

폐렴구균 Type 23 협막다당류 생산의 최적화

민관기 · 표석능 · 이동권*

성균관대학교 약학대학

Optimization of the Capsular Polysaccharide Production from *Streptococcus pneumoniae* Type 23

Kwan-Kee MIN, Suhk-Neung PYO, Dong-Kwon RHEE*

College of Pharmacy, Sungkyunkwan University, Su-Won 440-746, Korea

(Received August 2, 1999; accepted August 31, 1999)

Abstract – *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) is the most frequent causative agent of acute bacterial pneumonia. Outstanding characteristic of pneumococcus is an ample polysaccharide capsule that is highly antigenic agent and is the major factor for classification of pneumococcus into more than 94 serotypes. In this study, production of capsular polysaccharide from *Streptococcus pneumoniae* type 23 was optimized by supplementation of metal ions or by modulation of culture conditions. When brain heart infusion (BHI) broth was supplemented with 1 mM concentration of CaCl_2 , CuSO_4 and MgSO_4 , growth of pneumococcus as well as polysaccharide yield were stimulated. Also slight aeration gave rise to better polysaccharide yield.

Key words □ *Streptococcus pneumoniae*, Type 23, capsule, polysaccharide

그람 양성균인 폐렴구균 (*Streptococcus pneumoniae*)은 폐렴, 수막염, 류마티스성 심장병, 중이염, 패혈증 등을 일으키며 전체 폐렴의 90% 이상이 이 세균에 의해서 발병되고 있다. 특히 15세 이상의 어린이나 어른에서 발병되는 수막염의 경우에도 폐렴구균이 주된 원인균으로 알려져 있다(Willett, 1992).

폐렴구균 성분중에서 항원으로 작용하는 물질로는 협막 다당류, C substance, F antigen, M protein 등이 있다. 협막 다당류는 친수성 gel을 형성하는 복합다당류로 구성되어 있고, 다당류를 구성하고 있는 단당류, 이당류 및 여러 가지 화합물들의 복합체가 다양하게 존재하여 serotype 도 94 가지 이상이 존재하지만 폐렴구균의 높은 형질전환효율 때문에 serotype수는 더욱 증가될것으로 예상된다 (Willett, 1992; Henrichsen, 1995). 현재 사용되고 있는 23가 다당류백신은 1967-84년까지 미국에서 환자로부터 분리한 폐렴구균 5800개의 폐렴균주를 대상으로 폐렴균 협막의 serotype을 결정한 결과 23가지 type(1, 2, 3, 4, 5, 6B, 7F, 8, 9N, 9V, 10A, 11A, 12F, 14, 15B, 17F, 18C, 19A, 19F, 20, 22F, 23F, 33F) 이 전체환자의 90% 이상을 차지하고 있기 때문에 23가지 type의 폐렴구균으로부터 협막다당류를 분리 정제하여 직접 백신으로 사용되거나 (Robbins와 Robbins, 1986) toxoid와 conjugate 시켜 백신

(Anttila 등, 1999; Seong 등, 1999)으로 사용되고 있다.

현재까지 폐렴구균의 배양에는 defined media(Adams와 Roe, 1945), synthetic medium(Sicard, 1964), casein hydrolysate(CAT) broth(Porter와 Guild, 1976), brain heart infusion(BHI) broth, tryptic soy broth 등이 알려져 있으나 어떤 배지가 협막 다당류 생산에 적합한지는 거의 보고된 바 없다. 즉, 폐렴구균 type 4 균주의 협막 다당류 생산을 위해 CAT broth를 주원료로 하는 배지의 최적화실험에서 단당류 탄수화물, 아미노산 첨가, 약간의 공기를 넣어 주면서 금속이온을 첨가하는 것이 다당류 수율을 증가시키는 현상에 대해 보고된 바 있다(Kim 등, 1996). 그러나 폐렴구균은 94가지 이상의 다양한 type의 협막 다당류가 존재하므로 본 실험에서는 백신/백신원료로 사용되는 type23 협막 다당류의 수율을 높이기 위한 연구를 수행하였다. 즉 L-rhamnose : D-galactose : D-glucose : phosphate (35 : 31 : 32 : 3)를 함유한 Type 23 균주(Richards와 Perry, 1988) 를 이용하여 여러 가지 배지에서의 생장을 측정하고 그중 생장이 잘되는 배지를 선정하여 금속이온을 첨가하여 생장 및 다당류 생성에 미치는 효과를 측정하였다.

