

벼의 수분활성도가 *Fusarium moniliforme* NRRL 13569의 성장과 Fumonisin B₁ 생성에 미치는 영향

정수현 · 이택수 · 김영배
고려대학교 식품공학과

Effect of Water Activity on the Growth of *Fusarium moniliforme* NRRL 13569 and on the Fumonisin B₁ Production on Rough Rice

Soo-Hyun Chung, Taek-Soo Lee and Young Bae Kim

Department of Food Technology, Korea University

Abstract

In the present study, an attempt was made to investigate the effect of water activity(Aw) of rough rice on the growth of *Fusarium moniliforme* NRRL 13569 as well as on the production of Fumonisin B₁(FB₁). The maximum growth of *F. moniliforme* and the production of FB₁ occurred at Aw 0.97 when the Aw of rough rice was controlled from 0.85 to 0.97. The fungal growth and FB₁ production decreased with the decrease of Aw. Sparse growth of fungus was observed even at Aw 0.85. FB₁ production on rough rice decreased considerably under Aw 0.97 and the trace amounts of FB₁ were observed at Aw 0.93 and 0.90. Therefore Aw required for the prevention of FB₁ production was turn out to be below 0.90 while that of fungal growth below 0.85.

Key words: water activity, fumonisin B₁, *Fusarium moniliforme*, rough rice

서 론

Fumonisin은 1988년 새로히 밝혀져 세계적으로 관심을 모으고 있는 곰팡이 독소로서 2-amino-12,16-dimethyl-pentahydroxyeicosane의 골격에 두 분자의 propane-1,2,3-tricarboxylic acid가 각각 ester 결합으로 연결된 fumonisin B₁(FB₁)을 비롯하여 6개의 동족체가 알려진 수용성 화합물이다^(1,2). Fumonisin을 생성하는 곰팡이로는 *Fusarium moniliforme*를 비롯한 *Fusarium*속과 관련된 몇 종류와 *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*가 알려져 있다^(3,4). *F. moniliforme*는 옥수수과 벼에 서식하는 포장곰팡이(field fungi)로서 특히 옥수수 mycoflora중 우점종을 차지하며, 벼의 키다리병(Bakanae disease)의 원인이 되는 식물병원성 곰팡이로도 유명하다⁽⁵⁾. Fumonisin은 말의 뇌백질 연화증(equine leukoencephalomalacia, ELEM)⁽⁶⁾과 돼지의 폐수종(porcine pulmonary edema, PPE)⁽⁷⁾의 원인물질로 확인되었다. 또한 쥐(rat)의 간암⁽⁸⁾을 촉진 및 유발시키며, 사람의 식도암(human esophageal cancer)⁽⁹⁾과 높은 상관관계가 있는 것으로 밝혀졌다.

*Fusarium*속과 같은 포장곰팡이는 저장곰팡이와 달리 내건성이 약하며 건조된 곡류에서는 저장중에 잘 성장하지 못하고 오히려 감소하는 종류로 곡류에서 이들의 성장과 독소생성에는 수분이 가장 중요한 요인이다. Fumonisin의 발생은 포장에서 시작되며 특히 옥수수가 주된 자연발생처로서 이를 이용한 식품에서도 검출되고 있다⁽¹⁰⁾. 배양실험 결과에 따르면 *F. moniliforme*의 성장 및 FB₁ 생성을 위한 최적온도⁽¹¹⁾는 25°C이며, 옥수수과 쌀 등의 기질⁽¹²⁾에서 FB₁ 축적이 높았다는 보고가 있다.

쌀은 우리 국민의 주식 곡물로서 양적인 확보와 함께 안전성에 대한 보장이 요구된다. 우리나라 벼의 수확시 수분함량⁽¹³⁾은 18~30% 정도로 포장에서 *F. moniliforme*의 오염가능성이 상존하고 있으며 이들이 성장으로 이어지면 fumonisin의 발생도 가능하다. 따라서 본 연구에서는 벼에서의 *F. moniliforme*의 성장과 FB₁ 생성에 미치는 수분활성도의 영향을 조사하여 곰팡이 및 독소 방제를 위한 기초자료로 이용하고자 하였다.

