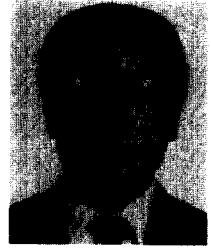


우수균주 개발의 최적화

한국과학기술연구원 유전공학센터 **오 태 광**



최근, 시장개방과 물질특허제의 도입으로 인하여 신규활성물질의 개발에 대한 국가적 요구가 증대함에 따라, 이 방면에 대한 연구투자가 증가하고 있다. 하지만 연구사업 자체가 장기적인 목표로 하는 물질이 식품, 의약, 농약 등의 모든 분야를 포괄하는 다양성 때문에 현재까지 우리나라에서는 주로, 국가주도 연구기관, 또는 대학에서 연구되어 왔고, 연구과제의 중요성에 비하면, 연구경험과 연구인원 및 장비가 부족한 실정인바 여기에 대한 국가사회적 더 많은 배려가 요구된다. 생리활성물질에는 새로운 식품자원, 첨가물 등의 식품계통, 항생물질, 항암물질, 생리조절물질, 면역조절물질, 혈액순환조절제 등의 의학계통, 살균제, 살충제, 식물성장조절제, 사료첨가제 등의 농업계통으로 대별되지만, 근래에 와서 그 적용 및 응용범위가 biopolymer, biomedical 등 재료부문까지 확대되고 있고, 신규물질의 탐색방법에도 미생물 대사산물만 이용한다 할지라도 Screening, chemical modification, biotransformation, interspecific protoplast fusion 및 gene choning 방법(Crueger 등 1984) 등이 소개되고 있어서 생리활성물질의 우수균주를 개발하기 위한 탐색의 최적화를 일반화시키기는 어려운 과제이다. 일반적으로 미생물자원에서 신규활성물질을 탐색하는 과정은 토양, 담해수, 동식물 등으로부터 목적미생물 선발, 미생물 배양, 생리활성 검정, 정제 및 결정화, 신규성 확인, 물질구조 결정, 안정성 및 임상시험 등의 순에 따라 바꾸어 실시하기도 한다. 하지만, 이와 같은 탐색과정의 단계에서 일상적이고 보편적으로 탐색한다면, 이미 선진국에서 많이 탐색된 분야이기 때문에 신규생리활성물질을 찾을 수 있는 확률이 그만큼 낮아진

다. 따라서, 우리는 선진국이 갖지 않은 자원과 idea를 이용하여 새로운 탐색방법을 개발하여 우리 고유의 우수균주 개발의 최적화 방법을 정립시키는 일은 시급한 실정이다. 우수균주 개발의 최적화는 포함되는 생리활성물질이 전술한 바와 같이 다양하고, 아울러 각기 생리활성에 대한 탐색방법도 상이하기 때문에 본고에서는 한국과학기술원, 유전공학센터, 미생물자원실에서 3여년간 행했던 토양방선균으로부터 농용살균제 탐색과 의약품 효소저해제 탐색을 근간으로 기술하고 기술범위는 미생물 Screening을 중심으로 대상물에서 미생물 선발, 배양을 통한 선발, 선발시험 방법 및 신규성 확인 등의 순으로 검토하겠다.

1. 대상물에서 미생물 선발

생리활성역가를 가진 목적미생물을 얻기 위해서는 토양, 담해수, 동식물, 사막 및 유전 등의 대상물의 물리화학적 특성이 다른데서 시료를 채취하는 방법과 물리화학적 특성이 같은 지역일지라도 온도, 계절, 주위 식생 등의 환경인자가 다를 때 채취하는 방법으로 대별되는데, 대부분의 시료 채취는 지역적인 위치가 다른 물리화학적 특성의 차를 이용했다. 환경인자를 달리한 시료채취는 같은 지역이라도 식물 형성군이 다른 장소에서 토양을 채취하거나 동일한 식물체 근처의 토양이라도 계절에 따른 채취 등은 예를 들 수 있고 식물과 관련된 방선균 채취의 예로는 Baiting technique(Demain 등, 1986)을 들 수 있는데 이 방법은 식물체 옆면 뒤에 배양액이 포함된 유리관을 붙여둠으로서 식물과 관련된, 또는 식물의 연령에 따른 미생물을 선정할 수 있는 방법이다. 이와 같은 방

