

# Clostridium acetobutylicum의 耐酸性 機作

金 炳 弘

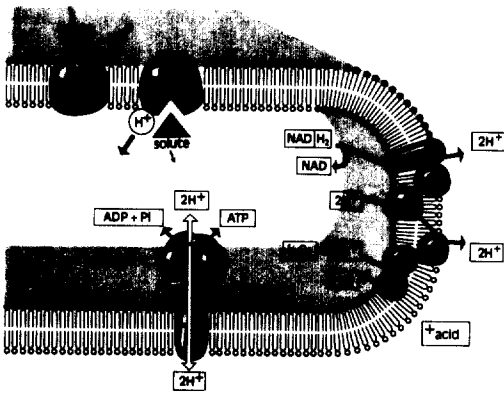
韓國科學技術院 生物工學部 微生物研究室

微生物은 高等生物과 그들이 生育하는 環境을 調節할 수 있는 能力이 제한되어 있다. 環境變化에 따라 自身을 適應시킬 수 있는 能力이 있어야 끊임없이 變하는 環境에서 살아남을 수 있고 다른 微生物과의 競爭에서 이길 수 있다. 溫度, 滲透壓, 營養物質의 溫度, 水素 ion 濃度 (pH) 等 物理的 化學的 環境要因이 微生物의 生育에 영향을 미치며 이들 중 水素 ion 濃度は 自然界에서 짧은 時間에 넓은 폭으로 變하며 (Abeliovich and Azov 1976) 微生物에서 energy 代謝의 中心이 되는 proton motive force 를 이루는 proton gradient ( $\Delta pH$ )의 크기를 決定하는 중요한 環境因子이다.

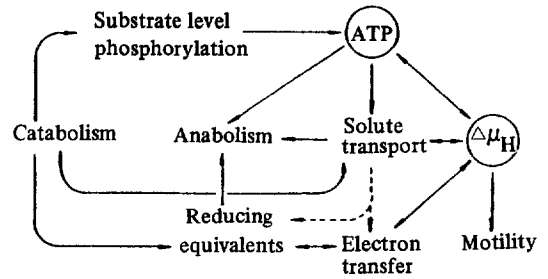
微生物과 水素 ion 濃度; 自然界에는 硫黃泉等 pH가 1以下로 극히 酸性의 環境에서 부터 pH가 11以上으로 극히 塩基性인 soda lake 等 水素 ion 濃度 10<sup>10</sup>배 이상 차이를 보이는 環境이 存在하며 大部分의 環境에서 微生物이 捷息하고 있다. 小數의 微生物은 넓은 범위의 pH에서 生育할 수 있는 能力이 있으나 大部分은 最適 pH를 中心으로 pH값 2~3 정도의 좁은 범위에서만 生育이 可能하며 最適 pH에 따라 好酸性菌 (acidophile), 中性菌 (neutrophile) 및 好塩基性菌 (alkalophile)로 분류된다. 生育의 最適 pH나 環境의 pH에 關係없이 모든 微生物은 細胞內 pH를 6~8의 中性으로 유지하며 (Padan *et al.*, 1981, Koning and Veldkamp 1983), ionophore로 細胞膜의 透過性を 增加시키면 細胞內 pH가 外部와 같아져서 菌體는 죽게된다 (Guffanti *et al.*, 1979). 細菌의 細胞壁이나 outer-membrane은 分子量이 600以下인 低分子物質은 透過되므로 (Lugterberg 1981) 細胞膜이 細胞內 pH를 中性으로 유지하는 역할을 한다.

微生物의 耐酸性; 外部 pH가 2~4에서 가장 잘 生育하는 *Thiobacillus*, *Bacillus acidocaldarius*, *solfobus*, *Thermoplasma* 等 好酸性菌들의 耐酸性機作은 細胞膜보다 外部에 存在하는 菌體部位, 특히 순수히 protein으로 이루어진 flagella는 낮은 pH에서 耐性이 있으며 (Langworthy 1978), 細胞膜을 이루는 脂質의 脂肪酸이 cyclization되어 膜의 硬直性を 높이므로 透過性を 낮추어 낮은 外部 pH에도 불구하고 内部 pH를 效果의으로 中性으로 유지할 수 있음이 밝혀졌다 (Krulwich and Guffanti 1983, Padan *et al.*, 1981). 이러한 膜脂質의 硬直性도 親油性이 강한 電離되지 않은 (protonated) 有機酸의 透過를 막을 수 없다. 즉 pH 2.0에서 生育하는 *Thiobacillus ferrooxidans*는 5mM의 acetic acid에 의해서 生育이 沮害되며 (Tuttle and Dugan 1976) 이는 pka가 4.76인 acetic acid가 pH 2.0에서 거의 모두 protonated되어 細胞內로 유입되어 内部의 pH가 外部와 같아지기 때문이다 (Kell *et al.*, 1981, Ingledew 1982). 細胞內 pH가 外部와 같아지면 細胞內 高分子物質이 變性될 뿐 아니라 energy 代謝의 中心이 되는 proton motive force를 構成하는 proton gradient ( $\Delta pH$ )가 무너져 energy 代謝에 이상이 생기게 된다.

