

S. peucetius subsp. *caesius*와 *S. platensis*의 원형질체 융합 및 융합균주의 분리

임미송 · 이강만*
이화여자대학교 약학대학
(Received October 17, 1994)

The Interspecific Protoplast Fusion between *S. peucetius* subsp. *caesius* and *S. platensis*.

Mi Song Im and Kang Man Lee*
College of Pharmacy, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

Abstract—An interspecific fusant strain, MS1, was obtained by protoplast fusion between *S. peucetius* subsp. *caesius* and *S. platensis*. We studied on the microbiological and cultural characteristics of the fusant MS1. In liquid culture, the viscosity of culture broth of *S. peucetius* increased during incubation. However, the fusant MS1 formed pellet like *S. platensis* without viscosity change. On agar medium, the colony morphology of MS1 resembled *S. platensis* but the color was similar to *S. peucetius*. The fermentation products of the fusant MS1 was identical with *S. peucetius*.

Keywords □ protoplast fusant, *S. peucetius* subsp. *caesius*, *S. platensis*

Adriamycin은 anthracycline 계통의 항생물질로 gram positive bacteria와 gram negative bacteria에 항균 작용이 있으며,¹⁾ 현재 광범위하게 사용되는 항암제 중 하나이다.^{2,3)} Daunorubicin이 *Streptomyces peucetius*에서 1963년에 처음 분리되었으며, 그후 adriamycin이 Arcamone 등에 의해서 *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*로부터 분리, 확인되었다.⁴⁾

Daunorubicin과 adriamycin이 효과적인 항암제로 사용되고 있으나, 강한 축적성 심장독성이 있으며 또한 생산 균주가 불안정하여 배양환경의 영향을 쉽게 받으며^{6,7)} 그 생산 효율이 낮아 생산비가 높다는⁸⁾ 문제점을 가지고 있다. 독성이 감소되고 항암효과가 증가된 anthracycline계 물질을 찾기 위한 연구가 이러한 문제점을 해결하기 위해 반합성 및 전합성을 이용한 유도체 합성⁹⁾ 생물학적 전환을 통한 유도체 분리^{10,11)} 및 균주개량 방법^{12,13)}을 이용한 생산성 향상 등의 면에서 진행되고 있다. 본 연구에서는 균주개량의 목적으로 시행될 수 있는 PEG를 이용한 원형질체

융합을 anthracycline계 물질을 생산하는 *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*와 oxytetracycline을 생산하는 *Streptomyces platensis* 사이에 적용하였다. 원형질체 융합 기술을 위 두균주에 적용한 것은 *Streptomyces* 속 사이의 원형질체 융합현상이 PEG를 이용하였을 때 잘 일어남이 보고되었고^{14,15,16)} 균주개량의 목적으로 사용한 예가 많이 있기 때문이다.¹⁷⁾ 또한 anthracycline 항생제와 tetracycline 항생제의 생합성 경로는 polyketide 생합성 경로를 가진다는 점에^{18,19)} 착안하여 *S. peucetius*와 *S. platensis* 사이의 원형질체 융합을 시도하였다.

본 논문에서는 원형질체 융합과 융합균주의 선별 과정, 융합균주의 변화된 형질에 대해 실험한 결과를 보고하고자 한다.

실험방법

균주—실험에 사용한 균주는 *S. peucetius* subsp. *caesius* KCTC 9039와 *S. platensis* KCTC 1088 및 위

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

두 균주의 원형질체 융합에 의해 얻어진 융합균주 *Streptomyces* MS1이었다.

배지-균주 보존과 원형질체 형성 및 재생에는 sucrose 10.3%, K_2SO_4 0.025%, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.024%, yeast extract 0.5%, casamino acids 0.01%를 포함하는 배지 90 ml에 5.73% Tes buffer(pH 7.2) 10 ml, trace elements solution 200 μ l, agar 2.0 g를 첨가하여 고압 멸균한 용액에 0.5% KH_2PO_4 1 ml, 5M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 1 ml, 20% L-Proline 1.5 ml, 1N NaOH 0.7 ml를 첨가해 R2YE 고체배지를 만들어 사용하였다. Trace elements solution은 증류수 1000 ml에 $ZnCl_2$ 40 mg, $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ 200 mg, $CuCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 mg, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 10 mg, $Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$ 10 mg, $(NH_4)_6Mo_7O_{24} \cdot 4H_2O$ 10 mg를 첨가하여 조제하였다. 종배양과 본배양에는 R2YE 액체배지를 사용하였다.

