

Fusarium proliferatum KGL0401의 지베렐린 생산 최적조건과 waito-c 생장에 미치는 영향임순옥 · 이진형 · 이인중¹ · 이인구² · 김종국*경북대학교 미생물학과, ¹경북대학교 농학과, ²경북대학교 농화학과

Received November 13, 2006 / Accepted November 30, 2006

Optimization of gibberellin production by *Fusarium proliferatum* KGL0401 and its involvement in waito-c rice growth. Soon-Ok Rim, Jin-Hyung Lee, In-Jung Lee¹, In-Koo Rhee² and Jong-Guk Kim*. Department of Microbiology, ¹Department of Agriculture, ²Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University 1370 Sankyuk-dong Buk-gu Daegu 702-701 Korea. — *Fusarium proliferatum* KGL0401 was previously isolated from *Physalis alkekengi* var. *francheti* plant roots and exhibited higher GA productivity than wild type *Gibberella fujikuroi*. The aim of this work was to find out an optimal culture condition for GA production. Various carbon(fructose, glucose, lactose, maltose, sucrose) and nitrogen(KNO₃, urea, glycine, NaNO₃, NH₄Cl) sources were used for this study. GAs activities were analysed by gas chromatography and mass spectrometry(GC-MS). The highest yield of GA₃ was found in the growth medium supplemented with sucrose as carbon source and NH₄Cl as nitrogen source. The optimum carbon-nitrogen concentration for GA₃ production was found to be 0.5 M:0.17 M. Supernatant was prepared from the culture fluid of *F. proliferatum* KGL0401 cultured for 7 days at 30°C and the 10 ul supernatant was treated with 2 leaf-rice seedling.

Key words — *Fusarium proliferatum* KGL0401, *Gibberella fujikuroi*, Gibberellin, GC-MS analysis, waito-c

서 론

지베렐린은 식물호르몬으로써 식물의 잎과 줄기 신장, 종자 발아, 개화유도 및 휴면 타파등 식물발달에 중요한 작용을 한다[6,7,11]. 1926년 일본과학자인 Kurosawa 박사가 벼 키다리병의 원인균인 *Gibberella fujikuroi*라는 곰팡이에서 처음 지베렐린을 발견하였고, *Spaceloma manihoticola*[13], *Neurospora crassa*[9], *Phaeosphaeria* sp. L487[8], *Pseudomonas* sp.[1]등이 지베렐린을 생산하는 균으로 보고되어 있다. 지베렐린은 식물, 곰팡이뿐만 아니라 세균에서도 생산되고 있다[7].

지금까지 136종류의 지베렐린이 밝혀졌고, GA₁, GA₃, GA₄ 그리고 GA₇이 생물학적 활성을 가지고 있다[2]. 그 중 GA₃가 생물학적 활성이 가장 높은 것으로 알려져 있고, GA₄, GA₇과 혼합하여 농업과 양조에 사용되어지고 있다[15]. 이러한 GA₃는 년 간 25톤이 생산되어 10억 USD의 매출을 기록하고 있다[15]. 그러나 최근 보고에 의하면 GA₃보다 GA₁이 토마토, 콩, 딸기에서 생물학적 활성이 높게 나타나는 것으로 알려져 있다[8,10].

지베렐린 생산균인 *G. fujikuroi*에서 지베렐린 최적생산 조건을 살펴보면 C:N ratio가 36.8이고 pH 5에서 지베렐린이 가장 많이 생산되는 것으로 밝혀졌으며[5], 또 다른 지베렐린 생산균인 *Pseudomonas* sp.에서는 C:N ratio가 100:17 mM 일

때 가장 많은 지베렐린이 생산되는 것으로 알려져 있다[1].

대표적인 지베렐린 생산균인 *G. fujikuroi* 야생균주 보다 더 많은 양의 지베렐린을 생산하는 균주로서 *Fusarium proliferatum* KGL0401[13]을 *Physalis alkekengi* var. *francheti* 뿌리로부터 분리하여, 다양한 탄소원과 질소원의 종류의 첨가에 따른 지베렐린 생합성량의 변화와 C:N ratio의 변화에 따른 지베렐린 생합성량의 변화를 측정하였으며, 그 배양액을 waito-c(난장이 벼씨)에 처리 후 일주일간 벼의 지상부 생장을 측정함으로써, 배양액 속에 존재하는 지베렐린이 식물 생장에 영향을 주는 정도를 파악하고자 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법**실험재료**

Physalis alkekengi var. *francheti*의 뿌리로부터 분리된 *Fusarium proliferatum* KGL0401을 이용하여 본 실험을 수행하였다[13].

