

有效增强重组腈代谢酶系表达活性的策略

史悦 孙旭东 于慧敏 罗晖 沈忠耀
(清华大学化工系, 北京 100084)

摘要: 讨论并提出了有效增强重组腈代谢酶系表达活性的多种策略。根据所选用的载体和宿主的不同表达特性, 同时克隆目的基因上、下游的正向调控序列可直接增强酶表达水平; 强化翻译后的修饰, 可有效提高活性; 除了常用的大肠杆菌克隆表达体系外, 开发新型宿主-载体系统可为重组酶的活性表达提供新的途径; 随着生物信息学技术的迅速发展, 利用已知三维结构的蛋白对目标酶进行突变位点设计及结构与功能预测, 将有望加快腈代谢酶系的定点突变研究进程。

关键词: 腈水合酶; 腈代谢酶系; 表达活性

中图分类号: Q556.4

文献标识码: A

文章编号: 0253-4320(2003)09-0023-04

Strategies to enhance functional expression of nitrile-degradation enzymatic system in recombinant strains

SHI Yue, SUN Xu-dong, YU Hui-min, LUO Hui, SHEN Zhong-yao
(Department of Chemical Engineering, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract: To enhance the functional expression of nitrile-degradation enzymatic system, several efficient strategies are presented and discussed. According to the different expression characteristics of the clone vector and the host, the expression level of the enzyme can be directly raised by cloning the upstream or downstream genetic sequences of the positive regulators simultaneously. The post-translational modification being strengthened, the activity can be raised efficiently. The development of novel host-vector systems can provide a new approach for the functional expression of the recombination enzyme. Based on the knowledge of the 3D structure of the enzyme, the mutational site design and the structure and function prediction can be made with the rapid development of the bioinformatics, which in turn will accelerate the research progress in the site-directed mutagenesis of the nitrile-degradation enzymatic system.

Key words: nitrile hydratase; nitrile-degradation enzymatic system; functional expression

腈代谢酶系作为微生物氮代谢网络中的重要组成部分广泛存在于红球菌 (*Rhodococcus*)、假单胞菌 (*Pseudomonas*)、诺卡氏菌 (*Nocardia*) 及芽孢杆菌 (*Bacillus*) 等细菌中。在腈代谢酶系的参与下, 这些菌株可将毒性很强且难以降解的腈类催化变为酰胺或羧酸加以利用。由于腈代谢酶系作为生物催化剂具有反应条件温和、产率高、副产物少、产物的自聚损失小、环境污染小、成本低, 符合绿色化工的发展理念等化学方法无法比拟的优越性, 近年来广泛地应用于氨基酸、酰胺、羧酸及其衍生物的合成。有关酶自身的结构和生理特性, 如光活性^[1-2]、热不稳定性^[3]、区域选择性^[4]、立体选择性^[5-6]等以及各种因

素如 pH 值、胞内组分、螯合剂、巯基化合物^[7]和氨基化合物^[8]等对酶活性影响的研究也日益深入。

虽然全世界每年通过腈水合酶生产的丙烯酰胺超过 30 万 t, 且腈代谢酶系在有机合成上的应用也越来越广泛, 但是目前生产腈代谢酶系的野生菌在应用中存在酶稳定性差、对底物和产物的耐受性不强以及间歇生产、产品质量不稳定等问题。为了解决这些问题, 从 20 世纪 80 年代末期以来, 各国研究者纷纷采用基因工程技术, 从野生菌株中得到腈代谢酶系的基因, 并对这些基因进行克隆、测序和特性研究。基因工程菌表达腈代谢酶系有很多野生菌不可替代的优点, 如 3 种基因可以单独克隆, 不会相互

收稿日期: 2003-04-14; 修回日期: 2003-06-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20206014)

作者简介: 史悦(1976-), 男, 博士生; 沈忠耀(1937-), 男, 本科, 教授, 博导, 主要从事生物化工方面的研究, 通讯联系人, 010-62785514, szy-dce@mail.tsinghua.edu.cn。

干扰,不会发生野生菌中因 3 种酶同时存在而使酰胺在产生的同时又有一部分被降解,也不会因产酸降低了发酵液的 pH 值而抑制脲水合酶的活性;基因工程菌的基因背景清晰,有利于对基因表达调控机理进行深入研究,同时它的适应性强,发酵周期短,有利于实现大规模培养和工业化生产,从而有着更加广阔的应用前景。因此,关于重组脲代谢酶系的研究已经越来越引起人们的重视。

