

대장균을 이용한 Phenylalanine 생산에 있어서 온도조절형 발현 Vector의 안정성

강상모^{1*} · 박인숙²

¹건국대학교 공과대학 미생물공학과, ²배화여자전문대학 식품영양과

Phenotypic Stability of a Temperature-Controllable Expression Vector on Phenylalanine Production by *Escherichia coli*

Kang, Sang-Mo^{1*} and In-Sook Park²

¹Department of Microbial Engineering, College of Engineering, Konkuk University, Seoul 133-701, Korea

²Department of Food and Nutrition, Baewha Women's Junior College, Seoul 110-735, Korea

Abstract — The plasmid pSY130-14 for the high production of phenylalanine is a temperature-controllable expression vector composed of the P_R and the P_L promoter and a temperature sensitive repressor, cI_{857} , of bacteriophage lambda. Strain AT2471 harbouring plasmid pSY130-14 is induced the phenylalanine production by shifting up the incubation temperature to 38.5°C. Plasmid stability of *E. coli* AT2471 harbouring pSY130-14 was very low, it was about 30% after 48 h cultivation at 38.5°C without kanamycin. The plasmid disappeared immediately at 40°C without kanamycin, and at 40°C adding kanamycin, the plasmid stability decreased at the beginning, but rose with the extension of the culture time. For the improvement of plasmid stability, the plasmid obtained was designated as pSY150-1 by changing origin region (*ori*) pACYC 177 of pSY130-14 for *ori* pSC101. *E. coli* AT2471 harbouring pSY150-1 was stable at 38.5°C without tetracycline, and the plasmid stability was about 40% after 48 h cultivation at 40°C.

각종의 유전자들은 유전자 재조합 기술을 이용하여 cloning되고 있으며, cloning된 유전자의 발현은 구성적으로 행하여지는 비제어형과 유도물질의 첨가 혹은 온도를 높이는 것 등에 의해 발현이 유도되는 유도형으로 나눌수 있다(1).

λ phage cI_{857} repressor는 cI repressor의 66번째 아미노산인 alaine이 threonine(2)으로 바뀐 온도감수성 repressor로서 37°C에서 실활이 시작되어 42°C에서는 완전히 실활되는 것 같다고 한다(3).

Sugimoto 등(4-7)은 이 λ phage 유래의 온도감수성 repressor 유전자 cI_{857} 과 그 right promoter(P_R)와 left promoter(P_L) 유전자 영역으로 된 발현 vector를 사용하여, 이들의 promoter 하류의 유전자 발현이 온도에 의해 가능한 것을 밝히고(4, 5), 배양온도를

37°C 이상으로 상승시켜 유전자 발현을 유도하는 system을 이용, phenylalanine 생산에 대한 응용을 검토하였다. 이때 만들어진 plasmid 중 $pheA^{FR}$ (FR = feedback resistant) 구조유전자를 P_L 하류에, $aroF^{FR}$ 구조유전자를 P_R 하류에 삽입하여 phenylalanine 생산량이 아주 높은 plasmid pSY130-14(6, 7)를 만들었다. 이 pSY130-14를 갖는 *Escherichia coli* AT2471은 38.5°C에서 phenylalanine의 최대생산량(18.6 g/l)을 나타냈으나 40°C 이상에서는 균체중식이 크게 떨어지고 phenylalanine의 생산량이 최대생산량의 약 70%로 낮아졌다.

Plasmid의 copy 수는 저, 중, 다 copy 수로 나눌수 있다. 예를 들면 저 copy 수(1~3/cell)로는 안정한 F plasmid(8, 9) 유래인 mini-F(10), *IncF* II(11)와, RP4(12)가 있으며, 중 copy 수(~5/cell)로는 안정한 pSC101(12-15)가 있으며, 그리고 다 copy 수(10~100/cell)로는 불안정한 pBR322(16-18)와 pACYC177

Key words: Plasmid stability, copy number, cI_{857} repressor, phenylalanine production

*Corresponding author

(19) plamid 등이 있다.

본 논문에서는 온도상승으로 phenylalanine 생산량이 떨어지는 원인을 검토하고 plasmid의 copy 수를 변화시켜 안정화를 시도하였다. 즉, pACYC177(19)를 갖는 plasmid pSY130-14와 이 plasmid의 origin region(*ori*) pACYC177 대신 pSC101의 *ori*를 삽입한 plasmid를 작성하여, plasmid의 안정성과 phenylalanine의 생산량을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

사용균주

Escherichia coli 균주는 LB 배지 혹은 phenylalanine 생산배지(6)에 필요시 kanamycin 혹은 tetracycline을 적절한 농도로 첨가하여 사용하였으며, 본 실험에 사용한 균주 및 plasmid는 Table 1과 같다. *E. coli* RR1은 형질전환 수용균으로, AT2471은 phenylalanine 생산균으로 사용하였다.

Plasmid DNA 분리

Plasmid DNA 분리는 Holmes와 Quiley 방법(23)에 준하였으며, 제한효소에 의한 절단, ligation, 전기영동 등 일반적인 recombinant DNA 조작은 Maniatis 등의 방법(24)에 준하였다.

배양

Flask 배양은 500 ml용 Sakaguchi flask에 50 ml의 배지를 넣어 진탕배양을 하였고, Jar 발효조의 경우는 2.5 l 용량의 발효조(type MD-250, Marubishi Bioeng. Co Ltd., Tokyo, Japan)에 의한 유가배양을 하였다. 2.5 l 용량 발효조에 1.5 l의 phenylalanine 생산배지 (6) (1l 수용액 중 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 29.8g, KH_2PO_4

6g, NH_4Cl 2g, NaCl 1g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 8.8g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3g, glucose 20g, Na-citrate 10g, Na-glutamate 0.4g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 8 μg , $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 10.7 μg , $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 6.7 μg , $\text{Co}(\text{NO}_3)_2$ 6.7 μg , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10.7 mg, $\text{ZnCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.8 mg, tyrosine 30 mg)를 넣고 교반회전수 850 rpm, 통기량 1 vvm으로 배양하였다. 배지의 pH는 28% NH_4OH 로 7.0으로 제어하였다. 배지 중의 glucose는 용존산소농도를 지표로 하여, 고갈된 시점에서 2% 농도가 되도록 첨가하였다. Jar 발효조의 전배양은 필요에 따라 kanamycin 혹은 tetracycline이 든 LB 배지에 균주를 접종하고 30°C에서 24시간 배양하였다. 본배양은 전배양액을 2% 농도가 되도록 접종하였다.

