

Primjena genetičkog inženjerstva u oplemenjivanju bakterija mliječne kiseline

Application of Genetic Engineering in the Improvement of Lactic Acid Bacteria

Blaženka Brkić, Jagoda Šušković i S. Matošić

Prehrambeno-biotehnološki fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb

Primljeno 8. 3. 1994.
Prihvaćeno 21. 4. 1994.

Sažetak

Bakterije mliječne kiseline koriste se kao »starter kulture« u pripremi cijelog niza prehrambenih fermentiranih proizvoda, silaže i probiotskih pripravaka. Da bi se poboljšala kakvoća proizvoda, oplemenjuju se postojeći i dobivaju novi sojevi bakterija za industrijsku primjenu, što se sve više postiže metodama genetičkog inženjerstva. Poznavanje fiziologije i genetike bakterija mliječne kiseline preduvjet je za genetičko konstruiranje sojeva sa specifičnim obilježjima.

Summary

Lactic acid bacteria are used as starter cultures in a variety of food fermentation products, silage and probiotics. The improvement of existing strains or the development of novel strains for industrial application could also be realized by genetic engineering techniques to improve products quality. Knowledge about the physiology and genetics of lactic acid bacteria is the prerequisite for genetically constructed strains with specific characteristics.

Uvod

Bakterije mliječne kiseline obuhvaćaju velik broj bakterijskih vrsta koje pripadaju rodovima: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus* i *Pediococcus*. Tradicionalno se primjenjuju u pripremi fermentirane hrane i napitaka, silaže i probiotskih pripravaka (tablica 1). Iako su proizvodi mliječno-kisele vriobe poznati već tisućama godina, za ulogu bakterija mliječne kiseline u procesu priprave fermentiranih proizvoda zna se tek posljednjih stotinu godina (1–4). Poznavanje metabolizma, fiziologije i genetike bakterija mliječne kiseline prijeko je potrebno da bi se poboljšali fermentacijski procesi u prehrambenoj industriji. Provođenjem selekcije bakterija mliječne kiseline, radi dobivanja sojeva sa željenim svojstvima, postiže se bolja kakvoća proizvoda i povećava ekonomičnost procesa.

Primjenom »starter kultura« učinjen je značajan korak u industrijalizaciji mliječno-kiselih vrioba (5). Održana »starter kultura« utječe na poboljšanje arome, okusa i sastava prirodnog materijala, a u pojedinim slučajevima i povećanje hranjive vrijednosti i probavljivosti fermentiranih proizvoda. Također je značajna njezina sposobnost uporabe različitih tipova ugljikohidrata, proteina i peptida, mogućnost rasta na željenoj temperaturi, rezistencija na bakterijske viruse i antagonističko djelovanje prema drugim mikroorganizmima, kao poslje-

dica djelovanja mliječne kiseline i bakteriocina. Ti su se kriteriji u prošlosti koristili kao parametri za selekciju, a i danas služe za dobivanje genetički konstruiranih mikroorganizama (6).

Genetička nestabilnost »starter kulture« najčešće je povezana s gubitkom plazmida, dok je u mješovitoj kulturi moguća i promjena brojčanog odnosa pojedinih vrsta unutar mikrobne populacije. Primjenom »tehnologije rekombinantne DNA« moguće je dobiti jedan mikroorganizam sa svim potrebnim svojstvima, koji se može primijeniti umjesto mješovite »starter kulture« (5).

U ovom će radu biti navedena primjena genetičkog inženjerstva radi priprave sojeva bakterija mliječne kiseline s traženim obilježjima za pojedine fermentacijske procese.

»Starter kulture«

Bakterije mliječne kiseline najviše se primjenjuju u industriji mliječnih preradevina. Fermentirani mliječni proizvodi čine 20 % cjelokupne ekonomske vrijednosti fermentiranih prehrambenih proizvoda. »Starter kulture« za fermentaciju mlijeka i zrenje sira morale bi imati sposobnost razgradnje laktoze iz mlijeka, proteolitičku aktivnost, a u pojedinim slučajevima i sposobnost proizvodnje diacetila (kao važnog sastojka u stvaranju okusa

Tablica 1. Primjena bakterija mliječne kiseline (4)
Table 1. Application of lactic acid bacteria (4)

Proizvodi Products	Bakterije mliječne kiseline Lactic acid bacteria
Sirevi i fermentirano mlijeko Cheeses and fermented milks	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>cremoris</i> <i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> var. <i>diacetylactis</i> <i>Streptococcus thermophilus</i> <i>Lactobacillus helveticus</i> <i>Lactobacillus acidophilus</i> <i>Lactobacillus casei</i> <i>Lactobacillus delbrüeckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> <i>Leuconostoc cremoris</i>
Fermentirano meso i riba Meat and fish fermentations	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus pentosus</i> <i>Lactobacillus sake</i> <i>Lactobacillus curvatus</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>
Fermentirano povrće Fermented vegetables	<i>L. plantarum</i> <i>Lactobacillus bavaricus</i> <i>L. casei</i> <i>Pediococcus pentosaceus</i> <i>Leuconostoc mesenteroides</i>
Vino Wine	<i>Leuconostoc oenos</i> <i>Pediococcus</i> sp. <i>Lactobacillus delbrüeckii</i> <i>L. plantarum</i>
Umak od soje Soy sauce	<i>L. delbrüeckii</i> <i>P. soyae</i>
Silaža Silage	<i>L. plantarum</i> <i>Enterococcus faecium</i>
Probiotski pripravci Probiotic preparations	<i>L. acidophilus</i> <i>L. casei</i> <i>Bifidobacterium bifidum</i>
Pekarski proizvodi Bakery products	<i>L. plantarum</i> <i>L. casei</i> <i>Lactobacillus brevis</i> <i>Lactobacillus sanfrancisco</i> <i>Lactobacillus fermentum</i>

i arome proizvoda) te ugljik(IV)-oksida, odgovornog za pojavu rupa ili tzv. očiju u pojedinim vrstama sira. Najznačajnija »starter kultura« za proizvodnju sira je mezofilna bakterija *Lactococcus lactis*, najčešće uporabljena bakterija mliječne kiseline u genetičkim istraživanjima i manipulaciji. Zahvaljujući proteolitičkoj aktivnosti bakterijske kulture pri zrenju sira poboljšava se reološka i organoleptička kakvoća proizvoda. U procesu proizvodnje sira poželjno je koristiti termolitičke mutante vrste *L. lactis* ssp. *cremoris*, koji liziraju pri temperaturi od 40 °C, već nakon 2–3 sata. Pritom oslobođeni proteolitički i drugi enzimi ubrzavaju proces zrenja sira. Vrste s amplificiranim genima za β-galaktosidazu mogu se primjenjivati u proizvodnji različitih mliječnih proizvoda za one potrošače koji ne toleriraju laktozu (4,5,7,8).

