

## 약초 근권토양 내 다당 생성세균 분리 및 계통학적 특성

이혜란<sup>1</sup> · 김기광<sup>1</sup> · 황경숙<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>목원대학교 미생물나노소재학과, <sup>2</sup>목원대학교 미생물생태자원연구소

### Isolation and Phylogenetic Characteristics of Exopolysaccharide Producing Bacteria in a Rhizosphere Soil of Medicinal Herbs

Hae-Ran Lee<sup>1</sup>, Ki-Kwhang Kim<sup>1</sup>, Kyung-Sook Whang<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Microbial & Nano Materials, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

<sup>2</sup>Institute of Microbial Ecology & Resources, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

(Received August 6, 2010/Accepted September 16, 2010)

We examined the distribution of exopolysaccharide (EPS) producing bacteria population in rhizosphere soils of domestic medicinal herbs; *Angelica sinensis*, *Atractytodes japonica*, *Achyranthes japonica*, *Anemarrhena asphodeloides*, and *Astragalus membranaceus*. Fifty-six percent of the total isolates from rhizosphere soil of *Angelica sinensis* were EPS producing bacteria, suggesting the dominance of EPS producing bacteria in rhizosphere soil of *Angelica sinensis*. EPS producing bacteria were enumerated in root system (rhizosphere soil, rhizoplane, inside of root) of *Angelica sinensis*. Bacterial density of rhizosphere soil, rhizoplane, and inside of root were distributed  $9.0 \times 10^6$  CFU/g · soil,  $7.0 \times 10^6$  CFU/g · soil, and  $1.4 \times 10^3$  CFU/g · soil, respectively. EPS producing bacteria from rhizosphere soil were categorized into five major phylogenetic groups: *Alphaproteobacteria* (4 strains), *Betaproteobacteria* (6 strains), *Firmicutes* (2 strains), *Actinobacteria* (3 strains), and *Bacteroidetes* (1 strain) subdivisions. Also, the EPS producing isolates from rhizoplane were distributed as 7 strains in *Alphaproteobacteria*, 3 strains in *Betaproteobacteria*, 2 strains in *Actinobacteria*, 3 strains in *Bacteroidetes*, and 1 strain in *Acidobacteria* subdivisions. All of the EPS producing bacteria inside of root belong to genus *Chitinophaga*. *Burkholderia caribiensis* DR14, *Terriglobus* sp. DRP35, and *Rhizobium hainanense* SAP110 were selected in 112 EPS producing bacteria. These appeared to have produced high levels of exopolysaccharide 6,555 mpa.s, 3,275 mpa.s, and 1,873 mpa.s, respectively. The purified EPS was analyzed Bio-LC. As neutral sugars, glucose, galactose, mannose were detected and as amino sugars, galactosamine and glucosamine were detected. Especially, analysis of Bio-LC showed that *Rhizobium hainanense* SAP110 produced glucose (60~89%) and glucosamine (8.5%) as major neutral sugar and amino sugar, respectively.

**Keywords:** exopolysaccharide, medicinal herb, rhizosphere soil

근권토양 내 미생물군집 구조와 밀도는 식물 생육에 매우 밀접한 영향을 미친다. 토양미생물은 식물뿌리 및 뿌리주변에 밀집하여 근관세포로부터 용탈된 유기물을 이용하고 생육하면서 군집을 형성한다. 이들 근권미생물군집은 항생물질을 생산하여 식물병원균으로부터 식물을 보호하고, 식물생육을 촉진하는 효소 및 호르몬 등을 생산하며, 인과 같은 무기영양물을 가용화시켜 식물이 흡수하기 쉽게 도와주는 등 식물생육에 중요한 역할을 수행한다(3, 5, 7, 20). 식물생육촉진 근권세균(plant growth promotion rhizobacteria; PGPR)은 근권 내에 서식하

면서 auxin, gibberellin, cytokinin 등과 같은 식물생육촉진 호르몬이나 siderophore와 같은 물질을 생산하여 식물 생장을 촉진시키거나 병원성 세균에 대한 저항성을 높여주는 등 다양한 역할을 하는 것으로 보고되어왔다(11, 16, 23). *Pseudomonas*, *Azospillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Xanthomonas*, *Serratia* 속에 속하는 다양한 세균들이 PGPR로 알려져 있으며, 이들 PGPR이 벼, 보리, 옥수수, 밀, 귀리, 콩, 오이, 양파 등 농업적으로 중요한 작물의 성장과 수확량 증가에 중요한 역할을 하는 것으로 밝혀졌다(8, 9, 11, 16, 22).

최근 근권으로부터 분리된 다당(exopolysaccharide; EPS) 생성세균의 기능에 관한 다양한 연구가 진행되고 있다(17, 24,

\* For correspondence. E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr; Tel: +82-42-829-7593; Fax: +82-42-829-7599

32). 자주개자리의 공생세균 *Sinorhizobium meliloti*에 의해 생산된 EPS 및 해바라기 뿌리에서 분리된 *Rhizobium* sp. YAS34 균주가 생산하는 EPS가 식물생장촉진 인자로 작용하였고, *Pantoea agglomerans*로부터 생산된 EPS는 담배, 파슬리, 밀과 쌀의 세포배양 결과 성장속도를 증가시키는데 기여하였다는 연구결과가 발표되면서 근권 내 EPS 생성세균 탐색에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다(1, 9, 18, 22, 27).

