

*Aspergillus parasiticus*에 의한 大豆品種別 Aflatoxin 생성

박 건 영 · 이 규 복

부산대학교 식품영양학과
(1985년 3월 11일 접수)

Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in Various Varieties of Soybeans

Kun-Young Park and Kyu-Bok Lee

Department of Food and Nutrition, Pusan National University.

(Received March 11, 1985)

Abstract

Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 with two different levels of inoculum sizes (10^2 and 10^6 spores) was studied on such varieties of soybeans produced in Korea as Bongeui, Hwang Keum, Jangbaek, Danyeop, Jangyeop and Namcheon. With the inoculum size of 10^2 spores/10 g of soybeans, there were statistically difference ($p<0.05$) on the production of aflatoxins in the varieties of soybeans. The variety of Namcheon produced 7 times higher amount of aflatoxin B₁ than that of Bongeui. The variety of Jangyeop produced the highest level of aflatoxin G₁ among the varieties employed. Namcheon and Jangyeop were the varieties which supported high amounts of aflatoxins. Much higher levels of aflatoxins were obtained on the soybeans than on rice in general with the inoculum size of 10^2 spores. With the inoculum size of 10^6 spores/10 g of soybeans, significantly lower levels of aflatoxins were synthesized by the mold than those with 10^2 spores. The variety of Namcheon resulted in the lowest production of aflatoxin B₁ while Hwangkeum was the variety that produced highest amount of aflatoxin B₁. There were no significant differences within the varieties on the production of aflatoxin G₁ by the mold except the variety of Hwangkeum. Lower quantities of aflatoxin B₁ were produced by the mold on the soybeans than on rice with the inoculum size of 10^6 spores.

서 론

Aflatoxin(이하 AF라고 표기함)은 *A. flavus*나 *A. parasiticus* 곰팡이들에 의해 생성되는 제2차 대사산물로서 독성 및 발암성이 매우 강한 물질이다.¹⁾ 사탕수수, 땅콩, 옥수수, 귀리, 밀 및 쌀 등의 농산물에서는 이를 곰팡이들의 성장이 양호할 뿐 아니라 이런 고탄수화물 식품은 AF 생성을 위해 좋은 기질

로 알려져 왔다.^{2~4)} 한편 대두는 일반적으로 AF 생성에 좋은 기질이 못된다고 알려진바, 이를 곰팡이가 대두에서 왕성히 성장했을 경우라도 AF 생성은 미량이거나 검출되지 않았다는 보고들과^{2,3,5)} 상반하여 어떤 경우에는 상당량의 AF이 생성되었다는 보고도 있다.^{6,7)} 대두는 한국인에게 중요한 단백질 원으로 특히, 된장과 간장은 재래식 방법에 의하여 제조되어 있는 바 이를 식품 제조시의 자연발효 과

정에서는 편재되어 있는 이들 곰팡이의 오염이 일어 날 가능성이 있다.

대두에서 AF 생성은 AF을 생성하는 균주의 종류뿐 아니라 대두품종의 차이에 의해서도 영향을 받는데, 미국산 Hawkeye^{2,3)}종에서는 AF 생성이 일어나지 않거나 미량이었으나, 미국산 York종⁶⁾과 Bragg 종⁷⁾에서는 다량의 AF이 생성되었다고 보고되고 있다. 한편, 다섯 종류의 인도산 대두로 *A. flavus*와 *A. parasiticus*의 AF 생성능을 검토한 결과 *A. flavus*는 소량의 AF을 생성하였지만 품종간의 AF 생성량에 큰 차이를 나타내었다.⁸⁾ 한국산 대두가 AF 생성에 양호한 기질이 되지 못한다면 매우 발효중 이력한 균들이 오염된다 하더라도 심각한 문제는 되지 않을 것이므로 본 연구에서는 최근 전국적으로 장려 품종으로 선발된 대두들을 기질로 *A. parasiticus*의 접종균체수(Incubation size)를 다르게 하여 AF 생성 가능성을 검토하였다.

