

Cholesterol Oxidase를 생산하는 방선균분리주 HSL-613의 동정

이홍수 · 이인애 · 최용경 · 이희구 · 이근철 · 박용하 · 오태광
최인성 · 정태화*

한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

Identification of the *Streptomyces* Strain HSL-613 Producing Cholesterol Oxidase

Lee, Hong-Soo, In-Ae Lee, Yong-Kyung Choe, Hee-Gu Lee, Keun-Chul Lee,
Yong-Ha Park, Tai-Kwang Oh, In-Seong Choe and Tai-Wha Chung*

Genetic Engineering Research Institute, KIST.
P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

Abstract — An actinomycete strain, HSL-613 was isolated from soil and identified by International Streptomyces Project (ISP) and chemotaxonomic methods. The spore chain of the strain HSL-613 appears in a spiral shape, and its spores are spherical shape with smooth surface. The cell wall contains LL-diaminopimelic acid (DAP). Menaquinone MK-9 (H₆, H₈) and iso- and anteiso-branched fatty acids were detected from whole cell extract. Sugars identified from whole cell extract include galactose, glucose, mannose and ribose, which are distinct from general sugar patterns of *Streptomyces*. Average G+C content in the chromosome is 59%. 5S rRNA of HSL-613 consists of 120 nucleotides as determined by comparing with that of a type strain *Streptomyces griseus* subsp. KCTC 9080. Through morphological, physiological, and chemical characterization, HSL-613 was identified and named as *Streptomyces* sp. HSL-613.

방선균으로부터 항생물질외에 여러가지 생리활성 물질들이 분리되어 보고되면서(1) 전 세계적으로 방선균에 대한 탐색이 계속되어 왔다(2-4). 지금까지 알려진 생리활성물질과 항생물질중 80% 이상이 *Streptomyces*속의 미생물에서 분리되어(5) 이들의 생태학적 연구와 다양한 대사산물에 관한 연구가 많이 진행되고 있다.

최근 들어 임상진단용 kit에 효소학적 방법이 이용되고 있는데 이들 가운데 cholesterol을 산화시키는 효소인 cholesterol oxidase는 혈청중에 존재하는 cholesterol의 농도를 측정하는데 사용되고 있어 대표적 성인병인 동맥경화, 동맥 협착증, 고혈압등을 예방할 수 있는 지침을 제공한다. Cholesterol oxidase는 유리형 cholesterol에 특이성이 있는 것이 아니고 β- 위치에 수산기를 가진 steroid 화합물, 즉 3β-hydroxy steroid를 기질로 사용하는 효소로서 1973년 Richmond(6)와 Flegg (7)에 의해 cholesterol oxidase

(E. C, 1, 1, 3, 6)로 분류되었다. Cholesterol을 산화할 수 있는 미생물로는 *Pseudomonas*속(8), *Nocardia*속(6, 9), *Arthrobacter*속(10), *Streptomyces*속(11, 12), *Brevibacterium*속(13, 14) 및 *Corynebacterium*속(15) 등이 보고되었다.

미생물에 의해 생성되는 효소는 세포내 (intracellular) 효소와 세포외 (extracellular) 효소로 대별되는데, 세포내 효소는 미생물 균체내에 효소가 존재하므로 세포를 파괴하여 효소를 얻는 반면, 세포외 효소는 세포를 파괴시키는 과정없이 배양액을 원심분리하여 상등액을 조효소액으로 사용할 수 있어 원가를 절감하며 높은 수율을 얻을 수 있는 점이 있다. 이러한 세포외 효소로 사용되는 균주로는 *Brevibacterium stercorificum*, *Streptomyces violascens*, *Arthrobacter simplex* 등이 있으나 단위 ml당 역가가 낮아 상업화하는데 어려움이 있다. 본 연구실에서는 세포외 효소로 cholesterol oxidase를 강력하게 생산하는 방선균 분리주 HSL-613을 토양으로부터 선별하여 배양조건과 cholesterol oxidase 생산조건에 대한 연구와 효소의 특성에 관한 연구를 하였다(16, 17). 높은 역가의 chole-

Key words: Cholesterol oxidase, *Streptomyces*, identification

*Corresponding author

terol oxidase를 생산하는 분리주 HSL-613의 형태학적, 생리학적, 배양학적 제 특성들을 규명하고 균체의 구성 성분에 대한 화학적 분석을 통하여 분리주에 대한 동정을 실시하였기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

사용배지 및 배양방법

방선균 분리용 배지를 사용하여 토양 시료에서 HSL-613을 분리했으며(16), Actinomycetes isolation agar(18)를 사용하여 배양했고 보존배지로는 Bennett's agar 배지(19)를 사용하였다. 선별분리주의 동정을 위해서는 ISP. No 2, 3, 4, 5, 7배지, Bennett's agar 배지, Czapeck solution agar 배지(18)를 사용하였다.

분리주 HSL-613의 배양학적 특성

선별된 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology(20)와 Actinomycetes Taxonomy(21) 방법에 따라 조사하였다. 분리주 HSL-613을 ISP. No 2, 3, 4, 5, 7 배지(18, 22-25), Bennett's agar 배지, Czapeck solution agar 배지(18)에 접종한 후 30°C에서 배양하면서 7일, 14일, 21일 간격으로 기균사의 색깔, 배면색깔, 배지색깔, 생육정도, 가용성 색소 생성 유무 및 멜라닌 색소 생성 유무를 관찰하였다.

분리주 HSL-613의 형태학적 특성

분리균주의 형태는 Gerhardt 등(26)의 방법에 따라 Gram 염색하여 광학현미경(Jana, Leipug, Germany)으로 관찰하였으며 정밀한 외형을 관찰하기 위해 2% phosphotungstic acid로 염색하여 gold coating 한 후 주사 전자현미경인 SEM 515(Philips, Netherlands)를 이용하여 포자의 사슬형태, 표면상태, 포자의 형성능을 관찰하였다. 포자형성능을 조사하기 위해 Bennett's agar 배지를 이용하여 30°C에서 7일간 배양한 후 원심분리하여 생리 식염수로 두차례 세척한 뒤 fuchsin-methylene blue 법에 따라 조사하였다.

분리주 HSL-613의 생리학적 특성

분리주 HSL-613에 대한 멜라닌 생성과 당 이용성은 Shirling과 Gottlieb 방법(22-25, 27)에 따라 carbon utilization 배지에 arabinose, xylose, rhamnose, fructose, sucrose, inositol, mannitol, cellulose 등을 첨가하여 이용성을 조사하였고, 젤라틴 액화력과 전분 분해력, 질산염 환원력은 Gordon과 Mihm 방법(28)을 사용하여 조사하였다.

