

## 방선균 원형질체 재생에 의한 독소루비신 고생산성 균주개발

<sup>1</sup>박희섭 · <sup>1</sup>박현주 · <sup>1</sup>김용훈 · <sup>1</sup>임상민 · <sup>1</sup>김동일 · <sup>2</sup>류옥상 · <sup>2</sup>김상린 · † <sup>1</sup>김응수  
<sup>1</sup>인하대학교 생명화학공학부, <sup>2</sup>보령제약 중앙연구소  
(접수 : 2003. 5. 14. 게재승인 : 2003. 8. 27.)

## Development of Doxorubicin overproducing *Streptomyces* Strain using Protoplast Regeneration

Hee-Sup Park<sup>1</sup>, Hyun-Joo Park<sup>1</sup>, Yong-Hun Kim<sup>1</sup>, Sang-Min Lim<sup>1</sup>, Dong-Il Kim<sup>1</sup>, Wuk-Sang Ryu<sup>2</sup>, Sang-Lin Kim<sup>2</sup>, and Eung-Soo Kim<sup>1†</sup>

<sup>1</sup>Division of Chemical Engineering and Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea

<sup>2</sup>Central research Institute, Boryung Pharmaceutical Co., Ansan 425-120, Korea

(Received : 2003. 5. 14. Accepted : 2003. 8. 27.)

Doxorubicin is an anthracycline-family polyketide compound with a very potent anti-cancer activity, typically produced by *Streptomyces peuceitius*. In order to increase doxorubicin productivity, a semi-industrial doxorubicin-producing *Streptomyces* strain named BR-Dox was cultured in a R2YE liquid medium containing CaCO<sub>3</sub>, and then converted to a cell wall-free protoplast using lysozyme treatment method, followed by PEG-mediated cell wall regeneration. Among several protoplast-regenerated *Streptomyces* BR-Dox strains, two independent isolates named BR-Dox4 and BR-Dox6 were visually selected using thin layer chromatography (TLC) based on the pigment overproducing phenotype. Comparing with *Streptomyces* BR-Dox parental strain, two protoplast-regenerated strains, BR-Dox4 and BR-Dox6 exhibited 25.2% and 12.2% higher doxorubicin productivity analyzed by high pressure liquid chromatography (HPLC), respectively. This result suggests that a protoplast-regeneration of an antibiotics-producing *Streptomyces* strain should be a promising strain development approach for antibiotics overproduction in *Streptomyces* species.

**Key Words** : Protoplast regeneration, Doxorubicin, *Streptomyces peuceitius*

### 서론

방선균은 필라멘트 형태의 그람 양성 토양미생물로서, 항생제, 항암제, 면역억제제로 대표되는 다양한 종류의 이차대사산물을 생산하며, 현재까지 보고된 미생물 유래 유용생리활성물질 중 70% 이상이 방선균에서 유래되는 것으로 알려져 있다(1-4). 일반적으로 생리활성물질의 효율적 생산 및 분리공정은 방선균 균주개발과 밀접한 관련이 있는데, 그 이유는 대부분의 방선균 유래 이차대사산물의 생산성이 방선균 균주개발을 포함한 배양조건 최적화와 밀접하게 연관되어 있기 때문으로 알려져 있다(5, 6). 특히 최근 폴리케타이드계 생리활성물질 생합성 유전자들의 유전공학적인 변형 및 치환으로 가능해진 하이브리드 항생제 생산기술에 의한 신약개발

가능성으로 말미암아 방선균 균주개발기술의 중요성이 더욱 증가하고 있는 실정이다(7-10). 따라서 다양한 방선균 균주개발 기법을 통한 특정 유용 생리활성물질의 효율적 생산기술은 고부가가치 산업인 21C 바이오산업의 핵심기술로 인식되고 있다.