재료 및 방법

시료

시료로 사용한 벼는 1992년 고려대학교 부속 농장(경기도 남양주군 소재)에서 재배되어 수확된 벼(품종: 일품)를 사용하였다. 벼의 살균을 위하여 그린피아 주식

Corresponding author: Young Bae Kim, Department of Food Technology, Korea University, Anam-dong, Sungbuk-ku, Seoul 136-701, Korea

회사의 500,000 Ci, ^{60}Co γ 선 조사실에서 25 kGy의 선량으로 상온 조사하였다. 살균된 시료는 Petri dish에 25g씩 취하여 포화 염용액을 사용하여 상대습도를 조절된 밀폐 용기에 넣어 25°C에서 보관하였다. 상대습도는 일반적인 포자 곰팡이의 성장 한계 이하인 85%부터 시작하여 87%, 90%, 93% 및 97%까지의 상대습도를 각각 lithium sulfate, potassium chromate, barium chloride, potassium nitrate 및 disodium phosphate를 사용하여 만들었다⁽¹⁴⁾.

시약 및 균주

표준품 FB_1 및 ergosterol은 Sigma사 제품이었으며, 추출 및 HPLC 용매인 methanol, ethyl acetate, acetonitrile 등은 HPLC grade를, 기타 시약은 1급 이상을 사용하였다. 실험에 사용한 *Fusarium moniliforme* NRRL 13569는 Minnesota 대학의 Mirocha 교수로부터 분양받았다.

접종 및 배양

시험균주는 potato dextrose agar 사면배지에 배양한 후 냉장보관하였고, 사용시 Czapek agar 사면배지에 계대하여 30°C에서 7일 배양하여 활성화시켰다. 배양물에 살균한 0.05% Tween 80을 함유한 희석수를 붓고 백금으로 부드럽게 긁어 포자를 현탁시킨 후 4겹의 거즈로 균사를 제거하여 포자현탁액을 만들어 접종원으로 사용하였다. 현탁액의 포자수는 Petroff-Hauser bacterial counting chamber를 사용하여 10^7 conidia/ml 되게 조정하였으며, 벼 배지 25g당 1ml씩 접종하여 25°C의 항온배양기에서 정지배양하였다.

곰팡이 성장의 측정

벼에서의 곰팡이성장은 ergosterol 함량으로 나타내었으며, ergosterol의 측정은 Seitz 등⁽¹⁵⁾의 방법을 일부 수정한 HPLC 방법에 의하여 행하였다. 배양시료 25g에 methanol 50ml를 가하여 waring blender로 마쇄한 후 Whatman No.4 filter paper로 여과하였다. 여과액 10ml에 10N KOH 2ml를 가하여 70°C에서 검화시키고 petroleum ether(b.p. 35~60°C)로 ergosterol을 추출하였다. 추출액은 60°C에서 N_2 가스로 건조시킨 다음 methanol-ethyl acetate-water(5:3:2) 1ml로 다시 녹여 분석 시료로 사용하였다. Ergosterol의 HPLC 분석은 시료 20 μ 를 C_8 column(4.6 \times 150 mm, Cosmosil)에 주입하여 실시하였다. 용매는 methanol-ethyl acetate-water(5:3:2) 혼합액을 1ml/min의 속도로 사용하고 UV detector(282 nm)로 검출하였다. 본 조건에서 ergosterol의 검출 한계는 10 ng 수준이었다.

Fumonisin B₁의 정량

벼에서의 FB_1 검출은 Shephard 등⁽¹⁶⁾의 방법을 일부 수정한 HPLC 방법에 의하여 실시하였다. Waring blender로 곱게 마쇄한 시료 25g을 methanol-water(3:1,

v/v) 50 ml와 함께 250 ml Erlenmeyer flask에 넣고 60분간 진탕 후 Whatman No. 42 filter paper로 여과하였다. 여과액 10 ml을 1N NaOH로 pH 6.5가 되도록 조정된 다음 strong anion exchange cartridge(Merck)를 사용하여 FB_1 을 흡착시키고 methanol로 세척한 다음 0.5% acetic acid 함유 methanol로 용출시켰다. 용출된 용액은 60°C에서 N_2 가스를 이용하여 건조시킨 후 일정량의 acetonitrile-water(1:1, v/v)로 다시 녹이고 이 중 50 μ 를 2 ml glass vial에 옮겨 FB_1 의 o-phthalaldehyde(OPA) 유도체를 제조하였다. FB_1 의 HPLC 분석은 C_{18} reverse phase column(Nova-Pak C_{18} , Waters)에 20 μ 의 시료를 주입하고 $\text{CH}_3\text{OH}:\text{H}_2\text{O}:\text{CH}_3\text{COOH}(77:23:1)$ 혼합액을 0.5 ml/min의 속도로 흐르게 하였다. FB_1 의 OPA 유도체는 형광 검출기(excitation wavelength 338 nm, emission wavelength 440 nm)를 사용하여 검출하였다.

