

특집 : 유산균의 산업적 이용(II)

*Bifidobacterium*을 이용한 유전자 발현 시스템의 개발과 이용 가능성

박명수 · 지근역*

서울대학교 농업생명과학대학 농업개발연구소, *서울대학교 식품영양학과

*Bifidobacterium*은 그람양성의 편성 혐기성 세균으로서 인체의 장내 세균중 주요 균총 중의 하나이다. 인체의 장내에는 약 400여종의 세균이 존재하며 그 수는 10^{14} cfu/g 이상으로 전체 중량의 30~40%에 해당한다. 특히, 모유를 섭취하는 유아의 장내 균총 중의 90% 이상이 *Bifidobacterium*으로 이루어져 있다. 그러나 이유식 섭취 이후에 *Bifidobacterium*의 숫자는 감소하며 전체 균총 중의 10~20% 수준으로 존재하다가 노인이 되면서 더욱 감소한다. 반면에 이유식 이후로 평생동안 계속하여 *Bacteroides*균이 최우세 균으로 자리잡고 이외에 *Peptostreptococcus*와 *Eubacterium* 등도 *Bifidobacterium* 균주 수준으로 존재한다. 이상의 균들은 모두 혐기성 균들로 이들 균들은 산소가 거의 없는 대장 내에서 음식물, 약물, 장 분비 물질들을 혐기적으로 대사한다. 그 결과 세균의 대사물질과 세균의 세포 성분 자체는 숙주인 인체의 영양, 노화, 면역, 질병의 발생 등에 지대한 영향을 미치게 된다. 현재까지 보고된 바에 의하면 *Bifidobacterium*은 장내 세균 중 가장 유익한 균으로 알려져 있다. 그 이유로서는 *Bifidobacterium*은 유해 물질을 거의 생산하지 않고 병원성 균에 대한 길항작용이 있으며 비타민 B군 등을 생산하여 인체에 공급하고 유당을 분해하여 유당불내증을 개선하는 효과가 있는 것에 기인하는 것으로 알려져 있기 때문이다. 모유를 섭취하는 유아의 경우 설사 등 질병 이환율이 낮는데 그 이유중의 하나로서 모유아의 장내에 *Bifidobacterium*이 우세하게 자리잡는 것으로 생각하고 있다. 이러한 작용 이외에도 최근에 *Bifidobacterium*의 면역 증강 능력, 항 종양 효과, 혈중 콜레스테롤의 감소능 등이 다수 보고되고 있는데 이들 작용에 대한 것은 앞으로 보다 많은 연구가 이루어져야 적절히 해석할 수 있을 것이다. 이상과 같이 *Bifidobacterium*의 유익작용이 점차 널리 알려지게 됨에 따라 *Bifidobacterium*을 이용하여 발효유와 정장 캡슐제 등 다양한 probiotics 제품이 개발되어 왔다. 특히, 최근에는 각 균주마다의 특성과 능력이 상이함에 근거하여 보다 우수한 형질의 *Bifidobacterium*을 개발하기 위한 노력이 경주되고 있으며 또한 생존성, 안정성 및 장 정착성을 증진시키기 위한 연구도 활발한 상태이다. 본 논문에서는 우수한 probiotics로서의 기능

을 가지고 있는 *Bifidobacterium*을 유전공학적으로 개선하기 위하여 현재까지 진행되어온 유전자수준에서의 연구와 발현백터의 개발현황 그리고 그 응용방안에 대하여 살펴보겠다.

