

## *Streptomyces lavendulae*의 균사체 발달에 따른 Ascorbate oxidase 동위효소 양상 변화

이현무·김재현

단국대학교 이공대학 미생물학과

### The change of ascorbate oxidase isozyme pattern during mycelial development of *Streptomyces lavendulae*

Lee, Hyeon Moo and Jae Heon Kim

Department of Microbiology, Dan Kook University, Cheonan 330-180

**ABSTRACT:** pH decreased as the substrate mycelium developed,  $\Delta$ pH was 1.05-1.15, but increased after the aerial mycelium formation. The lactic acid content in culture solution showed no difference between 0.2% and 5% glucose, at which the aerial mycelium formation was repressed. The growth and development of mycelium was delayed by the lactate treatment. The activity of catalase was maximum in 24 hours after inoculation, and the superoxide dismutase activity showed a constant level during the developmental phases. The ascorbic acid accumulated after the aerial mycelium formation. The ascorbate oxidase isozyme of Rf 0.44 appeared, while the isozyme of Rf 0.36 disappeared during the development.

**KEY WORDS** □ *Streptomyces lavendulae*, lactic acid, ascorbate oxidase

*Streptomyces*의 성장과정에는 포자, 제1차 균사체(substrate mycelia), 제2차 균사체(aerial mycelia)의 발달과정이 있다. 이중 제2차 균사체의 발달은 포자형성의 전제조건이며, 제2차 대사와 서로 밀접하게 연결, 조절받고 있다(Kalakoutskii와 Agre 1976). *Streptomyces griseus*에서 제2차 균사체의 발달은 산소를 요구하는 것이 보고되었다(Francisco와 Silvey 1971). 또한 제2차 균사체가 발달되는 시기에 배지의 pH가 5.4-6.5임이 *Streptomyces aureofaciens*에서 알려졌고, 배지의 초기 pH를 조절하여 제2차 균사체 발달을 유도하였다(Silvestri 1955). *Streptomyces catleya*의 제2차 균사체 발달을 위한 최적 pH는 6.0이었다(Foor 등 1982). *Streptomyces lavendulae*에서는  $\text{NH}_4^+$ 의 흡수에 기인된 일정수준의 pH 감소 후에 제2차 균사체의 발달이 일어났다(Küster

등 1985).

본 논문에서는 *Streptomyces lavendulae*의 발달과정에서 나타나는 배양액의 pH 변화와 Lactic acid 함량의 관계를 조사하고, Ascorbate oxidase 등의 산화환원 효소들의 활성을 측정하여 제2차 균사체 발달을 위한 생리적 조건들에 대하여 논의하고자 한다.

### 재료 및 방법

#### 균주 및 배양액

모든 실험에 *Streptomyces lavendulae* KCTC 9007가 사용되었다. 사용된 배양액은 Bennett 배양액(Beef extract 1g, Yeast extract. 1g, Casitone 2g, Glucose 10g, 증류수 1l) 및 ISP 기준에 따른 Trypton-yeast extract 배양액, Yeast extract-

malt extract 배양액, Inorganic-salts-starch 배양액, Tyrosine 배양액 등이다(Shirling과 Gottlieb 1964).

**정치배양**

각 배양액을 pH7.0으로 조정하여 100 ml 플라스크에 8 ml씩 분양한 후 Talc 0.1g을 넣어 표면에 Talc막을 형성하게 한 후 멸균하였다. Glucose는 따로 멸균하여 최종 농도가 되도록 첨가하였다. 포자용액은 Bennett 사면배지에서 14 일 이상 성숙된 배양에 증류수를 부은 후 백금니로 끊어서 만들었다. 각 배양액에 10<sup>7</sup>-10<sup>8</sup>의 포자를 접종한 후 30°C에서 배양하였다. 제 2차 균사체 발달은 균사체 표면이 희게 변하는 것을 기준으로 육안으로 판정하였다.

**Glucose 및 Lactic acid 정량**

Glucose는 Glucose oxidase를 이용하여 정량하였다(Sigma Kit No. 510). Lactic acid는 L-Lactate dehydrogenase를 이용하여 측정되었다(Sigma Kit No. 826-UV).

