

■ GC-fatty acid 분석에 의한 동정방법

농업과학기술원 생물자원부 분자유전과
송 재 경

1. 서론

세균의 분류 동정에 이용되는 분류학적 특성들은 형태적, 배양적 특성 및 생리화학적 특성뿐만 아니라, 영양요구성에 관련되는 표현형적 특성 등이 중요하게 이용되어 왔다. 최근에는 세포 구성물질의 조성 즉, 세포 내의 전체 단백질의 구성, 세포벽의 조성(Quinones, LL-DAP, Murein 등) 및 세포막의 지방산 조성 등과 같은 세포의 화학적 특성들을 이용한 화학적인 분류(CHEMOTAXONOMY)가 새로운 분류의 방법으로 대두되고 있다. 화학적인 분류는 다양한 화학적 성질을 이용하여 미생물을 분류 동정하는 학문으로 정의된다. 보다 면밀한 의미로서의 화학적인 분류는 세균의 AMINO ACIDS, SUGARS, LIPIDS, PROTEINS와 그 외 여러가지 구성물질의 조성을 분석하고, 세포나 발효산물의 일부와 enzymes를 분석하는 것을 말한다. 이러한 화학적 분류는 GC, TLC, HPLC, Starch gel, Polyacrylamide gel electrophoresis 등, 복잡하고 보다 진보된, 넓은 분야의 기술을 도입하므로써 미생물 세포의 화학적인 연구에 유용하게 되었다. 또한 같은 생물체량(biomass)으로부터 LIPIDS, AMINO ACIDS와 SUGARS의 조성을 분석하는 향상된 방법이 개발되어졌으며 자동화된 system과 data 분석이 이루어지고 있다. 더불어 single colony와 같은 소량의 균체만으로 빠른 분류동정이 행해지고 있다. 이들 방법들이 장단점을 가지고 있지만, 여러 방법의 조합(polyphasic taxonomy)으로 훨씬 가치 있는 결과를 얻을 수 있을 것이다.

본 GC-fatty acid 분석에 의한 분류동정은 세포막 및 세포벽의 구성물질인 LPS, phospholipid 등을 Esterification 시킨 후 Gas Chromatography를 이용하여 fatty acid의 조성(Length, Branched, Unsaturated, Cyclo)을 분석함으로써 각 미생물을 분류 동정하는 방법이다. 이러한 방법은 1950년대에 처음으로 세균동정에 시도되었으며 1963년에 GLC에 의한 fatty acid 분석방법으로 세균동정의 가능성에 대한 증거가 제시되었다(Abel et al). 이후 최근에 이르기까지 GC를 이용하여 Cellular Fatty Acid(CFA)를 분석하는 세균 동정법이 개발되어지고 있다

2. GC-fatty acid 분석에 의한 미생물 동정

미생물의 세포벽은 종에 따라 지방산의 조성이 차이가 있다. 이러한 차이를 Gas Chromatography로 분석하여 미생물의 종을 동정하는 방법을 이용하여 Microbial Identification System (MIDI

Sherlock system)이 개발되었다. MIDI Sherlock system은 CFA 분석을 위한 GC와 Data 해석 및 미생물 종의 동정결과를 위한 computer system으로 구성되어 있다.

(1) 구성

- Gas chromatograph(HP5890 II or HP6890)
- Autosampler system
- Computer system(Chemstation software)
- Microbial Identification System software
- Library Generation Software

