(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0140090
(43) 공개일자 2012년12월28일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
A23L 3/3454 (2006.01) *A23L 3/3418* (2006.01)
A01C 1/08 (2006.01) *A61L 2/18* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0059740
(22) 출원일자 2011년06월20일
심사청구일자 2011년06월20일

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김경헌
서울특별시 서초구 서초중앙로 200, 18동 805호 (서초동, 삼풍아파트)
박형석
경상남도 창녕군 창녕읍 우포2로 1216, 박수의과병원
김욱
서울특별시 성북구 동소문로13길 47, 한신휴아파트 116동 202호 (동소문동4가)
(74) 대리인
특허법인다나

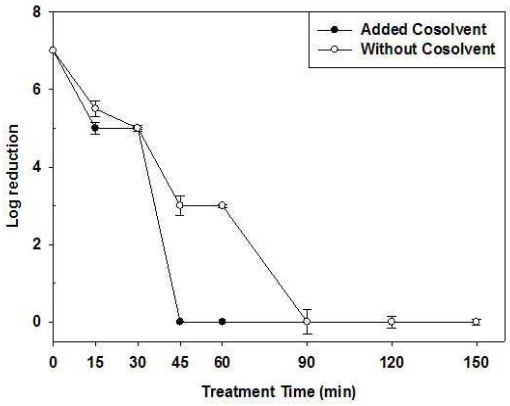
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 **조용매의 상승효과를 이용한 초임계 이산화탄소에 의한 곰팡이 포자 살균 방법**

(57) 요 약

본 발명은 곰팡이 포자의 살균을 최적화하기 위해 초임계 이산화탄소와 조용매의 상승효과를 이용하여 살균한 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도5



특허청구의 범위

청구항 1

초임계 이산화탄소를 이용하여 곰팡이 포자를 사멸시키는 방법에 있어서,

a) 처리조 온도가 38~50℃에 도달한 때, 곰팡이 포자를 포함하는 시료를 처리조에 로딩하는 단계;

b) 처리조를 닫고 액체 이산화탄소를 도관을 통해 처리조에 투입하고 펌프를 통해 처리조의 압력을 100~250 bar로 가압하는 단계; 및

c) 상기의 온도 및 압력 조건 하에서 15분 이상 처리하는 단계를 포함하는

초임계 이산화탄소를 이용하여 곰팡이 포자를 사멸시키는 방법.

청구항 2

제 1항에 있어서, 상기 방법은 b)단계와 c)단계 사이에 조용매(cosolvent)를 처리조에 펌핑하는 단계를 더욱 포함하는 것을 특징으로 하는 초임계 이산화탄소를 이용하여 곰팡이 포자를 사멸시키는 방법.

청구항 3

제 1항에 있어서, 상기 곰팡이 포자는 페니실리움 옥살리쿰(Penicillium oxalicum) 또는 알터나리아 브라시시콜라(Alternaria brassicicola) 포자인 것을 특징으로 하는 초임계 이산화탄소를 이용하여 곰팡이 포자를 사멸시키는 방법.

청구항 4

제 2항에 있어서, 상기 조용매(cosolvent)는 에탄올, 메탄올, H_2O_2, 또는 물인 것을 특징으로 하는 초임계 이산화탄소를 이용하여 곰팡이 포자를 사멸시키는 방법.

청구항 5

제 1항에 있어서, 상기 방법은 곰팡이 포자가 페니실리움 옥살리쿰(Penicillium oxalicum) 포자인 경우에 압력, 온도 및 시간 조건은 200 bar 및 45℃에서 25분 또는 100-200 bar, 50℃에서 15분 이상인 것을 특징으로 초임계 이산화탄소를 이용하여 곰팡이 포자를 사멸시키는 방법.

청구항 6

제 1항에 있어서, 상기 방법은 곰팡이 포자가 알터나리아 브라시시콜라(Alternaria brassicicola) 포자인 경우에 압력, 온도 및 시간 조건은 150-250 bar, 46℃에서 15분 이상인 것을 특징으로 초임계 이산화탄소를 이용하여 곰팡이 포자를 사멸시키는 방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 곰팡이 포자의 살균을 최적화하기 위해 초임계 이산화탄소와 조용매의 상승효과를 이용하여 살균한 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 종자, 과실 및 잎의 곰팡이 오염은 들판(field), 운송 및 저장 과정 동안에 식물 질환을 발생시킨다. 또한 종자 및 과실의 곰팡이 감염은 수확 및 발아률을 감소시킬 뿐만 아니라 질적 및 양적 모두에서 현저한 감소를 야기한다(Kells, S.A., Mason, L.J., Maier, D.E., Woloshuk, C.P. 2001. Journal of Stored Products Research 37, 371-382). 특히, 곰팡이독소를 가지는 곰팡이에 오염된 사료, 곡물 및 야채를 인간이나 동물이 섭취 시 인간 및 동물 모두의 건강에 심각한 위험을 유발할 수 있다 (Dagenais, T.R.T., Keller, N.P. 2009. Clinical Microbiology Reviews 22, 447-465;Jestoi, M. 2008. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 48,

21-49).

[0003] *Penicillium* 종은 일상생활에서 가장 흔히 볼수 있는 푸른색 곰팡이로 종자, 과실 및 야채의 운반이나 저장 동안 감염되어 푸른곰팡이병을 야기한다(Riteni, A. 2003. Journal of Agricultural and Food Chemistry 51, 6086-6090;Rychlik, M., Schieberle, P. 2001. European Food Research and Technology 212, 274-278). 또한, *Penicillium* 종은 2차 대사산물로 ochratoxin과 patulin과 같은 곰팡이독소(mycotoxin)를 생성하고 이들 곰팡이독소는 인간에게 발암성이다(Moake, M.M., Padilla-Zakour, O.I., Worobo, R.W. 2005. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 4, 8-21;Schwartz, G.G. 2002. Hypothesis: Cancer Causes & Control 13, 91-100).

[0004] *Alternaria* 종은 양배추와 겨자와 같은 십자화과(crucifer) 식물에서 흑반병(dark leaf spot diseases)을 야기하는 곰팡이 중 한 종이고(Chen, L.Y., Price, T.V., Silvapulle, M.J. 2005. Australian Journal of Agricultural Research 56, 699-714) 기관지 천식(Bush, R.K., Prochnau, J.J. 2004. Journal of Allergy and Clinical Immunology 113, 227-234), 앨러지성 비염(Kurup, V.P., Shen, H.D., Vijay, H. 2002. International Archives of Allergy and Immunology 129, 181-188) 및 축농증(Stark, P.C., Celedon, J.C., Chew, G.L., Ryan, L.M., Burge, H.A., Muilenberg, M.L., Gold, D.R. 2005. Environmental Health Perspectives 113, 1405-1409)을 포함하는 여러 질환을 야기하는 것으로 알려졌다.