S. peuceitius와 S. platensis의 원형질체 형성에 있어서 glycine의 영향-Glycine의 농도를 0~2% 까지 변화시킨 R2YE 액체배지 50 ml에 두 균을 접종하여 30°C, 200 rpm에서 48시간 배양하였다. 각각의 배양액을 원심분리하여(SS-34 rotor, 3000 rpm, 10분, 4°C) 균체만 모은 후 10.3% sucrose로 2회 세척하였다. 재생빈도를 구하기 위해 100 μ l를 취해 놓았다. P buffer(sucrose 10.3 g, K_2SO_4 0.025 g, $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 1.024 g을 함유하는 증류수 70 ml에 5.73% pH 7.2 TES buffer 10 ml, 5M $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 10 ml, 0.5% KH_2PO_4 , 10 ml, trace elements solution 200 μ l를 첨가하여 제조)에 lysozyme(1 mg/ml)을 첨가한 용액 4 ml를 가하여 30°C에서 90분 반응시킨 후 5 ml의 P buffer를 가하고 균질화하여 균체로부터 원형질체를 분리시켰다. 분리된 원형질체는 G3 synthetic glass filter를 통과시켜 여과 후 원심분리하여(ECONOSPIN, 3000 rpm, 7분) 모았다. 원형질체의 생성여부는 위상차 현미경으로 확인하고 적당한 농도로 희석, 신선한 R2YE 고체배지에 plating하여 30°C에서 7일간 재생시켰다. 재생빈도는 원형질체 형성 전의 균수와 재생된 균수의 비로 계산하였다.

S. peuceitius와 S. platensis의 원형질체 형성 및 재생-Glycine을 0.5%, 1.0% 포함하는 R2YE 액체배지 50 ml에 각각 *S. peuceitius*와 *S. platensis*를 접종하여 30°C, 200 rpm에서 48시간 배양 후 균체를 모아 원형질체를 만들고 재생시켰다. 융합에 사용할 목적으로

만들어진 원형질체를 500 μ l씩 eppendorf tube에 나누어 넣어 -70°C 냉동고에 보관하였다.

PEG를 이용한 원형질체 융합과 재생-재생 결과를 바탕으로하여 거의 동수의(약 10^6 개) protoplast를 포함하는 용액 0.5 ml씩을 cap test tube에서 혼합한 후 원심분리하여(ECONOSPIN, 3000 rpm, 10분) 원형질체만을 모았다. P buffer 5 ml를 가하여 세척한 후 다시 원심분리하여 원형질체를 모은 후 50% PEG 1000 0.8 ml를 가해 잘 섞어주었다. 1분 동안 실온(25°C)에 방치한 후, P buffer로 희석하여 R2YE 고체배지에 도포한후 30°C에서 7일 동안 배양하여 재생하였다.

융합체 선별-R2YE 고체배지에서 재생된 균의 형태와 색깔을 비교하여 융합체를 선별하였다. 선별된 융합체를 R2YE 액체배지에 접종하여 30°C, 200 rpm에서 4일 동안 배양 후 발효 생성물질을 원균들과 비교하기 위하여 $CHCl_3$ 와 butanol로 추출하여 silicagel TLC로 분석하였다.