본 연구에서는 친환경 작물생육용 자재로 이용 가능한 농업 미생물 유전자원 다양성을 확보하기 위하여 국내에 자생하는 다양한 약초 근권토양으로부터 EPS 생성세균의 분포율을 조사하고 계통학적 다양성을 밝힘과 동시에 EPS 생성 우수 균주를 분리하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 약초 근권토양 시료 채취

경상북도 농업기술원 신물질 연구소의 약초재배 시험장에서 삼주(*Attractylodes japonica*), 쇠무릎(*Achyranthes japonica*), 지모(*Anemarrhena asphodeloides*), 황기(*Astragalus membranaceus*)의 근권토양을 채취하였고, 충청북도 금산군 당귀 재배농가로부터 당귀(*Angelica sinensis*)의 근권토양을 채취하였다. 채취한 각 시료는 polyethylene vinyl에 넣어 4°C에 보존한 후 24 시간 이내에 실험하였다.

### 시료 처리

근권으로부터 채취한 토양시료는 10 g을 정량한 후 90 ml의 멸균수를 넣고 초음파기(Vivra cell VCX750, USA)를 이용하여 30 W에서 2분간 분산 처리하였다. 근면시료 처리를 위하여 먼저 약초 뿌리에 부착되어 있는 토양을 붓으로 털어낸 후 뿌리를 10 g 정량하고 90 ml의 멸균수를 넣고 초음파기(Vivra cell VCX750, USA)를 이용하여 30 W에서 2분간 분산 처리하였다. 근내부 시료는 뿌리표면을 무균적으로 벗겨낸 내부조직 10 g을 90 ml의 멸균수에 넣고 homogenizer (Nikon Seiki Co., Japan)을 이용하여 15,000 rpm에서 5분간 분산 처리하였다.

### 다당 생성세균의 계수 및 분리

분산 처리된 각 시료를 순차적으로 희석한 후, PDA (Potato 200 g, Glucose 20 g, Agar 15 g, DW 1 L)와 SCA (Starch 10 g, Casein 1 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.5 g, Agar 15 g, DW 1 L), 그리고 NA (Beef extract 10 g, Peptone 10 g, Sodium chloride 5 g, Agar 15 g, DW 1 L) 평판배지에 100 µl씩 분주하고 28°C에서 1주일간 배양한 후 평판배지 상에 형성된 콜로니 중 점액성 콜로니를 형성한 균주를 선택적으로 계수하고 순수 분리하였다.

### 다당류 정제

다당 생성 균주가 생산하는 다당류 분석을 위하여 Goubet의 방법에 따라 정제하여 분석하였다(6). 순수 분리한 각 균주를

250 rpm에서 4일간 진탕 배양한 후 2배량의 증류수로 희석하여 3,560×g에서 30분간 원심분리하여 균체침전물을 제거하였다. 상층액에 4% 농도의 Trichloroacetic acid를 첨가하고 4°C에서 5시간 동안 침전시킨 뒤, 3,560×g에서 30분간 원심분리하여 단백질을 제거하고 2배량의 99% EtOH를 첨가하여 4°C에서 다당류를 침전시켰다. 침전된 다당류를 증류수에 녹여 투석한 뒤 동결 건조하였다. 다당류를 증류수에 녹여 0.3% 농도의 CPC (Cetylpyridinium chloride, Junsei Chemical Co., Japan)로 침전시킨 후 침전물을 10%의 NaCl에 용해시켰다. 여기에 3배량의 99% EtOH를 첨가하여 다당류를 침전시킨 후 침전물을 증류수에 녹여 투석하고 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

### 구성당 분석

정제된 EPS의 구성당 분석은 한국 기초과학지원연구원에 의뢰하여 다음과 같은 조건으로 분석하였다. 동결건조된 시료를 2 M Trifluoroacetic acid와 6 N HCl을 이용하여 100°C에서 4시간 동안 중성당과 아미노당으로 가수분해시킨 후 동결 건조하여 증류수에 용해시켰다. 상기의 시료를 Bio-LC DX-600 (Dionex, USA)를 이용하여 CarboPac PA1 (4.5×250 mm, Dionex), CarboPac PA1 cartridge (4.5×50 mm) 컬럼과 amperometry를 사용하여 1.0 ml/min 16 mM NaOH의 조건에서 분석하였다.

### 16S rRNA 염기서열 분석

16S rRNA를 증폭하기 위해서 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 27F (5'-AGAGTTTGTAT CCTGGCTCAG-3') Primer와 1492R (5'-AAGGAGGTGAT CCAG-CCGC-3') Primer를 이용하였다. PCR 조건은 1× PCR buffer, 0.2 mM dNTPs, 0.2 µM primer, 2.5 U *Taq* DNA polymerase (Solgent co., Korea), template는 10-50 ng으로 하였다. 16S rRNA PCR은 Perkin Elmer (Gene Amp PCR system, Applied Biosystem)을 이용하여 94°C에서 2분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 1분, 54°C에서 annealing 30 초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고, 72°C에서 5분간 final extension 시켰다. PCR 증폭산물의 16S rRNA 염기서열 분석은 ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)를 사용하였다. 16S rRNA 유전자 분석을 통하여 염기서열을 결정된 후 NCBI/RDP database의 BLAST program을 이용하여 계통분류학적 유연관계를 분석하였다. 각 염기서열의 alignment는 CLUSTAL X program을 이용하여 정렬하였고, 근린결합법에 의거하여 분리된 다당 생성 균주의 계통분류학적 위치를 결정하였다(26, 30).

