

Ethanol 충격에 의한 *Campylobacter jejuni*의 Ethanol 내성

김치경* · 가익현

충북대학교 자연과학대학 미생물학과

Ethanol 충격에 의한 *Campylobacter jejuni*의 생존성 및 ethanol 충격 단백질의 합성과 내성 반응을 연구하였다. 1%의 ethanol 충격에 대해서는 60분, 3%의 ethanol 충격에서는 30분, 5%의 ethanol 충격에서는 10분대에, 분자량이 90, 66, 60, 45, 24 kd인 충격 단백질이 합성되는 것을 autoradiography로 확인하였다. *C. jejuni*를 1%와 3%의 ethanol에서 30분간 충격을 준 후 각각 3%와 5%의 농도에 노출시켰을 때의 생존율은 ethanol 충격없이 직접 3%와 5%의 ethanol에 노출시켰을 때보다 $10^1 \sim 10^2$ 정도 높게 나타났다. 또 5%에서 10분간 충격을 준 후 7%의 ethanol에 노출시켰을 때에도 직접 7%에 노출시켰을 때보다 생존율이 10^2 정도 높게 나타났다. 그러므로 1~5%의 ethanol로 충격을 받은 *C. jejuni*는 그보다 높은 농도의 ethanol에 대하여 ethanol 충격 단백질에 의한 내성반응이 나타나 생존율의 감소가 훨씬 적어졌다.

KEY WORDS □ Ethanol shock, shock proteins, ethanol tolerance, *Campylobacter jejuni*

미생물을 포함하여 모든 생물이 살아가는 동안 외 환경은 수시로 변하여 생존하기 어려울 만큼 극한 상황에 다다르게 되는 경우가 많기 때문에, 그들의 적응 기작은 매우 중요하다. 이와 같은 적응 및 방어 기작은 생물 자신이 가지고 있는 유전정보의 발현에 의하여 나타나는 것으로서, 이에 수반되는 세포내의 여러 가지 생화학적 변화는 박테리아를 포함하여 모든 생물체에서 비슷한 양상으로 나타난다고 알려져 있다 (10).

이와 같은 적응기작의 특징은 생명체가 환경충격에 처했을 때, 대부분의 일반 단백질의 합성이 중단되는 반면, 약 10종 내외의 충격 단백질들의 합성이 크게 증가되고, 이 단백질들은 여러가지 생리기능에 관여 한다는 것이 열(12)이나, ethanol(11, 18), UV 조사(8) 등에 의하여 연구 보고되었다. 예비충격에 의하여 충격 단백질의 합성이 증폭되어 예비충격을 받지 않은 세포보다 생존성이 높아진다는 것이 열충격 실험에서 보고되었다(21). 또 충격 단백질의 기능이 불활성화된 세포는 충격 환경에서 뿐 아니라 정상상태에서도 생존율의 급격한 감소현상을 나타내었다(22). 환경충격 단백질들 중 가장 일찍부터 연구되고 그 기능들이 비교적 잘 밝혀진 것은 열처리에 의한 열충격 단백질들이며(10, 13), 그 외 다른 환경충격에 대한 연구는 미비한 편이다. Ethanol 충격반응에 대한 연구로서는, *E. coli*(18)와 *Zymomonas mobilis*(7)에서 ethanol 충격 단백질들의 합성이 보고된 바 있으며, 이들 ethanol 충격 단백질들은 열충격 단백질들과 분자량이 매우 유사하고 ethanol 내성 반응을 나타낸다고

보고되었다. 그러나 *Campylobacter jejuni*에 대한 ethanol의 충격반응에 관한 연구는 아직 보고된 바가 없다.

*C. jejuni*는 자연계의 많은 야생 조류와 포유 동물의 장내에 서식하는 Gram 음성의 미호기성 나선 간균으로, 최적 생장 온도가 인체의 다른 장내 세균들 보다 높은 42°C 로서 열에 대한 안정성이 비교적 높은 thermophilic 세균이다. *C. jejuni*는 오염된 물이나 음식을 통하여 인체에 전염될 때 설사 질환을 일으키는 중요한 병원성 세균으로 알려져 있다(1, 19). 따라서 음료수나 음식물에 대하여 일상 생활에서 가장 보편적으로 사용되는 살균 방법은 열에 의한 조리 방법이기 때문에, Kim 등(5)은 *C. jejuni*에 대한 열 충격 반응과, 그 결과 유도 합성되는 열충격 단백질에 관하여 보고한 바 있다.