Bakterije mliječne kiseline osobito su značajne u procesu zrenja fermentiranih mesnih proizvoda. Osnovno, važno svojstvo tih mikroorganizama je proizvodnja mliječne kiseline koja bitno utječe na teksturu i okus proizvoda. Osim toga, »starter kulture« moraju proizvoditi enzime nitrat i nitrit reduktaze i katalaze koje pridonose stvaranju karakteristične boje salamurenog mesa (boja nitrozomioglobina). Sposobnost proizvodnje proteina s antibiotskim djelovanjem (bakteriocina) svakako pojačava povoljno djelovanje »starter kultura« (9).

U proizvodnji kiselih tijesta primjenjuju se »starter kulture« koje sadržavaju homofermentativne i heterofermentativne bakterije mliječne kiseline. Odgovorne su za stvaranje kisela okusa i karakteristične arome kisela tijesta, inhibiraju enzime za razgradnju škroba i zadržavaju plino-

ve nastale djelovanjem kvasaca. Primjenom mješovitih »starter kultura«, koje uz bakterije mliječne kiseline sadržavaju i posebne vrste kvasaca, poboljšava se struktura kore i sredine kruha i produljuje trajnost proizvoda (10,11).

Dodatkom »starter kulture« pri fermentaciji kiselog kupusa, maslina i krastavaca, osigurava se dostatan broj bakterija mliječno-kiselog vrenja, kako bi fermentacija krenula u željenom smjeru. Pri fermentaciji povrća najčešće probleme uzrokuje nepoželjna mikroflora povrća, jer proizvodi plin i maslačnu kiselinu što je praćeno neugodnim mirisom. Stoga se u proizvodnji fermentiranih krastavaca koristi vrsta *Lactobacillus plantarum* koja ne može dekarboksilirati jabučnu kiselinu pa ne nastaje CO₂. Danas se posebno istražuju bakterije mliječne kiseline koje imaju bakteriocinsku aktivnost, svojstvo koje bi im omogućilo odlučujuću ulogu u kontroliranoj fermentaciji povrća (12,13).

Bakterije mliječne kiseline koje se koriste za poticanje jabučno-mliječne vriobe u vinu razgrađuju dikarboksilnu jabučnu kiselinu do mliječne kiseline i CO₂. Odabrane bakterijske kulture kontroliraju početak i brzinu fermentacije, što utječe na aromu i okus vina. Budući da su uvjeti za rast nepovoljni, »starter kultura« mora podnositi male pH-vrijednosti (pH niži od 3), velike koncentracije etanola (do volumnog udjela od 15 %), niske temperature skladištenja (10–15 °C) i dodatak SO₂ (do 50 mg/L) (14).

Najčešće »starter kulture« za siliranje su homofermentativne bakterije mliječne kiseline. Selekcionirani soj mora razgraditi heksoze i ne smije imati proteolitičku aktivnost. Kako u prirodnoj mikrobnj populaciji silaže nema dostatan broj bakterija mliječne kiseline, dodatak »starter kulture« uz prisutnu mikrobnj populaciju omogućava brzo zakiseljavanje supstrata. Silaža ne sadržava dostatnu koncentraciju otopljenih šećera za brzu fermentaciju. Stoga je poželjno da industrijski soj proizvodi enzim celulazu, što se može postići primjenom metoda genetičkog inženjerstva (15,16).

Bakterije mliječne kiseline nisu značajne samo kao »starter kulture« za pripremu fermentiranih proizvoda. Sastavni su dio mikrobne populacije probavnog trakta zdravih ljudi i životinja te sudjeluju u njihovu metabolizmu (8). Probiotski pripravci sadržavaju specifične bakterije mliječne kiseline koje mogu spriječiti i suzbiti crijevne i urogenitalne infekcije, potaknuti djelovanje imunostava, smanjiti koncentraciju kolesterola i poboljšati metabolizam laktoze. Probiotski pripravci pokazuju također antikancerogenu i antimutagenu aktivnost (17). Za pripremu probiotika namijenjenih preživcima poželjno je da mikrobna kultura proizvodi celulozitičke enzime, jer 40 % celuloze hranom unesene u organizam ostaje neprobavljeno, kao i aminokiseline koje su ograničavajući faktor rasta preživača. Također se tijekom probave mogu osloboditi toksične molekule sadržane u krmivu. Utvrđeno je da razgradni proizvodi tropske leguminoze *Leucaena leucocephala* uzrokuju zdravstvene probleme preživača u sjevernoj Australiji, dok je preživači s Havaja i Indonezije dobro podnose. Toksično je djelovanje spriječeno pod utjecajem mikrobne populacije gastrointestinalnog trakta neosjetljivih preživača. Genetički stabilne kulture mikroorganizama, koje će razgraditi toksičnu supstanciju u probavnom traktu preživača, omogućile bi raznovrsnu primjenu tropske leguminoze kao stočne hrane (18,19).

Sposobnost bakterija mliječne kiseline da proizvode bakteriocine važna je za kakvoću i čuvanje fermentirane hrane. Kloniranjem i manipulacijom gena za bakteriocine može se povećati proizvodnja antagonističke supstancije, a i proširiti njihovo djelovanje. Primjenom metoda genetičkog inženjerstva može se postići kombinirana proizvodnja različitih bakteriocina u jednom soju (5).

Nestabilnost ključnih metaboličkih značajki i osjetljivost na bakteriofage temeljni su problemi vezani uz primjenu bakterija mliječne kiseline. Klaenhammer i suradnici (20) utvrdili su da laktokoki sadržavaju različite plazmide s genima čiji su produkti odgovorni za obranu od napada virusa. Oni sprečavaju adsorpciju faga i uključeni su u restriksijske i modifikacijske sustave za zaštitu od virusnih infekcija. Istraživanja su pokazala da se mnogi takvi plazmidi mogu konjugacijom prenijeti u drugu stanicu. To je iskorišteno za konstrukciju sojeva rezistentnih prema bakterijskim virusima. Metodama genetičkog inženjerstva dobivaju se sojevi s kloniranim genima, odgovornim za različite mehanizme rezistencije na bakteriofage (20).

Primjena genetičkog inženjerstva u konstrukciji sojeva

Genetičko inženjerstvo ili »tehnologija rekombinantne DNA« je skup eksperimentalnih postupaka kojima je jedan od osnovnih ciljeva kloniranje gena, nositelja određenih osobina organizma. Klonirani geni koriste se zatim za dobivanje genetički modificiranih organizama.

S gledišta molekularne biologije i genetike, još uvijek se malo zna o bakterijama mliječne kiseline, u usporedbi s dobro proučenim mikroorganizmima, kao što su bakterije *Escherichia coli* i *Bacillus subtilis* te kvasac *Saccharomyces cerevisiae*. Ipak, ustanovljen je i istražen velik broj plazmida različitih sojeva bakterija mliječne kiseline, izravno ili neizravno značajnih za pojedine fermentacije. Proučeni su i načini prijenosa plazmidne DNA, kao što su konjugacija, transformacija i transdukcija, koje čine temeljni pristup tehnikama prenošenja genetičkog materijala iz jedne stanice u drugu. Poznavanje strukture kromosoma te strukture, ekspresije i kontrole pojedinih gena čini osnovu daljnjih istraživanja (21).