배지 및 배양조건

기본 배지는 Czapek's (1% glucose, 1% Bacto-peptone, 0.1% KH₂PO₄, 0.05% KCl, 0.05% MgSO₄ · 7H₂O, 0.001% FeSO₄ · 7H₂O, pH 7.3±0.2) 액체배지를 이용하여 30°C에서 180 rpm으로 7일 동안 배양하고[4, 13], 탄소원으로서 fructose, glucose, lactose, maltose, 또는 sucrose를 사용하였고, 질소원으로서 KNO₃, urea, glycine, NaNO₃, 또는 NH₄Cl을 사용하였다[1].

***Corresponding author**

Tel : +82-53-960-5379, Fax : +82-53-955-5379

E-mail : kimjg@knu.ac.kr

GAs 분석

내생 gibberellins의 추출

7일 동안 미생물을 배양한 후 배양액을 membrane filter로 여과시킨 후 6N HCl을 이용하여 pH를 2.5로 조절하였으며, 내부표준물질로는 20 ng의 [17.17-²H₂] GA₁, GA₃, GA₄, GA₇ 그리고 GA₅₃을 추출하기 전 배양액에 첨가하여 내부표준물질로 사용하였다. 배양액에 동일한 양의 ethyl acetate를 첨가하여 3개로 나눈 후 ethyl acetate를 휘발시키고 60% methanol로 희석한 후 2N NH₄OH로 pH를 8.3으로 조정하였다. 시료는 C₁₈ column(90-130 μm, 60 Å pore size, Altech)을 통과시킨 후 감압농축하였다. 농축된 잔사는 Celite/SiO₂ column(용매 formic acid로 포화된 ethyl acetate : hexan = 95 : 5)으로 통과시킨 여액을 감압농축하여 인산완충용액(pH 8.0)에 녹인 다음 2N NaOH로 pH를 8~9로 조정하고 인산완충용액을 이용하여 3회 분획한 뒤 여액(인산완충용액)에 PVPP를 가하여 1시간 동안 진탕하였다. 여과한 여액의 pH를 6N HCl을 이용하여 2.5로 조정 후 ethyl acetate로 3회 분획한 후 감압농축하였다. 농축한 잔사를 methanol에 용해시켜 0.2 μm membrane filter로 여과한 후 HPLC용 분석시료로 사용하였다.

High-performance liquid chromatography (HPLC) 분석

HPLC column은 μ Bondapak C₁₈ column(3.9 × 300 mm)을 사용하였으며 각 GA는 1% acetic acid를 포함한 28% methanol과 100% methanol 용액의 농도구배로 분리하였다. 유속은 분당 1.5 ml로 유지하였으며 1.5 ml씩 총 50분획으로 나누었다. 각 GA의 정확한 머무름 시간은 각 분획소량(15 ul)을 취하여 liquid scintillation counter를 이용(Beckman, 1801)하여 ³H-GA 표준물질의 유무를 확인하여 결정하였다.

Gas Chromatography/Mass Spectrometer (GC-MS) 분석

건조시킨 각각의 GA 분획들을 100% methanol에 용해시킨 후 동일 GA를 포함한 분획을 합하여 1 ml의 reaction vial로 옮긴 후 40°C에서 질소가스로 건조시켰다. GA분획 중 불순물을 많이 함유한 분획은 NH₂ PreSep extraction cartridge를 사용하여 GA의 불순물을 제거한 후 reaction vial로 옮겼다. 각 GA는 2차래 ethereal diazomethane을 사용하여 methyl ester로 유도한 후 질소가스로 건조하였다. Silylation이 필요한 GA는 35 ul의 pyridine과 35 ul의 N, D-Bis(trimethyl silyl)-trifluoroacetamide(1% TMCS 포함)로 65°C에서 30분간 반응시킨 후 질소가스로 건조하였다. 시료는 무수 dichloromethane으로 녹인 후 1 ul를 30 m × 0.25 mm (i.d.), 0.25 μm film thickness HP-1 capillary column (J & W)이 장착된 GC-MS에 주입하였다.

