

***Ferrobacillus ferrooxidans*에 대한 면역학적연구**

—균체성분의 화학적 분석에 관하여—

이강순 · 장정순 · 민봉희 · 이강석

(한국원자력연구소, 방사선생물학 연구실)

Immunological Studies on *Ferrobacillus ferrooxidans*

—Chemical Analysis on the Bacterial Cell Components—

RHEE, Kang Soon, Chung Soon CHANG, Bong Hee MIN, and Kang Suk LEE.

(Radiation Biology Laboratory, Korea Atomic Energy Research Institute)

ABSTRACT

The cell components of an iron-oxidizing *F.ferrooxidans* were analyzed with heterotrophic *E.coli* as a control group.

The large amounts of total carbohydrate and lipids were represented in *F.ferrooxidans* and especially the total lipids including total sterol, glyceride, and phospholipid possessed about 4.6% of total dry cell.

In amino acids analysis, an unknown material was detected in *F.ferrooxidans* and it is assumed that this material is a ninhydrin-positive and have an association with lipid.

서 론

유기영양성 세균과는 달리 세균의 생활사 및 대사과정등이 여러면으로 특이한 무기영양성 세균에 대한 전반적인 연구는 후진적이며 최근에 이르러 무기영양성 세균중 산업적 이용도가 큰 *Thiobacillus*속과 *Ferrobacillus*속에 대한 연구(Sutton, 1963; Argall, 1964; Woodcock, 1967)가 일부 이루어지고 있다.

특히 철을 산화하는 세균으로 알려지고 있는 *Ferrobacillus ferrooxidans* (이하 *F.ferrooxidans*라 약함)는 광산이나 광물에 침출적으로 작용하여 유용금속을 효과적으로 침출함으로써 특히 산업적인 면에서 유용한 세균으로 알려져 있으나 기실 이세균에 대한 기초적인 연구는 물론 면역학적 연

구는 많지 않다.

저자들은 무기영양성 세균중 철을 산화하는 세균인 *F.ferrooxidans*에 대한 면역학적 연구를 수행하기 위하여 우선 항원으로서의 균체성분을 분석 규명할 의도하에 국내 동광산의 갱내수에서 분리 동정한 *F.ferrooxidans* 균체 성분의 화학적성상을 검토하기 위하여 단백질, 당, 아미노산 및 지질등의 분석실험을 행하여 얻은 성적을 보고 드리는 바이다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배양

실험에 사용한 균주인 *F.ferrooxidans* st-3는 경북소재 달성광산의 갱내수에서 Sutton 및 Corrick(1963)등의 방법으로 동정한 균주로 9K배양액에 접종한 후 (Silver-

rman, 1959) 28°C 항온기 내에서 5~6일간 연속통기 배양을 실시하였고 일단 배양이 끝난 세균은 냉동원심분리기(I. E. C. B-20 type, centrifuge, USA)를 이용하여 9,000 r.p.m.에서 15분간 원심분리 후 침전세균을 모은 다음 다시 냉생리식염수로 3번 반복 세척하여 순수한 침전세균만을 모아 실험에 공시하였다.

대조균인 *E. coli*, 113-3은 국립보건연구원에서 분양받아 사면한천배지에 접종한 후 37°C 항온기 내에서 배양한 다음 상기방법에 따라 순수한 침전세균만을 모은 후 실험에 사용하였다.

2. 성분분석

1) 당 정량

위에서 얻은 세균에 대한 전당을 정량하기 위하여 anthrone법(Trevelyan, 1956)으로 파장 620nm에서 glucose의 양으로서 정량하였다.

2) 조단백 정량

조단백은 micro-kjeldahl법에 따라 각각 정량하였다.

3) 아미노산 분석

각각의 침전세균 일정량에 6N HCl을 분쇄관에 넣어 진공펌프로 공기를 제거한 후 110°C의 항온기 내에서 48시간 가수분해한 후 과잉의 염산을 냉동건조기(Virtis lyophilizer, USA)로 제거한 다음 아미노산 분석용 시료로 하였고 분석은 Spackman (1958)등의 방법에 따라 liquid chromatograph (Hitachi 034 liquid chromatograph)를 이용하여 다음과 같이 실시하였다.

