

계면 활성제 처리에 의한 세균 세포막의 변화에 관한 연구

*李鍾三 · 李豪容 · 曹基勝 · *趙善姬 · 張成烈 · 崔榮吉

(漢陽大 自然科學大 · *誠信女大 自然科學大)

The effect of some detergents on the changes of bacterial membrane

*LEE, Chong Sam, Ho Yong LEE, Key Seung CHO, *Sun Hee CHO
Sung Yeoul CHANG, and Yong-Keel CHOI.

(College of Natural Sciences, Hanyang Univ., *College of Natural Sciences,
Sungshin Women's Univ.)

ABSTRACT

The results that the effect of 6 detergents on the structural changes and biochemical composition of bacterial membrane of *Escherichia coli* and *Bacillus cereus* are as follows;

1. Population growth of the bacteria was increased in case of the treatment with palmitoyl carnitine and sodium deoxy cholate but was decreased by sodium dodecyl sulfate and palmitoyl choline, in *E. coli* and was decreased by palmitoyl carnitine and palmitoyl choline at the low concentration, in *B. cereus*.
2. The electron micrograph showed that cell wall lysis or cell collapse were observed in the treatment of sodium dodecyl sulfate and palmitoyl choline, and also cell wall was condensed by triton X-100 and sodium deoxy cholate, in *E. coli*. And, in *B. cereus*, endospore formation of the bacteria was stimulated by palmitoyl choline, and cell lysis or structural changes of the membrane were observed in the treatment of sodium dodecyl sulfate, sodium deoxy cholate, and triton X-100, respectively.
3. As to the effect of detergent on the biochemical composition of biomembrane, the content of protein was increased by saponin and decreased by both of palmitoyl choline and palmitoyl carnitine, in *E. coli*, and in *B. cereus*, the content of structural protein and phospholipid were decreased by treatment of sodium dodecyl sulfate and structural protein was denatured by palmitoyl choline.
4. The profile of membrane protein revealed that the bacterial membrane were composed of various proteins. By dint of this result, some of membrane proteins were solubilized or changed to small molecules by the treatment of sodium dodecyl sulfate and palmitoyl choline, in *E. coli*, and membrane protein of the biomembrane by treatment of sodium dodecyl sulfate, sodium deoxy cholate, palmitoyl choline, and palmitoyl carnitine were confirmed to be different profile as compared with those of the control, in *B. cereus*.

Therefore, it is suggested that sodium dodecyl sulfate and palmitoyl choline solubilized biomembranes

* 본 연구는 1981~1982년도 한국과학재단의 연구비에 의하여 수행되었음.

or inhibited membrane transport and that palmitoyl carnitine and sodium deoxy cholate were used as an energy source or stimulating the membrane transport, in *E. coli*.

And, it is suggested that all of detergents were inhibited biomembrane synthesis, except saponin, in *B. cereus*.

緒 論

세균 세포막계의 조성은 Gram 양성 세균과 Gram 음성 세균의 두 가지로 크게 구분되는데 일반적으로 Gram 양성 세균의 cell wall은 최대 95%에 이르는 peptidoglycan과 teichoic acid가 풍부한 반면 Gram 음성 세균은 지질과 단백질로 이루어지는 outer membrane을 가지고 있다(2, 3, 12, 27). 또한 Boman 등(1974)과 Leive(1973)는 Gram 양성 세균에 비해 Gram 음성 세균이 항생제에 대한 내성이 크다고 보고함으로써 구조적 차이뿐 아니라 기능적인 차이도 있음을 설명하였으며 Tilby(1978)는 detergent-resistant *Bacillus subtilis*의 보고를 통해 야생종과 mutant의 생화학적 조성의 차이가 detergent에 대한 내성을 나타낸다고 보고 하였다.

또한 *Escherichia coli*는 gram-negative bacteria로서 구조적, 화학적 조성의 차이를 갖는 세개의 막으로 구성되어 있다(1, 27). *E. coli*의 outer membrane과 cytoplasmic membrane은 서로 detergent에 대한 감수성이 다른데 triton X-100은 Mg^{+2} 존재하에서 세포막단을 용해한다고 보고되었고(9, 32), Filip 등(1973)은 *E. coli*의 outer membrane이 ionic detergent인 sodium lauryl sarcosinate의 용해에 대한 내성을 갖는다고 보고하였다. 또한 Higashi 등(1981)은 SDS를 *E. coli*에 처리하여 비저막 균사체를 유도함으로써 이들 detergent가 세포막의 생성에도 영향을 준다고 보고하였다.

세균 세포막계의 구조와 생화학적 조성을 연구하기 위해서는 이들의 조성물질인 단백질과 지방질을 변성없이 용해해야 하는데 이를 위해 본 실험에서는 이런 효과가 큰 6종의 detergent; sodium dodecyl sulfate(14, 30, 31), sodium deoxy cholate(25, 28), triton X-100(25, 33), palmitoyl carnitine(17, 22, 36), palmitoyl choline 및 saponin(8)을 media에 직접 처리함으로써

이들 detergent들이 세균의 성장과 bacterial membrane의 생화학적 조성 및 구조에 어떤 영향을 주는가 조사하였다.

材料 및 方法

1. 使用 菌株 및 培養

Gram 음성균으로는 *Escherichia coli*(ATCC 11303)을 실험균주로 사용하였으며 배지는 Cho 등(1973)에 의한 media를 사용하였고 최초 균체수를 1.5×10^6 cell/ml 되게 접종한 후 37°C에서 70~80회의 속도로 진탕배양하였다. 또한 Gram 양성균으로는 *Bacillus cereus* strain 425를 실험균주로 사용하여 peptone 1%, yeast extract 1%, NaCl 0.5%, Na_2HPO_4 0.04%가 되게 조성한 배지에서 37°C로 10시간 진탕 배양하였다. 이때 media의 pH는 7.2로 조절하였고 접종 균체수는 2.0×10^6 cell/ml 되도록 하였으며 진탕속도는 분당 70~80 회전의 속도로 배양하였다.

