

인산가용화균 *Penicillium* sp. GL-101의 유리인산 생성기작에 관한 연구

강선철* · 양미옥 · 태언희

대구대학교 생물공학과

(2001년 1월 5일 접수 · 2001년 2월 7일 수리)

Mechanism of Free Phosphate Production by *Penicillium* sp. GL-101, Phosphate Solubilizing Fungus, in the Submerged Culture

Sun-Chul Kang · Mi-Ok Yang · Un-Hee Tae (Dept. of Biotechnology, Taegu University, Kyongsan 712-714, Korea, E-mail: sckang@taegu.ac.kr)

ABSTRACT : We investigated the capability of the phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. GL-101, to solubilize *in vitro* some insoluble rock phosphate via possible mechanisms: acidification of the medium, production of chelating metabolites, redox activity, and so on. GL-101 was able to solubilize rock phosphate (mostly calcium phosphate) in a liquid potato dextrose broth(PDB) medium, as determined by spectrophotometric analyses. Acidification was the major mechanism of solubilization since the pH of cultures fell below 4.0 and in cultures containing 1.0%(w/v) loess the pH dropped from 7.0 to 3.2. More than 10 mg/mL concentrations of citric acids were detected by high-performance liquid chromatography(HPLC) in the culture supernatants. Also this fungus showed the phosphatase activity (over 1.3 unit) to contribute partially releasing phosphate from rock phosphate, when supplemented with 1.0% loess in culture broth. The chelating activity of GL-101 in culture supernatants was not present because 2-ketogluconic acid, a chelating agent for the phosphate, was produced only a basal level. Therefore, the solubilization mechanism of rock phosphate by *Penicillium* sp. GL-101 involves both acidification due to citric acid production and phosphatase activity.

Key words : phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp., loess, citric acid, phosphatase

서론

지금까지 우리 농업은 단위면적당 작물의 수확량을 극대화하기 위하여 다량의 화학비료와 유기물을 사용해 왔다. 그러나 이들 대부분은 화학적, 생물학적 반응을 거쳐 비료성분의 불용화나 유실현상이 일어나게 된다. 특히 인산은 산성토양에서 철 및 알루미늄 이온과 그리고 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 불용화됨으로써 토양의 지력 저하와 하천과 바다의 부영양화를 가져오는 주원인이 되고 있다.¹⁾ 앞으로 우리가 지향해야 할 농업은 환경친화적이고 부가가치가 높은 무공해 농산물을 생산하는 영농 시스템이다. 따라서 인산비료의 사용을 대체할 수 있고 환경오염 문제를 해결할 수 있는 방법이 절실히 요구된다. 이러한 문제를 해결하기 위한 가장 바람직한 방법은 인산가용화 미생물을 이용하여 토양속에 다량으로 축적되어 있는 불용성 인산태를 작물이 이용할 수 있는 유리인산으로 전환하는 것이다.

인산가용화 미생물을 이용한 환경친화형 생물비료(biofertilizers)의 개발노력은 부단히 이루어져 왔다. 이미 1950년대에 러시아와 동유럽에서 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물(phosphobacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과 작물의 인

산 흡수를 증대시킬 수 있었으며 평균 10%의 수량 증가를 보았다.²⁾ 1980년대는 *Penicillium bilaji* 등의 사상균이 인산의 흡수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다.³⁾ 최근에는 토양에 천연 인광석을 시비하거나 *Bacillus megaterium*,²⁾ *B. polymyxa*,⁴⁾ *Pseudomonas striata*,^{4,5)} *Pseudomonas* sp. (PI18/89),⁶⁾ *Penicillium simplicissimum*,⁷⁾ *P. aurantiogriseum*,⁸⁾ *P. bilaii*,³⁾ *Aspergillus awamori*,^{5,9)} *A. aculeatus*,¹⁰⁾ *A. niger*⁷⁾ 등의 인산가용화균을 biofertilizers로 사용했을 때 곡물류, 콩과 식물류, 감자류, 기타 작물들의 생산량이 증대하는 것으로 보고되고 있다.²⁾

미생물을 이용한 biofertilizer의 개발은 미국, 일본, 인도, 중국 등지에서 질소고정균인 VAM(vesicular-arbuscular mycorrhizae)¹¹⁻¹⁴⁾과 *Rhizobium*이 주로 연구되어^{15,16)} 세계 각지에서 생산하고 있으며, 특히 미국에서는 VAM과 인산가용화균의 혼용에 대하여 연구가 이루어지고 있다.¹⁷⁾ 국내에서도 환경농업의 중요성이 인식되면서 여러 대학 및 연구소에서 미생물제제에 대한 연구를 시작하고 있으나 균주선발 및 배양특성 조사, 포장시험 등에 관한 폭넓은 연구의 부족으로 아직 실험실 수준의 초보적인 단계에 머무르고 있다.^{18,19)} 환경보존을 위한 규제강화로 2000년대에는 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 판단되기 때문에 난용성 인산염

을 효율적으로 분해하여 작물이 필요로 하는 인산질 비료성분을 충분히 공급해 줄 수 있는 biofertilizers의 개발은 중요한 과제가 될 것이다.

