

발 간 등 록 번 호

11-1543000-000667-01

식물정유 티몰을 이용한 양파 및 마늘의 장기 저장
기술 개발에 관한 연구

(A Study on Development of Long-term Storage of Onions
and Garlic with Thymol of Plant Essential Oil)

건국대학교

농 립 축 산 식 품 부

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “식물정유 티몰을 이용한 양파 및 마늘의 장기 저장 기술 개발에 관한 연구” 과제(협동과제 “식물 정유 티몰의 훈증 효과 및 처리 기술 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2014년 9월 21일

주관연구기관명 : 건국대학교

주관연구책임자 : 천세철

연 구 원 : 지상혜

연 구 원 : 김태광

연 구 원 : 고은영

협동연구기관명 : 고려대학교

협동연구책임자 : 김기덕

연 구 원 : 상미경

연 구 원 : 오지연

연 구 원 : 김두연

요 약 문

I. 제 목

식물정유 티몰을 이용한 양파 및 마늘의 장기 저장 기술 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

양파의 수확시기는 대부분 장마기와 겹쳐 적기에 수확이 어렵고 수확한 양파는 건조가 제대로 되지 않아 저장 중 양파 부패피해는 매우 심각함. 특히 양파는 수확 후 저장고(상온, 저온)에 입고되기 전에 논둑이나 길옆에 야적한 상태로 비를 피할 목적으로 비닐을 씌워 저장할 경우 매우 다습한 상태가 되어 양파 검은곰팡이병에 의한 피해가 매우 큼. 양파 저장 중 발생하는 병은 대부분 재배기간 중에 침입 감염되어 저장 중 발병 조건에 이르면 격발하게 됨.

양파 저장 중 발생하는 주요 병으로는 저온 다습할 때 주로 발생하는 썩빛썩음병과 푸른곰팡이병, 저온저장고에 넣기 전 상온에 쌓아 둘 경우에 큰 피해를 주는 검은곰팡이병, 어린묘로부터 저장에 이르기까지 계속해서 발생하는 시들음병 (마른썩음병) 등이 있으며, *Pseudomonas* spp 등 세균에 의한 피해가 최근 들어 점차 증가되는 추세임

양파는 재배상의 문제, 저장기술의 문제 등에 의해서 저장고내에서 많은 양이 식물병원균에 의하여 부패됨. 정확한 통계자료는 없으나 저장량의 약 20% 정도가 병원균에 의한 부패라고 알려지고 있음. 따라서 재배포장 및 저장고 내에서의 식물병의 방제는 수량 증산 및 품질 향상에 있어서 매우 중요한 요인이 됨.

양파의 경우 재배 과정에서 질소(N)나 인산(P)과 같은 비료의 과다 사용으로 인해 양파의 영양이 불균형 상태에 이르게 되면 생리적인 퇴화가 쉽게 일어나 곰팡이나 박테리아와 같은 병원균에 대한 저항성이 약해져 급격히 부패되는 것으로 알려져 있음. 곰팡이나 박테리아에 오염된 양파가 저장고에 입고되어 장기간 저장되면 습도가 매우 높은 저장고 환경 하에서 쉽게 번식하게 되고 송풍기와 덕트, 적재된 모든 양파에 전염됨으로써 부패가 가속화되어 저장된 양파의 엄청난 손실을 가져오게 됨.

농약사용에 의한 저장병 방제는 수확후 농산물에 대한 약제를 처리하기 보다는 수확전 약제를 살포하여 병원균의 밀도를 줄임으로써 수확후 저장 중 부패를 줄이는 방법이 주로 이용되고 있음. 하지만 국내의 경우 농약을 전혀 사용할 수 없기 때문에 저장 중 부패를 줄일 수 있는 경감기술의 개발이 절실히 요구되고 있음.

국내 저온저장고는 '97년도 기준으로 32만평인데 이중 양파와 마늘이 각각 42%와 13%를 차지할 정도로 농산물 저장유통 산업에서 양파와 마늘이 차지하는 비중은 매우 큼

국내산 양파의 경우 저장중에 이차생장이나 생리 및 병리적 부패로 인해 폐기되는 양이 거의 30%에 가까운 것으로 추정됨. 특히 국내 양파 품종은 목줄기가 두꺼워 수확시 절단부위를 통해 병원균의 침입과 이차생장이 용이하므로 저장중에 쉽게 부패되는 것으로 알려져 있음. 또한 껍질이 얇고 층이 적어 저장이나 유통과정에서 변질로 인한 상품성 저하 및 손상으로 인해 막대한 경제적 손실을 가져오고 있음.

중국에서 생산된 양파는 최근 품질이 개선되고 가격면에서 국산보다 월등한 경쟁력을 가지고 있기 때문에 수입량이 급격히 증가되리라 예상됨. 특히 중국산 양파의 도매가격이 202원/kg로 국내산 가격 (509원/kg)에 비해 2.5배가 낮음(표 2). 따라서 수확후 품질관리 개선을 통한 비용절감에 의해 국내산 양파의 가격경쟁력 확보가 시급히 요구되는 실정임.

저장고 내에서의 부패율의 증가에 의해 장기 보관한 양파의 저장물량이 부족한 현상을 받게 되는데 이로 인한 가격상승을 막기 위해 외국산 양파가 수입되어 국내산 저장양파의 가격 하락을 초래하고 있으며 양파의 생산 및 수확후 관리가 낙후된 상태에서 부패율 증가에 따른 원가의 상승으로 가격경쟁력 측면에서 외국산 양파에 비해 열위에 있게 되므로 미국이나 기타

양파 수출국으로부터의 값싼 양파의 수입이 더욱 증가할 것으로 예측됨.

저장병은 대부분 저장고 내부에서 발생하여 감염되는 것보다 저장전 토양이나 운송과정에서 감염되어 잠복하고 있다가 저장중 발현하는 것이 대부분임. 하지만 저장병 방제를 위해서는 저장고 소독과 함께 재배지에서의 관리도 매우 중요하다고 할 수 있음. 이러한 저장병은 적절히 방제하지 않을 경우 그 확산속도가 매우 빠르며 토양내 잔류에 의한 지속적인 피해를 주기 때문에 저장병에 의한 손실을 막기 위해서는 반드시 철저한 방제를 실시하여야 함

국내의 생물학적 방제연구는 토양 및 엽권에 생육기에 발생하는 병해만을 대상으로 수행되어 왔을 뿐 저장 중에 발생하는 병해를 대상으로 한 연구는 전무한 실정임

최근 저장중 부패를 줄이기 위한 방법 이외에 길항균이나 영양원 경합균 처리에 의한 저장병의 생물학적 방제연구가 활발히 추진되고 있음. 저장조건은 엽권이나 근권에 비하여 환경조절이 쉽고, 미생물을 처리할 경우 환경에 의한 영향을 덜 받고, 처리하고자 하는 부위에 길항균의 투여가 용이하다는 장점이 있어 미국, 캐나다, 스페인, 이스라엘, 호주 등의 선진국을 중심으로 실용화 연구를 활발히 추진하고 있음.

저장병 피해를 줄이기 위한 연구는 경종적 측면에서 기상환경을 고려한 수확 및 수확기 조절, 시비, 농작업시 상처발생 배제, 저장중 부패에 관여하는 온도, 습도, CO₂ 등 환경요인 조절, 열처리, 저장시설 개발 등에 역점을 두고 추진되고 있으며, 일부 국가에서는 주로 열대 및 아열대 과일 및 채소를 중심으로 농약사용에 의한 화학적 방제도 추진되고 있음

Dubey와 Kishore (1988)은 *Melalleuca leucadendron*, *Ocimum canum*, *Citrus medica* 등의 식물 오일이 *Aspergillus* 종들에 대하여 항균 활성이 있음을 보고하였으며, 과일 및 채소류에 식물오일을 살포하거나, 과수 및 채소류를 식물 오일에 침지하여 저장병의 방제에 적용할 수 있다는 것이 제시됨(Aeschbach et al., 1994, Backheet, 1998, Bhaskara et al, 1998, Tiwari et al., 1988; Smid et al., 1994; Dixit et al., 1995). 또한, 휘발성이어서 저장병원균의 방제에 아주 효과적으로 사용될 수 있음(Mihaliak et al, 1991, Rakotonirainy and Lavedrine, 2005).

유황훈증처리를 위해 유황을 태우는 과정에서 유황이 타면서 나오는 이산화황(아황산무수물SO₂)이 미생물 번식을 막아 부패를 방지하기 때문에 요즘은 유황훈증을 하지 않는 곳은 전국적으로 찾아보기가 힘들. 그러나 유황은 천식환자 등에게 치명적인 해를 줄 수 있어서 식품의약품안전청은 이산화황 잔류기준을 2천ppm 이하로 규제하고 있음.

Tymol은 thyme (*Thymus capitatus*)식물 오일의 주성분인데 의약품, 식품보존제, 주스류의 첨가제로 사용되고 있는데 (Burt, S. 2004), 체리를 30ppm의 tymol로 훈증한 결과 *Botrytis cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병을 무처리구의 35%에서 0.5%로 감소하였다고 하였음(Chu et al., 1999). 또한 티몰 처리에 의하여 사과와 저장병원균인 잿빛곰팡이병에 대한 억제 효과가 무처리구 대비 38% 감소되었다고 보고되었다(Kim et al, 2007).

식물 정유 티몰은 인공적으로 합성되고 있으며 병원균 사멸 효과는 10-30ppm에서 항균 효과가 높고 1kg 당 15,000원 정도로 매우 저렴할 뿐만 아니라 인체에 대한 안정성 또한 높아서 있어서 미국 환경청은 이에 대한 허용한계 농도를 설정하지 않고 있음. 마늘 양파 저장고의 훈증 기술 개발은 매우 절실하지만 적용할 수 있는 이와 같은 훈증 기술은 아직 없음.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

1. 양파, 마늘 저장고 내의 병원균 발생특성 조사

양파 와 마늘의 주산단지인 전라남도 무안군의 양파와 마늘의 재배 생산동향 및 현황을 조사하고 2012년 12월부터 저온 저장된 양파가 출하되기 전까지 저장병 발생 피해 조사 및 연작

재배지에서 발생하는 병해 및 피해 조사. 전라남도 무안군의 양파 및 마늘의 연작재배지에서 발생하는 양파와 마늘의 병해를 조사하고, 농협 및 개인 기업체의 양파, 마늘 저온저장고 8곳을 방문하여 곰팡이병에 의한 비상품 양파와 마늘의 발병 정도 및 발생 경로등을 조사함

전남 무안의 저온저장고에서 곰팡이병에 의해 상품가치가 떨어지는 양파와 마늘로부터 분리한 주요 저장병원균 *Botrytis aclada*, *Aspergillus niger* 등 13종을 분리 동정하여 발생원인 규명.

양파와 마늘에서 분리된 주요 병원균 *Botrytis aclada*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium acuminatum*, *Penicillium* sp. B1-35, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*의 포자현탁액 또는 agar 조각 접종방법을 사용하였다. 1% sodium hypochlorite 소독한 양파와 마늘 표면에 침으로 낸 상처구와 무상처구에 각각 접종원을 접종하고, 포화습도를 유지시키면서 25~28°C에서 보관하여 일주일 후부터 발병 유무를 조사함으로써 병원성을 검정하였음

2. 식물 정유 티몰의 훈증 효과 및 처리 기반 기술 개발

병원균별 억제 최소 농도 조사를 조사하기 위하여 저장병원균 *Botrytis aclada*, *Aspergillus niger* 등 6종에 대한 티몰의 직접 효과와 휘발성에 의한 EC50 value 결정함. positive control로 acetic acid의 직접 효과와 휘발성에 의한 EC50 value 결정

식물 정유 티몰이 부패균 포자 발아에 미치는 영향 조사를 위해서 저장병원균 *Botrytis aclada*, *Aspergillus niger* 6종에 대한 티몰과 ethanol, acetic acid의 직접적, 휘발성에 의한 간접적 효과에 의한 포자발아에 미치는 영향 평가

아황산가스와의 비교 실험을 위하여 양파와 마늘에서 분리된 6개의 곰팡이 *Fusarium acuminatum*, *F. proliferatum*, *Botrytis aclada*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium* sp. B1-35에 대한 아황산가스와 식물 정유 티몰의 항균활성 효과 비교함

3. 식물 정유 티몰의 훈증 효과 및 처리 기술 개발

실험실 규모에서 저온저장 중 티몰의 훈증 효과. 표면소독하지 않은 무안 양파를 무처리구와 30ppm 티몰 처리구를 3반복씩 각각 저온에 저장하여 8주, 16주 후에 비교 관찰함으로써 티몰의 곰팡이 병 방제효과를 조사함. 30ppm의 티몰을 30ml의 100% 에탄올에 녹여 분무처리함. 다양한 티몰 처리 방법 실험을 통해 실증실험에 적용할 적절한 티몰훈증방법을 모색함.

실증 시험 규모하의 0.5톤, 6톤, 12톤 저온저장 컨테이너에서 티몰 훈증처리에 의한 양파의 이병률 조사 및 티몰 잔류량 분석. 6톤, 12톤에 해당하는 저온 저장 컨테이너에 무안양파를 약 6개월 동안 저장 하면서 무처리구, 유향처리 및 티몰처리구 각각의 이병률을 조사함으로써 티몰처리에 의한 병 방제 효과를 검정하고 티몰 처리구 샘플의 양파 표피로부터 티몰 잔류량을 분석함. 또한 무안양파를 환풍 시설이 갖추어져 있고 컨테이너 내부의 튜브가 외부의 에어펌프와 연결되어 있는 0.5톤 저온 컨테이너에 저장 하면서 내부의 가스를 시간대 별로 포집하여 컨테이너 내부의 티몰농도 및 양파 표피의 티몰 잔류량을 GC-MS로 분석함.

티몰 훈증처리를 위한 전라남도 무안 몽탄농협 29평 (547톤) 양파 저온 저장고 실증실험. 전라남도 무안의 몽탄 농협 양파 저온저장고 29평에 20ppm에 농도에 해당하는 티몰을 100% 에탄올에 충분히 녹인 후 10개에 해당하는 훈증장치에 분주(1개의 훈증 장치 당 약 300ml의 티몰용매를 분주하였음)하여 6시간 동안 가열하여 훈증시켜 현장 실증 시험으로 저장병 방제 효과 확인함. 처리후 저장 6개월간 저장병 발생률 및 손실율을 조사함.

티몰의 양파 품질에 미치는 영향. 티몰 훈증처리 후 잔류성 조사를 위해 HPLC를 통한 양파의 생리활성 물질의 변화 분석. 4°C에서 8주 동안 저온 저장 한 무안 양파의 30ppm thymol 처리구와 무처리구의 생리활성물질 quercetin, 항산화 활성, 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량을 분석함으로써 티몰 처리에 의한 양파의 생리활성 물질 함량 변화를 분석함

IV. 연구개발결과

1. 양파와 마늘의 생산 동향 및 저장병 발생 상태

양파와 마늘의 주산단지인 전남 무안군의 양파와 마늘의 재배 생산동향 및 현황을 조사하고 2012년 12월부터 저온 저장된 양파가 출하되기 전까지 전남 무안군의 양파 연작재배지에서 자연발병에 의해 상품가치가 떨어지는 양파와 마늘의 저장병 발생 상태를 조사함.

Table 1. 양파, 마늘의 주산단지 전라남도 무안군의 연도별 양파 마늘 재배면적 생산동향

연도	양파				마늘			
	면적(ha)	단수(kg)	생산량(톤)	조수익	면적(ha)	단수(kg)	생산량(톤)	조수익
2009	3,982	6500	258,830	1294억	861	1,200	10,332	145억원
2010	4,074	6700	272,958	1501억	593	1,134	6,725	201억원
2011	3,703	6000	222,180	1221억	661	1,128	7,456	260억원

: 2009년 500원/kg, 2010년 550원/kg, 2011년 550원/kg 기준으로 조수익산출

마늘 : 2009년 1,400원/kg, 2010년 3,000원/kg, 2011년 3,500원/kg 기준으로 조수익산출

Table 2. 양파, 마늘의 주산단지 전라남도 무안군의 품종에 따른 재배 현황

양파	조생종	중만생종
2010년 재배 품종	한터 (8,800)	선파워(53,400)
	우리황(5,000)	
	하마에미(9,800*)	뉴마르스(36,900)
	미래황(2,700)	카다마루(44,900)
	쏘닉(3,000)	천주황(8,000)
	기타(30,100)	기타(40,400)
2011년 재배 품종	한터(9,200)	선파워(63,200)
	우리황(500)	
	하마에미(11,000*)	뉴마르스(42,300)
	미래황(2,000)	카다마루(49,400)
	쏘닉(1,800)	천주황(2,000)
	기타(18,300)	기타(46,000)
마늘	2010년 재배 품종	2011년 재배 품종
재배 품종	남도(33,200*)	남도(41,600*)
	대서(4,400)	대서(5,200)
	기타(1,800)	기타(1,200)

Table 3. 저장병 발생율

농협별	저장병 발생율 (%)	
	양파	마늘
무안농협	10%	2% 내외
일로농협	10%	-
삼향농협	20%	-
몽탄농협	70%	-
무안농협 공동사업	10%	2% 내외
서남부 채소농협	5%	2% 내외

전남 무안의 저온저장고에서 곰팡이병에 의해 상품가치가 떨어지는 양파와 마늘로부터 분리한 주요 저장병원균 *Botrytis aclada*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp. 등 13종을 분리 동정하여 발생원인 규명. 저온 저장중에 발생하여 가장 피해가 많은 병원균으로는 검은곰팡이(*Botrytis acalada*, *Penicillium* spp.) 와 흰곰팡이(*Fusarium*) 이었음

2. 저장병원균에 대한 티몰의 억제 효과 살내 시험

양파와 마늘에서 분리한 저장병원균 6균주 (*Botrytis aclada*, *Fusarium accuminatum*, *Fusarium proliferatum*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*)에 대하여 티몰의 곰팡이 생장에 미치는 직접적 억제 효과를 평가한 결과 10ppm의 농도부터 티몰은 균사 생장 및 포자 발아를 억제하였음. 특히 깻빛곰팡이병은 30ppm의 티몰이 20ppm의 아황산가스 보다도 균사생장억제 효과 매우 탁월하였음

티몰을 에탄올에 용해하여 실내 용기를 사용하여 양파에 훈증한 결과, 4℃, 25℃에 저장한 결과 9주간 저장하였을 때 무처리는 90% 이상 병이 발생하였으나 티몰 처리구는 10% 이내로 병이 발생하여 처리의 효과가 탁월하였음

티몰 훈증 시험을 저온 저장 16주 동안 실내 용기에 시험하였을 때도 티몰 처리의 효과 우수하여 실험의 결과의 재현성이 매우 높았음

3. 파일럿 시험으로서 무안 양파의 저장병에 대한 티몰 고체의 가열 훈증 처리 효과 (4개월 저장)

전북 익산의 저온저장 컨테이너에 무안 양파를 무처리, 20ppm SO₂, 30ppm thymol 처리구 별로 5℃ 에서 약 4개월 동안 보관하면서 이병률을 조사하여 티몰의 훈증효과를 조사하였는데, 티몰 처리구에서는 저장병 발생율이 0% 이었지만, 아황산가스처리는 17.8%, 무처리는 33.3%로 티몰 처리구의 저장병 발생율이 현저히 낮았음 (LSD, P=0.05).

또한 티몰 처리구에서는 양파가 5℃로 4개월 저장시 썩이 나온 것이 없었지만 무처리는 많은 양파들이 썩이 나와 티몰이 양파의 호흡을 지연하여 저장기간을 더 연장할 수 있음을 제시하여 주었다. 이후 또한 추가로 20ppm의 티몰을 처리한 양파 시험에서는 처리 2개월 동안 저장병이 발생하지 않았지만 무처리는 저장병이 매우 심하게 발생하였음 (Table 4).

Table 4. 양파의 저장병에 대한 티몰 고체 가열 훈증 처리 효과 (익산 저온 컨테이너에서 약 4개월 동안 보관)

반복	처리 ^a	이병율A(%) ^b			이병율B(%) ^c : severe infection		
		무처리	황	티몰	무처리	황	티몰
R1		40	18	0	10	2	0
R2		38	10	0	9.0	2	0
R3		29	22	0	7.0	0	0
R4		26	21	0	14	2	0
평균		33.3a ^d	17.8b	0c	10a ^d	1.5b	0c

^aThe onions in the 8 bags of 20kg were treated with 30ppm of thymol in the 6 tons and 14 tons of storage container for untreated control and thymol treatment, respectively.

^bOnions were infected only around root attached area.

^cWhole onions were infected severely.

^dThe means followed by same letter are not significantly different between treatment (LSD, $P=0.05$)

티몰을 에탄올에 녹여 30ppm의 농도로 훈증 처리하였을 때 양파외피의 티몰 잔류량을 측정. 30ppm 농도의 티몰을 각각 100% 에탄올에 녹인 후 24시간 동안 훈증 처리한 양파 샘플 5개의 외피(껍질)를 에틸아세테이트 용매에 녹여 티몰 잔류량을 GC-MS 분석으로 확인하였음. 30ppm의 티몰을 에탄올에 녹여 훈증 처리한 샘플에서는 양파 1그램당 7.55ppb 티몰이 잔류하고 있는 것으로 확인되어 매우 안전한 수준의 극미량으로 검출되었음.

4. 티몰 훈증처리를 위한 전라남도 무안 몽탄농협 29평 (547톤) 양파 저온 저장고 실증실험

양파와 마늘의 장기 저장에 영향을 미치는 가장 큰 요인 중의 하나는 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* 및 *Botrytis* 등의 다양한 곰팡이로 조사되었는데, 마늘의 경우는 그 발생 빈도가 약하여 훈증 처리 기술 개발의 필요성이 크지 않아서 대량으로 많은 저온 창고 시설에서 장기 저장되는 양파에 초점을 맞추고 연구를 하였다. 컨테이너 내부의 부피를 기준으로 하여 내부의 티몰 농도가 20-30ppm이 되도록 티몰을 훈증하는 것은 양파의 외피에 식품허용한계(30ppm) 수준보다 매우 낮은 농도로 흡착되고 저장병 억제 효과의 효과가 매우 우수하였다.

특히, 티몰 고체를 직접 가열하여 기화하여 훈증하면 빠른 속도로 티몰이 양파의 외피에 흡착함으로써 저장병의 방제 효과가 더욱 탁월하였지만, 저온에서 티몰 고체를 직접 가열하면 기화하면서 저온으로 인하여 티몰이 재 결정화되어 가루를 남기게 되기 때문에 티몰은 저온에서 기화도가 낮은 것으로 판단되었다.

그러나 티몰을 에탄올에 완전 용해하면 가열 훈증 처리하거나, 기화시켜 훈증한 후 저온 처리를 하여도 재 결정화하지 않아서 현장 적용 방법으로는 에탄올 용매에 완전 용해하여 하면 저온에서 처리를 하여도 균질하게 훈증되어 양파의 외피나 양파의 땅에 티몰 가루가 엉기는 현상은 없었다.

따라서 이러한 특성을 감안하여 시중에 판매되고 있는 모기 퇴치용 훈증장치(주식회사 모

스텍)의 원리와 마찬가지로 본 티몰 처리기술 개발 연구 과제 3년차에서는 시중에 모기되지기로 시판되고 있는 코드형 훈증장치와 비슷하게 양파 저온 저장고의 특징을 감안하여 사이즈를 늘려서 제품을 개발하고자 하였으나 기화 속도가 늦으면서 용기의 사이즈를 크게 하기 위한 대량 제작이 현실적으로 어려워 아황산가스 훈증기를 사용하여 티몰의 훈증기로 현장 적용 시험을 하였다.

29평 저장고에 티몰 훈증을 20ppm으로 처리한 것은 저장병 방제에 탁월한 효과를 보여주었다. 저장 6개월후에 무처리는 관찰 가능한 파렛트에서 70개의 양파에 저장병에 감염되었으며 일부는 심하게 발생하여 양파의 땅이 물러 앓기 시작하였다. 그러나 티몰 처리 양파는 단지 3개의 양파만이 감염되었다 (Table 5, Fig. 1). 무처리 저장실은 모두 저장 7개월 전에 상품성의 저하로 인한 피해를 줄이기 위해 출하가 완료되었지만 티몰 처리 저장실은 저장 10개월째인 이듬해 3월에 출하되었다 (Fig. 2).

경제성 분석 (1개 저장실 547톤 기준): 20kg 양파 약8000망이 저장됨, 훈증시 3개월 이상 저장 가능, 약 8000망 가운데 약96% 피해가 감소한다고 가정하면 8000 x 96% (Table 5) = 7,680망 이익이나 부패에 의한 손실을 줄이기 위해 미리 출하함
 :이론적으로는 20kg 1망의 가격 10,000원 x 7680망 = 76,800,000원 - 300,000원(76,500,000원) 으로 이익을 계산할 수 있으나
 - 그러나 현실적으로 그 이전에 다 더 낮은 가격으로 출하함으로 20kg당 2,000원 할인가격으로 한다고 가정하면: 8000x2000=16,000,000원 손해 (1540-66) X 10,000 = 14,740,000원 부패로 발생된 손실
 - 비용: 티몰 3kg은 약 300,000원
 - 종합하면 저장병 방제로 한 개 저장실당 약 30,000,000원 이익을 보는 것이 가능함

Table 5. 티몰 훈증의 현장 적용시의 저장병 방제 효과

	<i>B. aclada</i> (젓빛곰팡이)	<i>F. profileratum</i>	<i>Penicillium</i> sp. and others (푸른곰팡이 등)	총 감염양파 (창고의 1/22면) ^a	예상 총 감염 양파수 (전 창고) ^b
무처리	24	11	35	70	1540
20ppm 티몰 훈증	1	2	0	3 (발병율 96.7% 감소)	66

^a관찰할 수 있는 창고의 1/4면적을 관찰함

^b총 면적을 가정하여 계산한 양파 감염수, 6월초 티몰 훈증후 6개월 후인 12월에 관찰, 3월중순까지의 손실율이 18%로 무처리구에 비하여 3개월 저장기간 연장됨. 무처리 창고는 양파 저장병 발생의 손실이 더욱 심하여지기 전인 12월 초에 20%의 양파 손실

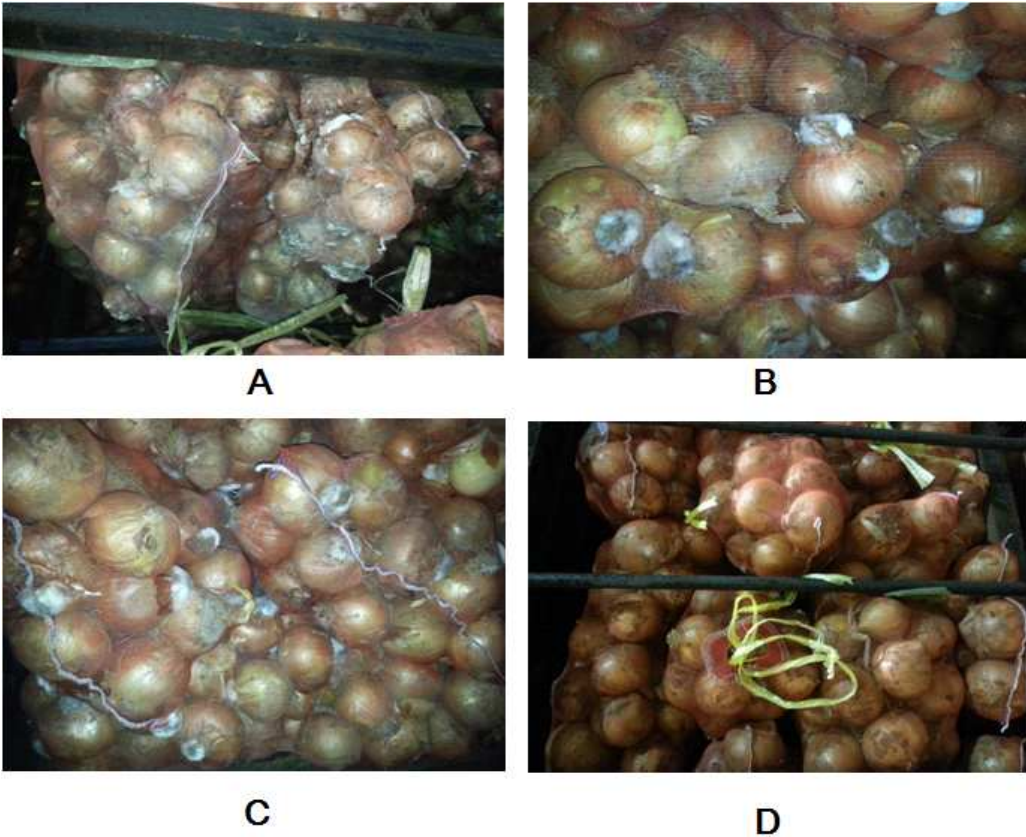


Fig. 1. 훈증처리 6개월 후. A, B 및 C; 무처리 창고의 저장병 발생 실태. D. 티몰20ppm 훈증 처리 창고 양파 (저장병 거의 발생하지 않음)

5. GC-MS를 이용한 양파 외피의 티몰 잔류량 분석

양파의 경우는 처리 3시간 후의 양파 1개 당 티몰 $12.8\mu\text{g}$ 이 잔류하였는데 이는 양파 1cm^2 당 $0.0408\mu\text{g}$ 으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 양파 1그램당 환산한 농도로 한다면 0.078ppb 의 농도로 양파에 존재하였고, 처리 24시간 후는 양파 1개 당 티몰 $1.49\mu\text{g}$ 이 잔류하였는데 이는 양파 1cm^2 당 $0.0047\mu\text{g}$ 으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 양파 1그램당 환산한 농도로 한다면 0.009ppb 의 농도로 양파에 존재하여서 티몰의 식품 허용한계 30ppm 농도에는 현저히 못 미치는 극미한 수준이었다. 더군다나 껍질은 식용하지 않고 버리므로 인체에 대한 위험성은 전혀 없다 할 것이다. 또한 현장에 실증 적용한 6개월 이상 저장한 양파에서 티몰은 검출되지 않아서 식품 안정성에는 아무런 문제가 없는 것으로 판단되었다.

마늘의 경우는 마늘 1개 당 $143.9\mu\text{g}$ 이 잔류하였는데 이는 마늘 1cm^2 당 $0.458\mu\text{g}$ 으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 마늘 1개의 부피로 환산한 농도로 한다면 13.69ppb 의 농도로 양파에 존재하여서 티몰의 식품 허용한계 농도에는 못 미치는 극미한 수준이었다. 마늘의 경우에도 티몰처리 후 3시간 후에 채취한 샘플보다 하루가 지난 후에 채취한 샘플에서 마늘 외피에 남아있는 티몰의 농도가 현저히 떨어지는 것이 확인되었다. 이는 티몰이 양파나 마늘의 외피에 분해되지 않고 계속 남아 있는 것이 아니라, 시간이 지나면서 계속 분해되거나 휘발되는 것으로 생각된다.

SUMMARY

I. Title

Development of long-term storage of onions and garlic with thymol of plant essential oil

II. The objectives and necessities of the research and development

When the onions are harvested, most do not properly be dried because the season for the crop harvest overlaps the rainy season. If the onion are not properly dry, they are readily rot during storage, especially the onions covered with plastic on the bank of the rice field to avoid the rain. Most severe disease are occurred during the storage if onions are infected in the field.

Blue mold and gray mold occurs on low and humid condition of storage room. White mold disease caused by *Fusarium* species may be originated from the field. Onions is rot by postharvest disease by the cultivation and storage technology. Although there is no precise data on the postharvest loss, it is roughly known to 20% that is considered to be caused by the postharvest disease. Therefore, the control of plant diseases during the cultivation and postharvest control is the most import factor to increase yield and quality.

If the onions faces to the imbalance of nutrient during cultivation such as too much of nitrogen and phosphate, the resulted physiological degeneration makes onions very susceptible to fungal and bacterial pathogens. This makes onions rot rapidly. If the onions contaminated with mold and bacteria are stored long-term and maintained in high humid condition, the postharvest disease spreads out to other onions and makes huge loss by severe decay.

The control of post-harvest disease by pesticide is practiced through the application of pesticide to onions in the field before harvest in such way that pathogen population could be reduced, resulting in less disease development in storage room. There is no pesticide registered for usage to control onion disease in storage room so there is urgent need to develop the technology to reduce postharvest disease.

There were about 97,000 square meters of storage house in Korea in 1997 and of these storage, onion and garlic storage houses take part 42% and 13%, respectively, indicating that onion and garlic is a major product in storage and distribution industry.

The amount of domestic onion discarded due to secondary growth and physiological and pathological decay during storage is estimated to be almost close to 30%. It is known that onion cultivars grown in Korea is particularly easy to decay during storage because it has the thick collar so that cut collar is the wide infection sites for pathogen invasion. It is also noted the thin layer of onions make more susceptible to infection during storage and distribution so that it cause a huge economic loss due to damage

occurred during storage.

Importation of onions from China are expected to be drastically increased due to recent improvements in quality and price competitiveness to domestic production. Especially in China wholesale onion prices is 202won/kg, compared to domestic prices (509won/kg) that is 2.5 times low (Table 2). So in such situation where price competitiveness of domestic onion is low, the cost savings is need through improved post-harvest quality.

Postharvest disease comes mostly from the soil and infected onions than those during storage. However, disinfestation of storage and management of onions is also important to control postharvest disease.

To prevent the loss due to postharvest disease, postharvest disease control must be accomplished. So if it is not properly controlled, disease spread rate is very fast and cause continuously cause damage to onions.

In order to reduce damage caused by postharvest disease, the research is conducted on harvest time adjustment avoiding rainy days, proper fertilization and temperature and moisture control during storage, dry, and the use of pesticides in some countries, mainly in the center of the tropical and sub-tropical fruits and vegetable.

Dubey and Kishore (1988) reported the antimicrobial activity against *Aspergillus* species such as *Melalleuca leucadendron*, *Ocimum canum*, *Citrus medica* plant oil. It is suggested that these oils could be sprayed to fruit and vegetables, or dipping fruit and vegetables (Tiwari et al 1988.; Smid et al, 1994;. Dixit et al, 1995) to the control of postharvest disease in the storage. Furthermore, this can be used very effectively to control the pathogen because it is volatile (Mihaliak et al, 1991, Rakotonirainy and Lavedrine, 2005).

Sulfur fumigation treatment prevent the growth of microorganisms due to sulfur dioxide (sulfurous anhydride, SO₂) fumed during burning process. It is widely used now in Korea. But sulfur dioxide could be fatal to asthma patient, Korean Food and Drug Administration regulate strictly so that sulfur dioxide residue must be less than 2000 ppm.

Tymol is a major compound of thyme (*Thymus capitatus*) oils and has been used for food preservation and additive for fruit juice (Burt, S. 2004). It has been reported that fumigation of 30ppm of thymol to Cherry resulted in reduction of the gray mold *Botrytis cinerea* to 0.5% from 35% of the untreated control(Chu et al., 1999). It was also reported (Kim et al, 2007) that gray mold on apples of storage reduced by 38% by the thymol treatment compared to the untreated control.

Thymol is artificially synthesized and the effects on microorganism is very high with 10-30ppm and also is inexpensive as 15,000won per 1kg. It is also considered "generally regarded as safe" so that the United States Environmental Protection Agency does not set limit concentration to use that. It is very urgent, but there is no fumigation technique yet to apply to control postharvest disease of onions in storage house.

III. The content and scope of research and development

1. Study on postharvest disease incidence of onion and garlic in storage

We surveyed the major production areas of onion and garlic, Muan, Jeollanamdo province with regarding to the status and trends of production. Also investigated postharvest disease of onions and damage generated during cold storage rooms from December to March 2012. Investigated onion and garlic diseases in continuous cultivation areas and surveyed conditions of onion and garlic products, and the incidence pathways of postharvest diseases in the 8 locations of Agricultural cooperatives and private storage.

We identified 13 species that causes major storage diseases such as *Botrytis aclada*, *Fusarium* species and *Penicillium* in cold room maintained at 0°C and *Aspergillus niger* and *Rhizopus* isolated from market onion and garlic that reduce the qualities of the products.

Major pathogens isolated from onion and garlic were *Botrytis aclada*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium acuminatum*, *Penicillium* sp. *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*. In addition, pathogenicities were tested with inoculation of the mycelial agar block or spore suspension into needle-wound or intact onion and garlic surface sterilized by 1% sodium hypochlorite. The inoculated onions and garlics were incubated at 25~28 °C for 7 days, maintaining highly saturated humidity to determine pathogenicity.

2. Effect of thymol fumigation on postharvest pathogen *in vitro* and the basic study for the technology development of thymol treatment

In order to study the minimum inhibition concentration of thymol on pathogen, the six species of pathogen such as *Botrytis aclada*, *Aspergillus niger* were tested. EC50 value was determined by the direct and volatile effect of acetic acid on pathogens as a positive control.

Direct and indirect effects of thymol, ethanol and acetic acid on spore germination of the six species including *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* were tested.

Comparative experiments of thymol with sulfur dioxide were also conducted on the six fungal species isolates from onion and garlic, *Fusarium acuminatum*, *F. proliferatum*, *Botrytis aclada*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium* sp with regarding to their antifungal activities.

3. Effect of thymol fumigation on postharvest pathogens for long storage and the technology development of thymol treatment

Fumigation effects of thymol on postharvest pathogen of the onions in cold storage in the laboratory scale. Investigated the effect of 30ppm thymol fumigation on fungal diseases of onions stored for 8 weeks and 16 weeks after treatment. Thymol 30ppm

dissolved in ethanol was sprayed to the surface of onions to develop one of methods to treat onions to control postharvest diseases that could be applied to the commercial condition.

Postharvest disease incidence of onion treated with thymol fumigation that conducted in 0.5, 6, 6 tons in size containers and thymol residues analysis. There were the untreated control, sulfur dioxide and thymol fumigation treatments. The onions stored at 5°C were observed for six months to determine effect of thymol fumigation and analysis thymol residue on the onions. The gas trap sample plastic pockets were established to intake the air inside of containers to be analyzed by GC-MS. The gas samples were taken by hours with the air pump that was connected with tube to inside container.

