

Research Article



CrossMark

Open Access

## 후코이단과 후코이단 이용 박테리아의 멜론 성장 촉진 효과 검증

양소희, 길예지, 오희정, 구연종\*

전남대학교 농업생명과학대학 농생명화학과

### Melon Growth Enhancement by Fucoidan and Fucoidan Decomposing Bacteria

Sohee Yang, Yeji Gil, Heejeong Oh and Yeonjong Koo\* (Department of Agricultural and Biological Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 61186, Korea)

Received: 15 January 2020/ Revised: 11 February 2020/ Accepted: 17 February 2020

Copyright © 2019 The Korean Society of Environmental Agriculture

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ORCID

Yeonjong Koo

<https://orcid.org/0000-0002-0147-1758>

#### Abstract

**BACKGROUND:** Marine algae is a productive organism that is consumed as a nutritious food. However, large amounts of unused portions of the algae are incinerated as trash or dumped in the sea, causing pollution. Recycling algae is important for saving resources and conserving the environment. In this study, the fucoidan which is a major carbohydrate of marine algae was tested as a source of fertilizer for farming.

**METHODS AND RESULTS:** The growth rate of the melon was examined after treating fucoidan and the melon growth factors, weight and length of stem were measured. To discover the mechanism of melon growth promotion of fucoidan, bacteria that decomposed fucoidan were isolated from soil and abalone. *Bacillus wiedmannii* and *Stenotrophomonas pavanii* were isolated from terrestrial soil and *Pseudomonas* sp. was isolated from abalone. Among these three bacteria, *Pseudomonas* sp. had the highest and most specific fucoidan-decomposing activity. When *Pseudomonas* sp. was treated with fucoidan on melon-growing soil, the growth of melon was relatively improved compared to the treatment with fucoidan alone.

**CONCLUSION:** We found that fucoidan, the main

carbohydrate of marine algae, promoted melon growth. Fucoidan-decomposing microorganisms were isolated from terrestrial soil and marine organism, and we found that these bacteria stimulated the effect of melon growth promotion of marine algae. This is the first report that confirms the fertilizer effect of marine algae and shows the use of bacteria with marine algae.

**Key words:** Fucoidan, Fucoidan Decomposing Bacteria, Melon, Plant Growth Promotion

#### 서론

해조류인 미역은 해양 생태계의 중요한 부분을 차지한다. 우리나라 미역 생산량은 2018년 기준 약 62만톤에 이르고 미역을 활용한 가공식품의 다변화와 건강 식품에 대한 소비자의 관심으로 매년 생산량이 증가하고 있으나 생산된 미역의 40~60%인 14~21만여 톤이 양식장에 그대로 버려져 해양 생태계를 오염시키는 것으로 파악된다[1]. 미역 생산 총량은 매년 증가하고 있으나 버려지는 미역의 매립이나 소각처분 양도 증가하여 경제적, 환경적 문제를 발생시키고 있다. 식용 이외에 미역의 활용 방법은 크게 연구되어 있지 않으며, 일부 비료로 활용하려는 시도가 있으나 미역이 식물 생장에 미치는 영향에 대한 자료가 부족하고 미역이 포함하는 식물 생장 조절 물질에 대한 연구도 매우 부족하여 활용도가 낮은 생물 자원으로 간주되어 왔다[2]. 최근에는 미역을 포함한 해조류가 식물의 성장을 촉진하는 식물 호르몬인 옥신이나 사이토키닌과 유사한 기능을 하는 식물 생장조절 물질을 포함하고

\*Corresponding author: Yeonjong Koo  
Phone: +82-62-530-2133; Fax: +82-62-530-2139;  
E-mail: [yeonjong@jnu.ac.kr](mailto:yeonjong@jnu.ac.kr)

있는 것으로 보고되어[3], 옥신 종류중 하나인 Indole-3-acetic acid와 사이토키닌 종류인 Zeatin, Kinetin, 6-benzylaminopurine, Isopentenyladenine 등을 활용하여 식물 생장촉진을 위한 비료로 활용하는 연구가 진행되고 있다[1].

