



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2014년11월27일
(11) 등록번호 10-1465409
(24) 등록일자 2014년11월20일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

A01C 1/08 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0063547

(22) 출원일자 2014년05월27일

심사청구일자 2014년05월27일

(56) 선행기술조사문헌

JP11168969 A*

KR1020100110602 A*

KR1020120094919 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

류지훈

서울특별시 성북구 안암로 145, 동관 413호 (안암동5가, 고려대학교 생명과학대학)

서현선

서울특별시 성북구 안암로 145, 동관 413호 (안암동5가, 고려대학교 생명과학대학)

남혜경

서울특별시 성북구 안암로 145, 동관 413호 (안암동5가, 고려대학교 생명과학대학)

(74) 대리인

특허법인다나

전체 청구항 수 : 총 6 항

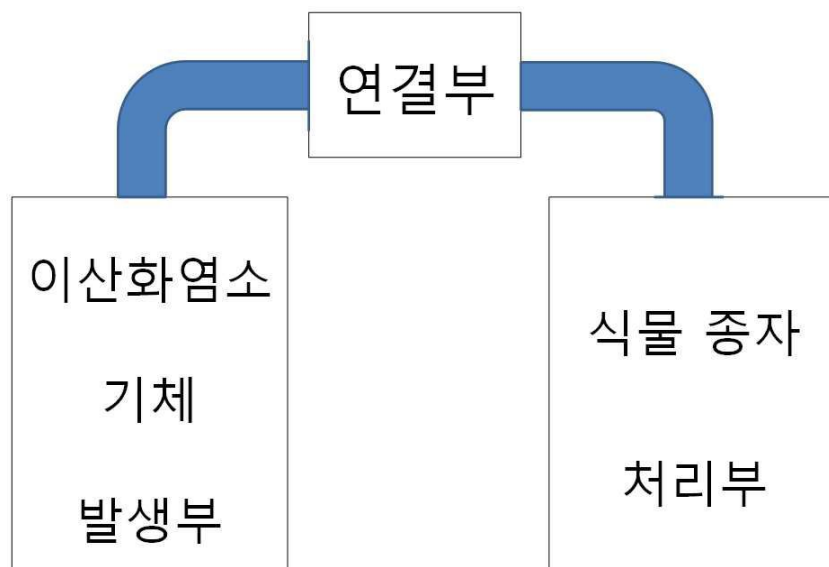
심사관 : 서광욱

(54) 발명의 명칭 이산화염소 기체를 이용한 무균 식물 종자의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 이산화염소 기체를 이용한 식물 종자의 살균 방법 및 이산화염소 기체를 이용한 식물 종자의 살균 장치에 관한 것이다. 본 발명에 따르면, 이산화염소 기체를 식물 종자에 처리함으로써, 식물 종자의 발아율에 영향을 미치지 않으면서 종자에 존재하는 위해 미생물을 완전히 제거할 수 있다.

대표도 - 도1



이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 111138033HD110

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 협동]천연항균물질 함유 능동형 식품포장기술의 위생안전성 검증

기 여 율 1/1

주관기관 고려대학교 산학협력단

연구기간 2013.12.26 ~ 2014.12.25

특허청구의 범위

청구항 1

50 내지 70℃의 온도 조건에서, 이산화염소 기체를 식물 종자에 처리하는 것을 포함하는 식물 종자의 살균 방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 식물 종자는 채소 종자 또는 곡물 종자인 식물 종자의 살균 방법.

청구항 3

제2항에 있어서, 채소 종자는 배추, 양배추, 시금치, 상추, 당근, 토마토, 호박, 오이, 고추, 양파, 자운영, 알팔파, 겨자, 경수채, 들깨, 메밀, 적갓, 설채, 홍빛열무, 클로버, 다채, 브로콜리, 콜라비 및 무의 종자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 식물 종자의 살균 방법.

청구항 4

제2항에 있어서, 곡물 종자는 벼, 보리, 밀, 콩, 팥, 땅콩, 녹두, 감자, 고구마, 옥수수, 조 및 수수의 종자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상인 식물 종자의 살균 방법.

청구항 5

제1항에 있어서, 이산화염소의 처리 농도는 100ppm 내지 500ppm인 식물 종자의 살균 방법.

청구항 6

삭제

청구항 7

제1항에 있어서, 이산화염소 기체의 처리는 70 내지 100%의 상대습도 조건에서 수행되는 식물 종자의 살균 방법.

청구항 8

삭제

청구항 9

삭제

청구항 10

삭제

청구항 11

삭제

청구항 12

삭제

청구항 13

삭제

청구항 14

삭제

명세서

기술분야

- [0001] 본 발명은 이산화염소 기체를 이용한 식물 종자의 살균 방법 및 이산화염소 기체를 이용한 식물 종자의 살균 장치에 관한 것이다.

배경기술

- [0002] 새싹채소는 저칼로리, 저지방 식품으로 높은 영양학적 가치를 인정받아, 2002년 이후 연평균 국내생산량이 24%의 증가를 보이는 채소류로, 선진국에서는 새싹채소가 이미 채소시장에서 많은 비중을 차지하고 있다. 새싹채소는 별도의 조리과정이 없이 생식되는 경우가 많기 때문에 새싹채소의 소비가 증가하면서 식중독 발병위험성도 증가하였다.
- [0003] 식중독 집단발병을 일으킨 새싹채소는 대부분 종자상태에서 이미 식중독균에 오염되어 있는 것으로 알려져 있다. 그러므로 새싹종자에서 식중독균과 같은 위해 미생물을 제어하는 것이 중요하다.
- [0004] 또한 새싹채소가 재배되는 환경은 미생물이 성장하기에 적당한 온도와 습도를 제공하기 때문에 새싹채소 종자에 낮은 수준으로 병원균이 오염되어 있다고 하더라도 새싹채소 생산의 최종단계에서 병원균이 높은 수준으로 존재할 수 있다. 그러므로 새싹종자로부터 식중독균을 단순히 저감화하는 것이 아니라, 완전히 제거하는 것이 새싹채소와 관련된 식중독 발생가능성을 줄이는 가장 중요하고 효과적인 방법이라 할 수 있다.
- [0005] 새싹채소 이외에도 위해 미생물 (식물병원세균, 곰팡이)의 오염으로 인한 농작물의 병해는 막대한 경제적 손실을 발생시킨다. 세계적으로 토마토에 발생하는 중요한 세균병인 토마토쾌양병은 1910년 미국에서 처음으로 알려진 후 전세계로 확산되어 큰 피해를 주고 있으며 최근 국내에서 토마토 쾌양병이 발생하여 국내 농가 피해가 증가하고 있다. 토마토쾌양병은 1차적으로 병원성 세균이 감염된 종자를 통해 발생하고, 토마토 재배 시 방제가 어렵고 생산량을 크게 감소시키는 병으로 알려져 있다.
- [0006] 작물에 발생하는 식물병원균의 또 다른 예로, 벼에 발생하는 곰팡이병인 키다리병은 국내에서 2000년도부터 상자옥묘에서 발생하기 시작하여 2005년에 2%, 2006년에 16%, 2007년 33%의 상자옥묘에서 발생하였다. 키다리병을 유발하는 곰팡이 *Fusarium fujukuroi*은 대표적인 벼 종자 전염균으로 종자 내부에 침입하여 존재할 수 있다. 벼에 키다리병이 많이 발생하면 30%까지 수량감소가 될 정도로 심각한 병이므로 이를 방제하기 위하여 철저한 병 씨소독이 필요하다.
- [0007] 종자를 소독하는 대표적인 방법에는 살균수 용액에 일정시간 담그는 침지소독과 냉수와 온수를 이용한 냉수온탕 침법 등이 있다. 살균수로는 차아염소산나트륨, 이산화염소, 오존, 전해수 등의 액체형 살균소독제가 주로 사용되고 있고, 본 발명자들은 저장성과 살균 활성이 향상된 이산화염소 용액의 제조 방법을 특허 등록을 받은 바 있다(대한민국 등록 특허 제10-0973826호). 그러나, 액체형 살균제의 경우, 살균 효과가 제한적이어서 새싹채소의 종자에 오염된 식중독세균을 완전히 살균하는 것이 불가능한 문제점이 있다.
- [0008] 따라서, 식물종자의 발아율에는 영향을 미치지 않으면서 위해 미생물을 완전히 제거하기 위한 종자 살균 방법의 개발이 필요하다.

