

RESEARCH ARTICLE

저장 땅콩에서 분리된 *Aspergillus flavus*의 다양성 및 독소생성능

최정혜, 나주영, 이미정, 임수빈, 이데레사, 김점순*
국립농업과학원 유해생물과

Diversity and Mycotoxin Production of *Aspergillus flavus* in Stored Peanut

Jung-Hye Choi, Ju-Young Nah, Mi-Jeong Lee, Su-Bin Lim, Theresa Lee, and Jeomsoon Kim*
Division of Microbial Safety, National Institute of Agricultural Sciences, Rural Development Administration, Wanju 55365, Korea

*Correspondence author: kimjs33@korea.kr

ABSTRACT

Peanuts in storage were estimated for mycotoxigenic fungi and mycotoxins. Peanut samples collected from storages in Gochang were mainly contaminated with *Fusarium* (17.2±28.0%), *Penicillium* (12.4±28.0%), and *Aspergillus* (8.0±7.6%). Other genera, including *Talaromyces*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Trichocladium*, *Clonostachys*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Trametes*, *Epicoccum*, and *Humicola*, were also found. Although aflatoxins were not detected in the peanut samples, 29 strains of *Aspergillus flavus* were identified using molecular marker genes. Among them, 17 selected isolates produced aflatoxins in solid culture media ranging from 0.61–187.82 µg/kg. All of them could produce both aflatoxin B₁ and B₂ and some (n=5) produced additional G₁, G₂, or both. This study is the first report that *A. flavus* stains obtained from Korean stored peanut are aflatoxigenic.

Keywords: Aflatoxin, *Aspergillus flavus*, Genetic diversity, Mycotoxin production, Peanut



OPEN ACCESS

pISSN : 0253-651X
eISSN : 2383-5249

Kor. J. Mycol. 2021 September, 49(3): 303-313
<https://doi.org/10.4489/KJM.20210027>

Received: July 13, 2021

Revised: September 01, 2021

Accepted: September 17, 2021

© 2021 THE KOREAN SOCIETY OF MYCOLOGY.



This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서론

Aspergillus 속 곰팡이는 자연계에 널리 분포하는 부생성, 기회감염성 곰팡이로 *Penicillium* 속과 함께 다양한 작물의 저장 중 부패를 유발하는 것으로 알려져 있다[1]. 그러나 저장 중인 곡물 뿐만 아니라 재배 중인 밀, 벼, 옥수수, 수수, 견과류, 목화, 고추 등의 작물들과 가공식품에서도 발견된다[2,3]. *A. flavus*와 *A. parasiticus*를 비롯한 18여 종의 *Aspergillus* 속 곰팡이는 인간과 동물에 유해한 아플라톡신 독소를 생성한다[4]. 아플라톡신은 B₁, B₂, G₁, G₂를 포함하여 20여 종이 알려져 있는데, B₁의 독성이 가장 강하며 발암, 돌연변이, 기형유발, DNA 손상, 면역력 억제 등을 일으킨다[5,6]. 아플라톡신은 Group 1 발암물질로 분류되어 대부분의 국가들이 강력히 규제하고 있다[1].

전 세계적으로 쌀, 옥수수 등 곡물류의 최대 37.6%가 아플라톡신에 오염되어 있으며[7], 특히 땅콩 등의 견과류, 무화과 등의 건조과일, 고춧가루의 오염률이 높은 것으로 보고되고 있다[3]. 땅콩의 주요 생산국인 중국에서 저장 땅콩의 19%가 0.01–1,602 $\mu\text{g}/\text{kg}$, 땅콩 오일(427점)의 22.5%가 15.4–49.9 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 의 아플라톡신에 오염된 것으로 보고되었다[8,9]. 국내의 경우 유통 중인 견과류 및 가공식품에서 아플라톡신의 오염이 보고되었다. 박[10]에 의하면, 2003년 국내에서 유통되고 있는 땅콩 및 땅콩버터의 아플라톡신 B₁ 오염률은 각각 25%와 17%로 국산 땅콩 28점 중 4점, 수입산 12점 중 6점에서 오염이 확인되었으며, 평균 오염수준은 수입산이 높은 것으로 보고되었다. 또한 국내 유통 중 견과류(가공식품 포함), 장류, 곡류(가공품)에 대한 아플라톡신 B₁ 오염도 조사 결과 식품 기준치를 초과하지는 않았으나 견과류 및 그 가공식품의 검출빈도가 가장 높았다[11].

국내에서 땅콩의 아플라톡신 오염이 일부 보고되었으나 *A. flavus*의 발생에 대한 연구는 전무하다. 이에 본 연구에서는 아플라톡신 오염 빈도가 높은 땅콩의 저장 중 독성 곰팡이 및 아플라톡신의 오염도를 조사하였다. 또한 땅콩에서 분리된 *A. flavus*의 다양성 및 아플라톡신 독소의 생성능을 평가하였다.

