

## 嶺南地方 穀類로부터 Ochratoxin A 生成菌의 分離에 관한 研究

김동술 · 정덕화\* · 조태웅\* · 여명재\* · 강진순\*\*

국립보건원 미생물부, \*경상대학교 식품공학과, \*\*진주전문대학

## Study on the Isolation of Ochratoxin A—Producing Strains from Agricultural Products in Youngnam Districts

Dong-Sul Kim, Duck-Hwa Chung, Tae-Woong Cho,  
Myeong-Jai Yea and Jin-Sun Kang

Department of Microbiology, National Institute of Health, \*Department of Food Science and Technology,  
Gyeongsang National University, \*\*Jinju Junior College

### ABSTRACT

To isolate the ochratoxin A producing strains from agricultural products and soil in Youngnam districts, rice (37), unhulled rice (10), barley (20), unhulled barley (3), corn (21), soil (26), meju (25), malt (8), soybean (26) and peanut (15) were collected from homes and markets of Youngnam districts through September 1992 to November 1992. 187 strains of *Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp. were isolated from 191 samples. As a result of screening by TLC, 36 strains expressed fluorescent spot and a same Rf value of standard ochratoxin A, and 9 strains of them were identified as ochratoxin A producing strains by HPLC.

**Keywords :** Ochratoxin A, *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., Strain.

### I. 서 론

Ochratoxin A는 주로 신장 및 간에 치명적인 손상을 주어 급성 지방변성을 일으키고<sup>1,2)</sup> 간의 glyco-  
gen합성효소를 저해하며 특히 면역작용을 저해하여  
사람에서 Balkan endemic nephropathy 등의 만성  
질환을 일으키는 nephrotoxin으로<sup>3,5)</sup> 그 종류는  
ochratoxin A, ochratoxin B, ochratoxin C, 4-hy-  
droxy-ochratoxin A, mellein, 및 4-hydroxymellein  
등으로 현재까지 17종의 유도체가 알려졌으며<sup>6)</sup> 그  
중에서 독성이 가장 강력한 것은 ochratoxin A이다.

Ochratoxin A는 남아프리카의 곡류와 콩과식물  
로부터 분리된 곰팡이의 독성을 조사하는 과정에서  
오리, 쥐 등의 치사요인 물질로 확인되었<sup>7,8)</sup> 이를  
생성하는 곰팡이는 *Aspergillus ochraceus*, *A. mel-  
leus*, *A. sclerotiorum*, *A. alliaceus*, *A. ostianus*, *A.  
petrakii* 등과 *Penicillium viridicatum*, *P. palitans*,

*P. commune*, *P. variabile*, *P. purpurescens*, *P. cyclo-  
pium* 등으로 밝혀졌다.<sup>9,10)</sup>

Ochratoxin A의 생성에 영향을 미치는 요인<sup>11)</sup>으  
로는 기질의 온도, 기질수분의 활성도, pH 및 곰팡  
이의 종류를 들 수 있으며 *Penicillium*속의 곰팡이는  
4°C, 수분활성도는 0.83~0.87이상에서, *Aspergillus*  
속은 12°C, 수분활성도 0.83~0.86이상에서 ochra-  
toxin A를 생성할 수 있으며, ochratoxin A 생성을  
위한 최적의 조건은 *Penicillium*속은 24°C, 수분활  
성도 0.99이며, *Aspergillus*속은 31°C, 수분활성도  
0.99이다.<sup>12)</sup>

곡류중에 ochratoxin A가 처음 발견된 것은 1963  
년 미국에서 시판되고 있는 옥수수 사료였으며, 이때  
오염농도는 110~150 ppb 정도였다. 그 이후 캐나다  
에서도 ochratoxin A가 함유된 밀 19건이 발견되  
었으며, 오염수준은 30 ppm이었으며 덴마크에서 33  
건의 보리에서 57.5%인 19건에서 ochratoxin A의

오염이 확인되었고 덴마크와 스웨덴에서 신장질환을 앓고있는 돼지의 장기 등에서 ochratoxin A가 검출되었다. 또한 발칸풍토성 질환이 만연되어 있는 유고슬라비아 지방에서 생산된 736점의 곡류와 32점의 빵을 분석한 결과 곡류에서 8.7%와 빵에서 18.8%의 ochratoxin A가 검출되었다. 이때 오염된 곡류의 33%가 100 µg/kg이상이었다. 따라서 발칸풍토성 신장독은 ochratoxin A에 오염된 식품을 섭취함으로써 기인되는 것으로 보고되고 있다.<sup>13,14)</sup>