[0005] 따라서, 곰팡이 오염 또는 감염으로부터 식물, 동물 및 인간을 보호하기 위하여 살균 과정은 반드시 필요하고 현재까지 다음과 같은 곰팡이 포자를 살균하는 여러가지 방법들이 개발되었다; 오존 가스(Allen, B., Wu, J.N., Doan, H. 2003. Journal of Environmental Science and Health Part B-Pesticides Food Contaminants and Agricultural Wastes 38, 617-630), UV-pulse (Jun, S., Irudayaraj, J., Demirci, A., Geiser, D. 2003. International Journal of Food Science and Technology 38, 883-888), 화학 처리제(Sauer, D.B., Burroughs, R. 1986. Phytopathology 76, 745-749), 초음파(Lopez-Malo, A., Palou, E., Jimenez-Fernandez, M., Alzamora, S.M., Guerrero, S. 2005. Journal of Food Engineering 67, 87-93), 감마선 (Braghini, R., Sucupira, M., Rocha, L.O., Reis, I.A., Aquino, S., Correa, B. 2009. Food Microbiology 26, 927-931).

[0006] 그러나 이들 방법들은 일부 결점 또는 제한을 가진다. 오존 가스 및 UV-펄스 처리는 식품 질을 떨어트릴 수 있다. 화학물질은 환경오염을 야기하고 화학 잔류물을 제거하지 않으면 식품에 적합하지 않다. 초음파 처리한 경우에는 보고된 다른 방법들에 비하여 박테리아 사멸 효과가 낮았다. 감마선에 의한 고주파 방사선(high frequency radiation)에 노출은 중요한 영양분의 변성을 야기하거나 종자 또는 식품에서 변화된 물리적 특성을 야기한다. 따라서 감마선 조사는 호주에서 식품 생산물의 살균에 금지되었다(Dehghani, F., Annabi, N., Titus, M., Valtchev, P., Tumilar, A. 2009. Biotechnology and Bioengineering 102, 569-576.).

[0007] SC-CO_2는 낮은 임계점(73.8 bar, 31.1)을 가지고, 액체와 같은 높은 용해력(dissolving power)과 기체와 같은 높은 확산성 (diffusivity) 및 낮은 점도를 가지므로 액체 및 기체의 특성을 동시에 가지는 이상적인 용매이다. 또한, SC-CO_2는 무색, 무취, 무미이고 식품에 잔류하지 않아 인간에게 안전하며 이산화탄소는 회수 및 재사용이 용이해 탄소사용량은 절약할 수 있어 환경친화적인 장점을 가진다.

[0008] 본 발명에서 본 발명자들은 SC-CO2를 이용하여 *Penicillium oxalicum* (*P. oxalicum*) 및 *Alternaria brassicicola* (*A. brassicicola*) 포자와 같은 유해 곰팡이의 불활성화 효과를 조사하였다. 특히, 반응 표면 분석(response surface methodology;RSM)에 의하여 불활성화 조건을 최적화하였다. 특히, *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* spores포자의 불활성화 수율에 대한 조용매와 SC-CO_2의 상승 효과를 조사하였다. 마지막으로, 포자의 불활성화 기작을 주사 전자 현미경(SEM) 및 공초점 레이져 주사 현미경(CLSM)으로 관찰하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0009] 본 발명은 상기의 문제점을 해결하고 상기의 필요성에 의하여 안출된 것으로서 본 발명의 목적은 곰팡이 포자를 살균하기 위한 불활성화의 최적화 방법과 조용매 사용시 불활성화의 상승효과를 제공하는 것이다.

과제의 해결 수단

[0010] 상기의 목적을 달성하기 위하여 본 발명은 초임계 이산화탄소를 이용하여 곰팡이 포자를 사멸시키는 방법에 있

어서,

[0011] a) 처리조 온도가 38~50℃에 도달한 때, 곰팡이 포자를 포함하는 시료를 처리조에 로딩하는 단계;b) 처리조를 닫고 액체 이산화탄소를 도관을 통해 처리조에 투입하고 펌프를 통해 처리조의 압력을 100~250 bar로 가압하는 단계; 및 c) 상기의 온도 및 압력 조건 하에서 15분 이상 처리하는 단계를 포함하는 초임계 이산화탄소를 이용하여 곰팡이 포자를 사멸시키는 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 상기 방법은 b)단계와 c)단계 사이에 조용매(cosolvent)를 처리조에 펌핑하는 단계를 더욱 포함하는 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0013] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 곰팡이 포자는 페니실리움 옥살리쿰(Penicillium oxalicum) 또는 알터나리아 브라시시콜라(Alternaria brassicicola) 포자, 아스퍼질러스 플라버스 (Aspergillus flavus), 또는 푸사리움 옥시스포룸(Fusarium oxysporum)인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0014] 본 발명의 일 구현예에 있어서, 상기 조용매(cosolvent)는 에탄올, 메탄올, H2O2, 또는 물인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0015] 본 발명의 바람직한 실시예에 있어서, 곰팡이 포자가 페니실리움 옥살리쿰(Penicillium oxalicum) 포자인 경우에 압력, 온도 및 시간 조건은 200 bar 및 45℃에서 25분 또는 100-200 bar, 50℃에서 15분 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0016] 본 발명의 다른 바람직한 실시예에 있어서, 상기 곰팡이 포자가 알터나리아 브라시시콜라(Alternaria brassicicola) 포자인 경우에 압력, 온도 및 시간 조건은 150-250 bar, 46℃에서 15분 이상인 것이 바람직하나 이에 한정되지 아니한다.

[0017] 이하 본 발명을 설명한다.

[0018] 본 발명은 반응 표면 분석을 활용하여 *Penicillium oxalicum* (*P. oxalicum*) 및 *Alternaria brassicicola* (*A. brassicicola*) 포자의 불활성화에 대한 초임계 이산화탄소(supercritical carbon dioxie;SC-CO_2)의 살균 조건을 최적화하고 조용매를 사용하여 불활성화 효과를 상승시키는 것이다. 처리 압력, 처리 온도 및 처리 시간과 같은 세개의 독립적인 변수의 불활성화 효과를 조사하기 위하여 Box-Behenken 디자인을 사용하였다. *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화 수율은 모든 독립적인 변수가 증가함에 따라 현저하게 증가하였다. *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화에 대한 최적 조건은 능선(ridge) 분석을 사용하여 얻었다. *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화에 대한 측정된 최적 조건은 다음과 같다; 각각 168 bar, 20분 동안 49℃, 5.74 log의 예상 불활성화 수율을 가지며, 196 bar, 17분 동안 46℃, 6.37 log의 예상 불활성화 수율을 가진다. 실험 값들은 예상치와 잘 일치하였다. 200 프루프(proof)의 에탄올을 조용매(cosolvent)로 사용하였을 때, SC-CO_2에 의한 불활성 효과가 증가하였다. 최종적으로, 본 발명자들은 각각 공초점 레이져 주사 현미경 및 주사 전자 현미경에 의한 SC-CO_2 처리된 포자에서 표면 및 내부적 형태 변화를 조사하였다.

[0019] 반응 표면 분석

[0020] *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 의 포자들은 Box-Behnken 디자인에 따른 SC-CO2을 사용하여 불활성화하였다. *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 의 불활성화 형태는 매우 유사하였다. 표 3 및 4에서 알 수 있는 바와 같이, 모든 처리 계수(압력, 온도 및 처리 시간)의 레벨의 증가는 불활성화 수율의 증가를 야기하였다. *P. oxalicum* 포자를 200 bar 및 45℃에서 25분 또는 100-200 bar, 50℃에서 15분 이상 처리할 때, 불활성화 수율은 7.00 log CFU/ml (완전하게 불활성화)이었다. *A. brassicicola* 포자는 150-250 bar, 46℃에서 15분 이상 처리하면 완전하게 불활성화되었다.

