

固體培地에서 Aflatoxin生成에 미치는 Temperature Cycling의 影響

정덕화 · 정영철* · 성낙개

慶尙大學校 · 미주산업*

Influence of Temperature Cycling on the Production of Aflatoxin in Solid Media

Duck Hwa Chung · Young Chul Chung* · Nack Kaie Sung

Gyeongsang National University · MIJU CO. LTD.*

Abstract

This study was designed to observe the effect of temperature cycling on the production of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* R-716 in rice, barley, peanut and soybean. In those media, temperature cycling resulted in more total aflatoxin production by the strain of R-716 than constant incubation at 28°C and natural condition did. Especially, high level of total aflatoxin (1826 μ g/30g) in rice medium at temperature cycling was produced. The intensity of yellow color of chloroform extracts correlated with the concentration of aflatoxin, and the ratio of aflatoxin B₁ to aflatoxin B₂, G₁, G₂ is lower at temperature cycling condition than at 28°C.

1. 서 론

지금까지 aflatoxin은 B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, B_{2a}, 및 B₃ 등 12종이상이 분리동정되었으며¹⁾, pH 3 이하의 산성과 pH 10 이상의 알칼리성, 산화제, 환원제 및 UV와 γ 선에 불안정하고 건조상태에서는 용융점까지 가열해도 열에 안정하나 수분존재하에서는 매우 불안정한 물질로 알려져 있다.

이들 aflatoxin의 농산물의 오염방지는 관련 미생물의 생성을 억제하는 길이며, 이것은 환경의 조절, 항공팡이 약제의 사용 및 농산물이 함유하고 있는 자연적 저항인자의 이용으로 가능하며, 그중 인위적으로 환경을 조절함으로써 aflatoxin 생성을 저해시키기 위한 연구의 일환으로 이들 aflatoxigenic mold의 배양학적 조건이 폭넓게 검토되었다.

일찌기 Codner²⁾, Kulik³⁾ 등은 aflatoxin을 생성하는 균주로 밝혀진 *Aspergillus flavus* 와

Aspergillus parasiticus 가 같은 종이라도 배양 조건에 따라 aflatoxin 생성능에 큰 차이가 있다고 보고하였고, Austwick 등⁴⁾ 은 상대습도가 aflatoxin 생산에 중요한 인자라 하였으며, 그의 온도와 습도가 높은 곳일수록 진균류의 번식율과 mycotoxin 생성이 증가된다고 보고한 Majumder⁵⁾, Schroeder⁶⁾ 등의 1960 년대의 논문에서부터 최근에 이르기까지 상당한 연구가 진행되었다.

이에 반해 우리나라에서는 서동⁷⁾ 이 온도, 습도 및 pH 를 서로 다르게 하여 *Aspergillus flavus* 를 배양한 경우 높은 온도, 습도, pH 에서는 오히려 aflatoxin 함량이 감소되었으나, 30% 수분, pH 5.0, 20°C 에서 total aflatoxin 이 가장 많이 생성되었고, 아울러 발효식품에서 공존하기 쉬운 *Bacillus subtilis* 와 혼합 배양하면 27%의 aflatoxin 이 감소된다고 보고한 것을 비롯하여 몇 편의 논문^{8,9)} 이 있으나 아직도 많은 기초자료가 필요한 실정이다.

이와같은 일련의 보문을 요약하면 식물과 사료에서의 aflatoxin 생성은 물리적, 화학적 및 생물학적 요인에 영향을 받으며 그중 물리적 요인은 온도, pH, 습도, 통기, 배양시간, 배양방법, 햇빛 및 mechanical damage 등이 있고, 화학적 요인으로는 미량원소를 포함한 영양원이며, 생물학적 요인으로는 균주의 종류, 균의 경쟁적 증식 및 미생물의 detoxification 등을 들 수 있다. 이들 요인중 온도의 영향은 균의 증식과 aflatoxin 생성에 가장 중요한 인자로 작용하는데 7.5°C 와 40°C 이상에서는 대체로 aflatoxin 이 생성되지 않는 것으로 보고되고 있다.¹⁰⁾ 그러나 이제까지의 온도와 관련된 연구는 거의 일정한 온도에서 행하여져 왔다. 그런데 실험실에 일정한 조건과 온도에서 aflatoxin 생성균을 배양하는 것보다 낮과 밤의 온도차와 여러가지 환경인자를 받고있는 농산물과 발효식품에서 더 많은 aflatoxin 이 생성되

는 경우가 흔히 있다^{11,12)}. 따라서 본 연구는 온도를 바꾸어 가면서 배양하는 temperature cycling 조건을 적용하여 우리가 주식으로 하는 농산물인 쌀, 보리, 땅콩 및 대두에 공시균을 접종한 다음, 배양하면서 aflatoxin 생산성을 비교검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

1. 공시균주

공시균주는 前報¹³⁾ 에서와 같이 본 대학교 식품위생학교실에서 변질미로부터 분리동정하여 보관중인 *Aspergillus parasiticus* R-716 을 사용하였다.