내부 GAs의 정량

5973 Network Mass Selective Detector (Hewlett Packard)

가 부착된 GC-MS를 사용하였으며 data는 HP5970C chemstation (Hewlett Packard)을 사용하여 처리하였다. 정성과 정량분석을 위해 hydrocarbon standard를 이용하여 KRI 값을 구하였으며, 각 GA와 [²H₂]GA internal standards (obtained from Prof. Lewis N. Mander, Australian National University, Canberra, Australia)의 3개의 주요 ion mass를 비교하여 정량하였다.

Bioassay

F. proliferatum KGL0401을 위에서 언급한 배지에 접종한 후 30°C에서 180 rpm으로 일주일간 진탕 배양한 배양액을 여과한 후 waito-c의 이엽기 엽액 부분에 배양액 10 ul를 처리한 후 일주일간 유묘의 성장을 측정하였다.

결과 및 고찰

탄소원의 효과

본 연구는 지베렐린 고 생산 균주 *F. proliferatum* KGL0401 [13]로 부터 지베렐린생산을 위한 최적 탄소원의 종류를 선별하기 위해, 탄소원으로는 fructose, glucose, lactose, maltose, 및 sucrose를 사용하여 실험을 수행하였다[1]. 100 ml 삼각플라스크 속에 각각의 탄소원을 1% 되게 넣은 40 ml Czapek's 액체배지[4, 13]에 *F. proliferatum* KGL0401을 접종한 후 7일간 진탕배양한 배양액 내에 생산된 지베렐린 양을 GC-MS로 측정하였다[3, 4, 13]. 전체적으로 GA₄가 GA₁, GA₃, GA₇, GA₉에 비해 높게 나타났으며, 생물학적으로 가장 활성을 띠는 Gibberellic acid(GA₃)[15]의 생산량은 sucrose를 사용했을 때 7.0 ng/ml로 가장 높게 나타났다(Table 1). 그러나 탄소원의 종류에 따른 지베렐린 합성량의 변화에는 큰 차이가 관찰되지 않았다.

질소원의 효과

질소원의 종류에 따른 *F. proliferatum* KGL0401 균주의 최적 지베렐린 생산량을 조사하기 위해 KNO₃, urea, glycine, NaNO₃, 또는 NH₄Cl을 사용하였다[1]. 탄소원으로는 지베

Table 1. Optimization of carbon source for the production of Gibberellins by *F. proliferatum* KGL0401

C sources (10 g/L)	ng/ml				
	GA ₁	GA ₃	GA ₄	GA ₇	GA ₉
Fructose	6.06	6.23	20.93	2.91	20.02
Glucose	6.30	6.56	21.30	11.45	18.77
Lactose	6.29	6.05	22.54	12.21	18.61
Maltose	5.62	6.06	21.81	ND	15.85
Sucrose	6.49	7.02	20.93	9.16	20.06

렐린 GA₃의 생산 효과가 가장 높은 sucrose를 사용하였으며, 각각의 질소원(1%)을 첨가한 40 ml Czapek's 액체배지에 *F. proliferatum* KGL0401을 접종한 후 7일간 진탕배양한 배양액을 가지고 배양액 속에 생산된 지베렐린 함량을 GC-MS로 측정하였다[3, 4, 13]. 탄소원과 마찬가지로 전체적으로 GA₄가 GA₁, GA₃, GA₇, GA₉에 비해 높게 나타났으며, 생물학적으로 가장 활성을 띠는 GA₃의 생산량은 NH₄Cl을 첨가했을 때 187.6 ng/ml로 가장 높게 나타났고, urea를 첨가했을 때 19.8 ng/ml로 가장 낮게 나타났다(Table 2). 따라서 질소원으로 NH₄Cl을 사용했을 때 *F. proliferatum* KGL0401으로부터 이차대사산물인 Gibberellic acid(GA₃) 합성이 촉진되는 것을 알 수 있었다. 지베렐린과 같은 이차대사산물은 질소원을 다 사용해버리고, 정지기가 된 후 이차대사산물을 유발한다는 사실이 보고되어 있다[1, 14]. 결국 질소원으로 NH₄Cl 사용은 *F. proliferatum* KGL0401의 정지기를 보다 빨리 유도하고,

Table 2. Optimization of nitrogen source for the production of Gibberellins by *F. proliferatum* KGL0401

N sources (10 g/L)	ng/ml				
	GA ₁	GA ₃	GA ₄	GA ₇	GA ₉
KNO ₃	34.05	125.11	410.23	161.84	131.49
Urea	3.09	19.79	79.62	39.95	3.61
glycine	43.55	112.42	370.01	143.65	164.41
NaNO ₃	16.41	94.62	452.69	129.07	79.89
NH ₄ Cl	129.36	187.63	316.23	116.44	156.84

GA₃를 합성시킨다는 사실을 알 수 있었다.

