

알코올에 대한 *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, *Saccharomyces cerevisiae*의 반응

박주용* · 홍천상** · 한지혜*** · 강현우**** · 정봉우****,† · 최기욱**** · 민지호*,****,†

*전북대학교 반도체·화학공학부
561-756 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14
**가나자와 대학교 프론티어 사이언스 기구
이시가와 가나자와 920-1192
***전북대학교 생물공정공학과
561-756 전주시 덕진구 덕진동 1가 664-14
****(주)창해에탄올 창해연구소
561-203 전주시 덕진구 팔복동 3가 829
(2010년 7월 5일 접수, 2010년 8월 2일 채택)

Cellular Responses to Alcohol in *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, and *Saccharomyces cerevisiae*

Ju-Yong Park*, Chun-Sang Hong**, Ji-Hye Han***, Hyun-Woo Kang****, Bong-Woo Chung****,†,
Gi-Wook Choi**** and Jiho Min*,****,†

*Graduate School of Semiconductor and Chemical Engineering, Chonbuk National University,
664-14, Deokjin-dong, 1ga, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 561-756, Korea

**Frontier Science Organization, Kanazawa University, Kakuma, Kanazawa, Ishikawa 920-1192, Japan

***Department of Bioprocess Engineering, Chonbuk National University,
664-14, Deokjin-dong, 1ga, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 561-756, Korea

****Changhae Institute of Cassava and Ethanol Research, Changhae Changhae Ethanol Co., Ltd,
Palbok-dong 829, Deokjin-gu, Jeonju-si, Jeonbuk 561-203, Korea

(Received 5 July 2010; accepted 2 August 2010)

요 약

유가의 급등과 화석 연료에 의한 온난화 현상은 재생 가능한 대체 연료에 대한 필요성이 요구되었다. 수송용 바이오 연료를 비교하였을 때 에탄올보다 높은 알코올 경우 휘발유와 비슷한 장점을 갖는데 그 이유는 높은 에너지 밀도와 낮은 흡습성을 갖기 때문이다. 이러한 이유로 미생물의 발효는 지속적인 에너지를 얻을 수 있는 잠재적 생산자라 할 수 있다. 본 연구에서는 생물학적으로 생산되는 알코올 성분에 대하여 두 종의 세균과 한종의 효모인 *Escherichia coli*와 *Clostridium acetobutylicum* 그리고 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 바이오 알코올에 대한 세포 성장 정도와 함께 미생물내에 스트레스 반응 유전자들의 분석을 실시하였다. 분석한 알코올은 에탄올과 부탄올이며, 이들의 농도별 세균의 성장속도와 산화적 손상에 민감하게 반응하는 *katG* 유전자, 생물막 손상에 민감하게 반응하는 *fabA* 유전자, 단백질 손상에 민감하게 반응하는 *grpE* 유전자, 유전자 손상에 민감하게 반응하는 *recA* 유전자의 반응여부를 분석하였다. 그 결과, 에탄올과 부탄올 중 부탄올의 세포 독성이 더 높게 관찰되었으며, 부탄올의 경우 생물막 손상을 유발하는 세포내 독성효과를 지니고 있음을 확인하였다.

Abstract – The increased concern for the security of the oil supply and the negative impact of fossil fuels on the environment, particularly greenhouse gas emissions, has put pressure on society to find renewable fuel alternatives. Compared to the traditional biofuel, ethanol, higher alcohols offer advantage as gasoline substitutes because of their higher energy density and lower hygroscopicity. For this reason, microbial fermentation is known as potential producers for sustainable energy carriers. In this study, bacterial responses including cellular and molecular toxicity were studied in three different microorganisms, such as *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum*, and *Saccharomyces cerevisiae*. In this study, it was analyzed specific stress responses caused by ethanol and butanol using four different stress respon-

† To whom correspondence should be addressed.

