

최 종 보 고 서

발간 등록 번호
11-1541000-001503-01

Ethylene Antagonist로서의 씨클로프로펜 유도체의 제품화

(Development of cyclopropene derivatives
as ethylene antagonist)

(주)이룸바이오테크놀러지

농 립 수 산 식 품 부

제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “Ethylene Antagonist 로서의 씨클로프로펜 유도체의 제 품 화” 과제의 보고
서로 제출합니다.

2012 년 6 월 29 일

주관연구기관명 : (주)이룸바이오테크놀로지

주관연구책임자 : 유 상 구

연 구 원 : 정 진 욱

연 구 원 : 김 지 영

연 구 원 : 임 정 호

협동연구기관명 : 서울대학교

협동연구책임자 : 김 도 순

요 약 문

I. 제 목 : Ethylene Antagonist 로서의 씨클로프로펜 유도체의 제품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

기후 스트레스 상황에서도 수확량을 확보할 수 있고, 과수원에서의 수확시기 지연에도 적용가능한, 오픈된 공간에서 사용할 수 있는 에틸렌 저해제 (Ethylene Antagonist)를 개발하기 위해서 상온에서 액상으로 존재할 수 있는 분무가 가능한 씨클로프로펜 유도체를 개발하고자 하였다. 이러한 시도는 전 세계적으로 아직 상용화된 제품이 없는 블루오션시장이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

에틸렌 저해 효과가 있을 것으로 예측되는 씨클로프로펜 유도체의 전구물질을 개발하고 후보물질을 선정하였으며, 이 후보물질에 대한 독성실험을 진행하였고, 전구물질과 Activator 가 in-situ 로 반응하여 씨클로프로펜 유도체로 전환될 수 있는 발생장치의 목업 및 시제품 제작을 실시하였으며, 이렇게 해서 선정된 씨클로프로펜 유도체를 이용하여 실제 작물 및 과일에서 에틸렌 저해 효과가 있는지 효능실험을 실시하였다.

IV. 연구개발결과

씨클로프로펜 유도체의 전구물질의 제조방법을 확립하였으며, 선정된 후보물질에 대한 독성실험 결과, 안정성을 입증하였고, 실제 농작물을 대상으로 일반생육 및 품질에 미치는 효과 등을 실험을 통하여 입증하여 제품 개발 가능성을 확인 할 수 있었다.

V. 연구 성과 및 성과활용 계획

본 과제를 통해 얻어진 결과를 바탕으로 1회의 외부 포럼에서 포스터를 발표하였으며, 지식재산권 확보를 위하여 해외출원을 진행하였고, 국내 대기업 및 미국의 회사와 기술협력을 위한 논의를 진행 중이다. 향후 이 과제를 통해 얻어진 결과를 바탕으로 후속연구-제품화 연구가 될 것임-를 통하여 오픈된 공간에서 처리할 수 있는 에틸렌 저해제 개발을 진행할 계획이다.

SUMMARY

(영문요약문)

Title : Development of cyclopropene derivatives as ethylene antagonist

Summary : The availability of fresh water is one of the biggest problems that could be exacerbated by climate change. Agriculture uses more than 70% of the fresh water in the world. Water tables are dropping rapidly in many parts of the world and will continue to shrink as more land is converted to grow food and fuel crops. One of the biggest challenges for agricultural biotechnology is to develop drought-tolerant crops that can thrive with less water without impeding yield. It has been well-known that 1-MCP (1-methylcyclopropene) is one of the most effective ethylene inhibitor to delay fruits' self-aging. The science behind an 1-MCP was originally discovered by Prof. Sisler at North Carolina State, a leading American university for agricultural studies, who studied the natural ripening process of apples in the mid-1990s. Now, 1-MCP is known to be the most effective material to prevent ethylene to trigger ripening process of picked fruits and vegetables. But 1-MCP exists in gas stage at the room temperature and is not suitable for using in the open field as a ethylene antagonist.

It was Rohm and Haas who firstly developed 1-MCP storing method and they used alpha-cyclodextrine to absorb each 1-MCP molecule separately to prevent polymerization and it was commercialized as name of SmartFresh. and That Rohm and Haas now are tried to develop new Ethylene antagonist with Syngenta and the project name INVINSA which can be used in the field for crop stress protection.

We studied and developed 1-MCP generating device after Rohm and Haas and also studied ethylene antagonist which is suitable for open field to lessen the crop stress.

The key idea behind this research and development is that if it has more molecular weight, it can exist in the liquid state and be suitable for the open field. That's because we synthesized LCCP(longer chained cyclopropenes) and tested the efficacy. As far as we found out, our technology works for ethylene antagonist and 1-alkylcyclopropene derivatives we develop can be used for ethylene antagonist.

CONTENTS

(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction of this research

Chapter 2. Current Research and Development Going-On this area

Chapter 3. Research and development / Results

Chapter 4. Goal Achievement and Contribution on relative research area

Chapter 5. Outcomes and Practical Uses

Chapter 6. Information gathered during this research

Chapter 7. References

목 차

- 제 1 장 연구개발과제의 개요
- 제 2 장 국내외 기술개발 현황
- 제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과
- 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도
- 제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획
- 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보
- 제 7 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 1 절 연구개발의 목적

에틸렌 저해제(Ethylene Antagonist)인 1-MCP(1-Methylcyclopropene) 의 경우 식물의 노화에 작용하는 호르몬인 에틸렌의 작용을 탁월하게 억제하는 것으로 알려져 있으며¹⁻¹² 미국 다국적기업 Rohm and Haas 사 및 국내벤처회사인 (주)이룸바이오테크놀로지 사 등에 의해 제품화 되었다. 하지만 1-MCP 가 상온에서 기체인 관계로 처리하기 위해서는 밀폐된 공간에서 훈증하는 방식을 선택 할 수 밖에 없으며, 이는 오픈된 공간에서의 에틸렌 저해효과가 요구되는 니즈(Needs)에 부합될 수 없는 기술적 한계를 가지고 있다. 만일 상온에서 액상으로 존재할 수 있는 씨클로프로펜 유도체를 합성하여 분무하는 형태로 제품개발이 된다면 화훼의 절화보존기간연장이나 과수원에서의 수확시기 지연과 같은 분야에서 보다 획기적으로 확대된 적용성을 가질수 있게 된다. 이러한 분무형태의 에틸렌 저해제는 전세계적으로 상용화 된 적이 없는 새로운 기술이다.

제 2 절 연구개발의 필요성

해마다 경작지에서 수확되는 작물들은 기후의 영향을 받을 수밖에 없고, 가뭄이나 홍수 등이 발생하게 되면 그 해 수확량은 현저히 감소되는데, 이때 작물은 Crop Stress 를 받게 되고, 결과물로서 에틸렌을 발생시키게 된다. 이처럼 가뭄이나 홍수에 의한 영향은 농부들이 조절할 수 있는 범위를 넘어선 것으로 세계시장은 인구증가에 따른 같은 경작지에서의 더 높은 소출을 끊임없이 요구하고 있는 것이 현실이다. 미국에서만 매년 가뭄이나 홍수로 인해 콘(Corn) 의 수확량이 25bu/A (피해금액으로는 약 8조원에 해당) 만큼 줄어든다는 보고도 나와 있다. 현재 1-MCP 의 경우 상온에서 기체인 관계로 수확후 농산물을 처리함에 있어 밀폐된 공간에서 1-MCP를 일정농도로 만들어 주는 방식으로 밖에는 처리가 불가능하므로 개방된 공간에서는 사용이 제약되는 것이다. 하지만 개방된 공간에서 작용될 수 있는 Ethylene Antagonist 로서의 씨클로프로펜이 만들어 질 수 있다면 그 활용범위는 대단히 확장될 것으로 보여진다.¹³⁻¹⁵

이미 유일한 미국 경쟁사의 경우 기존 1-MCP 저장기술을 사용하여 개방된 재배지에서 처리하는 기술 개발 프로젝트를 Syngenta 와 조인트벤처 회사를 공동으로 투자하여 연구개발을 있다. 현재 Invinsa 에서는 이러한 가뭄이나 홍수 조건에서 에틸렌작용을 억제하여 작물이 Crop Stress 를 덜 받게 함으로서 소출이 줄어드는 것을 최대한 방지하는 연구를 진행중이지만 에틸렌 발생을 억제하는 Cyclopropene 유도체는 대부분 저장 안정성이 취약하여 쉽지 않을것으로 예상되고 있다. 실례로 이미 상용화 된 1-MCP의 경우만 보더라도 분자량이 54.09에 해당하는 활성이 큰 탄화수소화합물(CAS No. 3100-14-7)로 끓는점이 10℃/760mmHg 에 불과하여 상온에서는 기체로 존재하며 활성이 크고 화학적으로 불안정한 가

스로 이를 기체상태로 압력탱크에 저장할 경우 쉽게 중합반응을 일으킬 뿐만¹¹ 아니라 대기 중의 산소와도 반응하기 때문에 이를 액상으로 보관했다가 분무하는 기술이 결코 쉽지 않다. 기존의 기체형태로 밀폐된 공간에서 사용가능한 제약조건에서 벗어나 스프레이 분무형태로 사용할 수 있다면 이는 사용자의 편의성을 훨씬 더 극대화 할 수 있으며 농산물 생산자 입장에서는 분무할 수 있는 액상형태의 씨클로프로펜 개발이 대단히 유망한 기술이 될 것은 자명한 일이다. 이에 다양한 씨클로프로펜 유도체를 개발하여 Field에서 수확 전에 적용 가능한 Ethylene Antagonist 로서의 상용화를 위하여 연구를 진행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

위에서도 언급했듯이 현재 수확 전에 필드에서 사용가능한 에틸렌 저해제는 1-MCP를 최초로 상업화에 성공한 립앤하스社와 신젠타社와 공동연구를 진행하고 있는 INVINSA라는 프로젝트가 유일하다. 2008년 두 회사는 노지작물의 스트레스를 보호하기 위하여 특히 고온 또는 한발과 유사한 각종 기후 스트레스로부터 작물을 보호하여 증수를 가능하게 하기 위하여 향후 5000 억원 이상의 잠재시장을 예상하며 공동 연구를 시작하였다. 하지만 1-MCP 저장기술을 기반 기술로 하여 상업화 되려면 최소 3~5년 정도 걸릴 것으로 예상되고 있다. 립앤하스는 여러편의 특허를 통해 1-MCP를 안전하게 저장하고 있다가 필요한 곳에서 간편하게 방출하는 방법에 대해서 개시하고 있다. 저장방법의 핵심은 소위 Host-Guest Chemistry 라 불리는 원리인데, α -씨클로덱스트린(α -Cyclodextrin) 과 같이 중앙에 커다란 구멍(Hole)을 가진 거대한 주인분자 (Host Molecule) 의 중앙 구멍으로 1-MCP 와 같은 작은 손님분자 (Guest Molecule) 가 스며들게 한다. 이 과정에서 작은 손님분자는 거대한 주인분자의 구멍에 개별 분자상태로 격리되어 존재하기 때문에 이들 손님분자들 사이에 일어날 수 있는 중합반응의 위험으로부터 안전하게 보호할 수 있다. 이처럼 α -씨클로덱스트린(α -Cyclodextrin) 을 사용하여 1-MCP를 캡슐화 하여 안전하게 저장하고 있다가 필요한 시기에 이들 콤플렉스(Complex)를 물로 처리하면 친화력이 더 큰 물분자가 α -씨클로덱스트린의 중앙구멍으로 천천히 스며들면서 이곳에 위치하고 있던 1-MCP를 천천히 쫓아낸다. 이 과정에서 1-MCP 가 방출되어 농산물의 숙성과정을 촉진하는 에틸렌의 작용을 억제하게 된다. 립앤하스는 이러한 기반기술을 바탕으로 오픈된 공간에서도 사용할 수 있는 제품을 개발하고자 하는데 1-MCP 는 상온에서 기체로 존재하기 때문에 오픈된 공간에서 사용할 수 있는 제품을 만드는 것에는 한계가 있을 것으로 예상된다.

연구수행기관	연구개발의 내용	개발현황
립앤하스+신젠타 공동개발	옥수수, 콩, 목화, 밀, 해바라기, 쌀 및 유채등 노지작물의 작물스트레스보호를 위한 제품 개발	2012년에 Field Test를 실시한다고 언론에 밝힌(2010년) 이후 별다른 보도가 없으며, 아직 개발단계로 추정됨



그림 1. INVINSA 실험결과 자료사진(출처 립앤하스 홈페이지)

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 최적의 1-알킬싸클로프로펜 유도체 선정 및 최적화

본 개발팀은 에틸렌저해 물질로 이미 잘 알려진 1-MCP는 상온에서 기체로 존재 하므로 필드에서 사용가능하지 않다는 점에 주목하고, 1-MCP 보다 분자량이 큰 1-알킬싸클로프로펜(이하 Long Chained Cyclopropene : LCCP) 유도체를 개발하고자 하였다. 또한 싸클로프로펜 유도체가 공통적으로 가지고 있는 불안정한 성질(쉽게 Dimerize 함)을 극복하기 위하여 Field 에 살포하기 직전 *in-situ* 로 발생시키는 Model을 연구목표로 잡고, 1-알킬싸클로프로펜 전구물질개발, *in-situ* 발생방식 최적화, 전구물질 합성방법 최적화, 등을 실시하였다.

1. 발생기술에 적합한 *in-situ* 발생 방식의 최적화

1-알킬싸클로프로펜 화합물은 쉽게 Dimerize 하면서 분해되기 때문에 그 자체로는 'Ethylene Action of Plant'을 조절할 수 있는 Antagonist or Inhibitor로 사용하는 데는 한계가 있다. 이 문제를 해결하기 위해서 1-알킬싸클로프로펜의 전구물질 (Precursor)과 불소 음이온 (F⁻)의 반응을 이용하여 1-알킬싸클로프로펜 화합물을 현장에서 직접 제조하고 이를 곧바로 식물에 부가함으로써 Ethylene Action of Plant 을 효과적으로 조절할 수 있는 새로운 방법을 개발하고자 하였다. 이 과정을 도식화 하면 다음과 같다.

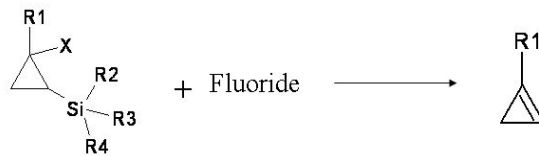


그림 2. 1-알킬싸클로프로펜 생성과정

여기서 LCCP 의 전구물질은 불소이온 (Fluoride)과의 Peterson Like Elimination 반응을 통해서 정확하고 (100% 수율) 빠르게 (1시간 이내 반응 종결) LCCP를 생성한다. 따라서 0.5~1시간 이내의 짧은 시간에 고순도의 LCCP를 합성할 수 있을 뿐만 아니라 여기서 합성된 LCCP는 탄화수소로만 구성된 화합물이므로 소수성이 대단히 뛰어날 뿐만 아니라, LCCP를 발생시키는 반응에는 친수성이 높은 물질들만 사용했기 때문에 합성한 LCCP는 단순히 톨루엔, 벤젠, 자일렌, 헥산 등과 같은 비극성 용매로 단순히 추출하는 것만으로도 빠르고 손쉽고 정제할 수 있다. 따라서 이렇게 정제한 LCCP를 지체 없이 곧바로 제형 과정을 진행함으로써 결과적으로 1mM 이하의 농도로 물에 희석시킨 상태로 약제를 준비할 수 있다. 이렇게 해서 물에 희석된 LCCP는 마치 공기 중에 1ppm 이하의 농도로 희석된 1-MCP처럼 상당히 안정적인 것으로 추정된다. 이 과정을 도식화 하면 다음과 같다.

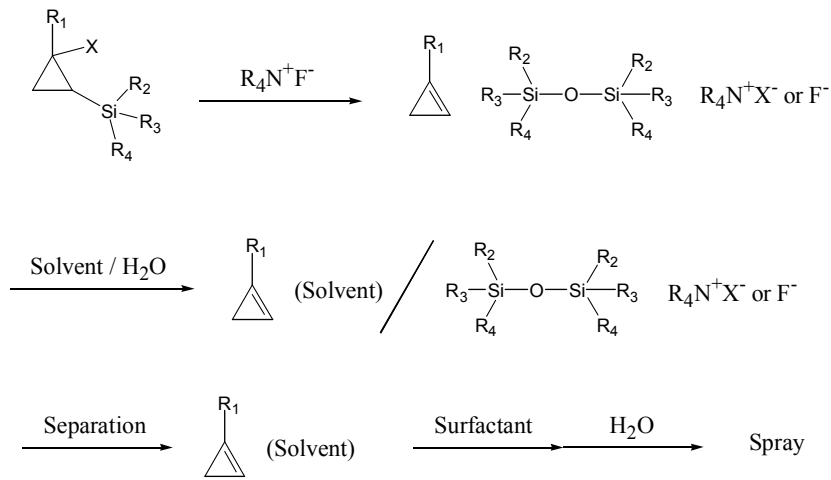
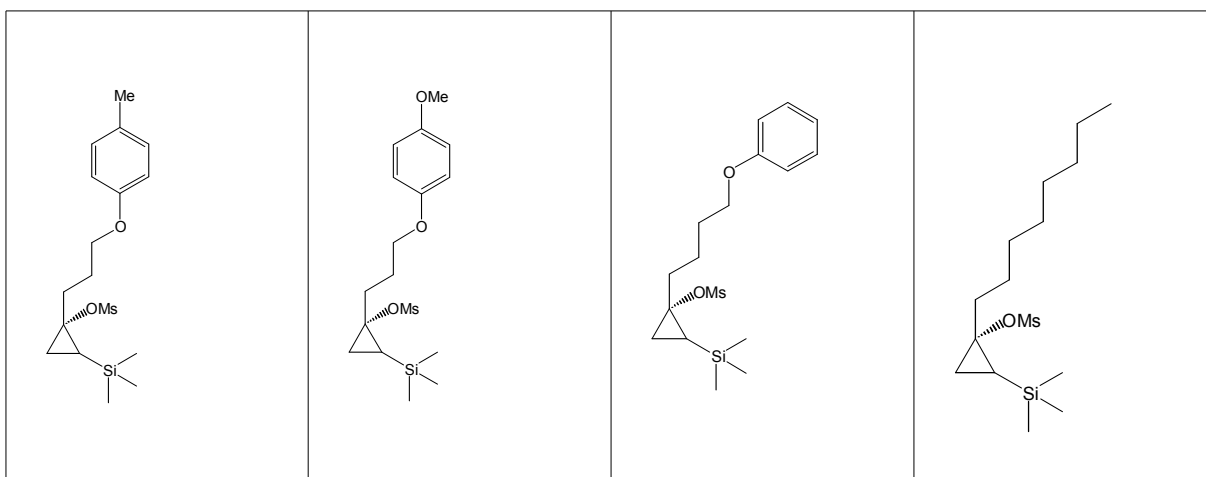


그림 3. 전구물질로부터 LCCP 합성후 제형화 하는 과정

2. 발생기술에 적합한 실리콘계 1-알킬씨클로프로펜 유도체 전구물질 후보군 합성

위와 같이 LCCP 의 전구물질 개발은 LCCP 의 상업화에 가장 핵심 요소라 할 수 있다. 이에 당사는 본 과제를 통하여 다음과 같은 다양한 형태의 신규 전구물질 총 12 종을 디자인, 합성하였다. 화합물들의 구조는 다음과 같다.

