

인삼뿌리의 적변현상과 근권미생물

윤길영 · 양덕조[#]

충북대학교 자연과학대학 생명과학부
(2001년 1월 10일 접수)

The Relationships between the Microorganisms and the Red-Colored Phenomena of Ginseng (*Panax ginseng* C.A. Meyer)

Kil-Young Yun and Deok-Cho Yang[#]

School of Life Sciences, College of Natural Sciences, Chungbuk National University, Cheongju, 361-763, Korea
(Received January 10, 2001)

Abstract : To clarify a significant difference between red-colored phenomena (RCP) and microbes isolated from rhizosphere soil of healthy ginseng (HES) and red-colored ginseng (RCS), we have examined growth and cellulase activities of the microbes according to pH variation and iron status. The soil microbes could not grow at pH 3.0 on the YEB medium. The growth of bacterium isolated from RCG at pH from 5.0 to 9.0 showed small differences and the growth of bacterium HES was lower than that of others. The growth of bacteria from RCS and surface soil (SUS) at pH 5.0 were also lower than that of pH 7.0 and pH 9.0. However, the bacteria isolated from red-colored ginseng (RCG) and RCS are able to grow on the medium contained 2 mM Fe³⁺ at pH 3.0. Furthermore, the growth of bacterium from RCG increased about two times in the medium contained iron at pH 7.0 compared with minus iron. The cellulase activity of isolated bacteria increased two times in the medium contained 2 mM Fe³⁺ compared with minus iron. The activity of extracellular cellulase was higher by one hundred times than that of intracellular level. The cellulase activity of the bacterium from RCS at pH 5.0 was higher by two times than that of pH 7.0. Especially, intracellular activity of the bacterium from RCS on the medium contained 2 mM Fe³⁺ increased about six to seven times compared with control (minus iron). Also, extracellular activity increased about eleven to twelve times compared with control. These results indicate that the soil microbes seem to be related iron redoxidation by proton extrusion and with cell wall digestion by secreted cellulase.

Key words : Cell wall, cellulase, iron, microbes, pH.

서 론

인삼근 적변현상(Red-Colored Phenomena; RCP)의 원인을 구명하고자 하는 연구에서 미생물이 관련되어 있음이 보고되고 있고 붉은빛뿌리썩음병(赤腐病)과 관련된 연구에서는 적수(赤銹) 또는 썩은 부위로부터 *Cylindrocarpum destructans*와 비슷한 *Fusarium solani*가 자주 분리되어 원인 미생물로 생각되었다.^{1,2,3} 그러나 당시 fungicide로 잘 알려진 mercury chloride(HgCl₂)⁴나 메르크론^{5,6}의 처리만으로도 뿌리 전체가 적변현상과 유사하게 착색이 되므로 병원균 하나의 원인으로 적변현상의 기작을 설명하기는 어렵

다고 하였다.

上田⁷은 우리나라 및 일본 인삼의 뿌리에 적변을 유발하는 미생물을 동정하여 *Bacillus araliavora* Uyeda라고 명명하였으나, 그후 *Erwinia araliavora*(Uyeda) Magrow로 정정되었다. 그러나 현재까지 적변삼 유발의 정확한 병원 미생물에 대해서는 논란이 지속되고 있고 *E. araliavora*는 Bergey's manual에서 인정하기 어려운 종이라는 주석과 함께 등록되어 있지 않다.⁸ 또한 Chung¹과 Lee²는 근부 또는 적부 인삼에서 분리한 *Erwinia*가 ATCC의 *E. carotonora*(Jones) Holland와 유사하게 인삼, 당근, 감자의 썩음병을 유발하였으며 Bergey's manual⁹에 기술되어 있는 균주의 형태 및 생리적 특성의 유사성을 들어 *E. araliavora*(Uyeda) Magrow는 *E. carotonora*(Jones) Holland의 다른 이름이라고 주장하였다. Whetzel 등¹⁰은 rust가 *Thielaviopsis vasicola*(B. &

[#]본 논문에 관한 문의는 이 저자에게로
(전화) 043-261-2293; (팩스) 043-261-2293
(E-mail) dcyang@pct.chungbuk.ac.kr

B.) Zopf.에 의한 것이라 보고하였으며, Zinssmeister¹¹⁾는 *Ramularia panacis*와 *R. destuctans*에 의한 root rot가 rust라고 주장하였다. 또한 Lee¹²⁾는 강화군의 현지 인삼포장에서 적변발생 부위에서 분리한 미생물을 동정하여, 재 접종한 인삼뿌리에서 병원성이 강한 두 균주의 생리·생태적 특성을 조사하여 각각 *Erwinia*와 *Carotovora*로 명명하였다.

