

이종간 원형질체 융합을 이용한 acetaminophen 생산균주 개량

손여원* · 정대영 · 이상섭* · 민홍기

국립보건원 생물공학과, *서울대학교 약학대학

(Received July 5, 1994)

Strain Improvement by Interspecific Protoplast Fusion of *Streptomyces griseus* and *Streptomyces hygroscopicus* producing Acetaminophen

Yeowon Sohn*, Daeyoung Jung, Sangsup Lee* and Hongki Min

National Institute of Health, Seoul 122-020, Korea

*College of Pharmacy, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

Abstract—Acetaminophen, a widely used analgesic, can be formed by N-acetylation and *p*-hydroxylation of aniline. Interspecific protoplast fusion technique was used to get acetaminophen directly from aniline and to increase the productivity of acetaminophen. Three auxotrophic mutants were obtained from *S. griseus*(ATCC 13273) and *S. hygroscopicus*(KCTC 1089) by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG) treatment. Regeneration frequencies of *S. griseus*(his⁻), *S. griseus*(lys⁻), *S. hygroscopicus*(arg⁻) were 42%, 45%, and 31%, respectively. Fusion of protoplasts carrying different auxotrophic markers was achieved by treatment with polyethylene glycol. When protoplasts were treated with 50% polyethylene glycol for 3 minutes, the fusion frequency between *S. griseus*(his⁻) and *S. hygroscopicus*(arg⁻) was 3.8×10^{-5} . The fusion frequency between *S. griseus*(lys⁻) and *S. hygroscopicus*(arg⁻) was 5.6×10^{-4} . When we checked the production of acetaminophen, thirty-four out of the fifty-six fusants produced larger amounts of acetaminophen than the parent strains did. Nine fusants produced twice more and twenty-five fusants produced one to two times more of acetaminophen than their parents.

Keywords □ Interspecific protoplast fusion, acetaminophen, protoplast formation, protoplast regeneration

산업미생물로서 *Streptomyces*는 대부분의 항생물질을 생산할 뿐 아니라 항암물질, 면역억제제, 면역상승제 등과 같은 생리활성물질 및 다양한 특수 효소의 생산균으로 그 활용 가치가 매우 크다.¹⁾ 미생물 전환 반응에 있어서 *Streptomyces*는 일반적으로 기질 특이성이 매우 크고 효소의 안정성이 높아 작용 기작 연구 및 구조 결정 등에 이용되고 있다. 특히 *Streptomyces*의 효소는 전환된 기질을 더 이상 분해하지 않아 미생물 전환반응을 이용하여 원하는 유기화합물을 얻고자 할 때 *Pseudomonas*나 다른 미생물에 비해 유용하다.²⁾ 원형질체 융합은 균주개량·생산성 향상, 신물질 개발에 유용한 기술로 *Streptomyces* spp. 균주에서의 동종간 원형질체 융합은 생산성 향상이나 유*

*본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로

전연구의 목적으로 많이 시행되고 있다.^{3,4)} 이종간 원형질체 융합은 각 균주내 존재하는 restriction modification system으로 인하여 융합빈도가 낮고 융합 후의 안정성이 낮아 실제 이용에 어려움이 있으나 새로운 항생물질 개발의 목적으로 이종간 원형질체 융합이 시도되고 있다.^{5,6)}

Acetaminophen은 널리 이용되는 해열진통제로 aniline의 N-acetylation, *p*-hydroxylation을 통해 얻을 수 있으므로(Fig. 1) 각각의 활성이 높은 균주를 융합시키면 aniline에서 바로 acetaminophen 생산이 가능하다. 본 연구에서는 이종간 원형질체 융합을 이용하여 acetaminophen을 생산하는 우량균주를 얻고자 방선균 중 *p*-hydroxylation 활성이 큰 *Streptomyces griseus*(ATCC 13273)와 N-acetylation 활성이 큰 *St*

reptomyces hygroscopicus(KCTC 1089)균주의 종간 용합을 시도하였다.