Proton Motive Force와 Energy代謝; 有機酸이 細胞內로 流入되어 energy代謝에 이상이 생기는 것은 微生物에서 energy를 保存하는 proton motive force와 ATP가 서로 變換이 가능하며  $\Delta pH$ 와  $\Delta \psi$  (transmembrane potential)도 서로 變換이 가능하기 때문이다. Energy源으로 利用되는 基質을 酸化시키면서 還元되는 pyridine nucleotide와 substrate-level phosphorylation에서 合成되는 ATP가 菌體生成成



**Fig. 1. Some chemiosmotic energy transducing systems in the cytoplasmic membrane of bacteria. (Konings and Veldkamp 1983)**



**Fig. 2. Interaction between energy-generating and energy-consuming processes in bacteria. (Konings and Veldkamp 1983)**

에 이용되며 一部分의 reduced pyridine nucleotide는 好氣性細菌에서 전자전달계를 통해 酸化되면서 細胞膜을 中心으로 proton gradient ( $\Delta pH$ , inside alkaline)와 transmembrane potential ( $\Delta\psi$ , inside negative)을 형성한다 (그림 1, Mitchell 1972). 전자전달계가 없는 嫌氣性細菌에서는 substrate-level phosphorylation에서 얻어진 ATP를 energy로 membrane-bound ATPase가 proton을 菌體밖으로 배출하여 proton motive force를 형성한다 (Riebeling and Jungermann 1976). 이렇게 형성된 proton motive force는 여러가지 형태의 energy를 요구하는 過程에서 利用된다(그림 2), 즉 membrane-bound ATPase에 의한 ATP 생산,  $H^+$  symport에 의한 基質의 吸收, 양이온의 吸收, motility, transhydrogenase活性을 위한 energy等에 proton motive force가 利用된다. 전자전달계에 의해서 proton이 細胞밖으로 배출되면  $\Delta pH$ 뿐 아니라 proton이  $+$ 로 charge되어 있기 때문에  $\Delta\psi$ 도 同時에 형성된다. Proton이  $Na^+/H^+$  혹은  $K^+/H^+$  antiporter의 作用으로  $Na^+$  혹은  $K^+$ 와 교환되면서  $\Delta pH$ 가  $\Delta\psi$ 로 변환된다(Bakker and Mangerich 1981, Krulwich 1984). 이는 1分子의  $H^+$ 가 translocate되면서 1分子 以上の  $Na^+(K^+)$ 가 교환되기 때문이다 (Thauer and Morris 1984).

$Na^+(K^+)/H^+$  antiporter에 의해 형성된  $Na^+(K^+)$  gradient는  $Na^+(K^+)$  dependent symport system으로 基質을 transport하며 ATP도 생산한다(Heefner and Harold 1982). 有機酸의 decarboxylation에서 발생하는 energy가  $Na^+$  gradient로 保存되기도 한다(Dimroth 1982).

以上の 考察에서 微生物의 代謝로 일어나는 energy가 保存되는 proton motive force ( $\Delta pH$ 와  $\Delta\psi$ ),  $Na^+(K^+)$  gradient, ATP等이 서로 變換되므로 어느 한 要因이 uncouple되면 이를 보완하기 위해 다른 형태의 energy가 消費되어 그 微生物은 生育이 不可能해지는 것이 밝혀졌다. 前述한 *Thiobacillus ferrooxidans*가 acetic acid에 依해서 生育을 阻害받는 것이 이의 좋은 例이다. 有機酸을 生育하는 微生物은 많이 알려져 있으나 大部分은 前述한 *Clostridium thermoaceticum*과 같이 protonated된 有機酸이 蓄積되면 그 生産이 停止된다. 産業적으로 利用되고 있는 acetic acid生産菌(*Acetobacter*, *Gluconobacter*), lactic acid生産菌(*Lactobacillus*, *Streptococcus*等) 및 acetone-butanol生産菌(*Clostridium*)은 그들이 生産한 酸이 protonated된 狀態에서도 生育하는 것이 알려져 있다(Crueger and Crueger 1982, Kim *et al.*, 1984, George and Chen 1983). 그러나 이들이 어떠한 mechanism으로 ionophore로 作用하는 protonated fatty acid로부터 자신을 防禦하는지에 對한 研究는 거의 되지않고 있다. 最近 butanol 醱酵에 새로운 関心이 일어나면서 protonated fatty acids의 蓄積과 buta-

nol生産에 直接的인 關係가 있음이 밝혀졌다 (George and chen 1983, Thauer and Morris 1984).

