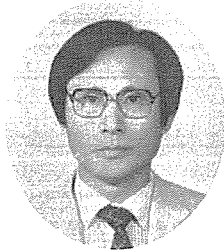
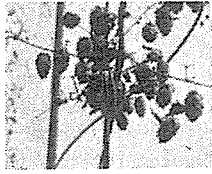


窒素固定微生物의 利用 및 遺傳



閔 泰 益
(韓國科學技術院
醱酵工學研究室長)

◇ 序 言

窒素肥料의 化學的 生産방법은 1900년대 初 Harber에 의해서 高안된 이래로 가장 널리 쓰이는 방법이다. 이 工程은 高溫, 高壓과 多量의 還元力(水素)이 필요하기 때문에 石油資源이 풍부하고 값이 低廉할 경우에는 窒素肥料의 生産 單價는 낮았지만 2차례의 石油波動은 그 生産 單價를 상승시키게 되었고, 窒素肥料의 生産량 감소는 세계의 穀物價格을 앙등시키는 요인이 되고 있다.

한편, 20세기末 현재의 世界人口는 2倍로 늘 어날 전망이다, 그 食糧需要를 충족시키기 위해서는 현재 農業에 투입되는 窒素肥料의 量을 2倍 이상으로 증가시키지 않으면 안된다. 이때 派生되는 문제는 窒素肥料을 어떤 방법으로 倍加시켜 투입할 것인가 하는 문제이다.

앞으로 代替 또는 改良된 技術개발이 없는한 2000年代의 人口증가에 대비한 食糧增産을 위해서는 총 1억 6천만톤의 化學肥料가 필요하게 될 것이다. 이같은 需要를 충족하기 위해서는 1억 \$ 규모의 窒素肥料 工場이 500개나 追加 建設되어야 하며, 이 工場에서 소비되는 에너지(天然 gas)도 $170 \times 10^9 m^3$ 이 될것이라 한다. 또한 化學的 窒素肥料는 原料難이나 原價昂騰問題 이외에 環境汚染에도 지대한 영향을 미치기 때문에 化學肥料를 사용하지 않는 窒素肥料의 生産이 절실히 요구되고 있다.

최근 窒素固定微生物을 이용한 Biomass 및 농작물의 증산방법개발이 遺傳工學技術의 발전과 더불어 새로운 연구의 대상이 되고 있다. 실제로 地球上에는 總需要量의 70%에 해당하는 1억7천5백만톤의 窒素肥料가 매년 生物學的方法에 의해서 生産되고 있다.

◇ 窒素固定微生物

自然界에는 Nitsogenase라는 酵素를 가지고 있어서 Harder法과는 달리 大氣壓과 常溫下에서 大氣中の 窒素를 암모니아로 전환시킬 수 있는 많은 微生物이 있다.

Diazotrophs로 通稱되는 이들 窒素固定微生物

은 <表 1>에서 보는 바와 같이 高等植物과 관련을 가지고 窒素를 고정하는 共生型과 独立的으로 窒素를 고정하는 自生型으로 분류된다.

共生關係의 窒素固定 System에서 宿主植物은 Diazotrophs에게 光合成物質이나 窒素固定에

<表 1> 自然界에 存在하는 窒素固定微生物

Symbiotic	lichens	<u>Nostoc</u> , <u>Anabaena</u> , <u>Tolypothrix</u> (P)
	angiosperms (Gunnera)	<u>Nostoc</u>
	Azolla	<u>Anabaena azollae</u>
free-living	tropical grasses	<u>Azotobacter paspali</u> , <u>Spirillum lipoferum</u> (<u>Azospirillum brasilense</u> Kreig), <u>legumes+Rhizobium</u> (<u>leguminosarum</u> , <u>trifolii</u> , <u>phaseoli</u> , <u>meliloti</u> , <u>lupini japonicum</u> , <u>cowpea rhizobia</u>) non-legumes+ 'Frankia' (actinomycete)
	root nodules	<u>Nostoc</u> , <u>Anabaena</u> , <u>Plectonema</u> , <u>Trichodesmium</u> , <u>Gloeocapsa</u> etc. (P) <u>Azotobacter</u> , <u>Beijerinckia indica</u> , <u>Derxia</u> , <u>gummosa</u> <u>Mycobacterium</u> (<u>flavum roseoalbum</u> , <u>azot-absorptum</u>), <u>Methane-oxidizing bacteria</u> , (e.g. <u>Methylococcus capsulatus</u>) <u>Corynebacterium autotrophicum</u> <u>Azospirillum lipoferum</u> , <u>brasilense</u> , <u>Aquaspirillum</u> (<u>perigrinum</u> ; <u>fasciculum</u>) <u>Thiobacillus ferrooxidans</u> <u>Cowpea Rhizobium</u>
free-living	aerobic	<u>Klebsiella pneumoniae</u> , <u>Bacillus polymyxa</u> , <u>Bacillus macerans</u> <u>Escherichia</u> (<u>coli intermedia</u>), * <u>Citrobacter freundii</u>
	facultative	<u>Rhodospirillum</u> , <u>Rhodopseudomonas</u> 's (P)
	anaerobica	<u>Clostridium</u> (<u>pasteurianum</u> , <u>butyricum</u> , <u>butyrium</u> , <u>Kluyverii tetanomorphum</u> and others) <u>Desulfotomaculum</u> , <u>Desulfovibrio Chromatium</u> , <u>Chlorobium</u> , (P)