실험방법

사용균주—본 실험에서 사용한 균주는 *p-hydroxylation*의 활성이 큰 *S. griseus*(ATCC 13273)와 *N-acetylation*의 활성이 큰 *S. hygroscopicus*(KCTC 1089)이다.

시약—Yeast extract, Bacto peptone, casamino acid, dextrose, Bacto agar, Soybean flour는 Difco의 제품을 사용하였고 NTG는 Fluka것을, lysozyme(52,000 units/mg protein), PEG, triton X-100, aniline 등은 Sigma제품을 사용하였으며 기타 모든 시약은 특급품을 사용하였다.

배지—균주보관과 포자 형성에는 sporulation agar slant medium(ATCC medium 5)을 사용하였고, mutagenesis와 auxotroph 선별⁷⁾에는 완전배지(yeast extract 1.0 g/l, Bacto peptone 2.0 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/l, NaCl 0.5 g/l, K₂HPO₄ 5.0 g/l, casamino acid 1.5 g/l, glucose 25.0 g/l, yeast nucleic acid hydrolysate 5.0 ml/l, vitamin solution 1.0 ml/l, agar 20.0 g/l, pH 7.2)와 최소배지(asparagine 0.5 g/l, K₂HPO₄ 0.5 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.2 g/l, FeSO₄·7H₂O 0.01 g/l, glucose 10.0 g/l, agar 20.0 g/l, pH 7.0~7.2)를 사용하였다. 또 각 균주의 *p-hydroxylation* 및 *N-acetylation*활성을 조사하는데는 Theriault's screening medium(dextrose 50.0 g/l, soybean flour 5.0 g/l, yeast extract 5.0 g/l, NaCl 5.0 g/l, KH₂PO₄ 1.0 g/l, K₂HPO₄ 2.0 g/l, pH 7.0)이 사용되었다. 균사체 배양에는 glycine을 함유한 S배지(dextrose 10.0 g/l, peptone 4.0 g/l, yeast extract 4.0 g/l, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/l, KH₂PO₄ 2.0 g/l, K₂HPO₄ 4.0 g/l)를 사용하였으며 원형질체 형성 및 회석에는 P 완충액을, 세포벽 재생에는 R₂배지를 사용하였다.⁸⁾

돌연변이 유발 및 영양요구주의 선별—Sporulation agar medium에 접종하여 28°C에서 2주간 배양한 후 0.05%(v/v) triton X-100용액을 가하여 포자용액을 얻은 후, 용액에 있는 균사체로부터 포자를 얻기 위해 sonication하고 솜으로 여과하였다. 거른 포자용액을 1,000×g에서 10분간 원심분리한 후 0.1M Tris-maleic acid(TM) buffer(pH 7.0)로 세척하고 0.1M TM

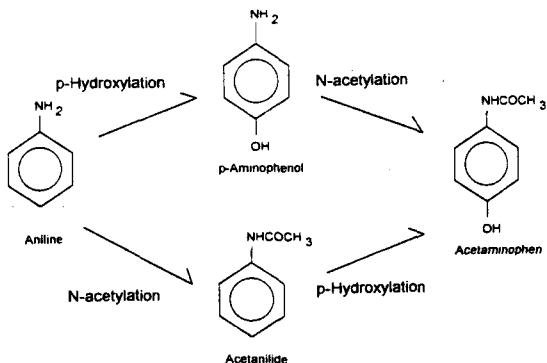


Fig. 1—A possible biotransformation pathway.

buffer(pH 9.0)에 녹인 3 mg/ml의 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)을 가하여 30°C, 120분간 진탕하였다. 0.1M sodium phosphate buffer(pH 7.0)로 3회 세척하고 적당하게 회석하여 완전배지에 도말하였다. 완전배지에서 자란 colony를 최소배지에 replica plating하여 최소배지에서 자라지 않는 영양 요구성 돌연변이주를 분리하였다. 이들 auxotroph의 영양요구물질을 밝혀내기 위해 auxonography method를 사용하였다.