Application of thymol fumigation to a commercial storage rooms in size of 29 pyung (95.7m²) of Mongtan Agricultural Cooperation, Jeollanam-do (547 tons of volume in size and stored 160 M/T of onion). The 10 fumigation apparatuses contained thymol solution (one for about 300g thymol dissolved in 100% ethanol) were used to make final concentration of thymol corresponding to 20ppm in total storage space to fume the storage room of Mongtan Agri-Cooperation in Muan, Jeollanam-do to six hours by heating thymol solution to control postharvest disease. The disease incidences were determined at 6 and 10 months after treatment.

Effect of thymol on onion quality. Changes in the functional compounds of onions such as flavnoids, quercertine, total phonols, antioxidants, and sugars were analysed through HPLC at 8 weeks after treatment at 4°C.

IV. The results of research and development

1. Production trends of onion and garlic, and ecology of disease of postharvest disease

Major production areas of onion and garlic was investigated for cultivation and production status. Also ecology of postharvest diseases that caused qualities and economic loss was studied in the continuous cultivation areas of Muan, Chonnam province.

Table 1. Production and cultivation status of onion and garlic of Muan, Jeollanam-do

Year	Onion				Galic			
	Hectare (ha)	Kg	Production (M/T)	Net profit (billion WON)	Hectare (ha)	Kg	Production (M/T)	Net profit (billion WON)
2009	3,982	6500	258,830	129.4	861	1,200	10,332	14.5
2010	4,074	6700	272,958	150.1	593	1,134	6,725	20.1
2011	3,703	6000	222,180	122.1	661	1,128	7,456	26.0

Onion : 2009yr 500won/kg, 2010yr 550won/kg, 2011yr 550won/kg

Garlic : 2009yr 1,400won/kg, 2010yr 3,000won/kg, 2011yr 3,500won/kg

Major storage pathogens of 13 species such as *Botrytis aclada*, *Aspergillus niger*, *Penicillium spp.*, *Fusarium spp.*, *Rhizopus spp.* were identified. White fungus growing with white fungi (*Fusarium*) and gray mold (*Botrytis acalada*) were major pathogens, then followed by *Penicillium spp.* in cold storage of Muan of Cheollanam-do.

2. Inhibitory effects of thymol on postharvest pathogen *in vitro*

The effects of thymol on fungal growth was very significant, of 6 species (*Botrytis aclada*, *Fusarium accuminatum*, *Fusarium proliferatum*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium sp.*, *Aspergillus niger*) isolated from onion and garlic. The concentration of 10ppm thymol inhibited the mycelial growth and spore germination. Especially gray mold pathogen was significantly inhibited. 30ppm of thymol inhibited mycelial growth much more than the 20ppm of sulfur dioxide.

The fumigation of thymol dissolved in ethanol to onions using room chamber at 4°C and 25°C resulted in less than 10% of disease incidence compared to more than 90% disease incidence of non-treated control.

When the storage period was increased for 16 weeks, also the effect of thymol was significantly higher than the untreated control.

3. Effect of thymol fumigation by heating on postharvest disease as pilot experiment (at 4 months of storage of 6, 14 M/T containers)

Muan produced onions of cold storage container in Iksan was treated with 20ppm SO₂, and 30ppm thymol, respectively and stored for 4 months at 5 °C and disease incidences were investigated compared to the untreated control. The results showed 0% disease incidence from the fumigation of thymol, 17.8% of sulfur dioxide treatment and 33.3% of the untreated control (LSD, *P* = 0.05).

Also there was no sprouted onions in thymol treated at 4 months after treatment but many several sprouted onions in the untreated control (Table 2).

Table 2. Effect of thymol fumigation by heating on postharvest disease as pilot experiment (4 months of storage)

Replication	Disease incidence A(%) ^b			Disease incidence B(%) ^c : severe infection		
	Treatment ^a Untreated	Sulfur dioxide	Thymol	Untreated	Sulfur dioxide	Thymol
R1	40	18	0	10	2	0
R2	38	10	0	9.0	2	0
R3	29	22	0	7.0	0	0
R4	26	21	0	14	2	0
Mean	33.3a ^d	17.8b	0c	10a ^d	1.5b	0c

^aThe onions in the 8 bags of 20kg were treated with 30ppm of thymol in the 6 tons and 14 tons of storage container for untreated control and thymol treatment, respectively.

^bOnions were infected only around root attached area.

^cWhole onions were infected severely.

^dThe means followed by same letter are not significantly different between treatment (LSD, $P=0.05$)

Measurement of the residual amount of thymol on onion surface after treatment of thymol fumigation dissolved in ethanol at a concentration of 30ppm. Thymol was dissolved in 95% ethanol with 30ppm of concentration and thymol was fumed for 24 hours. The residual amount of thymol on onion surface after treatment was analysed by GC-MS. Residual thymol was detected at 7.55ppb per 1 gram of onion, which is far below safety level.

4. Application of thymol fumigation to a commercial storage rooms in size of 29 pyung (95.7m²) of Mongtan Agricultural Cooperation, Jeollanam-do (547 tons of volume in size and stored 160 M/T of onion).

Major postharvest pathogens were identified to be various fungi such as *Fusarium* and *Botrytis* in onion. However, disease incidence of these disease were very low that made us not to apply to garlic in commercial scale. Also it was very difficult to have cooperation with storage facilities of garlic. The study was conducted with a focus on technology development to control postharvest disease of onions in the massive storage houses.

Fumigation (20-30ppm of thymol based on total volume of storage room) effect of postharvest disease incident was greatly significant and residual thymol was not detected by GC-MS after long term storage 7 - 10 months.

After 6 months storage, 70 onions were infected from the untreated control room. In

contrast, only 3 onions were infected from the thymol fumed room among the places of one–twenty–second section of total pallets stacked in the whole storage room (Table 5, Fig. 1). To reduce the loss, the onions were all sold after 6 months of storage of the control. However, the onions of the thymol fumed room were sold at 10 months after storage with 17% loss of onions. In the untreated control, 20% loss was already occurred even at 7 month after storage (Fig. 2).

Cost and Yearning Analysis (based on storage room with size of volume 547M/T):

Approximately 8,000 bags of 20kg onion were stored.

Fumigation increase storage period more than 3 months.

Reduction was 96% less of 20kg size of bags: 8000 x 96% (See Table 5) = 7680bags saved

Net price of 20kg = 10,000WON. ₩10,000 x 7680 bags = 76,800,000,000WON saved per storage room – 300,000won (76500000won)

In reality, the Cooperation sells to market with reduce price.

If assumed to 2,000won reduction per bag before three months. 8000x2000=16,000,000won loss.

In table 5, (1540–66)bags X 10,000won = 14,740,000won loss by postharvest disease

Cost: 300,000won (reagent grade of thymol 3kg used)

Net profit: about 30,000,000won ((16,000,000 + 14,740,000) per room

Table 5. Control effect of thymol fume in commercial scale at 7 months after treatment

	<i>B. aclada</i> (Gray mold)	<i>Fusarium</i> species	<i>Penicillium</i> species and others	Infected onions (one of twenty–second of room) ^a	Expected total onions (whole room) ^b
Untreated 20ppm	24	11	35	70	1,540
Thymol fume	1	2	0	3 (96% reduction)	66

^aAbout one–twenty–second (1/22) areas of room only could be accessed to observe.

^bWhole room assumed at the time of 6 months after storage. Deterioration by disease and rotting is assumed to accelerated in longer storage. In fact, the loss was 17% after the 10 months of storage. The control had 20% loss of whole 8,000bags after 6 months storage.

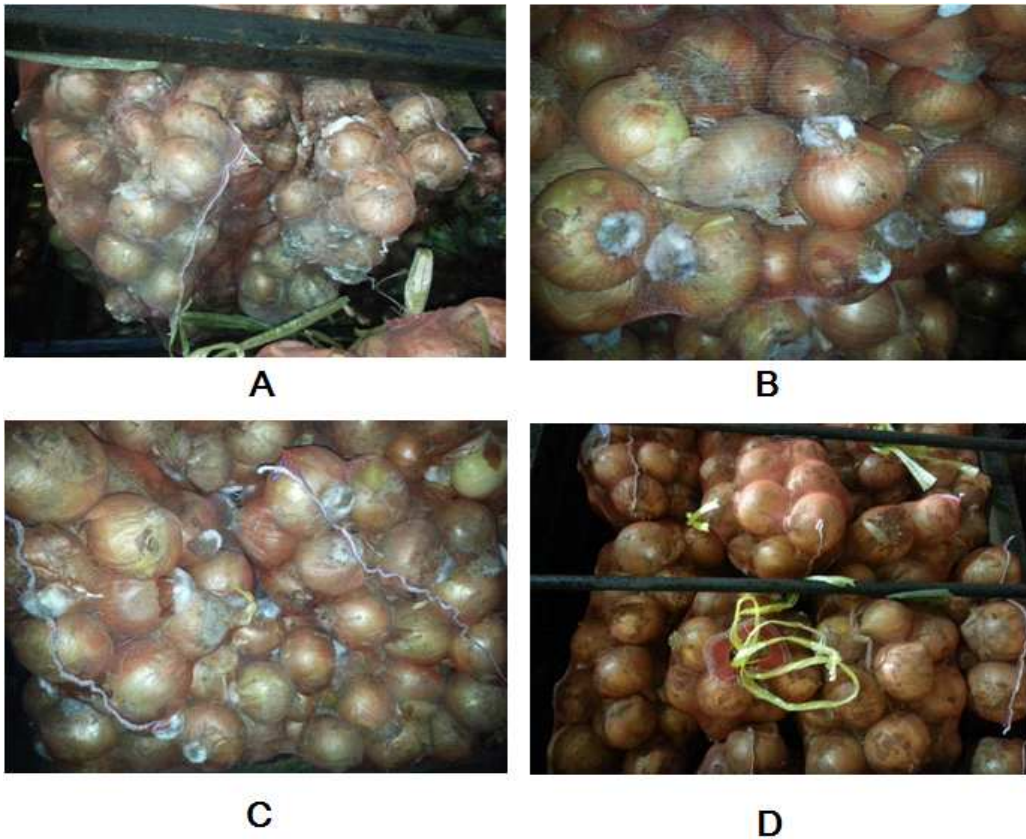


Fig. 1. At 6 months after treatment. A, B and C; Diseases in the untreated control D. Onions treated with 20ppm of thymol fume (note no disease occurred)

5. Analysis of residual thymol of onions with GC-MS

The residual thymol existed as $0.0408\mu\text{g}$ per 1cm^2 and $12.8\mu\text{g}$ per whole onion at 3 hrs after treatment, and $0.0047\mu\text{g}$ per 1cm^2 and $1.49\mu\text{g}$ per whole onion at 24 hours after treatment. The residual concentration of thymol would be 0.009ppb per gram of onion.

The residual thymol existed as $0.4588\mu\text{g}$ per 1cm^2 and 13.69ppb per whole garlic at 3 hrs after treatment, and $0.0047\mu\text{g}$ per 1cm^2 and $1.49\mu\text{g}$ per whole onion at 24 hours after treatment. The residual concentration was significantly dropped to negligible level at 24 hrs after treatment, indicating that continual degradation or volatilization be progressed with time.

CONTENTS

Chapter 1 Introduction of research development.....	22
Section 1. Technological view.....	22
Section 2. Economical view.....	23
Section 3. Society view.....	24
Chapter 2. Status of technological development of domestic and foreign country.....	25
Chapter 3. Contents of research development and results.....	27
Section 1. Study on postharvest disease incidence of onion and garlic in storage	27
1.. Introduction.....	27
2. Materials and methods.....	28
3. Results	31
4. Discussion.....	40
Section 2. Effect of thymol on inhibition of growth and spore germination of postharvest pathogen	42
1. Introduction.....	42
2. Methods and results.....	42
3. Discussion.....	58
Section 3. Technology development of thymol fumigation and its effect on onions	58
1. Introduction.....	58
2. Effects of thymol on postharvest disease in cold storage for 9 weeks	58
3. Effect of thymol spray on postharvest disease in cold storage for 16 weeks	60
4. Analysis of thymol residue on onion and garlic fumed with dissolved thymol with GC-MS.....	61
5. Residual analysis of thymol on onion and garlic treated with thymol fumed without ethanol	64
6. Pilot experiment of thymol fumed directly from solid thymol and residual thymol analysis.....	69
7. Effect of thymol fumed directly from solid thymol on postharvest disease of onions stored for 4 months	72
8. Technology development of thymol fumigation	74
9. Commercial application of thymol fumigation in the storage room with size of 95.7m ² (547 tone in volume of storage room) in Mongtan Agricultural Cooperation.....	81
Section 4. Effect of thymol fume on quality of onions	87
1. Introduction.....	87

2. Materials and methods.....	87
3. Results and discussion.....	89
Section 5. Basic study on solvent for thymol fumigation	92
Chapter 4. Accomplishment of the objectives and contribution to related areas	102
Chapter 5. Achievement of research and development, and application of the achievement.....	104
Chapter 6. Information of foreign on the technology during the research period.....	105
Chapter 7. Research facility and equipment used for this research.....	106
Chapter 8. Reference.....	107

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요.....	22
제1절 기술적 측면.....	22
제2절 경제 산업적	23
제3절 사회적 측면.....	24
 제 2 장 국내외 기술개발	 25
 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과.....	 27
제1절 양파, 마늘 저장고 내의 부패균 발생 특성, 현황 및 생태 분석.....	27
1. 서론.....	27
2. 재료 및 방법.....	28
3. 결과	31
4. 고찰.....	40
 제2절 식물 정유 티몰의 훈증 효과 및 처리 기술 개발.....	 42
1. 서론.....	42
2. 실험 방법 및 결과.....	42
3. 고찰.....	58
 제3절 티몰의 훈증 처리 기술 개발 및 훈증 효과.....	 58
1. 서론.....	58
2. 저온 저장 (4℃)시 티몰 처리의 저장병 방제 효과 (9주 저장 1차 시험).....	58
3. 저온 저장한 무안양파에 대한 티몰 분무 처리의 저장병 발생 억제 효과 시험 (16주 저장 2차 시험).....	60
4. 에탄올 용해후 훈증 양파에 대한 GC-MS를 이용한 티몰 잔류량 분석.....	61
5. 티몰고체를 35ppm, 42ppm의 농도가 되도록 가열 훈증처리 하였을 때 양파와 마늘의 티몰 잔류량에 대한 GC-MS 분석 (실온에서 처리 시험).....	64
6. 티몰 고체 가열 훈증 처리 기술 개발을 위한 파일럿 시험 및 티몰 잔류량 분석.....	69
7. 파일럿 시험으로서 무안 양파의 저장병에 대한 티몰 고체의 가열 훈증	

처리 효과(4개월 저장)	72
8. 티몰 훈증 처리 기술 개발.....	74
9. 티몰 훈증처리를 위한 전라남도 무안 몽탄농협 29평 (547톤) 양파 저온 저장고 실증실험.....	81
제4절 저장병 방제를 위한 티몰 훈증 처리가 양파의 품질에 미치는 영향.....	87
1. 서론.....	87
2. 재료 및 방법.....	87
3. 결과 및 고찰.....	89
제5절 저장병 방제를 위한 티몰 훈증 용매 기초 연구.....	92
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도.....	102
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획.....	104
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 과학기술정보.....	105
제 7 장 연구시설·장비 현황.....	106
제 8 장 참고문헌.....	107

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1절 기술적 측면

양파의 수확시기는 대부분 장마기와 겹쳐 적기에 수확이 어렵고 수확한 양파는 건조가 제대로 되지 않아 저장 중 양파 부패피해는 매우 심각함. 특히 양파는 수확 후 저장고(상온, 저온)에 입고되기 전에 논둑이나 길옆에 야적한 상태로 비를 피할 목적으로 비닐을 씌워 저장할 경우 매우 다습한 상태가 되어 양파 검은곰팡이병에 의한 피해가 매우 큼. 양파 저장 중 발생하는 병은 대부분 재배기간 중에 침입 감염되어 저장 중 발병 조건에 이르면 격발하게 됨.

양파 저장 중 발생하는 주요 병으로는 저온 다습할 때 주로 발생하는 잿빛썩음병과 푸른곰팡이병, 저온저장고에 넣기 전 상온에 쌓아 둘 경우에 큰 피해를 주는 검은곰팡이병, 어린묘로부터 저장에 이르기까지 계속해서 발생하는 시들음병 (마른썩음병) 등이 있으며, *Pseudomonas* spp 등 세균에 의한 피해가 최근 들어 점차 증가되는 추세로 이에 대한 많은 관심이 요구됨. 그 밖에 잎마름병, 탄저병, 효모에 의한 피해도 발견되기는 하나 미미한 실정임 (그림 1).



그림 1. 저온저장 중 부패된 양파 모습

양파에 *Sclerotium cepivorum* 에 의한 흑색썩음균핵병의 피해가 최근 매우 넓은 면적에 확산되어 있으며, 마늘, 파, 쪽파에도 발생하여 큰 피해를 주고 있다. 특히 밭 양파 재배지역은 무안지방에서 피해가 크며, 양파가 연작되는 밭에서 문제가 되며 마늘에 피해가 큰 포장에 양파를 재배하여 피해가 확산되는 것으로 생각된다. 퇴비, 화학비료, 석회질소의 시용은 본 병의 발생에 영향을 준다. 기주 범위는 파, 마늘, 쪽파 등 과속 식물을 침입하는데 우리나라 남부지방의 양파재배지에 발생하여 큰 피해를 주고 있다. 따라서 기주가 같으므로 마늘 지대의 흑색썩음균핵병 발생포장에는 양파를 재배하지 않도록 해야 한다.

양파 저장 중 부패를 줄이기 위해서는 재배기간에는 적절한 비배관리를 하고, 가능한 한 맑은 날씨에 수확작업을 하는 것이 좋으며, 특히 간편한 작업을 위해 수확 전에 양파 줄기를 미리 잘랐을 때 강우가 계속되어 수확시기를 일실하면 심한 피해를 받게 되므로 이런 작업은 가능한한 지양해야 함.

양파 잿빛썩음병은 지상부에 발생하여 비가 올 때 빗물을 따라 주두부분으로 이행되므로 이 부분에 발생이 많음. 저장 중 이 병에 의한 피해를 줄이기 위해서는 생육기간 동안 등록약제를 철저히 살포하면 그 피해를 줄일 수 있을 것임.

양파는 재배상의 문제, 저장기술의 문제 등에 의해서 저장고내에서 많은 양의 식물병원균에

의하여 부패됨. 정확한 통계자료는 없으나 저장량의 약 20% 정도가 병원균에 의한 부패라고 알려지고 있음. 따라서 재배포장 및 저장고 내에서의 식물병의 방제는 수량 증산 및 품질 향상에 있어서 매우 중요한 요인이 됨.

양파의 경우 재배 과정에서 질소(N)나 인산(P)과 같은 비료의 과다 사용으로 인해 양파의 영양이 불균형 상태에 이르게 되면 생리적인 퇴화가 쉽게 일어나 곰팡이나 박테리아와 같은 병원균에 대한 저항성이 약해져 급격히 부패되는 것으로 알려져 있음. 곰팡이나 박테리아에 오염된 양파가 저장고에 입고되어 장기간 저장되면 습도가 매우 높은 저장고 환경 하에서 쉽게 번식하게 되고 송풍기와 덕트, 적재된 모든 양파에 전염됨으로써 부패가 가속화되어 저장된 양파의 엄청난 손실을 가져오게 됨(그림 2).

농약사용에 의한 저장병 방제는 수확후 농산물에 대한 약제를 처리하기 보다는 수확전 약제를 살포하여 병원균의 밀도를 줄임으로써 수확후 저장 중 부패를 줄이는 방법이 주로 이용되고 있음. 하지만 국내의 경우 농약을 전혀 사용할 수 없기 때문에 저장 중 부패를 줄일 수 있는 경감기술의 개발이 절실히 요구되고 있음.

양파, 마늘은 연작에 의해서 해마다 저장중 병발생이 심각해지는 실정임. 이러한 저장병 방제를 위해서는 정확한 병원균 규명과 생리, 생태적 특성에 대한 연구가 필요함.

양파, 마늘 등을 0°C에 저온 저장을 하면 저장병원균의 발생율을 10%~20% 수준으로 감소시킬 수는 있으나 양파, 마늘의 수확기가 여름시기이므로 이후 저온 저장을 유지하기 위하여 막대한 비용을 소모하게 됨. 그러나 상온 저장을 하면 부패율은 경우에 따라서 심지어 70%~80% 까지도 도달함. 또한 잣빛썩음병이나 무름병등은 0~5°C에서도 자라므로 이병에 감염되면 저온저장고 내에서도 발병이 진행됨. 최근 우리나라에서도 국외에서와 같이 상온 저장을 하려는 시도가 있는데 이를 달성하기 위하여는 저장고의 수확물을 훈증할 수 있는 기술 개발이 매우 시급한 실정임.

제2절 경제 · 산업적 측면

국내 저온저장고는 '97년도 기준으로 32만평인데 이중 양파와 마늘이 각각 42%와 13%를 차지할 정도로 농산물 저장유통 산업에서 양파와 마늘이 차지하는 비중은 매우 큼(표 1).

표 1. 품목별 저온저장 물량(M/T) 및 점유율 (1997)

품 목	양파	마늘	사과	단감	밤	배	기타	계
저장물량	154,229	48,837	56,333	25,549	17,413	17,104	134,686	364,469
점유율 (%)	(42.3)	(13.4)	(15.4)	(7.0)	(4.8)	(4.7)	(12.4)	(100.0)

국내산 양파의 경우 저장중에 이차생장이나 생리 및 병리적 부패로 인해 폐기되는 양이 거의 30%에 가까운 것으로 추정됨. 특히 국내 양파 품종은 목줄기가 두꺼워 수확시 절단부위를 통해 병원균의 침입과 이차생장이 용이하므로 저장중에 쉽게 부패되는 것으로 알려져 있음. 또한 껍질이 얇고 층이 적어 저장이나 유통과정에서 변질로 인한 상품성 저하 및 손상으로 인해 막대한 경제적 손실을 가져오고 있음.

마늘은 5월말부터 7월초순경에 수확되어 오랜 기간동안 저장되므로 저장중 부패율이 많은데 특히 겨울철을 지나 봄까지 저장된 마늘은 78%까지 부패율을 보임.

중국에서 생산된 양파는 최근 품질이 개선되고 가격면에서 국산보다 월등한 경쟁력을 가지고 있기 때문에 수입량이 급격히 증가되리라 예상됨. 특히 중국산 양파의 도매가격이 202원/kg 로 국내산 가격 (509원/kg)에 비해 2.5배가 낮음(표 2). 따라서 수확후 품질관리 개선

을 통한 비용절감에 의해 국내산 양파의 가격경쟁력 확보가 시급히 요구되는 실정임.

표 2. 중국산과 한국산 양파의 경쟁력 비교

가격경쟁력	품질경쟁력	기타 경쟁력
<ul style="list-style-type: none"> ○ 양국 도매시장 가격비교시 한국산이 중국산의 2.5배(2000년) ○ 미국산에 비해 가격도 저렴하고 품질도 좋아져 수출증가 추세 ○ 신선양파 수입판매가 국산에 비해 약 20% 저렴하여 수입확대 가능성 큼 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 양질의 수입종 사용, 비닐피복 재배, 재배기술 향상, 수확후 건조·선별 양호로 한국산과 차이가 없음 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 수출목적의 재배면적 급증으로 수출잠재력 큼 ○ 수입종 사용, 비닐피복재료, 밀식재배로 한국과 유사한 단수

저장고 내에서의 부패율의 증가에 의해 장기 보관한 양파의 저장물량이 부족한 현상을 낳게 되는데 이로 인한 가격상승을 막기 위해 외국산 양파가 수입되어 국내산 저장양파의 가격하락을 초래하고 있으며 양파의 생산 및 수확후 관리가 낙후된 상태에서 부패율 증가에 따른 원가의 상승으로 가격경쟁력 측면에서 외국산 양파에 비해 열위에 있게 되므로 미국이나 기타 양파 수출국으로부터의 값싼 양파의 수입이 더욱 증가할 것으로 예측됨.

저장병은 대부분 저장고 내부에서 발생하여 감염되는 것보다 저장전 토양이나 운송과정에서 감염되어 잠복하고 있다가 저장중 발현하는 것이 대부분임. 하지만 저장병 방제를 위해서는 저장고 소독과 함께 재배지에서의 관리도 매우 중요하다고 할 수 있음. 이러한 저장병은 적절히 방제하지 않을 경우 그 확산속도가 매우 빠르며 토양내 잔류에 의한 지속적인 피해를 주기 때문에 저장병에 의한 손실을 막기 위해서는 반드시 철저한 방제를 실시하여야 함

제3절 사회적 측면

기 개발된 수확후 작업체계 및 시설을 통해 양파의 수확후 물류체계를 크게 개선함으로써 농산물 유통구조 개선에 기여함.

새롭게 개발된 수확후 훈증처리제 개발을 통해 고품질의 양파를 유지 관리하고 국내 농산물의 대외 경쟁력을 확보함으로써 농가소득 증대를 가져와 궁극적으로 농민의 농사의욕을 고취시킬 수 있음.

농산물의 수출 현장에도 적용이 가능하게 된다면, 신선 농산물, 신선 화훼류의 일본 수출 등이 더욱 증가될 수 있고 화훼류에서는 수출 선적후 도착지에서 저장병원균 또는 해충 검출에 의한 소독명령을 받게 되어 막대한 손실을 입는 경우가 현저히 감소될 수 있을 것임.

농촌의 소득향상 및 기술첨단화에 따른 도시와 농촌간의 사회 문화적 격차해소에 기여할 것으로 판단됨.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

국내의 생물학적 방제연구는 토양 및 엽권에 생육기에 발생하는 병해만을 대상으로 수행되어 왔을 뿐 저장 중에 발생하는 병해를 대상으로 한 연구는 전무한 실정임

마늘에는 저장균이 매우 중요한데 불구하고 단지 푸른곰팡이병과 마른썩음병에 의한 피해가 크다고 보고되어 있을 뿐 정확한 피해 조사나 병원균 분류동정이 조사되어 있지 않음. 최근 저장중 부패를 줄이기 위한 방법 이외에 길항균이나 영양원 경합균 처리에 의한 저장병의 생물학적 방제연구가 활발히 추진되고 있음. 저장조건은 엽권이나 근권에 비하여 환경조절이 쉽고, 미생물을 처리할 경우 환경에 의한 영향을 덜 받고, 처리하고자 하는 부위에 길항균의 투여가 용이하다는 장점이 있어 미국, 캐나다, 스페인, 이스라엘, 호주 등의 선진국을 중심으로 실용화 연구를 활발히 추진하고 있음.

저장병 피해를 줄이기 위한 연구는 경종적 측면에서 기상환경을 고려한 수확 및 수확기 조절, 시비, 농작업시 상처발생 배제, 저장중 부패에 관여하는 온도, 습도, CO₂ 등 환경요인 조절, 열처리, 저장시설 개발 등에 역점을 두고 추진되고 있으며, 일부 국가에서는 주로 열대 및 아열대 과일 및 채소를 중심으로 농약사용에 의한 화학적 방제도 추진되고 있음

Dubey와 Kishore (1988)은 *Melalleuca leucadendron*, *Ocimum canum*, *Citrus medica* 등의 식물 오일이 *Aspergillus* 종들에 대하여 항균 활성이 있음을 보고하였으며, 과일 및 채소류에 식물오일을 살포하거나, 과수 및 채소류를 식물 오일에 침지하여 저장병의 방제에 적용할 수 있다는 것이 제시됨(Aeschbach et al., 1994, Backheet, 1998, Bhaskara et al, 1998, Tiwari et al., 1988; Smid et al., 1994; Dixit et al., 1995, Liu et al., 2002). 또한, 휘발성이어서 저장병원균의 방제에 아주 효과적으로 사용될 수 있음(Mihaliak et al, 1991, Rakotonirainy and Lavedrine, 2005).

식물오일은 식물들이 식물병원균에 대한 저항성 기작으로 생성성하는 물질인 것으로 알려져 있음(Deighton et al., 1994, Mihaliak et al, 1991). 그러나, 대부분의 식물오일을 이용한 항균 효과와 저장병 방제 연구는 실험실 수준에서 이루어진 것이며, 생체에서, 그리고 실제적 적용을 위한 연구는 외국에서도 매우 소수에 불과함

유황훈증처리를 위해 유황을 태우는 과정에서 유황이 타면서 나오는 이산화황(아황산무수물 SO₂)이 미생물 번식을 막아 부패를 방지하기 때문에 요즘은 유황훈증을 하지 않는 곳은 전국적으로 찾아보기가 힘들. 그러나 유황은 천식환자 등에게 치명적인 해를 줄 수 있어서 식품의약품안전청은 이산화황 잔류기준을 2천ppm 이하로 규제하고 있음. 하지만 이산화황 잔류기준이 정해져 있을 뿐 유황 사용 자체를 강제로 막을 법이나 규정은 현재 없기에 아주 안심하고 먹을 수 있는 상황이 아님.

Tymol은 thyme (*Thymus capitatus*)식물 오일의 주성분인데 의약품, 식품보존제, 주스류의 첨가제로 사용되고 있는데 (Burt, S. 2004), 체리를 30ppm의 tymol로 훈증한 결과 *Botrytis cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병을 무처리구의 35%에서 0.5%로 감소하였다고 하였음 (Chu et al., 1999). 또한 티몰 처리에 의하여 사과 저장병원균인 잿빛곰팡이병에 대한 억제 효과가 무처리구 대비 38% 감소되었다고 보고되었다(Kim et al, 2007).

식물 정유 티몰은 인공적으로 합성되고 있으며 병원균 사멸 효과는 10-30ppm에서 항균 효과가 높고 1kg 당 15,000원 정도로 매우 저렴할 뿐만 아니라 인체에 대한 안정성 또한 높아서

있어서 미국 환경청은 이에 대한 허용한계 농도를 설정하지 않고 있음. 마늘 양파 저장고의 훈증 기술 개발은 매우 절실하지만 적용할 수 있는 이와 같은 훈증 기술은 아직 없음. 마늘에는 저장병원균이 매우 중요한데 불구하고 단지 푸른곰팡이병과 마른썩음병에 의한 피해가 크다고 보고되어 있을 뿐 정확한 피해 조사나 병원균 분류동정이 이루어지지 않음.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1절: 제1세부과제: 양파, 마늘 저장고 내의 부패균 발생 특성, 현황 및 생태 분석

○ 연구개발 목표: 양파, 마늘 저장고 내의 병원균 발생특성 조사

○ 연구개발 내용

- 양파, 마늘의 주산단지 전라남도 무안의 양파, 마늘의 저장 조건 및 피해 발생 현황 조사
- 양파, 마늘의 주요 저장병 발생형태 실태조사 후 저장병 발생 원인 규명
- 국내 양파, 마늘의 저장시설 및 설비에 따른 저장병 발생 실태 조사 후 발생경로 규명

1. 서론

양파는 백합목 부추과 부추속에 속하는 다년생 식물로 동서양을 막론하고 야채와 향신 조미료로써 널리 사용되고 있다. 양파의 품종은 겉껍질 색깔로 보면 백색, 황색, 적색이 있다. 우리나라에서 생산 유통되는 품종은 대부분 황색이며 백색은 없고 적색 양파도 한 품종만 생산 유통되고 있고 백색 양파는 미국에서 주로 재배 된다. 재배 출하시기로는 5월 말부터 수확이 가능한 조생종(극조생), 6월말부터 수확이 가능한 중생종과 만생종으로 구분된다. 양파는 품종에 따라 맛, 형태, 색깔, 저장성 등이 다양한데, 조생종은 대체로 매운맛이 약하고 당 함량이 낮으며 수분함량이 높아 저장력이 떨어지는 반면, 중,만생종은 매운맛이 강하고 당 함량이 높으며 저장력이 강해 주로 장기저장용으로 재배된다. 양파의 모양으로 보면 편형, 편원형, 원형, 타원형, 원추형에 이르기까지 다양하다.

초기에 조생종은 편평형, 중만생종은 편원형의 양파가 주류를 이루어 왔으나 수요의 변화와 더불어 최근에는 조생종 및 중,만생종 구분 없이 구형에 가까운 품종 위주로 개발되고 있다. 양파는 4-6월에 수확이 집중되므로 연중 공급을 위해 장기저장이 필수적인 작물이지만 수확 후 관리가 제대로 이루어 지지 않아 저장 중 부패 및 생리장해로 인한 손실이 매우 높다. 저장 중 부패율을 낮추기 위해 수확후 예건 공정이 필수적으로 요구되는 작물이다.

양파의 저장성에는 여러 요인이 관여하나 토양조건, 시비, 품종, 수확기, 저장 중 온도·습도 등이 주요 원인이다. 상온의 간이저장 시설에서 저장하는 방법으로 휴면기인 2-3개월은 저장이 가능하나 그 이후는 맹아신장 및 부패로 인해 상품성이 떨어지고 저온 저장시에는 온도는 0℃ 전후, 상대습도는 70-80%가 적당하며, 충분히 예건시킨 후 저장하는 것이 효과적이다. 양파는 수분함량이 높기 때문에 -1℃ 이하 의 온도에서는 동해를 입을 수 있다.

그러나 상대습도가 조절되는 저온저장고의 사용이 미비한 실정이고 저장기간이 길어질수록 양파 호흡량 상승에 의한 수분함량이 늘어나며 당함량이 감소하여 상품가치가 떨어진다. 이에 저장고 내에서의 양파의 부패율은 약 30%에 달할 정도로 높고 저온 저장고를 유지하기 위해 서도 과다한 경비가 지출되고 있기 때문에, 상온에서 양파를 보관하려는 노력이 있어 왔다.

양파의 수확시기는 대부분 장마기와 겹쳐 적기에 수확하기 어렵고 수확한 양파는 건조가 제대로 이루어 지지 않아 저장 중 부패 피해가 매우 심각하다. 양파 부패에 관여하는 대표적인 병원을 살펴보면, 곰팡이는 잿빛곰팡이병 (*Botrytis* spp.), 마름썩음병(*Fusarium* spp.), 검은곰팡이병(*Aspergillus* spp.), 푸른곰팡이병(*Penicillium* spp.) 등이 있으며 세균은 무름병(*Erwinia* spp.) 및 썩음병(*Pseudomonas* spp.)등이 주종이다. 현재 보고되어 있는 양파 저장병원균으로

서 잿빛곰팡이 병은 *Botrytis alli* (acalada), *Botrytis cinerea*, *Botrytis squamosa* (한국에 존재하는지에 대한 논란 가능성 존재) 등이, 시들음병 및 저장병원균인 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cepae*, 검은곰팡이병은 *Aspergillus niger*, 푸른곰팡이병 *Pecillium* species, 흑색석음균핵병(*Sclerotinia sclerotium*) 등이 보고되어 있고 세균병으로는 *Pseudomonas* sp. *Burkholdera cepacia* 등이 보고되었다 (한국식물병목록 2009).

양파의 저장병을 일으키는 병원균의 대부분은 상처 부위를 통해 침입하는데 예건과 같은 저장 전 처리과정의 미비에 의해 상처부위가 제대로 치유되지 않아 부패가 일어나게 된다. 마늘 역시 수확 전후 처리 기술개발이 미흡하여 저장 중 부패되고 품질이 저하되므로 이에 대한 대책 마련이 시급한 실정이다. 수확기를 전후하여 온도가 고온이고 다습할 경우 잎마름병의 발생이 증가되어 저장 중 부패의 원인이 된다. 이 병이 발병된 포장에서 수확작업시 상처가 나면 지상부에 발생된 병원균이 빗물을 타고 구근으로 내려와 병든 부위부터 병을 일으킨다.

이 병이 발병된 포장에서 수확 작업시 상처가 나면 지상부에 발생된 병원균이 빗물을 타고 구근으로 내려와 병든 부위부터 병을 일으킨다. 대부분의 저장병원균은 토양 속이나 토양내의 병든 식물체에서 생존하다가 수확작업이나 기타 농작업을 할 때 상처를 통해 쉽게 침입한다. 특히 수확기에 비가 계속되어 제때에 수확을 하지 못하거나, 수확한 마늘을 제대로 건조하지 못했을 경우 많은 발병을 보일 때가 많다. 한편 장기간 마늘을 연작할 경우 토양 내 병원균의 밀도가 증가되어 많은 부패를 초래하기도 한다.

마늘 저장 중 피해를 주는 병원균으로는 *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Stemphyllium* spp. 등이 관여하는 것으로 알려져 있으나 병원균별, 저장환경별, 재배조건별 피해정도에 대해서는 구체적으로 연구 검토된 바가 거의 없다. 일부 국가에서는 주로 열대 및 아열대 및 채소를 중심으로 농약사용에 의한 화학적 방제도 추진되고 있다. 수확 전에 약제를 살포하여 병원균의 밀도를 줄임으로써 수확 후 저장 중 부패를 줄이는 방법이 주로 이용되고 있으나, 양파는 재배상의 문제, 저장기술의 문제 등에 의해서 저장고내에서 많은 양이 식물병원균에 의하여 부패되는데 정확한 통계자료는 없으나 저장량의 약 20% 정도가 병원균에 의한 부패라고 알려져 있다.

따라서 재배포장 및 저장고 내에서의 식물병의 방제는 수량 증산 및 품질 향상에 있어서 매우 중요한 요인이 되고 있다. 본 식물정유 티몰을 이용한 양파 및 마늘의 장기저장 기술 개발 과제는 현장 적용을 위한 훈적 적용 기술 개발로서 식물 정유 티몰이 식품첨가물로 판매가 되고는 있으나 티몰에 대한 저장병 방제에 적용하는 실용화 기술은 현재 없기 때문에 저장병원균에 대한 식물 정유 티몰의 항균연구 뿐만아니라 이에 적용할 수 있는 실용화 기술을 개발하고자 동일한 조건에서 무처리와 처리시의 효과를 조사하는 것으로서 티몰의 훈증 효과 조사 시 모든 처리구에 사용되는 양파는 동일한 상태의 양파를 가지고 실험을 진행하였다. 1년차 연구에서는 양파, 마늘 저장고 내의 병원균 발생특성을 조사하기 위해 양파 마늘의 주산단지 전라남도 무안군의 농가 및 저온저장고의 실태를 조사하고 저장 양파와 마늘로부터 병원균을 분리 동정 하여 저장병의 발생 원인을 구명하였다.

2. 재료 및 방법

본 실험은 2011년 9월부터 2012년 7월까지 양파 마늘의 주산단지인 전라남도 무안군의 재배 농가, 농협 및 개인회사의 저장고를 선정하여 실시하였다.