**Ascorbic acid 함량 측정**

2,4-Dinitrophenylhydrazine (DNPH)을 이용하여 정량하였다. 여과 세척된 균사체를 5% (w/v) Trichloroacetic acid 5 ml에 넣어 마쇄하였다. 15,000×g에서 10분간 원심분리한 후 얻은 상층액과 DNPH 혼합용액을 섞고 60°C에서 1시간 방치하였다. 78% (w/v) H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 ml를 얼음 중탕하에서 넣은 후 암실에서 20분간 방치하여 520 nm에서 흡광도를 측정하였다. DNPH 혼합용액은 9N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>에 녹인 2.2% (w/v) DNPH : 0.6% (w/v) CuSO<sub>4</sub> : 5% (w/v) Thiourea를 20 : 1 : 1로 혼합하여 만들었다. 갈색병에서 4°C에 보관하였으며 1주일 이내에 소비하였다.

**효소용액 제조 및 활성도 측정**

균사체를 여과 세척한 뒤 70 mM의 인산 완충용액 (pH8.0 1mM EDTA 포함)에 넣어 마쇄하였다. 18,000×g에서 30분간 원심분리한 후 얻어진 상층액을 효소용액으로 사용하였다. 단백질은 Bovine serum albumin을 대조로 하여 Lowry 등 (1951)의 방법에 따라 정량되었다.

Catalase의 활성도는 Chance와 Maehly (1955)의 방법에 따라 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 분해량을 240nm에서의 1분간의 흡광도 감소를 측정하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 몰 흡광계수

0.44×10<sup>2</sup>M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>로 부터 산출하였다.

Superoxide dismutase (SOD) 활성도의 측정은 Nitroblue tetrazolium (NBT)의 광 환원을 억제하는 효과를 이용하였다(Dhinsa 등 1981).

**Polyacrylamide gel 전기영동**

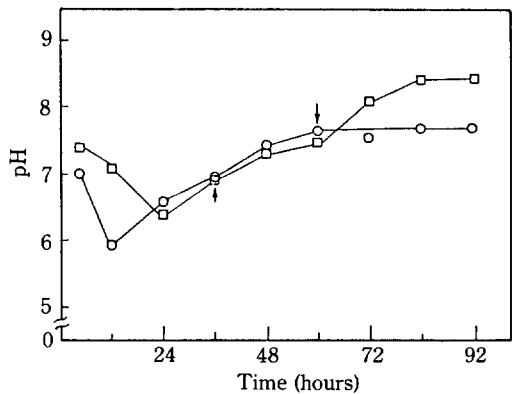
Ascorbate oxidase의 전기영동은 8% acrylamide 농도에서 Riboflavin을 촉매로 사용한 slab gel을 이용하여 수행되었다(Hames 1981) 효소의 염색에는 2,6-Dichlorophenolindophenol (DCPIP)을 이용하였다. Gel을 1.5 mM의 Ascorbic acid 용액에 15분간 30°C에서 방치한 후 DCPIP 용액에 처리하여 최대의 대조가 일어났을 때 사진을 찍었다.

SOD는 7.5% acrylamide 농도에서 Disc gel을 이용하였다. 효소의 염색은 Beauchamp와 Fridovich (1971)의 방법에 따랐다.

