

몇가지 고오지 곰팡이가 *Aspergillus flavus* 에 의한 Aflatoxin 생성에 미치는 영향

김 성 태·김 영 배

고려대학교 농과대학 식품공학과
(1986년 5월 15일 접수)

The Effect of Some Koji Molds on Production of Aflatoxin by *Aspergillus flavus*

Sung-Taek Kim and Young-Bae Kim

Department of Food Technology, College of Agriculture, Korea University, Seoul, Korea

Abstract

The aflatoxin production by *Aspergillus flavus* ATCC 15517 decreased in the mixed culture with *Aspergillus awamori*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, or with *Aspergillus shirousamii* to 1.3%, 13.8%, 1.3%, 0.7%, or 38.5% of that of monoculture respectively. These koji molds degraded 75%~100% of added aflatoxin B₁ (791 μ g/50ml YES medium). *A. awamori* secreted during growth aflatoxin degrading factor(s) which was heat-labile. The degraded aflatoxin by the factor(s) showed no toxicity against *Bacillus megaterium* NRRL B-1368.

서 론

Aflatoxin은 곰팡이독 중에서 가장 강력한 급성 독성과 발암성을 보이며¹⁾, 저장곡류나 기타 식품에 흔히 오염되는 몇종의 *Aspergillus* 속의 곰팡이에 의해서 생성되므로 보건위생상 큰 우려를 낳고 있다. 그러나 한편 실험적으로 쌀이나 메주에서 *Aspergillus flavus*는 다량의 aflatoxin을 생성할 수 있으나²⁾ 실제로 자연발효에 의해 제조된 재래식 메주에서의 aflatoxin의 검출량 및 빈도는 의외로 낮다고 할 수 있다^{3,4)}. 또한 독소를 생성할 수 있는 곰팡이가 확인되었으나 독소가 검출되지 않은 땅콩⁵⁾이나 치즈⁶⁾의 경우가 공존하는 미생물군에 의하여 생성감소나 분해의 결과라고

알려졌다⁷⁾. 더우기 aflatoxin은 이를 생성하는 곰팡이 자신도 소량 분해함이 보고되었고^{8,9,10,11)} *Corynebacterium*의 높은 분해율도 보고되었다¹²⁾.

이 실험은 곰팡이독이나 이를 생성하는 곰팡이로 오염된 식량자원의 효과적인 이용의 기초연구로서, 독소를 생성하지 않으면서 강한 효소생산력 때문에 널리 이용되는 *Aspergillus* 속의 고오지 곰팡이에 의한 aflatoxin의 생성감소 및 분해능을 조사하였기에 보고하는 바이다.

실험재료 및 방법

1. 미생물 및 시약

Aflatoxin 생성균주는 *Aspergillus flavus* ATCC 15517을, 고오지 곰팡이는 본 대학 식품미생물

학 연구실에 보존중인 *Aspergillus awamori*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* 및 *Aspergillus shirousamii* 를 사용하였다. Aflatoxin의 bioassay는 *Bacillus megaterium* NRRL B-1368을 사용하였다. Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂의 표준품은 Sigma 제품이였다.

2. 배양방법

곰팡이는 potato-dextrose-agar 사면배지에서 9일간 28°C로 배양하여 Park and Bullerman¹³⁾의 방법대로 포자현탁액을 만들고, YES medium (15% sucrose, 2% yeast extract, pH 6.4) 50ml가 들어있는 250ml의 삼각 flask에 1.8×10⁶ 정도의 곰팡이 포자를 접종하여 28°C에서 정치배양하였다. 혼합배양의 경우 각각의 포자를 위와 같은 양으로 접종하였다. *B. megaterium*은 이 등¹⁴⁾의 방법대로 배양하였다.

3. 분석

배양이 끝난 배양물은 즉시 121°C에서 1분간 가압살균하고 미리 무게를 달아 둔 여지(Whatman No. 4)로 걸러 균사체를 분리하고 80°C에서 하룻밤 말려서 건물중을 구하였다. 여액은 pH meter로 pH를 측정후 chloroform으로 3회 추출하고 농축하여 TLC에 의하여 목측법으로 aflatoxin을 정량하였다^{2,15)}. 특별히 언급이 없는 한 모든 분석은 3회 반복한 결과의 평균값으로 나타내었다. Aflatoxin의 bioassay는 이 등¹⁴⁾의 방법을 따라 행하였다.

