

## *Streptococcus faecalis var. liquefaciens*에 존재하는 Plasmid DNA의 특성

姜国熙·李命基·朴淵姬\*

成均館大学校 農科大学

\*亞洲大学校 工科大学

(1985년 10월 21일 수리)

## Characterization of Plasmid DNA in *Streptococcus faecalis var. liquefaciens*

Kook Hee Kang, Myung Ki Lee and Yun Hee Park\*

College of Agriculture, Sung Kyun Kwan University

\*College of Engineering, A-Jou University

(Received October 21, 1985)

*Streptococcus faecalis var. liquefaciens* was examined for the presence of plasmid deoxyribonucleic acid. An analysis by agarose gel electrophoresis revealed the presence of at least four plasmids of approximately 6.8, 5.2, 2.6, and 2.1 Mdal. Two plasmid cured strains were obtained by novobiocin treatment. SKR2, which lost 5.2 Mdal plasmid (pSK2) and 2.1 Mdal plasmid (pSK4) was sensitive to lincomycin and erythromycin. However, all cured strains showed identical response as parental strain in sugar fermentation, temperature sensitivity, proteolytic activity, and liquefaction of gelatin. The results imply that pSK2 or pSK4 is associated with antibiotic resistance of *Str. faecalis var. liquefaciens*.

유제품의 제조에 사용하는 乳酸菌의 乳糖 발효성과 같은 중요한 성질이 菌株을 취급하고 보존하는 과정에서 소실되어 분해되고 있는데<sup>(1,2)</sup> 이와 같은 성질이 유산균의 plasmid에 의하여 유전적인 변화로 나타나는 현상이 밝혀지고 있다.

유업용 유산균에는 수종류에서 수십종류의 plasmid가 존재하는 것으로 McKay<sup>(3)</sup> 등은 보고하였으나 아직 그 기능은 확실히 밝혀져 있지 않은 것이 많다.

Anderson and McKay<sup>(4)</sup>는 *Str. cremoris* B<sub>1</sub>에서 36 Mdal의 plasmid가 유당대사에 관여하고 있으며, acriflavin 처리에 의하여 얻어진 Lac<sup>-</sup> 균주에서는 이 plasmid가 소실되었다고 하였고, Cords<sup>(5)</sup> 등도 *Str. lactis* C<sub>2</sub>, *Str. cremoris* B<sub>1</sub>, *Str. diacetylactis* 18~16에서 plasmid의 존재를 확인하였고, 또 Klaen-

hammer and Sutherland<sup>(6)</sup>은 *L. acidophilus*에서 13.7 Mdal과 6.3 Mdal의 plasmid를 분리하였다. Park and McKay<sup>(7)</sup>는 *Str. lactis* KB<sub>21</sub>로 실험한 결과에서 galactose transport system이 lactose plasmid에 존재한다고 하였다.

Kuhl<sup>(8)</sup>은 *Str. lactis* C10, ML3, M18의 변이균 중에서 C10의 Lac<sup>-</sup> Prt<sup>-</sup> 균주에는 40 Mdal의 plasmid가 소실되었고, ML3에서는 33 Mdal의 plasmid가, M18에서는 45 Mdal의 plasmid가 소실되었음을 보고하였고, Kempler와 McKay<sup>(9)</sup>에 의하면 *Str. lactis subsp. diacetylactis*의 유당분해에 41 Mdal의 plasmid가 관여한다고 하였다.

*Lactobacillus*의 plasmid에 대해서는 Chassy 등<sup>(10)</sup>이 최초로 보고하였는데 *L. casei subsp. casei* 64 H에서 유당발효성에 관여하는 23 Mdal의 plasmid

의 존재를 확인하였다. 유산균의 단백질 분해성은 유당발효성과 마찬가지로 유산균 starter의 중요한 성질인데, 이것도 유당발효성과 동시에 소멸 된다는 사실<sup>(12)</sup>이 보고되어 있으나 McKay and Baldwin<sup>(13)</sup>에 의하면 *Str. lactis* C<sub>2</sub>에서는 30 Mdal의 plasmid가 protease 생성을 지배하고 있다고 하였다. 또, *Lactobacillus*의 항생제 내성 plasmid에 대해서도 Ishiwa and Iwata<sup>(14)</sup>에 의해 최초로 보고 되었는데 *L. fermentum*에 tetracycline과 erythromycin의 내성 plasmid가 각각 10 Mdal과 36Mdal의 크기로 존재한다고 하였다.

