

지베렐린 생산에 관한 연구

이영선 · 손형진 · 김익환 · 민태익

한국과학기술원 미생물연구실

(1983년 8월 18일 접수)

Studies on the Production of Gibberellic acid

Yeong Seon Lee, Hyeong Jin Son, Ik Hwan Kim,

Tae Ick Mheen

Korea Advanced Institute of Science and Technology, Seoul, Korea

(Received August 18, 1983)

By the treatment of *Gibberella fujikuroi* I-892 with mutagen such as UV light and N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, a mutant *G. fujikuroi* G-471 was selected as the highest producer of gibberellic acid among 800 mutant strains. It showed 30% increase of production yield compared with that of the parent strain.

At optimum medium composition (saccharose 1.0%, ammonium tartarate 50mM, malt extract 1.0% KH_2PO_4 0.5%, MgSO_4 0.5%, FeSO_4 0.0002%, trace element sol. 0.002% (v/v), the yield of submerged culture increased by 30% after 7 days culture at 24°C (253mg/l).

In submerged culture, the initial pH showed much effects on the increase of gibberellic acid production. The highest yield of the production was attained with pH adjustment to 4.0 at the initial stage of fermentation.

지베렐린(Gibberellin)은 식물의 생장, 개화, 종자발아 및 휴면각성을 촉진하는 식물생장 조절 물질로^{1,2)} 지베렐린 A₃가 그 대표적인 구조를 갖고 있다.

지베렐린은 Ascomycetes에 속하는 *Gibberella fujikuroi*의 대사산물로서 처음 분리되었는데, 이 균은 Kurosawa³⁾에 의해 벼의 키다리병(bakanae disease)의 원인으로 처음 발견되었으며, 지베렐린에 대한 연구로는 *G. fujikuroi*의 배양 여과액을 벼의 묘에 처리하면 현저한 생장촉진을 가져온다는 관찰에서 시작되었다⁴⁾

현재 곰팡이와 고등식물로부터 분리된 지베렐린은 51종(GA₁~GA₅₁)에 이르고 있으며, 이 중 GA₂, GA₁₀₋₁₆, GA₃₆, GA₄₀₋₄₂, GA₄₇의 13종은 *G. fujikuroi*에서만, GA₅₋₆, GA₈, GA₂₆₋₃₅, GA₃₈₋₃₉, GA₄₃₋₄₆, GA₄₈₋₅₁의 29종은 고등식물에만 존재하며 나머지 8종은 *G. fujikuroi*와 고등식물 모두에서 분리되고 있다⁵⁾. 이들 지베렐린 중에서 gibberellic acid (GA₃)가 식물의 생장 촉진 물질로서 가장 널리 쓰이고 있다.

본 연구에서는 지베렐린의 국내생산을 목표로 우수 지베렐린 생산 균주를 선별 개량하고 몇가지

배지 및 발효조건을 검토하였기에 보고한다.

실험재료 및 방법

균주 및 배지 조성

본 실험에서 사용한 균주는 *G. fujikuroi* ATCC 12616, *G. fujikuroi* ATCC 14614, *G. fujikuroi* I-892이며, 이들 균주는 potato-dextrose agar에서 2~3일간 24°C에서 배양한 뒤 4°C에서 보존하였다.

지베렐린 생산에는 Table 1의 배지를 사용하였고 변이주 선별시에는 potato-dextrose배지에 0.015%의 sodium deoxycholate를 첨가하여 균사의 과다 성장을 억제시켜 배양하였다. 그리고 최적배지 조성을 조사하기 위해 각종 탄소원 및 malt extract농도별 첨가 효과를 검토하였다.

변이주 분리

돌연변이주는 *G. fujikuroi* I-892를 모균주로 사용하여 자외선과 N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)를 처리하여 분리하였다. 자외선과 NTG를 처리하여 각각 LD_{99.5}와 LD₅₀을 정하고, 이 조건에서 연속적으로 원균주와의 형태학적 특성(즉

Table 1. Composition of Fermentation Medium

Ingredient	Concentration (g/l)
Glucose	100
Ammonium succinate	5.0
KH ₂ PO ₄	5.0
MgSO ₄	5.0
K ₂ SO ₄	0.2
FeSO ₄	0.002
Malt extract	5.0
*Trace element soln	2 ml

*Composition of trace elements solution

CuSO ₄	0.5g
MnSO ₄	0.1g
ZnSO ₄	0.1g
Na ₂ MoO ₄	0.01g
Distilled water	100ml

colony크기, 모양 및 색깔)을 비교하여 차이가 있는 균주를 1차로 선별하였다. 이 변이주들을 각각 Table 1의 배지에 접종하여 8~9일간 진탕 배양한 뒤, 지베렐린 생산성이 원균주보다 증가된 균주만을 선택하였다.