재료 및 방법

사용 균주: 본 실험에 사용한 *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999은 미국 USDA Northern Regional Research Laboratory로부터 공급받아 PDA(Potato dextrose agar) 배지에서 계대(繼代) 배양하여 4°C에서 보관하면서 사용하였다.

포자 혼탁액 조제 및 계수: PDA slant에 균을 접종하여 25°C에서 7~8일간 배양하여 포자가 잘 형성되게 한 후 멸균수로 혼탁하고 멸균한 4겹의 cheese cloth를 통해 여과시켜 포자를 수집하였으며 포자수는 Hemocytometer를 사용하여 측정한 후 포자 혼탁액을 4.0×10^2 spores/ml와 4.0×10^6 spores/ml로 조제하였다.

사용 대두품종: 사용된 대두는 수원의 농촌 진흥청과 밀양의 작물시험소로부터 제공받은 강원도 장려품종인 봉의(鳳儀, 百粒重: 19.8 ± 0.3 g), 충북부 지역의 장려 품종인 황금(黃金, 百粒重: 23.2 ± 0.8 g)과 장엽(長葉, 百粒重: 26.2 ± 0.5 g), 남부지역의 장려 품종인 남천(南川, 百粒重: 18.9 ± 0.3 g)과 단엽(短葉, 百粒重: 11.0 ± 0.3 g) 및 전국지역의 장려 품종인 장백(長白, 百粒重: 15.2 ± 0.2 g)이었으며 이들의 수분함량은 9.4~10.0%이었다. 한편, 이 실험의 대조군으로 사용한 쌀은 시중에서 구입한 일반미(아끼바레)였다.

실험방법: 상기의 대두를 각각 10 g 씩 취해 pint

jar에 옮긴 후 물 10 ml를 가한 후 3~4시간 동안 자주 혼들어 주며 물이 대두에 고르게 흡수되도록 하였으며 pint jar의 두껑에는 각각 작은 구멍(dia. 3~4 mm) 12~13개를 내고 두껑 안에 2장의 여과지 (Toyo # 2)를 대어 공기의 유통이 되도록 하였다.⁹⁾ 그 후 121°C에서 15분간 가압살균한 후 포자현탁액 1 ml를 접종하였으며 쌀은 상기와 같은 조작으로³⁾ 이 실험의 대조군으로 사용하였다. 균은 AF 생성의 적합한 조건으로 알려진 28°C에서 7일간 배양하였고 배양기간 중 균의 성장과 함께 기질이 응집되는 것을 방지하기 위해서 적어도 하루에 한번씩 혼들어 기질의 표면적을 넓게 해 주었다.²⁾

분석방법: 배양이 끝난 Sample은 121°C에서 1분간 처리하여 포자를 살균한 후 Park과 Bullerman⁹⁾의 방법에 따라 AF을 추출, 정제하였다. AF 생성량은 Dual-Wavelength TLC Scanner(Shimadzu, CS-930)를 사용하여 TLC plate³⁾에서 표준물질과 비교, 정량하였으며 전개 용매로는 Toluene-ethylacetate-90% formic acid(60: 30: 10)를 사용하였다.

통계 분석: 실험 data로부터 ANOVA를 구한 후 Duncan's multiple range test로 대두 품종간, AF 생성량의 유의성 검정을 하였다.¹⁰⁾

결과 및 고찰

대두가 Aflatoxin(AF) 생성에 좋은 기질이 못된다 는 이유 중 하나는 대두는 소량의 Zn ($0.01 \mu\text{g/g}$)을 함유하고 있기 때문인데 이것도 phytic acid와 결합된 상태로 있어 가열하지 않는 한 AF 생성에 이용될 수 없다는 점이다.¹¹⁾ Zn는 이들 곰팡이의 탄수화물 catabolism에 관련하여 HMP 경로와 TCA cycle에 관여된 효소들의 작용을 저해하여 AF 생성을 하는 2차 대사계인 polyketide 경로로 중간 생성물들을 이용하게 하기 때문에 식품기질에 있어 충분한 양의 Zn는 AF 생성을 자극하는 것으로 알려져 있다.^{12,13)} 그러나 Table 1에서 보여 주듯이, 소량의 포자(10^2)들이 대두에 접종되었을 때 AF 생성을 위한 기질로 가장 양호하다고 알려진 것 중의 하나인 쌀보다 훨씬 많은 양(남천과 장엽의 경우와 비교하면 약 70배)의 AF이 생성되었다. 결국 소량의 Zn 함량의 열세를 대두가 가지고 있는 다른 영양소의 영향에 의해 상쇄케 하였든지 Zn 함량이 이들 대두품종에서는 AF 생성에 관계가 없는 다른 기질의 특이성에 불과 하였을 가능성도 있다. Ames mutagen test나 동물실험에¹⁴⁾ 의하면

