

*Lactobacillus acidophilus*의 세포표층의 성상
—세포벽외층의 규칙적 배열구조 단백질의 성상과 세포표면 소수성—

정영건 · 안장연

영남대학교 식품가공학과

Cell Surface Characteristics of *Lactobacillus acidophilus*
—Characterization of Regularly Arranged Proteins in the Outer Cell Wall
Layer and Cell-Surface Hydrophobicity—

Yung-Gun Chung and Jang-Yeon Ahn

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungsan, 713-800, Korea

Abstract

Many strains of *Lactobacillus acidophilus*, which is one of the most important normal flora in the intestinal tract of human and animals, and has been used as a dietary adjunct for beneficial effect on the intestinal tract, were examined for the cell surface properties. Electron microscopy of negatively stained preparations of the isolated cell walls revealed that 15 out of 21 strains examined possessed a regularly arranged outer cell wall layer. All the *L. acidophilus* strains which produce regular arrays belonged to group A classified based on DNA-DNA homology by Johnson et al. (Int. J. Syst. Bacteriol. 30 : 53~68, 1980) ; While the strains carrying no regular arrays fell under group B. The regular arrays were shown to be constructed from a single protein species with molecular weights ranging from 41 kDa to 48 kDa as analyzed by sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of the isolated cell walls.

All the regularly arranged proteins isolated from the strains of subgroup A-1 described by Johnson et al. gave the same amino acid composition and peptide pattern after limited proteolysis with *Staphylococcus aureus* V8 protease, and were resistant to cleavage with N-chlorosuccinimide. On the other hand, the regularly arranged proteins isolated from the strains of the other subgroup A gave quite different amino acid compositions and peptide patterns one another, if the strains were in the same subgroups. These results suggest that *L. acidophilus* strains can divide into group A and B by examining the presence or absence of regular arrays by electron microscopy or by detecting regularly arranged proteins by SDS-PAGE of the isolated cell walls. Furthermore, the strains of subgroup A-1 can be also identified by comparing peptide patterns of the regularly arranged proteins after limited proteolysis with *S. aureus* V8 protease. Cell surface hydrophobicity of the regular array-producing strains of *L. acidophilus* is generally higher than that of the strains carrying no regular arrays. However, regularly arranged proteins seemed to have no relationship to the cell surface hydrophobicity in the most regular array-producing strains.

서 론

많은 세균의 세포벽외층에는 단백질 혹은 당단백질로 구성된 4각형 혹은 6각형의 regular array (이하 RA로 약함)가 있다¹⁻³⁾.

식품미생물로서 중요한 *Lactobacillus* 속에 있어서도 *L. brevis*, *L. buchneri*, *L. fermentum* 등에 RA가 존재함이 발견되어 이들의 형태학적·화학적·형질학적 성상 및 형태형성이 밝혀져 있다³⁻⁶⁾.

*Lactobacillus*속균은 사람 및 동물의 장관의 대표적인 상재균의 하나로, 그중에서도 *L. acidophilus*는 상재균으로서 중요하므로 정장의 목적으로 식품의 첨가물로서 광범위하게 사용되고 있다^{9, 10)}.

*L. acidophilus*에는 RA를 생산하는 균주와 생산하지 않는 균주가 공존하고 있음이 보고되어 왔으며¹¹⁾, 본균종이 적어도 RA생산에 관해 2군으로 나누어 질수가 있음을 알았다. 특히 근년 deoxyribonucleic acid (DNA) homology에 의하여 *L. acidophilus*가 2군과 6~7개의 subgroup으로 분류가능함을 알았다^{12, 13)}. 이러한 사실은 본균이 여러성상의 다른 균주로 구성되고 있음을 시사하고 있다.

한편 상재균 혹은 병원균의 숙주에 기생하여 서식하기 위하여는 점착이 필요하며, 이를 위해서는 균은 숙주세포에 점착하지 않으면 안된다. 세균이 숙주세포에 점착하기 위한 인자로서는 fimbriae가 잘 알려져 있으나¹⁴⁾, 상피세포나 치아의 표면에서의 세균의 점착에는 소수성상호작용(疎水性相互作用)이 관여함도 근년 명확해지고 있으므로¹⁵⁾, fimbriae를 생산하지 않는 *L. acidophilus*의 장관상피세포와의 점착에는 소수성 상호작용이 강력히 관여하고 있을 가능성이 있다고 생각된다.

세균의 RA는 소수성이 높은 단백질로 구성되어 있으며²⁾ *Lactobacillus*속균의 RA도 소수성이미노산을 다량 함유하고 있는 것으로 보고되어 있다^{2, 11)}.

본연구에서는 여러 *L. acidophilus*의 세포표면의 성상을 명백히 할 목적으로, RA의 생산유무를 전자현미경적으로 검색하여 RA생산주에 대해서는 RA의 화학성상과 균주간의 RA단백질의 차이점을 검토하였다. 또 세포표면의 소수성을 측정하여 RA의 세포표면 소수성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

균주와 배양

사용한 *L. acidophilus*균주는 Table1에 나타내었다. 균은 ILS액체배지¹⁶⁾에 37°C로 24시간 정치배양한 것의 100ml를 3l의 동배지에 접종하여 37°C로 12시간 정치 배양하였다. 균은 10,000×g로 연속원심하여 얻었다.

세포벽의 조제

세포벽은 Masuda와 Kawata¹⁾의 방법에 따라 균체를 증류수로 원심분리하여 세척한 후 약 30ml의 증류수에 현탁하여, 40ml의 glass beads (diameter 0.25mm)와 혼합하여 Braun MSK Cell homogenizer로 1분간 격하게 혼들어 세포를 파쇄하였다.

파쇄된 세포현탁액중의 glass beads는 glass filter로 여과시켜 제거하였으며 filtrate를 5분간 원심분리하여 미파쇄세포를 침전시켜 상정액을 10,000×g로 20분간 원심분리하였다. 세포벽 fragment를 함유한 침전물은 1M의 NaCl로 1회, 증류수로 2회 원심분리하여 세척하였으며, 침전물은 1%의 lauroyl sarkosine sodium salt(sarkosyl)로 약함, Nakarai Chemicals, Kyoto, Japan)에 현탁시켜 30분간 약하게 교반하여 혼재하는 세포질막을 가용화시킨후 다시 10,000×g로 20분간 원심분리하여 침전물을 증류수로 3회 원심에 의하여 세척하여 세포벽표층으로 하였다.

RA단백질의 조제

분리한 세포벽을 Masuda와 Kawata³⁾의 방법에 준하여 4M의 guanidine hydrochloride(GuHCl)로 약함, Nakarai Chemicals, Kyoto, Japan)로 현탁시켜 37°C로 5분간 배양하여 RA단백질을 세포벽으로부터 해리시켜 가용화한 후, 100,000×g로 60분간 원심분리하여 얻은 RA단백질을 함유한 상정액을 증류수에 투석하여 GuHCl을 제거하여 RA단백질로 하였다.

