

인삼 근계로부터 다당 생성세균의 분리 및 특성

조건영¹ · 전인화¹ · 한송이¹ · 황경숙^{1,2*}

¹목원대학교 미생물나노소재학과
²목원대학교 미생물생태자원연구소

Isolation and Characteristics of Exopolysaccharide Producing Bacteria in a Ginseng Root System

Geon-Yeong Cho¹, In-Hwa Jeon¹, Song-Ih Han¹, and Kyung-Sook Whang^{1,2*}

¹Department of Microbial & Nano Materials, ²Institute of Microbial Ecology & Resources, Mokwon University, Daejeon 302-729, Republic of Korea

(Received September 4, 2013 / Accepted September 26, 2013)

EPS producing bacteria were enumerated in ginseng root system (rhizosphere soil, rhizoplane, inside of root). EPS producing bacterial density of rhizosphere soil, rhizoplane and inside of root were distributed 9.0×10^6 CFU/g, 7.0×10^6 CFU/g, and 1.4×10^3 CFU/g, respectively. Phylogenetic analysis of the 24 EPS producing isolates based on the 16S rDNA gene sequences, EPS producing isolates from rhizosphere soil (RS) belong to genus *Arthrobacter* (6 strains) and *Rhizobium* (1 strain). EPS producing bacteria from rhizoplane (RP) were *Arthrobacter* (6 strains), *Rhodococcus* (1 strain) and *Pseudomonas* (1 strain). EPS producing bacteria from inside of root (IR) were categorized into *Rhizobium* (6 strains), *Bacillus* (1 strain), *Rhodococcus* (1 strain), and *Pseudomonas* (1 strain). Phylogenetic analysis indicated that *Arthrobacter* may be a member of representative EPS producing bacteria from ginseng rhizosphere soil and rhizoplane, and *Rhizobium* is typical EPS producing isolates from inside of ginseng root. The yield of EPS was 10.0 and 4.9 g/L by *Rhizobium* sp. 1NP2 (KACC 17637) and *Arthrobacter* sp. 5MP1 (KACC 17636). The purified EPS were analyzed by Bio-LC and glucose, galactose, mannose and glucosamine were detected. The major EPS sugar of these strains was glucose (72.7-84.9%).

Keywords: *Arthrobacter* sp., *Rhizobium* sp., exopolysaccharide, ginseng root system

미생물이 생산하는 다당류는 기능에 따라 탄소 및 에너지원을 세포 내에 저장하는 기능을 가진 세포 내 다당류(intracellular polysaccharide)와 세포구조를 이루는 구조다당류(structural polysaccharide) 그리고 세포 외 다당류(extracellular polysaccharide, EPS)로 구분될 수 있다(Magaritis and Pace, 1985). 이들 다당류 중 EPS는 식물 다당류에 비해 물성이 다양하고 독특하며, 부가가치가 매우 높아 안정제, 유화제, 현탁제, 점증제, 겔형성제, 교결제, 응집제, 피막제, 수분흡수제, 접착제 등 여러 용도로 식품, 의료제약, 향장, 농업, 화학에 이르기까지 매우 광범위한 산업소재로 높은 상업적 가치를 지닌다(Kitazawa *et al.*, 1998; Ozdemir *et al.*, 2005; Arena *et al.*, 2006). 미생물 다당에 대한 연구가 진행되면서 *Bacillus licheniformis*에서 얻은 다당은 면역조절기능제와 항바이러스 활성제로 개발되었으며(Arena *et al.*, 2006), *Lactobacillus* sp.가 생산하는 균체의 다당류는 식품의 맛이나 질감 향상을 위한 식품첨가제로 개발되었다(Sutherland, 1998).

