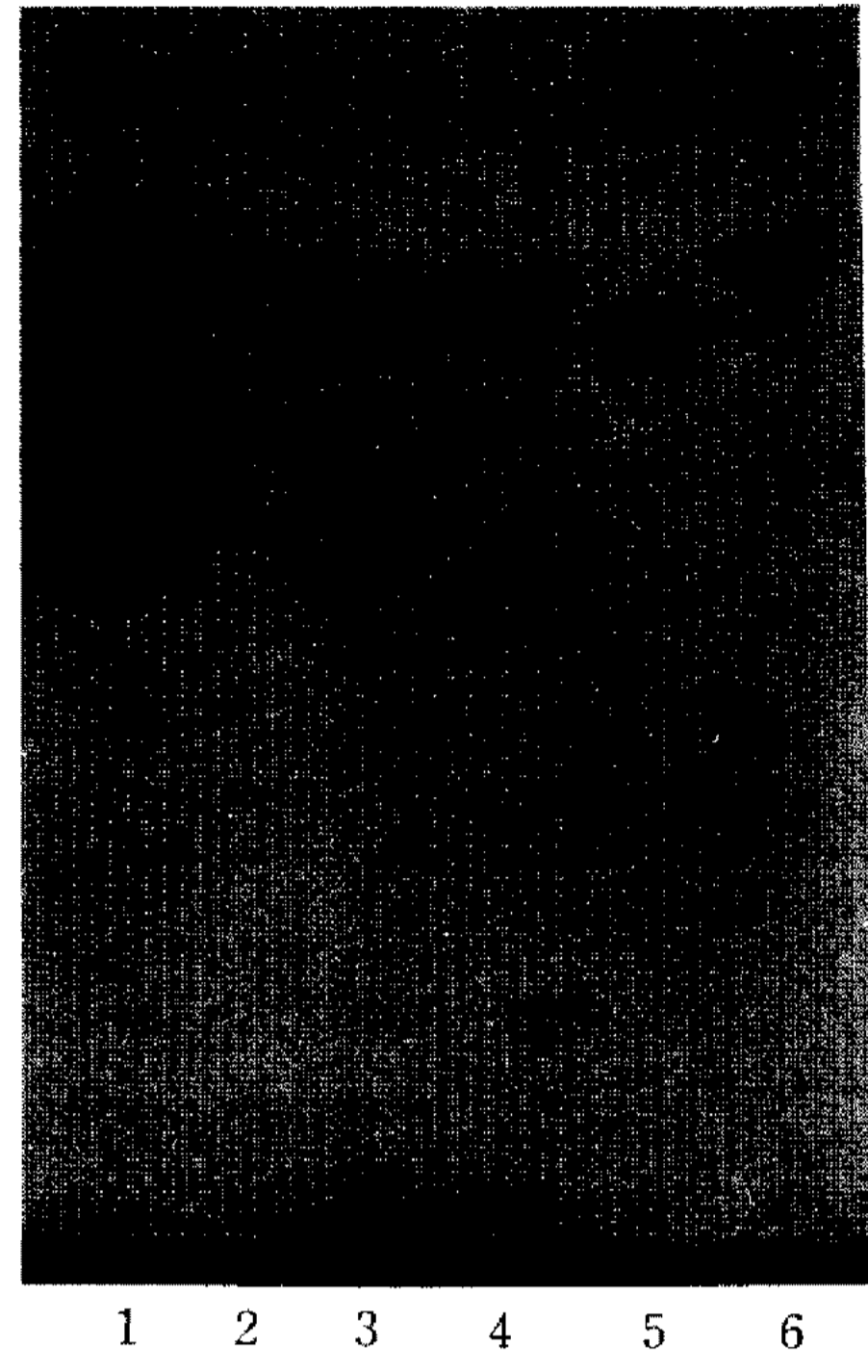