전기영동

Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel elec-

Table 1. *L. acidophilus* strains and the result of electron microscopic examination for production of regular array.

Strain(other designation)	RA Production ^{a)}	Subgroup classified by :	
		Johnson et al. ¹²⁾	Lauer et al. ¹³⁾
VPI 0328	+	A-1	
VPI 0326	+	A-1	
VPI 0324(ATCC 314)	+	A-1	Ia
VPI 11760	+	A-1	
VPI 11843	+	A-1	
JCM 1229(B39/4d)	+	A-1	Ia
VPI 1799	+	A-2	
VPI 11083	+	A-2	
VPI 0607-1B	+	A-2	
VPI 7635	+	A-2	
VPI 11761	+	A-2	
VPI 1754	+	A-3	
VPI 0824	+	A-3	Ib
JCM 1029(RN-RI-2-3)	+	A-3	Ib
VPI 1294	+	A-4	
VPI 11844	-	B-1	
VPI 1131(63AM)	-	B-1	IIa
VPI 7690	-	B-2	
VPI 0325(ATCC 332)	-	B-2	IIa
VPI 11094	-	B-3	
VPI 11095	-	B-3	

a) RA production of *L. acidophilus* strains was examined by electron microscopic observations of negatively stained preparations of the isolated cell walls. Symbols + or - represent presence (production) or absence (no production) of RAs, respectively.

trophoresis(SDS-PAGE)는 Laemmli¹⁷⁾의 방법에 따라 분리 gel로서 14%, 농축gel로서 5% acrylamide를 사용하여 행하였다.

시료의 가용화는 Laemmli¹⁷⁾의 sample buffer중에 100°C, 30분간 가열하여 행하였으며 전기영동후 gel은 coomassie brilliant blue R-250(Nakarai Chemicals, Kyoto, Japan)으로 단백질 band를 염색하였다¹⁸⁾. 분자량측정 marker단백질로는 electrophoresis calibration kits (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden)를 사용하였다.

RA단백질의 정제

앞에서 기술한 RA단백질표본에는 아직 미량의 他단백질이 혼재하고 있으므로 RA단백질표본을 SDS-PAGE한후 coomassie brilliant blue R-250으로 5분간 가볍게 염색한 후, RA단백질에 상당하는 band를 절단하여 Sreekishna등¹⁹⁾의 방법으로 gel을 0.05% SDS를 함유한 0.05M의 중탄산 암모늄으로 원심분리하여 추출하여 water bath상에서 37°C로 10시간 진탕배양하였다. Gel현탁액을 18,000×g로 30분간 원심분리한뒤 맑은 상정액을 분리하여 농축시킨뒤, 맑은 상정액을 분리하여 농축시킨다음, 증류수로 다시 세척하고 1.5시간 진탕한 후 상정액을 0.

005% SDS로 4°C에서 투석한다음 동결건조후 정제 RA 단백질로 사용하였다.

Peptide mapping

Staphylococcus aureus V8 protease로 한정분해한 RA 단백질의 peptide mapping은 Cleveland 등²⁰⁾의 방법에 의하여 행하였다.

SDS-PAGE로 분리한 RA 단백질의 band로부터 절단한 gel 조각(약 5~20 μ g의 RA 단백질을 포함)을 50 μ g의 *S. aureus* V8 protease (ICN Immuno Biologicals, Lisle, Ill., U. S. A)와 함께 12~24%의 linear polyacrylamide gradient gel에 중층한 stacking gel의 slot 속에 넣어 영동하여, tracking dye인 bromphenol blue가 stacking gel의 선단까지 흐를때 전류를 끊고 30분간 방치하여 gel 중에 효소반응시킨 후, 다시 전기영동하였다. N-chlorosuccinimide (NCS로 약함)로 부분분해시킨 RA 단백질의 peptide mapping은 Lischewe와 Ochs²¹⁾의 방법으로 행하였다.

SDS-PAGE한 gel로 부터 절단한 RA 단백질 약 5~20 μ g을 함유한 gel 조각을 cleavage buffer urea/acetic acid/water ; 1g/1ml/1ml) 중에서 50mM NCS 속에 2시간 담근후, NCS를 함유하지 않은 cleavage buffer중에 20분간 담근후 Laemmli¹⁷⁾의 sample buffer중에 60분간 침지시켜, 상술한바와같이 12~24%의 linear polyacrylamide gradient gel을 사용하여 전기영동을 행하였다. 영동후 gel은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하였다¹⁸⁾.

화학분석

단백질은 Lowry 등²²⁾의 방법으로 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 정량하였으며, 아미노산은 정제된 RA 단백질을 6N HCl로 110°C 24시간 가수분해하여 아미노산자동 분석기(Hitachi 835)로 분석하였다. RA 단백질중의 아미노산잔기수는 SDS-PAGE로 구한 분자량과 아미노산 조성에서 계산하여 얻었다.

RA 단백질의 hydrophobicity factor(H ϕ)는 Bigelow와 Channon²³⁾의 식을 사용하여 구성아미노산의 소수성과 잔기수로 부터 계산하여 얻었다.

세포표면소수성의 측정

세포표면소수성은 Rosenberg 등²⁴⁾의 방법에 기초를 두어 *n*-octane 및 *p*-xylene에의 균의 부착을 측정하여 검토하였다.

12시간 배양균을 PUM buffer²⁴⁾로 1회 원심분리에 의하여 세척하여 같은 buffer에 410nm에서 흡광도(A410)가 약 0.5가 되도록 다시 현탁시켜 이의 4.8 ml를 가하여 30°C에서 10분간 방치한 후 2분간 진탕하여 유기용매층과 수층이 완전히 분리될 때까지 5~10분간 정치하였다. 그후 유기용매가 혼입되지 않도록 주의하여 수층을 취해 분광광도계(Hitachi)로 A410을 측정하였다. 소수성은 아래의 식에 의하여 구하였다.

$$100 - \frac{\text{용매추출후의 수층의 A410}}{\text{용매추출전의 수층의 A410}} \times 100$$

따라서 이 수치가 클수록 소수성이 높고 적을수록 소수성이 낮아진다. RA 생산균주에 관해서는 RA를 제거한 세포의 소수성도 측정하였다. RA의 제거는 세포를 4M GuHCl에 현탁시켜 실온에서 10분간 배양한 후, 6,000 \times g로 10분간 원심한 균을 침전시켜 PUM buffer²⁴⁾로 3회 세척하여 행하였다.

전자현미경 관찰

분리한 세포벽은 1M의 암모니아로 pH 7.0으로 조정한 2% ammonium molybdate에 현탁시켜 그의 한방울을 collodion막을 덮은 동체의 grid에 놓아, 파잉의 액을 여과지로 흡수시킨뒤 negative 염색을 행하였다. Negative 염색한 시료는 전자현미경(Hitachi HU-11E)을 사용하여 가속전압 75KV로 관찰하였다.

