

Fourier 변환 적외선 분광분석법에 의한 딸기 과육의 성숙도 측정 가능성

민성란¹, 곽철원^{2,6}, 김석원², 정원중¹, 정화지¹, 최필선³, 고석민⁴, 박상규⁵, 정회일⁶, 유장렬^{1*}
¹한국생명공학연구원 식물유전체연구센터 및 ²생물자원센터, ³남부대학교 생약자원학과, ⁴(주)유진텍 부설연구소,
⁵충청남도농업기술원 논산딸기시험장, ⁶한양대학교 화학과

Feasibility of Determining the Ripeness of Strawberry Fruit Flesh by Fourier Transform Infrared Spectroscopy

Sung Ran Min¹, Chul Won Kwak^{2,6}, Suk Weon Kim², Won Joong Jeong¹, Hwa Jee Chung¹, Pil Son Choi³,
Suk Min Ko⁴, Sang Kyu Park⁵, Hoeil Chung⁶ and Jang R. Liu^{1*}

¹Plant Genome Research Center and ²Biological Resource Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 305-806, Korea

³Department of Medicinal Plant Resources, Nambu University, Gwangju 506-606, Korea

⁴Eugentech Inc., Daejeon 305-806, Korea

⁵Nonsan Strawberry Experiment Station, Chungcheong Nam-Do Agricultural Research and Extension Services, Chungnam 320-862, Koera

⁶Department of Chemistry, Hanyang University, Seoul 133-791, Korea

ABSTRACT Fourier transform - infrared spectroscopy (FT-IR) provides biochemical profiles containing overlapping signals from a majority of the compounds that are present when whole cell extracts are analyzed. We attempted to determine the ripeness of strawberry fruit flesh by FT-IR. Fruit ripeness was divided into four developmental stages based on fruit skin color: 'yellow-green', 'pink-green', 'pink', and 'red' stages. Principal component analysis of FT-IR data of inside fruit flesh extracts clustered samples of four different developmental stages into three discrete groups: (1) 'yellow-green' group, (2) 'pink-green' group, and (3) 'pink' and 'red' group. The most remarkable difference between four different developmental stages was found in the carbohydrate fingerprint region (1,000-1,100 cm⁻¹) of the FT-IR spectrum, indicating that differences in carbohydrate compounds represented the ripeness of strawberry fruit. Overall results indicate that FT-IR in combination with PCA enables discrimination of the ripeness of strawberry fruit flesh.

서 론

과육의 성숙도는 과일의 출하시기 및 저장상태를 결정함에 있어 매우 중요하다. 대부분의 과일의 경우 성숙 단계에 따라 과피의 색깔이 바뀌므로 과피의 색깔은 성숙도를 반영한다고 할 수 있다. 그러나 과피의 색깔은 동일한 과일에서도 전체적으로 균일하지 않은 것이 일반적이다. 또한 과피

의 색깔은 주로 flavonoid 계열의 화합물에 의해서 결정되는데 실제로 성숙도와 관련된 과육의 세포벽의 상태 등이 직접적으로 드러난 것이 과피의 색깔이 아니므로 과피의 색깔에 따른 성숙도의 측정은 간접적인 측정방법이라고 할 수 있다.

Fourier 변환 적외선 분광분석법 (Fourier transform infrared spectroscopy, FT-IR)은 물질의 분자 진동에 의한 에너지 변화를 측정하여 정성·정량 분석에 이용하는 기술로서 감수성이 높고 비파괴적이며 high throughput screening 방법에 적용하기 용이한 비교적 저가의 분석방법이다. 전세포 추

