

## 방선균 *Streptomyces griseus* NRRL B-2682의 액내포자형성

지의상

신흥전문대학 식품영양과

### Sporulation of *Streptomyces griseus* NRRL B-2682 in Submerged Culture

Eui-Sang Ji

Department of Food and Nutrition, Shinheung Junior College

#### Abstract

Sporulation of *Streptomyces griseus* NRRL B-2682 occurs at 26~28 hours during incubation while shaking at 30°C in a defined medium. The time of sporulation is the same when the levels of each nutrient is increased ten times. The levels of the carbon, nitrogen and phosphate source are at a high level when sporulation begins. Sporulation of *S. griseus* B-2682 is clearly not caused by nutrient deprivation. It appears that a clock mechanism is involved instead. Once spores are germinated, the time of sporulation is programmed. Sporulation of *S. griseus* is repressed by high levels of casein hydrolysate. A study of the effect of individual amino acids revealed that L-valine when added to the normal growth medium causes an inhibition or repression of sporulation without affecting growth.

Key words : sporulation, clock mechanism, repression, time schedule, downshift

#### 서론

방선균은 항생물질을 대표로 하는 다종, 다양한 2차 대사산물의 생산균으로서 발효공업적으로 중요한 균이다. 방선균은 gram 양성균으로 분류되어 있지만 균사상으로 생육하며 그 선단에 포자를 착생한다는 것 때문에, 생물의 형태분화에 관한 기초적 자료를 얻기 위해서는 좋은 연구재료의 하나라고 생각할 수 있다. 따라서 방선균의 형태분화와 2차 대사의 개시는 통상 때를 같이 하여 일어난다는 것, 또 포자형성능의 소실이 항생물질 생산능의 소실을 수반한다는 것<sup>1)</sup> 때문에 포자형성 기구의 기초적 해명은 항생물질 생산능력 향상 등의 응용면에도 기여할 수 있는 것으로 기대된다.

방선균의 포자형성 기구에 관한 연구는 영국의 J. A. Hopwood와 K. F. Chater 등의 그룹을 중심으로 *Streptomyces coelicolor* A<sub>3</sub>을 사용하여 행하여져 왔지

만 *S. coelicolor*는 통상 고형배지에서만이 양호한 포자형성능력을 나타내기 때문에 포자형성에 대한 세포의 생리, 생화학적 변화를 경시적으로 해석하기에는 한계가 있다.

한편, Streptomycin 생산균으로 알려져 있는 *Streptomyces griseus*의 몇가지 균주는 액내배지 중에서도 효율이 좋은 포자(액내포자)를 형성하는 것<sup>2)</sup>이 알려져 있다. 또한 K. Ochi는 *S. griseus* ATCC 13189 균주를 이용하여 여러가지 연구<sup>3-7)</sup>를 하였으며, 세포내 GTP 수준의 저하가 방선균 포자형성의 기초가 된다고 제창한 바 있다.

본 논문에서는 위스콘신 대학의 J. C. Ensign 교수를 중심으로 액내포자형성능이 높은 *S. griseus* NRRL B-2682주(이후 B-2682주라 칭함)를 사용한 포자형성 기구의 생리, 생화학적 해석을 주제로 한 연구가 활발히 진행됨에 따라 B-2682주의 포자형성 기구에 관한 연구자료를 보고하고자 한다.

Corresponding author : Eui-Sang Ji

## 재료 및 방법

### 사용균주

실험에 사용한 균주로는 미국의 Northern Regional Research Center (Peoria, Ill.)로부터 구입한 prototrophic wild type의 *Streptomyces griseus* B-2682균주이며 포자형성에 강한 변이주 NY-5는 B-2682 균주로부터 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG)에 의하여 변이를 유도하였다.

