

Saccharomyces cerevisiae를 이용한 효율적인 호흡저해제 검정법

최경자* · 김진철 · 김홍태 · 조광연

한국화학연구소 스크리닝연구부

요약 : *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하여 효율적인 호흡저해 스크리닝 방법을 개발하고자 실험하였다. *S. cerevisiae*균을 glucose 발효와 미토콘드리아 호흡이 가능한 yeast extract-peptone-dextrose (YPD) 배지와 단지 미토콘드리아 호흡만이 가능한 non-fermentable carbon source-yeast extract (NFY) 배지로 수확하였다. 96-well plate의 각 well에 균 현탁액을 분주한 다음 다양한 작용기작의 46개 살균제를 여러 가지 농도로 처리하였다. NFY배지에서의 non-fermentable carbon source로는 ethanol (NFY-E배지) 및 glycerol (NFY-G배지), lactate (NFY-L배지)를 이용하였다. 접종 후 1~3일 동안 배양한 다음 최소억제농도 (minimum inhibitory concentration, MIC)를 결정한 결과, 4개의 호흡억제 살균제인 azoxystrobin, kresoxim-methyl, metominostrobin, trifloxystrobin은 YPD배지에서 균의 생육을 전혀 억제하지 못하였으나, 세가지 NFY배지에서는 높은 항균활성을 보였다. 이와는 반대로 5개의 N-trihalomethylthio계 살균제는 NFY배지보다 YPD배지에서 높은 활성을 보였다. 그리고 11개 살균제는 두 배지 모두에서 같은 항균활성을 나타내었고, 나머지 26개의 살균제는 모든 배지에서 전혀 항균활성을 보이지 않았다. 그러므로 *S. cerevisiae*와 96-well plate를 이용한 호흡저해제 검정법은 신속하고 편리하게 호흡저해제를 스크리닝할 수 있는 방법으로 여겨진다.(2000년 8월 17일 접수, 2000년 9월 15일 수리)

Key words : Respiration inhibition assay, *Saccharomyces cerevisiae*, non-fermentable carbon source, 96-well plate.

서론

살균제를 개발하기 위한 스크리닝 방법은 초기의 병원균의 생육만을 조사하던 실내 (in vitro) 스크리닝에서 현재 사용되는 온실 (in vivo) 스크리닝으로 변천되었다. 그러나 최근에는 과거의 실내 스크리닝과는 차별적인 식물병원균의 특이적인 작용점에 대해 대량의 화합물의 생리활성을 보다 효율적으로 조사하여 새로운 리드화합물 (lead chemical)을 창출하는 실내 스크리닝 방법이 요구되고 있다 (Corran 등, 1998; Ridley 등, 1998).

Oudemansin과 strobilurin A는 *Oudemansia mucida*와 *Strobilurus tenacellus* 등에 의해 생성되는 항생물질로 매우 다양한 식물병원 진균에 대하여 활성을 나타내고 저농도에서도 살균활성이 우수한 화합물이다 (Baldwin 등, 1996). 이 화합물을 리드 화합물로 하여 합성한 살균제인 strobilurin 계열의 신규 살균제가 1997년 말까지 약 400여개 이상의 특허가 출원되고, Zeneca사의 azoxystrobin 및 BASF사의 kresoxim-methyl이 1998년에, Shionogi사의 metominostrobin이 1999년에 상용화 되었다 (Beautement 등, 1991; Bryant와 Bite, 1999). 그리고 현재에도 전 세계의 신농약 개발 연구자들은 이 strobilurin 계열의 신농약을 개발하기 위하여 무수히 많은 화합물을 합성하고 있다. 그러므로 신속하고 적은 비용으로 이들 화합물의 살균활성을 조사하는 high-throughput screening (HTS) 방법이 요구되고 있다. 이 strobilurin 계열의 살균제들은 호흡저해제인데, 미토콘드리아의 bc_1 complex에 결합하여 전자전달을 방해하여 ATP 생성을 방해하는 작용 메커니즘을 지녔다 (Ypema 등, 1999;

Ammerman 등, 1992; Becker 등, 1981). 기존의 호흡 저해 활성을 조사하는 방법으로는 산소전극을 이용하여 세포에서의 산소소비량을 조사하는 방법과 미토콘드리아를 분리하여 산소소비량을 조사하는 방법 및 spectrophotometer로 340 nm에서의 흡광도를 측정함으로써 미토콘드리아에서 NADH가 산화되는 것을 조사하는 방법 등이 있다 (Natvig, 1982; Billiar 등, 1970; Corran 등, 1998). 그러나 이들 모두 한 시료당 소요되는 시간이 많아서 수 많은 시료의 호흡 저해효과를 조사하는 데는 적합하지 않다.

