Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 28, No. 3, 152–155 (2000)

Gibberella fujikuroi ATCC 12616으로 부터 얻어진 변이주 *Gibberella fujikuroi* G-36의 Gibberellic Acid의 배양조건

오 영 준
동신대학교 식품생물공학과

Cultural Conditions for the Improvement in Gibberellic Acid Productivity by a Mutant of *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616-*Gibberella fujikuroi* G-36 . Oh, Young-Jun. *Department of Food and Biotechnology, Dongshin University, Naju 520-714, Korea* – A mutant *Gibberella fujikuroi G*-36 was selected by metagenesis of *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616 with mutagens such as N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and hydroxylamine for improving productivity of gibberellic acid. The mutant strain produced gibberellic acid (70 mg/l) more than that of wilde type. A fermentation medium containing glucose, NH_4NO_3, $MgSO_4$, KH_2PO_4 and trace elements was developed for the maximal production of a gibberellic acid by the mutant. The fluctuating cultural temperature that was varied from 30°C to 20°C resulted in higher GA yield than that of fixed cultural temperature at 28°C.

Key words: *Gibberella fujikuroi*, mutagenesis, gibberellic acid

식물생장 조절제의 일종인 지베렐린(gibberellic acid)은 고가의 유기화합물로 식물을 신장시킬 뿐 아니라 휴면종자의 발아와 휴면아의 성장을 촉진하고 씨없는 과일의 생산을 가능하게 하며 과일의 노화억제제로 사용된다[8, 13]. 현재 곰팡이와 고등식물로 부터 분리된 지베렐린은 51종에 이르고 있으며 이 중에서 gibberellic acid(GA_3)가 가장 널리 쓰이고 있으며 일본, 영국 등 몇 개국에서 *Gibberella fujikuroi*를 이용한 발효법에 의하여 생산되고 있다[3,9,10].

Gibberellic acid를 생산하는 곰팡이인 *G. fujikuroi* (*Fusarium moniliforme*)는 분생포자 시기에 대소 2종의 분생포자(macronidia, microcnidia)를 형성하며 소형 분생포자는 단포 무색이며 장타원형 또는 원형으로 수개가 연생하며 크기는 6×3 μm-15×5 μm이다. 대형 분생포자는 무색 방추형으로 약간 구부러지고 1-6개(보통 3-5개)의 격막이 있고 크기는 20×2 μm-57×5 μm이고 모여서 포자 덩어리를 이룬다 [5,12].

본 연구에서는 *Gibberella fujikuroi* ATCC 12616의 포자를 N-metyhyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)과 hydroxylamine (NH_2OH)로 처리했을 때 얻어지는 변이주 중에서 지베렐린 생산성이 가장 높은 균주를 선별하고 액체배지에서의 최적 발효조건을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배지조성

본 실험에서 사용한 균주는 *G. fujikuroi* ATCC 12616이며 이 균주는 potato dextrose agar(PDA)에서 28°C로 3일간 배양한 뒤 4°C에서 보존하였다. 지베렐린 생산을 위한 주 배지의 조성은 Glucose 100 g/l, NH_4NO_3 4.8 g/l, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 1.0 g/l, KH_2PO_4 5.0 g/l 및 trace element 용액 2 ml ($CuSO_4$ 5.0 g/l, $MnSO_4$ 1.0 g/l, Na_2MoO_4 0.1 g/l)를 함유하고 있으며, pH 4.0 으로 조정하여 사용하였다. 지베렐린의 생산에 미치는 배양조건을 조사하기 위하여 탄소원, 질소원 및 온도변화에 따른 효과를 검토하였다.

변이주 분리

돌연변이주 선별은 *G. fujikuroi* ATCC 12616를 모균주로 하여 200-ml 삼각 flask에 증류수 100 ml를 넣고 0.1 ml Tween 80와 PDA배지에서 자란 포자 한 백금이를 넣어 1시간 진탕한 다음 Haemacytometer(Superior Co.)를 사용하여 포자수를 구한 다음, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine(NTG)과 hydroxylamine을 0.02-0.1 mM농도로 상온에서 30분간 처리하여 LD_{90}를 구했으며 이 조건에서 모균주와의 형태학적인 특성 즉 모양, 색깔 및 colony 크기에 차이가 있는 균주를 선별한 후 이 변이주들을 Table 1의배지에 접종하여 28°C에서 7일간 배양하여 지베렐린 생산성이 모균주보다 증가된 균주만을 선택하였다. 건조 균체량은 배양액 10 ml을 3,000 rpm에서 20분간 원심분리하고 침전된 균체를 0.1N HCl 와 증류수로 차례로 세척한 뒤 Whatman filter paper No.2로 여과한 후 24시간 동안 80°C에서 건조시켜 무게를 측정하였다.