### 배지 및 배양

*Streptomyces*의 성장배지는 DM-1<sup>8)</sup>[50 mM glucose, 10 mM (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 5 mM K-PO<sub>4</sub>(7.0), 50 mM MOPS buffer pH 7.0, 1.25 mM MgSO<sub>4</sub>, trace salts containing 50 uM each of Ca, Zn, Mn and Fe ions], DMCY[DM-1 supplemented with 1% each of casein hydrolysate(ICN Biomedicals, Cleveland, Ohio) and yeast extract(Difco Laboratories, Detroit, Mich. )]를 사용하였다.

*S. griseus*의 포자는 DM-1 배지에서 집락성장시켜 7~10일 후의 것을 얻었으며 몇가지 실험에 있어서의 포자는 동시 발아촉진을 위하여 45℃에서 15분간 가열하였다. 포자는 즉시 냉각시키고 포자의 접종량은 1ml 당 10<sup>6</sup>~10<sup>7</sup>의 농도로 DM-1 또는 DMCY 배지에 접종하였으며, 액내배양은 250ml 플라스크에 50ml의 배양액을 220 RPM으로 니크롬선을 감아 배양하였다.

## 결과 및 고찰

### 포자형성

*S. griseus* B-2682주의 포자형성은 간단한 조성의 DM-1 배지에서 기중포자 현탁액을 접종하여 30℃에서 배양하는 것만으로 대단히 많은 액내포자가 형성되었다(약 5×10<sup>8</sup>/ml). 포자형성 개시는 30℃에서 진탕배양한 후 26~28 시간이 지나면서 형성되기 시작하였으며 이 때 각각의 영양수준을 10배씩 높이고 포자형성의 시간을 같게 하였을 때의 결과는 Table 1과 같다. 포자형성 개시에서의 탄소, 질소, 인의 수준은 높았지만 이러한 결과는 B-2682주의 포자형성이 영양제한과 관련되지 않는다는 것을 나타낸다. 한편, 액내포자형성 개시가 현미경하에서 관찰되는 시점(이하 IS 점 ; Initiation of spore formation)은 배양 개시 후 26~28 시간으로 일정하였지만 그 후 약 60 시간이 지나면 포자형성은 완료되었다.

완충액으로 균체를 이행하는 경우 10 시간 이전의 균체로는 용균되지만 12 시간 이후의 균체로는 증식정도가 일어났음에도 불구하고 액내포자를 형성한다. 이것은 배양 개시 10~12 시간에서 세포가 잠재적인 포자형성능을 획득하는 것을 나타내고 있다. 이 점을 CS(Commitment of sporulation)점이라 한다.

### 액내포자형성에 있어서의 clock mechanism

DM-1 배지에서의 glucose, 인산염, 질소농도를 단

**Table 1. Effect of nutrient level on time of sporulation of *Streptomyces griseus***

Medium	Percent remaining at 30 hr			
	Glucose	Ammonia	Phosphate	Spores*
DM-1	40	36	66	26
Plus 10× glucose	74	28	63	26
Plus 10× ammonia	38	82	57	28
Plus 10× phosphate	42	33	94	26
Plus 10× trace salts	44	31	54	26
Plus 10× glucose, NH <sub>4</sub> , PO <sub>4</sub> and salts	69	83	91	28

\* Time of 10-times increase in acid resistant viable counts and microscopic examination.

독 또는 모두 5배 이상으로 하여도 CS점, IS점에 변화는 나타내지 않는다. 방선균의 형태분화는 일반적으로 탄소원, 인산, 특히 질소원의 결핍에 의하여 일어나는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>. B-2682주의 액내포자형성에서는 영양원의 과다에 관계없이 일정한 time schedule로 형태분화가 진행되기 때문에 정교한 clock mechanism의 기구가 작용하고 있다는 것이 강하게 시사되었다. Fig. 1에 나타난 time schedule은 고체배지상에서의 포자형성에 관하여 CS점까지를 영양균사의 성장, CS점에서 IS점까지를 기균사 형성, IS점 이후를

포자착생과 각기 대응된다고 설명할 수 있다.

