Lait 81 (2001) 75–82
© INRA, EDP Sciences, 2001

Physiologie, métabolisme

Métabolisme sucre-citrate chez *Leuconostoc mesenteroides*

Gérald BOUREL, Samia HENINI, Kamel KRANTAR, Mona ORABY, Charles DIVIÈS, Dominique GARMYN*

Laboratoire de Microbiologie UMR-INRA, ENSBANA,
1 esplanade Erasme, 21000 Dijon, France

Abstract — Sugar citrate cometabolism in *Leuconostoc mesenteroides.* Bacteria from the genus *Leuconostoc* play roles in the dairy industry. The most important functions of this bacteria are their ability to produce CO_2 and flavour compounds through lactose heterofermentation and citrate utilization. Although the biotechnological role of the citrate metabolism is very important and widely appreciated, little is known about the genetic properties of *Leuconostoc* spp. In our laboratory, we cloned the genes responsible for citrate metabolism (*clyR mae citCDEFGOP* cluster), for D-lactate dehydrogenase (*ldhD*) and for phosphotransacetylase (*pta*). In addition we have planned to construct new vectors and we have tried to improve a method to introduce recombinant DNA molecules into *Leuconostoc* as well. Characterization of the plasmid involved in this study is still in progress. The nucleotide sequence analysis of p22R revealed the presence of C5 cytosine methylase gene typical of type II restriction/modification system. The low transformation efficiency of some strains of *Leuconostoc* may be due to the presence of that plasmid. The construction of the defective strain for restriction activity could be very useful to genetic manipulations of *Leuconostoc* in the future.

metabolic engineering / lactic acid bacteria / *Leuconostoc mesenteroides* / citrate / plasmid / restriction modification

Résumé — Les *Leuconostoc* sont utilisés dans l'industrie laitière pour leur capacité à produire du CO_2 et des composés d'arôme (diacétyle) grâce au cométabolisme du citrate et du lactose. Les gènes du métabolisme du citrate (*clyR mae citCDEFGOP*), de la lactate déshydrogénase et de la phosphotransacétylase ont été clonés dans notre laboratoire. Ces différents gènes semblent de bons candidats pour des expériences d'ingénierie métabolique. C'est pourquoi un des aspects de notre travail consiste à développer et améliorer les méthodes de transfert et de manipulation d'ADN de *Leuconostoc.* En parallèle, la caractérisation du plasmide de 10 kb de *L. mesenteroides* p22R est en cours. L'analyse de la séquence partielle a révélé la présence d'un gène codant pour une C5 cytosine méthylase. Cette méthylase est typique des systèmes de restriction/modification de type II. Il est possible que la présence

* Correspondance et tirés-à-part
Tél. : (33) 3 80 39 66 77 ; fax : (33) 3 80 39 66 40 ; e-mail : garmyn@u-bourgogne.fr

de ce plasmide soit responsable de la faible efficacité du transfert de l'ADN chez les *Leuconostoc*. La construction d'une souche R^-M^+ devrait faciliter les manipulations ultérieures des bactéries du genre *Leuconostoc*.

ingénierie métabolique / bactérie lactique / *Leuconostoc mesenteroides* / citrate / plasmide / restriction modification

1. INTRODUCTION

Les bactéries lactiques présentent un grand intérêt biotechnologique. Elles sont largement utilisées dans des procédés d'élaboration de produits alimentaires. En industrie laitière, les bactéries du genre *Leuconostoc* jouent un rôle important grâce à leur propriétés métaboliques, principalement la production de CO_2 et la synthèse de diacétyle.

La production du CO_2 par *Leuconostoc* provient de l'hétérofermentation du lactose et de l'utilisation du citrate. Dans la technologie des fromages à pâtes persillées, le CO_2 produit est à l'origine de la formation des cavités dans le caillé, qui seront ensuite peuplées par le *Penicillium*. Le diacétyle dont le citrate est le précurseur constitue le principal composé aromatique recherché dans les produits laitiers frais comme le beurre, le fromage frais et la crème fraîche. Cependant, d'autres composés issus de l'hétérofermentation tels que l'acétate et l'éthanol contribuent à la texture et à la flaveur de ces produits laitiers.