*Bygenetic transfer of nif from *K. pneumoniae*.
P=Photosynthetic.

<表 2> 各種 Rhizobium이 共生할 수 있는 豆科植物.

Biomass의 생산에서, Azolla와 Anabaena의 共生은 水稻作에서 중요한 窒素供給源이 되고 있다.

즉, Rhizobium과 豆科植物의 共生에서 年間 약 3,500萬톤(數億弗 相當)의 窒素를 고정하고 있으며, 현재 약 13,000餘種의 豆科植物中 100餘種에만 legume inoculant(豆科植物接種劑)가 商業規模로 생산 이용되고 있다. 1960年代 이후 미국에서는 NITRGIN(Wisconsin), LINICO(Minnesota), HIRHIZE(Florida)등 많은 會社가 legume inoculant를 생산, 판매하고 있으며, 실제로 美國內 콩의 50% 이상에 Rhizobium 接種劑를 사용하고 있다. 또한 印度 및 東南亞에서도 自國產 豆科作物에 적합한 接種劑를 개발하여 農民에게 廉價로 供給함으로써 10~70% 이상의 增產效果를 거두고 있는 실정이다.

豆科植物에서 뿌리혹(Nodule)을 형성하는 Rhizobium의 종류 및 그 窒素固定能力은 <表 2>와 같다. 우리나라의 경우, 大豆의 生産量은 115

필요한 特殊環境(적당한 酸素E)을 제공해 주는 대신에 Diazotrophs로 부터는 고정된 窒素를 공급받는다. Rhizobium과 豆科植物間의 共生的 窒素固定은 농업생산에서 중요한 의의가 있으며, 放線菌類와 樹木間의 共生은 木材 및

Rhizobium sp.	Cross-Inoculation Group	Host Genera	Legumes included	Approximate Range of Nitrogen Fixed (kg/ha/yr)
<u>R. meliloti</u>	Alfa lfa group	Medicago Melilotus	Alfalfa Sweetclo	100-300 125
<u>R. trifolii</u>	Clover group	Trifolium	Clovers	100-150
<u>R. leguminosarium</u>	Pea group	Pisum Vicia Lathyrus Lens	Pea Vetch Sweetpea Lentil	100 100
<u>R. phaseoli</u>	Bean group	Phaseolus	Beans	100
<u>R. lupini</u>	Lupine group	Lupinus Omithopus	Lupines Serradella	150-200
<u>R. japonicum</u>	Soybean group	Glycine	Soybean	60-80
<u>Rhizobium</u>	Cowpea group	Vigna Lespedeza Crotalaria Pueraria Arachis Phaseolus	Cowpea Lespedeza Crotalaria Kudzu Peanut Limabean	85

-125kg/10a로 미국의 생산량 180-220kg/10a에 비하면 현저히 낮은 생산성을 나타내고 있다. 이러한 차이는 大豆品種, 氣候條件, 土質의 肥

沃度등 여러가지 복합적인 요인이 작용하였다고 할 수 있으나, 效率的인 大豆接種劑의 未活用이 低生産性의 중요한 원인이라고 추정된다.

한편, 放線菌의 一種인 *Frankia* sp. 는 많은 樹木(특히 오리나무)에서 共生的으로 窒素固定 Nodule (Endophytes) 을 형성, 大氣中の 窒素를 고정한다. 放線菌類와 共生하면서 固定窒素를 이용하는 樹木은 9科, 165種이나 된다. 이들 樹種은 다양한 기후조건, 酸性化된 土壤 또는 不毛의 幹燥土壤에서 잘 生育하는 Pioneer 로서 그 經濟的 價値는 Biomass의 増産뿐만이 아니고, 土壤의 肥沃度를 증가시켜 經濟作物의 耕作을 가능케 할 수 있다는 점에서도 중요하다.