대부분의 곰팡이는 strobilurin 계열의 화합물에 의하여 생육이 억제되지만, 특이하게 *Magnaporthe grisea*, *Botrytis cinerea*, *Monilinia fructicola*, *Saccharomyces cerevisiae*는 이 살균제에 의하여 호흡이 저해되지 않는다 (Hayashi 등, 1996). *M. grisea*, *B. cinerea*, *M. fructicola*의 경우에는 미토콘드리아의 bc_1 complex에 결합하여 전자전달을 방해하게 되면 alternative oxidase가 활성화되어 우회경로를 통해 호흡이 유지됨이 보고되었다 (Tamura 등, 1999; Mizutani 등, 1995; Mizutani 등, 1996). 그러나 이들과 달리 *S. cerevisiae*는 strobilurin에 의해 미토콘드리아를 통한 호흡이 억제되어도 알코올 발효과정을 통해 ATP를 생산하여 균의 생육이 가능하다 (Chiba 등, 1987). Corran 등 (1998)은 *S. cerevisiae*의 이러한 특성을 이용하여 glucose 대신에 non-fermentable carbon인 glycerol과 lactate를 사용하여 미토콘드리아의 호흡저해 실험을 통해 균의 생육을 억제하는 화합물들을 스크리닝할 수 있다고 하였다.

그러므로 본 실험에서는 알코올 발효경로를 가지고 있어 호흡이 저해되어도 생육이 가능한 *S. cerevisiae*를 사용하여 화합물의 호흡저해 활성을 조사하는 호흡저해제 검정법을 확립하고자 실험하였다. 그리고 이 검정법을 이용하여 기존의 호흡저해제를 포함한 살균제 46종의 호흡 저해 활

*연락저자

성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 약제 및 처리

호흡저해제 스크리닝 방법을 확립하기 위해서 그림 1의 strobilurin계 살균제인 azoxystrobin (methyl(E)-2-[2-[6-(2-cyanophenoxy)pyrimidin-4-yloxy]phenyl]-3-methoxyacrylate), kresoxim-methyl (methyl(E)-2-methoxyimino-[2-(*o*-tolylloxy-methyl)phenyl]acetate)을 사용하였다. 그리고 확립된 호흡저해제 스크리닝 방법을 이용한 46종 살균제들의 호흡저해 활성은 표 1의 살균제로 실험하였으며, 이들은 원제를 사용하였다. 약제는 dimethyl sulfoxide (DMSO)에 용해하여 사용하였으며, 무처리구에는 1%의 DMSO만을 처리하였다.

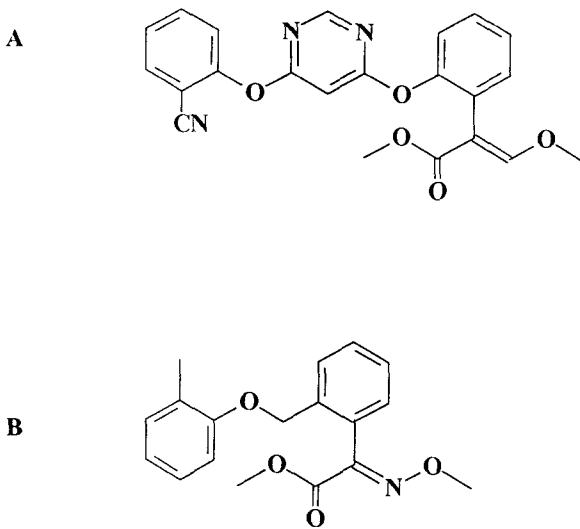


Fig. 1. Chemical structures of strobilurin fungicides azoxystrobin (A) and kresoxim-methyl (B).

사용 균주 및 균 배양

실험에는 생명공학연구소에서 분양받은 야생형 (wild type) *S. cerevisiae* Y-139 균주를 사용하였으며, *S. cerevisiae*는 yeast extract-peptone-dextrose agar (YPDA, yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%, agar 1.5%)에 접종하여 30°C에서 1일 동안 배양한 후 균체를 yeast extract-peptone-dextrose (YPD, yeast extract 1%, peptone 2%, dextrose 2%) 배지, non-fermentable carbon-yeast extract (NFY) 배지인 NFY-G배지 (yeast extract 1%, glycerol 1%), NFY-E배지 (yeast extract 2%, ethanol 1%), NFY-L배지 (yeast extract 2%, lactate 1%)에 수확하여 접종원으로 사용하였다. 이때 접종 농도는 spectrophotometer로 조사하여 600 nm에서의 흡광도가 0.03이 되도록 조정하였다. *S. cerevisiae*는 30°C에서 배양하

였으며, YPD배지는 발효를 촉진하기 위하여 정치배양을 하였고, NFY배지는 150 rpm으로 진탕배양 하였다.

