대한위생학회지. 제21권 2호(2006)
KOREAN J. Sanitation. Vol. 21, No. 2. pp.1~10(2006)

안전한 한약재(잔대, 만삼) 재배를 위한 유용미생물 이용에 관한 연구

김재근
나주대학 치위생과

The research for the utilization of useful microorganism for the culture of harmless medicinal herbs (*Adenophora triphylla, Codonopsis pilosula*)

Jae-Keun Kim
Naju College, Department of Dental Hygiene

Abstract

Codonopsis pilosula and *Adenophora triphylla were* cultivated by sawing seeds, but the germination rate were low. To cultivate these two wild plants was very difficult. The marketable roots of the plants had low quality. The plant pathogens were very difficulty to prevent the diseases (*Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Erwinia*, *Botrytis*, *Phythophthora*) appeared in cultural state. For the extermination of the disease needs a lot of agricultural chemicals, the effect of remain behind an insecticides was high of a hazardous rate after harvest.

On this studies, for the safe prevention of the diseases and the promote of seeds germination, we used *Bacillus subtilis*, *B. liquefaciens*, *Paenibacillus polymixa*, *Pseudomonas putida* separated in our research, these results would bring us harmless products of medicinal herbs for human.

Key words: *Codonopsis pilosula*, *Adenophora triphylla*, pathogenics, insecticides

*Corresponding author E-mail : jkkim@naju.ac.kr

Ⅰ. 서 론

자연에서 채취한 야생식물들은 대부분 심산계곡이나 청정지역에서 채취되어 안전한 무공해식물로 인식되어있다. 그러나 자연채취는 수요를 충족시킬 만큼 자원이 풍부하지 못한 실정이다. 이러한 야생식물들 중 민간요법 한방재료였던 만삼(*Codonopsis pilosula*)과 잔대(*Adenophora triphylla*)는 과거에는 산과 들에서 채취하여 출산부의 보양식이나 여성의 기력을 향상시키는 먹거리와 한약재로 이용되었으나 근래 식물생태계의 변화와 남획에 의해 채취량이 절대부족하고 재배기술이 정립되지 않아 구하기 힘든 한약재들이다.

만삼은 당삼, 소화당삼, 태삼, 선초근, 엽자채, 동당삼, 삼성더덕, 삼엽채, 선초, 참더덕, 좀만삼 등으로 불리는 다년생 덩굴식물로 초롱꽃과(*Campanulaceae*)식물이다. 약효가 인삼과 비슷하여 한방에서는 혈이 높아 인삼을 사용하지 못하는 환자에게 인삼 대체한약재로 사용되고 있다. 만삼의 처방은 강장보호 등 26가지 질병에 대한 처방[1]이 알려져 있다. 복용방법은 물에 끓이거나, 술에 침지 후 숙성[2], 환 제조, 생식, 영양식[3]등의 복용방법이 알려져 있다. 만삼의 기능성 성분[4]으로는 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde, alkaloid, Vitamin B1, B2, saponin 등이 보고되어, 한방에서는 허약체질, 식욕증진, 회복기환자, 만성피로환자 치료에 처방하고 있다. 임상실험결과[5]로 방사선치료 중인 암환자에게 만삼을 복용시키면 igG, igA, C3 등 체액성 면역지수에는 일반 환자와 차이가 없었으나 igM에서는 유의적으로 높다고 하였다[6].

잔대는 초롱꽃과의 다년생식물로 딱주, 사삼, 남사삼, 조선제니, 박마육잔다, 잔다구 등으로 불리는 자생식물로 우리나라에는 둥근잔대, 넓은잔대, 두메잔대, 왕잔대, 나리잔대, 진퍼리잔대, 털잔대, 당잔대, 섬잔대 등 40여 종이 자생하고 있다. 잔대는 한방에서보다 민간요법에 널리 사용되는 자생식물로[7] 이른 봄 뿌리와 싹을 함께 캐어 나물로 조리하여 먹거나 생식을 하며, 알려진 주요 영양성분은 Vitamin A, C와 칼슘함량이 높다. 한방에서는 해충의 독, 중금속의 독이나 화학약품 등에 의한 독 등을 완화시키는 약초로 알려져 있으며, 약리작용으로 진해, 거담, 강장제, 종기치료[10]효과 등이 알려져 있다.

