

대장균에 있어서 영양물 흡수에 미치는 Palmitoylcarnitine과 인삼 Saponin의 영향*

金順玉 · 李豪容 · 李鍾三** · 崔榮吉 · 曹基勝

(漢陽大 自然科學大 · **誠信女大 自然科學大)

The effect of Palmitoylcarnitine and Ginseng Saponin on the nutrient uptake in *Escherichia coli* B.

Kim, Soon-Ok, Ho-Yong Lee, **Chong-Sam Lee, Yong-Keel Choi and Key-Seung Cho

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

ABSTRACT

When enterobacterium, *Escherichia coli* B was cultivated with normal media in the presence of 0.2~0.6% Palmitoylcarnitine and 0.05~0.2% Ginseng Saponin, maximum population growth of the bacteria was presented 71% and 31%, respectively. Such a result, in vitro test, was concluded from the result that both detergents stimulated C¹⁴-glucose, C¹⁴-alanine and C¹⁴-phosphatidylethanolamine uptake into the membrane of cells.

The pre-treatment of cells with different amounts of Palmitoylcarnitine from 0.005~0.05μ moles represented a significant increase of uptake, 33% of C¹⁴-glucose, 129% of C¹⁴-alanine and 158% of phosphatidylethanolamine at the concentration of 0.05μ moles of Palmitoylcarnitine. On the other hand, the result of 10⁻²% Saponin treatment showed the maximum value of uptake, 17% of C¹⁴-glucose and 112% of C¹⁴-alanine. In case of C¹⁴-phosphatidylethanolamine, the maximum uptake showed 25% of increase at the concentration of 10⁻⁴% Saponin.

緒 論

여러가지 계면활성제가 세포막의 구성성분과 결합하여 혼성 micelle을 형성함으로써 세포막이 용해된다는 사실은 이미 잘 알려져 있다(Helenius & Simons, 1925; Kirkpatrick등 1974; Taford & Reynolds, 1976). 동물 세포막을 포함해서 미생물 세포막 용해를 위해 현재까지 가장 많이 사용된 계면활성제를 보면 Sodium dodecylsulfate (SDS) (Reynolds & Tanford, 1970; Reavley & Burge, 1972), Sodium deoxycholate(SDC) (Osborn, 1969; Philippot, 1971), Triton X-100(TX-100) (MacDonald, 1980; Schnaitman, 1971) 등이 가장 중요하게 다루어졌는데, 이들 계면 활성제들은 막단백질이나 막의 인지질등과 주로 hydr-

ophobic interaction에 의해 각성분들과 결합하여 용해시키는 것으로 알려져 있다.

Gram 양성세균이나 gram 음성세균의 cell wall 혹은 membrane등은 구조상으로는 성분상에 상당한 차이가 있어 (Anderson, 1978; Shockman & Barrett, 1983) 여러가지 계면 활성제에 대해서도 다른 내성을 보이고, 용해도 면에서도 차이를 보이는데 (Kirkpatrick등, 1974; Moosic등, 1982), Tilby(1978)는 *Bacillus subtilis*의 야생종과 mutant가 detergent에 대해 내성이 다르게 나타나는 것은 세포막의 조성의 차이에서 오는 것이라고 결론을 지었다.

세균 세포막계의 구조변화와 화학적 조성변화 관계를 연구하기 위하여 시도하였던 6종의 ionic 및 nonionic detergents를 사용한 전자현미경적 관찰의 연구 결과는 이미 보고한 바 있는데 (Lee

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

등, 1983), 이들 결과에 의하면 각종 detergents가 막계에 많은 변화를 주고 있음이 확인되었고, 몇종의 계면활성제는 gram 음성세균의 성장을 현저히 촉진시키기도 하였으며, gram 양성세균은 거의 성장을 억제하는 결과를 보여주었다.

본 연구에서는 성장을 현저히 촉진하였던 palmitoylcarnitine과 인삼 saponin을 가지고 gram 음성세균인 *E. coli*에 있어서 세균막계의 영양물 흡수에 어떠한 영향을 주는지를 고찰하여 성장 촉진과의 관계를 연구하여 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 菌株 및 培養

본 실험에 사용한 균주는 *Escherichia coli* B (ATCC 11303)로 배지는 Cho(1973)등에 의한 배지를 사용하였고 최초 균체수는 1.5×10^6 cell/ml되게 접종하여 37°C에서 70~80회 진탕속도로 배양하였다. 배양후 균체수는 spectrophotometer (Baush and Lomb spectronic 20)를 사용하여 520nm에서 균체수의 광학밀도(Optical density)를 측정하여 확인하였으며, 동일한 방법으로 palmitoylcarnitine과 saponin에 의한 성장촉진효과도 관찰하였다.