융합 균주의 DNA Tm 측정-각각의 균을 R2YE 액체배지 50 ml에 접종하여 30°C, 200 rpm에서 48시간 배양한 후 원심분리하여(SS-34 rotor, 3000 rpm, 10분, 4°C) 균체만을 모아 *S. peuceitius*, *S. platensis*, 융합균주 MS1의 chromosomal DNA를 Hopwood 등²⁰⁾의 방법으로 분리하였다. DNA를 농도가 30~50 μ g/ml 범위가 되도록 TE buffer(10 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.2 mM NaCl)로 희석하여 흡광도를 0.5~1.0내로 조절하고 200 μ l를 cuvette에 넣은 후 온도를 55°C에서 90°C까지 1분에 1°C씩 올리면서 cuvette holder를 전기적으로 가열하는 thermoprogrammer와 automatic recording system(Gilford, UV-VIS Microprocessor-controlled spectrophotometer system 2600)을 사용하여 DNA의 melting curve를 흡광도의 변화로 측정함으로써 Tm을 측정하였다.

형태학적, 생리학적 특성-Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(8th ed.)²¹⁾를 참고하여 *S. peuceitius*, *S. platensis*, 융합균주 MS1에 대해 다음 항목에 대하여 실험하였다.

Melanin 색소생성-ISP6(peptone-yeast extract-iron agar: peptone 1.5%, yeast extract 0.1%, ferric ammonium citrate 0.05%, KH_2PO_4 0.1%, $Na_2S_2O_3$ 0.008%, agar 1.5%)배지와 ISP7(Tyrosine agar: Tyrosine 0.5%, gelatin 0.5%, beef extract 0.3%, agar

1.5%)배지에 각각 균을 접종 후 30°C에서 4일 배양한 후 melanin 색소 생성여부를 판별하였다.

투과성 색소생성—Glycerol-asparagine agar(Glycerol 1.0%, L-asparagine 0.1%, KH_2PO_4 0.1%, trace elements solution 0.1%, agar 1.5%)배지에 각각 균을 접종 후 30°C에서 4일 배양한 후 투과성 색소 생성 여부를 판별하였다. Trace elements solution은 증류수 1000 ml에 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{MnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g을 첨가하여 조제하였다.

포자형성—R2YE 고체배지에 각각 균을 접종 후 30°C에서 14일간 배양한 후 spore의 생성 여부를 광학 현미경으로 관찰하였다.

분해성 및 탄소원 이용도—Tyrosine, starch, gelatin을 각각 1.0%, 0.4%, 0.5% 포함한 Benetts modified agar(Dextrin 1.0%, casein 0.2%, yeast extract 0.1%, beef extract 0.1%, $\text{CoCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.001%, agar 1.5%)에 각각 균을 접종 후 30°C에서 14일 동안 배양한 후 배지의 투명성으로 분해성을 관찰하였으며, 탄소원 이용도는 동일 배지에 dextrin 1.0% 대신 sucrose, starch, fructose, glucose, maltose를 각각 1.0% 포함시킨 후 균의 성장 여부로 판단하였다.

총 세포외 단백질 정량—R2YE 액체 배지 50 ml에 *S. peucetius*와 융합균주 MS1을 접종하여 30°C, 200 rpm으로 4일 배양한 후 원심분리하여(SS-34 rotor, 6000 rpm, 20분, 4°C) 균체를 모았다. 상등액을 취하고 포화 ammonium sulfate를 가하여 0~20%, 20~40%, 40~60% 분획의 protein을 모은 후 100 mM HEPES(pH 8.0)에 10 mM CaCl_2 , 10 mM MgCl_2 을 포함한 buffer 3 ml에 녹였다. Bio-Rad protein assay solution 800 μl 에 sample solution 200 μl 를 가해 섞은 뒤 15분간 방치한 후 595 nm에서 흡광도를 측정하여 bovine serum albumin으로 작성한 표준검량곡선으로부터 단백질량을 계산하였다.