표 3

Run	X_1	X_2	X_3	Y	
				Observed	Predicted
1	100	40	15	0.97	0.81
2	100	50	15	7.00	5.90
3	200	40	15	**1.55**	**2.63**
4	200	50	15	**7.00**	**7.14**
5	100	45	5	**0.96**	**1.74**
6	100	45	25	**1.53**	**1.99**
7	200	45	5	1.08	0.60
8	200	45	25	7.00	6.20
9	150	40	5	0.55	-0.09
10	150	40	25	0.96	0.64
11	150	50	5	2.21	2.51
12	150	50	25	7.00	7.62
13	150	45	15	0.75	0.97
14	150	45	15	1.06	0.97
15	150	45	15	1.13	0.97

[0021]

[0022] 표 3은 초임계 이산화탄소에 의한 P. oxalicum 불활성화에 대한 실험을 위한 Box-Behnken 디자인을 나타낸 표이다.

표 4

Run	X_1	X_2	X_3	Y	
				Observed	Predicted
1	150	38	15	1.27	1.86
2	150	46	15	7.00	6.80
3	250	38	15	**1.70**	**1.89**
4	250	46	15	**7.00**	**6.40**
5	150	42	5	1.70	1.49
6	150	42	25	3.70	3.51
7	250	42	5	1.69	1.86
8	250	42	25	2.56	2.76
9	200	38	5	1.58	1.19
10	200	38	25	2.35	1.94
11	200	46	5	4.80	5.20
12	200	46	25	7.00	7.38
13	200	42	15	1.96	2.06
14	200	42	15	1.93	2.06
15	200	42	15	2.31	2.06

[0023]

표 5

Regression	Degree of freedom	Sum of Squares	F-value	P-value
Linear	3	203.3968	148.71	<0.0001
Quadratic	3	51.1579	37.40	<0.0001
Cross product	3	36.0855	26.38	<0.0001
Total Model	9	290.6404	70.83	<0.0001

R^2 : 0.95

[0024]

[0025]

표 6

Regression	Degree of freedom	Sum of Squares	F-value	P-value
Linear	3	146.9505	291.26	<0.0001
Quadratic	3	38.3818	76.08	<0.0001
Cross product	3	2.6243	5.20	0.0045
Total Model	9	187.9567	124.18	<0.0001

R^2 : 0.97

[0026]

[0027] *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화에 대한 모델을 예측하기 위하여 아래의 2 차 다항 모델 방정식(2 및 3)이 사용되었다:

$$Y=135.0379-0.1853X_1-5.4958X_2-1.2720X_3-0.0005X_1X_2+0.0026X_1X_3+0.0218X_2X_3+0.0006X^2_1+0.0637X^2_2+0.0010X^2_3$$

(eq. 2)

$$Y=184.8599-0.0232X_1-9.1323X_2-0.1950X_3-0.0005X_1X_2-0.0005X_1X_3+0.0089X_2X_3+0.0001X^2_1+0.1154X^2_2+0.0001X^2_3$$

(eq. 3)

[0028]

[0029] *P. oxalicum* 포자의 불활성화에 대한 변량 분석법(analysis of variance;ANOVA)은 표 5에 나타내었다. ANOVA 결과들은 모든 회귀 모수[선형, 2차, 교적(cross product), 전체 모델]는 매우 유의성이 있다($p < 0.0001$)는 것

을 나타내었다. *A. brassicicola* 포자의 경우에는(표 6), 선형, 교적, 2차 및 전체 모델 회귀는 매우 유의성이 있었다($p < 0.01$). *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자 모두 회귀 계수(R^2)는 각각 0.95 및 0.97이었다. 모델 방정식은 높은 유의성을 가지는 실험데이터에 적합하였다.

[0030] 그러나, 정준 분석(canonical analysis)에 의하여 얻어진 정류점(stationary point)은 *P. oxalicum* and *A. brassicicola* 포자 모두에서 안상점(saddle point)인 것으로 판명되었다. 최적 조건을 결정하기 위하여 능형 분석(ridge analysis)을 수행하였다.

[0031] 표 7에서 나타낸 것과 같이, *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* spores포자의 예측되는 최적 불활성화 조건은 각각 168 bar, 49℃에서 20 min(예측되는 불활성화 수율, 5.74 log) 및 196 bar, 46℃에서 17분(예측되는 불활성화 수율, 6.37 log)이었다. 최적 조건의 증명은 예측 계수를 사용한 실제 실험에서 테스트하였고, *P. oxalicum* (6.12±0.16) 및 *A. brassicicola* (6.54±0.23)의 실험 값은 예측된 값과 잘 일치하였다.

표 7

Response	최적 조건	Stationary point	예측된 값 (log reduction)[a]	관찰된 값 (log reduction)[b]
P. oxalicum	X_1=168 bar X_2=49°C X_3=20 min	saddle	5.74	6.12±0.16
A. brassicicola	X_1=196 bar X_2=46°C X_3=17 min	saddle	6.37	6.54±0.23

[a] 2 차 모델의 리지 분석을 사용하여 예측.

[0032] [b] 3 회 반복 실험의 평균 ± 표준 편차

[0033] 표 7은 불활성화에 대한 예측 및 실험 값을 비교한 표이다.

[0034] 도 2 (a), 및 (b)는 고정된 압력(*P. oxalicum*, 200 bar 및 *A. brassicicola*, 250 bar)에서 온도 및 처리 시간의 효과를 나타낸다. *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화 형태는 매우 유사하였다. 도 2(a)는 온도 및 처리 시간이 증가함에 따라서 *P. oxalicum* 포자에 대한 감소는 증가하여 온도 47-50℃ 및 처리 시간 15-25 분에서 7 log 감소 이상에 도달하였다. 도 2 (b)는 *A. brassicicola* 포자의 불활성화 수율을 나타내고, SC-CO_2 조건이 46℃에서 25 분간 수행될 때, 불활성화 수율은 7 log 감소이었다.

[0035] 고정된 온도(50℃ 및 46℃)에서 압력 및 처리 시간의 효과로서 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola*의 불활성화 수율을 나타낸 도 3(a) 및 (b)의 입체도면에서 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola*의 불활성화 수율은 처리압력이 증가하는 것보다 처리 시간이 증가함에 따라 현저하게 더 높았다. *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 7 log 불활성화에 대한 조건은 각각 고정 온도(50℃)에서 100 bar 및 15 분 이상 및 고정온도(46℃)에서 150 bar 및 17 분 이상에서 얻었다.

[0036] 도 4 (a) 및 (b)는 고정된 처리 시간(25분)에서 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 감소가 압력 및 온도에 따라 어떻게 변하는가를 보여준다. *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화 수율은 온도가 증가함에 따라 증가하였다.

