

米穀貯藏中 Fungus 侵害 判定에 關한 研究

河永來·金明燦*·金正玉·沈奇煥*

(韓國煙草研究所, 慶尚大學 食品加工學科*)

(1979년 1월 18일 접수)

The Quantitative Change of Chitin as a Criterion to Indicate Fungal Invasion to Rice Storage

Yeong-Lae Ha, Myeong-Chan Kim*, Jeong-Ok Kim, Ki-Whan Sim*

Korea Tobacco Research Institute, *Dept. of Food Processing, Kyeong Sang National University

(Received Jan. 18, 1979)

Abstract

In order to find out a reliable chemical indicator which can be used to tell whether rice, during storage, is invaded by fungi or not, 90 percent milled rice (Tongil) was stored at 26°C for 4 weeks and weekly analyzed for changes in several chemical components. The results were as follows:

- 1) Of several genera of fungi (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., and *Rhizopus* sp.) observed in stored rice after surface disinfection, *Aspergillus* sp. were the most frequent fungi.
- 2) Chitin content in the rice was 25 ug/g at the beginning of the experiment and increased proportionly with moisture content of the storedrice to become 1980 ug/g at 26.9% moisture after 4 weeks.
- 3) Non-reducing sugartended to decrease with increasing moisture content and or prolonged storage period.
- 4) Fat acidity showed a tendency of increase with rise in moisture content of the stored rice.

Consequently, changes in chitin content can be mployed as a reliable measure to evaluate the quality of stored rice in connection with fungal invasion.

緒 言

米穀이 増産됨에 따라 그 貯藏의 必要性이 더욱要求되고 있다. 그러나 우리나라의 여름철은 高温多濕하여 곰팡이나 세균 等의 微生物 侵害의 危險度가 매우 높다.⁽¹⁾

貯藏中 變質에 관하여 많은 研究를 한 Christensen 等^(2~5)은 穀類 貯藏中에 微生物의 侵害는 生化學的인 變化, 水分含量의 增加 및 温度 上昇 等 貯藏에 不利한 條件을 招來한다고 하였으며 Bamberg

等⁽⁶⁾은 米穀에 有害物質인 mycotoxin을 生成하는 곰팡이 즉 *Asp. flavus*, *Asp. fumigatus*, *pen. islandicum*을 分離 報告하였다.

곰팡이는 貯藏穀類의 品質을 低下시키는 가장重要한 要因으로서, 곰팡이 侵害 程度를 測定하여 貯藏穀類의 損傷 程度를 評價하는 하나의 基準으로 利用하는 수도 있다. Christensen 等⁽⁷⁾은 小麥 貯藏中에서의 곰팡이 侵害 程度를 推定하는 微生物學的인 方法을 研究했다. 그러나 이 方法은 곰팡이의 胞子가 形成되어야만 하고 菌絲에 의한 推定은 不可能하였다. 一般的으로 貯藏穀類를 sodium

hypochlorite로 表面 殺菌한 後 一定한 條件으로 培養한 다음 穀類內에 存在하는 곰팡이의 種類를 調査하여 品質의 程度를 評價하고 있지만 그 結果를 얻는 데 5 내지 7 日의 時日을 要하고 또한 그 結果는 侵害한 곰팡이의 種類나 生菌糸는 測定되지만 死菌糸는 測定되지 않는다. 最近 穀物 加工 및 貯藏에서는 곰팡이 侵害 程度를 보다 正確하고 迅速하게 測定하는 方法을 要하고 있는 實情이다.

1933年 Elson과 Morgan⁽⁸⁾이 chitin의 定量 方法을 確立한 以後로 glucosamine 定量은 곰팡이의 貯藏 穀類 侵害 程度를 評價하는데 利用되고 있다. 이와 같은 外部의 方法은 곰팡이 細胞壁의 構成分인 chitin을 定量하는 것으로 生菌糸나 死菌糸를 測定하지만 어떤 種類의 곰팡이에 의해서 生成된 것인지는 現在까지 알 수 없다.

N-acetyl-D-glucosamine의 重合體인 chitin은 高等植物이나 穀類에서는 거의 存在하지 않거나 少量 存在하지만 大部分의 곰팡이 細胞 構成分이다. ^(2,9~12) 비록 그 量은 菌種, 生長培養條件 등에 따라서 다르지만, ⁽¹³⁾ glucosamine을 定量하면 穀類에 侵害한 곰팡이의 量을 測定하는데는 이상적인 方法일 것이다.

