

Gibberellic acid를 생산하는 분리주 *Gibberella* sp.의 배양학적 특성

오 영 준*

동신대학교 식품영양학과

Screening of *Gibberella* sp. from the Korean Paddy Field for the Production of Gibberellic Acid and its Cultural Properties

Young-Jun Oh*

Department of Food and Nutrition, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

Abstract — A different form from *Gibberella fujikuroi* was isolated from the paddy field of Naju area. The strain, designated as Y107, was identified as *Gibberella* sp. based on its morphological, physiological, and biochemical characteristics. The highest production of Gibberellic acid by the strain was achieved in a fermentation medium containing corn starch, glucose, soybean oil, soybean meal, NH_4NO_3 , K_2HPO_4 , MgSO_4 and trace elements.

Gibberellic acid(GA_3)은 식물생장조절물질로서 재배작물의 생장을 촉진하고 과수작물의 단위결과를 유도하여 씨없는 과일의 생산을 가능케 하며, 개화 및 결실기를 인위적으로 조절할 수 있다(1).

따라서 화훼재배 및 종자산업에는 필수적인 물질임과 동시에 종자의 휴면을 타파시키는 효과도 커서, 파종시기의 조절은 물론 발아상태를 조절시킬 수 있는 유용한 물질로 알려져 있다(2).

한편 지금까지 Gibberellic acid 생산에 관한 연구에는 대부분이 포도당을 주탄소원으로 한 일반배양 특성 측면에서 연구되어 있으며(4, 5) 전분을 주탄소원으로 이용한 연구는 거의 없으므로 연구에서는 나주지역 논에서 분리한 *Gibberella* sp. Y107을 이용하여 옥수수전분을 주탄소원 사용시 Gibberellic acid 생산에 미치는 배양학적 특성을 검토하여 다음의 결과를 얻었기에 보고한다.

재료 및 방법

균주

균주분리용 토양은 나주지역 경작지 및 도장벼에서 채취하였다. 토양 약 1g을 Table 1의 분리용 배지에서 3단희석 도말 후 28°C에서 7일간 배양하여 선별한 균주를 분리용 액체배지에서 배양 후 Gibberellic acid량을 측정하여 가장 활성이 높은 균주(Y107)를 선별

하였다.

배양배지

최적배지 조성을 설정하기 위하여 Table 2의 기본 배지(10)에 여러 가지 탄소원과 질소원을 첨가하여 배지조성을 검토하였다.

배양방법

Table 1. Isolation medium for starch hydrolysis mold

Ingredients	g/l
soluble starch	4.0
glucose	2.0
soy bean oil	1.0
soy bean meal	1.0

Table 2. Media composition for Cultivation of *Gibberella* sp.

Ingredients	g/l
Glucose	100.0
NH_4NO_3	4.8
$\text{MgSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1.0
KH_2PO_4	5.0
Trace element*	2.0
PH	4.0

*Composed of 0.5% CuSO_4 , 0.1% MnSO_4 , 0.1% ZnSO_4 and 0.01% Na_2MoO_4 .

Key words: Gibberellic acid, *Gibberella* sp.

*Corresponding author

종균배양은 기본배양배지 120 ml을 분주한 500 ml 삼각 flask에 *Gibberella* sp.을 한백금이 접종하여 28 °C, 120 rpm으로 3일간 진탕배양하였다. 삼각 flask를 이용한 본 배양은 3% 종배양액을 접종하여 28°C, 초기 pH 5.0, 180 rpm에서 7일간 배양하였고, 발효조(한국발효기)에서의 배양은 발효조의 총용량 2.5l의 50~60%를 기본배양배지로 채운 뒤 멸균하여 종배양액 5% 부피 비율로 접종하여 초기 pH 4.0, 배양온도 28°C, 교반속도 500 rpm, 통기량 1 vvm으로 7일간 배양하였다.

건조균체량

건조균체량은 배양액 10 ml을 취하여 2,500 rpm (Toyo model, RS-206)에서 20분간 원심분리하고 침전된 균체를 0.1 N-HCl과 증류수로 세척한 뒤 Toyo filter paper로 여과한 후 37°C에서 24시간 동안 건조시켜 무게를 측정하였다.