*S. cerevisiae*의 성장 억제효과

모든 실험은 YPD배지와 NFY-E, NFY-G 그리고 NFY-L 배지에서 동시에 실시하였다. 실험농도의 100배 농도로 준비한 각 약제 용액을 96-well plate에 well 당 1 μ l 씩 분주 하였다. 여기에 앞서와 같은 방법으로 각 배지로 수확하여 준비한 *S. cerevisiae* Y-139의 세포현탁액을 multi-channel pipet을 사용하여 well 당 99 μ l 씩 넣어 주고 배양하였다. 호흡저해제 스크리닝 방법 확립을 위한 non-fermentable carbon과 yeast extract의 농도에 따른 약제반응 실험은 azoxystrobin과 kresoxim-methyl을 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ g/ml 농도로, strobilurin계 살균제를 포함한 기존 살균제 46종의 호흡저해 활성은 0.03, 0.16, 0.8, 4, 20, 100 μ g/ml로 실험하였다. YPD배지는 배양 20시간 후에 그리고 NFY-G, NFY-E 및 NFY-L배지 등의 NFY배지는 약 배양 70시간 후에 각 약제의 최소억제농도 (minimal inhibitory concentration, MIC)를 조사하였다. 모든 실험은 4반복으로 실시하였다.

NFY배지의 non-fermentable carbon과 yeast extract 농도에 따른 약제 반응

NFY배지의 yeast extract 농도와 non-fermentable carbon인 ethanol, glycerol 혹은 lactate의 적정 농도를 결정하기 위하여 여러 종류의 NFY배지에서 azoxystrobin과 kresoxim-methyl의 약제 반응을 조사하였다. Yeast extract 0.5, 1, 2, 3%와 glycerol 0.5, 1, 2, 3, 4, 5% 각각의 조합으로 된 NFY-G배지 24종, yeast extract와 ethanol을 같은 방법으로 조합한 NFY-E배지 그리고 yeast extract와 lactate 조합의 NFY-L배지 각각 24종의 배지를 사용하였다. 이들 NFY배지에서 azoxystrobin과 kresoxim-methyl의 MIC를 조사하고 이때 생육 억제 반응이 분명한지를 조사하여, NFY배지의 yeast extract와 non-fermentable carbon인 glycerol, ethanol 및 lactate의 적정 농도를 결정하였다. 모든 실험은 4반복으로 실시하였다.

결 과

NFY배지에서의 non-fermentable carbon 및 yeast extract의 적정 농도

호흡저해제 스크리닝 검정법 확립을 위해 NFY배지에 첨가하는 non-fermentable carbon 및 yeast extract의 농도를 결정하기 위하여 실험하였다. YPD배지에서 azoxystrobin과 kresoxim-methyl은 100 μ g/ml에서도 전혀 *S. cerevisiae* Y-139의 생육이 억제되지 않았으나, glucose 대신 여러 농도의 glycerol, ethanol, lactate와 yeast extract로 구성된 NFY-G, NFY-E, NFY-L 각각 24종 NFY배지에서 azoxystrobin과 kresoxim-methyl은 NFY배지 종류에 관계없이 MIC가 모두 0.1 μ g/ml 이었다 (표 2). 하지만 ethanol이 고농도로 포함된 NFY-E배지에서는 약제 무처리구에서도 균의 생육이 조금 억제되었고, 3-5%

Table 1. Various agrochemicals used in respiration inhibition assay of *Saccharomyces cerevisiae* Y-139

