

고농도 삼투환경에서 생성되는 포도상구균의 Proline과 Glycine Betaine Transport System의 수준변화에 관한 연구

배 지 현

제명대학교 가정대학 식생활학과

Levels of the Proline and Glycine Betaine Transport Systems of *Staphylococcus aureus* at High Osmolarity

Ji-Hyun Bae

Department of Food Science and Nutrition

College of Home Economics, Keimyung University, Daegu, Korea

Abstract

Staphylococcus aureus, the most salt-tolerant nonhalophilic bacterium, is the only foodborne pathogen that is able to grow at a_w levels below 0.90. The fundamental osmoregulatory strategy used by this organism involves the accumulation of intracellular compatible solutes such as proline or glycine betaine which are accumulated by transport and act as osmoregulators in cells. In this study, levels of proline transport systems and glycine betaine transport system of *S. aureus* were examined when cells are grown at high osmolarity. The levels of all three transport systems within *S. aureus* were elevated at high osmolarity and the most dramatic increase was found for the low-affinity proline transport system. However, in 5mM glycine betaine-supplemented medium, the level of the low-affinity proline transport system did not become elevated when cultures were grown at high osmolarity. The metabolic fate of the accumulated proline and glycine betaine was investigated by thin-layer chromatography and found to be not metabolized by *S. aureus*.

Key Word : Osmoregulation, *Staphylococcus aureus*, proline, glycine betaine.

서 론

Staphylococcus aureus(포도상구균)는 가장 내염성이 강한 세균 중 하나로 다른 식중독을 유발하는 세균과는 달리 water activity ≤ 0.90 [1]

하에서도 성장할 수 있는 유일한 균이다. 이 균이 자랄 수 있는 최소 water activity값은 0.86이고¹⁾, 호기성 조건 하에서 성장시킬 경우 0.83에서 까지도 성장이 가능하다는 보고가 있다²⁾. 일반적인 조건 하에서 다른 미생물들과 혼합 배양했을 시

에는 비교적 성장력이 약하지만, low water activity환경 (a_w , 0.80–0.87) 하에서는 성장에 유리함을 나타내 생장이 가능할 뿐만 아니라 식품위생에 큰 문제가 되고 있는 enterotoxin이라는 독성물질도 생성하게 된다⁹⁾.

삼투조절이란 세포가 osmotic stress를 받는 환경 하에서 적응하기 위해 이용하는 active process를 의미한다¹⁰⁾. 세포를 둘러싸고 있는 환경의 삼투압이 높아지게 되면 세포로부터 물이 빠져나와 세포의 부피가 줄어들게 되며 따라서 세포막 기능에 손상을 가져와 성장이 어렵게 된다. 이와 같은 조건하에서 성장을 재개하려면 세포는 삼투조절기능을 이용하여 부피를 회복하고 세포막 안팎의 turgor pressure를 유지해야만 한다¹¹⁾. 일반적으로 식물이나 미생물은 삼투조절기전으로 세포 내에서 osmoregulator로 작용하는 compatible solute를 축적한다^{6,7)}. Compatible solute란 단백질 합성, 효소기능, DNA복제와 같은 세포의 대사활동에는 아무런 영향을 미치지 않는 분자량이 적은 cytoplasmic solutes(당류, 아미노산, polyols, 아미노산 유도체)⁸⁾나 ion(K^+)⁹⁾ 등의 삼투조절물질로, 세포가 고농도 환경에 처해지게 되면 세포 밖으로부터 이동에 의해서거나 세포내 자체 합성에 의해 축적되게 된다¹⁰⁾.

그러나 고삼투 환경에서도 성장하여 위생학상 심각한 문제를 유발할 수 있는 포도상구균의 삼투조절기전에 관한 연구는 많이 진행되지 않았다. 이 미생물은 고농도의 osmotic stress를 받는 환경 하에서 proline이나 glycine betaine과 같은 compatible solute를 세포내에 축적시키며, 이 두 물질은 포도상구균에 의해 자체 합성되지는 않고, proline transport system 또는 glycine betaine transport system에 의해 외부로부터 이동, 축적된다¹¹⁻¹³⁾. 본 연구는 고삼투환경에서 *S. aureus*의 생육을 억제하기 위한 기초적 연구자료를 제시할 목적으로 *S. aureus*가 고삼투 환경에서 성장할 경우 이들 transport systems의 level 변화와, 축적된 proline이나 glycine betaine의 변화에 관해 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양방법