*Corresponding author Tel 042-860-4430 Fax 042-860-4608

E-mail: jrliu@kribb.re.kr

출물 (whole cell extracts)을 대상으로 FT-IR 스펙트럼을 profiling하면 세포를 구성하는 모든 생화학적 내용물을 반영하는 상당히 복잡한 스펙트럼을 얻게 되나 이들 스펙트럼에 대한 복잡한 디지털 데이터를 계량분석화학 (chemometrics) 기법으로 정리하면 유용한 생물학적 정보를 확보할 수 있게 된다 (Kim et al. 2006). 이때 주성분분석 (principal component analysis, PCA)와 같은 패턴인식법이 가장 널리 쓰이는 방식이다. 이와 같이 FT-IR 스펙트럼을 이용하여 미생물 (Freeman et al. 1994, Goodacre et al. 1998, Wenning et al. 2002)이나 고등식물 (Kim et al. 2004)의 분류학적 구분이 가능하다. 특히 식물소재를 대상으로 할 때 세포벽 구성 물질에 대한 감수도가 매우 높아 FT-IR 스펙트럼을 이용하여 세포벽 성분의 돌연변이체를 탐색하는데 유용하게 활용되고 있다 (Séné et al. 1994, McCann et al. 1997, Chen et al. 1998, Wilson et al. 2000).

본 연구에서는 딸기의 과육을 대상으로 성숙단계에 따른 FT-IR 스펙트럼 profiling을 통하여 스펙트럼 데이터의 PCA 분석으로부터 과육의 성숙도를 측정하는 기준을 세울 수 있는지 여부를 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

식물재료

딸기 (*Fragaria ananassa* Duch. cv.Maehyang)의 과육을 성숙 정도 (과피의 색깔)에 따라 ‘yellow-green’, ‘pink-green’, ‘pink’, ‘red’ 등 4 단계 (Fig. 1)로 구분하여 사용하였다. 과피를 제외한 과육부분만 절편체로 만들어 냉동건조 시킨 후 막자사발에 마쇄하였다. 마쇄된 건조 powder는 -70°C 초저온 냉동고에 보존하면서 사용 직전에 꺼내어 사용하였다.

과육 시료로부터 전세포 추출물 (Whole Cell Extracts) 제조

건조된 성숙 단계별 딸기 시료 각각 50 mg을 취해 Eppendorf tube (1.5 ml)에 넣고 20% MeOH 용액 1 mL을 첨가하여 잘 섞어 준 다음 50°C 수조에서 10분간 방치하였다. 반응이 완료된 시료를 수조에서 꺼낸 다음 실온에서 12,000 rpm으로 5분간 원심분리하였다. 침전물이 혼합되지 않도록 상층액을 조심스럽게 새 tube로 옮긴 다음 각 시료별 5 µl를 FT-IR 스펙트럼 조사용 silicon plate 위에 도말하여 FT-IR 스펙트럼을 측정하였다. 각 FT-IR 스펙트럼 시료는 성숙 단계별, 개체별 딸기 시료로부터 개체당 3 반복으로 FT-IR 스펙트럼을 조사하였다.

FT-IR 스펙트럼 조사 및 PCA 분석

FT-IR 스펙트럼은 FT-IR spectrometer (Bruker Tensor27)에 장착된 HTS-XT 고효율 자동화 장치를 이용하여 스펙트럼을 조사하였다. 각 시료의 FT-IR 스펙트럼은 IR global 광원을 이용하여 DTGS 검출기로 분석 하였으며 스펙트럼은 총 400-4000 cm⁻¹ 범위, 4 cm⁻¹ 간격으로 총 128회 반복 조사 후 얻어진 평균 스펙트럼을 데이터 분석에 사용하였다. FT-IR 스펙트럼 조사 및 분석에는 OPUS 와 OPUS Lab 프로그램을 사용하였다.

PCA 분석을 위해 FT-IR 스펙트럼 데이터의 baseline 교정, normalization 및 mean centering 등 스펙트럼의 processing 과정 (Fig. 2)은 상기의 조건에서 얻어진 스펙트럼 데이터를 Matlab (ver 7.0)에 도입하여 수행하였다. Baseline 교정을 위해 FT-IR 스펙트럼 분석 영역의 양 끝점 (960-1800 cm⁻¹)의 흡광도를 0으로 조정하였으며 실험상의 오차를 최소화하기 위