L'intérêt de notre laboratoire pour ces bactéries est fortement axé sur le cométabolisme sucre-citrate. Les études menées jusqu'il y a peu sont restées très descriptives. Avec le développement des techniques de biologie moléculaire, il nous ait apparu opportun de développer la recherche en génétique des bactéries hétérofermentaires. C'est pourquoi, nous avons entrepris un programme de recherche concernant deux axes principaux :

– la caractérisation des gènes du métabolisme sucre-citrate ;

– l'adaptation des outils (vecteurs…) existants ou la construction de nouveaux outils utilisables chez les *Leuconostoc*.

2. CARACTÉRISATION DES GÈNES DU MÉTABOLISME SUCRE-CITRATE

En observant un schéma simplifié du métabolisme des *Leuconostoc* (Fig. 1), il nous ait apparu que la voie de la conversion du citrate en acétate et pyruvate (Fig. 1A), le carrefour du pyruvate (Fig. 1B) et le carrefour de l'acétyl-P (Fig. 1C) constituent des cibles de choix pour l'étude de ce métabolisme. Notre laboratoire a donc entrepris le clonage des différents gènes impliqués. Ceci afin d'affiner les études entreprises précédemment, notamment du point de vue régulation. Les différents gènes clonés nous permettront la construction de mutants (délétion, surexpression, dérégulation), dont l'étude permettra une connaissance plus approfondie du métabolisme.

Chez les bactéries lactiques, le transport du citrate à travers la membrane cellulaire est assuré par une citrate perméase. Une fois dans la cellule, le citrate est clivé en acétate et oxaloacétate par une citrate lyase. L'oxaloacétate est décarboxylé en pyruvate qui est transformé en diacétyle par le biais d'une série de réactions intermédiaires [2] (Fig. 1). Le pool du pyruvate disponible pour les voies de synthèse du diacétyle dépend de l'activité des enzymes impliquées dans la bioconversion du citrate en pyruvate, le flux de carbone vers le pyruvate peut être modulé en jouant sur le niveau d'expression de la

citrate perméase [5]. Il est à noter aussi que le maintien du gradient de concentration dépend de la vitesse de disparition du citrate dans le milieu intracellulaire, donc de l'activité de la citrate lyase (dégradation du citrate en oxaloacétate et acétate) et de l'oxaloacétate décarboxylase (décarboxylation de l'oxaloacétate en pyruvate). L'activité de la citrate lyase est inductible par le citrate et disparaît rapidement après épuisement du citrate dans le milieu [3]. En revanche, chez *Lactococcus lactis* ssp. *diacetylactis* la citrate lyase est constitutive [17]. Les données physiologiques sur l'oxaloacétate

