

몇가지 韓國食品중 Aflatoxin의 檢出

金容華 · 皇甫丁淑 · 李瑞來

韓國原子力研究所 環境化學研究室

(1977년 1월 7일 수리)

Detection of Aflatoxins in Some Korean Foodstuffs

by

Yong-Hwa Kim, Jeong-Sook Hwangbo and Su-Rae Lee

Environmental Chemistry Laboratory, Korea Atomic Energy Research Institute, Seoul, Korea

(Received January 7, 1977)

Abstract

In order to detect the occurrence of aflatoxins in some suspicious Korean foodstuffs, 54 samples of Meju (a naturally inoculated soybean substrate for soy sauce and paste fermentation), 125 samples of Doenjang (a Korean-style fermented soybean paste), both produced at household level, and 31 samples of peanut were collected from 8 major cities of South Korea and subjected to assay by the official method of AOAC. The results were as follows:

- 1) Frequencies for the occurrence of aflatoxins in Meju, Doenjang and peanut were 7.4%(4/54), 8.8%(11/125) and none (0/31), respectively, in which Meju and Doenjang samples from Daegu and Busan showed the high ratio of the presence.
- 2) A Doenjang sample from Busan was found to contain the highest content of aflatoxins, of which B₁, B₂, G₁ and G₂ were 66 ppb, 13 ppb, non-detectable and 5 ppb, respectively, while other samples detected were for G₂ only.
- 3) The identity of aflatoxin B₁ isolated from the Doenjang sample from Busan was confirmed by thin-layer chromatographic behavior, derivative formation and chicken embryo bioassay.

서 론

食品에서 유래되는 發癌物質중 가장 강력한 것으로 알려진 aflatoxin은 1960년의 사건 발생후 이에 대한 미생물학적 및 毒物學的 문제가 집중적으로 연구되어 왔다. 이에 따라 각국에서는 aflatoxin 및 그 生成菌株에 대한 檢索과 아울러 豫防대책에 대한 노력이 경주되고 있다.⁽¹⁾

우리나라에서는 1968년 전주 예수병원 실 박사가 한국인의 癌發生率에 관한 臨床의 경험에 의하여 간장, 된장중 aflatoxin의 존재가능성을 시사한 바 있으나 실

험적 확증은 내리지 못하였다. 이에 따라 한국인이 소비하는 식품중 aflatoxin의 有無와 이에서 분리된 곰팡이의 aflatoxin 生成能에 대한 檢索이 1969년부터 시도되어왔다.

즉, 李동⁽²⁾은 메주 및 된장 15점을 조사한 결과 6개 시료에서 TLC에서의 Rf값은 동일하나 자외선 스펙트럼이 다른 aflatoxin 유사물질을 검출하였다고 보고한 바 있다. 鄭 및 權⁽³⁾은 콩, 메주, 된장, 간장 35점을 검색한 결과 TLC상의 Rf값으로 보아 콩 및 간장에서 aflatoxin G₁을, 메주 및 된장에서 aflatoxin G₁ 및 G₂를 확인하고, 시료에서 분리된 *Aspergillus flavus*의 액체 배양에서는 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂를 확인하였다고 주

광하였다. 또 이등⁽⁴⁾은 메주, 된장, 고추장, 쌀, 밀, 팥, 낙화생. 막걸리등의 시료 228점을 검색한 결과 TLC상의 Rf값으로 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂를 검출하였으나 자외선 스펙트럼이 상이하므로 aflatoxin관련 물질이라고 추정하였다. 한편 이등⁽⁵⁾은 발효식품에서 분리한 *Asp. flavus* 15균주, 고등⁽⁶⁾은 곡류에서 분리한 *Aspergillus*속 58균주의 aflatoxin 생성능을 시험한 결과 각각 3균주만이 TLC상에서 Rf 값이 비슷한 aflatoxin 유사물질을 분리한다고 하였다. 국내에서 발표된 이들 모든 보고를 보면 TLC상에서 aflatoxin과 Rf값이 유사한 형광성 물질을 발견하였으나 자외선 스펙트럼이 표준품과 일치하지 않았으므로 aflatoxin의 존재를 부정하거나 유사물질의 존재를 추정하는데 그쳤을 뿐이다.

결국 우리나라에서는 아직 한국산 식품중 aflatoxin의 존재를 확정짓지 못하고 있는 상태인 바, 그 이유로서는 aflatoxin의 경제과정이 불충분하여 그의 確定이 불가능하였던 것으로 간주된다. 그러나 사람의 肝癌발생율과 식품중 aflatoxin 함량간에는 높은 相關性이 있다는 최근의 疫學的 調査결과⁽⁷⁻¹¹⁾와 아울러 한국인에게 肝癌發生率이 매우 높다는 사실을 감안할 때 한국인이 常食하는 곰팡이 醱酵食品과 곡류중 aflatoxin의 존재여부를 확정 짓는 일은 국민보건상 매우 중요한 연구과제이다. 著者등은 국내의 變質米에서 분리된 *Asp. flavus* 균주의 aflatoxin 생성능을 確定하여 既報^(12,13)에서 보고한 바 있다.