Golubchuch 等^(14,15)이 곰팡이의 侵害 程度가 다른 5種의 小麥에서 chitin의 含量을 定量하여 貯藏 小麥의 品質 低下를 診斷할 수 있다고 했으나 그 方法이 너무 複雜하였다. Arima와 Uozumi는⁽¹⁶⁾ koji에서 菌糸의 量을 成功的으로 定量했고 Ride와 Drysdale⁽¹⁷⁾는 토마토의 *Fusarium oxysporum*, *Fusarium lycopersici*의 侵害 程度를 測定하기 위하여 酶素의 方法으로 glucosamine을 定量하였고, 또한 이들은 이것을 應用하여 chitin을 알칼리로 分解하여 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone (MBTH)으로 比色하는 定量法을 開發하였다. Donald⁽⁹⁾는 옥수수와 大豆 貯藏中에 곰팡이 生長에 의한 chitin을 Ride^(18,19) 等의 方法에 의하여 研究한 바 있다.

우리 나라에서도 金 等⁽¹⁾의 貯藏 米穀의 變質 原因이 되는 微生物에 關한 研究가 있지만 곰팡이 侵害 與否의 判定에 關한 研究는 아직 報告되지 않았다.

이 研究는 곰팡이 侵害 與否를 判定하기 위하여 水分 含量을 評定한 米穀 貯藏 條件에서 일어나는 chitin, 色, 非還元糖 및 脂肪酸度의 變化에 關하여 實驗하였던 바 그 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 試料

農村振興廳 作物試驗場 慣行 試驗園地에서 生產(1977年產)된 '統一'를 白米로 捣精하여 試料로 하였다.

2. 試料의 貯藏

試料 1.5 kg을 polyethglenen 봉지에 넣고 여기에 殺菌水를 적당량씩 添加하여 4°C의 冷蔵庫에 2日間 貯藏하면서 水分을 쌀알에 풀고 뿐 吸濕시키기 为하여 가끔 혼들어 주었다. 3日째 끄집어 내어 一部는 水分 定量用으로 使用하고 나머지는 Fig. 1 과 같은 plastic 바구니에 담어서 26°±1°C가 維持되는 growth cabinet에서 28日間 貯藏하였다. 相對濕度를 80~85%를 維持하기 위하여 plastic 바구니 상하에 포화 황산암모늄 溶液을 넣었다. 그리고 大氣中の CO₂濃度를 維持하기 위하여 80~85%의 相對濕度를 맞춘 공기를 2日에 한번씩 供給하였다.

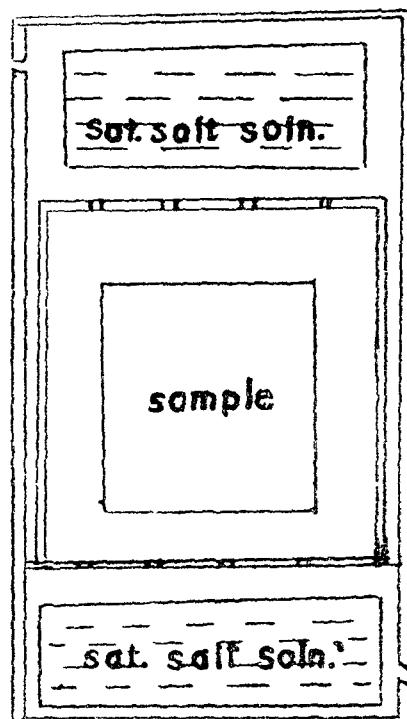


Fig. 1. Schematic Structure of Humidistot Chamber to Store Rice.

3. 分析方法

(1) 水分 상법에 따라 105°C에서 24時間 乾燥하여水分의含量을求하였다.

(2) 곰팡이의 分類 貯藏試料를 채취하여 1% sodium hypochlorite溶液에 1分間 表面殺菌後 殺菌水에 4回 洗滌한 다음 tomato juice salt agar⁽²⁰⁾로 27°C에서 4日間 培養하고 standard taxonomic key⁽²¹⁾로 分離하였다.