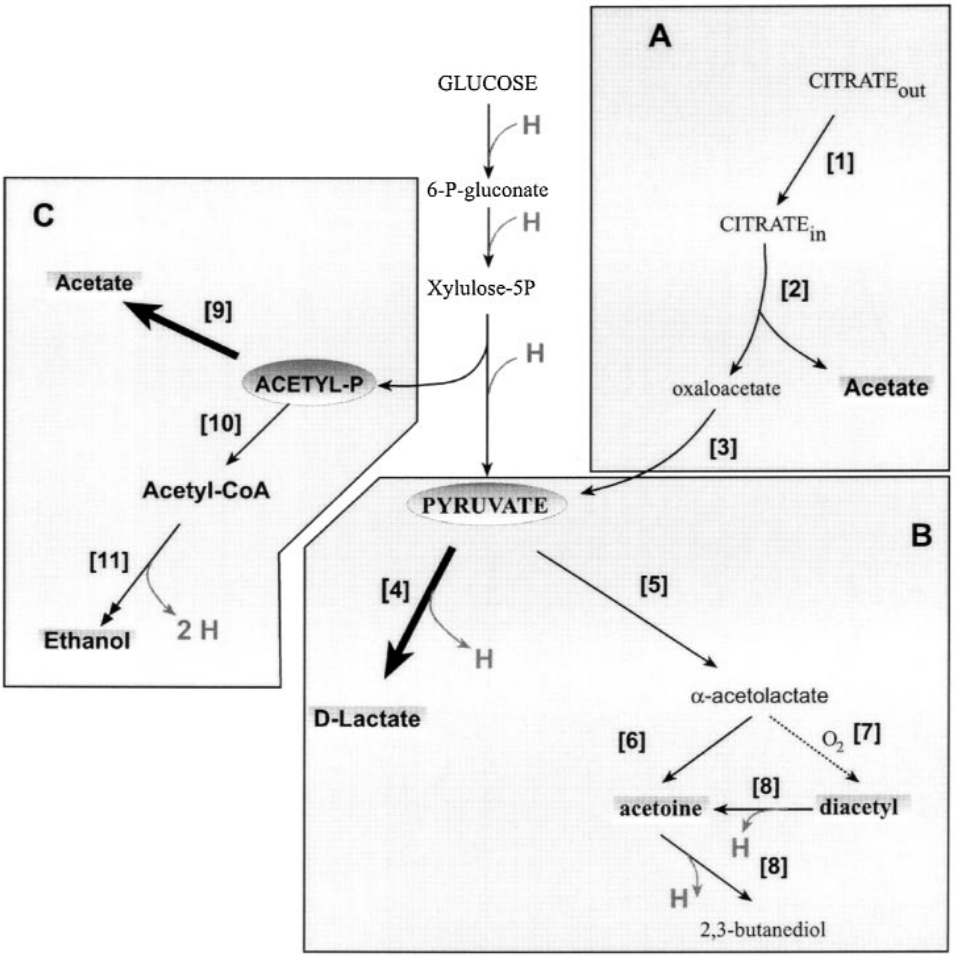


Figure 1. Schéma simplifié du cométabolisme sucre-citrate de *Leuconostoc mesenteroides* ; 1 citrate perméase, 2 citrate lyase, 3 oxaloacétate décarboxylase, 4 lactate déshydrogénase, 5 α-acétolactate synthase, 6 α-acétolactate décarboxylase, 7 décarboxylation non enzymatique, 8 2,3-butanediol déshydrogénase, 9 acétate kinase, 10 phosphotransacétylase, 11 alcool déshydrogénase.

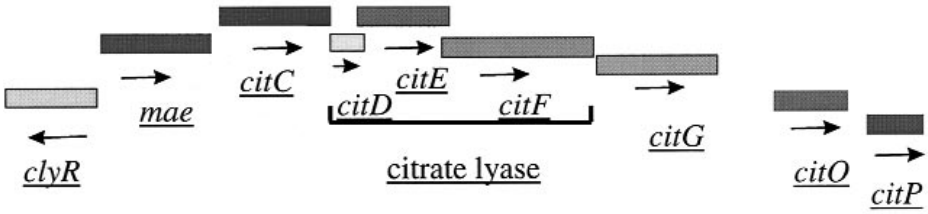
Figure 1. Pathways involved in glucose-citrate cometabolisme in *Leuconostoc mesenteroides*; 1 citrate permease, 2 citrate lyase, 3 oxaloacetate decarboxylase, 4 lactate dehydrogenase, 5 α-acetolactate synthase, 6 α-acetolactate decarboxylase, 7 non-enzymatic decarboxylation, 8 2,3-butanediol dehydrogenase, 9 acetate kinase, 10 phosphotransacetylase, 11 alcohol dehydrogenase.

décarboxylase des bactéries lactiques montrent que son activité est constitutive chez *Lactococcus* et inductible par le citrate chez *Leuconostoc* [23].

Le métabolisme du citrate a fait l'objet de nombreuses études chez les genres *Leuconostoc* et *Lactococcus* [7, 26]. Les études physiologiques ont mis en évidence l'importance des facteurs environnementaux tels que le pH, la concentration en sucre, en citrate et en oxygène comme étant des paramètres influents sur la synthèse des composés aromatiques par ces bactéries lactiques. Le mécanisme du transport du citrate est particulièrement bien établi chez ces deux genres bactériens. Chez *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* le transport du citrate à travers la membrane se fait par échange d'anions lactate produits lors du cométabolisme sucre/citrate contre la forme dianionique du citrate ($Hcit^{2-}$) [1].