Table 1. Number of actinomycetes produced by selected actinomycete taxa*

Genus	1974		1984		Genus	1974		1984	
	No	%	No	%		No	%	No	%
<i>Streptomyces</i>	1974	94.04	3477	82.84	<i>Streptosporangium</i>	7	0.33	0.62	
<i>Micromonospora</i>	41	1.95	269	6.41	<i>Actinosynnema</i>	0	0.00	25	0.60
<i>Nocardia</i>	45	2.14	107	2.55	<i>Dactylosporangium</i>	0	0.00	19	0.45
<i>Actinomadula</i>	0	0.00	51	1.22	<i>Streptoalloteichus</i>	0	0.00	14	0.33
<i>Actinoplanes</i>	6	0.29	95	2.26	<i>Faenia</i>	2	0.09	7	0.17
<i>Streptoverticillum</i>	19	0.91	64	1.52	<i>Microbispora</i>	4	0.19	6	0.14
<i>Saccharopolyspora</i>	0	0.00	33	0.79	<i>Thermonospora</i>	1	0.05	4	0.11

*from Berdy (1984)

법을 이용해서 우리나라의 특용 작용 또는 고유작물 근처의 미생물의 선발도 좋은 방법으로 사료된다. 채취하는 시료의 양이 많은 때는 냉장한 후 동시에 미생물을 분리하는데, 경험에 의하면, 산화환원계통의 미생물을 목적으로 할 때와 또는 방선균을 목적으로 할 때도 장시간 보관하는 산화환원력을 가지는 미생물은 거의 선발할 수 없었고, 방선균의 경우는 spore 을 가지는 방선균만 주로 선발할 수 있어서 우수균주를 선발하기 위해서는 채취 즉시, 배지에 접종하는 방안도 권장 할만한 방법이다. 대상으로 하는 미생물도 대부분은 방선균을 위주로 하는데, Table 1에서와 같이 70년대에는 주로 *Streptomyces* 을 가장 많이 이용했지만, 근래에는 희귀방선균에 대한 관심이 점차 높아져 가고 있는 실정이다. 하지만, Berdy(1984)의 보고에 의하면 총발견 방선균 중 83%가 *Streptomyces* 계통이고 나머지 17% 정도가 희귀방선균인 것으로 보아 아직까지 신규생리활성물질 탐색에는 *Streptomyces* 계통을 탐색하는 것이 확실상 가능성이 높을 것으로 판단한다. 희귀방선균의 경우는 근래에 Athale 등(1981), Willoughby 등(1971), Wakisaka 등(1982), Suzuki 등(1988)에 의해서 Selective media 를 찾는 연구가 진척됨에 따라서 이 방면에 대한 연구가 활성화되었고, 특히, Goodfellow(1988) 등이 Selective media 을 Computer 을 이용해서 formulation 할 수 있게 됨에 따라 희귀방선균을 이용한 신규생리활성물질의 탐색에 관한 연구가 확대되리라 판단한다.

2. 미생물의 배양

선발된 미생물을 목적하는 생리활성여가를 검정할 때는 대부분의 경우 2~3종의 배지를 임의로 선정하여 통상적인 배양을 통해서 여가를 확인하는데, 이 때도, 통상적인 방법 보다는 새로운 방법을 택하면 이미 알려진 균주라 할지라도 새로운 metabolite 를 얻을 수 있는 가능성을 높일 수 있다. 그 예로, 일반적으로 항생제를 생산할 때 phosphate 의 농도가 항생제 생산에 중요한 역할을 하기 때문에 Omura 등(1983)은 phosphate 의 농도를 낮추기 위해서 allophane 계통 물질인 "Kanumatsuchi"을 배지에 첨가하여 phosphate 을 흡착시키는 배지를 사용하기도 했는데, 오히려 고농도의 phosphate 가 함유된 조성으로 배양하여 저농도의 phosphate 에서는 생리활성여가가 없고 고농도의 phosphate 에서 생리활성이 있는 균주를 선발한다면 이미 알려진 균주라 할지라도 신규물질을 찾을 수 있는 가능성이 높으리라 판단한다. 이런 경우, phosphate 이외에, NaCl 등은 사용할 수도 있다. 농약으로 사용되는 항생제의 경우는 polyene 계통은 실제, field 에서는 자외선에 의해서 파괴되기 때문에 in vitro 에서는 강한 역가를 나타내지만 실용화시키는 어려운 물질이기 때문에 배양시킨 후 초기에 선발에서 제외시키는 것이 바람직하다. 이 때는, polyene 이 steroid 계통과 결합하여 농약활성을 나타내지 않기 때문에 초기 배지내에 steroid 계통을 포함시켜 배양하면, polyene 생산균주를 선발에서 제외시킬 수 있