결과 및 고찰

L. acidophilus 균주에 있어서 RA의 검색

L. acidophilus 여러균주에 있어서 RA 생산의 유무를 전자현미경으로 관찰한 결과 (Fig. 1, Table 1), 21주中 15주는 RA를 생산하였고 6주는 생산하지 않았음을 알았다(Table 1). Fig. 1a~c는 RA를 생산하는 균주의 negative 염색한 세포벽의 전자현미경 사진으로 균주 VPI 0326(Fig. 1a), VPI 11083(Fig.

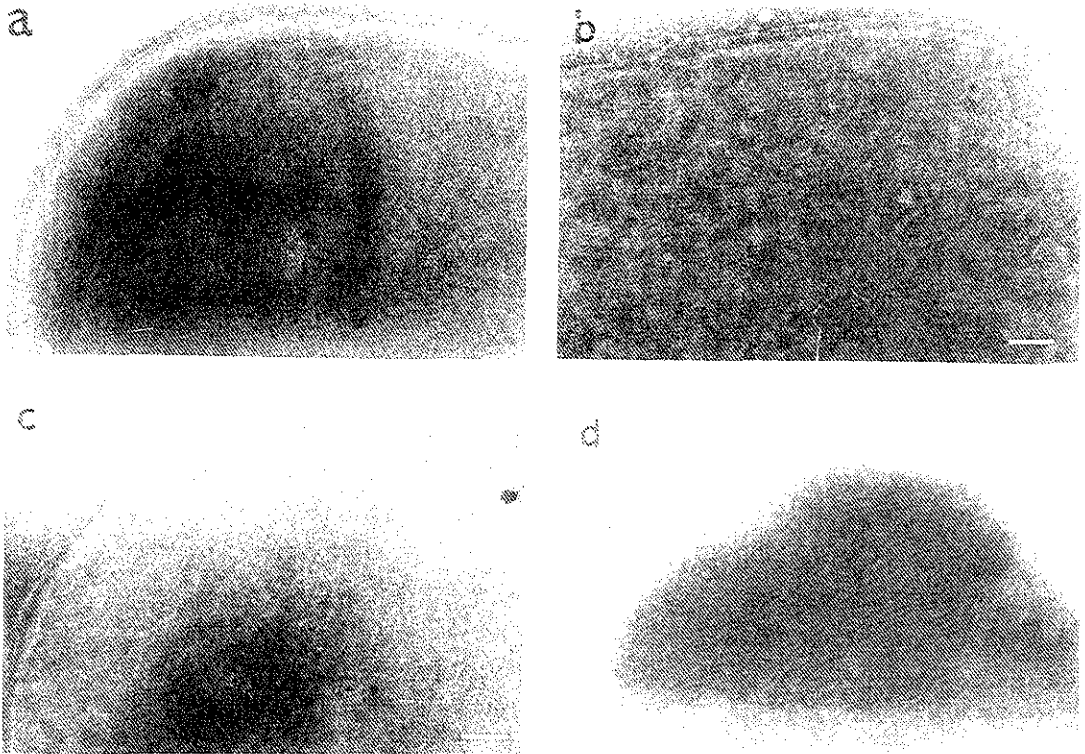


Fig. 1. Electron micrographs of the isolated cell walls from *L. acidophilus* strains. The isolated cell walls were negatively stained with 2% ammonium molybdate. (a) strain VPI 0326 ; (b) strain VPI 110 83 ; (c) strain VPI 1799 ; (d) strain VPI 7690. Scale bars represent 100 nm.

1b) 및 VPI 1799(Fig. 1c)의 세포벽 전면에 걸쳐서 규칙적인 배열이 확인되었다. 특히 세포의 가장자리에 느슨하게 결합한 외층이 확인된점으로 미루어 RA가 peptidoglycan의 외층에 층을 이루고 있는 것으로 판단된다. RA의 미세구조는 peptidoglycan을 함유한 비교적 두꺼운 세포벽층이 있기때문에 대부분의 경우 선명하지 않았는데, 균주 VPI 0326(Fig. 1a)에서는 특히 이러한 경향이 강하여 세포의 가장자리에서도 균주장축에 거의 평행으로 주행하는 선이 희미하게 관찰되었다. 균주 VPI 11083(Fig. 1b)에서는 RA층이 보다 확실히 관찰되었으며 이균의 RA층의 두께는 세포벽의 겹쳐진 가장자리 부분으로부터 약 10nm인것으로 추정되었다. 균주 VPI1799(Fig. 1c)의 RA의 미세구조도 VPI 11083만큼 확실하지는 않지만 RA층의 두께는 Fig. 1b와 비슷하였다. Fig. 1d는 RA를 생산하지 않는 균주 VPI7690으로 부터 분리한 세포벽의 negative염색상으로서 표면이 균일하게 염색되어 규칙적인 형태는 관찰되지 아니하였다. 본 관찰결과로 미루어 RA를 생산하지 않는균주들의 세포벽은 peptidoglycan 단일층으로 구성되어 있는것으로 사료된다. Johnson¹²⁾은 DNA homology에 기초를 두어 *L. acidophilus* 균주를

각각 A, B 및 Lauer등¹³⁾은 group I 과 II로 대별하고 있다. 본연구에서 RA를 생산하는 균주는 모두 Johnson등의 group A 혹은 Lauer등의 group I 에 속했으며, 오히려 RA를 생산하지 않는 균주는 모두 group B 혹은 group II에 속하고 있다. Lauer등은 그들의 분류의 group I 은 Johnson등의 분류의 group A에 상당한다고 기술하고 있다. DNA homology는 *L. acidophilus*뿐만아니라 모든 균주의 분류에 유효한 방법이지만 이 방법은 세포에서 DNA를 분리하여 radioisotope로 표식하는등으로 실험기술상 번거로움이 있으나 *L. acidophilus*의 경우는 본연구에서와 같이 RA생산의 유무에 따라서 간단히 분류할 수 있는 방법으로 판단된다. 더욱이 RA의 유무는 세포벽을 분리하지 않고도 세포를 직접 4M Gu-HCl에 현탁하여 원심분리후 SDS-PAGE에 의하여 주 단백질 band를 검출함으로써 가능한바 간단한 분류법이라 하겠다.

