

GOVP1200611682

최 종
연구보고서

효모를 이용한 딸기의 선도유지제 개발

Development of Post-harvest Biocontrol Agent from Yeast

충남대학교 농업생명과학대학 식품공학전공

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “효모를 이용한 딸기의 선도유지제” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2005 년 7 월 일

주관연구기관명 : 충 남 대 학 교

총괄연구책임자 : 성 창 근

연 구 원 : 이 정 현

연 구 원 : 가 소 근

연 구 원 : 고 리 주 안

연 구 원 : 임 득 균

연 구 원 : 엄 태 건

협동연구기관명 : (주)대덕바이오

협동연구책임자 : 모 은 경

요 약 문

I. 제 목

효모를 이용한 딸기의 선도유지제 개발

II. 연구개발의 목적 및 필요성

본 연구의 최종 목적은 기능성 효모를 이용한 딸기의 수확후선도유지제를 개발하고 궁극적으로 이를 산업화함에 있다.

딸기는 한국을 비롯하여 세계 여러 나라에서 생산되는 주요 원예작물이나 그 조직이 매우 연하고 수확후의 호흡율이 높으며 곰팡이에 대한 저항력이 약하여 장기저장이나 원거리 수송이 불가능하다. 그러므로 수확 후에 적절한 처리를 통해 곰팡이 발생을 억제하고 저장 기간을 연장하면 딸기의 유통 및 수출이 용이해지며 고부가가치를 생산할 것으로 사료된다.

따라서 본 연구를 통하여 딸기의 수확후선도유지제의 개발과 이에 대한 산업화가 이루어지면 딸기 유통 기간을 연장할 수 있다. 이는 국내의 유통산업을 활성화시킬 수 있으며, 딸기 유통에 어려움을 겪고 있는 우리의 농가에 새로운 활력이 될 수 있다. 뿐만 아니라 국내외로부터 지적재산권을 획득할 수 있으므로 관련 학문의 기술발달 및 산업을 활성화시킬 수 있다.

본 연구에 의하여 수행된 “효모를 이용한 딸기의 선도유지제 개발”은 기능성 효모 및 이의 추출물을 산업화한 것으로 산업화 과정을 통하여 제품개발의 국제경쟁력을 키우고 딸기 생산 농가에서의 고부가가치를 창출할 수 있는 것으로 사료된다. 왜냐하면 근본적으로 국가의 경쟁력은 기업에 달려있고, 기업의 경쟁력은 신제품 개발 및 제품의 끊임없는 품질 개선에 있기 때문이다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

본 연구과제인 “효모를 이용한 딸기의 선도유지제” 연구는 기능성 효모와 이로부터 유용 물질을 추출하여 산업화하는 것으로 2년간의 연구를 수행하였다. 전반적인 연구내용과 범위는 다음과 같다.

1. 인체의 분변으로부터 *Botrytis cinerea*에 대해 항진균력이 높은 균주를 분리하였고, 그 중 항진균력이 특히 높은 3개의 효모 균주를 동정하였다. 동정한 3균주를 딸기에 처리하여 딸기에서의 이화학적·관능적 특성이 우수한 1개의 균주를 선정하였다.
2. 선정된 균주를 배양하여 항진균력을 나타내는 물질을 분리하였고 chromatography 및 NMR로 동정하였다.
3. 분리 선정된 효모와 분리물질을 딸기에 처리한 후 딸기의 이화학적·영양적·관능적 특성을 평가하였다.
4. 분리 선정된 효모로부터 유용물질을 생산하는 최적의 발효조건을 설정하였다.
5. 유용물질이 딸기의 저장기간을 연장시키는 기전을 탐색하였다.
6. 분리선정된 효모의 안전성 검증을 위해 일반독성·유전독성·세포독성·세포막안전성·간독성을 평가하였다.
7. 상기 연구결과를 바탕으로 2개의 특허를 출원하였고, 2개의 신제품을 개발하였다.

Ⅳ. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

사람의 분변으로부터 *Botrytis cinerea*에 대해 항진균력이 있는 미생물을 분리하였고 그 중 3종의 효모를 동정하였다. 이 3균주는 각각 *Pichia farinosa* SKM-1,

Pichia anomala SKM-T, *Galactomyces geotrichum* SJM-59로 명명되었다. 상기 균주를 딸기에 처리하여 이화학적·관능적 특성을 평가한 결과, *Pichia anomala* SKM-T 균주의 효과가 가장 우수하여 이 균주를 딸기의 수확후선도유지제 연구에 사용하였다.

Pichia anomala SKM-T로부터 항진균력이 있는 물질은 open column chromatography를 이용하여 분리하였고, 이 물질은 NMR 동정으로 phenylethyl alcohol로 확인되었다.

Pichia anomala SKM-T가 phenylethyl alcohol을 생산하는 최적의 탄소원은 glucose, 질소원은 phenylalanine, 온도 30℃, 교반속도 160 rpm이었다. 반응표면분석법을 이용하여 *Pichia anomala* SKM-T가 phenylethyl alcohol을 생산하는 최적의 발효조건을 설정하였다.

Phenylethyl alcohol의 처리로 겨울딸기 및 여름딸기의 저장기간이 연장되었고, 이는 phenylethyl alcohol이 phenylalanine ammonia lyase (PAL)의 경쟁적저해제이기 때문인 것으로 사료되었다. 또한 phenylethyl alcohol은 *PAL1* mRNA의 축적을 억제하여 딸기에서 anthocyanin의 축적을 감소시켜 딸기의 품질을 수확 초기 상태로 유지시키는 것으로 관측되었다.

Pichia anomala SKM-T 균주를 rat에 경구투여하여 급성 및 아급성 독성시험을 시행한 후 체중변화량, 사료 및 음수량, 장기중량, 혈액학적 검사, 소변검사, 조직검사 결과 독성이 없는 것으로 사료되었다. Ames test를 이용한 유전독성검사에서도 복귀돌연변이를 유발하지 않는 것으로 관측되었다. 정상의 murine 세포주와 인체의 암세포주를 통한 세포독성시험에서도 정상 세포주에서는 독성을 유발하지 않았다. 전통적으로 섭취하고 있는 안전한 효모인 *Saccharomyces cerevisiae*를 비교대조군으로 하여 사람 혈액의 hemolysis를 측정된 결과, *Pichia anomala* SKM-T 균주는 *Saccharomyces cerevisiae*보다 세포막을 안정화시켰다. *Pichia anomala* SKM-T 균주를 장기간 급여한 후 혈액을 채취하여 간독성을 측정된 결과, 본 균주는 간독성을 유발하지 않았다. 전술한 바와 같이 *Pichia anomala* SKM-T 균주는 모든 독성시험에서 안전하다고 되었다.

건조된 *Pichia anomala* SKM-T가 주요 항목으로 포함된 분말형태의 잿빛곰팡이

억제제인 “팡이팡(Fungi-pop)”을 개발하였고, phenylethyl alcohol이 주요 항목인 액상 형태의 딸기의 선도유지제인 ”키핑레드(keeping-red)”를 개발하였으며, 이들과 관련하여 2건의 특허를 출원하였다.

2. 활용에 대한 건의

가. 본 연구에서 개발된 2개의 제품인 “팡이팡(Fungi-pop)”과 ”키핑레드(Keeping-red)”는 참여기업인 (주)대덕바이오에서 상품화되어 올 겨울부터 시판될 것으로 사료된다.

① 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 사료된다.

② 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 높을 것으로 사료되며, 이와 관련된 기술 및 지식의 축적은 국가경쟁력의 향상에 기여할 것으로 사료된다.

③ 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.

SUMMARY

I. Title

Development of postharvest biocontrol agent from yeast

II. Significance and purpose of research and development

This study is intended to develop the new postharvest biocontrol agent from yeast.

Strawberries are important crop in the world as well as in Korea, however their texture is very perishable, respiratory rate is very high, and sensitivity on *Botrytis cinerea* is very low. It is impossible that strawberries are not stored for long time, and not transport for long distance. Therefore, strawberries need postharvest biocontrol treatment and/or agent to extend their preservation period. If new postharvest biocontrol agent was developed for strawberry preservation, new industries for the manufacturing of postharvest biocontrol agent could be constructed in this country.

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.

It could be said that national competitiveness are dependent on the level of domestic industry. Furthermore industry's competitiveness is depend on the new product developments and endless product improvement.

III. Scope and range of research and development

This title "Development of postharvest biocontrol agent from yeast" is carried out two years. Overall scope and range of research and development could be summarized as follows:

1. Antifungal microorganisms were isolated from healthy human feces, three strains were identified. Strawberries were treated with three kinds of yeasts, and physicochemical and sensory properties were determined. One strain showed good physicochemical and sensory characteristics.
2. Antifungal compound was isolated from selected strain fermentation, and this compound was identified using chromatography and NMR analysis.
3. Determination of physicochemical, nutritional, and sensory properties was performed in strawberries treated with selected strain and/or identified compound.
4. Optimum ferment condition which selected strain producing identified compound was established.
5. Identified compound extend preservation period in strawberries, and this mechanism was studied.
6. Single-dose toxicity test, repeated-dose toxicity test, Ames test, cytotoxic test, hemolysis assay, and hepatotoxic test were carried out to confirm the safety of selected strain.
7. We developed two kinds of new products, and applied patents for the products.

IV. Results and proposal for the practical use

Antifungal microorganisms were isolated from healthy human feces, three strains were identified, *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T, and

Galactomyces geotrichum SJM-59. Strawberries were treated with three strains, the group treating *Pichia anomala* SKM-T showed good physicochemical and sensory properties. Therefore this strain used in this study.

Antifungal compound was separated from the *Pichia anomala* SKM-T culture, this compound was identified phenylethyl alcohol using chromatography and NMR analysis.

Pichia anomala SKM-T produce phenylethyl alcohol during its fermentation, the optimum culture condition was studied. The proper nutrients are glucose for carbon source and phenylalanine for nitrogen sources, and culture condition are temperature is 30°C, agitation speed is 160 rpm. The optimum culture condition was obtained using response surface methodology.

The stored periods were extended in strawberries which harvested during summer as well as winter. It is considered that phenylethyl alcohol is irreversible, competitive inhibitor of phenylalanine ammonia lyase (PAL). Furthermore, phenylethyl alcohol repress *PALI* mRNA accumulation, therefore ripening rate retarded and anthocyanin content maintained its initial value in *Pichia anomala* SKM-T treating strawberries.

The changes of body weight, food and water intake, 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 effect was detected in repeated-dose toxicity group using GOT/GPT activity. *Pichia anomala* SKM-T has not possess the cytotoxic activity on normal murine hepatocytes and/or intestinal cell lines. In contrast, *Pichia anomala* SKM-T has potent cytotoxic activity on human gastric and intestinal cell lines. Human red blood cell membrane was more stabilized in *Pichia anomala* SKM-T treating group than that of *Saccharomyces cerevisiae* treating group. Consequently, it is considered that *Pichia anomala* SKM-T strains is safe.

"Fungi-pop" is made of powdered *Pichia anomala* SKM-T, it work on fungi repression. "Keeping-red" is made of phenylethyl alcohol, it work on freshness maintenance. Two of patents were applied.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	13
1. Technical needs	13
2. Economical · Industrial needs	13
3. Social · Cultural needs	13
4. Purpose and range	14
Chapter 2. Internaltional · domestic trends	15
1. Post-harvest biological methods	15
2. Perspectives	15
Chapter 3. Results and discussion	16
1. Introduction	16
2. Research methods	18
3. Results and discussion	34
Chapter 4. Achievement and contribution	131
Chapter 5. Application	135
Chapter 6. International techniques	136
Chapter 7. References	138

목 차

제 1 장	연구 개발 과제의 개요	13
1.	기술적 필요성	13
2.	경제·산업적 필요성	13
3.	사회·문화적 필요성	14
4.	연구의 목적 및 범위	14
제 2 장	국내외 기술 개발 현황	15
1.	수확 후 선도유지를 위한 방안	15
2.	앞으로의 전망	15
제 3 장	연구 개발 수행 내용 및 결과	16
제 1 절	서론	16
제 2 절	연구 수행 방법	18
1.	<i>Botrytis cinerea</i> 저해제 탐색	18
2.	목적 물질의 분리 및 동정	20
3.	유용 미생물 처리 딸기의 품질 특성	22
4.	발효조건의 설정	26
5.	목적물질의 작용기전 탐색	27
6.	안전성 평가	30
제 3 절	연구 수행 내용 및 결과	34
1.	<i>Botrytis cinerea</i> 저해제 탐색	34
2.	목적 물질의 분리 및 동정	47
3.	유용 미생물 처리 딸기의 품질 특성	71
4.	발효조건의 설정	85
5.	목적물질의 작용기전 탐색	98
6.	<i>Pichia anomala</i> SKM-T의 안전성 평가	108
7.	시제품생산 및 제품화	128

제 4 장	목표달성도 및 관련분야에의 기여도	131
	1. <i>Botrytis cinerea</i> 생장 저해 균주의 분리 및 동정	131
	2. 미생물제 처리 딸기의 품질 특성의 측정	131
	3. 목적 물질의 분리·동정	132
	4. 유용 미생물의 최적 발효조건의 설정	132
	5. 목적 물질의 작용 기전의 탐색	132
	6. 미생물제 및 목적물질의 안전성 평가	133
	7. 시제품 생산 및 제품화	133
	8. 연구성과	134
제 5 장	연구 개발 결과의 활용 계획	135
제 6 장	연구 개발 과정에서 수집한 해외 과학 기술	136
제 7 장	참고문헌	138

제 1 장 연구개발과제의 개요

1. 기술적 필요성

딸기는 호흡과 증산작용이 활발하고, 과육이 연약하며 원거리 수송 및 장기저장이 불가능한 원예작물이다. 또한 딸기는 *Botrytis cinerea* (잿빛곰팡이)에 대한 감수성이 대단히 낮아 생산 및 저장 중 잿빛곰팡이의 감염이 문제시되고 있다. 잿빛곰팡이는 과실썩음병을 유발하는 수확후 가장 중요한 병원균 중의 하나이다. 농가에서 잿빛곰팡이 때문에 발생하는 수량의 손실은 50% 이상으로 알려져 있으며, 운송·판매 중에도 피해를 유발하여 딸기의 유통기간을 단축시키는 주요 원인균이다. *Botrytis cinerea* 발생을 억제하기 위해 시도되는 방안들의 대부분은 농가에서의 예냉 시설 부족과 그 사용 방법이 어려우며 처리시 부작용이 발생하여 실용화하는데 어려움을 갖고 있다.

따라서 농가에서의 사용이 간편하고, 별도의 처리 시설 및 장치가 필요없으며, 사용시 부작용이 없는 postharvest biocontrol agen (수확후선도유지제)의 개발이 필요한 상황이다.

2. 경제·산업적 필요성

딸기는 연간 약 6,300 억원의 농가 소득을 창출하는 주요 과채류로, 딸기의 총 수출량은 최근 5년간 약 10배 이상 증가하고 있다. 그러나 총 생산량 대비 수출량은 약 0.6% 수준으로 극히 저조한 실정이다. 이는 주요 수출 시기가 11월~5월까지의 겨울인데 반해, 딸기의 주요 수입국인 일본의 딸기 수입 시기는 7월~10월이기 때문으로 추정하고 있다. 7월~10월은 우리나라에서도 강원도 고지대를 제외하고는 딸기의 생산이 곤란하고, 생산된 여름딸기도 유통에 어려움이 많은 시기로 여름철 국내 유통은 거의 전무한 실정이다.

따라서 딸기 유통에 적합한 수확후선도유지제 (postharvest biocontrol agent)를 개발하여, 딸기의 유통기간을 연장하고, 하절기 딸기의 국내 유통 및 보다 많은 수출을 가능하게 하여 농가에서의 고부가가치를 창출하고자 한다.

3. 사회·문화적 필요성

딸기는 생산·유통시 합성 무기질 농약을 많이 사용하는 원예작물이다. 화학적 농약 및 살균제의 과다 사용에 의해 *Botrytis cinerea*가 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. 미생물을 이용한 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 딸기에 대한 소비자의 요구를 만족시키고, 고부가가치의 딸기 생산 및 유통을 가능하게 하고자 한다.

4. 연구의 목적 및 범위

본 연구과제인 “효모를 이용한 딸기의 선도유지제 개발” 연구는 ① 딸기유통시의 주요 병원균인 *Botrytis cinerea*의 저해제(미생물) 탐색, ② 탐색한 저해제를 처리한 딸기의 품질 특성 측정, ③ 유용 미생물로부터 *Botrytis cinerea*의 생장을 저해하는 물질의 분리 및 동정, ④ 목적물질을 최대량 생산할 수 있는 발효조건 설정, ⑤ 목적 물질의 딸기에서의 작용기전의 탐색, ⑥ 미생물제의 안전성 측정, ⑦ 시제품생산 및 제품화 완료 등으로 구분하며 2년간의 연구를 수행하였다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

1. 수확 후 선도 유지를 위한 방안

구분	CA/MA	미생물제제 (Postharvest biocontrol agent)	무처리
1. 중량	유지	유지	감소
2. 색도 (a 값)	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 실은 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	

2. 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 *Botrytis cinerea* 저해제의 탐색

다. 미생물 자원으로부터 친환경적인 방제제의 개발

라. 딸기의 유통 및 저장 기간 연장을 통한 고부가가치의 창출

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 서론

효모는 식품, 특히 과일, 채소, 곡류의 수확후 저장중에 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.

회색의 곰팡이인 *Botrytis cinerea*는 과채류의 병원균으로 잘 알려져 있으며, *Botrytis*의 감염으로 막대한 경제적 손실이 유발되는 것으로 보고 되고 있다. *Botrytis*를 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 화학 합성 농약 및 살균제의 단점을 보완·대체할 수 있는 미생물제제에 대한 소비자의 관심이 증가하고 있다.

딸기는 연간 약 6,300 억원의 농가 소득을 창출하는 주요 과채류로 딸기의 수출량은 최근 5년간 약 10배 이상 증가하고 있다. 그러나 총 생산량 대비 수출량은 약 0.6% 수준으로 극히 저조한 실정이다. 이는 주요 수출 시기가 11월 ~5월까지의 겨울인데 비하여, 딸기의 주요 수입국인 일본에서의 딸기 수입 시기는 7월 ~10월이기 때문으로 추정하고 있다. 7월~10월은 우리 나라에서도 강원도 고지대를 제외하고는 딸기의 생산이 곤란하고, 생산된 여름 딸기도 유통에 어려움이 많은 시기로 여름철 국

내 유통은 거의 전무한 실정이며 수출도 매우 어려운 상황이다. 이는 딸기가 호흡이 활발하며, 과육이 연약하여 원거리 수송 및 장기저장이 불가능하기 때문인 것으로 사료된다. 또한 *Botrytis cinerea*에 대한 감수성이 대단히 낮아 생산 및 저장 중 잿빛곰팡이의 감염이 문제시되고 있다. 잿빛곰팡이는 과실썩음병을 유발하는 수확 후의 가장 중요한 병원균 중의 하나이다. 농가에서 *Botrytis cinerea*의 감염 때문에 발생하는 수량의 손실은 50% 이상인 것으로 알려져 있으며, 운송·판매 중에도 피해를 유발하여 딸기의 유통기간을 단축시키는 주요 원인균이다.

Botrytis cinerea 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 딸기는 이취(off-flavor)를 발생한다. 더욱이 CA/MA 저장시 낮은 온도에서는 문제가 되지 않으나 저장 후 유통을 위해 실온으로 옮겼을 때는 품질의 저하가 매우 빠른 속도로 진행되는 단점을 가지고 있다.

*Botrytis cinerea*를 조절하는 효율적인 방법 중의 하나는 benimidazole과 같은 약제를 prophylactic field spray를 실시하지만, 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.

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 딸기에 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, 딸기 유통에 적합한 수확후선도유지제(postharvest biocontrol agent)를 개발하여, 딸기의 유통기간을 연장하고 농가에서의 고부가가치를 창출하고자 하였다.

제 2 절 연구수행방법

1. *Botrytis cinerea* 저해제 탐색

가. 시료의 수집 및 분리

*Botrytis cinerea*의 생육을 저해하면서 사람이 이용할 수 있는 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 *B. cinerea*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±3°C에서 8일간 배양하였다. 항진균력은 효모와 fungal biomass 간에 clear zone이 명확하게 형성되는 것으로 판단하였고, 대조군으로는 *B. cinerea* (한국생명과학연구원, 대전) 또는 *Saccharomyces cerevisiae* (한국생명공학연구원, 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 Kley 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 ×g에서 2분간 원심분리하여 효모세포만을 수집하였다. 그 후 멸균류수로 2회 세척하였으며, 최종적으로 멸균증류수 100 μ L에 재분산시켰다. 분산액은 10분간 끓인 후에 16,000 ×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 anomala SKM-T를 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 *B. cinerea*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 *B. cinerea*에 대한 항진균력 (simple-plate bioassay)을 측정하였다.

라. 목적물질의 분리 및 순수분리

*B. cinerea*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 4개의 분획물 (FR1~4)을 얻었다. 그 중 FR2 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. 유용미생물 처리 딸기의 품질특성

가. 중량감소율 및 수분함량

딸기 40 kg을 *P. anomala* SKM-T 배양액에 dipping한 후 15℃에서 2시간동안 건조하여 수분을 제거한 후 PVC 용기에 넣어 칭량하였다 (W_0). 이후 4℃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 딸기를 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

딸기를 40 kg씩 15그룹으로 나누어 *P. anomala* SKM-T 배양액에 dipping한 후 15℃에서 2시간동안 건조하여 수분을 제거한 후, 계수하여 (W_0) PVC 상자에 담아 4℃에 저장하였다. 이 후 경시적으로 한 상자당 표면에 곰팡이가 발생한 딸기를 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

딸기 100 g에 10배수의 증류수를 넣고 마쇄한 후 pH meter를 이용하여 pH를 측정하였고, 마쇄한 딸기액을 6,000 ×g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 상등액 중 일정량의 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.

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

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

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

b : Ascorbic acid의 농도 (mg/100g)

m : 색소액에 대한 ascorbic acid 용액의 적정치 (mL)

n : 색소액에 대한 시료용액의 적정치(mL)

v : 희석배수

마. 색소의 함량 변화 측정

딸기에 함유된 anthocyanin의 종류를 확인하기 위하여 딸기 마쇄액 100 mL, lead acetate 100 mL, NH₄OH 5 mL를 넣고 침전이 형성될 때까지 잘 흔들어 준 후, 원심 분리하여 침전물에 80% 알콜 25mL을 넣고 잘 흔들어 준 후 다시 원심분리하여 침전물만 회수하였다. 이 과정을 2회 반복하였다. 침전물에 n-BuOH 10 mL, HCl 1 mL를 가하여 유색의 염화납 침전이 형성될 때까지 강하게 흔들어 준 후, 상등액만을 분별 깔때기로 회수하였다 (× 2). 분별깔때기에 석유에테르 100 mL를 가하여 잘 흔들어 준 후 하층의 색소만을 회수하여 TLC (n-BuOH : HOAc : H₂O = 4 : 1 : 5)를 실시하고 R_f 값을 구하였다.

딸기 10 g에 methanol 100 mL (1% HCl)을 넣고 마쇄한 후, 2,000 ×g에서 15분간 원심분리하여 상등액의 흡광도를 측정 (O.D. = 510 nm)하여 다음의 공식으로 anthocyanin (pelargonidin -3-glucoside)의 함량을 산출하였다.

$$\text{Anthocyanin (mg)} = \text{MW} / \text{MEG} \times \text{OD} \times \text{DF}$$

MW : Anthocyanin의 분자량 (433.2)

MEG : 510 nm의 분자흡광계수 (36,000)

OD : 510 nm에서의 흡광도

DF : 희석배수

바. 경도 및 texture 변화 측정

딸기의 경도 및 texture는 각 저장구에서 임의로 20개씩을 취하여 딸기 섬유질의 수직방향으로 texture profile analysis (TPA)를 측정하였다. Force-time curve는 probe를 딸기에 2회 연속침투시켜 얻었으며, first bite에서의 가장 높은 peak를 경도 (hardness)로 하였고, first bite에서 제일 처음 관측되는 peak를 fracturability로 하였다. 딸기의 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

사. 색도변화 측정

딸기의 과피를 칼로 얇게 도려내어 유리판 위에 고르게 편 후 color meter (JX 777, Japan)로 Hunter color measuring scale 중 붉은색의 정도를 나타내는 a 값을 측정하였다.

아. 관능검사 및 통계처리

미생물 처리 딸기와 대조군 간의 선호도 검사를 시행하였다. 패널의 수는 12명

(남자 8명, 여자 4명)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

Pichia anomala SKM-T를 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 phenylethyl alcohol을 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 phenylethyl alcohol을 분리정량하였다.

다. 최적발효조건의 설정

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

5. 목적 물질의 작용 기전 탐색

가. 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.

나. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) 활성의 측정

딸기에 아세톤과 0.2 M Tris-HCl 완충용액 (pH 8.9)을 가하여 균질화하여 여과한 후 잔사를 5 mM 인산나트륨완충용액 (pH 7.2)에 현탁하고, 톨루엔을 첨가하여 3일간 방치한 후 원심분리하여 상정액으로 취하였다. 상정액에 ammonium sulfite로 포화염석하고 15,000 ×g에서 10분간 원심분리한 후 증류수에 용해하여 10 mM 초산나트륨 완충용액에 48시간 투석하였다. 이 투석액을 20,000 ×g에서 15분간 원심분리한 상정액을 한외여과한 후 가압농축하여 효소액으로 사용하였다.

0.06 μM 페닐알라닌 1 mL, 30 mM 붕산나트륨 완충용액 (pH 8.8) 1.5 mL의 효소액을 혼합하여 30°C에서 1시간 반응시킨후 0.1 mL의 6 N HCl 용액으로 반응을 정지시키고, 290 nm에서 흡광도를 측정하였다. 활성을 30°C에서 30분간 생성된 1 mM의 cinnamate 양을 1 unit으로 하였다.

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

다. 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase (Ds-Mn/DS-Co) 활성

딸기를 액체질소 하에서 마쇄한 후, 0.05g polyvinylpyrrolidone과 1.5 mL PBS (100mM, pH 8)을 함유한 1.4 mM 2-mercaptoethanol을 넣고, 1,000 rpm에서 15분간 원심분리하였다. 상정액을 sephdex G-25 컬럼을 통과시켜 정제하고 DAHP synthase의 효소액으로 하였다. 효소의 단백질 함량은 γ -globulin을 standard 로 하여 Bradford 법으로 정량하였다.

50 mM K-Epps 완충액 (pH 8), 0.5 mM dithiothreitol, 0.5 mM MnCl₂, 3 mM PEP, 0.6 mM E4P를 함유한 Ds-Mn 반응 혼합액 180 μ L에 20 μ L 효소액을 넣어 DS-Mn의 반응을 개시하였다. Ds-Co의 반응은 반응 혼합액 190 μ L에 10 μ L의 효소액을 넣어 개시하였다. 20~30분간 incubation 한 후 50 μ L 25% TCA를 넣어 반응을 종결하였다. 대조구는 50 μ L 25% TCA를 넣어 반응을 개시하였다. 4°C에서 15분간 원심분리 (15,000 \times g)한 후, 상정액 100 μ L에 0.125 N 황산을 함유한 100 μ L 25 mM NaIO₄를 넣어 30°C에서 30분간 incubation 하였다. 0.5 N HCl 800 μ L 0.3% thiobarbituric acid를 함유한 2% NaAsO₂ 200 μ L를 넣고 100°C에서 10분간 incubation한 후 549 nm에서 흡광도를 측정하였다.

라. L-aminocyclopropane-L-carboxylate (ACC) oxidase 활성

딸기를 물/0.5 mM AVG로 처리한 후 에틸렌을 3일간 노출시켰다. 100 μ M의 L-aminocyclopropane-L-carboxylic acid (ACC)를 처리하고 2시간 후에 에틸렌 생성량을 측정하여 ACC oxidase의 indicator로 이용하였다. 에틸렌의 생성은 GC를 이용하여 측정하였다.

마. Total RNA의 분리 및 Northern blot analysis

딸기 50 mg을 액체질소하에 마쇄한 후 Qiagen mini prep kit의 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 μ mol primer를 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% formade, 2.2 M dormaldehyde, 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 전기영동한 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.

6. 안전성 평가

가. 급성 및 아급성독성시험

생후 6주령의 SD rat를 암수 각각 5수씩으로 나누어 sonde를 이용하여 5용량의 동결건조한 효모를 경구투여하였다. 급성독성시험의 경우, 1회 경구투여 한 후 14일간 임상증상 (2회/일)을 관찰하였고, 체중을 측정하였으며, 관찰 종료 후 부검을 실시하여

육안적 변화를 관찰하였다.

아급성 독성 시험의 경우, 3주령의 SD rat을 암수 각각 5수씩으로 나누어 효모를 28일간 경구투여하였다. 관찰항목은 급성독성시험과 동일하였다.

실험동물은 1 케이지당 1마리씩을 사육하였고, 사육실은 온도 $20\pm 2^{\circ}\text{C}$, 습도 65%, 12시간 간격으로 빛의 양을 조절하였으며, 물과 사료는 자유급여하였고, 매일 갈아주었다. 사료의 조성은 Table 2와 같다.