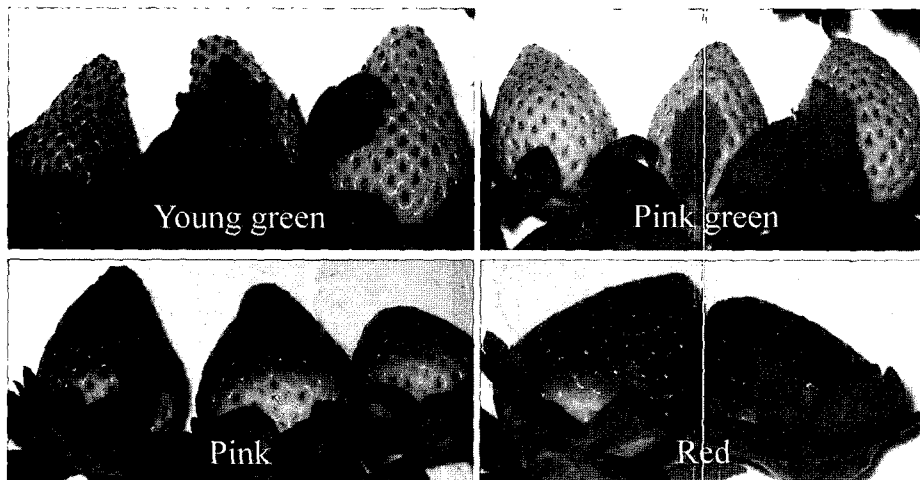


Figure 1. Four different developmental stages of strawberry named ‘yellow-green’, ‘pink-green’, ‘pink’, and ‘red’ stages based on fruit skin color.

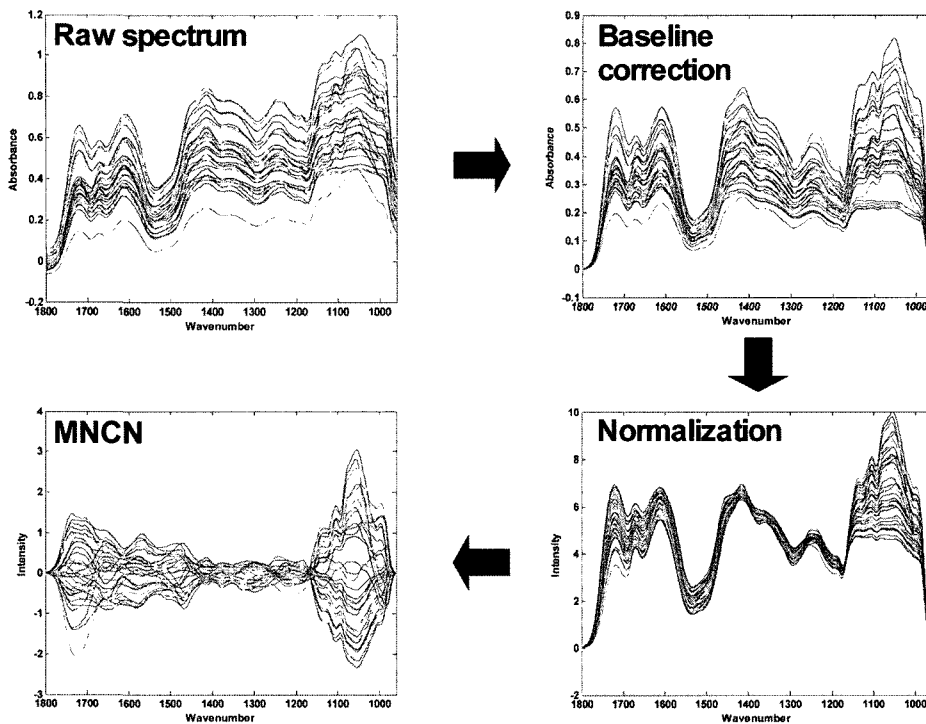


Figure 2. Preprocessing of FT-IR spectra data. After baseline correction, area normalization and mean centering of raw spectral data, PCA analysis was conducted.

