



## 미생물 대사산물을 이용한 신규 제초활성물질의 스크리닝

“

토양방선균으로 부터  
신규 제초활성물질  
탐색 연구의 성공 여부는  
간편하면서도 독특한  
스크리닝 방법의  
개발에 달려있다.

”

한국과학기술원 유전공학센터  
미생물생태연구실

이학박사 김 신 덕  
농학박사 김 창 진  
농학박사 유 익 동

최근 선진 각국으로부터의 물질특히 개방압력이 점점 그 강도를 더해감에 따라 국내외적으로 신규 생리활성물질의 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중에서도 농업용 항생물질, 특히 무독성 생물제초제의 개발연구는 인체의 안전성문제, 환경오염문제 및 노동절약형 농업재배방식의 도입등에 따라 관심이 집중되고 있다.

### 토양방선균 높은 가능성 시사

현재까지 보고된 항생물질수는 표 1과 같이 총 10,700 종류가 알려져 있다. 그 중 약 67%에 해당하는 7,150 종류의 항생물질이 미생물에 의해 생산되며, 미생물 중에서도 방선균에 의한 것이 4,600여종으로 약 43%를 차지하고 있어 미생물 이외의 고등동식물, 이끼류 및 조류에서

발견된 수와 거의 비슷한 실정이다. 이는 새로운 항생물질이나 제초활성물질을 탐색하기 위해서는 토양방선균을 대상으로 스크리닝(screening) 하는 것이 제일 가능성이 높다는 것을 시사한다고 하겠다. 실제 토양방선균에 의해 발견된 제초활성물질로는 최근 개발되어 실용화에 성공한 Bialaphos를 비롯하여 phosalacin, Herbicidin, Herbimycin 등 약 30여종류 이상이 보고되었다.

표 1. 현재까지 보고된 항생물질 현황

구 분	항생물질수	점유율(%)
미 생 물	7,150	67
세 균	950	9
방 선 균	4,600	43
곰 팡 이	1,600	15
고 등 동 식물	3,350	33
이끼류	100	1
조 류	250	2
고 등 식물	2,500	23
고 등 동물	700	7
계	10,700	100

이상과 같은 제초활성물질의 탐색, 개발을 위하여는 제일 먼저 간편하면서도 신속한 스크리닝 방법의 개발이 선행되어야 한다. 따라서 본란에서는 토양방선균의 분리, 배양 및 항균활성조사 방법을 소개하고 종자발아 검정법, Whole plant 검정법 등

일반적인 제초제 스크리닝 방법과 함께 최근 개발되어 이용되고 있는 TSA agar 검정법, 단백질합성 및 전분합성 저해물질의 탐색 등에 의한 신규 제초활성물질의 스크리닝 방법을 소개하고자 한다.

### 1 제초활성물질 생산미생물의 분리 및 배양

제초활성물질을 생산하는 미생물, 특히 방선균의 분리, 배양방법은 일반적으로 항생물질 생산 미생물의 분리, 배양방법과 거의 동일하기 때문에 이에 준하여 실시하면 된다. 그러나 토양미생물들은 기후조건, 환경조건 및 채취시기 등에 따라 미생물상(微生物相)이 매우 다르며 특히 배지 조건 및 배양조건에 따라서도 유용물질의 생산정도가 현저하게 다르므로 특별한 주의와 최적조건의 확립이 필수요건이라 할 수 있다.

#### 가. 토양시료 채취

대부분의 항생물질 생산균주들은 토양으로부터 분리되고, 또 토양은 각종 미생물이 풍부하게 서식하고 있기 때문에 미생물 채취원로서는 각종 조건하의 토양이 제일 적당하다. 채취장소는 미경작지 토양으로 표토를 제거하고 표면으로부터 2~5cm 깊이에서 채취한다. 채취량은 5~10

g으로 하고, 시료는 목적에 따라 채취 즉시 사용하든지 혹은 5°C 냉장고 보존 또는 petri-dish에 넣어 27~45°C에 방치하면서 자연건조시켜 사용한다. 특히 방선균이나 *Bacillus* 속은 건조상태에서도 생존율이 높아 토양시료를 자연건조 시킴으로써 분리시 세균이나 곰팡이의 생육을 억제시킬수 있다.