2. 界面活性劑 및 試藥

sodium dodecylsulfate(SDS), sodium deoxycholate(SDC)는 Sigma사 제품을, triton X-100(TX-100)은 Hartman-Leddon사 제품을 각기 구매했고 palmitoyl carnitine(P.Car)과 palmitoyl choline(P. Chol)은 Cho 등(1969)의 방법으로, saponin(SAP)은 Joo(1978)의 방법으로 합성 또는 추출한 후 thin layer chromatography(TLC) 방법으로 순도를 확인하여 사용하였다. 기타 시약은 특급품으로 구매하여 사용하였다.

3. 菌體數 測定

균체수는 spectrophotometer(Bausch and Lomb spectronic 20)를 사용하여 520nm에서 균체수의 광학 밀도(optical density)를 측정하였다.

4. 細胞收獲과 細胞膜 分獲

배양된 균주는 5,000rpm에서 30분간 원심분리한 후 0.01M Tris-HCl buffer(pH 7.2)로 잔여 detergent를 제거하였다. 세포의 파괴는 Ultrasonicator(Ultrasonics A 300g)를 사용하여 저온

상태에서 30분간 파괴하였으며 파괴된 세포 내용물의 분획은 5,000rpm에서 10분간 원심분리하여 파괴되지 않은 세포를 제거하고 상등액을 30,000g에서 30분간 원심분리하여 세포막 분획으로 사용하였다.

5. 細胞微細構造의 觀察

세포들은 formaldehyde-glutaraldehyde mixture에서 4시간동안 4°C로 전고정시킨 후 0.1M phosphate, 1% osmium tetroxide로 4°C에서 4시간 후고정하였으며 탈수는 일련의 alcohol series 과정을 거쳐서 실시하였다(19). 그후 Epon 812 mixture로 포메시킨 후(24) 초박편을 얻어 uranyl acetate로 염색하였으며 염색한 시료는 전자현미경(Hitachi HS7S)으로 세균 생체막의 미세구조를 관찰하였다.

6. 生化學的 定量分析

질세포와 생체막에 참여하는 단백질양은 Lowry 등(1951)의 방법으로 bovine serum albumin을 표준물질로 하여 정량하였다.

인지질양은 Bligh와 Dyer(1959)의 방법으로 지방질을 추출한 후 강산으로 digestion하여 Chen 등(1956)의 방법으로 인을 정량하였으며 인지질양은 지방질의 인양에 24배로 환산하였다.

7. 電氣泳動

세포막 분획은 SDS로 용출시켜 Weber 등(1969)의 방법에 의한 SDS-PAGE 법으로 관찰하였다. 이때 running gel은 7.5%로 사용하였고 spacer gel은 2.5%로 사용하였으며 염색과 탈색은 coomassie brilliant blue R-250 및 water: methanol: acetic acid(35 : 2 : 3; v/v/v)로 각각 실시하였다.

結果 및 考察

각 detergent들이 세균의 개체군 성장(population growth)에 미치는 결과는 Table 1, 2에 표시한 바와 같다. 그 결과를 보면 *E. coli*의 경우에는 TX-100, SAP 처리군에서 대조군과 유사한 증가를 보였으며 P. Car과 SDC 처리군에서는 약간의 증가를 P. Chol과 SDS 처리군에서는 감소 효과를 나타내었다.

P. Car은 동물체내에 존재하는 물질로 enteric bacteria인 *E. coli* 가 이용한다고 볼 수 있으며

(36) SDC 역시 저농도에서 배양 후반기에 급속히 균체수가 증가하는 것으로 보아 exoenzyme의 기능에 의한 SDC의 분해 또는 영양원으로서의 이용 등으로 가정할 수 있다. P. Chol의 경우 미생물에서는 존재하지 않는 choline 계통의 물

Table 1. Bacterial growth on detergent treatment *Escherichia coli* B.

<i>E. coli</i> SDS						
Conc.(%)	0	2	4	6	8	10
Hr.						
0	0.01	0.01	0.01	0.02	0.02	0.02
1	0.025	0.03	0.04	0.03	0.03	0.005
2	0.14	0.15	0.13	0.07	0.75	0.05
3	0.43	0.3	0.28	0.135	0.14	0.095
4	0.7	0.54	0.47	0.24	0.23	0.21
6	0.97	0.84	0.7	0.45	0.36	0.265
8	1.0	0.8	0.8	0.64	0.395	0.355
10	1.0	0.9	0.87	0.75	0.52	0.52

Figures in the table are optical density(O.D.) of broth culture at 520nm.

E. coli SDC

Conc.(%)	0	0.05	0.1	0.15	0.2
Hr.					
0	0.025	0.02	0.018	0.028	0.03
1	0.1	0.098	0.08	0.05	0.046
2	0.22	0.245	0.18	0.06	0.05
3	0.6	0.85	1.2	0.1	0.06
4	0.88	1.6	1.8	0.25	0.09
6	1.0	1.5	1.9	1.9	0.235
8	1.1	1.6	1.9	2.0	2.0

E. coli TX-100

Conc.(%)	0	0.1	0.5	1	5
Hr.					
0	0.021	0.11	0.009	0.01	0.007
1	0.028	0.018	0.01	0.009	0.008
2	0.098	0.08	0.054	0.41	0.008
3	0.455	0.405	0.32	0.026	0.052
4	0.8	0.75	0.66	0.6	0.24
6	1.1	1.15	1.12	1.1	0.79
8	1.12	1.3	1.3	1.28	0.98
10	1.01	1.3	1.3	1.3	1.09

