

貯藏乾柿 中の 有毒性 곰팡이에 관한 연구

—Aflatoxin 有無의 檢索에 관하여—

주 현 규, 권 우 건
건국대학교 농과대학 농화학과

Studies on the Population of Toxigenic Fungi in Dried-Persimmon

—Screen test of Aflatoxin—

Hyun Kyu Joo, Kun Kwon Woo

Department of Agricultural Chemistry Kon Kook University, Seoul, Korea

Abstract

Microorganisms growing on Dried-Persimmon have been isolated and identified. Fluorescent substance were extracted from a putrefactive Dried-Persimmon after invaded Toxigenic Fungi, and compared with Aflatoxin by Thin layer chromatography and u. v. absorption spectra.

The results obtained were summarized as follows:

1) Fungal invasion was frequently appeared at the beginning of storage, and after then Bacteria invasion was followed.

2) Several Genera of microorganisms (*Aspergillus sp.*, *Escherichia sp.*, *Mucor sp.*, *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.*) were observed in Dried-persimmon during storage. *Aspergillus sp.*, one of all Genus was predominant.

3) Two strains (*Aspergillus flavus* Group, *Penicillium citrinum* Series) of 6 Fungi had Fluorescent substance, which was presumed Aflatoxin-like substance.

4) The Rf value of T. L. C. and λ max of u. v. absorption spectra showed the same value as the standard of Aflatoxin. It is suppose that the Fluorescent substance in Dried-Persimmon is a Aflatoxin-like substance.

緒 論

같은 糖分을 10%¹⁾ 전후로 함유하고 이를 박피 건조한 乾柿는 수분이 증발한 표면에 농축된 Glucose, Fructose, Mannitol 등의 糖類가 結晶이 되어 나타난다. 貯藏乾柿에서는 이들 糖類를 基質로 하여 腐敗微生物이 번식하고 其中 주로 곰팡이와 好氣性 細菌이 번식한다²⁾³⁾.

1961年 Sargeageant等⁴⁾이 칠면조 X-disease의 원인은 *Aspergillus flavus*에 의한 질병이라 주장한 후 農産物 貯藏 中에 번식하는 곰팡이의 有毒性에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔으며 또한 이들 有毒性에 관한 臨床實驗의 研究報文이 발표되었다.

즉 Asplin과 Carnaghan⁵⁾는 Chichen과 duckling, Wilsen⁶⁾은 mice, Penters와 Smith⁷⁾는 Monkey, Lewis⁸⁾는 Sheep 등에 대한 毒性實驗에서 질병의 원

인이 眞菌類의 대사산물인 Mycotoxin이라 하였다. 그 특성과 發癌性은 Clifford⁹⁾ 및 Sporn¹⁰⁾의 보고에 의하면 Toxin과 효소가 직접 상호작용을 하거나 혹은 DNA Template(型板)을 修正하여 Toxin-DNA로 결합되어 核酸合成을 저해하기 때문이라고 하였다.

또한 이 Toxin은 땅콩, 大豆, 옥수수, 쌀 등의 農産物에서 생성되는 것으로 Wogen과 Mateles⁴⁾는 땅콩과 쌀을 실험배지로 하여 인공적으로 생성시켰고 나아가서 Nerbitt 및 Sargeant¹²⁾¹³⁾은 螢光色 및 Chromatography 상의 Rf치 순서에 따라 네개의 화합물로 분리하여 이 Toxin을 Aflatoxin이라 명명하였다. 그 후 Hartleg¹⁴⁾과 Asao¹⁵⁾은 4종의 Aflatoxin의 구조를 결정하였으며 Ambrecht¹⁶⁾은 이들의 化學的 物理的 性質에 대하여 상세히 연구하였으나 Aflatoxin 類似物質에 대하여는 아직 구조와 성질 등이 규명되지 못하고 있다.

식품에 관여하는 有害 微生物中 *Aspergillus Parasiticus*와 *Aspergillus flavus* 類似菌은 Aflatoxin, ¹⁷⁾¹⁸⁾ *Aspergillus ochraceus*는 Ochratoxin¹⁹⁾이 생산되며 *Penicillium Sp.*도 여러 有毒性 物質²⁰⁾을 생산한다는 연구가 보고되었다.

이같은 有害 微生物들이 농산물의 저장 중 쌀과 밀²¹⁾²²⁾²³⁾ 옥수수²⁴⁾ 콩²⁴⁾ 토마토²⁵⁾와 醱酵食品²⁶⁾등에 침입한다는 많은 연구 등이 있었지만 貯藏乾柿 중의 有害微生物에 관한 연구는 별로 알려진 바가 없다. 따라서 본인 등은 저장건시 중에서도 有毒性 곰팡이가 번식하리라 생각되어 부패에 관여하는 각종 미생물을 分離同定하고 이 중 有毒性 곰팡이의 Aflatoxin 生成能 여부를 검사한 바 그 결과를 보고하는 바이다.