### 나. 미생물 분리

미생물의 분리 방법은 분리하고자 하는 미생물의 종류에 따라 각기 달라 일반적으로 세균은 보통 한천배지, 곰팡이는 Czapek 한천배지 또는 potato dextrose 한천배지, 방선균은 Oatmeal 한천배지 및 Bennet 한천배지를 이용한다.

#### 1) 방선균 분리용 배지

많이 사용되고 있는 방선균 분리용 배지조성은 다음과 같다. 즉 Oatmeal 한천배지는 Oatmeal 20g, Agar 15g, 증류수 1ℓ, pH7.0으로 조절된 배지조성을 나타내며 Bennet 한천배지는 glucose 10g, peptone 2g, Beef extract 1g, yeast extract 1g, Agar 15g, 증류수 1ℓ, pH7.0으로 조절된 배지를 이용한다.

#### 2) 방선균 분리

채취된 토양시료 1~2g을 5ml의 멸균 증류수에 가하고 1시간 정도 실온에서 진탕시켜 미생물을 부유시킨

후 soil dilution plate 방법으로 약  $10^{-3}$ 으로 희석시켜 상기의 배지에 petri-dish 당 0.1ml씩 plating한다. 이 한천 평판배지를 28°C 항온기에 넣어 3~7일간 배양후 나타난 single colony를 가용성 색소의 생성유무 혹은 spore형성유무 등을 관찰하며 다르다고 판별된 균을 보존slant에 옮긴다. 이 때 곰팡이의 생육을 억제하기 위하여 Nystatin 1~5μg/ml 혹은 Na-propionate 0.4%를 가하면 효과적으로 곰팡이만 제거할수 있다.

#### 3) 방선균의 배양

방선균의 생육 정도는 배지조성 및 배양방법에 따라 상당히 다르다. 또 방선균의 생육이 좋은 조건이라 하여도 유용물질의 생산량이 반드시 많다고도 할 수 없다. 따라서 각 균주의 특성에 따라 배양조건을 확립치 않으면 안된다.

일반적인 방선균 액체배양을 위한 기본배지로는 soluble starch 10g, glucose 20g, Bacto soytone 25g, Beef extract 1g, yeast extract 4g, NaCl 2g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.05g, 증류수 1ℓ, pH7.3으로 조절된 배지를 많이 사용한다.

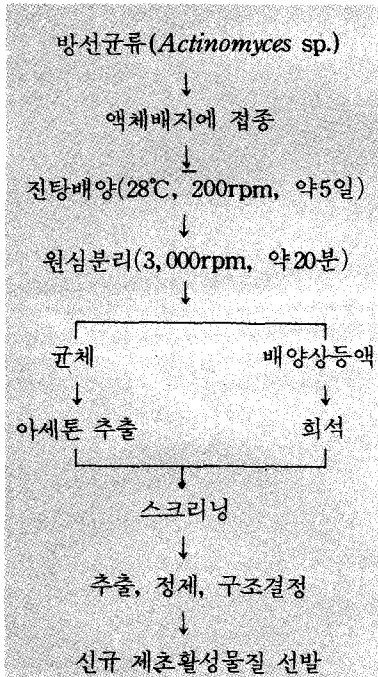
배양 용기 및 방법은 통기성이 양호한 조건으로 하고 28°C~30°C에서 4~5일간 배양한다. 배양이 끝나면 배양액은 3000rpm에서 20분간 원심분리하여 상등액은 직접, 균체는 보

통 아세톤(acetone)으로 추출후 아세톤을 증발시켜 사용한다. 이상과 같은 방선균의 분리, 배양에 의한 신규 제초활성물질의 선발과정을 그림1에 나타냈다.

## ② 분리·선발 방선균의 항균력 조사

앞에서 분리 배양한 각 균주들은 먼저 각종 항생물질의 생산능력을 확

그림 1. 방선균 배양에 의한 제초활성물질의 선발과정



인하기 위하여 paper disk method 를 이용하여 1차로 항균활성범위(spectrum)를 조사한다. 항균활성범위 조사를 위한 공시균주는 표2와 같이 그람양성균, 그람음성균, 효모, 곰팡이 및 크로레라 등을 대상으로 조사하며, 필요하면 공시균주를 바꾼다.

