

최 종
연구보고서

미생물로부터 복숭아의 수확후선도유지제 개발 및 상품화

Commercialization of Postharvest Control
Agent for Prunus sp. Fruits

(주) 대 덕 바 이 오

농림수산식품자료실



0014070

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “미생물로부터 복숭아의 수확후선도유지제 개발 및 상품화” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008 년 4 월 일

주관연구기관명 : (주)대덕바이오

총괄연구책임자 : 모 은 경

연 구 원 : 양 선 아

연 구 원 : 임 미 영

연 구 원 : 이 용 호

연 구 원 : 강 효 진

연 구 원 : 최 연 심

연 구 원 : 이 혜 립

연 구 원 : 손 백 신

연 구 원 : 이 청 하

협동연구기관명 : 공주교육대학교

협동연구책임자 : 지 옥 화

요 약 문

I. 제 목

미생물을 이용한 복숭아의 수확후선도유지제 개발 및 상품화

II. 연구개발의 목적 및 필요성

복숭아는 대표적인 여름과일로서 무더위가 한창인 7~8월에 주로 시장에 출하되므로 사과, 배, 감귤 등 과일류의 주 출하기와와의 경합을 피할 수 있기 때문에 소비량은 매년 안정적인 증가 추세를 보이고 있다. 1980년의 복숭아 생산량은 8만 9,000톤이었는데 매년 생산량이 증가하여 1996년에는 12만 8,000톤, 2005년에는 22만 4,000톤이 생산되었다. 또한 가공용 복숭아가 수입 개방된 1992년 이후에도 복숭아 생산량은 연평균 2.5%씩 높은 비율로 증가하고 있다. 일반적으로 6~9월까지 복숭아 유통이 이루어지나 주 수확기인 7~8월에 집중 출하되므로 이 기간 동안에는 가격이 낮게 형성되지만 다른 시기에는 가격이 급등하므로 월별 가격 변동폭이 다른 과일에 비해서 큰 편이다. 복숭아 과실은 과피의 발달이 약해 유통 중 품질의 하락이 매우 빠르다. 연화, 부패, 물리적 자극, 수분 손실, 과피 탈색 등이 주요인이다. 따라서 주 생산시기인 6월에서 9월 사이에는 생과 형태로, 나머지 기간에는 통조림 등 가공식품 형태로 유통되고 있다. 다른 작물의 경우 저온유통(cold-chain)을 통해 신선도 연장이 가능하나 복숭아 과실은 저온에 민감한 작물로서 10℃ 이하의 저온에서 2주 이상 저장 할 경우 조직감이 비정상적으로 변하는 woolliness 현상이 발생하고, 과피의 색이 검붉게 변하며, 연화 및 부패가 급격히 일어나는 등의 문제점이 있어 장기저장이 불가능하다. 또한 과육이 연하므로 선별 작업이나 전처리 작업 중 가벼운 물리적 자극이 가해질 경우 품질에 치명적인 문제를 야기 시키므로 품질 관리를 위한 처리 기술을 선택하기가 매우 까다로운 과실이다.

복숭아는 소비자의 선호도가 매우 높은 과일 중의 하나로 복숭아의 과실은

수체에서 완전히 숙성될 때 품질이 가장 우수하나 전술한 바와 같이 연화, 부패, 물리적 상해 등의 이유로 완전히 숙성되기 전 상태에서 수확하여 유통되고 있다. 수확 후 발생하는 품질 변화를 경감시킬 수 있는 기술이 적용될 경우, 유통기간을 연장시켜 신선한 상품을 소비자에게 공급할 수 있을 뿐 아니라 잘 숙성된 고품질의 복숭아 과실을 공급함으로써 소비자 인지도를 상승시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

따라서 과육이 약하고 호흡 작용이 왕성하여 저장기간이 짧은 복숭아의 유통 및 저장기간을 증가시키기 위해, 복숭아의 유통에 적합한 수확후선도유지제를 개발하여 국내 유통을 활성화하고 보다 많은 양의 수출을 가능하게 하여 농가에서의 고부가가치 창출, 관련 과학 산업 기술의 발전 및 국가경쟁력을 확보하고자 본 연구를 수행하였다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제인 “미생물을 이용한 복숭아의 수확후선도유지제 개발 및 상품화” 연구는 수확후선도유지제를 개발하여 복숭아의 저장성을 향상하고 하절기 국내 유통을 활성화하기 위해 2년간의 연구를 수행하였다. 전반적인 연구내용과 범위는 다음과 같다.

1. 복숭아의 병원성 진균류인 *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*에 저해능을 갖는 미생물 균주의 탐색: 인체에 무해하여 식품에 사용할 수 있고, 상기 주요 병원균에 대해 항진균력을 나타내는 미생물 균주를 분리동정하기위해, 사람의 분변으로부터 미생물을 분리하여 상기 식물병원균에 대한 항진균력을 탐색하였다.

2. 항진균활성 보유 균주의 항진균기전 탐색 및 항진균물질의 분리 및 동정: 사람의 분변으로부터 *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*에 저해능을 갖는 미생물 균주를 분리하였다. 이들 미생물 균주는 *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T, *Galactomyces geotrichum* SJM-59로 동정되었다. 이들 세 균주가 생산하는 공통의 항진균물질은 phenylethyl alcohol, tryptophol, phenylethyl acetate로 분리동정되었

다. 분리동정된 물질이 *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*에 항진균력을 나타내는 기전은 proteomics 연구를 통해 수행하였다.

3. 선정된 균주가 생산하는 항진균물질의 안전성 (일반독성, 유전독성, 세포독성) 검정: Phenylethyl alcohol, tryptophol, phenylethyl acetate의 일반독성, 유전독성, 세포독성 실험을 수행한 결과, 상기 3 물질은 독성을 나타내지 않는 것으로 확인되었다.

4. 복숭아의 수확후선도유지제 개발: Phenylethyl alcohol, tryptophol, phenylethyl acetate가 항진균력을 나타내는 최적조건을 탐색하고 이 물질들을 기반으로 하는 복숭아의 수확후선도유지제(시제품)을 개발하였다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

인체에 무해하여 식품에 사용할 수 있고, 복숭아의 병원성 진균류인 *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*에 저해능을 갖는 유용한 미생물 균주를 분리동정하기위해, 사람의 분변으로부터 미생물을 분리하여 상기 식물병원균에 대한 항진균력을 탐색하였다. 사람의 분변으로부터 *M. fructicola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*에 저해능을 갖는 미생물 균주를 분리하였다. 이들 미생물 균주는 *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T, *Galactomyces geotrichum* SJM-59로 동정되었다. 이들 3 균주가 생산하는 공통의 항진균물질을 open column chromatography를 이용하여 분리하여 NMR 등으로 동정한 결과, phenylethyl alcohol(PEA), tryptophol(TRTP), phenylethyl acetate(PEAC)로 확인되었다. 분리동정된 물질이 *M. fructicola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*에 항진균력을 나타내는 기전을 proteomics 연구를 통해 수행하였다.

PEA, TRTP, PEAC를 백서에 경구투여하여 급성 및 아급성 독성시험을 시

행한 후 체중변화량, 사료 및 음수량, 장기중량, 혈액학적 검사, 소변검사, 조직검사 결과 독성이 없는 것으로 사료되었다. Ames test를 이용한 유전독성검사에서도 복귀 돌연변이를 유발하지 않는 것으로 관측되었다. 정상의 murine 세포주와 인체의 암세포주를 통한 세포독성시험에서도 정상 세포주에서 독성을 유발하지 않았다. Phosphate buffered saline을 비교대조군으로 하여 사람 혈액의 hemolysis를 측정한 결과, PEA, TRTP, PEAC에 의한 세포막 용혈현상은 나타나지 않았다. PEA, TRTP, PEAC를 농도별로 장기간 급여한 후 혈액을 채취하여 간독성을 측정한 결과, 상기 물질들은 간독성을 유발하지 않았다. 따라서 PEA, TRTP, PEAC는 수행한 모든 독성시험에서 안전한 것으로 판단되었다.

PEA, TRTP, PEAC가 항진균력을 나타내는 최적조건을 탐색하고 이들을 주요 항목으로 하는 복숭아의 수확후선도유지제(시제품)인 “피치탱(Peach-taut)”을 개발하였으며 이와 관련하여 특허를 출원하였다.

2. 활용에 대한 건의

본 연구의 결과인 PEA은 화장품·식품산업에서 장미향을 내는 데 널리 사용되는 물질로 화학적 합성법에 의해 고가로 공급되고 있다. 근래의 소비자들은 화학합성품보다는 천연의 원료에서 추출한 것을 선호하는 경향이 두드러지고 있다. 따라서 발효법에 의한 PEA의 생산에 대한 심화된 기초 및 응용 연구가 요구된다. 또한 천연에서 추출한 PEA은 화장품 및 식품산업에서의 응용도가 높을 것으로 사료되며, 이와 관련된 기술 및 지식의 축적은 국가경쟁력의 향상에 기여할 것으로 사료된다.

PEA가 *B. cinerea*의 성장을 억제하는 작용을 나타내었으므로, 저장 중 썩음병 발생이 주요 문제인 밤, 인삼, 귤, 포도 등의 수확후선도유지제로서의 이용 가능성이 높다고 사료되며, 이에 대한 후속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

SUMMARY

I . Title

Commercialization of Postharvest Control Agent for *Prunus* sp. Fruits

II. Significance and purpose of research and development

In order to investigate and develop the new postharvest biocontrol agent from microorganism for *Prunus* sp. fruits, this study was performed for two years.

Fruit injured during harvesting or handling may come into contact with pathogens when it is packed, stored or shipped. The pathogens are wound parasites and in most cases require a wound in the skin or stem to enter into contact with susceptible tissue and initiate infection. Infection occurs during harvest or when fruit moves through water in the packing–line dump tank, to be washed, cleaned and rapidly refrigerated. Recirculated–water quickly becomes heavily contaminated by fungal spores and may infect dipped fruit. Brown rot caused by *Monilinia fructicola* is the most important stone fruit decay in Korea; the pathogen can only be controlled by fungicide spray programs in the fields, postharvest treatments are not allowed. For this reason, if weather conditions are favourable to brown rot during the postharvest phase, important economic losses in sweet cherries, apricots, peaches and nectarines can occur. Soft rot caused by *Rhizopus stolonifer* appears after storage, particularly in the market or in the consumer's home when temperatures are higher than 5°C. The pathogen is not efficiently controlled by registered fungicides and when fruit are mature or processed at room temperature, soft rot spreads quickly from infected to healthy fruit

After harvest rapid ripening in peach fruits is responsible for short shelf life and represents a serious constraint for efficient handling and transportation. Ripening can be retarded by cold storage. However, cold storage life of peaches is frequently limited by chilling injury and loss of quality. During storage, fruits are subjected to physicochemical and biochemical changes that affect their final texture, and therefore

the qualitative characteristics of processed fruits. The effort of elucidating the ripening mechanism of peach fruits and the maintenance of fruit quality has been based on the modifications taking place in the cell wall. In the attempt to reduce the incidence of brown and soft rot by alternative methods to fungicides, interest in safe, effective and economical substances like food additives or sanitizing products has greatly increased.

The development of noble postharvest biocontrol agent originated from non-toxic and functional microorganism is very important in terms of improving the level of agricultural productivity through the extension of preservation, as well as cultivation of international competition by the product development.

III. Scope and range of research and development

The study of "Commercialization of Postharvest Control Agent for *Prunus* sp. Fruits" was performed for two years. Overall scope and range of research and development could be summarized as follows:

1. In order to investigate the antifungal microorganisms on *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, and *Alternaria alternaria*, microorganisms were separated from healthy human feces and determined their antifungal abilities as above plant pathogenic fungi.
2. Isolation and identification of antifungal microorganism on plant pathogenic fungi from healthy human feces.
3. Isolation and identification of antifungal components from the antifungal microorganism were conducted, and their toxicity assessments(of antifungal components were also performed.
4. Establishment of optimum condition for the development of postharvest biocontrol agent for *Prunus* sp. (Peach).

IV. Results and proposal for the practical use

In order to isolate and identify the antifungal microorganism on the *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*, about 120 microorganisms were separated from healthy human feces. Three kinds of yeasts were isolated as potent antifungal strains on the plant pathogenic fungi, and these strains were identified as *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T, and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 using 26S rRNA sequencing. Phenylethyl alcohol (PEA), tryptophol (TRTP), and phenylethyl acetate (PEAC) were isolated and identified as common antifungal components from the *P. farinosa* SKM-1, *P. anomala* SKM-T, and *G. geotrichum* SJM-59 using open column chromatography, GC-MS, and NMR analyses.

The changes of body weight, food and water intake, and organ weight were not detected in single-dose toxicity test as well as in repeated-dose toxicity test. Besides there were no toxic evidence in hematology, urine examination, histology, and Ames' test. Furthermore, hepatotoxic effects were not detected in repeated-dose toxicity group based on GOT/GPT activity. PEA, TRTP, and PEAC have not possess the cytotoxic activity on normal murine hepatocytes and/or intestinal cell lines. The hemolytic activities of human red blood cell membrane were more stabilized in PEA, TRTP, and PEAC treating groups than that of phosphate buffered saline (PBS) treating group. Consequently, PEA, TRTP, and PEAC were considered as safety materials based on the performed toxicity assessments.

"Peach-taut", postharvest biocontrol agent for *Prunus* sp. and peach, was developed from this study, and the patent related with this pilot product was applied.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	12
1. Technical needs	12
2. Economical-Industrial needs	13
3. Social-Cultural needs	15
4. Purpose and range	15
Chapter 2. International-domestic trends	16
Chapter 3. Results and discussion	19
1. Introduction	19
2. Research methods	22
3. Results and discussion	36
Chapter 4. Achievement and contribution	149
Chapter 5. Application	152
Chapter 6. International techniques	153
Chapter 7. References	155

목 차

제 1 장	연구 개발 과제의 개요	12
1.	기술적 필요성	12
2.	경제·산업적 필요성	13
3.	사회·문화적 필요성	15
4.	연구의 목적 및 범위	15
제 2 장	국내외 기술 개발 현황	16
1.	수확후선도유지를 위한 방안	16
2.	국내연구현황	17
3.	국외연구현황	18
4.	앞으로의 전망	18
제 3 장	연구 개발 수행 내용 및 결과	19
제 1 절	서론	19
제 2 절	연구 수행 방법	22
제 3 절	연구 수행 내용 및 결과	36
I.	복숭아 병원성 진균 저해 활성 보유균주의 탐색	36
1.	<i>Monilinia fructicola</i> , <i>Rhizopus nigricans</i> , <i>Penicillium expansum</i> , <i>Botrytis cinerea</i> , <i>Alternaria alternaria</i> 저해균주의 탐색	36
2.	항진균활성을 보유한 균주의 분리 및 동정	40
II.	항진균활성 물질의 분리 및 동정	51
1.	선정된 미생물 균주로부터 항진균물질의 분리 및 동정	51
2.	항진균물질의 분리 및 구조	80
3.	항진균물질 생산을 위한 최적조건의 설정	87
4.	분자적 수준에서의 항진균기전 탐색	101
5.	항진균물질의 안전성 평가	114
6.	항진균물질 처리에 따른 복숭아의 품질평가	130

III. 시제품 생산 및 이에 의한 항진균 효과 검정	140
1. 복숭아의 수확후선도유지제 개발	140
2. 시제품을 처리한 복숭아에서의 곰팡이 발생률 평가	143
3. 시제품을 처리한 복숭아의 품질 평가	144
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	149
1. 복숭아 병원성 진균 저해활성보유균주의 탐색	149
2. 선정 균주로부터 항진균활성 물질의 분리 및 동정	149
3. 항진균활성 물질 처리후 복숭아의 품질 평가	149
4. 항진균활성 물질의 항진균기전 탐색	150
5. 시제품 생산과 항진균 효과 검정 및 복숭아 처리시의 품질 평가	151
6. 연구성과	151
제 5 장 연구 개발 결과의 활용 계획	152
제 6 장 연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술	153
제 7 장 참고문헌	155

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 기술적 필요성

복숭아는 과피의 발달이 약해 유통 중 품질의 하락이 매우 빠르다. 연화, 부패, 물리적 자극, 수분 손실, 과피 탈색 등이 주요인이다. 따라서 주 생산시기인 6월에서 9월 사이에는 생과 형태로, 나머지 기간에는 통조림 등 가공식품 형태로 유통되고 있다. 다른 작물의 경우 저온유통(cold-chain)을 통해 신선도 연장이 가능하나 복숭아 과실은 저온에 민감한 작물로서 10℃ 이하의 저온에서 2주 이상 저장 할 경우 조직감이 비정상적으로 변하는 woolliness 현상이 발생하고, 과피의 색이 검붉게 변하며, 연화 및 부패가 급격히 일어나는 등의 문제점이 있어 장기저장이 불가능하다. 또한 과육이 연하므로 선별 작업이나 전처리 작업 중 가벼운 물리적 자극이 가해질 경우 품질에 치명적인 문제를 야기시키므로 품질 관리를 위한 처리기술을 선택하기가 매우 까다로운 과일이다.

표 1. 우리나라 복숭아 재배면적 및 생산량 변화

연도 구 분	1980	1985	1990	1995	2000	2001	2002	2003
재배면적 (ha)	10,359	13,138	12,333	10,241	13,876	14,412	15,598	15,880
생산량 (톤)	88,692	131,544	114,578	129,640	170,044	166,275	187,542	189,413
수량 (톤/ha)	8.6	10.0	9.3	12.7	12.3	11.5	12.0	11.9

※ 자료 : 국립농산물품질관리원

따라서 농가에서의 사용이 간편하고, 별도의 처리 시설 및 장치가 필요없으며, 사용시 부작용이 없는 postharvest biocontrol agen (수확후선도유지제)의 개발이 필요한 상황이다. 또한 과육이 약하고 호흡 작용이 왕성하여 저장기간이 짧은 복숭아의 유통 및 저장기간을 증가시키기 위해, 복숭아의 유통에 적합한 수확후선도유지

제를 개발하여 국내 유통을 활성화하고 보다 많은 양의 수출을 가능하게 하여 농가에서의 고부가가치 창출, 관련 과학 산업 기술의 발전 및 국가경쟁력을 확보하고자 본 연구를 수행하였다.

표 2. 복숭아 농가의 연도별 소득 변화(/10ha)

연 도	0	100만원	금액(원)
2004년			2,209,991
2003년			1,777,718
2003년			1,923,997
2001년			2,224,017
2000년			2,063,073
1999년			2,045,956
1998년			2,059,279
1997년			2,182,536
1996년			2,169,618
1995년			1,534,648

※자료: 농촌진흥청 농업경영 정보관실

2. 경제·산업적 필요성

복숭아는 대표적인 여름과일로서 무더위가 한창인 7~8월에 주로 시장에 출하되므로 사과, 배, 감귤 등 과일류의 주요 출하시기와는 경합을 피할 수 있기 때문에 소비량은 매년 안정적인 증가 추세를 보이고 있다. 1980년의 복숭아 생산량은 8만 9,000톤이었는데 매년 생산량이 증가하여 1996년에는 12만 8,000톤, 2005년에는 22만 4,000톤이 생산되었다. 또한 가공용 복숭아가 수입 개방된 1992년 이후에도 복숭아 생산량은 연평균 2.5%씩 높은 비율로 증가하고 있다. 일반적으로 6~9월까지 복숭아 유통이 이루어지나 주 수확기인 7~8월에 집중 출하되므로 이 기간 동안에는 가격이 낮게 형성되지만 다른 시기에는 가격이 급등하므로 월별 가격 변동폭이 다른 과일에 비해서 큰 편이다.

표3. 복숭아 연도별 수출 통계자료

연도	신선복숭아		복숭아 주스		복숭아밀폐포장	
	수출량(kg)	금액(USD)	수출량(kg)	금액(USD)	수출량(kg)	금액(USD)
1996년	30	8	385,908	352,105	241,075	387,058
2000년	22,925	82,113	22,704	26,272	180,725	259,045
2001년	88,192	261,141	24,207	42,645	213,171	285,413
2002년	132,386	542,312	1,029	1,180	692,036	471,142
2003년	-	-	35,655	41,444	176,368	256,404
2004년	39,644	173,405	136	339	86,039	100,784
2005년	9,666	48,130	5,998	6,949	89,434	116,212

※자료 : 농산물 유통공사 농수산물 무역정보

표4. 복숭아 연도별 수입 통계자료

연도	복숭아 주스		복숭아밀폐포장		복숭아 조제저장제품	
	수입량(kg)	금액(USD)	수입량(kg)	금액(USD)	수입량(kg)	금액(USD)
1996년	535,057	1,335,725	11,145,846	9,894,166	283,958	302,192
2000년	1,194,662	2,744,660	7,368,795	5,779,597	58,610	52,666
2001년	1,321,805	2,716,265	9,239,919	6,829,078	33,550	57,750
2002년	1,180,228	2,479,962	11,066,640	7,731,031	84,964	67,535
2003년	1,008,987	2,033,794	8,261,979	6,435,265	137,617	106,929
2004년	692,939	1,666,254	5,914,612	5,405,002	6,711	34,695
2005년	683,346	1,372,380	4,592,088	4,065,182	128,698	123,818

※ 자료 : 농산물 유통공사 농수산물무역정보

3. 사회·문화적 필요성

복숭아는 소비자의 선호도가 매우 높은 과일 중의 하나로 복숭아의 과실은 수확에서 완전히 숙성될 때 품질이 가장 우수하나 전술한 바와 같이 연화, 부패, 물리적 상해 등의 이유로 완전히 숙성되기 전 상태에서 수확하여 유통되고 있다. 수확 후 발생하는 품질 변화를 경감시킬 수 있는 기술이 적용될 경우, 유통기간을 연장시켜 신선한 상품을 소비자에게 공급할 수 있을 뿐 아니라 잘 숙성된 고품질의 복숭아 과실을 공급함으로써 소비자 인지도를 상승시킬 수 있을 것으로 사료되었다.

과실의 생산 및 유통과정에 있어 화학적 농약 및 살균제의 과다 사용에 의해 식물성 병원균 (pathogenic fungi)이 화학적 살균제에 대한 저항성을 빨리 획득할 수 있게 되었다. 따라서 보다 강력한 효과를 발휘하는 화학 농약 및 살균제 사용이 요구되며, 이 경우 토양의 오염도 및 인체에 대한 위해성이 증가할 것으로 사료된다.

따라서 화학합성 농약 및 살균제의 단점을 보완·대체할 수 있는 무공해 제제의 개발이 필요하다. 미생물이 생산하는 물질은 유럽 등에서는 천연의 물질 (natural component)로 인정되고 있다. 이러한 물질은 환경생태계에 영향을 미치지 않고, 토양오염을 유발하지 않으며, 인체에 대한 위해성이 없는 장점을 지니고 있다. 그러므로 미생물을 기반으로 한 postharvest biocontrol agent (수확후선도유지제)를 개발하여 안전하고 깨끗한 복숭아에 대한 소비자의 요구를 만족시키고, 고부가가치의 복숭아 생산 및 유통을 가능하게 하고자 하였다.

4. 연구의 목적 및 범위

본 연구과제인 “미생물로부터 복숭아의 수확후선도유지제 개발 및 상품화” 연구는 ① 복숭아의 병원성 진균류인 *M. fructicola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*에 저해능을 갖는 미생물 균주의 탐색, ② 항진균활성 보유 균주의 항진균기전 탐색 및 항진균물질의 분리 및 동정, ③ 선정된 균주가 생산하는 항진균물질의 안전성 (일반독성, 유전독성, 세포독성) 검정, ④ 복숭아의 수확후선도유지제 개발 등으로 구분하여 2년간의 연구를 수행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 수확후 선도유지를 위한 방안

구분	CA/MA*	미생물제제 (Postharvest biocontrol agent)	무처리
1. 중량	유지	유지	감소
2. 색도	유지	유지	저하/증가
3. 경도 (hardness)	유지	유지	저하
4. 곰팡이 발생률	없음(정균효과)	없음(살균효과)	많음
5. 이취(off-flavor)발생	있음	없음	
6. 처리 후 실온 보관			
① 경도	심각한 저하	유지	
② 곰팡이 발생	급속히 발생	매우 낮음	
③ 부패속도	빠름	느림	
7. 농가에 적용			
① 특별 기술	공기조성이 어려움	적용하기 간편	
② 특별 시설	예냉 시설 필요	필요없음	
③ 사용난이도	어려움	매우 간단함	

*CA/MA: 복숭아를 저온 저장할 경우, wooliness 등의 문제점이 발생하므로 복숭아에 대한 실제적인 적용은 불가능함.

2. 국내 연구 현황

연구기관	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용방안
김일두 경북농업기술원	복숭아 수확후 오존수 침지처리가 품질신선도에 미치는 영향	한국식품저장유통학회지 10: 454~458(2003)
김병삼 한국식품개발연구원	예냉처리가 복숭아의 품질에 미치는 영향	한국식품과학회지 35:1233~1236(2003)
최종욱 식품생물산업연구소	일산화질소(NO)전처리가 MA포장 복숭아의 저장성에 미치는 영향	한국식품과학회지 34:1018~1022(2002)
김동만 한국식품개발연구원	복숭아의 상온유통을 위한 기능성 포장기법	한국식품과학회지 31: 1227~1234(1999)
최정희 서울대학교	복숭아의 Woolliness와 펙틴 물질 대사	한국원예학회 40:574~579(1999)
신승렬 경산대학교	복숭아의 성숙 및 저장중의 세포벽 성분의 변화	한국영양식량학회지 21:372~376(1992)
이재창 충남대학교	에테폰 처리가 자두과실의 성숙과 수확후 유통방법이 품질에 미치는 영향	농산물저장유통학회지 3:155~173(1996)
송대희 숙명여자대학교	셀룰로오스 식용코팅이 자두의 저장중 색 변화에 미치는 영향	한국포장학회 2; 21~32(1996)

3. 국외 연구 현황

연구자 (국가)	연구개발의 내용	연구개발성과의 활용현황
K.G. Tate (New Zealand)	Demostration of the role of ascospores in disease cycle of brown rot in dry regions.	<i>New Zealand J. Crop Hort. Sci.</i> 28:219-224, 2000
J. Mercier (USA)	Control of fungal decay of peaches by the biofumigant fungus <i>Muscodor albus</i> .	<i>Postharv. Biol. Technol.</i> 31:1-8, 2004
S. Tian (China)	Interaction of antagonist yeasts against postharvest pathogens of apple fruit and possible mode of action.	<i>Posthar. Biol. Technol.</i> 36:215-223, 2005
V.H.Tournas (USA)	Mould and yeast flora in fresh berries, citrus fruits. ; The most common moulds were <i>B. cynerea</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Alternaria</i> , <i>Penicillium</i> , <i>Cladosporium</i> , <i>Fusarium</i> .	<i>Int. J. Food Micobiol.</i> 105:11-17, 2005

4. 앞으로의 전망

가. Postharvest biocontrol 제제 및 산업화 연구

- 1) 수많은 국내·외 특허의 취득이 가능함
- 2) 수확후선도유지제에 대한 기술 축적이 가능함

나. 미생물로부터 유래한 천연의 식물성병원균 저해제의 탐색

다. 복숭아의 유통 및 저장 기간 연장을 통한 고부가가치의 창출

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 서론

복숭아는 우리나라 5대 과실 중의 하나이며 재배면적 및 생산량은 매년 증가추세를 나타내고 있다. 복숭아는 생과용과 가공용으로 구분되는데, 가공용은 외국과의 경쟁력이 낮아 대부분은 생과용으로 판매되고 있다. 또한 복숭아는 일시 출하가 불가피하며 이로 인한 가격 경쟁력도 매우 낮고 저장성도 매우 낮은 실정이다.

대부분의 과실은 유통 및 저장시 신선도를 연장시키기 위하여 수확 직후부터 저온 시스템을 적용시키고 있다. 그러나 복숭아는 온대성 작물이면서도 10℃ 이하의 저온에서는 woolliness 등의 저온 장애가 발생되므로 저온시스템을 통한 관리가 어려우며, 실제로 비교적 온도 관리가 용이한 대형 마켓에서도 약 20~22℃의 온도에서 전시/판매되고 있으므로 상온 유통 환경에서 신선도 유지를 증대시킬 수 있는 기술이 필요하다.

복숭아 과실은 수확 후 조직의 연화와 부패 현상이 쉽게 발생되어 유통기간이 비교적 짧은 문제점을 가지고 있어 이를 연장시키기 위하여 저장 중 주기적인 열처리, controlled atmosphere (CA) 및 hypobaric 저장, modified atmosphere (MA) 조작 등 각종 방법들의 효과에 대한 연구들이 수행되었다. 그러나 이러한 연구 결과들을 종합해보면, 복숭아는 일반적인 과실과는 달리 제어된 저장환경 하에서 체내 대사활성이 제어됨에 따른 일부 품질특성들의 손실은 억제되지만 관능특성을 결정하는데 기여하는 화학성분들의 감소나 조직감의 저하 등과 같은 특이한 품질연화 현상을 보이는 경우가 많이 실제적인 적용에 제약이 따르고 있다.

Monilinia sp.는 복숭아를 비롯한 핵과류 과실의 주요 병원균으로, 이들의 감염에 의한 핵과류 과실(복숭아, 살구, 체리)의 손실 (Brown rot)은 상당한 것으로 보고되고 있다. 또한 *Rhizopus* sp.은 실제로 5℃ 이상의 온도에서 핵과류에 번식하여 과실의 연화를 촉진하는 것으로 알려져 있으며, 이들 병원성 진균에 감염된 과실

의 연화 속도는 신선한 과실에 비해 매우 빠른 것으로 보고되고 있다.

갯빛곰팡이 (*Botrytis cinerea*)는 과실썩음병을 유발하는 수확 후의 가장 중요한 병원균 중의 하나이다. 농가에서 *B. cinerea*의 감염 때문에 발생하는 수량의 손실은 50% 이상인 것으로 알려져 있으며, 운송·판매 중에도 피해를 유발하여 과실의 유통기간을 단축시키는 주요 원인균이다.

따라서 *Botrytis*, *Monilinia* 및 *Rhizopus* 등의 병원성 진균을 조절하기 위해 사용되는 화학합성제제는 그 종류가 매우 많으며 경제적으로도 엄청난 금액이 소요되고 있다. 2003년 한 해 동안 유럽에서 *Botrytis* 조절을 위해 소모된 금액은 200~300만 유로이며, 이는 화학합성제제만으로는 *Botrytis*를 조절하는 것이 불가능함을 나타내는 것으로 추정하고 있다. 또한 화학적 농약 및 살균제의 과다 사용에 의해 *Botrytis cinerea*가 화학적 살균제에 대한 저항성을 획득하였다. 따라서 보다 강력한 효과를 발휘하는 화학 농약 및 살균제 사용이 요구되며, 이 경우, 토양의 오염도 및 인체에 대한 위해성은 더욱 증가할 것으로 사료된다. 따라서 화학합성 농약 및 살균제의 단점을 보완·대체할 수 있는 미생물제제에 대한 소비자의 관심이 증가하고 있다.

Botrytis cinerea 및 병원성 진균의 감염을 억제하기 위해 시도되는 효율적이고 안전한 방법인 CA/MA는 농가에서의 예냉 시설 부족과 그 사용 방법의 어려움으로 인해 실용화하는데 어려움이 있다. 또한 고농도의 이산화탄소에 노출된 과실은 이취(off-flavor)를 발생한다. 복숭아를 제외한 다른 과실의 경우, CA/MA 저장시 낮은 온도에서는 문제가 되지 않으나 저장 후 유통을 위해 실온으로 옮겼을 때는 품질의 저하가 매우 빠른 속도로 진행되는 단점을 가지고 있다. 그러나 전술한 바와 같이 복숭아는 낮은 온도에서의 저장으로 인해 품질 열화가 발생하므로 저온 저장법은 복숭아의 신선도를 유지하는데 적용할 수 없는 것으로 알려져 있다.

병원성 진균류를 조절하는 효율적인 방법 중의 하나는 benimidazole과 같은 약제를 prophylactic field spray하는 것이지만, 전술한 바와 같이 chemical residue가 식물에 잔류하거나 postharvest pathogen에 대한 내성을 증가시키며 인체에 유해할 수 있는 큰 문제점을 안고 있다. 그러므로 화학합성 농약 및 살균제의 대체제에 대한 요구와 관심이 끊임없이 증가되고 있는 실정이다.

효모는 식품, 특히 과일, 채소, 곡류의 수확후 저장 중에 발생하는 바람직하지 않은 효모 및 곰팡이를 억제하는 효과적인 biological control agent로 알려져 있다. 효모는 killer toxin을 생산하는데, 이러한 killer toxin은 사람, 동물, 식물의 병원성 곰팡이에 대한 항진균작용을 나타낸다. 따라서 biological control agent로서 효모를 사용하는 것이 세계적인 추세이다.

일본 된장인 shoyu의 초기 발효과정에서 분리동정된 *Pichia farinosa*는 나트륨을 매개로 하여 α 와 β subunit로 구성된 heterodimer인 killer toxin을 생산하는 내염성 균주이다. *P. farinosa*는 *Saccharomyces cerevisiae*과 유사한 기전을 이용하여 cadmium binding protein을 생성하는 것으로 알려져 있다.

*Pichia anomala*는 코코아 가공시 초기 발효과정과 풍미 생성에 관여하는 것으로 알려져 있다. 또한 동남아시아의 전통 음식인 Tape, Ragi 및 Ruou can 등에서도 정상 발효 균주로 분리되었다.

*Galactomyces geotrichum*은 fatty ester와 과일향을 생산하는 균주로 강한 지방분해능과 단백질분해능을 갖고 있다. 이 균주는 Danish feta cheese, Muster cheese 및 Raclette cheese의 숙성 과정에 관여하는 것으로 보고되고 있다. 또한 이들 균주는 건강한 한국인 유아의 분변으로부터 분리동정되었고, 우수한 장내부착능 및 probiotic 특성을 보유하고 있는 인체에 무해한 균주인 것으로 보고되었다.

미생물제제의 개발은 환경생태계에 영향을 미치지 않고, 토양오염을 유발하지 않으며, 안전한 미생물의 경우, 인체에 대한 위해성이 없는 장점을 지니고 있다. 그러므로 미생물을 기반으로 한 postharvest biocontrol agent (수확후선도유지제)를 개발하여 안전하고 깨끗한 과실에 대한 소비자의 요구를 만족시키는 연구가 필요한 것으로 사료되었다.

따라서 본 연구에서는 농가에서의 사용이 간편하고, 별도의 처리 시설 및 장치가 필요없으며, 사용시 부작용이 없는 수확후선도유지제를 개발하고자 하였다. 즉, 복숭아 유통에 적합한 수확후선도유지제(postharvest biocontrol agent)를 개발하여, 복숭아의 유통기간을 연장하고 농가에서의 고부가가치를 창출하고자 하였다.

제 2 절 연구수행방법

1. 병원성진균류 저해제 탐색

가. 시료의 수집 및 분리

Monilinia fructicola, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*의 생육을 저해하면서 인체에 무해한 효모를 분리하고자 건강한 사람 30명의 분변을 수거하였다. 이들은 이십대부터 40대까지의 어른 20명과 4개월부터 48개월까지의 유아 10명으로 구성되었으며, 분변을 수거하기 4주전부터 항생제 및 약제를 복용하지 않았다. 시료의 수집은 3회에 걸쳐 시행되었으며, 분변 수거 시에는 멸균된 용기와 시약스푼을 이용하였다. 1g의 인분 (人糞)에 9 mL의 멸균증류수를 넣고 시료를 균질화시켰다. 그 후에 4겹에 거즈를 이용하여 여과한 여액만을 미생물의 분리에 이용하였다.

나. 항진균력의 측정

상기 방법으로 분리된 효모의 *M. fructicola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*에 대한 항진균력을 측정하기 위하여 simple-plate bioassay를 이용하였다. 즉, potato dextrose agar (PDA, Difco, Detroit, MI., 미국) 위에 효모와 fungal mycelium를 동시에 접종하여 $25\pm 3^{\circ}\text{C}$ 에서 8일간 배양하였다. 항진균력은 효모와 fungal biomass 간에 clear zone이 명확하게 형성되는 것으로 판단하였고, 대조군으로는 *M. fructicola* (한국농용미생물센터, 수원), *R. nigricans* (한국농용미생물센터, 수원), *P. expansum* (한국생명과학연구원, 대전), *A. alternaria* (한국농용미생물센터, 수원), *B. cinerea* (한국생명과학연구원, 대전) 또는 *Saccharomyces cerevisiae* (한국생명과학연구원, 대전)를 이용하였다. 양성의 결과를 얻은 시료는 배양기간을 15일까지 연장하여 항진균력의 지속유무를 확인하였고, 최소저해농도 (MIC)를 측정하였다.

다. Phynotypic characterization

1/5 molten agar plate 위에 cellophane strip를 고정시키고 효모 균주를 접종하여 36시간 동안 배양하였다. 그 후 cellophane strip을 4% glutaraldehyde (Sigma, St. Louis, MO., 미국)로 고정한 후, 0.1 M cacodylate buffer (Sigma, St. Louis, MO., 미국)로 3회 세척하였으며, 30, 50, 70, 80, 95, 100% 에탄올로 순차 탈수하였다. 탈수된 시료는 critical-point dryer (BAL-TEC, CPD 0.30, 미국)에서 건조하였으며, ion-sputter (Hitachi E-101, 동경, 일본)를 이용하여 gold coating하여 주사전자현미경 (Hitachi S-2350, 동경, 일본)으로 효모균주의 형태학적 특성을 관측하였다.

분리된 효모 균주를 Kleyn media (sodium acetate 0.5 g, K_2HPO_4 0.02 g, KH_2PO_4 0.012 g, glucose 0.062 g, NaCl 0.062 g, biotin 2 μ g, mineral solution 1 mL, agar 2 g)에서 3일간 배양한 후 광학현미경을 이용하여 포자형성 유무를 관측하였다.

분리 균주의 탄소동화능은 API 20C AUX (BioMerieux SA 69280, Marcy-l'Etoile, 프랑스)를 이용하여 측정하였다.

라. Genotypic identification

분리된 효모를 potato dextrose broth (PDB, Difco, Detroit, MI., 미국)에 배양하여 30°C에서 24시간 동안 배양한 후, 16,000 \times g에서 2분간 원심분리하여 효모세포만을 수집하였다. 그 후 멸균류수로 2회 세척하였으며, 최종적으로 멸균증류수 100 μ L에 재분산시켰다. 분산액은 10분간 끓인 후에 16,000 \times g에서 5분간 원심분리하여, 그 상등액을 26S rDNA partial-sequencing 분석에 이용하였다.

18/6 (5'CTCAACACGGGGAAA3)와 YAM2 (5'CGACTTCCCTTATCTA CATT3')를 primer로 하여 약 3kb의 fragment를 증폭시켜 PCR를 수행하였다 (98°C /15; 59°C/60; 72°C/12; 35 cycle; 72°C/10 min). 이 때는 NL1 (5'GCATATCAATAA GCGGAGGAAAAG3')과 NL4 (5'GGTCCGTGTTTCAAGA CGG3')를 primer로 이용하여 600 bp-fragment (position 110-709 nt, *S. cerevisiae*)를 sequencing하였다.

Partial sequencing 분석을 위한 26S rRNA gene은 GenBank의 BLAST 프로그램을 이용하여 similarity를 측정하였으며, GenBank로부터 최적의 sequence를 추출하여 phylogenetic 분석을 시행하였다.

Sequence의 alignment와 26S rDNA similarity는 Kimura 2-parameter correction을 이용하여 산출하였으며, evolutionary distance는 Jules & Cator model를 이용하여 산출하였고, CLUSTAL W 프로그램 내의 Neighbor-joining method를 이용하여 phylogenetic tree를 작성하였다.

2. 목적물질의 분리 및 동정

가. 균주의 배양

Pichia farinosa SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T, *Galactomyces geotrichum* SJM-59를 PDB에 접종하여 (O.D. = 0.3 ± 0.05), 140 rpm에서 24시간동안 배양하였다 ($30 \pm 1^\circ\text{C}$). 대수기의 효모를 3,000 rpm에서 원심분리하여 효모균체를 회수하였고, 동결건조하여 목적물질의 분리에 사용하였다.

나. 목적물질의 비극성용매 추출

동결건조된 효모균체 5 kg 및 효모배양액 (효모균체를 제외한 상등액)에 각각 hexane (15 L \times 2), ethyl ether (15 L \times 2), chloroform (15 L \times 2), dichloromethan : pentane = 2 : 1 (15 L \times 2)을 각각 가하여 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 얻어진 여액을 45°C 에서 감압농축하여, 이 농축물을 추출용매 1 mL에 재용해하여 *M. fructicola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*에 대한 항진균력 (simple-plate bioassay)을 측정하였다.

다. 목적물질의 극성용매 추출

동결건조된 효모균체 5 kg 및 효모배양액 (효모균체를 제외한 상등액)에 각각 80% 메탄올 용액 (15 L × 2)을 가하여 실온에서 하룻밤 추출한 후 여과지로 여과하였다. 얻어진 여액을 45°C에서 감압농축하고, 이 농축물을 물 (1 L)과 ethyl acetate (EtOAc, 1 L × 2)로 분배 추출하였으며, 물층은 다시 n-butanol (n-BuOH, 1 L × 2)로 분배추출하였다. 각 층을 감압농축하여 EtOAc 분획, n-BuOH 분획 및 물분획을 얻었다. 각각의 분획물을 rotary vacuum evaporator를 이용하여 감압농축하였고, 용매 (CHCl₃-MeOH-H₂O = 10 : 3 : 1, 아래층) 1 mL에 재용해하여 *M. fructicola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*에 대한 항진균력 (simple-plate bioassay)을 측정하였다.

라. 목적물질의 분리 및 순수분리

M. fructicola, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*에 대한 항진균력 (simple-plate bioassay)이 양성으로 확인된 분획물을 silica gel column chromatography (hexane : EtOAc : H₂O = 12 : 8 : 1, 상층, Φ 7 × 27 cm)를 실시하여 3개의 분획물 (FR1~3)을 얻었다. 이들 분획을 silica gel column chromatography (hexane-EtOAc = 30 : 1, Φ 4.5 × 12 cm)를 이용하여 단일 분획을 얻었다. 얻어진 단일분획은 thin layer chromatography (TLC, hexane : EtOAc : H₂O = 12 : 8 : 1, 상층)와 GC (Hewlett-Packard 5890A, flame ionization detector; FID, capillary column; HP-1, 30 m × 0.25 mm i.e. × 0.33 mm, injector/detector were held at 250°C, oven temperature; 50°C (1 min) // 15°C/min // 230°C (1 min))와 GC/MS로 확인하였다.

3. 유용물질 처리 복숭아의 품질특성

가. 중량감소율 및 수분함량

Phenylethyl alcohol (PEA), tryptophol (TRTP), phethylethyl acetate(PEAC)을 농도별로 복숭아 (40kg)에 혼증한 후 10℃에서 2시간동안 건조하여 수분을 제거한 후 PVC 용기에 넣어 칭량하였다 (W_0). 이후 실온 ($25\pm 2^\circ\text{C}$)에 저장하면서 경시적으로 중량을 칭량하였고 (W_f), 중량감소율은 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{중량감소율 (\%)} = W_0 - W_f / W_0 \times 100$$

수분함량은 상압가열건조법을 이용하였다. 즉, 칭량병의 항량 (W_1)을 산출하고, 일정양의 복숭아를 칭량병에 담고 칭량 (W_2)한 후, 뚜껑을 연 채 뚜껑과 같이 105℃의 dry oven에서 5시간동안 건조하였고, 데시케이터에서 30분간 방냉하여 칭량하였다. 이후 105℃에서 1시간 건조하여 30분간 방냉한 후 칭량하여 항량 (W_3)을 구하였으며, 딸기의 수분함량은 다음의 식으로 산출하였다.

$$\text{수분함량 (\%)} = W_2 - W_3 / W_2 - W_1 \times 100$$

나. 곰팡이 발생율

복숭아를 40 kg씩 15그룹으로 나누어 PEA, TRTP, PEAC로 혼증한 후 10℃에서 2시간동안 건조하여 수분을 제거한 후, 계수하여 (W_0) PVC 상자에 담아 실온 ($25\pm 2^\circ\text{C}$)에 저장하였다. 이 후 경시적으로 한 상자당 표면에 곰팡이가 발생한 복숭아를 계수하였고 (W_f), 곰팡이 발생율은 다음의 공식으로 산출하였다.

$$\text{곰팡이발생율 (\%)} = W_0 - W_f / W_0 \times 100$$

다. pH, 산도 및 당도 변화 측정

복숭아 100 g에 10배수의 증류수를 넣고 마쇄한 후 pH meter를 이용하여 pH를 측정하였고, 마쇄한 복숭아액을 6,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액 중 일정양의 당도를 당도계를 이용하여 측정하였다. 상기 설명한 상등액 10 mL에 phenolphthalein을 넣고 0.1 N NaOH를 가하여 pH 8.2가 될 때까지 적정하였고, 아래의 공식에 따라 citric acid에 대한 산도를 산출하였다.

$$\text{산도 (w/v, \%)} = \frac{(b-a) \times f \times C \times 100 \times \text{희석배수}}{S}$$

b : 적정에 소모된 NaOH의 mL 수

a : Blank 시에 소모된 NaOH의 mL 수

f : 0.1 N NaOH 역가

c : citric acid의 적정계수 (0.0064)

S : 시료 채취량 (mL)

라. 비타민 (ascorbic acid) 함량 변화 측정

Ascorbic acid 용액 2 mL를 시험관에 취하여 요오드화칼륨액 0.2 mL와 전분액 2~3방울을 가하여 microburet을 사용하여 N/1000 요오드화칼륨액을 적정하였다.

$$\text{Ascorbic acid (mg/100g)} = \text{적정치(mL)} \times 1/2 \times 8.8$$

$$A = b \times m/n \times v$$

b : Ascorbic acid의 농도 (mg/100g)

m : 색소액에 대한 ascorbic acid 용액의 적정치 (mL)

n : 색소액에 대한 시료용액의 적정치(mL)

v : 희석배수

Indophenol 용액 1mL를 시험관에 취하고 여기에 전술한 ascorbic acid 용액을 microburet으로 적정하였고, 적색이 없어지는 점을 종말점으로 하였다. 복숭아 100g

에 400mL의 5% 메타인산용액을 가하여 해사를 넣고 마쇄한 후, 여기에 시료 1g에 5mL의 물을 가하여 흔들어서 원심분리하여 상등액을 얻었다. 상등액을 여과지로 1회 여과하여 전술한 바와 같이 indophenol로 적정하였고, 다음의 공식에 의해 ascorbic acid 함량을 산출하였다.

마. 경도 및 texture 변화 측정

복숭아의 경도 및 texture는 각 저장구에서 임의로 6개씩을 취하여 복숭아 섬유질의 수직방향으로 texture profile analysis (TPA)를 측정하였다. Force-time curve는 probe를 복숭아에 2회 연속침투시켜 얻었으며, first bite에서의 가장 높은 peak를 경도 (hardness)로 하였고, first bite에서 제일 처음 관측되는 peak를 fracturability로 하였다. 복숭아의 TPA curve를 얻기 위한 조건은 다음과 같다.

pretest speed	10.0 mm/s	distance(strain)	90.0 %
test speed	5.0 mm/s	force threshold	20.0 g
post test speed	10.0 mm/s	contact force	5.0 g
sample area	1.0 mm ²	probe	2(∅) × 7 mm

바. 에틸렌 생성량 측정

용적이 5 L인 밀봉 유리 용기에 딸기 1kg을 담고 3시간 동안 incubation 한 후 head space용 syringe를 이용하여 가스 1 mL를 취해 GC로 분석하였다.