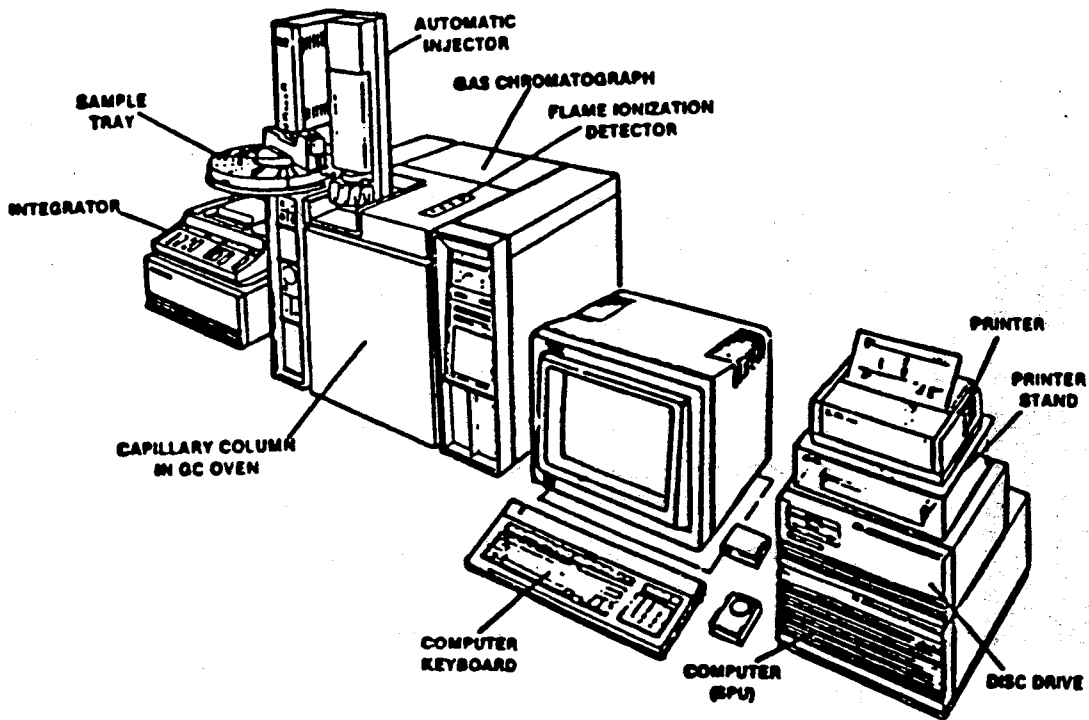


그림 1. Sherlock system의 주요기기의 구성

(2) 원리

○ 미생물의 세포막 및 세포벽에 존재(그림2)하는 300여개의 CFA중에 C₉₋₂₀가 대부분이며, 특히 C_{16, 18}이 가장 많은 percent를 차지한다.

- Source of fatty acids(phospholipid of cell membrane)
- Gram negative bacteria : LPS
- Gram positive bacteria : lipoteicoic acid
- Fungi : sterol

○ 미생물 및 거의 모든 생명체에는 특징적인 CFA (약 5~15가지)가 존재하며, 이러한 CFA의 종류 및 정량의 차이를 이용하여 미생물을 동정한다.

- 예) Gram positive bac. : branched chain-containing CFA, Odd numbered chain
- Gram negative bac. : cyclopropane-containing CFA, Even numbered chain
- Higher organism : polyunsaturated CFA