비피더스 발현 시스템의 필요성

미래 인류의 식량, 질병, 환경 등을 효율적으로 관리하고 다양한 생물자원의 활용성을 높이기 위한 생명공학이 눈부시게 발전하고 있다. 특히 대장균은 생명공학의 발전에 크게 기여한 균으로서 유전공학의 제 1세대 원천기반 기술을 정립하는데 많은 기여를 하였다. 이제는 대장균에서 파급된 기술이 다양한 생물자원(동물, 식물, 미생물 등)에 적용되어 실제적으로 산업에 응용되는 단계에 이르렀다. 현재 식품생명공학에서는 생리 기능성 물질의 탐색 및 발현 시스템 개발이 핵심적 과제이다. 따라서 안전성이 확보된 food-grade의 발현시스템을 개발한다면 많은 식품생명공학자들이 개발하는 소재를 발현시키는 시스템을 제공할 수 있게된다. 유용 유전자를 식품뿐만 아니라 인체 및 동물의 장(腸)내로 전달하기 위해서는 숙주의 장내에 정착성을 보유하는 유익균을 활용하는 것이 효율적이다. 유럽에서는 연간 생산되는 2300만 톤 이상의 우유 중 절반이 유산균에 의해 발효된 상태로 소비되고 있어 발효에 관여하는 유산균에 대한 체계적인 연구의 필요성을 인식하고 이에 대한 첨단연구들이 진행되고 있다. 이들은 이미 1982년부터 진행된 Biotech G program의 결과로 유산균의 유전자에 대한 많은 기초 연구결과를 얻었으며 이를 발전시켜 현재는 60개 이상의 산학연이 참여한 STARLAB(Strategic and Applied Research in Lactic Acid Bacteria, 표 1 참조) project를 EU 차원에서 진행하고 있으며 유산균 대사공학으로 기존 유산균 개량, 대사경로의 수식, 신설을 통한 유용물질의 대량생산 및 생물신소재 생산에 초점을 두고 있다. 비피더스균은 안전성이 입증된 GRAS 미생물로 최근에는 항암, 콜레스테롤 저하, 혈압강하, 혈전저해, 설사 방지 등의 probiotics 효과에 대한 연구 결과가 계속 발표되고 있는 건강기능성 유용 미생물이다. 또한 쌀, 인간, 생쥐, 효모, *Arabidopsis*, *Lactobacillus*, *Lactococcus* 등에

표 1. STARLAB 프로젝트

STARLAB project
· Protease 활성을 변형시킨 균주 개발(Lactic acid bacteria with modified properties in milk fermentation)
· bacteriophage에 대한 내성균주 개발(Control of bacteriophage development in Lactic acid bacteria)
· 호열성 유산균의 분자생물학적 연구(Molecular biology and genetics of thermophilic Lactic acid bacteria)
· 특정 기질에서 생육이 효율적인 발효종균 개발(Carbon catabolite control in food grade <i>Lactobacilli</i> for strain improvement)
· Catabolite-repression이 해제된 변이주 개발(Cell engineering in <i>Lactococcus lactis</i>)
· Vaccine delivery 수단으로 유산균 이용방안(Lactic acid bacteria for production and delivery of mucosal immunogens)

관한 원천기술은 이미 세계적으로 다국적 기업에서 선점한 상황이다. *Bifidobacterium*의 벡터 및 유전체 연구는 현재 국내 연구진이 선도할 수 있는 틈새 개발 분야이며 최근 Self-cloning에 의한 novel food 개념이 도입되어 *Bifidobacterium*을 이용한 재조합 균주는 법적으로 안전한 식품용 균주로 사용 가능성이 높아지고 있다. 비피더스 발현 시스템은 식품산업용 발효에서 매우 중요한 위치를 차지하는 비피더스 유산균의 효율을 극대화 할 수 있는 기술로서 식품산업 뿐 아니라 동물 사료 및 의약품 등 발효산업 전반에 걸쳐서 응용될 수 있는 기반 기술이다.