결과 및 고찰

원형질체 형성에 대한 glycine의 영향—효과적인 원형질체 융합을 얻기 위해서는 원형질체 형성 및 재생에 있어서 최적화가 필수적이다. Protoplast를 만들기 위한 전 배양에 있어서 첨가한 glycine은 균의 세포벽 형성과정에 D-alanine대신 들어가므로 세포벽 형성을 저지하여 lysozyme에 대한 감수성을 높이는

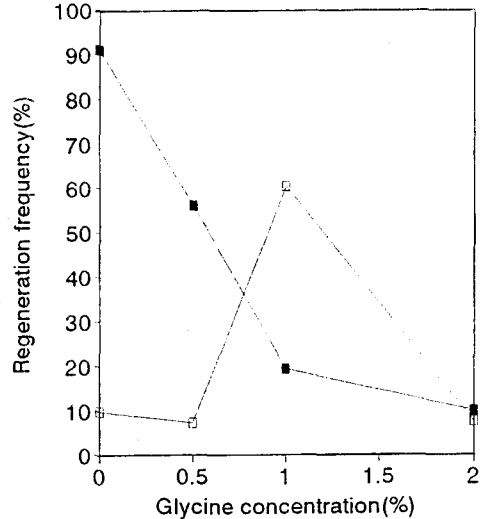


Fig. 1—The effect of glycine concentration on the protoplast regeneration of *S. peucetius*(—■—) and *S. platensis*(-□-).

효과가 있으나 너무 과량으로 넣어 주면 오히려 균의 성장을 저지시키므로 최적농도의 glycine첨가는 중요하다.²²⁾ *S. peucetius*와 *S. platensis*의 glycine농도 변화에 따른 재생빈도는 Fig. 1에서 보는 바와 같았다. Fig. 1의 결과로 볼 때 *S. platensis*의 경우에는 배양시 glycine첨가가 0~0.5%까지는 균의 성장은 좋았으나 pellet을 형성하면서 자랐기 때문에 protoplast 형성이 낮았다. 1.0%의 glycine 첨가시에는 pellet 형성 현상 없이 균일하게 퍼져 자라 protoplast형성을 촉진하였으나 그 이상의 농도에서는 균 성장이 저해를 받았다. 반면 균일하게 퍼져 자라는 *S. peucetius*의 경우에는 glycine 첨가가 균 성장을 저해하였으며, 오히려 glycine을 첨가하지 않았을 때 원형질체 형성이 가장 높았다.

원형질체 융합과 재생—원형질체 재생결과를 바탕으로 하여 거의 동수의 두 균 원형질체를 융합하기 위하여 *S. peucetius*는 0.5% glycine을, *S. platensis*는 1.0% glycine을 배양액에 첨가해서 얻은 균체로부터 만든 원형질체를 이용하였다. 각 균의 원형질체 재생빈도와 융합 후 재생빈도, 융합체의 재생빈도는 Table I에서 보는 바와 같았다. 융합체의 생성비율은 약 5% 정도가 되었다.

융합체 선별—R2YE 고체배지에 재생된 colony들 중 모양이나 색깔에서 원균들과 차이를 보이는 co-

Table I—The formation and regeneration of *S. peucetius* and *S. platensis* protoplasts

	Number of Protoplast/ml	CFU* /ml	Regeneration frequency(%)
<i>S. peucetius</i>	19.6×10^6	11×10^6	56.1
<i>S. platensis</i>	89.0×10^5	54×10^5	60.6
Fusant	28.5×10^5	7×10^5	4.9
Selectable	28.5×10^5	1×10^5	0.7

*CFU: Colony Forming Unit



Fig. 2—Characteristics of culture broth of MS1(1), *S. peucetius*(2) and *S. platensis*(3). The culture condition was at 30°C, 200 rpm in R2YE for 4 days.

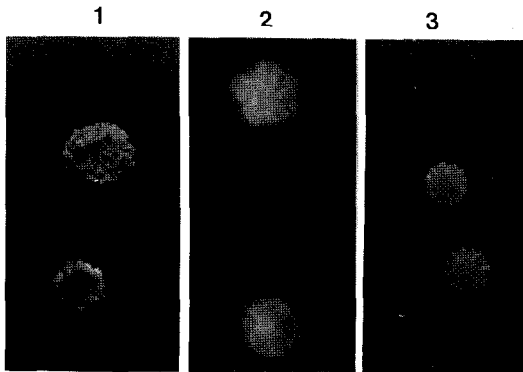


Fig. 3—The colony morphology of *S. peucetius*(1), *S. platensis*(2) and the fusant MS1(3) on R2YE agar plate(x4).

