

영남지방 농산물에서의 Zearalenone 생성균의 분리

김성영 · 정선희 · 정덕화
경상대학교 식품공학과

Isolation of the Zearalenone-Producing Strains from Agricultural Products in Youngnam Districts

Sung-Young Kim, Sun-Hee Chung and Duck-Hwa Chung

Department of Foods Science and Technology, Gyeongsang National University

Abstract

To isolate zearalenone-producing strains from agricultural products in Youngnam districts, various samples such as rice(60), barley(52), soybean(45), peanut(33), corn(32), maeju(27), unhulled rice(UR, 40), unhulled barley(UB, 54), and soil(32) collected. From 375 samples, 302 *Fusarium* strains were isolated. The isolated strains were cultured for 14 days at 30°C in rice medium, and then screened zearalenone-producing strains by TLC and HPLC. The result was that 29 isolates [rice(3), maeju(2), corn(1), barley(5), soil(4), peanut(3), soybean(4), U.B.(5), U.R.(2)] were screened as zearalenone-producing strains by TLC, while 19 isolates [rice(2), maeju(1), corn(1), barley(4), soil(3), soybean(2), U.B.(3), U.R.(3)] by HPLC method.

Key words: zearalenone, Youngnam Districts, *Fusarium*

서 론

최근 세계 여러나라에서 식품 및 사료의 오염원으로 대두되고 있는 mycotoxin의 일종인 zearalenone [6-(10-hydroxy-6-oxo-trans-1-undecenyl)- β -resorcylic acid lactone]은 *Fusarium*속 곰팡이가 생산하는 2차 대사산물로서 분자량이 318인 흰 결정체이며⁽¹⁻⁷⁾, 또한 UV 영역에서 푸른 형광성을 나타내며 유도물질로는 α -zearalenol, β -zearalenol, α -zearalanol 및 β -zearalanol 등이 대표적으로 알려져 있고⁽⁸⁻¹⁰⁾, 옥수수, 밀, 쌀, 우유 그리고 땅콩 등과 같은 농산물에 널리 오염될 가능성이 보고되고 있다⁽¹¹⁻¹⁵⁾. 이러한 zearalenone은 사료와 식품의 오염원이 되어 포유동물의 생산체계에서 발정효과(estrogenic effects)를 일으키며 돼지와 같은 동물들의 경우 zearalenone을 과잉 섭취하면 과에스트로젠증(hyperestrogenism)이 유발되어 그 결과 자궁확대, 불임증 및 유선확대 등의 증후를 나타낸다고 보고된 바 있다^(16,17). Zearalenone을 생성하는 *Fusarium*속 중에는 *Fusarium roseum*, *Fusarium graminearum*(*Gibberella zeae*) 및 *Fusarium tricinctum* 등이 있으며⁽¹⁸⁻²⁰⁾, Mirocha 등⁽¹⁶⁾에 의하면 밀과 쌀이 대두에 비해 *Fusarium*속 균의 zearalenone 생성에 좋은 배지가 되며 특히 곡류 저장 중에

*Fusarium*속의 오염과 더불어 zearalenone 축적 가능성이 높다고 보고한 바 있다. 우리나라의 경우도 고온다습하고, 특히 곡류를 주식으로 하는 것을 고려해 볼 때 곡류나 사료에의 이들 유해 *Fusarium*속 균 및 zearalenone 오염을 배제할 수 없지만 아직도 국내에서의 zearalenone에 대한 연구나 대책에 관한 자료는 대단히 부족한 실정이다. 따라서 본 연구자는 영남지방으로부터 쌀, 보리 등의 각종 곡류 375점을 수거하여, 이를 균원 시료로 먼저 *Fusarium*속 균주를 분리하고, 이들 분리균의 zearalenone 생성여부를 TLC 및 HPLC법으로 검색하여 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

Zearalenone 생성균주 분리를 위한 실험재료는 1989년부터 1990년까지 영남지방에서 Table 1과 같이 쌀, 메주, 옥수수, 보리, 토양, 땅콩, 대두 및 버 등으로부터 일정량씩 모두 375점을 sampling하여 4°C에 보관하면서 균원시료로 사용하였다.