E. coli P. Car

Conc.(%)					
Hr.	0	0.1	0.2	0.4	0.6
0	0.015	0.02	0.03	0.08	0.08
2	0.4	0.28	0.5	0.96	1.1
4	0.85	1.1	1.24	1.5	1.7
6	0.9	1.2	1.35	1.6	1.7
8	0.91	1.23	1.4	1.6	1.7
10	0.91	1.23	1.4	1.6	1.7

E. coli P. Chol

Conc.(%)					
Hr.	0	0.003	0.01	0.05	0.4
0	0.02	0.02	0.37	0.47	0.48
2	0.41	0.162	0.215	0.215	0.21
4	0.9	0.165	0.195	0.15	0.21
6	0.98	0.38	0.21	0.135	0.15
8	1.0	0.49	0.22	0.1	0.1
10	1.0	0.65	0.49	0.075	0.06

E. coli SAP

Conc.(%)					
Hr.	0	0.01	0.05	0.1	0.2
0	0.016	0.024	0.63	0.1	0.19
2	0.325	0.33	0.35	0.38	0.45
4	0.93	0.96	0.98	1.08	1.1
6	1.04	1.08	1.09	1.2	1.25
8	1.08	1.12	1.15	1.28	1.3
10	1.08	1.12	1.15	1.28	1.3

Table 2. Bacterial growth on detergent treatment
Bacillus cereus 425.

B. cereus SDS

Conc.(%)						
Hr.	0	0.002	0.004	0.006	0.008	0.01
0	0.04	0.03	0.04	0.04	0.03	0.04
1	0.055	0.055	0.055	0.04	0.03	0.04
2	0.32	0.33	0.18	0.04	0.03	0.04
3	0.65	0.62	0.52	0.055	0.03	0.04
4	0.84	0.78	0.65	0.1	0.35	0.04
6	1.09	0.98	0.96	0.62	0.035	0.04
8	1.2	1.1	1.1	0.7	0.035	0.04
10	1.4	1.18	1.18	1.02	0.035	0.04

Figures in the table are optical density(O.D.) of broth culture at 520nm.

B. cereus SDC

Conc.(%)						
Hr.	0	0.006	0.008	0.01	0.015	0.02
0	0.03	0.035	0.036	0.03	0.036	0.036
1	0.063	0.052	0.048	0.039	0.036	0.036
2	0.38	0.16	0.1	0.06	0.045	0.038
3	0.82	0.43	0.24	0.135	0.058	0.047
4	1.0	0.64	0.51	0.31	0.074	0.062
6	1.25	0.91	0.89	0.73	0.11	0.09
8	1.5	1.17	1.18	1.07	0.135	0.095
10	1.8	1.4	1.45	1.35	0.14	0.082

B. cereus TX-100

Conc.(%)						
Hr.	0	0.002	0.004	0.005	0.006	0.008
0	0.035	0.033	0.035	0.045	0.045	0.035
1	0.071	0.06	0.055	0.054	0.048	0.038
2	0.38	0.33	0.26	0.108	0.051	0.045
3	0.8	0.75	0.73	0.31	0.042	0.035
4	1.02	0.97	0.95	0.67	0.038	0.032
6	1.3	1.24	1.26	1.08	0.058	0.03
8	1.5	1.4	1.4	1.3	0.12	0.034
10	1.7	1.5	1.6	1.5	0.42	0.04

B. cereus P. Car

Conc.(%)					
Hr.	0	0.004	0.006	0.10	0.02
0	0.019	0.02	0.022	0.04	0.05
2	0.41	0.021	0.012	0	0.001
4	0.8	0.018	0.016	0.005	0.008
6	0.97	0.165	0.015	0.008	0.007
8	1.08	0.6	0.024	0.008	0.006
10	1.12	0.7	0.13	0.008	0.006

B. cereus P. Chol

Conc.(%)					
Hr.	0	0.001	0.003	0.005	0.01
0	0.020	0.024	0.03	0.132	0.315
2	0.41	0.026	0.03	0.162	0.38
4	0.84	0.03	0.04	0.162	0.38
6	1.0	0.24	0.18	0.162	0.365
8	1.08	0.8	0.64	0.175	0.365
10	1.12	1.0	0.75	0.175	0.36

B. cereus SAP

Conc. (%)					
Hr.	0	0.005	0.01	0.05	0.1
0	0.025	0.036	0.038	0.078	0.135
2	0.42	0.34	0.325	0.3	0.285
4	0.9	0.9	0.95	0.95	0.95
6	1.05	1.08	1.15	1.15	1.18
8	1.15	1.2	1.28	1.3	1.3
10	1.2	1.21	1.35	1.4	1.4

절인 때문에 저해효과를 나타낸다고 판단되며 SDS의 경우 고농도에서 cell wall과 membrane의 지방질과 단백질이 용출됨으로 그 성장에 저해를 받는 것으로 생각된다(14, 15, 16, 29, 30).

TX-100은 nonionic detergent로 성장에는 영향을 미치지 못하는 것으로 생각되며 saponin의 경우 Cho등(1981)이 그 성장효과를 보고한 바 있으나 본 실험에서는 큰 영향이 없는 것으로 나타났다.

이상의 결과로 보아 P. Car과 SDC는 영양원 또는 막투과 기능촉진에 간여하는 것으로 생각되며 SDS와 P. Chol은 세포막계의 용해성이 크거나 성장에 저해물질로 작용한다고 판단된다.

*B. cereus*의 성장에 미치는 detergent들의 효과는 Table 2와 같다. 그 결과를 보면 SAP을 제외한 전 구간에서 대체적으로 감소 효과가 나타났으며 특히 P. Chol과 P. Car은 0.005% 이하의 저농도에서도 저해 효과가 크게 나타났는데 이는 *E. coli*에 대한 detergent의 영향보다 더욱 두드러진 것으로, Boman 등(1974)이 penicillin에 대한 내성이 Gram 음성균이 강하다고 밝힌 보고와 그 결과가 같으며 이러한 이유로는 Gram 음성균의 outer membrane이 외부 물질에 대한 방어 역할을 하는 때문으로 생각된다.