해조류의 생체중량의 대부분은 탄수화물로 구성된다[4]. 그러나 해조류의 탄수화물은 육상 식물과 그 구조를 달리하는데 미역이 포함하는 대표적인 독특한 탄수화물로 알긴산과 후코이단이 있다[5]. 미역의 세포벽과 세포 사이의 매트릭스 구성분자는 후코이단과 알긴산을 포함하며[6], 이들은 탄수화물 함량이 높은 특성을 가지고 있다[7]. 후코이단의 정확한 구조적 특성은 현재까지 완전히 확립되지는 않았지만 후코이단 및 알긴산 다당류 성분은 미역과 같은 해조류의 세포벽 구성성분으로 많이 나타나는 것으로 보인다[8]. 후코이단 및 알긴산은 세포 표면인 세포벽을 방어하는 능력과 관련하여 수많은 중요한 생물학적 효과를 가지고 있다[9].

이들의 성장과 구성성분은 온도에 크게 영향을 받기 때문에 계절별, 지역별로 두 개체가 다르게 결정된다[10]. 알긴산과 후코이단 등의 난분해성 다당류와 만니톨(mannitol) 등의 단당류가 주요 탄수화물이며 이 중 알긴산과 후코이단이 건조 중량대비 구성함량이 높다[11]. 갈조류 다당류의 생물학적 전처리를 위해 갈조류의 분쇄물에 특정 미생물을 첨가하거나 유전자 조작된 미생물을 이용하는 생물학적 전처리 공정이 개발되었으나 다당류의 분해속도가 늦고 만니톨과 같은 유용한 단당류가 소비되는 문제점이 있으며[7], 유전자 변형 균주의 경우 통제된 연구실에서 벗어날 경우 잠재적 위험에 대해 우려가 있다[12].

본 연구에서는 대량으로 버려지는 탄소원 중 하나인 해조류를 활용하기 위해 미역의 구성 고분자인 후코이단이 작물 재배에 활용될 가능성을 살펴보고[13], 후코이단을 탄소원으로 활용하는 미생물을 토양과 전복에서 분리하여 후코이단 이용 미생물의 생물 비료로서의 활용 가능성을 조사했다.

## 재료 및 방법

### 후코이단 포함 배지 제작 및 후코이단 관주

후코이단 선별 평판배지 제작을 위해 판매 중인 Fucoidan (모즈쿠 추출, 오키나와 후코이단, JP) 분말을 0.8% 이용하여 평판배지는 NaCl 1.0%, bacto peptone 0.5%, bacto agar 1.5%, Fucoidan 0.8%으로 조성하였고, 후코이단 관주를 위한 액체배지는 한천을 제외한 동일한 조성의 배지가 이용되었다. 미생물 관주를 위해 고체배지 상에서 분리된 single colony를 액체배지에서 배양한 후 멜론모종 한구당 후코이단 배지와 미생물 균주를 함께 1 mL씩 처리하였다.

### 후코이단 이용 토양 미생물과 해양 미생물의 분리

후코이단 이용 토양 미생물 분리를 위해 논토양을 세 지점에서 채취하고, 판매 중인 Fucoidan (모즈쿠 추출, 오키나와 후코이단, JP) 분말을 0.8% 농도로 토양에 첨가한 후 멸균수를 토양 무게 대비 1:1비율로 첨가하였다. 3일간 정지배

양 후 감압여과를 통해 토양 입자를 제거하고 토양수를 얻었다. 각 토양수를 100배 또는 1000배 희석하여 후코이단을 포함하는 선별 평판배지에 도말하였다. 후코이단 이용 전복내장 미생물 분리를 위해 전복에서 내장을 분리하고 멸균수 15 mL를 첨가한 후 믹서기를 사용해 분쇄했다. 분쇄 한 전복내장을 100배, 1000배, 10000배 희석하여 후코이단을 포함하는 평판배지에 100 µL씩 도말하고 30°C에서 배양했다. 후코이단 포함 배지에서 높은 성장률을 보이는 콜로니를 선정하는 방식으로 후코이단 이용 미생물 균주를 선별했다. 알긴산 포함 배지는 0.8% sodium alginate (71238, Sigma, DE)를 후코이단 대신 첨가하여 사용하였다. 분리된 후코이단 이용 미생물들은 30°C에서 배양하였다. 알긴산 및 후코이단 배지에서 성장곡선을 얻기 위하여 0.8% sodium alginate, 0.8% fucoidan을 포함하는 액체배지에 선별된 후코이단 이용 미생물인 AF1, F4, F9을 각각 접종한 뒤 3h, 6 h, 9 h, 12 h 시간동안 배양한 후 A<sub>600nm</sub>에서 흡광도를 측정했다. 세 종류의 배지에서 4 반복 실시하여 얻은 값의 평균값으로 성장곡선을 얻었다.

