

Aspergillus flavus 로 汚染된 貯藏穀類에서의 Aflatoxin 生成

李 寬 寧 · 金 永 培 · 李 瑞 來
韓國原子力研究所 農業生化學研究室
(1974년 12월 19일)

Formation of Aflatoxins on Stored Grain Contaminated with *Aspergillus flavus*

by

Kwan-Young Lee, Young-Bae Kim and Su-Rae Lee

Agricultural Biochemistry Laboratory, Korea Atomic
Energy Research Institute, Seoul

(Received December 19, 1974)

Abstract

A series of experiment was undertaken to pursue the possibility of aflatoxin accumulation in stored grains which were artificially contaminated with *A. flavus* var. *columnaris* isolated from deteriorated rice in Korea. In storage of rice grain, aflatoxin formation needed relative humidity over 80%, once accumulated aflatoxin was degraded by other microbial growth maintaining 50% level and the absence of other microorganisms brought about the remarkable accumulation of aflatoxin. The formation of aflatoxin in grains was increasing in the order of soybean, peanut, corn, wheat, barley, foxtail millet, rice, polished wheat, mung bean and great millet and it appears to be affected by the size and oil content of grains.

서 론

食糧이나 飼料로 이용되는 곡류는 저장중 여러가지 유해한 곰팡이로 汚染되어 이들 미생물의 생장에 아주 좋은 環境條件이 형성되는 경우 變質되어 큰 문제가 될수 있다. 곰팡이의 有毒成分인 mycotoxin에 관한 연구는 크게 세가지를 들 수 있는 바 *Fusarium*屬에 의한 Fusariogenin, *Penicillium*屬에 의한 黃變米毒, 그리고 *Aspergillus flavus*에 의한 aflatoxin이 있다. 또 變質米에 汚染된 mycotoxin은 한 균주에 의하기 보다는 여러 종류의 곰팡이가 생성한 毒性물질의 혼합체로서 생각할 수 있겠으나 지금까지 알려진 mycotoxin은 단지 일부분 뿐일 것이라는 생각이 지배적이다. (1)

曹동(2,3)은 國內의 변질미에서 미생물을 분리 동정한 결과 지금까지 mycotoxin을 생성할 수 있다고 알려진 균들이 상당히 분포되어 있다고 지적하였다. 著者들은 이

들 중에서 *A. flavus*群의 aflatoxin 생성능을 이미 보고한 바 있다(4). 國內의 변질미에 *A. flavus*가 가장 優勢하게 분포되어 있지는 않으나 aflatoxin B₁의 毒性(LD50=5.5 mg/kg, oral, rats)은 黃變米毒인 islanditoxin의 毒性(LD50=6.5 mg/kg, oral, mice)에 상응하는 것으로서(5) 자연환경 인자가 *A. flavus*群의 번식에 유리한 조건으로 기울어진다면 큰 문제가 예상된다. aflatoxin은 최초로 땅콩 飼料에서 문제가 제기되었으나 그 후 다른 농산물에서도 그 위험성이 알려지게 되었고 Shotwell 등(6)은 쌀을 기질로 하여 가장 많은 aflatoxin을 얻었다고 보고한 바 있다.

저장중인 곡류에 捷息하고 있는 많은 미생물은 상호간에 生存競爭을 유지하게 되는 것으로 Ashworth 등(7)은 땅콩에 여러가지 곰팡이를 접종한 결과 *A. niger*, *Rhizoctonia solani* 등은 *A. flavus*의 생육과 기질에 있어서의 aflatoxin 생성을 제한한다고 하였고, Wildman 등(8)은 *Penicillium* species가 *A. flavus*와 競合의으로 생육할 때

aflatoxin의 생산을 감소시킨다고 하였다.

본 연구는 국내의 여질미에서 분리된 *A. flavus* var. *columnaris*가 곡류에 오염되었을 때의 危險可能性을 追究하기 위하여 수행되었다. 그리하여 곡류에 분리균주를 人爲的으로 接種하고 aflatoxin의 生成에 미치는 相對濕度, 溫度, 基質의 종류 및 微生物相등의 영향을 실험하였으므로 이에 그 결과를 보고한다.

실험 방법

1. Aflatoxin의 分別定量法

前報⁽⁴⁾에서의 같이 실시하였다. 즉 시료 50g을 chloroform으로 추출한 후 silica gel column으로 정제하고 silica gel H chromatoplate에서의 목적법에 의하였다.

