

自然界로부터 Patulin 生成 *Penicillium* sp.의 分離에 관한 研究

김동술 · 정덕화 · 김성영 · 전향숙* · 정선희 · 강성조

경상대학교 식품공학과, *한국식품개발연구원

Study on the Isolation of Patulin-Producing *Penicillium* sp. from Natural Sources

Dong Sul Kim, Duck Hwa Chung, Sung Young Kim, Hyang Sook Chun,
Sun Hee Chung and Sung Jo Kang

Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

*Korea Food Research Institute

ABSTRACT

To study the prevention of mycotoxin contamination, a large number of sample sources were collected, and *Penicillium* sp. were isolated. TLC and HPLC methods were applied to confirm the patulin producing abilities of isolated strains. From 321 sample sources such as fruit (46), rice (31), corn (19), barley (22) and soil (38), 203 strains of *Penicillium* sp. were isolated. By the result of TLC, 21 strains were assumed to be patulin producing strains, but as a result of HPLC, only 17 strains produced patulin. Among them, E-219 strain showed highest patulin level as 0.12 mg/ml broth.

Keywords : Patulin, TLC method, HPLC method, strain.

I. 서 론

Patulin(4-hydroxy-4H-furo(3,2C)-pyran-2(6H)-one)은 *Penicillium griseofulvum*,¹⁾ *P. patulum*,²⁾ *Aspergillus clavatus*³⁾ 및 *Byssosclamyis nivea*⁴⁾ 등의 곰팡이에 의해 생성되는 2차 대사산물로서 mycotoxin의 일종인 것으로 알려져 있다. 대부분의 mycotoxin이 발암물질로 알려져 있듯이 patulin 역시 식품이나 사료에 있어 독성물질로 문제시 되고 있는데, 실제 1954년 일본에서 발생한 잇소의 집단 중독 사고의 원인은 사료원료인 건조맥아에서 분리된 *Penicillium urticae*에 의해 생성된 patulin인 것으로 Ukai 등⁵⁾이 보고한 바 있고, 최근 Sommer 등⁶⁾도 유럽, 오스트리아, 북미주 등에서 7종류의 과일로부터 27균주의 *Penicillium expansum* LK. ex Thom을 분리하였다고 보고하였다. 이러한 patulin에 대한 분석방법은 주로 TLC(thin layer chromatography),

GLC(gas liquid chromatography) 및 HPLC(high pressure liquid chromatography)법에 의존하고 있는데 Alberto 등⁷⁾은 여러 과일과, 주스 그리고 잼에서 patulin을 비롯한 citrinin, aflatoxin을 TLC법으로 분석하여 보고하였으며, Marth 등⁸⁾도 Wisconsin에서 40개의 시료를 수거하여 HPLC법으로 patulin 생성을 실험한 결과 최고 350 µg/l까지 생성한다고 하였다. 이와 같이 외국 여러 나라에서는 patulin에 대한 많은 분리연구가 진행되고 있으나 우리나라에서는 patulin의 분석방법에 대한 기초적인 연구도 부족한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 patulin에 대한 기초자료를 마련하기 위해 진주, 사천을 비롯한 여러 지역에서 과일, 곡류, 토양 등의 시료를 수거하여 *Penicillium* sp.를 분리하고, 분리한 *Penicillium* sp. 중에서 patulin 생성균주를 TLC법, HPLC법으로 확인하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 실험재료

Patulin 생성균주의 분리를 위해서 진주를 비롯한 서부 경남지방으로부터 과일, 곡류, 토양 등 총 321 점을 수거하여 실험에 사용하였으며, 그 내용은 Table 1에서 보는 바와 같다.

2. 배지조성

본 실험에 사용된 배지는 곰팡이의 분리를 위해서 rose bengal agar를 사용하였으며, 이 때 세균과 효모의 성장을 억제하기 위해 rose bengal을 약 35 mg/l 첨가하였다. 균의 순수분리와 보관용 배지로는 PDA(potato dextrose agar, Difco제) 배지를 사용하였다. 모든 배지는 멸균(121°C, 1 atm, 15분) 후 사용하였으며, 배지조성은 Table 2에서 보는 바와 같다.