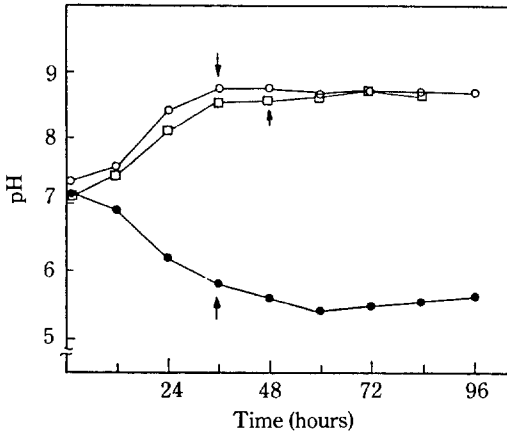
**결과 및 고찰**

**제 2차 균사체 발달과 pH, Lactic acid의 관계**

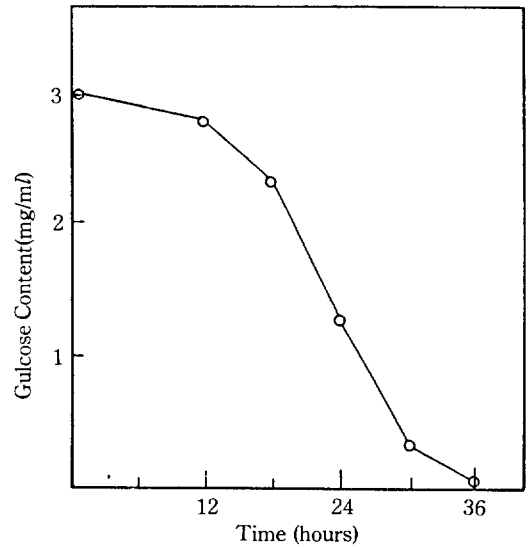
Yeast extract-malt extract 및 Bennett 배양액에서 본 균주는 제 2차 균사체 발달을 나타내었다. 이때 pH는 배양 초기에 1.05-1.15 감소한 후 24시간 이후부터 증가하는 경향을 나타내었다 (Fig.1). 이와는 대조적으로 성장과 발달이 미약한 배양액의 pH는 계속적인 증가 또는 감소를 나타내었다 (Fig.2). 즉 제 2차 균사체 발달은 배양



**Fig. 1.** pH changes of the medium during surface culture on Yeast extract-malt extract medium (□-□) and on Bennett medium (○-○). ↑ : Point of aerial mycelium formation.



**Fig. 2.** pH changes of the medium during surface culture on Inorganic salts-starch medium (●—●), on Tryptone-yeast extract medium (○—○), and on Bacto-nitrate broth (□—□). ↑: Point of aerial mycelium formation.



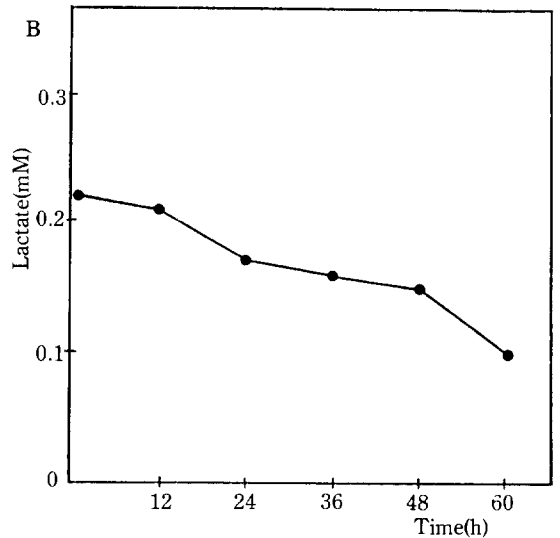
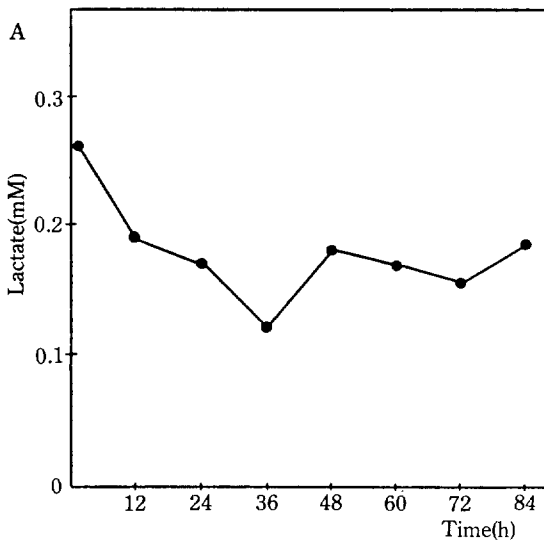
**Fig. 3.** Change of glucose contents in the Malt extract-yeast extract medium during surface culture.

