

Enzyme Amplification System Immunoassay에 의한 시설원예산물의 Deoxynivalenol 생성곰팡이의 검색

박미자 · 박정현 · 정덕화*
경상대학교 식품공학과

Screening of Deoxynivalenol Producing Fungi from Greenhouse Horticulture by Enzyme Amplification System Immunoassay

Mi-Ja Park, Jung-Hyun Park and Duck-Hwa Chung*
Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University

Abstract

In order to evaluate the safety of greenhouse horticulture products in Korea, we carried out this work by screening of *Fusarium* species, which produce deoxynivalenol (DON) from greenhouse horticulture in Western Gyeongsang and Northern Gyeongbuk, Korea. For this study, high sensitive enzyme-linked immunosorbent assay, ALP/NADP method, was applied to detection of DON by enzyme amplification system. From 192 samples of greenhouse horticulture soil and its products, 103 isolates of *Fusarium* species were obtained. The isolates were cultured at 28°C for 15 days and the cultured mediums were extracted by ethyl acetate. The production of DON was verified by thin layer chromatography (TLC). As the results of TLC, 8 strains were identified as DON producing strain. We screened potential producers of DON by ALP/NADP. The levels of DON production were shown from 0.007 to 1.21 g/ml of YES medium. The maximum DON producing strain No. 32-D-3 was isolated from soil in Namhae, Korea. In conclusion, the above results indicate that DON producing fungi contaminated greenhouse horticulture products in Korea. Therefore, further studies are required to accumulate more detailed data about the contamination of DON in various cereals.

Key words : deoxynivalenol(DON), enzyme amplification system immunoassay

서 론

곰팡이가 생성하는 독소는 식품 등의 안전성에 영향을 미치는 식품 위해 요소로 인식되면서 큰 사회문제로 대두되어, 세계 각국에서는 농산물의 수출입 과정에서 식품 속의 mycotoxin 오염문제를 중요하게 취급하고 있다. 자연계에 존재하는 여러 곰팡이 중에서도 *Fusarium*속 곰팡이는 비교적 저온에서도 생육이 양호하며 저장 또는 가공중의 곡류 및 채소류의 부패에 관여하여 많은 독성물질을 생성한다고 알려져 있다⁽¹⁻⁴⁾. 이러한 *Fusarium*속 곰팡이가 생성하는 독성물질을 *Fusarium* toxin이라 하며 이 중에서 가장 많은

비중을 차지하는 것이 trichothecene계 독소이다. Trichothecene은 현재 180여종의 유도체가 알려져 있으며⁽⁵⁾ 그 중에서도 deoxynivalenol(DON)이 자연계에서 가장 빈번히 분리되는 독소로서 지역에 따라 다소의 차이는 있으나 DON 생성 균주는 세계적으로 널리 분포되어 있다⁽⁶⁾.

DON(3 α , 7 α , 15-trihydroxy-12, 13-epoxytrichothec-9-en-8-one)은 vomitoxin이라는 명칭으로도 통용되고 있으며 *Fusarium*속 곰팡이 중 *F. graminearum* (*Gibberella zeae*)과 *F. sporotrichioides*가 생성하는 mycotoxin이다⁽⁵⁾. 1970년대 초 *Fusarium*속에 감염된 곡류를 섭취한 가축이 구토를 일으키는 사례가 발생하였으며, Vesonder 등에 의해 최초로 DON이 분리, 동정되었다^(3,7,8). DON이 오염된 곡물을 섭취한 사람이나 가축은 설사, 구토, 발열, 피부손상, 백혈구 감소, 단백질 생합성 작용억제 등의 증상을 보인다고 보고되었다^(9,10).