원형질체 생성—원형질체 생성과정은 Hopwood가 사용^{9,10)}한 방법의 일부를 변경하였다. S배지에 균을 접종하여 28°C에서 48시간 배양한 후 sonication하여 균질화 시킨 후 glycine첨가 S배지에서 배양하였다. 적당시간 배양한 배양액을 10 mL취하여 0.3M sucrose용액으로 씻고, 원심분리(1,500×g, 10 min)하고 그 pellet에 lysozyme용액 2 mL을 가하여 32°C에서 30~90분간 진탕배양하였다. 원형질체가 완전히 형성된 후 4 mL의 P완충액을 가하고 up-down pipetting을 여러번하고 솜으로 여과하여 미반응 균사체를 제거한 후 여과액을 냉각시킨 P완충액으로 2번씻고 원심분리(1,000×g, 8 min)하였다. 원형질체의 수를 세는데는 hemocytometer를 사용하였다.

원형질체 재생—원형질체 용액을 P완충액으로 회석하여 0.1 mL중에 200개 정도로 혼탁되게 하였다. 대조군으로는 멸균증류수로 회석하여 사용하였다. 재생배지로는 미리 건조시킨 Okanish¹¹⁾ R₂배지를 사용하였고 28°C에서 colony가 더이상 생기지 않을때까지 배양하였다. 재생빈도는 다음과 같이 구하였다.

재생빈도(%)=(P buffer로 회석하여 재생시킨 colony수 - 멸균수로 회석하여 재생시킨 colony수)÷ 각

plate당 접종한 protoplast의 수) × 100

원형질체 융합—두 auxotroph의 원형질체를 최소 재생배지에 각각 접종하여 back mutation을 확인하는 한편, 융합을 수행하기 위해 두 auxotroph의 원형질체($10^7 \sim 10^8$ protoplasts/ml)를 동량 섞어서 원심분리(1,000×g, 10 min)하여 상등액을 따라내고 이 pellet을 혼탁한 후 적당한 polyethylene glycol(PEG)-용액 0.9 ml을 가하여 30°C에서 3분간 반응시킨 후 4 ml의 P완충액을 가하고 원심분리(1,000×g, 10 min)하여 PEG작용을 중지시켰다. P완충액을 0.2 ml 가한 후 적당히 회석하여 R_2 배지 및 최소재생배지에 0.1 ml씩 접종하고 29°C에서 배양하여 2일 간격으로 colony수를 세었다. 융합빈도는 다음과 같이 계산하였다.

Fusion frequency = (The number of prototrophic colonies grown on R_2 minimal medium) ÷ (The number of colonies grown on R_2 complete medium)

융합균주의 활성검색—융합균주의 활성조사를 위해 최소배지에서 완전히 성장한 colony를 Theriault's screening 배지에 접종하여 48시간 배양하고 이를 새로운 Theriault's screening 배지에 옮겨 48시간 더 배양한 후 aniline을 기질로 가하고 5일간 더 배양하였다. 일정량의 배양액을 취하여 pH를 7로 맞추고 동량의 ethyl acetate로 추출하여 증발건조시키고 그 잔사에 대하여 비색정량으로 acetaminophen 생성량을 측정하였다.