사. 관능검사 및 통계처리

실험군과 대조군 간의 선호도 검사를 시행하였다. 패널의 수는 12명 (남자 6명, 여자 6명)이었고, 2회 반복하여 실시하였으며, 시료의 번호는 난수표를 이용하였다. 각 실험 결과는 1-WAY ANOVA, Scheffe's multiple comparison test, t-test로 분석하였고, 통계분석은 SPSS 프로그램 (ver. 10.0)을 이용하였다.

4. 발효조건의 설정

가. 탄소원의 선정

P. farinosa SKM-1, *P. anomala* SKM-T, *G. geotrichum* SJM-59를 glucose, yeast extract, peptone, malt extract로 구성된 배지에서 24시간동안 seed culture하였다. 본 배양은 nitrogen based medium (NBM; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 5.0g/L, KH_2PO_4 1.0g/L, MgSO_4 0.5g/L)에 탄소원을 첨가하였다. 탄소원은 glucose, tryptose, maltose, fructose, xylose, sorbitol, soluble starch, lactose을 가하여 30℃에서 24시간 동안 배양한 후 전술한 바와 같이 PEA, TRTP, PEAC를 분리정량하였다.

나. 질소원의 선정

탄소원의 선정 후, 질소원으로 ammonium chloride, NaNO_2 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, urea, asparagine, ammonium citrate, glutamic acid, NaNO_3 , phenylalanine을 첨가하여 전술한 바와 같이 배양하여 PEA, TRTP, PEAC를 분리정량하였다.

다. 최적발효조건의 설정

탄소원과 질소원을 선정된 후, 3 factor rotatable central composite design (Table 1)의 반응표면분석법으로 이용하여 PEA, TRTP, PEAC 생성을 위한 최적의 배지 비율을 선정하였다.

Table 1. 3-factor rotatable central composite design for optimum condition of phenylethyl alcohol production

Trt. No.	X1	X2	X3
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1.682	0	0
10	1.682	0	0
11	0	-1.682	0
12	0	1.682	0
13	0	0	-1.682
14	0	0	1.682
15	0	0	0
16	0	0	0
17	0	0	0
18	0	0	0
19	0	0	0
20	0	0	0

X-1; glucose, X-2; phenylalanine, X-3; pH

5. 목적 물질의 작용 기전 탐색

가. Total RNA의 분리 및 Northern blot analysis

복숭아 50 mg을 액체질소하에 마쇄한 후 trizol (Invitrogen)의 실험법에 준하여 total RNA를 분리하였고, cDNA probe는 PCR을 이용하였다. PCR은 0.125 μ L Taq polymerase, 10 \times PCR buffer 2.5 μ L, dNTP (2.5 mM) mix 2 μ L, 10 pmol primer을 포함한 20 μ L PCR 용액은 94 $^{\circ}$ C 30초, 52~59 $^{\circ}$ C 30초, 72 $^{\circ}$ C 60초, 30회, 72 $^{\circ}$ C 5분간 반응시켰다.

15 μ L PCR 산물 (200 ng)을 10분간 가열한 후 즉시 얼음에 냉각하였고, 2 μ L 10 \times hexanucleotide Mix, 2 μ L dNTP labelling mix, 1 μ L Klenow enzyme을 넣고 37 $^{\circ}$ C에서 20시간 incubation 한 후 65 $^{\circ}$ C에서 10분간 가열하여 반응을 종결하였다.

RNA는 50% formaldehyde, 2.2 M formaldehyde, 1X formaldehyde running buffer (0.02 M MOPS pH 7.0, 5 mM sodium acetate, 10 mM EDTA pH 8.0)에 넣고 65 $^{\circ}$ C에서 20분간 가열한 후 얼음에서 냉각하였다. RNA는 1% agarose gel에서 전기영동 한 후 20X SSC를 사용하여 capillary 법으로 18~24시간 동안 Hybond-N+ membrane으로 transfer하였다. Membrane은 3M paper로 soaking 하였고, 80 $^{\circ}$ C에서 2시간 incubation 한 후 공기 중에서 건조하였다. 42 $^{\circ}$ C에서 30분간 prehybridization 한 후, labeled probe mixture (200 ng/mL)을 넣고 42 $^{\circ}$ C에서 12시간 동안 hybridization 한 후, membrane을 2X SSC, 0.1% SDS buffer로 실온에서 세척하였다.

나. 곰팡이균주에서의 단백질 분리

Cell을 수거하여 10mM Tris-HCl buffer를 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 소니케이션한 후 10% trichloroacetic acid (TCA)와 0.1% DTT넣고 overnight 하여 침전시킨 후 아세톤을 이용하여 pellet을 세척하였다. Pellet을 rehydration solution(8M urea, 2%CHAPS, 0.5% IPG buffer, 15mM DTT, trace bromophenol blue)에 넣고 reconstitute하였다.

다. Two dimensional analysis

Isoelectric Focusing(IEF) Immobilized pH gradients strip을 사용하여 pI값에 의해 단백질을 분리하였다. IPG strip을 rehydration buffer에 넣고 rehydration 시킨 후에 준비된 단백질을 넣고 Isoelectric Focusing System(Bio-Rad) 사용하여 IEF를 시작하였다. Conditioning step(500V, 1h), voltage ramping step(1000V, 1h), Focusing step(8000-1600V, 2h)의 조건으로 분리하였다.

Focused protein을 녹이고, SDS-PAGE를 위해 SDS와 결합할 수 있도록 IPGstrip을 equilibration buffer에 20분동안 담근다. 12.5%의 SDS-PAGE gel을 만들어서 IPG strip을 삽입하여 electrophoresis를 시작하였다.

2-D gel arrays를 분석하기 위해 imaging system을 이용하여 gel spot을 digital form으로 획득하고 이를 analysis software를 이용해 분석하였다.

라. Protein identification

단백질의 Identification을 위해 원하는 spot을 잘라내 eppendorf tube에 넣고 30분 동안 3차 증류수에 washing하였다. Elution buffer를 첨가하여 overnight 후 원심분리하여 상등액을 모아 Poorb cartridge에 통과시킨 후 50% MeOH로 2회 washing하여 단백질을 용출시킨 후 sequencing을 하였다.

6. 안전성 평가

가. 급성 및 아급성 독성시험

생후 7주령의 SD rat를 암수 각각 5수씩으로 나누어 sonde를 이용하여 5배 용량의 시료를 경구투여하였다. 급성독성시험의 경우, 1회 경구투여 한 후 14일간 임상증상 (2회/일)을 관찰하고, 체중을 측정하였다. 관찰 종료 후 부검을 실시하여 육

안적 변화를 관찰하여 기록하였다. 아급성 독성 시험의 경우, 5주령의 SD rat을 암수 각각 5수씩으로 나누어 제품을 28일간 경구투여하여 급성독성시험과 동일하게 평가하였다. 실험동물은 대사케이지에 1마리씩 사육하였으며, 사육실은 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 65%, 12시간 간격으로 빛의 양을 조절하고, 물과 사료는 자유급여하였다.

Table 2. Composition of experimental diets (g%)

Ingredients	Composition
Casein	20.0
Corn strach	15.0
Corn oil	5.0
Cellulose	5.0
Mineral*	4.0
Vitamin**	1.0
L-Methionine	0.3
Sucrose	to make 100

*AIN mineral mix (g/kg mix); CaHPO_4 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K_2SO_4 53, MgO 24, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO_3 0.01, $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.01, $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.55, sucrose 118

** AIN vitamin mix (g/kg mix); thiamin-HCl 0.6, riboflavin 0.6, pyridoxine-HCl 0.7, nicotinic acid 3, D-calcium pantothenate 1.6, folic acid 0.2, D-biotin 0.02, cyanocobalamine 0.001, retinyl palmitate 0.8 (250,000 IU/g) 0.005, menaquinone 0.005, sucrose 972.9

나. 유전독성시험

히스티딘 영양 요구성 변이주인 *Salmonella typhimurium* TA 98 및 TA 100 변이주를 이용한 복귀돌연변이원성을 검증하였다. 녹용제품, 대사활성혼합물 (S9 mix) 0.1mL을 중층 한천 2.0 mL와 혼합한 후 최소 한천 평판의 표면 위에 붓고 배양하기 전에 중층 한천을 굳혀 37°C에서 24~48시간 배양한 후 평판 당 복귀집락수를 계수하였다.

다. 세포독성시험

사람의 위암세포주인 MKN-45는 RPMI1640 배지에 배양하고, 사람의 결장암 세포주인 Caco-2와 HT-29는 DMEM/F12 배지에서 배양하였다. 모든 배지는 열변성된 10% FBS, 1% non-essential amino acids, 160 U/mL benzylpenicillin, 100 U/mL streptomycin을 함유하였다. 세포의 배양조건은 5% 이산화탄소, 90% 습도, 37°C이며, 암 세포주들은 96 well plate에 5×10^4 개/well로 분주하여 72시간 동안 배양하였다. 배지를 Hank's balanced salt solution (HBSS)로 바꾸어 주고, 녹용제품을 $1 \times 10^4 \sim 10^8$ 으로 첨가한 후 37°C에서 4시간 incubation하였다. HBSS를 제거한 후 20 μ L의 MTT 용액 (5 mg/mL in PBS)을 넣고 37°C에서 5시간 incubation하였다. 반응산물에 200 μ L의 DMSO를 넣고 540 nm에서 비색정량하였다.

라. 세포막안정화시험

건강한 O형의 35세 남자 혈액을 제공받아 PBS (pH 7.4)로 세척한 후 혈장과 buffy coat를 흡인제거하였다. 적혈구는 헤마토크리트 치가 약 50%되도록 PBS에 suspension한 후 4°C에 보관하였다. 실험구와 대조구를 $1 \times 10^4 \sim 10^8$ /mL을 140 μ L PBS에 혼합하여 37°C에서 1분간 진탕배양한 후 40 μ L의 적혈구 (10% suspension)을 첨가하였다. 시료를 37°C에서 10분간 incubation 한 후 10,000 \times g에서 원심분리하였다. 상등액을 4배의 3차 증류수에 혼합하여 540 nm에서 비색정량하여 hemolysis (%)를

평가하였다. PBS에 incubation한 적혈구의 hemolysis를 0%로, 3차 증류수에 incubation한 적혈구의 hemolysis를 100%로 하였다.

마. 간효소활성도 측정

PEA, TRTP, PEAC를 식이에 혼합하여 4주령의 ICR 마우스 암수 각각 8수씩 4주간 공급하였다. 마우스는 에틸에테르로 마취하여 희생한 후 복대정맥으로부터 채혈하였다. 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈액 중의 glutamate oxalocetate transaminase (GOT)와 glutamate pyruvate transaminase (GPT)의 활성은 아산제약의 GOT/GPT kit의 방법에 준하여 측정하였다. 실험동물의 사육조건과 급여방법을 전술한 바와 동일하였다.

7. 통계처리

모든 실험군은 평균±표준편차로 표시하였고, 실험군간의 차이가 있을 경우 일원분산분석(ONE-WAY ANOVA)를 행하여 대조군과 유의적인 차이가 있는 경우 Duncan's multiple range test를 실시하였다. 모든 통계처리는 SPSS 13.0 통계 package를 이용하여 분석하였다.

제 3 절 연구수행 내용 및 결과

I. 복숭아 병원성 진균 저해 활성 보유균주의 탐색

1. *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria* 저해균주의 탐색

복숭아의 병원성 진균인 *M. fructicola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*에 대한 항진균력을 지니며 인체에 무해한 미생물을 분리동정 하기 위하여 건강한 사람의 분변으로 약 120여종의 미생물 균주를 분리하여 식물성 병원진균에 대한 항진균력을 측정하였다 (Table 3, Figs. 1~3).

Table 3. Antifungal effect of isolated strains from human feces.

No	R	No	R	No	R	No	R	No	R	No	R
S-1	++	S-21	-	S-41	-	S-61	+	S-81	-	S-A	-
S-2	-	S-22	-	S-42	-	S-62	W	S-82	-	S-B	-
S-3	-	S-23	-	S-43	-	S-63	-	S-83	-	S-C	-
S-4	-	S-24	-	S-44	-	S-64	-	S-84	-	S-D	W
S-5	-	S-25	-	S-45	-	S-65	-	S-85	+	S-E	-
S-6	-	S-26	W	S-46	-	S-66	W	S-86	-	S-F	-
S-7	-	S-27	+	S-47	+	S-67	+	S-87	-	S-G	-
S-8	+	S-28	-	S-48	-	S-68	-	S-88	-	S-H	-
S-9	-	S-29	-	S-49	-	S-69	-	S-89	-	S-I	W
S-10	-	S-30	-	S-50	-	S-70	-	S-90	-	S-J	-
S-11	-	S-31	-	S-51	-	S-71	-	S-91	-	S-K	-
S-12	-	S-32	-	S-52	-	S-72	-	S-92	-	S-L	-
S-13	-	S-33	-	S-53	-	S-73	-	S-93	-	S-M	-
S-14	+	S-34	-	S-54	-	S-74	-	S-94	-	S-N	-
S-15	-	S-35	-	S-55	-	S-75	-	S-95	-	S-O	-
S-16	-	S-36	-	S-56	-	S-76	W	S-96	-	S-P	-
S-17	-	S-37	-	S-57	-	S-77	+	S-97	W	S-Q	+
S-18	-	S-38	-	S-58	+	S-78	+	S-98	W	S-R	-
S-19	-	S-39	+	S-59	+++	S-79	-	S-99	-	S-S	-
S-20	W	S-40	W	S-60	-	S-80	+	S-100	-	S-T	+++

R; response, +; possess antifungal activity, -; negative activity, W; weak positive activity

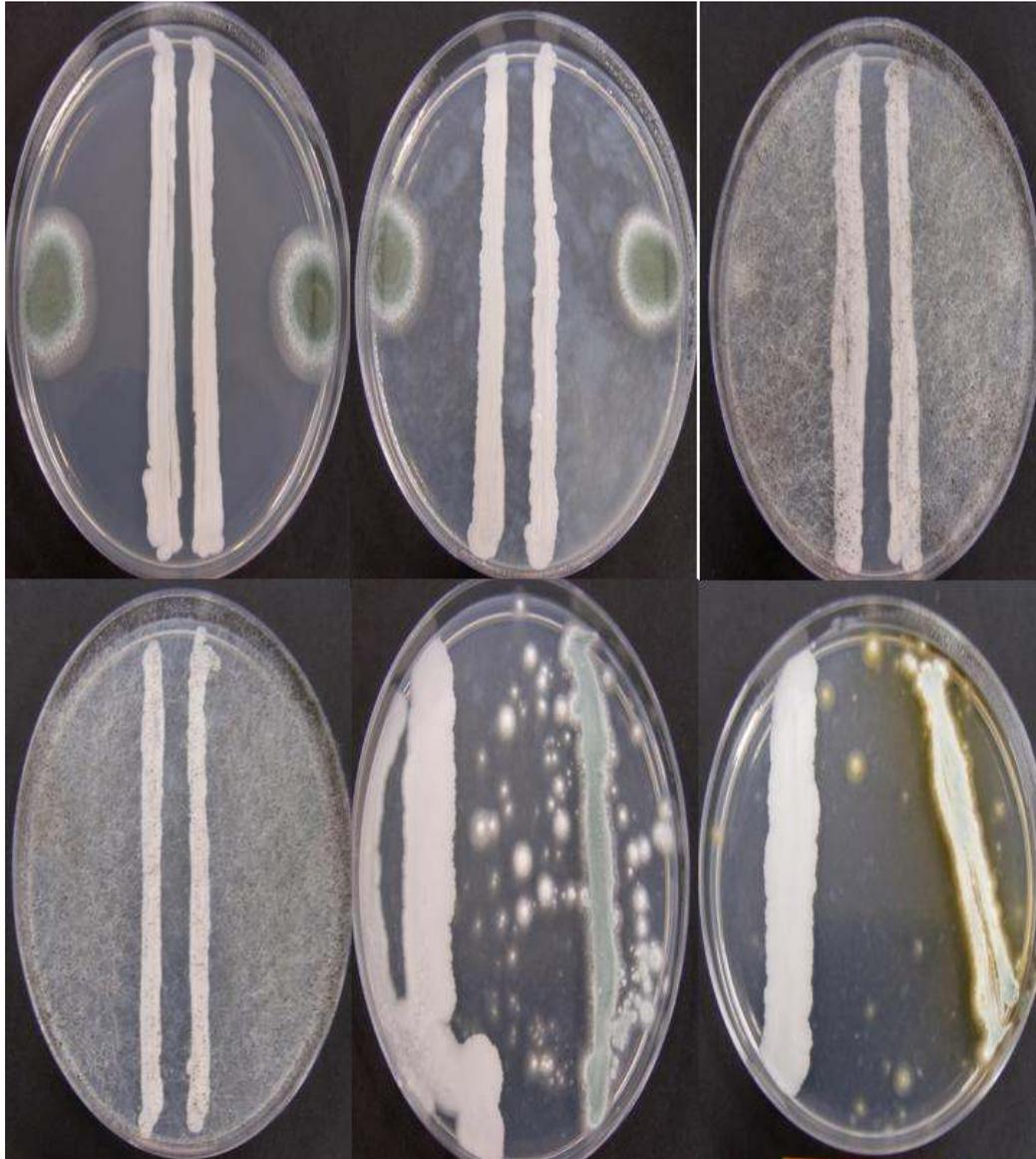


Fig. 1. Antifungal activities of *Pichia farinosa* SKM-1 on the plant pathogenic fungi, *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*

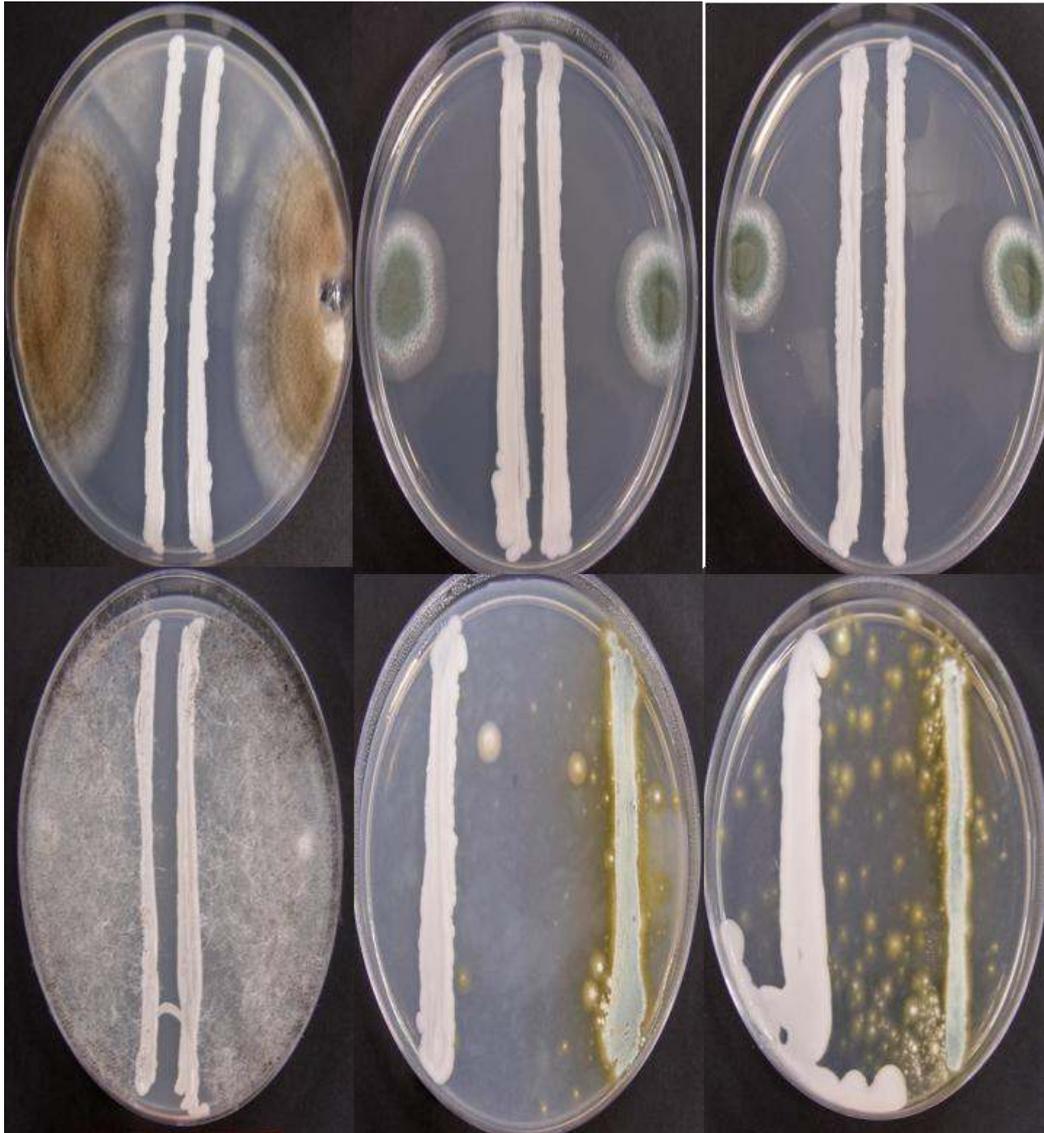


Fig. 2. Antifungal activities of *Pichia anomala* SKM-T on the plant pathogenic fungi, *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*

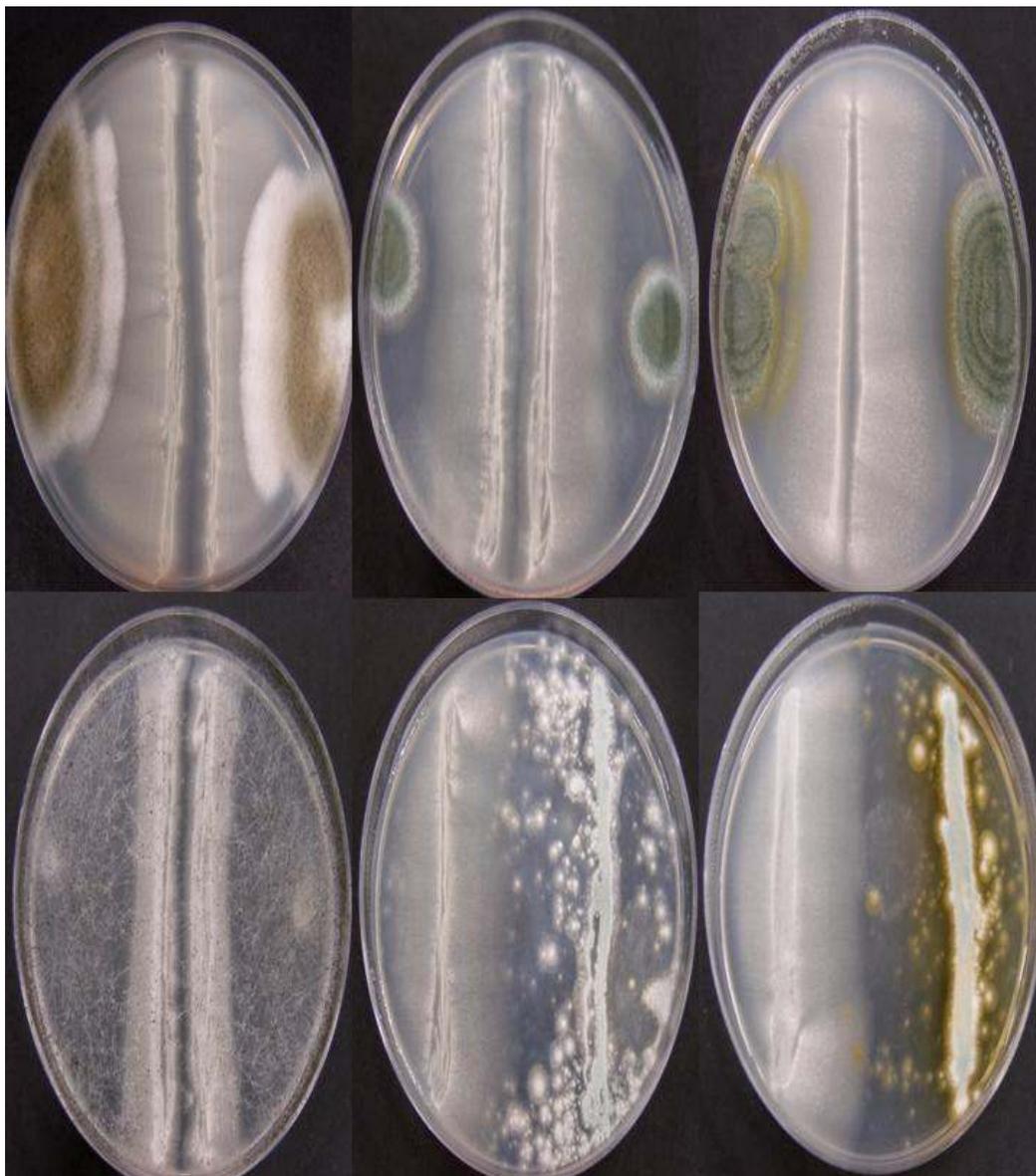


Fig. 3. Antifungal activities of *Galactomyces geotrichum* SJM-59 on the plant pathogenic fungi, *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*

2. 항진균활성을 보유한 균주의 분리 및 동정

전술한 바와 같이 복숭아의 병원성 진균인 *M. fructicola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, 및 *A. alternaria*에 대하여 강한 항진균력을 나타낸 3개의 효모를 선정하여 분리하였다.

3개의 균주에 대한 형태학적 특성을 알아보기 위하여 전자현미경 관측을 한 결과는 Fig. 4와 같고, 이들의 탄수화물 동화능을 측정한 결과는 Table 4와 같다. Table 4의 결과를 보충하기 위해 포자형성능을 측정한 결과는 Fig. 5와 같다. Fig. 5에서와 같이, 분리된 3균주는 heterothalic ascospores를 형성하는 것으로 나타났다. 따라서 Nos. S-1, S-59, S-T은 각각 *Pichia farinosa*, *Galactomyces* spp., *Pichia anomala*로 동정되었다.

보다 정확한 동정을 위하여 26S rDNA partial sequencing 분석을 시행하였으며, 분리균주의 DNA sequence와 homology는 Table 5와 Fig. 6과 같다. No. S-1은 *Candida*, *dbaryomyces*, *Pichia*로 구성된 *Dabryomyces* clade (Fig. 7)에 속하여 표준균주인 *Pichia farinosa* NRRL Y-7553^T와 99.8%의 homology로 동정되었다 (Table 5). No. S-59는 *Galactomyces* sp. NRRL Y-6418^T, *G. citriaurantii* NRRL Y-17913^T, *G. reessii* NRRL 17566^T로 구성된 phylogenetic group (Fig. 8)에 속하며, 표준균주인 *Galactomyces* sp. NRRL Y-6418^T와 97.5%의 homology를 보였고, 표준균주인 *Galactomyces geotrichum* NRRL Y-17569^T와 95.8%의 homology를 보였다. No. S-T는 *P. anomala*, *P. ciferrii*, *P. lynferdii*, *P. subpelliculosa*, *P. sydowiorum*, *Candida silvivultrixar*로 구성된 phylogenetic group (Fig. 9)에 속하며, 표준균주인 *Pichia anomala* NRRL Y-366^T와 100%의 homology로 동정되었다 (Table 5).

따라서 No. S-1은 *Pichia farinosa* SKM-1으로, No. S-59는 *Galactomyces geotrichum* SJM-59로, No. S-T는 *Pichia anomala* SKM-T로 명명하였다.

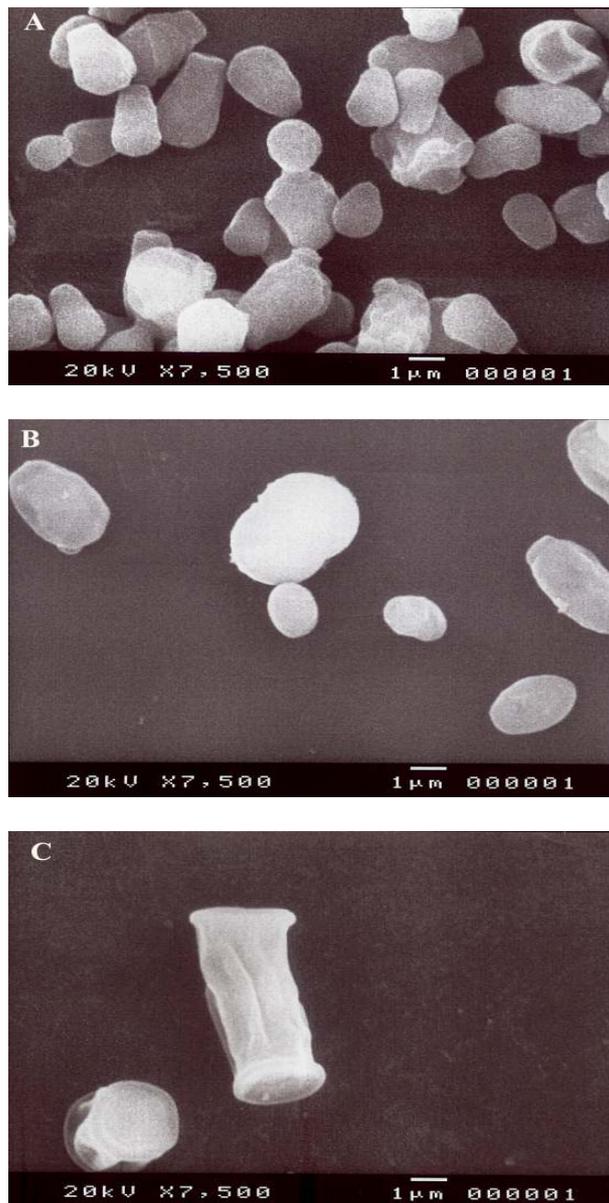


Fig. 4. Morphology of selected three strains using scanning electron microscopy. A, *Pichia farinosa* SKM-1; B, *Pichia anomala* SKM-T; C, *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

Table 4. Carbon compounds assimilation of selected three strains.

Compounds	Strains		
	No. S-1	No. S-T	No. 59
Control	-	-	-
D-galactose	+	-	-
Sucrose	-	+	-
N-acetyl-glucosmine	+	-	-
L-arabinose	-	-	-
Cellobiose	-	W	-
Raffinose	-	+	-
Maltose	-	+	-
Trehalose	+	+	-
α -keto-gluconate	-	-	-
α -methyl-D-glucoside	-	+	-
D-ribose	+	W	-
Rhamnose	W	-	-
Platinose	+	+	-
Erythritol	+	W	-
Melibiose	-	-	-
Glucuronate	-	-	-
D-gluconate	+	-	-
Lactose	-	W	-
Inositol	-	-	-
Sorbitol	+	+	+
D-xylose	-	+	+
Glycerol	+	+	+
Melezitose	-	W	-
Glucose	+	+	+
Actidione	-	-	+
DL-lactate	-	+	W
D-mannitol	+	+	+
Esculine	+	+	+
Adonitol	-	-	-
Xylitol	+	-	W
Levulinate	-	-	-
Sorbose	W	-	+
Glucosamine	-	-	-

+: positive reaction, -: negative reaction, W; weakly positive reaction, N.D.; not detected. S-1; *Pichia farinosa* SKM-1, S-T; *Pichia anomala* SKM-T, No. 59; *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

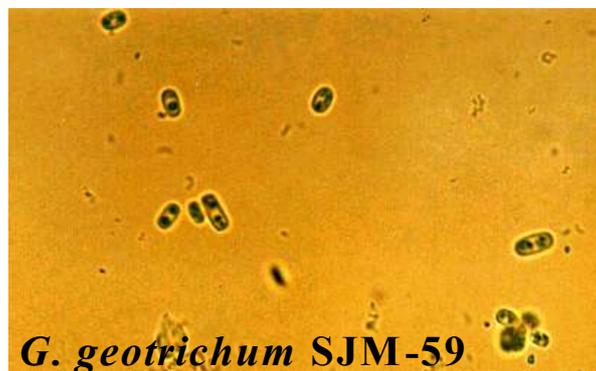
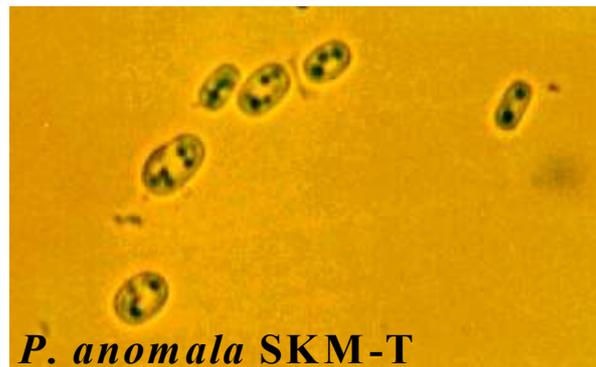
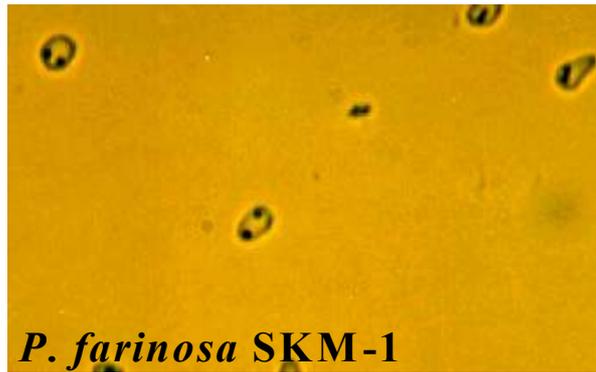


Fig. 5. Ascospores of three isolated strains cultured on Kleyn media for 3 day at 25°C. Sodium acetate 0.5 g, K_2HPO_4 0.02 g, KH_2PO_4 0.012 g, glucose 0.062 g, NaCl 0.062 g, biotin 2 μ g, mineral solution 1 mL, agar 2.0 g, and distilled water was added to make 100 mL.

Table 5. Levels of partial 26S rDNA sequences similarity for selected three strains and representatives of some other taxa.

A :

Strain	% Similarity in :											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 Strain No. S1												
2 <i>Pichia farinosa</i> NRRL Y-7533 ^T	99.8											
3 <i>Pichia acaciae</i> NRRL Y-7117 ^T	94.6	94.4										
4 <i>Debaryomyces polymorphus</i> NRRL Y-2022 ^T	92.5	92.7	90.6									
5 <i>Debaryomyces castellii</i> NRRL Y-7423 ^T	92.1	92.3	90.4	99.3								
6 <i>Debaryomyces vanriijiae</i> NRRL Y-7430 ^T	91.6	91.8	90.3	98.7	98.7							
7 <i>Debaryomyces yamadae</i> NRRL Y-11714 ^T	91.2	91.4	91.0	97.6	98.3	97.4						
8 <i>Debaryomyces occidentalis</i> NRRL Y-10 ^T	91.0	90.8	90.4	96.3	97.0	95.7	97.2					
9 <i>Debaryomyces etchellsii</i> NRRL Y-7121 ^T	90.8	91.0	89.7	94.9	94.6	94.0	95.1	95.5				
10 <i>Pichia spartinae</i> NRRL Y-7322 ^T	91.2	91.4	90.6	94.7	94.4	94.0	94.2	93.0	94.7			
11 <i>Pichia guilliermondii</i> NRRL Y-2075 ^T	90.4	90.3	88.0	93.3	92.9	92.7	91.9	91.7	92.1	91.5		
12 <i>Candida fluviatilis</i> NRRL Y-7711 ^T	91.4	91.2	90.4	95.3	95.3	95.1	95.1	94.0	93.2	93.6	92.8	
13 <i>Candida palmioleophila</i> NRRL Y-17323 ^T	91.2	91.0	90.6	95.3	95.3	94.7	95.1	94.2	93.6	94.4	93.2	98.9

to be continued

B :

Strain	% Similarity in :												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1 Strain No. ST													
2 <i>Pichia anomala</i> NRRL Y-366 ^T	100												
3 <i>Pichia lynferdii</i> NRRL Y-7723 ^T	99.3	99.3											
4 <i>Pichia subpelliculosa</i> NRRL Y-1683 ^T	99.1	99.1	99.5										
5 <i>Pichia sydowiorum</i> NRRL Y-7130 ^T	98.2	98.2	98.6	98.4									
6 <i>Pichia ciferrii</i> NRRL Y-1031 ^T	98.8	98.8	98.6	98.8	97.9								
7 <i>Candida silvicultrix</i> NRRL Y-7789 ^T	97.9	97.9	97.7	97.9	97.2	98.8							
8 <i>Candida odintsovae</i> NRRL Y-17760 ^T	94.2	94.2	93.7	94.0	93.5	93.3	92.8						
9 <i>Pichia hampshirensis</i> NRRL Y-4128 ^T	93.9	93.9	94.2	94.4	94.0	93.8	93.5	94.4					
10 <i>Candida peoriaensis</i> NRRL Y-1497 ^T	94.1	94.1	93.9	93.5	93.3	92.9	92.4	97.2	94.9				
11 <i>Pichia rabaulensis</i> NRRL Y-7945 ^T	94.1	94.1	93.5	93.9	93.5	93.1	92.6	99.5	94.4	96.7			
12 <i>Williopsis mucosa</i> NRRL Y-1344 ^T	94.7	94.7	95.1	95.2	94.7	93.8	93.6	95.6	95.1	95.2	96.1		
13 <i>Pichia strasburgensis</i> NRRL Y-2383 ^T	93.3	93.3	93.7	93.2	93.5	92.9	92.2	92.5	97.4	93.5	93.2	95.6	

to be continued

C :

Strain	% Similarity in :											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 Strain No. 59												
2 <i>Galactomyces</i> sp. NRRL Y-6418 ^T	97.5											
3 <i>Galactomyces geotrichum</i> NRRL Y-17569 ^T	95.8	95.6										
4 <i>Galactomyces citriaurantii</i> NRRL Y-17913 ^T	95.6	94.6	95.4									
5 <i>Galactomyces reessii</i> NRRL Y-17566 ^T	94.6	95.0	95.8	96.4								
6 <i>Dipodascus macrosporus</i> NRRL Y-17586 ^T	89.1	88.7	89.5	88.5	88.0							
7 <i>Dipodascus aggregatus</i> NRRL Y-17564 ^T	84.8	85.2	84.7	86.4	85.6	89.3						
8 <i>Geotrichum klebahnii</i> NRRL Y-17568 ^T	89.1	88.5	88.7	87.9	88.7	92.9	91.2					
9 <i>Geotrichum fermentans</i> NRRL Y-17567 ^T	84.1	83.9	83.3	82.5	83.1	84.5	82.9	82.5				
10 <i>Dipodascus australiensis</i> NRRL Y-17565 ^T	85.2	85.6	86.0	86.9	87.7	84.3	82.3	83.5	79.5			
11 <i>Dipodascus albidus</i> NRRL Y-12859 ^T	87.5	87.3	87.5	88.9	88.1	85.7	87.4	87.7	81.0	87.8		
12 <i>Dipodascus geniculatus</i> NRRL Y-17628 ^T	86.4	86.8	86.6	88.1	87.2	84.7	85.5	86.6	80.5	86.3	95.8	
13 <i>Dipodascus armillariae</i> NRRL Y-17580 ^T	87.4	86.8	87.7	87.5	87.2	91.0	91.0	94.4	82.3	84.3	89.5	87.9

A; *Pichia farinosa* SKM-1, B; *Pichia anomala* SKM-T, C; *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

No. S-1 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATT
No. S-T AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATT
No. 59 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAGCTCAAATT

No. S-1 TGAAATCTGGCGTCTTCGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCTACTTTGGG
No. S-T TGAAATCTAGCACCTTCGGTGTTCGAGTTGTAATTTGAAGATGGTAACCTTGGG
No. 59 TGAAATCTGGCGTCTTCGGCGTCCGAGTTGTAATTTGAAGAAGGCTACTTTGGG

No. S-1 GCTGGAGTTTGTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCG
No. S-T TTTGGCTCTTGTCTATGTTCCCTTGGAACAGGACGTCATAGAGGGTGAGAATCCCG
No. 59 GCTGGAGTTTGTCTAAGTTCCTTGGAACAGGACGTCACAGAGGGTGAGAATCCCG

No. S-1 TGAGATAAGCTTCCCAGTTCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTG
No. S-T TCTGATGAGATGCCATTCCCTATGTAAGGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTG
No. 59 TGAGATAAGCTTCCCAGTTCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTG

No. S-1 GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAG
No. S-T GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAG
No. 59 GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAG

No. S-1 AGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA
No. S-T AGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA
No. 59 AGACCGATAGCGAACAAGTACAGTGATGGAAAGATGAAAAGAACTTTGAAAAGA

No. S-1 GAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGAAGGGCTTGAGATCAGACATGG
No. S-T GAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGG
No. 59 GAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGAAGGGCTTGAGATCAGACATGG

No. S-1 GTATTTTGTAACCTTCTCTCTCGTGGAGGGGGCCCTTGCAAGTTTACTGGGCCA
No. S-T TGTTTTACGATTATCTTCTCTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAG
No. 59 TATTTTGTAACCTTCTCTCTCGTGGAGGGGGCCCTTGCAAGTTTACTGGGCCA

No. S-1 CATCAGTTTGGGCGGTAGGATAATGACTAAGGAATGTGACTTGCCTTCGGGGAA
No. S-T CATCGATTTCGGATGGCAAGATAATGGCAGTTGAATGTGGCTTCACTTCGGTGG
No. 59 CATCAGTTTGGGCGGTAGGATAATGACTAAGGAATGTGACTTGCCTTCGGGGAA

No. S-1 GTGTTATAGCCTTGGTTGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACCGCGTCT
No. S-T GTGTTATAGCTTCTGCTGATATTGCCTGTCTGGATCGAGGGCTGCGTCT
No. 59 GTGTTATAGCCTTGGTTGATACTGCCAGCCTAGACTGAGGACCGCGTCT

Fig. 6. Partial 26S rDNA sequences of selected three strains. S-1, *Pichia farinosa* SKM-1; S-T, *Pichia anomala* SKM-T; 59, *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

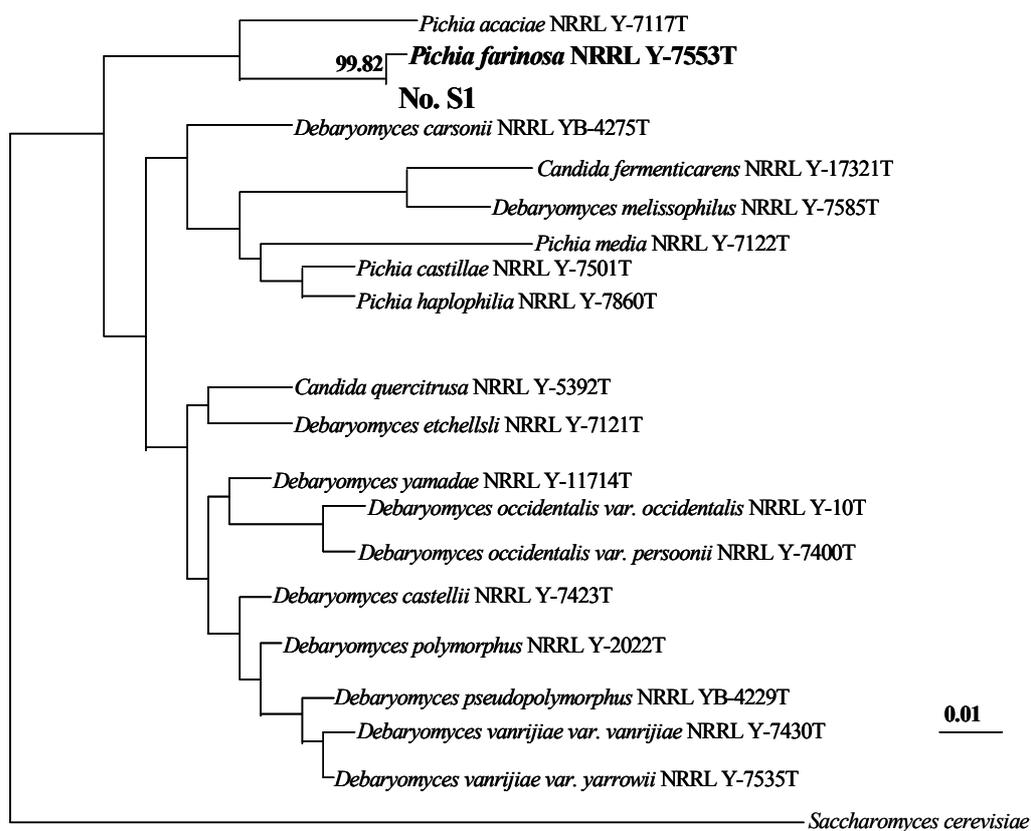


Fig. 7. Phylogenetic tree based on partial 26S rDNA sequences showing the position of strain No. S1 and some other taxa. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

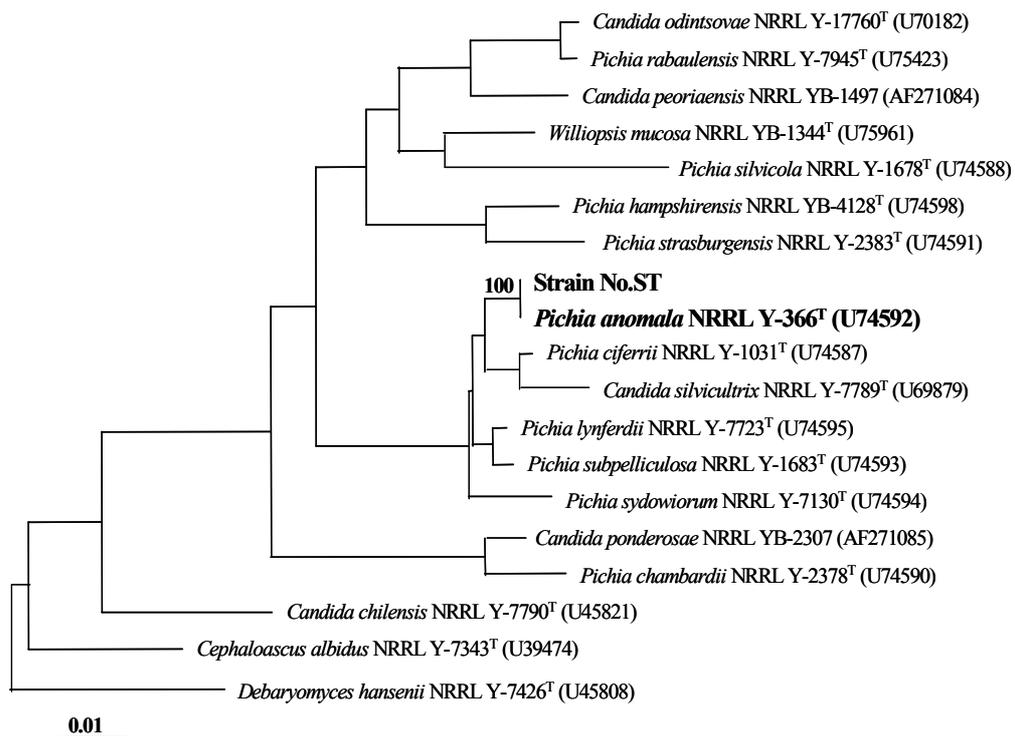


Fig. 8. Phylogenetic tree based on partial 26S rDNA sequences showing the position of strain No. ST and some other taxa. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

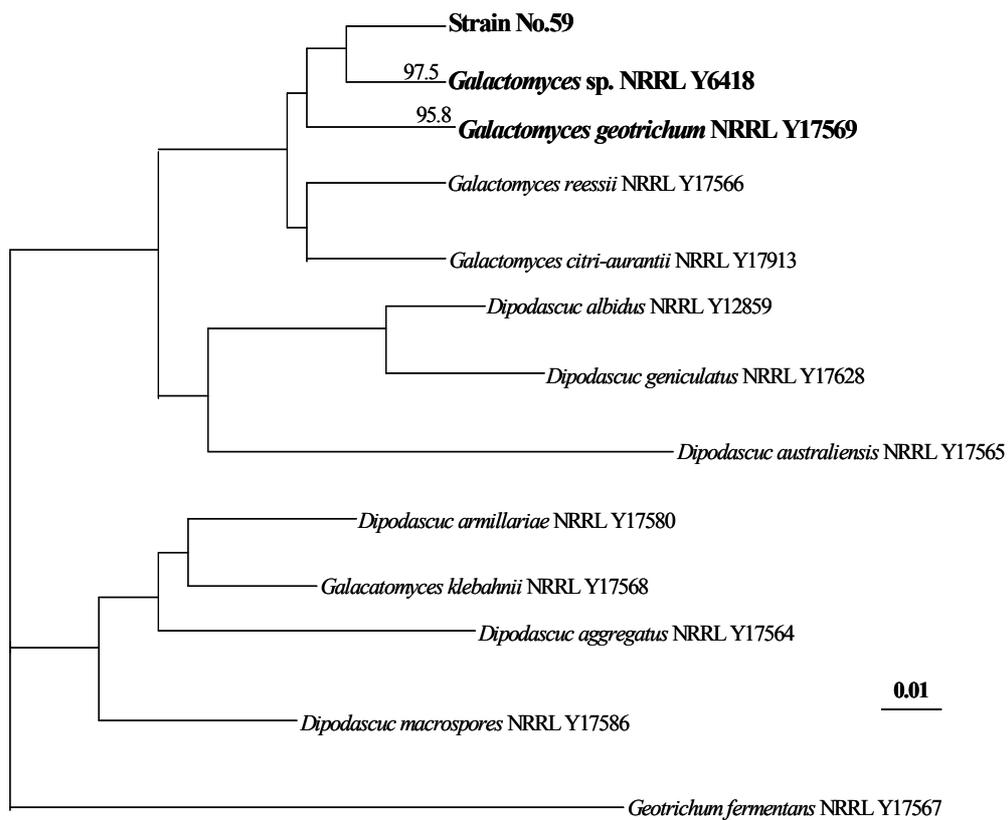


Fig. 9. Phylogenetic tree based on partial 26S rDNA sequences showing the position of strain No. 59 and some other taxa. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

II. 항진균활성 물질의 분리 및 동정

1. 선정된 미생물 균주로부터 항진균물질의 분리 및 동정

P. farinosa SKM-1, *P. anomala* SKM-T, *G. geotrichum* SJM-59 및 대조 균인 *S. cerevisiae*를 potato dextrose broth (PDB)에 배양하여 대수기에 이르면, 대조균인 *S. cerevisiae*를 제외한 분리 효모균에서 다량의 방향성/항진균성 물질을 생성하므로 관능적으로도 목적물질의 생성을 확인할 수 있었다 (Fig. 10). 따라서 배양 24시간째에 추출용매를 첨가하여 효모로부터의 물질 생성을 중단시키고, batch extraction으로 목적물질을 추출하거나 용해도에 따라 순차추출하였다.