E-mail: jihomin@chonbuk.ac.kr or bwchung@chungbuk.ac.kr

‡ 이 논문은 전북대학교 김기주 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다.

sive genes, i.e. *fabA*, *grpE*, *katG* and *recA*. The expression levels of these genes were quantified by semi-quantitative reverse transcription-PCR. It was found that four genes have shown different responsive patterns when *E. coli* cultures were under stressful conditions caused by ethanol and butanol, respectively. Therefore, in this study, the stress responsive effects caused by these alcohols and the extent of each stress response can be analyzed using the expression levels and patterns of different stress responsive genes.

Key words: Alcohol Toxicity, Specific Stress Responsive Gene, *E. coli*, *C. Acetobutylicum*, *S. Cerevisiae*

1. 서 론

다양한 바이오 매스로부터 발효공정을 통해 바이오 연료를 생산하여 수송용 액체연료로 활용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 이미 전분질계 바이오 매스를 기반으로하는 바이오 에탄올 생산의 경우 상용화되어 있으며, 현재는 다양한 바이오 매스로부터 대량의 에탄올을 생산하려는 시도가 이루어지고 있다[1,2]. 또한 기존의 가솔린과 매우 유사한 바이오 부탄올 역시 크게 주목 받고 있는 상황이다. 부탄올은 에탄올과 같은 shot chain primary alcohol로 에탄올보다 2개의 메틸기가 더 있어 보다 높은 소수성과 낮은 휘발성을 가지며, 휘발유와 잘 혼합될 수 있고, 보다 높은 에너지 밀도를 갖고 있다[1-3]. 따라서, 부탄올의 발효 생산을 위한 연구가 많이 시도되고 있지만, 발효 미생물의 낮은 부탄올 내성에 의해 고농도의 부탄올 생산이 어려운 실정이다[4]. 이러한 이유로 고농도의 바이오 에탄올과 바이오 부탄올을 생산할 수 있는 미생물의 선택과 개발이 가장 중요한 요인으로 주목 받고 있다[5-7].

따라서 본 연구는 바이오 에탄올과 부탄올이 발효 미생물에 미치는 영향과 내성을 알아보기 위해 농도에 따른 에탄올과 부탄올의 첨가에 따른 *Escherichia coli*, *Clostridium acetobutylicum* 그리고 *Saccharomyces cerevisiae*의 성장속도를 측정하였다. 또한 *E. coli*에서 각각의 다른 스트레스에 반응하는 유전자인 *fabA*, *grpE*, *katG*, *recA*에 대하여 역전사 중합효소연쇄반응을 통한 발현양상을 실험하였다. 그러므로써 에탄올과 부탄올의 스트레스에 의한 반응의 차이와 영향에 대하여 알아보고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2-1. 사용된 재료 및 균주

본 연구에서 사용된 균주 중 하나로는 *Escherichia coli* BL21 (DE3)로 Novagen Chemicals Inc(Germany)에서 구입하여 Luria-Bertani 배지(Yeast extract 0.5%, tryptone 1%, NaCl 0.5%; w/v)를 Erlenmeyer flask를 사용하여 37 °C에서 160 rpm으로 호기적으로 배양하는 조건으로 하였다.

Saccharomyces cerevisiae W303a(MATa ade2-1 can1-100 his3-11 leu2-3, 112 trp1 ura3-1 GAL.)는 YPD배지(Yeast extract 1%, peptone 2%, glucose 2%; w/v)를 Erlenmeyer flask를 사용하여 37 °C에서 160 rpm으로 호기적으로 배양하는 조건으로 하였다.

Clostridium acetobutylicum ATCC 824는 Reinforced Clostridial Medium(peptone 1%, beef extract 1%, yeast extract 0.3%, dextrose 0.5%, NaCl 0.5%, soluble starch 0.1%, cysteine HCl 0.05%, sodium acetate 0.3%, agar 0.05%)를 anaerobic vial를 사용하여 30에서 혐기적으로 배양하였다. 혐기적 조건을 위해 RC배지에 용존산소량을 줄이기 위해 2시간 질소 purging을 한 후 멸균하여 사용하였다[8].