결과 및 고찰

1. *A. flavus*의 성장과 aflatoxin의 생성

Fig. 1에 보인 바와 같이 *A. flavus*는 배양 7일에 최대의 성장에 달하였고 그 후 서서히 감소추세에 들어갔다. pH는 배양 5일까지 감소되었으나 다시 점차 증가하여 초기 pH인 6.4보다 높아졌다. Aflatoxin은 균사체와 같이 7일에 최대량이 생성되었으나 이후 급격히 감소하였다. 이는 일단 분비된 aflatoxin이 재흡수되거나 분해되어 나타나는 결과로 볼 수 있다. Doyle and Marth^{9, 10, 11)}는 *A. parasiticus*의 균사체, 특히 절단된 균사체에 의하여 aflatoxin이 분해됨을 보고하였고 균사체내의 효소나 미지의 물질에 의한 것이라고 주

장하였다. pH의 변화로 볼 때 유기산은 일단 분비되었다가 후에 재흡수되어 영양원으로 이용되었다고 볼 수 있다. 그러나 aflatoxin은 충분한 영양원의 첨가시에도 분해되므로 영양원으로 이용하기 위한 분해는 아니라고 한다¹⁶⁾.

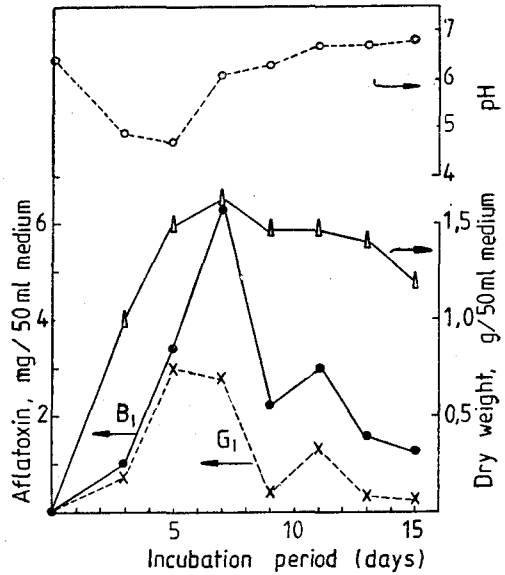


Fig. 1. Growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* ATCC 15517 at 28°C in YES medium.

2. *A. flavus*와 고오지 곰팡이의 혼합배양시의 aflatoxin 생성

Table 1에 보인 바와 같이 28°C에서 7일 배양시 *A. flavus*는 총 10093 μg/50 ml medium의 aflatoxin을 생성하였고, 반면에 *A. flavus*를 각각 *A. shirousamii*, *A. kawachii*, *A. awamori*, *A. niger* 및 *A. oryzae*와 혼합배양한 경우에는 각각 38.5%, 13.8%, 1.3%, 1.3% 및 0.7%만의 aflatoxin이 생성되었다. 이렇게 현저한 aflatoxin의 생성감소는 공존하는 고오지 곰팡이의 영향임에는 틀림없겠으나 두 곰팡이의 균사체가 혼합배양시 서로 엉키어서 분리측정 할 수 없었으므로, 성장저해에 의한 것인지 아니면 생성된 곰팡이독이 고오지 곰팡이에 의해 분해된 것인지 판단할 수는 없었다.

3. 고오지 곰팡이에 의한 aflatoxin의 분해

7일 배양한 *A. flavus*의 배양액을 membrane

Table 1. Growth and aflatoxin production in mono- and mixed cultures of *Aspergillus flavus* ATCC 15517 and several koji molds after 7 days at 28°C in 50ml of YES medium

Microorganisms	pH	Dry wt. (g)	Aflatoxin (μg)				
			B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Total
<i>A. flavus</i>	6.1	1.62	6328	331	2809	625	10093
<i>A. awamori</i>	4.9	1.69					
<i>A. kawachii</i>	3.0	1.83					
<i>A. niger</i>	2.1	1.75					
<i>A. oryzae</i>	5.1	1.61					
<i>A. shirousamii</i>	2.2	1.97					
<i>A. awamori</i> + <i>A. flavus</i>	6.4	1.20	90	10	30	tr	130
<i>A. kawachii</i> + <i>A. flavus</i>	5.5	1.60	1017	71	301	tr	1389
<i>A. niger</i> + <i>A. flavus</i>	3.3	1.41	67	32	30	7	136
<i>A. oryzae</i> + <i>A. flavus</i>	5.4	1.25	39	4	26	tr	6969
<i>A. shirousamii</i> + <i>A. flavus</i>	5.2	1.73	1921	160	1806	tr	3887