인삼뿌리의 적변현상과 근권의 미생물에 대한 지금까지의 보문을 종합해 보면, *Cylindrocarpum* sp., *Erwinia* sp., *Pseudomonas* sp., *Kurthia* sp. 그리고 *Bacillus* sp.등과 같은 미생물과의 직·간접적인 상관관계를 보고하고 있다.^{13,14,15,16)} 그러나 이들 미생물 중 어느 하나도 적변을 유도하는 유일한 원인균은 되지 못하고 적변현상의 상승 및 가속화에만 관여하는 것으로 확인되었다. 한편, Yang 등¹⁶⁾의 연구결과에서는 적변삼의 표피조직에서 철이온의 함량이 건전삼의 표피에 비해 2~3배 높게 확인되었다. 따라서 적변삼 포장으로부터 분리된 미생물¹⁶⁾의 철이온 대사와 관련된 생리적 특성을 조사하여 철이온 대사와 미생물과의 관계 그리고 적변현상 유발과정에서 근권 미생물의 역할을 구명하고자 하였다.

재료 및 방법

1. 토양 미생물의 생리적 특성

적변삼 근권에서 분리한 미생물¹⁶⁾의 생리적 특성을 확인하기 위하여 YEB(beef extract 5g, peptone 5g, yeast extract 1g, MgSO₄ · 7H₂O 0.406g, sucrose 5g, H₂O 1L)배지를 이용하여 철이온 및 pH 변화에 대한 성장 특성을 조사하였다. 철이온(Fe³⁺)은 2mM ferric ammonium sulfate {Fe(SO₄)₃(NH₄)₂SO₄ · 24H₂O}를 EDTA와 킬레이트 하였고 pH를 각각 5.0, 7.0, 9.0으로 조절한 배지에 배양하였다. 토양세균의 성장율은 접종 밀도를($\lambda_{660}=0.4$) 일정하게 조절한 다음 28°C에서 암조건에서 진탕배양(110 rpm)하면서 4시간 간격으로 밀도를 측정하여 계산하였다.

2. 토양 미생물의 초미세구조

건전삼과 적변삼 그리고 근권토양에서 분리된 토양세균의 초미세구조는 주사전자현미경(Scanning Electron Microscope; SEM)을 이용하여 관찰하였다. 분리된 미생물을 523 고체배지에 점적한 다음 28°C에서 배양하여 colony가 형성되면 배지와 함께 절편으로 만들어 2.5%(v/v) glutaraldehyde로 전고정한 다음 1%(v/v) osmium tetroxide(OsO₄)로 후고정을 하였다. 고정이 끝난 시료는 alcohol series와 isoamylacetate로 탈수한 후 gold coating하여 SEM(Hitachi SENS-570, Japan)으로 관찰^{16,17)}하였다.

3. Cellulase 추출

건전삼과 적변삼의 근권토양과 적변삼으로부터 분리한 토양세균의 cellulase 활성은 Garhardt 등¹⁸⁾의 방법을 다소 변형하여 수행하였다. 철이온과 pH가 다르게 조절된 배지에서 배양한 토양세균을 동일한 밀도로 조절하여 3000 rpm에서 10분간 원심분리 하였다. 상등액은 세포 외 효소액으로 하였으며, 침전물을 2 mL 0.05M Acetate buffer(pH 5.5)에 현탁하여 원심분리한 후 상등액을 세포 내 효소액으로 하여 활성을 조사하였다.