*Str. lactis subsp. diacetylactis* DRC 3에서는 nisin과 phage에 대한 저항성에 관계있는 40 Mdal의 plasmid를 분리하였다고 McKay and Baldwin<sup>(15)</sup>은 보고하였다.

유산균의 plasmid에는 이상의 유전형질 이외에도 citrate 발효성<sup>(9)</sup>, bacteriocin sensitivity, conjugal activity, hemolysin, bacteriocin, ultraviolet 저항성 등의 형질이 관계하고 있는 것으로 알려지고 있다<sup>(16, 17)</sup>.

이와 같이 유업용 유산균의 여러가지 형질이 plasmid에 존재한다는 것은 그것을 취급, 보존하는데 어려운 점도 있으나 plasmid를 이용한 새로운 유업균주의 개발도 가능할 것이다. 실제로 여러가지 유산균 plasmid의 특성이 밝혀지면서, 각종 plasmid 특유의 새로운 형질을 유산균에 도입하기 위하여 transformation, transduction, conjugal transfer, protoplast fusion 등의 방법으로 연구된 결과가 보고되고 있다<sup>(18, 19)</sup>.

본 연구에서는 단백질 분해력이 강하여 치즈의 제조나 기타 유제품에 이용<sup>(20)</sup>되고 있는 *Str. faecalis var. liquefaciens* SKD 1007를 대상으로 하여 이 균의 plasmid 분포와 특성을 조사하고, 유당발효성과 단백질 분해성의 형질, 항생물질 내성형질, 기타 유산균의 형질이 plasmid와 어떻게 연결되어 있는지를 검토하여 유업용 유산균의 개량에 이용할 수 있는 기초정보를 수립하는데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 균주 및 plasmids

본 실험의 시험균주로서 본 연구실에서 보존하고 있는 유산균 *Streptococcus faecalis var. liquefaciens* SKD 1007과 plasmid DNA의 분자량 측정을 위한 표준균주로서는 *Str. lactis* ML 3 (분자량 33

Mdal, 5.5 Mdal, 2 Mdal, 1 Mdal의 plasmid를 보유)를 사용하였다.

### 배지

시험균의 증균배지로서는 MRS broth<sup>(21)</sup>, lactose 분해능의 시험 배지에는 glucose 대신에 lactose를 첨가한 BCP agar, protease의 생성 판별에는 Milk agar (Nutrient agar에 10% 환원멸균 탈지유를 10% 첨가)를 사용하였다. Plasmid분리를 위한 균주 배양에는 lysis broth<sup>(22)</sup>를 사용하였다.

### Curing agent처리

Curing agent로서 sigma chemical사의 acriflavin 20 µg/ml, novobiocin<sup>(23)</sup> 8 µg/ml, acridine orange 15 µg/ml, ethidium bromide 15 µg/ml를 MRS 배지에 첨가하고 wild type strain을 약 10<sup>6</sup>/ml로 접종하여 24시간 배양한 후, 변이주의 선발시험에 사용하였다.

### 변이주 검출

#### ① Lac<sup>-</sup>와 Prt<sup>-</sup> strain의 검출

돌연변이 유기물질을 처리한 배양균액을 milk agar와 BCP agar 상에 희석도말하여 milk agar [1]에 나타난 colony 중에서 크기가 작고 단백질 용해환이 없는 것을 Prt<sup>-</sup> strain으로 하고, BCP agar [1]에서는 백색 colony를 Lac<sup>-</sup> strain으로 선택하였다.

