

**組換え DNA 技術応用飼料添加物の
安全性確認
(案)**

**JPBL017 株を利用して生産された
アルカリ性プロテアーゼ**

**令和 8 年 2 月 10 日
農林水産省消費・安全局
畜水産安全管理課**

目次

I	はじめに	3
II	確認対象飼料添加物の概要	3
III	審議内容.....	4
1	生産物の既存のものとの同等性に関する事項.....	4
2	組換え体等に関する事項	4
	（1）GILSP（Good Industrial Large-Scale Practice）組換え体又はカテゴリー 1 組換え体を安全に取り扱うことができる作業レベルでの製造に用い得る非病原性の組換え体であることに関する事項.....	4
	（2）組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項.....	4
	（3）宿主に関する事項	5
	（4）ベクターに関する事項	6
	（5）挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項	7
	（6）組換え体に関する事項	11
3	組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項	12
	（1）飼料又は飼料添加物の製造原料としての使用実績及び安全性に関する事項..	12
	（2）飼料又は飼料添加物の製造器材としての使用実績及び安全性に関する事項..	12
4	生産物に関する事項	12
	（1）組換え体の混入を否定する事項.....	12
	（2）製造に由来する不純物の安全性に関する事項	12
	（3）精製方法及びその効果に関する事項.....	12
	（4）含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する事項.....	12
	（5）組換え体によって製造された生産物の外国における認可及び使用等の状況に関する事項	13
5	2 から 4 までにより安全性に関する知見が得られていない場合は次の試験のうち必要な試験の成績に関する事項.....	13
IV	審議結果.....	13
V	参考文献及び参考資料.....	13

「JPBL017 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ」に係る安全性確認

I はじめに

「JPBL017 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ」について、令和 7 年 6 月 11 日付けで遺伝子組換え飼料添加物としての安全性確認の申請があったことから、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき審議を行った。

II 確認対象飼料添加物の概要

添加物：JPBL017 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼ

製品名：Proact 360TM（プロアクト 360TM）（顆粒又は液状）

有効成分概要

一般名	EC 番号	CAS 番号	機能
アルカリ性 プロテアーゼ	3.4.21.62	9014-01-1	たん白質のペプチド結合を エンド型で加水分解する

用 途：飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進

申請者：ノボザイムズ ジャパン株式会社

開発者：Novozymes A/S（デンマーク）

本飼料添加物の有効成分は、たん白質の消化を促進するアルカリ性プロテアーゼの生産性を高めるため、*Bacillus licheniformis* Ca63 株（以下「Ca63 株」という。）を宿主として、改変を加えた *Cytobacillus sp.* TY145 株由来のプロテアーゼ遺伝子（改変 *PTY* 遺伝子）を導入して作成した JPBL017 株により生産されたアルカリ性プロテアーゼ（以下「JPBL017 プロテアーゼ」という。）である。

また、宿主である Ca63 株、改変 *PTY* 遺伝子の供与体である *Cytobacillus sp.* TY145 株及び生産菌である JPBL017 株の安全性、製造器材・製造工程の安全性並びに不純物を含めた生産物の安全性について確認したところ、飼料添加物としての安全上の問題となる点は認められなかった。

農業資材審議会飼料分科会遺伝子組換え飼料部会における審議の結果、JPBL017 プロテアーゼについて、「組換え DNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」(平成 14 年 11 月 26 日農林水産省告示第 1780 号)に基づき、遺伝子組換え飼料添加物として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

III 審議内容

1 生産物の既存のものとの同等性に関する事項

JPBL017 プロテアーゼは Ca63 株に導入された *Cytobacillus sp.* TY145 株の遺伝子によって産生される。既存のアルカリ性プロテアーゼを比較対象として、アミノ酸配列、生化学的性質（有効成分、酵素活性）の比較を実施した。有効成分の性質やアミノ酸配列に違いが見られるものの、いずれもたん白質のペプチド結合をエンド型で加水分解するアルカリ性プロテアーゼであり、活性部位を構成する三つのアミノ酸残基の種類は同じであり、加えてそれらの空間配置は酷似していることが確認された。