하여 각 스펙트럼을 동일 면적으로 normalization 하였다. 이후 데이터의 mean centering (MNCN) 과정을 거쳐 PCA 분석을 위한 표준화된 데이터로 사용하였다. 이와 같이 가공된 FT-IR 스펙트럼 데이터는 Matlab (version 7.0)에 도입한 다음 NIPALS 알고리즘 (Wold, 1966)에 따라 PCA (Principal component analysis) 분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

딸기의 성숙 단계별 FT-IR 스펙트럼 데이터의 PCA 분석 결과 과피 색깔에 따른 성숙단계 구분과 일치하는 것으로 나타났다 (Fig. 3). PC score 1이 87.17%이며 PC score 2가 9.01%로서 PC score 1, 2번이 전체 데이터 set이 가지고 있는 변이량의 96.2%를 반영하였으며 특히 PC score 1의 값이 87.17%로 PCA plot 상에서 시료간의 차이를 크게 반영하였다. 이 결과는 과피가 ‘yellow green’인 발달 초기 시료와 ‘pink green’의 발달 초기 시료가 PC score 1에 의해 일차적으로 구분이 이루어지고 있음을 의미하는 것이다. 또한 ‘yellow green’ 발달 초기 시료와 ‘pink’ 및 ‘red’의 발달 후기 시료는 PC score 2를 기준으로 구분이 가능함을 나타내는 것이다. 또한 전체적으로 PCA plot 상에는 세 개의 클러스터로 구분되었는데 ‘yellow green’ 과피를 띠는 발달 초기 시료와 ‘pink green’의 발달 초기 시료는 각각 독립적인 클러스터를 형성한 반면,

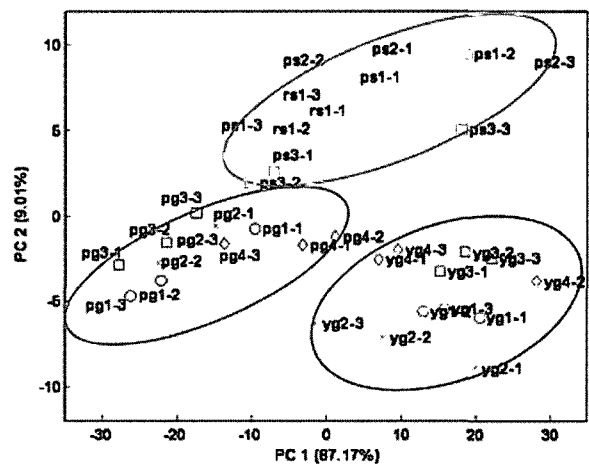


Figure 3. PCA of FTIR data from inside fruits of four different developmental stages based on skin color. The abbreviations yg, pg, ps, and rs refer to ‘yellow-green’, ‘pink-green’, ‘pink’, and ‘red’ stages, respectively. The first numbers next to the abbreviations indicate different samples obtained from different fruits and the second numbers 1, 2, and 3 indicate three replicates obtained from the same fruits.

‘pink’와 ‘red’의 발달 후기 시료는 뚜렷한 구분 없이 혼재된 형태로 클러스터를 형성하였다. 한편 동일한 개체에서 조사된 반복구간의 차이와 동일 발달단계내의 개체간 차이가 거의 대등한 것으로 보아 동일 열매의 과육에서도 부위별로 균질하지 않음을 시사한다. 본 연구 결과는 UPLC-QTOF-MS를

이용하여 딸기의 발달단계별 metabolites fingerprinting 패턴에 의한 구분 (Aharoni et al. 2002), 토마토의 발달 단계별 PCA 분석에 의한 구분 (Roessner et al. 2003) 결과와 유사한 결과를 보임으로써 FT-IR 스펙트럼 데이터의 다변량 통계분석 기법에 의한 발달단계별 구분체계 확립이 가능함을 보여 주었다.