배지조성

본 실험에 사용된 배지는 균 분리를 위하여 rose-bengal agar 배지를 사용하였으며, 특히 균 분리시에 세균과 효모의 성장을 억제하기 위해 rose-bengal을 약 35 mg/l 첨가하였고 배지의 pH는 5.6으로 조정하여 살균(121°C,

Corresponding author: Duck-Hwa Chung, Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju, Gyeongnam 660-701, Korea

Table 1. Location of sampling site and source of samples for the isolation of zearalenone-producing strains

Source	Total	Location ¹⁾
Rice	60	A(7) B(8) C(8) D(7) E(8) F(7) G(7) H(8)
Maeju	27	A(4) B(4) C(2) D(2) E(4) F(4) G(4) H(3)
Corn	32	A(4) B(4) C(4) D(4) E(4) F(4) G(4) H(4)
Barley	52	A(7) B(6) C(6) D(6) E(6) F(7) G(7) H(7)
Soil	32	A(4) B(4) C(4) D(4) E(4) F(4) G(4) H(4)
Peanut	33	A(5) B(3) C(4) D(4) E(4) F(5) G(4) H(4)
Soybean	45	A(6) B(5) C(6) D(5) E(6) F(6) G(6) H(6)
Unhulled Barley	54	A(7) B(7) C(7) D(7) E(7) F(7) G(7) H(7)
Unhulled Rice	40	A(5) B(5) C(5) D(5) E(5) F(5) G(5) H(5)
Total	375	

¹⁾A: Sangju, B: Porhang, C: Andong, D: Kimchun, E: Chinnju, F: Ulsan, G: Hamyang, H: Masan. Values in parentheses present number of sample obtained from district.

Table 2. Composition of the rose-bengal agar medium used for the isolation of *Fusarium* spp.¹⁾

Peptone	5g
Bacto Dextrose	10g
KH ₂ PO ₄	1g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5g
Rose Bengal	0.035g
Agar	20g
Distilled Water	1 l

¹⁾pH was adjusted to 5.6 at 25°C

15분) 후 사용하였다. 곰팡이를 순수분리 및 보존하기 위해서 potato dextrose agar(PDA) 배지를 사용하였고, 고체배지는 백미를 12시간 실온에서 증류수에 침지한 후 살균하여 사용하였다. 각각의 배지조성은 Table 2, 3에 나타낸 바와 같다.

균의 분리

각 시료 1g과 멸균수 10 ml을 test tube(20 cm×18 mm)에 넣은 후 tube mixer로 교반하여 200 μl를 취해 rose bengal agar plate에 분주 도말한 후 30°C에서 3~4일간 배양하여 외형상 *Fusarium*속으로 추정된 균주를 선별했다. *Fusarium*속으로 추정된 균주를 PDA 배지상에 접종하여 30°C에서 3일간 배양시켜 단일 colony로 순수 분리한 다음 분리된 균을 PDA 사면배지에 접종, 배양한 후 4°C에 보존하면서 실험에 사용하였다.

배양방법

분리균의 zearalenone 생성여부를 검색하기 위한 배양방법은 침지시킨 쌀 5g씩을 시험관(200×18 mm)에 첨가하고 살균(121°C, 15 min)시킨 다음 무균적으로 접종하여 30°C에서 14일간 배양하여 실험에 사용하였다.