(3) 非環元糖 A.O.A.C法⁽²²⁾에 준하여 分析하였다.

(4) 脂肪酸度 A.O.A.C定⁽²³⁾에 준하여 試料 100g을 中和하는데 소요되는 KOH mg數로 表示하였다.

(5) 色度의 测定 試料를 stainless stell miller에서 분쇄하여 40 mesh 節을通過시켜 Color and Color Difference Meter로 C.I.E system으로 表示하였다.⁽²⁴⁾

(6) Chitin의 定量 Donald와 Mirocha의 方法⁽⁹⁾에 준하여 다음과 같이 分析하였다.

1) 試料의 加水分解(chitosan) : 試料 0.2g을 30 ml autoclavable centrifuge tube에 넣고 5 ml KOH (120 g/100 ml H₂O)를 加하여 15分間 autoclave한 후 0°C로 冷却하였다.

2) 溶炭液의 調製 : ice-cold 70% ethanol 8 ml加하고 celite 溶液 1 ml (1g celite/20 ml 70% ethanol) 加하여 12,000 rpm에서 10分間 遠心分離하여 上清액을 버리고 40% ice-cold ethanol 8 ml加하여 혼탁액을 만들고 다시 12,000 rpm에서 10分間 遠心分離한다. 上清액을 버리고 중류수 8 ml로 다시 혼탁액을 만들어 묽은 鹽酸으로 pH 2.0으로 조절하여 12,000 rpm에서 遠心分離하여 上清액은 버렸다.

3) 比色定量 : 各 시험관에 KHSO₄(5%, w/v)와 NaNO₂ (5%, w/v)를 각각 1.5 ml 加하여 혼탁액으로 한 후 중류수로 10 ml로 맞추고 1.5 ml를 취하여 0.5 ml NH₄SO₃NH₂ (12%, w/v)을 加하여 잘 훤풀고 0.5 ml 3-methyl-2-benzothiazolone hydrazone (MBTH, 0.5%, w/v)을 가하고 잘 훤풀어 4分間 煮沸하고 冷却하여 1.5 ml FeCl₃ (0.5% w/v)을 가하여 30分間 放置한 다음 遠心分離하여 recording spectrophotometer (Hitachi)로 650 nm에서 吸光度를 읽었다. 이내 glucosamine-HCl로 標準曲線을 그려 그含量을求하였다.

結果 및 考察

米穀貯藏期間中 化學的인 變化에 의한 곰팡이侵害 여부를 判定하기 위하여水分含量을 달리한統一쌀을 相對濕度를 80~85%로 維持하면서 4주間 貯藏하여 곰팡이의 分布 및 그 化學的인 變化를 調査한 結果 4°C에서 2日間水分의含量을 평衡시킨 후의 試料水分含量은 14.5, 18.0, 22.3, 26.9%이었다.

Table. 1에서는 貯藏期間中에 侵害한 곰팡이의 種類의 비를 表示한 것으로 이것은 貯藏期間中 각 주마다 試料를 채취하여 1% sodium hypochlorite溶液으로 1分間 殺菌한 後 tomato juice salt agar에서 4日間 培養한 結果이다. 貯藏期間동안 가장 侵害가 많았던 곰팡이는 *Aspergillus* sp. 이었고 다음이 *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp.의 順이었다. *Aspergillus* sp.는水分의增加에 의하여 分布가 낮아지는 傾向이 있고 *Penicillium* sp.는 貯藏初期에 分布比率이 높았다. 金等¹⁾에 의하면 우리나라米穀變質에 가장 影響을 많이 미치는 곰팡이는 *Aspergillus glaucus* group이고 다음이 *Aspergillus candidus*, *pezicellum* sp., *Rhizopus* sp.의 등이 있다고 報告하였다. 또한 Tuite 등⁽²⁵⁾은 大麥種子의水分含量이 15~19%에서 *Aspergillus glaucus* group의 分布가 가장 많았다고 報告한 바와 같은 傾向

Table. 1. Percentage of Mycoflora of Stored rice for Four Weeks at Different Moisture Content

Storage weeks	mold sp.	Moisture content (%)			
		14.5	18.0	22.3	26.9
1	<i>Aspergillus</i> sp.	70	75	95	45
	<i>Penicillium</i> sp.	30	25	5	50
	<i>Rhizopus</i> sp.	0	0	0	5
2	<i>Aspergillus</i> sp.	70	80	90	80
	<i>Penicillium</i> sp.	25	15	5	20
	<i>Rhizopus</i> sp.	5	5	5	0
3	<i>Aspergillus</i> sp.	75	80	90	90
	<i>Penicillium</i> sp.	20	20	10	10
	<i>Rhizopus</i> sp.	5	0	0	0
4	<i>Aspergillus</i> sp.	85	80	80	85
	<i>Penicillium</i> sp.	15	20	20	15
	<i>Rhizopus</i> sp.	0	0	0	0

이었다.