본 연구는 재배지에서 채취한 종자를 인공재배하기 위해 토양미생물 중 발아촉진물질을 생산하는 미생물을 이용하여 입모율을 향상시켜 고품질 한방재료를 안정적으로 생산할 수 있도록 기술을 개발하는 재배과정에서 발생하는 병원균들을 인체에 해가 없는 길항미생물들을 이용하여 방제함으로써 약용으로 섭취 시 우려되는 잔류농약에 의한 위험을 없애기 위해 수행하였다.

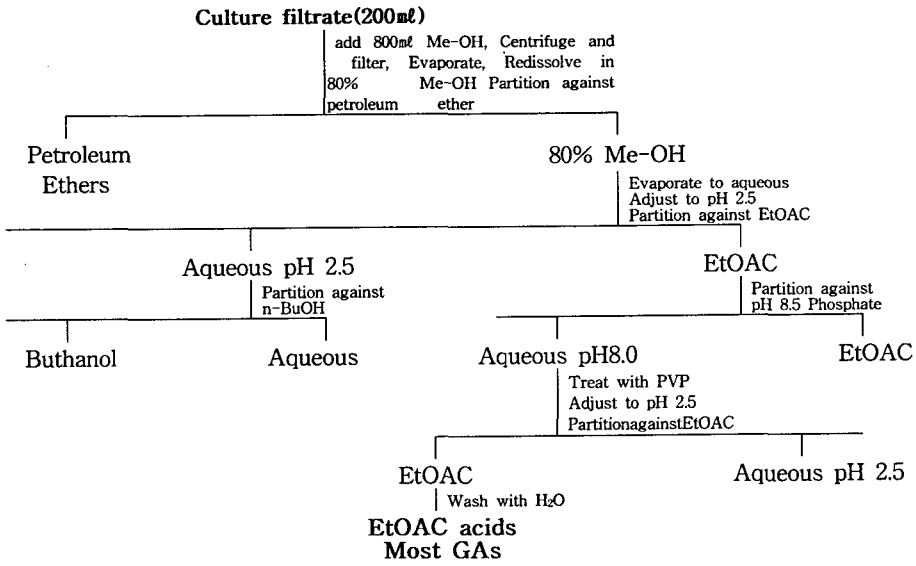

Fig. 1. The separate of germination-promoting material for the products of microorganism

II. 재료 및 방법

1. 종자수집 및 발아촉진물질생산 미생물분리

여름에 재배지를 확인하고 가을에 수집한 뿌리를 해가림포장에 이식하여 재배한 만삼과 잔대로부터 수확한 종자를 1% 차염소산나트륨용액에 30분간 침지하여 표면살균하고 멸균수로 3회 세척하여 종자에 남아있는 차염소산나트륨을 제거하였다. 발아촉진물질 생산미생물(PGPR)은 두 식물의 근권으로부터 선택배지를 이용하여 분리하였으며, 분리된 균주는 순수분리과정을 거쳐 보존하였다. 보존 균주들의 발아촉진물질 생산 여부는 균주 현탁액(10^5cfu/㎖)에 표면살균 처리한 종자를 침지 처리한 후 한천 배지(2%)에 치상하여 발아율 향상 유무로 판정하였다.

2. 만삼, 잔대 주요 병원균 조사

재배하는 동안 돋아나는 새 순의 시들음 증상, 생육 중 지재부 무름 증상, 잎과 화기에 발생한 병반시료를 채취하여 실험실에서 이병조직을 습실 처리 배양하여 형성된 집락으로부터 병원균을 분리하였다.

