

유산균의 Host-Vector System 개발

윤성식* · 김창민¹

연세대학교 문리대학 생물자원공학과, ¹식품의약품안전청 식품평가부

Development of Host-Vector Systems for Lactic Acid Bacteria. Yoon, Sung-Sik* and Changmin Kim¹. Department of Biological Resources and Technology, College of Liberal Arts and Sciences, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea, ¹Department of Food Evaluation, Korea Food and Drug Administration, Korea - Lactic acid bacteria (LAB) are widely used for various food fermentations. With the recent advances in modern biotechnology, a variety of bio-products with the high economic values have been produced using microorganisms. For molecular cloning and expression studies on the gene of interest, *E. coli* has been widely used mainly because vector systems are fully developed. Most plasmid vectors currently used for *E. coli* carry antibiotic-resistant markers. As it is generally believed that the antibiotic resistance markers are potentially transferred to other bacteria, application of the plasmid vectors carrying antibiotic resistance genes as selection markers should be avoided, especially for human consumption. By contrast, as LAB have some desirable traits such that they are GRAS(generally recognized as safe), able to secrete gene products out of cell, and their low protease activities, they are regarded as an ideal organism for the genetic manipulation, including cloning and expression of homologous and heterologous genes. However, the vector systems established for LAB are still insufficient to over-produce gene products stably, limiting the use of these organisms for industrial applications. For a past decade, the two popular plasmid vectors, pAM β 1 of *Streptococcus faecalis* and pGK12, the *B. subtilis*-*E. coli* shuttle vector derived from pWV01 of *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* Wg2, were most widely used to construct efficient chimeric vectors to be stably maintained in many industrial strains of LAB. Currently, non-antibiotic markers such as nisin resistance(Nis^r) are explored for selecting recombinant clone. In addition, a gene encoding S-layer protein, *slpA*, on bacterial cell wall was successfully recombined with the proper LAB vectors for excretion of the heterologous gene product from LAB. Many food-grade host vector systems were successfully developed, which allowed stable integration of multiple plasmid copies in the chromosome of LAB. More recently, an integration vector system based on the site-specific integration apparatus of temperate lactococcal bacteriophage, containing the integrase gene(*int*) and phage attachment site(*attP*), was published. In conclusion, when various vector systems, which are maintain stably and expressed strongly in LAB, are developed, lots of such food products as enzymes, pharmaceuticals, bioactive food ingredients for human consumption would be produced at a full scale in LAB.

Key words: Lactic acid bacteria, food-grade host vector, plasmid stability, shuttle vector

동서양을 막론하고 유산균 (lactic acid bacteria, LAB)은 다양한 발효 식품의 제조 과정에 직접 관여하는 유익한 미생물로서 인간이 마음놓고 섭취할 수 있는 안전한 미생물이다. 최근 생명공학 기술의 급속한 발전에 힘입어 인체에 유익한 고부가가치성의 물질을 미생물을 이용하여 대량 생산하기 위한 연구가 활발히 수행되고 있다. 미생물을 이용한 생산의 경우 우선적으로 생산물의 안전성이 고려되어야 하므로 유산균처럼 안전한 미생물(generally recognized as safe, GRAS)의 이용이 바람직하다. 생명 공학적 측면에서 유산균이란 그 경제적 활용 가치가 매우 높은 미생물이다

[26,30]. 유산균의 일반적인 생리적 특징은 단백질을 세포 밖으로 분비하는 기작이 있고, 세포외 단백질 가수분해 효소의 활성이 낮다는 점이다. 따라서 자체 또는 외래의 바람직한 유전자를 적당한 vector system을 이용하여 클로닝한 다음 유전자 산물을 발현시키기에 이상적인 숙주 미생물이다[3].

유산균 중에서도 특히 치즈나 buttermilk와 같은 유제품의 발효를 담당하는 *Lactococcus lactis* (*L. lactis* ssp. *lactis* 와 *L. lactis* ssp. *cremoris*)는 유가공 산업에서 특히 중요한 starter이기 때문에 유전학적 균주 개량의 표적 미생물로서 그 동안 집중적인 연구가 수행되어 왔다[49]. 지금까지 유산균을 형질 전환시켜 관심의 대상이 되는 외래 유전자 산물을 유산균으로부터 얻기 위한 유산균 스타터의 개량은 다음 3가지 항목에 연구의 초점이 맞추어져 있다. 즉 1)

*Corresponding author

Tel. 82-33-760-2251, Fax. 82-33-763-4323

E-mail: sunsik@dragon.yonsei.ac.kr

산업적 유용성이 큰 유전자의 클로닝 및 특성 규명, 2) gene transfer system의 개발, 3) cloning vector의 개발 등이다. 이를 위해서는 각종 유산균 즉, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* 및 *Carnobacterium* 등으로 대표되는 이 미생물의 chromosome (대개 크기가 1.8-3.4 Mbp임) 뿐만 아니라 plasmid의 이용을 비롯한 gene transfer system 개발이 선행되어야 함은 필수적이라 할 수 있다.

본 고에는 유산균의 형질 전환에 널리 사용되고 있는 *E. coli*-유산균 shuttle vector, food-grade 및 host-vector system 등의 종류, 특징 및 용도 등을 개괄적으로 소개 하고자 한다.

Gene transfer system 의 개발

유산균의 형질 전환에 가장 널리 사용되는 vector로서는 plasmid가 있다. Plasmid란 chromosome 이외에 독립적으로 복제될 수 있는 replicon으로서, vector로 사용되는 것은 독특한 제한 효소 절단 부위와 형질 전환체의 선택적 표지 물질로서 항생제 내성 유전자를 가지고 있는 경우가 대부분이다[5]. 이 plasmid를 이용하여 형질 전환 및 고효율 발현을 목표로 할 경우 high copy number와 strong promoter 유전자를 가지는 것이 바람직할 것이다[30]. 그런데 보고된 바와 같이 대부분의 유산균용 plasmid vector는 single-stranded intermediate를 사용하는 rolling-circle형 복제를 하는 까닭에, 복제 과정 중 single-stranded intermediate가 생성됨으로서 segregation instability 문제, 고분자 plasmid multimer 생성, long insert가 존재할 경우 copy 수의 감소 등이 일어나는 것으로 알려져 있다[51]. 따라서 integrative plasmid가 연구되고 있는 데, 이 plasmid의 제작에 응용될 수 있는 insertional sequence(IS)는 지금까지 5개가 *L. lactis* 중에서 발견된 바 있으며, 5개중 적어도 2개 이상은 multiple copy로 알려져 있다. 몇몇 균주는 68-kbp나 되는 대단히 큰 conjugative transposon을 포함하고 있는 것도 있다. IS element는 *Lactobacillus*나 *Leuconostoc* 속에서 발견된 바 있으나 *S. thermophilus*에서는 아직 확인된 바 없다[9].

한편 plasmid는 유산균속 가운데 균 종마다 그 수가 상이하게 존재하는데, 알려진 바에 의하면 *L. lactis* 중에는 대부분 발견되었고(보통 4-7개), *Lactobacillus*와 *Pediococci* 중에는 일부만이, 그리고 *S. thermophilus*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* 혹은 intestinal lactobacilli 중에서는 극히 드물게 발견된 바 있다[5]. 그 외에 prophage의 존재도 연구되고 있는 데 보고에 의하면 *L. lactis* prophage는 genome의 공통 성분으로 추정되고 있으며, prophage에 의해 기인되는 용원성(lysogenicity)은 lactobacilli에서는 흔히 발견되지만 *S. thermophilus*에서는 매우 드물게 나타나는 현상이라고 한다[19].

