

한국산 쌀과 메주에서의 Aflatoxin 생성 진균분리

원자력 병원

이 장 규

경희대학교 의과대학 미생물학 교실

김 찬 수

경희대학교 약학대학 미생물학 교실

김 종 우

=Abstract=

Isolation of Aflatoxin Producing Fungi from Korean Rice and Soybean Paste

Jang Kyu Lee, M.D.

Radiological Research Institute

Chan Soo Kim, M.D.

Kyung Hee University School of Medicine, Department of Microbiology

Jong Woo Kim, B.S.

Kyung Hee University College of Pharmacy, Department of Microbiology

In view of the warmth and humidity in Korea, there is little possibility to avoid the fungal contamination of rice soybean paste which are major foodstuffs in this country.

In order to isolate aflatoxin producing fungi from these foodstuffs, 6 samples of rice were collected from the farmhouses at Changsung and 40 samples of soybean paste in Seoul areas.

The peptone glucose chloramphenicol, Czapek-Dox agar and malt agar were used for the isolation and identification of fungi, and Adye and Meteles medium and/or Sabouraud medium for the production of toxins. The cultures for the toxin production were done at 25°C for 5~7 days.

Eleven *Penicillium* species were isolated from 6 samples of rice, and 37 *Aspergillus flavus*, 48 *Aspergillus* species, 1 *Penicillium* species and 105 others were isolated from 40 samples of soybean paste. Among these, one *Penicillium* species isolated from rice was found to be aflatoxin producing strain, and the toxin was quantitatively measured. Aflatoxin appeared to be more favorably produced in the glucose Sabouraud medium than in the Adye and Meteles medium.

I. 서 론

1960년 영국에서 10만여 마리의 칠면조가 무더기로 죽었을 때 Sargeant 등 (1961)이 그 사료에서 aflatoxin

을 검출한 이래 식품과 aflatoxin의 관계가 큰 문제로 대두되어 식품 관리에 많은 관심을 가지게 되었다.

Aflatoxin을 생성하는 진균은 *aspergillus*, *penicillium* 기아가 분리되어 있는 바 이와 같은 진균은 우리나라

의 쌀과 메주에도 많이 존재하므로(이들, 1970) aflatoxin에 폭로될 기회가 많을 것이 추측된다. 그러나 aflatoxin 생산 균주를 분리하는 것은 그다지 용이하지 않기 때문에 한국에서의 분포는 아직 명확하게 밝혀지지 않았다. 저자들은 그 분리를 계속 시도하고 있는 바 이에 한국산 쌀과 메주에서 분리한 사상균중 aflatoxin을 생성하는 것으로 사료되는 penicillium의 1주를 쌀에서 분리하였기에 보고하는 바이다.

II. 재료 및 방법

A. 시 료

쌀은 1973년 7월 전남 장성 교의 농가에서 각호마다 1시료씩 6시료를 수집하여 멸균된 두꺼운 2중 봉투에 넣고 밀봉하여 실험실에 운반하였다.

메주는 같은 시기에 가정에서 만든 것을 서울시내에서 40개 수집하여 멸균된 소포지에 2중으로 싸고 밀봉한 후 실험실에 운반하였다.

B. 배 지

진균분리 및 동정용으로 PGC (peptone glucose chloramphenicol)(Kurata et al, 1967)와 Czapek-Dox agar, malt agar를 사용 하였고, 독소생산 배지로서는 주로 Adye and Mateles medium-MIT (Adye et al, 1964)를 사용하였다. 필요에 따라서는 Sabouraud liquid medium (Bacto-peptone 1%, dextrose 2%)도 사용하였다.

C. 시 약

Chloroform, methanol 등은 E. Merck 계 GR을 사용하였으며 thin-layer chromatography (TLC)에서의 정성 시험에 사용한 흡착제는 E. Merck 계인 TLC용 silica gel G를, 정량시험에는 silica gel H를 사용하였다. Aflatoxin B₁ 및 G₁의 표준품은 Calbiochem 제품을 사용하였다.

발색시약으로 사용한 ninhydrin, 2, 4, -dinitrophenylhydrazine 및 tollens 시약은 E. Merck 제를, 이외의 시약은 특급품을 사용하였다.