즉 산성 및 중성 아미노산은 Hitachi custom ion exchange resin 2612를 이용하여 pH 3.25 및 pH 4.25인 sodium citrate buffer로 유출시켜 분리하였고 염기성 아미노산은 역시 같은 회사제품인 ion exchange resin 2611를 이용하여 pH 5.28인 sodium citrate로 유출시켜 분리하였으며 이때 buffer유출은 60ml/hr, ninhydrin 30ml/hr 및 column temp.는 55°C를 유지하였다.

4) 지질 분석

침전균체 2gm(wet wt)에 10ml의 methanol을 가하여 공전 시험관에 옮긴후 55°C 수조내에서 aircondenser를 부착하여 1시간 관류시키고 여기에 chloroform 30ml를 가하여 다시 30분간 관류시켰다.

이와같이 처리한 시료를 Folch(1957)등의 방법에 의하여 정제 추출한 지질에 methanol을 가하여 전량이 30ml 되게 조정된 다음 cholesterol, glyceride 및 phospholipid분석용 시료를 작성하였다.

분석용 시료로부터의 지질의 분리는 thin layer chromatography법에 의하였으며 중성지질의 분리는 Skipski(1964)등의 법에 따라, phospholipid는 Nickols(1965)등의 법에 의하여 각각 실시하였다.

분리 정제된 cholesterol정량은 Kenny (1952)법에 의한 Libermann-Buchard반응을 이용하였고 glyceride정량은 Harvey (1951)등의 법에 따라, 끝으로 phospholipid의 정량은 Biezanski(1964)등의 법을 개량하여 각각 실시하였다.

Table 1. The Chemical analysis of *F. ferrooxidans*

Chemical analysis Bacteria	1) Total carbohydrate	2) Total protein
<i>F. ferrooxidans</i> st-3	mg/100mg dry wt 43.01	28.76
<i>E. coli</i> , 113-3	13.68	39.70

1) Total carbohydrate as glucose by anthrone method

2) Total protein as micro-kjeldahl method

결과 및 고찰

1. 당 및 단백질 분석에 대하여

무기영양성 세균인 *F. ferrooxidans* 균체의 성분중 전당 및 조단백의 양을 정량하기 위하여 anthrone방법과 micro-kjeldahl법으로 분석을 실시한 성적은 Table 1과 같다.

즉 전당 및 조단백의 양은 각각의 세균을 100mg dry wt로 하였을때 *F. ferrooxidans*

는 43.01mg 및 28.76mg이였고 대조균인 *E.coli*는 각각 13.68mg 및 59.71mg이었다.

이상의 결과로 볼때 전당의 양은 *F.ferrooxidans*가 *E.coli*에 비하여 현저히 많은 수치를 나타냈으나 조단백은 오히려 *F.ferrooxidans*가 *E.coli*에 비해 적은 수치를 나타냈다.

*F.ferrooxidans*의 균체성분 분석에 관한 직접적인 보고는 적으나 Shively(1970)등이 무기영양성 세균인 *Thiobacillus*속의 미세구조를 전자현미경을 이용하여 관찰한 바에 의하면 균체의 cytoplasm내에는 강하게 염색이 되는 densely stained body가 많이 존재한다고 하며 그 화학적 주성분은 다당류인 glycogen이 축적되어 형성된 것이라고 보고하고 있다.

무기영양성 세균은 cytoplasm뿐만 아니라 cell wall에도 다량의 다당류를 함유하고 있는 것으로 알려져 있으며, Wang(1970)등에 의하면 *F.ferrooxidans*의 cell wall을

구성하고 있는 성분은 당지질 및 peptidoglycan이 주축을 이루고 있다고 보고하였고 역시 cytoplasm에도 *T. thiooxidans*와 같이 다당류가 대부분인 dense body가 있다고 보고하고 있다.

일반적으로 cell wall을 이루고 있는 주성분은 당단백, 당지질 및 acidic mucoprotein 등으로 구성되어 있다고 생각되며 이 성분은 세균종속에 따라 일정한 조성 내지 형태를 취하고 있으며 *F.ferrooxidans*는 *E.coli*에 비해 훨씬 두꺼운 cell wall 및 cell membrane등을 갖고 있다고 생각된다.

이와같은 결과는 무기영양성 세균 및 유기영양성 세균 균체의 성분에 많은 차이점이 있다는 사실을 말하며, 즉 *F.ferrooxidans*의 균체가 *E.coli*에 비해 cell wall 및 cytoplasm의 구조적 내지 성분의 차이를 암시하고 있다.