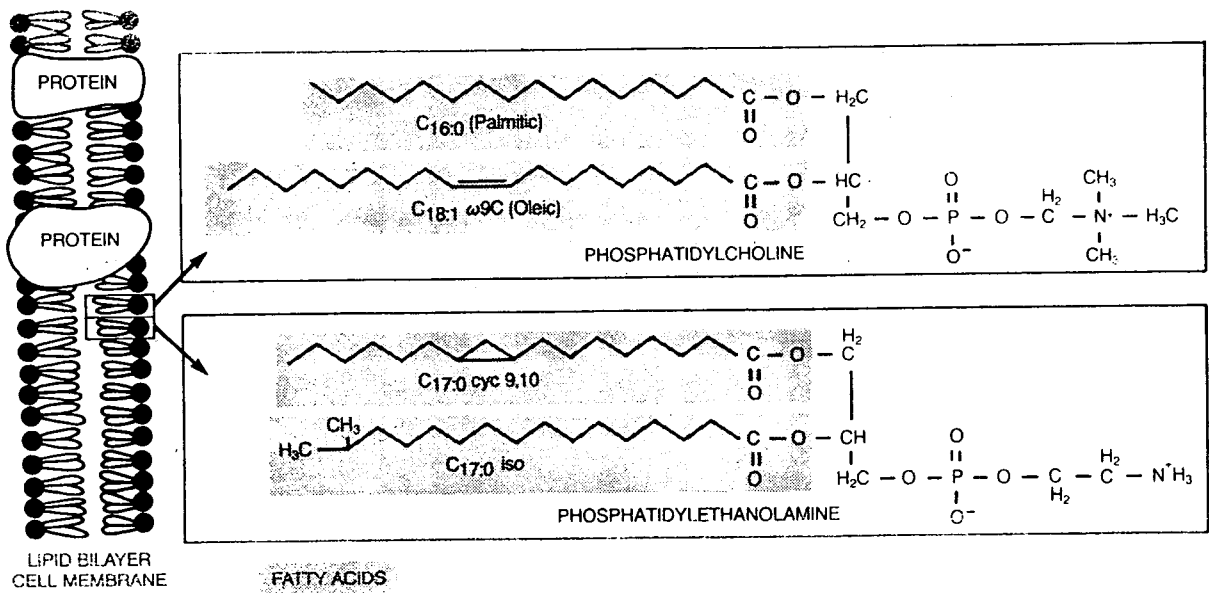


그림2. 미생물의 세포막과 지방산의 구성

○ 지방산의 명명

화학적인 명명법은 일반적으로 IUPA(systematic) name이 있으나, Sherlock system에서는 간편화된 형태로 명명하였다 (표 1). 예를 들면 C_{16:1}ω₇c에서 16은 지방산의 탄소수이고 1은 이중결합의 수를 나타낸다. 또한 ω는 carbonyl기의 반대쪽을 나타내며, 7은 이중결합의 위치이며 c는 cis를 나타낸다.

표 1. 세균의 일반적인 지방산

Type of fatty acid	Name		
	Systematic	Simplified	Common
Saturated	Dodecanoic	C12:0	Lauric acid
	Tetradecanoic	C14:0	Myristic acid
	Hexadecanoic	C16:0	Palmitic acid
	Octadecanoic	C18:0	Stearic acid
	Eicosanoic	C20:0	Arachidic acid
Unsaturated	cis-9-Hexadecenoic	C16:1 ω 7c	Palmitoleic acid
	cis-9-Octadecenoic	C18:1 ω 9c	Oleic acid
	cis-11-Octadecenoic	C18:1 ω 7c	Vaccenic acid
Branched chain	13-Methyltetradecanoic	Iso-C15:0	
	12-Methyltetradecanoic	Anteiso-C15:0	
	10-Methyloctadecanoic	10-Me-C19:0	Tuberculostearic acid
Hydroxy	3-Hydroxytetradecanoic	3-OH-C14:0	β -Hydroxymyristic acid
Cyclopropane	cis-11,12-Methylene-octadecanoic	C19:0cyclo11,12	Lactobacillic acid

3. 전처리 및 분석

표준조건에서 세균을 배양한 후, 지방산을 추출한다. 이 추출물을 GC로 분석하고 분석된 data는 library와 비교하여 미생물의 종을 동정한다(그림 3).

