Korean J. Microbiol. Biotechnol. (2013), 41(1), 26–32
http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1210.10009
pISSN 1598-642X eISSN 2234-7305

KJMB
Korean Journal of Microbiology and Biotechnology

부탄올 내성 미생물의 분리, 동정 및 변이주의 개발

정혜숙, 이진호*
경성대학교 식품생명공학과

Received : October 23, 2012 / Revised : December 4, 2012 / Accepted : December 5, 2012

Isolation, Identification and Mutant Development of Butanol Tolerance Bacterium. Jung, Hyesook and Jinho Lee*. *Department of Food Science & Biotechnology, Kyungsung University, Busan 608-736, Korea*

Butanol-resistant bacteria were isolated from butanol solvent. The cell growth of isolated strains declined with increasing concentrations of butanol, and isolated strain BRS02 displayed more resistance to 12.5 g/L of butanol than other isolated strains. In addition, strain BRS251, which was resistant to even higher concentrations of butanol, was developed by the mutation of BRS02 using UV. BRS251 could grow in LB medium containing up to 17.5 g/L of butanol, 32.5 g/L of propanol, or 6 g/L of pentanol, whereas the control strain *Escherichia coli* was found to be tolerant to 7.5 g/L of butanol, 20 g/L of propanol, or 2 g/L of pentanol. The isolated BRS02, a Gram(+) bacterium seen to have a cocci form under the microscope, grew in 6.5% NaCl. According to biochemical tests, BRS02 can metabolize and produce acid with D-galactose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, methyl-β-D-glucopyranoside, D-ribose, sucrose, or D-trehalose, as carbon sources. Also, this strain showed resistance to bacitracin, vibriostatic agent O/129, and optochin, alongside positive activities for arginine dihydrolase, α-glucosidase, and urease. The BRS02 strain was identified as *Staphylococcus* sp. by analyses of the 16S rRNA gene, phylogenetic tree, and biochemical tests.

Keywords: Butanol, tolerance, *Staphylococcus*, mutagenesis

서 론

석유자원 등의 화석연료의 고갈과 가격의 급등, 이산화탄소의 증가에 기인한 지구 온난화 문제 등으로 인해 석유자원을 사용하지 않고 재생 가능한 바이오매스로부터 에탄올과 부탄올과 같은 바이오 알코올류를 생성하는 연구가 매우 활발히 진행되고 있다[14, 17]. 특히, 부탄올의 경우 에탄올에 비해 높은 에너지 밀도, 낮은 증기압, 가솔린과 비슷한 옥탄가, 가솔린과의 높은 혼합성, 연료수송 인프라에 대한 낮은 부식성 등의 장점을 가지고 있어 에탄올을 대체할 수 있는 바이오 에너지로 각광을 받고 있는 유기용매이다[12].

생물학적인 방법으로 부탄올을 생산하는 방법은 *Clostridium acetobutylicum*과 *C. beijerinckii*와 같은 *Clostridium* 속 미생물을 이용하여 2분자의 acetyl-CoA의 condensation에 의해서 생성되는 acetoacetyl-CoA로부터 4단계의 환원을 거치면서 부탄올, 아세톤, 에탄올이 동시에 생성되는 방법으로 생산되고 있다[12, 17]. 그러나 *Clostridium* sp. 균은 성장속도가 매우 느리며 혐기적인 조건에서 발효해야 하는 배양적인 측면에서의 단점과 대사경로의 유전자 조작의 어려움으로 인한 고농도 생산균주 개발의 지체, 부탄올이 미생물의 세포막에 영향을 미쳐서 세포를 죽이는 높은 독성[1, 6, 12, 15] 등으로 인해서 매우 낮은 농도/수율/생산성을 나타내는 문제점이 있다. 특히, 부탄올에 의한 세포독성이 가장 큰 문제로 *Clostridium* sp. 균의 배양액에 7-13 g/L의 부탄올을 첨가하면 세포성장이 50% 저해 받는 것으로 알려져 있으며, 균주 측면에서 이를 해결하기 위해 전통적인 화학변이법을 통해서 1.8% 부탄올에서 성장이 가능한 균을 개발한 보고가 있지만[12, 17] 부탄올 생산농도는 아직 15-20 g/L의 낮은 수준에 있다. 최근, 대사공학을 통해 쉽게 생산 미생물을 개발할 수 있고, 많은 환원력을 요구하는 기존의 acetyl-CoA 대사경로를 거치지 않고 아미노산 생합성 및 분해 대사경로를 이용하여 2-keto acid decarboxylase와 alcohol dehydrogenase를 암호화하는 유전자들을 *Escherichia coli* 및 *Corynebacterium glutamicum*에 도입하여 다양한 알코올 형태인 1-프로판올, 이소부탄올, 1-부탄올, 2-메틸-1-부탄올, 3-메틸-1-부탄올, 2-페닐에탄올 등을 생산할 수 있는 기술을 개발하여 보고하였다[2-5, 20, 23]. 그러나, *E. coli*와 *C. glutamicum* 또한 이들 용매에 대한 내성이 매우 약하여 바