세포벽의 diaminopimelic acid(DAP) isomer의 분석

동결건조 균체 약 10 mg과 6 N HCl 1 ml을 시험관에 넣고 밀봉한 후 100°C에서 18시간 가수분해하여 탈염산 농축하고 이 농축시료를 cellulose TLC 판 위에서 methanol : water : 6 N HCl : pyridine(80 : 20 : 4 : 10)을 용매로 사용하여 전개시킨 다음 0.2% ninhydrin으로 발색시켜 확인하였다(29).

세포내의 당 분석

동결건조한 균체 50 mg을 시험관에 넣고 밀봉한 후 1 N H₂SO₄와 함께 2시간 동안 가수분해시키고 Ba(OH)₂로 pH 5.2~5.5가 되도록 중화시킨 다음 원심분리하여 침전물을 제거하고 상등액을 농축한 후 이를 0.3 ml의 증류수에 녹여 TLC 시료로 사용하였다. 이 시료를 cellulose TLC plate에서 n-butanol : water : pyridine : toluene(10 : 6 : 6 : 1, v/v)이 포함된 용매로 전개시킨 후 aniline phthalate로 발색시켜 세포내의 당을 확인하였다(30).

세포내 지방산 분석

동결건조한 균체 20 mg과 무수 5% methanolic-HCl 2 ml을 시험관에 넣고 100°C에서 3시간 동안 가열하여 지방산을 fatty acid methyl ester(FAME)화시켰다. 그 후 실온에서 냉각시킨 후 증류수 1 ml과 petroleum benzine 2 ml를 넣고 혼합한 후, 원심분리하여 상층의 petroleum benzine 층만을 분리하여 질소가스로 농축하였다. 농축된 시료는 microtube에 넣고 보관하면서 gas chromatography(Shimadzu GC-14A)로 분석 확인하였다(31).

세포내 quinone 분석

동결건조 균체 약 200 mg을 30 ml의 chloroform : methanol(2 : 1, v/v) 용액에 현탁시키고 차광한 다음 냉장 정치시키면서 overnight 추출하였다. 이것을 여과하여 균체 잔사를 제거하고 추출액은 감압 농축 후 건조시켰다. 건조된 시료는 소량의 아세톤에 녹여 취한 다음 질소가스로 농축하여 TLC plate의 시료로 사용하였다. 시료를 TLC plate에서 petroleum benzine : ethyl ether(85 : 15)로 전개하여 254 nm의 UV lamp로 quinone band의 위치를 확인하고 긁어 내어 아세톤으로 추출한 후 여과하여 질소가스로 농축시켜 갈색유리 마이크로병에 넣어 보관하면서 HPLC로 분석하였다. 이 때 표준 menaquinone으로는 MK-9(H₆), MK-9(H₈)을 사용하였는데 Type strain인 KCTC 9080 *Streptomyces griseus* subsp. *griseus*에서 분리한

것이다(32).

G+C(mol%)의 분석

분리 균주의 G+C 비율을 조사하기 위해 Tamaoka 등(33)의 방법으로 basal medium broth에 glycine 0.2%를 넣고 배양한 후 crude chromosomal DNA를 얻어 HPLC에 의해 분석하였다. 이 때 사용된 column은 cosmosil 5C₁₈로 0.2 M NH₄H₂PO₄와 acetonitrile을 10 : 1로 혼합한 용매로 1.0 ml 씩 용출시켰으며 270 nm에서 조사하였다.

5S rRNA 2차 구조

Basal medium broth에서 배양한 균체에 5S ribosomal RNA의 2차 구조를 조사하기 위해 Park 등(34)의 방법으로 crude 5S rRNA를 얻은 후, 정제한 5S rRNA의 염기서열을 결정한 다음 5S rRNA의 2차 구조를 조사하였다.

결과 및 고찰

형태 및 배양학적 특성

분리된 HSL-613 균주를 7, 14, 21일간 배양한 뒤 ISP. No 2, 3, 4, 5, 7 배지, Bennett's agar 배지, Czapeck solution agar 배지에 접종하여 배양하면서 colony의 성장, 생육정도, 기균사의 색깔, 배면색깔 등을 관찰한 결과 colony의 성상은 배지에 따라 차이를 보였다. 배양학적 특성을 조사한 결과 Bennett's agar,

ISP. No. 2, 3, 4, 5, 7 agar 배지에서는 잘 생육하였으나 Czapeck solution agar에서는 생육이 왕성하지 못했다(Table 1). 또한 Shirling과 Gottlieb 등(27)의 방법에 따라 색소 생성을 조사한 결과 배지에 따라 약간의 차이는 있으나 대체적으로 colony 중앙은 짙은 갈색을 나타내며, 가장자리는 옅은 붉으스레한 회색으로 변화됨을 볼 수 있었으며, 포자형성 및 분지법 등으로 볼 때 *Streptomyces* 형이었다(35, 36). ISP agar 배지에서 7일간 배양한 후 전자현미경으로 관찰한 바에 의하면 HSL-613 균주의 균사는 spiral 형이었으며, 포자는 원형으로 smooth type(size : 0.5~0.8

