

## Coryne型 細菌의 原形質體 融合頻度 向上

金宗憲 · 林繁三 · 李世永 · 全文鎮

고려대학교 농과대학 농화학과

## Frequency Improvement of Protoplast Fusion in Coryneform Bacteria

Kim, Jong-Heon, Beon-Sam Lim, Se-Young Lee and Moonjin Chun

Department of Agricultural Chemistry, Korea University

For frequency improvement of protoplast fusion in *Brevibacterium flavum*, *Brevibacterium lactofermentum lactofermentum* and *Corynebacterium glutamicum*, the effect of plasma expanders on fusion and cell wall regeneration, comparison between direct and two-step selection method, tendency of fusion frequency according to pH of fusion fluid and polyethylene glycol concentration were examined. By addition of 3% polyvinyl pyrrolidone to cell wall regeneration medium, regeneration frequencies were expressed 23 (*Brevibacterium lactofermentum*), 10.4 (*Brevibacterium flavum*) and 2.7 (*Corynebacterium glutamicum*) times higher than those of none polyvinyl pyrrolidone medium respectively.

아미노산 발효공업에서 산업적으로 유용성이 높은 lysine을 고농도로 생산하는 방법으로 원형질체 융합에 의한 균주의 육종연구가 기대되고 있다.

현재 lysine 생산균으로서 *Corynebacterium* spp. 와 *Brevibacterium* spp. 등의 Coryne형 세균들이 주로 이용되고 있는데 아미노산을 생산하는 Coryne형 세균에 대한 원형질체 융합의 연구는, 1979년 Kaneko등이 *Brevibacterium flavum*의 同種間 융합을 시도한 이래 *Brevibacterium lactofermentum*과 *Brevibacterium flavum*의 異種間 융합에 의한 균주의 개발이 보고된 바 있고(Tosaka등, 1982), Zhdanova등(1982)은 *Brevibacterium flavum*과 *Corynebacterium glutamicum*의 異屬間 융합에 대해 보고하였으며 현재에도 세계적으로 연구가 계속되고 있다. 국내의 경우 이 분야에 대한 연구는 초기단계로서(Shin등, 1984; Lim,

1985), 이에 관한 많은 연구가 기대되고 있다.

본 연구에서는 lysine을 생산하는 Coryne형 세균의 원형질체 융합척도를 향상시키는 것을 목적으로, 융합과 재생에 plasma expander가 미치는 영향, 직접선별법과 2 단선별법에 의한 비교실험, polyethylene glycol (PEG) 6000의 농도와 fusion fluid의 pH에 따른 융합빈도의 변화 등을 검토하였다.

## 재료 및 방법

## 균주

본 연구에서는 lysine 생산균주인 *B. flavum* ATCC 21528R (Thr<sup>-</sup>, AEC<sup>r</sup>, rif<sup>r</sup>), *B. lactofermentum* ATCC 21086R (Thr<sup>-</sup>, Ile<sup>-</sup>, Val<sup>-</sup>, rif<sup>r</sup>), 21086S (Thr<sup>-</sup>, Ile<sup>-</sup>, Val<sup>-</sup>, str<sup>r</sup>) 그리고 *C. glutamicum* ATCC 21514R (Thr<sup>-</sup>, Met<sup>-</sup>, rif<sup>r</sup>)를 사용하였다. rif<sup>r</sup>균주는 rifampicin 100

$\mu\text{g/ml}$  농도에 내성, streptomycin  $10\mu\text{g/ml}$  농도에 감수성을 나타내었고,  $\text{str}^r$  균주는 streptomycin  $100\mu\text{g/ml}$  농도에 내성, rifampicin  $10\mu\text{g/ml}$  농도에 감수성을 나타내었다.

본 연구에서는 이 항생물질 내성을 遺傳標識로 사용하였다.