2. Plmitoylcarnitine의 合成과 人蔘 Saponin의 抽出

Palmitoylcarnitine(P. car)은 palmitoylchloride와 DL-carnitine을 Sigma회사로부터 구입하여 Cho(1969)등의 방법으로 합성정제하였다. 즉 30ml용량시험관에 DL-carnitine HCl 1g을 넣고 1.5ml의 trifluoroacetic acid(TFA)를 가하여 가온 용해시킨후 2당량의 palmitoylchloride를 가하여 50~55°C에서 3~5시간동안 교반반응시켰다. 감압하에서 TFA를 증발시킨후 10ml 상당의 열음조각을 넣어 미반응 palmitoylchloride를 분해시킨 다음 ethyl ether로 수회 씻어 미반응 지방산을 제거하였다. 수용액을 pH 7.0으로 중화시킨후 P. car을 침전시켜 원심분리에 의해 수거하였다. 합성된 P. car은 전개용매 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{OH-HAc-H}_2\text{O}$ (50:25:8:4, v/v)을 사용한 TLC로 순도를 확인하였다.

인삼 saponin은 수삼(강화산, 5년근) 300g을 깨끗이 씻어 잘게 자른후 Waring blender내에서

methanol 1.5l를 가하여 blending하고, 삼각 flask내에서 8시간 동안 가열환류시킨 다음 감압 여과하여 여액을 감압 증발시켰다. 잔유물을 다시 순수한 methanol에 용해시킨 다음 불용성 물질을 제거하고 다시 증발시킴으로서 갈색의 복합물을 얻었다

3. C¹⁴-Phosphatidylethanolamine과 인지질 Sol의 製造

C¹⁴-phosphatidylethanolamine(C¹⁴-PE)은 Cho(1977)등의 방법으로 제조하였다. C¹⁴-sodium acetate(영국 Amersham제, 50 μ Ci)를 500ml 배지에 가하여 *E. coli*를 배양하고 cell을 수거한 후 Bligh and Dyer(1959)방법에 의해 total lipid를 추출한후, $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CH-H}_2\text{O}$ (65:25:4, v/v)용매를 사용하여 TLC로 인지질을 분리하고 C¹⁴-PE 분획을 모아 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CH}$ (1:2, v/v)로 추출, 순수한 표지화된 C¹⁴-PE를 얻었다.

C¹⁴-PE sol은 C¹⁴-PE일정량을 $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH-CHCl}_3$ (10:1, v/v) 1ml에 용해시키고 90°C의 증류수 10ml를 가하여 현탁액을 만든 다음 중탕에서 ethanol과 chloroform을 증발시켜 최종부피를 10ml되게 맞추었다.

4. C¹⁴-標識化合物과 放射能 測定

영양물 흡수를 보기위한 표지화합물로는 D-(1-C¹⁴)-glucose와 L-(u-C¹⁴)-alanine을 영국 Amersham회사로부터 구입하였으며, 수용액상 표지화합물의 방사능을 측정하기 위한 scintillation cocktail은 1l의 toluene에 500ml의 ethanol을 가하고 15g의 PPO와 0.15g의 dimethyl-POPOP를 용해시켜 제조하였다. 10ml의 cocktail에 0.1ml 수용액시료를 가하여 잘 혼합한후 방사능은 PACKARD사의 liquid scintillation counter, Model TRI-CARB 4530을 사용하여 측정하였다.

5. C¹⁴-標識 化合物의 膜 吸收實驗

본 실험에 사용한 *E. coli* cell은 1배지에서 10시간 배양한 cell을 수거하여 10ml, 0.01M Tris-HCl buffer, pH 7.2에 희석하여 사용하였다. 희석한 cell 0.5ml를 시험관에 취하여 농도가 다른 P. car 및 saponin을 가하고 37°C shaking water bath에서 30분간 preincubation시켰다. 여기에 C¹⁴-glucose, C¹⁴-alanine 및 C¹⁴-PE등을 일정량 가한후 total volume을 1ml로 buffer를 가하여 맞춘후 다시 37°C에서 30분간 배양시킨 다음 2,000

rpm에서 5분간 원심분리하여 상층액 0.1ml를 취해 방사능을 측정하였다. 이때 대조구는 preincubation 과정에서 P. car과 saponin을 가하지 않았으며, C¹⁴-표지화합물의 흡수량의 계산은 가한 방사능 양에서 상층액에 남아있는 방사능 양을 빼줌으로서 cell에 흡수된 C¹⁴-표지화합물의 양을 계산하였다.

