

用重组DNA方法构建分解淀粉酿酒酵母的新进展

毛小洪 蔡金科

(中国科学院微生物研究所, 北京)

自1978年酵母转化方法建立以来, DNA重组技术在酵母系统中得到了日趋完善的发展, 为改良工业酵母菌种提供了新的, 更加有效的一整套方法。近年来, 美国、日本、巴西、加拿大和丹麦等国的研究人员利用重组DNA技术将各种来源的淀粉酶基因引入酵母 (*Saccharomyces*) 中, 培育能直接利用淀粉发酵生产乙醇和含酒精饮料的工业酵母, 目前已取得重大进展, 这些菌株显示出广泛的应用潜力, 不久这些分解淀粉酵母菌株很有可能进入商业化应用阶段。

酿酒酵母 (*S. cerevisiac*) 在发酵工业中广泛应用于乙醇和酒精饮料的生产, 但因缺乏分解淀粉所必需的淀粉酶, 因此在发酵过程中淀粉需经蒸煮、 α -淀粉酶液化处理和随后的酸解或酶解(糖化酶)糖化过程变成葡萄糖后才能被酵母利用。而能利用淀粉作为碳源的酵母菌株中还没有发现完全适合于用淀粉直接发酵生产酒精的菌株。如果所有或大部分淀粉能被发酵菌株直接利用的话, 将会产生很高的商业利润, 构建带有淀粉水解酶基因的酿酒酵母有可能达到上述目的, 其潜在的优越性有以下几方面: (1)减少了购买(或在另一过程产生)淀粉水解酶或大麦麦芽的需求, 降低了添加酶所需的费用; (2)增强了淀粉转化的效率, 促使利用淀粉替代糖蜜来生产各类酵母产品; (3)简化了加工步骤及设备, 加快了发酵过程, 降低了能源消耗; (4)能够消除因添加酶而带来的副作用, 因而比添加酶利用淀粉的途径更安全; (5)能够提供作为酿造过程副产品的淀粉水解酶用于糖浆生产; (6)胞外淀粉酶的产生是研究酵母蛋白质分泌的典型模式。

目前构建分解淀粉酿酒酵母菌种的工作借助的手段包括: 酵母杂交育种(包括稀有交配)、原生质体融合技术和重组DNA技术, 三种方法各有所长, 相辅相成。本文主要概述用重组DNA方法构建成的分解淀粉酿酒酵母及其应用。

淀粉酶基因的克隆与表达

目前在酿酒酵母中已表达的淀粉酶基因来源于原核生物中的枯草杆菌、低等真核生物酵母菌、丝状真菌和高等动植物小麦、鼠唾液腺、胰腺、人唾液腺(表1)。这些基因包括 α -淀粉酶基因和糖化酶基因两种。其中枯草杆菌和酵母菌的淀粉酶基因由于无内含子, 所以可从供体菌的基因文库中分离出。而丝状真菌和高等动植物的淀粉酶基因带有内含子, 为了使之在酿酒酵母中表达, 需要得到无内含子的cDNA基因, 所以必须先分离供体菌的mRNA, 建立cDNA库后再进行分离。淀粉酶基因的鉴定有以下几种方法: (1)通过在受体菌中基因表达后产生的淀粉水解圈来筛选所需淀粉酶基因克隆; (2)通过对表达产物的免疫学检测来选择转化子; (3)在无功能表达的情况下, 初始筛选可用探针杂交来进行。

值得注意的是, 某些糖化酶基因的克隆与表达需要适宜的酿酒酵母受体菌。由于大部分实验室用酿酒酵母菌株中携带了这些糖化酶基因的抑制基因^[1,2], 故需要构建基因型为 $cta^+ inh^-$ (淀粉酶基因和它的抑制基因均不存在)的受体菌来克隆目的糖化酶基因。与酿酒酵母亲缘关系很近的糖化酵母(*Saccharomyces diastaticus*)三个糖化酶基因STA1, STA2, STA3和拟囊拟内孢霉(*Saccharomycopsis fibuligera*)的糖化酶基因就是用上述受体菌克隆到的^[3-6]。我们实验室通过酵母经典杂交育种方法, 成功地构建了一系列可用于糖化酶基因克隆的受体菌, 这些菌株带有 $trp1$ 或 $leu2$ 的营养缺陷型标记, 适宜于克隆载体YR_p(TRP1)或YE_p(LEU2)的转化与筛选, 为下一步克隆糖化酶基因打下了基础。