선행기술문헌

특허문헌

- [0009] (특허문헌 0001) 대한민국 특허 등록 제 10-1083340호

(특허문헌 0002) 대한민국 특허 등록 제10-0973826호

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 본 발명은 이산화염소 기체를 이용한 식물 종자의 살균 방법 및 이산화염소 기체를 이용한 식물 종자의 살균 장치에 관한 것이다.

과제의 해결 수단

[0011] 본 발명은 이산화염소 기체를 식물 종자에 처리하는 것을 포함하는 식물 종자의 살균 방법을 제공한다.

[0012] 본 발명은 또한, 이산화염소 기체 발생부; 식물 종자 처리부; 및

[0013] 상기 이산화염소 기체 발생부에서 발생하는 이산화염소 기체와 상기 식물 종자 처리부에 존재하는 식물 종자를 접촉시키기 위하여, 상기 이산화염소 기체 발생부 및 상기 식물 종자 처리부를 연결하는 연결부를 포함하는 식물 종자 살균 장치를 제공한다.

발명의 효과

[0014] 본 발명에 따르면, 이산화염소 기체를 식물 종자에 처리함으로써, 식물 종자의 발아율에 영향을 미치지 않으면서 종자에 존재하는 위해 미생물을 완전히 제거할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0015] 도 1은 본 발명의 일 예에 따른 식물 종자 살균 장치의 모식도이다.

도 2는 본 발명의 식물 종자 살균 장치의 일 예를 보여준다.

도 3은 본 발명의 식물 종자 살균 장치의 일 예를 보여준다. A는 이산화염소 기체를 생성하기 위한 용기를 보여주고, B는 이산화염소 용액으로부터 생성된 이산화염소 기체를 새싹채소 종자에 적용하는 모습을 보여준다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0016] 본 발명은 이산화염소 기체를 식물 종자에 처리하는 것을 포함하는 식물 종자의 살균 방법을 제공한다.

[0017] 본 발명자들은 식물 종자 내에 존재하는 유해균을 저감화하기 위하여 꾸준히 연구하였고, 그 결과 이산화염소 용액을 이용하여 식물 종자 내에 존재하는 미생물을 저감화하는 기술을 개발하여 특허 등록을 받은 바 있다 (대한민국 등록 특허 제 10-1083340호). 또한, 저장성과 살균 활성이 향상된 이산화염소 용액을 제조하는 방법을 개발하여 특허 등록을 받은 바 있다(대한민국 등록 특허 제10-0973826호). 그러나, 액체형 살균제의 경우, 살균 효과가 제한적이어서 새싹채소의 종자에 오염된 식중독세균을 완전히 살균하는 것이 불가능한 문제점이 있다.

[0018] 이산화염소 기체를 이용하여 식물 종자 내에 존재하는 미생물을 완전히 제거하는 기술에 대해서는 알려진 바 없다. 기존에 알려진 방법과 본 발명에 따른 방법의 살균 효과를 비교한 결과 (실시예 5) 본 발명에 따른 방법이 더 짧은 처리 시간에 의하여 더 높은 살균 효과를 나타냄을 확인할 수 있었다.

[0019] 이산화염소(ClO_2) 기체는 이산화염소 용액으로부터 생성할 수 있고, 이산화염소 용액 및 이를 이용하여 이산화염소 기체를 발생하는 방법은 업계에 잘 알려져 있다.

[0020] 한 구체예에서, 살균의 대상이 되는 식물 종자의 종류는 제한되지 않으나, 예를 들어, 채소 종자 또는 곡물 종자일 수 있다.

[0021] 예를 들어, 채소 종자는 배추, 양배추, 시금치, 상추, 당근, 토마토, 호박, 오이, 고추, 양파, 자운영, 알팔파,

겨자, 경수채, 들깨, 메밀, 적갓, 설채, 홍빛열무, 클로버, 다채, 브로콜리, 콜라비, 레드콜라비, 핑크양배추 및 무의 종자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상 일 수 있다. 또한, 곡물 종자는 벼, 보리, 밀, 콩, 팥, 땅콩, 녹두, 감자, 고구마, 옥수수, 조 및 수수의 종자로 이루어진 군으로부터 선택되는 하나 이상일 수 있다.

[0022] 한 구체예에서, 이산화염소 기체의 처리 농도는 100ppm 내지 500ppm일 수 있다. 상기 농도 범위에서 이산화염소 기체의 식물 종자 살균 효과가 극대화될 수 있다. 100ppm 미만의 농도의 경우, 살균효과가 충분치 못할 수 있다. 이산화염소 기체의 농도가 500ppm을 초과하는 경우, 종자의 발아율이 저하될 수 있다.

[0023] 한 구체예에서, 이산화염소 기체의 처리는 40 내지 85℃, 45 내지 80℃, 50 내지 75℃, 50 내지 70℃, 50 내지 65℃ 또는 50 내지 60℃의 온도 조건에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 이산화염소 기체의 처리 온도는 50 내지 60℃일 수 있다. 이산화염소 기체의 처리 온도가 미생물 살균 효과 및 식물 종자의 발아율에 미치는 영향을 확인한 결과, 상기 온도 범위에서 식물 종자의 발아율에 영향을 미치지 않고, 미생물 살균 효과가 극대화됨을 확인할 수 있었다 (실시예 1).

[0024] 한 구체예에서, 이산화염소 기체의 처리는 30 내지 100%, 40 내지 100%, 50 내지 100%, 60 내지 100%, 70 내지 100%, 80 내지 100%, 또는 90 내지 100%의 상대습도 조건에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 이산화염소 기체 처리는 90 내지 100%의 상대습도 조건에서 수행될 수 있다. 이산화염소 기체의 처리 시, 상대습도가 미생물 살균 효과 및 식물 종자의 발아율에 미치는 영향을 확인한 결과, 상기 범위에서 식물 종자의 발아율에 영향을 미치지 않고, 미생물 살균 효과가 극대화됨을 확인할 수 있었다 (실시예 1).

[0025] 한 구체예에서, 이산화염소 기체의 처리는 상기 범위의 온도 및 상대습도를 조합한 조건 하에서 수행될 수 있다. 예를 들어, 이산화염소 기체의 처리는 50 내지 60℃의 온도 및 90 내지 100%의 상대습도 조건에서 수행될 수 있다. 세 가지 조건을 모두 조합하는 경우, 식물 종자 내에 존재하는 위해 미생물의 저감 효과를 극대화할 수 있다.

[0026] 한편, 식물 종자는 내열성이 강한 종자도 있고, 내열성이 약한 종자도 있다. 내열성이 강한 종자의 경우, 상기 온도 조건의 열처리를 아무런 제한 없이 적용할 수 있으나, 내열성이 약한 종자의 경우 그대로 적용하기에는 발아율에 안 좋은 영향을 미칠 가능성이 있다. 따라서, 내열성이 약한 종자에도 온도 조건을 그대로 적용할 수 있는지 실험하였다. 그 결과, 벼 종자와 같은 내열성이 약한 종자에는 50 내지 60℃의 온도 조건을 그대로 적용하는 경우, 발아율이 떨어지는 문제가 있음을 확인할 수 있었다 (실시예 2).

