

## Staphylococcus aureus의 菌體分劃

崔慶浩 · 玄恩旻 · \*朴今順

曉星女子大學 食品營養學科

\* 國立馬山大學 家政學科

### Fractionation of the Cells of Staphylococcus aureus

Kyoung-Ho Choi, Eun-Min Hyun and \*Kum-Soon Park

(Dept. Food Science & Nutrition, Hyoseung University)

(\*Dept. Home Economics, Masan National College)

#### Abstract

The growing cells of *S. aureus* were fractionated along the Schmidt-Thannhauser-Schneider's technique into several fractions such as TCA(trichloroacetic acid)-soluble, lipid, nucleic acid, protein and residue fraction. They were also fractionated according to their cellular structure into Sonic-supernatant, SDS(sodium lauryl sulfate)-soluble, Formamide-soluble and Residue fraction. Fractionation was carried out by orderly treatment of the Sonic pellet with 1.0% SDS and hot(150°C) formamide, and the pellet was prepared by centrifugation of the cells sonic osillated for 20 minutes at 150 watt.

Sonic-supernatant fraction contained a 91.3% of total DNA while other fractions contained less than 9.5%. SDS-soluble fraction showed a high activity of malate dehydrogenase(13.67 unit/mg protein) and which was higher 22.3 times than the activity found from unsoluble fraction. Formamide-soluble fraction prepared from SDS-undoluble pellet by using the hot formamide exhibited a clear action of reducing sugars against the Anthronesulfate, while it exhibited no clear action against the ninhydrin. However, contrastly, the residue remainning after extraction with formamide exhibited a clear action against ninhydrin and glucosamine was detected form the hydrolysate of residue by paper chromatography.

From these results it is considered that the Sonic-supernatant fraction is mainly consisted of plasmic component of the cells. Other fractions, SDS-soluble, Formamide-soluble and Residue, should be consisted of plasma membrane, lipoplysaccharide and peptidoglycan of the cell, respectively.

#### I. 結 論

單細胞 植物인 細菌은 細胞內容物인 原形質과 이  
것을 둘러싸고 있는 原形質膜, 그리고 最外層을 形

成하여 體型을 유지하고 外部의 자극으로부터 菌體  
를 保護하는 細胞壁으로 構成되어 있다.<sup>1~3)</sup> 이와  
같이 細菌은 他 組織細胞에 比하여 構造的으로 單  
純하기 때문에 여러가지 目的으로 細菌細胞는 그 構

造物에 따라 分割되어 왔다<sup>4~6)</sup>.

그러나 이러한 分割 事例들은 大部分이 特定の 目的에 遂行되어 왔기 때문에 菌體 構造物 중 特定 部位가 集中的으로 分割되어 왔고 이로 因하여 菌體 構造物을 均衡있게 分割하는 것은 아직 未恰한 狀態에 있다.

이러한 觀點에서 著者들은 Gram陽性인 S. aureus의 카드름耐性 菌株를 利用하여 菌體 構造物을 可能한 限 細分하고 各 劃分의 生化的 特性을 檢討하여 各 劃分을 定性하였으며 나아가 菌體 部位別 카드름含量 調査의 試料로 하였다.

## II. 材料 및 方法

### 1. 菌株 및 培養條件

#### 가. 菌株

찰들<sup>7)</sup>이 分離한 카드름耐性的 Staphylococcus aureus를 使用하였다.

Table 1. Composition of Cultural Medium

Component	Content (g/liter)
Glucose	10.0
Peptone	5.0
Yeast extract	2.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	0.3
NaCl	1.0

#### 나. 培地

Table 1로 表示한 組成의 液體培地를 使用하여 pH 7.0으로 調整한 後 0.75 kg/cm<sup>2</sup>G에서 10分間 加壓殺菌하였다.

#### 다. 培養條件

30℃에서 15時間 진탕 培養하였으며 其他 培養條件 및 混濁測定法은 찰들<sup>7)</sup>의 方法에 準하였다.