유산균의 유전적 개량과 관련하여 효과적인 연구 방법은 식품용으로 허용될 수 있는 유전공학 기법의 응용이라고 생각된다. 산 및 향기 생성, phage 내성, 단백질 분해 활성, 그리고 자가 소화성 균주(autolytic strain) 등 수많은 특성을 암호화 하는 관련 유전자의 발현 연구가 최근 분자 생물학적 기법을 이용하여 활발하게 이루어지고 있다. 일반적으로 특정한 유전자를 over-expression시키기 위해서는 multi-copy cloning vector를 이용하는 방법이 우선적으로 고려된다. 그 외에도 food-grade/host-vector system의 개발, bacteriophage의 attB site를 응용한 integration vector 개발이나 IS element의 무작위적 결합능 등도 고려되며, 이를 잘 활용하면 유제품은 물론 성장제(pro-biotics)용으로 적합한 유산균 개량이 가능하고, 부가가치가 큰 food-grade product의 생산이 실현될 수 있을 것이다.

위에서 간략히 언급한 바와 같이 plasmid를 이용한 유산균의 형질 전환 연구에서는 형질 전환체의 낮은 플라스미드 안정성(plasmid stability)이 고질적인 문제였다. 따라서 host chromosome 상에 직접 결합(integration)시킬 수 있는 vector의 개발 쪽으로 많은 연구가 수행되어 왔다. Integration은 Campbell-like recombination (Fig. 8) 혹은 상호 치환적 재조합 방식(reciprocal replacement recombination)을 통하여 일어나는 것으로 알려져 있다.

유산균 host-vector system

Host-vector system이란 미생물 자신이 가지는 vector plasmid (대개는 cryptic)를 이용하여 homologous 또는 heterologous DNA를 cloning시켜 자신을 형질 전환시킬 수 있는 vector를 지칭한다. 이 vector는 형질전환이 비교적 용이하고, 일단 host 내로 들어가면 복제가 가능할 뿐만 아니라 형질 전환체 내에서 삽입된 vector DNA가 안정하게 유지될 수 있는 장점이 있다. 기존에는 항생제 내성 marker를 가진 vector들이 개발된 바 있으나 plasmid 상의 항생제 내성이 타 미생물로 전달될 수 있다는 잠재성 때문에, 이들 vector를 이용하여 만든 유전자 재조합 균주(genetically-modified microorganism, GMM)의 산업적 이용은 미국 식품의약국(FDA)의 인가를 얻기가 거의 불가능한 상태이다. 그러므로 인간이 섭취할 수 있는 미생물에서 유래된 plasmid vector는 항생제 내성 유전자를 운반하지 않는 것이 바람직하다. 이러한 관점에서 보면 nisin resistance(Nis^r)은 좋은 selection marker가 될 수 있다. 따라서 최근에는 식품으로 섭취할 수 있는 유산균의 host-vector system이 food-grade vector로 매우 활발하게 개발되고 있다. 이 vector는 항생제 내성 유전자 이외의 선택적 marker를 사용하는 특징을 가진다.

이상과 같은 food-grade vector를 이용하여 형질전환 시험을 실시할 때 고려해야 할 중요한 사항이 세포 내 도입 과정이라 할 수 있다. 현재 대부분의 연구들이 주로 전기

천공법(electroporation)에 의해 수행되고 있으며[2], 이 경우 아래와 같은 몇가지 실험 조건을 충분히 고려해야 한다. 즉, (i) 숙주의 생육 조건 (ii) electroporation 용액의 조성 (iii) electroporation 조건(전장의 세기, 저항 등) (iv) DNA의 길이, 농도, 순도 등 (v) 형질 전환체의 선택 조건 등이다. 숙주의 생육 조건에서 참고해야 할 사항은 적절한 농도의 glycine이 함유된 배지에서 자란 대수증식기의 세포 및 산성 sucrose 용액의 사용이다. 형질 전환 빈도를 가급적 1×10^5 transformants/ μg plasmid DNA 수준으로 높이기 위해서는 위에 기술된 몇 가지 검토 사항 이외에도 여러 가지 영향 인자를 꼼꼼하게 검토하지 않으면 안된다[11].

유산균용 host-vector system

pAM β 1 계열

이 plasmid vector는 원래 *Streptococcus faecalis* DS5[4]에 존재하는 erythromycin 내성 plasmid (17-Mdal, 26.5-kbp)로서 다른 gram-positive 균주로 직접 이동이 가능(self-transferable)하며, 이미 여러 가지 cloning용 vector가 이 plasmid를 기초로 하여 개발되었다[23]. 이 plasmid는 *L. casei*, *S. aureus*, *B. subtilis*로 전이된 바 있어 광범위 숙주역을 가진다. Non-conjugative plasmid인 pAM α 1도 이 plasmid와 함께 처리할 경우 *S. faecalis*로부터 *S. aureus*로 전이될 수 있었다. Nisin-resistant 부분[18]도 이 plasmid 상에 삽입되어 *L. lactis* ssp. *lactis*에 cloning된 바 있다. pAM β 1을 *L. lactis* ssp. *lactis*나 기타 형질전환이 가능한 Gram-positive 세균 내에서 발현시키기 위해서는 erythromycin resistance marker는 물론 다양한 copy 수 (적게는 6-9, 많게는 45-85) 및 poly-restriction site sequence가 고려되어야 한다[41].

특히 이 plasmid는 broad host range를 가지므로 더욱 유용한데, *L. reuteri* DSM 20016에 들어있던 이 plasmid는 *Enterococcus faecalis* JH2SS에 전이되기도 하였다[31]. pAM β 1(Em^r)과 pIP501(Em^r, Cm^r)와 pJH4(Em^r, Sm^r, Km^r) 등은 conjugation과 유사한 과정을 통하여 *S. faecalis*로부터 *Clostridium acetobutylicum*으로 전이될 수 있었다고 한다[38].

또한 이 plasmid가 가지는 광범위 항생제 내성이 타 균주로 용이하게 전이됨이 확인되었는데, conjugation 과정을 통하여 *S. faecalis*로부터 15 균주의 *Listeria monocytogenes* 중 9 균주로 전달되었다. *L. monocytogenes* 형질 전환체는 이 plasmid를 다른 *L. monocytogenes* 균주 혹은 원래의 *S. faecalis*로 역전이 시킬 수 있었으며, 이때 plasmid DNA상의 재배열은 발생하지 않았다[12].

Conjugation을 통하여 Gram-positive 세균의 유전자를 *E. coli*와 같은 Gram-negative 세균으로 전이시키고자 할 경우에는 pBR322-pAM β 1 chimeric plasmid(예 pAT191)

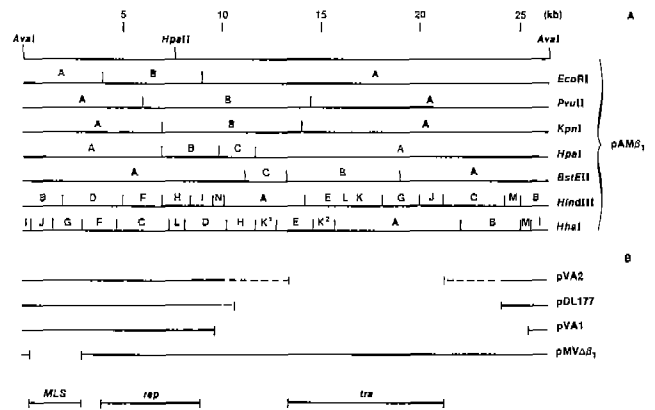


Fig. 1. Restriction enzyme map of *Streptococcus faecalis* DS5 plasmid, pAM β 1.

