

## 시설원예산물로부터 Ochratoxin A 생성 곰팡이의 검색

강성조 · 박봉정\* · 이종옥\*\* · 강진순\*\*\* · 정덕화\*  
경상대학교 농어촌개발연구소, \*경상대학교 식품공학과,  
\*\*식품 의약품 안전청 식품규격과, \*\*\*진주전문대학 가정학과

### Screening of Ochratoxin A Producing Fungi from Greenhouse Horticulture

Sung-Jo Kang, Bong-Jung Park\*, Jong-Ok Lee\*\*,  
Jin-Soon Kang\*\*\* and Duck-Hwa Chung\*

Institute of Agriculture and Fishery Development,

\*Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

\*\*Division of Food Standard, Korea Food and Drug Administration

\*\*\*Department of Home Economic, Chinju Technical College

#### Abstract

In order to evaluate the safety of greenhouse horticultures, a large number sample sources were collected, and the fungi of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. were isolated from them. Indirect competitive ELISA method and high performance liquid chromatography (HPLC) were applied to confirm the ochratoxin A producing abilities of isolated strains. One hundred ninety two sample sources including soil, pepper, strawberry and water melon were collected for fungi isolation from western Gyeongnam, Andong and Gyeongbuk. One hundred forty two strains of *Aspergillus* sp. and one hundred fifty three strains of *Penicillium* sp. were isolated respectively from them. The isolated fungi were tested for the production of ochratoxin A by ELISA. After culture of them on the modified sucrose low salt medium at 28°C for 15 days, we found that five strains of *Penicillium* sp. produced ochratoxin A at the levels of 0.082~2.128 µg/mL. Among them, #129-2 strain isolated from water melon, showed the highest level of ochratoxin A as 2.128 µg/mL broth. However, all of isolated *Aspergillus* sp. didn't produce ochratoxin A. When we compared the results of ELISA method with HPLC method, ochratoxin A production of each isolated strains showed very similar levels.

Key words: Ochratoxin A, greenhouse horticulture, indirect competitive ELISA

#### 서 론

Ochratoxin은 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속 곰팡이가 생성하는 독소<sup>(1-5)</sup>로서 1965년 남아프리카산 곡물에 함유되어 있는 진균독을 조사하는 과정에서 처음 발견되었다. 이외에도 *Aspergillus sulphureus*, *Aspergillus ostianus*, *Aspergillus petrakii*, *Penicillium viridicatum*, *Penicillium palitas*, *Penicillium commune*, *Penicillium variable*, *Penicillium cyclopium* 등에서 보고되고 있다<sup>(2-3)</sup>.

Ochratoxin류에는 현재 7종의 유도체가 알려져 있으며 그 중 독성이 가장 강한 것은 ochratoxin A로 알려져 있다. Ochratoxin A의 경우, 화학구조는 7-carboly-

5-chloro-hydrox-3,4-dihydro-3R-methuyl;-isocumarin-7L-β-phenylalanine으로 알려져 있고 분자구조식은  $C_{20}H_{18}O_6 \cdot NCl$ 이며, 분자량은 403.1이다<sup>(2,3)</sup>.

식품과 사료에서 ochratoxin A는 thin layer chromatography (TLC)법<sup>(6,7)</sup>, High performance liquid chromatography (HPLC) 등<sup>(8-10)</sup>의 방법으로 분석되어 왔다. 이러한 기존 분석방법은 광범위한 정제과정, 유해한 용매사용으로 인한 안전성 문제, 비싼 기기 구입 및 정밀 기기를 다루기 위한 연구요원 확보에 필요한 경제적 어려움 등의 문제점을 지니고 있다. 최근 이러한 단점들을 보완하기 위하여 간편한 전처리로 많은 시료를 단 시간에 처리하고, 특이성과 감도가 높은 효소면역측정법(Enzyme-linked-immunosorbent-assay: ELISA)<sup>(11-15)</sup>이 개발되었다. 그러나 국내에서는 곰팡이 독소를 비롯한 저분자 화학물질의 분석이 기존의 기기분석에 의존하

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

고 있으며, ochratoxin A의 경우 단일클론성 항체를 이용한 효소면역측정법에 관한 보고는 없는 실정이다.

