Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.
Vol. 10, No. 2, 117—122 (1982)

Streptomyces sp.가 生産하는 抗眞菌性 抗生物質에 관한 硏究

(제 3 보) 生産菌株의 微生物學的 性質

高永熹, *鄭善姬, 裵 武
한국과학기술원 응용미생물연구실
*江原大學校 醱酵工學科

(1982년 4월 28일)

Studies on the Antifungal Antibiotics Produced by a *Streptomyces* sp.

(Part 3) Microbiological Properties of the Strain

Yung Hee Kho, Sun Hee Jung and Moo Bae
Applied Microbiology Lab., Korea Advanced Institute of Science Technology,
P.O. Box 131, Dongdaemun, Seoul, Korea

(Received April 28, 1982)

Summary

Streptomyces sp. No. 297 previously isolated from a soil sample collected in Mt. Soyo of Kyeongi Province, which produced strong antifungal substances *t*-cinnamamide and another unknown compound, was identified as *Streptomyces griseorubiginosus* var. *soyoensis*.

The results of examinations in morphologial, physiological and cultural characteristies of the strain are presented.

서 론

벼 紋枯病菌에 대하여 강한 抗眞菌性 物質을 生成하는 放線菌을 경기도 소요산 부근의 토양으로부터 분리하고 이 菌株의 배양액에서 두가지의 抗眞菌性 抗生物質을 추출, 정제하였으며 그 중 하나는 *trans cinnamamide*임을 보고하였다.[1,2]

本 報에서는 이 菌株의 形態的, 生理的및 培養上의 特性을 檢討하여 同定한 결과를 보고한다.

실험재료 및 방법

사용균주

전보[1]에서 분리선정한 *Streptomyces* sp. No. 297을 사용하였다.

菌株의 同定方法

菌의 形態的, 生理的및 培養上의 特性을 조사하여 Bergey's Manual of Determinative Ba-

cteriology (8th ed.) 및 International Streptomyces Project (I. S. P.)의 Description Report에 準하여 同定하였다.[3,4]

形態的 特性 檢定

Oatmeal agar에 접종하여 28℃에서 14일간 slide culture하여 気菌絲를 광학현미경으로 관찰하였으며, 또한 斜面培養으로 얻어진 胞子를 채취하여 2%phosphotangastic acid (pH7.2) 에 현탁시켜 folmbar막을 입힌 grid위에 도포하고 1분간 실온에 방치한 후 건조시켜 Hitachi Hu-11C 전자현미경으로 胞子의 表面形態 (spore surface ornamentation)을 관찰하였다.[5]

糖의 利用性 檢討

Pridham and Gottlieb의 기초배지를 사용하여 糖 利用性을 조사하였다.[6] 기초배지를 常法에 따라 멸균한 후 별도로 멸균한 各名의 糖液을 糖이 1% 농도가 되도록 참가하여 평판배지를 조제하였다. Oatmeal agar에서 충분히 성장하여 形成된 胞子를 채취하여 멸균된 생리식염수로 2～3회 세척하고 재차 현탁시킨 액에서 胞子를 취하여 준비된 평판배지에 접종한 후 28℃에서 14일간 배양하면서 菌의 成長을 관찰하여 糖 利用性을 판단하였다.

生理的 特性 檢定

Melanin색소및 가용성 색소 형성 : Melanin 색소의 형성여부를 관찰하기 위하여 selective indicator medium, tyrosine agar및 potato plug을 常法에 따라 조제하여 사용하였다.[7,8] 또한 가용성 색소 형성은 glucose asparagine agar를 비롯한 15여종의 배지를 이용하였다.

Nitrate환원성 시험 : Czapeck배지에 glucose 0.5% 및 yeast extract 0.1% 첨가한 액체배지에서 28℃, 5일간 200rpm으로 진탕배양한 후 원심분리하여 균체를 제거한 배양액 5 ㎖에 sulfanilic acid용액과 2-naphtolamine용액을 각각 1 ㎖씩 가하고 색의 변화를 관찰하여 nitrate 환원성을 판단하였다.

Gelatin 액화력 시험 : Bennet agar에 gelatin 0.4%를 함유시킨 평판배지에 균을 접종, 28℃에서 7일간 배양한 후 0.1% mercuric chloride액을 흘려 보내어 투명대의 형성여부에 따라 판단하였다.

전분 분해능 protease 및 cellulase 생성시험 : 常法에 따라 평판배지를 조제하고 28℃에서 7일간 배양한 후 관찰하였다.

食塩耐性 및 streptomycin에 의한 생육 저해 시험 : Bennet agar에 NaCl을 1～10%되게 첨가하여 배양시키면서 生育度에 따라 食塩耐性을 관찰하였고 또한 streptomycin은 bennet agar에 5～100㎍/㎖되게 첨가하여 菌의 生育을 관찰하였다.