Table 1. Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 with inoculum size of 10^2 spores on various soybean varieties

Soybean varieties	Aflatoxin ($\mu\text{g/g}$) ^e			
	B ₁	G ₁	B ₁ +G ₁	B ₁ /G ₁
Bongeui	13.3± 0.6 ^a	35.7± 3.5 ^a	49.0± 3.6 ^a	0.4
Hwangkeum	19.6± 4.6 ^a	68.7±12.7 ^b	88.3± 9.0 ^b	0.3
Jangbaek	30.8± 3.3 ^b	20.5± 6.8 ^a	51.3± 5.9 ^a	1.5
Danyeop	35.5±10.6 ^{b,c}	22.5± 2.1 ^a	58.0±12.7 ^a	1.6
Jangyeop	38.9± 1.4 ^c	154.6±22.6 ^c	193.5±24.0 ^c	0.3
Namcheon	97.3± 4.5 ^d	95.7±11.4 ^d	193.0± 7.0 ^c	1.0
Rice ^f	2.7± 0.6	0.07± 0.05	2.7± 0.6	

^{a-d} Means in the same column with the same letter are not significantly different at the 0.05 level of significance as determined by the Duncan's multiple range test.

^e Values shown are means and standard deviations of two to four determinations.

^f The substrate was employed as control.

AF B₁은 어떤 화합물 보다 강한 발암성 물질인 동시에 그 효과가 AF G₁의 30배가 된다고 알려져 있는데 AF B₁의 경우, 남천은 봉의의 약 7배나 되는 AF B₁을 생성하였다. 한편, 장엽과 단엽은 동량의 AF B₁을 생성하였지만 장엽은 단엽보다 7배 정도의 AF G₁ ($p<0.05$)을 생성하였다. 단엽은 장엽보다 많은 양의 linoleic acid를 함유하고 있는데¹⁵⁾ linoleic acid는 AF G₁의 생성을 저해한다고 알려져 있다.¹⁶⁾ AF 생성에 있어서 장백과 남천은 가장 많은 양의 AF B₁ + G₁을 생성하였으며 황금 그리고 가장 소량의 AF B₁ + G₁을 생성한 봉의, 장백 및 단엽들 사이에는 통계적인 유의성 ($p<0.05$)을 보였다. 소립(小粒)형의 단엽과 장백은 많은 양의 AF B₁을 생성하여 AF B₁ + G₁의 비율이 높았고 대립(大粒)형인 장엽, 황금 및 봉의는 낮은 값을 나타내어 AF G₁이 더 많이 생성되었음을 보여주었다.

Table 2에서 보듯이, 다량의 포자(10^6)들이 대두에서 AF 생성에 참여했을 때 소량의 포자(10^2)들이 AF 생성에 관여했을 때보다(Table 1 참조) 훨씬 적은 양의 AF이 생성되었다($p<0.05$). 접종 포자수가 10^2 인 경우 2일 후부터 성장이 시작되어 3일 후부터 포자 형성이 시작된 반면 10^6 인 경우에는 1일 후에 성장이 시작되어 2일 후에는 이미 포자가 왕성하게 형성되었다. AF 생성은 포자형성 시기와 관련이 있어 포자형성이 시작될 때 2차 대사(AF 생성)도 시작된다고 하였는데¹⁷⁾ 10^6 인 경우 AF 생성이 이미 되었다가 배양기간 중 빠른 속도로 파괴되었을 가능성을 배제할 수 없다. 이것은 대두가 함유하고 있는 다량의 불포화 지방산에서부터 유래된 과산화 물질들에 의해, 이미 생성된 AF이 빠르게 파괴되었다고 볼 수 있겠으나¹⁸⁾ 이 점에 대해서 관련된 연구가 더 필요하다고 본다. AF가 소량 생성되었던 가능성의 이유 중

Table 2. Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 with inoculum size of 10^6 spores on various soybean varieties.