### 미생물의 알긴산 및 후코이단 분해능 측정

분리한 미생물의 후코이단 분해능 측정을 위해 환원당 정량을 실시하였다. 액체 배지에 접종한 미생물들을 30°C 배양기에서 A<sub>600nm</sub> 0.5 흡광도가 되도록 배양하고 1 mL의 배양상층액을 환원당 정량에 사용하였다. 환원당 정량은 DNS (3,5-dinitrosalicylic acid) 방법을 따라[14] 1.5 mL의 DNS 시약(중류수 500 mL, 3,5-dinitrosalicylic acid 7.5 g, Rochelled Salt 216.1 g, NaOH 14 g, Phenol 5.4 mL, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 5.9 g)에 500 µL 상층액을 넣고 혼합한 후 95°C의 물에 10분간 증탕하고 분광광도계(biochrom Libra S22, Biochrom, Cambridge, UK)를 사용하여 A<sub>540nm</sub>에서 발색량을 측정했다. 정량을 위한 표준곡선은 glucose를 0.34 mM에서 5.5 mM 범위에서 순차적으로 희석한 용액을 사용하여 구했다.

### 분리한 미생물의 동정

고체배지 상에서 분리된 single colony를 액체배지에서 배양한 후 genomic DNA를 추출하여 16S rRNA 유전자 증폭을 위한 primer들인 357F 5'-CTCCTACGGGAGGCAG-3'와 1391R 5'-ACRTGTGTGGCGGGCAG-3' 또는 v3-4-F 5'-TCGTCGGCAGCGTCAGATGTGTATAAGAGACAGCCTACGGGNGGCWGAAG-3'와 v3-4-R 5'-GTCTCGTGGGCTCGGAGATGTCTATAAGAGACAGGACTAC HVGGGTATCTAATCC-3' 조합을 이용해 PCR하여 증폭하고[15] 염기서열 분석을 통해 분리된 후코이단 이용 미생물을 동정하였다(마크로젠, KR).

### 후코이단 및 후코이단 이용 미생물의 식물생장 영향 평가

분리한 후코이단 이용 미생물의 비료로서의 효과를 확인하고자 1주된 멜론모종에 3주 동안 3회 관주 처리 후 각 처리구 별 멜론의 생장율을 비교하였다. 대조군으로 무처리구 멜

론을 사용하였고 실험군으로 후코이단 배지와 후코이단 분해 능이 뛰어난 AF1을 각 멜론에 1 mL씩 처리하였다. 각 멜론의 줄기의 길이와 무게를 관찰하여 생장율을 비교하였다.

## 결과 및 고찰

### 후코이단의 멜론 생장촉진검증

후코이단의 멜론 생장촉진 효과를 확인하기 위하여 발아 후 1주일 된 멜론에 0.8% 후코이단을 주 1회 3 mL씩 3주 동안 관주하였다. 결과 대조구 대비 후코이단을 관주한 멜론의 성장이 빠르고 줄기의 길이가 더 긴 것을 확인했다(Fig. 1A). 후코이단 관주 멜론의 생장율은 마지막 관주 1주 후에 무게를 측정했을 때 대조구에 비해 70% 증가된 생장율을 나타냈다(Fig. 1B). 이 결과는 해조류가 가지는 단일 탄수화물 고분자인 후코이단이 식물 생장을 촉진하는 효과가 있음을 보여준다.

### 후코이단 이용 미생물 분리 및 생장률

후코이단의 식물 생장촉진 기능의 기작을 밝히기 위하여 후코이단 이용 미생물을 농도양과 전복에서 분리하였다. 분리된 미생물의 16S rRNA 유전자 염기서열을 분석한 결과 토양 미생물은 *Bacillus wiedmannii* (*B. wiedmannii*, F4), *Stenotrophomonas pavanii* (*S. pavanii*, F9)의 염기서열과 100% 일치하였고, 전복에서 분리된 미생물은 *Pseudomonas* sp. (AF1)로 16S rRNA 염기서열과 100% 일치했다. 후코이단 또는 알긴산 배지에서 각 미생물의 생장율을 분석하기 위하여 접종 후 3, 6, 9, 12 시간 동안 세 가지 다른 배지에서 배양 한 후 분광광도계를 이용해 흡광도를 측정했을 때 AF1은 후코이단 배지에서 가장 높은 생장율을 보이고, 알긴산, 펩톤 배지 순서로 생장률이 높았다(Fig. 2A). 반면 F4는 알긴

