

## *Streptomyces mitakaensis*의 원형질체 형성과정의 전자현미경적 연구

한순옥 · 정미경 · 이형환\*  
건국대학교 생물학과 및 유전공학연구소

### Electron Microscopy Observation of Protoplast Formation of *Streptomyces mitakaensis*

Han, Soon Ok, Mi Kyung Chung, Hyung Hoan Lee\*

Institute for Genetic Engineering and Department of Biology,  
Kon Kuk University, Seoul 133, Korea

The protoplast formation of *Streptomyces mitakaensis* was monitored with scanning electron microscopy and transmission electron microscopy. The normal cells formed regular mycelium and spore, and their cell wall and cell membrane appeared to be normal, but the cell wall of the lysozyme treated cells (1 mg/ml) was damaged, which was finally disappeared from cells to become protoplast in 30 to 60 minutes.

현재까지 알려진 항생물질의 약 70%를 *Streptomyces* 속에 속하는 균주들이 생산하는 것으로 알려져 있으며(1), 1970년대 들어와서는 이들의 유전자 조작을 통한 항생물질의 수율향상을 높이는 방향으로 연구되고 있다(2). *Streptomyces*의 세포벽은 lysozyme에 쉽게 분해된다는 보고가 있는 이래(3, 4), Sagara 등(5)은 고농도의 glycine이 함유되어 있는 배지에서 성장한 *S. griseoflavus*의 균사체는 lysozyme의 작용에 민감하게 반응하여 mesosome들이 소실된 원형질체들이 형성됨을 보고하였고, Okanishi 등(8)은 *Streptomyces*의 원형질체를 형성하여 다시 원래의 균사체 상태로 환원시키는 방법을 개발하였으며, 원형질체 형성시의 형태적 변화를 전자현미경으로 관찰하였고, 이로부터 *Streptomyces*속의 형질전환 및 세포융합이 가능하게 되었다. 본 연구에서는 mikamycin을 생산하는 *Streptomyces mitakaensis*가 원형질체로 형성되는 과정을 전자현미경으로 관찰하였다.

#### 재료 및 방법

#### 균 주

Key words: Electron microscopy observation, protoplast formation  
\*Corresponding author

*Streptomyces mitakaensis*(K-2484)을 사용하였으며, 이 균주는 건국대학교 축산대학 김창한 박사로 부터 분양받았다.

#### 사용한 배지

- ① 균주 보관배지로는 peptone-yeast extract-glucose slant 배지를 사용하였다(8).
- ② SPMM 배지의 조성 및 제조과정은 Han 등(9)의 방법을 이용했다.
- ③ GBYN 배지의 조성 및 제조과정은 Kim 등(6)의 방법을 수정하여 이용했다.

#### 삼투압 안정제의 조성

삼투압안정제로는 Okanishi 등(8)이 사용한 PT 완충액을 이용했다.

#### 세포벽 분해효소 제조

삼투압안정제인 PT 완충액에 lysozyme(Sigma Co.)을 녹인후 미세공여과지(0.2~0.45 μm)로 여과하여 사용하였다.

**원형질체 형성과정의 전자현미경적 관찰**

(1) 주사전자현미경적 관찰 ; 주사전자현미경의 시료는 정상균사체와 형성된 원형질체를 사용하였다. 시료는 1% glutaraldehyde와 paraformaldehyde로 2 시간 이상 전고정하고 PT 완충액으로 세척하여 1%(w/v) osmium tetroxide로 후고정 한 다음 60, 70, 80, 90, 95% 에탄올로 탈수하였으며, 무수알콜에서는 15분씩 2 번 탈수하였다. 건조후 gold로 coating(Eiko IB-3, Ion coater)한 후에 SEM(Hitachi-450)으로 20 kv 에서 관찰하였다.

(2) 투과전자현미경적 관찰 ; 투과전자현미경 관찰의 시료는 균사체를 대수기까지 배양한후 0.3 M sucrose 로 3 번 원심세척하여 배지를 완전히 제거한 후 효소를 처리하지 않은 균사체와 lysozyme 을 처리한 균사체를 검경하였다. 이들 시료는 각각 세포의 수가 ml 당  $10^6 \sim 10^8$  세포가 되도록 PT 완충액으로 부유시킨 후 3% glutaraldehyde 용액의 최종 농도가 1.5%되게 전고정하였다. 2 시간 이상 전 고정한 시료를 PT 완충액으로 여러번 원심분리하여 세척한 다음 수확된 정상 균사체와 형성된 원형질체 두 시료를 1.33%(w/v) osmium tetroxide로 4°C 에서 2 시간 후고정한 다음 30, 50, 60, 80, 90% 에탄올의 순으로 탈수하였으며 마지막으로 무수알콜로 2 회 탈수시킨 후 propylene oxide 에 20분간 방치하였다. 다음에 epon 과 propylene oxide 의 비가