Corresponding author : Duck-Hwa Chung, Department of Food Science and Technology, Gyeongsang National University, Chinju, Gyeongsang 660-701, Korea
Tel : 82-591-751-5480
Fax : 82-591-753-4630
E-mail : dhchung@nongae.gsnu.ac.kr

DON에 대해 많은 나라에서 규제를 하고 있는데, 캐나다의 경우 연질밀 2 ppm, 유아식품 1 ppm 수준을 허용 규제치로 정했으며, 미국 FDA의 경우 밀 완제품 1 ppm, 사료 5 ppm 수준을 규제치로 정해놓고 있고, 소련 보건의 규제는 경질밀 1 ppm, 기타밀 0.5 ppm으로 상당히 엄격하다^(11,12). 그러나 우리 나라의 경우 DON 등의 허용 기준치가 아직 설정되어 있지 않은 실정이라서 이에 대한 관심과 연구가 더욱 필요하다. 농산물에서의 DON 오염 여부의 검색 및 오염방제를 위해서는 DON 생성 곰팡이의 존재 유무, 분포상황 및 생성능 등에 관한 과학적 연구와 동시에 분석법을 확립하는 것이 선행되어야 할 것이다.

현재 DON의 분석은 주로 thin layer chromatography(TLC), gas chromatography/mass spectrometry 등이 이용되고 있으나, 대량의 시료 분석시 장시간과 인력이 많이 요구된다는 단점이 있다. 그러므로 DON을 정밀하게 모니터링하기 위해서는 시료 요구량이 적고, 정제가 간편하며, 대량 처리 할 수 있는 enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA)법의 개발이 요구되고 있다. 이에 Stanley 등⁽¹⁴⁾은 기존의 ELISA보다 민감성을 증가시킨 amperometric enzyme-amplified immunoassay를 확립하여 이에 대해 보고하였다.

본 연구에서는 시설원예산물과 원예산물의 안전성을 평가하기 위한 일환으로 시설재배가 많이 이루어지고 있는 경남일대의 비닐하우스에서 그 산물과 토양을 채취하여 *Fusarium*속 곰팡이를 분리하고, 분리된 균을 인공배양 한 후 독소 생성능이 있는 곰팡이를 TLC 방

법으로 검색한 후 enzyme amplification system immunoassay에 의해 DON 생성량을 정량하여 그 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

Anti-DON MAb는 본 실험실에서 제작한 DON-3 hybridoma cell line 배양상등액을 사용하였으며, polyethylene sorbitan monolaurate(Tween 20), hydrogen peroxide, deoxynivalenol(DON), diethanolamine, p-iodonitrotetrazolium violet(INT-violet) 등은 Sigma사(Louis, MO, USA)로부터, antimouse-IgG-alkaline phosphatase conjugate는 Jacson사에서, diaphorase, β -nicotinamide adenine dinucleotide phosphate(β -NADH), alcohol dehydrogenase는 Boehringer mannheim사에서 그리고 TLC plate(No. 5553)는 Merck사에서 구입하여 사용하였다. 그 외 사용한 시약과 유기용매는 특급 이상을 사용하였다. 또한 microtiter plate 96 well은 Dynex technologies사에서, ELISA reader는 Bio-Rad model 550(U.S.A)을 사용하였고 계산은 Bio-Rad사에서 제공한 Ver. 4.0 MPM ELISA reader software를 사용하여 산출하였다.

균원시료

본 실험에 사용된 균원시료는 진주를 비롯한 서부 경남 일원과 경북 안동근교의 비닐하우스에서 재배되

Table 1. Sample origin for the screening of DON producing strains from greenhouse horticulture environment in Western Gyeongnam and Northern Gyeongbuk

	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
Sesame	1											1
Total	35	34	18	18	5	7	8	4	51	8	4	192

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

고 있는 가지, 오이, 메론, 참외, 수박, 딸기, 호박 등의 시설원예산물과 그 토양을 1997년 6월부터 1998년 8월 사이 5차에 걸쳐 Table 1과 같이 총 192점의 시료를 일정량씩 수집하여 4°C에 보관하면서 DON 생성균의 검색에 사용하였다.

*Fusarium*속 곰팡이의 분리

균의 분리는 시험관(18×200 mm)에 증류수 10 mL과 시료 1 g을 취하여 시험관을 교반기로 혼합한 후 혼합액 200 µL를 rose bengal agar 평판배지에 분주하여 도달한 후 28°C에서 4일간 배양하였다. 평판배양 후 Nelson⁽⁴³⁾ 등의 방법으로 colony의 모양, 크기 및 색깔 등을 관찰하여 *Fusarium*속으로 추정되는 균주를 선정하여 PDA 평판배지에서 분리를 반복하면서 단일 집락을 PDA 사면배지에 접종시킨 후 4°C에 보관하며 실험에 사용하였다.