나. 유전독성시험

히스티딘 영양 요구성 변이주인 *Salmonella typhimurium* TA 98 및 TA 100 변이주를 이용한 복귀돌연변이원성을 검증하였다. *Pichia anomala* SKM-T, 대사활성 혼합물 (S9 mix) 0.1 mL을 중층 한천 2.0 mL와 혼합한 후 최소 한천 평판의 표면 위에 부었다. 배양하기 전에 중층 한천을 굳혔다. 37°C 에서 24~48시간 배양한 후 평판 당 복귀집락수를 계수하였다.

다. 세포독성시험

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

Table 2. Composition of experimental diets (g%)

Ingredients	Composition
Casein	20.0
Corn starch	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); CaHPO₄ 500, NaCl 74, K citrate monohydrate 220, K₂SO₄ 53, MgO 24, Mn carbohydrate 3.5, Fe citrate 6.0, Zn carbonate 1.6, Cu carbonate 0.3, KIO₃ 0.01, Na₂SeO₃ · 5H₂O 0.01, CrK(SO₄)₂ · 12H₂O 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

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℃에 보관하였다. *Pichia anomala* SKM-T와 *Saccharomyces cerevisiae*를 $1 \times 10^4 \sim 10^8$ /mL을 140 μ L PBS에 혼합하여 37℃에서 1분간 진탕배양한 후 40 μ L의 적혈구 (10% suspension)을 첨가하였다. 시료를 37℃에서 10분간 incubation한 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

Pichia anomala SKM-T를 식이에 0.3% 혼합하여 4주령의 ICR 마우스 암수 각각 6수씩 4주간 공급하였다. 마우스는 에틸에테르로 마취하여 희생한 후 복대정맥으로부터 채혈하였다. 혈액은 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 혈청을 분리하였다. 혈액 중의 glutamate oxaloacetate transaminase (GOT)와 glutamate pyruvate transaminase (GPT)의 활성은 아산제약의 GOT/GPT kit의 방법에 준하여 측정하였다. 실험동물의 사육조건과 급여방법을 전술한 바와 동일하였다.

제 3 절 연구수행 내용 및 결과

1. *Botrytis cinerea* 저해제 탐색

가. 항진균력 균주의 동정

건강한 성인 및 유아의 분변으로부터 균을 분리한 결과, 120종이 분리되었다. 상기 균종의 *B. cinerea*에 대한 항진균력을 simple-plate bioassay로 측정한 결과는 Table 1과 같다. Table 1에서와 같이 6개의 분리 균주에서 강한 항진균력을 나타내었다. 이들 중 No. S-47과 No. S-67은 colony 형성결과, 세균으로 판명되어 본 연구에서 제외시켰고, No. S-80은 No. S-1과 동일한 균주로 판명되었다. 따라서 3종의 분리 균주에 대한 동정을 실시하였다.

나. 분리균주의 동정

전술한 3개의 균주에 대한 형태학적 특성을 알아보기 위하여 전자현미경 관측을 한 결과는 Fig. 1과 같고, 이들의 탄수화물 동화능을 측정한 결과는 Table 2와 같다. Table 2의 결과를 보충하기 위해 포자형성능을 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. Fig. 2에서와 같이, 분리된 3균주는 heterothallic ascospores를 형성하는 것으로 나타났다. 따라서 Nos. S-1, S-59, S-T은 각각 *Pichia farinosa*, *Galactomyces* spp., *P. anomala*로 동정되었다.

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

No	Response	No	Response	No	Response	No	Response	No	Response	No	Response
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	+++

+: positive effect, -: negative effect; W; weak positive effect

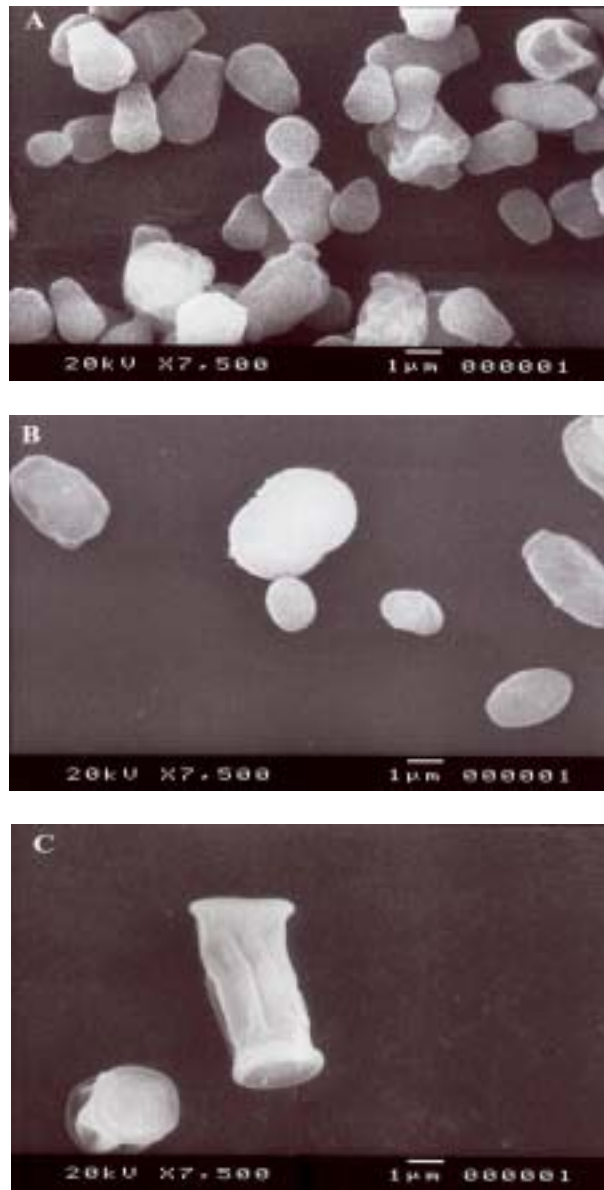


Fig. 1. Morphology of isolated 3 strains using scanning electron microscopy. A, *Pichia farinosa* SKM-1; B, *Pichia anomala* SKM-T; C, *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

Table 4 Carbon compounds assimilation of isolated 3 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.

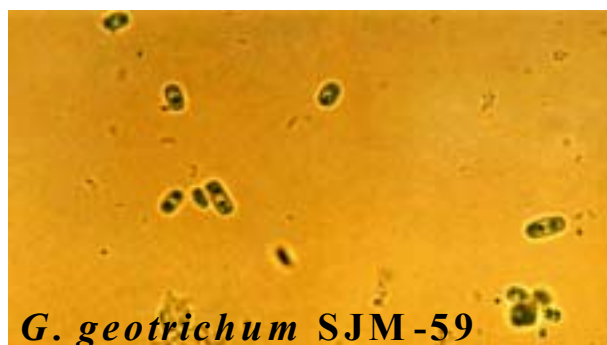
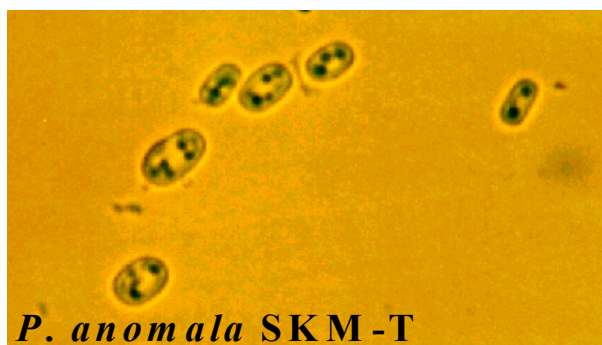


Fig. 2. Ascospores of three isolated strains cultured on Kleyn media for 3 day at 25°C. Sodium acetate 0.5 g, K_2HPO_4 0.02 g, KH_2PO_4 0.012 g, glucose 0.062 g, NaCl 0.062 g, biotin 2 μ g, mineral solution 1 mL, agar 2.0 g, and distilled water was added to make 100 mL.

보다 정확한 동정을 위하여 26S rDNA partial sequencing 분석을 시행하였으며, 분리균주의 DNA sequence와 homology는 Table 3과 Fig. 3과 같다. No. S-1은 *Candida*, *dbaryomyces*, *Pichia*로 구성된 *Dabryomyces* clade (Fig. 4)에 속하여 표준균주인 *Pichia farinosa* NRRL Y-7553^T와 99.8%의 homology로 동정되었다 (Table 3). No. S-59는 *Galactomyces* sp. NRRL Y-6418^T, *G. citriaurantii* NRRL Y-17913^T, *G. reessii* NRRL 17566^T로 구성된 phylogenetic group (Fig. 5)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. 6)에 속하며, 표준균주인 *Pichia anomala* NRRL Y-366^T와 100%의 homology로 동정되었다 (Table 3). 따라서 No. S-1은 *Pichia farinosa* SKM-1으로, No. S-59는 *Galactomyces geotrichum* SJM-59로, No. S-T는 *Pichia anomala* SKM-T로 동정되었다.

Table 5. Levels of partial 26S rDNA sequences similarity for isolated 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 vanrijae</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 fluvialtilis</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 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATT
No. S-T AAACCAACAGGGATTGCCTCAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATT
No. 59 AAACCAACAGGGATTGCCTTAGTAACGGCGAGTGAAGCGGCAAAAAGCTCAAATT

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 TCTGATGAGATGCCATTCCCTATGTAAAGTGCTATCGAAGAGTCGAGTTGTTTG
No. 59 TGAGATAAGCTTCCCAGTTCTATGTAAAGTGCTTTCGAAGAGTCGAGTTGTTTG

No. S-1 GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAG
No. S-T GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAG
No. 59 GGAATGCAGCTCTAAGTGGGTGGTAAATTCCATCTAAAGCTAAATATTGGCGAG

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

No. S-1 GAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACATGG
No. S-T GAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCATTAGATCAGACTTGG
No. 59 GAGTGAAAAAGTACGTGAAATTGTTGAAAGGGAAGGGCTTGAGATCAGACATGG

No. S-1 GTATTTTGTAAACCTTCTCTCTCGTGGAGGGGGCCCCCTTGCAGTTTACTGGGCCA
No. S-T TGTTTTACGATTATCTTCTCTTCTTGAGTTGTGCACTCGTATTTCACTGGGCCAG
No. 59 TATTTTGTAAACCTTCTCTCTCGTGGAGGGGGCCCCCTTGCAGTTTACTGGGCCAG

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

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

Fig. 3. Partial 26S rDNA sequences of isolated 3 strains. S-1, *Pichia farinosa* SKM-1; S-T, *Pichia anomala* SKM-T; 59, *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

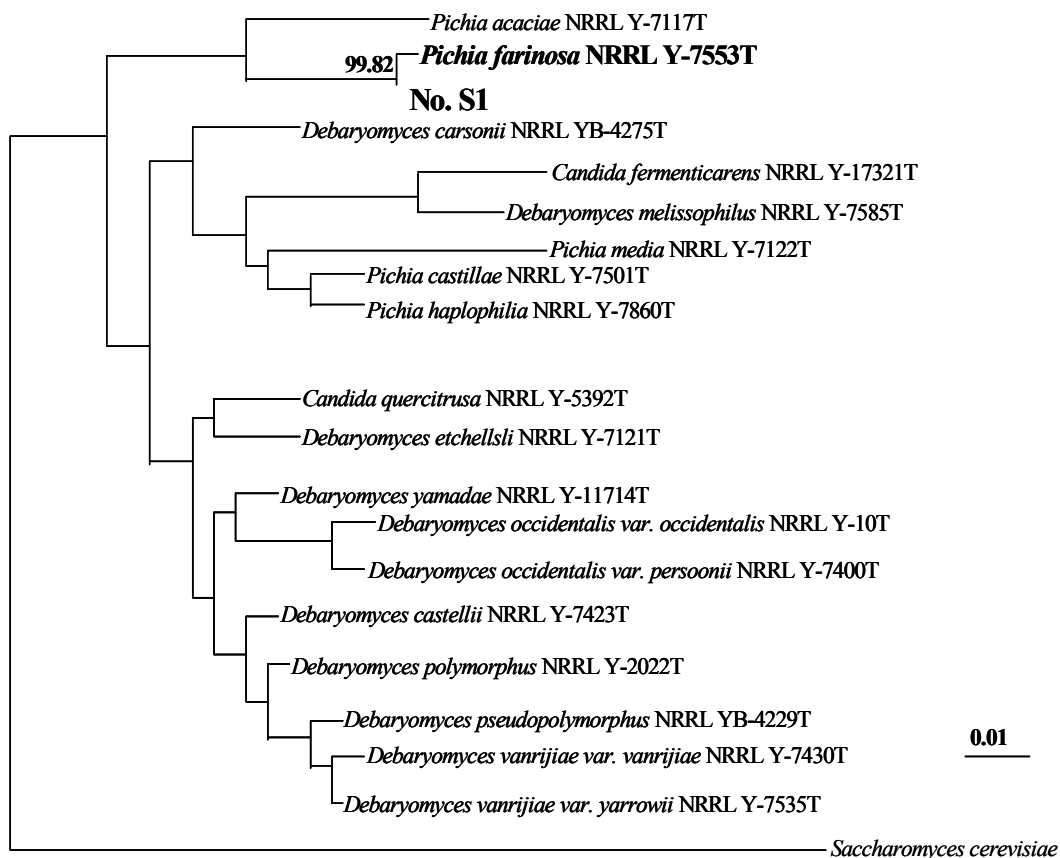


Fig. 4. Phylogenetic tree based on partial 26S rDNA sequences showing the position of strain No. S1 and some other taxa. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

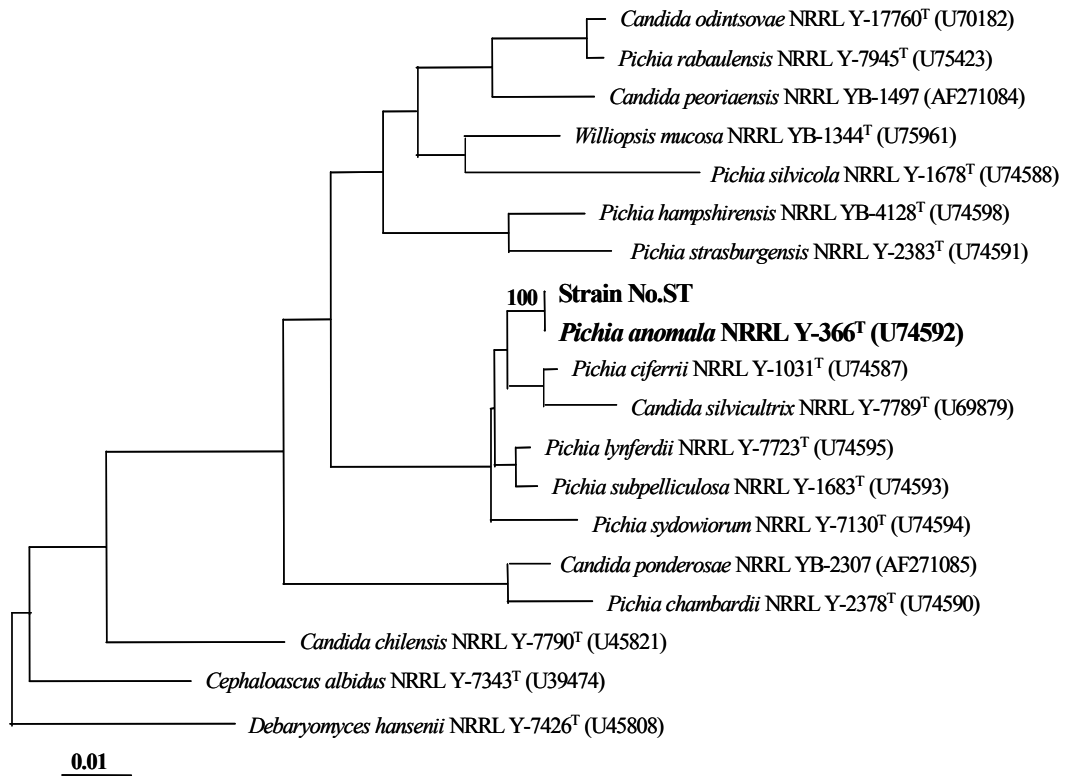


Fig. 5. Phylogenetic tree based on partial 26S rDNA sequences showing the position of strain No. ST and some other taxa. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

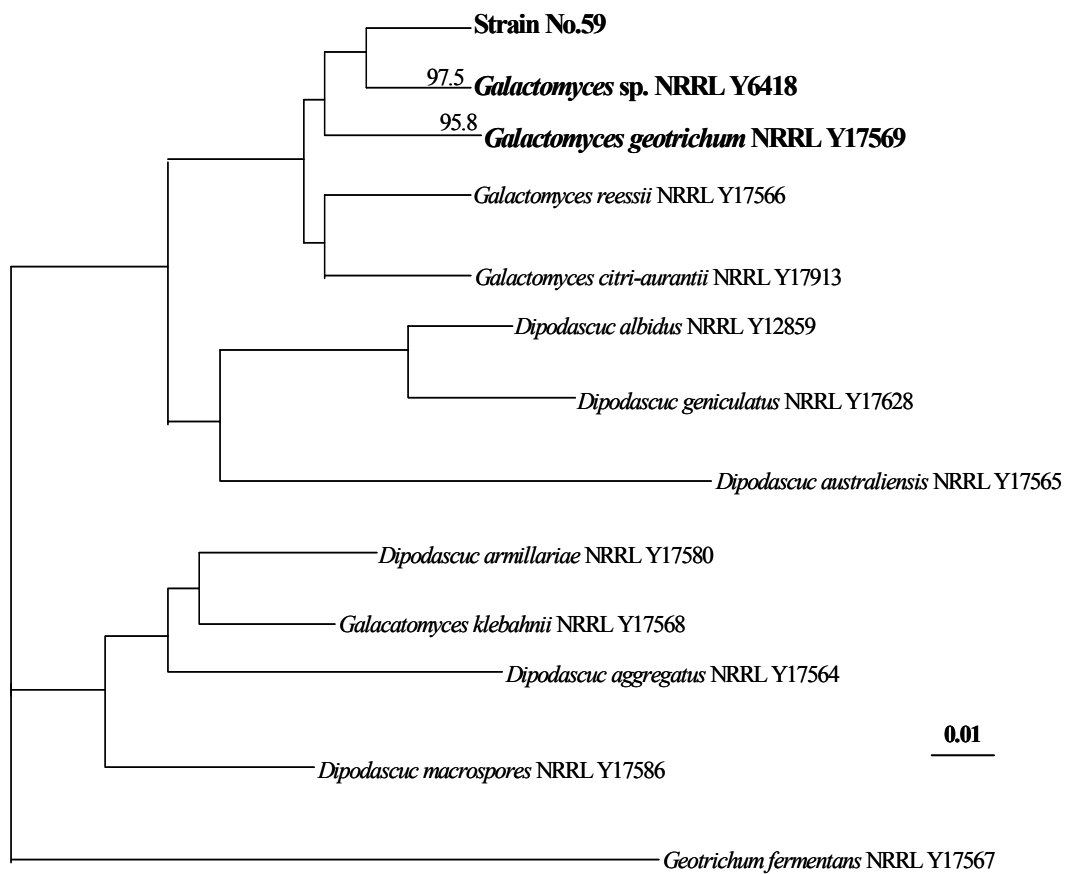


Fig. 6. Phylogenetic tree based on partial 26S rDNA sequences showing the position of strain No. 59 and some other taxa. Scale bar represents 0.01 substitution per nucleotide position.

2. 목적물질의 분리 및 동정

가. 유용물질 추출을 위한 미생물의 배양

P. farinosa SKM-1, *P. anomala* SKM-T, *G. geotrichum* SJM-59, *Saccharomyces cerevisiae*를 PDB에 배양하여 대수기에 이르면, 대조군인 *S. cerevisiae*를 제외한 분리 효모군에서 다량의 물질을 생성하므로 관능적으로도 목적물질의 생성을 확인할 수 있었다 (Fig. 7). 따라서 배양 24시간째에 추출용매를 첨가하여 효모로부터의 물질 생성을 중단시키고, batch extraction으로 목적물질을 추출하거나 용해도에 따라 순차추출하였다.

나. 용매 추출 분획의 항진균력 측정

극성 용매 추출물에서는 *B. cinerea*에 대해 항진균력을 나타내는 분획이 없었고, 비극성용매 중 dichloromethan-pentane (D/P) = 2 : 1의 추출분획에서 가장 높은 항진균력을 나타내었다 (Table 4). 따라서 D/P = 2 : 1의 혼합용매를 사용하여 목적물질을 추출하여 GC 및 GC/MS로 확인하였다 (Figs. 8~11, Table 5~7). 세 가지 효모 추출분획에서 공통으로 확인된 물질은 phenylethyl alcohol이었다.

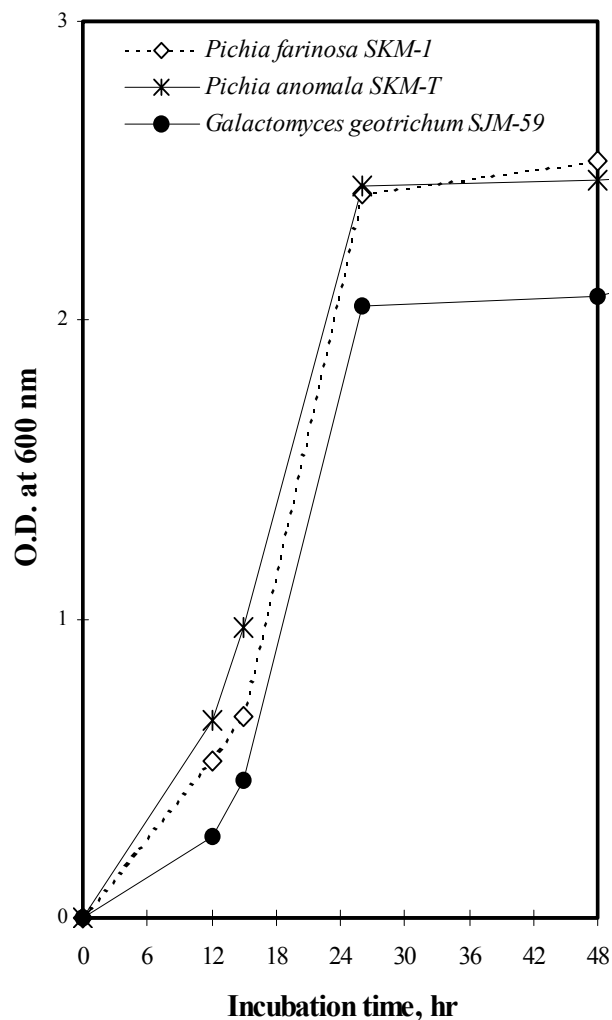


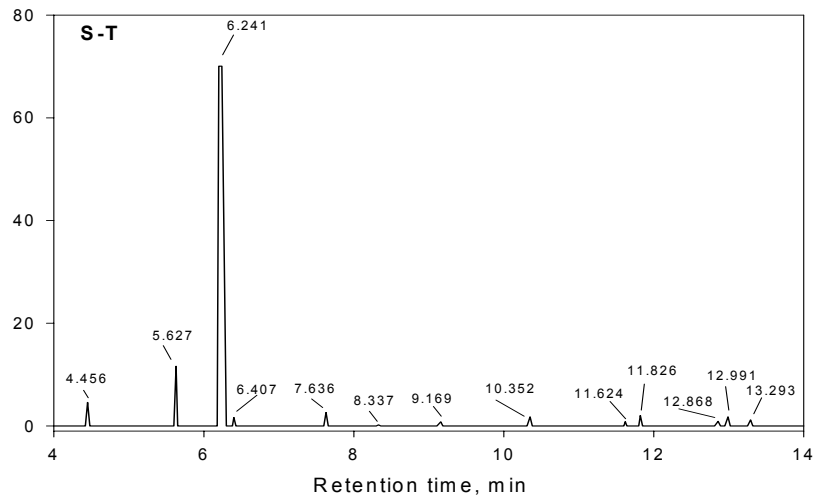
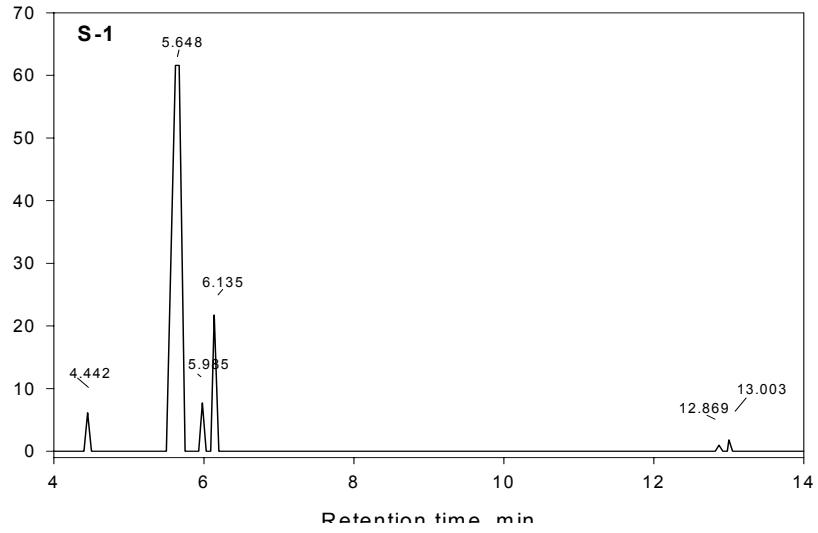
Fig. 7. The growth curves of *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59. *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 were inoculated into 1.5 L potato dextrose broth in 3 L Erlenmeyer flask and the 3 samples were placed on the shaker of 140 rpm for 48 h at 30±1°C.

Table 6. Action of *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T, and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 against the plant pathogene, *Botrytis cinerea*.