수분함량의 측정

벼의 수분함량은 AOAC 방법에 따라 $130\pm 3^\circ\text{C}$ 에서 항량에 도달할 때까지 건조하고 감소된 무게를 측정하여 구하였다⁽¹⁷⁾.

결과 및 고찰

배지의 평형수분함량과 수분활성도

*F. moniliforme*를 벼에 접종한 후 상대습도를 85, 87, 90, 93 및 97%로 조절된 용기에서 배양하였을 때 벼의 수분함량 변화는 Fig. 1과 같다. 벼의 수분함량은 초기에 13%이었으며 배양중 점차 증가하여 85%와 87% RH에서는 1주, 90%와 93% RH에서는 2주 그리고 97% RH에서는 4주째에 평형에 도달하였다. 벼의 평형수분함량은 배양중 상대습도를 85, 87, 90, 93 및 97%로 조절한 경우 각각 18.0%, 19.0%, 19.5%, 20.7% 및 22.6%로 나타났다.

벼의 평형 수분함량과 평형 상대습도(% equilibrium relative humidity, % ERH)에 의한 벼의 등온 흡습곡선은 Fig. 2와 같다. 본 실험에서의 평형상대습도는 85~97% ERH 구간으로 수분의 모세관응축영역⁽¹⁸⁾에 속하며, 이 범위에서의 평형수분함량은 김 과 이⁽¹³⁾가 보고한 벼의 등온흡습곡선에서 나타난 결과와 큰 차이가 없었다. 따라서 본 실험에서 벼의 수분함량이 평형에 도달한 이후에는 벼의 수분활성도는 조절한 평형상대습도에 따라 각각 Aw 0.85, 0.87, 0.90, 0.93 및 0.97이었으며, 평형에 도달하기 이전의 1~4주간은 이보다 낮은 상태이었다.

곰팡이 성장에 미치는 Aw의 영향

벼의 수분활성도에 따른 *F. moniliforme*의 성장곡선은 Fig. 3과 같다. 곰팡이 성장곡선으로 부터 측정된 최대 비증식속도(μ_{max})는 Aw 0.97, 0.93, 0.90, 0.87 및 0.85에서 각각 1.28, 1.04, 0.83, 0.33, 및 0.23 week⁻¹이었으며, 또한 최대성장에 도달하는 배양시간은 Aw 0.97과 0.93의 경

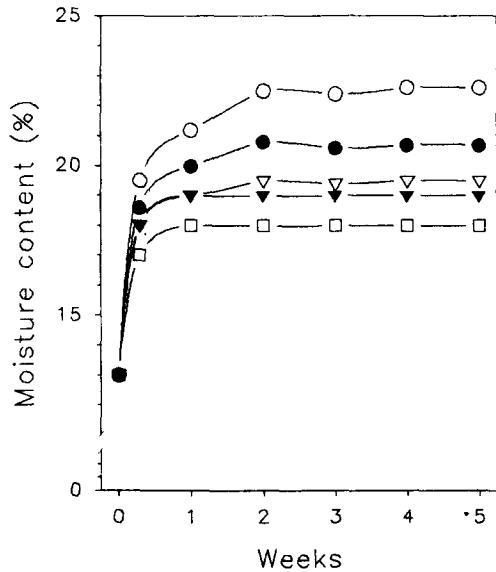


Fig. 1. Changes of moisture content of the rough rice stored at different relative humidity at 25°C
○; 97% RH, ●; 93% RH, ▽; 90% RH, ▼; 87% RH, □; 85% RH