No. ER-HCCP-P01	No. ER-HCCP-P02	No. ER-HCCP-P03	No. ER-HCCP-P04
No. ER-HCCP-P05	No. ER-HCCP-P06	No. ER-HCCP-P07	No. ER-HCCP-P08
No. ER-HCCP-P09	No. ER-HCCP-P10	No. ER-HCCP-P11	No. ER-HCCP-P12



각 전구물질 합성 방법 및 분석(NMR) DATA 는 다음과 같다.

① (trans)-1-벤질-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판의 합성

100 ml 3구 둥근 플라스크에 마그네슘 2.02 g과 에틸 에테르 30 ml를 반응기 내에 충전한 상태에서, 2-클로로프로판 6.3 g을 천천히 가하여 그리그나드 용액을 준비하였다. 또 다른 100 ml 3구 둥근 플라스크는, -78°C로 냉각시킨 상태에서 티타늄(IV) 이소프로폭사이드 10.7 g과 비닐트리메틸실란 3.7 g을 가하고, 앞서 준비한 그리그나드 용액을 30 분 동안 천천히 가하였다. 이렇게 준비한 반응용액을 -50°C로 가열한 상태에서 2 시간 동안 세차게 교반한 후, 반응용액을 -50°C로 유지하면서 페닐아세트산 메틸 에스테르 4.8 g을 30 분 동안 천천히 가하였다. 반응용액을, -20°C로 가열한 상태에서 다시 1 시간 동안 세차게 교반한 후, 0°C로 가열한 상태에서 1 시간 더 세차게 교반하였다. 반응용액을 상온으로 가열한 상태에서 진한 소금물 7 ml를 가한 다음, 이를 셀라이트(Celite)를 사용하여 여과하고 셀라이트는 20 ml의 에테르를 사용하여 한 번 더 깨끗이 세척하였다. 이렇게 해서 걸러진 여과액은 무수망초(MgSO₄)를 사용하여 건조한 후, 이를 30°C 이하의 저온에서 용매를 증류함으로써 농축시켰다. 이를 실리카겔을 사용하여 (trans)-1-벤질-1-히드록시-2-(트리메틸실릴)시클로프로판 {1-Benzyl-1-hydroxy-2-(trimethyl -silyl)cyclopropane}을 순수하게 분리하였다.

[¹H-NMR과 ¹³C-NMR]

¹H-NMR (DMSO-d₆,δ): 7.308 (2H, m, J=1.6, 7.2Hz), 7.259 (2H, m, J=1.6, 7.2Hz), 7.172 (1H, m, J=1.6, 7.2Hz), 5.209 (1H, s, b), 2.988 (1H, dd, J=1.2, 14.8Hz), 2.539 (1H, d, J=14.8Hz), 0.832 (1H, ddd, J=1.2, 4.0, 11.6Hz), 0.508 (1H, dd, J=4.0, 8.4Hz), 0.000 (9H, s), -0.022 (1H, dd, J=8.4, 11.6Hz).

¹³C-NMR (DMSO-d₆,δ): 140.839, 129.973, 128.464, 126.386, 59.116, 43.047, 17.332, 14.341, 0.000.

② (trans)-1-(2-페닐에틸)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판의 합성

위 방법에 준하여, 3-페닐프로피온산 메틸 에스테르를 사용하여 (trans)-1-(2-페닐에틸)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판을 얻었고, ¹H-NMR과 ¹³C-NMR 은 다음과 같다.

[$^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3, δ): 7.18~7.33 (5H, m), 2.87~3.04 (2H, m), 2.932 (3H, s), 2.585 (1H, m), 1.719 (1H, m), 1.308 (1H, ddd), 0.716 (1H, dd), 0.440 (1H, dd), 0.000 (9H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3, δ): 141.367, 128.447, 128.395, 125.954, 70.696, 39.770, 37.015, 32.480, 14.921, 12.843, -1.194.

③ (trans)-1-(3-페닐프로필)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판의 합성

위 방법에 준하여, 4-페닐부타노익산 메틸 에스테르를 사용하여 (trans)-1-(3-페닐프로필)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)을 얻었고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 다음과 같다.

[$^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3, δ): 7.26~7.31 (2H, m), 7.15~7.20 (3H, m), 2.900 (3H, s), 2.677 (2H, t), 2.186 (1H, m), 1.85~2.06 (2H, m), 1.432 (1H, m), 1.312 (1H, ddd), 0.647 (1H, dd), 0.435 (1H, dd), -0.003 (9H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3, δ): 141.878, 128.411, 128.368, 125.894, 71.191, 39.895, 35.389, 34.427, 27.865, 14.914, 12.999, -1.287.

④ (trans)-1-(4-페닐부틸)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판의 합성

위 방법에 준하여, 5-페닐펜타노익산 메틸 에스테르를 사용하여 (trans)-(4-페닐부틸)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판을 얻었고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 다음과 같다.

[$^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3, δ): 7.26~7.31 (2H, m), 7.15~7.21 (3H, m), 2.895 (3H, s), 2.646 (2H, t), 2.183 (1H, m), 1.62~1.76 (4H, m), 1.460 (1H, m), 1.317 (1H, ddd), 0.654 (1H, dd), 0.481 (1H, dd), 0.053 (9H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3, δ): 142.298, 128.393, 128.282, 125.714, 71.189, 39.866, 35.779, 34.893, 31.114, 25.718, 15.057, 12.778, -1.187.

⑤ (trans)-1-(5-페닐펜틸)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판의 합성

위 방법에 준하여, 6-페닐헥사노익산 메틸 에스테르를 사용하여 (trans)-1-(5-페닐펜틸)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판을 얻었고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 다음과 같다.

[$^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3, δ): 7.26~7.31 (2H, m), 7.16~7.21 (3H, m), 2.945 (3H, s), 2.631 (2H, t), 2.183 (1H, m), 1.58~1.73 (4H, m), 1.35~1.46 (3H, m), 1.317 (1H, ddd), 0.664 (1H, dd), 0.479 (1H, dd), 0.074 (9H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3, δ): 142.547, 128.371, 128.235, 125.622, 71.319, 39.922, 35.816, 34.979, 31.347, 29.006, 25.997, 14.953, 12.844, -1.172.

⑥ (trans)-1-(3-페녹시프로필)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판의 합성

위 방법에 준하여, 4-페녹시부타노익산 메틸 에스테르를 사용하여 (trans)-1-(3-페녹시프로필)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판을 얻었고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 다음과 같다.

[$^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3, δ): 7.277 (2H, m), 6.956 (1H, m), 6.867 (2H, m), 4.040 (2H, m), 2.971 (3H, s), 2.382 (1H, m), 2.04~2.21 (2H, m), 1.700 (1H, m), 1.336 (1H, ddd), 0.693 (1H, dd), 0.540 (1H, dd), 0.093 (9H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3, δ): 158.761, 129.420, 120.624, 114.340, 70.745, 66.495, 39.926, 31.378, 26.000, 14.914, 12.903, -1.237.

⑦ (trans)-1-(4-페녹시부틸)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판의 합성

위 방법에 준하여, 5-페녹시펜타노익산 메틸 에스테르를 사용하여 (trans)-1-(4-페녹시부틸)-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판을 얻었고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 다음과 같다.

[$^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3, δ): 7.275 (2H, m), 6.894 (1H, m), 6.867 (2H, m), 3.989 (2H, t), 2.952 (3H, s), 2.258 (1H, m), 1.77~1.92 (4H, m), 1.511 (1H, m), 1.347 (1H, ddd), 0.679 (1H, dd), 0.520 (1H, dd), 0.083 (9H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3, δ): 158.926, 129.402, 120.564, 114.426, 71.101, 67.451, 39.916, 34.768, 28.958, 22.840, 15.045, 12.846, -1.185.

⑧ (trans)-1-펜틸-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판의 합성

위 방법에 준하여, 헥사노익산 메틸 에스테르를 사용하여 (trans)-1-펜틸-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판을 얻었고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 다음과 같다.

[$^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3, δ): 2.955 (3H, s), 2.152 (1H, m), 1.2~1.5 (8H, broad m), 0.903 (3H, t), 0.652 (1H, dd), 0.485 (1H, dd), 0.066 (9H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3, δ): 71.469, 39.948, 34.988, 31.586, 25.844, 22.596, 14.961, 14.012, 12.842, -1.182

⑨ (trans)-1-헥실-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판의 합성

위 방법에 준하여, 헵타노익산 메틸 에스테르를 사용하여 (trans)-1-헥실-1-(메탄설폰닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판을 얻었고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 다음과 같다.

[$^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3, δ): 2.955 (3H, s), 2.148 (1H, m), 1.2~1.5 (10H, broad m), 0.888 (3H, t), 0.653 (1H, dd), 0.485 (1H, dd), 0.068 (9H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3, δ): 71.495, 39.959, 35.049, 31.750, 29.081, 26.126, 22.579, 14.973, 14.034, 12.872, -1.176

⑩ (trans)-1-옥틸-1-(메탄설포닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판의 합성

위 방법에 준하여, 노나노익산 메틸 에스테르를 사용하여 (trans)-1-옥틸-1-(메탄설포닐옥시)-2-(트리메틸실릴)시클로프로판을 얻었고, $^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$ 은 다음과 같다.

[$^1\text{H-NMR}$ 과 $^{13}\text{C-NMR}$]

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3, δ): 2.946 (3H, s), 2.143 (1H, m), 1.53~1.65 (2H, b), 1.403 (1H, m), 1.23~1.35 (11H, broad m), 0.871 (3H, t), 0.645 (1H, dd), 0.476 (1H, dd), 0.060 (9H, s).

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3, δ): 71.453, 39.959, 39.923, 35.007, 31.799, 29.494, 29.385, 29.202, 26.132, 22.617, 14.941, 14.059, 12.822, -1.203

3. 1-알킬시클로프로펜 유도체 전구물질의 합성 조건 최적화

이 방법을 실제로 실현하기 위해서는 우선 전구물질에 대한 대량 생산 가능성을 고려할 필요가 있다고 판단하였다. 따라서, 경제성 있는 방법으로 대량 생산 가능한 합성 scheme을 디자인하여 전구물질 합성 scheme을 확립하였다.

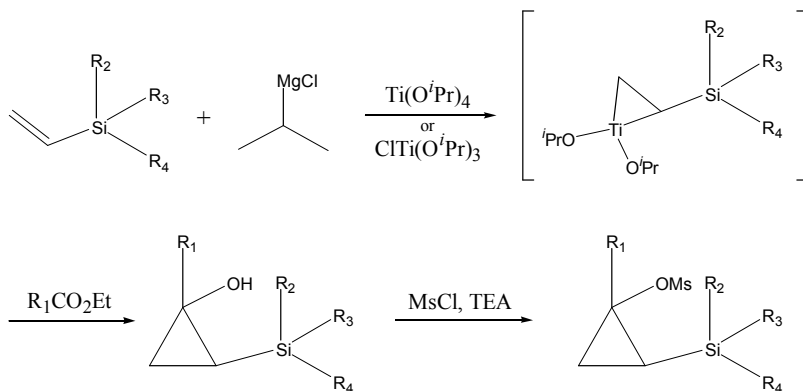
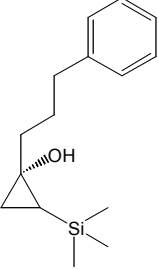
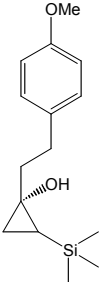
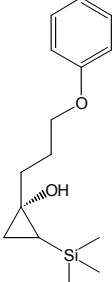
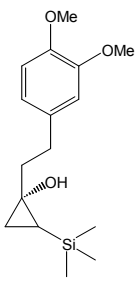


그림 4. 전구물질 합성과정 최적화

또한 만들어진 전구물질을 대상으로 재결정 과정을 통해서 정제가 가능한 물질을 우선 선별하고자 하였다. 이때, 실제로 Mesylates보다는 2-Trimethylsilyl cyclopropan-2-ol을 대상으로 재결정 과정에 적합한 물질을 선별하고자 하였다. 이는 재결정 과정을 고려할 때 충분히 예상 가능할 뿐만 아니라 실제 실험 결과도 Mesylates보다는 2-Trimethylsilylcyclopropan-2-ol의 경우에 재결정이 잘 되는 것을 확인할 수 있었다. 앞서 열거한 총 14종의 유도체 가운데 실제로 재결정이 가능한 물질은 다음과 같다.

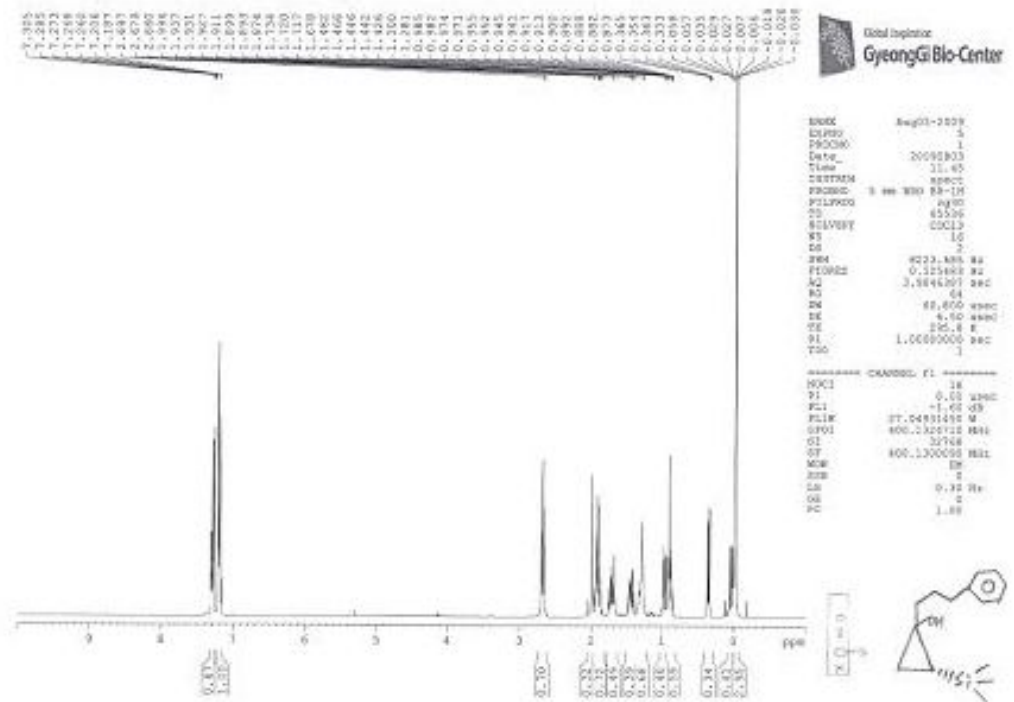
가. 재결정 가능 물질

No. ER-HCCP-02	No. ER-HCCP-05	No. ER-HCCP-08	No. ER-HCCP-06
			

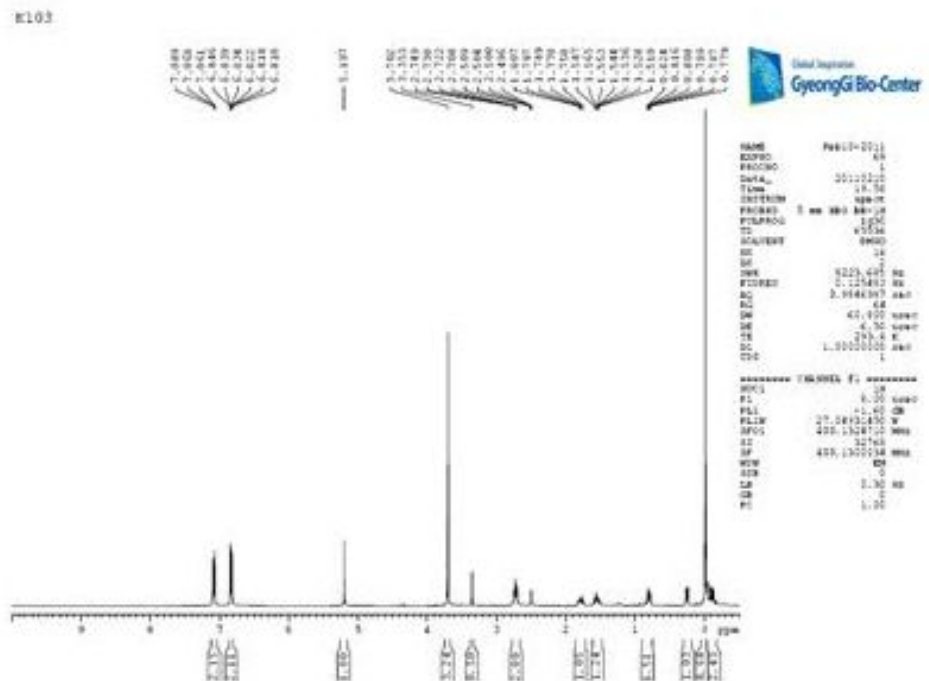
Compound	ER-HCCP-02	ER-HCCP-05	ER-HCCP-08	ER-HCCP-06
M.P.	~30℃	< 10℃	< 10℃	< 10℃
Re-crystallization Yield	17g / 100g	25g / 100g	50g / 100g	< 5g / 100g
Efficacy	Confirmed	Not Yet	Not Yet	Not Yet

나. 재결정 가능한 화합물들의 NMR DATA

1. No. ER-HCCP-02



2. No. ER-HCCP-05



4. 제형화 TEST를 통한 제형화 방법 결정

위에서 기술한 대로 재결정이 가능한 화합물을 대상으로 Ethylene antagonist로의 효능을 test

하기로 하였다. 이것은 재결정이 가능한 화합물이 대량 생산 시 순도를 확보하기 용이하고, 발생장치 내에서도 Formulation 되기 쉽기 때문이다. 제형화 Test는 다음과 같이 진행하였다.

가. 제형화 TEST

1-알킬시클로프로펜은 안정성이 낮아서 초저온 조건에서만 저장할 수 있다. 따라서, 본 과제에서 개발한 실리콘을 함유한 1-알킬시클로프로펜 전구물질을 이용하여 합성하고 합성과 동시에 계면활성제를 사용하여 곧바로 제형화 과정을 진행하여야 한다. 이에 다양한 용매 및 계면활성제에서의 제형화 조건을 test 하였으며, 경제성, 편리성 등을 고려하여 제형화 방법을 결정하였다. 즉 현장에서(in situ), 1-알킬시클로프로펜 전구물질 2.0 mmol을 DMSO 2.0 ml에 녹이고, $\text{Bu}_4\text{NF}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$ 0.94g을 가하고 상온에서 1 시간 동안 세차게 교반한다. 반응용액으로 톨루엔 8.0 ml와 물 5.0 ml를 가하고 5 분간 세차게 교반한 다음 방치한다. 혼합물로부터 톨루엔 층(상층)과 물 층(하층)으로 나뉘어지면 톨루엔 층만 분리하여 취하고 물 층은 폐기한다. 톨루엔 층에 Sodium dodecylbenzenesulfonate 1.0 g, 계면활성제 1.0g을 가하고 5 분간 교반한 다음, 다시 물 2.0 l를 가한 상태에서 전체가 고르게 혼합되도록 천천히 교반한다. 이렇게 함으로써 1-알킬시클로프로펜 1.0 mM 농도의 제형을 준비한다. 이 용액은 필요에 따라서 1 ~ 100 배로 희석하여 사용한다.