극성 용매 추출물에서는 *M. fruticola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*에 대해 항진균력을 나타내는 분획이 없었고, 비극성용매 중 dichloromethan-pentane (D/P) = 2 : 1의 추출분획에서 가장 높은 항진균력을 나타내었다 (Table 6). 따라서 D/P = 2 : 1의 혼합용매를 사용하여 목적물질을 추출하여 GC 및 GC/MS로 확인하였다 (Figs. 10~14, Tables 7~9). 세 가지 효모추출분획에서 공통으로 분리되고 항진균력을 나타낸 물질은 phenylethyl alcohol (PEA), tryptophol (TRTP; 1H-indole-3-ethanol), phenylethyl acetate (PEAC)이었다.

Dichloromethan과 pentane의 혼합용매 추출물 분획 내의 항진균물질을 순수 분리하기 위해 silica gel open column chromatography를 실시하여 약 20개의 분획으로 분리하였다. 상기 분획을 감압농축한 후 추출용매에 재용해하여 simple-plate bioassay를 실시한 결과는 Figs. 15~20과 같았다. Figs. 15~20에서와 같이 각각의 병원성 진균에 대한 추출 분획의 항진균력은 다르게 측정되었다. 그러나 3개의 분획(물질)은 *M. fruticola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*에 대하여 공통적으로 강한 항진균력을 나타내었다. 병원성 진균의 배양기간이 증가할수록 추출 분획의 항진균력이 약해지는 것이 관측되었으나 배양 5일 이내에서는 모두 강한 항진균력을 나타내었으므로 이들을 순수분리하여 동정하였다.

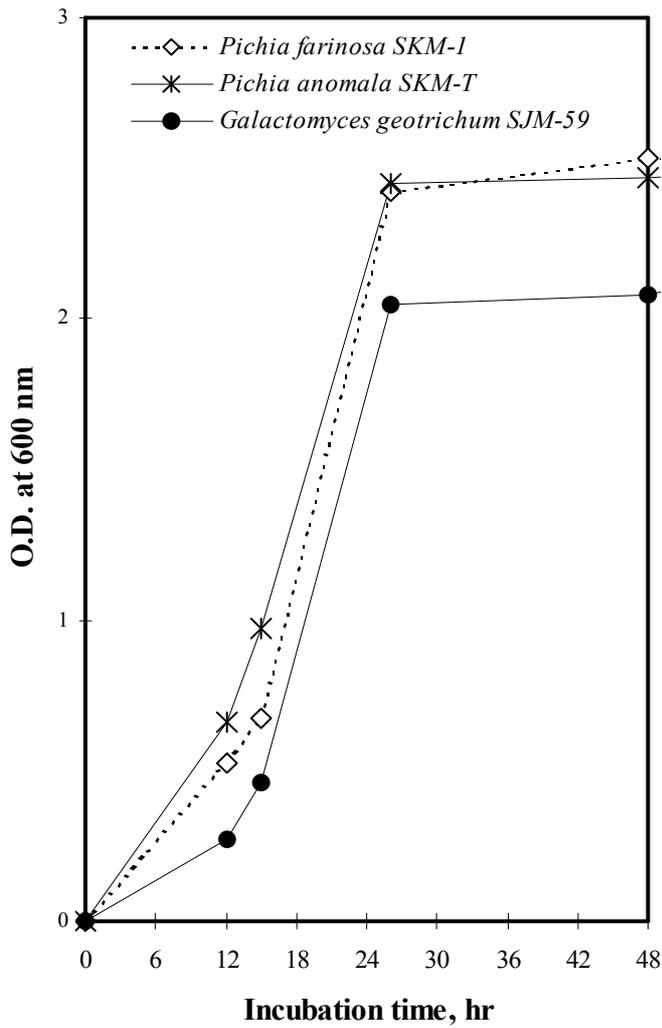


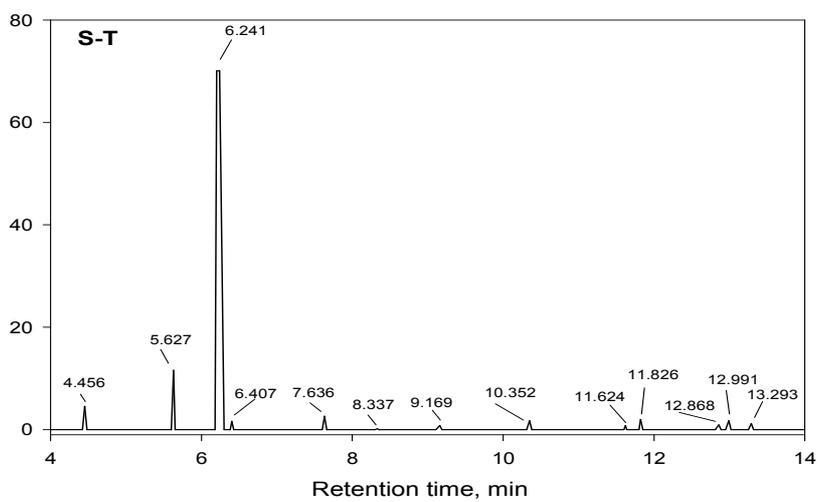
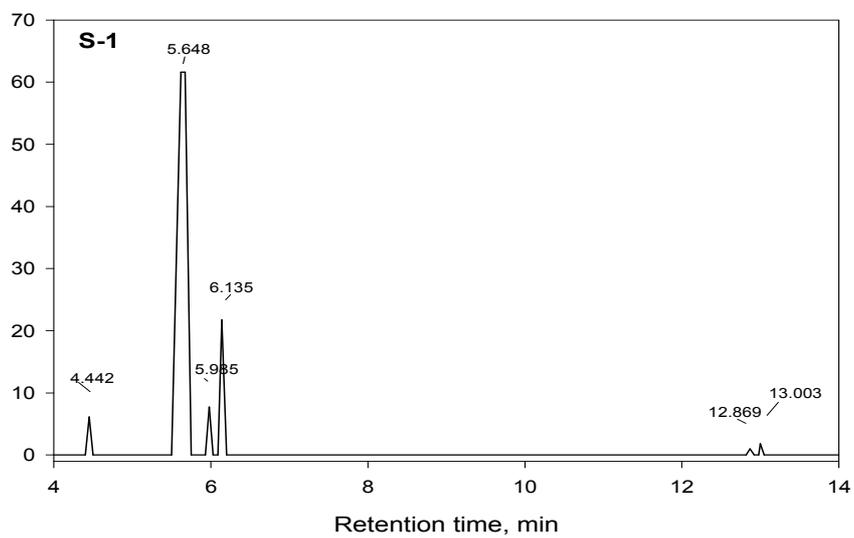
Fig. 10. The growth curves of *P. farinosa* SKM-1, *P. anomala* SKM-T and *G. geotrichum* SJM-59. *P. farinosa* SKM-1, *P. anomala* SKM-T and *G. geotrichum* SJM-59 were inoculated into 1.5 L potato dextrose broth in 3 L Erlenmeyer flask and the three samples were placed on the shaker of 140 rpm for 48 h at $30 \pm 1^\circ\text{C}$.

Table 6. Action of *P. farinosa* SKM-1, *P. anomala* SKM-T, and *G. geotrichum* SJM-59 against the plant pathogene, *M. fructicola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*.

		<i>P.farinosa</i> SKM-1	<i>P.anomala</i> SKM-T	<i>G.geotrichum</i> SJM-59	<i>S.cerevisiae</i>
Non-polar	H	W	++	++	-
	E	-	++	++	-
	C	-	+	+	-
	D/P	++	+++	+++	-
Polar	EA	-	-	-	-
	B	-	-	-	-
	W	-	-	-	-

+; positive antifungal effect, -; negative antifungal effect, W; weak effect.

H; hexane, E; ethyl ether, C; chloroform, D/P; dichloromethan-pentane = 2 : 1, EA; ethyl acetate, B; n-butanol, W; water. *S. cerevisiae* was used as a negative control.



continued

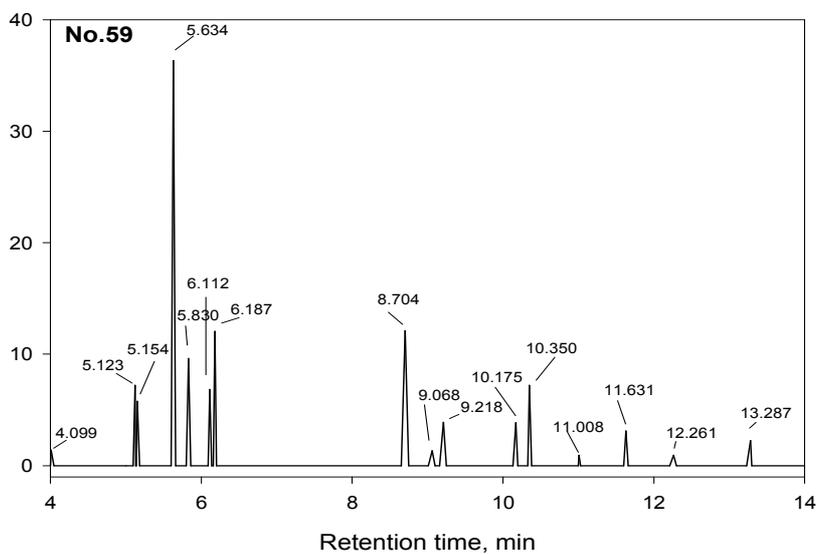
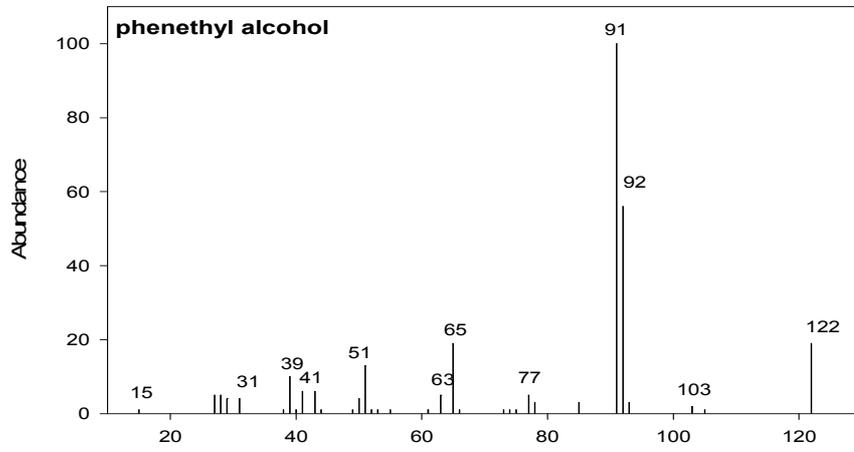
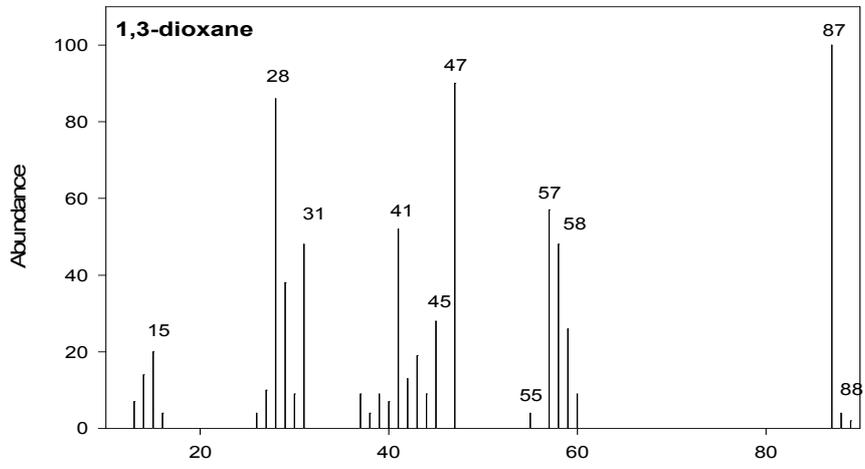
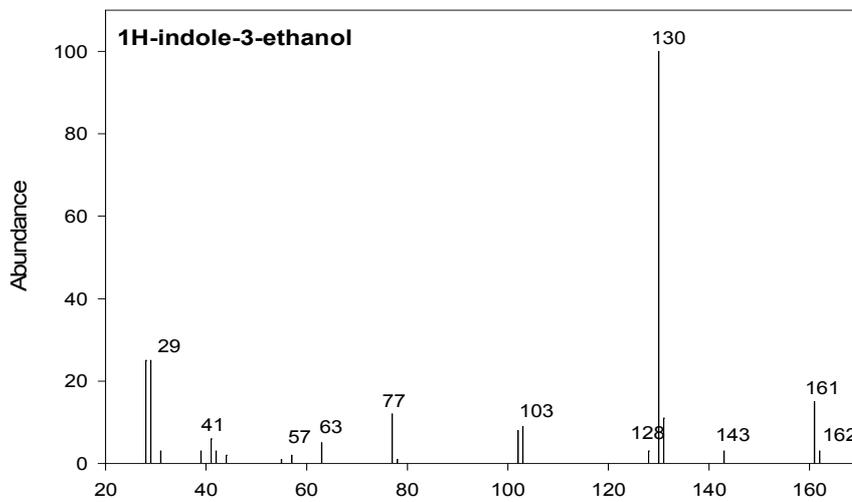
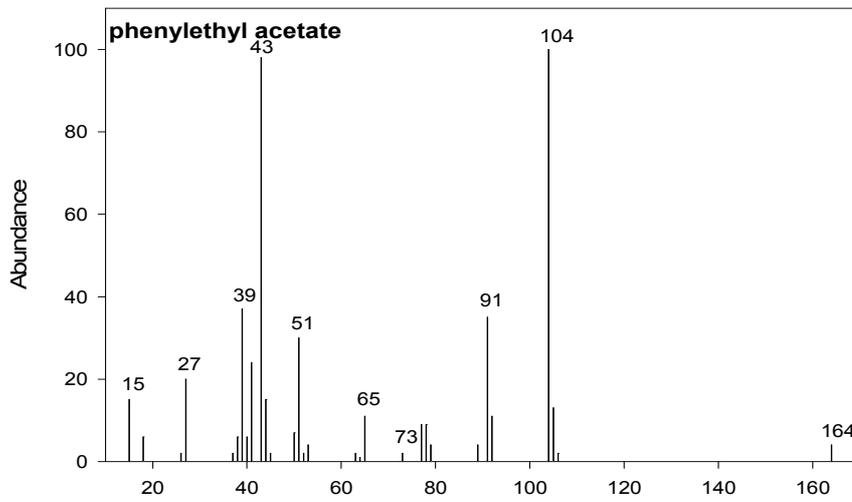


Fig. 11. Chromatograms of antifungal compounds from *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59. S-1; *Pichia farinosa* SKM-1, S-T; *Pichia anomala* SKM-T and No. 59; *Galactomyces geotrichum* SJM-59.



continued



continued

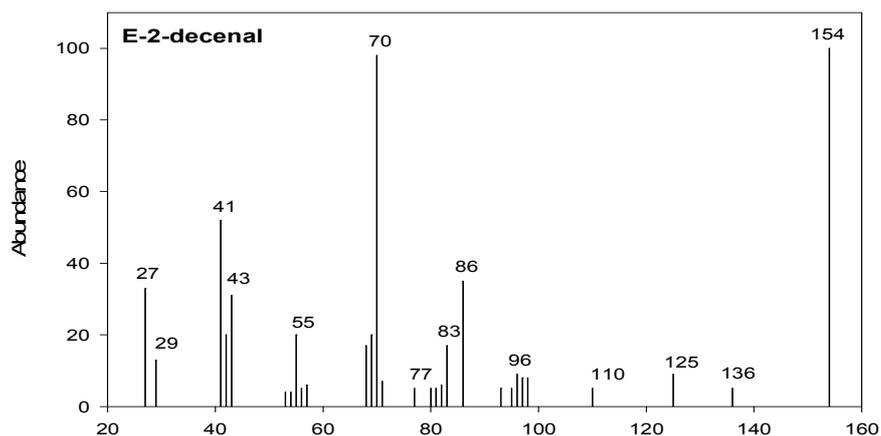
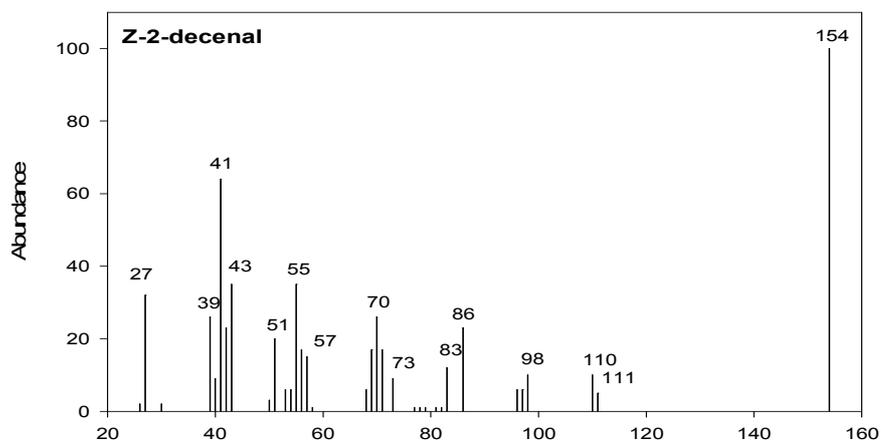
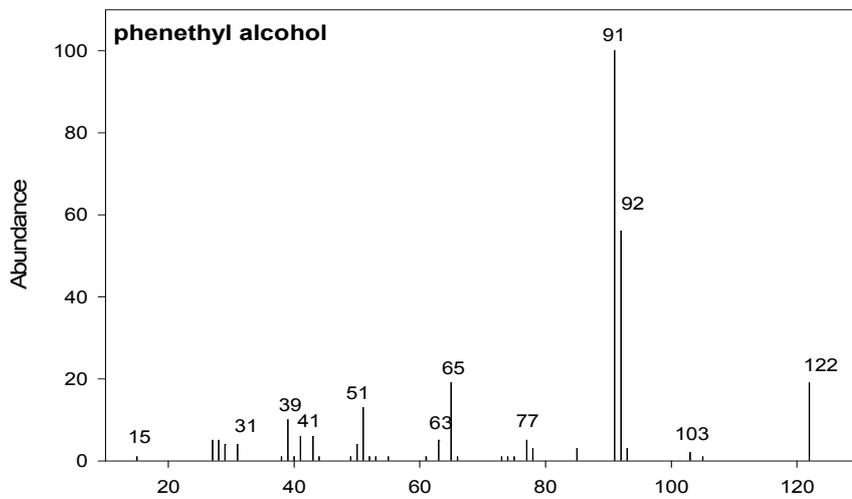
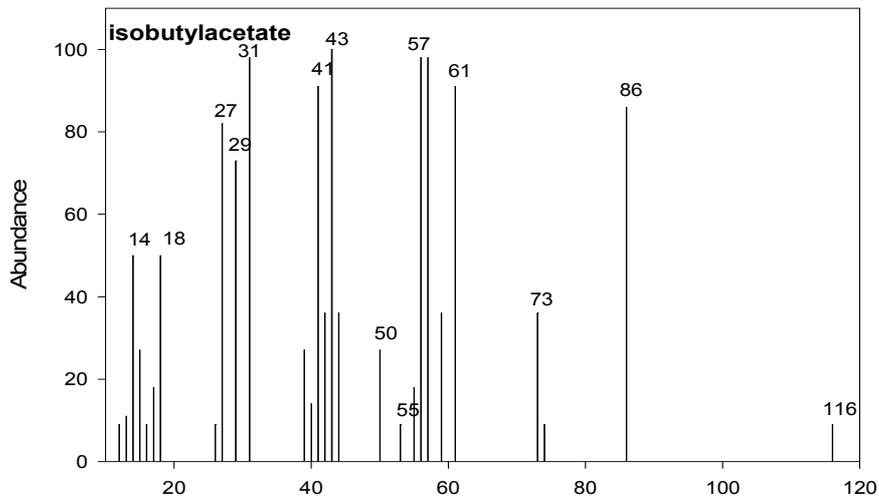


Fig. 12. GC-MS spectrum of identified antifungal compounds from *Pichia farinosa* SKM-1. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV, ion species were normal ion (MF-Linear) and TIC range was m/z 10 to 300. The spectrometric data were compared with those from the NIST Hewlett-Packard 59942C original library mass-spectra.

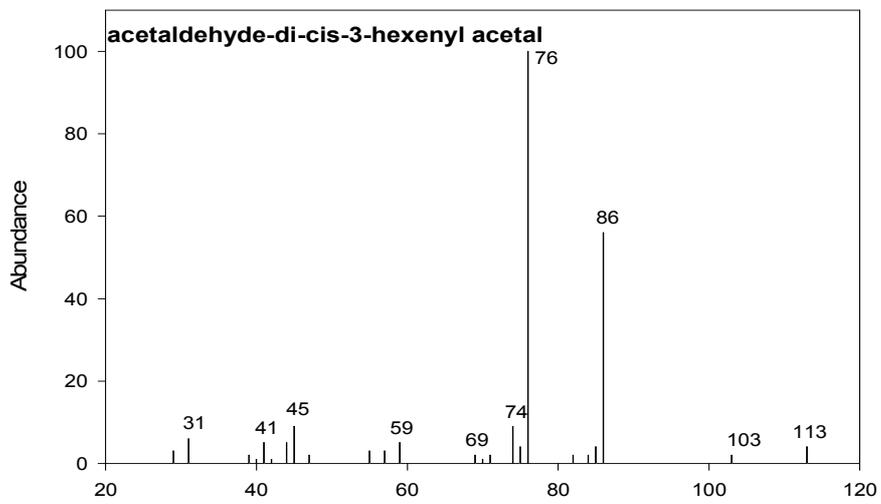
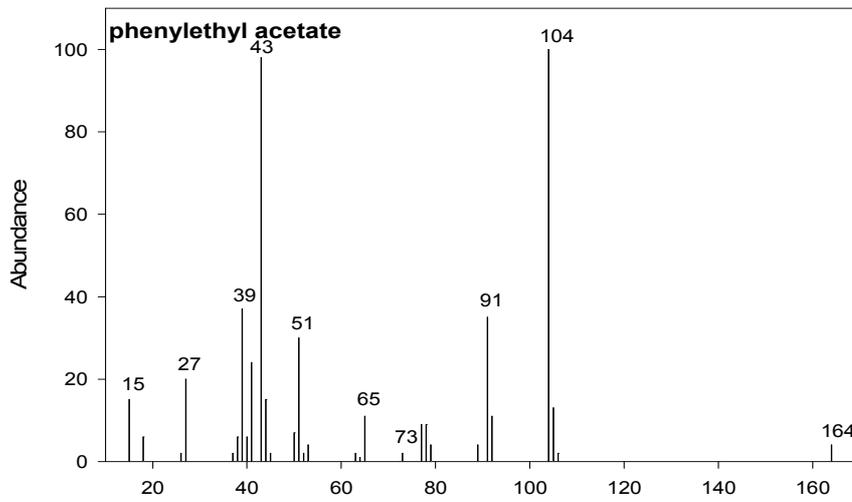
Table 7. Characteristics of identified antifungal compounds from *Pichia farinosa* SKM-1.

No	R.T.*	Compounds	M.W.	Characteristics
1	4.442	1,3-dioxane	88	very sweet, mild-ethereal odor
2	5.648	Internal standard**		
3	5.985	unknown		
4	6.135	phenylethyl alcohol	122	rose-honey odor
5	7.634	phenylethyl acetate	122	very sweet, rose-fruity, honey-like
6	11.814	1H-indole-3-ethanol (tryptophol)	122	auxin precursor
5	12.869	Z-2-decenal	154	waxy-orange-like, sweet-aldehydic odor
6	13.003	E-2-decenal	154	waxy-orange-like, sweet-aldehydic odor

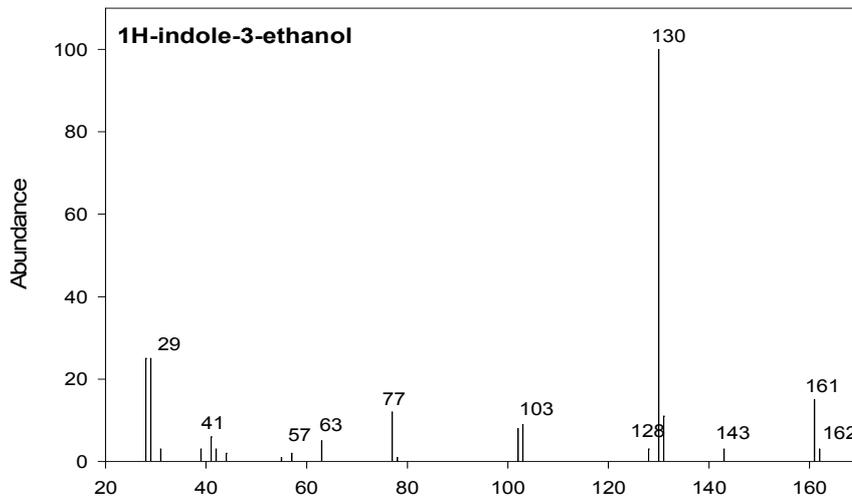
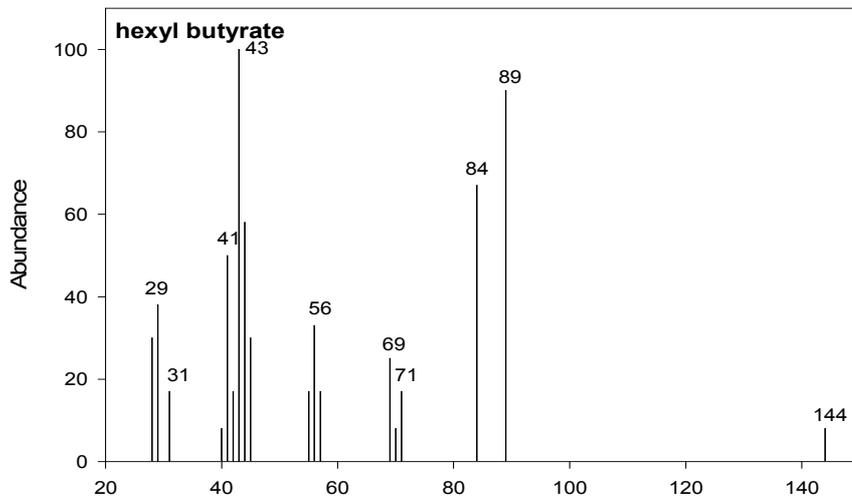
* R.T. is retention time, ** is butyl benzene



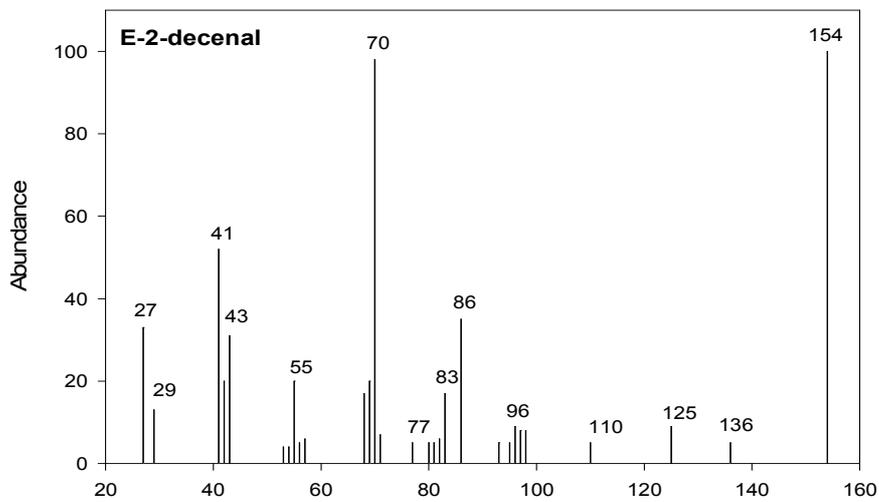
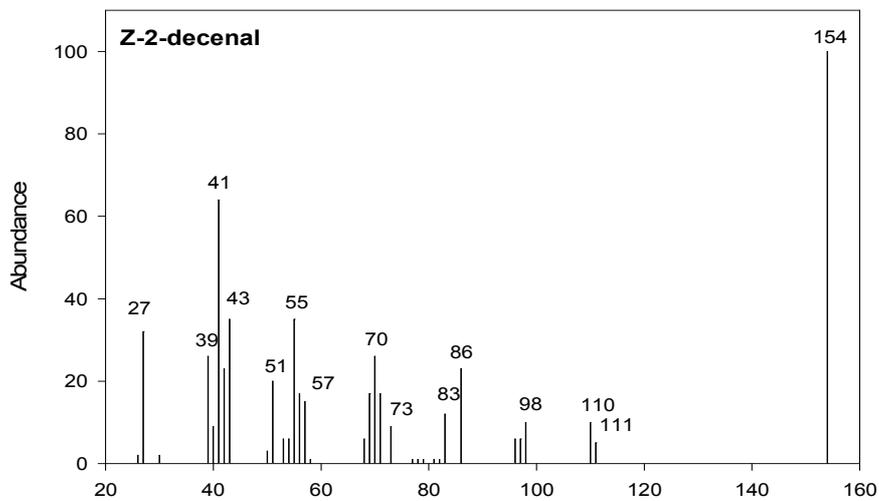
continued



continued



continued



continued

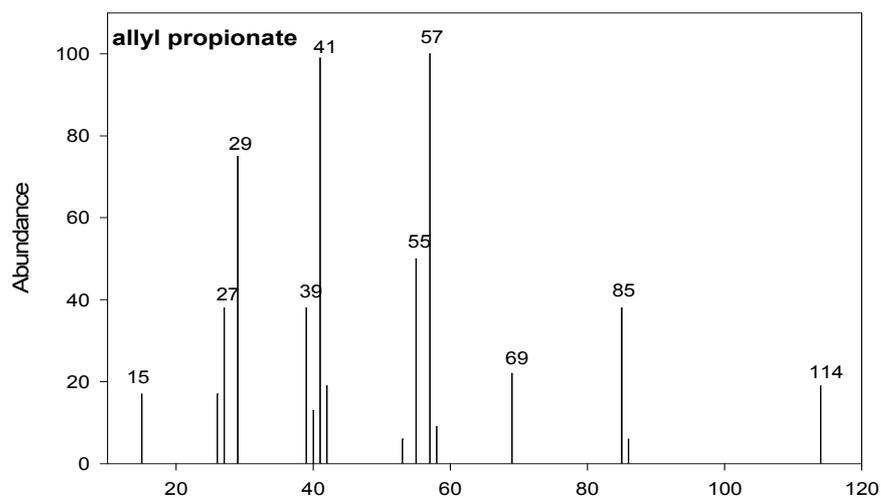
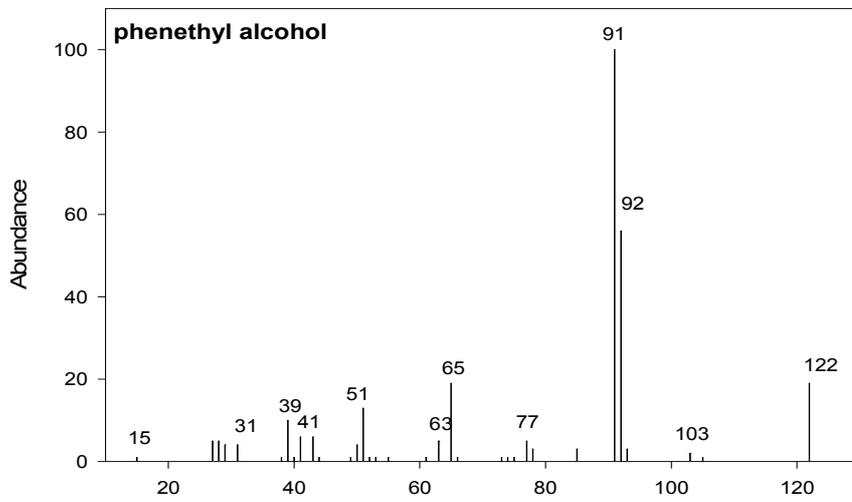
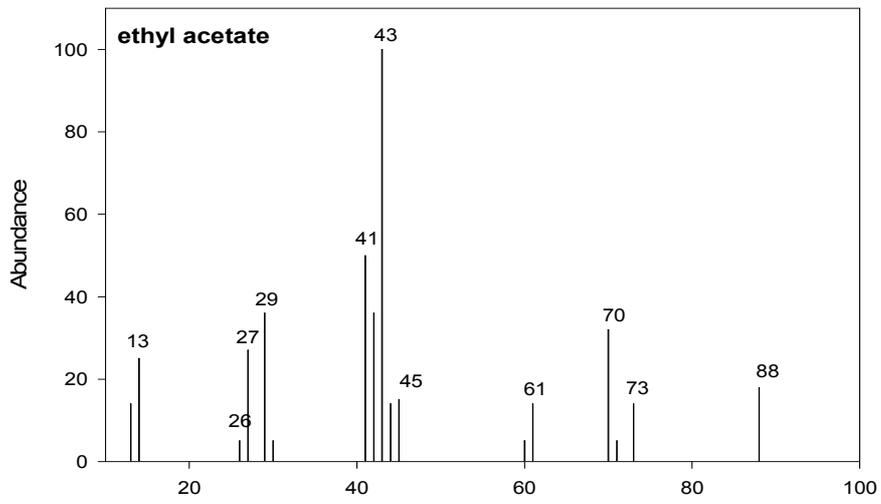


Fig. 13. GC-MS spectrum of identified antifungal compounds from *Pichia anomala* SKM-T. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV, ion species were normal ion (MF-Linear) and TIC range was m/z 10 to 300. The spectrometric data were compared with those from the NIST Hewlett-Packard 59942C original library mass-spectra.

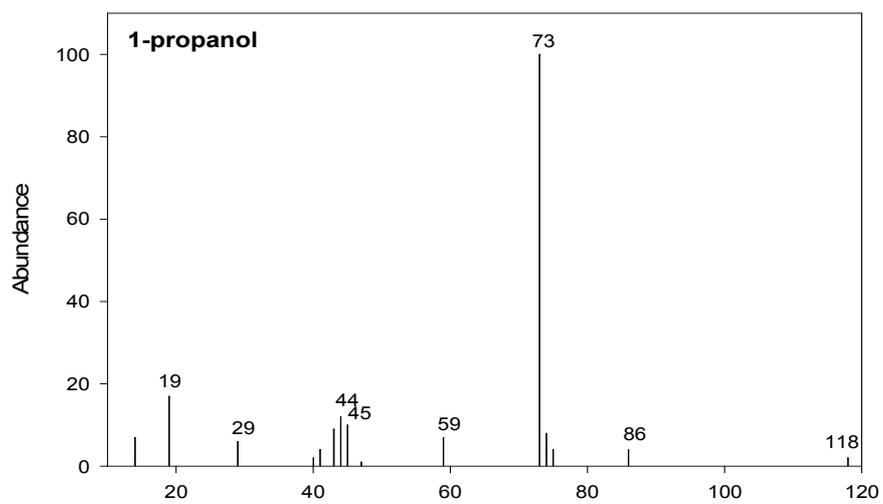
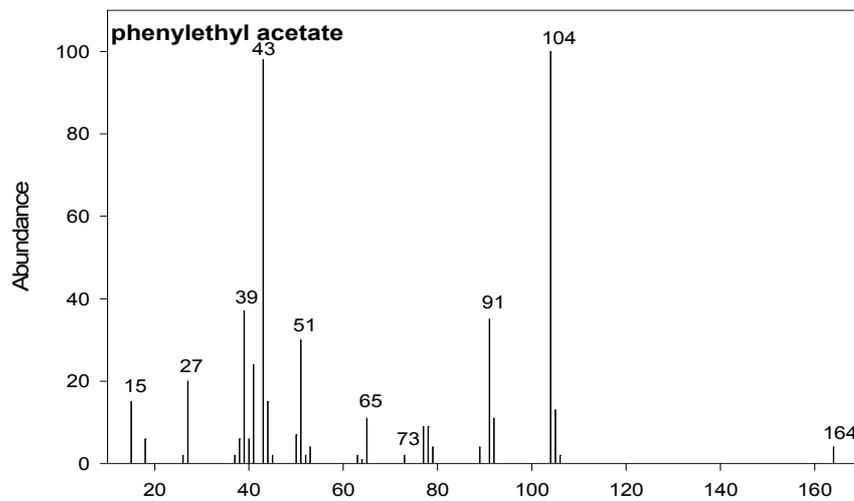
Table 8. Characteristics of antifungal compounds from *Pichia anomala* SKM-T.

No	R.T.*	Compounds	M.W.	Characteristics
1	4.456	isobutyl acetate	116	ethereal, fermented odor
2	5.627	Internal standard**		
3	6.241	phenylethyl alcohol	122	rose-honey like odor
4	6.407	unknown		
5	7.636	phenylethyl acetate	164	very sweet, rose-fruity, honey-like
6	8.337	unknown		
7	9.163	unknown		
8	10.352	acetaldehyde-di-cis-3-hexenylacetal	226	oily-green odor with a sweet taste
9	11.624	hexyl butyrate	172	fruity, heavy odor
10	11.826	1H-indole-3-ethanol	161	auxin precursor
11	12.868	Z-2-decenal	154	waxy-orange-like, sweet-aldehydic
12	12.991	E-2-decenal	154	waxy-orange-like, sweet-aldehydic
13	13.293	allyl propionate	114	sour-fruity odor

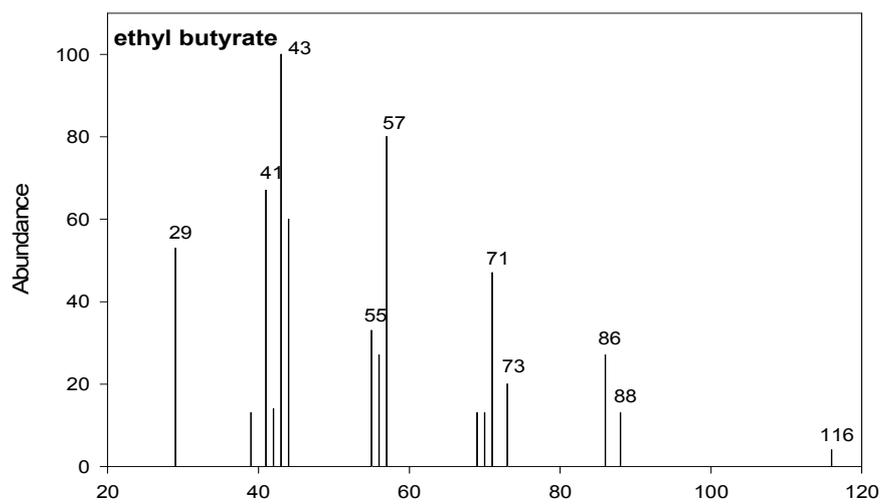
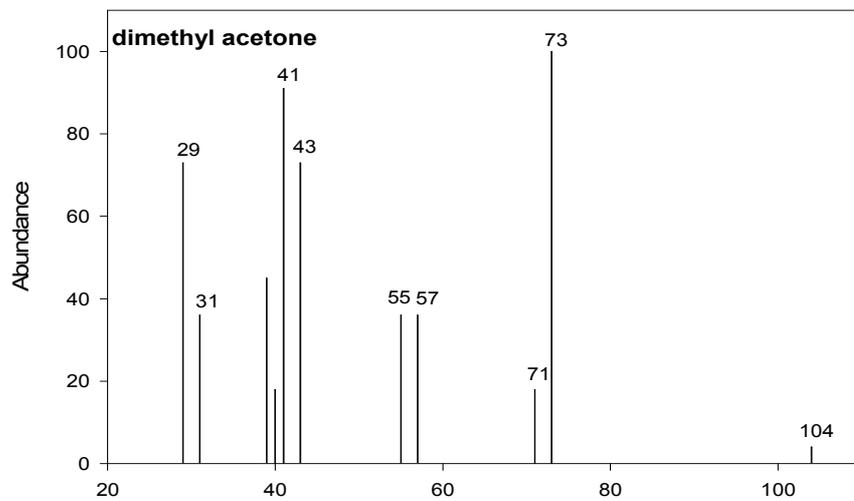
* R.T. is retention time, ** is butyl benzene



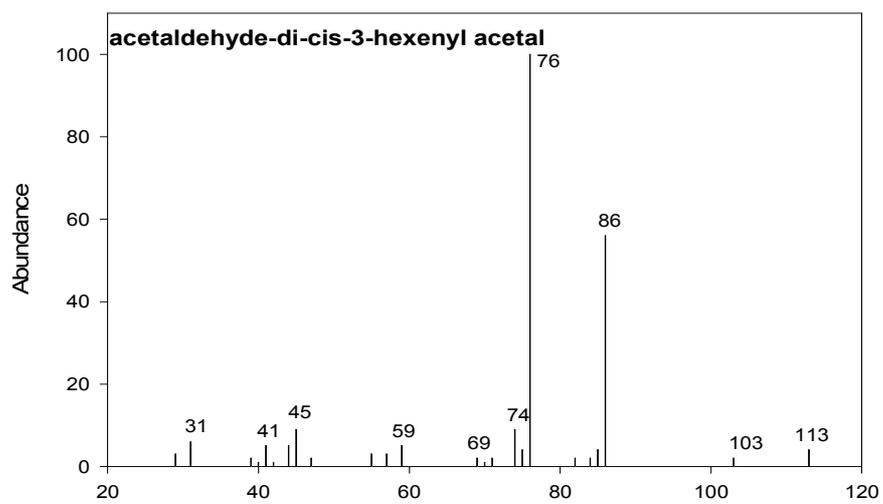
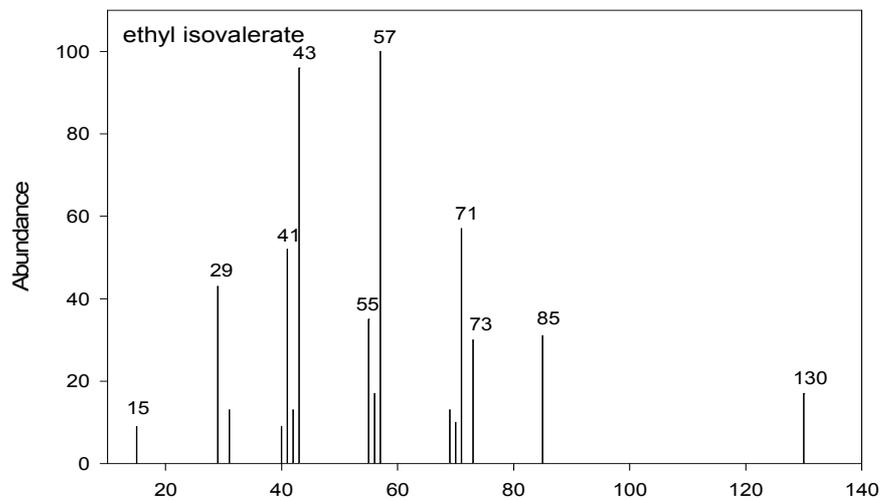
continued



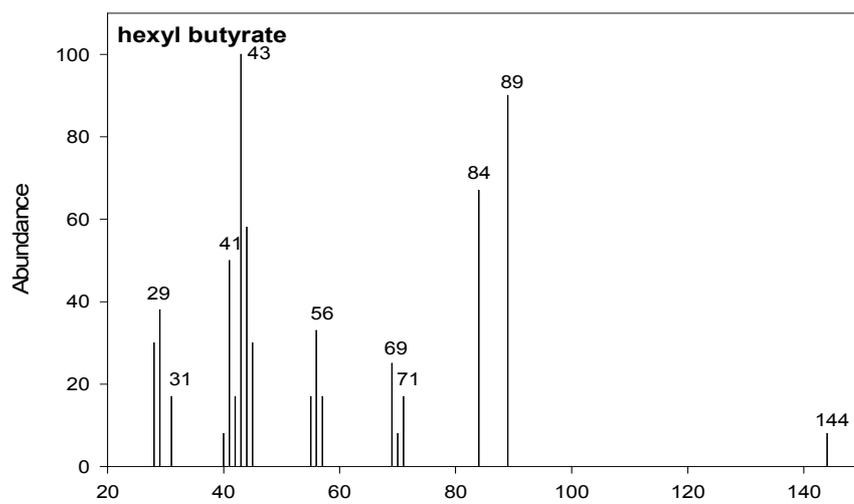
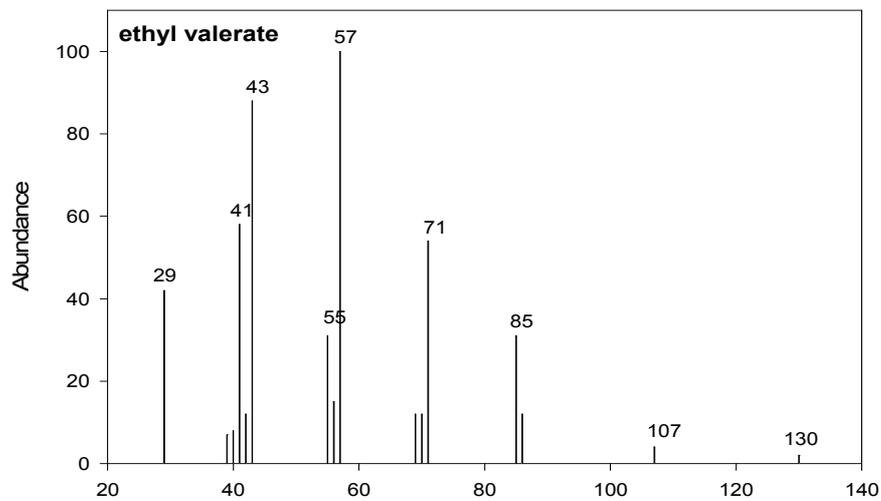
continued



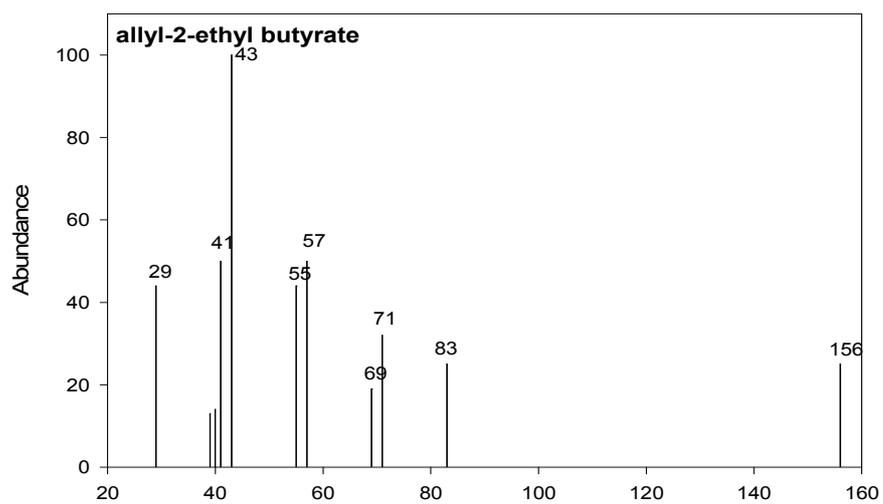
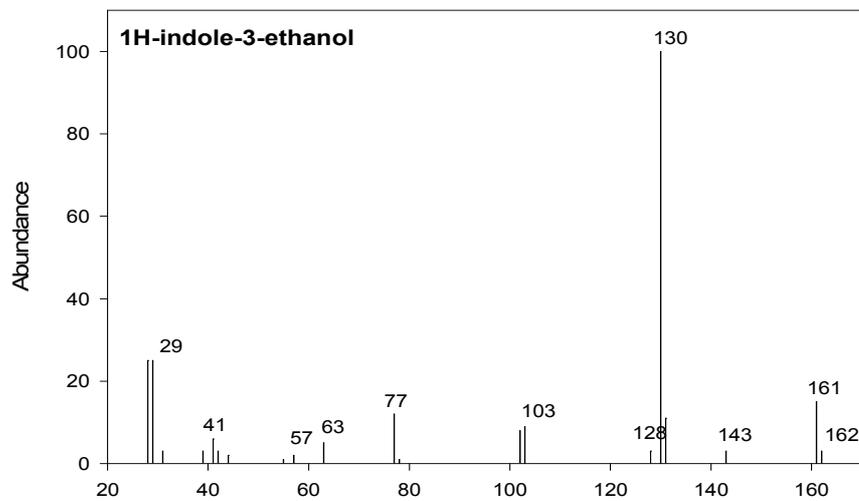
continued



continued



continued



continued

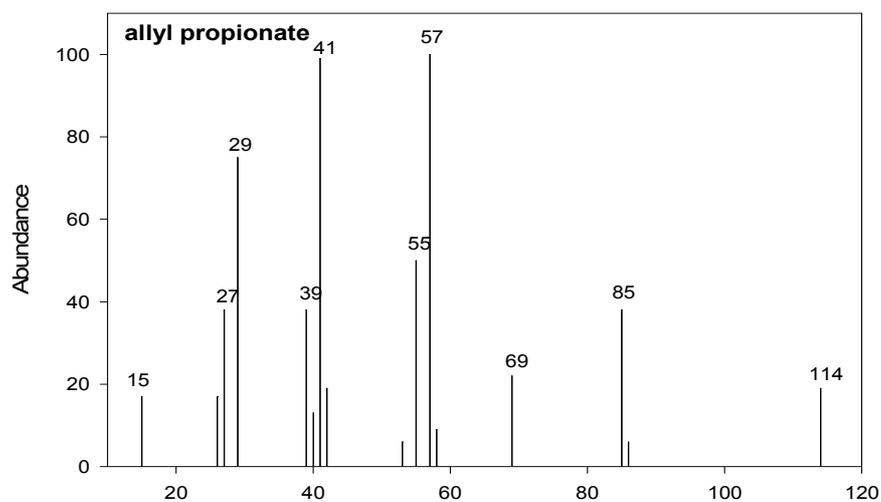


Fig. 14. GC-MS spectrum of identified antifungal compounds from *Galactomyces geotrichum* SJM-59. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV, ion species were normal ion (MF-Linear) and TIC range was m/z 10 to 300. The spectrometric data were compared with those from the NIST Hewlett-Packard 59942C original library mass-spectra.