비색법에 의한 acetaminophen의 정량—발색시약으로는 2-nitroso-1-naphthol-4-sulfonic acid(NNS)와 trichloroacetic acid(TCA)를 각각 250 mg/l, 100 g/l의 농도로 조제하여 혼합한 것을 A시액, NaNO₂를 1 g/l 농도로 조제한 것을 B시액으로 사용하였다. 증발 건조한 잔사를 100 μl methanol에 녹여 900 μl screening 배지를 가하여 1 ml로 하고 여기에 A시액 2ml를 가하여 vortex하여 혼합한 후, 1,500×g에서 10분간 원심분리하여 상층액 1.8 ml을 취하고 여기에 0.2 ml의 B시액을 가하고 상온중에 15~30분간 방치하여 530 nm에서 흡광도를 측정하였다.¹²⁾ 검량선 작성是为了 acetaminophen을 4.8, 6.4, 8, 16, 24, 32, 40 μg/ml(100 μl methanol + 900 μl screening 배지)로 준비하여 동일하게 시행하였다.

실험결과

Table I—Mutant strains of *Streptomyces* spp. used in this experiment

Strain ^a	Genotype ^b	Source
<i>Streptomyces griseus</i>	prototroph	ATCC13273
SG1	his ⁻	ATCC13273
SG2	lys ⁻	ATCC13273
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	prototroph	KCTC1089
SH	arg ⁻	KCTC1089

^a*Streptomyces* mutants were prepared by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine mutagenesis using spores.

^bAbbreviation: arg, arginine; his, histidine; lys, lysine.

Table II—Reversion frequency of auxotrophs of *Streptomyces* spp.

Strain	Reversion frequency ^a
<i>S. griseus</i> (his ⁻)	<1.0×10 ⁻⁸
<i>S. griseus</i> (lys ⁻)	<1.4×10 ⁻⁸
<i>S. hygroscopicus</i> (arg ⁻)	<2.9×10 ⁻⁹

^aReversion frequency = The number of regenerated colonies on R_2 minimal medium/The number of plated protoplasts

영양요구주의 선별—Sporulation agar medium에서 2주간 배양하였을 때 *Streptomyces griseus*, *Streptomyces hygroscopicus* 균주 모두 양호하게 포자를 형성하였다. 융합체를 식별하기 위한 표식(marker)을 붙이기 위하여 각각의 균주에 NTG를 3 mg/ml의 농도로 120분간 반응시켜 영양요구성 변이주를 얻었다. Auxonographic method를 이용하여 *S. griseus*는 histidine과 lysine이 *S. hygroscopicus*는 arginine이 영양요구 물질임을 확인하였다(Table I). 얻은 영양요구주가 원형질체 융합에 사용할 수 있을 정도로 안정한지를 알아보기 위해 prototroph로의 전환율을 조사하였는데 세 영양요구주 모두 10⁻⁸~10⁻⁹정도의 전환율을 갖는 안정한 영양요구주였다(Table II).

원형질체 재생—*S. griseus*는 0.4%의 glycine을 함유하는 S배지에서 48시간 배양하고 1.0 mg/ml lysozyme으로 32°C에서 120분간 처리하여 원형질체를 얻고 이를 재생배지에서 재생시켰을 때 histidine 영양요구주의 재생율은 42%, lysine 영양요구주의 재생율은 45%였다. *S. hygroscopicus*의 경우에는 2.0%의 glycine을 함유하는 S배지에서 48시간 배양후 2.5 mg/ml lysozyme으로 32°C에서 120분간 처리하여 원형질체를 얻고 이를 재생배지에 도말하여 재생시켰을

Table III – Regeneration frequency of *Streptomyces griseus* and *Streptomyces hygroscopicus*

Strain	Regeneration frequency ^a
<i>S. griseus</i> (his ⁻)	42%
<i>S. griseus</i> (lys ⁻)	45%
<i>S. hygroscopicus</i> (arg ⁻)	31%

^aRegeneration frequency(%)=[(The number of regenerated colonies diluted with P buffer)–(The number of regenerated colonies diluted with distilled water)] ÷ (The number of protoplasts per plate)×100

때 arginine영양요구주의 재생율은 31%였다(Table III).

