

# 인삼 재배토양의 토양 미생물의 분류를 위한 T-RFLP기술의 이용

양덕춘, 이준원, 조영철<sup>1)</sup>, 김선기<sup>1)</sup>

경희대학교 한방재료가공학과, <sup>1)</sup>경기도 농업기술원 제 2 농업연구소

## Using of T-RFLP Technology for Diversity and Community Analysis of Microorganism in Ginseng Field

Deok-Chun Yang\*, Jun-Won Lee, Young-Cheol Jo<sup>1)</sup>, Seon-Ki Kim<sup>1)</sup>

Oriental Medicinal Material & Processing, College of Life Science, Kyung Hee University,  
Yongin 449-701, Korea;

<sup>1)</sup>Gyeonggi Do Agricultural Research and Extension services, Yeoncheon, Gyeonggi  
486-833, Korea

### 서 론

고려인삼(*Panax ginseng* C. A. Meyer)은 학명에서도 나타난 바와 같이 거의 만병통치약과 같이 사용되고 있는 실정이지만 타 생약제에 비해 비교적 가격이 매우 비싼 편이다. 이는 재배환경에서 기인한 것으로 종자의 관리, 일복의 설치 및 오랜기간동안의 비배기간이 소요되기 때문이다. 인삼에는 당류, 단백질, 아미노산, 사포닌, 지방산, 폴리아세틸렌, 페놀성 화합물, 알칼로이드 등 다양한 성분이 함유되어 있으며 1957년 소련의 약리학자 Brekhmann에 의하여 인삼사포닌이 인삼의 유효성분이라고 제시되었고 많은 동물실험과 임상실험을 통해 그 효능이 실증되었다.

인삼은 한국이 옛부터 중주국으로서 그명성을 유지하고 있으며 이는 한반도라는 특수한 지리적위치에 있으면서 4계절이 뚜렷하고 최적의 재배조건은 위도 35-38도상에 위치하고 있으며 토양 또한 최고의 적합한 상태에서 재배되기 때문인 것으로 알려져 있다. 그러나 아직도 토양속에 존재한 미생물에 대한 양상을 전혀 알지 못하여 계획적인 재배가 어려운 상황이다. 인삼은 보통 한 장소에서 4-6년 동안 재배되는 특성때문에 한번 미생물에 의하여 병발생이 되면 피해가 심각한 상태이며, 연작재배가 어려운 특별한 작물이다. 연작 장애의 가장 큰 원인은 *Cylindrocarpon*과 *Fusarium*에 의한 인삼 뿌리썩음병(인삼 근부병)으로서 인삼 근부병의 발병 속도는 매우 느려서 초기에는 증상이 나타나지 않다가 수확기에 나타나기 때문에 피해가 더욱 심각하다. 따라서 안정적인 수확을 얻을 수 있는 인삼 재배를 위해서는 사전에 병원균 분포밀도를 정확히 측정하여 인삼의 파종 여부와 4년된 인삼의 재배 지속 여부, 연작가능 판단이 필수적인 것으로 생각된다. 그러나 예정지관리시 인삼 파종포장의 선택과 4년근과 6년근의 재배에 대한 결정, 그리고 연작가능여부등은 기존의 방법으로는 균밀도 측정이 매우 어려워 현재까지 거의 불가능한 일로 알려졌으나, 최근 분자생물학적 방법등 즉 T-RFLP기술등을 이용한 신속, 정량적, 대량분석이 가능한 병원균 분포밀도 측정 기술이 개발됨으로서 가능할것으로 생각되어 이에 소개하고자 한다.