산, 펩톤, 후코이단 배지 순서로 높은 생장율을 보였으며, F9는 후코이단, 펩톤, 알긴산 순서로 생장률이 높으나 다른 군주에 비해 대체로 낮은 생장율을 나타냈다(Fig. 2C). 배지별 세 미생물들의 생장율을 비교하면 후코이단 배지에서는 AF1과 F4가 유사하고, 알긴산 배지에서는 F4만이 비교적 높은 생장율을 보일 뿐, 나머지 두 미생물은 매우 낮은 생장율을 보였다.

생장률 분석 결과, AF1은 후코이단에 특이적으로 높은 친화력을 보이며 알긴산에 대해서는 생장이 저해되는 성질을 나타냈다. F4는 후코이단과 알긴산 모두에서 높은 친화력을 나타내어 두 가지 탄소원에 대한 특이성이 발견되지 않았다. 따라서 후코이단을 특이적으로 분해하는 것으로 보이는 AF1을 후코이단 이용 미생물로 선발하여 후코이단의 식물생장 조절 효과 규명에 활용하였다. 마지막으로 F9는 대체적으로 낮은 생장율을 보여 후코이단 또는 알긴산 이용 미생물로서의 활용 가치가 떨어지는 것으로 판단된다.

### 분리된 미생물의 환원당 생성 능력 비교

미생물들의 후코이단 분해능을 살펴보기 위하여 DNS방법[14]을 활용하여  $A_{540}$ 에서 생성된 환원당을 정량했다(Fig. 3). 후코이단 이용 미생물인 AF1, F4, F9는  $A_{540}$ 에서 평균 0.277, 0.220, 0.117의 흡광도를 나타내었다. 이를 농도로 환산하면 AF1은 0.49 mM, F4는 0.43 mM, F9는 0.19 mM의 환원당이 생성된 것으로 분석됐다. 따라서 세 미생물 중에서 AF1이 16시간 동안 가장 높은 후코이단 분해능을 보였다. 앞선 후코이단 및 알긴산 포함 배지에서의 생장률과 환원당 생성 능력을 종합했을 때 AF1은 F4에 비해 후코이단에 특이적인 생장성을 보이고 환원당 생성 능력도 우수한 것으로 판단하여 앞으로의 실험에 활용하였다.