1 脲代谢酶系的组成和研究现状

脲代谢酶系由 3 种不同功能的酶构成,即催化脲类直接生成相应羧酸和氨的脲水解酶(Nitrilase)、催化脲类生成相应酰胺的脲水合酶(Nitrile Hydratase, NHase)和催化酰胺生成相应羧酸和氨的酰胺酶(Amidase)。

脲代谢酶系中的脲水合酶是 1 种由微生物生产的金属酶,它由 2 个亚基二聚或多聚构成,以单分子非血红素铁或非咕啉类钴作为辅因子,能够催化多种脲化合物水合生成相应的酰胺^[9]。酰胺酶由单亚基构成,不含金属离子,它的基因与脲水合酶位于同一个基因簇上并且一起表达。脲水解酶的基因虽独立存在,但是它与同酶系的其他 2 种酶共同转录^[10],是 1 种单亚基多聚(最高为 16 聚体)的硫醇酶,也不含金属离子,靠活性中心的 1 个半胱氨酸残基完成催化作用。

目前,已经从红球菌、芽孢杆菌和假单胞菌等不同野生菌株中得到了一系列脲代谢酶系的基因,如表 1 所示。

表 1 不同来源的脲代谢酶系基因序列

基因序列	来源	基因库编号
Nitrilase	<i>Rhodococcus rhodochrous</i>	E09026
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> K22	D12583
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	D11425
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> M8	X86737
	<i>Rhodococcus rhodochrous</i> J1	E03847
	<i>Rhodococcus</i> sp. AJ270	AJ278349
	<i>Rhodococcus</i> sp. N-771	AB016078
NHase	<i>Rhodococcus</i> sp. N-774	E02362-E02364
	<i>Bacillus</i> sp. BR449	AF257487
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	E03179
	<i>Pseudomonas putida</i>	U89363
	Soil samples	AJ306171, AJ306172
Amidase	<i>Rhodococcus</i> sp. N-774	X54074
	<i>Pseudomonas chlororaphis</i> sp. B23	D90216
	<i>Brevibacterium</i> sp. R312	M60264
	<i>Pseudomonas putida</i> 5B	U89363
	<i>Bacillus</i> sp. BR449	AF257487

然而,由于当前利用重组脲代谢酶系构建的基因工程菌的表达水平普遍较低,优势无法显现,因此,有必要在总结前人研究结果的基础上,对增强脲代谢酶系在基因工程菌株中的活性表达的有效方法进行进一步探索。

2 有效增强重组脲代谢酶系表达活性的途径

在脲代谢酶系中,由于脲水合酶具有非常重要的工业应用价值,因此历来受到各国研究工作者的重视。笔者也主要以脲水合酶为例,对有效增强重组脲代谢酶系表达活性的各种途径进行探讨。

2.1 同时克隆基因表达所必需的上、下游序列

脲水合酶基因位于 1 个基因簇上,其上、下游特定序列翻译后所表达的蛋白对脲水合酶存在着正向或负向的调控,因此在构建脲水合酶的重组表达体系时,其上、下游调控序列的同时克隆不容忽视。

Hashimoto、Komeda、Kobayashi 和 Wu 等的研究表明,红球菌 N-774 中脲水合酶基因下游编码开放阅读框 ORF1188 的序列^[11]、绿针假单胞菌 B23 中脲水合酶基因下游编码开放阅读框 P47K 和 OrfE 的序列、玫瑰色红球菌 J1 低分子质量和高分子质量脲水合酶基因上游分别编码开放阅读框 NhlC 和 NhhC 的序列^[12-13]、恶臭假单胞菌 5B 中脲水合酶基因上游编码开放阅读框 P38K 以及下游编码 P14K 的序列等都是可以直接增强酶表达水平的正调控序列^[14],因此对来源不同的脲水合酶基因进行基因克隆时,应该尽可能同时克隆这些序列。