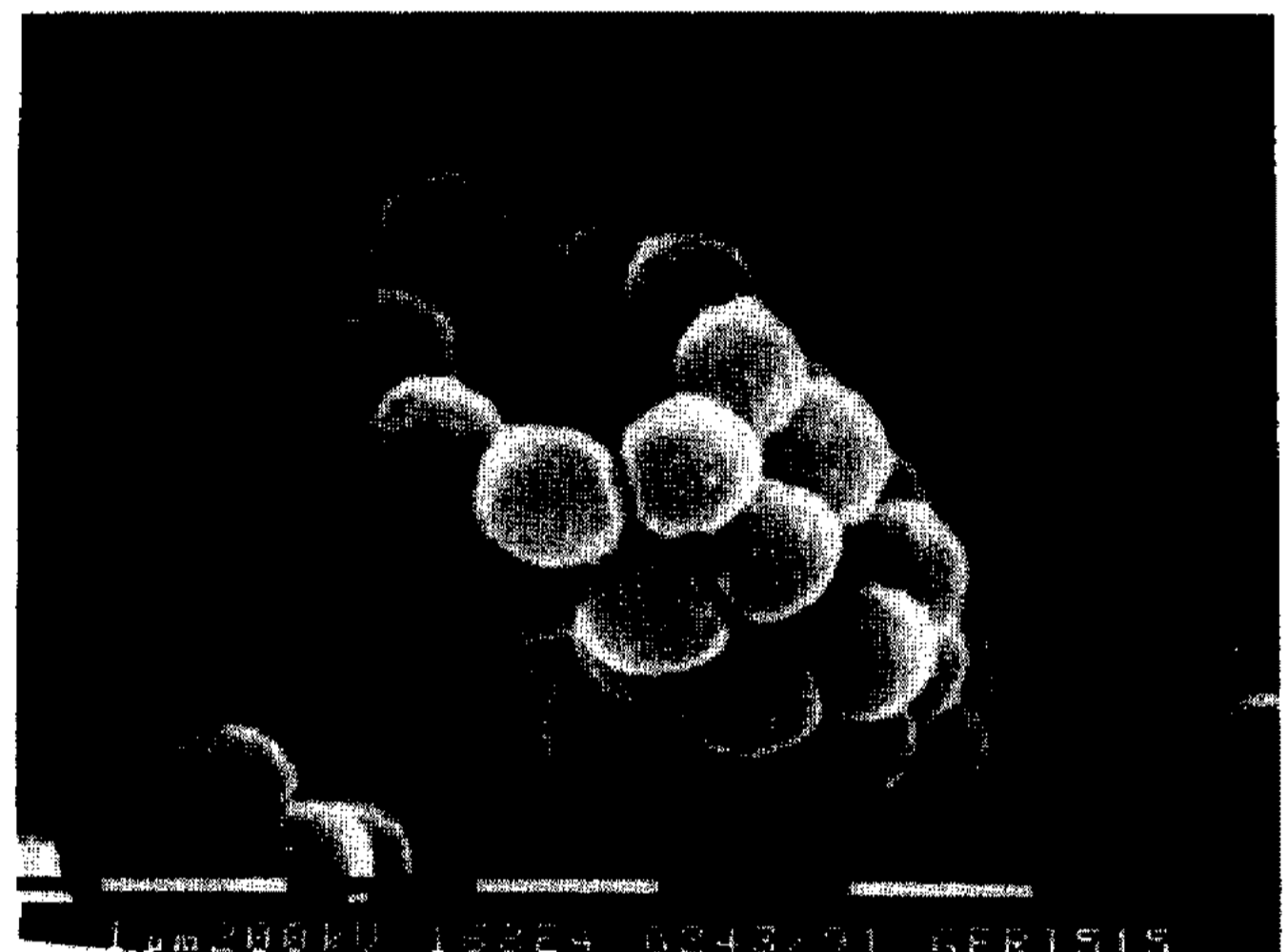


Fig. 1. Scanning electron micrograph of the isolated *Streptomyces* sp. HSL-613 (Philips SEM 515).

Table 1. Cultural characteristics of the isolated strain HSL-613 on various agar media

Medium	Aerial mass color	Reverse side color	soluble pigment	Growth
Tyrosine agar (ISP 7)	Red (light reddish gray)	Pale yellowish brown-brownish gray (in side-in center)	ligh brownish gray	very good
Glycerol-asparagine agar (ISP 5)	Red (light reddish gray)	pale yellowish brown-yellowish brown	pale yellowish brown	very good
Inorganic salts starch agar (ISP 4)	Red, light reddish gray	dull yellow-light brownish	trace of yellowish	very good
Yeast-malt agar (ISP 2)	Red, light reddish gray	light brownish gray with dark brown center	none	very good
Oatmeal agar (ISP 3)	Red, light reddish gray	dull yellow with black mosaic	trace of brownish	very good
Bennett's agar	Red, light reddish gray	dull yellow with dark brown center	trace of brownish	very good
Czapeck solution agar	none	none	none	poor

μm)이었다(Fig. 1, Table 2).

생리학적 특성

분리한 균주 HSL-613의 gelatin 액화력을 실험한 결과 양성으로 판정되었으며 Bergey's Manual(37) 및 Actinomycetes Taxonomy(21) 등의 방법에 따라 각종 배지에 배양시켜 색소생성을 조사한 결과 옅은 갈색의 색소를 생산하였다. 그러나 ISP. No.2(yeast-malt)와 Czapeck solution agar 배지에서는 색소를 생성하지 않았다. 또 starch의 가수분해 결과는 양성으로 나타났으나 melanoid 색소는 생성하지 않았다(Table 2). 탄수화물 이용성을 알기 위하여 Pridham 등(38)의 한천배지에 농도 10%의 각종 탄소원을 별도로 여과하여 제균한 후 상기 한천배지에 최종농도가 1% 되게 넣고 30°C 에서 10~14일간 배양하여 조사한 결과는

Table 2. Morphological characteristics of the strain HSL-613

Factor	Characteristics
spore chain	spiral
spore surface	smooth
aerial mass color	reddish-gray
soluble pigment	Yellowish brown

Table 3과 같았다. D-xylose, D-glucose, D-fructose, D-galactose, D-mannitol은 잘 이용하였으나 L-arabi-