가 사용된다. 이 shuttle vector는 실제로 *E. faecalis*에서 *E. coli*으로 잘 전달되었으며, 평균 빈도는 colony당 5×10^9 였다[46].

pTRKH1/H2와 pTRKL1/L2

pAM β 1으로부터 유래된 vector로 잘 알려진 pIL252와 pIL253[42]은 broad-host range vector이다. *E. coli* P15A의 plasmid origin을 위 두 vector에 삽입시킴으로서 몇 개의 *Lactococcus-E. coli* shuttle vector가 제작되었다[34]. 이들 vector는 구조적으로 *Lactococcus* 중에서 안정하였는데, 그 이유는 theta (θ)-replicating plasmid의 공통적인 성질 때문으로 생각되었다. 또한 *Lactococcus*외에도 *E. coli*에서 구조적 안정성을 나타냈는데, 그 이유는 resolvase 유전자의 결손 때문으로 추정하였다. 몇몇 vector는 *cat* gene(pTRKH; pTRKL1) 혹은 *tet* gene(pTRKH1; pTRKH3; pTRKH5) 부위에서 insertional inactivation 이용할 수 있기 때문에 clone의 selection이 용이하도록 개발된 것들이다. 그 외에도 β -galactosidase를 암호화하는 *lacZ* gene 가운데 MCS(multiple cloning site)를 삽입시킨 vector들(pTRKH2/H5와 pTRKL2)은 α -complementation을 요구하는 *E. coli* 주를 사용할 경우 X-Gal이 들어있는 고체 배지 상에서 blue/white screening이 가능하다[34].

pNZ12

이것은 넓은 host range를 보이는 pAM β 1의 deletion 유도체로서, David 등[8]은 전기천공법에 의해 *L. paramesenteroides*(현재는 *Weisella paramesenteroides*)를 성공적으로 형질 전환시킨 바 있다. 그들의 연구에서 pNZ12 DNA는 불규칙적으로 *Lactococcus lactis* pSH71 replicon을 함유하였고, 전환 빈도는 4×10^3 transformant/ μg DNA 정도였다. 이들 plasmid는 100 세대 후에도 *L. paramesenteroides* NZ6009 중에서 안정하게 유지되었다, 또 저자

이 host의 생존에 필수적인 아닌 것을 가리킨다[1].

pBN183, pBN183A 및 pDBN183

*S. thermophilus*와 *E. coli*의 shuttle vector용으로 개발된 이들 chimeric plasmid vector중 pBN183은 *E. coli* plasmid인 pBR322을 *Bam*HI 처리하고 *Bg*III로 직선화시킨 streptococcal plasmid와 결합시킨 후 마지막으로 pNZ18와 조립하여 제작되었다[44]. 따라서 이 plasmid vector는 pBR322 유래의 vector로 볼 수 있다. pBN183은 *E. coli*를 성공적으로 형질 전환시켜 ampicillin(Apr) 내성을 부여하였는데 이때의 빈도는 $8.2 \pm 1.2 \times 10^5$ CFU/ μ g DNA 였다.

또한 *S. thermophilus*를 pBN183으로 electrotransformation 시킨 결과 Cm^r 및 Ap^s의 형질 전환체가 얻어졌다. pBN183로 형질 전환시킨 *S. thermophilus* clone들의 plasmid를 검색한 바, 약 70%의 전환체에서 plasmid가 탈락된 것으로 나타났다. pBN183A는 pBN183의 deletion mutant이다. 이 plasmid도 역시 *E. coli*를 형질 전환시킬

수 있고, 전환체는 Ap^r를 나타냈을 뿐만 아니라 *S. thermophilus* 또한 형질전환 되어 Cm^r을 보여주었다.

pBN183A의 구조를 기초로 하여 새로운 shuttle plasmid, 즉 pDBN183이 제작되었는데, pBN183으로부터 1.2-kbp *Sa*I fragment를 제거하여 얻은 것이다. 이상 3가지 plasmid의 copy number는 *E. coli* 중에서 chromosomal 당 17~18 copy 정도로 추정된다. 이들 3개 plasmid는 모두 Ap^r와 Cm^r를 *E. coli* 뿐만 아니라 *S. thermophilus*에서 나타내었다. *Streptomyces* 유래 cholesterol oxidase 유전자(*choA*)를 pDBN183에 클로닝한 경우, *L. casei* 중에서 이 plasmid의 안정성에 전혀 영향을 미치지 않았으나 *S. thermophilus* 중에서는 재조합 DNA의 탈락이 발생하였다고 한다[44].

pSD1과 pSD2

이들은 *Lactobacillus-E. coli* shuttle plasmid vector로서 채장 단백질 분해효소 처리에도 분해되지 않는 *Clostridium thermocellum*이 생산하는 endoglucanase를 lactobacilli 중에서 발현시키는데 성공적으로 사용된 것이다[3]. *Clostridium*이 가지는 자체 promoter (pSD1)와 *L. lactis*의 *lacA* promoter (pSD2)를 결합시켜 제작한 것이다. Cho 등[3]은 이 plasmid를 사용하여 endoglucanase 유전자를 cloning한 후 장간 유래의 세균인 *L. gasseri* 및 *L. johnsonii*를 형질 전환 시킨 바 있다.

pBG10

*L. helveticus*용 host-vector system으로서 β -galactosidase 유전자를 selection marker로 가진다. *L. bulgaricus*의 β -galactosidase 유전자, erythromycin 저항성 유전자(pAM β 1)의 promoter, pBR322 replication region, 그리고 pLJ1(*L. helveticus*의 cryptic plasmid) replication region을 순서대로 결합시켜 제작하였다[14]. 이 plasmid를 이용하여 *L. helveticus* SBT2195 (Lac⁻ mutant)를 형질전환 시켰다. 또한 *B. licheniformis* 유래 α -amylase 구조유전자(1,536 bp)를 promoter region 바로 밑 pBG10의 erythromycin resistance 유전자 부위에 삽입시켜 *L. helveticus* 내에서 성공적으로 발현시킨 바 있다. 따라서 plasmid pBG10는 food-grade용 및 expression vector로 사용될 수 있다.

pSA3

이 plasmid는 shuttle vector로서 *Streptococcus* spp.는 물론 *E. coli*중에서도 복제될 수 있다. *E. coli* plasmid인 pACYC184 (chloramphenicol 및 tetracycline 내성)를 streptococcal plasmid인 pGB305 (erythromycin resistance)와 결합시켜 triple selection marker를 가진 chimeric plasmid, 즉 pSA3(chloramphenicol, erythromycin 및 tetracycline 내성)를 제작하였다 (Fig. 4)[7]. 이 plasmid 상에는 7개의 unique restriction sites(*Eco*RI, *Eco*RV, *Bam*HI, *Sa*I, *Xba*I,