Najvažniji su zadaci genetičkog inženjerstva na ovom području: (1) konstrukcija vektora za bakterije mliječne kiseline, (2) kloniranje i karakterizacija gena za proteolitičku aktivnost i metabolizam laktoze, (3) kloniranje i karakterizacija gena za proizvodnju bakteriocina i rezistenciju na bakteriocin, (4) identifikacija i kloniranje gena za rezistenciju na bakteriofage i stvaranje stanica neosjetljivih na bakteriofage, (5) regulacija ekspresije gena i (6) stabiliziranje plazmidne DNA i amplificiranih gena.

Da bi se to postiglo, potrebno je poznavati fiziologiju, genetiku i biokemijske značajke bakterija mliječne kiseline koje sudjeluju u fermentacijskim procesima ili se koriste za pripremu probiotika (4).

Plazmidi

Za industrijsku primjenu potrebni su genetički stabilni sojevi određenih osobina, jer se zahtijeva izjednačena ili sve veća kakvoća pojedinih fermentiranih proizvo-

da. Spoznaja da su važne metaboličke funkcije bakterija mliječne kiseline nestabilne jer su vezane na plazmide, pokrenula je istraživanje tih ekstrakromosomskih genetičkih struktura. Mehanizmi za stabilnost nasljeđivanja plazmida nisu još dovoljno poznati, ali je utvrđeno da ih stanica može izgubiti spontano ili primjenom mutagena (22,23).

Iako je funkcija većine plazmida bakterija mliječne kiseline nepoznata, postoje podaci o izravnoj vezi pojedinih plazmida s određenim fenotipskim obilježjima. Utvrđeno je da bakterije *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus acidophilus* i *Lactococcus lactis* imaju gene za metabolizam laktoze na plazmidima (24,25). Vrsta *Lactobacillus helveticus* subsp. *jugurti* usporeno proizvodi mliječnu kiselinu, što se dovodi u vezu s aktivnošću proteinaze, kodirane na plazmidu veličine 2,31 kb (26). Za metabolizam N-acetil-D-glukozamina odgovorni su produkti gena koji se također nalaze na plazmidu (20). Geni za rezistenciju na različite antibiotike prirodno su prisutni na plazmidima bakterija roda *Lactobacillus* (27). Utvrđeno je također da su za proizvodnju bakteriocina, kod nekih bakterija mliječne kiseline, odgovorni geni prisutni na plazmidima (28). Plazmidi sadržani u različitim sojevima roda *Lactobacillus* pokazali su se korisnim ekološkim oruđem za kontrolu prisutnosti ili odsutnosti pojedinih vrsta lakto bacila u gastrointestinalnom traktu ili silaži. Pročišćena plazmidna DNA, obilježena biotinom, dioksigeninom ili radioaktivnim fosforom, koristi se za provođenje hibridizacije kako bi se otkrila prisutnost specifičnih vrsta roda *Lactobacillus* u uzorku iz želuca miša (29).

a) Plazmidi odgovorni za metabolizam laktoze

Brzo prevođenje laktoze u mliječnu kiselinu primarna je funkcija bakterija mliječne kiseline što se primjenjuje u pripravi fermentiranih mliječnih proizvoda. Poznato je da bakterije roda *Lactococcus* i *Lactobacillus* metaboliziraju laktozu preko fosfoenolpiruvat ovisnog fosfotransferaznog tzv. laktoza-PTS sustava. Dvije specifične komponente laktoza-PTS sustava su: transmembranski protein, enzim II-lac i faktor III-lac, a zaduženi su za fosforilaciju i transport laktoze u stanicu. Enzim fosfo- β -galaktozidaza hidrolizira laktozu-6-fosfat na D-galaktozu-6-fosfat i D-glukozu-6-fosfat. Nastala D-galaktoza-6-fosfat dalje se razgrađuje, preko D-tagatoza-6-fosfat metaboličkog puta, do trioza-fosfata. Razgradnja do mliječne kiseline nastavlja se Embden-Mayerhof-Parnasovim putem (30).

Kloniranje gena uključenih u laktoza-PTS sustav opširno je opisano (31). Park i McKay (32) i Kantani i suradnici (25) dokazali su da se geni koji kodiraju za enzim II-lac, faktor III-lac i za enzime D-tagatoza-6-fosfat metaboličkog puta nalaze na plazmidima bakterija *L. lactis* i *L. acidophilus*, a određena su i mjesta na plazmidu gdje se nalaze strukturni geni za laktoza-specifične enzime (21,33–36). Određivanjem redoslijeda parova baza (tzv. sekvenciranjem DNA), utvrđeno je da postoji određen stupanj homologije u sekvencijama gena koji kodira za fosfo- β -galaktozidazu u vrsta *L. lactis*, *Staphylococcus aureus* i *Lactobacillus casei*. Enzim fosfo- β -galaktozidaza iz bakterije *L. lactis*, fosfo- β -glukozidaza iz bakterije *E. coli* i β -glukozidaza iz bakterije roda *Agrobacterium* imaju sličan aminokiselinski sastav (37).

Strukturni geni za laktoza-specifične enzime, prisutni na plazmidu pLP712 bakterije *L. lactis*, sekvencirani su i označeni simbolima lac ABCDFEGX. Sekvencija lacG predstavlja gen za fosfo- β -galaktozidazu, a lacF i lacE gene za faktor III-lac i enzim II-lac. Redoslijed aminokiselina kodiranih na položaju lacABCD pokazuje da ti geni nose informaciju za enzime D-tagatoza-6-fosfat metaboličkog puta. Sekvencija lacX još nije poznata. Uzvodno od lac-operona nalazi se glukoza-inducibilan represor gen lacR koji regulira transkripciju s lac-operona (31).

b) Plazmidi odgovorni za proteolitičku aktivnost

Bakterije mliječne kiseline ne mogu sintetizirati mnoge, za njih esencijalne, aminokiseline. Stoga im je važna razgradnja proteina do peptida i slobodnih aminokiselina. Složeni sustav djelovanja proteinaza i peptidaza još nije potpuno objašnjen. Biokemijske studije pokazuju da su proteinaze enzimski kompleksi veličine 80-145 kDa. Aktiviraju ih i stabiliziraju Ca^{2+} -ioni, a inaktiviraju inhibitori serin-proteinaze. Prema specifičnosti djelovanja, proteinaze su podijeljene u dvije skupine: HP-tip (ili PI-tip) koji hidrolizira samo β -kazein i AM1-tip (ili PIII-tip) koji razgrađuje i α - i β -kazein. Razgradni proizvodi β -kazeina, nastali djelovanjem PI i PIII proteinaza, međusobno se razlikuju (38-40).

Sposobnost sojeva vrste *L. lactis* da proizvode proteineza vezana je uz plazmide veličine od 13,5 do 100 kb. Dovođeno je kloniranje i sekvenciranje gena za proteinazu triju različitih sojeva vrste *L. lactis*. Međutim, nakon provedenog kloniranja pokazalo se da nije moguće održati velik broj kopija vektora u kloniranim sojevima bakterija *E. coli* i *L. lactis* (41,42).