분석방법

지베렐린은 Holbrook등⁽⁶⁾이 개발한 spectrophotometric method를 사용하였다. 이 방법은 산성 조건에서 gibberellic acid를 gibberellenic acid로 전환시켜 254nm에서 흡광도를 측정하는 것으로 그 분석과정은 Fig. 1과 같다.

배양액 중의 glucose함량은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)에 의한 비색법⁽⁷⁾을 사용하여 정량하였다.

배양 및 발효조건

모든 실험은 진탕배양 하였고, submerged culture에는 500ml fermentor (NBS BIOFLO Model 30)와 2ℓ fermentor (Marubishi Model MD-250)를 사용 Table 1의 배지에 진탕배양 하였으며 배양조건은 Table 2와 같다.

지베렐린 생산을 위한 최적 발효조건을 찾기 위해 종 배양액의 접종량, 통기 및 교반속도, 그리고 배양액의 초기 pH 및 pH조절 효과를 검토하였다.

실험결과 및 고찰

지베렐린 표준곡선

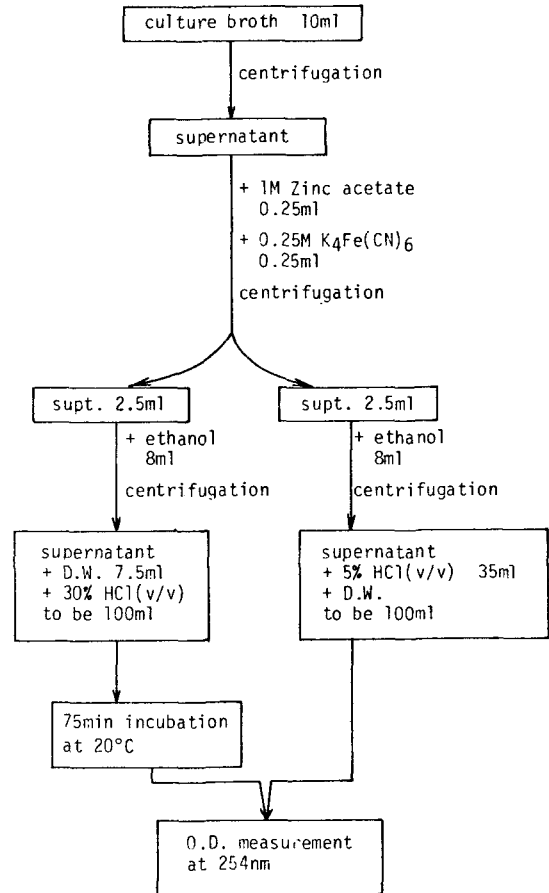


Fig. 1. Spectrophotometric Method for the Determination of Gibberellic Acid

Table 2. Fermentation Conditions for Gibberellic Acid Production

Condition	Flask culture	Fermentor culture
Temperature	24°C	24±1°C
Medium/Fermentation vessel	60ml/500ml flask	1ℓ /2ℓ fermentor
Agitation	120rep/min	300-500rpm
Aeration	—	0.5-1.0vvm
Culture period	8-10days	9days
Initial pH	6.0	4.0-6.0
Antifoam agent (Neorin 202)	—	0.05% (v/v)
*Seed inoculum ratio	5%	5-10%

*Seed:72hr's culture at 24°C

본 실험에서 지베렐린 정량을 위해 사용된 표준곡선은 Fig. 2와 같다.