식품 중 곰팡이 독소의 규제를 위해서는 신속한 분석방법, 식품에서의 오염수준, 안전성 그리고 섭취수준과 위해 가능성에 대한 정보가 필요하지만 대부분의 곰팡이독소와 같이 ochratoxin A의 경우도 이러한 정보가 충분하지 못하다. 특히 진주를 비롯한 서부경남지방은 비닐하우스에서 다양한 시설 원예산물이 생산되고 있으나 이들 시설 원예산물과 환경에 대한 위생학적 기초조사가 대단히 부족하다. 따라서 본 연구는 시설 원예산물의 안전성에 대한 연구의 일환으로 시설재배가 많이 이루어지고 있는 경남 일대의 비닐하우스에서 시설 원예산물과 토양 등의 시료를 채취하여 *Aspergillus*속 및 *Penicillium*속 곰팡이를 분리한 다음 본 연구실에서 생산하여 보관 중인 단일클론항체를 사용한 효소면역분석법(ELISA)으로 분리균의 ochratoxin A 생성능을 조사하여 그 결과를 보고하고자 한다.

**재료 및 방법**

**균원시료**

진주를 비롯한 서부 경남 일원과 경북 안동 근교의 비닐하우스에서 재배되고 있는 가지, 오이, 메론, 참외, 수박, 딸기, 호박 등의 시설 원예산물과 그 토양을 1997년 6월부터 1997년 8월 사이 5차에 걸쳐 총 192점의 시료를 Table 1과 같이 일정량씩 수집하여 4°C에 보

관하면서 ochratoxin A 생성균의 검색에 사용하였다.

**사용배지**

본 실험에서 사용한 배지는 분리용 배지로 세균과 효모의 성장을 억제하고 곰팡이만을 선택적으로 자라게 하기 위해 rose bengal이 35 mg/L첨가된 rose bengal agar (Difco Laboratories, U.S.A.)배지를 사용하였으며 곰팡이의 순수분리와 보관용 배지로 potato dextrose agar (PDA)배지를 사용하였으며 모든 배지는 멸균(121°C, 1 kg/cm<sup>2</sup>, 15 min) 하여 사용하였다.

**균의 분리 및 배양**

균의 분리는 시험관(18×200 mm)에 멸균한 증류수 10 mL와 시료 1 g을 취하여 vortex mixer로 교반한 후 상징액 200 µL를 rose bengal agar 평판배지에 분주하여 도말하고 28°C에서 4일간 배양하였다. 평판배양 후 육안으로 colony의 모양, 크기 및 색깔 등을 관찰하여 *Aspergillus*속 및 *Penicillium*속으로 추정되는 균주를 선정하여 PDA평판배지에서 분리를 반복하면서 단일 집락을 PDA사면배지에 접종시킨 후 4°C에 보관하면서 각 균의 ochratoxin A 생성능을 조사하였다. 순수분리하여 사면배양한 *Aspergillus*속과 *Penicillium*속 곰팡이는 sucrose low salt (SLS) 배지 7 mL을 시험관(18×200 mm)에 넣고 멸균한 다음 분리균의 포자를 접종하고 28°C, 15일간 정치 배양한 다음 배양액의 ochratoxin A 생성정도를 조사하였다. 이때 선정된 균의 배양을 위해 사용된 포자현탁액은 분리한 *Aspergillus*

**Table 1. Sample sources for the screening of ochratoxin A producing strains from greenhouse horticulture**

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	Total
Soil	11	17	8	7	3		6	1	51			107
Pepper	5		1									6
Strawberry	1	1	2									4
Watermelon	4	13	2	2		7	1					29
Tree	1			1								2
Chines cabbage		1										1
Pumpkin	1	2	1	1								5
Sweet potato	2		1				1					4
Lettuce			1							1		2
Yellow melon	1		1	2						2	2	8
Cucumber			1	4				1		1		7
Tomato	3			1	2						1	7
Corn								1				1
Young radish	2							1		1	1	5
Melon	2											2
Eggplant	1											1
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>34</b>	<b>18</b>	<b>18</b>	<b>5</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>51</b>	<b>8</b>	<b>4</b>	<b>192</b>

