

*Ferrobacillus ferrooxidans*로 부터 Ornithine-Containing Lipid 분리에 관한 연구

이 강 순

(한국 원자력 연구소, 방사선 생물학 연구실)

Study on Ornithine-Containing Lipid from *Ferrobacillus ferrooxidans*

RHEE, Kang Soon

(Radiation Biology Laboratory, Korea Atomic Energy Research Institute)

ABSTRACT

It is well known that the ornithine-containing lipids were separated and identified from the other lipids of *Rhodospseudomonas spheroides*, *Rhodospirillum*, and *Thiobacillus thiooxidans*.

An ornithine-containing lipid that lacks phosphorus and glycerol has been observed in *Ferrobacillus ferrooxidans* which was isolated from Dalsung copper mine in Korea.

The aminolipid was extracted from *F.ferrooxidans* and further purified by thin layer chromatography, and the product was identified as an ornithine-containing lipid by paper and liquid chromatography respectively.

緒 論

유기영양성 세균에 관하여는 많은 연구가 되어 있으나 무기영양성 세균에 관하여서는 그 역사가 짧은 관계도 있겠으나 많은 연구가 이루어져 있지 않다.

특히 철산화세균인 *Ferrobacillus ferrooxidans*(이하 *F.ferrooxidans*라 약함)은 높은 농도의 무기염 및 높은 수소이온 농도의 배지에서 배양되는 점등 유기영양성 세균과는 많은 차이점을 나타내고 있는 것으로 알려져 있으나 기실 전자현미경을 이용한 형태에 관한 연구 이외에 균체성분 분석에 관하여서는 밝혀지지 않은 점이 많다.

저자는 *F.ferrooxidans*의 균체 amino acid 분석중 basic amino acid lysine 분획에 특이한 peak가 관찰되었기에 이 peak

의 성상을 규명코자 thin layer chromatography 및 paper chromatography와 liquid chromatography를 실시하여 약간의 성적을 얻었기에 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 세균의 배양

실험의 재료로 사용한 *F.ferrooxidans* st-3는 국내 광산 경내수에서 Sutton 및 Corrick(1963)의 방법으로 동정한 균주로 9K 배양액에 (Silverman, 1959) 접종하여 28°C에서 5~6일간 연속 통기 배양하여 얻은 균체를 원심분리하여 세균을 수집 후 시료로 사용하였다.

2. Amino acid의 분석

1) 균체단백의 amino acid의 조성

세균 일정량에 6N HCl을 가하고 유리관에 넣어 진공 밀봉후 110°C에서 48시간

가수분해하였다.

가수분해가 끝난 후 HCl을 lyophilizer로 제거하고 0.2M sodium citrate buffer (pH 2.2)로 용해한후 Hitachi liquid chromatograph model 034로 전개하였다. (Spackman, 1958)

이 때 resin은 Hitachi custom ion exchange 2611을 사용하였으며 column (0.9×15cm)에 흡착시킨 후 sodium citrate buffer (pH 5.28)로 elution하여 basic amino acid를 분리 정성하였다.

이때 elution buffer의 유속은 60ml/hr 및 ninhydrin은 30ml/hr로 하였으며 column 온도는 55°C에서 행하였다.

2) Amino lipid

가수분해물의 정성 조건은 상술한 바와 같고 column의 규격(0.9×50cm)으로 하였으며 elution buffer의 유속은 30ml/hr, ninhydrin은 15ml/hr로 하여 6시간 전개하였다.

3. 지방의 추출

세균 2~3g에 10ml의 methanol을 가하고 70°C water bath상에서 1시간 추출 후 20ml의 chloroform을 가하고 60°C에서 다시 1시간 추출 후 추출액을 glass filter로 여과하였다.

Folch(1957) 및 Kanfer(1964)의 방법에 의하여 지방 추출액을 정제하였다.

여액에 증류수 5~6ml를 가하고 수분간진탕 후 12시간 방치하여 두층으로 분리하였다.