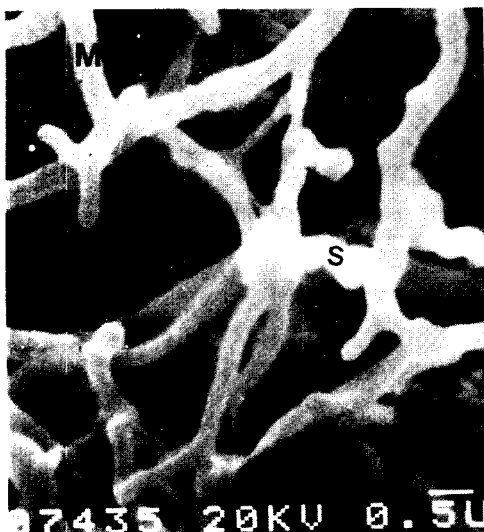


Fig. 1. Scanning electron micrograph of normal mycelia of *Streptomyces mitakaensis*. S indicates spore and M does mycelium.

1:2, 1:1, 2:1이 되는 용액에 각각 1 시간씩 방치하여 epon 이 시료속으로 잘 스며들게한 후 epon 에 포매하여 24시간 동안 방치한 후 65°C에서 3 일간 고체화 시켰다. 유리칼을 사용하여 ultramicrotome(Sorvall MT-2형)으로 박편을 만들었으며, uranyl acetate와 lead citrate로 박편을 이중 염색하여 투과전자현미경(Hitachi-H-500형)으로 관찰하였다.

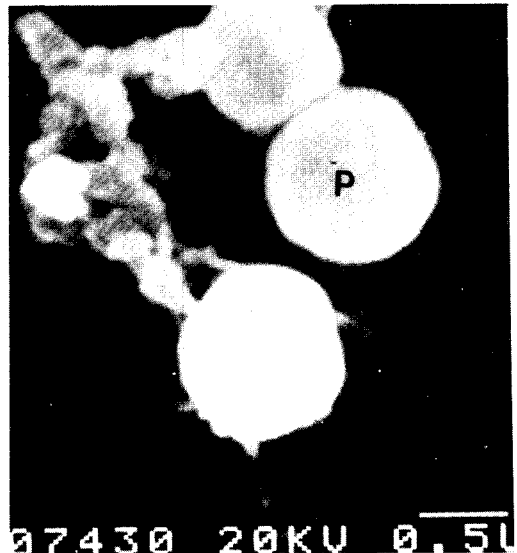


Fig. 2. Scanning electron micrograph of *Streptomyces mitakaensis* protoplast  
P indicates protoplast formed by lysozyme treatment.

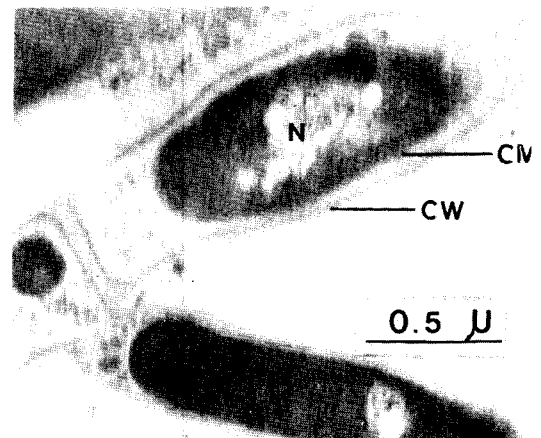


Fig. 3. Transmission electron micrograph of normal mycelial section of *Streptomyces mitakaensis*. CW: cell wall, CM: cell membrane, N: nucleoid

결과 및 고찰

원형질체 형성 과정의 전자현미경적 관찰

Lysozyme 을 처리하지 않은 정상 *S. mitakaensis* 균사체는 가지가 형성되어 가늘고 긴 균사가 복잡하게 꼬여 있고 균사체 끝이 양쪽으로 뻗어나가서 성장하는 모습을 관찰할 수 있었으며, 원형질체를 잘 형성시키기 위해 배지에 glycine 을 첨가하여 균사체를 성장시킨 후 시료로 사용 하였기 때문에 spore 가 다수 형성됨을 관찰할 수 있었다(Fig.1).

