

오염된 곡물류(밀, 콩, 옥수수)에서 주요 진균독소 검출

정일민 · 김은영 · 백수봉 · 유승헌*
건국대학교 농업생명과학대학 식량자원학과
*충남대학교 농과대학 농생물학과
(1999. 4. 20 접수)

Detection of Major Mycotoxins from Contaminated Cereals (Wheat, Soybean and Corn)

Ill-Min Chung, Eun-Young Kim, Su-Bong Paik and Seung-Hun Yu*

Department of Crop Science, College of Agriculture and Life Science, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea

*Department of Agricultural Biology, College of Agriculture, Chungnam National University, Taejon 305-764, Korea

(Received April 20, 1999)

요 약: *Penicillium*, *Aspergillus* 및 *Fusarium*에 오염된 밀(*Triticum aestivum* L.), 콩(*Glycine max* Merr.), 옥수수(*Zea mays* L.)에서 HPLC를 이용하여 주요 독소들을 검정하였다. *Penicillium* 독소인 brefeldin A는 밀에서 3.1~270 ppm, 콩에서 45~230 ppm, 옥수수에서 1030~1240 ppm로 다량 검출되었다. Citreoviridin과 griseofulvin은 밀, 콩, 옥수수에서 각각 40~80 ppm과 3.6~26.0 ppm이 검출되었다. 그리고 citrinin과 patulin은 밀, 콩, 옥수수에서 각각 0.3~4.0 ppm과 420~3800 ppm로 검출되었고, 특히 옥수수에서 다량 검출되었다. *Aspergillus* 독소로 ochratoxin A는 밀에서 730 ppm, 콩에서 12.4 ppm, 옥수수는 310 ppm이 검출되었다.

Abstract: The major mycotoxins were detected from wheat(*Triticum aestivum* L.), soybean(*Glycine max* Merr.) and com(*Zea mays* L.), infected postharvest pathogens, *Penicillium*, *Aspergillus* and *Fusarium*. Analyses of the major mycotoxins were conducted using HPLC analysis. Detected *Penicillium* mycotoxins of infected cereals were brefeldin A with amount ranged from 3.1 to 1240 ppm, citreoviridin with amount ranged from 40 to 80 ppm, griseofulvin with amount ranged from 3.6 to 26.0 ppm, citrinin with amount ranged from 0.3 to 4.0 ppm and patulin with amount ranged from 420 to 3800 ppm. *Aspergillus* toxins of infected postharvest wheat, soybean and corn were ochratoxin A with amount of 730 ppm, 12.4 ppm and 310 ppm, respectively.

Key words: cereals, mycotoxins, postharvest, HPLC

1. 서 론

진균독소(mycotoxin)는 진균이 생산하는 2차대사산물로 인축에 여러 종류의 중독증을 일으킨다. 지금까지 350여종(species)의 진균이 생산하는 300종이 넘는 진균독소가 보고되어 있으며¹ 주요 진균독소들은 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Phoma*, *Myrothecium* 등의 대사산물로 알려져 있다.

수확 후 저장중인 곡류에서는 특히 *Penicillium*과 *Aspergillus*가 주로 보고되어 있으며 *Alternaria*와 *Fusarium*의 오염이 문제가 되기도 한다. *Penicillium*이

생산하는 진균독소로는 citreoviridin, citrinin, patulin, penicillic acid, rubratoxin 등이 잘 알려져 있고,^{2,6} *Aspergillus*가 생산하는 독소로는 aflatoxins, ochratoxins, cyclopiazonic acid 등이 유명하다.⁷⁻⁹ 한편 *Alternaria* 독소중 잘 알려진 것으로는 alternariol, alternariol monomethyl ether, tenuazonic acid 등이 있고,¹⁰⁻¹² *Fusarium* 독소로는 trichothecenes, zearalenone, fumonisins 등이 있다.¹³⁻¹⁵

독소생성균으로 오염된 곡류에서는 이 균들이 분비하는 진균독소가 검출되기도 하며 이런 곡류를 섭취할 경우 급, 만성 중독증상을 일으키게 된다. 진균독소에