최근 세계 각국에서는 농산물을 비롯한 식품에서의 mycotoxin오염문제를 중요하게 취급하고 이에 대한 법적 허용규제한도를 설정하여 농산물 등에 ochratoxin에 대한 오염여부를 엄격히 검색하고 있으나 우리나라의 경우는 aflatoxin B<sub>1</sub>에 대한 잠정 허용기준 이외에는 미흡한 편이다. 조만간 우루과이라운드의 한 분야인 위생 및 동·식물 검역 규제안(Sanitary and Phytosanitary Restrictions : SPSR)이 체결될 경우 수입농산물의 완전 개방화로 인해 다종다량의 농산물이 수입됨에 따라 오염농산물의 수입이 늘어날 소지가 있으므로 이에 대한 법적규제와 검색업무를 위한 제도적 장치가 요구된다. 이를 위해서는 무엇보다도 체계적인 연구결과가 뒷받침되어야 한다.

따라서 본 연구는 영남지방의 곡류중 ochratoxin A의 생성균주 검색과 오염현황을 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재 료

Ochratoxin A 생성균주를 분리하기 위하여 1992년 9월부터 11월 사이에 함양, 김천, 상주, 안동 및 포항 등의 5개 지역으로부터 쌀을 비롯한 10 종류의 시료에서 총 191점의 균원시료를 Table 1과 같이 수거하여 실험에 사용하였다.

### 2. 배지조성

본 실험에 사용된 배지는 시료로부터 곰팡이 부리를 위해 rose bengal agar배지(Difco Laboratories, Detroit, USA)를 사용하였으며, 이때 세균과 효모의 성장을 억제하고 곰팡이만을 선택적으로 자라게 하기 위한 목적으로 rose bengal을 35 mg/l 첨가하였다. 그리고 곰팡이의 순수분리와 계대배양을 위해서는 potato dextrose agar(PDA) 배지(Difco)를 사용하였으며, 본 배양에는 YES(yeast extract sucrose) broth를 사용하였다. 모든 배지는 멸균(121°C,

**Table 1.** Sample sources for screening of ochratoxin A-producing strains from Youngnam district

Area source	Ham-yang	Kim-chun	Sang-ju	An-dong	Po-hang	To-tal
Rice	9	6	9	8	5	37
Unhulled rice	1	1	6	1	1	10
Barley	4	4	3	5	4	20
Unhulled barley	1	—	—	1	1	3
Corn	3	4	6	5	3	21
Soil	5	5	6	5	5	26
Meju	3	5	5	5	7	25
Malt	1	3	2	2	—	8
Soybean	7	5	6	7	1	26
Peanut	2	7	2	3	1	15
Total	36	40	45	42	28	191

**Table 2.** The composition of rose-bengal medium\*

Glucose	10	g
Peptone	5	g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1	g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.5	g
Rose-bengal	35	mg
Agar	15	mg
Tetracycline	35	mg
Distilled water	1	l

\*Initial pH of the medium was 5.2.

**Table 3.** The composition of modified PDA medium\*

Potatoes	200	g
Bacto-dextrose	20	g
Bacto-agar	15	g
Yeast extract	50	g
Distilled water	1	l

\*Initial pH of the medium was 5.5.

**Table 4.** The composition of modified YES medium\*

Yeast extract	20	g
Sucrose	200	g
Distilled water	1	l

\*Initial pH of the medium was 5.5.

1 kg/cm<sup>2</sup>, 15 min)하여 사용하였으며, 그 배지조성은 Table 2~4와 같다.

### 3. 방 법

1) 균주분리 및 분리균의 배양

시험관(18×200 mm)에 증류수 10 ml와 시료 1g

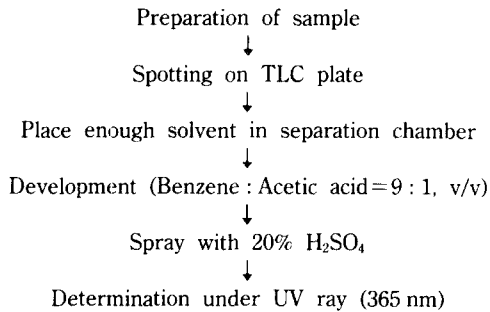


Fig. 1. Analytical method of ochratoxin A by TLC.

