



基因工程在氨基酸产生菌选育中的应用

余红方 序 杜珠还

(浙江大学生物科学与技术系, 杭州)

氨基酸在医药、食品、饲料、农业和化工等方面都得到了广泛的应用。除蛋氨酸、胱氨酸、半胱氨酸外, 其他18种氨基酸均可用发酵法生产。

经典的氨基酸产生菌的选育方法是从自然界中分离筛选野生型菌株和通过多次诱变, 选育营养缺陷型和代谢类似物抗性的菌株, 使产量逐步提高。此法工作量大, 盲目性高, 而且不能把不同菌株中的优良性状组合起来。70年代兴起的重组DNA技术可以弥补这些不足, 它具有经典育种方法无可比拟的优点。应用重组DNA技术进行氨基酸产生菌的定向育种, 既有实际应用价值又有理论意义, 它不仅打破种、属的界限, 把不同菌株的优良性状集中到一株菌上, 选育出高产、优质、易自动化生产和现代化管理的超级生产菌, 而且对于阐明氨基酸产生菌的遗传体系, 进行基因定位, 了解菌体的代谢调控机制都具有重要的作用。因此, 重组DNA技术正越来越被育种工作者所重视。

进入80年代后, 重组DNA技术开始迅速地渗透到工业发酵研究的各个领域。短短几年内已经在酶、酒精、单细胞蛋白、核苷酸和氨基酸发酵等方面取得了令人瞩目的进展。

1979年, 苏联人^[1]首先成功地利用基因工程选育苏氨酸产生菌, 进行工业生产苏氨酸, 开创了氨基酸发酵工业的新纪

元。以后日本也大量报道了这方面的工作。据初步统计, 现已构成12种氨基酸产生菌, 而且这方面的报道有越来越多的趋势。

本文试就基因工程技术在氨基酸产生菌选育中的应用, 从载体系统、转化受体系统以及已取得的重要成果作一简要的论述。

载体系统的发展

DNA体外重组首先要解决载体问题。合适的载体需要有较小的分子量、选择性标记、高表达的启动子、数种限制性内切酶的单切位点和能在受体菌中多拷贝复制等特性。一般以质粒、噬菌体或转座子作为载体, 尤以质粒为多。

氨基酸产生菌主要是棒状杆菌、短杆菌等棒状类细菌(Coryneform bacteria)。在此类细菌中构建合适的载体困难较多。例如, 含质粒的棒状类细菌较少, 而且大多数是隐蔽性质粒, 难以直接作为克隆载体; 还有此类菌的遗传背景、质粒稳定性不清楚等。

1979年, Kaneko等人^[5]首先在氨基酸产生菌——乳糖发酵短杆菌中发现了一种质粒, 其分子量为 3.7×10^7 道尔顿, 具

本文于1987年1月20日收到。

有多个EcoR I 和BamH I 的切点。虽然它还不能被直接做为载体用于基因工程,但也给今后的基因工程定向育种 奠定了基

础。随后,在其他棒状类细菌中也发现了多种质粒(见表1)。

表 1 在棒状类细菌中发现的质粒

来 源 菌	质粒名称	分 子 量	标 记	拷 贝 数	文 献
<i>C. glutamicum</i> T250	pCG ₁	29 kb	Sp ^c ^r , Str ^r	—	(6)
<i>C. glutamicum</i> 225-218	pCG ₂	6.6 kb	—	—	(7)
<i>B. lactofermentum</i> ATCC 13869	pAM330	4.6 kb	—	10—14	(8)
<i>C. glutamicum</i> ATCC 13058	pHM1519	2.8 kb	—	140	(8)
<i>C. callunae</i> NRRL B-2244	pCC ₁	4.3 kb	—	30	(9)
<i>B. lactofermentum</i> BL _o	pBL ₁	4.3 kb	—	30	(10)

Yoshihama^[11]、Sandoval^[12]等人还报道,通过对几十株棒状类细菌的质粒筛选,发现其中许多菌株存在1个或2个质粒。

但以上所发现的质粒大多是隐蔽性质粒,不能作为合适的载体,需要对它们进行改建。已有的改建方法是:将棒状类细菌的隐蔽性质粒与已知的质粒进行重组,

构建成杂合质粒。建成的质粒如表2所示。Santamaria^[10]还将 pBL₁ 与含质粒 pBR322、pIJ350 和转座子 ΔTn 5 的杂合质粒 pIJ860 (10.34kb) 进行重组,得到分子量为14.6kb的重组质粒pUL61,然后再用SalI切除以pIJ350为主的一段DNA片段,得到了分子量为9.6kb的质粒pUL62。

