

수확 후 과실류에 발생하는 진균독소의 탐색 및 방제

1. 사과, 배, 감귤, 포도에서 분리한 *Penicillium*이 생산하는 주요 진균독소

오소영 · 정일민¹ · 백수봉¹ · 유승현*

충남대학교 농과대학 농생물학과, ¹건국대학교 농과대학 식량자원학과

Survey and Control of the Occurrence of Mycotoxins from Post-harvest Fruits

1. Mycotoxins Produced by *Penicillium* Isolates from Apple, Pear, Citrus and Grape

Soh Young Oh, Ill Min Chung¹, Su Bong Paik¹ and Seung Hun Yu*

Department of Agricultural Biology, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea
College of Agriculture, Kon-kuk University, Seoul 143-701, Korea

A total of 65 isolates of *Penicillium* were isolated from decayed post-harvest fruits of apple, pear, citrus and grape. The *Penicillium* species isolated from the apple were identified as *P. aurantiogriseum* and *P. expansum*, those from the pear were *P. crustosum* and *P. expansum* and those from the grape were *P. aurantiogriseum* and *P. expansum*. From decayed citrus fruits, *P. digitatum* and *P. italicum* were isolated. Citrinin and patulin from these species in the YES (yeast extract sucrose) broth were extracted with ethyl acetate and purified by thin-layer chromatography (TLC), and high performance liquid chromatography (HPLC). Among 51 isolates of *Penicillium* from apple, pear and grape, 7 isolates produced citrinin, 13 isolates produced patulin and 12 isolates produced citrinin and patulin also. All 14 isolates of *Penicillium* from citrus produced only patulin.

Keywords : citrinin, mycotoxin, patulin, *Penicillium*, post-harvest fruit

사과, 배, 감귤, 포도와 같은 과실류의 수확 후 저장 및 수송 중에 발생하는 병 중에서 *Penicillium* spp. 에 의한 푸른곰팡이병 또는 녹색곰팡이병은 전 세계적으로 발생되며 피해가 큰 병이다. 이 병들은 *Penicillium* 썩음병으로도 알려져 있는데 주로 상처를 통해 발병되지만 상처가 없는 경우 감염된 과실과의 접촉을 통하여도 전파된다. 이 병들은 발병초기에는 수침상의 병반이 생겨 점차 커지고 물러 썩으며 썩은 부분에서 흰곰팡이가 피다가 점차 푸른색 또는 초록색을 띠게 된다 (Agrios, 1997; Jones 와 Aldwinckle, 1991). 우리 나라에서는 *P. expansum*에 의한 사과푸른곰팡이병, *P. crustosum*에 의한

배푸른곰팡이병, *P. italicum*에 의한 감귤푸른곰팡이병과 *P. digitatum*에 의한 감귤녹색곰팡이병이 보고되어 있다 (Anonymous, 1993; 1998).

*Penicillium*은 수확 후의 과실을 부패시켜 일으키는 손실 외에도 여러 종류의 진균독소를 생성하여 부분적으로 썩은 과실로 만든 주스를 오염시키기도 한다(Agrios, 1997). *Penicillium*이 생성하는 진균독소는 40여 종이 알려져 있고(Scott, 1997), 그 중 citrinin, patulin, penicillic acid, cyclopiazonic acid, citreoviridin, rubratoxin 등의 독성이 보고되어 있으며(El-Banna 등, 1987; Scott, 1997), 특히 citrinin과 patulin은 인간뿐만 아니라 가축에게도 다양한 중독증상을 일으키는 것으로 알려져 있다(Blunden 등, 1991; Carlton 등, 1974; Friis 등, 1969; Pohland, 1993).