D. 사상균 분리

사상균의 분리 배양은 Kurata (1967)의 방법에 의 하였다. 쌀과 메주를 멸균된 용기에서 분쇄, 분말로 한 후 쌀, 메주 1g를 각각 0.1% sodium lauryl sulfonate 함유 증류수로 1×10⁶배 희석 농도의 유체를 만

든 후 1 ml를 취하여 PGC 배지에 평판 배양을 하였다. 이 때 평판은 시료 1천체에 대하여 3개씩을 사용하였고 배양온도는 25°C이었다. Aflatoxin 검색은 분리된 사상균을 Adye and Mateles 배지 또는 필요에 따라서 Sabouraud 액체 배지에 접종한 후 25°C에서 5~7 일간 배양한 후 배양액과 균체를 다음과 같이 화학적 처리를 하여 TLC를 실시하였다. Rf 값이 표준 독소의 것과 유사할때는 독소정량시험, 정색반응 등을 실시하여 aflatoxin을 동정하였다.

E. Thin-Layer Chromatography

(i) TLC에서의 정성시험:

상기와 같이 배양된 배양액과 균체를 CHCl₃로 추출한 추출물을 상온에서 감압농축하여 가검물로 하였으며 silicagel G의 박층이 300 μ인 plate에 가검물과 표준 aflatoxin B₁, G₁을 spot하여 Me·OH·CHCl₃ (1:9)의 혼합물 용매중에서 전개시킨 후 실온에서 건조시키고 UV로 조사하여 형광성 물질을 검색하였다.

(ii) TLC에서의 정량시험:

정성이 끝난 chloroform 추출액은 증발 건조 시킨 후 이것을 0.3 ml의 benzene-acetonitrile (98:2) 용매에 용해한 후 IAEA (FAO/IAEA/IAMS, 1970) 및 AO-AC법(1970)으로 정량하였다.

III. 실험성적 및 고찰

Aflatoxin 생성균주 분리:

쌀 6시료로부터는 Penicillium sp. 가 11주 분리되었고 그 배양액이 형광을 나타내는 Penicillium sp. 는 1주 이었다. 메주 40개로 부터는 Aspergillus flavus 37, Aspergillus sp. 48, Penicillium sp. 1 기타 사상균 105주가 분리되었으며 형광을 나타내는 균주는 각각 13, 10, 0, 11이었다(Table 1.).

A. Aflatoxin 정성시험

이 형광성 균주를 Adye and Mateles 배지에 배양하여 얻은 배양액과 균체추출물의 TLC에서의 aflatoxin 정성시험결과 aspergillus의 배양 추출액은 B₁, G₁에 대한 Rf 값이 모두 0.01~0.2사이에 있었다. 이것은 표준 aflatoxin B₁, 0.63; G₁, 0.45의 Rf 값과 비교하면 상당한 차이가 있었다. 그러나 쌀에서 분리된 형광성인 Penicillium sp. (Penicillium sp. IIE라고 기함)(Fig. 2. A, B, C, D)의 배양추출액의 Rf 값은 B₁, 0.65; G₁, 0.35이어서 이들 spot 중 하나는 B₁과 유사

Table 1. Numbers of Fungi Isolated from Rice and Soybean Paste

Kinds of samples	No. of samples	Area	Aspergillus flavus	Aspergillus sp.	Penicillium sp.	Others
Rice	6	Changsung			11(1)	
Soybean paste	40	Seoul	37(13)	48(10)	1	101(11)
Total	46		37(13)	48(10)	12(1)	105(11)

() Number of fluorescent fungi

하였고 다른 하나는 G₂와 유사할 것으로 보였다(Fig. 1). 이 *Penicillium* sp. IIE를 Sabouraud 배지에서 동일한 조건으로 배양하였을 때는 같은 Rf 값에서 더 강하게 spot가 나타났다. 또 배양액을 120°C 20분 가열하여 검사하였을 때에도 spot의 강도가 약화되지 않았다.