P. Car은 동물체에는 존재하나 그 외의 자연 환경에는 흔히 존재하지 않는 물질(36)로 *B. cereus*의 경우 이를 이용하지 못하는 것으로 판단되며 SDS, SDC 및 Tx-100의 경우는 여러 보고가 밝힌 바(10, 14, 16, 25, 28, 30, 31, 32, 33) 이들의 막 단백질과 지방질의 용해 또는 binding 효과에 따른 결과로 인하여 성장에 영향을 미치는 것으로 판단되며 P. Chol은 미생물에 존재하지 않는 choline

계통의 물질로 이들 역시 성장에 이용하지 못하는 것으로 판단된다. SAP 처리군에서는 성장의 촉진효과가 나타났는데 이는 이등(1981)이 *E. coli*를 실험재료로 SAP을 처리한 보고에서 그 성장효과를 보고한 바 있는데 그 결과와 유사하며 그 기작에 관한 연구는 계속되어야 할 과제로 생각된다.

Detergent 처리에 의한 *E. coli*의 세포막계 변화에 대한 전자현미경 관찰결과는 Plate I에서 보는 바와 같다.

SDS와 P. Chol 처리군은 cell wall이 모두 lysis되어 protoplast 수준으로 되어있거나 cell 자체가 심하게 변화된 것으로 관찰되었으며 SDC와 TX-100의 경우엔 cell wall 부분이 굴곡되었거나 일부 소실되었고 P. Car은 cell wall 보다는 원형질체를 변화시킨 것으로 보이며 SAP 처리군은 비교적 대조군과 유사한 것으로 나타났다.

이러한 결과는 Ehrhart 등(1975), Helenius 등(1971), Kirkpatrick 등(1974), Makino 등(1973), Moosic 등(1982), Liscia 등(1982)들이 밝힌바 대로 이들 detergent들이 세포막계 물질의 용해 또는 binding 효과에 기인하는 것으로 판단된다. 또한 De Pämphilis와 Adler(1971), Schnaitman(1971)들이 triton X-100의 *E. coli* cytoplasmic membrane의 specific solubilizing effect에 대한 보고를 한 바 있는데 본 실험의 관찰 결과로는 cell wall에 대한 effect도 큰 것으로 보이며 saponin 처리에 대한 Cho 등(1981)의 보고에서는 periplasmic region이 커졌다고 하였는데 본 실험의 결과로는 큰 차이는 없으나 연관성이 있는 것으로 판단되었다.

전자현미경적 관찰로는 cytoplasmic membrane의 미세구조적 변화를 정확히 파악할 수 없으나 detergent들이 막계에 미치는 영향으로는 protein과 lipid의 용해를 통한 cell wall의 파괴 또는 이들 물질과의 결합으로 인한 구조적변화 및 이러한 결과로 인한 영양물질의 막 투과 기능의 변화등을 생각할 수 있으며 SDS 처리군에서는 cell elongation의 모습들도 나타나는데 이는 Higashi 등(1981)이 보고한 바와 유사한 것으로 이러한 결과 역시 detergent가 세포막계 합성시에 미치는 효과중의 한가지로 판단된다.

Table 3. Amount of protein and phosphorus in *Escherichia coli* whole cell and membrane fraction

1. Whole cell				
	Protein	Total phosphorus	Total* phospholipid	ptn/PL
CON	2.25×10^3	2.6×10^2	254.66	8.84
SDC	2.35×10^3	2.8×10^2	285.87	8.22
TX-100	2.70×10^3	3.3×10^2	264.54	10.21
P.Chol	2.40×10^3	3.2×10^2	321.24	7.47
P.Car	2.90×10^3	1.3×10^2	265.25	10.93
SDS	1.08×10^3	2.3×10^2	212.35	5.09
SAP	2.85×10^3	3.8×10^2	382.76	7.45

2. Membrane fraction

	Protein	Total phosphorus	Total* phospholipid	ptn/PL
CON	1.44×10^2	10.0	121.74	1.18
SDC	1.91×10^2	16.8	184.20	1.04
TX-100	1.95×10^2	13.6	178.84	1.09
P.Chol	1.20×10^2	9.1	162.45	0.74
P.Car	1.92×10^2	18.7	121.42	1.58
SDS	0.98×10^2	8.4	98.78	0.99
SAP	1.84×10^2	13.7	136.54	1.35

unit: $\mu\text{g/ml}$

*: 전인지질 양은 인양에 24배로 환산한 양임.

Abbreviation

CON: Control, SDC; sodium deoxycholate, TX-100; triton X-100, P.Car: palmitoyl carnitine, P.Chol: palmitoyl choline, SDS: sodium dodecyl sulfate, SAP; saponin, ptn; protein, PL: phospholipid.

Table 4. Amount of protein and phosphorus in *B. cereus* whole cell and membrane fraction

1. whole cell				
	protein	Total phosphorus	Total* phospholipid	ptn/PL
CON	3.20×10^3	2.14×10^2	408.00	7.84
SDC	2.86×10^3	2.26×10^2	432.00	6.62
TX-100	3.08×10^3	2.72×10^2	382.56	8.05
P.Chol	3.08×10^3	2.37×10^2	364.61	8.45
P.Car	2.08×10^3	2.30×10^2	309.12	9.06
SDS	3.06×10^3	1.33×10^2	257.10	11.90
SAP	3.22×10^3	1.80×10^2	302.40	10.65

2. Membrane fraction

	protein	Total phosphorus	Ttotal* phospholipid	ptn/PL
CON	3.35×10^2	34.5	73.2	4.58
SDS	3.01×10^2	37.0	87.6	3.44
TX-100	3.83×10^2	38.5	126.0	3.04
P.Chol	2.78×10^2	41.5	156.0	1.78
P.Car	3.0×10^2	44.1	160.56	0.53
SDS	3.15×10^2	28.0	52.08	6.05
SAP	3.41×10^2	38.0	70.56	4.83

unit: $\mu\text{g/ml}$

*: 전인지질 양은 인양에 24배 하여 환산한 양임.