*Corresponding author
Tel: +82-51-663-4716, Fax: +82-51-622-4986
E-mail: jhlee83@ks.ac.kr

이오 알코올류가 생산되면 세포의 성장이 정지되면서 비성장 단계에서 축적이 되며, 아직 그 농도도 매우 낮은 수준 상태에 있다[4, 23]. 따라서, 부탄올을 포함한 바이오 알코올의 경제성을 갖는 생산기술을 개발하기 위해서 호기적인 조건에서 성장이 빠르며, 유전자 조작이 용이하며, 높은 부탄올 내성을 지닌 미생물의 스크리닝과 내성균 개발이 매우 중요하다.

지금까지 *Clostridium* sp. 균 이외의 미생물에서 부탄올 내성균에 관한 연구는 주로 *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Pediococcus pentosaceus*, *Leucnostoc pseudomesenteroides*를 포함하는 젖산균에 한정되어 있으며, 이들은 2.5%의 부탄올에 내성을 나타내는 것으로 확인이 되었다[9, 13]. 즉, 부탄올 내성균의 분리 및 고농도 부탄올 내성균의 개발은 절대혐기성 또는 내기성혐기성균 등에 주로 한정되어 있으며, 호기성균의 경우 일부 *Bacillus subtilis*에서 2% 부탄올 내성을 나타내는 것으로 알려져 있는 것 외에는[7], 다양한 종류의 균의 분리 및 그 특성규명 연구가 매우 미비한 상태이다. 따라서 대사공학을 통한 부탄올을 포함한 바이오알코올류를 고농도로 생산하기 위해서는 고농도 부탄올에 내성을 갖는 호기성균 또는 통성혐기성균을 탐색하고 개발하는 연구가 매우 필요하다고 사료된다.

본 연구는 99% 이상의 순도를 갖는 부탄올 용매안에 존재하는 미생물이 12.5 g/L의 부탄올에 내성을 나타내는 *Staphylococcus* sp.를 분리, 동정하였으며, 인공변이를 통해 17.5 g/L까지 내성을 나타내는 부탄올 내성균을 개발하고 여러 알코올류에 대한 내성정도를 *E. coli*와 비교하여 그 특성을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

배지

부탄올 내성세균을 분리하고 배양하기 위해 LB(Luria-Bertani) 한천배지를 사용하였다[19]. 필요할 경우, 부탄올을 15-30 g/L 첨가하여 사용하였다.

부탄올 내성세균 분리

99% 순도의 부탄올 용매(Junsei 제품, 일본) 100 ml을 0.2 μm membrane filter를 사용하여 용매를 통과시켜 균체를 포집한 다음, 필터를 2 ml 생리 식염수에 현탁시킨 후, 15-30 g/L 부탄올을 함유한 LB 한천배지에 도말하여 32°C에서 2-3일간 배양하였다. 큰 콜로니 형태를 보이는 미생물 32종을 1차 선택하여 15, 17.5, 20, 22.5, 25 g/L의 부탄올을 함유한 LB 한천배지에서 그 성장유무를 확인하여 최종적으로 20 g/L에서도 잘 성장하는 3종의 균을 선별하였으며, 분리된 균주들은 3회 순수분리 후 20% 글리세롤에 보관하면서 사용하였다.

부탄올 내성균주 개발

탐색 분리된 BRS02 균을 전날 밤 4 ml LB배지를 함유한 test tube에서 접종하여 16시간 진탕 배양한 후 다음 날 30 ml LB배지를 함유한 300 ml 삼각플라스크에 seed 균을 2% 접종 한 다음 OD가 0.7 될 때까지 배양하였다. 배양액을 petri dish에 옮긴 후 stirring하면서 40 W 자외선등으로 40 cm 정도의 거리에서 15분간 조사한 후 다시 1시간 진탕 배양한 다음 원심 분리하여 25-30 g/L의 부탄올을 함유한 LB 한천배지에 도말하여 2-3일간 배양하였다. 큰 콜로니 형태를 보이는 미생물들을 1차 선택하여 25, 27.5, 30 g/L 부탄올 함유배지에서 그 성장유무를 다시 확인하여 27.5 g/L 에서도 성장이 잘되는 3종을 선별한 후, 다시 15 g/L 부탄올 함유 액체배지에서 제일 높은 내성을 나타내는 균을 최종 선별하였으며, 3회 순수 분리하여 20% 글리세롤에 보관하면서 사용하였다.