## 본 론

### 1) T-RFLP을 이용한 균주의 구별

기존에 배양을 통한 통성 혐기성, 절대혐기성 박테리아의 분리로 인하여 많은 박테리아가 분리된 것이 사실이고 이로 인하여 미생물 생리를 알았지만, 이렇게 배양될 수 있는 박테리아는 전체 세균의 1%정도밖에 안된다는 것은 통상적으로 알려진 바이다. 또한 배지내에서 우점종으로 분리된 박테리아들이 과연 그 공정내에서 우점종인가에 대해서는 부정적인 견해로 흐르는 것이 분자생물학적인 Taxonomy/Ecology 방법이 개발됨으로써 확실히 되었다. 이러한 분자생물학적 Taxonomy/Ecology 방법을 통해서 아직 기존의 배양된 박테리아와 다르게 계통학적 특성을 보이는 Un-cultured된 박테리아들이 많다는 것을 여실히 보여주고 있다. 이것은 곧 아직 미생물학자들이 순수배양해야할 박테리아들이 많다는 것을 의미한다. 물론 이 중에는 정말 시도를 하지 않아서 분리를 못한 박테리아들이 있을 것이고, 일반적인 배양방법으로는 절대로 배양되어지지 않는 난배양성 박테리아들이 있을 것이다. 하지만, 계속 노력을 하여 미생물학의 영역을 늘려서 박테리아의 특성을 연구해나가야 하지 않을 수 없겠다. 따라서 어떤 샘플이든간에 예를 들어, 토양, 하천, 바닷물, 슬러지, 반응기내 특수 슬러지 등 아래의 2가지 방법을 병행하여 분석해야한다고 사료된다. 첫째는 기존의 배양방법을 좀 더 개량하여 원하는 박테리아 분리를 시도해야 한다. 결국 박테리아의 생리를 알기 위해서는 연속적으로 증식할 수 있는 균체가 반드시 필요하기 때문이다. 최근에는 16S rDNA를 이용한 분자생물학적 분류학의 발달과 NCBI의 GenBank같은 곳에서의 자료의 축적과 검색을 같이 할 수 있는 시스템의 발달로 어떤 박테리아이든지 사람의 눈에 보일만큼의 colony만 이뤄진다면 그 균의 동정을 수행할 수 있어 기존의 이미 배양된 균인지 아니면 새로이 분리된 균인지를 아주 빠른 시일내에 결정하고 추후 실험에 들어갈 수 있다. 결국 관건은 배지성분이나 배양조건을 난배양성 박테리아가 잘 성장할 수 있도록 여러 방법을 시도하는 것이다. 두 번째는 언제까지나 박테리아가 배양되기만을 기다릴 수는 없는 실정하기에, 바로 시료에서 박테리아들의 핵산들(rRNA, DNA)을 추출하여 이것들을 PCR(Polymer Chain Reaction) 증폭후 여러 가지 Molecular Ecology Tools (PCR/DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis), Random Cloning, T-RFLP(Terminal Restriction Fragment Length Polymorphism), FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) 등을 이용하여 시료내의 실질적인 박테리아의 군집을 분석할 수 있다. 토양에 따른 박테리아의 군집 변화 분석을 할 수 있어 환경과 분석된 clone data로부터 미생물들의 역할을 유추해낼 수 있다. 물론 Molecular Ecology Tools에도 각각의 장점과 단점들이 있어 분석을 다해낼 수는 없어 우점종 중심으로 수행해야 한다(그림 1).

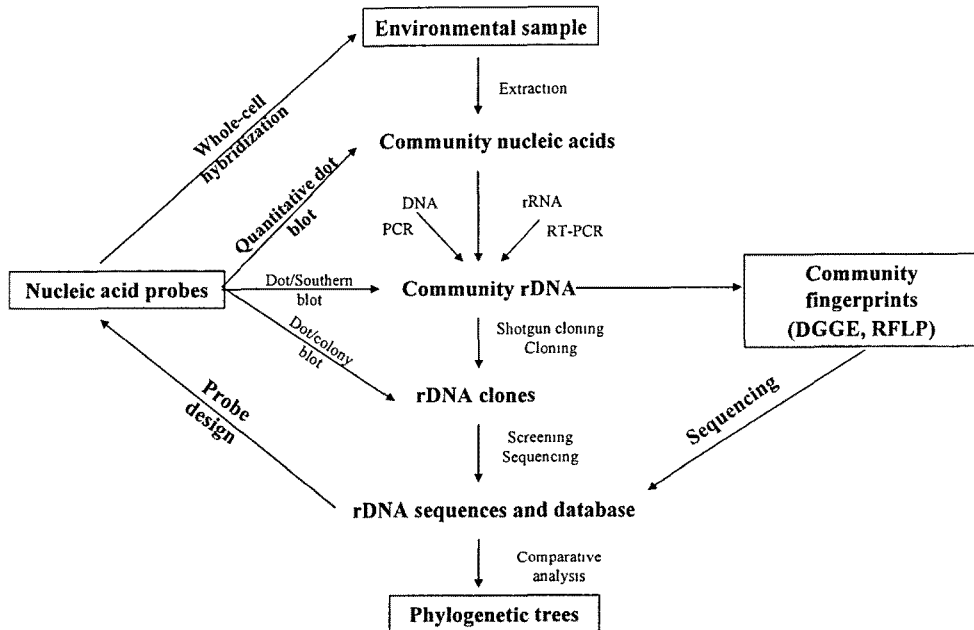


그림 1. 핵산 분석에 의해서 배양하지 않은 미생물의 Phylogenetic relationship.

