

Penicillium griseofulvum 成長과 Patulin 生成에 미치는 磷酸鹽의 效果

김승교 · 강성조 · 송재영 · 전향숙* · 강진순** · 김일환*** · 정덕화
경상대학교 식품공학과, *한국식품개발연구원, **진주전문대학, ***(주)서도화학

Effect of Polyphosphates on the Growth of *Penicillium griseofulvum* and the Production of Patulin

Seung-Kyo Kim, Sung-Jo Kang, Jae-Young Song, Hwang-Sook Cheun*,
Jin-Soon Kang**, Il-Hwan Kim*** and Duck-Hwa Chung

Gyeongsang National University, *Korea Food Research Institute,

Chinju Junior College, *Seo-Do Chemicals Co.

ABSTRACT

To extend the shelf lives of rice and corn products, the effects of the polyphosphates[Na(PO₃)_n, n=11] on the growth of *Penicillium griseofulvum* and patulin production were investigated. The growth was completely inhibited in the potatoes dextrose agar medium treated with 2% polyphosphate. Moisture content had a considerable influence on the production of patulin. At 30% moisture content, the amounts of patulin produced in rice and corn were 61.40 µg/ml and 40.74 µg/ml, respectively, but the level of the toxin was significantly decreased to 93~95% by addition of 1% polyphosphates. No patulin was detected in both rice and corn medium added 2% polyphosphate when the incubation time prolonged. The result of scanning electron microscopy was supposed that the biocidal action of polyphosphate on fungi was related to the collapse of cell wall structure.

Keywords : Polyphosphate, Patulin, HPLC, *Penicillium griseofulvum*

I. 서 론

곰팡이 독소(mycotoxin)는 오염된 농산물을 통하여 인간에게 직접적으로 여러가지 유해한 영향을 나타낼 뿐만 아니라 오염된 사료의 섭취로 인해 가축에게 장해를 주며, 장애를 받은 가축의 조직 등에 잔류함으로써 인간에게 2차적인 장애를 초래하기도 한다.¹⁾ 1942년 Chain 등²⁾에 의해서 *Penicillium claviform* 으로부터 최초로 분리되어진 patulin (4-hydroxy-4H-furo(3, 2C)-pyran-2(6H)-one)은 clavacin, expansine, mycosin C3, penicidin, leucopin, tercicin이라고도 부르며, 일반적으로 항균력(antibiotic)있는 mycotoxin의 일종인 것으로 알려져 있으며 patulin을 생성하는 균주로는 *Penicillium patulum*,³⁾ *Penicillium expansum*⁴⁾, *Penicillium griseofulvum*⁵⁾ *Aspergillus clavatus*⁶⁾ 등으로 현재 알려져 있다. Patulin은 식품이나 사료에 있어 독성물질로

문제시되고 있으며, 실제 일본에서 발생한 것소의 집단중독사고의 원인은 사료원료인 건조 맥아에서 분리된 *Penicillium urticae*에 의한 것이었다고 Ukai 등⁷⁾이 보고하였다. 또한 patulin은 효모세포에 돌연변이를 일으키며,⁸⁾ 사람에게 있어서는 경구투여시 메스꺼움과 위경련을 일으킨다고 보고되었고,⁹⁾ 1%의 patulin이 함유된 연고를 피부에 발랐을 때 부종이 발생하였다고 보고되었다.¹⁰⁾ 사료, 곡류 및 다양한 식품에 오염된 patulin의 분석법으로는 Alberto 등¹¹⁾에 의한 TLC법과 HPLC법이 일반적으로 알려져 있다. 이러한 유해 곰팡이의 주요 감염원인 사료, 곡류 및 다양한 식품으로부터 안전성을 유지하면서 곰팡이의 생존 및 증식을 저해하려는 많은 연구가 행해져 왔다.¹¹⁻¹³⁾ 그중에서도 식품용제 등으로 광범위하게 사용되고 있는 인산염(polyphosphates)을 배지나 식품에 첨가하였을 경우 일어나는 주요 화학적인 기작은 pH 감소, 금속이온의 해리 및 다가

