

眞菌株의 毒素生産能에 관한 研究

廉 鎰 · *李 長 勳

단국대학교 미생물학과

*성균관대학교 약학과

Studies on the Toxin Productivity of Fungi in Cereals

K. Ryeom. · *J.H. Lee

Dept. of Micro., Dan Kook University

*Dept. of Pharm., Sung Kyun Kwan University

ABSTRACT

The determination of fungal flora in some kinds of cereals have been carried out in order to obtain an appropriate information of the population of fungi and toxin productivity.

The results were summarized as follow;

1. The predominant genera were *Aspergillus*, *Penicillium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Fusarium*.
2. Six of *Aspergillus flavus* were aflatoxin-producing strains.
3. Sample barleys were found to contain the highest content of aflatoxin.
4. In electron microscopic studies of liver cells from mouse which had been injected with crude toxin, the liver cells showed the cytoplasmic change.

緒 論

眞菌類가 식품 발효 공업에 利用 및 抗生物質生産 등으로 人間에게 이로운 역할만을 해 오던 것으로만 믿어왔던 과거와는 달리 1950년대 부터는 소홀해지기 쉬운 질병으로써 진균증에 대한 관심이 높아지게 되었고¹⁾ 이어서 1960년대 초에 영국에서 10여만 마리의 칠면조가 괴사한 사건을 계기로 이에 대한 질병을 Turkey-x-disease라 칭한후²⁾ 眞菌이 分泌하는 代謝産物의 일종이 發癌性 및 毒性을 내포하고 있다

고 알려진 以來로 이러한 mycotoxin에 대한 問題는 世界的으로 관심을 갖게 되었다.^{3,4)}

이에 mycotoxin에 대한 研究가 활발히 進行되었 으며 주로 食品으로 인해 人間에 영향을 미치는 것이 aflatoxin類라는 것이 규명되어졌고⁵⁾ 이러한 物質에 대한 구조 및 生化學的 특성에 대해 계속적인 研究가 進行되고 있었으며^{6~10)} 이에 이들을 生成하는 주된 菌株가 *genus aspergillus*, *genus penicillium*이란 것이 일반적으로 알려지게 되었다.

또한 이런 菌株들이 일반 곡류 및 발효 식품에 많

이 존재하는 것으로 인식되어져 왔기에¹¹⁾ 식품의 안전성 확보에 대한 관심이 점점 증가되어지므로 國內에서 유통되고 있는 곡류 및 발효 식품에 대한 mycotoxin 生成 菌株의 분포도 및 毒素生産能의 정도가 아직까지 체계적으로 밝혀지지 않았기에 著者 등은 서울 시내 곡류상으로부터 가검물 50건을 무균적으로 채취하여 함유하고 있는 眞菌을 분리 同定한 후 食品 위생상 가장 밀접한 관계가 있는 aflatoxin의 生成能을 조사 定性, 定量하였으며 動物 實驗을 하여 장기에 미치는 영향에 대해 조사한 결과 약간의 차이점을 얻었기에 보고하고자 한다.

實驗材料 및 方法

A. 實驗材料

1. 供試眞菌株

서울 시내에서 유통되고 있는 곡류 및 발효 식품을 무균적으로 밀봉된 봉지에 채취하여 수집된 검체에서 分離된 菌株를 同定하여 供試眞菌株로 使用하였다.

2. 對照眞菌株

Aspergillus flavus A.T.C.C. 15517.

Aspergillus parasiticus A.T.C.C. 1037.