현재 유전체 해독이 완료된 방선균 *S. coelicolor*에서 규명된 폴리케타이드 생합성 조절 유전자들의 경우, 다양한 분자생물학적 연구기법을 통해 산업적으로 유용한 여러 방선균에서도 유사한 조절기작이 존재함이 확인되었다(11). 따라서 생합성 조절기작은 *S. coelicolor*와 같은 특정 방선균에만 국한된 것이 아니라, 대부분의 방선균 유래 폴리케타이드 생합성에도 적용되는 일반적인 조절 기작으로 추정되며, 이와 같은 사실은 조절 유전자의 유전공학적인 기법을 이용한 특정 유용 생리활성 물질의 생산성 향상에 성공적으로 적용되었다(12). 하지만 현재까지 산업적으로 유용한 방선균 유래 조절유전자를 이용한 고생산성 균주 개발 시도는 매우 부족한 실정인데, 그 이유는 우선 유용 방선균에 관한 분자생물학적 기법

† Corresponding Author : Division of Chemical Engineering and Biotechnology, Inha University, Incheon 402-751, Korea  
Tel : +82-32-860-8318 Fax : +82-32-872-4046  
E-mail : eungsoo@inha.ac.kr

이 정립되지 않았고, 또한 고생산성 방선균 균주가 대부분 반복적 돌연변이로 인하여 유전적으로 매우 불안정하여 유전자 변형을 시도하는 과정에서 생산성의 현격한 감소가 발생하기 때문에 추정되고 있다(13, 14). 따라서 현재까지도 무작위 돌연변이체 검색을 통한 고생산성 방선균 균주개발 방법이 가장 보편적으로 사용되고 있는 실정이다(15).

대표적인 고부가가치 항암제인 독소루비신 (doxorubicin)은 방선균 *Streptomyces peucetius*가 생산하는 폴리케타이드계 (polyketide) anthracycline 화합물로서, 생합성 조절기작이 세포의 배양상태에 의해 조절을 받는다는 사실로부터 생산균주의 반복적인 돌연변이 방법에 의한 고생산성 균주의 개발 및 발효조건 최적화시도가 꾸준히 진행되고 있다(16). 하지만 이와 같은 전통적인 균주개발 방법은 균주 유전체의 분자생물학적 특성을 고려하지 않고 단지 경험적으로 반복 수행되는 단점으로 인해 독소루비신 생산성 향상에 한계를 드러내고 있으며, 또한 독소루비신과 구조적으로 유사한 대사산물들의 동반 생성으로 인한 분리공정의 어려움을 초래하고 있다(17). 따라서 보다 획기적으로 독소루비신의 생산성을 최적화하기 위해서는 기존의 균주개발 방법의 단점을 극복하는 새로운 개념의 방선균 균주개발 방법이 절실하게 요구되고 있다. 최근 발표된 방선균 유전체 연구결과, 그램 양성 세균인 방선균은 세포벽이 제거된 원형질체 상태의 인위적 유도 및 세포벽 재생으로도 유전적 변이를 포함한 돌연변이체가 생성된다고 밝혀졌으며, *Streptomyces peucetius* var. *caesius*의 원형질체 도입과 세포벽 재생을 통한 균주 선별에서도 독소루비신의 생산성이 증가한 연구결과가 보고된 바 있다(18). 따라서 본 연구에서는 인위적 원형질체 도입과 세포벽 재생을 통한 새로운 개념의 방선균 균주개발 방법을 제시하고, 이를 이용한 독소루비신 고생산성 균주개발의 가능성을 제시하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 독소루비신 생산균주 *S. peucetius*의 배양