2. 배양방법

쌀, 보리, 땅콩 및 대두 30g 을 300ml flask 에 취한 후 증류수 15ml 을 가하고 1kg/cm² 에서 15분간 가압살균하였다. 여기에 前報¹³⁾ 에서와 같은 방법으로 조제된 포자현탁액 0.5ml 을 접종한 다음, aflatoxin 최대생성 온도인 28°C 에서 일정하게 배양한 것과 7월 25일에서 8월 8일 사이의 낮의 평균온도인 28°C 에서 18시간, 밤의 평균온도인 15°C 에서 6시간 cycling 을 적용한 것과 7월 25일에서 8월 8일 사이에 실험실에서 자연방치를 시킨 3구간으로 하여 15일간 정치배양한 다음 분석하여 비교하였다.

3. 배양물의 분석

1) Aflatoxin 의 추출

배양물의 aflatoxin 추출은 AOAC 法¹⁴⁾ 에 준하였다. 먼저 배양이 끝난 교체배지에 15ml 의 증류수, 150ml 의 chloroform 및 15g 의 구조토를 가하여 waring blender 로 5분간 추출하였다. 완전히 밀봉된 추출물은 shaker 로 30분간 격렬히 진탕시킨 다음 Toyo No. 2 여지위에 5mm 두께의 구조토를 간 Büchner

funnel로 여과하여 분액여두에서 chloroform 층만 분리하는 조작을 3회 반복한 후 50ml 이하로 감압농축해서 정제를 위한 column chromatography를 실시하였다.

2) Aflatoxin의 정제

aflatoxin정제를 위한 column chromatography는 AOAC법¹⁴⁾에 따라 glass filter가 부착된 22×300mm column에 5g의 무수 Na₂SO₄를 가한 후 chloroform을 1/2정도 채웠다. 그위에 미리 chloroform으로 천타하여 활성화된 silica gel 10g을 가하여 15분간 방치한 다음 15g의 무수 Na₂SO₄를 다시 첨가하였다.

이렇게 충전된 column에 chloroform 추출물 50ml를 흡착시킨 후 질소가스로 유속을 10~20ml/min로 조절하여 150ml의 n-hexane과 150ml의 ethyl ether로서 지방분과 색소를 각각 제거하였다. column에 흡착된 aflatoxin은 150ml의 chloroform/methanol(97/3) 혼합액으로 용출시켜 수집하였다. 이 용출액을 감압농축하여 소량의 chloroform으로 vial에 옮기고 진공상태에서 건조시켰다.

3) Aflatoxin의 정량

aflatoxin은 high pressure liquid chromatography법¹⁵⁾으로 정량하였고, 분석을 위한 기기조건은 Table 1과 같다. 그 결과 standard aflatoxin과 추출 시료의 HPLC에서의 chromatogram은 Fig. 1과 같이 aflatoxin G₂, G₁, B₂, B₁의 순으로 나타났으며 이때 사용한 solvent는 H₂O/MeOH/Acetonitrile(50/25/10) 혼합용액이었고, sensitivity는 0.01~0.5 AUFs 범위였으며 Fig. 2와 같은 calculating curve에 따라 aflatoxin을 정량하였다.

실험에 사용된 aflatoxin 표준품은 Israel의 Marko chemical사 제품이었고, column용 silica gel(0.063-0.2mm)은 Merck 제품이었으며, n-hexane, ether, methyl alcohol 및 ch-

loroform 등의 유기용매는 Merck제 특급시약을 사용하였다.

Table 1. Condition of high pressure liquid chromatograph for the analysis of aflatoxin.