따라서 본 연구는 한국인이 소비하는 식품중 aflatoxin의 존재가 가장 의심되는 메주, 된장, 땅콩 不良品을 전국 주요도시에서 수집하여 aflatoxin의 출현빈도를 조사하였고 된장중 aflatoxin B₁의 존재와 농도를 理化學的 및 生物學的 方法에 의하여 確定하였으므로 이에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 試料의 蒐集 및 保存

서울특별시를 비롯한 주요도시의 가정 및 市場에서 메주, 된장, 땅콩을 1976년 2월부터 5월에 걸쳐 Table 1과 같이 수집하였다. 메주는 1975년 11월에 각 가정에서 제조하여 1976년 2~3월에 담글 예정인 것을 200~500 g씩 수집하여 50°C에서 12시간 건조 후 진동분쇄기(橫山 공업주식회사 T-100형)에 의하여 20 mesh로 분쇄한 것을 분석시까지 4°C의 냉장고에 보존하였다. 된장은 1975년 2~3월에 각 가정에서 메주로 부터 在來的인 방법으로 담근 것을 200~500 g씩 수집하여 분석시까지 냉장고에 보존하였다. 땅콩은 각도시의 도매상에서 200 g씩 製菓用으로 쓰인다는 下級品과 榨油用으로 쓰이는 不良品을 수집하여 냉장고에 보존하였다가 분석시 최절구로 20 mesh로 분쇄하였다.

2. 試 藥

본 실험에 사용한 aflatoxin 標準品은 Calbiochem 재

Table 1. Location and number of food samples collected for analysis

Area	District (with the number of samples in parentheses)		
	Meju* ¹	Doenjang* ²	Peanut* ³
Seoul	Dobong(8), Dongdaemoon(5), Seodaemoon(4), Yeongdeungpo(3)	Chongro(5), Dobong(7), Dongdaemoon(8), Mapo(4), Seodaemoon(6), Yeongdeungpo(6), Yongsan(4)	Market(7)
Chuncheon	Whole(1)	Whole(9)	Market(3)
Daejeon	—	Whole(8)	Market(1)
Jeonju	—	Whole(8)	Market(2)
Kwangju	—	Whole(10)	Market(2)
Jeju	—	Whole(10)	Market(1)
Daegu	Dong(11), Nam(5)	Dong(14), Nam(6)	Market(9)
Busan	Busanjin(5), Dong(5), Dongnai(3), Seo(4)	Busanjin(10), Dong(4), Dongnai(3), Seo(3)	Market(6)
Total number	54	125	31

*1. Meju is a naturally inoculated soybean substrate for soy sauce and paste fermentation.

*2. Doenjang is a Korean-style fermented soybean paste, produced at household level.

*3. Peanut samples were lower grade products from wholesale stores in the market.

품이었고 TLC용 silica gel H 및 column용 silica gel은 Merck제품이었다. 구조토는 和光純藥공업주식회사 제품인 celite 545를 그대로 사용하였다. Chloroform, methanol은 Merck제 1급 및 특급시약을, anhydrous ethyl ether는 ACS 규격품을 그대로 사용하였다. Chicken embryo bioassay에 사용한 absolute ethanol은 Merck제 특급품이었다.

3. Aflatoxin의 檢出 및 定量法

된장은 약 50%의 수분을 함유하므로 100 g을, 메주와 땅콩은 건조 시료로서 각각 50 g씩을 취하여 AOAC公定法(26.014—26.018)⁽¹⁴⁾중 땅콩 및 땅콩제품에 대한 방법에 준하여 aflatoxin의 所在를 檢索하였다. 즉, 된장은 증류수를 가하지 않고 그대로, 메주와 땅콩은 증류수 25 ml를 가하여 충분히 적신뒤 250 ml의 chloroform을 가하여 waring blender로 3분간 추출하였다. 이것을 1 l 삼각플라스크에 옮긴 후 25 g 구조토를 가한 다음 밀봉하여 wrist action shaker (Burrell 製)로 30분간 격렬히 진탕하였다. 이것을 5 mm 정도의 구조토를 균일하게 깔 Buchner funnel로 여과하고 여액 50 ml만을 취하여 다음의 column정제과정을 거쳤다.

무수황산소오다 5 g, 비활성화된 column용 silica gel (0.063—0.2 mm) 10 g, 무수황산소오다 15 g을 차례로 채운 22×300 mm column에 시료를 주입한 후 150 ml의 hexane으로 지방분을 용출, 제거한 후, 다시 150 ml의 anhydrous ethyl ether로서 황색색소를 제거하였다. 그 후 column에 흡착된 aflatoxin을 150 ml의 chloroform-methanol(97:3)로 용출하였다. 이 용출액은 45°C에서 감압농축하여 소량의 chloroform으로 vial에 옮기고 질소캐스 존재하에 steam bath상에서 건조하였다.

이 건조물에 0.5 ml의 benzene-acetonitrile (98:2)을 가하고 1분간 격렬히 흔든 후 활성화된 0.25 mm silica gel H plate에 각 시료당 10 μ l씩 spotting하고 그 옆에 표준 aflatoxin혼합용액 (B₁, G₁, 1 μ g/ml씩, B₂, G₂ 0.5 μ g/ml씩)을 2, 5, 10 μ l씩 spotting하였다. 24±1°C로 조절된 암실에 chloroform-acetone (9:1) 혼액을 전개용매로 하여 전개조가 포화되지 않은 상태로 약 40분간 전개시켰다(통례적인 방법과는 달리 전개조 내벽에 여지를 들리지 않았다). 분리가 완료되면 plate를 꺼내서 용매를 완전히 날려보낸 뒤 자외선등(Ultraviolet Products 製 UVSL-25)의 長波長부에서 시료중의 aflatoxin존재 여부를 檢索하였다. 이 방법에서 aflatoxin의 最低檢出 限界値는 B₁, G₁이 5 ppb, B₂, G₂가 2.5 ppb이었다.