본 연구는 수확 후 농산물에 발생하는 진균독소 탐색에 관

* Corresponding author
Phone) +82-42-821-5762 Fax) +82-42-823-8679
E-mail) shunyu@cuvic.cnu.ac.kr

한 연구의 일환으로 수행하였다. 수확 후 저장 및 유통중인 썩은 사과, 배, 감귤 및 포도에서 *Penicillium*을 분리, 동정하고 이 균들의 주요 진균독소(citrinin, patulin) 생성능을 조사하였다.

재료 및 방법

부패과실 수집. 사과는 대전시내의 청과물 시장과 슈퍼마켓에서, 배는 나주의 배 유통단지의 저온저장고와 배연구소의 저온저장고에서 각각 부패한 과실을 수집하였다. 감귤은 제주도 감귤연구소의 저온저장고와 시중의 청과물 시장에서, 포도는 수원 원예연구소의 저온저장고와 시중의 청과물 시장에서 각각 부패한 과실을 수집하였다. 부패한 열매는 각 과일 당 30-50개씩을 수집하여 *Penicillium*의 분리, 동정에 사용하였다.

균분리 및 동정. 수집한 열매의 부패부위를 잘라내어 각각 1% sodium hypochloride 용액으로 표면 살균하고 감자한천배지(PDA)에 치상하여 22~28°C에서 4~5일간 배양한 후 *Penicillium*의 특징을 나타내는 균총을 선별하여 PDA 사면배지에 옮겨 배양하였다. 분리균을 동정하기 위하여는 Czapek yeast autolysate agar(CYA) 배지에 접종하여 25°C 항온기에서 암상태로 7일간 배양한 후 균총의 특징과 형태적 특징을 조사하였고, Pitt(1991), Singh 등(1991)의 문헌을 참고하여 동정하였다.

균배양. 분리균의 진균독소 생성은 yeast extract sucrose(YES) 액체배지 (yeast extract 20g, MgSO₄ · 5H₂O 0.5g, sucrose 150g, water 1000ml, trace metal solution 1.0ml)에서 배양하여 조사하였다. 삼각후라스크(200ml)에 50ml의 YES 액체배지를 넣고 살균한 후 PDA에서 전배양한 *Penicillium* 균총을 접종하여 25°C 암상태의 배양기에서 25일간 정치배양하였다.

***Penicillium* 진균독소의 동정.** *Penicillium* 진균독소를 동정하기 위하여 YES액체배지에서 배양한 배양여액을 chloroform으로 추출, 농축하고 이를 silica gel column에서 chloroform으로 용출시킨 후 TLC 및 HPLC 분석을 실시하였다. TLC분석에는 toluene : ethyl acetate : 90% formic acid (50:49:1, v/v/v)와 chloroform : methyl alcohol (7:3, v/v) 및 benzene : methyl alcohol : acetic acid (18:1:1, v/v/v)의 용매계를 이용하였으며, TLC에서의 R_f값과 발색반응을 표준독소와 비교하여 동정하였다. Citrinin은 TLC plates에서 장파장의 UV광을 비추면 yellow fluorescence가 나타나며, 단파장의 UV광을 비추면 quenching spot로 나타났고, patulin은 장파장의 UV광에서는 반응이 없으나 단파장의 UV광을 비추면 quenching spot로 나타났다. HPLC분석을 위하여는 TLC상의 독소부위를 긁어모은 후 acetonitrile을 가하여 독소성분을 추출하고 이를 HPLC

분석에 사용하였다. 분석에 사용한 칼럼은 역상칼럼 Phenomenex C₁₈이고 이동상 용매로 citrinin 분석에는 0.25N phosphoric acid-acetonitrile (5:5, v/v), patulin분석에는 acetonitrile-water (45:55, v/v)를 사용하였다. Citrinin, patulin의 검출을 위하여 각각 350nm, 300nm의 UV detector를 사용하였다. 표준독소 citrinin, patulin은 모두 Sigma사 제품을 구입하여 사용하였다.