C:N ratio에 따른 효과

미생물에서 탄소원과 질소원의 ratio는 이차대사산물 생산을 위해 매우 중요하다[1]. *F. proliferatum* KGL0401의 탄소원과 질소원의 ratio를 알아보기 위해서 탄소원으로서 su-

Table 3. Optimization of C:N ratio for the production of Gibberellins by *F. proliferatum* KGL0401

C:N ratio	ng/ml					
	GA ₁	GA ₃	GA ₄	GA ₇	GA ₉	GA ₂₀
0M : 0M	5.8	44.4	18.6	8.5	ND	ND
0M : 0.07M	2.8	38.9	45.2	19.3	ND	ND
0M : 0.17M	2.5	38.1	28.1	20.8	ND	ND
0M : 0.27M	2.9	38.5	22.9	1.5	ND	ND
0M : 0.37M	2.1	34.4	18.8	11.4	ND	ND
0M : 0.47M	3.0	32.6	16.8	7.2	ND	ND
0.25M : 0M	6.0	340.1	74.5	38.5	ND	ND
0.25M : 0.07M	154.0	40.3	138.6	33.6	ND	ND
0.25M : 0.17M	46.8	49.9	0.4	68.4	ND	ND
0.25M : 0.27M	45.5	55.3	128.2	26.1	ND	ND
0.25M : 0.37M	30.1	19.2	108.0	30.8	ND	ND
0.25M : 0.47M	47.0	43.7	13.7	47.9	ND	ND
0.5M : 0M	11.7	37.0	68.4	38.4	ND	ND
0.5M : 0.07M	37.8	48.1	128.3	49.3	ND	ND
0.5M : 0.17M	144.5	140.0	354.1	146.3	201.9	18.9
0.5M : 0.27M	95.7	126.1	348.4	125.8	161.2	20.6
0.5M : 0.37M	78.5	143.3	349.6	153.7	148.6	8.5
0.5M : 0.47M	54.5	116.9	345.8	147.4	187.7	22.4
1M : 0M	2.1	35.1	69.4	48.0	ND	ND
1M : 0.07M	6.8	28.9	125.6	9.2	ND	ND
1M : 0.17M	73.1	127.8	297.5	ND	145.7	11.3
1M : 0.27M	ND	ND	ND	6.4	0.8	31.3
1M : 0.37M	34.4	74.5	128.1	39.9	20.1	23.3
1M : 0.47M	24.0	22.2	185.8	110.1	39.2	14.6
1.5M : 0M	1.7	27.8	30.8	24.7	ND	ND
1.5M : 0.07M	3.6	1.7	73.1	74.0	ND	ND
1.5M : 0.17M	5.8	53.8	34.0	11.7	2.1	14.4
1.5M : 0.27M	11.8	67.4	87.0	36.8	2.4	23.0
1.5M : 0.37M	44.2	43.0	19.2	6.4	0.2	15.2
1.5M : 0.47M	2.7	46.0	33.8	17.5	4.7	12.2

ND : Not determined

crose를 0 M, 0.25 M, 0.5 M, 1 M, 1.5 M로 첨가하였으며, 질소원으로는 NH₄Cl을 0 M, 0.7 M, 0.17 M, 0.27 M, 0.37 M, 0.47 M로 첨가한 40 ml Czapek's 액체배지에 *F. proliferatum* KGL0401를 접종시킨 후 일주일간 진탕배양 한 다음 배양액 내의 지베렐린 함량을 GC-MS로 측정하였다[3, 4, 13]. 이 실험에서 C:N ratio가 0.5 M : 0.17 M 일 때 GA₁의 생산량이 144.5 ng/ml, GA₃가 140.0 ng/ml, GA₄가 354.1 ng/ml, 그리고 GA₇이 146.3 ng/ml로 생산되었고, C:N ratio가 0.5 M : 0.47 M 일 때 GA₁이 54.5 ng/ml, GA₃이 116.9 ng/ml, GA₄가 345.8 ng/ml, 그리고 GA₇이 147.4 ng/ml로 생물학적 활성을 가진 지베렐린 생산이 높게 나타났다(Table 3). 그러나 생물학적 활성이 높고 벼, 토마토, 콩 등의 농업작물의 생장에 영향을 많이 준다고 알려진 GA₁[10]의 생산량은 C:N ratio가 0.5 M : 0.47 M의 경우 보다 0.5 M : 0.17 M일 때 3배 더 많이 생산되었다.

