

국내산 사과로부터 분리된 *Penicillium crustosum*의 액상배지에서의 Patulin 생성능 평가

김동호[†] · 윤혜정 · 임상용 · 백상호 · 조민호 · 김수현¹
한국원자력연구원 정읍방사선과학연구소, ¹한국기초과학지원연구원

Patulin Producing Capacity in Broth Culture Media of *Penicillium crustosum* Isolated from Korean Apple

Dong-Ho Kim[†], Hye-Jeong Yun, Sang-Yong Lim, Sang-Ho Baik,
Min-Hoe Jo and Sooh-Hun Kim¹

Korea Atomic Energy Research Institute, Advanced Radiation Technology Institute, Jeongeup 580-185, Korea
¹Korea Basic Science Institute, Daejeon 305-333, Korea

Abstract

The patulin producing capacity of *Penicillium crustosum*, an isolate from Korean apple, in various broth culture media, was investigated, and compared with patulin production by the standard strain *P. griseofulvum* (ATCC 46037). The maximal patulin production capacity of the *P. griseofulvum* ATCC 46037 was 2,029-2,829 ppm in 5-GYEP, SY and MEB broth media. The patulin-producing capacity of the isolated fungus (*P. crustosum*) attained 2,794 ppm in a 5-GYEP broth medium, but was only 324 and 11 ppm in SY and MEB media, respectively. There were no significant correlations between mycelial growth levels and patulin-producing ability in either *P. crustosum* or *P. griseofulvum*. The patulin production of *P. griseofulvum* was induced in the wide pH range of pH 3.0-11.0, while that of *P. crustosum* was induced in the acidic pH range pH 3.0-5.0. Patulin production levels were dependent on the carbon sources in the media and maximal patulin production by *P. griseofulvum* and *P. crustosum* was observed in media containing glycerol and fructose, respectively.

Key words : patulin, apple, *Penicillium*, mycotoxin, fruit

서 론

곰팡이독(mycotoxin)에 의한 식성병해는 곰팡이독을 생성하는 미생물에 오염된 농산물과 식품의 섭취를 통하여 발생하며, 단기적인 식중독뿐만 아니라 만성적인 유전학적 독성을 유발하기도 한다. 곰팡이독에 의한 식성병해는 인간이 섭취하는 식품의 직접적인 오염과 더불어, 가축이 오염된 사료를 섭취한 다음 가축에 잔존하는 독소에 의하여 인간에게 2차적인 장해를 초래하는 경우처럼 먹이연쇄를 통하여 전파되기도 한다(1). 따라서 곰팡이 독소는 병원성 세균과 더불어 농산물 및 식품의 미생물학적 식성병해 관리

기준으로 중요하게 다루어지고 있으며 특히 국제적인 식품 및 농산물 교역에서 검역기준으로서의 중요성이 더욱 강조되고 있는 추세이다. 곰팡이독 patulin [4-hydroxy-4H furo(3,2C)pyran-2(6HO)-one] 은 주로 사과의 병반에 서식하는 곰팡이의 이차 대사산물로서 사과 이외에도 포도, 복숭아, 배 등지에서도 검출된다(2). Patulin은 주로 *Penicillium* 속의 곰팡이에서 생성되며, *P. chrysogenum*, *P. expansum*, *P. divergens*, *P. melinn*, *P. griseofulvum*, *P. roqueforti* 등이 대표적인 patulin 생산균주로 보고되고 있고 *Aspergillus* 속의 *A. clavatus* 등도 patulin 생산 곰팡이로 알려져 있다(3,4). Patulin은 aflatoxin 등의 다른 곰팡이독에 비하여 상대적으로 독성이 낮다고 알려져 있으나, 급성독소로 소화기의 장해를 유발하며 특히 영유아에게는 심각한 식중독 증상을 나타낸다(5,6). Patulin의 만성 독성에 대한 연구결과로는,

[†]Corresponding author. E-mail : fungikim@kaeri.re.kr,
Phone : 82-63-570-3140, Fax : 82-63-570-3149

취에서의 암 유발(7)과 가공류에서의 기형유발(8) 등이 알려져 있으며, patulin이 면역반응계에 작용하여 폐의 부종을 유발하고 간, 비장 및 신장을 손상한다는 연구보고도 발표되어 있다(9). Patulin에 대한 국제적인 연구는 patulin의 독성학적 평가(10,11) 이외에도 patulin의 검출 및 분석기술개발(12), 과실류나 주스의 patulin 오염도 평가(13), patulin 생산균주의 분리 동정(14), patulin의 제거기술개발(15-17) 등의 다양한 관점에서 수행되어 왔다. 특히 patulin의 주요 오염원인 사과와 사과주스에 대한 연구가 활발하게 추진되고 있는데 WHO와 EU에서는 사과주스의 patulin 최소함량을 50 ppb로 정하여 검역기준으로 시행하고 있으며(18) 최근에는 국제적으로 사과와 사과주스에 대한 patulin의 검역기준이 보다 강화되는 추세에 있다(19).