培養上의 特性 檢定

Glycerol asparagine agar를 포함한 15종류의 斜面培地에 접종하여 28℃에서 14일간 배양한 후 균의 생육도, 気菌絲의 形態, 胞子生成 有無 및 水溶性 色素의 形成등을 조사하였다.

결과 및 고찰

形態的 特性

slide culture한 후 気菌絲및 胞子鎖의 形態를 광학현미경 관찰한 것은 Fig. 1과 같고 胞子表面의 형태를 전자현미경 관찰한 것은 Fig. 2와 같으며 特性은 Table 1에 나타내었다.

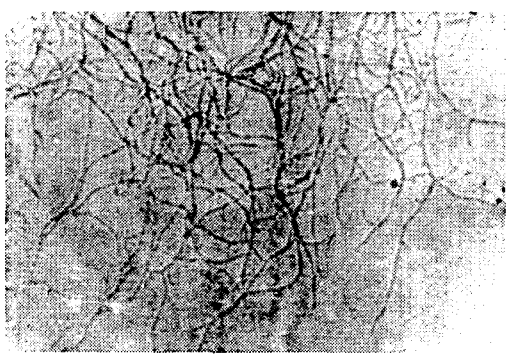

Fig. 1. Photomicrograph of Aerial Mycelia of *Streptomces* sp. No. 297

Table 1. Morphological Characteristics of *Streptomyces* sp. No. 297

Factor	Characteristics
Spore chain	retinaculum abertum and spiral
Spore surface ornamentation	smooth
Color of mature sporulated aerial mycelium	whitish gray

Fig. 2. Electronmicrograph of Spores of Streptomyces sp. No. 297

菌의 외관적 형태와 생육상태등으로 보아 이 菌은 *Actinomycetes*屬의 *Streptomycetaceae* 內에서 genus *Streptomyces*로 추정된다. 胞子鎖는 직선형(retinaculum abertum)이며 간혹 끝부분이 약간 꼬부라진 형태를 하고 있었다. 胞子表面은 평활하였고 ellipsoid型이었다.

糖 利用性

Pridham and gottlieb의 기초배지에 Bergey's manual上의 糖類를 各各 유일한 炭素源으로하여 糖 利用性을 검토한 결과는 Table 2와 같다.

本 菌은 여기서 사용한 糖을 모두 利用하는 것으로 보아 糖 利用性은 광범위한 것으로 보이며 glucose, fructose, galactose 및 mannitol 에서 왕성한 생육을 보였다.

生理的 特性

各種培地에서의 生理的 特性을 본 결과는 Tabla 3과 같다. Melanin색소가 매우 강하게 형성되었는데 이것은 이 菌이 tyrosinase를 강하게 분비하고 있음을 말한다. Nitrate환원력이 있었고 gelatin을 액화시켰다. 전분 분해력은 약하긴 하였으나 양성이었으며 cellulase는 生成하지 않았고 skim milk를 첨가한 Bennet배지에서 뚜렷한 투명대를 형성하는 것으로 보아 protease를 내고 있음을 알 수 있었다. 食塩에 대한 耐性은 4% 까지는 生育에 영향이 없었고 6%까지 弱하게 생육하였다. litmus milk를 37℃와 25℃에서 모두 응고시켰고 peptone化가 서서히 일어났으며 赤變하는 것으로 보아 酸生成및 protease의 生成을 확인할 수 있었다.

Streptomycin에 대한 내성은 30μg/mℓ 이하에

Table 2. Utilization of carbon Compounds by *Streptomyces* sp. No. 297

Carbon source	Growth
Control (no carbon)	—
D-qlucose	+++
D-xylose	+
D-arabinose	+
L-rhamnose	++
D-fructose	+++
D-galactose	++
raffinose	+
i-inositol	+
sucrose	+
D-mannitol	++

Table 3. Physiological Characteristics of *Streptomyces* sp. No. 297

Factor	Characteristics
melanoid pigment producing	positive
nitrate reduction	positive
gelatine liquefaction	positive
starch hydrolysis	positive, very weak
cellulase producing	negative p p p p
protease producing	positive
NaCl tolerance	≧4%, but<7%
temparature and pH range	15—45℃, pH 5—10
optimum	25—30℃, pH 6—7
litmus milk	color, changed to red
(37℃ and 25℃)	coagulation slowly, peptonization slowly.
growth inhibition by streptomycin	no growth ≧ 30 μg/ml

서는 생육하였으나 그 이상에서는 전혀 생육하지 않았다.

培養上의 特性

사용한 各種의 培地에서 전반적으로 매우 왕성한 생육을 보였으나 Czapeck배지에서의 生育은 좋지 않았다. 各種培地에서의 生育度, 気菌絲의 色狀, 胞子의 形成能및 色, 水溶性 色素形成등을 살펴 본 결과는 Table 4와 같다.