表 2 建成的载体系统

原 始 质 粒	已知质粒及其标记	内 切 酶	杂合质粒及其标记	文 献
pCC ₁ (<i>C. callunae</i>)	pBR329(<i>E. coli</i>) Ap ^r , Cm ^r , Tc ^r	Hind III	pUL193 Ap ^r , Cm ^r , Tc ^r	(9)
pSR ₁ (<i>C. glutamicum</i>)	pBD10(<i>B. subtilis</i>) Em ^r , Cm ^r , Km ^r	BclI	pHY416 Cm ^r , Km ^r pHY47	(11)
pBL ₁ (<i>B. lactofermentum</i>)	pBR322(<i>E. coli</i>) Ap ^r , Cm ^r	Hind III Bal I Bal I / BamH I	pUL1 Ap ^r pUL10 Ap ^r , Tc ^r pUL20 Ap ^r	(10)
pCG ₁ , pCG ₂ (<i>C. glutamicum</i>)	pGA22(<i>E. coli</i>) km ^r , Tc ^r , Cm ^r , Ap ^r	Bgl I / BamH I Bgl I / BamH I Bgl I / BamH I Pst I	pCE51 Km ^r pCE52 Km ^r , Ap ^r , Cm ^r pCE53 Km ^r , Ap ^r , Cm ^r , Tc ^r pCE54 Km ^r , Cm ^r , Tc ^r	(13)

通过构建杂合质粒,沟通了棒状类细菌与研究得较成熟、遗传背景清楚的细菌之间的联系,这样就可以较容易地在棒状类细菌中开展各项分子生物学研究。

我国也早已开始了对工业微生物中质粒DNA 的研究^[13]。已在3株谷氨酸棒杆菌和1株产氨短杆菌中发现了质粒存在。郑兆鑫等人^[3]已将其中1株1014菌中有

氯霉素抗性标记的质粒 pXZ10145 与大肠杆菌质粒 pBR322 进行重组, 得到了杂合质粒。

转化受体系统的建立

(一) 提高棒状类细菌转化效率的研究

棒状类细菌是革兰氏阳性菌。未见报道这类菌能像大肠杆菌和枯草芽孢杆菌一样有感受态。在正常条件下, 它们不能进行转化。

自 S.Chang 和 S.Cohen^[14] 报道了枯草芽孢杆菌原生质体高频转化的研究工作后, 质粒转化原生质体的方法在棒状类细菌中也迅速得到广泛应用。其整个转化过程可分为三个步骤: (1) 制备对 DNA 转化有感受能力的原生质体; (2) 细胞对 DNA 的吸收; (3) 转化子的选择与再生。要提高转化效率, 必须提高原生质体形成率和再生率, 同时还要提高原生质体对 DNA 转化的感受能力。在制备原生质体过程中, 菌体在含 2% 的甘氨酸培养基中培养 24—48h 后, 再进行溶菌酶处理, 其最后的转化效率比未接触甘氨酸的细菌提高 1—2.6 倍。而在培养基中加青霉素和脂肪酸合成抑制剂 (浅兰菌素 Cerulenin 和异烟肼) 对谷氨酸棒杆菌的转化效率无影响^[11]。在溶菌酶处理细胞的时间问题上报道不一。有人认为^[11] 处理时间以 1.5h 最佳, 也有人在溶菌酶处理 4h^[10]、6h^[15]、甚至 16h^[16] 后才进行转化; 但 Smith^[17] 报道, 细胞经溶菌酶处理 2—10min 后, 就可达到高频率转化 (10^4 — 10^5 转化子/ μg DNA)。

由于线形质粒 DNA 的转化效率比超螺旋质粒 DNA 的转化效率低约二个数量级^[15], 通过改进供体 DNA 的质量也是提高转化效率的途径之一。

异源 DNA 还要受到受体菌的限制修

饰系统的作用。从供体菌中提出的质粒 DNA 转化到受体菌中, 其转化频率在 10^4 — 10^6 转化子/ μg DNA; 然后从受体菌的转化子中提取质粒 DNA, 对相同的受体菌再转化, 转化频率就可提高 2 个数量级^[13,16]。