Agrochemicals	Action mechanism
Azoxystrobin	Mitochondrial respiration (blocking electron transfer)
Benomyl	β -Tubulin assembly
Blasticidin-S	Protein synthesis
Carboxin	Mitochondrial respiration (blocking electron transfer)
Captafol	Unknown
Captan	Unknown
Chlorothalonil	Unknown
Dichlofluanid	Unknown
Diethofencarb	β -Tubulin assembly
Dimethomorph	Formation of the Oomycete fungal cell wall
Ferimzone	Unknown
Fluazinam	Mitochondrial oxidative phosphorylation
Fludioxonil	Transport-associated phosphorylation of glucose
Flusilazole	Ergosterol biosynthesis
Flutolanil	Succinate dehydrogenase complex (leading to inhibition of aspartate and glutamate synthesis)
Folpet	Unknown
Fosetyl-Al	Unknown
Hexaconazole	Ergosterol Biosynthesis
Iprobenfos	Phospholipid synthesis
Imazalil	Ergosterol Biosynthesis
Iprodione	Membrane lipid peroxidation
Isoprothiolane	Formation of infection peg or cellulase secretion
Kresoxim-methyl	Mitochondrial respiration (blocking electron transfer)
Mancozeb	Unknown
Mepanipyrim	Secretion of pathogen protein such as cell-wall degrading enzyme pectinase, Uptake by the pathogen of amino acids and glucose
Mepronil	Succinic acid oxidation during metabolic respiration
Metalaxyl	Protein synthesis (ribosomal RNA synthesis)
Metominostobin	Mitochondrial respiration (blocking electron transfer)
Nuarimol	Ergosterol biosynthesis
PCNB (Quintozene)	Unknown
Pencycuron	Unknown
Phthalide	Melanin biosynthesis
Prochloraz	Ergosterol biosynthesis
Procymidone	Membrane lipid peroxidation
Propineb	Unknown
Pyrimethanil	Secretion of pathogen protein such as cell-wall degrading enzyme pectinase, Uptake by the pathogen of amino acids and glucose
Thiophanate-methyl	β -Tubulin assembly
Tolclofos-methyl	Phospholipid biosynthesis
Tolyfluanid	Unknown
Triadimefon	Ergosterol biosynthesis
Trichlamide	Unknown
Trifloxystrobin	Mitochondrial respiration (blocking electron transfer)
Triflumizole	Ergosterol biosynthesis
Triforine	Ergosterol biosynthesis
Validamycin	Unknown
Vinclozolin	Membrane lipid peroxidation

Table 2. Inhibitory effects of azoxystrobin and kresoxim-methyl on *S. cerevisiae* in 72 NFY media

Yeast extract (%)	Glycerol (%)						Ethanol (%)						Lactate (%)					
	0.5	1	2	3	4	5	0.5	1	2	3	4	5	0.5	1	2	3	4	5
0.5	C ^{a)}	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
2	C	C	C	V	V	V	C	C	C	C	C	C	C	C	C	V	V	V
3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	C	C	C	V	V	V	V	V	V

^{a)}In 72 NFY media, MICs of azoxystrobin and kresoxim-methyl were all 0.1 µg/ml.

C: clear response in growth inhibition of *S. cerevisiae*; V: vague response in growth inhibition of *S. cerevisiae*.

의 glycerol이나 lactate가 포함되거나 yeast extract가 3% 함유한 NFY-G, NFY-L배지에서는 두 살균제 모두 0.1~100 µg/ml의 모든 농도에서 미세한 균의 생육이 관찰되었다. 그러므로 NFY-G 및 NFY-E, NFY-L배지에서 glycerol, ethanol, lactate 그리고 yeast extract의 농도는 각각 0.5~2%일 때 두 살균제의 MIC 반응이 가장 분명하였다. 이후의 실험에는 non-fermentable carbon source인 glycerol, ethanol, lactate는 각각 1% 그리고 yeast extract는 1% 혹은 2%로 실험을 수행하였다.

***S. cerevisiae* 생육 억제효과**

확립된 호흡저해제 검정법에 따라 기존 살균제의 호흡저해효과를 조사하기 위하여, YPD배지와 NFY-G, NFY-E 그리고 NFY-L배지에서 *S. cerevisiae* Y-139에 대한 MIC 값을 구하였다 (표 3). 대부분의 살균제는 NFY-G, NFY-E 및 NFY-L 등 3종의 NFY배지에서 비슷한 MIC 값을 보이므로, NFY배지 종류에 따른 *S. cerevisiae*에 대한 항균활성은 차이가 없음을 알 수 있었다. 그러므로 호흡저해제 검정법의 NFY배지로는 NFY-G, NFY-E 그리고 NFY-L배지 모두가 가능하므로 이들 중 하나를 선택하여 사용하였다. 이와는 달리 46종 기존 살균제들은 YPD와 NFY배지에서 다양한 약제반응 차이를 나타내었다.

Strobilurin계 살균제는 YPD배지에서는 100 µg/ml에서도 무처리구와 동일하게 *S. cerevisiae*가 생육하였으나, NFY배지에서는 낮은 농도에서도 높은 생육억제 활성을 보였다. 또한 NFY배지에서는 살균제 종류에 따라 다른 생육 억제효과를 나타내었는데, azoxystrobin, kresoxim-methyl 그리고 trifloxystrobin은 0.03 µg/ml에서 균의 생육을 완전히 억제하였으나 metominostrobin은 0.8 혹은 4 µg/ml의 MIC 값을 보였다. Chlorothalonil, flusilazole, hexaconazole, imazalil, fluazinam, mancozeb, prochloraz, propineb, triadimefon, trichlamide 그리고 triflumizole은 실험한 모든 배지 즉 YPD, NFY-G, NFY-E, NFY-L배지에서 유사한 MIC를 나타내었다.