결국 기존에 배양되어진 미생물과, 새롭게 분리하여 동정하는 미생물, 그리고 Molecular Ecology Tools을 이용한 rDNA clones 분석을 통하여 어느 정도나 배양되어지는 미생물들과 좀더 실제세계에 가까운 Molecular Ecology 사이에 비교 분석을 할 수 있을 것이다. 아직 국내에서는 이러한 토양내 특히나 인삼근권이라는 특별하고 중요한 곳의 Molecular Ecology 방법을 이용하여 우점종 확보를 수행한 적이 없기에 조금이라도 먼저 수행하고 깊이 수행한다면 과학적인 발견에서 그 우선순위가 있다고 보고 이로 인해 미생물간의 관계, 미생물과 식물과의 관계, 박테리아와 곰팡이의 관계를 더욱 차원높게 향상시킬 수 있을 것이다.

## 2) 실험 방법

### ○ DNA 추출

- 수집된 샘플에서 바로 DNA를 뽑기위해서 상업용 DNA 추출 키트(DNA extraction kit from soil, Bio101, U.S.A.)를 사용하였다.

### ○ PCR amplification

- 16s rRNA 진의 Primer 증폭은 9F, 각각 5'-GAGTTTGATCCTGGCTCAG-3' (위치 9-27 [*Escherichia coli* 16S rRNA numbering]) 와 1512R, 5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3' (위치 1512-1492) 였다. PCR 증폭을 위해 50  $\mu$ l를 최종반응 부피로 정하고 반응 값.농도가 1  $\mu$ M의 매개 프라이머를 포함한 혼합반응, 50ng의

DNA 농도가 0.1  $\mu$ M 인 deoxynucleoside triphosphate, 10X 반응 buffer, 2.5U 의 *Taq* DNA 로 실행하였다. PCR 을 열변성을 94  $^{\circ}$ C 에서 1분, primer 증폭을 60  $^{\circ}$ C 에서 1분, 확장을 72  $^{\circ}$ C 에서 2분 등 조건으로 25회 돌렸다. final extension 은 72  $^{\circ}$ C 에서 10분으로 PCR 반응을 마쳤다. ITS 영역의 증폭은 앞의 방법과 동일하게 수행하였다.

○ T-RFLP

- 최근 T-RFLP (terminal restriction fragment length polymorphism) 분석은 16S rRNA gene 또는 다른 기능의 genes 을 이용하여 토양이나 바다, 맑은 물, 등의 여러 환경에서 미생물의 군집을 분석하는데 사용되고 있다. T-RFLP (그림 2) 적어도 1%의 군집까지 검출해낼 수 있는 기법으로써 우점종의 분석뿐 아니라 전반적인 미생물의 분포에 유력하게 쓰인다.

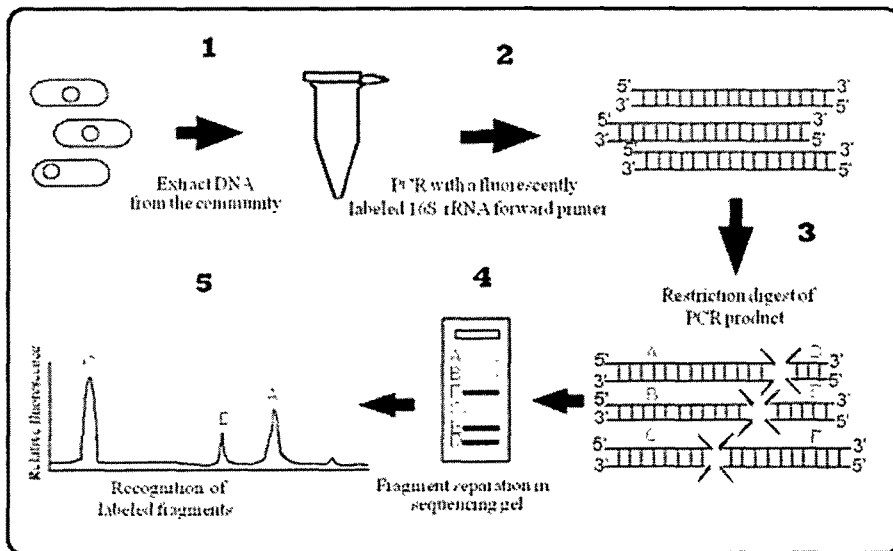


그림 2. 인삼근부병원균의 분석을 위한 T-RFLP의 개념도.