또한 熱帶羊齒植物인 *Azolla*와 Blue green algae인 *Anabaena*의 共生關係는 葉腔內的 "Heterocysts"를 分離培養함으로써 입증되었으며, 이 *Azolla-Anabaena*의 共生的 窒素固定은 東南 亞地域의 水稻作에 이용되고 있다. Egypt의 ARC에서는 2種의 窒素固定藻類(*Tolypotrix tenuis*와 *Aulosira fertilissima*)를 선정, 水稻作의 10%에 이 接種劑를 사용하고 있으며, 印度에서도 ARI에서 藻類接種劑가 개발되어 農民에게 공급되고 있다. 특히 Blue-green algae는 砂漠에서도 窒素를 고정할 수 있음이 밝혀져 이들 藻類의 重要性이 강조되고 있다.

自生型 非共生的 窒素固定細菌은 약 25屬 이 알려지고 있으며, 窒素固定量도 炭素源이나 에너지源에 따라 다르기 때문에 이들 細菌이 土壤에 얼마나 窒素를 공급하는지는 확실치 않다. 土壤中에는 많은 細菌이 존재하기 때문에 單一窒素固定菌의 寄与度를 평가하기는 어렵다.

Clostridium, *Klebsiella* 및 數種의 *Enterobacteria*는 에너지가 풍부한 土壤에서만 窒素固定이 보장되며, *Azotobacter* sp. 는 好氣的條件下에서 炭素源이 충분하여야 窒素를 고정할 수 있다. *Azotobacter* sp. 는 大氣中の 酸素濃度에서 1kg의 窒素를 고정하는데 50kg의 Sucrose를 소비하기 때문에 이 菌의 窒素固定效率는 지극히 낮다. 그러나 Russia와 印度에서는 多年間 土壤이나 非豆科作物의 種子에 *Azotobacter*

*chroococcum*의 接種劑를 실용화하고 있다.

최근, 熱帶土壤에서 *Baphia grass* (*Paspalum notatum*)와 *Azotobacter paspall*, *Digitaria* 와 *Azospirillum lipoferum*의 協助的 共生關係가 발견됨으로써 Free-living 窒素固定菌에 대한 새로운 관심이 고조되고 있다.

◇ 窒素固定微生物의 遺傳的 研究

窒素固定遺傳子(nif genes)의 Cloning에 관한 연구는 1971年 Streicher 등이 *K. pneumoniae* M 5al 과 Bacteriophage P 1 을 이용하여 *K. pneumoniae*의 窒素固定遺傳子를 窒素固定能力이 없는 變異株에 Transduction하고, Dixon 과 Postgate가 Conjugation을 통하여 *K. pneumoniae*의 nif gene을 E. coli에 移植하여 최초로 種間 또는 屬間雜種을 만드는데 성공함으로써 각광을 받게 되었다.

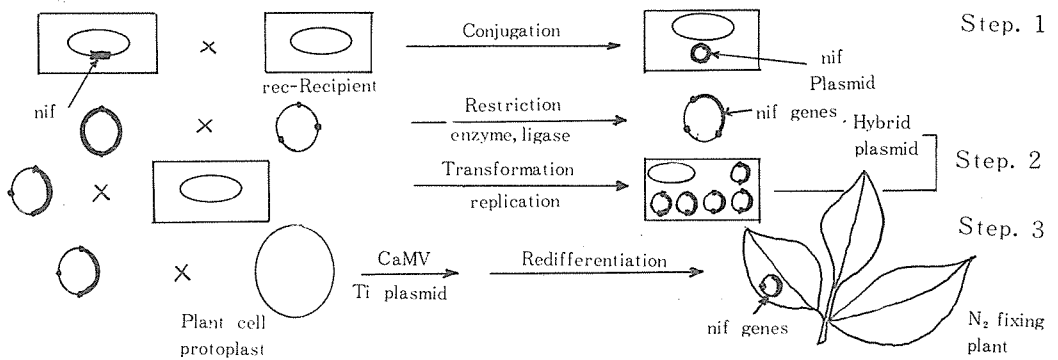
*K. pneumoniae*의 窒素固定遺傳子는 1975年 St. John 등이 4개의 遺傳子를 고정한 이래 현재 까지 17개의 遺傳子가 확인되었다. 이들 窒素固定遺傳子集團은 His遺傳子에 근접해 있고 遺傳子座는 His...QB AL (R) F(W) MVSU NE KDHJ 로 配列되고 7개의 Operon으로 성립되어 있으며 그 기능은 <그림 1>과 같다. 즉, nif K, D, H는 窒素固定酵素의 蛋白質成分 I, II를 각각 Coding하는 構造遺傳子이며, nif B, N, E. 는 酵素成分 I의 활성화에 필요한 FeMo-co 合成에 관여하고 nif M, S는 酵素成分 II를 활성화시킨다. nif F와 J는 生体内에서 窒素固定에 필요한 電子傳達系遺傳子로 추정하고 있다. 복잡한 窒素固定機構의 조절은 nif A, L, R 및 其他 遺傳子와 암모니아, 酸素濃度등 여러요인이 상호작용 하여 이루어진다.