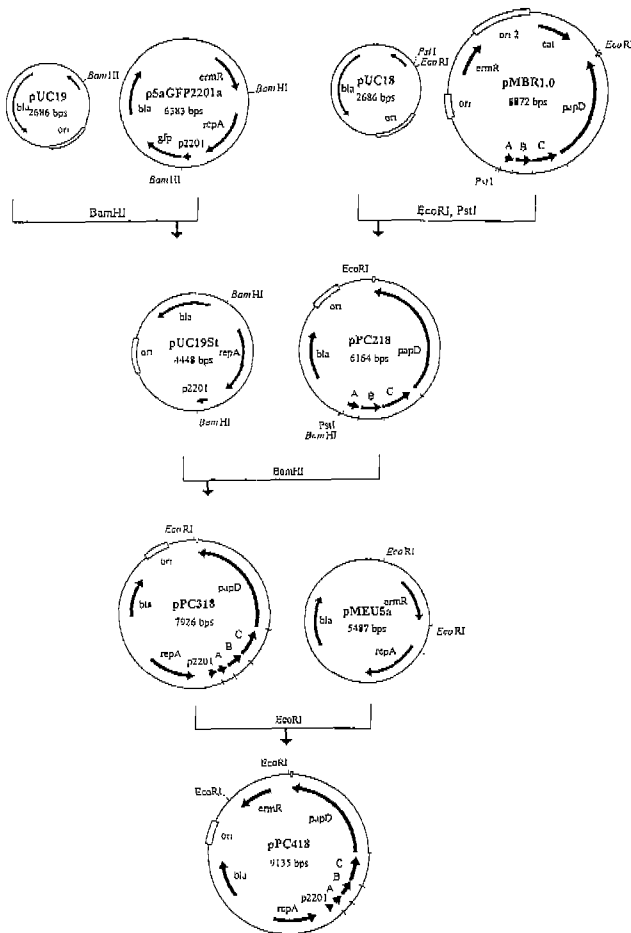


Fig. 3. Schematic diagram for constructing *E. coli-S. thermophilus* vector, pPC418.

*Nru*I 및 *Sph*I가 존재한다. 원하는 유전자를 *Eco*RI 혹은 *Eco*RV site에 클로닝 시키면 chloramphenicol 내성 유전자의 inactivation이 일어나고, *Bam*HI, *Sal*I, 혹은 *Sph*I site에 클로닝 시키면 대장균이 tetracycline 내성을 잃게 되므로 쉽게 형질 전환체를 선발할 수 있다.

pMG36과 pMG36e

L. lactis 중에서 외래 유전자를 발현시킬 수 있는 한 쌍의 vector(pMG36과 pMG36e)가 개발되었다. 이들 vector는 broad host range 뿐만 아니라 *L. lactis* ssp. *cremoris* Wg2 plasmid인 pVW01 유래의 gene expression signal과 이웃하고 있는 부위에 multiple cloning site(MCS)가 있다. pVW01은 *E. coli*와 *B. subtilis*에서 모두 복제될 수 있는 광범위 vector이다. 두 vector는 대략 그 길이가 3.7 kbp

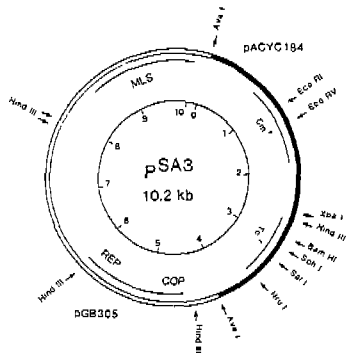


Fig. 4. Restriction endonuclease map of the cloning vector, pSA3. Bold line represents the fragment originated from pACY184 (Cm^r and Tc^r).

정도로 비슷하나 항생제 내성 marker가 서로 다른 차이가 있다. pMG36은 *S. faecalis* plasmid인 pJH1 유래의 kanamycin 내성 유전자를, pMG36e는 erythromycin 내성 유전자를 각각 marker로 운반한다. 이 vector를 이용하여 계란의 난백 lysozyme을 암호화하는 sequence가 삽입되어 성공적으로 발현된 바 있다[47,48].

pWV01 유래의 host-vector system

pGK12 및 계열 vector

이 plasmid vector, pWV01(1.5 megadalton)은 *L. lactis* ssp. *cremoris* Wg2에서 분리된 크기가 아주 작은 cryptic plasmid로서 *B. subtilis* 세포내에서 복제 가능한 사실이 밝혀지면서 널리 응용되고 있다[25]. pC194로부터 유래된 chloramphenicol 내성 유전자(Cm^r)를 포지하여 얻은 plasmid가 pGK1(2.4 megadalton)이며, *B. subtilis* 중에서 복제될 수 있다. 또한 이 plasmid에 pE194 *cop-6* 유래의 erythromycin 내성 유전자 (Em^r)을 삽입시켜 insertion-inactivation이 가능한 vector가 제작되었는데, 이것이 바로 pGK12(2.9 megadalton)이다(Fig. 5). pGK12는 유산균용 vector 중에서 가장 널리 이용되고 있는 plasmid로서 Em 내성 유전자에 존재하는 단일의 *Bcl*I site 및 Cm 및 Em 내성유전자 부위 바깥에 존재하는 *Clal*I 및 *Hpa*II site가 있다. 이 plasmid는 *B. subtilis*중에서 안정하게 유지될 수 있고 copy 수는 대략 5 정도이다. 따라서 pGK12는 *Lactococcus*, *B. subtilis* 및 *E. coli*을 형질 전환시킬 수 있는 광범위 vector이다. *E. coli* 중에서의 copy 수는 약 60으로 목적하는 외래 유전자를 클로닝 하면 gene dosage 효과를 기대할 수 있다.

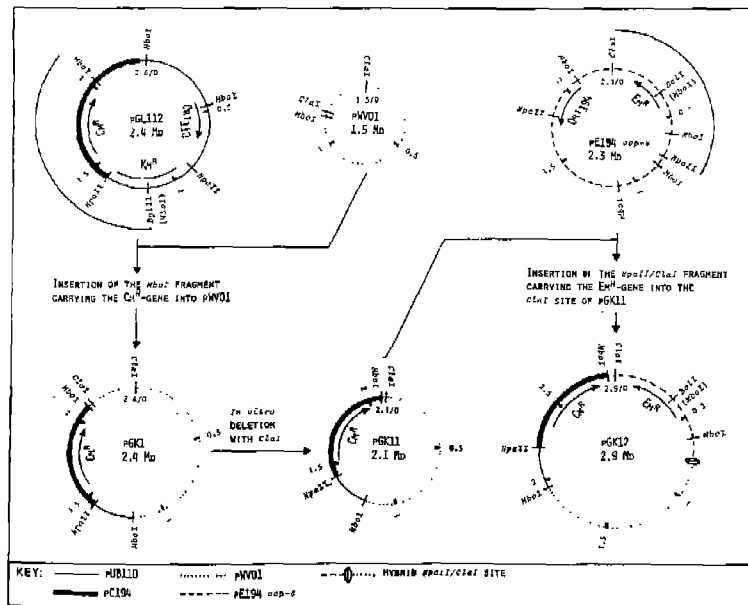


Fig. 5. Schematic diagram for constructing pGK12-derived plasmid vectors. [19].