결과 및 고찰

부패과실에서 분리한 *Penicillium*의 동정. 사과, 배, 감귤 및 포도의 *Penicillium* 썩음병 이병과에서 분리한 *Penicillium*의 종류는 Table 1과 같다. 사과에서 17균주의 *Penicillium*이 분리되었는데 그 중 *P. aurantiogriseum*이 6균주(35%), *P. expansum*이 11균주(65%) 분리되었고, 배에서는 *P. crustosum* 6균주(35%), *P. expansum* 11균주(65%)가 분리되었다. 감귤에서는 *P. digitatum* 10 균주(71%), *P. italicum* 4균주(29%)가 분리되었고, 포도에서는 *P. aurantiogriseum* 6균주(35%), *P. expansum* 11균주(65%)가 분리되었다. 사과, 배의 푸른곰팡이병 감염 과실에서 11종의 *Penicillium*이 보고되었으나 *P. expansum*이 가장 흔하고 경제적으로 중요한 균으로 알려져 있다(Jones 와 Aldwinckle, 1991). 국내에서는 사과 및 배의 푸른곰팡이병 균으로 각각 *P. expansum* 및 *P. crustosum*만이 보고되어 있는데(Anonymous, 1993; 1998), 본 연구에서는 보고된 균 외에 사과에서는 *P. aurantiogriseum*이, 배에서는 *P. expansum*이 분리되었다. 감귤에서는 이미 국내에서 보고된(Anonymous, 1993; 1998) *P. digitatum*과 *P. italicum*이 분리되었다. 포도의 푸른곰팡이병은 국내에서는 보고된 바 없으나, 본 연구의 결과 포도에서도 *P. aurantiogriseum* 및 *P. expansum*에 의한 푸른곰팡이병의 발생과 피해가 확인되었다.

***Penicillium* 진균독소의 동정.** 공시균주들이 생성하는 citrinin과 patulin의 동정을 위하여 YES액체배지에서 배양한 *P. aurantiogriseum* 2균주(CNU 5010, 7001), *P. crustosum* 2균주

Table 1. Isolation frequency of *Penicillium* isolates from blue or green mold of apple, pear, citrus and grape

<i>Penicillium</i> sp.	No. of isolates from			
	Apple	Pear	Citrus	Grape
<i>P. aurantiogriseum</i>	6			6
<i>P. crustosum</i>		6		
<i>P. digitatum</i>			10	
<i>P. expansum</i>	11	11		11
<i>P. italicum</i>			4	
Total	17	17	14	17

Table 2. Rf values of TLC and HPLC retention time of *Penicillium* mycotoxins

Toxin	TLC ^a Rf			HPLC ^b retention time(min)
	A	B	C	
Citrinin	0.32	0.37	0.16	7.70
Patulin	0.36	0.73	0.18	7.47

^aTLC was performed on silica gel pre-coated plates with a fluorescence indicator(Merck, Item No. 5715, TLC plates silica gel 60 F₂₅₄) by using toluene-ethyl acetate-90% formic acid (50:49:1, v/v/v)(A), chloroform-methyl alcohol (7:3, v/v)(B), benzene-methyl alcohol-acetic acid (18:1:1, v/v/v)(C) as a solvent system.

^bHPLC was performed on a reverse phase column (Phenomenex C₁₈). 0.25N phosphoric acid : acetonitrile (5:5, v/v) was used as mobile phase for the analysis of citrinin, acetonitrile : water(45:55, v/v) for patulin. The wavelength of the UV detector was set at 350nm for citrinin, at 300nm for patulin.