우리나라의 사과재배 면적은 2000년 기준으로 약 26,000 ha에 이르며 생산량 또한 연간 5,000톤 수준에 이르고 있다(20). 따라서 국내산 사과나 사과가공품의 patulin 오염도 및 과실류에 분포하는 patulin 생산균주의 모니터링과 같은 기반연구가 필요하나 아직까지 우리나라의 곰팡이독에 관한 연구는 aflatoxin, ochratoxin 및 sterigmatocystin 등에 관한 연구가 주를 이루어 왔고(21,22) patulin에 대한 연구는 Kim등(23)이 발표한 patulin 생성 균주 분리 등의 몇 편에 불과한 실정이다. 저자 등은 국내산 사과의 병반으로부터 patulin 생산 균주를 분리하여 이를 *Penicillium crustosum*으로 동정한 바 있다(24). 한편, 곰팡이독을 생성하는 곰팡이는 서식 환경의 차이나 다른 미생물과의 상호작용 등에 의해 곰팡이의 성장과 독소 생성능에 차이가 나타난다(25,26). 이와 관련하여 patulin을 생성하는 *Penicillium*속 곰팡이의 생육환경에 따른 독소 생성능이 보고되어 있으며, Patterson 등(27)은 곰팡이의 patulin 생성 관련 유전자인 IDH (isoepoxydon dehydrogenase) gene을 probe로 하여 PCR 방법으로 patulin 생성균주를 분석한 결과, IDH 유전자는 가지고 있으나 환경 조건에서 이 유전자가 발현되지 않아 patulin 생산이 관찰되지 않은 경우가 많음을 보고한 바 있다. 특히, patulin의 생성 및 분해에는 곰팡이 생육환경의 pH가 가장 큰 영향을 미치는 것으로 알려져 있다(28).

이에 따라 본 연구에서는 국내산 사과로부터 분리, 동정하여 실험실에 보존 중인 *P. crustosum*에 대해 다양한 탄소원과 pH에 따른 생육정도와 patulin 생성능을 patulin 생성 표준균주인 *P. griseofulvum*(ATCC 46037)과 비교하여 분석하였다.

재료 및 방법

재 료

본 연구에 사용한 toluene, ethyl acetate, formic acid, acetonitrile, patulin 표준품, 그리고 3-Methyl-2-benzothionone

hydrozane은 미국 Sigma사에서 구입하여 사용하였고, thin layer chromatography를 위한 silica gel은 silica gel 60 F₂₅₄(Merck & Co., Inc., Darmstadt, Germany)를 사용하였다. Patulin의 추출 및 HPLC 분석에 사용된 시약은 모두 HPLC grade로 구입하여 사용하였다.

사용균주 및 균주배양

국내산 사과로부터 분리, 동정된 *P. crustosum*을 시험균주로 사용하였으며, patulin 생산 표준균주인 *P. griseofulvum* ATCC 46037는 American Type Culture Collection(ATCC)에서 분양받아 대조구로 사용하였다. 각각의 균주는 potato dextrose agar에 접종하여 25°C의 암소에서 1주간 배양하여 포자를 생성시켰다. 포자가 생성된 petri dish에 0.1% Tween 80 용액 1 mL를 첨가하여 포자를 씻어내는 조작을 3회 반복한 다음 회수된 포자 현탁액을 여과하고 이를 멸균수로 희석하여 10⁶ conidia/mL로 조절하여 실험에 사용하였다.

곰팡이 배양 및 patulin 생산을 위한 배지는 SY(sucrose 4%, yeast extract 2%; BD Difco), MEB(2% malt extract, 2% dextrose, 0.1% peptone; BD Difco), 5-GYEP(5% dextrose, 0.1% yeast extract, 0.1% peptone; BD Difco)의 세 가지 배지를 사용하였다. 5-GYEP 배지조성에서 탄소원을 dextrose, sucrose, fructose, lactose, galactose, maltose, mannitol, sorbitol 및 glycerol로 대체한 배지에서 탄소원에 따른 균주의 patulin 생성능을 측정하였다. 균체의 생육도와 patulin 생성능은 Erlenmeyer flask(250 mL)에 배지를 각각 50 mL씩 분주하여 멸균시킨 다음 포자현탁액 1 mL를 접종하고 30°C의 암소에서 200 rpm의 조건으로 4 주간 진탕배양하면서 1주일 간격으로 측정하였다. 배지의 pH에 따른 patulin의 생성정도 비교분석을 위하여, 배지의 pH를 2.0-12.0의 범위로 조절한 potato dextrose broth에서 4주간 배양하면서 1주일 간격으로 균체의 생육도와 patulin 생성능을 조사하였다. 배지의 pH 조절에는 0.1 M citric acid와 0.2 M disodium hydrogen phosphate를 이용한 McIlvaine buffer를 사용하였다.

균의 생육도 측정

배양액 50 mL를 취하여 균체를 증류수로 세척하고, 이를 항량을 구한 여과지에 여과한 다음, 60°C의 dry oven에서 24 시간 건조시켜 방랭한 후, 항량이 된 무게에서 여과지의 무게를 제외한 무게를 측정하여 균의 생육도를 측정하였다.