3. 병 방제를 위한 길항미생물분리

무농약 방제기술개발을 위해 재배지 토양을 채취하여 연속희석법으로 접종한 선택배지로부터 분리한 길항미생물들은 PDA:NA를 1:1로 혼합한 배지에 병원균과 대치 배양하여 형성된 저지원인으로 항균물질 생산능을 확인하였다.

4. 길항균 생산 항균물질 병 방제 효과 조사

항균물질 생산능이 확인된 길항균들은 액체배양하고, 배양액을 원심분리 하여 균체를 제거한 다음 배양여액을 Ethyl acetate, n-Butanol로 추출하여 농축한 후 Dimethyl sulfoxide의 함량이 2%가 되도록 유제로 조제한 다음 500배로 희석하여 3회 이상 엽면에 살포하였다.

5. 분리균주 동정

순수 분리한 균주 중 곰팡이류는 광학현미경(Leica DMR)으로 형태적 특성을 확인하여 동정하였다. 세균류는 광학현미경(X1,000배)으로 그람염색과 내생포자 형성유무를 확인하고, 세균 동정기 (Biolog; Microlog™ system, Release 4.2)로 동정하였다.

6. 만삼, 잔대 유기용매 추출물 살균효과 조사

4년생 뿌리를 채취하여 동결건조 분쇄한 후 유기용매(Hexane, acetone, methanol)를 이용하여 추출하고 감압 농축 건조시킨 조추출물을 농도별로 세균, 곰팡이 등에 대한 항균활성을 조사하였다.

III. 결과 및 고찰

채집한 만삼과 잔대는 4년 근으로 해발 400m이상의 고지대 농가에서 재배[10,11]한 것으로 출하를 위해 수확 중인 것들이었다. 만삼은 직파하여 재배한 것으로 밀파된 잔대의 뿌리는 Fig. 2와 같이 뇌두 부분이 서로 붙어 있고, 뿌리의 생육도 저조하여 상품성이 좋지 않았으며, 잔대는 상토에 산파하여 1년간 육묘하여 이식 재배[10]한 것으로 잔뿌리가 많고 주근의 길이가 짧아(Fig. 3) 세척 시 어려움이 많고 수확량도 적었다.

Fig. 2. *Codonopsis pilosula*

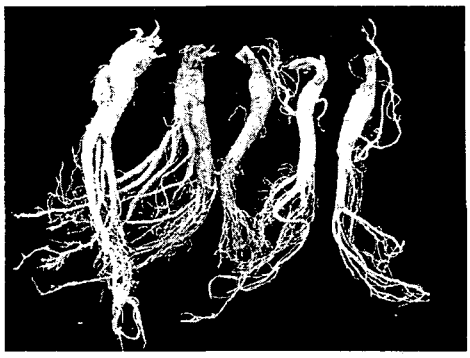

Fig. 3. *Adenophora triphylla*

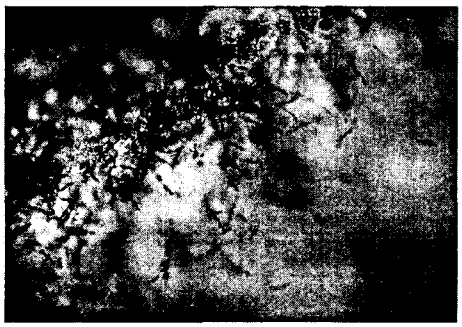

Fig. 4. *Alternaria* sp.

본 연구에서 분리한 미생물 배양여액을 Fig. 1과 같은 과정을 거쳐 추출한 물질에 종자를 침지하여 파종하면 발아율[13,14,15]이 크게 향상되었다(Fig. 15; Table 5). 현재 농가에서는 수확 후 그늘진 곳에서 건조하여 건조 중 부패율이 높고 외형도 균일하지 않아 상품가치가 떨어지는 요인으로 인식되고 있다. 그러나 수확된 뿌리를 일정한 크기로 절편을 내어 동결건조하면 2일 이내에 건조가 가능하고 수분함량도 낮아서 장기간 저장이 가능하고, 그리고 분말로 가공하기가 편리하여 상품성을 높일 수 있었다. 만삼과 잔대는 초롱꽃과에 속하는 식물로 수확한 종자는 1㎜이하로 미세하다. 뿌리를 채집하여 이듬해 봄에 이식재배 중인 만삼과 잔대는 새싹이 나오는 이른 봄에 병이 발생하여 지제부 줄기가 썩어서 죽어 가는데 이 잘록병 이병주를 채취

