

TMV 감염 잎담배가루의 바이러스 불활성화를 위한 온도 조건

김영호* · 채순용 · 박은경 · 이윤환

한국인삼연초연구원 원료연구부

(1996년 10월 5일 접수)

Temperature Conditions for Inactivation of Tobacco Mosaic Virus in Dried Tobacco Leaf Debris

Young Ho Kim*, Soon Yong Chae, Eun Kyung Park and Yun Hwan Lee

Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, Taejon, Korea

(Received Oct. 15, 1996)

ABSTRACT : Dried tobacco leaf debris infected with tobacco mosaic virus (TMV) was subjected to heat treatment (60°C~100°C) with or without addition of moisture and to room temperature for natural decay to examine the periods of time required for the inactivation of TMV in the inoculum source. Wet conditions (60% moisture content of the debris) for heat treatment were more efficient than dry conditions to inactivate the virus at 70°C~100°C, and with decrease of temperature, the time needed for the viral inactivation increased greatly. At 60°C and 70°C, the temperatures in a compost heap during the actively decomposing period, it takes about 15 days or more for the complete inactivation of the virus. However, considering the decrease of the viral infectivity during the decomposition, a shorter period of time will be required to inactivate TMV in the conditions mentioned above, suggesting that a well decomposed organic manure containing tobacco leaf debris may not have infective TMV and may not provide a potential inoculum source.

Key words : tobacco mosaic virus, tobacco leaf debris, heat treatment, inactivation.

* 연락처자 : 305-345 대전광역시 유성구 신성동 302 한국인삼연초연구원

* Corresponding author : *Korea Ginseng & Tobacco Research Institute, 302 Sinseong-Dong, Yuseong-Ku, Taejon 305-345, Korea*

담배 모자이크 바이러스(TMV)는 우리나라 황색종 담배 산지에서 발병률이 높고 발병 정도도 매우 심하여 잎담배의 생산에 질적, 양적으로 큰 피해를 초래하는 병해이다 (박 등, 1993).

TMV는 이병 식물체와의 접촉을 통해 쉽게 전염이 된다 (Lucas, 1975). 이 바이러스는 물리화학적적으로 비교적 안정하며 감염된 조직내에 다량 존재하기 때문에 (Van Regenmortel, 1981), TMV에 이병된 담배 식물체의 잎, 줄기 및 뿌리 잔해물은 이 바이러스의 중요한 전염원이 된다. 이들 전염원으로부터 이식, 배토, 제초 및 적심 작업을 할 때 손이나 농기구를 통해 바이러스가 건전 식물체로 전염된다. 따라서 TMV를 방제하기 위해서는 이병 식물체인 전염원을 철저히 제거하거나 작업도중 전염이 되지 않도록 위생관리에 만전을 기하여야 할 것이다.

최근 잎담배의 이용성 제고를 위하여 저장 및 제조 과정에서 부산물로 나오는 잎담배가루(泥粉)를 유기질 비료 제조에 이용하고 있다. 이 경우 감자 바이러스 Y(PVY)나 오이 모자이크 바이러스(CMV)는 식물체 조직내에서 생존력이 약하여 전염원이 될 가능성이 거의 없다. 그러나 TMV는 식물체 조직에서도 생존력이 강하여 (Lucas, 1975) 이분을 부숙시킨 유기질 비료를 사용할 경우 바이러스 전염원이 될 가능성이 있다.

이 연구에서는 이분을 담배 재배용 퇴비 원료로 사용할 때 이분내 TMV의 불활성화에 요구되는 온도 조건 및 지속 시간을 조사하였고, TMV에 감염된 이분이 부숙 유기질 비료로 사용될 때 전염원이 될 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

TMV 이병 건조 잎담배가루 (전염원) 준비 및 바이러스 감염력 조사 : 한국인삼원초연구원 담배포장에서 TMV에 이병된 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. NC 82) 잎을 채취하여 음지에서 건조시켰으며, 건조 담배 잎을 손으로 비벼 가루로 만들어 시료로 사용하였다. 이 TMV 오염 잎담배가루(이분)는

건조한 상태로 또는 수분 60% (w/w)가 되도록 살균 증류수를 첨가하여 250 ml 삼각플라스크에 약 50 ml씩 넣고 알루미늄박으로 밀봉하였다.