## 결과 및 고찰

### 약초 근권토양 내 다당 생성세균의 분포

국내에 자생하는 당귀(*Angelica sinensis*), 삼주(*Attractylodes japonica*), 쇠무릎(*Achyranthes japonica*), 지모(*Anemarrhena*

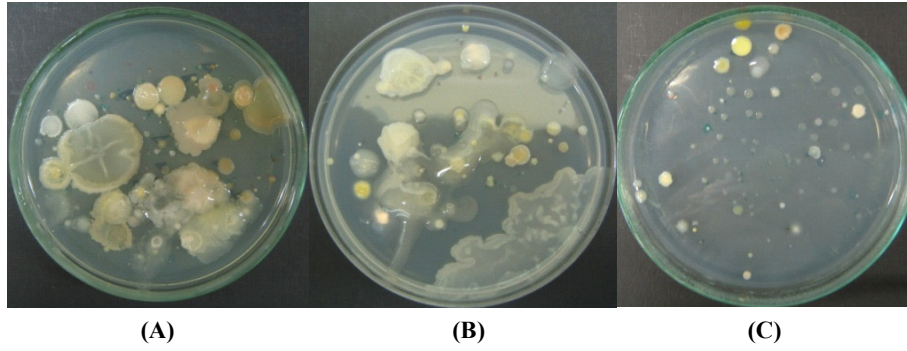


Fig. 1. Numerical comparison of mucoidal colonies on various culture media. (A) PDA medium, (B) SCA medium, and (C) NA medium

*asphodeloides*), 황기(*Astragalus membranaceus*) 5종류의 약초 근권토양을 채취하여 다당(exopolysaccharide, EPS) 생성세균의 분포율을 조사하였다. 다당 생성세균의 계수 및 분리에 사용할 배지를 선정하기 위하여 근권토양 시료를 식물성 배지인 감자 추출물을 이용한 PDA배지, 전분을 이용한 SCA 배지와 동물성 배지인 육즙(NA) 배지에 접종한 후 평판상에 형성된 점액성 콜로니 수를 비교 검토하였다. 각 평판 배지에 형성된 콜로니 중 점액성 콜로니를 형성하는 세균은 PDA 배지의 경우 87.5%, SCA 배지의 경우 78.7%를 나타낸 반면 동물성 배지인 NA 배지에서는 점액성 콜로니가 8%를 나타내어 다당 생성세균 수 측정 및 분리를 위하여 PDA 배지를 사용하기로 하였다(Fig. 1).

각 약초 근권토양으로부터 분리한 세균 콜로니를 PDA 평판 배지에 계대배양한 후 점액성 콜로니의 점도를 3단계(+++, ++, +)로 구분하여 관찰한 결과, Fig. 2에 나타낸 바와 같이 강한 점도를 나타내는 균주를 EPS 생성 균주로 추정하고 분리하였다.

당귀(*Angelica sinensis*) 근권토양으로부터 분리된 118균주 중 61균주가 EPS 생성 균주로 56%의 높은 분포율을 나타내었으며, 삼주(*Atractylodes japonica*)와 황기(*Astragalus membranaceus*) 근권토양으로부터 분리된 균주의 경우 약 25%, 지모(*Anemarrhena asphodeloides*)는 10%가 EPS 생성균주로 관찰되어, 약초 근권으로부터 분리된 총 431 균주 중 112균주를 EPS 생성세균으로 확보하였다(Fig. 3).

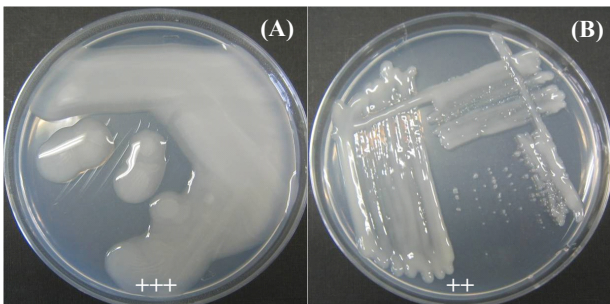


Fig. 2. Colony morphology of EPS producing bacteria on PDA plates.

당귀 근계로부터 EPS 생성세균의 분리 및 계통학적 특성

다양한 약초를 대상으로 근권토양 내 EPS 생성세균의 분포율을 검토한 결과, 당귀 근권토양으로부터 분리한 세균의 56%가 EPS 생성세균으로 밝혀져 당귀 근계 내에 EPS 생성 미생물 유전자원이 다수 분포해 있음으로 판단되었다. 본 연구에서는 당귀 시료를 근권, 근면, 근내부로 구분하여 당귀 근계 내 EPS 생성세균의 분포율을 검토하였다. 근권, 근면, 근내부 시료를 각각 분산 처리한 후 PDA 평판배지에 배양하면서 EPS 생성 세균의 수를 측정하였다. 근권토양 내 EPS 생성세균 수는  $9.0 \times 10^6$  CFU/g-soil, 근면에는  $7.0 \times 10^6$  CFU/g-soil, 그리고 근내부에는  $1.4 \times 10^3$  CFU/g-soil 분포하여 근권과 근면에 높은 밀도로 분포하는 것으로 확인되었다. 이들 각 평판배지 상에 형성된 점액성 콜로니 중 대표균주 35균주를 순수 분리하였다 (Table 1).