본 연구에서는 이미 반복적인 돌연변이 방법으로 개발된 독소루비신 고생산성 산업균주 (BR-Dox이라 명명함)를 이용하였다. 독소루비신 생산을 위한 BR-Dox 배양조건은, 20% glycerol stock으로 -20℃에 보관된 BR-Dox 균주를 25 ml의 seed 배지 (complex medium supplied by Boryung Pharmaceutical Co.)에 접종하여 72 시간 동안 30℃, 250 rpm 조건하에서 진탕 배양한 후, 15 ml의 main 배지 (complex medium supplied by Boryung Pharmaceutical Co.)로 seed 배양액 0.75 ml를 옮겨 접종하여 7일 동안 배양하였다. BR-Dox의 분자유전학적 균주개발을 위하여, R2YE 배지 (sucrose 103 g; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250 mg; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 10.12 g; glucose 10 g; casamino acid 100 mg; yeast extract 5 g; N-Tris (hydroxymethyl)-2-aminoethane-sulfonic acid (TES) 5.73 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mg; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 14.702 g; NaOH 1.4 g; L-proline 1.5 g; trace element solution (ZnCl<sub>2</sub> 40 mg; FeCl<sub>3</sub> · 6H<sub>2</sub>O 200 mg; CuCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 10 mg; MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O 10 mg; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10H<sub>2</sub>O 10 mg; (NH<sub>4</sub>)Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 4H<sub>2</sub>O 10 mg; H<sub>2</sub>O 1,000 ml) 2 ml; H<sub>2</sub>O 1,000 ml)와 2 CM 배지 (corn starch

10 g; NaCl 1 g; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1 g; CaCO<sub>3</sub> 2 g; MgSO<sub>4</sub> 2 g; tryptone 2 g; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 mg; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 1 mg; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 mg; H<sub>2</sub>O 1,000 ml)를 추가적으로 사용하였다(19).

### TLC 및 HPLC를 이용한 독소루비신의 정성 및 정량분석

Thin-Layer Chromatography (TLC) 분석으로 BR-Dox의 독소루비신 생산의 정성분석을 수행하였으며, 배양액의 일정량을 취해 pH 8.5로 맞추고 1 ml을 취하여 추출액 (Chloroform : Methanol = 9 : 1) 1 ml과 섞어 교반한 후 원심 분리하여 바닥의 유기용매층만을 취하여 용매를 증발시킨 후 50 µl의 methanol에 재현탁하였다(20). 추출액 시료 4 µl를 silica gel (Aldrich Co., Milwaukee, USA)에 집적하여 전개용매 (chloroform : methanol : acetic acid : water = 80 : 20 : 16 : 6)로 전개하고 건조시킨 후 UV light (365 nm)에서 형광을 나타내는 독소루비신을 확인하였다(21). BR-Dox의 독소루비신 생산의 정량분석은 C-18 reverse phase (250×4.6 mm) column (Waters, Ireland)을 사용하여 high-performance liquid chromatography (HPLC)로 분석하였다. 추출조건은 배양액의 일정량을 취하여 1 vol.의 추출액 (Iso-propyl alcohol : 30% HCl = 50 : 1)을 섞고 30분 교반한 후 15,000 rpm에서 10 min 원심 분리하여 상등액만을 취하여 acetonitrile/water (1 : 1 v/v) 혼합액에 sodium (lauryl) sulfate (1.327 g/L)와 phosphoric acid (0.68 ml/L)를 섞어 mobile phase로 사용하였고, 유속은 1 ml/min로 column 온도는 상온으로 유지하여 UV detector로 254 nm에서 독소루비신의 생산량을 정량분석하였다.