A: Chin-ju, B: San-chung, C: Sa-chun, D: Nan-hae E: Ham-an, F: Eui-ryung, G: Ko-sung, H: Ham- yang, I: An-dong, J: Da-sa K: Sung-ju

속, *Penicillium*속 균을 PDA plate 상에서 활성화시킨 다음 0.1% Tween 80용액 1 mL과 멸균수 5 mL을 가해 포자를 씻어 내는 조작을 3회 반복하여 얻은 포자 현탁액을 완전히 멸균된 4점의 cheese cloth에 여과하고 적당한 양의 멸균수로 희석하면서 현미경으로  $10^6 \sim 10^7$  conidia/mL로 조절하여 시험관에 분주한 후  $-70^\circ\text{C}$ 에 보관하면서 실험에 사용하였다.

**Ochratoxin A 생성균 검색을 위한 시료조제**

분리균의 ochratoxin A 생성능을 조사하기 위해서는 앞서와 같이 SLS배지에 분리균을 접종하여  $28^\circ\text{C}$ 에서 배양한 다음 배양액을 수거하여 고압증기멸균하고 균체를 제거한 다음 인산 완충용액(phosphate buffer saline solution, 0.05M, pH 7.2, PBS)으로 희석하여 실험에 사용하였다.

**ELISA법에 의한 ochratoxin A 분석**

분리균의 ochratoxin A의 분석은 indirect competitive ELISA법을 기초로 하였다. 이때 사용한 항체는 본연구실에서 개발한 ochratoxin A에 대한 단클론성항체이며 분석방법은 다음과 같았다. 즉 ochratoxin A-BSA conjugate를 완충액(carbonyl buffer, pH 9.6)에 녹여 microtiter plate에 100  $\mu\text{L}$ 씩 주입한 다음  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 방치하여 coating한 후 세척용 완충액(PBS-Tween solution)으로 3회 세척하였다. 그런 다음 항체의 비특이적인 반응을 방지하기 위해 인산 완충용액에 녹인 0.1% ovalbumin을 가하여 하룻밤 방치한 후 세척용 완충액으로 3회 세척하였다. 세척한 plate에 표준 ochratoxin A 또는 분석 시료 추출액과 500배로 희석한 ochratoxin A 항체를 동량 혼합하여 vortex하여 100  $\mu\text{L}$ 를 well에 주입하고  $4^\circ\text{C}$ 에서 하룻밤 반응시켰다. 반응시킨 plate를 세척용 완충액으로 4회 세척하고 1:2,000으로 희석한 2차 항체(anti-mouse IgG-HRP, Sigma, U.S.A.)를 100  $\mu\text{L}$ 씩 분주하여 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 세척용 완충액으로 다시 6회 세척한 후 기질용액(2,2'-anizo-bis-3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid, ABTS) 100  $\mu\text{L}$ 를 분주하여 실온에서 30분 발색시킨 후 반응정지용액을 100  $\mu\text{L}$ 씩 넣어 반응을 정지시켰다. 이것을 ELISA reader (Microplate Reader, Bio-Rad Model 550)로 410 nm에서 흡광도를 측정하였다.

**HPLC에 의한 ochratoxin A 생성균의 확인**

ELISA와 TLC에 의해 선별된 분리 균주들을 HPLC

법과 비교하였다. HPLC시료의 조제는 배양액을 유기용매로 추출한 후 TLC하여 표준물질과 같은 Rf치의 band만을 잘라 ethyl acetate에 용해하여 농축시킨 후 HPLC 이동상인 acetonitrile : water : acetic acid (99 : 99 : 1, v/v%)에 재용해시켜 millipore filter (0.2  $\mu\text{m}$ )로 여과한 다음 HPLC로 분석하였다. 분석조건은 instrument : Pharmacia system (LCC2252, Sweden), detector : fluorescence detector (EX 333 nm, EM 418 nm), column :  $\mu\text{Bondapak C18}$  (3.9 mm $\times$ 300 mm steel column), mobile phase : acetonitrile : distilled water : acetic acid (99 : 99 : 1, v/v%), flow rate : 1.0 mL/min로 하였다.

