

實驗室 廢水中 Aflatoxin 감소를 위한 化學的 處理에 관한 研究

金 宗 圭

英麟科學技術研究所 分析研究室

Chemical Treatment for the Destruction of Aflatoxins in Laboratory Waste Water

Jong-Gyu Kim

Analytical Laboratory, Young-In Research Institute of Science and Technology, Seoul 135-120, Korea

ABSTRACT

The ability of chemicals, 10% sodium hypochlorite, 28% ammonium hydroxide, 5% sodium hydroxide, 5% sodium bicarbonate, 0.1% hydrochloric acid, 5% hydrogen peroxide, and 5% acetone, to destroy aflatoxins in laboratory waste water containing 3.26 ppb of B₁, 7.64 ppb of B₂, 6.83 ppb of G₁, and 11.39 ppb of G₂ with the total of 29.11 ppb was investigated. High performance liquid chromatograph (HPLC) was used for the separation and quantitation of aflatoxins. Treatment for 2 hours by the chemicals affected the destruction of aflatoxins and the most effective chemical was 10% sodium hypochlorite ($p < 0.05$). Sodium hypochlorite concentrations more than 1% significantly reduced aflatoxin B₂, G₁, G₂ and total aflatoxins and more than 3% reduced B₁ ($p < 0.05$). No further significant decreases were observed above the concentration of 5% for all 4 aflatoxins. Complete destruction of aflatoxins B₂, G₁, and G₂ was achieved by 5% sodium hypochlorite at 48 hours and B₁ at 72 hours.

Keywords : Chemical treatment, destruction of aflatoxins, waste water, HPLC

I. 緒 論

Aflatoxin은 *Aspergillus flavus* 및 *Asp. parasiticus*에 의하여 생성되는 곰팡이의 2차 代謝產物이다. 발암성 및 독성을 갖는 aflatoxin으로 오염된 環境과 食品 및 飼料 등에 있어서 이 독소를 감소 및 분해시키거나 제거하기 위한 문제¹⁾가 끊임없이 관심이 되고 있다. 이와 관련하여 여러 종류의 시료에 있어서 aflatoxin을 감소시키고자 하는 노력으로 物理的, 化學的 및 生物學的 方法들²⁾이 탐구되어 왔다.

Aflatoxin을 파괴 또는 감소시키고자 하는 化學的인 方法으로서 몇 가지 化學物質들이 오염된 環境과 農產物 등에서 aflatoxin의 오염 수준을 낮추는 효력이 있는지의 여부가 실험되었다. 여기서는 산, 알칼리 성분들이 대체로 유효한 것으로 평가되었으며 또한 산화제, 기체 등도 효과가 있는 것으로 나

타났다.³⁻¹⁰⁾

한편 aflatoxin에 관한 實驗 및 研究에 있어서 가장 지적이 많이 되는 問題는 오염된 實驗 環境의 무독화, 배출되는 廢水 및 廢棄物 처리와 관련된 安全性 問題이나 이와 관련하여서는 研究가 많지 않은 편이다. 실제로 實驗 環境으로부터 aflatoxin에 직접 노출 및 흡입되어 나타나는 健康危害는 오염된 食物이 먹이연쇄로 침입되었을 때보다 훨씬 더 위험한 것으로 우려되어 왔다. 實驗室에서 研究者들은 aflatoxin 관리에 각별한 주의를 기울일 것이 권장되고 있어 특히 健康을 위하여 안전 수칙을 철저히 지킬 것이며, 實驗 環境을 가능한 오염시키지 않도록 유의하고 aflatoxin을 무독화 또는 최소 수준으로 감소시키도록 처리하는 등이 지켜져야 한다. 이와 같은 관점에서 本 研究는 實驗室에서 배출된 廢水中 aflatoxin의 감소를 위하여 산, 알칼리 및 산화제

등으로 처리를 시도하고 비교하였으며 농도 및 處理時間에 따른 影響 등을 평가하였다.

