

고점도 다당류를 생산하는 갈근 내생균의 분리 및 특성

황경숙^{1*} · 최성현² · 한송이¹

¹목원대학교 생명산업학부, 미생물생태자원연구소

²청미바이오 주식회사

식용 및 약용으로 광범위하게 이용되고 있는 갈근 내부조직으로부터 강한 점액성 물질을 생산하는 50개의 내생 균주를 분리하였다. 다당류의 수율이 높은 내생균주 HDN-14, TDG-3 및 TNB-3 균주를 선발하여 이들이 생산하는 다당류의 구성당 조성을 분석한 결과 glucose (45.6~63.1%), maltose (14.6~28.3%) 및 fructose (17.4~23.7%)가 검출되었다. 이들 분리균주의 16S rDNA 염기서열(약 1,300bp)을 결정하여 계통학적 위치를 검토한 결과, γ -Proteobacteria 그룹의 *Pseudomonas* 속에 속하는 균주임이 확인 되었으며, HDN-14과 TNB-3 균주는 *Pseudomonas koreensis*^T, *Pseudomonas jessenii*^T와 99.06~99.32%의 상동성을 나타내었으며 TDG-3 균주는 *Pseudomonas plecoglossicida*^T, *Pseudomonas mosselii*^T, *Pseudomonas monteilii*^T와 99.48~99.74%의 상동성을 나타내었다. 이들 분리균주는 주요 균체지방산으로 3OH-C_{10:0}, 2OH-C_{12:0}, 3OH-C_{12:0} 및 3OH-C_{12:1}가 검출되었으며, TDG-3 균주의 경우, 3-OH C_{13:0}, 3-OH C_{14:0}, 3-OH C_{15:0} 및 3-OH C_{16:0} 등 다양한 종류의 3-OH 지방산이 검출되어 기존의 *Pseudomonas* 종과 비교하여 매우 특징적인 성질을 나타내었다.

Key words □ endophytic bacteria, polysaccharide, *Pseudomonas* sp., Pueraria root

식물체 내생균에 관하는 초기의 연구는 주로 식물기생성 병원균을 중심으로 연구 보고 되어져 왔다(19). 토양 및 공기 중에 분포해 있는 식물병원성 미생물은 뿌리나 기공을 통하여 기주체 내부로 침입증식하여 마름병, 흑반병 및 각종 암종병 등을 유발시켜 경제적 손실을 초래한다.

최근 식물체 내생균에 관한 연구가 보다 다양한 각도에서 접근하면서, 식물체 내생균은 식물생육증진 및 건전성에도 영향을 준다는 사실이 보고 되었다(6, 9, 20, 23, 26). 대표적인 식물병원체균으로 잘 알려져 있는 *Erwinia carotovora*가 식물체내에 서식하고 있는 고유 내생균인 *Pseudomonas* sp., *Curtobacterium luteum* 및 *Pantoea agglomerans* 등에 의해 증식저해를 받는다는 사실이 밝혀졌다(14, 15). 즉 병원균이 식물체 내부로 침입해 와도 이들 내생균에 의해 증식이 억제되어 병이 유발되지 않는다는 사실이 밝혀지면서, 이들 식물체 내생균을 생물학적 방제제로 이용하기 위한 적극적인 검토와 더불어 각종 식물체로부터 유용 내생균을 탐색 분리하려는 노력들이 활발히 진행되고 있다(10).

이와 같이 지금까지의 식물 내생균에 관한 연구는 인삼을 비롯한 고부가가치 작물에 대한 생물학적 방제의 일환으로 주로 연구되어 왔으며, 대부분이 내생균과 식물생육과의 관계에 대한 연구에 국한적으로 진행되어 왔다(1, 3).

미생물이 생산하는 다당류는 식물 다당류에 비해 물성이 다양하고 독특하며, 부가가치성이 매우 높아 각종 산업의 기능성 신

소재로서 잠재력이 매우 크다. 최근 미생물 다당류가 단순 물질 기능 소재가 아니고 생리 기능소재로 주목받고 있어 미생물 다당에 대한 많은 연구가 진행되어 왔으나 실제 산업적으로 이용되는 다당류는 매우 제한되어 있다. 따라서 미생물 다당류의 산업적 응용을 위해 다양한 다당류 생산균주의 탐색에 관한 연구가 절실히 필요한 실정이다(2, 26).

