

## 液體培地에서의 *Fusarium moniliforme*에 의한 Fusarin C생성에 관한 연구

안 명 수 · 현 영 희\*

성신여자대학교 식품영양학과\* · 성신여자대학교대학원

## Fusarin C Production by *Fusarium moniliforme* in Liquid Media

Myung Soo Ahn, Young Hee Hyun\*

Department of Food and Nutrition, Sungshin Women's University

\* Graduate School, Sungshin Women's University

### Abstract

This study was carried out to find the optimum condition for production of fusarin C, Known as a mutagenic and toxic agent.

Three liquid media, Czapek-kox, MYRO, GYEP and microorganism, *Fusarium moniliforme* F84 isolated by Bjeldanes lab. in U.C. Berkeley, were used in this experiment.

Fusarin C amounts were determined upon PH and fluctuating time/temperature.

The results were obtained as follows;

1. The largest amounts of fusarin C were shown in Czapek-Dox medium and the amounts were about 1/10 of fusarin C amounts in corn culture.
2. In Czapek-Dox medium, the best condition for fusarin C production was at 28°C for 2 weeks culture, and in corn culture, at 28°C for 1 week culture.
3. The best initial PH for fusarin C production was 6.5 in Czapek-Dox medium and also at the initial pH 6.3, 5.9 the fusarin C amounts produced were much higher than other initial PH.

### I. 서 론

*Fusarium moniliforme*은 옥수수, 쌀, 사탕수수등 여러 식물에 널리 분포되어 있으며 특히 옥수수에 가장

많이 기생하는 곰팡이 중의 하나이다<sup>1)</sup>. *F. moniliforme*은 Fusarin C (Mw, 481)와 moniliformin이라고 하는 두 계열의 變異源(mutagen)을 생성<sup>2)</sup>시키는 것으로 밝혀졌으며 그들의 구조<sup>3)</sup>는 다음과 같다.

옥수수를 상용하는 남아프리카의 Transkey 지역에서

식도암의 발병율이 매우 높다는 역학조사결과의 *F. moniliforme*의 오염율과는 높은 상관관계가 있음이 밝혀졌다<sup>4)</sup>. 또한 중국에서도 식도암의 발병율이 높으며 이 또한 곡류의 *F. moniliforme*의 오염율이 높은 지역에서 뚜렷하게 나타났다고 보고된 바 있다<sup>5)</sup>. 특히 중국 의서부 Henan지방의 Linxian country에서 조사된 바에 의하면 10만명중 263명이 식도암환자로서 세계에서 가장 높은 발병율을 보여 주었다<sup>6)</sup>.

Marasas<sup>7)</sup>들은 옥수수에 *F. moniliforme*를 접종하여 45~50°C에서 24시간 생육시킨 후 생성된 물질을 추출하여 쥐로서 동물실험한 결과 간암이 유발되었다고 보고하였다. 이와같이 Fusarin C는 동물은 물론 인체에 매우 유독하다는 사실이 확인된 바 있다.

그러나 정성정량적으로 Fusarin C를 측정하는데 필요한 표준 Fusarin C는 유기합성적으로 생산되지 않고 있어 표준품의 공급이 매우 부족한 실정이므로 순수한 Fusarin C 표준품의 대량생산이 시급하다.

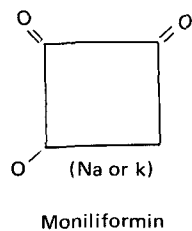
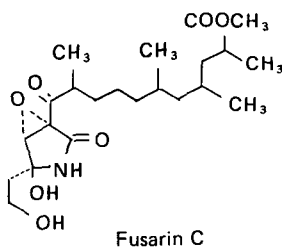
Farber<sup>8)</sup>들은 액체배지(MYRO)에서의 *Fusarium moniliforme* sheldon과 *Fusarium subglutinans*의 canadian isolate에 의한 Fusarin C 생성능력에 관하여 연구하였다. 그 결과 액체배지의 initial pH가 5.9인 것과 28°C에서 2주간 배양한 경우에 Fusarin C 생성량이 가장 높았음을 보고하였다.