이들 균주의 생육도는 spectrophotometer(Mecasys co. Korea)를 사용하여 600 nm에서 그 흡광도를 측정하였다.

2-2. 알코올 스트레스에 의한 성장 반응

알코올에 의한 스트레스를 주기위해 에탄올과 부탄올을 각 배지에 첨가하여 시간에 따른 균주의 생육도를 측정하였다.

알코올 내성도 범위 측정을 기반으로 각 LB배지, YPD배지, RC배지를 2배로 농축된 배지에 각각 ethanol을 0, 1, 2, 3, 4% 첨가하였고, butanol을 0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8% 첨가한 후 멸균수로 보충하여 동일한 배지 성분이 포함된 상태에서 알코올의 농도가 다른 상태가 되도록 하였다. 각 농도마다 100 ml의 배지 3개를 배양하여 각 배지에서의 균주의 생육도를 측정하여 그 평균값을 사용하였다.

2-3. RNA 추출과 역전사 중합효소연쇄반응

에탄올과 부탄올이 첨가된 배지에서 성장시킨 *E. coli*의 경우 각 농도에 따른 세포성장의 mid-exponential phase 에서 final 농도가 OD₆₀₀에서 0.4가 되도록 각각의 에탄올과 부탄올의 농도에 따른 균주를 harvest하여 같은 cell concentration이 되도록 하였다.

각각의 농도별에 따른 에탄올과 부탄올을 배지에 첨가하여 성장시킨 균주를 원심분리를 통해 모은 후 Trizol extraction methods (Invitrogen, Belgium)을 사용하여 RNA를 추출하였다. Total RNA농도는 Qubit fluorometer(Invitrogen Co. USA)을 사용하여 260 nm에서 흡광도를 통해 측정하였다. mRNA levels에서 알아보기 위한

Table 1. PCR primers used in the analysis of the *fabA*, *grpE*, *katG*, and *recA* from *E. coli*. *rrnH* was used as internal standards for *E. coli*

Species	Primer	Description	Sequence
<i>E. coli</i>	rrnH-f	Forward primer of <i>rrnH</i>	5'- CTACACACGTGCTACAATGG -3'
	rrnH-r	Reverse primer of <i>rrnH</i>	5'- CCTACGGTTACCTTGTTACG -3'
	fabA-f	Forward primer of <i>fabA</i>	5'- CGGTATAGATCAGACGACCA -3'
	fabA-r	Reverse primer of <i>fabA</i>	5'- ATGTTGAAGCAGAAGTGGAT -3'
	grpE-f	Forward primer of <i>grpE</i>	5'- TAATGCCAGTACGTTACCT -3'
	grpE-r	Reverse primer of <i>grpE</i>	5'- GTCGTCGTAAGTGAAGTGGAT -3'
	katG-f	Forward primer of <i>katG</i>	5'- CGAGTCACTGCTGATTGATA -3'
	katG-r	Reverse primer of <i>katG</i>	5'- GCAGGACAGAGTTAGAACCA -3'
	recA-f	Forward primer of <i>recA</i>	5'- GTTGGACTGCTTCAGGTTAC -3'
	recA-r	Reverse primer of <i>recA</i>	5'- AGGTAAAACCTGTGCGTTTA -3'

semi-quantitative RT-PCR을 진행하기 위해서 TaKaRa RNA PCR™ Kit(TaKaRa Inc., Japan)을 사용하였다[9,10]. *E. coli*에서 Alcohol에 대한 4종류의 스트레스 반응 유전자에 대한 양상을 확인하기 위해 내부표준측정으로 *rrnH* 유전자를 사용하였다. 사용된 유전자의 프라이머 서열은 Table 1에 나타나 있다. 역전사-중합효소연쇄반응은 T-Gradient Thermocycler(Biometra, Germany)를 사용하였고, 20주기 반응시켜 전기영동을 통해 확인하였다. 이에 대한 분석을 위해 GelScope 1.5 software(Imageline Inc., USA)를 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 알코올에 대한 미생물의 세포 독성 분석