상등액을 제거하고 하층의 정제된 지방 추출액을 진공 건조하였다.

농축 건조한 지방은 다시 소량의 chloroform, methanol (2:1 v/v)로 용해하여 시료로 사용하였다.

4. Thin layer chromatography에 의한 amino lipid의 분리 및 정제

추출 정제한 지방을 1차 및 2차 thin layer chromatography로 amino lipid를 분리 정제하였다(Shively and Knoche, 1969).

이때 absorbent는 silica gel G(E. Merk Co.)를 사용하였으며 1차 용매는 chloroform, methanol, ammonium hydroxide (75:25:2 v/v)로 전개하였다.

전개가 끝난 후 ninhydrin 및 molybdenum blue reagent(Dittmer and Lester, 1964)로 각각 발색시켜 amino lipid 및 phospholipid를 검출하였다.

다음 amino lipid분획을 끊어 모아 chloroform, methanol (2:1 v/v)로 용출한 후 감압 농축하고 다시 thin layer chromatography로 분리하였다.

용매는 chloroform, methanol, water (66:30:4 v/v)로 전개 후 ninhydrin-positive인 분획을 다시 chloroform, methanol로 용출한 후 농축 건조하여 amino lipid의 시료로 사용하였다.

5. Paper chromatography에 의한 정성

분리 정제된 amino lipid에 6N HCl을 가하고 진공 밀봉 후 110°C에서 12시간 가수분해하였다.

가수분해가 끝난 후 lyophilizer로 HCl을 제거하고 2차원 paper chromatography로 분리 정성하였다.

Filter paper는 Whatman No. 1을 사용하였으며 용매는(Shively and Knoche, 1969) phenol, water(100:38)와 *n*-butanol, propionic acid, water(142:71:100 v/v)로 1차 및 2차로 전개하였다.

전개가 끝난 후 ninhydrin 및 alkaline silver nitrate reagent (Trevely and Harrison, 1950)로 amino acid 및 glycerol을 각각 검출하였다.

결과 및 고찰

국내 동광산에서 저자들이 분리 동정한 *F. ferrooxidans*의 균체 단백 amino acid의 조성을 규명할 목적으로 균체 단백을 가수분해하여 amino acid분석을 실시한 결과는 Fig. 1과 같다.

즉 전반적인 amino acid의 pattern에는 큰 의의를 발견할 수 없었으나 basic amino

acid 중 lysine peak의 앞에 특이한 작은 peak를 관찰할 수 있었다.

분리한 결과는 Fig. 2와 같다.

1차에서는 ninhydrin으로 발색시켰을 때

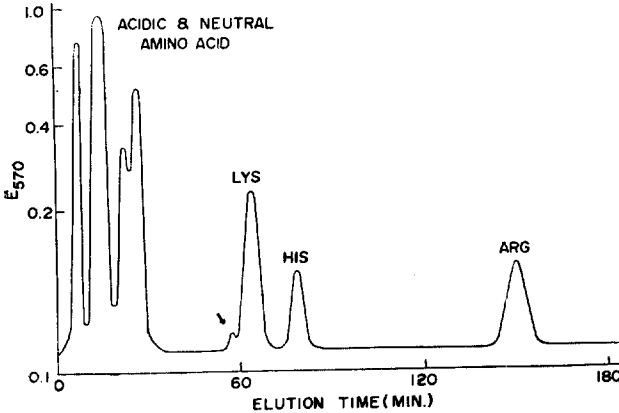


Fig. 1. Elution profile of the basic amino acid of *Ferrobacillus ferrooxidans* hydrolysate.

Liquid chromatography with 0.35M sodium citrate buffer, pH 5.28 at 55°C

Resin: Hitachi custom ion exchange resin 2611

Column: 0.9x15 c/m

Flow rate: buffer 60ml/hr, ninhydrin 30ml/hr

이 peak는 저자들이 별도의 실험에서 실시한 *E. coli* 및 *Salmonella typhi* 등 유기 영양성 세균균체단백 가수분해물 중에서는 검출되지 아니한 미지의 amino acid였다.