Gibberellin의 정량

*Corresponding author
Tel. 82-0613-330-3222, Fax. 82-613-330-2909
E-mail: yjoh@dongshinu.ac.kr

Table 1. Comparison of gibberellic acid production between parent strain and mutant strain

Strains	GA_3 Production (mg/l)		
	Culture period (days)		
	3	5	7
G. fujikuroi ATCC12616 (parent strain)	60 (mg/l)	8 (mg/l)	83.5 (mg/l)
G. fujikuroi G-36 (mutant)	66	106	110

Gibberellin의 양은 배양액을 3,000 rpm에서 15분간 원심분리로 얻은 상등액에 지베렐린이 25 μg/ml까지 되도록 methanol로 희석한 시료에 1 ml의 methanolic H_2SO_4용액을 넣어 60°C에서 20분간 반응시킨 후 10% ethanolamine 2 ml을 첨가하여 2시간 이내에 spectrophtometer (Shi-madzu, UV-1601)를 사용하여 257 nm에서 흡광도를 측정하였다 [7].

배양방법

종배양은 PDA배지에 사면배양한 균을 한 백금이씩을 Table 1의 종 배양배지 50 ml에 접종하였다. 그리고 접종한 삼각 flask는 rotary shaker(INFORS, RFI-125)에서 28°C, 120 rpm에 3일간 진탕배양하였다. 이 종 배양액을 주 배양배지 120 ml가 들어 있는 진탕 flask에 3%되게 접종한후 180 rpm에서 7일간 배양하였다. 발효조(한국발효기)에서의 배양은 발효조의 총용량 2.5 l의 50~60%를 주배양배지로 채운 뒤 멸균하여 종배양액 5%(v/v)를 접종하여 초기 pH 4.0, 배양온도 28°C, 교반속도 500 rpm, 통기량 1 vvm으로 7일간 배양하였다.

결과 및 고찰

우수변이주의 선별

본 실험에서는 *G fujikuroi* ATCC 12616을 모균주로 사용하여 실험방법에서 기술한 조건에서 NTG처리하여 52주의 변이주들을 flask에서 배양한 후 제일 생산성이 높은 균주 하나를 선별하고 이 변이주를 병행하여 hydroxylamine 처리 했을 때 100주의 변이주중에서 7일만에 110 mg/l를 생산하는 *G. fujikuroi* G-36을 선별하였다.

변이주 Gibberellic fujikuroi G-36의 생육곡선

배양시간에 따른 변이주 G-36의 건조균체량, pH 변화 및 지베렐린 생산성의 변화를 보기위하여 진탕배양을 하면서 1일 간격으로 조사한 결과는 Fig. 1과 같다. Cell mass는 3일 까지 점진적으로 증가하나 그 이후에는 세포내의 저장물질증가로 완만한 증가를 보였다. pH는 3일 후에 다소 떨어지나 그 후에는 pH 3를 유지하였으며 지베렐린은 7일 후에 최대 생산점에 도달하였다. 한편 자외선을 처리하여 생산성이 높은 변이주는 모균주보다 glucose 소비와 pH의 감소가 더 빨리 일어난다는 보고가 있었다[10].

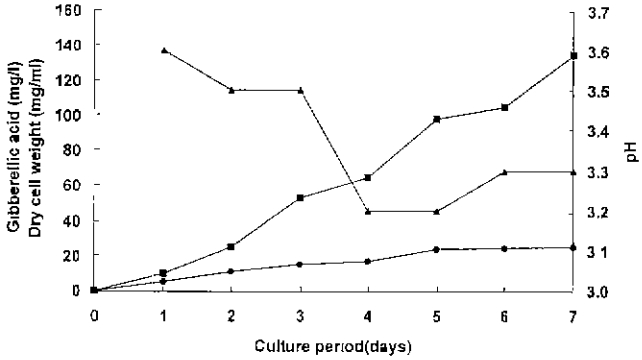

Fig. 1. Time course of gibberellic acid production by *G. fujikuroi* G-36.
Symbols: ■, gibberellic acid; ▲, pH; ●, dry cell weight.