3. 培地

Sabouraud dextrose agar

Sabouraud dextrose broth

B. 實驗方法

1. 眞菌의 分離方法

試料를 1%-HCl solution에 1분간 담근 후 멸균 증류수로 4회 세척하여 표면에 存在하는 미생물 및 오염물질을 제거한 후 1g씩을 抗生劑(CM 0.005 mg/mℓ, cycloheximide 0.5 mg/mℓ)를 첨가한 medium에 접종한 후 30±1°C로 배양기에서 10일간 培養하면서 生成된 morphology를 육안으로 차이는 것을 1차적으로 분리 각각을 3회 연속 계대 培養하여 충분히 활성화시킨 후 slide culture technique를 실시하여¹²⁾ 현미경 관찰을 통해 同定에 임하였다 (Fig. 1)

2. 眞菌의 同定方法

眞菌의 同定方法으로서 是 培地上에서 分離培養된 眞菌株를 육안으로 관찰하여 colony의 發育速度 및 表面構造 및 上下面의 色狀을 확인하였으며 顯微鏡觀察에 의해 hyphae의 넓이와 形態, 構造, conidia의 存在, 形態, 크기, 수, hyphae에 연결된 狀態 등을 확인하여 진균속을 區別하였으며 각 진균 종은 육안적인 관찰과 현미경 관찰을 통해 綜合한 각 speies의 특징을 비교하여 同定하였다¹³⁻¹⁶⁾ (Fig. 1).

3. Aflatoxin의 추출

分離된 眞菌을 sabouraud dextrose broth에 접종을 하여 30±1°C에서 10일간 증균을 시킨 후 MeOH : 1% NaCl(55 : 45) 200 mℓ를 가하여 진탕시킨 다음 10,000 rpm으로 10분간 원심분리 시킨 후 n-Hexane 100 mℓ를 소량씩 가하여 진탕을 실시하여 불순물을 제거시킨다.

이어서 MeOH-water layer를 취하여 chloroform 100 mℓ와 함께 separating funnel에 넣고 강하게 진탕을 실시한 다음 chloroform layer를 취하여 20 mℓ될 때까지 증발 농축한 다음 냉장고에 보관한다 (Fig. 2).

4. Aflatoxin의 확인

1) 定性

60 g의 adsorbosil-1을 benzene 500 mℓ에 녹인 후 2.5×50 cm의 column에 기포가 생기지 않도록 충전 후 하루밤을 방치시킨다.

그위에 무수 Na₂SO₄ 10 g을 가하여 crude toxin의 탈수에 도움을 주게하며 여분의 benzene은 column에 무리가 없도록 유출시킨다.

유출된 후 충전된 column위에 증발 농축하여 보관한 CHCl₃ 10~20 mℓ를 가한 후 유출시키고 benzene 5 mℓ로 두번 세척을 실시한다.

이어서 500 mℓ benzene과 CHCl₃-benzene (1 : 1)을 가하여 시간당 60~120 mℓ 속도로 流出시키면서 20 mℓ씩 유출액을 받아 보관후 TLC로 전개시켜 standard toxin과의 연관성을 UV-lamp로 확인 定性하였다.

2) 定量

자기 형광 분광 광도계를 사용하여 형광 강도를

TLC plate상에서 실시하여 전개된 crude toxin의 양을 측정하여 定量을 실시하였다.

5. Aflatoxin의 毒性 實驗

column을 통과시켜 分離한 aflatoxin B₁, B₂, G₁,

G₂를 dimethyl sulfoxide에 용해시켜 standard group과 함께 生後 15일된 mouse에 복강내 주사를 5~20일동안(0.03 ppm/day) 실시한후 각 group를 3회 나누어 autopsy하여 간 및 위장의 변화를 관찰 하였다(Fig. 3).

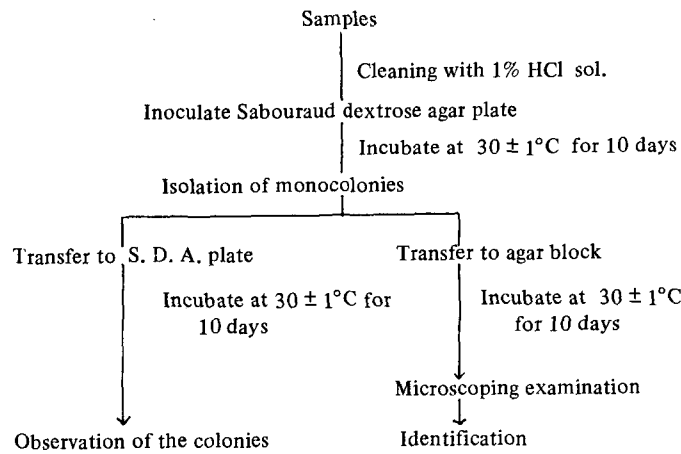


Fig. 1. Flow diagram of the identification for fungi in samples.