제 2 절 발생장치를 기초로 한 기구적 설계 및 테스트용 시제품 제작

위에서 설명한 대로 1-알킬시클로프로펜은 상온에서 반응성이 큰 물질이므로 1-알킬시클로프로펜 전구물질과 Activator (불소이온)를 *in-situ* 로 반응시켜 처리하고자 하는 농작물에 사용 직전 살포하는 방법으로 고안되었다. 따라서 전구물질과 Activator를 혼합시키고 발생시키는 발생장치 개발이 필수적이다. 후보물질 디자인 및 합성을 완료한 뒤 발생장치 개발을 위하여 기구설계 및 목업설계 또 목업제작을 거쳐 시제품 제작을 실시하였다. 당사는 이미 1-MCP 발생장치 개발을 통하여 전구물질과 Activator를 *in-situ* 로 반응시켜 처리하는 기구설계 및 개발성공 경험을 보유하고 있어 시제품 제작이 용이 하였다. 다만 1-MCP 발생장치와의 다른점은 액상 시클로프로펜 발생을 위해서는 층분리(유기용매와 수용액)과정과 계면활성제와의 Formulation 과정이 필요하여 이 2가지 단계를 추가로 더 작동시킬 수 있는 기구를 설계하였다. 기구 설계의 개념도는 다음과 같다. 당사가 신규 고안한 1-알킬시클로프로펜 유도체 발생장치는 다음과 같은 step 으로 작동하게 된다.

- Step 1. Chamber 1에는 불소이온함유 물질, Chamber 2 에는 1-알킬시클로프로펜 전구물질 보관
- Step 2. Air bubbling을 통해 Chamber 1 의 불소이온을 함유하는 물질이 1-알킬시클로프로펜 전구물질이 들어 있는 Chamber 2 로 이동
- Step 3. 두 물질이 혼합되어 반응을 일으키면 1-알킬시클로프로펜유도체가 생성
- Step 4. 생성된 1-알킬시클로 프로펜 유도체는 air bubbling을 통해 수용액과 유기용매가 혼합되어 있는 Chamber 3으로 이동

- Step 5. 1-알킬시클로프로펜 유도체는 유기용매 phase 에, 부산물은 수용액 phase 로 층 분리가 일어남.
- Step 6. 1-알킬시클로프로펜 유도체를 함유한 유기용매 phase를 계면활성제가 보관되어 있는 Chamber 4 로 이송되어 혼합
- Step 7. Chamber 4에서 formualtion 이 완료.

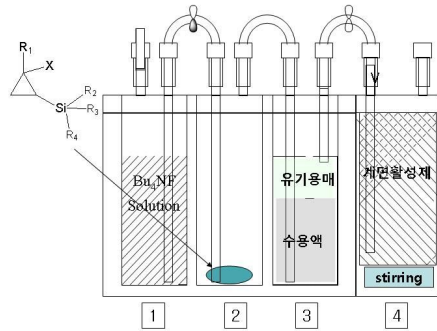


그림 5. 1-알킬시클로프로펜유도체 분무장치 개념도

이렇게 하여 *in-situ* 로 만들어진 적절하게 희석된 1-알킬시클로프로펜유도체는 분무장치를 통하여 직접 field 에 살포할 수 있게 된다. 위와 같은 개념을 구현하기 위하여 당사는 1차년도에 연구를 통하여 실험실 수준에서 그 가능성을 타진하였고 그 결과를 바탕으로 도면설계 3D 설계를 거쳐 1차 목업제작을 완료하였고, 2차년도 시제품 제작을 완료하였다.

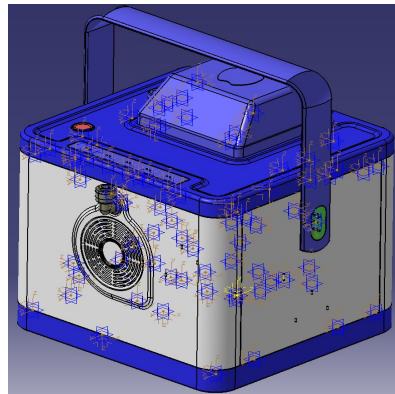


그림 6. 1-알킬시클로프로펜 유도체 발생장치 설계도

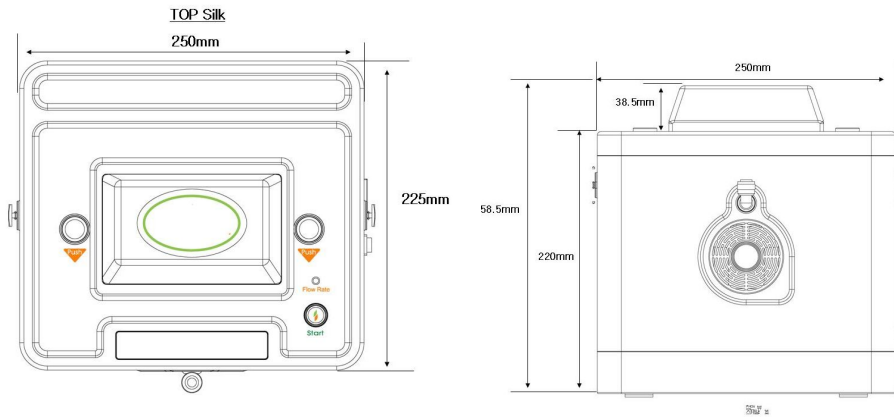


그림 7. 1-알킬씨클로프로펜 분무장치 설계도

위의 설계도를 바탕으로 1차 목업(Mock-up) 제작을 실시하였다. 1차 목업제품을 통하여 1-알킬씨클로프로펜 분무장치의 상품화 가능성을 타진할 수 있었다. 기구디자인 및 사출성형 파트와 전자파트의 설계는 외주를 주어 제작하였으며, 다음과 같은 Conceptual Mock-up 제품을 얻을 수 있었다.

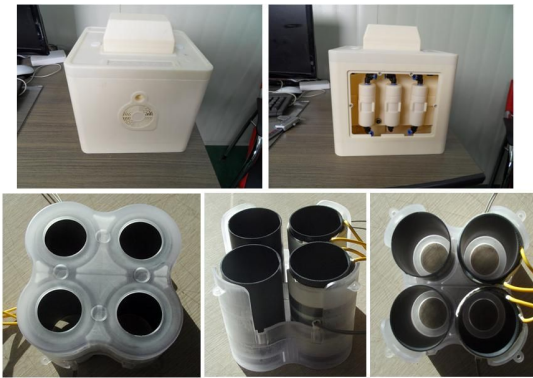


그림 8. 1-알킬씨클로프로펜 분무장치1차 목업 시제품

또한 1 차년도에 디자인 된 목업 시제품을 실제 금형을 제작 시사출하여 다음과 같은 발생장치 및 카트리지를 제작 조립하였다.



그림 9. 제작된 시제품

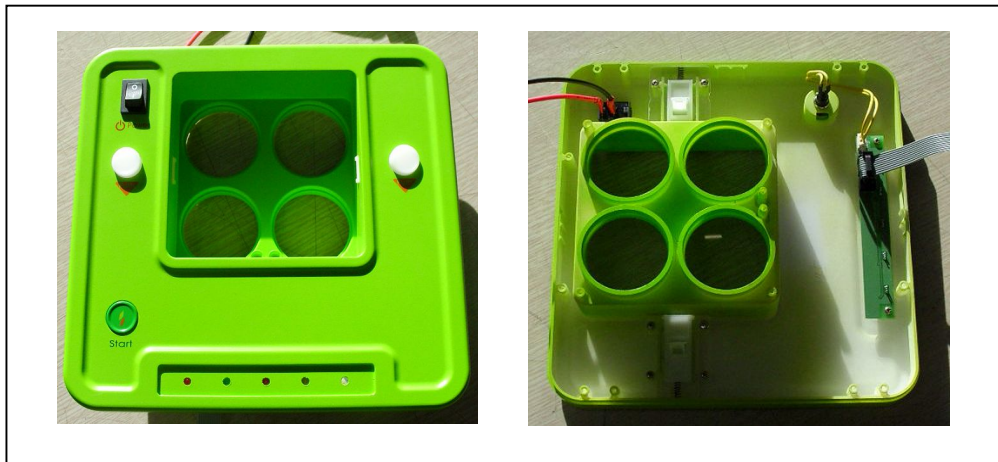
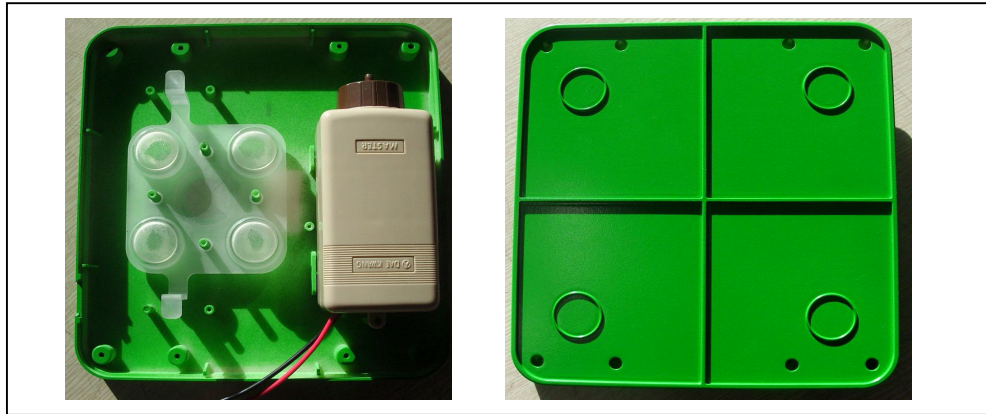


그림 10. 시제품의 Top 과 bottom 공간활용을 위해서 반응용기 병렬배치

제작된 발생장치 및 카트리지에 전구물질 및 발생용액을 채우고 1-알킬씨클로프로펜 유도체 발생 실험 진행결과 전구물질과 발생용액이 혼합되는 것은 확인하였으나 제형화 단계에서 유기용매와 수용액이 충분히 혼합되었다가 충분히리가 되는 과정에서 매끄럽지 못해, 실제 씨클로프로펜 유도체가 발생되지 않는 것을 분석을 통해 확인하였다. 이에 Reaction time을 빠르게 조절하는 방법으로 문제를 해결 할 수 있을 것으로 예측하고 효능평가를 진행할 때에는 좀더 강력한 Motor를 이용하여 전구물질과 발생용액을 함께 넣고 강제로 휘발시키는 방법으로 진행하였다. 이 방법을 통하여서는 효능평가 결과 예측한 대로 에틸렌 저해 효과를 확인할 수 있었다. 따라서 2차 시제품 제작시에는 Reaction time을 빠르게 조절하여 시제품을 제작해 보고자 한다. 1차 시제품은 성공하지 못했지만 이번 시제품 제작을 통하여서 제형화 방법(빠르게 충분히 되도록) 또한 새로운 방법이 시도되어야 할 것이라는 결론을 도출하였던 것도 큰 성과라고 할 수 있다.



모터를 이용하여
강제로 휘발시킴

그림 11. 실제 효능실험에 사용된 모터 및 실험 현장

제 3 절 효능 Test를 실시하기 위한 기초 효능실험

후보 물질들의 작물 스트레스에 대한 내성 및 생육 증진 효과를 보기 위해 기초 효능실험을 실시하고자 하였다. Ethylene antagonist로서의 효능을 테스트하기 위해 1-알킬씨클로프로펜의 농도를 1.0 mM 농도의 제형을 사용하여 1.0 mM, 100 μ M 용액을 준비한 다음, 아무 것도 처리하지 않은 무처리군, surfactant (Sodium dodecylbenzenesulfonate, Tristyrenylphenyl (ethoxy)₁₂ ethanol)만 녹여서 처리한 대조군과 약효를 비교하여 보았다. 대상 과일은 토마토로 선정하였고, 토마토(Tomato)는 꼭지점 부분이 핑크 빛으로 착색되기 시작한 토마토를 선별하여 수확한 다음, 4 개씩 한 조로 묶어서 각각 무처리군, 대조군 (surfactant), 서로 다른 농도의 처리군 1 (100 μ M), 처리군 2 (1.0 mM) 등 4 개 군으로 나누었다. 앞서 제조한 제형의 약제를 가정용 분무기를 사용하여 토마토 표면을 흠뻑 적실 정도로 처리하고서 상온 (25 ~ 30°C)에서 3 일간 방치하면서 개방된 공간에서 토마토가 붉게 착색되어 정도를 0 ~ 5로 평가하였다. 이때, 토마토의 윗면이 붉은색으로 빠르게 착색되는 반면에 아랫면은 상대적으로 훨씬 느리게 착색되기 때문에 착색되는 정도의 차이를 보다 명확히 평가하기 위해서 토마토가 붉게 착색된 빛깔이 아닌 붉게 착색된 면적을 기준으로 평가하였다. 즉, 토마토의 표면이 핑크 빛으로 착색된 면적이 10% 이하일 때는 '0', 토마토의 표면이 완전히 붉은색으로 착색된 면적이 10 ~

40%일 때 '1', 토마토의 표면이 붉은색으로 착색된 면적이 40 ~ 70%일 때 '2', 토마토의 표면이 붉은색으로 착색된 면적이 70% 이상이고 밑면의 10% 이상이 녹색으로 남아있을 때 '3', 토마토 표면의 대부분이 붉게 착색되었지만 밑면의 일부(0 ~ 10%)만이라도 녹색으로 남아있을 때 '4', 토마토 전체 표면에서 녹색이 완전히 사라졌을 때 '5' 등으로 나누어 점수를 부여하였다. 따라서 숫자가 클수록 토마토는 상대적으로 숙성된 정도가 높은 상태를 의미한다. 총 5개의 후보물질에 대하여 토마토 효능시험을 실시하였고 시험 결과는 아래의 표에 정리하였다.

① 1-헥실시클로프로펜 제형의 토마토 효능 시험

경과일	무처리군	대조군	처리군 1 (100µM)	처리군 2 (1.0mM)
0 일	0 0 1 2	0 0 1 2	0 0 1 2	0 0 1 2
1 일	1 2 3 4	1 2 4 4	1 2 3 3	0 1 2 3
2 일	2 3 4 5	3 4 4 5	2 2 3 4	1 1 3 3
3 일	5 5 5 5	5 5 5 5	4 4 4 5	2 2 3 3

② 1-(옥틸)시클로프로펜 제형의 토마토 효능 시험

경과일	무처리군	대조군	처리군 1 (100µM)	처리군 2 (1.0mM)
0 일	0 0 1 2	0 0 1 2	0 0 1 2	0 0 1 2
1 일	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 2 3	0 1 2 3
2 일	3 3 4 5	3 4 4 5	2 2 3 4	1 2 3 3
3 일	5 5 5 5	5 5 5 5	3 4 4 4	2 3 3 3

③ 1-(3-페틸프로필)시클로프로펜 제형의 토마토 효능 시험

경과일	무처리군	대조군	처리군 1 (100µM)	처리군 2 (1.0mM)
0 일	0 0 1 2	0 0 1 2	0 0 1 2	0 0 1 2
1 일	1 2 3 4	1 2 3 4	1 2 3 3	0 1 2 3
2 일	3 4 4 5	3 4 4 5	2 3 4 4	1 2 3 3
3 일	5 5 5 5	5 5 5 5	3 4 4 5	2 3 3 4

④ 1-펜틸시클로프로펜 제형의 토마토 효능 시험

경과일	무처리군	대조군	처리군
0 일	0 0 1 2	0 0 1 2	0 0 1 2
1 일	1 2 3 4	1 2 4 4	0 1 1 2
2 일	2 3 4 5	3 4 4 5	1 1 1 2
3 일	5 5 5 5	5 5 5 5	1 2 2 3

⑤ 1-메틸시클로프로펜 제형의 토마토 효능 시험

경과일	무처리군	대조군	처리군
0 일	0 0 1 2	0 0 1 2	0 0 1 2
1 일	1 2 3 4	1 2 3 4	0 0 1 2

2 일	2	3	4	5	3	4	4	5	0	1	1	3
3 일	5	5	5	5	4	5	5	5	0	1	1	3



1. 대조구 2. 계면활성제만 처리했을 경우, 3. HCCP 를 100µmol 처리했을 경우, 4. HCCP 를 1.0 mmol 처리했을 경우

그림 12. 1-알킬씨클로프로펜유도체 효능실험 결과

제 4 절 작물 스트레스에 대한 내성 및 생육 증진 효과 (위탁)

위에서 실시한 기초 효능 실험을 바탕으로 본 연구팀은 1-알킬씨클로프로펜 유도체가 예측한 대로 Ethylene Antagonist로서의 역할을 할 수 있다는 실험결과를 도출해 낼 수 있었고, 보다 세밀한 정성, 정량적인 Ethylene antagonist로서의 가능성을 보기 위하여 서울대학교 김도순 교수 연구팀의 위탁연구를 통해 후보물질들의 작물 스트레스에 대한 내성 및 생육 증진효과를 보기 위한 Test를 진행하였다. 그 내용 및 결과는 다음과 같다.

1. 과실 작물의 저장성에 미치는 Cyclopropene 화합물의 효과

가. 1-MCP의 과실 저장성 효과

국내 주요 재배품종인 ‘호용’을 녹숙기에 수확하여 0, 1, 3, 9ppm 농도의 1-MCP 농도로 밀폐 조건에서 24시간동안 처리한 후 20℃ 항온조건에서 저장하면서 2일 간격으로 과실의 호흡량, 에틸렌(C₂H₄) 발생량, 착색진전정도, 경도 등의 품질 요인의 변화를 조사한 결과 다음과 같았다.

(1) Ethylene 생성 및 호흡에 미치는 영향

토마토 과실에 1-MCP를 1, 3, 9 ppm 농도로 처리한 후 16일 동안 ethylene 생성량과 호흡량을 측정된 결과 그림-1과 같이 1-MCP 처리가 ethylene 생성과 호흡량을 현저히 감소시키는 것을 확인하였다. 특히, 16일차의 ethylene 생성억제는 1-MCP 농도와 비례하여 증가하였으며(그림-13A), 호흡량의 경우는 무처리 대비 1 ppm 이상의 농도에서 농도별 차이 없이 호흡을 현저히 감소시켰다(그림-13B).