비피더스용 vector 개발 및 외래 유전자의 발현

비피더스용 발현 시스템의 개발을 위해서는 이를 구성하는 비피더스 플라스미드에 관한 연구 뿐 아니라 외래 유전자를 비피더스에서 효율적으로 발현시키기 위한 조절 장치로서 비피더스에서 작동하며 발현 조절이 가능한 프로모터에 대한 연구 등이 필요하다. 또한 도입된 외래 유전자의 안정화를 위해서는 주 염색체에 integration 할 수 있는 장치의 개발이 필요하다. 그리고 Food grade vector를 개발하기 위해서는 이러한 구성 요소들이 모두 GRAS(Generally Recognized As Safe)에서 유래한 유전자로 이루어져야 한다. 이러한 목적을 이루기 위해서는 비피더스 유래의 플라스미드 및 유전자 발현과 transposase 등에 대한 체계적인 연구가 축적되어야 할 것이다.

비피더스에서 vector의 개발

*Bifidobacterium*에서 이용할 수 있는 vector는 대략 세 가지 타입이 가능하다. 첫째, *Bifidobacterium*에서 유래한 replicon을 이용한 경우, 두 번째, 이 균과 매우 가까운 유연관계를 가지는 미생물의 replicon을 이용하는 경우, 그리고 broad host range plasmid를 이용하는 경우가 그것이다. 첫 번째의 경우 생물산업

처럼 *Bifidobacterium* 유래의 replicon을 확보하기 위해서는 이 균의 cryptic plasmid에 대한 연구가 필수적이다. 비피더스 균의 플라스미드에 관한 연구는 1982년에 이탈리아의 Sgorbati 등에 의해서 시작된 이래 유전자 지도의 작성과 전체 염기서열 분석 등을 통해 shuttle vector로 개발하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 이러한 비피더스의 vector 연구는 주로 이탈리아 볼로냐 대학의 연구 그룹과 일본의 야쿠르트사와 교토 대학 그리고 본 연구진 등에 의해서 주도되고 있다. 현재까지 보고된 32종의 비피더스중에서 인간의 장에서 분리되는 비피더스는 *B. longum*, *B. infantis*, *B. adolescentis*, *B. bifidum*, *B. breve*으로 5종이며 *B. longum*과 *B. breve*만이 플라스미드를 보유한 것으로 알려져 있다[19]. *B. longum*의 경우 70%가 *B. breve*의 경우 40%가 플라스미드를 보유하고 있으며[8,19] 이들 플라스미드의 크기는 1.25kb-9.5kb로 비교적 작은 편이다. 이들 중 pCIBbI[11], pMB1[14], pKJ50[12], pKJ36[13] 등이 완전히 sequencing이 되었고, pCIBbI, pKJ50 그리고 pKJ36은 single-stranded DNA를 중간체로 하는 rolling circle replication에 의해서 복제하는 것이 확인되었다. 이와 같은 비피더스 플라스미드에 대한 유전자 수준에서의 연구결과가 축적이 되고 1980년대 중반부터 상용화된 electroporation에 의해 그램 양성균인 *Lactococcus lactis*[7], *Lactobacillus casei* [3] 그리고 *Leuconostoc paramesenteroides*[4] 등에 대한 성공적인 형질전환법이 보고되어 *Bifidobacterium*에서도 shuttle vector의 개발이 진행되었다. Argnani 등[1]은 형질전환용 세포를 4°C에서 4시간동안 electroporation buffer에 반응시키는 방법으로 제조한 결과 10^4 CFU/ μ g DNA 수준의 효율을 얻을 수 있었다. 따라서 pKJ50과 pKJ36 그리고 pMB1을 기초로 하여 항생제 marker와 *E. coli* vector로 구성된 *E. coli* - *Bifidobacterium* shuttle vector가 제작되었다. pMB1에 기초한 셔틀벡터는 *E. coli*와 *Bifidobacterium*에서는 복제되었으나 *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus casei*에서는 복제되지 않았다. 계통유전학적으로 *Bifidobacterium*과 가까운 *Corynebacterium*의 플라스미드는 *Bifidobacterium*에서 복제할 수 있었다. 반대로 *Lactobacillus*나 *Lactococcus*(AT-rich 미생물)로부터 유래된 broad host range 플라스미드는 *Bifidobacterium*에서 복제되지 않았다[1]. 이러한 셔틀벡터는 food-grade 클로닝 벡터나 발현벡터 구축을 위한 좋은 후보들이다.