4. Cellulase 활성

효소활성의 정성분석은 0.1%(w/v) carboxymethylcellulose(CMC)가 포함된 2%(w/v) agarose plate를 만든 다음, 3 μ L의 효소액을 떨어뜨렸다. Plate를 37°C에서 30분간 반응시킨 다음 0.1%(w/v) Congo red로 염색하여 CMC 분해 정도를 관찰하였다. 또한 정량분석은 Beguin¹⁹⁾의 방법을 다소 수정하여 수행하였다. 0.5g filter paper(Whatman No.1)와 2 mL 0.05M Acetate buffer(pH 5.5) 그리고 2 mL 효소액을 혼합하여 40°C에서 90분간 반응시켰다. 반응이 끝난 시료는 효소반응을 정지시킨 다음 생성된 glucose로 정량하였다. Glucose의 정량은 반응을 정지시킨 시료를 원심분리하여 1 mL 상등액과 3 mL DNS 시약을 혼합하여 5분간 반응시킨 후 냉각하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성은 10⁸ 세포가 1분 동안 1 μ M의 glucose를 생산하는 양을 1 unit로 계산하였다.

5. 철 산화

분리된 미생물의 iron 산화능력을 검정하기 위하여 Temple 배지²⁰⁾에 접종하여 28°C에서 배양하면서 철 산화에 의한 배지의 turbidity(%)로 확인하였다.

결과 및 고찰

1. 토양 미생물의 생리적 특성과 초미세구조

선별된 6종의 토양세균의 생리적 특성을 조사하여 적변현상과 토양세균 사이의 연관성을 구명하기 위해 pH 변화에 대한 성장 특성을 조사하였다. 그 결과, pH 3.0 배지에서는 분리된 모든 토양세균의 생장이 억제되었으며, pH 5.0에서는 적변삼의 표피조직에서 분리된 세균(RCG)과 적변삼 근권토양에서 분리된 세균(RCS)의 생장이 다소 높았고, pH 7.0에서는 RCS와 적변 증기의 인삼의 근권토양에서 분리된 세균(RCS⁺⁺) 그리고 표토에서 분리된 세균(SUS)이 높은 생장을 보였다(Fig. 1A). 반면에, 2 mM Fe³⁺가 첨가된 배지의 모든 pH 조건에서 RCG는 비교적 높은 생장을 보였으나 다른 미

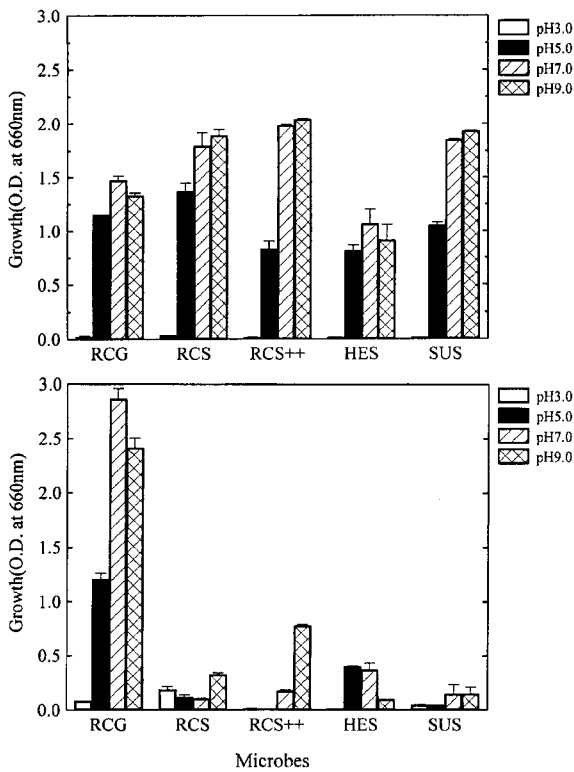


Fig. 1. Influence of pH and iron on the growth of isolated microbes from rhizosphere soil. (A: Without iron, B: Added 2 mM iron. RCG: bacteria isolated from epidermis of RCP ginseng, RCS: bacteria isolated from surrounding soil of RCP ginseng, HES: bacteria isolated from surrounding soil of healthy ginseng, SUS: Isolated bacterium from surface soil.)

생물의 생장은 현저히 억제되었다(Fig. 1B). 뿐만 아니라 RCS와 RCG 토양세균은 철이온이 포함된 pH 3.0 조건에서도 생장이 되었다. 이러한 결과는 RCS와 RCG는 철이온의 산화환원 능력이 활발하다는 것을 의미하는 것으로 식물체의 근권에서 철이온의 이용도에 따라 토양세균의 성장과 증식이 영향을 받는다는 것이 확인되었다.²¹⁾ 세균의 철이온 산화환원 능력은 세균의 종류에 따라 다르기 때문에 세균 상호간에도 흡수에 영향을 받아 생장에 영향을 준다. 적변현상이 인삼의 표피세포에 철이온의 침적과 상호관계가 있음¹⁶⁾을 상기해 볼 때, 이들 토양세균의 철이온 산화환원 활성은 적변현상 유발과 매우 밀접한 관련이 있을 것으로 판단되며 분리된 토양세균을 주사전자현미경(SEM)으로 관찰한 결과, RCS와 RCG는 모두 간균으로 확인되었다(Fig. 2).