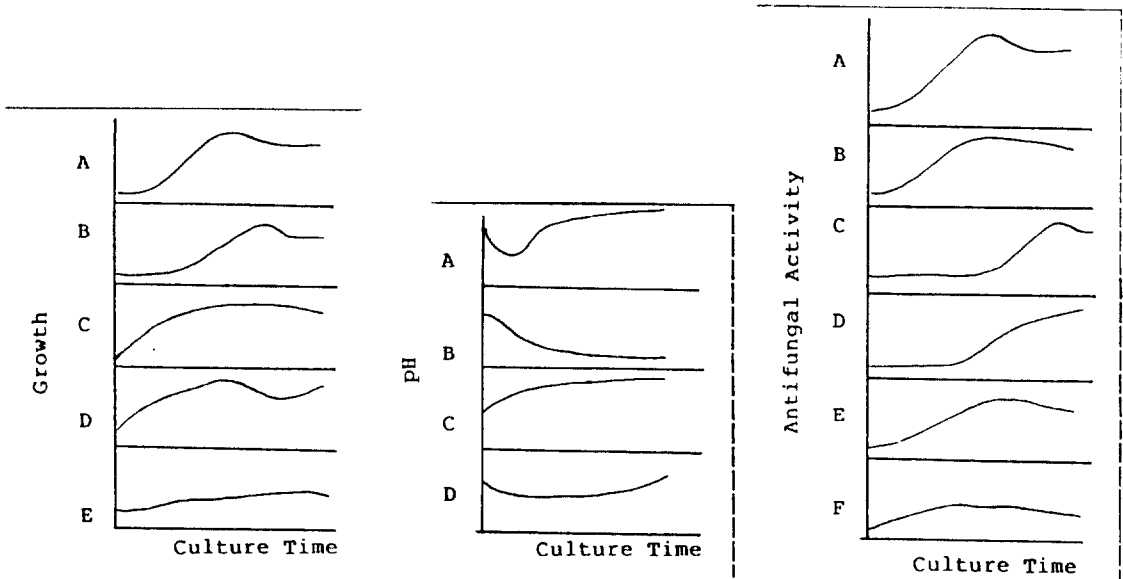


Fig. 1. Pattern of Growth, pH and antifungal activity during culture time.

다. 실제로 토양방선균에서 항곰팡이에 유효한 항생물질 탐색(고, 오 등, 1988) 결과 1차선발된 균주 중 50%가 polyene를 생산하는 균주였다. 또한, 사용되는 배지에 따라 발효 양상이 달라져, 우수균주를 선발하지 못하는 경우가 있는데, 고, 오 등(1989)에 의하면 동일배지에서 50여개의 최종선발 균주를 pH, Growth, 항균역가를 조사한 결과 Fig. 1과 같이 나타났다. 모든 균주를 일정시간 배양한 후 활성을 측정한다면, 배양기간에 따라 활성이 달라서 오히려 우수한 균주를 선발에서 제외시킬 가능성도 있기 때문에 발효초기, 중기, 후기 등의 기간별 점정도 좋은 방안이라 생각된다. Cell growth가 E형태와 같은 경우는 배양조건이 선발된 미생물에 맞지 않기 때문인데 이런 경우는 온도, 배지조건 등을 달리한 방법을 택해 보는 방법을 취할 수 있다. 항생제 생산시 전형적인 pH 변화는 A형태로 나타나는데 B형태와 같이 지속적으로 pH가 저하되어 산성을 나타내는데, 선발시, 통상적인 항생제의 발효양상과 다른 미생물을 탐색해도 좋은 방안이다. 실제로 pH가 B형태로 변하면서 활성을 갖는 균주를 약 5% 정도 선발(고, 오 등, 1989) 할 수 있었다. 이상과 같이, 많은 종류의 균주선발도 중요하지만, 같은 미생물에 대해서 조건에 따른 미생물 생리가 달라지

는 특성을 이용한 우수균주 선발 방법도 고려할 가치가 충분히 있다고 판단한다.