材料 및 方法

1. 材 料

1) 乾柿(Dried-Persimmon: Diospyros Kaki) ; 慶北, 金陵, 尙州地方에서 생산된 盤柿를 剝皮, 乾燥 후 저장한 것.

2) 試藥 ; 薄層 Chromatography의 吸着劑는 Kiesel Gel G. C. (Merck C. 獨逸製)이고 사용한 Aflatoxin B₁, G₁ 표준품은 建國大 文理大 生物科 保管品이며, 그 이외의 시약은 日本石津製藥과 和光工業의 一級 및 特級品을 사용하였다.

3) 展開溶媒²⁰⁾²⁴⁾ ; Chloroform과 Acetone을 9 : 1 (v/v)로 혼합하여 사용하였다.

4) 培地 : 곰팡이는 Czapeck media, 효모는 Hen-

nebergmedia, 세균은 Broth media를 사용하였다.

5) 裝置 : 분리에는 薄層 Chromatography (Thin-layer Chromatography: T. L. C.)를 사용하였고 분리된 螢光물질을 자외선등(ultra-violet products, INC, U. S. A.)을 사용하여 관찰하였다. Ultra-violet absorption spectra 측정에는 Varier U. V. Visible spectrophotometer (Model 634 S.)를 사용하였다.

2. 方 法

1) 乾柿의 貯藏

감을 剝皮 및 乾燥한 건시를 木製箱子(10×20×30cm)에 넣고, 다락방 선반 위에서 자연상태로 저장(10~20°C) 하였다. 그리고 3, 6, 12개월 저장한 것을 시료로 하였다.

2) 腐敗微生物의 分離²⁸⁾

건시 중 부패 부위를 증류수 100ml로 3회 이상 水洗한 후, 각각 10ml를 채취하고 10분간 진탕 혼합한 후, 5분간 靜置하고 상등액 0.5ml를 취하여 1000배 희석한 다음, Broth, Henneberg, Czapeck-Dox 평판 한천 배양기에 1백금이 접종하여 30°C에서 streak plate culture를 행하였다.

3) 純粹 分離 및 培養

1~3일 배양한 후 밀도가 적고 비슷한 종류의 colony를 따서 희석배양법(koch 평편 주가 배양법에 따라 배양하여 순수분리하고 세균은 10일, 효모는 3일, 곰팡이는 7일간 斜面培養)을 행하였다.

4) Toxin 生成 培養²⁰⁾²⁹⁾

순수분리한 부패곰팡이의 Crude-Toxin 생성여부를 알기 위하여 250ml flask에 액체배지 100ml를 분注하고 살균(120°C, 1kg/cm², 15cm) 한 후, 각종 분리한 균을 접종하여 27°C에서 2주간 通氣培養을 하였다.

액체배지는 건시를 조분쇄하여 분말 50g에 동량의 물을 넣고 60°C 물중탕에 12시간 가열, 여과한 후 그 濃液을 살균하여 배지로 하였다.

5) 純粹 分離한 微生物의 同定

세균은 駒形和男의 分類法³⁰⁾, 곰팡이는 Raper and Fennel 分類法³¹⁾, Raper and Thom 分類法³²⁾, Zycha 分類法³³⁾, Hughes 分類法³⁴⁾에 의한 그 형태적, 배양적 및 생리적 특성에 따라 동정하였다.

6) Chromato plate의 製作³⁵⁾

Kiesel gel G. 25g을 50ml의 증류수에 기포가 생기지 않도록 넣으면서 교반한 다음 glass plate (20×20cm) 상에 0.25mm 두께로 박층을 만들고, 105°C에서 7시간 건조하여 사용하였다. 이 때 coating 용으로 사용한 Kiesel Gel G.는 Column(3×40cm)

에 packing된 것을 Methanol로 씻고 2시간 건조 (105°C) 후 분쇄한 것이다.

7) 螢光性 物質의 抽出

배양균의 여액에서 형광성물질의 추출은 Cruditoxin의 抽出法²⁰⁾에 준하였다. 즉 배양균의 여액에 1/3에 해당하는 량의 Chloroform을 가하고 3시간 진탕한 후 이를 Separatory funnel에 옮겨 Chloroform 층만 분리하고 이 분리액을 2×8cm 크기의 無水 Na₂SO₄의 Column을 통과시켜 탈수시켰다. 이 chloroform 용액을 70°C의 water bath 상에서 5 ml가 되도록 증발 농축하였다.

고체시료(乾柿)에서 추출²⁶⁾²⁷⁾은 부패로 변질된 부위를 절단하고 수분 10% 내외로 건조시킨 후 10mesh 이하로 粉碎하였다. 이 분말 50g을 圓筒濾紙에 넣고 Soxhlet extract에 Petroleum ether 150ml를 넣은 다음 70°C water bath 상에서 6시간 추출한 후 원통여지 중의 잔사를 건조하여 methanol 150ml로 85°C의 water bath 상에서 6시간 저추출하여 이 추출액을 약 50ml가 되도록 증발 농축하고, 3배의 chloroform을 가한 후 3시간 진탕하여 Separatory funnel에 옮겨 chloroform 층만 분리, 탈수하고 5ml가 되게 농축하였다.