よって、JPBL017 プロテアーゼは既存の飼料添加物に比べ、全体として同等性を失っていないと考えるに十分であることが確認された。

2 組換え体等に関する事項

（1）GILSP（Good Industrial Large-Scale Practice）組換え体又はカテゴリー 1 組換え体を安全に取り扱うことができる作業レベルでの製造に用い得る非病原性の組換え体であることに関する事項

生産菌である JPBL017 株を含む *B. licheniformis* の組換え体は OECD の GILSP に準拠していることが認められ、工業的使用を許可される等して安全に利用されてきている（参考資料 1）。

ベクター及び挿入遺伝子については、分子量及び制限酵素による切断地図等が明らかにされており、既知の有害な塩基配列は含まれておらず、組換え体の外界での安定性が増大するようなものではない。

組換え体 JPBL017 株は、非病原性であり、工業的利用の場において宿主 Ca63 株と同程度に安全であると考えられる。

以上のことから、JPBL017 株は GILSP 組換え体に該当すると考えられた。

（2）組換え体の利用目的及び利用方法に関する事項

JPBL017 プロテアーゼは、豚及び鶏の飼料に添加することにより、消化管でのたん白質の消化が促進され、エネルギーの利用効率が上昇する。

JPBL017 プロテアーゼを生産する組換え体 JPBL017 株の利用目的は、酸性領域におけるプロテアーゼの安定性の向上及び JPBL017 プロテアーゼ生産性の向上であり、既存の添加物の生産菌と同様の方法で利用される。

(3) 宿主に関する事項

ア 学名、株名等の分類学上の位置付けに関する事項

学名：*Bacillus licheniformis* Ca63 株

Ca63株はノボザイムズ社において1972年以来食品用プロテアーゼの生産菌として使用されてきた実績がある。

イ 病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

B. licheniformis は食品用酵素の生産菌として広く使用されている孢子形成菌であり、その安全性が知られている。

また国立感染症研究所の病原体等安全管理規程（参考資料2）においては、*B. licheniformis* はバイオセーフティーレベル（BSL）2 及びBSL3 の実験室や施設を要する病原体等に分類されていない。またヒトあるいは動物に疾病を起こす見込みがなく（参考資料1）、病原体等のリスク群分類のリスク群1に分類される（参考資料3）。

ウ 寄生性及び定着性に関する事項

B. licheniformis が、哺乳動物に対して寄生性又は定着性を持つとの報告はない。

エ ウイルス等の病原性の外来因子に汚染されていないことに関する事項

B. licheniformis について、ウイルス感染等の例はこれまで報告されていない。Ca63株は、社内の安全管理規定に基づく実験室及び製造設備内で取り扱われているため、病原性の外来因子に汚染されることはない。

オ 自然環境を反映する実験条件の下での生存及び増殖能力に関する事項

B. licheniformis は自然界に広く分布する孢子形成菌であり、自然環境下において生存及び増殖する能力を有する。宿主であるCa63株についても同様であると考えられた。

カ 有性又は無性生殖周期及び交雑性に関する事項

B. licheniformis に有性生殖周期は見つかっておらず、無性生殖周期のみが知られている。一般的に、分類学上近縁種同士の微生物の交雑は起こり得るとされている。しかし、自然界において*B. licheniformis* とその近縁種間で交雑が起きたという報告はない。

キ 飼料に利用された歴史に関する事項

B. licheniformis は、家禽及び家畜の飼料用アルカリ性プロテアーゼの生産菌として、長年利用されていることから、家畜が摂取しても健康に影響を及ぼすおそれはないと考えられた。

ク 生存及び増殖能力を制限する条件に関する事項

B. licheniformis は自然界に広く分布する孢子形成菌であり、栄養源の欠乏等、環境が悪化した場合に細胞内に孢子を形成する。孢子は熱、乾燥、酸、アルカリ等に対して抵抗性を持ち、環境が好転するまで長期間休眠する。

Ca63株の至適増殖温度は 30~50℃であり、増殖可能最高温度は 55℃である。また、90℃付近で死滅する。

ケ 類縁株の病原性及び有害生理活性物質の生産に関する事項

Bacillus 属の中で *B. licheniformis* と比較的近い近縁種は、*B. subtilis* 及び *B. pumilus* であるが、米国EPA (Environmental Protection Agency) のDecision Document によると、これらは *B. licheniformis* と同様、非病原性かつ非毒素産生性とみなされており、毒性物質を産生することが知られている *B. cereus* 等とは明確に区別されるとしている（参考資料4）。