[0027] 따라서, 고온의 열처리 없이도, 높은 상대습도와 이산화염소 기체 처리만으로도, 내열성이 약한 종자를 효과적으로 무균화 하기 위한 방법을 추가로 연구하였다. 종래의 강산으로부터 생성된 이산화염소 용액으로부터 발생하는 이산화염소 기체는 초기에는 높은 농도의 이산화염소 기체가 발생되지만 시간이 지남에 따라 점차적으로 농도가 감소하는 문제가 있었기 때문에, 지속적으로 이산화염소 기체를 발생시킬 수 있다면, 내열성이 약한 종자를 효과적으로 무균화할 수 있으리라는 가설을 세웠다. 이에, 강산 대신 유기산을 이용하여 이산화염소 용액을 제조하였고, 제조된 이산화염소 용액으로부터 발생된 이산화염소 기체를 이용하여 내열성이 약한 종자의 살균 실험을 수행하였다. 이 때, 상대습도는 높게 유지하였다. 그 결과, 유기산에 의하여 이산화염소 기체가 천천히 지속적으로 발생됨에 따라, 내열성이 약한 벼 종자의 경우도 발아율에 영향을 미치지 않고 무균화할 수 있음을 확인할 수 있었다 (실시예 3).

[0028] 내열성이 강한 채소 종자로는, 예를 들어, 무순, 다채, 들깨, 메밀, 배추, 적갓, 홍빛열무, 새론무, 강화순무 등을 들 수 있다. 내열성이 약한 채소 종자로는, 예를 들어, 알팔파, 겨자, 경수채, 브로콜리, 콜라비, 레드콜라비, 클로버, 핑크양배추 등을 들 수 있다. 종자의 내열성 정도에 따라, 상기의 방법을 적절하게 채용하여 종자를 살균할 수 있다.

[0029] 본 발명은 또한, 이산화염소 기체 발생부; 식물 종자 처리부; 및

[0030] 상기 이산화염소 기체 발생부에서 발생하는 이산화염소 기체와 상기 식물 종자 처리부에 존재하는 식물 종자를 접촉시키기 위하여, 상기 이산화염소 기체 발생부 및 상기 식물 종자 처리부를 연결하는 연결부를 포함하는 식물 종자 살균 장치를 제공한다 (도 1). 본 발명에 따른 식물 종자 살균 장치는 이산화염소 기체를 식물 종자에 접촉시킬 수 있는 형태라면 어떤 구성을 취하여도 무방하다.

[0031] 한 구체예에서, 이산화염소 기체 발생부 및 식물 종자 처리부를 연결하는 연결부는 이산화염소 기체 투입량 조절용 밸브를 추가로 포함할 수 있다. 기체 투입량 조절 밸브를 추가함으로써, 식물 종자에 처리되는 이산화염소

기체의 양을 조절할 수 있다.

[0032] 본 발명은 또한, 외부 용기(10); 및 이산화염소 기체 발생부(22) 및 상기 이산화염소 기체 발생부 상단의 이격된 위치에 구비되는 식물 종자 처리부(24)를 포함하는 내부 용기(20)를 포함하는 식물 종자 살균 장치를 제공한다 (도 2).

[0033] 한 구체예에서, 외부 용기는 밀폐 용기일 수 있다. 밀폐된 용기를 사용하여, 발생된 이산화염소 기체가 외부로 빠져나가는 것을 방지할 수 있다. 외부 용기를 밀폐시키기 위하여, 외부 용기는 뚜껑 (12) 및 클립 (14)을 포함할 수 있다.

[0034] 한 구체예에서, 식물 종자 처리부는 기체 투과성 플레이트를 포함할 수 있다. 기체 투과성 플레이트를 통하여, 이산화염소 기체 발생부로부터 발생한 이산화염소 기체가 식물 종자 처리부에 전달되어, 상기 이산화염소 기체를 식물 종자에 접촉시킴으로써, 식물 종자를 살균할 수 있다.

[0035] 한 구체예에서, 외부 용기 외측에 구비되는 이산화염소 기체 농도 측정부 (30)를 추가로 포함할 수 있다. 이산화염소 기체 농도 측정부는 주입부 (38), 상기 주입부를 연결하는 실리콘 튜브 (32), 밸브 (34) 및 테플론 재질의 스탑콕 (36)을 포함할 수 있다. 이산화염소 기체의 농도를 측정하여, 용기 내의 이산화염소 기체의 농도를 적절하게 유지할 수 있다. 스탑콕은 외부 용기와 주입부 튜브의 연결관이다. 이산화염소 기체의 농도 측정 시, 이산화염소 기체 측정 검지관을 주입부에 삽입하고, 밸브를 열어 이산화염소 기체가 검지관으로 유입될 수 있는 상태로 만들어준다. 검지관의 펌프를 잡아 당겨 용기 내의 이산화염소 기체를 검지관으로 유입시킴으로써, 유입된 이산화염소 기체의 농도를 측정할 수 있다.

[0036] 이하, 본 발명을 실시예 및 실험예를 통해 상세히 설명한다. 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 이들에 한정되는 것은 아니다.

[실시예]

[제조예 1] 식물 종자 살균 장치의 제조

[0039] 이산화염소 기체를 생성하고, 생성된 이산화염소 기체의 농도를 측정하고, 이산화염소 기체를 종자에 처리하기 위한 장치를 개발하였다.

[0040] 이산화염소 기체 생성 및 종자 처리를 위한 장치는 이산화염소 용액으로부터 이산화염소 기체가 발생하는 이산화염소 기체 발생부, 식물 종자를 공급하는 식물 종자 처리부, 상기 이산화염소 기체 발생부로부터 발생한 이산화염소 기체를 상기 식물 종자 처리부에 존재하는 식물 종자에 처리하기 위하여, 상기 이산화염소 기체 발생부 및 상기 식물 종자 처리부를 연결하는 연결부, 및 이산화염소 기체의 농도를 측정할 수 있는 농도측정부로 구분될 수 있다 (도 1 및 도 2).

[0041] 도 3에 실제 실험에 사용한 식물 종자 살균 장치를 도시하였다. 뚜껑을 닫아 밀폐시킬 수 있는 외부용기, 이산화염소 기체 발생부 및 식물 종자 처리부를 포함하는 내부 용기가 있고, 상기 내부 용기 윗면에는 폴리스티렌 (polystyrene) 재질의 디쉬가 존재한다. 상기 디쉬 상에, 발생된 이산화염소 기체가 새싹채소 종자에 처리될 수 있는 기체투과용 채반(lid)이 존재한다. 농도 측정부는 밀폐용기 외부(바닥부분에서부터 7 cm 윗부분)에 테프론 재질의 기체용 코크 마개(6 mm 지름)가 위치한다.

[실험예 1] 상대습도에 따른 이산화염소 기체의 생성량 비교

[0043] 황산(sulfuric acid)용액(5%)과 아염소산나트륨(sodium chlorite) (10,000 $\mu\text{g/ml}$)을 반응시켜 이산화염소 용액을 제조하였다. 이산화염소 기체는 제조된 이산화염소 용액으로부터 자연적으로 기화시켜 생성하였다.

[0044] 상대습도가 이산화염소 기체의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 상대습도를 23% 및 100%로 조절하고, 각 조건에서의 이산화염소 기체의 생성량을 측정하였다. 상대습도를 23%로 조절하기 위하여 도 3에 도시한 바와 같은 식물 종자 살균 장치에 150 ml의 아세트산칼륨(potassium acetate) 포화용액을 넣었다. 상대습도를 100%로 조절하는 경우에는 150 ml의 물을 밀폐용기에 넣었다. 포화용액이나 물을 넣은 후, 밀폐용기를 닫고, 24시간 동안 상온에서 저장하였다.

[0045] 밀폐용기의 상대습도를 23% 또는 100%로 조절한 후, 황산기반의 이산화염소 용액(sulfuric acid-sodium chlorite solution) 0.33 ml을 용기의 이산화염소 기체발생부에 넣고, 25℃에서 0, 1, 2, 6시간 동안 저장하면서 발생된 이산화염소 기체의 농도를 측정하였다. 이산화염소 기체의 농도는 ClO₂ 기체 검출 펌프와 검지관(model 8 H 또는 23 M; Gastec Corporation, Tokyo, Japan)을 이용하여 측정하였다.

[0046] 그 결과를 하기 표 1에 나타내었다. 이산화염소 용액으로부터 자연 발생된(기화된) 이산화염소 기체의 농도는 100% 상대습도 조건과 비교하여, 상대습도가 23%일 때 유의적으로 높은 농도가 유지되는 것을 알 수 있었다.

