

## TLC法에 의한 醬類 및 穀類중의 Aflatoxin檢出에 關한 研究

경희대학교 · \*서울보건 전문학교

\*韓 良 一 · 金 光 湖 · \*吳 英 福

### The Study on the Detection of Aflatoxins in the Fermentation Products and Cereals

\*Yang Il Han, Kwang Ho Kim, \*Young Bok Oh,

Kyung Hee University, \*Seoul Health Junior College

#### Abstract

Aflatoxin, a mixture of the at least four toxic and carcinogenic metabolites, is known to be produced by only a few fungi. The toxins were designated aflatoxins because they were produced by the mold *Aspergillus flavus*(*A. flavus*). However, at least four other toxins and other species of the genus *A. niger*, *A. parasiticus* *A. ruber* and *wentii* have been reported to produce aflatoxins. And also the identical compounds may also be produced by molds, the *Penicillium*.

At least four different species of *Penicillium* have been reported to produce aflatoxins (*P. citrinum*, *P. frequentans*, *P. puberulum*. and *P. variable*). So it is now known that the problem of Aflatoxin is not restricted to the single species *A. flavus*, even though that is a very common mold. Also additional aflatoxins have been discovered. For several years, only four aflatoxins were known: B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub>, so designated by reason of their fluorescence and chromatographic characteristics. It is now known that there are really two new toxic materials in the milk. During the past year(1966) they were christened aflatoxin M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub>, since they were first found in milk. The two other and most recently discovered aflatoxins were isolated late in 1966 from cultures of *A. flavus*, and were designated aflatoxin B<sub>2a</sub> and aflatoxin G<sub>2a</sub>.

In order to obtain a brief information about extent of contamination of foodstuffs by aflatoxin which is known to produce eight different mold, aflatoxin detection of cereals and fermented foods on sale, such as polished rice, barley, wheat, wheat flour, lentil, red bean, soy bean, noodle, kochujang and Dwenjang (fermented soy bean paste) and chong Kuk, were carried out. The results of this investigation were summarized as follows: The hexane:CHCl<sub>3</sub> extracts of polished rice, barley, wheat, wheat flour, lentil, red bean, noodle and kochujang yielded fluorescent spots on thin layer plates. However their R<sub>f</sub> values were different from those of authentic aflatoxins. The fluorescent substances of the extract from soy bean, Dwenjang and chong kuk showed very similar R<sub>f</sub> values to those of the standard aflatoxins.

By two dimensional thin layer chromatography and comparison of ultra violet absorption spectra, it was found that these fluorescent substances were not aflatoxins. To conclude, aflatoxins themselves were not detected directly in those samples tested.

#### 結 論

*Aspergillus flavus* 및 *Aspergillus ochraceus* 등에 의

하여 生産되는 mycotoxin중 aflatoxin과 ochratoxin A 및 B 등의 강한 毒作用과 發癌性이 發見된 이래로 食品에 着生하는 有害黴類의 問題가 특히 주목되고 있다

1960年 英國의 七面鳥大量慘死事件인 Turkey X disease<sup>1-4)</sup>를 계기로 현재 aflatoxin 만도 최소 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> 및 G<sub>2</sub> 등 4種의 類緣物質임이 Massachusetts Institute of Technology group<sup>9)</sup>에 의하여 밝혀졌으며 또 Holzapfel<sup>10-11)</sup> 등은 milk product중에서 aflatoxin 類似構造의 物質을 發見하여 M<sub>1</sub> 및 M<sub>2</sub>라고 命名하였고 1966年 Dutton<sup>12)</sup> 등에 의하여 B<sub>2a</sub> 및 G<sub>2a</sub>가 추가되어 모두 8種임의 알려졌다.

倉田浩<sup>13-15)</sup> 등은 數種 食品으로부터 糸狀菌을 分離하여 aflatoxin 生産與否를 試驗하여 11種의 aflatoxin 生産菌株를 screening하였으며 橫塚<sup>16)</sup> 등은 日本産 種穀중에서 分離한 糸狀菌에 대하여 aflatoxin 生産與否를 檢索한 結果 chromatogram에서는 aflatoxin과 類似한 Rf值를 가지는 螢光性物質이 여러개가 分離되었으나 aflatoxin 이 아님을 確認한 바 있다.