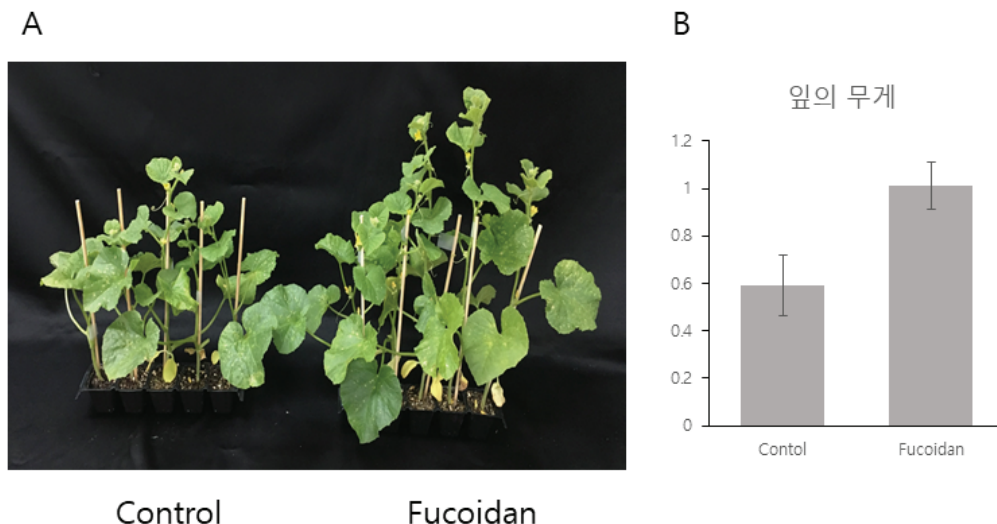
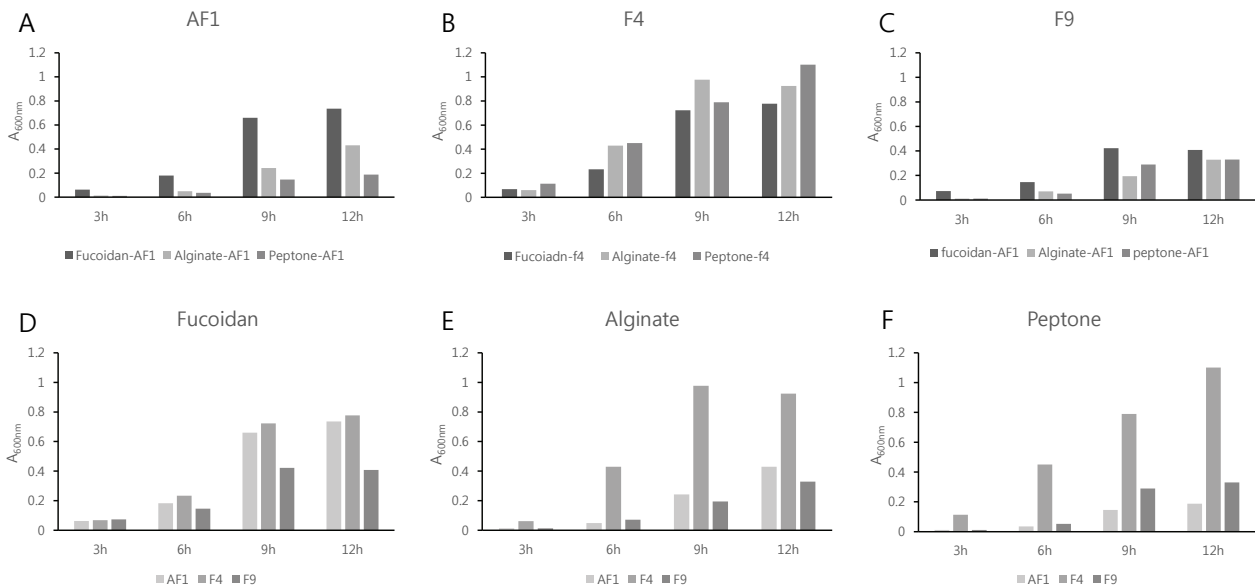
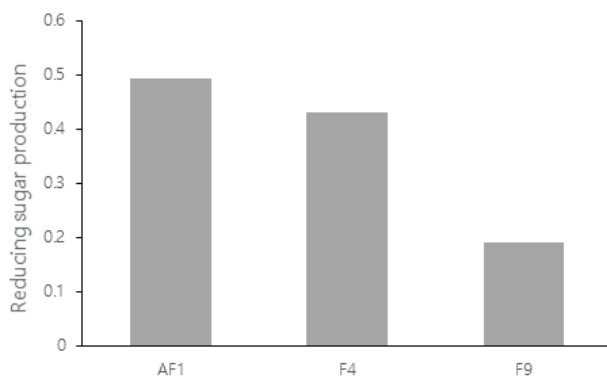


Fig. 1. The growth effect of fucoidan. Melon was treated with fucoidan containing media for 3 weeks. The growth promoting effect of fucoidan is shown in (A) and the weight is plotted on the graph (B) to show the growth promoting effect quantitatively ( $n=3$ ,  $p < 0.01$ ).



**Fig. 2. A ~ C** The growth effect of fucoidan and alginate in three different bacterial cells. **D ~ F** The growth rate of three different bacteria in fucoidan and alginate containing media. All bacterial growth was measured at least four times and the average numbers are indicated.



**Fig. 3.** The reducing sugar production of three different bacteria. AF1, F4 and F9 were grown in the fucoidan containing media until OD<sub>600</sub> = 0.5. The reducing sugar production was measured and calculated with DNS method. The standard curve was set using glucose.