Gibberellin의 정량(GA³)

Gibberellin의량은 에탄올(10%, v/v)과 14% 염산이 혼합된 액에 Gibberellin이 함유된 배양상등액을 진탕 교반 후 20°C에서 75분간 반응시켜 254 nm에서 흡광도를 측정하였다(3).

결과 및 고찰

선발균주의 당이용성

친균주 *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616과 선발균주 *Gibberella* sp. Y107의 당 이용성을 검토한 결과는 Table 3과 같다.

선발균주는 Glucose, Maltose, Sucrose, Lactose, Glycerol, Inositol, Arabinose, Rhamnose 등에서 친균주인 ATCC 12616과 큰 차이를 보이지 않으나, 전분 이용에 있어서는 친균주보다 월등한 특징을 나타내었다.

Table 3. Utilization of sugar of strain

Sugar	<i>Gibberella</i> sp. Y107	<i>Gibberella fujikuroi</i> ATCC 12616
Glucose	+++	+++
Maltose	++	++
Sucrose	++	++
Lactose	++	+
Glycerol	+	+
Inositol	++	++
Arabinose	+	+
Xylose	+	+
Starch	+++	+
Rhamnose	+	+

+++ : well utilization, ++ : good utilization, + : normal utilization

Table 4. Cultural characteristics of strain

Culture media	strain	growth	sporuration	color of substrate mycelium
Bennets agar	Y107	fair	good	yellow-white
	ATCC12616	fair	good	yellow-white
Peptone-yeast ex. agar	Y107	good	good	yellow-white
	ATCC12616	good	good	yellow-white
Inorganic salt starch agr	Y107	good	good	yellow
	ATCC12616	fair	good	yellow
Tryptone-yeast ex. agar	Y107	good	good	yellow
	ATCC 12616	fair	good	yellow
YEME agar	Y107	good	good	pale-brown
	ATCC12616	good	good	pale-brown
Glycerol-asparagine agar	Y107	fair	none	red
	ATCC12616	fair	none	red
Nutrient agar	Y107	fair	none	white-yellow
	ATCC12616	fair	none	white-yellow
Potato dextros agar	Y107	good	good	red-white
	ATCC12616	good	good	red
Corn meal agar	Y107	fair	none	yellow-white
	ATCC12616	fair	none	yellow-white

Growth, sporuration and color of substrate mycelium were measured by visual estimation

배양학적 특성

분리균주의 배양학적 특성을 조사하기 위하여 여러 가지 고체배지에서 분리균주 Y107 균주와 친균주 ATCC 12616을 28°C 에서 14일간 배양하면서 생육, 기균사의 색깔, 수용성 색소 등의 배양학적 특성을 관찰하였으며, 그 결과는 Table 4와 같다. 분리균주 Y107과 친균주는 Bennets agr 배지, YEME agar 배지, Triptone agar 배지, NA 배지, Corn meal agar 배지에서는 큰 차이점이 없었으나 전분 agar 배지, Glycerol asparagine agar 배지, PDA 배지 현저한 차이점을 관찰할 수 있었다.

