Journal of Radiation Industry 11(2) : 73~80(2017)

국내산 사과에서 분리한 곰팡이의 패툴린 생성능 및 방사선 감수성 평가

김 동 호[1,*] · 조 민 호[1]

[1]한국원자력연구원 첨단방사선연구소

Determination of Patulin Producing Activity and Radiation Sensitivity of Fungi Isolated from Korean Apples

Dong Ho Kim[1,*] and Min Ho Jo[1]

[1]*Advanced Radiation Technology Institute, Korea Atomic Energy Research Institute, Jeongeup 56212, Republic of Korea*

Abstract - Patulin is a mycotoxin produced by a variety of molds, especially within genera *Penicillium*, *Aspergillus* and *Byssochlamys* growing on various fruits. In this study, patulin producing activities and the effects of a gamma irradiation on the control and/or sterilization of fungal strains isolated from Korean apples, *Malus pumila* var. *dulcissima*, were evaluated. Nine fungal strains; five strains of genus *Penicillium* and one strains of genus *Glomerella*, *Giberella*, *Alternaria* and *Galactomyces* were isolated and identified by the similarity analysis based on the nucleotide sequence of the ITS5-5.8S-ITS4 region. Among the isolated strains, four *Penicillium* strains and a *Glomerella* showed patulin producing activities. The maximal patulin-producing activity of *P. griseofulvum* ATCC 46037, a standard strain of patulin-producing fungi, was 1,211.5 ppm in a 5-GYEP broth medium, while those of the isolated fungi reached to 27.4~134.2 ppm. Patulin-producing levels were dependent on the carbon sources and maximal production of the patulin by *P. griseofulvum*, *P. crustosum*, I-3, I-6, I-7 and I-8 was observed in a broth media containing glycerol, fructose, glycerol, glucose, lactose and fructose, respectively. The D_{10}-values of the conidia of tested strains in an aqueous suspension were calculated in the range of 0.25~0.64 kGy. In conclusion, although the patulin producing activities of the isolated fungi were significantly lower than those of standard strains, it cannot deny the possibility of an patulin contamination of the Korean apples. Therefore, gamma ray irradiation (1.0 kGy) after harvest of apples could be applied to prevent the growth of a patulin producing molds for a safe distribution.

Key words : Patulin, Mycotoxin, Apple, Fungi, Radiation

서 론

곰팡이독(mycotoxin) 패툴린[Patulin, 4-hydroxy-4H furo (3,2C)-pyran-2(6H)-1]은 화학적으로 α,β-unsaturated γ-lactone 구조를 갖는 곰팡이의 이차대사산물이다(Wright 2015). 패툴린 생산균주로 가장 잘 알려진 곰팡이는 푸른곰팡이인 *Penicillium expansum*이며(Ostry *et al*. 2004; Elhariry *et al*. 2011), 이외에도 *P. chrysogenum*, *P. divergens*, *P. melinn*, *P. griseofulvum*, *P. roqueforti* 등의 *Penicillium* 속 곰팡이와 *Aspergillus*, *Byssochlamys* 등의 곰팡이도 패툴린을 생산하

* Corresponding author: Dong Ho Kim, Tel. +82-63-570-3200, Fax. +82-63-570-3149, E-mail. fungikim@kaeri.re.kr

는 것으로 알려져 있다(Davis 1981; Cunha *et al*. 2014). 식품에서의 패툴린 오염은 주로 과실류나 곡류에 곰팡이가 착생하여 부패가 진행되면서 발현된다(Soliman *et al*. 2015). 패툴린의 주요 오염원은 사과이며 이외에도 배, 복숭아, 포도, 딸기 등의 과실류와 채소, 치즈, 건어물, 곡류 등에서도 패툴린의 검출이 보고된 바 있다(Larsen *et al*. 1998; Funes and Resnik 2009; Vansteelandt *et al*. 2012; Pattono *et al*. 2013; Wright 2015). 비가공식품에서의 패툴린 오염은 부패 병반이나 곰팡이의 생장을 동반하기 때문에 육안검사를 통하여 해당 식품을 기피하는 것으로 예방이 가능하다. 그러나 가공식품의 경우, 원료 선별 과정에서 패툴린에 오염된 원료가 혼입되면 이를 육안이나 맛, 냄새 등으로 판별하는 것이 불가능하다. 실제로 패툴린 오염이 문제시 되는 식품은 주스, 퓨레, 잼 등의 과실류 가공식품이며 특히 사과를 원료로 한 가공식품의 오염이 가장 많이 보고되고 있다.