음이온이 존재하는 용액 중 이온강도의 증가 등으로 알려져 있으며, 이로 인해 항균효과에 대한 많은 연구가 이루어졌다.¹²⁻¹⁵⁾ 따라서 본 실험에서도 곡류와 사료 등의 mycotoxin 조절대책 일환으로 인산염을 이용하여 수분량에 의한 patulin 생성량과 균생육 억제와 형태학적인 변화를 전자현미경상으로 관찰하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 사용균주 및 배지

본 실험에서 patulin 생성균주로 옥수수에서 분리된 *Penicillium griseofulvum*을 사용하였고 균주를 PDA(potatoes dextrose agar, Difco) plate 상에 28°C에서 14일간 배양시켜 활성화시킨 다음 0.1% Tween 80 1 ml와 멸균수 5 ml를 가해 교반기에서 강력하게 교반하여 포자를 씻어내는 조작을 3회 반복하여 얻은 포자 현탁액을 완전히 살균된 4겹의 cheese cloth에 여과하고 적당한 양의 멸균수로 희석하면서 현미경으로 $10^6 \sim 10^7$ conidia/ml로 조절하여 500 ml Eppendorf tube에 분주한 후 -72°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

2. 인산염의 이화학적 특성

곰팡이의 성장저해와 toxin 생성 실험에 사용한 인산염(polyphosphates)은 (주)서도 화학(안산, Korea)에서 자체 개발한 신제품으로 sodium acid polyphosphate의 물질로서 산성 영역의(NaPO_3)_n의 기본적인 화학식을 가지며 n=11 이상의 농축화합물이다. 또한 화학적 특성으로는 1% 용액의 pH는 1.8~2.2이고 P₂O₅ 함량이 70% 이상이며 분자량이 1121.57로서 물에 비교적 잘 용해되지 않는 난용성 물질이다. 이 물질은 cyclicphosphate가 아닌 polymerphosphate로서 poly-meta형의 혼합물인 특수 인산염이다.

3. 인산염의 처리 및 곰팡이의 생육억제

PDA배지에 인산염을 0, 0.5, 1, 1.5, 2%의 일정 농도로 첨가한 후 균을 접종하고 27°C에서 7일간 배양하면서 균의 생육정도를 매일 측정하였다. 쌀, 옥수수배지에서의 배양은 쌀, 옥수수를 분쇄하여 20 mesh로 거른 후 삼각 플라스크에 각각 20 g씩 일 정량을 취한 후 121°C, 1기압에서 15분간 가압 멸균한 후 멸균수를 배지에 첨가하여 10, 20, 30, 40, 50, 60%로 맞추고, 이 배지에 patulin 생성균주의 spore suspension($10^6 \sim 10^7$ conidia/ml)를 접종한 후, 28°C에서 2주간 배양하여 toxin 생성량을 측정하였

Table 1. The analytical conditions employed for high pressure liquid chromatography

HPLC Type	Waters
Detector	UV 276 nm
Column	Partisil 100DS (25 cm) (What men)
Flow rate	1 ml
Pressure	1,000~1,300 psi
Mobile phase	Distilled water

다. 장기간 배양은 쌀, 옥수수를 1l삼각 플라스크에 각각 100 g씩 넣은 후 1기압하에 121°C에서 15분간 멸균시킨 후 인산염의 농도를 각각 0, 1, 2%로 첨가한 후 공시균을 접종하고 28°C에서 45일간 정치 배양하면서 toxin의 생성량을 측정하였다.

