

## 열처리에 의한 콩나물 탄저병의 방제

이정한<sup>1</sup> · 한기수<sup>1</sup> · 김태형<sup>1</sup> · 배동원<sup>3</sup> · 김동길<sup>1,4</sup> · 강진호<sup>2,4</sup> · 김희규<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>경상대학교 농업생명과학대학 응용생물환경학과, <sup>2</sup>경상대학교 농업생명과학대학 농학과,

<sup>3</sup>경상대학교 공동실험실습관, <sup>4</sup>경상대학교 생명과학 연구원

### Establishment of Technology for Preventing the Soybean Sprout *Colletotrichum gloeosporioides* Rot

Jung Han Lee<sup>1</sup>, Ki Soo Han<sup>1</sup>, Tae Hyoung Kim<sup>1</sup>, Dong Won Bae<sup>3</sup>, Dong Kil Kim<sup>1,4</sup>,  
Jin Ho Kang<sup>2,4</sup> and Hee Kyu Kim<sup>1,4\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Applied Biology & Environmental Sciences, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>2</sup>Department of Agronomy, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>3</sup>Central Laboratory, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>4</sup>Research Institute of Life Science, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

(Received on March 16, 2007)

Anthracnose fungus was most pathogenic on soybean sprout, of the fungi and bacteria isolated from rotten sprout on market. Bacterial strains associated were not virulent. Dry heat (DHT) applied even as high as 65°C for 30 min. was not effective enough to eliminate the artificially inoculated *Colletotrichum gloeosporioides* propagules from seedlots. Hot water immersion treatment (HWT), at elevated temperature of 55°C for 20 min, did eliminate the pathogen but reduced seed germinating and retarded sprout growth: Seed germination was practically acceptable when the seedlots were exposed to at 55°C for 5 min, but about 20% anthracnose propagules survived. Accordingly, we have optimized the HWT scheme for 5 min at 60°C. This scheme was validated, at small to large scale production system, that surely rule out the possible carry over of the bacterial contaminant from seedlots. This result should improve the shelf-life of soybean sprout on the market.

**Keywords :** *Colletotrichum gloeosporioides*, Dry heat treatment (DHT), Hot water immersion treatment (HWT), Soybean sprout

콩나물은 우리민족 고유의 채소로 오랫동안 애용해왔으며, 최근에는 콩나물 산업발달로 시장규모가 연간 7,000억 원 정도에 달하고 있다. 콩나물을 대량으로 재배하면서 부패 증상이 많이 발생하게 되었고, 그 방제를 위해서 과거에는 유기수은제나 호마이 등의 농약처리로 부패 증상을 방제해왔으나, 최근 농약사용 규제로 인하여 적절한 방제수단의 개발이 요구되고 있는 실정이다. 콩나물 부패에 관여하는 균으로 탄저병균이 주로 확인되고 있지만 (김 등, 2002), 그 외에도 콩나물 재배 과정에서 종자의 변색, 발아 저해, 자엽의 무름증상 및 하배축 신장이 억

제되는 *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 세균성 무름병(박 등, 1997a)과 *Pseudomonas putida* biovar. A에 의해 세균성 부패병(박 등, 1997b)이 알려져 있다. 세균성 부패병 방제를 위해서는 acetic acid, propionic acid의 종자 침지처리와 인산염을 이용한 산성수(pH3) 관수 방법이 효과가 있는 것으로 알려져 있다(박과 최, 1995; 박 등, 1997b). 그러나 이들의 결과는 세균성 부패병일 경우에만 효과를 기대할 수 있는 방법으로 진균인 *Colletotrichum gloeosporioides*에 의한 탄저병은 산이나 염을 종자나 콩나물에 처리하는 방법으로는 완벽한 방제를 기대하기 어려울 것으로 예상되었다. 유통 중인 콩나물은 재배 특성상 항상 병원균 증식에 유리한 다습 조건 하에서 생산되므로 콩나물 종자의 무공해 종자소독 기술이 필