최근 官木<sup>17)</sup> 등은 農家保有米중에서 mycotoxin 生産性 菌類의 着生與否를 檢討한 結果 *A. ochraceus*가 ochratoxin A產生菌이고 *A. versicolor*는 sterigmatocystin 產生菌임을 발견하였으며 山崎<sup>18-19)</sup> 등은 農家の 自家製 된장 및 간장에서 ochratoxin A產生能을 確認한 외에 毒性이 강한 *A. ochraceus*를 分離하여 mouse나 鷄胚에 대하여 毒性이 있는 *Penicillium cyclopium*임을 確認하였다고 報告한 바 있다.

Aflatoxin의 發病性이 既知의 어떤 癌源物質보다 월 등히 강력하다는 結果 이를 生産하는 糸狀菌이 *Aspergillus flavus*외에 數種에 達하고 한편 이와 같은 糸狀菌類가 특히 穀類 및 醱酵食品 등에 광범위하게 존재한다는 점에 비추어 우리 나라의 穀類 및 醱酵食品에 mycotoxin이 존재하리라는 우려가 깊으며 衛生學的 檢討가 필요하다. 그럼에도 불구하고 현재까지 우리나라에 있어서 이에 관한 研究는 李<sup>20)</sup> 등의 市販메주 및 된장에 대하여 aflatoxin을 檢索한 結果 確認되지 않았으며 鄭<sup>21)</sup> 등은 數種醱酵食品중에서 aflatoxin 존재를 檢討하여 檢體중 aflatoxin B<sub>1</sub> 및 B<sub>2</sub>는 確認되지 않았으나 간장에서 aflatoxin G<sub>1</sub>, 메주 및 된장에서 aflatoxin G<sub>1</sub> 및 G<sub>2</sub>의 존재를 認定할 수 있었다는 報告의에 단편적인 報告가 있을 뿐이며 食品 전반에 대한 研究가 극히 적으므로 著者는 mycotoxin에 관한 研究의 一環으로서 우선 醬類 및 穀類에 대한 aflatoxin 존재 여부를 檢索코저 AOAC法<sup>22-27)</sup>, 二次元 展開法<sup>20)</sup> 및 UV absorption spectra<sup>20-26)</sup> 등을 이용하여 얻은 結果를 報告한다

## 實 驗

### 1. Standard aflatoxin分離

標準菌株 *Aspergillus flavus* 4001 A를 AOAC法<sup>22)</sup>에

Table I. List of samples

Polished rice	5 samples
Barley	5 "
Wheat	5 "
Wheat flour	5 "
Lentil	5 "
Red bean	5 "
Soy bean	5 "
Noodle	5 "
Kochujang	5 "
Dwenjang	10 "
Total	55 "

Table II. List of collected chong-kuk

Provinces	Districts	No. of Sample tested
Seoul	Market	6
Kyung ki-do	Suwon	1
Chung cheong buk-do	Ogcheon	1
	Jecheon	1
Chung cheong nam-do	Kongju	1
	Kumsan	1
	Cheonan	1
	Daejun	3
Chulra buk-do	Jinan	1
	Iri	1
	Chungeub	1
Chulra nam-do	Namwon	1
	Naju	1
	Kwangju	1
	Kwangsan	1
	Yungkwang	1
	Bosung	1
	Kangjin	1
	Jangheung	1
	Suncheon	1
	Kure	1
	Yusu	1
Kyung sang buk-do	Daeku	5
	Kyungju	1
	Sangju	1
Kyung sang nam-do	Jinju	1
	Milyang	1
	Jinhae	2
Total		40

準하여 aflatoxin을 分離精製하였으며 一部는 kurata로부터 제공받은 crystalline aflatoxin을 使用하였다.

## 2. 試料採取

市販되는 쌀, 보리, 밀, 밀가루, 녹두, 팥, 콩, 국수 및 고추장을 각각 5種과 된장 10種을 random sampling하였으며 種麴에 있어서는 서울 6種, 경기도 1種, 충청북도 2種, 충청남도 6種, 전라북도 3種, 전라남도 11種, 경상북도 7種 및 경상남도 4種을 각工場에서 모두 40種을 sampling하였으며 표 I 및 II와 같다.

## 3. 檢體로부터 aflatoxin抽出

固形檢體는 waring blender에서 10 mesh이하로 粉碎하고 塊形檢體는 그대로 각각 50g씩을 취하여 n-hexane 100ml와 250ml의 MeOH:H<sub>2</sub>O (55:45)를 넣어 waring blender로 5分間 抽出한 다음 즉시 2,000 rpm에서 抽出物을 centrifuge하여 n-hexane layer를 제거하고 중앙부분이 MeOH:H<sub>2</sub>O混液 layer를 취하여 500ml의 beaker에서 55g의 celite 545와 잘 混和하여 균일한 celite-sample mixture를 만들었다.