2. 미생물의 接種 및 計數法

A. flavus var. *columnaris*는 糞등⁽²⁾이 국내의 벌질미에서 분리한 것으로 potato-dextrose-agar 사면배양기에서 충분히 活性化시킨 후 사용하였다. 낱쌀에 *A. flavus* var. *columnaris*를 대량 접종할 경우는 2 liter용 Roux bottle을 사용하여 potato-dextrose-agar 배양기에 本菌을 접종하여 28°C에서 6일간 배양후, 가압살균한 쌀 100g을 넣고 심하게 흔들어 孢子를 입힌 다음 낱쌀 1.4kg과 잘 섞으므로 접종하였다. 이때 곰팡이의 포자수는 g당 약 8×10⁶개 이었다. 쌀입자의 外部에 汚染된 곰팡이의 번식상태는 既報⁽⁹⁾에서의 같이 48시간 배양후 計數하였다.

3. 相對濕도에 따른 米粒의 保存法

상대습도(RH)의 조절은 Houston에 의한 방법⁽¹³⁾을 사용하였다. 즉 RH가 53.3%~100% 범위의 각종 鹽類飽和溶液을 500ml 광구시약병에 넣고 25°C에서 완전히 포화시켰다. 이에 10g의 쌀 입자를 푸라스틱망 주머니에 넣어 紫外線燈으로 살균후 *A. flavus* 孢子를 2백금이씩 접종하고 시약병 하나에 5개씩 매달아 놓은 채 密閉狀態에서 30일간 保存하였다.

4. 夏節期中의 貯藏실험

A. flavus var. *columnaris*를 대량 접종한 낱쌀 1.4kg을 소형 麻袋에 넣고 1974년 7월 초부터 9월말까지 약 1m³의 나무 상자에 실내에서 보존하였다. 나무상자는 완전히 햇빛을 차단하였고, 그 속에 칸을 막아서 *A. flavus*를 접종하지 않은 對照區를 함께 보존하였다. 저장기간중 상자내의 상대습도와 온도는 Thermohyrometer (Fisher)에 의하여 自動記錄하였으며 하루 중 최고와 최저치의 평균으로 표시하였다.

5. 100%相對濕度에서의 貯藏실험

낱쌀 1kg에 *A. flavus* var. *columnaris*를 그대로 또는 無菌的으로 대량접종후 각각 100% RH로 조절한 밀폐된 유리容器에 넣고 30°C에서 60일간 保存하였다. 쌀을

無菌상태로 하기 위하여서는 낱쌀에 감마선(當研究所에 설치된 20,000 Ci ⁶⁰Co, BNL's shipboard irradiator 사용) 250 krad를 照射시켰다. 접종후의 시료는 무균적으로 취급하지 아니하였다. 한편 供試菌株을 접종하지 않은 것을 對照區로 保存하였다.

결과 및 고찰

1. Aflatoxin 生成에 미치는 相對濕度の 영향

*A. flavus*群에 의한 aflatoxin의 생성은 그것이 基質로 하는 穀類의 수분함량 또는 상대습도가 매우 중요한 것이다. 그리하여 Panassek⁽¹¹⁾는 *A. flavus*의 생장 최저 한계로서 80% RH가 필요하며 포자형성을 위하여서는 85% RH가 요구된다고 하였다. 그러나 이것은 미생물과 基質의 종류 및 外氣條件에 따라 상당히 달라진다고 한다⁽¹²⁾.

A. flavus var. *columnaris*를 낱쌀에 접종하여 여러가지 RH하에서 保存할 때 aflatoxin의 생성여부를 보면 Table 1과 같다. 본 실험에서의 aflatoxin B₁의 정량 최저 한계는 약 0.5 ppb로서 RH가 75% 이하에서는 전연 aflatoxin이 검출되지 않았고 84%에서부터 검출되었다. RH가 75~84%에서는 쌀입자의 平衡수분함량은 14~17% 정도가 되는 바⁽⁹⁾ *A. flavus* var. *columnaris*가 낱쌀에 오염되어 aflatoxin을 생성하려면 우선 이러한 조건이 필요함을 짐작할 수 있다. 또 前報⁽⁴⁾에서 지적한 바와 같이 aflatoxin의 生成과 노란색소의 형성이 함께 나타나고 있었다.