Aflatoxin의 성분별 정량을 위해서는 예비검색의 결과에 따라 용량을 다시 조정한 시료용액 및 aflatoxin표준용액을 각각 3.5, 5, 6.5 μ l씩 spotting하고 螢光強度가

같은 spot를 발견하므로서 aflatoxin의 농도를 계산하였다. 이때의 最低檢出 限界値는 B₁, G₁ 2.5 ppb, B₂, G₂가 1 ppb이었다.

4. Aflatoxin B₁의 정제법

Shotwell등⁽¹⁵⁾이 *Asp. flavus*를 집중한 쌀에 적용한 방법에 준하여 aflatoxin B₁을 정제하였다. 즉 된장 500 g을 검출과정에서와 같이 chloroform으로 추출하여 얻은 여액을 합하여 50~80 ml가 되도록 감압농축하고 무수황산소오다로 탈수, 여과하였다. 여액을 20~30 ml가 되도록 감압농축한후 200~300 ml의 hexane을 가하였다. 침전을 glass filter(Corning glass No. 36060, pore size: ASTM 10~12 μ)로 분리하고 10 ml의 chloroform에 전부 용해하였다.

이용액은 檢出 및 定量法에서와 같이 silica gel column(22×300 mm)을 통과시켜 불순물을 제거하고 aflatoxin이 함유된 chloroform-methanol(97:3) 용출액은 감압농축하여 0.5 ml의 chloroform에 녹였다. 이것을 silica gel H plate에 band상으로 spotting하여 chloroform-acetone(9:1)으로 전개하고 aflatoxin B₁에 해당하는 부분을 끊어 내어 glass filter(pore size: ASTM 4~4.5 μ)⁽¹⁶⁾ 상에서 감압하에 chloroform으로 5회 용출하고 여액을 steam bath상에서 증발건조시켜 aflatoxin B₁의 純品을 얻었다.

5. Aflatoxin B₁의 理化學的 同定法

Thin-layer chromatogram상의 R_f값을 비교하기 위해서는 AOAC (26.010)⁽¹⁴⁾에 권장된 용매계중 benzene-methanol-acetic acid (90:5:5), ether-methanol-water (96:3:1), dichloromethane-trichloromethane-n-amyl alcohol-formic acid (80:15:4:1)의 세 가지 용매를 사용하였다.

Aflatoxin B₁의 유도체로는 既報⁽¹²⁾에서와 같이 water adduct 및 acetate adduct를 합성하고 chloroform-acetone (9:1) 용매계에 의한 TLC상의 R_f값에 의하여 同定하였다.

6. Aflatoxin B₁의 生物學的 檢定法

AOAC 公定法인 chicken embryo bioassay (26.073—26.078)⁽¹⁴⁾에 준하여 실시하였다.

즉 single comb white leghorn의 계통간 四元交雜종란중 동일 계군에서 얻은 계란을 檢卵器로서 검사하여 卵殼에 흡이 있는 것을 골라내어 버리고 중량순으로 나열한 후 zigzag 배열로 區當 20개씩 나누었다. 다음 난각의 氣室부분을 솜곳으로 3~4 mm 직경이 되게 구멍을 뚫고 外卵殼膜은 핀셋으로 제거한 후 ethanol에 용해한 aflatoxin용액 3~10 μ l를 microsyringe (Hamilton Co. 製 # 701, 10 μ l用)로 內卵殼膜 및 內난각막에 닿지

않게 주의하면서 注入하였다. Control로서는 silica gel H를 시료정제과정과 동일하게 추출, 농축한 ethanol용액 10 μl를 처리한 것과, 처리시 오염정도의 지표가 되도록 난각과 외난각막만 제거하고 아무 처리도 하지 않은 것으로 하였다. 처리가 끝난 계란은 Scotch tape로 구멍을 메운 뒤 21일간 부화하였다.

본 실험에 사용한 부화기는 Thelco Co.製 model 6M incubator로서 下部에 환기구 및 fan이 부착되어 있어서 恒溫유지는 물론 환기에 적당하였다. 부화기의 용량은 90×65×43 cm³로서 부화중의 온도는 100±2°F로 유지하였고 습도는 부화기 下部에 여러개의 水盤을 넣어 주면서 58±3%가 되도록 조절하였다. 轉卵은 1일 3~4회 일정하게 계속하였고 檢卵은 매일 약 32°C로 유지된 암실에서 실시하였으며 檢卵에서 發育中止卵으로 단정된것은 (1)氣室을 중심으로 혈관이 아랫쪽으로 펼쳐지는 正常發育卵에 비하여 혈관이 아랫쪽에서 말려져 올라오는 것, 즉 아랫쪽에서 혈관이 멎어서 선명하게 떨어져나가지 못하는 것, (2) 배자가 움직이지 않고 난각에 붙어버려서 檢란시 배자가 선명하게 보이는 것 (3)氣室에서 혈관이 희미해져가는 것들이었다.