### 방선균의 원형질체 도입 및 세포벽 재생

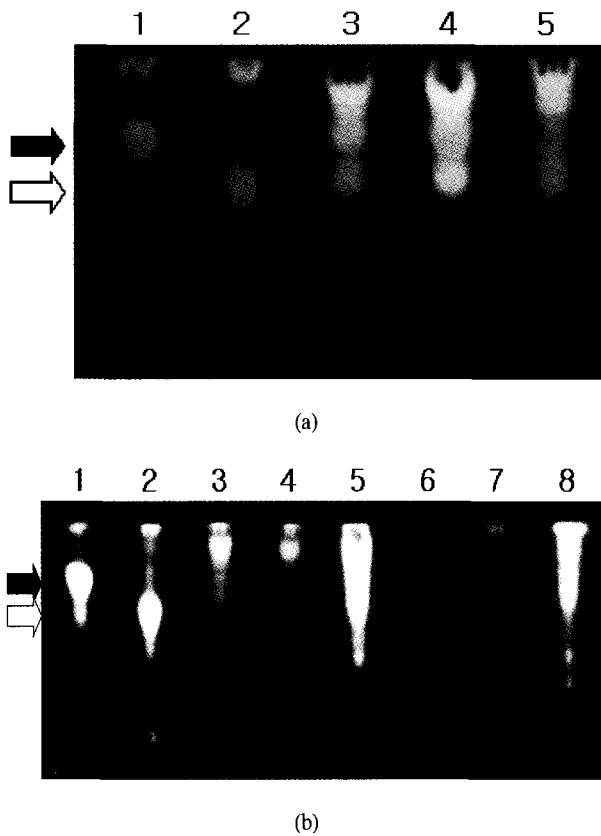
방선균 BR-Dox를 0.2% CaCO<sub>3</sub>가 첨가한 R2YE 배지에서 30℃, 200 rpm에서 40 시간 배양하여 원심분리 (8000 rpm, 5 분)로 세포를 얻어낸 후, 10.3% sucrose 용액으로 2회 세척하여 배지성분을 제거하고 P buffer (sucrose 103 g; K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 250 mg; MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O 2.02 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mg; CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O 368 mg; MOPS(pH 7.2) 573 mg; H<sub>2</sub>O 1,000 ml)에 lysozyme을 1 mg/ml 되게 하여 만든 lysozyme solution 5 ml을 넣고 30℃에서 1 시간 처리하였다. 이어서 숨이 들어간 주사기로 원형질체만을 걸러내고 5 ml의 P buffer로 두번 세척하여 정제된 원형질체만을 얻어내었다. 원형질체는 남은 buffer drop으로 재현탁 하였으며, 25% PEG1000 (Sigma Co., St. Louis, USA)과 P buffer를 각각 500 µl 넣어주어 1분간 상온에서 정제한 후 300 µl씩 R2YE 배지에 도말하였다.

## 결과 및 고찰

### 방선균 BR-Dox 균주에 의한 독소루비신 생산

방선균 BR-Dox의 독소루비신 생산능력을 검증하기 위하여 4일동안 진탕배양실험으로부터 배양액을 추출하여 TLC로 분석하였다(Fig. 1). BR-Dox는 배양시 독소루비신과 이의 전구체인 다나루비신 (daunorubicin)을 비슷한 정도로 생산하였으며, 독소루비신을 생산한다고 보고된 야생균주 (e.g. *S. peucetius* ATCC29050, ATCC27952)

와 비교하여 월등히 우수한 생산성을 확인할 수 있었으며(Fig. 1b), 2 CM 배지에서 배양하여 비교한 HPLC 분석에서도 월등히 우수한 생산성을 나타내었다(Fig. 2). 또한 Fig. 1에서 볼 수 있듯이, seed 배지 및 main 배지에서는 독소루비신과 다나루비신이 거의 비슷한 정도로 생산되는 반면, 2 CM 배지에서 배양하였을 경우 다나루비신의 생산능력이 현저히 감소되고 독소루비신만이 특이적으로 생산하는 것으로 관찰되었다. 이는 BR-Dox의 경우 배양조건에 따라 독소루비신 생합성이 매우 민감하게 조절됨을 암시하고 있다.