4. Patulin의 추출 및 정량

배양이 끝난 쌀, 옥수수배지 중의 patulin추출은 AOAC¹⁴⁾법을 참조로 하였다. 즉 ethylacetate를 60 ml 첨가하고 진탕후 원심분리하여 정제하였으며 patulin의 정량은 TLC법에 의해서 표준 patulin과 같은 Rf치의 band만을 잘라 ethanol에 용해시킨 후 speed vacuum concentrator에서 농축시키고 HPLC (high pressure liquid chromatography)이동상인 증류수에 재용해시켜 millipore filter(0.2 nm)에 여과한 다음 여액을 HPLC에 주입하여 분석한 후 표준 patulin과 비교 확인하였다. 그때의 HPLC조건은 Table 1에서 보는 바와 같다.

5. Scanning electron microscopy(SEM)에 의한 균체 형태의 관찰

인산염(polyphosphates)의 첨가가 patulin 생성균주인 *Penicillium griseofulvum*의 세포형태에 어떠한 영향을 미치는가를 알아보기 위하여 *Penicillium griseofulvum*의 포자현탁액을 0, 0.5, 1%의 인산염이 첨가된 각각의 PDA배지에 접종하고 28°C에서 48~60시간 동안 130~150 rpm으로 진탕배양한 다음, 배양물 1 ml를 eppendorf tube에 옮겨, 5,000 rpm에서 5분간 원심분리한 후 멸균수로 2회 세척하였다. 이어서 1 ml의 4% NBP(neutral buffered paraformaldehyde)로 4°C에서 48시간 동안 고정시킨 후 0.015 M PBS를 1 ml를 가해서 2회 세척하고 알콜 농도기울기(30~100%)으로 탈수한 다음 임계점 건조기로 건조하여 대조구와 함께 인산염에 의한 균의 형태 변화를 관찰하였다.

Table 2. The growth of *Penicillium griseofulvum* in PDA treated with polyphosphates

Phosphates(%)	Days at 28°C (cm)						
	1	2	3	4	5	6	7
0 (Control)	0.5	1.1	1.6	2.1	2.5	3.1	3.3
0.5	0.3	0.7	1.2	1.6	2.0	2.5	2.8
1.0	+ ^{a)}	0.4	0.9	1.3	1.4	1.5	1.7
1.5	- ^{b)}	-	-	-	-	+	+
2.0	-	-	-	-	-	-	-

^a (+): visible growth <1 mm in diameter

^b (-): no visible growth

III. 결과 및 고찰

1. PDA배지에서 인산염 첨가에 따른 곰팡이의 생육변화

PDA 배지에서 인산염(polyphosphates)이 곰팡이의 생육에 미치는 영향을 알아보기 위해 먼저 인산염의 농도를 각각 0, 0.5, 1, 1.5, 2%로 맞추어 28°C에서 배양하면서 곰팡이의 성장을 측정하였다. 그 결과 *Penicillium griseofulvum*은 인산염이 첨가되지 않은 PDA배지에서는 잘 성장하였으나 인산염 0.5, 1% 첨가한 배지에서는 곰팡이 성장이 조금 억제되었고, 1.5% 또는 2% 첨가된 배지에서는 거의 생육이 되지않았다.

2. 쌀, 옥수수배지의 수분량에 따른 toxin 생성량의 변화

수분함량을 달리하여 조제한 쌀, 옥수수배지에 공시균을 접종하여 28°C에서 2주간 배양한 후 수분량에 따른 toxin생성량을 검토하였다. 그 결과 표준 patulin의 HPLC chromatogram은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 표준 patulin과 같은 retention time인 9.22에서 peak를 나타내었다.

짧은기간 곡류에 곰팡이를 배양할 경우 낮은 농도의 수분 함량에서는 toxin생성이 적은 것으로 나타났다. 이러한 결과로 수분의 양을 30%이상으로 조절한 것에 인산염 첨가 영향을 조사하였다. 각 sample에서 toxin생성량은 수분량이 적은 10, 20%에서는 patulin이 생성되지 않았고, 30%에서는 쌀에 61.41 µg/ml, 옥수수 40.74 µg/ml가 생성되었다 (Table 3).