탄소원이 지베렐린 생성에 끼치는 영향

지베렐린 A_3생산에 대한 *G. fujikuroi* G-36의 최적탄소원을 알아보기 위해 glucose를 비롯한 7종의 탄소원을 주배양배지에 12% 농도로 첨가하여 실험한 결과 Table 3에 나타난 바와 같이 glucose, fructose, sucrose에서 양호한 지베렐린 생산성을 보였으며 glycerol에서는 생산성은 훨씬 떨어지며 lactose, galactose에서도 생산수율은 좋지 않았다. 따라서 원료수급, 원료 가격면을 고려해 볼 때 glucose, sucrose, fructose가 산업적으로 이용될 가능성이 크며 본 실험에서는 glucose를 주요 탄소원으로 사용하였다. Glucose를 탄소원으로 이용하여 glucose 농도에 따른 지베렐린 생성의 영향을 검토하기위하여 생산용 배지에 glucose 농도를 4, 8, 12, 16, 20%로 변화시켜 보았다. 7일간 배양하면서 최종 pH변화와 지베렐린의 생산량을 비교한 결과는 Fig. 2와 같다.

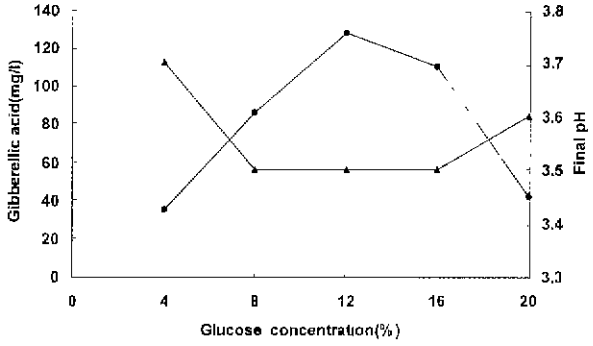

Fig. 2. Effect of concentration of glucose on the production of gibberellic acid.
Symbols: ●, gibberellic acid ; ▲, final pH.

Table 2. Effect of various carbon sources on the production of gibberellic acid (GA_3)

Carbon sources	GA_3 Production (mg/l)		
	Culture period (days)		
	3	5	7
Glucose	56 (mg/l)	87 (mg/l)	110 (mg/l)
Fructose	70	82	105
Sucrose	71	110	121
Galactose	35	72	83
Lactose	15	27	36
Glycero	125	32	33
Soluble starch	54	68	76

질소원의 종류에 따른 지베렐린 생성의 영향

지베렐린 A_3생산에 대한 *G. fujikuroi* G-36의 최적질소원을 알아보기 위해 ammonium chloride, ammonium sulfate, ammonium nitrate, ammonium tartarate, potassum nitrate, urea, glycine을 배지에 40 mM씩 첨가하여 실험한 결과, Table 3의 결과와 같이 ammonium nitrate, ammonium tartarate, glycine등을 첨가한 배지에서 지벨렐린 생성이 좋았다.

Table 3. Effect of various inorganic nitrogen sources on the production of Gibberellic Acid

Nitrogen Sources	GA_3 Production (mg/l)		
	Culture period, (days)		
	3	5	7
Ammonium chloride	47 (mg/l)	65 (mg/l)	110 (mg/l)
Ammonium sulfate	42	58	98
Ammonium nitrate	67	98	123
Ammonium tartarate	57	90	118
Sodium nitrate	63	72	105
Urea	62	73	103
Glycine	61	72	101

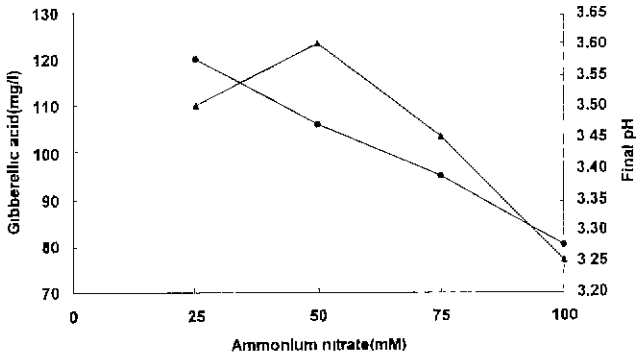

Fig. 3. Effect of the concentratation of ammonium nitrate on the production of gibberellic acid.
Symbols: ●, gibberellic acid ; ▲ , final pH.

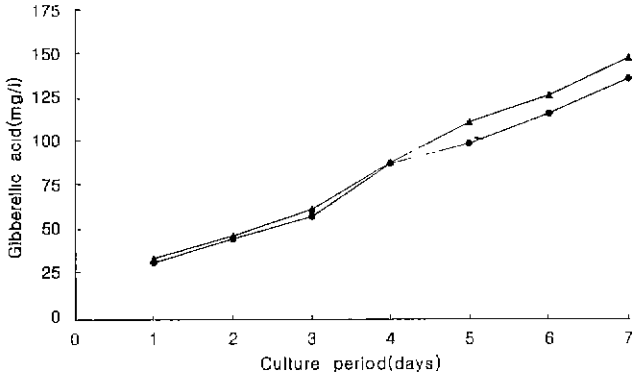

Fig. 4. Effect of temperature variation on the production of gibberellic acid.
Symbols: ●, 28°C; ▲ , 30→20°C.