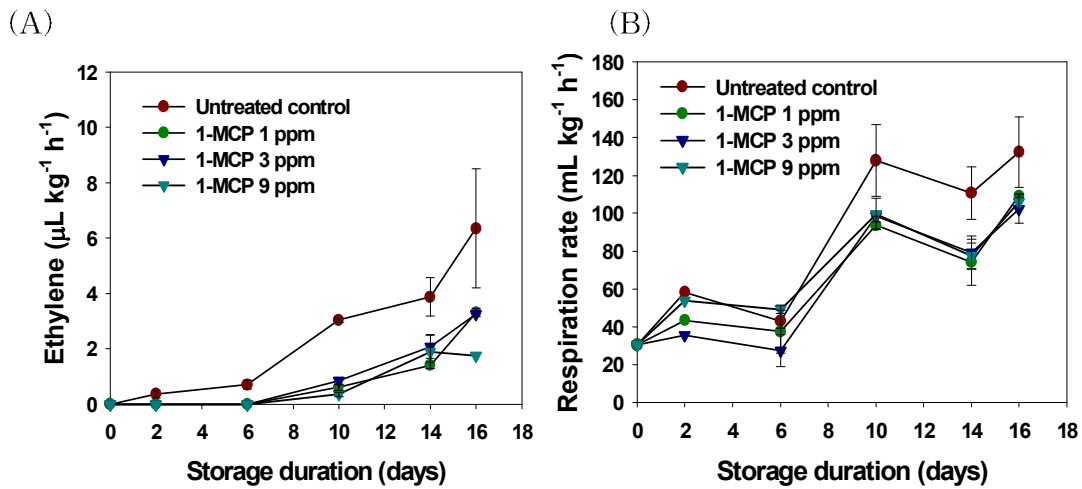
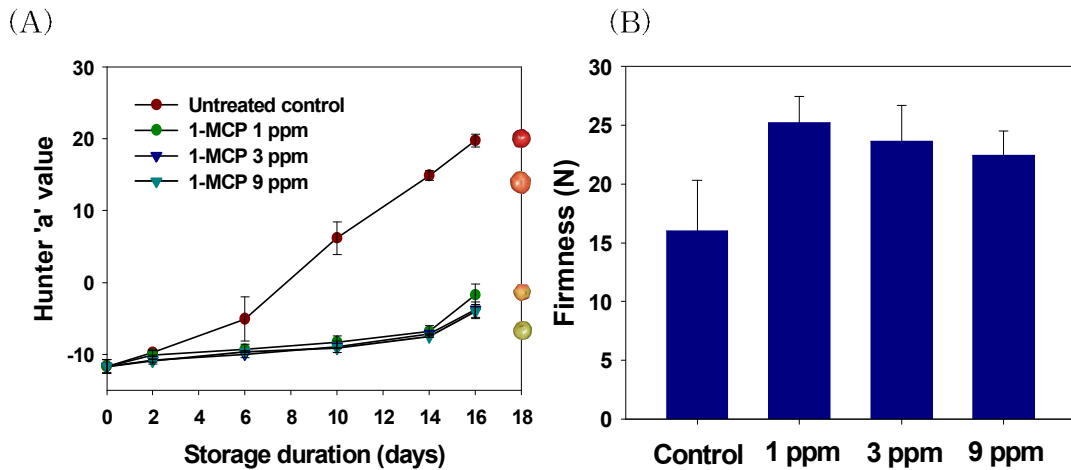


그림 13. 1-MCP 처리 농도별 토마토 과실 저장기간에 따른 ethylene생성(A) 및 호흡량(B)의 변화

(2) 저장 과실의 품질에 미치는 영향

토마토 과실에 1-MCP를 1, 3, 9 ppm 농도로 처리한 후 16일 동안 착색도(Hunter 'a' value)와 16일차에 토마토 과실의 경도와 당도를 조사한 결과 그림13와 같았다.

착색도에 있어서는 처리후 16일 동안 1-MCP 처리구에서 hunter 'a'값이 무처리구보다 현저히 낮았으며 처리 농도간에는 농도의 증가에 따라 착색도가 낮았지만 큰 차이는 없었다(그림-14A). 처리후 16일차에 과실 경도를 측정된 결과 경도에 있어서도 1-MCP 처리구가 무처리구보다 높았으나 처리 농도간의 유의적인 차이는 없는 것으로 판단되었다(그림-14B). 반면에 당도의 경우는 1-MCP 처리구와 무처리구 간의 유의적인 차이는 없었다(그림-14C).



(C) (D)

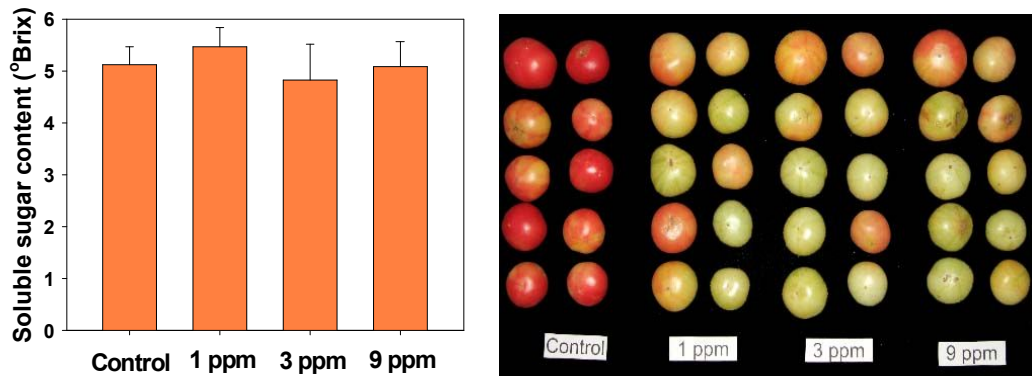


그림 14.. 1-MCP 처리농도별 토마토 착색도(A), 경도(B), 당도(C)와 1-MCP 처리후 16일차 토마토 과실의 모습(D)

종합적으로 1-MCP는 1 ppm의 농도에서도 토마토 과실의 저장성을 현저히 증진시키는 것으로 판단되었으며 그 증진효과는 농도에 따라 증가하는 경향이었으나 큰 차이는 없었다(그림-14D). 본 결과를 바탕으로 LCCP의 토마토 과실 저장성에 미치는 영향 평가에 1 ppm 1-MCP 처리를 대조구로 설정하기로 잠정 결론하였다.

나. Long chained cyclopropene (LCCP) 화합물의 과실 저장성 효과

토마토(품종: 호용)를 녹숙기에 수확하여 1-MCP(대조)와 LCCP를 밀폐조건에서 일정시간 동안 처리한 후 20℃ 항온조건에서 저장하면서 2일 간격으로 과실의 호흡량, 에틸렌(C₂H₄) 발생량, 착색도, 경도, 당도 등의 품질 요인의 변화를 조사한 결과 다음과 같았다.

(1) PPCP (1-(3-Phenylpropyl)cyclopropene)의 과실 저장성 효과

(가) Ethylene 생성 및 호흡에 미치는 영향

토마토 과실에 1-MCP(대조)를 1, 2 ppm, PPCP를 2, 4, 8, 16 ppm 농도로 처리한 후 8 일 동안 ethylene 생성량과 호흡량을 측정된 결과 그림-14과 같이 PPCP와 1-MCP처리는 ethylene 생성량과 호흡량을 현저히 감소시켰다. PPCP 처리는 무처리와 비교하여 2 ppm에서 효과적으로 ethylene 생성량을 감소시켰으며 1-MCP 1 ppm에서보다 높은 ethylene 생성량이 유지되었다(그림-15A). 흥미롭게도 PPCP 처리에 따른 감소효과는 2 내지 8 ppm에서 차이는 크지 않았으나 처리 후 4일차에 16 ppm에서의 효과는 8 ppm 이하에서보다 현저하게 차이가 있었다. 호흡량에 있어서는 처리 후 8일차에 PPCP 처리는 2 ppm 이상에서 농도별 차이 없이 무처리보다 호흡량을 감소시켰으며 1-MCP 1 ppm 처리보다 호흡량을 감소시키지 못하였다(그림-15B).

(A)

(B)

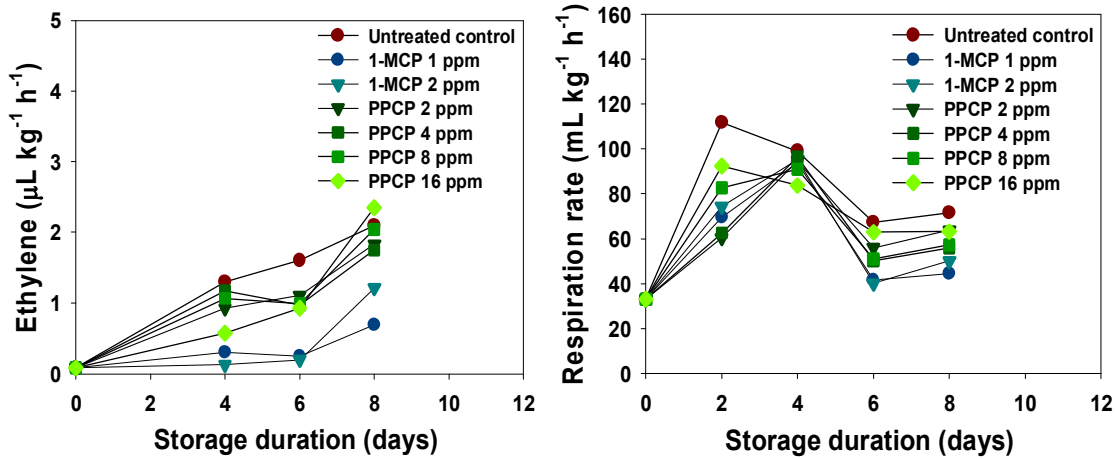


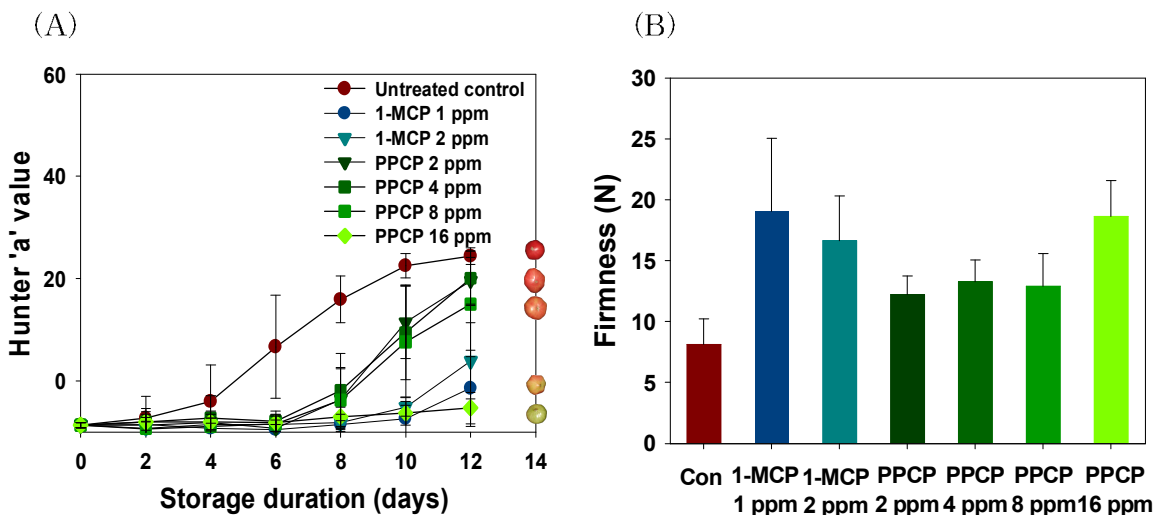
그림 15. 1-MCP (대조)와 PPCP 처리 농도별 토마토 과실 저장기간에 따른 ethylene 생성(A) 및 호흡량(B)의 변화

(나) 저장 과실의 품질에 미치는 영향

토마토 과실에 1-MCP(대조)를 1, 2 ppm, PPCP를 2, 4, 8, 16 ppm 농도로 처리한 후 12일 동안 착색도(Hunter 'a' value)와 12일차에 토마토 과실의 경도와 당도를 조사한 결과 그림-16과 같았다.

착색도의 경우 PPCP 처리는 처리 후 12일 동안 hunter 'a'값이 무처리구보다 현저히 낮았으며 처리 후 6일까지는 PPCP와 1-MCP 처리 간 차이가 없었으나 8일차부터 PPCP와 1-MCP 처리 농도간 차이가 나타났다(그림-16A). 특히, 처리후 12일차에는 PPCP 16ppm은 8ppm이하에서보다 현저하게 낮은 착색도를 유지하였으며 1-MCP 1ppm과 큰 차이가 없었다.

처리후 12일차에 과실 경도를 측정된 결과 경도에 있어서도 PPCP 처리는 무처리보다 현저하게 높았으며 PPCP 16 ppm에서 1-MCP 1 ppm이상과 유의적인 차이가 없이 높은 경도를 나타냈다(그림-16B). 반면에 당도의 경우는 PPCP와 1-MCP 및 무처리구 간의 유의적인 차이는 없었다(그림-16C).



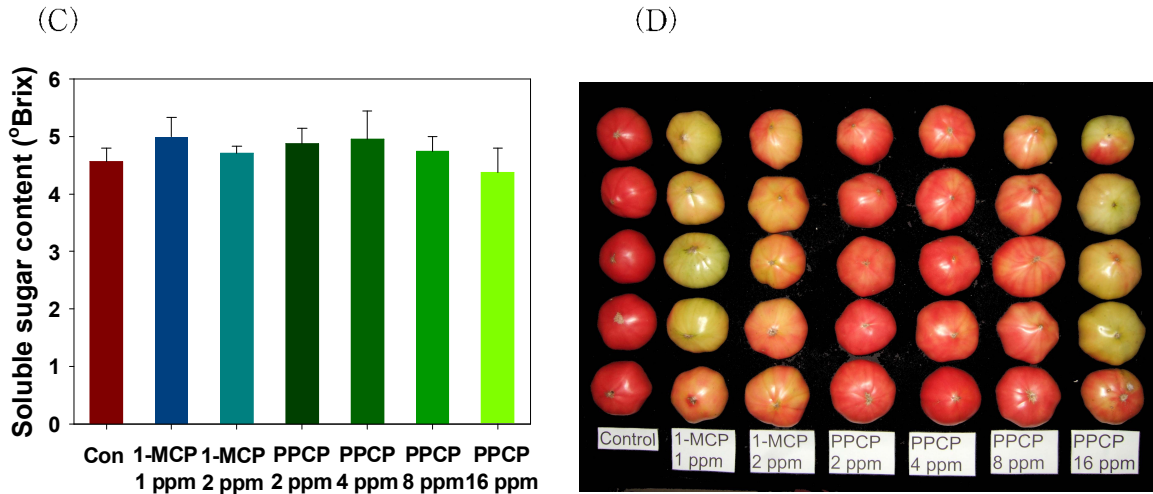


그림 16. PPCP와 1-MCP 처리농도별 토마토 착색도(A), 경도(B), 당도(C)와 PPCP와 1-MCP 처리후 12일차 토마토 과실의 모습(D)

종합적으로 PPCP는 2 ppm의 농도에서도 토마토 과실의 저장성을 현저히 증진시키는 것으로 판단되었으며 그 증진효과는 농도에 따라 증가하는 경향이었으나 PPCP 16 ppm에서 1-MCP 1 ppm와 같은 효과를 나타냈다(그림-16D).

(2) 다양한 Long chained cyclopropene (LCCP) 화합물의 과실 저장성 효과

(가) Ethylene 생성 및 호흡에 미치는 영향

토마토 과실에 1-MCP (대조)를 0.25, 0.5 ppm, PPCP를 0.5 ppm, POPCP (1-(3-Phenoxy propyl)cyclopropene), MPECP (1-(2-(4-Methoxyphenyl)ethyl)cyclopropene), OCP (1-Octylcyclopropene)를 2 ppm의 농도로 처리한 후 32 일 동안 ethylene 생성량과 호흡량을 측정된 결과 그림-17과 같이 LCCP와 1-MCP처리는 처리후 8일차까지 ethylene 생성량과 호흡량을 현저히 감소시켰다. Ethylene 생성량의 경우 PPCP 처리는 무처리와 비교하여 0.5 ppm 에서도 효과적으로 ethylene 생성량을 감소시켰으며 POPCP와 MPECP 및 OCP 처리 역시 2 ppm의 농도에서 무처리 대비 감소된 ethylene 생성량을 나타냈다. 다만, PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리의 ethylene 생성량은 1-MCP 0.25 ppm 이상에서보다 높았다(그림17-A). 호흡량의 경우는 PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리는 처리 간 차이 없이 무처리 대비 호흡량을 처리 후 16일차 전까지 현저히 감소시켰다(그림17-B).

(A)

(B)

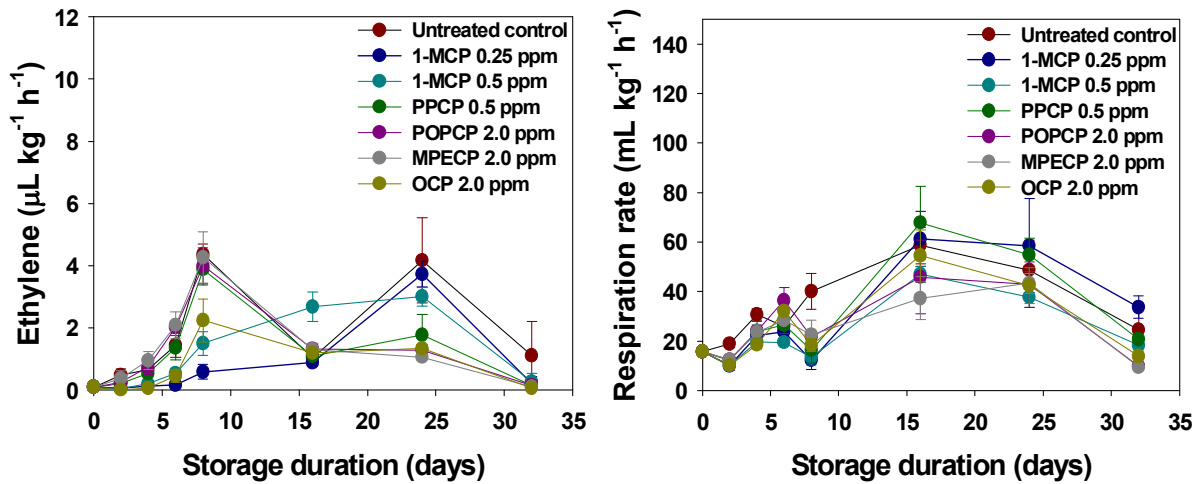


그림 17. 1-MCP (대조)와 LCCP 처리 농도별 토마토 과실 저장기간에 따른 ethylene생성 (A) 및 호흡량(B)의 변화

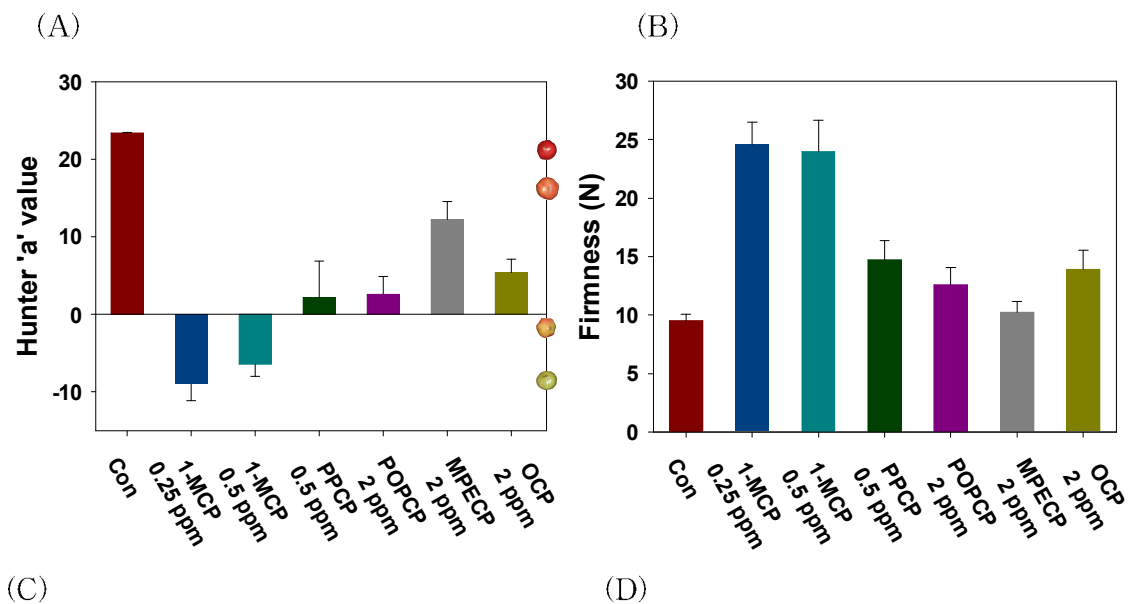
(나) 저장 과실의 품질에 미치는 영향

1-MCP (대조)를 0.25, 0.5 ppm, PPCP를 0.5ppm, POPCP, MPECP, OCP를 2 ppm의 농도로 처리한 후 16일차에 토마토 과실의 착색도(Hunter 'a' value)와 경도 및 당도를 조사한 결과 그림-18과 같았다.