从以上报道可见, 在棒状类细菌中已建立了比较完善的转化方法, 频率可达 10^6 转化子/ μg DNA, 已达到应用水平。

(二) 穿梭体系的研究

在棒状类细菌中已做了不少建立穿梭系统的工作。所构建的嵌合质粒都是在棒状类细菌与大肠杆菌或枯草杆菌之间进行穿梭转化。大多数有较高的转化率。例如最先报道的 Miwa 等人^[18] 将来自棒状类细菌的质粒 DNA 与来自大肠杆菌或枯草芽孢杆菌的质粒 DNA 重组, 构建了多种抗性嵌合质粒。它们可在棒杆菌和大肠杆菌或枯草杆菌之间穿梭复制。但是大多数都不够理想, 存在的缺点是, 穿梭质粒所带标记大都是棒状类细菌以外菌株的标记。外源基因在棒状类细菌中不能表达, 或表达效率低。这样就难以把外源基因克隆到棒状类细菌, 并在其中表达, 不能达到改良棒状类氨基酸产生菌的目的。例如, Ozaki^[13] 建立了一系列大肠杆菌-谷氨酸棒杆菌穿梭质粒 pCE51—pCE54, 这些质粒所编码的抗菌素失活酶在谷氨酸棒杆菌中的活性要比在大肠杆菌中低 4—10 倍。

过去已证明在革兰氏阳性菌与阴性菌之间存在转录与转译的障碍, 大肠杆菌质粒上的抗性基因不能在枯草芽孢杆菌中表达^[19]。但是在 Ozaki 的研究中, 大肠杆菌质粒上的抗性基因在棒杆菌中得到了表达, 虽然其表达水平要低一些。另外, 通过棒状菌噬菌体的 DNA 序列分析^[20-22], 发现其转录和转译信号与大肠杆菌

的有高度的相似性。这些都说明大肠杆菌与棒杆菌之间的转录与转译机制有相似的可能性。

Santamaria^[10] 构建的穿梭质粒 pUL61 可对大肠杆菌、变青链霉菌和乳糖发酵短杆菌三种不同菌进行转化。pUL61 上的青霉素抗性在大肠杆菌中表达, 在棒杆菌中不表达; 硫链丝菌肽(Thiostrepton) 抗性在链霉菌中表达, 在棒杆菌中不表达; 但转座子 Tn5 编码的卡那霉素抗性在三种菌中都得到表达。另外, 用谷氨酸棒杆菌质粒 pSR1 与枯草芽孢杆菌质粒 pBD10 构建成的重组质粒 pHY416^[11], 既可转化到棒杆菌中又可转入枯草杆菌, 新霉素抗性标记在两菌中都能表达, 但氯霉素抗性仅在枯草杆菌中表达。从以上例子可见, 有些标记在棒状类细菌中能够表达, 而另一些不能表达。外源 DNA 在受体菌中表达与否, 很可能与其启动子有关。当外源基因在受体菌中能够表达时表明其启动子可能在受体菌中起作用, 若在此启动子之后插入某一 DNA 片段, 此 DNA 片段上的基因就很可能得到表达。在运用 DNA 重组技术选育氨基酸产生菌的工作中, 认识这一点对于选择合适的受体菌和质粒, 以及合适的插入位点都有重要的意义。因此构建带有在两类细菌中都能高效表达的标记的质粒, 将是穿梭体系研究的重要目标。

应用基因工程选育氨基酸产生菌

有了合适的载体及其转化系统后, 就可通过 DNA 体外重组技术进行氨基酸产生菌的改造。在这方面, 日本发表文章较多, 且大多是以专利形式发表。

据统计, 氨基酸发酵基因工程的研究开展仅仅几年, 但已初见成效。已采用重组 DNA 技术, 从简单的鸟枪法单基因克

隆, 到整个操纵子的诱变与体外重组, 获得了精氨酸、谷氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、赖氨酸、色氨酸、组氨酸、缬氨酸、苏氨酸、高丝氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸等 12 种氨基酸产生菌。下面分别叙述。