8) 螢光性 物質의 檢定

가) Spotting과 展開²⁷⁾³²⁾

Ethanol에 녹인 Aflatoxin 표준품과 각 시료의 추출액을 각각 spotting 하여 developing solvent를 넣은 20°C의 전개상에 넣고 40분간 상승법으로 전개한 후, 용매를 증발시키고 U. V.-lamp 照射로 나타난 형광물질의 Rf치를 측정하였다.

나) 분리된 螢光物質의 Scrap 및 溶出

자외선 조사에 의해 나타난 형광물질들을 각 Band별로 Scrap해서 용출판²³⁾(0.7×6.0cm)에 넣고 Methanol 5ml로 용출하였다. 완전 용출을 위하여 Kiesel Gel G. 및 Glass wool등의 형광의 잔여가 없도록 Methanol 2ml로 다시 용출하였다.

다) 溶出液의 U. V. Absorption spectra 測定²⁴⁾

chromatogram상 AF와 그 Rf치 및 형광색이 유사한 물질의 용출액을 AF표준품과 비교하여 U. V. Visible Spectrophometer에 의해 그 absorbancy로 측정하여 Absorption spectra를 비교하였다.

結果 및 考察

1. 貯藏 乾柿 중의 微生物의 分離

건柿를 저장 기간별(3, 6, 12개월)로 채취한 시료에서 미생물을 분리 배양하고 각종 균의 분포를

Table 1. Colony count of the microorganism growing on Dried-Persimmon while being stored.

| Storage time (month) | section | microorganisms | colony count | the percentage of each Genera |
|----------------------|---------|------------------------|--------------|-------------------------------|
| 3 | | <i>Escherichia sp.</i> | 0 | 0% |
| | | <i>Aspergillus sp.</i> | 5 | 62.5 |
| | | <i>Penicillium sp.</i> | 0 | 0 |
| | | <i>Mucor sp.</i> | 1 | 12.5 |
| | | <i>Alternaria sp.</i> | 2 | 25 |
| 6 | | <i>Escherichia sp.</i> | 2 | 22 |
| | | <i>Aspergillus sp.</i> | 4 | 45 |
| | | <i>Penicillium sp.</i> | 1 | 11 |
| | | <i>Mucor sp.</i> | 2 | 22 |
| | | <i>Alternaria sp.</i> | 0 | 0 |
| 12 | | <i>Escherichia sp.</i> | 5 | 46 |
| | | <i>Aspergillus sp.</i> | 2 | 18 |
| | | <i>Penicillium sp.</i> | 1 | 9 |
| | | <i>Mucor sp.</i> | 3 | 27 |
| | | <i>Alternaria sp.</i> | 0 | 0 |
| Total | | | 28 | |

조사한 결과는 Table 1과 같다.

각종 배지에서 효모의 colony는 나타나지 않았고, 絲狀菌과 세균 등의 colony만 분리 배양되었다. 저장 기간 중 가장 침해가 많았던 미생물은 *Aspergillus*屬이었고, 다음이 *Escherichia*, *Mucor*, *Alternaria*, *penicillium*屬의 순이었다.

과실의 부패 시 주로 Molds가 침해하고 일부분 Bacteria가 번식하는데, 건柿에서도 이같은 미생물이 분리되었다. 또한 이는 穀類 저장 시 Molds (*Aspergillus sp.*, *Penicillium sp.*)와 Bacteria (*Bacillus sp.*, *Pseudomonas sp.*)가 침해한다는 金等²¹⁾의 보고와 비슷한 경향이었고, 여기에서는 *Mucor*屬과 *Escherichia*屬도 *Aspergillus*屬과 *Penicillium*屬과 같이 분리되었다.

그리고 저장 초기에는 곰팡이의 침입이 많았으나, 저장기간이 길어짐에 따라 Molds보다 Bacteria 침해가 많게 나타났는데 이는 불리한 환경에서도 내구력이 강한 *Escherichia Sp.*³⁾의 생존이 현저함을 알 수 있었다.

2. 分離 微生物의 同定³⁶⁾

순수분리 배양한 균에 대한 형태적, 배양적 및

Table 2. Morphological, cultural and physiological characteristics of the isolated Bacteria.

| | |
|----------------------------------|--------------------------|
| A. Morphological characteristics | |
| Form | Short Rod |
| Size | 0.5×1.0~3.0 μ |
| Motility | Gliding |
| Flagella | Peritrichic |
| Gram stain | Negative |
| B. Cultural characteristics | |
| Broth agar | white or Yellowish white |
| Endo agar | pink |
| Optimum temp. | 37°C |
| C. Physiological characteristics | |
| O-F test (Hugh-Leifson) | + |
| Indole | + |
| Methyl Red test | + |
| Gelatin liquefaction | - |
| Litmus milk | acid |
| Catalase | + |
| Voges-proskauer test | - |
| Assimilation of citrate | - |
| Carbohydrate Assimilation | |
| Glucose + Fructose + Galactose + | |
| Lactose + Maltose + Arabinose + | |
| Mannitol + Sorbitol + Inositol - | |
| Identification | <i>Escherichia sp.</i> |

생리적 특성을 조사하였다.