[0037] 또 표 3에 나타낸 것과 같이, 100 bar의 압력에서,40℃ 및 50℃에서 *P. oxalicum* 포자의 불활성화 수율은 각각 0.97 및 7.00 로그 감소였지만 SC-CO_2 밀도는 각각 0.63 및 0.38 g/mL로 계산되었다. 표 4에 나타낸 것과 같이, SC-CO2 압력과 처리 시간이 일정하게 유지하였을때 온도가 증가할 때, *A. brassicicola* 포자의 불활성화 효율은 크게 증가하였다. 이 결과는 온도 증가가 곰팡이 포자의 불활성화에 크게 영향을 미친다는 것을 나타낸다. 따라서 이들 결과는 온도가 압력에 비하여 곰팡이 불활성화에 더 효과가 크고 처리 온도는 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자들의 불활성화에 대한 주된 요인인 것을 나타낸다.

[0038] 또한 조용매(200 proof 에탄올)의 상승효과는 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화 효율을 개선하기 위하여 조사하였다. SC-CO_2의 불활성화 조건은 낮은 불활성화 수율조건하에서 수행되었다. 도 5 및 6은 각각 100 bar 및 40℃와 150 bar 및 38℃ 하에서 100g의 처리 용기 부피 내에 16 g의 조용매를 사용한 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화 시간 경과를 나타낸다. SC-CO_2 처리를 조용매를 첨가하여 45분간 수행한 경우, *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화 효율은 7 log 감소이었다(완전한 불활성화). 그러나, 순수한 SC-CO_2 (조용매없는)는 두 포자의 7 log 감소를 위해서는 더 오랜 처리시간(90분)을 요하였다.

[0039] SC-CO2 처리가 *P. oxalicum* (도 7) 및 *A. brassicicola* 포자(도 8)의 막 특성에 어떠한 영향을 미치는지를 결정하기 위하여, SC-CO2 처리된 포자를 적색 형광성 PI (죽은 포자)와 녹색 형광SYTO9(전체 포자)로 염색한 후, 공초점 레이져 주사 현미경으로 그 포자를 분석하였다. *P. oxalicum* (도 7 a 및 b) 및 *A. brassicicola* (도 8 a 및 b)의 대부분의 SC-CO2 처리전 포자들은 녹색 염료(SYTO 9) 또는 적색 염료(PI) 모두 약하게 염색만되었다.

[0040] *P. oxalicum* 포자 현탁액을 200 bar 및 45℃에서 25 분간 SC-CO2로 처리한 후(도 7 c 및 d), 양 SYTO 9 및 PI 모두 포자 내로 침투하였다. 대부분의 포자 경자(phialide) 및 분생자병(conidiophores)은 완전하게 염색되었다. 도 8 c 및 d는 150 bar 및 46℃에서 15 분간 SC-CO2로 처리한 *A. brassicicola* 포자를 나타낸다. SC-CO2로 처리한 *A. brassicicola* 포자는 *P. oxalicum* spores포자와 유사한 변화가 관찰되었다. SC-CO_2 처리 후, 대부분의 포자 및 격막이 PI 및 SYTO 9에 의하여 완전하게 염색되었다. 이들 결과에서, 포자의 막 특성은 SC-CO_2 처리에 의하여 파괴되었다는 것을 나타낸다.

[0041] 또한 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자에서 미세구조 및 형태적 변화를 SEM으로 조사하였다. 도 9에서, 미처리된 포자들(도 9 a 및 c)는 타원형(elliptical) 표면의 규칙적인 배열이었다. 반면에, 200 bar 및 45℃에서 25 분간 SC-CO_2로 처리한 *P. oxalicum* 포자(도 9 b 및 d)는 쪼그라들고 그들의 포자 표면이 벗겨졌다.

[0042] *A. brassicicola* 포자의 미세구조는 도 10에 나타내었다. 미처리된 포자들은 거의 원뿔형이다(도 10 a 및 c). 그러나 그 포자에서 형태적 변화가 SC-CO_2 처리 후에 관찰되었다. 150 bar 및 46℃에서 15 분간 SC-CO2로 처리한 경우에 그 처리된 *A. brassicicola* 포자는 *P. oxalicum* 포자와 거의 유사한 변화가 관찰되었다. 그 SC-CO2 처리된 포자들은 벗겨졌고 포자외막(exosporium)이 파괴되었다(도 10 b 및 d). 이들 결과들은 세포내 물질 및 원형질이 SC-CO2에 녹았고 SC-CO2에 의하여 추출되었다는 것을 예측할 수 있다.

발명의 효과

[0043] 본 발명을 통해서 알 수 있는 바와 같이, *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화 수율은 독립적인 변수들이 증가함에 따라 현저하게 증가하였다. 특히, 처리 온도는 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 불활성화에 가장 효과적인 것을 알 수 있었다. 독립변수 및 종속 변수 사이의 다중 회귀 모델의 상관관계를 확립할 수 있었고, 회귀 모델의 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 p-값은 매우 유의적이었다($p<0.0001$). 능선(ridge) 분석을 사용하여 곰팡이 포자의 불활성화에 대한 최적 조건을 얻었다. 예측된 최적 조건의 적합성을 실질적인 실험을 통하여 효과적으로 입증하였다. SC-CO_2를 조용매(예를 들어, 에탄올)과 결합한 경우, 불활성화 효율은 조용매 및 SC-CO_2의 살균 능력 사이의 상승 효과를 나타내었다. SC-CO_2 처리에 의한 곰팡이 포자의 불활성화 기작을 CLSM 및 TEM을 사용하여 조사하였다. SC-CO_2는 포자의 구조 및 막 특성을 포함하는 포자의 내부 및 외부에 손상을 야기하였다.

도면의 간단한 설명

[0044] 도 1은 초임계 CO_2 추출 시스템의 계통도(Schematic diagram): 1, CO_2 실린더; 2,전자 저울(electronic scale); 3, 냉동기(chiller); 4, CO_2 펌프; 5, 온도 조절기; 6, 조용매 저장기(cosolvent reservoir); 7, 조용매 펌프; 8, 가열조(heating bath); 9, 순환 펌프; 10, 처리조(treatment vessel); 11, 분리기 1; 12, 분리기 2; V1, 밸브 1; V2, 밸브 2; BPR, 배압 조절기(back pressure regulator); 점선, 물; 실선, CO_2.

도 2는 *P. oxalicum* (a: 고정 압력 200 bar에서) 및 *A. brassicicola* (b: 고정 압력 250 bar에서)에 대한 온도 및 처리 시간의 효과의 반응 표면 그림이다.

도 3은 *P. oxalicum* (a: 고정 온도 50℃) 및 *A. brassicicola* (b: 고정 온도 46℃)에 대한 압력 및 처리 시간의 효과의 반응 표면 그림이다.

도 4는 *P. oxalicum* (a: 고정 처리시간 25분) 및 *A. brassicicola* (b: 고정 처리 시간 25 분)에 대한 압력 및 온도의 효과의 반응 표면 그림이다.

도 5는 100 bar 및 40℃에서 *P. oxalicum* 포자의 불활성화에 대한 조용매의 효과를 나타낸 그림. 그 조용매(에탄올, 200 proof)을 16.0 g 사용하였다.

도 6은 150 bar 및 38℃에서 *A. brassicicola* 포자의 불활성화에 대한 조용매의 효과를 나타낸 그림. 그 조용매(에탄올, 200 proof)을 16.0 g 사용하였다.