취(*Pueraria lobata ohwi*) 뿌리를 한자로 갈근(葛根)이라 하는데, 우리나라를 비롯하여 중국 및 일본에서 자생하는 두과식물로 뿌리 중에 10~14%의 전분을 함유하고 있어 전분 제조용 원료로 이용되기도 하고, 취에서 뽑아낸 전분은 갈근이라 하여 떡과 과자를 만들어 먹기도 하는 것으로 보아 조선조부터 전해오는 민속식 이었던 것으로 짐작된다. 당분이 4~5% 들어 있어 단맛이 있으며 해열작용의 성분인 페롤린산과 카페인산 성분과 무기질로 칼슘, 칼륨, 인산 등과 비타민 B 복합체를 골고루 가지고 있는 알칼리성 식품에 속한다. 강장제 및 지혈제로서의 효능이 있어 한약제로 이용되고 있는데(7, 21), 이와 같은 약리작용은 갈근 중에 함유되어 있는 isoflavone 유도체에 의한 것으로 분리 동정되었다(13). 최근에는 취차 및 취즙 등의 원료로도 이용되는 등 그 이용범위가 매우 넓다.

선행 연구에서 공동연구자는 미생물 다당류 생산균주를 탐색하기 위하여 식용 및 한약제로 광범위하게 이용되고 있는 갈근으로부터 다당류 생산균주 HDN-14를 분리하고 세균학적 특성을 검토한 바 있다(4). 본 연구에서는 갈근으로부터 내생균을 다수 확보하여 고점도 다당류를 생성하는 미생물 유전자원을 탐색하고 이들 균주가 생산하는 구성당 분석과 분류학적 특성을 밝히

*To whom correspondence should be addressed.
Tel: 82-42-829-7598, Fax: 82-42-829-7599
E-mail: kswchang@mokwon.ac.kr

고자 한다.

재료 및 방법

시료채취

충청북도 영동지역 내 갈근이 군락을 이루고 있는 갈근 밭을 선정하여, 표토층 토양으로부터 지하 1 m 이하 부분까지 깊게 활착되어있는 갈근을 상처 나지 않도록 주의하면서 채취하고, polyethylene vinyl bag에 넣은 후 실험실로 운반하였다.

배지

생갈근 200 g을 1,000 ml의 증류수에 넣고 100°C에서 30분간 가열한 후 추출한 천연 갈근추출액 배지와 세균 배양에 통상적으로 사용되고 있는 육즙 한천배지(NB: beef extract 10 g, peptone 10 g, NaCl 5 g, pH 7.0, agar 15 g/L)를 내생균주의 분리 및 다당류 생산용 배지로 각각 이용하였다.

내생균의 분리 및 다당류 생산균주의 선발

조직배양법과 homogenizer를 이용한 분산처리법으로 갈근 내생균을 분리하였다. 먼저 표피조직을 불꽃으로 화염멸균한 후 무균적으로 표피조직을 제거 분리하고, 갈근 내부조직을 준비된 상기의 한천배지에 각각 접종하였다. 한편 무균적으로 절개한 갈근 내부조직 10 g을 100 ml의 멸균수에 넣고 homogenizer (Nikon Seiki Co., Tokyo, Japan)를 이용하여 15,000 rpm에서 5분간 분산 처리하였다. 분산된 갈근 현탁액을 순차적으로 희석한 후, 갈근추출액 배지와 NB 배지를 사용하여 28°C에서 1주일 이상 배양한 후 평판상에 형성된 colony 중 점도가 강한 균주를 1차 분리하고, 순수 분리된 균주를 상기의 액체배지에 접종하여 28°C에서 1주일 이상 배양한 후 점도가 가장 강한 균주를 최종 선발하였다.