		<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.



continued

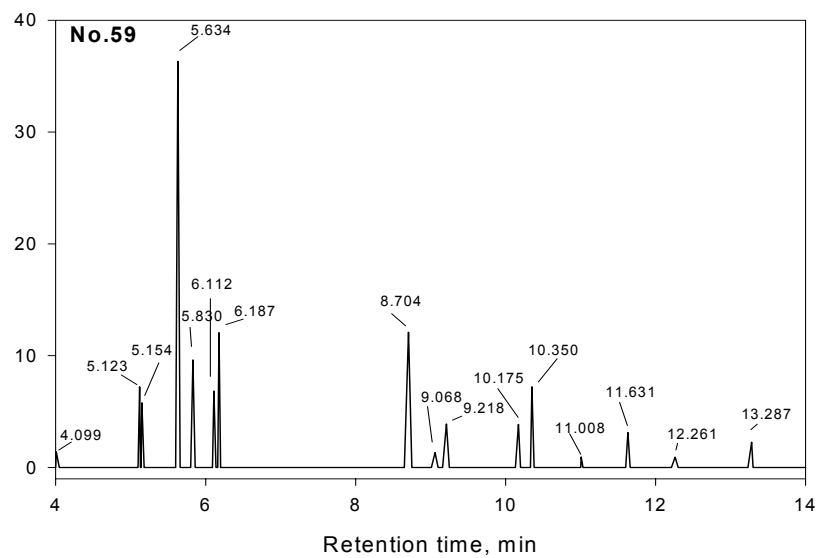
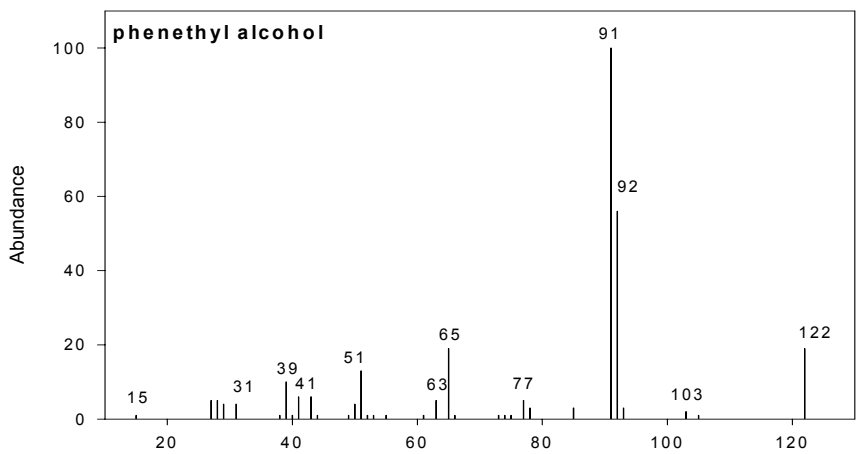
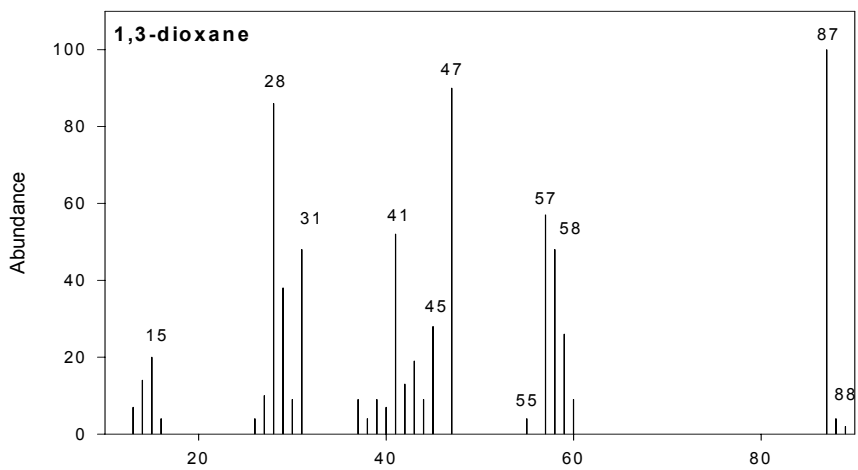


Fig. 8. Chromatograms of volatile compounds from *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59. S-1; *Pichia farinosa* SKM-1, S-T; *Pichia anomala* SKM-T and No. 59; *Galactomyces geotrichum* SJM-59.



continued

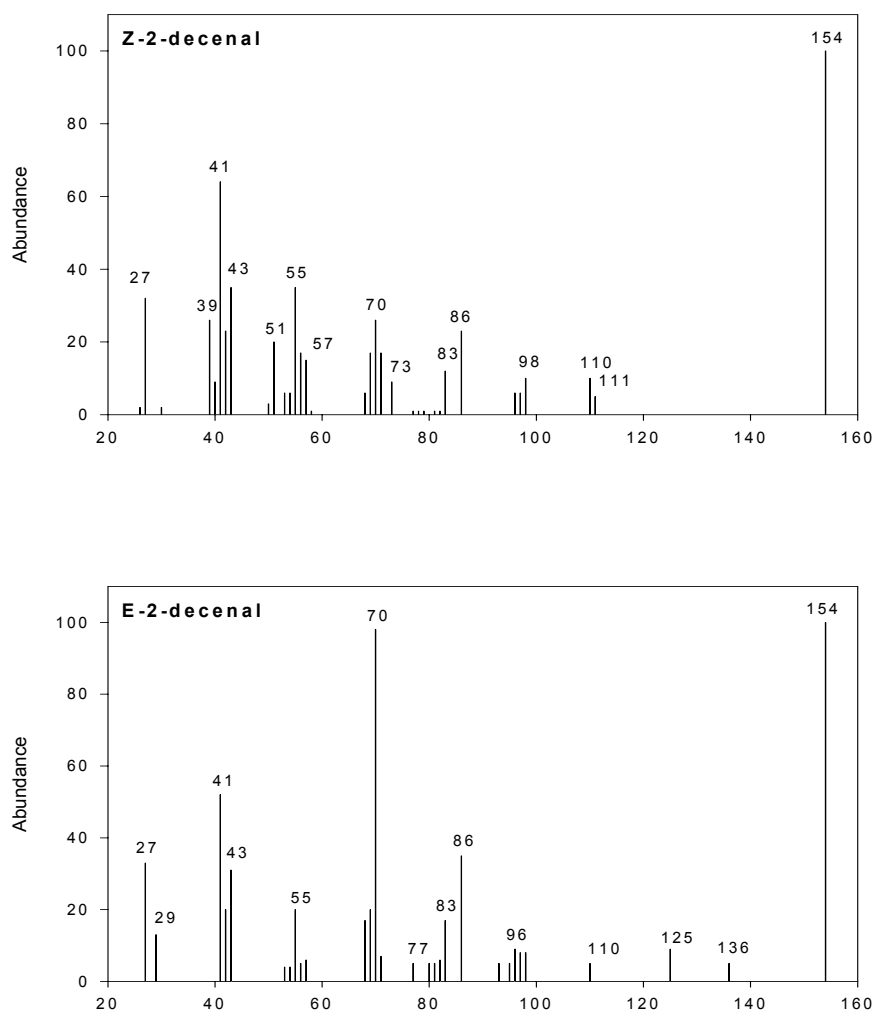
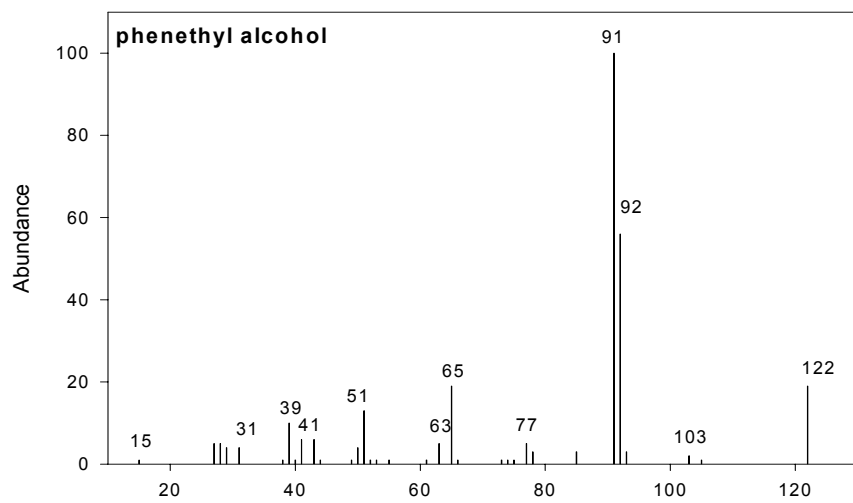
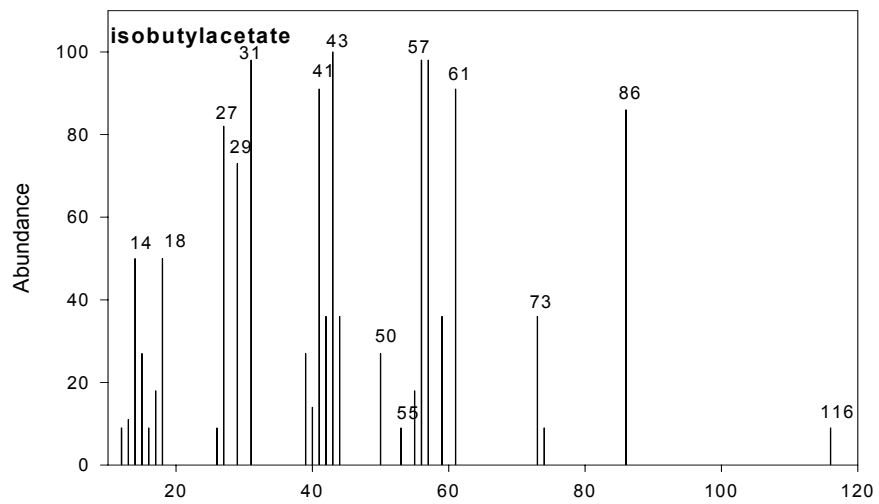


Fig. 9. GC-MS spectrum of identified volatile compounds from *Pichia farinosa* SKM-1. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV, ion species were normal ion (MF-Linear) and TIC range was m/z 10 to 300. The spectrometric data were compared with those from the NIST Hewlett-Packard 59942C original library mass-spectra.

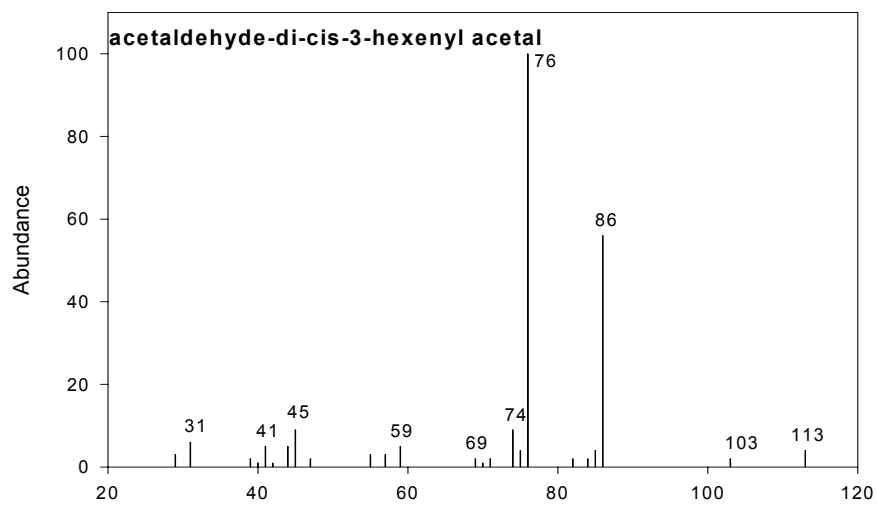
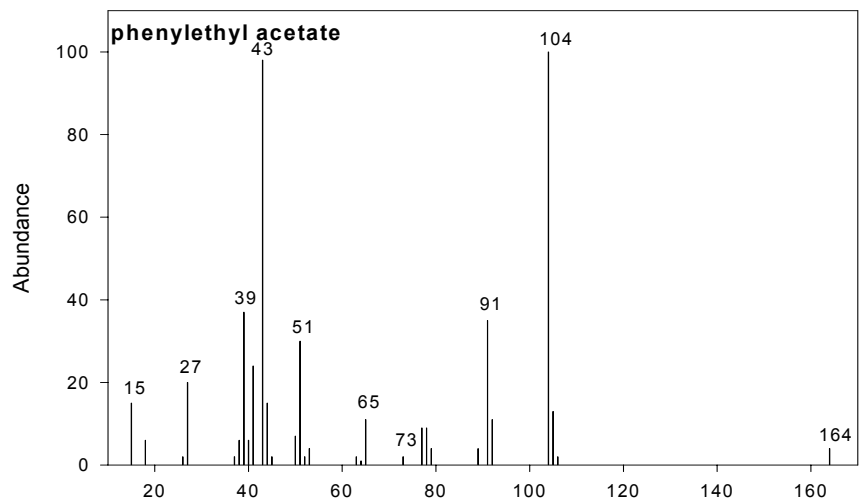
Table 7. Characteristics of identified flavor volatile compounds from *Pichia farinosa* SKM-1.

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	phenethylalcohol	122	rose-honey odor
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

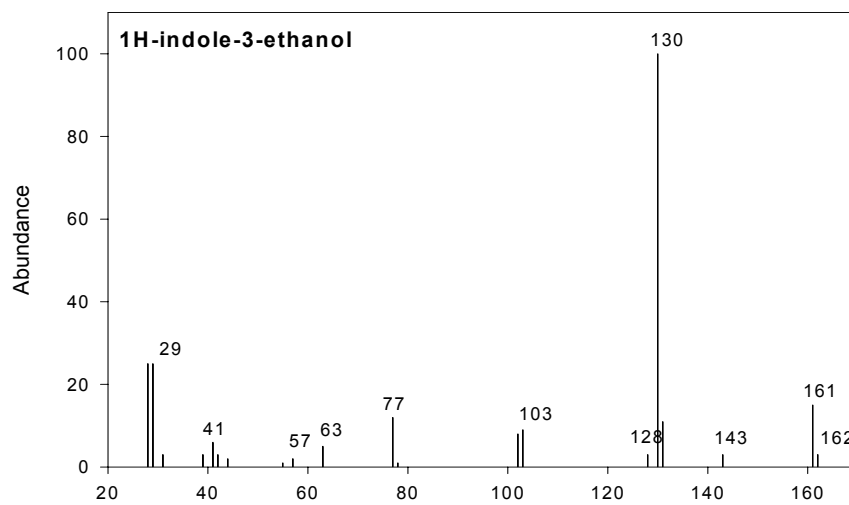
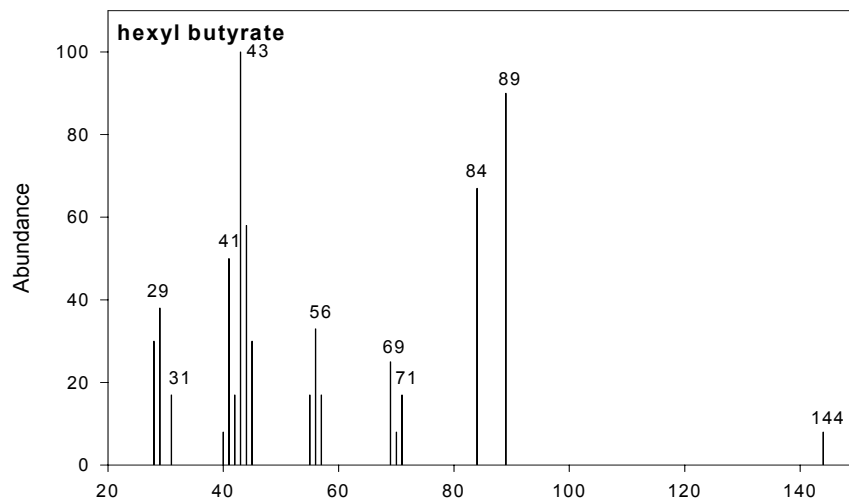
* R.T. is retention time, ** is butyl benzene



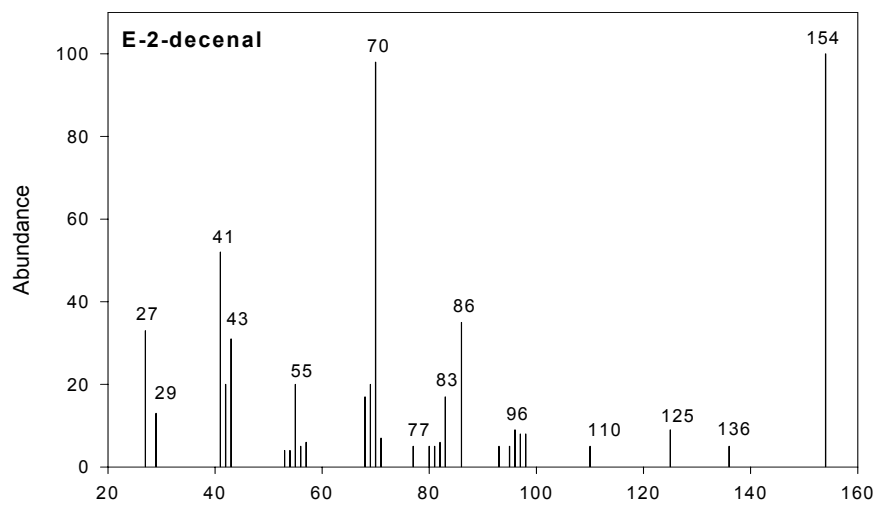
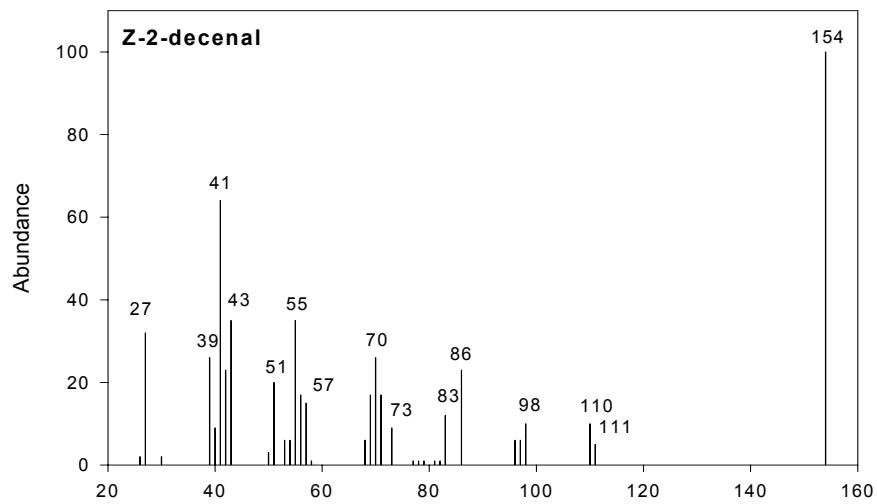
continued



continued



continued



continued

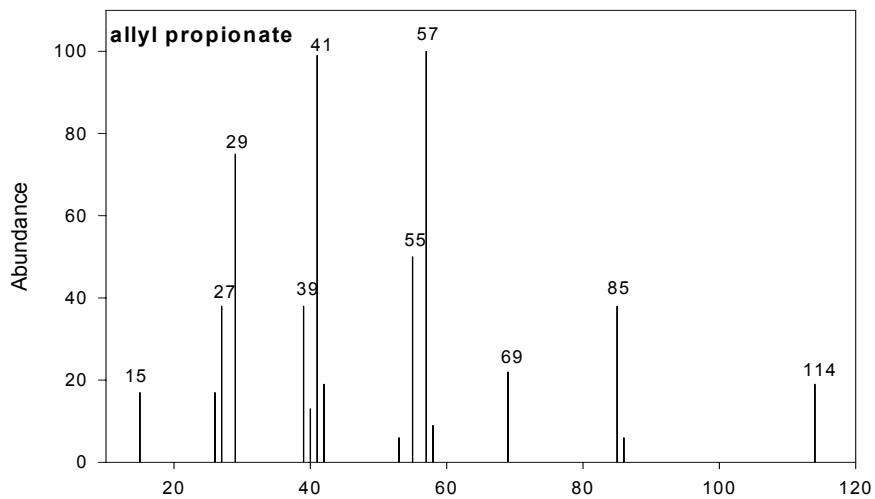
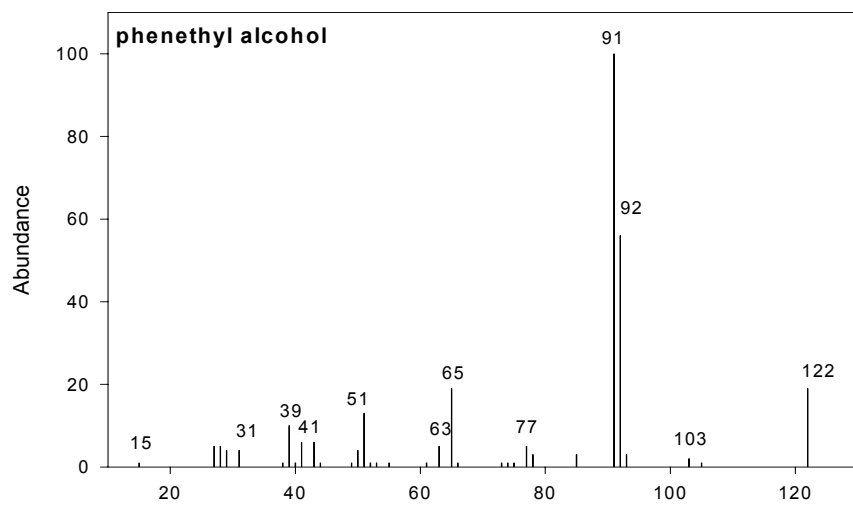
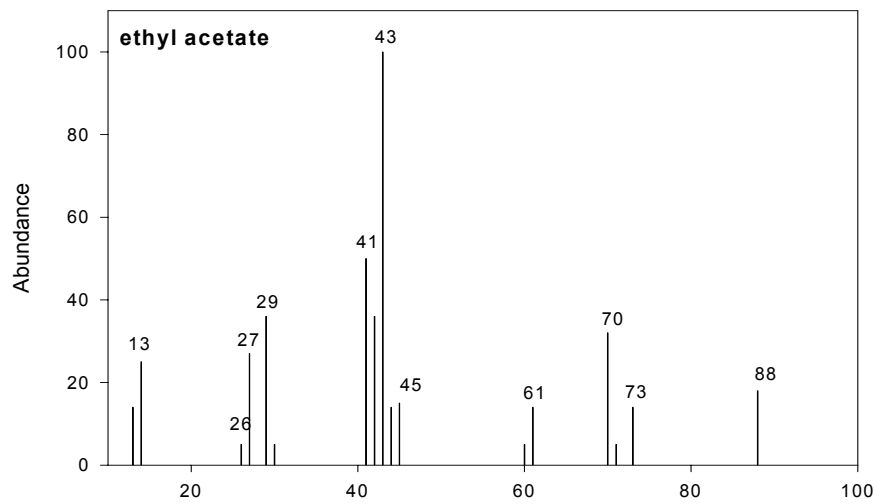


Fig. 10. GC-MS spectrum of identified volatile compounds from *Pichia anomala* SKM-T. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV, ion species were normal ion (MF-Linear) and TIC range was m/z 10 to 300. The spectrometric data were compared with those from the NIST Hewlett-Packard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

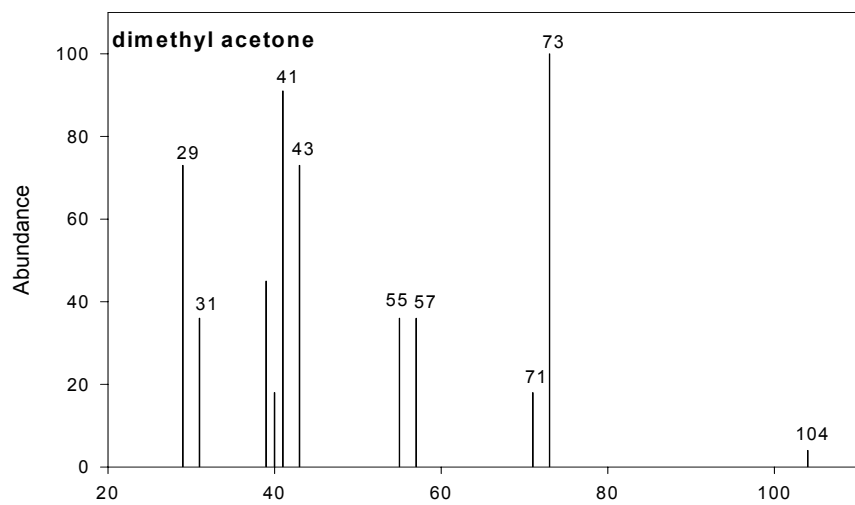
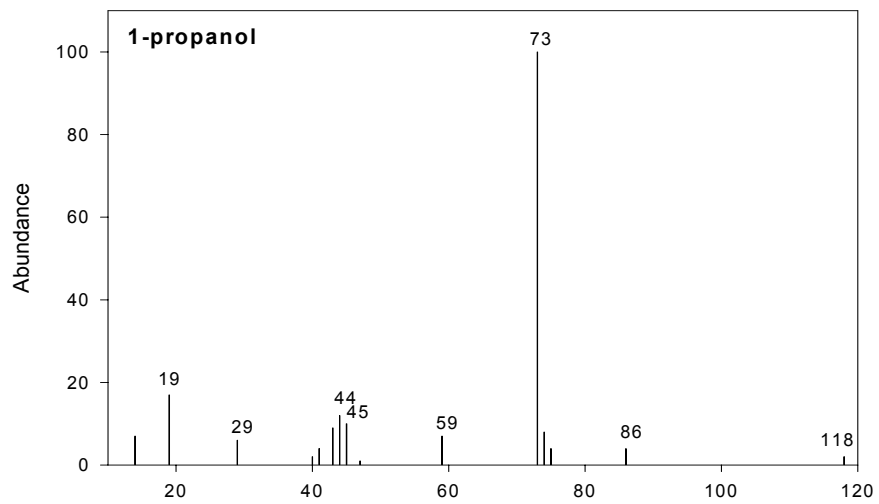
Table 8. Characteristics of identified volatile compounds from *Pichia anomala* SKM-T.

No	R.T.*	Compounds	M.W.	Characteristics
1	4.456	isobutyl acetate	116	ethereal, fermented odor
2	5.627	Internal standard**		
3	6.241	phenethylalcohol	122	rose-honey like odor
4	6.407	unknown		
5	7.636	phenethyl 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	not flavor, 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

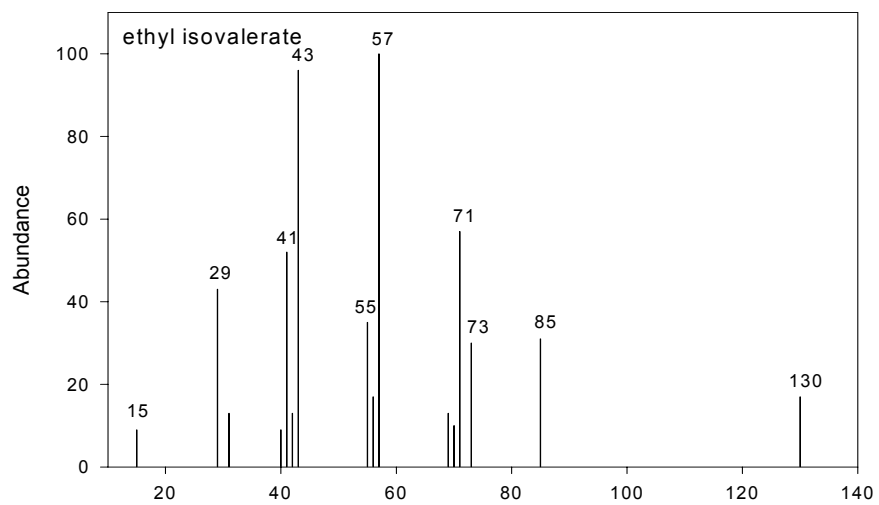
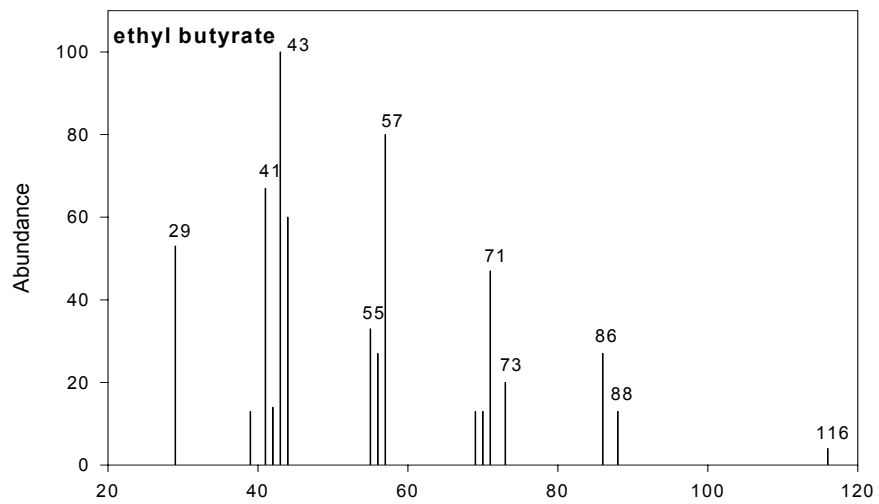
* R.T. is retention time, ** is butyl benzene



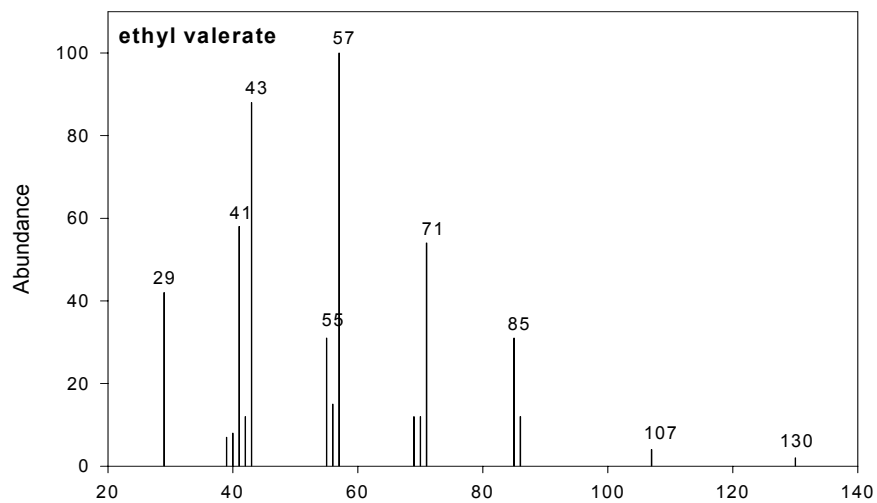
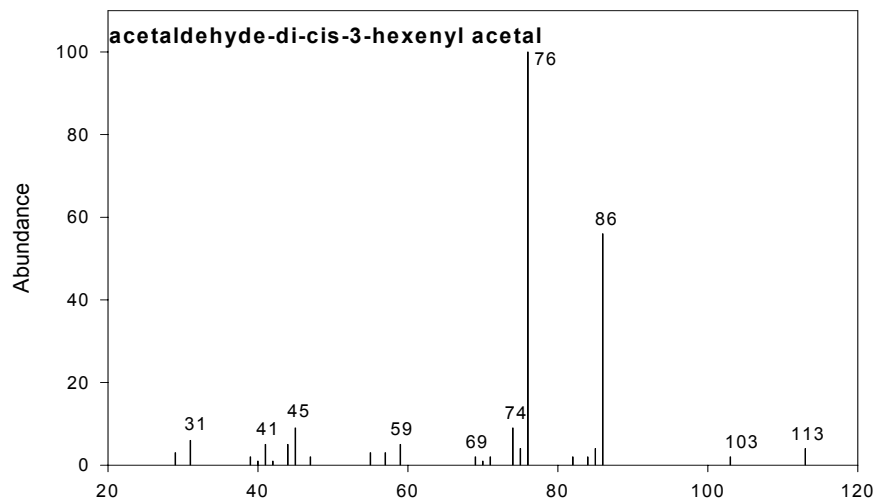
continued



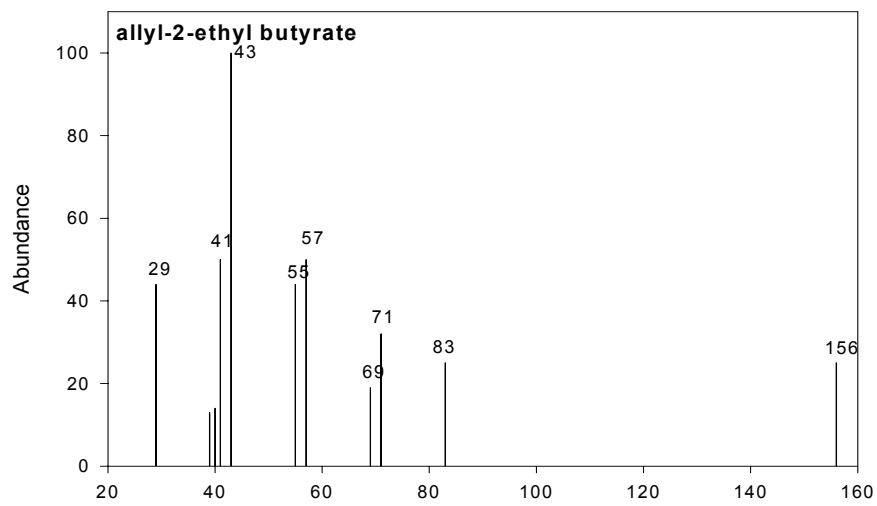
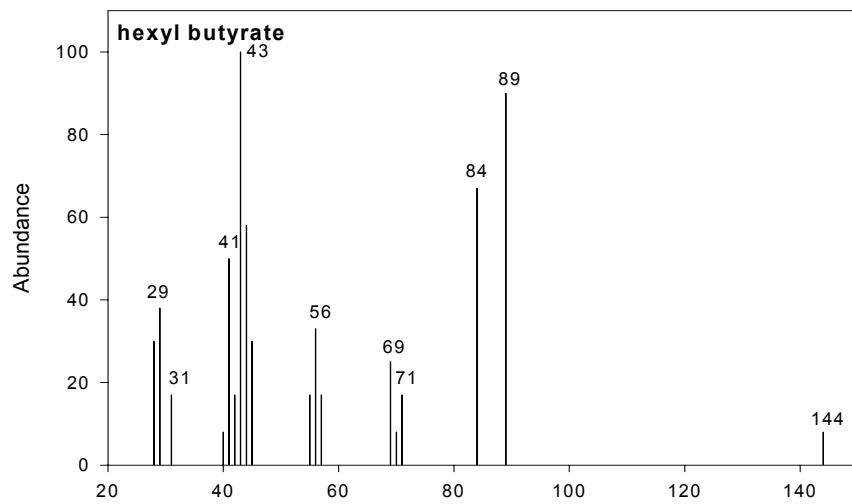
continued



continued



continued



continued

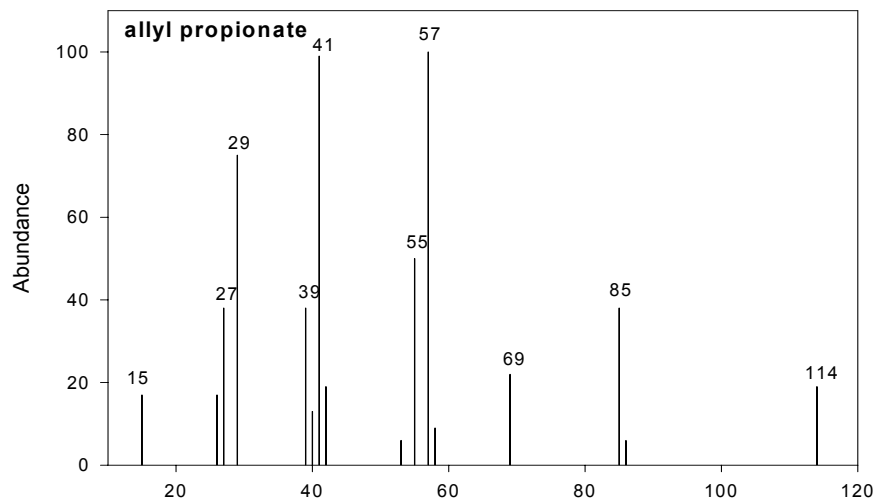


Fig. 11. GC-MS spectrum of identified volatile compounds from *Galactomyces geotrichum* SJM-59. Mass spectra were obtained by electron impact ionization at 70 eV, ion species were normal ion (MF-Linear) and TIC range was m/z 10 to 300. The spectrometric data were compared with those from the NIST Hewlett-Packard 59942C original library mass-spectra.