본 연구실에서는 이러한 노력의 일환으로 인산염 분해능이 우수한 인산가용화균을 토양으로부터 분리·동정하였으며 이 균주 *Penicillium* sp. GL-101 임을 밝혔다.²⁰⁾ 이 사상균은 액체배양시 tricalcium-phosphate, rock phosphate, aluminium phosphate, hydroxyapatite 등의 불용성 인산염을 분해하여 다량의 유리인산을 생성하였다.²⁰⁾ 이 균주를 생물비료화하기 위한 다음 단계로 batch culture를 시도하였으나 배양용 배지에서 상당한 크기(직경 0.5 cm 이상)의 mycelial pellet이 형성되었다. 일반적으로 mycelial pellet이 형성되면 표면적 감소에 따른 산소 및 영양분 흡수를 감소, 성장률 감소 등의 비효율적 배양적 특성이 나타난다.²¹⁾ 따라서 이 균주의 배양균체를 액상으로 대량생산하기 위해서는 pellet의 형성을 억제하는 배양기법이 필수적으로 요구된다.^{22,30)}

따라서 본 연구실에서는 유리인산 생성균 *Penicillium* sp. GL-101의 액체배양중 mycelial pellet 형성을 억제하기 위하여 배양조건(배지 종류, 초기접종량)과 배지 첨가물(점토광물, 계면활성제, PEG 200)의 종류에 따라 pellet 형성에 미치는 영향을 조사하였다.³¹⁾ 그 결과 이 균주는 배지종류를 달리하여 배양했을 때 YPD > SBD > PDB 순으로 pellet 크기가 감소하였다. 또한 이 균주는 $1 \times 10^3 \sim 1 \times 10^6$ conidia/mL 범위의 초기접종농도에서는 농도가 높을수록 pellet의 크기는 감소하였으며, $1 \times 10^7 \sim 1 \times 10^8$ conidia/mL 범위의 농도에서는 무정형의 불규칙적인 pellet을 형성하였다. 점토광물인 zeolite와 diatomite를 각각 1.0% 농도로 첨가하였을 경우에는 pellet이 3/4과 1/2로 감소하였으나, bentonite를 1.0% 첨가하였을 경우에는 오히려 pellet 크기가 2.5배 증가하였다. 계면활성제 역시 이 균주의 mycelial pellet 형성에 영향을 미쳤다. 즉 Triton X-100과 Tween 80을 각각 1.0%로 첨가하였을 경우 pellet 크기가 1/10과 1/4로 감소하였고, SDS를 첨가할 경우에는 이 균의 성장이 완전히 저해되었다. 그리고 PEG 200을 1.0% 농도로 첨가했을 경우에 직경 0.2 ± 0.1 mm의 pellet이 형성되었으며, 이는 대조군에 비하여 1/25의 크기로 가장 효과적으로 pellet 형성을 억제하였다.³¹⁾

또한 본 연구실에서는 이 균주의 액체배양 중 발생하는 mycelial pellets 형성을 억제하는 새로운 방법으로서 황토를 배지 중에 첨가하여 그 효과를 검증하였다.³²⁾ 그 결과 이 균주의 분생포자를 황토를 포함하는 PDB배지에 접종하여 50 rpm의 낮은 속도로 교반하여 배양하면 무정형의 불규칙적인 pellet을 형성하는 반면에 150 rpm의 높은 속도에는 구형의 규칙적인 pellet을 형성함을 확인하였다. 또한 0~1.5%(W/V) 범위의 황토 첨가시에는 황토의 농도가 높을수록 pellet의 크기가 작게 형성되었으며, 1.5% 황토 농도에서 0.4 ± 0.1 mm의 가장 작은 pellet이 형성되었다. 이 결과는 황토를 첨가하지 않을 경우에 비하여 7배 작아진 것이다. 그러나 황토 농도가 2.0% 이상 되면 pellet의 크기

가 오히려 증가하였다. 또한 황토의 주성분인 불용성 염의 분말을 0~1.0% 농도로 배지에 첨가하여 pellet 형성에 미치는 영향을 조사한 결과 염의 농도가 높을수록 작은 크기의 pellet이 형성되었으며, CaSO₄를 첨가했을 때 가장 작은 크기의 pellet을 형성하였다.³²⁾

본 연구에서는 대구·경북지역의 황토(loess)를 채취하여 적절히 선별 가공한 후 인산가용화균 *Penicillium* sp. GL-101 균주의 액체배양에 첨가함으로써 황토 속에 존재하는 미지의 성분에 의한 이 균주의 유리인산 생성 촉진효과 및 그 기작을 검증하고 경제적, 환경조화형, 고효율의 biofertilizers를 개발하고자 하였다.

재료 및 방법

황토 채취 및 성분분석

황토시료는 대구·경북 일대의 황토지대를 탐방하여 지상으로부터 1 m 깊이까지 판 후에 표토와 섞이지 않도록 주의하여 채취하였다. 채취한 황토는 음지에서 1주일간 건조한 후 막자사발로 가볍게 간 후에 0.05 mm 이내의 고운 분말이 생기도록 체로 걸렀다. 선별된 토양은 토양화학분석법에 따라 성분분석을 실시하였다.³³⁾

공시균주 및 균주배양

공시균주는 본 연구실에서 인산가용화능이 우수한 균주를 탐색하여 토양으로부터 선별 및 동정한 *Penicillium* sp. GL-101 균주를 사용하였다.²⁰⁾ 이 균주는 PDA(potato dextrose agar; potatoes infusion 200 g, dextrose 20 g, agar 17 g, 증류수 1 L) 배지에서 배양하여 유지하였으며, 액체배양 시에는 PDA에서 agar를 제외한 PDB(potato dextrose broth) 배지에 0.5% 인광석(w/v)을 첨가하여 25℃에서 7~14일 동안 200 rpm으로 진탕배양하였다. 균접종원으로 사용된 분생포자는 공시균주를 PDA 배지에서 25℃에서 10일간 배양하여 형성된 포자이며, hemocytometer를 이용하여 현미경 하에서 정확히 포자수를 측정하여 사용하였다.