○ T-RFLP를 분석하기 위한 단계:

- 분석하고자 하는 대상 (흙, 침전 토사, 반응기 물질, 물 등)의 샘플로부터 community DNA를 추출한다. 후에 이루어질 PCR 반응에 억제 작용을 할 수 있는 성분이 없도록 최상급의 DNA를 추출하는 방법을 사용해야 한다. 분석하고자 하는 유전자를 형광 라벨이 부착된 primer와 함께 PCR 증폭을 시킨다. T-RFLP 방법은 어떠한 유전자에도 적용할 수 있으며, 실험자가 분석하고자 하는 바에 따라 primer를 선택하면 되지만, 보통 미생물 군집의 분석에는 16S rDNA를 사용한다. 실험 과정은 특수한 유전자의 경우에도 똑같이 진행된다. 증폭은 형광 라벨이 부착된 정방향 또는 역방향의 primer를 사용하여 이루어진다. 두 primer는 서로 다른 색소를 부착하여 같은 반응

에서 동시에 사용될 수도 있다. 다음 단계에 사용할 충분한 양을 얻기 위해 여러 차례의 PCR 반응을 수행하는 경우도 있다 (제한 효소 반응을 위해서는 200-300ng의 DNA가 요구된다). 라벨이 부착된 primer의 증폭 효율은 라벨이 부착되지 않은 primer보다 낮은 경향이 있으므로 수율이 낮을 수 있다. PCR 산물의 농축과 정제. 여분의 primer, 염, 불특정 PCR 산물은 전기 영동 (젤 정제)으로 제거한다. 샘플을 젤에 걸기 위해서 SpeedVac이나 에탄올 침전 방법을 사용하여 부피를 처음의 2~5분의 1로 줄이도록 한다. 한천(Agarose) 젤 상에서 전기 영동 방법으로 PCR 산물을 분리한 다음 적당한 위치에 나타난 밴드를 오려내어 젤 정제 키트(gel purification kit) (Qiagen, MOBIO, Promega)를 이용, 제품에 따른 설명서를 참조하여 PCR 산물을 회수하도록 한다. 만약 불특정 PCR 산물이 검출되지 않으면, 일반적인 PCR 정제 키트를 사용하면 된다. PCR 산물의 제한 효소 반응. 정제된 PCR 산물은 제한 효소로 절단한다. ( 증폭된 부분 (amplicon) 내에 제한 부위를 가질 확률이 높기 때문에, 네 개의 염기쌍 절단자가 제일 적합하다) 어떠한 것이 최종 제한 효소 절편(terminal restriction fragment)의 개수와 분포를 많이 얻는지 알기 위해 단일 효소 반응에서 다양한 종류의 제한 효소가 쓰일 수 있다. 각각의 효소 반응에서 100-150ng의 정제된 PCR 산물 (정제과정 동안 약 50%가 손실된다고 가정)과 10-20 U의 제한 효소가 사용된다. 완전한 반응을 위해 효소의 최적 온도에서의 배양은 4-12 시간까지 다양하게 할 수 있다. 제한 효소는 65-80°C에서 20-25분간 가열함으로써 비활성화된다. 제한 효소 반응의 탈염. 모세관 전기 영동 (capillary electrophoresis)에서 DNA 샘플의 주입에는 두 가지 방법이 있다. 첫 번째로 유체 역학적인 주입에는 capillary 사이에 압력 차가 필요하다. 다른 방법으로는 동전기상의 주입으로, 전기 영동과 전기침투의 방법을 조합하여 샘플을 주입하는 것이다. Applied Biosystems PRISM 310과 3100 genetic Analyzer (PE Biosystems)에서는 후자를 사용한다. 동전기적인 주입 방법을 사용하게 되면 무거운 분자보다 높은 전하를 가지는 분자(예, Cl 이온)가 우선적으로 주입되기 때문에 이온의 존재가 DNA의 회수를 방해할 수 있다. 그러므로 Microcon columns (Amicon), Ququick Nucleotide Removal Kit (Qiagen)나 일반적인 에탄올 침전 방법 등을 사용하여 비활성화된 제한 효소를 탈염하는 것이 필수적이다. 우리의 경우는 Microcon columns로 농축하고 탈염하기 전에 제한 효소 반응 산물을 증류수로 500분의 1 까지 희석시켰다. 모세관 전기 영동 (Capillary electrophoresis :CE), 3-5 번 (A fifth to a third) 탈염된 제한 효소 반응물을 sequencing을 위해 최적화로 맞춰진 기본값을 사용하여 모세관 전기 영동을 수행한다. 이 과정은 불충분한 형광 신호를 유도하여, peak가 적고 높이도 낮게 나오는 경우가 있다. 주입 시간과 주입 전압은 DNA 회수를 조절하기 위해 다양하게 할 수 있다. 기본적인 샘플 주입 시간은 보통 10초이나, 주입 시간이 길어지면 희석된 샘플로부터의 DNA 회수가 증가하여 높은 형광 신호와 더 많은 peak를 관찰할 수 있다. 더 나아가 주입 전압은 주입된 DNA의 양에 직접적으로 비례하고 기본값은 3 kV이나