원형질체 융합– 영양요구주의 원형질체를 최소재생배지에 접종하여 back mutation을 확인하였을 때 융합에 사용된 원형질체양인 $10^7\sim 10^8$ protoplasts/ml까지는 야생형으로 전환되지 않았다. *S. griseus* histidine 영양요구주와 *S. hygroscopicus* arginine 영양요구주간의 융합빈도는 10^{-5} 정도였고 *S. griseus* lysine영양요구주와 *S. hygroscopicus* arginine영양요구주간의 융합빈도는 10^{-4} 정도였다. PEG를 처리한 것과 처리하지 않은 것을 비교하였을 때는 PEG처리군이 조금 높은 융합빈도를 나타내었고 PEG분자량의 차이에 따라서는 별다른 차이를 보이지 않았다(Table IV).

배양시간에 따른 acetaminophen 생성량변화– 배양시간에 따른 acetaminophen 생성량 변화를 보기 위해 *S. griseus*와 *S. hygroscopicus* 야생형을 각각 Theriault's screening 배지에 접종하고 48시간 배양 후 acetanilide와 aniline을 기질로 넣어준 후 일정시간 간격으로 배양액을 취하여 acetaminophen 측정량을 측정하였는데 *S. griseus*의 경우는 기질 투여후 120시간에(Fig. 2) acetaminophen 측정량이 최대였고 *S. hygroscopicus*의 경우는 기질 투여후 144시간에 최대였다(Fig. 3).

융합균주의 acetaminophen 생성량 측정–*S. griseus*

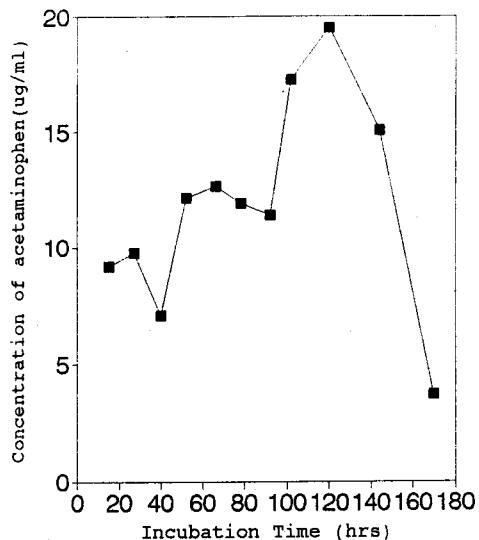


Fig. 2 – Effect of culture time on production of acetaminophen by *S. griseus*. Cultures were grown in Theriault's screening medium, samples were drawn at different time intervals and production of acetaminophen was measured as described in Materials and Methods. Acetanilide was added to the final concentration of 500 μ g/ml.

*seus*와 *S. hygroscopicus*의 acetaminophen 측정이 기질 투여후 120시간과 144시간에 최대였으므로 융합균주에 대해서는 기질투여 후 120시간에 acetaminophen 생성량을 측정하였다. *S. griseus* lysine 영양요구주와 *S. hygroscopicus* arginine 영양요구주간의 융합과 *S. griseus* histidine 영양요구주와 *S. hygroscopicus* arginine 영양요구주간의 융합에서 얻은 56종의 융합체에 대해 조사하였을 때 모균주에 비해 acetaminophen 생성이 감소한 균주도 있었으나 34종의 융합체에 있어서 acetaminophen 생성이 증가하였다(Fig. 4). 검색한 균주 중 9균주는 모균주에 비해 ace-

Table IV – Fusion frequency by protoplast fusion

Cross	without PEG	Fusion frequency ^a	
		PEG 1000	PEG 3350
<i>S. griseus</i> (his ⁻)× <i>S. hygroscopicus</i> (arg ⁻)	5.7×10^{-6}	2.9×10^{-5}	3.8×10^{-5}
<i>S. griseus</i> (lys ⁻)× <i>S. hygroscopicus</i> (arg ⁻)	4.2×10^{-5}	5.6×10^{-4}	5.6×10^{-4}