### 2. 供試菌體 準備

培養한 菌體를 4℃에서 遠心分離하여 集菌하고 Tris-HCl 완충액 (0.1 M, pH 7.0)으로 2回 洗滌하였다. 이것을 水冷却한 완충액에 再懸濁하여 懸濁液의 濁度를 1.0으로 調整한 後 供試하였다.

### 3. 菌體分割

#### 가. 成分別 分割

Fig. 1로 表示한 바와같이 菌體를 5%의 水冷却한 Trichloroacetic acid (TCA) 및 100℃로 加熱한 TCA로 各 2回式 抽出한 後 Schmidt-Thannha-

user-Schneider (STS)의 方法<sup>8)</sup>에 準하여 Ethanol-Ether可溶性劃分과 Perchloric acid 및 N-NH<sub>4</sub>OH可溶性劃分, 그리고 殘渣劃分으로 分割하였다.

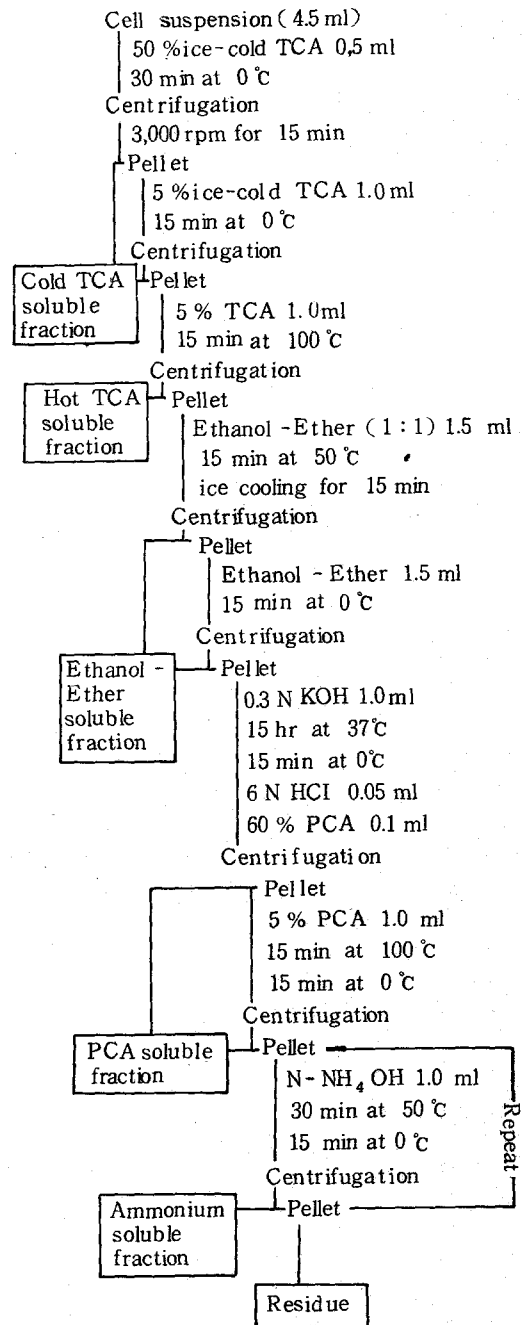


Fig. 1. Procedure of Modified Schmidt-Thannhauser-Schneider's Fractionation Method

나. 構造均別 分割

菌體를 超音波細胞破碎器 (Otake, 5202)를 使用하여 150 watt 에서 20分間 破碎한 後 Fig. 2로 表示한 바와 같이 田原<sup>9)</sup>의 方法을 變形하여 菌體를 原形質成分과 原形質膜 및 細胞壁으로 나누고 細胞壁은 다시 Moreno 들<sup>10)</sup>의 方法에 準하여 Peptidoglycan 部와 Polysaccharide 部로 分割하였다.