**Acetone-Butanol 醱酵**: *Clostridium acetobutylicum*과 *C. butylicum*은 糖을 醱酵하여 acetic acid와 butyric acid를 蓄積하여 培養液의 pH가 4.5 정도로 되면 生産된 酸이 acetone, butanol, ethanol로 환원된다(Kim *et al.*, 1984). 이러한 生理的 變化는 protonated fatty acid의 蓄積으로(George and Chen 1983) 酸을 中性인 solvent로 還元시키는데 필요한 酵素가 induce되어서 일어나며(Andersch *et al.*, 1983, Kim and Zeikus 1985a) 이러한 變化는 孢子形成과 關係가 있는(Jones *et al.*, 1982) secondary metabolism으로 밝혀졌다 (Kim *et al.*, 1984). Protonated된 acetic acid와 butyric acid에 대한 *C. acetobutylicum*의 防禦機作을 筆者等의 研究結果를 中心으로 考察한다 (Kim and Zeikus 1985b). *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259 菌株를 pH 4.5, 5.5 및 6.5로 調節하여 培養했을 때 pH 4.5에서 lagtime이 한시간 이하로 가장 짧았으며 初期生育速度도 가장 높았다. 이는 이 菌이 好酸性細菌임을 뜻한다. 前述한 바와 같이 醱酵初期에 糖을 醱酵하여 有機酸을 生産하고 醱酵가 進行되면서 酸이 蓄積되어 pH가 내려가 butanol等 solvent가 生産된다. 醱酵初期 酸의 濃도가 낮고 pH가 높을 때와 (acidogenesis) 酸의 濃도가 높고

pH가 낮은 solvent生産期를(solventogenesis) 계속적으로 유지하기 위해 2-stage chemostat를 시작하였다. 즉 一次 醱酵槽를 pH 5.5로 유지하여 酸生産(acidogenesis)만을 시키고 二次 醱酵에서는 pH를 4.5 이하로 調節하여 solvent生産(solventogenesis)을 유도하여 이들 醱酵中 菌體의  $\Delta pH$ 와  $\Delta\psi$ 를 測定한 結果(Table 1) 外部 pH나 有機酸의 濃도에 關係없이 内部 pH가 6.1~6.4로 유지되었으며 total proton motive force로  $-170 \sim -190$ mv로 거의 일정하게 유지되었다. 이러한 結果는 protonated fatty acids가 前述한 *C. thermoaceticum*에서와는 달리 *C. acetobutylicum*에서는 uncoupler로 作用할 수 없음을 뜻한다. 여기서  $\Delta pH$ 는 外部와 内部의 pH 차이로 인한 salicylic acid(pka 2.98)의 분포가 다른 것으로 測定하였다(Kashket *et al.*, 1980). 이는 protonated salicytic acid가 細胞膜을 自由로 이 透過할 수 있어야 한다.  $\Delta pH$ 測定の probe로 使用한 salicylic acid와 醱酵産物인 acetic acid 및 butyric acid의  $\Delta pH$ 에 따른 菌體內 蓄積을 測定한 結果 solvent를 生産하는 phase의 culture는 salicylic acid만 蓄積하였으며 acid를 生産하는 phase의 culture는 使用한 모든 有機酸이 蓄積되었다. 이 結果는 solvent를 生産하는 culture는 낮은 pH에서 高濃度로 存在하는 acetic acid나 butyric acid의 菌體內로의 流入을 防止하는 機作을 갖고 있는 것으로 풀이되며 salicylic acid는

**Table 1. Proton Motive Forces of Acidogenic and Solventogenic Cells of *C. acetobutylicum* grown in a 2-stage Chemostat.**

pH	Culture	Dilution Rate (hr <sup>-1</sup> )	External pH	Internal pH	$\Delta pH$	$\Delta\psi$ (mV)	PMF(mV)
Acidogenic							
5.5		0.32	5.35	6.32	0.97	-141	-199
Solventogenic							
4.5		0.072	4.37	6.39	2.02	-46	-167
4.0		0.032	4.20	6.07	1.87	-85	-197

Cultures had been taken to anaerobic pressure tubes before <sup>14</sup>C-salicylate and <sup>3</sup>H-tetraphenyl phosphonium ion were added. Subsample (1 ml) taken from the tubes was centrifuged using 1.5ml microfuge tubes contained 0.5ml silicone oil mixture heavier than medium but lighter than cells. The radioactivities in cell pellet were counted to calculate internal pH and membrane potential.