2. 토양 미생물의 Cellulase 활성

분리된 토양세균의 세포 내(intracellular) 및 세포 외(extracellular)의 cellulase 활성을 측정한 결과, 선별된 모든 토양세균 공히 cellulose(CMC)를 분해하는 능력이 있음이 확인되었다(Fig. 3). pH 변화에 따른 세포 내 효소활성은 pH 7.0에서는 RCS와 RCS++ 토양세균이 다소 높았으나, pH 5.0에서는 RCS++가 약 3배 정도 높은 증가를 나타냈다(Fig. 4A). 세포 외 효소의 활성 역시 경향은 세포 내 효소와 유사하였으나 활성 능력에서는 세포 내 효소에 비해 약 10배 이상 높았다(Fig. 4B).

한편 철이온이 포함된 배지에서 cellulase 활성은 현저히

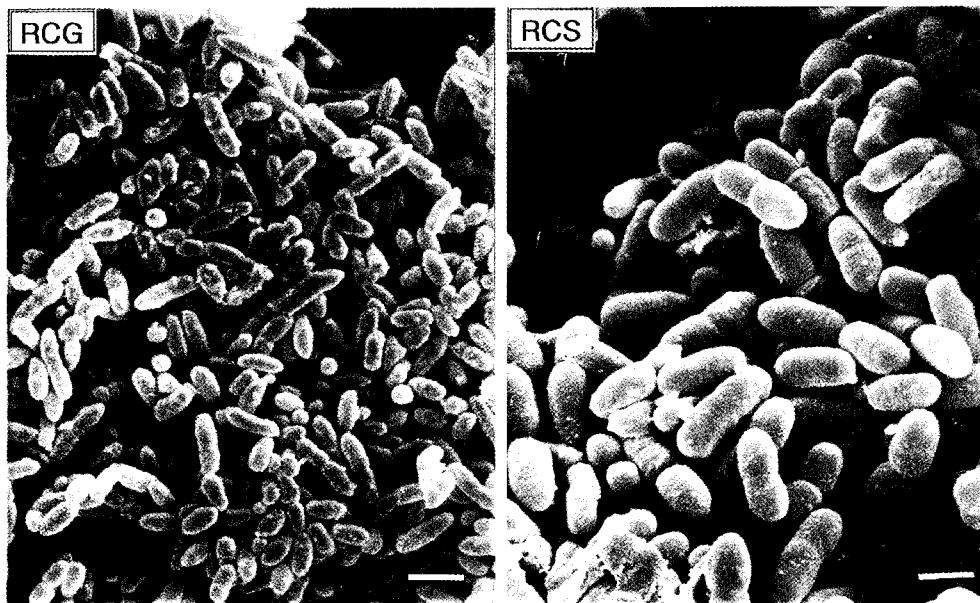


Fig. 2. Ultrastructure of isolated microbes from rhizosphere of ginseng. (RCS: bacteria isolated from surrounding soil of Red-Colored Phenomena, RCG: bacteria isolated from ginseng of Red Colored Phenomena.) Bar indicates 16 μm.

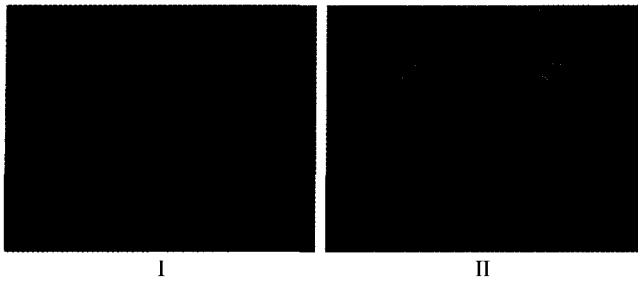


Fig. 3. Cellulase activities of microbes isolated from rhizosphere of ginseng on agarose gel containing 1% (w/v) carboxymethylcellulose (CMC). (I: stained with Congo red, II: fixed with 1M NaCl. (A) RCS⁺, (B) RCS⁺⁺, (C) RCG, (D) HES, (E)SUS.)