착색도의 경우 LCCP 처리의 hunter 'a'값이 무처리보다 현저히 낮았으나 1-MCP 0.25 ppm이 상보다 높게 나타났으며 MPECP를 제외하고 PPCP와 POPCP 및 OCP 처리간 차이가 없었다 (그림-18A).

경도의 경우에는 LCCP 처리가 무처리보다 높았으며 1-MCP 0.25 ppm이상보다 낮게 나타났다 (그림-18B).

반면, 당도의 경우는 LCCP와 1-MCP 및 무처리구 간의 유의적인 차이는 없었다(그림-18C).



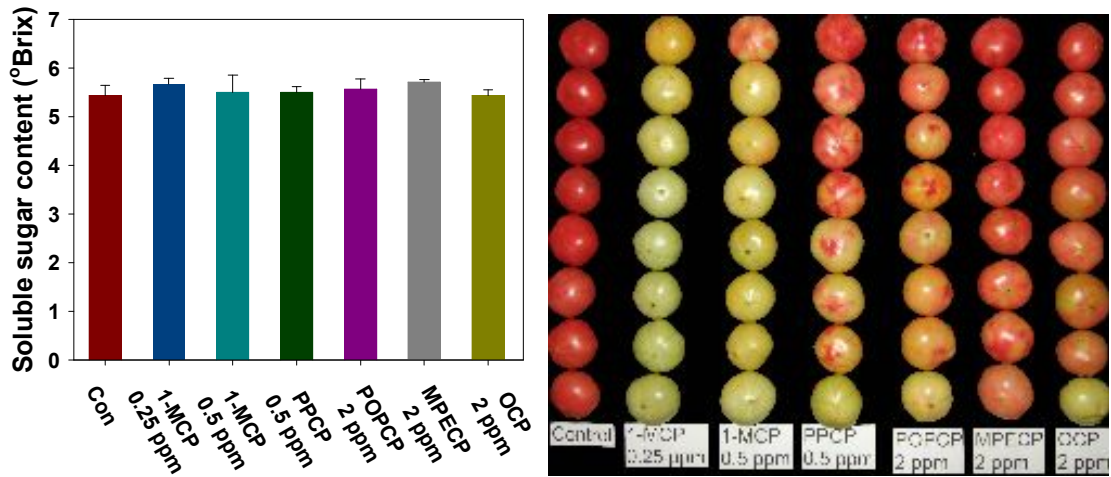


그림 18. 1-MCP (대조)와 LCCP 처리 농도별 토마토 착색도(A), 경도(B), 당도(C)와 1-MCP와 LCCP 처리후 16일차 토마토 과실의 모습(D)

종합적으로 PPCP, POPCP, MPECP, OCP는 토마토 과실의 저장성을 증진시키는 것으로 파악되었으며 그 지연 정도는 1-MCP 0.25 ppm > PPCP 0.5 ppm > POPCP와 OCP 2 ppm > 무처리 순으로 높았다. 따라서 cyclopropene계열 화합물을 토마토 과실에 처리함으로써 토마토 과실의 등숙을 지연시킬 수 있음을 확인하였다(그림18-D).

2. 등숙기에 처리한 Cyclopropene 화합물의 효과

가. 토마토에 미치는 영향

(1) 등숙기 1-MCP 처리의 효과

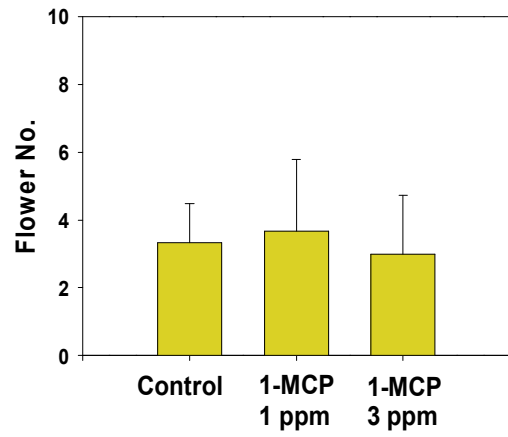
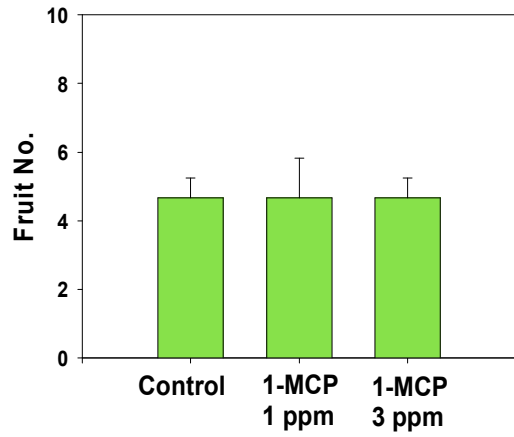
토마토(품종: 호용)를 온실조건에서 재배하여 직경이 40 mm 이상인 과실이 제 2화방까지 달린 등숙기(mature green 단계)에 (주)이룸바이오테크놀러지 사가 개발한 1-MCP를 발생시켜 1-MCP를 0, 1, 3 ppm 농도로 밀폐조건에서 24시간 동안 처리한 후 30/20°C(낮/밤) 온실조건에서 30일간 생육시킨 후 토마토의 착과수, 개화수, 초장, 광합성, 엽록소함량 등의 일반 생육요인의 변화와 과실의 착색도, 경도, 직경 등의 품질 요인의 변화를 조사한 결과 다음과 같다.

(가) 일반 생육에 미치는 영향

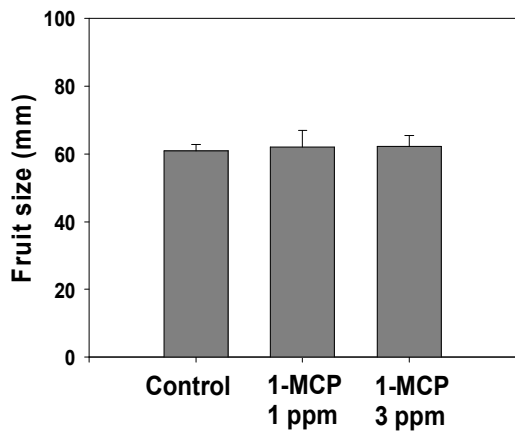
토마토에 1-MCP를 0, 1, 3 ppm 농도로 처리한 후 30일차에 조사한 결과 그림-19과 같이 1-MCP 처리는 착과수, 개화수, 과실의 직경 및 과실중에 있어서 무처리와 차이가 없었으며 3 ppm 이하에서 과실 생육에 부정적인 영향을 끼치지 않음을 확인하였다.

(A)

(B)



(C)



(D)

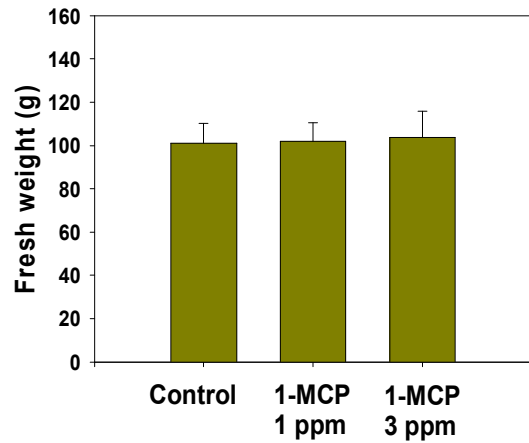
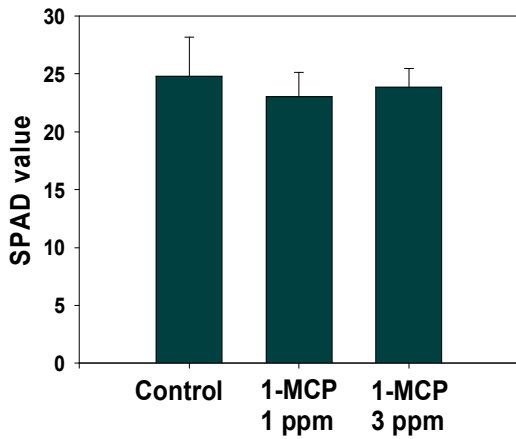


그림 19. 1-MCP 처리농도별 토마토 착과수(A), 개화수(B), 과실직경(C), 과실중(D)의 처리 후 30일차 결과

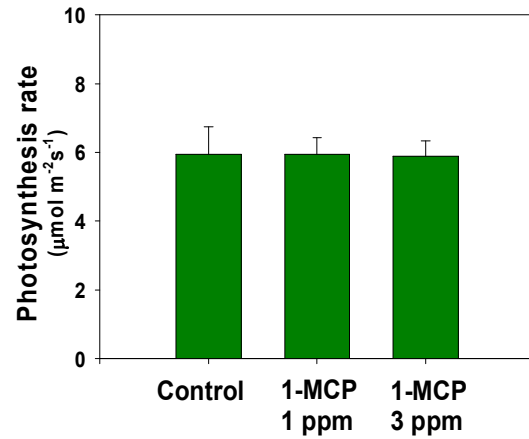
또한, 그림 19과 같이 1-MCP 처리는 토마토 잎의 엽록소함량(SPAD value), 광합성, 초장에 있어서 무처리와 차이가 없었으며 3 ppm 이하에서 기본 영양생육에 부정적인 영향을 끼치지 않음을 확인하였다.

(A)

(B)



(C)



(D)

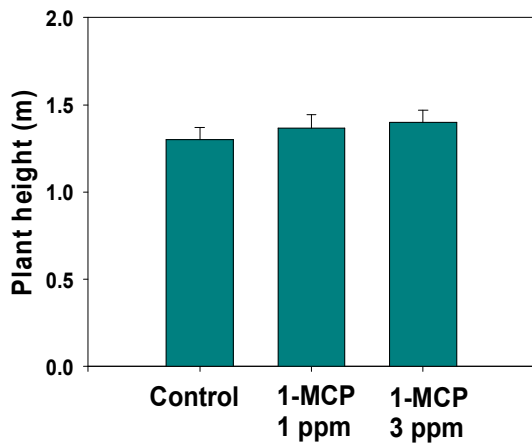


그림 19. 1-MCP 처리농도별 토마토 잎의 엽록소 함량(SPAD value)(A), 광합성(B), 초장(C)와 1-MCP 처리후 30일차 토마토의 모습(D)

(나) 과실 품질에 미치는 영향

1-MCP 처리 후 30일차에 수확하여 토마토 과실의 착색도(Hunter 'a' value), 경도, 당도를 조사한 결과 그림-20와 같았다.

착색도에 있어서는 1-MCP 3 ppm 처리에서 hunter 'a'값이 무처리보다 현저히 낮았으나 1 ppm에서는 무처리와 차이가 없었다(그림-20A). 마찬가지로 경도에서도 1-MCP 3 ppm의 경도는 무처리보다 높았으나 1 ppm에서 차이가 없었다(그림-20B). 반면에 당도의 경우는 1-MCP 처리와 무처리 간의 유의적인 차이는 없었다(그림-20C).

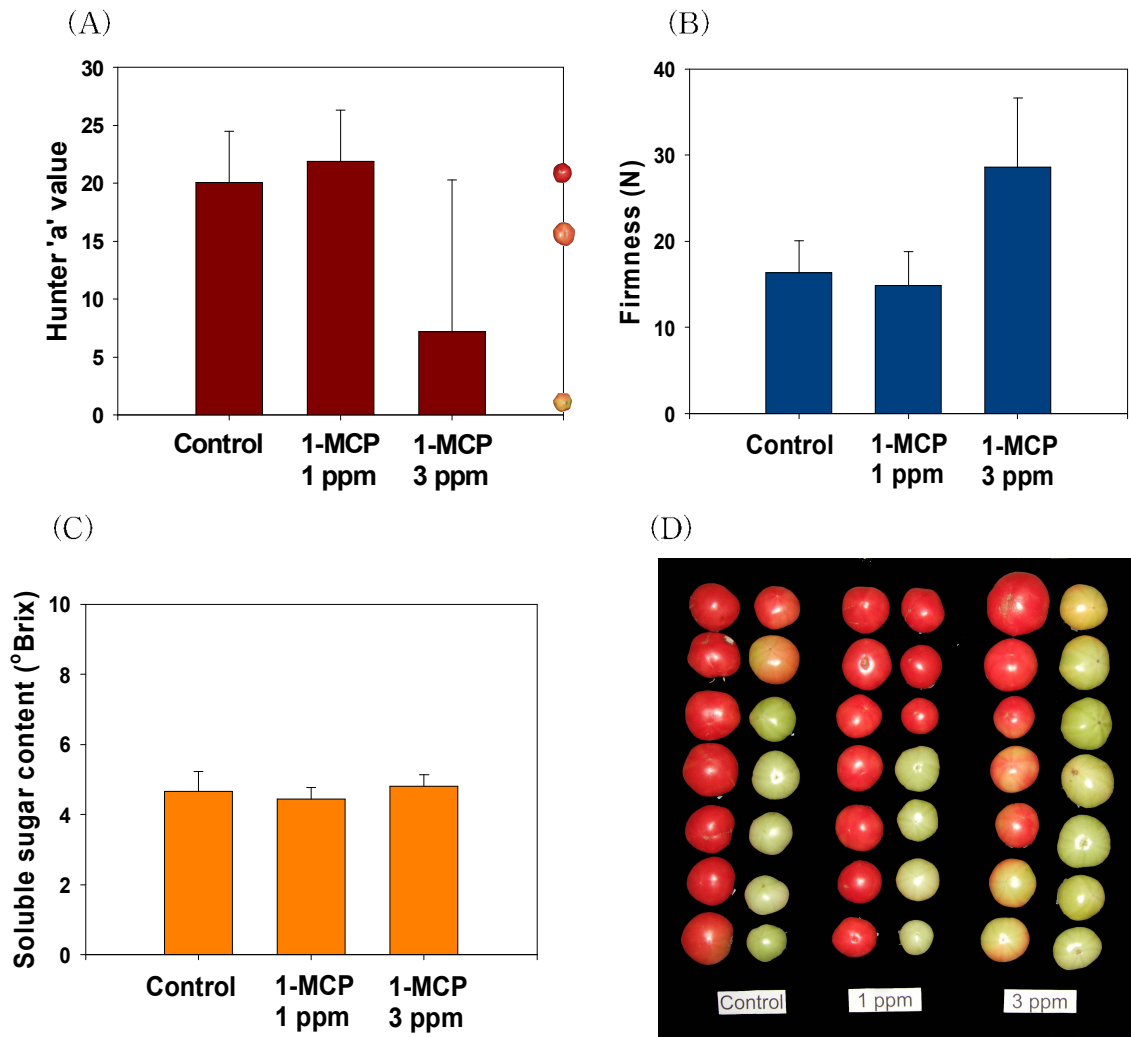


그림 20. 1-MCP 처리농도별 토마토 과실의 착색도(A), 경도(B), 당도(C)와 1-MCP 처리후 30 일차 토마토 과실의 모습(D)

종합적으로 1-MCP는 3 ppm이하에서 등숙기(mature green 단계)에 처리하여도 토마토의 일반 생육에 부정적인 영향을 끼치지 않으며(그림-20D), 3 ppm의 농도에서 토마토 과실의 등숙을 현저히 지연시키는 것으로 판단되었다(그림-20D). 본 결과를 바탕으로 LCCP의 토마토 등숙기에 미치는 영향 평가에 3 ppm 1-MCP 처리를 대조구로 설정하기로 잠정 결론하였다.

(2) 등숙기 LCCP 화합물의 효과 평가

토마토(품종: 호용)를 온실조건에서 재배하여 직경이 40 mm 이상인 과실이 제 2화방까지 달린 등숙기(mature green 단계)에 (주)이룸바이오테크놀러지 사가 개발한 1-MCP와 PPCP, POPCP, MPECP, OCP를 발생시켜 3 ppm 농도로 밀폐조건에서 24시간동안 처리한 후 30/20°C(낮/밤) 온실조건에서 18일간 생육시킨 후 토마토의 착과수, 개화수, 과실의 직경과 과실중, 초장, 광합성, 엽록소함량 등의 일반 생육 요인의 변화와 과실의 착색도, 경도, 당도 등의 품질 요인의 변화를 조사한 결과 다음과 같다.

(가) 일반 생육에 미치는 영향

토마토에 1-MCP (대조)와 PPCP, POPCP, MPECP, OCP를 3 ppm 농도로 처리한 후 18일차에 조사한 결과 그림-21과 같이 PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리는 착과수, 개화수, 과실의 직경 및 과실중에 있어서 무처리와 차이가 없이 과실 생육에 부정적인 영향을 끼치지 않음을 확인하였다. 또한 PPPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리는 1-MCP (대조)와 처리간 차이가 없었다.