병징 및 발병 조사. 양파와 마늘의 주산단지인 전남 무안군의 양파와 마늘의 재배 생산동향 및 현황을 조사하고 2012년 12월부터 저온 저장된 양파가 출하되기 전까지 전남 무안군의 양파 연작재

배지에서 자연발병에 의해 상품가치가 떨어지는 양파와 마늘의 병징을 관찰하였고 연작재배지에서 수확한 양파와 마늘을 큐어링 처리한 후 저온저장고에 보관되어지는 양파와 마늘에서 곰팡이병에 의한 발병율을 조사하기 위해 무안군 무안읍에 위치한 농협 및 개인 기업체의 저장고 8곳을 방문하여 발병정도 및 발생경로 등을 조사하였다.

Table 1. 양파, 마늘의 주산단지 전라남도 무안군의 연도별 양파 마늘 재배면적 생산동향

연도	양파				마늘			
	면적(ha)	단수(kg)	생산량(톤)	조수익	면적(ha)	단수(kg)	생산량(톤)	조수익
2009	3,982	6500	258,830	1294억	861	1,200	10,332	145억원
2010	4,074	6700	272,958	1501억	593	1,134	6,725	201억원
2011	3,703	6000	222,180	1221억	661	1,128	7,456	260억원

양파 : 2009년 500원/kg, 2010년 550원/kg, 2011년 550원/kg 기준으로 조수익산출

마늘 : 2009년 1,400원/kg, 2010년 3,000원/kg, 2011년 3,500원/kg 기준으로 조수익산출

Table 2. 양파, 마늘의 주산단지 전라남도 무안군의 품종에 따른 재배 현황

양파	조생종	중만생종
2010년 재배 품종	한터 (8,800)	선파워(53,400)
	우리황(5,000)	
	하마에미(9,800*)	뉴마르스(36,900)
	미래황(2,700)	카다마루(44,900)
	쏘닉(3,000)	천주황(8,000)
	기타(30,100)	기타(40,400)
2011년 재배 품종	한터(9,200)	선파워(63,200)
	우리황(500)	
	하마에미(11,000*)	뉴마르스(42,300)
	미래황(2,000)	카다마루(49,400)
	쏘닉(1,800)	천주황(2,000)
	기타(18,300)	기타(46,000)
마늘	2010년 재배 품종	2011년 재배 품종
재배 품종	남도(33,200*)	남도(41,600*)
	대서(4,400)	대서(5,200)
	기타(1,800)	기타(1,200)

전라남도 무안에서 가장 많이 재배되고 있는 품종은 양파는 선파워, 마늘은 남도 마늘 품종이 가장 많았고 재배시 가장 큰 문제점은 병해충에 대한 피해가 가장 많았음. 양파와 마늘에서는 내병성,내충성에 강한 품종에 대한 연구 결과가 미비한 실정임. (*) 양파와 마늘 재배자들 가운데 재배 면적 당 가장 많이 재배되는 품종



Fig. 1. 전라남도 무안군의 양파재배 농가에서는 5월 말부터 출하되는 조생종 양파로 겉껍질 색깔에 따른 2종류 황색양파 와 적색 양파가 재배되고 있었고 병해충으로 인한 피해가 10% 이내로 양호한 상태를 보임.

2012년도 전라남도 무안군의 주요 농협 및 기업체의 양파 및 마늘 저장고의 재고량에 따른 동향

- 전라남도 무안군의 저장고 현황

- 면 적: 84개소 102,970m² (31,200평) -농협저장고, 기업체 저장고 및 개인소유 저장고 포함
- 저장가능물량: 155,740톤(7,800,000/포/20kg) -생산량의 70% 저장 가능하나 실제 저장량은 50%정도 저장 가능

Table 3. 양파, 마늘 저장 물량 수매 결과

(단위:톤)

농협별	양파			마늘		
	2011 계획	저장량	재고량	계획	저장량	재고량
무안농협	9,971	9600	-	770	770	700
일로농협	2,700	2,700	-	-	-	-
삼향농협	300	300	-	30	-	30
몽탄농협	5,100	5,400	1,600	57	-	-
청계농협	600	740	-	43	-	43
운남농협	458	3,916	900	75	-	-
무안농협 공동사업	4,000	9,365	3,600	-	-	-
서남부 채소농협	16,748	16,748	5,280	600	1,800	1,200
풀빛	7,000	6,000	1,400	-	-	-
매봉	9,600	5,085	2,000	-	-	-
초당농산	8,000	6,700	800	150	150	150
싱싱유통	6,000	5,000	1,200	-	-	-
영흥	2,600	2,600	400	2,800	2,800	1,200
합계	73,077	74,154	17,180	4,525	5,520	3,323



Fig. 2. 무안군 농협 저장고. 전남 무안군 농협 양파, 마늘 저장고 현황 -2012년 2월 22일, 3월 20일 무안읍 농협 저장고 방문

3. 결과

Table 4. 농협별 저장병 발생율

농협별	저장병 발생율 (%)	
	양파	마늘
무안농협	10%	2% 내외
일로농협	10%	-
삼향농협	20%	-
몽탄농협	70%	-
무안농협 공동사업	10%	2% 내외
서남부 채소농협	5%	2% 내외

양파 마늘의 저장 병원균 분리 동정
 - 무안 양파의 저장 병원균 분리 및 동정

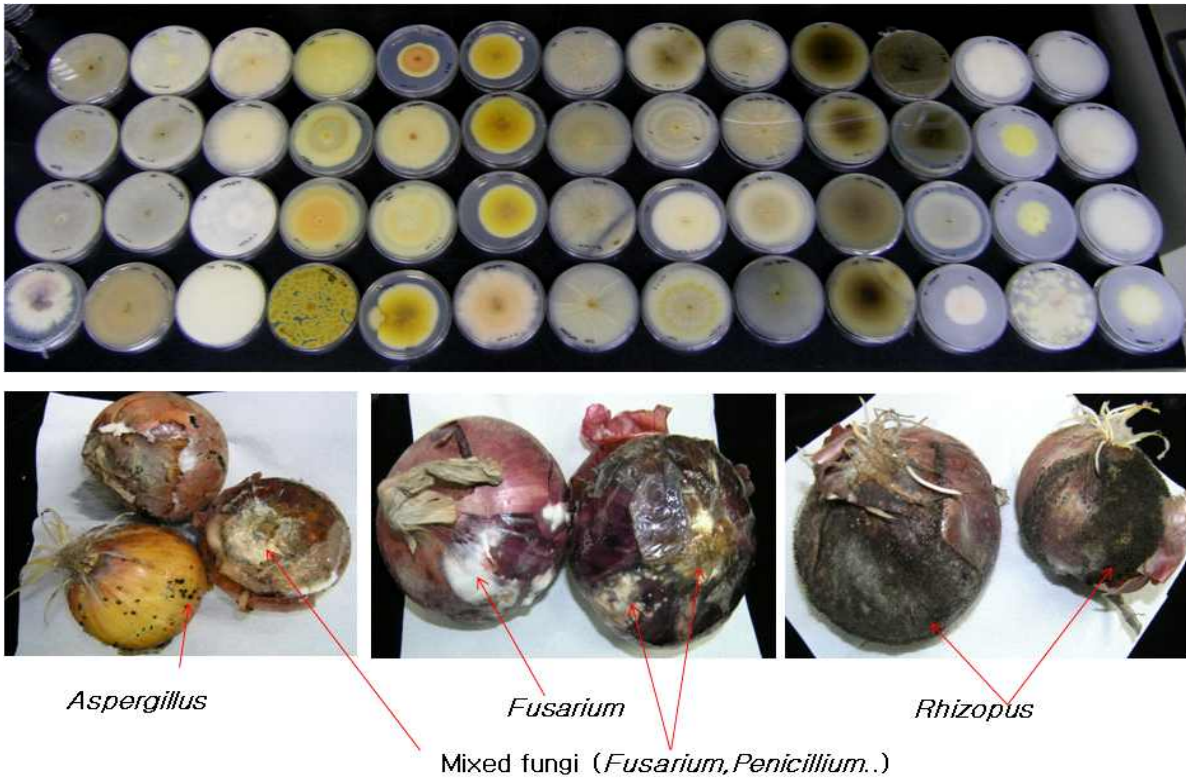


Fig. 3. 28°C에서 습실처리되어 저장된 무안 양파에서는 *Aspergillus* spp. *Rhizopus* spp. 와 *Fusarium* spp. *Penicillium* spp. 가 혼합되어서 자라는 것을 쉽게 확인 할 수 있었음.

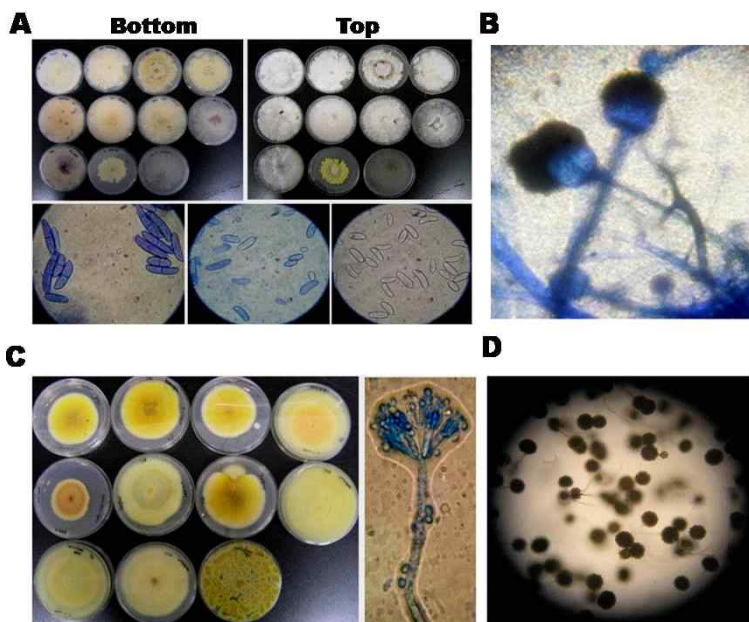


Fig. 4. 양파에서 분리 동정된 곰팡이
 A. 분리된 곰팡이 group 1 : *Fusarium* spp. B. *Aspergillus fumigatus* (group 2) C. 분리된 곰팡이 group 3 : *Penicillium* spp. D. *Aspergillus niger* (group 4)

- 남해, 의성 마늘의 저장 병원균 분리 및 동정

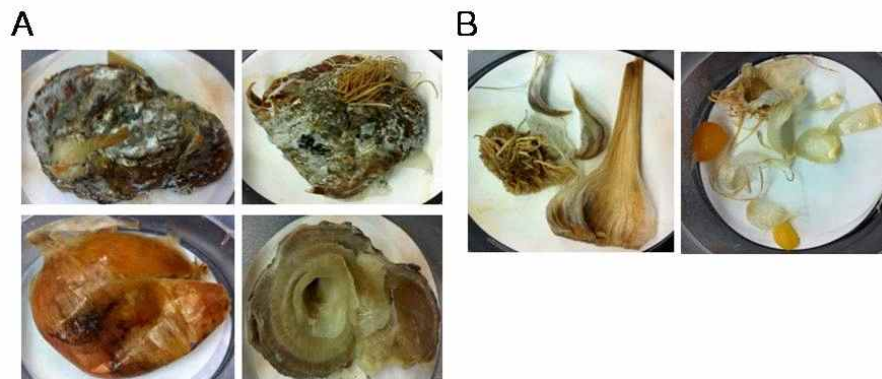
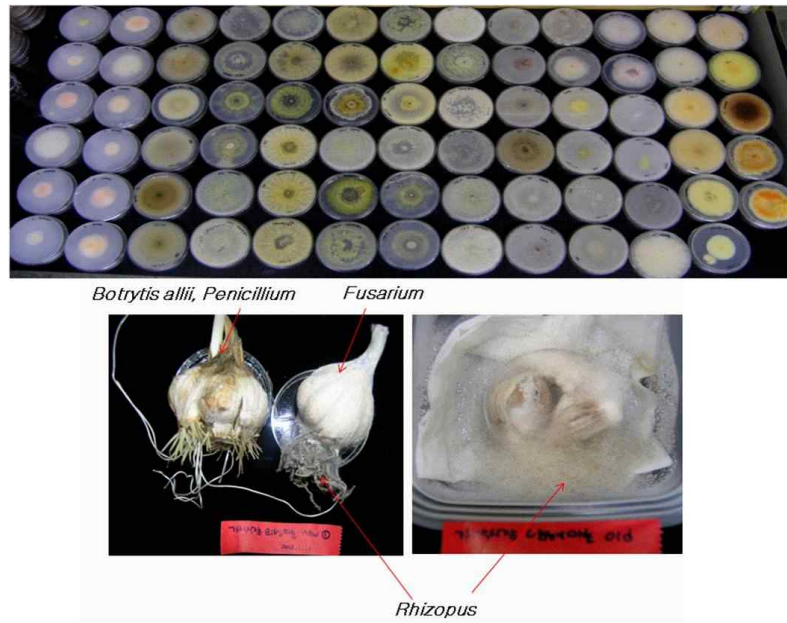


Fig. 5. 28℃에서 습실처리되어 저장된 남해·의성 마늘에서는 *Penicillium* spp., *Fusarium* spp., *Rhizopus* spp. 가 분리 동정됨.

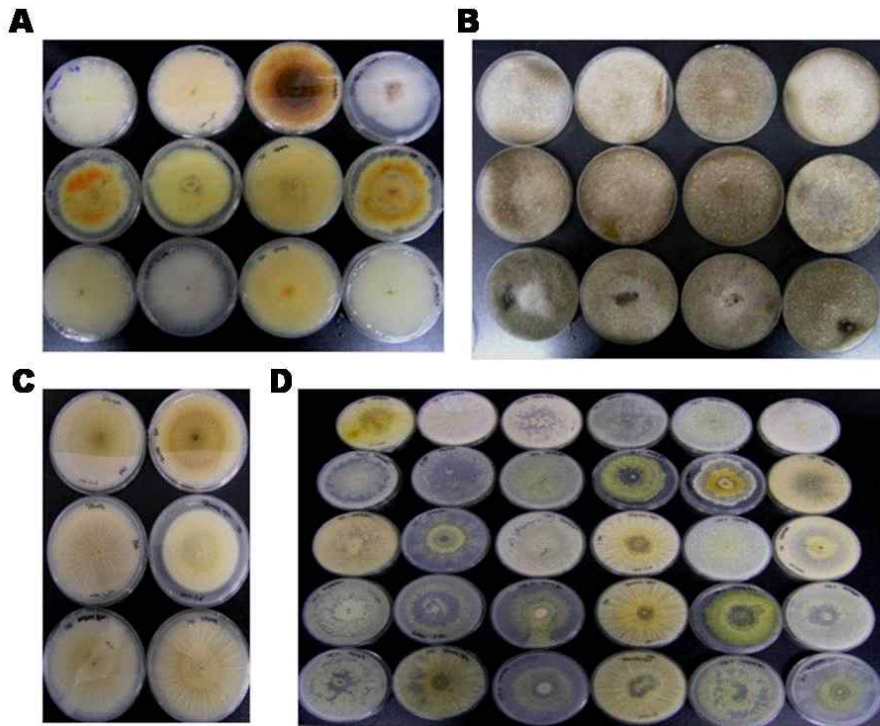


Fig. 6. 마늘에서 분리 동정된 곰팡이

A. 분리된 곰팡이 group 1 : *Fusarium* spp. B. *Rhizopus* spp. (group 2) C. *Aspergillus* spp.(group 3)
D. *Botrytis* spp. (group 4)

- 전남 무안 농협 저온 저장고의 양파 및 마늘의 병원균 분리 동정

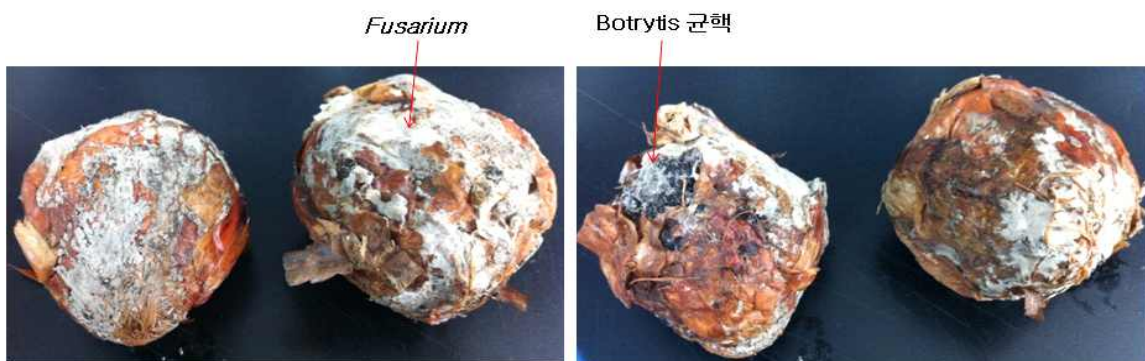


Fig. 7. 전남 무안 저온 저장고에 보관된 부패된 양파들

양파 외피부분에 흰곰팡이 *Fusarium* spp. 이 덮고 있고 검은 곰팡이 *Botrytis* spp. 의 균핵이 보여 짐.

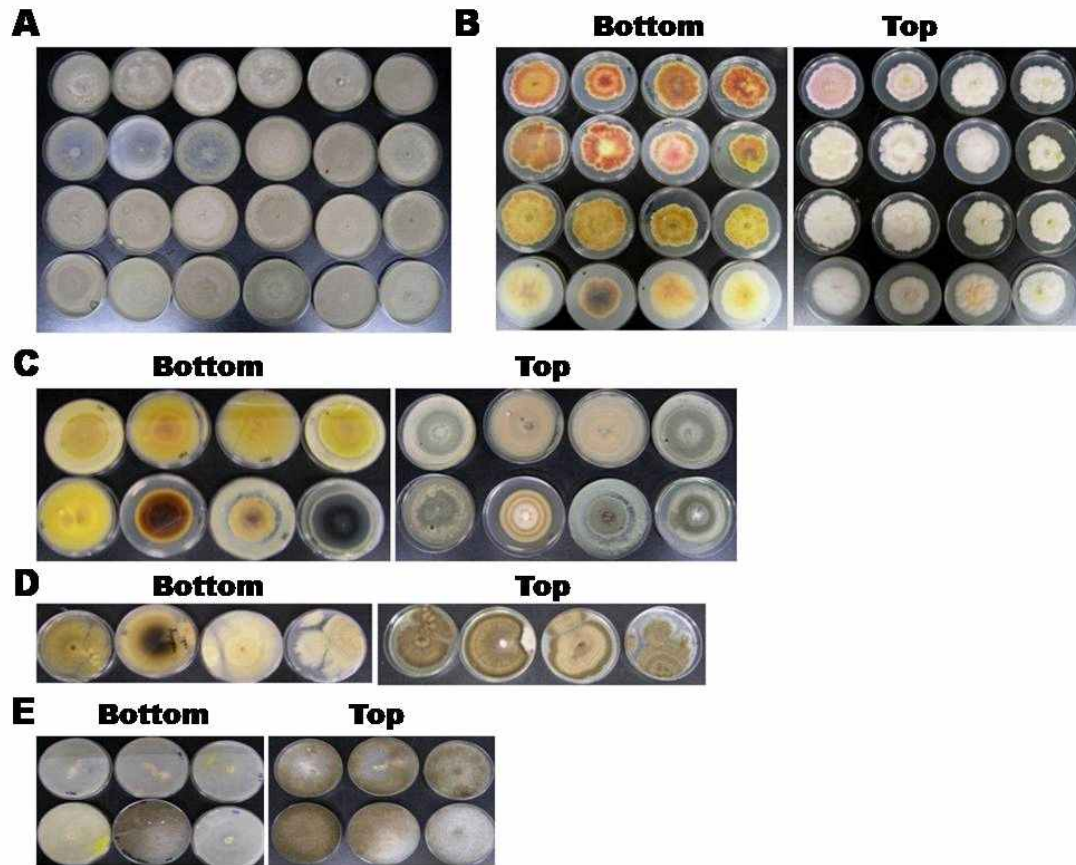


Fig. 8. 전남 무안 저온 저장고에 보관된 부패된 양파와 마늘의 주요 병원균 분리
 A. *Botrytis* spp. (group 1) B. *Fusarium* spp.(group 2) C. *Penicillium* spp.(group 3) D. *Aspergillus* spp.(group 4) E. *Rhizopus* spp.(group 5)

Table 5. 양파와 마늘에서 분리 동정된 병원균

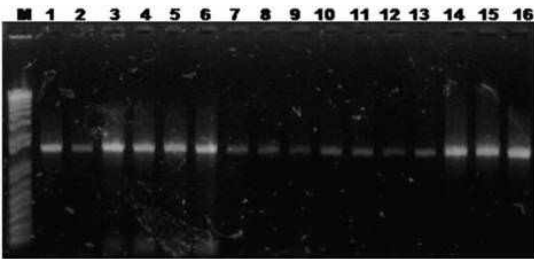
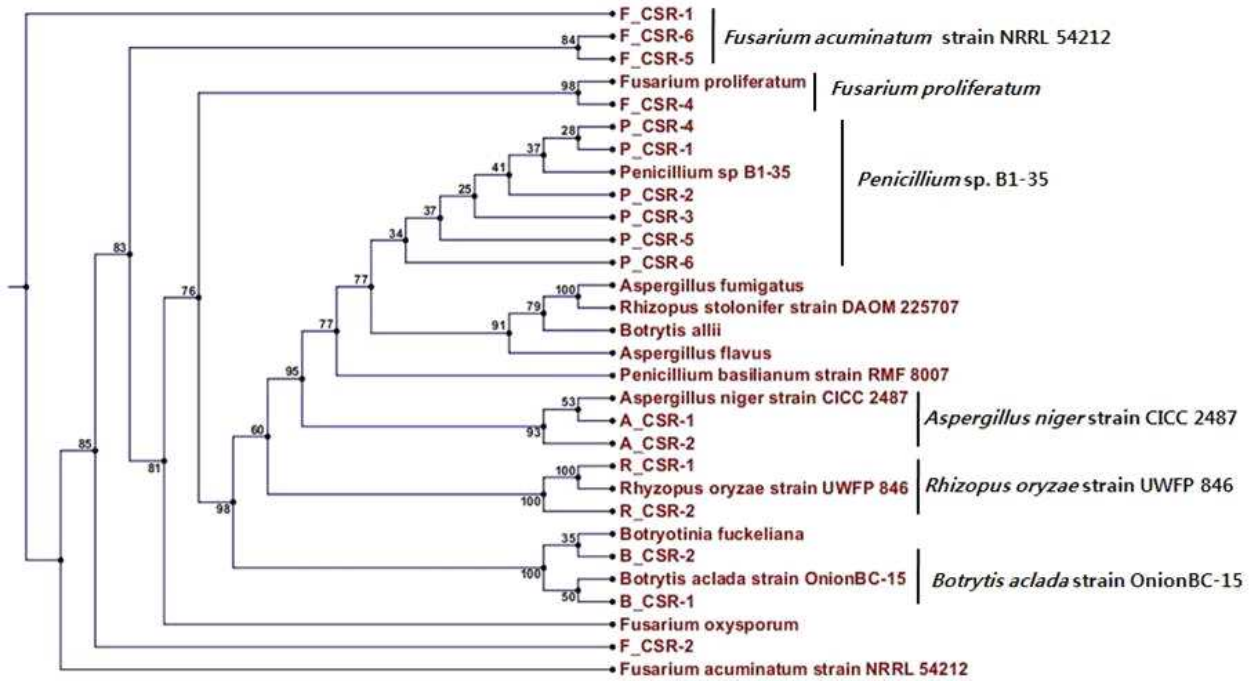
Plate no.	Host	Strain	Accession no.
1	마늘	<i>Penicillium sp. B1-35</i>	AB274312.1
2	마늘	<i>Cylindrocarpon obtusisporum</i>	GU726752.1
3	양파	<i>Penicillium brasilianum</i>	AB455514.1
4	마늘	<i>Penicillium brasilianum</i>	AB455514.1
5	양파	<i>Penicillium sp. B1-35</i>	AB274312.1
6	양파	<i>Penicillium brasilianum</i>	AB455514.1
7	양파	<i>Penicillium purpurogenum</i>	GU566251.1
8	양파	<i>Penicillium brasilianum</i>	AB455514.1
9	양파	<i>Penicillium purpurogenum</i>	GU566251.1
10	마늘	<i>Fusarium acuminatum</i>	HM068325.1
11	마늘	<i>Fusarium acuminatum</i>	HM068325.1
12	마늘	<i>Fusarium acuminatum</i>	HM068325.1
13	양파	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	HM989942.1
14	양파	<i>Botryotinia fuckeliana</i>	HM989942.1
15	양파	<i>Botrytis aclada strain onionBC-15</i>	EU093077.2
16	마늘	<i>Fusarium solani</i>	EU029589.1
17	양파	<i>Fusarium proliferatum</i>	HQ332533.1
18	마늘	<i>Fusarium acuminatum</i>	HM068325.1
19	마늘	<i>Fusarium acuminatum</i>	HM068325.1
20	마늘	<i>Fusarium acuminatum</i>	HM068325.1
21	마늘	<i>Rhizopus oryzae</i>	AY213685.1
22	양파	<i>Rhizopus oryzae</i>	AY213685.1
23	마늘	<i>Aspergillus niger</i>	HQ170509.1

Table 6. 양파와 마늘에서 분리된 주요 병원균

Description	Subject							Score		Identities
	AC	Length	Start	End	Bit	Raw	E-value	Match	Total	Pct(%)
<i>Penicillium</i> sp. B1-35 genes for ITS1, 5.8S rRNA, ITS2, 28S rRNA, complete and partial sequence	AB274312.1	596	148	584	858	433	0.0	436	437	99
<i>Fusarium acuminatum</i> strain NRRL 5421/ 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	HM068325.1	1148	2	562	1112	561	0.0	561	561	100
<i>Botrytis aclada</i> strain OnionBC-15 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	EU093077.2	539	15	533	1029	519	0.0	519	519	100
<i>Fusarium proliferatum</i> 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	HQ332533.1	1172	20	569	1090	550	0.0	550	550	100
<i>Rhizopus oryzae</i> strain UWFP 846 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	AY213685.1	627	15	621	1150	580	0.0	598	607	98
<i>Aspergillus niger</i> strain CICC 2487 18S ribosomal RNA gene, partial sequence; internal transcribed spacer 1, 5.8S ribosomal RNA gene, and internal transcribed spacer 2, complete sequence; and 28S ribosomal RNA gene, partial sequence	HQ170509.1	627	17	605	1112	561	0.0	582	590	98

18r DNA sequence analysis 에 universal 한 primer ITS 1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') 과 ITS 4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3')를 사용함. blast search 결과 모두 98~100% 의 homology를 보였고 분석결과 양파와 마늘에서 주요 곰팡이는 6가지로 동정됨; *Penicillium* sp. B1-35, *Fusarium acuminatum*, *Botrytis aclada* strain onion BC-15, *Fusarium proliferatum*, *Rhizopus oryzaea*, and *Aspergillus niger*.

Fig. 9. Phylogenetic tree



```

X|_GenBank|_24739.1| Pseudomonas hibiscicola strain ATCC 19647 16S ribosomal RNA, partial sequence
Length=1519
Score = 1347 bits (729), Expect = 0.0
Identical = 733/738 (99%), Gaps = 0/738 (0%)
Strand=Plus/Minus

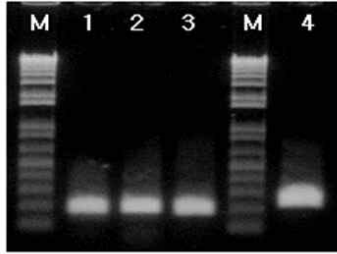
Query 1  AAGCCCTGGGCTCAACTGGGAACTGAGTACTGGAGACTAGAGTGTGTAGAGG 60
Sbjct 589  AAGCCCTGGGCTCAACTGGGAACTGAGTACTGGAGACTAGAGTGTGTAGAGG 60
Query 61  GTAGCGGAACTCCGCTGAGTGAATGCTGAGTGAATGCTGAGTGAATGCTGAGTGA 120
Sbjct 649  GTAGCGGAACTCCGCTGAGTGAATGCTGAGTGAATGCTGAGTGAATGCTGAGTGA 120
Query 121  AAGCGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGG 180
Sbjct 709  AAGCGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGG 180
Query 181  TTAGTACCTGGTGTGCTGAGTGAATGCTGAGTGAATGCTGAGTGAATGCTGAGT 240
Sbjct 769  TTAGTACCTGGTGTGCTGAGTGAATGCTGAGTGAATGCTGAGTGAATGCTGAGT 240
Query 829  CAGCGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGG 900
Sbjct 829  CAGCGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGG 900
Query 801  AACTCAAGGAAATGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 960
Sbjct 889  AACTCAAGGAAATGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 960
Query 949  CAGCGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGG 1008
Sbjct 949  CAGCGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGG 1008
Query 121  CTTTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTG 1068
Sbjct 1209  CTTTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTG 1068
Query 491  GGGTTAATCCGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1128
Sbjct 1069  GGGTTAATCCGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 1128
Query 541  ACTCTAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 1188
Sbjct 1129  ACTCTAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 1188
Query 601  GGGCCTTACCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 1248
Sbjct 1189  GGGCCTTACCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 1248
Query 661  GCGAGGTTAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 1308
Sbjct 1249  GCGAGGTTAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGG 1308
Query 721  TCCATGAGTGGGAACTG 738
Sbjct 1309  TCCATGAGTGGGAACTG 1326
    
```

```

X|_GenBank|_24740.1| Bacillus megaterium strain IAM 13410 16S ribosomal RNA, partial
sequence
Length=1486
Score = 1323 bits (716), Expect = 0.0
Identical = 720/722 (99%), Gaps = 0/722 (0%)
Strand=Plus/Minus

Query 1  CAAAAGGGGCTTGGGAACTGGTGTCTGCAATCTTCCAGATTTCAGCGTACAG 60
Sbjct 722  CAAAAGGGGCTTGGGAACTGGTGTCTGCAATCTTCCAGATTTCAGCGTACAG 60
Query 61  TGGATTCGGCTTTCTCTGCAATCTTCCAGATTTCAGCGTACAGCGTACAGCG 120
Sbjct 661  TGGATTCGGCTTTCTCTGCAATCTTCCAGATTTCAGCGTACAGCGTACAGCG 120
Query 121  TGGAGGCGGCTTTCAGATGAGTATGAGAAAGCGCTTACCGCGCTTACCGCGATA 180
Sbjct 602  TGGAGGCGGCTTTCAGATGAGTATGAGAAAGCGCTTACCGCGCTTACCGCGATA 180
Query 181  ATCCGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGG 240
Sbjct 542  ATCCGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGG 240
Query 241  GCTTCTGTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGT 300
Sbjct 482  GCTTCTGTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGT 300
Query 301  CAGCAGGTTTACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 360
Sbjct 429  CAGCAGGTTTACGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 360
Query 361  TGTTCATTCGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGG 420
Sbjct 362  TGTTCATTCGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGG 420
Query 421  TCCCGATGGGCGATCACTCTGAGTGGGCTATGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 480
Sbjct 302  TCCCGATGGGCGATCACTCTGAGTGGGCTATGCACTGCTGCTGCTGCTGCTGCT 480
Query 481  AACTCAAGGAAATGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 540
Sbjct 242  AACTCAAGGAAATGAGCGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 540
Query 541  TCAATCACTCCGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 600
Sbjct 182  TCAATCACTCCGCAAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG 600
Query 601  ATCCGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGG 660
Sbjct 122  ATCCGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGGGAACTGAGTACTGG 660
Query 661  GAGCAGGTTTAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAA 720
Sbjct 62  GAGCAGGTTTAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAACTGGGAA 720
Query 721  TC 722
Sbjct 2  TC 1
    
```

Fig. 10. 16S rDNA sequence analysis. 16S rDNA PCR에 사용된 universal 한 primer는 fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') 과 rp2(5'-ACGGCTACCTTGTTACGACTT-3')을 사용함. PCR products 크기는 1.4kb 고 1.2% agarose gel에 전기영동함. M은 1kb plus DNA marker: sequence analysis 결과 Pseudomonas 와 Bacillus 가장 homology 가 높았음.



```

>|emb|A2291477.1| Botrytis aclada, strain BA8, RAPD fragment I45-550
Length=556
Score = 344 bits (186), Expect = 1e-91
Identities = 190/192 (99%), Gaps = 0/192 (0%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  GGAATGAGATGATGAGAGTGTAAATAGGATATTTCCGCGCTTGTGTGATGAATCGAGAGA 60
Sbjct 25  GGAATGAGATGATGAGAGTGTAAATAGGATATTTCCGCGCTTGTGTGATGAATCGAGAGA 84
Query 61  ASITTTGGTGTCAAAAGCTGGTCCGACACTGCTACTGTTAATTGGGCTCATTCCACGCA 120
Sbjct 85  ASITTTGGTGTCAAAAGCTGGTCCGACACTGCTACTGTTAATTGGGCTCATTCCACGCA 144
Query 121 GGTAGGACTGTAACCTTTTGACTTGGATGGCAAGATGATAGATGCTCGAAGGACCGCT 180
Sbjct 145 GGTAGGACTGTAACCTTTTGACTTGGATGGCAAGATGATAGATGCTCGAAGGACCGCT 204
Query 181 TCCCAATTCAA 192
Sbjct 205 TCCCAATTCAA 216

>|emb|A278946.1| Fusarium proliferatum partial 28S rRNA gene and IGS, isolate
D454
Length=1866
Score = 364 bits (197), Expect = 1e-97
Identities = 225/243 (94%), Gaps = 2/243 (1%)
Strand=Plus/Plus
Query 1  CGGCCACAGGGATGTGGATGGAGGGGCTTAGGGTAGGCTGGTTGTCTTGGTCG-A 59
Sbjct 276  CGGCCACAGGGATGTGGATGGAGGGGCTTAGGGTAGGCTGGTTGTCTTGGTCGAA 335
Query 60  CTCGATGTGGCTCCCGCTCAGACCAGAGGGGTGGTCAGGGTAGGTACAGGGTAGG 119
Sbjct 336  CTCGATGTGGCTCCCGCTCAGACCAGAGGGGTGGTCAGGGTAGGTACAGGGTAGG 395
Query 120  CAGGCTAGACTGGTCGATCTGGATCTGGTCTCTGGCTGATGGATCTGAGAGCCTCA 179
Sbjct 396  TACCGCGCTGGTCGATCTGGATCTGGTCTCTGGCTGATGGATCTGAGAGCCTCA 455
Query 180  AACGAGATCC-GGGCGCTCAGGGTAGGTAACTTCTGTCTTGGTCAGGAAAGGATCTGG 238
Sbjct 456  AACGAGATCTGGGCGCTCAGGGTAGGTAACTTCTGTCTTGGTCAGGAAAGGATCTGG 515
Query 239  TTG 241
Sbjct 516  TTG 518

```

Fig. 11. 18S rDNA gene PCR. *Botrytis aclada*를 동정하기 위한 GSP(gene specific primer) BA2F (5'-GTGGGGGTAGGATGAGATGATG-3') 와 BA3R (5'-TTGAATTGGGAGAGCGTTCC TTCG-3') 그리고 *Fusarium proliferatum*을 동정하기 위한 Fp3-F (5'-CGGCCACCAGAGGATG TG-3'), Fp4-R (5'-CAACACGAATCGCTTCCTGAC-3') 을 사용하여 18s rDNA PCR을 수행함. 각 Phenotype 이 *Botrytis* 와 *Fusarium*으로 보이는 샘플의 DNA를 분리하여 sequencing 한 결과 200bp *Botrytis aclada* 와 230bp의 *Fusarium proliferatum* 을 확인하였음. (M, 1kb plus DNA marker(invitrogen); 1 to 3, *Botrytis aclada*; 4, *Fusarium proliferatum*)

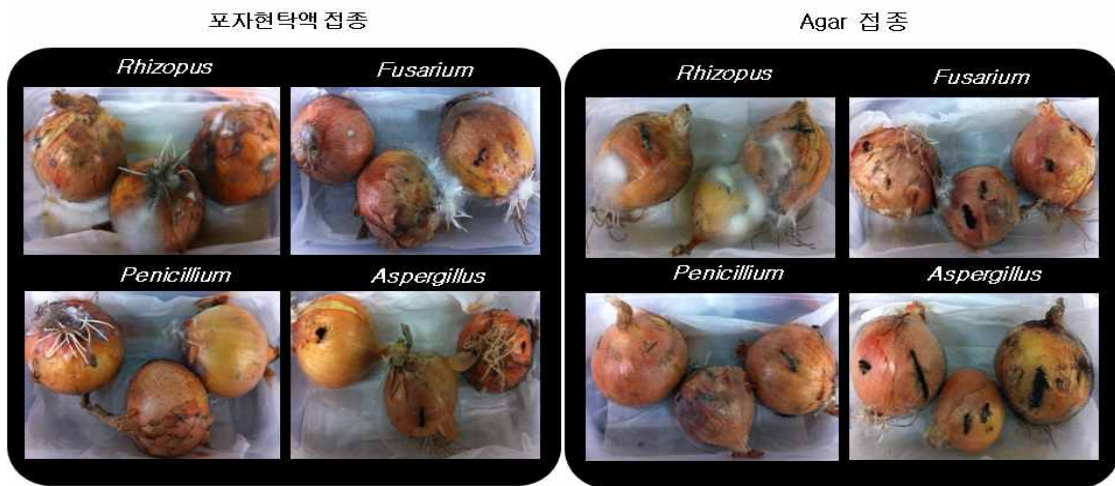


Fig. 12. 주요 병원균의 포자현탁액과 agar plate 접종방법에 의한 병원균 검정. *Rhizopus*의 발 병률과 발병속도가 가장 좋았음. 병원균의 특성상 *Fusarium* 과 *penicillium* 은 *Aspergillus*, *Rhizopus*에 비해 발병속도가 늦음. 접종하지 않은 부분에서 혼합된 병원균이 자라고 특히 양 과 뿌리에 주로 *Fusarium*이 쉽게 발병됨.