Strukturni geni za proteinazu soja *L. lactis* Wg2, tzv. prtP -geni, kodiraju protein veličine 200 kDa. Isti geni soja *L. lactis* SK11 nose informaciju za nešto veći protein s proteolitičkom aktivnošću. Oba enzima imaju na C-terminalnom kraju istu signalnu sekvenciju za vezanje na membranu (43,44).

Druga skupina gena, važna za proteolitičku aktivnost, nalazi se nizvodno od prtP-gena i prepisuje se odvojeno. Ti geni, nazvani prtM-geni, prisutni su u svim kloniranim dijelovima DNA koji dopunjavaju Prt^r fenotip bakterija slabom proteolitičkom aktivnošću i sudjeluju u posttranslacijskim promjenama enzima proteinaze. Do danas su klonirani geni koji kodiraju za proteinaze različitih sojeva *L. lactis* i neki od gena djelomično su sekvencirani. Rezultati pokazuju da su sve kodirane regije PrtP i PrtM vrlo slične, te da sve bakterije vrste *Lactococcus* proizvode vrlo slične proteinaze. Relativno kratak slijed aminokiselina odgovoran je za razlike u specifičnosti proteinaza. Otkriveno je da sojevi *L. lactis* Wg2 i SK11 imaju dvije regije specifične za njihove proteinaze i konstruirani su hibridni enzimi koji pokazuju nove kazeinolitičke specifičnosti (21,43,44).

Stabiliziranje plazmida

Mogućnost gubitka plazmida koji nosi neku od važnih fermentacijskih značajki predstavlja ozbiljan problem za industrijsku proizvodnju fermentiranih proizvoda. Stabiliziranje plazmidne DNA bakterije *L. lactis* događa se »spontano«, nakon unošenja plazmida u Lac^r mutante iste vrste. Povremeno nastaju transformanti koji nemaju

samostalno replicirajući plazmid te se može zaključiti da su se geni, koji kodiraju enzime za razgradnju laktoze, integrirali u kromosom. I proteolitička aktivnost jednog od transformanata soja *L. lactis* C2 također je stabilizirana integracijom plazmida u kromosom. Taj je transformant imao 50 % manju proteolitičku aktivnost od roditeljskog soja. Stabilni Lac⁺ Prt⁺ transformanti koriste se za proizvodnju sira koji je manje gorak od onog proizvedenog izvornim sojem. Budući da ovi plazmidi, kao i kromosomska DNA, sadržavaju IS-elemente (insercijske sekvencije koje nose samo gene za inserciju i transpoziciju), pretpostavlja se da su ti elementi odgovorni za ugradnju plazmida u kromosom (45,46).

Scheirlinck i suradnici uspješno su ugradili gene koji proizvode α -amilazu i endoglukanazu u kromosom bakterije *L. plantarum*. Stanice su transformirane s plazmidima koji sadržavaju gen za α -amilazu iz bakterije *Bacillus stearothermophilus*, gen za endoglukanazu iz bakterije *Clostridium thermocellum*, odsječak iz kromosoma laktobacila veličine 2–5 kb i ishodište replikacije za Gram-negativne bakterije. Neki od dobivenih transformanata imali su do deset kopija plazmida ugrađenih u kromosomsku DNA (47). Istraživanja Sharp i suradnika (16) pokazuju da su plazmidi integrirani u kromosom bakterije *L. plantarum* stabilni, za razliku od slobodnih plazmida. Također je utvrđeno da učestalost gubitka plazmida, koji nosi gene za endoglukanaznu aktivnost, u MRS-podlozi iznosi 3 % po generaciji (48), što je puno više nego pri uzgoju u silaži. Razlog može biti različita hranjiva vrijednost tih podloga, jer je generacijsko vrijeme bakterije *L. plantarum* puno kraće u MRS-podlozi nego u silaži.

Geni čiji su proizvodi odgovorni za razgradnju citrata do diacetila i CO₂ također se nalaze na plazmidu. Ako »starter kulture« za proizvodnju maslaca izgube takav plazmid, gubi se i aroma proizvoda. Stoga je korisno prirediti mutante vrste *L. lactis* ssp. *lactis* var. *diacetylactis* koji imaju plazmid s genima odgovornim za razgradnju citrata, ugrađen u kromosom (5).

Plazmidi koji sadržavaju dio kromosomske DNA uzrokuju stabilne genetičke promjene domaćina procesom homologne rekombinacije. Plazmidni se vektor ugrađuje, uz jednostruki »crossingover«, u kromosomsku DNA do DNA fragmenta koji se klonira. Takav je model predložio Campbell za integraciju bakteriofaga λ i od tada se često naziva Campbellova ugradnja vektora. Drugi model podrazumijeva dvostruki »crossingover«, a naziva se još rekombinacija supstitucijom. Događa se kad su na plazmidu prisutna dva fragmenta DNA koja nisu u dodiru na kromosomu. Nakon rekombinacije supstitucijom izgubi se dio kromosomske DNA koji se nalazi između dva fragmenta DNA prisutna na plazmidu. Ovaj je model prvi put opisan za fag λ u bakteriji *E. coli* (21).

Oba modela za integraciju najčešće su primjenjivana u vrsta *E. coli* i *B. subtilis*, posebno za: inaktivaciju kromosomskih gena, mapiranje inaktiviranih gena, njihovo kloniranje i stabiliziranje (49,50). Utvrđeno je da oba mehanizma ugradnje plazmida vrijede i za bakteriju *L. lactis* (51,52). Chopin i suradnici (53) ugradili su plazmid pE194 u kromosom primjenom ovih mehanizama i inaktivirali dva provirusa soja *L. lactis* IL1403. Geni za proteinazu soja *L. lactis* subsp. *cremoris* Wg2 ugrađeni su i stabilizirani

u kromosomu soja *L. lactis* subsp. *lactis* MG1363 uz jednostruki »crossingover«, a supstitucijskom rekombinacijom inaktiviran je gen za X-prolil dipeptidil aminopeptidazu soja MG1363 (21).

Transpozoni

Transpozoni su pokretni genetički elementi. Vrlo često sadržavaju gene za rezistenciju prema antibioticima. Imaju sposobnost integracije i ekscizije iz DNA molekula domaćina neovisno o sustavu rekombinacije stanice domaćina. U prirodi se često nalaze na bakterijskim plazmidima (21). Koriste se za izazivanje mutacija i kao biljezi za kloniranje DNA. Transpozoni Tn916 i Tn919, veličine 15–16 kb, izolirani iz bakterija roda *Streptococcus* (54,55), nositelji su rezistencije na tetraciklin (Tc^r). Procesom konjugacije mogu biti preneseni u različite vrste Gram-pozitivnih bakterija, pri čemu se na transpozone prenese i dio bakterijske DNA veličine nekoliko kilobaza. Transpozon Tn916 može se ugraditi i u kromosom bakterije *E. coli*, ali pokazuje veliku nestabilnost. Utvrđeno je da bez prisutnosti tetraciklina u podlozi dolazi do gubitka rezistencije (54).