재료 및 방법

땅콩 시료 수집 및 균 분리

2019년 10월에 고창 지역에서 수확되어 저장 중인 피땅콩을 2020년 2월과 4월에 수집하여 독성곰팡이 오염현황을 조사하였다. 저장창고 2곳에서 3개의 개별 포장백(30 kg)으로부터 각각 1 kg씩 채집하였다. 시료 채집 기간 동안 저장창고의 평균온도 및 상대습도는 각각 $7.9 \pm 2.5^\circ\text{C}$ 와 $68.0 \pm 8.1\%$, $7.5 \pm 1.4^\circ\text{C}$ 와 $68.2 \pm 1.0\%$ 의 조건이었다. 곰팡이 오염현황 조사 및 균 분리를 위하여 땅콩의 겉껍질을 제거하여 알땅콩을 수집하였다. 알땅콩은 속껍질을 유지한 채 1% sodium hypochlorite 용액에 3분간 침지하여 표면 소독하고 살균수로 2회 세척 후 여과지로 물기를 제거한 다음, 반으로 절단하여 potato dextrose agar (PDA) (streptomycin 600 $\mu\text{g}/\text{mL}$)와 dichloran-glycerol (DG18) agar 배지에 각각 50개씩 치상하였다. 25°C 항온기에서 5일간 배양한 후 현미경 하에서 형태학적 특성을 기반으로 곰팡이 오염도를 조사하였으며, 균 분리 및 동정을 위해 단일 균총의 포자현탁액을 water agar에 도말, 25°C 항온기에서 18시간 배양 후 단포자를 분리하였다(Fig. 1). 분리된 균주는 20% glycerol 용액에 혼입하여 -80°C 에 보관하였다.

DNA 추출 및 염기서열 분석

분리된 균주는 PDA 배지에 25°C 에서 3–5일간 배양 후, 지 등[12]의 방법을 이용하여 균사체로부터 genomic DNA를 추출하여 -20°C 에 보관하면서 실험에 사용하였다. 균 동정 및 유전적 다양성 분석을 위해 internal transcribed spacer region (ITS) rDNA, beta-tubulin (*BT*), RNA polymerase II subunit (*RPB2*), translation elongation factor 1 α (*TEF-1 α*) 유전자를 이용하였다(Table 1). *Aspergillus* 및 *Penicillium* 속 균주들은 보다 정확한 동정을 위해 ITS와 *BT* 유전자들을, *Fusarium* 속 균주는 translation elongation factor 1 α (*TEF-1 α*) 유전자의 염기서열을 분석하여 동정하였다. *Aspergillus* 속

균주 중 33개의 *A. flavus*와 *A. oryzae* 균주들은 아플라톡신 생합성 유전자 *norB-cypA*와 *omtA*를 추가로 분석하여 종을 구분하였다[13,14]. *A. flavus*와 *A. oryzae*는 ITS, *BT* 유전자는 물론 AFs 생합성 유전자 또한 높은 염기서열 상동성을 가져 구분하기 어렵기 때문에, *affT*, *norA* 그리고 *verA* 세 유전자에 대한 결손 여부, *omtA* 유전자의 다형성 비교를 통해 *A. flavus*, *A. oryzae* 종을 동정하였다.

균 동정 및 유전적 다양성을 조사하기 위해 ITS, *BT*, *RPB2* 그리고 *omtA* 유전자의 염기서열을 DNASTAR (Lasergene 8, Madison, WI, USA)를 이용하여 교정하고, ClustalW 소프트웨어[15]를 이용하여 정렬하였다. ITS, *BT*, *RPB2* 유전자들의 염기서열들을 결합한 multi-locus 염기서열(2,700 bp)과, *omtA* 유전자 단일 염기서열(510 bp)을 MEGA-X 프로그램[16]을 사용하여 각각 maximum likelihood (ML) 법으로 계통수를 작성하였다.