Table 3. Composition of the PDA medium used for the subculture¹⁾

Peptone	200g
Dextrose	20g
Yeast Extract	5g
Agar	15g
Distilled Water	1 l

¹⁾pH was adjusted to 5.6 at 25°C

Table 4. Operating condition of HPLC for zearalenone analysis

Items	Conditions
Instrument	Water associate, Inc. Model 600E multisolvent system Model U6K septum-less injector Model 484 tunable absorbance detector
Column	μ Bondapak C18 steel column(reversed phase)
Solvent	Methanol: Water (65:35)
Flow rate	1.2 ml/min
Chart speed	0.5 cm/min
Injection volume	4 μl

Zearalenone의 분석

분리균의 zearalenone의 생성유무를 확인하기 위해 14일간 배양한 고체배양물을 살균(121°C, 30 min)하고 70% MeOH 5 ml을 첨가하여 homogenizer(International 제, Model S-HO)로 마쇄한 후 교반(80 rpm, 30 min.)하여 하룻동안 방치시켜 MeOH층을 분리하고, 4°C에서 보관하면서 실험에 사용하였다. 추출물의 TLC는 먼저 추출물을 TLC plate에 spotting한 다음 CHCl₃: MeOH (97:3, v/v) 혼합액을 전개용매로 하여 전개하고, AlCl₃ 용액(75% ethanol 100 ml에 20g AlCl₃ 용해)으로 spray시켜 365 nm의 UV하에서 관찰하였으며, 대조구로서는 표준 zearalenone을 사용하여 전개시킨 후 표준 zearalenone과 같은 Rf치의 chromatogram을 비교한 후 zearalenone 생성여부를 1차 검색하였다.

한편, HPLC에 의한 zearalenone 생성균주 선별을 위해서는 TLC에서와 같이 고체배양을 하여 얻은 추출액을 millipore filter(0.5 μm, FH type)로 여과한 여액을 HPLC용 시료로 Holder 등⁽⁹⁾의 방법에 의해 Table 4와 같은 HPLC 조건으로 zearalenone 생성여부를 시험하였다.

결과 및 고찰

*Fusarium*속의 분리

영남지방에서 채취한 시료를 PDA 배지에서 순수분리한 결과 Table 5와 같이 총시료 375점에서 *Fusarium*속 302주를 분리하였으며, 이 결과는 균원시료에서 80.5%의 오염율을 나타내었다. 균 분리시 육안으로 확인된 균만

Table 5. Number of *Fusarium* spp. isolated from sample sources

No. of sample	No. of isolated strains
375	302

Table 6. The distribution of zearalenone-producing strains of *Fusarium* spp. by TLC and HPLC

Source of sample	No. of samples	No. of isolated strains	No. of strains by TLC	No. of strains by HPLC
Rice	60	28	3	2
Maeju	27	14	2	1
Corn	32	13	1	1
Barley	52	42	5	4
Soil	32	40	4	3
Peanut	33	18	3	0
Soybean	45	15	4	2
Unhulled Barley	54	62	5	3
Unhulled Rice	40	70	2	3
Total	375	302	29	19

순수분리하였기 때문에 실제로는 오염율이 더 높은 것으로 생각된다.

Walter⁽²¹⁾ 등도 Africa의 Transkei 공화국 남서지방의 옥수수에서 *Fusarium*속을 분리하여 mycotoxin 생성균을 검색한 결과 zearalenone과 deoxynivalenol을 생성하는 *Fusarium moniliforme* var. *subglutinans*와 *Fusarium graminearum* 및 *Fusarium verticillioides* 등 세 균주를 보고하였는데 분리장소와 분리시료 등에 따라 그 결과가 다양하게 나타날 것으로 생각된다.

Zearalenone 생성균주의 검색

분리균의 zearalenone 생성능을 조사하기 위해 고체 배지에서 실험방법대로 배양한 다음 처리하여 TLC 분석용 시료로 얻었다. 시료의 TLC 분석에 앞서 우선 양호한 TLC 조건을 확정하기 위해 전개용매와 발색방법을 달리하여 표준 zearalenone으로 TLC를 행한 결과 chloroform : methanol(97 : 3, v/v) 혼합액을 전개용매로 했을 때 가장 형광성이 크게 나타났고, 그 때의 Rf치는 0.67이었으며 toluene : ethylacetate : chloroform(100 : 50 : 50), diethylether : cyclohexane(3 : 1), toluene : ethyl acetate : formic acid(60 : 40 : 0.5)의 전개용매로 전개시켰을 때 각각의 Rf값은 0.55, 0.65, 0.75로 나타났으나 형광성의 정도가 chloroform : methanol(97 : 3, v/v) 혼합액보다 낮게 나타났다.