本文于1988年10月22日收到。

表 1 用重组DNA方法构建的分解淀粉酿酒酵母
Table 1 Construction of amylolytic yeasts by recombinant DNA technique

Activity introduced	Source of gene	Recipient yeast	Promoter	Signal sequence	Expression and secretion	Ref.
α -Amylase	Wheat	<i>S. cerevisiae</i>	PGK	α -Amylase cDNA	表达量很低, 能有效地分泌	7
"	Mouse salivary	"	ADC1	"	75 μ g/L, 其中90%分泌到胞外	8
"	"	"	PGK	MF α 1	分泌量1mg/L以上	9
"	Mouse Pancreas	"	MF α 1	"	153u/ml的分泌量	10
"	Human salivary	"	PHO5	α -Amylase cDNA	诱导后表达量为 5×10^5 酶分子/cell	12
"	Mouse salivary	<i>S. diastaticus</i>	ADC1	"	5天内以>93%的转化率降解淀粉	11
"	<i>Bacillus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	α -Amylase gene	α -Amylase gene	123u/ml的分泌量	14
"	<i>Saccharomyces fibuligera</i>	"	"	"	能表达和分泌	13
Glucoamylase	<i>Rhizopus oryzae</i>	"	Glucoamylase gene	Glucoamylase cDNA	0.005u/ml的分泌量	18
"	"	"	GPD	"	100-300mg/L	19
"	"	"	PGK	"	50-100mg/L	19
"	"	"	PHO5	"	"	19
"	<i>Aspergillus awamori</i>	"	ENO1	"	1mg/L分泌量	20
"	"	Distiller's Yeast	"	"	能利用95%的糊精	21
"	<i>Aspergillus niger</i>	<i>S. uvarum</i>	Dex1	Dex1	3.9mg/L分泌量	22
"	<i>Saccharomyces fibuligera</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Glucoamylase gene	Glucoamylase gene	能利用麦芽糊精生产低卡值啤酒	6
"	<i>S. diastaticus</i>	"	STA1	STA1	5.2u/ml透析液	3
"	"	<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	"	"	转化子酶活比供体菌高5-10倍	24
"	"	<i>S. cerevisiae</i>	Dex1	Dex1	1.8 $\times 10^2$ u/ml透析样品	25
"	"	<i>S. calshbergensis</i>	"	"	能表达和分泌	23
"	"	"	"	"	能利用30%的麦芽糊精	4
"	"	<i>S. cerevisiae</i>	STA2	STA2	能表达和分泌	4
"	"	"	STA3	STA3	能表达和分泌	5

外源淀粉酶基因在酿酒酵母中的表达一般需要在其5'端加上酵母启动子片段。为了得到高效表达产物,经常使用糖酵解酶如PGK(3-磷酸甘油酸激酶)、ENO1(烯醇酶1)、GPD(3-磷酸甘油醛脱氢酶)、ADC1(乙醇脱氢酶1)和MF α 1

(信息素 α -因子)等基因的组成型启动子。诱导型启动子如PHO5(酸性磷酸酶5)、半乳糖代谢途径GAL1(半乳糖激酶)、GAL10(UDP-D-半乳

糖4-差向酶)等基因的启动子也可被使用。从经济角度和使用的简便性方面考虑,对于胞外淀粉酶基因的表达,使用组成型启动子优于诱导型启动子,因为酵母产生的组成型淀粉酶将分泌到培养液中,避免了外源蛋白质在细胞内积累而引起对细胞生长的抑制。