(CNU 8001, 8010), *P. digitatum* 1균주(CNU 6001), *P. expansum* 2균주(CNU 5001, 5002) 등의 배양여액을 chloroform으로 추출한 후 표준독소와 비교하여 TLC 분석을 한 결과 Table 2에 서와 같이 citrinin 및 patulin의 생성이 확인되었다. Toluene-ethylacetate-90% formic acid (50:49:1, v/v/v), chloroform-methyl alcohol (7:3, v/v) 및 benzene-methyl alcohol-acetic acid (18:1:1, v/v/v) 용매계에서 이 독소들의 Rf 값을 보면 citrinin은 0.32, 0.37, 0.16, patulin은 0.36, 0.73, 0.18이었다. 또한 HPLC 분석 결과 공시균주들이 생성하는 citrinin, patulin의 retention time 은 각각 7.70분, 7.47분으로서 표준독소와 잘 일치하였다.

Penicillium 균주의 독소생성능. 부패과실에서 분리한 *Penicillium* 균주들의 진균독소생성능을 조사한 결과는 Table 3 및 4와 같다.

사과에서 분리한 *P. aurantiogriseum*은 6균주 중 2균주가 citrinin을, 1균주가 patulin을 생성하였고, 배에서 분리한 *P. crustosum*은 6균주 중 4균주가 patulin을, 2균주가 citrinin과 patulin을 동시에 생성하였다. 또한 사과 및 배에서 분리한 *P. expansum* 22개 균주 중 10균주가 patulin을 생성하였고 그 중 배에서 분리한 4균주는 citrinin과 patulin을 동시에 생성하였다. 한편 포도에서 분리한 *Penicillium*은 *P. aurantiogriseum* 6 균주 중 4균주가 citrinin과 patulin을 동시에 생성하였고, *P. expansum* 11균주 중 5균주가 citrinin을, 3균주가 citrinin과 patulin을 동시에 생성하였다. 감귤에서 분리한 *P. digitatum* 10 균주와 *P. italicum* 4균주는 모두 patulin을 생성하였다.

Citrinin은 동물의 신장독성(nephrotoxin)이 있는 진균독소로 신장을 손상시키고, 성장을 저해하며 결국 사망에 이르게 하는 것으로 보고되어 있으며(Blunden 등, 1991; Smith 등, 1985), 가축과 새의 주요 독소로 알려져 있으나(Friis 등, 1969), 사람

Table 3. Mycotoxin production from apple and pear isolates of *Penicillium* in the yeast extract sucrose liquid medium

Species	Isolate number	Source	Mycotoxin production ^a		
			Citrinin	Patulin	
<i>P. aurantiogriseum</i>	CNU 7001	Apple	ND	+	
	"	CNU 7003	"	ND	
	"	CNU 7012	"	+	
	"	CNU 7013	"	ND	
	"	CNU 7015	"	+	
<i>P. crustosum</i>	CNU 7017	"	ND	ND	
	CNU 8001	Pear	ND	+	
	"	CNU 8002	"	ND	+
	"	CNU 8010	"	+	+
	"	CNU 8011	"	+	+
<i>P. expansum</i>	CNU 8015	"	ND	+	
	CNU 8016	"	ND	+	
	CNU 7002	Apple	ND	+	
	"	CNU 7004	"	ND	+
	"	CNU 7005	"	ND	+
	"	CNU 7006	"	ND	ND
	"	CNU 7007	"	ND	ND
	"	CNU 7008	"	ND	ND
	"	CNU 7009	"	ND	ND
	"	CNU 7010	"	ND	ND
	"	CNU 7011	"	ND	ND
	"	CNU 7014	"	ND	ND
	"	CNU 7016	"	ND	ND
	"	CNU 8003	Pear	ND	+
	"	CNU 8004	"	ND	ND
	"	CNU 8005	"	+	+
	"	CNU 8006	"	ND	+
"	CNU 8007	"	+	+	
"	CNU 8008	"	+	ND	
"	CNU 8009	"	ND	ND	
"	CNU 8012	"	+	ND	
"	CNU 8013	"	ND	+	
"	CNU 8014	"	ND	+	
"	CNU 8017	"	ND	+	

^aDetected by TLC and HPLC, ND; not detected.