패툴린은 아플라톡신(aflatoxin) 등의 다른 곰팡이독들과 비교할 때 상대적으로 유전독성이 낮다고 알려져 있으나 인체 여러 기관에 작용하여 다양한 장해 증상을 나타낸다(Wright 2015). 패툴린은 면역반응계에 작용하여 폐의 부종을 유발하고 간, 비장 및 신장을 손상시킨다(Puel *et al*. 2010). 패툴린의 발암성과 관련하여 IARC (The International Agency for Research on Cancer)에서는 1986년까지는 패툴린을 발암물질로 규정하지 않았으나 이후 패툴린의 발암성에 대한 연구결과가 보고됨에 따라 패툴린을 발암물질로 관리하고 있다. 패툴린은 ROS-Induced MAPK (mitogen-activated protein kinase) pathway를 활성화시켜 피부암 등을 유도하는 것으로 보고되어 있으며(Doi and Uetsuka 2014) 화학적으로는 DNA 염기를 변형시켜 DNA strand의 파괴를 유발한다고 알려져 있다(Pfenning *et al*. 2014). 또한 패툴린은 급성독소로 소화기의 장해를 유발하는데 특히 영유아에게는 심각한 식중독 병증을 나타낸다(Juan *et al*. 2014). 이와 같은 독성학정 평가에 근거하여 WHO와 EU 등에서는 사과주스의 패툴린 최소 함량을 50 ppb (μg l^{-1})로 정하여 국제검역기준으로 시행하고 있으며 최근에는 사과와 사과주스에 대한 패툴린의 검역기준이 보다 강화되어 고형 가공품은 25 ppb 이하, 영유아용 가공품의 경우에는 10 ppb 이하의 기준을 적용하고 있다(Commission Regulation No. 1881 2006). 2000년대 이후 실시된 사과 가공제품 중 패툴린 오염 조사 결과에 따르면 EU 국가 내에서는 패툴린 오염이 적정하게 관리되고 있는 것으로 알려져 있으나(Ritieni 2003) 2012년 루마니아에서는 사과주스 제품의 6%에서(Oroian *et al*. 2014), 2013년 튀니지아에서는 검사제품의 18%에서(Zaied *et al*. 2013), 2013년과 2015년 이란에서는 검사제품의 11% 및 37.5%에서 50 ppb 이상의 패툴린이 검출(Azizi and Rouhi 2013; Rahimi and Jeiran 2015)된 것으로 보고되는 등 EU 이외의 국가에서는 아직도 패툴린의 검역관리가 적절하게 이루어지지 않는 것으로 평가되고 있다. 한편, 우리나라에서는 패툴린 생산균주의 분리 및 패툴린 생성능 평가와 같은 몇 편의 연구가 보고되어 있을 뿐이며(Kim *et al*. 1993; Kang *et al*. 2001; Yun *et al*. 2006) 아직까지도 패툴린에 관한 연구는 미비한 편이다.

사과를 비롯한 과실류 가공제품의 패툴린 오염을 낮추기 위해서는 원료인 과실류의 수확 후 보관과 가공식품 제조 공정에서의 선별처리가 중요하다. 원료 사과를 적정 조건(controlled atmosphere)에서 보관하고 가공 과정에서 부패 부위를 적절하게 제거하는 것만으로도 사과 가공제품의 패툴린 오염도를 80%까지 줄일 수 있다고 보고되어 있다(Bandon *et al*. 2009; Baert *et al*. 2012). 그러나 최근 캐나다에서 실시된 연구에 의하면 5 품종의 신선한 사과를 대상으로 패툴린 생산 균류의 검출 여부를 살펴본 결과, 22~24%의 신선한 사과의 속 부위(core)에서 *P. expansum*을 포함한 *Penicillium* 속 균류와 패툴린이 검출되었다고 보고하면서 외관적으로 신선하게 보이는 사과까지도 잠정적인 패툴린 오염원으로 작용할 수 있다고 주장하였다(Soliman *et al*. 2015).

식품의 방사선조사 기술은 세계 각국에서 식품이나 공중보건 제품의 물리적 살균방법으로 공인되어 산업적으로 이용되고 있다. 방사선조사 기술은 제품을 포장한 후 살균이 가능하여 제품생산 공정에서의 2차 오염을 방지할 수 있으며 미생물이나 해충에 대하여 강력한 선택적 살균효과를 나타내는 장점이 있다. 적정 선량의 방사선조사는 식품이나 농산물의 물리적, 화학적 및 관능적 특성에 영향을 미치지 않으면서도 식품의 병원성 미생물이나 부패 유발 미생물을 제거할 수 있어 식품 위생화 방법으로 활용도가 커지고 있으며 최근에는 농산물의 국제교역에서 검역기술로 각광받고 있다(Ferrier 2010; Hallman 2012).

본 연구는 국내산 사과의 곰팡이독 패툴린의 오염 가능성을 검토하고 패툴린 생산 곰팡이의 제어 및 검역에 방사선조사 기술을 적용하기 위한 기초자료를 제공할 목적으로 수행되었으며 이를 위하여 국내산 사과로부터 패툴린 생산 곰팡이를 분리 및 동정하고, 분리된 곰팡이의 패툴린 생성능과 방사선 감수성을 비교, 분석하였다.