發生期, 즉 18일 이후부터는 온도를 97±2°F로 유지하고 습도는 63±3%가 되도록 하였다. 致死率은 21일까지 난각을 깨고 나오지 못한 계란수의 入卵수에 대한 백분비로 표시하였다.

7. Aflatoxin定量時 회수율 검정

TLC에 의한 정성 실험에서 aflatoxin이 존재하지 않는 것으로 밝혀진 된장시료에 25 및 50 ppb가 되도록 aflatoxin 표준품을 용해시킨 chloroform을 가한 후 waring blender로 교반하고 그 이후의 과정은 前述한 바와 같은 정량법에 따랐으며 반복실험에 의한 평균치로서 표시하였다.

8. Thin-layer chromatogram의 사진촬영

자외선 下에서 나타나는 thin-layer chromatogram을 사진으로 보존하기 위해서는 film으로 Kodak Tri-X Pan (ASA 400)을, lens filer로는 Nikon L37C를 사용하여 37~40 cm 거리, 조리개 f 4.6, 노출시간 1/4~1/15초에서 촬영하였다. 사용한 UV lamp는 10 cm 상방에서 斜角으로 plate를 조사하였는 바, UVSL-25보다는 UVSL-58(Ultraviolet Products Co.製)이 강도가 커서 균일하게 조사할 수 있었다.

결과 및 고찰

1. 시료중 aflatoxin의 출현빈도

각 지역에서 수집한 시료중 aflatoxin의 출현빈도를

보면 Table 2와 같다. 수집한 땅콩은 제과용으로 쓰이는 것이 24점, 擲油用으로 쓰이는 不良品이 7점이었으며 이들중 볶은 것이 16점, 볶지 않은 것이 15점이었다. 이들의 대부분은 육안으로 곰팡이의 번식을 관찰할 수 있었다. 본 실험에서 低級品인 땅콩 시료를 택한 것은 aflatoxin의 최초 발견이 오염된 땅콩이었다는 점에서 aflatoxin의 존재 가능성이 클 것으로 추정하고 다소 과장된 분석(exaggerated estimate)을 시도하였기 때문이다. 그러나 본 실험에 供試된 땅콩에서는 aflatoxin이 전혀 검출되지 아니하였다.

메주 시료에서는 54개중 7.4%인 4개 시료에서 aflatoxin이 검출되었다. 이때 aflatoxin B₁ 유사물질로 나타난 것은 chloroform-acetone 용매계에서 co-chromatography를 행한 결과 同一物이 아님이 확인되었고, aflatoxin G₂ 유사물질로 나타난 것은 용매계를 바꾼 확인 실험에서 표준품과 Rf값이 동일하므로 aflatoxin G₂가 확실

Table 2. Number of samples detected/analyzed for aflatoxins in Korean foodstuffs*

Location	Meju	Doenjang	Peanut
Seoul	0/20	0/40	0/7
Chuncheon	0/1	0/9	0/3
Daejeon	—	0/8	0/1
Jeonju	—	0/8	0/2
Kwangju	—	0/10	0/2
Jeju	—	0/10	0/1
Daegu	0/16	6/20	0/9
Busan	4/17	5/20	0/6
Total	4/54	11/125	0/31

* Figures indicate the number of food samples detected/number of samples analyzed for aflatoxins. Only one Doenjang sample from Busan was detected for B₁, B₂ and G₂, and all other detected samples were for G₂ only, with the lowest detection limit of 5 ppb for B₁, G₁ and 2.5 ppb for B₂, G₂.

히 존재하는 것으로 결론지었다.

된장 시료에서는 125개중 8.8%에 해당하는 11개 시료에서 aflatoxin G₂유사물질이 검출되었고, 용매계에 의한 실험에서 그 존재가 확인되었다. 그중 부산시 동래구 온천동의 어느 가정에서 수집한 된장 시료는 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂에 해당하는 Rf값을 갖는 형광성 물질이 검출되었고 이들은 co-chromatography에 의하여 재확인 되었다.