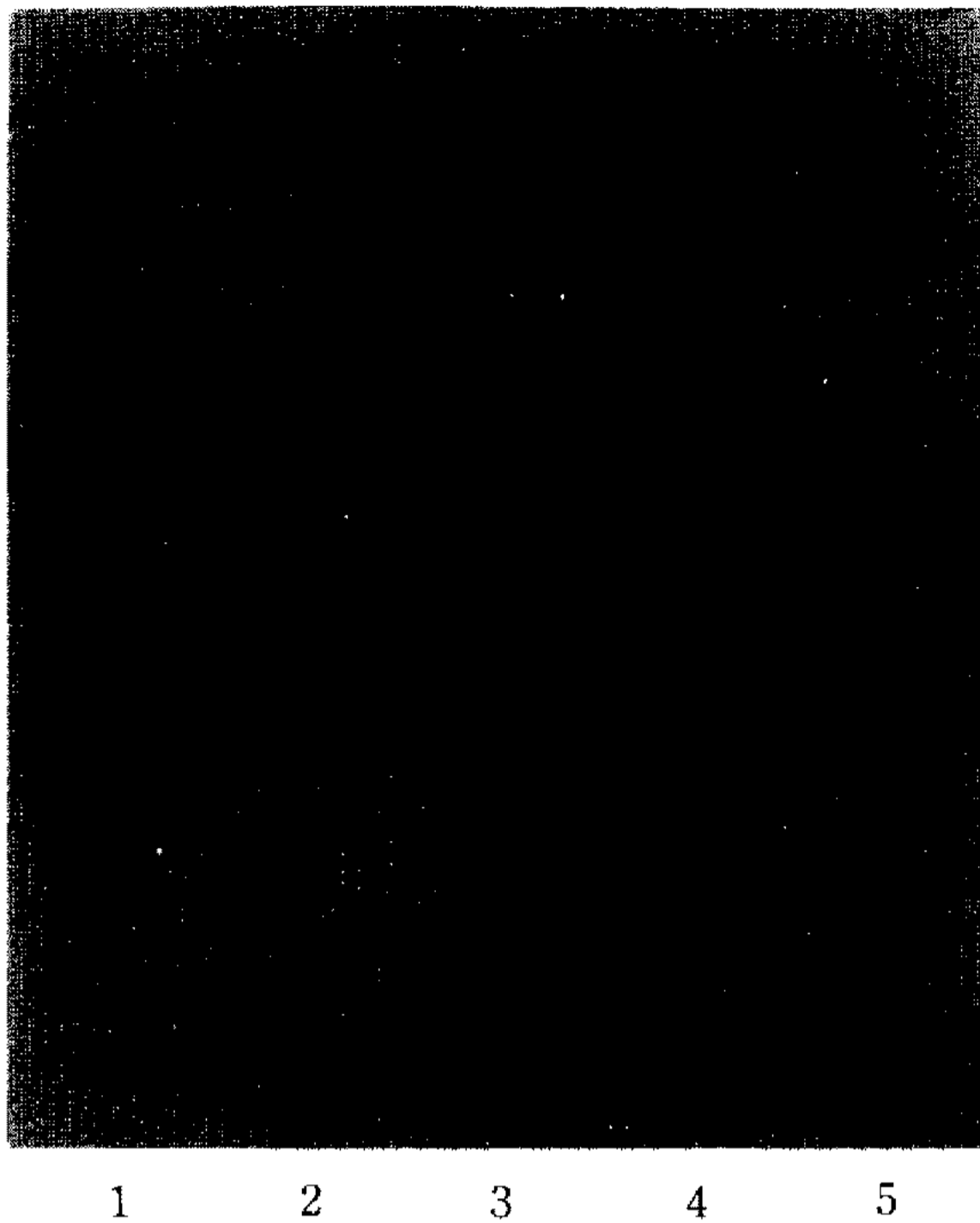


