

냄새 센서를 이용한 식품 부패 감지장치

곰팡이분자유전학 연구실

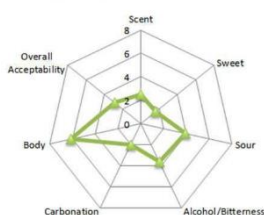
■ 관심 연구분야

- 곰팡이 참조유전체(Reference Genome) 해독
- 비교유전체(Comparative Genomics)
- 곰팡이 2차대사 (Fungal Secondary Metabolism) 물질 생성
- 곰팡이 효소생성 (Fungal Amylase & Protease)
- 유용유전자 기능규명 (Functional Genomics)
- 곰팡이 신호전달기작 (Fungal Signaling Pathway)
- 발효곰팡이 산업적 활용 (Industrial Application of Fungal Enzymes)

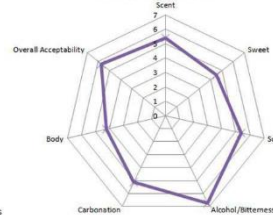
1. 한국 전통주류 당화곰팡이 균주의 참조유전체 및 오믹스 분석 연구

- 전통 주류 진핵 미생물의 참조유전체 및 오믹스 분석을 통한 유용 유전자 발굴, 활용 기술 개발

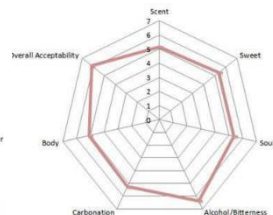
S. fibuligera SSU2601-09



A. oryzae CN1102-08



R. oryzae SSU2603-06

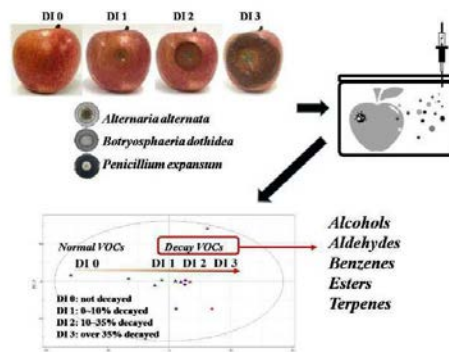


2. 미생물 군집 프로파일링 활용한 원산지 판별용 마커 발굴

- 대사체 지문 및 미생물 군집 분석 기반 농산물 원산지 판별법 및 플랫폼 구축과 현장 적용
- 원산지에 따른 농산물 대사체 및 연계변수와의 상관관계 규명, 통합 데이터베이스 (농산물 3종 이상) 및 네트워크 개발

3. 수출용 신선 농식품 고품질화를 위한 냄새지문 활용 부패감지기 개발

- 신선 농식품 수출 전략 3품목(파프리카, 사과, 딸기)의 부패 지수 확립 및 미생물 정보DB 구축
- 파프리카, 사과, 딸기의 부패 관련 미생물과 부패 냄새의 상관성 분석 및 부패 기작 규명
- 농산물 품목별, 부패 단계별, 부패 원인 미생물별 냄새 정보 DB 및 미생물 생명정보 DB 구축

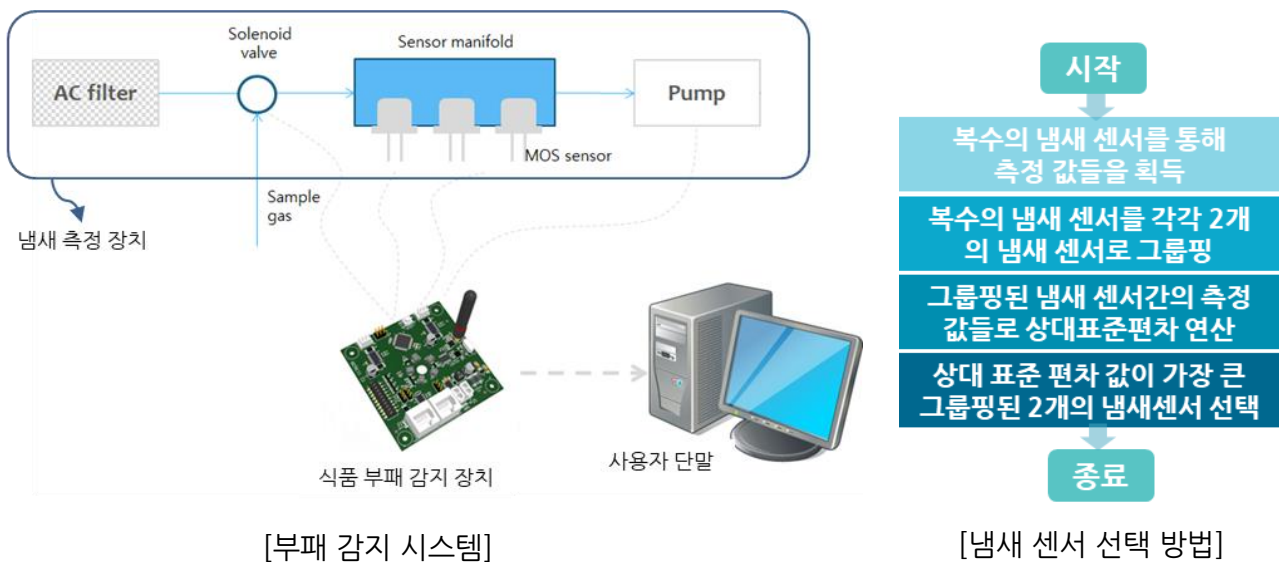


특허 정보

- 냄새 센서를 이용한 식품 부패 감지 장치 및 그 방법, 그리고 냄새 센서 선택방법 (출원 10-2017-0086172호)

기술 개요

- 냄새 센서를 이용하여 식품의 부패 여부를 판단하는 장치에 관한 기술
 - 냄새 측정 장치에는 복수개의 냄새 센서가 장착되어 있으며, 센서의 측정값 중 차이가 가장 큰 2개의 센서를 선별, 식품 부패 감지에 사용
 - 선별된 두개의 냄새 센서 출력 신호의 비율을 산출하여 농식품의 부패 판단



- 식품 부패 감지 장치는 크게 연산부, 판단부, 제어부로 구성
 - 연산부: 2개의 냄새센서 측정값의 비율을 산출
 - 판단부: 산출된 비율값이 설정 된 기준 값의 범위를 벗어나면 부패가 진행되고있는 것으로 판단, 범위를 벗어나지 않을 경우 식품의 신선도 판단 및 부패 예상 시기 예측
 - 제어부: 식품 측정 시간 및 위치정보를 이용, 부패 판단대상 식품의 위치정보를 사용자 단말에 제공

■ 식품의 부패 감지

- | | sensor value | | | | ratio | | |
|----------|--------------|-------|-------|--------|-----------|-----------|-----------|
| | #1 | #2 | #3 | | #1/#2 | #1/#3 | #2/#3 |
| 신선 농식품 1 | x11 | x12 | x13 | | z11 | z12 | z13 |
| 신선 농식품 2 | x21 | x22 | x23 | | z21 | z22 | z23 |
| 신선 농식품 3 | x31 | x32 | x33 | | z31 | z32 | z33 |
| 신선 농식품 4 | x41 | x42 | x43 | | z41 | z42 | z43 |
| | | | | | | | |
| 표준가스 1 | y11 | y12 | y13 | | q11 | q12 | q13 |
| 표준가스 2 | y21 | y22 | y23 | | q21 | q22 | q23 |
| 표준가스 3 | y31 | y32 | y33 | | q31 | q32 | q33 |
| | | | | | | | |
| | | | | 평균 | m1 | m2 | m3 |
| | | | | 표준편차 | d1 | d2 | d3 |
| | | | | 상대표준편차 | S1 | S2 | S3 |

Figure 1 is a line graph showing the predicted value (sensor ratio) over time (days) for three samples: control sample, inoculation apple 1, and inoculation apple 2. The y-axis is labeled "Predict value(sensor ratio)" and ranges from 0 to 8. The x-axis is labeled "Time(day)" and ranges from 0 to 35. A horizontal dashed line at y=2.0 is labeled "boundary value = 2.0". A vertical red line at x=6 is labeled "6 day" and "artificial decay / inoculation". The control sample (black squares) starts at (0, 2.0), rises to (6, 3.0), then to (10, 4.2), (15, 6.2), (20, 6.8), (25, 6.5), (30, 7.5). Inoculation apple 1 (red circles) starts at (0, 2.0), rises to (6, 2.5), then drops to (10, 1.5), (15, 1.0), (20, 1.0), (25, 1.0), (30, 1.0). Inoculation apple 2 (blue triangles) starts at (0, 2.0), rises to (6, 2.5), then drops to (10, 1.5), (15, 1.0), (20, 1.0), (25, 1.0), (30, 1.0). An arrow labeled "decay" points from the control sample line at day 6 to the inoculation apple 1 line at day 6. A red text label "부패 진행(기준 값 2.0 이하)" is placed near the bottom right of the graph.

- 사용자 단말을 통해 정보 제공

-
- The diagram illustrates the Smart Device System Architecture, showing the flow of data between three main components: Hardware Part, DB server Part, and User Part.
- Hardware Part:** A central block containing various modules:
- MCU (Microcontroller Unit)
 - WiFi module (highlighted in blue)
 - Bluetooth module (highlighted in red)
 - SD card
 - Sensor Module (MOS 2ea)
 - Power module
 - Pump
 - S. Valve
- DB server Part:** A computer icon representing the database server.
- User Part:** A smartphone icon representing the user's smart device.
- Data Flow:**
- A blue arrow points from the **WiFi module** in the Hardware Part to the **DB server Part**, labeled "User가 승인한 데이터만을 서버로 전송" (Transmit only data approved by the user to the server).
 - A green dashed arrow points from the **DB server Part** to the **User Part**, labeled "서비스 정보 (사용자에게 가지정보 제공)" (Service information (providing information to the user)).
 - A red arrow points from the **Bluetooth module** in the Hardware Part to the **User Part**, labeled "Display / 상태 표시" (Display / status display).
 - A red arrow points from the **Bluetooth module** in the Hardware Part to the **DB server Part**, labeled "← Hardware 구동/제어 신호, 네트워크/서버 설정" (← Hardware operation/control signal, network/server setting).
- Legend:**
- 부패감지기 시작품 / 기구부 구성 (Start product / Mechanism part composition)
 - 개인정보보호를 위해 별도의 wifi를 통해 데이터 전송 (Data transmission through separate wifi for privacy protection)
 - 부패감지기 구동을 위한 전용 App 개발 (Development of a dedicated App for the start product operation)

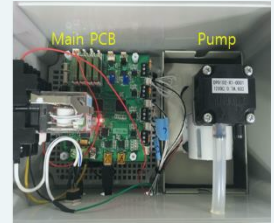
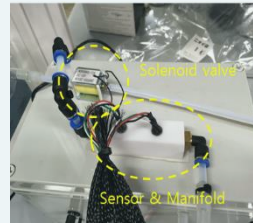
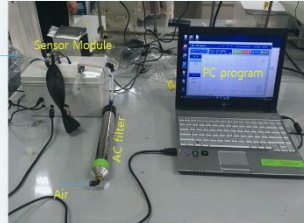
[illegible]

[테스트용 윈도우 운영 프로그램
및 DB데이터 창]

기술개발 현황

■ Lab-scale용 부패 감지기 시제품 제작

- 간단한 시제품을 개발, 제작하여 신선 농식품 냄새를 평가할 수 있도록 구성
- 윈도우 PC용 운영 프로그램과 연동 되도록 구성



[Lab-scale 부패 감지기 시제품]

■ 현장평가를 위한 부패 감지기 시제품 제작

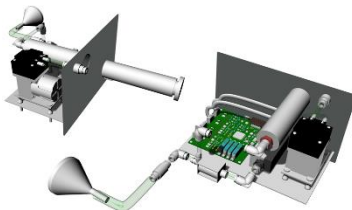
- Dual 가스센서(금속산화물 가스센서) 기술을 이용한 Cloud방식의 휴대용 부패 감지센서 시제품 개발 완료
- 부패 감지기의 내부 구성품은 메인 PCB와 연결, 스마트기기로 제어 가능
- 메인 PCB에는 Bluetooth/Wi-Fi 무선통신 모듈을 장착 스마트 기기와 연동하여 하드웨어 제어 및 서버시스템에 측정된 데이터 전송 가능
- 개발된 시제품을 통해 사과, 파프리카, 딸기의 부패발생 예측값 산출, 이를 이용해 부패발생 예측값 DB 구축