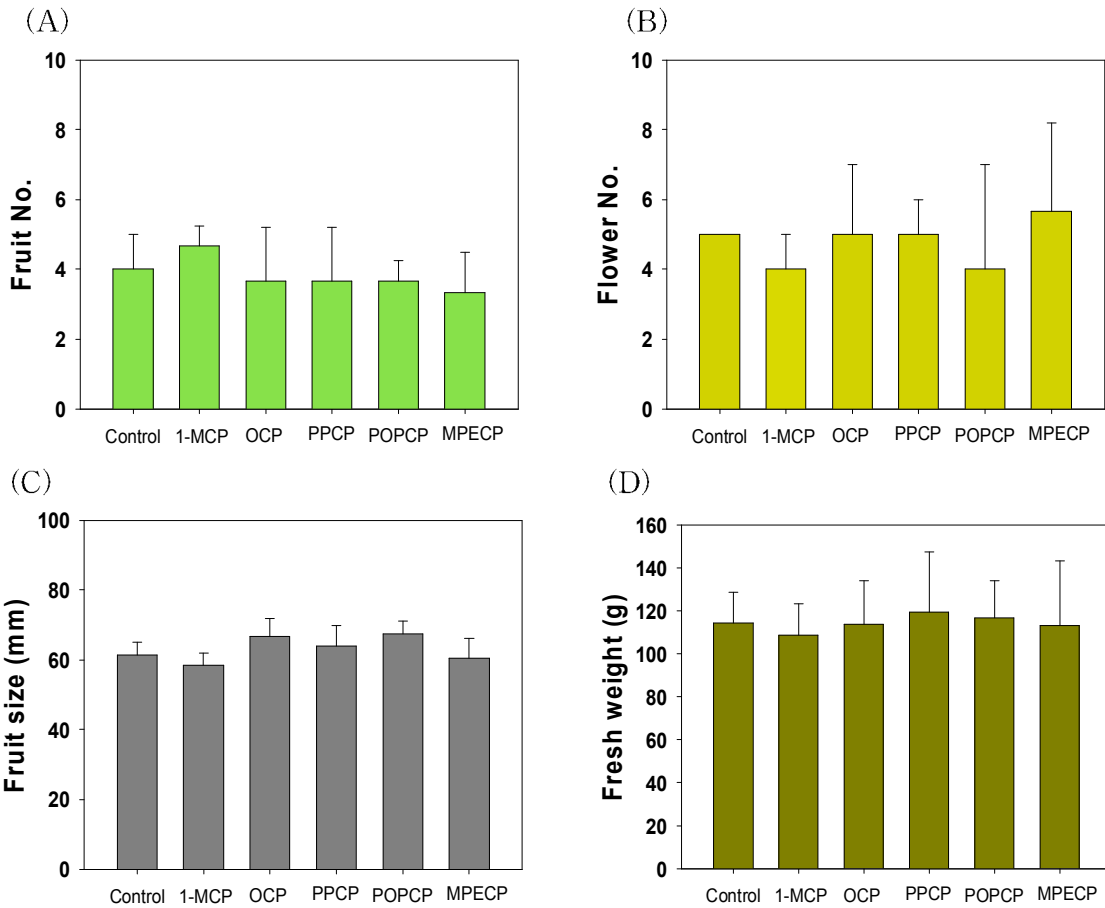


그림-21. 1-MCP와 PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리별 토마토 착과수(A), 개화수(B), 과실 직경(C), 과실중(D)의 처리 후 18일차 결과

PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리는 그림-21과 같이 토마토 엽의 엽록소함량(SPAD value), 광합성, 초장에 있어서 무처리와 차이가 없이 3 ppm에서 기본 영양생육에 부정적인 영향을 끼치지 않았으며 1-MCP(대조)와 처리간 차이가 없음을 확인하였다.

(A)

(B)

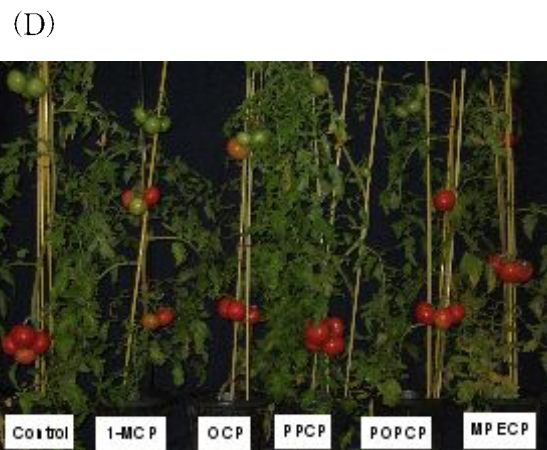
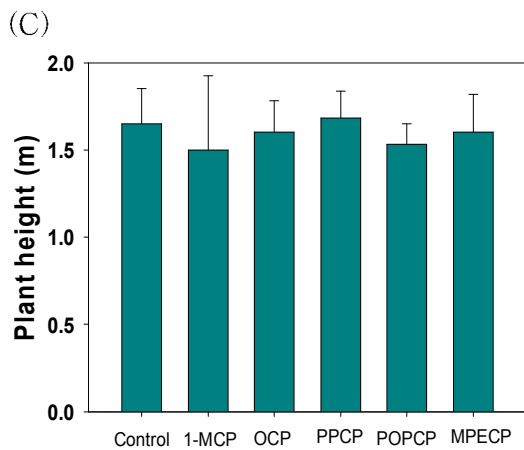
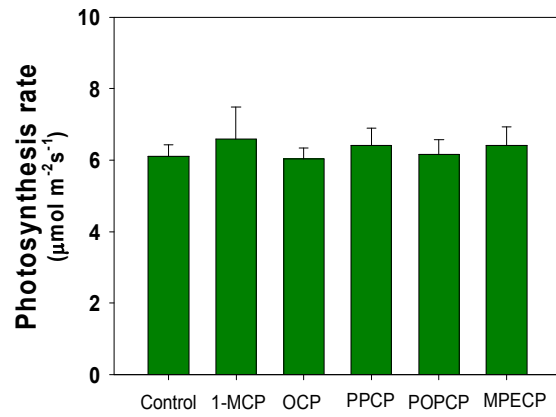
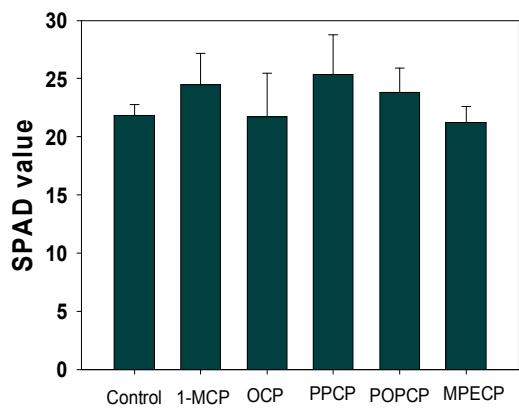


그림 21. 1-MCP(대조)와 PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리별 토마토 잎의 엽록소 함량 (SPAD value)(A), 광합성(B), 초장(C)와 1-MCP와 LCCP 처리후 18일차 토마토의 모습(D)

(나) 과실 품질에 미치는 영향

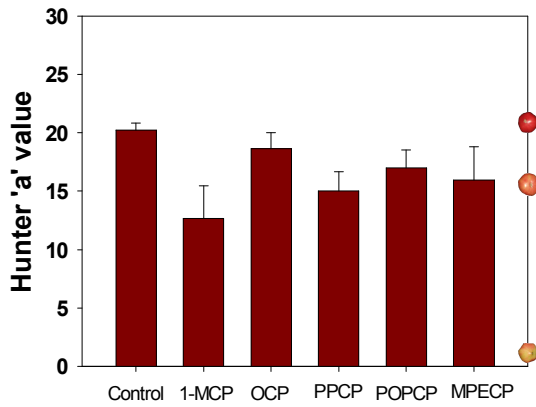
PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리 후 18일차에 수확하여 토마토 과실의 착색도(Hunter 'a' value), 경도, 당도를 조사한 결과 그림-22와 같았다.

착색도에 있어서는 PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리에서 hunter 'a'값이 무처리보다 현저히 낮았으나 1-MCP 처리보다 높았으며 처리 간 차이가 거의 없었다(그림-22A).

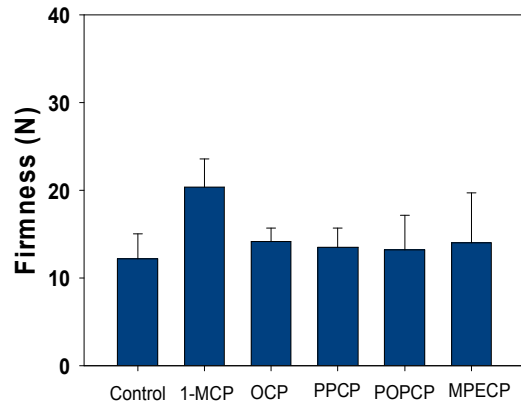
경도에서는 PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리가 무처리와 차이가 없었으며 1-MCP 처리보다 현저히 낮았다(그림-22B). 반면, 당도의 경우는 PPCP, POPCP, MPECP, OCP는 1-MCP (대조) 및 무처리와 유의적인 차이는 없었다(그림-22C).

(A)

(B)



(C)



(D)

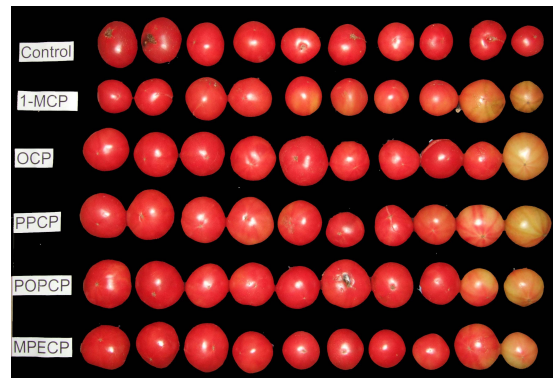
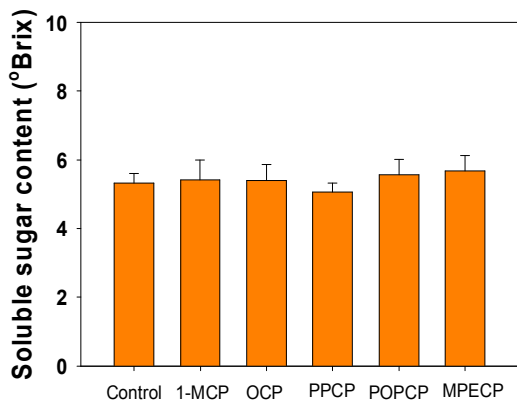


그림 22. 1-MCP(대조)와 PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리별 토마토 과실의 착색도(A), 경도(B), 당도(C)와 1-MCP와 LCCP 처리후 18일차 토마토 과실의 모습(D)

종합적으로 LCCP은 등숙기(mature green 단계)에 처리하여도 토마토의 일반생육에는 부정적인 영향을 끼치지 않았으나(그림-21D), 과실의 등숙을 지연시키는 것으로 판단되었다(그림-22D). 또한 LCCP 처리는 동일한 농도에서 1-MCP보다 과실의 등숙 지연효과가 떨어지는 것으로 확인되었다.

나. 딸기 등숙기에 처리한 1-MCP의 효과 평가

딸기(품종: 설향)를 온실조건에서 재배하여 작물 등숙기(mature green 단계)에 (주)이룸바이오 테크놀러지 사가 개발한 1-MCP를 발생시켜 1-MCP를 0, 1, 3, 9, 100 ppm 농도로 밀폐조건에서 일정시간동안 처리한 후 30/20°C(낮/밤) 온실조건에서 12일간 생육시킨 후 딸기의 개화수 감소율과 달관약해, 광합성, 엽록소함량 등의 일반 생육 요인의 변화와 과실의 달관등숙율, 당도, 과실중 등의 품질 요인의 변화를 조사한 결과 다음과 같다.

(1) 일반 생육에 미치는 영향

딸기에 1-MCP를 0, 1, 3, 9, 100 ppm 농도로 처리한 후 12일차에 조사한 결과 그림-23과 같이 1-MCP 처리는 엽록소함량(SPAD value), 광합성에 있어서 고농도(100 ppm)를 제외하고 무처리와 차이가 없었으나 개화수 감소율과 달관약해에 있어서는 처리 농도간 차이가 있어 1-MCP 3 ppm 이상에서 딸기의 생육에 부정적 영향을 끼치는 것으로 확인되었다.

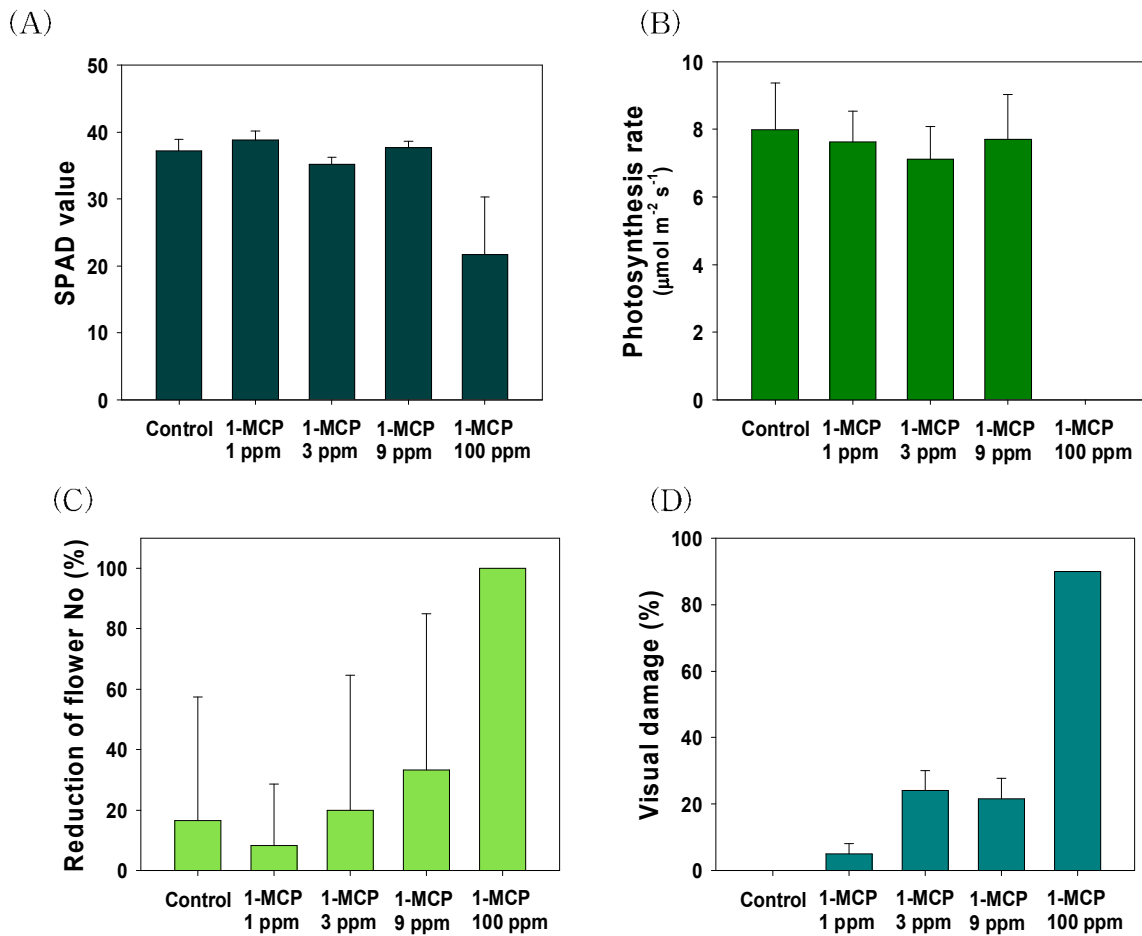


그림 23. 1-MCP 처리농도별 딸기의 엽록소함량(SPAD value)(A), 광합성(B), 개화수감소율(C), 달관약해(D)의 1-MCP 처리 후 12일차 결과

(2) 과실 품질에 미치는 영향

PPCP, POPCP, MPECP, OCP 처리 후 12일차에 수확하여 딸기 과실의 달관 등숙율, 당도, 과실중을 조사한 결과 그림-24와 같았다.

달관 등숙율에 있어서는 1-MCP 처리가 처리농도의 증가에 따라 등숙율을 낮추는 경향이 나타났으며 9 ppm 이상에서 무처리보다 현저히 낮았다(그림-24A). 반면에 당도와 과실중에서는 고농도(100 ppm)을 제외하고 1-MCP처리와 무처리 간에 차이가 없었다(그림-24B와 C).

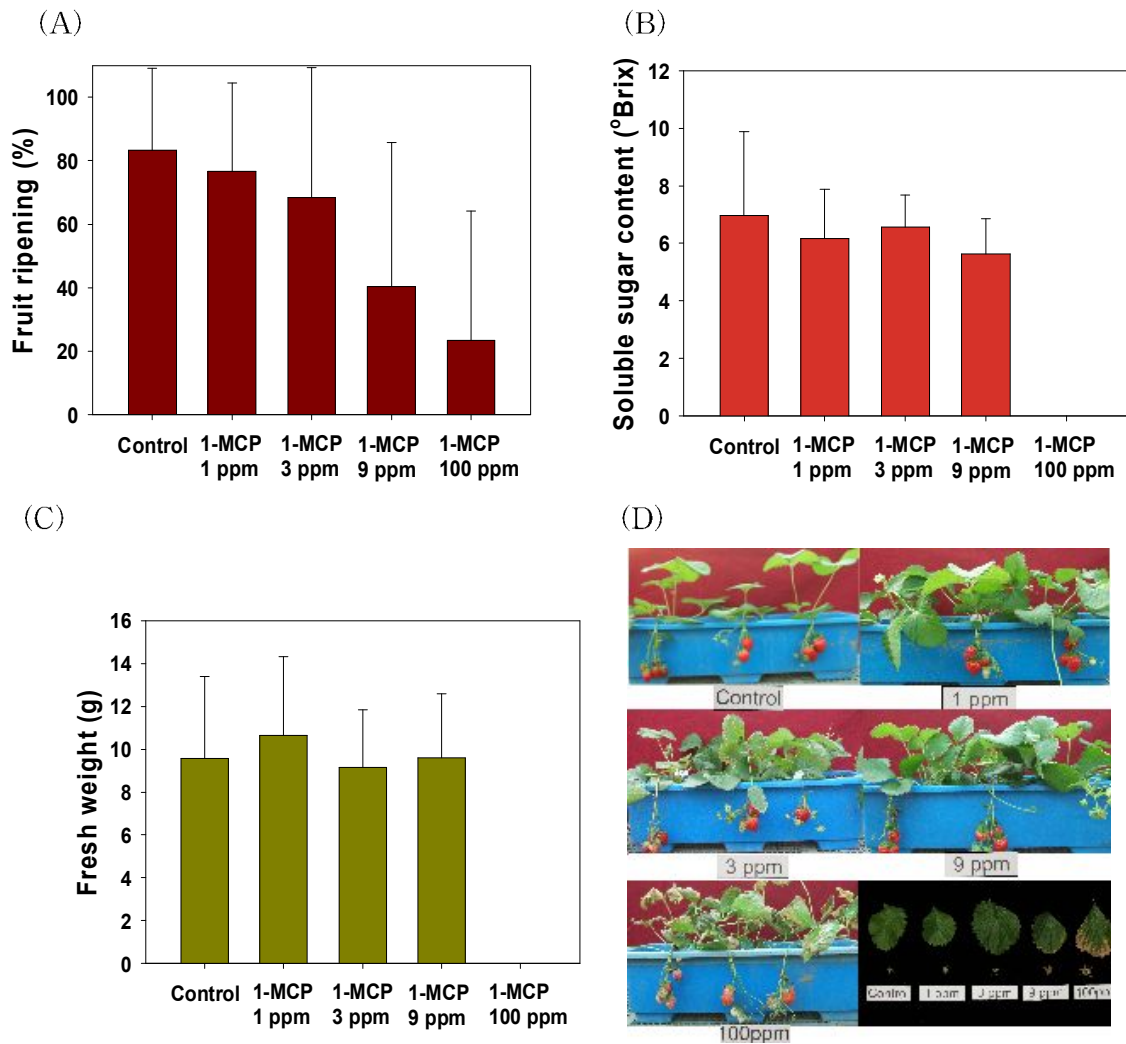


그림 24. 1-MCP 처리농도별 딸기의 달관등숙율(A), 당도(B), 과실중(C)와 1-MCP 처리 후 12일차 딸기의 모습(D)

종합적으로 1-MCP 처리는 3 ppm 이상에서 딸기의 일반생육에 부정적 영향을 끼쳤으나 과실의 등숙을 지연시키는 것으로 파악되었다(그림-24D). 1-MCP을 등숙기 딸기에 적정 처리함으로써 딸기의 등숙을 지연시킬 수 있을 것으로 판단되었다.