6. 試藥類

미생물 배양용 배지는 Difco 회사제물, buffer는 Sigma회사제물 구입하였고, 기타 모든 시약도 Merck 또는 Sigma제물 사용하였다.

結果 및 考察

E. coli 세균 배양에 있어서 여러 농도의 P. car과 인삼 saponin을 처리하였을때, 개체군 증식에 대한 효과는 Table 1에 나타난 바와 같다. Zwitterionic detergent성 물질인 P. car을 0.2~0.6%까지 처리하였을때 농도 증가에 따라 최고 71%의 증식효과를 나타냈다. 한편 Saponin의 경우는 0.05~0.2%농도에서 점차적인 증식효과를 보여 최고 31%까지의 성장 촉진효과를 보였는데, 이는 Joo등(1978)의 결과보다 높은 증식효과로서 배지의 조성이 다른데서 오는 결과일 수도 있으리라 생각된다. 이러한 성장촉진 효과에 대해서 고찰해 볼때, P. car에 의한 높은 증식 효과는 *E. coli*가 장내 세균이므로 P. car을 영양원으로 활용할 수도 있겠고, saponin과 같이, 영양물의 세포막흡수에 활성제로 작용하여 성장을 촉진시킬 수도 있으리라 생각된다.

Table 2는 일정양의 *E. coli*개체군에 여러 농

Table 1. Effect of Palmitoylcarnitine and Ginseng Saponin on Growth of *E. coli* B cells

Palmitoylcarnitine			Saponin		
Conc. (%)	10 hrs Incu. (OD)	Increase (%)	Conc. (%)	10 hrs Incu. (OD)	Increase (%)
0	0.99	0	0	0.99	0
0.2	1.23	24	0.05	1.12	13
0.4	1.6	61	0.1	1.15	16
0.6	1.7	71	0.2	1.3	31

Optical density(OD) in figure is measured a broth culture at 520nm.

도의 P. car을 가하여 진탕수조에서 30분간 preincubation시킨후, C¹⁴-glucose를 가하여 다시 30분간 incubation시켰을때 glucose가 세포막에 흡수된 결과를 나타낸 것이다. P. car농도 0.005 μ moles에서는 33.4%의 증가를 보여줌으로서 P. car이 glucose의 세포막 흡수에 큰 역할을 하고 있음을 잘 나타내 주고 있다.

Table 3은 동일한 조건하에서 C¹⁴-alanine의 막흡수를 고찰한 결과로 P. car의 저농도에서는 4%의 증가를 보여주나 0.05 μ moles에서는 129%의 현저한 증가를 보여줌으로서 P. car이 특히 amino acid의 막흡수에 큰 역할을 하고 있음을 잘 나타내 주고 있다. 한편 *E. coli*의 막 인지질증거의 60%이상을 차지하고 있는 (Cho 등, 1977) phosphatidylethanolamine의 막흡수를 보면 (Table 4), 저농도인 P. car 0.005 μ moles에서도 26%의 현저한 막흡수 증가효과를 보여주며, 0.05 μ moles에서는 158.8%의 매우 현저한 증가를 보여줌으로서 P. car이 막성분인 인지질의 흡수에 특히 좋은 촉진제역활을 하고 있음을 나타냈다. 이러한 결과는 Cho(1971)들이 P. car에 의해 적혈구가 용혈될때, 적혈구를 미량의 P. car과 preincubation 시킨후 막 인지질, glucose, glycerol, glycine, cystein등을 가하면 이들 물질이 적혈구내로 다량 흡수됨으로서 용혈이 증가된다고 보고한 결과와도 일맥상통하는 점이 있다.