RA를 생산하는 균주로부터 분리한 세포벽의 SDS-PAGE

*L. acidophilus*의 RA를 생산하는 균주의 RA단백질의 차이를 조사하기 위하여 분리한 세포벽을 SDS-

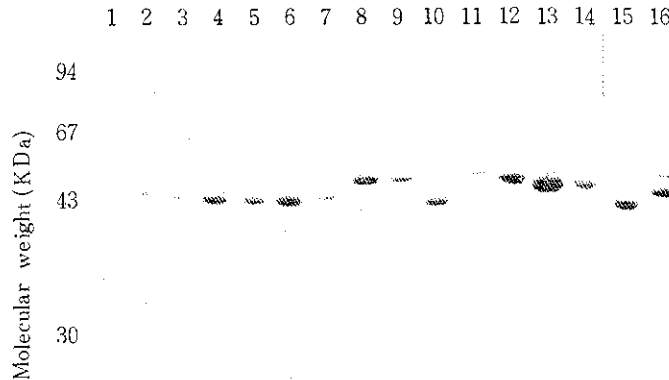


Fig. 2. SDS-PAGE of the isolated cell walls from *L. acidophilus* strains carrying RAs. Strains : lane 2, VPI 0328 ; lane 3, VPI 0326 ; lane 4, VPI 0324 ; lane 5, VPI 11760 ; lane 6, VPI 11843 ; lane 7, JCM 1229 ; lane 8, VPI 1799 ; lane 9, VPI 11083 ; lane 10, VPI 0607-1B ; lane 11, VPI 7635 ; lane 12, VPI 11761 ; lane 13, VPI 1754 ; lane 14, VPI 0824 ; lane 15, JCM 1029 ; lane 16, VPI 1294. Lane 1 shows molecular weight marker proteins ; numbers at the left side represent the molecular weights (in kDa) of the markers.

Table 2. Amino acid composition of RA proteins from *L. acidophilus* strains

Amino acid	RA protein from strain :																			
	Group A-1 ^{a)} Mole % NR ^{b)}	VPI 1799 Mole % NR ^{b)}	VPI 11083 Mole % NR ^{b)}	VPI 0607-1B Mole % NR ^{b)}	VPI 7635 Mole % NR ^{b)}	VPI 11761 Mole % NR ^{b)}	VPI 1754 Mole % NR ^{b)}	VPI 0824 Mole % NR ^{b)}	JCM 1029 Mole % NR ^{b)}	VPI 1294 Mole % NR ^{b)}										
Asp	15.31	56.0	14.84	61.0	11.85	48.7	15.87	58.1	17.48	75.0	16.60	70.0	15.25	61.3	16.94	68.1	16.07	58.8	17.47	68.7
Thr	10.42	38.1	9.02	37.1	7.41	30.5	11.30	41.4	11.25	48.3	11.08	46.5	10.33	41.5	11.59	46.6	11.47	42.0	12.93	50.8
Ser	9.42	34.5	9.01	37.0	8.38	34.4	7.33	26.8	8.23	35.3	7.62	32.0	9.23	37.1	7.55	30.4	8.75	32.0	8.00	31.4
Glu	6.27	22.9	8.15	33.5	7.84	32.2	7.56	27.7	6.34	27.2	7.57	31.8	8.95	36.0	4.79	19.3	5.17	18.9	5.01	19.7
Gly	11.13	40.7	18.78	77.2	28.72	118.0	9.26	33.9	11.62	49.8	9.84	41.3	12.46	50.1	11.39	45.8	10.53	38.5	10.53	41.4
Ala	12.06	44.2	9.30	38.2	7.53	30.9	10.44	38.2	10.25	44.0	9.37	39.4	8.60	34.6	8.91	35.8	11.51	42.1	9.61	37.8
Cys	0.18	0.7	0.10	0.4	0.40	1.6	0.20	0.7	0.06	0.3	0.13	0.5	0.30	1.2	0.14	0.6	0.17	0.6	0.21	0.8
Val	8.65	31.7	6.12	25.2	5.39	22.2	8.16	29.9	7.42	31.8	7.11	30.0	6.91	27.8	8.80	35.4	8.83	32.3	8.02	31.5
Met	0.11	0.4	0.06	0.2	0.21	0.9	0.21	0.8	0.12	0.5	0.12	0.5	0.24	1.0	0.46	1.8	0.14	0.5	0.22	0.9
Ile	3.60	13.2	3.30	13.6	3.55	14.6	2.85	10.4	3.06	13.1	4.27	17.9	3.13	12.6	2.93	11.8	3.02	11.1	2.54	10.0
Leu	3.95	14.5	4.56	18.7	4.19	17.2	5.11	18.7	5.06	21.7	5.20	21.8	6.27	25.2	4.75	19.1	4.76	17.4	6.18	24.3
Tyr	0.70	2.6	0.14	0.6	0.14	0.6	0.61	2.2	2.27	9.7	0.55	2.3	0.18	0.7	0.98	3.9	0.18	0.7	0.05	0.2
Phe	2.60	9.5	3.06	12.6	3.18	13.1	3.80	13.9	3.26	14.0	3.56	15.0	3.07	12.3	3.19	12.8	3.18	11.6	3.04	11.9
Lys	7.37	27.0	6.79	27.9	5.83	24.0	8.97	32.8	7.20	30.9	7.99	33.6	7.23	29.1	7.36	29.6	7.48	27.4	8.76	34.4
His	3.82	14.0	3.39	13.9	3.00	12.3	3.52	12.9	2.06	8.8	4.18	17.6	3.97	16.0	4.40	17.7	4.64	17.0	3.91	15.4
Arg	1.93	7.1	1.56	6.4	1.67	6.9	1.56	5.7	1.65	7.1	2.14	9.0	1.93	7.8	2.60	10.5	1.57	5.7	1.38	5.4
Pro	2.46	9.0	1.82	7.5	0.71	2.9	3.25	11.9	2.65	11.4	2.67	11.2	1.95	7.8	3.22	12.9	2.53	9.3	2.14	8.4
Neutral	65.30	65.27	69.81	62.52	65.27	61.52	62.57	63.91	65.07	65.07	63.91	62.57	63.91	65.07	63.91	65.07	63.91	65.07	63.91	63.47
Acidic	21.58	22.99	19.69	23.43	23.82	24.17	21.73	21.73	21.24	21.24	21.73	21.73	21.73	21.24	21.73	21.24	21.24	21.24	22.48	22.48
Basic	13.72	11.74	10.50	14.05	10.91	14.31	14.36	14.36	13.69	13.69	14.36	14.36	14.36	13.69	14.36	13.69	13.69	13.69	14.05	14.05
Hydrophobic ^{c)}	22.07	19.06	17.37	23.99	23.84	23.48	21.75	24.33	22.64	22.64	24.33	21.75	24.33	22.64	24.33	22.64	22.64	22.64	22.19	22.19
Molecular weight ^{d)} (kDa)	41	46	46	41	48	47	45	45	44	44	47	45	45	41	45	45	41	41	44	44
H ^{e)}	674	587	527	736	670	726	402	402	685	685	402	402	402	685	402	685	685	685	681	681

a) Group A-1 includes strains VPI 0328, VPI 0326, VPI 0324, VPI 11760, VPI 11843 and JCM 1229.

b) NR : the number of residue per molecule.

c) Hydrophobic amino acids include isoleucine, leucine, proline, phenylalanine, tyrosine, valine and methionine.

d) Molecular weights were determined by SDS-PAGE.

e) Hydrophobicity factor

PAGE에 의하여 분석하였다(Fig. 2). 이 SDS-PAGE pattern에 있어서 주된 band는 각균주의 RA 단백질이었으며 이외에 sarkosyl 처리와 증류수로 세척해서 제거되지 않았던 타단백질의 minor band로 검출되었다.