딸기의 성숙 단계별 PCA에 의한 구분 (Fig. 3) 과정에서 중요한 역할을 하고 있는 변수를 알아보기 위하여 PCA loading plot을 분석하였다 (Fig. 4). 그 결과 ‘yellow green’ 및 ‘pink green’의 발달 초기 시료를 구분하는데 중요 역할을 하고 있는 PC score 1의 경우 스펙트럼의 1000-1100 cm⁻¹ 영역에서 그 변이가 매우 컸다. 또한 발달 초기와 발달 후기를 구분하는데 중요 역할을 하고 있는 PC score 2의 경우 스펙트럼의 1550-1750 cm⁻¹ 영역에서 그 변이가 두드러졌다. 이상의 결과는 FT-IR 스펙트럼의 1000-1100 cm⁻¹ 및 1550-1750 cm⁻¹ 영역이 딸기 과육의 발달단계별 구분에 중요한 역할을 하고 있음을 의미하는 것으로 관련 영역에서 FT-IR 스펙트럼의 peak를 가지는 화합물의 양적 질적인 변화가 이루어지고 있는 것으로 간주된다.

PCA plot 상에서 딸기의 성숙 단계별 각 클러스터의 중심에 위치하고 대표 시료의 FT-IR 스펙트럼을 비교한 결과 FT-IR 전 파장영역에서 가장 두드러진 차이를 들어내는 영역은 loading plot 분석 결과 (Fig. 4)와 마찬가지로 1,000-1,100 cm⁻¹이었다 (Fig. 5). FT-IR 스펙트럼에서 1,000-1,200 cm⁻¹ 영역은 탄수화물 등 sugar compounds에서 주요 peak이 나타나는 영역으로 알려져 있으며 cellulose, pectin 등 세포벽 구성성분 및 sucrose, glucose, fructose 등 단당류 및 다당류 성분들의 FT-IR 스펙트럼 예비조사 결과 이들 화합물 모두 1,000-1,200 cm⁻¹ 영역에서 주요 peak들이 나타남을 알 수 있었다 (데이터 미제시). 이는 딸기, 토마토 등 과실 및 과육의 성숙 단계별로 soluble sugars의 함량변화가 이루어진다는 보고 (Lee and Chi. 1989, Park et al. 1994, Hong et al. 2003, Park et al. 2004; Park et al. 2004) 및 사과나 배의 경우 세포벽 성분의 변화에 기인한 조직 경도 변화가 이루어진다는 보고 (Byun et al. 1993, Yoo et al. 2002) 와 밀접한 상관 관계가 있을 것으로 추측된다. 특히 발달초기 ‘yellow green’의 딸기 과육에서 FT-IR 스펙트럼의 1,000 cm⁻¹ 영역에서 peak 폭이 다른 단계의 시료에 비해 좁아지고 있음을 알 수 있었다. 이는 발달 초기 시료의 경우 탄수화물의 질적 변화가 매우 큼을 반영하는 것으로 해석된다. 아울러 1,700-1,600 cm⁻¹ 영역 사이에 있는 아미드 (amide) 1,2 계열의 peak의 형태가 과육의 성숙 단계에 따라 다른 패턴을 보이는 것도 주목할 만 하다. 그러나 아미드 계열의 화합물의 경우 종류가 다양하여 아직 FT-IR peak의 변화를 특정 화합물의 양적 질적 변화와 연결 짓기는 한계가 있다.

향후 딸기 과육의 성숙 단계별 시료를 HPLC, MS 등 타 분

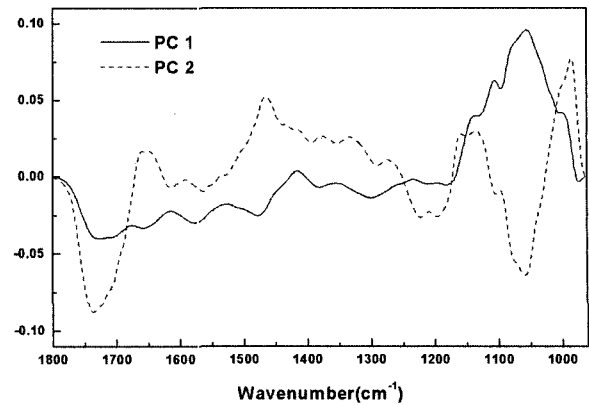


Figure 4. PCA score loading plot for PC score 1 and 2.