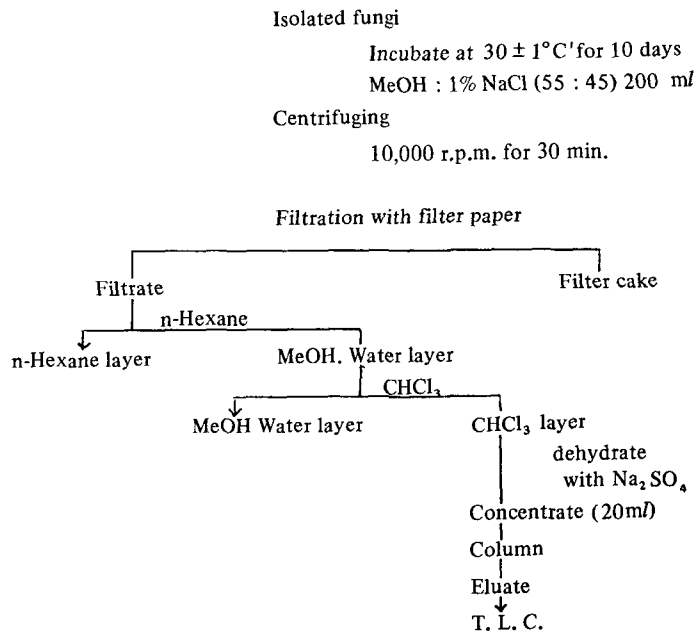


Fig. 2. Flow diagram for extraction and purification of aflatoxin.

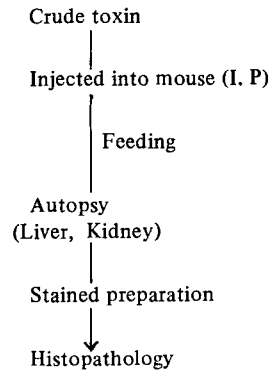


Fig. 3. Histopathologic test in vivo.

實驗結果

1. 各種 곡류에서 分離된 眞菌株

시료에서 分離한 眞菌株의 총수는 63주이었으며 그중 *Aspergillus sp.*가 29株로 최우선 균주이었으며 그다음 우선균이 *Penicillium sp.*로서 10株이었으며

냉대 지방에서 生成되는 眞菌株라 알려진 *Fusarium sp.*도 1株가 발견되었다(Table 1).

Aflatoxin을 가장 많이 生成한다고 알려진 *Aspergillus sp.*를 분류하면 *Aspergillus flavus*가 10株로 최우선 균주이며 *Aspergillus oryzae*가 6株, *Aspergillus parasiticus*가 3株이었다(Table 2).

2. *Aspergillus flavus*의 Aflatoxin 生産能

分離된 *Aspergillus sp.*에서 최우선 菌株인 *Aspergillus flavus*에서 生成된 물질중 TLC상에서의 Rf value가 standard aflatoxin과 일치하고 blue 및 green 형광을 띄는 菌株의 분포가 다음과 같다(Table 3).

3. Aflatoxin 定量

자기 형광 분광 광도계를 使用하여 定量한 결과 Barley에서 가장 많은 양이 추출되었으며 Rice와 Peanut의 G₁ group에서는 TLC plate 상에서는 定性的으로 미량 확인되었으나 定量的으로는 감지되지 않았다(Table 4).