Les gènes codant pour la citrate perméase (*citP*) localisés sur des plasmides de 7,9 kb chez *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis* et 23 kb chez *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *mesenteroides* [19] ont été clonés et caractérisés [1]. Chez ces souches, le phénotype citrate est un caractère instable lié à la perte du plasmide citrate [18]. Exception faite pour la souche *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* 195, où le caractère citrate semble stable.

Les recherches réalisées dans notre laboratoire ont permis la caractérisation de 6 gènes impliqués dans le métabolisme de l'acide citrique chez *L. mesenteroides* ssp. *cremoris* 195 [4]. Ces gènes sont regroupés sur le chromosome et appartiennent au locus : *clyR-mae-citCDEF*. La citrate lyase codée par *citDEF* forme un complexe fonctionnel de 3 protéines : une sous unité α codée par *citF*, une sous unité β codée par *citE* et une sous unité γ codée par *citD*. L'activation de ce complexe par acétylation est réalisée grâce à une citrate lyase ligase codée par *citC*. Le gène *mae* code pour une enzyme malique NAD^+-dépendante présumée, clyR code pour une protéine similaire aux régulateurs de la famille SorC. En aval du locus citrate lyase (*citCDEF*), 3 autres gènes sont



clyR : protéine régulatrice présumée (312 a.a.)
mae : enzyme malique (342 a.a.)
citC : citrate lyase ligase (348 a.a.)
citD : acyl carrier protéine (97 a.a.)
citE : sous unité β (302 a.a.)
citF : sous unité α (512 a.a.)
citG : fonction inconnue (467 a.a.)
citO : protéine similaires aux lipases/ estérases (265 a.a.)
citP : protéines identiques aux citrate permeases (69,5 %).

clyR: putative regulator (312 a.a.)
mae: malic enzyme (342 a.a.)
citC: citrate lyase ligase (348 a.a.)
citD: acyl carrier protein (97 a.a.)
citE: β sub-unit (302 a.a.)
citF: α sub-unit (512 a.a.)
citG: unknow function (467 a.a.)
citO: similar to lipase/esterase (265 a.a.)
citP: citrate permease (69.5 %).

Figure 2. Organisation des gènes du locus citrate chez *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* 195.

Figure 2. Genetic organization of *clyR mae citCDEFGOP* cluster in *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* 195.

identifiés, *citG, citO et citP* (Fig. 2). Le gène *citG* code pour une protéine de fonction inconnue, *citO* code pour une protéine de 265 acides aminés similaire aux lipases estérases dont la fonction dans le métabolisme du citrate n'est pas encore établie, aucun gène similaire à *citO* n'est présent dans les locus citrate lyase des autres bactéries. Par contre la séquence du gène *citP* est incomplète et code pour une citrate perméase chromosomique (CitP, 384 acides aminés), alors que les autres citrate perméases des bactéries lactiques sont plasmidiques. Cette protéine présente 70 % d'identité avec la citrate perméase des autres bactéries lactiques.

L'analyse transcriptionnelle du locus citrate lyase a révélé que *mae, citCDEF* sont cotranscrits en un ARN messager de 5.2 kb détecté uniquement lorsque les cellules sont cultivées en présence de citrate. En ce qui concerne *citG, citO* et *citP* l'analyse transcriptionnelle montre que ces gènes sont transcrits sur un ARN messager de 4 kb détecté uniquement lorsque les cellules sont cultivées en présence de citrate. La méthode de RT-PCR nous a permis de mettre en évidence un grand transcrit indécelable par northern blot, l'expérience d'extension d'amorce nous permettra de situer le site d'épissage du grand transcrit.