1) 分離 細菌의 同定

Broth agar media에서 순수분리한 colony 7 개는 같은屬의 균으로서 그 동정한 결과는 Table 2와 같다.

Gram 염색에서 陰性인 短桿菌을 Lactose broth에 접종시켜 37°C에서 24시간 배양 시 gas가 발생하는 것으로 보아 大腸菌群으로 분류하였다.

이 균을 Endo 한천배지에서 pink 색, Broth 한천배지에서 흰색 혹은 황백색의 colony를 나타내었으며, 生育適溫은 37°C였다.

O-F (Hugh-Leifson) Test, Indole 생성반응, M-R Test에서는 양성, Gelatin, Voges-proskauer 및 citrate Test에서는 음성을 나타내었고, 대부분 당은 資化하고 Inositol을 資化하지 않는 Gram 음성 균을 *Escherichia sp.*로 추정하였다.

2) 分離 絲狀菌의 同定

가) *Aspergillus* 屬의 同定

Czapeck 한천배지에서 분리 배양한 11개균 (M. 1~11)들을 Raper and Funnel 분류법에 따라 형태적 특성을 관찰한 결과는 Table 3과 같다.

菌絲(hyphae)에 隔膜이 있고, 分生孢子柄의 맨 끝이 팽대하여 頂囊을 형성하며, 頂囊 표면에는 梗子(sterigmata)가 생기고, 그 先端에는 分生포자가 착생하여 *Aspergillus*屬으로 추정할 수 있었다.

이 11개 균 중 4개 균(M. 1~4)은 被子器와 子

Table 3. Morphological characteristics of *Aspergillus sp.* isolated from Dried-persimmon.

| No. of Strains | M-1 | M-5 | M-9 |
|-------------------------|----------------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| Morph. charact. | | | |
| Hyphae | + | + | + |
| Septa | + | + | + |
| Ascospore | - | - | - |
| Perithecium | - | - | - |
| Colonial color | Bluish green | Yellowish green | Black |
| Conidial Heads | Greyish green or Bluish green | Yellow or Greenish brown | Black |
| Conidiophore surface | Smooth | Spiny | Smooth or Granular |
| Visicle shape | Flask | Globose | Globose |
| Visicle size | 20~30 μ | 30~40 μ | 80 μ |
| Sterigmata | Single | Single or Double | Double |
| Conidia surface | spiny | Smooth | Smooth |
| shape arranged in chain | Cylindrical | Radiated | Radiated |
| size | 2.4~4 μ | 4~8 μ | 3~4 μ |
| Identification | <i>Asp. fumigatu</i> Group | <i>Asp. oryzae-flavus</i> Group | <i>Asp. niger</i> Group |

囊胞子를 형성하지 않고, 頂囊은 flask형이며 생육도중 colony는 녹색이었고, 분생포자병의 표면이 평활하고, 梗子は 單條이며 분생포자 전면에 가사가 있고, 그 연쇄상은 圓錐形(cylindrical)이어서 *Aspergillus fumigatus* Group으로 추정할 수 있었다.

또한 *Aspergillus*屬에 속하는 다른 4개 균(M. 5~8)은 역시 被子器와 子囊胞子를 형성하지 않고, 頂囊은 球形이며 생육도중 colony는 녹색이었다. 분생포자병의 표면은 거칠고 가사가 있으며 colony는 녹색 혹은 황녹색을 띄므로 *Aspergillus flavus-oryzae* Group으로 추정하였다.

그리고 *Aspergillus*屬 중 다른 3개 균(M. 9~11)도 역시 被子器와 子囊胞子를 형성하지 않고, 頂囊은 球形이며, colony는 생육도중 흑색이었으며, 분생포자병의 표면은 평활하고 無色이었으며, 上端部는 황록색이었다. 분생포자 연쇄상은 放射形(radiated)이었고, 分生胞子頭는 흑색이므로 *Aspergillus niger* Group이라고 추정하였다.

나) *Penicillium*屬의 同定

Raper and Thom 분류법에 따라 2개 균(M. 12~13)을 동정한 결과는 Table 4와 같다.