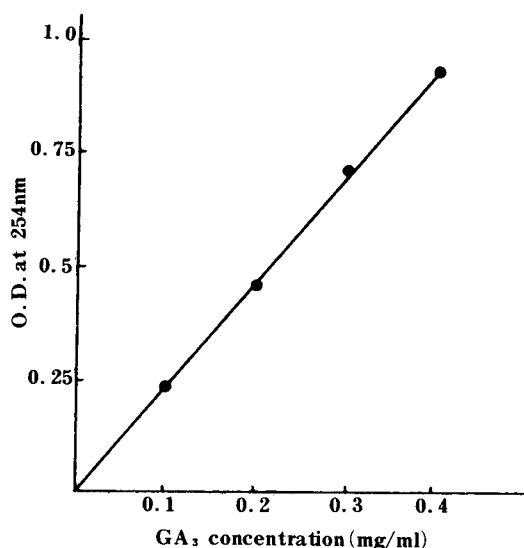


Fig. 2. Standard Curve for the Determination of Gibberellic Acid Concentration by Spectrophotometer

우수 변이주 선별

본 실험에 사용된 지베렐린 생산 균주중 *G. fujikuroi* I-892가 8일만에 138.6mg/l를 생산하여 모균주로 사용하였다.

전항에 기술한 조건에서 UV와 NTG를 처리하여 각각 500주(G-1~G-500)와 300주(N-1~N-300)의 변이주를 분리하였으며, 이들의 지베렐린 생산성을 비교한 결과 8일만에 178.2mg/l를 생산하는 변이주 *G. fujikuroi* G-471을 선별하였다.

UV를 처리한 경우에는 모균주보다 10~30%정도 생산성이 증가된 변이주를 다수 얻을 수 있었으나, NTG처리시에는 거의 모든 변이주의 생산

성이 감소되었고, multiple mutation이 유발되었다.

변이주 *G. fujikuroi* G-471의 생육곡선

배양시간에 따른 변이주 G-471의 생육도 glucose 소비량, pH변화 및 지베렐린 생산성의 변화를 보기 위해 진탕배양을 하면서 24시간 간격으로 살펴본 결과는 Fig. 3과 같다.

Cell mass는 72시간까지 급격히 증가하나 그 이후에는 주로 지방을 비롯한 세포내의 저장물질 Fig. 4의 증가에 의한 완만한 증가를 보였다. 그리고 glucose는 9일후에 거의 완전히 소모되었으며, 지베렐린은 8~9일후에 최대 생산점에 도달하였다. pH는 16시간 후에 다소 떨어지나,

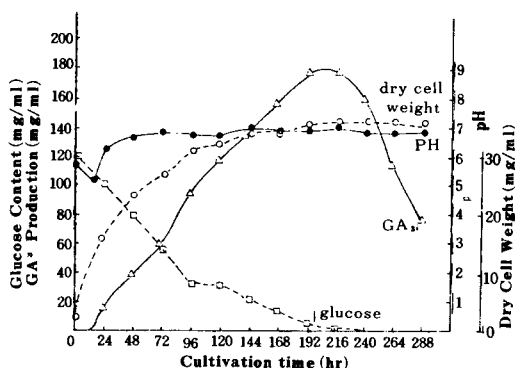


Fig. 3. Time Course of Gibberellic Acid Production by *G. fujikuroi* G-471 in Shaking Culture

Table 3. Comparison of Gibberellic Acid Production between Parent Strain(I-892) and Mutant(G-471)

Strain no.	Yield of GA ₃ (mg/l)		
	Incubation period(in days)		
	6	8	10
<i>G. fujikuroi</i> I-892	99	138.6	99
<i>G. fujikuroi</i> G-471	108.9	178.2	158.4

Fig. 4. Microscopic Observation of *G. fujikuroi* G-471 after 4 Days' Cultivation(Magnification X268)

그후에는 pH 6.5~7.0사이를 유지하였다.

균주개량 연구로는 Erokhina등이 자외선 등을 처리하여 생산성을 60%까지 증가시킨 바 있으며⁽⁸⁾ 또한 생산성이 높은변이주들은 모균주보다 glucose소비와 pH감소가 더 빨리 일어나고 acetic acid와 ethanol을 더 생산하며 citric acid와 glucuronic acid는 덜 생산하였다고 한다⁽⁹⁾.