Table 9. Characteristics of identified antifungal compounds from *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

No	R.T.*	Compounds	M.W.	Characteristics
1	4.099	unknown		
2	5.123	unknown		
3	5.154	ethyl acetate	88	ethereal, fruity, brandy-like odor
4	5.634	Internal standard**		
5	5.830	unknown		
6	6.112	unknown		
7	6.187	phenylethyl alcohol	122	rose-honey like odor
8	7.625	phenylethyl acetate	164	very sweet, rose-fruity, honey-like
9	8.704	1-propanol	60	alcoholic, sweet odor
10	9.068	dimethyl acetone	104	ethereal odor
11	9.218	ethyl butyrate	116	fruity, pineapple, banana, ethereal
12	10.175	ethyl isovalerate	130	fruity, apple on dilution odor
13	10.350	acetaldehyde-di-cis-3-hexenylacetal	226	oily-green odor with a sweet taste
14	11.008	ethyl valerate	130	fruity, apple odor
15	11.631	hexyl butyrate	172	fruity, heavy odor
16	11.831	1H-indole-3-ethanol (tryptophol)	161	auxin precursor
17	12.261	allyl-2-ethyl butyrate	156	oily-fruity odor
18	13.287	allyl propionate	114	sour-fruity odor

* R.T. is retention time, ** is butyl benzene

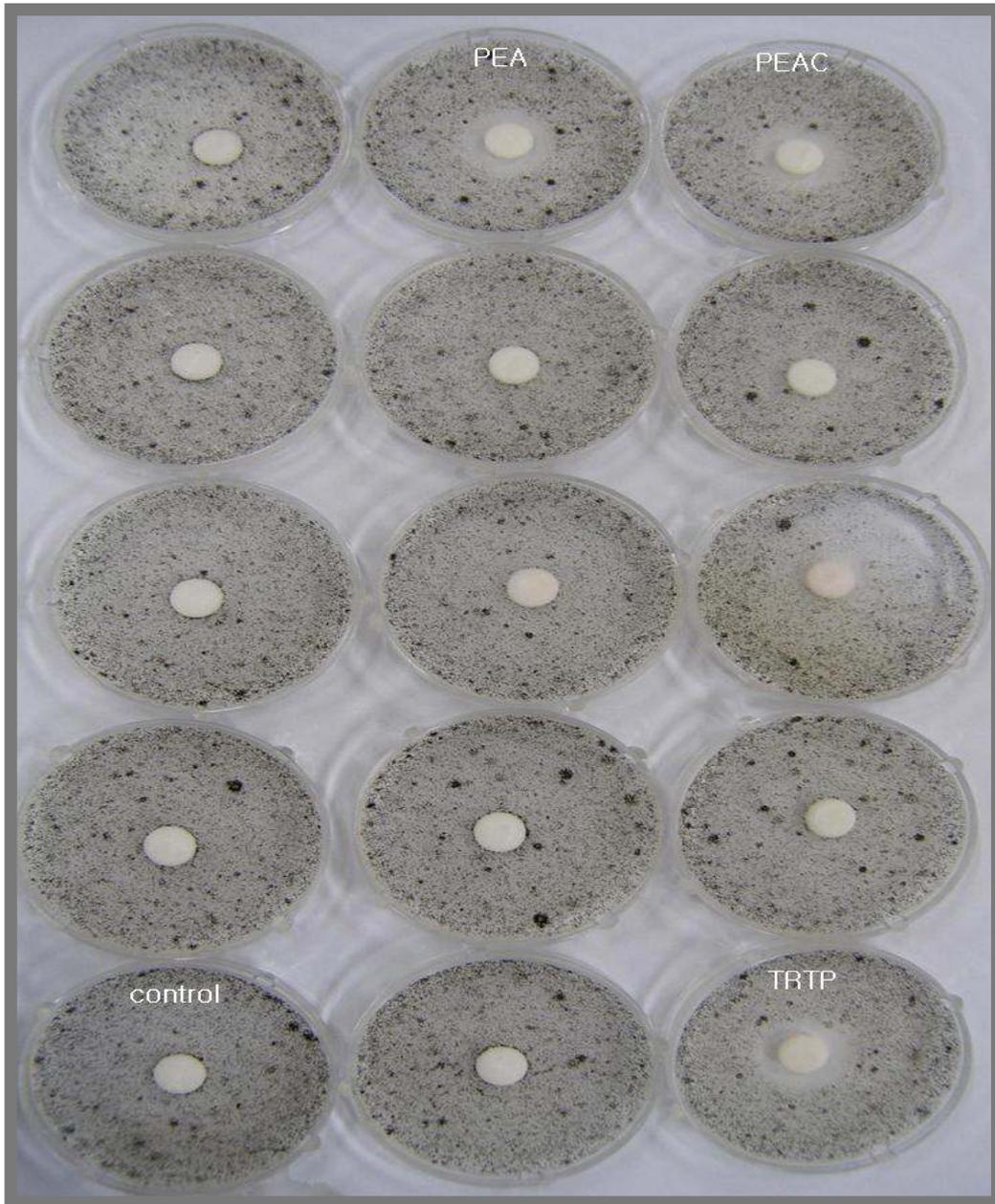


Fig. 15. Antifungal activities of separated components from *P. farinosa* SKM-1, *P. anomala* SKM-T, and *G. geotrichum* SJM-59 on *Altaria alternaria* of eight days of fermentation.

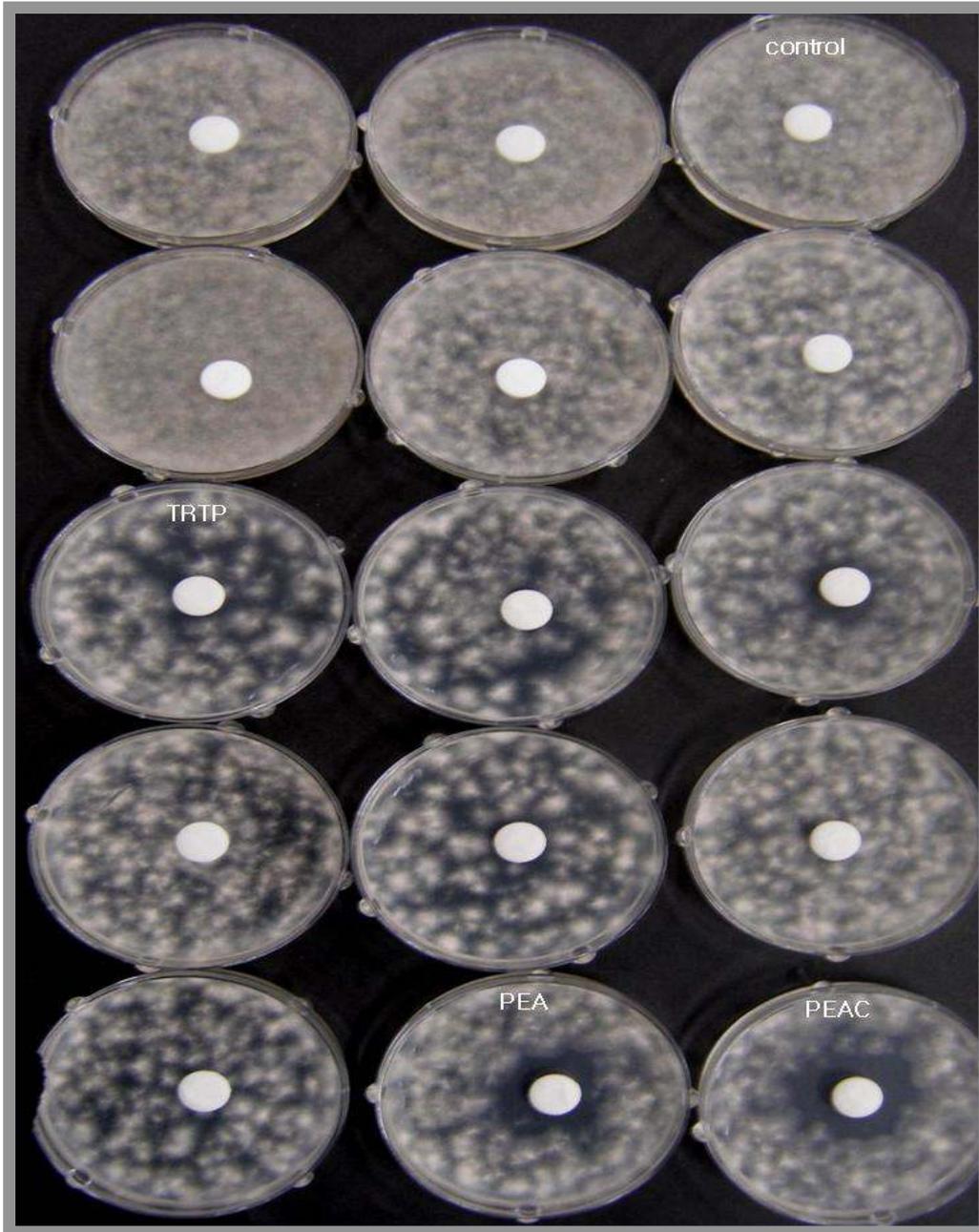


Fig. 16. Antifungal activities of separated components from *P. farinosa* SKM-1, *P. anomala* SKM-T, and *G. geotrichum* SJM-59 on *Monilinia fructicola* on five days of fermentation.

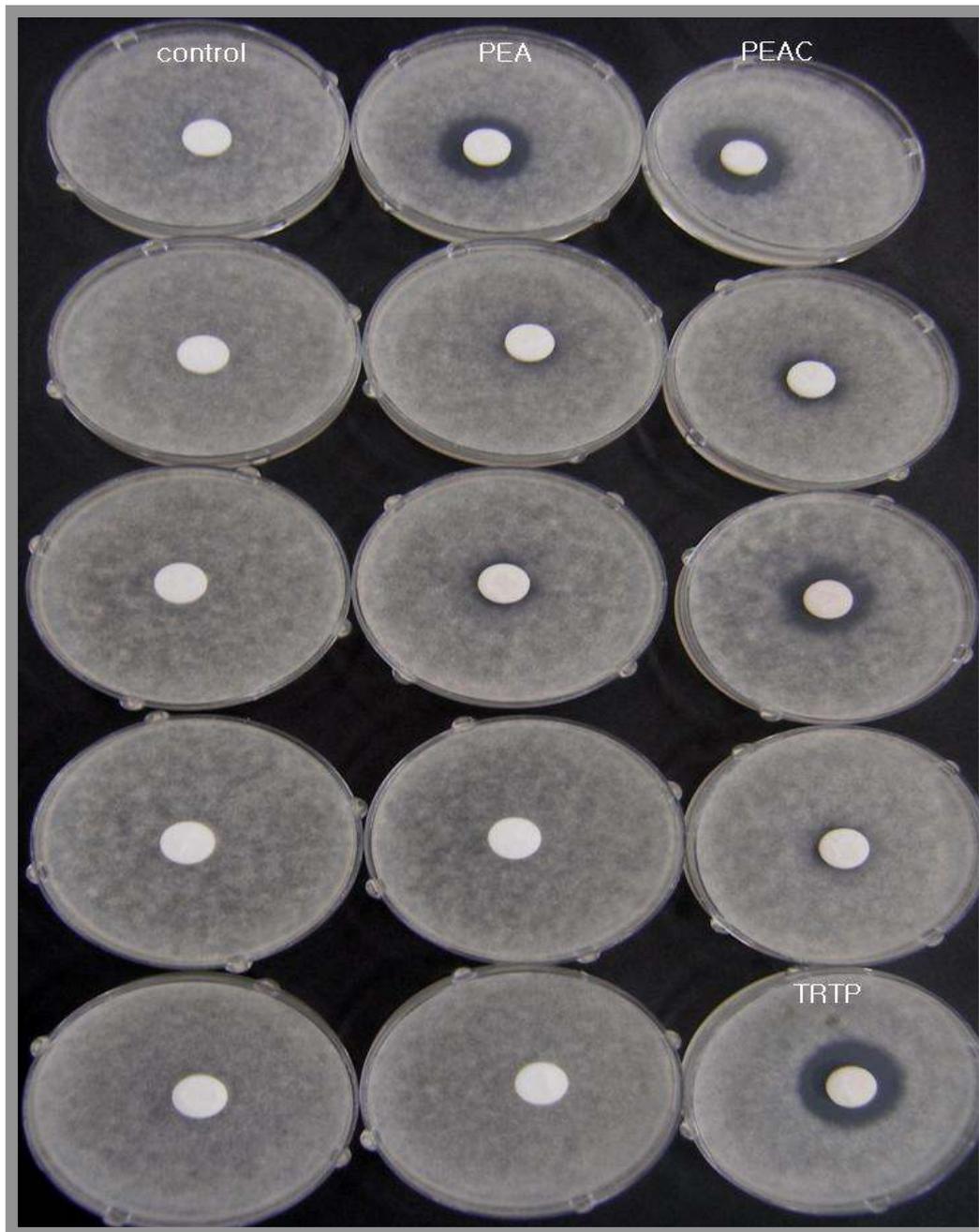


Fig. 17. Antifungal activities of separated components from *P. farinosa* SKM-1, *P. anomala* SKM-T, and *G. geotrichum* SJM-59 on *Botrytis cinerea* on five days of fermentation.



Fig. 18. Antifungal activities of separated components from *P. farinosa* SKM-1, *P. anomala* SKM-T, and *G. geotrichum* SJM-59 on *Penicillium expansum* on eight days of fermentation.

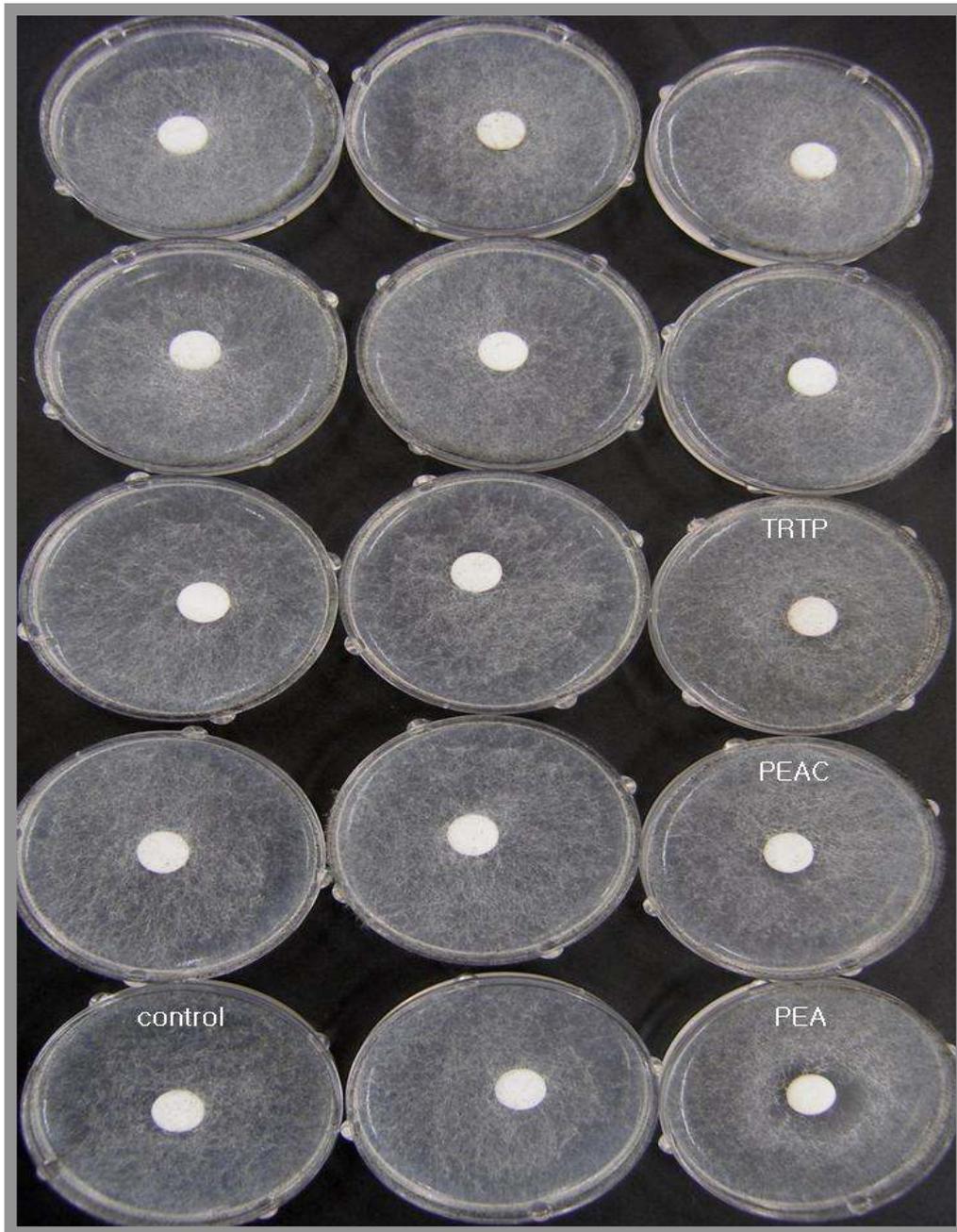


Fig. 19. Antifungal activities of separated components from *P. farinosa* SKM-1, *P. anomala* SKM-T, and *G. geotrichum* SJM-59 on *Rhizopus nigricans* on eight days of fermentation.

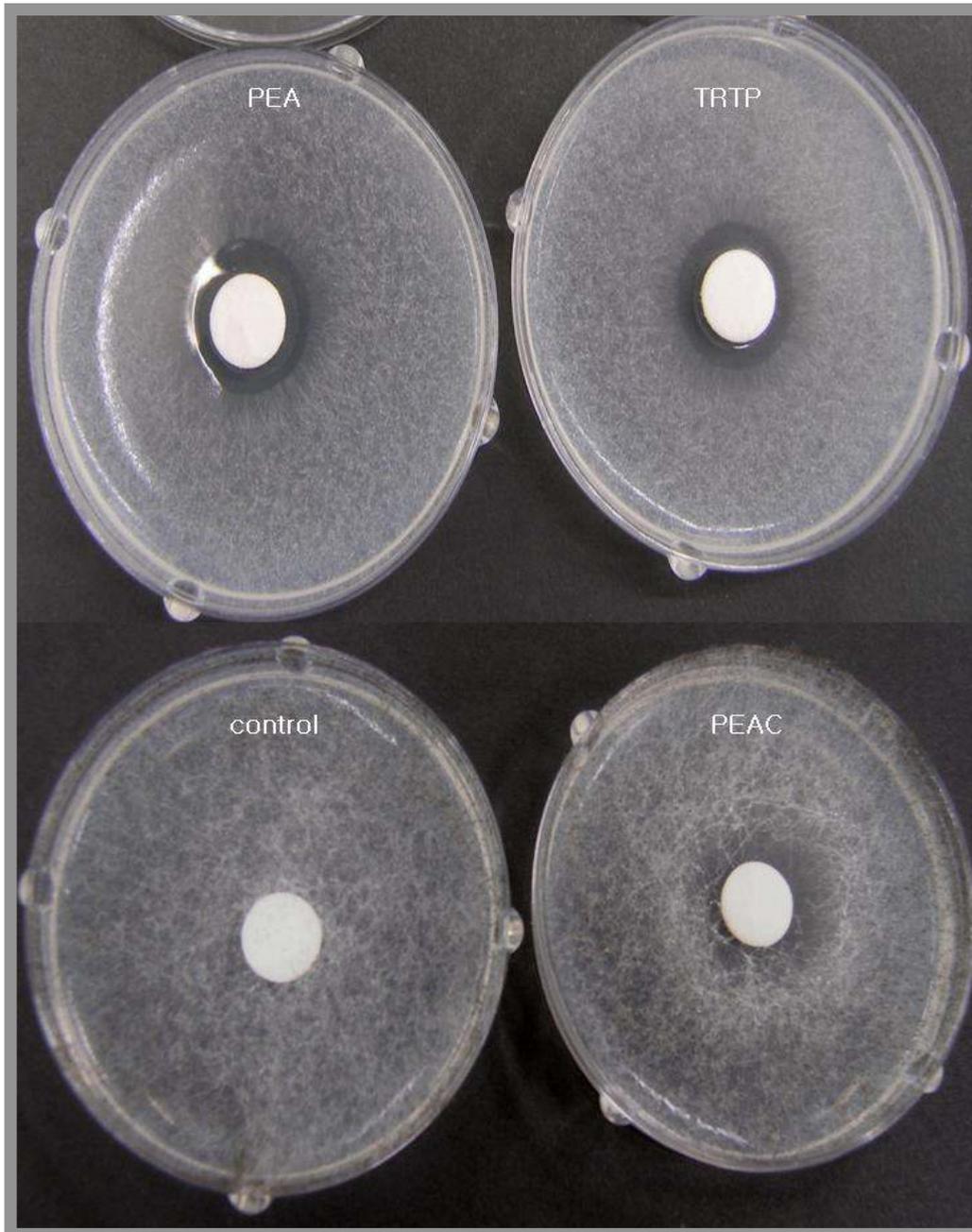


Fig. 20. Antifungal activities of separated components from *P. farinosa* SKM-1, *P. anomala* SKM-T, and *G. geotrichum* SJM-59 on *Rhizopus nigricans* on five days of fermentation.

2. 항진균물질의 분리 및 구조

전술한 바와 같이, 식물의 병원성 진균에 대해 항진균력을 나타낸 물질을 순수분리하기 위하여 상기 3개 분획을 open column chromatography하였다. 순수분리된 물질을 GC-MS, FT-IR 및 NMR로 분석하여 단일물질임을 확인하였다. Fig. 21에서와 같이 GC-MS로 분석한 결과, 첫 번째 항진균물질은 분자량 122의 물질임을 확인하였다.

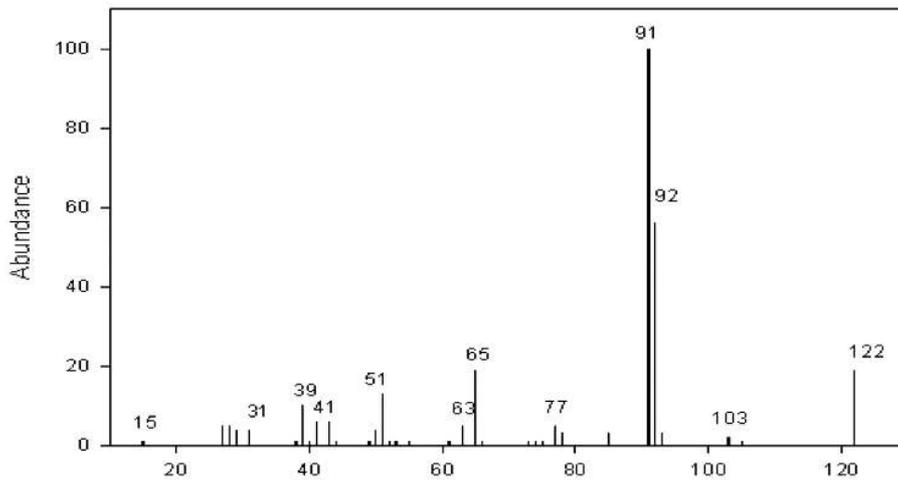


Fig. 21. EI-MS spectrum of the first isolated antifungal compound (PEA) from antifungal yeast cultures. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV. The ion species were of a normal ion (MF-Linear) and the TIC range was 0 m/z to 600.

또한 첫 번째 항균물질(PEA)을 200~300nm 파장에서 scanning을 수행하였다. PEA는 259nm에서 최대의 흡광도를 나타내었다. 따라서 이 물질이 aromatic ring을 함유하고 있음을 확인하였다.

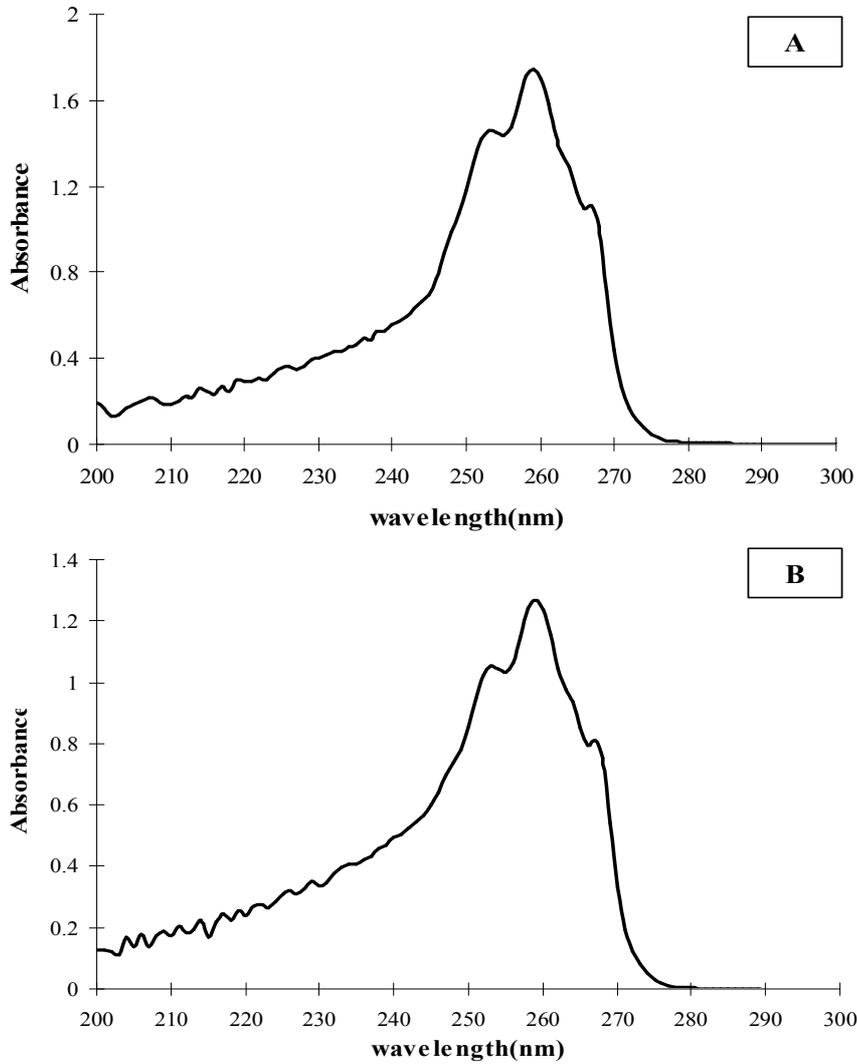


Fig. 22. Scanning of the first antifungal isolate (PEA) from the yeast cultures. A: isolates, B: authentic 2-phenylethyl alcohol (Sigma)

FT-IR 분석을 시행한 결과, 이 물질은 3322 cm^{-1} (OH), $2944\sim 2876\text{ cm}^{-1}$ (C-H stretching), $1810\sim 1940\text{ cm}^{-1}$ (w, combination), $1495\sim 1603\text{ cm}^{-1}$ (aromatic), 1045 cm^{-1} (CO), $698\sim 747\text{ cm}^{-1}$ (S, monosubstituted)를 가지고 있음을 확인하였다. 따라서 이 물질이 hydroxyl group을 지니고 있음을 알 수 있었다.

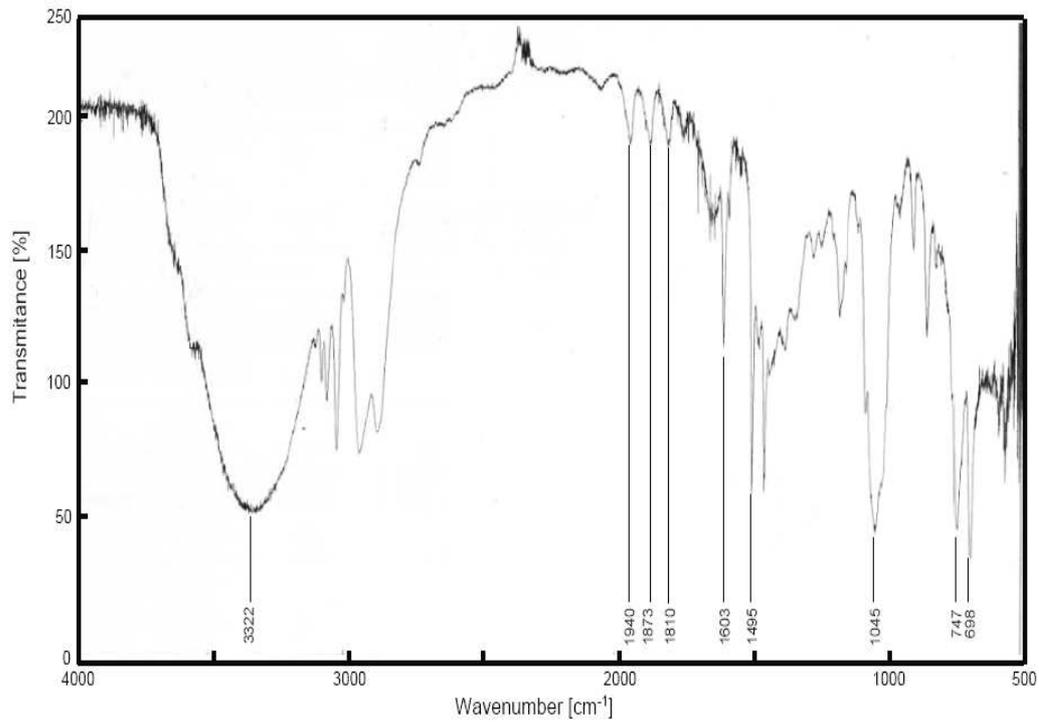


Fig. 23. FT-IR spectrum of the first isolated antifungal compound (PEAC) from yeast cultures.

이 물질의 분자구조를 알기 위하여 $^1\text{H-NMR}$ 분석을 실시하였다. 87.19과 87.29 사이의 5 proton signal로부터 mono-substitute phenol ring이 있음을 확인하였고, 83.80 (2H, t, H-8)로부터 hydroxyl group이 있음을 확인하였으며, 82.82 (2H, t, H-7)로부터 proton에 근접한 aromatic ring이 있으므로 확인하였다. 따라서 본 물질은 phenylethyl alcohol (PEA)로 동정되었다.

전술한 바와 동일한 방법을 통해 나머지 두 개의 항진균력 물질을 분석한 결과, tryptophol (TRTP; 1H-indole-3-ethanol)과 phenylethyl acetate (PEAC)로 동정되었다 (Figs. 25~30).

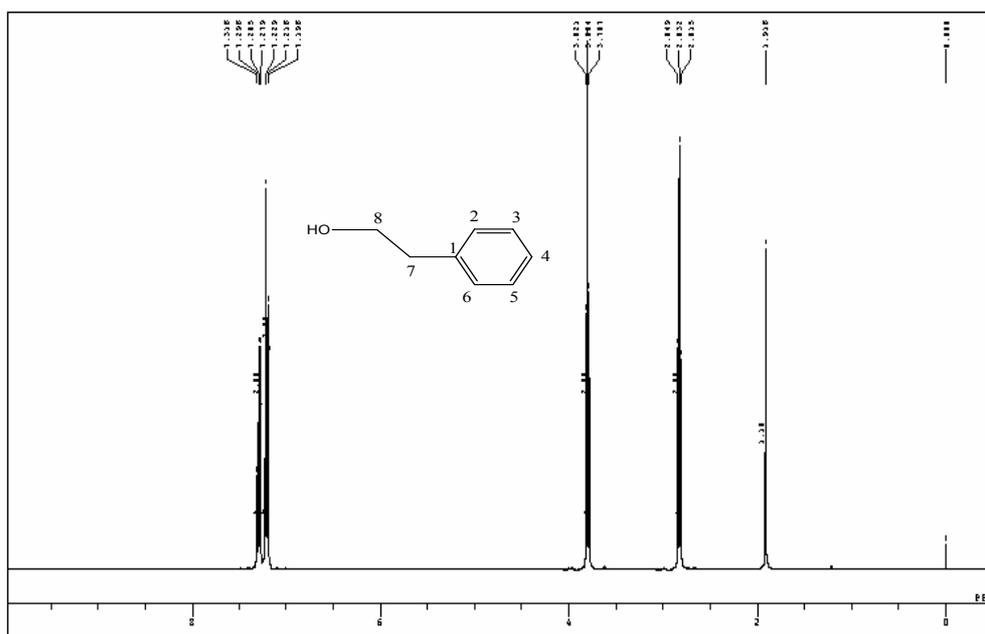


Fig. 24. $^1\text{H-NMR}$ spectrum (400MHz) of phenylethyl alcohol (PEA) in CDCl_3 . 7.29(2H, m, H-3, 5), 7.19~7.22(3H, m, H-2, 4, 6), 3.80(2H, t, H-8), 2.82 (2H, t, H-7).

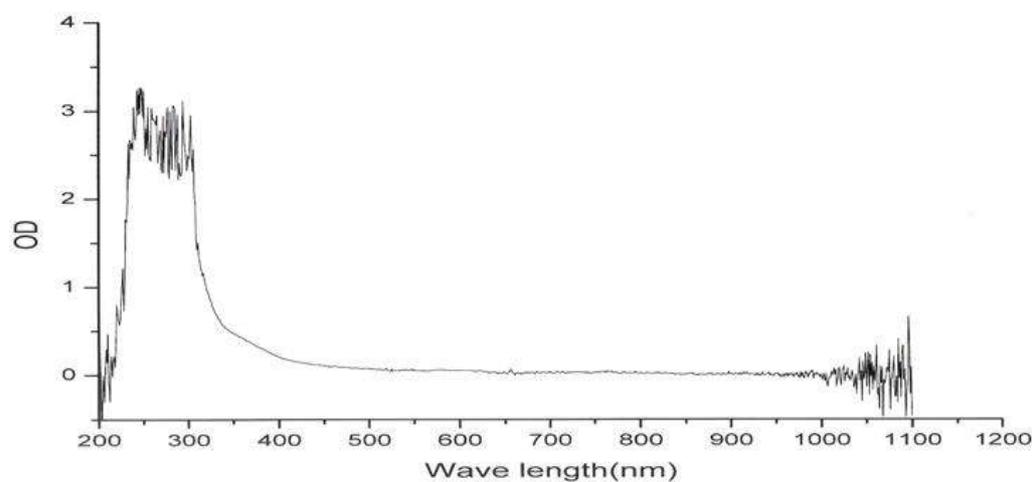


Fig. 25. Scanning of the second antifungal isolates (TRTP) from the yeast cultures.

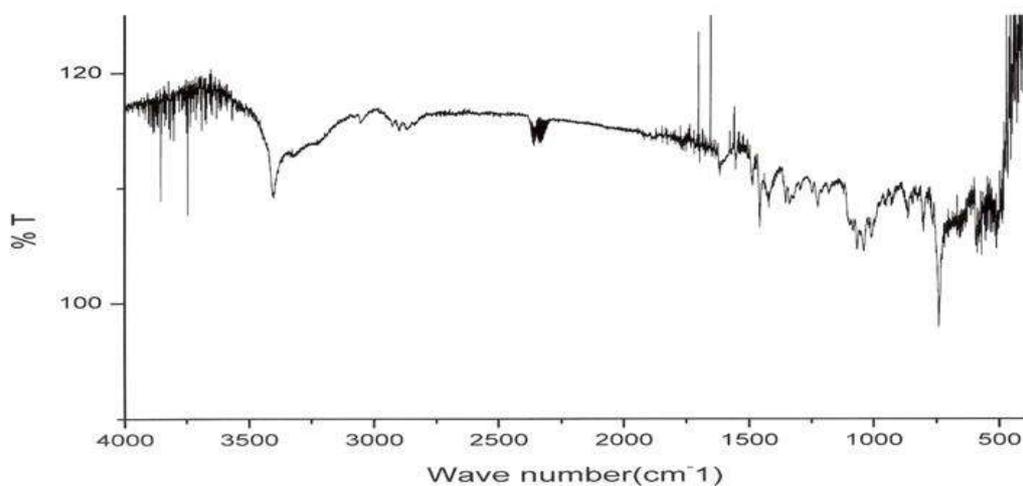


Fig. 26. FT-IR spectrum of the second isolated antifungal compound (TRTP) from yeast cultures.

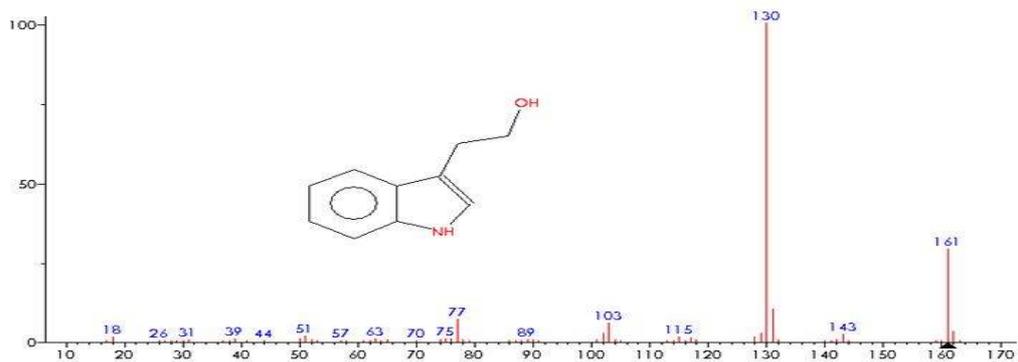


Fig. 27. EI-MS spectrum of the second isolated antifungal compound (TRTP) from antifungal yeast cultures. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV. The ion species were of a normal ion (MF-Linear) and the TIC range was 0 m/z to 600.

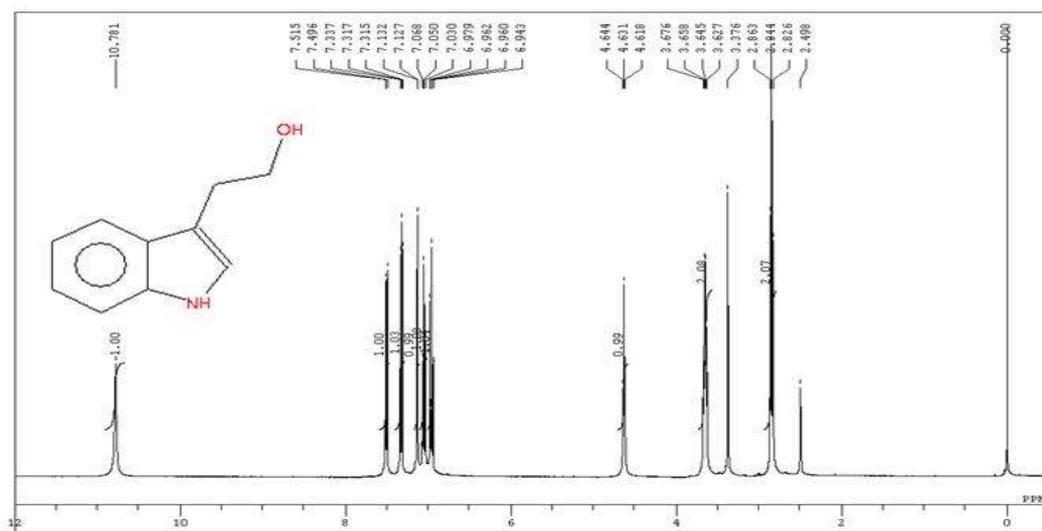


Fig. 28. ^1H -NMR spectrum (400MHz) of tryptophol (TRTP) in CDCl_3 . 2.82(t, 2H), 3.64(q, 2H), 4.61(t, 1H), 7.03(d, Pyrol 1H), 6.94–7.51(ArH, 4H), 10.78(s, 1H)

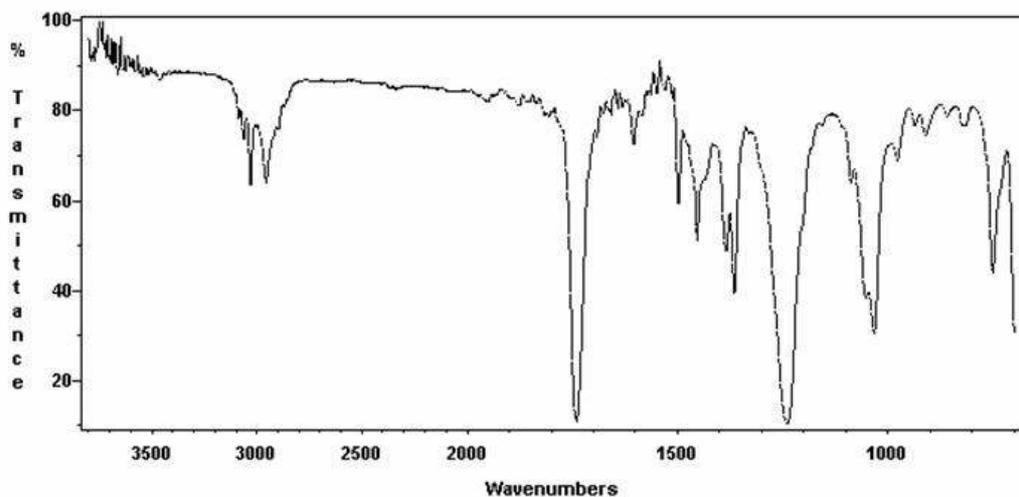


Fig. 29. FT-IR spectrum of the third isolated antifungal compound (PEAC) from yeast cultures.