변경 가능하다. CE를 수행하기 위한 적절한 부피가 유지되도록 탈염된 산물을 더 농축시킬 수도 있다.

○ T-RFLP결과 시료 분석

(1) 정상인삼의 근권토양 및 Rhizosphere 의 박테리아 군집 분석

- 그림 3-6은 16S rDNA를 증폭하여 T-RFLP를 한 결과이다. 샘플은 1번부터 6번까지는 정상 인삼의 근권에 있는 토양샘플이며 나머지 2종은 인삼표피를 포함한 근권토양(Rhizosphere)이다. 위의 peak (선) 하나 하나는 미생물 종이나 속을 대표하거나 또는 그 이상의 그룹을 대표할 수 있다. 선 하나 하나에 대한 동정은 재차 randome cloning을 통한 sequencing을 하면 정확히 알 수 있다. peak 개수가 50개가 넘는 것으로 분석되어서 최소 50종 이상이고, 그룹이 한 peak로 분석된다는 것을 감안한다면 수백종의 세균이 토양에 존재하는 것을 말해준다.

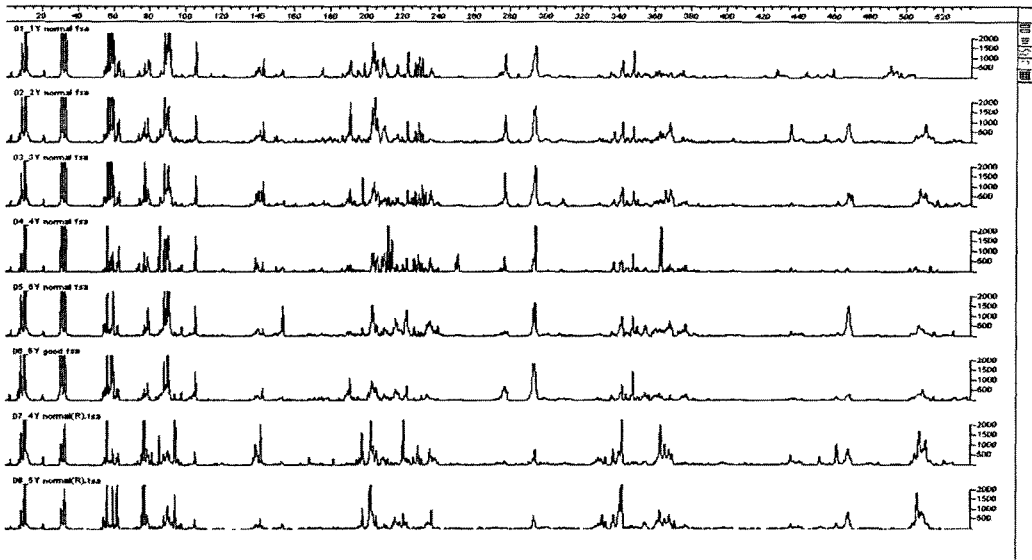


그림. 3. 정상인삼의 근권토양 및 Rhizosphere 의 박테리아 군집 분석  
(샘플 01-06번까지는 정상삼의 근권 토양 세균의 분석 패턴이고, 샘플 07-08은 근권 Rhizosphere(인삼표피포함) 세균 분석 패턴).