\*Corresponding author

Phone) +82-55-751-5443, Fax) +82-55-758-5110

E-mail) heekkim@nongae.gsnu.ac.kr

요하다. 식물병원균의 열처리에 관한 연구결과는 많지 않다. Lychee fruit 탄저병균(*C. gloeosporioides*)의 균사 및 분생포자의 사멸온도는 각각 60°C에서 30분, 50°C에서 10분(Liu 등, 2005)이 걸리는데 비하여 *Pythium*, *Phytophthora* 및 *Fusarium* 등 토양전염성 병원균은 44~54°C에서 사멸한다는 결과(Runia와 Amsing, 2005)가 알려져 있다. 본 연구에서는 이들 결과를 바탕으로 콩나물 콩 종자소독 방법으로서 열처리 방법을 개발하고, 부패관련 미생물의 살균 및 콩나물 탄저병 억제효과를 검증한 결과를 보고하고자한다.

## 재료 및 방법

**공시재료.** 본 실험에 공시한 콩나물 탄저병 균주는 진주, 사천 및 포항에서 수집한 콩나물 탄저병이 발생한 시료에서 분리한 콩나물 탄저병균을 사용하였고 콩나물콩의 품종은 준저리를 공시하여 실험하였다.

**열처리에 따른 탄저병원균 포자의 사멸효과 검증.** 공시한 콩나물 탄저병균 분생포자의 습열처리를 위하여 E-tube에 증류수를 950  $\mu$ l씩 넣고 수온을 55, 60, 65°C로 조절한 후,  $2 \times 10^3$  conidia/50  $\mu$ l의 분생포자 현탁액을 첨가하였다. 분생포자 현탁액은 각각의 온도 처리에서 5분이 경과한 후부터 5분 간격으로 50  $\mu$ l씩 취하여 PDA 배지에 도말 배양하였다. 도말한 배지는 25°C에서 배양하고 나타난 colony 수를 조사하였다. 건열처리는  $2 \times 10^3$  conidia로 포자 농도를 조절한 20  $\mu$ l의 분생포자현탁액을 filter paper disk(직경 0.8 cm)에 처리하고 상온에서 1차 건조 후, 55, 60, 65°C의 건조기에 보관하면서 5분부터 30분까지 5분 간격으로 filter paper disk를 꺼내어 증류수 1 ml에 넣고 vortexing한 후 50  $\mu$ l를 PDA 배지에 도말하고 위에서 동일한 조건에서 배양한 후, colony 수를 조사하였다.

**열처리에 의한 콩나물 생장 조사.** 콩종자를 5부터 30분까지 5분 간격으로 55, 60, 65°C에서 각각 건열, 습열처리한 후 3일간 재배하여 종자발아 및 하배축 기형발생 여부를 조사하였다.

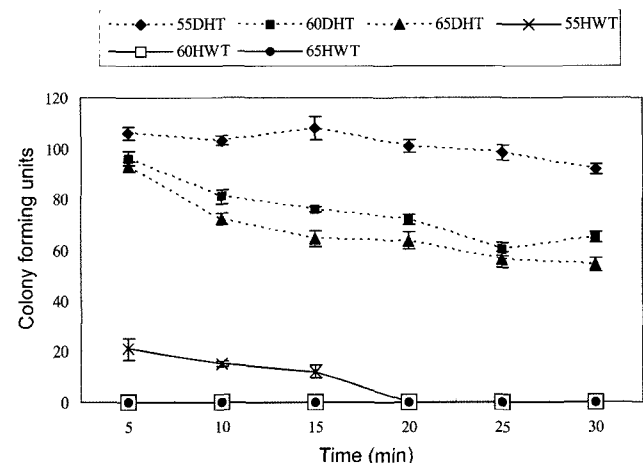
**부패관련 세균 사멸효과 조사.** 콩나물 부패증상에서 분리된 세균 *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas putida*는  $10^4$  cfu/ml 농도의 현탁액에 종자를 5분간 침지한 후 60와 65°C에서 건열처리 30분, 습열처리 5분간 실시하여, 처리된 종자 3개를 1 ml의 증류수에 넣어 Vortexing한 후 50  $\mu$ l를 TSA 배지에 도말하여 배양하였다.