生物學的窒素固定에 관한 遺傳的 研究의 최종 목표는 微生物에만 존재하는 窒素固定遺傳子를 植物細胞에 이식하여 식물스스로가 大氣窒素를 고정, 窒素肥料을 외부에서 공급하지 않고도 生育할 수 있게 하는데 있다. 이와같은 窒素固定 食물을 創製하기 위해서는 <그림 2>와 같은 여러 단계의 복잡하고 어려운 문제들이 해결되지

〈그림 1〉 窒素固定遺伝子の 機能

Regulation	Nitrogenase Structural Genes	Modification	Active Components	Electron Source	
nif A, L(R)	Proto I nif K, D	Fe-Mo co nif B, N, E. (Q, C, J)	Active I (Kp I)	Electron Transportfactors nif F, J	Active Nitrogenase
	Proto II nif H.	Modification nif M, S. (V, U)	Active II (Kp II)		

〈그림 2〉 窒素固定植物체 創製過程



않으면 안된다.

현재까지는 一部の 窒素固定遺伝子만이 大量 增幅이 가능한 Plasmid에 Cloning되었지만 앞으로는 大量으로 얻어진 窒素固定遺伝子를 식물의 Chloroplast genome, Agrobacterium tumefaciens의 Ti plasmid, Cauliflower mosaic virus (CaMV)를 이용, Vector를 개발하여 식물 DNA genome에 도입하고, 再分化過程을 거쳐 완전한 植物個体を 만드는 단계가 남아 있다.

nif 遺伝子の Plasmid 및 運搬체의 개발은 E. coli에서 K. pneumoniae의 nif 遺伝子和 His operon을 운반하는 Ffactor (FN 68)을 분리함으로써 촉진되었다.

1976년 Dixon등은 FN68과 P-type 抗生劑耐性 Plasmid RP 4를 Recombination시켜 RP 41 (PRD₁) plasmid를 粗立하였으며, 이 PRD₁은 Conjugation을 통하여 쉽게 Gram陰性 細菌에 移傳할 수 있기 때문에 遺伝의 도구로 사용할 수 있다.

Cannon등은 Amplification이 가능하며, nif 遺

伝子의 一部가 Cloning된 여러 종류의 Plasmid (PCR 37, PCM1, PSA 30등)를 만들어 DNA hybridization時에 Probe로 사용할 수 있도록 하였다. 또한 Ausbel등은 DNA再組立技術을 도입하여 nif 遺伝子의 半을 포함하는 小型 Plasmid를 만들었다.

최근에 개발된 nif gene plasmid와 Cloning vector는 〈表 3〉에서 보는 바와 같다.

한편, Rhizobium의 遺伝的 研究에서 Nuti 등은 nif genes의 一部가 Plasmid에 존재함을 입증하였으며, Prakash등도 여러 종류의 Fast growing khizobium의 構造遺伝子が Plasmid에 있다는 證명을 Homology연구를 통하여 밝힌 바 있다.

1981년 Henneke와 Mielenz는 R. Japonicum의 nif gene에 pBR 322를 Vector로 사용, Shot-gun method로 R. Japonicum의 DNA bank를 구성하였으며, 여기서 얻은 Clong들중 K. pneumoniae의 構造遺伝子(nif H, D K)와 Colony hybridization시켜 nif D gene과 Homology를 보