균주는 proline auxotroph으로 성장을 위해 micromolar 농도의 proline을 필요로 하는 *Staphylococcus aureus* ATCC 12600을 TSA (Trypticase Soy Agar, BBL Microbiology Systems, Cockeysville, Maryland) slant에 접종, 배양후 5°C에 보관하면서 사용하였다. 성장을 위한 배양은 0% NaCl이나 5% NaCl을 포함한 500ml 제한배지 (DFM)에 접종하여¹⁴⁾ 37°C, 150 rpm으로 진탕 배양하였다.

37°C에서 O.D.값 0.5 까지 배양시킨 배양액을 10분간 원심분리 (5°C, 9000Xg)한 후 성장배지와 동일한 농도의 NaCl을 함유한 50mM potassium phosphate buffer로 2회 세척하였다. 최종적으로 세포는 40mM glucose를 포함한 50mM potassium phosphate buffer 10ml에 혼탁시켜 두 균으로 나누었다. 세포내 이미 존재하고 있을지도 모르는 proline을 고갈시키기 위해 37°C, 150 rpm에서 30분간 배양시켰고, 다른 한 균의 세포는 transport 실험에 사용할 때까지 얼음 위에 보관하였다. 각각의 세포 혼탁액은 transport 실험을 시작하기 직전 실온에 5분간 배양시켰다.

Transport 실험

Transport 실험은 filtration 방법을 이용하여 수행하였다. 50mM K₂HPO₄, 40mM glucose, [³H]-proline 또는 [¹⁴C]-glycine betaine, 25μg chloramphenicol, 그리고 각각의 농도의 NaCl을 포함한 0.25ml 반응혼합물 (pH 7.5)을 microcentrifuge tube (1.5ml capacity)에 넣었다. 여기에 0.25 ml의 proline starved cell이나 unstarved cell을 넣고 실온에서 transport assay를 실시하였다. transport buffer의 최종 세포내 단백질 농도는 약 550μg/ml 이었다. 일정한 시간 간격 (15, 30, 45초)으로 0.4ml의 transport buffer을 취하여 0.22μm-pore GV filter (Millipore Corporation, Bedford, MA)에 여과, proline과 glycine betaine의 uptake 정도를 분석하였다. 전 여과과정은 2 내지

3초 이내에 완료되었고, filters는 같은 ionic strength를 가진 열음에 차게 한 5mℓ buffer로 즉시 씻어 주었다. Filters는 2mℓ 2-ethoxyethanol을 넣은 scintillation vials에 옮긴 후 5mℓ Ecoscint scintillation solution (National Diagnostics, Manville, NJ)을 넣고 Beckman model LS1701 scintillation spectrometer를 이용 측정하였다.

[³H]-proline과 [¹⁴C]-glycine betaine의 specific activity는 1,000~100,000 cpm/nmol이었고, proline의 최종농도는 high affinity system의 경우 2.5μM, low affinity system의 경우 1mM을 사용하였다. glycine betaine의 최종농도는 50μM 이었다. 최종 NaCl농도는 high affinity proline transport system의 경우 25mM이었고, low affinity proline transport system과 glycine betaine transport system의 경우 1M을 사용하였다. Nonspecific binding은 radiolabeled proline 또는 glycine betaine을 넣기 전 세포현탁액을 formaldehyde (3% vol/vol)로 처리하여 준 후 위에서와 같은 방법으로 측정, 분석하였다. 모든 분석은 3반복 실험을 행하였으며, 각 측정치는 평균값으로 나타내었다.