(4) ベクターに関する事項

ア 名称及び由来に関する事項

挿入遺伝子の宿主への導入に用いられた遺伝子導入用ベクターpJPV063は、*Staphylococcus aureus*由来のプラスミドであるpE194 を基に作製されている（参考資料5）。

イ 性質に関する事項

(ア) DNAの分子量を示す事項

pE194の塩基数は明らかになっている。

(イ) 制限酵素による切断地図に関する事項

pE194の制限酵素による切断地図は明らかになっている。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

pE194の機能及び性質は明らかであり、既知の有害なたん白質を産生する塩基配列は含まれていない。

ウ 薬剤耐性に関する事項

pE194にはエリスロマイシン耐性遺伝子 (*ermC*) が存在する。*ermC* 遺伝子は *S. aureus* 由来であり、この遺伝子がコードするアデニンメチラーゼによってエリスロマイシン耐性が付与される。なお、生産菌に *ermC* 遺伝子配列は挿入されていない。この遺伝子が生産菌の染色体に存在しないことは、シーケンス解析により確認されている。

エ 伝達性に関する事項

pE194には伝達性を付与する配列は含まれていない。

オ 宿主依存性に関する事項

pE194は *S. aureus* 由来のプラスミドであり、同じグラム陽性細菌である *Bacillus* 属で広く複製可能であることが知られている。しかし、それ以外の菌で複製することは知られておらず、宿主依存性は高いと考えられる。

カ 発現ベクターの作成方法に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV063 は、改変 *PTY* 遺伝子に加え、その他の配列を基本ベクター pE194 に組み込むことにより作製された。

キ 発現ベクターの宿主への挿入方法及び位置に関する事項

遺伝子導入用ベクター pJPV063 に組み込まれたインテグラーゼによって改変 *PTY* 遺伝子発現カセットを挿入した。

(5) 挿入遺伝子及びその遺伝子産物に関する事項

ア 供与体の名称、由来及び分類に関する事項

以下に詳細を示す。

挿入DNA	供与体	性質
改変 <i>PTY</i> 遺伝子	<i>Cytobacillus sp.</i> TY145株	有効成分であるJPBL017プロテアーゼをコードする。

挿入DNA	供与体	性質
P3プロモーター* (<i>amyL4199/amyQsc/cryIIIA</i> プロモーター)	<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. licheniformis</i> Ca63株 • <i>B. amyloliquefaciens</i> DSM 7株 • <i>B. thuringiensis subsp. tenebrionis</i> DSM 5525株 	改変 <i>PTY</i> 遺伝子発現カセットにおいて、遺伝子のプロモーターとして機能する。
<i>amyL</i> ターミネーター	<i>B. licheniformis</i> Ca63株	改変 <i>PTY</i> 遺伝子発現カセットにおいてターミネーターとして機能する。また中間株作製の段階でマーカー遺伝子のターミネーターとして遺伝子座に挿入され残存している。
<i>aprH</i> ターミネーター	<i>B. clausii</i> DSM 8716株	<i>aprH</i> 遺伝子のターミネーターとして機能する。中間株作製の段階でマーカー遺伝子のターミネーターとして挿入された。
改変 <i>cryIIIA</i> mRNA 安定化配列	<ul style="list-style-type: none"> • <i>B. thuringiensis subsp. tenebrionis</i> DSM 5525株 • <i>B. subtilis</i> ATCC 6051a株 	目的たん白質の発現を促進する。3'末端に近い箇所に、 <i>B. subtilis</i> ATCC6051a株の16S rRNA由来のRBS 配列25 bpが挿入されることで改変された。
attR 配列	Lactococcal bacteriophage TP901-1株	遺伝子導入用ベクターが宿主の染色体に挿入された後、インテグラーゼが結合する[]配列と[]配列が一部合わさって出現した配列である。目的遺伝子発現カセット内に含まれる。
<i>pdaC</i> 遺伝子の3'側領域	<i>B. licheniformis</i> Ca63株	各遺伝子座において、P3プロモーターの5'側の隣接領域に中間株作製の段階で挿入され、そのまま保