분리균의 배양 및 DON 생성균 검색을 위한 시료조제

순수 분리한 *Fusarium*속 곰팡이의 DON 생성곰팡이를 검색하기 위하여 시험관에 YES배지 7 mL씩 넣고 멸균한 다음 분리균의 conidia 100 µL씩 접종한 후 25°C에서 15일간 배양한 다음 멸균하고 AOAC법에 준하여 동량의 ethyl acetate로 추출하여 유기용매 층 1 mL을 취해 농축한 후 200 µL ethyl acetate에 재 용해하여 DON 생성균을 검색하였다.

TLC에 의한 DON 생성균 검색

TLC 방법에 의해 DON 생성능이 있는 균을 확인하였다. DON의 TLC 검색은 배양이 끝난 배지를 121°C에서 15분간 멸균한 후 균체를 제거하고 ethyl acetate로 추출하여 용매층을 일정량 회수하여 고속진공농축기로 농축시킨 후 ethyl acetate 200 µL에 용해시켜 TLC 하였다. 전개용매는 toluene : acetone : methanol = 5 : 3 : 2(v/v) 혼합용액을 사용하였으며, 발색제로서는 20% aluminum chloride anhydrous(20 g/60% ethanol 100 mL) 용액으로 발색시키고 100-110°C에서 10분 정도 건조시킨 후 UV(365 nm)하에서 관찰하였다.

면역분석법에 의한 DON의 분석

본 실험에서 제작된 DON-3 hybridoma cell 배양상등액을 이용한 일반적 ELISA법은 검출한계가 높아 이를 개선하기 위하여 enzyme amplification system immunoassay법을 사용하였다. 분리균의 배양액으로부터 DON을 분석하기 위하여 DON-BSA를 완충액(coating buffer pH 9.0)에 녹여 microtiter plate에

100 ng/well로 100 µL씩 주입하여 4°C에서 하룻밤 방치하여 코팅한 후 세척용 완충용액으로 3회 세척하였다. 항체의 비 특이적인 반응을 방지하기 위해 PBS에 녹인 0.5% skim milk를 가하여 하룻밤 4°C에 방치한 후 세척용 완충용액으로 3회 세척하였다. 세척한 plate에 표준 DON 또는 배양추출액인 ELISA sample과 DON-Ab를 희석하여(1 : 300) 각각 50 µL씩 well에 주입하고 다시 4°C에서 하룻밤 반응시켰다. 반응시킨 plate를 세척용 완충용액으로 4회 세척하고 1 : 5000으로 희석한 2차 항체(ALP-labeled goat anti-mouse IgG)를 100 µL를 분주하여 1시간 동안 실온에서 반응시킨 후 세척용 완충용액으로 다시 5회 세척하고 기질용액(NADP; 0.1 nM NADP(NAD free) in 50 mM diethanolamine buffer (pH9.5) with 1 mM MgCl₂ and Na₂S₂O₈ 100 µL)를 분주하여 1시간동안 실온에서 반응시킨 후 enzyme amplifier solution 100 µL를 분주하여 실온에서 30분간 발색시킨 후 ELISA reader로 490 nm에서 흡광도를 측정하고 Bio-Rad사에서 제공한 소프트웨어를 사용하여 DON 함량을 계산하였다.

결과 및 고찰

균의 분리

시설원예산물 중에서 *Fusarium* toxin 생성능이 있는 균주의 오염여부를 조사하기 위해 진주를 비롯한 서부경남 일원과 안동 근교에서 시료 192점을 수집하였다. 균의 분리는 순수한 곰팡이만을 자라게 하기 위하여 rose bengal agar와 PDA 평판배지에서 분리·배양한 후 곰팡이를 분리하였으며 집락을 관찰하여 그 종을 분류하였다. 분리한 *Fusarium*속 곰팡이의 균사체는

Fig. 1. Isolated *Fusarium* strain on potato dextrose agar plate.