실험방법

폐렴구균 Type 23의 종균배양액

*To whom correspondence should be addressed.

BHI 배지에서 폐렴구균의 한 집락을 접종하여 37°C에서 배양하여 550 nm에서 흡광도가 0.3에 도달하였을 때 glycerol을 10% 되도록 첨가하여 -65°C에서 보관한 것을 종균배양액으로 사용하였다.

배지 종류에 따른 Type 23의 성장

CAT 배지(Casitone 1%, Trypton 0.5%, NaCl 0.5%, Yeast Extract 0.1%, Glucose 0.2%, 0.5 N K_2HPO_4 3.4%), BHI 배지, Defined media 5 ml에 Type 23의 종균배양액 50 μ l를 각각 접종하고, 37°C에서 배양하면서 1시간마다 탁도(550 nm에서의 흡광도)를 측정하였다.

조다당류의 분리(Campbell과 Pappenheimer, 1966)

BHI 배지에 폐렴구균을 접종하여 550 nm에서 흡광도가 최고점에 도달할 때까지 37°C에서 배양한 다음 phenol을 1% 되도록 첨가하여 세포를 용해시켰다. 세포용해액에 -70°C로 냉각시킨 ethanol을 1/2 용량 가하여 4°C에서 3시간 방치한 다음 40°C에서 10,000 \times g로 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전물을 1/20 용량의 증류수에 완전히 용해하고 chloroform : butanol(5 : 1)을 1/5 용량 가하여 추출한 후 10,000 \times g에서 15분간 원심분리하여 상등액을 취하였다. 이 상등액에 hexadecyl trimethyl ammonium bromide를 0.2%가 되도록 가하고 -70°C로 냉각시킨 ethanol을 2배 용량 가하여 4°C에서 1시간 방치한 후 원심 분리(10,000 \times g \times 30분)하여 상등액을 제거하고 침전물을 증류수에 용해하여 검액으로 하였다.

Total sugar assay(Orcinol-sulphuric acid assay, White와 Kennedy, 1986)

검액 600 μ l과 표준액(Starch 2, 4, 8, 16, 32 μ g 함유) 600 μ l에 시약 A(H_2SO_4 에 0.2% orcinol을 용해하여 4°C에 보관한 것)를 2.4 ml씩 가하여 80°C에서 15분간 끓인 후 실온에서 냉각하여 420 nm에서 흡광도를 측정하여 당량을 산출하였다.

배지의 초기 pH 변화에 따른 성장곡선의 변화

BHI 배지 50 ml의 초기 pH를 각각 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10으로 조절한 후 종균배양액 0.5 ml을 가하여 37°C에서 8시간 동안 배양하면서 550 nm에서 흡광도를 측정하고 조다당류를 분리하였다.

금속 이온의 변화에 따른 조다당류 생성

50 ml의 BHI 배지에 종균 배양액 0.5 ml을 접종하고 $MnSO_4$, $MgSO_4$, $FeSO_4$, $CuSO_4$, $CoCl_2$, $CaCl_2$, EDTA를 농도별로 첨가한 후 37°C에서 배양하면서 흡광도를 측정하여 성장곡선을 작성하고 성장최고점에서 균을 수확하여 조다당류를 분리하였다.

통기에 따른 성장곡선의 변화

종균배양액 1 ml을 BHI 배지 100 ml에 접종하여 37°C에서 0, 50, 100, 150, 200 rpm으로 진탕(New Brunswick Scientific Co. Incubator Shaker) 배양하면서 성장곡선을

작성하고 1시간 간격으로 균을 수확하여 조다당류를 분리하였다.

결과 및 고찰

배지종류에 따른 폐렴구균 type 23의 성장곡선

폐렴구균의 배양이 가능하다고 알려진 배지 중에서 defined media, synthetic medium에서는 type 4 폐렴구균이 생육하지 않았으므로 (Kim 등, 1996) 본 실험에서는 type 23 균주의 성장을 비교하기 위해 여러 가지 배지에 type 23 균주를 접종한 후 흡광도를 측정하였다. BHI 배지와 CAT 배지에서 폐렴구균 type 23 균주를 배양했을 때 550 nm에서 최대흡광도가 모두 0.57이었지만 흡광도가 0.4에 도달하기까지 CAT 배지에서는 9시간 이상이 소요되고 BHI 배지에서는 6시간이 소요되었다. 그러나 defined media, synthetic medium, tryptic soy broth에서는 생육이 용이하지 않아 (data 제시하지 않음) 본 실험에서는 BHI 배지를 기본배지로 이용하였다.