(一) 谷氨酸

Tsuchida 等人^[23] 利用鸟枪法将 1 株产谷氨酸 5.5g/L 的乳糖发酵短杆菌染色体 DNA 的 Hind III 或 Bcl I 酶切片段插入到质粒 pAM330 中, 通过转化, 分别转入两株乳糖发酵短杆菌受体菌中, 转化子经发酵培养 48h, 谷氨酸盐产量可分别达到 9g 及 9.8g/L。

(二) 精氨酸

Momose 等人^[24] 用限制性内切酶将大肠杆菌 NRRL B-12424 染色体 DNA 进行酶切后插入质粒 pBR322 中, 然后将所得重组质粒转化到 1 株 argA⁻ 菌中 (*E. coli* NRRL B-12425), 检出 Ap^r Arg⁺ 的转化子。其中一株转化子可产生精氨酸 190 mg/dL, 而供体菌 (B-12424) 和受体菌 (B-12425) 的精氨酸产量分别只有 75 和 6 mg/dL。

(三) 甲硫氨酸

Tsuchida^[25] 对大肠杆菌甲硫氨酸产生菌染色体的 Hind III 酶切片段插入 pBR322, 并转化到 4 株大肠杆菌中, 结果转化子的甲硫氨酸产量可达 30mg/dL, 而原供体菌和受体菌的产量只有 2—4mg/dL。

(四) 脯氨酸

与上面方法相同, Tsuchida 等人^[26] 运用鸟枪法将产脯氨酸的大肠杆菌染色体 DNA 的 Hind III 酶切片段组入 pBR322, 转化后得到产 15—25mg/dL 脯氨酸的转化子, 亲本菌株分别为 2 和 0 mg/dL。

另据报道^[3], 将大肠杆菌脱氢脯氨酸耐性变异株的染色体 DNA 上的 ProA、B、C 三个基因同时切下连接到质粒上, 再转

化到脱氢脯氨酸耐性株中进行克隆, 得到脯氨酸高产菌株 (20—60g/L)。

(五) 组氨酸

在组氨酸合成途径中, 最后第二步从L-组氨酸醇磷酸变为L-组氨酸是由组氨酸醇磷酸酶(HP)催化的。日本味之素公司^[27]将编码此酶的基因重组到质粒中, 然后将含HP酶基因的重组质粒转入乳糖发酵短杆菌中, 转化子可产组氨酸130mg/ml。

Tsuchida等人^[28]将具有抗组氨酸类似物1, 2, 4-三吡咯丙氨酸的枯草杆菌AJ11733的染色体DNA用EcoRI酶切, 其片段插入到质粒pUB110上, 通过转化, 将重组质粒转到His⁻菌株(*B. subtilis* AJ11732), 在含1, 2, 4-三吡咯丙氨酸的培养基上, 得到3个转化子。将其中组氨酸产量最高的转化子的质粒DNA再重新转入AJ11733中, 这样获得的转化子可产生230mg/dL组氨酸, 而原菌株AJ11733只有110mg/dL。

(六) 苯丙氨酸

Osamu报道^[29]将原产苯丙氨酸162mg/dL枯草芽孢杆菌AJ11773染色体DNA用EcoRI酶切所得片段插入质粒pUB110中, 并将其转入枯草芽孢杆菌AJ11772中, 得到了产288mg/dL苯丙氨酸的菌株。另报道^[30], 1株抗*m*-氟苯丙氨酸的苯丙氨酸产生菌, 乳糖发酵短杆菌AJ3437, 其染色体DNA被PstI酶切后与具有氯霉素抗性的质粒pAJ1844重组, 并转化到另一株*m*-氟苯丙氨酸敏感的乳糖发酵短杆菌No. 64中, 分离同时具有*m*-氟苯丙氨酸抗性和氯霉素抗性的转化子, 将此转化子中所含的嵌合质粒pAJ11转入1株分枝变位酶 β -亚基缺失的菌株AJ12082(*phe*⁻), 得到了高产菌。