또한, 분리된 *Penicillium* sp.의 patulin 생성여부를 알아보기 위한 배지로는 YES(yeast extract sucrose)

Table 1. Location of sampling site and sources

Source	Total	Location
Fruit	46	A(20) B(4) C(5) D(8) E(9)
Rice	31	A(13) B(3) C(5) D(5) E(5)
Corn	19	A(6) B(3) C(5) D(3) E(5)
Barley	22	A(5) B(4) C(5) D(3) E(5)
Soil	38	A(10) B(6) C(6) D(8) E(8)
Peanut	29	A(8) B(5) C(6) D(5) E(5)
Soybean	30	A(7) B(5) C(6) D(6) E(6)
Unhulled barley	10	A(0) B(0) C(5) D(5) E(0)
Unhulled rice	15	A(0) B(5) C(5) D(5) E(0)
<i>et al.</i>	81	A(50) B(7) C(7) D(10) E(7)
Total	321	

A : Chinju, B : Sanchung, C : Hamyang, D : Sachun, E : Samchunpo.

Table 2. Composition of the rose bengal agar medium used for the isolation of *Penicillium* sp.

Components	Conc. (g/l)
Peptone	5 g
Bacto dextrose	10 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g
Rose bengal	0.035 g
Agar	20 g
Distilled water	1 l

배지를 사용하였으며, 그 배지조성은 Table 3과 같다.

3. 실험방법

(1) 균주의 분리 및 분리균의 배양

소형 test tube에 증류수 10 ml을 넣은 후 멸균하고 시료 1 g을 첨가하여 시험관 교반기에 섞은 다음 혼합액 200 μ l를 취해 rose bengal agar plate에 분주, 도말하여 28°C에서 3~4일간 배양하였다. 외형상으로 *Penicillium*속으로 추정되는 균주를 분리하여 PDA plate 상에 계속하여 순수분리하고, 28°C에서 3일간 배양시켜 단일 colony를 PDA 사면배지에 접종하여 배양시킨 후 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

또한, 분리균의 patulin 생성여부를 검색하기 위해서 test tube(15×150 mm)에 YES 배지 6 ml을 첨가하고 삼균시킨 다음 무균적으로 균을 접종하여 28°C에서 14일간 정지배양 하였다.

(2) 배양물의 분석

배양물 중의 patulin 추출은 AOAC법⁹⁾을 참조로 하여 배양이 끝난 배양기에 동량의 ethyl acetate를 첨가한 다음 Fig. 1과 같이 추출하였다.

Table 3. Composition of the YES broth used for the patulin-production

Components	Conc. (g/l)
Yeast extract	20
Sucrose	200
Distilled water	1 l

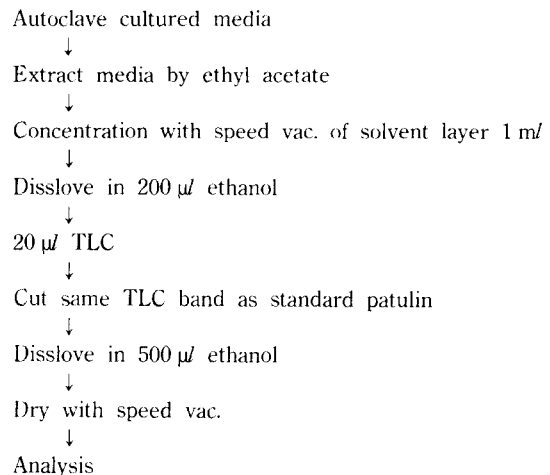


Fig. 1. Extraction and purification of patulin on the cultured media.

Table 4. The analytical condition of high pressure liquid chromatography

HPLC type	Waters
Detector	UV 276 nm
Column	μ Bondapak C ₁₈ (30 cm×3.9 mm)
Flow rate	1.3 ml
Pressure	1,300~1,400 psi
Mobile phase	D.W.

(3) Patulin의 정성

추출한 배양물은 Peter 등¹⁰⁾과 Thirugnana subramanian 등¹¹⁾의 보문을 참조로 하여 TLC하였다. 즉, 미리 TLC plate를 100~110°C 건조기에서 2시간 동안 활성화시킨 후 spotting하여 전개용매(toluene : ethyl acetate : formic acid = 5 : 4 : 1, v/v)가 포화된 전개조에 전개시킨 다음 TLC plate를 2% phenylhydrazine hydrochloride(2 g/100 ml D.W.) 용액으로 발색시켜 110°C에서 10분간 건조시킨 후 365 nm의 UV lamp하에서 관찰하여 patulin 생성 균주를 선별하였다.