부탄올, 프로판올, 펜탄올 내성도 측정

부탄올, 프로판올, 펜탄올에 대한 내성도는 LB 액체배지를 사용하여 측정하였다. 스크리닝한 미생물들과 *E. coli* Top10을 0-20 g/L의 부탄올, 0-35 g/L의 프로판올, 또는 0-10 g/L의 펜탄올을 각각 농도별로 첨가한 4 ml LB 배지를 함유한 15 ml 시험관에 접종 한 후 32°C, 16시간 배양하였다. 한편, 시간별 부탄올 내성도를 측정하기 위해서는 전날 배양한 seed를 각각 12.5-22.5 g/L 부탄올을 함유한 50 ml LB배지(300 ml 삼각플라스크)에 OD가 0.2-0.3되게 첨가한 다음, 배양액을 시간 별로 취하여 세포 OD를 측정하였다. 세포성장은 분광광도계(Shimadzu UV mini-1240, Japan)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하여 관찰하였다. 모든 실험은 1회 2번, 총 3회 반복 실험하였다.

부탄올 내성세균의 형태 및 생화학적 특성분석

세포의 형태는 그람염색(Difco Gram stain kit) 후 광학현미경(Model Motic BA210)으로 관찰하였다. D-galactose, D-maltose, D-mannitol 등과 같은 각종 탄소원에 대한 자화능력, bacitracin, novobiocin, polymyxin B 등의 항생제에 대한 내성능력, arginine dihydrolase, α-glucosidase, phosphatase 등의 여러 효소활성에 대한 생화학적 실험은 Biomerieux의 VITEK 2 Systems Version: 05.02를 사용하였다.

16S rDNA와 16S–23S Ribosomal DNA 유전자사이 공간(intergenic spacer, IGS) 염기서열분석 및 계통발생도 작성

16S rDNA는 16S-27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3')와 16S-1492R(5'-GGTTACCTTGTTACGACTT-3') 프라

이머를 사용하여 중합효소연쇄반응(polymerase chain reaction, PCR)을 이용하여 증폭하였다[11, 19]. 증폭된 DNA 단편은 솔젠트㈜의 plasmid T-blunt와 접합하여 대장균 Top10에 형질전환하여 얻은 plasmid를 사용하여 염기서열을 분석하였다. 16S rDNA의 염기서열은 National Center for Biotechnology Information(NCBI; http://www.ncbi.nlm.nih. gov/)의 BLAST server를 사용하여 분석하였다. 16S-23S IGS는 16/23S-1525F(5'-GCTGGATCACCTCCTTTCT-3')와 16/23S-40R(5'-CTGGTGCCAAGGCATCCA-3') 프라이머를 이용하여 PCR로 증폭하여 약 0.45 kb의 DNA 단편을 정제한 후 T-blunt plasmid에 클로닝하여 염기서열을 분석하였다[11]. IGS에 존재하는 tRNA 분석은 genomic tRNA database (http://lowelab.ucsc.edu/GtRNAdb/)를 사용하였다. 다중서열배열(multiple sequence alignment)은 CLUSTAL W 프로그램을 사용하여 분석하였으며[21], 계통발생도는 MEGA5 프로그램을 이용하여[10], 통계적 방법은 neighbor-joining법[18]으로, 계통발생론 평가는 Bootstrap법을 이용하여 구축하였다.

염기서열 가입번호(accession number)

16S rDNA 염기서열의 GenBank 등재번호는 JX648551이다.

결과 및 고찰

부탄올 내성 세균 분리 및 특징

부탄올 용매를 필터한 후 식염수에 현탁한 시료를 사용하여 15-25 g/L의 부탄올을 함유한 한천배지에 도말하여 성장하는 콜로니를 분리하여 부탄올 내성균을 선별하였다. 큰 콜로니 32개를 1차 선별하고, 20 g/L 부탄올 함유배지에서 잘 성장하는 균을 2차 선별 후 몇 단계의 순수분리 작업을 거쳐서 최종적으로 3개의 균주를 선택하였다. 부탄올의 내성정도를 확인하기 위하여 부탄올을 농도별로 함유한 액체배지를 이용하여 진탕 배양한 결과, 대조균주로 대표적인 산업미생물인 *E. coli*는 10 g/L에서 세포의 성장이 완전히 저해되는 반면, 스크리닝한 부탄올 내성주의 경우 모두 12.5 g/L까지 약간의 세포성장이 이루어졌으며 15 g/L 이상의 농도에서는 세포의 성장이 완전히 저해되었는데, 그 중 균주 BRS02가 가장 높은 부탄올 내성효과를 나타내어 본 연구의 모균으로 선정하였다(Fig. 1).