(2) 이병인삼의 근권토양 및 Rhizosphere 의 박테리아 군집 분석

- 그림 4는 16S rDNA를 증폭하여 T-RFLP를 한 결과이다. 샘플 01-04번은 이병인삼의 근권 토양세균의 분석 패턴이고, 샘플 5-8은 근권 Rhizosphere 세균 분석 패턴이다.

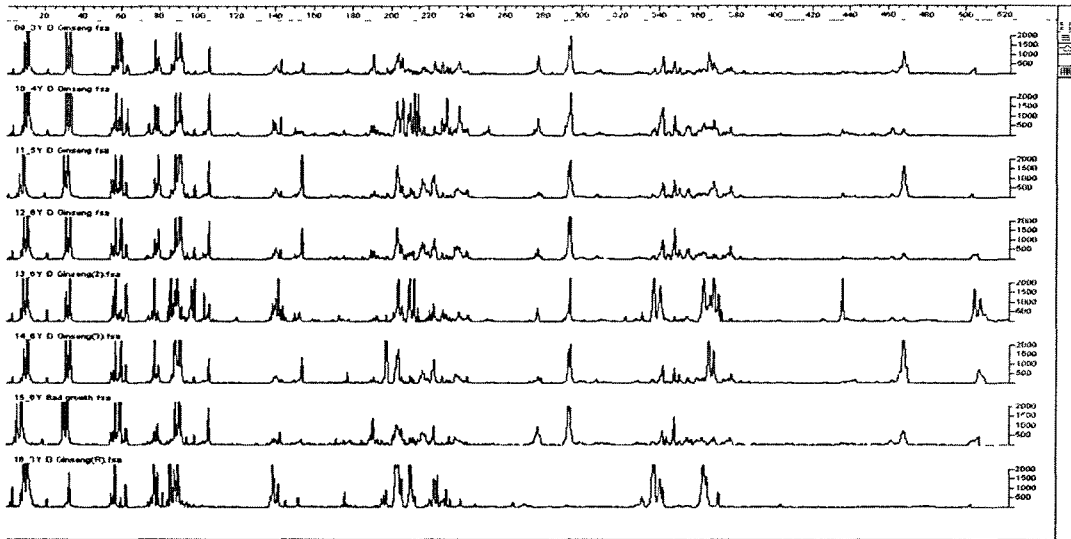


그림 4. 이병인삼의 근권토양 및 Rhizosphere 의 박테리아 군집 분석.

(3) 정상삼과 이병인삼의 근권 토양의 세균 군집 분석

- 그림 5의 샘플 1-3번은 정상삼이며, 4-6번은 이병인삼의 Rhizosphere세균의 분석 패턴이다.

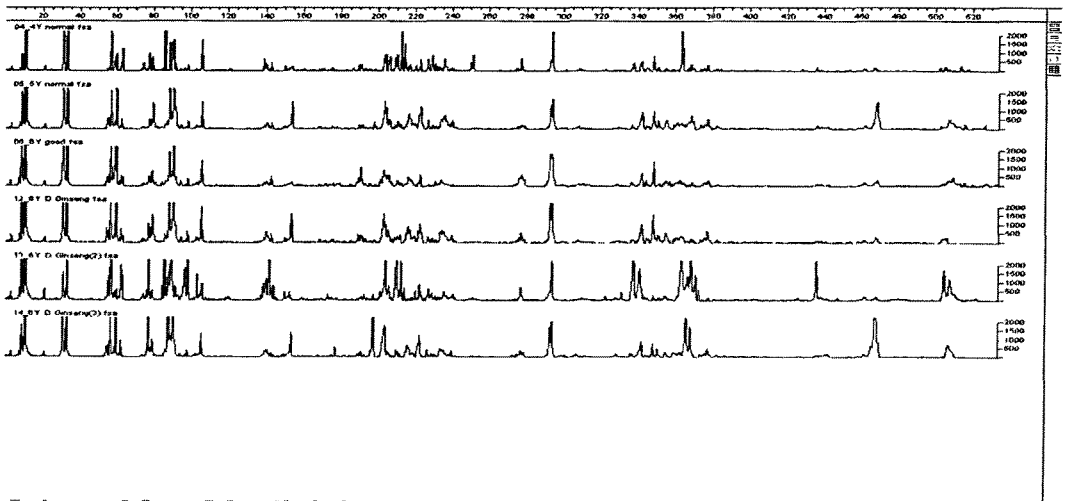


그림 5. 정상삼과 이병인삼의 근권 토양의 세균 군집 분석.