의한 중독증은 영국, 미국, 러시아, 일본, 한국 등 세계 여러 나라에서 찾아볼 수 있다. 1940년대 일본에서 발생한 황변미(黃變米)사건은 외국에서 수입한 쌀에 오염된 *Penicillium*의 2차 대사산물에 의한 것이었고, 소련에서 발생하여 다수의 사망자를 초래한 식중독 무백혈구증(ATA)은 *Fusarium*균이 생성하는 trichothecenes계 대사산물에 의한 것이었으며, 1960년대 영국에서 발생한 칠면조의 집단죽음(Turkey X disease)은 *Aspergillus flavus*가 생산하는 aflatoxin에 의한 것으로 알려져 있다.¹⁶ 우리 나라에서는 1963년 *Fusarium graminearum*에 의한 맥류의 붉은곰팡이병이 심하게 발생하여 40~80%의 수확량 감소를 초래하였을 뿐 아니라 이 균에 감염된 맥류를 섭취한 사람과 동물에서 심한 중독증을 초래하여 큰 피해를 준바 있다.^{17,18} 1998년에도 맥류 출수기 전 후의 잦은 강우로 인하여 밀과 보리의 붉은곰팡이병 발생이 심하게 발생하였으므로 수확물의 *Fusarium*진균독소 오염에 관한 세심한 주의가 요구된다.

진균독소에 의한 식중독 및 중독사건은 비교적 다량의 독소를 섭취하였을 경우 나타나는 급성독성이며, 미량의 진균독소를 섭취하였을 경우 나타나는 만성독성에 관하여는 밝혀지지 않은 점이 많았다. 그러나 최근 진균독소물질의 동정, 작용기작, 분석법 및 오염실태에 관한 정보가 모아지고 분자생물학의 발전에 따른 분자역학적 해석이 발전함으로써 부분적으로 알고 있었던 여러 가지 원인불명의 장애가 진균독소 오염과 관련된 것으로 밝혀지게 되었고 진균독소의 중요성에 대한 관심이 점점 커지게 되었다.

국내에서는 보리, 옥수수 및 같은 곡류에서 분리한 *Aspergillus* 균주들의 진균독소 생성,¹⁹ *Fusarium* 균주들의 진균독소 생성에 관한 보고가 있으며,^{20,21} 최근에는 몇 종류의 농산물에서 분리한 *Alternaria* 균주들의 진균독소 생성에 관한 보고가 있으나²² 옥수수, 밀과 같은 곡류의 진균독소 오염에 관한 연구는 찾아보기 힘들다.

본 연구는 수확 후 농산물에 발생하는 *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium* 균주들이 생성한 진균독소 탐색에 관한 연구의 일환으로 수확 후 저장 및 유통 중에 오염된 밀, 콩, 옥수수에서 진균독소를 분리·동정, 그 함유량을 조사하기 위하여 실시하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 독소균주의 배양 및 접종

곰팡이에 오염된 밀(*Triticum aestivum* L.), 콩(*Glycine max* Merr.), 옥수수(*Zea mays* L.)에서 진균독소를 다량 생성하는 *Penicillium* sp. 2균주(IN 302, 303), *Aspergillus* sp. 1균주(IN 201) 그리고 *Fusarium* sp. 2균주(IN 204, 208)를 분리하여 PDA (Potato dextrose agar) 배지에서 25°C 항온기에 7일간 배양하여 106/mL농도의 포자 현탁액을 만들어 시장에서 구입한 육안으로 건전한 밀, 콩, 옥수수에 80°C 건열 멸균한 후 살포 접종하였다. 본 실험에 사용된 균주는 충남대학교 농생물학과에서 분양 받아 사용하였다.

2.2. *Penicillium* 및 *Aspergillus* 진균독소 검출

Penicillium sp. 및 *Aspergillus* sp.에 의한 밀, 콩 및 옥수수로부터 진균독소를 추출하기 위하여 오염된 곡류 시료를 50g씩 취하여 Fig. 1과 같은 방법으로 분획하여 물층과 chloroform층을 감압 농축하여 HPLC분석으로 독소를 동정, 정량 하였다.^{20,26} 분석 조건은