#### ② 항생물질 감수성 변이주의 검출

돌연변이 유기물질로써 처리한 균액을 MRS agar [1]에 도말하여 나타난 colony를 replica법으로 Sigma chemical사의 streptomycin 50 µg/ml, tetracycline 3 µg/ml, kanamycin sulfate 50 µg/ml, nalidixic acid 100 µg/ml가 첨가된 MRS agar 배지상에 옮겨, 약제 감수성(R<sup>-</sup>) 균주를 선발하였다.<sup>(14, 24, 25, 26)</sup>

### 변이주의 형질 시험

변이주의 표현형질에 대하여 다음과 같은 내용을 확인하였다.

#### ① 당발효성 시험

Glucose 대신에 lactose, galactose, sucrose, xylose, sorbitol, mannose를 0.5% 첨가한 MRS fermentation broth에 변이주를 접종하여 37°C에 24시간 배양한 후, 배지의 변색을 기준으로 하였다.

#### ② 단백질 분해성 시험

2차에 대한 변이주의 배양액을 액상탈지유에 2% 접종하여 37°C에서 24시간 배양한 후, Hull<sup>(27)</sup>의 phenol 시약법으로 tyrosine 함량을 측정하여 단백질 분해력으로 하였다.

#### ③ Gelatin용해성 시험

Gelatin용해성은 nutrient broth에 gelatin 15%를

첨가하여 시험관에 7 ml씩 분주한 후 멸균하여 응고한 다음, 2차계대한 균배양액 0.1 ml를 배지의 상부에 접종하고 20°C에서 배양하면서 gelatin의 액화여부를 확인하였다.

④ 온도 감수성 시험

온도 감수성 시험은 MRS broth 환원 멸균 탈지유에 균배양액 2%를 접종하고 48°C에 배양하면서 균의 증식을 관찰하였다.

⑤ 항생물질 감수성 시험

MRS broth (BCP 0.004% 첨가)에 streptomycin 100 µg/ml, tetracyclin 6 µg/ml, kanamycin sulfate 100 µg/ml, nalidixic acid 100 µg/ml, oleanomycin 0.08 µg/ml, neomycin 20 µg/ml, erythromycin 10 µg/ml, lincomycin 75 µg/ml을 첨가하고 2차계대한 균액을 2% 첨가하여 24시간 배양한 후, 색조의 변화 및 혼탁도를 육안으로 비교 관찰하여 균의 증식여부를 판별하였다.

⑥ 용혈성 시험

Tryptic soy agar (Bacto)에 人血 O형을 5% 첨가하여 시험관을 plate 상에 심어 용혈환의 형성을 측정하였다.

Agarose gel 전기영동에 의한 Plasmid DNA의 분리

Plasmid의 분리는 Meyers 등<sup>28)</sup>, Guerry 등<sup>29)</sup>의 방법에 준하여 실시하였다. 즉, lysis broth 40 ml에 2차 계대한 균액을 1% 접종하여 32°C에서 4~6시간 배양 후, Kubota RA-3 rotor로 8,000 rpm에서 20분간 원심 분리하였다. 침전한 균체를 10 ml TES buffer (30 mM Tris, 50 mM NaCl, 5 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 8.0)로 씻은 다음에 1 ml sucrose buffer (25% W/V sucrose, 50 mM Tris, 1 mM Na<sub>2</sub>EDTA, 0.299 g NaCl/500 ml, pH 8.0)로 재현탁한 후, 여기에 lysozyme 용액 (0.25 M Tris에 lysozyme 10 mg/ml을 용해) 0.25 ml를 가하여 37°C에서 5~7분 방치하였다가, 얼음속에 두었던 0.25 M EDTA (0.25 M Na<sub>2</sub> EDTA, 0.25 M Tris, pH 8.0)와 5% SDS를 0.4 ml를 가하여 조용히 흔들어서 균체를 용해시켜 5 M NaCl 용액 0.7 ml를 가하여 얼음에 5~10분 방치한 다음, 4°C에서 27,000 × g로 30분간 원심분리한 후에 조심하여 상등액을 옮겼다. 이 상등액에 같은 양의 chloroform (chloroform : isoamylalcohol = 24 : 1)을 가하여 10번 정도 거꾸로 반전하면서 혼합한 후, 얼음에 5분간 방치하였다가 4°C에서 11,000 rpm으로 원심분리하여 상층을 마이크로 피펫으로 시험관에 옮겼다.