Abbreviation

CON: control, SDC; sodium deoxycholate, TX-100; triton X-100, P. Car: palmitoyl carnitine, P.Chol: palmitoyl choline, SDS: sodium dodecyl sulfate, SAP; saponin, ptn; protein, PL: phospholipid.

또한 *B. cereus*의 세포막계 미세구조에 미치는 각 detergent 들의 영향을 전자현미경으로 관찰한 결과는 Plate II에서 보는 바와 같다. P. Chol과 P. Car 처리군에서는 내생포자(endospore)가 형성된 것으로 나타났고 SDC와 SDS 처리군에서는 cell wall이 거의 lysis 되거나 심하게 손상을 받아 세포 자체의 모양이 변형되었으며 TX-100 처리군은 cell wall 일부가 굴곡되었거나 lysis된 것으로 나타났다. SAP 처리군은 비교적 대조군과 유사한 모습을 나타냈다.

세포막계에서의 각 detergent 들에 의한 생화학적 조성분석 결과는 Table 3, 4에서 보는 바와 같다. *E. coli* whole cell에 대한 각 detergent 들의 처리결과는 TX-100, P.Car, SAP 처리군에서 단백질의 양이 증가하였고 P. Chol과 SAP에서는 전인지질양이 증가했으며 SDS 처리군에서는 단백질양이 감소한 것으로 나타났다. 전체적인 단백질양과 인지질양의 비교를 보면 SDS, P. Chol과 SDS 처리군에서 그 값이 작게 나타났다.

또한 막계에 참여한 이들 물질에 대한 결과에 있어서도 SDS 처리군은 단백질과 전 인지질양 모두 그 값이 작았으며 P. Chol의 경우는 전 인지질양은 늘어났으나 단백질양은 작게 나타났는데 이는 P. Chol이 주로 단백질에 작용하는 것으로 판단할 수 있으며 P. Car, SDC, TX-100, SAP 처리군들은 대체로 대조군에 비해 단백질

양과 인지질양이 증가한 것으로 나타났다.

각 detergent 처리군별로 각 조성물질의 변화율이 다른 것은 Ehrhart 등 (1975), Helenius 등 (1971, 1972), Kirkpatrick 등 (1974), Makino 등 (1970)들이 밝힌바대로 detergent의 종류에 따라 각 조성물질의 용해도가 서로 다르기 때문으로 판단된다.

한편 *B. cereus*의 경우, SAP 처리군을 제외한

전 처리구간에서 detergent에 의해 성장저해 효과가 나타났는데 SAP의 경우 whole cell에서 단백질과 인지질의 비율이 대조군에 비해 30% 증가됨을 나타냈는데 이는 SAP이 단백질 생합성에 촉진효과가 있는 것으로 판단되며 (8) 저농도에서 저해효과를 나타내는 SDS의 처리구간에서도 whole cell과 membrane fraction에서 각기 단백질의 비율이 높는데 이는 SDS가 막계의 인지

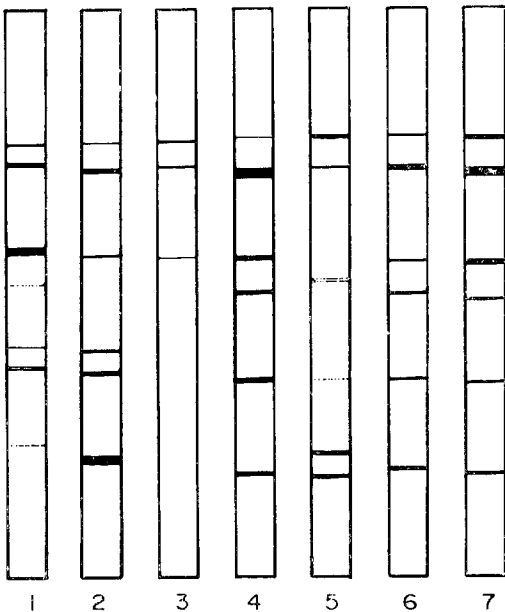
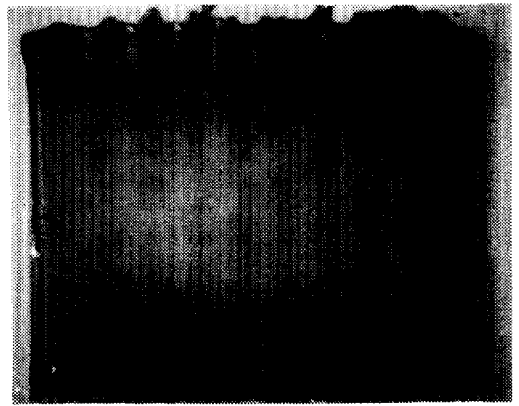
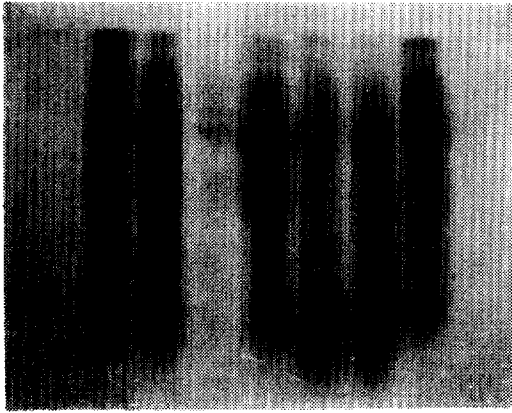


Fig. 1. Profiles of membrane extracts fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis *Escherichia coli B*
 1. CON 2. SDC 3. SDS 4. P.Car 5. P.Chol
 6. TX-100 7. SAP