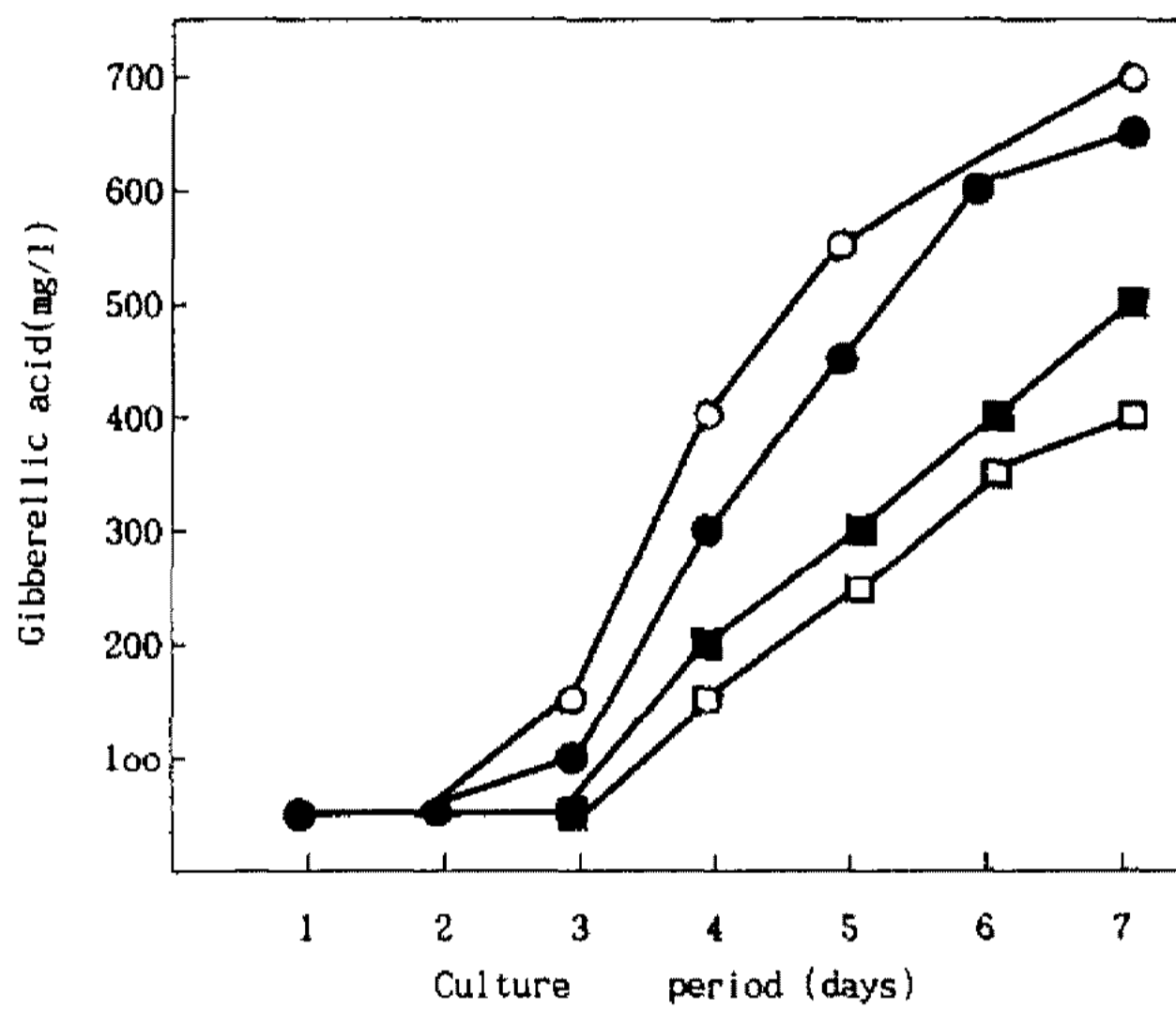


Fig. 1. Effect of temperature on the production of Gibberellic acid by *Gibberella* sp. Y107 in the medium same as in Table 2.
 (●) 26°C, (○) 28°C, (■) 30°C, (□) 32°C