당귀 근권, 근면, 근내부로부터 분리한 대표 EPS 생성균주의 계통학적 특성을 평가하기 위하여 16S rRNA 염기서열을 해석한 결과, 근권으로부터 분리된 EPS 생성세균은 *Alpha proteobacteria* (*Mesorhizobium*, *Rhizobium*), *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Variovorax*, *Achromobacter*, *Shinella*, *Mitsuaria*), *Firmicutes* (*Penibacillus*), *Actinobacteria* (*Rhodococcus*, *Leifsonia*, *Mycobacterium*), 그리고 *Bacteroidetes* (*Mucilagibacter*) 계

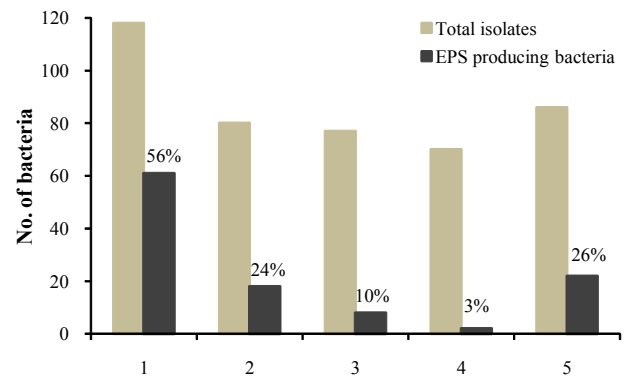


Fig. 3. The ratio of EPS producing bacteria collected from rhizosphere soil of various medicinal herbs. 1, *Angelica sinensis*; 2, *Atractylodes japonica*; 3, *Achyranthes japonica*; 4, *Anemarrhena asphodeloides*; 5, *Astragalus membranaceus*

**Table 1.** The ratio of EPS producing bacteria in a root system of *A. sinensis*

Sampling	EPS producing bacterial density (CFU/g-soil)	Isolate of EPS producing bacteria
Rhizosphere soil	9.0×10 <sup>6</sup>	16
Rhizoplane	7.0×10 <sup>6</sup>	16
Inside of root	1.4×10 <sup>3</sup>	3
Total		35

통균에 속하는 균주로 매우 다양하게 나타났다.

근면으로부터 분리된 EPS 생성세균은 *Alphaproteobacteria* (*Rhizobium*), *Betaproteobacteria* (*Burkholderia*, *Achromobacter*), *Actinobacteria* (*Rhodococcus*, *Microbacterium*), *Bacteroidetes* (*Mucilaginibacter*), 그리고 *Acidobacteria* 계통군으로 나타났다. 특히 *Rhizobium*, *Burkholderia*, *Achromobacter*, *Rhodococcus*, *Mucilaginibacter* 속에 속하는 균주는 근권과 근면에 공통적으로 분포하는 특징을 나타내었다.

근내부에서 분리된 EPS 생성세균은 모두 *Bacteroidetes* 계통군의 *Chitinophaga*에 속하는 특징을 나타내었다(Table 2).

### EPS 생성 우수 균주의 분리

본 연구를 통하여 약초 근권토양으로부터 분리된 다당 생성세균 112균주를 대상으로 감자추출물에 glucose 2%를 첨가한 배지에 4일간 진탕배양한 후 점도계를 이용하여 점도를 측정하였다. 다당 생성 세균 112균주 중 100 mpa.s 이상의 높은 점도를 나타내는 균주를 EPS 생성 우수 균주로 판정하고 선발한 결과 15균주가 선발되었다. 이들 균주 중 당귀에서 분리한 DR14, DRP35균주는 1,547 mpa.s와 2,136 mpa.s의 높은 점도를 나타내었으며, 삼주에서 분리한 SAP110균주는 점도가 1,680 mpa.s로 측정되어 EPS 생성 최우수균주로 최종 선발하였다(Fig. 4).

### EPS 생성 우수균주의 계통분류

EPS 생성 우수균주 DR14, DRP35, 및 SAP110의 16S rRNA 염기서열을 결정하여 계통학적 위치를 검토하였다. DR14균주는 *Burkholderia caribensis*<sup>T</sup> MWAP64 (Y17009)와 99.7%의 상동성을 나타내었으며, SAP110균주는 *Rhizobium hainanense*<sup>T</sup> I66 (U71078), *Rhizobium tropici*<sup>T</sup> CIAT 899 (U89832)와 99.5-99.2%의 상동성을 나타내었다. DRP35균주는 *Acidobacteria*계통군에 속하는 *Terriglobus roseus*<sup>T</sup> KBS