Chez les *Leuconostoc*, comme chez les autres bactéries lactiques la quasi totalité du pyruvate est convertie en lactate. Il est pourtant possible de réorienter le métabolisme lorsque l'on fait varier certains paramètres de culture tels que la disponibilité en oxygène, la nature et la quantité de la source de carbone, le pH… Plusieurs études d'ingénierie métabolique ont été réalisées sur les LDH de bactéries lactiques, la plus aboutie est sans conteste celle réalisée chez *Lactobacillus plantarum* [9–11].

Chez *L. mesenteroides*, la fermentation emprunte la voie des pentoses-P et non la glycolyse, une mole de glucose ne produit qu'une mole de pyruvate. Le pyruvate produit est ensuite réduit en lactate de forme D, avec réoxydation simultanée du cofacteur NADH en NAD^+. Le D-lactate produit peut ensuite être utilisé lors de la synthèse du précurseur du peptidoglycane, ce qui permet à ces bactéries la résistance à la vancomycine [14]. Le gène *ldhD* de *L. mesenteroides* a été cloné et séquencé [8]. L'analyse transcriptionnelle montre que ce gène est transcrit en un ARN messager monocistronique.

L'hétérofermentation des sucres chez *Leuconostoc* aboutit à la production de différents composés tels que le lactate, le CO_2, l'éthanol et l'acétate. Le métabolisme de ce dernier est étroitement lié à celui de deux principaux intermédiaires métaboliques : l'acétyl-CoA et l'acétyl-P. Chez *Leuconostoc* deux enzymes clés sont impliquées dans ce carrefour métabolique, l'acétate kinase qui catalyse la transformation de l'acétyl-P en acétate en produisant de l'énergie sous forme d'ATP et la phosphotransacétylase responsable de la transformation de l'acétyl-P en acétyl-CoA (Fig. 1). L'acétyl-CoA intervient dans plusieurs voies de biosynthèse des acides gras, acides aminés (leucine, lysine...). L'acétyl-P semble également intervenir comme donneur de groupement phosphate pour la phosphorylation des protéines régulatrices chez *E. coli* [22].

En théorie, chez les *Leuconostoc*, la compétition pour l'acétyl-P par l'acétate kinase et la phosphotransacétylase détermine la répartition du flux de carbone. L'acétate kinase dirige le flux de carbone vers la production d'acétate, ce qui permet la formation d'ATP nécessaire à la croissance. La phosphotransacétylase oriente le flux vers la production d'acétyl-CoA utilisé pour la synthèse de biomasse (acides aminés, acides gras...) ou la réoxydation du NADH via l'alcool déshydrogénase. Vu le double rôle que joue l'acétyl-P chez *Leuconostoc*, il est possible que ce carrefour soit soumis à un contrôle strict. Très peu de travaux ont été réalisés pour élucider les mécanismes de régulation de ce nœud métabolique. L'étude de l'effet de l'oxygène sur le métabolisme et la croissance de différentes souches de

Leuconostoc a montré que les cultures aérées ont un taux de croissance supérieur et produisent plus de biomasse [20]. Un effet de l'aération sur l'activité spécifique des différentes enzymes intervenant dans cette voie métabolique a été également noté, dont l'augmentation de celle de la phosphotransacétylase et la diminution de celle de l'acétate kinase en absence d'oxygène [20]. Les résultats préliminaires de nos travaux montrent le même effet sur la phosphotransacétylase. Une étude plus poussée nous permettra de mieux comprendre la régulation de ce carrefour.

Le gène *pta* de *Leuconostoc* a été cloné et séquencé dans notre laboratoire. L'organisation génétique de la région contenant le gène est différente de celles trouvées chez les autres bactéries déjà étudiées notamment l'absence d'association avec le gène de l'acétate kinase. Les résultats de l'analyse transcriptionnelle montrent que le gène de la phosphotransacétylase est exprimé en un transcrit monocistronique et les expériences d'extension d'amorce ont permis de mettre en évidence l'extrémité 5' du messager. D'autres expériences sur l'expression du gène sont en cours.