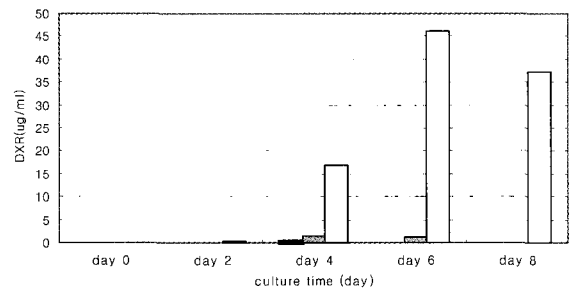


**Figure 1.** The BR-Dox products were compared to authentic standards run in parallel on TLC plate. (A) lane 1, daurorubicin standard; lane 2, doxorubicin standard; lane 3, BR-Dox culture in seed media; lane 4, BR-Dox culture in main media; lane 5, BR-Dox culture in 2CM media. (B) lane 1, daurorubicin standard; lane 2, doxorubicin standard; lane 3, ATCC29050 culture in seed media; lane 4, ATCC27952 culture in seed media; lane 5, BR-Dox in seed media; lane 6, ATCC29050 in 2 CM media; lane 7, ATCC27952 in 2 CM media, lane 8, BR-Dox in 2 CM media. (■) Daurorubicin standard, (□) Doxorubicin standard.

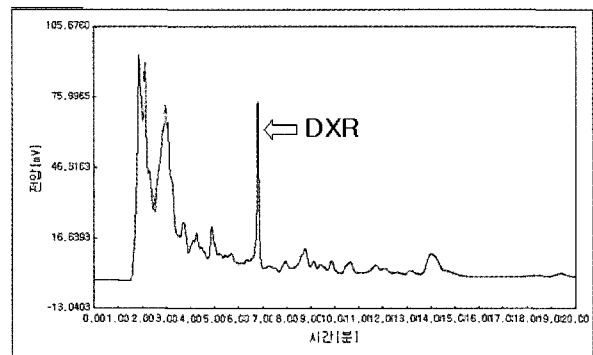
**방선균 BR-Dox의 원형질체 재생에 의한 독소루비신 고생산성 균주 선별**

그럼 양성 세균인 방선균은 세포벽이 제거된 원형질체 상태의 인위적 유도 및 세포벽 재생 (protoplast regeneration)으로도 유전적 변형을 포함한 돌연변이가 생성된다. 특히, 반복적인 돌연변이가 과정을 통해 선별되어 유전적으로 매우 불안정한 산업균주의 경우에는 단순한 원형질체 재생 방법만으로도 쉽게 추가적인 돌연변이가 유도되리라 예상되었다. 따라서 본 연구에

서는 BR-Dox의 인위적인 원형질체 재생을 유도함으로써, 독소루비신 생산성이 향상된 고생산성 균주를 선별하고자 하였다. 그러나 BR-Dox의 경우 원형질체 유도를 위해 세포만을 얻어내기 위하여 맑은 배지를 사용할 필요성이 있었으며, 이때 사용한 배지는 *streptomyces* spp.의 regeneration이 용이한 R2YE 배지를 사용하였다. BR-Dox의 경우 잘 알려진 *S. lividans* TK21에 비하여 증식속도가 상대적으로 낮아 실험을 수행하기 충분한 양의 세포를 얻기 위하여 2 CM 배지의 각 성분별로 R2YE에 첨가하여 배양하였다. 3일간의 배양 결과 CaCO<sub>3</sub> 0.2 %가 R2YE 배지에 첨가되었을 때 BR-Dox가 가장 잘 성장했으며, 세포가 pellet을 형성하지 않고 작아 원형질체 유도를 위한 세포포집에 적합한 것으로 예상되었다. K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.1 %가 R2YE 배지에 첨가되었을 때 역시 BR-Dox가 잘 자라기는 했지만 세포가 pellet을 이루어 원형질체 유도에는 부적합하다고 예상되었으며, 그 외의 2 CM 배지의 각 성분들은 세포의 증식이 증가하는 경향을 보이지는 않았다(data not shown). 이는 glucose가 포함된 배지에서 배양 중 생기는 유기산에 의해 일어나는 산성도를 CaCO<sub>3</sub>가 buffer로 작용하여 배지 내 pH의 변화를 억제했기 때문으로 사료된다(22). BR-Dox 균주의 인위적인 원형질체 도입 및 세포벽 재생 과정을 거쳐 형성된 파생 균주들을 2 CM 고체배지에 도말하여 3일간 배양한 후, 이중 특이적으로 독소루비신으로 추정되는 붉은 색의 색소를 많이 내는 콜로니 6개를 선별하여 BR-Dox1, BR-Dox2, BR-Dox3, BR-Dox4, BR-Dox5, BR-Dox6이라 명명하였다.