(4) 정상삼과 이병인삼의 근권 Rhizosphere 세균 군집 분석

- 그림 6의 샘플 1-4번은 정상삼이며, 5-7번은 이병인삼의 근권 Rhizosphere 토양 세균의 분석 패턴이다.

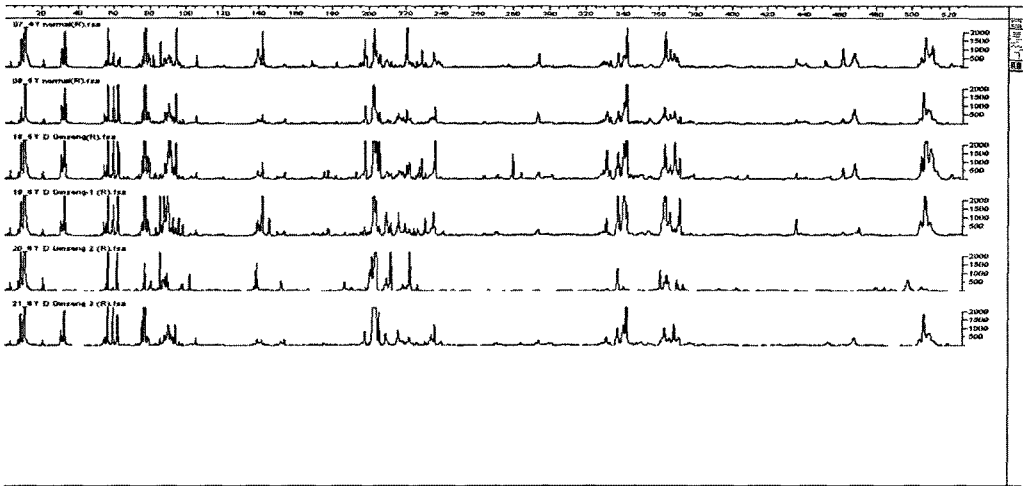


그림 6. 정상삼과 이병인삼의 근권 Rhizosphere 세균 군집 분석.

(6) 정상삼과 이병인삼의 근권 토양의 곰팡이 ITS 영역의 T-RFLP 패턴 분석

- 그림 7-8은 곰팡이 ITS 영역을 증폭하여 T-RFLP를 한 결과이다. 그림 7의 샘플은 정상삼과 이병인삼의 근권토양을 사용하였으며, 형성된 밴드의 1-2번은 정상삼, 그리고 3-5번은 이병인삼에서 확인한 밴드의 모습이다.

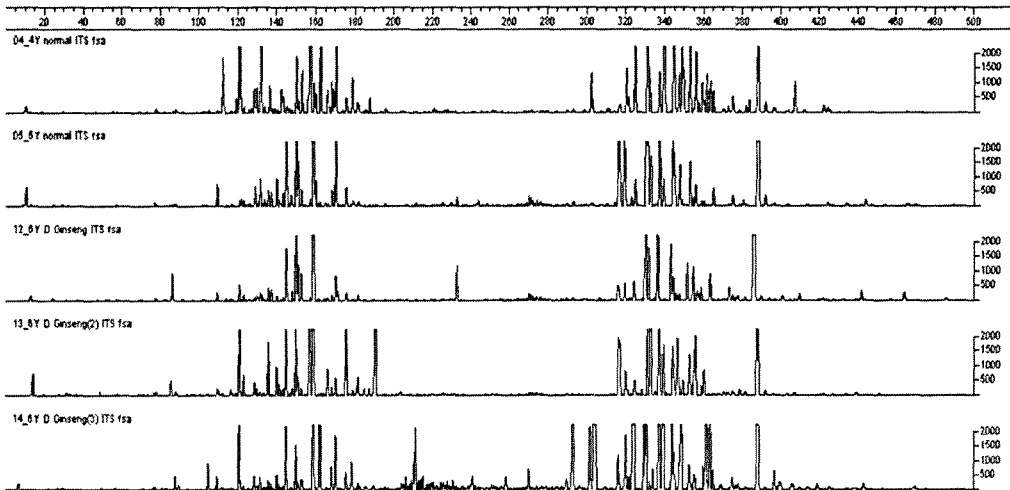


그림 7. 정상삼과 이병인삼의 근권 토양의 곰팡이 ITS 영역의 T-RFLP 패턴 분석.