이 미지의 amino acid를 규명할 목적으로 *F. ferrooxidans*의 균체에서 thin layer chromatography로 지방만을 추출 정제한 것을 1차 thin layer chromatography하여

4개의 spots가 positive로 나타났다.

그러나 molybdenum blue reagent에는 Rf 0.1인 spot만이 발색되지 아니하였다.

1차 thin layer chromatography에서 ninhydrin-positive인 spots 중 molybdenum blue reagent에 발색되지 아니한 Rf 0.1 spot만을 chloroform, methanol로 용출하여 2차 thin layer chromatography



Fig. 2. Thin layer chromatogram of lipids from *Ferrobacillus ferrooxidans*.

The plate was developed in chloroform, methanol, ammonium hydroxide (75 : 25 : 2 v/v). Visualisation: ninhydrin. Arrow indicates the amino lipid (Rf. 0.1).

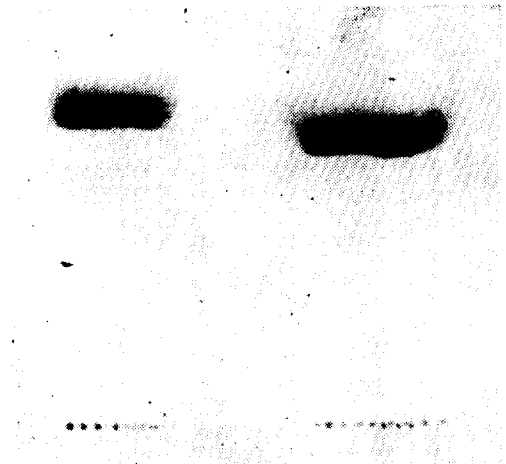


Fig. 3. Thin layer chromatogram of purified amino lipid. The plate was developed in chloroform, methanol, water (66 : 30 : 4 v/v).

로 전개하여 ninhydrin으로 발색시킨 결과는 Fig. 3과 같다.

thine peak와 일치하였다.

Macfarlane(1962) 및 Houstmuller(19

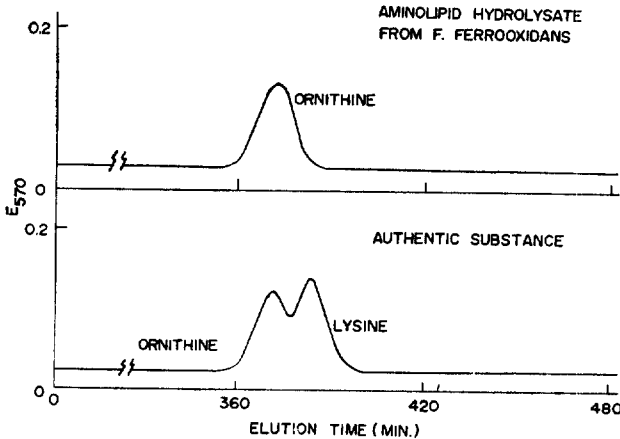


Fig. 4. Elution profile of the authentic substances (ornithine and lysine) and acid hydrolysate of purified amino lipid from *F. ferrooxidans*. Liquid chromatography with 0.35M sodium citrate buffer, pH 5.28 at 55°C.

Resin type: Hitachi custom ion exchange resin 2611

Column size: 0.9×50c/m

Flow rate: buffer 30ml/hr, ninhydrin 15ml/hr

이때 Rf 0.5인 ninhydrin-positive 단일 spot 만이 나타났다.

다음 ninhydrin-positive인 spot를 용출하고 이 amino lipid의 구성성분 중 amino acid를 확인하기 위하여 산으로 가수분해하고 2차원 paper chromatography로 분리 정성하였다.

그리고 ninhydrin-positive인 단일 spot로 검출된 amino acid의 Rf치는 수종의 표준 amino acids를 같은 방법으로 전개한 amino acid 중 ornithine의 Rf치와 일치하였다.