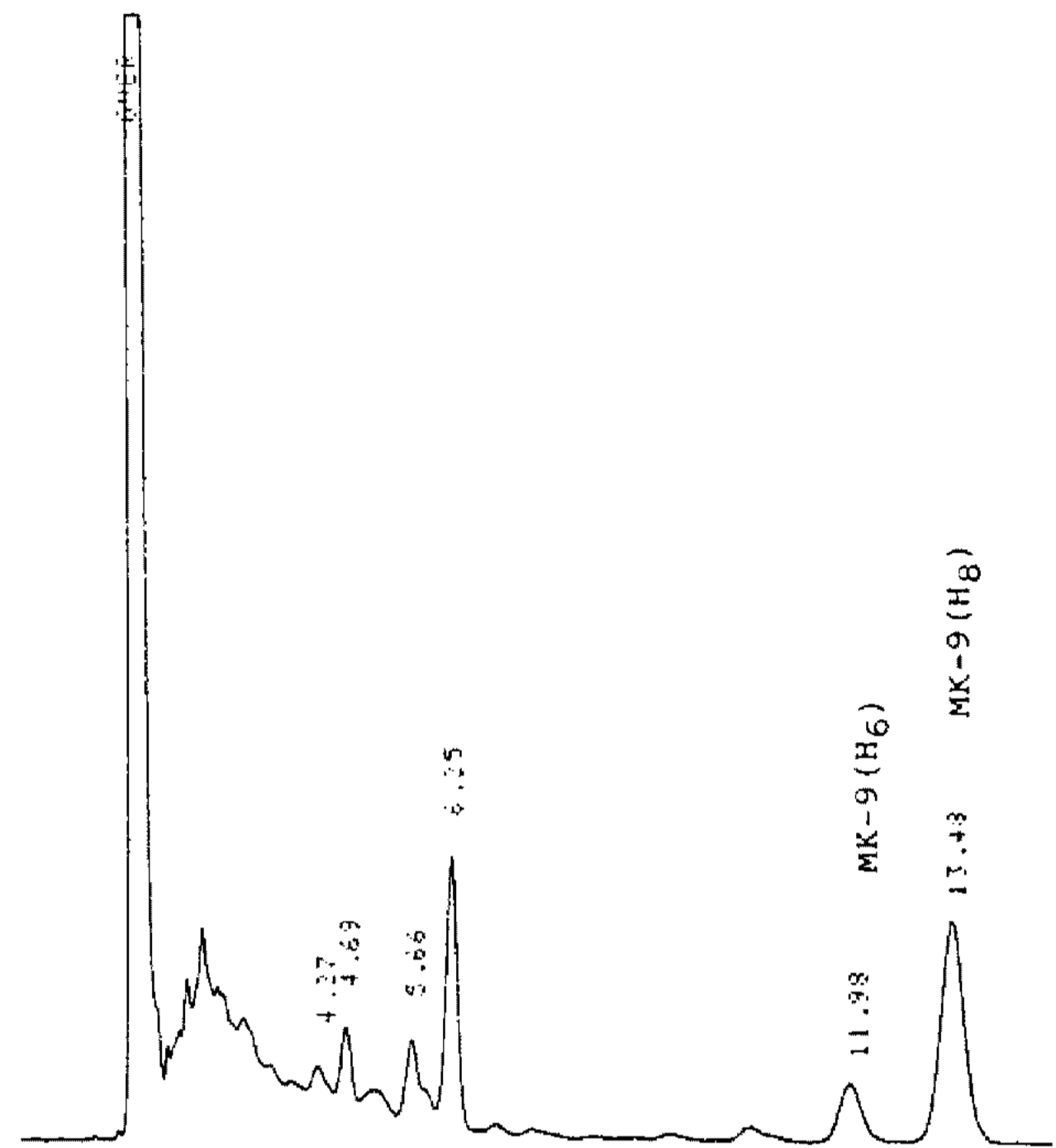


Fig. 2. High-performance liquid chromatogram of menaquinones prepared from the cells of Streptomyces sp. HSL-613.

Table 3. Comparison of the isolated strain No. HSL-613 with other related Streptomyces strains

Characteristics	Isolated No HSL-613	<i>S. glomeroaurantiacus</i>	<i>S. griseoviridis</i>	<i>S. peucetius</i>
Spore chain	spirals	spirals	spirals	spirals
Spore surface	smooth	smooth	smooth	smooth
Color of growth	red	gray	red	red
Color of aerial mycelium	reddish-gray	grayish-yellow	reddish-gray brown	red
Soluble pigments	yellowish-brown	yellowish-pink	yellowish	pinkish
Nitrate reduction	—	—	—	—
Hydrolysis of starch	+	+	+	+
Liquefaction of gelatin	+	+	+	+
Melanine pigment production	—	—	—	—
Carbon utilization				
D-glucose	+	+	+	+
D-xylose	+	+	+	+
L-arabinose	—	—	+	—
L-rhamnose	—	—	+	—
D-fructose	+	+	+	+
D-galactose	+	+	+	+
Raffinose	—	—	—	+
D-mannitol	+	+	+	+
Inositol	—	+	—	—
Sucrose	—	—	—	+

Table 4. Distribution of fatty acids and menaquinones among Actinomycetales and related organisms

	Fatty acid pattern					Menaquinone-type (number of isoprenyl units/additional H-atoms)
	Number of carbons					
	Type	Saturated	Iso-16	Iso-15/17	Anteiso-15-17	
Streptomycetaceae						
<i>Kitasatoa</i>	2c	+	+++	+	+++	9/6 9/6, 9/8
<i>Microellobosporia</i>	2c	+	+++	+	+++	9/4 9/6, 9/8
<i>Streptomyces</i>	2c	+	+++	+	+++	9/4 9/6, 9/8
<i>Streptoverticillium</i>	2c	+	+++	+	+++	9/4 9/6, 9/8
Isolate HSL-613	2c	+	+++	+	+++	9/6, 9/8

Note: +, positive

Table 5. Chemotaxonomic analysis of the isolated *Streptomyces* sp. HSL-613

G+C content (mol%)	Cellular fatty acid type	DAP	Menaquinone system	Whole Cell sugar
59	2c	LL-DAP	MK-9 (H ₈ , H ₆)	Glucose Mannose Ribose Galactose