균사에는 격막이 있고, 子囊胞子の 被子器를 형성하므로 Ascomycetes로 분류하였다. 분생포자병의 맨끝이 分岐하여 梗子和 분생포자를 착생하므로 *Penicillium*屬으로 추정하였다. 이어 筆狀 (pe-

Table 4. Morphological and Cultural Characteristics of the Isolated Strain M-12

| | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| Hyphae | + |
| Septa | + |
| Ascospore | + |
| Perithecium | + |
| Conidiophore | + |
| Mutulae | + (Radiated) |
| Sterigmata | + |
| Conidia | + |
| Penicillus | Asymmetrica |
| Colony | Velutina |
| No Adhesive beneath Mutulae | |
| Colonial color | |
| of the early stage | Bluish green |
| of the latter term | Dark brown |
| of a brim | white band |
| Reverseside pigment | Light yellow |
| Identification | <i>Pen. citrinum</i> Series |

Table 5. Morphological and Cultural Characteristics of Strain M-14

| | |
|-------------------|-----------------------|
| Hyphae | + |
| Septa | - |
| Zygosporae | + |
| Sporangiospore | + |
| Sporangium | globose |
| Sporangiophore | + (pellucid) |
| Columella | + |
| Rhizoid | - |
| Stolon | - |
| Aerial mycel | + |
| Oidia | + |
| Chlamydospore | + |
| Conjugated method | Homo-or Heterothalism |
| Suspensor size | uniform |
| Colonial color | white |
| Identification | <i>Mucor sp.</i> |

nicillus)은 2段 이상으로 分岐하여 梗子和 基底梗子(metulae)로 나누어졌고, 좌우 비대칭이어서 Asymmetrica Group에 속하였다. 또한 筆狀은 밀착되고 colony는 비로드狀(velutina)이고, 筆狀 중 基底梗子 밑에는 分岐하지 않으므로 *penicillium citrinum* series로 추정되었다.

이 colony의 생육초기에는 청록색, 후기에는 暗褐色이었으며 가장자리에는 흰 테두리를 하고 담황색의 색소를 생성하였다.

다) *Mucor*屬의 同定

Zycha 분류법에 따라 6개의 균(M. 14~19)을 동정한 결과는 Table 5와 같다.

균사에 격막이 없고 接합포자와 포자낭포자를 형성하기 때문에 Zygomycetes로 분류할 수 있었다. 포자낭은 球形이었고, 포자낭포자병은 투명(pellucid)하고 假根(rhizoid)과 葡萄枝는 형성되지 않았다. 雌雄同體 혹은 雌雄異體로 接합이 이루어지고 懸柄(suspensor) 크기는 일정하므로 *Mucor*屬으로 추정되었다.

라) *Alternaria*屬의 同定

Hughes 분류법에 따라 2개 균(M. 20~21)을 동정한 결과는 Table 6과 같다.

균사에 격막이 있고, 무성포자인 분생포자를 형성하며 무색인 氣菌絲(aerial mycel)가 있어 불완전균류로 분류할 수 있었다. 회록색의 균사체(mycelium)가 양털모양을 하고, 분생포자는 분생포장병위에 연쇄상으로 착생하며 가로 세로의 벽으로

Table 6. Morphological and cultural characteristics of strains M-20

| | |
|----------------|----------------------------|
| Hyphae | + |
| Septa | + |
| Conidia state | chain |
| shape | multi-celled |
| Aerial mycel | + |
| Conidiophore | + |
| Mycelium state | wool |
| color | Greyish green |
| Colony state | Villous form with pellicle |
| color | Black |
| Identification | <i>Alternaria sp.</i> |

나는 多細胞로 나타났다. 분생포자병은 分岐한 것과 分岐 하지 않은 것이 있으며, colony는 흑색의 얇은 비로드狀이므로 *Alternaria*屬으로 추정하였다.

즉 전체 28균주 중 7개는 *Escherichia*屬, 21개는 사상균인데 그 중 11개는 *Asp.*屬이고 2개는 *Penicillium*屬, 6개는 *Mucor*屬, 2개는 *Alternaria*屬으로

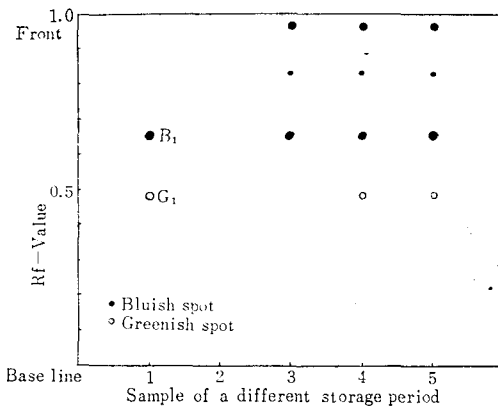


Fig. 1. Thin layer chromatographic pattern of Dried-persimmon

Samples : (1) AF-B₁ and AF-G₁
 (2) Fresh sample (non dried)
 (3) Sample stored for three month
 (4) Sample stored for six month
 (5) Sample stored for a year

Layer: Kiesel Gel G.