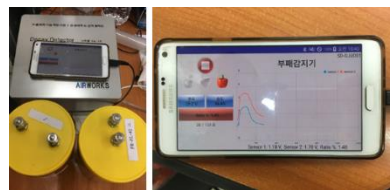
[부패 감지기 시제품 및 내부]



[부패 감지 측정 시료]



[시제품의 3D 내부 구성도]



[시제품에 의한 냄새 측정]

구분	사과	파프리카	딸기
Good	> 1.00	> 1.00	< 0.75
Not bad	1.00 ~ 0.85	1.00 ~ 0.85	0.75 ~ 0.90
Bad	< 0.85	< 0.85	> 0.90

[신선 농식품의 부패발생 예측값 범위]

■ 시제품 현장 평가

- 딸기 농장/사과 농장/파프리카 농장을 방문, 시제품 현장평가 진행

딸기 농장

- Lab실험 방법과 같이 딸기 시료를 200g내외가 되도록 선별, 현장 실험 진행



사과 농장

- 5kg 선물용 box를 기준으로 실험 진행(약 12과)
- lab실험 결과 12개 기준, 부패 사과 약 2~3개 존재 시(누적 부패율 23.6~36.3%) 부패 여부 판단 가능

파프리카 농장

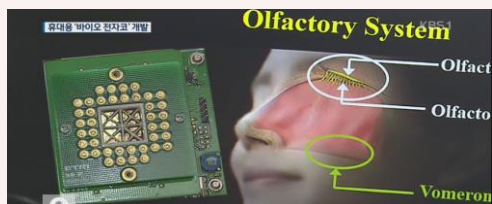
- 정상 파프리카 4개/부패 파프리카 6개 선별, 현장 데이터 확보 후 Lab환경에서 보완 실험 진행
- 현장에서 파프리카 부패 판단이 어느정도 가능함을 확인

종래 기술 대비 우수성

종래 기술

▪ 복잡한 전자코 시스템

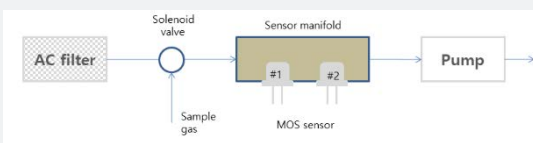
- 인간의 후각 세포에 해당되는 많은 수의 가스 센서를 장착
- 장착되는 가스센서의 수가 증가할수록 전기/전자적 하드웨어가 복잡해 짐



개발 기술

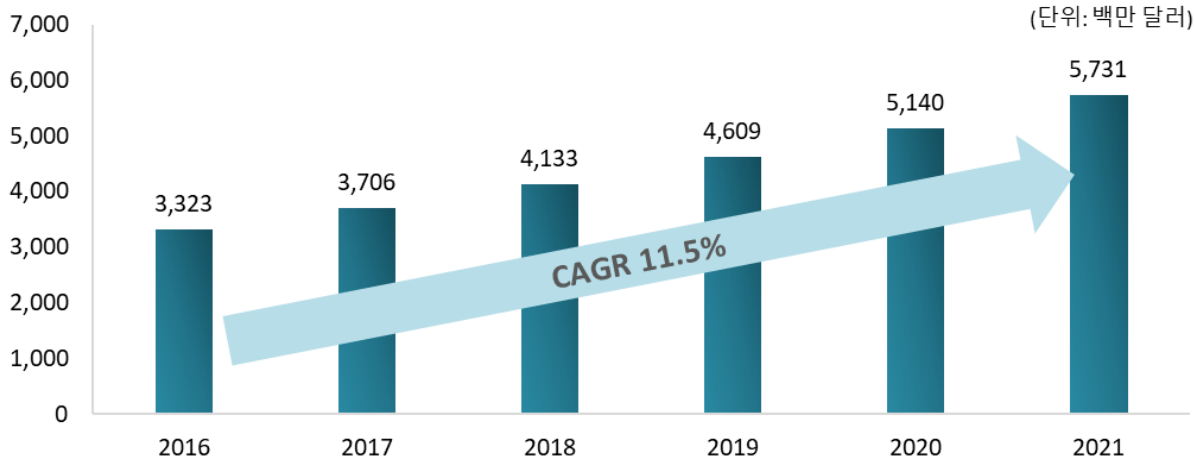
▪ 간단한 로직의 개발 기술

- 2개의 센서에서 출력되는 신호를 분석, 부패 냄새를 구분할 수 있는 로직
- 간편한 방법으로 현장에서 농산물 부패 정도를 측정, 예측 가능



기술 활용 전망

- 신선농식품의 품질관리와, 냉장고 내부 부패 감지 등에 활용 가능
- 식품안전검사 세계시장 규모는 11.5%의 성장률을 보이며 2016년 약 33억 달러 규모에서 2021년 57억달러를 넘어설 것으로 전망
- 전 세계적으로 대형 식중독 사고 발생이 다수 발생함에 따라, 식품 안전에 대한 관심 고조



자료: 중소기업기술로드맵(2017)(BCC Research, Global Markets and Technology for sensors, 2013. 활용하여 추정)

[식품안전검사 세계시장규모 및 전망]

보유 특허

No	국가	출원(등록)번호	명칭
1	KR	10-2016-0068705	당화 및 발효능이 우수한 전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라 KJJ81 균주 및 이를 이용한 막걸리 제조방법
2	KR	10-1862486	전통주 양조 진핵미생물 리조푸스 오리재 SSU2603-06 균주 및 이를 이용한 막걸리 제조방법
3	KR	10-1862487	전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라 SSU2601-09 균주 및 이를 이용한 막걸리 제조방법
4	KR	10-1862488	전통주 양조 진핵미생물 아스퍼질러스 오리재 SSU1102-08 균주 및 이를 이용한 막걸리 제조방법
5	KR	10-2016-0082213	전통주 양조 진핵미생물 리조푸스 오리재 SSU2603-06균주 및 이를 이용한 막걸리 제조방법
6	KR	10-2016-0082215	전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라 SSU2601-09 균주 및 이를 이용한 막걸리 제조방법
7	KR	10-2016-0082216	전통주 양조 진핵미생물 아스퍼질러스 오리재 SSU1102-08 균주 및 이를 이용한 막걸리 제조방법
8	KR	10-1858903	사과 부패 곰팡이 유래 휘발성 화합물을 포함하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물
9	KR	10-2017-0086172	냄새 센서를 이용한 식품 부패 감지 장치 및 그 방법,그리고 냄새 센서 선택 방법

최근 연구실적

No	연구과제명	연구시작년도	지원부처
1	농업 유용 진핵미생물의 참조유전체 및 오믹스 정보 분석 연구	2014	농림축산식품부
2	수출용 신선 농식품 고품질화를 위한 냄새지문 활용 부패감지기 개발	2015	농림축산식품부
3	미생물 군집분석을 활용한 농산물 원산지 판별용 마커 발굴 연구	2016	농림축산식품부
4	포스트게놈다부처유전체사업 범부처 공동지원 및 확산 지원체계 구축	2018	농림축산식품부
5	농식품 유용 사상성 진균 참조유전체 해독 및 비교유전체 분석	2018	산업통상자원부



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2017-0137237
(43) 공개일자 2017년12월13일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 1/16 (2006.01) C12G 3/02 (2006.01)
C12R 1/85 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 1/16 (2013.01)
C12G 3/02 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2016-0068705
(22) 출원일자 2016년06월02일
심사청구일자 없음
기술이전 희망 : 기술양도

(71) 출원인
송실대학교산학협력단
서울특별시 동작구 상도로 369 (상도동)
중앙대학교 산학협력단
서울 동작구 흑석동 221
(72) 발명자
서정아
서울특별시 서초구 서운로9길 18, 101동 605호 (서초동, 자연인아파트)
김민주
서울특별시 구로구 개봉로20길 6, 104동 1403호 (개봉동, 현대아파트)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

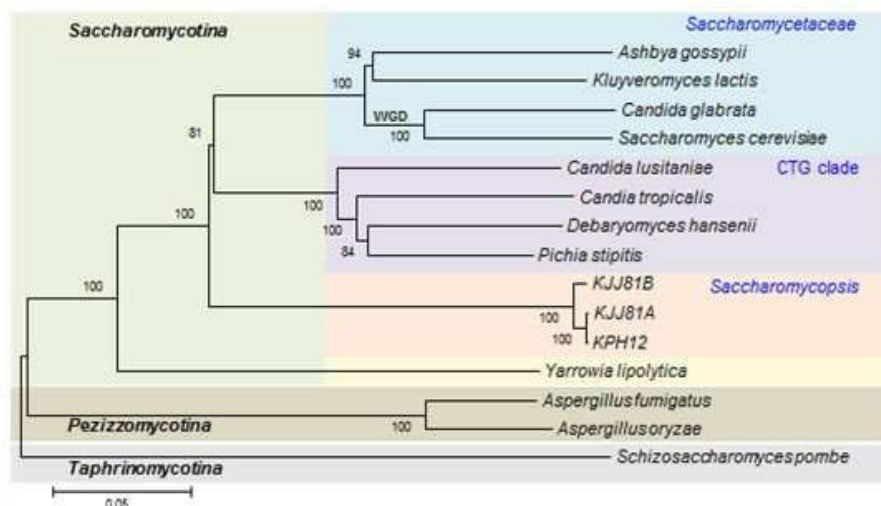
전체 청구항 수 : 총 6 항

(54) 발명의 명칭 당화 및 발효능이 우수한 전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라 KJJ81 균주 및 이를 이용한 막걸리 제조방법

(57) 요약

본 발명은 당화 및 발효능이 우수한 전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주(KCTC18466P) 및 이를 이용한 전통주 제조방법에 관한 것으로서, 국내 전통주에서 분리한 효모균을 통해 우수한 발효능과 기능성을 가진 종균 개발에 필요한 유용 유전자원을 확보하고, 전통주의 표준화 및 고급화 공정에 활용할 수 있는 기반 기술 개발은 바이오산업에서의 국제 경쟁력 제고에 크게 기여할 것으로 예상된다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C12R 1/85 (2013.01)

(72) 발명자

에밀리 캐롤

서울특별시 동작구 상도로60길 32 102호 (상도동)

손호경

서울특별시 관악구 대학7길 26, 관악아파트 나동
304호

강현아

서울특별시 강남구 선릉로 221, 205동 1402호 (도곡동, 도곡렉슬아파트)

추진호

인천광역시 부평구 충선로 191, 2동 1110호 (부개동, 뉴서울아파트)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 914007-4

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산식품기술기획평가원

연구사업명 미생물유전체활용기술개발사업

연구과제명 농업 유용 진핵미생물의 참조유전체 및 오믹스 정보 분석 연구

기 여 율 1/1

주관기관 숭실대학교 산학협력단

연구기간 2014.08.23 ~ 2018.08.22

명세서

청구범위

청구항 1

수탁번호 KCTC18466P로 기탁된, 당화 및 발효능이 우수한 전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 균주는 누룩으로부터 분리된 것을 특징으로 하는 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 균주는 알파-아밀라아제(Alpha-Amylase), 글루코아밀라아제(Glucoamylase) 또는 프로티아제(Protease) 활성이 우수한 것을 특징으로 하는 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 균주는 서열번호 3으로 표시되는 내부 전사 영역(Internal transcribed spacer; ITS)으로 이루어진 것을 특징으로 하는 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주.