(七) 酪氨酸

日本人^[31]用选育苯丙氨酸生产菌的

DNA供体菌和质粒, 进行了酪氨酸生产菌的选育。他们将具有酪氨酸类似物抗性的谷氨酸产生菌, 乳糖发酵短杆菌AJ3437的染色体DNA上含酪氨酸合成基因的片段插入到质粒pAJ1844(Ap^r)中, 然后转化到*m*-氟苯丙氨酸敏感、Lys⁻、Thr⁻、Met⁻的乳糖发酵短杆菌ATCC39134中, 转化子的酪氨酸产量可达108mg/dL, 而ATCC39134是不产酪氨酸的。Oka^[32]也报道了运用重组DNA技术选育了酪氨酸生产菌, 其酪氨酸产量为5.3mg/ml。

(八) 色氨酸

在大肠杆菌的色氨酸生物合成途径中, 从邻氨基苯甲酸以后, 反应的酶基因均由单一操纵子操纵。日本味之素公司^[33]将野生型或具有5-甲基色氨酸抗性的大肠杆菌中含色氨酸操纵子的DNA片段插入到质粒pBR322中, 这种质粒再与另一种含*serB*基因的质粒重组, 并转化得到色氨酸产量达0.3g/L的转化子。Aiba^[34-37]以大肠杆菌的色氨酸操纵子缺失、阻遏物缺损和色氨酸酶缺陷的突变株*tna*为受体菌, 用带有已解除色氨酸反馈抑制的色氨酸操纵子的重组质粒pSC101-Trp I 15对其进行转化, 得到色氨酸生产菌*Tna/pSC101-Trp I 15*。此菌在含有邻氨基苯甲酸的培养基中, 可积累色氨酸6.2g/L。

色氨酸合成酶中的 β_2 亚单位可单独催化由吲哚和丝氨酸生成色氨酸的反应。利用此反应, Anderson^[38]克隆了Trp B基因, 使 β_2 亚单位的活性提高230倍, 该菌以吲哚和丝氨酸为底物, 可生成色氨酸78g/L。

对于在棒状类细菌中是否也存在与大肠杆菌类似的色氨酸操纵子, 至今尚不清楚。所以在棒状类细菌中运用基因工程进行色氨酸生产菌的选育工作不如在大肠杆

菌中活跃。Miwa^[39]将邻氨基苯甲酸转磷酸核糖酶的基因插入质粒载体 pAJ1844, 然后转化到各种棒状类细菌中进行克隆表达。其中 1 株转化子可产生 76mg/dL 的色氨酸。

(九) 苏氨酸

在苏氨酸合成途径中, 终产物苏氨酸对催化第一步反应的天冬氨酸激酶有反馈抑制作用。具有苏氨酸类似物 AHV 抗性的突变株可以解除这种反馈抑制作用, 而使其自身过量合成苏氨酸。Debabov^[4]运用此原理, 获得了高产菌, 并投入工业化生产。三轮^[40]、Tsuchida^[41]、味之素公司^[42]也运用类似的方法获得了高产菌株。

另外, 通过增加高丝氨酸激酶的活力, 也可达到提高苏氨酸产量的目的。Nakamori 等人^[43]将乳糖发酵短杆菌 ATCC13869 中含编码高丝氨酸激酶基因的 DNA 片段插入质粒 pAJ1844, 并将此重组质粒转化到缺失高丝氨酸激酶基因的乳糖发酵短杆菌 AJ12078 中, 在无苏氨酸的培养基中选出转化子, 再将此转化子的重组质粒 pAJ211 分离并转化到 1 株苏氨酸产生菌中, 苏氨酸产量由原来的 1.24g/dL 提高到 1.86g/dL。

还有, Debabov^[44]构建的高丝氨酸和苏氨酸产生菌已达工业化生产水平, 他们在离体条件下用羟胺诱变带有 *thrA* 和 *thrB* 基因的重组质粒, 使 *thrB* 基因突变, 基因产物失活; 同时使 *thrA* 基因突变, 基因产物对高丝氨酸反馈抑制脱敏。将突变质粒克隆入产高丝氨酸细菌中, 结果高丝氨酸产量达到 60g/L。他们还将 *thrA*、*thrB* 和 *thrC* 基因克隆入大肠杆菌, 使苏氨酸产量达 30g/L。