탄소원 및 질소원 효과

지베렐린 생산에 대한 변이주 G-471의 최적 탄소원을 알아보기 위해 glucose를 비롯한 9종의 탄소원을 실험한 결과 Table 4에서 나타난 바와 같이 glucose, fructose 및 saccharose가 가장 좋았다. 따라서 본 실험에서는 경제적인 면을 고려하여 glucose를 주요 탄소원으로 사용하였으며, 그 최적 농도는 Fig. 5에서 보듯이 5% glucose 농도에서 최대에 도달하였으며 그 이상에서는 생

Table 4. Effect of Various Carbon Sources on the Production of Gibberellic Acid

Carbon sources	Relative yield of GA ₃ (%)					
	Final pH and incubation period					
	pH	6days	pH	8days	pH	10days
Glucose	6.8	59	6.8	100	6.8	88
Fructose	6.9	94	6.9	106	6.8	41
Galactose	6.9	35	7.0	76	6.9	59
Glycerol	7.5	24	7.7	29	7.6	12
Xylose	6.6	35	6.7	53	6.7	59
α -Lactose	7.9	12	8.0	12	7.9	12
Saccharose	6.7	71	6.8	124	6.8	106
α -Cellulose	8.5	12	8.7	0	8.7	0
Soluble starch	7.2	48	7.3	65		

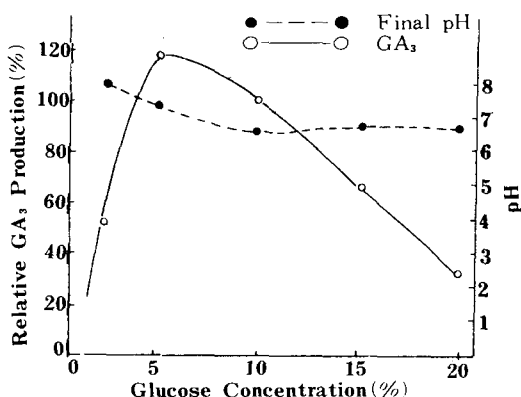


Fig. 5. Effect of Glucose Concentration on the Production of Gibberellic Acid

산성이 저하되었다.

Darken등은 탄소원으로서 glucose-glycerol-lactose를 혼합 사용하여 좋은 결과를 나타냈으며⁽¹⁰⁾, Borrow등이 균주 *G. fujikuroi* ATCC 917을 사용한 실험에서도 glucose 최적 농도는 5%로 본 실험과 같은 결과를 나타냈으며, 또한 glucose 최적 농도는 질소원에 따라 다소 다르게 나타난다고 보고하였다⁽¹¹⁾.

또한 무기질소원 및 유기질소원의 효과를 보기 위해 각각 50mM 및 0.5%에서 실험한 결과, Table 5에서 나타난 바와 같이 ammonium tartarate와 glycine이 각각 우수한 질소원으로 나타났다. 그 중 무기질소원인 ammonium tartarate의 최적 농도는 50mM이었으며 그 이상에서는 현저하게 감소하였다.

Borrow등도 최적 질소원으로 glycine과 urea를 보고하였다⁽¹¹⁾. 질소원 농도에서 농도가 높을수록 생산성이 감소하는 것은 균사체 증가로 인하여 효율적인 통기효과를 나타내지 못하기 때문인 것으로 추정되며⁽¹²⁾ 또한 지베렐린의 생산은 질소고갈을 전후하여 시작되므로, 탄소원과 질소원의농도 비율(C/N)에 의한 지베렐린 생산성을 검토한 실

Table 5. Effect of Various Inorganic Nitrogen Sources on the Production of Gibberellic Acid

Nitrogen source	Relative yield of GA ₃ (%)					
	Final pH and incubation period					
	pH	5days	pH	8days	pH	10days
Ammonium acetate	5.4	62.5	4.7	88	5.2	125
Ammoniumnitrate	6.2	50	6.0	94	6.3	100
Ammonium succinate	6.9	62.5	6.6	94	7.0	100
Ammonium sulfate	1.6	125	1.5	75	1.5	75
Ammonium tartrate	5.9	137.5	5.7	144	6.1	200
Sodium nitrate	8.3	100	7.9	94	8.2	113
Urea	4.0	62.5	5.1	125	5.2	138
Casamino acid	5.6	55.6	5.5	61	5.6	55.6
Casitone	4.9	133.3	4.6	126.7	4.6	133.3
Corn steep liquor	5.5	33.3	5.6	33.3	5.6	44.4
Glycine	3.8	188.9	3.6	211.1	3.7	222.2
Peptone	4.7	100	4.6	66.7	4.6	97.8
Phytone	5.9	44.4	6.0	57.8	6.0	57.8
Proteose peptone	4.6	133.3	4.5	112.2	4.3	83.3
Tryptone	4.8	111.1	4.6	100	5.6	68.9
Soytone	5.6	66.6	5.6	55.6	4.6	122.2

험에서 그 최적 농도비율은 30 : 1 ~ 55 : 1로 나타났다(13).