Plasmid의 안정성 검사

Kanamycin 혹은 tetracycline이 든 배지에서 전배양한 균주를 항생물질이 들지 않은 phenylalanine 생산배지가 든 Sakaguchi flask에 0.5% 접종하여 24시간 배양한 후 다시 phenylalanine 생산배지가 든 Sakaguchi flask에 0.5% 접종하고 24시간 배양하여 약 20번 정도 세포분열을 유도하였다. 이렇게 하여 얻은 배양액을 0.85% 식염수로 적당히 희석하고 희석액 100 μl 를 든 phenylalanine 생산 agar 배지에 도포하였다. 30°C에서 1일 배양한 후 자란 colony 100개를 kanamycin 혹은 tetracycline이 든 phenylalanine 생산 한천배지에 옮겨 30°C에서 배양하였다. 1일간 배양 후 잔존내성 colony 수로부터 plasmid의 보유율을 구하였다.

Phenylalanine 농도 측정

배양액 중의 phenylalanine 농도는 배양액을 원심 분리하여 얻은 상등액을 시료로 하여 McCaman 등의

Table 1. Baterial strains, plasmids and λ phage employed

Strains/plasmids/ λ phage	Genotypes and Characteristics	Sources
<i>E. coli</i> AT2471	<i>tyrA4, thi-1, relA1, spoT1</i>	Taylor <i>et al.</i> (20)
<i>E. coli</i> RR1	<i>hsdS20</i> ($r_B^- m_B^-$), <i>ara-14, proA2, lacY1, galK2, rpsL20, xyl-5, mtl-1, supE44</i>	Bolive <i>et al.</i> (21)
pSY130-14	<i>cI₈₅₇, P_R-aro^{FR}, P_L-pheA^{FR}, Km^r</i>	Sugimoto <i>et al.</i> (6)
pSC101	<i>Tc^r</i>	Cohen <i>et al.</i> (22)
pSY150-1	<i>cI₈₅₇, P_R-aro^{FR}, P_L-pheA^{FR}, Tc^r</i>	This work
λ cI ₉₀	<i>cI⁻</i>	Pons (29), 강 등 (30)

Km^r and Tc^r indicate the phenotypes of tetracycline and kanamycin resistance, respectively.

방법(25)에 준하여 다음과 같이 측정하였다. 증류수로 적당히 희석한 시료 10 μ 에 10 μ 의 trichloroacetic acid, 200 μ 의 0.3 M succinate buffer(pH 5.8), 40 μ 의 5 mM L-leucylalanine, 80 μ 의 30 mM ninhydrin을 첨가하고 교반 후, 60°C에서 2시간 가열하였다. 냉각 후 2 ml의 새로 조제한 동시약(65 ml/l potassium sodium tartarate, 60 mg/l CuSO₄·5H₂O, 1.6 g/l Na₂CO₃)을 첨가하고 교반 후 생성된 형광물질의 형광을 515 nm에서 측정하였다.

결 과

각 온도에서 Plasmid pSY130-14의 안정성

Sugimoto 등의 연구(6)에 의하면 AT2471/pSY130-14의 경우 Sakaguchi flask, 38.5°C, 24시간 배양에서 850 mg/l의 phenylalanine 생산량을 보이나, 40°C에선 이의 약 70% 밖에 생산하지 못하였다. 그 원인을 알기 위해 plasmid 안정성을 조사하였다(Fig. 1). Fig. 1에서와 같이 plasmid 안정성은 kanamycin 무첨가 상태, 온도 30~37°C, 배양시간 24시간까지의 상태에서는 97%의 안정성을 나타냈으며, 48시간 후에도 93%의 비교적 높은 안정성을 보였다. 그러나 38.5°C, 48시간