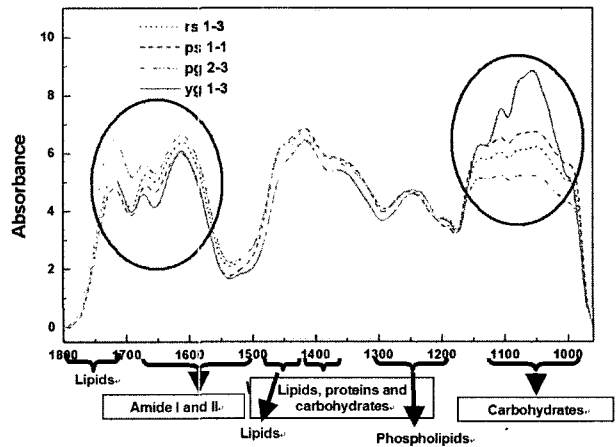


Figure 5. FT-IR Spectra comparison of representative samples from four different developmental stages based on skin color. The abbreviations yg, pg, ps, and rs refer to ‘yellow-green’, ‘pink-green’, ‘pink’, and ‘red’ stages, respectively. The numbers next to the abbreviations indicate different samples obtained from different fruits.

석 장비로 대사산물 데이터를 확보한다면 FT-IR profiling 데이터와의 상관관계 분석을 통해 대사산물의 정량적인 정보를 쉽게 파악 또는 예측할 수 있는 PLS (partial least square regression) 정량 모델 확립이 가능할 것으로 판단된다. 이는 FT-IR 측정치만으로 시료내 특정 대사산물들의 정량적인 결과를 high throughput 방식으로 제공할 수 있는 체계로 활용이 가능할 것으로 여겨지며 FT-IR을 이용한 분석법에 대한 신뢰도를 더욱 높일 수 있을 것으로 판단된다.

FT-IR 스펙트럼은 화합물의 정성분석적 정보를 각 성분 별로 제공하지는 못하지만 샘플의 전처리, 속도, 민감도 등에서 다른 분석기기에 비해 사용자에게 많은 이점을 제공한다. 최근에 나온 기기는 본 연구에서 사용된 것과 같이 한꺼번에 384개의 샘플을 처리할 수 있도록 고안된 기종을 이용하여 다량의 시료분석을 high throughput 방식으로 분석이 가능할 이점이 있다. 또한 profiling 데이터의 계량분석화학적 분석을

통하여 다양한 정보를 추출해 낼 수 있다. 여러 종류의 식물의 잎 추출물의 FT-IR 측정과 profiling의 계량분석화학적 분석으로 식물 상호간의 계통분류가 가능하였다는 연구 (Kim et al. 2004)가 그 대표적인 예가 될 것이다. 본 연구에서도 딸기의 과피 없이 과육만의 FT-IR 분석으로 탄수화물의 변화로 대표되는 과육의 성숙도를 상호 구분하는 것이 가능하였다. 결론적으로 본 연구에서는 딸기 과피의 색깔에 따른 과육의 성숙도의 차이를 FT-IR 데이터의 PCA 분석을 통하여 구분할 수 있었으며 이로써 FT-IR을 이용하여 딸기 과육의 성숙도를 결정하는 기준 설정이 가능함을 증명하였다.

사 사

본 논문은 농촌진흥청 바이오그린21 사업, 과학기술부의 21세기 프론티어 프로그램 작물유전체기능연구사업단, 과학재단 SRC의 경희대 식물대사연구센터, 한국생명공학연구원 기관고유사업의 연구비 지원으로 이루어졌음.