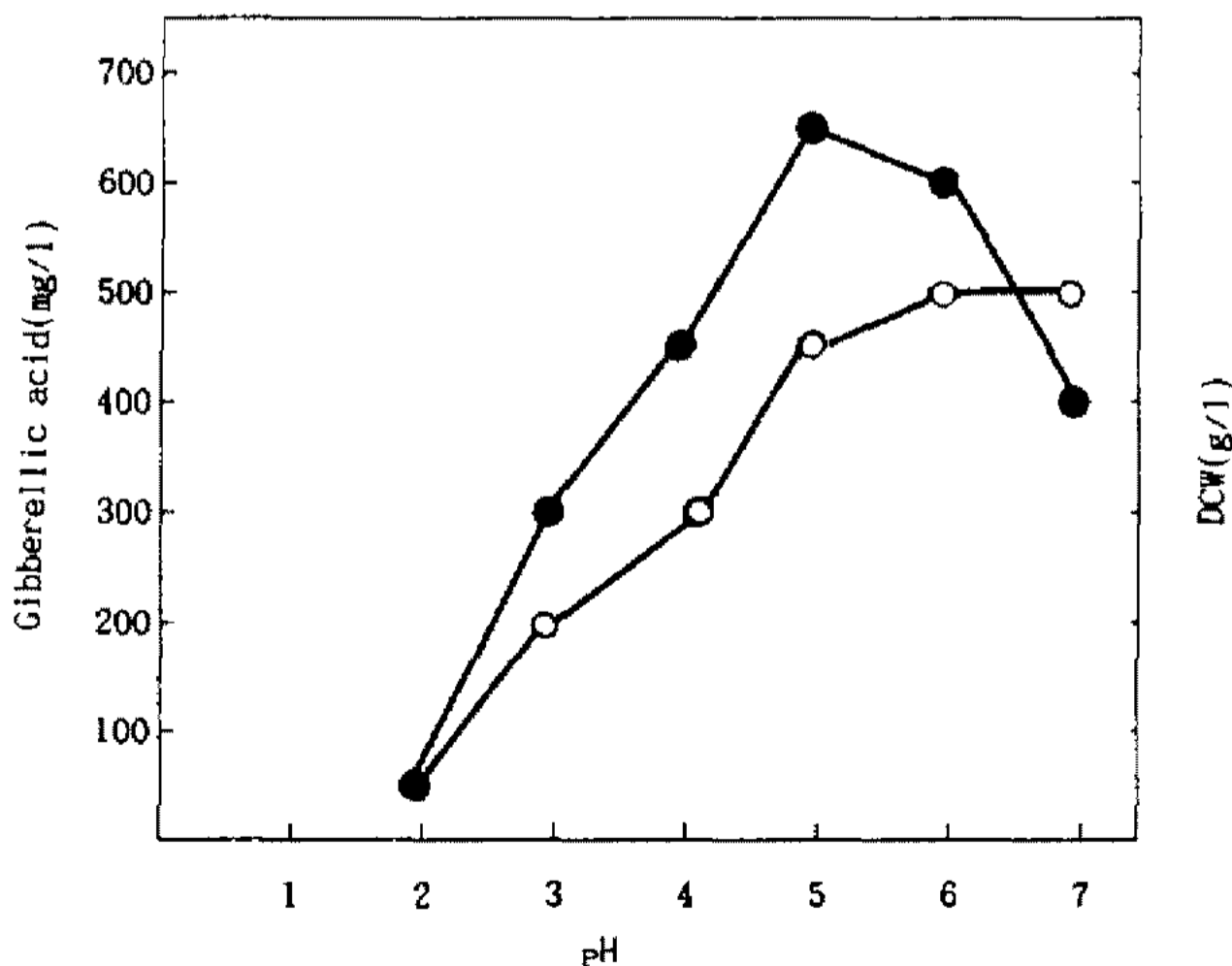


Fig. 2. Effect of initial medium PH on the production of Gibberellic acid in the medium same as in Table 2.
 (●) Gibberellic acid, (○) DCW (g/l)

배양온도에 따른 Gibberellic acid 생산

배양온도에 따른 균체량 및 Gibberellic acid 생산의 변화를 보기 위하여 26, 28, 30, 32°C 에서 각각 7일간 배양하여 본 결과는 Fig. 1과 같다.

Gibberellic acid 생산은 28°C 에서 7일간 배양했을 때가 최고 값에 도달하였다.

초기 pH에 따른 영향

28°C 에서 180 rpm으로 7일간 배양하면서 배지의 초기 pH에 따른 Gibberellic acid 생산 및 균의 생육을 살펴 본 결과는 Fig. 2와 같다. 그림에서와 같이 초기 pH는 5에서 6까지는 균체생육에 큰 차이가 없었으나 그 중에서도 pH 5가 가장 좋았다.

pH 2에서는 전혀 Gibberellic acid를 생산하지 않을 뿐만 아니라 균의 생장도 아주 미약하였다. pH 7에서는 Gibberellic acid 생성은 좋지 않으나 Gibberellic acid 이외에 그 유도체가 생성되는 것으로 사료되었다.

최적배지 조성의 검토

배지성분의 종류와 그 농도에 대한 활성의 변화를 조사한 결과 Y107 균주가 Gibberellic acid를 생산하는 있어서 최적 배지성분을 종합하여 Table 5와 Fig. 3에 나타내었다.