### 배지 및 완충용액

균 생육배지로 complete medium (CM; peptone 10, yeast extract 5, beef extract 5, NaCl 5 (g/l), pH 7.0) 을 사용하였고, minimal medium (MM), lysis fluid (LF), dilution fluid (DF), fusion fluid (FF; pH 6.5, 8.0, 10.5), Tris maleic buffer (TM) 등은 Kaneko 등 (1979) 의 방법에 따라 제조하여 사용하였다. 세포벽 재생용 배지로는 RCG (勝亦 등, 1981) 에다 polyvinyl pyrrolidone (PVP) 30g/l 첨가한 것을 사용하였으며, lysine 생산용 배지로는  $\text{CaCO}_3$  350, glucose 100,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  40, soybean acid hydrolysate 18, corn steep liquor 6, L-homoserine 5, L-leucine 5, L-threonine 5, L-methionine 5, peptone 2, meat extract 2,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  0.6,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.4,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01,  $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  0.01 (mg/ml), thiamine·HCl 100, biotin 20 (mg/ml) 의 조성을 사용하였다.

### 시약

Penicillin G (1,670 unit/mg) 와 lysozyme (40,000 unit/mg) 은 Sigma Co. (U. S. A.) 에서, streptomycin과 rifampicin은 각각 한독약품(주)와 유한양행(주)에서 구입하여 사용하였으며, PEG는 Kanto chemical Co. (Japan) 製를 사용하였다.

### 原形質體의 형성 및 정상생육세포의 확인

Kaneko 등의 방법을 적용하였으며, 본 연구에서는 MMYE 대신 CM에다 glycine을 첨가하여 균을 생육시켰고, lysozyme은 균중에 따라 350~400  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 10~12시간 처리하였다.

### 原形質體의 세포벽 재생

생성된 원형질체를 DF 용액에 희석하여 RCG 재생배지위에 도말한 다음 30°C에서 2~7일간 배양하면서 형성되는 colony 수를 관측하였다.

### 原形質體 融合

융합시키고자 하는 두 균주의 原形質體를 동일한 농도로 혼합한 후, 원심분리 (4,000 rpm, 20分, 4°C) 하여 FF 0.4ml에 현탁하였다. 여기에 9배 용량 (3.6ml)의 PEG를 첨가하여 30°C에서 15분간 경과한 후 FF 4ml을 추가하고 다시 원심분리하였으며, 여기에서 얻은 침전물을 다시 FF로 재현탁하였다. 직접선별법의 경우 FF의 pH는 10.5, PEG의 농도는 33% (w/v)였으며, 재현탁액을 일정량 취하여 rifampicin과 streptomycin이 각각 50  $\mu\text{g/ml}$ 씩 함유되어 있는 RCG 選別再生培地 (PVP 함유)에 도말한 다음, 10~14일 후에 나타나는 colony 수를 관측하였다. 2단선별법의 경우는 재현탁액을 항생물질이 함유되어 있지 않은 RCG 재생배지 (PVP 함유)에 도말하여 2~3일 후 생성되는 colony들을 rifampicin과 streptomycin이 각각 100  $\mu\text{g/ml}$ 씩 함유되어 있는 RCG 選別再生培地 (PVP 함유)에 replica하여 2~3일 후에 나타나는 colony 수를 관측하였다. 이 때 FF의 pH를 6.5, 8.0, 10.5로 조정하고, PEG의 농도를 30, 40, 50% (w/v)로 하여 각각에 따르는 融合頻度의 변화를 관찰하였다. 이와 별도로 自然突然變異에 의해 상대편 항생물질에 耐性을 갖는 變異株가 생성되는지를 확인하기 위하여, 두 균주의 原形質體를 혼합하지 않고 각각 같은 방법으로 選別배지에 도말하여 colony 생성 여부를 관찰하였다.