*F. ferrooxidans*와 *E. coli*는 원래 영양원을 달리하는, 즉 전자는 무기영양 세균이

Table 2. The amino acid composition of *F. ferrooxidans*

Bacteria	<i>F. ferrooxidans</i> st-3 hydrolysate	<i>E. coli</i> , 113-3 hydrolysate
Amino acid	mole/100moles of total amino acid	
Aspartic acid	13.57	11.98
Threonine	5.63	2.54
Serine	3.82	3.21
Glutamic acid	9.99	12.18
Proline	2.94	4.64
	acidic total 35.95	acidic total 34.55
Glycine	11.83	10.59
Alanine	15.00	14.42
Valine	4.96	4.88
Methionine	3.46	1.63
Iso-leucine	3.74	5.49
Leucine	6.35	9.66
Tyrosine	2.40	1.11
Phenylalanine	3.73	1.70
	neutral total 51.47	neutral total 49.48
Lysine	5.05	11.96
Histidine	1.80	0.65
Arginine	5.76	3.37
	basic total 12.61	basic total 15.98
Total	100.03	99.99

고 후자는 유기영양 세균인 만큼 동일 성분의 배양기를 사용할 수 없는 관계로 직접적으로 균체성분을 비교한다 하더라도 실험적인 문제점이 있으리라고 생각도 되나 저자들의 실험성적대로 고찰한다면 *F. ferrooxidans*는 당을 많이 함유하는 cell wall이 매우 두꺼워 전체적으로 cell wall이 얇은 *E. coli*에 비해 당의 양이 많고 비례적으로 단백질 양이 적은 것으로 생각된다.

2. 아미노산 조성에 대하여

무기영양성 세균인 *F. ferrooxidans*의 균체 구성 성분중 단백질의 아미노산 조성을 산성, 중성 및 염기성 별로 분석하여 *E. coli*의 그것과 비교한 성적은 Table 2와 같다.

*F. ferrooxidans*의 아미노산 조성을 mole%로써 표시할때 산성은 35.95, 중성은 51.47 및 염기성은 12.61에 비해 *E. coli*는 34.55, 49.48 및 15.98로 아미노산의 구성비는 거의 비슷한 수치를 나타냈고 다만 염기성 아미노산에 있어 *F. ferrooxidans*가 *E. coli*에 비해 약간 적었다.

그러나 각종 세균들 간의 균체성분중 아미노산 조성에는 큰 차이가 없는 것으로 생

각되며 상기 아미노산 조성을 기준으로 하여 두 세균간의 차이점을 논한다는 것은 큰 의의가 없는 것으로 생각된다.

그러나 무기영양성 세균인 *F. ferrooxidans*와 유기영양성 세균인 *E. coli*와의 염기성 아미노산 조성에 있어 큰 차이점은 없으나 lysine peak를 전후하여 약간의 차이점을 발견할 수 있었다. (Fig. 1)

즉 *F. ferrooxidans*는 lysine전에 ninhydrin-positive인 peak가 나타났고 *E. coli*는 lysine 후에 작은 peak가 나타났다.

*E. coli*에서 lysine후에 유출되어 나온 peak는 본 실험실에서 실시한 결과와 여기에 관련된 보고들을 (Kim, 1965; Livine, 1969; Park, 1971) 종합하여 보건데 monomethyllysine으로 생각되며 *E. coli*의 체내에 존재하는 methylated된 단백질로부터 유래한 monomethyllysine으로 사료된다.

한편 *F. ferrooxidans*에서 lysine전에 나타난 peak는 현재 본 실험실에서 추시중에 있다.