Table 1. Distribution of fungal contamination in cereals

Kinds of samples	Rice	Barley	Bean	Corn	Peanut	Wheat	Soybean	Total
No. of samples	10	10	10	5	5	5	5	50
Name of genera								
<i>Aspergillus</i>	5	7	4	2	4	2	5	29
<i>Penicillium</i>	2	1	2	1	1	1	2	10
<i>Mucor</i>	2	2		1	2		1	8
<i>Rhizopus</i>	1	1			1			3
<i>Alternaria</i>	1					1	1	3
<i>Fusarium</i>					1			1
Other fungi	3	2	1	1	1		1	9

Table 2. Numbers of *Aspergillus sp.* Isolated from cereals

Kinds of samples Name of Genera	Rice	Barley	Bean	Corn	Peanut	Wheat	Soybean
<i>Asp. flavus</i>	2	3	1	1	1	1	1
<i>Asp. niger</i>	1	1	1		1		1
<i>Asp. parasiticus</i>		1		1			1
<i>Asp. oryzae</i>	1	1	1		1	1	1
<i>Asp. fumigatus</i>		1	1				
Unknown sp.	1				1		1

Table 3. Production of aflatoxin by strains of *Asp. flavus*

Kinds of samples	No. of aflatoxin produced	Aflatoxin			
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Rice	1	1	1		
Barley	2	1	1	1	1
Bean	1	1		1	
Corn	1				1
Peanut	1	1		1	
Wheat					
Soybean					

Table 4. Comparisons of aflatoxin productibility of *Asp. flavus* Isolated from cereals

Kinds of samples	Aflatoxin (ppb)			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
Rice				
Barley 1	34.2	16.2	25.6	4.5
Barley 2	26.7		13.7	2.7
Bean	5.1		1.5	
Corn				3.4
Peanut	5.8			
Wheat				
Soybean				

4. Aflatoxin 毒性 實驗

5日間 복강내 주사후 관찰한 결과 체중도 증가하였으며 대조군과 차이가 없었으나 20日間 투여후에는 체중도 감소 현상을 보였으며 간조직에서 Acidophilic, Necrosis, Congested, Pyknosis, Hemorrhage 등의 변화가 관찰되었다.

考 察

지구상에는 수 많은 종류의 眞菌株가 存在한다고 알려져 있으며 人類生活과 밀접한 관계를 갖고 있기에 抗生物質生産, 식품발효공업등에 이용도가 높았다.

그러나 眞菌이 분비하는 대사 산물의 일종인 mycotoxin이 발암성 및 毒性을 내포하고 있다고 알

려진 이래로 mycotoxin에 대한 문제는 세계적으로 큰 관심거리로 대두되어 많은 연구가 되고 있으며 mycotoxin 生産 菌株에 대한 분포와 아울러 예방대책에 대한 努力이 계속되고 있었다.

그 結果로 *Aspergillus sp.*에서 生産되는 mycotoxin은 Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂, M₁, M₂, B_{2A}, G_{2A} 등이 存在한다고 알려졌으며⁶⁻⁸⁾ 分子量이 300이 넘으며 melting point가 230~290°C 사이에 存在하여 온도에 대한 안전성은 확보가 되나 습기가 存在한 상태에서는 가열에 의해 분해가 된다고 G.E. Mann et al.¹⁷⁾에 의해 보고되어 졌으며 B₁, B₂는 blue 형광이 G₁, G₂는 Green 형광이 UV下에서 생성이 된다고 알려졌으나⁹⁾ Ru-Dang Wei¹⁸⁾ 등은 UV下에서 일정시간 조사 하였을 경우 파괴가 된다고 보고한 것은 본 實驗의 rice와 peanut에서 나타난 결과와 유사하다고 생각할 수 있다.

그러나 FDA/WHO에서 Aflatoxin의 일일 섭취량이 30 ppb를 초과하지 않아야 한다는 규정이 있으며¹⁹⁾ 동물 실험 결과로 mycotoxicoses는 단시일에 생성되는 급성 질환이 아니라 축적 작용에 의해 나타나는 질환인 것을 볼때 우리가 많이 使用하고 있는 곡류 및 진균의 발효 식품인 된장, 고추장, 간장 등이 일광에 의한 UV의 조사에 의해 파괴가되어 무독화되어 지리라 생각은 하나 완전치 않기에 이에 대한 관심과 연구가 필요하리라 사료된다.