### 融合菌株에 의한 L-lysine 생산

Lysine의 생성능이 親株들보다 향상된 개량 균주를 선별할 목적으로 여러 균주간의 融合실험에서 얻은 融合균주의 일부를 임의로 뽑아서 親株들과 함께 lysine 발효실험을 행하였다. Lysine의 생성능은 glucose 50, peptone 10, yeast extract 10, corn steep liquor 6, urea 3.0, NaCl 2.51 (g/l), biotin 50 ( $\mu\text{g/l}$ ), pH 7.2 조성의 種培地에 진탕배양한 후 이를 생산배지에 접종하고, 30°C에서 72시간 진탕배양하여 생성된 lysine의 농도를 아미노산자동분석기 (Hitachi Model No. 835-50, Japan)로 측정하였다.

결과 및 고찰

原形質體의 형성

原形質體 형성을 위한 細胞壁 제거는 일반적으로 lysozyme이나 cellulase (Yamada and Sakaguchi, 1981), driselase와  $\beta$ -glucuronidase (Hong 등, 1984), Mutanase (Stephen and Nasim, 1981) 등의 lytic enzyme을 사용하며, 방선균의 경우 배지에 glycine을 첨가함으로써 原形質體 형성이 향상되는 것으로 보고된 바 있다 (Okanishi 등, 1974). 본 연구에서는 penicillin G와 lysozyme 처리방법을 적용하고, 동시에 균의 생육배지에 glycine을 첨가함으로써 原形質體를 형성시켰으며, 원형질체 형성 여부는 현미경 관찰시 세포형성의 변화와 nutrient 한천배지상에서 정상생육세포의 관측으로 확인하였는데, Coryne형 세균의 정상세포는 rod 또는 V-shape이지만 형성된 原形質體들은 球形을 나타내었다 (Fig. 1).

*B. flavum* ATCC 21528R, *B. lactofermentum* ATCC 21086R 및 *C. glutamicum* ATCC 21514R의 原形質體 형성은, 각 균들을 glycine이 각각 3%, 2%, 0% 첨가된 배지에서 생육시킨 후, 대수증식기 중기에 0.3 unit/ml의 penicillin G를 처리한 다음 다시 1.5~2 시간 후 lysozyme을 각각 400, 350 및 350  $\mu\text{g/ml}$ 의 농도로 처리하여 줌으로써, lysozyme 처리 10~12시간 후 99.9% 이상의 原形質體 형성을 나타내었다. 이 때 penicillin G를 균의 생육배지에 첨가하더라도 균의 성장저해는 거의 일어나지 않았으며, 첨가되는 glycine과 lysozyme의 농도를 고려해 볼 때 *B. flavum* > *B. lacto-*

Table 1. Experimental conditions for protoplast formation of Coryneform bacteria.

Strains	<i>B. flavum</i> ATCC 21528 R	<i>B. lacto-</i> <i>fermentum</i> ATCC 21086 R	<i>C. glutami-</i> <i>cum</i> ATCC 21514 R
Glycine concentration (%)	3	2	None
Lysozyme concentration ( $\mu\text{g/ml}$ )	400	350	350
Intact cell number (per ml)	$1.7 \times 10^{10}$	$8.5 \times 10^9$	$8.5 \times 10^9$
Viable cell number (per ml)	$3.2 \times 10^8$	$5.0 \times 10^8$	$8.0 \times 10^8$
Protoplast formation frequency (%)	99.9	99.9	99.9

Penicillin G (0.3unit/ml) was added at mid-exponential growth phase.

*fermentum* > *C. glutamicum*의 순으로 원형질체 형성이 어려움을 알 수 있었다. 또한 균주가 원형질체로 전환한 다음 시간이 경과함에 따라 크기가 커지고 불안정해 지면서 궁극적으로 원형질체의 파괴가 일어나, 원형질체의 농도가 감소함을 현미경으로 관찰할 수 있었다. 각 균주의 원형질체 형성조건은 Table 1과 같다.