통계분석

Proline과 glycine betaine의 uptake rate이 0% NaCl과 5% NaCl에서 성장시킨 세포의 경우 어떻게 변하는지 조사해 보고자 multiple linear regression analysis를 실시하였다. 이 분석에서 하나의 qualitative variable (0% NaCl 또는 5% NaCl)과, quantitative variable (시간), 그리고 이들 간의 상호작용 효과를 고려 first-order regression model을 작성하였다¹⁵⁾.

$$y = \beta_0 + \beta_1 X_1 + \beta_2 X_2 + \beta_3 X_1 X_2 + e$$

X_1 =시간 (15, 30, 45초)

$X_2=0$ (0% NaCl에서 성장시킨 세포)

$X_2=1$ (5% NaCl에서 성장시킨 세포)

$X_1 X_2$ =두 variable간의 상호작용

위의 model에 의한 각 성장조건에 따른 식은 다음과 같이 표현하였다.

$$0\% \text{NaCl} \text{에서 성장한 세포} : y = \beta_0 + \beta_1 X_2$$

$$5\% \text{NaCl} \text{에서 성장한 세포} : y = (\beta_0 + \beta_2) + (\beta_1 + \beta_3) X_1$$

위의 두식에서 기울기의 차이를 나타내는 β_3 를 이용, 5% NaCl에서 성장한 세포와 0% NaCl에서 성장한 세포간에 proline 또는 glycine betaine uptake rate이 다른지의 여부를 $\alpha=0.01$ 수준에서 t-분포를 이용 분석하였다. 통계처리는 SAS Package의 GLM (General Linear Model)을 이용 실시하였다¹⁶⁾.

Thin-Layer Chromatography

TLC는 transport buffer에서 1mℓ 세포현탁액을 뽑아 위에서와 똑같은 방법으로 원심분리한 후 cell pellet을 1mℓ 70% ethanol을 이용, 추출하였다. Ethanol추출물은 표준물질로 사용한 [³H]-proline이나 [¹⁴C]-glycine betaine과 함께 proline의 경우 70% ethanol solvent system을¹⁷⁾, glycine betaine의 경우 95% ethanol : 30% NH₄OH (95:5 vol/vol)¹⁸⁾을 이용 ascending thin-layer chromatography에 적용시켰다. 방사능을 떤 물질의 위치를 추적하고자 각 thin-layer chromatography lane을 1cm간격으로 잘라 scintillation vial에 옮기고, 10mℓ scintillation fluid를 넣어 측정하였다.

결과 및 고찰

Proline과 glycine betaine transport system의 steady-state level

*S. aureus*를 0% NaCl을 포함한 기본 재한배지에 배양하였을 때 high와 low-affinity proline transport systems는 확인되었고 (Fig. 1과 2, Table 1), 이 배지내에 glycine betaine이 존재하지 않음에도 불구하고 glycine betaine transport system이 여전히 발전되었다 (Fig. 3과 Table 1). 5% NaCl을 기본배지에 넣어주었을 경우, 이들 세개의 transport systems의 level은 증가하였고, low-affinity proline transport system의 증가가 가장 현저하였다. Fig. 2와 Table 1에서 보이는 바와 같이 세포가 5% NaCl이 포함된 배지에서

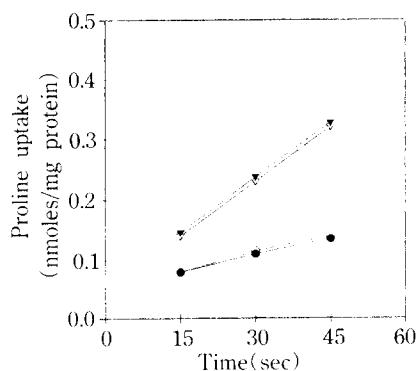


Fig. 1. Effect of NaCl concentration on proline uptake by the high-affinity proline transport system of *S. aureus*.

NaCl was present at a final concentration of 25 mM in the transport buffer. Proline was present at a final concentration of 2.5 μ M, with a specific activity of 100,000 cpm/nmol. Cells were grown in defined medium with 5 μ M proline containing 0% NaCl (○, starved cells, protein conc., 524 μ g/ml; ●, unstarved cells, protein conc., 578 μ g/ml) or 5% NaCl (▽, starved cells, protein conc., 518 μ g/ml; ▼, unstarved cells, protein conc., 569 μ g/ml). The points shown are the mean values of triplicate determinations. Standard deviations were within 10%.