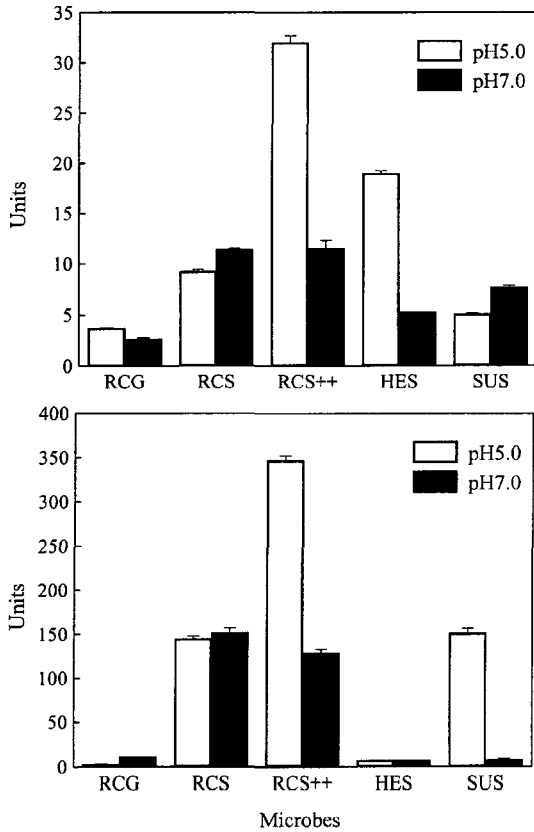


Fig. 4. Influence of pH on the intra (A)- and extra (B)- cellular cellulase activities of microbes isolated from rhizosphere of ginseng.

증가하였다. 세포 내 활성의 경우, 철이온이 포함된 배지에서 RCS는 5.7배, RCS⁺⁺는 7.2배 높았다(Fig. 5A). 세포 외 효소활성의 경우는 철이온이 포함된 배지에서 RCS는 10.8배, RCS⁺⁺는 12.3배의 현저한 활성 증가를 나타내었다(Fig. 5B).

적변삼의 경우 표피세포의 세포벽이 심하게 손상된 것으로 보아 세포벽 구성성분인 cellulose의 분해와 관련이 있는 토양세균이 관여함을 시사¹⁶⁾하는 것이다. 또한 적변삼의 근권

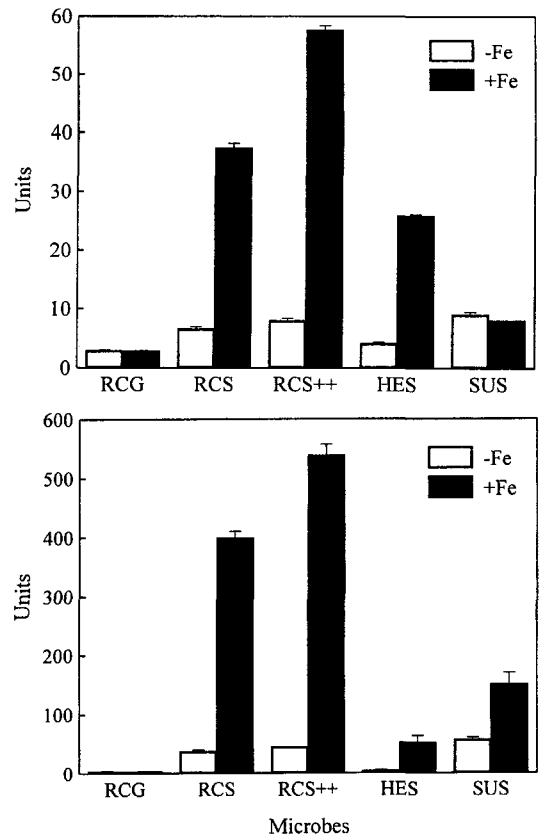


Fig. 5. Influence of iron on the intra (A)- and extra (B)-cellular cellulase activities of microbes isolated from rhizosphere of ginseng.

