

# 綜 述 評 論

## 微生物遗传育种的国外动态

盛 祖 嘉

(复旦大学生物系, 上海)

育种工作的理论基础是遗传学。本文简单介绍近年来国外和育种有关的微生物遗传学方面的动态及其在微生物育种工作中的应用。

### 一、突变的控制和诱变育种

自从 1909 年在果蝇中发现基因突变以后, 直到 1927 年才发现突变可以为 X 射线所诱发, 这是尝试控制突变的开始。1946 年发现了化学诱变剂, 接着在 1949 年发现了光复活作用。这给人们以新的启示, 既然突变是可以恢复的, 那么突变必然经历一个过程, 只要详尽地研究这一过程, 突变就能被控制。在五十年代中, 应用微生物中的回复突变作为研究对象, 报道了一些专一性的诱变现象。在 1953 年所提出的 DNA 分子结构理论的推动下, 诱变机制的研究出现了一个飞跃, 那便是 1959 年所提出的诱变机制理论, 即碱基对的转换和颠换。这一理论为回复突变中专一性的诱变效应提供了一种解释。可是从控制突变这一角度来看, 这并不意味着在育种工作中我们能够控制突变。这是因为回复突变常是某一碱基对的改变的结果, 可是在诱变育种工作中需要诱发正向突变, 而正向突变则涉及一个基因中几千碱基对中的任何一个碱基对的改变, 所以诱变剂就不容易显出它们的专一性。

碱基对转换和颠换理论指出, 诱发突变是通过诱变剂和碱基的反应以及 DNA 的复制而完成。在六十年代中有人试图通过控制 DNA 的复制而控制突变。例如将大肠杆菌 Hfr H 经 4°C 处理后进行同步培养, 培养不同时间后在相对湿度 60% 中用 320—400 毫微米光线处理, 接着用青霉素浓缩法选出营养缺陷型。发现经不同时间的同步培养后再进行处理, 这时所出现的缺陷型各不相同 (表 1)。

表 1 半干燥状态中的大肠杆菌 Hfr H 經不同时间的同步培养后再用 320—400 毫微米光线处理后所得到的营养缺陷型<sup>[1]</sup>

同步培养时间 (分钟)	出现的营养缺陷型
15	his(39)*
30	met(59—78), ser(57—89), cys(53—72)
60	lac(10), pro(9—10)

\* 括号中的数字系本文作者所加, 表示所查得的各个基因在染色体上的位置。这位置用杂交时基因转移的时间(分钟)表示。

以上结果被解释为半干燥状态中的细胞色素把所吸收的光能传递给 DNA 而引起突变, 诱变效果最强的部位认为是 DNA 正在进行复制中的部位。这里诱变作用的专一性表现在正向突变中, 具有一定的实践意义。

当许多人注意在研究诱变剂和碱基的化学反应的同时, 也有人注意到接受诱变处理的生物细胞的生理状态的重要性。在五十年代后期, 有人发现在光复活作用中有酶参予作用。六十年代初发现了光复活酶的作用在于分解被紫外线处理而形成的胸腺嘧啶二聚体, 从而使 DNA 所受的损伤得以恢复。接着又发现了在黑暗中的细菌也有修补 DNA 损伤的机能, 这些机能又和另一些酶有关, 而且和基因突变有关。

DNA 的暗修补一般认为可以分为复制前修补和复制后修补两类, 复制后修补也就是重组修补。修补过程和一些酶的作用可以用图 1 表示。

比较失去光复活能力的菌株 (phr<sup>-</sup>) 和野生型菌株 (phr<sup>+</sup>) 的诱变反应的结果说明, 光复活酶所促成的反应 (即胸腺嘧啶二聚体的分解) 和突变的发生较少关系。比较多聚酶突变型和野生型的结