특이적으로 N-trihalomethylthiol계 살균제인 captafol, captan, dichlofluanid, folpet, tolylfluanid는 호흡저해제와는 반대로 NFY배지에서는 *S. cerevisiae*에 대한 MIC가 20~100 µg/ml이었으나 YPD배지에서는 0.16~0.8 µg/ml이었다. 그러나 benomyl 등 26종의 살균제는 실험한 모든

배지에서 100 µg/ml에서도 균의 생육이 억제되지 않았다.

고찰

Azoxystrobin과 kresoxim-methyl 등을 포함한 strobilurin계 살균제들은 미토콘드리아의 전자전달계중 complex III의 cytochrome bc₁에서 전자전달을 저해하는 메카니즘을 가지는 호흡저해제이다 (Ypema 등, 1999; Ammerman 등, 1992; Becker 등, 1981). 이들의 *S. cerevisiae* 생육 억제효과를 96-well plate에서 NFY배지와 YPD배지를 동시에 사용하여 실험하였을 때, NFY배지에서는 낮은 농도에서도 균의 생육이 완전히 억제되었으나, YPD배지에서는 두 살균제 모두 100 µg/ml 농도에서도 *S. cerevisiae*가 잘 성장하였다(표 3). 이것은 glucose 대신 non-fermentable carbon인 glycerol, ethanol과 lactate를 각각 사용한 NFY-G, NFY-E, NFY-L배지에서는 *S. cerevisiae*의 발효가 억제되고 미토콘드리아에서의 호흡만으로 ATP를 얻어서 균이 생육할 수 있으므로, 0.03 µg/ml의 낮은 농도로 호흡저해 살균제를 처리하여도 호흡이 저해되어 균이 생육할 수 없기 때문이다 (Carlsen 등, 1991). 그러나 YPD배지에서는 *S. cerevisiae*의 발효가 잘 발달되어 호흡저해제에 의해 호흡이 저해되어도 발효과정에서 생성된 ATP로 충분히 생육이 가능하기 때문에 호흡저해제를 처리하여도 균의 생육이 억제되지 않는다고 생각되었다. 따라서 위와 같은 경우, NFY배지에서의 *S. cerevisiae* 생육 억제는 호흡저해 특이적인 생육억제를 나타낸다 (Corran 등, 1998). 그러므로 미지의 화합물이 호흡저해제인지 아닌지 그리고 호흡저해의 정도를 조사하기 위하여는, NFY-G, NFY-E, NFY-L배지 중 하나의 NFY배지 그리고 YPD배지에서 동시에 약제의 *S. cerevisiae* 생육 억제를 조사하여 YPD배지에서는 균의 생육이 억제되지 않고 NFY배지에서만 선택적으로 억제된다면 이 화합물은 호흡저해제라고 판단할 수 있다. 또한 NFY배지에서 *S. cerevisiae* 생육의 억제 정도를 조사하면 미지의 화합물의 호흡저해 활성 정도를 조사할 수 있다. 그 예로 실험한 strobilurin계 살균제 azoxystrobin, kresoximmethyl, trifloxystrobin, metominostrobin 중에 metominostrobin은 NFY배지에서 다른 살균제들에 비하여 높은 MIC를 보여 다른 살균제보다 호흡저해 활성이 낮음을 알 수 있었다 (표 3).

Table 3. MICs of various fungicides on the cell growth of *Saccharomyces cerevisiae* Y-139 in YPD or three different NFY media