그러므로 본 연구에서는 수인성 전염병 세균인 *C. jejuni*에 ethanol 충격을 줌으로서 그들의 생존성과 ethanol 충격 단백질의 합성을 조사하였으며, ethanol 충격 단백질에 의한 ethanol 내성 반응에 대하여 연구하였다.

재료 및 방법

균주 및 배지

본 실험에 사용한 *Campylobacter jejuni*는 Kim 등 (6)에 의하여 분리된 후, Smibert(17)의 분류 방법에 따라 동정된 균주이다. 순수 분리된 *C. jejuni*의 배양은 Brucella broth에 1.5%의 한천과 수혈용 혈액을 5~7%로 첨가한 Brucella blood agar 배지를 사용하였고, 대량 배양을 위해서는 Rollins 등(15)의 방법으로

* Corresponding author

biphasic culture system에 균체의 현탁액을 10^6 cells/ml 정도 되도록 접종하여 42°C 의 candle jar에서 20~24시간 배양하였다. 이 때 사용한 모든 배지에는 *Campylobacter* growth supplement(SR84, Oxoid Co., Hampshire, U.K.)와 selective supplement(SR85, Oxoid Co., Hampshire, U.K.)를 첨가하였다.

Ethanol 충격 및 생존율의 측정

Biphasic culture system에서 *C. jejuni*를 대수기까지 배양한 후, 배양액을 회수하여 $2,000\times g$ 로 15분간 원심 분리하여 균체를 회수하고, 0.08 M phosphate buffer(pH 7.2)로 세번 이상 세척하였다. 이 균체는 Westfall 등(20)의 방법에 따라 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입한 pH 7.2의 MEM(minimum essential medium Eagle)과 0.08 M phosphate buffer(pH 7.2)를 1:1로 혼합한 용액에 $10^8\sim 10^9$ cells/ml이 되도록 현탁하였다. 각 각의 시료는 42°C 의 수조에서 20분 이상 정지 배양한 후, 충격 실험에 사용하였다. 배양액에 ethanol을 0.5, 1, 3, 5, 7%가 되도록 각 각 첨가하여 일정시간 ethanol 충격을 준 후, Kim 등(4)의 보고에서와 같이 생존율을 측정하였다. 채취한 시료를 0.85% 생리 식염수로 십진 희석한 다음, *Brucella* blood agar배지에 0.1 ml/씩을 골고루 도말하고 42°C 의 candle jar에서 48~60시간 배양하였다. 배양후 형성된 colony를 계수하여 생존율을 계산하였다.

단백질의 pulse-labeling

42°C 에서 대수기까지 배양한 *C. jejuni* 균체를 methionine이 들어있지 않은 MEM(pH 7.2)과 0.08 M phosphate buffer(pH 7.2)의 혼합 용액(1:1)에 현탁하여 42°C 에서 20분 이상 정지 배양하였다. 배양액의 0.5 ml를 microcentrifuge tube에 취하여 각 각의 충격 조건에 따라 충격을 준 후, [^{35}S]-methionine을 $20\mu\text{Ci/ml}$ 씩 첨가하여 30분 동안 다시 배양함으로써 pulse-labeling을 하였다. 단백질 합성을 중지시키기 위하여 Gomes 등(2)의 방법에 따라 1 mg/ml의 methionine을 포함하는 25%의 TCA(trichloroacetic acid)를 시료와 동일한 양으로 첨가하여 얼음에서 30분간 방치하였다. 그리고 시료는 4°C 에서 $12,000\times g$ 로 1분간 원심분리하여 균체를 회수한 후, 냉각시킨 5% TCA로 1번, 그리고 0.08 M phosphate buffer(pH 7.2)로 3번 이상 세척하였다.

단백질의 추출

단백질의 추출은 Silhavy 등(16)의 방법에 따라 *C. jejuni* 균체를 TE buffer(Tris-EDTA, pH 7.2)에 현탁시킨 후, 동량의 SDS sample buffer를 넣어 100°C 에서 5분간 끓임으로서 단백질을 추출하였다. 이 시료는 $12,000\times g$ 로 10분간 원심분리한 후 단백질을 포함하는 $100\sim 150\mu\text{l}$ 상층액을 취하여 SDS-PAGE를 실시하였다.