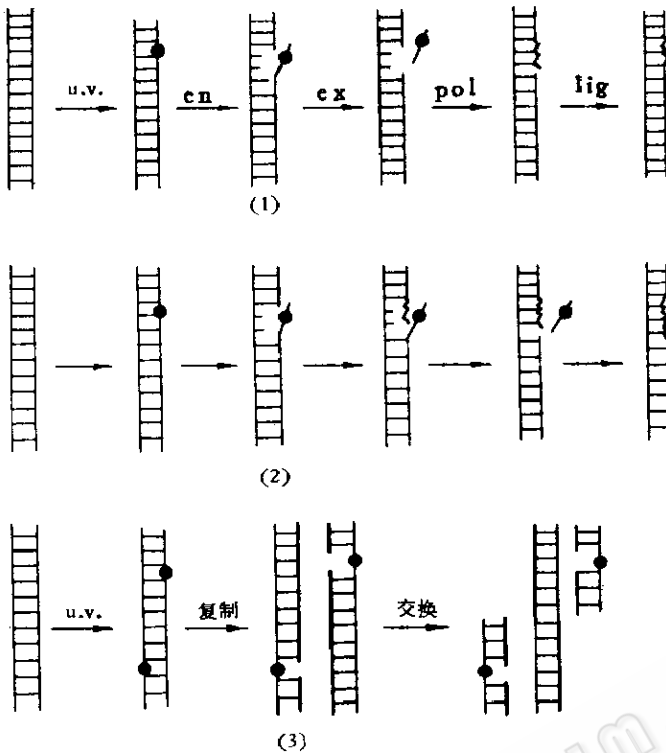


图1 DNA的三种暗修补作用示意  
 (1) 先切后补 (2) 先补后切 (3) 重组修补  
 u. v. = 紫外线处理  
 cn = 内核酸酶 (endonuclease)  
 cx = 外核酸酶 (exonuclease)  
 pol = DNA 多聚酶 (DNA polymerase)  
 lig = 连接酶 (ligase)

果说明,切补过程可以导致基因突变。可是更多的突变可能发生在胸腺嘧啶二聚体没有被切除的情况下,因为在大肠杆菌中曾发现在切补缺陷型( $hcr^-$ )中紫外线可以比在野生型( $hcr^+$ )中诱发更多的突变。此外,在重组缺陷( $rec^-$ )中不易诱发突变,这一事实说明,在切补缺陷型中可以诱发更多的突变正是由于重组修补机制的作用结果,而重组确能导致突变。这些方面的研究是在突变机制研究中近年来较为活跃的一个领域<sup>[2]</sup>。

总起来讲,可以看到基因突变控制包括诱变剂的选择,DNA复制的控制和一系列酶的控制,而酶的控制又包括遗传型的控制和培养以及处理条件的控制。这里也可以看到对于突变机制的认识和突变控制虽然已经有很大的进展,但是离开完全控制基因突变还有相当大的距离。因此当前在诱变育种工作中注意力并不集中在诱变处理本身,而是从各个方面考虑如何提高

工作效率,其中包括工作的全面部署,提高初筛效率,改进筛选方法以及操作的自动化等等。

## 二、基因重组和杂交育种

多数微生物不产生有性孢子,所以在四十年代以前普遍地认为多数微生物中不存在基因重组。1946年应用营养缺陷型标记方法首先在大肠杆菌中发现了基因重组现象,以后应用同一方法陆续在真菌、放线菌、假丝酵母等其他微生物中发现基因重组现象。通过杂交育种方法也已经在放线菌和真菌中育成高产菌株。

近年来,除了对大肠杆菌的基因重组进一步从DNA复制和代谢的角度深入研究以外,在另外两个方面有一些和杂交育种有关的新的发现,即细菌杂交不孕性问题和附加体(episome)重组。

在六十年代以前,普遍地认为细菌杂交能否成功决定于F因子,可是在1962年,有人发现还有其他因素起着作用<sup>[3]</sup>。当外来的DNA进入一个细菌细胞以后往往遭到受体细胞内两种酶的作用。一种是甲