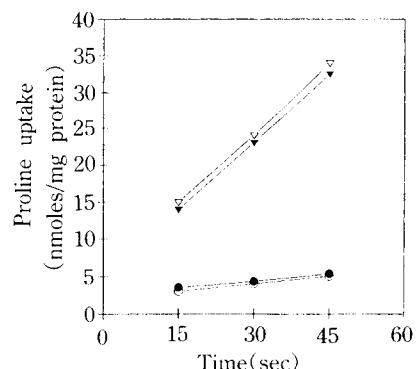


Fig. 2. Effect of NaCl concentration on proline uptake by the low-affinity proline transport system of *S. aureus*.

NaCl was present at a final concentration of 1M in the transport buffer. Proline was present at a final concentration of 1 mM, with a specific activity of 1,000 cpm/nmol. All abbreviations are the same as Fig. 1.

자랐을 경우 이 transport system의 steady-state level은 약 10배 증가되었다. 이와 비교하여 high-affinity proline transport system과 glycine betaine transport system의 level은 약 3배 정도 증가되었다.

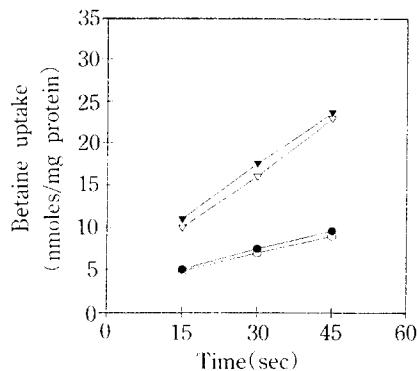


Fig. 3. Effect of NaCl concentration on glycine betaine uptake by the glycine betaine transport system of *S. aureus*.

NaCl was present at a final concentration of 1M in the transport buffer. Glycine betaine was present at a final concentration of 50 μ M, with a specific activity of 1,000 cpm/nmol. All abbreviations are the same as Fig. 1.

Table 1. The effect of NaCl on the level of proline and glycine betaine transport systems of *S. aureus*

Transport system	Concentration of NaCl (%)	
	0%	5%
High-affinity proline system	$y=0.002^aX+0.061$	$y=0.006^bX+0.054$
Low-affinity proline system	$y=0.057^cX+2.308$	$y=0.627^dX+5.103$
Glycine betaine system	$y=0.141^eX+3.012$	$y=0.419^fX+4.094$

Each equation reveals the calculated slope and y-intercept values. Slopes are expressed as nmoles of substrate transported per second per milligram of protein. Slopes having different superscripts denote significant differences in transport rates between the two groups of cells grown in either basal DFM medium or DFM medium containing 5% NaCl ($p<0.01$).

축적된 proline과 glycine betaine의 대사상의 변화

세포내 축적된 proline의 변화를 조사해 보고자 세포를 70% ethanol로 추출, ethanol extract를 TLC분석한 결과 모든 축적된 방사능 물질이(약 98% 이상) 하나의 점으로 이동되며 이는 사용된 proline 표준물질과 같은 지점까지 옮겨졌다 (Fig. 4). 또한 전체 세포와 관련된 방사능물질의 약 2% 미만만이 70% ethanol에 침전됨이 드러나, 축적된 proline이 세포내 단백질로 전환되지 않은음을 보여주었다. Glycine betaine의 경우도 같은 결과를 보여 세포내에서 다른 물질로 변화되지 않았다. 고삼투환경에서 대사되지 않고 축적된 proline은 *Salmonella orianenburg*의 성장과 호흡률을 증가시키며¹⁹⁾, 고등식물세포의 경우 낮은 수분활성에서 물분자구조와 단백질 용해도에 영향을 미친다^{20,21)}. glycine betaine도 고삼투환경에서 분해가 억제되어 *Rhizobium meliloti*의 성장에 영향을 미친다고 보고되고 있다²²⁾.

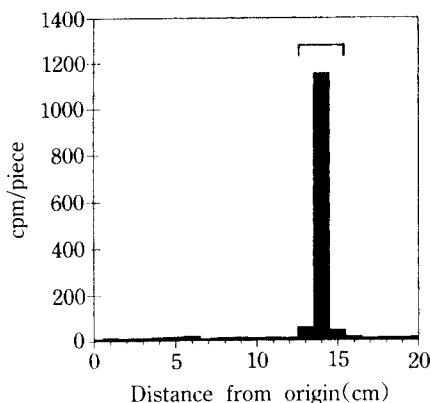


Fig. 4. Thin-layer chromatographic analysis of an ethanol extract of *S. aureus*. Cells incubated in the transport buffer containing 1M NaCl were exposed to [³H]-proline for 30 minutes. Proline was present at a concentration of 1mM, with specific activity of 1,000 cpm/nmol. 1mL aliquots of samples were centrifuged, and cell pellets were extracted with 1mL of 70% ethanol. The bracket indicates the position of authentic proline.