Malt extract 농도별로 지베렐린의 생산성을 살펴본 결과 0.125 ~ 1% 사이에서 지베렐린 생산성은 1.0%에서 최고였으나 현저한 차이를 나타내지는 못하였다.

Sanchez-Marroquin은 malt extract에 methanol이나 ethylene diaminetetra acetic acid(EDTA)를 첨가하여 생산성적을 다소 증가시킬 수 있다고 한다(14).

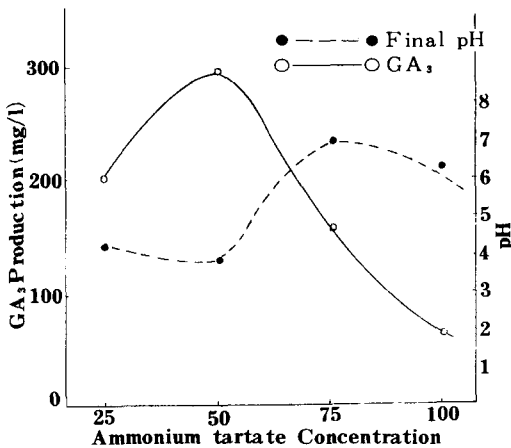


Fig. 6. Effect of Ammonium Tartrate Concentration on the Production of Gibberellic Acid

최적 발효조건

종균의 최적 배양시간 및 집종량을 알기 위하여 배양 일수를 1 ~ 5일로 변화시킨 결과 3일간 배양하는 것이 가장 생산성이 높았고 종균의 집종량은 5%가 가장 좋은 것으로 나타났다.

현재까지 최적으로 알려진 배지조성, 즉 saccharose 10%, ammonium tartarate 50mM, malt extract 1%, KH₂PO₄ 0.5%, MgSO₄ 0.5%, FeSO₄ 0.0002%, 미량원소 0.002% (v/v)를 이용하여 2ℓ fermentor에서 지베렐린 생산성을 조사한 결과 6일만에 최고 253mg/ℓ에 도달하였다. (Fig. 7) 이로써 발효일수도 2일을 앞당겼고, 생산성도 30% 이상 증가 되었다.

초기pH의 영향

현재까지의 실험결과에서 발효 초기의 pH가 큰 영향을 미치는 것으로 추정되므로, 초기의 pH를 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 변화시킨 결과 Fig. 8에서 보듯이 초기 pH가 산성인 4.0에

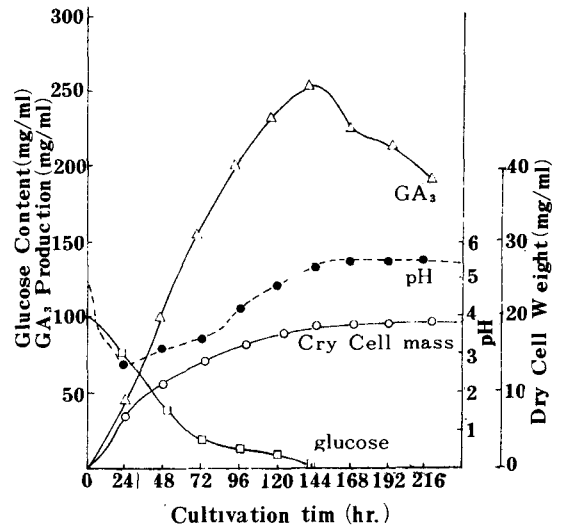


Fig. 7. Time Course of Gibberellic acid Fermentation in Using Optimized Medium Submerged Culture

서 지베렐린 생산성이 가장 높았다. pH3.5~5.0 사이에서는 최종 pH는 낮았으나, 지베렐린 생산성은 비교적 높았고, pH5.0이상에서는 최종 pH는 7.0정도를 유지했으나 지베렐린 생산성은 낮았다. 그러므로 초기 pH를 4.0~5.0사이로 조절하는 것이 가장 좋으리라고 본다. 이는 Borrow 등의 최적 pH범위 3.0~5.5와 거의 일치하였으며(11) 본 실험에서 지베렐린 발효는 발효 경과시 pH변화가 비교적 적기 때문에 초기에 pH를 조절하는 것으로 충분하다고 여겨진다.