3. 지질 분석에 대하여

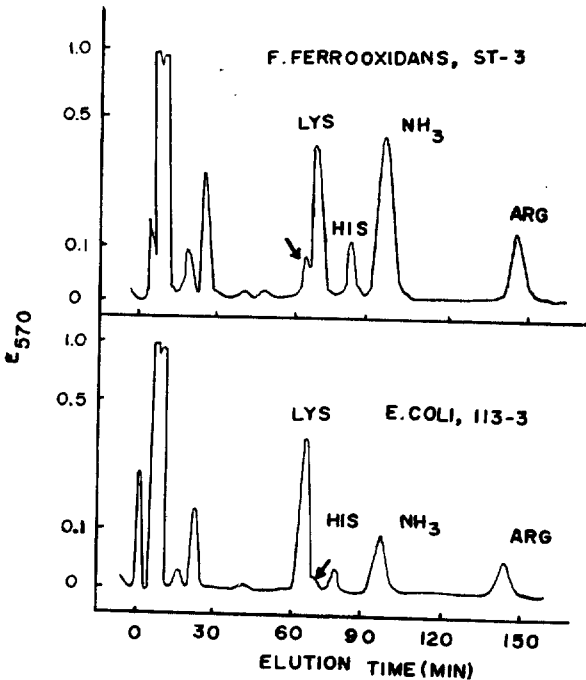


Fig. 1 Elution profile of the basic amino acid of *F. ferrooxidans* and *E. coli* hydrolysate. Liquid chromatography with 0.35M sod. citrate buffer, pH 5.28 at 55°C. Resin type: Hitachi custom ion exchange resin 2611. Column size: 0.9×15 c/m. Flow rate: buffer 60ml/hr, ninhydrin 30 ml/hr

Table 3. The lipid composition of *F. ferrooxidans*

Lipid components	<i>F. ferrooxidans</i> st-3	<i>E. coli</i> 113-3
	mg/g of dry wt	
Free sterol	3.98	1.65
Esterified sterol	4.38	1.67
Total sterol	8.36	3.32
Monoglyceride	7.47	4.11
Diglyceride	3.73	4.12
Triglyceride	8.74	3.08
Total glyceride	19.94	11.31
Phosphatidyl inositol	2.56	0.40
Phosphatidyl choline	2.74	0.44
Phosphatidyl ethanolamine	5.76	1.37
Unidentified phospholipid	7.07	0.73
Total phospholipid	18.13	2.94

무기영양성 세균인 *F. ferrooxidans* 균체의 지질 조성과 이와 관련되어 있는 이들 세균의 생활사 및 대사과정 등의 유연관계를 추구하기 위하여 세균으로부터 지질을 추출한 후 분석한 성적은 Table 3과 같다.

표에서와 같이 total sterol은 8.36mg, total glyceride는 19.94mg 및 total phospholipid 18.13mg/100mg dry wt로써 *E. coli*의 3.32, 11.31 및 2.94mg에 비하여 상당히 많은 수치를 나타내고 있다.

철산화세균인 *F. ferrooxidans*와 *E. coli*의 지질 함량을 비교할때 전반적으로 *F. ferrooxidans*의 지질 함량이 많은 것은 이 세균의 생활사, 생화학적 및 형태학적 특성이 균체의 각 성분중 특히 지질의 함량과 매우 밀접한 관계가 있다는 사실을 잘 말하여 주고 있다 (Short, 1969). 일반적으로 *F. ferrooxidans*는 매우 낮은 산도의 배양액에서 서식을 하고 있으며 특히 cell wall은 hydrogen ion에 대하여 비투과성이고 지질의 조성중 phospholipid는 세포내부의 환경을 외부의 조건으로부터 보호하는데, 즉 transport system에 대하여 매우 중요한 역할을 한다고 보고 되고 있다 (Hokin, 1965).

또한 *F. ferrooxidans* 균체는 cell wall에 상당량의 지질을 함유하고 있고, Korczynski (1967) 등에 의하면 대략 전체세포의 약

20%가 지질이라고 보고하고 있다.

또한 Short (1969) 등은 전체세포의 약 2%가 지방산이라고 보고하였고 저자들이 행한 실험 결과에 의하면 전체 지질은 약 4.6%를 차지하고 있었다. 특히 Short (1969) 등은 *F. ferrooxidans*의 phospholipid 조성중 phosphatidyl ethanolamine, phosphatidyl monomethylethanolamine, phosphatidyl dimethylethanolamine 및 phosphatidyl choline이 각각 63% 및 1.5%를 차지하고 있다고 보고하였고 저자들의 결과에 의하면 전자가 32% 및 후자가 15%를 차지하고 있다.

이와같은 결과를 논의하여 보면 분석의 방향성 및 분석방법 등에 따라 상당히 다르며 이들 결과를 서로 직접적으로 비교하기는 곤란하나 유기영양세균인 *E. coli*보다 많은 양의 지질이 *F. ferrooxidans*에 함유되어 있다는 사실은 다른 저자들의 보고와 일치하고 있다.