다당류의 정제

분리균주가 생산하는 다당류 분석을 위하여 Goubet의 방법에 따라 정제하여 분석하였다(5). 배양액을 증류수로 2배 희석한 후 6,000×g에서 원심분리하여 균체를 제거하고, 상정액에 2배량의 99% ethanol을 첨가하여 다당류를 침전시키고 이를 70% ethanol로 2회 세척한 후 증류수에 녹여 투석한 다음 동결건조 하였다. 이렇게 하여 얻은 조다당류를 다시 증류수에 녹여 0.3% 농도의 양이온 세제 CPC (cetylpyridinium chloride, Junsei Chemical Co., Japan)로 침전시킨 후 침전물을 다시 10%의 NaCl에 용해시켰다. 여기에 3배량의 ethanol을 첨가하여 다당류를 침전시킨 후 침전물을 증류수에 녹여 투석하고 동결 건조하여 시료로 사용하였다.

구성당 분석

분리된 polysaccharide의 구성당 분석은 동결건조된 시료를 1 N-HCl로 80°C에서 3시간 분해시킨 후 HPLC (Waters 600 controller)을 이용하여 column; carbohydrate column, carbosep

CHO-820A (Transgenomic Co. Ltd), column temperature; 90°C, Detector (Waters 410RI), flow rate; 0.5 ml/min, pressure:360Pa의 조건으로 실시하였다(12).

균체지방산 조성 분석

분리균주의 균체 지방산 조성 분석을 위하여 TSA 배지에서 28°C, 48시간 배양한 대수기의 균체를 회수하여 Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID, Inc., Newark, USA)을 이용하여 분석하였다(22).

16S rDNA 염기서열 분석

Chromosomal DNA의 분리는 Benzyl chloride 방법을 변형하여 수행하였다(8). 16S rDNA를 증폭하기 위해서 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 하여 27F; 5'-AGA GTTIGATCCTGGCTCAG-3' primer와 1525R; 5'-AAGGAGGT GATCCAGCCGCA-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. 반응 부피는 50 μl로 핵산증폭기(GeneAmpR PCR System 9700, Applied Biosystems)을 이용하여 94°C에서 5분간 반응한 다음 94°C에서 denaturation 1분, 58°C에서 annealing 30초, 72°C에서 extension 1분을 30회 반복하고 72°C에서 10분간 final extension 반응시켰다. Thermal cycler는 Perkin Elmer (GeneAmp PCR system 9700, Applied Biosystems)를 이용하였다. 16S rDNA PCR 증폭산물을 전기영동을 통하여 확인하고, Qiagen PCR Purification kit (Qiagen Inc.)를 이용하여 정제한 후 band의 단일성을 최종 확인 하였다.

ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems)를 사용하여 16S rDNA partial (약 1,300 bp) 염기서열을 결정하고, 16S rDNA 염기서열의 homology는 DDBJ/NCBI/GenBank database의 Blast program을 이용하여 입수하였다. 각 염기서열의 alignment는 CLUSTAL X (Version 1.8) program package를 이용하여 정렬하였고(25), 근린 결핵법에 의거(18), 분리된 갈근 내생균주의 계통분류학적 위치를 결정하였다.

결과 및 고찰

내생균주의 분리

갈근 내부조직을 조직배양법과 한천혼합법을 이용하여 배양한 결과 각 평판배지 위에 형성된 콜로니의 대부분이 강한 점액성을 나타내었다. 특히 육즙영양배지(NB)보다 갈근추출액 배지(G)에서 강한 점액을 나타내는 콜로니가 다수 확인되었다(Fig. 1). 각 평판배지로부터 점액성을 나타내는 세균 콜로니 50균주를 순수분리하고, 순수분리된 균주 중 점액성이 가장 강하게 나타난 TDG-3, HDN-14 및 TNB-3 내생균주를 최종 선발하였다.

생성다당류의 조성

표준시료 glucose, galactose, maltose 및 fructose를 사용하여

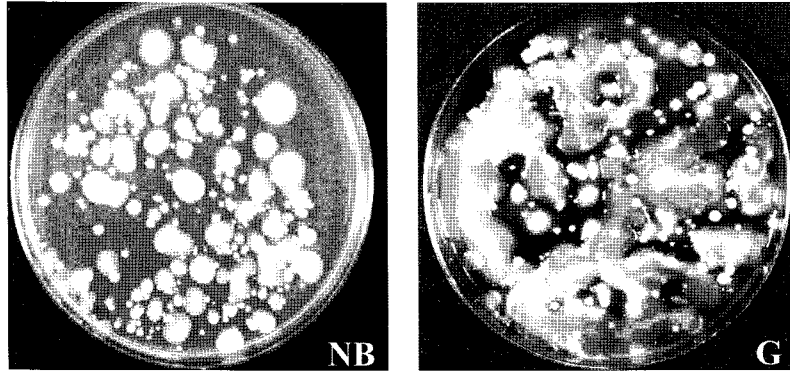


Fig. 1. The characteristics of colonies which were isolated from pueraria root on nutrient broth (NB) and pueraria root extract (G) medium. Endophytic bacteria were produced slime around the colonies.