바이러스 감염력을 조사하기 위하여 처리된 시료에 시료의 20배 (v/w)에 해당하는 0.01 M 인산 완충액(pH 7.0)을 건조 시료의 20배액(v/w)을 첨가하여 유발에 간 후, 그 즙액을 담배 잎에 접종하였다. 검정용 담배는 *N. tabacum* cv. Xanthi-nc를 사용하였으며, 처리한 시료의 즙액을 한쪽 반엽에, 처리하지 않은 시료의 즙액을 접종엽의 다른 쪽 반엽에 접종하는 반엽접종법으로 이분의 TMV 감염력 정도를 조사하였다. 처리당 3 반복의 시료를 사용하였고, 시료당 3 반복으로 접종하였다.

자연 부패에 의한 TMV 감염력 : TMV 이병 이분을 수분 60%로 조절한 후 삼각플라스크에 넣고 실온(약 22-25 °C)에 방치하였다. 처리 2일 후부터 곰팡이가 자라는 것을 관찰할 수 있었다. 처리후 시기별로 시료를 채취하여 위에서 언급한 방법대로 이분내 TMV의 감염력 정도를 조사하였다.

담배 이분의 열처리 조건 : 건조한 이분을 마른 채로 사용하거나 살균수를 첨가하여 수분을 60%로 조절한 후 가온 처리를 하였다. 온도는 80, 100 °C로 인위적으로 가열 가능한 범위의 온도와 60, 70°C로 퇴비 발효 과정에서 나타날 수 있는 온도로 구분하였다. 각각의 시료는 온도가 고정된 oven에 넣은 후 시간별로 시료를 채취하여 위에서 언급한 방법대로 바이러스의 감염력 정도를 조사하였다. 또한 수분 조절시 증류수 대신 3%의 요소 수용액을 첨가하여 수분을 60%로 조절한 후 90°C로 처리하여 요소가 TMV 불활성화에 미치는 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

이 시험에서는 열처리와 자연부패에 의한 이분의 TMV 감염력을 본래의 이분시료의 감염력에 대한 상대적인 크기로 표시하였다. 또한 이들 감

염력의 처리시간에 따른 변화 곡선은 온도에 따른 TMV의 불활성화율이 지수함수적이라는 근거(Lucas, 1975)에 따라 지수함수 그래프로 표시하였다. 이 연구에서 조사된 실측 자료와 지수함수 그래프의 계산된 수치와 상관관계는 100℃ 습열처리를 제외하고는 모두 유의성이 있었으며 결정계수(coefficient of determinant)가 0.9를 넘어 처리시간에 따른 불활성화율의 변화를 나타내는데 지수함수가 적절한 것으로 생각되었다. 100℃를 제외하고는 해당 곡선의 식은 각각의 그래프상에 나타나 있다.

담배 이분의 자연 부패에 의한 TMV 불활성화 : 실온에서 담배 이분의 자연 부패에 따른 경시별 바이러스의 감염력은 Fig. 1과 같다. 자연 부패에 의하여서는 바이러스 감염력이 처음 4일간은 급격히 감소되었으나 그 이후에는 감소 정도가 낮아져 24일 후까지 감염력이 지속되었는데, 감염력은 지수함수적으로 감소하는 경향이였다 (결정계수 $\langle R^2 \rangle = 0.9804$). 건조한 상태 하에서는 식물체 이분내의 바이러스 감염력은 조사기간 동안은 시간이

경과됨에 따라 유의성 있는 변화가 없었다.

자연상태하에서 담배 식물체 잔해물에서의 바이러스의 불활성화는 환경 조건에 따라 많은 차이가 있는데, 잔해물의 부패 정도와 밀접한 관련이 있다. TMV 이병 식물체의 잔해물이 완전 부패하지 않으면 TMV는 토양에서 2년까지 생존이 가능하며 (Gooding, 1969), 또한 지상에 노출되더라도 5~6 개월 경과 후에야 불활성화 된다 (Lucas, 1975). Gooding와 Lucas (1969)는 제조제를 처리하면 이병 식물체의 부패가 촉진되어 전염원 제거에 효과가 있다고 하였다.