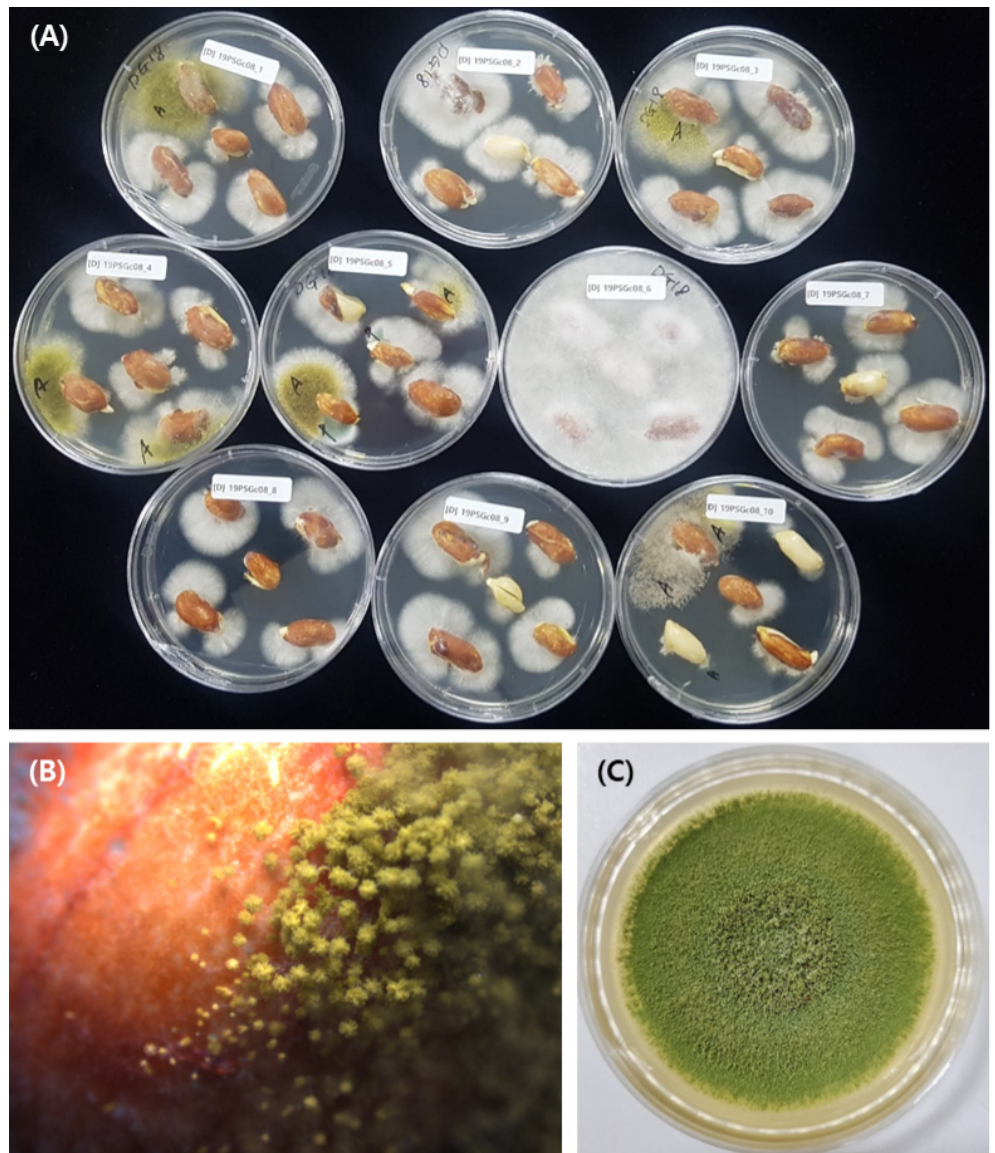


Fig. 1. Fungal colonies grown from peanuts on PDA (A), conidial heads of *A. flavus* (B) and PDA culture (C).

Table 1. Primers and polymerase chain reaction (PCR) conditions used in this study.

Target genes	Primer name	Sequences	Tm (°C)	PCR product size (bp)
ITS	ITS4	5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'	52	710
	ITS5	5'-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3'		
BT	bt2a	5'-GGTAACCAAATCGGTGCTGCTGCTTTC-3'	55	500
	bt2b	5'-ACCCTCAGTGTAGTGACCCTTGGC-3'		
RPB2	fRPB2-5F	5'-ATGGGYAARCAAGCYATGGG-3'	52	1,100
	fRPB2-7cR	5'-GCRTGGATCTTRTCRTCSAC-3'		
	fRPB2-7cF	5'-ATGGGYAARCAAGCYATGGG-3'	51	910
	fRPB2-11aR	5'-GCRTGGATCTTRTCRTCSAC-3'		
norB-cypA	AP1729	5'-GTGCCCAGCATCTTGGTCCACC-3'	52	300: <i>A. oryzae</i> 800: <i>A. flavus</i> 1800: <i>A. parasiticus/A. niger</i>
	AP3551	5'-AAGGACTTGATGATTCCTC-3'		
omtA	omtAF	5'-CAGGATATCATTGTGGACGG-3'	55	594
	omtAR	5'-CTCCTCTACCAGTGGCTTCG-3'		
TEF-1α	EF1	5'-ATGGGTAAGGARGACAAGAC -3'	54	700
	EF2	5'-GGARGTACCAGTSATCATGTT-3'		

Tm, annealing temperature; ITS, internal transcribed spacer region; BT, beta-tubulin; RPB2, RNA polymerase II subunit; norB-cypA, aryl alcohol dehydrogenase and cytochrome P450 monooxygenase; omtA, O-methyltransferase; TEF-1α, translation elongation factor 1α.

땅콩의 곰팡이독소 분석

땅콩에서 자연 발생하는 아플라톡신의 정량분석은 식품공전[17]과 Trucksess 등의[18] 시험법을 변형하여 수행하였다. 땅콩의 겉껍질을 제거, 알땅콩만 수집하여 믹서로 분쇄 후 65°C에서 18 시간 건조하여 실험에 사용하였다. 아플라톡신(B₁, B₂, G₁ 및 G₂) 분석을 위해 균질화된 시료 3 g에 NaCl 1 g과 추출용액(MeOH: 0.5% NaHCO₃=7:3, v/v) 15 mL을 가하여 300 rpm에서 1시간동안 진탕 추출하였다. 추출액은 3600 rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액 7 mL을 취해 phosphate-buffered saline (PBS) 28 mL과 혼합하여 면역친화성컬럼(AflaTest WB, Vicam, MA, USA)에 주입하였다. 추출액이 여과된 컬럼은 0.1 × PBS 3 mL과 증류수 5 mL로 순차적으로 세척하여 MeOH 2 mL로 용출 후 건조하였다. 용출액의 유도체화를 위해 트리플루오로초산(trifluoroacetic acid) 0.2 mL을 가하여 암실에서 15분간 방치하고, 20% ACN 0.8 mL을 가하여 혼합 후 0.2 μm 필터로 여과하였다. 시액들은 UPLC (Waters Acquity UPLC® H Class, Waters, Singapore)에 Xselect CSH C18 (2.5 μm, 2.1 × 100 mm, Waters, Dublin, Ireland) 컬럼을 장착하여 분석하였고, 유속 0.2 mL/min, 시료 주입량 10 μL, 분석시간 10 min, 이동상 DW:ACN:MeOH (65:15:20), 형광검출기(fluorescence detector, FLD) 파장 Ex=362 nm와 Em=455 nm 조건에서 분석하였다.