청구항 5

제1항 내지 제4항 중 어느 한 항의 균주를 사용하여, 곡류 원료로 막걸리를 제조하는 방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 곡류 원료는 쌀 또는 밀기울인 것을 특징으로 하는 막걸리를 제조하는 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 당화 및 발효능이 우수한 전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주(KCTC18466P) 및 이를 이용한 막걸리 제조방법에 관한 것이다. 특히, 당화 및 발효능이 우수하나 유전체 해독이 미완료된 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*)의 참조유전체 서열 해독 및 유전체 분석에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 우리나라는 오래전부터 김치, 술, 간장, 된장과 같이 전통발효 방법을 사용하여 다양한 발효식품을 제조해온 나라임에도 불구하고 국내 전통식품 관련 발효 미생물의 유전체 정보를 확보하고 이를 기반으로 하는 종균 개발 및 유용자원 활용 기술 개발 연구는 외국에 비해 상대적으로 미진하다. 국내 전통주 산업은 대표적인 2~3개 업체를 제외하면 매우 영세한 규모로 운영되어 기본적인 품질관리조차 제대로 이루어지지 않는 업체가 대부분이다. 특히 아직 우수한 종균 발명이 미비한 관계로 매년 고액의 로열티가 해외 생물자원의 사용 대가로 지불되고 있다.

[0003] 외국의 전통주와 달리 한국 전통주는 복합 누룩 균주에 의해 제조되고 있는데, 한국 전통주의 표준화, 과학화, 세계화를 위해서 핵심 종균들에 대한 참조유전체 정보의 확보가 필수적이다. 국내 전통주에서 분리한 효모균들을 대상으로 우수한 발효능과 기능성을 가진 종균 개발에 필요한 유용 유전자원을 확보하고, 전통주의 표준화 및 고급화 공정에 활용할 수 있는 기반 기술 개발은 바이오산업에서의 국제 경쟁력 제고에 크게 기여할 것이다.

[0004] 참조유전체 해독을 통해 유용 형질과 관련된 유전자들을 발굴하고 관련 대사경로를 이해할 수 있으며 이를 기반

으로 종 다양성 분석 연구를 수행하여 야생 균주 및 우량 형질 보유 균주들을 체계적으로 선별 및 확보하고, 더 나아가 우수 목표 형질을 가진 균주로의 개량이 필요하다.

[0005] 국내에서 일부 모델 생물체로 활용되는 곰팡이 혹은 효모 대상의 오믹스 분석 연구는 진행된 바 있으나, 전통 주류 진핵 미생물에 관한 유전체 기반 오믹스 분석 연구는 미비한 상태이므로, 효모 및 곰팡이를 이용한 전통 주류의 유전체 기능에 대한 총체적인 연구 및 품미, 품질관리에 대한 미생물 유전체와 발효조건의 상관관계에 대한 연구가 필요한 실정이다.

[0006] 전통 주류산업에서 효모 균주의 생화학적 작용에 의해 다양한 대사체들이 최종적으로 생성되며, 이들에 의해 전통 발효주의 기능성, 영양학적 특성 및 품질 특성이 결정된다. 특히, 제품의 기호도와 밀접한 연관이 있는 품미와 관련한 미생물 대상의 전사체/대사체에 대한 총체적인 연구는 제품 개선을 위한 기초적인 자료로 활용될 수 있으며, 산업적으로도 품질 관리에 유용한 정보를 제공할 것이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2014-0055917호(2014.05.09)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명의 목적은 당화 및 발효능이 우수한 전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주 및 이를 이용한 막걸리 제조방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0009] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 수탁번호 KCTC18466P로 기탁된, 당화 및 발효능이 우수한 전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주를 제공한다.

[0010] 또한, 본 발명은 상기 균주를 사용하여, 곡류 원료로 막걸리를 제조하는 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0011] 본 발명은 당화 및 발효능이 우수한 전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주(KCTC18466P) 및 이를 이용한 막걸리 제조방법에 관한 것으로서, 국내 전통주에서 분리한 효모균을 통해 우수한 발효능과 기능성을 가진 종균 개발에 필요한 유용 유전자원을 확보하고, 전통주의 표준화 및 고급화 공정에 활용할 수 있는 기반 기술 개발은 바이오산업에서의 국제 경쟁력 제고에 크게 기여할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0012] 도 1은 본 발명에 따른 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 (KCTC18466P)의 계통관계를 유전체 간 비교(whole genome comparison)을 통해 나타낸 것이다.

도 2는 본 발명에 따른 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 (KCTC18466P)를 현미경으로 관찰한 결과이다.

도 3은 본 발명에 따른 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 (KCTC18466P)로 빚은 막걸리의 관능평가 결과이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0013] 본 발명은 수탁번호 KCTC18466P로 기탁된, 당화 및 발효능이 우수한 전통주 발효 효모 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주를 제공한다.

[0014] 상세하게는, 상기 균주는 누룩으로부터 분리되었으며, 알파-아밀라아제(Alpha-Amylase), 글루코아밀라아제

(Glucoamylase) 또는 프로티아제(Protease) 활성이 우수한 것을 특징으로 한다.

[0015] 상세하게는, 상기 균주는 서열번호 3으로 표시되는 내부 전사 영역(Internal transcribed spacer; ITS)으로 이루어질 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 또한, 본 발명은 상기 균주를 사용하여, 곡류 원료로 막걸리를 제조하는 방법을 제공한다.

[0017] 상세하게는, 상기 곡류 원료는 막걸리를 제조할 수 있는 찹쌀, 멥쌀, 보리쌀, 현미, 옥수수, 고구마, 밀 등의 곡류 원료일 수 있으며, 보다 상세하게는 쌀 또는 밀기울일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0018] 본 발명에 있어서, '막걸리'는 막걸리는 찹쌀, 멥쌀, 보리쌀, 현미, 옥수수, 고구마, 밀 등의 전분질을 원료로 하고 발효제로서 누룩을 첨가하여 발효시킨 술덧을 혼탁하게 제성한 우리나라 고유의 전통주로, 단맛, 신맛, 쓴맛, 매운맛과 청량감이 있고 알코올 함량이 2~8%인 술이다. 다른 주류와 달리 막걸리는 각종 영양원이 풍부하게 함유되어 있는데, 인체 신진대사에 관여하는 비타민 B군을 비롯한 라이신, 류신, 아르기닌 등의 필수 아미노산, 풍미물질인 에틸아세테이트, 아밀아세테이트, 에틸카르보에이트 등의 에스테르, 새콤한 맛을 내어 갈증을 해소케 하는 유기산, 그리고 간 기능을 도와주는 아세틸콜린 등이 함유되어 있다. 이와 같이 막걸리는 영양학적 및 기능적 가치가 높을 뿐만 아니라 생효모가 함유되어 있기 때문에 다른 주류와 비교할 수 없는 독특한 맛을 지니고 있다.

[0019] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0020] <실시예 1> 신균주인 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81의 분리

[0021] 1. 균주의 분리

[0022] 본 발명자들은 당화, 발효 및 풍미를 가진 신균주를 발굴하기 위하여 2013년 7월 제주지역의 전통방식으로 만든 누룩을 수집하여 4℃에서 보관하고 고르게 분쇄한 누룩 10 g을 90 ml의 0.1% 펩톤(peptone)에 현탁한 후 단계적으로 10^{-2} ~ 10^{-7} 배 희석하였다. 희석한 현탁액은 100 μ l씩 분리용 평판배지에 도말하여 25℃에 배양하였다. 이때 사용되는 분리배지는 Dichloran-glycerol agar (DG18: Peptone 0.5%, Glucose 1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 0.2% Dichloran 1.0 ml, Chloramphenicol 0.01%, Agar 1.5%) 배지와 Dichloran rose bengal chloramphenicol agar (DRBC: Peptone 0.5%, Glucose 1%, KH_2PO_4 0.1%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05%, 0.2% Dichloran 1.0 ml, Rose bengal 0.0025%, Chloramphenicol 0.01%, Agar 1.5%) 배지이며, 이후 분리된 균주는 Malt extract agar (MEA: Malt extract 3%, Mycological peptone 0.5%, Agar 1.5%) 배지에 접종하고 보존하였다.

[0023] 2. 선별된 균주의 동정

[0024] (1) 형태학적 동정

[0025] 상기에서 선별된 균주를 대상으로 현미경을 통해 균주의 형태학적 모양을 관찰하였다. 관찰 결과, 동정된 균주는 5 ~ 10 μ m 크기의 단일세포가 multipolar hyphae를 형성하면서, 각 마디가 20 ~ 40 μ m로 신장되어 연결되어 있는 긴 hyphae를 형성하는 모양을 갖는 것을 관찰할 수 있었다(도 2).

[0026] (2) 분자생물학적 동정

[0027] 상기에서 선별한 균주의 분자생물학적 동정을 위해 CTAB 방법을 이용하여 DNA를 추출하였고, ITS (Internal transcribed spacer)를 PCR (polymerase chain reaction) 증폭하기 위하여 배양체로부터 비드 비팅(bead beating) 방법을 이용하여 DNA를 추출하였고, 내부 전사되는 ITS(Internal transcribed spacer)를 PCR (polymerase chain reaction) 증폭하기 위하여 ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG; 서열번호 1) / ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC; 서열번호 2)의 프라이머 세트를 각각 이용하여 증폭한 후 정제를 통해 (주)Macrogen에 시퀀싱을 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 분석된 ITS 부위의 염기서열은 서열번호 3에 나타났다.

[0028] (3) 균학적 동정

[0029] 상기 동정한 신균주인 사카로마이콥시스 피브리게라 (*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81의 균학적 특징을 조사하였는데, 즉 다양한 온도 조건, 다양한 배지 및 질소원 하에서 최적의 배양 조건을 조사하였다.

[0030] 조사 결과, 표 1에서 나타난 바와 같이 생육 온도는 25 ~ 42℃의 온도에서 성장하는 특징이 있는 것을 나타냈으

며, 특히 25 ~ 37℃에서 성장이 우수한 것으로 나타났다(표 1).

표 1

배지	25℃	37℃	42℃	45℃
CM	+++	+++	+	-
PDA	+++	+++	+	-
YPD	+++	+++	+	-
MM	-	-	-	-
MM (NaNO ₃)	-	-	-	-
MM (NH ₄ Cl)	-	-	-	-

<실시예 2> 신균주인 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81의 효소 역가 특성

본 발명에서 동정한 신균주 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 및 비교대상균주인 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KPH12 균주로 만든 쌀코지와 밀기울 코지의 알파-아밀라아제, 글루코아밀라아제, 프로테아제(곰팡이성)의 역가를 확인하였다(표 2). 분석방법은 식품의약품안전처의 식품첨가물 공전에 따라 분석하였다.

표 2

		알파-아밀라아제 (Alpha-Amylase)	글루코아밀라아제 (Glucoamylase)	프로테아제 (Protease)
사카로마이콥시스 피브리게라 KJJ81	쌀코지 (Rice Koji)	2.821	0	0
	밀기울 코지 (Wheat Koji)	7.863	131.55	53.27
사카로마이콥시스 피브리게라 KPH12	쌀코지 (Rice Koji)	4.398	31.04	425.25
	밀기울 코지 (Wheat Koji)	1.967	68.06	537.06

Alpha-amylase: the amount of ceralpha units per gram of koji.

The glucose activity: the units of glucose released per gram of koji.

One unit of protease: the amount of enzyme required to release 1μg of tyrosine/hour.

<실시예 3> 신균주인 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81로 빚은 막걸리의 특성

1. 쌀 코지

쌀을 세미 후 2시간 동안 침지한 다음 30분간 물 빼기를 한 뒤 증미기를 이용하여 1시간 30분 증자한다. 증자된 쌀을 실온에서 냉각한 뒤 쌀 중량의 0.1%의 종균을 접종하여 항온항습배양기에서 30℃, 상대습도 70% 조건에서 72시간 배양하였다.

2. 밀기울 코지

밀기울 50g에 증류수 30mL를 첨가해 반죽한 뒤 상온에서 10분간 방치한 뒤 밀기울 반죽 30g씩 500mL 삼각 플라스크에 넣고 121℃, 20분간 가압 살균한다. 균주별로 배양시킨 사면배지에 증류수 10mL를 첨가해 균 현탁액을 제조하여 실온에서 냉각한 밀기울에 접종한다. 접종 완료 후 항온항습배양기에서 30℃, 상대습도 70% 조건에서

72시간 배양하였다.