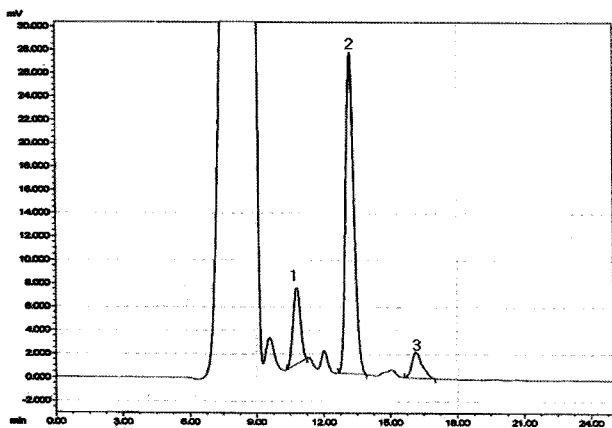


Fig. 2. Detection of HPLC spectrum of the polysaccharide produced on the liquid culture of pueraria root extract medium. (1) maltose, (2) glucose, (3) fructose.

분리 선발된 내생균주 중 갈근추출액 배지에서 생성하는 다당류의 조성 분석을 수행한 결과, 갈근 내생균주 HDN-14, TDG-3 및 TNB-3 균주가 생산하는 다당류로부터 glucose (45.6~63.1%), fructose (14.6~28.3%) 및 maltose (17.4~23.7%)가 각각 검출되었다(Fig. 2). 갈근 내생균이 생산하는 다당류에 관한 보고는 매우 미흡한 형편으로 향후 이들 다당류에 대한 구조분석 등 세밀한 검토가 요구된다.

고점도 다당류를 생성하는 갈근 내생균의 분류학적 특성

고점도 다당류를 생성하는 갈근 내생균주(TDG-3, HDN-14 및 TNB-3)의 16S rDNA 염기서열(약 1,500 bp)을 결정하여 계통학적 위치를 검토하였다. 각 분리균주의 16S rDNA 염기서열 결과를 DDBJ/NCBI/GenBank의 database와 상동성 비교한 결과 TDG-3, HDN-14 및 TNB-3 균주는 γ -Proteobacteria 그룹의 *Pseudomonas* 속에 속하는 균주임이 확인 되었다. 이들 균주 중 HDN-14와 TNB-3균주는 *Pseudomonas koreensis*^T, *Pseudomonas jessenii*^T와 99.06~99.32%의 상동성을 나타내었으며 TDG-3 균주는 *Pseudomonas plecoglossicida*^T, *Pseudomonas mosselii*^T, *Pseudomonas*

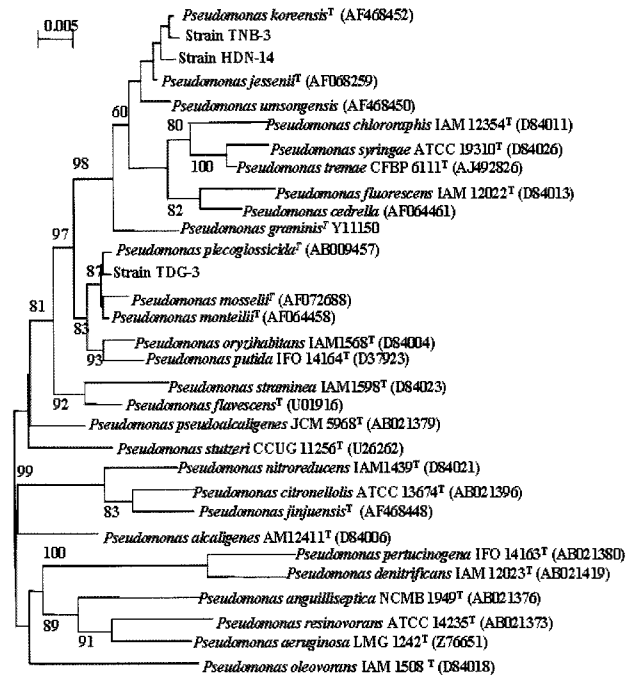


Fig. 3. Phylogenetic relationships of endophytic isolates from pueraria root and genera *Pseudomonas* based on similarities of 16S rDNA. The phylogenetic tree was constructed using the neighbor-joining method. Bootstrap values are shown at nodes.