Table 5는 여러농도의 인삼 saponin을 *E. coli*

Table 2. Effect of Palmitoylcarnitine on C¹⁴-glucose uptake to *E. coli* B cells

Treatment of palmitoylcarnitine	C ¹⁴ -glucose bound(cpm)	Increase (%)
(1) <i>E. coli</i> +C ¹⁴ -glucose	4,910	0
(2) <i>E. coli</i> +P.car 0.005 μ moles +C ¹⁴ -glucose	5,150	4.8
(3) <i>E. coli</i> +P. car 0.01 μ moles +C ¹⁴ -glucose	5,530	12.6
(4) <i>E. coli</i> +P. car 0.03 μ moles +C ¹⁴ -glucose	5,965	21.4
(5) <i>E. coli</i> +P. car 0.05 μ moles +C ¹⁴ -glucose	6,550	33.4

The radioactivity of C¹⁴-glucose used was 29,800 cpm and specific activity was 56.8 mCi/m mol. All other conditions were same as indicated in the text.

Table 3. Effect of Palmitoylcarnitine on C¹⁴-alanine uptak to *Escherichia coli* B cells

Treatment of Palmitoylcarnitine	C ¹⁴ -alanine bound(cpm)	Increase (%)
(1) <i>E. coli</i> +C ¹⁴ -alanine	1,250	0
(2) <i>E. coli</i> +P. car 0.005 μmoles +C ¹⁴ -alanine	1,300	4.0
(3) <i>E. coli</i> +P. car 0.01 μmoles +C ¹⁴ -alanine	1,505	20.4
(4) <i>E. coli</i> +P. car 0.03 μmoles +C ¹⁴ -alanine	1,816	45.3
(5) <i>E. coli</i> +P. car 0.05 μmoles +C ¹⁴ -alanine	2,864	129.1

The radioactivity of C¹⁴-alanine used was 21,900 cpm and specific activity was 171 mCi/m mol. All other conditions were same as indicated in the text.

Table 4. Effect of Palmitoylcarnitine on C¹⁴-phosphatidylethanoamine uptake to *E. coli* B cells

Treatment of Palmitoylcarnitine	C ¹⁴ -PE bound (cpm)	Increase (%)
(1) <i>E. coli</i> +C ¹⁴ -PE	905	0
(2) <i>E. coli</i> +P. car 0.005 μmoles +C ₁ ⁴ -PE	1,140	26.0
(3) <i>E. coli</i> +P. car 0.01 μmoles +C ¹⁴ -PE	1,144	26.4
(4) <i>E. coli</i> +P. car 0.03 μmoles +C ¹⁴ -PE	1,398	34.5
(5) <i>E. coli</i> +P. car 0.05 μmoles +C ¹⁴ -PE	2,342	158.8

The radioactivity C¹⁴-PE used was 11,574 cpm. All other conditions were same as indicated in the text.

와 preincubation시켰을 때 C¹⁴-glucose의 세포막 흡수를 고찰한 결과이다. P. car에서 보여주는 결과와 마찬가지로 saponin의 농도를 증가시켰을 때 10⁻²%에서 최고 17%까지 증가효과를 나타냈다. 고농도인 10⁻¹%에서는 오히려 감소됨을 보여주었는데 이러한 결과는 과량의 saponin이 glucose와 결합함으로써 glucose의 막흡수를 오히려 방해하는 것이 아닌가 생각되며 이는 saponin이 P. car보다 glucose의 막흡수에 좋지 않은 촉진제임을 나타내 준다.

또한 C¹⁴-alanine의 막흡수에 대한 saponin의 영향은 Table 6에 나타낸바와 같은데, glucose흡수와는 다르게 저농도에서도 상당한 흡수증가를

Table 5. Effect of Saponin on C¹⁴-Glucose uptake of *E. coli* B cells

Treatment of Saponin	C ¹⁴ -glucose bound(cpm)	Increase (%)
(1) <i>E. coli</i> +C ¹⁴ -glucose	4,910	0
(2) <i>E. coli</i> +Saponin 10 ⁻⁴ % +C ¹⁴ -glucose	4,920	0.2
(3) <i>E. coli</i> +Saponin 10 ⁻³ % +C ¹⁴ -glucose	5,030	2.4
(4) <i>E. coli</i> +Saponin 10 ⁻² % +C ¹⁴ -glucose	5,740	16.9
(5) <i>E. coli</i> +Saponin 10 ⁻¹ % +C ₁ ⁴ -glucose	5,150	4.9

All other conditions were same as indicated in table 2.