액이 산성화 되거나 알칼리화 되는 경우 일어나지 않고 있었다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 Glucose는 36시간 이내에 모두 소비되는데, 이때 생성되는 유기산에 의하여 pH가 감소되는 것으로 생각되었다. 초기 Glucose의 농도가 5%일 때 제2차 균사체의 발달이 억제되고 pH는 5.07로 유지되었다. Surowitz와 Pfister(1985)는 *Streptomyces alboniger*에 의해 Pyruvic acid가 분비됨을 확인한 바 있다. 본

실험에서는 Pyruvic acid와 Lactic acid를 배양액에 첨가해본 결과, Lactic acid에 의한 제2차 균사체 발달 지연효과가 뚜렷함을 알았다. 14mM의 Lactic acid에 의하여 제2차 균사체 발달은 48시간 지연되었다.

그러나 Glucose의 농도가 0.2%와 5%일 때 분비되는 Lactic acid의 함량을 측정할 결과, 뚜렷한 차이를 발견하지 못하였다(Fig.4). Lactic



**Fig. 4.** The change of lactate contents in the Yeast extract-malt extract broth  
 A) at 0.2% glucose    B) at 5% glucose

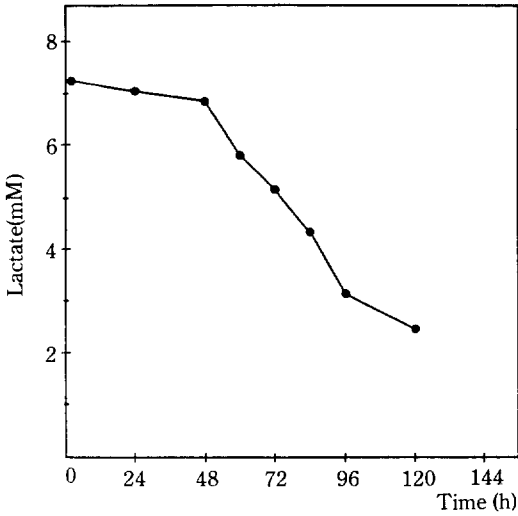


Fig. 5. Change of L-lactate content in the Yeast extract-malt extract medium containing lactate.

acid가 첨가된 경우에는 비록 48시간 이후 함량이 감소되기는 하지만 제 2차 균사체의 발달은 Lactic acid의 농도가 높은 시점에서 일어났다(Fig.5). 이러한 사실들로 부터 제 2차 균사체의 발달은 Lactic acid에 의한 pH감소에 영향받는 것이 아니며, 다른 종류의 유기산과 관계되거나 Küster 등(1985)에 의해 토론된  $NH_4^+$  흡수 기작과 연결되리라 생각된다.

**Catalase 및 Superoxide dismutase 활성 변화**

모든 호기성 생물에서  $H_2O_2$ 와 Superoxide는 불완전 환원에 의해 생성되며 강한 독성을 지닌다(Elstner 1982). 이들은 각각 Catalase 또는 SOD에 의해 제거된다.

Catalase의 활성은 접종 후 24시간에 최대를 나타내었으며 제 2차 균사체 발달 후 80% 이상 감소했다(Table 1). SOD의 활성은 전반적으로 일정하게 유지되었다(Table 2). Fig. 6에서 보는 바와

Table 1. Change in the catalase activity of *Streptomyces lavendulae* grown on Yeast extract-malt extract medium.

Time	12	24	36	48	60
Specific* activity (ukatal)	26.19 ± 1.87	73.7 ± 1.45	69.6 ± 7.02	43.6 ± 2.82	16.7 ± 2.62

\*Each value is a mean of four replicates at two times.

Table 2. Change in the superoxide dismutase activity of *Streptomyces lavendulae* grown on Yeast extract-malt extract medium.

Time	12	24	36	48	60
Specific* activity (unit)	10.50 ± 1.45	11.89 ± 2.04	17.55 ± 2.06	9.18 ± 1.00	15.04 ± 4.36

\*Each value is a mean of four replicates.

같이 SOD의 전기영동 결과 1개의 Band만 나타났고 5mM의 Azide에 의한 억제 효과가 없었다(Misra와 Fridovich 1978). 또한 Chloroform : Ethanol(5:3 v/v)에 처리했을 때 Band의 분리가 없었으므로, *Streptomyces lavendulae*의 SOD는 MnSOD로 추정된다(Giannopolitis와 Ries 1977).