3. 우수균주 선발시험 방법

생리활성의 새로운 측정방법의 개발은 신규물질을 탐색할 수 있는 가능성이 높아지기 때문에 여기에 대한 방법을 많이 개발하고 있다. 새로운 활성 측정 또는 탐색방법은 주로 작용기작을 이용하여, 직접적인 작용부위에 활성화 또는, 저해를 하는 선발방법이기 때문에, 실험방법을 비교적 단순화시킬 수 있어 노동력이 적게 들고, 아울러, 작용부위가 선택적일 경우에는 개발 후, 물질에 대한 어느 정도의 안전성을 보장할 수 있는 장점이 있다. 이런 새로운 시험방법에는 세포벽의 생성저해, 고감수성 시험균 및 효소저해제를 주로 이용해 왔다. Omura(1986) 등은 *Bacillus subtilis*은 세포벽이 있고, *Mycoplasma*은 세포벽이 없는 특성을 이용해서 *Bacillus*에서는 유효하고 *Mycoplasma*에 활성이 없는 균주를 1단계로 선정하고 2차단계로 diaminopimelic acid은 cell wall의 peptidoglycan의 전구체이고 leucine은 단백질 합성에 전구체인 것을 이용해서 bacterium의 macromolecular의 fraction에 diaminopimelic

acid와 leucine의 결합저해 여부를 판단하여 신규항생제를 선별할 수 있었다. 이때, Bacteria에만 활성이 있고 diaminopimelic acid의 결합을 저해하는 특성에서 Azureomycins, AM-5289 등을 발견했고, Bacteria에만 유효하고 leucine 또는 diaminopimelic acid에 결합을 저해하는 Asukamycin, Setomimycin, Vineomycins 등을 발견했고, 마지막으로 Antimycoplasmal antibiotics 역가가 있는 특성에서 Nanaomycins, Frenolicin B, Cervinomycins 등을 발견할 수 있었다. 이와 같이, 특징있는 새로운 선별시험방법은 새로운 생리활성을 다수 발견할 수 있는 지름길임을 알 수 있다. 제초제의 경우는 몇 가지 합성제초제가 식물 조직내에서 glutamic biosynthesis을 저해하여 식물체내에 NH_4^+ 을 축적시켜서 식물체를 죽이는 작용기작을 이용해서 minimal medium에서 *Bacillus subtilis*을 저해하지만, 배지 중 glutamine이 존재할 시는 저해하지 않는 phosalacin을 Takahashi 등(1984)이 발견했다. 이 외에 folate의 metabolism을 이용해서 Murata 등(1985)이 diazaquinomycin을 발견할 수 있었다.

고감수성 시험미생물을 이용하는 방법은 친주를 감수성 높은 미생물로 전환시켜서 저농도의 새로운 생리활성물질을 생산하는 우수균주를 선별하는 방법이다. 일반적으로 이용되는 균주로는 항생제 고감수균주로 *Escherichia coli* BE 1186(친주: *Escherichia coli* AB 1657)와 *Salmonella typhimurium* SL 1102(친주: *Salmonella typhimurium* TV 119)가 그 예로 들 수 있고 이외에, 세포벽이 결실된 균주로는 *Pseudomonas aeruginosa* N-10(친주: *Pseudomonas aeruginosa* IFO 13130), 항생제 내성균으로는 *Staphylococcus aureus* R-209(친주: *Staphylococcus aureus* IFO 12732) 등이 사용되고 있다. 효소저해제에 대한 연구는 발견된 물질에 대한 내성을 나타내는 경우와 활성물질의 작용되는 기작 중의 효소를 이용하는 방법으로 연구되어 왔다. β -lactam계 항생물질인 penicillins이나 cephalosporins은 그 사용빈도가 높아짐에 따라 여기에 내성을 갖는 균주가 발견되었고 발견된 균