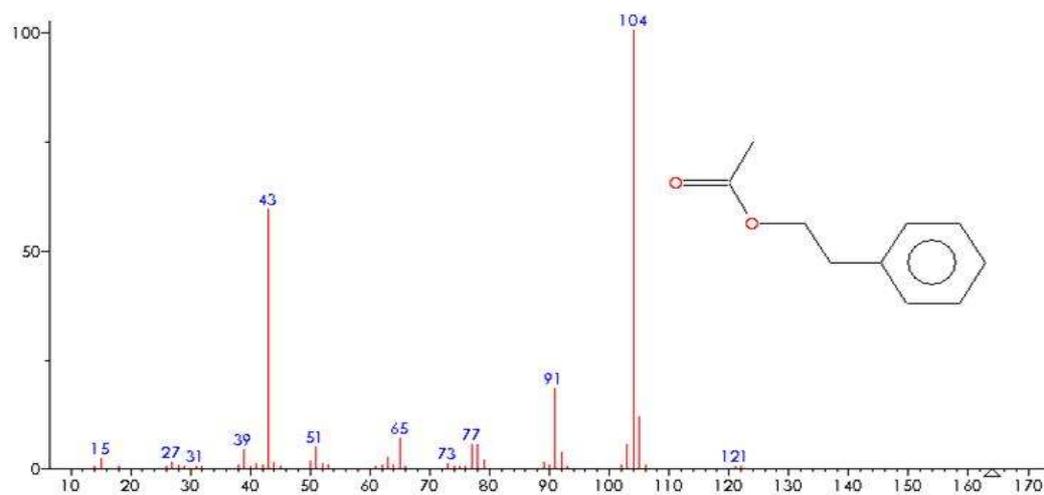


Fig. 30. EI-MS spectrum of the third isolated antifungal compound (PEAC) from antifungal yeast cultures. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV. The ion species were of a normal ion (MF-Linear) and the TIC range was 0 m/z to 600.

3. 향진균물질 생산을 위한 최적조건의 설정

P. farinosa SKM-1, *P. anomala* SKM-T, *G. getorichum* SJM-59로부터 공통되는 향진균물질은 PEA, PEAC 및 TRTP임을 확인하였다. 세 균주 중에서 가장 많은 양의 향진균물질을 생산하는 균주는 *P. anomala* SKM-T 균주이었다. 따라서 향진균물질 생산의 최적 조건을 설정하기 위한 연구를 위해 *P. anomala* SKM-T 균주를 사용하였다.

향진균물질 생산을 위한 탄소원과 질소원의 선정: 미생물 균주를 배양할 때 탄소원과 질소원의 종류에 따라 생산되는 물질의 종류와 양이 달라지는 것으로 알려져 있다. 탄소원의 종류가 *P. anomala* SKM-T로부터 생성되는 향진균물질의 양에 미치는 영향을 측정하기 위하여 *P. anomala* SKM-T를 탄소원을 달리한 semi-synthetic media에서 24시간 동안 배양하였다 (Table 10~12).

Table 10. Growth and production of phenylethyl alcohol by *Pichia anomala* SKM-T in media with various carbon substrates

Substrates (5 g carbon /L)	Biomass (g/L)	PEA (mg/L)	Yield (PEA/biomass, mg/g)
Glucose	1.98±0.06	97.61±1.06	49.30±0.11
Maltose	1.95±0.03	88.10±0.91	45.18±0.05
Fructose	1.75±0.05	41.09±0.06	23.48±1.23
Xylose	1.02±0.25	9.27±0.04	9.09±0.61
Sorbitol	0.89±0.01	0.21±0.01	0.24±0.03

Medium contained KH_2PO_4 1.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, L-phenylalanine 1.0 g/L, and initial biomass 0.1 g/L. Cultivation was conducted at 30°C and with agitation speed of 200 rpm for 24h. Initial pH of media is 5.

Table 11. Growth and production of tryptophol by *Pichia anomala* SKM–T in media with various carbon substrates

Substrates (5 g carbon /L)	Biomass (g/L)	TRTP (mg/L)	Yield (TRTP/biomass, mg/g)
Glucose	1.98±0.06	2.01±0.05	1.015±0.01
Maltose	1.95±0.03	1.03±0.01	0.687±0.01
Fructose	1.75±0.05	0.04±0.01	0.229±0.02
Xylose	1.02±0.25	0.27±0.02	0.265±0.01
Sorbitol	0.89±0.01	0.12±0.01	0.135±0.01

Medium contained KH_2PO_4 1.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, L-phenylalanine 1.0 g/L, and initial biomass 0.1 g/L. Cultivation was conducted at 30°C and with agitation speed of 200 rpm for 24h. Initial pH of media is 5.

Table 12. Growth and production of phenylethyl acetate by *Pichia anomala* SKM–T in media with various carbon substrates

Substrates (5 g carbon /L)	Biomass (g/L)	PEAC (mg/L)	Yield (PEAC/biomass, mg/g)
Glucose	1.98±0.06	32.54±2.04	16.43±0.16
Maltose	1.95±0.03	29.37±1.25	15.06±0.96
Fructose	1.75±0.05	13.69±1.47	7.82±1.02
Xylose	1.02±0.25	3.09±0.98	3.03±0.05
Sorbitol	0.89±0.01	0.08±0.01	0.09±0.03

Medium contained KH_2PO_4 1.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, L-phenylalanine 1.0 g/L, and initial biomass 0.1 g/L. Cultivation was conducted at 30°C and with agitation speed of 200 rpm for 24h. Initial pH of media is 5.

PEA 생산의 critical step은 phenylalanine 이화과정의 첫 단계인 phenylpyruvate decarboxylase reaction으로 알려져 있다. 효모의 호기 배양 과정에서 phenyl pyruvate decarboxylase 활성은 phenylalanine이 가장 유효한 질소원인 것으로 보고되고 있다. 따라서 본 연구에서는 phenylalanine의 농도를 다양화하여 PEA, PEAC 및 TRTP의 생산량을 측정하였다.

Tables 13~15에서와 같이 phenylalanine의 농도가 5 g/L일 때까지 PEA, TRTP, PEAC의 생성율은 증가하였다. 최고의 세포 성장과 PEA, TRTP, PEAC의 생산은 phenylalanine의 농도가 9 g/L일 때 관측되었다. 그러나 phenylalanine의 농도가 7 g/L이상일 때는 PEA, TRTP, PEAC가 생성되는 양은 크게 증가하지 않았다. 항진균물질의 생산에 소요되는 phenylalanine의 가격을 고려할 때, 유효한 phenylalanine의 농도는 5 g/L인 것으로 사료되었다. 따라서 이후의 연구에서는 탄소원으로는 포도당 5 g/L를, 질소원으로는 phenylalanine 5 g/L를 사용하였다.

Table 13. Growth and production of phenylethyl alcohol by *Pichia anomala* SKM-T in media with various L-phenylalanine concentrations

Concentration (g/L)	Biomass (g/L)	PEA (mg/L)	Yield (PEA/biomass, mg/g)
1	1.98±0.21	97.61±1.32	49.30±1.76
3	1.98±0.08	109.87±1.98	55.49±1.66
5	2.01±0.02	584.81±1.65	290.95±1.97
7	2.34±0.46	681.83±0.86	291.38±2.35
9	2.35±0.03	687.33±1.75	292.48±0.58

Medium contained KH_2PO_4 1.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, glucose 5.0 g/L, and initial biomass 0.1 g/L. Cultivation was conducted at 30°C and with agitation speed of 200 rpm for 24h. Initial pH of media is 5.

Table 14. Growth and production of tryptophol by *Pichia anomala* SKM–T in media with various L–phenylalanine concentrations

Concentration (g/L)	Biomass (g/L)	TRTP (mg/L)	Yield (TRTP/biomass, mg/g)
1	1.98±0.21	1.32±0.039	0.67±0.076
3	1.98±0.08	1.48±0.098	0.75±0.061
5	2.01±0.02	1.48±0.065	0.75±0.052
7	2.34±0.46	1.38±0.095	0.59±0.067
9	2.35±0.03	1.49±0.075	0.63±0.058

Medium contained KH_2PO_4 1.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, glucose 5.0 g/L, and initial biomass 0.1 g/L. Cultivation was conducted at 30°C and with agitation speed of 200 rpm for 24h. Initial pH of media is 5.

Table 15. Growth and production of phenylethyl acetate by *Pichia anomala* SKM–T in media with various L–phenylalanine concentrations

Concentration (g/L)	Biomass (g/L)	PEAC (mg/L)	Yield (PEAC/biomass, mg/g)
1	1.98±0.21	39.04±1.81	19.72±0.79
3	1.98±0.08	39.21±1.25	19.80±0.91
5	2.01±0.02	40.81±1.92	20.30±1.13
7	2.34±0.46	41.83±1.84	17.88±2.07
9	2.35±0.03	41.91±1.59	17.83±2.88

Medium contained KH_2PO_4 1.0 g/L, MgSO_4 0.5 g/L, glucose 5.0 g/L, and initial biomass 0.1 g/L. Cultivation was conducted at 30°C and with agitation speed of 200 rpm for 24h. Initial pH of media is 5.

항진균물질 생산을 위한 물리적 요인에 대한 효과: PEA, TRTP, PEAC
생산을 위한 최적 온도를 설정하기 위하여 10~40 사이에서의 효모 생육 (biomass)을
측정한 결과는 Fig. 31과 같다. Fig. 31에서와 같이 30 °C에서 최대의 항진균물질 생
산을 나타내었다 (290.95 mg/g).

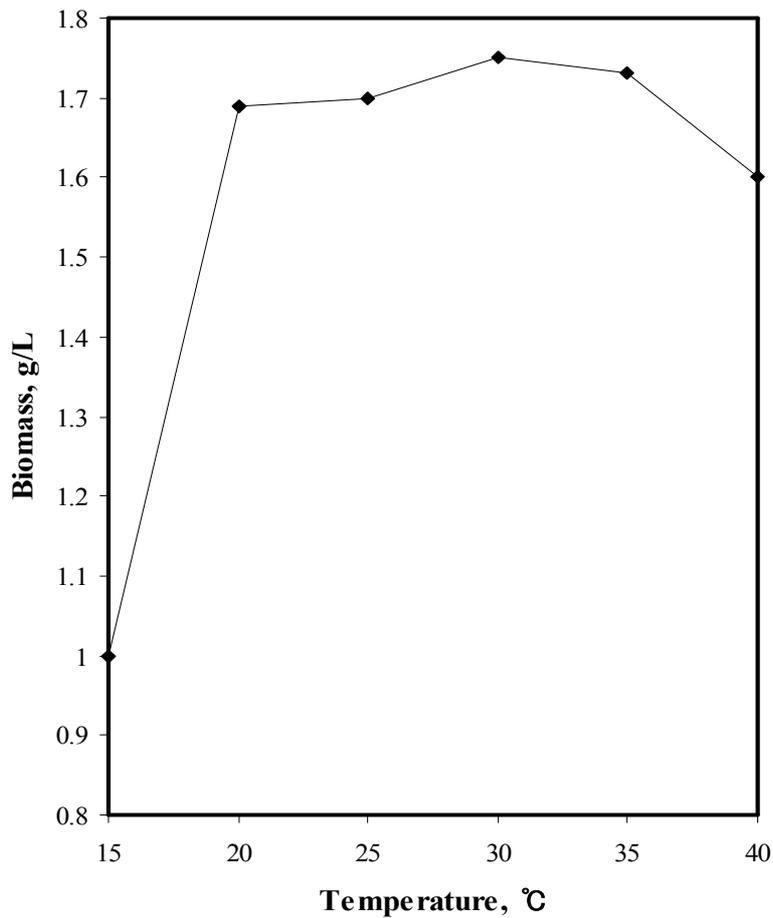


Fig. 31. Effect of temperature on the growth of *Pichia anomala* SKM-T.
24 h, 5 g/L glucose, 5 g/L phenylalanine, pH 5, 160 rpm, initial biomass = 0.1
g/L

항진균물질 생산에 영향을 주는 pH의 영향을 측정한 결과는 Fig. 32와 같다. Fig. 32에서와 같이 최대의 biomass 생성을 나타낸 pH는 5이었다 (290.95 mg/g).

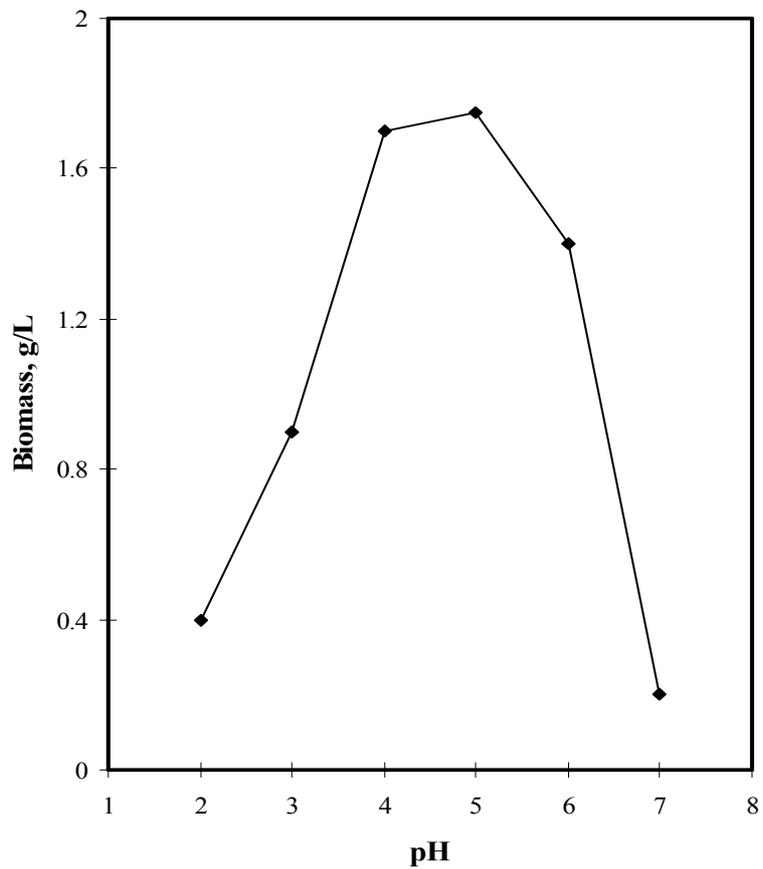


Fig. 32. Effect of various pH on the growth of *Pichia anomala* SKM-T. 24 h, 5 g/L glucose, 5 g/L phenylalanine, at 30°C, 160 rpm, initial biomass = 0.1 g/L

미생물 균주에 의한 알코올의 생산 과정은 교반속도 및 산소공급양 (aeration rate)에 영향을 받는 것으로 알려져 있다. 따라서 교반속도가 향진균물질 생산에 미치는 영향을 측정하였다 (Fig. 33). Fig. 33에서와 같이 교반속도가 증가할수록 biomass 생산량이 증가하였으나 실험 범위 내에서 통계적으로 유의적인 차이가 관측되지는 않았다.

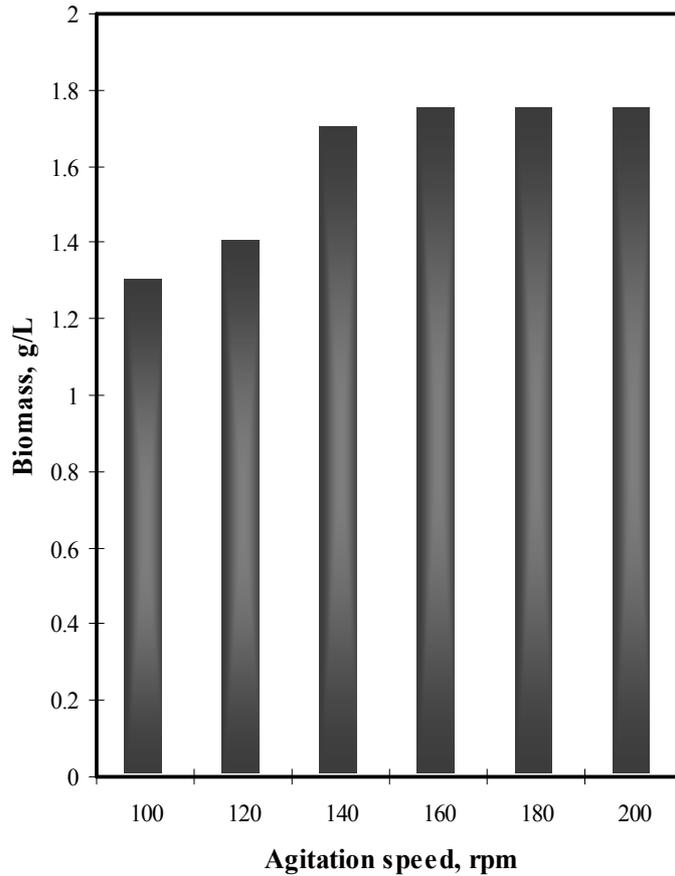


Fig. 33. Effect of agitation speed on the growth of *Pichia anomala* SKM-T. 24 h, 5 g/L glucose, 5 g/L phenylalanine, pH 5, at 30°C, initial biomass = 0.1 g/L

항진균물질의 최적 생산 조건의 설정: 상기 결과를 기준으로 하여 최적조건 설정 실험을 수행하였다. 반응표면분석 (response surface methodology; RSM)을 실시하기 위한 첫 단계는 독립변수와 종속변수 간의 true functional relationship을 확인하는 것이다. 따라서 Table 1과 같이 3개의 독립변수 간의 최적조건을 설정하기 위해 회전중심합성계획 (rotatable central composite design)을 실시하였다. 각 독립변수의 최적치는 response surface contour map으로부터 구하였다.

RSM을 이용하여 항진균물질 생산에 영향을 미치는 최적 조건을 설정하기 위하여 배양액의 초기 pH, phenylalanine 농도, 포도당 농도를 독립변수로 설정하였다. 효모 배양액으로부터 생성된 항진균물질의 농도를 반응변수로 설정하였고, 중심값 (center point)은 “0(zero)”으로 하였다. 일원분산분석 (ANOVA)을 통한 95.85% 신뢰수준에서 quadric model의 유의성을 확정하였고, coefficient ($R^2 = 0.8613$)를 통해 모델의 적합성을 확정하였다. 최적조건설정 실험을 통해 얻어진 이차방정식은 Table 16과 같다 (coded value).

Table 16. The equation for the optimum condition of antifungal compounds production from *Pichia anomala* SKM-T

$$y = 600.38 - 1.27 \cdot x_1 + 77.29 \cdot x_2 + 10.85 \cdot x_3 - 163.71 \cdot x_1^2 - 79.22 \cdot x_2^2 - 167.60 \cdot x_3^2 + 23.25 \cdot x_1 \cdot x_2 + 1.00 \cdot x_1 \cdot x_3 + 48.50 \cdot x_2 \cdot x_3$$

Coded value, X1; pH, X2; phenylalanine (g/L), C; glucose (g/L), medium contained KH_2PO_4 1.0g/L; MgSO_4 0.5g/L, 24 h, at 30°C, initial biomass = 0.1 g/L

RSM을 통한 종속변수간의 결과는 Table 17과 같다. Table 17에서와 같이 phenylalanine은 유의적인 효과 ($p = 0.0358$)를 나타낸 반면, 포도당 ($p = 0.7407$)과 pH ($p = 0.9689$)는 유의적인 효과를 나타내지 않았다. Figs 34~37에서와 같이 circular contour에 의하면 반응변수 간의 교호작용은 무시할 수 있는 것으로 나타났다. 따라서 항진균물질 생산은 phenylalanine 농도에 의존적인 것으로 분석되었다.

Table 16의 이차방정식을 통해 얻어진 항진균물질 생산의 최적조건은 pH 5.03, phenylalanine 6.53 g/L (w/v), 포도당 6.11 g/L (w/v)이었다. 최적조건설정 실험을 통해 얻어진 항진균물질 생산의 최적값은 621.27 mg/L이었다 (Fig. 38). 본 실험에서 얻어진 최적값은 모델예측값 (702.79 mg/L; desirability 0.884)과 11.6%의 근소한 차이만을 나타내었다

Table 17. Rotatable central composite design of optimum culture condition for the antifungal compounds production from *Pichia anomala* SKM-T

No.	X1		X2		X3		Antifungal compounds (mg/L)
	C	A	C	A (g/L)	C	A (g/L)	
1	-1	4.5	-1		-1	5	340.02±1.65
2	1	5.5	-1	5	-1	5	131.14±2.33
3	-1	4.5	1	7	-1	5	94.08±0.98
4	1	5.5	1	7	-1	5	313.57±0.25
5	-1	4.5	-1	5	1	7	79.23±1.23
6	1	5.5	-1	5	1	7	209.86±3.58
7	-1	4.5	1	7	1	7	362.12±3.69
8	1	5.5	1	7	1	7	250.19±2.74
9	-1.682	4.0	0	6	0	6	105.85±1.59
10	1.682	6.5	0	6	0	6	78.39±2.99
11	0	5.0	-1.682	4	0	6	94.33±1.98
12	0	5.0	1.682	8	0	6	567.51±0.06
13	0	5.0	0	6	-1.682	4	43.00±0.47
14	0	5.0	0	6	1.682	8	118.16±1.57
15	0	5.0	0	6	0	6	605.45±0.68
16	0	5.0	0	6	0	6	697.38±1.53
17	0	5.0	0	6	0	6	643.29±2.65
18	0	5.0	0	6	0	6	612.35±3.01
19	0	5.0	0	6	0	6	523.78±2.98
20	0	5.0	0	6	0	6	538.85±0.69

x₁; pH, x₂; L-phenylalanine, x₃; D-glucose, C; coded value, A; actual value

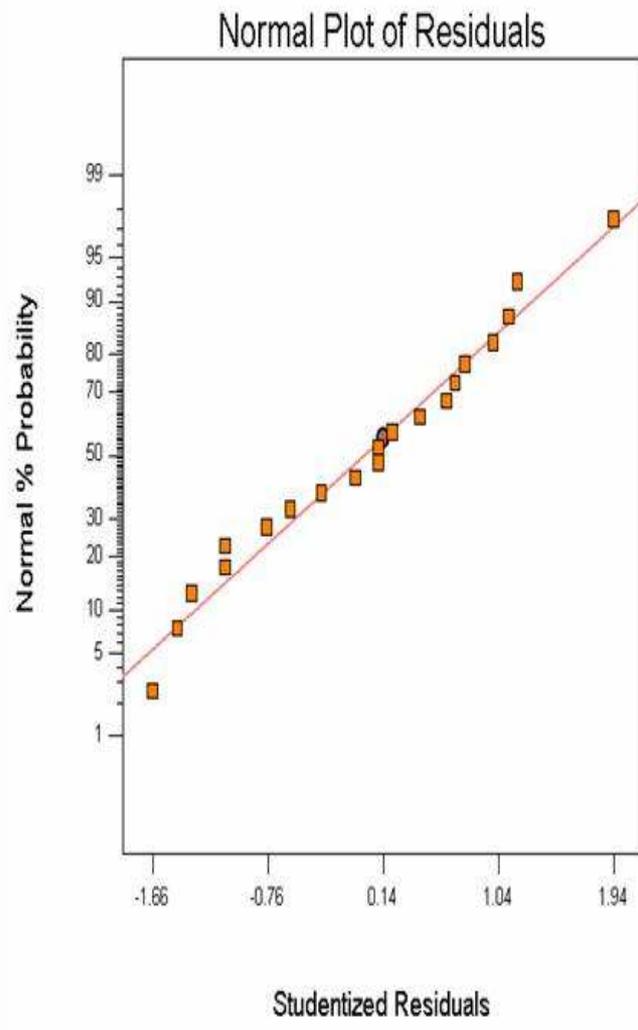


Fig. 34. Normal plot residuals

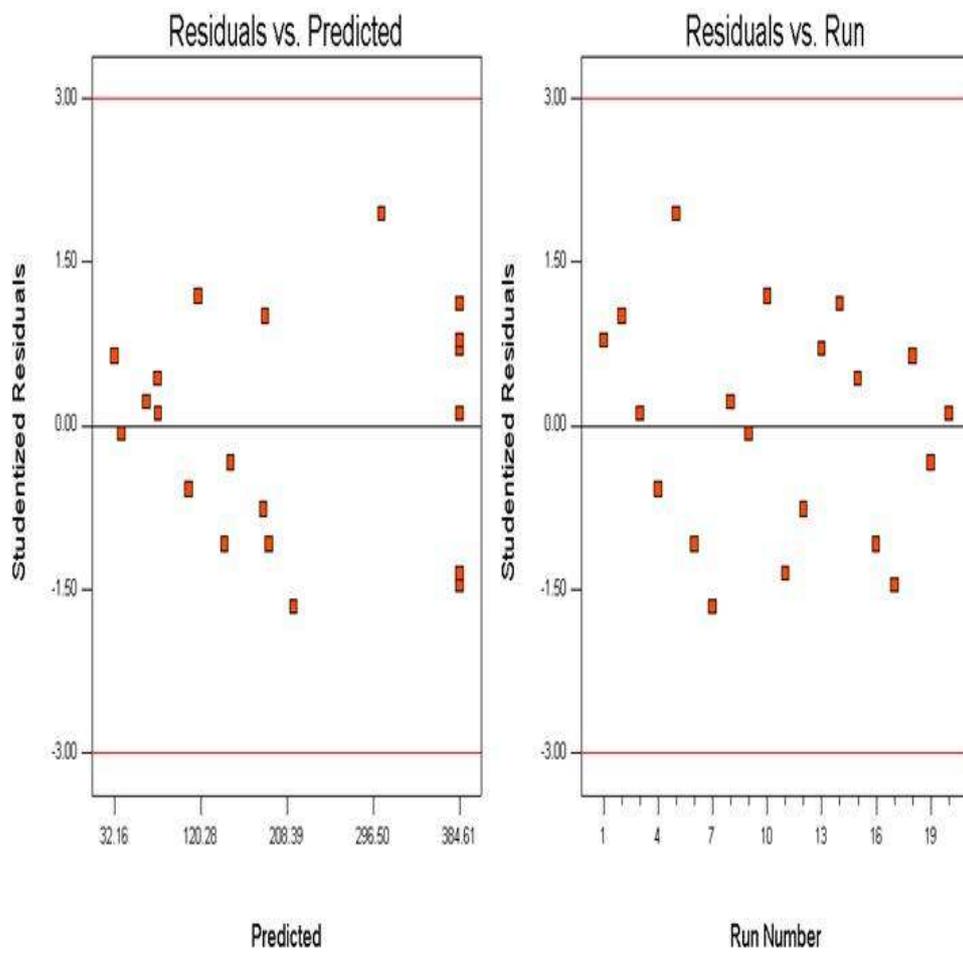


Fig. 35. Validity of rotatable central composite design experiments

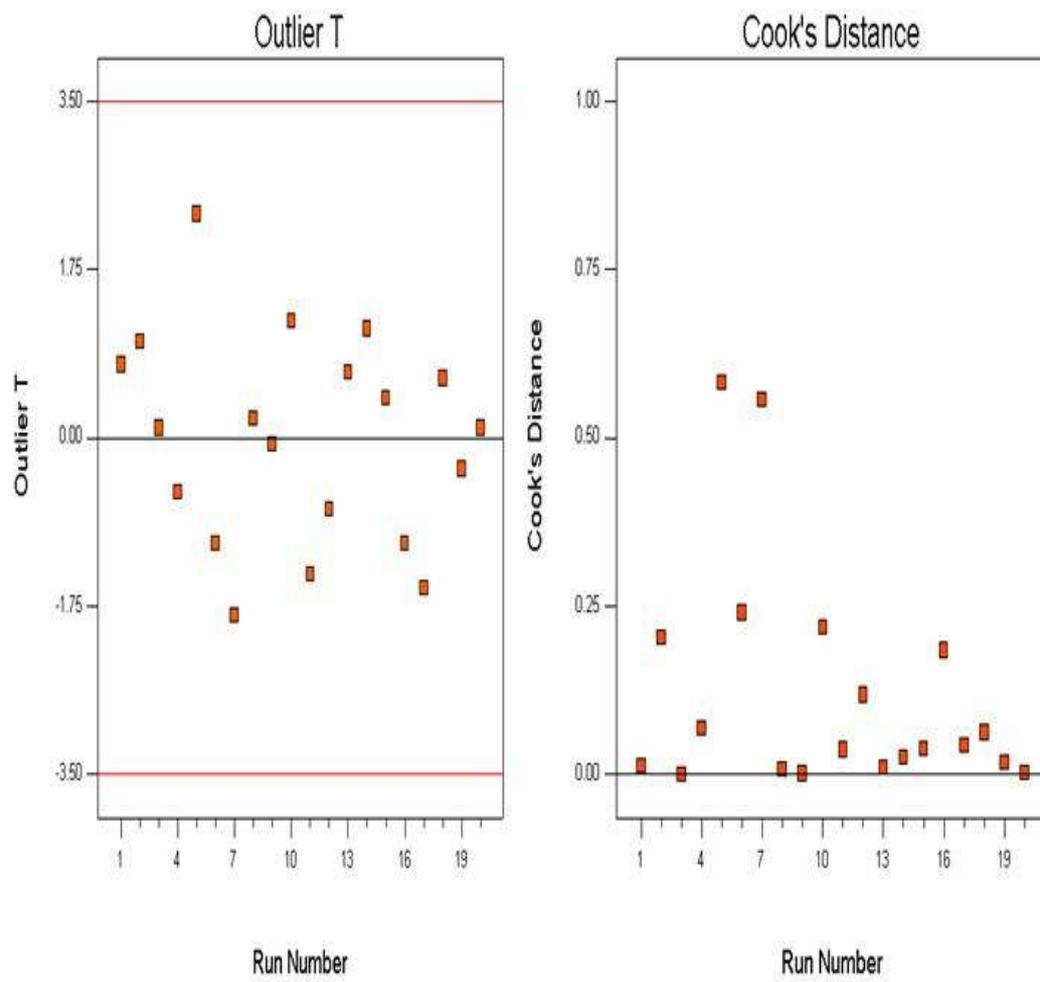


Fig. 36. Validity of rotatable central composite design

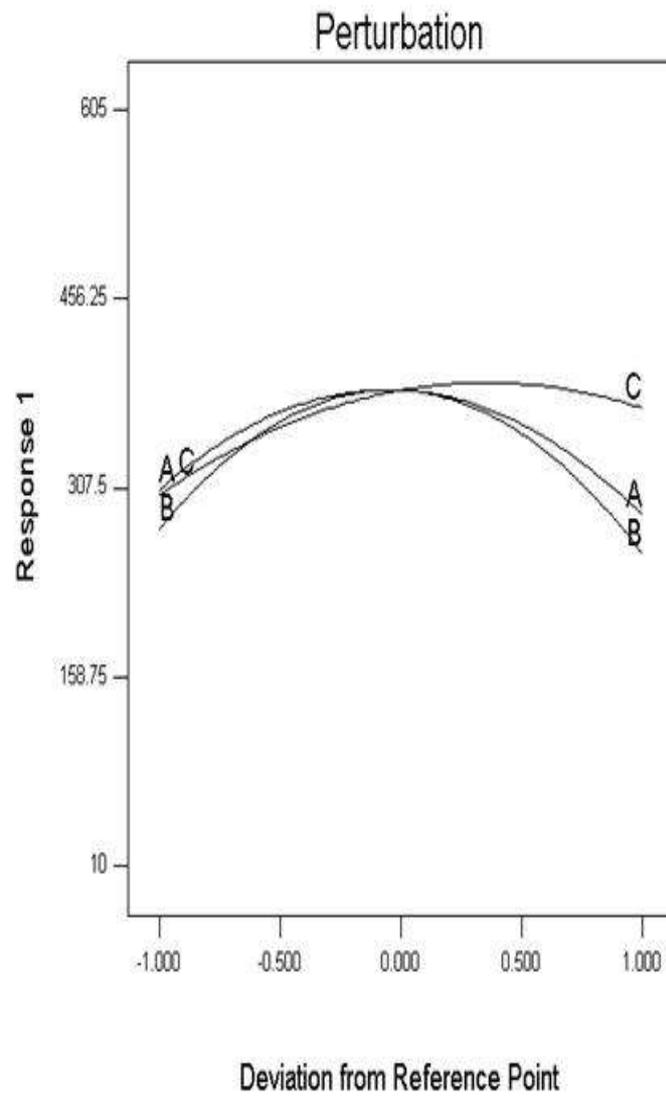


Fig. 37. Perturbation of rotatable central composite design experiments

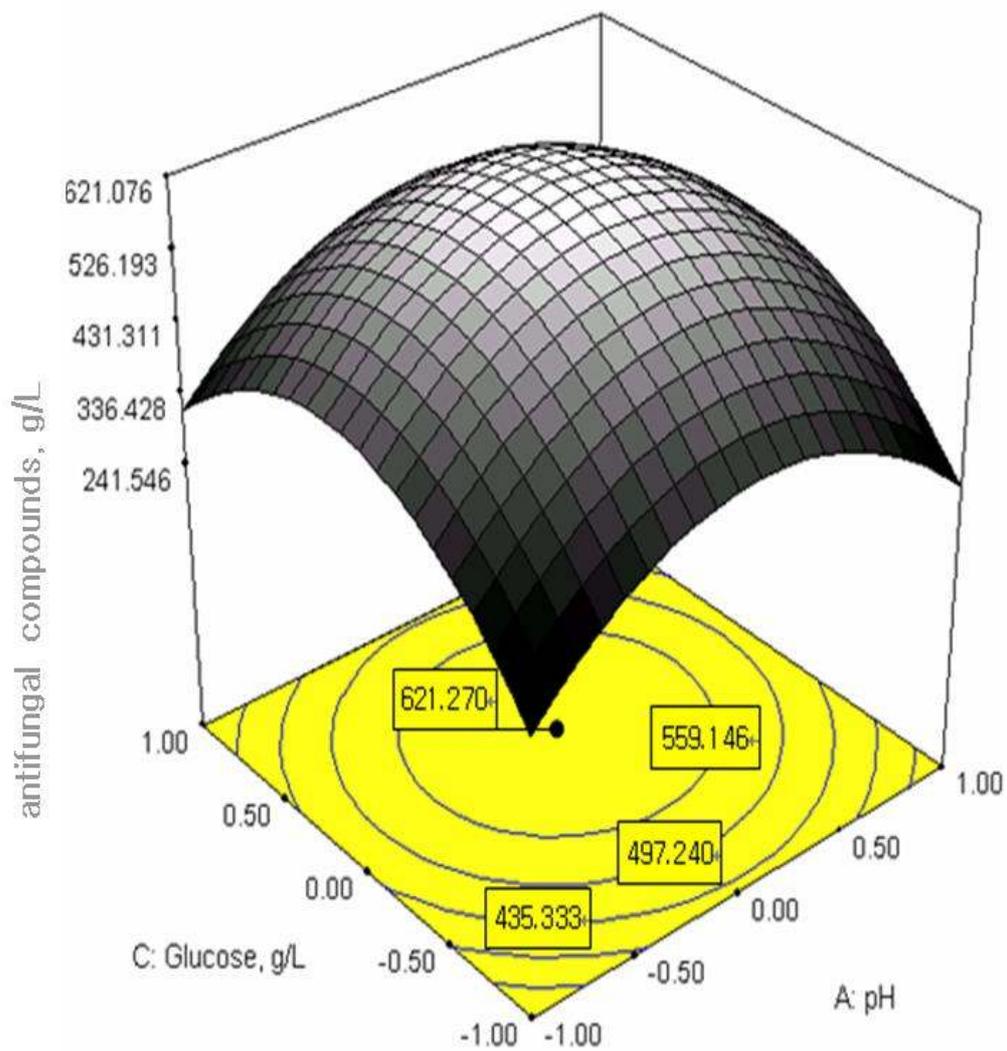


Fig. 38. Response surface contour map of antifungal compounds production in *Pichia anomala* SKM-T. The effect of pH and glucose on the antifungal compounds production. L-phenylalanine was held at 0.53 level (coded value), and other conditions were held at 24h, 200 rpm, 30°C, initial biomass 0.1 g/L (w/v), respectively.

4. 분자적 수준에서의 항진균기전 탐색

PEA, TRTP, PEAC의 항진균효과 기전을 알아보기 위하여 *M. fruticola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*, *A. niger*을 대상으로 slide culture를 실시하고, 이를 광학현미경으로 관찰하였다 (Figs. 39~42). Figs. 39~42에서 보는 바와 같이, 항진균물질을 처리한 진균의 균사가 무처리군의 균사보다 가늘며, 무성포자를 형성함에 있어서 정상적인 포자 형성에 실패하고, 포자를 형성하더라도 기형적인 포자를 형성하는 것으로 관측되었다.

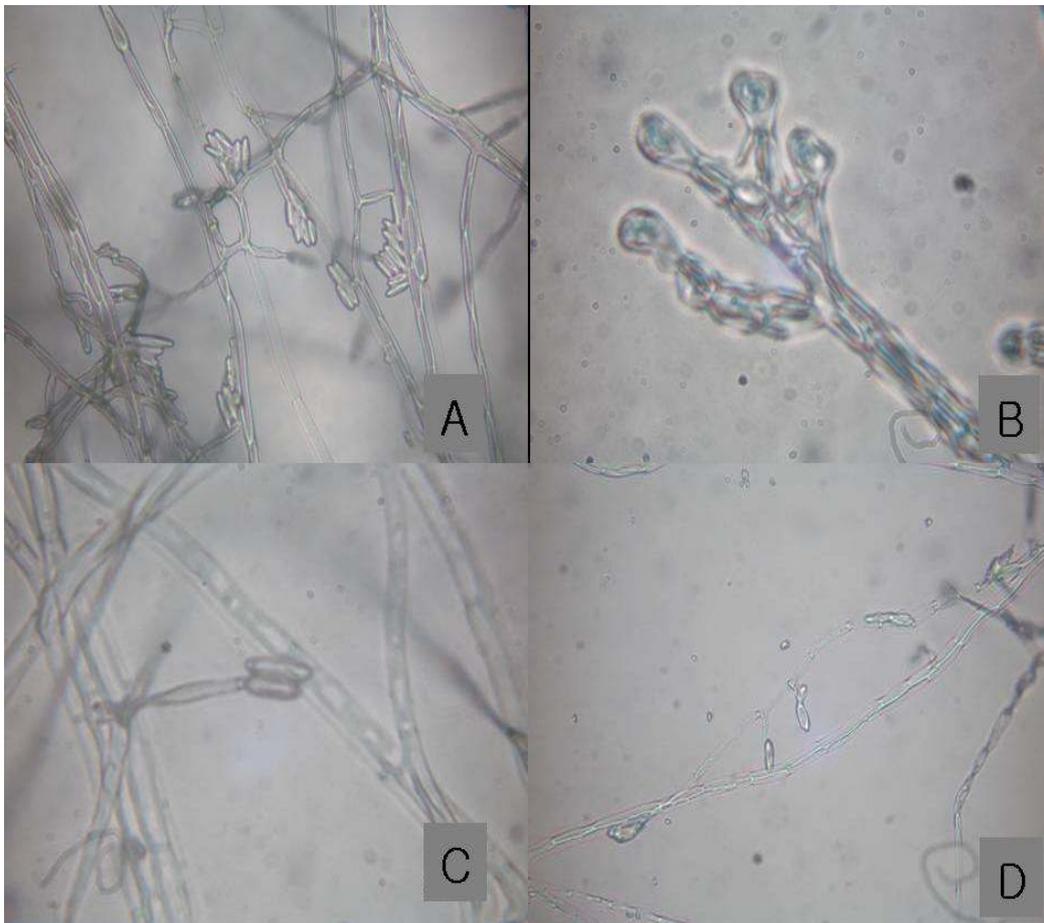


Fig. 39. Light microscope of *Monilia fruticolar* treated with antifungal compounds. A; Control, B; TRTP, C; PEAC, D; PEA, 100 ppm

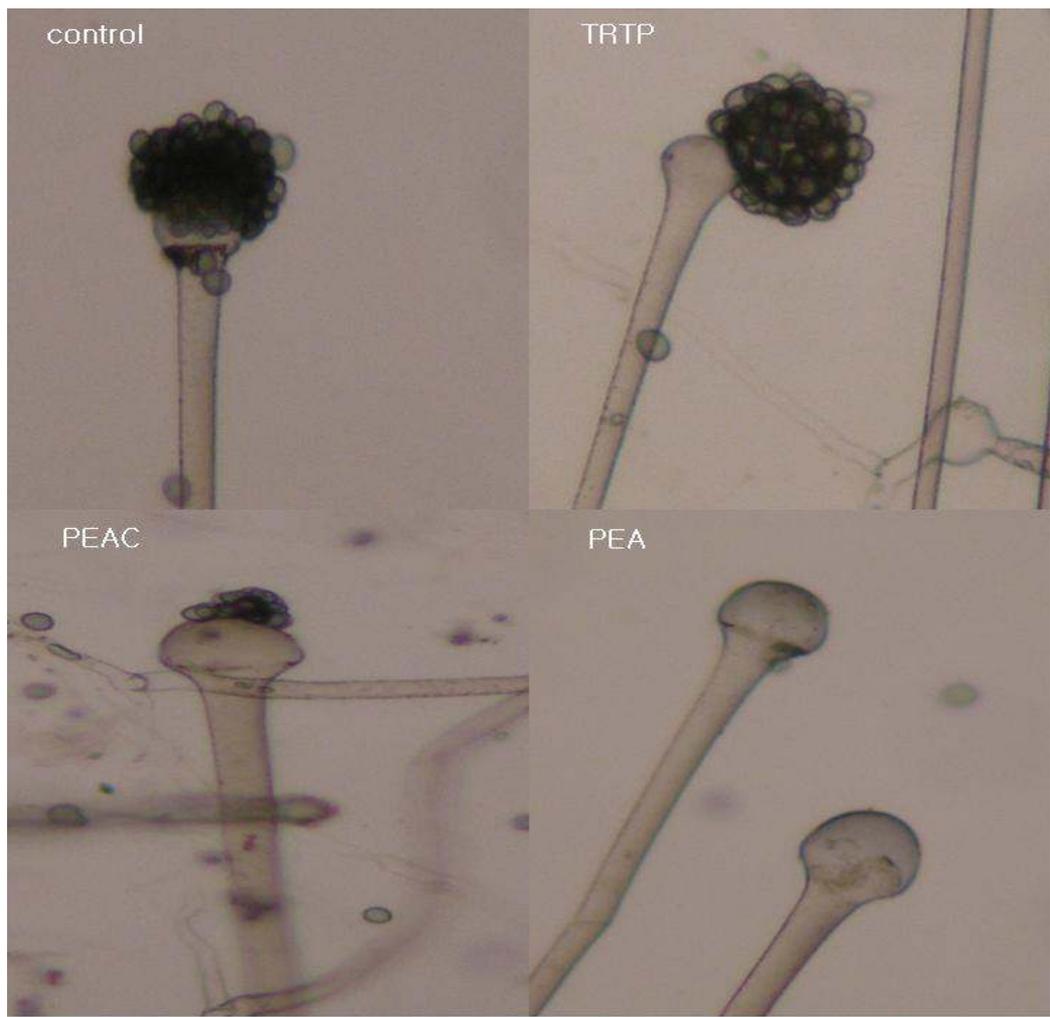


Fig. 40. The spore formation of *Aspergillus niger* treated with antifungal compounds (100 ppm).

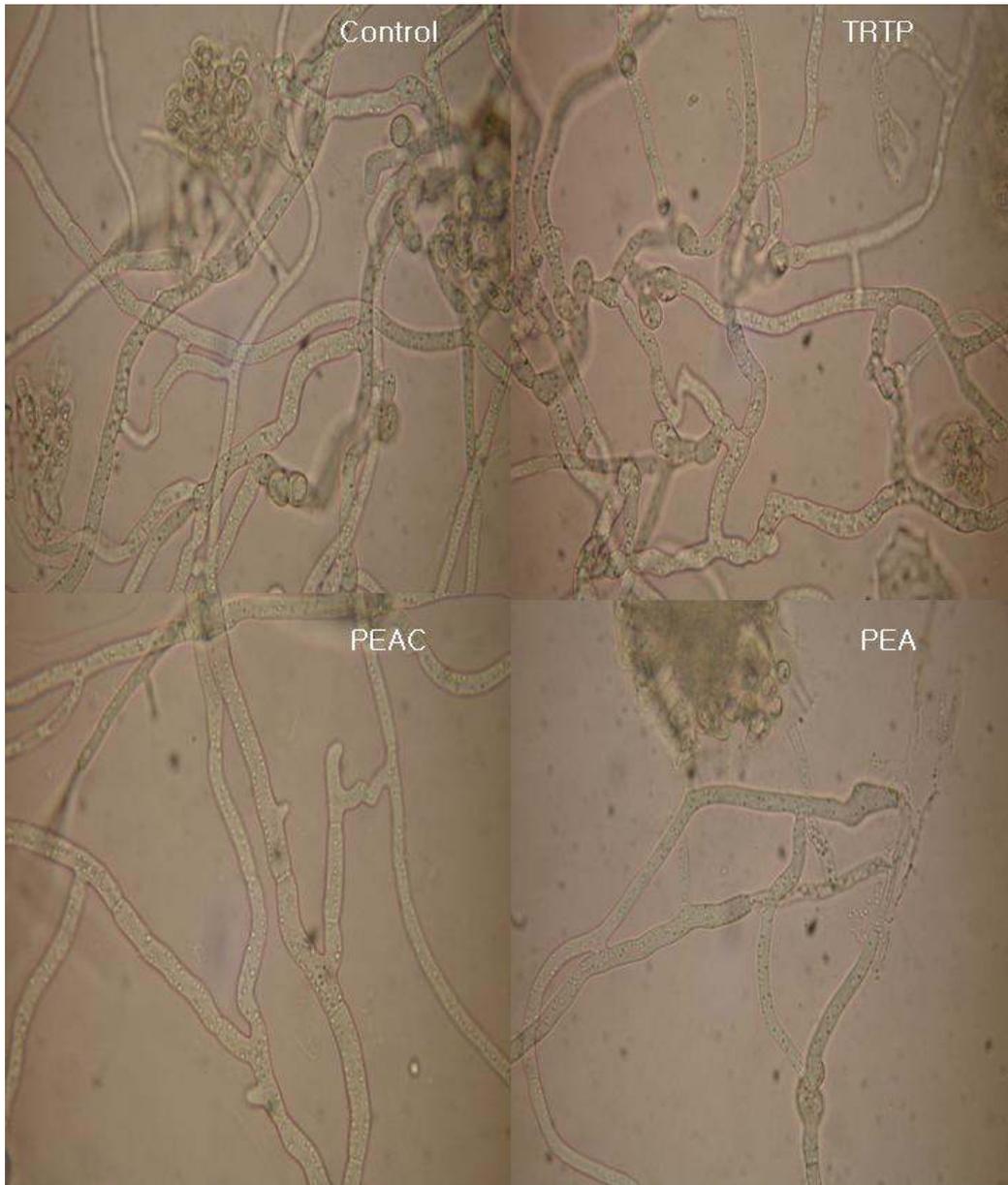


Fig. 41. The mycelium formation of *Rhizopus nigricans* treated with antifungal compounds (100 ppm).