하여 습실 처리한 결과 만삼과 잔대 모두에서 *Pythium*과 *Rhizoctonia* 균이 분리되었고, *Phytophthora* (Fig. 6)는 만삼에서 분리되었다. 세균병인 *Erwinia*는 잔대의 어린순에서 발생하여 역한 냄새를 풍겼다. 시들음 증상은 장마기간이 지난 생육 후기에 나타나는 병으로, 만삼은 잎이 황색으로 변색하고 지제부 줄기가 말라서 시들어져 죽은 주수가 증가하였으며, 발병 부위에서는 *Pythium*과 *Fusarium* (Fig. 7)균이 관찰되었다. 지상부 생육이 왕성한 6월 말부터 엽 표면에 흰가루병(*Sphaerotheca*)이 발생하여 시간이 경과하면 잎이 지는 피해가 컸으며, 만삼은 잿빛곰팡이 병(*Botrytis*)에 의한 줄기, 잎, 화기의 피해가 많았다(Table 1). 흰가루병 피해를 입은 잔대의 잎에서는 Fig. 4와 같은 *Alternaria* 균이 관찰되었으나 병원성여부는 확인되지 않았다.

Fig. 5. *Botrytis* sp.

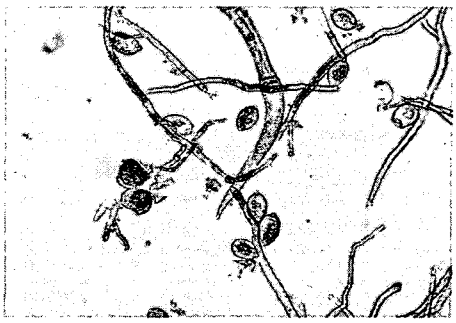

Fig. 6. *Phytophthora* sp.

Table 1. Species of key disease in *Codonopsis pilosula* and *Adenophora triphylla*

Host plants	Species of disease		
	Damping off	Seedling wilt	Foliar and flower blight
Codonopsis pilosula	*Pythium* sp. *Rhizoctonia* sp. *Phytophthora* sp.	*Pythium* sp. *Fusarium* sp.	*Sphaerotheca* sp. *Botrytis* sp.
Adenophora triphylla	*Pythium* sp. *Rhizoctonia* sp. *Erwinia* sp.		*Sphaerotheca* sp. *Alternaria* sp.

Fig. 7. *Fusarium* sp.

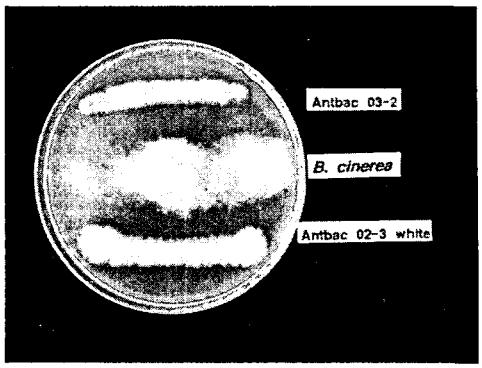

Fig. 10. *Botrytis* mycelium growth inhibition by antagonist antibac 03-2, 02-3.