3. DÉVELOPPEMENT DES OUTILS GÉNÉTIQUES

Des techniques de transfert efficaces (transformation, conjugaison) sont disponibles pour la plupart des espèces. De nombreux vecteurs réplicatifs et intégratifs ont été construits [21]. Un système d'intégration chromosomique est disponible et permet d'échanger des allèles sans laisser de traces sur le chromosome [15], les constructions ainsi obtenues sont stables.

Pour les *Leuconostoc*, les outils indispensables à l'introduction de matériel génétique n'ont pas été développés et l'utilisation des outils développés chez les autres bactéries lactiques n'a pas été couronnée de succès. Nous avons dû orienter une partie de nos recherches vers le développement d'outils commodes pour la manipulation des *Leuconostoc*. Notre choix s'est porté sur un vecteur utilisé pour la manipulation de souches de *Streptococcus sobrinus* [6]. Ce vecteur (pDL289Δ202) présente plusieurs caractéristiques intéressantes. C'est un vecteur navette *E. coli* bactéries Gram$^+$, il peut être mobilisé par les plasmides conjugatifs de la famille pAMβ1 (pIP501 par exemple) ce qui nous permet de le transférer par transformation ou conjugaison. Il est également instable, cette instabilité est le résultat d'une délétion de 202 nucléotides dans l'origine de réplication. Cette mutation ne peut pas être complémentée par les plasmides de *Leuconostoc*.

Une première tentative d'utilisation chez les *Leuconostoc* a été réalisée dans notre laboratoire. Le gène *ldhD*, interrompu par l'insertion d'un gène de résistance à l'érythromycine, a été transféré chez *Leuconostoc mesenteroides* ssp. *cremoris* 195. Ce plasmide s'est révélé particulièrement instable (0,1 % de CFU kanamycine résistantes après 100 générations). Ce qui nous a permis d'obtenir l'intégration de ce plasmide au locus *ldhD*. A ce jour, nous n'avons pu obtenir la mutation Δ*ldhD*. Malgré ces premiers résultats encourageants, ce plasmide ainsi que d'autres constructions n'ont pu être transférés dans les différents *Leuconostoc* testés. Ces résultats laissent présumer que les *Leuconostoc* testés se révèlent réfractaires à l'entrée d'ADN étranger ce qui pourrait suggérer l'existence de systèmes de restriction modification.

Le rôle de l'ADN extra chromosomique dans les caractéristiques des souches industrielles est bien documenté. L'ADN plasmidique est connu pour déterminer les métabolismes des sucres, de l'azote, la production des exopolysaccharides, les mécanismes de résistance aux phages et la production des bactériocines. Comme beaucoup de bactéries lactiques, les espèces de *Leuconostoc* contiennent un ou plusieurs plasmides de tailles différentes [25]. À l'exception de

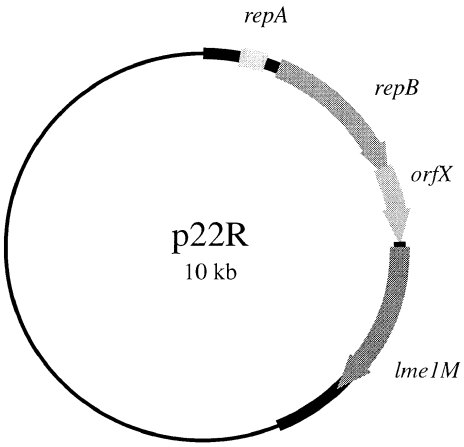


Figure 3. Carte de p22R. L'origine de réplication repA est indiquée par une boîte. Les séquences potentiellement codantes sont indiquées par les flèches. La séquence actuellement déterminée est indiquée par le trait épais.

Figure 3. Circular map of p22R. The replication origin (*repA*) is indicated by a box. Potential coding sequences are indicated by arrows. Bold line is sequence determinated at present.

quelques-uns de ces plasmides [16, 19] les fonctions codées restent inconnues.