Kok 등[22]은 pGK12를 이용하여 *L. lactis* protoplast를 형질전환시켜 Cm 내성 및 Em 내성을 나타내게 하였으며, pGK12는 *L. lactis*중에서 매우 안정하였고 copy number는 3개 였다고 보고하였다.

균체의 분비용 발현 vector들

미생물의 세포벽에 존재하는 surface layer protein은 gram-positive는 물론 gram-negative 세균에서도 발견되는 표면 단백질로서 크기는 40~200 kDa의 단백질 또는 당단백질(glycoprotein)이다. 이 물질은 대체로 자신의 보호, 표면 인식, 세포 형태 또는 외막의 견고성 유지 등과 관련된 기능을 수행한다고 알려져 있다[20-21]. *L. brevis*의 S-layer protein (*slpA* 산물)의 생산 및 분비에 관여하는 secretion cassette이 제작되었는데, low-copy number를 가진 pGK12 유래의 vector와 *E. coli*의 β -lactamase(*bla*)가 reporter protein으로 이용되었다. Kahala와 Palva[21]는 *L. lactis*를 비롯한 여러 유산균 (*L. brevis*, *L. plantarum*, *L. gasseri*와 *L. casei*)의 이중발현을 측정하기 위한 S-layer signal(*slpA*)을 사용하였다. 즉 *L. brevis*의 S-layer protein 유전자의 promoter를 pGK12 유래의 plasmid에 삽입시켜 만든 secretion cassette를 이용하면 원하는 유전자 산물을 성공적으로 발현, 분비시킬 수 있다고 하였다(Fig. 6). 또한 *L. brevis* S-layer promoter는 *L. lactis*, *L. brevis*, *L. plantarum* 중에서는 잘 인식되었지만 *L. gasseri*와 *L. casei*에서는 잘 인식되지 못하는 문제점이 있었다. β -lactamase 생산은 대체적으로 대수 증식기 세포에만 국한되었고, 최고 수율은 *L. lactis*와 *L. brevis*를 사용한 경우에만 얻을 수 있었다. *L.*

*lactis*의 경우 β -lactamase를 80 mg/L이나 생산하는 것으로 나타났으나, 배양 중 pH 조절을 하지 않으면 β -lactamase의 분해가 상당히 일어난 것으로 관찰되었다. 이상의 결과들은 단백질의 효과적 생산 및 세포의 분비를 위해서 *L. brevis*의 *slpA* signal의 광범위한 응용성을 암시하고 있다 [32,33,40].

pWV01-based integration vector

이미 앞에서 소개한 바와 같이 유산균 plasmid vector의 가장 큰 단점중의 하나는 숙주 중에서 안정성이 없다는 점이다. 따라서 숙주 chromosome 상에 결합이 가능한 vector를 사용하면 클로닝된 유전자의 안정화에 크게 도움이 된다. pWV01은 산업용 vector의 frame으로 가장 널리 사용되는 vector의 하나이다.

pINT1

Leenhouts 등[24,25]은 *B. subtilis*의 chromosome 상에 lactococcal plasmid pWV01로부터 절단하여 얻은 *repA* gene이 삽입된 균주를 제작하였다. 그리고 이 균주를 사용하여 pWV01-based integration vector인 pINT1를 제작하였는데 이 plasmid는 *repA* gene을 결손시킨 것이다. 길이가 3.6 kbp인 plasmid pINT1는 *L. lactis* MG1363중에서 복제가 불가능하였지만 lactococcal chromosomal DNA 단편이 plasmid 상에 존재하는 경우에는 Campbell-like mechanism(Fig. 8)을 통하여 chromosome내로 들어갈 수 있다. Transformant는 chromosome 상에 직렬로 배열된 1-4개 plasmid copy를 가진다. 즉 pWV01은 Campbell-like integration system 과정을 통하여 관심 있는 유전자를 *Lactococcus*의 chromosome 상에 여러 개의 안정한 copy를 삽입시킬 수 있는 특징이 있다.

Food-grade cloning system

현재까지 수많은 유산균용 vector가 개발되었으나 그 대부분은 항생제 내성 marker를 가진 것이었다. 그러나 항생제 내성 유전자는 타 미생물로 전달성이 우려되기 때문에 사용이 제약을 받게 된다. Food-grade cloning vector는 모든 염기서열들이 식품으로 섭취할 수 있는 미생물에서 분리된 것이 이상적이다.

pFM011

Forseth와 McKay[13]는 *L. lactis* biovar. *diacetylactis* DRC3의 pNP40(60 kbp)로부터 pNP40의 replication origin을 가지며 nisin resistance (*Nis^r*)[50]를 selectable marker로 가지는 7.6-kbp plasmid vector를 제작하였다. 이 plasmid에 multiple cloning site가 추가로 삽입되었으며, 저자들은 이 plasmid를 이용하여 *L. lactis* ssp. *lactis*의 bacterio-

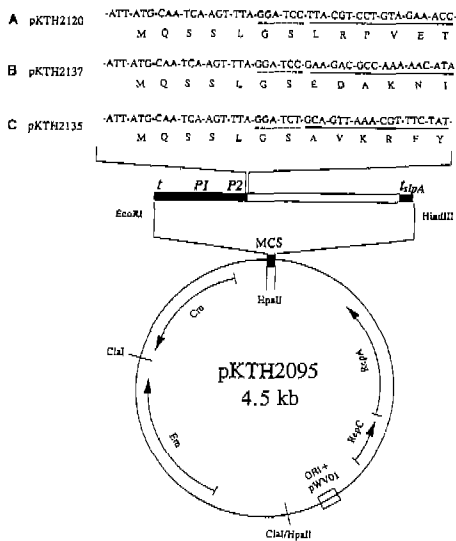


Fig. 6. The expression cassette consisting of the *Lactobacillus brevis* *slpA* promoter region and the reporter genes(A, *gus*; B, *luc*; C, *pepN*) with the nucleotide and corresponding amino acid sequences of the joint regions.

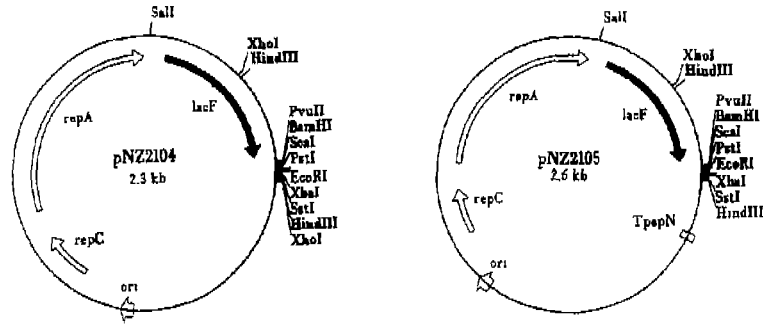


Fig. 7. Food-grade cloning and expression vectors, pNZ2104 and pNZ2105.

phage sensitivity를 감소시키기 위해 phage resistant gene 을 cloning 시키는데 사용하였다. 이 plasmid는 *L. lactis* ssp. *lactis* 세포 내에서 비교적 안정하게 유지되었다.