**Ascorbic acid 함량 및 Ascorbate oxidase 동위 효소**

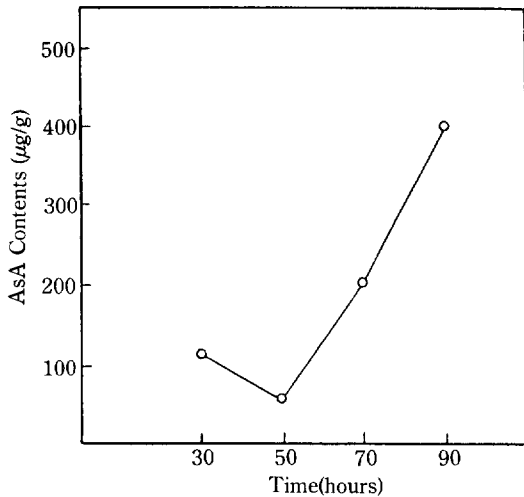
$10^{-4}M$ 의 Ascorbic acid는 제 2차 균사체의 발달을 촉진하였다. 이 촉진효과와 관련지어 균사체 내의 Ascorbic acid 함량을 측정하였다(Fig.7). 제 2차 균사체 발달 후 포자형성 시기에 Ascorbic acid 함량은 증가되었다.

이와 더불어 생장과정에서 Ascorbate oxidase



Fig. 6. Polyacrylamide gel electrophoresis of superoxide dismutase

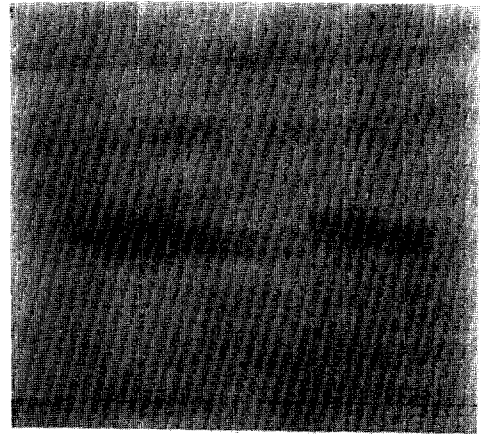
A: 24h, B: 48h, C: Treatment with 5mM azide.



**Fig. 7.** Change of ascorbic acid content of the mycelia during surface culture on Yeast extract-malt extract medium.

동위효소의 양상이 변화하였다(Fig.8). Rf 0.44인 동위효소는 접종 후 24시간 이후 전 발달과정에서 나타나며 진탕배양한 경우 제2차 물질대사가 이루어지는 6일째에 나타났다. 따라서 이 효소는 제2차 균사체 발달과 관련되는 것으로 추측된다. 그러나 Rf 0.36인 동위효소는 제2차 균사체 발달과 동시에 활성이 감소하여 48시간 이후 나타나지 않았다. Rf 0.40인 동위효소는 전체 성장과정에서 항상 나타났다.

Dixon과 Webb(1978)은 Ascorbic acid가 전자 전달계에 기여할 가능성을 제시하였다. Ascorbate oxidase는 Ascorbate를 기질로 하여 4개의



A B C D E F G H I

**Fig. 8.** Polyacrylamide gel electrophoresis of ascorbate oxidase with culture time. A: 12h, B: 24h, C: 30h, D: 36h, E: 48h, F: 60h, G, H: 3 days in submerged culture, I: Treatment of 24h with chloroform.

전자를 산소로 전달하기 때문에 전자전달계의 Cytochrome c oxidase와 같은 산소환원 반응을 촉매한다. 따라서 전자는 NADH에서 Ascorbic acid를 거쳐 산소에 전달된다.

제2차 균사체 발달 이후 제1차 균사체는 자가분해되는 것으로 알려져 있다. 따라서 포자형성을 위하여 필요한 에너지는 제2차 균사체내에만 존재하는 전자전달계에 의하여 생성되리라 생각되는데, 이때 Ascorbic acid와 Ascorbate oxidase가 중요한 의미를 지닐 것이다.