도 7은 *P. oxalicum*의 CLSM 이미지를 나타낸 그림, (a) SYTO 9로 염색된 미처리된 포자, (b) PI로 염색된 미처리된 포자, (c) SYTO 9로 염색된 SC-CO_2 처리된 포자, (d) PI로 염색된 SC-CO_2 처리된 포자. SC-CO_2 처리는 200 bar, 45℃에서 25 분간 수행되었다.

도 8은 *A. brassicicola*의 CLSM 이미지를 나타낸 그림, (a) SYTO 9로 염색된 미처리된 포자, (b) PI로 염색된 미처리된 포자, (c) SYTO 9로 염색된 SC-CO_2 처리된 포자, (d) PI로 염색된 SC-CO_2 처리된 포자. SC-CO_2 처리는 150 bar, 46℃에서 15 분간 수행되었다.

도 9는 *P. oxalicum*의 SEM 이미지를 나타낸 그림, (a) 미처리된 포자(X1000), (b) SC-CO_2 처리된 포자 (X1000), (c) 미처리된 포자 (X3000), (d) SC-CO_2 처리된 포자(X3000). SC-CO_2 처리는 200 bar, 45℃에서 25 분간 수행되었다.

도 10은 *A. brassicicola*의 SEM 이미지를 나타낸 그림, (a) 미처리된 포자(X1000), (b) SC-CO_2 처리된 포자 (X1000), (c) 미처리된 포자 (X3000), (d) SC-CO_2 처리된 포자(X3000). SC-CO_2 처리는 150 bar, 46℃에서 15 분간 수행되었다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0045] 이하 비한정적인 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명한다. 단 하기 실시예는 본 발명을 예시하기 위한 의도로 기재된 것으로서 본 발명의 범위는 하기 실시예에 의하여 제한되는 것으로 해석되지 아니한다.

[0046] 실시예 1: 곰팡이 균주

[0047] *Penicillium oxalicum* (KACC 41013) 및 *Alternaria brassicicola* (KACC 40039)는 대한민국 수원 소재 한국 농업 미생물자원센터로부터 2007년 4월 입수하였다. Potato dextrose agar (PDA, Difico, Detroit, MI, USA) 위에 존재하는 각 곰팡이 포자들을 10% glycerol (Junsei Chemical, Tokyo, Japan)에 넣어 스톡용액을 만들었다 스톡용액은 실험에 사용하기 전까지 -80℃에서 저장하였다.

[0048] 실시예 2: 포자 현탁액의 제조

[0049] 스톡 용액을 PDA 배지에 접종하고 포자를 25℃에서 7일간 배지 상에서 완전하게 성장시켰다. 그 후 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자들을 콜크 보러(cork borer)를 사용하여 살균 튜브로 옮겨서 5분 동안 10 ml 살균수로 볼텍싱하였다. *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자의 초기 농도는 약 10^7 CFU/ml이었다.

[0050] 실시예 3: 초임계 이산화탄소 처리

[0051] SC-CO_2 처리 시스템(Ilshin Autoclave Co., Daejeon, Korea)의 계통도를 도 1에 나타내었다. *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자를 SC-CO2로 정적 모드(static mode)에서 처리하였다. 요약하면, 처리조 온도 설정 값에 도달한 때, 2 ml의 *P. oxalicum* 및 *A. brassicicola* 포자를 함유한 느슨하게 캡핑된 살균 튜브를 처리조에 로딩하고 그 처리조를 밀봉하였다. 액체 CO_2 (순도 99.5%, Daehan Specialty Gases, Seoul, Korea)를 그 처리조에 펌핑하고, 압력과 유속을 각각 배압 조절기(BPR) 및 CO_2 펌프로 일정하게 유지하고, 그 처리조를 3분 이내로 완전하게 압력을 가한다. 다음 필요한 양의 조용매(200 프루프(proof)의 에탄올, Sigma, St. Louis, MO, USA)를 그 처리조에 펌핑하고, 유속을 조용매 펌프를 사용하여 일정하게 유지시켰다. 원하는 처리 시간 후, 그 벤트 밸브(V-3)를 즉시 열고. 그 처리조를 약 2분간 압력을 뺐다. 모든 샘플은 3회 반복실험 처리하였다.

[0052] 실시예 4: 생존 포자의 결정

[0053] SC-CO_2 처리 후, 생존 포자의 수를 0.1 ml의 계대 희석된 샘플을 PDA 배지 상에 2회 반복 스프리딩하고 25℃에서 72시간 배양하여 정량화하였다. 상기에서 얻은 데이터를 비처리된 샘플에 대한 생존 포자의 평균수를 처리된 샘플에 대한 평균 생존 포자의 수로 나눈 로그 값으로 표현하였다.

[0054] 실시예 5: 공초점 레이저 주사 현미경

[0055] 포자의 SC-CO_2 처리에 대한 내부 형태적 변화를 공초점 레이저 주사 현미경(CLSM)을 통하여 육안화하였다. 형광 염료로 SYTO9 (Invitrogen, Eugene, OR, USA) 및 propidium iodide (PI) (Invitrogen, Eugene, OR, USA)를 사용하였다. SYTO 9는 대부분의 막을 투과하여 전체 세포(생존 및 사멸)를 측정하는 녹색 형광 염료이다. Propidium iodide (PI)는 단지 손상 막 세포 또는 사멸 세포에만 투과할 수 있는 적색 형광 염료이다.

[0056] SC-CO_2 처리 전과 후에, 1 ml의 포자 현탁액을 2 ml 살균 마이크로 튜브로 옮겼다. 최종 농도는 SYTO 9에서 25 μM 그리고 PI에서 720 μM 이었고, 그 염색된 포자 현탁액을 암실에서 37 ℃에서 20 분간 배양하였다. 그 후 염색된 포자 현탁액을 16,000 rpm, 4℃에서 2 분간 원심분리한 후, 그 포자 펠렛을 2회 세척하고 동일 부피의 phosphate-buffered saline (PBS; KH_2PO_4 0.24 g/l, KCl 0.2 g/l, NaCl 8 g/l, Na2HPO4 1.44 g/l; pH 7.4; Sigma, St. Louis, MO, USA)에 재현탁하였다. 10 마이크로리터의 각 포자 현탁액을 커버 슬라이드에 옮기고 37 암실에서 건조하였다. 소량의 마운팅 오일을 버블이 생기지 않게 각 포자에 처리하고 커버 글라스로 조심스럽게 덮었다. 커버 슬라이드 상에 커버 글라스를 고정하기 위하여, 매니큐어액(fingernail polish)을 그 커버 글라스의 가에 붓질하였다.

[0057] 그 포자의 형광 이미지를 40 배 렌즈의 공초점 레이저 주사 현미경(CLSM, LSM 5 Exciter, Zeiss, Jena, Germany)에 의하여 관찰하였다. 현미경 분석을 파장 488 nm Argon laser (녹색 채널) 및 543HeNe-laser (적색 채널)에서 수행하였다. 추출 필터는 적색 채널(PI)용 Long path (LP) 560 방출 필터와 녹색 채널(SYTO 9)용 band path (BP) 505-530 방출 필터를 사용하였다.