*2c: iso-anteiso-branched

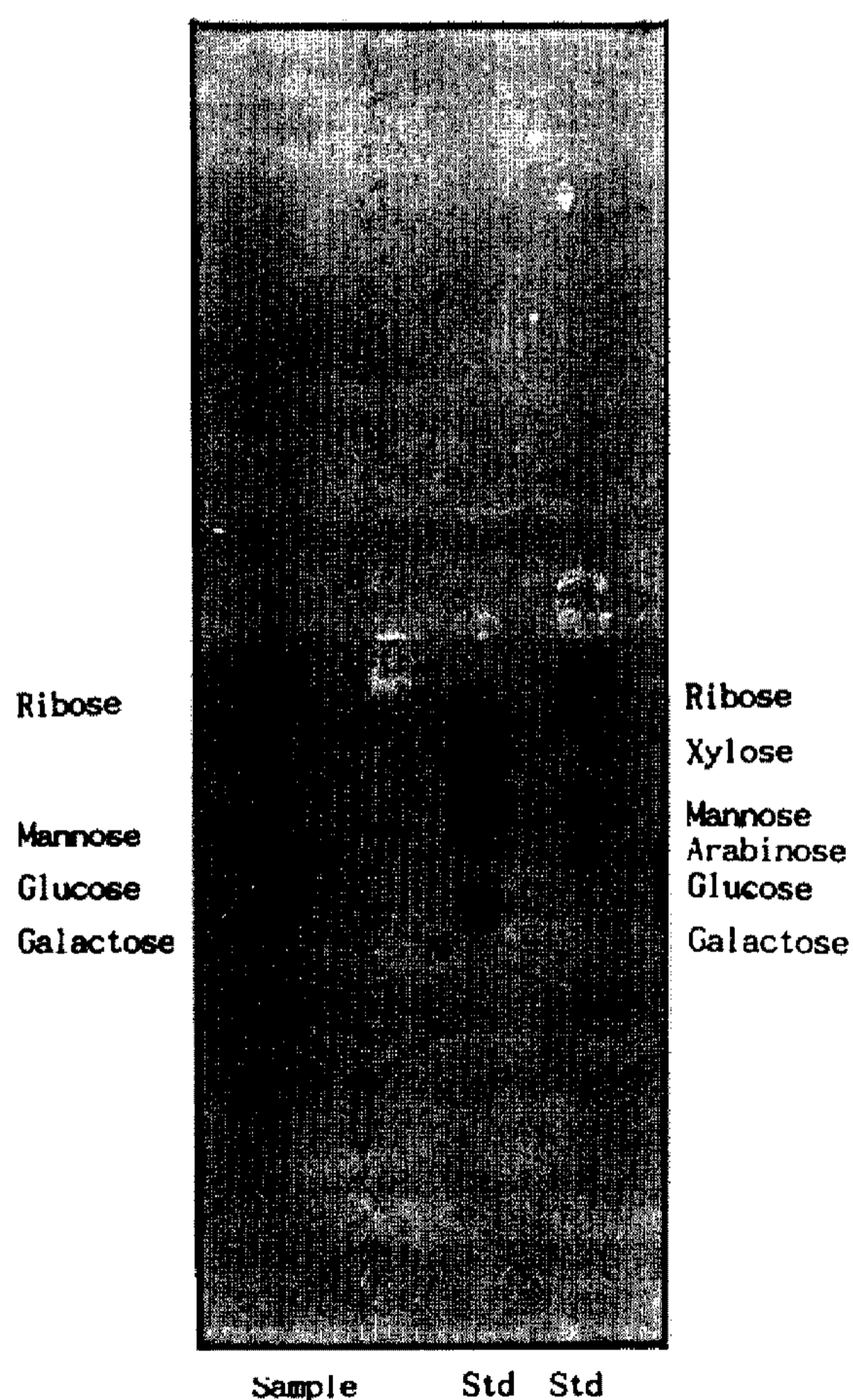


Fig. 3. Thin-layer chromatogram of whole-cell sugars prepared from the cells of *Streptomyces* sp. HSL-613.

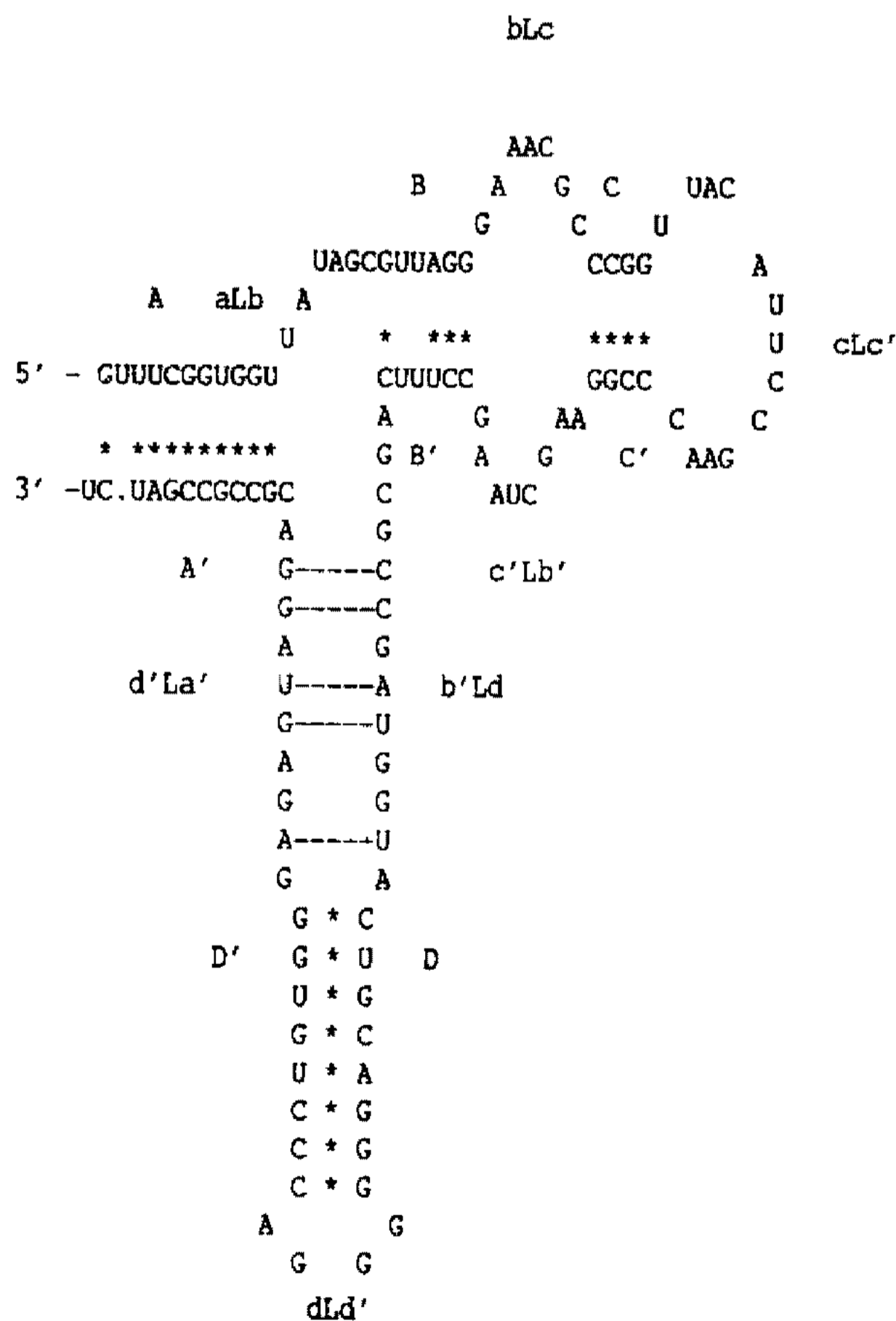


Fig. 4. Secondary structure of 5S rRNA of *Streptomyces* sp. HSL-613.