발효조에서 통기량을 0.5~1vvm으로 조절하여 지베렐린 생산성을 비교한 결과 통기량이 많을수

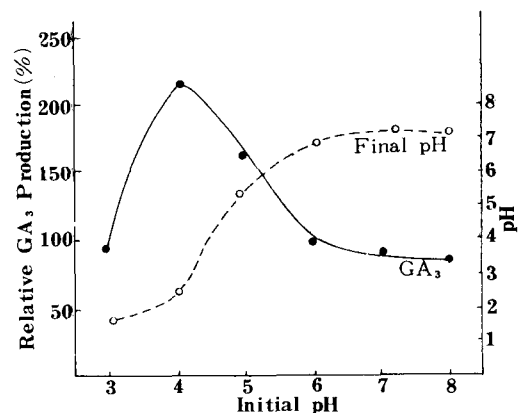


Fig. 8. Effect of Initial pH on the Production of Gibberellic Acid

록 생산성이 증가되었다. 이러한 결과는 지베렐린의 생합성 경로가 전반적으로 산화를 이뤄 나가면서 진행되기 때문이라 생각되며⁽¹⁵⁾ 이는 Borrow등의 통기량과 교반속도 실험에서도 유사하게 나타나고 있다⁽¹¹⁾

요 약

본 실험에서 *G. fujikuroi* I-892를 우수 균주로 선정 후 자외선과 NTG를 처리하여, 지베렐린 생산성이 30%이상 증가된 변이주 *G. fujikuroi* G-471을 분리하였다 (178.6mg/ℓ)

이 변이주에 적당한 최적 배지조성과 발효조건을 조사한 결과 saccharose 10%, ammonium tartrate 50mM, malt extract 1.0%KH₂PO₄ 0.5% MgSO₄ 0.5%, FeSO₄ 0.0002%, 미량 원소 0.002% (v/v)으로 나타났으며, 초기pH 5.0, 통기량 1vvm 교반속도 400rpm의 발효조건에서 253mg/ℓ가 생산되어 기존의 배양조건에서 보다 30%정도 생산성이 증가되었다.

발효액의 초기pH는 지베렐린 생산에 상당한 영향을 미쳤으며, 초기pH를 4.0으로 조절한 경우가 가장 좋은 생산성을 나타냈다.

참고문헌

- Brian, P. W.: *Int. Rev. Cytol.*, **19**, 299 (1966)
- Plant Protection Ltd.: "Berelex" Technical Service Department, Yalding, Kent Great Britain (1969)
- Kurosawa, E.: *Trans. Nat. Hist. Soc. Formosa* **16**, 213 (1926)
- Kurosawa, E.: *Ann. Phytopathol. Soc. Jap.*, **4**, 65 (1934)
- Letham, P. S., Goodwin, P., and Higgins, T. J. V.: *Phytohormones and related compounds-A comprehensive treatise* vol. 1, 107 (1978)
- Holbrook, A. H., Edge, W. J., and Bailey, F.: *Adv. Chem. Series*, **28**, 159 (1961)
- Miller, G. L.: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
- Erokhina, L. I., and Sokolova, E. V.: *Genetika* **1**, 109 (1966)
- Imshenesky, A. A., and Ulyanova, O. M.: *Mikrobiologia*, **31**, 832 (1962)
- Darken, M. A., Jensen, A. L., and Shu, P.: *Appl. Microbiol.* **7**, 301 (1959)
- Borrow, A., Brown Sheila, Jefferys, E. G., Kessel, R. H. J., Lloyd, Eithance C., Lloyd, P. B., Rothwell, A., Rothwell, B., and Swait, J. C.: *Can. J. Microbiol.* **10**, 407 (1964)
- Jefferys, E. G.: *Adv. in Appl. Microbiol.* **13**, 283 (1970)
- Imperial Chemical Industries Ltd.: *Brit. Pat.* **838**, 032 (1960)
- Sanchez-Marroquin, A.: *Appl. Microbiol.* **11**, 523 (1970)
- Geissman, T. A., Verbiscar, A. J., Phinney, B. O., and Cragg, G.: *Phytochemistry* **5**, 933 (1966)