Valine에 의한 포자형성의 억제

*S. griseus*의 포자형성은 고수준(1% 이상)의 casein 가수분해물이나 효모 extract의 존재에 의하여 억제된다<sup>3,9)</sup>. 정상 성장배지에서 성장에 영향을 주지 않고 포자형성의 저해나 억제 등의 영향을 미치는 아미노산에 대해서는 L-valine이 반응을 나타냈다. Fig. 2는 valine 첨가에 의한 DM-1 배지에서의 포자형성과정을 나타낸 사진이다. 그림을 보면 48 시간 후

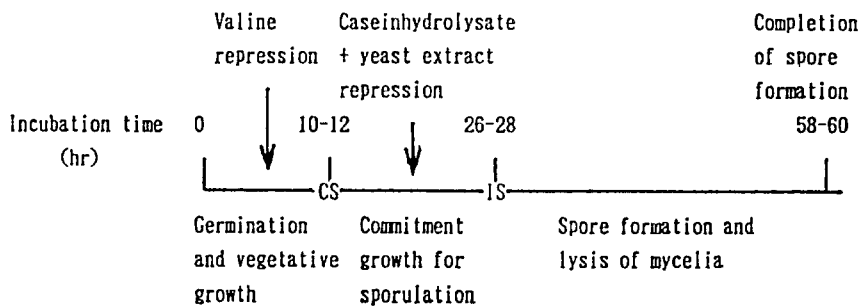


Fig. 1. Clock mechanism sporulation of *Streptomyces griseus* NRRL B-2682 in submerged culture. CS, Commitment time of sporulation : IS, Initiation time of sporulation

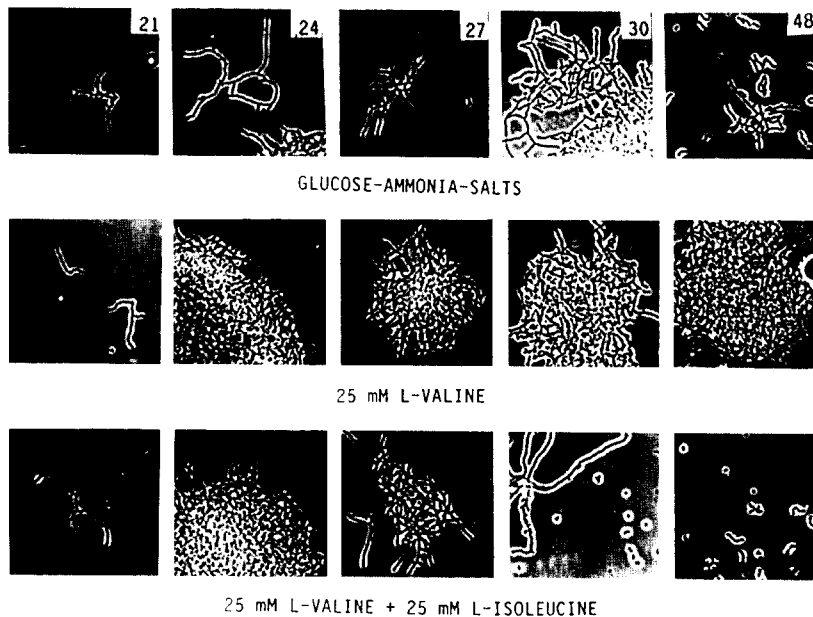


Fig. 2. Photomicrographs of cells growing in different media.

**Table 2. Repression of sporulation and NAD-glycohydrolase activity by L-valine and recovery of both properties following valine removal**

Media*	Valine removed**	Time of appearance of	
		Glycohydrolase**	Spores**
DM-1	—	10	26
DM-1 valine	—	+48	+48
DM-1 valine	8	19	35
DM-1 valine	12	23	38
DM-1 valine	18	30	41
DM-1 valine	24	34	55

\* Glucose, ammonium, salts medium. L-valine at 25 mM.