**대량생산 모형의 적용.** 분생포자 현탁액( $1 \times 10^3$  conidia/ml)에 종자를 5분간 침지처리한 후 상온에서 건조시키고

65°C에서 5분간 습열처리하였다. 처리된 종자를 하면 담수 방식으로 실험실 규모(4시간마다 5분간 담수)와 실제 대량 생산 방법(강 등, 2003, 특허 제 0382558호)으로 7일간 콩나물을 재배하여 부패방지 효과를 검증하였다.

## 결과 및 고찰

**열처리에 대한 병원균의 사멸효과.** 열에 대한 탄저병원균 포자는 건열처리 경우 온도와 시간에 따라 병원균의 생존수가 줄어드는 듯하나 65°C에서 30분까지 처리하여도 50% 이상 생존하여 살균효과가 낮은 것으로 나타났다. 이에 반해 습열처리는 55°C에서 20분 이상 처리하면 병원균이 완전히 사멸하였다(Fig. 1). 그러므로 전염원 살균처리 방법으로 건열처리보다는 습열처리가 콩나물 탄저병방제에 더 효율적일 것으로 판단된다. Lychee fruit에서 분리한 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.의 포자 및 균사의 사멸온도는 각각 50°C에서 10분, 60°C에서 30분(Liu 등, 2005)이라고 하였으나 본 시험의 경우 콩나물 탄저병 포자는 60°C에서 5분 처리로 비슷한 경향을 보였다. 탄저병 외에 다른 균의 사멸온도로 담배에 모잘록병을 일으키는 *Pythium ultimum*과 *Rhizoctonia solani*의 열에 대한 생존 시간을 조사한 결과, *P. ultimum*의 경우 46°C에서 45분까지 생존하였고 90분 노출 시에는 생존이



**Fig. 1.** Colony forming units *in vitro* of hot water immersion treatment (HWT) and dry heat treatment (DHT) on *C. gloeosporioides in vitro*. E-tubes carrying 950  $\mu$ l distilled water were exposed to temperature ranges of 55–65°C at 5°C intervals in hot block to which the conidial suspension ( $2 \times 10^3$  conidia/50  $\mu$ l) were added for HWT. For DHT, 0.8 cm filter paper discs were immersed in conidial suspensions ( $2 \times 10^3$  conidia/20  $\mu$ l) by vortexing for 2 min and air dried under sterile condition in clean bench for 1 h, prior to heat treatment followed by retrieval of pathogen. Values are means of three replicates and bars represent standard deviation.

불가능하였으며, 50°C에서는 3분까지 생존하였고, 50°C 이상의 온도에서는 1분 안에 모두 사멸하였다. *R. solani*의 경우에는 이보다 더 높은 온도로 60°C에서 1분이 사멸온도라고 보고된 바 있다(Gayed 등, 1978). 본 실험의 콩나물 탄저병 분생포자 사멸온도와 비교하여 볼 때 상당히 낮은 온도와 시간 범위에서 *P. ultimum*과 *R. solani* 모두 사멸하는 것을 알 수 있는데 두 병원균 모두 토양 전염성으로 태양열 토양 소독법으로 효과적으로 제거할 수 있음을 나타낸다. 따라서 식물의 지상부를 주로 감염하는 탄저병과는 차이가 인정되었다. 탄저병 발생 시기가 주로 고온 다습할 때 많이 발생한다는 점을 미루어 보면 모잘록병보다 고온에 더 잘 견딜 수 있는 균으로 판단된다.

**Table 1.** Fungal and bacterial isolates associated with soybean sprout rot and pathogenicity

Isolate (number)	Local	Pathogenicity <sup>a</sup>
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Jinju, Gyeongju, Iksan, Pohang, Cheongyang	+
<i>Micrococcus luteus</i>	Jinju	-
<i>Enterobacter cloacae</i>	Jinju	-
<i>Pseudomonas putida</i>	Jinju	-

Fungal and bacterial strains associated with soybean sprout rot was isolated from samples from Jinju, Gyeongju, Iksan, Pohang, and Cheongyang and cultured on PDA and/or TSA at 27°C, which were identified by morphological characteristics and MIDI gas chromatography. Soybean seedlots were submerged in bacterial and/or conidial suspension ( $10^{6-7}$  cells/ml,  $10^{3-4}$  conidia/ml, respectively) for 5 min and dried at ambient temperature in clean bench for 1 h. The artificially infested seeds were subjected to small scale production procedure to confirm pathogenicity.