Glycine betaine과 NaCl이 low-affinity proline transport system에 미치는 영향

5mM glycine betaine을 0% NaCl이나 5% NaCl을 포함한 기본 재한배지에 넣어 주었을 경우 low-affinity proline transport system의 level은 증가하지 않았다 (Fig. 5). 가장 높은 level증가는 세포가 5% NaCl을 포함한 기본 재한배지에서 성장했을 때 나타났다. 그러나 이 배지에 5mM glycine betaine이 보충된 경우는 low-affinity proline transport system의 level이 증가되지 않았다.

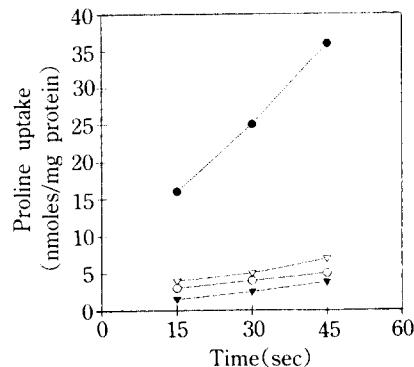


Fig. 5. Combined effects of NaCl and glycine betaine on proline uptake by the low-affinity proline transport system of *S. aureus*.

Cells were grown in defined medium with 5 μ M proline, 0% NaCl, (\blacktriangledown , protein conc., 553 μ g/mL); 5 μ M proline, 5% NaCl, (\bullet , protein conc., 548 μ g/mL); 5 μ M proline, 5 mM glycine betaine, 0% NaCl, (\triangledown , protein conc., 563 μ g/mL); and 5 μ M proline, 5 mM glycine betaine, 5% NaCl, (\circ , protein conc., 527 μ g/mL). NaCl was present at a final concentration of 1M in the transport buffer. Proline was present at a final concentration of 1mM, with a specific activity of 1,000 cpm/nmol. The points shown are the mean values of triplicate determinations. Standard deviations were within 10%.

*Escherichia coli*와 *Salmonella typhimurium*의 삼투조절에 관여하는 ProP 및 ProU transport system은 두 가지 level에서 조절된다고 보고되고 있다^{23,26)}. 먼저 세포가 높은 삼투압 환경에서 자랄 때 이들 두 transport system의 level은 증가한다. 실제로 세포를 고농도 삼투환경에서 생장시키면 ProP system 생성에 관여하는 structural gene의 transcription은 약 2 대지 3배 증가하고²³⁾, proU operon의 transcription은 약 100배 가량 증가하고 있다²⁶⁾. 이와 같이 합성 level이 증가할 뿐만 아니라, 세포를 높은 osmotic strength 하에서 분석할 경우 이들 두 transport system의 activity도 증가하였다^{27,28)}. Milner 등²⁹⁾의 연구에서도 hyperosmotic shift가 *E. coli*의 whole cell이나 membrane vesicle에 존재하는 ProP transport system의 activity를 증가시켰다고 보고하고 있다.

*Staphylococcus aureus*의 경우, 세포를 높은 osmotic strength를 주는 transport buffer 하에서 분석하면 low-affinity proline transport system과 glycine betaine transport system의 activity는 증가한다^{12,13)}. 본 연구 결과에 의하면 *S. aureus*를 고농도 삼투환경에서 성장시켰을 때 이들 두 transport system의 steady-state level 또한 증가하고 있음이 밝혀져, 이들 transport system은 Gram 음성 균의 ProP 및 ProU transport system과 유사한 특징을 가짐을 알 수 있다. 즉 *S. aureus*의 low-affinity proline transport system과 glycine betaine transport system을 통한 삼투조절은 두 가지 수준에서 일어나, 고삼투환경 하에서 두 system의 합성 level이 증가할 뿐만 아니라 activity도 증가하여 proline이나 glycine betaine 같은 compatible solute를 축적시키고 있다. 이와 관련하여 Kashket 등^{30,31)}은 재미있는 결과를 보고하고 있다. Gram 양성 균으로 내임성을 지닌 *Lactobacillus acidophilus* IFO 3532의 경우, 이들을 높은 삼투압 하에 두었을 때 proline이나 glycine betaine transport system과 유사한 transport system들의 activity는 증가하였지만 이들의 level은 증가하지 않았다.