Table 9. Characteristics of identified volatile 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	phenethylalcohol	122	rose-honey like odor
8	8.704	1-propanol	60	alcoholic, sweet odor
9	9.068	dimethyl acetone	104	ethereal odor
10	9.218	ethyl butyrate	116	fruity, pineapple, banana, ethereal
11	10.175	ethyl isovalerate	130	fruity, apple on dilution odor
12	10.350	acetaldehyde-di-cis-3-hexenylacetal	226	oily-green odor with a sweet taste
13	11.008	ethyl valerate	130	fruity, apple odor
14	11.631	hexyl butyrate	172	fruity, heavy odor
15	12.261	allyl-2-ethyl butyrate	156	oily-fruity odor
16	13.287	allyl propionate	114	sour-fruity odor

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

다. 목적물질의 분리 및 순수분리

Dichloromethan과 pentane의 혼합용매 추출 분획 내의 항진균물질을 순수분리하기 위해 silica gel column chromatography를 실시하여 4개의 분획 (FR 1~4)을 얻었다. 분획마다 감압농축하여 추출용매에 재용해한 후, simple-plate bioassay를 한 결과, FR2에서 항진균력이 확인되었고, FR2 분획은 세 가지 효모가 공통적으로 생산하는 phenylethyl alcohol을 함유한 분획이었다. 그러나 *P. farinosa* SKM-1의 FR2 분획의 *B. cinerea*에 대한 항진균력은 다른 두 효모추출분획보다 현저히 낮아서 산업적으로 유용하지 않을 것으로 사료되었다. FR2 분획을 open column chromatography로 분리정제하여 GC 및 NMR로 분석한 결과 phenylethyl alcohol로 동정되었다.

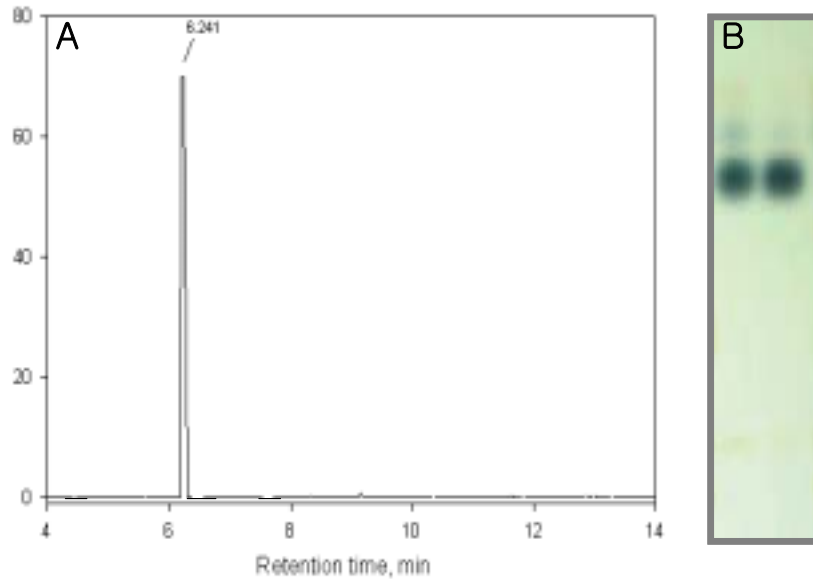


Fig. 12. Chromatograms of antifungal compound from *Pichia anomala* SKM-T. A; GC; Hewlett-Packard 5890A, flame ionization detector; FID, capillary column; HP-1, 30 m × 0.25 mm i.e. × 0.33 mm, injector/detector were held at 25 °C, oven temperature; 50°C (1 min) // 15°C/min // 230°C (1 min). B; TLC; hexane : EtOAc : H₂O = 12 : 8 : 1; upper layer.

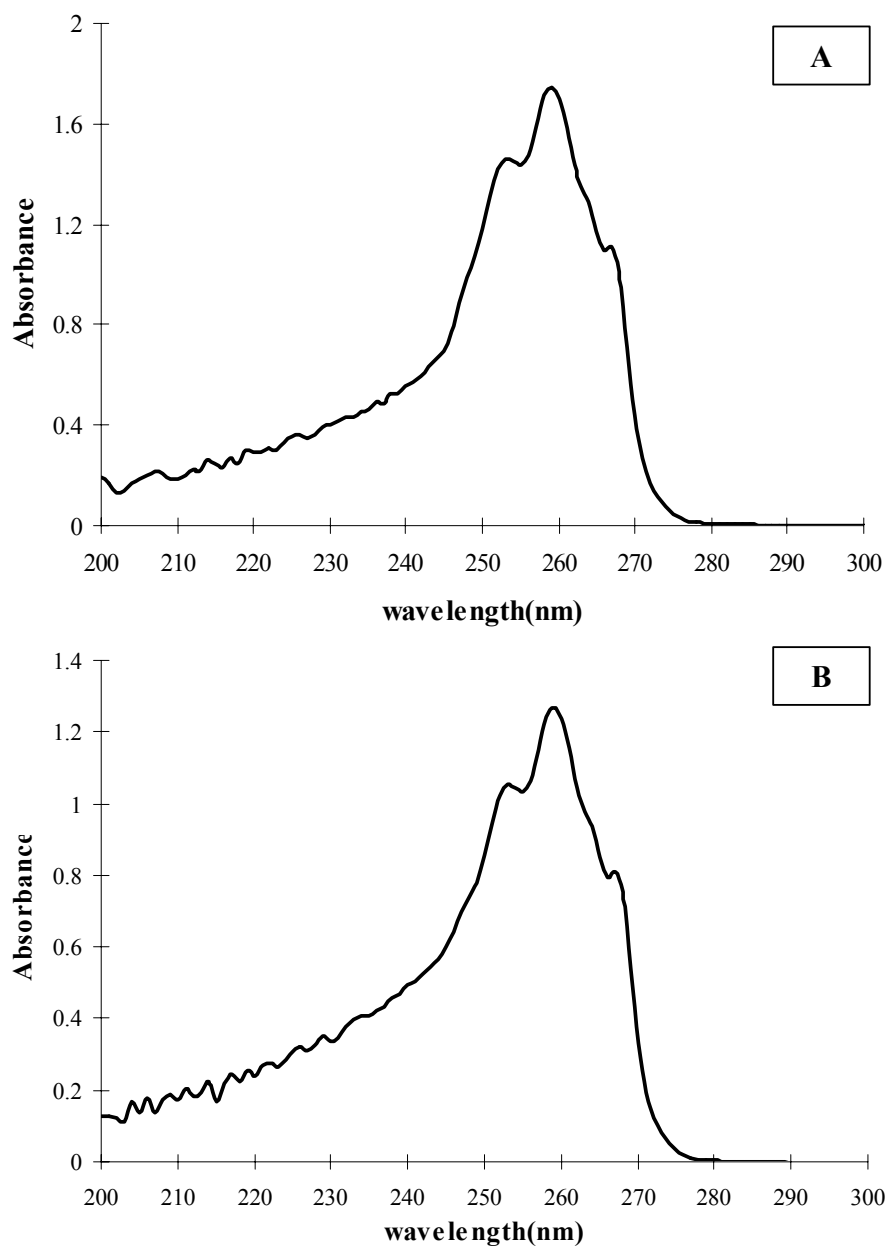


Fig. 13. Scanning of isolates (FR2) from *Pichia anomala* SKM-T
A: isolates, B: authentic 2-phenylethyl alcohol (Sigma)

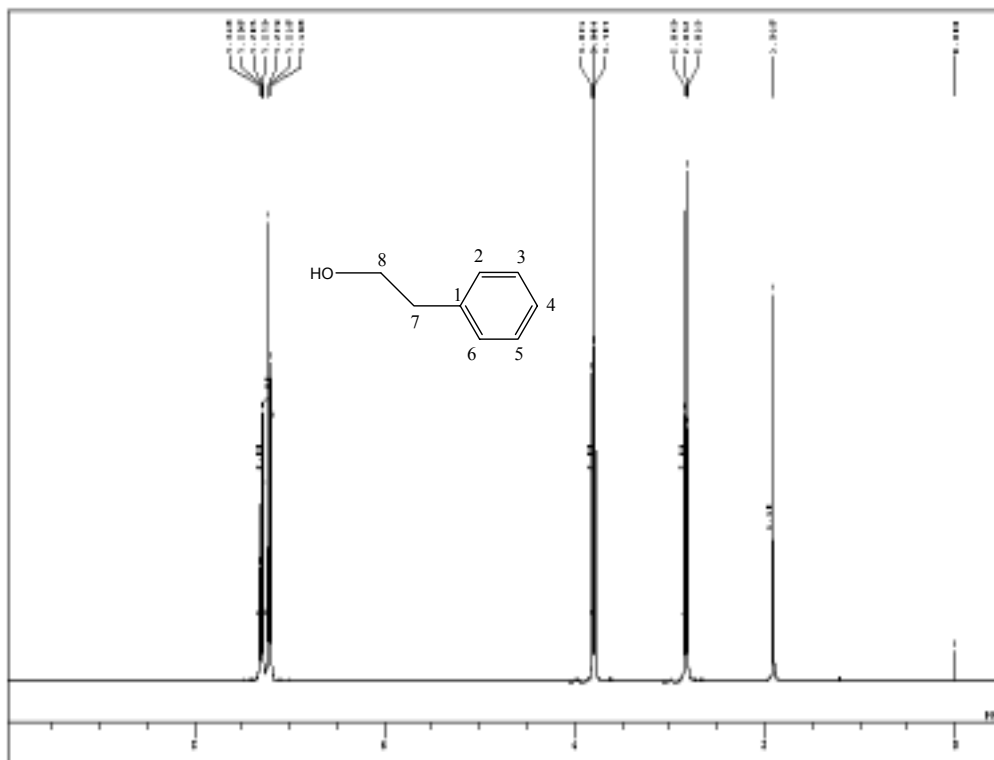


Fig. 14. ¹H-NMR spectral data of phenylethyl alcohol isolated from *Pichia anomala* SKM-T

7.29(2H, t, 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), 1.91(1H, s, OH)

3. 유용미생물처리 딸기의 품질특성

가. 중량감소율 및 수분함량 측정

P. anomala SKM-T와 *G. geotrichum* SJM-59에 dipping한 딸기를 4℃와 25℃에 저장하면서 경시적으로 중량감소율과 수분함량을 측정하였다. Fig. 13에서와 같이 *P. anomala* SKM-T 처리구에서는 딸기의 중량이 90% 이상을 유지하고 있으나 대조구의 경우는 심하게 낮아졌다. *G. geotrichum* SJM-59 처리구의 경우, 곰팡이 발생율은 낮았으나 표면의 붕괴가 심하여 중량이 감소하는 정도가 오히려 대조구보다 높았다. 이와 같은 결과는 Fig. 14에서와 같이 저장기간이 증가하면서 수분함량이 감소했기 때문인 것으로 사료되었으며, *G. geotrichum* SJM-59의 경우, 산업적으로 응용하기 어려운 것으로 사료되었다.

나. 곰팡이 발생율

효모를 처리한 딸기 표면에서의 곰팡이 발생율을 측정한 결과는 Fig. 15와 같다. 저장 초기에는 처리구 간의 차이가 관측되지 않았으나 저장기간이 증가되면서 처리구 간의 곰팡이 발생율에는 현저한 차이를 나타내었다. 즉, 저장 10일째, *P. anomala* SKM-T 처리구에서는 곰팡이 생성이 전혀 관측되지 않은 반면, *G. geotrichum* SJM-59 처리구 표면에서는 약 50% 정도의 곰팡이가 관측되었다. 저장 15일째는 곰팡이 발생이 더욱 증가하였으나 *P. anomala* SKM-T 처리구에서의 곰팡이 발생율 0.3% 정도였다. 이와 같은 썩음곰팡이 저해효과는 *P. anomala* SKM-T가 *G. geotrichum* SJM-59보다 강한 항진균물질을 지니고 있음을 시사하는 것으로 사료되었다.

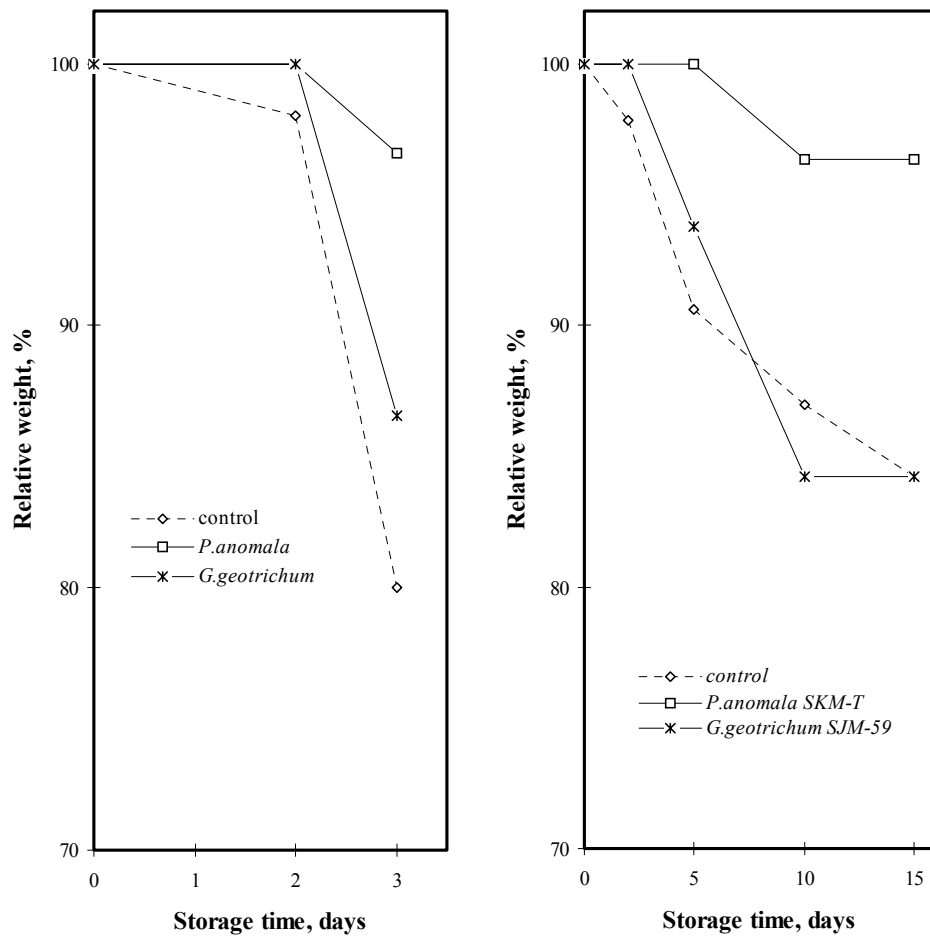


Fig. 15. Relative weight of strawberries treated with *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 during stored at 4°C (Right) and room temperature, 25±3°C (Left).

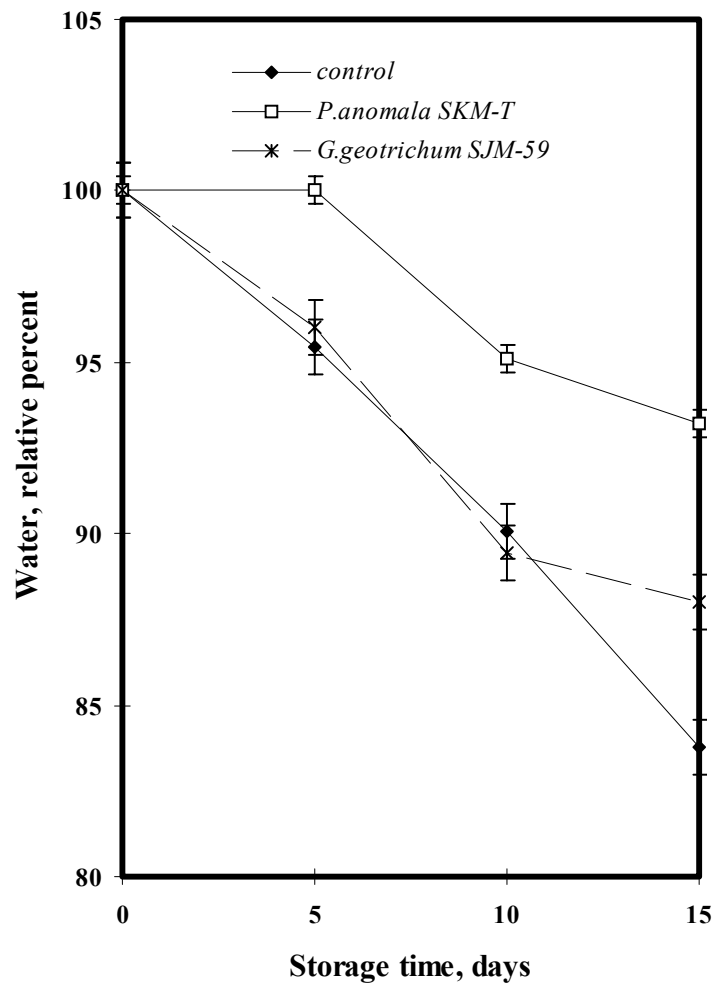


Fig. 16. Relative water content of strawberries treated with *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 during stored at 4°C.

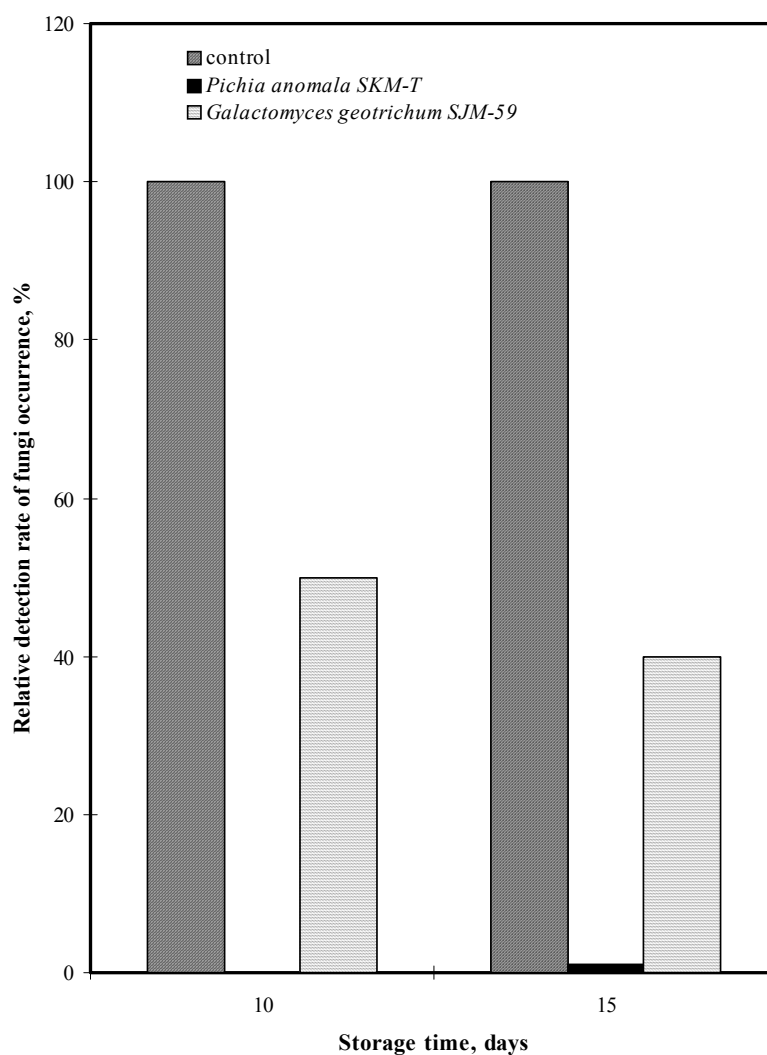


Fig. 17. Relative detection rate of gray molds from the surface of strawberries treated with *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59. Control was not dipping. *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 were harvested at logarithmic phase (O.D. = 1.95±0.5).

다. pH, 산도, 당도 및 비타민 C 함량

대조구의 경우, Fig. 16에서와 같이 저장기간이 증가하면서 pH가 점차로 증가하고 산도는 감소하였다. 이는 비타민 C 함량의 감소에 기인하는 것으로 사료되었다. 그러나 효모 처리구의 경우, 저장기간이 증가되어도 저장 초기보다 pH나 산도의 변화폭이 크지 않았다. 이는 효모가 생산하는 유기산때문인 것으로 사료되었다. 반면에 당도의 경우, 저장기간이 증가하면서 모든 처리구에서 완만히 감소하는 경향을 나타내었다. 아스코르브산 함량이 대조구에서 급격히 감소하는데 비해, 효모처리구에서는 거의 감소하지 않았다 (Fig. 18). 이는 효모가 생산하는 유기산에 의해 딸기의 아스코르브산이 안정화되어 분해되는 속도가 늦어진 것으로 사료되었으며, 이러한 차이는 저장 초기부터 현저히 나타났다.

라. 색도의 변화와 색소의 함량 변화

딸기의 품질 측정에 중요한 지표인 붉은색의 정도 (a 값)는 color meter를 이용하여 측정하였다 (Fig. 19). Fig. 19에서와 같이 a 값은 저장기간이 증가하면서 감소하였다. 저장 5일째의 a 값은 대조구와 *G. geotrichum* SJM-59 처리구가 30 이하로 내려간 반면, *P. anomala* SKM-T 처리구는 30을 유지하였다 ($p = 0.037$).

Fig. 20은 저장기간 중 anthocyanin 함량의 변화를 나타낸 그림이다. Fig. 20에서와 같이, *P. anomala* SKM-T 처리구에서는 anthocyanin 함량의 감소가 완만하였으나, 대조구와 *G. geotrichum* SJM-59 처리구에서는 저장기간의 증가와 함께 anthocyanin 양의 감소가 현저하였다. 따라서 저장기간이 증가하면서 a 값이 감소한 것은 anthocyanin 함량의 감소에 기인하는 것으로 사료되었다.