(一) 外源 α -淀粉酶基因引入酿酒酵母中表达,构建分解淀粉酵母菌株

构建分解淀粉酿酒酵母的工作集中在两方面, 其中之一是使 α -淀粉酶基因引入酿酒酵母。小麦^[7]、鼠唾液腺^[8, 9, 11]、胰腺^[10]、人唾液腺^[12]、拟内孢霉^[13]和枯草杆菌^[14]的 α -淀粉酶基因都在酿酒酵母中得到了表达并从细胞分泌到胞外。在已知的 α -淀粉酶中, 胰 α -淀粉酶证明是最有效的酶之一, 它能在淀粉糖苷键的多位点进行水解。巴西巴西利亚大学的Filho, S. A. 等(1986)将鼠胰 α -淀粉酶的cDNA插入表达质粒MFa1的启动子和分泌信号之后, 得到了稳定的酵母转化子, 它能将95%以上的 α -淀粉酶分泌到胞外, 转化子经48h培养后, 几乎所有淀粉被水解掉, 培养基上清液中酶活可达153u/ml^[10]。但由于 α -淀粉酶降解的主要产物是麦芽糖和麦芽三糖, 而受体菌中缺少麦芽糖酶和酵母糖化酶, 因此上述转化子还不能直接用于淀粉发酵产生酒精。他们将此转化子与麦芽糖酶组成型的酿酒酵母和糖化酵母杂交, 选出同时具有三种酶活的分离子。在以木薯粉为碳源的中等规模发酵实验中, 该酵母能以89%的产量生产乙醇, 但22%的糊精残留下来, 而且发酵速率低于用木薯粉水解液生产乙醇的酒精酵母。紧接着他们将上述分离子与 α 交配型酵母融合, 得到了多倍体融合子, 它的酒精产量高于单倍体亲株, 接近于用木薯粉水解液生产乙醇的酒精酵母。这是目前得到的最令人鼓舞的结果^[15]。

小麦的 α -淀粉酶基因虽然置于酵母强启动子之后, 但表达水平仍然较低, 推测可能是由于基因的密码偏倚性较高所致^[7]。另外枯草杆菌(*Bacillus amyloliquefaciens*) α -淀粉酶基因在酿酒酵母中用自己的启动子、分泌信号及终止区使其表达并分泌, 分泌量为123u/ml, 与带有该基因的枯草杆菌转化子分泌量相当, 看来啤酒酵母能特异性识别枯草 α -淀粉酶基因的调控信号^[14]。日本研究人员还报道了扣囊拟内孢霉 α -淀粉酶基因在酿酒酵母中克隆与表达成功, 该基因负责编码494个氨基酸的 α -淀粉酶分子^[13]。

三菱化成生命科学研究所的F. Hishinuma领导的研究小组将鼠唾液腺 α -淀粉酶cDNA基因置于不同的酵母启动子和分泌信号之后, 结果发现在强启动子PGK控制下, MFa1和K氏酵母(*Kluyveromyces Lactis*)的线状质粒PGKL1,

PGKL2上的分泌信号都能使 α -淀粉酶分泌到胞外, 且比 α -淀粉酶分子本身的分泌信号更有效, 更适用于酿酒酵母的分泌途径。他们构建的分泌质粒pMT56、pNW037、pNW052都能产生1mg/L以上的胞外 α -淀粉酶。使用这样的发酵菌株, 将来可少用或不用添加所需的 α -淀粉酶^[9]。

(二) 将糖化酶基因引入酿酒酵母中表达, 构建分解淀粉酵母菌株

构建分解淀粉酿酒酵母的另一方面工作集中于将来源于丝状真菌和酵母菌本身带有的糖化酶基因引入酿酒酵母中。曲霉糖化酶是重要的工业酶源之一, 它能在 α -1,4键和 α -1,6键水解淀粉分子。现有的真菌糖化酶cDNA基因来源于泡盛酒曲霉(*Aspergillus awamori*)^[16]、黑曲霉(*Aspergillus niger*)^[17]和米根霉(*Rhizopus oryzae*)^[18, 19]。泡盛酒曲霉的糖化酶基因有一24个氨基酸的信号肽序列和4个内含子, 它负责编码两种形式、分子量相差10000道尔顿的糖化酶分子G1、G2, 两者的氨基末端是相同的, 只是羧基末端不同, 这可能是由于糖化酶mRNA加工不同造成的^[16]。Innis, M. A. (1985)等人首次将泡盛酒曲霉GA1的cDNA序列引入酿酒酵母表达载体, 在ENO1启动子控制下得到了表达, 并有90%的糖化酶分泌到胞外。该转化子能利用95%的作为碳源的糊精, 表明 α -1,6分枝点被水解掉了。然而与添加酶过程的发酵速度相比, 其整个发酵过程是相当慢的, 该菌株的酒精耐受性差、表达质粒的稳定性和糖化酶表达水平也较低, 因此不适用于工业生产酒精^[20]。

在上述基础上, Cetus公司的研究人员(1988)通过删除表达框架中ENO1的URS区(上游负调节序列)、使前原糖化酶5'端非翻译区的mRNA前导序列与天然ENO1的mRNA前导序列极其相近, 得到了一批新的表达质粒, 它们的转化子糖化酶表达水平都有很大程度的提高, 最高可达3.9mg/L, 连续发酵实验表明, 一株稳定高产糖化酶的酒精酵母转化子经800代生产后表达量仍保持原有水平, 在含25%可溶性淀粉碳源中约95%被利用, 并且酒精产量也有提高达118.2g/L。他们还发现, 淀粉发酵的速率直接与糖化酶的表达水平相关, 表达水平越高, 发酵速率越快, 上述转化子的发酵速率仍有待提高, 能够发