폐렴구균의 성장곡선과 시간별 헤파막 다당류 양

생장에 따른 헤파막 다당류 양의 변화를 관찰하기 위해 매 시간마다 성장곡선과 헤파막 다당류의 양을 측정하였다. 그 결과 성장 최고점(흡광도 0.43)에서 헤파막 다당류의 양이 배지 1 liter 당 2.6 mg 이었으나 (Fig. 1) 그 이후에는 흡광도 및 헤파막 다당류 양이 더 이상 증가되지 않았다. 이렇게 다당류의 양이 감소되는 이유는 영양분의 고갈로 헤파막 다당류를 영양원으로 이용하기 때문인 것으로 추정된다.

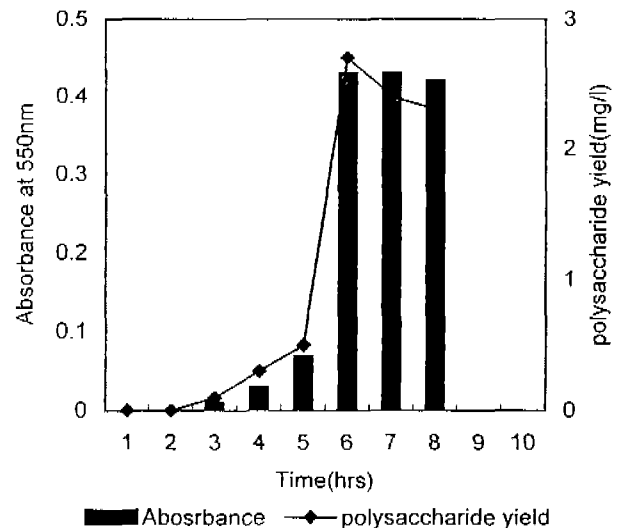


Fig. 1. Growth curve and polysaccharide yield of pneumococcus type 23 in BHI broth. Pneumococcus was incubated at 37°C in BHI broth and absorbance (vertical bar) was measured each time at 550 nm. Polysaccharide yield (filled diamond) was defined as mg per liter of culture broth.

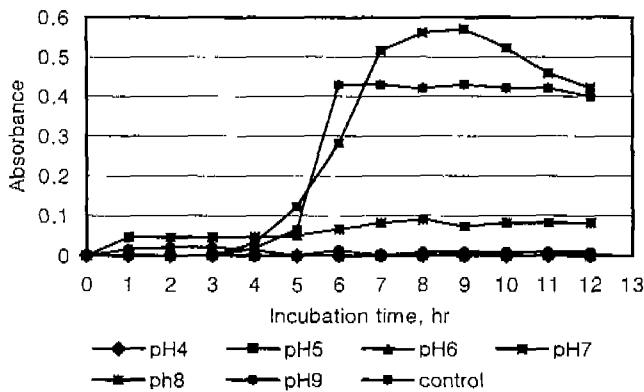


Fig. 2. Effect of initial pH on growth of pneumococcus type 23. Pneumococcus was incubated at 37 °C in BHI broth and absorbance was measured each time at 550 nm.