또한, *Alteromonas* sp.가 생산하는 다당은 화장품의 보습물질로 활용되고 있다(Welman and Maddox, 2003). 이와 같이 다양한 종류의 다당 생성 미생물이 보고 되었으나, 실제 산업적으로 이용되는 다당류는 매우 제한되어 미생물 다당류의 산업적 응용을 위해 다양한 다당류 생산균주의 탐색에 관한 연구가 절실히 필요하다. 선행 연구에서 공동연구자는 미생물 다당류 생산균주 탐색을 위하여 국내에 자생하는 황기, 당귀 등 다양한 종류의 약초근권토양으로부터 EPS 생성세균의 분포율을 조사하고 계통학적 다양성을 밝힘과 동시에 EPS 생성 우수 균주를 분리 보고한 바 있다(Lee *et al.*, 2010). 본 연구에서는 인삼 근계로부터 다당류를 생성하는 미생물 유전자원의 다양성을 확보하기 위하여 EPS 생성 우수 균주를 분리하고 이들 균주가 생산하는 구성당의 특성을 밝히고자 하였다.

인삼과 인삼 근권토양 시료는 충청남도 금산지역(N36°03'-05'E127°32') 일대의 인삼 재배지에서 수행하였다. 인삼뿌리와 함께 약 30-50 cm 정도의 깊이의 주변의 토양을 채취하였다. 본 연구에서는 인삼 근계시료를 근권토양, 근면, 근내부로 나누어 시료처리를 하였다. 근권으로부터 채취한 토양시료는 10 g을 정량

*For correspondence. E-mail: kswhang@mokwon.ac.kr; Tel.: +82-42-829-7593,7597; Fax: +82-42-829-7599

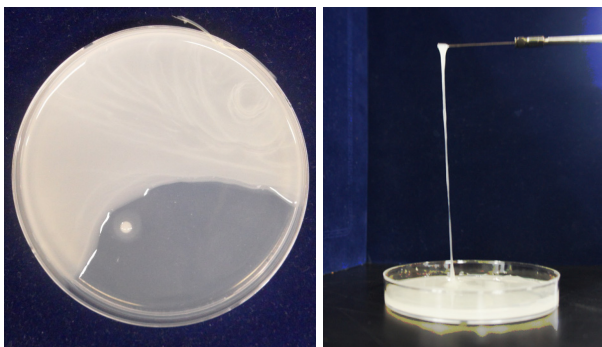
Table 1. Isolation of EPS producing bacteria in a ginseng root system

Sample	No. of bacteria (CFU/g-soil)	No. of isolates	No. of EPS producing isolates
RS	2.4×10^6	26	14
RP	9.1×10^6	49	25
IR	2.1×10^4	53	29
		128	68

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

한 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 무균적으로 표피조직을 벗겨내고 내부조직 10 g을 90 ml의 멸균수에 넣고 homogenizer (Nikon Seiki Co., Japan)를 이용하여 15,000 rpm에서 5분간 분산 처리하였다. 분산 처리한 각 시료를 순차적으로 희석하여, PDA 배지에 접종하고 28°C에서 7일간 배양하고 인삼 근계 내 EPS 생성 세균의 분포율을 검토하였다. 평판배지에 형성된 세균 콜로니 중 점액성 콜로니를 계수한 결과 근권토양(RS) 내에는 2.4×10^6 CFU/g, 근면에는 9.1×10^6 CFU/g, 그리고 근내부에는 2.0×10^4 CFU/g 분포하였다. 평판배지로부터 순수분리된 128균주의 콜로니 중 점액성이 강한 콜로니 68균주를 EPS 생성균주로 확보하였다(Table 1). 선행연구에서 저자들은 국내에 자생하는 당귀, 황기의 근권 토양 내 EPS 생성균주의 분포율을 조사한 결과 근권 토양으로부터 분리된 균주의 56%, 26%가 EPS 생성세균으로 식물체 근계 내에 EPS 생성 미생물 유전자원이 다수 분포해 있음을 보고한 바 있다(Lee et al., 2010). 본 연구에서는 인삼 근권, 근면, 근내부로부터 분리한 EPS 생성 68균주의 점도를 3단계로 구분하여 관찰하고 강한 점도를 나타내는 24균주를 최종 EPS 생성 우수 균주로 순수분리하였다(Fig. 1).