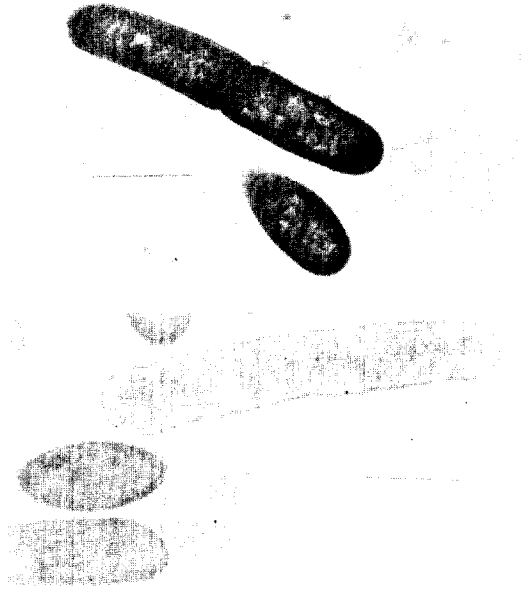


Fig. 3. Electron micrographs of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259.

- a. acidogenic culture  
b. solventogenic culture  
Bars represent 1  $\mu$ m.

다른 酸보다 親油性이 높아 이러한 機作으로는 流入의 防止가 充分하지 않은 것으로 풀이된다. Acidogenic 및 solventogenic culture의 이러한 차이가 菌體의 微細構造의 차이에서 유래된 것인지를 밝히기 위해 각각의 culture를 glutaraldehyde와  $OsO_4$ 로 fix하여 전자현미경으로 관찰한 結果 acidogenic cell은 전형적인 Gram 양성균의 微細構造를 보였으며(그림 3a) solventogenic cell은 cytoplasm內 膜으로 보이는 構造가 많이 나타나(그림 3b) acidogenic cell과 달랐다. 이 結果는 60時間 培養한 *C. acetobutylicum*細胞內에서 많은 膜構造가 發見되었다는 報告(Cho and Doy 1973)와 一致한다. 이러한 微細構造上의 차이가 어떠한 機作으로 protonated fatty acids의 透過性을 調節하는지는 분명치 않으나 細胞內 膜構造를 갖는 solventogenic cell에서 protonated fatty acid의 透過性이 낮을 뿐 아니라 細胞를 파괴하는 物理的 및 化學的 方法에 대단히 安定하였다(Table 2). Solvent生産은 이미 酸酵生産된 有機

Table 2. Disintegration Efficiency of Solventogenic Cells by physical and Chemical Methods.

Disintegration Methods	Efficiency (%)	Hydrogenase ( $\mu$ M $H_2$ ·mg protein <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> )
Lysozyme	0.04	< 0.01
French Press	0.50	< 0.01
Sonication	0.01	< 0.01
Blending with Glass Beads (0.12-0.18mm)	0.03	0.01
Mutanolysin(Sigma) + Agchropeptidase (Wako) (24 hrs)	50.40	0.68
Mutanolysin (1 hr) - French Press	7.84	0.64
Mutanolysin (1 hr) -Freeze-Thaw French Press	43.00	3.25
Pronase (2 hrs)	89.00	< 0.01

Table 3. Distribution of Alcohol Dehydrogenase, Acetate Kinase and ATPase in Soluble and Membrane Fractions of Cell-free Extract.

Enzyme	(Activity ( $\mu$ M. mg protein <sup>-1</sup> ·min <sup>-1</sup> ))			
	Acidogenic		Solventogenic	
	Soluble	Membrane	Soluble	Membrane
NADPH-Butyraldehyde Butyraldehyde reductase	NA	NA	0.31	0.07
ATPase	0.01	0.03	0.04	0.04

NA : not assayed

Cell-free extract of acidogenic culture was prepared by passing through French press. Solventogenic cell suspension was treated by 50U/ml Mutanolysin(Sigma) at 37°C for 1hr, frozen, thawed and pressed in French Press. The cell-free extract was centrifuged 150,000xg for 90min to separate membrane and soluble fraction. ATPase was assayed by method of Riebeling and Jungermann(15).