### 후코이단과 후코이단 이용 미생물의 식물 성장 촉진 효과 검증

발아한 후 일주일 이 지난 멜론에 후코이단과 후코이단 이용 미생물을 3주 동안 총 세 번 관주처리 했다. 무처리구와 후코이단 포함 배지, 그리고 후코이단 포함 배지와 AF1미생물을 함께 멜론에 1 mL씩 관주 처리했을 때 멜론의 생장률을 비교했다(Fig. 4). 결과 후코이단 또는 후코이단과 AF1을 함께 관주한 처리구의 멜론은 무처리구에 비해 확연히 높은 생장률이 관찰되었다. Fig. 4A에서 보듯 멜론의 잎의 성장, 줄기의 성장에서 시각적으로 큰 차이를 나타내었다. 정량적 분석을 위해 이들 멜론들의 전체 무게를 측정했고, 무처리구, 후코이단 처리구, 후코이단 AF1 처리구에서 각각 평균 1.5 g,

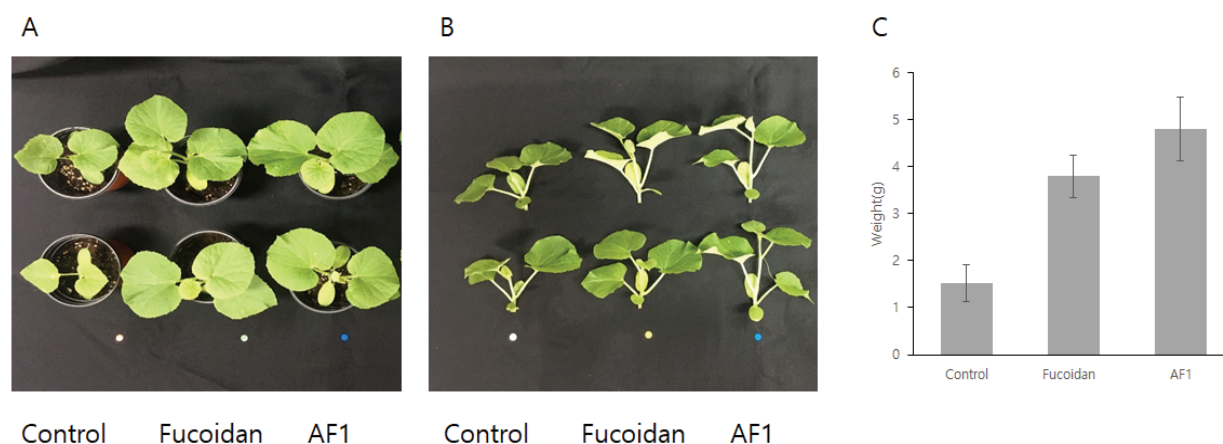
3.8 g, 4.8 g으로 나타났다. 후코이단 처리구와 후코이단 AF1 처리구에서는 무처리구에 비해 두 배 이상의 성장촉진 효과를 관찰할 수 있었다. 통계적 분석에 의하면 후코이단 처리구와 후코이단 AF1 처리구에서 유의적인 차이를 발견할 수 없었으나 반복된 실험에서 평균 무게가 지속적으로 후코이단 AF1 처리구에서 높은 값을 나타내는 것으로 보아 AF1의 후코이단 분해 기능이 식물의 생장에 다소 도움이 되는 것으로 판단된다. 따라서 후코이단은 토양에 관주되기 전 미생물의 분해를 통해 식물이 이용할 수 있는 형태의 탄소화합물을 생성하는 것으로 생각되며 이러한 원리로 후코이단의 활용도를 높일 수 있을 것으로 예상된다.

위와 같은 연구를 바탕으로 미역의 탄소화합물 중 하나인 후코이단이 식물의 성장촉진 성분으로의 활용될 가능성을 탐색했다. 후코이단이 단독으로 활용될 때 토양에 존재하는 미생물에 의해 분해되고 이를 식물이 활용하는 탄소 이동 경로가 예상된다. 본 논문에서는 후코이단 이용 박테리아를 활용하여 후코이단을 전 처리했을 때 후코이단의 식물 성장촉진 효과는 증폭될 수 있음을 확인했다. 실험적인 조건에서 미역의 한 성분인 후코이단의 식물 성장촉진 효과를 확인하였으나 미역은 후코이단, 알긴산 이외에 더 다양한 탄수화물을 포함하고 있는 복합적인 유기물로서, 버려지는 폐미역을 효율적으로 활용하기 위해서는 폐미역에 미생물을 활용할 수 있는 원료로의 재생산, 다양한 탄수화물을 높은 효율로 분해할 수 있는 미생물 개발 등 다양한 연구가 필요하다.