본 연구는 Berkeley대학 영양학과 Dr. Bjeldanes Lab에서 isolate된 *Fusarium moniliforme*를 세 종류의 액체배지와 조건이 다른 액체배지에서 배양하여 Fusarin C의 생성량이 가장 많은 조건을 찾고자 하는데 목적이 있다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 미생물

미국 Berkeley대학 영양학과 Dr. Bjeldanes Lab



에서 순수 분리된 squared paper상태의 *Fusarium moniliforme* 84(F84)를 사용하였다.

살균된(121°C에서 15분간) Double Distilled water 100 ml에 F84를 0.096 g가하여 진탕한 다음 접종액으로 사용하였다.

### 2. 액체배지

사용된 액체배지는 Czapek-Dox, GYEP, MYRO등 세가지였으며 성분과 배합비는 다음과 같다.

#### 1) Czapek-Dox Medium<sup>9)</sup>(Difco 사제품, g/l)

Bactosaccharose	30
NaNO <sub>3</sub>	3
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5
KCl	0.5
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.01

#### 2) GYEP Medium<sup>10)</sup>(g/l)

Glucose	10
Yeast Extract	1
Peptone	1

#### 3) MYRO Medium<sup>10)</sup>(g/l)

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2
NaCl	5
Sucrose	40
Glycerine	10

#### 4) Corn culture: control로 사용됨

Cutting corn	50 g
Double distilled water	30 g

### 3. 배양방법

각각의 액체배지 50 ml와 옥수수배지를 250 ml 삼각 flask에 넣고 121°C에서 15분간 autoclave내에서 살균한 다음 냉각시키고 접종액 3 ml씩을 추가하였다. 이것을 28°C에서 14일간 항온하면서 중속으로 진탕배양하였고 광선을 차단하기 위하여 yellow light room에서 행하였다. 배양후에는 즉시 -20°C에서 냉동보관하였으며 추출시에 꺼내어 사용하였다.

또한 배양온도와 배양기간의 변화에 따른 Fusarin C 생성량을 비교하기 위하여 Czapek-Dox medium에 대

하여 28°C에서 1주, 2주, 4주간, 28°C에서 2주와 11°C에서 2주간 그리고 28°C에서 1주, 11°C에서 1주 후 다시 28°C에서 1주간 배양하는 6가지 조건에 대하여 검토하였다.

또한 액체배지의 initial pH가 Fusarin C의 생성량에 미치는 영향을 검토하기 위하여 pH 8.34, 6.5, 6.3, 5.9, 5.5, 5.0, 4.5, 3.5로 initial pH를 맞추고 배양하였다. pH를 조정하기 전의 원래 Czapek-Dox medium의 pH는 8.34이었다.

#### 4. 추출방법

배양된 액체배지는 분리여두상에서 50 ml의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 두번, 20 ml로 한번 분리·추출하여 하층액을 취하고 Anhydrous sodium sulfate를 가하고 1주야간 방치한 후, 여지(Watman No. 1)상에서 여과하고 Rotary Evaporator (Büchi, ch-9230 Flawil/Schweiz 850830) 30±5°C에서 감압 건조시켰다. 그 후 2, 1, 1 ml의 degassed CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 용해시켜 Spice micro column (Si)상에서 세번 여과하고, 또 2, 1, 1 ml의 5% CH<sub>3</sub>OH/CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 용액으로 용해시켜, 동일한 column 상에서 세번 여과하여 정제하였다.

이때에 얻어진 액을 5 ml vial에 담고 N<sub>2</sub> stream하에서 건조시킨 후 Teflon 처리된 뚜껑으로 덮어 -20°C에서 냉동시켜 HPLC측정시까지 보관하였다.

corn의 경우는 배양된 corn에 50 ml의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>를 가하고 cold room에서 24시간 방치한 다음 여지(Watman No. 1)상에서 추출하고 다시 50 ml, 20 ml의 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>로 추출 여과한것에 Anhydrous sodium sulfate를 가한 다음 여지상에서 여과하였다. 그 다음의 단계는 액체배지에서 행한 것과 동일하였다.