3. 단양주 막걸리 만들기

1.4L의 물에 4×10^8 cells/g의 각각의 균주를 넣고 코지 200g을 넣은 다음 800g의 고두밥을 넣고 90% Lactic acid 5.5mL를 넣는다. 25℃에서 7일간 배양 후 120 mesh 필터로 거른 다음, 21~50세의 12명 남녀에게 관능평가 (향, 단맛, 신맛, 알코올향, 탄산의 세기, 바디감)를 분석하고, 유기산 및 알코올 함량을 분석하기 위하여 -70℃에 보관하였다(표 3). 제조된 막걸리의 분석결과는 표 4에 나타냈으며, 관능평가 결과는 표 5 및 도 3에 나타냈다.

표 3

Organic acids	Relative peak area (mean±SD)
2-(Methoxyimino) propanoic acid	1.298±0.178
Acetic acid	0.275±0.027
Oxalic acid	0.047±0.01
Succinic acid	14.415±0.895
2-Butenedioic acid	0.129±0.014
2-Methylbenzoic acid	0.612±0.038
2-(Lactoyloxy)propanoic acid (lactic acid dimer)	7.966±0.183
Methyl valerate	0.022±0.005
2-Hydroxy-2-methylsuccinic acid	0.261±0.013
Malic acid	5.808±0.108
Ethyl 4-hydroxybenzoate	0.887±0.008
2,3,4-Trihydroxybutanoic acid	0.093±0.007
Glutaric acid	4.264±0.051
3-Phenylpropanoic acid	0.287±0.013
Phenylacetic acid	0.016±0.004
Citric acid	0.789±0.039

표 4

	막걸리 결과	
	사카로마이콥시스 피브리게라 KJJ81	사카로마이콥시스 피브리게라 KPH12
pH	4.2	4.1
Brix	13	17.5
Reducing Sugars	24.50	20.16
Liquid Volume (ml)	1000	700
Rice Weight (g)	3118.77	3179.16

표 5

	관능평가 결과	
	사카로마이콥시스 피브리게라 KJJ81	사카로마이콥시스 피브리게라 KPH12
Scent	3.6	2.4
Sweet	3.4	2.6
Sour	6.2	7.4
Alcohol/Bitterness	6.2	5
탄산의 세기	4	3.2
Body	3.8	3.4
Overall Acceptability	3.6	1.8

[0053] <실시예 4> 신균주인 사카로마이콥시스 피브리게라(*Saccharomycopsis fibuligera*) KJJ81 균주의 참조유전체 서열 해독 및 유전체 분석

[0054] KJJ81과 KPH12 유전체 시퀀싱을 위하여 long-reads, short reads, long-mate pair reads 시퀀싱을 수행하였다. Pacific Biosciences 사의 Single molecule real time sequencing (SMRT) 기술을 이용하여 평균 9 kb 크기로 총 94x의 long-reads 시퀀싱을 수행하였다. 또한 TruSeq Synthetic Long Reads (TSLR) sequencing library (Illumina)를 이용하여 KPH12 및 KJJ81 균주에서 각각 23X and 10X의 시퀀싱을 수행하였다. 또한 86X 이상의 short insert reads (a 500-bp library)와 87 X 이상의 long-mated pair reads (a 15-kb library)를 Illumina HiSeq2500 sequencing 기술을 이용하여 100-bp paired-end 시퀀싱을 수행하였다. 이렇게 생산된 시퀀싱 데이터를 가지고 long-SMRT 시퀀싱 reads는 HGAP3, 15-kb mate-pair와 500-bp short insert reads는 SSPACE 소프트웨어를 이용하여 scaffolds를 만들었다. Short read data를 이용하여 Gap들은 GapCloser 소프트웨어를 이용하여 수정하였다. (Ref.#). 게놈 조립(genome assembly)의 질(quality)은 QAST 소프트웨어를 이용하여 수행한 TSLR 시퀀싱 조립 결과와 비교 분석하였고 반복서열 분석 및 염색체 수준의 게놈 scaffolds를 제작하기 위해 KPH12 균주를 가지고 BioNano physical mapping을 수행하여 rRNA cluster 수를 분석하였고 KPH12 균주는 7개의 염색체를 가졌으며 KJJ81 균주는 7쌍의 염색체를 가진 균주로 분석되었다. KPH12 와 KJJ81 두 유전체의 게놈크기는 각각 약 19.7, 38.6 Mb의 크기를 지니는 것으로 분석되었다.

수탁번호

[0055]

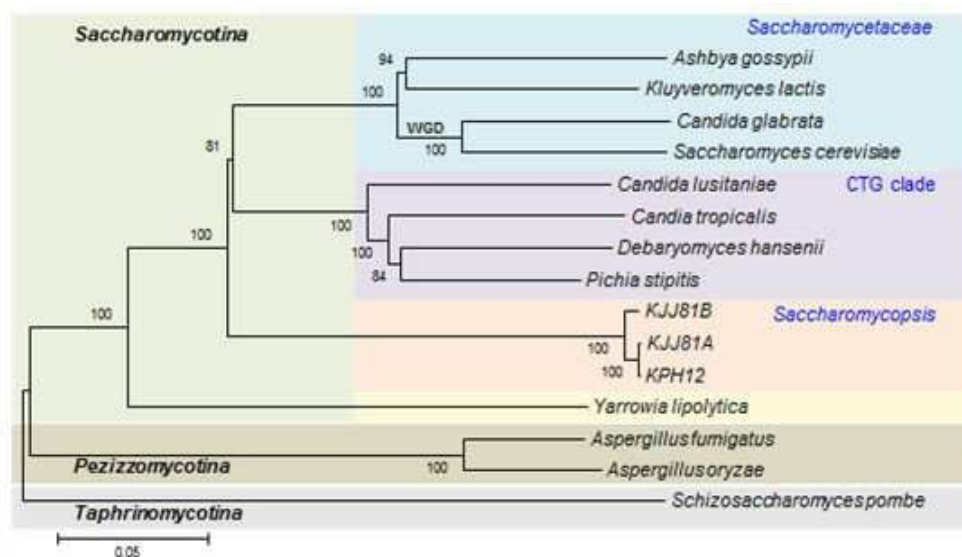
기탁기관명 : 한국생명공학연구원

수탁번호 : KCTC18466P

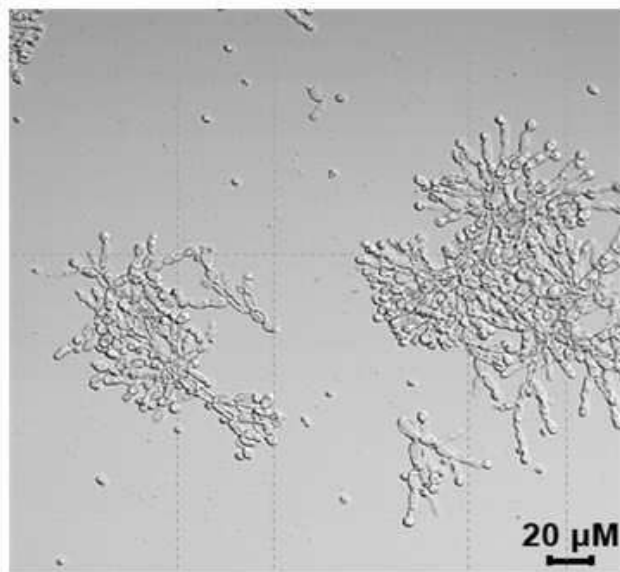
수탁일자 : 20160503

도면

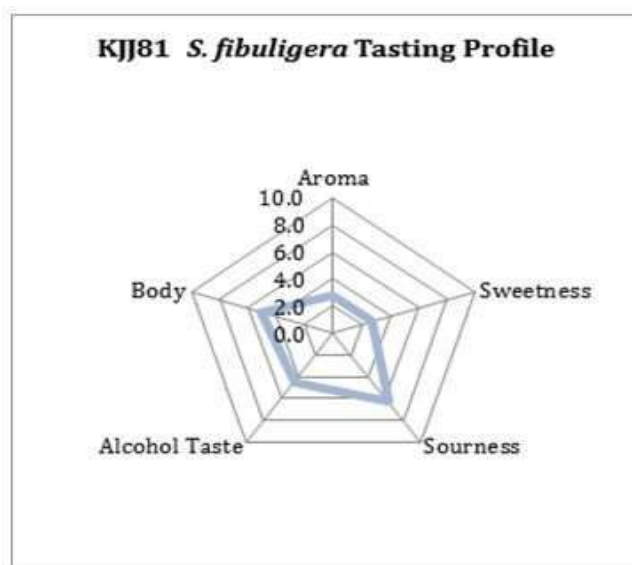
도면1



도면2



도면3



서열 목록

- <110> Soongsil University Research Consortium techno-PARK
Chung-Ang University Industry-Academy Cooperation Foundation
- <120> Saccharomycopsis fibuligera KJJ81 strain with high
saccharification and fermentation capability and the method for
preparing makgeolli
- <130> ADP-2016-0156
- <160> 3
- <170> KopatentIn 2.0
- <210> 1

<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	1	
tccgtaggtg aacctgcgg		19
<210>	2	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	Artificial Sequence	
<220><223>	primer	
<400>	2	
tcctccgctt attgatatgc		20
<210>	3	
<211>	558	
<212>	DNA	
<213>	Saccharomycopsis fibuligera	
<400>	3	
ctcttataca cagtgttttt gtttgcgaat ttggtttagt ttgttggttt tcattcgaaa		60
ggatgaagat tgattgctaa atcttattca gctttttaaa ctcatatctc tttttaagag		120
aaatgtatgt ttttaattac aactagtcga ttttacaac taaaagttaa aaactttcag		180
caacggatct cttggttctc gcatcgatga agaacgcage gaattgcgat aagtaatgtg		240
aattgcagat tttcgtgaat catcgaatct ttgaacgcat attgcgctct atagtattct		300
atagagcatg cctgtttgag cgtcatttct ctcttaaacc tttgggttta gtattgaagg		360
ttgtgttagc ttctgctaac tcctttgaaa tgacttggca attgattgag ttttccatat		420
atttgcttaa ggatttaata ttaggttcta ccaacttatt aaataccctt ttgcgaagga		480
cttactcgtg tatcaaggcc ttataacttt gtcattaatt ttgacctcga atcaggtaag		540
gatacccgct gaacttaa		558



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월16일
(11) 등록번호 10-1858903
(24) 등록일자 2018년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
G01N 33/02 (2006.01) G01N 30/12 (2006.01)
G01N 30/72 (2006.01)
(52) CPC특허분류
G01N 33/025 (2013.01)
G01N 30/7206 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-0083318
(22) 출원일자 2017년06월30일
심사청구일자 2017년06월30일
(56) 선행기술조사문헌
US20020119513 A1
Development of a SPME-GC-MS method for
spoilage detection in case of plums
inoculated with *Penicillium expansum* (Acta
Alimentaria, 2011, 40(Suppl.18), pp 188-197)
Regeneration of volatile compounds in Fuji
apples following ultra low oxygen atmosphere
storage and its effect on sensory
acceptability(2008)

(73) 특허권자
송실대학교산학협력단
서울특별시 동작구 상도로 369 (상도동)
이화여자대학교 산학협력단
서울특별시 서대문구 이화여대길 52 (대현동, 이
화여자대학교)
(72) 발명자
서정아
서울특별시 서초구 서운로9길 18, 101동 605호 (서
초동, 자연인아파트)
김영석
경기도 고양시 일산동구 위시티4로 46, 208동
1801호
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인태백