基化酶,它使外来DNA的某些特定位置的腺嘌呤和胞嘧啶转变为6-甲基腺嘌呤和5-甲基胞嘧啶,经甲基化以后的DNA不被核酸酶所分解;另一种是核酸酶,也称为限制酶,它促使没有被甲基化的DNA的分解。外来的DNA进入受体细胞以后或是被甲基化或是被分解(或者说被限制),两者必居其一。细菌杂交或F因子转移能否成功常决定于受体细菌的限制作用。

甲基化作用和限制作用都是细菌酶的作用结果,因此必定能够得到失去甲基化作用或限制作用的菌株,将失去限制作用的菌株作为杂交的受体往往就能克服杂交不孕。例如 *Citrobacter freundii* 不容易接受大肠杆菌的F因子(感染率小于  $3 \times 10^{-4}$ ),如果将少数感染了F因子的细菌用吡啶黄除去F因子,然后再进行F因子转移试验时就可以得到感染率为  $1.8 \times 10^{-4}$  的非限制性菌株( $R^-$ ),它们显然是野生型( $R^+$ )菌株的突变型。

*C. freundii* 和大肠杆菌以及沙门氏菌杂交时都很难得到重组体,但是用前者的非限制性菌株作为受体时便容易得到杂交子代<sup>[4]</sup>。利用基因连锁知识和采用非限制性的受体,曾经通过杂交使大肠杆菌具有固氮能力<sup>[5]</sup>。肺炎克氏杆菌(*Klebsiella pneumoniae*)能固定大气中的氮气,它的固氮基因和组氨酸基因紧密连锁。把野生型的克氏杆菌和已经知道不具限制作用的大肠杆菌C的抗链霉素、组氨酸缺陷型进行杂交,在不含组氨酸但含有链霉素的培养基上能选择不需要组氨酸的链霉素耐药性杂交子代菌落。这些细菌除了能固氮以外其他特征都与大肠杆菌相同。

在细菌中基因重组不限于染色体基因,还包括附加体。所谓附加体是细胞中的染色体以外的DNA短链,它们既可以脱离染色体而存在也可以依附(插入)染色体而存在,例如F因子和温和噬菌体都是附加体。当大肠杆菌的Hfr菌株的F因子从染色体上脱离时如果带有染色体基因,那么通过F因子的感染转移就可以使受体细菌获得外来的基因,从而改变它的遗传性状。由于各个Hfr菌株中F因子的位置不同,所以可以获得转移不同基因的F因子<sup>[6a]</sup>。带有乳糖发酵基因F因子的菌株称为F<sub>lac</sub>,从这一菌株可以筛选得到F因子变为温度敏感状态的菌株(F<sub>TS lac</sub>)<sup>[6b]</sup>,这些细菌在42℃以上培养时,F因子将由于不能复制而消失。

从染色体上脱离下来的F因子,可以再回到染色体上去,这些菌株可以从F<sub>TS lac</sub>和F<sup>-</sup>lac<sup>-</sup>细菌的混合培养中筛选得到,方法是在42℃中培养一段时间后选出乳糖发酵的细菌。因为只有当F<sub>TS lac</sub>因子回到染色体上去时才能使F<sup>-</sup>lac<sup>-</sup>细菌在42℃中培养时成为能发酵乳糖的细菌。

大肠杆菌对于噬菌体T<sub>1</sub>是敏感的。决定它的敏感性基因的旁边是温和噬菌体φ80的位置。在上述混合培养中加入噬菌体T<sub>1</sub>,就可以得到抗T<sub>1</sub>的乳糖发酵细菌,在这些细菌中F<sub>TS lac</sub>因子插入染色体的位置必定在T<sub>1</sub>基因中央,因此也在φ80的旁边;不过这里所用的乳糖不发酵的F<sup>-</sup>菌株应是发酵基因缺失的菌株F<sup>-</sup>Δlac,这样可以避免F<sub>TS lac</sub>因子插入在乳糖发酵基因的旁边。这些细菌经诱导后可以释放能够转移乳糖发酵基因的φ80。同样可以得到能转移其他基因的φ80<sup>[7]</sup>。