\*\* Times in hours: cells collected on filter, washed and resuspended in DM 1 medium without valine. NAD-glycohydrolase activity appears 10~12 hours and sporulation occurs 26~30 hours following removal of valine.

에 정상배지에서는 최대로 포자가 형성되었음에도 valine 배지에서는 포자를 형성하지 않았다. 이러한 valine 억제는 valine의 제거에 의해 해제되지만 그래도 IS점은 언제나 valine 제거 후 약 26~28 시간째로 그 때부터 포자를 형성하였다. 또 배양 도중에서의 valine 첨가에서 CS점을 통과한 후의 첨가로는 액내포자형성이 억제를 받지 않았다. 이것은 valine이 CS점 이전의 단계에 작용한다는 것을 나타낸다(Fig. 1 참조). 또한 광통의 생합성 경로를 가진 isoleucine이 같은 농도에서 동시에 존재하면 valine 억제가 해제되고(Fig. 2 참조), valine, isoleucine 각각의 대사 중

간체인  $\alpha$ -ketovaleric acid와  $\alpha$ -keto- $\beta$ -methylvaleric acid에서도 같은 유형의 액내포자형성 억제와 탈억제를 나타냈다. 이들  $\alpha$ -keto산은 *Streptomyces*속 막지질의 중요한 구성분지방산의 생합성 중간체라는 것<sup>11,13)</sup> 때문에 valine의 기구와 함께 생각하여 흥미가 깊다. 한편, Table 2는 8, 12, 18, 24 시간 후에 성장배지로부터 valine을 제거한 결과를 나타낸 것이며, 포자형성에 있어서 중요한 역할을 하는 NAD-glycohydrolase 효소<sup>10)</sup>의 활성에서도 valine은 억제를 나타냈다. 이 효소는 valine을 제거하고 10~12 시간 후에 다시 활성을 나타냈다.

#### SP 변이주의 액내포자형성

극히 최근에 이르러 B-2682주의 기균사 및 기중포자형성이 완전히 억제되는 조건에서 그들이 형성되는 변이주인 SP(Sporulation-proficient) 변이주를 얻는 데에 성공했다. 그 대표주인 SY-1(자연돌연변이)과 NY-5(NTG처리)는 Table 3에 나타낸 바와 같이 DMCY 배지(1%의 casein 가수분해물과 효모 extract 첨가 DM-1 배지)에서 액내포자를 형성하고, 그 회수량은 DM-1 배지의 약 10배에 달했다. 한편, 친주는 변이주와 마찬가지로 대단히 양호한 생육을 나타내지만 포자형성은 억제되어 배양 3일 후에는 거의 용균되었다.

#### Downshift에 의한 포자형성능

DMCY 배지에서 변이주가 나타내는 CS점 및 IS점에 도달하는 시간은 증식속도와 균체 회수량이 현저하게 증대함에도 불구하고 DM-1 배지와 거의 같은

**Table 3. Effect of nutrient level on sporulation of parent and mutants in submerged culture**

	Spore counts / ml, after 3 days		
	B-2682	SY 1	NY 5
Control (DM-1)	$4.5 \times 10^8$	$4.9 \times 10^8$	$4.2 \times 10^8$
+25 mM Valine	$<1 \times 10^7$	$4.6 \times 10^8$	$4.6 \times 10^8$
+1% Casein hydrolysate+1% Yeast extract (DMCY)	$<1 \times 10^7$	$6.6 \times 10^9$	$5.2 \times 10^9$

Inoculum size was  $1 \times 10^7$  spores per ml.

**Table 4. Commitment of *S. griseus* sporulate: Complete nutrient downshift**

Hrs before nutrient downshift*	Spore count / ml	
	B-2682	NY-5
6	$<1 \times 10^7$ (Lysis)	$<1 \times 10^7$ (Lysis)
10	$<1 \times 10^7$ (Lysis)	$<1 \times 10^7$ (Lysis)
12	$9.6 \times 10^7$	$5.2 \times 10^7$
18	$1.2 \times 10^8$	$4.5 \times 10^8$
20	$1.4 \times 10^8$	$5.3 \times 10^8$
24	$<1 \times 10^7$ (Lysis)	$4.9 \times 10^8$
26	$<1 \times 10^7$ (Lysis)	$8.0 \times 10^8$

\* Time of nutrient downshift in DMCY medium.  
Inoculum size was  $1 \times 10^7$  spores per ml.