SDS-PAGE후 분자량 marker 단백질의 영동거리의 비교에 의하여 얻은 RA 단백질의 분자량은 VPI 0328, VPI 0326, VPI 0324, VPI 11760, VPI 11843, JCM1229, VPI 0607-1B 및 JCM 1029의 8주는 평균 41,000dalton(41KDa), VPI1799 및 VPI11083의 2주는 평균 46KDa, VPI 1754 및 VPI 0824의 2주는 평균 45KDa, VPI 7635주는 48kDa, VPI 1754주는 47KDa, VPI1294주는 44KDa이었다(Table 2). 이와같이 RA 단백질의 분자량은 균주에 따라 상당히 다른것도 있으므로 적어도 RA 단백질의 분자량에 관해서는 RA를 생산하는 균주에 있어서도 *L. acidophilus*에는 성장이 다른 여러균주가 포함되어 있음을 나타내고 있다. RA를 생산하지 않은 균주로부터 분리한 세포벽을 SDS-PAGE로 분석하면 몇개의 단백질 band가 생기지만 주band는 생성되지 않아서 이는 RA를 생산하지 않는균주의 세포벽에는 아마도 단백질함량이 RA생산균주에 비해서 낮은것임을 시사하고 있다. RA 단백질의 분자량은 균주에 따라 다른것 같았으나, Johnson등¹²⁾에 의한 분류의 subgroup A-1 및 Lauer등¹³⁾에 의한 분류의 subgroup Ia에 속하는 6株의 RA 단백질의 분자량은 모두 41KDa으로 동일하였다. SubgroupA-1과 Ia는 같으므로 이 subgroup의 균주는 모두 동일한 분자량의 RA 단백질을 생산한다고 생각된다. 그러나 Ia이외의 subgroup에 속하는 균주의 RA 단백질은 분자량이 서로 다른것이 많은것으로 추측된다. 같은 subgroup의 균주라도 자기 다른 분자량의 RA 단백질을 생산한다.

RA 단백질의 아미노산조성

*L. acidophilus*의 RA 단백질은 앞에서 기술한 바와같이 균주에 따라 분자량이 동일한 것과 다른것이 있으므로, RA 단백질의 차이를 조사하기 위해 아미노산분석을 행하였다. Table 2의 결과에서 나타난것처럼 *L. acidophilus*의 모든 균주의 RA 단백질은 중성아미노산을 약61.5~69.8%로 가장 많이 함유하고

있었으며, 산성은 19.7~24.2%, 염기성아미노산 함유량은 10.9~14.4%로서 산성아미노산을 많이 함유하고 있었다. 주요구성 아미노산은 aspartic acid, threonine, serine, glycine, alanine이었으며 특히 균주 VPI1799 및 VPI11083의 RA 단백질은 glycine의 함량이 높아 각각 18.8% 및 28.7%를 나타내었다. Cysteine, methionine 및 tyrosine은 *L. acidophilus*균주의 모든 RA 단백질중의 minor 성분으로 그 함량은 1% 이하였다. 특히 소수성아미노산함량은 17.4~24.6%로 비교적 적었다.

Biggelow와 Channon²³⁾의 식에 따라 얻은 hydrophobicity factor(H ϕ)는 402~726으로 상당히 낮은값을 나타내었다(Table 2).

전술한바와 같이 *L. acidophilus*의 8주에 있어서 RA 단백질의 분자량은 41KDa이었으나 이들 균주중 VPI 0328, VPI 0326, VPI 0324, VPI 11760, VPI 11843 및 JCM 1229의 RA 단백질의 아미노산 조성을 달랐다. 아미노산 조성이 동일하였던 6주는 Johnson등¹²⁾과 Lauer등¹³⁾에 의한 분류의 각 group A-1 혹은 group Ia에 속하였으며, 동일한 아미노산 조성을 가진 이들 6주이외의 균주의 RA 단백질의 아미노산 조성은 모두 서로 상이하였다.

RA 단백질의 peptide mapping

아미노산분석결과 *L. acidophilus*의 RA 단백질은 아미노산 조성이 같은것과 다른것이 있음을 알았으나, 더욱 상세하게 RA 단백질의 차이를 조사하기 위해 RA 단백질의 *S. aureus* V8 protease에 의해 한정분해후 및 NCS로 부분절단후의 peptide mapping을 SDS-PAGE에 의하여 행하였다(Fig. 3, 4). *S. aureus* V8 protease에 의한 한정분해후의 RA 단백질의 peptide pattern은 Fig. 3과 같이 아미노산 조성이 동일하였던 6주(VPI 0328, VPI 0326, VPI 0324, VPI 11760, VPI 11843 및 JCM 1229, lane2~7)의 RA 단백질은 동일한 peptide pattern이었다. 이에반해 그외균주의 RA 단백질로부터 이 protease에 의해 한정분해하여 얻은 peptide fragment pattern은 서로 상이하였다. 또 같은 peptide pattern을 나타내었던 6주(lane 2~7) 및 VPI0607~1B(lane 10)에 있어서는 한정분해후에도 꽤 많은양의 미소화 RA 단백질이 남아 있었으나 그외의 균주에서는 미

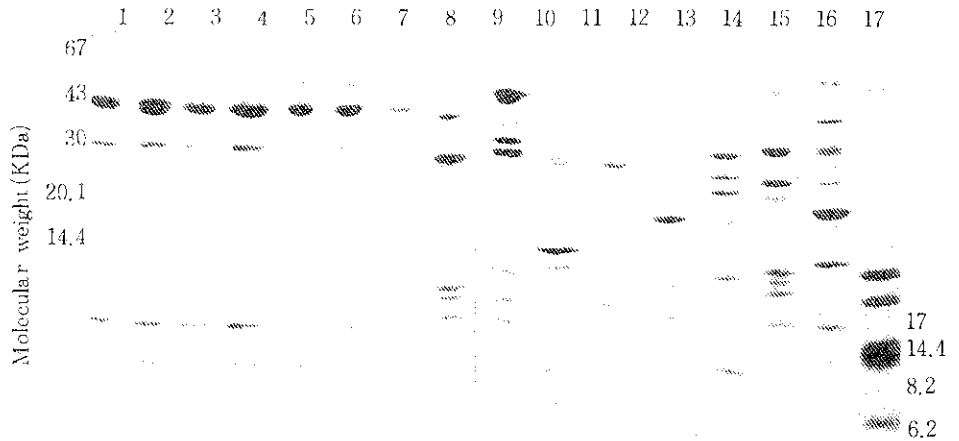


Fig. 3. Peptide maps of the RA proteins from *L. acidophilus* strains after limited proteolysis with *S. aureus* V8 protease.