배양온도에 따른 Gibberellic acid 생산

배양온도의 변화에따른 gibberellic acidic acid 생산에 미치는 영향을 보기위하여 현재까지 알려진 배지조성, 즉 sucrose 12%, ammonium chloride 0.4%, $MgSO_4 \cdot H_2O$ 0.1%, KH_2PO_4 0.5%, trace element 0.2%, pH 4.0를 이용하여 2대의 2.5 l fermentor에서 7일간 배양하되 1대의 fermentor는 배양 3일후 부터 배양온도를 30°C에서 20°C로 낮춘후 7일간 배양하였다. 다른 1대의 fermentor는 배양 초기부터 온도를 28°C로 일정하게 유지시키면서 7일간 배양하였다. 상기 두 fermentor에서 회수한 배양액의 배양일수에 따른 지베렐린 생산성을 Fig. 4에 나타난 바와 같이 배양온도를 변화(30°C→20°C)시켰을 때 7일만에 최고 130 mg/l 농도의 지베렐린이 생성됨을 알 수 있었다. 이것은 균체증식이 충분한 상태에서 온도가 낮추면 균체증식 보다는 지베렐린 생성이 촉진되는 것으로 사료된다.

요 약

곰팡이 *Gibberella fujikuroi* ATCC12616을 mutagen, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine과 hydroxylamine으로 처리하여 지베렐린 생산 수률이 가장 높은 변이주 *G. fujikuroi* G-36을 선별하였다. 변이주 *G. fujikuroi* G-36는 모균주 *G. fujikuroi* ATCC 12616과 비교하여 볼 때 지베렐린 생산수율이 약 32%향상된 것으로 관찰되었다. 이 균주를 액체배지에서 발효시키면 주 탄소원으로 sucrose를 사용할 때 높은 생산성을 나타내었으며 초기배지 pH와 온도는 각각 pH 4.0, 28°C 조건이 가장 좋았다. 배양온도를 30°C에서 3일 배양후 20°C로 낮추어 7일간 배양하면 130 mg/l의 가장 높은 지베렐린이 생성됨을 알았다.

REFERENCES

1. Borrow, A., S. Brown, and F. G. Jeffery. 1964. Metabolism of *Gibberella fujikuroi* in stirred culture. *Can. J. Microbiol.* **10**: 407–444.
2. Bruckner, B. and D. Blechschmidt, 1991. Nitrogen regulation of gibberellin biosynthesis in *Gibberella fujiluroi*. *Appl. Microbio.* **35**: 646–650.
3. Bruclner, D., D. Blechschmidt, and B. Schubert. 1989. *Fusarium moniliforme held*: a fungus producing a broad spectrum of bioactive metabolites. *Zentabl. Bacteriolgie.* **144**: 3–12.
4. BuLock, J., D. Detroy, R.W. Hostalek, and Z. Munim-Al-Shakarchi. A. 1974. Regulation of secondary biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *Trans Br. Mycol. Soc.* **62**: 377–389.
5. Demain. A. L. 1986. Regulation of secondary metabolism in fungi. *Pure Appl. Chem.* **58**: 219–226.
6. Dubois, and M. A. Moen 1956: Colorimetric method for determination of sugars and related substances *Analyt. Chem.* **28**: 550–553.
7. Holbrook, A. A., W.J. Edge, and F., Bailey, 1961. Spectrophotometric method for determination of gibberrlic acid. *Adv. Chem. Series.* **28**: 159–167
8. Jefferys, E. G. 1971. The gibberellin fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* **13**: 283–323.
9. Kumar, P.K., and B.K. Losane. 1990. Solid state fermentation: Physical and nutritional factors influencing gibberellic acid production. *Appl. Microbiol. Biotech.* **34**: 145–148.
10. Kumar, P.K.R. and B.K. Losane. 1989. Microbial production of gibberellins: state of the art. *Adv. Appl. Microbiol.* **34**: 29–139.
11. Lin, J. T., A.E. Stafford. and G.L. Steffens. 1991. Identification of endogenous gibberellins in immature apple seeds. *Agric. Biol. Chem.* **8**: 2183–2185.
12. Martin, C.G. 1983. The biochemistry and physiology of gibbellin. *In* Crozier.A. (ed) Gibberellins, vol. 2. Praeger Publishers. New York, pp. 395–411.
13. Vass, R.C. and E.G. Jefferys. 1979. Gibberellic acid. *In* Rose, A.H. Economic microbiology: Secondary products vol. 3. Academic Press, New York, pp. 421–435.

(Received April 3, 1999)