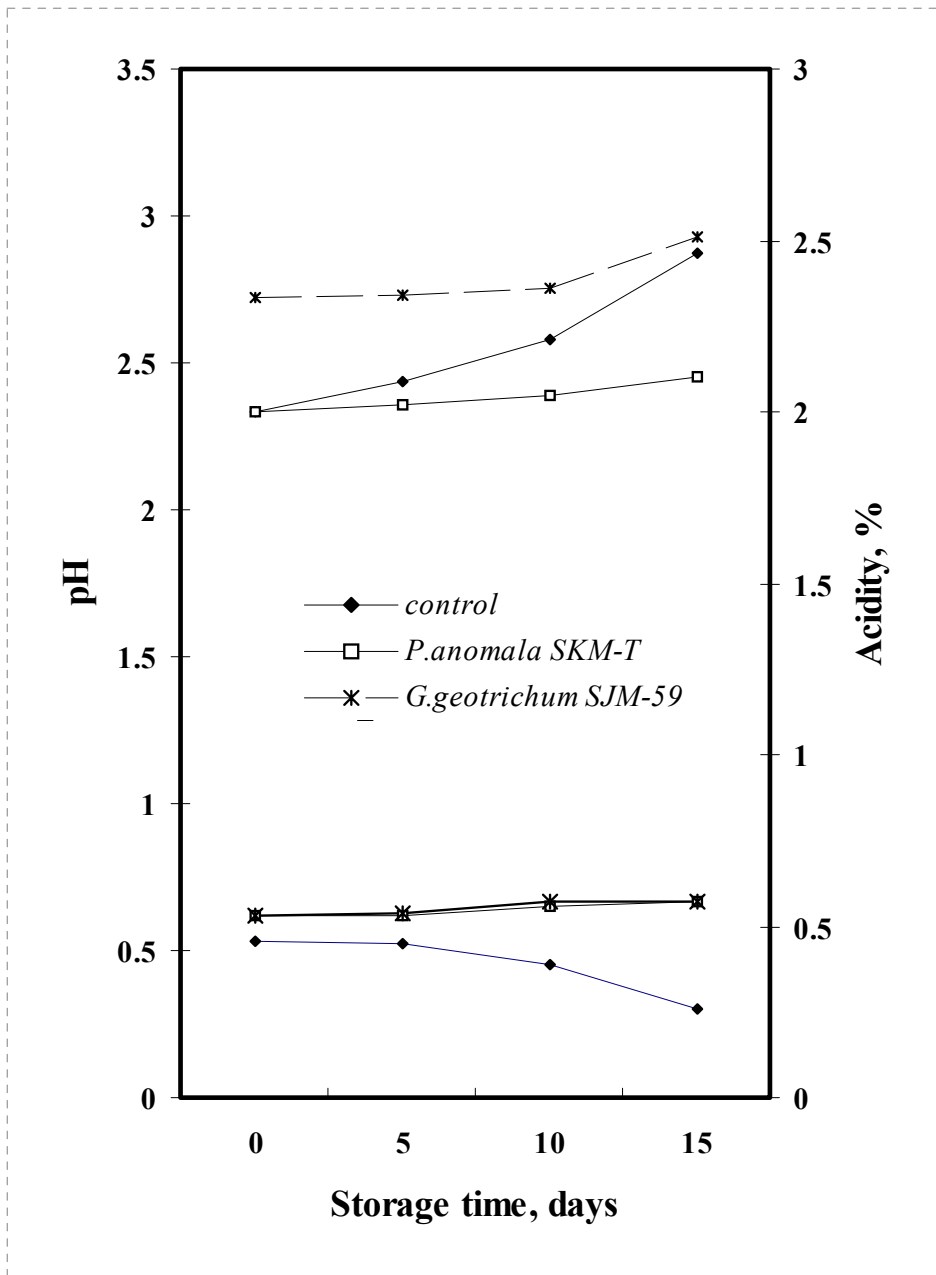


Fig. 18. Change of pH and acidity of strawberries treated with *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

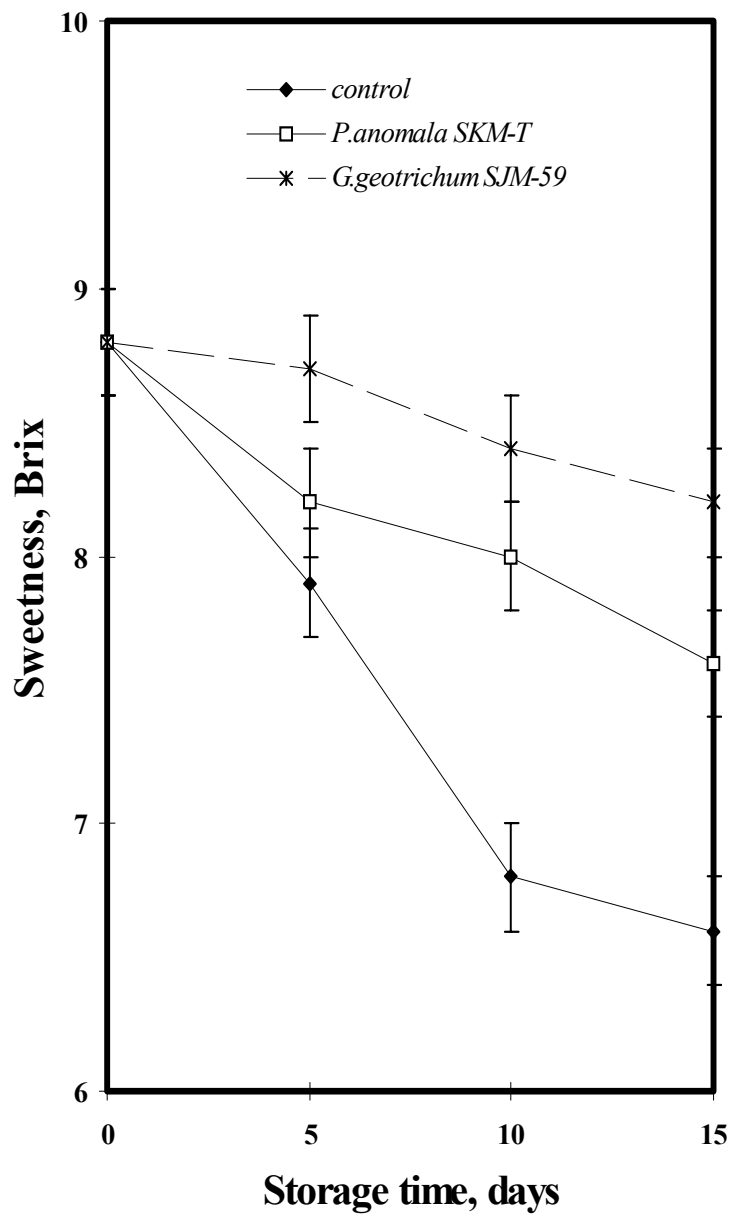


Fig. 19. Change of sweetness of strawberries treated with *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

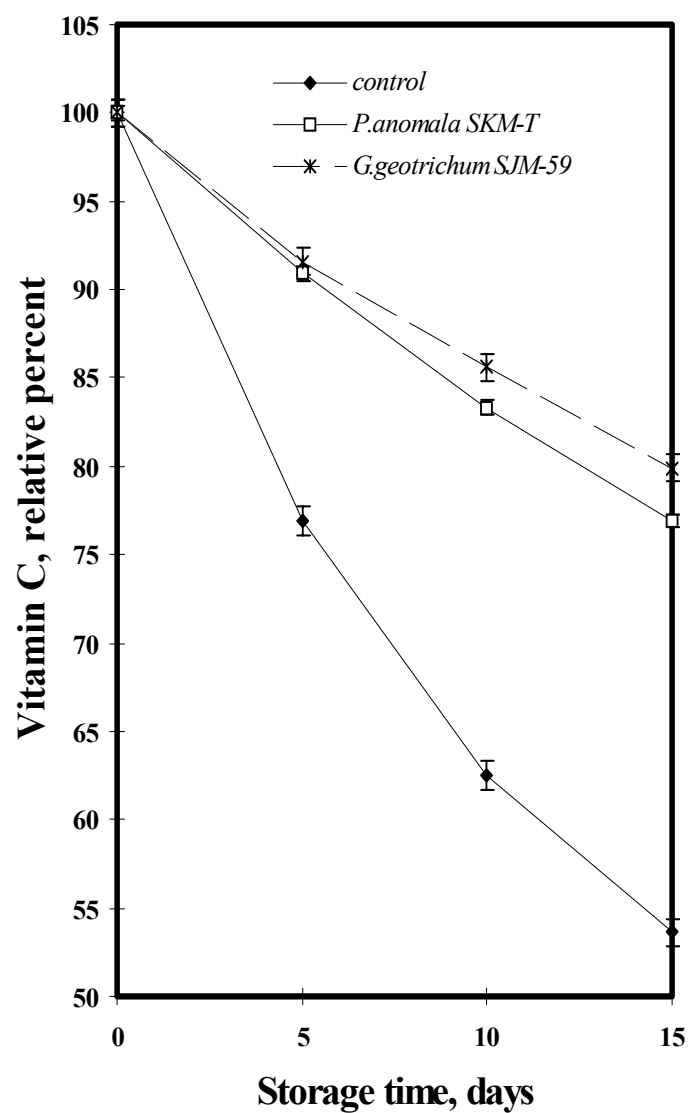


Fig. 20. Relative ascorbic acid content of strawberries treated with *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

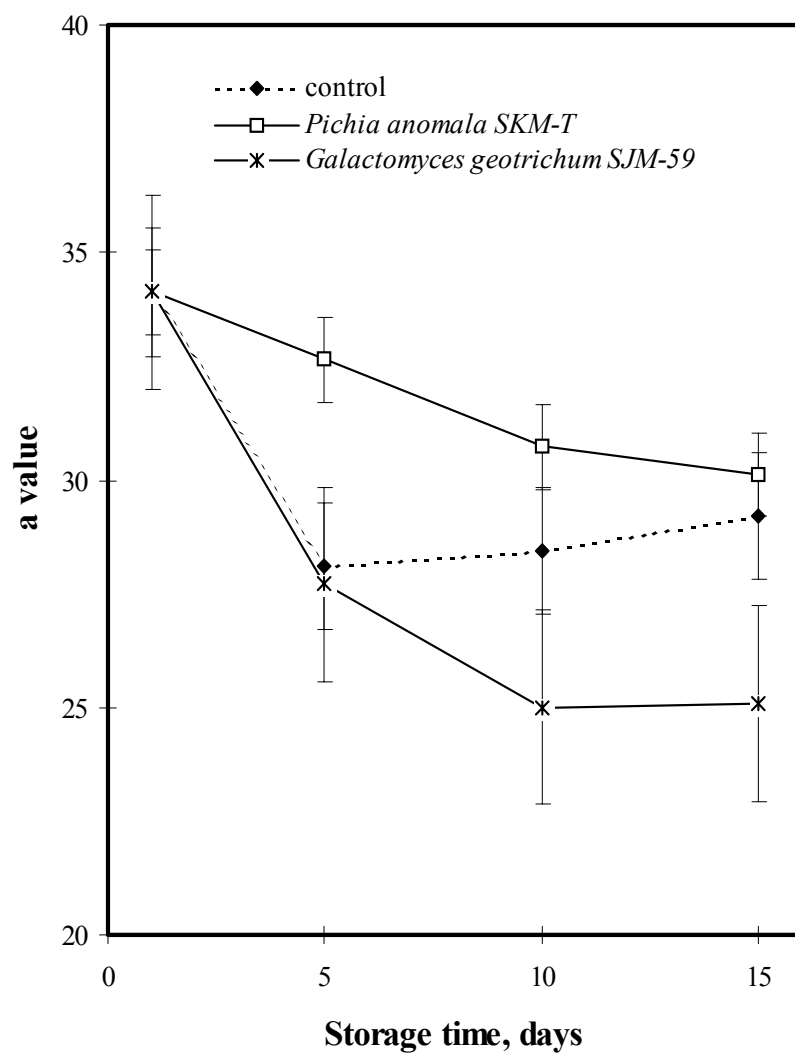


Fig. 21. Changes of redness, a value, of strawberries treated with *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 culture broth during stored at 4°C. The redness was different between the experimental group of *Pichia anomala* SKM-T and control (p=0.037).

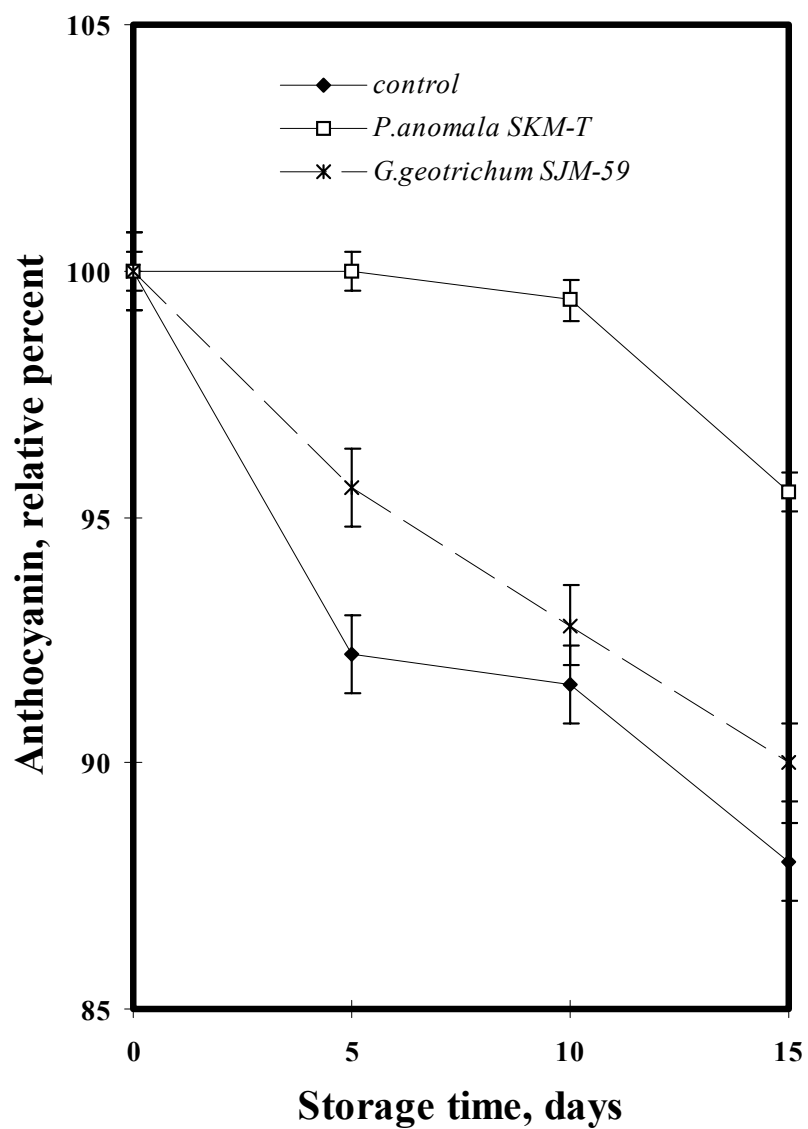


Fig. 22. Relative anthocyanin content of strawberries treated with *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59.

마. 경도 및 texture

P. anomala SKM-T와 *G. geotrichum* SJM-59에 dipping한 딸기의 hardness (경도)와 fracturability (부서짐성)을 측정한 결과는 Fig. 21과 같다. 저장기간이 증가하면서 hardness와 fracturability는 모두 감소하였다. 그러나 *P. anomala* SKM-T 처리구의 경우, 저장 15일 째에도 hardness가 변하지 않았을 뿐만 아니라 ($p=0.041$), 대조구와 저장 딸기의 *G. geotrichum* SJM-59 처리구와는 매우 큰 차이를 나타내었다. 또한 *P. anomala* SKM-T 처리구의 경우, 저장기간이 증가하면서 오히려 hardness와 fracturability가 증가하였다. 이는 *P. anomala* SKM-T가 생산하는 indole-3-ethanol의 효과인 것으로 사료되었다.

바. 관능검사

P. anomala SKM-T와 *G. geotrichum* SJM-59를 처리한 딸기를 4°C에서 15일간 저장하면서 처리구간의 관능적인 차이를 평가하기 위하여 12명의 panel을 대상으로 관능검사를 실시하였다 (Fig. 22). Panel은 각각 제시되는 딸기의 외관, 색, 신선도 및 상품구매의사를 평가하였고, 기호도 검사와 Scheffe's 다중비교검사 결과는 Table 8과 같다. *P. anomala* SKM-T 처리구는 동일한 기간 동안 저장한 대조구나 *G. geotrichum* SJM-59 처리구보다 선호되어, *B. cinerea*의 생육을 저해시키는 것이 관능특성을 향상시키는 것으로 나타났다.

4°C에서 7일간 저장한 *P. anomala* SKM-T 처리 딸기를 실온에서 2일간 저장한 후, 계속하여 9일간 4°C에서 저장하였던 대조구와 *G. geotrichum* SJM-59를 순위법으로 관능검사를 하였다 (Table 9). Table 9에서와 같이 냉장보관후 실온에서 이틀간 저장하였던 *P. anomala* SKM-T가 가장 높게 선호되었다.

이와 같은 결과는 CA/MA 저장 후 실온에 상품을 보관하면 품질이 현저히 저하되는 단점을 보완하는 것으로, *P. anomala* SKM-T의 처리는 딸기의 수출 및 유통 과정에 유용하게 이용될 것으로 사료되었다.

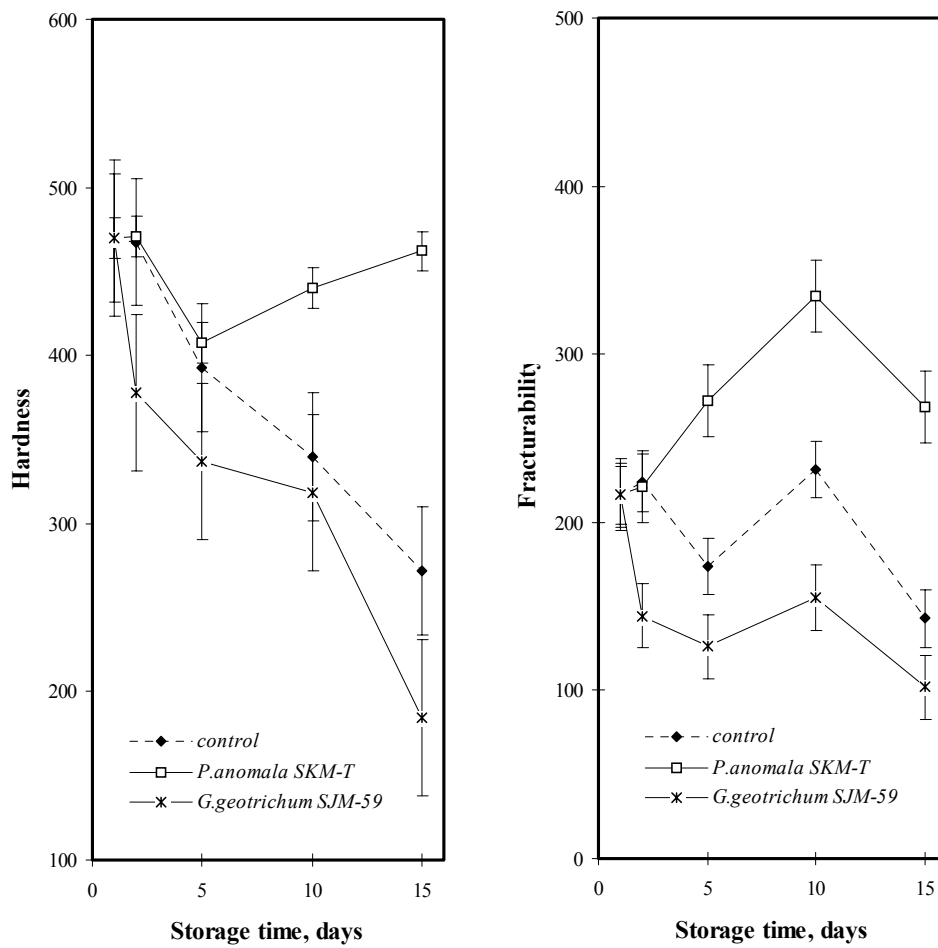


Fig. 23. The changes of texture properties of strawberries dipped into *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 culture broth during stored at 4°C. Left; hardness, $p=0.001$ on 15th day, Right; fracturability, $p=0.041$, $p=0.026$ and $p=0.000$ on 5th, 10th and 15th day, respectively.



Fig. 24. The appearances of strawberries treated with *Pichia anomala* SKM-T, *Galactomyces geotrichum* SJM-59 and control. Control and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 were stored at 4°C for 9 days, *Pichia anomala* SKM-T was stored at 4°C for 7 days and then at room temperature (30±3°C) for 2 days.

Table 10. The preference of strawberries dipped with *Pichia anomala* SKM-T and *Galactomyces geotrichum* SJM-59 culture broth during stored at 4°C for 15 days.

Treatment Storage(days)	Control	<i>P. anomala</i> SKM-T	<i>G. geotrichum</i> SJM-59	p value*
2	14 ^a	30 ^b	27 ^c	0.05
5	30 ^a	13 ^b	29 ^a	0.01
10	33 ^a	18 ^b	19 ^b	0.05
15	34 ^a	13 ^b	25 ^c	0.01

* was obtained via 1 WAY ANOVA and Scheffe's multiple comparison test

Table 11. The preference of strawberries between treated with *Pichia anomala* SKM-T stored at 4°C for 7 days and then stored at room temperature for 2 days and control and/or *Galactomyces geotrichum* SJM-59 stored 9 days at 4°C.

Treatment	Control	<i>P.anomala</i> SKM-T	<i>G.geotrichum</i> SJM-59
Rank	3 (32)**	1 (12)**	2 (28)#

**; p=0.01, #; the number of blank was indicated that results of sensory evaluation.

4. 발표조건의 설정

가. 탄소원의 선정

Nitrogen based medium에 탄소원을 첨가하여 발효 24~48 시간 후의 균체수율을 확인하였다. Table 12에서와 같이 *P. anomala* SKM-T 균주는 배양 3일이 경과하여도 soluble starch를 이용하지 못하였다. 배양 24시간 경과후의 균체수율은 tryptose, maltose, glucose 순으로 높았고, 그 외의 탄소원으로 48시간 이상 배양했을 때 상기 3개의 탄소원과 비슷한 균체수율을 나타내었다. 따라서 발효효율과 경제성을 고려할 때 tryptose와 glucose가 *P. anomala* SKM-T 균주의 효율적인 탄소원인 것으로 판단되었다.

Table 12. Influence of different carbon sources on growth of *P. anomala* SKM-T

Substrate (2.5 g carbon / L)	Biomass (O.D. at 600 nm)	
	24 h	48 h
Glucose	1.856	2.024
tryptose	2.370	2.455
maltose	1.967	2.218
fructose	1.457	2.021
xylose	1.286	1.522
sorbitol	0.894	0.987
lactose	0.332	0.432
soluble starch	0.302	0.321

나. 질소원의 선정

Nitrogen based medium에 탄소원으로 glucose와 tryptose를 가하고 질소원의 종류를 달리하여 탄소원 선정시와 동일한 조건으로 배양하여 균체수율을 측정한 결과는 Table 13과 같다. Table 13에서와 같이 glucose와 tryptose 처리구에서의 균체수율은 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 탄소원으로 glucose을 사용하여 24~48시간 동안 배양한 후 균체수율 및 phenylethyl alcohol의 생산량을 측정하였다. 균체수율은 질소원의 종류와 관계없이 거의 비슷하였으나, phenylethyl alcohol의 양은 phenylalanine을 질소원으로 사용했을 때 가장 많았다 (Table 14).

Table 13. Influence of different nitrogen sources on growth of *P. anomala* SKM-T

Nitrogen sources (2.5 g/L)	Biomass (O.D. at 600 nm)	
	Tryptose	Glucose
Ammonium sulfate	1.578	1.675
Ammonium chloride	1.804	1.590
Ammonium citrate	1.469	2.146
Sodium nitrite	1.080	0.185
Sodium nitrate	1.750	2.108
Urea	1.756	1.028
Peptone	2.076	2.310
Asparagine	1.973	1.839
Glutamic acid	1.126	1.574
Phenylalanine	1.907	1.472

24 h, at 30°C, initial biomass = 0.1 g/L

Table 14. Influences of different nitrogen sources on the aroma production.

Nitrogen sources (2.5 g/L)	Biomass (g/L)	Phenylethyl alcohol (mg/L)
Ammonium sulfate	1.42	0.03
Ammonium chloride	1.65	0.34
Ammonium citrate	1.31	0.57
Sodium nitrite	0.92	0.01
Sodium nitrate	1.59	1.29
Urea	1.59	0.11
Peptone	1.92	19.89
Asparagine	1.82	0.39
Glutamic acid	0.97	0.01
Phenylalanine	1.75	28.48

24 h, 2.5 g/L glucose, at 30°C, initial biomass = 0.1 g/L

다. 온도, pH 및 교반속도의 설정

Glucose와 phenylalanine을 영양원으로 하여 phenylethyl alcohol 생산을 위한 적정 온도, pH 및 교반속도를 설정하였다. Fig. 25~27에서와 같이 효모의 최적 발효 온도로 알려진 30°C, pH 5에서 균체수율이 가장 높았다. 35°C 이상에서는 균체 생장이 현저히 감소하였으며, pH 6 이상에서는 거의 성장하지 못하는 것으로 사료되었다. 교반속도는 100~160 rpm까지는 속도가 증가할수록 균체수율도 증가하였으나 160 rpm 이상에서는 교반속도의 증가와 균체 생산량에는 상관성이 없었다.

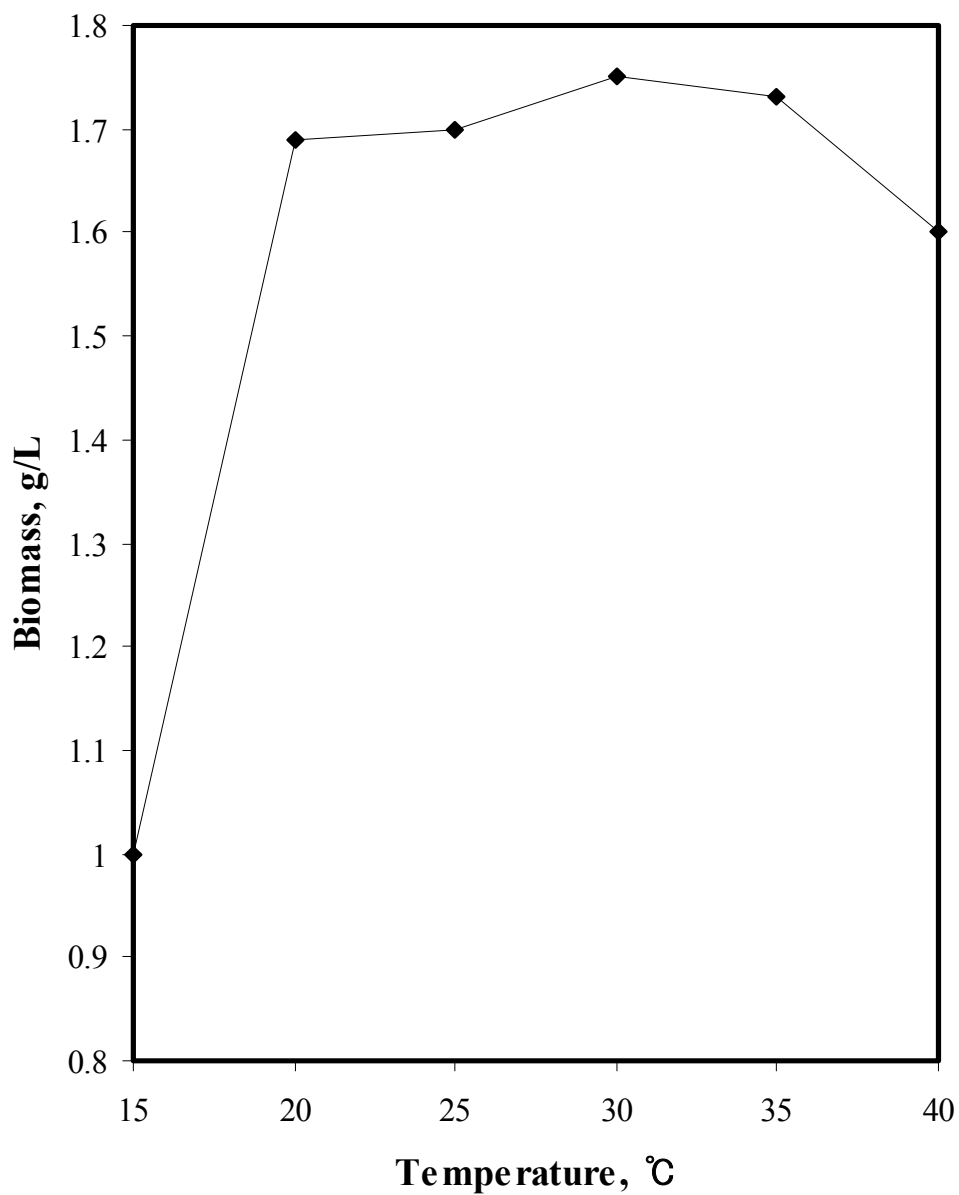


Fig. 25. Effect of temperature on the growth of *Pichia anomala* SKM-T. 24 h, 2.5 g/L glucose, 2.5 g/L phenylalanine, pH 5, 160 rpm, initial biomass = 0.1 g/L

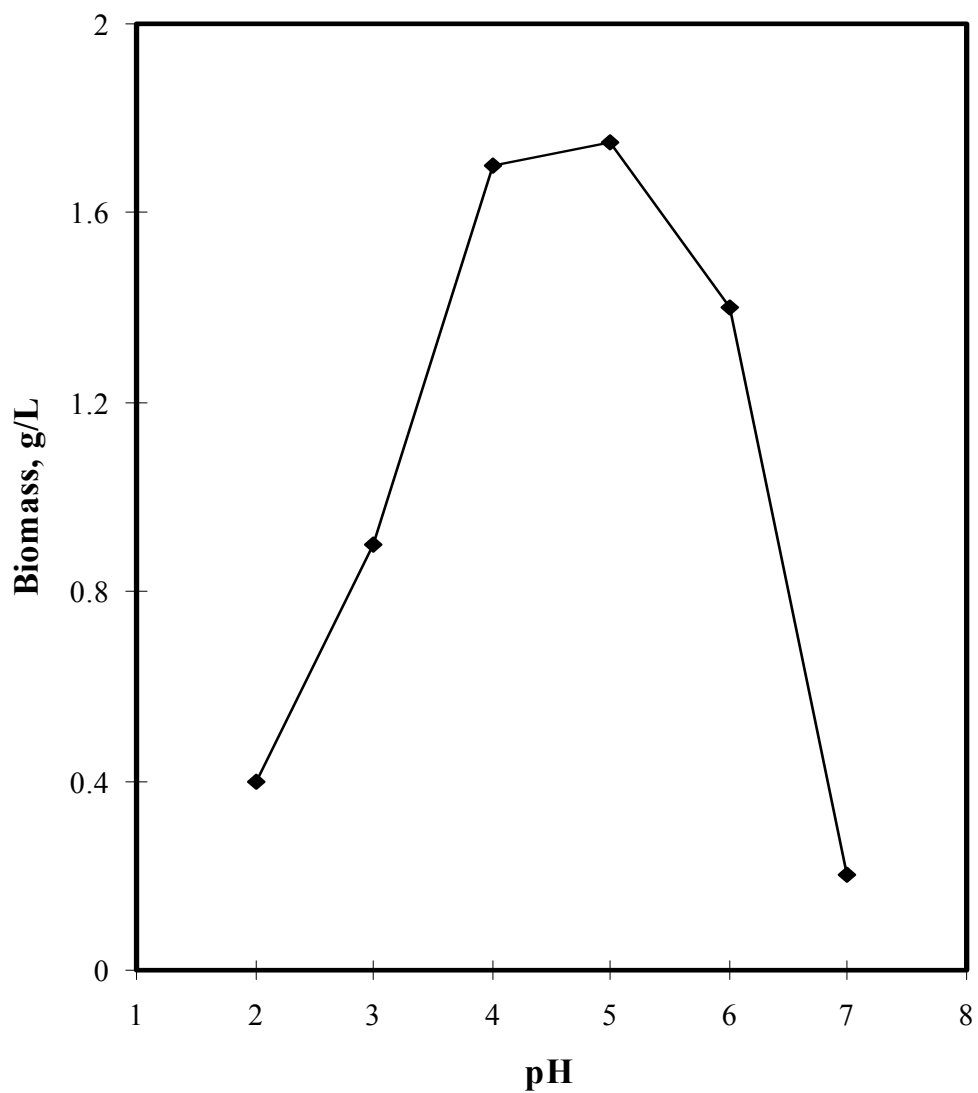


Fig. 26. Effect of various pH on the growth of *Pichia anomala* SKM-T. 24 h, 2.5 g/L glucose, 2.5 g/L phenylalanine, at 30°C, 160 rpm, initial biomass = 0.1 g/L