본 시험에서는 실온에서 2일 후부터 이분 시료(수분함량 60%)에 곰팡이가 자라는 것이 육안으로 관찰되었고, 4일 후에는 곰팡이 균사가 시료 전체를 덮었으나 그 이후에는 균사량에 뚜렷한 변화를 관찰할 수 없었다. 이분의 자연부패시 초기에 바이러스 감염력의 급격한 감소는 아마도 초기에 조직의 부패율이 높기 때문이라 사료된다. 일정 기간 후에는 부패의 진전 속도가 느려지며 이에 따라 조직내 바이러스의 불활성화도 지연되는 것이 아닌가 생각된다. 자연상태하에서의 담배 뿌리내 바이러스의 불활성화 경향도 이와 같아 초기에는 불활성화 속도가 크나 후기에는 조직내 바이러스의 감염력에 큰 변화가 없었다 (박 등, 1994).

박 등(1994)은 수확후 잔근 그루터기에 요소를 처리하면 뿌리가 빨리 부패하여 전염원 제거에 효과적이라고 하였으나 이듬해 봄까지 바이러스가 완전히 불활성화되지는 않았다. 따라서 자연상태하에서 단기간에 담배 잔해물내 TMV의 완전한 불활성화는 쉽지 않을 것으로 생각되며 이분을 포함하는 유기질 비료의 제조시 TMV 전염원의 빠른 제거를 위해서는 부숙을 촉진시키거나 발열을 동반하는 부숙이 필요할 것으로 생각된다.

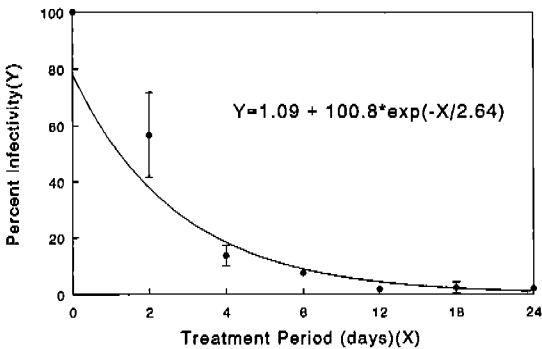


Fig. 1. Decrease of TMV viability (infectivity) and a fitted exponential curve following natural decaying of tobacco leaf debris (60% moisture content) under room temperature conditions. TMV Infectivity was relative to that of untreated dry tobacco leaf debris. Vertical bars indicate standard deviations of 3 replications.

고열 처리에 의한 바이러스의 불활성화 : 건조한 담배 이분의 열처리 (건열처리) 및 60% 함수 이분의 열처리(습열처리)에 따른 시간별 바이러스의 감염력은 Fig. 2에서 나타난 바와 같다. 습열처리의 경우 100℃에서는 3시간 이내에 바이러스가 불

TMV 감염 잎담배가루의 바이러스 불활성화를 위한 온도 조건

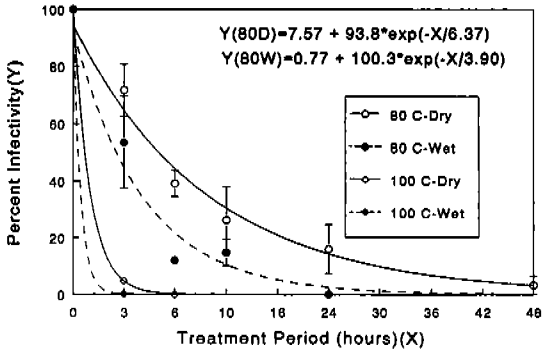


Fig. 2. Decreases of TMV infectivity in tobacco leaf debris (relative to that of untreated controls) and fitted exponential curves during the period of heat treatments at 80°C and 100°C in wet (60% moisture content) and dry conditions. Vertical bars indicate standard deviations of 3 replications.