Thickness of layer: 0.25mm

Developing solvent: Chloroform: Acetone (9 : 1)

Developing Temp. : 20°C

Spots was identified by uv-lamp

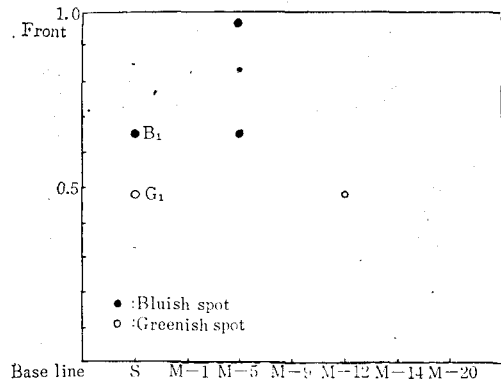


Fig. 2. Thin layer chromatographic pattern of isolated strains

Samples: (S) Standard (AF-B₁ and AF-G₁)
 (M-1) *Asp. fumigatus* Group
 (M-5) *Asp. flavus* Group
 (M-9) *Asp. niger* Group
 (M-12) *Pen. citrinum* Series
 (M-14) *Mucor sp.*
 (M-20) *Alternaria sp.*

동정되었다.

3. T. L. C. 에 의한 螢光性物質 調査

1) 腐敗 乾柿 中の 螢光物質

부패미생물에 의해 변질된 乾柿 중에 T. L. C. 에 의한 형광물질의 조사 결과는 Fig. 1과 같다.

剝皮한 盤柿은 저장 전에 spots가 나타나지 않았고 3개월 저장전지에는 3개의 spots, 6개월과 1년 저장지에는 4개의 spots가 나타났다. 이 중 3개월, 6개월, 1년 저장지에 나타난 Rf치 0.65의 3개 spots는 Aflatoxin B₁과 동일한 Rf치로 청색 형광을 나타내었고, 6개월과 1년 저장 시 나타난 Rf치 0.48의 2개 spots는 Aflatoxin G₁과 동일한 Rf치로 녹색 형광을 나타내었다.

2) 分離 菌株의 培養液 中の 螢光物質

분리고정된 사상균 6株를 액체배양하고 그 濾液의 형광물질이 T. L. C. 상에 나타난 모형은 Fig. 2와 같다. 실험균주 6株中 2株(M. -5, 12)가 형광성을 내고, M-5 (*Asp. flavus* Group)는 3개의 spots (Rf치 0.65, 0.83, 0.96)를, M-12 (*Pen. Citrinum* Series)는 1개의 spot (Rf치 0.48)을 나타내었다. 그 중 M. -5에서 나타난 Rf치 0.65의 spot는 Aflatoxin B₁과 동일한 Rf치로 청색형광을 나타내었고, M. -12에서 나타난 Rf치 0.48의 spot는 Aflatoxin G₁과 동일한 Rf치로 녹색형광을 나타내었다.

3) 腐敗 乾柿와 分離 菌株에서 TLC상에 나타난 螢光物質의 比較考察

건시 저장 중 형광물질은 저장 전에는 나타나지 않았고 3, 6, 12개월 저장함에 따라 나타났다. 이는 저장 전에는 有害곰팡이가 아직 번식하지 못하여 Toxin 類似物質이 생성되지 않았으나 저장기간이 길어짐에 따라 有害곰팡이가 번식하여 형광성물질이 나타난 것으로 생각된다³⁷⁾.

건시저장지에 나타난 형광물질의 Rf치로는 Aflatoxin 표준품(Rf치 0.48, 0.65)과 일치하였으므로 Toxin 유사물질임이 확인되었다(Fig. 1, 2).

형광물질은 TLC상에서 분리할 때 전개용매, 박층의 두께, 展開過度에 따라 다소 차이가 생기나 A. O. A. C. 법²⁷⁾에 따르면 Aflatoxin (AF)은 23~25°C에서 40분간 전개시키면 Rf치 0.4~0.7사이에 도달한다고 하였는데 본 실험에도 Rf치가 0.48, 0.65를 갖는 형광물질로 이에 해당하는 Aflatoxin 유사물질이라 생각된다.

그리고 Asao等⁴⁾과 李等³⁴⁾은 대부분 Toxin을 분리 전개 후 Aflatoxin B는 청색 spots로 Rf치는 0.5~0.7이고, Aflatoxin G는 녹색 spots로 Rf치는 0.4~0.5 사이에 나타난다고 보고하였는데 이들에 의하면 본 실험의 *Aspergillus flavus* Group과 *penicillium citrinum* Series에서 나타난 두개 spots의 Rf치는 0.65, 0.48이므로 Aflatoxin B, G의 유사물질에 해당된다고 생각된다.

Penicillium citrinum Series가 내는 녹색 spot(Rf치 0.48)는 高等²⁰⁾이 한국식물 중에서 분리한 *pen. citrinum*의 배양물에서 분리전개한 녹색 spot와 거의 유사하였고, *Aspergillus flavus* Group이 생성한 청색 spot를 나타낸다는 李等^{26, 33, 39)}의 보고와도 類似點이 있음을 알 수 있었다. 그러나 이 의의 Rf치 0.83과 0.96은 어떤 Mycotoxin인지 확인할 수 없었다.

Bamberg等⁴⁰⁾과 高等²⁰⁾은 *Asp. flavus*, *Asp. fumigatus*, *Pen. citrinum* 등에서 Mycotoxin을 생성한다는 보고와 같이, 본 실험에서도 6개 실험군주 중 *Asp. flavus* Group (M-5)와 *Pen. citrinum* Series (M-12) 군주에서 Aflatoxin B₁과 G₁에 해당하는 형광성 유사물질이 나타났다고 생각된다.