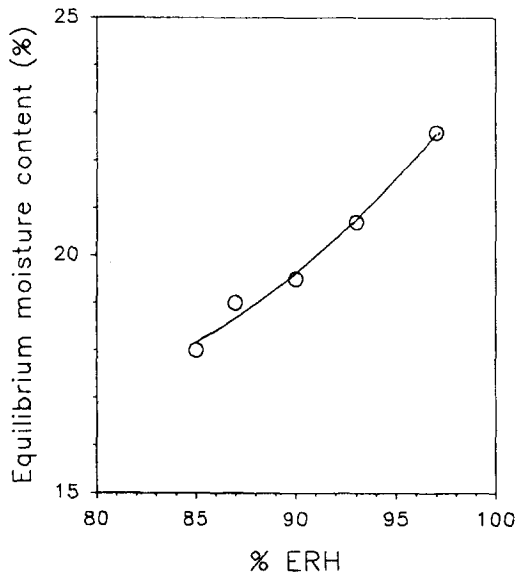


Fig. 2. Moisture sorption isotherm for the rough rice at 25°C

우에는 6주, Aw 0.90에서는 7주이었으나 Aw 0.87 및 0.85에서는 10주 이상으로 나타났다. 한편 최대 성장량은 Aw 0.97, 0.95, 0.90, 0.87 및 0.85에서 각각 3.34, 2.54, 1.44, 0.59 및 0.31 μg ergosterol/g rough rice를 나타내었다. 곰팡이의 성장속도와 최대 성장량은 Aw의 감소에 따라

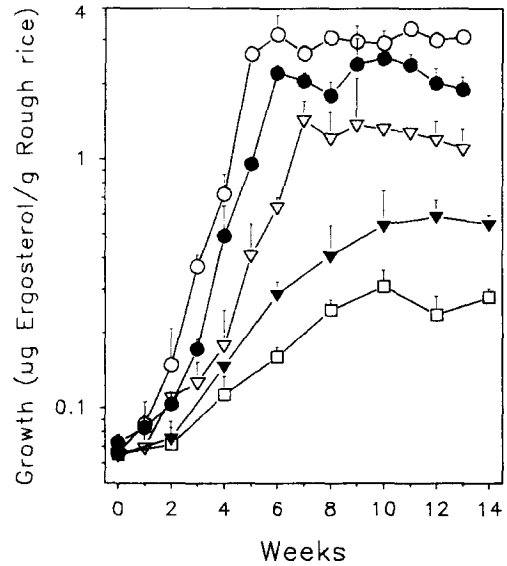


Fig. 3. Growth of *F. moniliforme* NRRL 13569 on the rough rice at 25°C
Vertical bars indicate +SE when larger than symbols.
○; Aw 0.97, ●; Aw 0.93, ▽; Aw 0.90, ▼; Aw 0.87, □; Aw 0.85

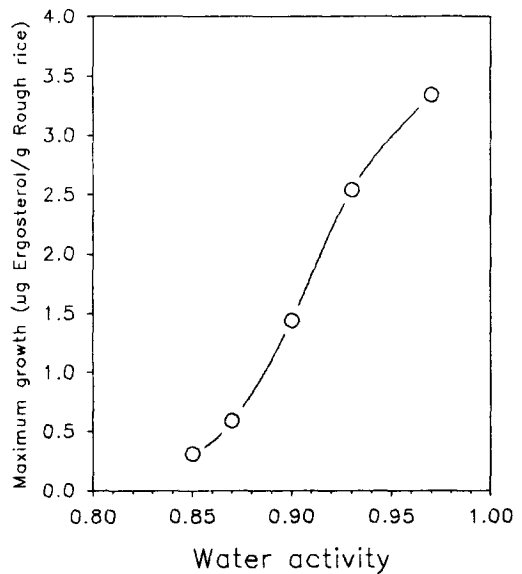


Fig. 4. Effect of water activity on the growth of *Fusarium moniliforme* NRRL 13569 on the rough rice at 25°C

감소하는 경향을 보였으며 특히 Aw 0.87 이하에서 큰 폭으로 감소하였다.

벼에서의 *F. moniliforme*의 배양곡선에서 나타난 최대

Table 1. FB_1 production by *F. moniliforme* NRRL 13569 on the rough rice at various water activity at 25°C (mean±SD ng/g)

Weeks	Water activity				
	0.97	0.93	0.90	0.87	0.85
0	—	—	—	—	—
1	ND	ND	ND	—	—
2	ND	ND	ND	ND	ND
3	ND	ND	ND	—	—
4	ND	ND	ND	ND	ND
5	ND	ND	ND	—	—
6	ND	ND	ND	ND	ND
7	ND	ND	ND	—	—
8	15±26	ND	ND	ND	ND
9	84±28	16±27	18±32	—	—
10	73±16	ND	14±24	ND	ND
11	946±878	ND	ND	—	—
12	514±99	18±32	14±24	ND	ND
13	1,524±1,421	ND	ND	—	—