还有一些序列,它们虽然不能直接调节酶的表达,但是对酶活性的形成具有重要作用。比如玫瑰色红球菌的高分子质量脲水合酶基因簇中 IS1164 插入序列,它编码的 NhlF 可向钴离子提供能量,实现了细胞对于钴的摄取,并最终提供给脲水合酶。脲水合酶基因在玫瑰红球菌中与 nhlF 的联合表达比单独表达时表现出更高的酶活性^[15]。再如红球菌 N-771 中脲水合酶基因的下游序列,它编码的脲水合酶激活子很可能参与了铁离子的转运和配基的修饰^[16],因此它对脲水合酶的活性表达也至关重要。当利用大肠杆菌或其他宿主外源表达脲水合酶时,必须根据所选用的载体和宿主的表达特性,选择性地同时克隆这些上下游序列,否则将无法得到高活性表达的脲水合酶。

2.2 强化翻译后的修饰

铁型和钴型的活性脲水合酶的光谱研究均表

明^[17-18],当基因被顺利地转录并翻译后, α 亚基中的112位半胱氨酸残基被修饰为半胱氨酸亚磺酸(Cys-SO₂H),同时114位半胱氨酸残基还被修饰为半胱氨酸次磺酸(Cys-SOH),以保证位于酶活性中心的6个氨基酸CS(T)LCSC与中心离子(Fe或Co)形成稳定的八面体结构。

X射线以及傅里叶变换离子回旋共振质谱分析表明,重组红球菌中外源表达的脬水合酶的半胱氨酸配基 α Cys112与在天然酶中一样被翻译后修饰为半胱氨酸亚磺酸。质谱研究表明,分别来自半胱氨酸亚磺酸、半胱氨酸次磺酸和 α Ser113的3个氧原子形成“瓜子”结构,既有利于形成稳定的活性中心,又为脬水合酶具有光活性提供了证据^[19]。

研究证实这种翻译后的修饰就是对半胱氨酸残基的氧化,且当这种氧化作用加强时,酶活力会得到提高。红球菌N-771中钴取代铁系脬水合酶在大肠杆菌中表达时,钴离子虽可替代铁离子与催化中心特异地结合,但酶活力始终很低。然而当与0.5 mol/L的氧化剂K₃[Fe(III)(CN)₆](六氰合铁(III)酸钾,高铁氰化钾)一起保温后,酶活性就会逐渐增大^[20]。Nojiri等分析认为,该氧化剂可能强化了112位半胱氨酸残基的亚磺酸修饰,从而不但使金属离子与蛋白稳定结合,而且还通过催化中心的氧化修饰来进一步激活酶^[20]。因此,在外源表达脬水合酶时,除加入金属离子和诱导剂之外,适量加入氧化剂以强化酶的翻译后修饰应该会进一步提高酶的表达活性。

2.3 开发多种新型的宿主-载体系统

虽然已经克隆并测序了多种编码脬水合酶 α 和 β 亚基的基因,但是在大肠杆菌中克隆基因的过量表达会导致无活性的不可溶多肽的累积^[21],从而导致外源表达的脬水合酶活性很低。开发高效的新型宿主-质粒系统是解决问题的关键。

1992年,Hashimoto等首先开发了大肠杆菌-红球菌穿梭质粒载体^[22],并以*Rhodococcus rhodochrous* ATCC 12674为宿主,对克隆的脬水合酶基因簇进行了表达。结果表明,应用上述红球菌宿主和穿梭质粒重组体系,在甲基丙烯酸酰胺诱导作用下,可以有效地表达脬水合酶重组蛋白。1998年,Duran等^[23]进一步开发了新型的短杆菌-红球菌穿梭载体,用于脬水合酶表达的研究。他们通过将乳酸短杆菌ATCC13869的隐蔽性质粒pBL13869与大肠杆菌质粒pBR328 E进行融合,构建了分别携带氯霉素(Cm)抗性基因和氯霉素、卡那霉素(Km)双抗性基

因的2种穿梭载体pRC52(10.7 Kb)和pRK52(12.2 Kb)。

Bigey等^[24]利用从红球菌ACV2克隆得到的酰胺酶和脬水合酶基因,分别构建了以tac、lac和T7为启动子的质粒,当把生长温度降至29℃且不以异丙基 β -D-硫代半乳糖苷(IPTG)诱导时,在T7表达体系的大肠杆菌中得到了大量可溶活性的重组酰胺酶,其活性为野生菌株的3倍。

毕赤酵母也是一种用于外源蛋白表达的理想宿主菌,近年来它的应用越来越广泛。Wu等^[25]用基因工程毕赤酵母通过共表达3个同源蛋白成功地表达了具有立体异构选择性的脬水合酶。同时还由于基因被整合到毕赤酵母的染色体上从而稳定遗传,因此解决了因质粒的不稳定性所带来的诸多问题。另外,枯草芽孢杆菌表达体系可以将外源蛋白分泌到胞外或细胞周质中,减少形成包含体的可能,这为重组脬水合酶的活性表达又提供了一条新的途径。