유리인산 생성균의 균체량 측정

공시균주의 액체배양시 황토 첨가에 따른 균체 생성량의 변화를 알아보기 위하여 30 mL의 PDB 배지가 들어있는 100 mL 삼각플라스크에 황토를 각각 0, 0.1, 0.5, 1.0%(w/v) 농도로 첨가하고, 1.0×10^6 spore/mL의 분생포자를 접종한 후 25℃에서 4일간 진탕배양하였다. 이 배양액을 원심분리(3,000×g, 10 min)하여 수확한 균체를 완전건조될때까지 동결건조한 후 (Moisture analyzer, Mettler LJ16, Swiss) 평량하였으며, 이 값에서 배지에 첨가한 황토량을 뺀 값을 균체량으로 결정하였다. 이상의 실험은 3회 이상 반복 수행하여 그 값의 평균값을 구하였다.

유리인산의 농도측정

균체배양액 1.5 mL을 취하여 Eppendorf tube에 담은 후 microcentrifuge로 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하였다. 원심분리 후 상등액 1.0 mL을 취하고 증류수 4 mL을 첨가하여 총 5 mL이 되게 하였다. 여기에 폴리브덴산 암모늄용액 0.2 mL과 염화제일주석용액 0.025 mL을 가하여 잘 섞은 후 30°C에서 10분간 방치한 다음 690 nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 실험에 사용한 용액은 다음과 같은 방법으로 제조하였다. 폴리브덴산 암모늄용액: 폴리브덴산 암모늄(4수화물) 25 g을 증류수 175 mL에 녹인 다음 황산 280 mL을 증류수 약 400 mL에 천천히 넣고 방냉하면서 혼합한 다음 최종적으로 1,000 mL이 되도록 한다. 염화제일주석용액: 염화제일주석(2수화물) 2.5 g을 글리세린 100 mL에 넣어 수용액상에서 유리봉으로 섞으면서 빨리 녹인다.

배양액 중의 유기산 분석

공시균주의 액침배양 중에 생성되는 각종 유기산의 조성과 양을 측정하기 위하여 Eppendorf tube에 배양액 1.5 mL을 취하여 5,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 HPLC (Varian, USA)로 분석하였다. 실험에 사용한 HPLC 분석조건은 Table 1에 요약하였다.

Phosphatase 활성 측정

균체에 의하여 생성·분비되는 phosphatase 활성은 Onish 등의 방법을 약간 변형하여 측정하였다.³⁴⁾ 배양액 중의 효소액 시료는 Eppendorf tube에 배양액 1.5 mL을 넣고 5,000×g에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 준비하였다. 기질용액은 10 mM Tris/HCl(pH 7.6) 완충용액에 10 mM *p*-nitrophenyl phosphate(*p*NPP)와 1 mM MgCl₂를 첨가하여 만들었다. 반응액은 50 mM Tris/HCl (pH 7.6) 완충용액 800 μL에 10 mM *p*NPP 기질용액 100 μL와 효소시료액 100 μL를 혼합하여 30°C에서 10분간 반응시킨 후 얼음에 옮겨 2 N NaOH 200 μL를 가하여 반응을 중지시키고 실온에서 원심분리하였다. 효소활성은 spectrophotometer(Cecil, USA)로 410 nm에서의 흡광도를 측정하여 결정하였다.³⁴⁾ 이때 효소활성 1 unit는 30°C에서 1분당 1 nmole의 *p*-nitrophenol을 유리시키는 효소의 양으로 정의하였다.

Table 1. HPLC operating parameters for the analysis of organic acids

Parameter	Condition
Instrument	Varian / LC star
Column	Hypersil BDS C ₁₈
Detector	UV, 210 nm
Mobile phase	0.1% H ₃ PO ₄
Flow rate	0.7 mL/min
Column temperature	30°C
Injection volume	20 μL

결과 및 고찰

황토의 성분분석

Penicillium sp.의 액침배양에서 이들 균주가 생성하는 균사체는 서로 엉켜서 종종 mycellial pellet을 형성하게 된다. 이와 같은 pellet 형성은 균체의 대량생산 과정에서 가장 큰 문제점이 되고 있다. 따라서 본 연구진들은 유리 인산 생성균 *Penicillium* sp. GL-101의 액침배양중 pellet 형성을 억제하기 위한 효과적인 방법으로 황토를 배양액에 첨가함으로써 이와 같은 문제점을 해결할 수 있음을 확인하였다.³²⁾

한편 본 연구에서는 황토의 독특한 물리, 화학적 성질이 공시균주의 pellet 형성의 억제 뿐만 아니라 균체성장과 유리인산 생성기작에도 영향을 미칠 수 있음을 확인하여 그 결과를 보고하고자 한다.