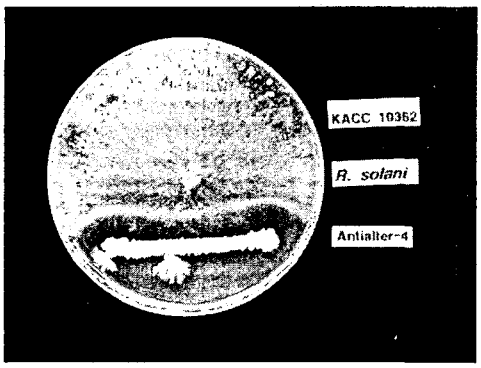

Fig. 8. *Rhizoctonia* mycelium growth inhibition by antagonist antialter-4

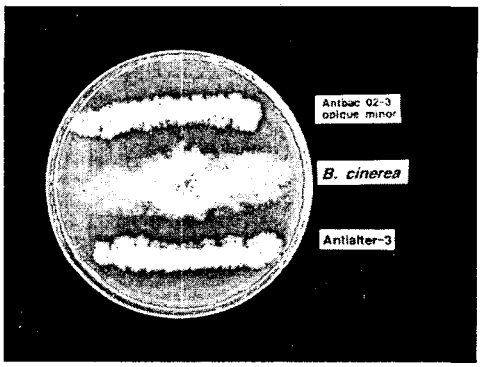

Fig. 11. *Botrytis* mycelium growth inhibition by antagonist antibac 02-3, antialter-3.

약초식물의 주요 병 방제를 위해 토양 및 근권에서 분리한 세균 중 병원균 생육을 억제하는 균주(Fig. 8~11)들을 동정하였다. 병원균에 대해 길항력을 갖는 균주들은 그람양성의 내생포자를 형성하는 세균(Fig. 12~14)들로 각 균주들의 생화학적 분해능을 그람양성세균 생화학적분해능으로 조사한 결과 *Bacillus subtilis*(Table 2), *Bacillus amyloliquefaciens*(Table 3), *Paeni-bacillus polymyxa* (Table 4)로 동정되었다.

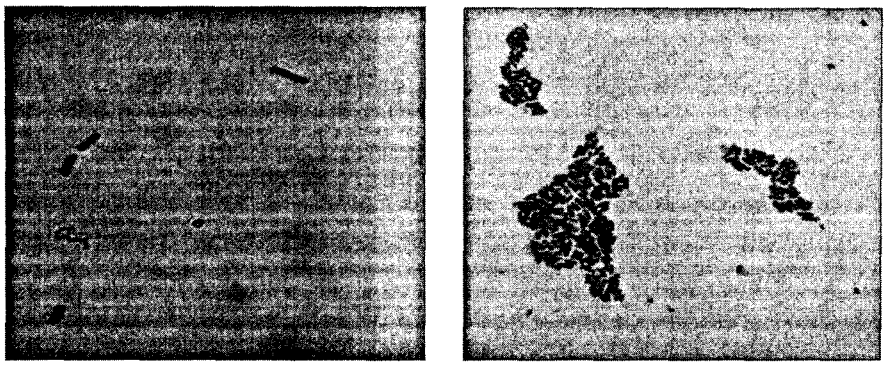

Fig. 12. *Bacillus subtilis* (L-gram stain, R-endospore).

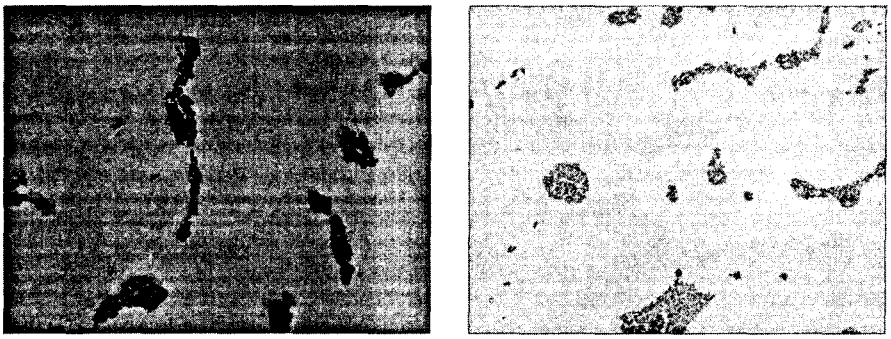

Fig. 13. *Bacillus amyloliquefaciens* B(L-gram stain, R-endospore).