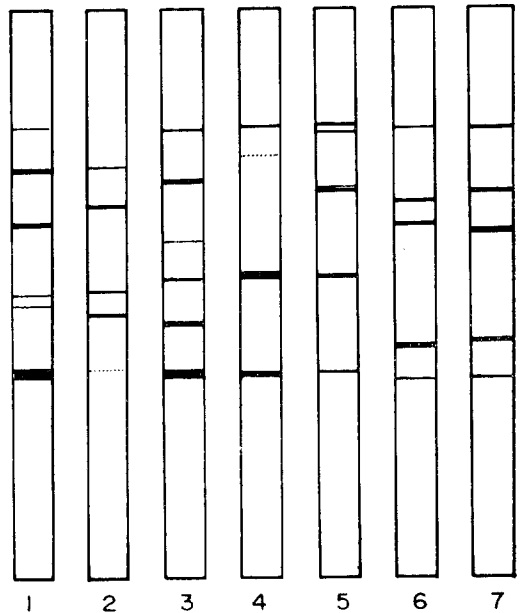


Fig. 2. Profiles of membrane extracts fractionated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis *Bacillus cereus 425*
 1. CON 2. SDC 3. SDS 4. P.Car 5. P.Chol
 6. TX-100 7. SAP

질을 용해했기 때문인 것으로 생각된다. 또한 P. Chol과 P. Car의 처리군에서는 membrane fraction에서 인지질양에 비해 단백질양이 상당히 감소됨을 보이고 있는데 이는 이들 detergent 들이 membrane protein의 용해에 깊이 관련되어 있는 것으로 판단된다. 이러한 결과로 미루어 볼때 각 detergent 들이 생물체의 조성물질과는 서로 상이한 작용을 하는 것으로 판단되며 이러한 결과는 결국 생체막의 구조 변화나 또는 성장에 영향을 주는 것으로 나타난다고 생각된다.

막단백질의 조성에 미치는 detergent들의 영향은 Fig. 1, 2에서 보는 바와 같다. *E. coli*의 경우 막 단백질은 분자크기가 서로 다른 몇가지 분자로 구성되어 있으며 그 pattern은 각 처리군간에 서로 연관성을 가지고 있는 것으로 나타났다. SDS와 P. Chol의 경우 대조군과 비교하여 차이를 나타내었는데 이는 막계에 참여하는 일부 단백질들이 이들 detergent 들에 의해 용출

되었거나 구성 단백질들이 저분자의 단백질로 분해된 결과로 판단되며 또한 다른 처리군에서도 저분자 단백질의 pattern이 나타났다.

이와 같은 결과로 볼때 detergent 들은 모두 막 단백질의 형성에 관계하는 것으로 판단되었으며 특히 SDS와 P. Chol 이 *E. coli*의 막 단백질에 작용이 큰 것으로 나타났다.

한편 *B. cereus*의 막 단백질에 미치는 detergent 들의 결과는 다음과 같다.

Tx-100과 SAP 처리군은 대조군과 비교하여 유사한 pattern을 나타냈으며 SDC, SDS, P. Chol, P. Car 들은 대조군에 비해 많은 차이를 나타내었다. 이는 막 단백질에 참여하는 몇가지 종류의 단백질들이 이들 detergent 들에 의해 일부 용출되거나 저분자로 분해된 까닭으로 생각된다. 이러한 결과로 볼때 SDC, SDS, P. Chol, 및 P. Car 들이 막단백질의 형성에 많은 영향을 주는 것으로 판단되었다.

摘 要

이화학적 성질을 달리하는 6종의 detergent 들이 세균 세포막의 구조와 생화학적 조성에 미치는 영향을 조사한 결과는 다음과 같다.

1. *E. coli* 경우 palmitoyl carnitine과 sodium deoxy cholate 처리군에서 개체군의 성장증가 효과가 나타났으며 palmitoyl choline과 sodium dodecyl sulfate 처리군에서는 억제효과가 나타났으며 *B. cereus*에서는 saponin을 제외한 전 처리군에서 성장의 감소가 나타났으며 특히 palmitoyl choline과 palmitoyl carnitine은 저농도에서도 저해효과가 크게 나타났다.
2. 전자현미경으로 관찰한 결과 *E. coli*에서는 sodium dodecyl sulfate와 palmitoyl cholin 처리군에서 cell wall 이 lysis 되었거나 세포가 파괴되었으며 sodium deoxy cholate와 triton X-100 처리군에서도 cell wall이 손상된 것으로 나타났다. 또 *B. cereus*에서는 palmitoyl choline과 palmitoyl carnitine의 처리군에서 내생포자(endospore)가 형성되었으며 saponin을 제외한 전 구간에서 cell wall이 lysis 되었거나 세포의 모양이 변화된 것으로 나타났다.
3. Bacterial membrane의 생화학적 조성에 미치는 영향으로는 *E. coli*의 경우 sodium dodecyl sulfate 처리군에서는 단백질과 인지질함량이 모두 낮았으며 palmitoyl choline은 주로 단백질에 영향을 미치는 것으로 나타났으며 *B. cereus*의 경우 saponin 처리군에서 단백질 양의 증가가 나타났으며 palmitoyl choline과 palmitoyl carnitine의 처리군에서는 단백질양이 감소되는 것으로 나타났다.
4. 막 단백질의 pattern을 전기영동법으로 확인한 결과 이들 막계는 다양한 단백질로 이루어졌음을 알 수 있는데 *E. coli*의 경우 sodium dodecyl sulfate와 palmitoyl choline 처리군에서 저분자로 쪼개진 단백질의 pattern이 나타났다. 또한 *B. cereus*의 경우에서는 saponin을 제외한 전 구간에서 그 pattern이 대조군에 비해 상이함을 나타냈는데 이는 막단백질의 일부가 detergent 처리에 의하여 용해되거나 저분자로 나뉘어진 것으로 해석되었다.