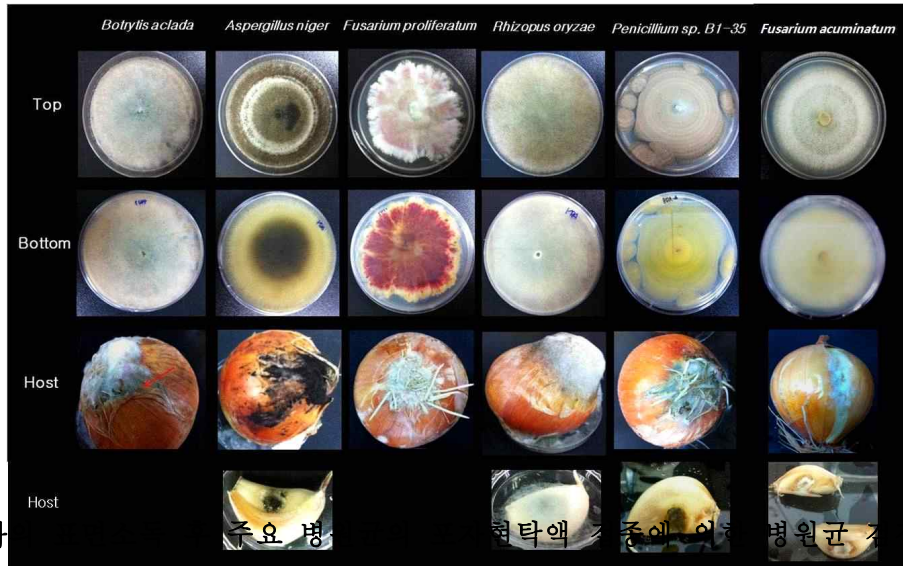


Fig. 13. 양파 주요 병 원균의 배양 모습. (위쪽부터 시계방향으로) Botrytis aclada, Aspergillus niger, Fusarium proliferatum, Rhizopus oryzae, Penicillium sp. B1-35, Fusarium acuminatum. (아래쪽부터 시계방향으로) 양파, 마늘의 주요 병 원균의 배양 모습.

Table 7. 본 연구에서 동정된 양파와 마늘의 주요 병원균

병명	기존에 보고된 곰팡이 (한국식물병목록 2009).	본 연구에서 동정된 곰팡이
젓빛곰팡이병	<i>Botrytis alli</i> <i>B. cinerea</i> <i>B. squamosa</i>	<i>Botrytis alli (aclada) strain onion BC-15</i> <i>B. cinerea (Botryotinia fuckeliana)</i>
시들음병	<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>F. cepae</i>	<i>Fusarium acuminatum</i> <i>F. proliferatum</i> <i>F. solani</i>
검은곰팡이병	<i>Aspergillus niger</i>	<i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>
푸른곰팡이병	<i>Penicillium</i>	<i>Penicillium sp. B1-35</i> <i>P. brasilianum</i> <i>P. purpurogenum</i>
흑색썩음균핵병	<i>Sclerotinia sclerotium</i>	
세균병	<i>Pseudomonas sp.</i> <i>Burkholdera cepacia</i>	<i>Pseudomonas hibiscicola</i> , <i>Bacillus megaterium</i>
털곰팡이병		<i>Rhizopus oryzae</i>

발생경로: Fusarium, 양파뿌리에 감염되어 잠복된 채로 저온 저장됨, 젓빛곰팡이병은 생육 중에 감염되어 저온저장됨, Penicillium 등은 토양이나 외부 환경에서 전파되어 감염됨

4. 고찰

양파, 마늘의 주산단지 전라남도 무안의 양파와 마늘의 저장고 내의 병원균의 발생특성을 조사하기 위해 전라남도 무안의 양파 및 마늘의 재배농가와 저온저장고를 방문하여 실태조사를 통해 병충해에 의한 피해가 가장 컸다. 특히 양파와 마늘 저온 저장고내의 습도 조절 시스템이 갖추어지지 않은 곳이 많았고 대량의 양파에 큐어링 처리가 제대로 이루어 지지 않고 곰팡이병을 방제하기 위해 농가에서 주로 사용하고 있는 아황산가스 처리는 저장되는 물량에 비해 그 처리 기술이 부족하여 황산처리에 의한 방제효과는 실제로 기대하기 어려운 저장고가 많았다.

가장 피해가 많은 병원균으로는 검은곰팡이(*Botrytis, Aspergillus*)와 흰곰팡이(*Fusarium*) 이었고, 이미 토양병원균에 감염된 양파는 야적하는 동안 장마철이 되면 적당한 발병조건이 되면 발병속도와 발병률이 높아져 주로 *Aspergillus, Rhizopus, Fusarium, Penicillium* 등이 발병하기 때문에 앞으로 티몰 훈증 처리기술 개발에 저장고내에서의 처리기술 뿐만아니라 수확 후 야적시에 방제할 수 있는 티몰의 새로운 처리기술 개발이 필요할 것으로 생각된다. 무안 지역에서 주로 문제가 되는 양파의 저장병원균은 *Botrytis acalada, Fusarium proliferatum, Fusarium acuminatum, Fusarium solani, Rhizopus oryzae, Penicillium brasilianum, Penicillium purpurogenum* 등은 기존에 보고되지 않은 종이 이었으며, 특히 *Rhizopus oryzae* 는 양파의 저장병원균으로 빈번히 분리되었던 기존에 보고되지 않았던 종이였다. 최근 저장병에서 문제되는 것은 어떠한 것들인지에 대한 발생 소장 또한 본 연구개발의 중요한 기초 자료 일 것이다. 기존의 연구자들이 보고하였던 바에 의하면 흑색썩음균핵병원균이 저장병원균으로 보고되었는데 본 연구에서는 무안 지역의 양파에서는 거의 발생이 되지 않았다. 주로 문제가 되는 것은 *B. acalada(alli)*, 여러 종의 *Fusarium* 종들, *Rhizopus oryzae, Penicillium* 종들, *Aspergillus niger* 등이었는데 기존의 저장병 발생 특성 조사에서 보고되었던 병원균과는 발생 소장이 유사하지 않았다.

양파와 마늘의 주요 병원균들을 조사하기 위해서 먼저 정상적인 양파와 마늘을 습식처리하여 주요 병원균들을 분리하고 저장고 내의 부패된 양파와 마늘로부터 분리한 주요 병원균들과 비교하여 포자의 형태적 특징 관찰 및 universal primer ITS1/ITS4 와 GSP를 이용한 18S rRNA sequencing 을 통해 저장병원균을 동정 하였다. 특정 곰팡이의 18S rDNA ITS region의 primer 및 저온저장고에서 가장 문제가 되는 검은곰팡이 *Botrytis alli (acalada)* 와 흰곰팡이 *Fusarium proliferatum*를 동정하기 위한 gene specific한 primer를 이용한 정확한 균 동정의 데이터와 함께 발생 특성을 조사한 결과 *Fusarium proliferatum, Fusarium acuminatum, Aspergillus niger, Penicillium* sp. B1-35, *Botrytis aclada, Rhizopus oryzae* 6개 그룹의 주요 병원균이 분리되었고 특히 *Botrytis aclada* 는 저장고내의 부패된 양파에서만 분리된 저장병원균으로 통상적으로 25~28℃에서 잘 자라는 다른 병원균과 달리 18~20℃에서 잘 자라고 상처로 인한 양파 껍질이 벗겨진 틈에서 쉽게 발병하는 것을 확인 하였다. 뿌리에서는 *Fusarium proliferatum, Fusarium acuminatum* 이 주로 발병되었는데 이는 토양에서 뿌리 조직 물관부에 쉽게 감염되어 나타나는 것으로 사료되었다. 또한 Gene specific한 primer로 중합효소 연쇄반응 (Polymerase chain reaction)과 염기서열 분석을 통해 *Botrytis alli (acalada)* 와 *Fusarium proliferatum* 을 재확인 할 수 있었다.

제 2절 티몰의 저장병원균의 생장 및 포자 발아 억제 효과

1. 서론

양파는 4-6월에 수확이 집중되므로 연중 공급을 위해 장기저장이 필수적인 작물이지만 수확 후 관리가 제대로 이루어 지지 않아 저장 중 부패 및 생리장해로 인한 손실이 매우 높다. 저장 중 부패율을 낮추기 위해 수확 후 예건 공정이 필수적으로 요구되는 작물이다.

양파 마늘의 재배 과정에서 질소, 인등의 과다시비를 피하고, 발생 병원균에 대하여 농약품 목고시에서 제시된 적절한 약제를 살포하여 병원균의 밀도를 줄임으로써 수확 후 저장 중 부패를 줄이는 방법이 주로 이용되고 있으나, 저장고내에서 많은 양이 식물병원균에 의하여 부패되는데 정확한 통계자료는 없으나 저장량의 약 20% 정도가 병원균에 의한 부패라고 알려지고 있다. 따라서 재배포장 및 저장고 내에서의 식물병의 방제는 수량 증산 및 품질 향상에 있어서 매우 중요한 요인이 되고 있다. 따라서 재배중의 *Fusarium* 시들음병, 잿빛곰팡이병 등의 식물병의 방제 뿐만 아니라, 저장고 시설의 환풍기 팬의 청소 및 저장고 내부의 청결은 기존 공기 전염성 곰팡이의 밀도를 줄이는데 매우 필요한 조치일 것이다.

Tymol은 thyme (*Thymus capitatus*) 식물 오일의 주성분인데 의약품, 식품보존제, 주스류의 첨가제로 사용되고 있는데 (Aeschbach et al., 1994, Backheet, 1998, Bhaskara et al., 1998, Tiwari et al., 1988; Smid et al., 1994; Dixit et al., 1995), 체리를 30ppm의 tymol로 혼중한 결과 *Botrytis cinerea*에 의한 잿빛곰팡이병을 무처리구의 35%에서 0.5%로 감소하였다고 하였고 (Chu et al., 1999), 또한 티몰 처리에 의하여 사과와 저장병원균인 잿빛곰팡이병에 대한 억제 효과가 무처리구 대비 38% 감소되었다고 보고되었다 (Kim, 2007).

식물 정유 티몰은 인공적으로 합성되고 있으며 병원균 사멸 효과는 10~30ppm에서 항균 효과가 높고 1kg 당 15,000원 정도로 매우 저렴할 뿐만 아니라 인체에 대한 안정성 또한 높아서 있어서 미국 환경청은 이에 대한 허용한계 농도를 설정하지 않고 있으며 (Kim, 2005), 양파 마늘 저장고의 훈증 기술 개발은 매우 절실하지만 적용할 수 있는 이와 같은 훈증 기술은 아직 없다.

식물정유 티몰을 이용한 양파 및 마늘의 장기저장 기술 개발 과제는 현장 적용을 위한 훈증 적용 기술 개발로서 식물 정유 티몰이 식품첨가물로 판매가 되고는 있으나 티몰에 대한 저장병 방제에 적용하는 실용화 기술은 현재 없기 때문에 저장병원균에 대한 식물 정유 티몰의 항균연구 뿐만 아니라 이에 적용할 수 있는 실용화 기술을 개발하고자 하는 것이다.

2. 실험 방법 및 결과

양파와 마늘에서 분리한 저장병원균 6균주 (*Botrytis aclada*, *Fusarium accuminatum*, *Fusarium proliferatum*, *Rhizopus oryzae*, *Penicillium* sp., *Aspergillus niger*)에 대하여 티몰의 곰팡이 생장에 미치는 직접적 억제 효과를 평가하기 위하여 다양한 농도 (0, 100, 250, 500, and 1000 $\mu\text{g/ml}$)의 티몰을 potato dextrose agar (PDA)에 혼합한 후 각 병원균의 균사 생장을 평가하였다. 이 때 티몰의 용매로 50% DMSO를 사용하였으며, PDA 배지의 전체 volume에 1%의 volume으로 stock solution을 첨가하였다. 저장 병원균의 포자 현탁액 2 μl 를 배지에 접종

한 후 20℃에서 10일 배양한 후 균사 길이를 측정하였다. 그 결과는 Figure 1과 같으며, 첨가한 티몰의 농도가 250~500 $\mu\text{g/ml}$ 일 때 저장병원균 6균주의 균사 생장은 모두 억제되었으나, 실험한 농도의 범위로는 EC50 value를 구할 수는 없었다.

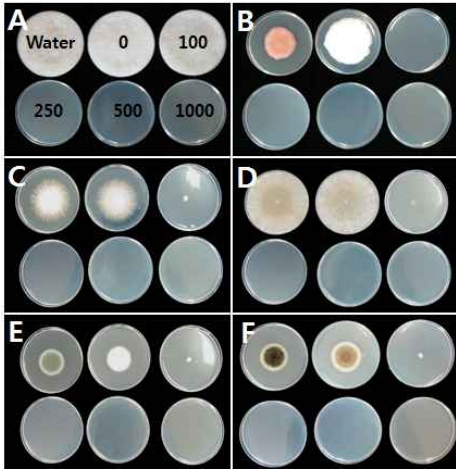


Fig 1. Mycelial growth of six fungi isolated from stored onion or garlic on potato dextrose agar and various concentration (0, 100, 250, 500, and 1000 $\mu\text{g/ml}$) of Thymol. Thymol was dissolved in 50% DMSO, and then the stock solution (1%) was added to media. A, *Botrytis aclada* B, *Fusarium accuminatum* C, *Fusarium proliferatum* D, *Rhizopus oryzae* E, *Penicillium* sp.; F, *Aspergillus niger*.

반면, 티몰이 양파와 마늘의 저장병원균의 균사생장에 미치는 간접적 효과를 알아보기 위하여 티몰을 용액으로 만들었을 때 휘발되는 성분에 의한 균사생장 억제효과를 petridish에 물리적으로 구획이 나뉘어진 I-plate에서 평가하였다. 티몰에 의한 직접적 효과와 동일한 농도로 실험한 결과, 배지에 티몰을 혼합하여 직접적으로 병원균의 생장에 주는 효과에 비하여 상대적으로 높은 농도에서도 병원균의 균사생장을 억제하지 못하거나, 그 효과가 적었다 (Figure 2). 티몰의 휘발성에 의한 각 병원균의 EC50 value는 *Botrytis aclada*는 2.54, *Fusarium accuminatum*는 2.71, *Fusarium proliferatum*는 2.37, *Penicillium* sp.는 2.66, *Aspergillus niger*는 3.32로 234~2089 $\mu\text{g/ml}$ 이었다 (Table 1). 하지만 *Rhizopus oryzae*는 균사 생장 억제효과가 없었으며, 이는 티몰이 곰팡이의 종에 따라 특이성, 혹은 *R. oryzae*의 빠른 균사 생장에 의한 것으로 생각된다.

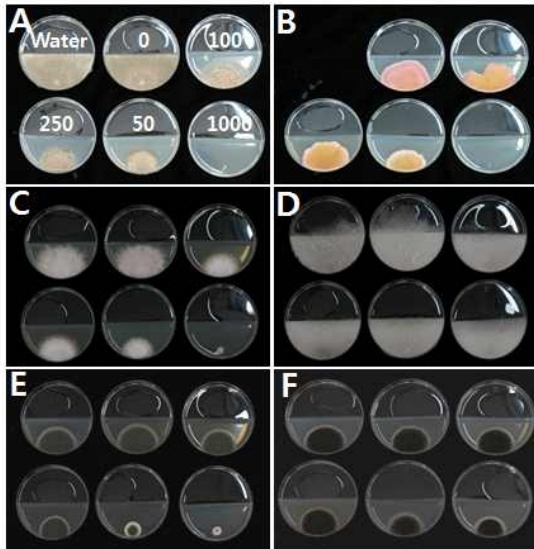


Fig 2. Mycelial growth of six fungi isolated from stored onion or garlic in a I-plates containing potato dextrose agar and various concentration (0, 100, 250, 500, and 1000 µg/ml) of Thymol. solution (5ml) Thymol was dissolved in 50% DMSO, and then the stock solution (1%) was added to distilled water. A, *Botrytis aclada* B, *Fusarium accuminatum* C, *Fusarium proliferatum* D, *Rhizopus oryzae* E, *Penicillium* sp.; F, *Aspergillus niger*.

Table 1. EC₅₀ values of six fungal isolates to gaseous Thymol^a based on relative mycelial growth on potato dextrose agar in I-plates

Fungal isolate	EC ₅₀ ^a	95% Fiducial limit	
		Lower	Upper
<i>Botrytis aclada</i>	2.54377	2.47516	2.61050
<i>Fusarium accuminatum</i>	2.71759	2.41099	3.11343
<i>Fusarium proliferatum</i>	2.37890	1.94170	2.63410
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	2.66499	2.58185	2.75992
<i>Aspergillus niger</i>	3.32350	3.10170	3.79710

^a Thymol was dissolved in 50% DMSO, and then 50 µl of Thymol solution was added to 5ml distilled water in a I-plates.

^b EC₅₀ values (logThymolµg/ml) and fiducial limits were determined by probit analysis. Relative mycelia growth of six fungal isolates were measured 10 days after inoculation at 20°C.

추후 지속적인 연구를 위하여 티몰의 용매를 ethanol로 대체하기 위하여 용매 자체에 대한 효과 및 관용적인 처리 방법에 대하여 조사하기 위하여 기존에 사용하던 DMSO와 ethanol을 사용하여 위와 동일한 방법으로 평가하였다. 50% DMSO를 용매로 티몰의 stock을 제조하여 PDA배지 volume에 1%로 혼합하였으며, ethanol은 absolute ethanol을 사용하여 참고문헌에 따라 0.01%의 volume으로 PDA배지에 혼합하여 평가하였다. 그 결과 50% DMSO stock을 사용한 것보다 ethanol을 용매로 사용한 것에서 EC₅₀ value가 높게 나오는 것이 관찰되었다 (Table 2-1 and 2-2). 그러나 ethanol의 경우 본 실험에서 0.01%의 매우 적은 양으로 고농도의 stock이 배지에 첨가되기 때문에 발생하는 오차일 가능성이 높고, 반면, 고농도로 배지 volume의 1% 수준으로 첨가될 경우에는 그 자체가 병원균의 균사 생장에 영향을 주기 때문에 적절한

농도의 stock을 제조하여 배지에 혼합하는 것이 필요하였다

Table 2-1. EC₅₀ values of six fungal isolates to Thymol^a based on relative mycelial growth on potato dextrose agar

Fungal isolate	EC ₅₀ ^b	95% Fiducial limit	
		Lower	Upper
<i>Botrytis aclada</i>	1.2897	1.0769	1.5526
<i>Fusarium accuminatum</i>	1.5449	1.0878	2.5228
<i>Fusarium proliferatum</i>	1.7567	1.3857	2.5694
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	1.9280	1.7061	2.2778
<i>Aspergillus niger</i>	1.9613	1.5447	2.8104

^aThymol was dissolved in 50% DMSO, and then Thymol solution (1% vol. of media) was added to potato dextrose agar (PDA).

^bEC₅₀ values (logThymol μ g/ml) and fiducial limits were determined by probit analysis. Relative mycelia growth of six fungal isolates were measured 7 days after inoculation at 20°C.

Table 2-2. EC₅₀ values of six fungal isolates to Thymol^a based on relative mycelial growth on potato dextrose agar

Fungal isolate	EC ₅₀ ^b	95% Fiducial limit	
		Lower	Upper
<i>Botrytis aclada</i>	1.5719	1.2006	2.3415
<i>Fusarium accuminatum</i>	3.1503	2.3929	5.6520
<i>Fusarium proliferatum</i>	2.3762	2.0437	3.0024
<i>Rhizopus oryzae</i>	-	-	-
<i>Penicillium</i> sp.	3.8593	2.6996	8.5194
<i>Aspergillus niger</i>	6.4250	3.8926	38.0123

^aThymol was dissolved in 100% ethanol, and then Thymol solution (0.01% vol. of media) was added to potato dextrose agar (PDA).

^bEC₅₀ values (log Thymol μ g/ml) and fiducial limits were determined by probit analysis. Relative mycelia growth of six fungal isolates were measured 7 days after inoculation at 20°C.

티몰의 용매로 ethanol을 사용하기 위하여 ethanol이 배지에 첨가되는 volume을 결정하였다. 이를 위하여, 6균주 중에서 주요병원균인 *B.aclada*와 *A.niger*로 실험하였으며, 배지의 volume에 대하여 0, 0.01, 0.1, 0.2, 0.5 와 1%로 배지에 첨가하여 두 병원균의 균사 성장을 평가하였다. 그 결과 *B.aclada*는 배지 volume에 1%로 혼합되었을 때 용매인 ethanol 자체의 영향으로 균사 생장이 억제되었으며, *A.niger*는 0.2% volume이상으로 배지에 혼합되었을 때 용매의 영향으로 병원균의 균사 생장이 억제되었다 (Figure 3 and Table 3).

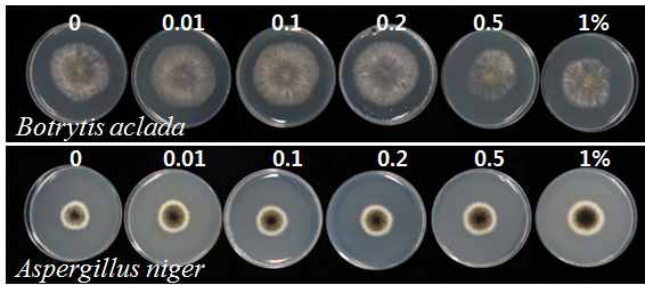


Fig 3. Mycelial growth of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* on PDA amended with various volume of absolute EtOH. Fungal suspension (2 μ l) was dropped on the media, and then incubated at 20°C for 7 days. Seven days after inoculation, mycelial growth (mm) was measured.

Table 3. Mycelial growth of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* on potato dextrose agar amended with various volume of absolute ethanol

Treatment ^a	Mycelial growth (mm) ^b	
	<i>Botrytis aclada</i>	<i>Aspergillus niger</i>
0% volume of absolute EtOH	56.67 \pm 0.58 ab ^c	33.00 \pm 1.73 a
0.01% volume of absolute EtOH	57.67 \pm 0.58 a	31.33 \pm 0.58 ab
0.1% volume of absolute EtOH	52.33 \pm 5.51 bc	30.80 \pm 0.00 ab
0.2% volume of absolute EtOH	57.00 \pm 1.73 ab	29.67 \pm 1.53 b
0.5% volume of absolute EtOH	58.00 \pm 0.00 a	30.00 \pm 1.00 b
1% volume of absolute EtOH	49.67 \pm 2.89 c	27.33 \pm 0.58 c

^aAbsolute ethanol was added to sterile potato dextrose agar (PDA) as 0, 0.01, 0.1, 0.2, 0.5, and 1% volume of media.

^bMycelial growth (mm) was measured at 7 days after inoculation. Fungal inoculums (2 μ l, 10⁷⁻⁸ spores/ml) were dropped on PDA, and then incubated at 20°C.

^cValue represent means \pm standard deviation of three replications. The same letters are not significantly different (P < 0.05) according to the least significant difference (LSD) test.

기존의 논문에서 ethanol을 용매로 사용하여 thymol (100 μ g/ml)을 용해시킨 후 배지의 volume의 0.01%사용한 것과, 본 실험에서 0.2% 이하를 기준으로 0.1% volume으로 배지에 첨가시킨 것을 비교 평가한 결과, thymol (100 μ g/ml)을 ethanol에 용해시킨 후 배지의 0.1% volume으로 배지에 혼합한 것이 0.01% volume으로 배지에 첨가한 것보다 통계적으로 균사 성장 억제 효과가 크게 나타났다 (Figure 4 and Table 4). 그러므로 이것으로 보아, 티몰을 참고문헌에 따라 ethanol에 녹인 후 0.01% volume으로 배지에 첨가했을 때 EC50 value가 상대적으로 높을 가능성이 있으며, 이는 적은 양의 volume으로 배지에 첨가되기 때문에 발생할 수 있는 실험오차일 가능성도 있다. 그러므로, 본 연구에서는 이후의 실험에서 티몰을 에탄올에 녹인 후 배지에 첨가되는 양을 배지 volume의 0.1% 수준으로 혼합하여 실험하였다.

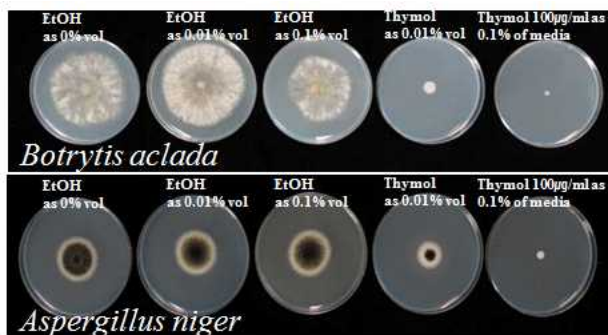


Fig 4. Mycelial growth of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* on PDA amended with various volume (0.1 and 0.01%) of absolute EtOH and thymol (100µg/ml). Fungal suspension (2µl) in tween20 solution) was dropped on the media, and then incubated at 20°C for 7 days. Seven days after inoculation, mycelial growth (mm) was measured.

Table 4. Mycelial growth of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* on potato dextrose agar amended with various volume of absolute ethanol or thymol

Treatment ^a	Mycelial growth (mm) ^b	
	<i>Botrytis aclada</i>	<i>Aspergillus niger</i>
addition of EtOH to media as 0% volume	62.33 ± 2.08 a ^c	34.67 ± 1.15 a
addition of EtOH to media as 0.01% volume	63.00 ± 1.00 a	36.00 ± 0.00 a
addition of EtOH to media as 0.1% volume	55.00 ± 7.00 a	32.00 ± 1.00 b
addition of thymol in EtOH to media as 0.01% volume	12.33 ± 3.51 A	22.67 ± 0.58 A ^a
addition of thymol in EtOH to media as 0.1% volume	4.33 ± 1.15 B	6.67 ± 1.53 B

^aAbsolute ethanol was added to sterile potato dextrose agar (PDA) as 0, 0.01, and 0.1, % volume of media. Thymol (100µg/ml) was dissolved in absolute ethanol, and then the solution was added to sterile PDA as 0.01 and 0.1% volume of media.

^bMycelial growth (mm) was measured at 7 days after inoculation. Fungal inoculums (2µl, 10⁷⁻⁸ spores/ml) were dropped on PDA, and then incubated at 20°C.

^cValue represent means ± standard deviation of three replications. The same letters are not significantly different (P < 0.05) according to the least significant difference (LSD) test.

티몰이 양과 저장중 발생하는 주요 병원균 *B. aclada*와 *A. niger*의 생장에 주는 영향을 평가하기 위하여 positive control로 glacial acetic acid를 비교하여 평가하였다. glacial acetic acid는 0, 1, 10, 100, 200, 500, 1000µl/L의 농도로 배지에 첨가하였으며, 티몰은 0, 1, 10, 50, 100, 200µg/ml의 농도로 배지에 혼합한 후 병원균의 포자 현탁액을 접종한 7일 후 균사 길이를 측정하여 EC50 value를 평가하였다 (Figure 5 and 6).

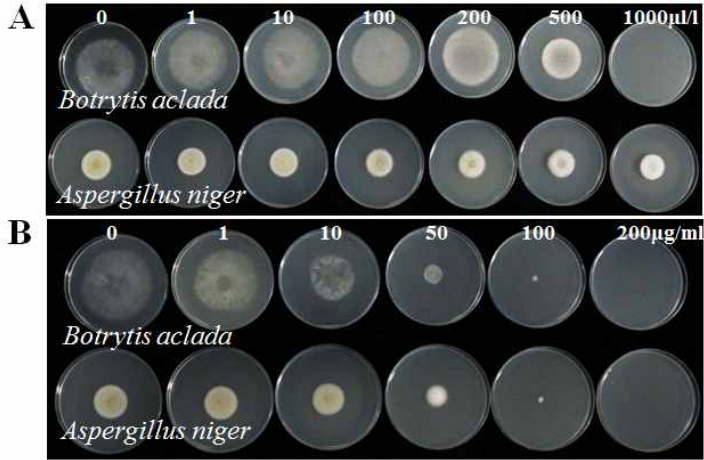


Fig 5. Mycelial growth of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* on PDA amended with various concentrations such as 0, 1, 10, 100, 200, 500, and 1000 µl/L of acetic acid (positive control) (A), and 0, 1, 10, 50, 100, 200 µg/ml of thymol (B). Fungal suspension (2µl in tween 20 solution) was dropped on the media, and then incubated at 20°C. Seven days after inoculation, mycelial growth (mm) was measured.

그 결과, glacial acetic acid의 *B. aclada*에 대한 EC50은 2.6431이었으며, *A. niger*에 대해서는 5.1042로 acetic acid는 *A. niger*에 대해서는 균사 억제 효과가 없는 것으로 관찰되었다 (Table 5). 반면, 티몰의 경우는 *B. aclada*에 대한 EC50은 1.1928이며, *A. niger*에 대해서는 1.6325이었다. 이는 positive control인 acetic acid보다 균사 성장 억제 효과가 더 있음을 의미하며, 특히 *A. niger*에 대해서도 직접적으로 균사 성장을 억제하는 것을 알 수 있다 (Table 5).

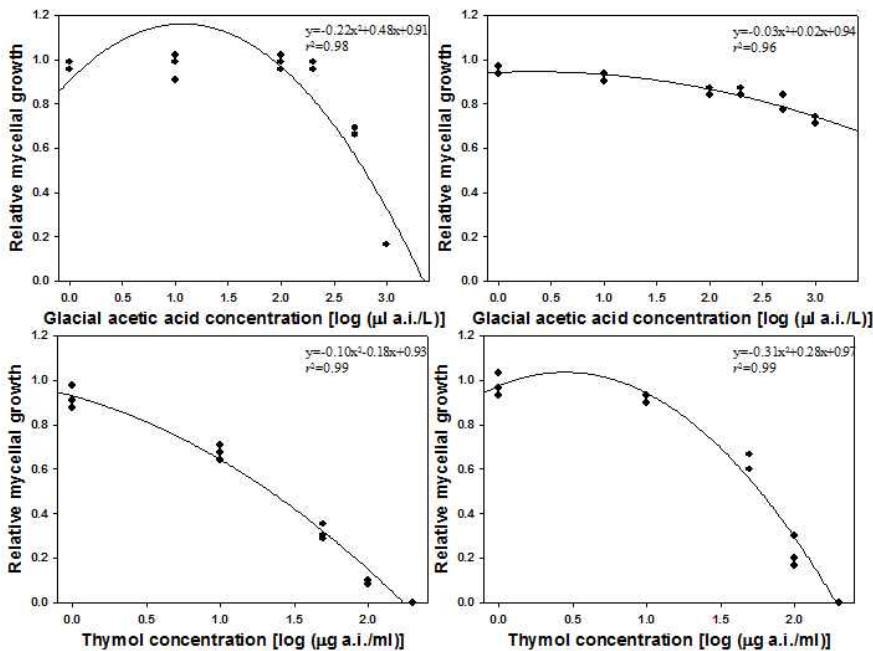


Fig 6. Dose-response curves for two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* to (A) glacial acetic acid and (B) thymol. Relative mycelial growths were determined as diameters on PDA amended with glacial acetic acid or thymol divided by diameters on PDA for acetic acid or PDA amended with ethanol for thymol control.

Table 5. EC₅₀ values of six fungal isolates to Thymol^a based on relative mycelial growth on potato dextrose agar

Treatment / Fungal isolate	<i>Botrytis aclada</i>			<i>Aspergillus niger</i>		
	EC ₅₀ ^b	95% Fiducial limit		EC ₅₀	95% Fiducial limit	
		Lower	Upper		Lower	Upper
Glacial acetic acid	2.6431	2.1555	3.1116	5.1042	4.1448	7.4492 ^a
Thymol	1.1928	1.0437	1.3251	1.6325	1.0719	2.0421

^aThymol was dissolved in absolute ethanol, and then Thymol solution (0.1% vol. of media) was added to potato dextrose agar (PDA).

^bEC₅₀ values (logThymol μg/ml) and fiducial limits were determined by probit analysis. Relative mycelia growth of six fungal isolates were measured 7 days after inoculation at 20°C.

반면, 티몰의 휘발성에 의한 간접적인 병원균 성장 억제 효과는 glacial acetic acid는 균사 성장을 억제하지 않아 평가할 수 없었으며, 티몰은 *B. aclada*에 대해서는 EC₅₀ value가 2.6843, *A.niger*에 대해서는 3.5201로 억제 효과가 없었던 acetic acid에 비하여 병원균의 성장 억제 효과가 있었다 (Figure 7 and 8, Table 6). 그러나 휘발에 의한 간접적 효과는 배지에 티몰을 혼합한 직접적인 효과에 비해서는 EC₅₀ value가 높기 때문에 휘발 자체에 의한 효과는 직접적 효과에 비해 적은 것을 알 수 있었다.

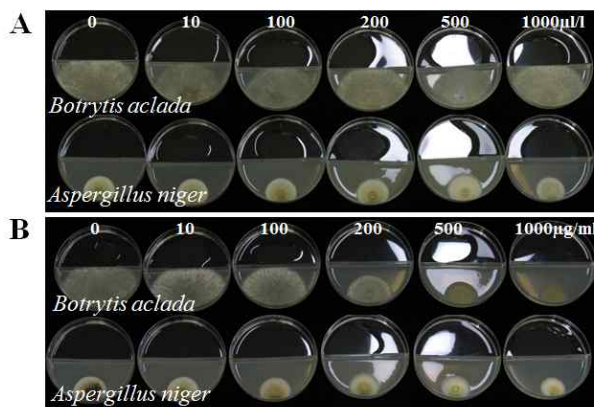


Fig 7. Mycelial growth of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* in I-plates containing PDA and various concentrations of acetic acid (positive control) (A) or thymol (B) solutions. Five ml of acetic acid or thymol solution were pour in one side of I-plates, and fungal suspension was dropped on PDA in the other side in I-plates. After fungal inoculation, the plates were incubated at 20°C for seven days.

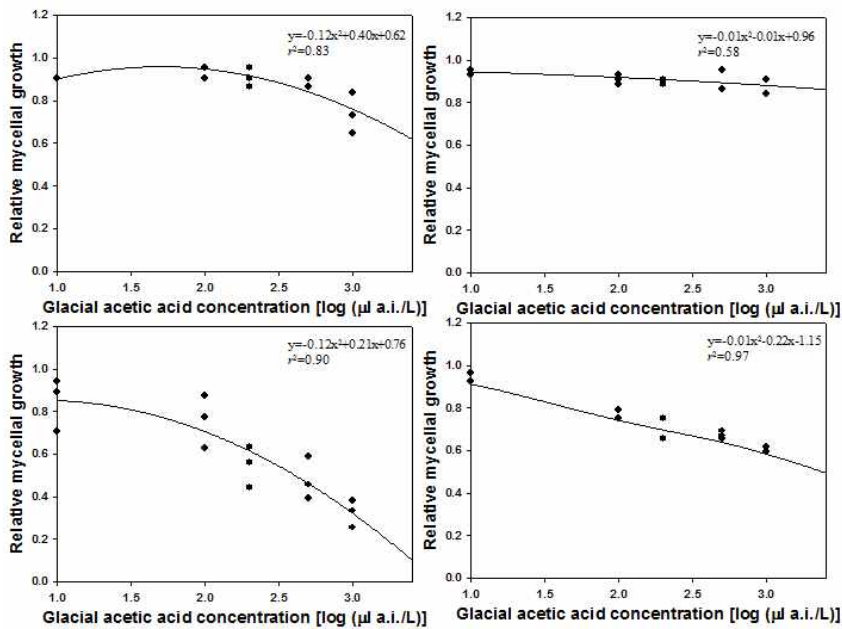


Fig 8. Dose-response curves for two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* to volatile of (A) glacial acetic acid and (B) thymol. Relative mycelial growths were determined as diameters on PDA in I-plates.

Table 6. EC₅₀ values of two fungal isolates to gaseous putative positive control and Thymol^a based on relative mycelial growth on potato dextrose agar in I-plates

Treatment / Fungal isolate	<i>Botrytis aclada</i>			<i>Aspergillus niger</i>		
	EC ₅₀ ^b	95% Fiducial limit		EC ₅₀	95% Fiducial limit	
		Lower	Upper		Lower	Upper
Glacial acetic acid	-	-	-	-	-	-
Thymol	2.6843	2.2979	3.5365	3.5201	3.1201	4.3993

^aFive ml of Thymol solution was added to the other side of I-plates.

^bEC₅₀ values (logThymol μ g/ml) and fiducial limits were determined by probit analysis. Relative mycelia growth of six fungal isolates were measured 7 days after inoculation at 20°C.

티몰에 의한 병원균의 균사 생장억제 효과는 positive control인 acetic acid보다 저농도에서 효과가 있는 것을 알 수 있었다. 또한 티몰의 경우 병원균과의 직접적인 접촉에 의한 효과 뿐만 아니라 휘발에 의한 효과도 있었으며, 양과 주요 저장병원균인 *B. aclada*와 *A. niger*에 대해서 모두 억제 효과가 있었다. 이러한 티몰의 균사 생장에 대한 효과에 더하여 이들 병원균의 포자 형성량과 포자의 발아에 미치는 영향도 평가하였다. 이를 위해서 EC₅₀ value를 결정하기 위하여 배지에 acetic acid와 thymol을 혼합한 것과 휘발성에 의한 균사 생장 억제 효과를 평가한 것에서 형성된 포자량을 현미경으로 평가하였으며, 이들 포자의 발아율도 평가하였다. 그 결과, 배지에 혼합할 경우에 glacial acetic acid는 *B. aclada*에 대해서 200 μ l/L이상의 농도에서 포자 형성량이 감소하였으며, *A. niger*에 대해서 포자형성 억제 효과는 관찰되지 않았다. 반면, 티몰

은 *B. aclada*는 1 μ g/ml이상의 농도에서, *A. niger*는 10 μ g/ml이상의 농도에서 포자 형성량이 감소하였다 (Table 7).