Gawron-Burke i Clewell (56) istražili su način ugradnje i kloniranja tog transpozona u DNA streptokoka. Transpozon Tn916 unese se u stanice recipijenta, koje se zatim izoliraju selekcijom na tetraciklin. DNA, izolirana iz stanica recipijenta, pocijepa se restriksijskom endonukleazom koja ne prepoznaje sekvencije nukleotida unutar transpozona. Dobiveni se dijelovi DNA ugrade u odgovarajući plazmid-vektor. Tako je omogućeno kloniranje gena unutar kojeg se nalazi i transpozon. Dobiveni rekombinantni plazmid poslije se selekcionira u bakteriji *E. coli* na osnovi rezistencije na tetraciklin. Cjelovitost gena, unutar kojeg se transpozon integrira, ponovno se uspostavlja uzgojem dobivenog kлона bez prisutnosti tetraciklina (56).

Ugradnjom transpozona Tn916 u plazmid pMG600 bakterije *L. lactis* povećava se učestalost prijenosa plazmida. Broj se rekombinanata povećava od 7×10^{-8} na $1,3 \times 10^{-4}$ po recipijentu. Prelaskom transpozona iz plazmida na kromosom pojavile su se slučajne mutacije na kromosomu vrste *L. lactis*. Neke su mutacije bile u genima za citratni metabolizam i iskorištavanje maltoze (57).

Transpozon Tn919 ugrađen je u kromosom soja *L. lactis* IL1441 radi indukcije mutacija gena uključenih u metabolizam maltoze, manoze i arginina (58,59). Transpozon Tn919 također se koristi za konstrukciju vektora za laktokoke. Da bi se takav vektor mogao ugraditi i replicirati u bakteriji *L. lactis*, potrebno je osigurati homologiju s kromosomskom DNA. Drugi interesantan transpozon Tn917, koji se ne prenosi konjugacijom, izoliran je iz vrste *Enterococcus faecalis* i potpuno je sekvenciran (60). Jedan od konstruiranih vektora pTV1 sadržava transpozon Tn917 na plazmidu pE194. Kao biljezi se upotrebljavaju geni za rezistenciju na kloramfenikol (na plazmidu) i za rezistenciju na eritromicin (na transpozonu). Primjenom tog vektora uspješno su transformirane bakterije *L. plantarum* i *L. lactis* soj LM0230. Proučavanjem četiri dobivena transformanta soja *L. lactis* LM0230 utvrđeno je da se transpozon Tn917 uključuje na različita mjesta u kromosomsku DNA domaćina (61,62).

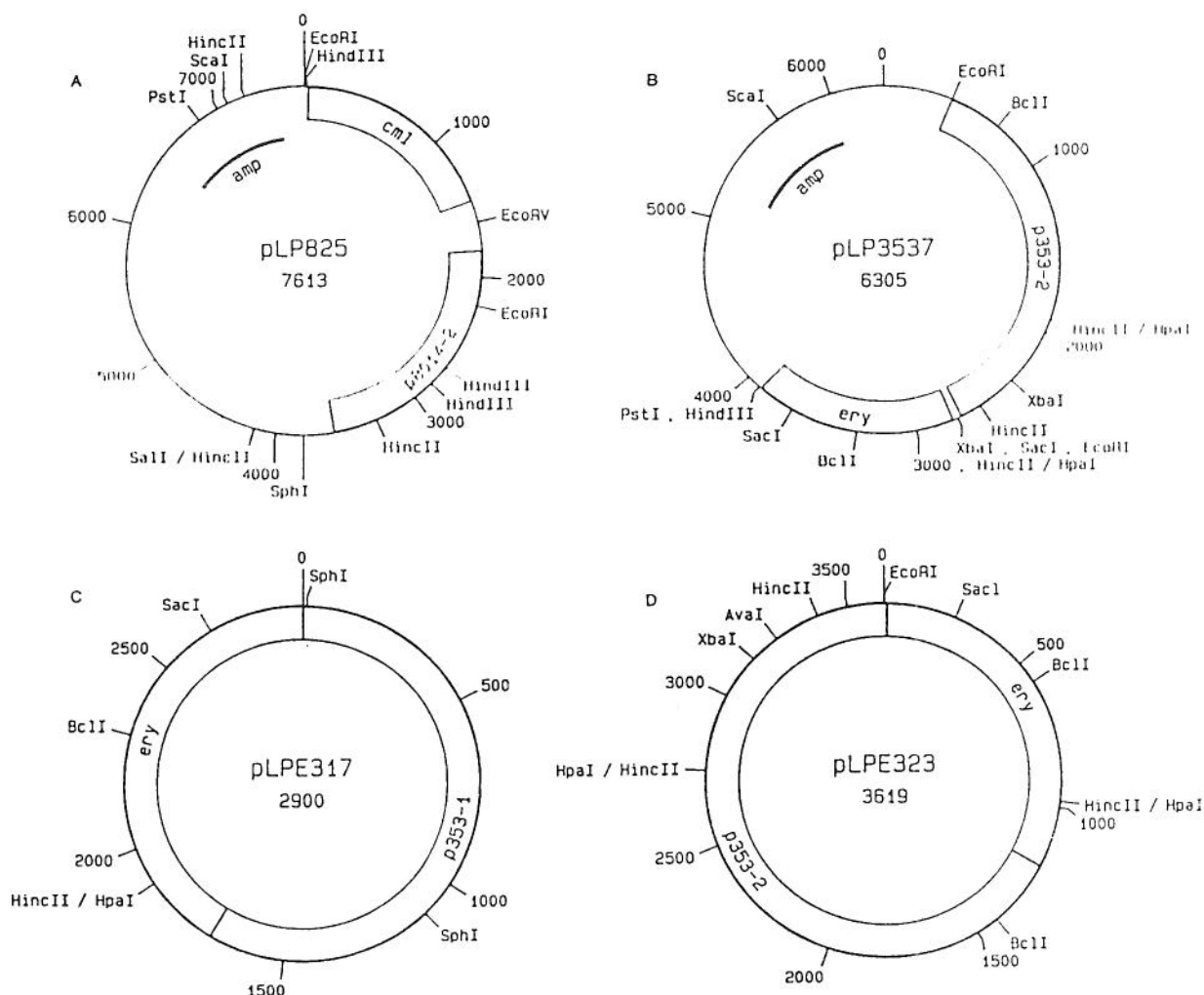
Može se zaključiti da transpozoni prisutni u vektorima mogu poslužiti kao mutagena sredstva, kao i za prijenos gena iz kromosoma jedne bakterije mliječne kiseline u kromosom druge.

Prijenos genetičkog materijala

Genetički se materijal može prenijeti prirodnim putem iz jedne bakterijske stanice u drugu: konjugacijom, transdukcijom i transformacijom. Takav prijenos genetičkog materijala nije se pokazao potpuno djelotvornim u programima oplemenjivanja industrijskih mikroorganizama, te se u tu svrhu primjenjuju metode genetičkog inženjerstva kojima se postižu učestalije i uspješnije rekombinacije gena. Te metode obuhvaćaju: transformaciju

stanica ili protoplasta plazmidnom DNA, transfekciju virusnom DNA, elektroporaciju i transformaciju protoplasta plazmidnom DNA uklopljenom u liposome (63). Do sada je konstruiran cijeli niz plazmidnih i virusnih vektora koji osiguravaju visoku razinu ekspresije klonirane homologne ili heterologne DNA u bakterijama mliječne kiseline. Za uvođenje vektora u stanice tih bakterija i dobivanje rekombinanata koriste se protoplasti, jer stanična stijenka nije propusna za konstruirane vektore.