pND304와 pND625

*L. lactis*용 cloning vector이다. 이 vector의 특징은 selectable marker로서 cadmium 내성 유전자를 이용한다는 점이다. 대부분의 *L. lactis*는 Cd-sensitive이나 *L. lactis* ssp. *lactis* M71은 8.8-kb pND302를 가지고 있어 Cd에 대한 내성을 보인다. Liu 등[27]은 이 plasmid의 *EcoRI* site에 1.6-kbp nisin resistance gene(*nsr*)을 삽입시켜 pND304와 pND624를 제작하였다. 또 pND624로부터 *E. coli* DNA를 제거하여 pND625(10.4-kbp; Cd^r, Nis^r)를 만들었다. 따라서 pND304와 pND625는 pBR322와 pGEM-7ZF(+) 유래의 DNA 단편을 함유하므로 *E. coli*-*Lactococci* shuttle vector로 사용이 가능하다. 저자들은 이 plasmid가 food-grade로 사용될 수 있다고 주장하였다.

pFG200과 pFG202

이 둘은 *L. lactis* food-grade cloning vector용으로 제작된 것이다[44]. pFG1는 ochre suppressor gene 즉 *supB*을 선택적 marker로 사용한다. 이 marker는 5-9 copy가 세포 중에 존재하며, 실험실 균주인 MG1363을 사용한 경우 여러 *Lactococcus* 유전자의 over-expression을 유발하였다. 그러나 pFG1를 산업용 균주에 적용한 경우 산생성 속도가 감소하였으므로 부적합하였다. Ochre suppressor는 amber 및 ochre codon을 억제하며 82% *Lactococcus* 유전자는 amber 또는 ochre stop codon을 이용하므로, 생육 저해 현상의 원인은 대부분 번역오류로 생긴 polypeptide의 축적 때문이라고 판단된다. 따라서 새로운 food-grade cloning vector인 pFG200를 제작되는데 이 plasmid는 오직 amber suppressor(*supD*)만을 selectable marker로 사용하며, *supD* altered tRNA^{Ser}을 암호화한다. 흥미로운 점은 이 vector의 개발과 병행하여 강력한 selection system이 개발되었다. 즉, amber codon을 *pyrF* gene에 삽입함으로써 pyrimidine

auxotroph를 제작하고, 이를 pFG200용 host 균주로 사용하였다. 이 marker를 사용하면 pyrimidine-free medium 중에서 pFG200를 지닌 세포들의 선발과 plasmid 유지가 가능하다. 또 우유중의 pyrimidine 농도는 pyrimidine auxotroph를 생육시키기에는 부족하므로, 우유가 selection 실험에 잘 이용될 수 있다는 장점이 있다.

L. lactis Wg2의 N 유전자도 pST03의 promoter를 포함하는 3.5-kbp *BamHI*-*SacI* 단편에 subclone 되어 pFG200 polylinker 부위에 끼어들어 감으로서 결과적으로 pFG202가 제작되었다. 마찬가지로 promoterless *lacLM* gene이 *HindIII*-*SalI*을 처리하여 이중 절단된 pFG200에 삽입된 후 결과적으로 pFG209가 제작되었다[44].

pNZ 계열 vector

이 vector들은 Platteeuw 등[35]에 의해서 개발되었으며, *L. lactis*의 cloning 및 expression용으로 사용될 수 있다. 강력한 *lacA* promoter 혹은 pSH71 유래의 replication origin 과 *repC* promoter, aminopeptidase N gene(*pepN*)의 transcriptional terminator, *lacF* 등이 조립되어 있다 (Fig. 7). 이 plasmid의 selection marker는 *lacF*으로서 transformant는 lactose를 이용할 수 있어 용이하게 선발될 수 있다. Copy 수는 대략 50 정도이고, 발현 vector로서의 가능성을 promoterless *E. coli gusA* reporter gene을 클로닝한 후 P_{lac} control 하에서 측정된 결과, 발현 효율이 매우 우수한 것으로 밝혀졌다.

Integrative food-grade cloning vector system

Lactococcus 내에서 복제가 불가능한 plasmid도 chromosome 조각을 결합시켜주면 single crossover 과정을 통하여 chromosome 상에 도입될 수 있다는 사실이 밝혀졌다. 이 경우 유산균 temperate phage가 이용된다. Phage는 host chromosome의 specific site에 integration되는 것으로 알려져 있다. Integration 과정은 Campbell-like integration 과정 (Fig. 8)로 설명되는 데, λ phage의 결합 기구와 매우 유사한 과정으로 추측된다. Raya 등[37]은 chromosome상의

attP site와 phage-encoded integrase를 잘 이용하면 유산균을 chromosome상에 성공적으로 삽입시킬 수 있는 integrative vector의 개발이 가능하다고 주장하였다. 또한 protease P 유전자(*priP*)의 예에서 볼 수 있듯이 *L. lactis*의 chromosome에 multiple plasmid copy를 삽입시킴으로써 몇 종류의 food-grade vector system이 제작되기도 하였다[36]. 이 system은 lactococcal plasmid pWV01의 plus origin (Ori^+), *Pediococcus pentosaceus* PPE1.0 유래의 sucrose 유전자를 selectable marker로 가지며, multiple-cloning site(MCS)가 있고, 염기 서열을 밝혀진 lactococcal DNA 단편이 함께 조립되어 있다. 특히 *repA* protein은 Ori^+ vector의 복제에 중요한 부분이다. 또한 이들 균주는 homologous background clone으로부터 integration된 plasmid의 분리에 이용될 수 있다. 이 plasmid를 이용하면 single-crossover integration 과정을 통하여 *L. lactis* MG1363 중에서 chromosome당 20 copy까지 증폭할 수 있고 이 증폭 과정은 선택적 증식 조건하에서 매우 안정하였다고 보고되었다[26].

최근 Lin 등[28]은 *L. acidophilus* ADH 염색체로부터 얻은 1.9 kbp의 *Hind*III-digested chromosomal fragment를 *E. coli* vector인 pBluescriptII SK⁺에 삽입시켜 integrative cloning vector를 제작하였다[28]. 이 vector는 homologous host인 *L. acidophilus* ADH 중에서는 복제가 불가능하였지만, 이 plasmid 상에 존재하는 chromosome 단편은 β -galactosidase gene을 homologous recombination과정을 통하여 host chromosome에 integration 시킨 것으로 확인되었다. 나란히 인접한 chromosome 단편은 한 개의 대략 0.95 kbp 정도로서 double crossover를 일으켰으며, 형질 전환체의 β -galactosidase 활성은 야생주와 비교하였을 경우 약 200배 증가한 것으로 밝혀졌다. 이 유전자는 transformant 중에서 30회 계대 후에도 안정하게 보존되었다. 특히 저자들은 이 plasmid가 인간이 섭취할 수 있는 미생물의 DNA만을 이용하여 제작된 제 1세대 integrative cloning vector로 food-grade vector로 사용될 수 있다고 주장하였다.

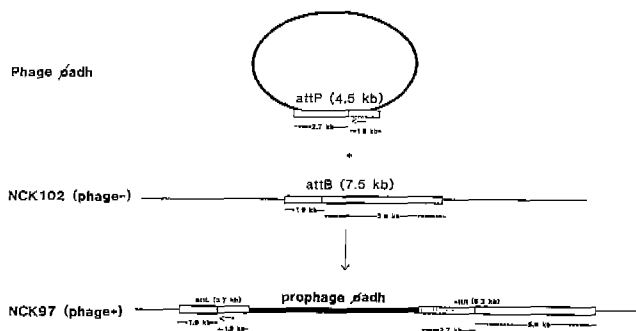


Fig. 8. Schematic representation of the Campbell-like integration of phage ϕ ADH genome into the bacterial *attB* site of NCK102.

