

Pseudomonas sp. F721의 세포외 대사산물에 의한 종자의 발아억제
An inhibitory of seed germination by an extracellular
metabolite of *Pseudomonas* sp. F721

오경택, 류인재, 이민주, 김홍재, 김성준, 정선용
전남대학교 공과대학 환경공학과
전화 (062) 530-1858, 팩스 (062) 530-0742

Abstract : *Pseudomonas* sp. F721 isolated from soil produced a substance related in seeds germination inhibition. Addition of phytohormone, and GA (gibberellin acid) in the culture broth elevated production of the germination inhibition substance. The production of the substance was optimized in the culture conditions of 35°C, pH 9.0, 150 rpm, 48 hr, glucose 0.5% (w/v), and inoculation ratio 1.0% (v/v). The physical and chemical stability of the substance in the variety of pH ranging from 2.0 to 12.0 and from freezing to 100°C were shown. The germination inhibition substance suppressed 90% of germination compared with that of the control experiment in a few days.

서론

농작물을 장기간 보존하려면 습도, 온도, 조도 등을 일정하게 유지시켜 주어야 한다. 그렇지 않으면 농작물이 발아되어 품질이 떨어져 상품가치도 함께 떨어지며 경제적 손실이 발생될 수 있다. 일반적으로 수확된 농작물 중 15-20% 정도가 운송 중 또는 저장시 경제적 손실을 입는데, 손실규모는 연간 수백억원에 달한다.

농작물을 장기간 보존하는 방법으로는 습도, 온도, 조도 등 보존환경을 제어하는 물리적 보존법, MH-30, 방부제, 염소 등과 같은 화학약품을 사용한 화학적 보존법, ⁶⁰Co, ¹³⁷Cs 등 방사선 동위원소에서 나오는 감마선을 이용한 방사선을 조사하여 맹아억제 효과를 높이는 보존방법, 농작물을 비닐팩에 밀봉하여 보존하는 방법 등이 있다.

물리적 농작물 저장법은 온도, 습도를 조절하는데 유지비가 많이 들며, 화학적 보존법 중 MH-30은 농작물의 맹아억제 효과가 뛰어나지만 암을 일으킬 수 있는 물질로 1983년에 금지조치 되었으면 방부제, 염소 등과 같은 화학약품도 인체에 미치는 영향에 관하여 계속 연구 중에 있다. 방사선 조사된 농작물은 안정성에 관한 문제가 명확하게 해결되지 않은 상태이고, 국민들 의식에도 아직까지는 의견이 분분하다. 비닐팩에 농작물을 밀봉하여 보존하는 방법은 비닐팩 처리 문제가 아직 해결되지 않고 있다.

이러한 현안에 대하여 하나의 해결책으로 미생물을 이용한 방법을 들 수 있다. 미생물을 이용한 작물 종자 발아억제에 관한 연구는 1983년에 Kim *et al.*¹⁾의해서 수행되었다. 종자가 발아하기 위해서는 종자에 포함된 다당류를 단당류로 분해하여 에너지원으로 활용한다. 이때 starch를 분해하는 효소는 α -amylase²⁾이다. 균주 F721의 배양액은 농작물 발아를 억제시키는 것으로 사료되며, 중온, 높은 습도에서도 농작물 발아억제에 대한 효과가 탁월하다는 것을 다양한 연구를 통해서 검증하였다. 자연계에 서식하고 있는 미생물로부터 생성되는 발아억제물질은 어떤 방법보다도 환경친화적이라고 할 수 있다. 따라서 본 연구에서는 미생물로부터 생산된 발아억제물질을 농작물 저장기술, 운송기술에 적용하여 농작물에 대한 장기적인 저장기술 확립과 상품의 가치를 유지하는데 유지비를 최소화시킬 수 있는 방법에 초점을 맞추어 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

균주 분리 및 동정

자연계로부터 종자 (농작물) 발아억제물질을 생산하는 미생물을 샘플링 하여 C-배지³⁾를 사용하여 균을 분리하였다. pH는 7.0으로 맞추었으며 기질로서는 glucose를 사용하였다. 균주의 동정은 Bergy's Manual of Systematic Bacteriology에 준하였고, API Kit로 하였다. 순수 분리된 균을 glycerol과 혼합한 후, -70°C에서 보관하고, 필요시 0°C에서 해동시켜 사용하였다.

종자 발아 검정

종자 발아억제물질을 생성하는 미생물을 확인하기 위하여 petri-dish에 여과지를 깔고 원심분리하여 얻은 균주 및 여과액을 단계적으로 희석하여 30 ml씩 분주하고, 여러 종류의 씨앗을 여과지 위에 20개씩 놓은 후 실온에서 일주일간 배양하여 발아 정도를 균주 및 여과액 대신에 멸균수를 사용한 대조구와 비교하여 검정¹⁾하였다.