부탄올 내성균주의 생화학적 특성

그람염색 후에 현미경으로 관찰한 결과 포도상 모양의 구형의 그람양성 세균으로 확인이 되었다(Fig. 2). BRS02에 대한 생화학적 특성을 조사한 결과 6.5% NaCl에서 성장이 가능하며, arginine dihydrolase, α-glucosidase, urease 효소활성을 가지고 있었다(Table 1). 호기적인 조건에서 D-galactose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, methyl-β-D-glucopyranoside, D-ribose, sucrose, D-trehalose를 탄소원으로 자화하여 산을 생성할 수 있었다. 항생제에 대한 내성실험의 경우, bacitracin, vibriostatic agent O/129 및 optochin에 내성이 있는 반면 novobiocin과 polymyxin B에 대해서는 감소성을 나타냈다.

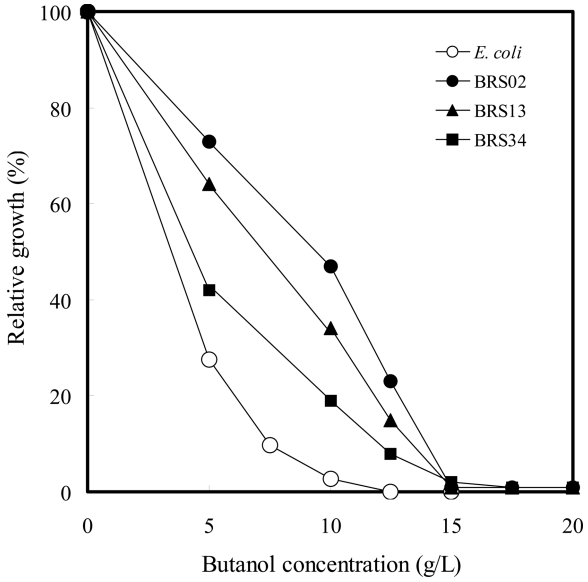

Fig. 1. Butanol tolerance of the screened butanol-resistant strains and *E. coli* Top10.
Cells were cultured in LB medium with 0~20 g/L of butanol for 16 h at 32°C. Relative growth of BRS02, BRS13, BRS34, and *E. coli* Top10, respectively, means cell growth in butanol relative to medium without butanol.

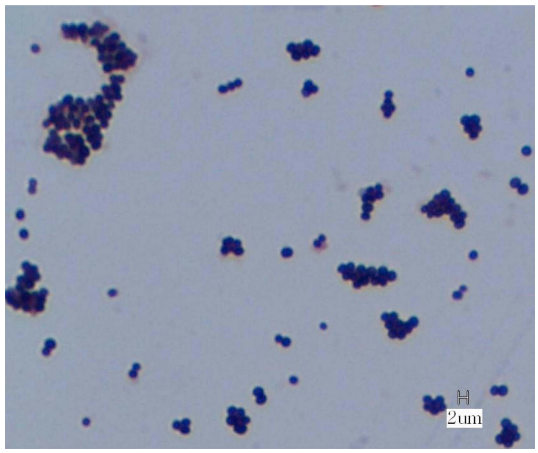

Fig. 2. Light micrograph of BRS02 strain after Gram staining (×1,000).

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1210.10009

Table 1. Phenotyphic characteristics of the *Staphylococcus* sp. BRS02.

Characteristics	Results	Characteristics	Results
Shape	cocci	Novobiocin resistance	-
Gram stain	+	Optochin resistance	+
Growth in 6.5% NaCl	+	Polymyxin B resistance	-
Enzyme activity		Utilization of carbon source	
Ala-phe-pro-arylamidase	-	N-Acetyl-D-glucosamine	-
Alanine arylamidase	-	Amygdalin	-
L-Aspartic acid arylamidase	-	D-Galactose	+
Arginine dihydrolase	+	Lactose	-
Leucine arylamidase	-	D-Maltose	+
L-Proline arylamidase	-	D-Mannitol	+
L-Pyrrolydonyl-Arylamidase	-	D-Mannose	+
Tyrosine arylamidase	-	Methyl-β-D-glucopyranoside	+
Phosphatase	-	Pullulan	-
Phosphatidylinositol phospholipase C	-	D-Raffinose	-
α-Galactosidase	-	D-Ribose	+
α-Glucosidase	+	Salicin	-
α-Mannosidase	-	D-Sorbitol	-
β-Galactosidase	-	Sucrose	+
β-Glucuronidase	-	D-Trehalose	+
Urease	+	Xylose	-
Antibiotics resistance		L-Lactate alkalinization	+
Bacitracin resistance	+		