전기영동 및 Autoradiography

단백질의 전기영동은 Laemmli(9)의 방법으로 실

시하였으며, separating gel은 10%의 acrylamide gel(두께 1.5 mm)을 사용하였고, stacking gel로는 4%의 acrylamide gel을 사용하였다. 전기영동은 30 mA에서 4~5시간 전개시켰으며, 전기영동이 끝난 후 Coomassie 염색 용액(Kodak Co., Rochester, N.Y.)으로 2~4시간 동안 염색시키고, destaining solution I(50% methanol, 10% acetic acid)에서 1시간, 그리고 destaining solution II(5% methanol, 7% acetic acid)에서 탈색시킨 후 각 단백질의 band를 확인하였다. 단백질의 분자량은 여러 가지 reference protein(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO)들을 함께 전기영동 함으로서 Rf 값을 측정하여 결정하였다.

염색과 탈색과정을 거쳐 단백질의 band가 확인된 acrylamide gel은 공기 중에서 완전히 건조시켰다. 이 gel은 [^{35}S]-methionine으로 label된 ethanol 충격 단백질들을 검출하기 위하여 Paek과 Walker(14)의 방법으로 XAR-5 X-ray film(Kodak Co., Rochester, N.Y.)에 접촉시켜 -70°C 의 deep freezer에서 7일간 노출시킨 후 현상하였다.

결과 및 고찰

Ethanol 충격에 의한 *C. jejuni*의 생존율

*C. jejuni*에 ethanol 충격을 주면서 시간별로 생존율의 변화를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 0.5%와 1% ethanol 농도에서 1시간 동안 처리했을 때에는 생존

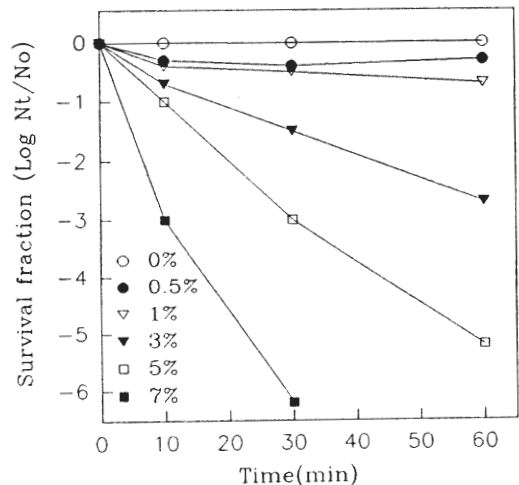


Fig. 1. Survival of *C. jejuni* at various ethanol concentrations.

C. jejuni were shocked with ethanol at concentrations of 0.5, 1, 3, 5, and 7%. Survival fractions of the shocked organisms were determined by enumerating the colonies developed by incubation of the cells at 42°C for 48~60 hours.

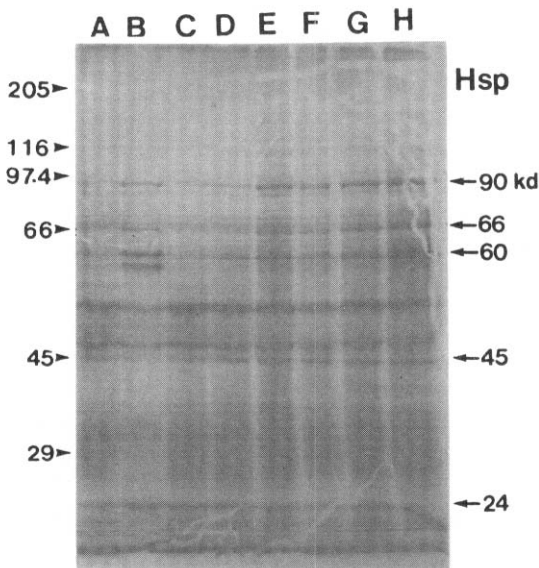


Fig. 2. Autoradiogram of the proteins synthesized in *C. jejuni* shocked with 1% and 3% ethanol. The cells were labeled with [35 S]-methionine in the medium without ethanol for 30 minutes after ethanol shock. Arrows on the left side are standard sizemarkers in kilodalton. Lanes: A, 42°C; B, 48°C (15 min); C, 1% (10 min); D, 1% (30 min); E, 1% (60 min); F, 3% (10 min); G, 3% (30 min); H, 3% (60 min).