Strains : lane 2, VPI 0328 ; lane 3, VPI 0326 ; lane 4, VPI 0324 ; lane 5, VPI 11760 ; lane 6, VPI 11843 ; lane 7, JCM 1229 ; lane 8, VPI 1799 ; lane 9, VPI 11083 ; lane 10, VPI 0607-1B ; lane 11, VPI 7635 ; lane 12, VPI 11761 ; lane 13, VPI 1754 ; lane 14, VPI 0824 ; lane 15, JCM 1029 ; lane 16, VPI 1294. Lanes 1 and 17 shows molecular weight marker proteins ; numbers at the left and right sides represent the molecular weights (in kDa) of the markers.

소화 RA단백질이 다소량 남거나 거의 존재하지 않았다. 이 사실은 *L. acidophilus* 균주의 RA단백질의 *S. aureus* V8 protease에 대한 감수성은 균주에 따라 상이하였음을 나타내고 있다. *S. aureus* V8 protease는 단백질분자중의 glutamyl bond를 특이적으로 가수분해한다²⁵⁾. 각균주의 RA단백질의 1분자당 glutamic acid의 잔기수는 약 19~36이었으며(Talbe 2), 균주에 따라 현저한 차이가 있으나, glutamic acid잔기수와 *S. aureus* V8 protease로 절단되어 생긴 peptide fragment수는 반드시 비례하지는 않았다. glutamic acid잔기를 약 19 함유한 균주 VPI 0824의 RA단백질로부터는 많은 peptide fragment가 생성되었으나, glutamic acid잔기를 약 34 함유한 VPI1799의 RA단백질로부터는 불과 몇개의 peptide fragment만 생성되었다. Subgroup A-1 속하는 *L. acidophilus* 6주의 RA단백질은 *S. aureus* V8 protease에 의해 한정분해후의 peptide map이 동일하였고, 그의 균주의 RA단백질의 peptide map와는 달랐다(Fig. 3). 이 사실은 RA단백질의 분자량과 *S. aureus* V8 protease에 의해 한정분해후의 peptide

map을 검사함으로써 *L. acidophilus*의 subgroup A-1을 DNA homology법에 비하여 훨씬 간단하게 동정될 수 있음을 시사하고 있다. Subgroup A-1이외의 subgroup(A-2, A-3, A-4 및 Ib^{a, b})의 균주의 RA단백질의 peptide map은 *S. aureus* V8 protease의 한정분해에 의해서도 모두 서로 달랐다.

NCS로 부분절단된 *L. acidophilus*의 RA단백질의 SDS-PAGE에 의한 peptide pattern은 Fig. 4와 같이 15주중 9주(VPI 0328, VPI 0326, VPI 0324, VPI 11760, VPI 11843, JCM 1229, VPI 1799 (lane 1~7), VPI1754(lane 12) 및 VPI1294 (lane 15))의 RA단백질은 NCS로 절단되지 않았다. 이 사실은 NCS는 단백질 분자중의 tryptophanyl bond를 절단하므로²⁶⁾ 이들 9주의 RA단백질은 tryptophan을 함유하지 않음을 시사하고 있다. 그의 6주의 RA단백질중 균주 VPI 11083(lane 9)과 VPI 0607-1B (lane 10)의 RA단백질은 NCS절단에 의하여 생긴 peptide fragment의 수가 아주 적었으므로 이들의 RA단백질 분자중의 tryptophan 잔기수는 아주 적다고 생각된다. NCS로 절단된 6주의 RA단백질의

peptide pattern은 서로 달랐는데, 이는 subgroup A-1 이외의 균주는 같은 subgroup에 속하고 있는 균주에 있어서도 RA 생산에 관해서는 아주 불균질하였음을 알 수 있다. 실제로 Johnson 등¹²⁾에 의하면 subgroup A-1의 DNA homology는 87~100%로 아주 높으나, 그외의 subgroup A-2, A-3 및 A-4의 homology는 상당히 낮아 각기 43~100%, 64~100% 및 72~100%로 상당히 불균질하였다. 이 결과와 RA를 생산하는 *L. acidophilus* 균주중 A-1 이외의 subgroup에 속하는 균주는 특히 더 세분할 수 있는 것으로 사료된다. Johnson 등¹²⁾ 및 Lauer 등¹³⁾은 각기 group B 및 group II를 *L. acidophilus*와는 다른 species, *L. gasseri*로 해야 한다고 제안하고 있다. 그들의 이 제안은 group B¹²⁾ 및 group II¹³⁾에 속하는 균주는 그외의 *L. acidophilus* 균주와는 달리 RA를 생산하지 않는다는 본 연구의 결과와도 일치된다.

세포표면소수성

소수성용매로서 *n*-octane 및 *p*-xylene을 사용했을 때의 *L. acidophilus* 균주의 세포의 수층과 소수성용매간의 분배에 기초를 두어 세포표면소수성을 측정 한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. RA를 생산하는 균주는 VPI7635를 제외하고는 소수성80이상의 높은

소수성을 나타내었다. GuHCl로 처리하여 RA를 제거한 세포의 표면소수성은 많은 균주로, GuHCl로 처리하지 않은 RA를 보유한 세포의 소수성과 유사 하였으나, 몇주는 RA의 제거에 의하여 표면소수성이 저하한 균주가 있었으며 특히 균주 VPI0324 및 VPI0607-1B에서는 저하하였다.

한편 RA를 생산하지 않는 균주의 세포표면소수성은 측정 한 6주중 3주는 높았으며 1주는 중등도, 2주는 낮았다. 따라서 RA를 생산하지 않는 균주중에는 RA를 생산하는 균주보다 낮은 표면소수성을 가진 세포가 많다고 사료된다. *L. acidophilus* 균주의 RA 단백질의 아미노산조성에서 얻은 hydrophobicity factor는 일반적으로 그의 세균의 RA 단백질과 비교 하였을 때 상당히 낮았다(Talbe 2)^{2, 11)}. 그럼에도 불구하고 그의 RA 단백질이 세포의 최외층을 형성하고 있는 RA 생산균주는 대부분 높은 세포표면소수성을 나타내었다(Fig. 5). 이 사실은 RA 단백질은 그 표면에 소수성아미노산이 배좌를 가지고 있음을 나타내고 있다. 특히 GuHCl 처리로 RA 단백질을 제거하여도 세포표면 소수성은 거의 변화하지 않는 것이 많으므로 이러한 균주에서는 RA 단백질은 세포표면소수성에 큰 기여는 하지 않는다고 생각된다. 한편 소수의 균주에서는 RA 단백질의 제거에 의하여