본 연구의 흥미로운 결과는 glycine betaine을 성장배지에 넣어줄 경우 *S. aureus*가 고농도 삼

투환경에서 자랐다 할지라도 low-affinity proline transport system의 level이 증가하지 않았다는 점이다. 이런 조건하에서 세포는 성장배지로부터 높은 농도의 glycine betaine을 세포내에 축적하게 되고 *S. aureus*의 경우 glycine betaine이 proline보다 더 효과적인 compatible solute로 알려져있음으로¹¹⁾ glycine betaine이 성장배지에 충분히 존재할 경우 많은 양의 low-affinity proline transport system 합성을 불필요하게 될 것이다. 이와 관련하여 Cairney 등²⁴⁾도 비슷한 결과를 *Salmonella typhimurium*의 경우 보고하고 있어 세포를 glycine betaine이 존재하는 성장배지에서 길렀을 경우 proU operon의 발현은 현저하게 감소하였다.

요약

식품에 오염되어 식중독을 유발하는 균인 포도상구균은 수분활성치가 0.90이하인 경우에서도 자랄 수 있다는 점이 다른 food-borne pathogens와는 구분된다. 이는 proline이나 glycine betaine과 같은 compatible solutes가 transport에 의해 세포내에 축적되어 삼투압이 조절되기 때문이다. 본 연구에서는 이 세포가 높은 농도의 삼투환경에서 자랄 때 proline transport systems와 glycine betaine transport system의 level이 어떻게 변화하는지에 대해 조사해 보았다. 세포를 삼투압이 높은 환경에서 자라게 했을 때 이들 transport systems의 level은 증가하였고 특히 low-affinity proline transport system의 증가가 가장 현저하였다. 그러나 *S. aureus*가 고농도 삼투환경에서 자랐다 할지라도 5mM glycine betaine을 성장배지에 넣어 주었을 경우 low-affinity proline transport system의 level은 증가하지 않았다. 세포내 축적된 proline과 glycine betaine이 어떻게 변하는지 thin-layer chromatography로 분석해 본 결과, 이들은 세포내에서 다른 물질로 전환되지 않았다.

