

유전자 조작에 의한 유산균주 개량



경기대학교 식품가공학과 이 호

I. 서 론

유산균(Lactic acid bacteria)은 현대과학이 발달하기 오래전부터 많은 발효제품에 관련되어 왔으며, 미생물학의 발전과 더불어 이들 제품에서의 유산균의 역할이 밝혀지게 되었다. 유산균들은 많은 발효제품에 맛, 향기 및 형상 등의 독특한 특성을 부여해 준다. 유산균 발효제품에 사용되는 starter 균주는 원래 원유나 식물체와 같은 자연조건에서 분리해서 사용되었다. 그러나 산업적으로 이용되는 여러종의 유산균주들은 그 특징적 대사능력이 불안정하고 제품의 특성에 따라 여러 면에서 균주의 개량이 필요하게 되었다. 균주의 개량은 주로 자연적인 선택에 의존하였으며 유전학적 균주개량은 극히 제한되어 있었다.

유전공학의 발달과 더불어 최근에는 유산균의 유전학적 연구가 활발히 진행되어서 특징적 대사능력을 가진 유전자의 분리와 특성의 규명이 이루어졌으며, 새로운 유전공학 기술을 이용한 유산균주의 개량에 관한 많은 연구가 행하여지고 있다(Froseth와 McKay, 1991). 유산균에 대한 유전학적 연구의 목적은 1) 발효속도, 발효에 사용되는 재료의 단순화, phage에 대한 내성, 항생물질에 대한 내성 등을 개선하고, 발효 중이나 제품의 저장시에 오염과 부패를 방지함으로써 전체제품과 생산과정을 개선하고(표 1) 2) 새로운 식품의 제조와 공정이 가능케하고 3) 유산균에 의한 예방과 치료효과를 증진하는데 있다(Mercenier와 Chassy, 1988). 최근 유산균주의 개량에 대한 연구는 세가지 중요한 영역에 그 초점을 맞추고 있다. 첫째 앞으로 산업적으로 중요한 유전자의 성격규명과 cloning, 둘째 유산균에 적합한 유전자 전달계(gene transfer system)의 개발, 셋째

cloning vector의 개발이다(Froseth와 McKay, 1991). 이 논문에서는 발효제품에 관여하는 유산균들의 유전학적 연구 및 새로운 균주개량법에 대하여 최근 발표된 자료를 토대로 기술하려 한다.

II. 유산균의 plasmid와 대사능력

유제품 발효에서 유산균의 세가지 중요한 대사기능은 유당발효, 단백질 분해능력과 citrate 발효를 들 수 있다. 유산균에 있어서 불안정한 이같은 대사기능들은 오랜 동안 알려져 왔으나 이같은 불안정성을 설명하려는 시도는 거의 없었다. 그러나 지난 15년 동안 plasmid에 대한 지식의 진보와 기술의 발달이 이루어져 이들 대사기능의 불안정성을 설명하게 되었다. 지금은 유산균들이 여러가지 다른 크기의 plasmid와 많은 종류의 plasmid를 함유하고 있다는 것이 증명되었다. 대부분의 plasmid는 기능이 알려져 있지 않으나 일부는 확인할 수 있는 특성을 가진 것으로 밝혀졌다(McKay, 1988). 예를 들면 *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* HP Lac⁻ Prt⁻ 변이주는 8 Mdal plasmid를 잃은 것이고, *L. lactis* ssp. *cremoris* Wg2의 Prt⁻ 변이주는 16 Mdal plasmid가 없는 것이고, *L. lactis* ssp. *lactis* C2의 Lac⁺ Prt⁻ 변이주는 12 Mdal과 18 Mdal plasmid를 잃은 것이다. 또한 *L. lactis* ssp. *cremoris* B1의 Lac⁻ Prt⁺ 변이주는 13 Mdal plasmid를 *lactis* ssp. *lactis* C2, ML3, C10, M18의 Lac⁻ Prt⁻ 변이주는 각각 30, 33, 40, 45 Mdal plasmid를 잃은 것이다. *L. lactis* ssp. *diacetylactis* Cit⁻ 변이주는 5.5 Mdal plasmid를 잃었으며 이 plasmid는 다른 균주에는 존재하는 것으로 밝혀졌다(Kempler와 McKay, 1979). *Lactobacilli*(유산간균)에서 분리된 첫번째 plasmid는 Lac-

Table 1. Recent research areas for lactic starter culture improvement.