		持されたものである。このDNA断片は宿主の <i>pdaC</i> 遺伝子に由来し、またORFを含まないため遺伝子機能を持たない。
--	--	---

* P3プロモーターは三つのプロモーター（*amyL4199* プロモーター、*amyQsc* プロモーター及び*cryIIIA* プロモーター）を連結したものである。

イ 遺伝子の挿入方法に関する事項

（ア）ベクターへの挿入遺伝子の組込方法に関する事項

■■■■■ 及び ■■■■■ で処理した pE194 に、*int* 遺伝子/■■■■■ 遺伝子断片、*oriT* 断片、改変 *cryIIIA* mRNA 安定化配列断片、改変 *PTY* 遺伝子断片及び *amyL* ターミネーター/■■■■■ 配列断片を挿入し、遺伝子導入用ベクター pJPV063 を作製した。

（イ）挿入遺伝子の宿主への導入方法に関する事項

遺伝子導入用ベクターをCa63株に導入する前に、相同組換えによりCa63株の染色体にマーカー遺伝子発現カセット（プロモーター、mRNA安定化配列及びターミネーターを含む）を挿入した。この際、遺伝子が欠失した。なお、■■■■■ 遺伝子座では、遺伝子の挿入を目的として、マーカー遺伝子発現カセットとともに■■■■■ 配列が挿入されたが、生産菌構築過程で特定の酵素をコードする遺伝子の挿入は行われず、目的の遺伝子発現カセットの挿入に先立ち、欠失導入用ベクター■■■■■を用いてマーカー遺伝子発現カセットを除去した。その後、遺伝子導入用ベクターpJPV063 を導入し、形質転換株を選抜した。なお、シーケンス解析により適切な領域に適切なDNAが挿入されていることを確認している。

ウ 構造に関する事項

（ア）プロモーターに関する事項

改変 *PTY* 遺伝子のプロモーターには *amyL4199* プロモーター、*amyQsc* プロモーター及び *cryIIIA* プロモーターで構成されるP3プロモーターを用いた。

（イ）ターミネーターに関する事項

改変*PTY* 遺伝子のターミネーターには*amyL* ターミネーターを用いた。*amyL* ターミネーターはCa63株由来*amyL* 遺伝子のターミネーターである。また中間株作成時に導入した*aprH* ターミネーターが[REDACTED]遺伝子座に残存している。*aprH* ターミネーターは*B. clausii* DSM 8716 株由来*aprH* 遺伝子のターミネーターである。

(ウ) 既知の有害塩基配列を含まないことに関する事項

遺伝子導入用ベクターpJPV063に含まれる遺伝子の性質は明らかにされており、既知の有害塩基配列を含まない。

エ 性質に関する事項

(ア) 挿入DNAの機能に関する事項

JPBL017株に導入された挿入DNAの機能及び挿入DNAから産生されるたん白質の性質、機能は明らかとなっている。また、JPBL017プロテアーゼのアミノ酸配列中では、ペプシン及びトリプシンによって切断される可能性がある部位が確認された。

(イ) DNAの分子量を示す事項

挿入遺伝子の塩基数は明らかとなっている。

(ウ) 制限酵素による切断地図に関する事項

JPBL017株に導入された遺伝子の制限酵素による切断地図は明らかとなっている。

オ 純度に関する事項

遺伝子導入用ベクターの配列は解析の結果、想定した通りであることが確認されている。また、遺伝子導入用ベクターは陰イオン交換樹脂のカラムで精製されたものが用いられている。このことから目的外遺伝子の混入はないと考えられる。

カ 抗生物質耐性マーカー遺伝子の安全性に関する事項

遺伝子導入用ベクターpJPV063はエリスロマイシン耐性遺伝子 (*ermC*) を有するが、JPBL017株はエリスロマイシン耐性を示さない。*ermC* 遺伝子が