[표 1]

상대습도 (%)	밀폐용기 내의 ClO ₂ 기체의 농도(ppm)			
	0 h	1 h	2 h	6 h
23	0.0±0.0	100.0±0.0	82.5±3.5	42.5±3.5
100	0.0±0.0	95.0±7.1	52.5±3.5	27.5±3.5

[0048] [실험예 2] 온도에 따른 이산화염소 기체의 생성량 비교

[0049] 온도가 이산화염소 기체의 생성에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실험예 1에서와 동일한 방법으로 이산화염소 용액을 제조하여, 25℃ 또는 55℃로 조절된 밀폐용기에 저장하였다. 제조된 이산화염소 용액으로부터 발생한 이산화염소 기체의 농도를 측정하였다.

[0050] 그 결과를 하기 표 2에 나타내었다. 25℃보다 55℃에서 이산화염소 기체의 농도가 빠르게 상승하지만, 시간이 지나면서 용기 내 이산화염소 기체의 농도는 25℃에서 좀 더 높게 나타남을 알 수 있었다.

[표 2]

온도 (°C)	밀폐 용기 내의 ClO ₂ 기체의 농도(ppm)					
	0 h	0.5 h	1 h	2 h	4 h	6 h
25	0.0±0.0	100.0±0.0	120.0±0.0	110.0±0.0	91.7±2.9	71.7±2.9
55	0.0±0.0	120.0±0.0	110.0±0.0	93.3±5.8	66.7±2.9	46.7±2.9

[0052] [실시에 1] 이산화염소 기체를 이용한 내열성 강한 종자의 무균화

[0053] [실시에 1-1] 이산화염소 기체와 높은 상대습도의 조합처리가 무순 종자의 살균 및 발아율에 미치는 영향 확인

[0054] 실험예 1에서와 동일한 방법으로 이산화염소 용액을 제조하였으며, 상대습도를 각각 23%와 100%로 조절하여, 24시간 동안 상온에서 저장하였다. 상대습도가 23% 또는 100%로 조절된 밀폐용기에 무순 종자를 25℃에서 24시간 동안 저장하여, 무순 종자의 수분활성도를 0.23과 1.0으로 조절하였다. 그 후, 0.33 ml의 황산기반의 이산화염소 용액을 이용하여 이산화염소 기체를 발생시켰다.

[0055] 상대습도가 23% 또는 100%인 조건에서 무순 종자(10 g)를 이산화염소 기체에 25℃에서 0, 1, 2, 6시간 동안 처리한 후, 무순 종자에 존재하는 중온성 세균의 개체수를 평판도말법(spread plating method)을 이용하여 측정하였다. 이산화염소 기체를 처리하지 않은 균을 대조군으로 하였다. 구체적으로, 0, 1, 2, 6시간 후, 5 g씩 무순 종자를 채취하여 균질기봉지(stomacher bag)에 TSB(trypic soy broth) 25 ml과 함께 넣고 균질기를 이용하여 1분간 균질화시켰다. 이를 멸균된 시험관에 담은 후, 0.1% 펄톤수를 이용하여 단계적으로 희석하였다. 시간에 따른 중온성 세균의 개체수를 확인하기 위하여 희석한 용액을 각각 TSA(trypic soy agar)에 도말하고 37℃에서 24시간에 배양한 후 형성된 집락수를 측정하였다.

[0056] 그 결과를, 하기 표 3에 나타내었다. 23%의 상대습도와 비교하여, 100%의 상대습도에서 이산화염소 기체는 유의적으로 높은 살균력을 보였다. 즉, 23%의 상대습도에서 이산화염소 기체에 6시간 동안 노출시킨 경우, 무순 종

자에 남아있는 중온성 세균의 개체수는 2.4 log CFU/g이었지만, 100%의 상대습도에서 이산화염소 기체에 6시간 동안 노출시킨 경우에는 중온성 세균의 개체수가 1.2 log CFU/g으로 10배 이상의 살균능력의 차이를 보였다.

[표 3]

상대습도 (%)	처리	중온성 세균의 개체수 (log CFU/g)				
		초기	처리 시간 (h)			
			0	1	2	6
23	대조군	3.7±0.0	3.7±0.0	3.8±0.1	3.8±0.0	3.7±0.0
	ClO ₂ 기체	3.7±0.0	3.7±0.0	3.1±0.0	2.9±0.1	2.4±0.0
100	대조군	3.7±0.0	3.8±0.0	3.7±0.1	3.7±0.0	3.7±0.0
	ClO ₂ 기체	3.7±0.0	3.8±0.0	2.5±0.5	1.7±0.1	1.2±0.2

이러한 결과는 상대습도 100%일 때, 이산화염소 기체의 살균 효과가 10배 이상 우수하다는 것을 의미한다.

한편, 이산화염소 기체 및 상대습도가 무순 종자의 발아율에 미치는 영향을 확인하였다. 23% 또는 100%인 조건에서 무순 종자(10 g)를 이산화염소 기체에 25℃에서 0, 1, 2, 6시간 동안 처리한 후, 무순 종자의 발아율을 측정하였다. 각 처리 시간마다 무순 종자 100 개를 멸균된 거즈가 깔려있는 재배틀(phytohealth jar, 120 X 80 mm)에 골고루 잘 퍼주었다. 이때 멸균된 스푼을 이용하여 종자를 옮겨 주며, 재배틀에 미리 살균 처리된 1차 증류수를 담아 두었다. 종자를 25℃에서 5일간 재배한 후, 100 개의 종자 중 발아된 무순 종자의 수를 측정하였다. 발아율은 100개의 종자 중 발아된 종자 수를 측정하여 그 값을 100으로 나눠서 계산하였다.

그 결과를 하기 표 4에 나타내었다. 무순 종자의 발아율은 종자에 적용된 상대습도 또는 이산화염소 기체 농도와 관계없이 96.0%-99.0%로 유지되었다.

[표 4]

상대습도 (%)	처리	발아율 (%)				
		초기	처리 시간 (h)			
			0	1	2	6
23	대조군	98.5±0.7	96.0±1.4	97.5±0.7	97.5±0.7	96.0±1.4
	ClO ₂ 기체	98.5±0.7	96.0±1.4	96.5±0.7	96.0±1.4	98.5±0.7
100	대조군	98.5±0.7	97.0±2.8	99.5±0.7	96.5±0.7	96.5±0.7
	ClO ₂ 기체	98.5±0.7	97.0±2.8	98.0±1.4	99.0±0.0	96.5±2.1

이러한 결과는, 상대습도 및 이산화염소 기체의 조합처리가 무순 종자의 발아율에 영향을 미치지 않음을 의미한다.

[실시예 1-2] 이산화염소 기체와 열처리의 조합처리가 무순 종자의 살균 및 발아율에 미치는 영향 확인

온도가 무순 종자의 살균 및 발아율에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 실험예 1에서와 동일한 방법으로 이산화염소 용액을 제조하여, 25℃ 또는 55℃의 다른 온도 조건에서 저장하였다.

온도 조건을 달리한 것을 제외하고 실시예 1-1과 동일한 방법으로 무순 종자에서 형성된 중온성 세균의 개체수를 측정하였다. 이산화염소 기체를 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하였다.

그 결과를, 하기 표 5에 나타내었다. 25℃ 보다 55℃에서 중온성미생물의 살균효과가 더 좋았다. 즉, 25℃에서 이산화염소 기체를 처리한 경우에는 약 6시간의 처리 후에도 약 2.2 log CFU/g의 중온성 세균이 존재하였다. 하지만, 55℃에서 이산화염소 기체를 처리한 경우에는 약 4시간 만에 완전 멸균되었다.

[표 5]

온도 (°C)	처리	중온성 세균의 개체수 (log CFU/g)					
		처리 시간 (h)					
		0	0.5	1	2	4	6
25	대조군	3.7±0.0	3.6±0.0	3.6±0.1	3.6±0.0	3.6±0.0	3.6±0.0
	ClO ₂ 기체	3.7±0.0	3.5±0.0	3.3±0.0	2.8±0.1	2.5±0.1	2.2±0.1
55	대조군	3.7±0.0	3.6±0.1	3.6±0.0	3.6±0.0	3.6±0.0	3.6±0.0
	ClO ₂ 기체	3.7±0.0	2.7±0.1	1.8±0.3	<0.8±0.2	- ^a	-

^a 중온성 세균이 증균배양 후에도 검출되지 않음 (완전 멸균됨).