AREA	RESEARCH GROUP (S)
Lactose Metabolism	Klaenhammer and Sanozky, 1985
Sucrose Metabolism	DeVos and Simmon, 1988; Schmidt <i>et al.</i> , 1989 Gonzalez and Kunka, 1985; Steele and McKay, 1986
Proteolytic Enzyme Production	Kok and Venema, 1988
Phage Resistance	Murphy <i>et al.</i> , 1988; Sanders, 1988 Froseth and McKay, 1991 Klaenhammer and Sing, 1991
Bacteriocin Production	Muriana and Klaenhammer, 1987 Klaenhammer, 1988; Stoddard <i>et al.</i> , 1991
Antibiotic Resistance	Lin and Savage, 1986 Parada and Giacchi, 1986
Nicin Resistance	von Wright, 1991 Hughes and McKay, 1991

tobacillus casei 64 M에서 분리된 35 Kb 크기의 pLZ 64이다(Chassy, 1978). 이 plasmid를 잃은 균주들은 유당 발효능력을 상실한다는 것이 밝혀졌다. 이와 같은 결과를 종합하여 보면 유산균의 특징적 대사에 plasmid가 관여하고 있다는 사실을 알 수 있다.

또한 plasmid는 다른 당류들(sucrose, galactose, mannose, xylose)의 발효, nicin 생성, phage 내성 및 항생물질에 대한 내성에 관련되어 있다(McKay, 1988). 그러므로 plasmid 연구는 여러 측면에서 중요하다. 먼저 plasmid는 세포분열시에 쉽게 소실된다는 사실이 밝혀져 이로써 유제품 발효의 중요한 기능이 자연적으로 상실되는 이유를 밝혀주었다. Bacteria는 다른 균주와 혼합배양에서 다른 plasmid를 얻음으로써 새로운 성질을 나타낼 수도 있다. 또한 만일 특정한 plasmid를 순수하게 분리할 수 있다면 여기서 특정한 유전자를 절단하여 cloning할 수도 있으며 또한 다른 유전자를 삽입하여 cloning vector로서 사용할 수도 있다. 그러므로 plasmid는 유산균주의 개량에 있어서 중요한 역할을 한다.

여기에 기술한 바와 같이 지금까지는 유산균의 유전학적 연구는 plasmid와 관련된 표현형의 성격 규명과 plasmid의 이용에 그 초점을 맞추었으며, 유산균의 염색체(chromosome)에 대한 연구는 거의 이루어지지 않았다. 그러나 최근에 염색체에서 유래된 유전자의 분리와 동정에 관한 연구가 시작되고

있다(Luchansky 등, 1991).

III. 유산균 cloning vector(전달인자)

특정한 유전자들을 상업적 starter 균주에 cloning하기 위해서는 적절한 cloning vector들이 필요하다. 그리하여 바람직한 균주에 cloned DNA를 소개하는데 가장 중요한 유전자 전달계의 개발이 빠른 속도로 진전되고 있다. *Lactobacillus casei*에 적합한 vector로서 pSA3(Dao & Ferretti, 1985), pNZ12(DeVos, 1987)와 pLP825가 적합하며, 이들 plasmid들이 *L. casei*로부터 분리될 수 있었으며, 제한 효소 처리시 어떤 변화도 보이지 않았다고 보고되었다. *L. casei* 내로 전달된 plasmid들 중에서 pLP 825만이 유산간균에서 직접 파생된 vector이었다고 보고되었다. 그밖에도 지금까지 유산균에 적합한 많은 vector들이 개발되었으나 대부분은 약물치료제(human drug therapy)에 사용되는 항생물질에 저항성을 가진 선택표지(selection marker)를 함유하고 있기 때문에 식품제조에 관여하는 균주에는 적합하지 않다. Food-grade cloning vector는 반드시 식품제조에 인정된 미생물에서 유래된 DNA로 구성되어야 하며 사람과 동물의 약물치료제로 사용되지 않는 선택표지를 가지고 있어야 한다는 사실을 고려해야 한다(Froseth와 McKay, 1991).

Table 2. Transformation of lactobacilli by Electroporation.