다음 外徑 4.5cm, 길이 60cm의 cork가 붙은 column의 아랫부분을 脫脂綿으로 막고 n-hexane과 CHCl<sub>3</sub>소량으로 잘 세척한 후 celite-sample mixture를 넣고 400 ml의 n-hexane으로 elution하였다. n-hexane이 celite-sample mixture 표면까지 내려가면 受器를 바꾸고 n-hexane : CHCl<sub>3</sub> 同量混液 100ml씩 2回 beaker를 씻어 붓고 계속 同液을 추가하여 전량 500ml를 받을 때까지 抽出하였다.

Elution할 때의 流速은 전과정이 1시간이내에 끝낼 수 있을 정도로 조절하였고 column이 건조상태로 되지 않도록 주의했다.

抽出液 500ml를 減壓濃縮하여 n-hexane-CHCl<sub>3</sub>混液이 완전히 증발시켜 건조상태로한 후 CHCl<sub>3</sub>液으로 수회 溶出하여 polyethylene screw cap이 달린 vial(外徑 1.5cm, 길이 12cm)에 옮겨 다시 溶媒를 전부증발시켜 건조상태가되면 이것을 냉암소에 보존하였다.

Thin layer chromatography (TLC)用 plate에 spot할 때에는 3ml의 CHCl<sub>3</sub>에 溶解하여 使用하였다.

## 4. Standard strain으로부터 aflatoxin抽出

Aspergillus flavus 4001 A를 30°C에서 10일간 Adaye and Matel's media에 배양하여 100ml를 직접 CHCl<sub>3</sub>同量으로 檢體處理때와 같은 방법으로 centrifuge하여 CHCl<sub>3</sub> layer를 취하고 남은 잔액을 다시 100ml CHCl<sub>3</sub>液으로 再抽出, centrifuge하고 전액과 합쳐서 無水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 탈수한 다음 감압농축하여 溶媒를 완전히 증발시켜 건조상태로한 후 CHCl<sub>3</sub>液으로 녹여 vial에 옮기고 다시 증발농축하여 건조되면 냉암소에 보존하였다.

## 5. One dimensional ascending method<sup>28)</sup>

上記 抽出物의 CHCl<sub>3</sub>液을 105°C에서 2시간 活性化

시킨 kiesel gel G의 TLC plate (250 μ thickness)에 spot하여 CHCl<sub>3</sub>:MeOH (95:5)液으로 전개하여 波長 365mμ의 紫外線 照射下에서 나타나는 螢光性 spot를 aflatoxin standard의 spot와 비교하였다.

## 6. Two dimensional method<sup>28)</sup>

One dimensional ascending method에서 유사한 Rf 値의 螢光性 spot를 나타내는 檢體에 대해서는 acetone:CHCl<sub>3</sub> (10:90)液과 ethylacetate:propylalcohol:H<sub>2</sub>O (10:2:1)液을 차례로 사용하여 二次元展開를 행하여 aflatoxin standard의 二次元展開 plate의 spot와 비교하였다.

## 7. UV absorption spectrum<sup>29)</sup>

한편 一次元展開에서 standard와 유사한 Rf 値의 spot를 따로 끊어모아 하부를 綿絨한 적은 column(外徑 0.8cm, 길이 100cm)에 넣고 4ml MeOH로 溶出하여 UV absorption을 測定하여 그 curve를 aflatoxin standard의 curve와 비교하였다.

## 結果 및 考察

### 1. One dimensional ascending method에서의 推定

콩, 된장 및 種麴을 제외한 다른 檢體 즉 쌀, 보리, 밀, 밀가루, 녹두, 팥, 국수 및 고추장 등에서는 aflatoxin standard의 spot와 비교하여 유의할 만한 Rf 値의 spot를 볼 수 없으므로 aflatoxin이 存在하지 않음을 認定하였다.