Table 5. Conditions of HPLC for determination of ochratoxin A

Items	Conditions
Instrument	Pharmacia, LCC2252, Sweden
Column	S5 ODS2
Flow rate	1 ml/min
Mobile phase	Acetonitrile + water + acetic acid (99+99+1)
Pressure	1.0×10 <sup>5</sup> Pa
Detector	Fluorescence detector (EX 333 nm, EM 418 nm)

을 취하여 시험관 교반기로 혼합한 후 혼합액 200  $\mu$ l를 rose-bengal agar 평판배지에 분주하여 도말한 후 28°C에서 4일간 배양하였다. 평판배양 후 colony의 모양, 크기 및 색깔 등을 관찰하여 *Aspergillus* spp.과 *Penicillium* spp.로 추정되는 균주를 선정하여 PDA 평판배지에의 분리를 반복하면서 단일 집락을 PDA 사면배지에 접종시킨 후 4°C에 보관하면서 실험에 사용하였다.

또한 분리균의 ochratoxin A 생성여부를 검색하기 위해 시험관(15×150 mm)에 YES broth를 6 ml 첨가하여 멸균(121°C, 1 kg/cm<sup>2</sup> 15 min)한 후 분리된 균주를 무균적으로 접종하여 28°C에서 14일간 정지배양 하였다.

2) TLC법에 의한 ochratoxin A 생성균주의 선별 배양이 끝난 배지를 멸균한 후 균체를 제거하고 AOAC(Association of Official Analytical Chemistry)법에 준하여 배지 동량의 ethyl acetate를 첨가하고 강하게 흔들여 섞은 다음 하룻밤 방치하여 유기용매층을 취하여 speed vacuum concentrator에서 농축하였다. 다시 일정량의 ethyl acetate에 용해시켜 TLC를 행하였다. 추출액과 ochratoxin A를 각각 20  $\mu$ l씩을 취하여 미리 준비한 TLC plate에 spotting한 다음 benzene + acetic acid(9 + 1, v/v) 혼합액의 전개용매를 사용하여 전개시킨 후 plate를 100~110°C 건조기에서 5분 동안 건조시킨 후 20% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 용액으로 발색시켜 장파장의 자외선(UV, 365 nm)하에서 검색하였다. 즉, 표준 ochratoxin A의 Rf치와 형광유무를 비교하여 1차 선별하였으며, 이상의 과정을 요약하면 Fig. 1과 같다.

3) HPLC법에 의한 ochratoxin A 생성균주의 선별 한편, TLC방법에 의해 1차 검색된 시료는 HPLC법에 의한 확인을 거쳤다. 즉, 추출된 배양물을 다시 TLC하여 표준 ochratoxin A로 추정되는

band만을 잘라 ethyl acetate에 용해시켜 speed vacuum concentrator에서 농축시킨 후 HPLC 이동상인 acetonitrile + water + acetic acid(99+99+1)에 재용해시켜 millipore filter에 여과한 다음 여액을 HPLC에 주입하여 표준 ochratoxin A와 비교 확인하였다. 그때의 HPLC 조건은 Table 5에서 보는 바와 같다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. Ochratoxin A 생성균주의 검색

1) *Aspergillus*속 및 *Penicillium*속 곰팡이의 분리 자연계로부터 ochratoxin A 생성능이 강한 균주를 얻기 위하여 영남지방의 함양군, 김천군, 상주군, 포항시 일원에서 수집한 쌀, 옥수수, 보리, 메주, 콩, 땅콩, 토양 등의 균원시료 총 191점으로부터 ochratoxin A 생성균주의 검색을 광범위하게 하였다. 균의 분리에 있어서는 먼저 균원시료의 균을 PDA 평판배지에 분리, 배양한 후 *Aspergillus*속 및 *Penicillium*속으로 추정되는 colony를 취하여 순수분리하였고, 분리된 균에 대한 동정은 slide culture를 통하여 conidiogenesis 위주로 Barron<sup>15)</sup>의 분류법으로 하였으며 분리된 동정균은 다시 Pitt<sup>16)</sup>와 Kendrick<sup>17)</sup>의 분류 방법으로 재확인한 결과 *Aspergillus*속 및 *Penicillium*속 187종의 곰팡이를 얻었다.