SPECIES	Frequency (transformant/ viable cell)	Efficiency ^a (transformants/ µg DNA)
<i>Lactobacillus</i>		
<i>casei</i>	10 ⁻¹ -10 ⁻⁴	10 ⁴ -10 ⁷
<i>acidophilus</i>	10 ⁻³ -10 ⁻⁵	10 ³ -10 ⁵
<i>plantarum</i>	10 ⁻³ -10 ⁻⁵	10 ³ -10 ⁵
<i>reuteri</i>	10 ⁻² -10 ⁻⁴	10 ⁵ -10 ⁶
<i>bulgaricus</i>	10 ⁻⁴ -10 ⁻⁶	10 ² -10 ³
<i>helveticus</i>	10 ⁻³ -10 ⁻⁵	10 ³ -10 ⁵
<i>salivarius</i>	10 ⁻² -10 ⁻⁴	10 ⁴ -10 ⁶

^aThe data are summarized from Chassy and Flickinger (1987), Muriana *et al.* (1988), Luchansky *et al.* (1989), Aukrust and Nes (1988), Mercenier and Chassy (1988).

최근 *L. lactis* ssp. *lactis* biovar. *diacetylactis* DRC 3로부터 분리된 60 Kb plasmid인 pNP40의 DNA로 구성된 7.6 Kb plasmid의 합성이 이루어졌다(Froseth 등, 1988). pFM001이라고 명명된 이 plasmid는 pNP40에서 유래된 원래의 복제를 가지고 있었으며, *L. lactis* ssp. *lactis*에 의해 생성된 항미생물제인 nicin에 저항성을 보였다. 그리하여 이 연구자들은 pFM001이 유산균에 적합한 food-grade cloning vector로서 이용이 가능한지에 대하여 연구하였다(Froseth와 McKay, 1991). 그들의 결과에 따르면 pFM001과 이의 재조합 유도체들은 *L. lactis* ssp. *lactis*에서 비교적 안정하였으며, pFM001 전체가 유산균의 DNA로부터 유래된 사실과 선택표지로서 Nic^r를 사용했기 때문에 유산균에 적합한 food-grade cloning vector로서 pFM001의 사용 가능성을 시사하였다(Froseth와 McKay, 1991).

IV. 유전자 전이방법

재조합 DNA 기술을 이용하여 새로운 균주를 만드는 데 형질전환이 꼭 필요하며, 이때 유산균 내로 DNA를 전달하는 데는 여러가지 방법들이 이용된다. 이들 유전자 전달방법 중에서 전기형질전환(Electroporation)이 가장 효율이 높으며 좋은 방법이다. 그러나 때때로 외래 DNA를 도입하는 다른

기술들을 이용할 필요가 있기 때문에 그들에 대한 방법과 응용에 관하여 간단히 소개하려 한다.

1. Electroporation에 의한 형질전환

Electrofusion(Zimmermann과 Vienken, 1982)이나 Electroporation(Neumann 등, 1982)의 기술들은 고전압 전기 방전에 세포를 노출시키는 동안에 일어나는 세포막 투과성의 변화를 이용한 것이다(Chassy 등, 1988). 살아있는 세포가 강한 전기장에 놓이게 되면 세포막에 변화가 일어나게 된다. 임계전압에서 세포막은 탈분극이 되고 세포막에 손상이 초래된다. 이에 따라 거대분자들이 자유롭게 이동할 수 있는 구멍이 만들어지게 된다. 다시 전장을 제거하면 투과될 수 있는 세포막의 구멍이 막히게 된다.

Electroporation은 전기방전에 의해 virus DNA가 세포내로 투과되어지는 전이(transfection) 과정을 말하며, 원래 세포벽이 없는 진핵세포에 이용하기 위해 개발되었다. 세포벽의 두꺼운 층은 형질전환을 시키는 DNA의 침투를 막는 장벽의 역할을 하며, 세균은 대부분의 진핵세포들보다 직경이 훨씬 더 작기 때문에 더 높은 전장강도를 주어야 했다(Chassy 등, 1988). Electroporation 과정은 쉽게 행하여질 수 있다. 세포를 세척한 후 현탁액을 만들어 DNA와 함께 냉각된 시료실에 넣고 전원공급장치를 이용해서 세포와 DNA의 혼합물에 순간적으로 고전압 방전을 시킨다. 그 다음은 새로 획득한 유전자가 발현될 수 있도록 세포들을 성장배지에 키운 후, 그 배양액을 선택배지에 옮겨 선별한다(그림 1).