이러한 결과는 이산화염소 기체와 열처리를 조합하는 경우, 무순 종자내 중온성세균에 대한 살균시너지 효과가 있다는 것을 의미한다.

또한, 온도 조건을 달리한 것을 제외하고 실시예 1-1과 동일한 방법으로 무순 종자의 발아율을 측정하였다.

그 결과를, 하기 표 6에 나타내었다. 모든 조건에서 무순 종자의 발아율은 감소하지 않았다.

[표 6]

온도(°C)	발아율 (%)					
	처리 시간 (h)					
	0	0.5	1	2	4	6
25	96.7±2.3	96.5±1.5	96.3±2.1	98.3±2.1	98.0±1.7	98.3±1.5
55	96.7±2.3	97.0±2.6	96.3±1.5	99.0±1.7	98.3±1.5	97.7±2.5

이러한 결과는, 무순 종자 발아율에 온도(55°C)와 이산화염소 기체의 조합처리가 영향을 미치지 않음을 의미한다.

[실시예 1-3] 이산화염소 기체, 상대습도 및 열처리의 조합처리가 무순 종자의 살균 및 발아율에 미치는 영향 확인

상대습도 및 열처리의 조합처리가 이산화염소 기체의 무순 종자의 살균 및 발아율에 미치는 영향을 확인하였다. 이산화염소 기체를 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하였다.

상대습도를 100%로 조절하기 위하여 밀폐용기에 150 ml의 멸균 된 물을 밀폐용기에 넣고, 무순 종자(10 g)를 25 °C에서 24시간 저장하여, 무순 종자의 수분활성도를 1.0으로 조절하였다. 그 후, 55°C에서 0.33 ml의 황산기반 이산화염소 용액으로부터 이산화염소 기체를 발생시켰다. 55°C, 상대습도가 100%인 조건에서 무순 종자(10 g)를 이산화염소 기체에 0, 1, 2, 6, 12시간 동안 처리한 후, 무순 종자에 존재하는 중온성 세균의 개체수를 평판도 말법을 이용하여 측정하였다. 각각 0, 1, 2, 6, 12시간 후, 5 g씩 샘플을 채취하여 균질기 봉지에 TSB 25 ml과 함께 넣고 균질기를 이용하여 1분간 균질화시켰다. 이를 멸균된 시험관에 담은 후, 0.1% 펩톤수를 이용하여 단 계적으로 희석하고 시간에 따른 중온성 세균의 개체수를 확인하기 위하여 희석한 용액을 TSA에 도말한 후, 각각 37°C에서 24시간 배양한 후 형성된 집락수를 측정하였다.

그 결과를 하기 표 7에 나타내었다. 이산화염소 기체를 처리한 경우, 약 2시간 만에 무순 종자를 멸균시킬 수 있었다.

[표 7]

처리	중온성 세균의 개체수 (log CFU/g)				
	처리 시간 (h)				
	0	1	2	6	12
대조군	3.7±0.0	4.0±0.3	3.7±0.0	3.8±0.1	3.7±0.0
ClO ₂ 기체	3.8±0.0	1.5±0.6	- ^a	-	-

^a 중온성 세균이 증균배양 후에도 검출되지 않음 (완전 멸균됨).

이는, 표 5의 이산화염소 기체와 열처리의 조합효과와 비교할 때, 높은 상대습도 조건을 추가로 적용함으로써 무순 종자를 멸균시키는 시간이 약 절반으로 단축됨을 의미한다.

또한, 상대습도가 100%이고 온도가 55℃로 조절된 밀폐용기 안에서 무순 종자(10 g)를 이산화염소 기체에 0, 1, 2, 6, 12 시간 동안 처리한 후, 무순 종자의 발아율을 측정하였다.

그 결과를 하기 표 8에 나타내었다. 12시간 처리하는 동안 무순 종자의 발아율은 감소하지 않았다.

[표 8]

처리	발아율 (%)				
	처리 시간 (h)				
	0	1	2	6	12
대조군	97.0±2.8	95.5±0.7	95.0±0.0	97.5±2.1	96.0±2.8
ClO ₂ 기체	97.0±2.8	99.5±0.7	97.5±0.7	97.5±3.5	96.0±2.8

이는, 상대습도 및 열처리를 조합한 경우에도, 무순 종자의 발아율에는 영향을 미치지 않음을 의미한다.

[실시예 2] 이산화염소 기체, 높은 상대습도 및 열처리의 조합처리가 내열성이 약한 종자의 살균 및 발아율에 미치는 영향 확인

실시예 1의 무순 종자와 같은 내열성 강한 종자의 살균법이 벼 종자와 같은 내열성이 약한 종자에도 동일하게 적용될 수 있는지 알아보기 위하여, 높은 상대습도와 고온 조건에 따른 벼 종자의 살균 및 발아율을 측정하였다. 이산화염소 기체를 처리하지 않은 경우를 대조군으로 하였다.

상대습도를 100%로 조절하기 위하여 밀폐용기에 150 ml의 멸균 된 물을 밀폐용기에 넣고, 벼 종자(10 g)를 25℃에서 24시간 동안 저장하여, 벼 종자의 수분활성도를 1.0으로 조절하였다. 그 후, 55℃에서 0.33 ml의 황산기반 이산화염소 용액으로부터 이산화염소 기체를 발생시켰다.

상대습도가 100%인 조건에서 벼 종자(10 g)를 이산화염소 기체에 55℃에서 0, 2, 6, 12, 24시간 동안 처리한 후, 벼 종자에 존재하는 중온성 세균의 개체수를 평판도말법을 이용하여 측정하였다. 각각 0, 2, 6, 12, 24시간 후, 5 g씩 샘플을 채취하여 균질기 봉지에 TSB 50 ml과 함께 넣고 균질기를 이용하여 2분간 균질화시켰다. 이를 멸균된 시험관에 담은 후, 0.1% 펩톤수를 이용하여 단계적으로 희석하고 시간에 따른 중온성 세균의 개체수를 확인하기 위하여 희석한 용액을 TSA에 도말한 후, 37℃에서 24시간 배양한 후 형성된 집락수를 측정하였다.

[0089] 그 결과를 하기 표 9에 나타내었다. 벼 종자의 초기 중온성 세균의 개체수는 약 7.7 log CFU/g이었고, 세 가지 스트레스(이산화염소 기체, 높은 상대습도, 고온)를 조합한 조건에서 24시간 처리한 경우에도 약 3.9 log CFU/g의 중온성 세균이 남아 있었다.

[표 9]

처리	중온성 세균의 개체수 (log CFU/g)				
	처리 시간 (h)				
	0	2	6	12	24
대조군	7.7±0.1	7.8±0.1	7.5±0.0	7.0±0.0	6.4±0.0
ClO ₂ 기체	7.7±0.1	6.7±0.0	6.0±0.4	4.5±0.2	3.9±0.1

[0090]

[0091] 또한, 온도 55℃, 상대습도가 100%인 조건에서 벼 종자(10 g)를 이산화염소 기체에 처리한 후, 무균 종자의 발아율을 측정하였다. 각 처리 시간마다 벼 종자 100 개를 멸균된 거즈가 깔려있는 재배틀(255 X 325 X 150 mm)에 골고루 잘 퍼주었다. 이때 멸균된 스푼을 이용하여 종자를 옮겨 주며, 재배틀에 미리 살균 처리된 1차 증류수를 담아 두었다. 종자를 25℃에서 5일간 재배한 후, 100 개의 종자 중 발아된 벼 종자의 수를 측정하였다. 발아율은 100개의 종자 중 발아된 종자 수를 측정하여 그 값을 100으로 나눠서 계산하였다.