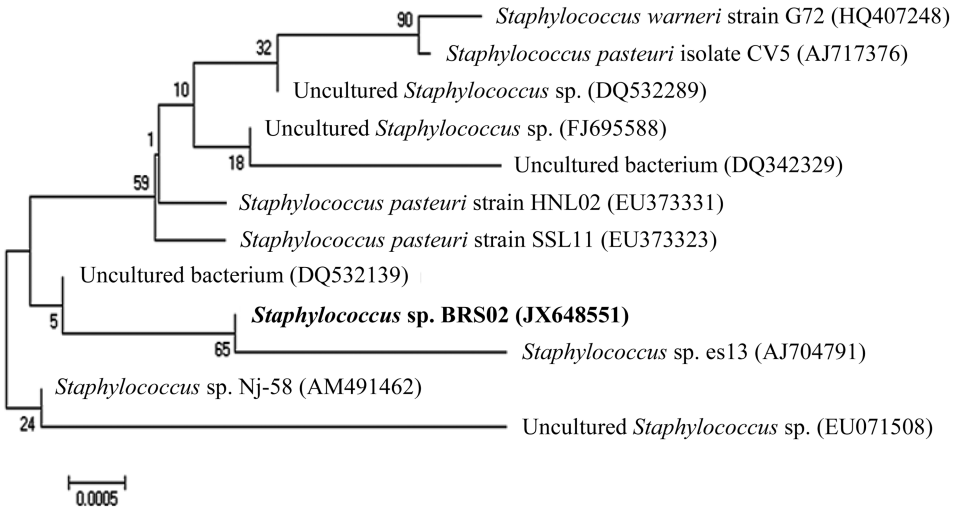

Fig. 3. Phylogenetic tree of strain BRS02.
The 16S rRNA sequence was analyzed and compared with nucleotide sequence database using BLAST program. The tree was created by neighbor-joining method. The numbers on the tree indicate the percentages of bootstrap based on 1,000 replication. The scale bar indicates 0.0005 change per nucleotide.

균주 BRS02의 16S-rDNA 및 16S-23S ribosomal DNA IGS 서열분석

균주를 동정하기 위해 BRS02의 16S rDNA 서열을 결정하였다. BLAST를 이용하여 상동성 분석을 한 결과, 많은 *Staphylococcus* sp. (HQ407248, FJ695588, AJ704792, AJ704791, AM491462, EU373323, AJ717376)의 16S rDNA 서열들과 99~100%의 서열 동일성(sequence identity)을 확인하였다. Fig. 3은 BRS02의 계통발생도를 표현한 것으로, *Staphylococcus* sp.에 속하며, 특히 *Staphylococcus* sp. es13과 가장 유사한 것으로 확인이 되었다[22]. 따라서, 본 연구에서 분리된 BRS02는 현미경 관찰, 생화학적인 특징, 16S rRNA 염기서열, 그리고 계통발생도 분석결과 *Staphylococcus* sp. 임을 확인하였다. 한편 rRNA 오페론의 유전적 배열을 더 확인하기 위하여, BRS02의 16S-23S IGS부위를 PCR로 증폭하여 약 450 bp 크기의 1가지 단편을 얻었으며, 438 bp의 염기서열을 결정하여 tRNA를 분석한 결과, 특정 tRNA를 암호화하는 유전자는 확인할 수 없었다. 상동성을 분석한 결과, uncultured bacterium clone BITS_URP1_W28 (HQ543010)의 IGS와는 435 염기쌍 중에서 하나의 염기서열 차이를 나타내어 가장 높은 서열 상동성을 나타냈으며, *Staphylococcus* sp. 3 (AY728166) 및 *Staphylococcus aureus* (CP002110)의 IGS와는 각각 92%, 90%의 상동성을 나타내었다. 본 연구에서 분리, 동정한 BRS02는 기존에 보고된 *Staphylococcus* sp. 들과는 rRNA 오페론의 유전적 특징 측면에서 다른 신규의 미생물임을 확인할 수 있었다.