항원으로서의 *F. ferrooxidans*를 보면 상기 세균의 특성은 주로 cell wall과 연관되어 있는 lipopolysaccharide, peptidoglycan 및 lipoprotein 등이라고 생각되며 상기 물질과 연관되어 있는 cell wall에 대하여 항원성 또는 *F. ferrooxidans* 균체 고유의 특이항원 문제를 더 깊이 추시할 필요가 있다고 생각된다.

摘 要

철산화세균인 *F. ferrooxidans*의 균체성분을 대조균인 *E. coli*와 비교검토 하였다. 전당 및 지질은 *E. coli*에 비하여 *F. ferrooxidans*가 전반적으로 함량이 높았고 지질의 전체성분은 세포의 약 4.6%를 차지하고 있었으며 아미노산 조성중 열기성 아미노산인 lysine peak전에 미지의 물질이 검출되었다.

引 用 文 獻

1. Argall, G.D., 1964. Leaching dumps to recover more United States copper at lower cost. *World Mining*, **17**, 40.
2. Biezenski, J.J., 1964. Quantitative and preparation of phospholipids by elution following improved thin layer chromatography separation. *Federation Proc.*, **23**, 503.
3. Folch, J., Lees, M., and Sloane Stanley, G.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **226**, 497.
4. Harvey, S.C., and Higby, V., 1951. A microcolorimetric method for the quantitative determination of glycerol. *Arch. Biochem. Biophys.*, **30**, 14.
5. Hokin, M.R., and Hokin, L.E., 1965. Metabolism and physiological significance of lipids. John Wiley and Sons, London, 423.
6. Kenny, A.P., 1952. The determination of cholesterol by the Liebermann-Burchard reaction. *Biochem. J.*, **52**, 611.
7. Kim, S., and Paik, W.K., 1965. Studies on the origin of ϵ -N-methyl-L-lysine in protein. *J. Biol. Chem.*, **240**, 4629.
8. Korczynski, M.S., Agate, A.D., and Lundgren, D.G., 1967. Phospholipids from the chemoautotroph *Ferrobacillus ferrooxidans*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **29**, 457.
9. Levine, M.J., Weill, J.C., and Ellison, S.A., 1969. Identification of ϵ -N-methyllysine in *Spirillum serpens* flagella and of ϵ -N-dimethyllysine in *Salmonella typhimurium* flagella. *Biochim Biophys. Acta*, **118**, 165.
10. Nichols, B.W., 1965. Light induced changes in the lipids of *Chlorella vulgaris*. *Biochim. Biophys. Acta*, **106**, 274.
11. Paik, W.K., and Kim, S.D., 1971. Protein methylation. *Science*, **174**, 114.
12. Shively, J.M., Decker, G.L., and Greenawalt, J.W., 1970. Comparative ultrastructure of the *Thiobacilli*. *J. Bacteriol.*, **101**, 618.
13. Short, S.A., White, D.C., and Aleem, M. I. H., 1969. Phospholipid metabolism in *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **99**, 142.
14. Silverman, M.P., and Lundgren, D.G., 1959. Studies on the chemosynthetic iron bacteria *Ferrobacillus ferrooxidans*. *J. Bacteriol.*, **77**, 624.
15. Skipski, V.P., Peterson, R.F., and Barclay, M., 1964. Quantitative analysis of phospholipids by thin layer chromatography. *Biochem. J.*, **90**, 374.
16. Spackman, D.H., Stein, W.H., and Moore, S., 1958. Automatic recording apparatus for use in the chromatography of amino acids. *Anal. Chem.*, **30**, 1190.
17. Sutton, J.A., and Corrick, J.D., 1963. Leaching copper sulfide minerals with selected autotrophic bacteria. U.S. Bureau of Mines Repot. Invest., 6423, 1-23.
18. Trevelyan, W.E., and Harrison, J.S., 1956. Studies on yeast metabolism. *Biochem. J.*, **63**, 23.
19. Wang, W.S., and Korczynski, M.S., 1970. Cell envelope of an iron-oxidizing bacterium: Studies of lipopolysaccharide and peptidoglycan. *J. Bacteriol.*, **104**, 556.
20. Woodcock, J.T., 1967. Copper waste dump leaching. *Proc. Aust. Inst. Min. Met.*, **224**, 47.