Table 1. Effect of relative humidity on aflatoxin formation and color change in rice grains inoculated with *A. flavus* var. *columnaris*

Relative humidity(%)	Aflatoxin B ₁ (ppb)	State of grains
53.3	nil	no change
64.4	nil	white kernels
75.4	nil	//
84.3	22.7	white & yellow kernels
92.5	25.9	//
100	19.4	//

2. 夏節期 貯藏중 aflatoxin의 消長

*A. flavus*의 왕성한 발육이 예상되는 自然環境으로서 1974년 7월 초부터 시작되는 夏節期中 *A. flavus* var. *columnaris*를 낱쌀에 대량 접종한 후 온도, RH, 곰팡이의 繁殖狀態와 aflatoxin B₁의 消長을 관찰한 결과는 Fig. 1과 같다.

7월중순부터 8월 중순까지의 온도는 대개 26~29°C, RH는 80~85% 부근으로 aflatoxin의 생성에 최적이라고 생각되는 범위이었고 9월에 들어서서는 나쁜 조건으로

떨어지고 있었다. 곰팡이의 발육상태를 보면 接種하지 않은 自然狀態에서는 계속적으로 증가하는 경향을 보였다. 그러나 人爲的으로 接種한 區에서는 오히려 초기에 곰팡이 수가 감소하다가 1개월 후 부터는 비슷한 발육상태를 유지하였고 無接種區 보다는 항상 높은 計數를 나타내었다. 그동안 aflatoxin의 변화를 보면 최초로 대량 接種에 의하여 존재하는 250 ppb의 aflatoxin B₁은 저장기간이 지남에 따라 감소하였으며 1개월이 경과해도 최초량의 약 50% 수준을 계속 유지하였다. 한편 *A. flavus*를 접종하지 않은 對照區에서는 aflatoxin B₁을 전혀 검출할 수 없었다.

이상의 결과로 미루어 보아 穀類에 여러가지 곰팡이가 발육된다 하여도 aflatoxin을 생성하는 菌株가 존재하지 않는 한 aflatoxin에 의한 汚染 가능성은 없다고 할 수 있다. 한편 aflatoxin 生成菌은 다른 곰팡이의 발육과 競合關係를 유지하는 것으로 생각되며 일단 생성된 aflatoxin도 다른 미생물의 번식에 의하여 분해된 다음 일정한 수준의 독소가 殘留하는 것으로 판단된다.

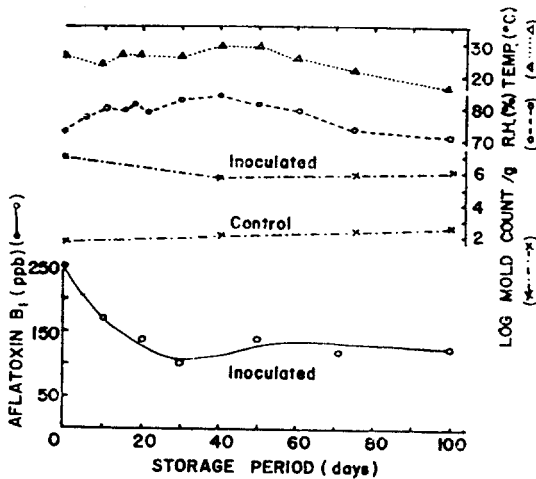


Fig. 1. Variation in mold counts and aflatoxin content in rice grains inoculated with *A. flavus* var. *columnaris* during storage in summer season

3. 100% 相對濕度에서의 aflatoxin의 消長

쌀의 夏節期 저장중 aflatoxin 生成菌株의 接種에 따른 aflatoxin의 消長關係를 더 규명하기 위하여 곰팡이의 발육에 좀 더 좋은 조건이라고 생각되는 100% RH와 30°C에서 60일간 저장한 실험의 결과는 Fig. 2와 같다.

본 실험에서는 *A. flavus*와 쌀에 汚染되어 있는 다른 곰팡이와의 關係를 관찰하기 위하여 낱쌀에 그대로 또는 감마선 照射에 의하여 既存하는 곰팡이를 제거한 쌀에 供試菌株를 接種하였다. 이때 곰팡이의 繁殖 狀態를 보면 滅菌시킨 쌀에 *A. flavus*를 대량 接種한 것은 약간 증가하다가 감소되었고, 생쌀에 그대로 接種한 것은 계속 감소되었으며 *A. flavus*를 접종하지 않은 對照區는 계