## 항균 활성 범위 조사 결과로 제초활성물질 신규성 여부 판단

조사 방법은 다음과 같이 실시한다. 즉 표2에 나타난 공시균주를 각각의 최적 조건에서 배양한다. 별도로 nutrient agar배지를 멸균후 45~50°C로 식힌 다음 공시균주를 약 0.2~0.5% 되도록 각각 섞고 petri-dish에 20ml씩 분주한다. 여기에 방선균 분리 균주의 배양 상등액을 filter paper disk(8mmφ)에 약 40μl 씩 흡착시켜 일정한 간격으로 놓은 후 배양한다. 배양후 공시균주의 생육저지환이 나타나는지의 여부를 확인하여 항균활성범위를 조사한다. 이와같은 항균활성범위 조사결과는 제초활성물질의 신규성 여부를 판단하는데 중요한 지표가 된다.

## ③ 제초활성물질의 스크리닝 방법

제초활성물질을 스크리닝 하는 방법으로는 종자발아 검정법, whole plant 검정법등 일반적인 스크리닝

표2. 항균력 검정을 위한 공시균주

<b>Gram negative bacteria</b>	
<i>Escherichia coli</i> AB 1157	: AB
<i>Escherichia coli</i> BE 1186	: BE
<i>Salmonella typhimurium</i> TV 119	: TV
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102	: SL
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 13130	: PA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> N-10	: L
<i>Xanthomonas oryzae</i> IFO 3312	: XO
<i>Xanthomonas citri</i> IFO 3781	: XC
<i>Erwinia carotovora</i> IFO 12380	: EC
<b>Gram positive bacteria</b>	
<i>Staphylococcus aureus</i> IFO 12732	: 209
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	: R-209
<i>Mycobacterium phlei</i> IFO 3158	: PH
<b>Fungi</b>	
<i>Alternaria mali</i> IFO 8984	: AM
<i>Colletotrichum lagenarium</i> IFO 7531	: CL
<i>Botrytis cinerea</i> IFO 5365	: BC
<i>Pyricularia oryzae</i> IFO 5994	: PO
<i>Cochliobolus miyabeanus</i> IFO 5277	: OM
<i>Glomerella cingulata</i> IFO 9767	: GC
<i>Rhizoctonia solani</i> IFO 6258	: RS
<i>Aspergillus oryzae</i>	: AO
<i>Aspergillus niger</i>	: AN
<i>Penicillium chrysogenum</i>	: PC
<i>Fusarium oxysporum</i> IFO 9761	: FO
<b>Yeast</b>	
<i>Candida albicans</i> IFO 1594	: CAN
<b>Algae</b>	
<i>Chlorella vulgaris</i>	: CH

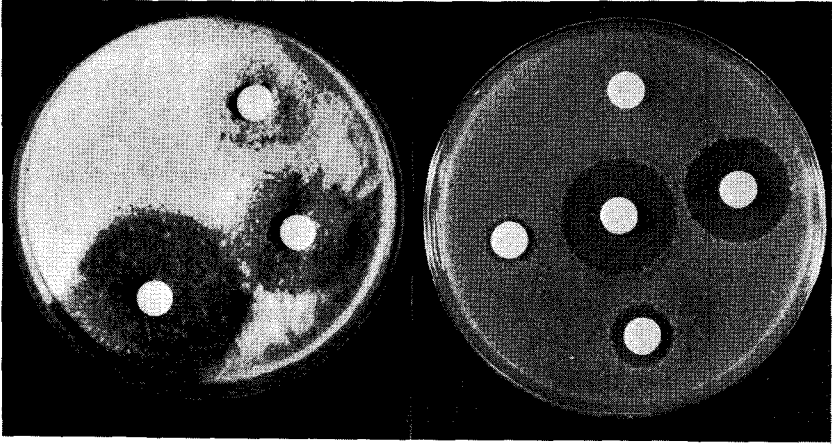


그림 2. Paper disk method에 의한 생육저지환

방법과 광합성 저해물질 또는 단백질 합성 저해물질등 작물의 생리적 특성을 이용한 스크리닝방법 등으로 차별할 수 있겠다. 이들의 대표적인 검정 방법을 요약하면 다음과 같다.

### 가. 종자 발아 검정법

일반적으로 제일 많이 사용되는 검정법이다. Petri-dish에 1~2매의 여지를 깎다음 몇 단계로 희석한 미생물 배양액 약 5ml를 가한다. 화분과 작물이나 광엽작물 혹은 잡초종자를 10~20립씩 놓은 다음 30℃, 광조건 하에서 5~10일간 배양하며 발아정도, 뿌리의 성장정도, 줄기의 신장정도, 작물의 선택독성 유무등을 판단하며 검정한다.