배지조성 A는 본 실험실에서 조합한 것이고 배지 조성 B와 C는 영국특허 838, 032호와 미국특허 3, 681, 196호에 나타난 배지조성을 사용한 것이다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 주 탄소원으로 corn starch를 사용한 배지조성 A가 Gibberellic acid 생산량이 월등히 우수함을 알 수가 있었다. 이것은 배지 A가 soybean oil과 soybean meal의 첨가로 체량이 증대와

Table 5. Media composition for GA production by Y 107 strain

Ingredients (g/l)	Medium		
	A	B	C
Corn starch	120	—	—
Glucose	20	100	100
Cotton meal	—	—	4
Soy bean oil	10	—	—
Soy bean meal	11	—	—
NH ₄ NO ₃	0.3	4.8	—
(NH ₄) ₂ SO ₄	—	—	0.7
K ₂ HPO ₄	5.0	5.0	0.5
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.0	1.0	—
Trace element	2.0	2.0	—

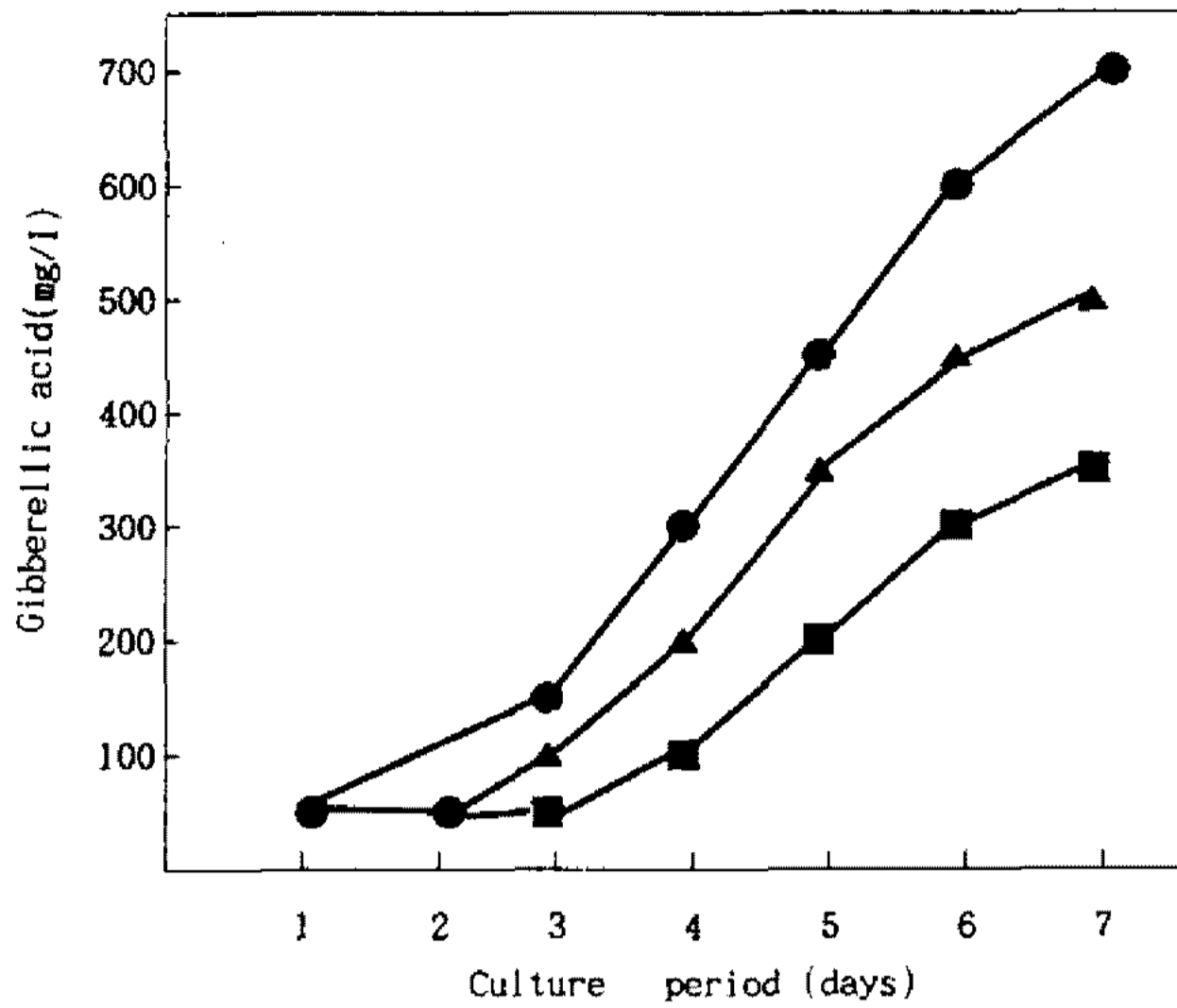


Fig. 3. Effect of memium composition on the production of Gibberellic acid by *Gibberella* sp. Y107. (●) medium A, (■) medium B, (▲) medium C