Chitin은 보통 곤충의 表皮에 存在하는 物質로서 大部分의 곤팡이 菌系나 胚子에 存在한다. ^(12, 26) 一般的으로 Chitin은 glucosamine으로 加水分解한 후 deamination시켜 比色方法으로 測定한다. ^(8, 16, 19, 27) Fig. 2에서는 glucosamine을 3-methyl-2-benzothiazole hydrazone (MBTH)法으로 發色시켜 吸光度를 表示한 것으로 650 nm에서 最大吸光度를 나타내고 있다.

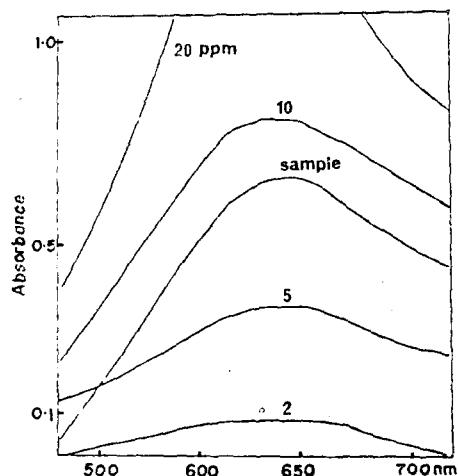


Fig. 2. Absorbance Spectra of Chitin Extracted from Stored Rice.

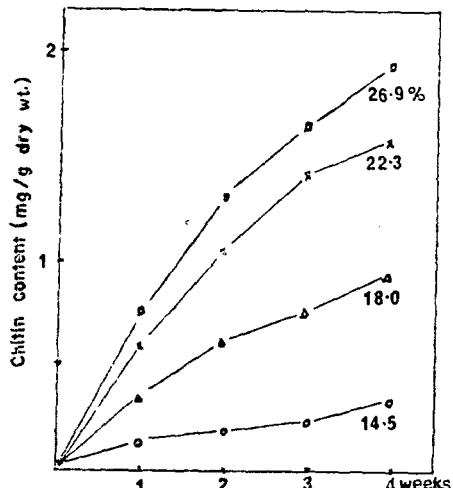


Fig. 3. Changes of Chitin Content, as Glucosamine, of Stored Rice for Four Weeks at Different Moisture Content.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 供試 統一쌀(9분도) 中의 Chitin含量은 25 µg/乾物g을 表示하고 있는 데 이것은 統一쌀의 構成分인 glycoprotein에서 由來한 것이다. ⁽²⁸⁾ 이와같은 Chitin의 含量은 穀類種類의 特性으로서 그 含量에는 差異가 많다. 大麥에서는 glucosamine이 흔적이지만 紫雲英種子에서는 0.051 g/乾物g인 것도 있다. ⁽¹⁷⁾ 水分의 含量이 높아지고 貯藏期間이 길어 질 수록 Chitin의 含量은 急激히 增加하고 있다(Fig. 3). 그리고 쌀 中의水分 含量이 比較的 낮은 14.5%에서는 貯藏期間이 길어져도 그 含量의 變化에는 큰 差異가 없었지만水分 含量이 18.0% 이상으로 增加함에 따라 急激히 增加하고 있다. 이와같은 結果는 Donald等⁽⁹⁾이 23.2%의水分을 含有한 옥수수를 4 주동안 貯藏한 結果 貯藏期間이 길어짐에 따라 急激히 增加한 結果와 類似하였다.