원형질체의 세포벽 재생

정상세포에서 원형질체가 형성된 후 다시 세포벽이 재생되어 완전한 형태의 세포로 될 때까지 삼투압적으로 高張液의 상태를 유지시켜 주어야 한다. *Bacillus*속 균주의 경우 horse serum이나 bovine serum albumin 같은 plasma

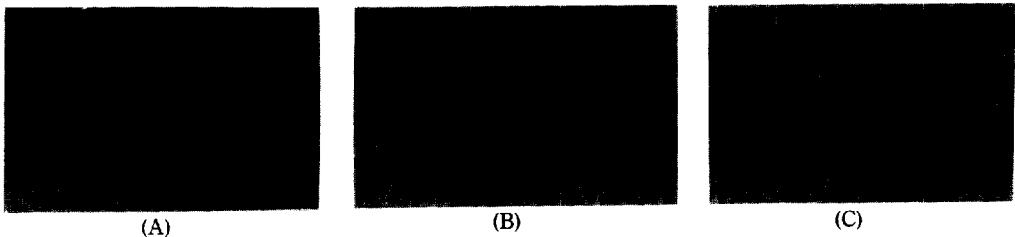


Fig. 1. Microscopic observation of *B. flavum* ATCC 21528 R

A: Intact cells ( $\times 1000$ )

B: Protoplasts formed by lysozyme treatment for 4 hours ( $\times 400$ )

C: Protoplasts formed by lysozyme treatment for 12 hours ( $\times 400$ )

expander 또는 dextran, polyvinyl pyrrolidone과같이 plasma expander의 성질을 가지고 있는 물질을 재생배지에 첨가함으로써 재생율을 높였다는 보고가 있다(Gabor and Hotchkiss, 1979; Takashi and Sekiguchi, 1981). 본 연구에서는 高張液으로 0.4M sodium succinate를 사용하였으며, plasma expander의 성질을 가지는 PVP와 dextran을 농도별 (20, 30, 40 g/l)로 RCG에 첨가하여 각 균주들의 세포벽 재생에 미치는 영향을 검토하였다.

Fig. 2에서 보듯이 PVP는 균의 종류에 관계없이 30g/l을 첨가했을 때 가장 높은 재생율을

나타내었다. 이 농도에서 재생율은 무첨가시에 비하여 현저한 증가를 보였는데, *B. flavum*은 10.4배, *B. lactofermentum*은 23배 그리고 *C. glutamicum*은 2.7배가 각각 상승하였다(Table 2). 그러나 dextran을 첨가했을 경우는 균종에 관계없이 재생율 증가폭이 매우 완만하였다. Coryne형 세균들의 균종 사이의 세포벽 재생율은 *C. glutamicum* > *B. flavum* > *B. lactofermentum*의 순으로 높았다. 본 실험을 통하여 PVP가 재생율 증가에 큰 효과가 있음을 확인하였으며, 다른 plasma expander 종류들에 의해서도 더 검토할 필요성이 있을 것으로 생각된다.

原形質體 融合

1974년 Kao 등이 고등식물의 원형질체 융합에 PEG의 첨가가 유효하다는 사실을 보고한 이후로 오늘날의 원형질체 융합은 주로 PEG 유도에 의한 방법에 의존하고 있다. pH에 의한 영향에 대해서는 Tozawa 등(1983)에 의하여 산성측 보다는 pH 8.0~12.0범위의 알칼리성측으로 갈수록 융합이 촉진되는 것으로 보고되었다. 본 연구에서는 원형질체 세포벽 재생실험에서 얻은 결과를 토대로 하여, 직접선별법과 2단선별법에 의한 원형질체 융합실험의 비교와 함께 FF의 pH 및 PEG 농도에 따른 융합빈도 변화를 관찰함으로써, 융합빈도를 향상시킬 수 있는 최적조건을 구하고자 하였다.