**적 요**

*Streptomyces lavendulae*의 제2차 균사체 발달에 따른 생리적 변화를 조사하였다. 제2차 균사체는 배양액의 초기 pH가 감소한 후 증가하는 시점에서 발달되었다. Yeast extract-malt extract 배양액의 Glucose 농도가 5%일 때 pH는 5.07로 유지되며 제2차 균사체 발달이 이루어지지 않았다. 이 억제효과는 Lactic acid의 축적에 의한 것이 아닌 것으로 생각된다. Catalase는 접종 후 24시간에 최대의 활성을 나타냈으며, Superoxide dismutase의 활성은 일정하게 유지되었다. Ascorbic acid는 제2차 균사체 발달 이후에 축적되었다. Ascorbate oxidase는 3개의 동위효소로 구성되는데, Rf 0.36인 동위효소는 제1차 균사체, Rf 0.44인 동위효소는 제2차 균사체와 관련되는 것으로 생각되며, Rf 0.40인 동위효소는 전체 성장과정에서 모두 필요한 것으로 나타났다.

**REFERENCES**

1. Beauchamp, C., and I. Fridovich, 1971. Su-

peroxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analyst. Biochem.* **44**, 276-287.

2. Chance, B., and A.C. Maehly, 1955. Assays of catalase and peroxidase. In *Methods in enzymology* Vol. 2. (ed Colowick, S.P., and S.P. Kaplan) pp. 764-769. *Academic press*, New York.
3. Dhinsa, R.S., P. Plumb-Dhinsa, and T.A. Thorpe, 1981. Leaf senescence: correlated with increased levels of membrane permeability and lipid peroxidation, and decreased levels of superoxide dismutase and catalase. *J. Exp. Botany* **126**, 93-101.
4. Dixon, W., and E.C. Webb, 1978. The enzymes. 3rd ed. *Academic press*, Oxford.
5. Elstner, F.E., 1982. Oxygen activation and oxygen toxicity. *Ann. Rev. Plant Physiol.* **33**, 73-96.
6. Foor, F., B. Tyler, and W. Morin, 1982. Effect of glycerol, phosphate, and pH on cellular differentiation and production of beta-lactam antibiotic thienamycin by *Streptomyces cattleya*. *Dev. Ind. Microbiol.* **23**, 305-314.
7. Francisco, D.E., and J.K.G. Silvey, 1971. The effect of carbon monoxide inhibition on growth of an aquatic streptomycete. *Can. J. Microbiol.* **17**, 347-351.
8. Gianopolitis, G.N., and S.N. Ries, 1977. Superoxide dismutase. *Plant Physiol.* **59**, 309-314.
9. Hames, B.D. 1981. An introduction to polyacrylamide gel electrophoresis. In *Gel electrophoresis of proteins* (ed. Rickwood, D., and B.D. Hames). pp. 1-86. IRL Press, Oxford.
10. Kalakoutskii, L.V., and N.S. Agre, 1976. Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* **40**, 469-524.
11. Küster, E., J.H. Kim, and W. Neumeier, 1985. Some biochemical aspects of the aerial mycelium formation within Streptomycetes. In *Proceedings of the sixth international symposium on actinomycetes biology*. Debrecen, Hungary. 26-30 August, 1985.
12. Lowry, O.H., N.J. Rosbrough, A.L. Farr, and R.J. Randall, 1954. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275.
13. Misra, H.P., and I. Fridovich, 1973. Inhibition of superoxide dismutase by azide. *Arch. Biochem. Biophys.* **189**, 317-322.
14. Shirling, E.B., and D. Gottlieb, *Methods manual*. pp. 1-27. Streptomyces Type Culture Project.
15. Silvestri, L.G., 1955. L'importanza fondamentale del pH nella sporificazione dello *Streptomyces aureofaciens*. *Rend. Ist. Sup. Sanita* **18**, 1312-1321.
16. Surowitz, K.G., and R.W. Pfister, 1985. Glucose metabolism and pyruvate excretion by *Streptomyces alboniger*. *Can. J. Microbiol.* **31**, 702-706.

**(Received Mar. 22, 1988)**