재료 및 방법

1. 곰팡이의 분리

본 실험에 사용된 사과(*Malus pumila* var. *dulcissima*)는 2015년 10월에 전북 정읍지역의 사과농장에서 재배한 제품 중 외관에 병반이 발생한 제품 50개를 농장 현지에서 선별하여 시료로 사용하였다. 사과의 병반 부위를 약 1 cm^3 크

기로 잘라낸 다음 여기에 동일 부피의 증류수를 혼합하여 균질화하고 시료 1 ml씩을 20개의 potato dextrose agar (BD Difco) 평판배지에 도말하여 30°C의 조건에서 5일간 배양하였다. 배양 후 생성된 곰팡이 집락의 색, 균사 및 포자모양 등을 육안 및 현미경으로 관찰하여 서로 다른 형태를 나타내는 단일집락을 선별하고, 이를 potato dextrose agar 배지에 3회 이상 계대배양한 다음 4°C에 보관하면서 잠정 동정 및 패툴린 시험 균주로 사용하였다.

2. 분리 곰팡이의 잠정 동정

사과의 병반 부위에서 분리된 곰팡이의 잠정 동정은 Boekhout *et al*. (1994)의 방법에 따라 5.8S rDNA를 포함한 Ribosomal DNA의 ITS (internal transcribed spacer regions) 분석방법으로 실시하였다. 분석된 염기서열은 CLUSTAL W ver. 1.74 program (http://www.clustalw.genome.jp/)으로 정렬하여 분석한 다음 염기서열의 상동성과 비교 염기서열과의 차이를 나타내었다 (Kurtzman and Robnett 1998).

3. 분리 곰팡이의 패툴린 생성능 평가

국내산 사과로부터 분리 및 동정된 9종의 곰팡이를 시험균주로 사용하였으며, 패툴린 생산 표준 균주는 American Type Culture Collection (ATCC)에서 분양받은 *P. griseofulvum* ATCC 46037과 Yun *et al*. (2006)이 분리한 *P. crustosum*을 대조구로 사용하였다. 표준 균주 2종 및 순수분리된 곰팡이 9종을 PDA 평판배지에 배양하여 포자를 형성시킨 다음 멸균된 Tween 80 (0.1% v/v) 용액 1 ml를 3회 가하여 포자를 수확하고 원심분리 (2,000 × g for 10 min at 4°C)하여 포자를 수확하였다. 수확된 포자 침전물은 다시 멸균식염수로 2회 세척하고 최종 세포 수가 10^7 cells ml^{-1}가 되도록 희석하여 이를 패툴린 생성능 평가를 위한 접종세포로 사용하였다. 패툴린 생성능 평가를 위한 기본 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 사용하였으며 동시에 5-GYEP 배지 조성에서 탄소원을 dextrose, sucrose, fructose, lactose, galactose, maltose, mannitol, sorbitol 및 glycerol로 대체한 배지에서 탄소원에 따른 균주의 패툴린 생성능을 측정하였다. 이때 배지의 pH는 4.0으로 하였으며 pH 조절에는 0.1 M citric acid와 0.2 M disodium hydrogen phosphate를 이용한 McIlvaine buffer를 사용하였다. 분리 균주의 패툴린 생성능 평가를 위한 균체 배양은 Erlenmeyer flask (250 ml)에 배지를 각각 50 ml씩 분주하여 멸균시킨 다음 10^5 cells ml^{-1}가 되도록 포자현탁액을 접종하고 30°C의 암소에서 200 rpm의 조건으로 14일간 진탕배양하였다.

균체 배양액의 패툴린 함량은 Yun *et al*. (2006)의 방법에 따라 HPLC로 분석하였다. 먼저, 균체배양액 10 ml를 시험관 (I)에 취하여 10 ml의 ethyl acetate를 첨가한 다음 1분간 교반 후 정치하여 상층액을 시험관 (II)에 옮겼다. 시험관 (I)에 ethyl acetate 10 ml를 추가로 첨가하여 동일 방법으로 얻어진 상층액을 시험관 (II)에 합하였다. 이 ethyl acetate 추출액에 1.5% 탄산나트륨용액 2 ml를 첨가하여 혼합한 다음 정치하고 상층액을 시험관 (III)에 옮겼다. 시험관 (II)에 다시 ethyl acetate 5 ml를 첨가하여 혼합한 다음 정치한 후 상층액을 시험관 (III)에 합하였다. 위 추출용액에 무수황산나트륨 1 g을 첨가하여 30초간 혼합한 다음 상층액을 회수하여 40°C에서 질소 농축하였다. 농축된 추출물은 pH 4.0의 0.1 M acetate buffer에 녹여 이를 시험용액으로 사용하였다. 시험용액은 0.45 μm membrane filter (milipore filter)에 여과하여 HPLC용 시료로 사용하였다. HPLC는 Waters 2690 (Waters Co., Milford, MA, USA), detector는 Waters 996 Photodiode Array Detector (Waters Co., Milford, MA, USA)를 사용하였으며 detector의 파장은 276 nm로 설정하였다. Column은 Shiseido (30 cm × 3.9 mm)를 이용하였으며, 이동상은 증류수 : acetonitrile = 95 : 5의 비율로, 유속은 0.7 ml min^{-1}의 속도로 하였으며 시료는 20 μl씩 주입하여 분석하였다. 위의 추출과정과 HPLC 분석과정은 패툴린 표준품 용액에서도 동일하게 처리하여 이를 기준으로 균체 배양액의 패툴린 함량을 비교, 정량하였다.