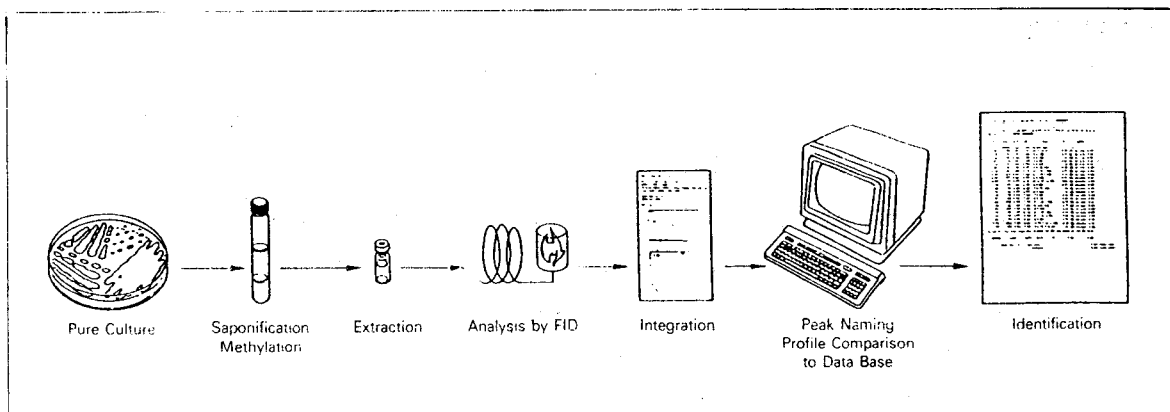


그림 3. Sherlock system을 이용한 미생물의 동정 모식도

(1) 세균의 배양

세포는 환경조건(배지, 배양시간, 배양온도 등)의 변화에 따라 세포막의 유동성을 유지하기 위하여 세포막에 존재하는 지방산의 조성을 바꾼다. 이러한 이유로 인하여 정확한 동정을 하기위해 standard library(표 2)에 사용되어진 조건에 맞추어 세균을 배양해야 한다.

표 2. Sherlock의 standard libraries(95.11.1)

Package	Name	Version	Entries	Description
Aerobe	TSBA	3.9	721	Aerobes, 28°C, 24hr, on trypticase soy broth agar
	CLIN	3.9	392	Clinical Aerobes, 35°C, 24hr, on Blood Agar, Chocolate, etc
	MI7H10	3.8	31	Mycobacteria, 35°C, 5-10% CO ₂ , on Middlebrook 7H10 with OADC enrichment
Anaerobe	BHIBLA	3.8	156	Anaerobes, 35°C, 48hr, on BHIBLA plates in Gas Paks
	MOORE	3.9	816	VPI Broth-grown Anaerobe Library, 35°C, in PYG Broth
Yeast	YST28	3.8	196	Yeasts, 28°C, 24hr, on SAB Dextrose Agar
	YSTCLIN	3.8	20	
	ACTIN1	3.8	42	Actinomycetes, 28°C, 3-10days, in Trypticase Soy Broth, 150rpm
	FUNGI	3.8	62	Fungi, 28°C, 2-5days, in SAB Dextrose Broth, 150rpm

(2) 지방산의 추출

표준조건에서 세균을 배양한 후, 50~100mg의 균체를 tube에 모은다. 이 균체를 용액 I, II를 사용하여 saponification, methylation시킨 후, 용액III로 Fatty Acid Methyl Ester(FAME)를 추출한다. 이 추출액은 GC로 분석을 용이하게 하기 위해 용액IV로 세척한다.(그림 4)

- 용액 I : NaOH 45g, MeOH 150ml, deionized distilled water 150ml
- 용액 II : 6.00N HCl 325ml, MeOH 275ml
- 용액 III : Hexane/Methyl tert-Butyl Ether (1/1)
- 용액 IV : NaOH 10.8g, ddw 900ml