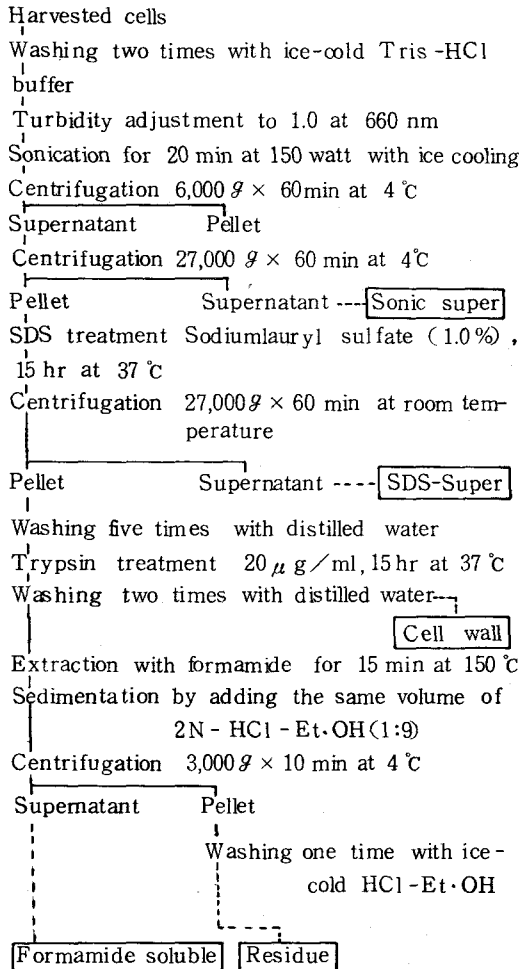


Fig. 2. Procedure for Fractionation of Cells to Prepare the Major Cellular Structural Components.

4. 構造物別 劃分の 定性

細胞 構造物別로 特異한 Marker 를 選定하여 定性하였으며 詳細內譯은 다음과 같다.

가. 原形質劃分の 定性

Deoxyribonucleic acid (DNA) 및 蛋白質을 Marker 로 하였으며 各各 Diphenylamine 法<sup>8)</sup> 및 Phenol 試藥法<sup>11)</sup>으로 定量하였으며 標準物質로는 Boovine DNA (Signra, Type VIII) 및 Bovine Albumin (Sigma)을 使用하였다.

나. 原形質膜 劃分の 定性

Membrane bound Malate dehydrogenase 를 marker 로 하였으며 Gutmann<sup>12)</sup>의 方法에 따라 酵素를 0.8N PCA (Perchloric acid)로 1回抽出하고 K<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>로 中和하여 遠心分離하였으며 遠心上澄液을 試料로 하였다.

酵素活性도 Gutmann의 方法에 따라 測定하였다. 卽, 氷水 中에서 酵素液 0.3 ml 에 0.2 ml 의 NAD<sup>+</sup> (50 mM, Sigmer) 및 0.2 ml 의 malic acid (0.01 %)를 加하고 이것을 37 °C 의 水溶 中으로 옮긴 後 加溫한 0.4 M Hydrazine-Glycine buffer (pH 9.0)를 2.5 ml 加하여 正確히 30分間 反應시켰다. 反應終了 後 生成된 NADH의 量을 Double Beam Spectrophotometer (Shimadzu, UV-200)를 使用하여 340 nm의 吸光度를 測定함으로 定量하였다.

同 反應期間 中 1.0 m mol 의 NAD<sup>+</sup>를 還元시킨 酵素活性을 1Unit 로 表示하였다.

다. Peptidoglycan 劃分の 定性

Formamide 抽出後의 殘渣를 2N HCl-Ethanol (1:9) 溶液으로 1回洗滌하여 殘存 Formamide 를 除去한 後 6N HCl을 加하여 減壓封管하고 110 °C에서 24時間 加水分解하였다. 加水分解한 試料로 다시 100 °C의 水溶 中에서 減壓 乾燥하고 증류水를 加하여 溶解시킨 後 Paperchromatography 및 電氣泳動法으로 Glucosamine의 存在를 確認하였다.

Paper chromatography 에는 iso-Propanol: Pyridine:水:Acetic acid의 8:8:4:1 溶液을 展開溶媒를 使用하였으며 電氣泳動은 5M Acetic acid를 泳動溶媒로 하여 250 Volt에서 140分間 泳動시켰다. 泳動裝置는 Jok Sangyo의 PA-20을 使用하였으며 0.25% Ninhydrin 溶液을 發色劑로 하였다.