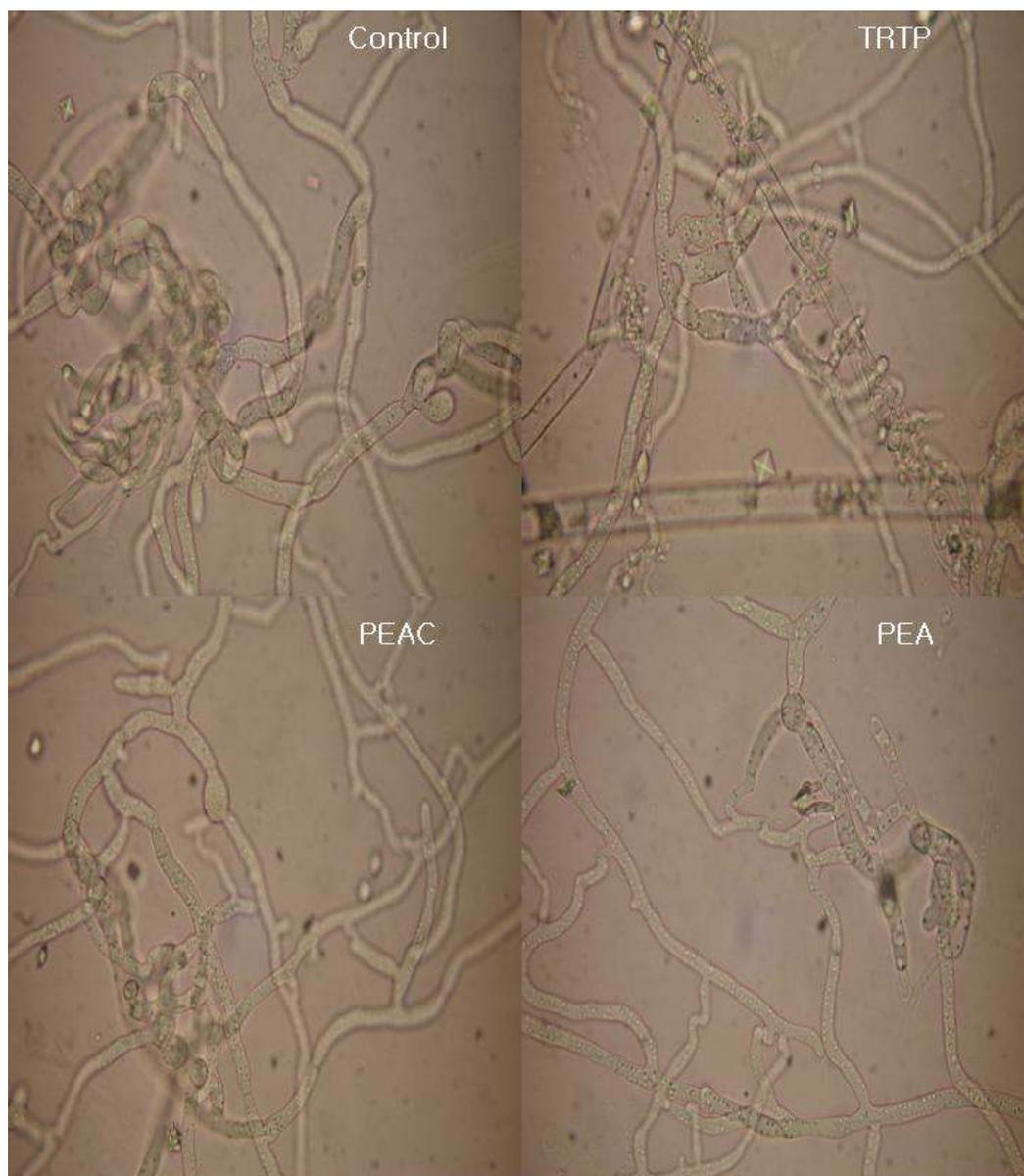


Fig. 42. The mycelium formation of *Alternaria alternaria* treated with antifungal compounds (100 ppm).

다수의 진균은 구조 내에 polyaromatic complex polymer를 지니며 이러한 구조를 지닌 진균은 흑색색소인 melanin을 생성하는 것으로 알려져 있다. Melanin은 균사체(hyphae)의 세포벽이나 포자 내에서 발견된다. 진균 내에 존재하는 melanin은 외부 환경으로부터 진균을 보호하는 기능을 하는 것으로 보고되고 있다. 따라서 melanin을 생성하는 진균은 그렇지 않은 진균에 비해 microbial antagonist, 방사선, 열 및 가수분해 효소에 대한 저항성이 높은 것으로 알려져 있다. *B. cinerea*와 *A. niger* 균주도 흑색 포자를 형성하는 진균이나 PEA, TRTP, PEAC 처리시 포자를 형성하지 못하거나 포자 내에 melanin 합성을 하지 못하는 것으로 관측되었다 (Figs. 40, 43~44).

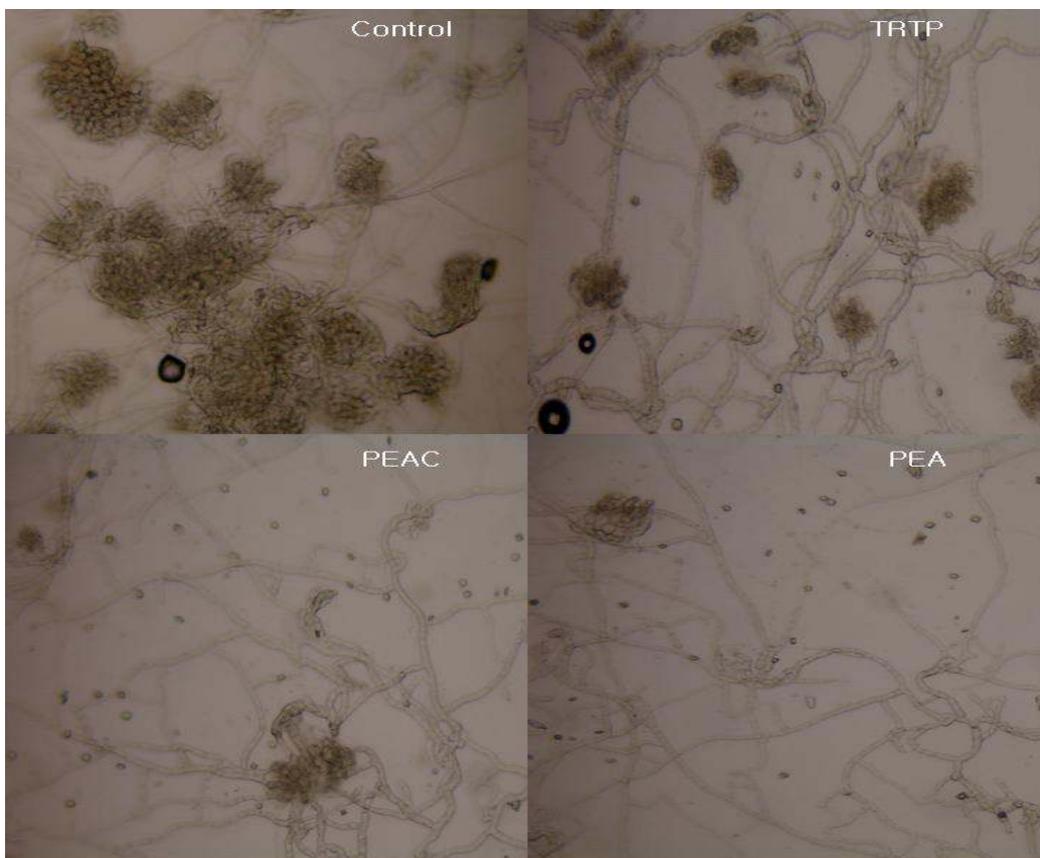


Fig. 43. The melanine formation of *Botrytis cinerea* treated with antifungal compounds (100 ppm).



Fig. 44. The spore formation of *Alternaria alternaria* treated with antifungal compounds (100 ppm).

진균류에서 melanin의 합성은 4개의 다른 대사과정을 통해 일어난다: (1) glutamyl dihydroxybenzene, (2) dopaquinone 또는 dopachrome (DOPA), (3) catechol, (4) dihydroxymaphthalene (DHN). 그러나 fungal melanin의 대부분은 polyketide pathway를 통해 생성되는 DHN melanin으로 알려져 있으며, DHN melanin은 phytopathogenic fungi가 식물체에 침입하는데 반드시 필요한 요소로 보고되고 있다. DHN melanin의 합성 경로는 Fig. 45와 같다.

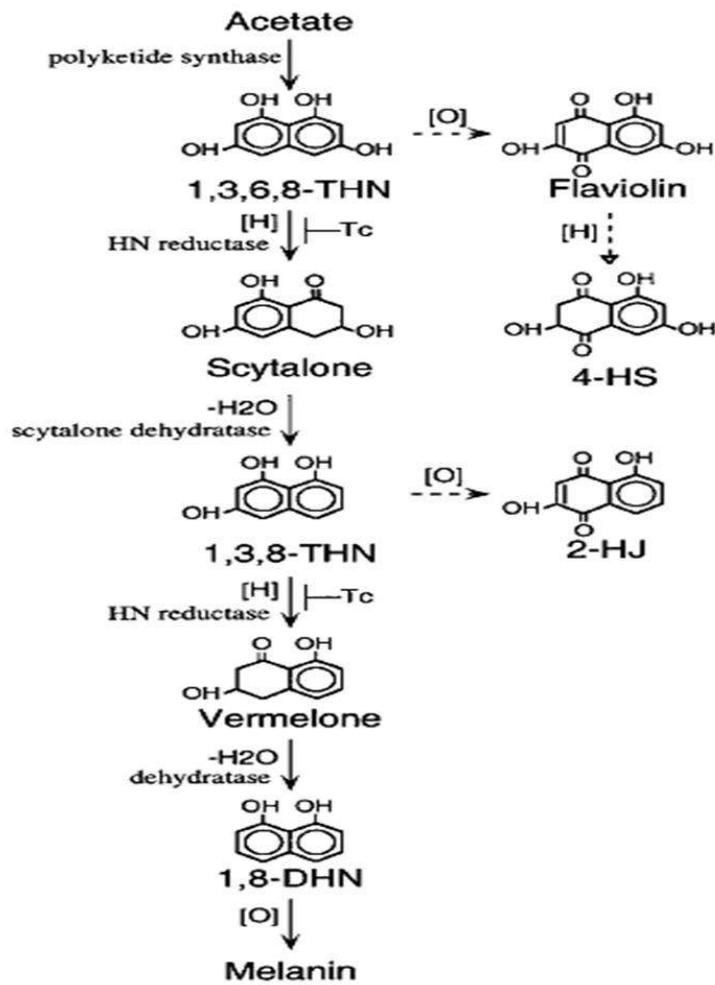


Fig. 45. The DHN melanogenesis pathway in black fungi.

만약 phytopathogenic fungi에 DHN melanin이 결여되어 있으면 식물체는 병원성 진균에 감염되지 않는 것으로 알려져 있고, 이와 같은 이유로 DHN melanin 합성을 저해하는 specific inhibitor 탐색에 대한 연구도 활발히 진행되고 있다. 따라서 Figs. 40, 43~44에서와 같이 PEA, TRTP, PEAC에 의한 phytopathogenic fungi의 흑색 포자 형성 억제가 DHN melanin synthesis와 관련되어 있는지를 Northern blot analysis를 통해 연구하였다.

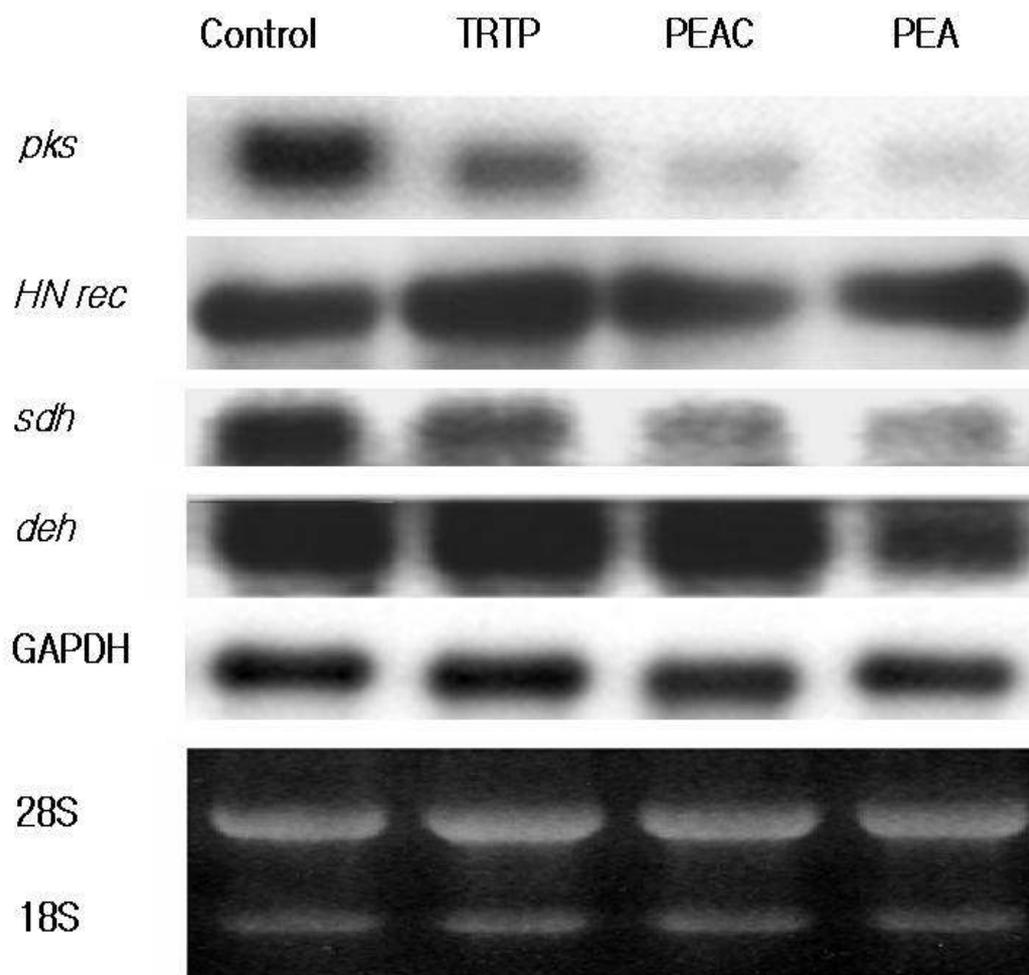


Fig. 46. Northern blot analysis of mRNA from *Alternaria alternaria* treated with 100 ppm of TRTP, PEAC, and PEA. *A. alternaria* was cultured for 5 days at room temperature. *pks*; polyketide synthase, *HN rec*; HN reductase, *sdh*; scytalone dehydratase, *deh*; dehydratase, GAPDH; house keeping gene.

PEA, TRTP, PEAC가 DHN melanin synthesis pathway에 참여하는 효소의 발현에 미치는 영향을 *Alternaria alternaria* 배양을 통해 측정하였다 (Fig. 46). Fig. 46에서와 같이 TRTP, PEAC 및 PEA는 polyketide synthase의 발현을 강력히 억제하였으나 HN reductase의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. Scytalone dehydratase의 발현은 TRTP에 의해서는 영향을 받지 않으나 PEAC와 PEA에 의해서는 발현양이 감소되었다. Dehydratase의 발현은 TRTP 및 PEAC에 의해서는 영향을 받지 않으나 PEA에 의해서는 발현양이 미세하게 감소된 것이 관측되었다. 이상의 결과를 고려할 때, 본 연구에서 분리된 항진균물질인 TRTP, PEAC, PEA에 의한 포자 및 균사체 내의 melanin 합성 저해 현상은 항진균물질이 DHN melanin synthesis 과정 전체에 영향을 미치어 나타난 결과로 사료되었다.

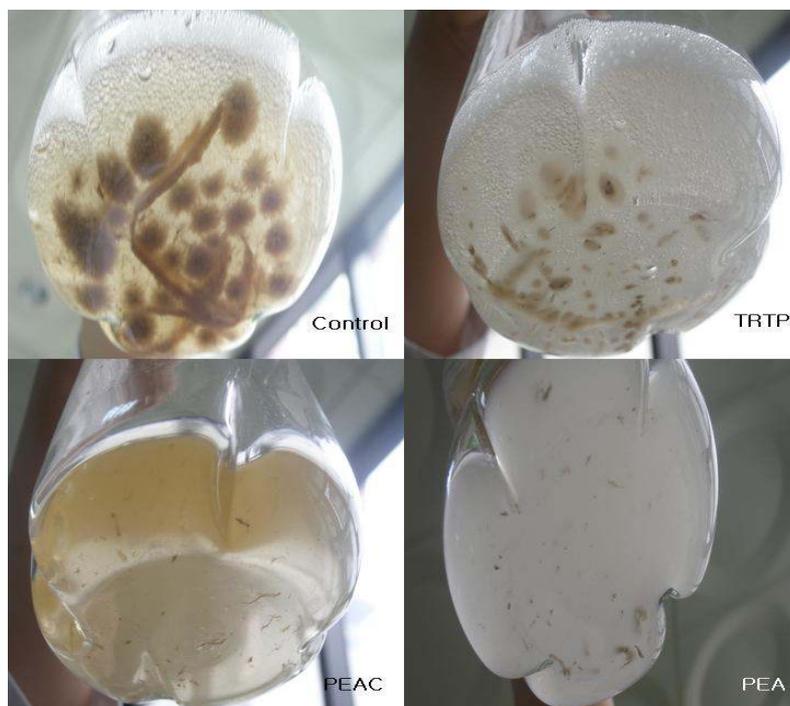


Fig. 47. Liquid fermentation of *Alternaria alternaria* treated with 100 ppm of TRTP, PEAC, and PEA for 5 days at room temperature.

DHN melanin synthesis 과정 이외의 기전에 PEA, TRTP 및 PEAC가 미치는 영향을 효과적으로 분석하기 위하여 *Alternaria*에 항진균물질을 첨가하여 Fig. 47과 같이 액체배양한 후 단백질을 urea buffer로 추출하여 2 dimensional analysis를 시행하였다. Fig. 48에서와 같이 대조구 및 실험구에서 다른 양상의 2D 분석 결과를 얻을 수 있었다. Figs. 49~50에서와 같이, PEA, TRTP, PEAC 처리구보다 대조구의 발현양이 많은 단백질 및 적은 단백질을 선정하여 해당 spot을 분리한 후 tripsinization을 실시하고 MALDI-TOF을 실시하여 Table 18~19와 같은 결과를 얻었다. 따라서 PEA, TRTP, PEAC는 DHN melanin synthesis 과정 이외에 *A. alternaria* 생육에 관련된 여러 단백질의 발현에 영향을 주는 것으로 사료되었다.

Table 18. Some different expressions of up-regulated genes in gene control versus antifungal compounds treated groups.

Identified genes	Function	Fold
AA995403/ ELAV	Cell recognition; molecular function	2.00
AA598787/ Cytoskeleton-associated protein 4	Biological process; Intracellular	2.01
N93505/ Transmembrane 4 superfamily member 2	Intracellular	2.04
H09066/ BRCA1 associated protein-1	Hydrolase activity	2.04
AA448402/ RNA binding motif protein 8A	Nucleic acid binding	2.05
AI954093/ Proteasome 26S subunit.	Metabolism; Molecular function	2.06
AA418689/ Polymerase II polypeptide F	Metabolism; Nucleic acid binding	2.14
AA705225/ Myosin, light polypeptide 4	Embryonic development	2.14
AA598513/ Protein tyrosine phosphatase, receptor type F	Hydrolase activity; Receptor	2.15
AI197974/ NCL_CGAP_Brn25	Nucleic acid binding	2.32
AA676458/ Lysyl oxidase-like 2	Metabolism	2.34
AA633997/ Tyrosine 3-monooxygenase	Kinase activity	2.61
AA490864/ Heat shock factor binding protein 1	Response to stress	2.67
R12473/ Adenosine kinase	Kinase activity	2.87
AA426096/ Chromatin assembly factor 1.	Intracellular	2.87
AI761788/ Complement component 1	Receptor	2.90
AA425934/ S100 calcium binding protein A1	Calcium ion binding	2.91
AI828088/ Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C	Kinase activity	4.90

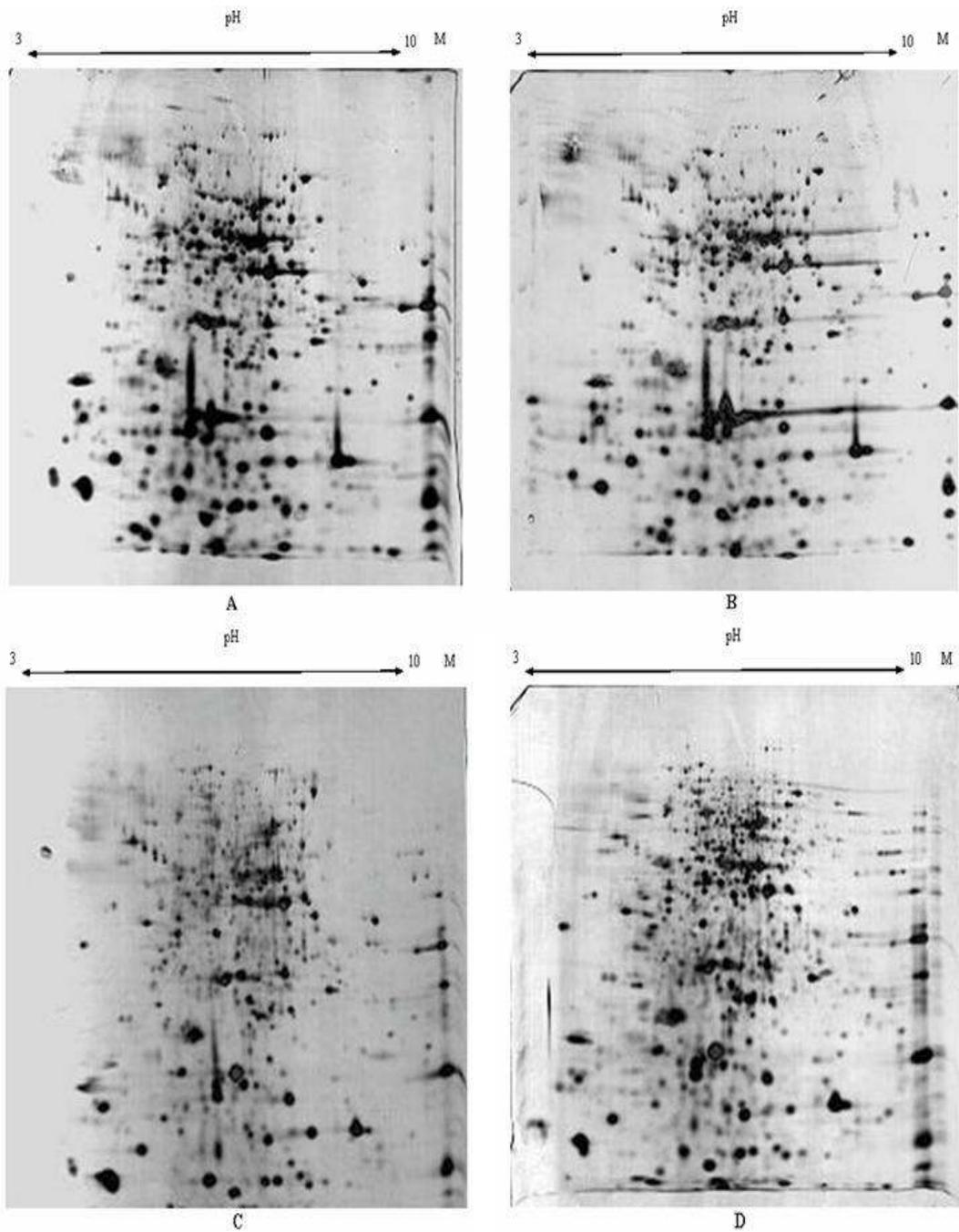


Fig. 48. Two dimensional analysis of *Alternaria alternaria* treated with 100 ppm of PEA, TRTP, and PEA. A; control, B; PEA, C; TRTP, D; PEAC.

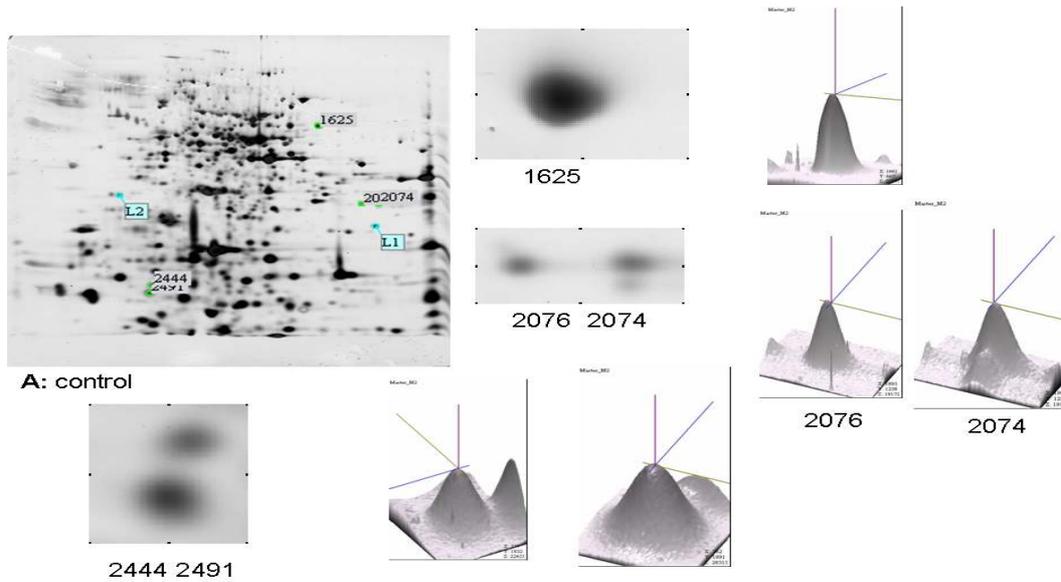


Fig. 49. Highly expressed proteins in *Alternaria alternaria* (control)

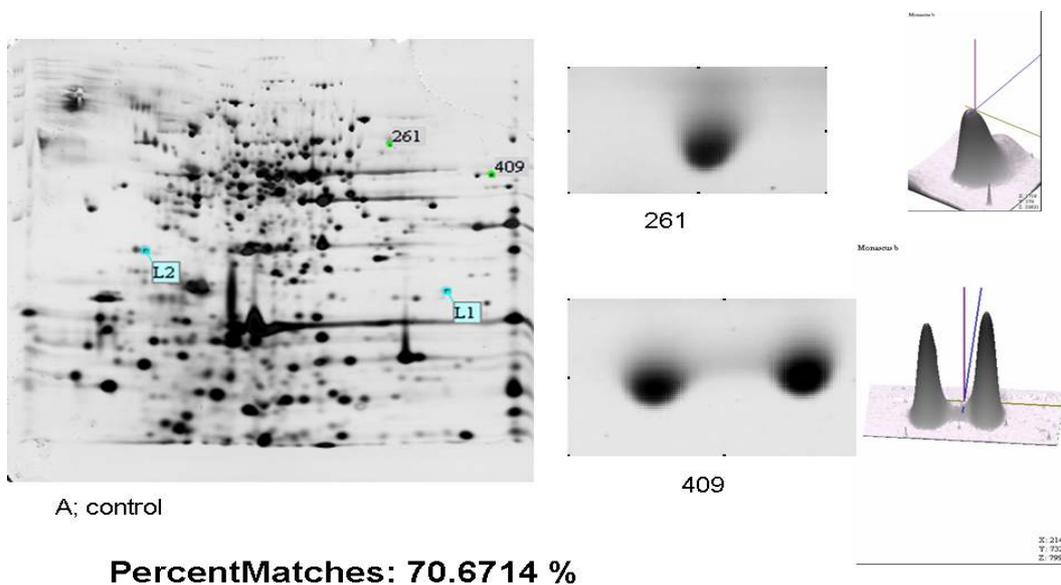


Fig. 50. Less expressed proteins in *Alternaria alternaria* (control)

Table 19. Some different expressions of down-regulated genes in gene control versus antifungal compounds treated groups.

Identified genes	Function	Fold
T55870/ Solute carrier family 20 member 2	Transport	1.25
AI336918/ Acyl-Coenzyme A dehydrogenase family, member 9	Metabolism; Electron transporter	2.02
T71976/ Phosphatidic acid phosphatase type 2B	Hydrolase activity	2.02
AA487034/ Transforming growth factor, beta receptor II	Growth; Molecular function	2.03
AI301004/6-phosphofructo-2-kinase/ructose-2,6-biphosphatase 3	Kinase activity	2.03
AA455235/ Aldehyde dehydrogenase 1 family.	Metabolism; Electron transporter	2.06
AA029934/ Integrin, alpha V	Biological process; Molecular function	2.08
AA486533/ Early growth response 1	Growth	2.08
AA020012/ Chromosome 11 open reading frame 8	Intracellular	2.11
AA873351/ Ribosomal protein L35a	Intracellular	2.11
AI368402/ A disintegrin and metalloproteinase domain 10	Hydrolase activity	2.12
H05768/ ATPase, H ⁺ transporting	Metabolism	2.14
H05768/ ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal.	Intracellular; Electron transporter	2.14
T52564/ Solute carrier family 40 member 1	Transport	2.17
AA485362/ Glutathione peroxidase 1	Metabolism	2.25
AA683077/ Mitogen-activated protein kinase 1	Kinase activity	2.26
H95960/ Secreted protein.	Extracellular	2.26
AA478543/ A kinase anchor protein12	Kinase activity	2.29
N92783/ Coronin, actin binding protein, 2B	Protein binding	2.30
H46554/ Transcription factor 8	Growth; Molecular function	2.30
AA872095/Tyrosine3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein.	Transferase	2.31
AA676453/ CD37 antigen	Biological process; Molecular function	2.31
AA425746/ Runt-related transcription factor 1	Biological process; Molecular function	2.35

5. 항진균물질의 안전성 평가

급성 및 아급성 독성시험: SD rat을 암수 각각 6수씩으로 나누어 체중 kg 당 PEA, TRTP, PEAC를 농도별로 단회경구투여한 후, 14일간을 관찰한 결과, 각 투여군 모두에서 비투여대조군 (untreated control)과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 SD rat을 암수 각각 6수씩으로 나누어 체중 kg당 PEA, TRTP, PEAC를 28일간 경구투여한 결과, 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 PEA, TRTP, PEAC는 단회독성시험 및 아급성독성시험에서 특이소견을 나타내지 않았으므로 이들 물질은 인체에 무독한 것으로 사료되었다. 자료는 항진균물질 처리구의 평균값으로 표기하였다.

Table 20. Influence on body weight, food intake, and food efficiency of single-dose toxicity test

Items	Groups	Negative control		Antifungal compounds	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Initial weight		201.0±15.15	157.7±13.08	202.3±9.46	159.2±11.29
Final weight		290.0±13.16	198.0±15.4	274.0±15.61	199.0±23.23
Weight gain		89.0±16.30	40.3±6.28	88.7±19.87	39.8±13.82
Mean food intake		26.3±1.83	19.0±1.92	25.9±1.32	18.5±2.47
Mean water intake		36.5±2.3	35.5±3.2	38.7±2.2	33.0±2.3
FER		0.24±0.04	0.15±0.02	0.20±0.06	0.15±0.03

FER; Food efficiency ratio

Table 21. Influence on the weight of major organs of single-dose toxicity test

Organs	Group	Negative control		Antifungal compounds	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Liver		9.172±0.715	6.266±0.592	8.832±0.354	6.243±0.770
Spleen		0.719±0.084	0.512±0.036	0.706±0.081	0.552±0.047
Thyroid gland		0.017±0.002	0.014±0.003	0.016±0.004	0.016±0.003
Brain		1.626±0.055	1.492±0.073	1.617±0.090	1.539±0.084
Heart		1.053±0.099	0.774±0.102	1.032±0.069	0.779±0.049
Kidney	L	1.063±0.072	0.728±0.037	1.051±0.088	0.741±0.099
	R	1.162±0.166	0.757±0.040	1.142±0.073	0.756±0.090
Lung	L	0.481±0.027	0.380±0.022	0.489±0.059	0.369±0.021
	R	0.967±0.090	0.767±0.029	0.990±0.099	0.784±0.046
Adrenal	L	0.024±0.002	0.027±0.006	0.023±0.005	0.028±0.006
	R	0.023±0.003	0.025±0.010	0.025±0.007	0.027±0.006
Testis/ Ovary	L	1.733±0.139	0.044±0.014	1.793±0.119	0.044±0.015
	R	1.728±0.103	0.042±0.003	1.802±0.096	0.048±0.011

Table 22. Influence on urine of single-dose toxicity test

Parameters \ Group	Negative control		Antifungal compounds	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Excretion	19.03±2.34	21.28±6.38	22.55±5.52	19.71±1.35
pH	8.5±0.00	8.4±0.22	8.4±0.42	8.7±0.27
Glucose(mg/dl)	15.60±11.01	10.80±10.33	13.40±13.50	11.25±11.32
Protein(mg/day)	95.40±12.72	93.50±17.97	92.03±20.08	89.60±32.94
Blood	Negative	Negative	Negative	Negative
Microscopy	Negative	Negative	Negative	Negative
Ketone*	0.60±0.22	0.30±0.27	0.60±0.22	0.30±0.22
Bilirubin	Negative	Negative	Negative	Negative
Nitrite	Negative	Negative	Negative	Negative

Table 23. Influence on plasma of single-dose toxicity test

Parameters \ Group	Negative control		Antifungal compounds	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Protein(g/dl)	5.35±0.26	5.52±0.27	5.28±0.08	5.27±0.12
BUN(mg/dl)	15.32±2.96	17.47±3.90	14.70±4.57	16.45±4.10
Glucose(mg/dl)	120.5±13.74	122.5±8.64	126.5±28.25	120.17±13.15
Cholesterol(mg/dl)	88.33±10.25	70.50±10.41	79.17±6.97	78.67±10.56
Bilirubin(mg/dl)	0.10±0.08	0.10±0.00	0.08±0.04	0.08±0.04
Creatinine(mg/dl)	0.50±0.04	0.50±0.00	0.50±0.00	0.50±0.06
Na(mmol/L)	137.17±3.19	137.00±1.67	137.67±1.75	135.00±3.35
K(mmol/L)	41.50±19.55	40.03±6.09	40.70±8.99	40.87±13.37
Cl(mmol/L)	95.83±1.60	96.50±1.97	96.50±2.07	96.17±1.47

Table 24. Influence on EDTA–blood of single–dose toxicity test

Parameters \ Group	Negative control		Antifungal compounds	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
RBC(*10 ³ mm ³)	7.09±0.38	7.18±0.29	7.44±0.32	7.30±0.27
WBC(*10 ³ mm ³)	8.70±1.42	5.79±0.62	8.73±1.49	5.64±1.79
HCT(%)	50.00±3.58	48.33±1.51	52.67±1.86	49.00±1.55
Hb(g/dl)	14.17±0.98	14.37±0.53	15.58±0.50	14.62±0.62
MCV(μ ³)	70.33±1.51	67.33±1.03	71.17±3.66	67.17±1.83
MCH(μg)	19.83±0.75	20.00±0.63	20.83±0.75	20.17±0.41
MCHC(g/ml)	28.33±0.52	29.67±0.52	29.67±0.82	29.83±0.75
Platelet(*10 ⁵ mm ³)	9.21±1.56	9.70±0.99	9.04±1.54	8.99±1.40
Reticulocyte(%)	5.73±0.77	4.48±0.50	5.27±1.57	4.97±0.56
Neutrophil Seg(%)	13.00±3.46	13.33±5.92	13.67±7.94	13.33±5.85
Lymphocyte(%)	79.67±4.41	83.33±4.08	80.17±8.35	83.83±6.79
Monocyte(%)	4.83±3.82	4.50±1.97	5.17±2.23	4.67±1.75
Eosinophil(%)	1.50±0.55	1.83±2.04	1.00±1.67	1.17±0.41

Table 25. Influence on body weight, food intake, and food efficiency of repeated-dose toxicity test

Items	Groups	Negative control		Antifungal compounds	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Initial weight		203.0±12.15	159.7±12.06	204.3±7.56	158.6±10.49
Final weight		287.0±10.16	197.0±12.3	284.4±13.68	199.7±13.03
Weight gain		84.0±14.21	37.3±5.04	80.7±14.54	41.1±12.22
Mean food intake		27.3±1.75	18.0±1.74	26.9±1.02	18.4±1.69
Mean water intake		37.3±2.7	35.2±2.1	37.8±2.5	34.8±3.1
FER		0.33±1.25	0.48±1.68	0.33±0.98	0.45±1.03

FER; Food efficiency ratio

Table 26. Influence on the weight of major organs of repeated-dose toxicity test

Organs	Group	Negative control		Antifungal compounds	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Liver		9.387±0.376	6.376±0.374	8.937±0.382	6.379±0.774
Spleen		0.721±0.044	0.563±0.067	0.711±0.037	0.562±0.048
Thyroid gland		0.016±0.001	0.014±0.002	0.016±0.003	0.015±0.003
Brain		1.673±0.085	1.589±0.077	1.671±0.094	1.538±0.025
Heart		1.046±0.099	0.782±0.112	1.042±0.075	0.797±0.043
Kidney	L	1.053±0.042	0.729±0.052	1.052±0.069	0.743±0.027
	R	1.062±0.093	0.773±0.032	1.052±0.039	0.763±0.099
Lung	L	0.485±0.031	0.386±0.021	0.488±0.062	0.396±0.083
	R	0.976±0.029	0.779±0.083	0.991±0.090	0.781±0.041
Adrenal Grand	L	0.025±0.001	0.026±0.003	0.024±0.004	0.027±0.001
	R	0.024±0.003	0.025±0.009	0.025±0.003	0.026±0.002
Testis/ Ovary	L	1.725±0.201	0.043±0.017	1.790±0.039	0.045±0.009
	R	1.782±0.126	0.044±0.023	1.810±0.005	0.047±0.009

Table 27. Influence on urine of repeated-dose toxicity test

Parameters \ Group	Negative control		Antifungal compounds	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Excretion	23.42±1.54	20.36±4.74	23.56±5.87	21.48±2.41
pH	8.5±0.15	8.4±0.14	9.5±0.24	8.4±0.27
Glucose(mg/dl)	13.54±10.45	12.52±10.78	13.48±10.24	11.99±10.27
Protein(mg/day)	90.47±10.77	73.57±27.78	92.58±10.73	77.82±22.58
Blood	Negative	Negative	Negative	Negative
Microscopy	Negative	Negative	Negative	Negative
Ketone*	0.40±0.23	0.40±0.25	0.40±0.23	0.40±0.52
Bilirubin	Negative	Negative	Negative	Negative
Nitrite	Negative	Negative	Negative	Negative

Table 28. Influence on plasma of repeated-dose toxicity test

Parameters \ Group	Negative control		Antifungal compounds	
	Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
Protein(g/dl)	5.25±0.16	5.47±0.16	5.27±0.14	5.34±0.18
BUN(mg/dl)	15.98±1.95	16.55±2.98	14.99±7.23	16.43±3.56
Glucose(mg/dl)	123.5±11.54	122.4±7.45	126.1±18.64	120.03±23.22
Cholesterol(mg/dl)	89.35±21.42	78.83±14.78	82.56±8.35	79.82±14.76
Bilirubin(mg/dl)	0.08±0.05	0.08±0.02	0.08±0.03	0.08±0.05
Creatinine(mg/dl)	0.50±0.02	0.50±0.04	0.50±0.01	0.50±0.06
Na(mmol/L)	137.17±2.53	137.00±1.82	137.61±0.25	137.01±2.63
K(mmol/L)	43.57±13.53	40.78±3.94	42.79±4.69	40.32±10.45
Cl(mmol/L)	96.82±1.33	96.73±1.03	96.78±1.94	96.01±1.94

Table 29. Influence on EDTA–blood of repeated–dose toxicity test

Parameters	Group	Negative control		Antifungal compounds	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
RBC(*10 ³ mm ³)		7.14±1.45	7.21±1.03	7.14±0.36	7.33±0.35
WBC(*10 ³ mm ³)		8.73±1.23	5.81±1.53	8.74±1.56	5.92±1.67
HCT(%)		49.76±2.55	48.02±2.44	50.23±1.00	49.56±2.31
Hb(g/dl)		14.21±0.21	14.67±0.83	15.05±0.63	14.90±0.88
MCV(μ ³)		71.11±1.67	67.01±1.94	71.38±1.89	67.27±2.13
MCH(μg)		20.03±1.67	20.32±0.83	20.92±0.38	20.73±0.33
MCHC(g/ml)		29.74±0.28	29.98±0.47	29.78±0.47	29.98±0.95
Platelet(*10 ⁵ mm ³)		9.07±0.74	8.74±1.04	9.05±0.94	8.93±0.49
Reticulocyte(%)		5.68±1.67	4.31±0.59	5.72±1.75	4.47±1.97
Neutrophil Seg(%)		14.70±2.68	13.34±4.67	14.66±7.35	13.21±4.87
Lymphocyte(%)		80.24±3.56	82.36±3.17	80.23±6.27	83.95±5.38
Monocyte(%)		4.95±2.64	3.98±2.08	5.06±2.84	4.07±0.63
Eosinophil(%)		0.98±0.54	1.21±2.21	1.01±0.23	1.03±0.87

Table 30. Antimutagenic effect of antifungal compounds against 4-Nitroquinoline-1-oxide, Sodium azide, and 2-Aminoanthracene in *Salmonella typhimurium* TA98 and TA100

Sample	S9 mix	Dose ($\mu\text{g}/\text{plate}$)	Number of revertant colonies per plate (mean \pm S.D.)	
			TA98	TA100
H ₂ O	-		24 \pm 1.5	110 \pm 12
	+		24 \pm 2	114 \pm 17.7
	-	2500	24 \pm 2.1	156 \pm 12
	-	1250	32 \pm 0.7	140 \pm 20
	-	625	23 \pm 3.5	146 \pm 5.7
	-	313	23 \pm 5	153 \pm 8.5
	-	156	20 \pm 0.7	143 \pm 7.8
	+	2500	35 \pm 3.5	162 \pm 7.8
	+	1250	33 \pm 1.4	160 \pm 4.2
	+	625	33 \pm 0	143 \pm 0.7
	+	313	35 \pm 0.7	146 \pm 15.5
	+	156	29 \pm 1.4	143 \pm 2.8
Positive control	-		506 \pm 69 ^a	772 \pm 97 ^b
	+		873 \pm 39 ^c	1408 \pm 82 ^c

Positive control agents: ^a4-Nitroquinoline-1-oxide(0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$), ^bSodium azide(0.5 $\mu\text{g}/\text{plate}$), ^c2-Aminoanthracene(0.4 $\mu\text{g}/\text{plate}$)

Table 31. Cytotoxic effect on normal murine liver and intestinal cell lines of antifungal compounds

Antifungal compounds	Cell lines		
		Liver	Intestine
control	L	100	100
	I	100	100
1×10 ¹	L	101.21±0.91	97.72±6.83
	I	99.54±2.56	99.73±2.87
1×10 ²	L	99.98±1.78	100.03±2.87
	I	97.28±4.20	97.49±1.98
1×10 ⁴	L	97.32±4.09	98.33±1.87
	I	99.38±2.21	96.48±3.82
1×10 ⁶	L	98.33±3.95	99.46±1.73
	I	96.21±2.74	98.77±4.88

L; live yeast cell diluted in phosphate buffered saline, I; inactivated at 95°C for 30 min, n=8.

Table 32. Relative inhibitory effect on human cancer cell lines of Antifungal compounds

Antifungal compounds		Cell lines	
		MKN-45	HT-29
control	L	100	100
	I	100	100
1×10	L	28.59±5.32	42.44±3.41
	I	35.72±2.56	36.44±3.26
1×10 ²	L	39.99±2.59	47.75±3.53
	I	49.54±3.47	40.31±1.21
1×10 ⁴	L	47.96±4.21	47.99±3.36
	I	50.42±1.57	41.03±0.07
1×10 ⁶	L	81.47±2.73	72.03±7.51
	I	57.02±2.05	43.23±1.32

MKN-45; human gastric cancer cell line, HT-29; human colon cancer cell line, L; live yeast cell diluted in phosphate buffered saline, I; inactivated at 95°C for 30 min, n=8.

세포막 안정화 시험: 건강한 35세 남성의 O+ 형 혈액 중의 적혈구 만을 분리하여 PBS와 증류수에 incubation한 후 적혈구의 hemolysis 정도를 측정한 결과는 Table 33과 같다. Table 31과 Fig. 51에서와 같이 antifungal compounds는 saline보다 낮은 hemolysis 정도를 나타내었다. 따라서 antifungal compounds는 세포막의 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었다.

Table 33. Effect of antifungal compounds and saline on the stability of RBC membrane

	Cell	Supernatant
Antifungal compounds	1.6975±1.414	0.0062±0.0053
Saline	1.8210±1.927	1.8827±1.4354

The degree of hemolysis was obtained from standard curve ($y=0.0108X+0.0001$, $R^2=0.9999$)

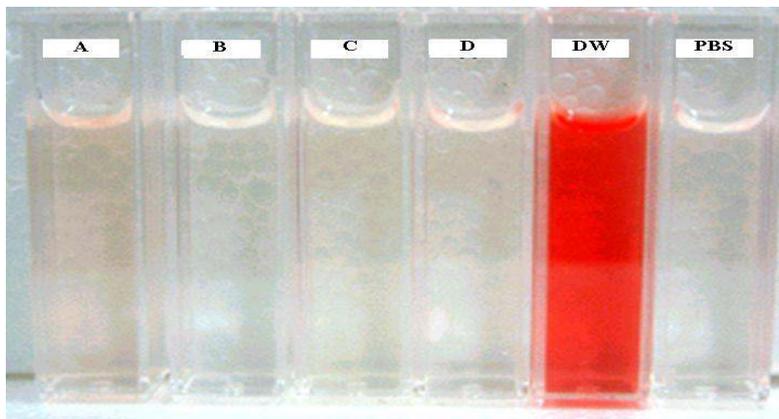


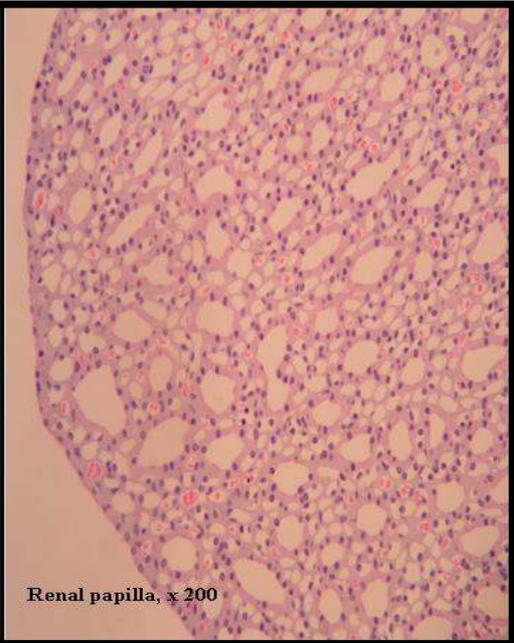
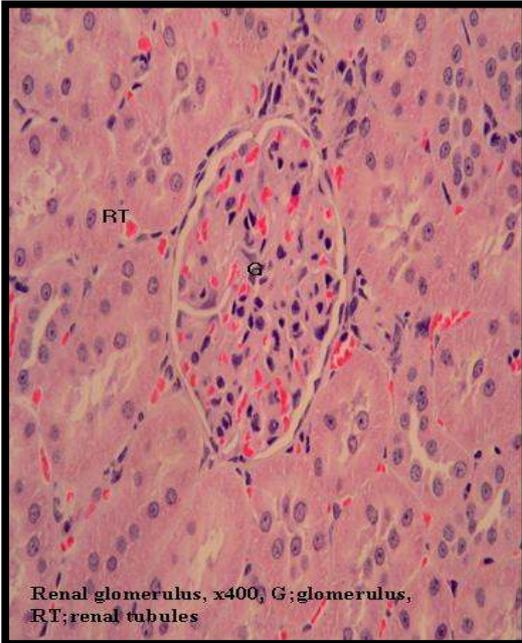
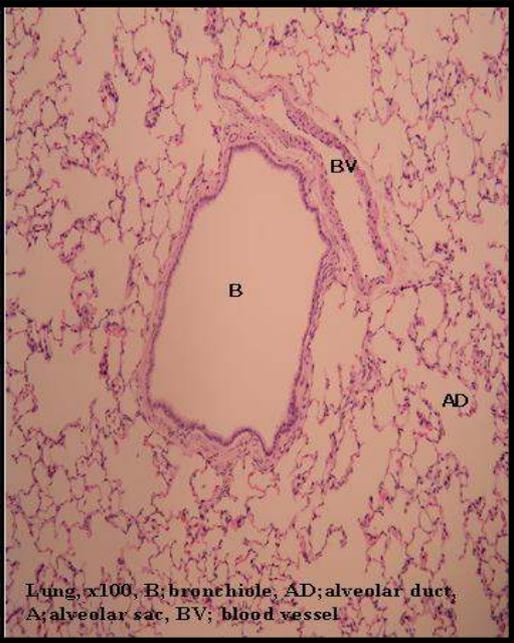
Fig. 51. The degree of RBC hemolysis. A; saline, B; PEA, C; TRTP, D; PEAC, DW; distilled water, PBS; phosphate buffered saline

간독성 지표 효소의 활성화도: Antifungal compounds를 rat에 투여한 후 혈액을 채취하여 GOT, GPT 및 ALP 활성을 측정하였다. Table 34에서와 같이 효소활성도는 비투여대조군과 항진균물질투여군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 Antifungal compounds의 경구투여는 간독성을 유발하지 않는 것으로 사료되었다.