4. 분리 곰팡이의 방사선 감수성 평가

분리 곰팡이의 방사선 감수선 평가 시료는 위의 패툴린 생성능 평가 시험을 위하여 최종 세포 수가 10^7 cells ml^{-1}가 되도록 준비한 포자현탁액을 사용하였다. 시료의 감마선 조사는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소의 Co-60 감마선 조사시설 (AECL;IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd., Ottawa, ON, Canada)을 이용하여 분당 70 Gy의 선량율로 0, 1, 2, 3, 4, 5 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였으며, 이때 흡수선량의 확인은 ceric/cerous dosimeter를 이용하여 실시하였다 (±5%). 방사선조사된 포자현탁액을 적량 희석하여 potato dextrose agar (Difco) 배지에 pore plating 방법으로 접종한 다음 30°C에서 72시간 배양하여 생성된 균체 집락을 계수하여 D_{10} 값 (생존 포자 균수의 90% 감소를 나타내는 kGy 선량)을 계산하였다. 각 시험구의 최적 희석배수 3개 평판계수에 대한 평균값 (N)을 3개의 비조사구 평균값 (N_0)으로 나누어 생존균수 값 N/N_0을 산출하였으며 D_{10} 값은 log 생존 균수값의 회귀식으로부터 기울기의 역수 값을 구하여 나타내었다. 한편, 다핵상인 곰팡이 균사는 방사선조사에 따른 사멸율 측정에서 생존 세포가 단일 colony로 생성되지 않아 D_{10} 값 측정이 어려운 문제점이 있으므로 대수

Table 1. Similarity analysis of the fungal strains isolated from Korean apple based on the nucleotide sequences (NT) of the ITS5-5.8S-ITS4 region

No. of isolates	Presumptive strains	Accession No.	Similarity	nt difference/compared
I-1	*Glomerella acutata*	AM404279	99%	1/539
	Colletotrichum acutatum	AJ301910.1	99%	1/539
I-2	*Gibberella avenacea*	AF009186.2	100%	0/507
	Fusarium sp.	AJ279478.1	99%	1/501
I-3	*Penicillium expansum* NRRL6069	DQ339562.1	99%	4/541
	Penicillium griseofulvum NRRL5256	DQ339557.1	98%	9/531
I-4	*Penicillium* sp. NRRL28143	AF125941.1	100%	0/446
	Penicillium brasilianum RMF8007	AF178523.1	98%	5/425
I-5	*Alternaria tenuissima* EGS34-015	AY751455.1	100%	0/527
	Alternaria alternata	AF455448.1	99%	1/528
I-6	*Penicillium polonicum* NRRL995	AF033475.1	99%	1/543
	Penicillium albocoremium	AJ004819.1	99%	1/531
	Penicillium verruculosum	AJ005487.1	99%	1/531
I-7	*Penicillium paneum* NRRL25162	DQ339571.1	99%	4/541
	Penicillium venetum IBT 5464	AJ005485.1	98%	10/542
I-8	*Penicillium crustosum* NRRL35178	DQ123647.1	100%	0/440
	Penicillium commune	AF455418.1	100%	0/440
I-9	*Galactomyces geotrichum*	AJ279445.1	99%	2/332
	Dipodascus australiensis	AF157596.1	97%	8/334

기의 균체를 방사선조사하여 완전사멸에 이를 수 있는 선량을 불활성화 선량(inactivation dose)으로 나타내었다.

결 과

1. 곰팡이의 분리 및 분리 균주의 잠정 동정

사과의 병반 부위로부터 분리된 20여 개의 곰팡이에 대하여 Ribosomal DNA의 ITS (internal transcribed spacer regions) 분석 방법으로 잠정 동정을 실시한 결과, 최종적으로 nucleotide sequence가 각기 다른 9개 균주를 시험 균주로 분리하였다(Table 1). Table 1에 나타낸 바와 같이 분리된 9개의 분리 균주 가운데 5개가 *Penicillium*속으로 가장 높은 검출빈도를 나타내었으며(I-3, I-4, I-6, I-7, I-8), *Glomerella* 또는 *Colletotrichum* (I-1), *Gibberella* 또는 *Fusarium* (I-2), *Alternaria* (I-5), *Galactomyces* (I-9)속으로 추정되는 곰팡이가 각각 1종씩 분리되었다. 한편, 패툴린을 생산하는 주요 균주들은 *Penicillium*, *Aspergillus*, *Byssochlamys*속 곰팡이이며 특히 *P. expansum*, *P. griseofulvum*, *P. crustosum* 등이 패툴린 생산의 가장 대표적인 균종으로 보고되고 있다(Davis 1981; Cunha *et al*. 2014). 본 연구에서 분리된 사과 곰팡이 중 *Penicillium*속 곰팡이의 검출빈도가 50% 이상 수준으로 높고, 잠정 동정 결과 *P. expansum* 또는 *P. griseofulvum* (I-3), *P. crustosum* (I-8)으로 추정되는 곰팡이가 검출된 것으로 보아 국내산 사과의 패툴린 오염에 대한 잠재적 위험성이 있을 것으로 추정되었다.