Soybean varieties	Aflatoxin ($\mu\text{g/g}$) ^e			
	B ₁	G ₁	B ₁ +G ₁	B ₁ /G ₁
Bongeui	9.3± 1.0 ^{a,c}	7.0± 1.2 ^a	16.3± 2.1 ^a	1.3
Hwangkeum	11.0± 2.8 ^c	11.5± 1.3 ^b	22.5± 3.3 ^c	1.0
Jangbeak	8.0± 2.8 ^{a,b,c}	6.5± 3.5 ^a	14.5± 6.4 ^{a,b}	1.2
Danyeop	6.0± 1.8 ^{b,d}	7.3± 2.1 ^a	13.3± 3.6 ^{a,b}	0.8
Jangyeop	4.0± 2.8 ^d	5.5± 2.1 ^a	9.6± 4.9 ^b	0.7
Namcheon	3.7± 1.2 ^d	5.7± 2.1 ^a	9.3± 3.2 ^b	0.7
Rice ^f	30.0± 7.8	1.7± 1.2	31.7± 9.0	

^{a-d} Means in the same column with the same letter are not significantly different at the 0.05 level of significance as determined by the Duncan's multiple range test.

^e Values shown are means and standard deviations of two to four determinations.

^f The substrate was employed as control.

또 하나는 균의 성장과 포자 형성이 왕성한 결과 영양소를 이미 다 소비하여 AF 생성에 쓰일 기질의 부족으로 인하여, 성장이 왕성했을 때도 AF 생성이 소량 또는 거의 없었다는 다른 보고들과 연관성이 있다고 볼 수 있겠다.^{3,5)} 한편 품종별 AF 생성량 차이를 보면 10^2 때와는 달리 10^6 인 경우 남천과 장엽이 가장 적은 양의 AF B_1 을 생성하였으며 황금이 가장 많은 양의 AF을 생성하였다. AF G_1 의 생성량을 보면 황금에서만 통계적 유의성이 있었을 뿐 다른 품종간의 차이는 없었다. 황금이 가장 많은 AF B_1+G_1 을 생성하였지만 다른 품종간에는 10^2 때와 같은 현저한 차이는 보여주지 않았다. 대조군으로 사용한 쌀의 경우 대두보다 다량의 AF이 생성되어 남천과 비교한다면 약 8배의 AF B_1 이 생성되어 일반적으로 다량의 균이 대두에 접종되었을 때는 쌀보다 소량의 AF이 생성되었다.

이 실험 결과에 비추어 대두는 AF 생성에 좋은 기질이 될 수 있음을 알 수 있었는데 특히 소량의 균수가 AF 생성에 관여되었을 때(10^2), 다량의 균수 때보다 (10^6) 더 많은 양의 AF이 생성되었고(남천, 장엽의 경우 약 20배), 대두 품종간의 AF 생성량도 현저한 차이를 보였다.

한편 대두에서 균은 왕성히 성장하였지만 AF 생성이 미량 또는 없었다는 보고들^{2,35)}과 이 실험의 결과를 관련지어 볼 때 이를 균들이 대두를 기질로 했을 때는 다른 기질들에서 보다 AF 생성을 위한 적합 환경 조건의 범위가 극히 한정되어 이런 차이가 있었으리라고도 사료된다.

요약

한국산 6종의 대두 품종 봉의, 황금, 장백, 단엽, 장엽 및 남천을 선정하고 *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999의 접종량을 다르게 하여(10^2 과 10^6) aflatoxin 생성을 검토하였다.