한편 콩, 된장 및 種麴에서는 TLC 一次元展開에서

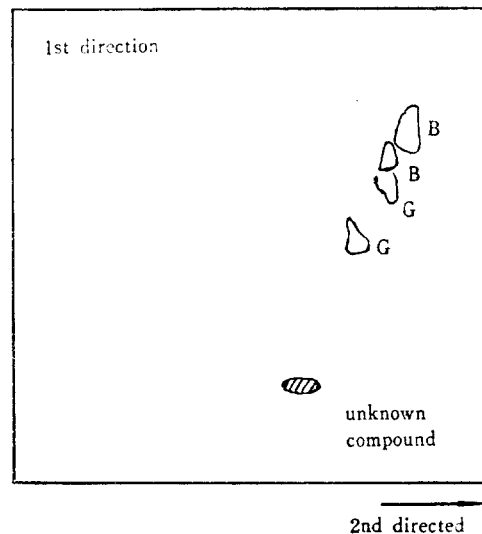


Fig. 1. Two dimensional chromatogram of extracted aflatoxin produced by standard strain

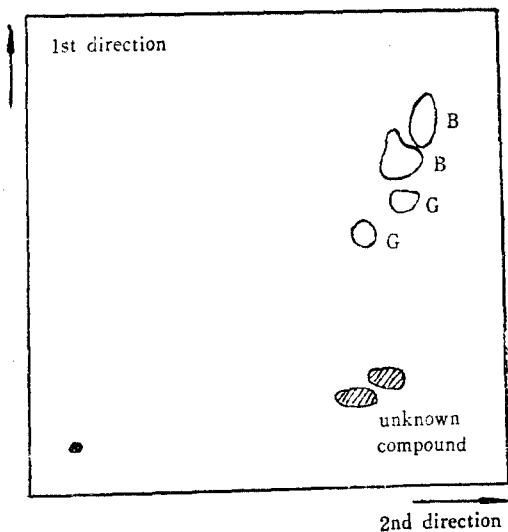


Fig. 2. Two dimensional chromatogram of crystalline aflatoxin standard.

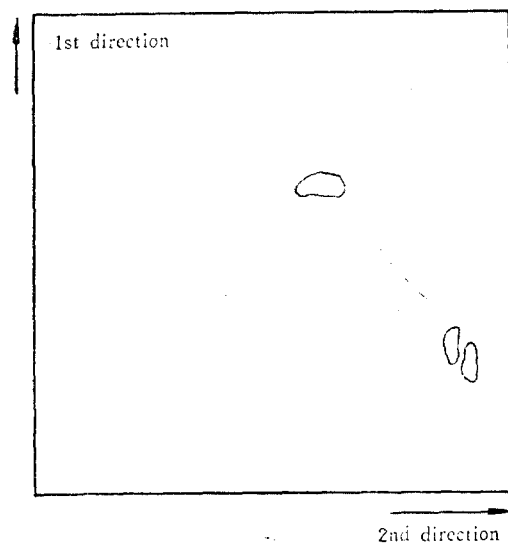


Fig. 3. Two dimensional chromatogram of aflatoxin like substances in chong kuk.

standard aflatoxin B<sub>2</sub> 및 G<sub>1</sub>과 유사한 Rf值를 나타내는 螢光性物質을 볼 수 있었다.

### 2. Two dimensional method에서의 推定

그림 1~3에서와 같이 菌株로부터 抽出한 液(그림 1) 및 crystalline aflatoxin mixture (그림 2)의 spot는 同一한 樣相을 보였으나 콩, 된장 및 種麴抽出液은 전혀 다른 樣相으로 나타나 aflatoxin이 아님을 推定하였으며 種麴抽出液의 樣相만 Fig. 3에 표시하였다.

### 3. UV absorption spectra에 의한 確認

콩, 된장 및 種麴 등에서 抽出 分離한 aflatoxin B<sub>2</sub>樣 substances와 aflatoxin B<sub>2</sub>의 curve가 일치하지 않았으며 aflatoxin G<sub>1</sub>樣 substances도 standard aflatoxin과 일치하지 않았으므로 aflatoxin이 아님을 確認하였으며 standard aflatoxin B<sub>2</sub> 및 G<sub>1</sub>의 UV spectra를 그림 4에 표시하였다.

一次元展開 aflatoxin과 동일한 Rf值를 나타낸 물질에 대해서는 계속 追求중에 있다.