부탄올 내성균주의 개발 및 알코올류에 대한 내성도

액체배양에서 15 g/L 이상의 부탄올에 대한 내성을 갖는 균주를 개발하기 위해 BRS02를 모균주로 사용하여 자외선을 조사하여 고농도 부탄올 내성균을 개발하였다. 15분간 자외선을 조사한 결과 균주 사멸율은 99.2%를 나타내었으며, 25 g/L와 27.5 g/L에서 내성을 나타내는 콜로니 중 성장이 우수한 균 5종을 순수 분리하였으며, 최종적으로 15 g/L의 부탄올을 함유한 액체배지에서 가장 높은 내성을 나타내는 균주 BRS251을 선별하였다. 액체배지에서 모균주인 BRS02의 경우 15 g/L의 부탄올에서 성장이 완전히 저해된 반면에 BRS251은 17.5 g/L 첨가조건까지 세포의 성장이 이루어졌다(Fig. 4). 시간별로 부탄올 농도 증가에 따른 세포의 성장을 관찰한 결과에서도 대장균의 경우 12.5 g/L 첨가조건에서는 성장이 전혀 이루어지지 않은 반면, BRS251의 경우 부탄올 무첨가 상태에서 가장 성장이 빠르며, 12.5, 15, 17.5 g/L에서 농도가 증가할 수록 세포의 성장속도가 느려짐을 확인할 수 있었으며, 20 g/L에서는 그 성장이 매우 지연되며, 22.5 g/L에서는 전혀 성장이 안 되는 것을 확인하였다(Fig. 5). 부탄올 이외의 다른 알코올에 대한 내성도를 조사하기 위

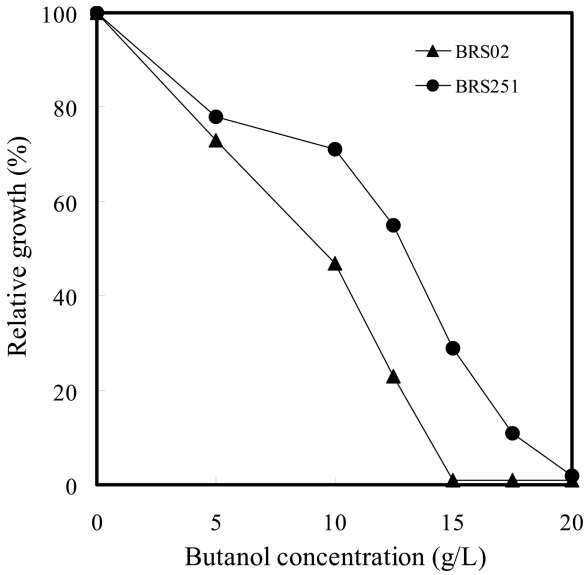

Fig. 4. Comparison of butanol tolerance between BRS02 and BRS251.
Cells were cultured in LB medium with 0~20 g/L of butanol for 16 h at 32°C.

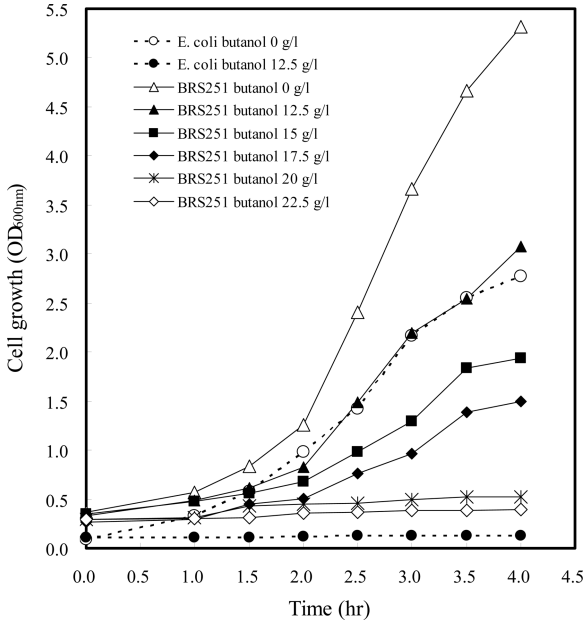

Fig. 5. Growth curves of strain BRS251 and *E. coli* Top10 in different butanol concentration in LB medium at 32°C.

해 프로판올과 펜탄올에 대한 내성도를 대장균과 비교한 결과, 대장균은 프로판올 및 펜탄올 함유배지에서 각각 20 g/L 및 4 g/L 이상에서 성장이 억제되며[16], BRS251의 경우 프로판올 25 g/L에서도 높은 내성을 나타내었으며, 35 g/L 이상에서 그 성장이 완전히 정지되었으며, 펜탄올의 경우 8 g/L

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1210.10009

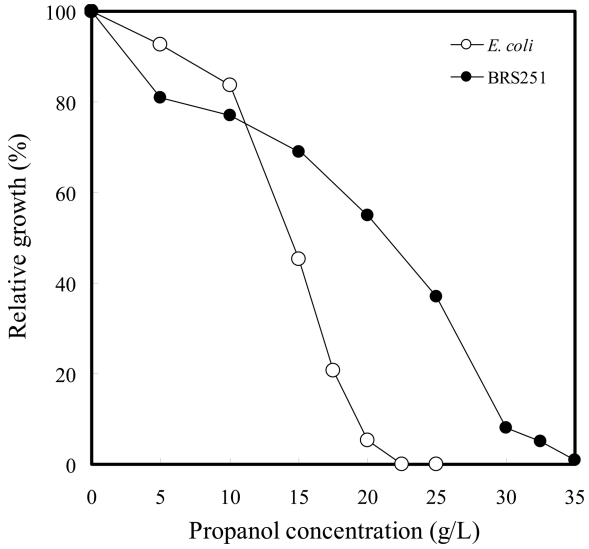

Fig. 6. Propanol tolerance of the developed butanol-resistant strain BRS251 and *E. coli*.
Cells were cultured in LB medium with 0-35 g/L of propanol for 16 h at 32°C.