Type	WATERS MODEL 244
Detector	UV 365 nm
Column	μ Bondapak C ₁₈
Flow rate	1 ml/min.
Solvent	H ₂ O/MeOH/Acetonitrile=50/25/10
Chart speed	0.5 cm/min.
Sensitivity	0.01 - 0.5 AUFs*

* Absorbance unit full scale

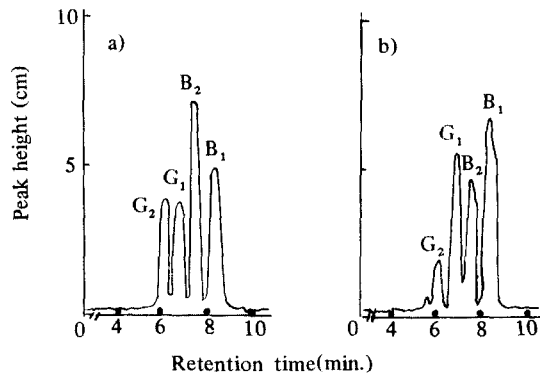


Fig. 1. HPLC chromatogram of aflatoxins, flow rate 1.0 ml/min. a) Standard aflatoxins b) Aflatoxin extracted from sample.

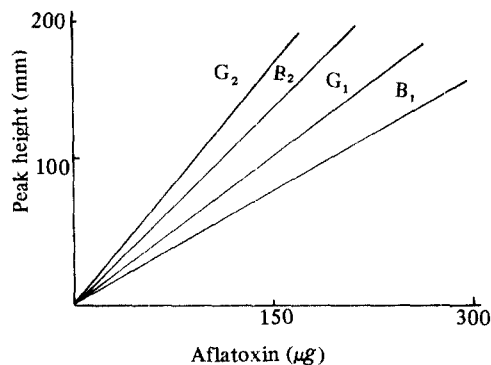


Fig. 2. Calculating curve for quantitative analysis of aflatoxin.

III. 결과 및 고찰

aflatoxin 생성균의 aflatoxin 합성에 중요한 인자로 알려져 있는 온도의 변화에 따른 aflatoxin 생산성을 검토하기 위해 우리가 주식으로 하는 농산물인 쌀, 보리, 땅콩 및 대두에 공시균을 접종하여 temperature cycling을 행하면서 일정한 온도하에서의 배양과 자연방치 상태에서의 공시균 *Aspergillus parasiticus* R-716의 aflatoxin 생성등을 비교하였다.

우선 쌀배지에 있어서 28°C와 자연방치에서는 각각 1667, 1693 µg의 aflatoxin이 생성된데 비하여 temperature cycling을 행하므로써 1826 µg이 생성되어 9~10%의 aflatoxin이 증가된 것으로 나타났다.

또한 aflatoxin과 색소는 다같이 제 2차 대사산물이므로 chloloform 추출액의 색깔을 aflatoxin 함량과 비교해 본 결과 쌀을 비롯한 모든 고체배지에서 chloloform 추출액의 색깔이 노란색일수록 배지중의 aflatoxin 함량이 많았다. 따라서 배지 색깔의 변화를 관찰하므로써 aflatoxin의 축적량을 정성적으로 확인할 수 있었는데 이는 Mateles 등¹⁶⁾의 견해와도 일치하였다.

보리를 기질로 한 배양에서는 Table 3에서 보는 바와 같이 쌀을 기질로 한 경우보다 약 20%의 total aflatoxin이 감소되었으나 temperature cycling을 행한 시험구에서 1483 µg의 aflatoxin이 생성되므로써 다른 처리구보다 10~11%의 aflatoxin이 증가되어 쌀에서와 같은 경향을 보였다.

aflatoxin의 종류별 생성비율을 살펴보면 전반적으로 aflatoxin B group의 함량이 많은 편이며 특히 temperature cycling을 적용한 경우 28°C에서 보다 total aflatoxin 함량이 증가되었고, aflatoxin B₂, G₁, G₂의 생성비가 증가되었다. 그러나 aflatoxin B₁ 생성비는 오

Table 2. Aflatoxin Production in Rice Medium after Incubation of *A. parasiticus* for 15 Days at Different Temp.

Aflatoxin (µg/30g)	Temperature Programs		
	28°C	28°C(18hr) 15°C(6hr)	N.C
B ₁	923	787	903
B ₂	144	281	294
G ₁	542	591	427
G ₂	58	162	69
Total	1677	1826	1693
Color of CHCl ₃ extracts	Yellow	Yellow	Yellow

N.C.: Natural Condition

Table 3. Aflatoxin Production in Barely Medium after Incubation of *A. parasiticus* for 15 Days at Different Temp.