Aspergillus 분리균의 독소생성능

분리된 *Aspergillus* 속 균주들 중에서 아플라톡신 생성 가능성이 있는 균주들을 선발하기 위해 PCR을 실시하였다. 아플라톡신은 생합성 유전자 중 norB-cypA 유전자 부위를 증폭하기 위해 AP1729와 AP3551 프라이머를 이용하였다. 선발된 17점의 아플라톡신 생성 가능 균주들은 *A. flavus-A. parasiticus* agar (AFPA, Oxoid) 배지에 배양하여 배지 뒷면의 orange-yellow 발색 양성을 확인한 후[19], 독소생성능 실험에 이용하였다. 균주들은 20 mL로 정량하여 제작된 PDA 배지에 접종하여 25°C 항온기, 암조건에서 배양하였다. 배양 7일 후 균사를 포함하는 배지 3 g을 취하여 땅콩의 곰팡이독소 분석법과 동일하게 분석하였다.

결과 및 고찰

저장 땅콩의 곰팡이 및 곰팡이독소 오염

겉껍질이 있는 상태로 저장창고에서 보관되고 있는 땅콩은 *Fusarium* (17.2±28.0%), *Penicillium* (12.4±28.0%) 그리고 *Aspergillus* (8.0±7.6%) 속 곰팡이에 주로 오염되어 있었으며(Fig. 2), 그 외 *Talaromyces*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Trichocladium*, *Clonostachys*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Trametes*, *Epicoccum*, *Humicola* 속 곰팡이도 검출되었다. 땅콩의 주요 독성곰팡이로 알려진 *Aspergillus* 속을 주로 분리하였으며, 또한 다양한 작물들에서 독성곰팡이로 잘 알려진 *F. graminearum* species complex, *F. fujikuroi* species complex, *Penicillium* 속 곰팡이도 분리하였다. 분리된 총 145점의 균주를 동정한 결과, *Aspergillus* (68점), *Fusarium* (37점), *Penicillium* (23점), *Talaromyces* (11점) 속으로 나타났다. *Aspergillus* 속에서는 아플라톡신을 생성하는 것으로 알려진 *A. flavus* (29점, 42.6%)가 가장 많았으며, 다음으로 *A. niger* (25.0%), *A. amstelodami* (10.3%), *A. oryzae* (5.9%), *A. chevalieri* (4.4%), *A. fumigatus* (2.9%), 순이었다(Fig. 3). *Penicillium* 속은 *P. citrinum* (56.5%)이, *Fusarium* 속은 *F. oxysporum* (54.1%)이 가장 많이 동정되었다. 브라질에서 저장 땅콩은 *Fusarium* (25.8%), *Aspergillus* (21.8%)에 주로 오염되었고, 케냐에서는 *Rhizopus*, *Fusarium*, *Aspergillus*가 각각 80, 45, 24% 오염된 것으로 보고되었으며[20,21], 남아프리카에서 유통 중인 땅콩도 *Aspergillus*가 40% 이상의 발생률을 나타내었다[22]. 중국의 저장 땅콩에서는 지역간 차이는 있으나, *Rhizopus*, *Emericella*, *Clonostachys*, *Penicillium*, *Eurotium*, *Aspergillus* 순으로 우점하는 것으로 나타났고, *Aspergillus*의 오염률은 0.53–25.75%였다[23].

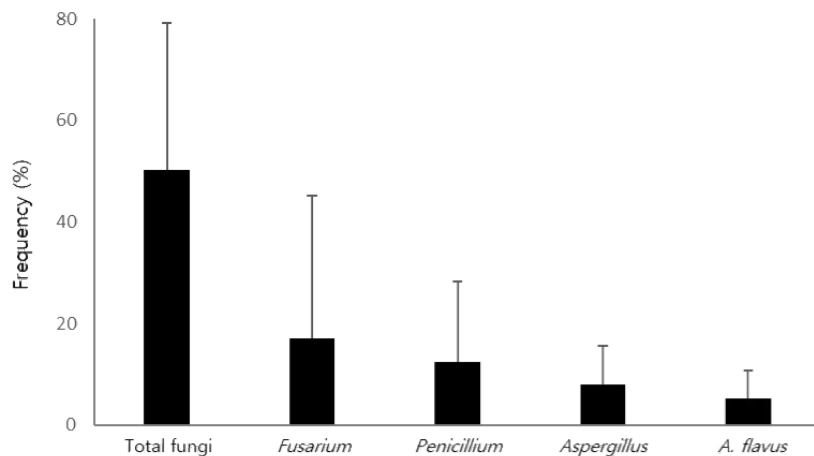


Fig. 2. Frequency of major fungal genera in Korean peanut.

고창지역 저장 땅콩에서 *A. flavus*는 6–10%의 오염률을 나타내었으나 아플라톡신은 전혀 검출되지 않았다. 브라질의 *A. flavus* 오염률 및 아플라톡신 B₁ 오염농도는 각각 3.0–31.0%와 7.0–116 µg/kg 이었고, 중국의 경우 0.12–6.39%와 1.02–4.03 µg/kg인 것으로 보고되었다[21,23]. 브라질의 경우 저장 온도는 19–27°C, 상대습도는 59–87% 이었는데, 시료의 33%가 아플라톡신에 오염되었고 대부분 기준치 이상의 농도였다. 중국의 경우 저장 초기(0–6개월)에는 온도가 -1–15°C 였으나 저장 후기(7–12개월)에는 30°C까지 증가하였고, 상대습도는 48–83%까지 증가하였다. 이에 온도가 낮은 저장 초기