B. Aflatoxin 정량시험

Penicillium sp. IIE 배양 추출액의 TLC에서의 aflatoxin 정량시험 결과는 Table 2와 같다(Table 2),

즉 1974년 7월에 adye and mteles 배지 및 Sabouraud 배지에서 동일한 조건으로 배양한 *Penicillium* sp. IIE 배양 추출액을 냉장고에 저장한 후 1년만에 aflatoxin B₁ 및 G₁를 정량하였던바 Sabouraud 배지에서의 배양

추출액에서만 B₁ 0.78 μg으로 정량되었다. 이것은 배양액 10 ml에 해당되는 것이었다. 1975년 6월에 이균주를 다시 두가지 배지에 동일한 조건으로 배양하여 aflatoxin B₁ 및 G₁를 정량하였던바 역시 Sabouraud 배지에서 배양한 추출액에서만 aflatoxin B₁ 0.15 μg으로 정량되었다. 이것은 배지 30 ml에 해당되는 양이었다.

Adye and Mateles 배지는 aflatoxin 생산용 배지로 우수한 것이 인정되어 있으나 glucose Sabouraud 배지가 때로는 이것보다 양호할 때가 있다. 그리고 Sabouraud 배지의 구성성분인 peptone은 neopeptone보다 Bacto-peptone이 양호하였다.

C. 정색반응

상기와 같이 정성, 정량시험을 한 *Penicillium* sp. IIE의 배양액으로부터 추출 분리한 형광물질은 ninhydrin, 2,4-dinitrophenylhydrazine 및 tollen's reaction 등에 의한 정색반응이 음성이었다. 이상 TLC에

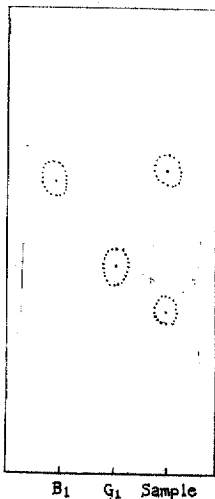


Fig. 1. Thin-layer chromatogram of a *Penicillium* sp. culture extract

Absorbent: silica gel G

Developing solvent: MeOH-CHCl₃ (1 : 9)

Temperature: room temp. (25~27°C)

Sample: a culture extract of *Penicillium* sp. isolated from rice

Rf value: B₁, 0.63 G₁, 0.45 Sample, 0.63, 0.35

Table 2. Production of aflatoxin by *Penicillium* sp. isolated from rice in Korea

Penicillium sp. culture	Aflatoxin			
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂
A (1974. 7, Adye and Mateles medium)	ND	ND	ND	ND
B (1974. 7, Sabouraud medium)	0.78 μg*	ND	ND	ND
C (1975. 6, Adye and Mateles medium)	ND	ND	ND	ND
D (1975. 6, Sabouraud medium)	0.15 μg**	ND	ND	ND

ND: not detectable

* dose in 10 ml of the culture

** dose in 30 ml of the culture

서의 정성, 정량시험 및 정색반응의 성적으로 보아 쌀에서 분리한 *Penicillium* sp. IIE는 aflatoxin을 생산하는 균주라고 볼 수 있다.

VI. 결 론

이상과 같이 쌀 6시료 메주 40개로부터 *Aspergillus flavus* 37, *Aspergillus* sp. 48, *Penicillium* sp. 12, 기타 사상균 105를 분리하여 aflatoxin 생성능을 검토하였던 바

1. 한국산 쌀에서 aflatoxin B₁으로 사료되는 독소를 생성하는 *Penicillium* sp. 1주가 분리되었다.
2. 이 균주의 독소생 산용 배지는 Abye and Mateles 배지보다 glucose Sabouraud 배지가 양호하였다.

参 考 文 献

AOAC: *Official Methods of Analysis*. 11th ED. p. 429, 1970.

FAO/IAEA/IAMS: *Specification and Testing Methods for Irradiated Food*. IAEA. p. 64. 1970.

Kurata, H., and Ichinoe, M., J.: *Food Hygiene Society of Japan*. 8:237, 1967.

이근배, 이장규, 김찬수, 유 준, 심길순, 성호경, 전세일, 이화성, 조신애, 이금자, : 과학기술처 1970년도 연구개발사업 보고서, MOST-R-70-84-PM, 41 pp. 1970.

Sargent, K., O'Kelly, J., Carnagham, R.B.A., and Allcroft, R.: *Veterinary Record* 73:1219, 1961.

Fig. 1. *Penicillium* sp. 11E. A and B, Two-week old colonies on Czapek and malt agars. C, Colony margin showing showing characteristic aspect of *Penicilli* as see under low-power, x100. D, Detail of single *Penicillus*, x450.