기술이전 희망 : 기술양도

전체 청구항 수 : 총 11 항

심사관 : 기광용

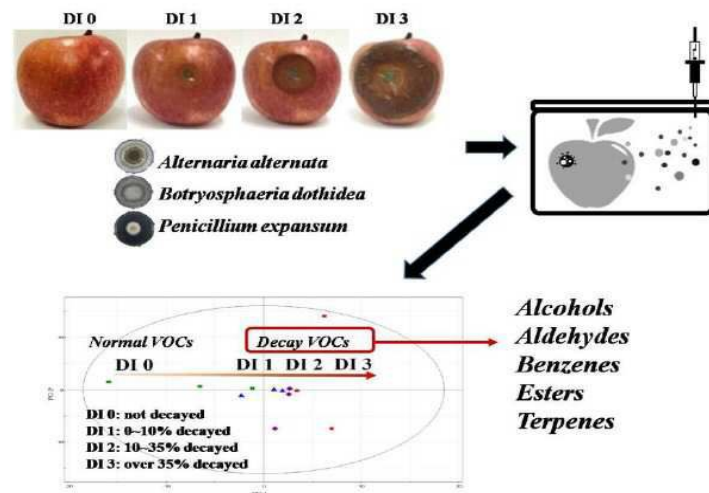
(54) 발명의 명칭 사과 부패 곰팡이 유래 휘발성 화합물을 포함하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물

(57) 요약

본 발명은 사과 부패 곰팡이 유래 휘발성 화합물을 포함하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물에 관한 것으로서, 부패한 부사로부터 분리한 3가지의 부패균 보트리오스페리아 도치데아(*Botryosphaeria dothidea*), 페니실리움 엑스판섬(*Penicillium expansum*), 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*)를 사과에 인공 접종하여

(뒷면에 계속)

대표도 - 도3



온도 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 상대 습도 $90 \pm 2\%$ 에서 보관하면서 접종하기 전과 접종 후 10% 미만으로 부패한 상태, 10~35% 부패한 상태, 35% 이상 부패한 상태의 단계에 맞춰 휘발성 성분을 분석하였다. 또한, 주요 부패 균주들 각각의 부패되면서 차별적으로 증가, 생성되는 휘발성 성분들을 분석하였다. 부패한 부사로부터 분리한 부패 원인균에 따른 사과 부패지수별 냄새 마커를 발굴하고, 냄새 DB를 구축하여 각 정보의 상관성 분석을 통하여 농산물 수확 후 관리시 부패에 의한 경제적 손실 및 다양한 농수축산식품의 부패 방지로 경제적 손실 저감에 기여할 것으로 예상된다.

(52) CPC특허분류

G01N 2030/128 (2013.01)

G01N 2030/884 (2013.01)

(72) 발명자

김민주

서울특별시 구로구 개봉로20길 6, 104동 1403호 (개봉동, 현대아파트)

이상미

서울특별시 강남구 선릉로126길 22, 111동 203호 (삼성동, 롯데캐슬프리미어아파트)

김성미

경기도 안양시 만안구 경수대로 1193, 114동 303호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 315043-3

부처명 농림축산식품부

연구관리전문기관 농림수산물기술기획평가원

연구사업명 수출전략기술개발사업

연구과제명 수출용 신선 농식품 고품질화를 위한 냄새지문 활용 부패감지기 개발

기 여 율 1/1

주관기관 숭실대학교 산학협력단

연구기간 2015.08.14 ~ 2018.08.13

공지예외적용 : 있음

명세서

청구범위

청구항 1

(E)-헥스-3-에닐 아세테이트((E)-hex-3-enyl acetate), 1-메틸-4-프로판-2-일벤젠(1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene), 2-(2-에톡시에톡시)에탄올(2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol), 메틸 벤조에이트(Methyl benzoate), 1-메틸-4-프로프-1-엔-2-일벤젠(1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene), 아세트알데하이드(Acetaldehyde), 2-메틸프로판-1-올(2-Methylpropan-1-ol), 프로판-1-올(Propan-1-ol), 3-헥센-1-올(3-Hexen-1-ol), 2-메틸프로프-2-에날(2-Methylprop-2-enal), 펜탄-3-원(Pentan-3-one), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,3-디엔(1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,4-디엔(1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene), 2-펜틸퓨란(2-Pentylfuran), (E)-헥스-2-에날((E)-Hex-2-enal), 메틸 헵타노에이트(Methyl heptanoate), 에틸 데카노에이트(Ethyl decanoate), 에틸 2-페닐아세테이트(Ethyl 2-phenylacetate), 디에틸 카보네이트(Diethyl carbonate), 프로필 옥타노에이트(Propyl octanoate), 1-옥텐-3-올(1-Octen-3-ol), 3-옥타논(3-Octanone), 페닐메탄올(Phenylmethanol), 2-에틸헥산-1-올(2-Ethylhexan-1-ol), 아세토페논(Acetophenone), 에틸 (E)-2-메틸부트-2-에노에이트(Ethyl (E)-2-methylbut-2-enoate) 및 3-메틸부타날(3-Methylbutanal)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 유효성분으로 포함하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 사과 부패는 보트리오스페리아 도치데아(*Botryosphaeria dothidea*), 페니실리움 익스판섬(*Penicillium expansum*) 및 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 균주에 의해 부패되는 것을 특징으로 하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물.

청구항 3

제1항에 있어서, (E)-헥스-3-에닐 아세테이트((E)-hex-3-enyl acetate), 1-메틸-4-프로판-2-일벤젠(1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene), 1-메틸-4-프로프-1-엔-2-일벤젠(1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene), 2-메틸프로판-1-올(2-Methylpropan-1-ol), 프로판-1-올(Propan-1-ol), 3-헥센-1-올(3-Hexen-1-ol), 2-메틸프로프-2-에날(2-Methylprop-2-enal), 펜탄-3-원(Pentan-3-one), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,3-디엔(1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene) 및 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,4-디엔(1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 유효성분으로 포함하는 보트리오스페리아 도치데아(*Botryosphaeria dothidea*)에 의한 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물.

청구항 4

제1항에 있어서, (E)-헥스-2-에날((E)-Hex-2-enal), 메틸 헵타노에이트(Methyl heptanoate), 에틸 데카노에이트(Ethyl decanoate), 에틸 2-페닐아세테이트(Ethyl 2-phenylacetate), 디에틸 카보네이트(Diethyl carbonate), 프로필 옥타노에이트(Propyl octanoate), 1-옥텐-3-올(1-Octen-3-ol) 및 3-옥타논(3-Octanone)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 유효성분으로 포함하는 페니실리움 익스판섬(*Penicillium expansum*)에 의한 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물.

청구항 5

제1항에 있어서, 페닐메탄올(Phenylmethanol), 2-에틸헥산-1-올(2-Ethylhexan-1-ol) 및 아세토페논(Acetophenone)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 유효성분으로 포함하는 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*)에 의한 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사과는 부사(Fuji)인 것을 특징으로 하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물.

청구항 7

사과 샘플로부터 (E)-헥스-3-에닐 아세테이트((E)-hex-3-enyl acetate), 1-메틸-4-프로판-2-일벤젠(1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene), 2-(2-에톡시에톡시)에탄올(2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol), 메틸 벤조에이트(Methyl benzoate), 1-메틸-4-프로프-1-엔-2-일벤젠(1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene), 아세트알데하이드(Acetaldehyde), 2-메틸프로판-1-올(2-Methylpropan-1-ol), 프로판-1-올(Propan-1-ol), 3-헥센-1-올(3-Hexen-1-ol), 2-메틸프로프-2-에날(2-Methylprop-2-enal), 펜탄-3-원(Pentan-3-one), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,3-디엔(1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,4-디엔(1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene), 2-펜틸퓨란(2-Pentylfuran), (E)-헥스-2-에날((E)-Hex-2-enal), 메틸 헵타노에이트(Methyl heptanoate), 에틸 데카노에이트(Ethyl decanoate), 에틸 2-페닐아세테이트(Ethyl 2-phenylacetate), 디에틸 카보네이트(Diethyl carbonate), 프로필 옥타노에이트(Propyl octanoate), 1-옥텐-3-올(1-Octen-3-ol), 3-옥타논(3-Octanone), 페닐메탄올(Phenylmethanol), 2-에틸헥산-1-올(2-Ethylhexan-1-ol), 아세토페논(Acetophenone), 에틸 (E)-2-메틸부트-2-에노에이트(Ethyl (E)-2-methylbut-2-enoate) 및 3-메틸부타날(3-Methylbutanal)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 검출하는 단계를 포함하는 사과 부패 감지 방법.

청구항 8

제7항에 있어서, 사과 샘플로부터 (E)-헥스-3-에닐 아세테이트((E)-hex-3-enyl acetate), 1-메틸-4-프로판-2-일벤젠(1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene), 1-메틸-4-프로프-1-엔-2-일벤젠(1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene), 2-메틸프로판-1-올(2-Methylpropan-1-ol), 프로판-1-올(Propan-1-ol), 3-헥센-1-올(3-Hexen-1-ol), 2-메틸프로프-2-에날(2-Methylprop-2-enal), 펜탄-3-원(Pentan-3-one), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,3-디엔(1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene) 및 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,4-디엔(1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물 검출시, 보트리오스페리아 도치테아(*Botryosphaeria dothidea*)에 의한 사과 부패라고 판단하는 단계를 포함하는 사과 부패 감지 방법.

청구항 9

제7항에 있어서, 사과 샘플로부터 (E)-헥스-2-에날((E)-Hex-2-enal), 메틸 헵타노에이트(Methyl heptanoate), 에틸 데카노에이트(Ethyl decanoate), 에틸 2-페닐아세테이트(Ethyl 2-phenylacetate), 디에틸 카보네이트(Diethyl carbonate), 프로필 옥타노에이트(Propyl octanoate), 1-옥텐-3-올(1-Octen-3-ol) 및 3-옥타논(3-Octanone)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물 검출시, 페니실리움 익스판섬(*Penicillium expansum*)에 의한 사과 부패라고 판단하는 단계를 포함하는 사과 부패 감지 방법.

청구항 10

제7항에 있어서, 사과 샘플로부터 페닐메탄올(Phenylmethanol), 2-에틸헥산-1-올(2-Ethylhexan-1-ol) 및 아세토페논(Acetophenone)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물 검출시, 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*)에 의한 사과 부패라고 판단하는 단계를 포함하는 사과 부패 감지 방법.

청구항 11

제7항 내지 제10항 중 어느 한 항에 있어서, 상기 사과는 부사(Fuji)인 것을 특징으로 하는 사과 부패 감지 방법.

발명의 설명**기술 분야**

[0001] 본 발명은 사과 부패 곰팡이 유래 휘발성 화합물을 포함하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 수확 후 저장 기간 동안의 품질을 개선하기 위해서, 많은 과일들은 최적의 시기 전에 상업적으로 수확되고

있다. 하지만, 저장 기간 동안 조직감이 손상되는 등 과일의 특성이 변할 수 있으며, 특히 저온 저장 기간 동안에는 질감이 약해지거나 퍼석거림을 야기될 수 있다. 과일의 향은 복합적으로 섞인 휘발성 화합물에 의해 결정되며, 이는 종종 과일의 품질을 결정하는 중요한 인자로 여겨지기도 한다. 이에, 수확 후 저장 기간 동안 적절한 향기 프로파일을 유지하는 것은 농업에 있어 가장 중요한 이슈 중 하나이다. 여러 연구 결과, 사과에는 350개 이상의 휘발성 성분을 포함하고 있는 것으로 밝혀졌는데, 특히 에스테르가 가장 많은 것으로 알려졌다. 사과에 의해 방출되는 휘발성 화합물은 수확 및 성숙 시기에 따라 영향을 받고, 과일 숙성 기간 동안 빠르게 변화한다. 특히, 특정 알코올 및 에스테르는 수확 시기에 따라 상당히 달라진다. 수확 후 손실의 대부분은 저장 기간 동안의 질병으로 인한 것이다. 병든 과일의 저장은 휘발성 유기 화합물(volatile organic compounds; VOCs)에 변화를 보이는데, 보통 악취를 발생시켜 가치를 떨어뜨린다. 저장 시 질병은 주로 병원성 곰팡이에 의해 발생하는데, 이는 식물성 바이오매스 분해에 중요한 역할을 한다. 카보하이드레이트-가수분해 효소를 생산하여, 곰팡이는 식물세포벽 뿐만 아니라 셀룰로오스 및 펙틴과 같은 식물 다당류를 분해할 수 있다. 또한, 곰팡이는 VOCs 형태의 1차 및 2차 대사체를 생산한다. 곰팡이에 의해 방출되는 VOCs의 변화는 과일의 냄새 품질에 부정적인 영향을 미칠 수 있고, 사람의 건강에도 나쁜 영향을 미칠 수 있다.