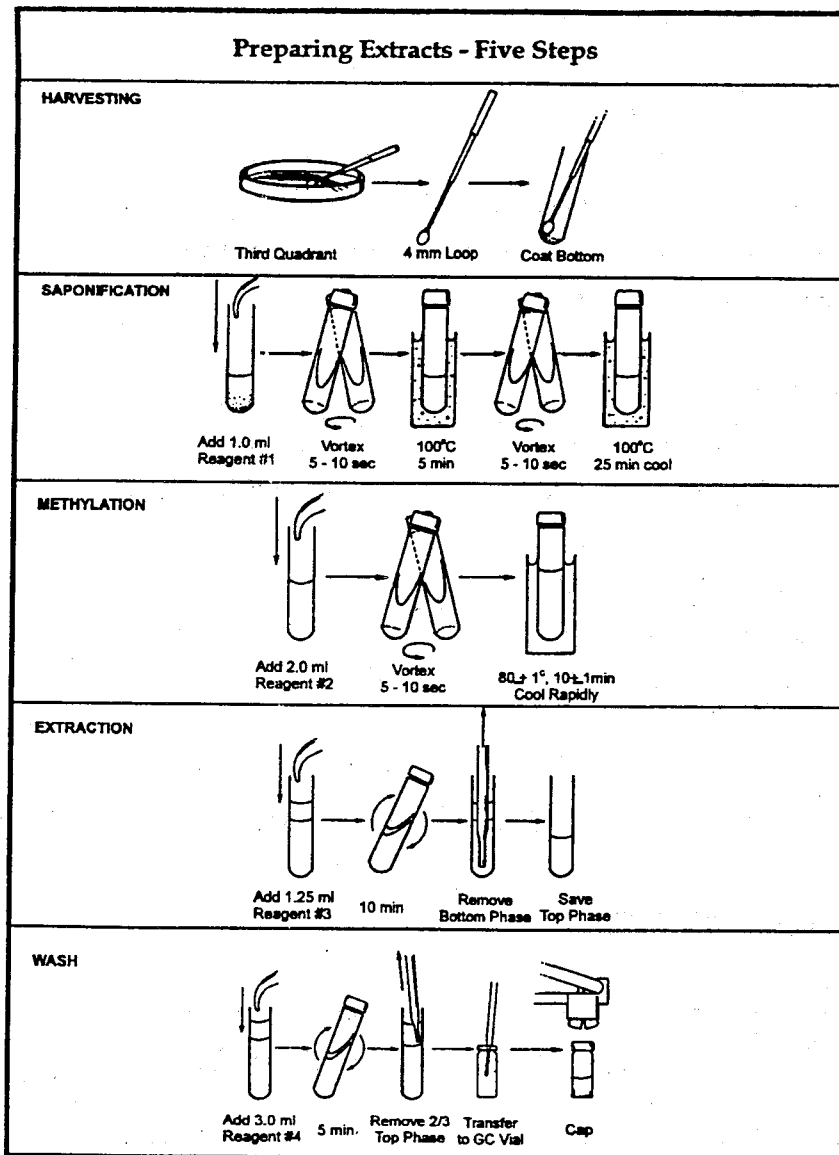


그림 4. 세균의 지방산추출 5단계

(3) GC를 이용한 분석

전처리가 된 지방산을 아래와 같은 조건으로 GC를 이용하여 분석한다.

- 사용되는 기체 : 수소(운반기체, 30psi), 질소(보조기체, 20psi), 공기(40psi)
- Autoinjector : 일정양(2 μ l)의 시료주입에 필요함
- 분석용 칼럼 : 25m * 0.2mm phenyl methyl silicone fused silica

Capillary column

- 검출기 : FID
- 분석 온도
 - Injection part : 250°C
 - Oven part : 170 ~ 270°C, rate = 5°C/min
 - ~ 300°C, column cleaning
 - Detection part : 300°C

○ 작동 순서

- GC power on → Gas pressure control → Oven on(290℃)
- Injector on(250℃) → Detector on(300℃)
- oven temp.가 150℃ 이상일 때 점화 → Sherlock software
- Sample table작성 → start

(4) 분석결과 해석 및 동정

Sherlock Software를 이용하여 GC에서 분석된 chromatogram과 data를 정성 및 정량 분석하여 이를 library와 대조하여 Similarity Index(SI)값으로 표시 ⇒ 미생물의 동정

SI : Library의 CFA조성 표준값과 얼마나 가까운지를 수로 표시

SI > 0.5 : Best match(단일 균주)

0.3 < SI < 0.5 : Good match(단일 균주)
match(2균주 이상)