4) U. V. Absorption Spectra 測定에 依한 螢光物質調査

TLC상에서 AF-B₁ 및 AF-G₁과 동일한 Rf치를 갖는 AF 유사물질이 Aflatoxin 표준품과 일치하는가를 同定하기 위하여 U. V. Absorption spectra를

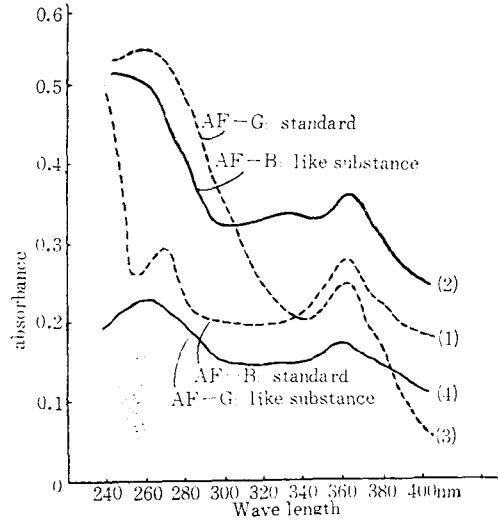


Fig. 3. U. V. absorption spectra of Aflatoxin (A. F) and Aflatoxin like substance (Sample)

- λmax. 1. 265, 360mμ
- 2. 330, 360mμ
- 3. 260, 360mμ
- 4. 260, 360mμ

측정 비교하였다(Fig. 3).

Standard AF-B₁과 AF-G₁의 Pattern을 보면 λmax는 다같이 260-265, 360mμ인데 A. F 유사물질은 AF-B₁ 유사물질에서 λmax가 330~360mμ이고, AF-G₁ 유사물질의 λmax는 260, 360mμ로 Standard와 거의 유사하게 나타내었다.

Büchi等⁴⁾과 A. O. A. C. 法²⁴⁾에 의하면 純品の Aflatoxin은 다같이 260과 360mμ 부근에서 자외선 최대흡수파장을 갖는다고 하였는데 이는 본 실험의 결과와 유사하다고 생각된다. 李等^{26) 38) 39)}의 보고에 의하면 한국 각종식품 중에 함유된 형광성물질을 분리하고 U. V. absorption spectra를 測定한 결과 대부분의 형광성물질은 TLC상에서 동일한 Rf치를 나타내었으나 U. V. absorption spectra는 A. F와 相異하다고 하였는데 본 실험 결과는 TLC상의 Rf치에서나 U. V. absorption spectra 측정에서도 거의 유사하게 나타내고, 더우기 AF-G₁만은 더 확실하게 同一하게 나타내었다. Toyonabu 등⁴¹⁾은 Aflatoxin B₁의 U. V. Absorption Spectra의 λmax는 255, 264, 332mμ이고 AF-G₁에서 243, 257, 264, 362mμ라고 하였는데 본 실험의 경우도 AF-B₁의 330mμ는 거의 유사하게 일치하였고 AF-G₁에서 260, 360mμ도 거의 같게 나타났으므로, AF-B₁

또 AF-G₁의 유사물질은 표준물질과 같은 유사물질이 아닌가 생각된다.

건지에서 분리 동정한 미생물과 또는 형광성물질의 Rf치와 U. V-Absorption spectra로 보아서 부패건지 중에는 Aflatoxin의 유사물질이 함유된다고 사려된다. 이는 앞으로 계속 究明해야 되겠고, 이에 따른 대책이 강구되지 않으면 아니되겠다.

要 約

건지 저장 중 부패미생물을 분리동정하고, 有毒性 곰팡이의 Aflatoxin생성 여부를 검사한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1) 건지 저장 초기에는 곰팡이가, 저장기간이 길어짐에 따라 세균의 침해가 많았다.

2) 분리 동정한 부패 미생물의 菌數는 *Asp. sp.*가 가장 많았고, *Escherichia sp.*, *Mucor sp.*, *Alternaria sp.*, *Penicillium sp.* 順으로 많았다.

3) 분리균주 중 *Aspergillus flavus* Group과 *Penicillium citrinum* Series도 동정된 균에서와 저장건지에서 분리한 형광물질은 TLC 상에서의 Rf 값으로 보아 Aflatoxin B₁, G₁ 유사물질로 推定하였다.

4) 乳柿試料 또는 분리균주에서 분리된 Aflatoxin 유사물질은 U. V. absorption spectra 측정 결과 *Asp. flavus* Group에서 Aflatoxin B₁, *Pen. citrinum* Series에서 Aflatoxin G₁으로 확인되었다. 이것은 앞으로 계속 더 究明하여야 하겠다.