tr : trace, less than 0.013μg/50ml medium

Table 2. Degradation of aflatoxin by koji molds after 7 days at 28°C in 50ml YES medium containing 10ml of culture broth filtrate of *Aspergillus flavus* ATCC 15517

	pH	Dry wt. (g)	Aflatoxin B ₁ (μg)	Degradation rate (%)
Not inoculated	5.3	0	791	0
<i>A. awamori</i>	4.0	1.35	14	98
<i>A. kawachii</i>	3.6	1.54	13	98
<i>A. niger</i>	2.3	1.12	tr	100
<i>A. oryzae</i>	5.2	1.34	200	75
<i>A. shirousamii</i>	2.2	1.73	tr	100

tr : trace, less than 0.013μg/50ml medium

filter로 여과하여, 그 여액 10ml를 신선한 YES medium 40ml와 섞어, 고오지 곰팡이를 접종하여 다시 7일간 배양했을 때, 균사체의 성장 및 aflatoxin의 분해정도를 Table 2에 나타내었다. 배양액에 함유되었던 aflatoxin은 *A. niger* 및 *A. shirousamii*에 의하여 거의 모두 분해되었고 *A. awamori* 및 *A. kawachii*에 의하여 98%, *A. oryzae*에 의하여 75%가 분해되는 등 시험한 고오지 곰팡이 모두 높은 분해능을 보였다. 한편 균사체는 *A. flavus* 배양여액이 함유되지 않은 경우 (Table 1)보다 감소하였다. 신선한 배지가 20% *A. flavus* 배양여액으로 대체된 것을 감안한다면 *A. shirousami*, *A. kawachii*, *A. oryzae* 및 *A. awamori*가 각각 12%, 16%, 17% 및 20% 감소

한 것은 영양원의 감소가 주된 원인을 추측할 수 있다. 다만 *A. niger*는 그 외에도 *A. flavus*가 생성한 물질에 의하여 생장이 억제되어 36%의 감소를 보인 것이라 믿어진다. Aflatoxin의 분해율도 혼합배양시와는 다른 양상으로서, *A. oryzae*가 상대적으로 제일 낮은 분해율을 보인 반면 혼합배양시 효과적인 aflatoxin 감소를 보인 것은 *A. oryzae*가 *A. flavus*와의 경쟁에서 우위를 지켰기 때문으로 생각된다. 한편 분해율이 높은 *A. shirousamii* 및 *A. kawachii*가 혼합배양시 aflatoxin 생성을 비교적 감소시키지 못했던 것도 이들이 *A. flavus*와 공존시 경쟁에서 열세였기 때문으로 볼 수 있겠다.

Table 3. Degradation of aflatoxin by culture filtrate of *Aspergillus awamori*

	Trial	Aflatoxin B ₁ (μ g)		Degradation rate(%)
		0 hr	48 hr	
Heated culture broth	1st	135	135	0
	2nd	135	135	0
Unheated culture broth	1st	135	41	70
	2nd	135	13	90

Table 4. Bioassay of aflatoxin incubated with culture filtrate of *Aspergillus awamori* using *Bacillus megaterium* NRRL B-1368

Aflatoxin preparation	Aflatoxin B ₁ by TLC (μ g)	Inhibition zone (mm, diameter)
Authentic	1	10
0 hr, unheated filtrate	0.26	8
48 hr, heated filtrate	0.26	8
48 hr, unheated filtrate	0.08	not detected

4. *A. awamori* 배양여액에 의한 aflatoxin의 분해

고오지 곰팡이의 aflatoxin 분해가 세포밖에 분비된 물질에 의한 것인지를 알기 위해, 임의로 선택한 *A. awamori*를 5일 배양한 후 균사체를 제거하고 membrane filter로 여과한 여액 20ml에 *A. flavus* 배양액의 chloroform 추출물을 가하여 28°C에서 48시간 반응시킨 후 분석한 결과는 Table 3과 같다.

A. awamori 배양여액을 100°C에서 5분간 가열한 경우 2회 반복에서 모두 처음 첨가된 aflatoxin B₁이 모두 회수되었으나 열처리하지 않은 여액에서는 각각 70% 및 90%의 분해율을 보였다. 이는 *A. awamori*가 성장중에 aflatoxin을 분해하는 물질을 분비하며 이 물질은 가열처리로 불활성화 된다고 볼 수 있다. Doyle과 Marth¹⁷⁾는 균사체에 의한 분해는 일종의 peroxidase의 작용이라 추측하고, lactoperoxidase로 실험한 결과 최고 5.1%의 분해율을 보였다고 한다. 그러나 균사체에 의한 lactoperoxidase의 생성은 확인되지 않았다. 한편 *Streptococcus lactis*도 aflatoxin을 분해한다고 보고되어 있으나 분해기작에 대하여는 아직 보고가 없다²⁾.