#### 2) Ochratoxin A 생성균주의 검색

분리된 *Aspergillus*속 및 *Penicillium*속을 YES (yeast extract sucrose) broth에 배양하여 AOAC법에 따라 전처리하고 TLC를 행한 후 Rf값으로 보아 ochratoxin A와 유사한 형광물질을 생성하는 균주를 조사한 결과 Table 6에서 보는 바와 같이 분리된 187균주 중 19.3%인 36균주가 분리되었다. TLC법으로 확인된 36균주를 HPLC법으로 재확인한 결과

**Table 6.** The distribution of *Aspergillus* and *Penicillium* species isolated from different commodities and examination for ochratoxin A producing by TLC and HPLC

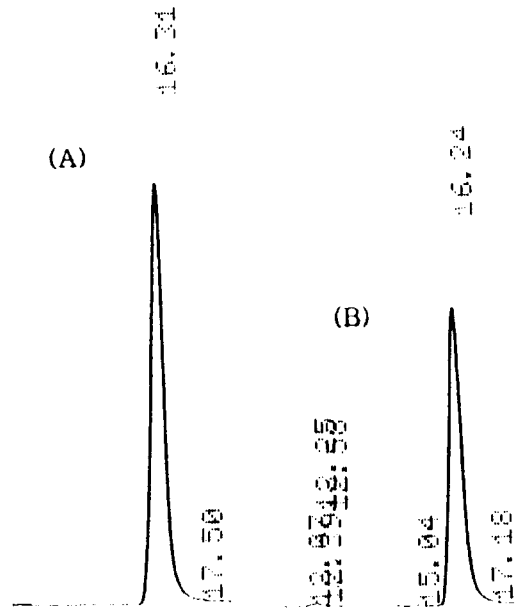
Source of sample	No. of samples	No. of isolates	No. of ochratoxin A producers	
			by TLC	by HPLC
Rice	37	33	9	2
Unhulled rice	10	8	3	1
Barley	20	19	5	—
Unhulled barley	3	5	1	—
Corn	21	25	2	1
Soil	26	27	3	1
Meju	25	18	5	1
Malt	8	10	—	—
Soybean	26	22	5	2
Peanut	15	20	3	1
Total	191	187	36	9



**Fig. 2.** Photograph of colony of isolated *Aspergillus* sp. on PDA medium.  
A: front view of colony  
B: rear view of colony

9균주만이 ochratoxin A를 생성하는 것으로 나타났다. TLC법과 HPLC법으로 확인된 ochratoxin A 생성균주의 오염율은 4.8%이었다.

일반적인 ochratoxin A 생성균의 형태학적인 관찰을 보면 *Penicillium*속은 Czapek Dox배지상의 콜로니는 노란-녹색 또는 황녹색이며 밀바탕은 노란색을 띤다. 23~25C 에서 14일간 배양한 경우 콜로니 직경은 29 mm로서 불규칙한 홈과 가운데 돌기물이 있으며 중심부쪽으로 털이 나 있다. 현미경의



**Fig. 3.** HPLC chromatogram of ochratoxin A.  
(A): Standard ochratoxin A  
(B): Sample

검색에서는 conidiophores가 표면의 균사에서 성장하고 stipe는 대개  $100\sim 200\times 2.5\sim 3.2\ \mu\text{m}$ 이다. *Penicilli*는 전형적인 biverticillate이고 metulae는 4~8개의 divergent verticils가 있고 바늘모양의 phialide는 metulae당 4~8개이고  $8\sim 11\times 2.8\sim 3.5\ \mu\text{m}$ 이며 길고 가늘어지는 collula를 가진다. Conidia는 가늘고 좁은 ellipsoidal이고  $3.5\sim 4.2\times 2.5\sim 3.0\ \mu\text{m}$ 이다. 한편 분리된 *Aspergillus*속 중에는 PDA 사면배지상에 배양했을 때 Fig.2와 같이 되었다. 균사체는 처음에는 백색을 나타내다가 후에 노란색에서 황색을 띄며, 뒷면은 황색에서 갈색을 띄기도 하였다.

특히 분리된 균주의 ochratoxin A 생성여부를 확인하기 위하여 Fig.3과 같이 HPLC법으로 조사한 결과 ochratoxin A의 retention time은 16분 정도였다.

본 실험에서는 쌀을 비롯한 10종류의 곡류 191점으로부터 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속 187균주를 분리하여, 실험한 결과, 9균주가 ochratoxin A를 생성하는 것으로 나타났다. 한편, 姜<sup>18)</sup>도 국내에서 재래적인 방법에 의해 생산, 시판되고 있는 전통발효식품인 메주, 된장, 간장을 전국에서 수거하여 ochratoxin A 생성균을 분리 동정한 바 분리균 222

주에서 ochratoxin A 생성균주가 39였고, 형태학적으로 대부분 *Aspergillus*속, *Penicillium*속 및 *Paecilomyces*속인 것으로 보고하였다. 이러한 결과를 미루어 볼때 주위의 환경에서 ochratoxin A 생성균의 오염이 가능하며, 식품에서의 잔류가능성도 배제할 수 없다. 따라서 우리나라 전역에서 다양한 균원시료를 채취하여 ochratoxin A 생성균을 검색하는 등 체계적인 조사연구가 이루어져야 할 것으로 사료된다.