^aFusion frequency= The number of prototrophic colonies grown on R₂MM/The number of colonies grown on R₂CM

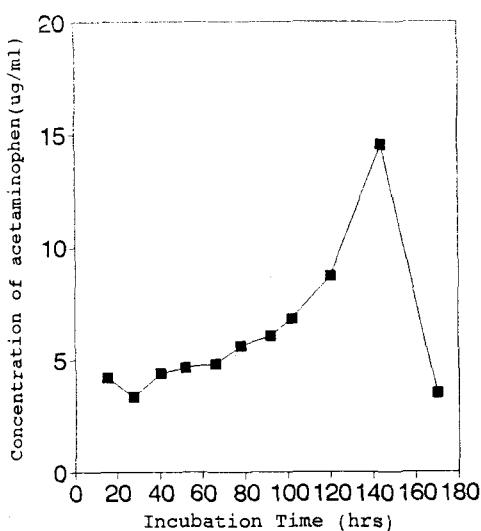


Fig. 3—Effect of culture time on production of acetaminophen by *S. hygroscopicus*. Cultures were grown in Theriault's screening medium, samples were drawn at different time intervals and production of acetaminophen was measured as described in Materials and Methods. Aniline was added to the final concentration of 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

taminophen 생성이 2배 이상 증가하였으며 25균주는 1~2배의 증가를 보였다. 56 융합체 중 1~26은 *S. griseus* lysine 영양요구주와 *S. hygroscopicus* argi-

nine 영양요구주간의 융합에서 얻은 융합체이고 27~56은 *S. griseus* histidine 영양요구주와 *S. hygroscopicus* arginine 영양요구주간의 융합에서 얻은 융합체이다.

고 칠

원형질체 융합기술은 균주 개량의 목적으로 많이 이용되는 기술로 항생물질과 같이 여러 가지 효소 과정의 결과로 생산되는 물질의 경우에는 해당 효소의 유전자를 cloning하여 발현시키는 것보다는 원형질체 융합을 이용하는 것이 바람직하다. 이종간 원형질체 융합을 이용하여 유용물질을 얻기 위해서는 크게 원형질체 형성, 원형질체의 융합 그리고 융합된 원형질체의 세포벽 재생의 3단계를 거쳐야 한다. 본 실험에 사용한 영양요구주는 lysozyme 처리만으로도 $10^{-9}/\text{ml}$ 의 원형질체를 얻을 수 있었고 10% (w/w) 건조시킨 재생배지에서 재생시켰을 때 40% 정도의 재생빈도를 보였다. 영양요구주를 융합시켰을 때 융합빈도는 10^{-5} 정도로 electrofusion에 비하여는 융합빈도가 낮았으나¹³⁾ PEG로 유도한 다른 원형질체 융합과 비슷한 정도의 융합빈도를 보였다.¹⁴⁾

배양시간에 따른 acetaminophen 축적을 보았을 때 120시간, 144시간까지는 서서히 증가하다가 그 이후 급속히 감소하는데 이는 생성된 acetaminophen이