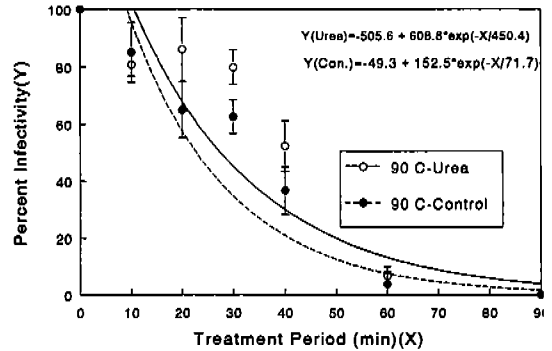


Fig. 3. Decreases of TMV infectivity in tobacco leaf debris (relative to that of untreated one) and fitted exponential curves during the period of heat treatments at 90°C with or without amendment of 3% urea. Vertical bars indicate standard deviations of 3 replications.

활성화되었으며, 80°C에서는 처리후 24시간만에 불활성화되었다. 한편 건열처리에 있어서는 100°C에서 처리후 6시간만에, 80°C에서는 처리후 80시간만에 불활성화되어 습열처리보다 건열처리가 바이러스 불활성화에 효과가 낮았다. 또한 100°C에서 습열처리시 바이러스의 불활성화에 소요되는 시간을 정확히 알기 위해 10분 단위로 조사한 결과 처리후 20분만에 바이러스가 완전히 불활성화되었다(자료미제시). 각 처리조건별 바이러스의 감염력 저하는 100°C의 경우 고온처리 초기에 바이러스가 불활성화되어 감염력 변화를 곡선으로 표시하기에 적당치 않았다. 그러나 80°C의 경우는 바이러스 감염력이 지수함수적인 변화를 보였으며 건열처리와 습열처리에서 실측치와 곡선상의 수치사이에 상관관계는 각각의 결정계수가 0.9825와 0.9723으로 고도의 유의성이 있었다.

90°C의 습열처리에 있어서는 요소의 첨가에 관계없이 이분내 바이러스의 불활성화에 소요되는 시간은 90분으로 나타나 (Fig. 3), 바이러스의 불활성화에 소요되는 시간이 100°C에 비해 4.5배 정도 증가하였다. 80°C에서의 바이러스 불활성화 소요 시간은 90°C에 비해 약 16배 증가하여 온도가 낮

아질수록 지수함수적으로 증가하는 경향이었다.

열에 의해 바이러스는 불활성화되는데 온도가 올라감에 따라 바이러스 감염력이 급격히 저하된다. 또한 일정한 온도조건하에서 즙액상태의 바이러스의 감염력은 시간에 비례하여 지수함수적으로 감소한다 (Lucas, 1975). 즙액 상태에서 10분간 가온하였을 때 TMV의 감염력은 65°C에서는 변화가 없었으며, 70°C에서는 상당한 정도가, 80°C에서는 대부분이 그리고 90~93°C에서는 완전히 불활성화되었다 (Lucas, 1975; Zaitlin & Israel, 1975). 그러나 식물체 조직 내에 있을 경우에는 본 시험에서 나타났듯이 90°C에서 90분이 소요되어 즙액 상태보다 훨씬 열에 대한 안정성이 높아지는 것으로 나타났다. 식물체 조직내에서는 바이러스가 집단으로 존재하기 때문에 (Esau, 1968), 즙액 상태에서보다 열이나 기타 외부 환경에 대해 더 안정적이라 생각된다.

TMV는 지금까지 알려진 식물바이러스 중에서 가장 안정적인 바이러스로 알려져 있다. 특히 동결건조한 상태에서는 안정성이 크게 증가하는데, 예를 들어 동결건조한 잎에서는 TMV 감염력이 52년간 유지된다 (Lucas, 1975). 또한 일반적으로 습

기가 있는 조직보다 건조한 조직내에서 바이러스가 안정적이라고 알려져 있다. TMV는 핵산인 RNA와 핵산을 둘러싸고 있는 단백질(피복단백질)로 구성되어 있는데 RNA가 TMV의 감염력에 관여한다. TMV가 상당히 안정되어 있는 것과는 달리 RNA는 매우 불안정하여 피복단백질로부터 분리되거나 피복단백질이 분해되면 쉽게 불활성화된다. 습기가 있는 상태에서 열을 가하면 RNA의 분리나 단백질의 변성이 건조한 상태에서보다 쉽게 일어나는데, 이 시험에서 습열처리가 건열처리보다 바이러스의 불활성화에 더욱 효과적인 이유라 할 수 있다.