#### IV. 결 론

영남지방의 곡류중에 ochratoxin A 생성균 분리 및 오염여부를 조사하기 위하여 1992년 9월부터 11월 사이에 영남지방의 함양, 김천, 상주, 안동, 포항에서 쌀 37건, 벼 10건, 보리쌀 20건, 보리 3건, 옥수수 21건, 토양 26건, 메주 25건, 맥아 8건, 콩 26건 및 땅콩 15건 총 191건을 수집하여 실험한 결과 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속 곰팡이 187주를 분리하였다. 이들 균주를 YES배지에 접종하여 28°C에서 14일간 배양하여 TLC로 분석한 결과 표준균주와 RF치가 같은 형광성물질을 생성하는 균주는 36균주이었으며 HPLC로 확인한 결과 9균주(4.8%)가 ochratoxin A를 생성하는 것으로 나타났다.

#### 참고문헌

- 1) Boorman, G. : Toxicology and carcinogenesis studies of ochratoxin A in rats (gavage studies). NIH publication No.88-2813. NIH, Washington D.C., 1988.
- 2) Kanisawa, M. and Suzuki, S. : Induction of renal and hepatic tumors in mice by ochratoxin A. A mycotoxin, *Gann.*, **69**, 599-600, 1978.
- 3) Krogh, P. : Causal association of mycotoxic nephropathy. *Acta Path. Microbiol. Scand. Sect. A-Suppl.*, **269**, 28-80, 1978.
- 4) Krogh, P. : Mycotoxic nephropathy. In : *Advances in Veterinary Science and Comparative Medicine*. Academic Press, New York, **20**, 147-170, 1976.
- 5) Krogh, P. : Mycotoxic porcine nephropathy : A possible model for Balkan (endemic) nephropathy. In : *A. puchlev*, Ed. : *Endemic nephropathy*. Proceedings of the 2nd International Symposium on Endemic Nephropathy. Bulgarian Academy of Sciences. Sofia. 266-270, 1974.
- 6) Steyn, P. S. : Ochratoxin and other dihydro-isocoumarins. *Microbial toxins*, Vol. IV. fungal toxins, 1971.
- 7) Scott, De B. : Toxigenic fungi isolated from cereal and legume products. *Mycopathol. Mycol. Appl.*, **25**, 213-222, 1965.
- 8) Van der Merwe, K. J., Steyn, P. S., Fourie, L., Scott, De B. and Theron, J. J. : Ochratoxin A, a toxic metabolite produced by *Aspergillus ochraceus* with. *Nature (London)*, **205**, 1112-1113, 1965.
- 9) Ciegler, A., Fennell, D. L., Mintzloff, H. J. and Leistner, L. : Ochratoxin synthesis by *Penicillium* species. *Naturwissenschaften* **59**, 365-366, 1972.
- 10) Lee, S. S. and Chu, F. S. : Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat. *J. AOAC.*, **67**, 45-69, 1984.
- 11) Bullerman, L. B. : Interactive effects of temperature and pH on mycotoxin production. *Depart. Food Sci. and Tech.*, **31**, 197-200, 1984.
- 12) Northolt, M. D. and Bullerman, L. B. : Prevention of mold growth and toxin production through control of environmental conditions. *J. Food Protection*. **42**, 485-490, 1979.
- 13) Brodnik, T., Klemenc, N., Vospernik, P. and Zust, J. : Maize contamination by moulds and mycotoxins in SR Slovenia-Yugoslavia. *Krmiva* **19**, 29-33, 1970.
- 14) Cuturic, S., Pepeljnjak, S. and Cvetnic, Z. : The prevalence of micromycetes on cereals and other crops in the vegetation growing in a region of endemic nephropathy in middle posavina. *Lij. vjesnik*, **101**, 525-530, 1979.
- 15) Barron, G. L. : *The genera of hypomycetes from soil*. Robert E. Krieger Publishing Co. New York, 363, 1968.
- 16) Pitt, J. I. : *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 266-269, 1987.
- 17) Kendrick, W. B. and Carmichael, J. W. : *Hypomycetes*. Aca. Press. New York, pp.322-509, 1973.
- 18) Kang, S. C. : Studies on condition of production, isolation and identification of the fungi and analysis of present ochratoxin A in Korea traditional fermented foodstuffs. 건국대학교 석사학위논문, 1991.