Table 3에서 보는 바와 같이 Coryne형 세균의 동종 및 이종간 융합실험에서는 pH가 산성에서 알칼리성으로 변화할수록 융합빈도가 전반적으로 상승하는 경향을 나타내었으며, 異屬

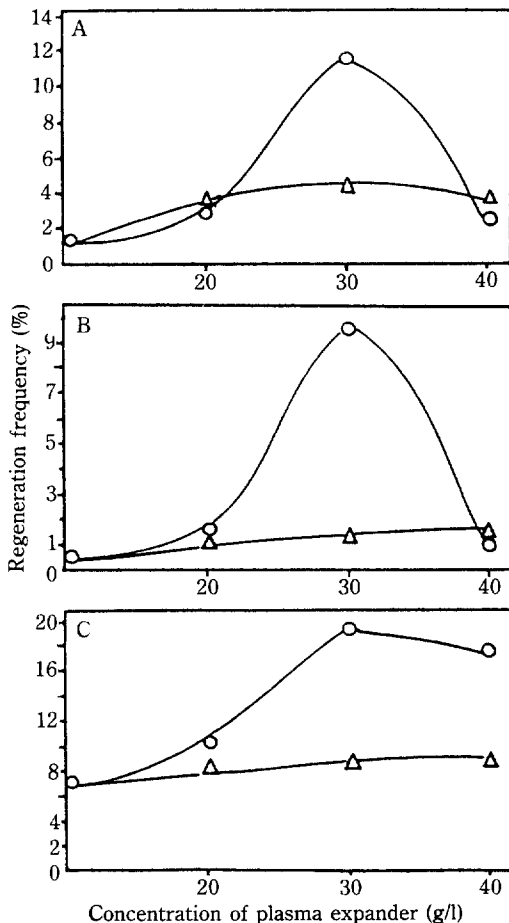


Fig. 2. Effect of concentration of plasma expanders on regeneration frequency.

A: *B. flavum* ATCC 21528R

B: *B. lactofermentum* ATCC 21086R

C: *C. glutamicum* ATCC 21514R

—○— polyvinyl pyrrolidone,

—△— dextran

Table 2. Effect of polyvinyl pyrrolidone on protoplast regeneration frequency of Coryneform bacteria.

Strains	Polyvinyl pyrrolidone conc. (%)	
	None	3
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 21086R	0.4	9.2
<i>B. flavum</i> ATCC 21528R	1.1	11.5
<i>C. glutamicum</i> ATCC 21514R	7.1	19.2

**Table 3.** Effects of pH and PEG concentration on protoplast fusion frequency of *Coryneform* bacteria by two-step selection method.

Cross	pH	Conc. of PEG (%)			
		0	30	40	50
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 21086R	6.5	-	$2.24 \times 10^{-6}$	$3.36 \times 10^{-6}$	$3.84 \times 10^{-6}$
×	8.0	-	$2.72 \times 10^{-6}$	$4.80 \times 10^{-6}$	$4.16 \times 10^{-6}$
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 21086S	10.5	$2.08 \times 10^{-6}$	$3.52 \times 10^{-6}$	$4.96 \times 10^{-6}$	$3.35 \times 10^{-6}$
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 21086S	6.5	-	$1.03 \times 10^{-7}$	$1.03 \times 10^{-7}$	$1.58 \times 10^{-7}$
×	8.0	-	$3.82 \times 10^{-7}$	$1.91 \times 10^{-7}$	$1.53 \times 10^{-7}$
<i>B. flavum</i> ATCC 21528R	10.5	$2.73 \times 10^{-8}$	$4.31 \times 10^{-7}$	$3.39 \times 10^{-7}$	$2.46 \times 10^{-7}$
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 21086S	6.5	-	$1.44 \times 10^{-4}$	$1.28 \times 10^{-4}$	$1.42 \times 10^{-4}$
×	8.0	-	$1.23 \times 10^{-4}$	$1.00 \times 10^{-4}$	$1.33 \times 10^{-4}$
<i>C. glutamicum</i> ATCC 21514R	10.5	$6.44 \times 10^{-5}$	$1.49 \times 10^{-4}$	$1.30 \times 10^{-4}$	$1.32 \times 10^{-4}$

間 융합실험에서는 pH에 따른 융합빈도 변화가 크지는 않았으나 최고융합빈도는 30% PEG, pH 10.5에서 나타났는데, 이러한 현상은 앞에서 지적한 바 있는 Tzawa 등의 보고내용과 부합되는 것이다.