이상의 결과로 볼때 *E. coli*의 경우 sodium dodecyl sulfate와 palmitoyl choline은 막계를 용해하거나 막계의 수송기능에 저해를 주는 것으로 판단되었으며 palmitoyl carnitine과 sodium deoxycholaten은 영양원으로 쓰이거나 막계의 수송기능을 촉진시키는 것으로 판단되었다. 또한 *B. cereus*의 경우에서는 saponin을 제외한 모든 detergent 들이 세포막계의 형성에 저해효과를 나타내는 것으로 판단되었다.

引用文獻

1. Andersen, H.C. 1978. Probes of membrane structure. *Ann. Rev. Biochem.* **47** : 359~383.
2. Archibald, A.R. 1974. The structure, biosynthesis and function of teichoic acids. *Adv. Microbial Physiol.* **11** : 53~95.
3. Baddiley, J. 1972. Teichoic acids in cell walls and membranes of bacteria. *Ess. Biochem.* **8** : 35~77.
4. Bligh, E.G. and W.J. Dyer. 1959. A lipid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Biophysiol.* **37** : 911~917.
5. Boman, H.G., K. Normark. 1974. Penicillin resistants in *Escherichia coli* K-12. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **245** : 569~586.
6. Chen, P.S. Jr., T.Y. Toribara, and H. Warner. 1956. Microdetermination of phosphorus. *Anal. Chem.* **28** : 1756~1758.
7. Cho, K.S., G. Bennis and P. Proulx. 1973. Formation of acyl phosphatidylglycerol by *Escherichia coli* extracts. *Biochim. Biophys. Acta*, **326** : 355~360.
8. Cho, K.S and P. proulx. 1969. Lysis of Erythrocytes by Long-Chain Acyl Esters of Carnitine. *Biochim. Biophys. Acta*, **193**, 30~35
9. Cho, Y.D., T.U. Kim and H.G. Choi. 1981. A study on the effect of ginseng saponin fraction on cell wall. *Kor. J. Ginseng Sci.* **5** : 65~72.
10. De Pämphilis, M.L. and J. Adler. 1971. Attachment of flagellar basal bodies to the cell envelope: specific attachment to the outer lipopolysaccharide membrane and the cytoplasmic membrane. *J. Bacteriol.* **105** : 396~407.
11. Ehrhart, J.C. and J. Chauveau. 1975. Differential solubilization of proteins, phospholipids, free and esterified cholesterol of rat liver cellular membrane by sodium deoxycholate. *Biochim. Biophys. Acta*, **375** : 434~445.
12. Filip, C., G. Fletcher, J.L. Wulff, and C.F. Earhart. 1973. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by the ionic detergent Sodium-lauryl sarcosinate. *J. Bacteriol.* **115** : 717~722.
13. Glauert, A.M. and M.J. Thornlet. 1969. The topography of the bacterial cell wall. *Ann. Rev. Microbiol.* **23** : 159~198.
14. Hancock, I.C., G. Wiseman., and J. Baddiley. 1981. Lipid intermediate in the synthesis of the linkage unit that joins teichoic acid to peptidoglycan in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **147** : 698~701.
15. Helenius, A. and K. Simons. 1971. Removal of lipids from human plasma low-density lipoprotein by detergents. *Biochemistry*, **10** : 2542~2547.
16. Helenius, A. and K. Simons. 1972. The binding of detergents to lipophilic and hydrophilic proteins. *J. Biol. Chem.* **247** : 3651~3661.
17. Higashi, T., K. Suzuki, and N. Otsuji. 1981. Sodium dodecyl sulfate sensitive separation in a mitomycin C-sensitive, mtc, mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **146** : 1117~1123.
18. Hjemelund, L.M. 1980. A nondenaturing zwitterionic detergent for membrane biochemistry: Design and synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **77** : 6368~6370.
19. Joo, C.N. 1978. The effect of ginseng saponin of lipid dispersion. In "The 20th anniversary thesis collection of Korean ginseng." pp. 35~46.
20. Karnovsky, M.J. 1965. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolarity for use in electron microscopy. *J. Cell Biol.* **243** : 100~103.
21. Kirkpatrick, F.S., S.E. Gordesky and G.V. Marinetti. 1974. Differential solubilization of proteins, phospholipids, and cholesterol of erythrocyte membranes by detergent. *Biochim. Biophys. Acta*, **345** : 154~161.
22. Leive, L. 1973. Ed. Bacterial membranes and walls. 495pp. N.Y. Marcel Dekker Inc.
23. Liscia, D.S., T. Algade, and B.K. Vandergaar. 1982. Solubilization of active prolactin receptors by a nondenaturing zwitterinoic detergent. *J. Biol. Chem.* **257** : 9401~9405
24. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr, and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** : 265~275.
25. Luft, J.H. 1961. Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9** : 409~414.
26. Makino, S., J.A. Reynolds, and C. Tanford.