Patulin 정량

균체 배양액의 patulin 함량은 AOAC 방법(29)으로 분석하였다. 추출물의 patulin 검출여부를 평가하기 위한 정성적 실험으로 thin layer chromatography (TLC)를 실시하였다. 미리 100-110°C 건조기에서 2시간 동안 활성화 시킨 TLC

plate에 각각의 patulin 표준품과 추출물 10 uL를 spotting하여 전개용매(toluene : ethyl acetate : 90% formic acid = 5 : 4 : 1)가 포화된 전개조에 전개시켰다. 전개된 TLC plate를 110°C에서 건조시킨 다음 UV 등 아래에서 표준 patulin과 동일한 Rf치를 나타내는지 관찰한 후 0.5% 3-Methyl-2-benzothiazoline hydrazone (MBTH) 용액을 분무한 후 건조시켜 육안으로 표준 patulin에서와 같은 노란색의 발색반응이 나타나는지를 확인하였다. Patulin의 정량적 분석은 HPLC로 실시하였다. 즉, 배양물 10 mL을 시험관(I)에 취하여 동량의 ethyl acetate를 첨가하여 1분간 충분히 교반한 다음 정치하여 상층액을 시험관(II)에 옮겼다. 시험관(I)에 ethyl acetate 10 mL을 첨가하여 1분간 혼합한 다음 정치하여 상층액을 시험관(II)에 합하고 이 추출액에 1.5% 탄산나트륨용액 2 mL을 첨가하여 혼합한 다음 정치하고 상층액을 시험관(III)에 옮겼다. 시험관(II)에 ethyl acetate 5 mL을 첨가하여 혼합한 다음 정치한 후 상층액을 다시 시험관(III)에 합하였다. 위 추출용액에 무수황산나트륨 1 g을 첨가하여 30초간 혼합한 다음 상층액을 회수하여 40°C에서 질소농축한 후 초산용액으로 pH 4.0으로 조정된 용액으로 용해하여 시험용액으로 사용하였다. 시험용액은 0.45 µm membrane filter (milipore filter)를 이용하여 여과한 후 여액을 HPLC용 시료로 사용하여 표준 patulin과 비교하여 정량하였다. HPLC는 Waters 2690 (Waters Co., Milford, MA, USA), detector는 Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters Co., Milford, MA, USA)을 사용하여 파장 276 nm로 설정하였다. Column은 Shiseido (30 cm × 3.9 mm)을 이용하였으며, 이동상으로는 증류수 : acetonitrile = 95 : 5의 비율로 유속 0.7 mL/min의 속도로 하였다. 이때 시료는 20 µL씩 주입하여 분석하였다.

통계분석

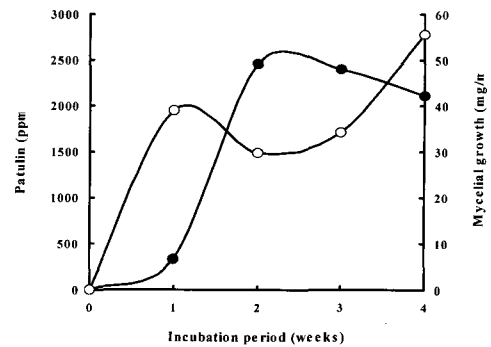
이상의 실험에서 얻어진 실험결과는 Statistical Package for Social Sciences(SPSS, 10.0)를 이용하여 oneway ANOVA 분석을 하였으며, 시료간의 유의성은 Duncan's multiple range test로 p<0.05 수준에서 비교하였다.

결과 및 고찰

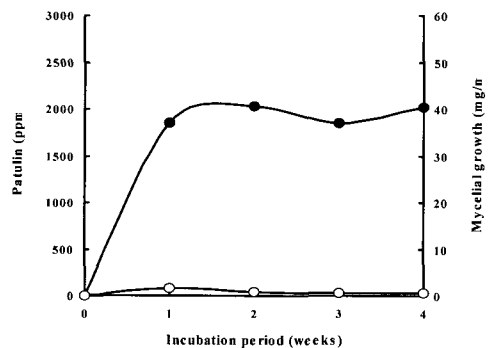
***Penicillium griseofulvum*의 생장 및 patulin 생성능**

곰팡이 배양 및 patulin 생산 유도배지인 SY, MEB, 5-GYEP 에서의 patulin 생산 표준균주 *P. griseofulvum*의 균체생장과 patulin 생성능 측정결과를 Fig. 1에 나타내었다. *P. griseofulvum*의 균체생장은 SY배지에서 가장 높았으며 MEB 배지와 5-GYEP 배지에서는 상대적으로 균체생장이 낮았다. SY배지에서 *P. griseofulvum*의 건조 균체량은 배양 1주 경과 후 40 mg/mL로 증가하였다가 이후 점차

(A)



(B)



(C)

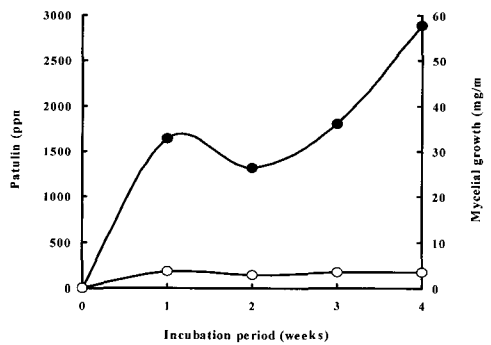


Fig. 1. Comparison of the growth and patulin producing capacity of *Penicillium griseofulvum* ATCC 46037 in a cultivation media of SY broth (A), MEB broth (B) and 5-GYEP broth (C) during a cultivation at 30°C for 4 weeks.

○—○; mycelial growth (mg/mL dry weight) ●—●; patulin (ppm).