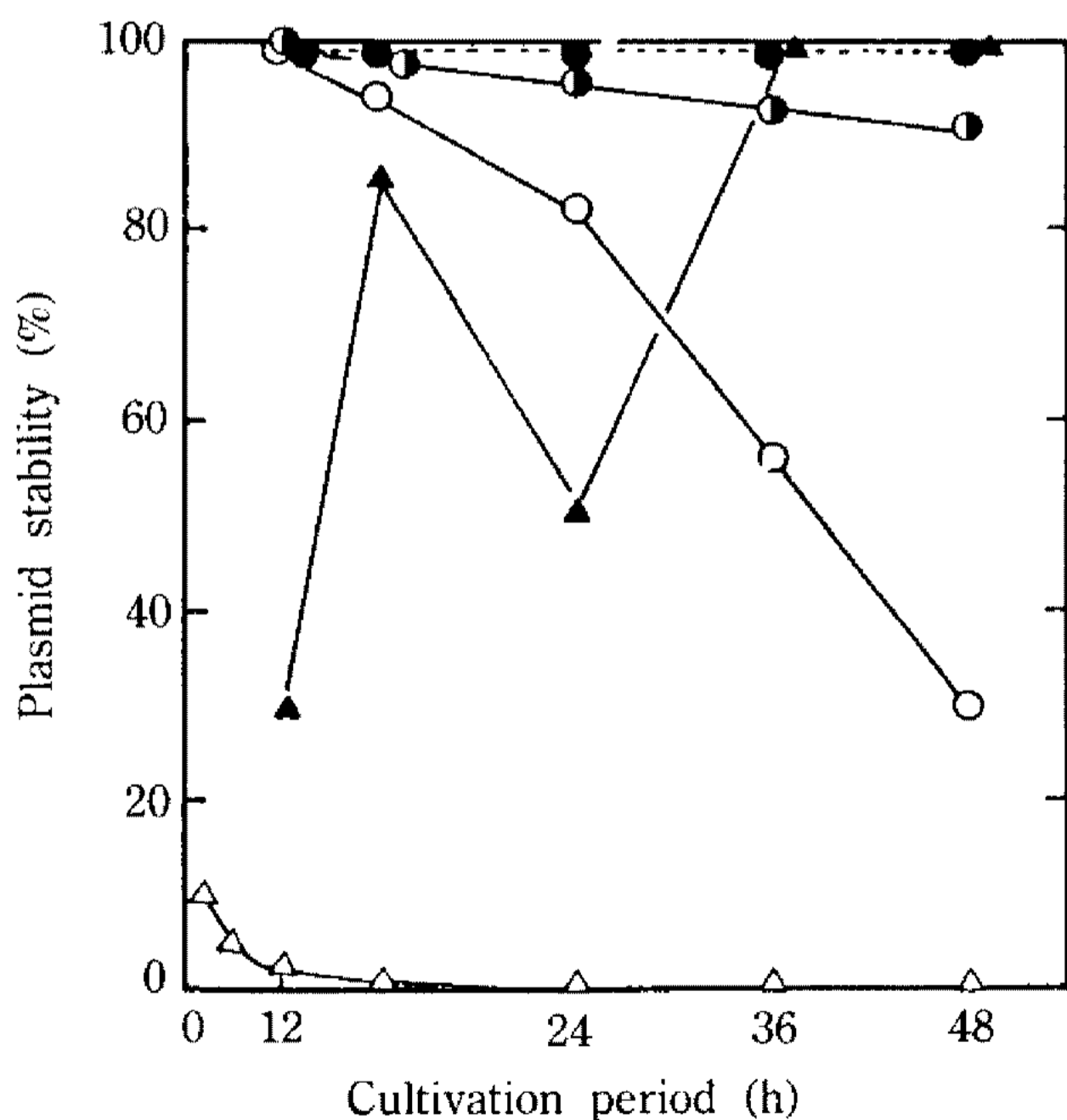


Fig. 1. Time course of plasmid stability of strain AT 2471 harbouring plasmid pSY130-14.

Symbols, (●) cultivation at 37°C without kanamycin; cultivation 38.5°C (○) without and (●) with kanamycin; cultivation 40°C (△) without and (▲) with kanamycin.

배양에서는 약 30%의 안정성을 보였으며, 40°C에선 거의 plasmid가 존재하지 않았다. 그러나 kanamycin 첨가 배지에서는 38.5°C에서 거의 안정되었으며, 40°C에선 배양시간과 더불어 불안정한 상태에서 안정한 상태로 올라갔다. 이들의 원인을 검토하기 위해 전기영동으로 plasmid의 상태를 조사하였다(Fig. 2). 38.5°C kanamycin 무첨가에서 plasmid의 안정성은 배양시간과 더불어 떨어지지만 Fig. 2에 의하면 plasmid가 원형 그대로 존재함을 알 수 있으며, kanamycin 첨가에서도 같은 결과를 보인다. 그러나 kanamycin 첨가 40°C에선 원형과 틀리는 여러 가지 DNA 단편들이 나왔다. 이것은 kanamycin gene과 ori를 포함하는 변이 plasmid의 단편들로 생각된다. Fig. 1에서와 같이 40°C, kanamycin 첨가에서 배양시간과 더불어 plasmid 안정성이 올라가는 것으로 보아, 결국 kanamycin 첨가 40°C의 경우는 배양시간과 더불어 균주내에는 생존에 필요한 kanamycin gene 중심으로 DNA 단편이 남는 것으로 생각된다.