에탄올과 부탄올에 대한 내성을 확인하기 위한 농도 범위를 확인하기 위해 *E. coli*, *C. acetobutylicum* 그리고 *S. cerevisiae*에서 성장이 가능한 농도 범위를 확인하기 위한 실험을 진행하였다. 그 결과 배지에 첨가되는 에탄올은 4% 이하의 조건에서 부탄올은 0.8% 이하의 조건에서 배지에 첨가 되었을 때, 최종 세포 농도에서 알코올에 의한 LC50(lethal concentration) 값의 범위가 포함된 농도임을 확인할 수 있었다. 그 이상의 농도에서는 균주의 성장이 매우 느리게 진행됨을 확인할 수 있었다.

Table 2는 각 균주별로 배지에 농도별 에탄올 첨가에 의한 성장 결과로써 성장속도는 중간 대수 증식기의 성장 속도이며, 세포의 농도는 정지기에서의 측정된 결과이다.

*E. coli*의 경우는 첨가되는 에탄올의 농도에 따라 저해되는 성장속도가 일정한 비율로 줄어드는 반면, 그람 양성균인 *C. acetobutylicum*은 *E. coli*에 비해 성장속도의 감소 비율이 적게 줄어드는 양상을 보였다. 반면에 효모인 *S. cerevisiae*의 경우는 성장속도의 감소가 에탄올의 농도가 높아질수록 더 빠르게 진행되었다. 이것은 아마도 균주마다 다른 에탄올의 충격에 대한 내성의 정도의 차이와 보호능력의 차이라고 판단된다. 특히 세포막에서의 막 지질의 구성을 교란시키며, 에탄올 농도에 따라 막 유동성의 증가로 인한 탄소원인 당과 아미노산 같은 양분의 수송을 방해하는 원인이 된다고 알려져 있다 [11]. 특히 효모인 *S. cerevisiae*의 경우는 에탄올이 ribosome과 결합하여 단백질 합성을 방해할 하여 성장에 많은 영향을 준다. 또한 적

은 농도의 에탄올이라 하더라도 막에 있는 ATPase의 작용을 억제하며, 막의 삼투를 증가시켜 이차 수송을 억제한다[12]. 따라서 그람 음성균과 양성균 그리고 효모와 같은 각각 다른 균주에 따른 에탄올의 내성이 다르게 나타나는 것을 알 수 있었다.

Table 3는 각 농도 별 부탄올 첨가에 대한 균주의 성장 결과로써

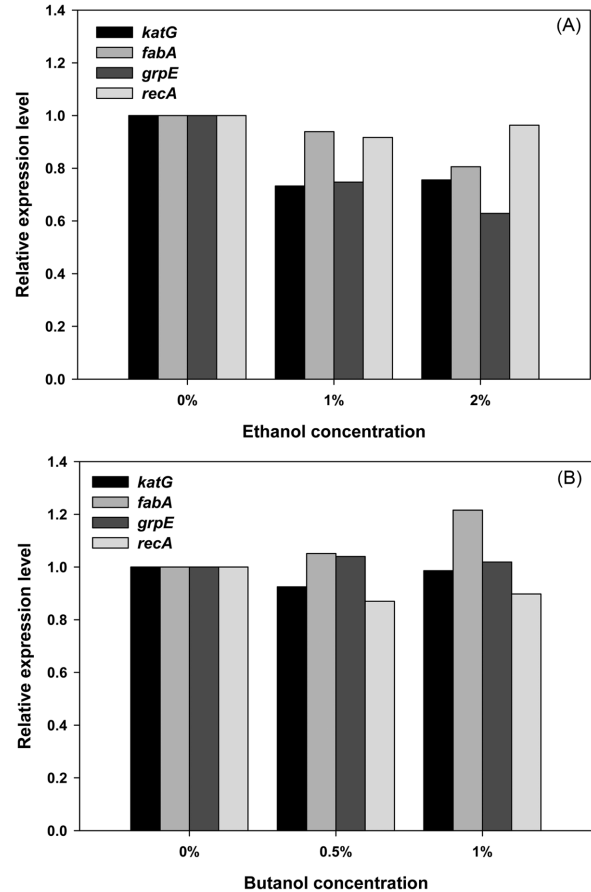


Fig. 1. Relative expression levels of *fabA*, *grpE*, *katG* and *recA* selected from *E. coli* after exposure to (A) 1% and 2% of ethanol, and (B) 0.5% and 1% of butanol. All data was reported relative to the expression level of the *rrnH* gene.