감소하였으며, 3주 후부터 다시 증가하여 배양 4주에는 55 mg/mL까지 증가하였다 (Fig. 1-A). 그러나 MEB와 5-GYEP 배지에서는 균체생장이 매우 낮았다. 즉, MEB 배지에서는 배양 1주 이후 건조 균체량이 1.5 mg/mL로 최고치를 나타내었다가 이후 점차 감소하여 배양 4주후에는 0.6 mg/mL까지 감소하였으며 (Fig. 1-B), 5-GYEP 배지에서는 배양 1주 이후부터 4주까지 3.6-3.9 mg/mL의 건조 균체량을 유지하였다 (Fig. 1-C). Patulin 생산 표준균주 *P. griseofulvum*의 patulin 생성능은 Fig. 1에 나타난 바와 같이

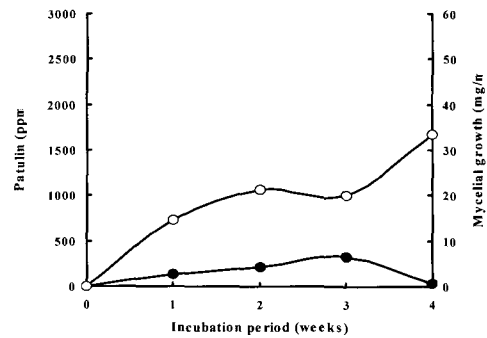
각 배지에 따라 생산시간과 생산량에 다소의 차이가 있었으나, 전체적으로 최대 patulin 생산량 2,000-3,000 ppm 수준의 비교적 높은 농도의 patulin 생산능을 보여주었다. 각 배지별로는 SY 배지의 경우, 배양 2주째에 2,456 ppm으로 최대의 patulin 생산량을 나타내었으며 이후 점차 감소하여 2,024-2,399 ppm을 유지하였다 (Fig. 1-A). 반면 MEB와 5-GYEP배지에서는 배양기간 경과에 따른 균체 생장은 낮았으나 patulin 생산은 SY 보다 다소 낮거나 높은 수준을 나타내었다. 특히 SY 배지에서는 *P. griseofulvum*의 patulin 생산이 배양 2주 이후부터 활성화된 것과는 달리 MEB와 5-GYEP 배지에서는 배양 1주 이후에 각각 1,852 ppm과 1,640 ppm의 patulin이 검출되어 상대적으로 SY 배지보다 빠른 patulin 유도 시간을 나타내었다. 배양기간별로는 MEB 배지에서는 2주후에 2,028 ppm으로 최고 생성능을 보였으나 차츰 감소하여 4주후에는 2,893 ppm의 patulin이 검출되었으며, 5-GYEP배지에서는 배양 1주에 1,640 ppm의 patulin이 검출되었으며 배양 2주에 다소 감소하였다가, 이후 증가하여 4주 경과 후에는 2,892 ppm의 patulin 생성능을 나타내었다.

Penicillium crustosum의 성장 및 patulin 생성능

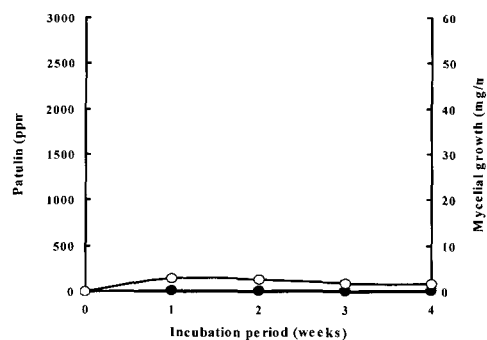
SY, MEB, 5-GYEP 배지에서 국내산 사과로부터 분리된 patulin 생산균주 *P. crustosum*의 균체생장과 patulin 생성능 측정결과를 Fig. 2에 나타내었다. *P. crustosum*의 균체생장은 *P. griseofulvum*과 마찬가지로 SY배지에서 가장 높았으며 MEB 배지와 5-GYEP 배지에서는 균체생장이 낮았다. SY배지에서 *P. crustosum*의 건조 균체량은 배양 2주 경과 후 약 22 mg/mL으로 증가하였다가 이후 점차 감소하였으며, 3주 후부터 다시 증가하여 배양 4주에는 36 mg/mL까지 증가하였다 (Fig. 2-A). MEB배지에서 *P. crustosum*의 균체생장은 배양 1-2주까지 2.8-2.6 mg/mL의 성장을 나타내었으나 이후 점차 감소하여 3-4주에는 1.9-1.6 mg/mL으로 감소하였다(Fig. 2-B). 또한 5-GYEP 배지에서는 배양 1-2주에 3.8-3.4 mg/mL으로 나타났으며, 배양 4주후에는 4.7 mg/mL로 다소 증가하였다(Fig. 2-C).