不但染色体和附加体可以发生重组,附加体和附加体也能发生重组。如果首先获得带有φ80

位置以及某些基因的F因子的菌株,将它和另一带有其他基因的F因子的菌株进行杂交,选择F因子标记发生重组的杂交子代,然后再用φ80进行感染,就能获得能转导某一基因组合的φ80。

近年来,曾利用以上所举的一些方法进行了遗传学中某些基础理论的研究,例如单个乳糖发酵基因的分离,将乳糖发酵操纵子转移到染色体上的另一位置,使它受嘌呤或色氨酸操纵基因的控制,以便研究酶的合成过程中的遗传调节机制等等。它们在杂交育种工作中应用的可能性也是显而易见的。

### 三、结构基因和微生物育种

由于对DNA分子结构、遗传密码、突变机制以及突变型的蛋白质结构分析等方面的研究,在五十年代末对于结构基因已经有了一个明确的概念。

当一个结构基因发生突变时,一种蛋白质的分子结构就发生相应的改变。如果这是一种酶蛋白,那么这改变可能使这酶作用的最适温度、最适pH或对金属离子抑制作用的敏感性等发生变化,也可能使这酶失去活性。在合成代谢途径中,一种酶的失活直接使某一生化反应发生遗传性的障碍。这种障碍导致某一营养缺陷型的出现,也常导致某一代谢中间产物的积累,这就是利用营养缺陷型进行发酵生产的根据。有些营养缺陷型已经在生产上应用<sup>[8]</sup>。

利用微生物发酵方法现代化工业生产氨基酸等辅助食物是从1957年谷氨酸的生产开始,紧接着就应用微生物的营养缺陷型生产必需氨基酸以及核苷酸。到目前为止,至少赖氨酸和苏氨酸已大量生产。赖氨酸生产中所用的是谷氨酸小球菌(*Micrococcus glutamicus*)的高丝氨酸缺陷型,它能产赖氨酸达40克/升,以重量计25%的葡萄糖可以转化为赖氨酸。在苏氨酸生产中结合营养缺陷型的利用和代谢调节控制方面的措施,产量达6克/升。在核苷酸生产中同样利用营养缺陷型以及代谢调节方面的措施使鸟核苷和肌苷产量每升分别达4克和10克。此外,利用营养缺陷型而使苏氨酸、高丝氨酸、异亮氨酸、苯丙氨酸等的产量达2—20克/升,这些都有报道。

### 四、调节基因、代谢调节和微生物育种

一个菌株能否产生某一种具有正常活性的酶

决定在结构基因,但是在什么情况下产生这酶却为调节基因所决定。主要根据乳糖发酵中酶合成的研究,终于在1961年出现了关于代谢调节的理论,同一理论也适用于合成代谢的遗传调节。这理论可以用图2概括。

近年来,代谢作用遗传调节研究方面的进展<sup>[9a]</sup>,包括单个结构基因的分离; $\beta$ -半乳糖苷酶阻遏物被证明为一种蛋白质,并把这种蛋白质分离提纯而且测定了它和操纵基因 DNA 的结合以及诱导物的影响。通过极性突变的研究揭示转录过程,特别是转录的开始和中止。通过遗传学分析发现紧接着操纵基因 O 的前面还有一个发动基因 P (promotor)。关于乳糖分解酶方面目前一般认为 P 为转录开始时 RNA 多聚酶结合部位,如果阻遏物和 O 相结合那么转录就不能进行,如果由于诱导物的存在而使阻遏物不再能和 O 相结合那么转录就能进行。