여기에서 주목할 일은 이번에 aflatoxin이 검출된 15개의 메주와 된장 시료는 모두 경상도 지역인 대구, 부

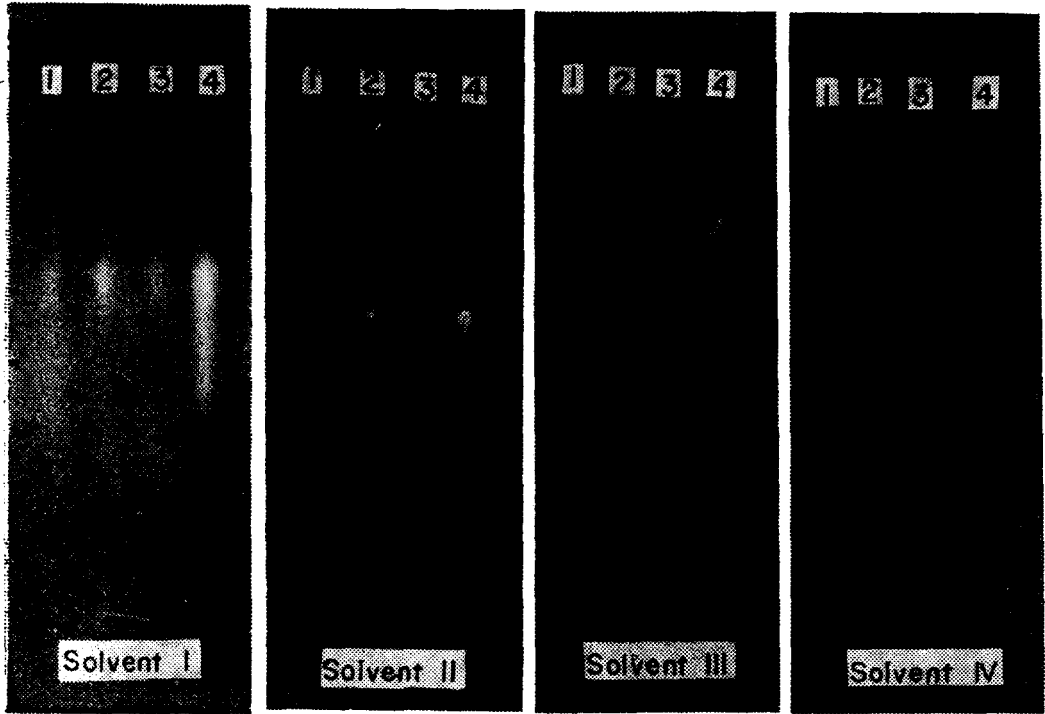


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of aflatoxin B₁ isolated from Doenjang

Developing solvent: I, chloroform-acetone (9 : 1)

II, benzene-methanol-acetic acid (90 : 5 : 5) III, ether-methanol-water (96 : 3 : 1)

IV, dichloromethane-chloroform-n-amyl alcohol-formic acid (80 : 15 : 4 : 1)

Sample : 1, authentic aflatoxin B₁ 2, authentic & isolated aflatoxin B₁ 3, isolated aflatoxin B₁ 4, authentic aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂

산지에서 수집되었다는 사실이다. 그 이유로서 高温多濕한 기후조건, *Asp. flavus* 균주의 分布相 또는 메주, 된장 제조방법의 차이를 들 수 있겠는바 그 정확한 원인에 대해서는 앞으로 追試되어야 할 과제라 생각한다

2. Aflatoxin B₁의 理化學的 同定

Aflatoxin B₁이 검출되는 것으로 인정된 부산시에서의 된장을 재수집하고 이에서 B₁을 순수 분리하였다. 분리된 B₁은 용매계를 달리한 TLC와 유도체 합성에 의한 실험에서 표준품과 동일함이 증명되었다.

용매계에 의한 결과는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 용매계 I, II, III, IV에서의 co-chromatography결과는 同一物임을 나타내었다. 특히 용매계 IV는 B₂와 G₁의 순서가 바뀌는 독특한 용매였는데 여기서도 역시 표준품과 시료에서 정제된 aflatoxin의 Rf값은 일치하고 있었다.

유도체 합성에 의한 동정 결과는 Fig. 2에 나타난 바와 같다. Water adduct는 원점 가까이에서 청색반응물이 확인되었고, acetate adduct는 aflatoxin G₁과 G₂에 상응하는 Rf 값에 G₁, G₂ 본래의 황록색 형광과는 약간 다른 청색에 가까운 형광을 나타내었다. 시료에서 추출한 aflatoxin B₁의 water adduct와 acetate

adduct의 chromatogram 결과는 aflatoxin B₂의 위치에 spot를 관찰할 수 있었는데 이는 aflatoxin B₁을 TLC plate에서 끓어 추출하는 과정에서 혼입된 aflatoxin B₂라 생각된다. 즉 water adduct와 acetate adduct합성시는 0.1 μg내외의 aflatoxin B₁을 사용하였으므로 그대로 TLC상에 나타났으나 Fig. 2의 1에 spotting한 aflatoxin B₁은 0.01 μg에 해당하므로 이때는 혼입되었던 aflatoxin B₂가 나타나지 않고 있다. 따라서 유도체 합성에 있어서 aflatoxin B₂는 反應하지 않고 그대로 남아 표준 aflatoxin B₂와 같은 Rf값과 청색형광을 나타냄을 관찰할 수 있었다.

자의선 및 적외선 스펙트럼에 의한 同定은 된장시료의 부족으로 정제된 aflatoxin B₁이 충분하지 못하여 시도하지 못하였다.

3. Aflatoxin B₁의 生物學的 檢定

본 실험에서 행한 chicken embryo bioassay의 예비 실험결과는 Fig. 3과 같다.

보통 실험실에서 사용되는 fan이 달린 incubator로서 부화실험을 행하였으므로 control구에서 그 조건이 정상인가를 점검해야 했는데 무처리구가 치사율 13%,

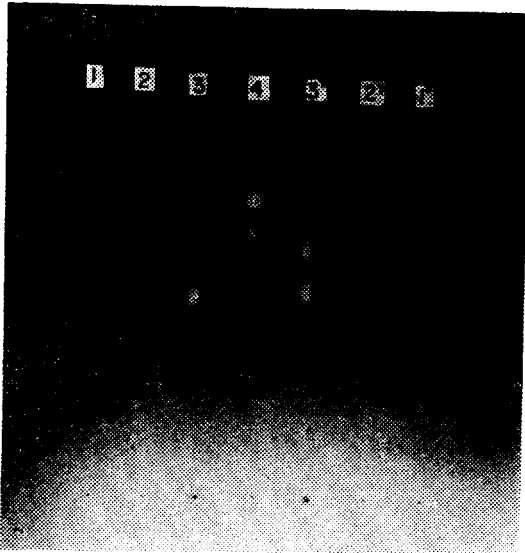


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of derivatives from authentic and isolated aflatoxin B₁