곰팡이의 侵害에 대한水分의 影響을 調査하기 위하여水分 含量에 따른 chitin含量의 變化를 表示한 結果(Fig. 4)를 보면水分의 含量에 따라 直線的으로 增加하고 있다. 26.9%에서 4週 貯藏後의 Chitin含量은 1,980 mg/g으로도 다른水分 含量에서보다 Chitin含量이 높고 14.5~18.0%에서도 變化幅이 큰 것으로 미루어 볼 때 chitin의 定量은 穀類加工 및 貯藏에서 곤팡이 侵害에 대한 하나의 指標로서 使用될 수 있을 것으로 思料된다.

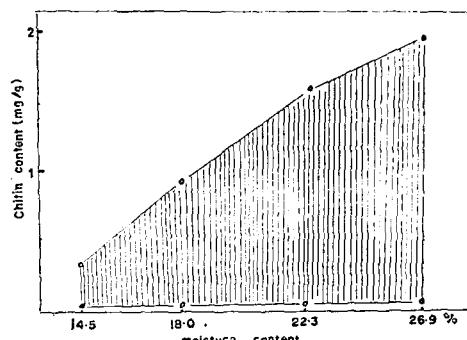


Fig. 4. Effect of the Seed Moisture Content on the Amount of Chitin in Stored Rice after Four Weeks.

Fig. 5에서는 貯藏期間동안 非還元糖의 變化를 表示한 것으로 試料 自體에 非還元糖의 含量은 119 mg/乾物g이었으나,水分의 含量이 比較的 낮은 14.5와 18.0%에서는 貯藏期間이 길어짐에 따라 감소하였으나 그 含量에는 큰 差異가 없었다. 그

러나水分含量이 22.3%와 26.9%에서는貯藏期間이 길어짐에 따라變化의 폭은 커다. 이와같은倾向은 Botomley 等⁽³⁾이 貯藏 옥수수에서 곰팡이의侵害程度에 따라 非還元糖의變化量이 다르고水分의增加에 의해서 非還元糖이減少한다고 한사실과類似하다. 22.3%와 26.9%의水分含量에 2주저장 후의 非還元糖含量에서 差異가 있었는 것은 Botomley 等^(2,3)이 *Aspergillus glaucus* group

Aspergillus flavus *Aspergillus Candidus*, *penicillium* sp. *Fusarium* sp. 보다 빠르게 非還元糖의減少를 일으킨다고 報告한 점과 Table. 1에서 22.3%가 26.9%보다 *Aspergillus* sp.의 分布가 많았으며 또한 Tuite 등⁽²⁵⁾은 19%程度의水分含量에서 *Aspergillus glaucus*의 分布가 많다고 報告한 점으로 볼 때 이와같은 차이가 일어난 것으로 생각되나 앞으로 더욱 檢討하여야 할 것은로 생각된다.

試料自體의 脂肪酸은 9.1 KOH mg/100g, dry wt였으나(Fig. 6) 貯藏期間이 길어지고水分含量이增加함에 따라 脂肪酸度는增加하였으나 26.9%의水分含量에서는 다른水分含量에서 보다變化폭이 커다. 貯藏期間中 脂肪酸度의變化는 穀類의變質을意味하는 것으로 이와같은現狀은 穀類中のglyceride의加水分解에依하여增加한다.^(10,11) 加水分解는 곰팡이나 세균이生成하는 lipase의活性의結果에依한 것으로^(29~31) Milner 等^(32~33)이 小麥의貯藏中微生物의增殖과 더불어 脂肪酸度가增加하고 Botomley 等⁽²⁾은 옥수수, Geddes⁽¹⁵⁾는大豆, 그리고 christensen⁽⁴⁾은 棉實에서 脂肪酸度의增加를報告하였다. 脂肪酸度의變化가 14.5, 18.0, 22.3%의水分含量에서比較的적은 것은 Bottomley 等⁽²⁾이 옥수수를貯藏하는 동안 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus Candidus*, *penicillium* sp., *Fusarium* sp., 等이 *Aspergillus glaucus* group 보다 脂肪酸度의變化를 빠르게誘導하며 Tuite 등⁽²⁵⁾은 *Aspergillus glaucus*가 15~19%의水分含量에서分布가 많았다고 report하였으며 Table. 2에서 22.3%이하에서比較的 *Aspergillus* sp의分布가 많은 점으로 보아 22.3%이하에서 脂肪酸度의變化가 26.9%보다 적지 않았는가思料된다.