율에 큰 변화가 없었으나, 3%에서는 1시간 동안의 처리에 의하여 2.5 log 정도의 세포가 사멸하였으며, 5%에서는 30분 후에 3 log의 세포가 사멸하였고, 7%에서는 30분 후에 6 log의 세포가 사멸하였다. 이와 같은 결과를 토대로 1, 3, 5%의 ethanol 농도에서 일정시간 동안 ethanol 충격을 주면서 충격 단백질의 합성을 조사하였다.

Ethanol 충격 단백질의 합성

Ethanol 충격을 주면서 시간별로 충격 단백질의 합성 양상을 autoradiography를 통하여 실험한 결과는 Fig. 2와 3에서와 같다. 1%와 3%의 ethanol에서 10, 30, 60분간 충격을 주면서 [35 S]-methionine 으로 pulse-labeling 했을 때, Fig. 2의 lane E, G, H에서와 같이 ethanol 충격 단백질들이 합성된 것을 관찰할 수 있었다. 1%와 3%에서 모두 ethanol의 충격 시간이 길어짐에 따라 충격 단백질의 합성이 증가되었고, ethanol 충격 단백질들의 분자량은 각각 90, 66, 60, 45, 24 kD으로 측정되었다.

5%의 ethanol 충격(Fig. 3)에서는 5분간(lane A) 충격을 주었을 때에 별 다른 변화가 없었으나, 10분간(lane B) ethanol 충격을 주었을 때에는 90, 66, 60, 45, 24 kD의 ethanol 충격 단백질들이 관찰되었다.

*C. jejuni*를 1%의 ethanol로 처리했을 때에는 30분

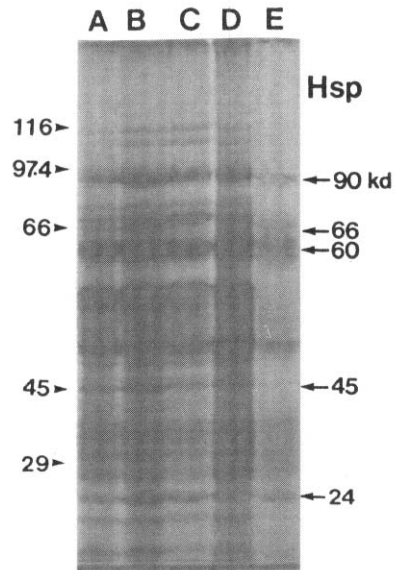


Fig. 3. Autoradiogram of the proteins synthesized in *C. jejuni* shocked with 5% ethanol. The cells were labeled with [35 S]-methionine in the medium without ethanol for 30 minutes after ethanol shock. Arrows on the left side are standard sizemarkers in kilodalton. Lanes: A, 5% (5 min); B, 5% (10 min); C, 5% (15 min); D, 42°C; E, 48 (15 min).

이후부터, 3%의 ethanol에서는 10~30분 사이에 ethanol 충격 단백질들이 합성되기 시작하였고, 5%의 ethanol에서는 10분에 충격 단백질들의 합성이 관찰되었다. Neidhardt 등(12)은 *E. coli*의 경우 4%의 ethanol 충격을 주었을 때 30~60분 사이에 충격 단백질의 합성이 최고에 도달했고, 10%의 농도로 충격을 주었을 때에는 5~10분 사이에 ethanol 충격 단백질의 합성이 최고에 도달했다고 보고하였는데, *C. jejuni*에서도 ethanol의 농도가 높아지면서 ethanol 충격 단백질들의 합성속도가 빨라지는 것을 알 수 있었다.

한편 *C. jejuni*에서 ethanol 충격에 의하여 생성된 충격 단백질들의 분자량이 열 충격 단백질들과 매우 유사하게 나타났다. 이는 ethanol 충격 단백질들의 합성에서도 열 충격 단백질의 합성에서와 같이 *hsp R* 유전자에 의해 조절된다고 보고한 Krueger와 Walker(8) 그리고 VanBogelen 등(18)의 결과와 일맥상통한다.