Transformacijom se može unijeti plazmidna DNA (DNA vektora) u stanicu recipijenta. Dio DNA stanice donora najčešće se ugradi u vektor koji se, nakon ulaska u stanicu recipijenta, rekombinacijom integrira u kromosom ili se samostalno replicira u stanici. Pri konstrukciji vektora za laktobacile najčešće se upotrebljavaju mali krip-



Slika 1. Restriksijske mape plazmida pLP825 (A), pLP3537 (B), pLPE317 (C) i pLPE323 (D). Unutar kružnice upisana je veličina plazmida izražena u parovima baza (bp); p8014-2 (1800 bp) kriptični je plazmid bakterije *L. plantarum* soj ATCC8014; p353-1 (1700 bp) i p353-2 (2300 bp) kriptični su plazmidi bakterije *L. pentosus* soj MD353; *cml*-gen za rezistenciju na kloramfenikol iz plazmida pC194; *ery*-gen za rezistenciju na eritromicin iz plazmida pE194; *amp*-gen za rezistenciju na ampicilin. Precrtano iz *Applied and Environmental Microbiology* (67) uz odobrenje izdavača.

Fig. 1. Restriction maps of pLP825 (A), pLP3537 (B), pLPE317 (C), and pLPE323 (D). The size of the plasmid, in base pairs (bp) is shown inside each circle; p8014-2 (1800 bp) is the cryptic plasmid from *L. plantarum* ATCC8014; p353-1 (1700 bp) and p353-2 (2300 bp) are cryptic plasmids from *L. pentosus* MD353; *cml*-chloramphenicol resistance gene from plasmid pC194; *ery*-erythromycin resistance gene from plasmid pE194; *amp*-ampicilin resistance gene. Reprinted from the *Applied and Environmental Microbiology* (67) with permission of the publisher.

tični plazmidi sa selektivnim biljezima koji se ispoljavaju u laktobacilima. Selektivni biljezi uglavnom sadržavaju gene za rezistenciju na antibiotik. Uspješna transformacija protoplasta bakterije *L. reuteri* provedena je s plazmidom pSA3 koji sadržava biljeg za rezistenciju na eritromicin, ali je broj dobivenih transformanata bio nizak (64). Posredovanjem liposoma pri unošenju plazmida pLZ15 s genima za β -galaktozidazu provedena je uspješnija transformacija protoplasta bakterije *L. casei* od 10^6 transformanata/mg DNA (65).

Danas se transformacija uspješno provodi i elektroporacijom. Tom se tehnikom pri visokom naponu, u određenim uvjetima i vremenu trajanja, dobiju pore u staničnoj membrani kroz koje ulazi DNA koju želimo klonirati. Tako su uvedeni plazmidi pLZ15, pSA3, pLP825 i pNZ12 u stanice bakterije *L. casei* (66). Novi vektori za laktobacile uspješno se unose elektroporacijom u stanice bakterija: *L. casei*, *L. acidophilus*, *L. pentosus*, *L. plantarum*, *L. fermentum* i *L. brevis* (slika 1) (67). Ista je metoda primijenjena za transformaciju soja *L. plantarum* 80 s plazmidnim vektorom pCBH1 koji je sadržavao gene odgovorne za hidrolizu konjugiranih žučnih kiselina (68).

Do sada su opisani i različiti bakterijski virusi koji bi mogli biti potencijalni vektori za prijenos rekombinantne DNA. Veličina genoma virusa specifičnih za bakteriju *L. lactis* iznosi između 18 i 134 kb. Većina tih virusa je virulentna, što znači da ulaze u litički ciklus. Od umjerenih virusa najbolje je opisan virus BK5-T. Pakiranje njegove DNA odvija se mehanizmom »punjenja glave«, karakterističnim za virus P22 bakterije *Salmonella typhimurium*, a različita je veličina genoma tih virusa, od 39,7 do 46 kb, što je posljedica neprecizna mehanizma njegova pakiranja (69–71). Primjenu umjerenih virusa u bakteriji *L. lactis* opisao je Chopin i suradnici (53). Smjesa DNA virusa bIL285 i bIL286 pocijepana je restriksijskim endonukleazama. Dobiveni odsječci DNA ugrađeni su u linearizirani plazmid pE194. Tako dobivena hibridna DNA unosi se u protoplaste soja *L. lactis* IL1403. Homolognom rekombinacijom nastaju stabilni transformanti s ugrađenim vektorom pE194 u kromosom bakterije *L. lactis*.

Amplifikacija gena

Prerasporedi u genomu nastali amplifikacijom, tj. povećanjem broja kopija pojedinačnih dijelova kromosoma ili plazmida, zapaženi su u mnogim mikroorganizmima. Selektivna amplifikacija gena postiže se uzgojem bakterija u prisutnosti povećanih koncentracija antibiotika ili inhibitora rasta.

U bakterija su opisana dva osnovna modela koja omogućuju amplifikaciju istosmjernih sekvencija s ponavljanjem, u tandemu, tj. jedna do druge ili odvojeno (72,73). Plazmidi pAMA1 iz bakterije *E. faecalis* (74) i pNR1 vrste *Proteus mirabilis* (72), s genima za rezistenciju prema antibioticima, sadržavaju dvije komponente: faktor za prijenos rezistencije (RTF) i determinante rezistencije (r), koje su međusobno odvojene IS-elementima. Prema prvom modelu, homolognom rekombinacijom IS-elementa na plazmidu, odvajaju se r -determinanta i faktor RTF. Nastala samostalna, kružna r -determinanta, s IS-elementom koji čini regiju homologije s drugim plazmidima, omogućuje ugradnju determinante rezistencije u drugi plazmid. Tako je moguće dobiti plazmide s višestru-

kim brojem kopija r -determinante. Drugi model, uz nejednaki »crossingover«, obuhvaća rekombinaciju između dva sestrijska genoma sa po dvije iste ponavljajuće sekvencije, za vrijeme replikacije plazmidne DNA. Dobiveni je plazmid s jednom ili tri iste ponavljajuće sekvencije intermedijer za daljnju amplifikaciju. Povećanjem broja kopija gena povećava se mogućnost amplifikacije pri procesu rekombinacije, zbog povećanja regija homologije. Istraživanja su pokazala da je amplifikacija gena na plazmidu pNR1, s dvije r -determinante u nizu, nekoliko stotina puta veća od amplifikacije gena na istom plazmidu divljeg tipa, koji sadržava samo jednu determinantu rezistencije. Također je utvrđeno da derivati plazmida pNR1 s višim početnim brojem kopija r -determinante postižu viši konačni broj gena (72).