**결과 및 고찰**

**균의 분리**

시설 원예산물 중에서 ochratoxin A 생성능이 있는 균주의 오염여부를 조사하기 위해 진주를 비롯한 서부 경남 일원과 안동 근교에서 가지, 오이, 메론, 수박, 참외, 토마토, 딸기, 호박 및 그 흙 등의 시료 192점을 수집하였다. 균의 분리는 순수한 곰팡이만을 자라게 하기 위하여 rose bengal agar와 potato dextrose agar 배지에서 분리·배양한 후 곰팡이를 분리하였으며 colony를 육안적으로 관찰하여 그 종을 분류하였다. 그 결과 Table 2과 같이 *Aspergillus*속으로 추정되는 142종과 *Penicillium*속으로 추정되는 153종의 균을 분리하였다.

**Table 2. Occurrence of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. from sample sources**

Sample	No.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
Soil	107	89	62
Pepper	6	6	12
Strawberry	4	2	4
Watermelon	29	19	32
Tree	2	1	1
Chines cabbage	1	-	1
Pumpkin	5	4	3
Sweet potato	4	1	3
Lettuce	2	-	2
Yellow melon	8	4	10
Cucumber	7	3	3
Tomato	7	1	7
Corn	1	1	-
Young radish	5	1	7
Melon	2	1	2
Eggplant	1	1	2
Sesame	1	1	1
Total	192	142	153

ELISA법에 의한 OTA생성균의 검색

앞서 시설 원예 산물에서 분리된 142균의 *Aspergillus*속 곰팡이와 153종의 *Penicillium*속 곰팡이의 ochratoxin A 생성 여부를 실험하였다. 이때 1차 검색을 위해서 indirect competitive ELISA법을 응용하였고 사용된 항체는 본 실험실에서 생산하여 보관 중인 단일클론항체중 역가가 높은 것을 선택하여 실험에 응용하였다. 항체의 특이성은 Table 3와 같이 ochratoxin C와 약간의 교차반응이 있었으나 ochratoxin A와는 특이하게 반응하였고 ochratoxin B, 4-hydroxyochratoxin A 및 aflatoxin B1과는 전혀 반응하지 않았다.

앞서 언급한 바와 같이 indirect competitive ELISA법으로 표준 ochratoxin A를 농도별로 반응시킨 후 각 well의 발색정도를 410 nm에서 흡광치로 나타내어 표준곡선을 작성한 결과 Fig. 1에서 보는 바와 같이 표준 ochratoxin A의 농도가 높아짐에 따라 O.D.값의 수치가 상대적으로 적어지는 경향으로 나타나 전형적인 면역분석법에서의 표준곡선을 보였다.

분리균의 배양액으로부터 indirect competitive ELISA법에 의해 분리균의 ochratoxin A의 생성여부를 조사한 결과 Table 4와 같이 ochratoxin A를 생성하는

균주는 *Penicillium*속 5균주였고, *Aspergillus*속은 모두 음성반응을 나타내었다. 분리된 5균주의 배양액을 ELISA법으로 분석한 결과 1균주가 0.1 µg/mL이하, 3균주가 0.1~1 µg/mL, 그리고 1균주가 1.0 µg/mL이상의 ochratoxin A를 생성하는 것으로 나타났다.

Ochratoxin A 생성균의 확인

ELISA법에 의해 선별된 분리 균주들의 배양물을 HPLC법으로 분석하여 ochratoxin A의 생성량을 비교한 결과는 Table 5과 같았다.