酵麦芽糖、异麦芽糖的工业酵母菌株在这方面尤其重要^[21]。

Boel, E. 等(1984年)从黑曲霉中分离到糖化酶的cDNA序列和基因组序列^[17]。有趣的是,泡盛酒曲霉和黑曲霉的糖化酶有相同的氨基酸序列,只是核苷酸序列有很小的差异。最近美国Bio-technica公司的科学家将黑曲霉糖化酶的cDNA基因置于糖化酵母糖化酶基因STA2的启动子和信号肽后,然后将其插入葡萄汁酵母染色体中得到了相应的转化子,该菌株具有酿制淡啤酒的能力,去除了添加糖化酶的中间步骤,进一步中试仍在进行之中^[22]。

日本三得利公司对米根霉的糖化酶基因进行了深入的研究。根霉在固体培养时产生大量的糖化酶,该糖化酶的生淀粉降解能力很强。根霉基因组糖化酶序列有4个内含子,因此不能在酿酒酵母中表达,经DNA重组得到带该基因5'侧序列和编码区cDNA序列的糖化酶基因,将其转入酿酒酵母后得到了糖化酶的表达和分泌,然而表达水平之低不足使该转化子直接利用淀粉生产酒精^[18]。他们通过置换酵母强启动子,使糖化酶表达量大幅度提高,每升达几十毫克,这种分解淀粉酵母用于生淀粉发酵可产生13%的酒精,使原来生产工艺中的糖化和酒化两步合为一步,该无曲制酒精新菌种已在日本投产^[19]。

糖化酵母的糖化酶基因对构建能发酵麦芽糊精的酿酒酵母很有吸引力,这是因为:(1)不需特殊处理便可在宿主中使糖化酶基因表达;(2)糖化酵母的糖化酶比黑曲霉的糖化酶更不耐热,在发酵后巴斯德处理过程中更易失活,这对低卡值啤酒在贮藏过程中保持风味来说非常重要。STA1、STA2、STA3三个糖化酶基因都已在酿酒酵母中克隆和表达成功^[3,4,5],它们分别负责编码三种糖化酶同工酶I、II、III。目前只有STA2基因引入了工业酿酒酵母中,该菌株能在无脱支酶活力情况下,水解30%的麦芽糊精,用它生产出的淡啤酒引人注目。然而要使啤酒中含糖量低于1%(W/V),还需引入能水解 α -1,6分支键的基因,减少支链糊精的数量^[23]。

到目前为止,用重组DNA方法使特异的脱支酶基因在酿酒酵母中表达的工作还未报道,但来源于产气克雷伯氏菌(*Klebsiella aerogens*)的

支链淀粉酶(脱支酶)基因已被克隆并鉴定^[26,27],另外巴西利亚大学的研究人员已在啤酒酵母中克隆到了来源于克雷伯氏菌(*Klebsiella pneumoniae*)的脱支酶基因。使该基因在酿酒酵母中表达能提高对淀粉的利用率,因为它能特异性水解淀粉的 α -1,6分支键^[15]。

(三) 淀粉酶基因导入工业酵母受体技术及其稳定性

为了将淀粉酶基因引入工业发酵菌株,需要使用显性选择标记筛选转化子,从而不必对工业受体菌株进行遗传修饰便可进行遗传操作。工业菌株通常都是原核型多倍体,对其诱变处理可能会使生产能力或产品风味发生变异,况且多倍体菌株得到突变体的频率比单倍体要低得多,很不容易得到。现有显性标记中G418(氨基葡萄糖苷)抗性选择效果最佳,酿酒酵母对常用的抗菌素不敏感,但对G418是敏感的,将大肠杆菌Tn601上的氨基葡萄糖苷磷酸转移酶基因(aphA)置于酵母启动子后,表达产物将使转化子对G418产生抗性,利用该选择标记已将黑曲霉和泡盛酒曲霉的糖化酶cDNA基因转入酿酒酵母及酒精酵母中^[21,22]。BioTechnica公司的Yocum等人构建了专门用于野生型多倍体生产酵母的整合质粒,它带有G418抗性基因和同宗配合(homothalism)的hoDNA序列,可使质粒整合定位于ho位点,这个基因参与交配型的开启,在多倍体中是关闭的。由于每个酵母细胞都有ho位点,这一技术有希望成为通用的手段^[22]。另一常用选择标记是CUP1(铜整合蛋白基因),由于一些酿酒酵母菌种对铜离子比较敏感,用CUP1基因作抗性标记的载体转入酵母受体后可使酵母菌的铜离子抗性能力提高。带有CUP1基因的自我复制型质粒在下面发酵酿酒酵母中相当稳定,而在上面发酵菌株中很不稳定。用这一标记已使STA2基因成功地引入工业酵母中,带有该标记的转化子经过45次细胞传代后没有发现丢失质粒的情况^[23]。