JPBL017株の染色体に存在しないことはシーケンス解析で確認されている。
キ オープンリーディングフレームの有無並びにその転写及び発現の可能性に関する事項

DNA挿入領域の境界領域におけるオープンリーディングフレーム (ORF) 形成の有無を調べるため、The European Molecular Biology Open Software Suite (EMBOSS)のORF検索用プログラム「Getorf」を使用してORF検索を行った。さらに、NCBIをデータベースとしたE-value $<1.0 \times 10^{-5}$ を指標にして相同性検索を行ったところ、複数の遺伝子座において、改変*PTY* 遺伝子の配列を含むORFと相同性を示すたん白質が検出された。いずれもプロテアーゼの機能を有するたん白質であり、単独で毒性が報告されているたん白質ではないため、遺伝子導入によって新たに生じたORFが発現したとしても、本添加物製剤中に毒性を有するたん白質が含まれる可能性は低いと考えられる。

(6) 組換え体に関する事項

ア 組換えDNA操作により新たに獲得された性質に関する事項

JPBL017株は、JPBL017プロテアーゼ生成能を獲得している。

イ 宿主との差異に関する事項

JPBL017株には、改変*PTY* 遺伝子を導入することにより付与されたJPBL017プロテアーゼ産生能とともに、遺伝子欠失に伴う酵素産生能の欠損の違いがあるが、これらの形質は病原性又は有害性生理活性物質に関するものではない。

ウ 外界における生存性及び増殖性に関する事項

生産菌であるJPBL017株と*B. licheniformis* 野生株の外界における生存性及び増殖性に相違はない。

エ 生存及び増殖能力の制限に関する事項

生産菌であるJPBL017株と*B. licheniformis* 野生株の生存及び増殖能力に相違はない。

オ 不活化法に関する事項

JPBL017株は培養後に生産物から分離除去された後、90℃の加熱及び生石灰

(CaO) を用いたアルカリ処理 (pH 11以上) によって不活化される。この方法は非遺伝子組換えの酵素生産菌の場合と同様である。

3 組換え体以外の製造原料及び製造器材に関する事項

(1) 飼料又は飼料添加物の製造原料としての使用実績及び安全性に関する事項

JPBL017プロテアーゼの製造に用いられる製造原料は、いずれも食品製造に使用される品質のものである。

(2) 飼料又は飼料添加物の製造器材としての使用実績及び安全性に関する事項

JPBL017プロテアーゼの製造に用いる発酵器材及びその他の設備（精製、製剤化）は、いずれも食品用酵素の製造に長年安全に使用された実績があり、その製造工程はISO 9001 適合の認証を受けている。

4 生産物に関する事項

(1) 組換え体の混入を否定する事項

本添加物製剤中に組換え体由来の残存DNAがないことはPCR 解析により確認されている。

(2) 製造に由来する不純物の安全性に関する事項

JPBL017プロテアーゼの製造用原体について、重金属を分析し、飼料添加物成分規格の基準値に適合していることを確認している。

(3) 精製方法及びその効果に関する事項

回転真空ろ過による細胞分離工程、及び限外ろ過等による精製工程により、非酵素成分が除去される。これらの工程を経た最終製品中に生産菌JPBL017株が存在しないことが確認されている。

(4) 含有量の変動により有害性が示唆される常成分の変動に関する資料

JPBL017プロテアーゼ製造用原体について、製造に用いられる原料及び製造方法は従来の食品用酵素の製造 に使用されてきたものである。そのため、常成分の変動範囲も従来の酵素剤と同等であると考えられる。

(5) 組換え体によって製造された生産物の外国における認可及び使用等の状況に関する事項

主な国の認可状況として、プロアクト360はEFSA（欧州食品安全機関）において評価され、2024年3月に鶏用飼料添加物として認められた。

その他、北米及び欧州の各国で、飼料が含有している栄養成分の有効な利用の促進を目的として使用されている。

5 2から4までにより安全性に関する知見が得られていない場合は次の試験のうち必要な試験の成績に関する事項
該当しない。

IV 審議結果

JPBL017 株を利用して生産されたアルカリ性プロテアーゼについて、「組換えDNA 技術応用飼料及び飼料添加物の安全性に関する確認の手続」に基づき審議した結果、飼料添加物として摂取する家畜等への安全上の問題はないと判断された。