분리된 EPS 생성균주 24균주의 계통학적 특성을 평가하기 위해 16S rRNA 유전자 단편을 PCR 반응으로 증폭하여 염기서열을 결정하였다. PCR 반응 primer는 27F (forward primer; AGAGT TTGATCCTGGCTCAG)와 1492R (reverse primer; GGTAC CTTGTTACGACTT)을 사용 하였고, ABI 3730XL

**Fig. 1.** Selection of high viscosity of EPS producing bacteria on PDA plate.

capillary DNA sequencer를 이용하여 sequencing 분석하였다 (Saitou and Nei, 1987). 근권(RS)으로부터 분리된 EPS 생성세균은 *Arthrobacter* 속 6균주, 그리고 *Rhizobium* 속 1균주로 나타났다. 근면(RP)으로부터 분리된 EPS 생성세균은 *Arthrobacter* 속 6균주 *Rhodococcus* 속 1균주, *Pseudomonas* 속 1균주로 나타났다. 근내부(IR)에서 분리된 EPS 생성 우수균주는 *Rhizobium* 속 6균주, *Bacillus* 속 1균주 그리고 *Rhodococcus* 속 1균주로 나타났다. 근권과 근면에서 분리된 EPS 세균 중 *Arthrobacter* 속에 속하는 균주는 가장 특징적인 세균으로 밝혀졌으며, 근내부에서 분리된 가장 특징적인 EPS 세균은 *Rhizobium* 속으로 나타났다(Table 2).

인삼 근계로부터 분리된 EPS 생성균주 24균주를 대상으로 감자추출물에 glucose 2%를 첨가한 배지에 7일간 진탕 배양한 후 점도계 DV-E Viscometer (Brook Field, USA)를 이용하여 점도 측정하였다. *Rhizobium* 속에 속하는 EPS 생성균주 중 *Rhizobium* sp. 1NP2과 PNP8 균주는 각각 7,393 mpa.s와 8,906 mpa.s의 높은 점도를 나타내었다. *Arthrobacter* 속에 속하는 EPS생성균주 중 *Arthrobacter* sp. 3MP1과 5MP1 균주는 각각 1,800 mpa.s와 962 mpa.s의 높은 점도를 나타내어 EPS 생성 우수균주로 선발하였다(Fig. 2).

상기의 우수 다당 생성균주 *Rhizobium* sp. 1NP2, PNP8와 *Arthrobacter* sp. 3MP1, 5MP1 균주가 생성하는 다당을 분리·정제하기 위하여 PDA 배지에서 28°C, 200 rpm, 7일간에서 진탕 배양한 후, 3,560×g에서 30분간 원심분리하여 균체침전물을 제거하였다. 상층액에 4% 농도의 trichloroacetic acid를 첨가하고

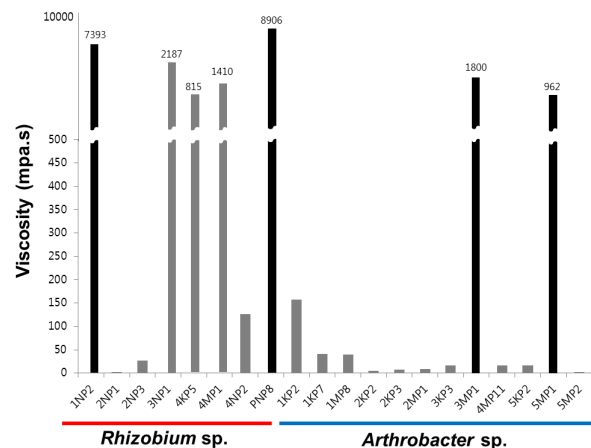
**Fig. 2.** Comparison of relative viscosity in *Rhizobium* sp. and *Arthrobacter* sp. EPS producing isolates.