#### 5. Fusarin C의 분석

Fusarin C의 양을 High Performances Liquid Chromatography (HPLC)에서 측정하기 위하여 추출된 Fusarin C에 degassed CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> 1 ml로 희석하여 20 μl씩 주입하였다. 이때 사용한 HPLC (Beckman Model 332)의 Reverse phase LC는 Column No. pp/7903 (amino acid), Mobile phase는 CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>-CH<sub>3</sub>OH (99+1), flow rate는 0.01 μl/min으로 365 mm에서 흡광도를 측정하여 다음의 식으로 환산 하였다.

$$n \text{ mol} = \frac{\text{SRF}}{0.6\epsilon}$$

이때  $\epsilon$ : 30,000 (Excition Coefficient)

S : Peak 면적 × Voltage

R : Sensitivity Range

F : Flow Rate

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 액체배지 종류별 Fusarin C 생성량

Czapek-Dox, MYRO, GYEP 등의 액체배지에서 28°C에서 2주간 저속으로 진탕배양한 후 Fusarin C의 생성량을 보면 다음 Table 1과 같다.

세가지 액체배지중 Czapek-Dox medium에서 가장 많은 생성량을 볼 수 있으나 옥수수에 비하면 월등히 낮은 것을 볼 수 있는데 이것은 고형물질의 농도가 월등히 높으므로 직접적인 비교는 곤란하다. 그러나 옥수수배지를 사용하는 경우 추출분리시에 어려운 점이 많은 데에 비하여 액체배지로서는 다량배양도 용이하며 상당량의 Fusarin C가 생성되는 것으로 보아 *Fusarium moniliforme*의 순수배양과 순수 Fusarin C의 분리예 유용하다고 생각한다.

#### 2. 배양온도와 시간에 따른 Fusarin C의 생성

액체배지중 GYEP에서도 Czapek-Dox와 거의 비슷한 양이 생성되었으나 Yeast Extract 자체가 매우 복잡한 요소가 많으므로 Czapek-Dox를 배지로 택하여 배양온도와 시간에 따른 Fusarin C의 생성량을 측정, 비교한 결과는 다음 Table 2와 같았다.

Czapek-Dox의 경우에는 28°C에서 2주간 배양한 때에 Fusarin C의 생성량이 가장 높았으며 대체적으로 배

Table 1. The amounts of fusarin C production in liquid media

Liquid media	Fusarin C (ng/ml, 2wk/28°C)*
Czapek-Dox	29.4
MYRO	6.6
GYEP	21.45
Corn	876

\* Average of triplicate determination

Table 2. Effect of fluctuating time/temperature conditions on the production of Fusarin C by *F. moniliforme* in Czapek-Dox media

Condition of incubation	Fusarin C (ng/ml)*	
	Czapek-Dox	Corn
1 wk/28°C	36.08	379.99
2 wk/28°C	72.15	375.18
4 wk/28°C	51.47	153.92
2 wk/28°C+1 wk/11°C	23.09	355.94
2 wk/28°C+2 wk/11°C	14.43	226.07
1 wk/28°C+1 wk/11°C+1 wk/28°C	19.24	192.40

\*Average of triplicate determination.

Table 3. Effect of initial pH on the production of Fusarin C by *F. moniliforme* in Czapek-Dox media

Initial pH	Fusarin C (ng/ml)*a in Czapek-Dox
8.34*b	36.08
6.5	182.78
6.3	153.92
5.9	139.49
5.5	17.80
5.0	12.99
4.5	4.81
3.5	1.92

\*a Average of triplicate determination

\*b Original pH before adjusted.

양온도가 28°C인 때가 11°C에서 배양을 번갈아 한 것보다 다소 높게 나타났다.