*Star marker indicate base pairs and broken lines indicate potential base pairs

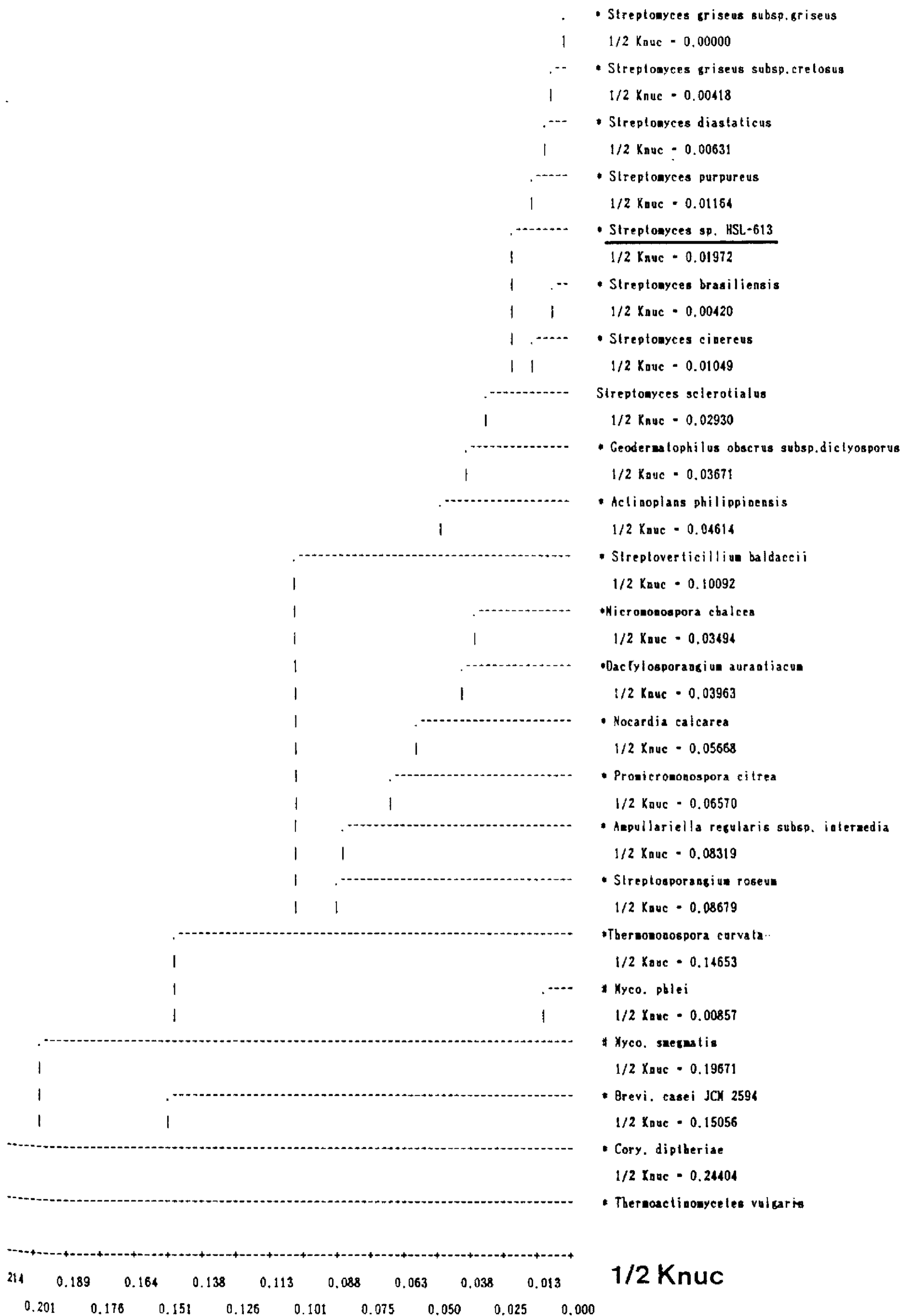


Fig. 5. Phylogenetic tree constructed from the nucleotide sequences of 5S rRNA of *Streptomyces* sp. HSL-613 and related microorganisms.

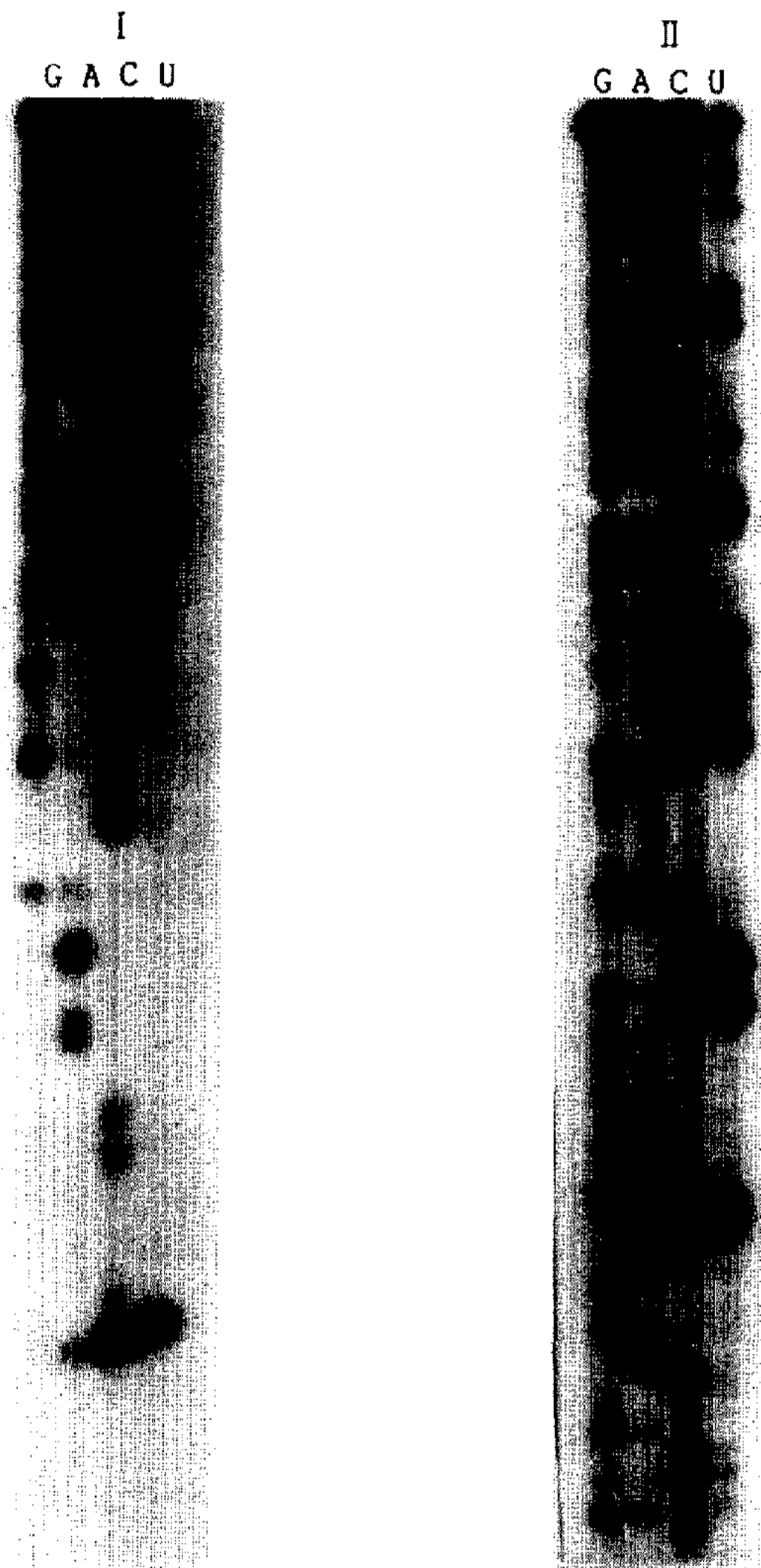


Fig. 6. The 5S rRNA sequencing ladder of *Streptomyces* sp. HSL-613.
 *Chemical digests of 3'-³²P labelled 5S rRNA electrophoresed on a 12% and 8% polyacrylamide gel
 I: Short term, II: Long term