Table 7. Sporulation of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* on potato dextrose agar amended with various concentration of putative positive control and thymol

Treatment ^a	Sporulation [log (spores/cm ² +1)] ^a	
	<i>Botrytis aclada</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Glacial acetic acid (μ l/L)		
0	5.68 \pm 0.03 b	6.32 \pm 0.02 ab
1	6.02 \pm 0.04 a	6.30 \pm 0.08 ab
10	5.79 \pm 0.02 b	6.34 \pm 0.06 a
100	5.84 \pm 0.03 ab	6.17 \pm 0.16 b
200	4.90 \pm 0.17 c	6.25 \pm 0.11 ab
500	4.96 \pm 0.24 c	6.21 \pm 0.13 ab
1000	NT	6.24 \pm 0.03 ab
Thymol (μ g/ml)		
0	5.85 \pm 0.07 a	6.38 \pm 0.06 a
1	5.65 \pm 0.16 b	6.26 \pm 0.06 a
10	5.16 \pm 0.15 c	6.08 \pm 0.03 b
50	3.45 \pm 0.18 d	5.92 \pm 0.04 c
100	3.20 \pm 0.21 d	5.20 \pm 0.17 d
200	NT	NT

^aSporulation [log (spores/cm²+1)] was measured at 7days after inoculation on PDA amended with each concentration of positive control (glacial acetic acid) and thymol at 20°C.

^bNT = not tested.

^cValue represent means \pm standard deviation of three replications. The same letters are not significantly different ($P < 0.05$) according to the least significant difference (LSD) test after log transformation.

반면, 휘발성에 의한 포자형성 억제 효과를 평가한 결과, glacial acetic acid는 200, 1000 μ l/L의 농도에서 *B. aclada*의 포자 형성을 감소시켰으며, *A. niger*는 100 μ l/L이상의 농도에서 포자 형성을 감소시켰다. 티몰의 경우는 두 병원균에 대하여 1000 μ g/ml에서 포자 형성 억제효과가 관찰되었다 (Table 8). 티몰의 휘발성에 의한 간접적인 포자형성 억제효과는 직접적인 효과에 비하여 비교적 고농도에서 두 병원균의 포자 형성을 감소시켰으며, acetic acid의 경우는 *B. aclada* 균사 생장 억제효과는 티몰에 비하여 비교적 고농도에서 관찰되었고, *A. niger*의 경우는 거의 억제시키지 못했지만, 포자 형성은 두 병원균에 대해서 모두 관찰되었다 (Table 8). 이러한 결과로, 티몰은 직접적으로 병원균의 균사 생장을 감소시키며, 휘발성에 의해서는 균사 생장은 억제시키지만 포자 형성량을 감소시키지는 않는 것으로 생각된다. 반면, acetic acid는 *B. aclada*의 경우에는 직접적으로 균사 생장을 억제시키고, 휘발성에 의해서 포자 형성량도 감소시키지만, *A. niger*는 직접적인 균사 생장이나 포자 형성량 감소보다는 휘발성에 의한 포자 형성을 감소시키는 효과가 큰 것으로 관찰되었다.

Table 8. Sporulation of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* affected by gaseous putative positive control and Thymol^a on potato dextrose agar in I-plates

Treatment ^a	Sporulation [log (spores/cm ² +1)] ^a	
	<i>Botrytis aclada</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Glacial acetic acid (μl/L)		
0	6.16 ± 0.06 b	6.29 ± 0.03 a
10	6.42 ± 0.02 a	6.19 ± 0.09 ab
100	6.13 ± 0.10 b	6.12 ± 0.05 b
200	5.95 ± 0.01 c	5.95 ± 0.14 c
500	6.18 ± 0.06 b	5.66 ± 0.07 d
1000	5.83 ± 0.12 c	5.73 ± 0.06 d
Thymol (μg/ml)		
0	6.08 ± 0.08 a	6.70 ± 0.03 a
10	5.81 ± 0.09 a	6.70 ± 0.02 a
100	5.13 ± 0.23 ab	6.46 ± 0.06 b
200	5.26 ± 0.24 ab	6.30 ± 0.07 c
500	5.33 ± 0.06 ab	6.13 ± 0.08 d
1000	3.33 ± 2.89 b	5.96 ± 0.07 e

^aSporulation [log (spores/cm²+1)] was measured at 7days after inoculation in I-plates containing PDA. Five ml of Thymol solution was added to the other side of I-plates.

^bNT = not tested.

^cValue represent means ± standard deviation of three replications. The same letters are not significantly different ($P < 0.05$) according to the least significant difference (LSD) test after log transformation.

티몰에 의하여 영향을 받은 병원균의 포자 발아율을 평가하기 위하여, 티몰이나 acetic acid를 배지에 혼합하여 배양된 병원균이 형성한 포자를 관찰했으며 acetic acid의 경우에 *B. aclada*는 1μl/L, *A. niger*는 10μl/L이상의 농도에서 포자의 발아율이 감소하였다 (Table 9). 반면, 티몰은 *B. aclada*는 1μg/ml 이상의 농도에서 발아율을 감소시켰으나, *A. niger*에 대해서는 발아율 억제 효과가 없었다.

Table 9. Germination of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* on potato dextrose agar amended with various concentration of putative positive control and Thymol

Treatment ^a	Germination (%) ^a	
	<i>Botrytis aclada</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Glacial acetic acid (μ/L)		
0	65.67 ± 10.97 a	66.67 ± 2.89 a
1	34.33 ± 5.13 b	71.67 ± 2.52 a
10	40.00 ± 12.53 b	36.33 ± 5.13 bc
100	33.33 ± 11.93 bc	40.67 ± 1.15 b
200	19.33 ± 2.08 c	40.33 ± 0.58 b
500	19.67 ± 0.58 c	20.67 ± 16.77 d
1000	NT	25.33 ± 0.58 cd
Thymol (μg/ml)		
0	68.00 ± 2.65 a	63.00 ± 4.58 a
1	56.67 ± 4.16 b	58.33 ± 2.89 a
10	16.33 ± 3.21 c	65.67 ± 6.03 a
50	3.67 ± 1.15 d	64.67 ± 5.51 a
100	4.00 ± 1.00 d	60.33 ± 1.53 a
200	NT	NT

^aGermination (%) of fungal isolates grown PDA amended with each concentration of positive control (glacial acetic acid) and thymol were evaluated at 24 hours after inoculation at 20°C.

^bNT = not tested.

^cValue represent means ± standard deviation of three replications. The same letters are not significantly different ($P < 0.05$) according to the least significant difference (LSD) test after arcsine transformation.

반면, 간접적으로 티몰에 의하여 영향을 받은 병원균의 포자 발아율은 acetic acid의 경우에 *B. aclada*는 10μl/L이상의 농도에서 억제 효과가 있었으며, *A. niger*에서는 영향을 주지 않았다 (Table 10). 티몰은 *B. aclada*는 10μg/ml 이상의 농도에서 발아율을 감소시켰으며, *A. niger*에 대해서는 200μg/ml 이상의 농도에서 발아율을 억제하였다. 그러므로, 이러한 결과로 보아, acetic acid는 직접적으로는 두 병원균의 발아율을 감소시키지만, 휘발에 의한 효과는 *B. aclada*에서만 있었으며, 티몰의 경우는 *B. aclada*에 대해서는 직간접적 효과가 모두 있었으나, *A. niger*에 대해서는 휘발에 의하여 간접적으로 발아율이 감소되는 것을 알 수 있었다.

Table 10. Germination of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* affected by gaseous putative positive control and Thymol^a on potato dextrose agar in I-plates

Treatment ^a	Germination (%) ^a	
	<i>Botrytis aclada</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Glacial acetic acid (μl/L)		
0	66.33 ± 8.74 a	71.67 ± 9.29 a
10	39.67 ± 10.69 b	76.00 ± 5.29 a
100	37.67 ± 15.37 bc	67.67 ± 2.52 a
200	33.67 ± 1.53 bc	71.00 ± 3.61 a
500	23.33 ± 2.89 cd	72.33 ± 7.51 a
1000	15.33 ± 0.58 d	72.67 ± 6.43 a
Thymol (μg/ml)		
0	59.67 ± 2.08 a	70.00 ± 2.00 a
10	35.00 ± 9.64 c	64.00 ± 5.29 ab
100	45.67 ± 5.13 b	63.33 ± 6.11 ab
200	32.00 ± 2.00 c	58.00 ± 2.65 b
500	36.33 ± 7.37 bc	62.00 ± 2.00 b
1000	20.33 ± 0.58 d	64.67 ± 5.51 ab

^aGermination (%) of fungal isolates, *B. aclada* and *A. niger*, affected by gaseous positive control (glacial acetic acid) and thymol were evaluated at 24 hours after inoculation at 20°C.

^bNT = not tested.

^cValue represent means ± standard deviation of three replications. The same letters are not significantly different ($P < 0.05$) according to the least significant difference (LSD) test after arcsine transformation.

본 연구에서 결정된 균사 성장 억제 EC50 value를 기준으로 양파에서 인위접종에 의한 두 병원균의 병을 티몰과 positive control인 glacial acetic acid이 직간접적으로 억제하는 효과가 있는지 평가하였다. 직접적인 효과를 평가하기 위하여 티몰과 glacial acetic acid를 *B. aclada* 검증을 위해서 각각 200μg/ml과 400μl/L를 스프레이하였으며, *A. niger*를 검증하기 위해서 티몰을 40μg/ml을, acetic acid를 100,000μl/L 용액으로 스프레이하였다. 휘발에 의한 간접적 효과를 평가하기 위해서는 500μg/ml의 농도로 티몰과 acetic acid 용액을 준비한 후 용액 200ml을 플라스틱 밀폐용기 바닥에 부은 후 위에 sieves를 설치한 후 양파를 올려놓고 밀폐하여 평가하였다. 이와 같은 처리 후 병원균을 sandpaper로 상처를 낸 양파 표면에 10⁵, 10⁶, 10⁷ cells/ml로 20μl drop-inoculation하였다. 20°C에서 10일간 배양한 후, 병의 발생 유무를 평가하였다 (Fig. 9). 그 결과 10⁶~10⁷ cells/ml로 접종하였을 때 병이 일정하게 발생하였으며, 티몰을 스프레이 처리한 것이 휘발에 의한 것보다 병이 적게 발생하였다. 또한 acetic acid의 경우는 스프레이했을 때 용매만 처리된 대조구와 유사하게 병이 발생하였다 (Fig. 9). 따라서 티몰은 스프레이 처리와 같이 병원균과 직접적으로 닿을 경우에 병을 감소시키는 효과가 큰 것으로 생각되며, 이는 훈증과 같은 처리 방법을 고려해볼 수 있을 것이다.

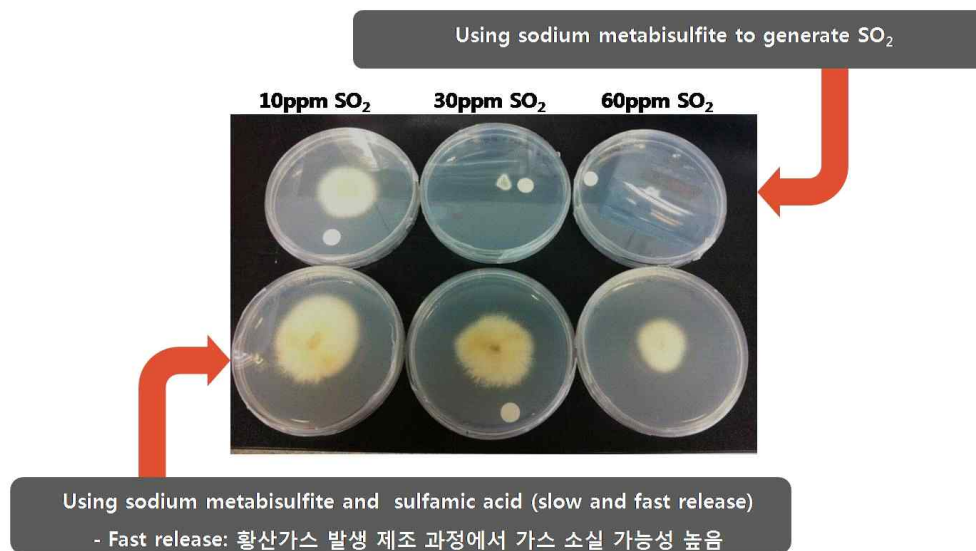


Fig 9. Sulfamic acid 의 첨가에 따른 SO₂ 훈증효과 비교 (*F. acuminatum*)

농도별 (10ppm, 30ppm, 60ppm)로 Sodium metabisulfite 에 sulfamic acid 를 첨가한 것과 (제조하여 플레이트에 처리하는 과정에 황산가스 소실 가능성 높음) 첨가하지 않은 처리구에서 각각 균억제 정도를 비교실험하였다. sulfamic acid를 첨가함으로써 생성되는 SO₂ gas 의 휘발 정도가 높아짐에 따라 Sodium metabisulfite 만 첨가한 처리구에 비해 균 억제 능력이 떨어지는 것을 확인하였고 농도별 황산처리구에서 10ppm은 균억제효과가 적고 30ppm 부터는 균이 죽은 것으로 판단되었다. 따라서 아황산처리구 실험은 Sodium metabisulfite 20ppm의 농도로 실험을 진행하였다.

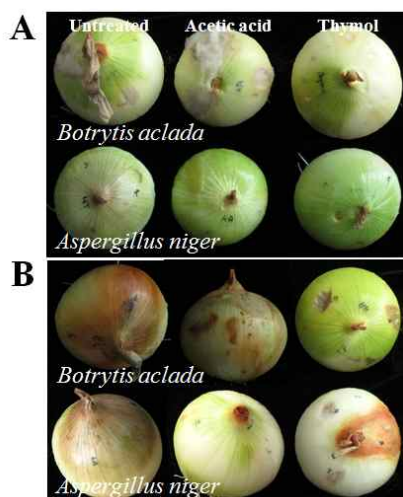


Fig 10. Diseases caused by two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* on onions sprayed (A) or treated with volatiles (B) of with water (untreated), acetic acid (positive control), and thymol. Onions were sprayed with water, acetic acid, and thymol based on EC50 values against each pathogen (acetic acid 400 μ L, and thymol 200 μ g/ml for *B. aclada* acetic acid 100,000 μ L, and thymol 40 μ g/ml for *A.niger*). For volatile test, 200ml of acetic acid (500 μ L) or thymol solutions (500 μ g/ml) were put in plastic boxes, and then onions were put upon the sieves, the closed plastic boxes were maintained at 20 $^{\circ}$ C for 10 days. For pathogen inoculation, 10⁵, 10⁶, 10⁷ cells/ml of fungal suspensions (20 μ l) were dropped on onion surface wounded by a sandpaper.

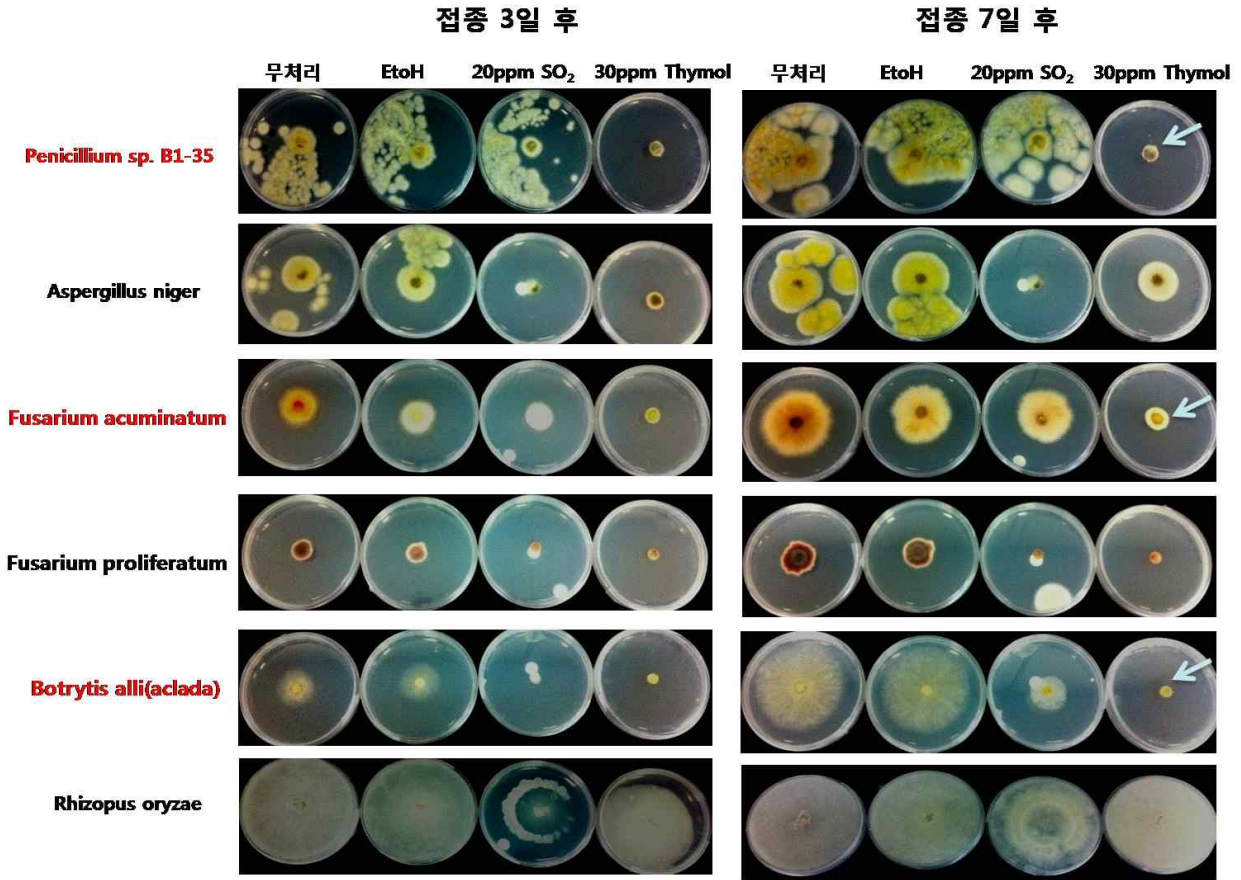


Fig 11. 식물 정유 티몰과 아황산가스와의 항균활성 비교

티몰 훈증효과 실험 결과 *Aspergillus niger* 와 *Rhizopus oryzae* 는 SO₂ 에서 균 억제효과가 더 좋았음. 30ppm 과 20ppm의 SO₂ 농도의 차이별로 실험 해 보았으나 두 균주 *Aspergillus niger* 와 *Rhizopus oryzae* 에 대해서는 thymol 에서 보다 SO₂ 에서 방제 효과가 더 크게 나타났다. *Botrytis aclada* 는 SO₂ 의 농도가 높아도 Thymol에서 균 억제 효과가 좋았으며, 이 결과를 통해 농도의 차이에 의한 억제 효과 보다 균의 훈증제 성분의 차이에 따라 균주의 억제 효과가 다르게 작용하는 것을 알 수 있었다. 나머지 *Penicillium* sp. B1-35, *Fusarium acuminatum*, *Fusarium proliferatum*, *Botrytis aclada* 에서는 SO₂ 보다 Thymol에서 균 억제 효과가 더 뛰어났다.

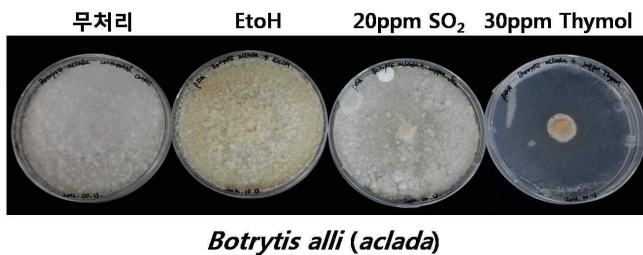


Fig 12. *Botrytis aclada* 에 대한 식물 정유 티몰과 황산가스와의 항균활성 비교

집중일로부터 3주 후에 *Botrytis alli (aclada)* 균에 대한 억제 효과. 20ppm의 아황산가스 보다 30ppm의 티몰이 현저히 높음

A



25°C 저장

B



4°C 저장

Fig. 15. *Botrytis alli (aclada)* 에 대한 식물정유 티몰의 항균활성의 *in vivo* test.

A. 표면소독하지 않은 양파에 *Botrytis aclada*의 포자현탁액을 분무접종하여 30ppm thymol을 처리하여 25°C에서 보관하면서 무처리구와 병징을 비교. B. 표면소독한 양파에 *Botrytis aclada*의 포자현탁액을 분무접종하여 30ppm thymol을 처리하여 2°C에서 보관하면서 무처리구와 병징을 비교

티몰을 양파에 혼증하여 처리하여 각각 상온과 저온 저장시 저장병의 발병률과 발병속도를 조사한 결과, 무처리구에 비하여 티몰 처리구에서는 저장병의 발생율이 현저히 감소하였는데 (Fig. 15., Table 11), 무처리구의 경우 상온 저장된 양파의 경우 2주 후부터 양파의 부패율이 심해졌고, 저온 저장시에는 9주 후부터 양파의 부패율이 심해지는 것을 확인하였다. 저온 저장시에도 저장병이 발생하는 것은 밀폐된 공간에서 시간이 지나면서 양파의 호흡으로 인해 발생

되는 수분 등으로 인해 저장병이 발생하는 것으로 생각되며, 또한 *Botrytis aclada*는 0℃에서 자라는 저온 저장병원균이므로 이와 같은 병원균이 저온 저장에서도 계속 증식하는 것인데, 흰색의 곰팡이 균을 재분리하여 확인한 결과 대부분의 곰팡이는 잿빛곰팡이 병원균으로 확인되었다.

Table 11. Effect of thymol fumigation on disease incidence of onion

처리	발병율(%)±평균오차	
	25℃ 저장 (9주 저장)	4℃ 저장 (9주 저장)
무처리	90±14	97±17
에탄올	Not done	51±12
티몰처리	10±8	3±1



Fig 16. 식물정유 티몰 훈증에 의한 양파 저장병원균의 억제

식물정유 티몰의 항균활성의 in vivo test. 표면소독 후 양파의 주요 병원균 *Botrytis aclada* 포자현탁액을 분무 접종한 뒤에 무처리구와 에탄올 처리구, 티몰처리구를 25℃에서 일주일간 보관한 후에 각 처리구에 따른 병징을 관찰함. 무처리구에서는 표면소독 후에도 무처리구와 에탄올 처리구에서는 양파 뿌리 부분에서는 *Fusarium proliferatum*이 많이 자랐고 양파 외피가 벗겨진 틈에 *Botrytis aclada*가 자라는 것을 확인하였고, 티몰처리구 양파에서는 양파 뿌리를 포함한 표면에 *Botrytis aclada*가 자라지 않은 것을 확인함으로써 티몰의 저장병 억제 효과를 확인할 수 있었다.

3. 고찰

티몰 훈증을 위한 최적 용매를 탐색하기 위하여 시험된 DMSO, 초산, 에탄올 중에서 에탄올 가장 적절한 것으로 평가되었다. 티몰은 인공 합성되는 식물 정유로서 스스로 휘발되지만 휘발되는 속도가 늦어서 에탄올을 용매로 사용할 경우가 휘발이 더 잘 되므로 저장병의 방제에 더욱 유리할 것으로 판단되었다. 초산 용매로 사용하여 티몰은 훈증하는 것도 가능하였으나 강초산이 티몰 훈증 장치나 패드를 제작하는데 더 어려움이 있다. 또한, 에탄올에 대한 티몰의 용해도는 매우 높아서 50평 규모의 저장시설을 훈증 하는데 유리할 것으로 판단되었다. 에탄올을

용매로 하여 혼증하여 근사의 생장 저해 실험과 양파의 저장병 방제 실험을 한 결과, 30ppm의 티몰 농도로 양파를 혼증하였을 때 양파의 저장병을 현저히 감소시킬 수 있어서 실제 에탄올을 이용한 티몰의 혼증 방법을 양파 저장고에 적용할 수 있는 기술이 될 수 있음을 가르쳐주었다.

제3절 티몰의 혼증 처리 기술 개발 및 혼증 효과

1. 서론

1차년도 연구 조사 결과 경북, 무안의 서남부 채소 농협 등의 여러 창고를 조사한 결과 무안의 일부 지역의 저장고의 양파는 저장고에 따라서 저장 6개월 경과시에 곰팡이에 의한 저장병이 가장 현저히 발생하여 많은 피해를 주고 있었으나, 김제 등 마늘 산지 저장고의 경우 그 규모가 현장 적용 시험을 하기 위한 시설이 소규모이고 혼증 처리를 하기 위한 시설이 적절하지 못하였고 또한, 저장병에 의한 부패는 매우 적은 편이어서 혼증의 경제적 가치가 없다고 고려되어서 2차년도 이후 현장적용을 위한 파일럿 시험과 현장 적용시험을 마늘에 대하여는 하지 않기로 결정되었다. 그러나 양파의 경우는 현장 적용이 가능한 시설 규모를 갖추고 있었고 저장병 방제에 의한 경제적 가치가 높아서 실내 혼증 시험 및 파일럿 시험, 대규모 현장 적용 시험을 진행하였다.

2. 저온 저장 (4℃)시 티몰 처리의 저장병 방제 효과 (9주 저장 1차 시험)

무안 양파를 실험 재료로 하여, 30ppm의 thymol을 100% 에탄올에 1:1의 비율로 용해하여 분무 처리하여 3반복 실험에서 비교했을 때 30ppm thymol 처리구에서 발병도(disease severity)는 발병도 1 ~ 2의 경우에서 티몰 처리는 20.8%의 이병율을 보였고, 발병도 4 ~ 5에서는 0%의 이병율을 보였지만, 무처리구에서는 발병도 4 ~ 5에서는 74.8%의 이병율을 보였고, 발병도 2 ~ 3의 경우에는 25.2%의 이병율을 보였지만, 티몰 처리구에서는 발병도 (1~2)와 발생율이 (발병도 1~2에서 20.8%; 발병도 4~5에서는 0%) 현저하게 낮게 나타났다 (Table 1). 1차년도 시험과 비교할 때, 상온실험에서 보다는 저온 저장시에 티몰에 의한 병 방제 효과를 뚜렷하게 확인할 수 있었다 .

Table 1. Effect of thymol fumigation on disease incidence of onion in low temperature storage

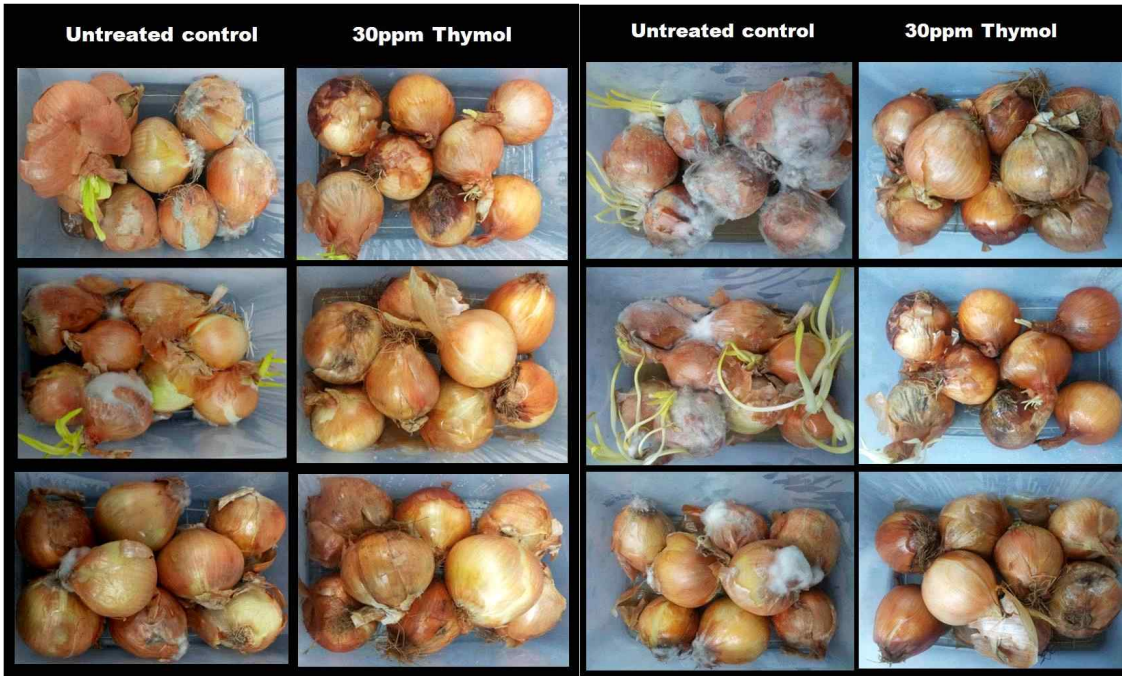
Treatment	Disease severity (0-5) ^a / Percent disease incidence(%)	
	Untreatment	30ppm Thymol
4°C Storage (For 9 weeks)	4 to 5 / 74.8a ^b	4 to 5 / 0.0b
	2 to 3 / 25.2a ^b	2 to 3 / 0.0b
	Not applicable	1 to 2 / 20.8

^a0 to 5 scale: 0 = symptomless onion, 1= few lesions to less than 10% of onion skins affected, 2=10 to less than 25% of onion skins affected, 3= 25 to less than 50% of onion skins affected, 4= 50 to less than 75% of onion skins affected, 5= more than 75% of onion skins affected.

^bThe means followed by same letter are not significantly different between treatment (T-test, $P=0.05$)

3. 저온 저장한 무안양파에 대한 티몰 분무 처리의 저장병 발생 억제 효과 시험 (16주 저장 2차 시험)

무안 양파 8개씩 락앤락 통에 넣고 (312x220x164(H)=8.3L, 바이오킵스) 무처리구와 30ppm 티몰 처리구를 3반복씩 각각 저온에 저장하여 8주, 16주 후에 비교 관찰함으로써 티몰의 곰팡이 병 방제 효과를 조사하기 위하여, 30ppm의 티몰 농도로 30ml의 100% 에탄올에 녹여 분무 처리한 결과, 무처리구에서는 *Penicillium*, *Fusarium* 및 *Botrytis* 곰팡이가 가장 많았고 티몰 처리구에서는 곰팡이 병이 전혀 생기지 않았다 (Fig. 1). 무처리구에서는 약 50% 이상 양파에 싹이 났으나 티몰 처리구에서는 싹이 난 양파가 전혀 없었던 것으로 보아 티몰처리가 저장병의 발생을 억제하는 것 외에도 양파의 호흡을 늦추어 생육을 지연한 것으로 판단되었다 (Fig. 1).



저온 저장 8주 후

저온저장 16주 후

Figure 1. Effect of 30ppm thymol treatment postharvest disease in low temperature (4°C) storage for 16 weeks

4. 에탄올 용해후 훈증 양파에 대한 GC-MS를 이용한 티몰 잔류량 분석

30ppm의 농도로 에탄올에 티몰을 용해하여 양파와 마늘을 분무 처리한 후, 티몰의 표준 농도를 만들어 GC-MS 분석을 위한 표준 곡선에 기초하여 처리 후 시간별 양파 및 마늘에 남아 있는 티몰의 잔류량을 분석하였다 (Fig. 2A and 2B).

티몰 처리한 샘플을 용매에 (GC-MS 분석을 위한 용매: 에칠 아세테이트) 녹이는 시간과 상관없이 (샘플링하여 용매에 녹이는 시간을 길게 하여 비교 실험함: data not shown) 처리 후 3시간 후에 채취한 샘플보다 24시간 지난 후에 채취한 샘플에서 양파 외피에 남아있는 티몰의 농도가 현저히 떨어지는 것을 확인하였다 (Table 2, 3, 4).

양파의 경우는 처리 3시간 후의 양파 1개 당 티몰 12.8 μ g이 잔류하였는데 이는 양파 1cm² 당 0.0408 μ g으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 양파 1그램당 환산한 농도로 한다면 0.078ppb의 농도로 양파에 존재하였고, 처리 24시간 후는 양파 1개 당 티몰 1.49 μ g이 잔류하였는데 이는 양파 1cm² 당 0.0047 μ g으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 양파 1 그램당 환산한 농도로 한다면 0.009ppb의 농도로 양파에 존재하여서 티몰의 식품 허용한계 30ppm 농도에는 현저히 못 미치는 극미한 수준이었다 (Table 4). 더군다나 껍질은 식용하지 않고 버리므로 인체에 대한 위험성은 전혀 없다 할 것이다.

마늘의 경우는 마늘 1개 당 143.9 μ g이 잔류하였는데 이는 마늘 1cm² 당 0.458 μ g으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 마늘 1개의 부피로 환산한 농도로 한다면 13.69ppb의 농도로 양파에 존재하여서 티몰의 식품 허용한계 농도에는 못 미치는 극미한 수준이었다 (Table 4).

마늘의 경우에도 티몰처리 후 3시간 후에 채취한 샘플보다 하루가 지난 후에 채취한 샘플에서 마늘 외피에 남아있는 티몰의 농도가 현저히 떨어지는 것이 확인되었다. 이는 티몰이 양파나 마늘의 외피에 분해되지 않고 계속 남아 있는 것이 아니라, 시간이 지나면서 계속 분해되거나 휘발되는 것으로 생각된다.

A

Area	ng	ppm
2892	0.2	0.1
35844	2	1
392121	20	10
2867269	100	50
4427786	200	100
38042144	1000	500

B

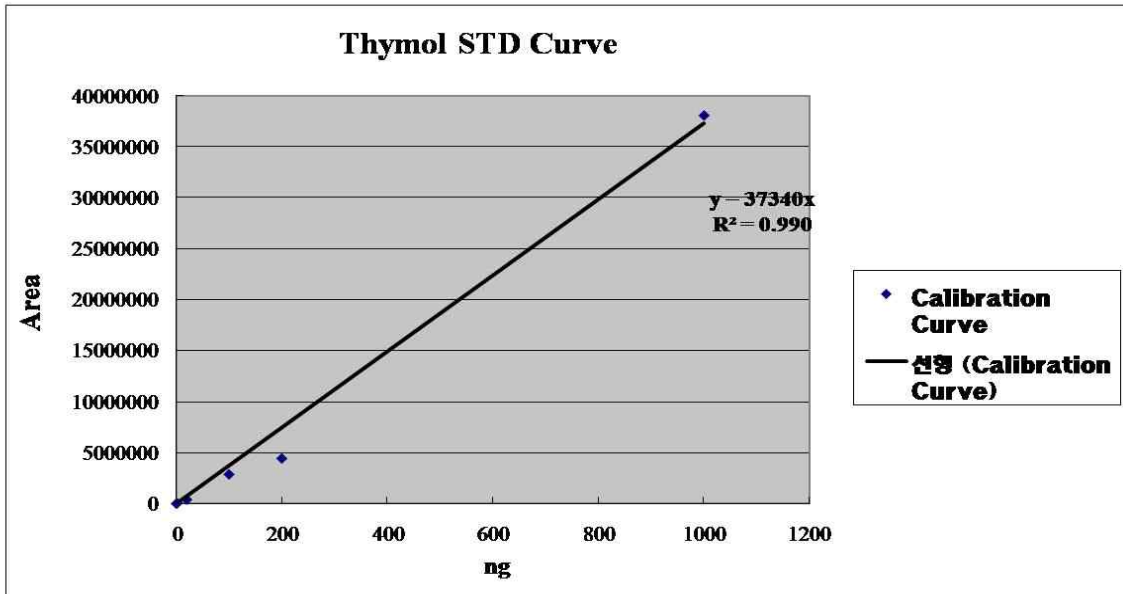


Figure 2. A, Thymol concentration for standard (STD) curve for ppm determination. $Y(\text{ppm})=0.5X(\text{ng}/\mu\text{l})$. B, Thymol standard curve for GC-MS analysis.

Table 2. Measurement of thymol concentration of onion skins treated with 30ppm thymol spray with GC-MS

양파 시료 ^a		회수량(ng)	평균(ng)±표준 편차	평균 (ppm)
처리 3시간 후	OT1	0.6463	0.6408±0.06	0.3206
	OT2	0.6969		
	OT3	0.5791		
처리 24시간 후	OT7	0.0606	0.0746±0.02	0.0376
	OT8	0.0860		
	OT9	0.0771		

^a30ppm 농도의 티몰을 분무처리(30ppm 농도로 티몰을 100% EtOH에 녹여서 스프레이로 분사함) 하여 3시간 또는 24시간 후 양파 3개의 외피를 200ml of ethyl Acetate에 용해한 후 2 μ l를 GC-MS 로 분석하였다.

Table 3. Measurement of thymol concentration of garlic skins treated with 30ppm thymol spray with GC-MS

마늘 시료 ^a		회수량(ng)	평균(ng)±표준 편차	평균 (ppm)
처리 3시간후	GT1	6.84132	7.197±0.545	3.5987
	GT2	6.92512		
	GT3	7.82587		
처리 24시간후	GT7	2.06920	2.065±0.020	1.0328
	GT8	2.04325		
	GT9	2.08460		

^a30ppm 농도의 티몰을 분무처리(30ppm 농도의 티몰로 100% EtOH 에 녹여서 스프레이로 분사함) 하여 3시간 또는 24시간 후 마늘 3개의 외피를 200ml of ethyl Acetate에 용해한 후 2 μ l를 GC-MS 로 분석하였다.

Table 4. 티몰 분무 처리의 양파와 마늘에 잔류하는 티몰 농도 분석^a

분석시료의 잔류량 (µg)	분석시료의 용액 (ml)	티몰의 농도				
		µg/양파 또는 마늘 1개	µg/외피 표면적 (cm ²)	ppb /g양파 또는 g마늘		
양파	처리 3시간 후	0.3204	200	12.816	0.0408	0.078
	처리 24시간 후	0.0373	200	1.492	0.0047	0.009
마늘	처리 3시간 후	3.5987	200	143.948	0.4580	13.687
	처리 24시간 후	1.0328	200	41.312	0.1310	3.928

^aThe table was analysed from data of table 2 and table 3 to determine practical residual thymol in onions and garlics.

5. 티몰고체를 35ppm, 42ppm의 농도가 되도록 가열 훈증처리 하였을 때 양파와 마늘의 티몰 잔류량에 대한 GC-MS 분석 (실온에서 처리 시험)

티몰을 분무 처리하는 방법은 대형 저온 저장고에 현장 적용하기에는 불편하다는 창고 관계자의 의견을 참작하여 티몰을 고체 상태에서 바로 기화하여 양파를 처리하는 기술을 개발하기 위하여, 35, 42ppm의 티몰을 고체 상태에서 가열 기화하여 훈증처리 했을 때 양파에 잔류하는 티몰의 농도를 분석하였다 (Table 5, Table 7).