<sup>a</sup>-, avirulent; +, highly pathogenic.

**콩나물 생장에 미치는 열처리의 영향.** 열처리에 의한 콩종자의 발아 및 하배축의 생장에 미치는 영향을 조사한 결과 건열처리와 습열처리 모두에서 콩종자의 발아 및 하배축의 생장에 영향을 미치는 것으로 나타났다. 건열처리에 의한 스트레스는 65°C에서 25분과 30분, 60°C에서 30분 처리부터 종자발아 및 하배축 기형이 나타났고, 습열처리는 건열처리보다 더 낮은 온도와 짧은 시간인 55°C와 60°C 10분 후 그리고 65°C에 5분 처리 후 종자발아 및 하배축 기형이 나타났다(Table 2). 열처리에 대한 병원균의 내성 조사와 콩나물 성장결과를 종합하면 탄저병이 사멸하면서 콩나물 생장에 영향을 주지 않는 60°C에서 5분간 습열처리하는 것이 효율적이라 생각된다. Weiss와 Hammes(2005)는 무와 알팔파 종자를 50°C~65°C 범위에서 분 단위로 습열처리하여 발아 실험한 결과 온도가 높을수록 처리시간이 길수록 발아율은 떨어진다라는 결과를 보고하였는데, 본 실험의 결과와는 온도와 시간의 차이는 있었지만 같은 경향이였다.

**열처리의 부패 관련 세균 사멸효과.** 이 실험에서 분리된 *Micrococcus luteus*, *Enterobacter cloacae*와 *Pseudomonas putida*를 콩종자에 접종하여 재배하면 병을 일으키지는 않으나(Table 1), 2차적인 부패의 원인이 되기 때문에, 이들에 대한 열처리 효과를 확인한 결과(Table 4) 60°C에서 건·습열 처리 시 모두 사멸하는 것으로 나타났다. 따라서 콩나물 생산 후 부패에 관여하는 세균을 사멸시켜 콩나물 부패에 대한 보존성도 높이는 효과가 있을 것으로 예상되며 부가적으로 식중독을 유발하는 병원성 세균의 배제효과도 기대된다. 이와 관련하여 Weiss와 Hammes(2005)는 무, 알팔파 그리고 녹두종자가 95% 이상 발아되는 습

**Table 2.** Influence of dry heat (DHT) and hot water immersion treatment (HWT) on germinability of soybean seedlot and sprout growth during cultivation

Temperature (°C)	Nongermination and deformed sprout <sup>b</sup>						
	5 min <sup>c</sup>	10	15	20	25	30	
DHT	CK <sup>a</sup>	1.2 ± 0.45	1.6 ± 0.55	1.4 ± 0.89	1.2 ± 0.45	1.2 ± 0.45	1.2 ± 0.45
	55	1.4 ± 0.55	1.6 ± 0.55	1.2 ± 0.45	1.4 ± 0.55	1.2 ± 0.45	2.8 ± 1.79
	60	1.6 ± 0.55	1.2 ± 0.45	3 ± 0.71	86.4 ± 6.73	93 ± 2.00	100
	65	1.8 ± 0.84	4.6 ± 2.30	83 ± 4.47	88.8 ± 3.19	97.4 ± 2.07	100
HWT	55	1.6 ± 0.55	56.8 ± 3.96	75.2 ± 2.68	85 ± 5.39	92.8 ± 2.17	100
	60	1.4 ± 0.55	70.8 ± 6.46	90.2 ± 6.72	100	100	100
	65	86.4 ± 4.62	94.4 ± 3.36	100	100	100	100

Whole experiment was repeated for three times. Each value represents the mean obtained from five samples per treatment ± S.D. Commercial soybean seedlots, not artificially inoculated, were exposed to 55, 60, 65°C and were subjected to small scale production procedure for 3 days, then inspected for germinability and deformity of sprouts.

<sup>a</sup>Untreated control.

<sup>b</sup>Rate of seed sprouted to abnormal germlings and retarded abnormal sprouts with coarse-wrinkled hypocotyl.

<sup>c</sup>Time period in minutes for heat treatment.