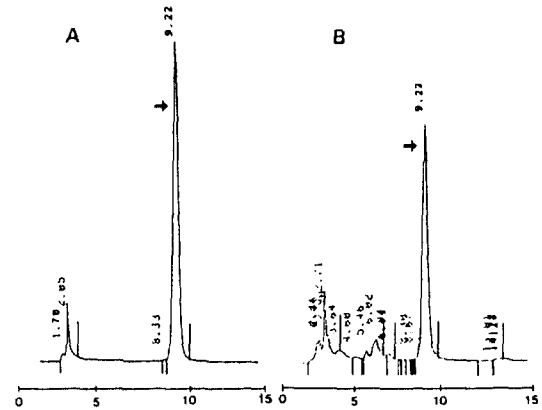


Fig. 1. High pressure liquid chromatogram of patulin (A: Standard patulin, B: From culture extract).

Table 3. Effects of moisture contents on the production of patulin in cultured rice and corn

Toxin	Media	Moisture (%)					
		10	20	30	40	50	60
Patulin (10 µg/ml)	Rice	nd*	nd	61.41	90.40	170.50	210.50
	Corn	nd	nd	40.74	78.70	132.07	162.86

*: (nd) not detected

Table 4. Effects of polyphosphates concentration on the production of patulin in cultured rice and corn with 30%~50% moisture contents

Moisture	Media	Polyphosphates (%)				
		0	0.5	1	1.5	2
30%	Rice	59.30	18.79	0.80	nd	nd*
	Corn	42.50	17.44	0.72	nd	nd
40%	Rice	102.57	43.69	2.17	0.41	nd
	Corn	81.94	28.29	2.49	0.23	nd
50%	Rice	182.46	63.75	4.49	0.68	nd
	Corn	149.14	50.24	3.62	0.57	nd

*: (nd) not detected

3. 수분과 인산염의 농도별 첨가에 따른 toxin의 변화

즉 쌀, 옥수수배지에 수분을 30%, 40%, 50%로 고정시킨 후 인산염의 농도를 0, 0.5, 1, 1.5, 2%로

Table 5. Production of patulin in cultured rice and corn treated with polyphosphates for 45 days

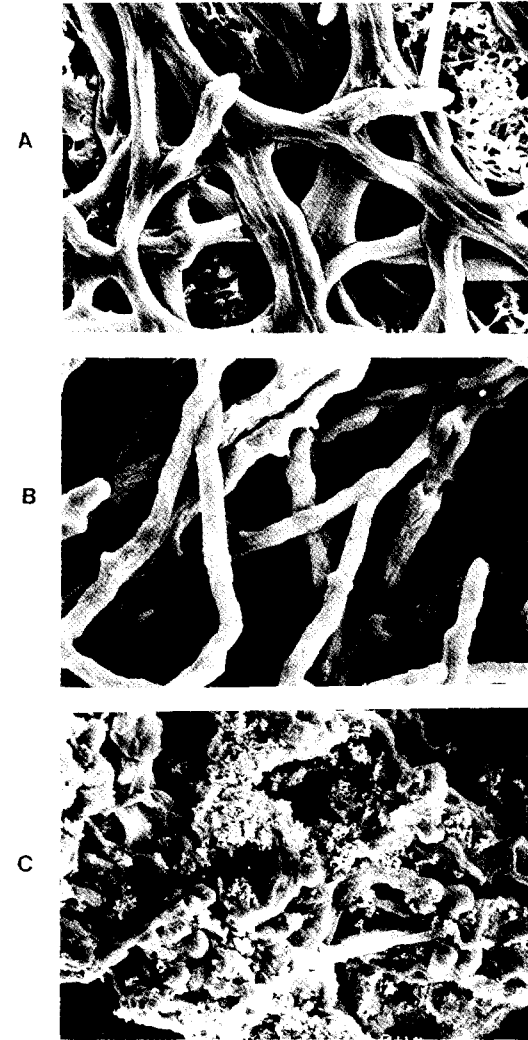
Toxin	Media	Polyphosphates (%)		
		0	1	2
Patulin ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Rice	2,700	170	nd*
	Corn	1,820	78	nd