Table 2. Occurrence of *Fusarium* spp. from sample origin

Sample	No. of sample	<i>Fusarium</i> spp.
Soil	107	53
Pepper	6	5
Strawberry	4	3
Watermelon	29	17
Tree	2	-
Chines cabbage	1	-
Pumpkin	5	3
Sweet potato	4	3
Lettuce	2	1
Yellow melon	8	5
Cucumber	7	4
Tomato	7	4
Corn	1	1
Young radish	5	2
Melon	2	2
Eggplant	1	1
Sesame	1	-
Total	192	103

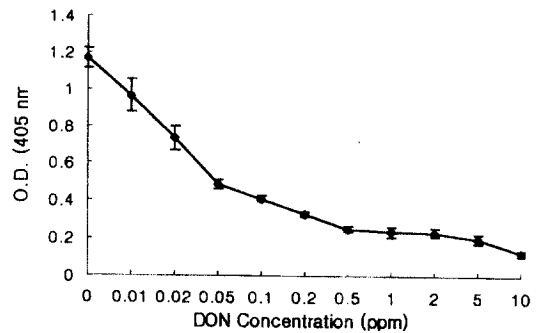
Fig. 2. TLC chromatogram of culture extracts from *Fusarium* isolates.

A :32-D-3, B :57-G-2, C :36-D-3, D :Standard DON, E :88-E-5, F :32-D-4

모양으로 처음에는 백색을 나타내다가 후에 Fig. 1과 같이 핑크색을 보이는 전형적인 *Fusarium*속 곰팡이의 형태를 나타내었다. 이러한 집락의 형태학적 특징으로 *Fusarium*속으로 추정되는 103종의 균을 Table 2와 같이 분리 할 수 있었다.

TLC법에 의한 DON 생성균의 검색

분리한 균을 순수 분리하여 conidia를 얻은 다음, YES배지에서 배양하여 DON 생성균을 검색하였다. 배양물을 ethyl acetate로 추출하여 유기용매 총 1 mL을 취하고 농축한 후 200 μ L의 ethyl acetate에 재 용해하여 TLC를 행한 결과 Fig. 2와 같이 DON 생성 균주

**Fig. 3. Standard curve of DON by enzyme amplification system immunoassay.****Table 3. Concentration of DON from the culture media by enzyme amplification system immunoassay**

Sample source	No. of isolate	DON (ng/mL medium)
Soil	32-D-3	1.210.02
Soil	57-G-2	0.550.16
Soil	36-D-3	0.870.08
Soil	91-B-2	1.120.05
Soil	58-G-1	0.800.02
Soil	32-D-4	1.10.19
Soil	88-E-5	0.210.03
Pepper	113-H-3	0.0070.01

8개가 1차 검색되었다.

Enzyme amplification system immunoassay에 의한 DON 정량

TLC법에 의해 확인된 균주의 DON 생성능을 조사하기 위하여, 본 실험실에서 제작한 DON-3 monoclonal hybridoma cell 배양상등액을 이용하여 enzyme amplification system immunoassay의 표준곡선을 작성하였다. 그 결과 10 ppb-10 ppm까지 검출 가능함을 확인할 수 있었다. 이를 바탕으로 TLC법에 의해 확인된 8균주의 ethyl acetate 추출물을 1 mL 취하고 농축한 후 100% methanol로 용해한 후 PBS로 10% methanol/PBS가 되도록 희석하여 시료를 조제한 후 확립된 enzyme amplification system immunoassay한 결과 Fig. 3과 같이 표준 DON의 농도가 높아짐에 따라 O.D. 값의 수치가 상대적으로 적어지는 민감한 표준곡선을 보였다. 분리된 8균주의 배양액을 민감도가 뛰어난 enzyme amplification system immunoassay에 의해 정량하여 그 결과를 Table 3에 나타내었다. 그 결과, 분리균 32-D-3이 1.21 μ g/mL로 가장 높았고 113-H-3이 0.007 μ g/mL로 가장 적게 나타났다. 이와 같이 낮은 수준의 DON도 측정 가능한 것으로 보아 enzyme

amplification immunoassay법이 DON 생성균의 검색에 신속하고 민감한 방법으로 사용될 수 있을 것으로 생각되었다.