总之,在分解代谢中,酶由于底物的存在而产

生;在合成代谢中,酶由于代谢产物积累而停止产生。这些机制十分有利于微生物的生存,因为它们使微生物需要这些酶时才进行合成,而在不需要时则停止合成。

可是这些调节作用还只能起一半作用,原因是它们只能使细胞在不需要这些酶时停止合成,而不能使已有的酶停止作用。这就得有另一些调节机制来作为补充。几乎和代谢的遗传调节理论提出的同时有人提出了反馈抑制和分解阻遏概念<sup>[9b]</sup>。总之,微生物的代谢控制至少包括以下几种。

#### 分解代谢的调节

诱导 (enzyme induction)——影响酶的合成  
分解阻遏 (catabolic repression)——影响酶的合成  
分解抑制 (catabolic inhibition)——影响酶的作用

#### 合成代谢的调节

阻遏 (repression)——影响酶的合成  
反馈抑制 (feed back inhibition)——影响酶的作用

分解阻遏也和诱导与(合成)阻遏一样,通过影响酶的合成而调节代谢作用。当培养基中一种利用率较高的糖(例如葡萄糖)和另一种利用率较低的糖(例如乳糖)同时存在时,微生物优先利用前者,这时  $\beta$ -半乳糖苷酶的合成便受到阻遏。

微生物细胞中已有的酶的作用的调节,主要依靠分解抑制和反馈抑制作用。在分解抑制中,一种利用率较高的底物或它的中间代谢产物抑制利用率较低的酶的作用;在反馈抑制中,代谢最终产物抑制合成途径中的第一个酶的作用。不过,合成代谢途径常是交叉的、分枝的。象图3(1)那样情况中,如果代谢最终产物  $P_1$ 、 $P_2$  或  $P_3$  都能抑制第一个酶 a 的作用,那么这种代谢调节机制对于微生物还是不利的,因为假如培养基中存在着大量的  $P_1$  而缺乏  $P_2$  和  $P_3$ ,在这种调节机制的作用下微生物将由于不能

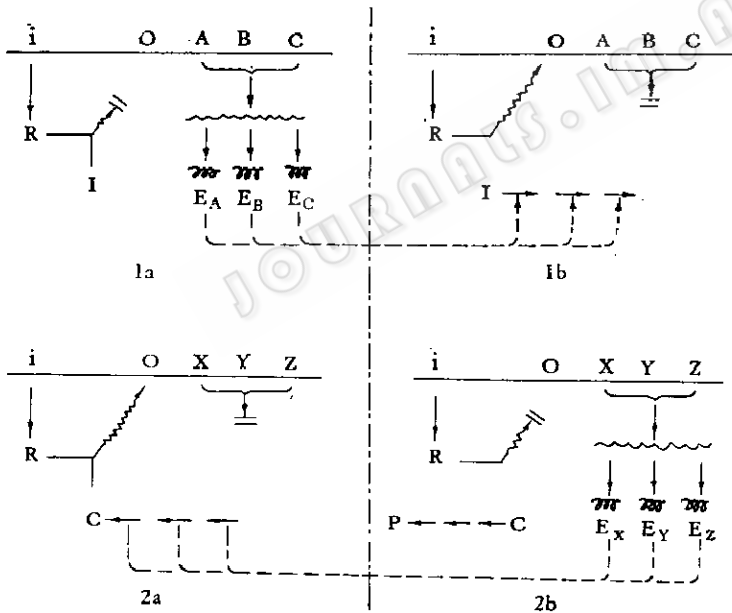


图2 分解代谢和合成代谢中酶合成的遗传调节机制图解

1a, 1b. 为分解代谢: 1a, 诱导物 I 存在导致酶的合成;

1b, 诱导物 I 因酶的作用而消失导致酶合成中止。

2a, 2b. 为合成代谢: 2a, 最终产物 C 因酶的作用而形成,使酶合成中止;