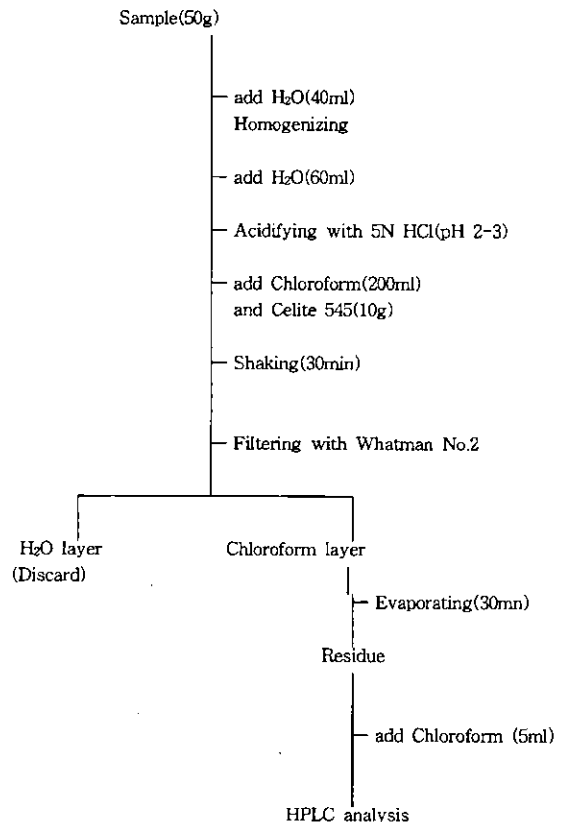


Fig. 1. The procedure to detect *Penicillium* and *Aspergillus* mycotoxins from Wheat, Soybean and Corn.

Table 1. Operating condition of HPLC for fractionation of *Penicillium* mycotoxin

Parameters	Conditions				
	Patulin	Citrinin	Griseofulvin	Citreoviridin	BrefeldinA
Column	Lichrospher 100RP-18.5 μ m (MERCK)	Lichrospher 100RP-18.5 μ m (MERCK)	Lichrospher 100RP-18.5 μ m (MERCK)	Lichrospher 100RP-18.5 μ m (MERCK)	Lichrospher 100RP-18.5 μ m (MERCK)
Mobile phase	H ₂ O-CH ₃ CN (80:20)	H ₂ O-CH ₃ CN (60:40)	H ₂ O-CH ₃ CN (60:40)	H ₂ O-CH ₃ CN (60:40)	H ₂ O-CH ₃ CN (70:30)
Flow rate	1.0 mL/min	1.0 mL/min	1.0 mL/min	1.0 mL/min	1.0 mL/min
Detector	280 nm	325 nm	325 nm	325 nm	220 nm

Table 2. Operating condition of HPLC for fractionation of *Aspergillus* mycotoxin

Parameters	Conditions
Column	Lichrospher 100 RP-18.5 μ m(MERCK)
Mobile phase	H ₂ O-CH ₃ CN(60:40)
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	325 nm

Table 1, 2와 같으며 진균독소 정량분석은 Sigma사에서 구입한 brefeldin A, patulin, citrinin, citreoviridin, griseofulvin 및 ochratoxin의 표준물질을 정량하여 chloroform에 용해시킨 용액을 stock solution으로 해서 이를 희석하여 사용하였다. 만든 용액을 각각 20 μ g씩 주입하여 chromatogram을 얻고 chromatogram으로부터 peak area을 구하여 검량선을 작성하여 사용하였다.

2.3. *Fusarium* 진균독소 검출

Fusarium sp.에 의한 밀, 콩 및 옥수수로부터 진균 독소를 추출하기 위하여 오염된 곡류 시료를 50 g씩 취하여 Fig. 2와 같은 방법으로 감압 농축하여 HPLC분석으로 독소를 동정, 정량하였다.^{9,14} 분석 조건은 Table 3과 같으며 진균독소 정량분석은 nivalenol과 zearalenone의 표준물질을 정량하여 MeOH에 용해시킨 용액을 stock solution으로 하여 위와 같은 조건으로 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

*Penicillium*에 오염된 밀, 콩, 옥수수의 진균독소 오염 여부를 HPLC로 분석한 결과 Table 4에서 보는바와 같이 brefeldin A는 retention time이 8.62 min이고 밀에서는 3.1~270 ppm, 콩은 45~230 ppm, 옥수수는 1030~1240 ppm로 다량 검출되었다. Citreoviridin과