이상의 결과로 보아 시설원예산물에서 DON 생성균의 오염가능성이 예측되므로 시설원예산물의 안정성 향상을 위하여 DON을 포함한 mycotoxin의 오염방지를 위한 지속적인 관심과 연구가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

요 약

시설원예산물 중 DON 생성능이 있는 균주의 오염 여부를 조사하기 위해 진주를 비롯한 서부 경남 일원과 경북 안동 근교에서 총 192점의 시료를 분리하여 균 분리를 실시한 결과 *Fusarium*속 103균주를 분리하였다. 분리된 균을 YES배지로 28°C, 15일 배양한 후 ethyl acetate로 추출하여 thin layer chromatography (TLC)법으로 확인한 결과 DON 생성 균주 8개가 확인되었다. Enzyme amplification system immunoassay법을 이용하여 DON 생성 균주 8개를 정량한 결과 검출범위는 0.007-1.21 µg/mL 이었다. 이 중 남해 토양에서 분리한 32-D-3 균주가 1.21 µg/mL로 가장 높았다.

감사의 글

본 연구는 교육부(한국학술진흥재단)에서 시행한 1999년도 과학기술기초 중점연구지원사업에 의하여 연구비 지원을 받았으므로 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Kang S. J., Park B. J., Lee J. O., Kang J. S. and Chung D. H. Screening of ochratoxin A producing fungi from greenhouse horticulture. *Korean J. Food Sci. Technol.* 30: 1415-1419 (1998)
2. Lee H. B., Shon D. H., Kunio, K. and Ueno, Y. Development of enzyme-linked immunosorbent assay system for the detection of deoxynivalenol in corn. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 414-419 (1997)
3. Kang S. J. and Chung D. H. Establishment of indirect competitive ELISA for the detection of zearalenone produced by *Fusarium* sp. *J. Fd. Hyg. Safety* 13: 419-424 (1998)
4. Forsell, J. H., Witt, M. F., Tai, J. H., Jensen, R. and Pestka, J. J. Effects of 8-weeks exposure of the B6C3F1 mouse to dietary deoxynivalenol(vomitoxin) and zearalenone. *Fd. Chem. Toxic.* 24: 213-219 (1996)
5. Ueno, Y. Mycotoxins. p. 139. In: *Toxicological aspects of food.* Miller, K. (ed.). Elsevier Applied Science, London, UK (1987)
6. Vesonder, R.F., Ciegler, A. and Fensen, A. H. Isolation of the emetic principle from *Fusarium*-infected corn. *Appl. Microbiol.* 26: 1008-1010 (1973)
7. Yoshizawa, T and Morooka, N. Deoxynivalenol and its monoacetate: new mycotoxin from *Fusarium roseum* and mouldy barley. *Agric. Biol. Chem.* 37: 2933-2934 (1973)
8. Abouzied, M. M., Azcona, J. I., Braselton, W. E. and Pestka, J. J. Immunochemical assessment of mycotoxins in 1989 grain foods: evidence for deoxynivalenol(vomitoxin) contamination. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 672-677 (1991)
9. Rotter, B. A., Prelusky, D. B and Pestka, J. J. Toxicology of deoxynivalenol. *J. Toxicol. Environ. Health* 48: 1-34 (1996)
10. Pestka, J. J. Enhanced surveillance of foodborne mycotoxins by immunochemical assay. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71: 1075-1081 (1988)
11. Clare, mills, E. N., Sandra, A., Heather, A. L. and Morgan, M. R. A. An Enzyme-linked immunosorbent assay for deoxynivalenol in wheat, utilizing novel hapten derivatization. *Food Agric. Immunol.* 2: 109-118 (1990)
12. Rotter, B. A., Prelusky, D. B. and Pestka, J. J. Toxicology of deoxynivalenol. *J. Toxicol. Environ. Health* 48: 1-34 (1996)
13. Nelson, P. E., Toussoun, T. A. and Marasas, W. F. O. *Fusarium* species and illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University Park, Pennsylvania. 1-193. (1983)
14. Stanley, C. J., Cox, R. B., Cardosi, M. F. and Turner, A. P. F. Amperometric enzyme-amplified immunoassays. *J. Immunol. Methods* 112: 153-163 (1988)

(1999년 12월 10일 접수)