근래에 여러 종류의 세균에서 이 방법을 통하여 유전물질이 성공적으로 전달된 사실이 보고된 바 있다(Calvin과 Hanawalt, 1988). 유산균에 있어서 electroporation에 의한 형질전환은 *L. lactis* ssp. *lactis*에서 처음 시도되었다(Harlander, 1986). 그 후에 이 방법이 많이 개선되어서 높은 빈도로 형질전환이 이루어질 수 있었으므로 많은 유산균들이 이 방법을 통해서 형질전환되었다(Muriana 등, 1988; Luchansky 등, 1989; McIntyre와 Harlander, 1989; Aukrust와 Nes, 1988). 특히 Luchansky들(1989)은 이 방법에 의해 형질전환된 균을 최대한으로 회수하기 위해 중요한 요인들, 즉 전압, 완충용액, 세포의 나이와 농도를 최적화시키는 연구를 했다. 표 2는 electroporation에 의한 유산균들의 형질전환의 빈도

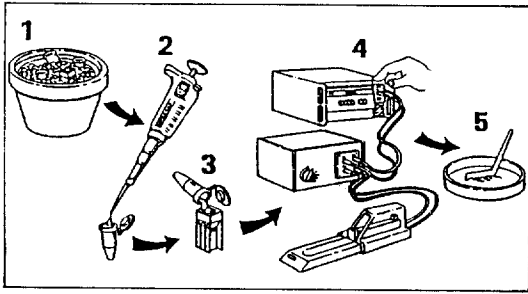


Fig. 1. Apparatus used for electroporation of bacteria.

와 효율을 보여준다. 최근에 발표된 유산균의 유전학적 균주개량에 대한 연구에서도 이 방법을 많이 사용했다(Luchansky 등, 1991; Hughes와 McKay, 1991; Roseth와 McKay, 1991).

2. Liposome을 매개로 하는 원형질체 변이(proto-plast transfection)

리포솜을 매개로하는 원형질체 변이는 처음에 유용한 재조합균을 얻지 못했기 때문에 가치를 인정받지 못했다. 이 기술은 레시틴으로 만든 조그만 소낭으로 파아지 유전단위 DNA를 싸서, 그 소낭을 polyethylene glycol과 함께 원형질체에 융합시킨다. 세포들은 삼투압적으로 안정화된 배지에서 배양되어 파아지 지시균주(phage indicator strain)와 함께 반고형 한천면(soft agar overlay)에 도포하여 일정시간 배양하면 파아지 plaque가 나타난다. 각 plaque는 변이된 하나의 원형질체를 나타낸다. 이 방법은 원형질체 사용시 빈번히 발생하는 비효율적이고 느린 재생과정이 없으며, 형질전환체가 없는 세균을 형질변환시킬 때 나타나는 실패의 원인을 결정하는데 어려움이 없다는 잇점이 있다(Mercenier와 Chassy, 1988).

유산균에 있어서 원형질체 변이는 처음으로 *L. casei*에서 연구되었으며 변이가 이루어지기 위해서 리포솜이 필요하다는 사실이 밝혀졌다(Shimizu-kadota와 Kudo, 1984). Boizet들(1988)은 *L. casei*와 *L. bulgaricus*에서 높은 빈도(10^6 - 10^7 transformants/ug phage DNA)로 변이(transfection)가 일어났다고 보고하고 있다.

3. 원형질체 형질전환(proto-plast transformation)

몇가지 종의 유산간균들 *L. reuteri*(Morelli 등, 1987)와 *L. acidophilus*(Lin과 Savage, 1986)에서는

리포솜이 없이 원형질체 형질전환이 일어날 수 있다고 보고되었다. 이 실험과정은 protoplast transfection과 유사하나 두가지 중요한 차이점이 있다. 이 과정은 형질전환체를 재생시킬 필요가 없으나, 표적세균에서 발현되고 유지될 형질전환 DNA의 확인이 요구된다(Morelli 등, 1987).

4. Phage에 의한 유전자 전달(Transduction)

*E. coli*와 *B. subtilis*를 연구하는 사람들에게 귀중한 도구인 이 형질도입(transduction)이 유산균에서도 이루어지고 있다. *L. lactis* ssp. *lactis* C2에서 temperate bacteriophage가 존재함이 밝혀지고(McKay와 Baldwin, 1973), 그 후 이 유산균에서 phage에 의한 형질도입이 발견되었다(McKay, 1973). 특히 낙농 starter culture에서는 유당발효 중의 안정화가 바람직함으로 이 연구자들은 *L. lactis* ssp. *lactis* C2의 chromosome에 통합된 유당발효 중의 안정화된 Lac⁺ transductant를 분리해냈다(McKay와 Baldwin, 1979).