이는 p15C 2 Plasmid를 分離, R. Japonicum의

〈表3〉 K. pneumoniae의 窒素固定遺傳子 plasmid와 vector

Plasmid	Cloning vector	Size of plasmid (kb)	Drug resistance phenotype conferred	his and nif genes present
pMB9	—	5.25	Tc ^R	none
pACYC184	—	3.98	Tc ^R CAM ^R	none
pCRA10	pMB9	7.65	Tc ^R	his D, G
pCRA10	pMB9	9.3	Tc ^R	his D, G
pCRA37	pMB9	22.50	Tc ^R	his D, G, nif Q, BALFMVS(U)
pCM1	pCRA10	23.7	none	his D, G, nif(Q), BALFMNSNEK
pSA30	pACYC184	10.35	Tc ^R	nif(E), KDH
pGR102	pMB9	16.95	none	his D, G, nif Q, BAL(F)
pGR103	pMB9	11.37	Tc ^R	his D, G, nif(Q)
pGR112	pACYC184	11.9	Tc ^R	nif D, G, nif(F)
pGR113	pACYC	6.1	Tc ^R	nif(U) N(E)

nif gene 一部를 Cloning하였다. 또한 Ausubel과 Ruvkun도 R. Meliloti의 DNA bank로부터 K. Pneumoniae의 nif D, H와 일치하는 pRmR₂ plasmid를 Cloning하여 broad-host-range vector pRK 290에 Veccloning하였다고 한다.

GIM-82에서 Johnston등은 R. leguminosarum에서 많은 Nodulating plasmid를 分離하고 이들 Plasmid中에서 窒素固定과 관련있는 Hydrogen uptake plasmid를 Hydrogenase activity가 없는 Rhizobium에 옮기므로써 窒素固定能力은 현저히上昇되었다고 발표하였으며, Puhler등도 K. Pneumoniae와 R. Meliloti의 nif genes의 微細構造를 분석한 결과를 보고하였다. 그러나 Rhizobium sp.에 대한 遺傳的情報는 아직 상세히 밝혀져야 할 사실이 많으며 그 중에서도 lectin과의 Binding에 관여하는 遺傳子, ng遺傳子, Legume에 존재하는 Leghemoglobin 遺傳子 등이 특히 중요하다. Legume 이외의 다른 식물과 Rhizobium이 共生하기 위해서는 Lectin gene과 Leghemoglobin gene도 함께 새로운 식물로 이전되어야만 효율적인 共生關係를 유지할 수 있기 때문이다.

A. Tumefaciens는 R. Meliloti와 分類學的으로 매우 類似하며 傷處난 植物體에 感染하여 Crown gall을 형성하므로 窒素固定遺傳子를 植物體

로 옮기는 가장 유력한 Vector로 등장하고 있다

Prakash등은 A. Tumefaciens의 Ti plasmid上的 23Kb DNA切片을 식물에 이전하여 Crown gall을 형성하였고, Hooykas등은 R. Trifolii의 160Kb plasmid를 A. Tumefaciens Ti plasmid에 Conjugation함으로써 Rhizobium의 plasmid를 含有하는 A. Tumefaciens strain을 만들고 이 Strain이 Clover에서 窒素는 固定하지 못하지만 發育不進의 Nodules을 형성하는 것을 입증하였다. 그러나 현재까지 Rhizobium plasmid DNA를 식물의 根細胞에 이전하여 共生的으로 窒素를 고정할 수 있다는 실험이 보고된 바는 없다.

Crown gall tumor와는 달리 細菌細胞는 Nodule로 쌓여있기 때문에 Nodule에 DNA를 이전하기는 매우 어렵기 때문이다.

그러나 Agrobacterium과 Rhizobium의 Analogy는 매우 흥미있는 일이며 앞으로 지속적인 연구가 이루어져야 할 것이다.

◇ 結 言

窒素固定微生物의 궁극적 활동목표는 이들 菌에 존재하는 nif 遺傳子를 植物細胞에 이식함으로써 高等植物이 독자적으로 窒素를 고정하여 窒素肥料의 공급없이도 生育할 수 있도록 하는 것이다.

현재 原始核細菌에서는 窒素固定遺傳子를 窒素를 고정하지 못하는 다른 細菌에 이식하여 窒素固定能力을 갖는 Diazotrophs가 합성되었지만 窒素固定遺傳子의 眞核細菌 내지는 植物細胞로의 이식은 앞으로 窒素固定機作이 상세히 밝혀지고 遺傳子移植技術이 더욱 발전, 개발됨으로써 가능할 것이다.

가까운 장래에 人類는 天然의 Nitroctnase의 결점이 보완된 아주 작고, 酸素에 感受性이 없으며, ATP가 요구되지 않고, 固定窒素에 의해서 적당히 억제되는 高性能의 이상적 窒素固定遺傳子를 合成할 것이며, 이런 遺傳子가 植物細胞에 이식되는 날 生物學的 窒素固定의 진정한 가치 가 인정을 받게 될 것이다.