Amplifikacija od 6 do 9 kopija gena na plazmidu pE194, integriranom u kromosom soja *L. lactis* IL1403, postignuta je selektivnim uzgojem pri velikim koncentracijama antibiotika klindamicina. Broj kopija gena smanjivao se za 1,6 % po generaciji, pri uzgoju bez dodatka antibiotika (53).

Proučavanjem amplifikacije gena na plazmidima vrste *L. lactis* soja MG1363 utvrđeno je da stabilnost kopija gena ovisi o samom plazmidu i o odabranim biljezima za rezistenciju na antibiotike (51,52).

Doziranje gena, koje obuhvaća integraciju i određeni stupanj amplifikacije gena, određuje se količina proizvoda tih gena, što je posebno važno u industrijskoj primjeni bakterija mliječne kiseline.

Zaključak

Bakterije mliječne kiseline značajne su za industrijsku proizvodnju fermentirane hrane i pića. Poboljšanje karakteristika gotovih proizvoda, radi što boljeg prihvatanja kod potrošača i povećanja ekonomske isplativosti industrijske proizvodnje, postiže se primjenom »starter kultura« koje poboljšavaju okus, teksturu, izgled i trajnost proizvoda. Primjena odabranih kultura bakterija mliječne kiseline može povećati hranjivu vrijednost i zdravstvena svojstva fermentirane hrane i pića. Posebno se zbog toga proizvode probiotski pripravci s bakterijama mliječne kiseline koje omogućavaju bolje zdravstveno stanje ljudi i životinja.

Proizvodni sojevi bakterija mliječne kiseline za određenu fermentaciju odabiru se nakon ispitivanja brojnih izolata. U posljednje vrijeme primjenjuje se »tehnologija rekombinantne DNA« radi dobivanja »starter kultura« s točno određenim značajkama. Stabiliziranje značajnih funkcija, kodiranih na plazmidima, postiže se ugradnjom plazmida u kromosomsku DNA, primjenom metoda genetičkog inženjerstva. Genetičko konstruiranje sojeva i oblikovanje njihovih karakteristika omogućit će novi razvoj tehnologije i kakvoće proizvoda.

Extended Abstract

Lactic acid bacteria are essential in the manufacture of fermented foods and beverages, silage and probiotics (1–5). The use of large scale fermentations necessitates the availability of genetically stable strains with defined properties (4,8–16). The desirable lactic acid bacteria have

been isolated, characterized and added to ensure the right properties of the fermented products (Table 1). The development of techniques for the selection and manipulation of genetic material will result in enhanced flavor, extended shelf-life and improved nutritional quality and safety of fermented foods, in which lactic acid bacteria are involved (5,6).

Cloning of α -amylase and cellulase genes in lactic acid bacteria is important in the production of starch-containing fermented foods (16,47,48). Decarboxylation of malate into lactate is studied with the aim of allowing the selection of proper wine starters (14). The production of nitrite and nitrate reductase has been improved in starter cultures for the fermentation of meat, by the use of genetic techniques (9).

The ability of lactococci to ferment lactose is an unstable property which can lead to variants unable to utilize lactose (22–25,32–34). Genetic engineering techniques can be used to improve the lactic acid fermentation, either by integrating *lac* and other essential genes into the chromosome (45,46,51,52), or by cloning genes for lactose metabolism on a high-copy number plasmid (7,31,35,36). The strains which overproduce β -galactosidase might be used to produce a variety of dairy products which would benefit people who suffer from lactose intolerance (8).

Proteinase activity is also an unstable property and has been linked to plasmid DNA (5,26,40,43,44). The development of strains capable of accelerating the ripening of cheese could be obtained by manipulating the activity of existing enzymes (45,46) or by the introduction of new peptidases (21,41,42).

Other plasmid linked traits of interest are bacteriocin production (13,28) and phage resistance (20). By using genetically modified cultures with such traits, the inhibition of spoilage bacteria and food borne pathogens could be enhanced, and abnormal fermentations due to the phage attack could be eliminated as well (5).

The two mechanisms for the integration of plasmid, or parts thereof, into the chromosome are a single cross-over and a double cross-over recombination event (21,47,51,53).

Plasmids may carry transposons able to transit from one DNA molecule to another (21), often carrying antibiotic resistance (54,55). Transposons have been used to generate mutations and to mark genes genetically, thus facilitating their cloning and analysis (56–62).

The cryptic plasmids of lactic acid bacteria could be chosen to serve as starting material for the construction of vectors (Fig. 1) (64–67). Vectors are used to develop highly efficient plasmid DNA transfer mechanisms such as conjugation, protoplast transformation and electrotransformation which enabled the cloning of genes in recipient cells (53,54,56–59,64–68). Vectors become established as an inheritable factor following recombination between chromosomal DNA sequences, also cloned in the plasmid, which are homologous with a region of the recipient's chromosome (21,47,49,50,53). An additional benefit of chromosomal insertion is that multiple copies of the inserted DNA may lead to the gene amplification (51–53,72–74). Integration of a plasmid vector can also be facilitated using DNA from a lysogenic bacteriophage to

provide homologous sequences for plasmid-chromosome recombination as described for *Lactococcus lactis* (53,70).

Intensive research of lactic acid bacteria have attempted to expand fundamental knowledge of these bacteria and link this to a more scientific control of their use in existing and new applications.

Literatura

1. A. Hosono, R. Wardojo, H. Otani, *Agric. Biol. Chem.* 54 (1990) 1639.
2. A. Lonvand-Funel, A. Joyeux, J. Ledoux, *J. Appl. Bacteriol.* 71 (1991) 501.
3. P. Mensah, A. M. Tomkins, B. S. Drasar, T. J. Harrison, *J. Appl. Bacteriol.* 70 (1991) 203.
4. A. Aguilar, Community activities in biotechnology; The bridge »T« project on the biotechnology of Lactic Acid Bacteria. U: Lactic acid bacteria, research and industrial applications in the agro-food industries, Adria Normandie, Caen (1992) 333.
5. L. L. McKay, K. A. Baldwin, *FEMS Microbiol. Rev.* 87 (1990) 149.
6. M. I. Gurr, *FEMS Microbiol. Rev.* 46 (1987) 337.
7. G. Simons, M. Nijhuis, W. M. de Vos, *J. Bacteriol.* 175 (1993) 5168.
8. S. E. Gilliland, *FEMS Microbiol. Rev.* 87 (1990) 175.
9. D. R. Bartholomen, T. N. Blumer, *J. Food Sci.* 42 (1977) 494.
10. M. A. Martinez-Anaya, M. J. Torner, *Z. Lebensm. Unters. Forsch.* 190 (1990) 126.
11. M. A. Martinez-Anaya, B. Pitarch, P. Bayarri, C. B. de Barber, *Rev. Agroquim. Technol. Aliment.* 29 (1989) 63.
12. F. Breidt, H. P. Fleming, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 3845.
13. M. A. Daeschel, R. E. Andersson, H. P. Fleming, *FEMS Microbiol. Rev.* 46 (1987) 357.
14. M. A. Daeschel, D. S. Jung, B. T. Watson, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 601.
15. D. R. Seale, *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* (1986) 95.
16. R. Sharp, A. G. O'Donnell, H. G. Gilbert, G. P. Hazlewood, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 2517.
17. K. M. Shahani, B. A. Friend, P. J. Bailey, *J. Food Protect.* 46 (1983) 385.
18. R. Fuller, Probiotics, Chapman and Hall, London (1992) 181.
19. M. J. Allison, A. C. Hammond, R. J. Jones, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 590.
20. T. R. Klaenhammer, *FEMS Microbiol. Rev.* 46 (1987) 313.
21. K. Leenhouts, Development and use of plasmid integration systems for Lactococci, Ph.D., Groningen, The Netherlands (1990).
22. B. M. Chassy, E. M. Gibson, A. Guiffrida, *J. Bacteriol.* 127 (1976) 1576.
23. M. Vescovo, L. Morelli, V. Bottazzi, *Appl. Environ. Microbiol.* 43 (1982) 50.
24. B. M. Chassy, E. M. Gibson, A. Guiffrida, *Cure. Microbiol.* 1 (1978) 141.
25. K. Kantani, K. Yoshida, T. Tahara, H. Miura, M. Sakamoto, *Agric. Biol. Chem.* 55 (1991) 2051.
26. M. B. Smiley, V. Fryder, *Appl. Environ. Microbiol.* 35 (1978) 777.
27. H. J. Curragh, M. A. Collins, *J. Appl. Bacteriol.* 73 (1992) 31.
28. M. J. van Belkum, B. J. Hayema, A. Geis, J. Kok, G. Venema, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 1187.
29. G. W. Tannock, R. Fuller, K. Pedersen, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 1310.