[0058] 실시예 6: 주사 전자 현미경 이미징

[0059] 그 포자들을 2시간 동안 0.1M/l phosphate (pH 7.2) 내 2.5% (v/v) paraformaldehyde 및 glutaraldehyde 혼합물에서 미리 고정하고 0.1 mol/l phosphate buffer (pH 7.2)로 3회 세척하였다. 미리 고정 후, 그 포자들을 0.1 mol/l phosphate buffer(pH 7.2)을 가지는 1% osmium tetroxide에서 1시간 동안 후고정하였다. 그 후에, 그 포자들을 50, 70, 80, 90 및 100% (v/v) 에탄올(3회)로 연속적으로 세척하여 탈수하였다. 그 후 탈수된 샘플을 CO2 내 임계점에서 건조하고 건조된 포자를 골드로 코팅하였다. 그 샘플들을 주사 전자 현미경(S-3400N, Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan)으로 관찰하였다.

[0060] 실시예 7: 실험 디자인

[0061] Box-Behenken 디자인을 최적 불활성화 조건을 결정하기 위하여 수행하였다 (Myers, Montgomery, 1995). 그 $\log_{10}$ 감소는 종속변수이다. 세 독립적인 변수들(알벽, 온도 및 처리시간)이 포자의 불활성화 수율에

관련되었다. 그것은 세 레벨로 구성되었고(저, 중 및 고) 각각 -1, 0 및 +1로 코드화하였다(표 1 및 2).

표 1

독립 변수	Levels		
	-1	0	1
압력 (X_1)	100	150	200
온도 (X_2)	40	45	50
처리 시간(X_3)	5	15	25

[0062]

[0063] 표 1은 초임계 이산화탄소에 의한 *P. oxalicum* 포자의 불활성화에 대한 실험 디자인에 사용된 독립 변수의 수준을 나타낸 표이다.

표 2

독립 변수	Levels		
	-1	0	1
압력 (X_1)	150	200	250
온도 (X_2)	38	42	46
처리 시간(X_3)	5	15	25

[0064]

[0065] 표 2는 초임계 이산화탄소에 의한 *A. brassicicola* 포자의 불활성화에 대한 실험 디자인에 사용된 독립 변수의 수준을 나타낸 표이다.

[0066] 불활성화 실험의 결과에서, 반응 표면 회귀(RSREG) 및 유의성 실험을 SAS 소프트웨어(version 9.0, Raleigh, NC, USA)를 사용하여 데이터에 적용하였다.

[0067] 실험 데이터의 통계학적 유의성 및 반응 표면 분석에서 사용된 2차 다항(polynomial) 모델 방정식(1)은 다음과 같다:

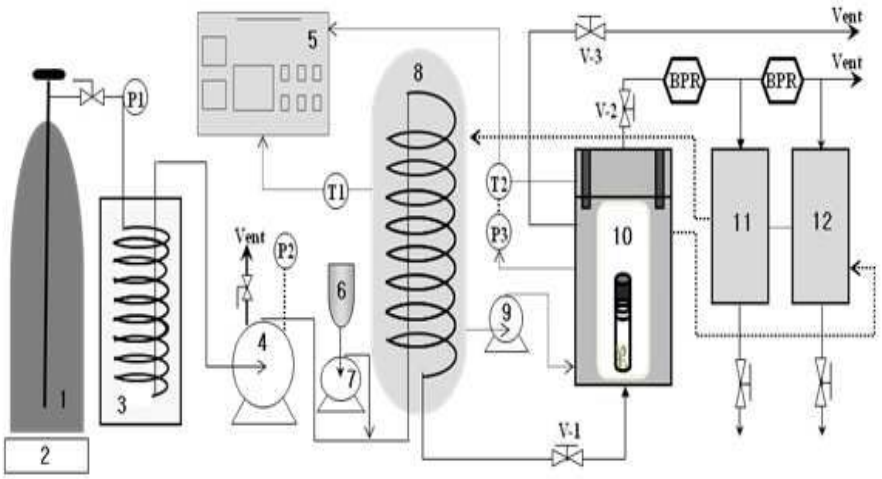
$$Y=\beta_0+\beta_1X_1+\beta_2X_2+\beta_3X_3+\beta_{12}X_1X_2+\beta_{13}X_1X_3+\beta_{23}X_2X_3+\beta_{11}X^2_1+\beta_{22}X^2_2+\beta_{33}X^2_3$$

[0068] *(Eq. 1)*

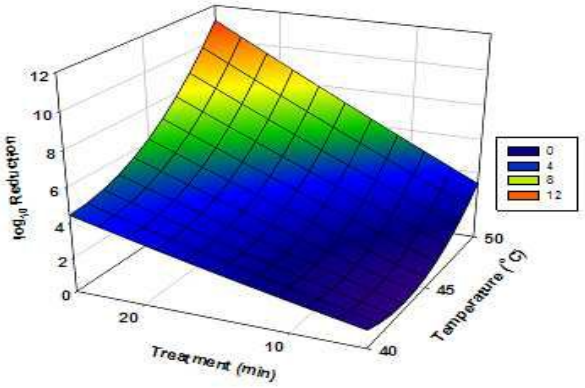
[0069] 여기서, Y는 예측된 $\log_{10}$ 감소; X_1은 처리 압력; X_2는 처리 온도; X_3는 처리 시간; β_0은 상수; β^1, β_2 및 β_3은 선형 계수; β_{12}, β_{13} 및 β_{23}은 교호 계수(cross product coefficients); and β_{11}, β_{22} 및 β_{33}은 2차(quadratic) 계수이다.

도면

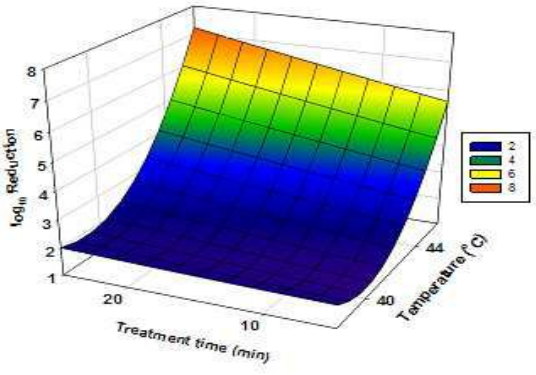
도면1



도면2

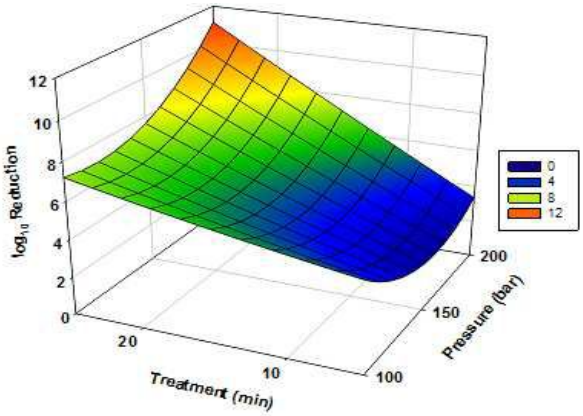


(a)