또한 모든 眞菌株가 mycotoxin을 生産하는 것은 아니며 眞菌은 저장조건(온도, 습도, 환경)에 의해 우선균의 순위가 변한다는 보고가 있는 것을 볼때^{20,21)} 眞菌 汚染 가능 식품의 관리에도 관심을 가져야 할 것이며 본 實驗에서 *Fusarium sp.*가 발견이 된것은 냉대 지방에서 수입되는 곡물에 대해 정밀한 주의와 검사가 요구 된다고 할 수 있다.

따라서 우리가 사용하고 있는 모든 식품에 대해 眞菌오염의 방지가 요구되며 이에 대한 진균 독소의 파괴 및 무독화에 대한 방법이 계속 강구되어야 하며 연구되어져야 한다고 사료된다.

結 論

서울 시내 곡류상으로부터 채취한 가검물 50종으로 부터 眞菌을 분리하고 Aflatoxin 生産能을 조사한 結果 다음 같은 結論을 얻었다.

1. 총가검물 50종으로 부터 분리된 眞菌株는 63株였다.
2. 주된 眞菌株는 *Aspergillus sp. Penicillium sp.*였다.
3. 냉대 지방에서 生成되는 *Fusarium sp.*도 1株 분리되었다.
4. 분리된 *Aspergillus flavus* 10株중 Aflatoxin 生成 가능주는 6株였다.
5. 가검물중 Barley에서 가장 높은 함량의 Aflatoxin이 함유 되어 있다.
6. Mouse 동물 실험 결과 간에서 cytoplasmic change가 관찰 되었다.

REFERENCES

1. J. Forgacs 1962: *Feedstuffs* 34(18) : 124.
2. W.P. Blount 1961: *Turkeys* 9(2) : 55.
3. Kraybill, H.F. and Shimkin, M.B. 1964: *Advan. Cancer. Res.* 8, 191.
4. Jackson, C.R. 1965: *Plant soil.* 23, 203.
5. Sargent, K., O Kelly, J. Carnagham, R.B.A. and Allcroft, R 1961; *Veterinary Record* 73, 1291.
6. R.D. Hartley, B.F. Nesbitt and J. O Kelly 1963: *Nature(London)* 198 : 1056.
7. C.W. Holzapfel, P.S. Steyn, and I.F.H. Purchase 1966; *Tetrahedron Lett.* 2799.
8. M.F. Dutton and J.G. Heathcote 1968; *Chem. Ind.* : 418.
9. Stubblefield, R.D. et al. 1970: *J. Agri. Food. Chem.* 18(3), 392.
10. Andrellos., P.J. Beckwith, A. c. and Epply, R.M. 1967: *Assoc. Offic. Anal. Chem.* 50, 346.
11. 이근배 · 이장규 · 김찬수 · 유준 · 심길순 · 성호경 · 전세일 · 이화성 · 조신애 · 이금자 1970 : 과학기술처 연구개발 사업보고서.
12. Elmer W. Koneman, M.D. et al. 1978: *Practical Laboratory Mycology* 2nd. Edition The Williams & wilkims Company.
13. Gary S. Moore, Douglas M. Jaciow 1979; *Mycology Forthe Clinical Laboratory.*
14. John Webster 1970; *Introduction to fungi.*
15. Raper KB, Fennel DI 1973: *The Genus Aspergillus.*
16. Raper KB, Thom C, Fennel DI 1949; *The manual of Penicillia.*
17. G.E. Mann, L.P. Codifer and F.G. Dollear 1967; *J. Agric. Food Chem.* 15, 109.
18. Ru Dong Wei, and Fun Sun Chu 1979; *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 63, 1080.
19. Shotwell O.L. Hesseltine. C.W., Stubblefield. R. D. and Sorenson, W.G. 1966: *Appl. Microbial.* 14, 425.
20. Christensen, C.M. 1957; *Botan. Rev.* 23, 108.
21. Christensen, C.M. and. Drescher, R.F. 1954; *Cereal Chem.* 31, 206.