가. 티몰고체를 35ppm의 농도가 되도록 가열 훈증 처리

양파의 외피의 경우는 티몰 처리 5시간 후의 티몰 잔류량을 분석한 결과, 양파 1개 당 티몰 656µg이 잔류하였는데 이는 양파 1cm² 당 2.089µg으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 양파 1 그램 당 3.99ppb의 농도로 양파에 존재하였고, 처리 24시간 후는 양파 1개 당 티몰 588µg이 잔류하였는데 이는 양파 1cm² 당 1.87µg, 양파 1 그램 당 3.578ppb의 농도로 양파에 존재한 것이었다 (Table 6, Fig. 3A). 티몰의 식품 허용한계 농도 30ppm에는 현저히 못 미치는 극미한 수준이었다. 더군다나 껍질은 식용하지 않고 버리므로 인체에 대한 위험성은 전혀 없다 할 것이다.

양파의 내피의 경우는 티몰 처리 5시간 후의 티몰 잔류량을 분석한 결과, 양파 1개 당 티몰 4.4µg이 잔류하였는데 이는 양파 1cm² 당 0.014µg으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 양파 1 그램 당 0.027ppb의 농도로 양파에 존재하였고, 처리 24시간 후는 양파의 내피는 티몰이 전혀 잔류하지 않았다(Table 6, Fig. 3A).

마늘의 경우는 티몰 처리 5시간 후의 티몰 잔류량을 분석한 결과, 마늘 1개 당 티몰 644µg이 잔류하였는데 이는 마늘 1cm² 당 25.6µg으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 마늘 1 그램 당 765.4ppb의 농도로 마늘에 존재하였고, 처리 24시간 후는 마늘 1개 당 티몰 348µg이 잔류하였는데 이는 마늘 1cm² 당 13.8µg, 마늘 1 그램당 413.6ppb으로 존재한 것이었다. 처리 48시간 후

에는 마늘 1개 당 티몰 48 μ g이 잔류하였는데 이는 마늘 1cm² 당 1.91 μ g, 마늘 1 그램당 57.1ppb으로 존재한 것이었다 (Table 6, Fig. 3B). 이는 티몰의 식품 허용한계 농도 30ppm에는 현저히 못 미치는 극미한 수준이었다.

Table 5. 티몰 고체를 가열 기화하여 35ppm이 되도록 훈증한 양파와 마늘에 잔류하는 티몰 농도에 대한 GC-MS 분석

시료		회수량(ng)	평균 \pm 표준편차	평균(ppm)	
양파	처리후 5시간	외피	35p-O-1 32.3591	32.7044 \pm 0.48517	16.4
			35p-O-2 32.4951		
			35p-O-3 33.2591		
		내피	35p-O-4 0.1925		
			35p-O-5 0.22268		
			35p-O-6 0.2369		
	처리후 24시간	외피	35p-O-7 30.088	29.3705 \pm 0.75309	14.7
			35p-O-8 29.4372		
			35p-O-9 28.5862		
		내피	35p-O-10 0		
			35p-O-11 0		
			35p-O-12 0		
마늘	처리후 5시간	외피	35p-G-1 32.3029	32.2053 \pm 0.23831	16.10
			35p-G-2 32.3793		
			35p-G-3 31.9337		
	처리후 24시간	외피	35p-G-4 16.7817	17.3480 \pm 0.49043	8.67
			35p-G-5 17.633		
			35p-G-6 17.6292		
	처리후 48시간	외피	35p-G-7 2.40155	2.41618 \pm 0.02966	1.21
			35p-G-8 2.39668		
			35p-G-9 2.45032		

^a35ppm 농도의 티몰을 고체 상태로 가열 훈증 처리하여 5, 24, 48시간 후 각각 5개 양파의 외피와 내피, 마늘 외피를 200ml의 에틸 아세테이트에 용해하여 2 μ l를 취하여 GC-MS로 분석하였다.

Table 6. 티몰 고체를 가열 기화하여 35ppm이 되도록 훈증한 양파와 마늘에 잔류하는 티몰 농도 환산^a

분석시료 종류와 잔류량 (μg)	분석시료의 용액 (ml)	티몰의 농도					
		μg/양파 또는 마늘 1개	μg/외피 표면적 (cm ²)	ppb /g양파 또는 g마늘			
양파	처리 후 5시간	외피	16.4	200	656	2.0892	3.992
		내피	0.11	200	4.4	0.0140	0.027
	처리 후 24시간	외피	14.7	200	588	1.8726	3.578
		내피	0	200	0	0.0000	0.000
마늘	처리 후 5시간	외피	16.1	200	644	25.637	765.4
	처리 후 24시간	외피	8.7	200	348	13.853	413.6
	처리 후 48시간	외피	1.2	200	48	1.910	57.1

^aThe table was analysed from data of table 5 to determine practical residual thymol in onions and garlics.

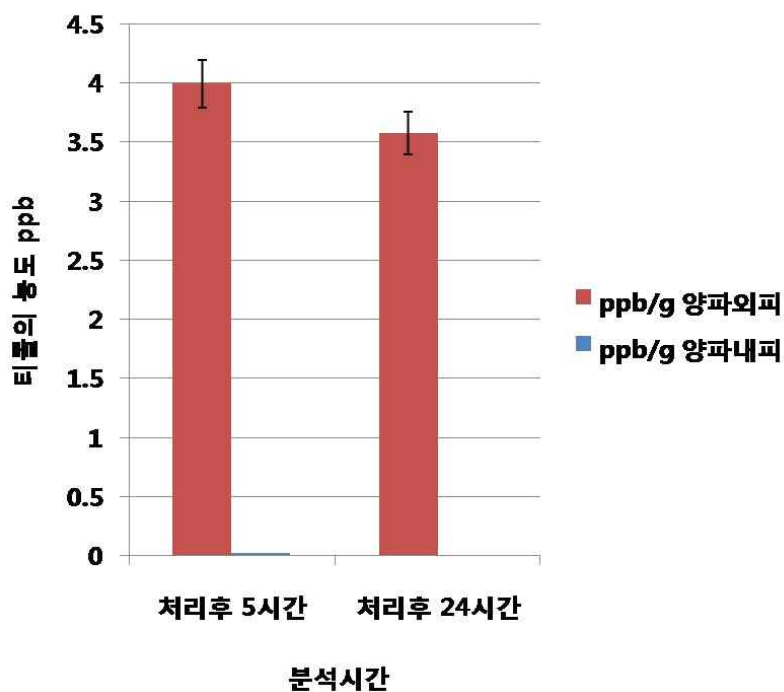


Fig. 3A. 티몰 고체를 가열 기화하여 35ppm이 되도록 훈증한 양파에 잔류하는 티몰 농도. 내피는 극미량 존재

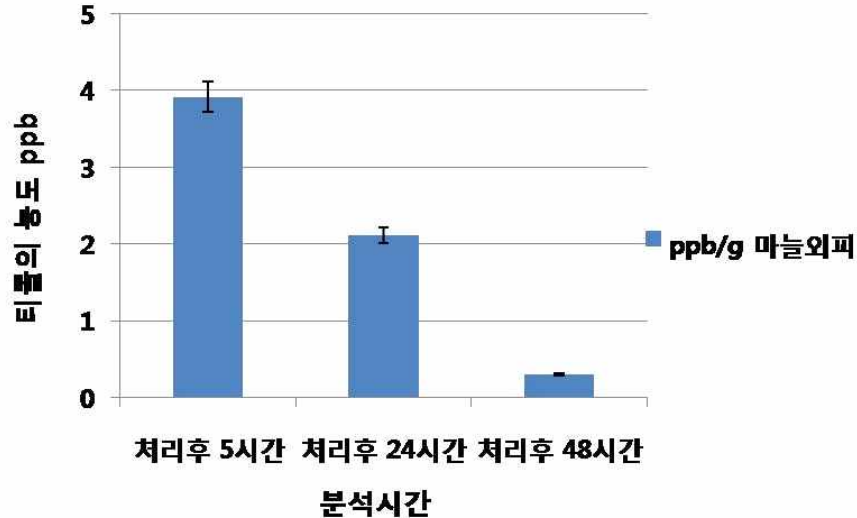


Fig. 3B. 티몰 고체를 가열 기화하여 35ppm이 되도록 훈증한 마늘에 잔류하는 티몰 농도

나. 티몰고체를 42ppm의 농도가 되도록 가열 훈증 처리

42ppm의 티몰을 고체 상태에서 가열 기화하여 훈증처리 했을 때 양파에 잔류하는 티몰의 농도를 분석한 결과, 양파의 외피의 경우는 티몰 처리 5시간 후의 티몰 잔류량을 분석한 결과, 양파 1개 당 티몰 1,596 μ g이 잔류하였는데 이는 양파 1cm² 당 5.08 μ g으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 양파 1 그램 당 9.71ppb의 농도로 양파에 존재하였고, 처리 24시간 후는 양파 1개 당 티몰 920.7 μ g이 잔류하였는데 이는 양파 1cm² 당 2.93 μ g, 양파 1 그램 당 5.6ppb의 농도로 양파에 존재하였고, 처리 48시간 후는 양파 1개 당 티몰 528.1 μ g이 잔류하였는데 이는 양파 1cm² 당 1.68 μ g, 양파 1 그램 당 3.21ppb의 농도로 양파에 존재한 것이다 (Table 8, Fig. 4). 티몰의 식품 허용한계 농도 30ppm에는 현저히 못 미치는 극미한 수준이었다.

양파의 내피의 경우는 티몰 처리 5시간 후의 티몰 잔류량을 분석한 결과, 양파 1개 당 티몰 6.0 μ g이 잔류하였는데 이는 양파 1cm² 당 0.02 μ g으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 양파 1 그램 당 0.036ppb의 농도로 양파에 존재하였고, 처리 24시간 후는 양파의 내피는 티몰이 매우 극미한 양으로 존재하였다 (Table 8, Fig. 4).

따라서 티몰의 농도가 약 30-40ppm이 되도록 창고 내부를 가열 훈증 처리하는 것은 양파의 저장병을 안전한 수준에서 충분히 방제할 수 있는 것으로 제시하여 주었다 하겠다. 이것을 토대로 익산의 6-14톤 규모에서 티몰 고체를 직접 가열하는 방법으로 훈증을 시도하게 되었다. 마늘의 경우는 티몰이 더 잘 흡착되는 경향을 보였고 잔류량도 미미하였는데, 1차 년도의 연구 결과 마늘의 경우는 곰팡이등 미생물에 의한 저장병의 발생이 큰 문제가 되지 않았고, 2차년도 마늘의 경우 저장병 억제 및 티몰 잔류에 대한 분석을 하였지만 본 시험에 사용한 마늘의 경우 4개월 저온 저장시에도 저장병의 발생도 미미하여서 이후 실험은 양파에 초점을 두고 티몰 훈증 처리 기술 개발시험을 하였다.

Table 7. 티몰 고체를 가열 기화하여 35ppm이 되도록 훈증한 양파에 잔류하는 티몰 농도에 대한 GC-MS 분석

시료		회수량(ng)	평균(ng)	표준편차	평균 (ppm)
외피 (껍질)	5시간 후	42p-O-1	82.8736	79.8246	3.03853
		42p-O-2	79.8036		
		42p-O-3	76.7967		
	24시간 후	42p-O-4	55.8314	46.0328	19.401
		42p-O-5	58.5803		
		42p-O-6	23.6868		
	48시간 후	42p-O-10	26.1683	26.4027	0.21589
		42p-O-11	26.4462		
		42p-O-12	26.5935		
내피(속)	5시간 후	42p-O-7	0.24368	0.29795	0.05046
		42p-O-8	0.30672		
		42p-O-9	0.34344		
	24시간 후	42p-O-13	0.04711	0.06209	0.0137
		42p-O-14	0.06516		
		42p-O-15	0.074		

^a42ppm 농도의 티몰을 고체 상태로 가열 훈증 처리하여 5, 24, 48시간 후 각각 5개 양파의 외피와 내피를 200ml의 에틸 아세테이트에 용해하여 2 μ l를 취하여 GC-MS로 분석하였다.

Table 8. 티몰 고체를 가열 기화하여 42ppm이 되도록 훈증한 양파에 잔류하는 티몰 농도 환산^a

처리 부위 및 시간	분석시료의 잔류량 (μ g)	분석시료의 용액 (ml)	티몰의 농도			
			μ g/양파 1개 중량	μ g/외피 표면적 (cm^2)	ppb /g양파	
외피 (껍질)	5시간 후	39.9	200	1596.5	5.08	9.71
	24시간 후	23.0	200	920.7	2.93	5.60
	48시간 후	13.2	200	528.1	1.68	3.21
내피 (속)	5시간 후	0.10	200	6.0	0.020	0.036
	24시간 후	0.03	200	1.2	0.004	0.008

^aThe table was analysed from data of table 7 to determine practical residual thymol in onions.

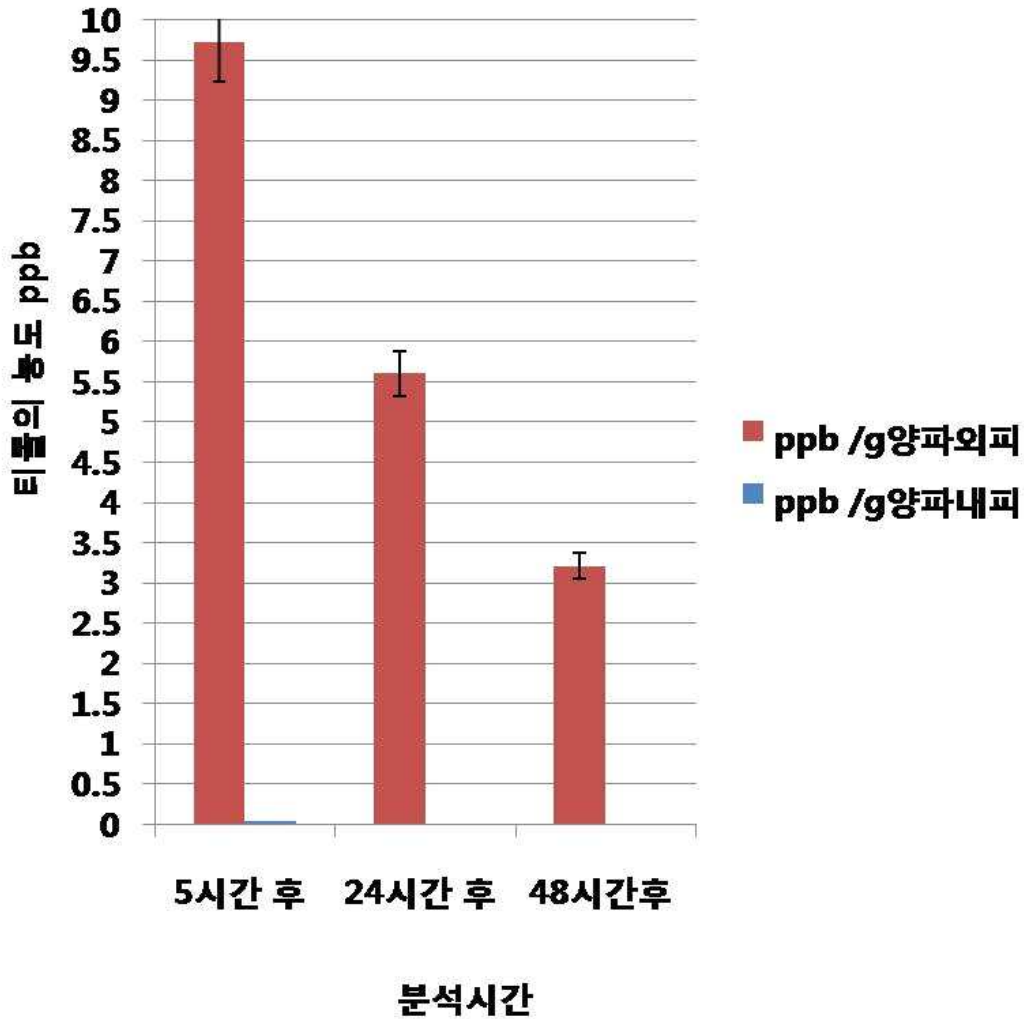


Fig. 4. 티몰 고체를 가열 기화하여 42ppm이 되도록 훈증한 양파에 잔류하는 티몰 농도. 내피는 극미량으로 존재

6. 티몰 고체 가열 훈증 처리 기술 개발을 위한 파일럿 시험 및 티몰 잔류량 분석

가. 티몰 고체 가열 훈증 처리 기술 개발을 위한 파일럿 시험

다양한 소형 컨테이너에서 (8.3리터, 51리터 규모) 티몰을 분무처리, 티몰 고체 가열 훈증처리를 하여 저장병 억제 효과를 재확인하면서 양파와 마늘에 티몰에 얼마나 잔류하여 저장병 방제에 효과를 나타낼 수 있는지, 어느 정도의 시간이 지난 후 티몰이 분해되고 인체에 안전한 정도로 양파의 외피에 잔류하는지에 대한 연구를 마치고, 160톤 규모 대형 양파 저장고 현장 적용 예비 안전 시험을 위하여 6톤, 14톤 규모의 저온 저장고에서 티몰 고체를 가열 훈증 처리하는 방법을 적용하기로 하였다. 소형 실내 박스에서 티몰 고체를 급속히 직접 가열 하여 훈증하는 것은 저장병 방제에 효과가 매우 확실하였다.

이를 바탕으로 전북 익산의 저온 창고에 14,214L (약 14톤; 가로185cm x 세로 390cm x높이 197cm) 에 무안양파 200kg과 창고 내부가 30ppm 농도가 되도록 티몰 322g을 가열 훈증기에 넣고 훈증처리를 하였다 (Fig. 5).

훈증장치 4개를 쌓아놓은 양파 주변에 설치하고 80.5g씩 티몰을 각 훈증장치에 나누어 놓고 가열함과 동시에 저온 가동 (5℃) 시켰다. 일주일 후에 20kg 양파망과 양파 외피 및 훈증장치 주변의 바닥에 티몰 가루가 묻어 있는 것이 관찰되어, 티몰 농도 또는 저온에서 티몰 기화 훈증 처리 방법의 문제라고 판단하여 티몰의 농도를 20ppm이 되도록 낮추고 훈증장치에 남아있는 티몰이 없이 모두 훈증된 것을 확인한 후에 (티몰 가열 훈증 처리 후 약 3시간), 저온 장치를 가동시키고 저장 일주일 후에 관찰하자 티몰 가루가 보이지 않았다 (Fig. 6).



Figure 5. 티몰 처리한 14톤 규모의 양파 저온저장 컨테이너

양파 망에 티몰가루가 남아있음



Figure 6. 티몰 고체 가열 기화 훈증 처리시 저온이 티몰의 처리 농도에 따른 가루 결정화에 미치는 영향

아황산가스 처리를 위해서 전북 익산의 저온 저장 컨테이너 6,078L(약 6톤; 가로130cm x 세로 275cm x 높이 170cm)에 무안양파 200kg과 아황산가스의 농도가 20ppm이 되도록 108g을 티몰 처리구와 마찬가지로의 방법으로 훈증장치를 이용하여 처리하였고, 무처리를 위한 별도의 저장고는 시설이 부족하여, 아황산가스 처리 후에 가스를 배출한 후 동일한 크기의 양파를 동일한 저온 저장 (5℃) 컨테이너에 넣고 저장병 방제에 대한 효과를 조사하였다 (Fig 7).



Figure 7. 유향을 가열 훈증(아황산가스) 처리한 6톤 규모의 저온저장 컨테이너에서의 저장병 방제 시험

나. 티몰 잔류량 분석

저온 저장 (5°C) 온도에서 30ppm의 농도가 되도록 티몰 322g을 훈증 처리한 티몰 처리구 샘플은 양파 외피에 티몰 가루가 묻어 있었는데 이는 양파 외피의 티몰 잔류량이 양파 1그램당 23.2ppb로 (Table 10) 존재하였는데, 이는 실온에서 티몰을 가열 훈증 처리한 것 (Table 6, Table 8) 보다 잔류량이 약 2배 정도 높았는데 티몰이 상온에서 충분히 휘발한 후 저온 처리를 하는것이 올바른 티몰 처리 방법임을 가르쳐 주었다. 상온에서 농도가 20ppm이 되도록 처리한 양파의 외피에서는 티몰 가루가 보이지 않았으며, 30ppm 및 20ppm이 처리된 양파 외피의 티몰 잔류량은 처리 3개월 후인 8월 21 일 2차로 샘플을 채취하여 분석될 것이다.

Table 9. 티몰 30ppm이 처리된 저온 저장고 양파의 티몰 잔류량 GC-MS 분석^a

시료	회수량(ng)	평균(ng)±표준편차	평균(ppm)
익산-T-1	92.210		
익산-T-2	190.162	190.56±98.54	95.28
익산-T-3	289.303		

^a35ppm 농도의 티몰을 고체 상태로 가열 훈증 처리하여 5, 24, 48시간 후 각각 5개 양파의 외피와 내피, 마늘 외피를 200ml의 에틸 아세테이트에 용해하여 2μl를 취하여 GC-MS로 분석하였다.

Table 10. 티몰 30ppm이 처리된 저온 저장고 양파에 잔류하는 티몰의 농도 환산^a

처리 부위 및 시간	분석시료의 잔류량 (μg)	분석시료의 용액 (ml)	티몰의 농도		
			μg/양파 1개	μg/외피 표면적 (cm ²)	ppb /g양파
외피 (껍질) 5시간 후	95.3	200	3811.2	12.1	23.2

^aThe table was analysed from data of table 7 to determine practical residual thymol in onions.

7. 파일럿 시험으로서 무안 양파의 저장병에 대한 티몰 고체의 가열 훈증 처리 효과 (4개월 저장)

전북 익산의 저온저장 컨테이너에 무안 양파를 무처리, 20ppm SO₂, 30ppm thymol 처리구 별로 5°C 에서 약 4개월 동안 보관하면서 이병률을 조사하여 티몰의 훈증효과를 조사하였는데, 티몰 처리구에서는 저장병 발생율이 0% 이었지만, 아황산가스처리는 17.8%, 무처리 33.3%로 티몰 처리구의 저장병 발생율이 현저히 낮았고 (LSD, P=0.05) (Fig. 8, Table 11),

또한 티몰 처리구에서는 양파가 5°C로 4개월 저장시 썩이 나온 것이 없었지만 무처리는 많은 양파들이 썩이 나와 티몰이 양파의 호흡을 지연하여 저장기간을 더 연장할 수 있음을

제시하여 주었다 (Fig.8, Fig. 9). 이후 또한 추가로 20ppm의 티몰을 처리한 양파 시험에서는 처리 2개월 동안 저장병이 발생하지 않았지만 무처리는 저장병이 매우 심하게 발생하였다.



무처리



유황처리

30ppm Thymol 처리

Fig. 8. 양파의 저장병에 대한 티몰 고체 가열 훈증 처리 효과 사진

Table 11. 양파의 저장병에 대한 티몰 고체 가열 훈증 처리 효과 (익산 저온 컨테이너에서 약 4개월 동안 보관)

반복	이병율A(%) ^b			이병율B(%) ^c : severe infection		
	무처리	황	티몰	무처리	황	티몰
R1	40	18	0	10	2	0
R2	38	10	0	9.0	2	0
R3	29	22	0	7.0	0	0
R4	26	21	0	14	2	0
평균	33.3a ^d	17.8b	0c	10a ^d	1.5b	0c

^aThe onions in the 8 bags of 20kg were treated with 30ppm of thymol in the 6 tons and 14 tons of storage container for untreated control and thymol treatment, respectively.

^bOnions were infected only around root attached area.

^cWhole onions were infected severely.

^dThe means followed by same letter are not significantly different between treatment (LSD, $P=0.05$)

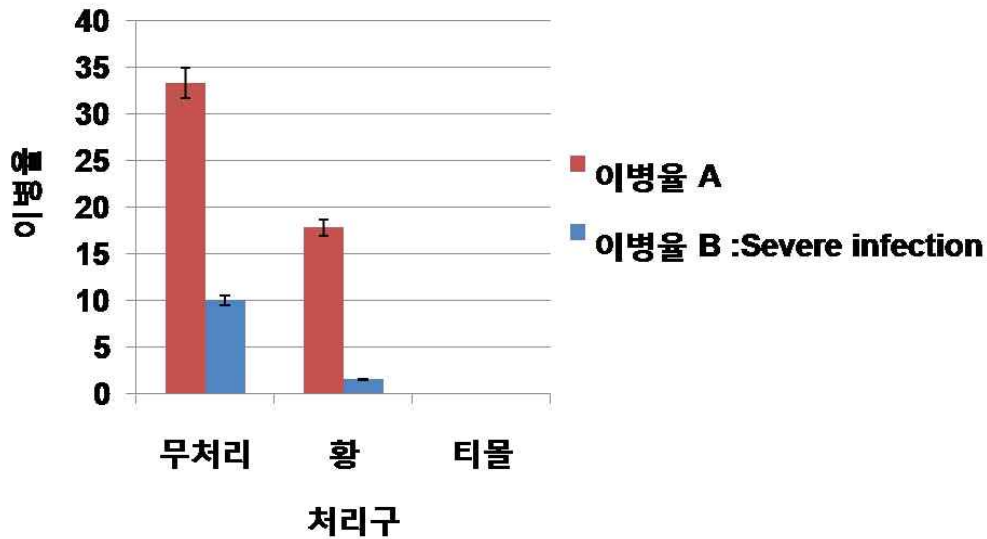


Figure 9. 양파의 저장병에 대한 티몰 고체 가열 훈증 처리 효과 (익산 저온 컨테이너에서 약 4개월 동안 보관)

8. 티몰 훈증 처리 기술 개발

가. 티몰 고체 가열 훈증 및 에탄올 용해 가열 훈증에 따른 저온시 티몰 재 결정화 영향 연구

30ppm의 티몰 고체를 저온에서 직접 가열하여 기화 훈증하면 미세한 티몰 가루가 발생하는 문제점을 개선하기 위하여 티몰의 농도를 낮춰 20ppm의 thymol powder를 훈증장치에 넣고 약 3시간 가열한 후 훈증기의 티몰이 모두 훈증된 것을 확인한 뒤에 저온 장치를 가동시켰다. 양파에는 티몰 가루 결정체가 남아 있지 않음 확인하였으나, 저온저장 컨테이너 내부의 찬공기가 나오는 냉각기 주변으로 티몰이 응결되어 있는 것을 확인하여, 이를 개선하기 위하여 실내에서 티몰을 고체로 가열 훈증하는 방법과 에탄올에 용해하여 가열 훈증하는 방법을 다음 시험에서 시도하였다.

티몰을 기화시키는 방법에 대한 기술을 개발하기 위해서 예비 실험으로 우체국박스 5호 (48cm x 36cm x 30cm)에 해당되는 30ppm의 티몰을 바로 가열하여 훈증시키는 방법으로, 24시간 동안 티몰 처리를 한 후 바로 4℃에 7일간 저장한 결과, 티몰 결정체가 양파 외피와 박스 표면에 남아있는 것을 알 수 있었다 (Fig. 10A).

이것은 티몰고체가 바로 기화되면서 저온조건에서 기화도가 낮아 결정체가 만들어 지는 것이라고 판단되어 기화된 티몰이 저온에서 재 결정화되는 것을 개선하기 위하여 에탄올 용매에 녹여서 기화되기 전에 티몰의 농도를 낮추어 훈증하기 위하여, 우체국 박스 5호에 무안양파와 30ppm의 티몰을 1:1의 비율로 100% 에탄올에 녹여 24시간 동안 실온에서 훈증처리 한 후 바로 4℃에 7일간 저장한 결과, 양파 외피 및 박스 표면에 티몰 결정체가 없는 것을 확인하였다 (Fig. 10B 오른편 사진).

또한, 30ppm의 10배에 해당하는 고농도(300ppm)의 티몰도 에탄올 용매에 용해하여 훈증하면 가열 훈증 처리하여도 티몰 결정체가 남지 않는다는 것을 알 수 있었다 (Fig. 10B 왼편 사진). 이에 근거하여 전라남도 무안 몽탄 저장고의 실증실험에서는 티몰을 에탄올에 녹여서 훈증하는 방법으로 처리하기로 하였다.



Fig. 10A



Fig. 10B

Fig. 10. A, 티몰 고체 가열 기화 시험. B, 티몰을 에탄올에 용해하여 기화

나. 티몰을 에탄올에 녹여 30ppm의 농도로 훈증 처리하였을 때 양파외피의 티몰 잔류량을 측정

30ppm 농도의 티몰을 각각 100% 에탄올에 녹인 후 24시간 동안 훈증 처리한 양파 샘플 5개의 외피(껍질)를 에틸아세테이트 용매에 녹여 티몰 잔류량을 확인하였다 (Table 12). 30ppm의 티몰을 에탄올에 녹여 훈증 처리한 샘플에서는 양파 1그램당 7.55ppb 티몰이 잔류하고 있는 것으로 확인되었다 (Table 13). 이후 훈증실험에서는 티몰고체를 에탄올에 녹여서 훈증처리 하는 방법을 적용하였다.

Table 12. GC-MS 분석을 통한 저온 저장 양파의 Thymol 잔류량 확인

시료	회수량(ng)	평균(ng)±표준편차	평균(ppm)
EtOH30p-1	62.3261		
EtOH30p-2	62.7058	62.037±0.85	31.02
EtOH30p-3	61.0791		

^a30ppm 농도가 되도록 티몰을 훈증 처리하여 24시간 후 각각 5개를 200ml의 에틸 아세테이트에 용해하여 2μl를 취하여 GC-MS로 분석하였다.

Table 13. 티몰의 농도가 30ppm이 되도록 에탄올에 용해하여 훈증 처리한 양파에 잔류하는 티몰 농도 환산^a

처리 부위 및 시간	분석시료의 잔류량 (µg)	분석시료의 용액 (ml)	티몰의 농도		
			µg/양파 1개	µg/외피 표면적 (cm ²)	ppb/g양파
외피 (껍질) 5시간 후	31.02	200	1240.8	3.95	7.55

^aThe table was analysed from data of table 12 to determine practical residual thymol in onions.

다. 티몰을 에탄올에 용해한 후 가열 훈증 처리기술 개발을 위한 컨테이너 내부 티몰 농도 분석 시험



Fig.11. 식물 검역소의 500L (약 0.5톤; 가로125cm x 세로 50cm x 높이 80cm)의 내부에서 가스를 포집할 수 있는 훈증 실험용 컨테이너



환풍시설과 훈증장치



부의 에어펌프와 연결된 튜브 및 실험군 무안 양파

Fig. 12. 훈증 실험용 컨테이너 내부. 환풍시설이 갖추어져 있는 컨테이너 내부에는 튜브를 설치하고 그 튜브를 통해 내부의 가스가 포집될 수 있도록 컨테이너 외부의 에어펌프에 연결되어있음. 내부의 가스를 시간대 별로 포집함. 36개씩 4망의 양파를 놓고 내부의 티몰 농도가 30ppm 이 되도록 100% 에탄올에 녹인 후 훈증기에 가열하여 기화하는 방식으로 처리함



Fig. 13. 컨테이너 내부의 티몰 가스 포집 및 분석. 컨테이너 내부의 가스를 시간대 별로 에어 펌프를 이용해 tedlar bag에 포집함. 포집된 가스 샘플을 각각 40ml 씩 에틸아세테이트 용매 2ml에 직접 녹여 GC-MS 로 분석함.

라. 양파 외피의 면적을 기준으로 한 티몰 처리 방법에 대한 티몰 잔류량 분석

티몰을 훈증하였을 때 휘발된 티몰이 양파의 외피에 바로 잘 부착된다는 가정하에 저장병 방제에 효과가 있는 최소한의 농도로 양파를 처리하기 위하여 양파 표면적에 기준하여 30ppm 농도가 되도록 thymol을 처리하고, 처리 3일 후에 양파외피에 남아있는 티몰농도를 분석한 결과 (Table 14), 4개의 처리구 양파 모두에서 양파 1그램 당 0.015~0.033ppb으로 존재하는 것으로 분석되었는데(Table 15), 티몰의 처리에 의한 잔류량은 농산물 처리 허용한계 보다 매우 낮게 나타나서 안전하게 사용될 수 있는 것으로 판단되었다.

Table 14. 양파 표면적에 기준한 30ppm의 thymol을 처리한 후 양파 외피의 티몰 잔류량 GC-MS 분석

	시료번호	회수량(ng)	평균±표준편차	평균(ppm)
반복 1	0.18-1-1	0.03348	0.03627±0.0025	0.018
	0.18-1-2	0.03704		
	0.18-1-3	0.03830		
반복 2	0.18-2-1	0.01813	0.02561±0.0073	0.013
	0.18-2-2	0.03273		
	0.18-2-3	0.02598		
반복 3	0.18-3-1	0.0369	0.02682±0.00878	0.013
	0.18-3-2	0.02086		
	0.18-3-3	0.02268		
반복 4	0.18-4-1	0.06907	0.05875±0.00908	0.029
	0.18-4-2	0.05517		
	0.18-4-3	0.05201		

^a30ppm 농도의 티몰을 처리하여 3일 후 각각 5개 양파의 외피를 200ml의 에틸 아세테이트에 용해하여 2μl를 취하여 GC-MS로 분석하였다.

Table 15. 양파 표면적에 기준한 30ppm의 thymol을 처리한 후 양파 외피의 티몰 잔류량 환산^a

반복	분석시료의 잔류량 (μg)	분석시료의 용액 (ml)	티몰의 농도			
			μg/양파 1개	μg/외피 표면적 (cm ²)	ppb /g양파	
0.18g thymol	0.18g-1	0.018	200	0.72	0.0023	0.020
	0.18g-2	0.013	200	0.52	0.0017	0.015
	0.18g-3	0.013	200	0.52	0.0017	0.015
	0.18g-4	0.029	200	1.16	0.0037	0.033
	Mean	0.01825	200	0.73	0.00235	0.02075

^aThe table was analysed from data of table 14 to determine practical residual thymol in onions.

마. 훈증 컨테이너 내부에서의 티몰의 훈증에 의한 양파 외피의 티몰 잔류량 분석

티몰을 훈증하였을 때 휘발된 티몰이 훈증 컨테이너 내부에서 계속하여 확산한다는 가정 하에서 양파의 외피가 일정 시간 티몰에 노출되어야 저장병 억제에 효과가 있을 것이라고 생각하여 컨테이너의 부피를 기준하여 30ppm thymol을 처리하고, 처리 3일 후 양파외피에 남아있는 티몰농도를 분석한 결과 (Table 16)

양파 1개 당 티몰 33.6~76.4μg이 잔류하였는데 이는 양파 1cm² 당 0.107 ~ 0.2433μg으로 존재한 것이며, 또한, 이것을 양파 1그램당 환산한 농도로 한다면 0.947 ~ 2.152ppb의 농도로 양

과에 존재하였고, 컨테이너 내부의 농도는 처리 3시간 후 최고 농도에 도달한 것이 0.0248ppm로 나타나 30ppm이 되도록 티몰을 처리하였지만 양과의 표면이나 컨테이너의 내부 표면에 지속적으로 티몰이 흡착되는 것으로 생각되었다 (Table 17). 티몰 처리에 의한 잔류량은 식품사용 허용한계 보다 매우 낮게 나타나서 안전하게 사용될 수 있는 것으로 판단되었다.

Table 16. 훈증 컨테이너에 기준한 30ppm의 thymol을 처리한 후 양과 외피의 티몰 잔류량 GC-MS 분석^a

시료	회수량(ng)	평균±표준편차	평균(ppm)
15g-1-1	2.79767	3.12721±0.31347	1.56
15g-1-2	3.42167		
15g-1-3	3.16229		
15g-2-1	4.98889	3.82909±1.02431	1.91
15g-2-2	3.04826		
15g-2-3	3.45013		
15g-3-1	1.73875	1.67472±0.13665	0.84
15g-3-2	1.7676		
15g-3-3	1.51781		
15g-4-1	3.2477	3.37831±0.11858	1.69
15g-4-2	3.47919		
15g-4-3	3.40803		

^a30ppm 농도가 되도록 티몰을 처리하여 3일 후 각각 5개 양과의 외피를 200ml의 에틸 아세테이트에 용해하여 2μl를 취하여 GC-MS로 분석하였다.

Table 17. 훈증 컨테이너에 기준한 30ppm의 thymol을 처리한 후 양과 외피의 티몰 잔류량 환산

반복	분석시료의 잔류량 (μg)	분석시료의 용액 (ml)	티몰의 농도			
			μg/양과 1개	μg/외피 표면적 (cm ²)	ppb /g양과	
15g thymol	15g-1	1.56	200	62.4	0.1987	1.758
	15g-2	1.91	200	76.4	0.2433	2.152
	15g-3	0.84	200	33.6	0.1070	0.947
	15g-4	1.69	200	67.6	0.2153	1.905
	Mean	1.5	200	60	0.19108	1.6905

처리 후 3시간 동안은 티몰 가스 농도가 3시간 까지는 최고 농도로 증가했지만 4시간 부터는 농도가 감소하기 시작하였다 (Table 18, Fig.14). Standard curve에서 나타나는 최소

농도에 해당하는 극소량의 티몰이 검출되었는데, 이는 티몰이 양파의 외피 및 컨테이너의 내부 표면 및 기타 물체에 계속적으로 흡착되거나 분해되는 것으로 생각이 된다. 그러나, 처리 3일 후에 훈증장치를 개봉했을 때 양파외피의 티몰냄새가 나는 것을 확인하였는데 이는 내부의 티몰 가스가 양파에 흡착되었음을 가르쳐 주는 것이라 하겠다.

Table 18. 훈증 컨테이너에 기준한 30ppm의 thymol을 처리한 후 컨테이너 내부의 처리 시간 별 티몰 농도 분석^a

시료	ng	ppm
15g-1시간	0.01545ng	0.0077
15g-2시간	0.02876ng	0.0144
15g-3시간	0.04954ng	0.0248
15g-4시간	0.03859ng	0.0193
15g-5시간	0.01481ng	0.0074

^a컨테이너 내부의 가스를 시간 대 별로 에어펌프를 이용해 tedlar bag 에 포집하고, 포집된 가스 샘플 각각 40ml 씩 에틸아세테이트 용매 2ml에 직접 녹인후 이중 2μl를 취하여 GC-MS 로 분석함.