(0-6개월)에는 *Aspergillus* 속 곰팡이 오염률이 낮고 아플라톡신 B₁은 검출되지 않았으나 저장 후기 온도가 상승하면서 *Aspergillus* 속 곰팡이와 아플라톡신 B₁의 오염률이 증가하였다. *A. flavus*의 성장과 그에 따른 아플라톡신의 생성은 여러가지 요인에 의해 영향을 받지만 특히 온도의 영향이 큰 것으로 알려져 있다. Schindler 등[24]에 따르면 *A. flavus*는 18°C 이하 또는 35°C 이상의 온도에서는 아플라톡신을 생성하지 않는 것으로 보고하였다. 고창 지역에서는 땅콩이 10월경에 수확되어 다음해 4월까지 상온으로 저장되는데 평균온도 7°C, 상대습도 68% 내외로 유지된다. 고창지역 땅콩에서 상대적으로 *A. flavus*의 오염률이 낮고 아플라톡신이 검출되지 않은 것은 저장기간 동안의 온도와 습도가 낮아 *A. flavus*의 성장과 그에 따른 아플라톡신의 생성에 적합하지 않기 때문으로 판단된다.

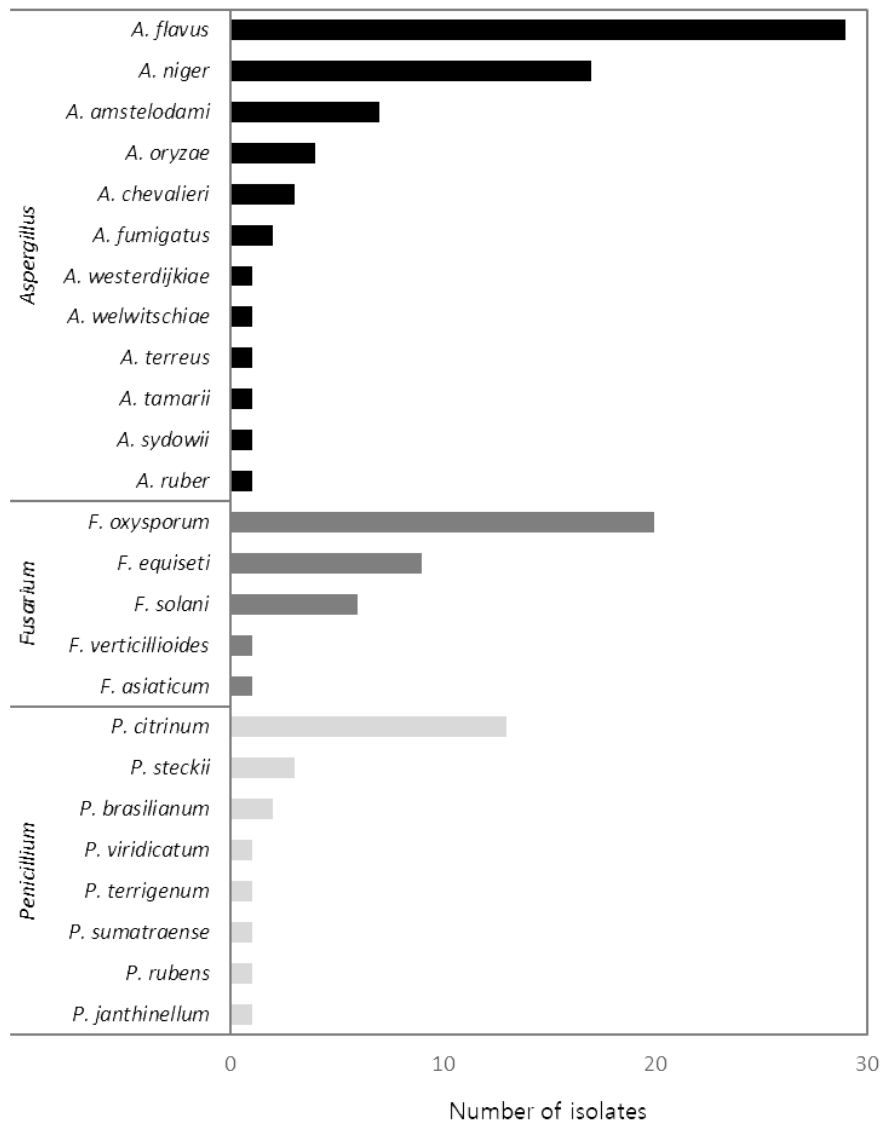


Fig. 3. Species composition of *Aspergillus*, *Fusarium* and *Penicillium* isolated from peanut.

*A. flavus*의 유전적 다양성

저장 땅콩에서 분리한 17점의 *A. flavus* 균주는 multi-locus sequence analysis 결과 2개의 유전적 그룹으로 나뉘었다(Fig. 4). PS 138과 PS 148 두 균주가 단일 그룹(Cluster IV)을 형성하였으며, 다른 그룹은 3개의 서브 그룹을 형성하였다. 3개의 서브 그룹에는 *A. flavus* NRRL 3357 균주와 근연관계를 가지는 균주 2점(Cluster III), *A. flavus* A9 균주와 근연관계를 가지는 균주 4점(Cluster I), 그 외 9점의 균주(Cluster II)가 각각 속하였다. 그룹간의 염기서열 유사도는 99.9%로 6 bp의 차이를 나타내었다. Chang 등[14]은 아플라톡신 합성 유전자 *omtA*의 다형성, *norB-cypA*의 결손 정보를 이용한 아플라톡신 독소 생성능, 그리고 morphotypes (S-와 L-type)의 비교를 통해 독성 및 비독성 *A. flavus*와 비독성 *A. oryzae*를 구분할 수 있음을 보고한 바 있다. 이에 본 연구에서 아플라톡신 생성 관련 *omtA* 유전자의 계통수 분석 결과, 분리된 *A. flavus* 균주들은 모두 L-type의 형태학적 특징을 가지며 아플라톡신을 생성할 수 있는 2개의 유전적 그룹으로 구분되었다(Fig. 5). 균주 PS 018, PS 104, PS 166, PS 175는 L-type, B+ 특성을 가지는 *A. flavus* NRRL 3357 및 *A. parasiticus* NRRL 3357 균주와 상동성을 보였고, 그 외 13점의 균주는 L-type, B+/B- 특성을 가지는 *A. flavus* A9과 *A. flavus* NPL VA2-9 균주와 100% 상동성을 보였다. *A. flavus*는 균핵의 형성 타입에 따라 2개의 morphotypes으로 구분되며, 일반적으로 L-type이 S-type보다 흔하게 발견된다. S-type의 *A. flavus*는 L-type에 비해 작은 크기(400 μm 이하)의 균핵을 만들며 3.5-4배의 아플라톡신을 만드는 것으로 보고되었다[25].