즉 ELISA법과 기존의 분석법인 HPLC법의 결과가 아주 비슷한 경향을 나타내었다. 이들의 ochratoxin A의 생성량 정도를 보면 전체적으로 0.084~2.128 µg/mL의 범위로 나타났으며, 그 중 수박에서 분리한 균에서 2.128 µg/mL의 ochratoxin A함량을 보여 가장 높은 생성량을 나타내었다. 또 대체로 토양 중에서 ochratoxin A의 생성균의 분리율이 높게 나타났다.

그 중 가장 높은 ochratoxin A의 생성능을 보인 분리균(# 129-2)의 경우, ELISA 분석 시는 2.128 µg/mL의 ochratoxin A생성량을 보였으나 HPLC법 결과는 2.071 µg/mL으로서 ELISA법 결과보다 다소 낮게 나타났다으나 이는 시료의 조제나 분석과정에서 나타난 실험상의 오차에 기인하리라 생각되며 ochratoxin A 생성균의 검색에 ELISA법이 신속하고 간편한 방법으로

Table 3. Cross-reactivity of ochratoxin A analogues by indirect competitive ELISA

Analogues	Cross-reactivity (%)
Ochratoxin A	100
Ochratoxin B	0
Ochratoxin C	24
4-Hydroxyochratoxin A	0
Aflatoxin B1	0

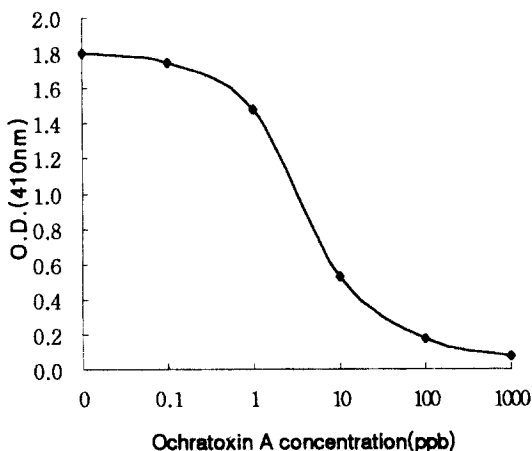


Fig. 1. Standard curve for ochratoxin A by indirect competitive ELISA.

Table 4. Distribution of ochratoxin A producing strains in the sample source

No. of sample	No. of isolates		Ochratoxin A producing strains	
	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.	<i>Aspergillus</i> sp.	<i>Penicillium</i> sp.
				1 (0.1µg/mL이하)
192	142	153	-	3 (0.1-1.0µg/mL)
				1 (1.0µg/mL이상)

Table 5. Comparison of ochratoxin A levels of isolated strains between indirect competitive ELISA and HPLC method

Sample sources	Strains isolated	Ochratoxin A (µg/mL medium)	
		ELISA	HPLC
Water melon	129-2	2.128	2.071
Soil	98-B-3	0.951	0.9301
Sesame	107-2	0.379	0.346
Soil	94-2	0.301	0.341
Soil	98-B-2	0.084	0.098

Cultured on modified sucrose low salt medium at 28°C for 15 days.

로 나타났다.

본연구에서는 시설원예산물에서 분리된 곰팡이 중 ochratoxin A 생성균을 확인하였고, 이러한 결과는 시설원예산물에서의 ochratoxin A를 비롯한 다른 mycotoxin 생성균의 오염가능성을 예측할 수 있다. 따라서 시설원예산물의 안전성향상을 위하여 이러한 유해균은 물론 유해 mycotoxin의 시설원예산물에서의 오염방지를 위한 지속적인 연구와 관심이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