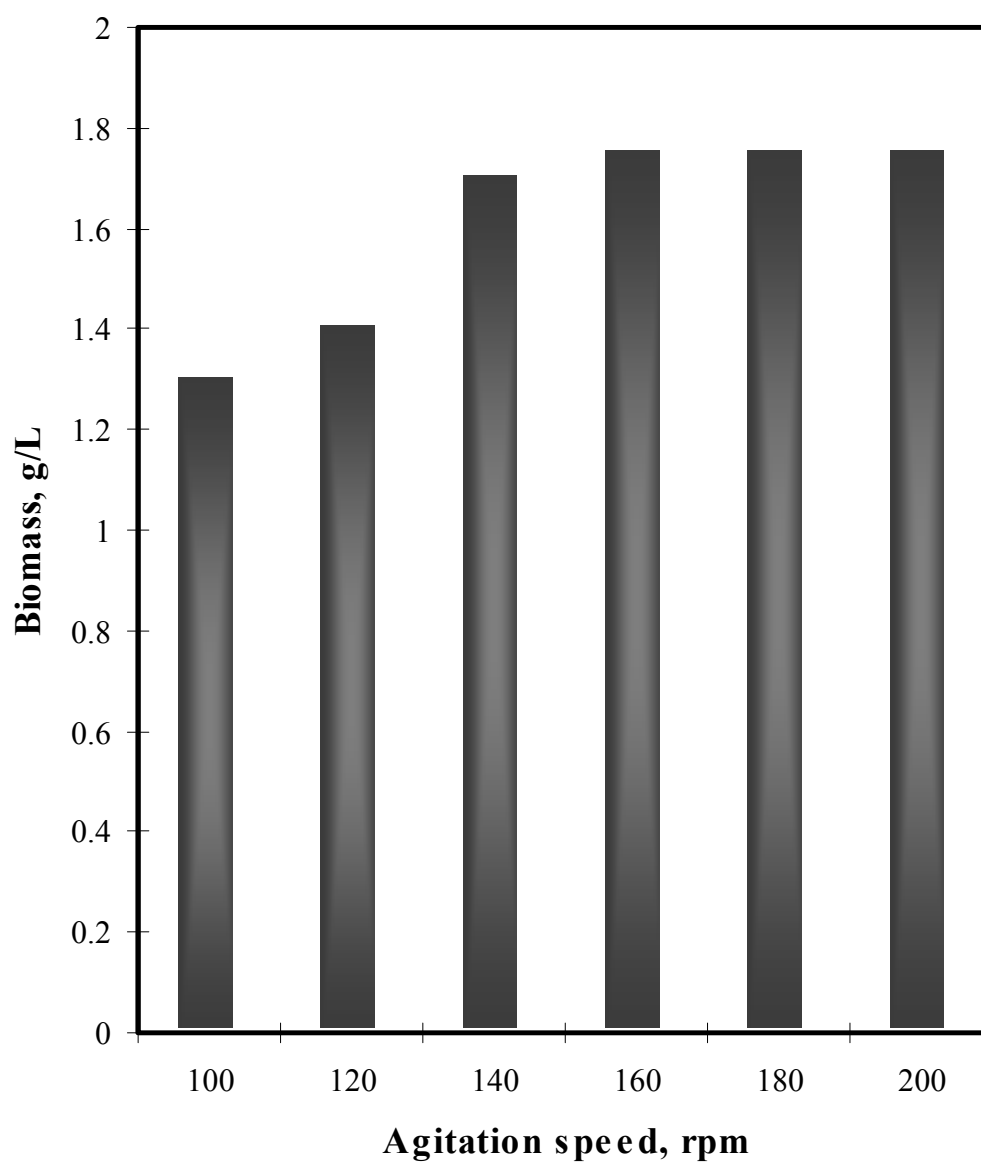


Fig. 27. Effect of agitation speed on the growth of *Pichia anomala* SKM-T. 24 h, 2.5 g/L glucose, 2.5 g/L phenylalanine, pH 5, at 30°C, initial biomass = 0.1 g/L

라. Phenylethyl alcohol 생산을 위한 최적 발효조건의 설정

Table 1과 같은 rotatable central composite design을 이용하여 *P. anomala* SKM-T 균주로부터 phenylethyl alcohol을 최대 생산할 수 있는 최적의 반응조건을 설정하여 Table 16과 같은 결과를 얻었다. Fig. 30에서와 같이 통계모델은 유의적이었으며 validity에는 이상이 없었다. 또한 Fig. 28~29에서와 같이 실험결과도 모델 내에 분포하므로 실험 및 통계모델은 본 실험조건을 만족하는 것으로 사료되었다. Fig. 31~32에서와 같이 최적조건을 얻을 수 있었다.

Pichia anomala SKM-T 균주에 기본염류를 가하고 30°C, 교반속도 160 rpm으로 배양하여 최대의 phenylethyl alcohol을 생산할 수 있는 발효조건은 glucose 0.6%, phenylalanine 0.6%, pH 4.75일 때 이었다.

Table 15. The equation for the optimum condition of phenylethyl alcohol production from *Pichia anomala* SKM-T

$$Y = 384.615 - 9.8888 \times A - 9.78534 \times B + 34.21428 \times C \\ - 88.5635 \times A^2 - 118.792 \times B^2 - 48.4352 \times C^2 \\ + 36.75 \times A \times B + 26.75 \times A \times C + 8.25 \times B \times C$$

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

Table 16. Rotatable central composite design for optimum condition of phenylethyl alcohol production from *Pichia anomala* SKM-T

Trt. No.	Glucose		Phenylalanine		pH		Experimental value
	C	A	C	A	C	A	
1	-1		-1		-1		310
2	-1		-1		1		30
3	-1		1		-1		130
4	-1		1		1		900
5	1		-1		-1		90
6	1		-1		1		10
7	1		1		-1		360
8	1		1		1		10
9	-1.682		0		0		105
10	1.682		0		0		278
11	0		-1.682		0		94
12	0		1.682		0		118
13	0		0		-1.682		43
14	0		0		1.682		567
15	0		0		0		605
16	0		0		0		97
17	0		0		0		403
18	0		0		0		119
19	0		0		0		523
20	0		0		0		538

C; coded value, A; actual concentration (%)

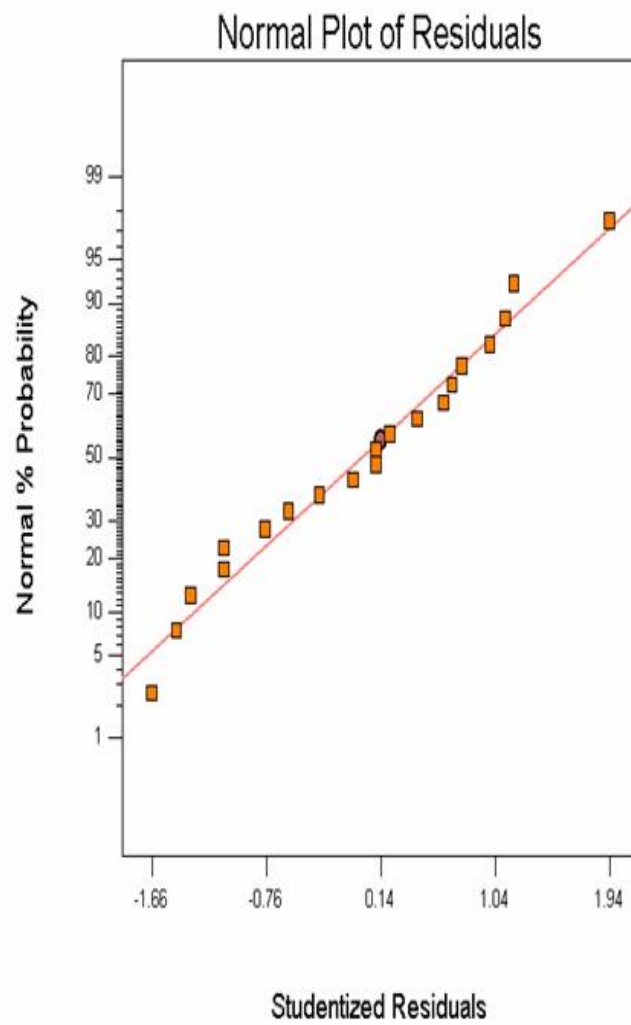


Fig. 28. Normal plot residuals

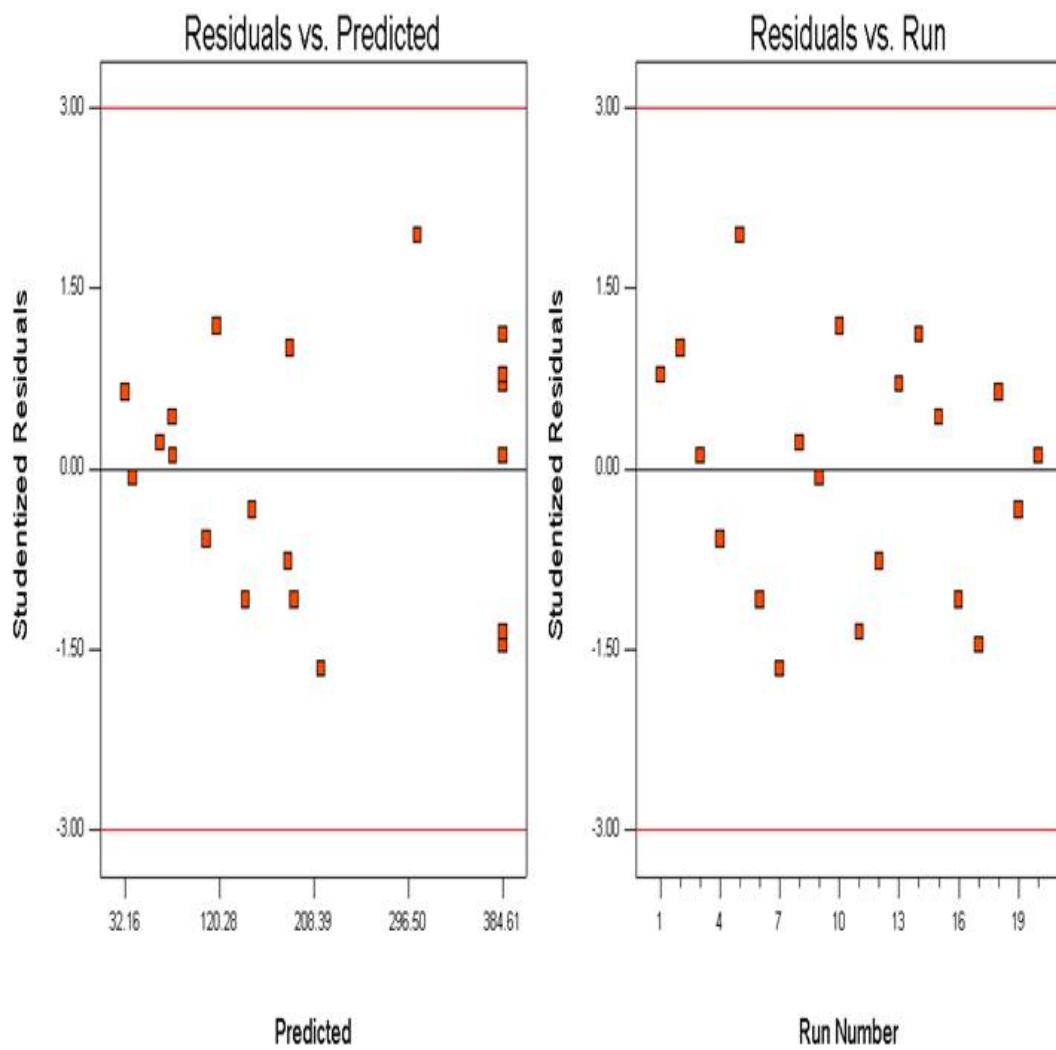


Fig. 29. Validity of rotatable central composite design experiments

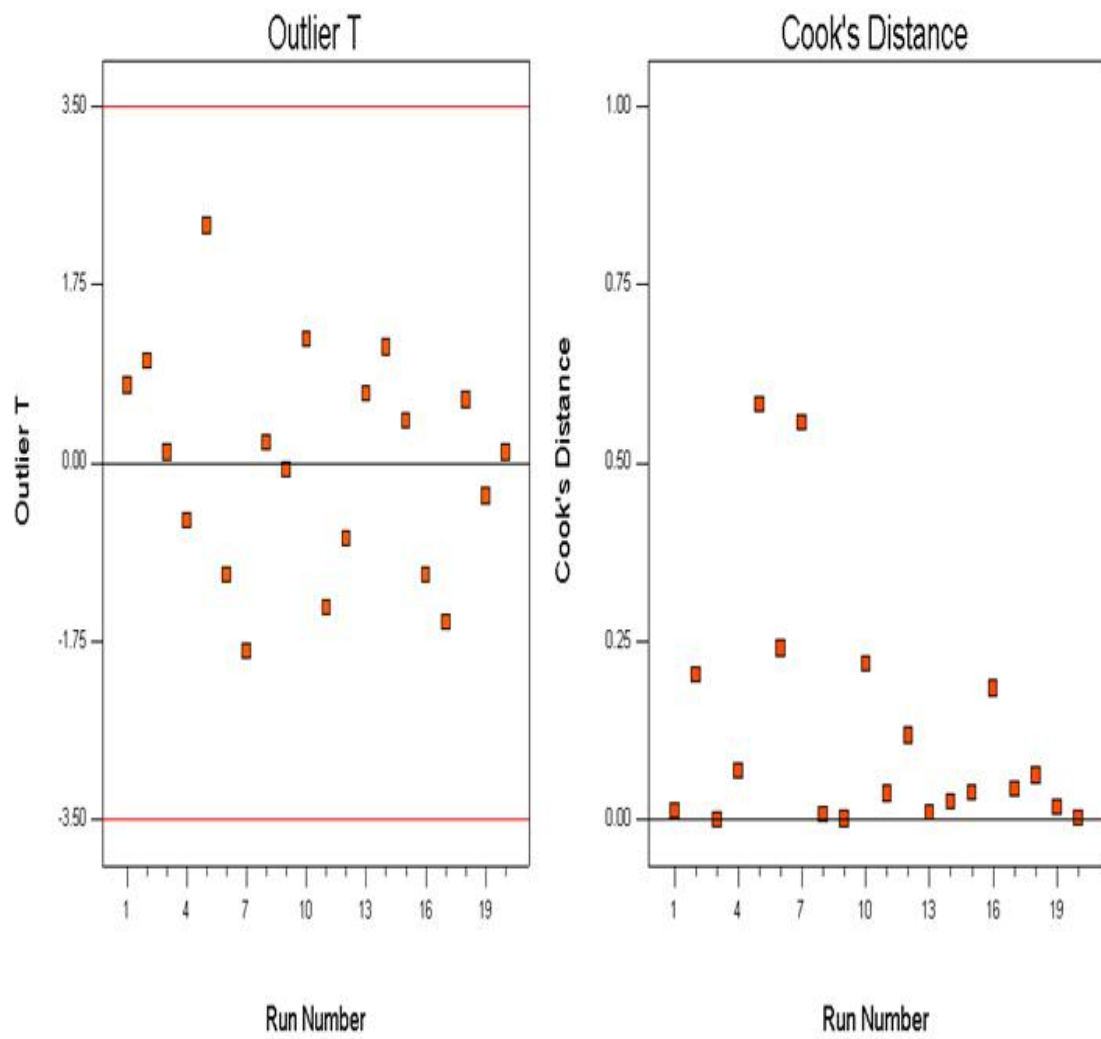


Fig. 30. Validity of rotatable central composite design

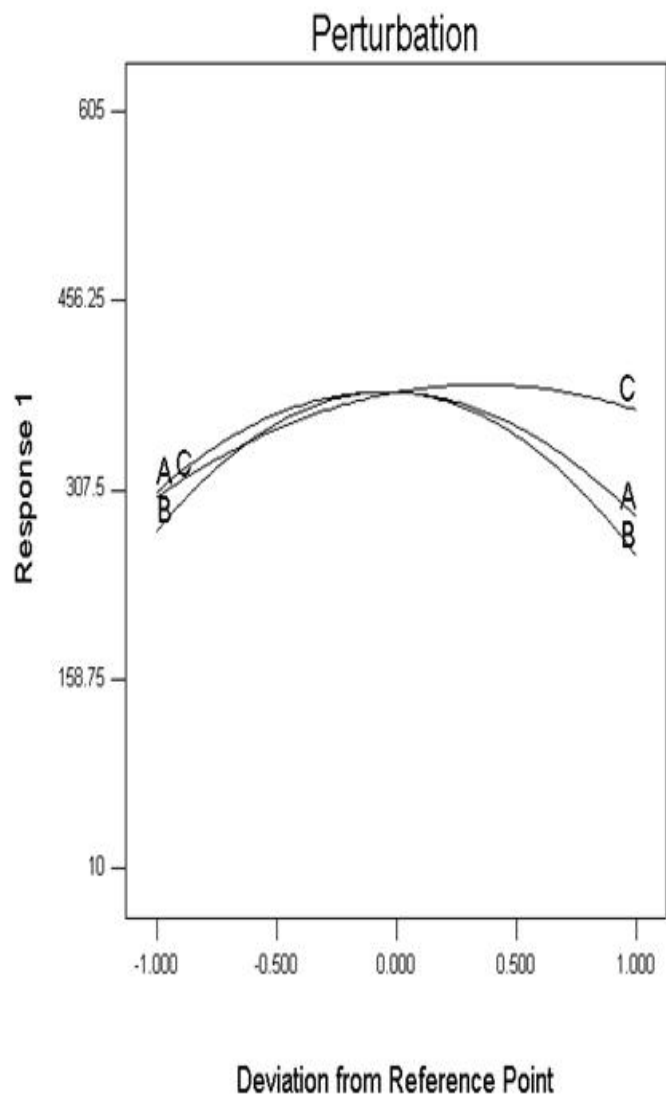


Fig. 31. Perturbation of rotatable central composite design experiments

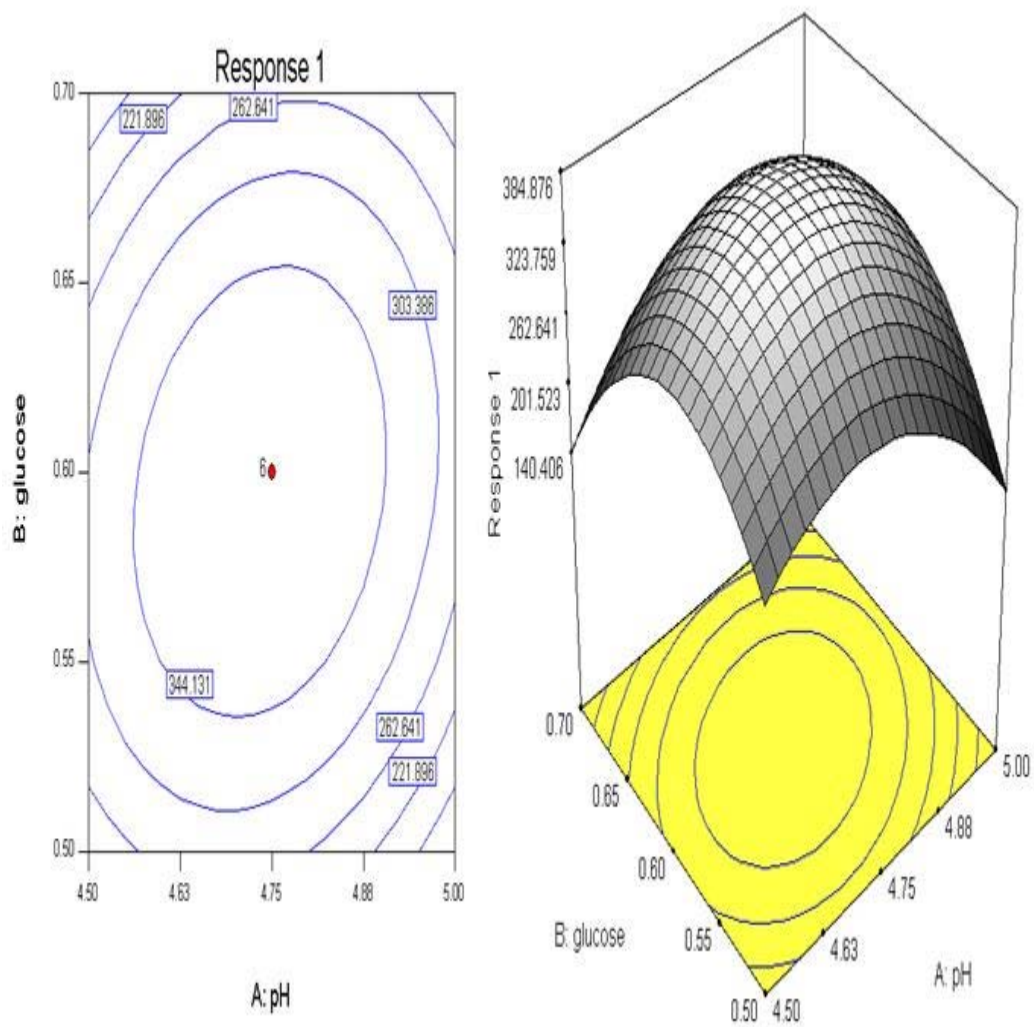


Fig. 32. Response surface diagram and contour map of phenylethyl alcohol production in *Pichia anomala* SKM-T

5. 목적 물질의 작용기전 탐색

가. 에틸렌 생성량 측정

대조구와 phenylethyl alcohol에 침지한 딸기 각각 1 kg을 실온에서 건조하여 수분을 제거한 후, 유리병에 넣고 밀봉하고 실온 (20℃)에서 3시간 동안 incubation하여 에틸렌을 생성을 유도하였다. Fig. 28에서와 같이 에틸렌 생성량은 phenylethyl alcohol 처리구와 대조구 간에 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 그러나 전술한 바와 같이 처리하여 비닐백에 넣고 밀봉한 후 24시간 후의 가스 발생량을 비교한 결과, 대조구에서는 연화속도가 증가되면서 다량의 가스가 생성된 반면, phenylethyl alcohol 처리구에서는 가스 생성량이 적었고 연화속도가 늦는 것이 관측되었다 (Fig. 29). 따라서 phenylethyl alcohol은 에틸렌의 생성에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었고, 딸기의 연화와 에틸렌 생성은 유의적인 상관성이 없다는 보고와 일치하였다. 이는 phenylethyl alcohol이 에틸렌 생성과는 별도의 기전으로 딸기의 연화과정을 조절하는 것으로 사료되었다.

나. L-aminocyclopropane-L-carboxylate (ACC) oxidase 활성

딸기를 물/0.5 mM AVG와 100 μ M의 L-aminocyclopropane-L-carboxylic acid (ACC)로 처리하고 2시간 후에 에틸렌 생성량을 측정한 결과, 대조구와 phenylethyl alcohol 처리구에서의 ethylene 생성량에는 차이가 없었다. 따라서 phenylethyl alcohol은 ACC oxidase의 활성에 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었으며, 이는 ethylene 생성에 영향을 주지 않는 결과와 일치하였다 (Fig. 30).

다. 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate (DAHP) synthase (Ds-Mn/DS-Co) 활성

Fig. 31에서와 같이 대조구 및 처리구 모두 incubation 시간이 경과하면서 DAHP synthase의 활성이 낮아졌다. 이는 phenylethyl alcohol의 처리와는 상관관계가 없는 것으로 나타났다. 따라서 phenylethyl alcohol은 DAHP synthase의 활성에는 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었다.

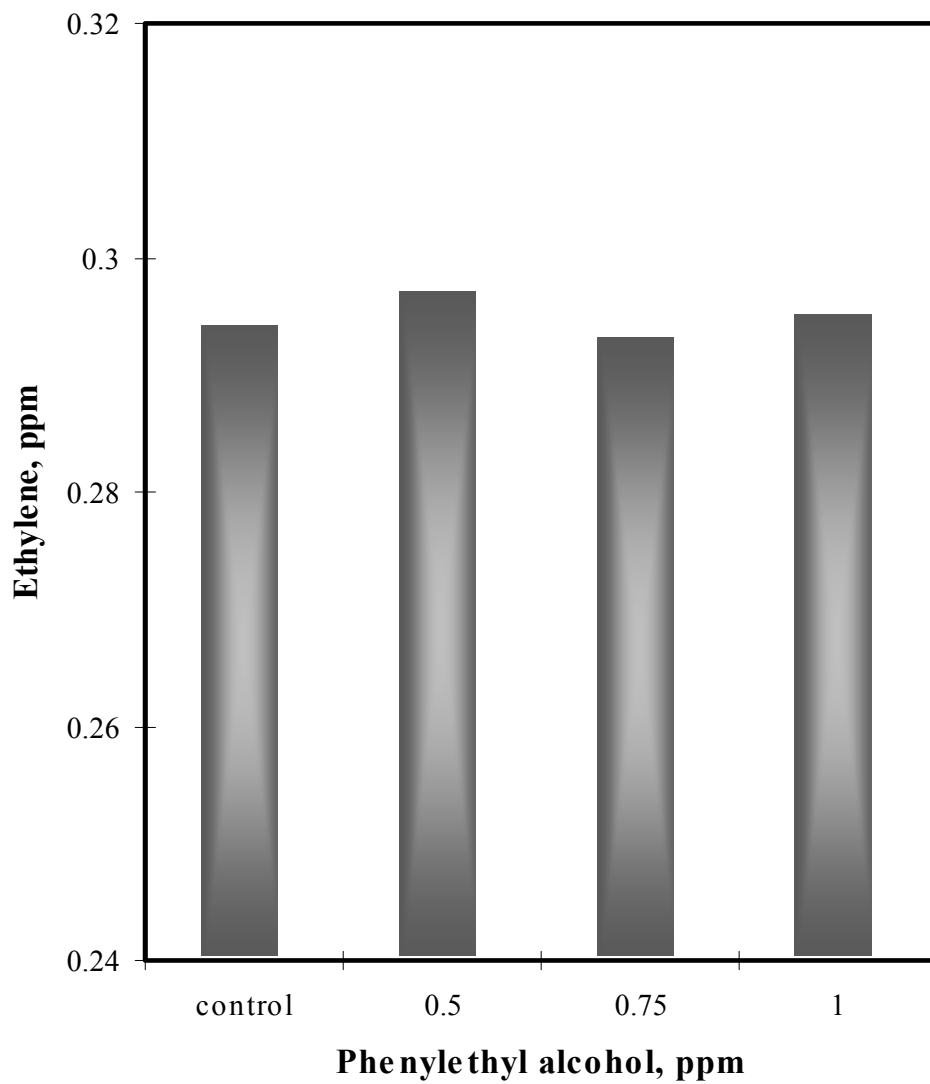


Fig. 33. Ethylene production in strawberries treated with phenylethyl alcohol.

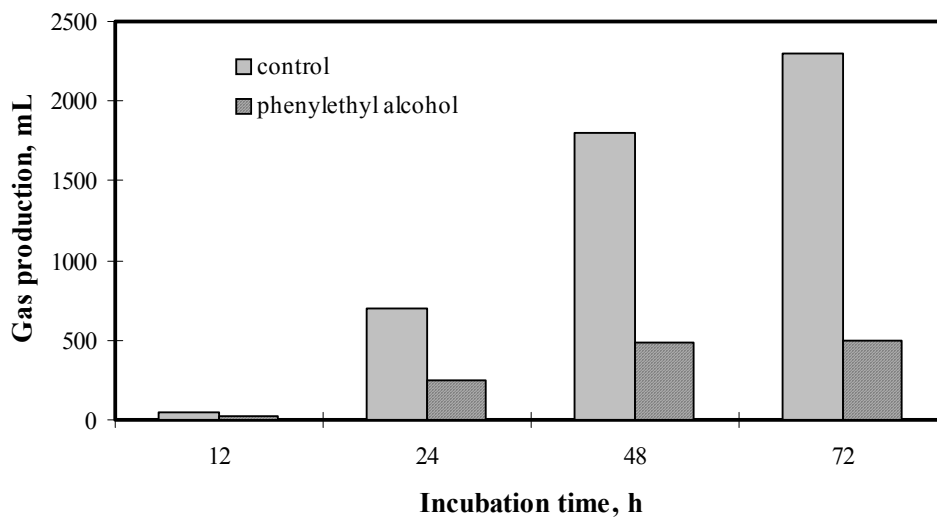


Fig. 34. Gas production in strawberries treating phenylethyl alcohol at 20 °C.