*: (nd) not detected

하여 28°C에서 2주간 배양하면서 수분과 인산염의 농도별첨가에 따른 patulin 함량을 조사하였다. 그 결과 Table 4와 같이 수분 30%를 함유한 배지에서는 수분량에 따른 toxin 생성과 마찬가지로 옥수수배지에서의 toxin의 양이 쌀배지에서보다 적은 양이 검출되었다. 또한 인산염을 0.5% 함유된 배지에서부터 toxin의 양이 현저히 저해되었으며 인산염의 농도가 1.5%이상 함유된 배지는 patulin이 전혀 검출되지 않았다. 한편 수분을 40%로 고정시킨 경우 인산염을 0.5% 첨가한 배지에서는 대조구와 현저한 차이가 나타났고, 1%를 함유한 배지에서는 toxin의 양이 급격히 감소하였다. 인산염의 농도가 1.5%에서의 patulin은 쌀배지에서 3.41 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 옥수수배지에서 1.43 μm l가 각각 생성되었고, 2%에서는 검출되지 않았다. 수분을 50%로 고정시킨 결과에서도 대조구에서의 patulin은 쌀에서 182.46 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 옥수수에서 149.14 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 이 각각 생성되었으나, 0.5%의 인산염 처리시에 toxin양은 61.3~66.5%로 감소되었고, 1% 처리시 97.6~98.5%, 그리고 1.5% 처리시에는 99.4~99.8%로 급격히 감소되었으며, 2% 처리시에는 toxin이 검출되지 않았다. 이상과 같이 toxin 생성의 감소는 인산염에 의해 배지내에 영양분의 킬레이트화로 인한 고갈,¹⁶⁾ pH 감소,¹⁷⁾ 세포벽과 세포막의 파괴¹⁸⁾로 균의 증식이 저해되었기 때문인 것으로 사료된다.

4. 장기간 배양에서 toxin 생성

분쇄한 쌀, 옥수수를 용량이 1 l씩각 플라스크에 100 g씩 넣고 살균 취해 인산염의 농도를 각각 0, 1, 2% 첨가하여 28°C에서 45일간 정지배양하면서 patulin을 분석한 결과는 Table 5에 나타나 있다. Table에서 보는 바와 같이 배지량을 많이 하고 배양기간을 길게 한 경우 인산염의 농도에 의한 toxin의 저해가 뚜렷이 나타나 대조구에서의 toxin의 양이 쌀배지에서는 2,700 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 옥수수배지에서는 1,820 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 를 생성한 반면 1% 인산염 처리시에는

**Fig. 2.** Scanning electron micrographs of *Penicillium griseofulvum* A: control ($\times 3,000$), B: Treated with polyphosphate (0.5%), C: Treated with polyphosphate (1%).

170, 78 $\mu\text{g}/\text{l}$ 의 patulin이 각각 생성되었고, 2%에서는 전혀 생성되지 않았다.

5. 전자현미경(SEM)에 의한 toxin 생성균주의 형태학적 변화

Patulin 생성균주인 *Penicillium griseofulvum*를 PDB배지에 인산염을 처리하지 않은 대조구와 인산염을 0.5%와 1%를 처리하고 배양한 후 전자현미경(SEM)검경시료로 조제한 다음 검경한 결과는 Fig.

2과 같다. 그 결과 patulin 생성 균주인 *Penicillium griseofulvum*은 인산염을 0.5% 처리한 경우, 균의 세포벽은 크게 영향을 받지 않았지만 성장 촉진 부분의 발육이 억제되고 균사에 매듭이 형성되는 것을 알 수 있었고, 1% 인산염 처리시에는 균의 세포벽이 파괴되어 균의 외형이 변화되는 것을 알 수 있었다. 항균제의 경우 주로 작용하는 부위가 세포벽과 세포 소기관이므로 항균제를 처리한 균주들은 세포벽이 파괴되어 세포내 물질이 세포밖으로 용출되어 나와서 균주가 사멸한다는 연구보고¹⁷⁾로 미루어 인산염의 경우도 항곰팡이 작용에 의해 세포벽이 파괴되어 세포내 물질이 소실되는 것으로 알려져 있다.¹⁸⁾