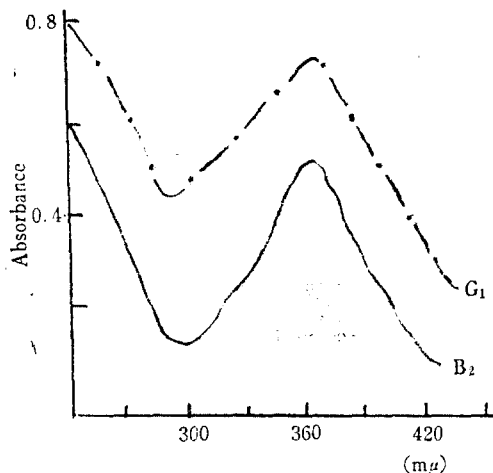


Fig. 4 UV absorption spectra of aflatoxin G<sub>1</sub> and B<sub>2</sub>

### 結 論

쌀, 보리, 밀, 밀가루, 팥, 콩, 국수, 고추장, 된장 및 種麴중에 aflatoxin 存在與否를 檢索하였다.

1) 쌀, 보리, 밀, 밀가루, 팥, 국수 및 고추장 중에서는 螢光性 物質을 볼 수 있었으나 Rf值를 비교하여 aflatoxin이 아님을 認定하여 이들 檢體중에는 aflatoxin이 存在하지 않음을 알았다.

2) 콩, 된장 및 種麴 등에서는 aflatoxin과 Rf值가 同一한 螢光性 spot를 볼 수 있었으나 二次元展開 및 UV absorption spectra에 의해 aflatoxin이 아님을 認知하여 이들 檢體중에도 aflatoxin이 存在하지 않음을 確認하였다.

### 文 獻

- 1) K. Sargeant *et al.*: *Nature* 192, 1096, 1961.
- 2) A.S.M, Van der Zijden *et al.*: *ibid.* 195, 1060, 1962.
- 3) Brenda F. Nesbitt *et al.*: *ibid.* 195, 1062, 1962.
- 4) R.D. Hartley *et la.*: *ibid.* 198, 1056, 1963.
- 5) A. Ciegler *et al.*: *Applied Microbiology* 14, 826, 1963.

- 6) Codner R.C. *et al.*: *Biotechnol. Bioeng.* 5, 185 (1963)
- 7) Kulik, M.M. and Holaday, C.E.: *Mycopathologia Mycologia Applicata* 30, 137(1966)
- 8) Hodges, F.A. *et al.*: *Science* 145, 1439 (1964)
- 9) G.N. Wogan: *Mycotoxin in Foodstuffs MIT press* (1965)
- 10) C.W. Holzapfel *et al.*: *Tetrahedron Letters* No. 25, 2799 (1966)
- 11) Allcroft, R. *et al.*: *Nature* 209, 154 (1966)
- 12) Dutton, M.F. and Heathcote, J.G.: *Biochem. J.* 101, 21 (1966)
- 13) H. kurata *et al.*: *J. Food Hyg. Soc. Japan* 8, 237 (1967)
- 14) *ibid.* 7, 23 (1968)
- 15) *ibid.* 9, 29 (1968)
- 16) T. Yokotsuka: *J. of Agr. Chem. Soc. Japan* 42, 288 (1968)
- 17) K. Miyaki *et al.*: *J. of Food Hyg. Soc. Japan* 11, 373 (1970)
- 18) M. Yamazaki *et al.*: *ibid.* 11, 381 (1970)
- 19) 栗飯原, 景昭: 食品衛生研究 18, 353 (1968)
- 20) 李泰寧, 李相圭: 韓國食品科學會誌 1, 78 (1968)
- 21) Y. Chung, S.P. kwon: *K.J. of Preventive Medicine* 2, 1 (1969)
- 22) AOAC meeting: *J. of AOAC* 49, 229 (1966)
- 23) J.H. Broadbent *et al.*: *Analyst* 88, 214 (1963)
- 24) T. J. Coomes *et al.*: *ibid.* 88, 209 (1963)
- 25) *ibid.* 89, 436 (1964)
- 26) S. Nesheim *et al.*: *J. of AOAC* 47, 586 (1964)
- 27) H. de Iongh *et al.*: *Vet. Rec.* 76, 901 (1964)
- 28) Peterson *et al.*: *J. of Chromatography* 31, 250 (1967)
- 29) J. Nabney *et al.*: *Analyst* 90, 155 (1965)
- 30) R.D. Stubblefield: *Appl. Microbiol* 15, 186 (1967)
- 31) Peterson: *J. of Chromatography* 27, 304 (1967)
- 32) A.C. Bechwith *et al.*: *J. of AOAC* 51, 602 (1968)
- 33) Walter A. Pons *et al.*: *ibid.* 51, 913 (1968)
- 34) Walter A. Pons *et al.*: *J. Am. il Chem. Soc.* 45, 694 (1968)
- 35) Ayres: *ibid.* 43, 423 (1966)