Right; phenylethyl alcohol treating group, Left; control treating distilled water

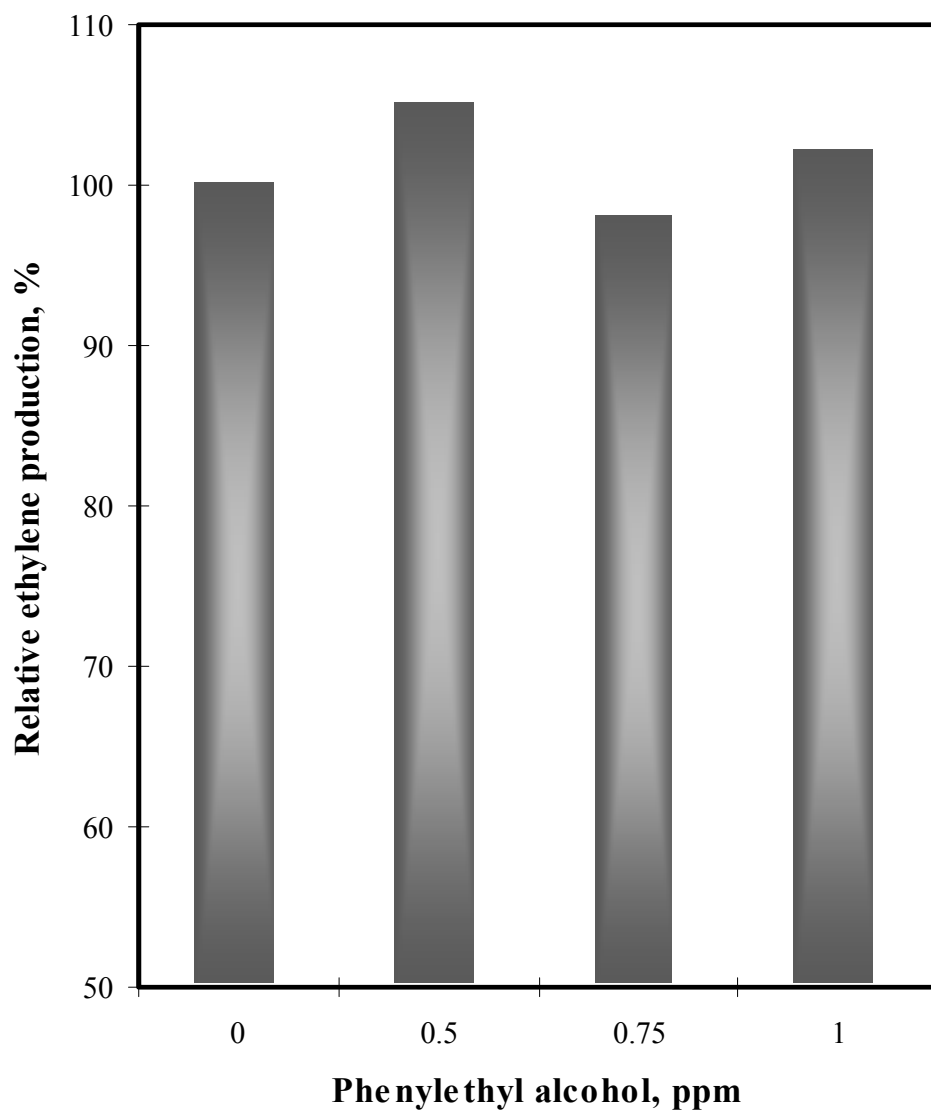


Fig. 35. Influence on ACC oxidase activity of phenylethyl alcohol isolated from *Pichia anomala* SKM-T

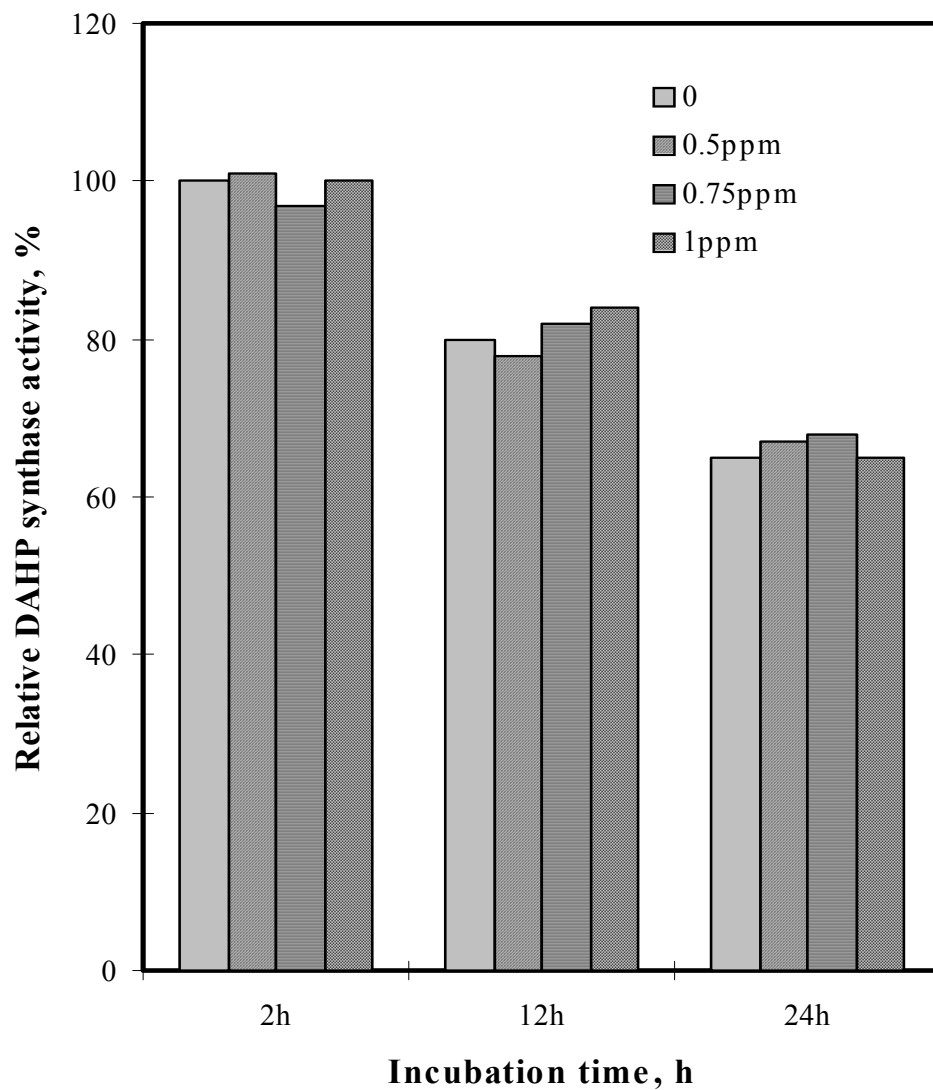


Fig. 36. Influence on DAHP synthase activity of phenylethyl alcohol isolated from *Pichia anomala* SKM-T

라. Phenylalanine ammonia lyase (PAL) 활성

Phenylethyl alcohol을 처리하여 4°C에서 15일간 저장한 딸기에서 PAL을 추출하여 그 활성을 측정된 결과는 Fig. 32와 같다. Fig. 32에서와 같이 대조구보다 처리구에서의 PAL의 활성이 낮았으며, phenylethyl alcohol의 처리농도가 높을수록 PAL의 활성도가 낮았다.

Phenylethyl alcohol이 PAL을 분자수준에서 저해하는지를 알고자, 대조구 및 처리구에서 RNA를 추출하여 그 발현양을 비교한 결과는 Fig. 33과 같다. Fig. 33에서와 같이 phenylethyl alcohol의 처리농도가 높을수록 *PAL1*의 발현양이 감소하였다. 반면에 *PAL2*의 발현양에는 영향을 미치지 않는 것으로 관측되었다.

Phenylethyl alcohol에 의한 *PAL1*의 저해가 anthocyanin의 축적에 미치는 영향을 알기위해, 미성숙한 녹색의 딸기에 phenylethyl alcohol을 처리하여 실온에서 3일간 incubation하였다. 대조구에서는 anthocyanin의 축적으로 붉은색으로 변하는 반면, phenylethyl alcohol 처리 딸기는 초기의 녹색을 유지하였으며 이러한 효과는 약 7일간 지속되었다. 이들 딸기로부터 RNA를 추출하여 *PAL1*의 발현양을 비교한 결과, 대조구에서는 *PAL1*이 강하게 발현되는 반면, phenylethyl alcohol 처리구에서의 *PAL1*의 발현양은 미성숙한 녹색의 딸기에서와 유사하였다 (Fig. 34).

Phenylethyl alcohol은 PAL의 irreversible - competitive inhibitor로 판단되었고, K_m 값은 0.9 μM 이었다 (Fig. 35). Phenylethyl alcohol은 PAL의 기질인 phenylalanine과 구조적으로 유사하며 이러한 구조적 유사성이 PAL의 competitive inhibitor로 작용하는데 기여한 것으로 사료되었다.

PAL은 식물의 연화와 관련된 효소로, 이 효소의 활성 증가와 더불어 과실에서의 연화가 진행되는 것으로 보고되어 있다. 따라서 *Pichia anomala* SKM-T 및 그로부터 추출된 phenylethyl alcohol을 딸기에 처리하였을 때, 딸기의 연화속도가 지연되고 딸기의 유통기간이 증가된 것은 phenylethyl alcohol에 의한 PAL의 저해효과로 사료되었다. 비록 K_m 값이 기 보고된 PAL inhibitor보다 낮을지라도 phenylethyl alcohol은 PAL의 효과적인 경쟁적 저해제로서 phenylethyl alcohol의 처리는 PAL의 활성을 영구히 상실시키며, 이러한 저해효과는 분자수준까지 이어지는 것으로 사료되었다.

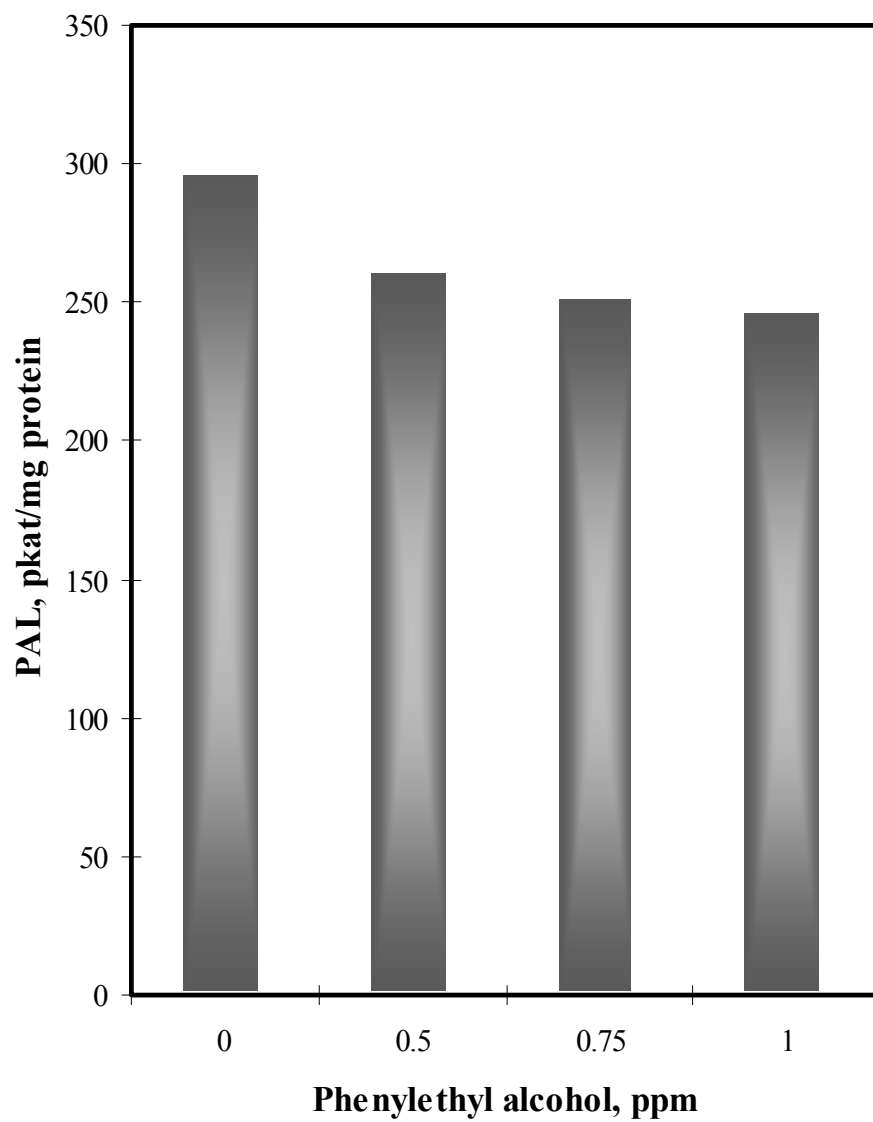


Fig. 37. Influence on PAL activity of phenylethyl alcohol isolated from *Pichia anomala* SKM-T

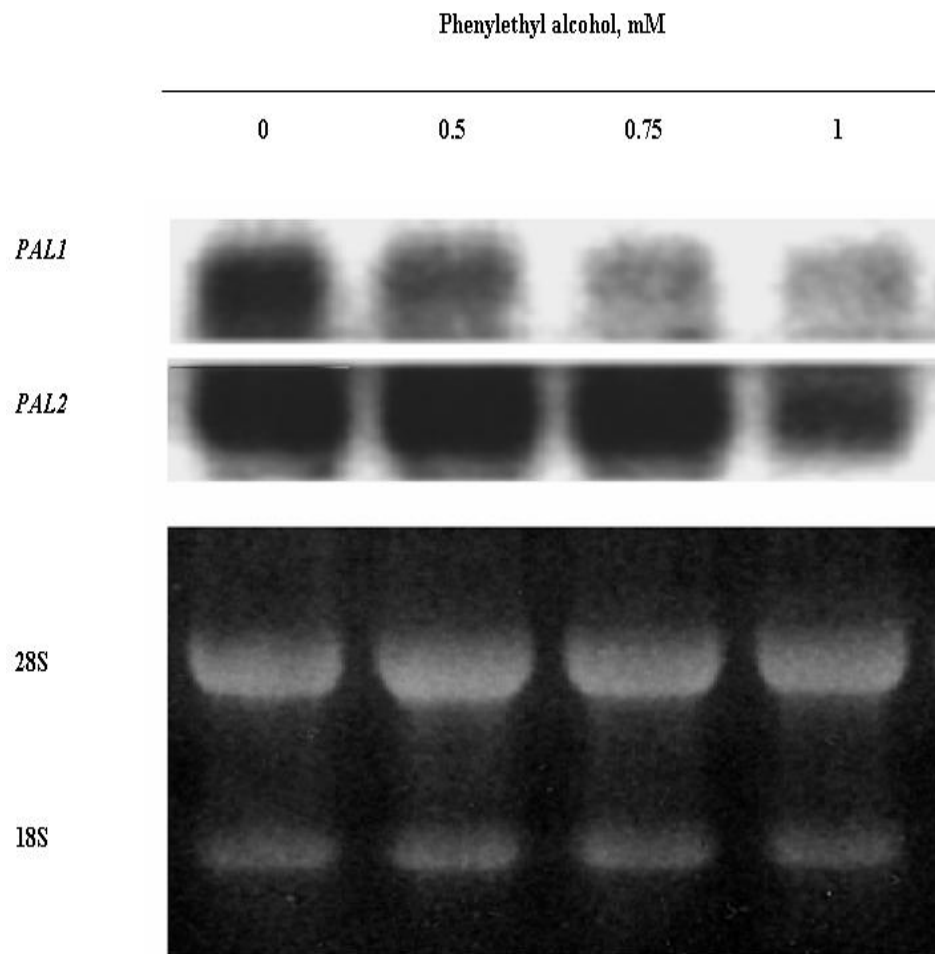


Fig. 38. Northern hybridization analysis for *PAL* mRNA accumulation in phenylethyl alcohol treated strawberries

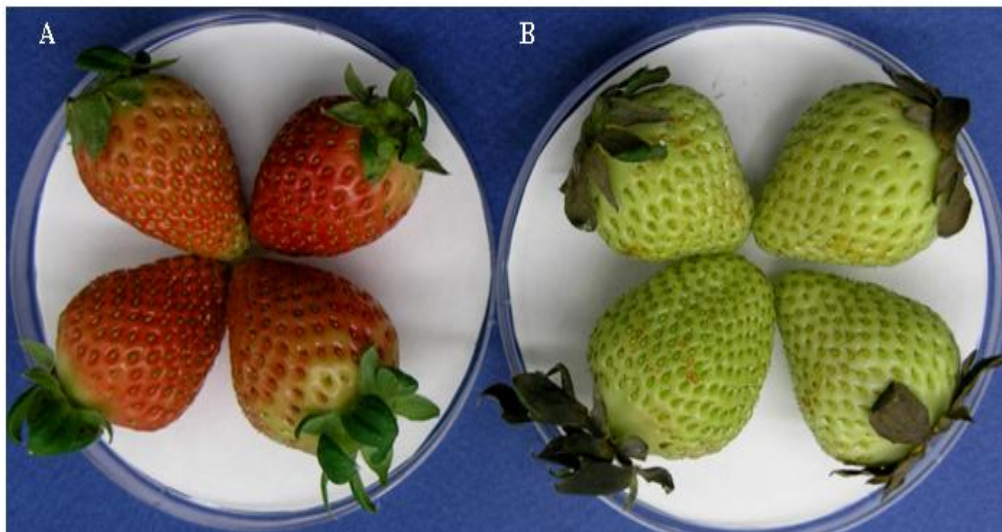
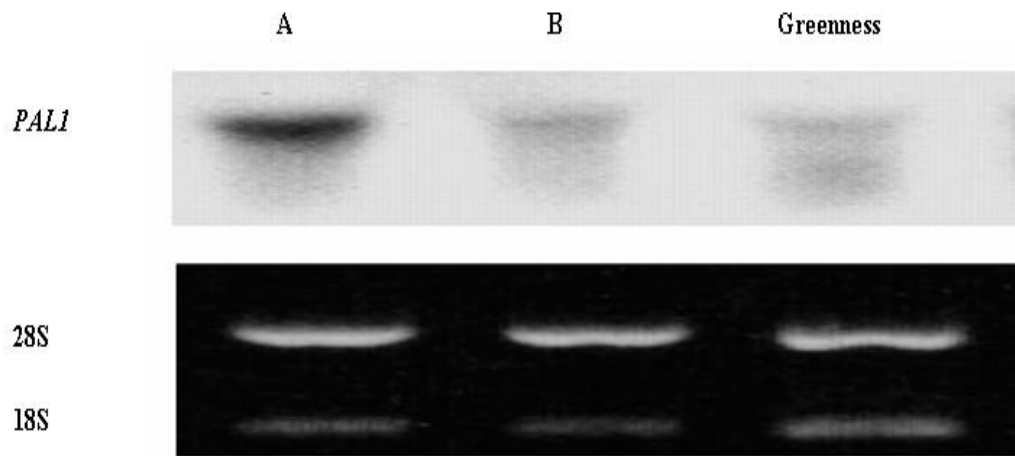


Fig. 39. Northern hybridization analysis for *PAL1* mRNA accumulation in green strawberries treated with phenylethyl alcohol. Green strawberries were incubated at room temperature, control group was changed into red (A), phenylethyl alcohol treated group maintained its initial color (B).

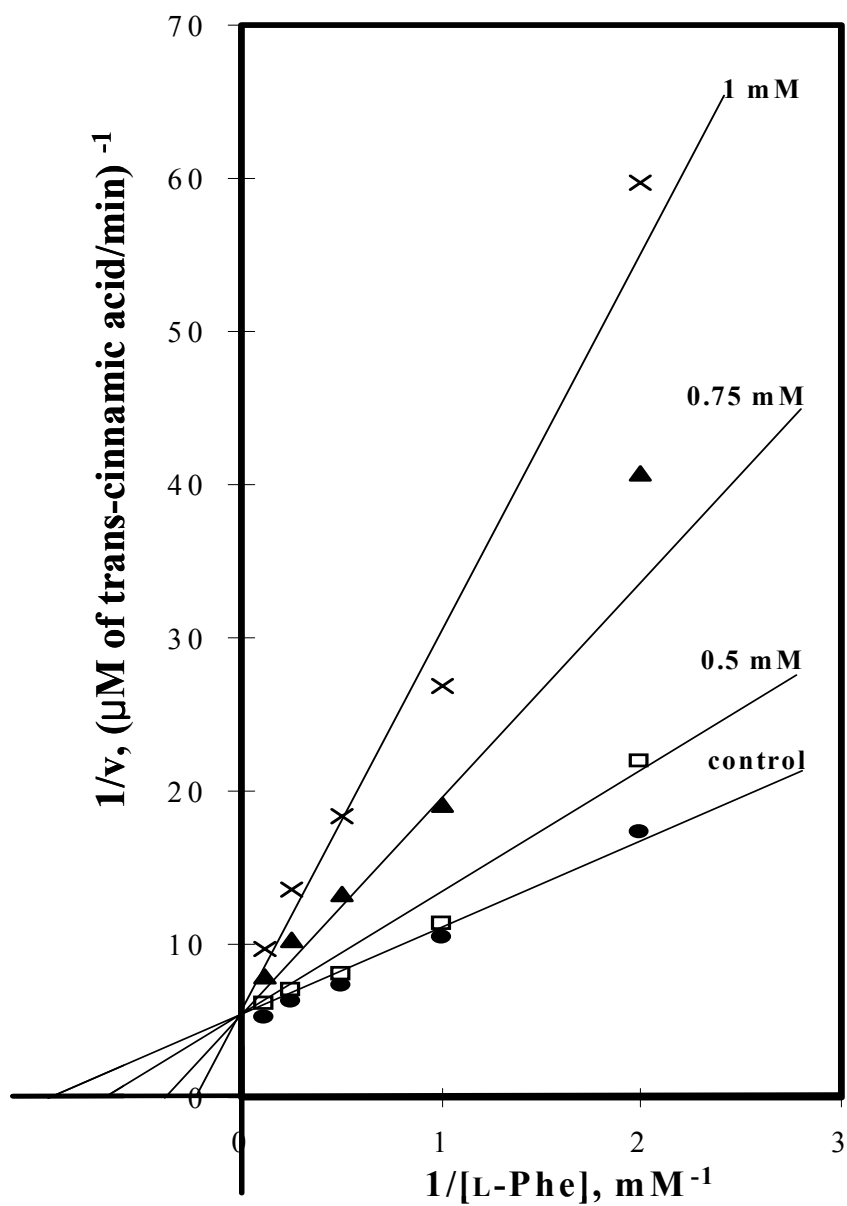


Fig. 40. Lineweaver-Burk plots showing the inhibition of PAL by phenylethyl alcohol. Initial velocity was determined from the increase of UV absorption at 290 nm.

6. *Pichia anomala* SKM-T의 안전성 평가

가. 급성 및 아급성 독성시험

6주령의 SD rat을 암수 각각 6수씩으로 나누어 체중 kg당 건조효모를 1~5g을 단회 경구투여한 후, 14일간을 관찰한 결과, 각 투여군 모두에서 비투여대조군 (untreated control)과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 3주령의 SD rat을 암수 각각 6수씩으로 나누어 체중 kg당 5g의 건조효모를 28일간 경구투여한 결과, 대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 *Pichia anomala* SKM-T는 단회독성시험 및 아급성독성시험에서 이상을 나타내지 않았다.

나. 유전독성시험

유전독성시험은 복귀돌연변이주인 *Salmonella typhimurium* TA98, TA100 균주를 이용한 Ames test를 이용하였다. 음성대조군(negative control)은 전통적으로 섭취하고 있는 *Saccharomyces cerevisiae*를 이용하였다. Table 27에서와 같이 음성대조군과 *P. anomala* SKM-T 투여군 모두 복귀돌연변이를 유발하지 않았다. 따라서 *P. anomala* SKM-T 균주는 유전독성이 없는 것으로 사료되었다.

다. 세포독성시험

4주령의 웅성 마우스를 희생하여 간과 장의 세포를 채취하여 primary culture한 후 *P. anomala* SKM-T를 투여한 후 MTT assay를 이용하여 세포독성을 측정하였다 (Table 28). Table 28에서와 같이 *P. anomala* SKM-T 투여군에서의 세포생존율은 비투여대조군과 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 또한 인체의 위암세포주와 대장암세포주를 이용하여 세포독성을 측정한 결과, *P. anomala* SKM-T는 암세포의 성장을 유의적으로 감소시키는 것으로 관측되었다 (Table 29~30). 따라서 *P. anomala* SKM-T는 정상 GI tract 세포에는 독성을 나타내지 않는 반면, GI tract의 암세포의 성장은 억제하는 것으로 사료되었다.

Table 17. Influence on body weight, food intake, and food efficiency of single-dose toxicity test

Items	Groups	Negative control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
		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

Table 18. Influence on the weight of major organs of single-dose toxicity test

Organs	Group	Negative control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
		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 Grand	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 19. Influence on urine of single-dose toxicity test

Parameters	Group	Negative control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
		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 20. Influence on plasma of single-dose toxicity test

Parameters \ Group	Negative control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
	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 21. Influence on EDTA-blood of single-dose toxicity test

Parameters \ Group	Negative control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
	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 22. Influence on body weight, food intake, and food efficiency of repeated-dose toxicity test

Items	Groups	Negative control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
		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

Table 23. Influence on the weight of major organs of repeated-dose toxicity test

Organs	Group	Negative control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
		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 24. Influence on urine of repeated-dose toxicity test

Parameters	Group	Negative control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
		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 25. Influence on plasma of repeated-dose toxicity test

Parameters \ Group	Negative control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
	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 26. Influence on EDTA-blood of repeated-dose toxicity test

Parameters \ Group	Negative control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
	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 27. Antimutagenic effect of *P. anomala* SKM-T 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 28. Cytotoxic effect on normal murine liver and intestinal cell lines of *P. anomala* SKM-T

Cell lines		Liver	Intestine
<i>P. anomala</i>	SKM-T		
control	L	100	100
	I	100	100
1×10	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 29. Relative inhibitory effect on human cancer cell lines of *P. anomala* SKM-T

<i>P. anomala</i> SKM-T	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.

라. 세포막 안정화 시험

건강한 35세 남성의 O+ 형 혈액 중의 적혈구 만을 분리하여 PBS와 증류수에 incubation한 후 적혈구의 hemolysis 정도를 측정한 결과는 Table 31과 같다. Table 31과 Fig. 36에서와 같이 *P. anomala* SKM-T는 *Saccharomyces cerevisiae*보다 낮은 hemolysis 정도를 나타내었다. 따라서 *P. anomala* SKM-T 균주는 세포막의 안정성에 영향을 미치지 않는 것으로 사료되었다.

마. 간독성 지표 효소의 활성화도

P. anomala SKM-T 균주를 rat에 투여한 후 혈액을 채취하여 GOT, GPT 및 ALP 활성을 측정하였다. Table 32에서와 같이 효소활성도는 비투여대조군과 효모투여군에서 유의적인 차이를 나타내지 않았다. 따라서 *P. anomala* SKM-T 균주의 경구투여는 간독성을 유발하지 않는 것으로 사료되었다.

바. 아급성 독성 시험 후의 조직 검사

아급성 독성 시험 종료시 검체를 부검하여 각 조직을 HE staining하여 조직검사를 실시하였다 (Fig. 37). 그 결과 효모 투여군의 조직은 정상의 조직의 소견을 나타내었다 (수의사 소견). 따라서 *P. anomala* SKM-T의 경구투여는 독성을 유발하지 않는 것으로 사료되었다.

Table 30. Effect of *P. anomala* SKM-T and *S. cerevisiae* on the stability of RBC membrane

	Cell	Supernatant
<i>P. anomala</i> SKM-T	1.6975±1.414	0.0062±0.0053
<i>S. cerevisiae</i>	1.8210±1.927	1.8827±1.4354

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

Table 31. Effect of *P. anomala* SKM-T on the activities of hepatotoxicity related enzymes.