이 때 전개된 spot를 그대로 관찰하는 것 보다는 20% AlCl₃ 용액을 spray 했을 때 형광성이 크게 나타나 이후의 실험에서 발색제로 사용하였다. 한편 Kamimura

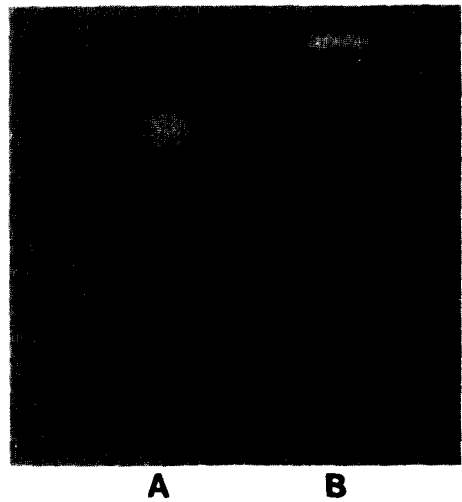


Fig. 1. TLC chromatogram of standard zearalenone and extract from incubated medium (R-5)

A: standard zearalenone, B: extract of medium (R-5)

등⁽²⁰⁾도 여러가지 전개용매를 사용하여 mycotoxin인 zearalenone, T-2 toxin, nivalenol과 deoxynivalenol 등의 Rf치, UV하에서 색깔 및 형태를 비교 검토하여 본 실험에서와 비슷한 경향의 결과를 얻었고, Gimeno 등⁽¹¹⁾과 Takeda 등⁽²²⁾도 여러가지 TLC 조건을 실험한 결과 20% AlCl₃을 발색제로 사용할 때 보다 선명한 푸른 형광성을 나타낸다고 보고했다. 따라서 위에서 얻은 조건으로 분리균의 배양물을 TLC로 분석한 chromatogram은 Fig. 1과 같이 나타났다. A는 표준 zearalenone의 chromatogram이며, B는 쌀에서 분리한 R-5를 배양시켜 추출한 배양추출물의 TLC chromatogram으로서, R-5 배양물(B)에서 Rf치가 A와 같은 지점에서 푸른형광성을 나타내어 zearalenone 생성균으로 1차 screening 하였다.

한편 쌀배지에 분리균을 접종하여 30°C에서 14일간 배양한 후에 methanol의 5 ml로 추출한 추출액을 millipore filter(0.5 µm, FH type)로 여과하고, 4 µl의 여과액을 HPLC용 시료로 분석하였다. 표준 zearalenone의 HPLC chromatogram은 Fig. 2와 같으며, 각 시료의 HPLC chromatogram에서 peak 1의 유무에 따라 zearalenone 생성균주를 선별하였다.

이상에서 얻은 TLC 및 HPLC 방법을 토대로 분리한 *Fusarium*속 곰팡이를 고체배지에서 배양한 후 배양물에서의 zearalenone 생성여부를 조사한 결과는 Table 6과 같았다. 즉, 총 302주의 *Fusarium*속 균 중 TLC에서 29주가 검색되었으나, HPLC 분석결과 29주 중 19주만이 zearalenone 생성균주로 나타났다. 이러한 결과는 TLC 상에서 표준 zearalenone과 Rf치가 비슷한 색소 중의 대사산물이 잘못 판단되었다가 HPLC에서 확인되었기 때문이라고 사료된다.