(a)



(b)

**Figure 2.** (A) Doxorubicin production from *S. peucetius* ATCC29050 (■), *S. peucetius* var. *casius* ATCC27952 (▨), and BR-Dox (□). (B) HPLC analysis of doxorubicin production by the BR-Dox strains. The arrow indicates doxorubicin (DXR).

### 원형질체 재생된 방선균 BR-Dox 파생균주들의 독소루비신 생산

방선균 BR-Dox 및 6개의 파생 균주들을 seed 배지에서 4일 배양 후 추출하여 TLC로 분석한 결과, BR-Dox4와 BR-Dox6의 경우가 BR-Dox보다 독소루비신의 spot이 진한 것으로 보아 정성적으로 독소루비신의 생산성이 증가한 것으로 예측되었다(Fig. 3). 독소루비신의 생산성을 보다 정량적으로 비교하기 위하여, 각각의 균주를 seed 배지에서 main 배지까지 배양한 후 doxorubicin의 생산성을 HPLC로 분석하였다. 비록 BR-Dox1, BR-Dox3, BR-Dox5는 독소루비신 생산성이 크게 증가하지 않았으나, BR-Dox2는 6.4%, BR-Dox4은 25.2%, BR-Dox6는 12.2%의 독소루비신 생산성이 증가함을 볼 수 있었다(Table 1). 4일간의 seed 배양액을 추출한 TLC 분석결과(Fig. 3)와 main 배양액을 추출한 HPLC 분석결과(Table 1)를 비교해 보면 BR-Dox4와 BR-Dox6은 TLC 분석에서의 예상대로 HPLC 분석에서도 BR-Dox에 비해 독소루비신의 생산성이 증가한 패턴을 보였다. 반면 BR-Dox2의 경우 BR-Dox에 비해 TLC 분석에서 독소루비신 spot의 진하기 및 크기가 작아 생산성이 감소된 것으로 해석하였으나 HPLC 분석에서는 BR-Dox2의 독소루비신 생산성이 증가된 것을 확인할 수 있었으며, 이러한 차이점은 TLC 분석을 위해 seed 배지에서 BR-Dox2를 배양하였을 때 독소루비신 생산성의 재현성이 일관되게 나타나지 않았던 것으로 추측되었다. 결론적으로 방선균 원형질체 재생 과정을 거친 6개의 파생균주 중에서 4일간의 seed 배양 및 TLC 분석결과를 통해 BR-Dox보다는 높은 생산성을 지닌 독소루비신 고 생산성 균주를 효과적으로 선별할 수 있었다. 따라서 이와 같은 원형질체 재생 방법은 BR-Dox와 같이 반복적 돌연변이 방법으로 선별된 균주에도 추가적인 생산성 향상을 유도할 수 있는 매우 효과적인 균주개발 방법이라 사료되며, 특히 원형질체 재생 및 선별작업을 반복적으로 수행할 경우 더욱 효과적인 생산성 향상을 기대할 수 있으리라 예상된다.