일반적으로 황토는 여러 가지 광물입자로 구성되어 있는데, 그 크기는 0.02~0.05 mm이며, 조립질과 중립질의 먼지를 포함한다. 이 범위의 크기를 갖는 입자비율은 무게비로 전체의 50%이고, 점토 크기(0.005 mm 이하)의 입자들은 5-10% 정도이다. 황토의 화학적 조성은 SiO₂가 50~60%, Fe₂O₃(3가 산화철) 2~4%, Al₂O₃ 8~12%, FeO(2가 산화철) 0.8~1.1%, TiO₂ 0.5%, MnO 0.5%, CaO(석회) 4~16%, MgO 2~6% 정도로 구성되어 있다.³⁵⁾

유리인산 생성에 미치는 황토의 효과를 검증하기 위하여 먼저 대구·경북 일대의 3개 지점(진량, 경산, 대구)에서 황토를 채취하여 토양화학분석법³³⁾에 따라 이들의 성분분석을 실시하였다 (Table 2). 그 결과 채취원에 따라 황토의 물성이 상당히 다르게 나타났으며, 특히 치환성 양이온양에서 큰 차이를 보였다.

본 연구를 위한 예비실험으로 각 지역에서 채취한 황토를 1.0%(w/v) 농도로 배지에 첨가하여 액침배양하였을 때 경산지역의 황토를 첨가한 경우에서 유리인산이 가장 많이 생성됨을 확인하였다. 따라서 경산지역에서 채취한 황토 표본을 공시토양으로 하여 이들 균주에 의한 유리인산 생성기작과 관련된 다음 실험을 수행하였다.

황토의 농도가 균체 성장에 미치는 영향

황토가 유리 인산 생성균 *Penicillium* sp. GL-101의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 PDB-인광석 배지에 황토를 각각

Table 2. Content analyses of loess collected from Taegu and Kyungbook area.

Soil sample	CEC cmol/kg	Ex. Cations, cmol/kg				pH	OM %	Sp. Area m ² /g
		Ca	Mg	K	Na			
Jinryang	12.8	22.6	0	0	0	5.8	0.3	30.6
Kyungsan	14.2	2.8	5.1	0.3	0.5	5.8	0.3	32.2
Taegu	15.0	2.5	0	0	0	5.9	0.4	25.9

Table 3. Changes of cell mass during the cultivation of *Penicillium* sp. GL-101 in the potato dextrose broth (PDB)-rock phosphate media after 4 days culture at various concentrations of loess.

Addition amount of loess %	Dry cell mass g/30ml
0 (control)	0.10±0.01
0.1	0.11±0.01
0.5	0.13±0.01
1.0	0.09±0.01

0, 0.1, 0.5, 1.0%(w/v) 첨가하고 분생포자를 접종한 후, 200 rpm으로 진탕배양하면서 균체생성량을 조사하였다(Table 3). 그 결과가 균주는 0~0.5% 범위의 황토첨가에서는 황토첨가량이 증가할수록 균체생산량이 증가하여 0.5%의 황토 첨가에서 최고의 균체생성량을 나타내었다. 이것은 균체의 pellet 크기가 작을수록 pellet 내부까지 산소의 공급이 용이하며 영양분 흡수율이 증가하기 때문에 0.5%의 황토 농도까지는 균체생성량이 증가한 것으로 사료된다. 그러나 1.0% 이상의 황토농도에서는 오히려 균체생성량이 감소하였다. 즉 황토의 농도가 너무 높으면 오히려 균체생장이 방해될 받는 것으로 나타났다. 이는 황토의 농도가 높으면 pellet 크기는 작게 형성되어 균체생장에 유리하지만 배양액의 점성이 증가하여 산소와 영양분 공급이 방해되는 것으로 사료된다.²¹⁾ 또한 음으로 하전된 황토의 고체입자는 배양액 속에 하전된 무기염류의 양을 감소시켜 균체의 성장을 억제할 수 있으며, 고체입자 자체가 균체의 성장을 억제할 수도 있다. 황토가 균체 성장을 억제하는 요인에 대한 정확한 분석은 보다 자세한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

황토의 농도에 따른 유리인산 생성 효과

인광석이 첨가된 PDB 배지에서 인산가용화균 *Penicillium* sp. GL-101 균주를 배양할 때 이 균주의 인산가용화능에 미치는 황토의 효과를 검토한 결과(Fig. 1), 1.0%(w/v)의 황토첨가구에서는 배양 11일째까지는 무첨가구에 비해 약간 높은 유리인산 생성능을 보였으나, 12일째에 최대 583 mg/kg의 유리인산을 생성하여 무첨가구의 503 mg/kg에 비하여 80 mg/kg의 유리인산이 더 많이 생산되었다. 그러나 0.1~0.5% 범위로 황토를 첨가했을 때는 유리인산 생성능이 무첨가구에 비하여 오히려 낮은 결과를 얻었다. 이와 같은 결과는 주로 배양중에 일어나는 배양액의 pH 감소 및 phosphatase 활성화와 밀접한 관련이 있는 것으로 판단된다(Fig. 2, Fig. 3). 이상에서 보여준 황토첨가가 미생물의 유리인산 생성능에 영향을 주었다는 보고는 국내외적으로 전혀 없었다. 그러나 황토의 어떤 성분이 유리인산 생성에 영향을 주었는지에 대해서는 보다 자세한 연구가 필요할 것이다.