유산간균(Lactobacilli)를 공격하는 phage들이 흔하지는 않지만 몇몇 phage에 대한 연구가 되었으며(Mata와 Ritzenthaler, 1988, Sechaud들, 1988), Raya들(1989)은 temperate phage를 이용하여 *L. acidophilus* ADH 안으로 plasmid의 형질도입을 꾀하였다.

5. 접합(conjugation)에 의한 유전자 전달

접합은 물리적 접촉에 의한 유성적 방법으로 유전물질이 donor cell에서 recipient cell로 옮겨지는 것이다. 접합을 통한 균주의 개량은 재조합 DNA 기술을 필요로 하지 않는 장점을 가지고 있다. 광범위한 숙주범위를 가지는 gram 양성 R-factor들이 유산균 안으로 접합에 의해 전달된다는 사실이 알려졌다(Gasson과 Davis, 1980; Shrago들, 1986, 1988).

L. casei ATCC 4646은 독자적으로 전달될 수 있는(self transmissible) plasmid를 가지고 있으며 유당 분해 능력이 없는 균주에 이 plasmid가 전달되면 유당 대사능력을 갖게 된다는 사실이 알려졌다(Chassy와 Rokaw, 1981). 또한 일부 *L. acidophilus*에서는 bacteriocin과 내성에 관여하는 plasmid의 접합이 이루어진 형질전환에 대한 연구가 보고된 바 있다(Muriana와 Klaenhammer, 1987). 유산균에서도 접합에 의한 유당발효에 관련된 plasmid의 전이가

발견되었다(Kempler와 McKay, 1979). 이들은 plasmid가 제거된 *L. lactis* spp. *lactis* C2 변이주를 recipient로 하고 *L. lactis* spp. *diacetylactis* 18-16을 접합한 결과 18-16 균주의 유당대사에 관련된 유전자가 41 Mdal plasmid에 연결되었다는 사실을 밝혔다. 또한 Group N Lactococci는 chromosome이나 plasmid에 관련된 전달인자(transfer factor)를 가지고 있다고 제안되었고, 이 factor는 lactose plasmid로 옮겨짐으로 plasmid의 전이빈도(transfer frequency)가 매우 높다고 보고되었다. 이 높은 빈도의 접합은 균주개량에서 유전정보의 신속한 교환방법을 제공함으로써 중요하게 여겨진다.

유산균에 의한 생육저해 물질(bacteriocin-like substance)의 생산에 관하여 많이 알려져 있다. 이 물질들은 부패성 세균이나 병원성 세균의 생육을 억제하는 것으로 알려져 있다(McKay, 1988). 또한 이같은 현상은 복합균주의 starter culture에서 한 균주의 다른 균주에 대한 우세성을 나타내는데 영향을 미칠 수도 있다. Scherwitz들(1983)은 *L. lactis* ssp. *diacetylactis* WM14의 생육저해물질의 생성능력이 *L. lactis* ssp. *lactis*에 형질전환되는 사실을 발표했다. 이같이 생육저해 물질 생성을 조절하는 유전적 factor를 다른 유산균에 이전하는 능력을 이용하여 궁극적으로 우유나 육류 또는 야채 발효 과정에서 부패성·병원성 세균의 생육을 억제하는 능력을 가진 균주로 만들어 낼 수도 있는 것이다.

V. 결 론

지금까지 발효 유제품에 사용되는 유산균주를 대상으로 유전학적인 연구 및 균주개량법에 대하여 살펴본 바와 같이 지난 10여년 동안의 유산균주의 유전학적 연구는 유산균주의 개량면에서 볼 때 많은 초석이 될 것이다. 지금도 많은 분야에서 연구가 진행되고 있으나, 아직도 초기단계에 있다. 그러나 더 많은 유산균 유전자들이 분리 및 동정되고, 유산균 염색체내로 안정되게 유전자를 연결시키는 system이 개발된다면, 발효과정의 수율을 높이고 최종 산물의 질을 더욱 향상시킬 수 있을 것이다.