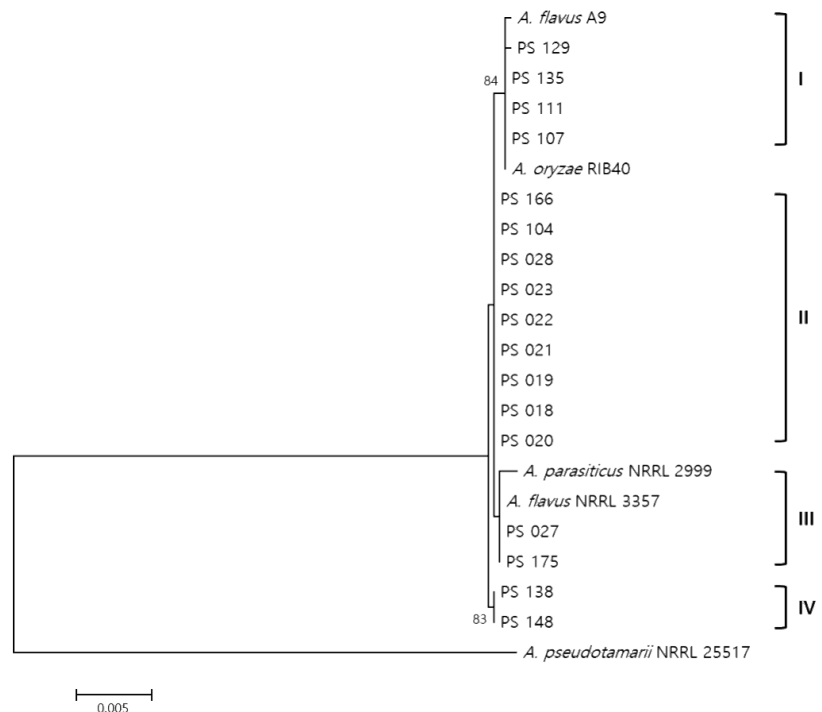


Fig. 4. Maximum-likelihood phylogenetic tree based on combined sequences of internal transcribed spacer (ITS) region, beta-tubulin (*BT*), RNA polymerase II subunit (*RPB2*) genes of *A. flavus* isolates. The numbers above the nodes represent bootstrap values of >70% out of 1,000 bootstrap replication. *A. pseudotamarii* NRRL 25517 was used as an outgroup.

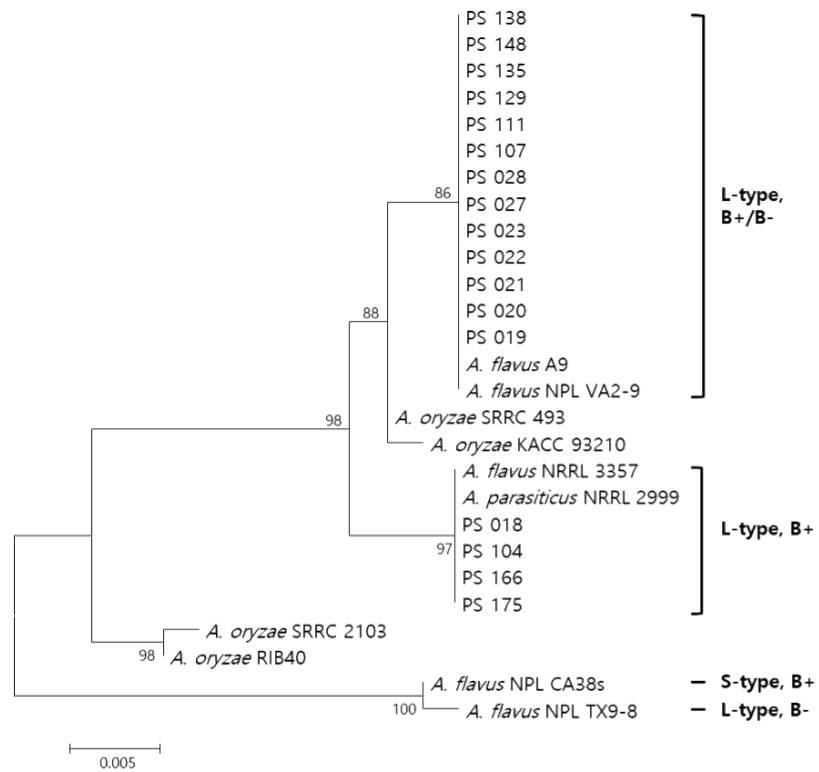


Fig. 5. Maximum-likelihood tree based on sequences of *omtA* gene of *Aspergillus flavus* isolates and related species. The numbers above the nodes represent bootstrap values of >70% out of 1,000 bootstrap replication. L- and S-type, morphotype; B+ and B-, aflatoxin B producing and non-producing strains.