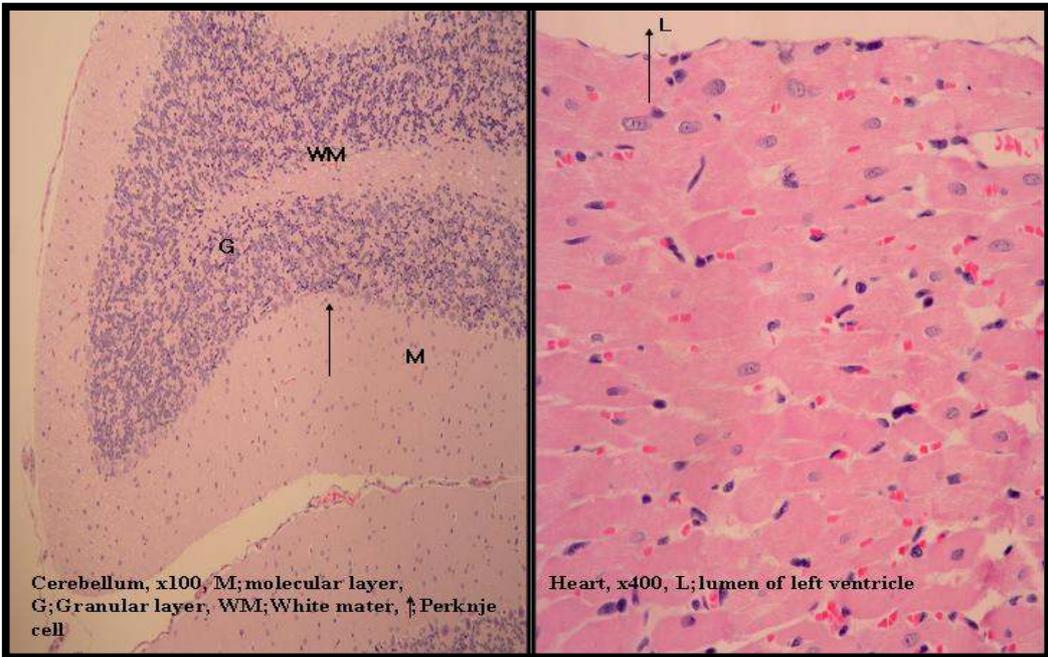
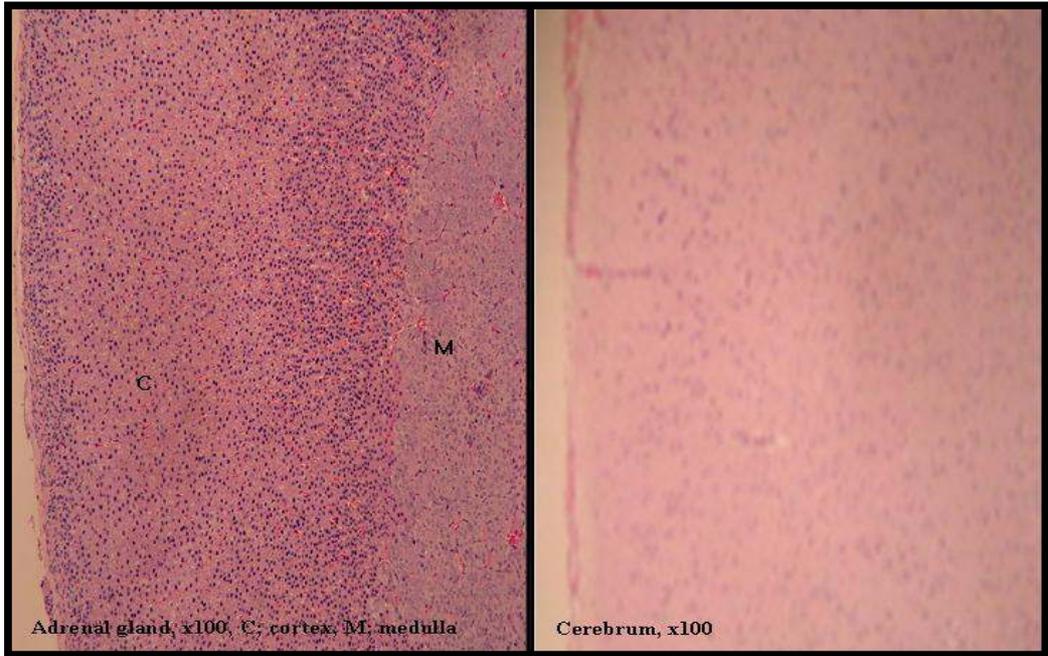
아급성 독성 시험 후의 조직 검사: 아급성 독성 시험 종료시 검체를 부검하여 각 조직을 HE staining하여 조직검사를 실시하였다 (Fig. 52). 그 결과 효모 투여군의 조직은 정상의 조직의 소견을 나타내었다 (수의사 소견). 따라서 antifungal compounds의 경구투여는 독성을 유발하지 않는 것으로 사료되었다.

Table 34. Effect of antifungal compounds on the activities of hepatotoxicity related enzymes.

Parameters	Group	Untreated control		Antifungal compounds	
		Male(n=6)	Female(n=6)	Male(n=6)	Female(n=6)
GOT(U/L)		73.17±27.65	66.67±6.80	73.83±12.22	72.00±8.69
GPT(U/L)		41.50±10.37	32.50±4.59	40.17±7.83	41.33±17.26
ALP(U/L)		1.17±1.33	1.50±1.05	0.83±0.75	0.50±0.55



continued



continued

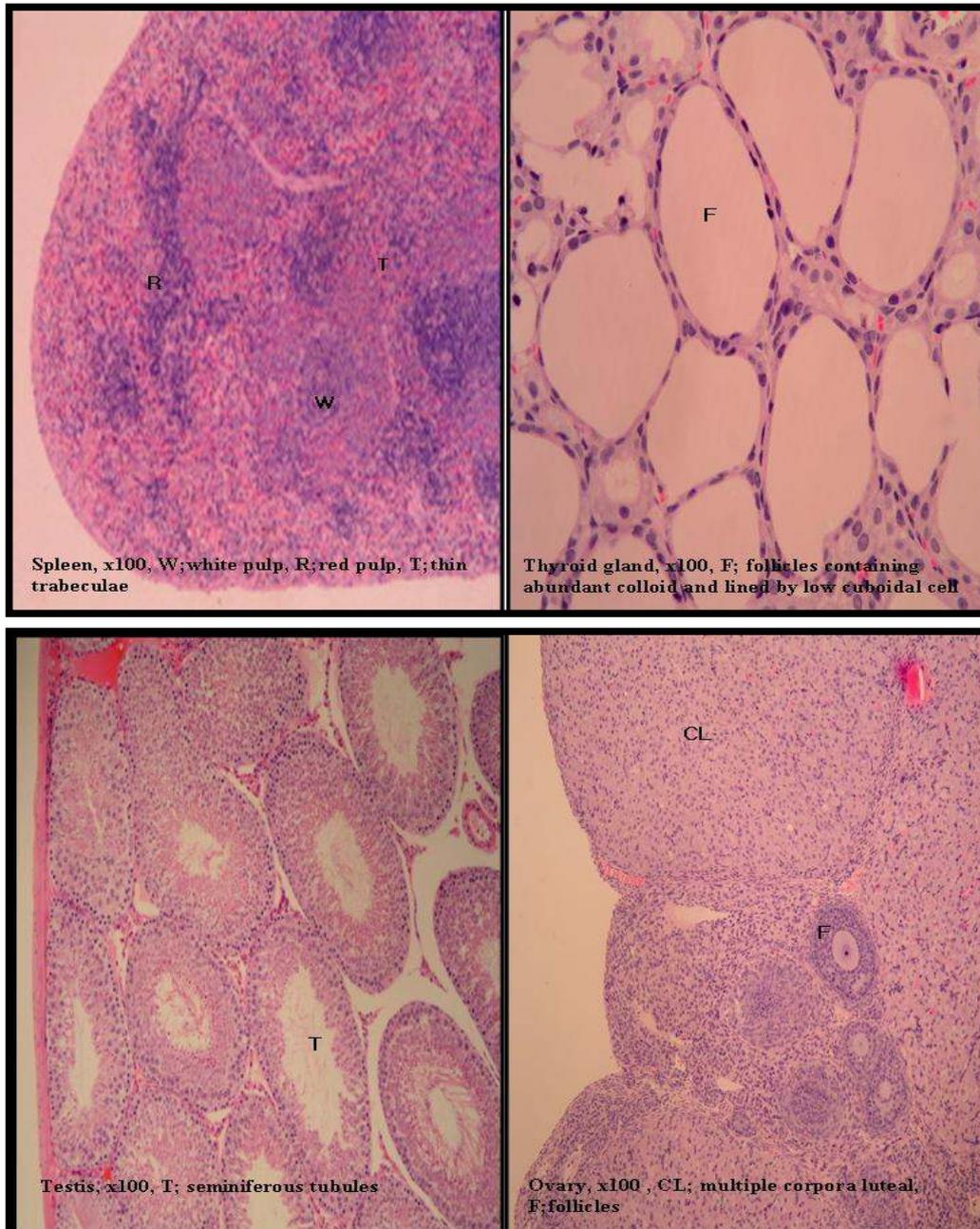


Fig. 52. Histological examination of various organs extracted from the repeated-dose toxicity testing rat

6. 항진균물질 처리에 따른 복숭아의 품질평가

항진균물질 처리에 의한 곰팡이 발생을 평가: 복숭아 과일의 상품성을 저해하는 중요한 요소 중의 하나인 곰팡이 발생이 PEA, TRTP, PEAC에 의해 억제되는지를 조사하기 위하여 복숭아 밭에서 수확 직후 항진균물질에 복숭아 (유명)를 혼합하여 실온에 저장하면서 곰팡이 발생율을 측정하였다. Fig. 53에서와 같이 저장기간이 경과할수록 대조구 및 PEA, TRTP, PEAC 처리구 모두 곰팡이 발생율이 증가하였으나 항진균물질 처리구에서의 곰팡이 발생율은 실험 전 기간동안 대조구보다 낮았다. 따라서 항진균물질 처리에 의해 복숭아에서의 곰팡이 발생이 감소하는 것으로 사료되었다.

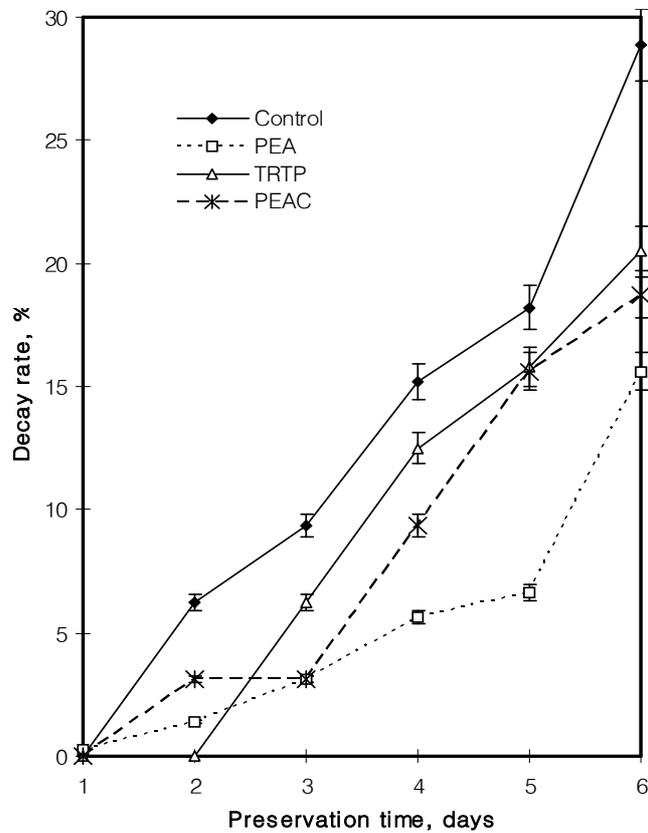


Fig. 53. Effects of PEA, TRTP, and PEAC on the fungal decay rate of 'Yumyung', peach fruits for 6 days at room temperature.

항진균물질 처리에 따른 복숭아 중량의 변화: PEA, TRTP, 및 PEAC를 처리한 복숭아의 중량 감소율을 측정한 결과는 Fig. 54와 같다. Fig. 54에서와 같이 대조구의 중량감소율은 저장기간의 증가와 함께 비례하여 증가되었다. PEAC 처리구에서의 중량감소율의 증가 경향은 대조구와 유사하였으나 전 실험기간 동안 대조구보다 낮았다. PEA 처리구에서의 중량감소율은 저장 초기에 낮았으며, TRTP 처리구에서의 중량감소율은 저장 후기에 낮았다.

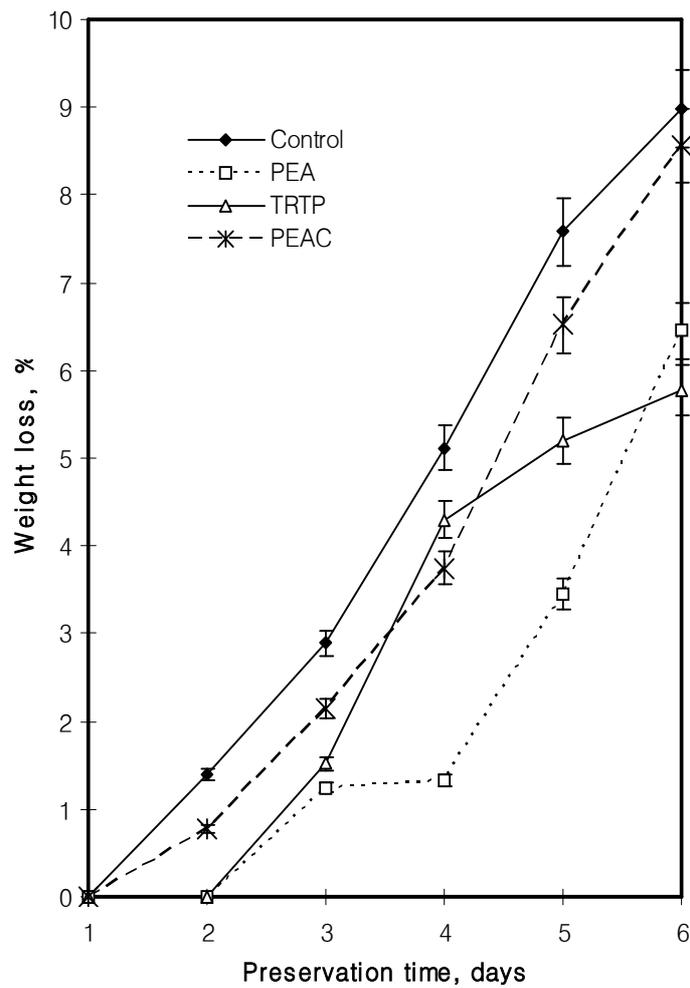


Fig. 54. Effects of PEA, TRTP, and PEAC on the relative weight loss of 'Yumyung', peach fruits for 6 days at room temperature.

Woolliness의 측정: 항진균물질 처리 후 실온에 저장하면서 복숭아의 woolliness를 측정한 결과는 Fig. 55와 같다. Fig. 55에서와 같이 저장기간이 증가하면서 대조구의 woolliness가 현저히 증가된 반면, 항진균물질 처리구에서의 woolliness 증가폭은 매우 낮게 나타났다. 이는 항진균물질 처리에 의해 복숭아의 ripening 과정이 억제되기 때문인 것으로 사료되었다.

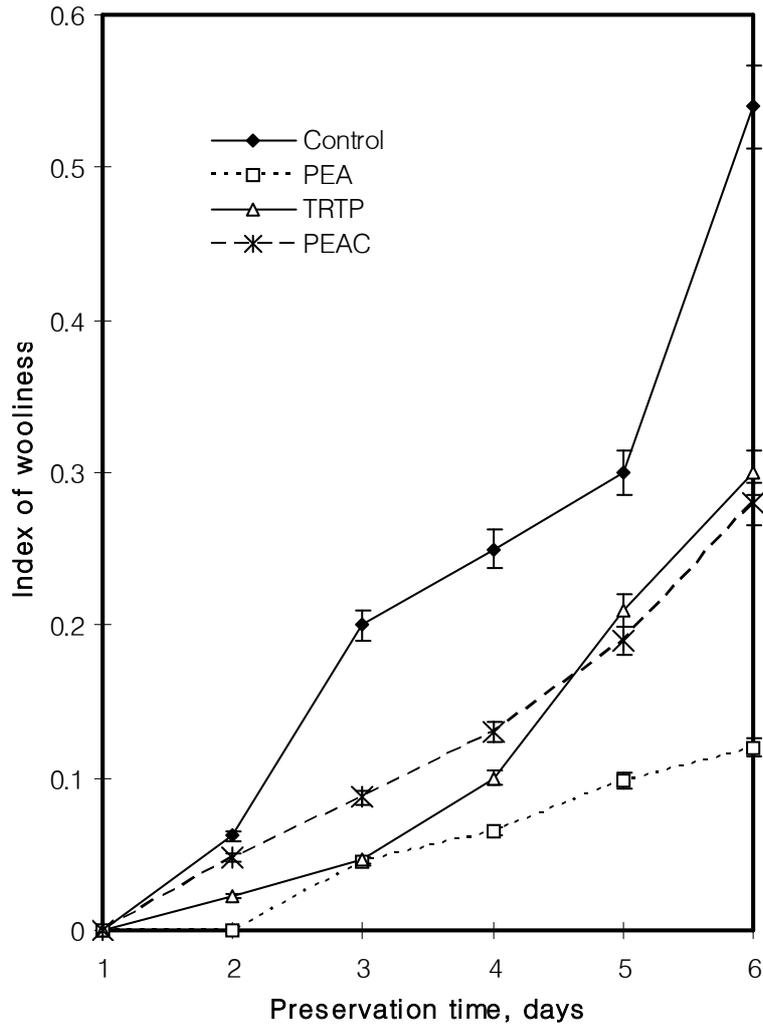


Fig. 55. Effects of PEA, TRTP, and PEAC on the index of woolliness of 'Yumyung', peach fruits for 6 days at room temperature.

Texture의 변화: 항진균물질을 처리하여 실온에서 저장한 복숭아의 경도 변화를 측정된 결과는 Fig. 56과 같다. Fig. 56에서와 같이 대조구의 경도는 저장기간이 증가하면서 감소하였고 TRTP과 PEAC 처리구의 경도 감소폭도 대조구와 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 PEA 처리구에서의 경도 감소는 매우 낮았으며 이는 딸기를 대상으로 기 보고되었던 결과와 일치하였다. 따라서 PEA 처리는 과실의 경도를 신선한 상태로 유지시키는 효과가 있는 것으로 사료되었다.

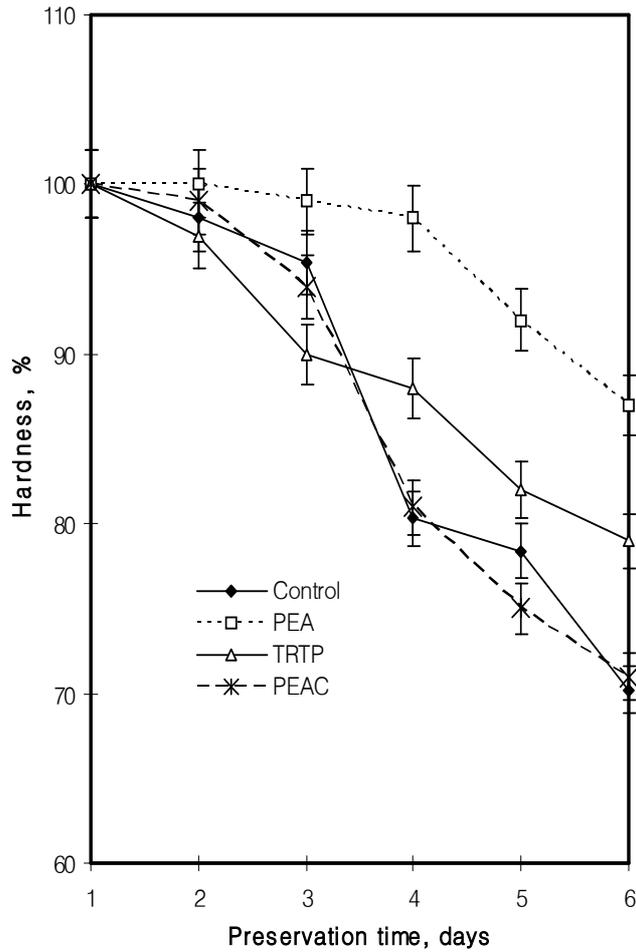


Fig. 56. Effects of PEA, TRTP, and PEAC on the relative change of hardness (xg) of 'Yumyung', peach fruits for 6 days at room temperature.

이화학적 특성 평가: 항진균물질 처리 복숭아의 ascorbic acid 함량 변화를 측정한 결과는 Fig. 57과 같다. Fig. 57에서와 같이 PEA 처리구는 대조구 및 다른 처리구에 비하여 유의적으로 높은 ascorbic acid 함량을 나타내었다.

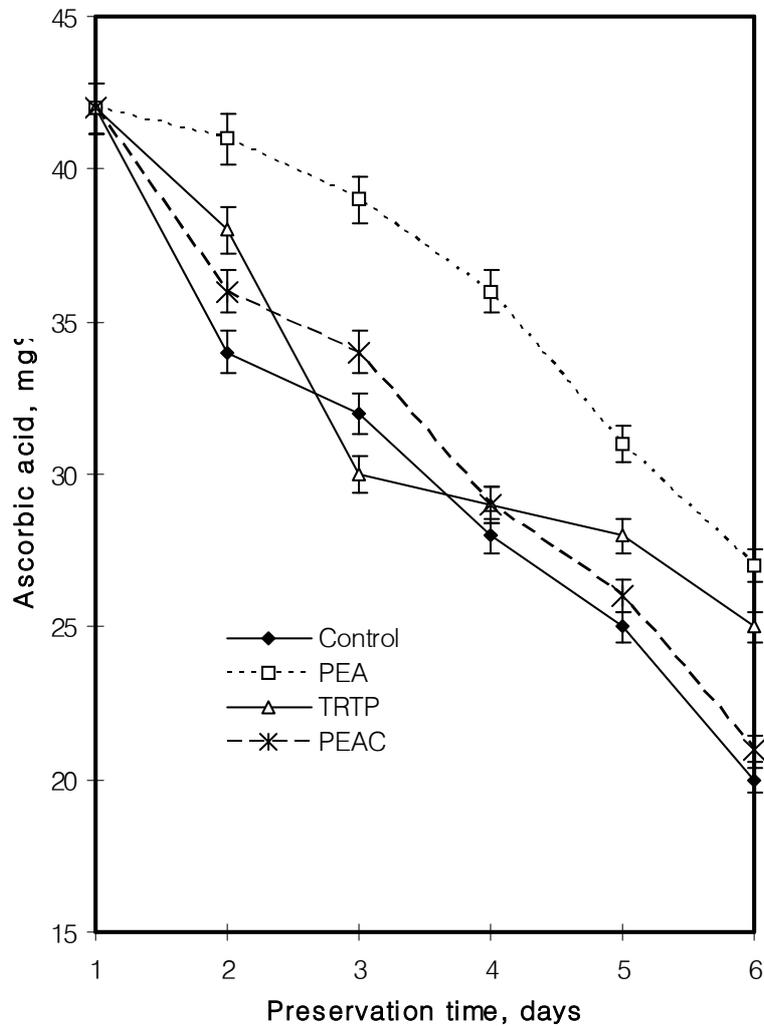


Fig. 57. Effects of PEA, TRTP, and PEAC on the concentration (mg/g) of ascorbic acid of 'Yumyung', peach fruits for 6 days at room temperature.

복숭아의 환원당 함량을 측정한 결과는 Fig. 58과 같다. 복숭아의 당 조성은 일반적으로 포도당 0.76%, 과당 0.93%, 자당 5.14%로 총당함량은 6.83%에 해당하는 것으로 보고되고 있다. 과실의 당함량은 수확 후에는 호흡의 기질로 사용되므로 저장기간이 증가할수록 당함량도 낮아지게 된다. 따라서 PEA 처리구에서 당함량이 대조구에 비하여 높게 유지되는 것은 PEA가 복숭아 과실의 수확후 호흡 기질을 억제하기 때문인 것으로 사료되었다.

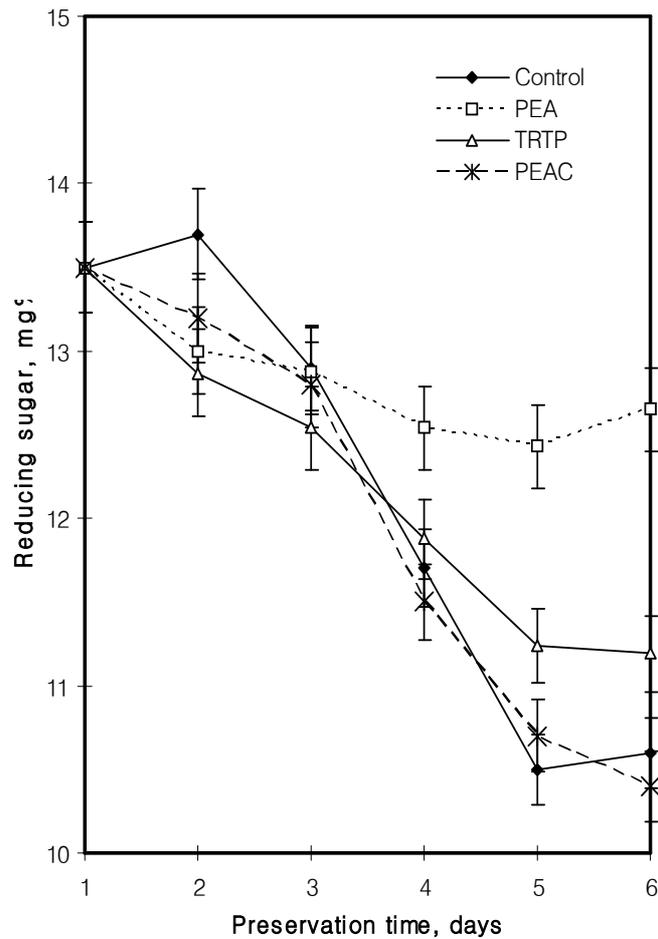


Fig. 58. Effects of PEA, TRTP, and PEAC on the concentration (mg/g) of reducing sugar of 'Yumyung', peach fruits for 6 days at room temperature.

복숭아의 적정산도를 측정된 결과는 Fig. 59와 같다. 적정산도의 변화 경향은 대조구 및 TRTP, PEAC 처리구의 경우 저장기간이 증가할수록 산도가 감소하였고, PEA 처리구의 경우는 전체적으로 적정산도 값이 대조구보다 높았으나 실험기간 동안 유의적인 차이는 나타나지 않았다. 저장 중 복숭아의 적정산도가 감소하는 것은 수확 후 성숙대사의 과도한 억제에 따른 비정상적 대사의 작동과 관련이 있는 것으로 보고되고 있다. 따라서 PEA 처리에 의해 수확 후 비정상적 대사의 작동이 저해되는 것으로 사료되었다.

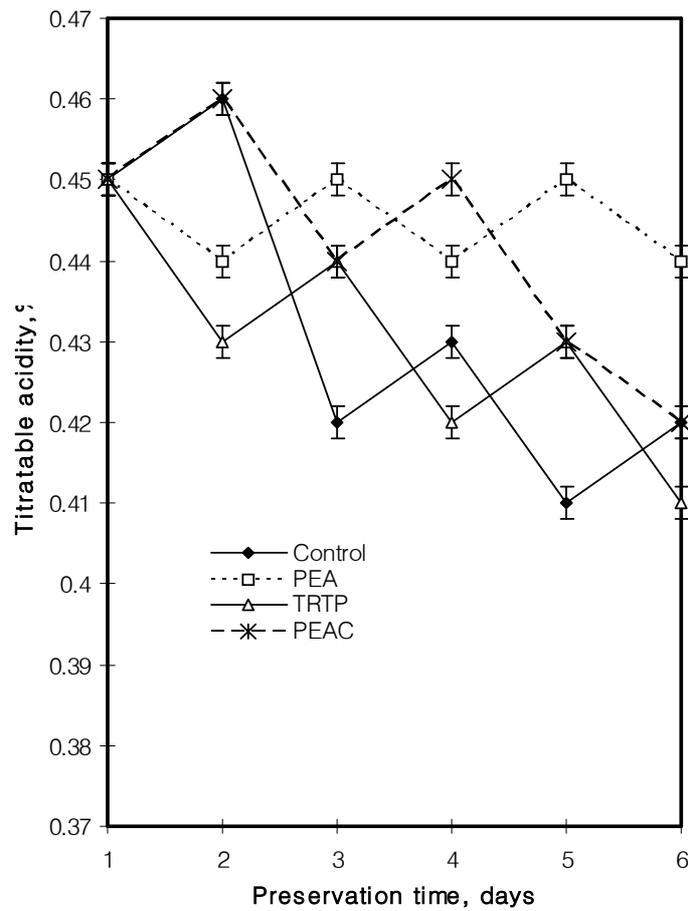


Fig. 59. Effects of PEA, TRTP, and PEAC on the titratable acidity (malic acid, %) of 'Yumyung', peach fruits for 6 days at room temperature.

Ethylene 발생량: PEA, TRTP, PEAC를 처리한 복숭아에서의 에틸렌 발생량을 측정하였다 (Fig. 60). 저장기간이 증가할수록 대조구에서의 에틸렌 발생량은 급격히 증가한 반면, PEA와 TRTP 처리구에서의 에틸렌 발생량은 대조구보다 유의적으로 낮았다. PEA의 경우, 에틸렌 생합성의 마지막 단계를 조절하는 효소인 ACC-1 (1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid) oxidase 활성을 억제하는 것으로 보고되었다. 따라서 PEA와 TRTP 처리구에서의 에틸렌 발생량이 적은 것은 이 물질들이 ACC oxidase 활성을 억제하기 때문인 것으로 사료되었다.

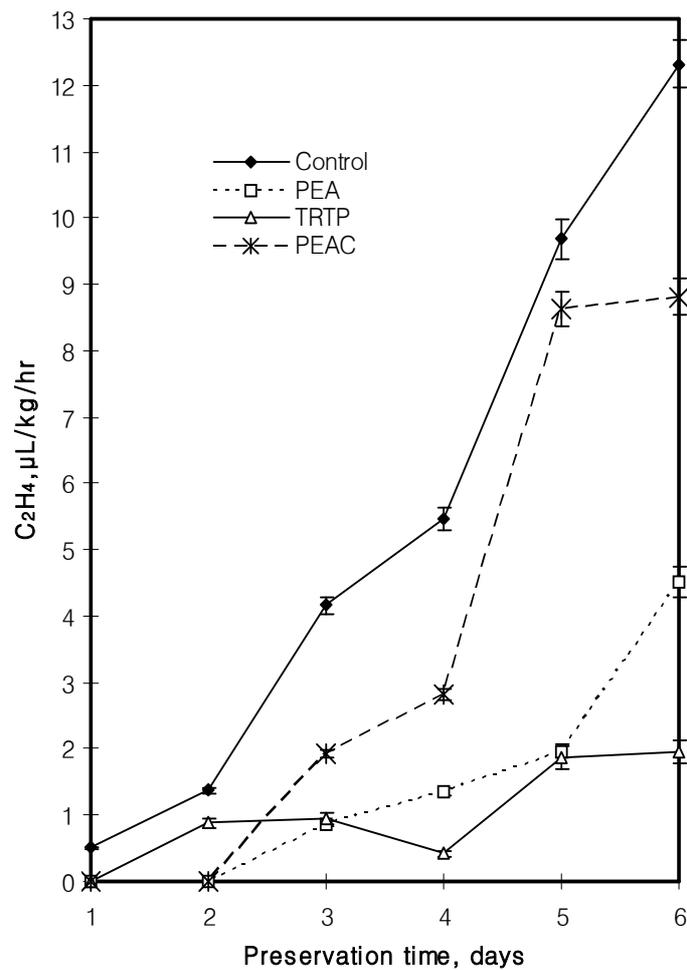


Fig. 60. Effects of PEA, TRTP, and PEAC on ethylene production of 'Yumyung', peach fruits for 6 days at room temperature.

향기성분 분석: PEA, TRTP, PEAC 처리구와 대조구를 실온에서 5일간 저장한 후, dichloromethane: pentane = 2: 1의 용매로 향기성분을 추출하여 GC 및 GC-MS로 분석하였다 (Table 35). Table 35와 같이 PEA, TRTP, PEAC 처리구에서 추출한 향기성분의 프로파일은 신선한 시료의 향기성분 프로파일과 유사하였다. 대조구에서는 ethylene, sec-butyl ethyl ether, 2-methyl propanal, 2-methyltetrahydrofuran, ethanol, cyclopentanol, decane, methyl-3-hydroxy hexanoate, methyl benzoate, nonanal, octanoic acid, hexadecanal, 1,2-propanediol, 1,2-ethanediol, γ -octalactone, 1-phenyl-1-butanol, o-methylbenzyl alcohol, 2-tetradecanol, 2-hexadecanol이 검출되었다. 이들 성분은 향진균물질 처리구 또는 신선한 시료구에서는 검출되지 않았다. 따라서 향진균물질 처리로 복숭아의 수확 후 숙성 과정이 억제되는 것으로 사료되었다.

Table 35. Flavor analysis of *Prunus persica* treated with PEA, TRTP, and PEAC

Compounds	R.T.	Fresh	Control	PEA	TRTP	PEAC
Ethylene	4.32		0			
Ethyl isopropyl ether	4.52	0	0	0	0	0
2-Methyl-1-pentene	4.66	0	0	0	0	0
2,3,-dimethyl-2-butene	4.74	0	0	0	0	0
Ethyl propyl ether	4.80		0	0	0	0
Cyclohexene	4.97	0	0	0	0	0
Cyclohexen-2-one	4.98	0	0	0	0	0
sec-Butyl ethyl ether	5.11		0			
n-Heptane	5.23		0	0	0	0
Ethyl butyl ether	5.82	0	0	0	0	0
Ethyl formate	6.31	0	0	0	0	0

continued

Compounds	R.T.	Fresh	Control	PEA	TRTP	PEAC
2-Propenal	6.69	0	0	0	0	0
2-Methyl propanal	7.06		0			
2-Methyltetrahydrofuran	7.27		0			
Butanal	7.39	0	0			
Ethyl acetate	7.68	0	0	0	0	0
Nonane	7.99	0	0			
2-Butanone	8.03		0	0	0	0
2-Methylbutanal	8.40	0	0			
3-Methylbutanal	8.54	0	0			
2-Propanol	9.04	0	0			
Ethanol	9.27		0			
Ethylfuran	9.80	0	0	0	0	0
Propyl acetate	10.71	0	0	0	0	0
Cyclopentanol	10.78		0			
Pentanal	10.80	0	0	0	0	0
Decane	11.71		0			
2-Methylpropyl acetate	12.36	0	0	0	0	0
1-Penten-3-one	12.68	0	0			
2-Butanol	13.13	0	0		0	
Propanol	13.82	0	0	0	0	0
Methyl-buten-1-ol	13.86	0	0			
3-Hexanone	14.31	0	0	0	0	0
2,3-Pentanedione	14.66	0	0	0	0	0
Butyl acetate	15.54	0	0	0	0	0
Hexanal	16.13	0	0			

continued

Compounds	R.T.	Fresh	Control	PEA	TRTP	PEAC
2-Methylpropanol	16.73	0	0			
3-Pentanol	17.71	0	0			
2-Pentanol	18.54	0	0			
2,3-Hexanedione	18.83	0	0			
(E)-2-Pentenal	18.79	0	0			
Butanol	20.07	0	0			
3-Heptanone	20.42	0	0	0	0	0
1-Penten-3-ol	21.01	0	0			
(Z)-3-Hexenal	23.60	0	0	0	0	0
2-Methyl-1-butanol	24.34	0	0			
(E)-2-Hexenal	24.99	0	0	0	0	0
2(3H)-Furanone	27.71	0		0	0	0
n-Hexyl furoate	27.74	0	0	0	0	0
1,3-Cyclopentadiene	27.25	0		0	0	
Phenylethyl acetate	28.33	0	0	0	0	0
2-Phenethyl alcohol	28.44			0		
2H-pyran-2-one	28.35	0		0		0
Methyl-3-hydroxy hexanoate	28.49		0			
Hexyl acetate	28.60	0	0	0	0	0
4-Heptanol	29.57	0	0			
Butyl benzene(I.S.)	31.79	0	0	0	0	0
6-Methyl-5-hepten-2-one	33.09	0	0			
Hexanol	34.47	0	0	0	0	0
Tryptophol	35.20				0	
Methyl benzoate	35.20		0			

continued

Compounds	R.T.	Fresh	Control	PEA	TRTP	PEAC
2-Cyclohexen-1-one	35.22	0		0		0
3-Methyl-2-phenylbutyr aldehyde	36.11	0			0	
Nonanal	36.92		0			
1-Methylindane	37.14	0	0			
2-Phenylethyl alcohol	37.73			0		
(E)-2-Hexen-1-ol	38.04	0	0			
Decanal	38.93	0	0			
2,6-Dimethyl-2-octanol	39.52	0	0	0	0	0
Octanoic acid	40.64		0			
2-Ethyl-1-hexanol	43.64	0	0	0	0	0
Hexadecanal	44.15		0			
Benzyl alcohol	45.21	0	0			
Benzaldehyde	45.51	0	0	0	0	0
Linalool	47.22	0	0	0	0	0
Nonanal	47.77		0			
1,2-Propanediol	50.21		0			
1,2-Ethandiol	52.34		0			
Gibberellin	59.12	0				
γ -Octalactone	67.29		0			
1-Phenyl-1-butanol	69.19		0			
2-Hexenoic acid	69.47	0	0	0	0	0
o-Methylbenzyl alcohol	70.00		0			
2-Tetradecanol	70.89		0			
2-Hexadecanol	76.96		0			
Farnesylacetone	81.99		0	0	0	0

Control, PEA, TRTP, PEAC; stored at room temp. for 3 days.

Ⅲ. 시제품 생산 및 이에 의한 항진균 효과 검정

1. 복숭아의 수확후선도유지제 개발

PEA, TRTP, PEAC를 기본으로 하여 복숭아의 수확후선도유지제인 “피치 탕(Peach-taut)”을 개발하였다 (Fig. 61). 본 제제는 액상 형태의 제제로서 복숭아에 직접 스프레이하거나 훈증함으로써 복숭아의 수확 후의 신선도를 대조구에 비하여 3 일 이상 연장하는 것으로 관측되었다.



Fig. 61. *Peach-taut*, a new postharvest biological control agent using PEA, TRTP, PEAC from extracted from natural

2. 시제품을 처리한 복숭아에서의 곰팡이 발생률 평가

*피치탱*을 복숭아 (홍백)에 훈증하여 곰팡이 발생률을 측정한 결과는 Fig. 62와 같다. *피치탱* 처리구의 경우, 저장 8일까지 곰팡이 발생이 대조구에 비하여 현저히 낮았다. 그러나 저장 10일에는 30%가 넘는 곰팡이가 발생하였다. 복숭아 포장 한 상자당 곰팡이 발생 과실이 30%가 넘을 경우 실제의 유통과정에서의 상품성은 매우 감소할 것으로 사료되었다. 곰팡이 발생률이 30%일 때를 기준으로 평가시 *피치탱* 처리에 의해 곰팡이 발생이 3일 연장된 것으로 나타났다. 국내의 복숭아 유통이 하절기 실온 (15°C 이하)인 것을 고려하면 *피치탱* 처리로 인해 유통기간이 3일 연장되는 것은 복숭아의 수확 후 선도유지에 매우 큰 효과인 것으로 사료되었다.

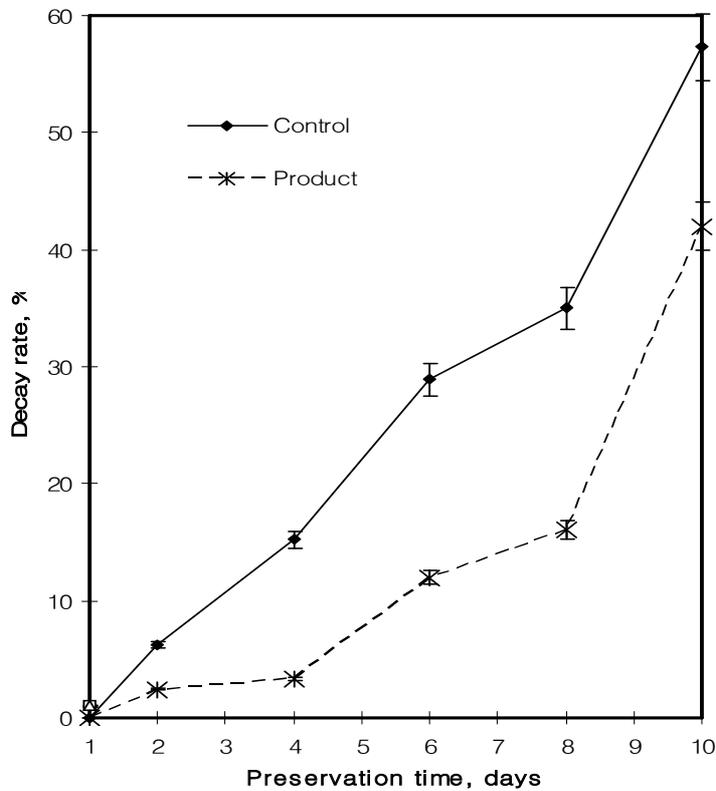


Fig. 62. Effect of *Peach-taut* on the fungal decay rate of 'Hongbak', peach fruits for 10 days at room temperature.

3. 시제품을 처리한 복숭아의 품질 평가

피치탱을 복숭아 (홍백)에 처리하여 복숭아의 이화학적 품질을 평가하였다. Fig. 63~67과 같이 실험기간 동안 피치탱 처리는 대조구에 비하여 복숭아의 품질을 수확 후와 유사하게 유지시키는 것으로 관측되었다. 따라서 피치탱은 효과적인 복숭아의 수확후선도유지제로 사료되었다.

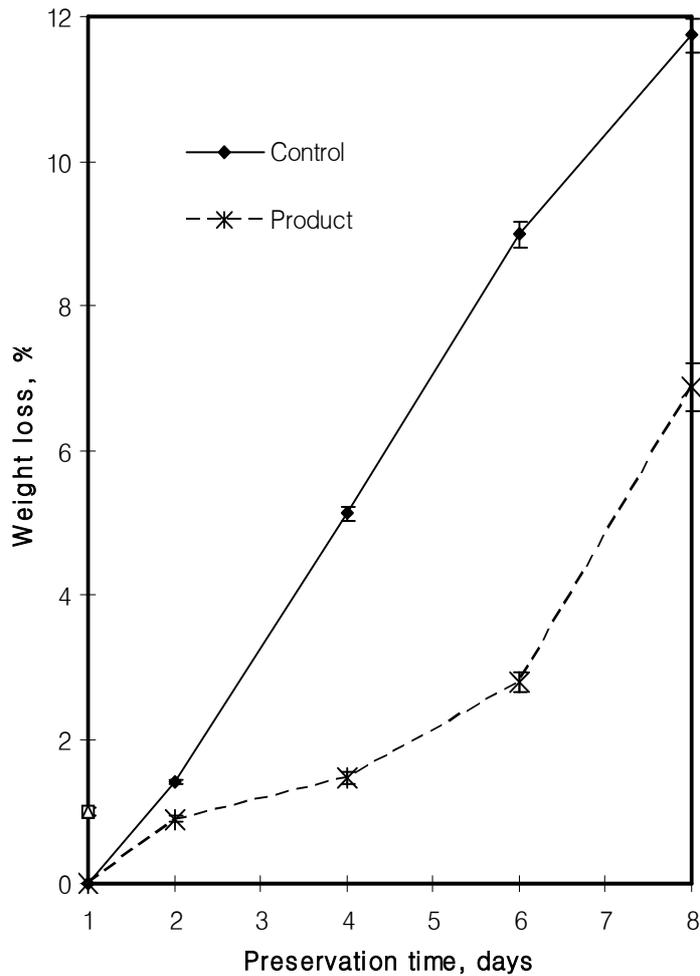


Fig. 63. Effects of *Peach-taut* on the relative weight loss of 'Hongbak', peach fruits for 8 days at room temperature.