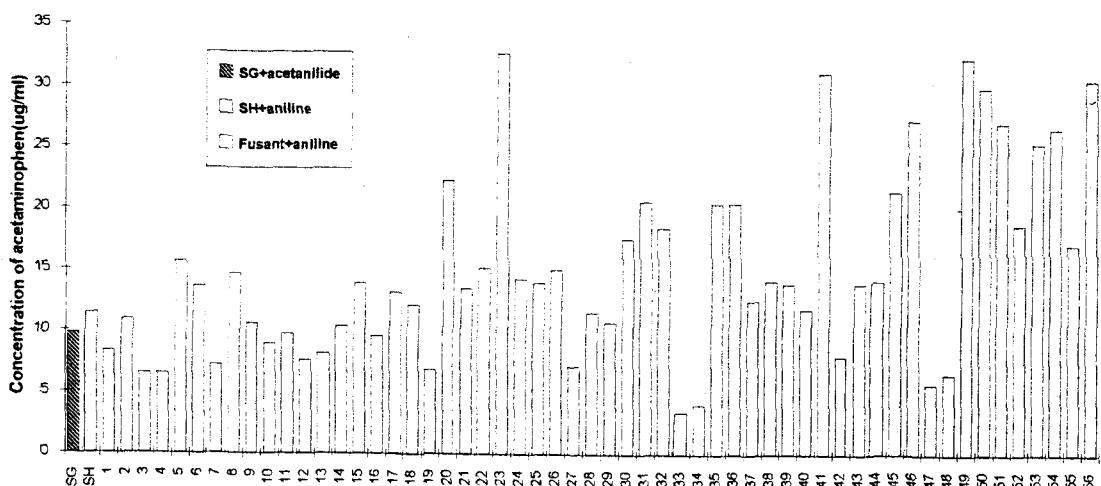


Fig. 4—Production of acetaminophen from fused colonies. Fusants No. 1-26 were obtained from cross of *S. griseus*(lys⁻) and *S. hygroscopicus*(arg⁻). Fusants No. 27-56 were obtained from cross of *S. griseus*(his⁻) and *S. hygroscopicus*(arg⁻).

dioxygenase 등으로 인해 분해되는 것으로 생각된다. 융합체의 acetaminophen생성량을 조사하였을 때 많은 융합체에서 acetaminophen의 생산이 증가하였는데 이것은 각각의 효소 활성이 높은 균주를 융합시킴으로써 한 균주에서 두 가지 효소활성이 높게 발현되는 것에서 기인하는 것으로 이러한 실험결과에서 이종간 원형질체 융합이 균주개량에 유용한 기술임을 알 수 있다.

이러한 *Streptomyces* 균주의 원형질체의 형성과 재생은 원형질체 융합뿐 아니라 DNA를 다른 균주에 도입하는 형질전환(transformation)에도 필요한 과정이다. 최근 신물질 개발 노력의 일환으로 항생제를 생산하는 *Streptomyces* 균주의 원형질체 융합이 많이 시도되는데 이 경우 marker로 영양요구주를 사용하는 것보다 항생제 내성을 이용하는 것이 새로운 항생제 발견의 가능성이 높다고 보고되었으며, 이것은 항생제 내성 유전자와 생산에 관여하는 유전자가 서로 인접하여 위치하기 때문인 것으로 생각된다. 본 연구에 사용된 *S. griseus*와 *S. hygroscopicus*는 각각 chromomycin¹⁵⁾과 angustamycin¹⁶⁾이라는 항생제를 생산하므로 융합체에서의 새로운 유용물질 생산 가능성에 대해서는 더 연구해 볼 필요가 있다.

결 론

해열진통제로 사용되는 acetaminophen을 미생물 전환반응으로 생성하기 위해 이종간 원형질체 융합을 실시하였다. 방선균중 *p*-hydroxylation 활성이 큰 *S. griseus*(ATCC 13273)와 N-acetylation 활성이 큰 *S. hygroscopicus*(KCTC 1089)에 대하여 NTG를 처리하여 *S. griseus*의 histidine 영양요구주와 lysine 영양요구주를 얻고 *S. hygroscopicus*는 arginine 영양요구주를 얻었다. *S. griseus* histidine 영양요구주의 재생빈도는 42%, lysine 영양요구주는 45%였으며 *S. hygroscopicus*의 arginine영양요구주는 31%였다. *S. griseus* histidine영양요구주와 *S. hygroscopicus* arginine영양요구주의 원형질체를 얻어 50% PEG 3350을 처리하였을 때 이종간원형질체 융합빈도는 3.8×10^{-5} 이었고 *S. griseus* lysine 영양요구주와 *S. hygroscopicus* arginine 영양요구주간의 이종간 원형질체 융합빈도는 5.6×10^{-4} 이었다. *S. griseus*와 *S. hygroscopicus*의 이종간 원형질체 융합의 결과로 acetami-

nophen생산성이 향상된 융합체를 얻을 수 있었는데 56종의 융합체 중 34종의 융합체가 모균주에 비해 acetaminophen생산성이 증가하였으며 그중 9균주는 2배 이상의 증가를 보였다.