monteilii^T와 99.48~99.74%의 상동성을 나타내었다(Fig. 3). 이들 분리균주는 *Pseudomonas* 속의 종과 근연관계에 위치해 있음이 확인되었으나 정확한 동정을 위해서는 DNA-DNA hybridization에 의한 근연관계의 재확인 필요하며, 향후 이들 분리균주의 동정을 위한 생리 생화학적 특성평가가 요망된다.

이들 갈근 내생균주의 균체 지방산조성을 검토한 결과, 3OH-C_{10:0} (12.07~33.30%), 2-OH C_{12:0} (12.17~24.20%), 3-OH C_{12:0} (5.16~16.70%) 및 3-OH C_{12:1} (0.64~11.45%)가 주요 균체지방산으로 검출되었다. 한편 TDG-3 균주는 상기의 2-OH 및 3-OH 지방산 이외에도 iso 3-OH C_{11:0}, 3-OH C_{12:0}, 3-OH C_{14:0}, 3-OH

Table 1. Cellular fatty acid profiles for pueraria root endophytic isolates.

Fatty acid	% of total cellular fatty acids		
	TDG-3	HDN-14	TNB-3
Saturated acids			
10:00	4.12	3.03	tr
11:00	tr	tr	-
12:00	11.40	5.31	3.62
13:00	tr	-	-
14:00	2.76	-	0.59
15:00	0.57	-	-
16:00	4.36	0.70	16.06
17:00	tr	-	-
Unsaturated acids			
16:1 w7c	12.82	1.41	13.88
18:1 w7c	2.99	-	6.49
19:0 10 methyl	tr	-	-
Hydroxy acids			
9:0 3OH	tr	tr	-
10:0 3OH	24.69	33.32	12.07
11:0 3OH	tr	tr	-
11:0 iso 3OH	tr	-	-
12:0 2OH	12.17	24.17	19.73
12:0 3OH	5.16	16.67	6.58
12:1 3OH	5.35	11.45	0.64
13:0 3OH	0.65	-	-
14:0 3OH	7.34	-	-
15:0 3OH	tr	-	-
16:0 3OH	tr	-	-
Branched acids			
Iso 15:1 AT 5	tr	-	tr
15:0 anteiso	tr	-	-
Cyclopropane acids			
17:0 CYCLO	2.62	tr	19.08
19:0 CYCLOw8c	-	-	tr
Unknown11.799	tr	0.81	-
Unknown12.484	tr	-	-
Unknown14.959	-	0.95	-
Sum in Feature 2	0.85	tr	-
Summed Feature 2	8.19	1.37	-

C_{15:0} 및 3-OH C_{16:0}를 함유하는 매우 다양한 지방산 특성을 나타내었다(Table 1).

호기성 그램음성 종속영양세균의 경우, OH기를 함유하는 지방산의 종류 및 함유 여부는 세균 분류학상 매우 중요하다. 대부분의 지방산이 세포막의 인지질로부터 유래하는데 반하여, OH기를 함유하는 지방산은 외막의 lipid A에 국재해 있다. Stead (17)와 Oyaiz 등(11)은 OH기를 갖는 지방산 type에 의해 *Pseudomonas* 속을 6~9개의 group으로 나눈 바 있다. 본 연구에서 분리된 갈

근 내생균주 TDG-3, HDN-14 및 TNB-3에서 검출된 hydroxy acids 중에는 3-OH C_{9:0}, 3-OH C_{11:0}, 및 3-OH C_{12:1}과 같은 기존의 *Pseudomonas* 속에서는 검출되지 않은 지방산이 검출되었으며, 특히 TDG-3 균주의 경우 3-OH C_{13:0}, 3-OH C_{14:0}, 3-OH C_{15:0} 및 3-OH C_{16:0} 등 다양한 종류의 3-OH 지방산이 검출되어 기존의 *Pseudomonas* 종과 비교하여 매우 특징적인 성질을 나타내었다.