nose, L-rhamnose, sucrose, raffinose, inositol은 잘 이용하지 못하였다. 이상과 같은 결과를 종합하여 이미 알려진 균주로 본 균주와 가장 유사한 균주 3개를 골라 생리적인 특성을 조사 비교한 결과 Table 3과 같았다. Table 3에서와 같이 비교균주인 *Streptomyces glomeroaurantiacus*, *Streptomyces griseoviridis*, *Streptomyces peucetius* 등은 spore chain, spore surface, nitrate reduction, 전분의 가수분해능, gelatin 액화력, melanoid 색소 생성 등이 분리한 본 균주인 HSL-613과 같았으나 mycelium 주위에 생성되는 색소에서 다소의 차이를 보였다.

한편 탄수화물 이용성에 있어서는 *Streptomyces glomeroaurantiacus* 근연의 종으로 판단되나 정확하게 일치되지 않아 *Streptomyces* sp.로 분류하였다.

화학적 특성

분리된 균주 HSL-613을 보다 정확하게 동정하기 위해 화학적 분석법으로 특성을 조사하였다. 그 중 호흡연쇄에서의 전자전달이 관계하는 quinone type을 조사한 결과 Fig. 2와 같은 isoprenoid chain이 9 (H₆, H₈)개로 연결된 menaquinone(MK-9)(39, 40)을 가지고 있었으며, 분리된 균주가 함유하는 fatty acid type은 Table 4와 같이 branched type(2C-type)이었다(41, 43).

Cell wall의 peptidoglycan 층에 존재하는 diamino-pimelic acid(DAP) type을 결정하기 위해 TLC로 분석한 결과 Table 5와 같이 LL-DAP를 함유하고 있었으며, chromosomal DNA의 평균 G+C 함량을 조사한 결과 Table 5에서와 같이 59%로 일반적인 *Streptomyces*의 균들보다는 비교적 낮은 함량의 특징을 보였다. Whole cell의 당을 분석한 결과 Fig. 3과 같이 hexose인 galactose, glucose, mannose, 그리고 pentose인 ribose로 구성되었다. 그러나 sugar pattern의 경우는 *Streptomyces*와는 전혀 다른 특징적 조성을 이루고 있었다(39, 44). 또한 Park 등(34)과 Maxam-Gilbert 등(45-47)의 방법에 따라 5S rRNA sequencing을 하여 분리주의 nucleotide 수와 진화에 의한 특징적인 부위에 따라 분류한 결과는 Fig. 4, 5, 6과 같았다. 5S rRNA의 염기서열을 sequencing 한 결과 일반적으로 *Actinomycetes*의 경우 120개의 nucleotide를 가지고 있으며, 본 분리주의 5S rRNA sequencing을 type strain인 *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* KCTC 9080(48)과 비교한 결과 120개의 nucleotide를 구성하고 있으므로 전형적인 *Streptomyces*속의 균주로 동정하였다.

요 약

임상진단용 산화효소인 cholesterol oxidase를 생성하는 방선균 분리주 HSL-613을 토양으로부터 분리하여 ISP(International Streptomyces Project) 분리법과 화학적 방법으로 동정하였다. 분리주 HSL-613의 모양은 spiral 형태이며, 포자는 원형으로 smooth type이었다. 분리주 HSL-613의 세포벽 성분은 LL-DAP(diaminopimelic acid)로 나타났으며, chromosomal DNA의 평균 G+C 함량은 59%였고, 지방산은 주로 iso-branched와 anteiso-branched로 구성되었으며, menaquinone은 MK-9(H₆, H₈)을 가지고 있었다. 세포내의 당은 육탄당인 galactose, glucose, mannose, 그리고 오탄당인 ribose로 구성되어 sugar pattern의 경우는 *Streptomyces*와는 전혀 다른 특징적 조성을

이루고 있었다. 5S rRNA의 염기서열을 sequencing한 결과 일반적으로 Actinomycetes의 경우 120개의 nucleotide를 가지고 있으며 본 분리주의 5S rRNA sequencing을 type strain인 *Streptomyces griseus* subsp. *griseus* KCTC 9080과 비교한 결과 120개의 nucleotide를 구성하고 있으므로 형태학적, 생리학적, 화학적 특성을 조사하고 type strain과 비교하여 동정한 결과 분리주 HSL-613을 *Streptomyces* sp. HSL-613이라고 명명하였다.