문 헌

- 1) Demain, A. L.: Biology of *Actinomycetes*: Japan Scientific Societies Press, Tokyo. p. 19 (1988).
- 2) Puczynska-Cozch, W. and Mordarski, M.: Biology of *Actinomycetes*, Academic Press, London. p. 288 (1984).
- 3) Kohler, J. and Parland, G.: Protoplast fusion in *Streptomyces avermitilis*. *J. Ind. Microbiol.* 3, 311 (1988).
- 4) Valin, C., Rodriguez, R., Ramos, A., Alonso, E. and Biro, S.: Increased oxytetracycline production in *Streptomyces rimosus* after protoplast fusion. *Biotechnology Letters* 8(5), 343 (1986).
- 5) Yamashita, F., Hotta, K. and Kursawa, S.: New antibiotic-producing *Streptomyces*, selected by antibiotic resistance as a marker. I. New antibiotic production generated by protoplast fusion treatment between *Streptomyces griseus* and *Streptomyces ten-jimariensis*. *J. Antibiotics*. 38(1), 58 (1985).
- 6) Okamura, T., Nagata, S. and Misono, H.: New antibiotic-producing *Streptomyces* TT-strain, generated by electrical fusion of protoplasts. *J. Ferment. Bioeng.* 67(4), 221 (1989).
- 7) Delic, V., Hopwood, D. A. and Friend, E. J.: Mutagenesis by N-methyl-N-nitroso-N-nitroguanidine in *Streptomyces coelicolor*. *Mutation Res.* 9, 167 (1970).
- 8) 민홍기, 김창민, 손여원, 한혜승, 최영주, 정대영, 한강현, 이상섭, 이흡숙, 원봉필: 방선균을 이용한 이종간 원형질체 융합과 그 융합체의 안정성에 관한 연구(II), 국립보건원보, 29(2), 543 (1992).
- 9) Hopwood, D. A. and Wright, H. M.: Genetic recombination through protoplast fusion in *Streptomyces*: PEG-induced protoplast fusion and regeneration. *Nature*. 268, 171 (1977).
- 10) Hopwood, D. A. and Wright, H. M.: Factors affecting recombinant frequency in protoplast fusion of *Streptomyces coelicolor*. *J. Gen. Microbiol.* 11, 137

- (1979).
- 11) Okanish, M. and Suzak, M.: Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: Culture condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.* **80**, 839 (1974).
 - 12) Shihabi, Z. K., and Davin, R. M.: Colorimetric assay for acetaminophen in serum. *Ther. Drug Monitor.* **6**, 449 (1984).
 - 13) Okamura, T., Nagata, S. and Misono, H. and Nagasaki, S.: Interspecific electrofusion between protoplasts of *Streptomyces antibioticus* and *Streptomyces fradiae*. *Agric. Biol. Chem.* **52**(6), 1433 (1988).
 - 14) Ikeda, H., Inoue, M., Tanaka, H. and Omura, S.: Interspecific protoplast fusion among macrolide-producing *streptomycetes*. *J. Antibiotics*. **37**(10), 1224 (1984).
 - 15) Trower, M. K., Sariaslani, F. S., and O'Keefe, D. P.: Purification and characterization of soybean flour-induced cytochrome P-450 from *Streptomyces griseus*. *J. Bacteriol.* **171**(4), 1781 (1989).
 - 16) Yuntsen, H. Studies on angustamycin. VIII.: The structure of angustamycin C. *J. Antibiotics* **11**(6), 244 (1958).