배지의 초기 pH 변화에 따른 폐렴구균의 성장과 협막 다당류 양

*Streptococcus cremoris*의 성장과 최고 성장률, 초기 pH 변화에 따른 lactic acid의 생산량 등을 비교한 실험에서는 pH가 균주의 성장과 lactic acid의 생산량에 큰 영향을 미치며 배지의 pH를 지속적으로 조절하는 것이 조절하지 않는 것보다 성장을 증가시킨다고 보고되었다(Boquien 등, 1988). 즉 배지에서의 초기 pH가 균주의 성장과 대사 산물의 생성 등에 큰 영향을 미치고 있음을 제시하였으므로 본 실험에서는 초기 pH를 4.0에서 9.0으로 조절한 BHI 배지에 type 23 균주를 접종한 후 성장을 측정하였다. 초기 pH를 4, 5, 6, 8로 조절하였을 때에는 생장이 매우 느리거나 억제되었으나 초기 pH를 7로 조절한 BHI 배지에서는 최대 성장점에 도달하였으며 협막 다당류의 양도 가장 높았다(Fig. 2). 초기 pH를 조절하지 않은 배지(pH 7.6)에서는 초기 pH를 7로 조절했을 때 보다 빨리 정상기(stationary phase)에 도달하여 결국 배지의 초기 pH는 7 이나 7.6 사이가 가장 적합하였지만 초기 pH를 7.0으로 조절했을 때의 협막 다당류 양은 pH를 조절하지 않았을 때의 다당류 양과 큰 차이가 없었다(data 제시하지 않음). 자연상태에서 폐렴구균은 pH 변화가 심하지 않은 환경(인간의 비인후부)에서 서식하고 있으며 혈액 및 다른 여러 가지 영양분들, 예를 들면 아미노산, 단백질, 지방, 당류, 등에 의해 pH 변화가 완충되어 pH 변화 폭이 크지 않은 환경에서 존재한다. 따라서 pH가 0.4 정도만 증가하여도 생장이 억제됨을 나타내었다. 이와 같은 현상은 협막 다당류를 함유하지 않는 폐렴균주(R type)를 형질전환 시킬 때 3 mM의 HCl을 첨가하면 competence의 발현이 완전히 억제되지만 6 mM의 NaOH를 첨가하면 competence의 발현이 유도되는 것(Chen과 Morrison, 1987)과 유사하게 pH 조절에 의해 생장이 조절되고 있음을 제시하고 있다.

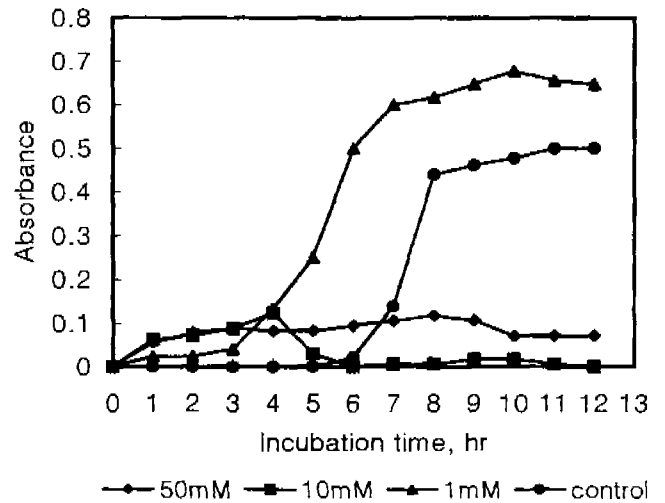


Fig. 3. Effect of calcium ion on growth of pneumococcus type 23 in BHI broth. Pneumococcus culture in BHI broth was supplemented with various concentrations of CaCl₂, and absorbance at 550 nm was measured to monitor growth of the cells.

금속 이온의 종류에 따른 폐렴구균의 성장과 협막 다당류 양

여러 종류의 금속이온들이 협막다당류 및 단백질 생산에 영향을 미친다는 보고(Cooper 등, 1981; Appanal, 1988)에 따라서 본 실험에서는 금속이온으로 MnSO₄, MgSO₄, FeSO₄, CuSO₄, CoCl₂, CaCl₂를 BHI 배지에 각각 농도 별로 첨가한 후 성장 및 협막다당류의 양을 측정하였다.

Ca⁺⁺ 이온을 0.5 mM 첨가하고 type 23 균주를 배양했을 때에는 흡광도의 증가가 관찰되지 않았으나(data 제시하지 않음) 1 mM을 첨가한 후 배양했을 때에는 지체기(lag phase)가 2시간 감소되고 최대성장점도 0.68까지 증가되었다(Fig. 3). 10 mM의 Ca⁺⁺ 이온을 첨가했을 때에는 배지 성분과 침전물을 형성하여 오히려 생장이 억제되었다(data 제시 않음). 그러나 0.5 mM 및 1 mM의 Ca⁺⁺ 이온을 첨가했을 때의 다당류양은 대조군과 차이가 없거나 오히려 감소되었다(Fig. 8).

Co⁺⁺ 이온 또는 EDTA를 BHI 배지에 0.5 mM 첨가한 후 type 23 균주를 배양했을 때에는 생장이 완전히 억제되었으며 이런 현상은 type 4 균주(Kim 등, 1996)에서도 관찰되었다(data 제시하지 않음).