라. Polysaccharide 劃分の 定性

Formamide 可溶性 劃분에 4倍量의 氷冷한 Acetone을 加하여 沈澱, 乾燥하였다. 이것을 다시 前記한 加水分解法으로 分解한 後 Anthrone-黃酸法<sup>13)</sup>으로 還元糖을 檢出하였다.

### III. 結 果

#### 1. 超音波處理 劃分の 特性

Fig. 2 로 表示한 分劃法에 따라 나누어진 各 劃分の DNA 및 蛋白質 含量은 Table 2 와 같이 Sonic - super fraction이 殘渣劃分 (Sonic - pellet) 보다 높은 含量을 나타내었다. 特히 DNA는 乾燥菌體mg當 總檢出量의 91.3 %에 相當하는 2.82 $\mu$ g 이 Sonic - super fraction에서 檢出되었으며 Pellet 가운데 含有되었고 DNA 도 以後 分劃된 SDS - super fraction에서 全量 檢出되고 SDS - pellet 에서 는 檢出되지 아니하였다.

한편, 蛋白質은 SDS - super fraction에서 總檢出量의 59.3 %에 相當하는 7.27  $\mu$ g 이 檢出되었고 殘渣 中에서도 約 40 %에 相當하는 量이 檢出되었으나 SDS - pellet 中에 含有된 量은 10 % 以下이었다.

本 結果로부터 Sonic - super fraction은 菌體에 含有된 大部分 (90 % 以上)의 DNA와 約 60 %의 蛋白質을 含有하는 劃分으로 判斷되었다.

Table 2. Content of Deoxyribonucleic Acid and Protein in the Fractions of Sonic - supernatant and Pellet

Fraction	Content ( $\mu$ g/mg dry cell)	
	DNA	Protein
Sonic - super	2.82	7.27
Sonic - pellet	0.27	5.00
SDS - super	0.27	3.91
SDS - pellet	-	1.09

Sonication was carried out for 20 min at 150 watt with ice cooling. DNA and protein was analyzed according to the Diphenylamine and Phenol method, respectively.

#### 2. SDS 處理 劃分中의 Malate dehydrogenase 活性

氷冷한 SDS 로 處理하여 分劃한 SDS - super fraction과 SDS - pellet 에 있어서의 malate dehydrogenase 活性은 Table 3 과 같이 蛋白質 mg 當 比活性이 各各 13.67 unit, 0.60 unit 로서 SDS - super fraction이 pellet 보다 22.3 倍의 높은 比活性을 나타내었다.

Table 3. Activities of Malate dehydrogenase Associated with SDS-Supernatant and SDS - Pellet Fraction

Fraction	NADH ( $\mu$ mol/ml)	Protin ( $\mu$ g/ml)	Specific activity (unit / mg protein)
SDS - Super	102.5	25	13.67
SDS - Pellet	13.8	77	0.60

One unit of the enzyme was defined as an enzyme activity to give the reduction of 1.0 Ommol NAD<sup>+</sup> to NADH during an enzyme reaction at 37 $^{\circ}$ C for 30 minute.

한편, SDS - super fraction을 Perchloric acid 로 1回 抽出하여 抽出前後의 酵素活性을 比較한 結果는 Table 4 와 같이 抽出後가 抽出前에 比하여 平均 81.5 %의 活性을 나타냄으로서 1回 抽出에 依하여서도 높은 回收率을 얻을 수 있음이 明確하였다.

Table 4. Recovery of Malate dehydrogenase Activity by Single Extraction with Perchloric acid.

Exteriment	Recovered activity
I	78.8 %
II	84.2 %
Average	81.5 %

以上の 結果로 부터 SDS - super fraction 은 Pellet 에 比하여 蛋白質含量이 높을 뿐만아니라 (Table 3 ) 越等한 酵素系를 가지고 있는 菌體 部位로 判斷되었다 (Table 4 에서 SDS - super fraction 의 ml 當 蛋白質含量이 pellet 보다 낮아진 것은 酵素活性 測定過程에서 適正活性值을 나타낼 수 있도록 회석되었기 때문임).