**Table 3.** Effect of hot water immersion treatment on soybean seedlot against sprout rot incidence under small-scale (SC) and large-scale (LC) production system

Temperature (°C)	No. of necrotic spots		Hypocotyl (cm)		Root (cm)	
	SC	LC	SC	LC	SC	LC
CK <sup>a</sup>	56.2 ± 5.24	43.4 ± 6.3	7.28 ± 0.72	7.5 ± 0.3	7.8 ± 0.53	1.3 ± 0.1
60	0	0	12.6 ± 0.46	13.6 ± 0.2	11.4 ± 0.58	2.4 ± 0.1

Whole experiment was repeated for three times. Each value represents the mean obtained from five samples per treatment ± S.D. Infected seedlots (see footnote of Table 1) were exposed to heat treatment and was subjected to sprouting for 5 days, followed by inspection for necrotic spot and sprout growth.

<sup>a</sup>Untreated control.

**Table 4.** Heat susceptibility of bacterial isolates associated with soybean sprout rot

Isolate	60°C		CK <sup>c</sup>
	DHT <sup>a</sup>	HWT <sup>b</sup>	
<i>Micrococcus luteus</i>	0	0	120.2 ± 4.8
<i>Enterobacter cloacae</i>	0	0	76.8 ± 6.2
<i>Pseudomonas putida</i>	0	0	82.6 ± 8.4

Whole experiment was repeated for three times. Each value represents the mean obtained from five samples per treatment ± S.D. Seedlots were artificially inoculated by each of bacterial strains (see footnote of Table 1) and were subjected to the above heat treatment scheme.

<sup>a</sup>DHT, treated for 30 min at temperature settings in Drying oven.

<sup>b</sup>HWT, treated for 5 min in hot water adjusted to corresponding temperature.

<sup>c</sup>Untreated control, No. of colonies recovered from untreated control sample.

열처리 조건에서 식중독을 유발할 수 있는 균인 *Salmonella senftenberg* W775, *S. bovis* *morbificans*와 *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> 각각의 살균 효과를 검정한 결과 열처리 온도와 시간별로 살균 효과는 달랐지만 60°C 내외의 온도에서 모든 세균의 수가 감소한 결과를, *Erwinia chrysanthemi*는 54°C에서 1분 45초간의 열처리로 사멸한 것으로 보고하였다(Runia와 Amsing, 2001).

**산모형에의 적용.** 습열처리방법으로 60°C에서 5분간 열처리를 하면 탄저병 전염원의 생존이 불가능하였고 종자발아 장애 및 하배축 기형의 발생도 없었다. 따라서 소규모 생산 모델과 실제 콩나물 재배 공정모델에 60°C에서 5분 습열처리하여 콩나물 탄저병 방제와 생산모형에 적용 가능성을 알아보았다. 그 결과 소규모 생산 모델과 실제 콩나물 재배 공정모델(Table 3)에서 습열처리한 처리구에서는 탄저병에 의한 괴사반점을 발견할 수 없었으나 열처리하지 않은 대조구에서는 50~60개 정도의 반점이 나타났으며 하배축과 뿌리의 길이 역시 습열처리구에서 생장이 좋은 것으로 나타나 실제 콩나물 재배 공정모델(강 등, 2003)에 적용 가능한 부패방지기술로 사료된다.

본 실험에서 소규모 생산 모델과 실제 재배 모델에서 나타나는 뿌리의 길이 차이는 실제 재배 모델에서는 종자를 benzyladenine(BA) 용액에 침지하기 때문에 뿌리와 세근발아가 억제되기 때문으로 생각된다. Williams 등(1994)이 오렌지 저장병의 원인균인 *Colletotrichum gloeosporioides*, *Penicillium digitatum*과 *P. italicum*을 53°C에서 12분 동안 습열처리하여 과일 표면의 병원균을 사멸시킨 결과와, 망고에 발생하는 탄저병 전염원 *Colletotrichum gloeosporioides* Penz.를 55°C에서 5분간 습열처리하면 탄저병 포자의 발아를 억제할 수 있다는 결과(Esguerra 등, 2006) 등이 본 실험과 다소 차이는 있었지만 유사한 온도와 처리시간에서 탄저병이 사멸하는 것을 알 수 있었다.