**Table 2.** Phylogenetic characteristics of EPS producing isolates from root system of *A. sinensis*

Phylogenetic group	Identification of 16S rRNA	Similarity (%)	No. of isolates			
			RS	RP	IR	
<i>Alphaproteobacteria</i>	<i>Mesorhizobium amorphae</i> <sup>T</sup> ATCC 19665	99.71	1			
	<i>Rhizobium lusitanum</i> <sup>T</sup> P1-7	100		1		
	<i>Rhizobium miluonense</i> <sup>T</sup> CCBAU 41251	97.59	3	3		
	<i>Rhizobium rhizogenes</i> <sup>T</sup> IFO 13257	96.78		3		
<i>Betaproteobacteria</i>	<i>Burkholderia caribensis</i> <sup>T</sup> MWAP64	99.70	1			
	<i>Burkholderia phytofirmans</i> <sup>T</sup> PsJN	100	1			
	<i>Burkholderia terrae</i> <sup>T</sup> KMY02	100	1	2		
	<i>Variovorax boronicumulans</i> <sup>T</sup>	100	1			
	<i>Achromobacter spanius</i> <sup>T</sup> LMG 5911	99.73	1			
	<i>Achromobacter xylooxidans</i> <sup>T</sup> DSM 10346	99.70		1		
<i>Firmicutes</i>	<i>Shinella zoogloeoides</i> <sup>T</sup> IAM 12669	95.29	1			
	<i>Paenibacillus peoriae</i> <sup>T</sup> DSM 8320	99.71	2			
	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rhodococcus erythreus</i> <sup>T</sup> X79289	100		1	
		<i>Rhodococcus qingshengii</i> <sup>T</sup> djl-6	100	1		
	<i>Leifsonia ginsengi</i> <sup>T</sup> wged11	98	1			
	<i>Mycobacterium llatzerense</i> <sup>T</sup> MG13	99	1			
	<i>Microbacterium oxydans</i> <sup>T</sup> DSM 20578	100		1		
	<i>Bacteroidetes</i>	<i>Mucilaginibacter kameinonensis</i> <sup>T</sup> SCK	97.30		2	
		<i>Mucilaginibacter oryzae</i> <sup>T</sup> B9	97.59		1	
		<i>Mucilaginibacter ximonensis</i> <sup>T</sup> XM-003	97.20	1		
<i>Chitinophaga ginsengisegetis</i> <sup>T</sup> Gsoil 040		99.60			3	
<i>Acidobacteria</i>	<i>Terriglobus roseus</i> <sup>T</sup> KBS 63	96.78		1		
Total			16	16	3	

RS, rhizosphere soil; RP, rhizoplane; IR, inside of root

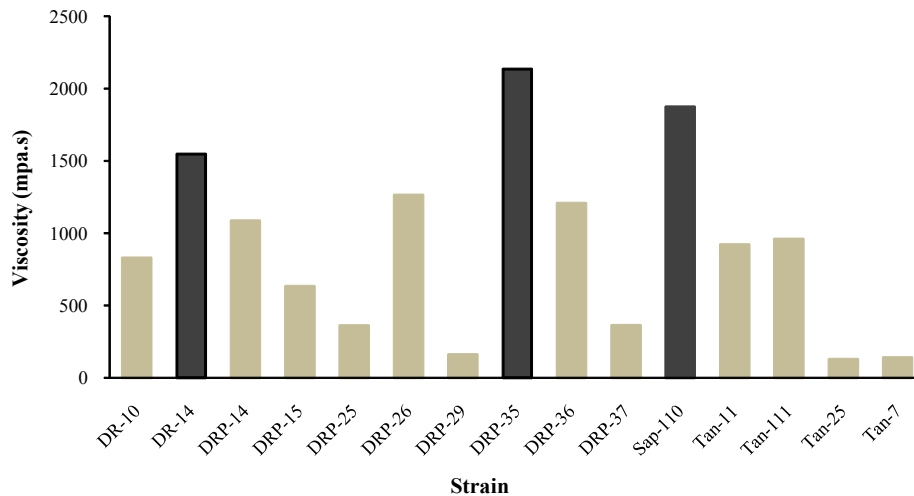


Fig. 4. Screening of viscosity of EPS producing bacteria collected from rhizosphere soil of various medicinal herbs.

63 (DQ660892)와 96.7%, *Edaptobacter modestus*<sup>T</sup> Jbg-1 (DQ528760)와 96.6%의 상동성을 나타내어 신종으로 제안되었다(Fig. 5).

### EPS 생성 우수균주의 당 조성 분석

최우수 균주로 선발된 *Burkholderia caribiensis* DR14, *Terriglobus* sp. DRP35, 그리고 *Rhizobium hainanense* SAP110 균주가 생성한 EPS를 Hydrochloric acid와 Trifluoroacetic acid를 이용하여 구성당과 아미노당으로 가수분해한 후 Bio-LC DX-600로 당 조성성분을 분석하였다. EPS 생성균주 *Burkholderia caribiensis* DR14, *Terriglobus* sp. DRP35, 그리고 *Rhizobium hainanense* SAP110 균주가 생산하는 주요 구성당은 galactose, glucose, mannose로 특히 glucose는 60-89%의 높은 함량을 나타내었다. 이들 균주가 생산하는 주요 아미노당은 glucosamine 이었으며 *Rhizobium hainanense* SAP110 균주는 glucosamine (8.5%)과 galactosamine (0.9%)을 생성하는 특징을 나타내었다(Table 3).