Developing solvent: chloroform-acetone (9 : 1)

Sample : 1, authentic aflatoxin B₁

- 1', isolated aflatoxin B₁
- 2, water adduct of authentic aflatoxin B₁
- 2', water adduct of isolated aflatoxin B₁
- 3, acetate adduct of authentic aflatoxin B₁
- 3', acetate adduct of isolated aflatoxin B₁
- 4, authentic aflatoxins B₁, B₂, G₁, G₂

silica gel H를 용출한 ethanol 처리구가 17%로서 AOAC 법에 규정된 20% 이내이므로 본 실험에서 사용한 계란 및 부화조건이 별 지장없음을 단정하였다. 표준 aflatoxin B₁ 0.1 μg/egg에서 100% 치사율, 0.03 μg/egg에서도 100% 치사율을 보였는데, AOAC법의 data는 0.03 μg/egg가 50~60%정도를 시사하고 있었다. 또한 된장 시료에서 추출하여 TLC로 1차 정제한 후 형광강도에 의해 目測法으로 정량한 시료를 0.015 μg/egg 주입한 것이 59%의 치사율을 보였는데, 이러한 결과는 계란의 민감도에 의한 것인지 또는 부화조건에 의한 것인지 확실치 않으나 매우 민감한 것으로 나타났다.

이상의 예비실험 결과 0.05 μg/egg만 주입하여도 부화말기에는 100%의 치사독성을 낼 수 있다고 단정하여 2차실험에서는 표준 aflatoxin B₁의 농도를 0.05, 0.025, 0.013 μg/egg로 하였고 된장에서 추출한 aflatoxin B₁의 농도는 0.042, 0.011 μg/egg로 하였다.

그 결과는 Fig. 4와 같다. Control구에서는 부화조건이 정상임을 다시 나타내었고, 표준 aflatoxin B₁처리구의 21일째 치사율을 보면 예비실험에서 예상된 바와 같이 0.05 μg/egg에서 100%, 0.025 μg/egg에서 100%이며 0.013 μg/egg에서는 63%이었다. 추출된 aflatoxin B₁ 처리구는 0.042 μg/egg에서 100%, 0.011 μg/egg에서 65%의 치사율을 나타내었다. 이로서 된장에서 검출된 aflatoxin B₁의 chicken embryo에 대한 致死毒性

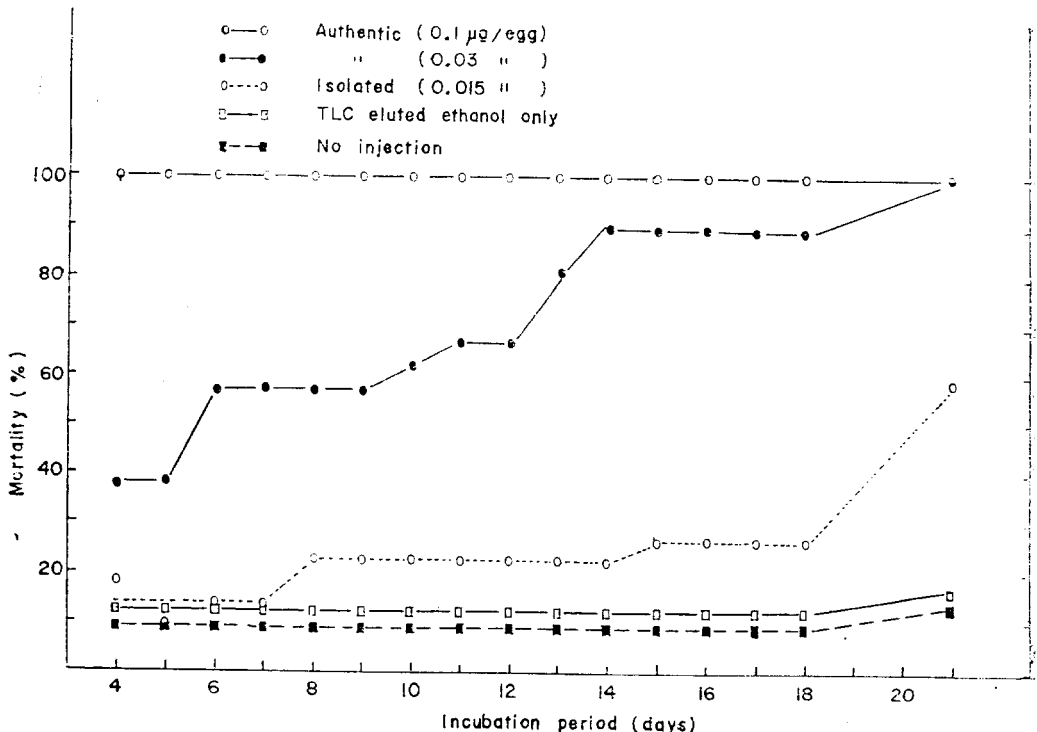


Fig. 3. Bioassay of aflatoxin B₁ toxicity by the chicken embryo test (first trial)