Plasmid의 안정화

Plasmid pSY130-14는 온도상승과 더불어 안정성이

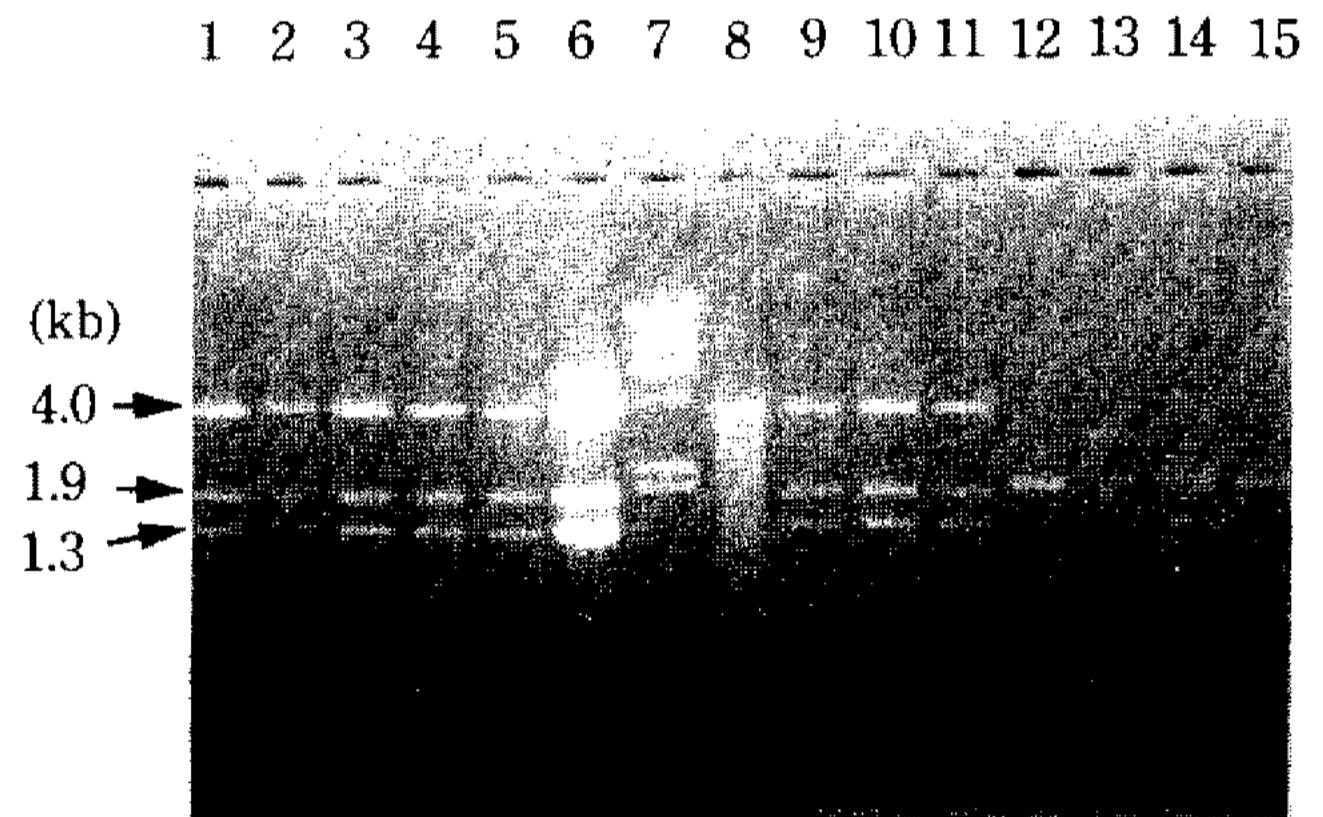


Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of the plasmid after each time cultivation of AT2471 harbouring plasmid pSY130-14 at temperature.

Plasmids after 12 h (lane 1), 24 h (lane 2), 36 h (lane 3), and 48 h (lane 4) cultivation at 38.5°C without kanamycin were digested with *Sma*I and *Pst*I. Plasmids after 24 h (lane 5), 24 h (lane 9), 36 h (lane 10), and 48 h (lane 11) cultivation at 38.5°C with kanamycin and after 12 h (lane 12), 24 h (lane 13), 36 h (lane 14), and 48 h (lane 15) cultivation at 40°C with kanamycin were digested with *Sma*I and *Pst*I. Lane 6, pSY130-14 was digested with *Sma*I and *Pst*I. Lane 7, λ phage was digested with *Hind*III. Lane 8, *Sma*I-*Pst*I fragment containing *P_L-pheA^{FK}* of pSY130-14.

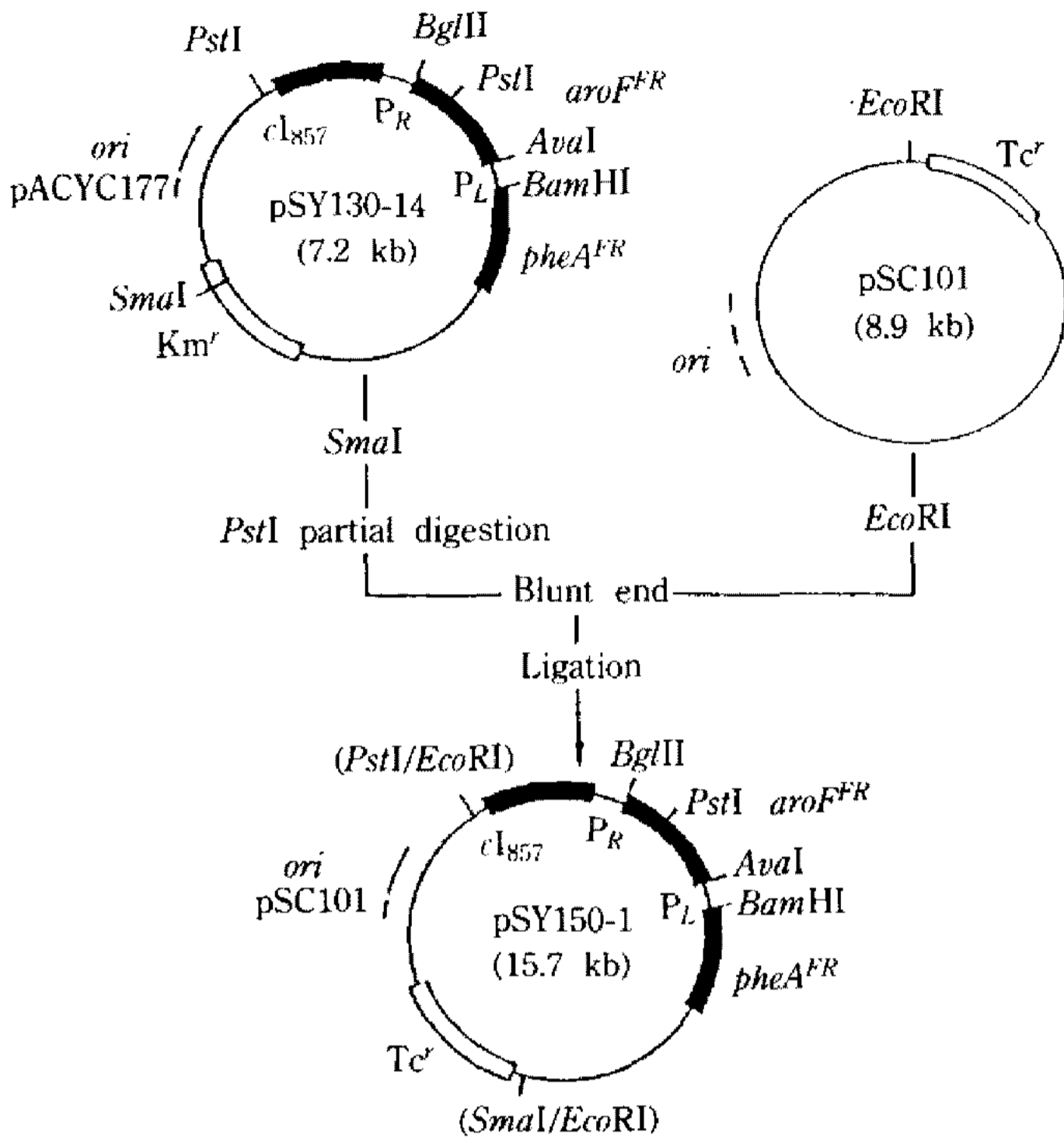


Fig. 3. Construction of plasmid pSY150-1 having the ori of pSC101.