Table 2. Analysis of growth rate and final cell density of *E. coli*, *S. cerevisiae* and *C. acetobutylicum* treated by various concentrations of ethanol

Ethanol concentration	<i>E. coli</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. acetobutylicum</i>	
	Growth rate	Cell density	Growth rate	Cell density	Growth rate	Cell density
0%	0.456	2.630	0.381	4.243	0.160	1.892
1%	0.353	2.440	0.239	2.507	0.103	1.212
2%	0.275	2.220	0.122	1.258	0.081	0.733
3%	0.176	1.783	0.040	0.863	0.068	1.030
4%	0.110	1.358	0.007	0.558	0.056	0.838

Table 3. Analysis of growth rate and final cell density of *E. coli*, *S. cerevisiae* and *C. acetobutylicum* treated by various concentrations of butanol

Butanol concentration	<i>E. coli</i>		<i>S. cerevisiae</i>		<i>C. acetobutylicum</i>	
	Growth rate	Cell density	Growth rate	Cell density	Growth rate	Cell density
0%	0.489	3.203	0.339	4.907	0.201	1.122
0.2%	0.377	2.570	0.112	1.893	0.166	1.342
0.4%	0.285	2.140	0.059	0.923	0.161	1.248
0.6%	0.174	1.657	0.020	0.359	0.124	1.510
0.8%	0.066	1.030	0.009	0.196	0.096	0.721

에탄올의 농도에 따른 결과와 비슷한 양상의 결과를 확인할 수 있다. 하지만 첨가되는 에탄올의 양에 비해 매우 적은 양의 부탄올의 첨가에도 균주의 성장에 많은 영향을 주는데, 이는 에탄올보다 메틸렌기가 2개가 더 있는 부탄올의 경우보다 높은 소수성에 의한 세포막에 변형, 영양분의 수송 방해 및 단백질 합성의 저해 등의 영향이라고 생각된다.

3-2. 알코올에 대한 대장균의 분자독성 분석

대장균에서 선택된 4종류의 유전자인 *fabA*, *grpE*, *katG*, *recA*에 대해 1%, 2%의 농도에서의 에탄올과 0.5, 1%에서의 부탄올 발현 양상을 확인하였다.

Fig. 1(A)은 *rrnH*로 내부표준을 사용하여 얻은 에탄올에 대한 상대적 발현 양상이며, Fig. 1(B)는 부탄올에 대한 상대적 발현 양상이다. *katG*는 산화적 손상에 대해 알 수 있는 대표적 유전자로 에탄올의 경우는 농도에 관계없이 발현을 억제시키는 반면 부탄올에서는 큰 영향을 주지 않았다. 하지만 세포막 손상에 대해 알 수 있는 *fabA*의 경우에는 에탄올에서 발현을 억제하지만 부탄올에서는 농도의 증가에 따라 발현을 증가시키므로써 부탄올이 세포막 손상에 관련되어 있음을 확인하였다. 또한 에탄올에서 *grpE*의 발현을 억제되는 것은 단백질의 손상에 대한 에탄올과 부탄올의 양상이 다를 수 있다. *recA*는 에탄올과 부탄올 모두 약간의 발현 억제가 있지만 큰 변화가 없어 DNA 손상에 대한 부분은 에탄올과 부탄올 모두 비슷한 영향을 주는 것으로 판단된다. 같은 알코올류에 속해있기 때문에 발현 정도의 차이는 존재하지만 비슷한 양상을 보일 것으로 생각되었다. 하지만, 본 실험의 결과에 의하면, 에탄올과 부탄올은 각각의 균주의 성장에 있어 다른 부분에 손상을 줌으로써 성장의 저해를 가져온다는 것을 스트레스에 대한 4종류의 유전자 발현양상을 통해 확인할 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 각 농도에 따른 에탄올과 부탄올을 첨가하였을 때 *E. coli*, *C. acetobutylicum*, *S. cerevisiae*에 대한 성장속도에 대한 것과 *E. coli*에서 *fabA*, *grpE*, *katG*, *recA*의 발현양상에 대한 실험을 하였다. 에탄올과 부탄올의 농도가 높아질 수록 성장속도는 줄어들었으며, *C. acetobutylicum*이 알코올 농도의 증가에 따른 성장속도의 감소가 가장 늦었으며, *E. coli*는 일정하게, *S. cerevisiae*는 더 빨리 성장속도가 감소되었다. *E. coli*에서 mRNA level에서 발현양상에서 에탄올과 부탄올의 발현양상이 달랐으며 이것은 같은 알코올에 속하지만 탄소수에 따른 각각의 알코올의 특성에 따라 세포에서의 독성은 다르게 작용한다는 것을 알 수 있었다.