Aflatoxin (µg/30g)	Temperature Programs		
	28°C	28°C(18hr)- 15°C(6hr)	N.C
B ₁	821	708	784
B ₂	12	221	133
G ₁	407	448	407
G ₂	87	106	78
Total	1327	1483	1402
Color of CHCl ₃ extracts	yellow	yellow	yellow

N.C.: Natural Condition

히려 감소되어 708 µg으로 약 15%가 적게 나타나 액체배양에서의 Lin 등¹⁷⁾의 결과와 일치하였다.

이와같이 aflatoxin B₂, G₁, G₂의 생성비가 큰 것은 공시균의 aflatoxin 생성에 관여하는 enzyme system이 온도변화로 활성이 촉진되어 그 결과 aflatoxin B₁에서 다른 aflatoxin에로의 대사가 빠르게 진행된 것으로 생각된다.

한편 땅콩은 Table 4에서와 같이 기질로 사용된 실험재료중 가장 많은 aflatoxin이 생성

되어 쌀에서 보다 4~9%의 증가를 보였고 특히 temperature cycling으로 균을 배양할 경우 역시 aflatoxin 생성은 훨씬 증가되었으며, 이처럼 땅콩에서의 aflatoxin 축적이 많은 것은 aflatoxin 생성에 중요한 factor로 작용하는 Zn의 함량이 다른 농산물에 비해 높기 때문이라고 하며¹⁸⁾, 특히 미량원소중 Zn은 세포내에서 ribosome, lysosome, microtubules, cell membrane 등을 안정하게 할 뿐만아니라 특히 배지내에 Zn이 결핍되면 균의 형태변화와 성장 및 metabolism이 변화되어 그 결과 배양액내의 aflatoxin은 물론 균체 자체의 각종 대사산물의 함량에 영향을 준다고 알려져 있다.

그리고 대두의 경우도 temperature cycling 시험구에서 28°C에서 보다 total aflatoxin이 약 40% 증가되어 다른 기질에서와 같은 경향을 나타내었다. 그런데 대두는 다른 기질에 비해 전반적으로 total aflatoxin 함량이 낮아 28°C에서는 1049 µg으로 쌀의 28°C보다 약 40%가 적었고 temperature cycling 구에서는 1463 µg으로 땅콩의 cycling 구의 1985 µg보다 35%가 적게 나타났다. 이것은 대두중에 phytic acid (inositol hexaphosphate)가 다량 함유되어 이 물질이 aflatoxin 생성에 필요한 Zn과 결합하여 Zn을 불활성화시켜 그 결과 기질내 Zn 결핍현상이 일어나 aflatoxin 생성이 저해된다고 한다.¹⁸⁾ 그러나 Goldbatt 등¹⁹⁾은 *Aspergillus parasiticus*와 *Aspergillus flavus*에 의해서 쉽게 대사가 되지않는 과량의 oil이 땅콩 및 대두에 함유되어서 aflatoxin 생성에 적합하지 않다고 하였다. 결과적으로 쌀을 비롯한 곡류에서도 Lin¹⁷⁾ 등의 액체배양에서와 마찬가지로 공기균의 aflatoxin 생산성은 temperature cycling을 행함으로써 증가되었다.

그런데 실제로 한국인이 주식으로 하고 있는 곡류와 발효식품은 거의다 낮과 밤, 그리고 저장 또는 진열시의 온도차를 받고 있으므로 공기균과 같은 aflatoxin 생성균주가 일단 오염

Table 4. Aflatoxin Production in Peanut Medium after Incubation of *A. parasiticus* for 15 Days at Different Temp.

Aflatoxin (µg/30g)	Temperature Program		
	28°C	28°C(18hr)-15°C(6hr)	N.C
B ₁	962	1012	943
B ₂	218	105	241
G ₁	426	627	382
G ₂	125	241	128
Total	1731	1985	1694
Color of CHCl ₃ extracts	yellow	yellow	yellow

N.C: Natural Condition

Table 5. Aflatoxin Production in Soybean Medium after Incubation of *A. parasiticus* for 15 Days at Different Temp.

Aflatoxin (µg/30g)	Temperature Program		
	28 C	28°C(18hr)-15°C(6hr)	N.C
B ₁	616	627	588
B ₂	84	289	116
G ₁	245	385	194
G ₂	102	126	83
Total	1049	1463	981
Color of CHCl ₃ extracts	pale yellow	yellow	pale yellow

N.C: Natural Condition

될 경우 다량의 aflatoxin이 생성될 가능성은 매우 높다고 할 수 있다. 특히 식품에 의한 aflatoxin 섭취량과 간암발생율 간에는 높은 상관성이 있다고 하는 의학적 조사연구를 고려해 볼때 곡류와 발효식품을 많이 섭취하는 한국인은 aflatoxin 생성균주의 오염방지에 각별한 주의를 기울여야 할 것으로 사료된다.