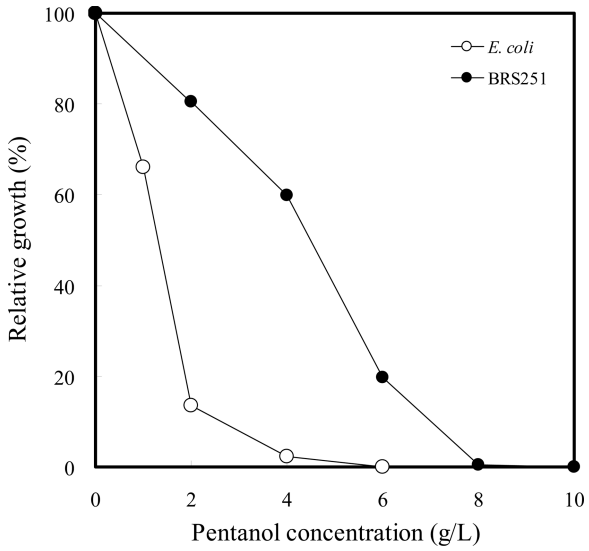

Fig. 7. Pentanol tolerance of the developed butanol-resistant strain BRS251 and *E. coli*.
Cells were cultured in LB medium with 0-10 g/L of pentanol for 16 h at 32°C.

이상에서 성장이 완전히 저해를 받았다(Fig. 6, Fig. 7). 즉, *Staphylococcus* sp. BRS251은 대장균에 비해 부탄올, 프로판올 그리고 펜탄올에 상대적으로 높은 내성을 나타내었다. 최근 *E. coli*와 *C. glutamicum* sp.에서 아미노산 생합성 및 분해 대사경로에서 출발하여 대사공학적으로 개발된 균을 이용하여 부탄올 또는 이소부탄올을 생산할 수 있음을 보여주었지만 모두 바이오알코올이 생산되면서 세포의 성장이 멈춘 상태에서 매우 느린 속도로 축적이 되어 그 생산성 및 농도가 매우 낮은 상황이다[4, 23]. 따라서, 향후 본 연구에서 개발된 부탄올 내성을 갖는 조건부혐기성균인 *Staphylococcus*를 이용하여 더 높은 부탄올내성균을 개발하고, *E. coli*/*Staphylococcus* shuttle vector에[8] 관련 유전자들인 *kdc*와 *adh*를 발현시켜 도입하면 호기적인 조건에서 보다 더 고 생산성, 고 농도의 바이오 알코올을 생산할 수 있을 것으로 기대된다.

요 약

부탄올 용매에서 생존하는 부탄올 내성 미생물을 분리하였다. 분리된 미생물들의 세포성장은 부탄올 농도가 증가함에 따라 감소하였으며, 그 중에서 BRS02가 12.5 g/L에서 가장 높은 내성도를 나타내었다. 또한, UV를 이용하여 BRS02 균의 변이를 유도하여 고농도 부탄올 내성균 BRS251을 개발하였다. 부탄올 생산 모델균주로 대장균과 함께 부탄올, 프로판올 및 펜탄올에 대한 내성도를 비교한 결과, 대장균은 7.5 g/L 부탄올과 20 g/L 프로판올, 2 g/L 펜탄올 농도까지 생육이 가능한 반면, BRS251은 더 고농도인 17.5 g/L 부탄올과 32.5 g/L 프로판올, 6 g/L 펜탄올 농도까지 생육이 가능하였다. 분리된 세균을 동정하기 위해서 그람염색 후 광학현미경으로 관찰한 결과 그람양성의 구균으로 확인이 되었으며, 6.5% NaCl에서 생육이 가능하였다. 생화학적 특성을 분석한 결과, arginine dihydrolase, α-glucosidase, urease 효소활성을 가지고 있었으며, 호기적인 조건에서 D-galactose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, methyl-β-D-glucopyranoside, D-ribose, sucrose, D-trehalose를 탄소원으로 자화하여 산을 생성할 수 있었으며, bacitracin, vibriostatic agent O/129 및 optochin에 대한 항생제 내성을 나타내었다. 16S rRNA 유전자 서열을 결정하고 계통발생도 분석을 통해 BRS02는 최종적으로 *Staphylococcus* sp. 임을 동정하였다.