然而,由于目前工业生产中普遍应用的野生红球菌或诺卡氏菌的酶活一般都能达到每毫克蛋白几千单位的水平,因此,相对而言,上述各种脬水合酶的重组表达体系表达的重组蛋白的活性仍然很低,一般不超过每毫克蛋白几百单位的水平。再考虑到野生红球菌或诺卡氏菌的细胞培养密度通常也很高,因此,笔者所在研究小组提出了如下全新的脬水合酶重组策略:首先在大肠杆菌中对脬水合酶基因进行基因突变,改善脬水合酶的热稳定性或产物耐受性,然后构建穿梭质粒载体,通过基因的同源重组,将突变后的脬水合酶基因导回原始野生菌株,从而得到性能优异的突变菌株。

2.4 基因突变

在蛋白质工程的研究中,定点突变是研究酶的结构,探索酶的功能,并对酶进行精细改良的非常有效的手段。1992年,Kobayashi等^[26]利用定点突变的方法对玫瑰红球菌K22的脬水解酶进行了研究,结果发现,Cys170位于该酶的活性位点上。1998年,同样利用定点突变的方法,Kobayashi等^[27]进一步发现,Ser195是保证酰胺酶催化活性所不可或缺的。

氰化物二水合酶可能的活性位点也可以采用定点突变的方法加以研究^[28]。氰化物二水合酶与脬水解酶和脬水合酶在氨基酸序列上的某些残基是保守的,利用定点突变的方法将施氏假单胞菌AK61的氰化物二水合酶中保守的氨基酸残基加以改变。当Cys163被Ser163取代时,酶就失去了全部的氰化物水合活性。

2000 年, Piersma 等利用定点突变的方法研究了脲水合酶 β 亚基中 56 位精氨酸的功能^[29]。结果表明, 含铁脲水合酶(NHase) β 亚基中 56 位精氨酸是脲水合酶氨基酸中高度保守残基之一, 当它分别被酪氨酸、谷氨酸或赖氨酸取代时, 只有 β 56 赖氨酸突变复合体表现出天然 NHase 酶活的 1% 左右, 而另外 2 种突变体完全失活。这说明 β 亚基中 56 位精氨酸(和 141 位精氨酸)虽然不是催化中心, 但由于它与催化中心的半胱氨酸残基经过翻译后修饰形成的亚磺酸和次磺酸基团形成氢键, 即它参与了催化中心活性基团的定位以及金属离子电子态的调整, 因此 β 亚基 56 位精氨酸是酶的催化活性所必需的。

另外, 采用定点突变的方法研究酶的稳定性也得到了越来越广泛的应用。但由于突变位点的选择比较困难, 再加上研究周期长、效率低, 因此在脲水合酶的应用方面尚没有突破。随着生物信息学技术的迅速发展, 利用已知三维结构的脲水合酶对目标脲水合酶进行突变位点设计及结构与功能预测, 将有望加快脲水合酶的定点突变研究进程。

随机突变的典型方法是定向进化, 它通过基因片段的无规重排或聚合酶链式反应过程中自由发生的错配产生许多突变序列, 再从中选出目标进化突变株。此法应用到脲代谢酶系的表达是最近 2 年内的事。2000 年, Cheong 等在大肠杆菌 DH5 α 中成功表达了嗜温芽孢杆菌 BR388 的广谱酰胺酶^[30], 并利用定向进化的方法成功地得到一段长度为 1.65 kb 的酰胺酶基因的突变序列, 其中 2 个腺嘌呤被鸟嘌呤取代, 从而使突变蛋白一级结构中的第 26 位组氨酸变为精氨酸。由于突变后的酰胺酶基因更易于转录, 因此突变体表现出的酰胺酶活性比野生型提高了 23 倍。

尽管定向进化的方法刚刚起步, 但由于其基因剪接重组的效率较高, 因此很适合提高酶活性、酶稳定性或底物、产物耐受性的研究。不过, 要从发生各种随机突变的脲水合酶基因中筛选出 1 种或几种在所需要的性质上有所进步的序列, 就必须首先建立一整套快速准确的筛选方法。