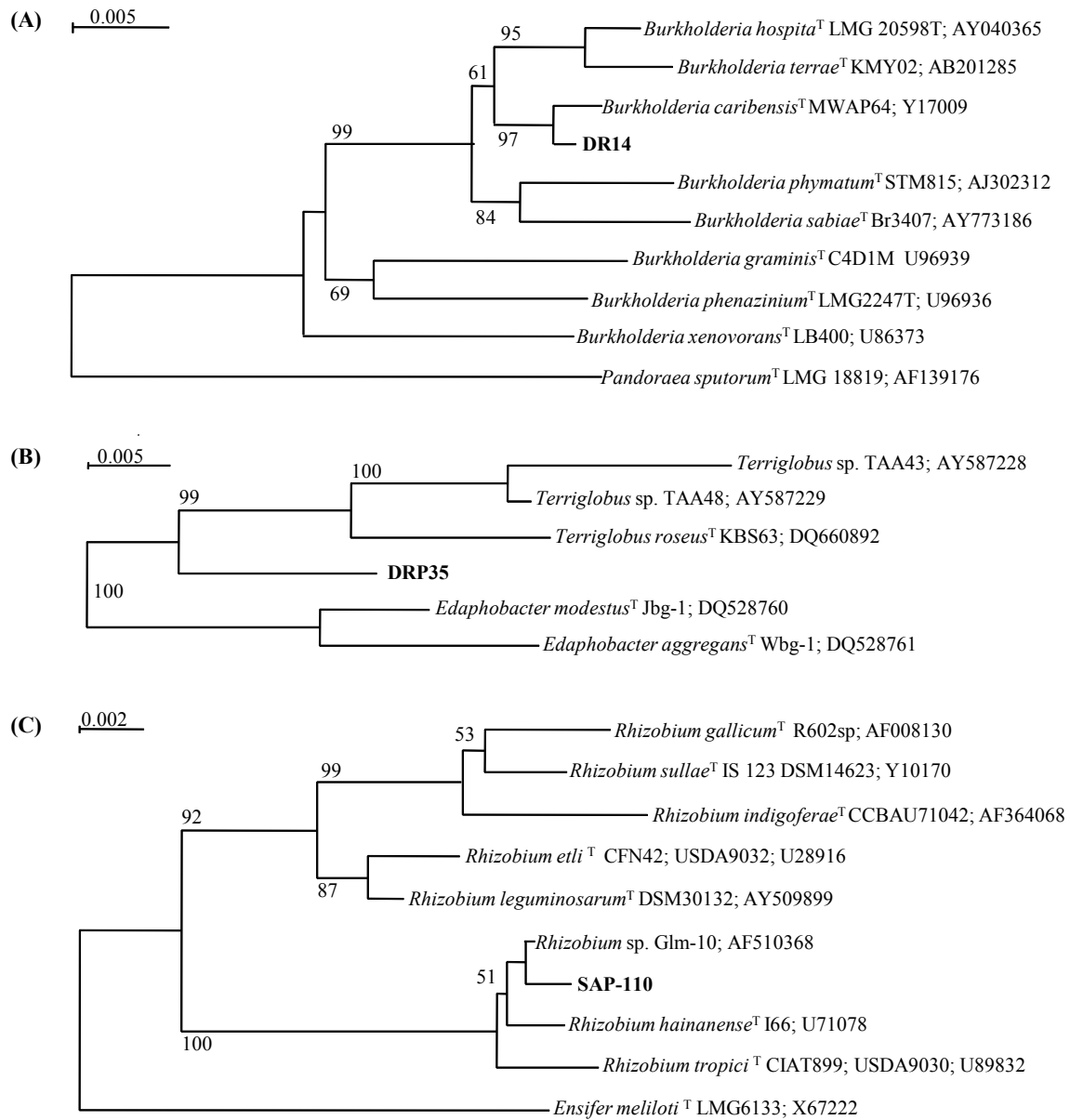
미생물 다당류는 겔 형성능, 수분 흡수능, 점착능 등 다양한 물성학적 특징을 지니고 있기 때문에 식품첨가제, 화장품 보습제, 혈청제 등의 소재로서 각종 산업에서 그 중요성이 크게 부각되면서 미생물 다당류는 많은 연구자들의 주목을 받아왔다(17, 24, 32). 1942년, *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 dextran이 혈장증량제로 개발된 이래 새로운 다당류 탐색을 목표로 기초 및 응용연구가 지속적으로 수행되고 있다.

Table 3. Monosaccharide analysis of EPS from three bacterial strains

Monosaccharide (%)	DR14	DRP35	SAP110
glucose	88.6	78.2	60.4
galactose	3.5	12.8	16
mannose	5.3	8.5	14.2
glucosamine	2.6	0.5	8.5
galactosamine	-	-	0.9

최근, 유제품을 비롯한 발효식품으로부터 EPS 생성 균주가 다수 분리되어 이들 EPS에 대한 기능 및 구성성분에 대한 연구결과가 많은 주목을 받고 있다. 김치로부터 분리한 EPS 생성 세균 *Weissella hellenica* SKkimchi3와, *Leuconostoc kimchii* GJ2가 생산하는 EPS의 구성성분은 주로 glucose만으로 이루어진 것으로 보고되었다(12, 21). 유제품으로부터 분리한 *Streptococcus thermophilus* LFG 균주와 *Lactobacillus acidophilus* 5e2 균주가 생산하는 EPS의 경우 glucose, galactose 중성당과, 소량의 galactosamine, glucosamine과 같은 아미노당이 함유되었다(14, 15). *Leuconostoc mesenteroides*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Pediococcus* spp., *Streptococcus* spp.는 glucose만으로 이루어진 glucan을 생산하고, *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus mutans*는 fructose가 길게 연결된 fructan을 생산한다는 연구결과가 보고되었으며, *Lactobacillus delbrueckii*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Streptococcus macedonius*, *Streptococcus thermophilus*와 같은 다수의 유산균이 glucose, galactose, mannose 등의 중성당과, 소량의 아미노당을 생산하며, 배지조건 및 생육조건에 따라 EPS생산량과 EPS의 구성이 달라진다는 연구결과가 보고되었다(4, 19, 25).

한편 해바라기 뿌리에서 분리된 *Rhizobium* sp. YAS 34의 다당류에 대한 연구 결과, 높은 점성을 갖는 galactose, glucose, mannose로 구성된 이형 다당류를 생산된다고 보고되었다(27). 사탕수수 뿌리에서 분리한 질소 고정 세균 *Burkholderia tropica* Ppe8에 의해 생산된 EPS의 경우 rhamnose, glucose, glucosamine으로 이루어져있으며 *Burkholderia caribiensis* MWAP71는 glucose, mannose, talose로 구성된 EPS를 생산한다는 연구결과가 발표되었다(28, 31). *Burkholderia* sp.와 *Rhizobium* sp.는 식물의 근권에서 다수 분리되었으며, 상기의 균주들이 생산하는 EPS는 glucose, galactose, mannose와 같은 중성당과, 소량의 아미노당으로 구성되어있는 것이 특징적이



**Fig. 5.** Phylogenetic tree of EPS producing bacteria. (A) *Burkholderia caribensis* DR14, (B) *Terriglobus* sp. DRP35, and (C) *Rhizobium hainanense* SAP110

며, 질소 고정화 작용, 식물 생육 촉진 인자의 생산 등의 식물 생육촉진세균으로서의 가능성에 관한 연구결과가 발표되었다 (2, 10, 32).