참 고 문 헌

1. Scott, W. J., Water relations of food spoilage microorganisms, Advances in Food Research, 7, 83~127, 1957.
2. Tatini, S. R., Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins, J. Milk Food Technol., 36, 559~563, 1973.
3. Troller, J. A. and Frazier, W. C., Repression of *Staphylococcus aureus* by food bacteria, I. Effect of environmental factors on inhibition, Applied Microbiology, 11, 11~14, 1962.
4. LeRudulier, D., Strom, A. R., Dandekar, A. M., Smith, L. T., and Valentine, R. C., Molecular biology of osmoregulation, Science, 224, 1064~1068, 1984.
5. Anagnostopoulos, G. D., and Dhavises, G., The role of proline and other amino acids in osmoregulation of *Escherichia coli* B/r/l, In Microbial growth and survival in extremes of environment, Academic Press, London, p. 141~147, 1980.
6. Brown, A. D., Mackenzie, K. F., and Singh, K. K., Selected aspects of microbial osmoregulation, FEMS Microbiol. Rev., 39, 31~36, 1986.
7. Csonka, L. N., Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress, Microbiological Reviews, 53, 121~147, 1989.
8. Csonka, L. N., Prokaryotic osmoregulation : Genetics and physiology, Annu. Rev. Microbiol., 45, 569~606, 1991.
9. Rains, D. W., Valentine, R. C., and Hollaender, A., Biological strategies for osmoregulation, In Genetic engineering of osmoregulation- Impact on plant productivity for food, chemicals, and energy, Plenum Press, New York, p.1~6, 1980.
10. Brown, A. D., Microbial water stress, Bacteriological Reviews, 40, 803~846, 1976.
11. Miller, K. J., Zelt, S. C., and Bae, J. H., Glycine betaine and proline are the principal compatible solutes of *Staphylococcus aureus*, Current Microbiology, 23, 131~137, 1991.
12. Bae, J. H. and Miller, K. J., Identification of two proline transport systems in *Staphylococcus aureus* and their possible roles in osmoregulation, Applied and Environmental Microbiology, 58, 471~475, 1992.
13. Bae, J. H., Anderson, S. H., and Miller, K. J., Identification of a high-affinity glycine betaine transport system in *Staphylococcus aureus*, Applied and Environmental Microbiology, 59, 2734~2736, 1993.
14. Bae, J. H., Effect of KCl and NaCl on uptake of proline in *Staphylococcus aureus*, J. East Asian Soc. Dietary Life, 5, 101~107, 1995.
15. Neter, J., Wasserman, W., and Kutner, M. H., Qualitative independent variables, In Applied linear statistical models, Wiley-Interscience, Irwin, p. 349~360, 1990.
16. SAS Institute Inc., The GLM procedure, SAS User's guide : Statistics, SAS Institute Inc., Cary, p. 433~506, 1985.
17. Mutschler, E., and Rochelmeier, H., Über die Trennung von Aminosäuren mit Hilfe der Dunnschichtchromatographie, Archiv der Pharmazie, 292, 449~452, 1959.
18. Bregoff, H. M., Roberts, E., and Delwiche, C. C., Paper chromatography of quaternary ammonium bases and related compounds, J. Biol. Chem., 205, 565~574, 1953.
19. Christian, J. H. B., The water relations of growth and respiration of *Salmonella oranienburg* at 30°C, Aust. J. Biol. Sci., 8, 490~497, 1955.
20. Schobert, B., Is there an osmotic regulatory mechanism in algae and higher plants? J. Theor. Biol., 68, 17~26, 1977.
21. Schobert, B. and Tschesche, H., Unusual solution properties of proline and its interaction

- with proteins, *Biochim. Biophys. Acta.*, 541, 270~277, 1978.
22. Smith, L. T., Pocard, J. A., Bernard, T. and LeRudulier, D., Osmotic control of glycine betaine biosynthesis and degradation in *Rhizobium meliloti*, *J. Bact.*, 170, 3142~3149, 1988.
23. Cairney, J., Booth, I. R., and Higgins, C. F., *Salmonella typhimurium* proP gene encodes a transport system for the osmoprotectant betaine, *J. Bacteriol.*, 164, 1218~1223, 1985a.
24. Cairney, J., Booth, I. R., and Higgins, C. F., Osmoregulation of gene expression in *Salmonella typhimurium*: proU encodes an osmotically induced betaine transport system, *J. Bacteriol.*, 164, 1224~1232, 1985b.
25. Dunlap, V. J., and Csonka, L. N., Osmotic regulation of L-proline transport in *Salmonella typhimurium*, *J. Bacteriol.*, 163, 296~304, 1985.
26. Perroud, B., and LeRudulier, D., Glycine betaine transport in *Escherichia coli*: Osmotic modulation, *J. Bacteriol.*, 161, 393~401, 1985.
27. Gowrinshankar, J., Osmoregulation in Enterobacteriaceae : Role of proline/betaine transport systems, *Curr. Sci.*, 57, 225~234, 1988.
28. Grothe, S., Krogsrud, R. L., McClellan, D. J., Milner, J. L., and Wood, J. M., Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12, *J. Bacteriol.*, 166, 253~259, 1986.
29. Milner, J. L., Grothe, S., and Wood, J. M., Proline porter II is activated by a hyperosmotic shift in both whole cells and membrane vesicles of *Escherichia coli* K12, *J. Biol. Chem.*, 263, 14900~14905, 1988.
30. Kashket, E. R., and Jewell, J. B., Osmotically regulated transport of proline by *Lactobacillus acidophilus* IFO 3532, *Applied and Environmental Microbiology*, 57, 2829~2833, 1991.
31. Hultkins, R. W., Ellefson, W. L., and Kashket, E. R., Betaine transport imparts osmotolerance on a strain of *Lactobacillus acidophilus*, *Applied and Environmental Microbiology*, 53, 2275~2281, 1987.