Cu⁺⁺ 이온을 BHI 배지에 0.5 mM 첨가한 후 배양했을 때에는 Ca⁺⁺ 이온을 1 mM 첨가하고 배양했을 때와 유사하게 지체기가 3시간 정도 감소되고 생장이 촉진되며 최대 성장점도 대조군과 비슷하였으나(Fig. 4) 다당류의 양은 대조군 보다 2배 증가되었다(Fig. 8). 또한 Cu⁺⁺ 이온을 1 mM 첨가한 후 배양했을 때에는 지체기의 감소와 더불어 정상기에 빨리 도달하고 최대성장점도 0.3으로 감소되지만 다당류양은 대조군의 다당류 양에 비해 1.3배 증가되었다

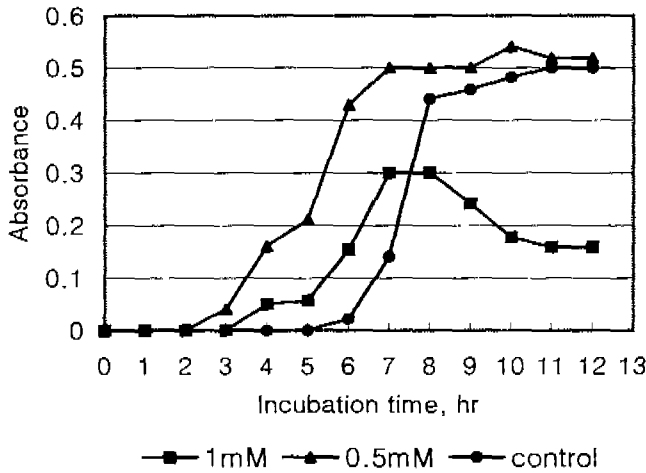


Fig. 4. Effect of copper ion on growth of pneumococcus type 23 in BHI broth. Pneumococcus culture in BHI broth was supplemented with various concentrations of CuSO_4 , and absorbance at 550 nm was measured to monitor growth of the cells.

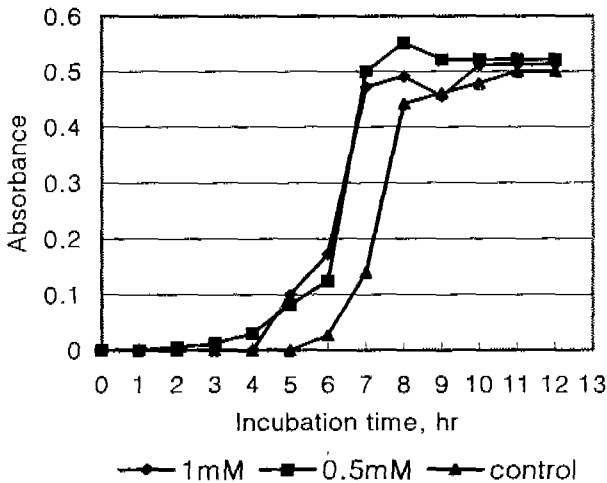


Fig. 5. Effect of iron ion on growth of pneumococcus type 23 in BHI broth. Pneumococcus culture in BHI broth was supplemented with various concentrations of FeSO_4 , and absorbance at 550 nm was measured to monitor growth of the cells.

(Fig. 8).

Fe^{++} 이온을 BHI 배지에 0.5 mM 첨가한 후 배양했을 때에는 지체기가 1시간 감소되지만 성장속도 및 최대성장점에는 유의성 있는 변화가 없었다. Fe^{++} 이온을 1 mM 첨가한 후 배양했을 때에는 BHI 배지 성분과 착화합물을 형성하여 접종직후의 흡광도가 증가하였으며 이로 인하여 최대성장점이 증가된 것처럼 관찰되었다. 따라서 Fe^{++} 이온을 1 mM 이상 첨가하는 실험은 실시하지 않았다(Fig. 5). 특이한 것은 type 4를 Fe^{++} 이온을 첨가한 CAT 배지에서 배양했을 때 다당류 양에 큰 변화가 없었지만 (Kim

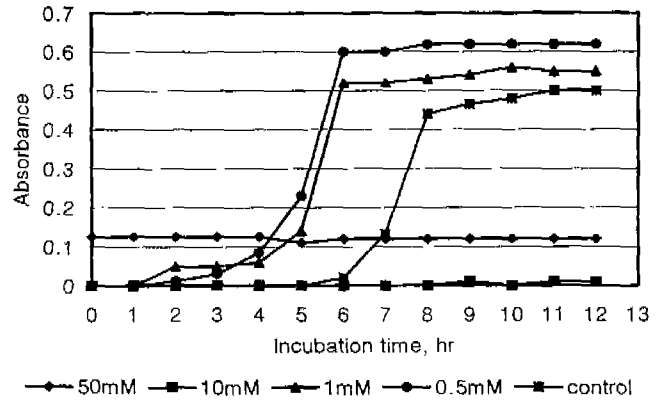


Fig. 6. Effect of magnesium ion on growth of pneumococcus type 23 in BHI broth. Pneumococcus culture in BHI broth was supplemented with various concentrations of MgSO_4 , and absorbance at 550 nm was measured to monitor growth of the cells.