인용문헌

- Aharoni A, de Vos CH, Verhoeven HA, Maliepaard CA, Kruppa G, Bino R, Goodenowe DB (2002) Nontargeted metabolome analysis by use of fourier transform ion cyclotron mass spectrometry. *OMICS A J Integrative Biol* 6: 217-234
- Byun JK, Her JS, Chang KH, Kang IK (1993) Changes in pectic substances and wall hydrolases during ripening and storage of apple fruits. *J Kor Soc Hort Sci* 34: 46-53
- Chen L, Carpita NC, Reiter WD, Wilson RH, Jeffries C, McCann MC (1998) A rapid method to screen for cell-wall mutants using discriminant analysis of Fourier transformation infrared spectra. *Plant J* 16: 385-392
- Freeman, R, Goodacre R, Sisson PR, Magee JG, Ward AC, Lightfoot NF (1994) Rapid identification of species within the *Mycobacterium tuberculosis* complex by artificial neural network analysis of NMR data. *J Med Microbiol* 40: 170-173
- Goodacre R, Timmins M, Burton R, Kaderbhai N, Woodward AM, Kell DB, Rooney PJ (1998) Rapid identification of urinary tract infection bacteria using hyperspectral whole-organism fingerprinting and artificial neural networks. *Microbiology* 144: 1157-1170
- Hong SJ, Lee JW, Kim YC, Kim KY, Park SW (2003) Relationship between physicochemical quality attributes and sensory evaluation during ripening of tomato fruits. *J Kor Soc Hort Sci* 44: 438-441
- Kim SW, Ban SH, Chung H, Cho SH, Chung HJ, Choi PS, Yoo OJ, Liu JR (2004) Taxonomic discrimination of higher plants by multivariate analysis of Fourier transform infrared spectroscopy data. *Plant Cell Rep* 23: 246-250
- Kim SW, Chung HI, Liu JR (2006) Advances in Plant Metabolomics. *J Plant Biotechnol* 33: 161-169
- Lee TS, Chi YS (1989) Studies on the changes in chemical composition of strawberry during maturing. *J Korean Agric Chem Soc* 32: 232-239
- McCann MC, Chen L, Roberts K, Kemsley EK, Séné C, Carpita NC, Stacey NJ, Wilson RH (1997) Infrared microspectroscopy: Sampling heterogeneity in plant cell wall composition and architecture. *Physiol Plant* 100: 729-738
- Park IK, Jang KS, Kim MK, Kim SD (1994) Circulation state of strawberry and quality changes during ripening. *Korean J Post-Harvest Sci Technol Agri Products* 1: 45-53
- Park SW, Lee JW, Kim YC, Kim KY, Hong SJ (2004) Changes in fruit quality of tomato 'Dotaerang' cultivar during maturation and postharvest ripening. *Kor J Hort Sci Technol* 22: 381-387
- Park SW, Ko EY, Lee IK, Lee MR, Hong SJ (2004) Seasonal variation of quality of tomato fruit (var. 'York') during ripening on the vine. *Kor J Hort Technol* 22: 173-176
- Roessner-Tunali U, Hegemann B, Lytovchenko A, Carrari F, Bruedigam C, Granot D, Fernie AR (2003) Metabolic Profiling of Transgenic Tomato Plants Overexpressing Hexokinase Reveals That the Influence of Hexose Phosphorylation Diminishes during Fruit Development. *Plant Physiol* 133: 84-99
- Sene CFB, McCann MC, Wilson RH, Grinter R (1994) Fourier-transform Raman and Fourier-transform infrared spectroscopy: an investigation of five higher plant cell walls and their components. *Plant Physiol* 106:1623-1631
- Wenning M, Seiler H, Scherer S (2002) Fourier-transform infrared microspectroscopy, a novel and rapid tool for identification of yeast. *Appl Environ Microbiol* 68: 4717-4721
- Wilson RH, Smith AC, Kacurakova M, Saunders PK, Wellner N, Waldron KW (2000) The mechanical properties and molecular dynamics of the plant cell wall polysaccharides studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Plant Physiol* 124: 397-405
- Wold H (1966) Estimation of principal components and related models by iterative least squares. In: Krishnaiah, K. R. (Ed.), *Multivariate Analysis*, Academic Press, New York, pp. 391-420
- Yoo Wj, Kim DH, Lee DH, Byun JK (2002) Changes in respiration rates, cell wall components and their hydrolase activities during the ripening of 'Whangkeumbae' pear fruit. *J Kor Soc Hort Sci* 43: 43-46

(접수일자 2006년 11월 9일, 수리일자 2006년 11월 22일)