To construct pSY150-1, pSY130-14 was digested with *Sma*I, and digested partially with *Pst*I. Only the large *Sma*I-*Pst*I fragment was isolated by agarose gel and was blunt ended with T₄ DNA polymerase. Plasmid pSC101 digested with *Eco*RI was also blunt ended with T₄ DNA polymerase. To isolate pSY150-1, *E. coli* RRI transformed by the ligation mixture was selected on LB agar plates containing tetracycline, and the resistant strain to phage *cl*₉₀ was selected. AT2471 was transformed by pSY150-1.

떨어지므로, 이 pSY101의 다 copy 수인 ori pACYC 177을 안정성이 높다고 보고된 중 copy 수인 pSC101 (12)의 ori로 바꾸기로 하였다. Plasmid pSY130-14를 *Sma*I으로 처리하고, 또한 *Pst*I으로 부분 분해하여 ori pACYC177만이 제거된 단편을 얻고, pSC101은 *Eco*RI으로 처리하고, 두 DNA 단편 모두 blunt end로 만들고, ligation하여 plasmid pSY150-1을 얻었다(Fig. 3).

Plasmid pSY150-1의 각 온도에 대한 안정성은 Fig. 4에 나타냈다. Fig. 4에 의하면 pSY150-1은 tetracycline 무첨가시는 40°C에서 불안정하였으나, 첨가시는 40°C에서도 안정성을 나타냈다. 그리고 plasmid pSY 150-1의 경우 40°C에서도 Fig. 2의 40°C에서와 같은 plasmid의 변화없이 그대로 보존되어 있었다.

Phenylalanine 생산성 비교

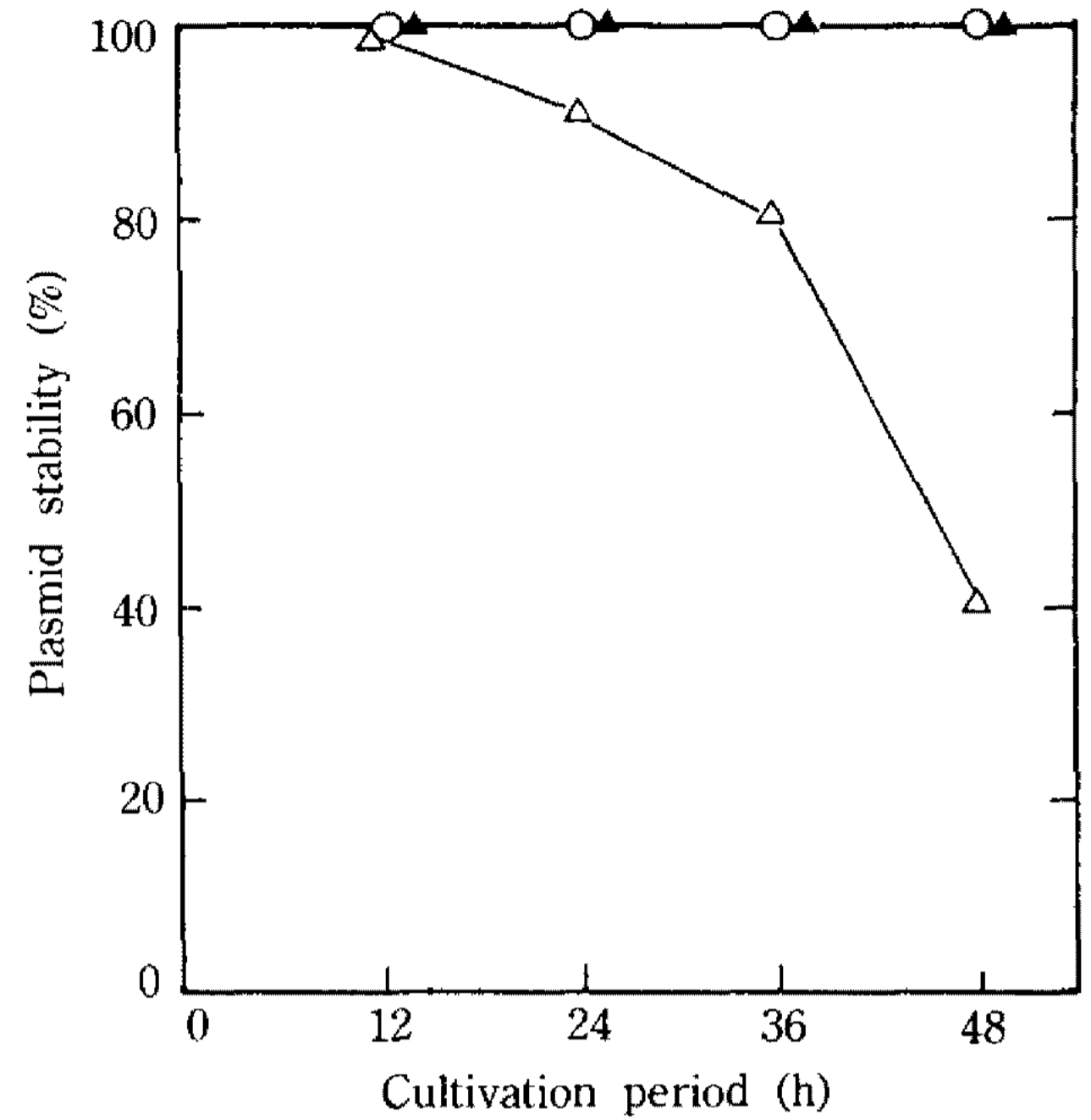


Fig. 4. Time course of plasmid stability of strain AT 2471 harbouring plasmid pSY150-1.

Symbols, (○) cultivation at 38.5°C without kanamycin; cultivation 40°C (△) without and (▲) with kanamycin.