비피더스에서 외래 유전자의 발현

이와 같이 몇 가지의 shuttle vector 들이 개발되었지만 *Bifidobacterium*에서 발현되는 것으로 확인되는 외래 유전자는 cholamphenicol acetylytransferase, erythromycin, spectinomycin 등의 항생제 내성 유전자뿐이었으나[15], 최근 셔틀벡터의 개발로 인하여 *Bifidobacterium*을 host로 한 외래 유전자 발현시도가 가속화되고 있다. 이탈리아에서는

Bifidobacterium longum MB 219 lacZ gene이 cloning되어 염기서열, 발현 및 전사조절부위가 분석되었다[16]. 본 연구실에서는 비피더스의 플라스미드를 이용하여 자체 개발한 셔틀 벡터 pBES2를 사용하여 박테리아나 동물세포에서 marker로 사용되는 GFP gene의 발현을 시도하여, mRNA 수준에서 GFP가 발현되는 것을 확인하였다[23]. 또한 *B. adolescentis* Int57 유래의 α -amylase를 pBES2를 이용하여 여러 *Bifidobacterium* host에서 발현시킨 결과 모균주보다 활성이 강한 transformant를 얻었다(특허출원). 이 유전자는 발현된 효소의 대부분이 세포밖으로 분비되어 외래 유전자의 발현 및 분비 시스템으로 개발할 때 매우 유용한 도구가 될 것으로 예상된다.

비피더스 유래의 유전자 연구

지금까지 *Bifidobacterium*에서 cloning 및 sequencing되어 발표된 유전자는 몇 종에 불과하다. 이들은 *B. longum*의 β -galactosidase[16], *B. breve*의 β -D-glucosidase[10], *B. adolescentis*의 α -galactosidase, *B. breve*의 *recA*, *B. asteroides*의 *recA*, *B. longum*의 *ldh*[17], *B. longum*의 bile salt hydrolase [20]등이다. 본 연구진은 비피더스에서 α -amylase[9], β -galactosidase (not published), β -xylosidase(not published), α -glucosidase[24]를 클로닝하여 염기서열 분석을 마쳤으며, 그 특성을 분자생물학적 방법을 사용하여 규명하였다. 이러한 효소들은 *Bifidobacterium*의 장내 대사연구에 많은 해답을 줄 것이며, 그 산업적 이용범위도 넓을 것으로 예상된다. 또한 food grade vector나 발현벡터의 항생제 marker가 아닌 새로운 marker로서의 시도가 기대되고 있다. 예를 들어 α -amylase의 경우 세포밖으로 분비되는 특성이 있어 도입된 외래 유전자의 발현과 세포외 분비시스템으로 이용이 가능하며 그 자체로서 선발인자로도 사용이 가능함을 확인하였다. 이외에도 외래 유전자를 비피더스 세포벽에 부착시킬 수 있다면 비피더스를 안전한 생물 전환체나 백신 전달체로 이용할 수 있을 것이다. 이러한 분야에 응용이 가능하기 위해서는 비피더스 세포벽에 부착시킬 수 있는 단백질에 관한 연구가 필요하다. Samartsev[18] 등은 세포벽에 부착되어 작용하는 *Bifidobacterium*의 단백질 분해 효소생산에 관한 연구결과를 발표하였으며 또한 본 연구실에서는 heat shock protein으로 예상되는 막 단백질을 정제하여 N-terminal sequencing에 의한 분석과 함께 클로닝 작업을 수행하고 있다.