국내산 사과로부터 분리된 patulin 생산균주 *P. crustosum*의 patulin 생성능은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 배지에 따라 현저한 차이를 나타내었다. SY 배지에서의 patulin 생산은 배양 1주시 135.77 ppm으로 나타났으며 3주 경과 후에는 323.96 ppm으로 최고 함량을 나타내었다가 이후 감소하는 경향을 나타내었다. MEB 배지에서는 배양기간이 경과함에 따라 5-10 ppm 수준의 patulin이 검출되어 다른 배지에서 보다 낮은 patulin 생성능을 나타내었다. 반면 5-GYEP배지에서는 균체의 생장은 크게 나타나지 않았으나, patulin 생성능은 배양 2주에 2,390 ppm을 나타내었으며, 3주후에는 2,794 ppm까지 증가하였다. 그러나 5-GYEP 배지에서 생산된 patulin은 배양 3주 이후 급격히 감소하여 배양 4주

(A)



(B)



(C)

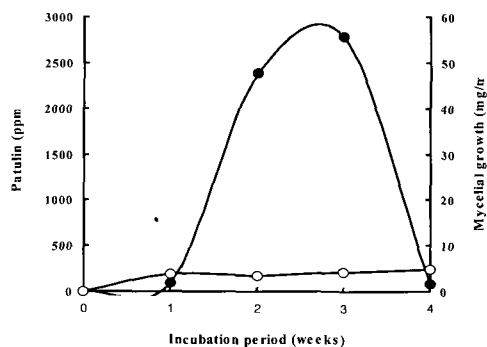


Fig. 2. Comparison of the growth and patulin producing capacity of *Penicillium crustosum*, isolated from Korean apple, in a cultivation media of SY broth (A), MEB broth (B) and 5-GYEP broth (C) during a cultivation at 30°C for 4 weeks.

○—○; mycelial growth (mg/mL dry weight) ●—●; patulin (ppm).

째에는 검출되지 않았다. 일반적으로 곰팡이의 성장은 배지조성, 수분활성도(Aw), pH, 온도, 빛 그리고 가스조성에 의존한다고 알려져 있다. 특히 수분활성도(Aw)와 pH는 곰팡이의 성장보다 2차 대사산물 생성에 큰 영향을 미친다고 보고되고 있으며, *P. caseifulvum*의 경우 pH가 낮을수록 2차 대사산물의 생성이 증가한 경향을 나타내었다(30). 또한 일반적으로 patulin은 산성의 조건에서 비교적 안정하다고 알려져 있으며, 중성 및 약 알칼리 조건에서는 patulin이 감소하는 보고가 있다(31). 반면, 산성의 조건에서 ascorbic

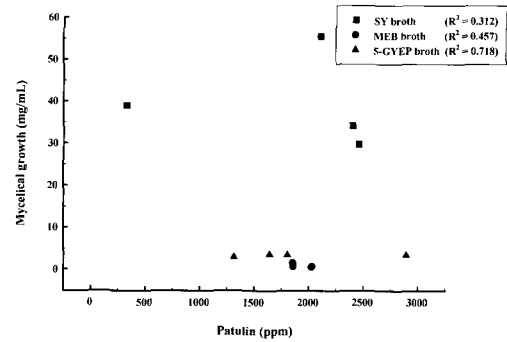
acid 첨가에 의해서 patulin 함량이 60-80% 감소하는 경향을 나타낸다는 보고(32)도 있으므로 patulin 함량 감소 및 자연 분해에는 pH에 의한 영향 이외에도 배양과정 중 생성되는 대사산물에 의한 상호작용이 있을 것으로 생각된다. 한편, 과일즙의 patulin은 발효에 의하여 자연적으로 제거된다고 알려져 있으나(33,34) 발효과정에서 미생물이 생산한 이차 대사산물의 복합적인 작용에 의하여 patulin이 분해된다고만 알려져 있을 뿐 상세한 반응기작은 아직까지 밝혀져 있지 않다. 본 실험에서, 배양액에서 이미 생산된 patulin이 시간 경과 후 검출되지 않은 것 또한 미생물 성장에 따른 대사산물의 생화학적 작용에 의하여 patulin이 분해되었을 것으로 추측되나 구체적인 반응기작 규명은 추후 연구가 필요할 것으로 사료되었다.

***P. griseofulvum*과 *P. crustosum*의 성장 및 patulin 생성능 비교**

본 실험에서 균체 생산량은 *P. griseofulvum*과 *P. crustosum* 모두 sucrose를 탄소원으로 한 SY broth 배지에서 가장 높은 균체 성장을 나타내었으며, MEB 배지와 5-GYEP 배지에서의 균체 생장은 건조 균체량 기준 5 mg/mL 이하의 낮은 성장을 보여주었다. SY 배지에서의 성장곡선을 살펴보면 두 균주 모두 배양 1-2주에 균체량이 증가하여 이후 감소하였다가 다시 증가하는 양상을 나타내었으며 다른 배지의 경우에도 성장률은 낮았으나 이와 유사한 경향을 보여주었다(Fig. 1, Fig. 2). 배양액에 따른 *P. griseofulvum*과 *P. crustosum*의 최대 patulin 생산 정도를 Table 1에 정리하였다. Table 1의 결과에 나타난 바와 같이 *P. griseofulvum*는 배양액 모두에서 2,000-3,000 ppm의 높은 patulin 생성을 나타내었으나 국내산 사과 분리균주인 *P. crustosum*은 5-GYEP 배지에서만 3,000 ppm 수준의 patulin을 생산하였고 SY 배지와 MEB 배지에서는 상대적으로 낮은 patulin 생성능을 보여주었다. Patulin의 생성시기는 각 배지에 따라 각기 달랐으나 주로 균체의 1차 생장이 이루어져 stationary phase에 도달한 이후에 생성되는 양상을 나타내었다. 한편, SY 배지에서 균체의 성장률과 patulin 생산이 모두 높았던 *P. griseofulvum*의 경우를 제외하고는 patulin 생산이 높았던 3개 시험구 모두 최대 균체량은 5 mg/mL 이하로 낮았고, 반대로 35 mg/mL 수준의 균체생장을 나타내었던 SY 배지 - *P. crustosum* 시험구에서는 patulin 생성이 낮은 결과를 나타내었다. 따라서 본 실험 결과를 통하여 균체의 성장 정도와 patulin의 생산과의 상관관계가 낮음을 알 수 있었다(Fig. 3) 또한 본 실험에 사용된 모든 배지에서 patulin 생성이 높았던 *P. griseofulvum*과는 달리 *P. crustosum*은 glucose가 탄소원으로 포함된 5-GYEP 배지에서 높은 patulin 생산성을 보여 주었다. 이는 *P. crustosum*의 patulin 생산이 탄소원에 따라 달라지는 것으로 해석될 수 있으나 이러한 추론의 확정에는 향후 보다 상세한 연구가 보완되어야 할 것으