Table 2. Phylogenetic analysis of EPS producing bacteria based on 16S rRNA gene sequence by BLAST search

	Strain	Best match	Base pair (bp)	Similarity (%)	
Rhizosphere soil (RS)	1KP2	<i>Arthrobacter defluvii</i> 4C1-a ^T (AM409361)	619	99.8	
	1KP7	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i> ALL ^T (AF235091)	691	99.7	
	2KP2	<i>Arthrobacter sulfonivorans</i> ALL ^T (AF235091)	701	99.7	
	2KP3	<i>Arthrobacter equi</i> IMMIB L-1606 ^T (FN673551)	701	98.1	
	3KP3	<i>Arthrobacter pascens</i> DSM 20545 ^T (X80740)	641	99.2	
	5KP2	<i>Arthrobacter defluvii</i> 4C1-a ^T (AM409361)	685	100.0	
	4KP5	<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 ^T (AY738130)	707	100.0	
	Rhizoplane (RP)	1MP8	<i>Arthrobacter globiformis</i> DSM 20124 ^T (M23411)	652	99.8
		2MP1	<i>Arthrobacter niigatensis</i> LC4 ^T (AB248526)	780	100.0
		3MP1	<i>Arthrobacter defluvii</i> 4C1-a ^T (AM409361)	690	99.3
4MP11		<i>Arthrobacter defluvii</i> 4C1-a ^T (AM409361)	723	100.0	
5MP1		<i>Arthrobacter oryzae</i> KV-651 ^T (AB279889)	771	99.5	
5MP2		<i>Arthrobacter defluvii</i> 4C1-a ^T (AM409361)	638	100.0	
4MP1		<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 ^T (AY738130)	730	100.0	
PMP6		<i>Rhodococcus globerulus</i> DSM 4954 ^T (X80619)	590	99.8	
5MP11		<i>Pseudomonas koreensis</i> Ps 9-14 ^T (AF468452)	649	100.0	
Inside of root (IR)		1NP2	<i>Rhizobium mesosinicum</i> CCBAU 25010 ^T (DQ100063)	710	99.6
	2NP1	<i>Rhizobium alarii</i> GBV016 ^T (AM931436)	670	100.0	
	2NP3	<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 ^T (AY738130)	731	100.0	
	3NP1	<i>Rhizobium lusitanum</i> P1-7 ^T (AY738130)	744	100.0	
	4NP2	<i>Rhizobium alarii</i> GBV016 ^T (AM931436)	751	100.0	
	PNP8	<i>Rhizobium mesosinicum</i> CCBAU 25010 ^T (DQ100063)	746	99.6	
	PNP5	<i>Bacillus aryabhatai</i> B8W22 ^T (EF114313)	686	100.0	
	PNP6	<i>Rhodococcus globerulus</i> DSM 4954 ^T (X80619)	663	100.0	

4°C에서 5시간 동안 침전시킨 뒤, 3,560×g에서 30분간 원심분리하여 단백질을 제거하고 2배량의 99% EtOH를 첨가하여 4°C에서 다당류를 침전시켰다. 분리된 다당류를 증류수에 녹여 투석막(viskase dialysis membrane)을 이용하여 투석 정제한 뒤 동결 건조하고 무게를 측정하였다(Scott and Glick, 1960). *Rhizobium* sp. 1NP2과 PNP8 균주는 배양액 1 L당 각각 10 g 그리고 3 g의 EPS를 생산하였으며, *Arthrobacter* sp. 3MP1과 5MP1은 배양액 1 L 당 각각 1.4 g 그리고 4.8 g의 EPS를 생산하여 *Rhizobium* sp. 1NP2 균주는 다당 생성능이 가장 우수한 균주로 확인되었다 (Table 3). 정제된 EPS의 구성당 분석은 한국 기초과학지원연구원에 의뢰하여 다음과 같이 분석하였다. 동결건조된 EPS 중 당과 단백질이 공유결합을 하고 있는 복합다당류인 당단백질(glycoprotein)을 2 M trifluoroacetic acid와 6 N HCl을 각각 첨가하고 100°C에서 4시간 동안 산처리하여 중성당과 아미노당의