Fig.2. Cellulose thin layer chromatogram of cell wall diaminopimelic acid (DAP) isomers and amino acids of the isolate.

1. cell wall hydrolysate, 2. DAP isomers, 3. Glycine, 4. Glutamic acid, 5. Alanine.

Fig. 3. Thin layer chromatogram of whole cell sugar extract from the isolate sp.264.

Lane 1: whole cell extract, Lane 2: rhamnose, Lane 3: arabinose, Lane 4: glucose, Lane 5: galactose, Lane 6: mannose.

Table 2. Identification of the isolate *Streptomyces* sp.264 to the major clusters of *Streptomyces* by using TAXON program

Taxon Major cluster (Centrotpe member)	Tax distance	95% Taxon radius	% Prob of strain further away	Willcox probability
19 (<i>Streptomyces diastaticus</i>)	0.4297	0.4508	13.4924	0.972436
18 (<i>Streptomyces cyaneus</i>)	0.4619	0.4497	2.5069	0.027563
21 (<i>Streptomyces griseoruber</i>)	0.5036	0.3709	0.0000	0.000000
31 (<i>Streptomyces antibioticus</i>)	0.5204	0.4131	0.0002	0.000000
5 (<i>Streptomyces exfoliatus</i>)	0.5209	0.4455	0.0155	0.000001
3 (<i>Streptomyces atroolivaceus</i>)	0.5210	0.3631	0.0000	0.000000

종 수준의 동정을 위하여 실시한 분리군 *Streptomyces* sp.264의 단위특성을 기본으로 하여 현재까지 분류가 완성된 균주들의 특징을 database화 하여 이를 수리 분류하도록 작성한 TAXON program을 이용, 수리 동정을 실시하였다(Table 1)(7, 12, 15). TAXON program을 이용하여 정확한 동정이 되기 위해서는, Willcox probability가 높고(>0.85) 분류학적 거리가 95% 분류군 반경 내에 들며 짧을수록 그리고 % probability of strain further away 값이 클 수록 좋다고 할 수 있다.

분리주 *Streptomyces* sp.264를 *Streptomyces* 주군집 (major cluster)을 대상으로 TAXON program을 이

용하여 수리동정을 한 결과, Table 2와 같이 주군집 19(*Streptomyces diastaticus*)에 대해 0.972436의 Willcox probability를 나타내었는데 이는 주군집 18(*Streptomyces cyaneus*)에 대한 값인 0.027563보다 월등히 높으므로 동균주가 주군집 19(*S. diastaticus*)에 속할 확률이 가장 높음을 알 수 있다.

본 분리균주의 단위 형질의 특성은, 주군집 19의 Hypothetical Median Organism(HMO), centrotpe 인 *Streptomyces phaeoviridis*, 본 분리균주와 가장 근 접한(best match strain) *S. diastatochromogenes*와 outer-most member strain인 *S. coralus*의 TAXON unit character와 Willcox probability를 비교 분석한 결과

Table 3. Identification of HMO, centrotpe, best match strain, outer-most member and isolate *Streptomyces* sp.264 to the major cluster 19 of *Streptomyces* by TAXON program

Member of cluster 19	Tax distance	95% Taxon radius	% Prob of strain further away	Willcox probability
HMO (hypothetical median organism)	0.2658	0.4508	99.9072	0.997032
Centrotpe (<i>Streptomyces phaeoviridis</i>)	0.3296	0.4508	92.9354	0.997509
Best match strain (<i>S. diastatochromogenes</i>)	0.3958	0.4508	40.8670	0.996240
Outer-most member (<i>Streptomyces coralus</i>)	0.4435	0.4508	7.2571	0.447286
Isolate (<i>Streptomyces</i> sp.264)	0.4297	0.4508	13.4924	0.972436

Table 4. Simple matching coefficient (S_{SM}) of the isolate sp.264 to member organisms in *Streptomyces* cluster 19

member of cluster 19	ISP NO.	ATCC NO.	S_{SM} (%)
<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	5449	12309	74.00
<i>Streptomyces vastus</i>	5309	25506	74.00
<i>Streptomyces coralus</i>	5256	23901	72.00
<i>Streptomyces phaeoviridis</i>	5285	23947	72.00
<i>Microellobosporia flavea</i>	M315	15332	70.00
<i>Streptomyces bottropensis</i>	5262	25435	70.00
<i>Streptomyces minoensis</i>	5031	19787	70.00
<i>Streptomyces tauricus</i>	5560	27470	70.00
<i>Microellobosporia cinerea</i>	M301	15840	68.00
<i>Streptomyces mirabilis</i>	5553	27447	68.00
<i>Streptomyces nigellus</i>	5490	27450	68.00
<i>Streptomyces humidus</i>	5263	12760	66.00
<i>Streptomyces rishiriensis</i>	5489	14812	66.00
<i>Streptomyces diastaticus</i>	5496	3315	64.00
<i>Streptomyces lincolnesis</i>	5355	25466	64.00
<i>Streptomyces glomeraurantiacus</i>	5429	19839	62.00
<i>Streptomyces galilaeus</i>	5481	14969	60.00
<i>Streptomyces</i> sp.	F1*		60.00
<i>Streptomyces achromogenes</i>	5028	12767	58.00
<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	5451	3336	54.00

*F1: soil isolate unnamed, selected by S.T. Williams.