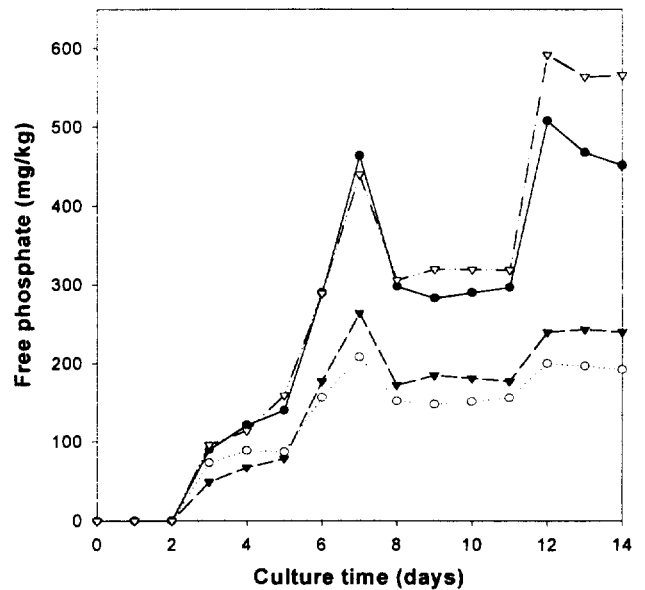


Fig. 1. Changes of free phosphate during the cultivation of *Penicillium* sp. GL-101 in the potato dextrose broth (PDB)-rock phosphate media containing various concentrations(w/v) of loess. ●-●, 0% loess(control); ○-○, 0.1% loess; ▼-▼, 0.5% loess; ▽-▽, 1.0% loess.

인산가용화균의 유리인산 생성기작

지금까지 알려진 난용성 인산염의 가용화에 관여하는 미생물의 작용기작은 H_2S 생성 즉 환원에 의한 FeS 로의 철 이온의 침전, 황 및 암모니아 산화에 의한 황산과 질산 생성³⁶⁾ 그리고 유기산 생성^{37,38)} 등에 의한 배지의 산성화, 2-ketogluconate와 같은 킬레이트 물질의 생성³⁹⁻⁴¹⁾ 등 매우 다양하다. 따라서 본 균주가 어떤 기작으로 유리인산을 생성하는지 정확히 알기 위해서는 배양액의 성분분석이 필요할 것이다.

본 연구에서는 GL-101 균주의 인산가용화 기작을 정확히 규명하기 위하여 먼저 이 균주를 14일 동안 배양하면서 배양액 중의 pH 변화를 조사하였다. 그 결과(Fig. 2) 초발 pH를 7.0으로 시작하여 이 균을 배양했을 때 황토첨가 농도에 관계없이 배양액의 pH가 급격히 떨어져서 배양 5일째가 되면 모든 시험구에서 pH가 4.0 이하로 떨어졌다. 특히 황토를 1.0% 첨가한 처리구와 무첨가구는 배양 8일 경에 pH가 3.2까지 떨어졌다(Fig. 2). 이와 같은 pH 감소의 원인물질을 추적하기 위하여 Table 1의 분석조건으로 HPLC를 수행한 결과(Fig. 2), retention time 8.9 min 지점에서 citric acid가 주성분으로 용출되었다. 그밖에도 tartaric acid, malonic acid, 2-ketogluconic acid, succinic acid 등의 유기산이 극소량으로 생성되는 것으로 확인되었다. 따라서 GL-101 균주는 2-ketogluconic acid의 생성에 의한 chelating 기작에 의한 유리인산 생성은 거의 없음을 알 수 있다. 또한 HPLC 분석결과에 의하면 0.1~1.0% 범위의 황토첨가구에서 대체로 무첨가구에 비하여 citric acid 생성량이 높았으며, 특히 1.0% 황토첨가구는 무첨

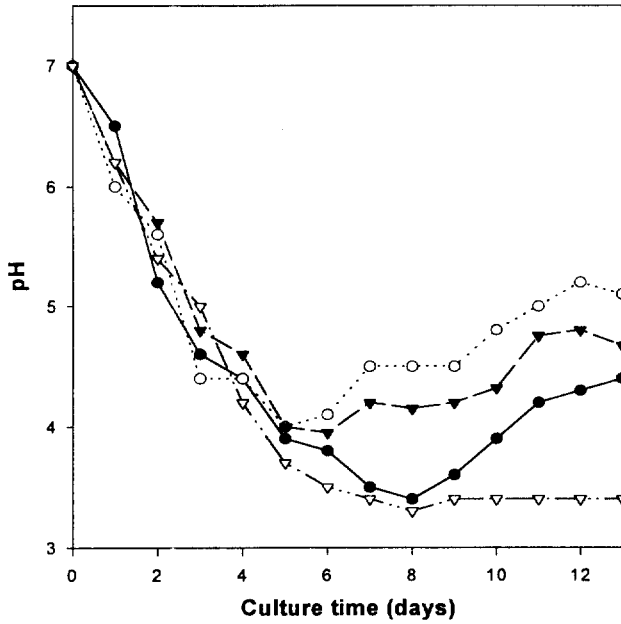


Fig. 2. Changes of pH values during the cultivation of *Penicillium* sp. GL-101 in the potato dextrose broth (PDB)-rock phosphate media containing various concentrations (w/v) of loess. ●-●, 0% loess(control); ○-○, 0.1% loess; ▼-▼, 0.5% loess; ▽-▽, 1.0% loess.