로 가수분해 시킨 후 동결건조하여 증류수에 용해시켰다(Goubet et al., 2002). 가수분해된 시료는 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. *Rhizobium* sp. 1NP2, PNP8와 *Arthrobacter* sp. 3MP1, 5MP1가 생산한 EPS 중 총 당단백질의 함량은 30% 3.34%, 78.2%, 그리고 35.7%로 확인되었다. 이들 당단백질의 구성당 성분을 확인한 결과, 모든 균주가 생산한 EPS는 galactose, glucose와 mannose를 공통적으로 구성하고 있었으며, 총 당 단백질 중 72-97%가 glucose로 주요 구성당임이 확인되었다. 또한 이들 균주가 생산하는 주요 아미노당은 glucosamine이었으며 *Rhizobium* sp. 1NP2 균주는 0.7%의 glucosamine를 생성한 반면, *Arthrobacter* sp. 5MP1 균주는 5.1%의 galactosamine을 생성하는 특징을 나

Table 3. Efficiency and Monosaccharide analysis of representative EPS producing isolates from ginseng root system

Sugar	<i>Rhizobium</i> sp.		<i>Arthrobacter</i> sp.	
	1NP2	PNP8	3MP1	5MP1
Dry weight (g/L)	10.0	3.0	1.4	4.9
Glycoprotein (g/100g)	30.0	3.3	78.2	35.7
Efficiency of glycoprotein (g/L)	3.0	0.1	1.1	1.7
Amino sugar	galactosamine	0.01 (0.3%)	-	-
	glucosamine	0.2 (0.67%)	2.0 (2.56%)	1.8 (5.04%)
Neutral sugars	galactose	7.5 (25%)	-	2.8 (7.84%)
	glucose	21.8 (72.67%)	76.0 (97.19%)	30.3 (84.87%)
	mannose	0.5 (1.67%)	0.06 (1.8%)	0.2 (0.26%)

타내었다(Table 3).

식물의 근권세균이 생성하는 다당(exopolysaccharide; EPS)은 식물생장촉진 인자로 작용하고 병원성 세균에 대한 저항성을 높여준다고 보고 되면서 많은 연구자들이 다양한 식물의 근권을 대상으로 EPS 생성균주에 대한 연구를 진행 해 왔다(Park, 2000; Kacia et al., 2005; Whang et al., 2007; Park et al., 2008; Santaella et al., 2008). 자주개자리, 해바라기, 사탕수수, 당귀 그리고 삼주 등 다양한 식물 근권으로부터 분리된 EPS 생성균주는 *Sinorhizobium*와 *Rhizobium*과 같은 α -*Proteobacteria* 계통군에 속하는 균주들이 특징적이었다. 상기의 균주들이 생산하는 다당은 glucose, galactose, mannose와 같은 중성당과 미량의 아미노당으로 구성되어 있었다(Kacia et al., 2005; Lee et al., 2010). 본 연구에서 인삼 근내부에서 분리된 EPS 세균은 *Rhizobium* 속으로 나타났으며, 근권과 근면에서 분리된 EPS 생성세균은 *Arthrobacter* 속에 속하는 균주가 특징적이었다. 이들 *Arthrobacteria* 속의 EPS 생성세균은 glucose, galactose, mannose와 같은 중성당과 더불어 galactosamine을 생성하는 것으로 특징을 나타내었다. 이상, 인삼 근내부로부터 분리된 다당생성 우수균주 *Rhizobium* sp. 1NP2 (KACC 17637)와 근면으로부터 분리된 *Arthrobacter* sp. 5MP1 (KACC 17636)의 대량 생산을 위한 배양법을 구축하고 산업화를 위한 기반 연구를 수행함으로써 농업, 제약, 향장, 화학 등 다양한 산업의 소재로 활용 될 것으로 기대한다.

적 요

인삼근계(근권, 근면, 근내부) 내 EPS 생성세균의 밀도를 측정 한 결과, 근권토양 내에는 2.4×10^6 CFU/g, 근면에는 9.1×10^6 CFU/g, 그리고 근내부에는 2.0×10^4 CFU/g로 확인되어 다수의 EPS 생성세균이 분포하고 있음이 확인되었다. 인삼 근계로부터 EPS 생성 우수 균주 24균주를 순수분리하고 계통학적 특성을 확인한 결과, 근권(RS)으로부터 분리된 EPS 생성세균은 *Arthrobacter* 속 6균주, 그리고 *Rhizobium* 속 1균주로 나타났다. 근면(RP)으로부터 분리된 EPS 생성세균은 *Arthrobacter* 속 6균주, *Rhodococcus* 속 1균주, *Pseudomonas* 속 1균주로 나타났다. 근내부(IR)에서 분리된 EPS 생성세균은 *Rhizobium* 속 6균주, *Bacillus* 속 1균주 그리고 *Rhodococcus* 속 1균주, *Pseudomonas* 속 1균주로 나타났다.