Table 1. Iron oxidation by microbes isolated from rhizosphere soil

Microbes	Oxidation rate(%)
SUS	66.7*
HES	31.3
RCS	67.0
RCS ⁺⁺	100
RCG	100

*Rate of oxidation based on the turbidity of culture medium.

토양에서 분리한 토양세균의 cellulase 활성이 높은 점과 Fe³⁺ 첨가에 의해 활성도가 현저하게 증가되는 현상은 이들 미생물과 적변현상 그리고 근권의 철이온과의 상호 작용에 대한 현상임을 잘 뒷받침하고 있다.

4. 철 산화

분리한 토양세균의 Fe²⁺ 산화 능력을 조사한 결과, 분리한 모든 토양세균들은 pH 5.8에서 Fe²⁺를 Fe³⁺로 산화하는 능력이 있음이 확인되었다(Table 1). 이들은 Temple 배지에 배양하였을 경우 약 2~3일이 경과하면 Fe²⁺를 산화시켜 배지

내에 침전물을 형성하였다. 따라서 이들 토양세균들은 철이온을 물질대사 과정에서 에너지원으로 이용함으로써 철이온(Fe^{3+})과 인삼의 표피세포 분해산물 즉 유기물질 사이에 강력한 복합체(리간드)를 형성할 수 있는 가능성을 증가시키는 요인으로 관여하고 있는 것으로 추론되고 있다.

이상의 결과로 미루어 볼 때, 적변현상은 철 산화 및 철 의존성 토양세균의 집적과 그들의 대사활성의 변화로 인해 근권에 환원된 철이온의 농도가 높아지고, mobilization된 철이온은 뿌리의 iron-reductase(turbo enzyme) 활성화에 의해 일부가 흡수되기도 하지만 토양세균에 의해 부분적으로 분해된 인삼표피 구성성분 특히, cellulose 분해산물과 강력한 ligand를 형성하는 것으로 판단된다. 철 흡수 능력은 식물체마다 다양하며 일반적으로 ligand:Fe의 비율에 따라 영향을 받게된다.²²⁾ 따라서 적변 현상은 적변삼 표피에 다량의 Fe가 침적되어 있다는 보고¹⁶⁾와, 적변삼에서 높은 토양세균의 밀도 및 높은 cellulase 활성 등을 고려해 볼 때, 인삼 뿌리와 토양세균이 철이온 흡수 기작에서 경쟁적 또는 길항적 상호작용이 일어나고 있다. 이 과정에서 생성되는 전자(e^-)는 철을 이용하는 토양세균의 에너지로 이용되기 때문에 많은 철이온을 산화시키게 된다. 또한 이들 토양세균은 물질대사 과정에서 분비되는 cellulase를 이용하여 인삼뿌리의 세포벽을 부분적으로 분해하여 생성된 분해산물(glucose, pectin, maltose, cellobiose 등)을 탄소원으로 이용한다. 이러한 현상은 근권으로 풍부한 영양원을 공급하는 결과가 되기 때문에 미생물의 집적이 더욱 증가하게 된다. 부분적으로 분해된 세포벽의 $\beta \rightarrow 1,4$ linkage는 분해산물로 cellobiose나 단당류인 glucose를 생성한다. 이러한 세포벽 분해산물과 세포가 파괴되어 유출되는 세포 내용물은 Fe^{2+} 이온과 5- 또는 6-membered ring을 쉽게 형성²³⁾하여 인삼뿌리의 표피에 적변 현상이 유발되는 것으로 판단된다. 결론적으로 유기물질이 풍부한 humus 토양(청초)에서 적변삼의 출현이 낮은 이유도 바로 토양의 철세균과 Fe^{3+} 의 산화환원 작용에 기인되는 것으로 추론된다.