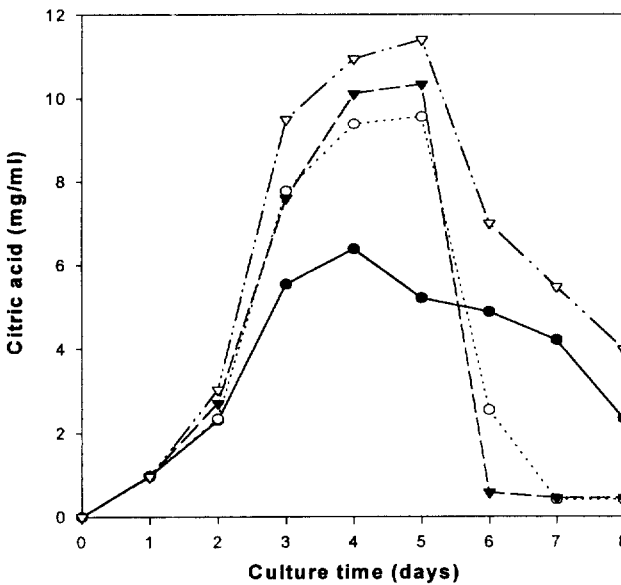


Fig. 3. Citric acid production during the cultivation of *Penicillium* sp. GL-101 in the potato dextrose broth (PDB)-rock phosphate media containing various concentrations (w/v) of loess. ●-●, 0% loess(control); ○-○, 0.1% loess; ▼-▼, 0.5% loess; ▽-▽, 1.0% loess.

리구에 비해 배양 4~5일 경에 최대 2배까지 유기산 생성에서 차이를 보였다. 황토 1.0% 첨가구에서 배양 5일째에 citric acid 생성량이 최대 11.5 mg/mL 수준으로 생성됨을 확인하였다(Fig. 2). 최

근에 Roukas의 연구³⁷⁾에 의하면 *Aspergillus niger*가 citric acid를 생성하여 난용성 인산염을 가용화시킬 수 있음을 보고하였다. 또한 Fenice 등의 연구³⁸⁾에 의하면 gluconic acid의 생성에 의해서도 인광석이 가용화됨을 보고하였다. 그러나 이상의 연구결과를 종합하면 유기산의 생성이 인산가용화에 직접적으로 영향을 미침에는 틀림이 없지만 유기산의 생성시점과 유리인산 생성시점 및 유기산의 생산량과 유리인산 생산량이 정확히 일치하지는 않았다(Fig. 1, Fig. 3). 따라서 이 균주의 유리인산 생성에는 다른 기작이 동시에 관여함을 알 수 있었다.

이상의 결과를 토대로 유리인산 생성기작에 대한 다른 가능성을 검토한 결과 이 균주는 배양액 속으로 phosphatase를 다량으로 생성·분비함을 확인하였다(Fig. 4). 그 결과에 의하면 이 균주는 황토첨가구 및 무첨가구 모두에서 배양 3일경에 0.8 unit의 효소를 분비하였으며, 4일부터 7일까지는 지속적으로 효소 활성이 감소하였다. 그러나 7일째부터는 효소활성이 다시 증가하여 10일째는 1.0% 황토첨가구에서 최대 1.3 unit의 효소활성을 보였다. 이는 무첨가구에 비해 약 1.6배 phosphatase 활성이 높음을 알 수 있다. 그러나 예상한 바와 마찬가지로 배양기간 중의 효소활성 변화도 이 균의 인산가용화능과 정확히 일치하지 않았다(Fig. 1, Fig. 4). 즉 전체적인 양상은 비슷하였으나 효소활성을 보인 후 인산가용화능이 생기는 데까지 약 2~4일 늦게 진행됨을 알 수 있다.

이상의 결과로부터 *Penicillium* sp. GL-101의 인산가용화 기작에 영향을 미치는 주요인은 citric acid 생성에 의한 산성화 및 phosphatase 생성에 의한 효소활성임이 밝혀졌다.

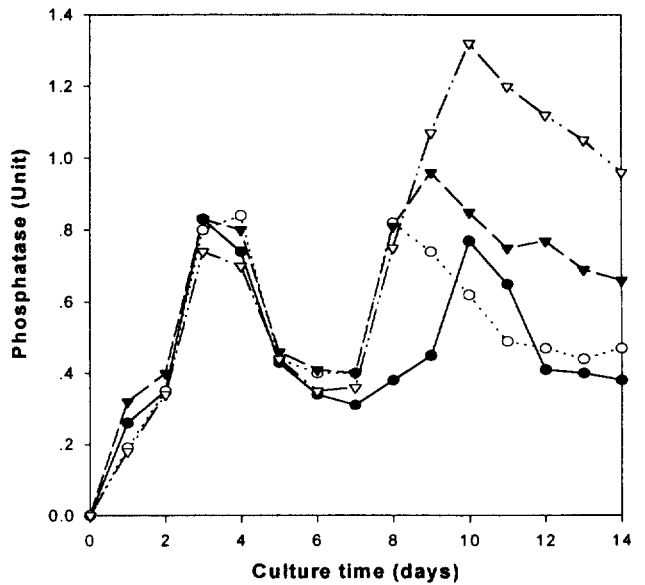


Fig. 4. Phosphatase activity during the cultivation of *Penicillium* sp. GL-101 in the potato dextrose broth (PDB)-rock phosphate media containing various concentrations (w/v) of loess. ●-●, 0% loess(control); ○-○, 0.1% loess; ▼-▼, 0.5% loess; ▽-▽, 1.0% loess.