*A. flavus*의 아플라톡신 생성능

분리된 *A. flavus* 균주는 시료 채집시기, 저장고, 저장백(bag)에 따라 1-2 균주씩 총 17점의 균주를 선발하였다. 선발 균주의 독소생성능을 평가한 결과, 모든 균주가 아플라톡신 독소를 생성하는 것을 확인하였다(Table 2). 총 아플라톡신 생성 농도는 최대 $187.82 \pm 20.89 \mu\text{g/kg}$, 최저 $0.61 \pm 0.87 \mu\text{g/kg}$, 평균 $68.69 \pm 62.16 \mu\text{g/kg}$ 이었고, 이 중 4점의 균주는 $100 \mu\text{g/kg}$ 이상의 아플라톡신 독소를 생성하였다. 이 균주들은 모두 아플라톡신 B₁과 B₂를 생성하였고, 그 중 1점은 G₁, 3점은 G₂, 1점(PS 175)은 G₁과 G₂를 모두 생성하였다. *A. flavus* 균주의 유전적 다양성과 아플라톡신 생성능의 관계를 살펴본 결과, Cluster III 균주들이 비교적 높은 농도의 아플라톡신을 생성하는 반면 Cluster IV의 균주들은 낮은 농도의 아플라톡신을 생성하였다.

본 연구의 고창지역 저장 땅콩에서 아플라톡신은 검출되지 않았으며, *A. flavus* 오염률이 5-10%로 낮았다. 그러나 분리된 *A. flavus* 균주의 대부분이 비교적 높은 농도의 아플라톡신을 생성할 수 있는 것으로 나타나 국내 주요 땅콩 생산지에 대한 추가적인 모니터링이 필요할 것으로 판단된다. 이 연구는 국내 저장 땅콩에서 *A. flavus* 오염률 및 독소생성능에 대한 첫 보고이다.

Table 2. Aflatoxin production of *A. flavus* isolates from stored peanut.

Isolates	Characteristics ^a	Aflatoxin (µg/kg) (mean±SD)				
		G ₂	G ₁	B ₂	B ₁	AFs
PS 166	II, B+, L	ND	0.81±0.07	0.69±0.21	186.32±20.64	187.82±20.89
PS 027	III, B+/B-, L	ND	ND	0.53±0.16	144.40±41.64	144.93±41.77
PS 104	II, B+, L	ND	ND	0.41±0.06	139.29±8.74	139.69±8.80
PS 175	III, B+, L	0.04±0.01	0.62±0.08	0.27±0.08	138.53±23.46	139.45±23.61
PS 129	I, B+/B-, L	0.03±0.02	ND	0.37±0.11	122.05±20.65	122.45±20.78
PS 111	I, B+/B-, L	0.02±0.02	ND	3.97±1.55	88.53±26.44	92.52±25.21
PS 018	II, B+, L	0.01±0.02	ND	0.23±0.05	80.54±21.73	80.78±21.76
PS 023	II, B+/B-, L	ND	ND	3.11±2.11	60.38±36.67	63.49±38.77
PS 019	II, B+/B-, L	ND	ND	1.27±0.88	59.28±35.36	60.55±36.03
PS 020	II, B+/B-, L	ND	ND	1.63±0.70	56.02±22.21	57.64±22.87
PS 022	II, B+/B-, L	ND	ND	1.39±0.70	30.24±12.28	31.62±12.83
PS 028	II, B+/B-, L	ND	ND	0.49±0.31	17.97±10.02	18.46±10.33
PS 021	II, B+/B-, L	ND	ND	0.5±0.28	12.43±2.70	12.93±2.97
PS 148	IV, B+/B-, L	ND	ND	0.13±0.03	5.36±1.62	5.49±1.65
PS 135	I, B+/B-, L	ND	ND	0.13±0.05	5.19±2.49	5.32±2.54
PS 138	IV, B+/B-, L	ND	ND	0.1±0.01	3.84±0.63	3.94±0.64
PS 107	I, B+/B-, L	ND	ND	0.02±0.03	0.59±0.83	0.61±0.87

ND: not detected; SD: fullname.

^aPhylogenetic cluster (I to IV), aflatoxin production (B+ and B-), and sclerotial morphotype (L and S).

Limit of detection (LOD) of aflatoxin G and B were 0.01 and 0.05 µg/kg, respectively.

적요

땅콩의 독성곰팡이 및 곰팡이독소 오염현황을 조사하기 위해 고창 지역의 저장고에서 땅콩을 수집하였다. 수집된 땅콩은 *Fusarium* (17.2±28.0%), *Penicillium* (12.4±28.0%), *Aspergillus* (8.0±7.6%) 속 곰팡이로 주로 오염되어 있었으며, 그 외에 *Talaromyces*, *Rhizopus*, *Rhizoctonia*, *Trichocladium*, *Clonostachys*, *Mucor*, *Chaetomium*, *Trametes*, *Epicoccum*, *Humicola* 속 곰팡이가 검출되었다. 땅콩시료에서 아플라톡신은 검출되지 않았으나, 29점의 *A. flavus* 균주가 분리, 동정되었다. 그 중 17점의 균주를 선발하여 potato dextrose agar (PDA) 배지 상에서 아플라톡신 생성능을 분석한 결과 0.61–187.82 µg/kg의 농도범위에서 모두 아플라톡신을 생성하였다. 이들 17 균주는 아플라톡신 B₁, B₂도 생성하였으며, 일부(5 균주)는 G₁ 또는 G₂를 생성하였다. 이 연구는 국내 저장 땅콩에서 *A. flavus* 오염률 및 독소생성능에 대한 첫 보고이다.