순수분리한 바이러스에서 RNA의 분리를 쉽게 하기 위해 요소, 초산 및 유기용매 등이 첨가되는 경우가 있어서 요소 등이 바이러스의 불활성화에 영향을 줄 가능성이 높다. 그러나 이 시험에서는 요소 처리에 따른 바이러스 불활성화율에 차이를 보이지 않았다. 아마도 이 시험에서 처리한 요소의 농도 범위에서는 조직내에 있는 바이러스의 불활성화에 유의성 있는 영향이 없었던 것으로 사료된다. 그러나 이 시험에서 90℃에서만 요소의 영향을 조사하였기 때문에 보다 신빙성 있는 요소의 바이러스 불활성화에 미치는 영향을 알기 위해서는 다른 온도 범위에서도 이에 시험이 있어야 할 것으로 생각된다.

본 시험에서 나타나 있듯이 처리 온도가 낮아지면 바이러스를 불활성화하는데 소요되는 시간은 지수함수적으로 증가하며, 같은 온도에서의 바이러스 감염력도 처리 시간이 증가함에 따라 지수함수적으로 감소한다. 열처리에 소요되는 에너지와 처리공정상 편이성을 고려할 때 높은 온도에서 짧은 시간이 경제적인지 또는 낮은 온도에서 긴 처리시간이 경제적인지는 시설과 처리 규모에 따라 달라질 수 있다. 열처리에 의한 바이러스 효과적인 불활성화 시설을 갖출 때에는 바이러스의 불활성화와 열처리 온도 및 시간과의 관계를 충분히 고려할 필요가 있다고 생각된다.

부숙열 범위의 열처리시 바이러스의 불활성화 : 유기

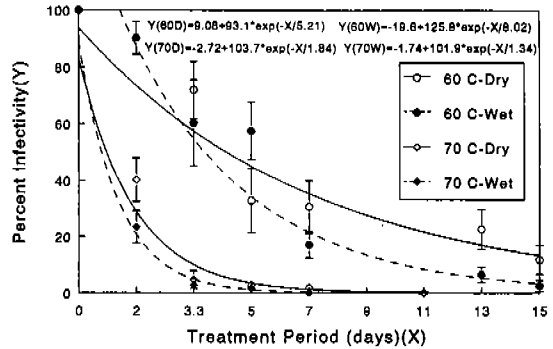


Fig. 4. Decreases of TMV infectivity in tobacco leaf debris (relative to that of untreated one) and fitted exponential curves during the period of heat treatments at 60 °C and 80 °C in dry and wet (60% moisture content) conditions. Vertical bars indicate standard deviations of 3 replications.

물 부숙시 퇴적을 하게 되면 일반적으로 많은 열이 발생하게 된다. 퇴비 퇴적물 중앙의 온도는 시기에 따라 80℃를 넘는 경우도 있으나 전체적으로 60~70℃ 이상의 온도가 20 여일 이상 유지된다 (이와 김, 1985; 김 등, 1995). 부숙시의 온도 범위에서의 바이러스 불활성화 정도를 조사한 결과는 Fig. 4와 같다. 열처리 시간에 따른 바이러스의 감염력 감소는 80℃와 마찬가지로 지수함수적인 변화를 보였으며, 건열처리보다 습열 처리시 바이러스 불활성화 속도가 빨랐다. 즉 70℃에서는 건열에서 13일만에, 습열에서는 7일만에 바이러스가 불활성화되었으며, 60℃에서는 조사 최후기인 15일에도 건열 및 습열 모두에서 바이러스 감염력이 있었으나 건열이 11.8%, 습열이 2.5%로 습열에서 상대적으로 바이러스 감염력이 낮았다. 유기질 비료 제조시에는 보통 60% 정도의 수분이 유지되므로 바이러스의 불활성화와 관련하여서는 습열처리 효과에 맞추어야 할 것으로 생각된다. 김 등 (1995)에 의하면 우분과 톱밥을 이용하여 퇴비를 제조할 때 70℃ 이상의 온도가 처음 25일간 유지되다가 60℃ 이하로 낮아졌다. 본 실험에서 70℃ 습열에서 바이러스의 불활성화에 소요되는

기간이 7일인 점을 감안할 때 퇴비의 부숙초기에 바이러스는 불활성화될 것으로 생각된다.