2b, 最终产物 C 在酶的作用下形成 P 而消失,导致酶的合成。

i = 调节基因 (regulator gene) O = 操纵基因 (operator)

A, B, C. (或 X, Y, Z) = 结构基因,合在一起成为一个操纵子 (operon)

E = 酶

R = 阻遏物 (repressor)

~~~~~ 表示阻遏作用

~~~~~ 表示 m-RNA

~~~~~ 表示蛋白质

→ || 表示转录或阻遏作用的中止

继续合成  $P_2$  和  $P_3$  而停止生长。实际上在各种微生物中存在着各种可以避免这一困难的反馈抑制机制(图 3)。

接受反馈抑制的酶一般具有两个和低分子物质相结合的部位,一个是和底物相结合的活性中心,一个是和最终代谢产物相结合的调节部位,这些酶称为别位酶或异构酶(allosteric enzyme)。分别包括这两个部位的蛋白质亚基已经在 1967 年从天冬氨酸转氨甲酰酶分离得到<sup>[13]</sup>。

这里应该指出反馈抑制和分解抑制都通过抑制某些酶的作用而调节代谢,但是酶能否被抑制决定于酶的结构,而酶的结构则又决定于结构基因,所以归根到底它们同样为遗传因素所控制。对于育种工作来讲,就应该看到我们可以针对阻遏和抑制这两类调节机制设法对于微生物的代谢作用进行控制,从而达到提高产量的目的<sup>[10]</sup>。

微生物的代谢活动可以通过培养条件进行控

制;但是内因是根本,所以改变微生物的遗传型是一个更为有效的措施。下面列举两类控制措施(表 2)。

对以上这些遗传型控制的应用较为普遍的是抗阻遏和抗反馈抑制突变型。代谢产物由于它的结构和代谢最终产物相似,所以在反馈抑制体系中能与合成途径中的第一个酶相结合而使它失去活性。正常代谢产物和这些酶的结合是暂时的和可逆的,当代代谢产物因为被用来合成为蛋白质和核酸等因而浓度下降时,酶的活性也就恢复。某些代谢产物不被用作构成蛋白质或核酸的材料,所以细胞中的浓度不会降低,因而酶的活性不会恢复。如果酶的调节部位因结构基因突变而改变为不能和代谢产物相结合而活力中心则不变,这将会是一个抗反馈抑制突变型。在这类突变型中正常代谢产物也将不再和酶结合,因此在代谢最终产物积累的情况下仍将继续合成这一产物。

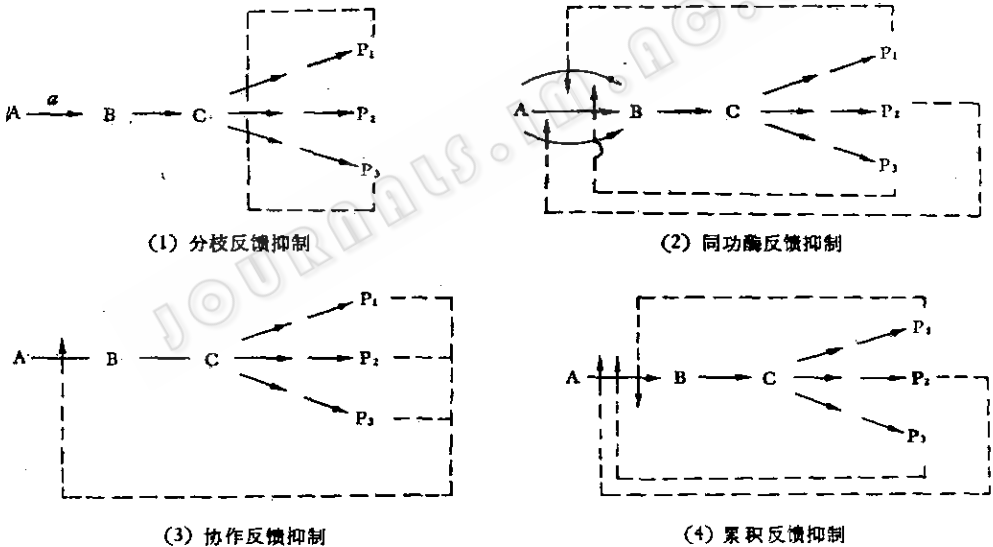


图 3 在分支的合成途径中各种反馈抑制机制

表 2 微生物发酵中的代谢调节措施

| 调节体系 | 培 养 条 件 控 制                      | 遗传型控制           |
|------|----------------------------------|-----------------|
| 诱导   | 加诱导物(包括安慰、间接诱导物)                 | 选组成型            |
| 分解阻遏 | 利用混合碳源,单一碳源限量流加,和以利用率较低的衍生物作为碳源。 | 选抗分解阻遏或抗分解抑制突变型 |
| 分解抑制 |                                  |                 |
| 阻遏   | 限制特种成分(如应用腺嘌呤缺陷型在生产肌苷酸中限制腺嘌呤量)   | 选渗漏(leaky)缺陷型   |
| 反馈抑制 | 限制一般成分(如蛋白酶生产中限制氨基酸量)            | 选抗阻遏(即消阻遏)或抗反   |