Table 6. Effect of Saponin on C¹⁴-alanine uptake to *E. coli* B cells

Treatment of Saponin	C ¹⁴ -alanine bound(cpm)	Increase (%)
(1) <i>E. coli</i> +C ¹⁴ -alanine	1,250	0
(2) <i>E. coli</i> +Saponin 10 ⁻⁴ % +C ¹⁴ -alanine	1,360	8.8
(3) <i>E. coli</i> +Saponin 10 ⁻³ % +C ¹⁴ -alanine	1,780	42.4
(4) <i>E. coli</i> +Saponin 10 ⁻² % +C ¹⁴ -alanine	2,650	112.0

All other conditions were same as indicated in table 3.

Table 7. Effect of S³⁵aponin on C¹⁴-phosphatidylethanolamine to *E. coli* B cells

Treatment of Saponin	C ¹⁴ -PE bound (cpm)	Increase (%)
(1) <i>E. coli</i> +C ¹⁴ -PE	905	0
(2) <i>E. coli</i> +Saponin 10 ⁻⁴ % +C ¹⁴ -PE	1,130	24.9
(3) <i>E. coli</i> +Saponin 10 ⁻³ % +C ¹⁴ -PE	1,050	16.0
(4) <i>E. coli</i> +Saponin 10 ⁻² % +C ¹⁴ -PE	980	8.3

All other conditions were same as indicated in table 4.

나타내고 있으며, 10⁻²%농도에서는 최고 112%의 현저한 흡수증가 효과를 보여주었다.

Table 7은 여러농도의 saponin에 의한 C¹⁴-PE의 막흡수를 나타낸 결과인데, PE경우는 sapo-

nin농도 $10^{-4}\%$ 인 저농도에서 25%의 최대흡수 효과를 나타냈고 농도 증가에 따라 점차 감소하는 결과를 보여주었다. 이러한 저농도에서의 증가효과와 고농도에서의 흡수 감소효과는 saponin과 세포막 표면과의 interaction에 의한 binding site의 노출 및 saponin과 PE와의 interaction에 의한 혼성 micelle 형성등의 상관관계에 의한 것으로 판단된다. 다시말해서 saponin은 $10^{-4}\%$ 정도의 저농도에서도 충분히 세포막구조를 변형시켜 PE를 흡수할수 있는 binding site를 노출시킬수 있는 것으로 판단되며, 농도가 $10^{-3}\%$, $10^{-2}\%$ 로 증가될수록 흡수량이 감소되는 결과는 saponin과 PE가 결합하여 혼성 micelle을 이루므로써 PE의 막흡수를 저해하지 않나 생각한다. 그리고 saponin 농도에 따른 glucose, alanine 및 PE의 흡수효과가 각각 다른 이유는 이들 영양물의 membrane binding site가 다 달라서 PE경우는 막의 외부에, glucose와 alanine은 막의 내부에 binding site가 있어 이러한 결과를 나타낸 것이 아닌가 생각한다.

한편 P. car이나 saponin을 E. coli와 preincubation시키지 않고 영양물과 동시에 incubation시킬때는 glucose, alanine 및 PE의 세포막 흡수가 별로 증가되지 않음을 관찰할수 있었는데, 이는 P. car이나 saponin이 막과 결합하여 binding site를 노출시키기전에 영양물과 혼성 micelle을 형성하게 됨으로 영양물의 막접근을 저해하게 되고 결과적으로 막흡수가 감소되는 결과를 초래하는 것으로 생각된다.

결론적으로 P. car과 saponin에 의한 E. coli의 성장촉진효과는 P. car과 saponin이 세포막에 먼저 binding하여 막표면을 영양물이 잘 binding할수 있도록 binding site를 노출시켜 영양물 흡수를 증가시킴으로서 성장이 촉진된다고 생각할수 있겠다. 동물체의 장내에서 지질과 같은 영양물의 흡수를 보면 주로 micelle을 형성하여 흡수되는 것으로 알려져 있는데, 세균과 같은 단세포에서의 영양물 흡수는 micelle에 의한 흡수가 아니라 일정한 binding site가 있어 영양물이 흡수되는 것으로 확신할 수 있겠다

摘 要

장내그람음성세균인 E. coli B를 0.2~0.6%의 농도가 다른 palmitoylcarnitine이나, 0.05~0.2%의 인삼 saponin을 함유한 정상배지에서 배양했을때, 이들의 가장 높은 농도에서 각각 71%와 31%의 성장촉진효과를 나타냈는데, 이러한 결과는 in vitro 실험에서 이들 물질이 C^{14} -glucose, C^{14} -alanine 및 C^{14} -phosphatidylethanolamine 등의 막흡수를 촉진시키기 때문인것으로 나타났다.