### Note

The authors declare no conflict of interest.





**Fig. 4.** The plant growth stimulation effect of fucoidan. Fucoidan containing media or AF1 growing fucoidan media were treated to the one week old melon for 3 weeks. A and B. The difference of melon leaf size (A) and length of stem (B) was photographed. C. The weight also measured and compared. Three to five independent melon was weighted and average weight is indicated. Error bars indicate standard deviation.  $p < 0.01$  between control and fucoidan or between control and AF1 + fucoidan ( $n=3$ ),  $p \approx 0.1$  between fucoidan and AF1 + fucoidan. ( $n=3$ ).

### Acknowledgement

This study was financially supported by Chonnam National University(Grant number: 2019-0176).

### References

- Cesário MT, da Fonseca MMR, Marques MM, de Almeida MCMD (2018) Marine algal carbohydrates as carbon sources for the production of biochemicals and biomaterials. *Biotechnology Advances*, 36, 798-817.
- Khan W, Rayirath UP, Subramanian S, Jithesh MN, Rayorath P, Hodges DM, Critchley AT, Craigie JS, Norrie J, Prithiviraj B (2009) Seaweed extracts as biostimulants of plant growth and development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 28, 386-399.
- Crouch IJ, Smith MT, van Staden J, Lewis MJ, Hoad GV (1992) Identification of auxins in a commercial seaweed concentrate. *Journal of Plant Physiology*, 139, 590-594.
- Ge L, Wang P, Mou H (2011) Study on saccharification techniques of seaweed wastes for the transformation of ethanol. *Renew. Energy*, 36, 84-89.
- Skriptsova AV (2015) Fucoidans of brown algae: Biosynthesis, localization, and physiological role in thallus. *Russian Journal of Marine Biology*, 41, 145-156.
- Klarzynski O, Descamps V, Plesse B, Yvin JC, Kloareg B, Fritig B (2003) Sulfated fucan oligosaccharides elicit defense responses in tobacco and local and systemic resistance against tobacco mosaic virus. *Mol Plant Microbe Interact*, 16, 115-122.
- Kim JH, Ha JH, Choi SS, Park JM (2019) Characteristics of biorefinery process using laminaria japonica for the production of carbohydrate and reducing sugar. *Applied Chemistry for Engineering*, 30, 627-632.
- Rioux LE, Turgeon SL, Beaulieu M (2007) Characterization of polysaccharides extracted from brown seaweeds. *Carbohydrate Polymers*, 69, 530-537.
- Usov AI, Smirnova GP, Klochkova NG (2001) Polysaccharides of algae: 55. Polysaccharide composition of several brown algae from Kamchatka. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 27, 395-399.
- Chevolot L, Mulloy B, Ratiskol J, Foucault A, Jouault CS (2001) A disaccharide repeat unit is the major structure in fucoidans from two species of brown algae. *Carbohydrate Research*, 330, 529-535.
- Bilan MI, Grachev AA, Ustuzhanina NE, Shashkov AS, Nifantiev NE, Usov AI (2002) Structure of a fucoidan from the brown seaweed *Fucus evanescens* C. Ag. *Carbohydrate Research*, 337, 719-730.
- Imbs TI, Shevchenko NM, Sukhoverkhov SV, Semenova TL, Skriptsova AV, Zvyagintseva TN (2009) Seasonal variations of the composition and structural characteristics of polysaccharides from the brown ALGA *Costaria costata*. *Chemistry of Natural Compounds*, 45, 786-791.
- Abetz P, Young CL (1983) The effect of seaweed

- extract sprays derived from *Ascophyllum nodosum* on lettuce and cauliflower crops. *Botanica Marina*, 26, 487-492.
14. Bottle RT, Gilbert GA (1958) The use of alkaline reagents to determine carbohydrate reducing groups. Part I. 3: 5-Dinitrosalicylate ion, and interference by air. *Analyst*, 83, 403-406.
15. Kolganova TV, Kuznetsov BB, Tourova TP (2002) Designing and Testing Oligonucleotide Primers for Amplification and Sequencing of Archaeal 16S rRNA Genes. *Microbiology*, 71, 243-246.