옥수수 경우에는 28°C에서 1, 2주간 한 것이나 배양 온도를 28°C와 11°C로 번갈아 한 경우 모두가 Fusarin C 생성량이 유사하게 나타나 옥수수의 경우는 28°C에서 1주간 배양으로 최대의 Fusarin C 생성량을 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

### 3. 액체배지의 PH의 따른 Fusarin C의 생성량 변화

액체배지의 initial pH를 8.34에서 3.5까지 달리 한 때의 Fusarin C 생성량의 변화를 비교한 결과는 Table 3과 같다.

그 결과 액체배지의 initial pH가 6.5인 때가 가장 높았으며 6.3, 5.9인 때도 Fusarin C의 생성량이 월등히 높

게 나타나 약산성으로 한 때에 *Fusarium moniliforme*의 생육이 왕성한 것을 알 수 있었고, 이와 같은 경우는 Canada의 Farber<sup>8)</sup>들이 MYRO 액체배지에서 행한 결과와 유사하게 나타났다.

## IV. 요약

세 가지 액체배지를 사용하여 Berkeley대학 Dr. Bjeldanes Lab에서 isolate된 *F. moniliforme*를 생육시킨 결과 Czapek-Dox medium에서 Fusarin C 생성량이 가장 높았으며 옥수수에 비하면 약 1/10정도의 양인 것으로 나타났다.

그리고 Czapek-Dox medium의 경우 28°C에서 2주간 배양한 때에 Fusarin C의 생성량이 가장 많았으며 옥수수의 경우는 28°C에서 1주간 배양한 때에 가장 높았다.

또한 Czapek-Dox medium의 initial PH가 6.5인 때에 Fusarin C의 생성량이 최대이었으며 6.3, 5.9인 때도 다른 PH보다 월등히 높은 양이 생성됨을 확인할 수 있었다.

## REFERENCES

- 1) Booth, C.: "The Genus *Fusarium*" P. 11 Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, U.K. (1971).
- 2) Bjeldanes L.F., and Thomson, S.V.: "Mutagenic Activity of *Fusarium moniliforme* Isolates in the Salmonella typhirium Assay" *Appl. Environ Microbiol.* **37**: 1118-1121 (1979).
- 3) Wiebe, L.A. and Bjeldanes, L.F.: "Fusarin C, a mutagen from *Fusarium moniliforme* grown on corn" *J. Food Sci.*, **46**: 1424-1426 (1981).
- 4) Marasas, W.F.O., Wehner, F.C., Van Rensberg, S.J., and Van Schalkwyk, D.J.: Mycoflora of corn in Human Esophageal Cancer Areas in Transkey. Southern Africa" *Phytopathology*, **71**: 792-798 (1981).
- 5) Li, M. and Cheng, S.J.: "Etiology of Carcinoma of the Esophagus" In: Huang, G.J. and Wu, Y.K. (Editor) "Carcinoma of the Esophagus and Gastric Cardia" Springer Verlag., New York, P. 26-51 (1984).
- 6) FASEB NEWS, "Esophageal Cancer may result from Fungal Injection" Federation of American Societies for Experimental Biology News. (1980. 4).

- 7) Marasas, W.F.O., Kriek, N.P.J., Finchman, J.E. and Van Resenberg, S.J.: "Primary Liver Cancer and Oesophageal Basal Cell Hyperplasia in Rats caused by *Fusarium moniliforme*" *Int. J. Cancer*, **34** : 383-387 (1984 a).
- 8) Jeffrey M Farber and Gregory W. Sanders: "Fusarin C production by North American Isolates fo *Fusarium moniliforme*" Bureau of Microbial Hazards, Food Directorate Health potection Branch, Health and Welfare Canada, Tunney's pasture, Ottawa, Ontario, Canada.
- 9) Difco manual, 1984
- 10) D. Brewer, A. Feicht, and A. Taylor: "Wine illthrift in Nova Scotia, q. production of experimental quantities of isocyanide metabolites of *Trichoderma hanatum*" National Research Council of Canada, 1252-1260, (1982).
- 11) Y. Ueno, M. Sawano, and K. Ishii: "Production of Trichothecene Mycotoxins by *Fusarium* species in shake culture" *Appl. Microbiol.* **30**(1)4-8 (1975)