[0003] 사과는 저장 기간 동안의 질병에 매우 취약하며, 90종 이상의 곰팡이가 저장된 사과의 부패에 관여한다고 밝혀졌다. 몇몇 연구에서는 곰팡이-감염된 사과에서의 휘발성 화합물 변화에 대해 보고하였다. 하지만, 상기 연구들에서는 곰팡이-접종 및 곰팡이-미접종 사과의 VOCs를 비교하였을 뿐, 사과의 각 부패 단계 및 특정 감염 균주에 따라 변화하는 VOCs 검출에 대한 연구는 미흡한 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0004] (특허문헌 0001) 중국공개특허 CN105241821A (2016.01.13 공개)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0005] 본 발명의 목적은 사과 부패 곰팡이 유래 휘발성 화합물을 포함하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물 및 이를 이용한 사과 부패 감지 방법을 제공하는 데에 있다.

과제의 해결 수단

[0006] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 (E)-헥스-3-에닐 아세테이트((E)-hex-3-enyl acetate), 1-메틸-4-프로판-2-일벤젠(1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene), 2-(2-에톡시에톡시)에탄올(2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol), 메틸 벤조에이트(Methyl benzoate), 1-메틸-4-프로프-1-엔-2-일벤젠(1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene), 아세트알데하이드(Acetaldehyde), 2-메틸프로판-1-올(2-Methylpropan-1-ol), 프로판-1-올(Propan-1-ol), 3-헥센-1-올(3-Hexen-1-ol), 2-메틸프로프-2-에날(2-Methylprop-2-enal), 펜탄-3-원(Pentan-3-one), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,3-디엔(1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,4-디엔(1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene), 2-펜틸퓨란(2-Pentylfuran), (E)-헥스-2-에날((E)-Hex-2-enal), 메틸 헵타노에이트(Methyl heptanoate), 1-메톡시-3-메틸벤젠(1-Methoxy-3-methylbenzene), 에틸 데카노에이트(Ethyl decanoate), 에틸 2-페닐아세테이트(Ethyl 2-phenylacetate), 디에틸 카보네이트(Diethyl carbonate), 프로필 옥타노에이트(Propyl octanoate), 1-옥텐-3-올(1-Octen-3-ol), 3-옥타논(3-Octanone), 페닐메탄올(Phenylmethanol), 2-에틸헥산-1-올(2-Ethylhexan-1-ol), 아세토펜론(Acetophenone), 에틸 (E)-2-메틸부트-2-에노에이트(Ethyl (E)-2-methylbut-2-enoate) 및 3-메틸부탈날(3-Methylbutanal)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 유효성분으로 포함하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물을 제공한다.

[0007] 또한, 본 발명은 사과 샘플로부터 (E)-헥스-3-에닐 아세테이트((E)-hex-3-enyl acetate), 1-메틸-4-프로판-2-일벤젠(1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene), 2-(2-에톡시에톡시)에탄올(2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol), 메틸 벤조에이트(Methyl benzoate), 1-메틸-4-프로프-1-엔-2-일벤젠(1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene), 아세트알데하이드(Acetaldehyde), 2-메틸프로판-1-올(2-Methylpropan-1-ol), 프로판-1-올(Propan-1-ol), 3-헥센-1-올(3-

Hexen-1-ol), 2-메틸프로프-2-에날(2-Methylprop-2-enal), 펜탄-3-원(Pentan-3-one), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,3-디엔(1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,4-디엔(1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene), 2-펜틸퓨란(2-Pentylfuran), (E)-헥스-2-에날((E)-Hex-2-enal), 메틸 헵타노에이트(Methyl heptanoate), 1-메톡시-3-메틸벤젠(1-Methoxy-3-methylbenzene), 에틸 데카노에이트(Ethyl decanoate), 에틸 2-페닐아세테이트(Ethyl 2-phenylacetate), 디에틸 카보네이트(Diethyl carbonate), 프로필 옥타노에이트(Propyl octanoate), 1-옥텐-3-올(1-Octen-3-ol), 3-옥타논(3-Octanone), 페닐메탄올(Phenylmethanol), 2-에틸헥산-1-올(2-Ethylhexan-1-ol), 아세토펜(Acetophenone), 에틸 (E)-2-메틸부트-2-에노에이트(Ethyl (E)-2-methylbut-2-enoate) 및 3-메틸부타날(3-Methylbutanal)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 검출하는 단계를 포함하는 사과 부패 감지 방법을 제공한다.

발명의 효과

[0008] 본 발명은 사과 부패 곰팡이 유래 휘발성 화합물을 포함하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물에 관한 것으로서, 부패한 부사로부터 분리한 3가지의 부패균 보트리오스페리아 도치데아(*Botryosphaeria dothidea*), 페니실리움 익스판섬(*Penicillium expansum*), 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*)를 사과에 인공 접종하여 온도 $25\pm1^{\circ}\text{C}$, 상대 습도 $90\pm2\%$ 에서 보관하면서 접종하기 전과 접종 후 10% 미만으로 부패한 상태, 10~35% 부패한 상태, 35% 이상 부패한 상태의 단계에 맞춰 휘발성 성분을 분석하였다. 또한, 주요 부패 균주들 각각의 부패되면서 차별적으로 증가, 생성되는 휘발성 성분들을 분석하였다. 부패한 부사로부터 분리한 부패 원인균에 따른 사과 부패지수별 냄새 마커를 발굴하고, 냄새 DB를 구축하여 각 정보의 상관성 분석을 통하여 농산물 수확 후 관리시 부패에 의한 경제적 손실 및 다양한 농수축산식품의 부패 방지로 경제적 손실 저감에 기여할 것으로 예상된다.

도면의 간단한 설명

[0009] 도 1은 병원균 접종 사과에서 휘발성 성분에 대한 주성분 분석(principal-components analysis; PCA) 점수 플롯을 나타낸다.

도 2는 부패 지수에 따른 병원균 접종된 '부사' 사과에서의 부패 부위 패턴을 나타낸다. DI 0: 부패 지수 0; DI 1: 부패 지수 1; DI 2: 부패 지수 2; DI 3: 부패 지수 3; PE: 페니실리움 익스판섬(*Penicillium expansum*; PE) 접종; BD: 보트리오스페리아 도치데아(*Botryosphaeria dothidea*; BD) 접종; AA: 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*; AA) 접종.

도 3은 본 발명의 실험 과정 모식도이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0010] 본 발명은 (E)-헥스-3-에닐 아세테이트((E)-hex-3-enyl acetate), 1-메틸-4-프로판-2-일벤젠(1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene), 2-(2-에톡시에톡시)에탄올(2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol), 메틸 벤조에이트(Methyl benzoate), 1-메틸-4-프로프-1-엔-2-일벤젠(1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene), 아세트알데하이드(Acetaldehyde), 2-메틸프로판-1-올(2-Methylpropan-1-ol), 프로판-1-올(Propan-1-ol), 3-헥센-1-올(3-Hexen-1-ol), 2-메틸프로프-2-에날(2-Methylprop-2-enal), 펜탄-3-원(Pentan-3-one), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,3-디엔(1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,4-디엔(1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene), 2-펜틸퓨란(2-Pentylfuran), (E)-헥스-2-에날((E)-Hex-2-enal), 메틸 헵타노에이트(Methyl heptanoate), 1-메톡시-3-메틸벤젠(1-Methoxy-3-methylbenzene), 에틸 데카노에이트(Ethyl decanoate), 에틸 2-페닐아세테이트(Ethyl 2-phenylacetate), 디에틸 카보네이트(Diethyl carbonate), 프로필 옥타노에이트(Propyl octanoate), 1-옥텐-3-올(1-Octen-3-ol), 3-옥타논(3-Octanone), 페닐메탄올(Phenylmethanol), 2-에틸헥산-1-올(2-Ethylhexan-1-ol), 아세토펜(Acetophenone), 에틸 (E)-2-메틸부트-2-에노에이트(Ethyl (E)-2-methylbut-2-enoate) 및 3-메틸부타날(3-Methylbutanal)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 유효성분으로 포함하는 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물을 제공한다.

[0011] 바람직하게는, 상기 사과 부패는 보트리오스페리아 도치데아(*Botryosphaeria dothidea*), 페니실리움 익스판섬(*Penicillium expansum*) 및 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 균주에 의해 부패될 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0012] 바람직하게는, (E)-헥스-3-에닐 아세테이트((E)-hex-3-enyl acetate), 1-메틸-4-프로판-2-일벤젠(1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene), 1-메틸-4-프로프-1-엔-2-일벤젠(1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene), 2-메틸프로판-1-올

(2-Methylpropan-1-ol), 프로판-1-올(Propan-1-ol), 3-헥센-1-올(3-Hexen-1-ol), 2-메틸프로프-2-에날(2-Methylprop-2-enal), 펜탄-3-원(Pentan-3-one), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,3-디엔(1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene) 및 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,4-디엔(1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 유효성분으로 포함하는 보트리오스페리아 도치데아(*Botryosphaeria dothidea*)에 의한 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물을 제공한다.

[0013] 바람직하게는, (E)-헥스-2-에날((E)-Hex-2-enal), 메틸 헵타노에이트(Methyl heptanoate), 1-메톡시-3-메틸벤젠(1-Methoxy-3-methylbenzene), 에틸 데카노에이트(Ethyl decanoate), 에틸 2-페닐아세테이트(Ethyl 2-phenylacetate), 디에틸 카보네이트(Diethyl carbonate), 프로필 옥타노에이트(Propyl octanoate), 1-옥텐-3-올(1-Octen-3-ol) 및 3-옥타논(3-Octanone)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 유효성분으로 포함하는 페니실리움 익스판섬(*Penicillium expansum*)에 의한 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물을 제공한다.

[0014] 바람직하게는, 페닐메탄올(Phenylmethanol), 2-에틸헥산-1-올(2-Ethylhexan-1-ol) 및 아세토페논(Acetophenone)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 유효성분으로 포함하는 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*)에 의한 사과 부패 감지용 냄새 마커 조성물을 제공한다.

[0015] 바람직하게는, 상기 사과는 부사(Fuji)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0016] 또한, 본 발명은 사과 샘플로부터 (E)-헥스-3-에닐 아세테이트((E)-hex-3-enyl acetate), 1-메틸-4-프로판-2-일벤젠(1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene), 2-(2-에톡시에톡시)에탄올(2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol), 메틸 벤조에이트(Methyl benzoate), 1-메틸-4-프로프-1-엔-2-일벤젠(1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene), 아세트알데하이드(Acetaldehyde), 2-메틸프로판-1-올(2-Methylpropan-1-ol), 프로판-1-올(Propan-1-ol), 3-헥센-1-올(3-Hexen-1-ol), 2-메틸프로프-2-에날(2-Methylprop-2-enal), 펜탄-3-원(Pentan-3-one), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,3-디엔(1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,4-디엔(1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene), 2-펜틸퓨란(2-Pentylfuran), (E)-헥스-2-에날((E)-Hex-2-enal), 메틸 헵타노에이트(Methyl heptanoate), 1-메톡시-3-메틸벤젠(1-Methoxy-3-methylbenzene), 에틸 데카노에이트(Ethyl decanoate), 에틸 2-페닐아세테이트(Ethyl 2-phenylacetate), 디에틸 카보네이트(Diethyl carbonate), 프로필 옥타노에이트(Propyl octanoate), 1-옥텐-3-올(1-Octen-3-ol), 3-옥타논(3-Octanone), 페닐메탄올(Phenylmethanol), 2-에틸헥산-1-올(2-Ethylhexan-1-ol), 아세토페논(Acetophenone), 에틸 (E)-2-메틸부트-2-에노에이트(Ethyl (E)-2-methylbut-2-enoate) 및 3-메틸부탈알(3-Methylbutanal)로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물을 검출하는 단계를 포함하는 사과 부패 감지 방법을 제공한다.