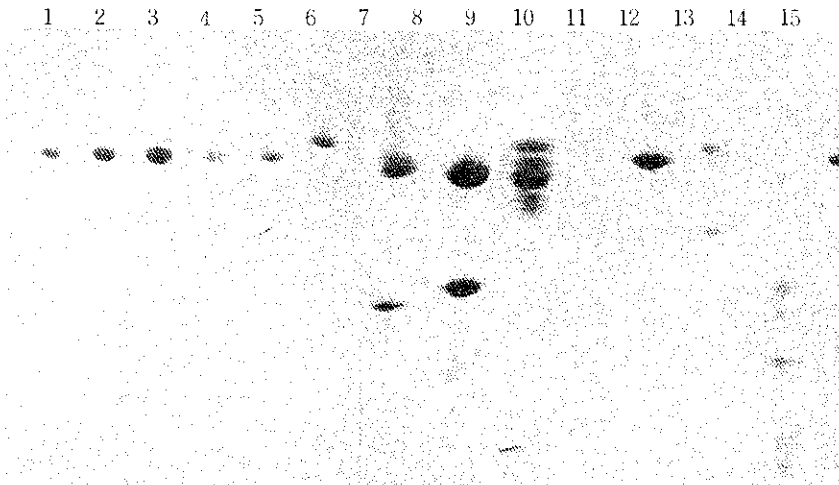


Fig. 4. Peptide maps of the RA proteins from *L. acidophilus* strains after partial cleavage with NCS.
 Strains : lane 1, VPI 0328 ; lane 2, VPI 0326 ; lane 3, VPI 0324, lane 4, VPI 11760 ; lane 5, VPI 11843 ; lane 6, JCM 1229 ; lane 7, VPI 1799 ; lane 8, VPI 11083 ; lane 9, VPI 0607-1B ; lane 10, VPI 7635 ; lane 11, VPI 11761 ; lane 12, VPI 1754 ; lane 13, VPI 0824 ; lane 14, JCM 1029 ; lane 15, VPI 1294.

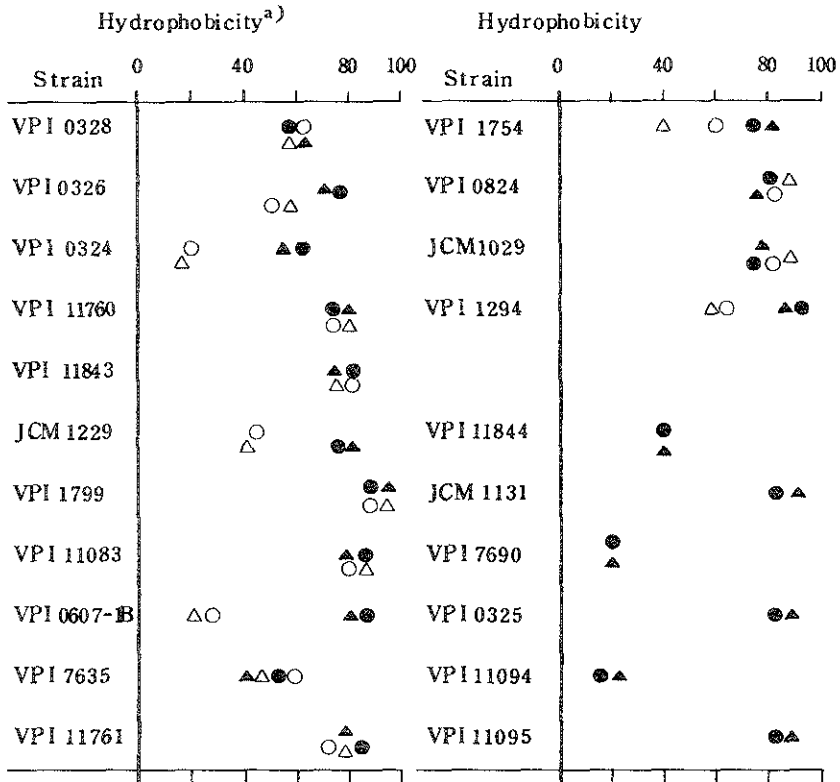


Fig. 5. Cell surface-hydrophobicity of *L. acidophilus* strains.

a) Hydrophobicity was expressed as :

$$100 \times \left[\frac{A_{410} \text{ in aqueous phase after organic solvent extraction}}{A_{410} \text{ in aqueous phase before organic solvent extraction}} \times 100 \right]$$

Solid symbols(● and ▲) show hydrophobicities of untreated native cells, and empty symbols(○ and △) show those of 4M GuHCl-treated cells to remove RAs.

n-Octane(● and ○) and p-xylene(▲ or △) were used as hydrophobic organic solvents.

분명하게 세포표면소수성이 저하하고 있으므로 이러한 세포에서는 RA 단백질은 세포표면소수성과 직접관계가 있다고 생각된다. 많은 세균에는 RA가 존재하지만³⁰⁾ RA 단백질과 세포표면소수성의 관계에 관한 정보는 극히 적어서 겨우 어빙(Furunculosis)의 원인균인 *Aeromonas salmonicida*의 사각형으로 배열한 RA층(A-layer)은 이균의 세포표면소수성을 증가시킨다고 알려지고 있다. *L. acidophilus*는 사람 및 동물의 소화관의 상재균으로 옛부터 성장의 목적으로 식품에 첨가되고 약으로 사용되고 있으며³⁰⁾, 또 다른 소화관내에 서식하는 *L. acidophilus*는 혈청cholesterol치를 내리고³¹⁾ 발암을 억제

하는등^{33,34)}이 알려져 있으므로 특히 분관을 식품에 광범위하게 첨가하고 있는것으로 생각된다. *L. acidophilus*가 소화관내에 서식하기 위해서는 소화관 상피세포에 점착하지 않으면 안된다. *L. acidophilus*는 점착인자로서 잘알려진 fimbriae는 생산하지 않으므로 분관의 점착과 정착에는 소수성상호작용이 관여하고 있음을 알 수 있다. 따라서 분관을 정장 및 그의 보건의 목적으로 식품에 첨가할 때는 세포표면소수성이 높은 균주(본연구에 사용된 균주중에는 VPI 11760, VPI 11843, VPI 1799, VPI 0824, JCM 1029)를 선택하여 사용하는 것이 더 좋다고 생각되며 소수성 상호작용 이외에도 점착과 정착에 관여하는

세포표면물질 또는 현상이 있다고 생각된다.

요 약

사람이나 동물의 소화관의 상재균으로서 중요한 *Lactobacillus acidophilus*의 여러 균주를 사용하여 세포표면의 성상을 조사하였다. 분리한 세포벽의 negative 염색한 표본을 전자현미경으로 검토한 결과, 사용한 21주중 15주는 세포벽외층에 단백질로 구성된 regular array를 생산하고 있음을 알았다. RA를 구성하는 단백질의 분자량은 41KDa~48 KDa이었다. 아미노산 조성 및 *Staphylococcus aureus* V8 protease로 한정분해 후 및 N-chlorosuccinimide로 부분절단후의 peptide map에서 Johnson 등의 분류의 subgroup A-1에 속하는 균주가 생산하는 RA 단백질은 불균질하였으나, 그의 균주의 RA 단백질은 같은 subgroup에 속하고 있어도 불균질하였음을 알았다.