배양 조건 검색

분리된 균주에 대하여 glucose를 탄소원으로 최적 배양조건을 조사하였다. 최적 온도조사는 25, 30, 35°C, 최적 pH조사는 6.0~9.0, 최적 glucose농도조사는 0.1~5.0% (w/v)에서 최적배양조건을 검토하였다. 선별된 발아억제 균주의 성장 측정은 2시간마다 배양액 일정량을 취하여 분광광도계(UV-1601, Shimadzu, Japan)를 사용하여 600nm에서 흡광도, CFUs (colony forming-units)를 측정하였다. 탄소원으로 사용된 glucose농도 측정법은 DNS 방법⁴⁾과 포도당 측정용시약 측정법을 병행하였다.

발아억제물질 유도

발아억제 물질의 유도성을 검토하기 위하여 탄소원인 glucose 외에 식물 호르몬 (GA-gibberellin acid, IAA-indole-3-acetic acid, BAP-6-bezylaminopurine)을 첨가 또는 유도성으로서 70% 에탄올로 2회 살균한 보리 5% (w/v)를 멸균수로 3~5회정도 세척한 후 C-배지에 첨가하여 배양한 후 배양액을 10,000 rpm × 10 min 원심분리하여 균체와 상등액을 분리하고 균체는 멸균수에 현탁시키고, 상등액은 균체를 완전히 제거하기 위하여 0.45 μm 멸균 실린지 필터로 여과시켜 실험에 사용하였다⁵⁾.

발아억제물질의 안정성 조사

발아억제물질이 포함된 배양액을 여과하여 다양한 pH, 온도에서 발아억제물질의 안정성을 조사하였다. pH에 대한 안정성 조사는 filter된 배양액을 초기 pH를 pH2.0, 7.0, 12.0로 맞추어서 다시 초기 pH 9.0로 2N NaOH, 6N HCl를 사용하여 조절한 후 petri-dish에 30 ml씩 분주하여 씨앗의 발아억제효과를 통한 발아억제물질의 안정성을 조사하였다. 온도에 대한 안정성 조사는 filter된 배양액을 냉동, 냉장, 실온, 40°C, 50°C, 60°C, 100°C에서 10분간 열처리를 실시한 배양액을 petri-dish에 30 ml씩 분주하여 씨앗의 발아억제효과를 통한 발아억제물질의 안정성을 검토하였다.

결과 및 고찰

균주 분리 및 동정

자연계로부터 분리된 종자 발아억제물질 생산 균주는 운동성을 지니고 그람염색한 결과 그람음성으로 나타났다. 분리된 균주를 API 20E Kit로 동정한 결과 *Pseudomonas* sp.이었다. *Pseudomonas* sp.로 판별된 균주를 F721로 명명하였다.

종자 발아억제

Pseudomonas sp. F721의 배양액을 균과 상등액으로 나누어 실험한 결과, 작물에 따라서 균이 포함된 배양액과 균이 포함되지 않은 배양액의 효과를 조금씩 다르게 나타났다. 이리

한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

배양조건 검색

Pseudomonas sp. F721의 최적배양 조건조사 결과, 배양온도에서는 25°C, 35°C에서 매우 비슷한 성장을 하였다. pH 조사에서는 pH 9.0 조건에서 배양된 배양액이 pH 6.0~8.0에서 배양된 배양액보다 작물 (벼, *Oryza sativa* L.)의 발아에 미치는 영향이 컸다. 균주 F721의 탄소원으로 사용된 glucose 주입농도는 0.5% (w/v)가 최적의 농도로 조사되었다. 최적의 배양시간은 사용 균주인 F721가 log phase를 거쳐 stationary phase로 접어드는 시점보다 stationary phase에서 death phase로 접어드는 시점인 48 hr에서 발아억제물질의 효과가 높았다. 이는 발아억제물질이 1차 대사산물일 가능성보다 2차 대사산물일 가능성이 높은 것으로 사료된다. 현재 잘 알려진 식물 호르몬인 GA는 2차 대사산물이다.

발아억제물질 유도 및 안정성 조사

발아억제물질 생성을 유도하기 위하여 본 배양시 벼, 보리를 첨가하여 실험한 결과 벼보다는 보리를 첨가하여 배양했을 때가 실험 작물인 벼에 대한 발아억제 효과가 좋은 것으로 조사되었다. 그리고 식물 호르몬을 이용한 발아억제물질 유도실험에서는 GA가 Auxins 계통의 IAA (indole-3-acetic acid), Cytokinins 계통의 BAP (6-benzylaminopurine)보다 발아억제물질 유도에 관여한 것으로 조사되었다. 이러한 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 탄소원 이외에 첨가된 보리, 식물 호르몬에 의하여 발아억제물질이 유도되는 이유에 대해서는 아직 분명하지는 않지만 앞으로 보다 많은 연구를 통하여 관련 기작을 밝히면 생물농업에 상당히 이바지 할 것으로 사료된다. 발아억제물질의 안정성 검토결과 pH 2.0~12.0, -20~100°C에서 대하여 안정성을 가지고 있었다. 다양한 pH 조건 (pH 2.0, broth, pH 9.0, pH 12.0)에 대한 발아억제물질의 안정성 조사결과 pH가 강산성, 강 알칼리성에서도 실패하지 않고 작물 (벼, *Oryza sativa* L.)의 발아억제 효과를 나타내었다. 다양한 온도 조건 (냉동, 냉장, 실온, 40°C, 50°C, 60°C, 100°C)에 대한 발아억제물질의 안정성 조사결과 실온과 60°C에서 작물 (벼, *Oryza sativa* L.)의 발아억제에 미치는 영향이 높았으며, 100°C에서도 대조군과 비교하여 벼 (*Oryza sativa* L.)의 발아를 억제시켰다. 이러한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 본 연구결과 발아억제물질은 pH, 온도에 대한 구조적 안정성이 확인되었으며, 작물의 발아억제효과 또한 여러 작물에서 검증되었다. 현재 발아억제물질의 분리 및 정제를 진행 중에 있다.