Acknowledgments

This work was supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MEST) (2010-0015503) and also financially supported by the Ministry of Knowledge Economy (MKE) and Korea Institute for Advancement in Technology (KIAT) through the Workforce Development Program in Strategic Technology.

References

1. Alsaker, K. V., C. Paredes, and E. T. Papoutsakis. 2010. Metabolite stress and tolerance in the production of biofuels and chemicals: Gene-expression-based systems analysis of butanol,

butyrate, and acetate stresses in the anaerobe *Clostridium acetobutylicum*. *Biotechnol. Bioeng.* **105**: 1131-1147.
2. Atsumi, S., A. F. Cann, M. R. Connor, C. R. Shen, K. M. Smith, M. P. Brynildsen, K. J. Y. Chou, T. Hanai, and J. C. Liao. 2007. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol production. *Metab. Eng.* **10**: 305-311.
3. Atsumi, S., T. Hanai, and J. C. Liao. 2008. Non-fermentative pathways for synthesis of branched-chain higher alcohols as biofuels. *Nature* **451**: 86-90.
4. Blombach, B., T. Riester, S. Wieschalka, C. Ziert, J. W. Youn, V. F. Wendisch, and B. J. Eikmanns. 2011. *Corynebacterium glutamicum* tailored for efficient isobutanol production. *Appl. Environ. Microbiol.* **77**: 3300-3310.
5. Cann, A. F. and J. C. Liao. 2008. Production of 2-methyl-1-butanol in engineered *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **81**: 89-98.
6. Ezeji, T., C. Milne, N. D. Price, and H. P. Blaschek. 2010. Achievements and perspectives to overcome the poor solvent resistance in acetone and butanol-producing microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **85**: 1697-1712.
7. Fischer, C. R., D. K. Marcuschamer, and G. Stephanopoulos. 2008. Selection and optimization of microbial hosts for biofuels production. *Metab. Eng.* **10**: 295-304.
8. Grkovic, S., M. H. Brown, K. M. Hardie, N. Firth, and R. A. Skurray. 2003. Stable low-copy-number *Staphylococcus aureus* shuttle vectors. *Microbiology* **149**: 785-794.
9. Knoshaug, E. P. and M. Zhang. 2008. Butanol tolerance in a selection of microorganisms. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **153**: 13-20.
10. Kumar, S., R. Jansen, F. Sasse, and G. Hofle. 2004. MEGA3: integrated software for molecular evolutionary genetics analysis and sequence alignment. *Brief Bioinform.* **5**: 150-163.
11. Lee, J. H. 2012. Isolation and genetic characterization of protease-producing halophilic bacteria from fermenting anchovy. *J. Life Science* **22**: 167-176.
12. Lee, S. Y., J. H. Park, S. H. Jang, L. K. Nielsen, J. Kim, and K. S. Jung. 2008. Fermentative butanol production by *Clostridia*. *Biotechnol. Bioeng.* **101**: 209-228.
13. Li, J., J. B. Zhao, M. Zhao, Y. L. Yang, W. H. Jiang, and S. Yang. 2010. Screening and characterization of butanol-tolerant micro-organisms. *Lett. Appl. Microbiol.* **50**: 373-379.
14. Lin, Y. and S. Tanaka. 2006. Ethanol fermentation from biomass resources: current state and prospects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **69**: 627-642.
15. Liu, S. and N. Qureshi. 2009. How microbes tolerate ethanol and butanol. *New Biotech.* **26**: 117-121.
16. Park, H. J. and J. H. Lee. 2012. Transcriptional analysis responding to propanol stress in *Escherichia coli*. *J. Life Science* **22**: 417-427.
17. Qureshi, N. and H. P. Blaschek. 2001. Recent advances in ABE fermentation: hyper-butanol producing *Clostridium beijerinckii* BA101. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **27**: 287-291.
18. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for constructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**: 406-425.
19. Sambrook, J. and D. W. Russell. 2001. Molecular cloning: a laboratory manual, 3rd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
20. Shen, C. R. and J. C. Liao. 2008. Metabolic engineering of *Escherichia coli* for 1-butanol and 1-propanol production via the keto-acid pathways. *Metab. Eng.* **10**: 312-320.
21. Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* **22**: 4673-4680.
22. Xu, M., P. Wang, F. Wang, and X. Xiao. 2005. Microbial diversity at a deep-sea station of the Pacific nodule province. *Biodivers. Conserv.* **14**: 3363-3380.
23. Yan, Y. and J. C. Liao. 2009. Engineering metabolic systems for production of advanced fuels. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **36**: 471-479.

http://dx.doi.org/10.4014/kjmb.1210.10009