따라서 RA생산의 유무 및 RA단백질의 분자량측정과 peptide mapping을 행하면 지금까지 행해온 DNA-hybridization과 같은 복잡한 절차를 사용하지 않아도 subgroup A-1의 *L. acidophilus*가 동정 가능함을 알았다. *L. acidophilus*의 세포표면소수성은 일반적으로 RA를 생산하지 않는 균주보다는 RA를 생산하는 균주에 높은 것이 많았다. RA생산균주에 있어서는 RA단백질은 세포표면소수성과 직접관계하고 있는 것은 적었다.

문 헌

1. Sleytr, U. B. : Regular arrays of macromolecules on bacterial cell walls ; Structure, chemistry, assembly and function. *Int. Rev. Cytol.*, 53, (1978)
2. Sleytr, U. B. : Crystalline surface layers on bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 37, 311(1983)
3. 増田邦義 : 細菌表層の規則的配列構造. 日本細菌雜誌, 第38卷 第5號, 717(1983)
4. Masuda, K. and Kawata, T. : Ultrastructure and partial characterization of a regular array in the cell wall of *Lactobacillus brevis*. *Microbiol. Immunol.*, 23, 941(1979)
5. Masuda, K. and Kawata, T. : Reassembly of the regularly arranged subunits in the cell wall of *Lactobacillus brevis* and their reattachment to cell walls. *Microbiol. Immunol.*, 24, 299(1980)
6. Masuda, K. and Kawata, T. : Characterization of a regular array in the cell wall of *Lactobacillus buchneri* and its reattachment to the other wall components. *J. Gen. Microbiol.*, 124, 81 (1981)
7. Masuda, K. and Kawata, T. : Reassembly of a regularly arranged protein in the cell wall of *Lactobacillus buchneri* and its reattachment to cell walls : Chemical modification studies. *Microbiol. Immunol.*, 29, 927(1985)
8. Bhowmik, T., Johnson, M. C. and Ray, B. : Isolation and partial characterization of the surface proteins of *Lactobacillus acidophilus* strains. *Int. J. Food Microbiol.*, 2, 311(1985)
9. Speck, M. L. : Preparation of lactobacilli for dietary uses. *J. Food. Protect.*, 42, 65(1980)
10. Steck, M. L. : Lactobacilli as dietary supplements and manifestations of their functions in the intestine. In B. O. Hallgren(ed), Nutrition and intestine flora, Almquist and Wiksell Int. Stockholm, 93(1981)
11. Masuda, K. and Kawata, T. : Distribution and chemical characterization of regular arrays in the cell walls of strains of the genus *Lactobacillus*. *FEMS Microbiol. Letters*, 20, 145(1983)
12. Johnson, J. L., Phelps, C. F., Cummins, C. S., London, J. and Gasser, F. : Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 30, 53(1980)
13. Lauer, E., Holming, C. and Kandler, O. : Heterogeneity of the species *Lactobacillus acidophilus*(Moro) Hansen and Moquot as revealed by biochemical characteristics and DNA-DNA hybridization. *Zbl. Bakt., Hyg.*, 1. Abt. Orig. Cl, 150(1980)
14. DeGraaf, F. K. and Mooi, F. R. : The fimbrial adhesions of *Escherichia coli*. *Adv. Microb. Physiol.*, 21, 65(1986)
15. Rosenberg, M. and Kjelleberg, S. : Hydrophobic interactions : roles in bacterial adhesion. *Adv. Microb. Ecol.*, 9, 353(1986)
16. Efthymiou, C. and Hansen, P. A. : An antigenic analysis of *Lactobacillus acidophilus*. *J. Infect. Dis.*, 110, 258(1962)
17. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*, 227, 680 (1970)

18. Fairbanks, G., Stech, T. L. and Wallach, D. H. : Electrophoretic analysis of the major polypeptides of the human erythrocyte membrane. *Biochemistry*, **10**, 2606(1971)
19. Sreekrishna, K., Jones, C. E., Guetzow, K. A., Prasad, M. R. and Joshi, V. C. : A modified method for amino acid analysis with ninhydrin of Coomassie-stained proteins from polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **103**, 55(1980)
20. Cleveland, D. W., Fischer, S. G., Kirschner, M. W. and Laemmli, U. K. : Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.*, **252**, 1102(1977)
21. Lischwe, M. A. and Ochs, D. : A new method for partial peptide mapping using N-chlorosuccinimide/ urea and peptide silver staining in sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **127**, 453(1982)
22. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J. : Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265(1951)
23. Biggelow, C. C. and Channon, M. : Hydrophobicity of amino acids and proteins. In G. D. Fasman, Handbook of biochemistry and molecular biology, 3rd edition, Proteins, 1, CRC Press, Cleveland, 209(1976)
24. Rosenberg, M., Gutnick, D. and Rosenberg, E. : Adherence of bacteria to hydrocarbons : a simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. *FEMS Microbiol. Letters*, **9**, 29 (1980)
25. Houmard, J. and Drapiau, G. R. : Staphylococcal protease : a proteolytic enzyme specific for glutamyl bonds. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **68**, 3506(1972)
26. Shechter, Y., Patchorink, A. and Burstein, Y. : Selective chemical cleavage of tryptophanyl peptide bonds by oxidative chlorination with N-chlorosuccinimide. *Biochemistry*, **15**, 5071 (1976)
27. Marmur, J. and Doty, P. : A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. *J. Mol. Biol.*, **3**, 208(1961)
28. Saito, H. and Miura, K. : Preparation of transforming deoxyribonucleic acid by phenol treatment. *Biophys. Acta*, **72**, 619(1963)
29. Hontebeyrie, M. and Gasser, F. : Deoxyribonucleic acid homologies in the genus *Leuconostoc*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**, 9(1977)
30. Masuda, K., Itoh, M., Kawata, T. : Characterization and reassembly of a regular array in the cell wall of *Clostridium difficile* GAI 4131. *Microbiol. Immunol.* **33**, 287(1989)
31. Trust, T. J., Kay, W. W. and Ishiguro, E. E. : Cell surface hydrophobicity and macrophage association of *Aeromonas salmonicida*. *Curr. Microbiol.* **9**, 315(1983)
32. Watanuki, M., Goto, Y. and Wada, Y. : Influence of gastrointestinal flora on the lipid metabolism of the host rats. Proc. 3rd IPCR Symp. Intestinal Flora, **3**, 107(1983)
33. Mizutani, T. and Mitsuoka, T. : Effect of intestinal bacteria on incidence of liver in gnotobiotic C₃ He male mice. *J. Natl. Cancer Inst.*, **63**, 1365(1979)
34. Goldin, B. R. and Gorbach, S. L. : Effect of *Lactobacillus acidophilus* dietary supplement on 1, 2-dimethylhydrazine dihydrochloride induced intestinal cancer in rats. *J. Natl. Cancer Inst.*, **64**, 263(1980)

(1989년 10월 13일 접수)