[0092] 그 결과를 하기 표 10에 나타내었다. 벼 종자는 열에 민감하게 반응하여 이산화염소 기체, 높은 상대습도, 고온의 세 조합처리를 하였을 경우, 약 2시간 만에 발아율이 86%로 낮아졌다.

[표 10]

처리	발아율 (%)				
	처리 시간 (h)				
	0	2	6	12	24
대조군	98.5±0.7	88.5±0.7	93.5±2.1	89.5±0.7	74.0±1.4
ClO ₂ 기체	98.5±0.7	86.0±1.4	91.4±0.7	87.5±2.1	41.0±4.2

[0093]

[0094] 이러한 결과들은, 벼 종자처럼 열에 민감한 종자들은 상대습도가 높은 조건에서 열처리를 하게 되면 발아율이 빠르게 저하되기 때문에, 이산화염소 기체, 온도 및 습도 조건 사이의 살균시너지를 이용하여 무균종자를 생산할 수 없다는 것을 의미한다.

[0095] [실시예 3] 내열성이 약한 종자의 무균화 방안

[0096] 실시예 2에서 확인한 바와 같이, 내열성이 약한 종자의 경우, 이산화염소 기체의 처리와 함께 고온의 열처리를 조합할 수가 없었다. 특히, 상대습도가 높은 경우엔 열에 의한 종자의 손상이 커지게 되므로, 내열성이 강한 종자에 적용한 “이산화염소 기체+높은 상대습도+고온”의 조합처리가 불가능하였다. 이에, 내열성이 약한 종자를 무균 종자로 만들기 위해서, 온도 조건을 제외한 “이산화염소 기체+높은 상대습도” 조합의 살균력을 극대화하는 것이 필요하다고 결론 내렸다.

[0097] 5% 황산용액과 10,000 µg/ml의 아염소산나트륨을 반응시켜 이산화염소 기체를 자연적으로 발생시킬 경우, 초기엔 높은 농도의 이산화염소 기체가 발생되지만 시간이 지남에 따라 점차적으로 농도가 감소한다(표 1 참조). 그 이유는 황산은 수소이온의 해리상수가 높아서 수소이온을 빠르게 배출하고, 배출된 수소이온이 아염소산나트륨과 반응하여 이산화염소를 생산하는데, 방출된 이산화염소 기체는 자연적으로 분해되거나 플라스틱 용기 표면,

종자표면 등에 흡착되어 사라지기 때문이다.

[0098] 따라서, 이산화염소 용액을 생성시킬 때, 황산이나 염산을 이용하지 않고, 대신 수소이온의 해리상수가 낮은 유기산을 아염소산나트륨과 반응시키면 이산화염소 기체를 천천히 발생시켜, 지속적으로 이산화염소 기체를 생산할 수 있을 것이라 가정하였다.

[0099] [실시예 3-1] 이산화염소 기체의 생성

[0100] 구연산(citric acid) (5%)과 아염소산나트륨 (10,000 $\mu\text{g/ml}$)를 반응시켜 제조한 용액(150 ml)을 밀폐용기의 이산화염소 기체발생부에 넣고, 25℃에서 16일간 저장하면서 발생된 이산화염소 기체의 농도를 ClO_2 gas 측정용 펌프와 검지관 (model 8 H, 23 M; Gastec Corporation, Tokyo, Japan)를 이용하여 측정하였다.

[0101] 그 결과를 하기 표 11에 나타내었다. 밀폐용기 내의 이산화염소 기체의 농도는 16일간 약 200.0 - 328.6ppm의 범위에서 유지되는 것을 확인하였다.

[표 11]

밀폐 용기 내의 ClO_2 기체의 농도 (ppm)					
저장 시간 (일)					
0	2	4	8	12	16
0.0±0.0	200.0±0.7	262.5±11.2	304.1±16.4	278.1±16.4	248.6±13.0

[0102]

[0103] [실시예 3-2] 높은 상대습도와 지속적으로 생산된 이산화염소 기체의 조합에 의한 무균 벼 종자 생산

[0104] 구연산(5%)과 아염소산나트륨(10,000 $\mu\text{g/ml}$)을 반응시켜 제조한 구연산기반 이산화염소 용액(150 ml)을 밀폐용기의 이산화염소 기체발생부에 넣고, 25℃에서 16일간 저장하면서 이산화염소 기체를 발생시켰다. 상대습도는 구연산기반 이산화염소 용액으로 인하여 자연적으로 100%에 도달되므로, 따로 조절하지 않았다. 이산화염소 기체를 처리하지 않은 균을 대조군으로 하였다.

[0105] 밀폐용기 안에 벼 종자(10 g)를 넣고, 생성된 이산화염소 기체에 최대 16일간 처리하면서, 벼 종자에 존재하는 중온성 세균과 곰팡이/효모의 개체수를 평판도말법을 이용하여 측정하였다. 각각의 샘플을 채취하여 균질기봉지에 TSB 50 ml과 함께 넣고 균질기를 이용하여 2분간 균질화시켰다. 이를 멸균된 시험관에 담은 후, 0.1% 펩톤수를 이용하여 단계적으로 희석하고 시간에 따른 중온성 세균과 곰팡이/효모의 개체수를 확인하였다. 중온성 세균은 TSA 배지에, 곰팡이/효모는 DRBC에 도말하였다. TSA 플레이트는 37℃에서 24시간, DRBC 플레이트는 25℃에서 5일간 배양한 후 형성된 집락수를 측정하였다.

[0106] 그 결과를 하기 표 12(중온성 세균) 및 표 13(곰팡이/효모)에 나타내었다. 표 12는 5% 구연산 용액과 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 아염소산나트륨을 반응시켜 생산한 이산화염소 기체를 처리한 벼 종자의 중온성 세균의 개체수 변화이다. 벼 종자의 초기 중온성 세균의 개체수는 약 8.0 log CFU/g이었고, 이산화염소 기체를 처리하지 않은 경우에는 16일간 개체수 변화가 없었다. 이산화염소 기체를 처리한 경우, 벼 종자의 중온성 세균은 12일 만에 완전 사멸되었다. 표 13은 5% 구연산용액과 10,000 $\mu\text{g/ml}$ 의 아염소산나트륨을 반응시켜 생산한 이산화염소 기체를 처리한 벼 종자의 곰팡이/효모 개체수의 변화이다. 벼 종자의 초기 곰팡이/효모 개체수는 약 6.0 log CFU/g이었고, 이산화염소 기체를 처리하지 않은 경우에는 16일간 개체수 변화가 없었다. 이산화염소 기체를 처리한 경우, 벼 종자의 곰팡이/효모는 8일 만에 완전 사멸되었다.

[표 12]

처리	중온성 세균의 개체수 (log CFU/g)								
	처리 시간 (일)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
대조군	8.0±0.0	7.9±0.3	8.0±0.0	7.9±0.1	8.3±0.0	7.9±0.0	8.0±0.1	8.0±0.3	8.0±0.2
ClO ₂ 기체	8.0±0.0	4.6±0.2	3.1±0.1	2.1±0.1	1.5±0.0	0.3±0.6	- ^a	-	-

^a 중온성 세균이 증균배양 후에도 검출되지 않음 (완전 멸균됨).

[표 13]

처리	곰팡이/효모의 개체수 (log CFU/g)								
	처리 시간 (일)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
대조군	6.0±0.0	5.8±0.2	5.9±0.1	5.6±0.0	5.8±0.0	5.5±0.1	5.7±0.4	5.6±0.1	5.8±0.2
ClO ₂ 기체	6.0±0.0	2.6±0.0	2.0±0.2	0.7±0.6	- ^a	-	-	-	-

^a 중온성 세균이 증균배양 후에도 검출되지 않음 (완전 멸균됨).

이러한 결과는, 높은 상대습도 및 지속적인 이산화염소 기체 처리로 인하여, 내열성이 약한 종자를 무균종자로 만들 수 있음을 의미한다.