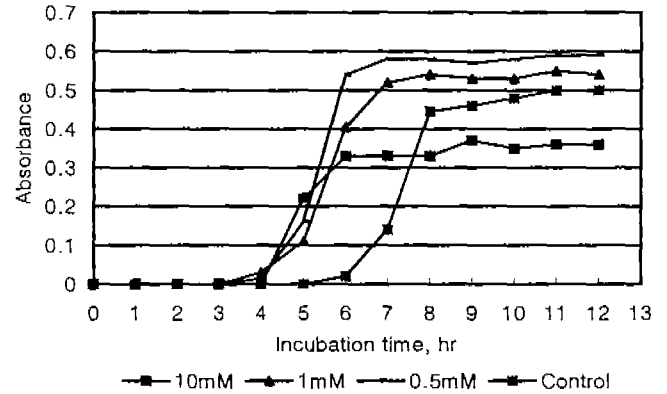


Fig. 7. Effect of manganese ion on growth of pneumococcus type 23 in BHI broth. Pneumococcus culture in BHI broth was supplemented with various concentrations of MnCl_2 , and absorbance at 550 nm was measured to monitor growth of the cells.

등, 1996) type 23에서는 BHI 배지에 Fe^{++} 이온을 0.5 및 1.0 mM 첨가하고 배양했을 때 다당류 양이 각각 대조군의 2.5배와 1.6배 증가된 점이다(Fig. 8).

Mg^{++} 이온 또는 Mn^{++} 이온을 BHI 배지에 0.5 mM 또는 1 mM 첨가한 후 배양했을 때에는 성장촉진효과가 관찰되어 지체기가 2시간 단축되었으며 대조군의 성장점보다 높은 성장점(최대 0.60 및 0.56)을 나타내었다. 이런 결과는 CAT 배지에 이들 이온을 첨가한 후 type 4 균주를 배양했을 때의 실험결과와 유사한 것이다(Fig. 6과 7). Mg^{++} 이온을 0.5 또는 1.0 mM 첨가한 BHI 배지에 type 23 균주를 접종한 후 배양했을 때 다당류 양은 오히려 대조군보다 현저히 감소되었으나 Mn^{++} 이온을 0.5 또는 1.0 mM 첨가한 후 배양했을 때에는 다당류 양이 각각 1.4 배 및 2.1배 증가되었다(Fig. 8).

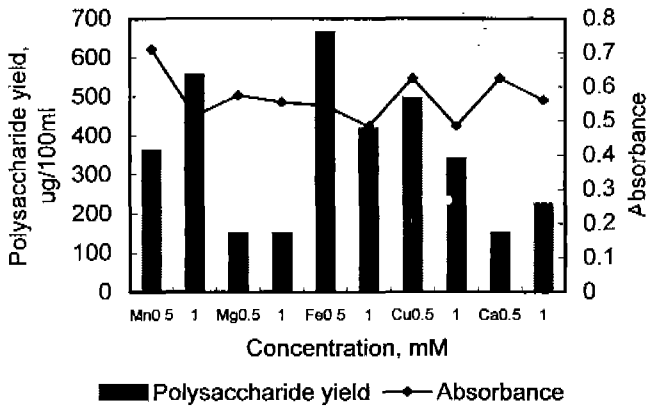


Fig. 8. Effect of metal ion on polysaccharide yield of pneumococcus type 23 in BHI broth. When several metal ions were added into BHI broth, and type 23 pneumococcus was incubated at 37°C and absorbance was measured at 550 nm. Polysaccharide yield (mg per liter of culture broth) was determined at the indicated absorbance.