***Bifidobacterium*의 부착능**

비피더스의 발현 시스템이 개발되어 외래 유전자가 발현이 되었을 경우 이를 인간이나 동물의 장내로 전달하고자 할 때 도입된 유전자가 충분히 발현되어 효과를 나타내기 위해서는 주입된 비피더스가 인체의 장에서 잘 부착하여야 한다. 이러한

분야에 대한 연구도 활발하게 진행되고 있으며 그 특성은 균주마다 상이한 것으로 나타나고 있으며 그 부착 메카니즘에 관한 연구결과가 보고되고 있다. Caco-2 세포는 비피더스의 부착능력을 측정하는데 사용되어 왔다[2]. *Bifidobacteria*는 병원성 장내 세균의 부착을 저해하며[2], 혈장 콜레스테롤 수치를 낮추고 면역체계를 자극하는 것으로 알려져 있다. 부착 메카니즘에는 부착능과 autoaggregation사이의 상관성[5], 표면 소수성과 부착능 사이의 상관성이 조사되었다[21]. 최근에는 autoaggregation하며 상당한 소수성을 가지고 있다면 cell monolayer에 부착할 수 있는 것으로 나타났[6]. 그러나 *in vitro* 테스트는 비용이 비싸고 시간이 많이 소요되기 때문에, 충분한 부착능력이 있다고 보이는 균주에 대한 *in vivo* 방법이 개발되어야 할 것이다. 이에 대한 가능성을 점검하는 연구로 최근 일본에서 *B. longum*이 mouse의 solid tumor에 정착하고 증식하는 것을 확인하였다[22]. 정상 세포의 산소 분압이 24-66mmHg인데 비해, solid tumor의 특징인 hypoxia region에서는 10-30mmHg의 산소분압 및 일부분에서는 2.5mmHg이하의 수치를 나타낸다. 따라서 이러한 특성을 이용한다면 비피더스 발현시스템에 항암 유전자를 도입하여 대장에 주입할 경우 대장암세포에 특이적으로 부착해서 항암 물질을 전달할 수 있을 것이다.

응용분야

비피더스 발현 시스템은 곧바로 식품 소재 및 기능성 발효유의 제조, 정장제품의 개발 뿐 아니라 질병치료를 위한 신개념의 유전자 치료 기법에 이용될 수 있을 것이다(그림 1 참조). 90년대 중반에 제시된 AIDS vaccine 개발에서의 주안점은 점막면역이다(Science 266, 1335-1337, 1994). 인간의 대장은 전체 면역체계의 약 70%를 차지하고 있어 이를 이용하기 위하여 *Salmonella*와 *Shigella* 등을 포함하는 장내 미생물이 관

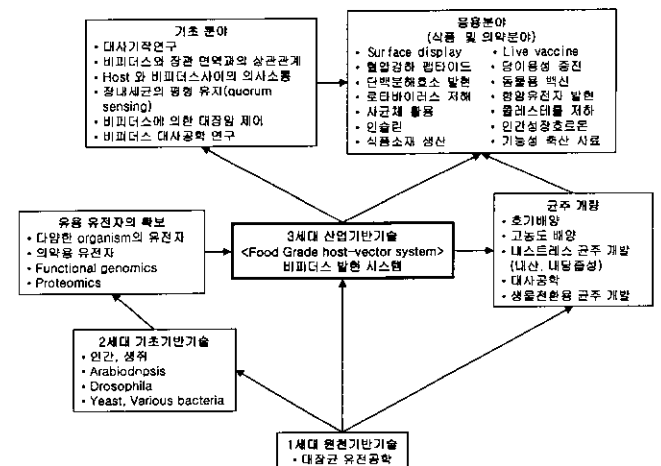


그림 1. 비피더스 발현 시스템의 응용가능 분야.