Chemicals	Media ^{a)}			
	YPD	NFY-G	NFY-E	NFY-L
Azoxystrobin	>100 ^{b)}	<0.03	<0.03	0.03
Kresoxim-methyl	>100	<0.03	<0.03	0.03
Metominostrobin	>100	4	0.8	4
Trifloxystrobin	>100	<0.03	<0.03	0.03
Captafol	0.16	20	20	20
Captan	0.8	20	20	100
Dichlofluanid	0.8	20	100	100
Folpet	0.8	20	20	20
Tolyfluanid	0.8	20	100	100
Chlorothalonil	0.8	0.8	4	4
Flusilazole	4	4	4	0.8
Hexaconazole	0.16	0.03	0.03	0.03
Imazalil	4	20	4	4
Fluazinam	0.8	0.8	0.8	0.8
Mancozeb	100	100	>100	100
Prochloraz	20	100	20	20
Propineb	4	20	20	20
Triadimefon	20	100	20	4
Trichlamide	20	20	4	20
Triflumizole	4	20	4	4
Benomyl	>100	>100	>100	>100
Blasticidin-S	>100	>100	>100	>100
Carboxin	>100	>100	>100	>100
Diethofencarb	>100	>100	>100	>100
Dimethomorph	>100	>100	>100	>100
Ferimzone	>100	>100	>100	>100
Iprodione	>100	>100	>100	>100
IBP	>100	>100	>100	>100
Isoprothiolane	>100	>100	>100	>100
Fludioxonil	>100	>100	>100	>100
Flutolanil	>100	>100	>100	>100
Fosetyl-Al	>100	>100	>100	>100
Mepronil	>100	>100	>100	>100
Metalaxyl	>100	>100	>100	>100
Neoasozin	>100	>100	>100	>100
Nuarimol	>100	>100	>100	>100
PCNB	>100	>100	>100	>100
Pencycuron	>100	>100	>100	>100
Phthalide	>100	>100	>100	>100
Polyoxin B	>100	>100	>100	>100
Procymidone	>100	>100	>100	>100
Thiophanate-methyl	>100	>100	>100	>100
Tolclofos-methyl	>100	>100	>100	>100
Triforine	>100	>100	>100	>100
Validamycin	>100	>100	>100	>100
Vinclozoin	>100	>100	>100	>100

^{a)}YPD: yeast extract (10 g liter⁻¹), peptone (20 g liter⁻¹), glucose (20 g liter⁻¹); NFY -G: yeast extract (10 g liter⁻¹), glycerol (10 g liter⁻¹); NFY-E: yeast extract (10 g liter⁻¹), ethanol (10 g liter⁻¹); NFY-L: yeast extract (10 g liter⁻¹), lactate (10 g liter⁻¹).

^{b)}Minimum inhibitory concentration, $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Table 4. Response of chemicals in the respiration inhibition assay and their mode of action

YPD	NFY		Mode of action
R ^{a)}	S	→	Mitochondrial respiration inhibitor
S	S/R	→	Non-mitochondrial respiration inhibitor
R	R	→	Unknown

^{a)}R: resistant to the chemical; S: sensitive to the chemical.

Fluazinam은 호흡저해제라고 불리기도 하지만 정확히 표현하면 미토콘드리아 전자전달계의 전자전달을 방해하는 기작이 아닌 ADP의 인산화를 저해하는 uncoupler이다 (Gasztonyi와 Lyr, 1995). 그러므로 NFY배지와 YPD배지에서 동일한 살균활성을 보이리라 예상되는데, 본 실험에서 구축한 *S. cerevisiae*를 이용하는 효율적인 호흡저해제 검정법으로 실험한 결과, fluazinam은 YPD와 NFY배지에서 동일한 살균 활성을 나타내었다 (표 3). 그리고 스테롤 생합성 저해제인 prochloraz, hexaconazole, imazalil 등과 다 작용점 저해제인 chlorothalonil, mancozeb 등은 예상대로 두 배지에서 거의 동일한 억제효과를 나타내었다. 따라서 본 실험에서 확립된 호흡저해제 검정법은 미토콘드리아 전자전달계의 전자 전달을 방해하는 호흡저해제를 효율적으로 선별할 수 있는 우수한 방법이라고 생각된다.

Corran 등 (1998)은 34개 살균제 중 67%가 100 µg/ml 농도에서 *S. cerevisiae*의 성장을 억제하므로 *S. cerevisiae*를 살균제 개발의 모델 균으로 사용하는 것이 적합하다고 하였다. 그러나 전자전달계의 complex II에서 전자전달을 방해한다고 보고된 carboxin은 본 실험의 검정법에서 YPD와 NFY배지 모두에서 100 µg/ml 농도에서도 *S. cerevisiae*의 생육이 억제되지 않았다 (Schewe와 Lyr, 1995; 표 3). 그리고 실험한 46종의 살균제중 26종의 살균제가 두 배지 모두에서 균의 생육을 억제하지 않았다. 이것은 우리의 호흡저해제 검정법이 세포벽을 깨고 미토콘드리아를 분리하여 호흡저해 활성을 조사하는 방법이 아니라 세포 전체의 호흡 특이적인 생육 억제를 조사하는 방법이므로, 화합물이 *S. cerevisiae*의 세포벽을 통과하지 못하여 작용점에 도달하지 못하였거나, 작용점이 달라서 원래부터 *S. cerevisiae*를 억제하지 않기 때문으로 생각된다.