近年来, 人们致力于开发改造酶的特异性和机理的合理策略, 在通过分子组装设计生物催化剂方面有了重要进展^[31]。这些基于知识的研究极大地受益于最近有关酶的结构和功能预测的生物信息学计算分析软件的出现。基础理论与分析方法的结合为设计出稳定而高效的酶展现了美好的发展前景。

3 展望

由于脲代谢酶系的克隆表达及其催化反应的研究在理论意义和应用价值上均具有美好的前景, 所以研究者们一方面不断深入研究脲水解酶、脲水合酶和酰胺酶的催化作用机理, 完善蛋白质的三维结构模型, 探讨中心离子、配基、产物、底物之间的相互作用关系, 改造高活性野生菌的基因, 筛选具有不同特性的宿主菌株, 以期获得更加优良的特性, 从而使微生物法生产丙烯酰胺的工艺得到进一步发展, 并为我国水处理、造纸等传统工业的振兴注入新的活力; 另一方面, 人们也通过探讨酶反应过程中各种因素对水解、水合反应的影响, 不断拓展脲代谢酶系的应用领域, 如具有光学活性的非天然氨基酸的合成、手性药物中间体的高选择性合成以及可降解塑料聚羟基链烷酯(PHAs)的合成等。这一系列的研究将为精细化工、制药、环境保护等行业的发展带来新的契机, 创造新的价值。

参考文献

- [1] Sari M, Moali C, Boucher J, *et al.* [J]. *Biochem and Biophys Research Comm*, 1998, 250(2): 364 - 368.
- [2] Yasuo K, Takashi T, Yasuhisa A. [J]. *Eur J Biochem*, 1999, 263(3): 662 - 670.
- [3] Nagasawa T, Shimizu H, Yamada H. [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1993, 40(2-3): 189 - 195.
- [4] Otto M C, Wang Meixiang. [J]. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, 1997, (21): 3197 - 3204.
- [5] Wang M, Lu G, Ji G, *et al.* [J]. *Tetrahedron Asym*, 2000, 11(5): 1123 - 1135.
- [6] Fallon R D, Stieglitz B, Turner I Jr. [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 47(2): 156 - 161.
- [7] Cramp R, Cowan D A. [J]. *Biochim et Biophys Acta*, 1999, 1431(1): 249 - 260.
- [8] Mizunashi W, Nishiyama M, Horinouchi S, *et al.* [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1998, 49(5): 568 - 572.
- [9] Kobayashi M, Shimizu S. [J]. *Nature Biotechnol*, 1998, 16(8): 733 - 736.
- [10] Cowan D A, Cramp R, Pereira R, *et al.* [J]. *Extremophiles*, 1998, 2(3): 207 - 216.
- [11] Hashimoto Y, Nishiyama M, Horinouchi S, *et al.* [J]. *Biosci Biotechnol Biochem*, 1994, 58(10): 1859 - 1865.
- [12] Komeda H, Kobayashi M, Shimizu S. [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(26): 15796 - 15802.
- [13] Komeda H, Kobayashi M, Shimizu S. [J]. *Proc National Acad Sci, USA*, 1996, 93(9): 4267 - 4272.
- [14] Wu S J, Fallon R D, Payne M S. [J]. *Appl Microbiol Biotechnol*, 1997, 48(6): 704 - 708.

1.2 合成方法

1.2.1 种子乳液的合成

向装有搅拌器、回流冷凝器、温度计和 N₂ 导气管的 250 mL 四颈瓶中加入一定量的水、聚乙烯吡咯烷酮、甲基丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸(用量见表 1), 搅拌均匀, 室温下抽真空及通氮气各 3 次, 升温到 70℃, 注入计量 KPS 水溶液, 反应 6 h。得到乳白色聚(甲基丙烯酸甲酯-甲基丙烯酸), 即 P(MMA-MAA)乳液, 单体转化率为 98.5%。

表 1 乳液聚合配比

原料	P(MMA-MAA) 种子乳液配比/g	P(MMA-MAA)/PSt 复合乳液配比/g
甲基丙烯酸甲酯	18	—
甲基丙烯酸	1.5	—
过硫酸钾	0.2	0.6
聚乙烯吡咯烷酮	0.3	—
苯乙烯	—	30
水	80	50
种子乳液	—	50