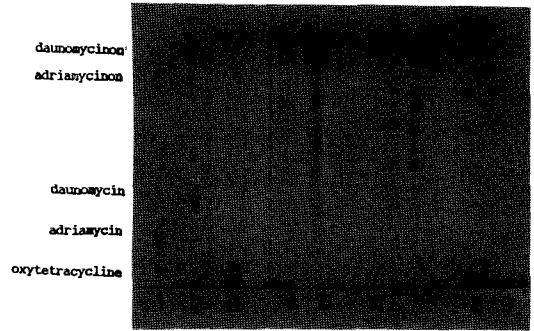


Fig. 4—TLC analysis pattern of CHCl_3 and butanol extracts of *S. peucetius*(4, 5), MS1(6, 7) and *S. platensis*(8, 9) culture broth. The TLC plate was developed in the solvent system CHCl_3 : MeOH : Formic acid(80 : 20 : 2). Adriamycin (1), daunosycin(2) and Oxytetracycline(3).

lony들을 선택하여 액체 및 고체배양을 실시한 결과 융합균주 MS1의 배양특성이 원균들과 차이가 있음을 알게 되었다. *S. peucetius*는 액체배지에서 균이 성장함에 따라 균액의 점도가 증가하는 반면 융합균주 MS1은 *S. platensis*처럼 직경 0.5~1.5 mm의 pellet을 형성하면서 맑은 붉은색으로 자랐다(Fig. 2). 고체배지에서 *S. peucetius*의 경우 많은 주름이 생기면서 자라는 반면(Fig. 3.1) *S. platensis*는 비교적 매끄럽게 자라는 집락형태의 특징을 보였다(Fig. 3.2). MS1의 colony 색깔은 *S. peucetius*와 같았으나, 형태는 *S. platensis*와 비슷했다(Fig. 3.3). MS1의 발효생성물형태는 *S. peucetius*와 동일했으며, *S. platensis*의 발효생산물인 oxytetracycline 계통물질은 생성하지 않았다(Fig. 4).

DNA Tm의 측정—*S. peucetius*, *S. platensis*, 융합균주 MS1의 각각 분리된 DNA를 TE buffer(pH 8.0)에 녹여 DNA melting curve를 측정하였다(Fig. 5). Melting curve로부터 Tm을 측정하여 *S. peucetius*는 71°C, *S. platensis*는 78°C, 융합균주 MS1은 83°C의 결과를 얻었다. MS1의 Tm이 원균들과 차이가 있는 사실로 원균들 사이의 원형질체 융합의 결과로 염색체 상의 변화가 일어났음을 추정할 수 있었다.

형태학적 및 생리학적 특성 조사—Bergey's Manual of Determinative Bacteriology를 참고로 하여 *S. peucetius*, *S. platensis*, 융합균주 MS1에 대해 실험한 결과는 Table II에서 요약 정리한 바와 같았다.

Table II—Morphological and physiological characteristics of *S. peucetius*, *S. platensis* and the fusant MS1

Characteristics	Medium	<i>S. peucetius</i>	<i>S. platensis</i>	Fusant MS1
Diffusible pigment	ISP 5	red-orange	—	red-orange
Melanin pigment	ISP 6	—	—	—
Spore	ISP 7	—	—	—
Color of spore	ISP 4	+	++	+
Colony surface	ISP 4	red	white	red-violet
Degradation activity	R2YE	spiny	smooth-spiny	smooth-spiny
	starch	++	—	+++
	tyrosine	+	++	++
	gelatin	+	—	+
Sugar utilization activity	++	sucrose glucose	sucrose glucose	sucrose, starch glucose, fructose, maltose
	+	starch		

Table III—Protein concentrations of culture broth of *S. peucetius* and the fusant MS1

Ammonium sulfate(%) fractionation	Protein concentration($\mu\text{g}/\text{ml}$)		Relative ratio(%) (MS1/ <i>S. peucetius</i>)
	MS1	<i>S. peucetius</i>	
0~20	21.99	109.0	20.1
20~40	25.6	89.95	28.4
40~60	53.5	208.4	25.6

Table II의 결과로부터 융합균주 MS1의 생리학적 특성은 *S. peucetius*에 가까우나 colony형태는 *S. platensis*와 유사하며, 탄소원 이용도의 범위가 넓어진 균임을 알 수 있었다.