Table 2. Patulin contents in SY, MEB and 5-GYEP broth cultures after incubation of the standard strains and isolated fungi for 2 weeks at 30°C (unit: ppm)

Strains	Culture media		
	SY	MEB	5-GYEP
P. griseofulvum	410.6	502.7	1,211.5
P. crustosum	272.1	293.6	568.6
I-1	16.0	n.d.	n.d.
I-2	n.d.[a]	n.d.	n.d.
I-3	64.7	83.1	105.9
I-4	n.d.	n.d.	n.d.
I-5	n.d.	n.d.	n.d.
I-6	13.4	15.6	27.4
I-7	38.0	41.0	67.5
I-8	70.1	95.3	134.2
I-9	n.d.	n.d.	n.d.

[a]Not detected in the analytical condition of this study.

2. 분리 곰팡이의 패툴린 생성능 평가

곰팡이 배양 합성배지인 SY (sucrose 4%, yeast extract 2%), MEB (2% malt extract, 2% dextrose, 0.1% peptone) 및 5-GYEP (5% dextrose, 0.1% yeast extract, 0.1% peptone)의 세 가지 액상배지에서 국내산 사과에서 분리된 곰팡이 9종과 표준 균주 2종을 2주간 배양하여 패툴린 생성능을 비교

Table 3. Patulin contents in 5-YEP broth cultures of a different carbon sources after incubation of the standard strains and isolated fungi for 2 weeks at 30°C (unit: ppm)

Strains	Carbon source (5%, w/w)								
	Glucose	Fructose	Galactose	Maltose	Lactose	Sucrose	Mannitol	Sorbitol	Glycerol
P. griseofulvum	1,211.5	987.4	966.5	875.0	1,514.8	1,176.1	2,835.7	537.2	6,291.3
P. crustosum	568.6	1.425.3	663.8	981.7	811.5	451.8	550.8	647.2	490.5
I-1	16.0	n.d.	18.3	n.d.	n.d.	12.9.	n.d.	n.d.	n.d.
I-2	n.d.[a]	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
I-3	105.9	51.3	28.5	33.2	76.5	71.8	59.3	31.0	253.1
I-4	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
I-5	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
I-6	27.4	25.5	n.d	n.d.	17.6	n.d.	n.d.	n.d	23.9
I-7	67.5	n.d.	17.9	n.d.	135.3	25.0	32.5	18.4	37.1
I-8	134.2	195.5	84.7	52.1	26.4	29.9	27.4	26.1	45.7
I-9	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

[a]Not detected in the analytical condition of this study.

하였다(Table 2). 표준 균주인 *P. griseofulvum*은 5-GYEP 배지에서 1,211.5 ppm의 패툴린을 생산하였고 *P. crustosum* 표준 균주는 5-GYEP 배지에서 586.6 ppm의 패툴린을 생산하였다. 배지의 종류에 따른 각 균주의 패툴린 생산능은 5-GYEP 배지에서의 패툴린 생산이 SY 배지나 MEB 배지에 비하여 2~3배 높은 경향을 보였다. 분리 균주 가운데는 *Penicillium*속으로 추정되는 I-3, I-6, I-7, I-8 균주에서 유의적인 패툴린 생산이 관찰되었으나 최대 생산량은 100 ppm 내외로 표준 균주에 비해서는 낮은 수준이었고 배지별 결과에서는 표준 균주와 유사하게 5-GYEP 배지에서의 패툴린 생산량이 SY 배지나 MEB 배지에 비하여 상대적으로 더 높은 수준이었다. 한편, 분리 균주 I-4는 *Penicillium*속 곰팡이임에도 패툴린 생산이 관찰되지 않았고 *Glomerella* 등으로 추정되는 I-1은 SY 배지에서만 소량의 패툴린을 생산하였으며 *Alternaria*로 추정되는 분리 균주 I-5와 *Galactomyces*로 추정되는 I-9에서는 패툴린 생산이 관찰되지 않았다.

5-GYEP 배지 조성에서 탄소원인 glucose를 sucrose, fructose, lactose, galactose, maltose, mannitol, sorbitol 및 glycerol로 대체한 합성배지를 제조하여 탄소원에 따른 균주의 패툴린 생성능을 측정하였다(Table 3). 표준 균주인 *P. griseofulvum*은 glycerol을 탄소원으로 공급한 배지에서 6,291.3 ppm의 패툴린을 생산하여 glucose 배지에 비하여 약 5.2배의 높은 패툴린 생산능을 보였으며 *P. crustosum* 표준 균주는 fructose 배지에서 1,425.3 ppm으로 가장 높은 패툴린 생산능을 나타내었다. 분리 균주 가운데는 *Penicillium* 속으로 추정되는 I-3 균주는 glycerol에서, I-7 균주는 lactose에서, I-8 균주는 fructose에서 다른 탄소원에 비하여 유의적으로 높은 패툴린 생산이 관찰되었다.