N-trihalomethylthio계 살균제 captafol, captan, folpet, dichlofluanid 및 tolylfluanid 등은 활성 본체인 trihalomethylthio 그룹이 곰팡이 단백질 그리고 조효소와의 반응으로 효과를 나타낸다는 것은 잘 알려져 있으나, 생화학적 작용 메카니즘은 glucose 대사 억제, DNA polymerization 활성 저해, p-nitrophenyl propionate esterase 저해 등이 보고되어 있으며 현재까지 이점이 많은 상태이다 (Montie 등, 1962; Scavetta 등, 1990; Lewis 등, 1978; Siegel, 1971). 본 실험에서 N-trihalomethylthio계 살균제는 strobilurin 살균제와 달리 NFY배지보다 YPD배지에서 더 높은 살균활성을 나타내었다 (표 3). 즉 발효과정은 억제되고 미토콘드리아 호흡만이 이루어지는 배지에서서보다 발효와 호흡이 동시에 일어나는 배지에서 더 높은 살균효과를 나타낸 것이다. 이것은 captan이 *S. pastorianus*

의 glucose 해당과정을 저해한다고 보고한 Montie 등 (1962)의 결과와 일치하는 것으로 앞으로 더 깊은 연구가 되어야 겠다고 사료된다.

결과적으로 미지의 화합물을 DMSO에 용해하여 1 µl 씩 well에 넣고, YPD배지와 NFY배지로 각각 수확한 *S. cerevisiae*를 분주하고 배양한 후 MIC를 조사하는 방법인 본 실험의 호흡저해제 검정법으로 실험하면 약제들은 4종류의 반응을 보인다 (표 4). YPD배지에서는 비감수성이고 NFY배지에는 감수성 반응을 보이면 이는 미토콘드리아의 전자전달을 억제하는 호흡저해제이고, 반대로 YPD에서 감수성이고 NFY에서 비감수성 반응을 보이거나, 두 배지 모두에서 감수성 반응을 보이면 이는 호흡저해제가 아닌 다른 작용점을 가지는 살균제이다. 그리고 두 배지에서 모두 비감수성 반응을 보이면 이는 판단할 수 없는 경우이다. 따라서 본 실험에서 확립한 *S. cerevisiae*와 96-well plate를 이용한 호흡저해제 검정법으로 미지의 화합물을 실험하면 빠르고 간단하게 호흡저해제 여부와 호흡저해 활성정도를 조사할 수 있을 것으로 사료된다.

인용문헌

- Ammerman, E., G. Lorenz, K. Schelberger, B. Wenderoth, H. Sauter and C. Rentzea (1992) BAS 490F-A broad-spectrum fungicide with a new mode of action. Pages 403~410, Proc. Brighton Crop Conf. Pests Dis.
- Baldwin, B. C., J. M. Clough, C. R. A. Godfrey, J. R. Godwin and T. E. Wiggins (1996) The discovery and mode of action of ICIA5504. pp.69~77, in: Modern Fungicides and Antifungal Compounds (ed. H. Lyr, P. E. Russell and H. D. Sisler), Intercept Limited, Andover.
- Beautement, K., J. M. Clough, P. J. de Fraine and C. R. A. Godfrey (1991) Fungicidal β -methoxyacrylates: From natural products to novel synthetic agricultural fungicides. Pestic. Sci. 31:499~541.
- Becker, W. F., G. von Jagow, T. Anke and W. Steglich (1981) Oudemansin, strobilurin a, strobilurin b, and myxothiazole: New inhibitors of the bc1 segment of the respiratory chain with an e- β -methoxyacrylate system as common structural element. FEBS Lett. 132:329~333.
- Billiar, R. B., M. Knappenberger and B. Little (1970)