(7) 정상삼과 이병인삼의 근권 Rhizosphere의 곰팡이 ITS 영역의 T-RFLP 패턴 분석

- 그림 8의 샘플은 정상삼과 이병인삼의 근권 Rhizosphere(표피포함) 토양을 사용하였



으며, 형성된 밴드의 1-2번은 정상삼, 그리고 3-4번은 이병인삼에서 확인한 밴드의 모습이다.

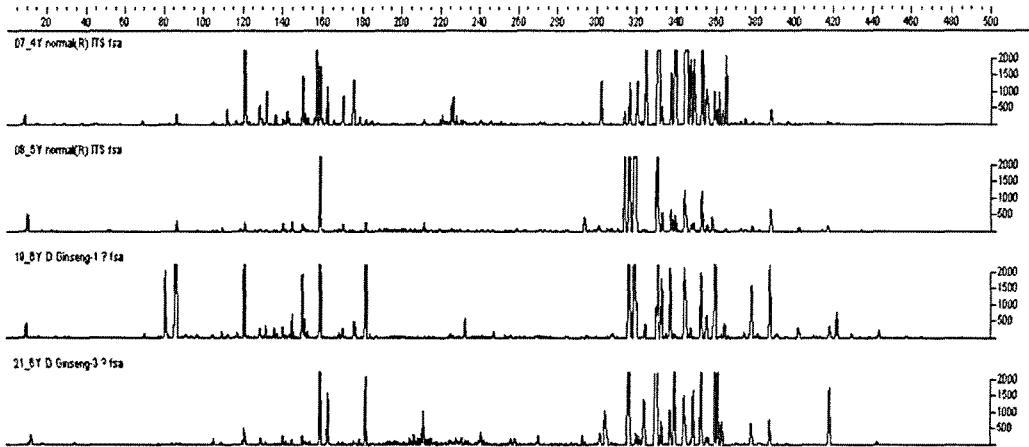


그림 8. 정상삼과 이병인삼의 근권 Rhizosphere의 곰팡이 ITS 영역의 T-RFLP 패턴 분석.

## 결 론

옛부터 인삼은 최고의 약재로 여겨져 왔으며, 최근 여러가지 효능이 과학적으로 입증되어짐에 따라 전 세계적으로 주목받고 있는 세계적인 약용작물이다. 오랫동안 인삼을 재배해 온 한국은 경작지의 한계성과 초작지의 고갈이라는 근본적인 문제에 봉착해있으며, 이러한 문제는 제작지 및 예정지관리가 잘못된 곳에 인삼을 재배할 경우 각종 연작재해 및 병해가 발생하게 되는데, 이러한 증상들은 수확량을 감소시킬 뿐만 아니라 심지어 조기 폐포로 이어지기 때문이다. 이것은 인삼이 한번 식재후 4~6년 동안 한국에서 재배하는 동안 비가림 시설로 인한 토양 순환 억제 및 동일 농약의 반복사용으로 인한 재배 토양층의 미생물의 다양성 및 군집 변화에서 기인하는 피해라고 예상되어진다. 따라서 예정지 선택 및 기작지의 재배지속 여부의 기준 마련을 위한 기초연구로서 건전인삼뿌리의 토양과 이병인삼뿌리 주변 미생물의 다양성과 군집 비교분석을 수행하였다. 다양성 및 군집분석은 sample내의 곰팡이 (Fungi)를 동등하게 비교분석하기위하여 total DNA를 뽑아 primer (ITS1F, ITS4)를 이용하여 곰팡이 ITS영역만을 증폭하였다. 다양성 군집분석을 위한 기법으로 TRFLP(terminal restriction fragment length polymorphism)를 이용하기위하여 형광 라벨이 부착된 primer를 이용하였다. PCR purification kit을 이용하여 정제된 PCR 산물을 8시간동안 restriction enzyme으로 처리하고, Quaquick nucleotide removal kit (Qiagen)를 이용하여 탈염과정을 거친뒤 Applied Biosystems PRISM 3100 genetic Analyzer 를 이용하여 분석을 수행하였다. 분석결과 정상시료와 이병시료에서 몇 가지 유의할만한 결과를 보였다. 그러나 TRFLP 분석결과만으로는 미생물의 다양성과 점유율에 대한 비교만 가능할뿐 어떠한 미생물인지는 알 수가 없었다. 따라서 이병인삼과 정상인삼의 미생물다양성의 차이를 구체화하고 실용화하기 위하여 미생물의 염기서열을 분석하는 방법을 통해서 유의성균주의 동정이 필요한 것으로 생각되어진다.