3. 분리 곰팡이의 방사선 감수성 평가

표준 균주와 분리 균주의 방사선 감수성은 단일 colony로 측정 가능한 포자는 D_{10} 값으로, 단일 colony로 분리 및 D_{10} 값 측정이 어려운 균사체는 대수기의 균사체를 완전사멸 시킬 수 있는 선량을 불활성화 선량(inactivation dose)으로 나타내었다(Table 4). 표준 균주 2종 및 분리 균주 9종의 포자에 대한 D_{10} 값은 대부분 0.25~0.38 kGy의 범위를 나타내어 일반적인 곰팡이 포자와 유사한 수준을 보였으나(Blank and Corrigan 1990) *Alternaria*속으로 추정되는 I-5 균주의 D_{10} 값은 0.64 kGy로 일반 곰팡이에 비하여 2배 수준의 방사선 저항성을 나타내었다. 대수기 생장의 다핵상 곰팡이 균사를 완전사멸 시킬 수 있는 방사선 선량 또한 I-5 균주에서 5.81 kGy로 상대적으로 높은 결과를 보였고 대부분의 시험 균주는 3~4 kGy 범위의 불활성화 선량값을 나타내었다.

Table 4. D_{10} values and inactivation doses of the standard strains and isolated fungi from Korean apples

Strains	D_{10} value (kGy)	Inactivation dose (kGy)
P. griseofulvum	0.30	3.62
P. crustosum	0.36	4.42
I-1	0.27	3.24
I-2	0.25	3.33
I-3	0.33	4.14
I-4	0.38	4.25
I-5	0.64	5.81
I-6	0.31	3.45
I-7	0.33	3.73
I-8	0.37	3.69
I-9	0.32	3.44

고 찰

국내산 사과의 곰팡이독 패툴린의 오염 가능성과 패툴린 생산 곰팡이의 제어 및 검역에 방사선조사 기술을 적용하기 위한 기초자료를 제공할 목적으로 국내산 사과로부터 패툴

린 생산 곰팡이를 분리하고, 분리된 곰팡이의 패툴린 생성능과 방사선 감수성을 비교, 분석하였다. 국내산 사과로부터 분리된 9종의 곰팡이를 잠정 동정한 결과 *Penicillium*속의 곰팡이가 가장 많이 분리되었으며 *Glomerella*, *Gibberella*, *Alternaria*, *Galactomyces* 등의 곰팡이도 분리되었다(Table 1). 이는 사과 내부에서 분리된 곰팡이는 *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Aspergillus* 등이 대표적이며 이 중 주로 *Penicillium*이 패툴린 오염에 관여한다는 보고와 유사한 결과였으나(Tournas and Memon 2009) 본 연구에서 *Aspergillus*는 검출되지 않았다. 한편, *Glomerella* (분리 균주 I-1)는 사과 잎이나 과피에 반점을 형성하여 병해 및 상품성 저하를 유발하는 곰팡이이며(Zhang *et al*. 2016), *Gibberella* (분리 균주 I-2)는 *Fusarium*의 teleomorph로 보고되어 있으며 주로 곡류식물의 병원성미생물로 잘 알려져 있다(Booth and Spooner, 1984). *Galactomyces* (분리 균주 I-9)는 분류학적으로 자낭포자를 형성하는 자낭균류(ascomycetes)에 속하는 효모형 곰팡이(yeast-like fungi)로 주로 고온성 또는 저항성 lipase 생산균주로 연구되고 있으며(Yan *et al*. 2007) 식물병원균 또는 곰팡이독 생성에 대한 기능과 역할은 보고된 바 없어 단순히 토양 서식 미생물이 사과 과실로 전이된 것으로 해석된다.

배지의 pH나 탄소원과 질소원 등 영양성분의 종류, 함량, 조성 등은 곰팡이의 유전체 발현에 영향을 주며 그에 따라 곰팡이독과 같은 이차대사산물의 생성능도 달라진다(Zong *et al*. 2015). 패툴린 생산 곰팡이의 선행연구에서는 일반적으로 낮은 pH에서 패툴린의 생산이 높아지며(Damoglou and Campbell 1986) 탄소원의 종류 또한 각 균주에 따라 서로 다른 반응을 나타낸다는 연구결과가 보고되어 있다(McCallum *et al*. 2002). 본 연구에서도 각 분리 균주들은 배지의 종류(Table 2) 및 탄소원의 종류(Table 3)에 따라 서로 다른 패툴린 생성능을 나타내었다. 한편, 본 연구에서 분리된 *Penicillium*속 곰팡이들의 패툴린 생성능은 표준 균주에 비하여 현저히 낮은 수준이었다. 그러나 상대적으로 패툴린 생성능이 낮고 본 연구가 실험조건에서 수행되었다는 사실을 감안하더라도 일부 분리 균주에서 국제 검역기준인 50 ppm 이상의 패툴린이 검출된 것은 사과에 서식하는 곰팡이의 제어가 필요하며, 향후 국내산 사과의 곰팡이들에 대한 패툴린 생성능 연구가 필요함을 시사한다. 특히 패툴린 생산에는 IDH (isoepoxydon dehydrogenase) 유전자가 중요한 역할을 하는 것으로 알려져 있으며(Paterson *et al*. 2003), 같은 종의 패툴린 생산 곰팡이라도 유전자 변이와 환경에 따른 유전자 발현이 달라지는 것으로 보고되어 있으므로(Sanzani *et al*. 2013) 패툴린 생산 유전자에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