본 연구를 통해 분리된 약초 근권토양으로부터 수집된 다수의 EPS 생성 세균은 식물생육촉진인자로서의 가능성을 향후 연구하여 친환경 농업 소재로의 이용성을 탐색할 계획이다.

### 적요

국내에 자생하는 당귀, 삼주, 쇠무릎, 지모, 황기의 근권토양 내 EPS 생성균주의 분포율을 조사한 결과 당귀로부터 분리된

균주의 56%가 EPS 생성 균주로 가장 높은 분포율을 나타내었다. 또한, 당귀 근계 (근권, 근면, 근 내부) 내 EPS 생성 세균의 밀도를 측정된 결과, 근권 토양 내에는  $9.0 \times 10^6$  CFU/g-soil, 근면에는  $7.0 \times 10^6$  CFU/g-soil, 그리고, 근 내부에는  $1.4 \times 10^3$  CFU/g-soil 로 확인되어, 다수의 EPS 생성 세균이 분포하고 있음이 확인되었다. 당귀 근권으로부터 분리된 EPS 생성세균은 *Alphaproteobacteria* (4 strains), *Betaproteobacteria* (6 strains), *Firmicutes* (2 strains), *Actinobacteria* (3 strains), 그리고 *Bacteroidetes* (1 strain) 계통군에 속하는 균주였다. 근면으로부터 분리된 EPS 생성세균은 *Alphaproteobacteria* (7 strains), *Betaproteobacteria* (3 strains), *Actinobacteria* (2 strains),

*Bacteroidetes* (3 strains), 그리고 *Acidobacteria* (1 strain) 계 통군으로 나타났으며, 근 내부에서 분리된 EPS 생성세균은 모두 *Bacteroidetes* 계통군 *Chitinophaga*에 속하는 특징을 나타내었다. 약초 근권토양으로부터 분리된 EPS 생성세균 112균주 중에서 *Burkholderia caribiensis* DR14 (1,547 mpa.s), *Terrioglobus* sp. DRP35균주(2,136 mpa.s), *Rhizobium hainanense* SAP110균주(1,680 mpa.s)를 최우수 EPS 생성 균주로 선발하였다. 분리 정제된 EPS를 Bio-LC로 분석한 결과 glucose, galactose, mannose의 중성당과, galactosamine, glucosamine의 아미노당이 나타났다. 특히 *Rhizobium hainanense* SAP110균주는 주요 중성당으로 glucose (60-89%)를 그리고 주요 아미노당으로 glucosamine (8.5%)을 생성하는 특징을 나타내었다.

### 감사의 말

본 연구는 교육과학기술부와 한국산업기술진흥원의 지역혁신인력양성사업(M-02-20080704171810)으로 수행된 연구 결과로 이에 감사 드립니다.