는 Table 3과 같았다.

본 분리균 *Streptomyces* sp.264는 주군집 19에서의 taxon distance(0.4297)가 95% Taxon radius(0.4508)보다 작고 outer-most member strain인 *S. coralus*의 taxon distance(0.4435)보다 약간 작지만 군집의 중심에 있다고 하는 확률(% probability of strain further away)이 centrotpe(92.9354)이나 best match strain(40.8670)보다 낮은 13.4924의 수치를 나타내는 것으로 보아, 분리균주는 주군집 19의 중심에서는 다소 떨어진 영역 내부에 위치하는 것으로 판단된다.

Streptomyces 주군집 19는 20개의 균주로 구성된 집단인데, 본 분리균주는 이 중에서 *Streptomyces diastatochromogenes*와 가장 가까운(best matched) 것으

로 나타났고 그 S_{SM} 값은 가장 높은 74.00이었다.

Streptomyces sp.264와 *S. diastatochromogenes*는 주군집을 동정하는 데 필요한 50개의 단위 형질(unit character)중 색소 생성, 항균력 실험, 탄소원 실험 등의 37개의 단위 형질에서 동일한 결과를 나타내었다 (Table 5).

이상의 수리 동정과 유사정도(similarity level) 비교 결과, 분리주 *Streptomyces* sp.264를 주군집 19의 *Streptomyces diastatochromogenes*로 동정하였다.

한편, 이 균주가 생산하는 제한효소 Sdi I의 다양한 DNA에 대한 digestion pattern에서 Sdi I은 Xho I 처럼 pBR322, pUC18, M13mp18을 절단하지 않았고 (Fig. 4), lambda DNA와 pBS는 1 site에서 절단하는

Table 5. Comparison of taxonomic unit characters between member organisms in cluster 19 *Streptomyces*, and the Willcox probability calculated by using TAXON program

Taxonomic unit charaters	% value in cluster 19	HMO in Cluster 19	Centrotype in cluster 19	Best matched strain	Isolate	Outer-most member
RFS	40	-	+	+	+	+
SPI	60	+	-	+	-	-
RED	15	-	-	-	-	-
GRY	50	+	-	+	+	-
ROS	15	-	-	-	+	-
PIG	10	-	-	-	-	-
YBP	5	-	-	-	-	-
MPI	50	+	+	+	+	+
MTY	50	+	+	+	+	+
SUB	20	-	-	-	-	+
LUT	20	-	-	-	-	+
ALB	1	-	-	-	-	-
CER	1	-	-	-	-	-
MUR	5	-	-	-	-	+
NIG	10	-	-	+	-	-
LEC	1	-	-	-	-	-
LIP	25	-	+	-	-	-
PEC	70	+	+	-	+	+
NO3	45	-	-	+	+	+
H2S	80	+	+	+	-	+
HIP	25	-	-	-	-	-
ELA	35	-	-	-	+	+
XAN	50	+	+	-	-	+
ARB	55	+	-	+	+	+
NEO	1	-	-	-	-	-
RIF	70	+	+	+	+	+
OLE	25	-	-	-	+	+
PEN	50	+	+	+	+	-
45C	15	-	-	-	-	+
7NA	30	-	-	-	-	-
01Z	5	-	-	-	-	-
PHN	95	+	+	+	-	+
01T	75	+	+	-	-	+
T01	5	-	-	-	-	-
BUT	30	-	-	+	-	+
CYS	75	+	+	+	+	+
VAL	70	+	+	-	+	+
PHE	20	-	-	+	+	-
HIS	70	+	-	+	+	+
HYD	20	-	-	-	+	+