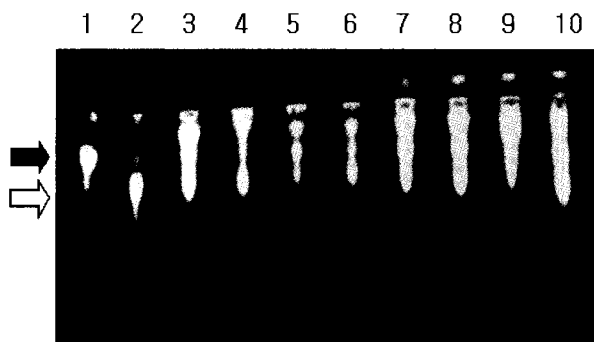


Figure 3. The BR-Dox products were compared to authentic standards run in parallel on TLC plate. lane 1, daunorubicin standard; lane 2, doxorubicin standard; lane 3, BR-Dox culture in seed media; lane 4, BR-Dox culture in 2CM media; lane 5, BR-Dox1 culture in seed media; lane 6, BR-Dox2 culture in seed media; lane 7, culture in seed media; BR-Dox3, lane 8, BR-Dox4 culture in seed media; lane 9, BR-Dox5 culture in seed media; lane 10, BR-Dox6 culture in seed media. (■) Daunorubicin standard, (□) Doxorubicin standard.

Table 1. Doxorubicin titers of BR-Dox, BR-Dox1, BR-Dox2, BR-Dox3, BR-Dox4, BR-Dox5, BR-Dox6

Protoplast-regenerated <i>Streptomyces</i> BR-Dox strains	Relative doxorubicin productivity (%)
BR-Dox (parental strain)	100.0
BR-Dox1	26.5
BR-Dox2	106.4
BR-Dox3	69.0
BR-Dox4	125.2
BR-Dox5	2.6
BR-Dox6	112.2

### 요 약

독소루비신 고 생산성 산업균주인 BR-Dox의 충분한 양의 세포를 얻어내기 위해 R2YE 배지를 사용하였으며, 방선균의 포자 형성이 잘 일어나는 2 CM 배지의 각 성분별로 첨가한 결과, CaCO<sub>3</sub>를 첨가하였을 때 인위적인 원형질체 유도에 적합한 양의 세포를 얻어낼 수 있었다. 독소루비신 생합성 능력이 향상된 균주를 선별하기 위해 BR-Dox를 배양하여 세포를 인위적으로 원형질체로 유도하여 세포벽을 재생시킨 결과, 특이적으로 독소루비신 색소로 추정되는 붉은 색을 많이 내는 콜로니를 선별하여 정성 및 정량분석을 수행하였다. 선별된 파생균주 BR-Dox4와 BR-Dox6의 경우 TLC 정성분석 및 HPLC 정량분석 결과, BR-Dox에 비해 각각 25.2%, 12.2%의 생산성이 향상되었다. 본 연구결과는 인위적 원형질체 도입과 세포벽 재생을 통한 새로운 개념의 방선균 균주개발 방법을 제시하고, 이를 이용한 독소루비신 고생산성 균주개발의 가능성을 제시하였다.

### 감 사

본 연구는 인하대학교 2003년 초정밀생물분리기술연구센터(ERC)의 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

### REFERENCES

- Berdy, J. (1984), New ways to obtain antibiotics, *Chin. J. Antibiot.* **7**, 272-290.
- Hopwood, D. A., K. F. Chater, J. E. Dowding, and A. Vvian (1973), Advances in *Streptomyces coelicolor* genetics, *Bacteriol. Rev.* **37**, 371-405.
- Kalakoutskii, L. V. and N. S. Agre (1976), Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes, *Bacteriol. Rev.* **40**, 469-524.
- Peggy, A. R., P. A. Mcann, M. A. Pentella and B. M. pogell (1979), Simultaneous loss of multiple differentiated functions in aerial mycelium-negative isolates of *Streptomyces*, *J. Bacteriol.* **137**, 891-899.
- Aikawa, M., S. A. R. Lopes-Shikida, M. F. Lemos, J. G. C. Pradella, and G. Padiilla (1999), Screening of spontaneous and induced mutants in *Streptomyces avermitilis* enhances avermectin production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 558-562.
- McGuire, J. C., G. Glotfelty, and R. J. White (1980), Use of cerulenin in strain improvement of the daunorubicin fermentation, *FEMS Microbiol Lett.* **9**, 141-143.
- Katz, L. (1997), Manipulation of modular polyketide synthase,