의 건강에 미치는 영향에 대하여는 평가하기가 어렵다. 그러나 ochratoxin과 같은 다른 진균독소와 함께 작용할 경우(Krogh 등, 1973) 독성의 상승작용이 우려되므로 주의를 요하는 독소이다. Patulin은 인축의 폐와 뇌에 출혈을 일으키는 것으로 보고되어 있는데(Blunden 등, 1991), 부패한 사과와 배에서도 검출되고(Smith와 Moss, 1985), 일부 부패한 사과에서는 250ppm의 다량의 patulin이 보고된 바 있다(Pohland, 1993). Patulin은 각종 과일 주스에서도 수백 ppb가 검출되며(Blunden 등, 1991), 시판되는 사과주스에서 최고 45ppm이 검출되기도 하였다(Pohland, 1993).

최근 국내산 양과, 마늘 및 옥수수, 밀에서 분리한 *Penicillium*

Table 4. Mycotoxin production from citrus and grape isolates of *Penicillium* in the yeast extract sucrose liquid medium

Species	Isolate number	Source	Mycotoxin production ^a	
			Citrinin	Patulin
<i>P. aurantiogriseum</i>	CNU 5010	Grape	+	+
"	CNU 5011	"	+	+
"	CNU 5013	"	ND	ND
"	CNU 5014	"	ND	ND
"	CNU 5015	"	+	+
"	CNU 5017	"	+	+
<i>P. digitatum</i>	CNU 6001	Citrus	ND	+
"	CNU 6002	"	ND	+
"	CNU 6003	"	ND	+
"	CNU 6004	"	ND	+
"	CNU 6005	"	ND	+
"	CNU 6007	"	ND	+
"	CNU 6009	"	ND	+
"	CNU 6010	"	ND	+
"	CNU 6011	"	ND	+
"	CNU 6012	"	ND	+
<i>P. expansum</i>	CNU 5001	Grape	+	ND
"	CNU 5002	"	+	+
"	CNU 5003	"	+	ND
"	CNU 5004	"	ND	ND
"	CNU 5005	"	+	ND
"	CNU 5006	"	ND	ND
"	CNU 5007	"	ND	ND
"	CNU 5008	"	+	ND
"	CNU 5009	"	+	ND
"	CNU 5016	"	+	+
"	CNU 5018	"	+	+
<i>P. italicum</i>	CNU 6006	Citrus	ND	+
"	CNU 6008	"	ND	+
"	CNU 6013	"	ND	+
"	CNU 6014	"	ND	+

^aDetected by TLC and HPLC, ND; not detected.

균주 중에 citrinin 및 patulin을 생성하는 균주가 분포하고 있음을 보고한 바 있으나(Oh 등, 1998; Yu 등, 1997), 본 연구의 결과, 수확 후 저장 및 유통 중에 부패한 사과, 배, 감귤, 포도의 과실에서 분리한 *Penicillium* 균주 중에도 patulin과 citrinin 생성균주가 광범위하게 분포하고 있음을 알 수 있었다. 따라서 과일 주스원료로 이들 부패한 과실이 섞여 들어갈 경우 주스 중에서 이들 독소가 검출된 가능성이 있으므로 부패한 과일 및 주스 중의 독소오염에 관한 연구가 추후 수행되어야 할 것이다.

요 약

수확 후 저장 및 유통 중에 부패한 사과, 배, 감귤, 포도의

과실에서 각각 17, 17, 14 및 17개균주의 *Penicillium*을 분리하였다. 사과에서 분리한 *Penicillium*은 *P. aurantiogriseum*과 *P. expansum*으로 동정되었고, 배에서는 *P. crustosum*과 *P. expansum*이 동정되었으며, 포도에서는 *P. aurantiogriseum* 과 *P. expansum*이 감귤에서는 *P. digitatum*과 *P. italicum*이 동정되었다. 분리한 *Penicillium* 균주들의 citrinin과 patulin의 생성능을 조사하기 위하여 yeast extract sucrose 배지에서 배양한 후 배양액을 chloroform으로 추출하고 TLC와 HPLC분석을 통하여 순화하였다. 사과, 배, 포도에서 분리한 *Penicillium* 51개 균주 중에서 7개 균주가 citrinin을, 13개 균주가 patulin을, 12개 균주가 citrinin과 patulin을 생성하였다. 감귤에서 분리한 14개 균주는 모두 patulin을 생성하였다.