參 考 文 獻

- 1) 金娟順 : 韓國榮養學會誌 4(1), 19(1975)
- 2) 劉太鐘, 李尙建, 李炳昊, 金秀賢 : 食品加工學, 文運堂 159, 283(1977)
- 3) Normann, W. Desrosier: The Technology of Food Preservation (1963); 김동훈譯, 食品貯藏學, 51, 207~208 (1969)
- 4) Martha Windholz et al.: The Merk Index Merck & Co., Inc. Rahway, N. T., U. S. A. 9th Ed. 24~25 (1976)
- 5) Asplin, F. D. Carnaghan, R. B. A.: *Vet Record*, 73, 1215~1219 (1961)
- 6) Wilson, B. T. and Willson, C. H.: *Science* 144, 177 (1964)
- 7) Peters, J. A. and Smith, L. M.: *Biochem. J.*, 92, 379 (1964)
- 8) Lewis, G., Markson, L. M. and Allcroft, R.: *Vet Record* 80, 312 (1967)

- 9) Clifford, R.: *Nature* 209, 312 (1966)
- 10) Sporn et al.: *Science* 151, 1539 (1966)
- 11) 李寬寧, 金永培, 李瑞來 : 韓國식품과학회지 7 (1), 7~10 (1975).
- 12) Nesbitt et al.: *Nature* 195, 1062 (1962)
- 13) Sargeant et al.: *Chem. & Ind.*, London 53 (1963)
- 14) Hartleg, R. D., Nesbitt, B. F. and O'Kelly, J.: *Nature*, 198, 1056 (1963)
- 15) Asao, T., Buchi, G., Abdel-karder, M. M., Chang, S. B., Wick, E. L. and Wogen, G. N.; *J. Am. Chem. Soc.*, 85, 1706 (1963)
- 16) Ambrech, B. H., Hodges, F. A., Smith, H. R. and Nelson, A. A.: *J. Assoc. Offic. Arg. Chemists*, 46 (5), 805 (1963)
- 17) Sargeant et al.: *Nature* 192, 1096 (1961)
- 18) Hesseltine et al.: Proc. Ist. U. S. Japan Conf. Toxic Microorganisms, Honolulu, Hawaii, 202 (1968)
- 19) 全英淵 : 建國大學術誌, 15, 575 (1973)
- 20) 高春明, 金聖光, 趙世勳, 金世鍾, 崔泰周, 柳駿 : 産業微生物學會誌 2(1), 19 (1974)
- 21) 金永培, 曹惠鉉 : 韓國農化學會誌 17 (1), 54 (1973)
- 22) Christensen, C. M. and R. F. Drescher: *Cereal Chem.* 31, 206 (1954)
- 23) Kurata, H. et al.: *J. Food Hyg. Soc. Japan* 9, 29 (1968)
- 24) Donald, W. W. and Mirocha, C. M.: *Cereal Chem.* 54, 466 (1977)
- 25) Puztai, A.: *Nature* 20, 1328 (1964)
- 26) 李泰寧, 李相圭 : 韓國식품과학회지 1(1), 78 (1969)
- 27) Horowitz, W.: Official methods of analysis of the Association of official Analytical Chemists 11th Ed., A. O. A. C. Washington 426~438 (1970)
- 28) 鄭東杓, 주현규, 유주현, 서경훈 : 미생물실험, 유평출판사 24~28 (1977)
- 29) 朱鉉圭, 權守鍵 : 産業微生物學會誌 7(4), 192 (1979)
- 30) 駒形和男 : 微生物の分類と同定(長谷川編), 東京出版會 203 (1975)
- 31) K. B. Raper and Fennel, D. I.: The Genus *Aspergillus*, Williams & Wilkins, Baltimore,

- (1965); Reprint, Krieger Pub, R. E., Huntington, N. Y.
- 32) Raper, K.B. and Thom, C.: A Manual of Penicilla, Williams & Wilkins, Baltimore, 1949; Reprint, Hafner Pub., N. Y. (1968)
- 33) Von H. Zycha: Kryptogamenflora der Mark Brandenburg, Band 11a, Pilze II, Mucorineae,; Reprint Verl. Von J. Cramer, (1963)
- 34) Hughes, S.J.: Conidiophores, Conidia and Classification can, J. Bot, 31, 577~659 (1953)
- 35) 石川正幸外 3人: 薄層 クロマトグラフィー, 南山堂, 東京 13~36(昭和 43)
- 36) 權守鍵: 貯藏乾柿 中에 關與하는 微生物의 分離 同定, 建國大 碩士學位論文集(1979)
- 37) 鄭東孝: 食品微生物學, 先進文化社, 476~486 (1980)
- 38) 이배함, 전영연, 최태주, 주현규, 김상재, 정성구: 建國大學術誌 12, 807~813 (1971)
- 39) 李寬寧, 李瑞來: 韓國食品科學會誌 6(3), 169~176 (1974)
- 40) Bamberg, J. R.: *J. Agr. Food Chem.* 17, 443 (1953)
- 41) Asao, T. et al.: *J. Am. Chem. Soc.* 87(4) (1965)