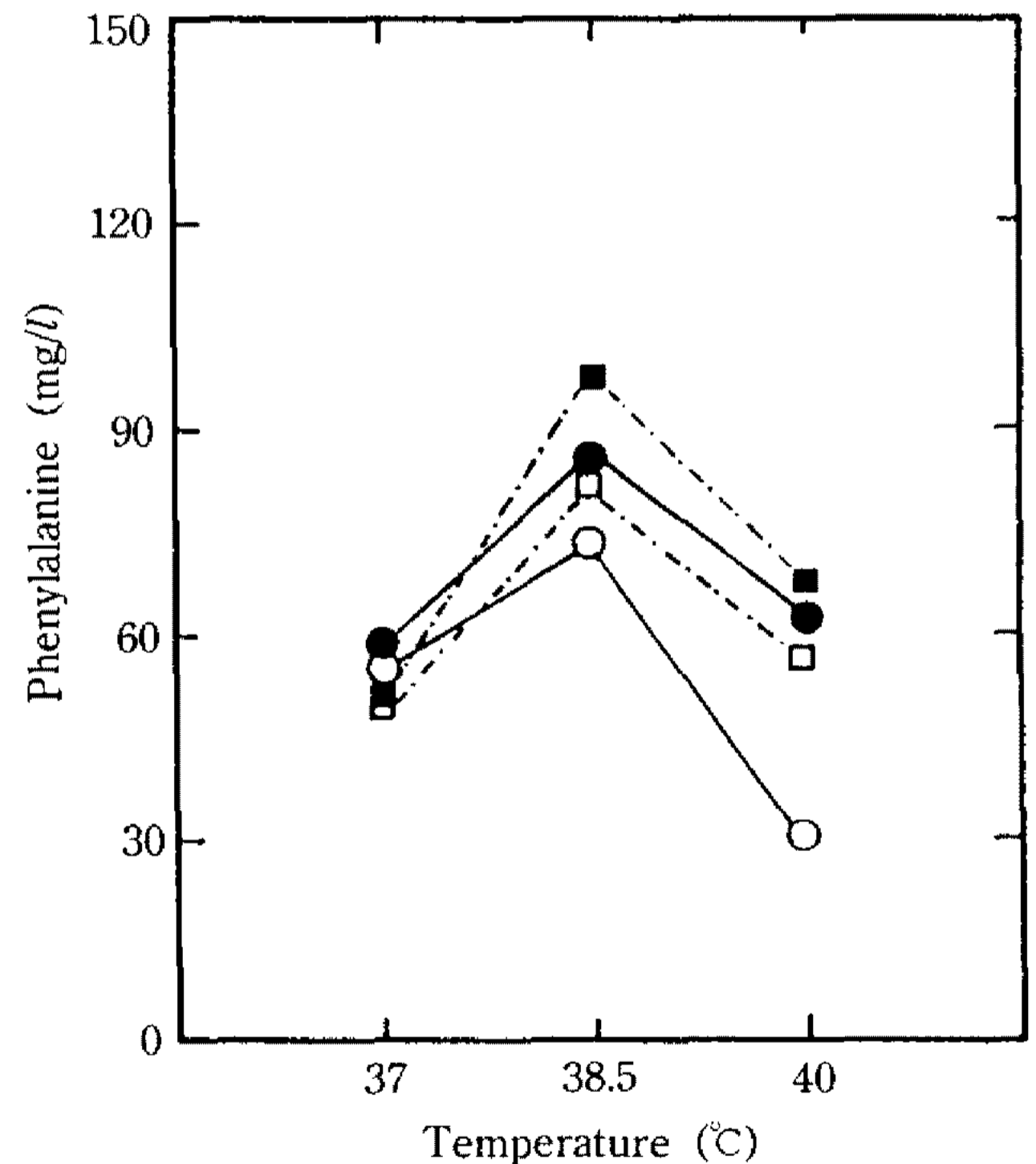


Fig. 5. Temperature dependency of phenylalanine production by strain AT2471 harbouring plasmid pSY130-14 or pSY150-1.

Symbols, phenylalanine concentration produced by plasmid pSY130-14 (○) without kanamycin and (●) with kanamycin in the culture supernatant; phenylalanine concentration produced by plasmid pSY150-1 (□) without tetracycline and (■) with tetracycline in the culture supernatant.