## 요 약

시설 원예산물 중 곰팡이 독소 생성능이 있는 균주의 오염여부를 조사하기 위해 진주를 비롯한 서부 경남 일원과 경북 안동 근교에서 가지, 메론, 배추, 상추, 오이, 수박, 참외, 토마토, 딸기, 및 그 토양 등의 시료를 수집하여 ochratoxin A 생성균의 오염정도를 관찰하였다. 분석방법은 indirect competitive ELISA 법을 사용하였으며, HPLC법과도 비교 분석하였다. 그 결과 경남 일원과 경북 안동 근교에서 총 192점의 시료를 분리하여 균분리를 실시한 결과 *Aspergillus*속 142균주, *Penicillium*속 153균주를 분리하였다. 분리된 균은 SLS배지로 28°C, 15일간 배양한 후 indirect competitive ELISA 법에 의해 ochratoxin A의 생성여부를 검색하였다. 그 결과 *Penicillium*속 5균주에서 ochratoxin A 생성이 확인되었으며 검출량은 0.084~2.128 µg/mL이었고, 수박에서 분리한 균주가 2.128 µg/mL로 가장 많은 ochratoxin A를 생산하였다. 그러나 *Aspergillus*속은 모두 음성반응을 나타내었다. ELISA법에서 ochratoxin A를 생성하는 것으로 나타난 균주를 HPLC법에 의해 확인한 결과 ochratoxin A의 생성이 확인되었으며 생성량은 ELISA 결과와 비슷하였다.

## 감사의 글

이 연구는 1997년도 교육부 농업과학 학술연구조성비 지원에 의해 수행된 연구결과의 일부로 연구지원에 감사드립니다.

## 문 헌

1. Ciegler, A.: Bioproduction of ochratoxin A and penicillic

acid by members of the *Aspergillus ochraceus* group. *Can. J. Microbiol.*, **18**, 631-636 (1972)

2. Moss, O.M.: Mode of formation of ochratoxin A. *Food Additives and Contaminants*, **13**, 5-9 (1996)

3. Steyn, P.S. and Betina, V.: Mycotoxins-production, isolation, separation and purification. Elsevier, Amsterdam, Oxford, New York, Tokyo. p. 183-239 (1984)

4. Haggblom, P. and Jyotirmou Ghosh.: Post harvest production of ochratoxin A by *Aspergillus ochraceus* by and *Penicillium Viridicatum* in barley with different protein levels. *Appl. Environ. Microbiol.*, **49**, 787-790 (1985)

5. Pitt. I.: *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and Production of Ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **53**, 266-269 (1987)

6. Patterson, D.S.P. and Roberts, B.A.: Mycotoxins in animal feedstuffs : Sensitive thin layer chromatographic detection of aflatoxin, ochratoxin A, sterigmatocystin, zearalenone and T-2 toxin. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 1265-1267 (1979)

7. Takeda, Y., Isohata, E., Amano, R. and Uchiyama, M.: Simultaneous extraction and fractionation and thin layer chromatographic determination of 14 mycotoxins in grains. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **62**, 573-578 (1979)

8. Horwitz, E.: Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. Association of Official Analytical Chemists, Washinton, D. C., p. 477-478 (1975)

9. Hisaya, T., Haruo, T. Katsuhiko, Y. Kazuo, H and Yoshio, S.: Liquid chromatographic determination ochratoxin A in coffee beans and coffee products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **69**(6), 960-963 (1986)

10. Andrzej, A. Frohlich, ronakd, R., M. and Aniko, b.: Quantities of Ochratoxin A : Use of reserve phase thin layer chromatography for sample clean up flowed by liquid chromatography or direct fluorescence measurement.. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **71**(5) 949-953 (1988)

11. Candlish A.A.G., Stimson W.H. and Smith J.E.: A monoclonal antibody to ochratoxin A. *Lett. Appl. Microbiol.*, **3**, 9-11 (1986)

12. Pestka J.J., Steinert B.W. and Chu F.S.: Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.*, **41**, 1472-1474 (1981)

13. Lee S.C. and Chu F.S.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in wheat. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **67**, 45-49 (1984)

14. Morgan M.R.A., Mcnerney R. and chan Henry W.S.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A in barye. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.*, **66**, 1481-1484 (1983)

15. Kawamura, O., Sato S., Kajii, H. M., Nagura, K., Ohtani, J., Chiba And Ueno Y.: Enzyme-linked immunosorbent assay of ochratoxin A based on monoclonal antibodies. *Toxicology*, **27**, 887-897 (1990)

(1998년 6월 4일 접수)