미생물 다당류는 겔 형성능, 물 흡수능, 점착능 등의 기능을 가지며 수용액에서의 물성학적 성질을 크게 변화시키므로 식품 첨가제, 화장품 보습제, 대용 혈청제의 소재로서 각종 산업에서의 그 중요성이 크게 부각되고 있다(11). 미생물 다당류에 관한 연구는 1942년 *Leuconostoc mesenteroides*가 생산하는 dextran이 혈장증광제로 개발된 이래 새로운 다당류의 탐색 및 용도개발을 목표로 한 기초 및 응용 연구가 지속적으로 수행되고 있어 (12, 17), 본 연구를 통해 분리된 갈근 내생균의 산업적 응용성이 크게 기대된다.

감사의 말

본 논문은 2007년도 농촌진흥청 바이오그린21사업(200503013 4384) 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. 엄안흠, 어주경, 김동훈, 정현숙. 2004. 18S rDNA를 이용한 인삼(*panax inseng*)의 내생균근 균의 동정. 한국응용생물화학회지 47, 182-186.
2. 이재훈. 1995. 미생물 다당류의 다양성과 산업적 이용 및 전망. 생물산업 8, 4033-4043.
3. 최재을, 육진아, 김진희, 최춘환, 천종식, 김영준, 이항범. 2005. 적변삼으로부터 분리한 내생세균의 동정 및 적변유발. 한국약용작물학회지 13, 1-5.
4. 황경숙, 최성현, 조민혜. 2003. *Pseudomonas* sp. nov. HDN-14 갈근내생균의 분리 및 특성. 목원대학교 자연과학연구소 제 12권, 1호.
5. Goubet, F., P. Jackson, M.J. Deery, and P. Dupree. 2002. Polysaccharide analysis using carbohydrate gel electrophoresis: a method to study plant cell wall polysaccharides and polysaccharide hydrolases. *Anal. Biochem.* 300, 53-68.
6. Hallmann, J., A. Quadt-Hallmann, W.F. Mahaffee, and J.W. Kloepper. 1997. Bacterial endophytes in agricultural crops. *Can. J. Microbiol.* 43, 895-914.
7. Hayagawa, J., N. Noda, S. Yamada, and K. Uno. 1984. Studies on physical and chemical quality evaluation of crude drugs preparations. I. Analysis of pueraria radix and species puerariae. *J. Pharm. Soc. Jpn.* 104, 50-56.
8. Heng, Z., Q. Feng, and H. Zhu. 1993. Isolation of genomic DNAs from plants, fungi and bacteria using benzyl chloride. *Nucleic Acids Res.* 21, 5279-5280.
9. Kirchhof, G., B. Eckert, M. Stoffels, J.I. Baldani, V.M. Reis, and A. Hartmann. 2001. *Herbaspirillum frisingense* sp. nov., a new nitrogen-fixing bacterial species that occurs in C4-fibre plants. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 157-168.
10. Leong, J. 1986. Siderophores: their biochemistry and possible role