5. 분해된 aflatoxin의 독성

Aflatoxin의 분해는 자외선 형광발생을 하지 않

음으로 판단하였으나 실제로 제독되었는지를 알기 위하여 *B. megaterium*을 이용한 bioassay를 행한 결과는 Table 4와 같다. 표준품 aflatoxin B₁에서 직경 10mm의 저해환이 형성된 것은 이 등¹⁴⁾의 결과와 일치하였다. 분해된 것과 분해되지 않은 것을 같은량(2 μ l)으로 실험한 결과 분해되지 않은 경우(0.26 μ g, TLC 분석)에 8mm의 저해환이 형성되었으나 70% 분해된 경우(0.08 μ g, TLC 분석)에는 전혀 저해환을 확인할 수 없었다. 이로써 *A. awamori*는 형광의 소실뿐 아니라 *B. megaterium*에 대해서도 aflatoxin의 독성을 잃게 하는 물질을 생성한다고 볼 수 있다. *Streptococcus lactis*에 의한 aflatoxin 분해물은 *Salmonella/mammalian* microsome에 의해서 돌연변이 유발성은 상실된 반면 *B. megaterium*에 대하여서는 계속 독성을 나타내어서²⁾ *A. awamori*와는 반드시 일치되는 기작으로 aflatoxin을 분해한다고 볼 수는 없을 것으로 생각된다.

요 약

Aspergillus flavus ATCC 15517에 의한 aflatoxin의 생산은 *Aspergillus awamori*, *Aspergillus kawachii*, *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* 및 *Aspergillus shirousamii*와의 혼합 배양시 단독배양에 비하여 각각 1.3%, 13.8%, 1.3

%, 0.7% 및 38.5%로 감소되었다. 또한 이들 고오지 곰팡이들은 aflatoxin B₁을 791 μ g/50ml 함유하는 배지에서 7일 배양시 75~100%의 aflatoxin 분해율을 보였다. *A. awamori*는 배양중 aflatoxin을 분해하는 물질을 분비하였으며 가열처리로 이는 불활성화 되었다. 이 물질에 의한 aflatoxin의 분해산물은 *Bacillus megaterium* NRRL B-1368에 대한 독성도 소멸되었다.

사 의

본 실험에 사용한 일부 균주를 분양해 주신 이서래 박사님께 감사드리며 지원해 주신 한국과학재단에 대하여도 사의를 표합니다.

참 고 문 헌

1. Chu, F.S.: Adv. Appl. Microbiol., 22 : 83 (1977).
2. Park, K.Y. and L.B. Bullerman: J. Food Prot., 46(3) : 178(1983).
3. 김용화, 황보경숙, 이서래 : 한국식품과학회지, 9 : 73(1977).
4. 김영국, 노정구 : 한국식품과학회지, 17(4) : 295(1985).
5. Ashworth, L.J.Jr., H.W. Schoeder and B.C. Langley: Science, 148 : 1227(1965).
6. Bullerman, L.B. and F.J. Olivigni: J. Food Sci., 39 : 1166(1974).
7. Coallier-Ascah, J. and E.S. Idziak: Appl. Environ. Microbiol., 49(1) : 163(1985).
8. Doyle, M.P. and E.H. Marth: Mycopathologia, 63(3) : 145(1978).
9. Doyle, M.P. and E.H. Marth: Mycopathologia, 64(1) : 59(1978).
10. Doyle, M.P. and E.H. Marth: J. Food Prot 41(7) : 549(1978).
11. Doyle, M.P. and E.H. Marth: Europ. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 6 : 95(1978).
12. Mann, R. and H.J. Rehm: Z. Lebensm.-Forsch., 163 : 39(1977).
13. Park, K.Y. and L.B. Bullerman: J. Food Sci., 46(4) : 1147(1981).
14. 이관영 · 최언호 · 이서래 : 한국생화학회지, 8(1) : 1(1975).
15. 이관영 · 이서래 : 한국식품과학회지, 6(3) : 169(1974).
16. Ciegler, A., R.E. Peterson, A.A. Lagoda and H.H. Hall: Appl. Microbiol., 14(5) : 826 (1966).
17. Doyle, M.P. and E.H. Marth: Z. Lebensm. Unters.-Forsch., 166 : 271(1978).