균체에 lysozyme 을 가하여 반응시킨 후 원형질체 형성을 관찰해 보면 세포벽이 부서져 균사체 끝에서 원형질체가 형성되거나 또는 균사체가 분절로 끊어져 부풀어 구형의 원형질체가 형성됨을 관찰할 수 있었다. 완전히 형성된 원형질체는 0.3~1.0 μm 정

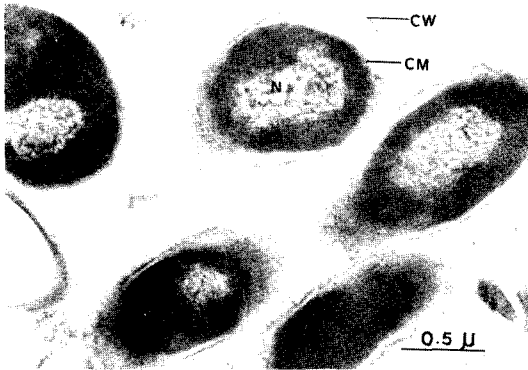


Fig. 4. Transmission electron micrograph of *Streptomyces mitakaensis* treated with 1 mg/ml of lysozyme for 30 minutes.

CW: cell wall, CM: membrane, N: nucleoid.

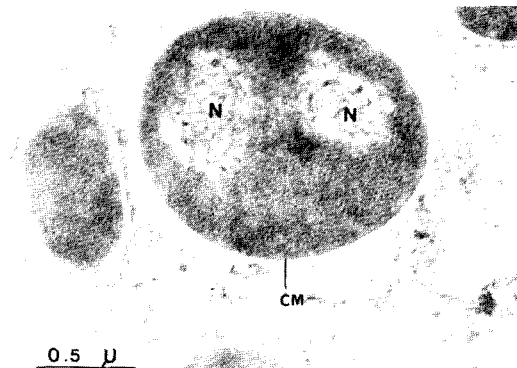


Fig. 5. Transmission electron micrograph of *Streptomyces mitakaensis* treated with 1 mg/ml of lysozyme for 60 minutes.

CW: cell wall, N: nucleoid.

도 크기인데 시간이 경과함에 따라 팽창하는 현상을 관찰할 수 있었다(Fig.2).

Lysozyme 을 처리하지 않은 정상형의 *S. mitakaensis* 균사체의 횡단면 사진이 Fig.3이다. 정상적인 세포벽(CW)과 세포막(CM)이 존재하는 것을 관찰할 수 있고, 핵모양체(N)가 뚜렷이 보인다. 그러나 lysozyme 을 처리한지 30분이 경과한 균체는 Fig.4 에서 보듯이 세포벽이 허물어져 있고, 이미 일부는 원형질체가 형성되었고, lysozyme 처리후 60분이 지나서는 세포벽이 완전히 제거되고 뚜렷한 세포막이 존재하는 원형질체가 되어 있으며, 이 원형질체는 단세포보다 크기가 약 3 배 정도 팽대되어 있다.

요 약

*Streptomyces mitakaensis* 균사체를 lysozyme 으로 처리하여 원형질체를 형성하면서 형태변이를 전자현미경으로 관찰하였다. 정상 균사체는 균사를 형성하고 포자를 형성했으며, 세포벽과 세포막이 완전한 상태로 나타났으나, lysozyme 을 처리한 후에는 균사체 말단에서 단일세포가 분리되고, 세포벽이 분리되기 시작하여 30분~60분 후에는 원래 세포의 약 3 배 이상 팽대한 원형질체를 관찰할 수 있었다.

참고문헌

1. Hopwood, D.A. and N.J. Merrick: *Bacteriol. Rev.*, **41**: 595-635 (1977).
2. Queener, S.W. and R.H. Baltz: *Annual Reports on Fermentation Processes*, **3**: 5-45 (1979).
3. Romano, A.H. and W.J. Nickerson: *J. Bacteriol.*, **72**: 478-482 (1956).
4. Romano, A.H. and A. Sohler: *J. Bacteriol.*, **72**: 865-868 (1956).
5. Sagara, Y., K. Fukui, F. Ota, N. Yoshida, T. Kashiyama and M. Fujimoto: *Japanese J. Microbiol.*, **15**: 78-84 (1971).
6. Kim, C.H., N. Otake, H. Yonehara: *J. Antibiotics*, **27**: 903-908 (1974).
7. Williams, S.T. and T. Cross: C. Bootu, ed., Vol. 4, Academic Press, N.Y., 295-334.
8. Okanishi, M., K. Suzuki and H. Umezawa: *J. Giener. Microbiol.*, **80**: 389-400 (1974).
9. Han, S.O., M.K. Chung and H.H. Lee: *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **15**: 89 (1987).

(Received February 16, 1987)