미생물의 지베렐린과 같은 이차대사산물의 생산은 질소원을 다 사용해버린 후 그 생산속도가 높아진다[1, 14]. 그러나 질소원은 미생물 생육에 절대적으로 필요하다. 본 실험에서도 질소원이 0 M일 때는 균의 생육에 필요한 질소원이 없기 때문에 지베렐린이 거의 생산되지 않았고, 질소원의 농도가 높아도 지베렐린 생산을 저해하는 것으로 나타났다. *F. proliferatum* KGL0401이 생육하기에 필요한 질소원의 농도가 0.17 M일 때 지베렐린의 생산량이 가장 높은 것으로 나타났다.

Bioassay 결과

F. proliferatum KGL0401을 C:N ratio를 다양하게 사용한 액체배지에 접종한 후 일주일간 30°C, 180 rpm으로 진탕배

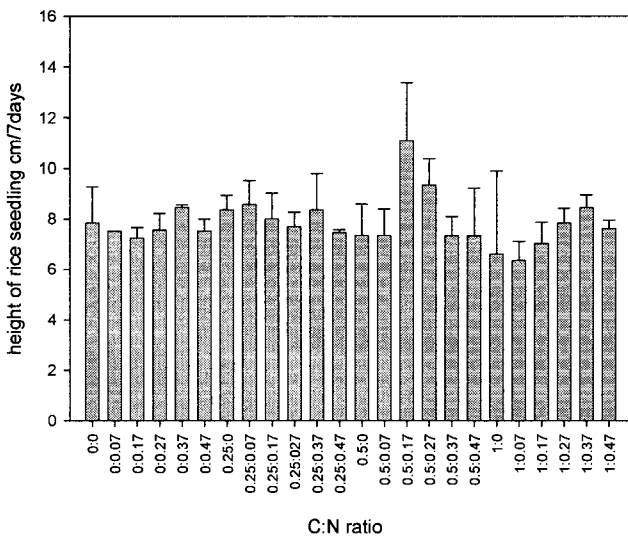


Fig. 1. Bioassay of rice sprout with cultural fluids. The waito-c rice was treated with 10 ul of culture broth prepared from various condition with of *F. proliferatum* KGL0401, grown at 30°C for 7 days and the height measured using a scale.

양 한 배양액을 여과처리 후 10 ul를 waito-c 벼의 이엽기에 처리하였다[13]. 그리고 30°C에서 일주일간 성장시킨 후 유묘의 신장을 측정하였다. 그 결과 식물생장에 제일 영향을 많이 미치는 GA₁과 GA₃의 생산량이 적었던, C:N ratio가 1 M : 0 M의 배지(2.1 ng/ml, 35.1 ng/ml)에 접종한 배양액을 처리한 waito-c 줄기의 길이는 평균 6.6 cm이었고, GA₁, GA₃, GA₄와 GA₉의 생산량이 높았던 0.5 M : 0.17 M과 0.5 M : 0.27 M의 배지에 접종한 배양액을 처리한 waito-c의 줄기 길이는 각각 11.1 cm와 9.3 cm 이었다. 이 결과 GA₁은 생물학적 활성을 가진 GA₁, GA₃, GA₄와 GA₉ 중에서 waito-c 길이 생장에 가장 중요하게 작용하는 것으로 생각된다.

요 약

본 연구는 지베렐린을 생산하는 곰팡이로 알려진 야생균주 *Gibberella fujikuroi* 보다 더 많은 지베렐린을 생산하는 균인 *Fusarium proliferatum* KGL0401를 파리 뿌리에서 분리하였으며[13], 지베렐린 생산을 위한 최적 탄소원과 질소원의 종류, C:N ratio에 대해서 실험을 수행하였다. 지베렐린 중 생물학적 활성이 가장 높은 GA₃를 가장 많이 생산하는 탄소원은 sucrose(7.02 ng/ml)이었으며, 질소원은 NH₄Cl(187.63 ng/ml)이었다. 그리고 최적 C:N ratio를 찾기 위해 탄소원(0 - 1.5 M)과 질소원(0 - 0.47 M)을 배지에 첨가하였다. 결과적으로 최적 탄소원과 질소원의 ratio가 0.5 M : 0.17 M일 때 생물학적 활성을 가진 GA₃를 140.0 ng/ml로 가장 많이 생산하는 것으로 나타났다.