Conjugative vector system

pTR2030

자가 전이성 (self-transmissible plasmid)을 지닌 pTR2030은 abortive phage infection (Hsp^+)와 관련된 plasmid[17]로, 이 plasmid DNA상의 13.6-kbp 크기의 *Bg*/II 단편이 *Streptococcus-E. coli* shuttle vector인 pSA3[7]에 cloning 된 바 있다. 또한 non-conjugative heterologous cloning vector인 pGK12 (Cm^r , Em^r)와 pSA3 (Cm^r , Em^r , Tet^r)의 항생제 내성을 10^{-5} ~ 10^{-6} 의 빈도로 이동시킬 수 있는 plasmid이다[39]. 이것이 전이된 transconjugant는 모균주(parent strain)가 갖지 못한 51- 혹은 58-kbp plasmid를 가지고 있었으며, 고빈도로 항생제 내성(Cm^r , Em^r) 및 pTR2030이 암호화하는 phage 내성 유전자(*hsp+*)가 함께 전이되었다. 제한효소 지도 작성 및 DNA-DNA hybridization 결과 pTR2030::vector가 함께 들어간 51-58-kbp plasmid를 확인하였다. Co-integrate에는 pGK12와 pSA3가 pTR2030 DNA 상의 다른 위치에 결합되는 것으로 나타났다. 또 이 co-integrate를 resolution 시켜 vector 유도체들 (pTR2030 DNA의 0.8 kbp가 들어 있음)을 제작하기도 하였다. 그러나 종종 pGK12 상의 Cm^r 혹은 Em^r marker가 탈락되는 경우가 관찰되었다[39].

요약 및 결론

최근 생명공학 기술의 급속한 발전과 더불어 인체에 유익한 고부가 가치성 물질을 미생물을 이용하여 대량 생산하기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 지금까지 대장균은 외래 유전자를 산물을 생산하는 숙주 미생물로서 가장 대표적인 세균이었으나 인간에게 식품용으로 이용할 목적으로는 안전성이 문제가 된다. 따라서 유산균처럼 안전한 미생물의 이용이 바람직하다. 특히 유산균은 단백질을 세포 밖으로 분비하며, 세포의 단백질 가수분해 효소의 활성이 낮다는 장점이다. 외래 유전자의 클로닝 및 발현에 이상적이다. 그러나 유산균에 대한 클로닝용 vector system이 충분히 개발되지 못한 점 이외에도 기존에 개발된 항생제 내성 marker를 가진 vector들은 plasmid 상의 항생제 내성이 타 미생물로 전달될 수 있다는 잠재성이 문제가 되고 있다. 분자 유전학적 유산균의 육종을 위해서는 항생제 내성 유전자를 대체할 수 있는 marker의 개발이 무엇보다도 중요하다. 이러한 관점에서 보면 *nisin* resistance (Nis^r)는 좋은 selection marker가 될 수 있을 것이다. 또 유전자 산물의 세포외 분비를 위해서는 유산균의 세포벽에 존재하는 S-layer protein 유전자(*slpA*)와 같은 세포외 분비와 관련된 유전자의 사용이 유망하다. 잘 알려진 바와 같이 대부분의 유산균용 plasmid vector는 single-stranded inter-mediate를 사용하는 rolling-circle형 복제를 하기 때문에 복제 과정 중 segregation instability 문제가 생긴다. 이를 극복하기 위해

서 유산균 chromosome 상에 integration 시킬 수 있는 integrative food-grade vector들이 최근 개발되어 주목받고 있다. 이 경우 insertional sequence(IS)나 temperate bacteriophage의 attachment segment의 응용이 유망하다. 결론적으로 유산균의 효과적인 vector system이 개발된다면 인간이 마음놓고 이용할 수 있는 수많은 식품 첨가물, 효소제제, 의약품, 기능성 소재 등이 유산균으로부터 생산될 수 있을 것이다.

REFERENCES

1. Bringel, F., L. Frey, and J. C. Hubert. 1989. A novel plasmid vector, pLP1 for *E. coli* and *S. thermophilus*. *Plasmid* **22**: 193-202.
2. Chassy, B. and J. Flickinger. 1987. Transformation of *L. casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**: 173-177.
3. Cho, J. S., Y. J. Choi, and D. K. Chung. 2000. Expression of *Clostridium thermocellum* endoglucanase gene in *Lactobacillus gasseri* and *Lactobacillus johnsonii* and characterization of the genetically modified probiotic lactobacilli. *Curr. Microbiol.* **40**: 257-263.
4. Clewell, D. B., Y. Yagi, G. M. Dunny, and S. K. Schultz. 1974. Characterization of three plasmid deoxyribonucleic acid molecules in a strain of *Streptococcus faecalis*: identification of a plasmid determining erythromycin resistance. *J. Bacteriol.* **117**: 283-289.
5. Clewell, D. B. 1981. Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus*. *Microbiol. Rev.* **45**: 409-436.
6. Coderre, P. E. and G. A. Somkuti. 1999. Cloning and expression of the pediocin operon in *Streptococcus thermophilus* and other lactic fermentation bacteria. *Curr. Microbiol.* **39**: 295-301.
7. Dao, M. L. and J. J. Ferretti. 1985. *Streptococcus-E. coli* shuttle vector pSA3 and its use in the cloning of streptococcal genes. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 115-119.
8. David, S., G. Simons, and W. M. de Vos. 1989. Plasmid transformation by electroporation of *Leu. paramesenteroides* and its use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 1483-1489.
9. Davidson, B. E., N. Kordias, M. Dobos, and A. J. Hillier. 1996. Genomic organization of lactic acid bacteria. *Antonie Van Leeuwenhoek*, **70**: 161-183.
10. Dornan, S. and M. A. Collins. 1990. High efficiency electroporation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* LM0230 with plasmid pGB301. *Lett. Appl. Microbiol.* **11**: 62-64.
11. Dunny, G. M., L. N. Lee, D. J. LeBlanc, C. Fredric, G. C. Michael, and M. Jacques. 1999. Purification, characterization, gene cloning, sequencing, and over-expression of aminopeptidase N from *Streptococcus thermophilus* A. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 3001-3007.
12. Framm, R. K. and D. J. Hinrichs, and M. F. Thomashow. 1984. Introduction of pAM1 into *Listeria monocytogenes* by conjugation and homology between native *L. monocytogenes* plasmids. *Infect Immun.* **44**: 157-161.
13. Froseth, B. R. and L. L. McKay. 1991. Development and application of pFM011 as a possible food-grade cloning vector. *J. Dairy Sci.* **74**: 1445-1453.
14. Hashiba, H., R. Takiguchi, K. Jyoho, and K. Aoyama. 1992. Establishment of a host-vector system in *Lactobacillus helveticus* with a -galactosidase activity as a selection marker. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56**: 190-194.
15. Herb, A. W., B. Mary, O. G. Kevin, and W. E. Sandine. 1996. Characterization and sequence analysis of a stable cryptic plasmid from *Enterococcus faecium* 226 and development of a stable cloning vector. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1481-1486.
16. Herb, A. W. and W. E. Sandine. 1991. Transformation of dairy *Leuconostoc* using plasmid vector from *Bacillus*, *Escherichia*, and *Lactococcus* hosts. *J. Dairy Sci.* **74**: 1454-1460.
17. Hill, C., K. Pierce, and T. Klaenhammer. 1989. The conjugative plasmid pTR2030 encodes two bacteriophage defense mechanisms in Lactococci, restriction modification(R⁺/M⁺) and abortive infection(Hsp⁺). *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2416-2419.
18. Hughes, B. F. and L. McKay. 1992. Deriving phage-insensitive Lactococci using a food-grade vector encoding phage and nisin resistance. *J. Dairy Sci.* **75**: 914-923.
19. Jarvis, A. W. 1989. Bacteriophages of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **72**: 3406-3428.
20. Kahala, M., K. Savijoki, and A. Palva. 1997. *In vivo* expression of the *Lactobacillus brevis* S-layer gene. *J. Bacteriol.* **179**: 284-286.
21. Kahala, M. and A. Palva. 1999. The expression signals of the *Lactobacillus brevis* *slpA* gene direct efficient heterologous protein production in lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 71-78.
22. Kok, J., J. M. van der Vossen, and G. Venema. 1984. Construction of plasmid cloning vectors for lactic streptococci which also replicate in *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 726-731.
23. LeBlanc, D. J. and L. N. Lee. 1984. Physical and genetic analysis of Streptococcal plasmid pAMβ1 and cloning of its replication region. *J. Bacteriol.* **157**: 445-453.
24. Leenhouts, K. J., J. Kok, and G. Venema. 1989. Campbell-like integration of heterologous plasmid DNA into the chromosome of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 394-400.
25. Leenhouts, K. J., J. Kok, and G. Venema. 1991. Stability of integrated plasmids in the chromosome of *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**: 2562-2567.
26. Leenhouts, K., A. Bolhuis, G. Venema, and J. Kok. 1998. Construction of a food-grade multiple-copy integration system for *Lactococcus lactis*. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 417-423.
27. Liu, C.-Q., V. Leelawacharamas, M. L. Harvery, and N. W.