—; not tested

ND; not detected

성장량을 수분활성도에 대하여 나타낸 그림은 Fig. 4와 같다. 본 실험에서의 곰팡이성장은 Aw 0.97에서 가장 높았다. 곰팡이의 최대 성장량은 수분활성도가 낮아짐에 따라 점진적으로 감소하여, Aw 0.97에서의 최대성장량과 비교할 때 Aw 0.93, 0.90, 0.87 및 0.85에서 각각 76.0%, 43.1%, 17.7% 및 9.3%이었다. 수분활성도에 따른 곰팡이성장의 변화는 완만한 S자형의 곡선으로 생각되며 Troller와 Christian⁽¹⁹⁾의 결과들에서도 유사한 경향을 보인다.

*Fusarium*의 성장 한계 Aw 값은 찾지 못하였으나 비슷한 환경에서 서식하는 *Cladosporium*의 경우 0.88로 보고되고 있다⁽²⁰⁾. 이 결과는 균사의 형성으로 측정된 값이어서 ergosterol 함량으로 추정된 본 실험의 결과와 직접 비교가 어렵다. 그러나 곰팡이의 균체성분이 증가하였으므로 *F. moniliforme*의 성장은 Aw 0.85의 벼에서도 가능한 것으로 판단되며 따라서 *F. moniliforme*의 성장을 막으려면 Aw 0.85 보다도 더 낮은 수분활성도의 유지가 필요하다고 생각한다.

FB_1 생성에 미치는 Aw의 영향

각 수분활성도의 벼에서 *F. moniliforme*에 의하여 생성된 FB_1 의 경시적 변화는 Table 1과 같다. FB_1 은 Aw 0.97, 0.93 및 0.90의 경우 8~9주 이후에 검출되었으며, 이 시기는 균체성장이 이미 정지기에 도달한 후이었다. Aw 0.97에서는 배양 8주 이후 FB_1 생성이 시작되어 11주와 13주에 그 생성량이 각각 946 ppb 및 1,524 ppb로 증가하였다. 그러나 Aw 0.93과 0.90에서는 배양 9주에 처음으로 FB_1 생성이 확인되었고 이후 10주와 12주에도 FB_1 이 생성되었으나 13주 배양 종료시까지의 FB_1 생성

량은 흔적 수준으로 미미하였다. Aw 0.85와 0.87의 벼에서는 곰팡이는 성장하였지만 배양 12주 동안 FB_1 의 생성을 확인할 수 없었다. 또한 FB_1 생성량은 균체 성장속도나 성장량과는 달리 Aw 0.97에서 0.93으로 수분활성도가 낮아질 때 현저히 감소하여 균체성장이 수분활성도의 감소에 따라 점진적으로 감소한 것과는 차이를 보였다. 따라서 벼에서 *F. moniliforme* NRRL 13569에 의한 FB_1 의 생성에 요구되는 수분활성도는 곰팡이성장에 필요한 수분활성도보다 높은 수준임을 알 수 있다. 이상의 결과로부터 독소의 유의한 축적에는 Aw 0.93 보다도 높은 수분활성도가 필요하며, FB_1 생성을 막으려면 이보다 낮은 수분활성도의 유지가 요구된다 하겠다.

요 약

수분활성도를 0.85~0.97로 조절한 벼에서 *Fusarium moniliforme* NRRL 13569의 성장과 Fumonisin B₁(FB_1) 생성량을 조사하였다. 곰팡이 성장은 Aw 0.97에서 가장 높았다. 곰팡이의 성장 속도와 최대 성장량은 수분활성도가 낮아질수록 점진적으로 감소하는 경향이었다. 곰팡이의 성장은 Aw 0.85에서도 가능한 것으로 나타나 벼에서 *F. moniliforme*의 성장을 막으려면 이보다 더 낮은 수분활성도의 유지가 필요한 것으로 생각된다. FB_1 의 생성은 Aw 0.93과 0.90에서 흔적 수준의 생성량을 보였으며 그 이하에서는 FB_1 의 생성을 확인할 수 없었다. 따라서 독소의 축적의 방지는 0.90 보다 낮은 Aw에서 가능하다고 생각된다.