- Chem. Rev.* **97**, 2557-2575.
8. Khosla, C. (1997), Harnessing the biosynthetic potential of modular polyketide synthase, *Chem. Rev.* **97**, 2577-2590.
  9. Tang, L., H. Fu, and R. McDaniel (2000), Formation of functional heterologous complexes using subunits from the picromycin, erythromycin and oleandomycin polyketide synthases, *Chem. Biol.* **7**, 77-84.
  10. McDaniel, R., A. Thamchaipenet, C. Gustafsson, H. Fu, M. Betlach, and G. Ashley (1999), Multiple genetic modifications of the erythromycin polyketide synthase to produce a library of novel "unnatural" natural products, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 1846-1851.
  11. Champness, W. C. and K. F. Chater (1994), Regulation and integration of antibiotic production and morphological differentiation in *Streptomyces* spp, In *regulation of bacterial differentiation*, P. Piggot, C. P. Moran, and P. Youngman eds.; Proc. American Society for Microbiology 1994, Washington, D.C., 61-93.
  12. Lee, J. Y., Y. S. Hwang, S. S. Kim, E. S. Kim, and C. Y. Choi (2000), Effect of a global regulatory gene, *afsR2*, from *Streptomyces lividans* on avermectin production in *Streptomyces avermitilis*, *J. Biosci. Bioeng.* **89**, 606-608.
  13. Hwang, Y. S., J. Y. Lee., E. S. Kim, and C. Y. Choi (2001), Optimization of transformation procedures in avermectin high-producing *Streptomyces avermitilis*, *Biotechnol. Lett.* **23**, 457-462.
  14. Volf, J. N. and J. Altenbuchner (1998), Genetic instability of the *Streptomyces* chromosome, *Mol. Microbiol.* **27**, 239-246.
  15. Aikawa, M., S. A. R. Lopes-Shikida, M. F. Lemos, J. G. C. Pradella, and G. Padilla (1999), Screening of spontaneous and induced mutants in *Streptomyces avermitilis* enhances avermectin production, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 558-562.
  16. Vetrivel, K. S. and K. Dharmalingam (2001), Isolation and characterization of stable mutants of *Streptomyces peucetius* defective in daunorubicin biosynthesis, *J. Genet.* **80**, 31-38.
  17. Nicholls, G., B. J. Clark, and J. E. Brown (1992), Solid-phase extraction and optimized separation of doxorubicin, epirubicin and their metabolites using reversed-phase high-performance liquid chromatography, *J. Pharm. Biomed. Anal.* **10**, 949-957
  18. Krasil'nikova, O. L., L. N. Anisova, N. B. Romanova, and IuE. Bartoshevich, (1988), Use of a protoplasting method for altering the qualitative and quantitative composition of the anthracycline complex in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, *Antibiot. Khimioter.* **33**, 483-486.
  19. Kang, M. J., J. K. Kang, and E. S. Kim (1999), Isolation and characterization of soil *Streptomyces* involved in 2,4-dichlorophenol oxidation, *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 877-880.
  20. Dickens, M. L. and W. R. Strohl (1996), Isolation and characterization of a gene from *Streptomyces* sp. strain C5 that confers on *Streptomyces lividans* TK24 the ability to convert daunomycin to doxorubicin, *J. Bacteriol.* **178**, 3389-3395.
  21. Dickens, M. L., N. D. Priesley, and W. R. Strohl (1997), In Vivo and In Vitro Bioconversion of e-Rhomomycinone Glycoside to Doxorubicin: Functions of DauP, DauK, and DoxA, *J. Bacteriol.* **179**, 2641-2650.
  22. Escalante, L., I. Ramos, I. Imriskova, E. Langley, and S. Sanchez (1999), Glucose repression of anthracycline formation in *Streptomyces peucetius* var. *caesius*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 572-578.