PEG의 농도에 따르는 융합빈도 변화는 pH에서의 경우처럼 어떠한 경향성을 나타내지는 않았다. 同種間 융합실험에서는 40% PEG에서 전반적으로 높은 융합빈도를 나타내었고, 異種間 융합실험에서는 30% PEG에서 높은 융합빈도를 나타내었으나 異屬간에서는 PEG의 농도 변화에 따르는 융합빈도 변화는 크게 나타나지 않았는데, 이 결과로부터 *Coryne* 형 세균들의 융합실험에서 PEG의 농도는 융합조합 내용에 관계없이 30~50범위에서 적용할 수 있다고 판단되었다. 또한 PEG를 첨가하지 않은 경우보다 첨가한 경우가 높은 융합빈도를 나타냄으로서 융합제인 PEG의 첨가 결과를 확인하였다.

Table 4는 직접선별법과 2단계선별법에 의한 同種, 異種 및 異屬간 융합실험에서 최고융합빈도를 상호 비교한 것이다. 직접선별법에 의한 융합의 경우 PEG의 농도는 33% (w/v), FF의 pH는 10.5였으며 융합체를 취득하기까지 소요된 기간은 10~14일이었다. 그러나 2단계선별법에 의한 융합실험의 경우 융합체를 취득하기까지 소요된 기간은 4~6일이었으며, 융합빈도는 직접선별법의 경우보다 同種, 異種 및 異屬간

에서 각각 1.9배, 3.8배, 1.7배 높게 나타남으로서 융합체 취득기간의 단축과 함께 높은 융합빈도를 얻을 수 있었는데, 본 실험을 통하여 2단계선별법은 직접선별법에 비하여 우월한 융합방법임을 확인하였다. 또한 자연돌연변이에 의해 상대편 항생물질에 내성을 갖는 변이주가 형성되는가의 확인실험에서, 두 균주의 원형질체를 혼합하지 않고 선별배지에 도말하여 배양한 결과 colony가 형성되지 않음을 알 수 있었다.

**Table 4.** Comparison of protoplast fusion frequency between direct and two-step selection method.

Cross	Selection methods	
	Direct	Two-step
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 21086R	$2.62 \times 10^{-6}$	$4.96 \times 10^{-6}$
×		
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 21086S		
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 21086S	$1.14 \times 10^{-7}$	$4.31 \times 10^{-7}$
×		
<i>B. flavum</i> ATCC 21528R		
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 21086S	$9.01 \times 10^{-5}$	$1.49 \times 10^{-4}$
×		
<i>C. glutamicum</i> ATCC 21514R		

### 융합균주에 의한 L-lysine 생산

이상의 융합실험에서 취득한 融合菌株들 중에서 일부를 임의로 선별하여 모균과 함께 lysine 생성능을 살펴 보았다. Table 5에서 보는 바와 같이 同種 및 異種間 융합 실험에서 lysine 생산 능이 親株보다 다소 상승된 융합균주가 나타났는데 이 결과는 세포융합 방법에 의한 lysine 고생산균주 개발의 가능성을 제시해 주는 것이라고 생각된다. 앞으로 아미노산 analog 내성 균주의 개발과 같은 돌연변이 기술과 세포융합 방법을 병행함으로써, 아미노산 생성능이 향상된 균주개발의 연구가 계속되어야 하리라고 생각된다.