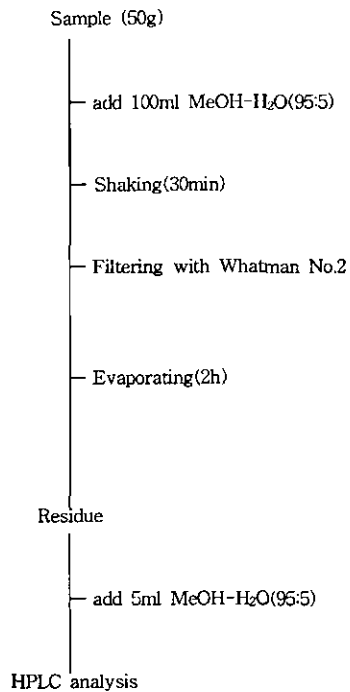


Fig. 2. The procedure to detect *Fusarium* mycotoxins from Wheat, Soybean and Corn.

Table 3. Operating condition of HPLC for fractionation of *Fusarium* mycotoxin

Parameters	Conditions
	Nivalenol(Zearalenone)
Column	VyDAC 100RP-10 260 μ m
Mobile phase	50% MeOH
Flow rate	1.0 mL/min
Detector	260 nm

griseofulvin의 retention time은 각각 9.63 min과 6.57 min이고 밀, 콩, 옥수수의 302에서는 검출되지 않

Table 4. Occurrence and content of *Penicillium* mycotoxins in sample of *Penicillium* infected cereals

Samples	Isolates number	Mycotoxin production(ppm)				
		Brefeldin A	Citreoviridin	Griseofulvin	Citrinin	Patulin
Corn	302	1240	ND	ND	<2.0	3800
	303	1030	<40	16.0	ND	ND
Soybean	302	<230	ND	ND	<4.0	1010
	303	<45	<40	26.0	ND	ND
Wheat	302	3.1	ND	ND	<0.3	420
	303	270	<80	3.6	ND	ND

* HPLC retention time ; Brefeldin A(8.62 min), Citreoviridine(9.63 min), Griseofulvin(6.57 min), Citrinin(11.47 min), Patulin(4.46 min) ND : not detected.

있고 303에서만 각각 40~80 ppm과 3.6~26.0 ppm이 검출되었다. 그리고 citrinin과 patulin의 retention time은 각각 11.47 min과 4.46 min이고 303에서는 검출되지 않았고 302에서만 각각 0.3~4.0 ppm과 420~3800 ppm로 특히 옥수수에서 다량 검출되었다.

*Penicillium*은 식품과 사료에서 흔히 분리되는 균이며 치즈와 소시지 생산에 이용하는 중요한 균²³이므로 이 균이 생산하는 진균독소에 대하여는 많은 연구가 수행되어 왔다. Citrinin은 *P. citrinum*에서 처음으로 분리되었으며 그 후 *P. expansum*과 *P. verrucosum*등에서도 생산되는 것으로 보고되었다.¹⁶ 이 독소는 식품 내에서는 비교적 불안정 하지만 강한 신장독성(nephrotoxin)이 있으며²⁴ 돼지나 개와 같은 가축과 새의 중요한 독소로 알려져 있다.^{4,18} 그러나 인간 건강에 미치는 citrinin의 중요성에 대하여는 현재로서는 평가하기 어려우나 ochratoxin과 같은 진균독소와 함께 작용할 경우⁷ 독성의 상승작용이 우려되므로 주의해야 할 것이다.

Patulin은 *P. expansum*과 *Aspergillus clavatis*의 균주가 생산하는 독소로서 폐와 뇌의 출혈을 초래하는 것으로 보고되어 있다.²⁵ 이 독소는 *Penicillium*에 오염된 사과, 배, 토마토의 열매에서 검출되었으며 가공한 사과 주스에서 수백 ppb까지 검출되기도 하였다.^{23,25} 근년 이 집트산 양파에서 citrinin의 검출에 관한 보고가 있었으며²⁶ 수확후 *Penicillium*균에 이병된 양파, 미늘 중에서 citrinin, patulin, penicillic acid 및 penicillium-G 독소가 검출되었다.²⁷ 본 연구에서도 오염된 곡류중에서 brefeldin A, citreoviridin, griseofulvin, citrinin 및 patulin 등 다양한 진균독소가 검출되었다.