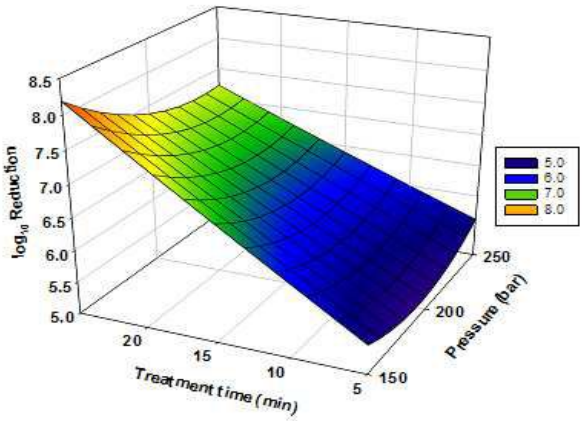


(b)

도면3

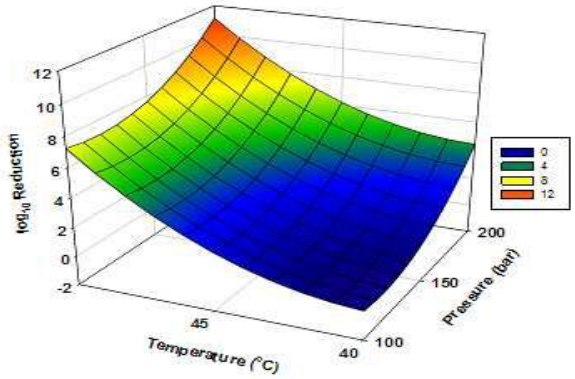

log10 Reduction
12
10
8
6
4
2
0
20
10
Treatment (min)
100
150
200
Pressure (bar)
0
4
8
12

(a)

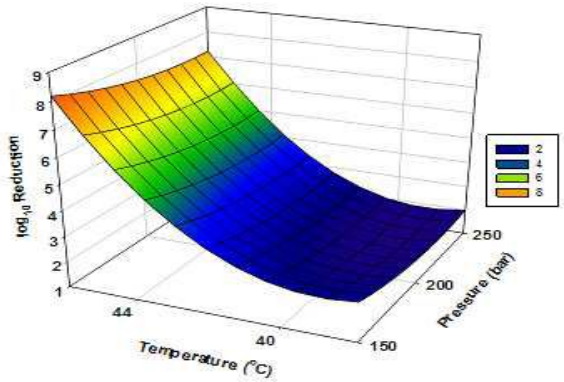

log10 Reduction
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
20
15
10
5
Treatment time (min)
150
200
250
Pressure (bar)
5.0
6.0
7.0
8.0

(b)

도면4

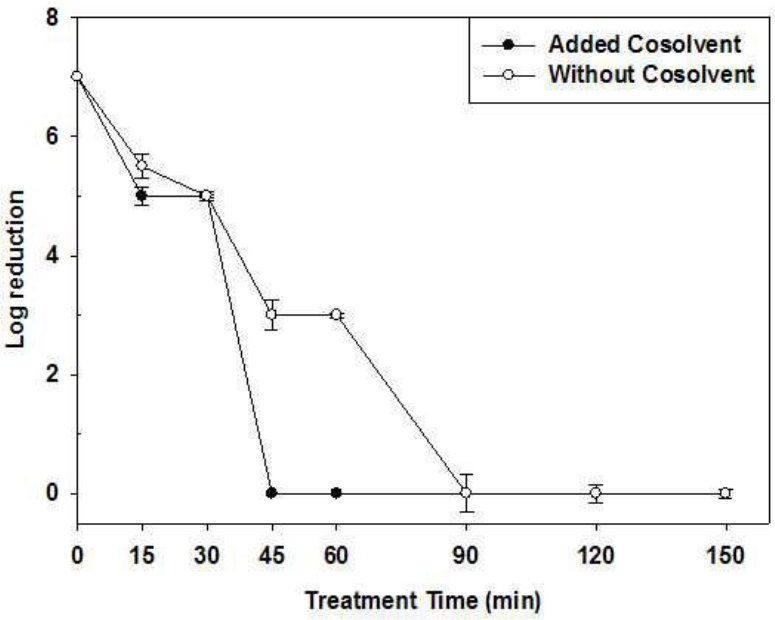

12
10
8
6
4
2
0
-2
log10 Reduction
45
Temperature (°C)
40
100
150
200
Pressure (bar)
0
4
8
12

(a)

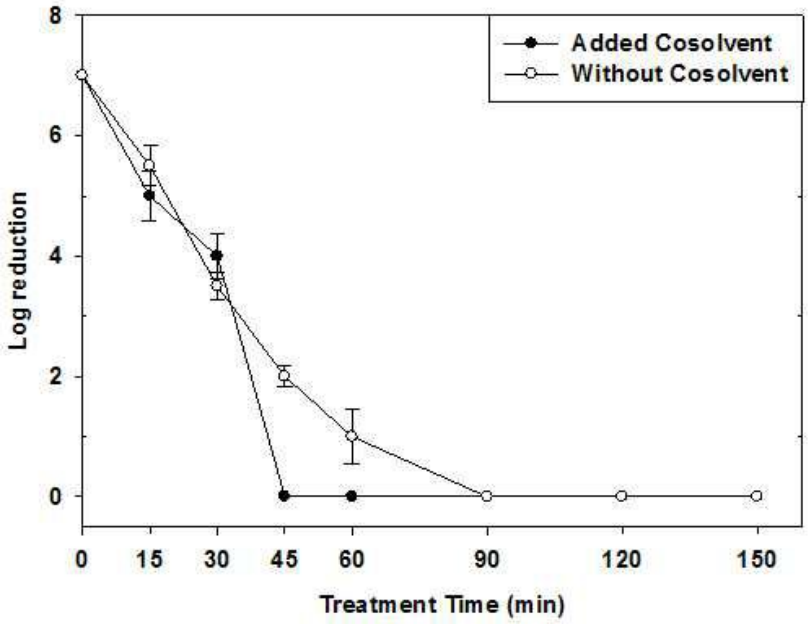

9
8
7
6
5
4
3
2
1
log10 Reduction
44
Temperature (°C)
40
150
200
250
Pressure (bar)
2
4
6
8

(b)