Notre choix s'est porté sur la souche de *L. mesenteroides* 22R. Cette souche semble ne contenir qu'un plasmide de 10 kb (Fig. 3). Un sous-clone *Hind*III de 3,4 kb a été inséré dans le pUC18 et la séquence de ce fragment a été réalisée. L'analyse de cette séquence révèle que le contenu en G + C est de 31 % ce qui n'est pas surprenant puisque les régions riches en A + T sont typiques des réplicons plasmidiques. La séquence consiste en une région non codante (*repA*) suivie de deux séquences potentiellement codantes (*repB* et *orfX*). La région *repA* contient une séquence particulièrement riche en A + T (86 %) ainsi que deux séquences directement répétées (DRI et DRII). DRI est répétée deux fois et DRII est une séquence de 22 pb répétée en tandem. Le gène *repB* code potentiellement pour une protéine de 384 résidus fortement similaire à la protéine de réplication du plasmide pJW563 de *L. lactis* [12]. Le premier codon de *orfX* chevauche *repB*, ce qui suggère un couplage traductionnel de ces deux séquences codantes. *orfX* est longue de 507 pb et bien que *orfX* soit généralement associée à *repB*, la fonction de la protéine potentiellement codée reste inconnue. Les caractéristiques de *repA* et les fortes identités de séquences de RepB et OrfX suggèrent que le plasmide p22R appartient à une famille de plasmides se répliquant par le mode thêta [13]. Les caractéristiques de cette origine de réplication ainsi que la séquence entière de ce plasmide est actuellement en cours de réalisation.

Le début d'une troisième ORF a été détecté 144 pb en aval de la fin de *orfX*. Cette ORF (*lmeIM*) code potentiellement pour une protéine similaire aux C5-cytosine méthyltransférases. Ces méthylases sont typiques des systèmes de restriction/modification de type II. L'association méthylase endonucléase est fréquente pour les plasmides de bactéries lactiques [24], il est donc probable que le plasmide p22R code pour un système de restriction modification. La construction d'une souche de *Lactococcus* possédant le gène *lmeIM* est en cours, ce qui devrait permettre une amélioration de l'efficacité de transfert de l'ADN entre *Lactococcus* et *Leuconostoc*. Nous envisageons également le développement d'une souche de *Leuconostoc* sans plasmide. Ces modifications devraient à terme faciliter les manipulations génétiques des bactéries du genre *Leuconostoc*.

RÉFÉRENCES

[1] Bandell M., Lhotte M.E., Marty-Teysset C., Veyrat A., Prévost H., Dartois V., Diviès C., Konings W.N., Lolkema J.S., Mechanism of the citrate transporters in carbohydrate and citrate cometabolism in *Lactococcus* and *Leuconostoc* species, Appl. Environ. Microbiol. 64 (1998) 1594–1600.

[2] Bekal S., Diviès C., Prévost H., Citrate lyases of lactic acid bacteria, Lait 78 (1998) 3–10.

[3] Bekal S., van Beeumen J., Samyn B., Garmyn D., Henini S., Diviès C., Prevost H., Purification of *Leuconostoc mesenteroides* citrate lyase and cloning and characterization of the *citCDEFG* gene cluster, J. Bacteriol. 180 (1998) 647–654.

[4] Bekal-Si Ali S., Diviès C., Prévost H., Genetic organization of the *citCDEF* locus and identification of mae and *clyR* genes from *Leuconostoc mesenteroides*, J. Bacteriol. 181 (1999) 4411–4416.

[5] Bourel G., Bekal S., Diviès C., Prévost H., Citrate permease gene expression in *Lactococcus lactis* subsp *lactis* strains IL1403 and MG1363, FEMS Microbiol. Lett. 145 (1996) 367–370.

[6] Buckley N.D., Lee L.N., Leblanc D.J., Use of a novel mobilizable vector to inactivate the *scrA* gene of *Streptococcus sobrinus* by allelic replacement, J. Bacteriol. 177 (1995) 5028–5034.

[7] Cogan T., Co-metabolism of citrate and glucose by *Leuconostoc* spp. effects on growth substrates and products, J. Appl. Bacteriol. 63 (1987) 551–558.

[8] Dartois V., Phalip V., Schmitt P., Diviès C., Purification, properties and DNA sequence of the D-lactate dehydrogenase from *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris*, Res. Microbiol. 146 (1995) 291–302.