1.2.2 种子乳液聚合

将上述得到的 P(MMA-MAA)乳液加入四口瓶中, 加入苯乙烯及助剂(见表 1), 使体系在 30℃ 下搅拌溶胀 24 h, 然后再升温到 80℃, 分批加入计量 KPS 引发聚合 5 h, 得到 P(MMA-MAA)/PSt 复合乳液, 单体转化率为 98.4%。将该乳液冷却, 用质量分数为 10% 的 KOH 调节 pH 值为 12, 升温至 95℃ 处理一定

时间, 然后冷却到室温得到中空型塑料颜料胶粒。

1.3 产物的分析检测

利用重量法测定未反应单体的含量^[5]。表面羧基含量用电导滴定法测定^[6]。

所得到产物经盐析、过滤、洗涤后晾干, 采用 KBr 压片法在 HITACHI 275-50IR 红外分光光度计上进行红外分析。

胶粒形态在 JEM-100CX II 型透射电子显微镜(TEM)上测定; 胶粒粒径及分散度在 Malvern Autosizer II c 型粒度测定仪(英国)上测定。

2 结果和讨论

2.1 P(MMA-MAA)种子乳液的合成

实验中首先选用甲基丙烯酸甲酯和甲基丙烯酸作为共聚单体, 经无皂乳液聚合制备了 P(MMA-MAA)种子乳液。在聚合体系中引入一定量的甲基丙烯酸不仅可以增加乳液稳定性, 而且得到的齐聚物具有相当的表面活性, 有利于对苯乙烯单体实现增溶。同时, 在种子乳液粒子中引入适量羧基, 有助于产品最终形成中空结构。由于甲基丙烯酸本身具有一定的疏水性, 倾向于与甲基丙烯酸甲酯发生共聚反应。图 1 中乳胶粒的电导滴定曲线表明, 3.29% 的甲基丙烯酸生成均聚物, 10.97% 的甲基丙烯酸存在于乳胶粒表面。可见甲基丙烯酸均聚物生成的量很少, 绝大部分的甲基丙烯酸生成了共聚物, 存在于乳胶粒内部和表面。从种子乳液透射电镜(TEM)照片(见图 2)看出, 种子乳胶粒粒径大小比较均匀, 平均粒径约为 0.22 μm 左右。

(上接第 26 页)

- [15] Komeda H, Kobayashi M, Shimizu S. [J]. Proc National Acad Sci, USA, 1997, 94(1): 36-41.
- [16] Degen O, Kobayashi M, Shimizu S, et al. [J]. ARCH Microbiol, 1999, 171(3): 139-145.
- [17] Miyana A, Fushinobu S, Ito K, et al. [J]. Biochem Bioph Res Co, 2001, 288(5): 1169-1174.
- [18] Mascharak P K. [J]. Coordin Chem Rev, 2002, 225(1-2): 201-214.
- [19] Endo I, Nojiri M, Tsujimura M, et al. [J]. J Inorg Biochem, 2001, 83(4): 247-253.
- [20] Nojiri M, Nakayama H, Odaka M, et al. [J]. FEBS Letters, 2000, 465(2-3): 173-177.
- [21] Ikehata O, Nishiyama M, Horinouchi S, et al. [J]. Eur J Biochem, 1989, 181(3): 563-570.
- [22] Hashimoto Y, Nishiyama M, Yu F, et al. [J]. J Genl Microbiol, 1992, 138: 1003-1010.
- [23] Duran R. [J]. J Basic Microbiol, 1998, 38(2): 101-106.
- [24] Bigey F, Chebrou H, Fourmand D, et al. [J]. J Appl Microbiol, 1999, 86(5): 752-760.
- [25] Wu S, Fallon R D, Payne M S. [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52(2): 186-190.
- [26] Kobayashi M, Yanaka N, Nagasawa T, et al. [J]. Biochem, 1992, 31: 9000-9007.
- [27] Kobayashi M, Goda M, Shimizu S. [J]. FEBS Letters, 1998, 439: 325-328.
- [28] Watanabe A, Yano K, Ikebukuro K, et al. [J]. Biochim et Biophys Acta, 1998, 1382: 1-4.
- [29] Piersma S R, Nojiri M, Tsujimura M, et al. [J]. J Inorg Biochem, 2000, 80(3-4): 283-288.
- [30] Cheong T K, Oriol P J. [J]. Enzyme and Microbial Technol, 2000, 26(2-4): 152-158.
- [31] Cedrone F, Ménez A, Quéméneur E. [J]. Current Opinion in Struc Biol, 2000, 10: 405-410. ■