(4) Patulin의 정량

TLC법에 의해서 1차적으로 선별된 분리균주들을 재배양하여, Fig. 1과 같은 방법에 의해 유기용매로 추출한 후 TLC하여 표준 patulin과 같은 Rf치의 band만을 잘라 ethanol에 용해시켜 다시 농축하여 millipore filter(0.2 μ m)로 여과한 여액을 HPLC용 시료로 하여 Table 4와 같은 조건으로 분석하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Patulin 생성균의 분리 및 검색

자연계로부터 patulin 생성능이 강한 균주를 얻기 위하여 시료 총 321점에서 육안적으로 관찰하여 *Penicillium* sp.로 추정되는 203균주를 분리, 28°C에서 배양하여 TLC한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 21 균주가 표준 patulin과 같은 Rf치를 나타내어 분리하였다. 그러나 TLC법에 의해 분리된 21균주를 재배양하여 HPLC법으로 분석한 결과 17균주만이 patulin 생성균주로 확인되었다.

이와 같이 TLC 결과와 HPLC 결과가 일치하지 않은 이유는 TLC의 경우는 단지 시각적으로 색과 Rf치만을 비교하였기 때문에 색소를 포함한 patulin 이외의 물질이 patulin으로 잘못 검색되었기 때문으로 생각된다.

이때 분리균주 중 spot가 가장 선명하게 나타난 균주의 배양물을 TLC로 분석한 chromatogram은 Fig. 2와 같이 나타났는데 A는 표준 patulin의 chromatogram이며, B와 C는 시료의 chromatogram이다.

본 실험에서는 발색제로 2% phenylhydrazine hydrochloride 용액을 사용하였는데 그외에도 Alberto 등⁷⁾은 MBTH(3-Methyl-2-benzothiazolinone hydrazone) 용액을 사용하여 비슷한 결과를 얻은 적이 있다. Gimeno 등¹²⁾에 의하면 일반적으로 patulin은 366 nm의 UV하에서 어두운 노란색을 나타내며 육안적으로도 노란색을 띄므로 다른 mycotoxin과는 쉽게 구별된다고 하였는데 본 실험에서도 같은 경향을 보였다.

2. 분리균의 patulin 생성능

한편, TLC법에서 확인된 균주들의 배양물을 추출,

Table 5. The distribution of patulin producing-strains by TLC and HPLC

Sample source	No. of sample	No. of isolated strain	No. of strains screened by TLC	No. of strains screened by HPLC
Fruit	46	35	2	2
Rice	31	22	2	2
Corn	19	10	-	-
Barley	22	14	1	1
Soil	38	14	2	2
Peanut	29	13	2	2
Soybean	30	21	1	1
Unhulled barley	10	7	1	1
Unhulled rice	15	10	1	1
<i>et al.</i>	81	57	9	5
Total	321	203	21	17



Fig. 2. TLC chromatogram of standard patulin (A) and samples (B, C).

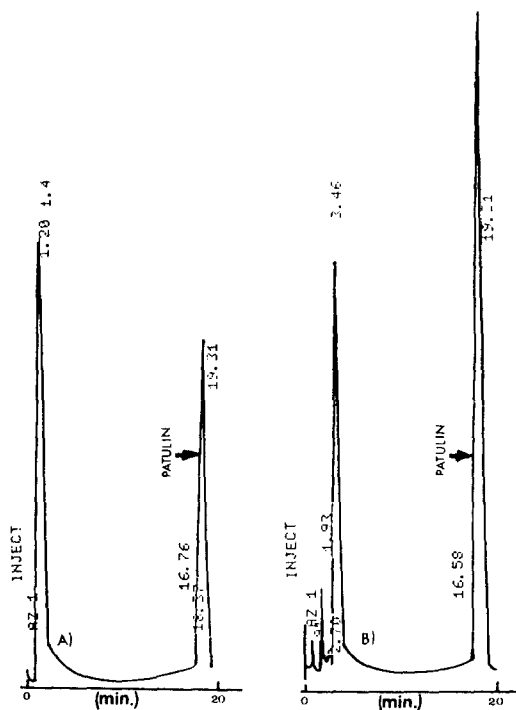


Fig. 3. High pressure liquid chromatogram of patulin. A : Standard patulin. B : Sample (E-219).