- in the biocontrol of plant pathogenes. *Annu. Rev. Phytopathol.* 73, 217-219.
11. Linker, A. and R.S. Jones. 1966. A new polysaccharide resembling alginic acid isolated from *Pseudomonas*. *J. Biol. Chem.* 241, 3845.
 12. Margaritis, A. and N.G.W. Pace. 1985. Comprehensive biotechnology: The principles, applications, and regulations of biotechnology in industry, agriculture, and medicine. *Microbial Polysaccharide* 3, 1005-1043.
 13. Nowak, J. 1998. Benefits of *in vitro* "biotization" of plant tissue cultures with microbial inoculants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 34, 122-130.
 14. Ohshima, Y., T. Okuyama, K. Takahashi, T. Takakizawa, and S. Shibata. 1988. Isolation and high performance liquid chromatography (HPLC) of isoflavonoids from the Pueraria root. *Planta Med.* 54, 250-254.
 15. Oyaiz, H. and K. Komagata 1983. Grouping of *Pseudomonas* species on the basis of cellular fatty acid composition and the quinone system with special reference to the existence of 3-hydroxy fatty acids. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 29, 17-40.
 16. Reiter, B., U. Pfeifer, H. Schwab, and A. Sessitsch. 2002. Response of endophytic bacterial communities in potato plants to infection with *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2261-2268.
 17. Ruijsenaars, H.J., F. Stinglee, and S. Hartmans. 2000. Biodegradability of food-associated extracellular polysaccharides. *Curr. Microbiol.* 40, 194-199.
 18. Saitou, N. and M. Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406-425.
 19. Schiessendoppler, E. and P. Cate. 1996. Schwarzbeinigkeit, bakterielle stengelfaule und Naßfaule der knolle. In B. Zwatz and Bedlan (ed.), Wichtige Krankheiten und Schadlinge der Kartoffel. p. 48-51. Institut für Phytomedizin im Bundesamt und Forschungszentrum für Landwirtschaft, Vienna, Austria.
 20. Sharma, V.K. and J. Novak. 1998. Enhancement of verticillium wilt resistance in tomato transplants by *in vitro* co-culture of seedlings with a plant growth promoting rhizobacterium (*Pseudomonas* sp. strain PsJN). *Can. J. Microbiol.* 44, 528-536.
 21. Shibata, S., T. Murakami, and Y. Nishikawa. 1959. Studies on the constituents of Japanese Chinese crude drugs. I. On the constituents of *Pueraria* root. *药学杂志* 79, 757-760.
 22. Stead, D.E. 1992. Grouping of plant-pathogenic and some other *Pseudomonas* spp. by using cellular fatty acid profiles. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 42, 281-295.
 23. Stoltzfus, J.R., R. So, P.P. Malarvithi, J.K. Ladha, and F.J. De Bruijin. 1998. Isolation of endophytic bacteria from rice and assessment of their potential for supplying rice with biologically fixed nitrogen. *Plant Soil* 194, 25-36.
 24. Sturz, A.V., B.R. Christie, B.G. Matheson, W.J. Arsenault, and N.A. Buchanan. 1999. Endophytic bacterial communities in the periderm of potato tubers and their potential to improve resistance to soil-borne plant pathogenes. *Plant Pathol.* 48, 360-369.
 25. 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.
 26. Yalpani, M. and A. Sandford. 1987. Commercial polysaccharides: Recent trends and developments. Industrial polysaccharides: genetic engineering, Structure/Property relation and applications. Edited by Yalpani, M. Amsterdam-printed in the Netherlands: Elsevier Science Publishers 311-335.

(Received November 22, 2007/Accepted December 17, 2007)

ABSTRACT : Isolation and Characterization of High Viscosity Polysaccharide Producing Endophytic Bacteria from Pueraria Root

Kyung-Sook Whang^{1*}, Seung-Hyun Choi², and Song-Ih Han¹ (¹Department of Biotechnology and Institute of Microbial Ecology and Resources, Mokwon University, Daejeon 302-729, Korea, ²Chung Mi Bio Co., Ltd., Ansan 461-701, Korea)

Fifty endophytic bacteria, which produced slime around the colonies, were isolated from Pueraria roots. In particular, HDN-14, TDG-3, and TNB-3 strains, which appeared to be high viscosity producers, were selected. These strains produced high levels of polysaccharides in Pueraria root medium extract. The purified polysaccharide was digested with 1N HCl and analyzed by HPLC, with glucose (45.6~63.1%), maltose (14.6~28.3%), and fructose (17.4~23.7%) detected as constitutive sugars. When determined by the homology relationship of the 16S rDNA sequence with the relative taxa, the HDN-14 and TNB-3 strains were closely (99.06~99.32%) related to the *Pseudomonas koreensis*^T and *Pseudomonas jessenii*^T, while TDG-3 were closely (99.48~99.74%) related to *Pseudomonas plecoglossicida*^T, *Pseudomonas mosselii*^T, and *Pseudomonas monteilii*^T. The major cellular *Pseudomonas* acids are 3OH-C_{10:0}, 2OH-C_{12:0}, 3OH-C_{12:0}, and 3OH-C_{12:1}, with these strains being further differentiated in species belonging to the genus *Pseudomonas*.