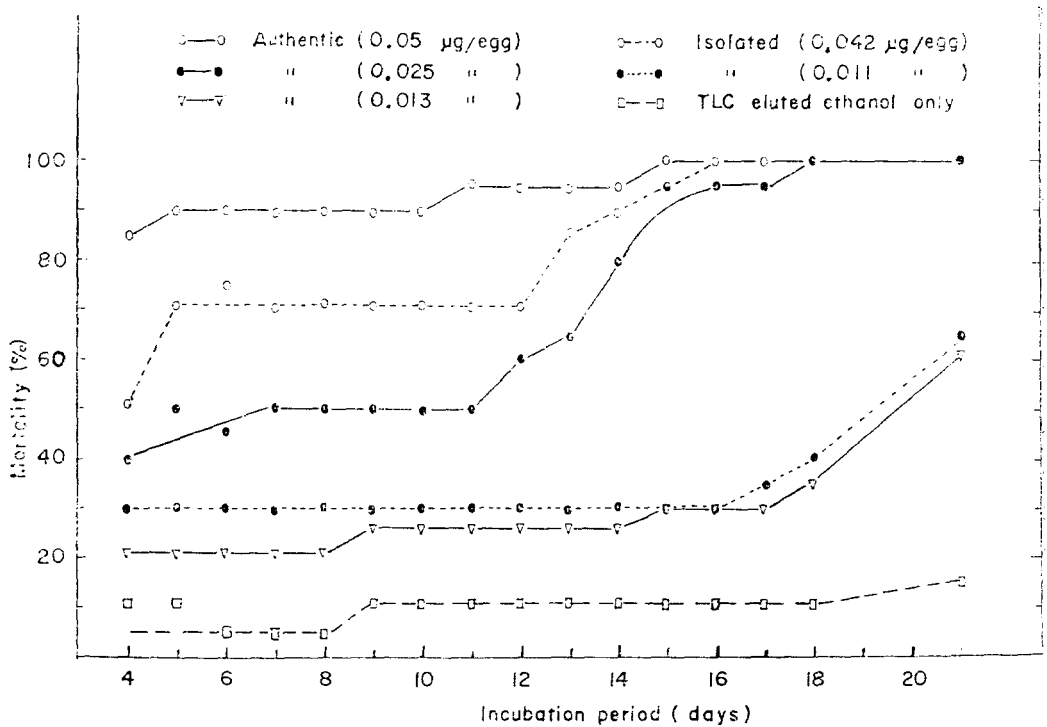


Fig. 4. Bioassay of aflatoxin B₁ toxicity by the chicken embryo test (second trial)

은 표준품과 동일함이 밝혀진 것이다.

시료 추출물과 표준품에 있어 0.01 µg/egg 이하의 낮은 농도에서는 dose-response의 비례적인 결과를 나타내지 않았다. Verrett등⁽¹⁷⁾의 실험에서도 0.02 µg/egg 이하에서는 dose-response간에 직선관계를 나타내지 아니하였다. Verrett등은 aflatoxin B₁의 독성평가에 있어서 부화기간중의 치사율의 변화가 고농도에서는 부화초기에, 저농도로 갈수록 후기에 독성이 나타난다고 관찰한 바 있다. Fig. 4에 나타난 바와 같이 0.05 µg/egg 구에서는 검란을 시작하는 4일째 대부분이 치사하였으며, 0.025 µg/egg구는 11일째 치사율이 증가하기 시작하고, 그 이하의 농도에서는 14일째 다소 변화가 있다 발생과로 옮기고난 후인 19일경 치사율이 높아진 것을 볼 수 있었다. 추출된 aflatoxin B₁의 경우도 0.042 µg/egg 구는 12일째, 그 이하의 농도에서는 19일경에 치사율이 높아지는 것으로 보아 dose-response의 양상이 역시 동일함을 알 수 있었다. 이로써 된장 중에서 검출된 aflatoxin B₁ 예상물질은 표준물질과 동일함이 생물學的 檢定의 결과 확정된 셈이다.

4. 시료 중 aflatoxin B₁의 정량

된장 시료에 인위적으로 첨가한 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂의 회수율을 검정한 결과는 Table 3과 같다. Aflatoxin B₁의 회수율은 30~45%인데 이는 AOAC법에서 검색대

Table 3. Chemical assay of aflatoxins in Doenjang from Busan

Aflatoxins	Aflatoxin content (ppb)	% Recovery		Aflatoxin content after calibration (ppb)
		25 ppb	50 ppb	
B ₁	20	45	30	66
B ₂	4	30	30	13
G ₁	ND	75	70	ND
G ₂	4	70	70	5

Lowest detection limit, 2 ppb for B₁, G₁ and 1 ppb for B₂, G₂.

상으로 삼았던 땅콩 가공식품에서의 결과⁽¹⁸⁾와 유사하므로 이 방법은 된장에도 적용될 수 있음을 보여주었다.

또한 TLC상에서 目測法에 의한 정량결과는 螢光強度를 肉眼으로 비교하는 것으로 최고 ±25%의 오차를 범할 수 있음을 충분히 감안하여야 한다.

Aflatoxin B₁이 존재하는 것으로 확인된 부산지역에서 수집한 된장중 aflatoxin의 정량치는 Table 3과 같다. 회수율을 감안한 aflatoxin의 함량을 보면 B₁이 66 ppb로 가장 많았고, B₂ 13 ppb, G₂ 5 ppb이었으며, G₁은 검출한계내에서 검출되지 아니하였다. 따라서 aflatoxin총량은 84 ppb가 된다.