이와같이 貯藏中 非還元糖이나 脂肪酸度의變化가 일어나고 있기 때문에 Bottomley 等⁽³⁾은 非還元糖과 脂肪酸度의變化를 穀類의變質에대한生化學의in指標로表示할 수 있다고 report하였다. 그러나 穀類의 貯藏中에서增加하는水分含量과本試驗에서 나타난結果를比較하면 18%이하의水分含量에서는 그變化程度가 적기 때문에米穀의加工 및 貯藏에서變質에對한 하나의指標로서 생각하는데는 상당한問題點이 있다고思料된다.

또한 Fig. 7에서는 貯藏中에서 일어나는表面色깔의變化程度를表示한 것으로서 CIE色度⁽²⁴⁾로表示하였다. 貯藏前試料의表面色度는主波長이

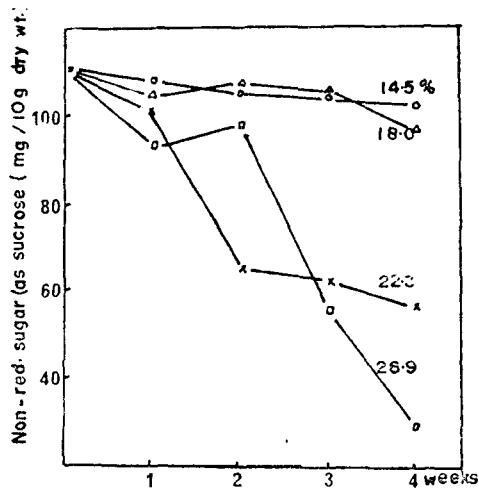


Fig. 5. Changes of Non-reducing Sugar of Stored Rice for Four weeks at Different Moisture Contents.

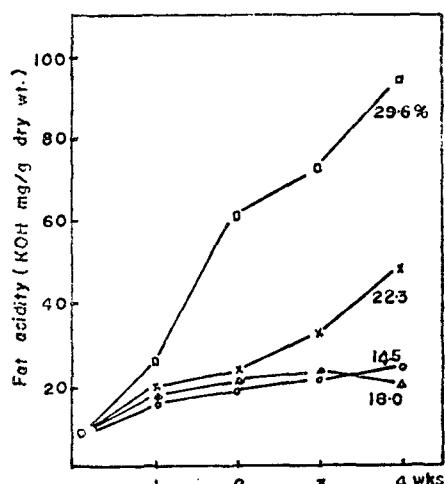


Fig. 6. Changes of Fat Acidity of Stored Rice for Four Weeks at Different Moisture Contents.

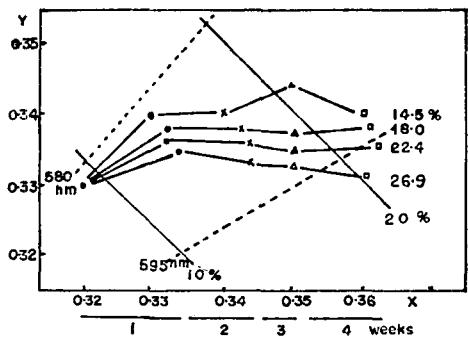


Fig. 7. Changes of the Chromaticity of Stored Rice for Four Weeks at Different Moisture

582 nm, 純度가 8 %였으나, 貯藏期間이 길어지고 水分含量이 높아짐에 따라 主 波長이 595 nm 쪽으로 기울어지고 純度가 높아져 갈색을 띠었다. 米穀 表面 色度의 變化는 곰팡이의 侵害에 의한 것 보다는 오히려 水分의 含量에 의한 影響이 큰 것으로 料된다.

摘要

米穀貯藏中 곰팡이 侵害與否를 chitin 정량법으로 判定하기 위하여 相異한 水分條件(14.5, 18.0, 22.3, 26.9%)에서 26°C를 維持하면서 4週동안 貯藏한 後 米穀(統一)에 侵害한 곰팡이 및 化學成分의 變化를 1週 간격으로 調査, 分析한 結果를 要約하면 다음과 같다.

1) 表面殺菌 後에 나타난 곰팡이는 *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Rhizopus* sp., 였으며 *Aspergillus* sp. 가 大部分이었다.