로 사료되었다.

(A)



(B)

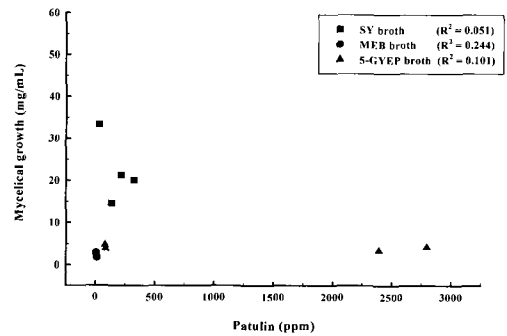


Fig. 3. Correlations between maximal growth rate and patulin producing capacity in a culture broth of *Penicillium griseofulvum*(A) and *Penicillium crustosum*(B) during a cultivation at 30°C for 4 weeks.

Table 1. Maximal patulin producing activity of *Penicillium griseofulvum* and *Penicillium crustosum* in a cultivation media of SY broth (A), MEB broth (B) and 5-GYEP broth (C) during a cultivation at 30°C for 4 weeks

Media	<i>P. griseofulvum</i>	<i>P. crustosum</i>
SY	2,456.1	323.9
MEB	2,028.6	10.9
5-GYEP	2,892.9	2,794.2

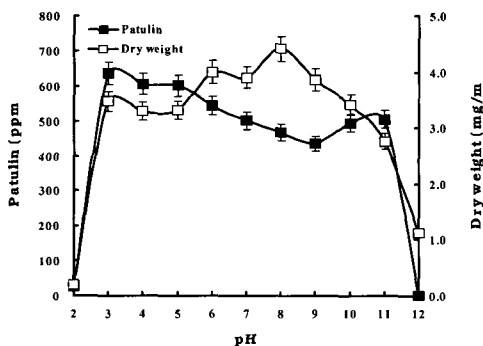
(unit:ppm)

배양액의 pH에 따른 patulin 생성능

곰팡이의 일반배양 배지인 potato dextrose broth에서 pH 변화에 따른 균체생장과 patulin 생산능을 비교하였다(Fig. 4). 표준균주 *P. griseofulvum*과 분리균주 *P. crustosum* 모두 pH 6-8의 중성 pH 영역에서 균체의 성장이 가장 높았다. Patulin 생산능은 *P. griseofulvum*은 표준균주는 pH 3-11의 넓은 범위에서 500 ppm 내외의 patulin 생산을 보여주었으며 *P. crustosum*은 pH 3-5에서 가장 높은 농도의 patulin을 생산하여 *P. crustosum*이 patulin 생성에 있어서 보다 민감하

계 pH의 영향을 받는 것으로 평가되었다. 일반적으로 곰팡이는 넓은 pH 범위(2-10)에서 성장하며(24), *Aspergillus parasiticus*의 경우 약산성이나 중성(pH 5.0-7.0)에서 aflatoxin을 가장 많이 생성한다고 알려져 있다(35). 그러나 배양액에 casein을 첨가한 조건에서의 *A. parasiticus*는 pH 9.3-9.9의 알칼리 상태에서 aflatoxin을 가장 많이 생성한다는 연구결과도 있으므로(36) pH 단일 조건만으로 곰팡이독의 생산조건을 평가하기는 어려우며 탄소원이나 질소원, 그리고 온도와 산소 조건 등 복합적인 요인이 고려되어야 할 것으로 사료된다.

(A)



(B)

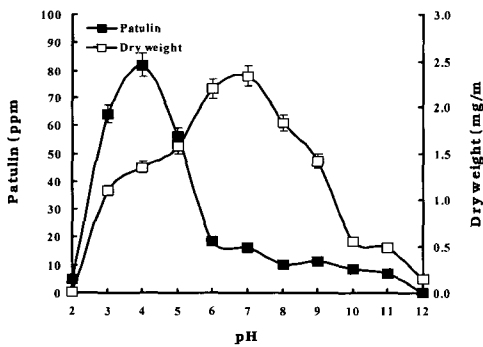


Fig. 4. Effect of pH on the mycelial growth and patulin producing capacity in the patulin producing fungi *P. griseofulvum*(A) and *P. crustosum*(B).