전개가 끝난 후 ninhydrin 및 alkaline silver nitrate reagent로 amino acid 및 glycerol을 각각 발색시켰다.

그 결과 ninhydrin-positive인 단일 spot 만이 나타났으며 glycerol은 검출되지 않았다.

상기 ninhydrin-positive인 amino acid와 표준 ornithine 및 lysine을 각각 liquid chromatography로 전개한 결과는 Fig. 4와 같다.

Amino lipid 가수분해물을 liquid chromatography로 전개, 6시간 후에 단일 peak로 나타났으며 이 amino acid는 표준 물질인 ornithine 및 lysine peak 중 orni-

64)등에 의하면 ornithine이 bacteria에서 phosphatidyl glycerol ornithine의 형태, 즉 phosphatidyl glycerol의 ester로 존재한다고 보고하였고 *Bacillus subtilis*, 168 세포막 mucopeptide에서 Duc-Nguyen과 Weed(1964)는 ornithine을 분리하였다고 보고하였으나 이 ornithine이 amino lipid 유래인지 또는 protein 유래인지 밝히지는 못하였다.

Gorchein(1964)은 *Rhodopseudomonas spheroides*의 amino lipid 연구중 상술한 phosphatidyl glycerol ornithine과는 구조를 달리하는 ornithine-containing lipid를 분리하였다.

즉 phosphorus를 함유하지 않은 새로운 구조의 amino lipid임을 보고하고 있다.

Depinto(1967)는 *Rhodospirillum*의 생장조건을 여러가지로 실험한 결과 ornithine이 lipid에 incorporation되는 것은 bacteriochlorophyll의 생합성과는 무관하다고 보고하였다.

Gorchein(1968)은 *Rhodopseudomonas spheroides*에서 분리한 ornithine-containing lipid는 ornithine과 지방산 및 고가 alcohol로 이루어졌다고 부분적인 구조를 밝히고 있음을 보아 유기영양성 세균에는 그

종속에 따라 amino lipid에서 유래한 ornithine을 함유하고 있음이 밝혀지고 있다.

무기영양 세균의 균체성분 분석 연구는 일반적으로 뒤떨어지고 있으나 *Thiobacillus thiooxidans*의 ornithine-containing lipid에 관한 연구는 유독 집중적으로 연구된 경향이 있다.

즉 Shively와 Benson(1967)은 *Thiobacillus thiooxidans*에서 ninhydrin-positive이고 phosphorus가 없는 amino lipid를 검출하였다. Shively와 Knoche(1969)는 이 ornithine-containing lipid의 부분적인 구조를 밝혔고 Knoche와 Shively(1969, 1972)는 ornithine-containing lipid의 구조를 완전히 밝혔다.

즉 ornithine에 3-hydroxyoctadecanoic acid가 amide 결합을 하고 2-hydroxyoctadecanoic acid는 3-hydroxyoctadecanoic acid에 ester로 결합되어 있다고 보고하였다. 저자들의 실험성적을 여러 보고들과 논의해 본다면 *F. ferrooxidans* 균체에서 thin layer chromatography로 분리한 정제지질이 ninhydrin-positive이나 molybdenum blue reagent에 발색되지 아니하고 또 본 시료를 가수분해한 후 paper chromatography하여 alkaline silver

nitrate에 발색되지 않은 점을 보아 phosphorus와 glycerol을 함유하지 아니한 amino lipid임을 알 수 있고 이것은 Macfarlane(1962) 및 Houstmuller(1964) 등이 검출한 phosphatidyl glycerol ornithine의 형태가 아니고 또 단백질의 구성성분이 아닌 amino lipid로 유래된 것임을 알 수 있었다.

그리고 paper chromatography로 분리한 후 alkaline silver nitrate reagent로 glycerol 검출을 시도하였으나 glycerol은 검출되지 아니하였다.