참고문헌

1. Aukrust, T. and I.F. Nes, *FEMS Microbiol. Lett.* **52**: 127 (1988).
2. Biozet, B., J.L. Flickinger and B.M. Chassy, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 3014 (1988).
3. Calvin, N.M. and P.C. Hanawalt, *J. Bacteriol.* **170**: 2796 (1988).
4. Chassy, B.M., E.V. Gibson and A. Giuffrida, *Current Microbiol.* **1**: 141 (1978).
5. Chassy, B.M. and J.L. Flickinger, *FEMS Microbiol. Lett.* **44**: 173 (1987).
6. Chassy, B.M., J.L. Flickinger and A. Mercenier, *Trends in Biotech.* **6**: 303 (1988).
7. Dao, M.L. and J.J. Ferretti, *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 115 (1985).
8. DeVos, W.M., *FEMS Reviews* **46**: 281 (1987).
9. DeVos, W.M. and G. Simons, *Biochimie* **70**: 461 (1988).
10. Froseth, B.R. and L.L. McKay, *J. Dairy Sci.* **74**: 1445 (1991).
11. Gasson, M.J. and F.L. Davies, *J. Bacteriol.* **143**: 1260 (1980).
12. Gonzalez, C.F. and B.S. Kunka, *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 627 (1985).
13. Harlander, S.K., In *Streptococcal Genetics* eds. by Ferretti, J.J. and R.C. Curtiss, ASM Publications, pp.229-233.
14. Hughes, B.F. and L.L. McKay, *J. Dairy Sci.* **74** (Suppl. 1): 120 (1991).
15. Kempler, G.M. and L.L. McKay, *Appl. Environ. Microbiol.* **37**: 1041 (1979).
16. Klaenhammer, T.R. and R.B. Sanozky, *J. Gen. Microbiol.* **131**: 1531 (1985).
17. Klaenhammer, T.R., *Biochimie* **70**: 303 (1988).
18. Klaenhammer, T.R. and W.D. Sing, *J. Dairy Sci.* **74** (Suppl. 1): 120.
19. Kok, J. and G. Venema, *Biochimie* **70**: 475 (1988).
20. Lin, J.H.C. and D.C. Savage, *J. Gen. Microbiol.* **132**: 2107 (1986).
21. Luchansky, J.B., P.M. Muriana and T.R. Klaenhammer, *Mole. Microbiol.* **2**: 637 (1989).

22. Luchansky, J.B., M.C. Tennant and T.R. Klaenhammer, *J. Dairy Sci.* **74**: 3293 (1991).
23. Mata, M. and P. Ritzenthaler, *Biochemie* **70**: 395 (1988).
24. McIntyre, D.A. and S.K. Harlander, *Appl. Environ. Microbiol.* **55**: 2621 (1989).
25. McKay, L.L. and K.A. Baldwin, *Appl. Microbiol.* **25**: 682 (1973).
26. McKay, L.L., B.R. Cords and K.A. Baldwin, *J. Bacteriol.* **115**: 810 (1973).
27. McKay, L.L. and K.A. Baldwin, *Appl. Environ. Microbiol.* **36**: 360 (1979).
28. McKay, L.L., In Bacterial starter cultures for food, ed. by S.E. Gilliland, CRC Press, Inc. pp.161-163 (1988).
29. Mercenier, A. and B.M. Chassy, *Biochemie* **70**: 503 (1988).
30. Morelli, L., P.S. Cocconcelli, V. Bottazzi, G. Damiani, L. Ferretti and V. Sgaramella, *Plasmid* **17**: 73 (1987).
31. Muriana, P.M. and T.R. Klaenhammer, *Appl. Environ. Microbiol.* **53**: 553 (1987).
32. Murphy, M.C., J.L. Steele, C. Daly and L.L. McKay, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1951 (1988).
33. Neumann, E., M. Schaefer-Ridder, Y. Wang and P.H. Hofschneider, *EMBO J.* **1**: 841 (1982).
34. Parada, J.L. and M.P. Giacchi, *J. Dairy Sci.* **69**: 2031 (1986).
35. Sanders, M.E., *Biochemie* **70**: 411 (1988).
36. Schmidt, B.F., R.M. Adams, C. Requadt, S. Power and S. Mainzer, *J. Bacteriol.* **171**: 625 (1989).
37. Shimizu-Kadota, M. and S. Kudo, *Agri. Biol. Chem.* **48**: 1105 (1982).
38. Shrago, A.W., Chassy, B.M. and W.J. Dobrogosz, *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 574 (1986).
39. Shrago, A.W. and W.J. Dobrogosz, *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 824 (1988).
40. Steele, J.L. and McKay, L.L., *Appl. Environ. Microbiol.* **51**: 57 (1986).
41. Stoddard, G.W., J.P. Petzel and L.L. McKay, *J. Dairy Sci.* **74** (Suppl. 1): 83 (1991).
42. von Wright, A., S. Wessels, S. Tynkkyinen and M. Saarela, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 2029 (1990).
43. Zimmerman, U. and J. Vienken, *Membr. Biol.* **67**: 165 (1982).