Miwa 等^[45]也构建了一株苏氨酸高产菌株, 产量为 13.5g/L。

(十) 赖氨酸

在细菌的赖氨酸合成途径中, 最后一步是在二氨基庚二酸脱羧酶的催化下, 二氨基庚二酸脱羧形成 L-赖氨酸。日本人^[46]将编码二氨基庚二酸脱羧酶的基因和质粒重组, 转化到 1 株乳糖发酵短杆菌中进行克隆, 转化子经发酵培养 72h, 赖氨酸盐酸盐的产量达到 15.8g/L, 而 DNA 供体菌和受体菌的产量分别只有 8.2g/L 和 0.3g/L。味之素公司^[47]用同法得到产量比供体菌高两倍的转化子。Miwa^[48]、协和发酵工业公司^[49]和 Sano^[50]分别将 AEC 抗性菌株中的抗性基因, 通过质粒载体, 克隆到 AEC 敏感菌中, 获得赖氨酸生产菌。Miwa 所选育的菌株可产赖氨酸 2.35g/L, KHK 公司获得了产量为 7.2g/L 的菌株。

Sano 还分别对赖氨酸合成途径中各种酶的基因进行克隆, 研究它们对赖氨酸生产性能的影响。结果只有二氢吡啶二羧酸合成酶活力的提高 (31 倍) 能使赖氨酸产量提高 (2 倍), 而其他 3 种酶 (天冬氨酸-β-半醛脱氢酶, 二氢吡啶二羧酸还原酶和二氨基庚二酸脱羧酶) 活性的提高对赖氨酸产量影响甚微或无。

Pette^[51]将编码二氢吡啶二羧酸合成酶的基因 *dapA* 重组到质粒 pBR322 上, 获得重组质粒 pDA1。pDA1 在大肠杆菌 RDA8 中的拷贝数为 50 左右, 含 pDA1 菌株的二氢吡啶二羧酸合成酶的活力要比野生型 *dapA*⁺ 的活力大 40 倍。以 1 株天冬氨酸激酶 (AK) 同功酶 I 和 II 缺失、但能持续合成不受赖氨酸抑制的 AK III 的大肠杆菌突变株 TOC21R 为受体菌, 用 pDA1 转化, 转化子合成赖氨酸的量比 TOC21R 大 8—10 倍。

结 束 语

综上所述, 对棒杆菌和短杆菌分子克

隆系统的研究近年来已取得了一些扎实的进展。在载体、受体、转化技术以及重组DNA 基因克隆表达等方面都有一些可喜的成果。但是,目前在棒状类细菌中的基因克隆系统与大肠杆菌及枯草芽孢杆菌系统相比还比较简单,大多运用鸟枪法,克隆基因的操作仅局限于基因剂量的操作技术,并且克隆基因大多是以代谢类似物抗性为标记的单基因(编码关键酶),这些基因都只与产量有关,而编码与细菌生长等性状有关的基因克隆未见报道。外源基因在棒状类细菌中的表达还有困难;克隆技术还没有达到能在体外重组操纵子、操纵基因和启动子等。

今后,在发展棒状类细菌分子克隆系统中,继续研究载体及其转化系统,建立与大肠杆菌和枯草芽孢杆菌相互之间的穿梭体系;稳定基因工程菌;通过克隆载体及其转化受体系统的研究,阐明棒状类细菌的遗传体系,作出其染色体基因图谱;应用基因剂量和基因表达的操作技术,克隆单基因和整个操纵子,使生物合成途径的调控与体外基因操作相一致等等,都是十分必需并且有重大意义的。