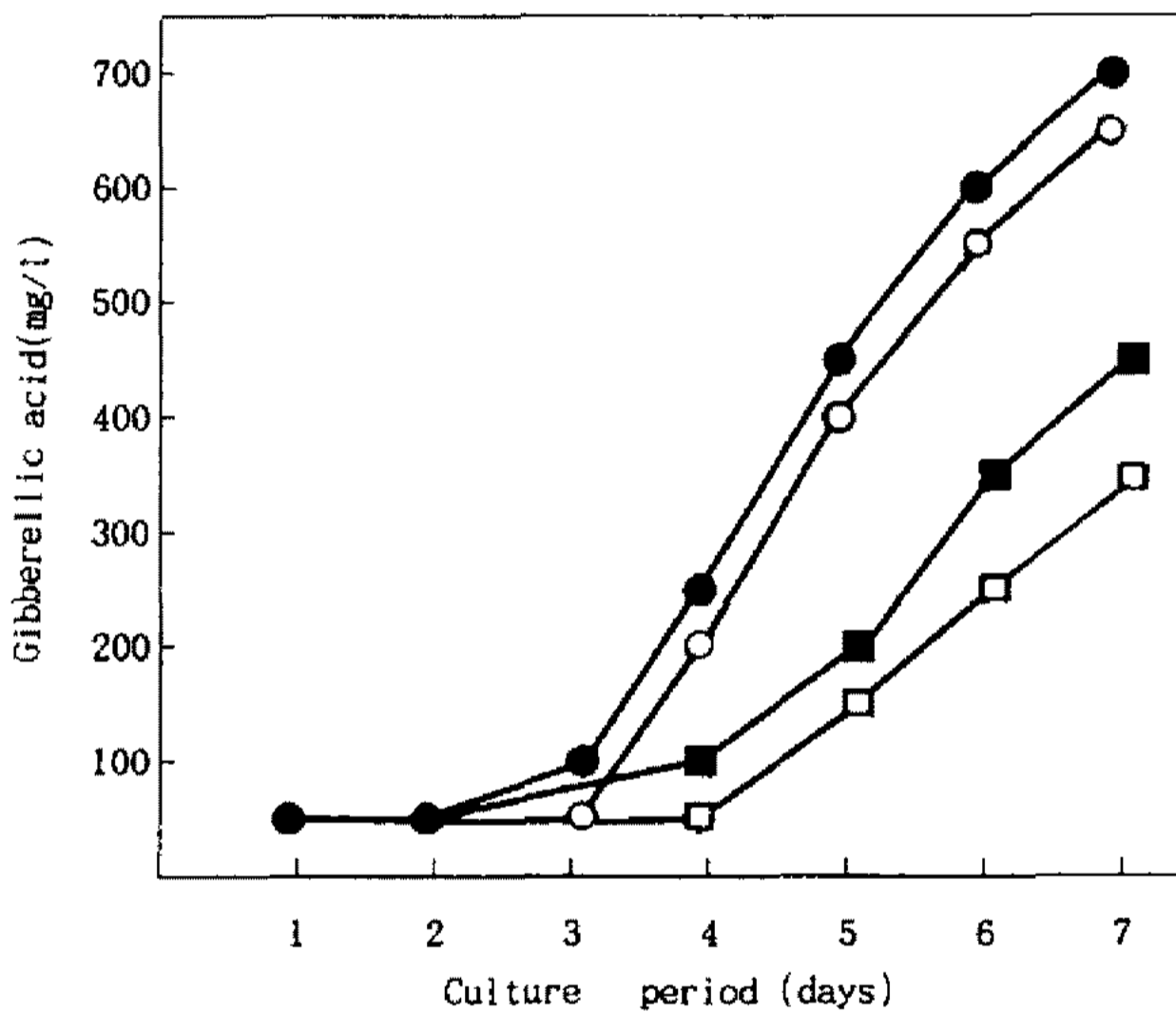


Fig. 4. Effect of corn starch concentratoin on the production of Gibberellic acid by *Gibberella* sp. Y107. (●) 100 g/l, (○), 120 g/l, (■) 150 g/l, (□) 180 g/l

아울러 선발균주의 전분 이용성이 증가하는데서 기인하는 것으로 사료되었다.

전분농도에 따른 영향

전분농도에 따른 GA 생성 변화를 관찰하기 위하여 옥수수전분 농도를 100, 120, 150, 180 g/l로 하여 발효기간에 따라 생성된 GA 량을 측정된 결과는 Fig. 4 와 같다. 전분농도 100, 120 g/l에서의 GA 생성은 매우 흡사한 양상을 보였으나 150, 180 g/l에서는 현저하게 수율이 감소하는 경향을 보였다.

요 약

토양 시료로부터 순수분리한 Gibberellic acid 생산성을 나타내는 균주 *Gibberella* sp. Y107을 선별하였다. 분리주 *Gibberella* sp. Y107은 친균주 *Gibberella fujikuroi* ATCC12616과 비교하여 불 때 고체배지상에서 전분이용성이 특이하게 높은 것으로 관찰되었다. 이 균주를 액체배지에서 발효시키면 주 탄소원으로 corn starch를 사용시 다른 보고된 배지조성보다 높은 생산성을 나타내었으며 초기배지 pH와 온도는 각각 pH 5.0, 28°C 조건이 가장 좋았다.

참고문헌

1. Jefferys, E.G. 1971. The gibberellin fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* **13**: 283-323.
2. Vass, R.C. and Jefferys, E.G. 1979. Gibberellic acid. In: Rose, A.H., *Economic microbiology: Secondary products of metabolism vol. 3.* Academic Press, New York, Pp. 421-435.
3. Holbrook, A.A., Edge, W.J. and Bailey, F. 1961. Spectrophotometric method for determination of gibberellic acid. *Adv. Chem. Series.* **28**: 159-167.
4. Demain, A.L. 1986. Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure Appl. Chem.* **58**: 219-226.