균 접종량이 적었을 때(10^2) 대두 품종간의 AF 생성량에 현저한 차이가 있어 남천은 봉의의 7배 정도의 AF B_1 을 생성하였으며, 봉의와 황금이 가장 적은 양의 AF B_1 ($p<0.05$)을 생성하였다. 한편 장엽은 가장 많은 양의 AF G_1 ($p<0.05$)을 생성하였고, 남천과 장엽은 AF B_1+G_1 을 가장 많이 생성하는 품종이었으며, 이들은 비교군으로 쓰인 쌀보다 70배 정도의 AF을 생성하였다. 소립(小粒) 대두인 단엽과 장백은 AF B_1/G_1 율이 높은 반면 대립(大粒) 대두인 봉

의 황금 및 장엽은 낮은 AF B_1/G_1 율을 나타내었다. 균 접종량이 많았을 때는(10^6) 10^2 때보다 소량의 AF이 생성되었는데 남천이 가장 적은 양의 AF B_1 을 생성하였으나 황금은 가장 많은 양의 AF B_1 을 생성하였다($p<0.05$). AF G_1 에 있어서는 황금을 제외하고는 생성량에 있어 품종간의 차이가 없었고 이 경우 AF 생성은 비교군 쌀에서 보다 적은 양이 생성되었다.

사사

본 연구는 한국과학재단 학술연구비 지원 연구중 일부로 수행되었으며 이를 감사드린다.

문현

1. 박건영 : 한국 영양식량학회지, 13, 117(1984)
2. Heskettine, C. W., Shotwell, O. L., Ellis, J. J. and Stubblefield, R. D. : *Bacteriol. Rev.*, 30, 795(1966)
3. Park, K. Y. and Bullerman, L. B. : *J. Food Prot.*, 46, 178(1983)
4. Heathcote, J. C. and Hibbert, J. R. : In "Aflatoxins : Chemical and Biological Aspects", Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, 16(1978)
5. Chang, Y. H., Beng, C. H., Ponnапalam, J. T. and Lim, R. K. H. : *Far East Med. J.*, 2, 298 (1966)
6. Sherertz, P. C., Eadie, T., Young, T. W. and Llewellyn, G. C. : *J. Assoc. off. Anal. Chem.*, 59, 662(1976)
7. Davis, N. D. and Diener, U. L. : In "Proceedings of the first. U.S. - Japan Conference on Toxic Microorganism", U.S. Govt. Printing Office, Washington, D.C., 43(1970)
8. Nagarajan, V., Bhat, R. V. and Tulpule, P. G. : *Experientia*, 29, 1302(1973)
9. Park, K. Y. and Bullerman, L. B. : *J. Food Sci.*, 48, 889(1983)
10. Steel, R. G. D. and Torrie, J. H. : In "Principles and Procedures of Statistics", McGRAW-HILL Kogakusha, LTD., 172(1980)
11. Gupta, S. K. and Venkatasubramanian, T. A. : *Appl. Microbiol.*, 29, 834(1975)

12. Venkatasubramanian, T. A. : In "Mycotoxins", Pathotox Publishers, Inc., Park Forest South, MN., 83(1977)
13. Niehaus, W.G., Jr. and Dilts, R.P., Jr. : *Arch. Biochem. Biophys.*, **228**, 113(1984)
14. Hsieh, D.P.H., Wong, J.J., Wong, Z.A., Michas, C. and Ruebner, B.H. : In "Origins of Human Cancer", Hiatt, H.H., Watson, J. D. and Winsten, J.A. Eds., Cold Spring Harbor Laboratory, Book B, 697(1977)
15. 윤태현, 임경자, 김동훈 : 한국식품과학회지, **16**, 375(1984)
16. Schultz, D.L. and Luedcke, L.O. : *J. Food Prot.*, **40**, 304(1977)
17. Bu'Lock, J.D. : In "The Filamentous Fungi", Smith, J.E. and Berry, D.R. Eds., Edward Arnold, London, Vol. 1, 33(1975)
18. Ciegler, A., Peterson, R.E., Lagoda, A.A. and Hall, H. H. : *Appl. Microbiol.*, **14**, 826 (1966)