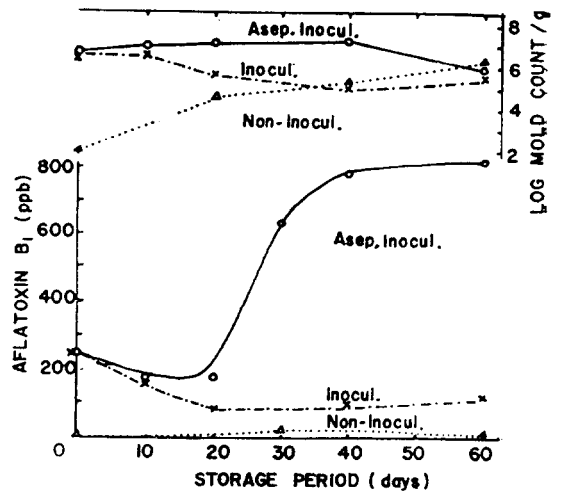


Fig. 2. Variation in mold counts and aflatoxin content in rice grains inoculated with *A. flavus* var. *columnaris* during storage at 100% relative humidity and 30°C

속 증가하였다. 그리하여 60일경에는 어느 것이나 거의 비슷한 수준에 도달하였다.

한편 aflatoxin의 消長을 보면 接種하지 않은 對照區에서는 거의 검출되지 않았고 그대로 接種한 區에서는 夏節期 저장에서의와 같이 초기에는 감소하다가 그후 50% 수준을 유지하였다. 그러나 無菌的으로 接種한 實驗區에서는 초기에 약간 감소하는 경향을 보이다가 30일경부터는 급격히 증가하여 최초의 4배로 증가하였다. 따라서 *A. flavus*群이 aflatoxin을 생성하는 데에는 다른 미생물과의 共存에 의하여 큰 영향을 받는 것으로 생각된다.

그러므로 無菌상태의 쌀과 같은 특수한 조건하에서 *A. flavus* var. *columnaris*가 汚染된다면 폭발적으로 다량의 aflatoxin이 축적될 수 있는 것이다. 이와같이 한번 생성된 mycotoxin은 자연환경 하에서 다른 미생물과의 競爭에서도 그 양의 50%는 殘存할 수 있다고 생각된다.

4. 基質에 따른 aflatoxin의 生成

여러가지 곡류를 前報(4)에서와 같이 가압살균 후 *A. flavus* var. *columnaris*를 人爲的으로 接種하고 진탕배양시 aflatoxin의 생성량을 분석한 결과는 Table 2와 같다. 곡류에 따라 분석방법이 다스 달라져야 하겠으나 여기서는 모두 같은 방법으로 측정하였다.

그 결과 *A. flavus* var. *columnaris*가 이들 곡류에 오염되면 모두 aflatoxin을 생성할 수 있음을 알 수 있었다. 그런데 大豆나 땅콩보다는 쌀, 밀쌀, 수수, 녹두에서 더 많은 aflatoxin을 생성하고 있었는데 이것은 진탕배양시 곡류입자에 *A. flavus*가 침입할 수 있는 표면적이 크게 작용하지 않았나 생각된다. 또 이런 경향은 oilseed 보다는 탄수화물의 함량이 높은 곡류가 aflatoxin의 생성에 더 적합하다는 說(1)과 잘 일치하고 있다.

Table 2. Production of aflatoxin on various grains by *A. flavus* var. *columnaris*

Substrate	Aflatoxin (ppb)	
	B ₁	B ₂
Polished rice	388.2	10.8
Naked barley	194.4	4.6
Wheat	153.4	8.6
Polished wheat	460.2	nil
Foxtail millet	310.4	6.1
Great millet	1940.0	122.7
Corn	108.6	nil
Mung bean	776.0	73.6
Peanut	31.1	nil
Soybean	25.9	nil

國內의 變質米에서 분리 동정된 *A. flavus* var. *columnaris*는 外國에서 강한 aflatoxin 생성균주로 알려진 *A. flavus* ATCC 15517 또는 *A. parasiticus* NRRL2999에 의한 aflatoxin 생성능의 약 1/80~1/90 정도밖에 되지 않음을 알았다⁽¹²⁾. 그러나 FAO/WHO에서 하루에 섭취되는 음식물중 aflatoxin의 함량이 30 ppb를 넘어서는 안된다⁽¹³⁾고 한 점을 생각해 볼 때 國內에서 분리된 *A. flavus* var. *columnaris*도 충분히 큰 危險性을 줄 수 있다고 생각한다. 그런데다 外國에서 導入하는 穀類에 이들 강력한 aflatoxin 생성균이 汚染된다면 aflatoxin의 危險性은 더욱 심각해질 것이다.