- Xanthine oxidase for calibration of the oxygen electrode apparatus. *Anal. Biochem.* 36:101~104.
- Bryant, R. and M. Bite (1999) AG Chem New Compound Review, volume 17. Agranova, UK. 126p
- Carlsen, H. N., H. Degn and D. Lloyd (1991) Effects of alcohols on the respiration and fermentation of aerated suspensions of baker's yeast. *Journal of General Microbiology* 137:2879~2883.
- Chiba, M., A. W. Bown and D. Danic (1987) Inhibition of yeast respiration and fermentation by benomyl, carbendazim, isocyanates, and other fungicidal chemicals. *Can. J. Microbiol.* 33:157~161.
- Corran, A. J., A. Renwick and S. J. Dunbar (1998) Approches to in-vitro lead generation for fungicide invention. *Pestic. Sci.* 54:338~344.
- Gasztonyi, M. and H. Lyr (1995) Miscellaneous fungicides. pp.389~414, in: *Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, and Mechanism of action* (ed. H. Lyr), Gustav Fisher Verlag, Jena.
- Hayashi, K., M. Watanabe, T. Tanaka and Y. Uesugi (1996) Cyanide-insensitive respiration of phytopathogenic fungi demonstrated by antifungal joint action of respiration inhibitors. *J. Pesticide Sci.* 21:399~403.
- Lewis, R. A. and D. Brown (1978) The inhibition of nuclear DNA polymerizing activity by captan. *Pestic. Biochem. Physiol.* 8:317~322.
- Mizutani, A., H. Yukioka, H. Tamura, N. Miki, M. Masuko and R. Takeda (1995) Respiratory characteristics in *Pyricularia oryzae* exposed to a novel alkoxyiminoacetamide fungicide. *Phytopathology* 85:306~311.
- Mizutani, A., N. Miki, H. Yukioka, H. Tamura and M. Masuko (1996) A possible mechanism of control of rice blast disease by a novel alkoxyiminoacetamide fungicide, SSF126. *Phytopathology* 86:295~300.
- Montie, T. C. and H. D. Sisler (1962) Effects of captan on glucose metabolism and growth of *Saccharomyces pastorianus*. *Phytopathology* 52:94~102.
- Natvig, D. O. (1982) Comparative biochemistry of oxygen toxicity in lactic acid-forming aquatic fungi. *Arch. Microbiol.* 132:107~114.
- Ridley, S. M., A. C. Elliott, M. Yeung and D. Youle (1998) High-throughput screening as a tool for agrochemical discovery: automated synthesis, compound input, assay design and process management. *Pestic. Sci.* 54:327~337.
- Scavetta, R., D. Chu, J. Gosar, R. Siedel, J. Hoyt, K. Schegg and W. Welch (1990) Captan produces differential, *in vivo* inhibition of esterase activity in *Penicillium dupontii* and *Penicillium chrysogenum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 38:81~91.
- Schewe, T. and H. Lyr (1995) Mechanism of action of carboxin fungicides and related compounds. pp.149~161, in: *Modern Selective Fungicides: Properties, Applications, and Mechanism of action* (ed. H. Lyr), Gustav Fisher Verlag, Jena.
- Siegel, M. (1971) Reactions of the fungicide folpet (*N*-(trichloromethylthio)phthalimide) with a thiol protein. *Pestic. Biochem. Physiol.* 1:225~233.
- Tamura, H., A. Mizutani, H. Yukioka, N. Miki, K. Ohba and M. Masuko (1999) Effect of the methoxyiminoacetamide fungicide, SSF129, on respiratory activity in *Botrytis cinerea*. *Pestic. Sci.* 55:681~686.
- Ypema, H. L. and R. E. Gold (1999) Kresoxim-methyl: Modification of a naturally occurring compound to produce a new fungicide. *Plant Dis.* 83:4~19.

Efficient assay for respiration inhibitor using *Saccharomyces cerevisiae*

Gyung Ja Choi*, Jin-Cheol Kim, Heung Tae Kim, and Kwang Yun Cho (*Screening Division, Korea Research Institute of Chemical Technology, Taejon 305-600, Korea*)

Abstract : A rapid assay to determine respiration inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* by chemicals was developed. *S. cerevisiae* was harvested with two different liquid media, yeast extract-peptone-dextrose (YPD) medium capable of occurring both glucose fermentation and mitochondrial respiration, and non-fermentable carbon-yeast extract (NFY) medium capable of occurring respiration only. Wells in 96-well plate were loaded with each cell suspension and various concentrations of 46 fungicides with various modes of action. In NFY medium, the non-fermentable carbon source, ethanol (NFY-E medium), glycerol (NFY-G medium) or lactate (NFY-L medium), was used. After incubation for 1~3 days, minimum inhibitory concentrations (MICs) of the chemicals were recorded in the media. Of the 46 inhibitors employed in this study, four inhibitors of fungal respiration by blockage of electron flux in the mitochondrial respiratory chain, azoxystrobin, kresoxim-methyl, metominostrobin, and trifloxystrobin, exhibited strong antifungal activity in all of NFY media, but no activity in YPD medium. In contrast to this, five *N*-trihalomethylthio fungicides showed much stronger antifungal activities in YPD medium than three NFY media. Eleven fungicides inhibited growth of *S. cerevisiae* in all media and the other 26 fungicides showed no antifungal activity in all media. Thus, our rapid and efficient *in vitro* method can be considered as an alternative assay system for respiration inhibitor.

*Corresponding author (Fax: +82-42-861-4913, E-mail: kjchoi@kriict.re.kr)