것으로 나타났다(Table 4). 또 친주는 변이주와 같은 time schedule로 CS점을 통과하지만 IS점 부근에서 잠재적으로 포자형성능을 소실하는 것으로 판명되었다. 이것으로부터 casein 가수분해물과 효모 extract에 의한 억제제는 valine 억제제와 달리 CS점 이후의 단계에서 작용하는 것으로 추측된다(Fig. 1 참조). 또한 변이주에 있어서는 valine 억제제도 해제되었지만(Table 3 참조), CS점은 DM-1 배지와 같다는 것에 대하여 IS점이 배양 약 50 시간 후에 shift하는 것 때문에 그 해석을 해야 할 필요가 있다.

## 요 약

액내포자형성능이 높은 *Streptomyces griseus* NRRL B-2682주를 사용한 포자형성은 DM-1 배지에서 기중포자 현탁액을 접종하여 30°C에서 배양하는 것만으로 대단히 많은 액내포자가 형성되었다(약  $5 \times 10^8$  /ml). B-2682주의 액내포자형성에서는 영양원의 과다에 관계없이 일정한 time schedule로 형태분화가 진행되기 때문에 정교한 clock mechanism의 기구가 작용하고 있었다.

*S. griseus*의 포자형성은 고수준(1% 이상)의 casein 가수분해물이나 효모 extract의 존재에 의하여 억제된다. 정상 성장배지에서 성장에 영향을 주지 않고 포자형성의 저해나 억제 등의 영향을 미치는 아미노산에 대해서는 L-valine이 반응을 나타냈다.

대표변이주인 SY-1과 NY-5는 DMCY 배지에서

액내 포자를 형성하고, 그 회수량은 DM-1 배지의 약 10배에 달했다.

## 감사의 말

본 연구는 교육부의 대학교수 해외파견연구에 의해 미국의 WISCONSIN UNIV. 에서 수행된 일부이며 이에 감사드립니다.

## 참고문헌

1. Chater, K. F. ; Microbial Development, ed. by R. Losick and L. Shapiro, Cold Spring Harbor Lab., N. Y., 1984
2. Kendrick, K. E. and Ensign, J. C. ; *J. Bacteriol.*, 155, 357, 1983
3. Ochi, K. ; *J. Gen. Microbiol.*, 132, 299, 1986
4. Ochi, K. ; *J. Gen. Microbiol.*, 132, 2621, 1986
5. Ochi, K. ; *J. Gen. Microbiol.*, 133, 2787, 1987
6. Ochi, K. ; *J. Bacteriol.*, 169, 3608, 1987
7. Ochi, K. ; *J. Bacteriol.*, 172, 4008, 1990
8. McBride, M. J. and Ensign, J. C. ; *J. Bacteriol.*, 169, 4995, 1987
9. Ensign, J. C. ; Biology of Actinomycetes '88, Japan Scientific Societies Press, 309, 1988
10. Ensign, J. C., McBride, M. J., Stoxen, L. J., Bertinsson, A., Pomplun, M., and Ho, A. ; *Akade-*

mi ai Kiado, 777, 1986

11. Batrakov, G. S. and Bergelson, L. D. ; *Chem. Phys. Lipids*, 21, 1, 1978
12. Grafe, U., Roth, M. and Krebs, D. ; *Z. Allg. Mikrobiol.*, 22, 595, 1982
13. Grafe, U., Eritt, T., Reinhardt, G., Krebs, D. and Fleick, W. F. ; *Z. Allg. Mikrobiol.*, 24, 515, 1984

---

(1994년 2월 15일 수리)