[9] Ferain T., Schanck A.N., Delcour J., ^{13}C nuclear magnetic resonance analysis of glucose and citrate end products in an *ldhL-ldhD* double-knockout strain of *Lactobacillus plantarum*, J. Bacteriol. 178 (1996) 7311–7315.

[10] Ferain T., Garmyn D., Bernard N., Hols P., Delcour J., *Lactobacillus plantarum ldhL* gene: overexpression and deletion, J. Bacteriol. 176 (1994) 596–601.

[11] Ferain T., Hobbs J.N. Jr., Richardson J., Bernard N., Garmyn D., Hols P., Allen N.E., Delcour J., Knockout of the two *ldh* genes has a major impact on peptidoglycan precursor synthesis in *Lactobacillus plantarum*, J. Bacteriol. 178 (1996) 5431–5437.

[12] Gravesen A., Josephsen J., von Wright A., Vogensen F.K., Characterization of the replicon from the Lactococcal theta-replicating plasmid pJW563, Plasmid 34 (1995) 105–118.

[13] Gravesen A., von Wright A., Josephsen J., Vogensen F.K., Replication regions of two pairs of incompatible lactococcal theta-replicating plasmids, Plasmid 38 (1997) 115–127.

[14] Handwerger S., Pucci M.J., Volk K.J., Liu J.P., Lee M.S., Vancomycin resistant *Leuconostoc mesenteroides* and *Lactobacillus casei* synthesize cytoplasmic peptidoglycan precursors that terminate in lactate, J. Bacteriol. 176 (1994) 260–264.

[15] Hols P., Ferain T., Garmyn D., Bernard N., Delcour J., Use of homologous expression-secretion signals and vector-free stable chromosomal integration in engineering of *Lactobacillus plantarum* for α-amylase and levanase expression, Appl. Environ. Microbiol. 60 (1994) 1401–1413.

[16] Huang D.Q., Prévost H., Kihal M., Diviès C., Instability of plasmid encoding for β-galactosidase in *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, J. Appl. Bacteriol. 34 (1994) 23–30.

[17] Hugenholtz J., Citrate metabolism in lactic acid bacteria, FEMS Microbiol. Rev. 12 (1993) 165–178.

[18] Kihal M., Prévost H., Lhotte M.E., Huang D.Q., Diviès C., Instability of plasmid-encoded citrate permease in *Leuconostoc*, Lett. Appl. Microbiol. 22 (1996) 219–223.

[19] Lin J., Schimtt P., Diviès C., Characterization of citrate-negative mutant of a *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* metabolic and plasmidic properties, Appl. Microbiol. Biotechnol. 34 (1991) 628–631.

[20] Lucey C.A., Condon S., Active role of oxygen and NADH oxidase in growth and energy metabolism of *Leuconostoc*, J. Gen. Microbiol. 132 (1986) 1789–1796.

[21] Maguin E., Duwat P., Hege T., Ehrlich S.D., Gruss A., New thermosensitive plasmid for Gram-positive bacteria, J. Bacteriol. 174 (1992) 5633–5638.

[22] McCleary W.R., Stock J.B., Ninfa A.J., Is acetyl phosphate a global signal in *Escherichia coli*, J. Bacteriol. 175 (1993) 2793–2798.

[23] Mellerrick D., Cogan T.M., Induction of some enzymes of citrate metabolism in *Leuconostoc lactics* and other heterofermentatives acid bacteria, J. Dairy Res. 48 (1981) 497–502.

[24] Nyengaard N., Vogensen F.K., Josephsen J., Restriction-modification systems in *Lactococcus lactis*, Gene 157 (1995) 13–18.

[25] Orberg P.K., Sandine W., Common occurrence of plasmid DNA and vancomycin resistance in *Leuconostoc* spp., Appl. Environ. Microbiol. 48 (1984) 1129–1133.

[26] Schmitt P., Diviès C., Merlot C., Utilisation of citrate by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *cremoris* in continuous culture, Biotechnol. Lett. 12 (1990) 127–130.