참고문헌

1. Reading, C. and M. Cole. 1977. Clavulanic acid; a β -lactamase inhibiting-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial agents and chemother.* **11**: 852-857.
2. Cross, T. 1982. Actinomycetes; a continuing source of new metabolites. *Devel. Indust. Microbiol.* **23**: 1-8.
3. 大野雅二, 大村智. 1984. 抗生物質 研究의 最尖端. 東京大學同人.
4. Kusaca, T. 1985. 微生物 探索 分離 育種. CMC. Tokyo.
5. Umezawa, H. 1982. Trends in Antibiotic Research Japan Antibiotics Research Association, Tokyo.
6. Richmond, W. 1973. Preparation and properties of bacterial cholesterol oxidase from *Nocardia* sp. and its application to the enzymatic assay of total cholesterol in serum. *Clin. Chem.* **19**: 1350-1356.
7. Flegg, H.M. 1973. An investigation of the determination of serum cholesterol by enzymatic method. *Ann. Clin. Biochem.* **10**: 79-84.
8. Allain, C.C., L.S. Poon, C.S.G. Chan, W. Richmond, and P.C. Fu. 1974. Enzymatic determination of total serum cholesterol. *Clin. Chem.* **20**: 470-475.
9. Weyman, A.E. 1974. Accidental hypothermia in an alcoholic population. *Am. J. Med.* **56**: 13-21.
10. Turfitt, G.E. 1944. The microbiological degradation of steroids. 2. oxidation of cholesterol by *Proactinomyces* sp. *Biochem. J.* **38**: 49-62.
11. Turfitt, G.E. 1947. Microbiological agencies in the degradation of steroids. *J. Bacteriol.* **54**: 557-562.
12. Fukuda, H., Y. Kawakami, and S. Nagamura. 1973. A method to screen anticholesterol substances produced by microbes and a new cholesterol oxidase produced by *Streptomyces viascens*. *Chem. Pharm. Bull.* **21**: 2057-2060.
13. Schatz, A., K. Savard, and I.J. Pinter. 1949. The ability of soil microorganisms to decompose steroids. *J. Bacteriol.* **58**: 117-120.
14. Uwagima, T., H. Yagi, S. Nagamura, and O. Terada. 1973. Isolation and crystallization of extracellular 3β -hydroxysteroid oxidase of *Brevibacterium Sterolicum* nov. sp. *Agric. Biol. Chem.* **37**: 2345-2350.
15. Tolalay, P. and M.M. Dodson. 1953. Purification and properties of a β -hydroxysteroid dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **205**: 823-837.
16. 이인애, 최용경, 이홍수, 최인성, 정태화. 1992. Cholesterol oxidase를 생성하는 토양미생물의 분리 및 효소생산에 관한 연구. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 395-400.
17. 이홍수, 이승철, 권태중, 정태화. 1992. 토양 미생물 HSL-613이 생산하는 Cholesterol oxidase의 정제 및 특성. *Kor. J. Appl. Microbiol. biotechnol.* **20**: 401-408.
18. Difco manual. 1984. Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology, 10th ed. Difco Lab. Detroit. U.S.A.
19. Waksman, S.A. 1961. The actinomycetes, Pp. 328. The Williams and Wilkins Co., Baltimore. Vol 2.
20. Peter, H.A.S., S.M. Nicholas, M.E. Sharp and J.G. Holt. 1986. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Vol II, Pp. 1104-1139. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
21. Dietz, A. and D.W. Thayer. 1980. "Actinomycetes taxonomy" SIM special publication NO. 6. Society for Industrial Microbiology.
22. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* II. species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 172-174.
23. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1968. Cooperative descriptions of type cultures of *Streptomyces* III. species descriptions from first study. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **18**: 150-152.
24. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1969. Cooperative description of type cultures of *Streptomyces* IV. species descriptions from the second, third and fourth studies. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **19**: 391-512.
25. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1972. Cooperative description of the type strains of *Streptomyces* V. additional descriptions. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **22**: 265-394.
26. Gerhardt, P., R.C.G. Murray, R.N. Costilow, E.W. Nester, W.A. Wood, N.R. Krieg, and G.B. Phillips. 1981. Manual of Methods for General Bacteriology. ASM. Washington.
27. Shirling, E.B. and D. Gottlieb. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* sp. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**: 313-340.
28. Gordon, R.E. and J.M. Mhim. 1957. A comparative study of some strains received as *Nocardiae*. *J. Bacteriol.* **73**: 15-27.
29. Yamada, K. and K. Komagata. 1970. Taxonomic

- studies on coryneform bacteria. IV. morphological, cultural, biochemical characteristics. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **16**: 103-113.
30. Staneck, T.L. and G.D. Roberts. 1974. Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **28**: 226-231.
 31. Komagato, K. and K.I. Suzuki. 1987. Lipid and cell wall analysis in bacterial systematics, Pp. 161-207. In Colwell, R.R. and Grigorova, R., eds. *Method in Microbiology* Vol. 19. Academic Press.
 32. Tamaoka, J., Y. Katayama-Fujimura, and H. Kuraishi. 1983. Analysis of bacterial menaquinone mixtures by high-performance liquid chromatography. *J. Appl. Bact.* **54**: 31-36.
 33. Tamaoka, J. and K. Komagata. 1984. Determination of DNA base composition by reversed-phase high-performance liquid chromatography. *FEMS Microbiology Letters* **25**: 125-128.
 34. Park, Y.H., H. Hory, S. Osawa, and K. Komagata. 1987. Phylogenetic analysis of the coryneform bacteria by 5S rRNA sequences. *J. Bacteriol.* **169**: 1801-1806.
 35. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M. H. Willington, P.H.A. Sneath, and M.J. Sackin. 1983a. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1743-1813.
 36. Williams, S.T., M. Goodfellow, G. Alderson, E.M. H. Willington, J.C. Vickers, P.H.A. Sneath, M. Sackin, and M. Mortier. 1983b. A probability matrix for identification of *Streptomyces*. *J. Gen. Microbiol.* **129**: 1815-1830.
 37. Buchanan, R. and N.E. Gibbson. 1989. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Pp. 618. 8th ed. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
 38. Pridham, T.G. and J. Lyons. 1969. A guide for the classification of *Streptomyces* according to selected groups. Placement of strains in morphological section. *Appl. Microbiol.* **6**: 52-79.
 39. Kroppenstedt, R.M. 1985. Fatty acid and menaquinone analysis of *Actinomycetes* and related organisms, Pp. 173-199. In Goodfellow and Minnikin (eds.), *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, Society for Applied Bacteriology Technical Series NO. 20, Academic Press, London.
 40. Alderson, G., M. Goodfellow, and D.E. Minnikin. 1985. Menaquinone composition in the classification of *Streptomyces* and other *Sporoactinomycetes*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1671-1679.
 41. Saddler, G.S., A.G. O'Donnell, M. Goodfellow, and D.E. Minnikin. 1987. SIMCA pattern recognition in the analysis of *Streptomyces* fatty acids. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 1137-1147.
 42. O'Donnell, A.G., M.R. Nahaie, M. Goodfellow, D.E. Minnikin, and V. Hajek. 1985. Numerical analysis of fatty acid profiles in the identification of *Staphylococci*. *J. Gen. Microbiol.* **131**: 2023-2033.
 43. Goodfellow, M. and D.E. Minnikin. 1985. *Chemical Methods in Bacterial Systematics*, Society for Applied Bacteriology Technical Series NO. 20, Academic Press, London.
 44. Lechevalier, M.P. 1968. Identification of aerobic *Actinomycetes* of clinical importance. *J. Lab. Clin. Med.* **71**: 934-944.
 45. Maxam, A.M. and W. Gilbert. 1977. A new method for sequencing DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **74**: 560-564.
 46. Peattie, D.A. 1979. Direct chemical method for sequencing RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **76**: 1760-1764.
 47. Dekio, S., R. Yamasaki, J. Jidoi, H. Hori, and S. Osawa. 1984. Secondary structure and phylogeny of *Staphylococcus* and *Micrococcus* 5S rRNAs. *J. Bacteriol.* **159**: 233-237.
 48. 임동구. 1989. 5S rRNA의 염기배열에 의한 방선균의 계통학적 분석 (Phylogenetic Analysis of *Actinomycetes* by 5S rRNA Sequences). 성균관대학교 대학원.

(Received June 27, 1994)