요 약

토양에서 분리된 인산가용화 사상균 *Penicillium* sp. GL-101 균주를 PDB-인광석 배지에서 액침배양했을 때 유리인산을 배양액 속에 다량 방출함으로써 높은 인산가용화능을 보였다. 일반적으로 미생물에 의한 인산가용화 기작은 산성화, 킬레이트 대사산물의 생성, 산화환원 활성 등이 알려져 있는데 본 연구에서는 GL-101 균주의 유리인산 생성기작을 밝히기 위하여 균체를 PDB-인광석 배지에 키우면서 유리인산 생성능을 분광학적인 방법으로 정량분석하였다. 또한 균체의 액침배양중의 pH 변화를 측정하여 결과 pH의 급격한 감소 즉 배지의 산성화가 주된 인산가용화 기작임을 확인하였다 즉 이 균주는 배양 4일이 경과하면 pH가 4.0 이하로 떨어지며, 특히 1.0%(w/v)의 황토를 첨가할 경우 pH가 3.2까지 떨어졌다. 이때 pH 감소에 영향을 주는 주 원인물질을 HPLC로 분석한 결과 citric acid 임을 확인하였다. 또한 이 균주는 균체의 성장중에 배지속으로 phosphatase를 생성·분비하였으며, 특히 황토를 1.0% 첨가했을 때 최대 1.3 unit의 효소활성을 보였다. 그러나 이 균주는 2-ketogluconic acid와 같은 킬레이트 물질은 거의 생성하지 않았기 때문에 이와 같은 기작에 의한 유리인산 생성은 거의 없을 것으로 생각된다. 따라서 *Penicillium* sp. GL-101 균주의 유리인산 생성기작은 citric acid 생성에 의한 산성화 및 phosphatase 활성의 두 가지 기작에 의한 것으로 결론지었다.

감사의 글

본 연구는 1999년도 대구대학교 학술연구비 지원에 의하여 수행된 연구결과이며 연구비 지원에 대하여 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Paul, E. A. and Clark, F. E. (1989) Soil Microbiology and Biochemistry. Academic press, New York, USA.
- Dubey, S. K. and Billore, S. D. (1992) Phosphate solubilizing microorganism(PSM) as inoculant and their role in augmenting crop productivity in india - A review. Crop Res. Hisar. 5, 11.
- Kucey, R. M. N. (1988) Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat, *Can. J. Soil Sci.* 68, 261-270.
- Tiwari, V. N., Pathak, A. N. and Lehri, L. K. (1993) Rock phosphate-superphosphate in wheat in relation to inoculation with phosphate solubilizing organism and organic waste, *Ind. J. Agr. Res.* 27, 137-145.
- Agasimani, C. A., Mudlagiriappa and Sreenivasa, M. N. (1994) Response of groundnut to phosphate solubilizing microorganisms. Groundnut News 6, 5.
- Illmer, P., Barbato, A. and Schinner, F. (1995) Solubilization of hardly-soluble $AlPO_4$ with P-solubilizing microorganisms, *Soil Biol. Biochem.* 27, 265-270.
- Sayer, J. A., Raggett, S. L. and Gadd, G. M. (1995) Solubilization of insoluble metal compounds by soil fungi: Development of a screening method for solubilizing ability and metal tolerance, *Mycological Res.* 99, 987-993.
- Illmer, P. and Schinner, F. (1995) Solubilization of inorganic calcium phosphates-solubilization mechanisms, *Soil Biol. Biochem.* 27, 257-263.
- Varsha, N., Jugnu, T. and Patel, H. H. (1993) Solubilization of natural rock phosphates and pure insoluble inorganic phosphates by *Aspergillus awamori*, *Ind. J. Exp. Biol.* 31, 747-749.
- Varsha, N., Jugnu, T. and Patel, H. H. (1995) Mineral phosphate solubilization by *Aspergillus aculeatus*, *Ind. J. Exp. Biol.* 33, 91-93.
- Bolan, N. S. (1991) A critical review on the role of mycorrhizal fungi in the uptake of phosphorus by plants, *Plant Soil* 65, 189-207.
- Elmes, R.P. and Mosse, B. (1984) Vesicular-arbuscular endomycorrhizae inoculum production. II. Experiments with maize(*Zea mays*) and other hosts in nutrient flow culture, *Can. J. Bot.* 62, 1531-1536.
- Jensen, A. (1982) Influence of four vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi on nutrient uptake and growth in Barley(*Hordeum vulgare*). *New Phytol.* 90, 45-50.
- Menge, J. A. (1983) Utilization of vesicular-arbuscular mycorrhizal fungi in agriculture. *Can. J. Bot.* 61, 1015-1024.
- Kumar, H., Arora, N. K., Kumar, V. and Maheshwari, D. K. (1999) Isolation, characterization and selection of salt tolerant Rhizobia nodulating *Acacia catechu* and *A. nilotica*, *Symbiosis* 26, 279-288.
- Craig, G. F., Atkins, C. A. and Bell, D. T. (1991) Effect of salinity on growth of four strains of *Rhizobium* and their infectivity and effectiveness on two species of *Acacia*, *Plant Soil* 133, 253-262.
- Kim, K. Y., Jordon, D. and McDonald, G. A. (1988) Effect of phosphate-solubilizing bacteria and vesicular-arbuscular mycorrhizae on tomato growth and soil microbial activity, *Biol. Fertil. Soils.* 26, 79-87.
- Kim, H. O., Uo, Z. K., Lee, S. C. and Kucey, R. M. N. (1984) Mycorrhizae distribution and rock phosphate dissolution by soil fungi in the citrus fields in Jeju-do, *Cheju Natl. Univ. J.* 17, 45-50.
- Suh, J. S., Lee, S. K., Kim, K. S. and Seong, K. Y. (1995)