실온에서 이분의 부패에 의한 바이러스 감염력 감소와 60℃에서 감염력 감소를 비교해 볼 때 실온에서 부패에 의해 바이러스 감염력 저하가 더 크게 일어났다. 이는 60℃정도의 온도에서보다는 조직의 부패가 바이러스의 불활성화에 더 효과적인 것을 시사한다. 또한 유기물의 부숙시에는 조직의 부패와 발열이 동시에 일어나기 때문에 바이러스 불활성화 속도는 더욱 빨라질 것이다. 따라서 비교적 낮은 온도인 60℃에서 유기물이 부숙된다고 할 때 유기물 부숙시 온도만을 고려한다면 15일 이상이 유지되어야 바이러스를 완전히 불활성화시킬 수 있지만 부숙시 조직의 부패에 의한 바이러스의 불활성화를 감안한다면 불활성화에 소요되는 기간은 이보다 짧아질 수 있다.

일반적으로 유기질 비료가 부숙후 담배 포장에서 사용되기까지 후숙과 유통에 비교적 장기간이 소요된다. 따라서 통상적인 부숙 기간을 거친 유기질 비료라면 이분내 바이러스가 생존할 가능성은 매우 낮으며 담배 포장에서 TMV 전염원이 될 가능성이 희박하다고 생각된다.

결 론

열처리에 의한 바이러스의 불활성화는 습열처리가 건열처리보다 효과적이었다. 온도가 낮아질수록 TMV를 불활성화하는데 소요되는 시간은 크게 증가하였다. 유기질 비료 제조시 부숙열 정도의 온도(60~70℃)에서 바이러스의 완전한 불활성화를 위해서는 15일 또는 그 이상이 소요되었다. 그러나 부숙시 발열과 함께 조직의 부패에 의한 바이러스의 불활성화를 감안한다면 유기질 비료 제조시에는 이보다 짧은 기간내에 TMV가 불활성화될 것으로 생각된다. 따라서 통상적인 방법에 의해 유기질 비료가 제조, 유통된다면 담배 이분 전염원이 될 가능성은 매우 희박하다고 생각된다.

참 고 문 헌

1. Esau, K. (1968) *Viruses in Plant Hosts*. U. Wis. Madison. 225 pp.
2. Gooding, J. V. (1969) *North Carolina Agr. Exp. Sta. Tech. Bull.* 195, p. 25.
3. Gooding, J. V. and G. B. Lucas (1969) *Plant Dis. Rep.* 43:152-154.
4. 김용주, 정훈채, 김용연 (1995) 연초경작용 퇴비 제조 및 시비법 개선연구. 담배연구보고서 (연초육종 및 환경편), pp 239-286. 한국인삼연초연구원.
5. 이운환, 김용연 (1985) 겨울철 비닐하우스내의 벧짚 퇴비더미의 온도 변화와 부숙 효과. 한토비지 18: 27-31.
6. Lucas, G. B. (1975) *Diseases of Tobacco*, Third Edition. Biological Consulting Associates, Raleigh, North Carolina. 621 p.
7. 박은경, 김상식, 김영호, 채순용, 강신웅 (1993) 바이러스병 방제 및 항균 살충 생물제어기술 개발. 담배연구보고서 (연초경작 육종 및 환경편), pp 59-143. 한국인삼연초연구원.
8. Park, E. K., Y. H. Kim, S. Y. Chae, S. W. Kang and Y. H. Lee (1994) Urea application on tobacco stumps for the control of tobacco mosaic virus infection. *J. Korean Soc. of Tobacco Sci.* 16:97-101.
9. Van Regenmortel, M. H. V. (1981) *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*, Kurstak ed., pp. 541-625. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
10. Zaitlin, M. and H. W. Israel (1975) Tobacco mosaic virus (type strain). *C.M.I./A.A.B., Description of Plant Viruses*, No.151.