### 적 요

Lysine 생산능을 가진 Coryne형 균주인 *Brevibacterium flavum* ATCC 21528R, *Brevibacterium lactofermentum* ATCC 21086R 및 *Corynebacterium glutamicum* ATCC 21514R의 原形質體 融合빈도를 향상시키기 위한 목적으로 (1) 세포의 융합과 재생에 plasma expander가 미치는 영향 (2) 직접선별법과 2단선별법에 의한 비교실험 (3) fusion fluid (FF)의 pH와 polyethylene glycol (PEG) 농도에 따른 융합척도의 변화 등을 조사하였다. 原形質體의 세포벽 재생배지에 3% polyvinyl pyrrolidone을 첨가함으로써 무첨가시보다 재생율이 각각 23배 (*Brevibacterium lactofermentum*), 10.4배 (*Brevibacterium flavum*) 그리고 2.7배 (*Corynebacterium glutamicum*) 높게 나타났다. 2단선별법에 의한 원형질체 융합의 경우, 직접선별법의 경우보다 融合體 취득기간이 4~10일 단축되었고, 同種, 異種 및 異屬間 원형질체 융합빈도가 각각 1.9배, 3.8배, 1.7배 상승하였다. pH가 산성 (6.5)에서 알칼리성 (10.5)으로 변화함에 따라 융합빈도가 높아지는 경향을 나타내었으며, polyethylene glycol의 농도에 따른 융합빈도의 변화는 크지 않았다.

### REFERENCES

- Gabor, M.H. and R.D. Hotchkiss, 1979. Parameters governing bacterial regeneration and genetic recombination after fusion of *Bacillus subtilis* protoplasts. *J. Bacteriol.*, **137** (3), 1346-1353.
- Hong, S.W., Y.C. Hah and H.M. Park, 1984. The conidial protoplast fusion of cellulolytic fungus, *Trichoderma koningii*. *Kor. Jour. Microbiol.*, **22** (4), 207-214.
- Kaneko, H. and K. Sakaguchi, 1979. Fusion of protoplasts and genetic recombination of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, **43** (5), 1007-1013.
- Kao, K.N. and M.R. Michayluk, 1974. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplast. *Planta*, **115**, 355-367.
- Lim, B.S., 1985. Studies on breeding of L-lysine producing microorganisms by cell fusion and bioreactor system by immobilization of fusants. *Ph. D. Thesis*, Korea University.
- Okanishi, M., K. Suzuki and H. Umezawa, 1974. Formation and reversion of *Streptomyces* protoplasts: cultural condition and morphological study. *J. Gen. Microbiol.*, **80**, 389-400.
- Shin, M.G., S.Y. Lee, B.S. Lim and M.J. Chun, 1984. The protoplast formation, regeneration and fusion of Coryneform bacteria. *Kor. Jour. Microbiol.*, **22** (3), 175-181.
- Stephen, E.R. and A. Nasim, 1981. Production of protoplasts in different yeasts by mutanase. *Can. J. Microbiol.*, **27**, 550-553.

9. Takashi, A. and J. Sekiguchi, 1981. Studies on regeneration media for *Bacillus Subtilis* protoplast. *Agric. Biol. Chem.*, **45** (12), 2887-2894.
10. Tosaka, O., M. Karasawa, S. Ikeda and H. Yoshii, 1982. Genetic recombination in amino acid-producing bacteria by protoplast fusion. *4th International Symp. on GIM Abstracts*.
11. Yamada, T. and K. Sakaguchi, 1981. Protoplast induction in *Chlorella* species. *Agric. Biol. Chem.*, **45** (8), 1905-1909.
12. Zhdanova, N., V. Livshits, A. Shtannikov, T. Leonova and L. Kozyreva, 1982. The obtaining of genetic recombinants in amino acid-producing Coryneform bacteria by protoplast fusion. *4th International Symp. on GIM Abstracts*.
13. 唐澤昌彦, 戸坂修, 池田茂穂, 吉井寛依, 1983. 細菌のプロトプラスト融合法. 日本公開特許 昭 58-158184.
14. 勝亦瞭一, 高山健一郎, 古屋晃, 1981. 遺伝的組換え元株の取得法. 日本公開特許 昭 56-109587.

(Received August 13, 1985)