酸이 還元되며 여기에 關與하는 酵素의 induction과 形態學的 變化가 同時에 일어남을 前述하였다. 만약 培養液 中の 有機酸이 solventogenic cell內로 透過할 수 없다면 이들 酵素가

periplasmic space에 存在할 可能性이 있으나 butanol을 生産하는 NADPH - butyraldehyde reductase의 活性이 cytoplasm에 있는 것으로 나타났다(Table 3). 이 事實은 細胞內 膜構造의 生産과 함께 酵素가 生産되고 菌體의 硬直도가 높아지면서 有機酸의 流入이 늦어지게 되나 일단 細胞內로 通過한 酸은 solvent로 還元되어 菌體外로 배출되므로 外形上 protonated fatty acids가 細胞內로 流入되지 못하는 것으로 난다.

**産業微生物에의 應用**: Baronofsky *et al.*, (1984)이 지적한 바와 같이 耐酸性이 없는 酸 生産菌을 産業의으로 利用하기에는 産物에 의 한 醱酵 沮害로 經濟性이 없으며 醱酵産物이 uncoupler로 作用하여 沮害하므로 통상적인 mutation으로는 耐酸性菌株를 育種할 수 없다. 그러나 耐酸性이 없는 菌株들 중에서 cellulose를 直接醱酵하거나(*C. thermocellum*) 一酸化炭素等 C, compound로 부터 chemical feedstock을 生産할 수 있는 細菌(*C. thermacetivum*, *Butyribacterium methylotrophicum*) 등 産業的으로 利用 可能性이 큰 微生物들이 많다(Zeikus 1980). 耐酸性細菌의 耐性機作을 밝히면 이들을 産業的으로 有用한 菌과 遺傳情報를 교환하여 이들로 하여 耐酸性을 나타나게할 수 있을 것이다.

## REFERENCES

1. Abeliovich, A and Y. Azov (1976). *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 801-806
2. Andersch, W., H. Bahl and G. Gottschalk (1983). *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 327-332.
3. Bakker, E. P. and W. E. Mangerich (1981). *J. Bacteriol.* 147: 820-826
4. Baronofsky, J. J., W. J. A. Schreurs and E. R. Kashket (1984). *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 1134-1139
5. Cho, K. Y. and C. H. Doy (1973). *Aust. J. Biol. Sci.* 26: 547-558
6. Crueger, W. and A. Crueger (1982). *Science Tech,*

- Inc. Madison, Wisconsin USA.*
7. Dimroth, P. (1982). *Eur. J. Biochem.* 121: 443-449
8. George, H. A. and J. S. Chen (1983). *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 321-327
9. Guffanti, A. A., L. F. Davidson, T. M. Mann and T. A. Krulwich (1979). *J. Gen. Microbiol.* 114: 201-206
10. Heefner, D. L. and F. M. Harold (1982). *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 79: 2798-2802
11. Ingledew, W. J. (1982). *Biochim. Biophys. Acta* 683: 89-117
12. Jones, D. T., A. Vander Westhuizen, S. Long, E. R. Allcock, S. J. Reid and D. R. Wood (1982). *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1434-1439
13. Kashket, E. R., A. G. Blanchard and W. C. Metzger (1980). *J. Bacteriol.* 143(1): 128-134.
14. Kell, D. B., M. W. Peck, G. Rodger and J. G. Morris (1981). *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 99: 81-88
15. Kim, B. H., P. Bellows, R. Datta, J. G. Zeikus (1984). *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 764-770
16. Kim, B. H. & J. G. Zeikus (1985a). Paper in preparation.
17. Kim, B. H. and J. G. Zeikus (1985b). Paper in preparation.
18. Konings, W. N. and H. Veldkamp (1983). *Soc. Gen. Microbiol. Symp.* 34: 153-186
19. Krulwich, T. A. (1984). *Biochim. Biophys. Acta* 726: 245-264
20. Krulwich, T. A. and A. A. Guffanti (1983). *Adv. Microb. Physiol.* 24: 173-214
21. Langworthy, T. A. (1978). pp. 279-215, Academic Press London
22. Lugtenberg, B. (1981). *Trend Biol. Sci.* 6: 262-266
23. Mitchell, P. (1972). *Bioeng.* 3: 5-24
24. Padan, E., D. Zilberstein and S. Schuldiner (1981). *Biochim. Biophys. Acta* 650: 151-166
25. Reibeling, V. and K. Jungermann (1976). *Biochem. Biophys. Acta* 430: 434-444
26. Thayer, R. K. and J. G. Morris (1984). *Soc-Gen. Microbiol. Symp.* 36(Part II): 123-168
27. J. H. Tuttle and P. R. Dugan *Can. J. Microbiol.* 22: 719-730 (1976)
28. Zeikus, J. G. (1980). *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 423-464