또는 petri-dish에 토양 혹은 석영

사를 채우고 종자를 뿌리의 방향이 일정하도록 나란히 늘어놓은 후 미생물 배양액을 가하여 스크리닝 하는 방법도 이용된다. 이때 petri-dish는 약 15도 정도 경사지도록 놓아 뿌리의 성장정도를 조사한다. 이 방법은 토양에 의한 활성물질의 반응, 분해정도, 완충능력등을 판정할 수 있는 이점이 있다.

### 나. Whole plant 검정법

종자발아 검정법에서 제초활성을 갖는 것으로 판정된 배양액은 whole plant를 이용하여 살초효능 검정을 실시한다. 공시작물로 화분과 작물이나 광엽작물, 혹은 잡초를 받아시켜 2~4엽기까지 키운다. 검정하고자 하는 미생물 배양액에 약 0.1%의 tw-

een solution을 가하고 식물체 1주당 2~3ml 정도 분무시킨 후 살초효과가 나타나는지를 판단한다.

일반적으로 살초효능은 식물의 종류, 품종, 식물의 성숙도 등에 따라 증상이 다르게 나타나기 때문에 많은 종류의 작물을 시기별로 공시할 필요가 있다. 또한 배양액을 분무할 경우에도 지상부, 지하부에 단독 또는 동시에 처리함으로써 제초활성물질의 살초능력의 회복성 여부, 식물체 내에서의 이행경로 등을 확인할 수 있다.

#### 다. 수경 및 사경검정법

제초활성물질의 효력을 좀더 확실히 확인하고 스크리닝하기 위하여는 수경(水耕) 및 사경법(砂耕法)을 이용한다.

수경법은 수경액면에 고운 망을 설치하여 종자를 놓고 발아시키며 미생물 배양용액을 경엽에 흡수시켜 살초활성의 유무를 검정하게 되는데 버나 논잡초를 이용하는데 적합하다.

한편 사경법은 0.5~2mm의 석영사 혹은 석영사와 버미큐라이트를 1:1의 비율로 섞은 것을 소형 pot에 충전하고 종자를 파종하여 선발한다. 제초활성물질에 따라 토양에 검정용액을 살포하거나, 식물체가 어느 정도 생육되었을 때 경엽에 직접 살포 후 고사 유무를 조사하여 판정한다.

#### 라. TSA배지 이용법

제초활성물질 생산균주를 비교적 간단히 스크리닝하는 방법중 TSA (toxin screening agar)배지를 이용하는 방법도 있다. TSA배지조성은 glucose 10g, molasses 20g, bacto pepton 5g, agar 15g, 증류수 1ℓ, pH7.0으로 공시균주나 작물의 생육에는 전혀 저해를 나타내지 않는다.

TSA배지를 멸균 petri-dish에 부어 굳힌후 공시 방선균을 1cm 넓이로 streak하여 28°C에서 약 2주간 배양한 다음, 표면살균한 종자를 agar에 부분적으로 삽입한다. 그 후 28°C에서 다시 1주일 정도 배양하며 종자의 발아 및 생육정도를 조사한다. 대조구에 비하여 종자의 발아 혹은 생육의 저해 정도가 60% 이상을 나타내는 균주를 제초활성물질 생산균주로 판정한다.

한편 광합성계는 식물에만 존재하는 작용기작이기 때문에, 인체에나 동물에는 독성을 나타내지 않고 식물에만 선택적으로 발현하는 제초활성물질의 선발에 이용된다. 광합성 저해물질의 탐색방법으로는 엽록소(chlorophyll) 합성 및 전분합성 저해물질의 스크리닝, oxygen evolution 측정 등에 의한 스크리닝법 등이 알려져 있다.

### 마. 엽록소 합성 저해물질의 스크리닝

미세조류의 일종인 *Scenedesmus obliquus*를 표3과 같은 액체 배지에 접종하고 암조건하에서 6일동안 배양한다. 배양후 동일배지로 적당하게 희석하여 소량의 방선균 배양액과 함께 petri-dish에 가하여 27°C 광조건하에서 약 18시간동안 배양한다. 배양액은 즉시 hot methanol로 추출, 665nm의 흡광도에서 새로 합성된 엽록소를 정량함으로써 엽록체형성 저해유무를 판정하여 스크리닝한다.