우리가 이들 mycotoxin의 危險性을 과소평가하는 것은 穀類에 有害한 미생물이 汚染되어 變質되면 우선 육안으로 알 수 있으므로 피하게 되고, 햇볕같은 自然環境이나 調理過程 등에 의하여 어느 정도 제거되므로 우연히 致死量 이상을 섭취하기 전에는 그 피해 원인을 알 수 없기 때문이라고 생각된다. 또 그 원인이 mycotoxin이라 하여도 營養不足이나 다른 病으로 생각해 버리기 쉽다. 그러나 mycotoxin을 潜在的으로 장기간에 걸쳐서 섭취하게 되면 큰 被害를 받을 危險性을 지니고 있다. 특히 穀類와 곰팡이 醱酵食品을 많이 섭취하는 東南亞에서 食品에 의한 aflatoxin의 섭취량과 肝癌發生率간에 높은 相關性이 있다고 하는 최근의 疫學的 調查研究⁽¹⁴⁻¹⁸⁾가 있으므로 mycotoxin에 대하여 더 많은 관심을 가져야 할 것이다.

요 약

國內의 變質米에서 분리된 *A. flavus* var. *columnaris*가 貯藏穀類에 汚染되었을 때 aflatoxin 生成에 의한 危險可能性을 追究하기 위하여 일련의 실험이 수행되었다. 그 결과 쌀 저장중 aflatoxin의 생성에는 80%이상의 相

對濕도가 요구되었고 일단 축적된 aflatoxin은 다른 미생물의 번식에 의하여 분해되어 50% 수준을 유지하였으며 다른 미생물이 공존하지 않는 경우는 aflatoxin의 대량축적이 일어났다. 穀類에서의 aflatoxin생성량은 大豆, 땅콩, 옥수수, 밀, 보리, 조, 쌀, 밀쌀, 녹두, 수수의 순서로 증가하였으며 穀粒의 크기와 油脂의 함량에 영향되는 경향을 보여 주었다.

참 고 문 헌

- 1) Goldblatt, L. A.: *Aflatoxin*, Academic Press, New York, Chapters II and VII (1969).
- 2) 曹惠鉉, 全在根, 金永培: 한국농화학회지, 15, 193 (1972).
- 3) 金永培, 曹惠鉉: 한국농화학회지, 17, 54 (1974).
- 4) 李寬寧, 李瑞來: 한국식품과학회지, 6, 169 (1974).
- 5) Bamberg, J. R., Strong, F. M. and Smalley, E. B.: *J. Agr. Food Chem.*, 17, 443 (1969).
- 6) Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D. and Sorenson, W. G.: *Appl. Microbiol.*, 14, 425 (1966).
- 7) Ashworth, L. J., Jr., Schroder, H. W. and Langley, B. C.: *Science*, 148, 1228 (1965).
- 8) Wildman, J. D., Stoloff, L. and Jacobs, R.: *Biotechnol. Bioeng.*, 9, 429 (1967).
- 9) 李瑞來, 金成器, 李寬寧: 한국식품과학회지, 5, 95 (1973).
- 10) Houston, D. F.: *Cereal Chem.*, 29, 71 (1952).
- 11) Panassenko, V. T.: *Microbiol.(USSR)*, 10, 470 (1941) [참고문헌 1에서].
- 12) 李寬寧, 李瑞來: 한국생화학회지(1975) (투고중).
- 13) Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Burmeister, H. R., Kwolek, W. F., Shannon, G. M. and Hall, H. H.: *Cereal Chem.*, 46, 454 (1969).
- 14) Shank, R. C., Wogan, G. N. and Gibson, J. B.: *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 51 (1972).
- 15) Shank, R. C., Wogan, G. N., Gibson, J. B. and Nondasuta, A.: *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 61 (1972).
- 16) Shank, R. C., Gordon, J. E., Wogan, G. N., Nondasuta, A. and Subhamani, B.: *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 71 (1972).
- 17) Shank, R. C., Bhamarapravati, N., Gordon, J. E. and Wogan, G. N.: *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 171 (1972).
- 18) Shank, R. C., Siddhichai, P., Subhamarapravati, N., Gordon, J. E. and Wogan, G. N.: *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 181 (1972).