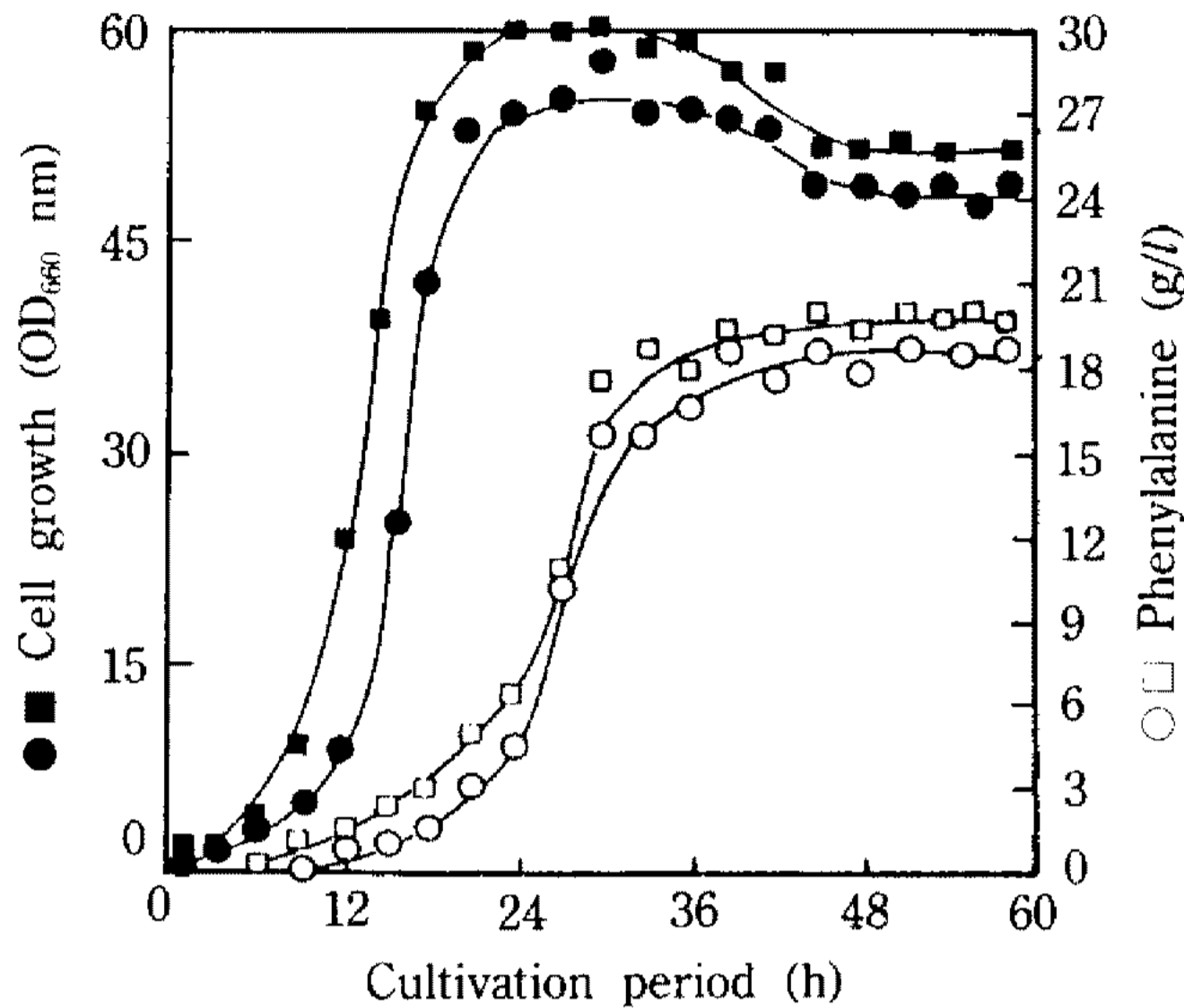


Fig. 6. Time courses of cell growth and phenylalanine production by strain AT2471 harbouring plasmid pSY 130-14 or pSY150-1 at 38.5°C in a reactor.

Symbols, phenylalanine concentration of (○) pSY130-14 and (□) pSY150-1 in the culture supernatant; cell concentration of (●) plasmid pSY130-14 and (■) pSY150-1 expressed as optical density at 660 nm.

Fig. 1, 4의 실험에서 phenylalanine의 생산량은 Fig. 5에 나타냈다. AT2471/pSY150-1은 AT2471/pSY130-14보다 항생물질 무첨가시 38.5°C에서 생산량이 높았으며, 40°C에선 생산량이 전체적으로 떨어졌으나, 생산량의 차는 더 컸다. 항생물질 첨가시는 38.5°C에서 pSY150-1의 생산량이 어느 정도 높았으나 40°C에선 그 차가 적었다. AT2471/pSY150-1의 균체농도는 항생물질 무첨가시 약 OD₆₆₀=2.5 정도였으나, 첨가시는 38.5°C에서 OD₆₆₀=2.2 정도이고, 40°C에선 OD₆₆₀=1.8 정도로, pSC101의 ori를 사용한 경우에도 Sugimoto 등(6)의 ori pACYC177을 사용한 경우의 보고와 같이 균체증식이 떨어졌다.

이상의 결과로부터 분배기구를 부여한 pSY150-1은 pACY177 계통인 pSY130-14 보다 온도에 대한 안정성이 높았으며 phenylalanine 생산에도 어느 정도 영향을 미쳤다. AT2471/pSY130-14와 AT2471/pSY150-1을 Jar 발효조를 이용하여 38.5°C에서 배양하고 그 결과 phenylalanine 생산량을 Fig. 6에 나타냈다. Fig. 6에 의하면 phenylalanine 생산량은 pSY150-1의 경우가 pSY130-14 보다 약 4% 더 많았다.

그리고 Jar 발효조의 경우 pSY150-1은 tetracycline이 없는 배지에서도 안정하게 plasmid를 유지하였으나, phenylalanine 생산량은 tetracycline 존재시

보다 많지는 않았다.

고 찰

숙주에서 plasmid의 안정성은 성장속도, plasmid 특성(copy 수, plasmid의 복제형식, plasmid에서 유전자 발현시 DNA 염기순서), 혹은 숙주에 가해지는 외부 stress 등에 의해 영향을 받는 것으로 추측된다.

pSC101의 copy 수는 ~5(26)로서 중 copy 수에 해당되나, 이 plasmid만 갖는 숙주는 Aiba 등(26)의 실험에서도, 본 논문의 AT2471에서도 100% 안정성을 나타냈다. 그리고 tryptophan 생산 gene을 삽입시 tryptophan operon 결실 숙주 AE1에선 100% 안정성을 보였으나 tryptophanase 결실 균주 Tna(27,28)에선 85% 안정성을 보였다(12,27). 이때 AE1에선 11 mg/l의 tryptophan 생산을, Tna 경우는 360 mg/l의 tryptophan을 생산하므로 생산량에 차가 있었다. 즉 생산량이 많을수록 균주에 stress를 가하게 되어 plasmid의 안정성이 떨어지는 것으로 생각된다. 이와 같이 Aiba 등의 보고에서 보듯 숙주에 따라 안정성이 틀린다고 볼 수 있는데, phenylalanine 생산균주 AT2471/pSY150-1의 경우 38.5°C에서 100% 안정성을 보였으나, phenylalanine 생산량이 크게 늘지는 않았다. 이것은 38.5°C가 가장 최적온도로 그 이상의 온도, 즉 40°C에서는 phenylalanine을 위한 promoter의 과발현으로 과잉의 m-RNA 합성 등(5) 균주에 지나친 stress를 가하게 되어 보통의 경우 100% 안정성을 갖는 pSC101의 ori도 안정성에 문제를 일으키는 것으로 생각된다. 또한 pSY150-1의 경우가 pSY130-14보다 phenylalanine 생산량이 크게 높지 않은 것은 plasmid가 어느 정도 불안정하더라도, Aiba 등의 보고(26)에서 다 copy 수 경우가 tryptophan 생산량이 많았다고 하는 것과 어느 정도 일치하는 것을 보인다. 즉, 다 copy의 plasmid의 경우 m-RNA의 다량 생산으로 산물이 대량 생산될 수 있기 때문이다. 반대로 저 copy의 plasmid의 경우도 유전자 발현으로부터 물질생산은 보다 안정성이 높아 경우에 따라선 충분한 것으로 생각되며, pSY150-1의 경우가 그 좋은 예가 되겠다. 그리고 배양조건에 따라 균체농도가 틀리는 이유는 배양온도가 높을수록 높은 stress로 plasmid가 탈락되기 쉬우며 탈락된 균체는 첨가된 항생물질에 의해 사멸되기 때문이라고 생각한다.