이 상층용액의 부피에 대하여 1/10배의 3 M Na-acetate와 2배의 95% ethyl alcohol (-30°C에 둠)을 가한 후, 잘 섞어 -30°C의 냉장고에 4시간 이상 방치하였다. 이것을 -10°C에서 12,000 × g로 20분간 원심분리하여 상등액을 버리고 원심 tube를 완전히 말린 다음, 건조 DNA를 TES buffer 100 µl에 녹였다. 여기에 RNase 10 µl (RNase를 1,000 µg/ml 되게 50 mM Na-acetate, pH 5.0에 녹이고 90°C에서 10분간 가열)를 가하여 37°C에서 1시간 이상 둔 다음, 전기 영동하였다. 즉, plasmid DNA sample 2~25 µl을 작은 tube에 옮기고 염색용액 (bromophenol blue 0.07%, SDS 7%, glycerol 33%를 물에 녹인다) 5 µl을 가한 다음, 0.625% Agarose gel (전기영동 완충액 - 89 mM Tris, 2.5 mM Na<sub>2</sub> EDTA, 89 mM Boric acid, pH 8.0 -에 녹인 것)에 옮겨 125 V, 40 mA에서 3~4시간 또는 80 V, 22 mA에서 6~7시간 또는 염색용액이 gel판 끝에 이동할 때까지 전기영동한 다음, ethidium bromide 5 µg/ml에서 30분간 처리한 후, 증류수에 1시간 담그었다가 polaroid camera로 촬영하였다<sup>(28)</sup>.

결과 및 고찰

시험균주의 plasmid 분리

시험균 *Str. faecalis* var. *liquefaciens* SKD

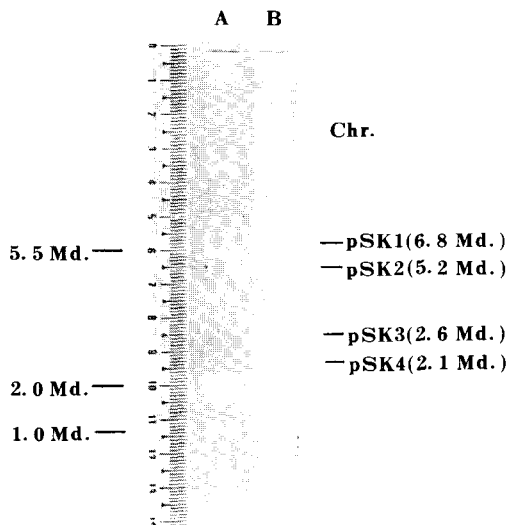


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNAs from *Str. lactis* ML3(A) and *Str. faecalis* var. *liquefaciens* SKD 1007(B).

**Table 1. Acid production and milk coagulation of *Str. faecalis* var. *liquefaciens* in 10% re-constituted skim milk**

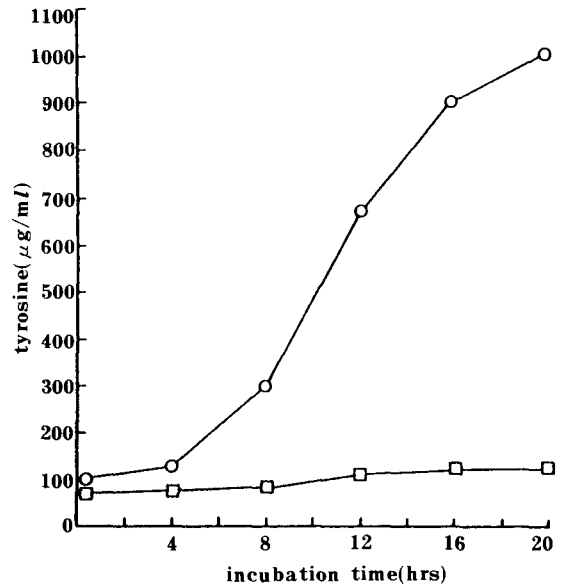
strain	After 9 hrs incubation at 37°C	
	pH	Clotting
SKD 1007	5.7	+
SKP 1	6.4	-