Table 5. Continued

Taxonomic unit charaters	% value in cluster 19	HMO in Cluster 19	Centrotype in cluster 19	Best matched strain	Isolate	Outer-most member
SUC	75	+	+	+	+	+
INO	80	+	+	+	+	+
MAN	85	+	+	+	+	+
RHA	95	+	+	-	+	+
RAF	85	+	+	+	+	+
MEZ	25	-	+	-	+	+
ADO	15	-	-	-	-	-
MEB	95	+	+	+	+	+
DEX	15	-	-	-	-	-
XYT	15	-	-	-	-	+
MATCHED		37	36	37	50	36
MISMATCHED		13	14	13	0	14
SSM VALUE (%)		74	72	74	100	72
STRAIN		Hypothetical median org.	<i>Streptomyces phaeoviridis</i>	<i>S. diastatochromogenes</i>	sp.264	<i>Streptomyces coralus</i>
Willcox probability		0.997032	0.997509	0.996240	0.972436	0.447286

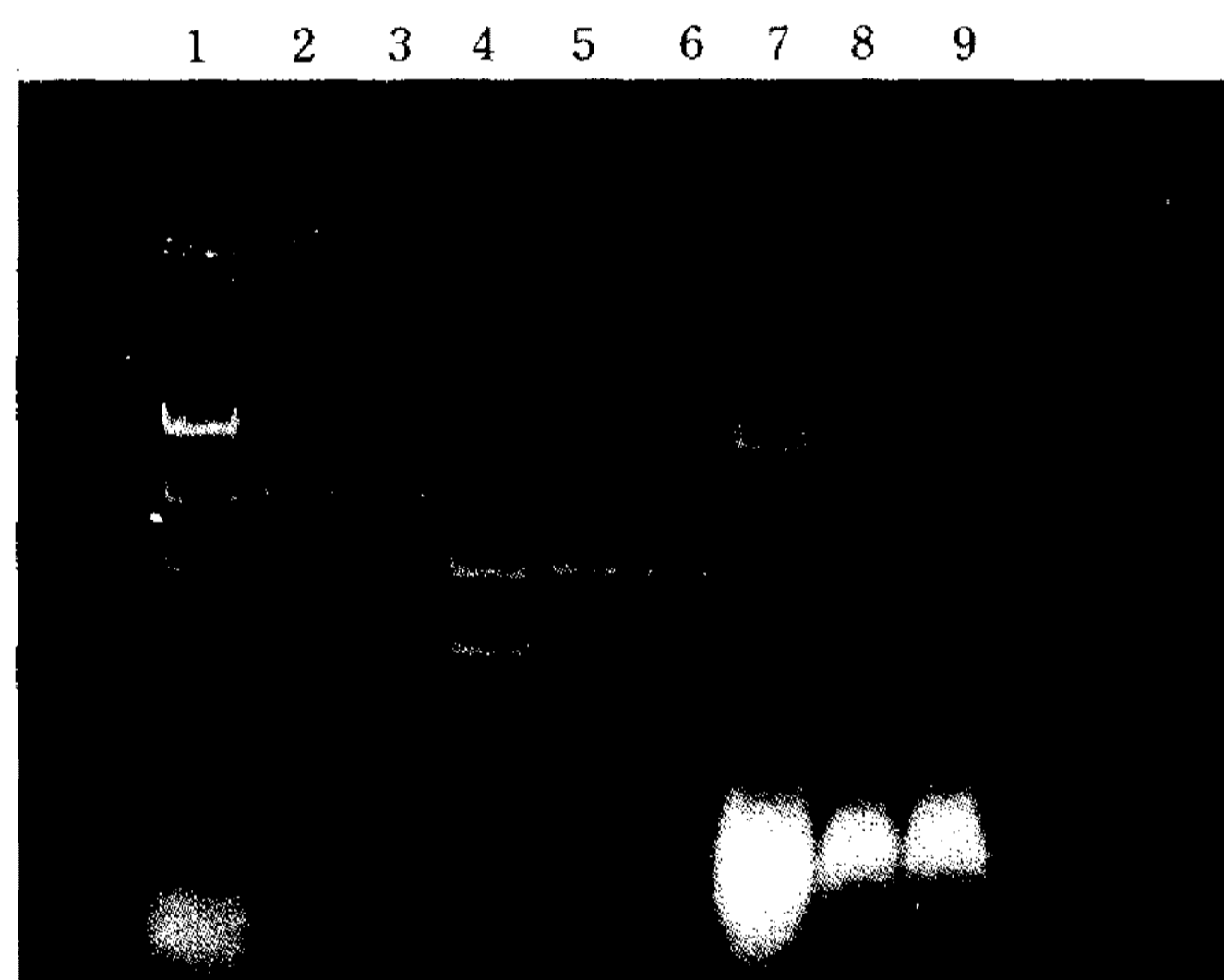


Fig. 4. Pattern of Sdi I and Xho I on various DNAs. Each reaction mixture contained 6 mM Tris-HCl (pH 7.9), 150 mM NaCl, 6 mM MgCl₂, 0.3 µg of DNAs and 1 µg of Sdi I or Xho I. The reaction was carried out at 37°C for 60 min. Electrophoresis was performed on 0.8% agarose gel.

Lane 1: pBR322 DNA control, Lane 2: pBR322 DNA + Sdi I, Lane 3: pBR322 DNA + Xho I, Lane 4: pUC18 DNA control, Lane 5: pUC18 DNA + Sdi I, Lane 6: pUC18 DNA + Xho I, Lane 7: M13mp18 DNA control, Lane 8: M13mp18 DNA + Sdi I, Lane 9: M13mp18 DNA + Xho I.