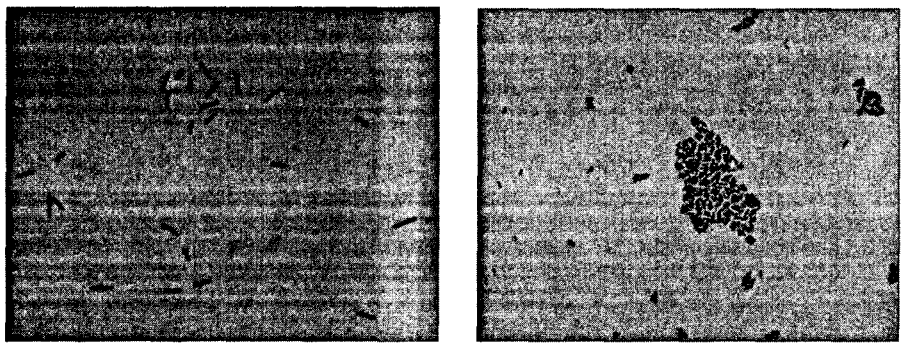

Fig. 14. *Paenibacillus polymyxa*(L-gram stian, R-endospore).

Table 2. Biochemical analysis of *Bacillus subtilis*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	+	+	+	+	-	-	/	/	/	-	/
B	-	-	+	+	+	-	+	-	+	/	+	-
C	-	-	+	+	+	+	/	-	-	-	-	+
D	+	-	+	+	/	-	-	+	-	+	-	+
E	-	+	+	-	-	/	-	-	-	-	-	-
F	-	-	/	-	+	+	/	-	+	-	-	-
G	-	/	+	-	+	+	-	/	+	-	/	+
H	/	/	+	+	+	-	/	-	-	-	-	+

※ Bio-log, GP microplate

Table 3. Biochemical analysis of *Bacillus amyloliquefaciens*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	+	/	-	-	/	/	+	/	+
B	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-
C	-	-	+	+	+	+	/	-	-	-	/	+
D	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+
E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	/
F	-	/	/	-	/	+	/	-	+	-	/	-
G	-	+	+	-	+	+	-	-	+	-	/	+
H	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	+

※ Bio-log, GP microplate

Table 4. Biochemical analysis of *Paenibacillus polymyxa*

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
B	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-
C	+	/	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-
D	+	-	+	/	+	-	-	+	-	-	+	+
E	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	/	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/
H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

※ Bio-log, GP microplate

Table 5. Biochemical analysis of *Pseudomonas putida* biotype B

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-
B	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	/
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	/	/
D	/	+	+	/	+	-	+	+	-	-	/	-
E	-	-	-	+	-	+	/	/	+	+	-	-
F	-	-	/	+	+	+	+	+	+	+	-	-
G	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
H	-	-	-	-	-	-	-	-	/	-	-	-

※ Bio-log, GN microplate

세균 균체를 수확하여 종자표면에 처리하고 발아시험을 하였을 때 발아 촉진효과를 보이는 균주는 그람음성 세균(Fig. 15)으로 내생포자는 형성하지 않았으며 생화학적 분해능을 조사한 결과 *Pseudomonas putida* biotype B로 확인되었다(Table 5).

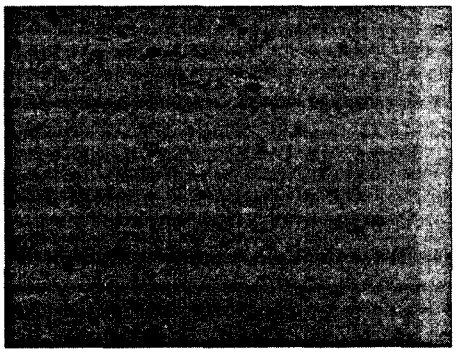

Fig. 15. *Pseudomonas putida* biotype B.