1973. The binding of deoxycholate and Triton X-100 to proteins. *J. Biol. Chem.* **248** : 4926~4932.
27. Moosic, J.P., E. Sung, A. Nilson, P.J. Jones, and D. J. McKean. 1982. The selective solubilization of different murine splenocyte membrane fractions with lubrol WX and Triton X-100 distinguishes two forms of Ia antigens. *J. Biol. Chem.* **257** : 9684~9681.
28. Osborn, M.J. 1969. Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Ann. Rev. Microbiol.* **23** : 501~538.
29. philippot, J. 1971. Study of human red blood cell membrane using Sodium deoxycholate. 1. Mechanism of the solubilization. *Biochim. Biophys. Acta*, **225** : 201~213
30. Reaveley, D.A. and Burge, R.E. 1972. Walls and membranes in bacteria. *Adv. Microbial physiol.* **7** : 1~81.
31. Reynolds, J.A. and C. Tanford. 1970. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of proteins in biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **66** : 1002~1007.
32. Reynolds, J.A. and C. Tanford. 1970. The gross conformation of protein-sodium dodecyl sulfate complexes. *J. Biol. Chem.* **245** : 5161~5165.
33. Sahnaitman, C.A. 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J. Bacteriol.* **108** : 545~552.
34. Sukow. W., H.E. Sandberg, E.A. Lewis, D.J. Eatough, and L.D. Hansen. 1980. Binding of the Triton X series of nonic surfactants to bovine serum albumin. *Biochemistry*, **19** : 912 : 917.
35. Tilby, M.J. 1978. Detergent-resistant variants of *Bacillus subtilis* with reduced cell diameter. *J. Bacteriol.* **136** : 10~18.
36. Weber, K. and M. Osborn. 1969. The reliability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244** : 4406~4412.
37. 이강순, 강정순, 조기승, 이강석. 1975. 적혈구막에 관한 연구(I) Palmitoyl carnitine에 의한 소적혈구 막의 용해. *한국 생화학회지.* **8** : 21 : 35.

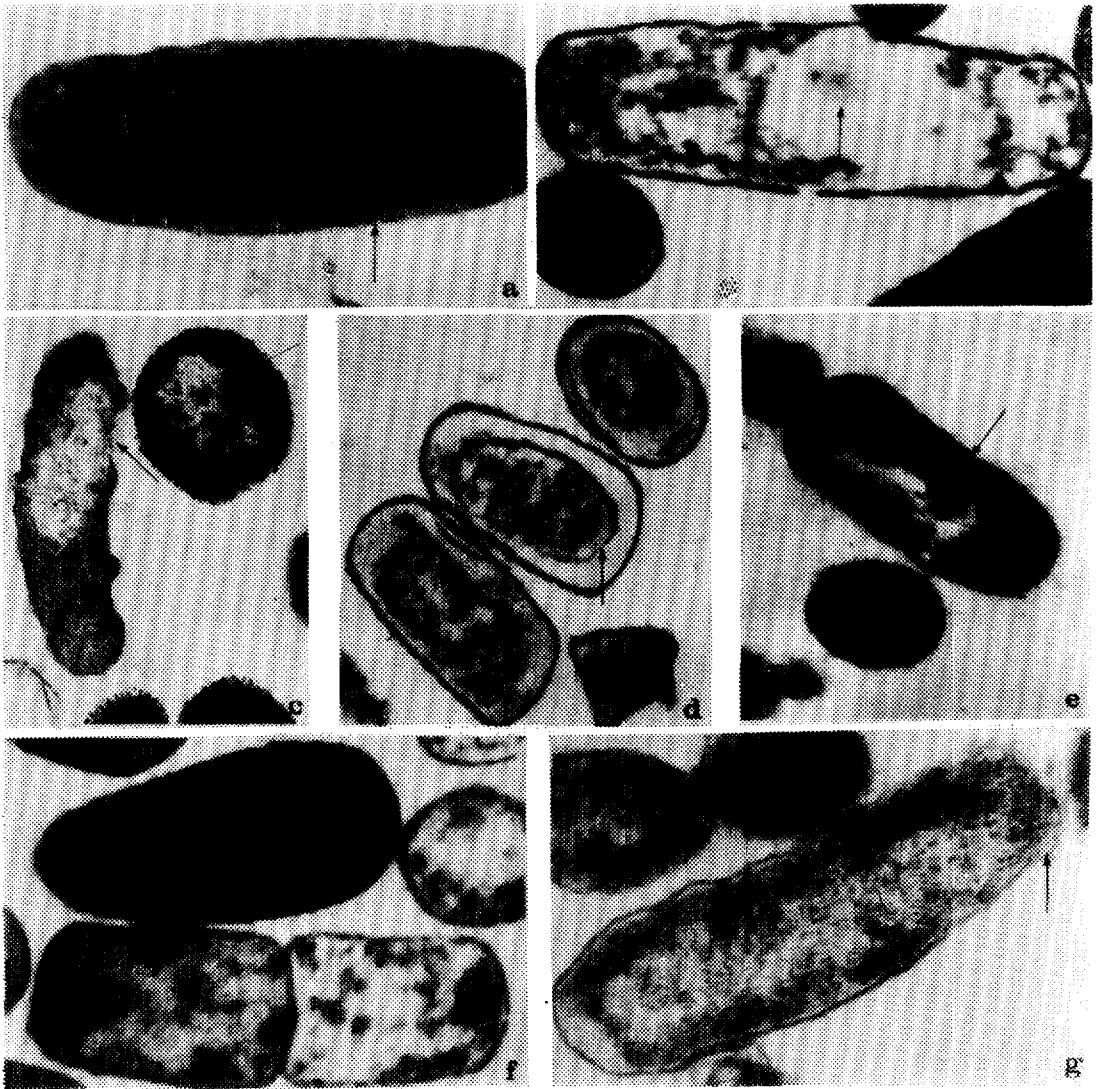
Plate (I)



Explanation of Plate I

- Plate I.** Electron micrograph of *Escherichia coli* B
- a. Control cell
 - b. The cell treated with P. Car.
 - c. Condensed cell wall by SDC
 - d. The *E. coli* cell were collapsed by P. Chol.
 - e. Cell wall lysis and cell elongation by SDS
 - f. The cell treated with SAP
 - g. Condensed cell wall by TX-100

Plate (I)



Explanation of Plate II

- Plate I.** Electron micrograph of *Bacillus cereus* 425
- a. Control cell
 - b. Early formation of endospore by P. Car.
 - c. Lytic phenomena of cell wall by SDS
 - d. Completion of endospore by P. Chol.
 - e. Cell wall lysis by SDS
 - f. Normal cell treated with SAP
 - g. Denatured cell wall by TX-100