#### 3. SDS - pellet 의 定性

SDS - pellet 로 얻어진 細胞成分을 材料 및 方法에서 記述한 바와 같이 Formamide를 처리하여 다시 Formamide 可溶性 劃分과 殘渣로 分割하고 各 劃分에 對하여 Ninhydrin 및 還元糖 反應, 電氣泳動 및 Paper chromatography 法으로 構成物質을 檢討하였다.

가. Ninhydrin 및 還元糖反應

上記 두 劃分の 酸 加水分解物은 모두 Anthrone-黃酸에 대한 還元糖 陽性으로 나타났으나 Ninhydrine에 대하여는 相異하여 殘渣劃分은 強한 陽性을 나타낸 反面 Formamide 可溶性 劃分은 陰性으로 나타났다.

나. 電氣泳動 및 paper chromatography

두 劃分の Amino 酸 및 糖造成을 確認하기 위하여 各各 Acetic acid (5M)와 Boric acid (0.2M)를

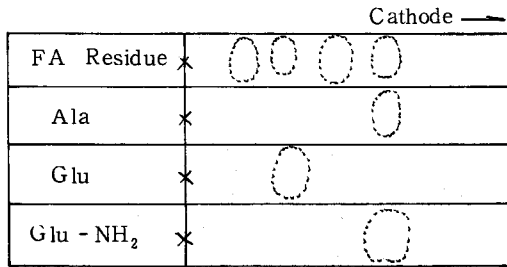


Fig. 3. Chromatogram of Paper Electrophoresis of Formamide Residue Fraction. Electrophoresis was carried out for 140 minutes at 250 volt as discribed in the text.

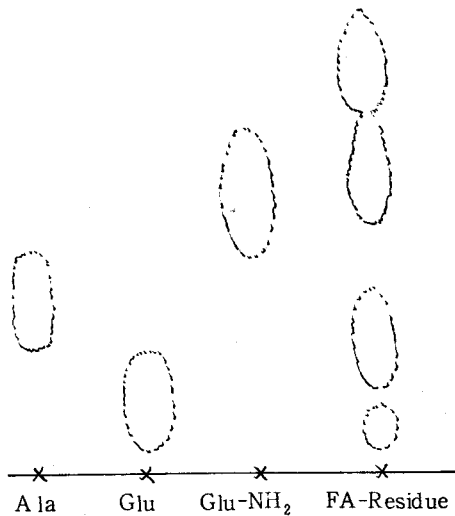


Fig. 4. Paperchromatograph of Fromamide Residue Fraction. Chromatography was carried out after hydrolysis of the residue by using a solvent system consisted of iso-propanol, pyridine, water and acetic acid.

使用하여 泳動하였으나 糖泳動은 糖의 分離가 不良하여 確認치 못하였고 Amino 酸 泳動에서 殘渣劃分이 Fig.3으로 表示한 바와 같이 4個의 Spot로 分離되었다. 同 spot 중 1個는 Glutamic acid로 判斷되었으나 marker로 選定한 Glucosamine이 Alanine과 같은 位置에 泳動되어 Fig.4의 Paper chromatography로 確認하였다.

以上은 結果로 미루어 Formamide 可溶性 劃分은 糖含量은 높으나 Amino 基는 거의 없는 狀態인 反面에 殘渣는 糖과 Amino 酸이 모두 含有되어 있는 劃分으로서 特히 Glucosamine을 含有한 菌體部位로 判斷되었다.