총 세포의 단백질 정량—*S. peucetius*는 4일간 배양하는 과정에서 균체가 풀어져 균액의 점도가 증가하는 반면, MS1은 pellet형태로 자랐기 때문에 균액이 맑은 상태로 유지되었다. *S. peucetius*균액의 현저한 점성증가가 배양하는 동안 균체의 용균에 의해 단백질과 같은 균 내부물질이 배양액으로 나온것에 원인이 있을 수 있으므로 두 균의 배양액 중의 단백질을 정량함으로써 두 균의 차이를 조사하였다. Bio-Rad protein assay 방법에 의해 단백질을 정량한 결과는 Table III와 같았다. Table III에서 볼 수 있는 바와 같이 MS1의 총 세포의 단백질량은 *S. peucetius*의 20~30%에 해당하였으며, *S. peucetius* 균액의 점성증가는 용균에 의한 균 내부물질의 배출에 기인할 가능성이 있음을 추측할 수 있었다.

결 론

융합균주 MS1은 *S. peucetius*와 *S. platensis*의 PEG를 이용한 원형질체 융합에 의해 얻어진 균주로 이에 대한 특성조사 및 *S. peucetius*, *S. platensis*와의 비교 결과는 다음과 같았다.

1. *S. peucetius*는 액체배지에서 균이 성장함에 따라 균액의 점도가 증가하는 반면 융합균주 MS1은 *S. platensis*처럼 직경 0.5~1.5 mm의 pellet을 형성하면서 자랐으며 균액은 맑았다. 고체배지에서의 집락 색깔은 *S. peucetius*와 같았으나 형태는 *S. platensis*와 유사했다.

2. 융합균주 MS1의 발효생성물 생성양상은 *S. peucetius*와 동일했으며, *S. platensis*의 발효산물인 oxytetracycline계통의 물질은 생산하지 않았다. 이상의 결과로부터 *S. peucetius*와 *S. platensis*간의 interspecific한 원형질체 융합가능성과 아울러 anthracycline 생성균주 개량의 목적으로 원형질체 융합법의 이용가능성을 확인하였다.

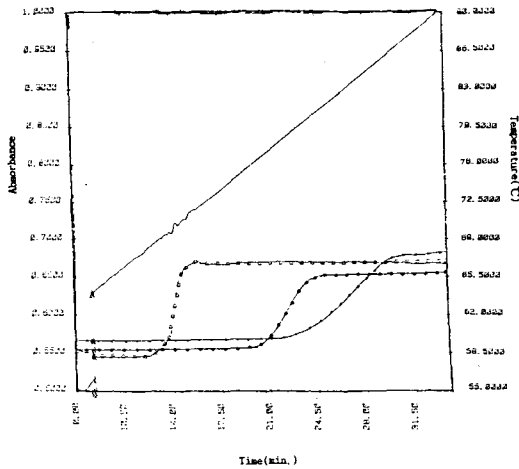


Fig. 5—The melting curves of DNA from *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*(—□—□), *S. platensis* (---●---●) and the fusant MS1(---■---■). The measuring condition was as follows: Solvent: TE buffer(Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 0.2 mM, pH 8.0), DNA concentration: 35 µg/ml, Instrument: Microprocessorcontrolled spectrophotometer system 2600(Gilford), Temperature increasing rate: 1.0°C/min.

감사의 말씀

본 논문은 연세대학교 생물산업소재연구센터의 연구비지원(과제번호 94-04-02-1)을 받아 수행하였습니다.