1007에 plasmid가 존재하는지를 검토하기 위하여, Meyer 등<sup>(28)</sup>의 방법으로 cleared lysate를 얻어 이것을 agarose gel 전기영동에 걸어서 나타난 plasmid의 분포는 Fig. 1과 같다. 이 그림에서 보는 바와 같이 chromosome band와는 별도로 4개의 plasmid band가 나타났으며, 이것을 pSK<sub>1</sub>, pSK<sub>2</sub>, pSK<sub>3</sub>, pSK<sub>4</sub>로 이름하였다. 이들 plasmid의 분자량은 표준 plasmid의 균주로서 *Str. lactis* ML<sub>3</sub>를 사용하여 plasmid의 이동도에 의하여 결정하였다. 표준 plasmid의 이동도에 기준하여 측정한 시험균 plasmid의 분자량은 Fig. 1에 표시하였다.

여기서 보는 바와 같이 확인된 4개의 plasmid는 대략적인 분자량이 약 2.1 Mdal에서부터 6.8 Mdal에 이르는 비교적 작은 plasmid를 가지고 있음을 알 수 있었다. 이보다 더 큰 분자량의 plasmid를 분리하기 위하여 Anderson and McKay<sup>(30)</sup>의 방법도 시도하였으나, 뚜렷한 plasmid band가 나타나지 않았다.

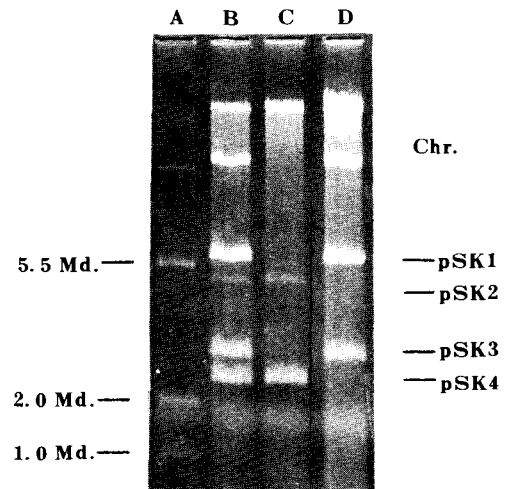
#### Acriflavin 처리에 의한 변이주 분리

Acriflavin 처리로 얻은 mutant SKP<sub>1</sub>은 우유배지에서 wild type의 우유 응고력보다 매우 약하여 응고 시간으로 비교해 본 결과, Table 1에서 보는 바와 같이 wild type은 9시간에 우유를 응고시켰으나 SKP<sub>1</sub>은 응고되지 않았고, 또 이 때의 pH도 wild type의 배양액은 5.7로서 우유 단백질의 등전점 pH 4.6보다 훨씬 높은 pH에서 응고되었지만 SKP<sub>1</sub>에서는 30시간 후에 같은 pH 수준에 도달했는데도 불구하고 우유가 응고되지 않았다. 탈지 환원유에 배양시의 단백질 분해를 tyrosine 함량으로 측정한 결과는 Fig. 2와 같으며, wild type에 비하여 SKP<sub>1</sub>은 거의 증가하지 않았다. 이와 같은 현상으로 보아 SKP<sub>1</sub>은 Prt<sup>-</sup>인 mutant strain으로 추측되었다. 이 우유 응고력과 단백질 분해성의 plasmid에 대한 연관성 여부를 조사하기 위하여 이 strain의 plasmid를 wild type과 동일한 방법으로 처리하여 agarose gel electrophoresis로 분리하여 본 결과 동일한 4개의 plasmid가 확인되었다. 따라서, 우유 단백질의



**Fig. 2. Proteolytic activity of *Str. faecalis* var. *liquefaciens* in 10% reconstituted skim milk at 37°C. ○, wild type SKD 1007; □, mutant SKP1 strain.**

응고에 관련된 응유효소의 생성은 본 실험에서 검출된 plasmid와는 직접적인 연관성이 없는 것으로 볼 수 있다. 또한, 이 변이주는 용혈성과 Gelatin 용해성 시험에서 음성으로 나타났다.