IV. 考 察

菌體 構成成分中 Trichloroacetic acid (TCA)에 溶出되는 것은 主로 有機酸, 糖類等의 低分子物 質로 널리 알려져 있고<sup>8)</sup> STS法에 依하여 分割하는 경우에도 Ethanol-Ether 可溶性 劃分은 脂質, Perchloric acid (PCA) 可溶性 劃分은 核酸類, 強 Alkali 可溶性 劃分은 蛋白質로 主로 構成되고 糖類等의 高分子 他化合物이 殘渣劃分을 構成하고 있는 것으로 多數 報告<sup>8,14)</sup>되어 왔기 때문에 菌體成分을 抽出溶媒에 따라 各各 相當하는 成分으로 判定하여도 無妨할 것이다. 그러나 菌體를 構造物別로 分割하는 경우에는 分割條件에 따라 分離된 劃分の 內容이 달라질 수 있기 때문에 合當한 marker를 選定하여 分離된 劃分이 細胞 構造物 중 어느 部位에 해당되는지는 點이 檢討되어야 할 것이다.

超音波로 破碎한 細胞의 遠心上澄液 (Sonic-super) 중에 蛋白質 및 DNA가 多量含有된 點 (Table 2)으로 미루어 Sonic-super 劃分은 主로 原形質로 構成된 劃分이며 Sonic-pellet는 原形質을 除한 表層構造物인 것으로 判斷된다. 特히 Sonic-pellet 中에 含有된 DNA가 量的으로도 僅少할 뿐만 아니라 畧하여 分割된 SDS-super 劃分 中에서 全量 檢出되는 點으로 미루어 菌體가 超音波 處理에 依하여 充分히 破碎되었고 原形質成分이 以後 分割된 劃分속에서 混入되는 量도 極히 僅少한 것으로 判斷된다.

Malate dehydrogenase는 原形質膜 以內에 分布되는 酵素로서 原形質 外側의 細胞壁에는 存在하지 않는 것으로 알려져 있는바<sup>15,16)</sup> SDS-super 劃分이 pellet에 比하여 越等히 높은 酵素活性을 나타내는 點 (Table 3)으로 미루어 細菌 細胞의 主要 表層構造物인 原形質膜과 細胞壁은 各各 SDS-su-

per 劃分과 SDS-pellet 中에 주로 含有되는 것으로 推定된다. 이것은 細菌 細胞壁 Peptidoglycan 의 特異的 構成物質인 Glucosamine<sup>17)</sup>이 以後 分劃된 SDS-pellet 의 Formamide 抽出 殘渣中에서 檢出됨(Fig.3 및 4)으로서 分明하다 하겠다.

細菌, 特히 Gram 陽性菌의 細胞壁은 內側에 發達된 Peptidoglycan 部와 外側에 少量의 脂質을 含有하는 Polysaccharide 部로 構成되어 있는바<sup>17, 18)</sup> 細胞壁 劃分 中 Formamide 可溶性 劃分の 加水分解物은 強한 還元糖反應을 나타낸 反面 Ninhydrin 에 對하여는 陰性인 點으로 미루어 Formamide 可溶性 劃分은 Polysaccharide 部에 相當하고 Formamide 不溶性 劃分の 加水分解物은 強한 Ninhydrin 反應과 아울러 Glucosamine 이 檢出됨으로서 Formamide 不溶性 劃分은 Peptidoglycan 部에 相當하는 것으로 判斷된다.

### V. 要 約

*S. aureus* 를 TCA 로 處理하여 低分子物質을 抽出한 後 STS 法에 準하여 脂質核酸, 蛋白質 및 殘渣로 分劃하였다. 이와 아울러 超音波處理로 菌體를 破碎한 後 遠心沈澱을 SDS 및 Formamide 를 使用하여 縮次的으로 可溶性 劃分을 抽出하고 얻어진 各劃分の 性質을 調査하였다.

그 結果, 超音波로 破碎한 菌의 遠心上澄液에서 菌體 DNA 의 91.3% 가 檢出되었고 遠心沈澱으로부터는 SDS 處理에 依하여 높은 比活性(13.67unit/mg Protein)의 Malate dehydrogenase 가 유지되었다. 한편, SDS 處理菌의 遠心沈澱物을 다시 熱 Formamide 150℃로 抽出하고 可溶性劃分 및 殘渣를 各各 酸 加水分解한 後 Paper chromatograph 하여 殘渣로부터 Glucosamine 을 確認하였다. 그러나 可溶性劃分은 Ninhydrin 反應에는 陰性이었고 還元糖反應은 陰性이었다.