- Solubilization of insoluble phosphates by *Pseudomonas putida*, *Penicillium* sp. and *Aspergillus niger* isolated from Korean soils, *J. Kor. Soc. Soil Sci. Fert.* 28, 278-286.
20. Choi, M. C., Chung, J. B., Sa, T. M., Lim, S. U. and Kang, S. C. (1997) Solubilization of insoluble phosphates by *Penicillium* sp. GL-101 isolated from soil, *Agric. Chem. Biotechnol.* 40, 329-333.
 21. Byrne, G. S. and Ward, O. P. (1989) Effect of nutrition on pellet formation by *Rhizopus arrhizus*. *Biotechnol. Bioeng.* 33, 912-914.
 22. Adamek, L. (1963) Submerged cultivation of the fungus *Metarhizium anisopliae* (Metch.), *Folia Microbiologia* 10, 255-257.
 23. Inch, J. M. M. and Trinci, A. P. J. (1987) Effects of water activity on growth and sporulation of *Paecilomyces farinosus* in liquid and solid media. *J. Gen. Microbiol.* 113, 247-252.
 24. Humphreys, A. M., Matewale, P., Trinci, A. P. J. and Gillespie, A. T. (1989) Effects of water activity on morphology, growth and blastospore production of *Metarhizium anisopliae*, *Beauveria bassiana* and *Paecilomyces farinosus* in fed-batch culture, *Mycol. Res.* 92, 257-264.
 25. Kleespies, R. G. and Zimmermann, G. (1992) Production of blastospores by three strains of *Metarhizium anisopliae* (Metch.) sorokin in submerged culture. *Biocontrol Sci. Technol.* 2, 127-135.
 26. Metz, B. and Kossen, N. W. F. (1977) The growth of molds in the form of pellets, *Biotechnol. Bioeng.* 19, 781-799.
 27. Elmayergi, H. (1975) Mechanisms of pellet formation of *Aspergillus niger* with an additive, *J. Ferment. Technol.* 53, 722-729.
 28. Takahashi, J. and Yamada, K. (1959) Studies on the effects of some physical conditions on the submerged mold culture. II. On the two types of pellet formation in the saking culture, *J. Agric. Chem.* 33, 707-710.
 29. Wainwright, M. P., Trinci, A. P. J. and Moore, D. (1993) Aggregation of spores and biomass of *Phanerochaete chrysosporium* in liquid culture and the effect of anionic polymers on this process, *Mycol. Res.* 97, 801-806.
 30. Jimenez-Tobon, G. A., Penninckx, M. J. and Lejeune, R. (1997) The relationship between pellet size and production of Mn(II) peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* in submerged culture, *Enzyme Microbiol. Technol.* 21, 537-542.
 31. Kang, S. C., Lee, D. G., Ha, C. G. and Lee, T. G. (1999) Culture conditions and additives affecting to the mycelial pellet size of *Penicillium* sp. GL-101 in the submerged culture. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 42, 188-192.
 32. Kang, S. C. and Lee, D. G. (1999) Effects of loess on the mycelial pellet formation of phosphate dissolving fungus, *Penicillium* sp. GL-101 in the submerged culture, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 14, 337-341.
 33. Han, K. K., Park, J. K., Jeong, L. K., Lee, C. S., Yoon, J. H., Kim, W. C. and Lee, S. K. (1988) Methodology for the chemical analyses of soil, Sammi Press, p.1-450.
 34. Onishi, H. R., Tkacz, J. S. and Lampen, J. Q. (1979) Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase, *J. Biol. Chem.* 254, 11943-11952.
 35. Ryu, D. O. (1995) Secret of loess, Haenglim Press. p.1-429.
 36. Jansson, M. (1987) Anaerobic dissolution of iron-phosphorus complexes in sediment due to the activity of nitrate-reducing bacteria, *Microb. Ecol.* 14, 81-89.
 37. Roukas, T. (1999) Citric acid production from carob pod by solid-state fermentation, *Enzyme Microb. Technol.* 24, 54-59.
 38. Fenice, M., Selbman, L., Federici, F. and Vassilev, N. (2000) Application of encapsulated *Penicillium variable* P16 in solubilization, *Bioresource Technol.* 73, 157-162.
 39. Varsha, N. and Patel, H. H. (2000) *Aspergillus aculeatus* as a rock phosphate solubilizer, *Soil Biol. Biochem.* 32, 559-565.
 40. Cline, G. R., Powell, P. E., Szaniszló, P. J. and Reid, C. P. P. (1982) Comparison of the abilities of hydroxamic, synthetic, and other natural organic acids to chelate iron and other ions in nutrient solution, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 46, 1158-1164.
 41. Berrow, M. L., Davidson, S. and Burridge, J. C. (1982) Trace elements extractable by 2-ketogluconic acid from soils and their relationship to plant contents, *Plant Soil* 66, 161-171.