또한, 밀폐용기 안에서 벼 종자(10 g)를 넣고, 생성된 이산화염소 기체에 최대 16일간 처리하면서, 벼 종자의 발아율을 측정하였다. 각 처리 시간마다 벼 종자 100 개를 멸균된 거즈가 깔려있는 재배틀(255 X 325 X 150 mm)에 골고루 잘 퍼주었다. 이때 멸균된 스푼을 이용하여 종자를 옮겨 주며, 재배틀에 미리 살균 처리된 1차 증류수를 담아 두었다. 종자를 30℃에서 5일간 재배한 후, 100 개의 종자 중 발아된 벼 종자의 수를 측정하였다. 발아율은 100개의 종자 중 발아된 종자 수를 측정하여 그 값을 100으로 나눠서 계산하였다.

그 결과를 하기 표 14에 나타내었다. 16일 처리하는 동안 90% 이상의 발아율을 보였다.

[표 14]

처리	발아율 (%)								
	처리 시간 (일)								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
대조군	98.0±1.7	96.3±2.1	96.7±0.6	98.3±1.2	98.0±1.7	95.7±1.2	94.3±1.2	93.3±1.0	92.0±0.0
ClO ₂ 기체	98.0±1.7	98.0±1.7	97.3±0.6	95.3±1.2	96.0±1.0	96.0±1.0	92.7±1.2	92.3±1.2	93.0±1.0

종합해 보면, 지속적으로 생산된 이산화염소 기체를 높은 상대습도 조건에서 처리함으로써 벼 종자에 존재하는 곰팡이/효모는 8일만에 완전 사멸시킬 수 있었으며, 발아율도 96% 이상으로 유지되었다. 벼의 생산성을 떨어뜨리는 가장 큰 위해 요인은 키다리병이며, 이 병을 유발하는 식물병원성 진균(곰팡이)인 *Fusarium fujukuroi*은 벼 종자에 존재한다. 따라서, 본 발명을 통하여, 벼 생산 시 발병가능성이 높은 키다리병을 제어할 수 있으며, 키다리병으로 인한 벼의 생산성 저하를 근원적으로 해결할 수 있다. 또한 현재 무균 벼 종자를 생산한 사례는

세계적으로 보고된 바가 없다는 점을 고려할 때, 본 발명의 가치는 더욱 크다고 할 것이다.

[실시예 4] 지속적으로 생산된 이산화염소 기체 처리가 무 종자의 살균 및 발아율에 미치는 영향 확인

[실시예 4-1] 지속적으로 생산된 이산화염소 기체의 무 종자 살균 효과

무 종자에 존재하는 미생물(중온성 일반세균, 곰팡이/효모)에 대한 이산화염소 기체의 살균력을 확인하기 위하여 5%의 구연산 용액(pH 5.0)과 10000 mg/ml의 아염소산 나트륨을 반응시켜 제조한 이산화염소 용액(100ml)으로부터 생성된 이산화염소 기체를 25℃에서 72시간 동안 처리한 종자에 존재하는 중온성 세균(mesophilic aerobic bacteria; MAB)과 곰팡이/효모(molds and yeasts; MY)의 개체수 변화를 확인하였다. 그 결과를 표 15 및 표 16에 나타내었다.

그 결과, 표 15에 나타난 바와 같이, 무 종자에 존재하는 중온성 세균의 초기 개체수는 3.5 log CFU/g이었다. 대조군(이산화염소 기체에 처리하지 않음)의 경우, 저장 초기부터 저장 72시간까지 무 종자 내 중온성 세균의 개체수는 3.5 log CFU/g으로 유지되었다. 이산화염소 기체를 처리한 무 종자의 중온성 세균 개체수는 저장 6시간일 때 2.5 log CFU/g(1 log 감소)이었고, 저장 12시간일 때 1.9 log CFU/g으로 1.6 log cycle이 감소하였다. 24시간 처리구의 경우 증균 배양한 플레이트에서 콜로니를 확인하였다. 이산화염소 기체에 새싹채소 종자를 48시간 이상 처리한 종자에서 중온성 세균은 완전 사멸하였다.

[표 15]

	중온성 세균의 개체수 (log CFU/g)					
	저장 시간 (h)					
	0	6	12	24	48	72
대조군	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5	3.5
ClO ₂ 기체	3.5	2.5	1.9	0.7	- ^a	-

^a 중온성 세균이 증균배양 후에도 검출되지 않음 (완전 멸균됨).

또한, 표 16에 나타난 바와 같이, 무 종자에 존재하는 곰팡이/효모의 초기 개체수는 2.1 log CFU/g이었다. 대조군(이산화염소 기체에 처리하지 않음)의 경우, 저장 초기부터 저장 72시간까지 무 종자 내곰팡이/효모 개체수는 2.1 log CFU/g으로 유지되었다. 이산화염소 기체에 처리한 무 종자의곰팡이/효모 개체수는 처리 6시간일 때 0.7 log CFU/g이었고, 처리 12시간 이상 처리한 경우, 곰팡이와 효모는 완전 사멸하였다.

[표 16]

	곰팡이 /효모의 개체수 (log CFU/g)					
	저장 시간 (h)					
	0	6	12	24	48	72
대조군	2.0	2.1	2.1	2.1	2.1	2.1
ClO ₂ 기체	2.0	0.7	- ^a	-	-	-

^a 중온성 세균이 증균배양 후에도 검출되지 않음 (완전 멸균됨).

[실시예 4-2] 지속적으로 생산된 이산화염소 기체의 무 종자 발아율에 미치는 영향

유기산에 의하여 지속적으로 생산된 이산화염소 기체가 무 종자의 발아율에 미치는 영향을 확인하기 위하여 실시예 4-1에서 생성된 이산화염소 용액으로부터 생성된 이산화염소 기체에 무순 종자를 25℃에서 72시간 처리하면서 처리된 종자의 발아율을 확인하였다.

[0127] 그 결과를 하기 표 17에 나타내었다. 무순 종자의 발아율은 이산화염소 기체와 상관없이 대조군과 이산화염소 기체 처리군 모두 98~100%이었다.

[표 17]

	발아율 (%)					
	처리 시간(h)					
	0	6	12	24	48	72
대조군	100.0	98.0	97.0	100.0	100.0	97.0
ClO ₂ 기체	100.0	100.0	100.0	100.0	97.0	98.0

[0128]

[0129] 이는 지속적으로 생산된 이산화염소 기체의 처리가 무 종자의 발아율에 영향을 미치지 않는 것을 의미한다.

[0130] [실시예 5] 식물 종자 살균 효과에 있어서, 이산화염소 용액의 처리와 이산화염소 기체 처리의 비교

[0131] [실시예 5-1] 무순 종자 살균 효과에 있어서, 이산화염소 용액의 처리와 이산화염소 기체 처리의 비교

[0132] 기존의 이산화염소 용액을 이용한 종자 살균 방법(대한민국 특허 제10-1083340호)에서는 새싹종자에서 식중독균인 *Escherichia coli* 0157:H7 을 완전 사멸시키기 위하여 살균기술을 개발하였다. 이를 위하여 *E. coli* 0157:H7을 접종한 무순 종자를 이산화염소 용액(500 µg/ml)을 5분간 처리한 후, 23%의 상대습도와 45℃의 온도에서 24시간 건조하고, 마지막으로 23%의 상대습도와 70℃의 온도에서 48시간을 처리하였다.

[0133] 그 결과를 하기 표 18에 나타내었다. 결과적으로 *E. coli* 0157:H7을 무순 종자로부터 72시간 만에 멸균시킬 수 있었지만, 본래 무순 종자에 존재하는 중온성 세균과 곰팡이/효모는 멸균시키지 못하였다.