V 参考文献及び参考資料

社内文書

社内文書 1 Product Data Sheet (Ronozyme Proact) (社外秘)

社内文書 2 CERTIFICATE OF FREE SALE [REDACTED]
[REDACTED] (社外秘)

社内文書 3 遺伝子導入用ベクターpJPV063の塩基配列並びに構成 (社外秘)

社内文書 4 Overview of Gene Insertion and Deletion (社外秘)

社内文書 5 Characterization of three registration batches, and comparison with toxbatch (社外秘)

社内文書 6 ProAct 360 protease cleavage sites prediction (社外秘)

社内文書 7 JPBL017 株の遺伝子挿入部位の塩基配列 (社外秘)

社内文書 8 [REDACTED]
[REDACTED] (社外秘)

社内文書 9 [REDACTED]
[REDACTED] (社外秘)

社内文書 10 [REDACTED]
[REDACTED] (社外秘)

社内文書 11 [REDACTED]
[REDACTED] (社外秘)

社内文書 12 [REDACTED]
[REDACTED] (社外秘)

社内文書 13 Absence of recombinant DNA in the product (社外秘)

参考資料

1. Chapter 4: Safety evaluation of foods and food ingredients derived from microorganisms. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, Article 1990;12(3 PART 2):S114-S128.
2. 国立感染症研究所. 病原体等安全管理規程
https://www.niid.jihs.go.jp/images/biosafe/kanrikitei3/Kanrikitei3_20240401.pdf. 令和 6 年 4 月.
3. 国立感染症研究所. 国立感染症研究所病原体等安全管理規 別冊 1 「病原体等の B S L 分類等」
https://www.niid.jihs.go.jp/images/biosafe/kanrikitei3/Kanrikitei3_230602-1.pdf. 令和 5 年 6 月.

4. *Bacillus licheniformis* TSCA Section 5(h)(4) Exemption: Final Decision Document. <https://www.epa.gov/sites/production/files/2015-09/documents/fra005.pdf> [accessed May 16, 2018].
5. Horinouchi S, Weisblum B. Nucleotide sequence and functional map of pE194, a plasmid that specifies inducible resistance to macrolide, lincosamide, and streptogramin type B antibiotics. *Journal of Bacteriology*, Article 1982;150(2):804-814.
6. legislation.gov.uk. *The Genetically Modified Organisms(Contained Use) Regulations 2000*.
7. *Risk Assessment of Genetically Modified Microorganisms other than Eukaryotic viruses (The Genetically Modified Organisms (Contained Use) Regulations 2000 (United Kingdom))*.
8. *Examples of Host-Vector Systems and Access Factors (Annex of Risk Assessment of Genetically Modified Microorganisms other than Eukaryotic viruses (The Genetically Modified Organisms (Contained Use) Regulations 2000 (United Kingdom))*.
9. Patel S, Gupta RS. A phylogenomic and comparative genomic framework for resolving the polyphyly of the genus *Bacillus*: Proposal for six new genera of *Bacillus* species, *Peribacillus* gen. nov., *Cytobacillus* gen. nov., *Mesobacillus* gen. nov., *Neobacillus* gen. nov., *Metabacillus* gen. nov. and *Alkalihalobacillus* gen. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 2020;70(1):406-438.
10. Sietske A, Diderichsen B. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B. amyloliquefaciens*: a review. *Applied Microbiology & Biotechnology* 1991;36(1):1.

- 11.Federici BA. Insecticidal bacteria: an overwhelming success for invertebrate pathology. *Journal of invertebrate pathology*, Article 2005(1).
- 12.Ricci A, Allende A, Bolton D, Chemaly M, Davies R et al. Scientific Opinion on the update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA. *EFSA Journal* 2017;15(3):1.
- 13.Christiansen B, BrØndsted L, Hammer K, Vogensen FK. A resolvase-like protein is required for the site-specific integration of the temperate lactococcal bacteriophage TP901-1. *Journal of bacteriology (USA)*, Article 1996(17):5164.
- 14.Widner B, Thomas M, Sternberg D, Lammon D, Behr R et al. Development of marker-free strains of *Bacillus subtilis* capable of secreting high levels of industrial enzymes. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, Article 2000;25(4):204-212.