- Dunn. 1996. Cloning vectors for Lactococci based on a plasmid encoding resistance to cadmium. *Current Microbiol.* **33**: 35–39.
28. Lin, M.-Y., S. Harlander, and D. Savaiano. 1996. Construction of an integrative food-grade cloning vector for *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **45**: 484–489.
29. McIntyre, D. A. and S. K. Harlander. 1989. Construction of first-generation lactococcal integrative cloning vectors. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **40**: 348–355.
30. Mercenier, A. and B. M. Chassy. 1988. Strategies for the development of bacterial transformation system. *Biochimie.* **70**: 503–517.
31. Morelli, L., P. G. Serra, and V. Bottanuzzi. 1988. *In vivo* transfer of pAM1 from *Lactobacillus reuteri* to *Enterococcus calis* *J. Appl. Bacteriol.* **65**: 371–375.
32. Nikky, H., I. M. Maria, M. M. Jose, E. H. Pablo, J. G. Michael, M. R. Juan, and M. D. Helen. 1998. Production of pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis* using the lactococcal A secretory apparatus. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 818–823.
33. Nikky, H., I. M. Maria, M. M. Jose, E. H. Pablo, J. G. Michael, M. R. Juan, and M. D. Helen. 1999. Enhanced production of pediocin PA-1 and coproduction of nisin and pediocin PA-1 by *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 4443–4450.
34. O'Sullivan, D. J. and T. R. Klaenhammer. 1993. High- and low copy-number *Lactococcus* shuttle vectors with features for clone screening. *Gene* **137**: 227–231.
35. Platteeuw, C., van Alen-Boergigter, I., van Schalkwijk, S., and de Vos, W. 1996. Food-grade cloning and expression system for *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1008–1013.
36. Pozzi, G., R.A. Musmanno, E. A. Renzoni, M. R. Ogioni, and M. G. Cusi. 1988. Host-vector system for integration of recombinant DNA into chromosomes of transformable and nontransformable streptococci. *J. Bacteriol.* **170**: 1969–1972.
37. Raya, R. R. C. Fremaux, G. L. de Antoni, and T. R. Klaenhammer. 1992. Site-specific integration of the temperate bacteriophage *adh* into the *Lactobacillus gasseri* chromosome and molecular characterization of the phage (*attP*) and bacterial (*attB*) attachment sites. *J. Bacteriol.* **174**: 5584–5592.
38. Reysset, G. and M. Sebald. 1985. Conjugal transfer of plasmid-mediated antibiotic resistance from streptococci to *Clostridium acetobutylicum*. *Ann. Inst. Pasteur. Microbiol.* **136B**: 275–282.
39. Romero, D. A. and T. R. Klaenhammer. 1990. Characterization of insertion sequence IS946, an Iso-ISS1 element, isolated from the conjugative lactococcal plasmid pTR2030. *J. Bacteriol.* **172**: 4151–4160.
40. Savijoki, K., M. Kahala, and A. Palva. 1997. High level heterologous protein production in *Lactococcus* and *Lactobacillus* using a new secretion system based on the *Lactobacillus brevis* S-layer signals. *Gene* **186**: 255–262.
41. Schaberg, D. R., D. B. Clewell, and L. Glatzer. 1985. Conjugative transfer of R-plasmids from *Streptococcus faecalis* to *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **22**: 204–207.
42. Simon, D and A. Chopin. 1988. Construction of a vector plasmid family and its use for molecular cloning in *Streptococcus lactis*. *Biochimie* **70**: 559–566.
43. Somkuti, G. A. and D. H. Steinberg. 1986. Distribution and analysis of plasmids in *Streptococcus thermophilus*. *J. Ind. Microbiol.* **1**: 157–163.
44. Solaiman, D. K. and G. A. Somkuti. 1998. Characterization of a novel *Streptococcus thermophilus* rolling-circle plasmid used for vector construction. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **50**: 174–180.
45. Sorensen, K. I., R. Larsen, A. Kibenchi, M. P. Junge, and E. Johansen. 2000. A food-grade cloning system for industrial strains of *Lactococcus lactis*. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 1253–1258.
46. Trieu-Cuot, P., C. Carlier, and P. Courvalin. 1988. Conjugative plasmid transfer from *Enterococcus faecalis* to *E. coli*. *J. Bacteriol.* **170**: 4388–4391.
47. van de Guchte, M., J. Kok, and G. Venema 1989. Construction of a lactococcal expression vector: expression of hen egg white lysozyme in *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 224–228.
48. van de Guchte, M., J. Kok, and G. Venema. 1992. Gene expression in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **8**: 73–92.
49. Venema, G., K. Venema, and J. Kok. Improvement of lactic acid bacteria by genetic modification. The 9th international symposium on lactic acid bacteria and human health. Aug. 25, 1995, Seoul, Korea.
50. von Wright, A., S. Wessels, S. Tynkkynen, and M. Saarela. 1990. Isolation of a replication region of a large lactococcal plasmid and use in cloning of a nisin resistance determinant. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2029–2032.
51. Wycoff, H. A., M. Barnes, K. O. Gillies, and W. E. Sandine. 1996. Characterization and sequence analysis of a stable cryptic plasmid from *Enterococcus faecium* 226 and development of a stable cloning vector. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 1481–1486.

(Received Nov. 13, 2000/Accepted Jan. 3, 2001)