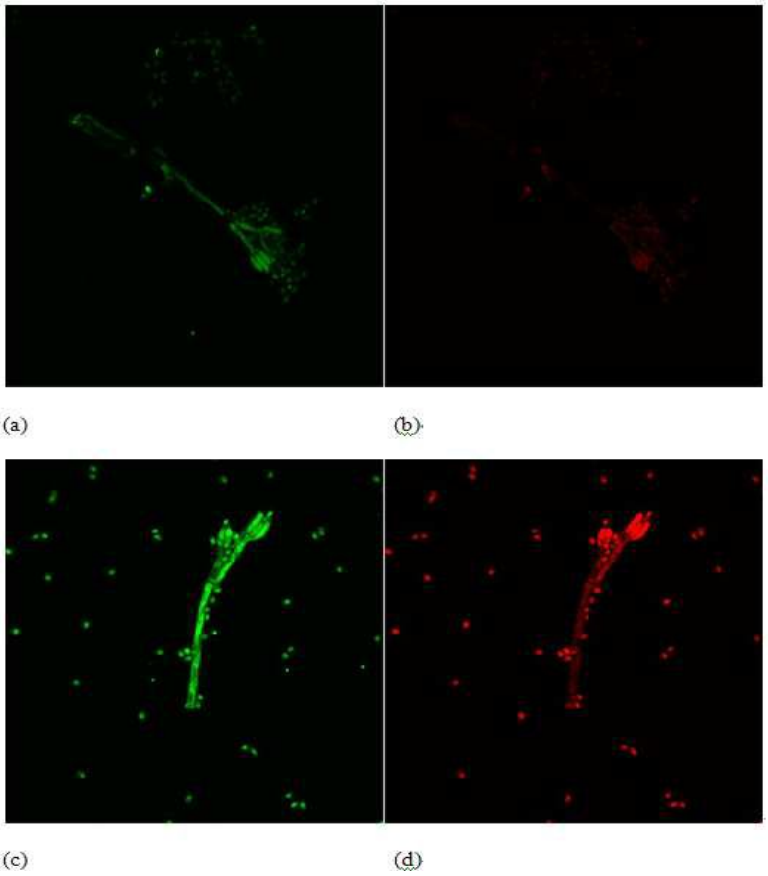
도면5


Added Cosolvent
Without Cosolvent
Log reduction
8
6
4
2
0
0
15
30
45
60
90
120
150
Treatment Time (min)

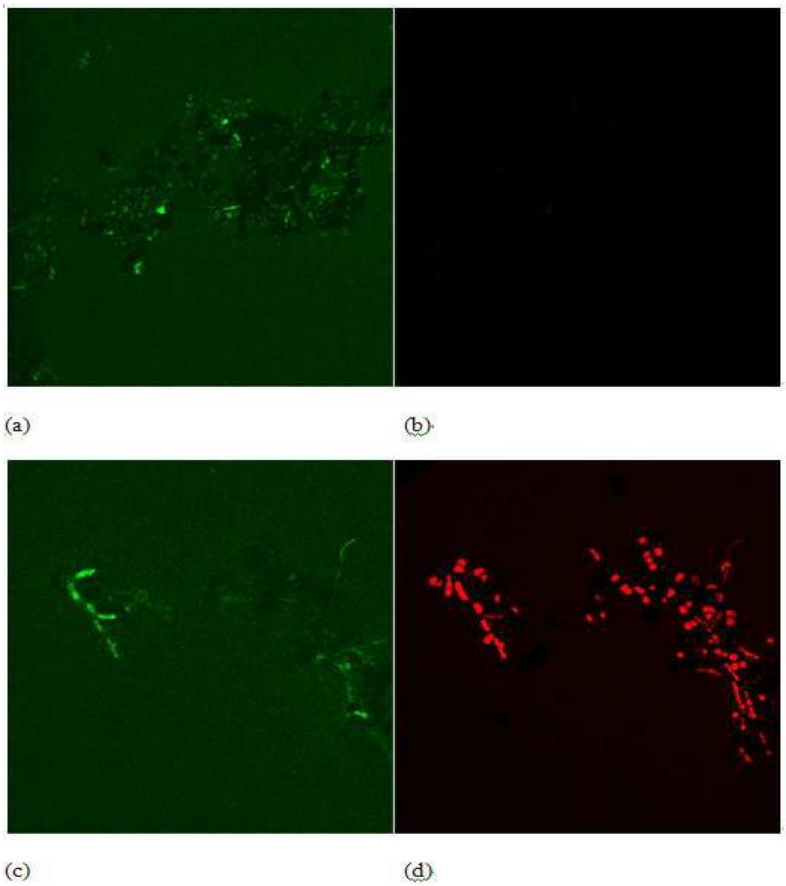
도면6


Added Cosolvent
Without Cosolvent
Log reduction
Treatment Time (min)
0
2
4
6
8
0
15
30
45
60
90
120
150

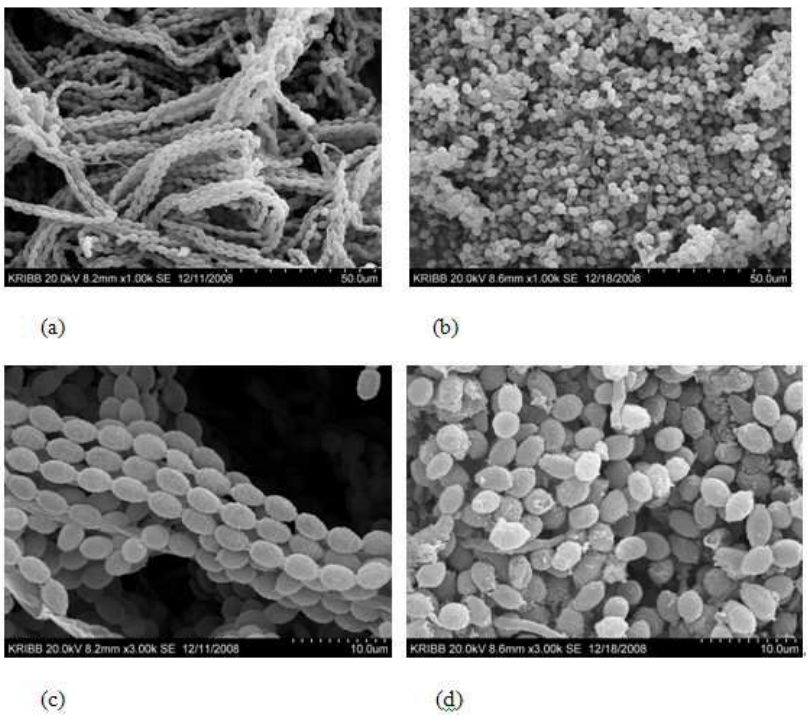
도면7


(a)
(b)
(c)
(d)

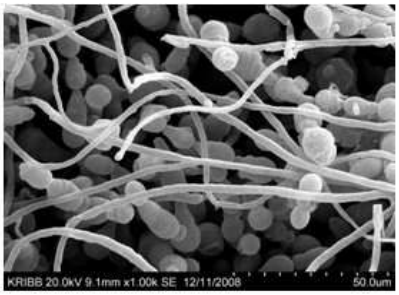
도면8


(a)
(b)
(c)
(d)

도면9


KRIBB 20.0kV 8.2mm x1.00k SE 12/11/2008
50.0um
KRIBB 20.0kV 8.6mm x1.00k SE 12/18/2008
50.0um
(a)
(b)
KRIBB 20.0kV 8.2mm x3.00k SE 12/11/2008
10.0um
KRIBB 20.0kV 8.6mm x3.00k SE 12/18/2008
10.0um
(c)
(d)

도면10


KRIBB 20.0kV 9.1mm x1.00k SE 12/11/2008
50.0um

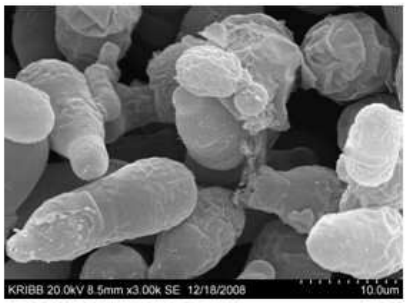
(a)


KRIBB 20.0kV 8.5mm x1.00k SE 12/18/2008
50.0um

(b)


KRIBB 20.0kV 8.1mm x3.00k SE 12/11/2008
10.0um

(c)


KRIBB 20.0kV 8.5mm x3.00k SE 12/18/2008
10.0um

(d)