본 실험의 결과로 미루어 보아 외국에서와 마찬가지로

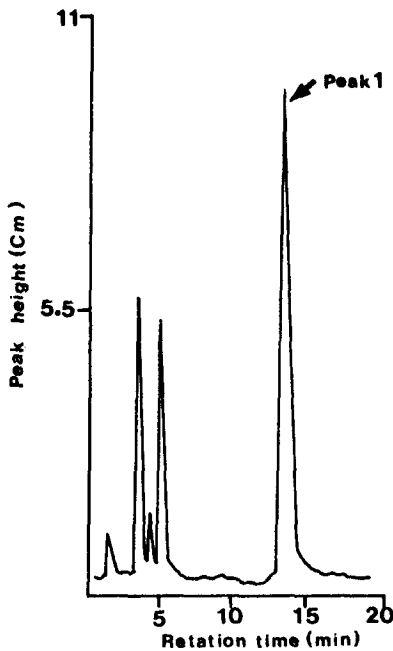


Fig. 2. High performance liquid chromatogram of standard zearalenone (Peak 1)

우리나라에서도 곡류 및 토양에서 *Fusarium* 독소인 zearalenone 및 zearalenone 생성균주가 오염되어 있다고 생각되며, 이를 위해서는 TLC와 HPLC 등의 종래의 zearalenone 등의 mycotoxin 분석방법이 추출과 정제에 많은 시간과 유기용매가 소비되고 넓은 공간, 많은 기구 그리고 전문인력을 필요로 하여 경제성이 없을 뿐만 아니라 처리과정에서 안전성 문제가 수반되기 때문에 보다 더 안전하고, 신속하게 zearalenone을 검색하는 방법이 모색되어야 하며 특히 곡류를 주식으로 하며, 이들 곰팡이의 생육조건과 비슷한 환경을 가진 우리도 이 분야에 대한 활발한 연구와 오염대책의 수립이 절실히 필요하다고 사료되는 바이다.

요 약

영남지방으로부터 백미(60), 보리쌀(52), 대두(45), 땅콩(33), 옥수수(32), 메주(27), 벼(40), 보리(54) 및 토양(32) 등 총 375종의 시료를 수거하여 *Fusarium*속으로 추정된 균주를 분리하고, 분리균을 고체배지에 접종하여 배양(14일, 30°C)한 후에 zearalenone 생성균주를 선별한 결과는 다음과 같다.

375종의 시료에서 302주의 *Fusarium*속을 분리하였고, 분리된 302주를 고체배지에서 배양한 다음 TLC와 HPLC법에 의해 zearalenone 생성균주를 선정하였다. TLC 결과에서 zearalenone 생성균주는 29주 [쌀(3), 메주(2), 옥수수(1), 보리쌀(5), 토양(4), 땅콩(3), 대두

(4), 보리(5) 그리고 벼(2)]로 나타났으나, HPLC 분석 결과 19주 [쌀(2), 메주(1), 옥수수(1), 보리쌀(4), 토양(3), 대두(2), 보리(3) 그리고 벼(3)]가 zearalenone 생성균주로 확인되었다.