### 참고문헌

- Alami, Y., W. Achouak, C. Marol, and T. Heulin. 2000. Rhizosphere soil aggregation and plant growth promotion of sunflowers by an exopolysaccharide-producing *Rhizobium* sp. strain isolated from sunflower roots. *Appl. Environ. Microbiol.* 66, 3393-3398.
- Amellal, N., G. Burtin, F. Bartoli, and T. Heulin. 1998. Colonization of wheat roots by an exopolysaccharide-producing *Pantoea agglomerans* strain and its effect on rhizosphere soil aggregation. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 3740-3747.
- Atlas, R.M. and R. Bartha. 1998. Interactions between microorganisms and plants. 99-140. *Microbial Ecology*. 4th. Benjamin-Cummings Publishing Company, USA.
- De Vuyst, L. and B. Degeest. 1999. Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 23, 153-177.
- Díaz, K., C. Valiente, M. Martínez, M. Castillo, and E. Sanfuentes. 2009. Root-promoting rhizobacteria in *Eucalyptus globulus* cuttings. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 25, 867-873.
- Goubet, F., P. Jackson, M.J. Deery, and P. Dupree. 2002. Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis: a method to study plant cell wall polysaccharide and polysaccharide hydrolyses. *Anal. Biochem.* 300, 54-68.
- Han, J., D. Xia, L. Li, L. Sun, K. Yang, and L. Zhang. 2009. Diversity of culturable bacteria isolated from root domains of moso Bamboo (*Phyllostachys edulis*). *Microb. Ecol.* 58, 363-373.
- Jesús, C.M., M.A. Lourdes, P.V. Guadalupe, and E.D. Paulina. 2004. *Budkholderia unamae* sp. nov., an N<sub>2</sub>-fixing rhizospheric and endophytic species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 54, 1165-1172.
- Ji, P., M. Wilson, H.L. Campbell, and J.W. Kloepper. 1997. Rhizobacterial mediated induced systemic resistance for the control of bacterial speck of fresh-market tomato. pp. 273-276. In A. Ogoshi, K. Kobayashi, Y. Homma, F. Kodama, N. Kondo, and S. Akino (eds.), plant growth-promoting Rhizobacteria: present status and future prospects. Nakanishi printing, Sapporo, Japan.
- Kacia, Y., A. Heyraudb, M. Barakatc, and T. HeulinKaci. 2005. Isolation and identification of an EPS-producing *Rhizobium* strain from arid soil (Algeria): characterization of its EPS and the effect of inoculation on wheat rhizosphere soil structure. *Res. Microbiol.* 156, 522-531.
- Khalid, A., M. Arshad, and Z.A. Zahir. 2004. Screening plant growth-promoting rhizobacteria for improving growth and yield of wheat. *J. Appl. Microbiol.* 96, 473-480.
- Kim, H.J. and H.C. Jang. 2006. Isolation and characterization of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria from Kimchi. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 196-203.
- Koo, S.Y. and K.S. Cho. 2006. Interactions between plants rhizobacteria in phytoremediation of heavy metal contaminated soil. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 34, 83-93.
- Laws, A.P., M.J. Chadha, M. Chacon-Romero, V.M. Marshall, and M. Maqsood. 2008. Determination of the structure and molecular weights of the exopolysaccharide produced by *Lactobacillus acidophilus* 5e2 when grown on different carbon feeds. *Carbohydr. Res.* 343, 301-307.
- Lim, Y.S. and S.K. Lee. 2009. Characteristics of exopolysaccharide produced in goat milk yogurt cultured with *Streptococcus thermophilus* LFG isolated from kefir. *Kor. J. Food. Sci. Ani. Resour.* 29, 143-150.
- Lucy, M., E. Reed, and B.R. Glinck. 2004. Applications of free living plant growth-promoting rhizobacteria. *Antonie van Leeuwenhoek.* 86, 1-25.
- Margaritis, A. and G.W. Pace. 1985. Microbial polysaccharides, 1005-1044. In H.W. Blanch, S. Drew, and D.I.C. Wang (eds.). *Comprehensive biotechnology*. 3. Pergamon Press. Oxford, USA.
- Mendrygal, K.E. and J.E. González. 2000. Environmental regulation of exopolysaccharide production in *Sinorhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.* 182, 599-606.
- Mozzi, F., F. Vaningelgem, E.M. Hébert, R.V. der Meulen, M.R.F. Moreno, G.F. de Valdez, and L. De Vuyst. 2006. Diversity of heteropolysaccharide producing lactic acid bacterium strains and their biopolymers. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 4431-4435.
- Muleta, D., F. Assefa, K. Hjort, S. Roos, and U. Granhall. 2009. Characterization of rhizobacteria isolated from wild coffee arabica L. *Eng. Life Sci.* 9, 100-108.
- Park, D.H., M.J. Kim, H.N. Seo, T.S. Hwang, and S.H. Lee. 2008. Characterization of exopolysaccharide (EPS) produced by *Weissella hellenica* SKKimchi3 isolated from kimchi. *Kor. J. Microbiol.* 46, 535-541.
- Park, K.S., J.W. Kloppe, and C.M. Ryu. 2008. Rhizobacterial exopolysaccharide elicit induced resistance on cucumber. *J. Microbiol. Biotechnol.* 18, 1095-1100.
- Park, M., C. Kim, J. Yang, H. Lee, W. Shin, S. Kim, and T. Sa. 2005. Isolation and characterization of diazotrophic growth promoting bacteria from rhizosphere of agricultural crops of Korea. *Microbiol. Res.* 160, 127-133.
- Park, Y.I. 2000. Structures and functions of microbial extracellular or wall polysaccharides in the physiology of producer organisms. *The Microorganisms and Industry* 26, 18-30.
- Ruas-Madiedo, P., J. Hugenholtz, and P. Zoon. 2002. An overview of the functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria. *Int. Dairy J.* 12, 163-171.
- Saitou, N. and N. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
- Santaella, C., M. Schue, O. Berge, T. Heulin, and W. Achouak. 2008. The exopolysaccharide of *Rhizobium* sp. YAS34 is not necessary for biofilm formation on *Arabidopsis thaliana* and *Brassica napus* roots but contributes to root colonization. *Environ. Microbiol.* 10, 2150-2163.

28. Serrato, R.V., G.L. Sasaki, P.A.J. Gorin, L.M. Cruz, F.O. Pedrosa, B. Choudhury, R.W. Carlson, and M. Iacomini. 2008. Structural characterization of an acidic exoheteropolysaccharide produced by the nitrogen-fixing bacterium *Burkholderia tropica*. *Carbohydr. Polym.* 73, 1-4.
29. Skorupska, A., M. Janczarek, M. Marczak, A. Mazur, and J. Król. 2006. Rhizobial exopolysaccharides: genetic control and symbiotic functions. *Microb. Cell Fact.* 5, 1-7.
30. Thomson, J.D., D.G. Higgins, and T.J. Gibson. 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
31. Vanhaverbeke, C., A. Heyraud, W. Achouak, and T. Heulin. 2001. Structural analysis of the exopolysaccharide from *Burkholderia caribensis* strain MWAP71. *Carbohydr. Res.* 334, 127-133.
32. Whang, K.S., S.H. Choi, and S.I. Han. 2007. Isolation and characterization of high viscosity polysaccharide producing endophytic bacteria from *Pueraria* root. *Kor. J. Microbiol.* 43, 341-345.
33. Zevenhuizen, L.P.T.M. and A.R.W. van Neerven. 1983. Gel-forming capsular polysaccharide of *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium trifolii*. *Carbohydr. Res.* 124, 166-171.