*Aspergillus*에 오염된 밀, 콩, 옥수수의 진균독소 오염 여부를 HPLC로 분석한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 ochratoxin A의 retention time은 8.27 min이고

Table 5. Occurrence and content of *Aspergillus* mycotoxin in sample of *Aspergillus* infected cereals

Samples	Isolates number	Mycotoxin production (ppm)
		Ochratoxin A
Corn	201	<310
Soybean	201	12.4
Wheat	201	<730

* HPLC retention time ; 8.27 min.

Table 6. Occurrence and content of *Fusarium* mycotoxin in sample of *Fusarium* infected cereals

Samples	Isolates number	Mycotoxin production (µg)
		Nivalenol + Zearalenone
Corn	204	ND
	208	10.38
Soybean	204	ND
	208	92.47
Wheat	204	ND
	208	113.89

*HPLC retention time ; Nivalenol(3.08 min), Zearalenone (2.98 min), ND : not detected.

밀은 730 ppm, 콩은 12.4 ppm, 옥수수는 310 ppm 검출되었다. Ochratoxin A는 실험동물에서 nephrotoxicosis,²⁸ hepatogenesis²⁹ 그리고 teratogenesis를 일으키며 발효식물에서 처음 검출되었고²³ 고기와 밀크에서도 존재하는 것으로 알려져 있으나³⁰ 본 연구에서는 *Aspergillus*균에 오염된 곡류에서 ochratoxin A만 검출되어 여기에 대해 앞으로 좀 더 광범위한 연구가 수행되어야 할 것으로 사료된다.

*Fusarium*에 오염된 밀, 콩, 옥수수의 진균독소 오염 여부를 HPLC로 분석한 결과 Table 6에서 보는바와 같이 nivalenol과 zearalenone의 retention time은 각각

3.083 min과 2.983 min이고 밀, 콩, 옥수수의 208에서는 검출되었으나 204에서는 검출되지 않았다. 현재까지 80종이 넘는 *Fusarium* 진균독소가 동정되었으며 그 중 trichothecenes와 zearalenone(ZEA) 및 fumonisins등이 주요 독소로 알려져 있다.¹³ Trichothecenes계 독소는 관련 유도체를 포함하여 약 100여종에 달하고 있으나 농산물에 흔히 자연발생 하는 독소는 deoxynivalenol (DON), nivalenol(NIV), T-2 toxin, zearalenone(ZEA), fumonisins 등으로^{15,16} 이들은 세포 독성이 있고 면역억제작용, 단백질 및 DNA합성억제 작용이 있으며 동물을 치사시킬 수 있다.³¹ ZEA는 estrogenic 진균독소로서 동물에 hyperstrogonism을 유도한다. 1983년과 1984년에 수확한 국산 곡류가 NIV, DON 또는 ZEA으로 오염되어 있음을 보고하였고⁹ 우리 나라 옥수수 산지에 분리한 *Fusarium* 균주들의 진균독소생성능을 조사한 결과 DON, ZEA를 생성하는 균주가 있다고 하며²⁰ 국내에서 수집한 보리에 서 분리한 *Fusarium* 균주중에 DON과 ZEA를 생성한다고 하였다.²¹ 본 연구에서는 *Fusarium* 균에 오염된 곡류에서 한 재료는 nivalenol과 zearalenone이 검출되었다.

이상의 연구결과에서 보는바와 같이 곡물류에 *Aspergillus* sp, *Penicillium* sp, *Fusarium* sp 등이 오염되면 진균독소를 함유하게 되므로 곡물류가 미생물이 오염되지 않도록 저장, 유통과정에서 특별한 대책을 강구하여야 될 것으로 사료된다.

감사의 글

이 연구는 1997년도에 교육부 농업과학분야 거점연구소 육성사업에 의한 연구비 지원으로 수행된 연구 결과의 일부임.