문헌

- 1) Arcamone, F., Cassinelli, G., Marco, A., and Gaetani, M.: U. S. Patent, 3590028 (1971).
- 2) Chuang, R. Y. and Chuang, L. F.: Inhibition of chicken myeloblastosis RNA polymerase activity by adriamycin. *Biochem.* **18**, 2069 (1979).
- 3) Goodman, M. F. and Bessaman, M. F.: Adriamycin and daunorubicin inhibition of T₄ DNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **71**, 1193 (1974).
- 4) White, R. J. and Stroshane, H.: Daunorubicin and adriamycin properties, biosynthesis and fermentation. *Biotech. Indus. Antibiotics.* **22**, 266 (1984).
- 5) Arcamone, F., Cassinelli, G and Spalla, C.: 14-Hydroxy-daunomycin, a new antitumor antibiotic from

- Streptomyces peucetius* var *caesius*. *Biotech. Bioeng.* **11**, 1101 (1969).
- 6) Dekleva, M. L and Strohl, W. R.: Glucose-stimulated acidogenesis by *Streptomyces peucetius*. *Can. J. Microbiol.* **33**, 1129 (1988).
- 7) Gibb, G. D. and Strohl, W. R.: Physiological regulation of protease activity in *Streptomyces peucetius*. *Can. J. Microbiol.* **34**, 187 (1988).
- 8) Otten, S. L., Stutzman-Engwall, K. J. and Hutchinson, C. R.: Cloning and expression of daunomycin biosynthesis genes from *Streptomyces peucetius* and *Streptomyces peucetius* subsp. *caesius*. *J. Bacteriology.* **172**, 3427 (1990).
- 9) El Khaden, H. S.: Anthracycline antibiotics. Academic Press, New York, pp. 90-91 (1982).
- 10) Oki, T., Takatsuki, Y., Tobe, H. and Yoshimoto, A.: Microbial conversion of daunomycin, carminomycin I and feudomycin A to adriamycin. *J. Antibiotics.* **34**, 1229 (1981).
- 11) Yoshimoto, A. and Oki, T.: Microbial conversion of anthracyclines to daunomycin by blocked mutants of *Streptomyces coeruleorubidus*. *J. Antibiotics.* **33**, 1158 (1981).
- 12) Stutzman-Engwall, K. J., Otten, S. L. and Hutchinson, C. R.: Regulation of secondary metabolism in *Streptomyces* spp. and overproduction of daunorubicin in *Streptomyces peucetius*. *J. Bacteriol.*, **174**, 144 (1992).
- 13) Stutzman-Engwall, K. J. and Hutchinson, C. R.: Multigene families for anthracycline antibiotic production in *Streptomyces peucetius*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 3135 (1989).
- 14) Baltz, R. H. and Matsushima, P.: Protoplast fusion in *Streptomyces*: Condition for efficient genetic recombination and cell regeneration. *J. General Microbiol.* **127**, 137 (1981).
- 15) Okanish, M, Suzuki, K and Umezawa, H.: Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: Cultural condition and morphological study. *J. General Microbiol.* **80**, 389 (1974).
- 16) Hopwood, D. A and Wright, H. M., Bibb, M. J. and Cohen, S. N.: Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*. *Nature.* **268**, 171 (1977).

- 17) Yamashita, F. and Hotta K., Kurasawa, S., Okami, Y. and Umezawa, H.: New antibiotic production of *Streptomyces*, selected by antibiotic resistance as a marker. *J. Antibiotics*, **18**, 58 (1985).
- 18) Wulf, C. and Anneliese, C.: *Biotechnology*. Sinauer Associates, Inc. p. 264 (1990).
- 19) Thomas, R. and William, D. J.: Oxytetracycline biosynthesis: Mode of incorporation of (1-¹³C) and (1,2-¹³C₂) acetate. *J. Soc. Chem. Commun.* **31**, 128 (1983).
- 20) Hopwood, D. A., Bibb, M. J., Chater, K. F., Kieser, T., Bruton, C. J., Kieser, H. M., Lydiate, D. J., Smith, C. P., Ward, J. M. and Schrempf, H.: Genetic manipulation of *Streptomyces*. A Laboratory Manual. The John Innes Foundation. pp. 71-84 (1985).
- 21) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed.). The Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 2451-2491 (1974).
- 22) Demain, A. L. and Solomon, N. A.: *Manual of industrial microbiology and biotechnology*. American Society for Microbiology. pp. 171-182 (1986).