요 약

적변삼과 건전삼 그리고 이들의 근권토양으로부터 분리한 토양세균과 적변현상과의 관계를 구명하고자 pH 변화와 철이온에 따른 토양세균의 성장 특성을 조사한 결과, 분리된 모든 토양세균은 pH 3.0에서는 성장하지 못하였다. 그러나 RCG와 RCS는 2 mM Fe^{3+} 가 포함된 배지에서는 pH 3.0에서도 성장하였다. 특히, RCG의 경우는 철이 포함된 배지에서는 철이 없는 배지보다 생장이 2배 정도 높았다. 적변삼의 뿌리에서 분리된 토양세균(RCG)은 pH 5.0에서 pH 9.0

사이에서는 생장에 큰 차이가 없었으나, 건전삼의 근권토양에서 분리된 토양세균(HES)은 다른 곳에서 분리된 세균에 비해 생장이 낮았다. 적변삼의 근권토양에서 분리한 토양세균(RCS)과 표토에서 분리한 토양세균(SUS)의 생장은 pH 5.0에서 pH 7.0과 pH 9.0에 비해 다소 낮았다. 분리된 모든 토양세균의 cellulase 효소활성은 철이온이 포함된 배지에서 철이온이 없는 배지보다 2배 이상 높게 나타났다. 세포 외 효소 활성은 세포 내 효소 활성보다 약 10 이상 높았고, pH 5.0에서 RCS의 효소활성은 pH 7.0 보다 2배 이상 높았다. 특히, 2 mM Fe^{3+} 가 포함된 배지에서 RCS의 세포 내 효소활성은 철이온이 없는 배지보다 6~7 배 높았고 세포 외 효소의 경우에는 11~12 배가 증가되었다. 이러한 결과는 인삼의 적변현상과 관련된 토양세균은 철이온의 산화환원과 cellulase 분비에 의한 세포벽 분해 그리고 인삼 표피세포에 철이온과 강력한 리간드를 형성하는 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구의 일부는 2000년도 고려인삼학회의 연구비 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

인용문헌

1. Chung, H. S.: *2nd Int. Mycol. Congr. Abstract.* **101** (1977).
2. 이종화, 김홍진, 배효원 : 한국식물보호학회지 **17**, 143 (1978).
3. 오승환, 박창석, 김홍진 : 고려인삼연구소 연구보고서(재배분야) p.31 (1978).
4. Whetzel, H.H. and Rosenbaum, J.: *U.S. Dept. Agr. Plant Industry Bull.* **250**, 44 (1912).
5. 정후섭, 최화자 : 한국식물보호학회 학술발표 (1969).
6. 정후섭 : 한국생약학회지 **2**, 73 (1972).
7. 上田次郎 : *農試報告* **35**, 30 (1909).
8. Breed, R. S., Murray, E. D. G. and Smith, N. R. : *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* 7th Ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1957).
9. Buchanan, R. E. and Gibbons, N. E. : *Bergey's manual of Determinative Bacteriology.* 8th Ed., The Williams and Wilkins Co., Baltimore (1974).
10. Whetzel, H. H., Rosenbaum, J., Brann, J. W. and McClintock, J. A. : *U. S. Dept. Agr. Farmer's Bull.* **736**, 1 (1916).
11. Zinssemeister, G. L. : *Phytopathology* **8**, 557 (1918).
12. Lee, M. W. : *Kor. J. Microbiol.* **17**, 179 (1979).
13. 김종희 : 한국미생물학회지 **6**, 150 (1968).
14. Chung, H. S. : *Symposium of Korean Ginseng by Korean Society of Pharmacognosy*, p.55 (1974).
15. 오승환, 박창석, 정영윤 : 고려인삼연구소 연구보고서(재배분야)

- p.23 (1979).
16. Yang, D. C., Kim, Y. H., Yun, K. Y., Lee, S. S., Kwon, J. N. and Kang, H. M. : *Kor. J. Ginseng Sci.* **21**, 91 (1997).
 17. Yang, D.C., Kim, M. W., Lee, S. J. and Yun, K. Y. : *Kor. J. Ginseng. Sci.* **14**, 416 (1990).
 18. Garhardt, P., Murray, R. G. E., Wood, W. A. and Krieg, N. R. : *Methods for general and molecular bacterology.* Amer. Micro. **614** (1994).
 19. Beguin, P. : *Anal Biochem.* **131**, 333 (1983).
 20. 농업과학기술원 : 토양화학분석법(토양, 식물계, 미생물), 농촌진흥청, 서울 (1988).
 21. Loper, J. E. and Buyer, J. S. : *Molecular Plant-Microbe Interaction* **40**, 5 (1991).
 22. Bar-Ness, E., Chen, Y., Hadar, Y., Marschner, H. and Romheld, V. : *Plant Soil* **130**, 231 (1991).
 23. Yun, K. Y. and Yang, D. C. : *J. Ginseng Res.* **24**, 107 (2000).