**Fig. 3. Agarose gel electrophoresis of plasmid DNAs from *Str. faecalis* var. *liquefaciens* SKD 1007; (A) *Str. lactis* ML<sub>3</sub>; (B) Parent SKD1007; (C) SKR1 strain (pSK<sub>1</sub>, 3 were absent); (D) SKR2 strain (pSK<sub>2</sub>, 4 were absent).**

Table 2. Growth of cured strains on MRS medium containing different antibiotics

Reagent ( $\mu\text{g/ml}$ )	Strain		
	Parent	SKR <sub>1</sub>	SKR <sub>2</sub>
Erythromycin (10)	+	+	-
Kanamycin (100)	+	+	+
Lincomycin (75)	+	+	-
Nalidixic acid (100)	+	+	+
Neomycin (20)	+	+	+
Oleandomycin (0.08)	+	+	+
Streptomycin (100)	+	+	+
Tetracyclin (6)	+	+	+

#### Novobiocin 처리에 의한 plasmid 소실 변이주의 특성

본 시험 균주에 acriflavin, acridin orange, ethidium bromide를 농도별로 처리하였으나, Pro 인 SKP<sub>1</sub> 외에는 다른 변이주를 얻지 못하였으나 최근 McHugh<sup>(23)</sup> 등이 *E. coli*, *Str. faecalis*의 plasmid에 효과적인 curing agent라고 보고한 novobiocin 처리구에서는 2 종류의 변이주(SKR<sub>1</sub>과 SKR<sub>2</sub>)를 얻어 plasmid DNA를 분석한 결과, 각각 다른 두 개의 plasmid를 잃은 것으로 나타났다(Fig. 3)

이 두 변이주에 대하여 wild type strain의 형질과 어떤 차이가 있는지 검색하기 위하여 실시한 당 발효 시험에서는 lactose, galactose, sucrose, xylose, sorbitol, mannose의 발효성이 wild type과 전혀 차이가 없었다. 이외에도 단백질 분해성, gelatin 용해성, 용혈성시험, 온도감수성에 대해서도 비교 시험해 보았으나 역시 wild type strain과 돌연 변이균주의 사이에 차이가 나타나지 않았다.

그러나 항생제 감수성 시험의 결과(Table 2)에서는 streptomycin, tetracyclin, kanamycin, neomycin, oleandomycin, nalidixic acid는 차이가 없었고, erythromycin과 lincomycin에서는 차이가 발견되었다. 즉 돌연변이균주 SKR<sub>1</sub>은 wild type과 같은 저항성을 가지고 있었으며, SKR<sub>2</sub>만이 erythromycin과 lincomycin에 감수성을 나타내었다. 이 SKR<sub>2</sub> 균주는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 wild type의 4개 plasmid 중에서 분자량 5.2 Mdal의 pSK<sub>2</sub>와 2.1 Mdal의 pSK<sub>4</sub>가 소실된 것으로 나타나 있다. 따라서, 이 두 개의 plasmid 중에서 어느 하나가 항생물질 저항성과 관련되어 있음은 확실하나, 보다 더 정확한 연관성은 더욱 연구하여야 밝혀질 것으로 생각된다.

#### 요 약

*Streptococcus faecalis* var. *liquefaciens* 에서 plasmid DNA를 분리한 결과, 4개의 plasmid를 가지고 있었으며, 각각의 대략적인 분자량은 6.8 Mdal, 5.2 Mdal, 2.6 Mdal, 2.1 Mdal로 측정되었다. 이 균주를 novobiocin으로 처리하여, 각각 다른 2개의 plasmid가 소실된 2개의 변이주를 얻었다. 이들 균주는 당발효성, 온도감수성, gelatin 용해성, 단백질용고성은 wild type과 동일하였으나 이중 한 균주가 lincomycin과 erythromycin에 대한 감수성을 나타내었다. 따라서 본 실험에서 검출한 4개의 plasmid는 당발효성 등의 특성과는 관련이 없는 것으로 추정할 수 있으며, pSK<sub>2</sub>와 pSK<sub>4</sub>의 두 plasmid 중 하나는 항생물질 저항성에 관련된 것으로 보인다.