Ethanol 충격에 의한 ethanol 내성 기능

1%의 ethanol에서 충격 시간을 다르게 한 후 3%의 농도로 옮겼을 때에는, 직접 3%의 ethanol에 노출시켰을 때보다 생존율이 높게 나타났으며, 충격시간에 따르는 차이는 없었다(Fig. 4). 또한 3%의 ethanol에서도 사전 충격 시간을 10, 20, 30분으로 다르게 한

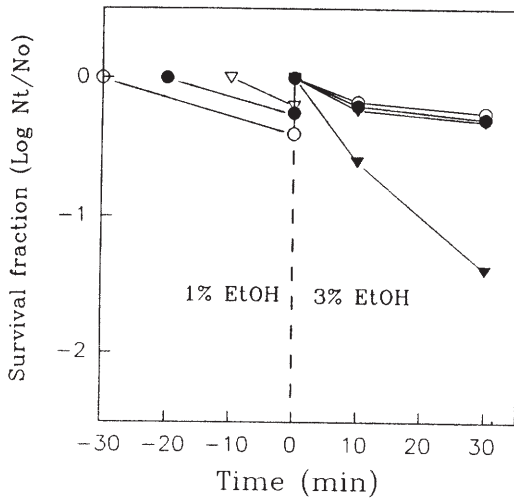


Fig. 4. Survival of *C. jejuni* in 3% ethanol after ethanol shock at 1% for 10 to 30 minutes.
 ▽, 1% (10 min) → 3%; ●, 1% (20 min) → 3%;
 ○, 1% (30 min) → 3%; ▼, 3%.

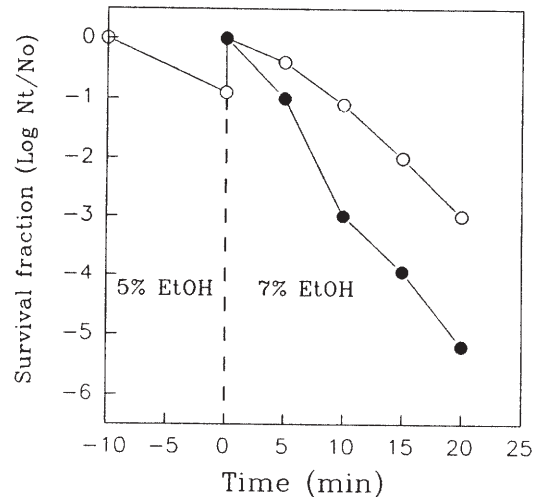


Fig. 6. Survival of *C. jejuni* in 7% ethanol after ethanol shock at 5% for 10 minutes.
 ○, 5% (10 min) → 7%; ●, 7%.

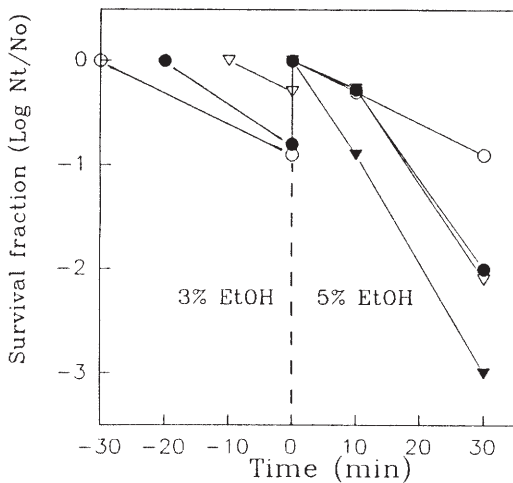


Fig. 5. Survival of *C. jejuni* in 5% ethanol after ethanol shock at 3% for 10, 20 and 30 minutes.
 ▽, 3% (10 min) → 5%; ●, 3% (20 min) → 5%;
 ○, 3% (30 min) → 5%; ▼, 5%.