그러므로 cloning된 유전자의 발현으로부터의 생산 물량은 plasmid의 안정성과 copy 수 사이의 상관관계에 의해 크게 영향을 받는 것으로 생각된다.

요 약

Phenylalanine 고생산용 plasmid pSY130-14는 λ phage 유래 온도감수성을 가지고 있으므로 cI_{857} repressor와 P_L 과 P_R 을 온도를 올려 phenylalanine의 생산을 유도한다. pSY130-14를 갖는 *E. coli* AT2471은 kanamycin 무첨가, 38.5°C, 48시간에서 약 30%로 plasmid가 없어지며 첨가에선 안정성이 떨어졌다가 배양시간과 더불어 올라갔는데, 이것은 생육에 필요한 kanamycin gene과 *ori*만이 남는 것으로 생각된다. 이 plasmid의 불안정성을 개선하기 위해 pSY130-14의 *ori*인 pACYC177를 pSC101의 *ori*로 바꾸어 pSY150-1을 제작하였다. pSY150-1을 갖는 *E. coli* AT2471은 38.5°C에서는 tetracycline 무첨가시도 안정하였으며, tetracycline 무첨가시, 40°C, 48시간에선 약 40%의 안정성을 보였다.

참고문헌

1. Brown, T.A.: *Gene cloning*, St. Edmundsbury Press Ltd, London, 2nd ed., 225 (1990)
2. Sussman, R. and F. Jacob: *Compt. Rend. Acad. Sci., Paris*, **254**, 1517 (1962)
3. Sauer, R.T. and R. Andregg: *Biochemistry*, **17**, 1092 (1978)
4. Sugimoto, S., M. Yabuta, T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **22**, 336 (1985)
5. Sugimoto, S., T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi: *Chem. Eng. Commun.*, **45**, 241 (1986)
6. Sugimoto, S., M. Yabuta, N. Kato, T. Seki, T. Yoshida and H. Taguchi: *J. Biotechnol.*, **5**, 237 (1987)
7. Konstantin, B. Konstantinov, N. Nishio and T. Yoshida: *J. Ferment. Bioeng.*, **70**, 253 (1990)
8. Brown, T.A.: *Gene cloning*, St. Edmundsbury Press Ltd, London, 2nd ed., 12 (1990)
9. Freifelder, D.: *Molecular Biology*, Jones and Bartlett Publishers, Inc. Boston, 2nd ed., 12 (1987)
10. 湯川英明: *The INTER*, **5**, 648 (1987)
11. Womble, D.D. and R.H. Rownd: *J. Mol. Biol.*, **192**, 529 (1986)
12. Aiba, S., H. Tsunekawa and T. Imanaka: *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 289 (1982)
13. Armstrong, K.A., R. Acosta, E. Ledner, Y. Machida, M. Pancotto, M. McCormick, H. Ohtsubo and E. Ohtsubo: *J. Mol. Biol.*, **175**, 331 (1984)
14. Gustafsson, P., H. Wolf-Watz, L. Lind, K.E. Johansson and K. Nordström: *The EMBO*, **2**, 27 (1983)
15. Imanaka, T., H. Tsunekawa and S. Aiba: *Journal of General Microbiology*, **18**, 253 (1980)
16. Brown, T.A.: *Gene clong*, St. Edmundsbury Press Ltd, London, 2nd ed., 103 (1990)
17. Old, R.W. and S.B. Primrose: *Principles of gene manipulation*, Blackwell Scientific Publications, Oxford, 4th ed., 48 (1989)
18. Bron, S. ana E. Luxen: *Plasmid*, **14**, 235 (1985)
19. Chang, A.C.Y. and S.C. Cohen: *J. Bacteriol.*, **134**, 1141 (1987)
20. Taylor, A.L. and C.D. Trotter: *Bacteriol Rev.*, **31**, 332 (1967)
21. Boliver, F., R.L. Rodriguez, P.J. Greene, M.C. Betlach, H.L. Heyneker, H.W. Boyer, J.H. Crosa and S. Falkow: *Gene*, **2**, 95 (1977)
22. Cohen, S.N., A.C.Y. Chang, H.W. Boyer and R.B. Helling: *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.*, **70**, 3240 (1973)
23. Holmes, D.S. and M. Quiley: *Anal. Biochem.*, **114**, 193 (1981)
24. Maniatis, T., E.F. Fritsch and J. Sambrook: *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold spring harbor, New York (1982)
25. McCaman, M.W. and E. Robins: *J. Lab. Clin. Med.*, **59**, 885 (1962)
26. Cabello, F., K. Timmis and S.N. Cohen: *Nature (London)*, **259**, 285 (1976)
27. Bachmann, B.J., K.B. Low and A.L. Taylor: *Bacteriol. Rev.*, **40**, 116 (1976)
28. Bachman, B.J. and K.B. Low: *Bacteriol. Rev.*, **44**, 1 (1980)
29. Pons, F.W.: *Mutation Res.*, **129**, 311 (1984)
30. 강상모, 권태종, 정호권: 산업미생물학회지, **19**, 45 (1991)

(Received July 16, 1991)