탄소원 종류에 따른 patulin 생성능

탄소원에 따른 *P. crustosum* 및 *P. griseofulvum*의 patulin 생성능을 Table 2에 제시하였다. 본 실험에서 두 균주의 patulin 생산 정도는 탄소원에 따라 각기 다른 결과를 나타냈다. *P. griseofulvum*는 탄소원 가운데 glycerol과 mannitol 첨가 시 각각 29,638.0, 8,595.5 ppm으로 높은 patulin 생산능을 나타내었으며, sorbitol에서는 1,075.4 ppm으로 가장 낮은 patulin 생산능을 나타내었다. 분리균주인 *P. crustosum*은 *P. griseofulvum*에 비해 전반적으로 patulin 생성량이 낮았으며, fructose 첨가배지에서 2,805.6 ppm 으로 가장 높은 함량을 나타내었다.

Table 2. Maximal patulin producing activity of *P. griseofulvum* ATCC 46037 and *P. crustosum* in various carbon media during a cultivation at 30°C for 4 weeks

(unit:ppm)		
Carbon sources	<i>P. griseofulvum</i>	<i>P. crustosum</i>
Dextrose	2662.8	1137.2
Sucrose	2352.1	903.6
Fructose	2029.8	2805.6
Lactose	3092.7	1622.9
Galactose	3322.9	1336.6
Maltose	1750.1	1963.5
Mannitol	8505.5	1101.6
Sorbitol	1075.4	1295.9
Glycerol	29638.0	981.1

요 약

국내산 사과로부터 분리, 동정한 *P. crustosum*과 patulin 생성균주인 *P. griseofulvum*(ATCC 46037)에 대하여 malt extract broth (MEB), sucrose yeast broth (SY) 및 5% glucose, yeast extract, peptone (5-GYEP) broth를 이용하여 생육정도와 독소 생성능을 비교하였다. 또한 균체 생육도와 독소 생성능과의 상관성을 검토하고, 배양액의 pH에 따른 균체 성장과 patulin 생성능을 조사하였다. *P. griseofulvum* (ATCC 46037)의 균체성장은 SY배지에서 가장 높았으나 patulin은 SY, MEB, 5-GYEP 배지 모두에서 2,000-3,000 ppm의 높은 생산능을 보여주었다. *P. crustosum*의 균체성장 역시 SY배지에서 가장 높았으나 patulin 생성능은 5-GYEP broth에서 배양 3주에 2,794 ppm으로 가장 높게 나타났다. *P. crustosum*과 *P. griseofulvum* 모두 균체성장과 patulin 생산능과의 상관관계는 매우 낮은 것으로 나타났다. 배지의 pH에 따른 patulin 생산능은 *P. griseofulvum*은 경우 pH 3-11의 넓은 범위에서 patulin 생성능을 나타내었으나, *P. crustosum*은 pH 3-5의 산성조건에서 높은 patulin 생성능을 나타내었다. 탄소원에 따른 patulin 생산능은 *P. griseofulvum*은 glycerol에서, *P. crustosum*은 fructose에서 가장 높았다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구사업(과제번호: 20070201080025)의 지원에 의해 이루어진 것임.