제 5 절 최종 후보 물질에 대한 독성시험

위에서 실시한 효능평가를 통하여 가장 효과가 좋은 PPCP 가 최종후보로 선정되었고, 공식 GLP 기관인 바이오톡스텍에서 PPCP 에 대한 독성테스트를 진행하였다. 당사가 개발하고자 하는 1-알킬싸클로프로펜 유도체는 현재 적은 용량으로 사용할 예정이라 독성 issue 는 크게 문제되지 않을 것으로 예상 되지만 신뢰성을 인정받은 GLP 기관에서 국립환경과학원 고시 규정에 의거하여 급성 경구투여 독성테스트를 진행하였고 독성시험 진행 및 결과 요약은 다음과 같다.

1. 결과 요약

본 시험은 시험물질인 ERB-12-PPCP를 Sprague-Dawley계 암컷 8 ~ 9주령 랫드를 이용하여 단회 경구 투여시 나타나는 독성반응을 관찰하고, GHS의 Category를 분류하기 위하여 실시하였다.

시험물질의 투여용량은 1 및 2단계는 300 mg/kg, 3 및 4단계는 2,000 mg/kg으로 하고, 각 단계마다 3마리를 사용하였다. 투여 후 14일 동안 일반증상의 관찰 및 체중측정을 실시하였고, 관찰기간 종료 시에 안락사 시켜 부검하였다.

300 mg/kg 용량에서 사망례는 관찰되지 않았다. 일반증상에서는 투여당일 및 투여 후 1일에 점액변이 관찰되었으나, 투여 후 2일부터는 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

2,000 mg/kg 용량에서 사망례는 관찰되지 않았다. 일반증상에서는 투여당일에 점액변이 관찰되었고, 투여 후 1 ~ 2일에 점액변 또는 하복부 오염이 관찰되었으나, 투여 후 3일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 체중 및 부검에서 시험물질 투여에 의한 영향은 인정되지 않았다.

본 시험의 조건 하에서 ERB-12-PPCP의 랫드에 대한 급성 경구 투여한 결과, Globally Harmonized Classification System의 분류는 'Category 5'로 분류하였다.

2. 진행내용

가. 물질명 : ERB-12-PPCP

나. 성분: 1-(3-phenyl-propyl)-2-(trimethylsilyl) cyclopropylmethanesulfonate

다. 종 및 계통: 랫드, Sprague-Dawley (CrI:CD(SD)), SPF

(1) 입수시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

암컷, 13마리, 7주령, 166.9 ~ 177.1 g

(2) 투여시 성별, 동물수, 주령 및 체중범위

암컷, 12마리, 8 ~ 9주령, 175.8 ~ 219.3 g

라. 투여경로: 경구투여

(1). 투여경로의 선택이유

시험물질이 경구로 노출되었을 때의 안전성을 평가하고자 경구경로를 선택하였다.

(2). 투여방법 및 투여횟수

투여액량은 5 mL/kg으로 하였고, 개체별 투여액량은 절식 후 (투여당일)의 체중을 기준으로 산출하였다. 경구투여용 존데를 부착한 일회용 주사기 (1 ~ 3 mL)를 용하여 위내에 단회 강제투여하였다. 모든 동물은 투여 전에 약 16시간 이상 음수는 자유

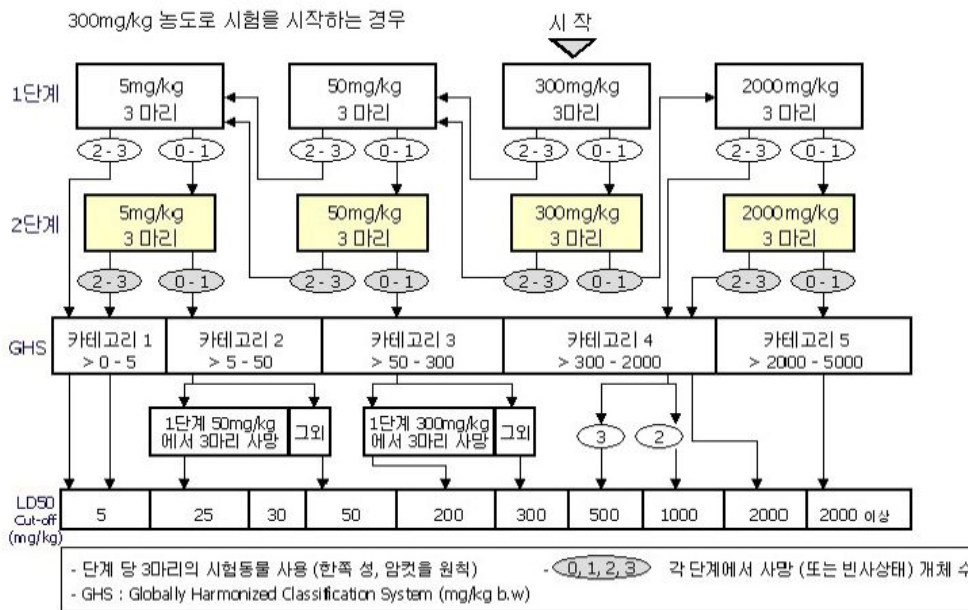
섭취 시키면서 절식시키고, 투여 후 약 4시간에 사료를 급여하였다.

(3) 투여용량

시험물질에 대한 독성정보가 없으므로, 본시험의 개시용량은 300 mg/kg으로 설정하였다.

이후의 투여용량은 독성시험 가이드라인 「독성등급법」의 시험순서 (첨부자료 - 그림 2. 본시험 단계의 흐름도)에 따라서 설정하였다.

그림 2. 본시험 단계의 흐름도



다음 단계의 투여는 동물을 3~4일간 관찰하고, 사망유무를 확인한 후에 실시하였다.

각 단계별 투여용량은 이하와 같이 투여하였다.

군 및 단계	투여용량 (mg/kg)	투여액량 (mL/kg)	동물 수 (개체번호) 암컷	사망례
G1 1단계	300	5	3 (2101 ~ 2103)	없음
G2 2단계	300	5	3 (2201 ~ 2203)	없음
G3 3단계	2,000	5	3 (2301 ~ 2303)	없음
G4 4단계	2,000	5	3 (2401 ~ 2403)	없음

마. 일반증상 관찰

투여당일 (0일)에는 투여 후 30분, 1, 2, 4 및 6시간째에 일반상태 (독성징후의 종류, 발현 시기, 회복시기 등) 및 사망유무를 관찰하였다. 투여 후 1일부터 14일까지는 매일 1회 일반증상을 관찰하였다.

(1) 체중측정

체중은 투여당일 (투여 전), 투여 후 1, 3, 7일 및 14일 (부검일)에 측정하였다.

(2) 부검

관찰기간 종료 후, 모든 동물에 대해서 CO₂가스를 흡입시켜 배대동맥에서 방혈하여 안락사시키고 부검하였다.

바. GHS의 Category 분류

각 단계의 사망유무의 결과를 토대로, 첨부자료에 따라서 Globally Harmonised Classification System for Chemical Substances and Mixtures (GHS)의 Category를 분류하였다.

3. 실험 결과

가. 사망유무

관찰기간 동안, 300 및 2,000 mg/kg 용량에서 사망례는 관찰되지 않았다.

Table. Summary of Mortality

Step / Dose (mg/kg)	No. of animals	Days after dosing														Mortality (dead/total)		
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		14	
Step 1 300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/3)
Step 2 300	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/3)
Step 3 2,000	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/3)
Step 4 2,000	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0%	(0/3)

나. 일반증상

300 mg/kg 용량에서 점액변 (mucous stool)이 투여 후 2 ~ 6시간에 1 ~ 2례, 투여 후 1일에

전례에서 관찰되었으나, 투여 후 2일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 이는 시험물질 투여에 의한 일시적인 영향으로 판단된다.

2,000 mg/kg 용량에서 점액변이 투여 후 6시간에 4례, 투여 후 1일에 전례에서 관찰되었고, 하복부 오염 (soiled perineal region)이 투여 후 1일에 5례, 투여 후 2일에 1례에서 관찰되었으나, 투여 후 3일부터 일반증상의 이상은 관찰되지 않았다. 이는 시험물질 투여에 의한 일시적인 영향으로 판단된다.

Table. Individual Clinical Signs

Step / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical signs	Hours (Day 0) after dosing				
			0.5	1	2	4	6
Step 1	2101		-	-	-	-	-
300	2102	Mucous stool	-	-	+	-	+
	2103		-	-	-	-	-
Step 2	2201	Mucous stool	-	-	+	-	+
300	2202		-	-	-	-	-
	2203	Mucous stool	-	-	+	+	-
Step 3	2301		-	-	-	-	-
2,000	2302		-	-	-	-	-
	2303	Mucous stool	-	-	-	-	+
Step 4	2401	Mucous stool	-	-	-	-	+
2,000	2402	Mucous stool	-	-	-	-	+
	2403	Mucous stool	-	-	-	-	+

Step / Dose (mg/kg)	Animal ID	Clinical signs	Days after dosing													
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Step 1	2101	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
300	2102	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	2103	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
Step 2	2201	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
300	2202	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
	2203	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Step 3	2301	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2,000	2302	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Soiled perineal region	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	2303	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Soiled perineal region	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
Step 4	2401	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
2,000		Soiled perineal region	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
	2402	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		Soiled perineal region	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
	2403	Mucous stool	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-				
		Soiled perineal region	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-				

-: No observable abnormality

+: Observable abnormality

다. 체중변화

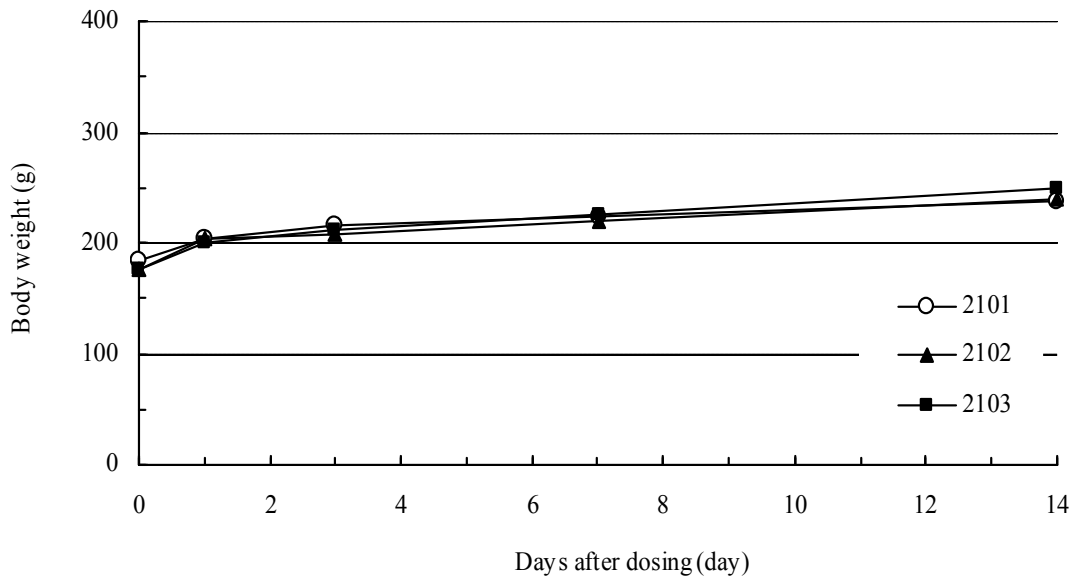


그림. 25. Body Weights (Step 1: 300 mg/kg)

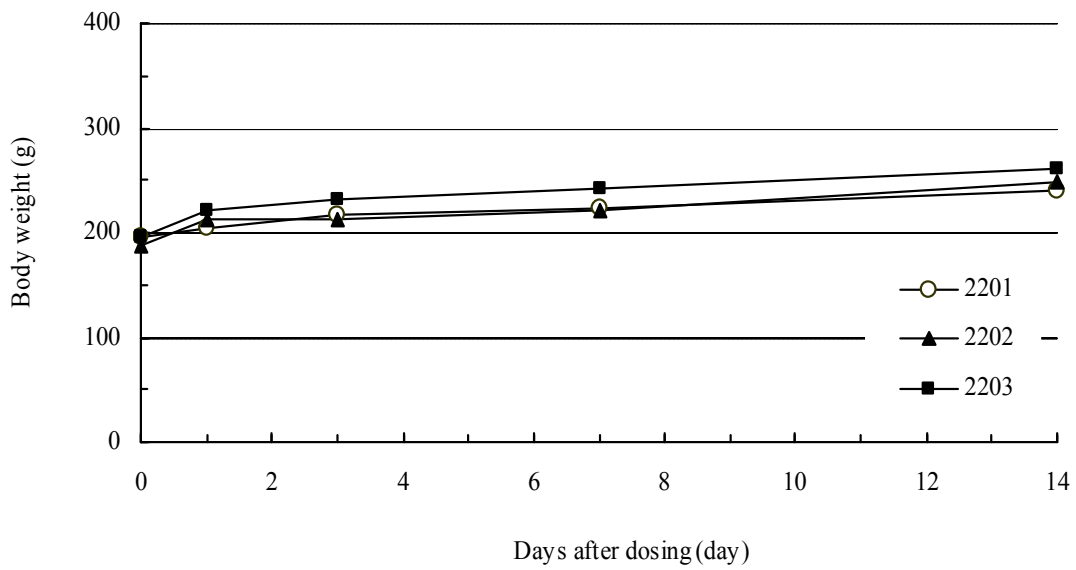


그림. 26. Body Weights (Step 2: 300 mg/kg)

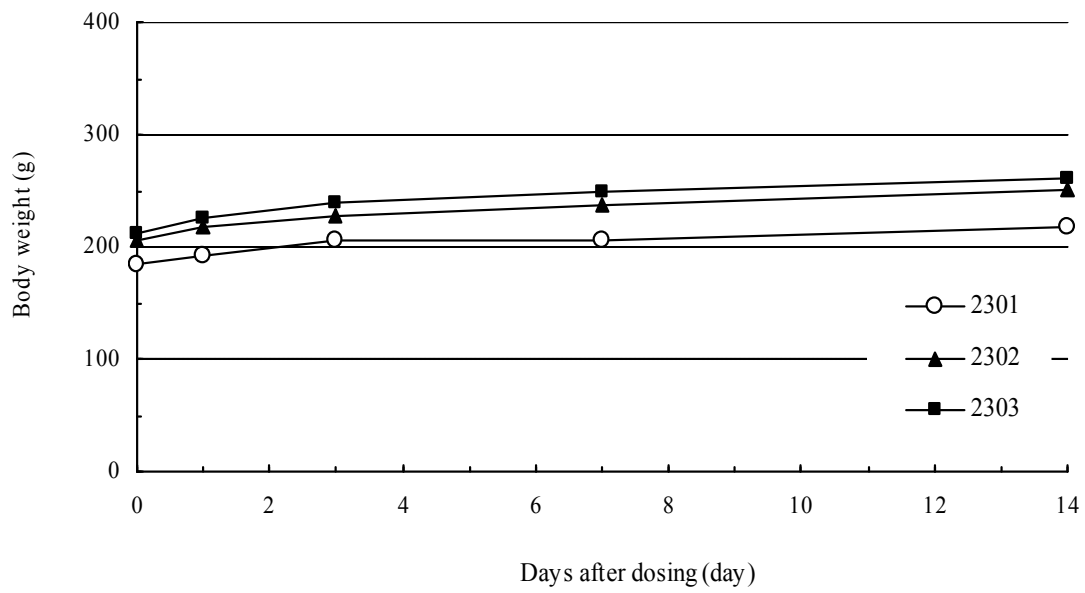


그림 27. Body Weights (Step 3. 2,000 mg/kg)

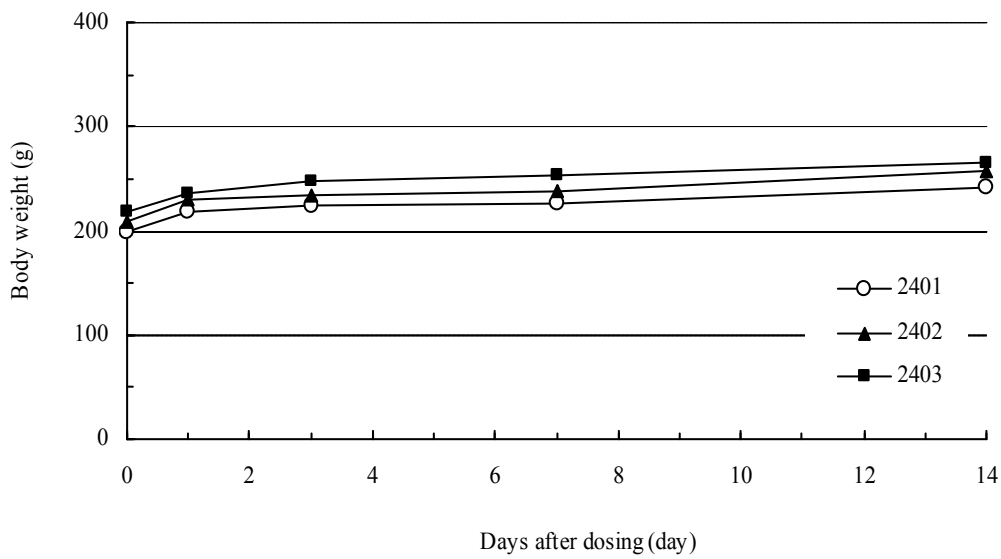


그림 28. Body Weights (Step 4. 2,000 mg/kg)

라. 육안적 부검소견

부검시, 300 및 2,000 mg/kg 용량 전례에서 육안적 이상 소견은 관찰되지 않았다.

Table. Individual Necropsy Findings

Step / Dose (mg/kg)	Animal ID	Organ*	Necropsy findings	Type of sacrifice	Day of sacrifice
Step 1 300	2101	All	Unremarkable findings	S	14
	2102	All	Unremarkable findings	S	14
	2103	All	Unremarkable findings	S	14
Step 2 300	2201	All	Unremarkable findings	S	14
	2202	All	Unremarkable findings	S	14
	2203	All	Unremarkable findings	S	14
Step 3 2,000	2301	All	Unremarkable findings	S	14
	2302	All	Unremarkable findings	S	14
	2303	All	Unremarkable findings	S	14
Step 4 2,000	2401	All	Unremarkable findings	S	14
	2402	All	Unremarkable findings	S	14
	2403	All	Unremarkable findings	S	14

* External surface and organs in body cavity
S: Scheduled

마. 결론

본 시험의 조건 하에서 ERB-12-PPCP의 랫드에 대한 급성 경구 투여한 결과, Globally Harmonized Classification System의 분류는 ‘Category 5’로 분류하였다.

첨부. 독성시험결과보고서

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

* 연도별 연구목표 및 평가착안점에 입각한 연구개발목표의 달성도 및 관련분야의 기술 발전에의 기여도 등을 기술

본 과제에의 2년 연구 개발 기간 동안 주관기관과 위탁연구기관이 설정하였던 목표대비 연구 성과는 다음과 같다.