E. coli B에 0.005~0.05 μ moles의 여러 다른 농도의 palmitoylcarnitine을 가하여 preincubation시킨후, 영양물을 가하여 다시 배양했을때 C^{14} -alanine는 최고 129%, C^{14} -alanine은 129%, C^{14} -phosphatidylethanolamine은 158%의 흡수증가효과를 나타냈다. 한편 $10^{-2}\%$ 농도의 saponin을 처리하였을때는 C^{14} -glucose가 17%, C^{14} -alanine은 112%의 흡수증가를 보여주었으며, C^{14} -phosphatidylethanolamine은 saponin농도 $10^{-4}\%$ 에서 25%의 최대흡수증가를 나타냈다.

引 用 文 獻

- Andersen, H.C., 1978. Probes of membrane structure. *Ann. Rev. Biochem.* 47:359-383.
- Bligh, E.G. and W.J. Dyer, 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochim. Biophysiol.* 37:911-917.
- Cho, K.S. and P. Proulx, 1966. Lysis of erythrocytes by long-chain acyl esters of carnitine. *Biochim. Biophys. Acta.* 193:30-35.
- Cho, K.S. and P. Proulx, 1971. Studies on the mechanism of hemolysis by acylcarnitines, lysolecithins and acyl cholines. *Biochim. Biophys. Acta.* 225: 214-223.
- Cho, K.S., G. Bennis and P. Proulx, 1973. Formation of acylphosphatidylglycerol by *Escherichia coli* extracts. *Biochim. Biophys. Acta.* 326:355-360.
- Cho, K.S., S.D. Hong, J.M. Cho, C.S. Chang and K.S. Lee, 1977. Studies on the biosynthesis of acylphosphatidylglycerol by *Escherichia coli* B and B/r. *Biochim. Biophys. Acta.* 486:47-54.

- Helenius, A., and K. Simons, 1975. Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 415:29-79.
- Joo, C.N., Y.D. Cho and H.Y. Kwan, 1978. The 20th anniversary thesis collection on Korean Ginseng. p. 169.
- Kirkpatrick, F.H., S.E. Gordesky and G.V. Marinetti, 1974. Differential solubilization of proteins, phospholipids, and cholesterol of erythrocyte membranes by detergents. *Biochim. Biophys. Acta*, 345:154-161.
- Lee, C.S., H.Y. Lee, K.S. Cho, S.H. Cho, S.Y. Chang and Y.K. Choi, 1983. The effect of some detergents on the changes of bacterial membrane. *Kor. J. Microbiol.* 21:115-126.
- MacDonald, R.I., 1980. Action of detergents on membranes: Differences between lipid extracted from red cell ghosts and from red cell lipid vesicles by Triton X-100. *Biochemistry*, 19:1916-1922.
- 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.* 257:9684-9691.
- Osborn, M.J., 1969. Structure and biosynthesis of the bacterial cell wall. *Ann. Rev. Microbiol.* 23:501-538.
- Philippot, J., 1971. Study of human red blood cell membrane using sodium deoxycholate. Mechanism of solubilization. *Biochim. Biophys. Acta*, 225:201-213.
- Reynolds, J.A. and C. Tanford, 1970. Binding of dodecyl sulfate to proteins at high binding ratios. Possible implications for the state of protein biological membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 66:1002-1007.
- Reaveley, D.A. and R.E. Burge, 1972. Walls and membranes in bacteria. *Adv. Microbial physiol.* 7: 1-81.
- Schnaitman, C.A., 1971. Solubilization of the cytoplasmic membrane of *Escherichia coli* by Triton X-100. *J. Bacteriol.* 108:545-552.
- Shockman, G.D. and J.F. Barrett, 1983. Structure, function and assembly of cell walls of gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 37:501-527.
- Tanford, C. and J.A. Reynolds, 1976. Characterization of membrane proteins in detergent solutions. *Biochim. Biophys. Acta*, 457:133-170.
- Tilby, M.J., 1978. Detergent-resistant variants of *Bacillus subtilis* with reduced cell diameter. *J. Bacteriol.* 136:10-18.