문 헌

- Gelderblom, W.C.A., Jaskiewicz, K., Marasas, W.F.O., Thiel, P.G., Horak, R.M., Vlegaar, R. and Kriek, N.P. J.: Fumonisin-Novel mycotoxins with cancer promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**(7), 1806 (1988)
- Voss, K.A., Plattner, R.D., Bacon, C.W. and Norre, W.P.: Comparative studies of hepatotoxicity and fumonisin B₁ and B₂ content of water and chloroform/methanol extracts of *Fusarium moniliforme* strain MRC 826 culture material. *Mycopathologia*, **112**, 81 (1990)
- Nelson, P.E., Plattner, R.D., Shackelford, D.D. and Desjardins, A.E.: Fumonisin B₁ production by *Fusarium* species other than *F. moniliforme* in Section *Liseola* and by some related species. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(3), 984 (1992)
- Chen, J., Mirocha, C.J., Xie, W., Hogge, L. and Olson, D.: Production of the mycotoxin fumonisin B₁ by *Alternaria alternata* f. sp. *lycopersici*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**(12), 3928 (1992)
- Nelson, P.E.: Taxonomy and biology of *Fusarium moniliforme*. *Mycopathologia*, **117**, 29 (1992)
- Wilson, T.M., Ross, P.F., Owens, D.L., Rice, L.G., Green, S.A., Jenkins, S.J. and Nelson, H.A.: Experime-

- ntal reproduction of ELEM. *Mycopathologia*, 117, 115 (1992)
7. Haschek, W.M., Motelin, G., Ness, D.K., Harlin, K.S., Hall, W.F., Vesonder, R.F., Peterson, R.E. and Beasley, V.R.: Characterization of fumonisin toxicity in orally and intravenously dosed swine. *Mycopathologia*, 117, 83 (1992)
 8. Gelderblom, W.C.A., Kriek, N.P.J., Marasas, W.F.O. and Thiel, P.G.: Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B₁, in rats. *Carcinogenesis*, 12(7), 1247 (1991)
 9. Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Sydenham, E.W., Shephard, G.S. and Gelderblom, W.C.A.: The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia*, 117, 3 (1992)
 10. Sydenham, E.W., Shephard, G.S., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O. and Stockenstörn, S.: Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.*, 39, 2014 (1991)
 11. Alberts, J.F., Gelderblom, W.C.A., Thiel, P.G., Marasas, W.F.O., Van Schalkwyk, D.J. and Behrend, Y.: Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B₁ by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56(6), 1729 (1990)
 12. Holcomb, M., Sutherland, J.B., Chiarelli, M.P., Korf-macher, W.A., Thompson, Jr. H.C., Lay, Jr. J.O., Han-kins, L.J. and Cerniglia, C.E.: HPLC and FAB mass spectrometry analysis of fumonisins B₁ and B₂ produced by *Fusarium moniliforme* on food substrates. *J. Agric. Food Chem.*, 41, 357 (1993)
 13. 김동훈, 이 철: 한국산 일부 농산물의 건조특성에 관한 연구. 제일보, 벼의 건조 특성에 관하여. 고려대학교 농림논집, 20, 53 (1980)
 14. Rockland, L.B.: Saturated salt solution for static control of relative humidity between 5 and 40°C. *Anal. Chem.*, 32(10), 1375 (1960)
 15. Seitz, L.M., Mohr, H.E., Burroughs, R. and Sauer, D. B.: Ergosterol as indicator of fungal invasion in grains. *Cereal Chem.*, 54(6), 1207 (1977)
 16. Shephard, G.S., Sydenham, E.W., Thiel, P.G. and Gelderblom, C.A.: Quantitative determination of fumonisins B₁ and B₂ by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Liquid Chromatography*, 13(10), 2077 (1990)
 17. AOAC.: *Official Method of Analysis*, 15th edition, Association of Official Analytical Chemists, Washington, D. C., p.777 (1990)
 18. Kapsalis, J.G.: Influence of hysteresis and temperature on moisture sorption isotherms. In *Water activity: Theory and applications to food*. Rockland, L.B. and Beuchat, L.R.(ed), Marcel Dekker Inc., New York, p. 173 (1987)
 19. Troller, J.A. and Chtistian, J.H.B.: *Water Activity and Foods*, Academic Press, New York, p.86-102 (1978)
 20. Bullerman, L.B., Schroeder, L.L. and Park, K.Y.: Formation and control of mycotoxins in food. *J. Food Protec.*, 47(8), 637 (1984)

(1994년 12월 5일 접수)