표3. *Scenedesmus* 속의 배지조성

화 합 물	함유량(g/l)
glucose	5.0
yeast extract	2.5
KNO <sub>3</sub>	0.808
NaCl	0.460
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ·12H <sub>2</sub> O	0.358
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.468
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.015
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.246
Arnon's 미량용액	1ml

### 바. 전분 합성 저해물질의 스크리닝

공시하고자 하는 작물 혹은 잡초를 온실에서 약 10일 정도 생육시킨다. 그 후 작물을 25°C 암조건으로 옮겨 약 12시간 방치하여 작물체내의 전분

함량을 전부 소비시킨다. 전분이 전부 소비된 작물의 2번째 경엽을 채취하여 5mm크기의 조각으로 자른 후 petri-dish에 옮긴다. pH6.5로 조절된 0.01M potassium phosphate 완충용액과 0.01% tween20 용액으로 1/10로 희석시킨 배양액을 가하여 25°C 14Klux 광조건하에서 16시간 방치후 엽절편을 꺼내 hot methanol에 추출 색소를 제거한 후 0.2% iodine과 2% potassium iodide 용액으로 발색시켜 전분합성 저해여부를 검정한다.

### 사. oxygen-evolution 측정에 의한 스크리닝

*Scenedesmus obliquus*균주를 0.5% glucose, 0.25% yeast extract가 함유된 기본배지에 접종하고 27°C 암조건에서 6일간 배양한다. 배양액은 50mM HEPES용액으로 2회 세정후 같은 용액으로 agal cell이 5mg dry-weight/ml가 되도록 현탁시킨다. 이 현탁액 2ml와 200mM NaHCO<sub>3</sub> 200μl를 반응용기에 넣고 알루미늄 film으로 싼 후 잘 혼합한다. projector lamp(150W, 40Klux) 하에서 광합성을 개시, membrane-coated oxygen electrode를 이용하여 oxygen evolution비율을 측정한다. 대조구의 광합성율은 보통 220~280 nmol oxygen evolution/mg cell/hr를 나타낸다. 광합성 저해정도는



약  $20\mu\text{l}$ 의 시료를 가하여 전, 후의 oxygen evolution치로 나타낸다. 이때 agar cell 대신에 cotyledon disc를 사용하여 oxygen evolution을 측정, 제초활성물질을 생산하는 균주를 스크리닝할 수도 있다.

#### 아. Antimetabolite의 스크리닝

공시균주로 *Serratia* sp. 또는 *Bacillus subtilis*를 배양한 후 일정량의 배양액을, 기본배지에 glutamine 등과 같은 metabolite를 첨가시킨 agar배지에 넣는다. 한편 paper disc를 미생물 배양액에 적셔 agar배지 위에 놓고  $35^{\circ}\text{C}$ 에서 하룻밤 배양한 다음 paper disc에 의한 생육저지환을 비교한다. metabolite를 첨가시킨 agar배지 상에서는 저해효과를 나타내지 않고 기본 agar배지상에서만 저해효과가 있는 미생물을 제초활성물질 생산균주로 판정하여 스크리닝한다.

이상으로 미생물에 의한 신규제초활성물질의 스크리닝방법을 알아 보았다. 토양방선균으로부터 신규 제초활성물질 탐색연구의 승패여부는 간편하면서도 독특한 스크리닝 방법의 개발이 무엇보다도 중요하다고 할 수 있다. 앞에서 설명한 몇가지의 기본적인 스크리닝방법을 응용하여 새로운 스크리닝방법을 개발한다면 유용한 제초활성물질의 탐색이 가능할 것이다. 또는 식물체내에만 존재하는 특이한 효소(enzyme)의 저해제(inhibitor)를 찾음으로써 안전성이 높은 제초제의 개발에도 주력해야 될 것이다.

미생물 대사산물을 이용한 제초활성물질의 탐색연구는 선진 각국에서도 비교적 최근부터 연구가 시작되었기 때문에 국내에서도 이제부터라도 연구가 본격적으로 진행된다면 충분한 국제경쟁력이 있으리라고 생각된다.

화합하여 더욱 안정  
단합하여 힘찬 전진