근권과 근면에서 분리된 EPS 세균 중 *Arthrobacter* 속에 속하는 균주는 가장 특징적인 세균으로 밝혀졌으며, *Rhizobium* 속은 근내부에서 분리된 가장 특징적인 EPS 생성세균으로 나타났다. EPS 생성 우수균주 *Rhizobium* sp. 1NP2 (KACC 17637)는 10 g/L 그리고 *Arthrobacter* sp. 5MP1 (KACC 17636)는 4.9 g/L의 다당을 생성하였으며, 당단백질의 구성당 성분을 확인한 결과, galactose, glucose, mannose를 구성하고 있었으며, glucosamine의 아미노당이 나타났다. 특히, glucose는 72.7-84.9%로 주요 구성당임이 확인되었다.

참고문헌

- Arena, A., Maugeri, T.L., Pavone, B., Iannello, D., Gugliandolo, C., and Bisignano, G. 2006. Antiviral and immunoregulatory effect of a novel exopolysaccharide from a marine thermotolerant *Bacillus licheniformis*. *Int. Immunopharm.* **6**, 8-13.
- Goubet, F., Jackson, P., Deery, M.J., and Dupree, P. 2002. Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis: a method to study plant cell wall polysaccharide and polysaccharide hydrolyses. *Anal. Biochem.* **300**, 54-68.
- Kacia, Y., Heyraudb, A., Barakatc, M., and HeulinKaci, T. 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.
- Kitazawa, H., Harata, T., Uemura, J., Saito, T., Kaneko, T., and Itoh, T. 1998. Phosphate group requirement for mitogenic activation of lymphocytes by an extracellular phosphopolysaccharide from *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*. *Int. J. Food Microbiol.* **40**, 169-175.
- Lee, H.R., Kim, K.K., and Whang, K.S. 2010. Isolation and phylogenetic characteristics of exopolysaccharide producing bacteria in a rhizosphere soil of Medicinal Herbs. *Kor. J. Microbiol.* **46**, 278-285.
- Magaritis, A. and Pace, G.W. 1985. Microbial polysaccharides. In Murray, M.Y. et al. (eds.), *Comprehensive biotechnology*, pp.1006-1044, Pergamon Press, Oxford.
- Ozdemir, G., Ceyhan, N., and Manav, E. 2005. Utilization of an exopolysaccharide produced by *Chryseomonas luteola* TEM05 in alginate beads for adsorption of cadmium and cobalt ions. *Biores. Technol.* **96**, 1677-1682.
- Park, K.S., Klopfer, J.W., and Ryu, C.M. 2008. Rhizobacterial exopolysaccharide elicit induced resistance on cucumber. *J. Microbiol. Biotechnol.* **18**, 1095-1100.
- 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.
- Saitou, N. and Nei, N. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* **4**, 406-425.
- Santaella, C., Schue, M., Berge, O., Heulin, T., and Achouak, W. 2008. The xopolysaccharide 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.
- Scott, J.E. and Glick, D. 1960. *Methods of biochemical Analysis*, Vol. 8, pp. 146-155, International Pub., New York, N.Y., USA.
- Sutherland, I.W. 1998. Novel and established applications of microbial polysaccharides. *Tibtech.* **16**, 41-46.
- Whang, K.S., Choi, S.H., and Han, S.I. 2007. Isolation and characterization of high viscosity polysaccharide producing endophytic bacteria from Pueraria root. *Kor. J. Microbiol.* **43**, 341-345.
- Welman, A.D. and Maddox, I.S. 2003. Exopolysaccharides from lactic acid bacteria: perspectives and challenges. *Trends Biotechnol.* **21**, 269-274.