[0017] 바람직하게는, 사과 샘플로부터 (E)-헥스-3-에닐 아세테이트((E)-hex-3-enyl acetate), 1-메틸-4-프로판-2-일벤젠(1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene), 1-메틸-4-프로프-1-엔-2-일벤젠(1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene), 2-메틸프로판-1-올(2-Methylpropan-1-ol), 프로판-1-올(Propan-1-ol), 3-헥센-1-올(3-Hexen-1-ol), 2-메틸프로프-2-에날(2-Methylprop-2-enal), 펜탄-3-원(Pentan-3-one), 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,3-디엔(1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene) 및 1-메틸-4-프로판-2-일사이클로헥사-1,4-디엔(1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물 검출시, 보트리오스페리아 도치데아(*Botryosphaeria dothidea*)에 의한 사과 부패라고 판단할 수 있다.

[0018] 바람직하게는, 사과 샘플로부터 (E)-헥스-2-에날((E)-Hex-2-enal), 메틸 헵타노에이트(Methyl heptanoate), 1-메톡시-3-메틸벤젠(1-Methoxy-3-methylbenzene), 에틸 데카노에이트(Ethyl decanoate), 에틸 2-페닐아세테이트(Ethyl 2-phenylacetate), 디에틸 카보네이트(Diethyl carbonate), 프로필 옥타노에이트(Propyl octanoate), 1-옥텐-3-올(1-Octen-3-ol) 및 3-옥타논(3-Octanone)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물 검출시, 페니실리움 익스판섬(*Penicillium expansum*)에 의한 사과 부패라고 판단할 수 있다.

[0019] 바람직하게는 사과 샘플로부터 페닐메탄올(Phenylmethanol), 2-에틸헥산-1-올(2-Ethylhexan-1-ol) 및 아세토페논(Acetophenone)으로 이루어진 군에서 선택된 어느 하나 이상의 휘발성 유기화합물 검출시, 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*)에 의한 사과 부패라고 판단할 수 있다.

[0020] 바람직하게는, 상기 사과는 부사(Fuji)일 수 있으나, 이에 한정되는 것은 아니다.

[0021] 사과, 특히 부사(Fuji)는 특정 미생물에 의한 부패 증상을 나타내기도 하는데, 1) 물풍선처럼 물러지는 증상은 Bot rot(=white rot)이라 하며 보트리오스페리아 도치데아(*Botryosphaeria dothidea*)에 의해 잘 발생하는 것은

로 알려져 있다. 2) 풍선의 바람이 빠지듯 물러지는 증상은 알테르나리아(*Alternaria*)에 의해 일어나는 증상으로 *Alternaria rot* 이라고 한다. 3) 나이트 모양을 나타낸다고 하여 Ring rot이라고 하며, 4) 탄저병이라고 부르는 증상은 bitter rot이라고 한다.

[0022] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만 하기의 실시예는 본 발명의 내용을 예시하는 것일 뿐 본 발명의 범위가 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다. 본 발명의 실시예는 당업계에서 평균적인 지식을 가진 자에게 본 발명을 보다 완전하게 설명하기 위해 제공되는 것이다.

[0023] <실험예>

[0024] 하기의 실험예들은 본 발명에 따른 각각의 실시예에 공통적으로 적용되는 실험예를 제공하기 위한 것이다.

[0025] 1. 샘플의 준비

[0026] 사과(부사; Fuji)는 2016년 대한민국 충청도 충주에서 재배되었고, 일정한 모양, 크기 및 성숙 정도에 기초하여 질병이 없는 사과를 선별하였다. 표면 살균을 위하여, 각각의 사과 표면을 증류수로 씻어냈고, 70% 에탄올로 헹구었다.

[0027] 2. 병원균

[0028] 3가지 곰팡이 병원균, 보트리오프리아 도치데아(*Botryosphaeria dothidea*; BD), 페니실리움 엑스판섬(*Penicillium expansum*; PE), 알테르나리아 알테르나타(*Alternaria alternata*; AA)를 부패된 부사로부터 분리하였다. 상기 병원균은 단일 포자로 분리되었고, 감자 텍스트로스 아가(potato dextrose agar; PDA) 배지에 배양하였다.

[0029] 3. 화합물

[0030] 본 발명에 사용된 대부분의 휘발성 화합물은 Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA)로부터 구입하였는데, 아세트알데히드(acetaldehyde) 및 헥실 아세테이트(hexyl acetate)는 Fluka (Milwaukee, WI, USA)로부터 구입하였다. 에탄올은 JT Baker (Philipsburg, NJ, USA)로부터 공급받았고, 아세트산, 클로로포름 및 벤젠은 Junsei (Chuo-ku, Tokyo, Japan)로부터 구입하였다.

[0031] 4. 단일 균주 접종 및 배양

[0032] 질병이 없는 각 사과 표면상 동일한 위치에 6.0 mm 지름의 구멍을 뚫었다. 단일 곰팡이 병원균을 포함하는 각각의 6.0 mm-감자 텍스트로스 아가 블럭 조각을 질병이 없는 부사에 접종하였다. 이후, 사과들은 대조군 사과(CF), 페니실리움 엑스판섬 접종 사과(PE), 보트리오프리아 도치데아 접종 사과(BD) 및 알테르나리아 알테르나타 접종 사과(AA)의 4개 그룹으로 나누었다. 모든 그룹은 3개의 사과 샘플로 이루어졌다. 접종된 사과는 온도 24 °C 및 상대 습도 90% 조건으로 항온항습배양기에서 배양하였다.

[0033] 5. 부패 지수(Decay index)

[0034] 사과의 부패 정도에 따라 총 4단계의 부패 지수(decay index; DI 0-3)를 사용하였다. DI 0 = 균 접종 전 부패 없는 정상 상태의 사과, DI 1 = 사과 표면 10% 미만 부패(약간 부패), DI 2 = 사과 표면 10~35% 부패(중간 부패), DI 3 = 사과 표면 35% 이상 부패(심각한 부패).

[0035] 6. 휘발성 화합물 분석

[0036] SPME 법을 이용하여 추출한 시료의 휘발성 향기성분은 6890N GC system과 5975 MSD(agilent technologies, Santa Clara, CA, USA)를 이용하여 분석하였다.

[0037] 사과의 휘발성 유기화합물을 분석하기 위하여 흡착시킨 SPME fiber를 250°C에서 5분간 유지하며 GC/MS에 휘발성 향기성분을 탈착시켰다. 탈착하는 5분 동안 액체질소를 이용하여 -80°C를 유지하는 cryo-focus system을 도입하였다. 컬럼은 HP-5MS UI capillary column(30m length × 0.25mm I.D., 0.15μm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)을 이용하였고, GC 오븐은 40°C에서 6분간 유지한 후 4°C/min의 속도로 220°C까지 올린 후 10°C/min의 속도로 250°C까지 올려 2분간 유지하였다. 이동상 기체로 helium을 0.8mL/min의 속도로 흘러주었으며, 주입기는 splitless 모드로 설정하였다. Mass scan range는 35-350 a.m.u.였으며 Scan rate는 4.45 scans/sec, Transfer line 온도는 280°C이고 Mass spectra ionization energy는 70eV였다.

[0038] 정확한 정량을 위하여 내부표준물질 2,3-dimethyl pyrazine (100 mg/L in methanol) 을 3μL 사용하여 peak area % 값을 (peak area/total peak area×100) 얻었다. 시료 간의 정량적인 차이를 줄이고 증가한 양을 배수

로 표현하기 위하여 fold change (relative peak area/해당 compound가 처음 동정된 시료의 relative peak area)를 도입하여 결과를 도출하였다. 각각의 VOC가 처음 동정되었을 때의 relative peak area 값을 1로 지정하고 그 다음 단계의 relative peak area 값을 배수로 표현하였다.

[0039] <실시예 1> 부패 지수에 따른 병원균 집중 사과에서의 휘발성 화합물 변화

[0040] 자연적으로 부패된 사과를 이용하여 메타 계층 분석을 수행한 예비실험 결과, 사과의 성장 및 저장 과정에서 주로 발생하는 곰팡이 병원균인 페니실리움 익스판섬, 보트리오프리아 도치테아 및 알테르나리아 알테르나를 확인하였고, 이에 본 발명에서는 상기 3종의 균주를 사과에 접종하여 부패되는 동안의 VOCs를 분석하였다.

[0041] 휘발성 성분의 GC-MS 데이터 세트에 대한 주성분 분석(principal-components analysis; PCA)을 적용하여, 각각의 병원균으로 접종된 사과 샘플을 부패 지수에 따라 구별할 수 있었다. 도 1은 2개의 주성분, PC1 및 PC2를 나타내는데, 전체 분산도는 50.08%를 나타낸다(각각 28.59% 및 21.49%). DI 0 샘플(병원균 접종 전)은 모두 PC1의 음성 차원에 위치하는데 비해, 알테르나리아 알테르나(AA)는 부패 지수가 증가할수록 PC2의 변화 없이 PC1의 양성 차원으로 이동하였다. 페니실리움 익스판섬(PE) 샘플은 PC1의 양성 차원 및 PC2의 음성 차원으로 점차적으로 이동하는데 비해, 보트리오프리아 도치테아(BD) 샘플은 부패지수가 증가할수록 PC1 및 PC2 모두 양성 차원으로 이동하였다. 일반적으로 사과 샘플은 부패 지수가 증가할수록 PC1의 양성 방향으로 이동하였으나, PC2는 접종 병원균에 따라 샘플이 분리되었다.

[0042] 표 1 및 표 2는 중요 변수 플롯(variables importance plot; VIP)(VIP > 0.60)의 수치에 의해 확인된 주요 휘발성 성분을 나타낸다. 이들 중, 42개의 휘발성 화합물이 DI 0이 위치한, PC1의 음성 차원 상에서 확인되는데 비해, 18개의 휘발성 화합물이 DI 3이 위치한, PC1의 양성 차원 상에서 확인되었다. PC1의 음성 차원과 관련된 유의성 있는 VOCs 중에서, 에스테르는 주요 화합물 그룹으로써 집중하지 않은 사과와 관련되어 있다. 2-메틸부틸 부타노에이트(2-Methylbutyl butanoate) 및 2-메틸부틸 2-메틸부타노에이트(2-methylbutyl 2-methylbutanoate)는 가장 높은 VIP 수치를 나타내고, 펜틸 2-메틸부타노에이트(pentyl 2-methylbutanoate), 펜틸 헥사노에이트(pentyl hexanoate) 및 다른 27개의 에스테르가 뒤를 이었다. 다른 그룹에서는 헥사날(hexanal)이 가장 높은 VIP 수치를 나타냈고, 톨루엔(toluene), 1,3-자일렌(1,3-xylene), 3,3-디메틸운데칸(3,3-dimethylundecane), 부탄-1-올(butan-1-ol), 2-메틸리덴부타날(2-methylidenebutanal), 6-메틸헵트-5-엔-2-온(6-methylhept-5-en-2-one), 1,2-자일렌(1,2-xylene), α -파네센(α -farnesene) 및 2-메틸부탄-2-올(2-methylbutan-2-ol)이 뒤를 이었다(표 1). 반면, VIP 수치에서 에스테르의 중요성은 PC1의 음성 차원보다 양성 차원에서 낮게 나타났는데, VIP 수치는 벤젠(benzene)이 가장 높았고, 벤즈알데히드(benzaldehyde)가 뒤를 이었다. 또한, PC1의 양성 차원에서 확인된 특정 화합물은 다음과 같다. 에틸 2-부테노에이트(ethyl 2-butenate) 및 에틸 프로파노에이트(ethyl propanoate)를 포함하는 몇몇 에스테르; 스티렌(styrene); 아세트알데하이드(acetaldehyde) 및 데카날(decanal)을 포함하는 몇몇 알데히드; 에탄올(ethanol), 페닐메탄올(phenylmethanol), 3-메틸부탄-1-올(3-methylbutan-1-ol) 및 1-옥텐-3-올(1-octen-3-ol)을 포함하는 몇몇 알코올; 헥산(hexane); 및 3-옥타논(3-octanone)(표 2).