30. P. W. Postma, J. W. Lengeler, *Microbiol. Rev.* 49 (1985) 232.
31. W. M. de Vos, G. Simons, *Biochimie*, 70 (1988) 461.
32. Y. H. Park, L. L. McKay, *J. Bacteriol.* 149 (1982) 420.
33. S. K. Harlander, L. L. McKay, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 342.
34. S. K. Harlander, L. L. McKay, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1984) 347.
35. J. M. Inamine, L. N. Lee, D. J. LeBlanc, *J. Bacteriol.* 167 (1986) 855.
36. G. K. Y. Limwostin, V. L. Crow, L. E. Pearce, *FEMS Microbiol. Lett.* 33 (1986) 79.
37. W. M. De Vos, M. J. Gasson, *J. Gen. Microbiol.* 135 (1989) 1833.
38. B. A. Law, E. Sezgin, M. E. Sharpe, *J. Dairy Res.* 43 (1976) 291.
39. T. D. Thomas, G. G. Pritchard, *FEMS Microbiol. Rev.* 46 (1987) 245.
40. S. Visser, F. A. Exterkate, C. J. Slangen, G. J. C. M. de Veer, *Appl. Environ. Microbiol.* 52 (1986) 1162.
41. J. Kok, *FEMS Microbiol. Rev.* 87 (1990) 15.
42. J. Kok, J. M. van Diji, J. M. B. M. van der Vossen, G. Venema, *Appl. Environ. Microbiol.* 48 (1985) 94.
43. A. J. Haandrikman, J. Kok, H. Laan, S. Soemitro, A. M. Ledebøer, W. N. Konings, G. Venema, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 2789.
44. P. Vos, M. van Asseldonk, F. van Jeveren, R. Siezen, G. Simons, W. M. de Vos, *J. Bacteriol.* 171 (1989) 2795.
45. L. L. McKay, K. A. Baldwin, *Appl. Environ. Microbiol.* 36 (1978) 360.
46. G. M. Kempler, K. A. Baldwin, L. L. McKay, H. A. Morris, S. Halambeck, G. Thorsen, *J. Dairy Sci.* 61 (1979) 42.
47. T. Scheirlinck, J. Mahillon, H. Joos, P. Dhaese, F. Micheils, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 2130.
48. E. E. M. Bates, H. J. Gilbert, G. P. Hazlewood, J. Huckle, J. I. Laurie, S. P. Mann, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 2093.
49. F. A. Ferrari, A. Nguyen, D. Lang, J. A. Hoch, *J. Bacteriol.* 154 (1983) 1513.
50. C. O'Kane, M. A. Stephens, D. McConnel, *J. Bacteriol.* 168 (1986) 973.
51. K. J. Leenhouts, J. Kok, G. Venema, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 394.
52. K. J. Leenhouts, J. Kok, G. Venema, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 2726.
53. M. C. Chopin, A. Chopin, A. Rouault, N. Galleron, *Appl. Environ. Microbiol.* 55 (1989) 1769.
54. A. E. Franke, D. B. Clewell, *J. Bacteriol.* 145 (1981) 494.
55. C. Hill, C. Daly, G. F. Fitzgerald, *FEMS Microbiol. Lett.* 30 (1985) 115.
56. C. Gawron-Burke, D. B. Clewell, *J. Bacteriol.* 159 (1984) 214.
57. C. Hill, C. Daly, G. F. Fitzgerald, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 74.
58. G. F. Fitzgerald, M. J. Gasson, *Biochimie*, 70 (1988) 489.
59. P. P. Renault, H. Heslot, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 320.
60. J. H. Shaw, D. B. Clewell, *J. Bacteriol.* 164 (1985) 782.
61. W. M. Cosby, L. T. Axelsson, W. J. Dobrogosz, *Plasmid*, 22 (1989) 236.
62. M. E. Sanders, M. A. Nicholson, *Appl. Environ. Microbiol.* 53 (1987) 1730.
63. D. Hranueli, *Prehrambeno-tehnol. biotehnol. rev.* 22 (1984) 19.
64. L. Morelli, P. Cocconcilli, V. Bottazzi, G. Damiani, L. Ferretti, V. Sgarabella, *Plasmid*, 17 (1987) 73.
65. B. M. Chassy, *FEMS Microbiol. Rev.* 46 (1987) 297.
66. B. M. Chassy, J. I. Flickinger, *FEMS Microbiol. Lett.* 44 (1987) 173.
67. M. Posno, R. J. Leer, N. van Luijk, M. J. F. van Giezen, P. T. H. M. Heuvelmans, B. C. Lokman, P. H. Pouwels, *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (1991) 1822.
68. H. Christiaens, R. J. Leer, P. H. Pouwels, W. Verstraete, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 3792.
69. G. Lakshmidēvi, B. E. Davidson, A. J. Hillier, *Appl. Environ. Microbiol.* 54 (1988) 1039.
70. G. Lakshmidēvi, B. E. Davidson, A. J. Hillier, *Appl. Environ. Microbiol.* 56 (1990) 934.
71. E. N. Jackson, A. Jackson, R. J. Deans, *J. Mol. Biol.* 118 (1978) 365.
72. B. C. Peterson, R. H. Rownd, *J. Bacteriol.* 161 (1985) 1042.
73. J. B. Perkins, P. J. Youngman, *J. Bacteriol.* 155 (1983) 607.
74. Y. Yagi, D. B. Clewell, *J. Mol. Biol.* 102 (1976) 583.