이상의 결과에서 콩나물 탄저병과 2차 감염되는 부생균에 의한 부패병을 방제하기 위해서는 콩나물 재배 직전에 콩을 60°C의 열탕에 5분간 침지하여 병원균과 부생균을 완전히 사멸하는 소독효과가 인정되었으며, 산업적으로 유용한 정보를 제공할 수 있을 것으로 생각한다.

## 요 약

콩나물 탄저병균 포자에 대한 열처리효과를 조사한 결과 65°C에 30분까지 건열처리 하였을 때는 균의 사멸효과가 50% 정도에 불과하여, 건열처리는 나물콩 살균에 활용할 수 없었다. 병원균은 55°C에서 20분 이상, 또는 60°C에서 5분간 습열처리하면 완전히 사멸하였고, 부생성세균 사멸효과도 높은 것으로 나타났다. 55°C에서 5분간 습열처리 조건하에서는, 발아장애 및 하배축 기형은 발생하지 않았으나, 20%의 탄저병균 분생포자가 생존하였기 때문에 실용적 가치가 인정되지 않았다. 따라서 종자발아 및 하배축 기형이 발생하지 않는 최적 열처리 조건인 60°C에서 5분간 습열처리를 실제 콩나물 재배 공정모델에 적용한 결과 탄저병 발생이 완전히 방제되어, 품질이 우수한 콩나물을 생산하게 되었다. 따라서 이는 확립된 부패방지기술로서 적용이 가능하다고 판단되었다.

## 감사의 글

본 연구는 농림부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구비지원으로 수행된 연구결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

## 참고문헌

- Esguerra, E. B., Valerio-Traya, R. F., Lizada, M. C. C., Pinto, A. C. Q., Pereira, M. E. C. and Alves, R. E. 2006. Efficacy of different heat treatment procedures in controlling diseases of mango fruits. *Acta Hort.* 645: 551-556.
- Gayed, S. K., Barr, D. J. S. and Weresub, L. K. 1978. Damping-off in tobacco seedbeds caused by *Rhizoctonia solani* and *Pythium ultimum*. *Can. Plant Dis. Surv.* 58: 15-19.
- 강진호, 전병삼, 박아정, 송경아. 2003. 빛, 초저 BA 및 식품첨가물을 처리를 통해 재배한 청정콩나물 및 그 재배방법. 특허청. 특허 제 0382558호.
- 김용기, 류재기, 류재당, 이상엽, 이승돈. 2002. *Collectotrichum* species에 의한 콩나물 부패. *한국식물병리학회지.* 8: 175-178.
- Liu, A., Chen, W. and Li, X. 2005. Changes in the postharvest physiology and lychee fruits latently infected by anthracnose fungus and the biological characteristic of the pathogenic fungus of the disease. *Acta Hort.* 665: 365-372.
- 박의호, 최영식. 1995. 콩나물 腐敗輕減에 有用한 藥劑 選拔. *한국작물학회지.* 40: 487-493.
- 박종철, 송완엽, 김형무. 1997a. *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*에 의한 콩나물 무름병 발생. *한국식물병리학회지.* 13: 13-17.
- 박원목, 편철우, 김정환. 1997b. 부생세균 *Pseudomonas putida* biovar. A에 의한 콩나물 세균성 부패병 발생 및 관수 산도에 의한 방제. *한국식물병리학회지.* 13: 304-310.
- Runia, W. T. and Amsing, J. J. 2001. Lethal temperatures of soilborne pathogens in recirculation water from closed cultivation systems. *Acta Hort.* 554: 333-340.
- Weiss, A. and Hammes, W. P. 2005. Efficacy of heat treatment in the reduction of *Salmonellae* and *Escherichia coli* O157:H<sup>-</sup> on alfalfa, mung bean and radish seeds used for sprout production. *Eur Food Res Technol.* 221: 187-191.
- Williams, M. H., Brown, M. A., Vesik, M. and Brady, C. 1994. Effect of postharvest heat treatments on fruit quality, surface structure, and fungal disease in Valencia oranges. *Aust. J. Exp. Agr.* 34: 1183-1190.