그리고 bioassay 결과 GA₁, GA₃, GA₄과 GA₇의 함량이 가장 높았던 C:N ratio가 0.5 M : 0.17 M 일 때의 배양액 10 ul을 처리한 waito-c 벼의 길이가 평균 11.1 cm로 가장 높게 나타났다.

감사의 글

본 연구는 2006년도 Biogreen 21과제 연구비로 수행한 연구결과의 일부로, 농촌진흥청의 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Basiacik, K. S. and N. Aksoz. 2004. Optimization of carbon-nitrogen ratio for production of gibberellic acid by *Pseudomonas* sp.. *Pol. J. Microbiol.* **53**, 117-20.
2. Bottini, R., F. Cassan and P. Piccoli. 2004. Gibberellin production by bacteria and its involvement in plant growth promotion and yield increase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 497-503.
3. Choi, W. Y., K. S. Shin, I. J. Lee, I. K. Rhee, J. H. Lee, and J. G. Kim. 2004. Isolation of gibberellin-producing *Penicillium* spp. from the root of *Lindera obtusilob* and

- Vaccinium koreanum*. *Kor. J. Mycol.* **32**, 16-22.
4. Choi, W. Y., S. O. Rim, J. H. Lee, J. M. Lee, I. J. Lee, K. J. Cho, I. K. Rhee, J. B. Kwon, and J. G. Kim. 2005. Isolation of gibberellins-producing fungi from the root of several *sesamum indicum* plants. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 22-28.
 5. Escamilla, EM, L. Dendooven, IP Magana, R. Parra and M. De la Torre. 2000. Optimization of gibberellic acid production by immobilized *Gibberella fujikuroi* mycelium in fluidized bioreactors. *J. Biotechnol.* **76**, 147-55.
 6. Hedden, Peter and A. L. Phillips. 2000. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes. *Trands in Plant Sci.* **5**, 523-530.
 7. Hedden, Peter, A. L. Phillips, M. C. Rojas, E. Carrera, and B. Tudzynski. 2002. Gibberellin biosynthesis in plants and fungi: A case of convergent evolution? *J. Plant Growth Regul.* **20**, 319-331.
 8. Kawaide, H. and T. Sassa. 1993. Accumulation of gibberellin A₁ and the metabolism of gibberellin A₉ to gibberellin A₁ in a *Phaeosphaeria* sp. L 487 culture. *Biosci Biotech Biochem.* **57**, 1403-1405.
 9. Kawanabe, Y., H. Yamane, T. Murayama, N. Takahashi and T. Nakamura. 1983. Identification of gibberellin A₃ in mycelia *Neurospora crassa*. *Agric. Biol. Chem.* **47**, 1693-1694.
 10. Oller-Lopez, JL, J. Avalos, AF Barrero, and JE Oltra. 2003. Improved GA₁ production by *Fusarium fujikuroi*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **63**, 282-5.
 11. Olszewki, N., T. Sun, and F. Gubler. 2002. Gibberellin signal: biosynthesis, catabolism, and response pathways. *The Plant Cell* S61-S80.
 12. Rachev, R., V. Gancheva, S. Bojkova, C. Christov, and T. Zafirova, 1997. Gibberellin biosynthesis by *Fusarium moniliforme* in the presence of hydrophobic resin Amberlite XAD-2. *Bulg. J. Plant Physi.* **12**, 24-31.
 13. Rim, S. O., J. H. Lee, W. Y. Choi, S. K. Hwang, S. J. Suh, I. J. Lee, I. K. Rhee, and J. G. Kim. 2005. *Fusarium proliferatum* KGL0401- as a new gibberellin-producing fungus. *J. Microbiol. Biotechnol.* **15**, 809-814.
 14. Sanchez-Fernandez, R., J. Avalos, and E. Cerda-Olmedo. 1997. Inhibition of gibberellin biosynthesis by nitrate in *Gibberella fujikuroi*. *FEBS Lett.* **413**, 35-39.
 15. Tudzynski, B. 1999. Biosynthesis of gibberellins in *Gibberella fujikuroi*: biomolecular aspects. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**, 298-310.