당초목표	당초연구목표 대비 연구결과
① 최적의 1-알킬씨클로프로펜 유도체 선정 및 화학반응조건 최적화	<ul style="list-style-type: none"> ○ 탁월한 Ethylene Antagonist이면서 개방된 공간에 처리 가능한 LCCP(Longer Chained Cyclopropene) 후보물질 탐색 ○ 후보 물질의 화학반응조건 최적화
② 발생장치를 기초로 한 기구적 설계 및 테스트용 시제품 제작	<ul style="list-style-type: none"> ○ 발생장치에 대한 concept 디자인 및 시제품 제작 ○ 시사출 금형제작 및 시제품 완성: 제작된 금형을 통해 시사출 제작된 1-알킬씨클로프로펜 발생장치 및 카트리지 작동여부 확인_Formulation 단계로 넘어가지 않는 것과 Reaction time 이 더 빨라야 함을 Check.
③ 상용화를 위한 물질효능 및 독성테스트	<ul style="list-style-type: none"> ○ 독성 및 효능테스트를 위한 전구물질 대량생산 공정 개발 및 합성 ○ 1-알킬씨클로프로펜 유도체 전구물질 후보물질 1종에 대한 급성경구독성시험실시-GLP 기관에서 실시-독성 Category 5 로 독성위험 없음 ○ 후보물질의 Formulation Test ○ Formulation 된 후보물질을 토마토에 대해 선도유지 Test 실시한 결과 Ethylene Antagonist로서의 가능성 입증
④ 작물 스트레스에 대한 내성 및 생육 증진 효과	<ul style="list-style-type: none"> ○ 씨클로펜 유도체화합물을 토마토와 딸기의 등숙기에 처리한 결과 과실의 등숙을 지연시키면서도 생육 및 수량에 영향을 주지 않았음 ○ 씨클로펜 유도체화합물을 과채류 등숙기에 처리함으로써 과채류의 숙기조절에 활용할 수 있을 것으로 기대됨
⑤ 과채류 & 절화류의 저장성 증대효과 (개방환경)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 씨클로펜 유도체화합물의 토마토의 저장성 증대효과가 높음을 확인했으며, LCCP 가운데 PPCP의 효용가능성이 높음을 확인하였음 ○ LCCP의 저장성 증대효과가 1-MCP에 비해 낮았으나 액상제형의 개발시 사용자 편이 측면에서 활용도가 높을 것으로 기대됨

본 과제수행을 통하여 우리가 개념적으로 가지고 있었던 1-알킬씨클로프로펜 전구물질을 사용한 1-알킬씨클로프로펜 유도체가 Ethylene Antagonist 로 실제로 작용하고 있는 것과, 이러한

작용으로 인해 작물스트레스에 대해 내성 및 생육증진효과에 대해서 입증할 수 있었으며 저장성도 증대시킨다는 결과를 도출해 낼 수 있었다. (추후 절화류에 대한 실험 및 개방형 공간에서 재실험 실시예정) 또한 이 과정에서 1-알킬씨클로프로펜 전구물질에 대한 대량생산 공정 및 합성공정, 최적화 공정을 확립하였으며, Formulation Test 도 진행할 수 있었다. 시제품 제작을 통해서 Field 에 살포 가능한 제품개발을 시도하였는데, 1-알킬씨클로프로펜 전구물질과 Activator 의 혼합과정은 정상적으로 진행되었으나, Formulation 단계가 연속적으로 일어나는 과정은 예측대로 진행되지는 않았다. 이를 통해 반응속도가 보다 빠르게 진행되는 쪽으로 발생장치 개선이 이루어져야 한다는 결과를 얻을 수 있었고, 생성되는 1-알킬씨클로프로펜 유도체의 Formulation 단계부터 연구가 더 진행되어야 할 것으로 추정된다. 마지막으로 후보물질에 대한 독성 Test를 통해 향후 상품화 진행시 독성으로 인한 등록문제도 무리없이 진행 될 것이라는 것을 확인하였다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

1. 포스터 발표

본 과제 수행중에 도출해낸 결과를 바탕으로 농림수산식품부 등 17개 부,청,위원회가 주최하고 한국연구재단과 (재)한국이산화탄소포집 및 처리연구개발센터에서 주관하는 “2012 녹색기술 포럼”에 포스터 발표 대상과제로 선정되어 2012년 4월3일~5일 포스터발표를 진행하였다.

가. 포스터 요약

Ethylene Antagonist 로서의 씨클로프로펜 유도체의 제품화

연구책임자 : (주)이룸바이오테크놀로지(skyoo@erumbiotech.com)

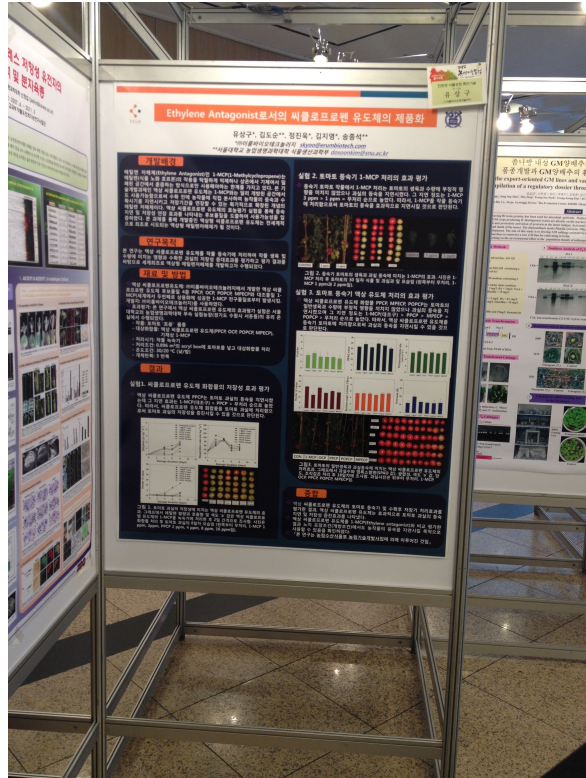
연구기간 : 2010. 07. 01. ~ 2012. 06. 30

지원부처 및 기관 : 농림수산식품부 농림수산식품기술기획평가원

요 약

에틸렌 저해제(Ethylene Antagonist)인 1-MCP(1-Methylcyclopropene)의 경우 식물의 노화에 작용하는 호르몬인 에틸렌의 작용을 탁월하게 억제하는 것으로 알려져 있으나 상온에서 기체로서 밀폐된 공간에서 훈증하는 방식으로만 사용되어져야 하는 한계를 가지고 있다. 본 기술개발과제인 씨클로프로펜 유도체는 1-MCP 와 달리 오픈된 공간에서도 사용 가능한 Ethylene Antagonist 로서 수확전에 농작물에 직접 분사함으로써 농작물의 등숙을 지연시키고, 수확시기를 지연시킬 수 있으며 저장기간을 연장할 수 있는 획기적으로 확장된 개념의 Ethylene Antagonist를 목표로 한다. 현재 액상형 씨클로프로펜 유도체 개발을 진행중이며, 효능평가를 통하여 등숙지연 효과 및 저장성 연장 효과를 보이는 후보물질을 도출해 내어 가능성을 입증하였다. 이것이 성공한다면 전세계적으로 최초로 시도되는 액상형 씨클로프로펜 유도체가 될 것이다. 「본 연구는 농림수산식품부 농림기술개발사업에 의해 이루어진 것임」

나. 포스터 현장사진



2 박람회 참가

당사는 대통령 직속 녹색성장위원회와 환경부가 주최하는“저탄소 녹색성장박람회2011”에 2011년 10월 12일부터 15일까지 부스를 마련하여 본 과제를 포함한 당사제품 홍보를 위하여 참가하였다.

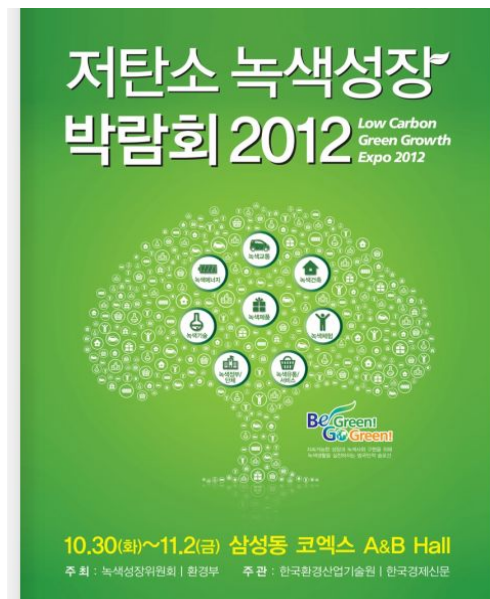


그림 29. 박람회 포스터



그림 30. 포스터 자료

당사는 본 박람회를 통해 4 일동안 일반 소비자 및 업계 관계자들에게 당사의 과제를 소개할 수 있는 기회를 가질 수 있었으며, 200명 이상의 방문객에게 당사소개 자료 및 과제 Presentation 을 실시하였다.

3. 지식재산권 확보현황

본 과제를 통해 이루어낸 기초 결과를 가지고 특허를 출원하였고, 씨클로프로펜 유도체와 관련된 (직간접) 특허 현황 및 이 과제기간 중 진행된 사항은 다음과 같다.

특허번호	발명의 명칭	2010.5~2012.6 진행상황	출원국가
10-0823872	농산물의 숙성과정을 조절하기 위한 시클로 프로펜유도체의 발생장치	-	대한민국
10-2009-0018375	1-메틸시클로프로펜을 제조하여 식물에 부가하는 방법	-	대한민국
10-2010-0037348	시클로프로펜 화합물을 농작물에 부가하는 방법	-	대한민국
10-2011-29038	1-메틸시클로프로펜 발생장치	출원 (2011.03.30)	대한민국
PCT/KR2006/004812	Cyclopropenes-generating devices to control ripening processes of agricultural products	미국등록 (2012.04.24)	미국,중국,호주,일본,유럽
PCT/KR2009/004001	Method of preparing 1-methylcyclopropene and applying the same to plants	공개, 의견서제출 및 심사청구 완료	PCT,미국,아르헨티나,칠레
PCT/KR2011/002692	Cyclopropenes and method for applying cyclopropenes to agricultural products or crops	출원 (2011.04.15)	PCT, 칠레, 아르헨티나

4. 실용화 및 산업화 추진현황

본 과제를 통해서 얻은 결과 및 지식재산권을 통해 실용화를 위해 기술개발 초기부터 협력할 파트너를 모색하였으며, 국내기업 K사와 미국기업 G사와 현재 비밀유지계약서를 맺었으며 현재 미국기업 G사와는 공동개발을 위한 MTA(Material Transfer Agreement) 계약을 위한 협의가 진행 중이다.

연번	계약서	계약체결일	대상국
1	비밀유지계약서	2010.12.08	대한민국
2	Confidential Disclosure Agreement	2011.09.26	미국 및 전세계
3	Material Transfer Agreement	진행중	미국 및 전세계

또한 본 연구성과를 통하여 1-알킬씨클로프로펜 유도체의 에틸렌 저해 효과를 입증하였기 때문에 본격적으로 상업화 및 제품화를 위한 연구를 가속화할 예정이다. 이를 위하여 산·학·연 공동연구를 추진중에 있으며, 다음과 같은 연구를 계획하고 있다.

- 1-알킬씨클로프로펜 유도체의 Formulation 연구
- 1-알킬씨클로프로펜 유도체의 Chemical stability test
- 1-알킬씨클로프로펜 유도체의 처리 작물 결정 및 처리 용량 결정
- Ethylene Antagonist 의 처리 시기 결정
- 1-알킬씨클로프로펜 유도체 발생장치 개발
- 1-알킬씨클로프로펜 유도체의 독성시험
- 1-알킬씨클로프로펜 유도체의 개방공간에서 효능실험 실시

당사가 위의 후속연구를 통하여 세계 최초로 Field 에 적용할 수 있는 Ethylene Antagonist 개발을 성공한다면 현재 수확후 시장의 몇배에 달하는 시장을 선점할 수 있게 될 것으로 예측된다. 즉 매 시즌 필드에서 수확하는 작물들은 기후의 영향을 받을 수 밖에 없고 가뭄이나 홍수 등이 발생하게 되면 그 해 수확량은 현저히 감소되는데 이 때 작물은 Crop stress를 받게 되고, 결과물로서 에틸렌은 발생시키게 되는 것이다. 이때 과잉 발생되는 에틸렌을 저해할 수 있는 Ethylene Antagonist 가 스프레이 분무형태로 사용할 수 있다면 이는 사용자의 편의성을 극대화 할수 있으며, 매해 기후변화에 따라 수확량이 들쭉날쭉하여 시장에서의 가격파동이 큰 면화(Cotton) 이나 대두(Soy Bean), 밀(Wheat), 쌀(Rice) 등의 작물에도 씨클로프로펜 유도체

기술이 효과적인 Crop Stress Protection 작용을 할 수 있을 것으로 기대하고 있으며 이러한 작물스트레스보호 시장규모는 기존 1-MCP 를 통해 형성된 저장 유통 시장 규모를 훨씬 능가할 것이다.



Cotton

Soy Bean

Wheat

Rice

그림 31. 씨클로프로펜 처리 가능 작물(예상)

또한 칠레 등지에서는 사과를 수확하는 과수원의 규모가 대단위 영농으로 작업되기 때문에 수확기에는 한번에 수확하는 것도 큰 애로사항으로 대두되고 있는데 현재 이 기술의 Target 시장 중의 하나는 과수원을 절반정도를 Ethylene Antagonist를 처리하여 Ripening 을 지연시켜 수확시기를 늦춘후 천천히 수확하는 용도로도 사용될 수 있을 것이며 경쟁사에서도 이와같은 시도를 하고 있는 것으로 알려져 있다.

이처럼 씨클로프로펜 유도체를 적용할 수 있는 작물시장의 형태나 규모는 대단히 다양하고 큰 규모이며 적용대상이나 범위가 확대됨에 따라 무궁무진하게 성장할 수 있는 시장이다.

(주)이룸바이오테크놀러지 사에서는 기존 1-MCP 발생장치를 개발한 역량을 토대로 본 과제에서 분무형태의 에틸렌저해제 발생장치를 개발한다면 세계적으로도 수확후 저장분야뿐만 아니라 수확이전 직접 작물에 분무하여 출하 시기를 조절하는 새로운 분야에 에틸렌저해효과에 대한 선두위치에 서게 될 것이며, 국내 농림기술개발분야의 선진화에도 많은 기여를 할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

현재 이 과제에서 목표로 삼고 있는 필드형 Ethylene Antagonist의 주요 Target 시장중의 하나인 Drought Tolerance 분야의 연구현황에 대한 보고 결과는 다음과 같다. 위에서 언급한 바와 같이 Ethylene Antagonist 분야에서의 연구는 INVinsa Project 가 유일하며 가장 활발하게 진행되고 있는 분야는 gene 유전자 분야이다. Monsanto 와 BASF 가 자연에 존재하는 유전자를 밝혀냈는데 이 유전자가 옥수수가 가뭄에 견디는데 도움을 줄 것으로 예상하고 있다. 또한 세계적인 글로벌 기업들이, 중국 및 브라질 등의 회사와 손을 잡고 가뭄극복을 위한 프로젝트를 진행하고 있는 것으로 파악되었다.

Table. Select Agrobiotech Deals

Company	Company	Description
Syngenta	Anhui Rice Research Institute (China)	Syngenta and Anhui agree to 8-year research collaboration on drought tolerance and nitrogen utilization optimization in key crops such as corn and soybeans
BASF	CTC(Brazil)	Brazilian sugar research center CTC and BASF partner to develop genetically engineered drought resistant sugarcane
Bayer CropScience	Ben-Gurion University (Israel)	Ben-Gurion will identify drought tolerance and stress resistant genes in plants
Monsanto	Huazhong Agricultural University (China)	Collaboration to develop novel traits such as higher yield, drought resistance & nitrogen utilization optimization in key crops such as corn and soybeans

제 7 장 참고문헌

* 보고서 작성 시 인용된 모든 참고문헌을 열거

1. Beaudry,R., Lansing,E. Watkins,K.(2001).Use of 1-mcponapples. *Perishables Handling Quarterly*, 108, 12-16.
2. Tatsuki,M., Endob,M., &Ohkawa,H.(2007). Influence of time from harvest to 1-MCP treatment on apple fruit quality and expression of genes for ethylene biosynthesis enzymes and ethylene receptors. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 28-35
3. DeEll, R.J., Murr, P.D., Porteous, D.M., & Rupasinghe,H.P.V.(2002). Influence of temperature and duration of 1-methylcyclopropene (1-MCP) treatment on apple quality. *Postharvest Biology and Technology*, 24, 349-353.
4. Watkins B.C., Nock,J.F.,& Whitaker,D.B.(2000). Responses of early, mid and late season apple cultivars to postharvest application of 1-methylcyclopropene (1-MCP) under air and controlled atmosphere storage conditions. *PostharvestBiologyandTechnology*, 19, 17-32.
5. Vilaplana, R., Soria, Y., Valentines, M. C., Larrigaudi`ere,C. (2007). Specific response of apple skin and pulp tissues to cold stress and 1-MCP treatment. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 215-220
6. Baritelle, L.A.,Hyde, M.G.,Fellman,K.J., &Varith,J.(2001). Using 1-MCP to inhibit the influence of ripening on impact properties of pear and apple tissue. *Postharvest Biology and Technology*, 23, 153-160.
7. Mostofi, Y., Toivonen ,M.A. P., Lessani ,H., Babalar ,M., &Lu, C.(2003). Effects of 1-methylcyclopropene on ripening of greenhouse tomatoes at three storage temperatures
Postharvest Biology and Technology, 27, 285-29.
8. Guill'en, F., Castillo,S., Zapata, P.J., Mart'inez-Romero, D., Valero, D., &Serrano,

- M.(2006). Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit 2. Effect of cultivar and ripening stage at harvest. *Postharvest Biology and Technology*, 42, 235-242.
9. Lichter , A., Guzev , L., Dvir , O., Farber , I., Danshin,A., Pressman , E., Ganz, S.,& Beno-Moualema, D.(2006).Seasonal changes in the abscission site in bunch tomatoes and differential response to 1-methylcyclopropene. *Postharvest Biology and Technology*, 40, 48-55.
10. Zhang,Z., Hubera, J.D., Hurra,M. B., & Rao,J.(2009). Delay of tomato fruit ripening in response to 1-methylcyclopropene is influenced by internal ethylene levels. *Postharvest Biology and Technology*, 54, 1-8.
11. Guill'en , F., Castillo , S., Zapata ,P.J., Mart'inez-Romero , D., Serrano,M., &Valero, D..(2007). Efficacy of 1-MCP treatment in tomato fruit 1. Duration and concentration of 1-MCP treatment to gain an effective delay of postharvest ripening. *Postharvest Biology and Technology*, 43, 23-27.
12. Vallejo, F., & Beaudry, R.,(2006).Depletion of 1-MCP by 'non-target' materials from fruit storage facilities. *Postharvest Biology and Technology*, 40, 177-182.
13. Chourasia, M. K. and T. K. Goswami. 2007. Simulation of effect of stack dimensions and stacking arrangement on cool down characteristics of potato in a cold store by computational fluid dynamics. *Biosystems Engineering*, 96(4), 503-515.
14. Ergun, S. 1952. Fluid flow through packed columns. *Chemical Engineering Progresses* 48:89-94.
15. 윤홍선, 조영길, 박관규, 박경규. 1995. 산물퇴적 청과물의 송풍특성. 한국농업기계학회지 20(4):333-342.

주 의

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