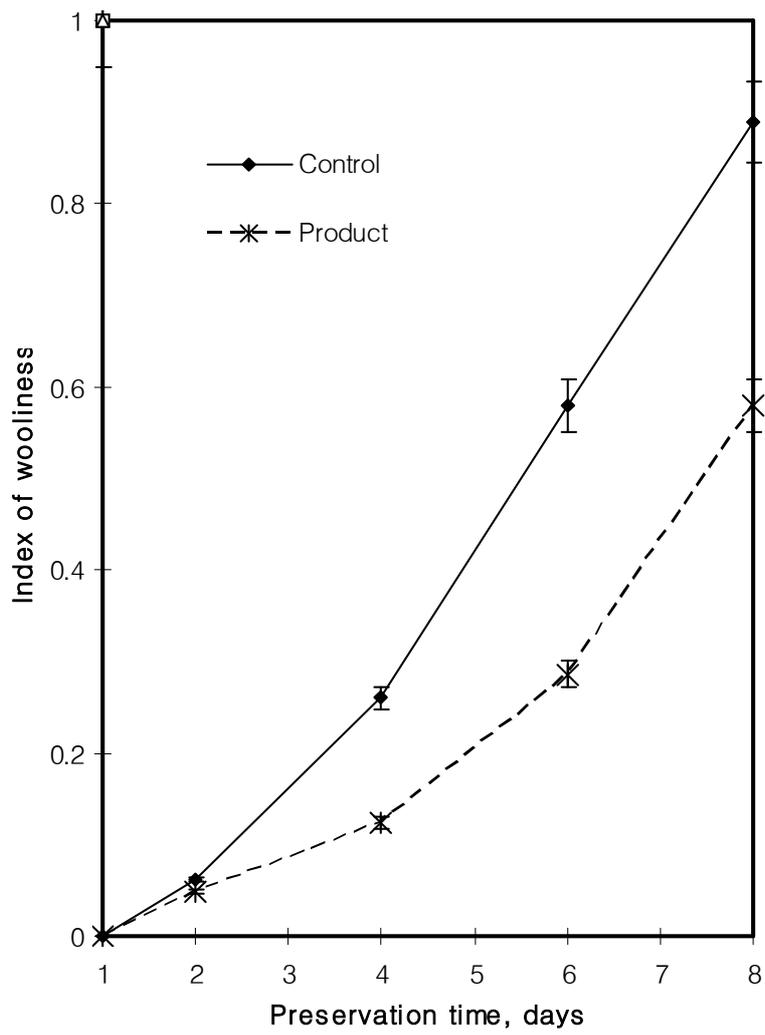


Fig. 64. Effects of *Peach-taut* on the index of wooliness of '*Hongbak*', peach fruits for 8 days at room temperature.

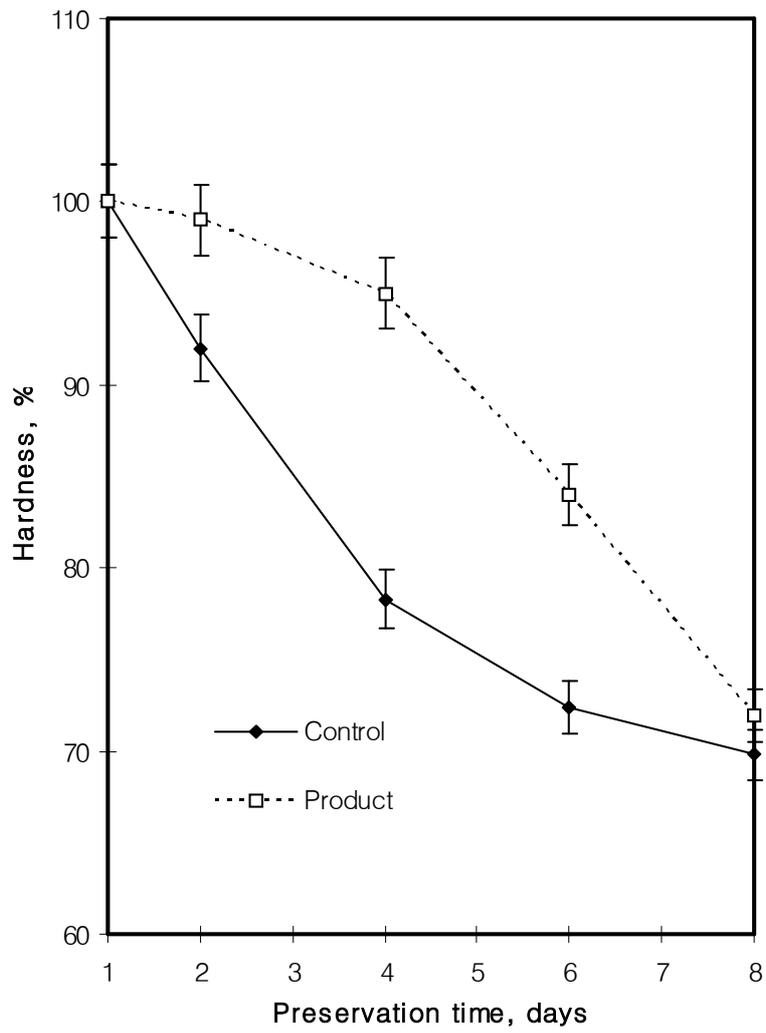


Fig. 65. Effects of *Peach-taut* on the hardness of 'Hongbak', peach fruits for 8 days at room temperature.

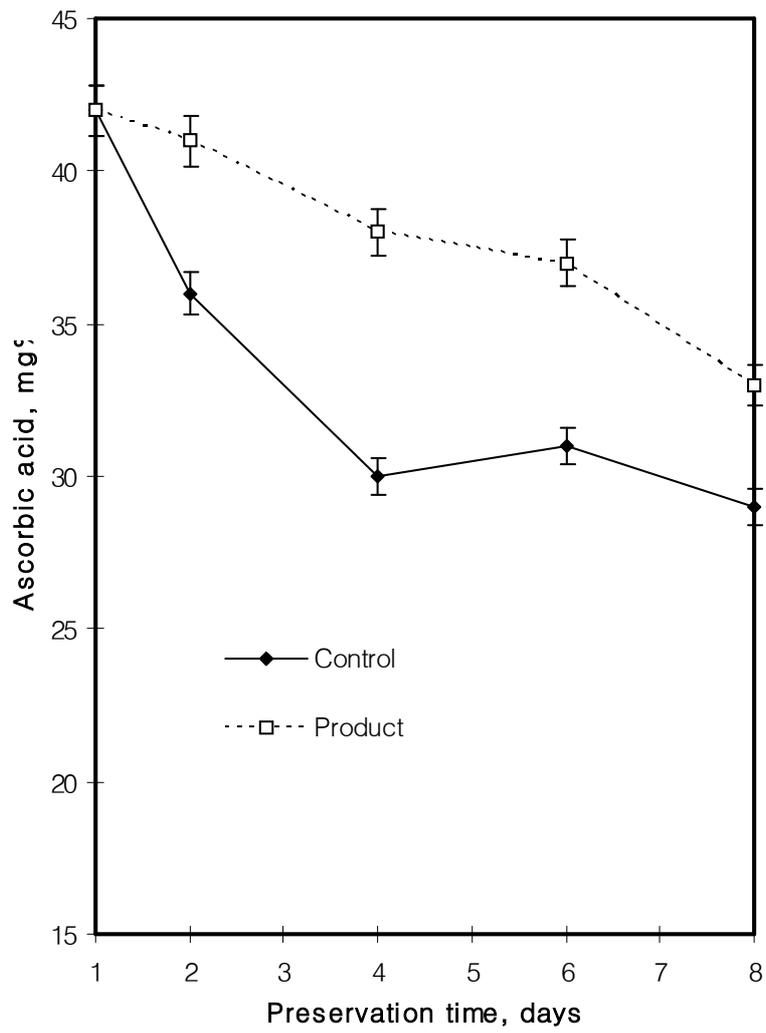


Fig. 66. Effects of *Peach-taut* on the concentration of ascorbic acid of '*Hongbak*', peach fruits for 8 days at room temperature.

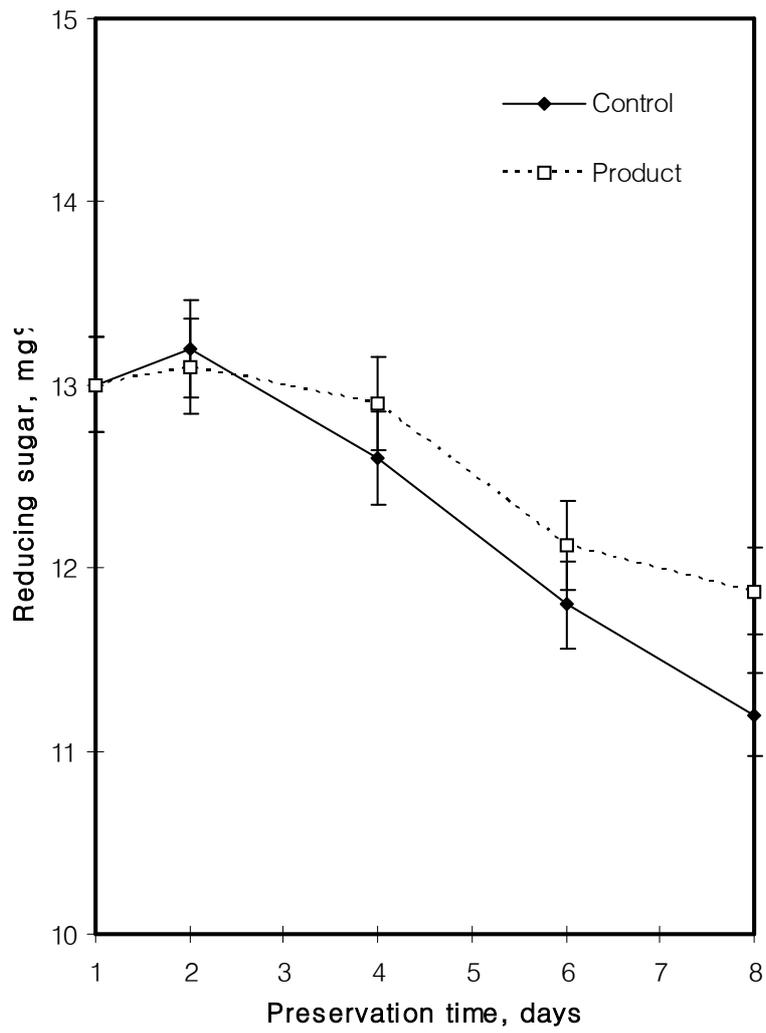


Fig. 67. Effects of *Peach-taut* on the concentration of reducing sugar of '*Hongbak*', peach fruits for 8 days at room temperature.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 복숭아 병원성 진균 저해활성보유균주의 탐색

실험 개시 전 6개월 동안 항생제를 투여 받은 경험이 없는 건강한 사람의 분변으로부터 약 120여개의 미생물을 분리하여 그 중에서 항진균력이 있는 미생물을 분리하였다. 분리된 미생물 중에서 식물성 병원진균 (*Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*)에 대한 항진균 효과가 우수한 3개의 균주를 순수분리하였다. 이들은 *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T, *Galactomyces geotrichum* SJM-59로 동정되었다.

2. 선정 균주로부터 항진균활성 물질의 분리 및 동정

Pichia farinosa SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T, *Galactomyces geotrichum* SJM-59 배양액을 dichloromethan: pentane = 2: 1의 용매로 추출하여 *Monilinia fructicola*, *Rhizopus nigricans*, *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternaria*에 대한 높은 항진균력을 나타내는 물질을 순수분리하였다. 이 물질들은 GC-MS, FT-IR, UV-scanning 및 NMR 분석을 통하여 phenylethyl alcohol (PEA), tryptophol (TRTP), 및 phenylethyl acetate (PEAC)로 동정되었다.

3. 항진균활성 물질 처리후 복숭아의 품질 평가

PEA, TRTP, PEAC를 복숭아 (유명)에 처리하여 복숭아의 품질을 평가하고자 이화학적 분석 실험을 시행하였다. 항진균물질 처리구는 대조구에 비하여 전실험

기간 동안의 곰팡이 발생율이 대조구에 비하여 유의적으로 낮았고, 곰팡이 발생이 저해되면서 중량감소율 또한 유의적으로 낮아지는 것으로 관측되었다. 실온에서 저장하는 동안 수확 후 숙성과정에서 나타나는 wooliness 또한 항진균물질 처리구가 대조구보다 유의적으로 낮은 것으로 관측되었고, texture의 변화도 이와 유사한 경향을 나타내었다. 실험기간이 증가하면서 대조구 및 항진균물질 처리구 모두에서 ascorbic acid 및 환원당 함량이 감소하였으나 항진균물질 처리구는 대조구에 비하여 그 감소폭이 낮았다. 적정산도는 대조구 및 항진균물질 처리구에서 저장 기간이 증가하면서 서서히 낮아지는 것으로 관측되었으나 대조구 및 항진균물질 처리구간의 유의적인 차이는 관측되지 않았다. 저장 기간이 증가하면서 대조구에서의 ethylene 생성량은 급격히 증가되었으나 항진균물질 처리구에서의 ethylene 생성은 대조구보다 유의적으로 낮았다. 특히 저장 초기의 ethylene 생성을 강력히 억제하는 것으로 관측되었다.

4. 항진균활성 물질의 항진균기전 탐색

PEA, TRTP, PEAC의 항진균효과 기전을 알아보기 위하여 *M. fructicola*, *R. nigricans*, *P. expansum*, *B. cinerea*, *A. alternaria*, *A. niger*을 대상으로 slide culture를 실시하고, 이를 광학현미경으로 관찰한 결과, 항진균물질을 처리한 진균의 균사가 무처리균의 균사보다 가늘며, 무성포자를 형성함에 있어서 정상적인 포자 형성에 실패하고, 포자를 형성하더라도 기형적인 포자를 형성하는 것으로 관측되었다. 또한 PEA, TRTP, PEAC 처리시 포자를 형성하지 못하거나 *B. cinerea*와 *A. niger* 균주에서 흑색 포자를 형성하지 못하는 것으로 관측되었다. PEA, TRTP, PEAC에 의한 phytopathogenic fungi의 흑색 포자 형성 억제가 DHN melanin synthesis와 관련되어 있는지를 Northern blotting을 통해 분석한 결과, TRTP, PEAC 및 PEA는 polyketide synthase의 발현을 강력히 억제하였으나 HN reductase의 발현에는 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. Scytalone dehydratase의 발현은 TRTP에 의해서는 영향을 받지 않으나 PEAC와 PEA에 의해서는 발현양이 감소되었다. Dehydratase의 발현은 TRTP 및 PEAC에 의해서는 영향을 받지 않으나 PEA에 의

해서는 발현양이 미세하게 감소된 것이 관측되었다. 이상의 결과를 고려할 때, 본 연구에서 분리된 항진균물질인 TRTP, PEAC, PEA에 의한 포자 및 균사체 내의 melanin 합성 저해 현상은 항진균물질이 DHN melanin synthesis 과정 전체에 영향을 미치어 나타난 결과로 사료되었다. DHN melanin synthesis 과정 이외의 기전에 PEA, TRTP 및 PEAC가 미치는 영향을 효과적으로 분석하기 위하여 *Alternaria*에 항진균물질을 첨가하여 액체배양한 후 단백질을 urea buffer로 추출하여 2 dimensional analysis를 시행하였고, PEA, TRTP, PEAC는 DHN melanin synthesis 과정 이외에 *A. alternaria* 생육에 관련된 여러 단백질의 발현에 영향을 주는 것으로 사료되었다.

5. 시제품 생산과 항진균 효과 검정 및 복숭아 처리시의 품질 평가

PEA, TRTP, PEAC를 주요성분으로 하는 복숭아의 수확후선도유지제인 “피치톡 (peach-taut)”을 개발하고 피치톡 처리에 의한 복숭아의 품질을 측정하였다. 피치톡 처리구는 대조구에서 비하여 곰팡이 발생율이 유의적으로 낮았고 복숭아의 품질 저하 현상도 유의적으로 감소하였다. 이와 관련된 특허를 출원하였다.

6. 연구성과

구분	연구성과
인력배출	-석사: 1인 -학사: 3인
논문	-SCIE 발표: 1편 [Food Sci. Biotech. 16(1): 159-162, 2007] -학진등재지발표: 1편 [J. Appli. Biol. Chem. 50(1): 29-31, 2007] -SCI/SCIE 투고중: 3편
국제학술대회	-포스터 발표: 3편 [식품영양과학회 국제학술대회 2007. 10] -포스터 발표 예정: 4편
특허	-3개 출원하였음 1. 특허출원번호: 10-2008-0034566 효모 <i>Pichia</i> 속 <i>P. farinosa</i> SKM-1, <i>P. anomala</i> SKM-T, <i>G. geotrichum</i> SJM-59 균주로 부터 향진균력을 가지는 phenylethyl acetate, tryptophol, phenylethy alcohol 분리 2. 특허출원번호: 10-2008-0034558 향진균 물질 phenylethyl acetate, tryptophol, phenylethy alcohol이 함유한 친화경적 수확후선도유지제 피치탕의 복숭아 품질향상 3. 특허출원번호: 10-2008-0034549 분변에서 분리한 신규한 <i>Pichia</i> 속 <i>P. farinosa</i> SKM-1, <i>P. anomala</i> SKM-T, <i>G. geotrichum</i> SJM-59의 분리 동정 및 식물성병원균에 대한 향진균 효과

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 본 연구에서 개발된 제품인 “피치톡 (Peach-taut)”은 참여기업인 (주)대덕바이오에서 상품화되어 시판될 것으로 사료된다.
2. 본 연구에서 분리된 효모인 *Pichia anomala* SKM-T은 안전성 시험에서 무독한 것으로 판명되었으므로, *Pichia anomala* SKM-T 균주를 이용한 산업적인 활용도가 높을 것으로 사료된다. 즉, 상기 균주를 생물산업에 응용함으로써 부가가치가 높은 제품의 개발이 가능할 것으로 사료되며 이에 대한 후속적인 연구가 필요하다.
3. 본 연구의 결과인 phenylethyl alcohol은 화장품·식품산업에서 장미향을 내는 데 널리 사용되는 물질로 화학적 합성법에 의해 고가로 공급되고 있다. 근래의 소비자들은 화학합성품보다는 천연의 원료에서 추출한 것을 선호하는 경향이 두드러지고 있다. 따라서 발효법에 의한 phenylethyl alcohol의 생산에 대한 심화된 기초 및 응용 연구가 요구된다. 또한 천연에서 추출한 phenylethyl alcohol은 화장품 및 식품산업에서의 응용도가 높으며, 이와 관련된 기술 및 지식의 축적은 국가경쟁력의 향상에 기여할 것으로 사료된다.
4. Phenylethyl alcohol이 *Botrytis cinerea*의 성장을 억제하는 작용을 나타내었으므로, 저장 중 잿빛곰팡이 발생이 주요 문제인 밤, 인삼, 귤, 포도 등의 수확후선도유지제로서의 이용가능성이 높다고 사료되며, 이에 대한 후속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. *Aureobasidium pullulans*

*Aureobasidium pullulans*은 많은 식물병원성 곰팡이에 대한 길항작용이 있어 수확 후 질병에 대한 biocontrol 제제로 고려되어져 왔다. 익지 않은 초록색 딸기에 상처를 내고 *Aureobasidium pullulans*를 처리하여 *Botrytis cinerea*를 접종했을 때 흰색곰팡이를 예방했다. 과일의 상처부위에 *A. pullulans*를 살아있는 균주와 열처리한 균주 2가지 형태로 처리하였을 때 모두 *B. cinerea* 감염을 감소시켰다. 수확 전 익지 않은 딸기를 *A. pullulans* 액에 살짝 담가 처리할 경우 완전히 숙성하여 수확할 때까지 흰색곰팡이의 감염이 지연되었다. 따라서 *A. pullulans*의 효과는 익고 있는 상태의 과일보다는 익지 않은 상태의 과일에서 그 효과가 높았다. 미숙성과일의 과피에 *A. pullulans*를 처리하면 대조군의 과육보다 항곰팡이 활성이 높게 나타났다.

*Aureobasidium pullulans*의 Strain L 47는 포도의 *Penicillium digitatum*에 대한 강한 보호효과를 보이며, *Botrytis cinerea*, *Aspergillus niger*, *Rhizopus stolonifer*에 대한 길항효과를 갖고 있다. 이런 길항작용은 영양소, 생육공간의 경쟁, hydrolytic enzyme 생성 등과 관련된다.

2. *Cryptococcus laurentii* (Kufferath) Skinner

Penicillium citrinum, *Verticicladiella abielina*에 의한 arbutus 딸기의 자연적 부패를 감소시키기 위해서 *Cryptococcus laurentii*를 수확 후 곰팡이 부패에 대한 biocontrol agent로 사용하였다. 세척한 *C. laurentii*는 broth배지에 배양한 yeast보다 부패에 대한 저항효과가 더 크게 나타났으며, 농도 의존적으로 효과가 높았다. 또한 *C. laurentii*는 4°C 저온, CaCl₂를 첨가시 부패를 조절하는 기능이 강화되었다.

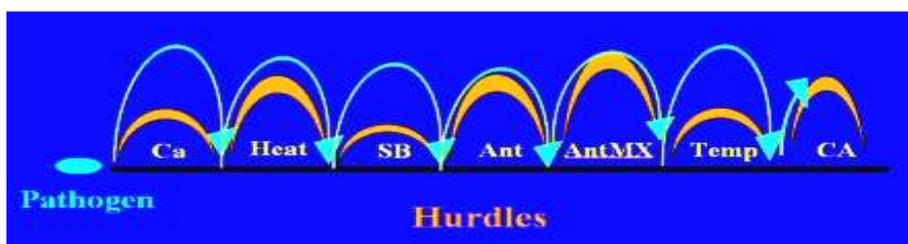
3. *Metschnikowia fructicola*

효모 *Metschnikowia fructicola*는 터기와 이스라엘에서 딸기 수확 후 곰팡이에 대한 수확 후 선도유지제로 시험되었다. 재배농장에서 효모 *Metschnikowia fructicola*와 화학적 선도유지제인 fenhexamid로 딸기 재배기간동안 실험하였다. *M. fructicola*는 재배농장에서 과일 곰팡이 발병률을 56-69% 감소시켰으며, 수확 후 곰팡이 발병률도 화학적 선도유지제인 fenhexamid보다 현저히 억제시켰다(70%). 수확 후 과일에 처리한 *M. fructicola*의 농도는 1×10^5 cfu/ml이었다. 0°C에서 저장했을 때 *M. fructicola* 균주를 처리한 결과와 유사한 효과를 확인할 수 있었다.

4. *Pichia guilliermondii*

사과의 흑색곰팡이를 효과적으로 저해하는 효과가 있다. 이 효모는 CA처리 및 저장 시에도 *Botrytis cinerea*의 성장을 저지하면서 계속적으로 증식할 수 있어 효과적인 선도유지제이다. *Pichia guilliermondii*는 *Botrytis cinerea*에 직접적으로 부착하여 세포벽을 분해하는 효소를 분비하여 *Botrytis cinerea*의 생육을 억제시킨다.

5. 사과의 수확후 곰팡이 조절을 위한 Hurdle concept



Ca; calcium, Heat; 38°C for 4 days, SB; sodium bicarbonate, Ant; antagonist, AntMX; antagonist mixture, Temp; low storage temperature, CA; controlled atmosphere storage

제 7 장 참고문헌

1. Cotes AM, Lepoivre P & Semal J 1992. Effect of precolonization of bean seeds with *Trichoderma* on symptoms induced by *Pythium*. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 57: 355–363.
2. Lepoivre P, Burgeff C, Jijakli MH & Bultreys A 1992. Les Biopesticides en arboriculture fruitière. Le Fruit belge 440: 242–248.
3. Cotes AM, Lepoivre P & Semal J 1993. Correlation between carboxymethylcellulase activity, colonization of bean seed coat by *Trichoderma*, and protection against *Pythium*. Diseases and Insects in Forest Nurseries. Les Colloques INRA 68: 179–188.
4. Jacqmin B, Cotes AM, Lepoivre P & Semal J 1993. Effect of the combination of seed priming and *Trichoderma* treatment on incidence of damping-off agents. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 58: 1321–1328.
5. Jijakli MH & Lepoivre P 1993. Biological control of postharvest *Botrytis cinerea* and *Penicillium* on apples. IOBC/WPRS Bulletin: Biological Control of Foliar and Post-harvest Diseases 16: 106–111.
6. Jijakli MH, Lepoivre P, Tossut P & Thonart P 1993. Biological control of *Botrytis cinerea* and *Penicillium* sp. on postharvest apples by two antagonistic yeasts. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 58: 1349–1358.
7. Mezui M'Ella JG, Cotes AM, Lepoivre P & Semal J 1993. *In vitro* evaluation of seed priming and *Trichoderma* treatment for the biological control of damping-off. Diseases and Insects in Forest Nurseries. Les Colloques INRA 68: 189–196.
8. Cotes AM, Thonart P & Lepoivre P 1994. Relationship between the protective activities of several strains of *Trichoderma* against damping-off agents and their ability to produce hydrolytic enzyme activities in soil or in synthetic media. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 59: 931–941.
9. Jijakli MH & Lepoivre P 1994. Traitements biologiques et physiologiques des maladies de post-récolte des pommes. Hortitec'94. Lebrun A, Bartiaux N & Toussaint A (Eds). pp 135–136.
10. Jijakli MH & Lepoivre P 1995. Utilisation des biopesticides pour la protection des pommes en conservation. Le Fruit belge 455: 83–88.
11. Jijakli MH & Lepoivre P 1995. Integrated use of two antagonistic yeasts to postharvest treatments against diseases on apples. XIIIth International Plant Protection Congress.

The Hague, The Netherlands. July (poster).

12. Cotes AM, Lepoivre P & Semal J 1996. Correlation between hydrolytic enzyme activities measured in bean seedlings after *Trichoderma koningii* treatment combined with pregermination and the protective effect against *Pythium splendens*. European Journal of Plant Pathology 102: 497–506.

13. Jijakli MH & Lepoivre P 1996. Production, purification and partial characterization of an exo- β -1,3-glucanase from *Pichia anomala* strain, an antagonistic yeast of *Botrytis cinerea* on post-harvest apples. XIth Symposium of *Botrytis*. Wageningen, The Netherlands. June (poster).

14. Nasraoui B, Barbier A & Lepoivre P 1996. Effect of three antitranspirant films on *Botrytis cinerea* activities *in vitro*. Arab Journal of Plant Protection 14: 98–101.

15. Jijakli MH & Lepoivre P 1997. Microbiological control of apple postharvest diseases: a case of study. 1st Congress on Environmental Microbiology. Bogota, Colombia. February (poster).

16. Jijakli MH & Lepoivre P 1997. Study of an exo- β -1,3-glucanase in the antagonistic relationship between *Pichia anomala* (strain K) and *Botrytis cinerea* Pers. on postharvest apples. 49ème Symposium International de Phytopharmacie et Phytiairie. Gand, Belgique. Mai (poster).

17. Jijakli MH & Lepoivre P 1997. Study of major fungal diseases control on postharvest apples with integrated use of two antagonistic yeasts and thermotherapy. Joint Workshop Cost 914–915 on Non Conventional Methods for the Control of Post-harvest Disease and Microbiological Spoilage. Bologna, Italy. October (poster).

18. Grevesse C, Jijakli MH & Lepoivre P 1998. Study of exo- β -1,3 glucanase activity production by the yeast *Pichia anomala* in relation to its antagonistic properties against *Botrytis cinerea* on postharvest apples. Med. Fac. Landbouww. Univ. Gent 63: 1685–1692.

19. Grevesse C, Jijakli MH & Lepoivre P 1998. Cloning of two exo- β -1,3 glucanase encoding genes of *Pichia anomala* and study of their segregation in relation to *Pichia anomala* antagonistic properties against *B. cinerea* on postharvest apples. Proceedings of the 7th International Congress in Plant Pathology. Edinburgh, UK. p 3.5.2.

20. Grevesse C, Jijakli MH & Lepoivre P 1998. Preliminary study of exo- β -1,3-glucanase encoding genes in relation to the protective activity of *Pichia anomala* (strain K) against *Botrytis cinerea* on postharvest apples. Proceedings of the Workshop on Molecular Approaches in Biological Control. Delémont, Switzerland. IOBC/EFPP Workshop Bulletin 21: 81–89.

21. Jijakli MH 1998. Possible mechanisms of action of two antagonistic yeasts against *Botrytis cinerea* on apple. 7th International Congress in Plant Pathology. Edimbourg,

UK. August (poster).

22. Jijakli, MH, Grevesse C & Lepoivre P 1998. Potentiels d'application de deux souches de levures vis-à-vis des maladies de conservation des pommes. 1er Colloque transnational sur les lutttes biologique, intégrée et raisonnée. Lille, France. Janvier. pp 425-432.

23. Jijakli MH & Lepoivre P 1998. Characterization of an exo- β -1,3-glucanase produced by *Pichiaanomala* strain K, antagonist of *Botrytis cinerea* on apples. Phytopathology 88: 335-343.

24. Jijakli MH & Lepoivre P 1998. Utilisation de biopesticides sur pommes en post-récolte. Compte-rendu des Journées techniques nationales de l'Agriculture biologique: 12-21.

25. Jijakli MH, Lepoivre P & Grevesse C 1998. Microbiological control of apple postharvest diseases : a case of study. Revista Corpoica, 2: 16-17.

26. Jijakli, MH, Medhid Y & Lepoivre P. 1998. Identification of a SCAR marker with RAPD technique for monitoring the antagonistic strain K of *P. anomala*. Workshop Cost 835 on Agriculturally Important Toxigenic Fungi. Athens, Greece. October.

27. Baltus C, Lepoivre P & Jijakli MH 1999. Effect of UV irradiation on antagonistic activity of *Trichoderma* sp. formulations. 51ème Symposium International de Phytopharmacie et Phytiairie. Gand, Belgique. Mai (poster).

28. Cagnet S, Lepoivre P & Jijakli MH 1999. Development of PCR-ELOSA for monitoring *Debaryomyces hansenii* (strain O), antagonistic of postharvest diseases on apples. 5th Workshop on Integrated Control of Pome Fruit Diseases IOBC/ WPRS. Fontevault, France. August .

29. Jijakli MH, Cagnet S, Prakoso B & Lepoivre P 1999. Use of SCAR primers for specific identification and monitoring of the antagonistic strain K of *Pichia anomala*. American Phytopathological Society Meeting. Montréal, Canada. August (poster).

30. Jijakli MH, Lepoivre P & Grevesse C 1999. Yeast species for biocontrol of apple postharvest diseases: an encouraging case of study for practical use. In: Biotechnological approaches in biocontrol of Plant Pathogens. Upadhyay RK and Mukerij KG (Eds). Kluwer Academic/Plenum Publishers, New-York, USA. pp 31-49.

31. Berto P, Jijakli MH & Lepoivre P 2000. Competitive colonization is involved in *Ulocladium atrum* antagonism against *Botrytis cinerea* on necrotic strawberry leaves. XIIth Symposium on *Botrytis*. Reims, France. Juillet (poster).

32. Cagnet S, Lepoivre P & Jijakli MH 2000. Monitoring of the antagonist yeast *Pichia anomala* strain K on apple surface using a semi-selective medium and PCR-ELOSA technique. 7th International Symposium on the Microbiology of the Aerial Plant Surfaces. Berkeley, USA. August (poster).

33. Jijakli MH 2000. La lutte biologique au moyen de deux souches de levures. L'arboriculture fruitière 539: 19–24.
34. Jijakli MH, Grevesse C & Lepoivre P 2000. Modes of action of biocontrol agents of postharvest diseases : Challenges and difficulties. IOBC/WPRS Workshop: Biocontrol of Bacterial and Fungal Diseases. Seville, Spain. December
35. Berto P, Jijakli MH & Lepoivre P 2001. Possible role of colonization and cell wall-degrading enzymes in the differential ability of three *Ulocladium Atrum* strains to control *Botrytis cinera* on necrotic strawberry leaves. Phytopathology 91: 1030–1036.
36. Berto P, Lepoivre P & Jijakli MH 2001. Galacturonic acid stimulates the antagonistic activity of *Ulocladium atrum* 385 against *Botrytis cinera* sporulation on necrotic strawberry leaf tissues. Joint Meeting of APS, MSA and SON. Salt Lake City, USA. August (poster). Phytopathology 91 (6) (suppl), S8.
37. Cheggour A, Jijakli HM & Lepoivre P 2001. Study of exopolysaccharides (EPS) involvement in the interaction *E. amylovora*–serratine P. Joint Meeting of APS, MSA and SON. Salt Lake City, USA. August (poster). Phytopathology 91 (6) (suppl), S15.
38. De Clercq D, Cognet S, Kubjak C, Lepoivre P & Jijakli MH 2001. Monitoring *Pichia anomala* strain K and *Candida oleophila* strain O, an antagonistic yeasts on apple surface. 9th International Symposium on Microbial Ecology. Amsterdam, The Netherlands. August (poster).
39. De Clercq D, Dickburt C, Lepoivre P & Jijakli MH 2001. Pre–and postharvest application of antagonistic yeasts for the control of gray and blue mold: efficacy and monitoring. Joint Meeting of APS, MSA and SON. Salt Lake City; USA. August (poster). Phytopathology 91 (6) (suppl), S21.
40. Dickburt C, Lepoivre P & Jijakli MH 2001. Beta–1,3–glucans and galacturonic acid enhanced the antagonistic activity of yeasts against apples postharvest rots. Joint Meeting of APS, MSA and SON. Salt Lake City, USA. August (poster). Phytopathology 91 (6) (suppl), S23.
41. Jijakli MH, De Clercq D, Cognet S, Massart S, Grevesse C & Lepoivre P 2001. Use of molecular tools to enhance antagonistics activity of yeasts against postharvest diseases of apples. Joint Meeting of APS, MSA and SON. Salt Lake City, USA. August. Phytopathology 91 (6) (suppl), S154
42. Stépien V, Lepoivre P & Jijakli MH 2001. Development of a monitoring method by using RAPD and SCAR markers for two biological control agents for post–harvest diseases: *Pichia anomala* J121 and *Pantoea agglomerans* CPA–2. Joint Meeting of APS, MSA and SON. Salt Lake City, USA, August (poster). Phytopathology 91 (6) (suppl), S85.

43. Jijakli MH, De Clercq D, Dickburt C & Lepoivre P 2002. Pre- and postharvest practical application of *Pichia anomala* strain K, β -1,3-glucans and calcium chloride on apples : Two years of monitoring and efficacy against post-harvest diseases.
44. Jijakli MH, Dickburt C, De Clercq D & Lepoivre P 2002. Application de *Pichia anomala* souche K, β -1,3-glucanes et chlorure de calcium pour le contrôle des maladies de conservation des pommes en conditions proches de la pratique. 2ème Colloque Transnational sur les Lutttes biologique, intégrée et raisonnée. Lille, France. pp 436-445.
45. Jijakli MH, Dickburt C, De Clercq D & Lepoivre P 2002. Impact des méthodes d'application sur l'efficacité d'un traitement à base de *Pichia anomala* souche K contre les maladies de post-récolte des pommes. VIIIème Journées scientifiques du réseau "Biotechnologies, amélioration des plantes et sécurité alimentaire" de l'AUF, 7-9 octobre 2002. Marrakech, Maroc. Biotechnologies végétales: valorisations pour une agriculture durable: 56-57.
46. Massart S, Sens-Espel R, Lepoivre P & Jijakli MH 2002. Application of RAP-PCR and cDNA-AFLP to isolate genes of *Candida oleophila* (strain O) induced by the presence of galacturonic acid. 7th IOBC Meeting of the Working group of Biological Control of Fungal and Bacterial Plant Pathogens. Kusadasi, Turkey, May. IOBC/WPRS Bulletin : Biological Control of Foliar and Postharvest Diseases: 399-402.
47. De Clercq D, Cognet S, Pujol M, Lepoivre P & Jijakli MH 2003. Development of a SCAR marker and a semi-selective medium for specific quantification of *Pichia anomala* strain K on apple surface. Postharvest Biology and Technology 29: 237-247.
48. Friel D, Vandebol M & Jijakli MH 2003. Cloning and sequence analysis of the TRP1 gene encoding the phosphoribosyl anthranilate isomerase from *Pichia anomala*(strain K). Yeast 20 (16): 1331-1337.
49. Grevesse C, Lepoivre P & Jijakli MH 2003. Characterization of exoglucanase encoding gene paEXG2, and study of its role in the biocontrol activity of *Pichia anomala* strain K. Phytopathology 93: 1145-1152.
50. Jijakli MH 2003. La lutte biologique contre les agents phytopathogènes. In: Lepoivre P (Ed): Traité de Phytopathologie. de boek et Presses agronomiques de Gembloux, Bruxelles: 289-317.
51. Jijakli MH 2003. Développement de méthodes de lutte biologique contre les maladies de conservation des agrumes et des pommes au Maroc. Journal de la CUD, novembre: 6
52. Jijakli MH & Lepoivre P 2003. State of the art and challenges of post-harvest diseases management in apples. In: Mukerji KG (Ed): Disease Management of Fruits and Vegetables Vol 1: Fruit and Vegetable diseases: 59-94.

53. Pujol M, De Clercq D, Cognet S, Lepoivre P & Jijakli MH 2003. Monitoring system for the biocontrol agent *Pichia anomala* strain K using quantitative competitive PCR–ELOSA. Plant Pathology (accepted for publication).
54. Wang J, Teng B, Yu Y. 2006. The firmness detection by excitation dynamic characteristics for peach. Food Control 17: 353–358
55. Akbudak B, Eris A. 2004. Physical and chemical changes in peaches and nectarines during the modified atmosphere storage. Food Control 15: 307–313
56. Ruiz–Altisent M, Lleo´ L, Riquelme F. 2006. Instrumental quality assessment of peaches: Fusion of optical and mechanical parameters. Journal of Food Engineering 74: 490–499
57. Jia HJ, Araki A, Okamoto G. 2005 Influence of fruit bagging on aroma volatiles and skin coloration of ‘Hakuho’ peach (*Prunus persica* Batsch). Postharvest Biology and Technology 35: 61–68
58. Kahlon TS, Smith GE. 2007. In vitro binding of bile acids by bananas, peaches, pineapple, grapes, pears, apricots and nectarines. Food Chemistry 101: 1046–1051
59. Zheng X, Tian S, Meng X, Li B. 2007. Physiological and biochemical responses in peach fruit to oxalic acid treatment during storage at room temperature. Food Chemistry 104: 156–162
60. Karabulut OA, Baykal N. 2004. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere package. Crop Protection 23: 431–435
61. Fabre CE, Blanc PJ, Goma G. 1998. Production of 2–phenylethyl alcohol by *Kluyvermyces marxianus*. Biotechnol. Prog. 14: 270–274
62. Maarse H, Visscher CA, Willensens LC, Boelens MH. 2000. Volatile components in food–qualitative and quantitative data. Central Institute Voor Voeding sondeziok. TNO Zeist, The Netherlands
63. Etschmann MMW, Bluemke W, Sell D, Schrader J. 2002. Biotechnological production of 2–phenylethanol. Appl. Microbiol. Biotechnol. 59: 1–8
64. US Food and drug Administration. 2001. Code of federal regulations. 21CFR 101.22
65. Jun MR, Jeong WS, Ho CT. 2006. Health promoting properties of natural flavor substances. Food Sci. Biotechnol. 15: 329–338
66. Stark D, Munch BS, Marison IW, Stockar U. 2000. Extractive bioconversion of 2–phenylethanol from L–phenylalanine by *Saccharomyces cerevisiae*.

Biotechnol. Prog. 18: 514–523

67. Huang CJR, Lee SL, Chou CC. 2000. Production and molar yield of 2-phenylethanol by *Pichia fermentans* L-5 as affected by some medium components. J. Biosci. Bioeng. 90: 142–147
88. Jiang J. 1993. Identification of flavor volatile compounds produced by *Kluyvermyces lactis*. Biotechnol. Tech. 8: 863–866
89. Seo WT, Ahn KC. 2003. Production of phenylethanol from L-phenylalanine by *Candida* sp. S-8. Food Sci. Biotechnol. 12: 644–648
90. Westall S. 1999. Characteristics of yeast species by their production of volatile metabolites. J. Food Mycol. 1: 187–201
91. Mo EK, Kang HJ, Lee CT, Xu BJ, Kim JH, Wang QJ, Kim JC, Sung CK. 2003. Identification of phenylethyl alcohol and other volatile flavor compounds from yeasts, *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T, and *Galactomyces geotrichum* SJM-59. J. Microbiol. Biotechnol. 15: 800–808
92. Box GE, Hunter JS. 1957. Multiple experimental designs for exploring response surfaces. Ann. Math. Stat. 28: 195–241
93. Lee SJ, Lee YB, Hong JH, Chung JH, Kim SS, Lee WJ, Yoon JR. 2005. Optimization of pine flavor microencapsulation by spray drying. Food Sci. Biotechnol. 14: 747–751
94. AOAC. 1995. AOAC official method 925.10. Solid and moisture in foodstuff (air-oven method). Scientific association dedicated to Anal.
95. Vuralhan A, Morais MA, Tai SL, Piper MDW. 2003. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Appl. Environ. Microbiol. 69: 4534–4541
96. Albertazzi E, Cardillo R, Servi S, Zucchi G. 1994. Biogenesis of 2-phenylethanol and 2-phenylethylacetate important aroma components. Biotechnol. Lett. 16: 491–496
97. Murthy MSRC, Swaminathan T, Rakshit SK, Kosugi Y. 2000. Statistical optimization of lipase catalyzed hydrolysis of methyloleate by response surface methodology. Bioprocess Eng. 22: 35–39
98. Mingorance-Cazorla L., Clemente-Jimenez JM., Martinez-Rodriguez S, Las Heras-Vazquez FJ, Rodriguez-Vico F. 2003. Contribution of different natural yeasts to the aroma of two alcoholic beverages. World J. Microbiol. Biotechnol. 19: 297–304.
99. De Hoog GS. 1996. Risk assessment of fungi reported from humans and animals. Mycoses. 39: 407–417.

100. Mo EK, Lee JH, Xu BJ, Sung CK. 2004. Identification of yeasts from Korean feces and prerequisite characterization for preparation of probiotics. *Food Sci. Biotechnol.* 13: 63-70.
101. 김익열, 김미영, 류종호, 김민, 이용세, 장태현. 2006. 복숭아 “백도” 품질 증진을 위한 열화갈습의 열면살포 효과. *한국환경농학회지* 25: 276-283
102. 임상철, 김선규, 윤철구, 김영호, 김학현, 윤태, 김태수. 2003. 하우스 가온 재배가 복숭아 과실의 유리당 함량과 조성에 미치는 영향. *한국원예학회지* 44: 66-69
103. 최정희, 임정호, 정문철, 김동만. 2005. 고 이산화탄소 전처리가 ‘일천백봉’ 복숭아의 품질 변화에 미치는 영향. *한국식품저장유통학회지* 12: 540-545
104. 변재균, 강인규, 장경호, 김대현, 이동훈, 김임수, 신성린, 최동근. 2003. 연화정도가 다른 복숭아 품종의 과실 발육 중 펙틴질 및 polygalacturonase 활성의 변화. *한국원예학회지* 44: 503-507
105. 최성진. 2005. 1-Methylcyclopropene (1-MCP) 처리에 따른 사과와 복숭아 과실의 품질 및 에틸렌 생성 변화의 비교. *한국식품저장유통학회지* 12: 511-515
106. 조재육, 김임수, 최충돈, 김일두, 장상문. 2003. 복숭아 수확후 오존수 침지처리가 품질신선도에 미치는 영향. *한국식품저장유통학회지* 10: 454-458
107. 김병삼, 김민정, 최정희. 2003. 예냉처리가 복숭아(미백)의 품질에 미치는 영향. *한국식품과학회지* 35: 1233-1236
108. 김병삼, 이호준, 박형우, 차환수. 2003. 과실류(복숭아, 사과, 배, 단감, 감귤)의 호흡 및 증산작용이 중량 손실에 미치는 영향. *한국식품저장유통학회지* 10: 142-146
109. 이동훈, 강상구, 강인규, 서상근, 변재균. 2003. 복숭아 과실 세포벽 구성 성분의 변형에 미치는 β -galactosidase의 역할. *한국원예학회지* 44: 697-701
110. 최정희, 임정호, 정문철, 김동만. 2007. 이산화탄소 전처리에 의한 ‘창방조생’ 복숭아의 수확후 품질 변화. *한국원예학회지* 25: 54-58
111. 정준호, 조성환. 2004. 천연 항균복합체재용액을 침지 및 재배용수로 처리한 콩나물의 선도유지 효과. *한국식품저장유통학회지* 11: 17-21
112. 송은영, 최영훈, 김승화, 고정삼. 2003. 출하 전 전해산화수 세척에 의한 하우스 감귤의 선도유지 효과. *한국식품저장유통학회지* 10: 1-5
113. 조성환, 정순경, 김영록. 2000. 남부지역 시설원예산물의 저장성 향상 및 가공품 개발에 관한 연구 - 시설원예산물의 선도유지를 위한 항균소재의 개발을 중심으로 (2). *한국식품저장유통학회지* 7: 1-7
114. 정윤정, 이숙지, 정순경, 김영록, 조성환. 1998. 시설원예산물의 선도유지를 위한 항균소재의 개발. *한국식품저장유통학회지* 5: 256-261
115. 정순경, 이숙지, 정윤정, 박우포, 이동선, 조성환. 1998. 시설채소산물의 선도유지

- 를 위한 한국산 약용식물추출물의 항균특성. 한국식품저장유통학회지 5:13-21
116. 조성환. 1997. 천연식물성 항균제처리에 의한 과채류의 선도 유지 및 병해 방지. 한국식품저장유통학회지 4: 87-99
117. 조성환, 김기옥, 이근희. 1994. 천연항균제처리에 의한 과채류의 선도유지 및 병해방지에 관한 연구 - Grapefruit 종자추출물로 부터 활성물질의 분리를 중심으로. 한국식품저장유통학회지 1: 1-7
118. 조성환, 서일원, 이근희. 1993. 천연항균제처리에 의한 과채류의 선도유지 및 병해방지에 관한 연구 - 저장중 병리적 장애 방지를 중심으로. 한국응용생명화학학회지 36: 265-270
119. 최정희, 이승구. 1999. 복숭아의 woolliness와 펙틴 물질 대사. 한국원예학회지 40: 574-576
120. 장경호, 이동훈, 김임수, 강인규, 변재균. 1999. 복숭아 과실의 연화중 세포벽 성분의 변화. 한국원예학회지 40: 355-358
121. 장경호, 이동훈, 변재균. 1999. 복숭아 과실의 연화 중 세포벽분해효소의 활성 변화. 한국원예학회지 40: 359-362
122. 최완근. 2002. 미생물을 이용한 복숭아 재배 사례. 한국유기농업학회 2002년도 상반기 학술발표 및 심포지엄 논문집 109-123
123. 허주녕, 김태균, 변상희. 2000. Log it 및 Turnbull 모형을 이용한 복숭아 품질인증의 소비자가치 평가. 농업경영·정책연구 27: 91-102
124. 이인규, 우수곤, 고복남. 2007. 미국 복숭아산업의 실태 분석과 시사점. 한국국제농업개발학회지 19: 14-19
125. 이기우, 최충돈, 조재욱, 김충실. 2004. 복숭아 당도 표시 소포장 판매 사례 분석. 한국식품유통연구 21: 21-36
126. 이기우, 박재홍, 이호철. 2000. 복숭아 유통개선을 위한 단계별 등급화 체계 연구. 한국식품저장유통학회지 7: 349-356
127. 이호철, 이기우, 석태문. 2000. 복숭아 고품질화를 위한 표준화 등급화 전략. 한국식품저장유통학회지 17: 97-112
128. 이호철, 박재홍. 2000. 복숭아 소비행태 및 등급규격 개선에 관한 연구. 한국식품저장유통학회지 17: 93-116
129. 이병서, 위태석. 2004. 소비자의 과일 브랜드 인지 수준과 개선방안. 한국식품유통연구 21: 103-119

주 의

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