Ⅳ. 결 론

잔대와 만삼은 종자를 파종하여 재배하는 직파작물로 종자크기가 작고[16,17] 발아율[18,19]이 낮아 재배에 어려움이 있었으며, 산파에 의한 파종 간격이 일정하지 않아 수확 시 상품성이 있는 뿌리 개체수가 낮았다. 재배 중에 나타나는 병들인 *Rhizoctonia*, *Pythium*, *Fusarium*, *Erwinia*, *Botrytis*, *Phythophthora* 들은 토양 유래 식물병원균으로 방제가 어려운 병들이다. 이 병들을 방제하는 화학농약들은 처리량이 많이 소요되고 약효가 장기간 유지되기 때문에 수확 시 잔류농약의 위험이 크다.

본 연구에서 분리한 *Bacillus subtilis*, *B. liquefaciens*, *Paenibacillus polymixa*, *Pseudomonas putida*[20]는 국내외적으로 인체에 무해한 균으로 보고[8,9]되어 안전한 병 방제 및 발아촉진재료로 사용할 수 있을 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1) http://www.ava.or.kr/min/ma/107-1.htm
2) http://www.ava.or.kr/min/ma/107.htm
3) http://www.pakpominbak.co.kr/vak-16.htm
4) http://user.chollian.net/~jangg/piant/r114.html
5) http://www.vulkyooh.co.kr/htm/life/view.ht
6) http://www.kiom.kr.kr/korea/meum2-2-0-7-4.htm
7) http://www.area.gangwoon.kr./sp/pc/PC3/sam2-3.htm
8) http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/tec_docs/brad 20006492
9) http://www.epa.gov/oppbppd1/biopesticides/ingredients/tec_tech/brad_20006479
10) 張鎭先, 李庚熙. : 韓國産 더덕의 栽培에 關한 硏究(1) 種子 發芽特性 및 床土種類가 種根의 生育에 미치는 影響. 韓國園藝學會發表要旨 6(2):78-79, 1988.
11) 金日燮, 黃重樂, 韓敎弼 : 自生 Actinidia 속 種子發芽에 關한 硏究. 韓國園藝學會誌 28(4):335-342, 1987.
12) 辛東永, 金鶴鎭 : 도라지(*Platycodon grandiflorum* DC.)의 種子發芽에 미치는 成分과 pH, 接種用土 및 生長調節劑의 影響에 關한 硏究. 順天大農業科學硏究 1:45-65, 1987.
13) Ahn, H.K., S.K. Kim, and J.H. Oh. : Seed germination of Actinidia arguta as affected by chilling, Gibberellin, Kinetin and light. J. Kor. Soc. Hort. Sci. 25:290-296, 1984.
14) Beweley, J.D., and M. Black : Seeds: Physiology of development and germination. 2nd. Plenum. New York. 1994.
15) Bradford, K.J. : Manipulation of seed water relations via osmotic priming to improve germination under stress conditions. Hortscience. 21:1105-1112, 1986.

16) Burns, J., B. Bennett, K. Rooney, J. Walsh and J. Hensley : Coatings for Legume and Grass Seed. Proc. 57th Southern Pasture and Forage Crop improvement Conference, Athens, GA April 23-25, 2002.
http://spfcic.okastate.edu/procedures/2002/extention/burns.htm

17) Frett, J.J. and W.G. Pill. : Germination characteristics of osmotically primed and stored impatiens seeds. Scientia. 40:171-179, 1989.

18) Park. Y.J., S.O. Yoo, G.W. Choi, and Y.O. Chung : Studies on the seed germination of Blackberry lily (Belamcanda chinensis(L.)DC.) antive to Korea. J/ Kor. Flower Res. Soc. 4:35-40, 1995.

19) Pill, W.G. and W.E. Finch-Savage : Effects of combining priming and plant growth regulator treatments on the synchronization of carrot seed germination. Ann. Applied Biol. 113:383-389, 1988.

20) Xie H. J.J. Pasternak, and B.R. Glick : Isolation and characterization of mutnats of theplant growth-promoting rhizobacterium *Pseudomonas putida* CR12-2 that overproduce indoleacetic acid. Current Microbiology. 32, 67-71, 1996.