것으로 나타났다(Fig. 5). 따라서 제한효소 Sdi I은 Xho I의 isoschisomer인 것으로 추정되며, 이 제한

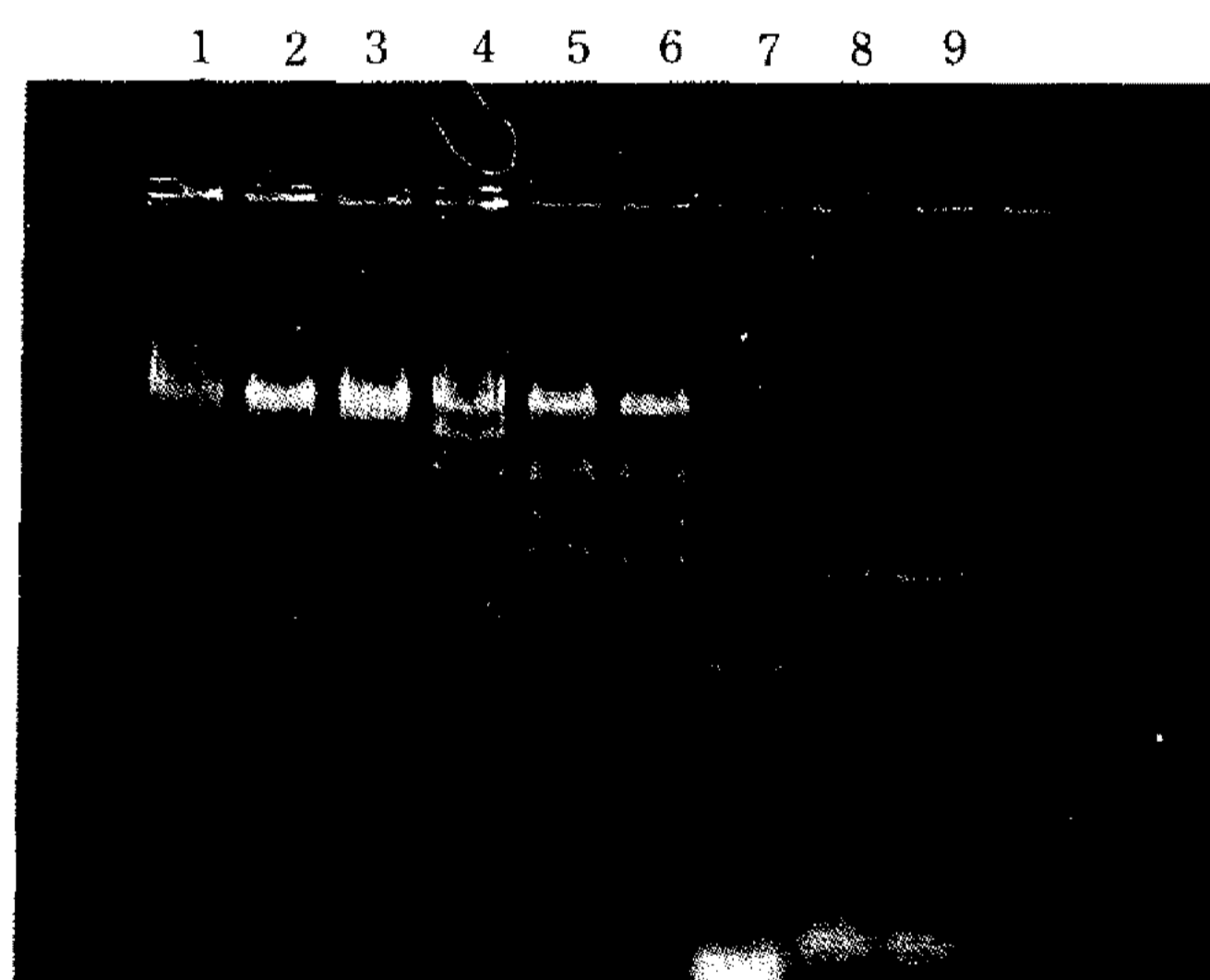


Fig. 5. Pattern of Sdi I and Xho I on various DNAs. Lane 1: λ DNA control, Lane 2: λ DNA + Sdi I, Lane 3: λ DNA + Xho I, Lane 4: λ-Hind III DNA control, Lane 5: λ-Hind III DNA + Sdi I, Lane 6: λ-Hind III DNA + Xho I, Lane 7: pBS DNA control, Lane 8: pBS DNA + Sdi I, Lane 9: pBS DNA + Xho I.

효소의 지도 작성 및 인식 부위에 관한 내용은 추후에 보고하기로 한다.

요 약

제한효소인 Sdi I을 생산하는 한 균주(*Streptomyces*

sp.264)를 토양으로부터 분리하여 형태적 관찰 및 수리동정을 실시하였다. 50여개의 분류 단위 형질을 분석하였고, 이 실험 결과를 TAXON program에 적용하여 종의 수리동정을 실시하였다. 그 결과 분리균 sp.264는 *Streptomyces*의 제 19주군집에 속하는 *Streptomyces diastatochromogenes*의 한 균주로 동정되었다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 우수연구센터(서울대학교 분자미생물학 연구센터)의 지원을 받아 수행되었으며 영국의 Ward 박사와 Goodfellow 박사에 의해 개발된 TAXON program을 이용하였으므로 이에 감사드리며, TAXON program 조작에 도움을 주신 서울대학교 미생물학과 김형태씨에게도 감사를 드립니다.

참고문헌

1. Locci, R. 1989. *Streptomyces* and related genera, Pp. 2451-2508. In S.T. Williams, M.E. Sharpe and J.G. Holt (eds.), *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Vol. 4, Williams and Wilkins, Baltimore.
2. Hopwood, D.A., M.J. Bibb, K.F. Chater, T. Kisser, C.J. Bruton, H.M. Kiedder, D.J. Lydiate, C.P. Smith, J.M. Ward, and H. Schrempf. 1985. *A Laboratory Manual*. The John Innes Foundation, Norwich, UK.
3. Langham, C.D. 1987. Aspects of the probabilistic identification of *Streptomyces*. Ph.D. Thesis, University of Liverpool, UK.
4. Shiring, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Method for the characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
5. Silvestri, L.G., M. Turi, 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.
6. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Anderson, E. M.H. Welligton, P.H.A. Sneath, and M. Sackin. 1983. A. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
7. Song, E.S. 1993. Purification and characterization of restriction endonuclease from *Streptomyces* sp. 264. Thesis, Ewha Womans University
8. Hidenori Shimotsu, Hideo Takahashi, and Hiuga Saito. 1980. Site-specific endonuclease in *Streptomyces* strains. *Agric. Biol.Chem.* **44**: 1665-1666.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Yun, M.S. and Moo Bae. 1993. Studies on Purification and characterization of a new restriction endonuclease from thermotolerable *Streptomyces violochromogenes* D2-5. Thesis, Ewha Womans University.
13. 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.
14. Maniatis, T., F. Fritsh, and J. Sambrook. 1984. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Lab. Cold Spring Harbor, New York.
15. Rho, Y.T. 1993. Studies on the characteristics and the formation of submerged spores in *Streptomyces avidofluvus* SMF301, Ph.D. Thesis, Seoul National University.

(Received February 18, 1994)