质粒多拷贝整合对提高基因表达水平和稳定性来说是一个重要的因素。Yocum发现要在工业生产条件下保持质粒的稳定性,则必须整合插入不止一个ho位点上,在无选择压情况下,整合质粒在模拟体积 10^{10} 升时仍很稳定^[22]。另外,Cole, G. E. 等发现带两个整合拷贝的菌株产糖化

酶的水平已跟带多拷贝自我复制质粒的菌株相当, 这有可能是因为当基因表达更紧密地和细胞周期联系在一起时, 分泌途径对蛋白质的加工更有效^[21]。

(四) 各种来源淀粉酶基因信号肽的比较

在酵母中表达的淀粉酶基因有一显著特点: 无论是来源于枯草杆菌的 α -淀粉酶基因, 还是来源于黑曲霉的糖化酶基因, 其产物都能有效地分泌到培养基中, 这与酿酒酵母自然分泌的几种酶情况不同, 它们大部分存在于细胞壁内。我们比较了一下几种糖化酶信号肽的氨基酸组成(表2),

表 2 几种糖化酶信号肽的比较

糖化酶(来源)	信号肽	成熟酶N-末端残基
AGA(<i>Aspergillus niger</i>)	<u>MSFR</u> SLLLSG- <u>LVCTGLANV</u> ISKR	A
RGA(<i>Rhizopus oryzae</i>)	<u>MQLFN</u> LPLKVS- <u>FFLVLSYFSL</u> LVSA	A
SGA(<i>Saccharomycesopsis fibuligera</i>)	<u>MKEGV</u> LFSVEA- <u>AIVSAIPLQEG</u> PLNKR	A
DGA I (<i>Saccharomyces diastaticus</i> STA1)	<u>MQRPF</u> LLAYLV- <u>LSLLFNSA</u>	L
DGA II (<i>Saccharomyces diastaticus</i> STA2)	<u>MQRPF</u> LLA- <u>YLVLSLLFNS-</u> <u>ALG</u>	unknown

注: 残基符号上有横线者为带电荷氨基酸残基, 下有横线者为疏水性氨基酸。M: Met, Q: Gln, L: Leu, F: Phe, N: Asn, P: Pro, K: Lys, V: Val, S: Ser, Y: Tyr, A: Ala, I: Ile, D: Asp, H: His, G: Gly, E: Glu, R: Arg, T: Thr, W: Trp

发现绝大多数为疏水性氨基酸, 偶而有个别带电荷氨基酸残基, 信号肽长度从21—30个残基不等, 这和信号肽的一般特点相符, 除此之外无其它特性。Kaiser, C.A.等(1987)在研究了酿酒酵母蔗糖酶的信号肽序列后推论: 信号肽识别特异性是很低的, 任何氨基末端的肽段只要疏水性超过某一阈值, 并包括很少的带电荷残基, 都将在一定程度上发挥信号肽功能^[28]。因此我们分析: 各种来源的淀粉酶都能有效地分泌到胞外可能是它的结构特性决定的, 有必要进一步研究胞外淀粉

酶的高级结构以加深对分泌机制的认识。

分解淀粉酿酒酵母菌株存在的问题及其对策

虽然构建分解淀粉酿酒酵母的工作已取得相当大的进展, 但仍存在不少问题需要解决。构建的多数菌株利用糊精及淀粉的能力是有限的, 而且降解速率较慢, 这一方面是由于淀粉酶的表达水平低造成的, 另一方面也是由于表达的淀粉酶只具有 α -1,4键或 α -1,6键水解能力引起的。淀粉的快速、完全水解需要酵母菌能够同时产生 α -淀粉酶、糖化酶和脱支酶, 使得淀粉的酶解产物最终为可发酵糖分子。那么外源淀粉酶基因在酿酒酵母中需要多高的表达量、各种水解酶需要怎样的组合才能得到令人满意的协同糖化和发酵速率以及较高的淀粉利用率都要进一步探讨, 而且分泌大量胞外酶的菌株在其发酵特性和产品风味上是否受到不利影响也还需要观察。用未蒸煮生淀粉来生产酒精的直接糖化过程已在工业化规模得以实现, 使分解淀粉菌株以可与添加酶过程相比的效率及速度来利用淀粉则是下一步奋斗的目标。