또한 Gorchein(1968)이 *Rhodospseudomonas*에서 분리한 ornithine-containing lipid나 Knoche와 Shively (1969, 1972)가 *Thiobacillus thiooxidans*에서 구조를 밝힌 ornithine-containing lipid와 유사하거나 동일한 구조의 물질로 생각된다.

그러나 thin layer chromatography상의 Rf치가 Shively와 Knoche(1969) 등의 결과와 일치하고 또한 autotrophic bacteria란 점으로 미루어 *Rhodospseudomonas*의 amino lipid보다 *Thiobacillus thiooxidans*의 ornithine-containing lipid와 동일한 구조를 갖고 있다고 추정된다.

摘 要

담성광산 갱내수에서 분리동정한 *F. ferrooxidans*의 지방 추출액에서 amino lipid를 1,2차 thin layer chromatography로 분리 정제하였고 상기 amino lipid 가수분해물을 2차원 paper chromatography 및 liquid chromatography로 전개하여 ornithine을 함유한 amino lipid임을 확인하였다.

또한 상기 ornithine-containing lipid에서는 glycerol 및 phosphorus가 검출되지 않은, 즉 phosphatidyl glycerol과는 다른 구조의 ornithine-containing lipid로 *Thiobacillus thiooxidans* 등에서 분리하여 구조가 밝혀진 ornithine-containing lipid와 동일한 구조를 갖고 있다고 추정된다.

引 用 文 獻

1. Depinto, J.A., 1967. Ornithine-containing lipid in *Rhodospirillum rubrum*. *Biochim. Biophys. Acta*, **114**, 113.
2. Dittmer, J.C., and R.L. Lester, 1964. A simple specific spray for the detection of phospholipids on thin-layer chromatograms. *J. Lipid Res.*, **5**, 126.
3. Duc-Nguyen, H., and L.L. Weed, 1964.

- D-Ornithine as a constituent of a bacterial cell wall. *J. Biol. Chem.*, **239**, 3372.
4. Folch, J., M. Lees., and G.H.S. Stanley, 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
 5. Gorchein, A., 1964. Ornithine in *Rhodospseudomonas spheroides*. *Biochim. Biophys. Acta*, **84**, 356.
 6. Gorchein, A., 1968. Studies on the structure of an ornithine-containing lipid from non-sulfur purple bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 564.
 7. Houstmuller, U.M., and L.L.M. van Deenen, 1965. On the amino acid esters of phosphatidyl glycerol from bacteria. *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 564.
 8. Kanfer, J., and E.P. Kennedy, 1964. Metabolism and function of bacterial lipids. *J. Biol. Chem.*, **239**, 1720.
 9. Knoche, H.W., and J.M. Shively, 1969. The identification cis-11,12-methylene-2-hydroxyoctadecanoic acid from *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Biol. Chem.*, **244**, 4773.
 10. Knoche, H.W., and J.M. Shively, 1972. The structure of an ornithine-containing lipid from *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Biol. Chem.*, **247**, 170.
 11. Macfarlane, M.G., 1962. Characterization of lipoamino-acids as O-amino acid esters of phosphatidyl glycerol. *Nature*, **196**, 136.
 12. Shively, J.A., and A.A. Benson, 1967. Phospholipids of *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol.*, **94**, 1679.
 13. Shively, J.A., and H.W. Knoche, 1969. Isolation of an ornithine-containing lipid from *Thiobacillus thiooxidans*. *J. Bacteriol.*, **94**, 829.
 14. Silverman, M.P., and D.G. Lundgren, 1959. Studies on the chromosynthetic iron bacteria *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **77**, 624.
 15. Spackman, D.H., W.H. Stein., and S. Moore, 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, **30**, 1190.
 16. Sutton, J.A., and J.D. Corrick, 1963. Leaching copper sulfide minerals. U.S. Bureau of Mines Repot. Invest., 6423, 1-23.
 17. Trevelyan, W.E., D.P. Procter, and J. S. Harrison, 1950. Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature*, **166**, 444.