참고문헌

1. Microcha, C.J. (1986) Metabolism and residue of trichothecene toxins in animals and plant system. In: Mycotoxins and Phytotoxins. Elsevier Science Publishers, Amsterfam, p.409-420
2. Frank, H.K. (1977) Occurrence of patulin in fruit and vegetables. *Anrales de la Nutrition et de l' Alimentation*, 31, 459-465
3. Crosby, N.T. (1984) Review of current and future analytical methods for the determination of mycotoxins. *Food Addit. Contam.*, 1, 39-44
4. Krivobok, S., Seigle-Murandi, F., Stwiman, R. and Marzin, D. (1987) Screening methods to detect toxigenic fungi in liquid medium. *J. Microbiol. Meth.*, 7, 29-36
5. Lai, C.L., Fuh, Y.M. and Shih, D.Y.C. (2000) Detection of mycotoxin patulin in apple juice. *J. Food Drug Anal.*, 8, 85-96
6. Drusch, S., Kopka, S. and Kaeding, J. (2006) Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. *Food Chem.*, 100, 192-197
7. Ciegler, A., Beckwith, A.C. and Jackson, L.K. (1976) Teratogenicity of patulin and patulin adducts formed with cysteine. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31, 664-667
8. Dickens, F. and Jones, H.E.H. (1961) Carcinogenic activity of a series of reactive lactones and related substances. *Br. J. Cancer*, 15, 85-100
9. Llewelly, G.C., McCay, J.A., Brown, R.D., Musgrove, D.L., Butterwrth, L.F., Munson, A.E. and White, K.L. (1998) Immunological evaluation of the mycotoxin patulin in female B6C3F(1) mice. *Food Chem. Toxicol.*, 36, 1107-1115
10. Wurgler, F.E., Friederich, U. and Schlatter, J. (1991) Lack of mutagenicity of ochratoxin A and B, citrinin, patulin and cneistine in *Salmonella typhimurium* TA102. *Mut. Res.*, 261, 205-216
11. Barhoumi, R. and Burghardt, R.C. (1996) Kinetic analysis of the chronology of patulin-and gossypol-induced cytotoxicity *in vitro*. *Fundamental Appl. Toxicol.*, 30, 290-297
12. Sewram, V., Nair, J.J., Leggott, N.L. and Shephard, G.S. (2000) Determination of patulin in apple juice by high-performance liquid chromatography- atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. *J. Chromatography*, 879, 365-374
13. Ritieni, A. (2003) Patulin in Italian commercial apple products. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 6086-6090
14. Tapia, M.O., Stern, M.D., Soraci, A.L., Meronuck, R., Olson, W., Gold, S., Koski-Hulbert, R.L. and Murphy, M.J. (2005) Patulin-producing mold in corn silage and high moisture corn and effects of patulin on fermentation by ruminal microbes in continuous culture. *Anim. Feed Sci. Technol.*, 119, 247-258
15. Sydenham, E.W., Vismer, H.F., Marasas, W.F.O., Brown, N., Schlechter, M. and Rheeder, J.P. (1996) The influence of deck storage and initial processing on patulin levels in apple juice. *Food Addit. Contam.*, 14, 429-433
16. Wheeler, J.L., Harrison, M.A. and Koehler, P.E. (1987) Presence and stability of patulin in pasteurised apple cider. *J. Food Sci.*, 52, 479-480
17. Zegota, H., Zegota, A. and Bachman, S. (1988) Effect of irradiation on the patulin content and chemical composition of apple juice concentrates. *Z. Lebensm. Unters. Forsch.*, 187, 235-238
18. Boonzaaijer, G., Bobeldijk, I. and Osenbruggen, W.A. (2005) Analysis of patulin in dutch food, an evaluation of a SPE based method. *Food Control*, 16, 587-591
19. Rychlik, M., Kircher, F., Schusdziarra, V. and Lippl, F. (2004) Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach. *Food Chem. Toxicol.*, 42, 729-735
20. Lee, J.H., Kim, Y.C., Kim, M.Y., Chung, H.S. and Chung, S.K. (2000) Antioxidative activity and related compounds of apples pomace. *Korean J. Food Sci. Technol.*, 32, 908-913
21. Bullerman, K.B. (1979) Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food. Prot.*, 42, 65-86
22. Davis, N.D. (1981) Sterigmatocystin and other mycotoxins produced by *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Prot.*, 44, 711-714
23. Kim, D.S., Chung, D.H., Kim, S.Y. and Chung, H.S. (1993) Study on the isolation of patulin-producing *Penicillium* sp. from natural sources. *Korean J. Environ. Health Soc.*, 19, 41-45
24. Yun, H.J., Lim, S.Y., Chung, J.W., Jo, C., Park, J.C., Kwon, J.H. and Kim, D.H. Isolation and Characterization of *Penicillium crustosum*, a Patulin Producing Fungus from Apples. *Food Sci. Biotechnol.*, 15, 896-901
25. Kang, S.J., Kang, J.S. and Chung, D.H. (2001) The effect of mixed culture with *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Penicillium griseofulvum* on aflatoxin and patulin production. *J. Food Hyg. Safety*, 16, 206-211
26. Dombrink-Kurtzman, M.A., Blackbum, J.A. (2005) Evaluation of several culture media for production of patulin by *Penicillium* species. *Int. J. Food Microbiol.*,

- 98, 241-248
27. Paterson, R.R.M., Kozakiewicz, Z., Locke, T., Brayford, D. and Jones, S.C.B. (2003) Novel use of the isoeopydon dehydrogenase gene probe of the patulin metabolic pathway and chromatography to test penicillia isolated from apple production systems for the potential to contaminate apple juice with patulin. *Food Microbiol.*, 20, 359-364
 28. Damoglou, A.P. and Campbell, D.S. (1986) The effect of pH on the production of patulin in apple juice. *Lett. Appl. Microbiol.*, 2, 9-11
 29. A.O.A.C. (1990) Official Methods of Analysis. 15th ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, D.C., p.1185-1205
 30. Suhr, K.I., Haasum, I., Steenstrup, L.D. and Larsen, T.O. (2002) Factors affecting growth and pigmentation of *P. caseifulvum*. *J. Dairy Sci.*, 85, 2786-2794
 31. Drush, S., Kopka, S. and Kaeding, J. (2006) Stability of patulin in a juice-like aqueous model system in the presence of ascorbic acid. *Food Chem.*, 192-197
 32. Brackett, R.E. and Marth, E.H. (1976) Ascorbic acid and ascorbate cause disappearance of patulin from buffer solutions and apple juice. *J. Food Prot.*, 42, 864-866
 33. Stinson, E.E., Osman, S.F., Huhtanen, C.N. and Bills, D.D. (1978) Disapperance of patulin during alcoholic fermentation of apple juice. *Appl. Environ. Microbiol.*, 36, 620-622
 34. Sands, D.C., Hohn, L.M. and Gerald, S.W. (1976) Use of activated charcol for the removal of patulin from cider. *Appl. Environ. Microbiol.*, 388-391
 35. Bucjanan, R.L. and Ayres, J.C. (1975) Effect of initial pH on aflatoxin production. *Appl. Microbiol.*, 30, 1050
 36. Lie, J.L. and Marth, E.H. (1968) Aflatoxin formation by *Asp. flavus* and *Asp. parasiticus* in a casein substrate at different pH values. *J. Dairy Sci.*, 51, 1743-1747

(접수 2007년 2월 27일, 채택 2007년 5월 7일)