IV. 요약 및 결론

온도를 바꾸어 가면서 균을 배양하는 tem-

perature cycling을 적용하여 우리가 주식으로 하는 농산물인 쌀, 보리, 땅콩 및 대두에 곰팡이를 배양하면서 aflatoxin 생산성을 비교한 결과 모든 곡류배지에서 *Aspergillus parasiticus* R-716의 aflatoxin 함량이 temperature cycling을 행하므로써 증가되었고, 그중 쌀 배지의 temperature cycling 시험구에서는 1862 μg 의 total aflatoxin이 생성되어 28°C의 1662 μg 보다 높은 함량을 보였다. 또한 aflatoxin 생합성과 색소생성에는 밀접한 관계가 있었고, aflatoxin B₁의 생성비율은 28°C 배양에서 높았으나 aflatoxin B₂, G₁, G₂ 생성비율은 temperature cycling 시험구에서 높았다.

參 考 文 獻

1. Wyllie T. D., and L. G. Morehouse : Mycotoxic Fungi, Mycotoxicosis, Dekker, 1:136-157, 1978
2. Codner R. C., and R. Yeo : Production of aflatoxin by the culture of strains of *Aspergillus parasiticus* on sterilized peanuts, Biotechnol. Bioeng., 5: 185-192, 1963.
3. Kulik M. M., and C. E. Holaday : Aflatoxin, A metabolic product of several fungi, Mycopathol. Mycol., 30:137-181, 1967.
4. Austwick P. K. C., and G. Ayerst : Toxic products in ground nuts, ground meal microflora and toxicity, Chem. Ind.(London), 2:55-59, 1963.
5. Majumder S. K., K. S. Nardsimban and H. A. B. Parpia : Microecological factors of microbial spoilage and the occurrence of mycotoxins on stored grains, mycotoxin in foodstuffs, G. N. Wogan editor, 27-51, 1965.
6. Schroeder H. W., and H. Hein : Effect of temperature cycling on the production of aflatoxin, Appl. Microbiol., 16: 988-993, 1967.
7. 서명자 : *Aspergillus parasiticus* aflatoxin 생성에 미치는 배양조건, 한국미생물학회지, 17(1) : 16-24, 1979.
8. Bahk J. R., and J. K. Lee : Growth and synthesis of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* in the presence of ginseng products with reduced minor elements, Kor. J. Env. Hlth. Soc., 10(1) 78-86, 1984.
9. 김은주, 정 용, 권숙표 : 진균류의 상호작용에 의한 aflatoxin 생성능에 관한 연구, 예방의학회지, 9(1) : 77-86, 1976.
10. Schindler A. F., G. John Palmer and W. V. Eisenberg : Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* as related to various temperature, Appl. Microbiol., 15: 1006-1009, 1967.
11. Stutz. H. K., and P. H. Krumperman : Effects of temperature cycling on the production of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*, Appl. Environ. Microbiol., 32: 327-331, 1976.
12. Park K. Y., and L. B. Bullerman : Increased aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* under condition of cycling temperature, J. Food Science, 46: 1147-1151, 1981.
13. 鄭德和, 禹永淑 : *Aspergillus parasiticus* R-716의生育, 脂質 및 aflatoxin 생산에 미치는 마늘(*Allium sativum* L.) 액기스의 영향, 韓國環境衛生學會誌, 10(2) : 89-97, 1984.
14. Association of Official Analytical Chemists : Official Methods of Analysis: 26-29, 1980.

15. Dong M. W., and J. L. Dicesare : Improved food analysis using high speed liquid chromatography, *Food Technology*:58–62, 1983.
16. Mateles R. I., and G. N. Wogan : Production of aflatoxin in submerged culture, *Appl. Microbiol.*, 13:208–211, 1965.
17. Lin Y. C., T. C. Agres, and P. E. Koehler: Influence of temperature cycling on the production of aflatoxin B₁ and G₁ by *Aspergillus parasiticus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 40: 333–338, 1980.
18. Gupta S. K., and T. A. Venkitasubramanian : Production of aflatoxin on soybean, *Appl. Microbiol.*, 29:834–836, 1975
19. Goldbatt L. A. : Conference on protein-rich food products from oilseeds, ARS. USDA., : 50, 1969.