표 1

No.	Volatile compounds	VIP
Esters		
e37	2-Methylbutyl butanoate	1.60
e41	2-Methylbutyl 2-methylbutanoate	1.60
e44	Pentyl 2-methylbutanoate	1.59
e54	Pentyl hexanoate	1.59
e48	Butyl hexanoate	1.58
e53	3-Methylbutyl hexanoate	1.57
e17	2-Methylbutyl acetate	1.56
e21	Pentyl acetate	1.55
e33	Hexyl acetate	1.55
e35	Butyl 2-methylbutanoate	1.55
e59	Hexyl hexanoate	1.55
e18	Propyl butanoate	1.53
e28	Butyl butanoate	1.53
e20	Butyl propanoate	1.52
e12	Butyl acetate	1.51
e32	Pentyl propanoate	1.51
e62	3-Methylbutyl octanoate	1.51
e57	2-Methylbutyl heptanoate	1.49
e13	Propan-2-yl butanoate	1.47
e45	Hexyl 2-methylpropanoate	1.47
e51	Hexyl 2-methylbutanoate	1.47
e26	2-Methylpropyl butanoate	1.45
e30	2-Methylpropyl 2-methylbutanoate	1.33
e46	2-Methylpropyl hexanoate	1.32
e27	3-Methylbutyl propanoate	1.18
e38	Propyl hexanoate	1.16
e7	2-Methylpropyl acetate	1.12
e43	Methyl octanoate	1.11
e22	Methyl hexanoate	1.06
e56	Hexyl 2-methylbut-2-enoate	1.00
e5	Methyl butanoate	0.98
Alcohols		
ac4	Butan-1-ol	1.29
ac6	2-Methylbutan-1-ol	0.87
Aldehydes		
ah5	Hexanal	1.47
ah4	2-Methylidenebutanal	1.11
Ketones		
k5	6-Methylhept-5-en-2-one	1.08
Benzenes		
b2	Toluene	1.41
b6	1,3-Xylene	1.39
b4	1,2-Xylene	0.96
Hydrocarbons		
h7	3,3-Dimethylundecane	1.37
Terpenes		
t5	α -Farnesene	0.90

[0043]

표 2

No.	Volatile compounds	VIP
Esters		
e14	Ethyl 2-butenate	0.80
e3	Ethyl propanoate	0.75
e2	Ethyl Acetate	0.71
e6	Ethyl 2-methylpropanoate	0.65
e47	Ethyl benzoate	0.62
e16	3-Methylbutyl acetate	0.60
e39	Methyl benzoate	0.60
Alcohols		
ac1	Ethanol	0.69
ac15	Phenylmethanol	0.69
ac5	3-Methylbutan-1-ol	0.65
ac11	1-Octen-3-ol	0.60
Aldehydes		
ac7	Benzaldehyde	0.87
ac1	Acetaldehyde	0.73
ac10	Decanal	0.63
Ketones		
k4	3-Octanone	0.60
Benzenes		
b1	Benzene	1.18
b5	Styrene	0.77
Hydrocarbons		
h1	Hexane	0.62

[0044]

[0045] <실시예 2> 집중 병원균에 따른 부패된 사과에서의 휘발성 화합물 비교

[0046] 도 2는 3종의 병원균-접종된 사과 샘플의 부패 부위를 부패 지수에 따라 나타냈다. 보트리오프리아 도치테아로 인한 부패 부위는 수분이 많고 부푼 형태의 연한-갈색 스팟을 보이고, 페니실리움 엑스판섬으로 접종된 부패 부위는 갈색 스팟 및 푸른색 곰팡이를 형성하며, 알테르나리아 알테르나로 접종된 부패 부위 역시 갈색을 보였다.

[0047] 3종의 다른 병원균으로 접종된 사과는 휘발성 화합물 프로파일에 있어서 양적 및 질적으로 다른 경향을 나타냈다. 표 3 내지 표 6에서는 각각의 균주로 접종된 사과에서 새롭게 생성되는 휘발성 화합물을 정리하였다. 표 3은 보트리오프리아 도치테아의 결과이고, 표 4는 페니실리움 엑스판섬의 결과이며, 표 5는 알테르나리아 알테르나로의 결과이다. 한편, 붉은 색으로 표시된 화합물은 각각의 균주에서 단독으로 생성된 성분이다.

표 3

우선순위	class	Possible Compound	군	Decay index			
				Area % = (성분 area/전체 area)*100			
				DI0	DI1	DI2	DI3
1	Ester	(E)-hex-3-enyl acetate	BD	-	0.23	0.45	-
	Benzene	1-Methyl-4-propan-2-ylbenzene	BD	-	0.35	0.74	0.37
	Alcohol	2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol	BD	-	0.44	0.10	-
	Ester	Methyl benzoate	BD	-	0.15	-	-
2	Benzene	1-Methyl-4-prop-1-en-2-ylbenzene	BD	-	-	0.36	0.10
	Aldehyde	Acetaldehyde	BD	-	-	0.01	0.18
3	Alcohol	2-Methylpropan-1-ol	BD	-	-	-	4.77
	Alcohol	Propan-1-ol	BD	-	-	-	0.23
	Alcohol	3-Hexen-1-ol	BD	-	-	-	0.08
	Aldehyde	2-Methylprop-2-enal	BD	-	-	-	0.05
	Ketone	Pentan-3-one	BD	-	-	-	0.10
	Terpene	1-Methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,3-diene (α -Terpinene)	BD	-	-	-	0.08
	Terpene	1-methyl-4-propan-2-ylcyclohexa-1,4-diene (α -Terpinene)	BD	-	-	-	0.01
	Furan	2-Pentylfuran	BD	-	-	-	0.15

[0048]

표 4

우선순위	class	Possible Compound	군	Decay index			
				Area % = (성분 area/전체 area)*100			
				DI0	DI1	DI2	DI3
1	Aldehyde	(E)-Hex-2-enal	PE	-	0.06	0.03	-
	Ester	Methyl heptanoate	PE	-	0.13	0.05	-
	Benzene	1-Methoxy-3-methylbenzene	PE	-	0.49	0.29	0.17
	Ester	Methyl benzoate	PE	-	0.05	0.02	0.06
2	Ester	Ethyl decanoate	PE	-	-	0.06	-
	Ester	Ethyl 2-phenylacetate	PE	-	-	0.16	0.06
	Ester	Diethyl carbonate	PE	-	-	0.04	0.13
	Ester	Propyl octanoate	PE	-	-	0.01	-
	Aldehyde	Acetaldehyde	PE	-	-	0.01	0.10
	Furan	2-Pentylfuran	PE	-	-	0.05	-
	Alcohol	1-Octen-3-ol	PE	-	-	-	2.41
3	Ketone	3-Octanone	PE	-	-	-	0.59

[0049]

표 5

우선순위	class	Possible Compound	군	Decay index			
				Area % = (성분 area/전체 area)*100			
				DI0	DI1	DI2	DI3
1	Alcohol	Phenylmethanol	AA	-	0.10	0.21	0.45
	Alcohol	2-(2-Ethoxyethoxy)ethanol	AA	-	0.40	-	-
2	Alcohol	2-Ethylhexan-1-ol	AA	-	-	0.08	0.83
	Ketone	Acetophenone	AA	-	-	-	0.06

[0050]

[0051]

한편, 상기 3종의 군주에서 공통으로 생성된 화합물은 표 6과 같다.

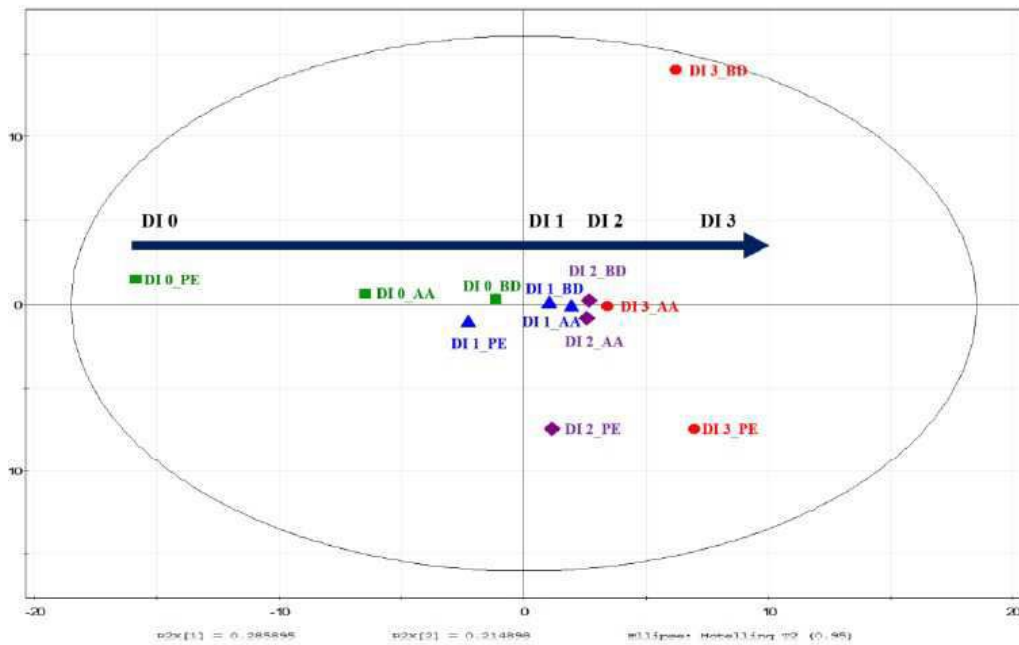
II 6

우선순위	class	Possible Compound	균	Decay index			
				Area % = (성분 area/전체 area)*100			
				DI0	DI1	DI2	DI3
1	Ester	Ethyl (E)-2-methylbut-2-enoate	BD	-	0.06	0.23	0.09
			PE	-	0.18	0.83	0.18
			AA	-	-	0.23	0.03
2	Aldehyde	3-Methylbutanal	BD	-	-	-	0.06
			PE	-	-	-	0.04
			AA	-	-	-	0.02

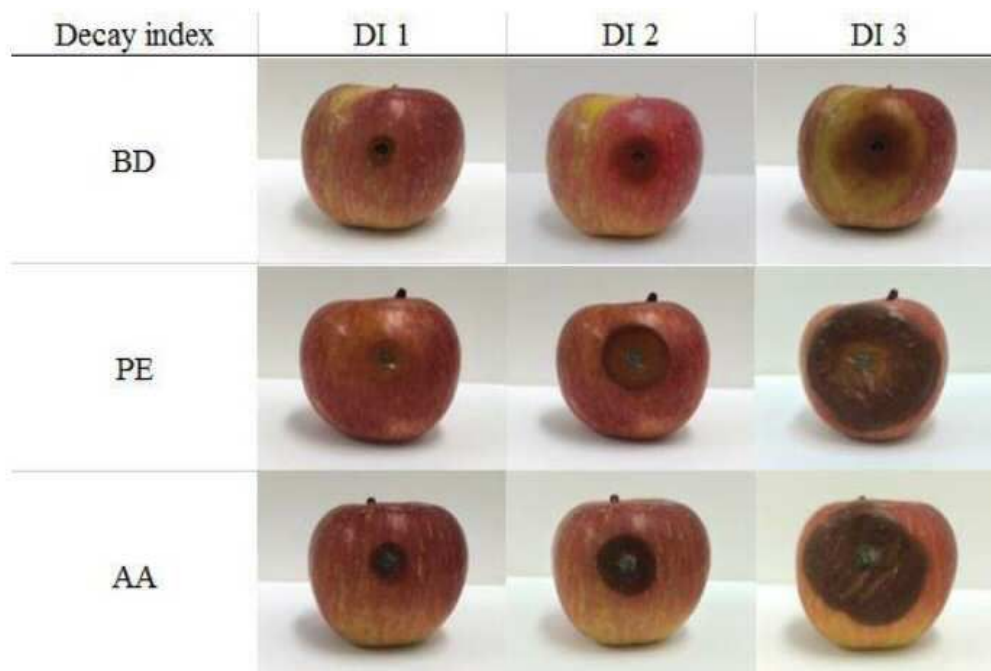
[0052]

도면

도면1



도면2



도면3