이상의 결과로 미루어볼 때 본 실험에 사용된 인산염 인산염(polyphosphates)은 기존의 식품보존제와 항균작용이 비슷할 뿐만 아니라 인체에 미치는 영향이 적어 식품제조용제 뿐만 아니라 보존제로 활용될 수 있어, 식품이나 사료에서의 활용에 대한 다양한 연구가 필요하다고 사료된다.

참고문헌

- 1) Mirocha, C. J. : Metabolism and residue of trichothecene toxins in animals and plant system. In Mycotoxins and Phytotoxins, pp. 409-420, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1986.
- 2) Chain, E., Florey, H. W. and Jennings, M. A. : An antibacterial substance produced by *Penicillium claviforme*. Br. J. Exp. Pathol., 29-202-205, 1942.
- 3) Birkinshaw J. H., Michael, S. E., Bracken, A. and Raistrick, H. : Patulin in the common cold II. Biochemistry. Lancet(ii), 625-630, 1942.
- 4) Anslow W. K., Raistrick, H. and Smith, G. : Anti fungal substances from moulds. Part I. Patulin a metabolic product of *Penicillium Patulium* Bainier and *Penicillium expansum*(Link) Thom. J. Soc. Chem. Ind., 62, 236-238, 1943.
- 5) Torres, M., Canela, R., Riba, M. and Sanchis, V. : Production of patulin and griseofulvum by a strain of *penicillium griseofulvum* in three different media. Mycopathologia 99, 85-89, 1987.
- 6) Bergal, F., Morrison, A. L., Moss, A. R., Klein, R., Rinderkencht, H. and Ward, J. L. : An antibacterial substance from *Aspergillus clavatus* and *Penicillium claviforme* and probable identify with patulin. Natuer(London). 152, 750, 1943.
- 7) 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.
- 8) Mayer, V. W. and Legator, M. S. : Production of petite mutants of *Saccharomyces cerevisiae* by patulin. J. Agr. Food Chem., 17, 454-456, 1969.
- 9) Freerksen, E. and Bonicks, R. : Die inaktivierung des patulin *in vivo*. Z. Hyg., 132, 274-291, 1951.
- 10) Hooper, I. R., Anderson, H. W., Skell, P. and Carter, H. E. : The identify of clavacin with patulin. Science, 99, 16, 1944.
- 11) Alberto Gimeno, and Martins, M. L. : Ripid thin layer chromatographic of patulin, citrinin, and aflatoxin in apples and pears, and their juices and jams. J. Assoc. Off. Chem., 66(1), 85-91, 1983.
- 12) Wang, L. L., Jonnson, E. A. : Inhibition of L. Monocytogenes by Fatty Acid and Monoglyceride. App. and Env. Microbiology, 2, 642-649, 1992.
- 13) 장명호 : *Listeria monocytogenes* Scott A의 생장에 미치는 인산염 (Polyphosphate)의 영향. 경상대 석사학위논문, 1993.
- 14) AOAC Official Methods of Analysis : 1209-1210, 1990.
- 15) Zaika, L. L. and Buchanan, R. L. : Review of compounds affecting the biosynthesis or bioregulation of aflatoxin. J. Food Prot., 50, 691-708, 1987.
- 16) Fisterberg, E. R., et al. : Inhibition of Moraxella-Acinebacter cells by sodium phosphates and sodium chloride. J. Food Sci., 46, 579-582, 1981.
- 17) Post, F. J., Krishnmurty, G. B. and Flanagan, M. D. : Influence of sodium hexametaphosphate on selected bacteria. Appl. Microbio., 11, 430-435, 1963.
- 18) Iran, R. R. and W. W. Morgentaler : Iron sequestration by polyphosphates. J. Am. Oil. Chem. Soc., 40, 283-285.