주는 β -lactam ring을 파괴하는 β -lactamase(Wise, 1982)를 분비한다는 사실이 밝혀진 후 β -lactamase inhibitor에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 근래에 와서는 치료제, 예방제 등의 약품을 개발하기 위한 연구가 진척되어 왔는데 그 예로는, 비만방지제, 당뇨병 등의 의약품으로 가능성이 높은 glycosidase inhibitor(Yoshikuni, 1988), 염증, 관절염, 폐기종 등에 유효한 proteinase inhibitor(Cole 등, 1988, Ary 등 1988), 항암, 항 virus성 치료제 개발에 protein kinase C inhibitor, reverse-transcriptase inhibitor(Bazzi 등, 1987), 면역조절물질 탐색으로 alkaline phosphatase inhibitor, aminopeptidase inhibitor, esterase inhibitor 등 세포표면에 존재하는 효소의 저해제(Bu/Lock, 1982)를 탐색하였다. 최근에는 AIDS의 치료 및 예방제로 AIDS virus가 host내에서 만들어 내는 aspartic-type proteinase(Seelmeier 등, 1988)와 reverse transcriptase(Mous 등, 1988)의 inhibitor를 이용해서 연구하고 있다. 농약을 탐색하는데 효소저해제가 이용되는 경우는 벼의 도열병(*Pyricularia oryzae*)이 생산하는 chitin 합성 효소의 저해제를 이용(磯野清, 1985)하여 도열병 약제개발, *Candida*, *Aspergillus*에서 유래된 β -1, 3 glucan 합성효소, 또는 Mannan 합성효소를 저해하는 물질의 탐색(田中晴雄, 1987), chitinase inhibitor을 이용한 살충제 농약개발(Somers 등, 1987) 등이 예로 들 수 있다. 이와 같은 효소저해제를 이용하여 선별하는 방법으로는 균주선발 과정에서 배지상에 가시화시키는 방법과 발효액을 검정하는 방법이 있는데, 전자는 배지 자체에 검정하고자 하는 효소의 기질과 효소를 넣고서 저해받지 않은 부분은 투명하게 만들거나 또는, 효소작용을 받은 부분을 발색시키는 방법을 사용해서 효소작용을 저해하는 균주를 선별하게 되고, 후자의 경우는 발효 후, 효소저해도를 직접 검정하는데 근래에는 동시에 많은 량을 처리하기 위해서 isotope을 이용하거나 micro ELISA reader(Somers 등, 1987, Arnold 등, 1986)을 이용하기도 한다. 농약계통을 탐색할 때는 *in vitro* 시험보다는 *in vivo* 시험이 더욱 중요하기

때문에, 초기단계에서 *in vivo* 시험을 거치는 방법을 많이 이용하고 있다. 하지만, *in vivo* 시험은 시험하기에 상당한 시설과 시간이 필요하기 때문에 *in vivo* 시험과 유사한 *in vitro* assay system 개발도 더 없이 중요하다. 그 예로 도열병 방지 농약검색에 배지상에 벼의 잎을 마쇄하여 넣고 검정하는 방법, 벼의 문고병의 경우는 高坂氏變法(田中晴雄, 1987), Validamycin을 개발할 Dendroid 방법(Iwasa 등, 1971)을 들 수 있다. 이와 같은, 작용기작, 고감수성균개발, 효소저해제 및 *in vivo* 유사 *in vitro* assay system 개발에 관한 연구는 기초적인 연구가 이루어져야 가능하기 때문에 신물질개발을 위해서는 이런 분야에 기초연구와 이런 기초연구 결과를 응용한 우수균주 선발작업이 병행해서 이루어진다면 신규생리활성물질을 선발할 수 있는 가능성이 높을 것으로 생각한다.

4. 신규성 확인

선발된 우수균주가 생산한 생리활성물질의 신규성 여부를 판단하는 것은 이 분야를 연구하는 연구자에게 가장 중요한 과정 중 한 가지이다. 신규물질을 목표로 할 때는 Known-Compound의 경우는 빨리 포기할수록 시간을 낭비하지 않는다. Gram 염색이 bacteria을 동정하는 가장 중요한 weight가 있는 parameter로 판단되고 비교적 시험방법이 간단한데 비해서 품질의 경우는 측정해야 될 parameters가 너무 많고 가장 중요한 parameter인 원소분석의 경우는 거의 완전히 정제되지 않았을 때는 큰 의미가 없기 때문에 어려운 점이 많다. 어느 정도 정제한 후, UV Spectrum, IR Spectrum, MS, Melting Point, PMR, CMR, 항생제의 경우, 항균 spectrum을 조사하는 것이 상례이다. UV-spectrum의 경우는 분리된 물질이 갖는 peak 중 extinction coefficient가 제일 큰 peak를 갖는 모든 물질을 조사해 보는 것이 좋을 것 같다. 실제 경험에 의하며, 특허화된 물질이 수록된 내용이 그 당시의 정제기술이 근래에 비해서 미흡해서 부정확한 경우가 있었다. Melting point는 정제도가 낮을수록

낮게 나타나서 정확한 수치를 판단하기 어렵기 때문에, 정제도와 Melting point를 동시에 볼 수 있는 Differential Scanning Calorimeter(DSC)을 이용하는 방법도 좋은 방법이다. 신규성 여부를 확인할 때는 쉽게 얻을 수 있는 모든 data을 동시에 Data base에 검정하여 가능성 있는 모든 물질과 비교해 보는 방법이 신물질을 찾는 최우선의 방법이라고 생각한다. 또한, 분리정제 도중에 PMR, DSC, UV-spectrum IR 등을 수시로 측정하여 정제될수록 사라지는 peak를 확인하여 정제과정 중 진정한 data의 추정과 아울러 정제도를 파악하여 known 물질을 분리정제 하는 시간을 절약하는 것도 우수균주 선발에 중요한 요인으로 판단한다.