|      | 使细胞中的代谢最终产物外渗(如谷氨酸生产中限制生物素的量)    | 馈抑制突变型          |
|      | 加入代谢产物                           | 增加有关基因数量等       |

如果由于调节基因突变而使阻遏蛋白变为不再能和代谢最终产物或它的类似物相结合,那么这也将是一个抗阻遏突变型,它将同样能在代谢最终产物积累的情况下继续合成这一产物。此外操纵基因突变也可能成为抗阻遏突变型。

因此可以预期,选取同一代谢阻遏物的抗性突变时,可以得到两类不同的突变型。在鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*)中发现5,5,5-三氟-DL-亮氨酸抗性菌株有两类。在一类中亮氨酸合成途径中的第一个酶(异丙基苹果酸脱氢酶)不再为亮氨酸所抑制,可是细胞中这个酶的含量并没有增加;在另一类中,酶的含量较野生型高出10倍,可是酶的作用能被亮氨酸所抑制。前者属于抗反馈抑制突变型,后者属于抗阻遏突变型,它们都能产生亮氨酸<sup>[11]</sup>。

除了利用上表所举的各种个别的突变型以外,综合利用这些类型可以收到进一步提高产量的效果。通过转导获得抗反馈抑制和抗阻遏双重突变型,曾使它的亮氨酸产量比两个突变型有所提高。

结合抗阻遏突变和结构基因突变曾经育成高效率地利用五碳糖醇作为唯一碳源的细菌<sup>[12]</sup>。产气杆菌原来不能利用木糖醇作为唯一碳源,在含有木糖醇作为唯一碳源的培养基中,曾经获得核糖脱氢酶由诱导型变为组成型的突变菌株。木糖醇经脱氢成为木酮糖后就能纳入产气杆菌的正常五碳糖代谢途径。木糖醇可以作为核糖脱氢酶的底物,可是不能作为诱导物,所以诱导型菌株不能把木糖醇作为唯一碳源而组成型则能够。这突变型称为X1。X1经诱变后又得到核糖脱氢酶结构基因发生突变的菌株(X2)。X2再经诱变后得到木糖醇透性酶由诱导型变为组成型的突变型(X3)。在37℃中在含有0.2%木糖醇的培养液中两次分裂的时间间隔X1是4小时,X2是2小时,X3是55分钟(而且在0.05%木糖醇中)。在这一例子中一种微生物获得了新的代谢能力,可是酶的种类都是原有的。这一类突变菌株可能有两个方面的实践意义:发酵工业中碳源资源的充分利用和工业污水处理。

用增加基因数量和渗漏缺陷型相结合的方法,曾经育成天冬氨酸转甲酰胺酶活力提高500倍的菌株<sup>[13]</sup>。首先在尿嘧啶缺陷型Hfr菌株中选渗漏缺陷型,通过杂交使F<sup>-</sup>菌株获得这一渗漏缺陷基因,然后将F<sup>-</sup>菌株和一个“双雄性”Hfr菌

株杂交,使F<sup>-</sup>菌株获得额外的天冬氨酸转甲酰胺酶结构基因,最后所得到的菌株的天冬氨酸转甲酰胺酶活力较原来菌株提高了500倍。

此外在氨基酸生产中曾经用营养缺陷型突变和抗反馈抑制突变相结合的方法而使产量大幅度地增长。例如大肠杆菌的 $\alpha$ -氨基- $\beta$ 羟基戊酸抗性菌株产苏氨酸1.9克/升,进一步筛选异亮氨酸缺陷型使产量提高到4.7克/升,以后再经筛选甲硫氨酸缺陷型又使产量提高到6克/升<sup>[14]</sup>。

自从四十年代初青霉素生产开始以来,许多抗菌素的单位产量提高了几百倍甚至上千倍。但是菌种改良的理论根据,主要是诱发突变,而在方法上主要依靠大量的测定工作。五十年代以来微生物发酵产品日见增加,同时由于微生物遗传学的发展,改良菌种的方法已不限于诱变,还包括各种形式的基因重组。基因突变也不限于结构基因,还包括调节基因。在筛选方法方面也有所创新。