2) 統一쌀에 含有된 Chitin의 含量은 25 µg/g. Dry wt이었으나 水分의 含量이 높아지고 貯藏期間이 길어짐에 따라 增加하였다. 29.6%의 水分含量에서 4週間에 生成된 Chitin의 量은 1955 µg/g. Dry wt이었다.

3) 非還元糖의 含量은 水分의 增加와 貯藏期間이 길어짐에 隨하로 減少하였다.

4) 脂肪酸度는 水分의 增加와 貯藏期間이 길어짐에 따라 增加하였다.

5) 以上的 結果로 米穀 貯藏中 곰팡이 侵害에 의하여 敏感하게 變하는 Chitin 定量法이 利用될 수 있을 것으로 料된다.

参考文獻

- 1) 金永培, 曹惠鉉: 韓國農化學會志, 17, (1) 54 (1973).
- 2) Bottomley, R. A. and C. M. Christensen and W. F. Geddes: *Cereal Chem.*, 27, 271 (1950).
- 3) Bottomley, R. A. and C. M. Christensen and W. F. Geddes *Cereal Chem.*, 29, 538 (1952).
- 4) Christensen, C. M.: *Cereal Chem.*, 28, 408 (1951).
- 5) Christensen, C. M.: *Cereal Chem.*, 32, 107 (1954).
- 6) Bamberg, J. R.: *J. Agr. Food Chem.*, 17, 443 (1952).
- 7) Christensen, C. M. and R. F. Dresher: *Cereal Chem.*, 31, 206 (1954).
- 8) Elson, L. A., and W. T. J. Morgan: *Biochem. J.*, 27, 1824 (1933).
- 9) Donald, W. W. and C. M. Mirocha: *Cereal Chem.*, 54, 466 (1977).
- 10) 金教昌: 韓國農化學會志, 17 (2), 117 (1974).
- 11) 金教昌: 韓國農化學會誌, 17 (2), 125 (1974).
- 12) Mackadervan, P. R. and E. L. Tatum: *J. Bact.*, 90, 1078 (1965).
- 13) Bartnicki-Garcia, S.: *A Rev. Microbial.*, 22, 87 (1968).
- 14) Golubchuk, M.: *Cereal Chem.*, 33, 45 (1956).
- 15) Golubchuk, M., L. S. Cuendet and W. F. Geddes: *Cereal Chem.*, 37, 405 (1960).
- 16) Arima, K. and Uozumix: *Agr. Biol. Chem.*, 31, 119 (1976).
- 17) Pusztai, A.: *Nature*, 20, 1328 (1964).
- 18) Ride J. P. and R. B. Drysdale: *Plant Physiol.* 1 409~420. (1971)
- 19) Ride, J. P. and R. B. Drysdale *Physiol. Plant Path.* 2, 88~98 (1972).
- 20) Tuite, J. F.: *Burgess Pub. Co.*
- 21) Thoma, C. and J. B. Paper: *A manual of the Asp.* Willium [and] Wilkins Co. Baltimore Md. (1945).
- 22) Willium, H.: *A. O. A. C.* 11 the Ed. 131 (1970).
- 23) Willium, H.: *A. O. A. C.* 11 the Ed. 222 (1970).

- 24) Mackinney, G. and A.C. Little: *Color of Food*, the AVI Pub. Co. pp. 28~67 (1962).
- 25) Tuite, J.F. and C.M. Christensen: *Cereal Chem.*, **32** (1955).
- 26) Bartnicki-Garcia, S. and W.J. Nickenson: *Biochem. Biophysics. Acta*, **58**, 102 (1962).
- 27) Tracey, M.V.: *Biochem.. J.*, **52**, 265 (1952).
- 28) Eriscon, M.C. and M.J. Chrispeels: *Plant Physiol.*, **52**, 98 (1978).
- 29) Lubert, D.J. and L.M. Smith: *Can. J. Research, F.*, **27**, 499 (1949).
- 30) Stiart, L.S.: *J. Bact.*, **105**, 88 (1976).
- 31) Loeb, J.R. and R.Y. Mayne: *Cereal Chem.*, **29**, 168 (1952).
- 32) Milner, M. and W.F. Geddes: *Cereal Chem.*, **24**, 182 (1947).
- 33) Milner, M. and W.F. Geddes and C.M. Christensen: *Cereal Chem.*, **31**, 143 (1954).