병원균의 숙주에서는 Ca⁺⁺ 및 금속 이온이 유리된 상태로 존재하지 않고 세포 내에 저장된 형태로 존재하며 병원균이 숙주에 침투하면 이들 이온을 얻기 위해 숙주세포에 침투하거나 숙주세포를 파괴하여 필요한 이온들을 얻게 된다(Salyers와 Whitt, 1994; Peterson과 Niesel, 1988). 즉 enterohemorrhagic *E. coli* 균에서는 hemolysin과 유사한 독소를 생산하여 세포를 파괴하여 유리된 Ca⁺⁺ 이온을 얻지만 enteropathogenic *E. coli* 균은 숙주세포 표면에 부착하여 저장되어 있던 Ca⁺⁺ 이온을 숙주세포의 세포질로 방출시켜 Ca⁺⁺ 농도를 증가시킴으로써 숙주세포 단백질의 인산화와 세포골격의 변화를 야기시켜 microvilli의 형태를 변형시키고 이때 세균이 세포 안으로 침투하는 것으로 추정된다(Salyers와 Whitt, 1994; Pettersson 등, 1996; Zhang과 Normark, 1996). 이런 현상은 같은 세균에 속하는 균주 간에도 금속이온을 확보하기 위해서 각기 다른 기전이 이용되고 있으며 금속이온의 농도변화가 균의 독성발현과 밀접한 관계가 있음을 제시하고 있다. 따라서 폐렴구균에서도 균주 type에 따라 Ca⁺⁺ 및 금속이온에 대한 반응에 차이가 있어서 다당류 양 및 성장에 변화가 야기된 것으로 추정된다.

진탕에 따른 폐렴균의 성장과 협막 다당류 총량

일반적으로 공기중의 O₂가 전자전달계를 통해 H₂O₂를 생성하여 미생물 생장이 억제되며 catalase라는 효소를 생성하여 H₂O₂를 H₂O로 전환시키지만 폐렴구균은 통성 혐기성균으로 catalase가 존재하지 않아서 (Willett, 1992) 배양할 때에 일반적으로 통기가 불필요한 것으로 알려졌다. 그러나 Porschen(1976)은 통기에 의해 폐렴구균의 성장과 협막 다당류의 양이 증가된다고 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 0, 50, 100, 150 rpm(Incubater Shaker Series 25D,

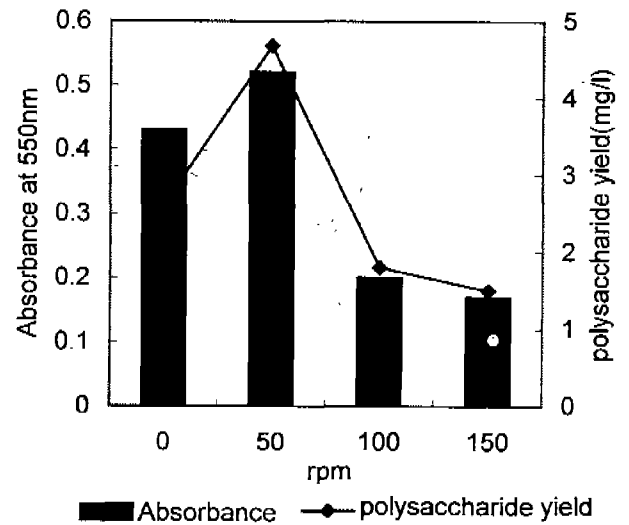


Fig. 9. Aeration effect on growth and polysaccharide production of pneumococcus type 23. When culture in BHI broth was aerated by rotatory shaking (0, 50, 100, 150 rpm) at 37°C, growth of pneumococcus was monitored by measuring absorbance at 550 nm (vertical bar). Polysaccharide yield was defined as mg per liter of culture broth (filled diamond).

New Brunswick Scientific Co.)으로 진탕하면서 각각 생장률과 협막 다당류의 양을 비교하였다. Type 23 균주를 100, 150 rpm으로 진탕했을 때에는 생장이 현저히 감소되었으나 50 rpm으로 진탕했을 때에는 진탕하지 않은 것과 큰 차이가 없었다. 그러나 협막 다당류의 양은 50 rpm에서 대조군 보다 1.8배 증가되었다(Fig. 9).

이상의 결과를 종합해 볼 때 폐렴구균의 협막 다당류 생산은 type에 따라 금속이온의 요구량에 다소 차이가 있으며 그 이유는 type에 따라서 협막 다당류의 조성이 다르기 때문인 것으로 사료된다. 그러나 진탕에 따른 효과는 type4와 type23 모두 50 rpm에서 협막 다당류 양이 최대치를 나타내고 있으므로 약간의 진탕을 하여주는 것이 협막 다당류 생산에는 도움이 될 것으로 사료된다. 진탕에 의해 협막 다당류 양이 증가하는 이유는 진탕에 의해 세포벽으로부터 협막 다당류가 분리되어 새로운 협막의 생성을 촉진시키기 때문으로 추정된다.