요 약

농작물 종자의 발아를 억제하는 미생물, *Pseudomonas* sp. F721을 자연계로부터 분리 및 동정하였다. 그리고 식물성장 호르몬에 의하여 발아억제물질이 유도되어 생산됨이 밝혀졌다. 분리된 균주의 최적 배양조건을 검토한 결과, 35°C, pH 9.0, 150rpm, 48 hr, substrate 0.5% (w/v), strain 1.0% (v/v)이었다. 발아억제의 정도는 종자의 종류에 따라 차이가 있었다. 발아억제물질의 물리·화학적 안정성 검토결과 pH 2.0~12.0, -20~100°C에서 대하여 안정성을 가지고 있었다. 발아억제 물질은 발아 초기에 대조 시험보다 약 90% 이상 발아를 억제하였다.

참고문헌

1. Kim, K. H. and J. H. Seu. An inhibitory substance of *Streptomyces* sp. on the germination of Mung Bean (I). *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* 11. 81-86. 1983.
2. Shim, K. H., Y. I. Bae, and J. S. Moon. Screening and characterization of α -amylase inhibitors from cereals and legumes in Korea. *Kor. J. Post-Harvest Sci. Technol.*

Agri. Products. 1. 117-124. 1994.

3. Oh, K. T., Y. W. Lee, M. Kubo, S. J. Kim, and S. Y. Chung. Isolation, identification and characterization of bacteria degrading crude oil. *Kor. J. Soci. Environ. Eng.* 22. 1851-1859. 2000
4. Wood, A. W. and S. T. Kellogg. Biomass part A : Cellulose and Hemicellulose. Academic press. Inc. 160. 87-112. 1988.
5. Cho, B. H., K. Kim, and N. M. Sung. Screening of microorganisms secreting plant growth regulators. *Kor. J. Mycol.* 21. 112-119. 1993.

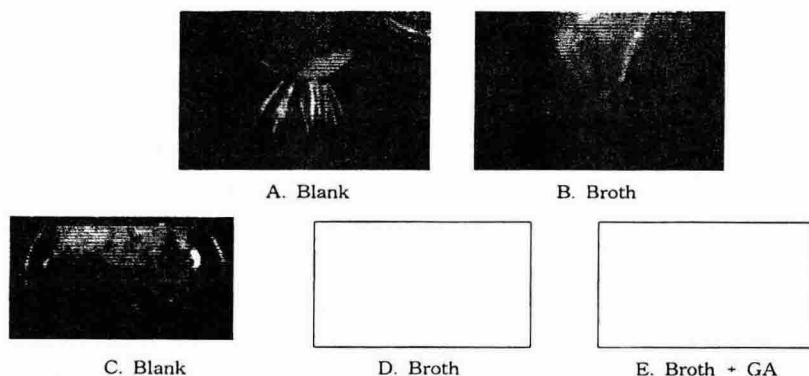


Fig. 1. The germination inhibition of Onion (*Allium cepa* L.) and Rice (*Oryza sativa* L.).

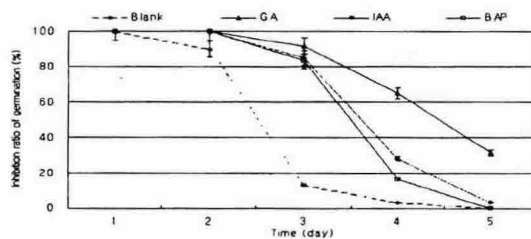


Fig. 2. The phytohormone induction for production of the substance of seeds germination inhibition.

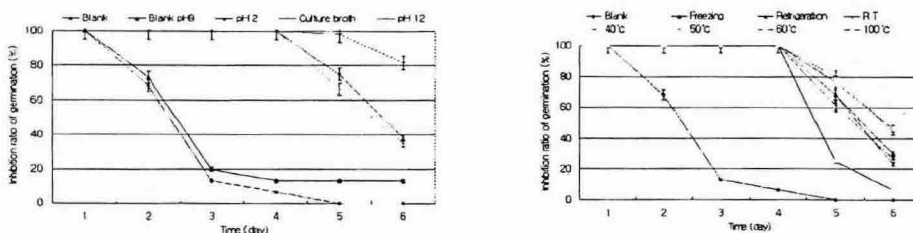


Fig. 3. The physical and chemical stabilization of the substance of seeds germination inhibition.