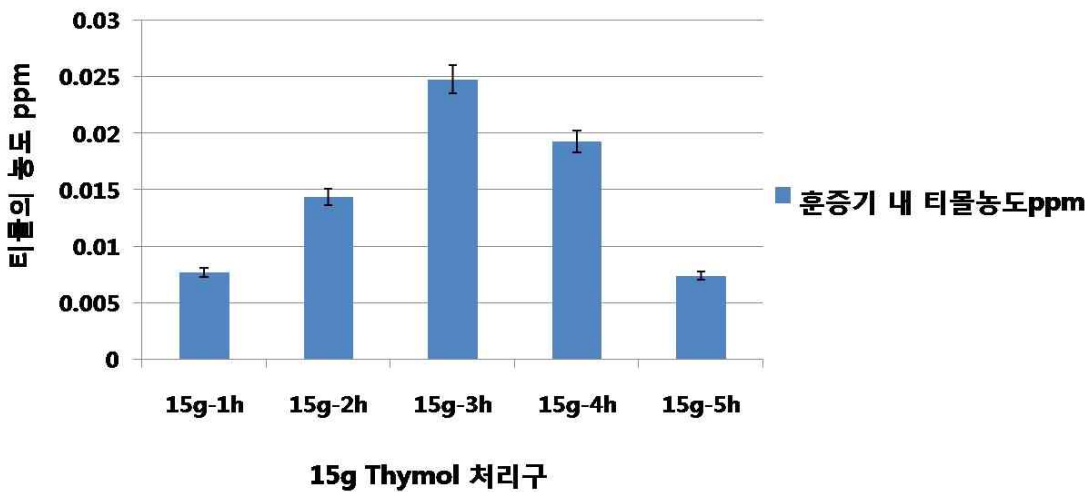


Figure 14. 훈증 컨테이너에 기준한 30ppm의 thymol을 처리한 후 컨테이너 내부의 처리 시간 별 티몰 농도 분석 (arranged from table 18)

9. 티몰 혼증처리를 위한 전라남도 무안 몽탄농협 29평 (547톤) 양파 저온 저장고

실증실험

양파와 마늘의 장기 저장에 영향을 미치는 가장 큰 요인 중의 하나는 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* 및 *Botrytis* 등의 다양한 곰팡이로 조사되었는데, 마늘의 경우는 그 발생 빈도가 약하여 혼증 처리 기술 개발의 필요성이 크지 않아서 대량으로 많은 저온 창고 시설에서 장기 저장되는 양파에 초점을 맞추고 연구를 하였다. 컨테이너 내부의 부피를 기준으로 하여 내부의 티몰 농도가 20-30ppm이 되도록 티몰을 혼증하는 것은 양파의 외피에 식품허용한계(30ppm) 수준보다 매우 낮은 농도로 흡착되고 저장병 억제 효과의 효과가 매우 우수하였다.

특히, 티몰 고체를 직접 가열하여 기화하여 혼증하면 빠른 속도로 티몰이 양파의 외피에 흡착함으로써 저장병의 방제 효과가 더욱 탁월하였지만, 저온에서 티몰 고체를 직접 가열하면 기화하면서 저온으로 인하여 티몰이 재 결정화되어 가루를 남기게 되기 때문에 티몰은 저온에서 기화도가 낮은 것으로 판단되었다.

그러나 티몰을 에탄올에 완전 용해하면 가열 혼증 처리하거나, 기화시켜 혼증한 후 저온 처리를 하여도 재 결정화하지 않아서 현장 적용 방법으로는 에탄올 용매에 완전 용해하여 하면 저온에서 처리를 하여도 균질하게 혼증되어 양파의 외피나 양파의 땅에 티몰 가루가 엉기는 현상은 없었다.

따라서 이러한 특성을 감안하여 시중에 판매되고 있는 모기 퇴치용 혼증장치(주식회사 모스텍)의 원리와 마찬가지로 본 티몰 처리기술 개발 연구 과제 3년차에서는 Fig 15과 같이 시판되고 있는 코드형 혼증장치와 비슷하게 양파 저온 저장고의 특징을 감안하여 사이즈를 늘려서 제품을 개발하고자 하였으나 기화 속도가 늦으면서 용기의 사이즈를 크게 하기 위한 대량 제작이 현실적으로 어려워 황 혼증기를 사용하여 티몰의 혼증기로 현장 적용 시험을 하였다.

29평 저장고의 160톤의 양파에 티몰 혼증을 20ppm으로 처리한 것은 저장병 방제에 탁월한 효과를 보여주었다 (Fig. 16, 17, 19, 19). 저장 6개월 후에 무처리는 관찰 가능한 파렛트에서 70개의 양파에 저장병에 감염되었으며 일부는 심하게 발생하여 양파의 땅이 물러 썩어 주저앉기 시작하였다. 그러나 티몰 처리 양파는 단지 3개의 양파만이 감염되었다 (Table 19, Fig. 17). 무처리 저장실은 모두 저장 6개월 후에 상품성의 저하로 출하가 완료되었지만 티몰 처리 저장실은 저장 10개월째인 이듬해 3월말 경에 출하되었다 (Fig. 19).



Figure 15. 다양한 티몰 혼증장치 개발을 위한 샘플의 예시. 2년차에 무안 양파 저온저장고의 파일럿 실험에서와 같이, 500g 티몰/1L 에탄올을 용해할 수 있는 코드형 혼증기를 개발하여 29평 저온저장고에 4개의 혼증장치를 처리할 수 있도록 (20ppm 농도로 처리할 때는 500g 티몰/1L 에탄올 혼증기 8개가 필요함)하고, 또한 추가적으로 현재 참여기업인 에코플랜

즈에서 판매되고 있는 산소흡수제는 티몰페드와 같은 원리로 제작하여 포장 용기 또는 운송 중에 사용할 수 있는 처리기술로 개발하고자 하였으나 기화 속도가 너무 늦어서 현실 적용이 어려웠다.

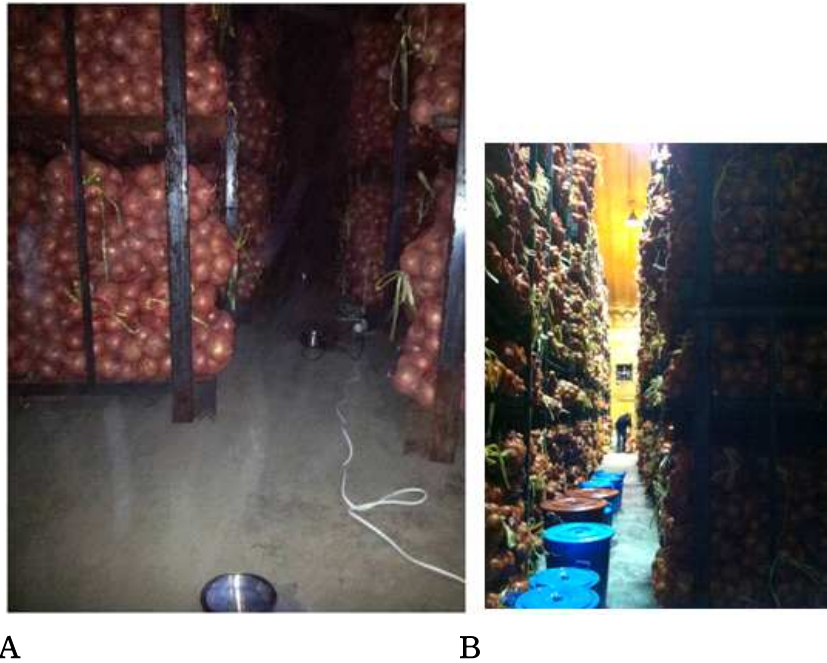


Fig. 16. 약 160톤의 양파가 저장되어 있는 29평 (547톤) 저온저장고에 에탄올에 용해시킨 20ppm thymol을 훈증 처리하는 모습. 전라남도 무안의 몽탄 농협 양파 저온저장고 29평에 20ppm에 농도에 해당하는 티몰을 100% 에탄올에 충분히 녹인 후 10개에 해당하는 훈증장치에 분주(1개의 훈증 장치 당 약 300ml의 티몰용매를 분주하였음)하여 6시간 동안 가열하여 훈증시켜 저장병 방제의 효과를 조사하였다.

참고 훈증을 위한 체적 계산

- * 팔레트 1개의 부피
: 가로 1.3m X 세로1.3 m X 높이 1.8m = 3m³
29평 창고에는 팔레트가 132개 들어감
- 3m²x132 = 402m²
- * 창고의 아치형 천장 반원기둥의 부피
: (πr² x h)/2 = (3.14 x 3.5² x 12)/2 = 231m³
- * 29평 저장고 총 부피
: 316m³+231m³=547m³
- * 29평 저장고 공간의 내부 부피 547m³-402m³=145m³
- * 29평 저장고의 20ppm 티몰 처리 양
: 145m³ x 20g = 2.90kg
- * 547톤 저장고 훈증시 일반 실험용 시약 기준시 5만원 x 6병 = 300,000원 소요

티몰처리농도 기준 설정

티몰의 항균성 억제 농도의 연구는 부피를 기준으로 하여 이루어져 10-30ppm에서 항균성 효과가 우수한 것으로 보고가 되었다. 훈증하는 방법으로 에탄올에 용해하여 실온에서 창고의 공간에 대한 부피를 기준으로 하여 10ppm으로 티몰을 3일간 훈증 처리하고 팬을 이용한 환기 후 저온 저장에 들어가는 것이 가장 추천된다. 저온에 훈증하며 티몰의 냄새가 배출되는데 시간이 걸리는 단점이 있다 (약 1달간).

항균성 물질 분자의 화학적 항균 기작은 미생물체 균체 표피나 내부의 세포의 분자들에 대한 필요한 티몰 분자의 반응 개수가 중요한 변수일 것이다. 티몰을 기화시키면 분자간의 거리가 액체 상태에 있을 때 보다 분자간의 거리가 멀어져서, 티몰이 한 공간에서 차지하는 부피를 가지고 농도를 결정하는 것은 통상적으로 효과를 보는 농도와(일반적으로 용해하여 액체 상태로 처리할 경우 10~30ppm)와 많은 차이가 생길 수 있으며 기존의 발표된 연구 결과와는 다른 결과를 나타낼 수 있기 때문에 공간의 부피에 대한 티몰의 실제 중량을 처리 농도로 계산하는 것이 기존에 발표된 연구 결과와 유사한 항균 효과를 나타낼 수 있을 것이다. 따라서 창고 훈증시 창고의 공간을 부피로 하여 티몰의 농도를 결정하였다.

- 경제성 분석 (1개 저장실 547톤 기준):** 20kg 양과 약8000망이 저장됨, 훈증시 3개월 이상 저장 가능, 약 8000망 가운데 약96% 피해가 감소한다고 가정하면 8000 x 96% (Table 5) = 7,680망 이익이나 부패에 의한 손실을 줄이기 위해 미리 출하함
- 이론적으로는 20kg 1망의 가격 10,000원 x 7680망 = 76,800,000원 - 300,000원(76,500,000원) 으로 이익을 계산할 수 있으나
 - 그러나 현실적으로 그 이전에 다 더 낮은 가격으로 출하함으로 20kg당 2,000원 할인가격으로 한다고 가정하면: 8000x2000=16,000,000원 손해 (1540-66) X 10,000 = 14,740,000원 부패로 발생된 손실
 - 비용: 티몰 3kg은 약 300,000원
 - 종합하면 저장병 방제로 한 개 저장실당 약 30,000,000원 이익을 보는 것이 가능함

Table 19. 티몰 훈증의 현장 적용시의 저장병 방제 효과

	<i>B. aclada</i> (갯빛곰팡이)	<i>F. profileratum</i>	<i>Penicillium</i> sp. and others (푸른곰팡이 등)	총 감염양과 (창고의 1/22면) ^a	예상 총 감염 양과수 (전 창고) ^b
무처리	24	11	35	70	1540
20ppm 티몰 훈증	1	2	0	3 (발병율 96.7% 감소)	66

^a관찰할 수 있는 창고의 1/4면적을 관찰함

^b총 면적을 가정하여 계산한 양과 감염수, 6월초 티몰 훈증후 6개월 후인 12월에 관찰, 3월중순까지의 손실율이 18%로 무처리구에 비하여 3개월 저장기간 연장됨. 무처리 창고는 양과 저장병 발생의 손실이 더욱 심하여지기 전인 12월 초에 20%의 양과 손실



A



B



C



D

Fig. 17. 훈증처리 6개월 후. A, B 및 C; 무처리 창고의 저장병 발생 실태. D. 티물20ppm 훈증처리 창고 양파 (저장병 거의 발생하지 않음)



Fig. 18. 훈증 처리 6개월 후 저장병 발생 조사 및 샘플링



Fig. 19. 티몰 처리후 9개월 후 창고 양파의 출하 사진 : 손실율 18% 기록됨. 무처리 창고는 저장 6개월 후에 손실율 20%를 기록하며 출하되었음

훈증의 또 다른 방법 개발을 위하여 몽탄농협 저온저장고 29평에 20ppm의 농도로 유황훈증장치에 티몰 용액을 가열 훈증하는 대신에 좀 더 편리한 펠라이트 봉지에 티몰을 혼합하여 티몰진공패키지를 제작후 처리 직전에 플라스틱 봉지를 제거하고 훈증펠라이트 부직포 주머니를 파레트에 매달아서, 양파의 겉 표면적을 기준으로 하여 30ppm 처리하여도 (이는 저장창고의 용적 기준으로 하면 1ppm의 티몰이 기화 훈증되는 것임) 저장병 방제 효과를 나타내는 지 조사하기 위하여 현장 적용하였으나, 처리 후 저장 3개월간 관찰한 결과 방제 효과를 보여 주지 못하였다. 따라서 저장고의 훈증은 유황훈증기와 같은 가열 훈증기를 사용하여 저장고의 내부 공간을 기준으로 하여 20ppm 이상으로 처리하여야 우수한 방제 효과를 얻을 수 있을 확 인하였다 (Fig. 20). 또는 티몰진공패키지의 개봉시 티몰 훈증의 농도를 내부 빈 공간을 기준으로 하여 10-20ppm 이상으로 처리하여야 저장병의 방제 효과를 볼 수 있을 것으로 생각되었다.

현재 양파의 장기 저장 중 저장병원균에 의한 부패로 많은 손실이 발생하고 있으나 이를 줄이기 위한 처리 방법으로 유황가루를 기화시켜 아황산가스 훈증하는 방법이 있으나 저장병 발생으로 인한 부패를 줄이는데 필요한 적절한 농도 등이 설정이 된 것이 없어서 널리 적용되고 있지 않는 현실이다. 티몰은 아황산가스보다 안전한 물질 (꿀풀과 thyme 식물의 휘발성 정유)로서 항균 효과가 우수하여 양파의 저장 중의 품질을 연장시키는데 매우 유용할 것이다.

국내 장기 저장 농산물 중 사과 단감 배 등에 대하여 티몰 훈증 처리를 할 경우 유통 과정 중에 나타날 수 있는 경도나 당도, 생리활성 물질에 대한 작물별의 연구는 거의 없어 유통 중에 나타날 수 있는 변화에 대하여는 선행 연구가 없어서 연구가 이루어진 후에도 이에 대한 정확한 검토가 이루어질 수 있을 것으로 사료된다.



Fig. 20. 티몰 자연 기화 훈증 처리. 2014년도 6월에 양파의 표면에 티몰이 흡착하는 양을 기준으로 30ppm의 티몰, 총 150g의 티몰을 150mL의 에탄올에 녹인 후 펠라이트에 혼합하고, 10개 주머니에 나누어서 파레트에 매달아 처리함. 창고의 용적 기준으로 하면 1ppm이 처리됨

제4절 저장병 방제를 위한 티몰 훈증 처리가 양파의 품질에 미치는 영향

1. 서론

천연 훈증제인 티몰 처리가 양파의 저장성에 미치는 영향에 대한 연구는 보고된 것이 아무 것도 없으나 티몰 처리에 의하여 혹시나 있을지 모르는 품질에 어떤 영향이 있는지를 조사하기 위하여 양파의 플라보노이드 등 양파의 주요 기능성 성분을 대상으로 품질에 변화가 있는지를 조사하였다.

2. 재료 및 방법

가. 전처리

무안 양파 15개씩 각각 30ppm thymol 처리구와 무처리구를 4°C에서 8주 동안 저장하면서 thymol 처리구와 무처리구의 양파를 비교하여 병 방제 효과를 검정 하였다. 30ppm의 thymol은 100% ethanol에 녹여 양파 외피에 골고루 분무처리 하였고 무처리구와 분리하여 각 처리구의 양파를 15개씩 락앤락 통에 넣어 4°C에서 8주 동안 저장하였다. 8주 후의 각 처리구별로 양파를 샘플링 하여 -70°C에 보관하였다.

나. 총 플라보노이드 추출법

양파의 총 플라보노이드 분석법은 Bonaccorsi et. al.의 방법에 의하여 추출하였다. 다진 양파 시료를 약 10g을 100mL의 메탄올과 함께 4°C에서 하룻밤 담가 둔다. 메탄올 추출물을 분리한 후 잔여물에 100mL 메탄올을 넣고 믹서기로 3분간 분쇄하였다. 그리고 마그네틱 바를 이용하여 1시간 동안 교반하였다. 그 현탁액을 10,000rpm으로 40분간 4°C에서 원심분리를 하였다. 상층액을 잔여물과 섞어주고, 메탄올을 넣고 다시 원심분리 하였다. 메탄올 추출액은 회전식증발기를 이용하여 45°C에서 증발시켜 8mL에 가깝게 만든 후 10mL로 맞춰준다. 추출액을 바로 사용하지 않을 경우 -20°C에 보관하였다.

추출물 HPLC 분석은 Agilent 1100 chromatograph(Agilent, Palo Alto, CA, USA)에서 용액 전달장치와 자동 샘플기 DAD검출기를 360nm로 이용하여 수행하였다. Flavonoids Lichrospher 100 RP-18 (250mm×4.6mm) column을 이용하고 입자크기는 5µm (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) 제품 phenomenex (USA) C18-type 보호 column이다. column은 25°C를 유지했다. 이동상으로는 물을 기본으로 0.1% TFA(solvent A)를 이용하고 메탄올 (solvent B)을 이용한다. 다음과 같은 변화로 용출 프로그램을 이용한다. B-20%, 0~10분; B-20~80%, 10~15분; B-80~20%, 15~22분. 유속은 0.8mL min⁻¹, 주입 부피 10µL. Quercetin flavonols을 각각 검량선을 수량화하여 비교한다. Chromatographic 분석을 각각 복제 sample을 두 번 반복하고 평균값 영역을 이용하여 계산하였다.

다. 총 플라보노이드 함량

비색방법(Chang et al. 2002)을 이용하여 총 Flavonoids를 밝혀낸다. 0.5mL 메탄올 추출물을 1.5mL 메탄올과 혼합하고, 0.1mL 10% 염화알루미늄, 0.1mL 0.1M 초산칼륨 그리고 2.8mL 증류수를 섞는다. 혼합물이 반응하기 위해 30분간 상온에서 유지한 다음 흡광도 415nm에서 Shimadzu UV-1700 spectrophotometer를 이용해 측정하였다. 검량선을 메탄올로 추출한 준비된 quercetin 용액을 농도 12.5 100 μ g/ml로 만들었다. μ g Q/g FW. 조건에서 결과를 표현하였다.

라. 총 페놀 함량

총 phenolics 분석은 spectrophotometer와 Folin Ciocalteu 비색법(Dalamu et al. 2010)을 약간 수정하여 사용하였다. 표준곡선은 범위 20-700.0 μ g 갈릭산/mL 이내에서 준비되었다. 양과 추출물(100 μ L)과 2.9mL 증류수를 test tube에 넣고 그 다음 0.5mL 희석한 Folin Ciocaltea 시약을 더해준다. 샘플을 적절히 섞고 15분동안 방치한다. 2mL 20% 염화나트륨 수용액을 더해준다. 반응혼합물을 90분간 상온에서 보관하고 790nm에서 흡광도를 Shimadzu UV-1700 spectrophotometer를 이용하여 측정한다. 모든 결과는 μ g GAE/g FW로 표현한다.

마. 총 페놀 함량

총 phenolics 분석은 spectrophotometer와 Folin Ciocalteu 비색법(Dalamu et al. 2010)을 약간 수정하여 사용하였다. 표준곡선은 범위 20-700.0 μ g 갈릭산/mL 이내에서 준비되었다. 양과 추출물(100 μ L)과 2.9mL 증류수를 test tube에 넣고 그 다음 0.5mL 희석한 Folin Ciocaltea 시약을 더해준다. 샘플을 적절히 섞고 15분동안 방치한다. 2mL 20% 염화나트륨 수용액을 더해준다. 반응혼합물을 90분간 상온에서 보관하고 790nm에서 흡광도를 Shimadzu UV-1700 spectrophotometer를 이용하여 측정한다. 모든 결과는 μ g GAE/g FW로 표현하였다.

바. 총 항산화 활성

양과의 항산화 활성은 Brand-Williams, Cuvelier, Berset (1995)의 DPPH 분석 방법을 수정하여 실시하였다. Trolox를 실험 표준으로 사용하였고 결과 표현 용어는 Trolox μ mol 와 동등한 g 생중량(μ mol TE/g FW)으로 한다. DPPH 용액을 100mL의 메탄올로 24mg의 DPPH을 용해하여 준비하고 사용할 때까지 -20 $^{\circ}$ C에서 저장 한다. 작업 용액을 515 nm에서 1.1 \pm 0.02 단위의 범위에서 흡광도를 얻기 위해 메탄올로 DPPH 용액을 희석하여 조제 하였다. 상기 희석 된 DPPH 용액 950 μ L를 50 μ L 공백, 표준 또는 샘플 추출물과 혼합하여 메탄올 (1:1, v / v)로 희석하고 20분 동안 반응시켰다. 흡광도는 Shimadzu UV-1700 분광 광도계를 사용하여 515 nm에서 측정 하였다. 표준 곡선은 25 및 800 μ M

Torlox 사이에서 직선적이었다. 모든 결과는 $\mu\text{mol TE/g FW}$ 로 표현하였다.

3. 결과 및 고찰

양파 저장병 방제를 위해 30 ppm 티몰을 24 시간 훈증 처리 후 quercetin 함량을 분석한 결과 무처리 양파는 $369.5\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW, 티몰 처리구는 $353.3\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ FW으로 유의적 차이를 보이지 않았다 (Fig. 1). 양파의 수확후 훈증처리는 Quercetin 함량 변화에 영향을 미치지 못할 것으로 사료된다.

양파의 항산화 활성, 총 페놀 및 총 플라보노이드 함량은 티몰 처리 양파가 무처리 양파에 비해 다소 높은 항산화 활성과 함량을 나타내었다 (Fig. 2~5). 이는 티몰이 페놀 구조를 띄고 있는 성분으로 항산화활성을 가지고 있기 때문에 티몰 처리 양파의 항산화 및 페놀 함량이 증가된 것으로 사료된다. 또한 총 페놀함량은 화학처리를 통해 증가될 수 있다고 보고된 바 있다.

기타 경도 및 색도 등 기타 외관상 품질에 어떠한 영향을 미치는 않은 것으로 관찰되었다.

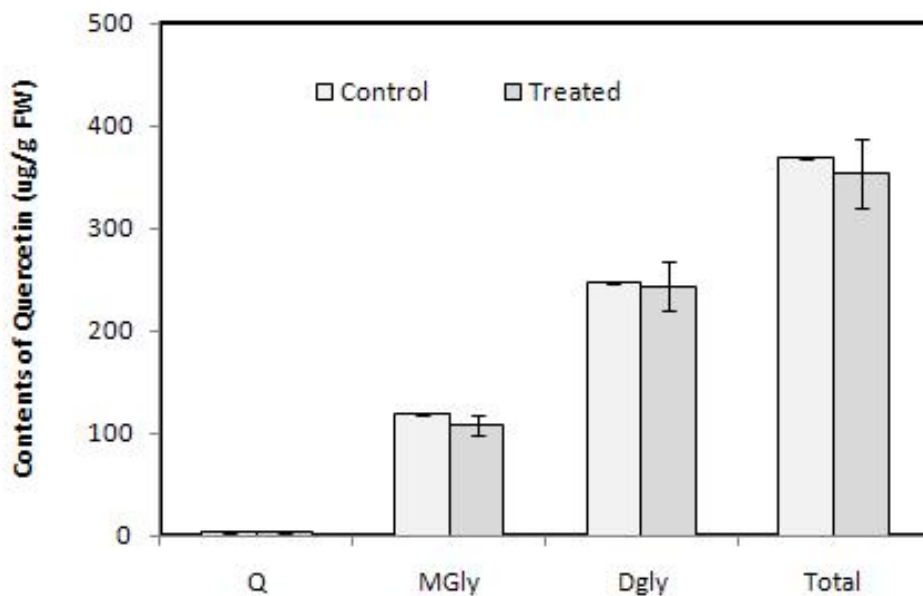


Fig. 1. Effect of thymol treatment on quercetin contents. Q, Quercetin; MGly, 4'-glucoside; Dgly, 3,4'-glucoside. Error bar indicates standard error of the mean.

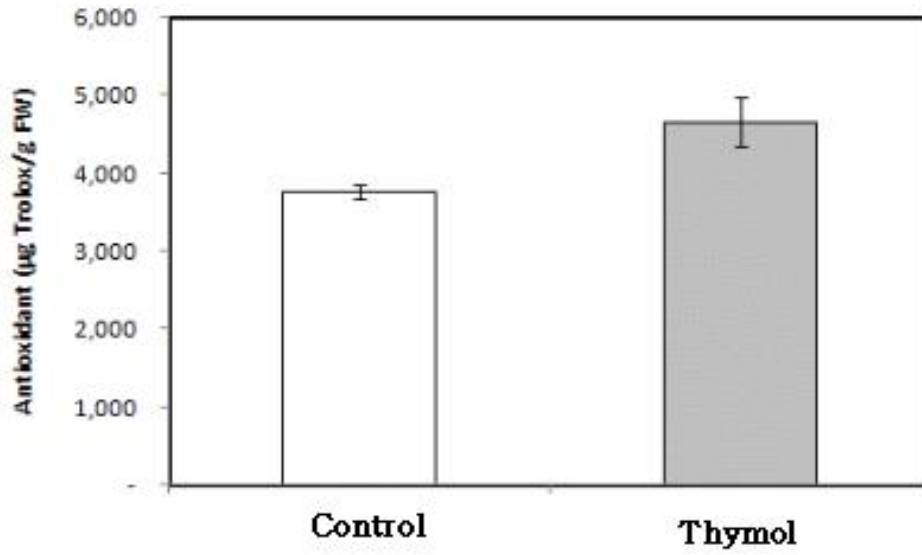


Fig. 2. Effect of thymol treatment on antioxidant activity. Error bar indicates standard error of the mean.

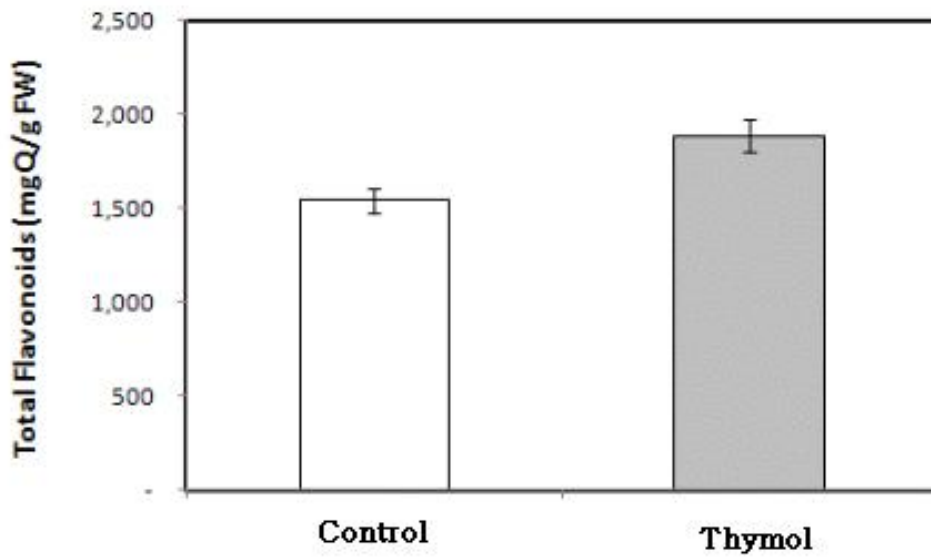


Fig. 3. Effect of thymol treatment on total flavonoids. Error bar indicates standard error of the mean.

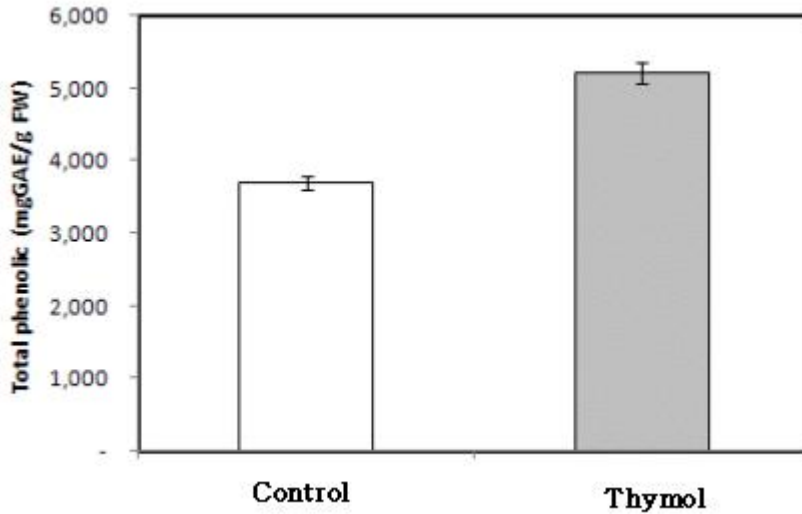


Fig. 4. Effect of thymol treatment on total flavonoids. Error bar indicates standard error of the mean.

티몰 훈증처리 후 양파의 당 조성을 비교하기 가용성 당 함량을 분석한 결과 Fructose와 Glucose 비율이 높고 Sucrose 함량이 가장 낮았다. 훈증처리에 따른 가용성 당함량 무처리 양파는 Fructose $19.6\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ FW, Glucose $17.3\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ FW, Sucrose $9.2\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ FW을 나타내었다. Thymol 처리 양파는 Fructose $16.9\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ FW, Glucose $16.3\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ FW, Sucrose $11.2\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ FW으로 무처리 양파와 유의적 차이를 보이지 않았다 (Fig. 20). 이와 같은 결과는 신(2007)의 티몰처리 후 포도의 당분석 결과와 비슷한 경향을 나타내었다. 결론적으로 티몰 훈증처리의 경우 양파의 저장성 관련 성분과 기능성 성분의 변화에는 긍정적 영향을 미칠 것으로 생각된다.

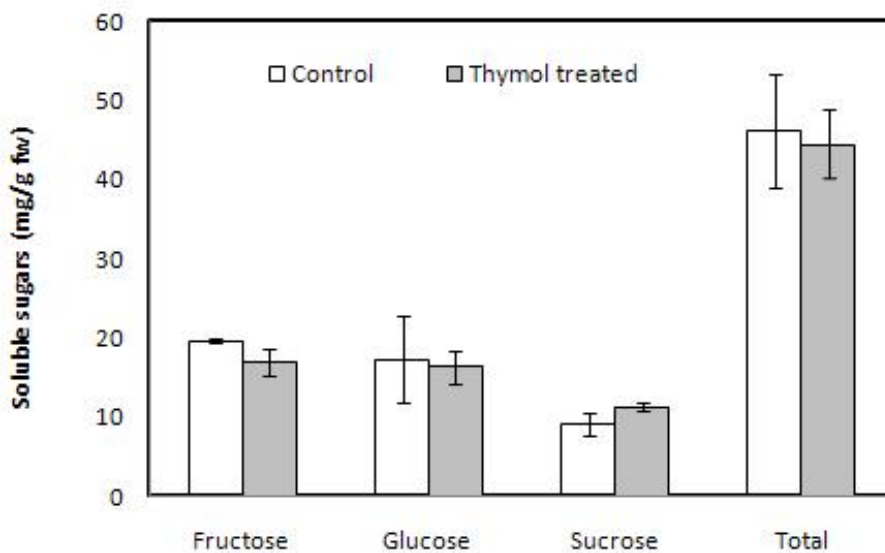


Fig. 5. Effect of thymol treatment on total soluble sugars. Error bar indicates standard error of the mean.

제 5절 저장병 방제를 위한 티몰 훈증 용매 기초 연구

양파 저장고와 가락 시장에서 유통중인 양파의 병반으로부터 각각 곰팡이 73, 63균주를 분리하였으며, 이 중 68, 55균주가 *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*과 *Rhizopus*의 속에 속하였다. 특히 가락 시장에서는 *Botrytis*에 속하는 균주는 없었으며, 반면 저장고에서는 *Aspergillus*가 분리되지 않았다. 가락 시장에서는 *Fusarium* (31.7%)이 가장 높은 빈도로 분리되었으며, 그 다음으로 *Aspergillus* (28.6%), *Penicillium* (17.5%) 과 *Rhizopus* (9.5%)이었다. 저장고에서는 *Botrytis*, (41.1%), *Fusarium* (27.4%), *Penicillium* (19.2%), *Rhizopus* (5.5%)의 빈도로 분리되었다 (Table 1).

Table 1

Fungal genera isolated from onion bulbs from two origins including a Garak commercial market, Seoul, and storage houses of the National Agricultural Cooperative Federation, Muan, Jeonnam province, Korea in 2012

Sample origin	Fungal genera	Isolate (No.)	Frequency of occurrence (%)
Commercial market	<i>Aspergillus</i>	18	28.6
	<i>Botrytis</i>	— ^a	—
	<i>Fusarium</i>	20	31.7
	<i>Penicillium</i>	11	17.5
	<i>Rhizopus</i>	6	9.5
	Others	8	12.7
	Total	63	100
Storage house	<i>Aspergillus</i>	—	—
	<i>Botrytis</i>	30	41.1
	<i>Fusarium</i>	20	27.4
	<i>Penicillium</i>	14	19.2
	<i>Rhizopus</i>	4	5.5
	Others	5	6.8
	Total	73	100

^a -, not detected.

분리된 5 속의 곰팡이들 중에서 대표적인 균주를 선발하여 동정하기 위하여 현미경 관찰을 통해 균사와 포자의 형태를 확인하였으며(Fig 1), ITS region의 염기서열 분석을 통하여 5 균주의 병원균을 동정하였다. 각 곰팡이의 ITS 염기서열은 neighbor-joining과 bootstrap analysis를 토대로 clustering을 하였으며, Kimura two-parameter model에 의해 phylogenetic tree를 완성하였다. ITS region의 염기서열은 NCBI에 업로드하였으며, *A. niger* F23 (accession number = KF263921), *B. aclada* F23 (KF263922), *F. proliferatum* F17 (KF263923), *P.*

brasilianum F1 (KF263924), *R. oryzae* (KF263925)이다 (Fig. 2).

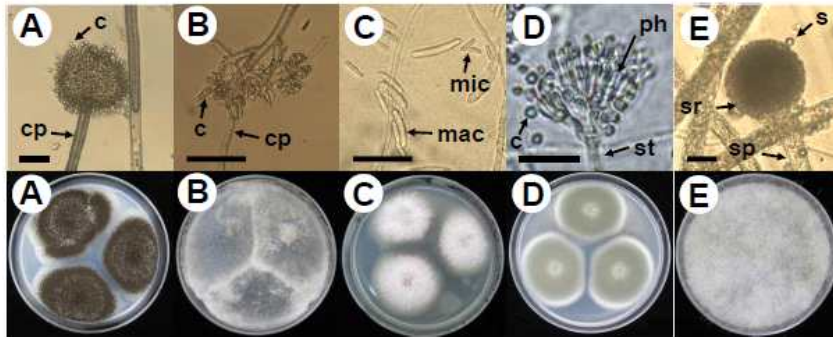
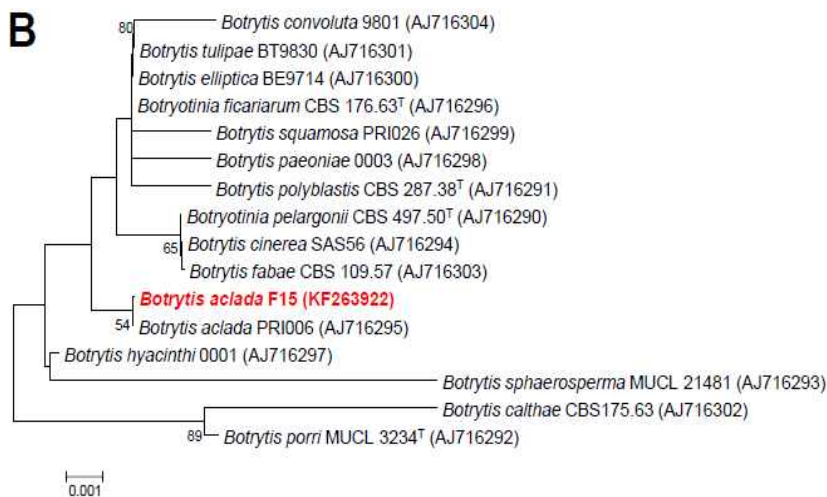
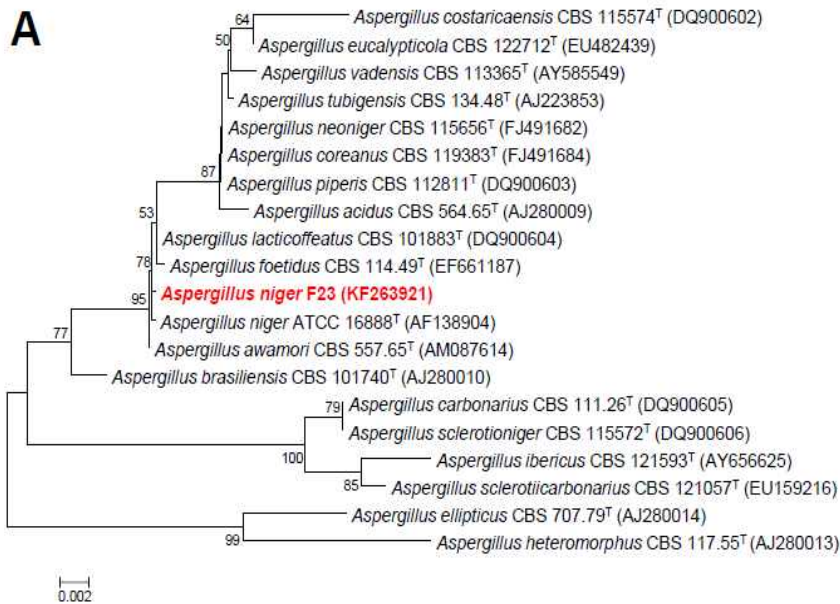


Fig 1. Morphologies of (A) the *Aspergillus* sp. F23, (B) *Botrytis* sp. F15, (C) *Fusarium* sp. F17, (D) *Penicillium* sp. F1, and (E) *Rhizopus* sp. F21 on potato dextrose agar grown at 28°C for 7 d; however, *Botrytis* sp. F15 was grown at 20°C. Abbreviations: c = conidia, cp = conidiophore, mac = macroconidium, mic = microconidium, ph = phialide, s = spore, sp = sporangiophore, sr = sporangium, and st = stipe. The scale bar = 50 μm.