#### 사 사

이 논문은 한국학술진흥재단의 1983년도 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

#### 참고문헌

- Hunter, G.J.E.: *J. Dairy Res.* **10**, 464-470 (1939).
- Mckay, L.L., K.A. Baldwin and E.A. Zottola: *Appl. Microbiol.* **23**, 1090-1096 (1972).
- Mckay, L.L., A. Miller III, W.E. Sandine and P.R. Elliker: *Bacteriol.* **102**, 804-809 (1970).
- Anderson, D.G. and L.L. Mckay: *J. Bacteriol.* **129**, 367-377 (1977).
- Cords, B.R., L.L. Mckay and P. Guerry: *J. Bacteriol.* **117**, 1149-1152 (1974).
- Klaenhammer, T.R. and S.M. Sutherland: *Appl. and Environ. Microbiol.* **39**, 671-674 (1980).
- Park, Y.H. and L.L. Mckay: *J. Bacteriol.* **149**, 420-425 (1982).
- Kuhl, S.A., L.D. Larsen and L.L. Mckay: *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 1193-1195 (1979).
- Kempler, G.M. and L.L. Mckay: *Appl. Environ. Microbiol.* **37**, 316-323 (1979).
- Chassy, B.M., E.M. Gibson and A. Giuffrida: *J. Bacteriol.* **127**, 1576-1578 (1976).
- Chassy, B.M., E.M. Gibson and A. Giuffrida: *Curr. Microbiol.* **1**, 141-144 (1978).
- Mckay, L.L. and K.A. Baldwin: *Appl. Microbiol.* **28**, 342-346 (1974).

13. Mckay, L.L. and K.A. Baldwin: *Appl. Microbiol.* **29**, 546-548 (1975).
14. Ishiwa, H. and S. Iwata: *J. Gen. Appl. Microbiol.* **26**, 71-74 (1980).
15. Mckay, L.L. and K.A. Baldwin: *Appl. Environ. Microbiol.* **47**, 68-74 (1984).
16. Oliver, D.R., B.L. Brown, D.B. Clewell: *J. Bacteriol.* **130**, 759-769 (1977).
17. Frazier, M.L. and L.N. Zimmerman: *Can. J. Microbiol.* **26**, 1253-1255 (1980).
18. Leblanc, D.J., R.J. Hawley, L.N. Lee and E.J. St. Martion: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **75**, 3484-3487 (1978).
19. Gasson, M.J. and F.L. Davies: *FEMS Microbiology Letters* **7**, 51-53 (1980).
20. 姜国熙 · 金志姬 · 金榮勳 : 한국낙농학회지 **5**, 205 - 211 (1983).
21. De Man, J.C., M. Rogosa and M.E. Sharpe,: *J. Appl. Bacteriol.* **23**, 130-135 (1960).
22. Klaenhammer, T.R., L.L. Mckay and K.A. Baldwin: *Appl. Environ. Microbiol.* **35**, 592-600 (1978).
23. Mchugh, G.L. and M.N. Swartz: *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **12**, 423-426 (1977).
24. Clewell, D.B., Y. Yagi, G.M. Dunny and S.K. Schultz: *J. Bacteriol.* **117**, 283-289 (1974).
25. 김종호, 송희중 : 전북대학교논문집, **21**, 237 - 243 (1979).
26. Courvalin, P., C. Carlier and E. Collatz: *J. Bacteriol.* **143**, 541-551 (1980).
27. Hull, M.E.: *J. Dairy Sci.* **30**, 881-884 (1947).
28. Meyers, J.A., D. Sanchez, L.P. Elwell and S. Falkow: *J. Bacteriol.* **127**, 1529-1537 (1976).
29. Guerry, P., D.J. LeBlanc and S. Falkow: *J. Bacteriol.* **116**, 1064-1066 (1973).
30. Anderson, D.G. and L.L. Mckay: *Appl. and Environ. Microbiol.* **46**, 549-552 (1983).