참고문헌

1. V. Betina, Biological effects of mycotoxins, In : *Mycotoxins-Production, Isolation, Separation and Purification*, ed. by V. Betina, 25 (1984).
2. W. W. Carlton, G. Sansing, G. M. Szczech and J. Tuite, *Food Cosmet. Toxicol.*, **12**, 479 (1974).
3. A. A. El-Banna, J. I. Pitt and L. Leistner, *Syst. Appl. Microbiol.* **10**, 42 (1987).
4. P. Friis, E. Hasselager and P. Korgh, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **77**, 559 (1969).
5. J. C. Frisvad and O. Filtenborg, Secondary metabolites

- as consistent criteria in *Penicillium* taxonomy and a synoptic key to *Penicillium* subgenus *Penicillium*. In : *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*, eds. by R. A. Samson and J. I. Pitt, 373 (1990).
6. P. M. Scott, *Penicillium* Mycotoxins. In : *Mycotoxic Fungi, Mycotoxins, Mycotoxicoses*, Vol. 1, ed. by T. D. Wyllie and L. G. Morehouse, 283 (1977).
7. P. Krogh, B. Hald and E. J. Pedersen, *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, **81**(Section B), 689 (1973).
8. K. Lee and S. R. Lee, *Korean J. Food Sci. Technol.* **6**, 168 (1974).
9. U. S. Lee, H. S. Jang, T. Tanaka, A. Hasegawa, Y. J. Oh and Y. Ueno, *Food Addit. Contam.*, **2**, 185 (1985).
10. D. J. Harvan and R. W. Pero, *Advances in Chem. Ser.* **149**, 344 (1976).
11. J. E. Schade and A. D. Jr. King, *J. Food Prot.* **47**, 978 (1984).
12. L. M. Seitz, *Alternaria* metabolites. In : *Mycotoxins-Production. Isolation, Separation and Purification*, ed. by V. Betina, 443 (1984).
13. W. C. A. Gelderblem, P. G. Thiel, K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, R. M. Horak, R. Vleggaar and N. P. T. Kriek., *Apple. Environ. Microbiol.* **54**, 1806 (1988).
14. T. Tanaka, A. Hasegawa, Y. Matsuki, K. Ishii and Y. Ueno, *Food Addit. Contam.*, **2**, 125 (1985).
15. P. G. Thiel, F. W. O. Marasas, E. W. Sydenham, G. S. Shephard and W. T. A. Gelderblom, *Mycopathologia*, **117**, 3 (1992).
16. Y. Ueno and O. Kawamura, *Jpn. J. Toxicol. Environ. Health*, **39**, 173 (1993).
17. J. H. Chun, Republic of Korea, 385 (1963).
18. H. S. Chung, *Kor. J. Mycol.*, **3**, 31 (1975).
19. B. H. Lee, *Konkuk Haksulji*, **12**, 807 (1971).
20. Y. W. Lee, K. H. Kim and H. S. Chung *Korean J. Plant Pathol.*, **6**, 276 (1990).
21. J. G. Ryu and Y. W. Lee, *Korean J. Plant Pathol.*, **6**, 21 (1990).
22. H. B. Lee and S. H. Yu, *Korea J. Plant Pathol.*, **11**, 1 (1995).
23. A. E. Pohland, Mycotoxins in review. *Food Addit. Contam.*, **10**, 17 (1993).
24. J. E. Smith and M. O. Moss, In: *Mycotoxins-Formation, Analysis and Significance*. Chichester, J. Wiley. (1985).
25. G. Blunden, O. G. Roch, D. J. Rogers, R. D. Coker, N. Bradburn and A. E. John, *Medical Lab. Sciences*, **48**, 271 (1991).
26. A. Zohri, S. M. Saber and Abded-Gawa, *Korean Mycol.*, **20**, 302 (1992).
27. I. M. Chung, H. J. Ju, S. C. Sim, S. B. Paik and S. H. Yu, *Analytical Science and Technology.*, **11**(3), 201

- (1998).
28. P. Krogh, B. Hald, R. Plestina and S. Ceovic. *Acta. Path. Microbiol. Sect. B.*, **85**, 238 (1977).
29. G. N. Szczech, W. W. Carton and J. Tuite, *Vet. Pathol.* **10**, 347 (1973).
30. F. E. Escher, P. E. Koehler and J. C. Ayres., *Appl. Microbiol.* **26**, 27 (1973).
31. J. H. Forsell and J. J Pestka, *Appl. Environ. Microbiol.*, **50**, 1304 (1985).