这里所介绍的原理和方法虽然并没有都在生产实践中应用,但不难想象,它们将在生产实践中得到愈来愈广泛的应用,而且随着发酵生产的实践以及微生物遗传学和代谢生理研究的发展,必将不断地出现新的理论和方法。

## 参 考 资 料

- [1] Webb, S. J. and Tai, C. C.: *Nature*, **224**: 1123—1125, 1969.
- [2] Witkin, E. M.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **23**: 487—510, 1969.
- [3] Arber, W. and Linn, S.: *Ann. Rev. Biochem.*, **38**: 467—498, 1969.
- [4] De Graaff, J. and Stouthamer, A. H.: *J. Gen. Microbiol.*, **67**: 91—97, 1971.
- [5] Dixon, R. A. and Postgate, J. R.: *Nature*, **237**: 102—103, 1972.
- [6a] Jacob, F. and Wollman, E. L.: *Sexuality and the genetics of bacteria*, Academic Press, New York & London, p. 192—198, 1961.
- [6b] Jacob, F., Brenner, S. & Cuzin, F.: *Cold Spring Harbor Symp. on Quant. Biol.*, **28**: 329—347, 1963.
- [7] Gottesman, S. and Beckwith, J. R.: *J. Mol. Biol.*, **44**: 117—127, 1969.
- [8] Huang, H. T.: *Progress in industrial Microbiology*, **5**: 57—89, 1964.
- [9a] Epstein, W. and Beckwith, J. R.: *Ann. Rev. Biochem.*, **37**: 411—431, 1968.
- [9b] Paigen, K. and Williams, B.: *Adv. Microbiol. Physiol.* **4**: 251—311, 1970.

- [10] Demain, A. L.: *Adv. Biochem. Engineering* I, (Ghose, T. K. and Fiechter, A. ed.) 113—142, 1971.
- [11] Calvo, R. A. and Calvo, J. M.: *Science*, **156**:1107—1109, 1967.
- [12] Wu, T. T., Lin, C. C. and Tanaka, S.: *J. Bacteriol.*, **96**:447—456, 1968.
- [13] Gerhart, J. C. and Holoubek, H.: *J. Biol. Chem.*, **242**:2886—2892, 1967.
- [14] Shio, I. and Nakamori, S.: *Agr. Biol. Chem.*, **33**:1152—1160, 1969.