水溶性 色素는 몇가지 배지를 제외하고는 강하게 형성되어 tyrosinase활성이 있음을 나타내었으며 気菌絲는 전반적으로 매우 왕성하게 형성되었다. 그러나 胞子의 色은 배지에 따라 약간씩 차이는 있었으나 대체로 灰白色이었다.

菌株의 同定

Streptomyces sp. No. 297의 糖 利用性을 포함한 培養上의 특성및 生理的, 形態的 특성등을 종합하여 Bergey's manual과 비교할때 本 菌은 *Streptomyces griseorubiginosus*와 매우 흡사하나 培養上의 특성 중 酸, alkali性培地에 따른 水溶性 色素形成의 양상이 약간 차이가 나기 때문에 이 菌은 *St. griseorubiginosus*의 근연의 菌이거나 새로운 變種인 것으로 판단된다. 즉 *St. griseorubiginosus*는 培地의 pH가 alkali性 일때는 핑크 혹은 붉은 色을, 酸性일 때는 황갈색 혹은 灰色의 水溶性 色素를 形成하는 indicator성 물질을 분비하나 *Streptomyces* sp. No. 297은 pH의 변화에 따른 水溶性 色素는 황갈색 혹은 갈색으로 일정하였다. 따라서 本 菌은 *St. griseorubiginosus*의 새로운 變種인 것으로 판단하여 菌 分離場所인 경기도 소요산의 이름을 따서 *Streptomyces griseorubiginosus* var. *soyoensis*도 命名하였다.

요 약

前報[1,2]에서 기술한 경기도 소요산부근의 토양으로부터 분리된 強한 抗眞菌性 物質 t-cinnamamide와 未知의 물질을 생성하는 streptomyces속 No. 297은 菌의 形態的, 生理的및 培養上의 특성을 조사하여 동정한 결과 *Streptomyces griseorubiginosus* var. *soyoensis*도 同定되었다.

Table 4. Cultural Characteristics of *Streptomyces* sp. No. 297

Media	Characteristics*	Media	Characteristics*
Glycerol-asparagine agar	G : Moderate A. M : Brownish gray S : Scant Whitish gray S. P : Brown	Yeast ext-malt ext-agar	G : Abundant A. M : Redish brown S : Poor Whitish gray S. P : Redish brown
Dextrose-tryptone agar	G : Abundant A. M : Blackish brown S : Scant Smoke gray S. P. Wooden brown	Yeat-Glucose agar	G : Abundant A. M : Olive yellow S : Scant S. P : Redish brown
Starch-mineral-salt agar	G : Scant A. M : Pale yellow S : Scant faint yellow S. P : None	Hichey and Tresner's agar	G : Good A. M : Grayish brown S : Scant White S. P : Light brown
Dextrose-starch agar	G : Abundant A. M : Yellowish brown S : Scant Whitish gray S. P : Brownish black	Nutrient-agar	G : Abundant A. M : Brown S : Poor Whitish gray S. P : Olive yellow
Potato-carrot agar	G : Moderate A. M : Yellow S : Scant Whitish gray S. P : None	Nutrient-gelatin agar	G : Abundant A. M : Yellowish brown S : None S. P : Clackish brown B
Synthetic-agar	G : Poor A. M : Greenish yellow S : Scant Whitish gray S. P : None	Czapeck-agar	G : Poor A. M : Yellow S : Poor White S. P : None
Half-Strength agar	G : Abundant A. M : Redish brown S : Scant Gray S. P : Light yellow	Milk	G : Good A. M : None S : None S. P : Light yellow
		Oatmeal-agar	G : Moderate A. M : Olive brown S : Scant Whitish gray S. P : Light brown

*G;Growth, S;Spore, AM:Aerial Mycelium S. P. :Soluble Pigment

참 고 문 헌

1) Bae, M. and Y. H. Kho : Kor. *J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, **10**, 33 (1982).
2) Bae, M., Y. H. Kho, W. S. Lee and J. H. Cho : *ibid*, **10**, 39 (1982)
3) Buchanan, R. E. and N. E. Gibbons : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8th ed. The Williams & Wilkinson Company, Baltimore (1974)
4) Nonomura, H : *J. Ferm. Technol.* **52**, 78 (1974)
5) Williams, S. T. : *J. Gen. Microbiol.* **62**, 67 (1980)
6) Shirling, E. B. and D. Gottlieb : *Inst. J. Syst. Bacteriol.* **19**, 391 (1969)
7) Williams, S. T. and T. Cross : *Methods in Microbiology*. (Booth, C. ed) Academic Press, London and Now York, Vol. **4**. 309 (1971)
8) Shirling, E. B. and D. Gottlieb : *Int. J. Sust. Bacteriol.* **16**, 313 (1966).
9) Bradshaw, L. J. : *Laboratory Microbiology*, W. B. Saunders Company, philadelpia, p 106 (1979)