이상에서와 같이 우수균주를 선발하기 위해서는 시료채취, 배양, 시험방법 및 신규성 판단 등 모든 여건이 목표로 하는 생리활성물질의 종류, 실험 경험 및 장소에 따라서 유기적으로 결합되어서 효율적인 방법이 각 연구부문마다 최적화될 때 좋은 결과를 가질 것으로 판단된다. 아울러, 전통적인 답습보다는 새로운 방법의 개발응용이 우수균주를 개발할 수 있는 첩경임을 강조하고 싶다. 마지막으로, 본고가 짧은 3여년간 일한 경험과 몇몇 논문을 발췌한 일천한 내용이어서 “우수균주선발의 최적화”란 제목에는 못 미치는 내용이지만, 생리활성물질을 탐색하는 연구자에게 조금이나마 도움이 되었으면 한다.

참고문헌

1. Crueger, W. and A. Crueger: “*Biotechnology*”, Science Tech., Inc., Madison, 5 (1984).
2. Demain, A.L. and N.A. Solomon: “*Manual of Industrial Microbiology and Biotechnology*” ASM, Washington, D.C. (1986).
3. Berdy, J.: *Chin. J. Antibiot.*, 7, 272 (1984).
4. Athalye, M, J., Lecey. and M. Goodfellows: *J. Appl. Bact.*, 51, 289 (1981).
5. Willoughby, L.G.: *Reshwater Biology.*, 1, 23 (1971).
6. Wakisaka, Y., Y. Kawamura, Y. Yasuda, K.

- Koizuma and Y. Nishimoto: *J. Anti biot.*, **35**, 822 (1982).
7. Suzuki, K., K. Nagai, S., Miyazaki and T. Saito: *Actionmycetologica*, **2(2)**, 99 (1988).
 8. Goodfellow, M.: *Actino mycetologica*, **2(1)**, 13 (1988).
 9. Omura, S. and Y. Tanka: "Macrolide", Addison-wesley Pub. Co. (1983).
 10. 김영희, 오태광 : KAIST Report BS N 7022(1)-65-3(1988).
 11. 김영희, 오태광 : KAIST Report BS N 7062(1)-137-3(1989).
 12. Omura, S.: *Microbiological Reviews, Sep. ASM*, 259 (1986).
 13. Takahashi, Y., Y. Iwai and S. Omura: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **30**, 377 (1984).
 14. Murata, M., T. Miyasaka, H. Tanaka and S., Omura: *J. Antibiotics*, **38**, 1025 (1985).
 15. Wise, R.: *J. Antimicrob. Chem other.*, **9**, 32 (1982).
 16. Yoshikuni, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **52(1)**, 1221 (1988).
 17. Cole, T.C., J. Melrose and P. Ghosh: *Biochimica et Biophysica Acta*, **52**, 201 (1988).
 18. Ary, M.R., P.R. Shewry and M. Richadson: *FEBS Lett.* **229(1)**, 71 (1988).
 19. Bazzi, M.D. and G.L. Nelsestuen: *Biochem. Biophysic. Research Comm.*, **146(1)**, 203 (1987).
 20. Bu'Lock, J.D., L.J. Nisbet. and D.J. Winstally: "Bioactive Microbial product" Academy press (London). (1982).
 21. Seelmeier, S., H. Schmidt, V. Turk and K.V.D. Helm.: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **88**, 6612 (1988).
 22. Mous, J., E.P. Heimer and S.F.J. Le Grice: *J. Virology*, **62(4)**, 1433 (1988).
 23. 磯野清 : "抗生物質一新領域展開", 日本農藝化學會編, 朝倉書店, 195(1985).
 24. 田中晴雄 : "抗生物質研究最先端", 現代化學, 16(1987).
 25. Somers, P.J.B., R.C. Yao, L.E. Doolin, M.J. McGowan, D.S. Fukuda and J.S. Mynderse: *J. Antibiotics*, **VXL(12)**, 1751 (1987).
 26. Iwasa, T., Higashide, E. and M. Shibata: *J. Antibiotics*, **24(2)**, 114 (1971).