심의 대상이 되고 있는데 이러한 장 감염성 세균들이 점막 면역 반응을 잘 유도하는 특징들 때문이다. 하지만 안전성 면에서 상당한 논란을 불러일으킬 소지가 있다. 이에 비하여 비피더스는 이미 GRAS(generally recognized as safe)로 인정을 받고 있으며 인간의 장에서 최우세 균총을 형성하여 *Lactobacillus*보다도 약 1,000배 정도의 수준으로 존재하며 또한 장에 대한 정착성 및 probiotics로서 기능이 널리 알려져 이것을 vaccine carrier로 이용할 수 있다면 live vaccine의 개발에 획기적인 진전을 이룰 수 있을 것이다. 인간계놈 프로젝트로부터 얻은 각종 정보들은 신개념의 혁신 의약품을 창출하는 젯줄이 되고 있으며, 조합화학(combinatorial chemistry), HTS(high throughput screening) 등 신기술이 적용되어 신약의 개발이 가속화되고 있다. 또한 식품의약품안전청은 2000년 12월 5일에 '유전자 치료제 허가 및 임상시험 관리지침'을 발표하였는데 유전자 치료제로서 허가를 받기 위해서는 독성시험, 임상시험 등에서 안전성·유효성 자료를 필수적으로 첨부하게 하였다. 세부규정에는 유전자의 도입 방법에 대하여 상세하게 규정되어 있으며 전달체(delivery system)의 독성시험에 대한 상세한 정보를 요구하고 있다. 따라서 신약을 인체에 안전하게 전달할 수 있는 매개체의 개발이 필수적이다.

결론

*Bifidobacterium*은 인간과 동물의 장내에 서식하는 중요한 미생물이다. 유당불내증의 개선, 면역증강효과, 병원미생물에 대한 억제효과, cholesterol의 저하능, 그리고 일반적인 장의 건강에 많은 유익한 작용을 보여주고 있다. 기능성 식품에 이용하거나 식이보조 및 건강과 관련된 여타 식품 등이 이들의 사용이 가능한 분야이다. 따라서 비피더스의 생리활성을 극대화하고 새로운 형질을 부여하기 위해서 *Bifidobacterium*에 대한 유전학적인 연구가 진행되어 외래유전자를 발현시킬 수 있는 시스템의 개발이 이루어지고 있다. 비피더스 발현 시스템은 유산균 발현 시스템과 함께 대장균 시스템을 보완 대체 할 수 있는 무한한 가능성이 있다고 하겠다.

참고문헌

1. Argnani, A., Leer, R. J., van Luijk, N. and Pouwels, P. H. 1996. A convenient and reproducible method to genetically transform bacteria of the genus *Bifidobacterium*. *Microbiology*. **142**: 109-114.
2. Bernet MF, Brassart D, Neeser JR, Servin AL. 1993. Adhesion of human bifidobacterial strains to cultured human intestinal epithelial cells and inhibition of enteropathogen-cell interactions. *Appl Environ Microbiol*. **59**: 4121-8.
3. Chassy, B. M. and Flickinger, J. L. 1987. Transformation

of *Lactobacillus casei* by electroporation. *FEMS Microbiol. Lett.*, **44**: 173-177.