감 사

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력 양성사업으로 수행된 연구결과입니다.

참고문헌

1. Liu, S. and Qureshi, N., "How Microbes Tolerate Ethanol and Butanol," *N. biotechnol.*, **26**, 117-121(2009).
2. You, K. M., Rosenfield, C. L. and Knipple, D. C., "Ethanol Tolerance in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* is Dependent on Cellular Oleic Acid Content," *Appl. Environ Microbiol.*, **69**, 1499-1503(2003).
3. Atsumi, S., Cann, A. F., Connor, M. R., Shen, C. R., Smith, K. M., Brynildsen, M. P., Chou, K. J. Y., Hanai, T. and Liao, J. C., "Metabolic Engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol Production," *Metab. Eng.*, **10**, 305-311(2008).
4. Knoshaug, E. P. and Zhang, M., "Butanol Tolerance in a Selection of Microorganism," *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **153**, 13-20(2009).
5. Zheng, Y. N., Li, L. Z., Xian, M., Ma, Y. J., Yang, J. M., Xu, X. and He, D. Z., "Problems with the Microbial Production of Butanol," *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **36**, 1127-1138(2009).
6. Novotný, C., Fliieger, M., Panos, J. and Doležalová, L., "Effect of Growth Rate on Ethanol Tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*," *Folia Microbiol.*, **37**, 43-46(1992).
7. Dien, B. S., Cotta, M. A. and Jeffries, T. W., "Bacteria Engineered for Fuel Ethanol Production: Current Status," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **63**, 258-266(2003).
8. Inui, M., Suda, M., Kimura, S., Yasuda, K., Suzuki, H., Toda, H., Yamamoto, S., Okino, S., Suzuki, N. and Yukawa, H., "Expression of *Clostridium acetobutylicum* Butanol Synthetic Genes in *Escherichia coli*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **77**, 1305-1316(2008).
9. Kim, Y. S., Min, J., Hong, H. N., Park, J. H., Park, K. S. and Gu, M. B., "Gene Expression Analysis and Classification of Mod of Toxicity of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs) in *Escherichia coli*," *Chmosphere*, **66**, 1243-1248(2007).
10. Lee, S. Y. and Min, J., "Regulation of NO from Endothelial Cells by the Decrease of Cellular cAMP Under Arsenite Exposure," *J. Microbiol. Biotechnol.*, **18**, 392-395(2008).
11. Mishra, P. and Prasad, R., "Relationship Between Ethanol Tolerance and Fatty Acyl Composition of *Saccharomyces cerevisiae*," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **30**, 294-298(1989).
12. Petrov, V. V. and Okorokov, L. A., "Increase of the Anion and Proton Permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* Plasmalemma by *n*-alcohols as a Possible Cause of its de-nergization," *Yeast*, **6**, 311-318(1990).