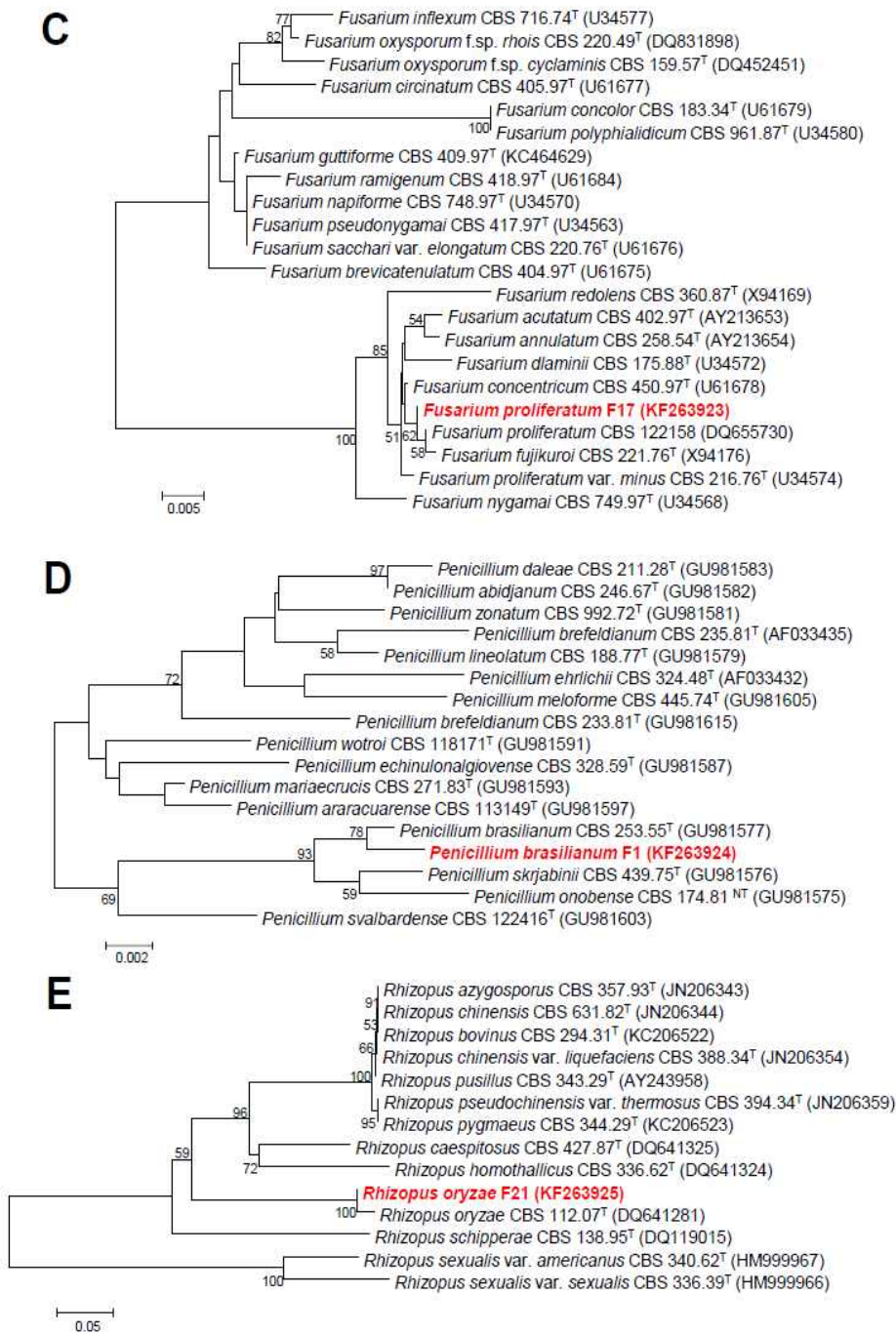


Fig 2. Phylogenetic trees constructed by the neighbor-joining method that show the relationships between isolates (A) F23, (B) F15, (C) F17, (D) F1, and (E) F21 and other members of the genus (A) *Aspergillus*, (B) *Botrytis*, (C) *Fusarium*, (D) *Penicillium*, and (E) *Rhizopus*, respectively, based on phylogenetic analysis of nuclear ribosomal ITS1–5.8S–ITS2 region sequences. Bootstrap values of 1000 analyses are shown at the branching points. The scale bar represents numbers of nucleotide substitution per 100 (E) or 1000 (A–D) nucleotides of the sequence. The type or neo-type strain of the species is indicated as “T” or “NT”; accession numbers at GenBank are shown in parentheses.

이 5균주 중에서 *P. brasilianum*은 양파 병원균으로 보고되지 않았으며, 양파 병원균으로 첫 보고일 것으로 생각된다 (Fig. 2).

분리한 5균주의 병원성을 평가하기 위하여 양파의 outer와 inner surface에 병원균을 접종하였다. 접종 대조구로 PDA plug를 사용하였으며, 무접종 대조구로는 scratch한 것만 사용하였으며, 이들 대조구에서는 병징이 관찰되지 않았다. *A. niger* F23과 *B. aclada* F15는 양파의 outer와 inner surface에서 병이 많이 발생하였으나, *F. proliferatum* F17과 *P. brasilianum* F1은 outer surface보다 inner surface에서 더 병이 잘 발생하였다. *R. oryzae* F21의 경우에는 outer와 inner surface에서 모두 매우 빠르게 병이 잘 발생하였다 (Fig. 3, Table 2).

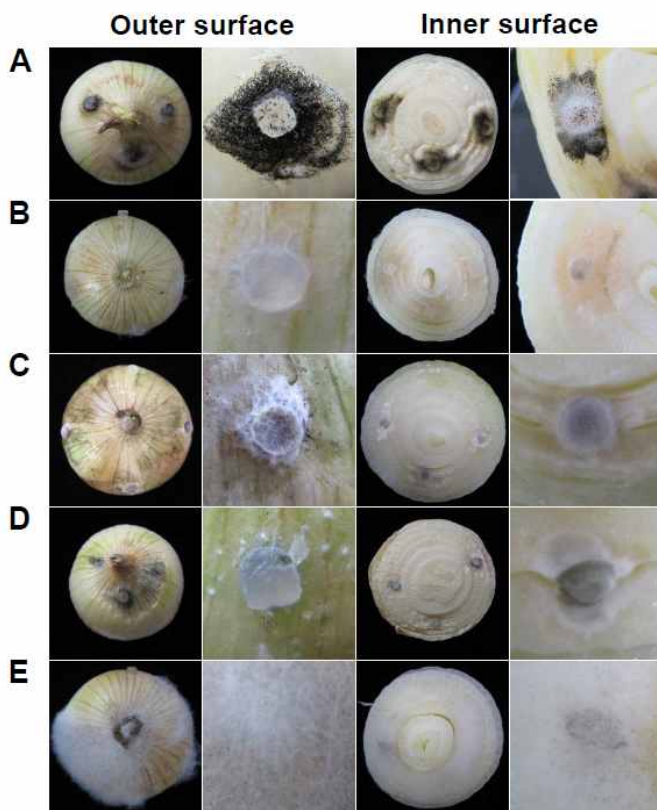


Fig 3. Symptoms of diseases on the outer and inner surfaces of the onion bulbs that were inoculated with (A) *Aspergillus niger* F23, (B) *Botrytis aclada* F15, (C) *Fusarium proliferatum* F17, (D) *Penicillium brasilianum* F1, and (E) *Rhizopus oryzae* F21. The outer surface of the onion bulbs, which were slightly scratched using sandpaper, or the inner surfaces of half-cut bulbs, that were inoculated with fungal mycelia grown on potato dextrose agar (PDA) for 5 d, were incubated at 28°C for 5 d except for the bulbs that were inoculated on the inner surfaces with *B. aclada* (20°C; 2 d). PDA plugs (inoculated control) or scratches alone (non-inoculated control) did not show any disease symptoms.

Table 2

Lesion diameters of five fungal isolates, *Aspergillus niger* F23, *Botrytis aclada* F15, *Fusarium proliferatum* F17, *Penicillium brasilianum* F1, and *Rhizopus oryzae* F21 on outer and inner surfaces of onion bulbs^a

Fungal isolate	Lesion diameter (mm)	
	Outer surface	Inner surface
<i>Aspergillus niger</i> F23	9.73 ± 1.21 a ^b	9.33 ± 1.23 a
<i>Botrytis aclada</i> F15	4.40 ± 1.06 a	6.09 ± 1.92 a
<i>Fusarium proliferatum</i> F17	3.76 ± 0.74 b	5.14 ± 1.06 a
<i>Penicillium brasilianum</i> F1	3.20 ± 0.91 b	6.14 ± 1.13 a
<i>Rhizopus oryzae</i> F21	8.52 ± 1.53 b	13.67 ± 0.46 a

^a Fungal mycelia were inoculated on the outer surfaces of onion bulbs by slightly scratching them with sandpaper and on the inner surfaces of half-cut bulbs in containers on mesh screens with two layers of wet paper towels. The inoculated onion bulbs were incubated at 28°C for 5 d, except for *B. aclada* (20°C). Potato dextrose agar (inoculated control) or scratched alone (non-inoculated control) did not exhibit any symptoms of disease on the onion bulbs.

^b Means ± standard errors followed by different letters are significantly different between the outer and inner surfaces of the onion bulbs according to the least significant different at *P* < 0.05. The values are the means of eight replicates.

선발한 병원균 *B. aclada*와 *A. niger*의 생장에 티몰이 주는 영향을 평가하기 위하여 positive control로 glacial acetic acid를 비교하여 평가하였다. glacial acetic acid는 0, 1, 10, 100, 200, 500, 1000µl/L의 농도로 배지에 첨가하였으며, 티몰은 0, 1, 10, 50, 100, 200µg/ml의 농도로 배지에 혼합한 후 병원균의 포자 현탁액을 접종한 7일 후 균사 길이를 측정하여 EC50 value를 평가하였다. 또한, 휘발성 효과를 평가하기 위하여, 티몰과 glacial acetic acid를 0, 10, 100, 200, 500, 1000 µg/ml or µl/L의 농도로 I-plate에 처리하여 균사 생장을 평가하였다 (Table 3).

Table 3 EC₅₀ values of two fungal isolates, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger*, to Thymol or positive control (glacial acetic acid) based on relative mycelial growth on potato dextrose agar

Application ^a	Treatment/ Concentration	Experiment 1						Experiment 2					
		<i>Botrytis aclada</i>			<i>Aspergillus niger</i>			<i>Botrytis aclada</i>			<i>Aspergillus niger</i>		
		EC ₅₀ ^b	95% Fiducial limit		EC ₅₀	95% Fiducial limit		EC ₅₀	95% Fiducial limit		EC ₅₀	95% Fiducial limit	
		Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper		Lower	Upper	
Amended	Glacial acetic acid	2.7709	2.6772	2.8780	-	-	2.9737	2.6623	4.7862	-	-	-	
	Thymol	1.1928	1.0437	1.3251	1.6325	1.0719	2.0421	1.1490	1.0476	1.2400	1.7137	0.3107	2.4978
Gaseous	Glacial acetic acid	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Thymol	2.6843	2.2979	3.5365	3.5201	3.1201	4.3993	2.3866	2.3330	2.4378	3.2595	3.0968	3.7162

^a Thymol was dissolved in absolute ethanol, and then thymol solution was added to potato dextrose agar (PDA); 5 ml of distilled water with the Thymol solution were treated on a part of I-plates. Conidial suspension (2µl of 10⁶⁻⁷ spores/ml 0.03% tween20) were dropped on potato dextrose agar amended (PDA) with various concentration of thymol for 'amended application', or it was dropped on PDA in the other side of I-plates for 'gaseous application'.

^b EC₅₀ values (log Thymol µg/ml, or log glacial acetic acid ml/L) and fiducial limits were determined by probit analysis. Relative mycelia growth of two fungal isolates were measured 7 days after inoculation at 20°C. Two experiments were conducted with three replications each.

그 결과, 처리의 직접적인 효과로 배지에 thymol과 glacial acetic acid을 혼합했을 경우에 *B. aclada*에 대한 EC50은 glacial acetic acid를 처리했을 때 두 번의 실험에서 2.7709, 2.9737이었으며, *A. niger*는 균사 억제효과가 미미하여 EC50이 계산되지 않았다. Thymol의 경우 *B. aclada*에 대한 EC50은 1.1928, 1.1490이었으며, *A. niger*에 대해서는 1.6325, 1.7137로 acetic acid에 비하여 저농도에서 두 병원균의 균사 생장을 감소시켰다. 휘발성에 의한 EC50은 glacial acetic acid의 경우에는 처리 농도에 따른 균사 성장 변화가 뚜렷하지 않아 EC50이 관찰되지 않았으며, Thymol의 경우에는 *B. aclada*의 경우에 2.6843, 2.3866이었고, *A. niger*에 대해서는 3.5201, 3.2595의 EC50 값을 나타냈다. Thymol을 배지에 직접 혼합하였을 때에 비하여 휘발될 때의 효과는 적은 것으로 생각된다 (Table 3).

티몰의 균사 생장에 대한 억제 효과에 외에 이들 병원균의 포자 형성량과 포자의 발아에 미치는 영향도 평가하였다. 이를 위해서 EC50 value 평가 때와 동일한 농도와 처리 방법으로 실험하였으며, 포자를 수확한 후 현미경 관찰을 통해 포자량과 발아율을 평가하였다. 그 결과, 배지에 혼합할 경우에 glacial acetic acid는 *B. aclada*에 대해서 두 번의 실험에서 500 μ l/L이상의 농도에서 포자 형성량이 감소하였으며, *A. niger*에 대해서 1000 μ l/L에서 포자형성 억제 효과는 관찰되었다(Table 4). 반면, 티몰은 *B. aclada*는 두 번의 실험에서 공통적으로 10 μ g/ml이상의 농도에서, *A. niger*는 한번의 실험에서만 50 μ g/ml 농도에서 포자 형성량이 감소하였다. *B. aclada*에서 Glacial acetic acid 1000 μ l/L과 두 병원균에서 thymol 100, 200 μ g/ml에서는 병원균의 균사가 성장하지 않아서 평가할 수가 없었다. 반면, 휘발성 형태로 처리할 경우에 glacial acetic acid는 *B. aclada*에 대해서 한번의 실험에서만 1000 μ l/L농도에서 포자 형성을 감소시켰으며, thymol의 경우는 200 μ g/ml 이상의 농도에서 두 실험에서 모두 포자 형성을 감소시켰다. 그러나 glacial acetic acid와 thymol은 모두 휘발성으로 처리할 경우에 *A. niger*의 포자 형성량은 감소시키지 못하였다 (Table 4).

Table 4 Effects of amended or gaseous applications of various concentration of Thymol^a or positive control (glacial acetic acid) on sporulation of two fungal isolates, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger*

Application	Treatment/Concentration	Sporulation [$\log(\text{spores}/\text{cm}^2 + 1)$] ^a			
		<i>Botrytis aclada</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
Amended	Glacial acetic acid				
	0	5.09±0.03 b ^b	4.49±0.18 ab	5.94±0.04 a	5.91±0.02 b
	1	5.43±0.04 a	4.30±0.37 bc	5.86±0.02 a	5.98±0.08 ab
	10	5.20±0.02 b	4.69±0.02 a	5.93±0.02 a	6.05±0.09 a
	100	5.25±0.03 ab	4.25±0.18 bc	5.87±0.07 a	6.04±0.02 a
	200	4.31±0.17 c	4.33±0.14 bc	5.95±0.07 a	5.92±0.06 b
	500	4.36±0.24 c	4.10±0.12 c	5.92±0.07 a	5.87±0.06 b
	1000	-	-	5.46±0.11 b	5.52±0.03 c
	Thymol				
	0	5.26±0.07 a	4.47±0.13 a	6.12±0.01 a	5.87±0.03 a
	1	5.06±0.16 a	4.38±0.26 ab	6.03±0.03 a	5.92±0.05 a
	10	4.57±0.15 b	3.43±0.85 bc	5.91±0.01 a	5.93±0.04 a
	50	4.25±0.21 c	2.87±0.05 c	4.90±0.38 b	5.91±0.01 a
	100	-	-	-	-
	200	-	-	-	-
	Gaseous	Glacial acetic acid			
0		5.57±0.06 b	4.64±0.15 ab	6.08±0.03 a	6.15±0.01 c
10		5.83±0.02 a	4.80±0.05 a	6.05±0.04 a	6.20±0.02 ab
100		5.53±0.10 b	4.73±0.11 ab	6.06±0.16 a	6.22±0.02 a
200		5.35±0.01 c	4.67±0.05 ab	6.01±0.03 a	6.19±0.03 b
500		5.58±0.06 b	4.59±0.13 b	5.98±0.03 a	6.17±0.03 bc
1000		5.24±0.12 c	4.62±0.06 ab	6.04±0.05 a	6.18±0.02 bc
Thymol					
0		5.49±0.08 a	4.71±0.05 a	6.04±0.02 a	6.19±0.02 a
10		5.21±0.09 a	4.74±0.09 a	5.97±0.11 a	6.22±0.02 a
100		4.54±0.23 bc	4.68±0.05 a	5.95±0.16 a	6.23±0.02 a
200		4.67±0.24 bc	3.97±0.55 b	5.97±0.05 a	6.21±0.02 a
500		4.74±0.06 b	3.40±0.47 bc	6.09±0.10 a	6.18±0.05 a
1000		4.41±0.01 c	3.11±0.01 c	6.01±0.07 a	6.20±0.03 a

^a Sporulation [$\log(\text{spores}/\text{cm}^2 + 1)$] was measured at 7 days after inoculation of conidial suspension (2 μ l of 10⁶⁻⁷ spores/ml 0.03% tween20) on PDA amended with thymol solution for 'amended application': PDA in a part of I-plates while thymol solution on the other side of I-plates for 'gaseous application' at 20 °C.

^b Value represent means \pm standard deviation of three replications each experiment. The same letters are not significantly different ($P < 0.05$) according to the least significant difference (LSD) test after log transformation.

포자 발아율의 경우는, 배지에 혼합할 경우에 glacial acetic acid는 *B. aclada*에 대해서 두 번의 실험에서 500 μ l/L이상의 농도에서 포자 발아율을 감소시켰으며, *A. niger*에 대해서 200 μ l/L에서 발아율을 억제시켰다. 반면, 티몰은 *B. aclada*는 두 번의 실험에서 공통적으로 10 μ g/ml 이상의 농도에서 발아율을 감소시켰지만, *A. niger*의 발아율에는 영향을 주지 않았다. 반면, 휘발성 형태로 처리할 경우에 glacial acetic acid는 *B. aclada*에 대해서 균일하게 포자 발아율을 감소시키지 못했으며, *A. niger*의 발아율에는 영향을 주지 않았다. thymol의 경우는 *B. aclada*에 대해서 1000 μ g/ml, *A. niger*에 대해서 200 μ g/ml 이상에서 발아율을 억제시켰다 (Table 5).

Table 5 Germination of two fungi, *Botrytis aclada* and *Aspergillus niger* on potato dextrose agar amended with various concentration of positive control and Thymol

Application	Treatment/Concentration	Germination ^a			
		<i>Botrytis aclada</i>		<i>Aspergillus niger</i>	
		Experiment 1	Experiment 2	Experiment 1	Experiment 2
Amended	Glacial acetic acid				
	0	65.7±11.0 a ^b	61.4±9.1 a	66.7±2.9 b	53.1±11.0 a
	1	34.3±5.1 bc	68.3±7.8 a	71.7±2.5 a	47.5±9.0 ab
	10	46.5±7.8 b	63.9±6.6 a	36.3±5.1 c	48.7±6.7 ab
	100	26.5±2.1 cd	70.4±2.4 a	40.7±1.2 c	42.2±2.9 ab
	200	19.3±2.1 d	65.9±3.8 a	40.3±0.6 c	40.9±12.9 b
	500	19.7±0.6 d	49.3±10.8 b	25.3±0.6 d	36.7±5.2 b
	1000	-	-	11.0±1.4 e	44.1±10.7 ab
	Thymol				
	0	68.0±2.6 a	71.5±7.3 a	63.0±4.6 a	48.3±2.7 a
	1	56.7±4.2 b	69.9±3.4 a	58.3±2.9 a	52.7±7.4 a
	10	16.3±3.2 c	52.9±7.7 b	65.7±6.0 a	51.5±5.5 a
	50	4.3±1.2 d	33.3±4.3 c	64.7±5.5 a	50.5±8.2 a
	100	-	-	-	-
200	-	-	-	-	
Gaseous	Glacial acetic acid				
	0	66.3±8.7 a	71.7±9.3 a	54.6±6.2 a	62.4±10.4 a
	10	39.7±10.7 bc	76.0±5.3 a	54.9±8.5 a	59.1±10.1 a
	100	46.5±2.1 b	67.7±2.5 a	55.0±5.0 a	55.0±11.7 a
	200	33.7±1.5 cd	71.0±3.6 a	51.3±4.5 a	54.1±1.5 a
	500	23.3±2.9 de	72.3±7.5 a	55.8±2.6 a	52.0±1.3 a
	1000	15.3±0.6 e	72.7±6.4 a	57.9±1.6 a	57.1±13.6 a
	Thymol				
	0	59.7±2.1 a	64.8±5.6 a	70.0±2.0 a	80.1±10.7 a
	10	35.0±9.6 bc	54.1±8.4 a	64.0±5.3 ab	75.3±6.5 ab
	100	45.7±5.1 b	53.3±3.1 a	63.3±6.1 ab	58.5±18.0 b
	200	32.0±2.0 c	55.2±7.3 a	58.0±2.6 b	38.5±2.5 c
	500	36.3±7.4 bc	56.2±1.6 a	62.0±2.0 b	26.9±6.8 c
	1000	20.5±0.7 d	26.5±7.0 b	64.7±5.5 ab	35.1±4.6 c

^a Germination (%) was evaluated at 24 hours for *Botrytis aclada* and 36 hours *Aspergillus niger* after inoculation at 20 °C.

^b Value represent means ± standard deviation of three replications each experiment. The same letters are not significantly different ($P < 0.05$) according to the least significant difference (LSD) test after arcsine transformation.

특히, *A. niger*에 의한 병에 대한 티몰은 효과는 1000과 2000µg/ml의 농도에서 병원균 접종전에 스프레이 처리했을 경우가 병원균 접종 후에 처리한 효과보다 고도로 유의하게 병을 감소시키므로, thymol은 치료효과보다는 보호효과에 의하여 *A. niger*에 의한 병을 감소시키는 것으로 생각되었다 (Table 6).

*B. aclada*에 대하여 티몰 500µg/ml의 농도에서 병원균 접종전에 스프레이 처리했을 경우가 병원균 접종 후에 처리한 효과보다 유의하게 병을 감소시키므로, thymol은 치료효과보다는 보호효과에 의하여 *B. aclada*에 의한 병을 감소시키는 것으로 생각되었다 (Table 6).

Table 6

Disease symptom caused by *Aspergillus niger* and *Botrytis aclada* on inner section of onion Pre or Post-treated with various concentrations of positive control and Thymol

Treatment ^a	Disease symptom (mm) ^b			
	<i>Aspergillus niger</i>		<i>Botrytis aclada</i>	
	Pre-treatment	Post-treatment	Pre-treatment	Post-treatment
Glacial acetic acid (μL/L)				
0	11.38 ± 1.87 a	11.39 ± 2.42 A	2.28 ± 1.00 a	4.13 ± 0.99 A
500	8.50 ± 1.06 ab	11.07 ± 0.69 A	0.68 ± 0.54 b	2.69 ± 1.15 AB
1000	5.21 ± 0.83 c	11.01 ± 1.73 A	1.56 ± 0.82 ab	1.75 ± 0.35 B
2000	7.21 ± 0.76 bc	9.46 ± 0.26 A	0.25 ± 0.43 b	1.69 ± 0.79 B
Thymol (μg/ml)				
0	11.08 ± 1.13 a	10.42 ± 1.01 A	3.54 ± 1.12 a	3.04 ± 1.82 AB
500	9.50 ± 0.71 a	11.03 ± 0.76 A	0.08 ± 0.14 b	5.38 ± 2.29 A
1000	4.34 ± 0.69 b	10.83 ± 1.46 A	0.04 ± 0.08 b	0.11 ± 0.19 B
2000	4.95 ± 0.48 b	11.59 ± 0.59 A	-	0.54 ± 0.41 B
Fluzianam(μL/L)				
400	2.59 ± 0.57	8.95 ± 1.14	0.13 ± 0.22	-

^a Inoculation on inner section of onion sprayed with each concentration of positive control (glacial acetic acid) and thymol at 28 °C for *A.niger* and 20 °C for *B.aclada*. Pre-treatment was sprayed 24 h before inoculation and Post-treatment was sprayed 24 h after inoculation. Concentration of fluzianam is commercially recommended.

^b Disease symptom was measured at 7 days after *A. niger* inoculation and 10 days after *B. aclada* inoculation.

^c Value represent means ± standard deviation of 3 replicates. The same letters are not significantly different ($P<0.05$) according to the least significant difference (LSD) test.

^d Non-inoculation has no lesion.

- means no lesion

양파에서 티몰에 의한 양파 저장병 억제 효과를 평가하기 위하여 양파에 다양한 농도의 thymol과 대조구 glacial acetic acid를 스프레이하였으며, 상용 농약인 fluzianam도 대조구로 사용하였다. 처리에 의한 보호 및 치료효과를 평가하기 위하여 병접종 24시간 전 후로 각 처리를 양파에 스프레이 하였으며, 병 접종한 후 *A. niger*는 7일, *B. aclada*는 10일 동안 각각 28도와 20도에서 배양한 후 병징 길이를 평가하였다. 병원균 접종 전에 각 처리구를 스프레이 했을 경우에 *A. niger*에 의한 병징은 Thymol 1000μL/L이상의 농도에서 감소하였으며 (Table 7), *B. aclada*의 경우에는 500μg/ml이상의 농도에서 현저하게 병이 감소하였다. 병원균 접종 후에 처리할 경우에는 두 병원균에 대한 병 감소효과는 없었다. 대조구로 사용한 상용농약 fluzianam은 병원균 접종 전 혹은 후에 처리하였을 때 모두 매우 효과적으로 병을 감소시켰다 (Table 8).

Table 7

Disease symptom caused by *Aspergillus niger* on inner section of onion Pre or Post-treated with various controls and Thymol

Treatment ^a	Disease symptom (mm) ^b			
	Pre-treatment	Post-treatment	F Value	Pr > F
Distilled water	11.38 ± 1.87	11.39 ± 2.42	0.00	0.9957
0.5% EtOH solvent	11.08 ± 1.13	10.42 ± 1.01	0.58	0.4881
Fluzianam (400µl/L)	2.59 ± 0.57	8.95 ± 1.14	74.78	0.0010**
Glacial acetic acid(500 µL/L)	8.50 ± 1.06	11.07 ± 0.69	4.30	0.1298
Glacial acetic acid(1000 µL/L)	5.21 ± 0.83	11.01 ± 1.73	26.44	0.0068**
Glacial acetic acid(2000 µL/L)	7.21 ± 0.76	9.46 ± 0.26	25.39	0.0151*
Thymol(500 µg/ml)	9.50 ± 0.71	11.03 ± 0.76	4.93	0.1131
Thymol(1000 µg/ml)	4.34 ± 0.69	10.83 ± 1.46	48.30	0.0023**
Thymol(2000 µg/ml)	4.95 ± 0.48	11.59 ± 0.59	197.39	0.0008**

^a Inoculation on inner section of onion sprayed with each concentration of control (distilled water, glacial acetic acid, 0.5% EtOH and fluzianam) and thymol at 28°C for *A.niger*. Pre-treatment was sprayed 24h before inoculation and post-treatment was sprayed 24h after inoculation

^b Disease symptom was measured at 7 days after inoculation.

^c Non-inoculation has no lesion.

*and** indicate a significant ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) difference between pre-treatment and post treatment at the tested mycelial growth by least significant difference (LSD) test. Values are means of 3 replicates.

Table 8

Disease symptom caused by *Botrytis aclada* on inner section of onion Pre or Post-treated with various controls and Thymol

Treatment	Disease symptom (mm) ^b			
	Pre-treatment	Post-treatment	F Value	Pr > F
Distilled water	2.28 ± 1.01	4.13 ± 0.99	5.14	0.0859
0.5% EtOH solvent	3.54 ± 1.12	3.04 ± 1.82	0.11	0.7724
Fluzianam (400µl/L)	0.13 ± 0.22	-	1.00	0.3739
Glacial acetic acid(500 µL/L)	0.68 ± 0.54	2.69 ± 1.15	7.63	0.0700
Glacial acetic acid(1000 µL/L)	1.56 ± 0.82	1.75 ± 0.35	0.09	0.7823
Glacial acetic acid(2000 µL/L)	0.25 ± 0.43	1.69 ± 0.79	7.45	0.0720
Thymol(500 µg/ml)	0.08 ± 0.14	5.38 ± 2.29	15.97	0.0162*
Thymol(1000 µg/ml)	0.04 ± 0.08	0.11 ± 0.19	0.32	0.6029
Thymol(2000 µg/ml)	-	0.54 ± 0.41	6.24	0.0878

^a Inoculation on inner section of onion sprayed with each concentration of control (distilled water, glacial acetic acid, 0.5% EtOH and fluzianam) and thymol at 20°C for *B.aclada*. Pre-treatment was sprayed 24h before inoculation and post-treatment was sprayed 24h after inoculation

^b Disease symptom was measured at 10 days after inoculation.

^c Non-inoculation has no lesion.

*and** indicate a significant ($P < 0.05$ and $P < 0.01$) difference between pre-treatment and post treatment at the tested mycelial growth by least significant difference (LSD) test. Values are means of 3 replicates.

- means no lesion

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제1절. 목표달성도

년도	세부연구 목표	비중(%)	달성도(%)	평가 착안점
1차년도	○ 양파, 마늘 저장고 내의 병원균 발생특성 조사	20	20	○ 양파 마늘 저장고 내의 부패성 병원균 발생 양상 조사 -무안 등에서는 5% 내지70%까지 저장별 발생 -경남 지역은 발생율이 2% 정도 낮음 - <i>Botrytis aclada</i> , <i>Fusarium proliferatum</i> , <i>Fusarium acuminatum</i> , <i>Penicillium</i> ○ 티몰 처리에 의한 양파 마늘의 품질 변화 비교 조사 ○ 실증 시험 규모하의 훈증 처리에 의한 저장 중 양파 마늘의 품질 변화 ○ 저온 저장고내의 훈증 처리 최종안 제시
	○ 티몰 천연 훈증제 처리가 양파, 마늘의 저장성에 미치는 영향 조사	10	10	
	○ 티몰 천연 훈증제 처리가 양파, 마늘의 저장성에 미치는 영향 조사	10	10	
2차년도	○ 식물 정유 티몰의 양파 마늘 부패균에 대한 억제 효과 조사	20	20	○ 티몰 휘발성 물질의 병원균 억제 효과 조사 -티몰 10ppm에서 균사 생장 및 포자 발아 억제 -티몰 30ppm은 잿빛곰팡이(<i>Botrytis aclada</i>)에 대한 탁월한 항균 효과를 보였으나 아황산가스는 잿빛곰팡이에 대한 억제 능력이 낮았음
	○ 최적농도의 티몰 훈증제 처리에 의한 품질 영향 분석	20	30	
3차년도	○ 상업적 규모의 현장 적용 시험	30	30	○29평 창고에 저장된 약160톤 양파에 대한 훈증 현장 적용 시험 - 20ppm의 티몰을 가열훈증기를 사용하여 훈증한 결과, 무처리에 비하여 저장병이 약 57% 감소하였음 - 양파의 저장기간을 10개월 유지하면서도 양파의 부패에 의한 손실율은 17% 내외를 유지하여 저장병 방제 효과가 우수한 것으로 판정되었음 ○ 저온저장고 내에서 최적 천연훈증제 처리 조건 최종안 제시 - 기존의 가열훈기에 티몰을 에탄올에 용해하여 가열 훈증하면 티몰의 잔류물을 남기지 않고 우수한 방제 효과를 달성할 수 있음

제2절 관련 분야에의 기여도

1. 저온 저장시 주요 병의 발생 생태에 대하여 상온이나 포장에서와는 다름에 대한 정보 제공

양파 마늘 장기 저장중에 가장 많이 발생하는 것은 잿빛곰팡이병과 Fusarium(흰곰팡이)이며, 특히 Fusarium은 양파의 뿌리에서 흙과 같이 와서 양파를 침입

2. 관련 산업 분야 활용 가능성

양파의 뿌리에서 오는 저장병으로 인한 부패율을 줄이기 위하여는 외국의 포장센터와 같이 세척 및 소독과 작업을 하면 현저히 감소시킬 수 있으나 막대한 비용을 들여 새로운 시설을 설치하여야 함으로써 국내에는 현실적으로 적용하기에 어려움이 있음.

전라도 지역의 양파 저장 시설들은 또한 건조 및 습도 조절 장치가 없이 시공되었기 때문에 저장병으로 인해 품질저하를 막는 방법을 훈증과 같은 살균 방법이 현실 대안임을 확인하여 주었다. 티몰을 사용한 훈증 방법은 또한 타 작물에서 적용이 가능할 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

- 실용화·산업화 계획(기술실시 등) : 2013-12-23일 특허 출원된 기술을 사용하여 저장병으로 인한 피해가 큰 무안지역의 농협 및 사설 창고에 훈증 기술을 사용할 예정. 1차로 무안군 일로면 농협 창고의 4개 저장실을 대상으로 함
- 양파의 저장병 방제 방법 특허 출원
 - 출 원 일 자 2013.12.24, 특 기 사 항 심사청구(유) 공개신청(무), 참조번호(P13E391)
 - 출 원 번 호 10-2013-0162387 (접수번호 1-1-2013-1183180-66)
 - 출 원 인 명 칭 건국대학교 산학협력단(2-2004-015764-8)
- 저장병 발생 생태에 대하여 논문 출판 게재 예정됨
- 타 저장 농산물에 대한 티물 훈증 적용 가능성 제시

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

없음

제 7 장 연구시설·장비 현황

* 도입·개발한 연구시설·장비 현황 및 국가과학기술종합정보시스템 장비 등록번호를 기술
없음

해당없음

제 8 장 참고문헌

- Aeschbach R, Loliger J, Scott BC, Murcia A, Butler J, Haliwell B. 1994. Antioxidation actions of thymol, carvacrol 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. *Food Chem Toxicol* 32: 31-36.
- Backheet EY. 1998. Micro determination of eugenol, thymol and vanillin in volatile oils and plants. *Phytochem Anal* 9:134-140.
- Bhaskara Reddy MA, Angers P, Gosselin A, Arul J. 1998. Characterization and use of essential oil from *Thymus vulgaris* against *Botrytis cinerea* and *Rhizopus stolonifer* in straw berry fruits. *Phytochemistry* 47:1515-1520.
- Burt, S. 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology* 94:223-253
- Chu, C.L., Liu, W.T., Zhou, T., Tsao, R., 1999. Control of postharvest gray mold rot of modified atmosphere packaged sweet cherries by fumigation with thymol and acetic acid. *Can. J. Plant Sci.* 79, 685-689.
- Dixit, S.N., Chandra, H., Tiwari, R., Dixit, V., 1995. Development of botanical fungicide against blue mold of mandarins. *J. Stored Prod. Res.* 31, 165-172.
- Deighton N, Glidewell SM, Deans SG, Goodman BA. 1994. The chemical fate of the endogenous plant antioxidants carvacrol and thymol during oxidative stress. *Proc Royal Soc B (Edinburgh)* 02: 247-252.
- Dubey, N.K., Kishore, N., 1988. Exploitation of higher plant products as natural fumigants. In: *Proceedings of the Fifth International Congress on Plant Pathology*, Kyoto, Japan, p. 423 (Abstract).
- Ji P, Momol MT, Olson SM, Pradhanag PM, Jones JB. 2005. Evaluation of Thymol as Biofumigant for Control of Bacterial Wilt of Tomato Under Field Conditions. *Plant Dis* 89: 497-500.
- Kim et al, 2007 Choi, Y.S., Kim, K.Y., Jang, D.Y., Uhm, D.Y., Kim, T.J., Jung, B.J., 2006. Plant Essential oils and their antifungal activity. *Kor. Jour. Pest Sci.* 10, 201-209.

Korean list of plant disease 2009. Korean Plant Pathological Society. 466p

Liu, W.T., Chu, C.L., Zhou, T., 2002. Thymol and acetic acid vapors reduce post harvest brown rot of apricot and plums. HortScience 37, 151-56.

Mihaliak, C.A., Gershenzo, J., Croteau, R., 1991. Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants, implications for theories of plant chemical defense. Oecologia 87, 373-76.

Rakotonirainy, M.S., Lavedrine, B., 2005. Screening for antifungal activity of essential oils and related compounds to control the biocontamination in libraries and archives storage areas. International Biodeterioration and Biodegradation 55, 141-147

Smid, E.J., Witte, Y., de Vrees, O., Gorris, L.M.G., 1994. Use of secondary plant metabolites for the control of post harvest fungal diseases on flower bulbs. Acta Hort. 368, 523-530.

Tiwari, R., Mishra, D.N., Upadhyay, P.S., 1988. Efficacy of some plant volatiles for the control of black mould of onion caused by *Aspergillus niger* Van Tiegh during storage. Natl. Acad. Sci. Lett. 11, 345-47.

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 생명산업기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.