重组DNA 技术应用于氨基酸发酵工业方兴未艾。可以预见,新的成果将层出不穷。希望我国遗传工程和发酵工业的研究者携起手来,迎接第三次浪潮。

参 考 文 献

- [1] 雷肇祖等: 工业微生物, (1): 1—4, 1981.
- [2] 雷英华: 工业微生物, (1): 21—27, 1984.
- [3] 郑兆鑫等: 生物工程学报, 3: 183—188, 1987.
- [4] Debabov, V.G.: US Patent 4,278,765, 1981.
- [5] Kaneko, H. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 43(4): 867—868, 1979.
- [6] Katsumata, R. et al.: *Eur. Pat. Appl.*, EP 63,763, 1981.
- [7] KKatsumata, R. et al.: *ibid.*, EP 73,062, 1981.
- [8] Miwa, K. et al.: *Agric. Biol. Chem.*, 48(11): 2901—2903, 1984.
- [9] Sandoval, H. et al.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 409—413, 1984.
- [10] Santamaria, R. et al.: *J. Gen. Microbiol.*, 130: 2237—2246, 1984.
- [11] Yoshihama, M. et al.: *J. Bacteriol.*, 162(2): 591—597, 1985.
- [12] Sandoval, H. et al.: *FEMS Microbiol. Lett.*, 27(1): 93—98, 1985.
- [13] Akio Ozaki et al.: *Mol. Gen. Genet.*, 196: 175—178, 1984.
- [14] Chang, S. & Cohen, S. N.: *Mol. Gen. Genet.*, 168: 111—115, 1979.
- [15] Santamaria, R. et al.: *J. Bacteriol.*, 162(1): 463—467, 1985.
- [16] Katsumata, R. et al.: *J. Bacteriol.*, 159(1): 306—311, 1984.
- [17] Smith, M. D. et al.: *Appl. Env. Microbiol.*, 5(3): 634—639, 1986.
- [18] Miwa, K. et al.: *Eur. Pat. Appl.*, EP93,611,1983.
- [19] Rubin, E. M. et al.: *Gene*, 10: 227—235, 1980.
- [20] Kaczorek, M. et al.: *Science*, 221: 853—858, 1983.
- [21] Greenfield, L. et al.: *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 80: 6853—6857, 1983.
- [22] Ratti, G. et al.: *Nucl. Acid. Res.*, 11: 6589—6593, 1983.
- [23] Tsuchida, T. et al.: *Fr. Demande*, FR 2,482,133, 1981.
- [24] Momose, H. et al.: *ibid.*, FR 2,484,448, 1981.
- [25] Tsuchida, T. et al.: *ibid.*, FR2,480,306, 1981.
- [26] Tsuchida, T. et al.: *ibid.*, FR 2,480,307, 1981.
- [27] Ajinomoto Co. Inc.: *Jap. Kokai Tokkyo Koho*, JP60-62, 983, 1985.
- [28] Tsuchida, T. et al.: *Eur. Pat. Appl.*, EP82,637, 1983.
- [29] Osamu, K. et al.: *ibid.*, EP85,958, 1983.
- [30] Nakamori, S. et al.: *Eur. Pat. Appl.*, EP139,387, 1985.
- [31] Ajinomoto Co Inc.: *Jap. Kokai Tokkyo Koho*, JP60-70,093, 1985.

- [32] Oka, T. et al.; PCT Int. Appl., WO84 03,301, 1984.
- [33] Ajinomoto Co. Inc.; JP. Kokai Tokkyo Koho, JP82 71,397, 1982.
- [34] Sannaku-Ocean Co. Ltd.; *ibid.*, JP82 80,398, 1982.
- [35] Aiba, S. et al.; Genet. Ind. Microorg. Proc. Int. Symp. 4th, pp 183—187, 1982.
- [36] 合叶修一; 化学工业, 32(6):597—603, 1981.
- [37] Aiba, S. et al.; *Appl. Environ. Microbiol.*, 43(2): 289—297, 1982.
- [38] Anderson, D. et al.; Genetic Tech. News, 2(10), 6 Oct., 1982.
- [39] Miwa, K. et al.; Eur. Pat. Appl., EP124,048, 1984.
- [40] 土田隆康, 三轮清志; 公开特许公报, 186,496, 1982.
- [41] Tsuchida, T. et al.; Eur. pat. Appl. EP66,129, 1981.
- [42] Ajinomoto Co. Inc.; JP. Kokai Tokkyo Koho, JP59-31,691, 1984
- [43] Nakamori, S.; Eur. Pat. Appl., EP137, 348, 1985.
- [44] Dehabov, V. G. et al.; Over-Production of Microbiol. Metabolice (EEMS Symp.), p.345, 1982.
- [45] Miwa, K. et al.; *Agric. Biol. Chem.*, 47(10): 2329, 1983.
- [46] Ajinomoto Co. Inc.; Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP60-62,994, 1985.
- [47] Ajinomoto Co. Inc.; Jpn. Kokai Tokkyo Koho, JP59-210, 887, 1981.
- [48] Miwa, K. et al.; Fr. Demande, FR2,482,622, 1981.
- [49] Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd.; JP Kokai Tokkyo Koho, JP58-126,789, 1983.
- [50] Sano, K.; US Patent 434,617, 1982.
- [51] Pette, J. C. et al.; Fr. Demande, FR2, 511,032, 1981.