5. Brückner, D., Blechschmidt, D., Schubert, B. 1989. *Fusarium moniliforme* SHELDT: a fungus producing a broad spectrum of bioactive metabolites. *Zentralbl. Bacteriologie.* **144**: 3-12.
6. Borrow, A., Brown, S. and Jefferys, E.G. 1964. Metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol.* **10**: 407-444.
7. Kumar, P.K.R. and Losane, B.K. 1989. Microbial production of gibberellins: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* **34**: 29-139.
8. Martin, C.G. 1983. The biochemistry and physiology of gibberellin. In: Crozier, A. (ed) *Gibberellins*, vol. 2. Praeger Publishers, New York, Pp. 395-411.
9. Lin, J.T., Stafford, A.E. and Steffens, G.L. 1991. Identification of endogenous Gibberellins in immature apple seeds. *Agric. Biol. Chem.* **8**: 2183-2185.
10. Kumar, P.K. and Losane, B.K. 1990. Solid state fermentation: Physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. *Appl. Microbiol. Biotech.* **34**: 145-148.
11. Brückner, B. and Blechschmidt, D. 1991. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Appl. Microbio.* **35**: 646-650.
12. Bu'Lock, J.D., Detroy, R.W., Hostalek, Z., Munim-Al-Shakarchi, A. 1974. Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Trans Br. Mycol. Soc.* **62**: 377-389.

(Received 8 November 1994)