문 헌

1. Blaney, B.J. and Dodman, L.: Production of the mycotoxins zearalenone, 4-deoxynivalenol and nivalenol by isolates of *Fusarium graminearum* group 1 and 2 from cereals in queensland. *J. Agric. Res.*, **39**, 21(1988)
2. Ware, G.M. and Thorpe, C.W.: Determination of zearalenone in corn by high pressure liquid chromatography and fluorescence detection. *J. AOAC.*, **61**, 1058 (1978)
3. Tanaka, T., Hasegawa, A. and Sugiura, Y.: Worldwide contamination of cereals by *Fusarium* mycotoxins nivalenol, deoxynivalenol, and zearalenone. I. survey of 19 countries. *J. Agric. Food Chem.*, **36**, 979(1988)
4. Royabal, J.E., Zmunns, R.K. and Shimoda, W.: Determination of zearalenone/zearalenone and their metabolites in edible animal tissue by liquid chromatography with electrochemical detection and confirmation by gas chromatography/mass spectrometry. *J. AOAC.*, **71**, 263(1988)
5. Ueno, Y., Tanaka, T. and Xu, D.D.: Deoxynivalenol, nivalenol and zearalenone in scabby wheat from Shanghai, China. *J. Food. Hyg. Soc. Japan*, **27**, 180(1985)
6. Renee, W.B., Jean, A. and Ware, G.M.: Liquid chromatographic determination of zearalenone and zearalenol in animal feeds and grains, using fluorescence detection. *J. AOAC.*, **69**, 894(1986)
7. Ueno, Y., Ishii, K. and Enomoto, M.: Toxicological approaches to the metabolites of *Fusaria*(V). *Jpn. J. Exp. Med.*, **42**, 187(1972)
8. Scott, P.M. and Lawrence, G.A.: Liquid chromatographic determination of zearalenone and α - and β -zearalenols in milk. *J. AOAC.*, **71**, 1176(1988)
9. Holder, C.L., Nony, C.R. and Bowman, M.C.: Trace analysis of zearalenone and or zearalenol in animal chow by high pressure liquid chromatography and gas-liquid chromatography. *J. AOAC.*, **60**, 272(1977)
10. James, L.J., Mcgirr, L.G. and Smith, T.K.: High pressure liquid chromatography of zearalenone and zearalenol in rat urine and liver. *J. AOAC.*, **65**, 8(1982)
11. Gimeno, A.: Rapid thin layer chromatographic determination of zearalenone in corn, sorghum and wheat. *J. AOAC.*, **66**, 565(1983)
12. Mirocha, C.J., Beth, S. and Pathre, S.V.: Isolation, detection and quantitation of zearalenone in maize and barley. *J. AOAC.*, **57**, 1104(1974)
13. Egon, B., Josefsson, G. and Moller, T.E.: Screening method for the detection of aflatoxins, ochratoxin, patulin, sterigmatocystin and zearalenone in cereals. *J. AOAC.*, **60**, 1369(1977)
14. Larry, M.S. and Mohr, H.E.: Simple method for simultaneous detection of aflatoxin and zearalenone in corn. *J. AOAC.*, **59**, 106(1976)
15. Tanaka, T., Hasegawa, A. and Ueno, Y.: Co-contamina-

- tion of the *Fusarium* mycotoxins, nivalenol, deoxynivalenol and zearalenone, in scabby wheat grains harvest in Hokkaido, Japan. *J. Food Hyg. Soc. Japan*, **26**, 510(1985)
16. Mirocha, C.J., Pathre, S.V. and Christensen, C.D.: Zearalenone, p.345-364. In J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine and M.A. Mehlman(eds.) Mycotoxins in human and animal health. Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, IL. (1977)
 17. Hagler, W.M., Mirocha, C.J. and Behrens, J.C.: Identification of the naturally occurring isomer of zearalenol produced by *Fusarium roseum* 'Gibbosum' in rice culture. *Appl. Environ. Microbiol.*, **37**, 849(1979)
 18. Janice, S.D. and Bu'lock, D.: Degeneration of zearalenone production in *Fusarium graminearum*. *Experimental Mycology*, **9**, 133(1985)
 19. Combrinck, S., Gelderblom, W.C. and Marasas, F.O.: Isolation and characterization of trichothecin from corn cultures of *Fusarium graminearum* MRC 1125. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 1700(1988)
 20. Kamimura, H., Nishijima, M., Yasuda, K. and Naoi, Y.: Simultaneous detection of several *Fusarium* mycotoxins in cereals, grains and foodstuffs. *J. AOAC.*, **64**, 1067(1981)
 21. Walter, F., Marasas, O. and Marocha, C.J.: Incidence of *Fusarium* species and the mycotoxins, deoxynivalenol and zearalenone, in corn produced in esophageal cancer areas in Transkei. *J. Agric. Food Chem.*, **27**, 1108(1979)
 22. Takeda, Y., Isohata, E., Amano, R. and Uchiyama, M.: Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains. *J. AOAC.*, **62**, 573(1979)
-
- (1992년 10월 5일 접수)