방사선조사 기술은 과실류나 곡류의 수확 후 저장(post-harvest)에서 유효한 검역기술로 활용되고 있으며(Ferrier 2010) 이를 통하여 곰팡이독 생산 균주의 제거뿐만 아니라 곰팡이독 함량을 낮출 수 있다고 보고되어 있다(Aziz and Moussa 2002). 일반적으로 곰팡이의 방사선 감수성은 세균 영양세포의 수준이나 *Alternaria alternata*와 같이 D_{10} 값이 2.4 kGy에 이르는 경우도 있다(Blank and Corrigan 1990). 본 연구에서 실시된 패툴린 생산 표준 균주 및 분리 균주의 방사선 감수성은 일반 곰팡이와 유사한 수준이었으며 상대적으로 방사선저항성이 높다고 보고된 *Alternaria*속으로 잠정 동정된 분리 균주의 D_{10} 값은 0.64 kGy로 조사되었다. 곰팡이독을 생산하는 대표적인 미생물군인 *Aspergillus*와 *Penicillium*속 곰팡이들의 방사선에 대한 D_{10} 값이 0.2~0.4 kGy 범위이고(Ito *et al*. 1973) 부패하지 않은 과실류의 곰팡이 오염도가 높지 않음을 감안하면 1 kGy 내외의 방사선조사에 의해서도 비교적 용이하게 과실류의 곰팡이를 살균할 수 있을 것으로 사료되었다.

결 론

본 연구에서는 국내산 사과로부터 곰팡이를 분리하고, 분리된 곰팡이의 패툴린 생성능과 방사선 감수성을 비교, 분석하였다. 분리된 9종의 곰팡이 가운데 5개의 strain이 *Penicillium*속으로 판별되었으며, 표준 균주에 비하여 패툴린 생성능이 낮은 수준이기는 하였지만 4개의 *Penicillium* 속 곰팡이를 포함한 5개의 분리 균주가 패툴린 생성능이 있는 것으로 밝혀져 국내산 사과나 사과 가공품의 패툴린 오염 가능성을 배제할 수 없음을 확인하였다. 또한 각 분리 균주의 패툴린 생성능은 배지의 종류, 탄소원의 종류에 따라 다양한 특성을 나타내었다. 표준 균주 2종 및 분리 균주 8종의 포자에 대한 D_{10} 값은 0.25~0.64 kGy의 범위를 나타내어 일반적인 식품의 검역 및 방사선살균 선량의 범위(1~3 kGy)에서도 비교적 용이하게 과실류의 곰팡이를 제어할 수 있을 것으로 판단되었으며 이를 통하여 곰팡이독 패툴린의 저감화도 가능할 것으로 사료되었다.

참 고 문 헌

Aziz NH and Moussa LAA. 2002. Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food Control* **13**:281-288.

Azizi IG and Rouhi S. 2013. Determination of patulin in fruit juices and compote of apple and pear. *J. Toxicol.-Toxin Rev.* **32**:39-42.

Blank G and Corrigan D. 1990. Comparison of resistance of fungal spores to gamma and electron beam radiation. *J. Food Sci.* **55**:275-276.

Boekhout T, Kurtzman CP, O'Donnell K and Smith MT. 1994. Phylogeny of the yeast genera *Hanseniaspora* (Anamorph Kloeckera), *Dekkera* (Anamorph Brettanomyces) and *Eeniella* as inferred from partial 26S ribosomal DNA nucleotide sequences. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **44**:781-786.

Booth C and Spooner BM. 1984. *Gibberella avenacea*, teleomorph of *Fusarium avenaceum*, from stems of *Pteridium aquilinum*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* **82**(1):178-180.

Commission Regulation (EC). 2006. No. 1881/setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union*. L364:5.

Cunha SC, Faria MA, Pereira VL, Oliveira TM, Lima AC and Pinto E. 2014. Patulin assessment and fungi identification in organic and conventional fruits and derived products. *Food Control* **44**:185-190.

Damoglou AP and Campbell DS. 1986. The effect of pH on the production of patulin in apple juice. *Lett. Appl. Microbiol.* **2**:9-11.

Davis ND. 1981. Sterigmatocystin and other mycotoxins produced by *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Prot.* **44**:711-714.

Doi K and Uetsuka K. 2014. Mechanisms of mycotoxin-induced dermal toxicity and tumorigenesis through oxidative stress-related pathways. *J. Toxicol. Pathol.* **27**:1-10.

Elhariry H, Bahobial AA and Gherbawy Y. 2011. Genotypic identification of *Penicillium expansum* and the role of processing on patulin presence in juice. *Food Chem. Toxicol.* **49**:941-946.

Ferrier P. 2010. Irradiation as a quarantine treatment. *Food Policy* **33**:548-555.

Funes GJ and Resnik SL. 2009. Determination of patulin in solid and semisolid apple and pear products marketed in Argentina. *Food Control* **20**:277-280.

Hallman GJ. 2012. Generic phytosanitary irradiation treatment. *Radiat. Phys. Chem.* **81**:861-866.