以上の 結果로 부터 超音波로 破碎한 菌體의 遠心上澄液은 주로 原形質劃分이며 SDS 및 Formamide 에 依하여 溶出되어 나온것은 各各 原形質膜 및 細胞壁의 Polysaccharide 劃分으로, Formamide 不溶性分은 Peptidoglycan 劃分으로 判定되었다.

### 參 考 文 獻

1. Structure and classification of procariotic organisms, p. 135-175 in Micro-organisms: Func-

tion, Form and Environment Ed. by Lilian, E.H. and Alan, H.L., 1979, Edward Arnold Press, London.

2. Determinants of cell shape, p. 413-438 in Bacterial Membrane and Walls, Ed. by Lorreta, L., 1973, Marcel Deckker Inc., New York.

3. Structure and classification of bacteria, p. 22-53 in Principles of Microbiology and Immunology, Ed. by Bernard, D.D. Renato, D., Herman, N.E., Harold, S.G. and Barry, W. Jr., 1969, Harper and Row, New York and London.

4. Guinand, M., Vancheron, M.J., Michel, G. and Tipper, D.J., (1979): Location of peptidoglycan lytic enzymes in *Bacillus sphaericus*, J. Bacteriol., 138, 126-132.

5. Kazuhito, H., Seichi, K., Tomio, K. and Kishimoto, Y. (1979): Fattyacid composition of lipopolysaccharides of *Vibrio cholerae* 35A3(Inaba) NIH(Ogawa) and 4715(Nag), *ibid*, 138, 288-290.

6. Jany, G. and Francoise, R.H. (1975): Cytoplasmic and Outer membrane separation in *Rhodospseudomonas sphaeroides*, Arch. Microbiol., 105, 269-275.

7. 朴燦性, 崔慶浩(1979): 카드뮴에 特異的인 耐性菌의 分離, 韓國營養食糧學會誌, 第8卷, 第1號, 25-30.

8. 細胞內 全 核酸의 定量, pp.16~19, 核酸의 一般的 分離 定量法, 水野重樹, 1969, 東京大學出版會, 東京.

9. 田原 康考(1974): *Clostridium*屬 細菌의 細胞壁을 分解 する 酵素に 關する 研究(學位請求論文)

10. Moreno, E., Munro, W., Pitt, L.M. Gerhart, G.S. and David, T.B. (1979): Purification and characterization of smooth and rough lipopolysaccharides from *Bacillus abortus*. J. Bacteriol., 132, 361-369.

11. Lowry, O.H., Roseburg, N.J., Farr, A.L. and Randal, R.J. (1951): Protein measurement with the folin phenol reagent, J. Biol. Chem., 193, 265-275.

12. Determination with malate dehydrogenase and NAD<sup>+</sup>, p. 1585-1589 in Methodes of Enzymatic Analysis vol. 3, Ed. by Bergmyer, H.U., Academic Press, New York and London.

13. 硫酸處理을 基本にする 糖의 定量, pp. 47-75, 還元糖의 定量法, 福井 作藏, 1969, 東京大學出版會,

東京.

14. 加 富民雄 (1975): クロストシンの作用機作に 関する 研究, 學位請求論文.
15. Bruce, B.H. and Gerilyn, Z.P., (1971): Membrane marker enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, 227, 402-412.
16. The use of membranous enzymes as probes of lipid-protein interaction in the cytoplasmic membrane of Escherichia coli, p. 199-212 in *The Enzymes of Biological Membranes*, Ed. by Anthony, M. (1976, Plenum Press, New York.)
17. Massatsu, K. (1972): Ultrastructure of bacterial cell wall, *Protein, Nucleic acid and Enzymes*, 17, 573-580.
18. Heller, K B. (1979): Outer membrane of Serratia marcesens, *J. Bacteriol.*, 137, 670-672.