SI < 0.3 : 전처리 과정이 잘못되었거나 일치되는 균주가 library에 없음.
그러나 가장 밀접하게 관련된 종을 나타냄

4. 각 균주별 지방산 분석의 예

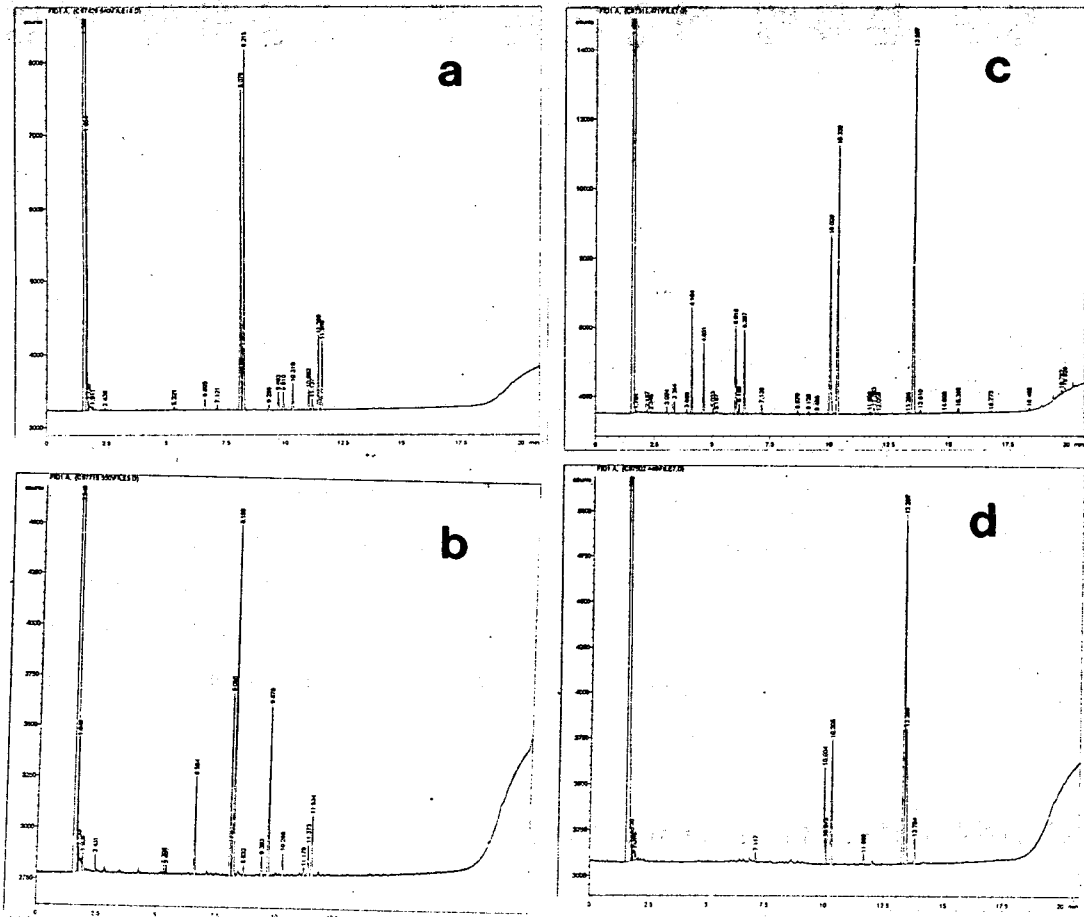
CFA	10:0 3OH	12:0	13:0 ISO	13:0 anteISO	12:0 2OH	12:0 3OH	14:0 ISO	14:0	15:0 ISO	15:0 ante ISO
표준균주										
<i>B. subtilis</i> (a)							1.14	0.62	32.7	37.3
<i>S. albus</i> (b)			0.90	0.79			9.14		18.5	35.2
<i>P. aeruginosa</i> (c)	6.72	4.67			6.39	6.27		0.71		
<i>C. albicans</i> (d)								1.06		

CFA	15:0	16:1 w7c alc	16:1 ISO	16:0 ISO	16:1 w11c	16:1 w7c	16:1 w7t	16:0	ISO 17:1 w10c	17:1 ISO
표준균주										
<i>B. subtilis</i> (a)		0.69		2.02	2.03			3.02	2.43	1.30
<i>S. albus</i> (b)	1.06		2.23	18.4				2.51		
<i>P. aeruginosa</i> (c)						15.8		22.4		
<i>C. albicans</i> (d)						10.9	2.79	13.8		

CFA	17:1 ante ISO	17:0 ISO	17:0 ante ISO	17:1 w8c	17:0 cyclo	18:2 cis 9,12	18:1 w9c	18:0	18:1w7 c	19:0 cyclo w8c
표준균주										
<i>B. subtilis</i> (a)		8.45	7.82							
<i>S. albus</i> (b)	1.1	3.35	6.65							
<i>P. aeruginosa</i> (c)					0.64				33.2	0.51
<i>C. albicans</i> (d)				1.31		41.6	25.3	3.12		

* 위의 수치는 CFA의 조성 %임

* 0.5이하의 수치는 무시함



5. 참고문헌

1. 미생물 분류 동정 장치(training manual), 영인과학, 1996
2. Microbial Chemotaxonomy, J. Chromato., 379(1986) 367-411
3. Application of Cellular Fatty Acid Analysis, Clin. Microbiol. Rev., oct. 1991, p.422-438