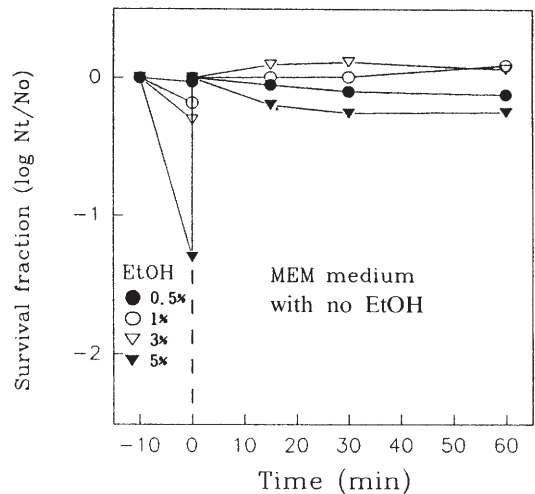


Fig. 7. Survival of *C. jejuni* in MEM medium after ethanol shock at various concentrations for 10 minutes.

후 5%의 ethanol에 옮겼을 때에도 Fig. 5에서와 같이 직접 5%의 ethanol로 충격을 주며 조사한 생존율보다 높게 나타났다. 또 3%의 ethanol에서 충격시간이 10~30분으로 길어질수록 생존율의 감소는 적어졌다. *C. jejuni* 균체를 5%의 ethanol에서 10분간 처리한 후 7%의 ethanol에 20분간 노출시켰을 때의 생존율도 Fig. 6에서처럼 직접 7%의 ethanol에 노출시켰을 때보다 약 100배 정도 높게 나타났다. 이와 같은 결과는

ethanol 충격에 의하여 생성된 충격 단백질은 ethanol에 대하여 내성기능을 나타내는 것임을 알 수 있었다. 이는 약한 충격을 미리 받은 세포가 다음의 강한 충격에서 생존할 수 있는 가능성이 충격을 받지 않은 세포보다 높다고 보고한 Hann과 Li(3) 그리고 Yamamori와 Yura(21)의 보고와 일치하는 결과이다.

*C. jejuni*에 0.5, 1, 3, 5%의 ethanol로 각각 10분 간격 충격을 준 후, ethanol 성분을 제거하고 생존율을 조사한 결과는 Fig. 7과 같다. 생존율의 회복은

충격을 준 ethanol의 농도에 상관없이 비슷하게 나타났다. 이와 같은 결과는 15분간 열충격을 준 후, 정상온도로 옮겼을 때 *C. jejuni*의 증식이 열충격을 받지 않은 세포들과 동일한 수준을 나타냈다는 Kim 등(5)의 보고에서와 같이, 1~5%의 ethanol 충격을 10분간 받은 세포들은 정상 배지로 옮기면 세포내 대사 기능이 정상상태로 회복된다는 것을 암시하는 것이다.

사 사

본 연구는 1992년도 교육부 학술연구 조성비(유전 공학)의 일부에 의하여 이루어졌음.