[표 18]

미생물	처리	개체수 (log CFU/g)				
		처리 시간		45°C, 24 h	70°C에서 건열 처리	
		0 min	5 min	동안 건조	24 h	48 h
중온성 세균	물	6.1±0.2	5.7±0.1	5.8±0.6	4.8±0.5	4.1±0.2
	ClO ₂ 용액	6.1±0.2	5.3±0.1	1.3±0.3	1.0±0.0	1.4±0.4
곰팡이/효모	물	3.5±0.5	3.3±0.3	2.3±0.1	2.0±0.6	1.7±0.4
	ClO ₂ 용액	3.5±0.5	1.7±0.3	1.1±0.2	1.6±0.7	1.2±0.2

[0134]

[0135] 이러한 결과를 실시예 1-3의 표 7의 결과와 비교할 때, 기존 방법에 따르면 무순 종자에 존재하는 중온성 세균을 완전히 사멸시킬 수 없지만, 본 발명에 따르면 이산화염소 기체를 높은 상대습도 및 온도 조건에서 처리함으로써, 2시간 만에 무순 종자에 존재하는 중온성 세균을 완전 사멸시킬 수 있다. 즉, 기존 방법에서는 높은 온도 조건(70℃)과 72시간의 처리시간으로도 무균 무순종자를 생산하지는 못하였으나, 본 발명에 따르면 더 낮은 온도(55℃)에서, 더 짧은 처리 시간(2 시간)으로 무균 무순종자를 생산할 수 있다.

[0136] [실시예 5-2] 벼 종자 살균 효과에 있어서, 이산화염소 용액의 처리와 이산화염소 기체 처리의 비교

[0137] 이산화염소 용액과 이산화염소 기체의 처리가 벼 종자의 살균 효과에 미치는 영향을 비교하였다. 기존의 방법(대한민국 특허 제10-1083340호)을 이용하여 벼 종자를 처리한 후, 벼 종자에 존재하는 중온성 세균과 곰팡이/효모 개체수의 변화를 측정하였다. 벼 종자를 500 µg/ml의 이산화염소 용액에 5분간 처리한 후, 23%의 상대습도와 45℃의 온도에서 24시간 건조하고, 마지막으로 23%의 상대습도와 70℃의 온도에서 48시간을 건열 처리하였다.

[0138] 그 결과를 하기 표 19에 나타내었다. 벼 종자에 존재하는 초기의 중온성 세균과 곰팡이/효모의 개체수는 각각

7.9±0.1 log CFU/g과 5.4±0.0 log CFU/g이었으며, 5분간 이산화염소 용액에 처리된 직후에는 약 7.2±0.1 log CFU/g와 4.3±0.1 log CFU/g로 감소되었고, 24시간 건조 후에는 다시 중온성 세균과 곰팡이/효모의 개체수가 각각 5.7±0.2 log CFU/g와 3.7±0.3 log CFU/g로 감소하였다. 최종적으로 70℃의 온도에서 48시간 열처리를 한 후에는 벼 종자에 중온성 세균은 5.0±0.0 log CFU/g가 남았고, 곰팡이/효모는 2.6 log CFU/g가 남았다.

[표 19]

미생물	처리	개체수 (log CFU/g)				
		처리 시간		45℃, 24 h 동안 건조	70℃에서 건조처리	
		0 min	5 min		24 h	48 h
중온성 세균	물	7.9±0.1	7.7±0.1	7.8±0.1	6.9±0.1	6.2±0.1
	ClO ₂ 용액	7.9±0.1	7.2±0.1	6.7±0.2	5.7±0.2	5.0±0.0
곰팡이/효모	물	5.4±0.0	5.4±0.1	5.3±0.4	3.9±0.2	2.8±0.0
	ClO ₂ 용액	5.4±0.0	4.3±0.1	3.7±0.3	3.0±0.2	2.6±0.1

[0139]

[0140]

이러한 결과를 실시예 3-2의 표 12 및 표 13의 결과와 비교할 때, 기존 방법에 따르면 벼 종자에 존재하는 일반 세균을 완전히 사멸시킬 수 없지만, 본 발명에 따르면 높은 상대습도 조건에서 지속적으로 생산한 이산화염소 기체를 처리함으로써 벼 종자의 중온성 세균을 12일만에 완전 사멸시켰고, 곰팡이/효모는 8일 만에 완전 사멸시킬 수 있었다.

[0141]

즉, 기존 방법에 따라 벼 종자를 처리하였을 경우, 무균 벼 종자를 생산하지 못했고, 특히 중온성 세균은 높은 수준(5.0 log CFU/g)으로 잔류하였다. 또한 벼의 가장 중요한 위해인자인 곰팡이/효모 개체수도 2.6 log CFU/g이 생존하였다. 그러나, 본 발명에 따르면 무균 벼 종자를 생산할 수 있다.

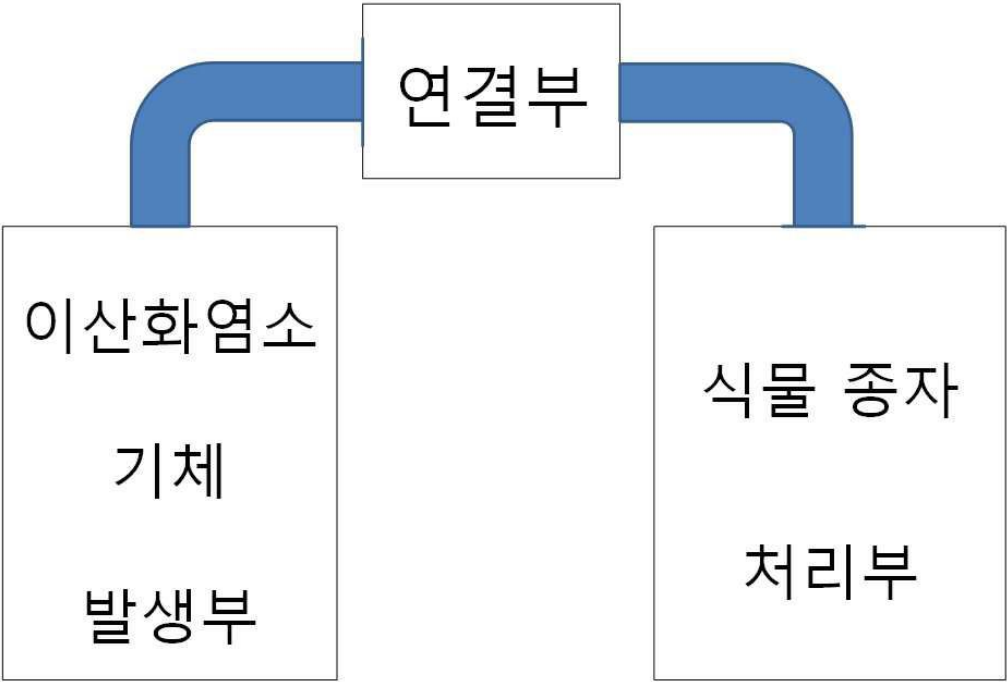
부호의 설명

[0142]

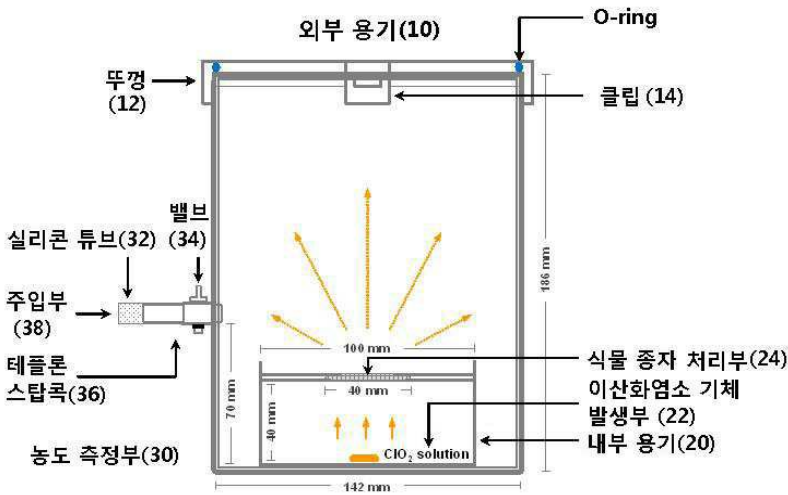
10: 외부 용기 12: 뚜껑 14: 클립
20: 내부 용기 22: 이산화염소 기체 발생부 24: 식물 종자 처리부
30: 이산화염소 기체 농도 측정부 32: 실리콘 튜브 34: 밸브
36: 테플론 스탑콕 38: 주입부

도면

도면1



도면2



도면3