감사의 말씀

이 연구는 1998년도 교육부 농업과학분야 거점연구소 육성 사업에 의한 연구비 지원으로 수행된 연구결과의 일부임.

참고문헌

- Agrios, G. N. 1997. *Plant Pathology*. 4th ed. Academic Press, New York. 653 pp.
- Anonymous. 1993. *Compendium of Fruit Tree Diseases with Colour Plates*. Agric. Sci. Inst. Suwon, Korea 286 pp.
- Anonymous. 1998. *List of Plant Diseases in Korea*. 3rd ed. Korean Soc. Plant Pathology. 491pp.
- Blunden, G., Roch, O. G., Rogers, D. J., Coker, R. D., Bradburn, N. and John, A. E. 1991. Mycotoxins in Food. *Medical Lab. Sciences* 48: 271-282
- Carlton, W. W., Sansing, G., Szczech, G. M., and Tuite, J. 1974. Citrinin mycotoxicosis in beagle dogs. *Food Cosmet. Toxicol.* 12: 479-490.
- El-Banna, A. A., Pitt, J. I., and Leistner, L. 1987. Production of mycotoxins by *Penicillium* species. *Syst. Appl. Microbiol.* 10: 42-46.
- Friis, P., Hasselager, E., and Korgh, P. 1969. Isolation of citrinin and oxalic acid from *Penicillium viridicatum* and their nephrotoxicity in rats and pigs. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 77: 559-560.
- Jones, A. L. and Aldwinckle, H. S. 1991. *Compendium of Apple and Pear Diseases*. APS Press, Minnesota. 100 pp.
- Krogh, P., Hald, B., and Pedersen, E. J. 1973. Occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals associated with mycotoxic porcine nephropathy. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 81(Section B): 689-695.
- Oh, S. Y., Chung, I. M., Paik, S. B., Yu, S. H. 1998. Survey and control of the occurrence of mycotoxins from postharvest cereals 1. Mycotoxins produced by *Penicillium* isolates from corn and wheat. *Korean J. Plant Pathol.* 14: 700-704
- Pitt, J. I. 1991. *A Laboratory Guide to Common Penicillium Species*. 1-187 pp. Commonwealth Scientific and Industrial Research Organization.
- Pohland, A. E. 1993. Mycotoxins in review. *Food Addit. Contam.*

- 10: 17-28.
- Scott, P. M. 1977. *Penicillium* Mycotoxins. In : *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*, Vol. 1, ed. by T. D. Wyllie and L. G. Morehouse, pp. 283-356. Marcel Dekker, Inc., New York.
- Singh, K., Frisvad, J. C., Thrane, U. and Mathur, S. B. 1991. *An Illustrated Manual on Identification of Some Seed-borne Aspergilli, Fusaria, Penicillia and Their Mycotoxins*. 8-10 pp. Danish Government Institute of Seed Pathology for Developing Countries. Hellerup. Denmark.
- Smith, J. E. and Moss, M. O. 1985. *Mycotoxins-Formation, Analysis and Significance*. Chichester, John & Wiley.
- Yu, S. H., Oh, S. Y., Lee, H. B., Kim, B. R., Chung, I. M. and Paik, S. B. 1997. Survey and control of the occurrence of mycotoxins from postharvest vegetables in Korea I. Mycotoxins produced by *Alternaria* and *Penicillium* isolates from spice vegetables (onions, garlics and peppers). *Korean J. Plant Pathol.* 13: 323-330.