Parameters \ Group	Untreated control		<i>P. anomala</i> SKM-T	
	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

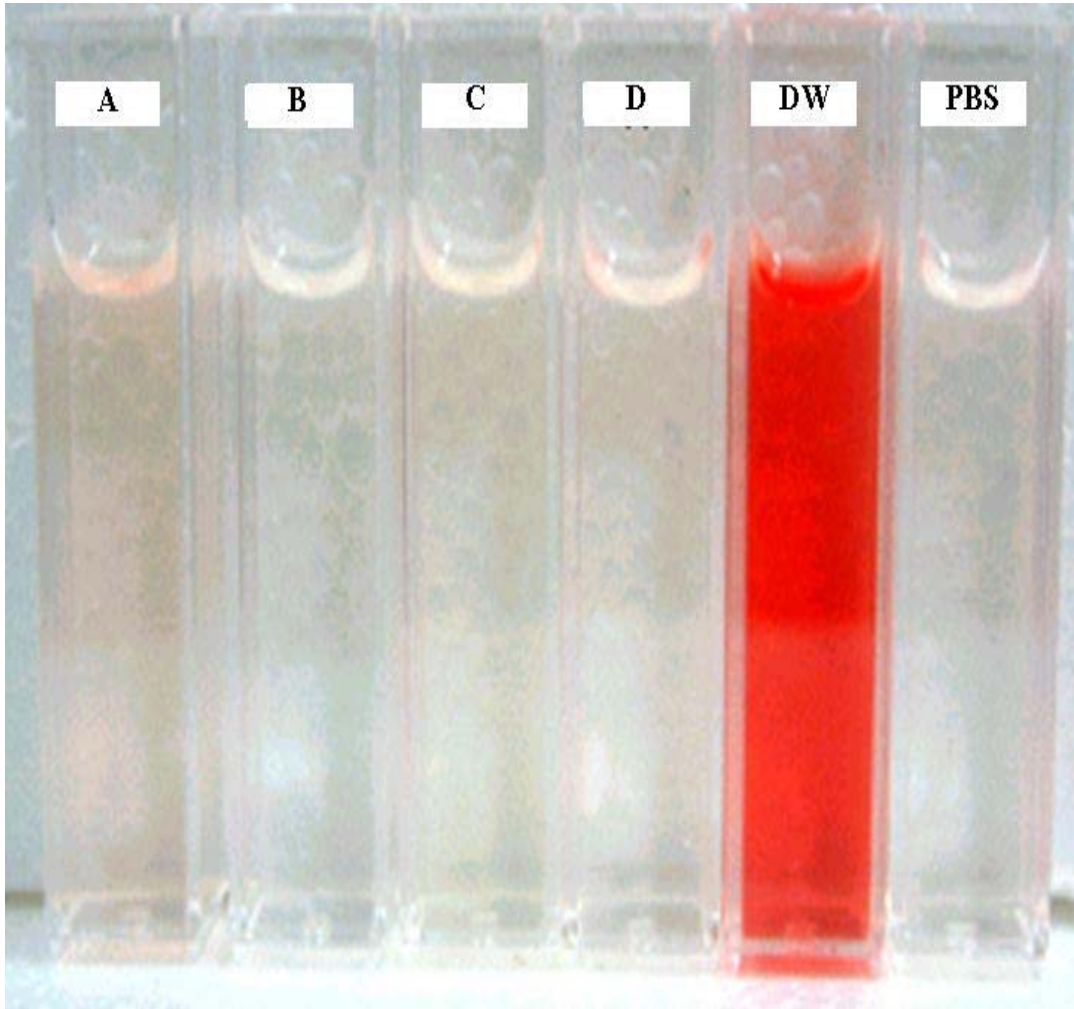
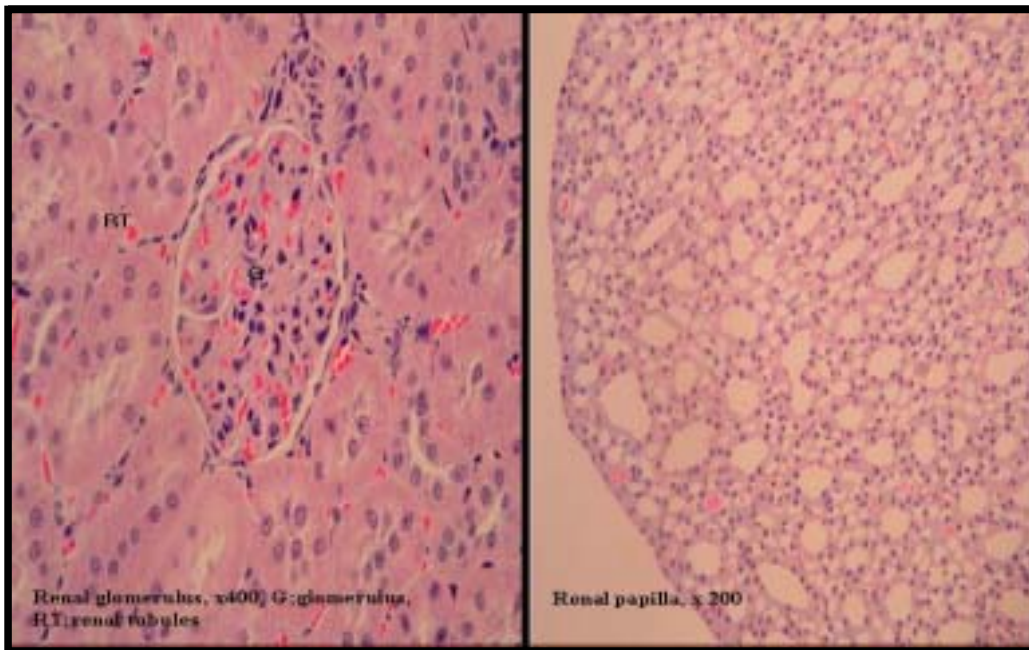
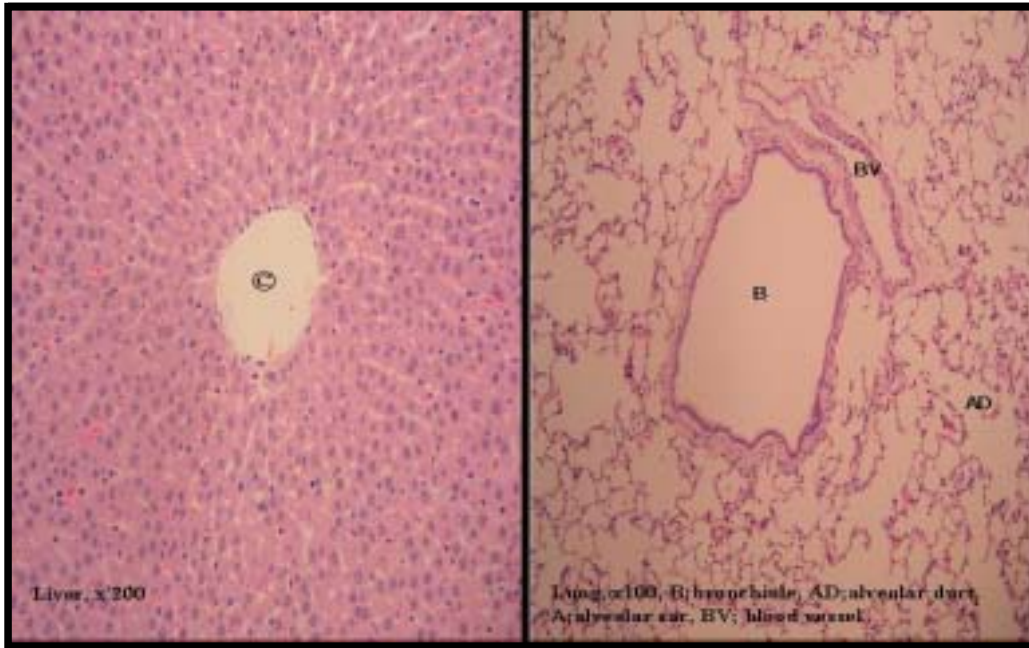
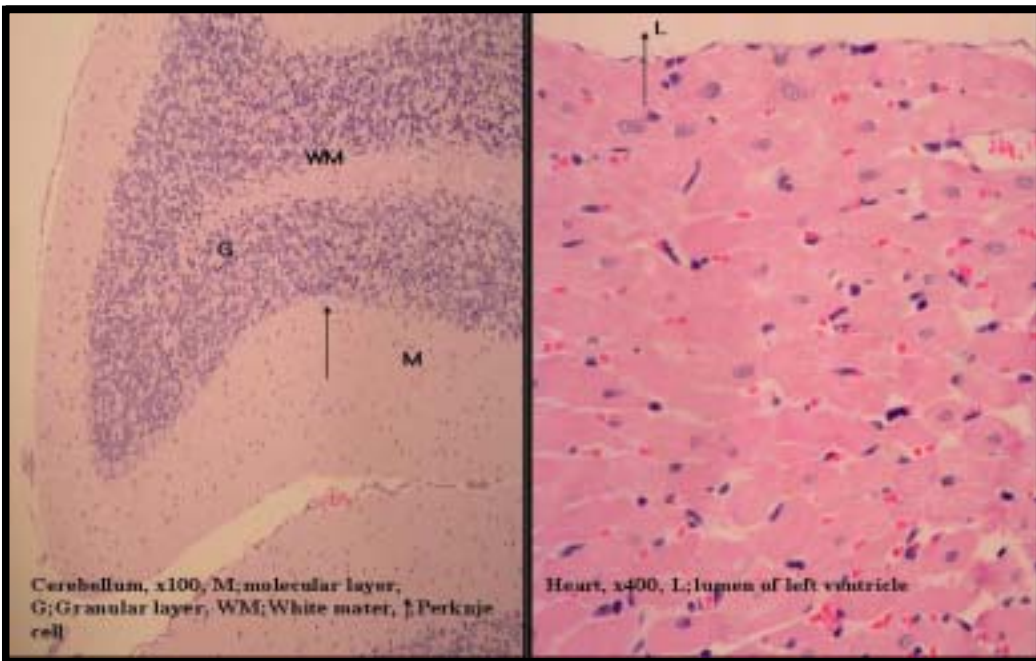
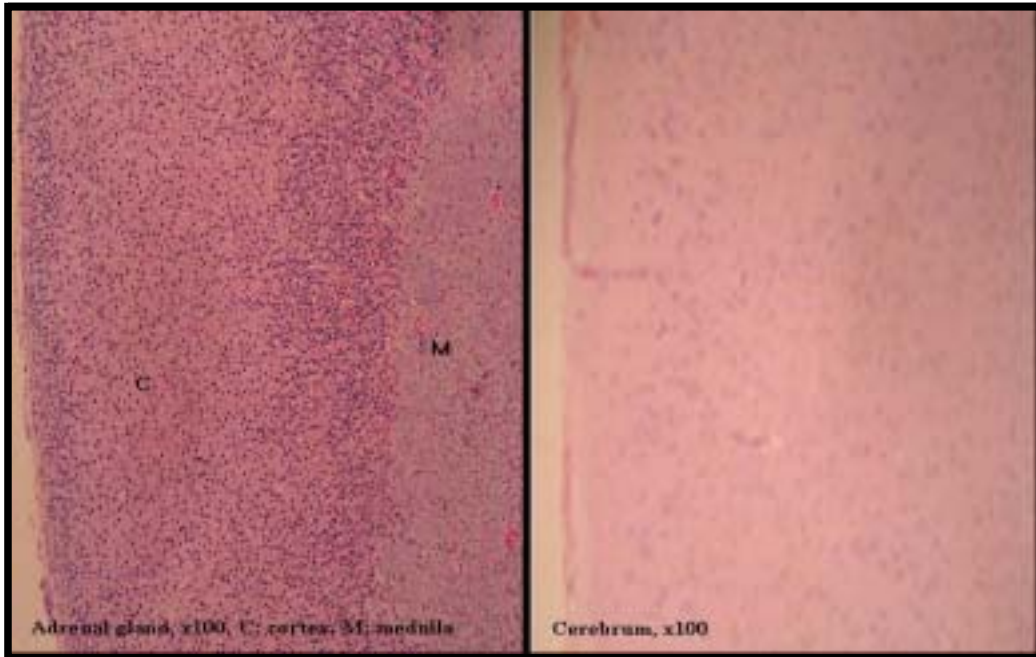


Fig. 41. The degree of RBC hemolysis in presence of *P. anomala* SKM-T and *S. cerevisiae*. A; *S. cerevisiae* supernatant, B; *P. anomala* SKM-T supernatant, C; *S. cerevisiae* cell, D; *P. anomala* SKM-T cell, DW; distilled water, PBS; phosphate buffered saline



continue



continue

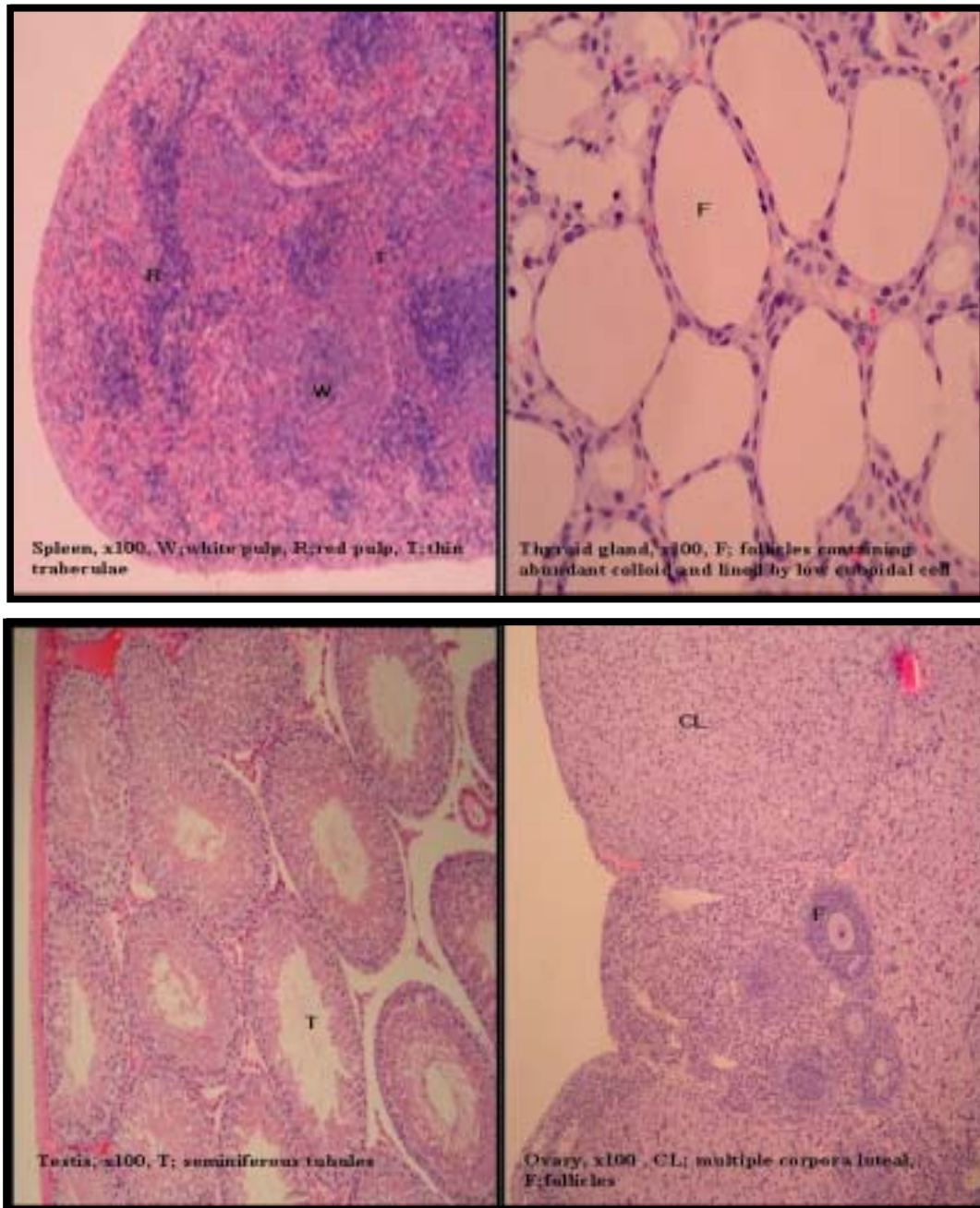


Fig. 42. Histological examination of various organs extracted from the repeated-dose toxicity testing rat

7. 시제품 생산 및 제품화

가. 총미생물배양액

P. anomala SKM-T의 건조 균체를 주요 제제로 하여 분말 형태의 항진균제를 개발하였고, 이에 관한 특허를 출원하였다 (Fig. 37).



Fig. 43. “팡이퐁 (Fungi-Pop)” is a new product which is made from *P. anomala* SKM-T

나. Phenylethyl alcohol 함유 제품

P. anomala SKM-T 배양액에서 추출한 phenylethyl alcohol을 주요 원료로 하여 딸기의 수확후 선도유지제품을 개발하였고 이에 대한 특허를 출원하였다 (Fig. 38).



Fig. 44. “키핑레드 (Keeping-red)” is a new product which is made of phenylethyl alcohol isolated from *P. anomala* SKM-T

“키퍼레드“의 경우, 겨울딸기의 선도유지 효과도 우수하였으며, 여름딸기 (플라멩고)는 겨울딸기보다 더 낮은 처리농도에서도 선도유지에 효과적이었다 (Fig. 39). 겨울딸기와 동일하게 처리하였을 때는 Fig. 39에서 같이 약해가 나타남을 관측할 수 있었다. 고농도에서는 곰팡이 발생은 나타나지 않았으나 표면의 색이 퇴색되어 상품성이 저하되었다. 따라서 본 제품은 겨울딸기뿐만 아니라 유통기간이 매우 짧은 여름딸기의 수확후선도유지제로서의 사용이 적합할 것으로 사료되었다.



Fig. 45. Appearance of summer strawberries treated with Keeping-red. Left; Keeping-red treating group (low concentration), Middle; control, Right; Keeping-red treating group (high concentration)

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. *Botrytis cinerea* 생장 저해 균주의 분리 및 동정

실험 개시 전 6개월 동안 항생제를 투여 받은 경험이 없는 건강한 사람의 분변으로부터 항진균력이 있는 미생물을 분리하였다. 그 중 항진균 효과가 우수한 3개의 균주를 동정하여 각각 *Pichia farinosa* SKM-1, *Pichia anomala* SKM-T, *Galactomyces geotrichum* SJM-59로 명명하였고, 최종적으로 효과가 가장 우수한 *Pichia anomala* SKM-T 균주를 본 연구에 주로 이용하였다.

2. 미생물제 처리 딸기의 품질 특성의 측정

Pichia anomala SKM-T 및 분리물질인 phenylethyl alcohol에 딸기를 dipping하여 수분을 제거하고 4°C에 저장하면서 경시적으로 딸기의 품질을 이화학적·영양학적·관능적으로 평가하였다. 효모 및 phenylethyl alcohol 처리구에서는 중량 및 기타 이화학적 특성치를 초기상태로 유지한 반면 대조구에서는 저장기간의 증가와 함께 이화학적 특성이 현저히 감소됨을 관찰하였다. 특히, 관능적 특성은 원예학 전문가 3인과 원예학과 대학원생 6인의 관능평가를 수행하였다. 원예전문가 3인의 약력은 다음과 같다.

성 명	소 속
황 용 수	충남대학교 원예학과 교수
김 중 현	우송정보대학 원예학과 교수
서 인 현	(주)대덕비티 생물농약팀 팀장

3. 목적물질의 분리·동정

Pichia anomala SKM-T의 발효산물 중 향진균력을 지니며 딸기의 선도를 유지하는 물질을 용매 (dichloromethan : pentane = 2 : 1)로 추출하여 분리하였다. Open column chromatography (hexane : ethyl acetate : water = 12 : 8 : 1)를 이용하여 순수물질로 isolation하였고 이를 TLC와 GC를 이용하여 isolation하였다. Isolate은 GC/MS 및 NMR 분석을 통하여 phenylethyl alcohol로 동정되었다.

4. 유용 미생물의 최적 발효 조건의 설정

Pichia anomala SKM-T가 phenylethyl alcohol을 최대로 생산할 수 있는 발효조건을 설정하기 위하여 rotatable central composite design (회전중심합성계획)을 이용하였다. Phenylethyl alcohol 생산에 큰 영향을 미치지 않는 발효 온도, 교반속도 및 무기염류의 조성을 고정하고 질소원은 phenylalanine, 탄소원은 glucose를 선정하였고, 균체수율에 영향을 주는 pH를 3번째 요인으로 설정하였다. 회전중심합성계획에 의해 얻어진 방정식은 $Y = 384.615 - 9.8888 \times A - 9.78534 \times B + 34.21428 \times C - 88.5635 \times A^2 - 118.792 \times B^2 - 48.4352 \times C^2 + 36.75 \times A \times B + 26.75 \times A \times C + 8.25 \times B \times C$ 이었다. 이 방정식에 의해 얻어진 최적의 발효조건은 phenylalanine 0.6%, glucose 0.6%, pH 4.75 이었다.

5. 목적 물질의 작용 기전의 탐색

Phenylethyl alcohol을 처리한 딸기와 대조구에서 phenylalanine ammonia lyase (PAL)를 추출하여 그 활성도를 측정한 결과, phenylethyl alcohol 처리구에서의 PAL의 활성도가 낮았다. 대조구와 처리구에서 PAL mRNA 발현양을 측정한 결과, 처리구에서의 PAL mRNA 발현양이 대조구보다 낮음을 확인하였다. 또한 미성숙한 녹색

의 딸기를 대조구와 처리구로 나누어, 처리구에만 phenylethyl alcohol을 처리한 결과, 대조구에서는 미성숙한 딸기가 붉게 변하는 반면, 처리구의 딸기는 녹색 상태를 유지하였다. 각각의 딸기로부터 *PAL1* mRNA를 추출하여 미성숙한 녹색의 딸기와 비교하였다. Phenylthyl alcohol의 처리는 *PAL1* mRNA의 발현을 억제하여 붉게 변하는 것이 억제되는 것을 관측하였다. 딸기로부터 추출한 PAL에 phenylethyl alcohol을 농도를 다르게 가하여 PAL의 활성화도 변화를 관찰한 후 이를 Lineweaver-Burk plot으로 나타내었다. 이 결과, phenylethyl alcohol은 PAL의 비가역적·경쟁적 저해제로 나타났으며 K_m 값은 $0.9 \mu\text{M}$ 이었다. PAL은 식물의 연화와 관련된 효소로 phenylethyl alcohol이 딸기의 선도유지에 효과적인 것은 phenylethyl alcohol에 의한 PAL의 발현 및 활성 억제효과로 사료되었다.

6. 미생물제 및 목적 물질의 안전성 평가

유용물질로 분리된 phenylethyl alcohol은 식품 및 화장품 산업에서 장미향을 내는 향료로 널리 사용되는 물질 (GRAS)이므로 안전성을 평가할 필요성이 없었다. 항진균력을 나타낸 *Pichia anomala* SKM-T를 일반독성평가 (급성 및 아급성 독성시험), 유전독성평가 (Ames' test), 세포독성평가(Normal murine hepatic/intestinal cell line과 Human gastric/intestinal cancer cell line), 세포막 안정화 평가 (hemolysis assay), 간독성 (3주간 경구투여후 혈청의 GOT/GPT, ALP 활성)을 측정한 결과, 본 연구에서 사용된 효모인 *Pichia anomala* SKM-T는 안전한 균주로 밝혀졌다.

7. 시제품 생산 및 제품화

Pichia anomala SKM-T가 주요성분인 항진균 분말제인 “팡이팡 (Fungi-pop)”을 개발하였다. 또한 phenylethyl alcohol을 주요 성분인 액상의 딸기 선도유지제인 “키핑 레드 (keeping-red)”를 개발하였고, 이와 관련된 2개의 특허를 출원하였다.

8. 연구성과

구분	연구성과
인력배출	-학사: 2인 (엄태건/손지숙) -석사: 1인 (임미영)
논문	-SCIE 발표: 1편 [Food Sci. Biotech. 14(4): 487-492, 2005] -SCI/SCIE 투고중: 3편
국제학술대회	-포스터 발표: 1편 [식품영양과학회 국제학술대회 2004. 11. 17~19] -포스터 발표 예정: 4편 -구두 발표: 1회 [2nd Asian conference on plant pathology, 2005. 6.25~29, Singapore Natl Univ]
특허	-2개 출원: 부록에 첨부

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

1. 본 연구에서 개발된 2개의 제품인 “팡이핑(Fungi-pop)”과 ”키핑레드(Keeping-red)”는 참여기업인 (주)대덕바이오에서 상품화되어 올 겨울부터 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, 꿀, 포도 등의 수확후선도유지제로서의 이용가능성이 높다고 사료되며, 이에 대한 후속적인 연구가 필요한 것으로 사료된다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

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 흰색 곰팡이를 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 cfu이었다. 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.

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. Jacquemin 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.** 49^{me} 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-b-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-b-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-b-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. Delfmont, 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 luttes 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 *Pichia anomala* 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**. 51^{ème} Symposium International de Phytopharmacie et Phytiairie. Gand, Belgique. Mai (poster).
28. Cognet S, Lepoivre P & Jijakli MH 1999. **Development of PCR–ELOSAs for monitoring *Debaryomyces hansenii* (strain O), antagonistic of postharvest diseases on apples**. 5th Workshop on Integrated Control of Pome Fruit Diseases IOBC/WPRS. Fontevrault, France. August .
29. Jijakli MH, Cognet 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. Cognet 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 againsts *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 antagonistic 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. Stϕprien 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.**

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: 29-32.

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. 2^{ème} 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. VIII^{ème} 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, Vandenbol 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. 김세리, 박선자, 심원보 2005. **진주 지역 딸기 주스 상점에서의 *Staphylococcus aureus*의 분리와 staphylococcal enterotoxin a, b, c gene 검색.** 한국환경보건학회. 31: 23~30

55. 김세리, 하광수, 윤혜숙 2005. 생딸기 주스 제조 환경에서의 미생물학적 오염도 조사. 한국식품과학회. 37: 287~293
56. 이종남, 이준구, 이응호, 박한영 2005. 사계성 딸기의 고랭지 여름재배 시 생육 반응. 한국원예학회. 23: 153~158
57. 김세현, 정현관, 김선창 2005. 복분자딸기 클론별 과실특성과 항산화 활성 탐색. 한국임학회. 94: 11~15
58. 이종남, 이응호, 용영록 2005. 사계성 딸기의 고랭지 여름재배 시 수확시기별 생산성과 품질 변화. 한국원예학회. 23: 159~163
59. 이세희, 이명숙, 선남규, 송경빈 2004. 저장조건이 딸기 “미너봉”의 저장 중 품질 및 미생물학적 변화에 미치는 영향. 한국식품저장유통학회. 11: 7~14
60. 조준일, 하상도, 김근성 2004. 저장중 온도, pH, potassium sorbate를 이용한 딸기 paste의 natural microflora의 증식억제 효과. 한국식품과학회. 36: 355~360
61. 이화형, 박한상 2004. 오버레이 백탄보드의 에틸렌가스 흡착과 딸기 보관성 효과. 한국목재공학회. 32: 86~92

62. 윤혜숙, 황연현, 황해준, 노치웅 2004. 저가 배지재료가 고설재배 딸기의 생육 및 수량에 미치는 영향. 한국원예학회. 22: 266~269
63. 남명현, 이인하, 김흥기 2004. 딸기탄저병균 *Colletotrichum gloeosporioides* 잠재감염주의 중요성 및 검출. 한국원예학회. 22: 294~297
64. 김세현, 정현관, 장용석, 박형순, 김선창 2004. 복분자딸기 다수확 우량 품종 선발. 한국임학회. 341~343
65. 정현관, 장용석, 이위영 2004. 복분자딸기의 클론별 향산화 활성도 탐색. 한국임학회. 279~281
66. 정순경, 조성환 2003. 천연항균물질을 침지 및 포장소재로 이용한 딸기의 저장효과. 한국식품저장유통학회. 10: 37~40
67. 남명현, 정석기, 라상욱, 김흥기 2003. 탄산수소나트륨 단용 및 Polyoxyethylene sorbitanmonolaurate 혼용처리에 의한 딸기흰가루병 방제. 한국원예학회. 21: 98~101
68. 이진만, 김숙경, 이기동 2003. 딸기의 알콜 발효 특성 모니터링. 한국식품영양과

학회. 32: 679~683

68. 김세현, 정현관, 박형순, 장용석 2003. 우리나라 복분자딸기의 증식 특성. 한국임학회. 157~159

69. 이기동, 김숙경, 이진만 2003. 딸기식초 제조를 위한 초산발효 조건 최적화. 한국식품영양과학회. 32: 812~817

70. 정영진, 육홍선 2003. 방사선 조사와 가열처리에 의한 닭고기의 비타민 B1 및 감귤과 딸기의 비타민 C 함량의 변화. 한국식품영양과학회. 32: 864~869

71. 변홍주, 최성진 2003. 딸기의 수확 전 과산화수소 처리에 의한 수확 후 잿빛곰팡이병 발생의 억제. 한국원예학회. 44: 859~862

72. 정순경, 조성환 2003. 천연항균물질을 침지 및 포장소재로 이용한 딸기의 저장효과. 한국식품저장유통학회. 10: 37~40

73. 정순경, 조성환 2002. 황금추출물을 함유한 항균성 포장필름을 이용한 딸기와 오이의 저장효과. 한국식품저장유통학회. 9: 271~276

74. 조재환, 김태균 2002. 일본 소비자의 신선딸기 원산지별 선호분석. 한국축산경영

학회. 29: 577~590

75. 이원옥, 윤홍선, 김만수 2001. **딸기의 저온유통용 골판지 포장상자 개발**. 한국농업기계학회. 273~279

76. 김용현, 김정환, 박상구 2001. **비닐하우스 재배 딸기에서 점박이응애의 발생**. 한국곤충학회. 31: 139~142

77. 차환수, 박민선, 박기문 2001. **복분자 딸기의 생리활성**. 한국식품과학회. 33: 409~415

78. 김문용, 전순실 2001. **양파를 첨가한 딸기잼의 품질특성**. 한국조리화학회. 17: 316~322

79. 차환수, 이문경, 황진봉, 박기문 2001. **복분자 딸기의 이화학적 특성**. 한국식품영양과학회. 30: 1021~1205

78. 이우승, 문종학, 김승기, 이하운 2001. **“여홍”딸기의 대구지방 휴면최심기와 반축성 보온개시기**. 한국원예학회. 42: 665~672

79. 이우승, 문종학, 김승기, 이하운 2001. **“보교조생”딸기의 대구지방 휴면 최심기와**

반축성 보온개시기. 한국원예학회. 42: 673~678

80. 서권일, 배영일, 이용수, 심기환 2000. 천연 유기질 비료로 재배한 딸기의 품질

특성. 한국식품저장유통학회. 7: 150~154

81. 이광희, 김미현, 김광수, 윤경영 2000. 성숙중 딸기의 세포벽 비섬유성 중성당 변

화. 한국식품저장유통학회. 7: 207~210

82. 김영민, 이상백, 조성환, 이동선 2000. 결착제 함유항균성 물질로 코팅한 폴리에

틸렌 필름의 제조 및 이를 이용한 딸기의 환경기체조절포장. 한국식품저장유통학

회. 7: 12~18

83. 하철규, 이동규, 강선철 2000. 식용식물의 유기용매 추출물로부터 딸기부패균

Staphylococcus sp. 에 대한 항균활성 검정. 한국생물공학회. 15: 226~231

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.