ACKNOWLEDGEMENTS

본 연구는 농촌진흥청 국립농업과학원 농업과학기술 연구개발사업(과제번호: PJ014811)의 지원에 의해 수행된 결과로, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Klich MA. *Aspergillus flavus*: The major producer of aflatoxin. *Mol Plant Pathol* 2007;8:713-22.
2. Alshannaq A, Yu JH. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int J Environ Res Public Health* 2017;14:632.
3. Mahato DK, Lee KE, Kamle M, Devi S, Dewangan KN, Kumar P, Kang SG. Aflatoxins in food and feed: An overview on prevalence, detection and control strategies. *Front Microbiol* 2019;10:2266.
4. Perrone G, Gallo A. *Aspergillus* species and their associated mycotoxins. *Methods Mol Biol* 2017;1542:33-49.
5. Wu F. Perspective: Time to face the fungal threat. *Nature* 2014;516:S7-S7.
6. Groopman JD, Kensler TW, Wild CP, JARPH. Protective interventions to prevent aflatoxin-induced carcinogenesis in developing countries. *Annu Rev Public Health* 2008;29:187-203.
7. Andrade P, Caldas EJWJ. Aflatoxins in cereals: Worldwide occurrence and dietary risk assessment. *World Mycotoxin J* 2015;8:415-31.
8. Wu LX, Ding XX, Li PW, Du XH, Zhou HY, Bai YZ, Zhang LX. Aflatoxin contamination of peanuts at harvest in China from 2010 to 2013 and its relationship with climatic conditions. *Food Control* 2016;60:117-23.
9. Qi N, Yu H, Yang C, Gong X, Liu Y, Zhu Y. Aflatoxin B₁ in peanut oil from Western Guangdong, China, during 2016-2017. *Food Addit Contam: B Surveillance* 2019;12:45-51.
10. Park JW. Analysis of peanut and peanut butter retailed in Korea for aflatoxin B₁. *Korean J Food Sci Technol* 2006;38:309-12.
11. Park MJ, Yoon MH, Hong HG, Joe TS, Lee IS, Park JH, Ko HU. A survey of the presence of aflatoxins in food. *J Food Hyg Safety* 2008;23:108-12.
12. Chi MH, Park SY, Lee YH. A quick and safe method for fungal DNA extraction. *Plant Pathol J* 2009;25:108-11.
13. Ehrlich KC, Chang PK, Yu J, Cotty PJ. Aflatoxin biosynthesis cluster gene *cypA* is required for G aflatoxin formation. *Appl Environ Microbiol* 2004;70:6518-24.
14. Chang PK, Ehrlich KC, Hua SST. Cladal relatedness among *Aspergillus oryzae* isolates and *Aspergillus flavus* S and L morphotype isolates. *Int J Food Microbiol* 2006;108:172-7.
15. Thompson JD, Gibson TJ, Plewniak F, Jeanmougin F, Higgins DG. The CLUSTAL_X windows interface: Flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4876-82.
16. Kumar S, Stecher G, Li M, Knyaz C, Tamura K. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol Biol Evol* 2018;35:1547-9.
17. Ministry of Food and Drug Safety. Korean food standards codex. Cheongju: Korea Ministry of Food and Drug Safety; 2020
18. Trucksess MW, Weaver CM, Oles CJ, Fry FS, Jr., Noonan GO, Betz JM, Rader JJ. Determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁, and G₂ and ochratoxin A in ginseng and ginger by multitoxin immunoaffinity column cleanup and liquid chromatographic quantitation: Collaborative study. *J AOAC Int* 2008;91:511-23.
19. Pitt JI, Hocking AD, Glenn DR. An improved medium for the detection of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J Appl Microbiol* 1983;54:109-14.

20. Gachomo EW, Mutitu EW, Kotchoni OS. Diversity of fungal species associated with peanuts in storage and the level of aflatoxins in infected samples. *Int J Agric Biol* 2004;6:955-9.
21. Nakai VK, de Oliveira Rocha L, Gonçalez E, Fonseca H, Ortega EMM, Corrêa B. Distribution of fungi and aflatoxins in a stored peanut variety. *Food Chem* 2008;106:285-90.
22. Adetunji MC, Ezeokoli OT, Ngoma L, Mwanza M. Phylogenetic diversity and prevalence of mycoflora in ready-to-eat supermarket and roadside-vended peanuts. *Mycologia* 2020;113:1-11.
23. Ding N, Xing F, Liu X, Selvaraj JN, Wang L, Zhao Y, Wang Y, Guo W, Dai X, Liu Y. Variation in fungal microbiome (mycobiome) and aflatoxin in stored in-shell peanuts at four different areas of China. *Front Microbiol* 2015;6:1-10.
24. Schindler AF, Palmer JG, Eisenberg WV. Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperatures. *Appl Microbiol* 1967;15:1006-9.
25. Gilbert MK, Mack BM, Moore GG, Downey DL, Lebar MD, Joardar V, Losada L, Yu J, Nierman WC, Bhatnagar D. Whole genome comparison of *Aspergillus flavus* L-morphotype strain NRRL 3357 (type) and S-morphotype strain AF70. *PloS ONE* 2018;13:e0199169.