참 고 문 헌

1. Doyle, M.P., 1981. *Campylobacter fetus* subsp. *jejuni*: an old pathogen of new concern. *J. Food Prot.* **44**, 480-488.
2. Gomes, S.L., M.H. Juliani, J.C.C. Maia and A.M. Silva, 1986. Heat shock protein synthesis during development in *Caulobacter crescentus*. *J. Bacteriol.* **168**, 923-930.
3. Hahn, G.M. and G.C. Li, 1990. In R.I. Morimoto *et al.* (ed.), Stress proteins in biology and medicine. pp. 79-100. Cold Spring Harbor Lab. Press, N.Y.
4. Kim, C.K., S.H. Lim, M.S. Yun, H.S. Oh and M. K. Cho, 1989. Disinfection effects of heat- and cold-treatment and UV-irradiation on *Campylobacter jejuni*. *Kor. J. Microbiol.* **27**, 291-296.
5. Kim, C.K., H.O. Kim and K.J. Lee, 1991. Synthesis and thermotolerance of heat shock proteins in *Campylobacter jejuni*. *Kor. J. Microbiol.* **29**, 49-55.
6. Kim, C.K., H.S. Oh, K. Ryeom and M.K. Cho, 1986. Contamination and survival of *Campylobacter jejuni* in river water. *Kor. J. Limnol.* **19**, 39-48.
7. Konkel, M.E. and L.A. Joens, 1989. Adhesion to and invasion of HEp-2 cells by *Campylobacter* spp. *Infect. Immun.* **57**, 2984-2990.
8. Krueger, J.H. and G.C. Walker, 1984. *groEL* and *dnaK* genes of *Escherichia coli* are induced by UV irradiation and nalidixic acid in an *htpR*⁺-dependent fashion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **81**, 1499-1503.
9. Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**, 680-685.
10. Lindquists, S., 1986. Heat shock response. *Ann. Rev. Biochem.* **55**, 1151-1191.
11. Michel, G.P.F. and J.Starka, 1986. Effect of ethanol and heat stresses on the protein pattern of *Zymomonas mobilis*. *J. Bacteriol.* **165**, 1040-1042.
12. Neidhardt, F.C., R.A. VanBogelen and V. Vaughn, 1984. The genetics and regulation of heat-shock proteins. *Ann. Rev. Genet.* **18**, 295-329.
13. Neidhardt, F.C. and R.A. VanBogelen, 1987. Heat shock response. pp.1334-1345. In F.C. Neidhardt, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magasanik, M. Schaechter and H.E. Umbarger (ed), *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. American Society for Microbiology, Washington, D.C.
14. Paek, K.H. and G.C. Walker, 1986. Defect in expression of heat-shock proteins at high temperature in *xthA* mutants. *J. Bacteriol.* **165**, 763-770.
15. Rollins, D.M., J.C. Coolbaugh, R.I. Walker and E. Weiss, 1983. Biphasic culture system for rapid *Campylobacter* cultivation. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 284-289.
16. Silhavy, T.J., M.L. Berman and L.W. Enquist, 1984. Experiments with gene fusions. pp. 208-212. Cold Spring Harbor Lab. Press, N.Y.
17. Smibert, R.M., 1984. Genus *Campylobacter*. pp. 111-118. In N.R. Crieg and J.G. Holt (ed.), *Bergey's manual of systematic bacteriology*. Vol. 1. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
18. VanBogelen, R.A., P.M. Kelley and F.C. Neidhardt, 1987. Differential induction of heat shock, SOS, and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **169**, 26-32.
19. Voget, R.L., H.E. Sour, T. Barretl, R.A. Feldman, R.I. Dickinson and L. Witherell, 1982. *Campylobacter enteritis* associated with contaminated water. *Ann. Intern. Med.* **96**, 292-296.
20. Westfall, H.N., D.M. Rollins and E. Weiss, 1986. Substrate utilization by *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**, 700-705.
21. Yamamori, T. and T. Yura, 1982. Genetic control of heat-shock protein synthesis and its bearing on growth and thermal resistance in *Escherichia coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **79**, 860-864.
22. Zhou, Y.N., N. Kusukawa, J. Erickson, C. Gross and T. Yura, 1988. Isolation and characterization of *Escherichia coli* mutants that lack the heat shock sigma factor σ^{32} . *J. Bacteriol.* **170**, 3640-3649.

(Received August 10, 1992)

(Accepted August 25, 1992)

ABSTRACT: Ethanol Tolerance of *Campylobacter jejuni* by Ethanol Shock

Kim, Chi-Kyung and Ick-Hyun Ga (Department of Microbiology, Chungbuk National University, Cheongju 360-763, Korea)

The responses of *C. jejuni* to ethanol shock were studied for their survival, synthesis of ethanol shock proteins, and increased survival at higher concentration of ethanol upon prior treatments of ethanol. When *C. jejuni* were shocked with ethanol at 1, 3, and 5% for 60, 30 and 10 minutes, respectively, those cells synthesized the ethanol shock proteins of 90, 66, 60, 45, and 24 kd in molecular weight. When the *C. jejuni* shocked with 1 and 3% ethanol were exposed to 3 and 5% ethanol for 30 minutes, their survival rates were increased by $10^1 \sim 10^2$ as compared with those of the cells without ethanol-shock. In the same way, *C. jejuni* shocked with 5% ethanol for 10 minutes showed about 10^2 times higher survival rates than the cells without ethanol-shock. This result suggests that *C. jejuni* shocked with 1~5% ethanol for 10~30 minutes synthesized five kinds of ethanol shock proteins, and that the shock proteins contributed to increase ethanol tolerance for their survival at the higher concentrations of ethanol.