4. David, S., Simons, G. and de Vos, W. M. 1989. plasmid transformation by electroporation of *Leuconostoc paramesenteroides* and its use in molecular cloning. *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**: 1483-1489.
5. Del Re B, Busetto A, Vignola G, Sgorbati B, Palenzona DL. 1998. Autoaggregation and adhesion ability in a *Bifidobacterium suis* strain. *Lett Appl Microbiol*. **27**: 307-10.
6. Del Re B, Sgorbati B, Miglioli M, Palenzona D. 2000. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Lett Appl Microbiol*. **31**: 438-42.
7. Harlander, S. 1987. Gene transfer systems in Lactic streptococci. In J. J. Ferretti and R. C. Curtiss(eds), *Streptococcal Genetics*. Washington, D. C.: ASM Publications, pp. 229-233
8. Iwata, M. and T. Morishita, 1989. The presence of plasmid in *Bifidobacterium breve*, *Lett, Appl. Microbiol*, **9**: 165-168.
9. Lee SK, Kim YB, Ji GE. 1997. Purification of amylase secreted from *Bifidobacterium adolescentis*. *J Appl Microbiol*. **83**: 267-72.
10. Nunoura N, Ohdan K, Tanaka K, Tamaki H, Yano T, Inui M, Yukawa H, Yamamoto K, Kumagai H. 1996. Cloning and nucleotide sequence of the β -D-glucosidase gene from *Bifidobacterium breve* clb, and expression of β -D-glucosidase activity in *Escherichia coli*. *Biosci Biotechnol Biochem*. **60**: 2011-2018.
11. O'Riordain, K., Fitzgerald, G. F. 1999. Molecular characterization of a 5.75-kb cryptic plasmid from *Bifidobacterium breve* NCFB2258 and determination of mode of replication. *FEMS microbiol. lett*. **174**: 285-292.
12. Park, M. S., Shin, D. W., Lee, K. H. and Ji, G. E. 1999. Sequencing analysis of the plasmid pKJ50 from *Bifidobacterium longum*, *Microbiology*, **154**: 585-592.
13. Park, M.S., Shin, D.W., Lee, K.H. and Ji, G.E. 2000. Characterization of plasmid pKJ36 from *Bifidobacterium longum* and construction of *E. coli* - *Bifidobacterium* shuttle vector. *J. Microbiol. Biotechnol*. **10**: 312-320.
14. Rossi, M., Brigidi, P., Rodriguez, A. G. V. and Matteuzzi, D. 1996. Characterization of the plasmid pMB1 from *Bifidobacterium longum* and its use for shuttle vector construction. *Res. Microbiol*. **147**: 133-143.
15. Rossi, M., Brigidi, P. and Matteuzzi, D. 1998. Improved cloning vectors for *Bifidobacterium* spp. *Letters in Applied Microbiology* **28**: 101-104.
16. Rossi, M. Altomare L, Gonzalez Vara y Rodriguez A, Brigidi, P. and Matteuzzi, D. 2000. Nucleotide sequence, expression and transcriptional analysis of the *Bifidobacterium longum* MB 219 lacZ gene. *Arch*

- Microbiol.* **174(1-2)**: 74-80.
17. Roy D, Sirois S. 2000. Molecular differentiation of *Bifidobacterium* species with amplified ribosomal DNA restriction analysis and alignment of short regions of the *ldh* gene. *FEMS Microbiol Lett.* **191**: 17-24.
 18. Samartsev AA, Astapovich NI, Novik GI. 2000. Production of proteinases associated with *Bifidobacterium adolescentis* 94-BIM cell wall. *Mikrobiologiya* **69**: 774-777.
 19. Sgorbati. B., Scardovi, V. and Leblanc, D. J. 1982. plasmids in the genus *Bifidoabacterium*. *Journal of General Microbiology* **128**: 2121-2131.
 20. Tanaka H, Hashiba H, Kok J, Mierau I. 2000. Bile salt hydrolase of *Bifidobacterium longum*-biochemical and genetic characterization. *Appl Environ Microbiol.* **66**: 2502-12.
 21. Wadstrom T, Andersson K, Sydow M, Axelsson L, Lindgren S, Gullmar B. 1987. Surface properties of lactobacilli isolated from the small intestine of pigs. *J Appl Bacteriol.* **62**: 513-20.
 22. Yazawa K, Fujimori M, Amano J, Kano Y, Taniguchi S. 2000. *Bifidobacterium longum* as a delivery system for cancer gene therapy: selective localization and growth in hypoxic tumors. *Cancer Gene Ther.* **7**: 269-74.
 23. 강윤희. 2001. Development of foreign-gene expression system for *Bifidobacterium longum* GE1, 석사학위논문, 서울대학교.
 24. 이선영. 2001. Molecular cloning and expression of a α -glucosidase gene from *Bifidobacterium longum* ATCC 15707 in *Escherichia coli*, 석사학위논문, 서울대학교.