Ito H, Izuka H and Sato T. 1973. Identification of osmiophilic *Aspergillus* isolated from rice and their radiosensitivity. *Agric. Biol. Chem.* **37**:789-798.

Juan C, Raiola A, Manes J and Ritieni A. 2014. Presence of mycotoxin in commercial infant formulas and baby foods from Italian market. *Food Control* **39**:227-236.

Kang SJ, Kang JS and Chung DH. 2001. The effect of mixed culture with *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger* and *Penicillium griseofulvum* on aflatoxin and patulin production. *J. Fd Hyg. Safe* **16**:206-211.

Kim DS, Chung DH, Kim SY and Chung HS. 1993. Study on the isolation of patulin-producing *Penicillium* sp. from natural sources. *Kor. J. Env. Hlth. Soc.* **19**:41-45.

Kurtzman CP and Robnett CJ. 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeast from analysis of nuclear large submit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek* **73**:331-371.

Larsen TO, Frisvad JC, Ravn G and Skaaning T. 1998. Mycotoxin production by *Penicillium expansum* on black currant and cherry juice. *Food Addit. Contam.* **15**:671-675.

McCallum JL, Tsao R and Zhou T. 2002. Factors affecting patulin production by *Penicillium expansum*. *J. Food Prot.* **65**:1937-1942.

Oroian M, Amariei S and Gutt G. 2014. Patulin in apple juices from Romanian market. *Food Addit. Contam. Part B. Surveill.* **7**:147-150.

Ostry V, Skarkova J and Ruprich J. 2004. Occurrence of *Penicillium expansum* and patulin in apples as raw materials for processing of foods-case study. *Mycotoxin Res.* **20**:24-28.

Paterson RRM, Kozakiewicz Z, Locke T, Brayford D and Jones SCB. 2003. Novel use of the isoepoxydon 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.

Pattono D, Grosso A, Stocco PP, Pazzi M and Zeppa G. 2013. Survey of the presence of patulin and ochratoxin A in traditional semi-hard cheeses. *Food Control* **33**:54-57.

Pfenning C, Esch HL, Fliege R and Lenhmann L. 2014. The mycotoxin patulin reacts with DNA bases with and without previous conjugation to GSH: implication for related a,b-unsaturated carbonyl compounds. *Arch Toxicol*. http://dx.doi.org/10.1007/s00204-014-1443-z.

Puel O, Galtier P and Oswald IP. 2010. Biosynthesis and toxicological effects of patulin. *Toxins* **2**:613-631.

Rahimi E and Jeiran MR. Patulin and its dietary intake by fruit juice consumption in Iran. *Food Addit. Contam. Part B Surveill.* **8**:40-43.

Ritieni A. 2003. Patulin in Italian commercial apple products. *J. Agric. Food Chem.* **51**:6086-6090.

Sanzani SM, Montemurro C, Di Rienzo V, Solfrizzo M and Ippolito A. 2013. Genetic structure and natural variation associated with host of origin in *Penicillium expansum* strains causing blue mould. *Int. J. Food Microbiol.* **165**:111-120.

Soliman S, Li X-Z, Shao S, Behar M, Svircev AM, Tsao R and Zhou T. 2015. Potential mycotoxin contamination risks of apple products associated with fungal flora of apple core. *Food Control* **47**:585-591.

Tournas VH and Memon SU. 2009. Internal contamination and spoilage of harvested apples by patulin-producing and other toxigenic fungi. *Int. J. Food Microbiol.* **133**:206-209.

Vansteelandt M, Kerzaon I, Blanchet E, Fossi Tankoua O, Robiou Du Pont T, Joubert Y, Monteau F, Le Bizec B, Frisvad JC and Pouchus YF. 2012. Patulin and secondary metabolite production by marine-derived *Penicillium* strains. *Fungal Biol.* **116**:954-961.

Wright SA. 2015. Patulin in food. *Curr. Opin. Food Sci.* **5**:105-

109.

Yan J, Yang J, Xu L and Yan Y. 2007. Gene cloning, overexpression and characterization of a novel organic solvent tolerant and thermostable lipase from *Galactomyces geotrichum* Y05. *J. Mol. Catal. B-Enzym.* **49**:28-25.

Yun HJ, Lim SY, Chung JW, Jo C, Park JC, Kwon JH and Kim DH. 2006. Isolation and characterization of *Penicillium crustosum*, a patulin producing fungus from apples. *Food Sci. Biotechnol.* **15**:896-901.

Zaied C, Abid S, Hlel W and Bacha H. 2013. Occurrence of patulin in apple-based-foods largely consumed in Tunisia. *Food Control* **31**:263-267.

Zhang Y, Shi X, Li B, Zhang Q and Liang W. 2016. Salicylic acid confers enhanced resistance to *Glomerella* leaf spot in apple. *Plant Physiol. Bioch.* **106**:64-72.

Zong Y, Li B and Tian S. 2015. Effects of carbon, nitrogen and ambient pH on patulin production and related gene expression in *Penicillium expansum*. *Int. J. Food Microbiol.* **206**: 102-108.

Received: 25 December 2016
Revised: 18 January 2017
Revision accepted: 25 March 2017