참고문헌

Adams, M. H. and Roe, A. S. (1945). A partially defined medium for cultivation of Pneumococcus. *J. Bacteriol.* **49**, 401-409.
 Anttila, M, Eskola, J., Ahman, H., Kayhty, H. (1999). Differences in the avidity of antibodies evoked by four different pneumococcal conjugate vaccines in early childhood. *Vaccine* **17**, 1970-1977.
 Appanal, V. D. (1988). Stimulation of exopolysaccharide

- production in *Rhizobium meliloti* JJ-1 by manganese. *Biotechnol. Lett.* **10**, 205-206.
- Boquien, C. Y., Corrieu, G. and Desmaseaud, M. J. (1988). Effect of fermentation conditions on growth of *Streptococcus cremoris* AM 2 and *Leuconostoc lactis* CNRZ 1091 in pure and mixed culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**, 2527-2531.
- Campbell, J. H. and Pappenheimer, A. M. (1966). Quantitative studies of the specificity of anti-pneumococcal polysaccharide antibodies, type III and VIII-I. *Immunochem.* **3**, 195-212.
- Chen, J. D. and Morrison, D. A. (1987). Modulation of competence for genetic transformation in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Gen. Microbiol.* **133**, 1959-1967.
- Cooper, D. G., Macdonald, C. R., Duff, S. J. B. and Kosaric, N. (1981). Enhanced production of surfactin from *Bacillus subtilis* by continuous product removal and metal cation additions. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**, 408-412.
- Henrichsen, J. (1995). Six newly recognized types of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* **33**, 2759-2762.
- Kim, S. N., Min, K. K., Choi, I. H., Kim, S. W., Pyo, S. N., and Rhee, D. K. (1996). Optimization of culture conditions for production of pneumococcal capsular polysaccharide type IV. *Arch. Pharm. Res.* **19**, 173-177.
- Peterson, J. W. and Niesel, D. W. (1988) Enhancement by calcium of the invasiveness of Salmonella for HeLa cell monolayers. *Rev. Infect. Dis.* **10** (Suppl 2), S319-322.
- Pettersson, J., Nordfelth, R., Dubinina, E., Bergman, T., Gustafsson, M., Magnusson, K. E. and Wolf-Watz, H. (1996). Modulation of virulence factor expression by pathogen target cell contact. *Science* **273**, 1231-1233.
- Porschen, R. K. (1976). A study of conditions favoring pneumococcal polysaccharide production. *Diss. Abstr. Int. B.* **33**, 834 (1976).
- Porter, R. D. and Guild, W. R. (1976). Characterization of some pneumococcal bacteriophage. *J. Virol.* **19**, 659-667.
- Richards, J. C. and Perry, M. B. (1988). Structure of the specific capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* type 23F (American type 23). *Biochem. Cell Biol.* **66**, 758-771.
- Robbins, F. C. and Robbins, J. B. (1986). Current status and prospects for some improved and new bacterial vaccine. *Annu. Rev. Public Health.* **7**, 105-125.
- Salyers, A. A. and Whitt, D. D. (1994). *Bacterial pathogenesis, a molecular approach*. ASM Press.
- Seong, S. Y., Cho, N. H., Kwon, I. C. and Jeong, S. Y. (1999). Protective immunity of microsphere-based mucosal vaccines against lethal intranasal challenge with *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **67**, 3587-3592.
- Sicard, A. M. (1964). A New Systemic Medium for *Diplococcus Pneumoniae*, and its use for the study of reciprocal transformations at the *amiA* locus. *Genetics* **50**, 31-44.
- White, C. A. and Kennedy, J. F. (1986). Oligosaccharides. In *Carbohydrate analysis: a practical approach* (Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. Ed.), pp. 37-38. IRL Press, Oxford.
- Willett, H. P. (1992). *Streptococcus pneumoniae*. In Zinsser Microbiology, (W. K. Joklik, H. P. Willett, D. B. Amos, and C. M. Wilfert, Ed.), 20 th ed., pp. 432-442. Prentice-Hall International Inc., London.
- Zhang, J. P. and Normark, S. (1996). Induction of gene expression in *Escherichia coli* after pilus-mediated adherence. *Science* **273**, 1234-1236.