自然界为我们提供了相当多的淀粉水解酶来源, 通过进一步努力, 还有希望得到新的淀粉酶基因用于发酵淀粉菌株的构建。从利用淀粉生产酒精方面考虑, 受体菌应选择乙醇耐受性高且发酵速率快的菌株, 控制淀粉酶基因表达的酵母启动子应是不受淀粉水解和发酵过程中产生的葡萄糖抑制的高效组成型启动子, 并且表达框架应多拷贝整合插入到酵母染色体上, 以便得到高产稳定的糖化酶用于淀粉水解。发酵菌株应同时具备 α -1,4和 α -1,6键水解能力, 最好还具有麦芽糖酶活力, 以提高对淀粉的利用率。用大麦 α -淀粉酶 β -淀粉酶cDNA基因在酿酒酵母中表达可能会使酿造出的啤酒风味更受欢迎, 还能减少麦芽的使用量, 国外还没有这方面的报道。

总之, 分解淀粉酵母的研究不仅有重大的应用价值, 而且对研究外源淀粉酶基因的表达调控, 蛋白质分泌等基础课题也很重要。

参 考 文 献

- [1] Yamashita, I. et al. : *Agric. Biol. Chem.*, 48(1):137—141, 1984.
- [2] Polaina, J. et al. : *Curr. Genet.*, 7:109—112, 1983.
- [3] Yamashita, I. et al. : *Agric. Biol. Chem.*, 47:2689—2692, 1983.
- [4] Pretorius, I. S. et al. : *Mol. Gen. Genet.*, 203:29—35, 1986.
- [5] Yamashita, I. et al. : *J. Bacteriol.*, 2:574—582, 1985.
- [6] Yamashita, I. et al. : *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 23:130—133, 1985.
- [7] Rothstein, S. J. et al. : *Gene*, 55:353—356, 1987.
- [8] Thomesen, K. K. : *Galsberg Res. Commun.*, 48:545—555, 1983.
- [9] Hishinuma, F. et al. : Annual Report, Mitsubishi-Kasei Institute of Life Sciences 35—40, 1985; 35—41, 1986, 72—75, 1987.
- [10] Filho, S. A. et al. : *Bio/Technology*, 4:311—315, 1986.
- [11] Kim, K. et al. : *Appl Environ. Microbiol.*, 54:966—1002, 1988.
- [12] Sato, T. et al. : *Gene*, 50:247—257, 1986.
- [13] Yamashita, I. et al. : *Agric. Biol. Chem.*, 49(10):3089—3091, 1985.
- [14] Pretorius, I. S. et al. : *Curr. Genet.*, 14:1—8, 1988.
- [15] Harvey, B. : *Bio/Technology*, 6:1139, 1988.
- [16] Nunberg, J. H. et al. : *Cell Mol. Biol.*, 4:2306—2314, 1984.
- [17] Boel, E. et al. : *EMBO J.*, 3:1097—1102, 1984.
- [18] Ashikiri, T. et al. : *Agric. Biol. Chem.*, 50(4):957—964, 1985.
- [19] Yoshizumi, H. et al. : *Trends Biotech.*, 10:277—281, 1987.
- [20] Innis, M. A. et al. : *Science*, 228:21—26, 1985.
- [21] Cole, G. E. et al. : *Bio/Technology*, 6:417—421, 1988.
- [22] Brunt, J. V. et al. : *Bio/Technology*, 4:1057—1062, 1986.
- [23] Meaden, P. G. et al. : in Proceedings of the 20th European Brewery Convention Congress, Helsinki, 219—226, 1985
- [24] Yamashita, I. et al. : *Agric. Biol. Chem.*, 48:1931—1932, 1984.
- [25] Meaden, P. G. et al. : *Gene*, 34:325—334, 1985.
- [26] Takizawa, N. et al. : *Appl. Environ. Microbiol.*, 49:294—298, 1985.
- [27] Michaelis, S. et al. : *J. Bacteriol.*, 164:633—638, 1985.
- [28] Kaiser, C. A. et al. : *Science*, 235:312—317, ©1987 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>