동축하여 HPLC법으로 분석한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 표준 patulin과 같은 19.31분에서 peak를 나타내었다. HPLC법으로 확인된 17균주의 patulin

Table 6. Contents of patulin analyzed by HPLC in cultured medium

Strains isolated	Patulin (mg/ml broth)
E-219	0.12
P-306	0.11
F-49	0.02
S-132	0.01

생성균주의 patulin 생성정도를 비교하였는데 그 중 생성능이 큰 4균주를 선택한 결과 Table 6과 같이 E-219, P-306, F-49 및 S-132로 나타났고, 그 중에서도 E-219가 0.12 mg/ml broth로서 가장 많은 patulin을 생성하는 것으로 나타났다.

한편, Helge stray는¹³⁾ 140개의 시료에서 HPLC법으로 patulin 생성정도를 분석한 결과 최고 220 µg/l까지의 patulin이 생성됨을 보고하였으며, George 등¹⁴⁾도 사과 주스에서 44~309 µg/l까지의 patulin이 생성됨을 보고한 바 있다. 본 실험에서는 120 µg 이상 검출된 시료는 없었지만 우리나라 전역에서 다양한 균원시료를 채취하여 patulin 생성균을 검색하는 등 patulin에 대한 체계적인 조사연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

요 약

Mycotoxin 오염예방을 위한 연구의 일환으로 자연계로부터 광범위하게 균원시료를 채취하여 *Penicillium* sp.를 분리하였으며, 분리균의 patulin 생성정도를 TLC, HPLC법으로 확인하였다. 과일(46), 쌀(31), 옥수수(19), 보리(22) 및 토양(38) 등을 포함한 총 321점의 균원시료로부터 203균주의 *Penicillium* sp. 균을 분리, 배양하여 TLC법으로 분석한 결과 21균주가 patulin 생성균주로 추정되었다. 분리된 21균주를 HPLC법으로 분석한 결과 17균주만이 patulin 생성균주로 확인되었으며 그 중 E-219 분리균주가 0.12 mg/ml broth로 가장 많은 patulin을 생성하였다.

참고문헌

- 1) Simonart, P. and R. de Lathouwer : Formation de patulinae per *Penicillium griseofulvum* dierckx. Zentrabl. Backteriol. Parasitenkd. Infectiionskr. Hyg. Abt. II. **110**, 107-109, 1956.
- 2) Anslow, W. K., Raistrick, H. and Smith, G. : Anti-fungal substances from moulds. Part I. Patulin

- a metabolic product of *Penicillium patulum* Bainier and *Penicillium expansum* (Link) Thom. *J. Soc. Chem. Ind.*, **62**, 236-238, 1943.
- 3) Bergel, F., Morrison, A. L., Moss, A. R. and Klein, R., Rinderknecht, H. and Ward, J. L. : An antibacterial substance from *Aspergillus clavatus* and *Penicillium claviforme* and its probable identify with patulin. *Nature* (London), **152**, 750, 1943.
 - 4) Anonymous, Moulds and colds : *Lancet.*, **245**, 641, 1943.
 - 5) Ukai, T., Yamamoto, Y. and Yamamoto, T. : Studies on the poisonous substance from a strain of *Penicillium*. II. Culture method of Hori-Yamamoto strain and chemical structure of its poisonous substance. *J. Pharm. Soc. Japan*, **74**, 450-454, 1954.
 - 6) Sommer, N. F., Buchanan, J. R. and Fortlage, R. J. : Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Appl. Microbiol.*, **28**, 589-593, 1974.
 - 7) Alberto Gimeno and Martins, M. L. : Rapid thin layer chromatographic determination of patulin, citrinin, and aflatoxin in apples and pears, and their juices and jams. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**(1), 85-91, 1983.
 - 8) Brackett, R. E. and Marth, E. H. : Patulin in apple juice from roadside stands in Wisconsin. *J. of Food Protection*, **42**(11), 862-863, 1979.
 - 9) AOAC : Official Methods of Analysis. 1209-1210 (1990).
 - 10) Peter, M. S. : Collaborative of a chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **57**(3), 621-625, 1974.
 - 11) Thirugnana subramanian : Colorimetric determination of patulin produced by *Penicillium patulum*. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **65**(1), 5-7, 1982.
 - 12) Gimeno, A. and Martins, M. L. : International IUPAC Symposium on Mycotoxins and Phycotoxins, Vienna, Austria, Sept., **1-3**, 24-27, 1982.
 - 13) Helge Stray : High pressure liquid chromatographic determination of patulin in apple juice. *J. AOAC.*, **61**(6), 1978.
 - 14) George, M. W., Charles, W. T. and Albert, E. P. : Liquid chromatographic method for determination of patulin in apple juice. *J. AOAC.*, **57**(5), 1974.