Aflatoxin은 急性毒性과 아울러 發癌毒性이 잘 알려

저 있으므로 선진국에서는 식품중 aflatoxin의 許容量을 이미 설정한 바 있다. 즉, 미국, 캐나다 3 ppb, 네델란드 5 ppb, 서독, 영국 不檢出로 되어있고, (19) FAO/WHO Joint Expert Committee on Nutrition(1966)에서는 세계 식량사정을 감안하여 30 ppb로 높이 설정하고 있다. (20)

본 실험의 결과 부산에서 수집한 된장중 경량된 aflatoxin함량은 선진국에서의 허용량을 수십배나, 그리고 국제허용량을 2.8배나 초과하였으며 특히 독성이 제일 강한 B₁이 가장 많이 검출되었음은 주목할 만한 일이다. 우리나라에서 재래식 메주와 된장은 自然微生物을 수집하여 만든 제품이며 이들 발효제품에는 *Asp. flavus*의 출현빈도가 높다는 真菌學的 연구보고가(4)있다. 따라서 한국인이 소비하는 大豆醱酵食品(된장, 간장, 고추장)에 대하여 전국적인 규모에서 aflatoxin의 오염상태를 조직적으로 檢索하는 동시에 이들 食品의 제조, 調理중의 消長 및 오염억제 방안을 규명하므로서 한국인이 전통적으로 섭취하는 이들 醱酵食品에 의한 危害가능성을 極少化해야 될 것이다.

요 약

전국 주요도시의 가정에서 메주 54점과 재래식 된장 125점, 시장에서 땅콩 31점을 수집하고 AOAC公定法에 의하여 aflatoxin을 검색한 결과는 다음과 같다.

1) Aflatoxin의 출현빈도는 메주 7.4%(4/54), 된장 8.8%(11/125), 땅콩 불검출(0/31)로서 특히 대구, 부산지역의 메주와 된장에서 높은 빈도로 검출되었다.

2) Aflatoxin이 가장 많이 검출된 것은 부산에서의 된장시료로서 B₁ 66 ppb, B₂ 13 ppb, G₁ 불검출, G₂ 5 ppb이었으며 기타 시료에서는 G₂만이 검출되었다.

3) 된장 시료에서 검출된 aflatoxin B₁은 정제후 제거 용매제에 의한 TLC에서의 Rf값, 유도체(acetate 및 water adducts)의 Rf값 및 2차에 걸친 chicken embryo bioassay에 의하여 표준물질과 동일한 동시에 화학적定量値가 타당함을 확인하였다.

참 고 문 헌

1) Goldblatt, L. A. : *Aflatoxin*, Academic Press, New York (1969).
 2) 李泰寧, 李相圭 : 한국식품과학회지, 1, 78 (1969).

3) 鄭勇, 權肅杓 : 豫防醫學會誌, 2, 1 (1969).
 4) 이근배, 이장규, 김찬수, 유준, 심길순, 성호경, 전세열, 이희성, 조신애, 이금자 : 과학기술처 1970년도 연구개발 사업보고서, MOST-R-70-84-PM, 41 pp. (1970).
 5) 이배환, 전영연, 최태주, 주원규, 김상재, 경성구 : 建國大學校 學術誌, 12, 807 (1971).
 6) 高春明, 崔泰周, 柳駿 : 韓國菌學會誌, 1, 17 (1973).
 7) Shank, R. C., Wogan, G. N. and Gibson, J. B. : *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 51 (1972).
 8) Shank, R. C., Wogan, G. N., Gibson, J. B. and Nondasuta, A. : *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 61 (1972).
 9) Shank, R. C., Gcrdon, J. E., Wogan, G. N., Nondasuta, A. and Subhamani, B. : *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 71 (1972).
 10) Shank, R. C., Bhamarapravati, N., Gordon, J. E. and Wogan, G. N. : *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 171 (1972).
 11) Shank, R. C., Siddhichai, P., Subhamarapravati, N., Gordon, J. E. and Wogan, G. N. : *Food Cosmet. Toxicol.*, 10, 181 (1972).
 12) 李寬寧, 李瑞來 : 한국식품과학회지, 6, 169 (1974).
 13) 이관영, 최연호, 이서래 : 한국생화학회지, 8, 1 (1975).
 14) AOAC : *Official Methods of Analysis*, 12th Ed., pp. 462~475 (1975).
 15) Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D., and Sorenson, W. G. : *Appl. Microbiol.*, 14, 425 (1966).
 16) Stahl, E. : *Thin-Layer Chromatography*, Springer Verlag, Berlin, p. 148 (1973).
 17) Verrett, M. J., Marliac, J. P. and McLaughlin, J. Jr. : *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 47, 1003 (1964).
 18) Eppley, R. M., Stoloff, L., and Campbell, A. D. : *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, 51, 67 (1968).
 19) Hansen, E. et al. : *Z. Lebensmitt-Untersuch.*, 141, 129 (1969) [*New Food Industry*, 13(4), 85 (1971)].
 20) Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Burmeister, H. R., Kwolek, W. F., Shannon, G. M. and Hall, H. H. : *Cereal Chem.*, 46, 454 (1969).