II. 實驗方法

1. 試藥 및 機器

Aflatoxins 표준물질은 Sigma Chemical Co.(St. Louise, Mo, U.S.A.) 제품을 사용하였으며, 고속액체크로마토그래프(HPLC) 분석을 위하여 HPLC급의 acetonitrile 및 methanol을 사용하였고, 그 외 實驗에 사용된 試藥은 모두 分析用 특급 試藥이었다. Aflatoxin의 분리 및 정제를 위하여 immunoaffinity column(Aflatest; Rhône-Poulenc Diagnostics, Ltd., Glasgow, Scotland)을 사용하였다.

2. 試料 및 化學的 處理

Aflatoxin에 관한 實驗이 수행되는 實驗室에서 廢水를 수거하였으며 수거된 廢水를 충분히 혼합하여 試料로 하였다. 4종의 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 초기 함량을 측정된 후 化學的 處理를 시도하였으며 사용된 化學物質은 sodium hypochlorite, ammonium hydroxide, sodium hydroxide, sodium bicarbonate, hydrochloric acid, hydrogen peroxide 및 acetone 등이었으며 處理 용액의 농도는 해당 시약이 시판되는 농도 및 일부 추측된 농도²⁾ 등으로 하였다. 處理後 각 액이 담긴 용기를 봉하여 혼합하고 상온에 저장하면서 aflatoxins를 분석하였다.

3. Aflatoxin의 추출 및 정제, 유도체화

化學的 處理가 시도된 각 용액 50 ml를 1l의 용기에 담고 250 ml의 60% methanol 용액을 첨가하여 격렬하게 혼합하였다. 다시 250 ml의 탈이온수를

첨가하여 혼합한 후 Whatman No. 4 여과지로써 여과하였다. 여과액 10 ml를 aflatoxin B₁, B₂, G₁ 및 G₂의 단일항체가 보유되어 있는 immunoaffinity column 상에서 처리하여 추출 및 정제를 수행하고 1 ml의 methanol로써 항체에 결합된 aflatoxins를 용출시켰다. 이 용출된 액을 상온에서 질소 기체로써 완전히 건조시킨 후 건조물에 trifluoro acetic acid를 가하여 aflatoxins를 유도체화 시켰다. 여기에 water : methanol : acetonitrile(90 : 10 : 1)의 용액을 가하여 HPLC 분석을 위한 시료로 하였다.

4. HPLC 分析 條件 및 定量

Aflatoxins의 分析을 위하여 사용된 HPLC는 Waters associates(Milford, MA, U.S.A.)의 system이었다. M510 용매전달장치, U6K 주입기, M746 인테그레이터가 사용되었으며 검출기로는 M470 형광검출기를 excitation 파장 360 nm, emission 파장 440 nm에서 사용하였다. Waters Nova-Pak C₁₈(15 cm×3.9 mm I.D.) column을 상온에서 사용하였으며 이 동상으로는 water : methanol : acetonitrile(60 : 20 : 20)의 용매를 사용하였으며 1.0 ml/min의 유속으로써 aflatoxins의 분리를 수행하였다.

III. 結果 및 考察

1. 化學物質別 aflatoxin 감소 능력

實驗室 廢水의 處理前 초기에 측정된 aflatoxin의 함량은 B₁, B₂, G₁ 및 G₂가 각각 3.26, 7.64, 6.83 ppb 및 11.39 ppb로 總 aflatoxin 함량은 29.11 ppb였다. 이를 각 化學物質別로 2시간 동안 處理하여 다시 aflatoxins의 함량을 측정된 結果는 Table 1 및 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 處理에 사용된 化學物質은

Table 1. Effect of chemical treatment for 2 hours on the aflatoxin content of laboratory waste water

Treatment	Content of aflatoxin, ppb ¹⁾				
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Total
Initial sample	3.26 ± 0.84 ^a	7.64 ± 0.68 ^a	6.83 ± 0.05 ^a	11.39 ± 0.30 ^a	29.11 ± 1.87 ^a
Sodium hypochlorite, 10%	1.38 ± 0.22 ^c	0.78 ± 0.11 ^d	0.91 ± 0.29 ^c	ND ²⁾	3.08 ± 0.64 ^c
Ammonium hydroxide, 28%	2.44 ± 0.72 ^a	1.59 ± 0.05 ^c	1.87 ± 0.10 ^{cd}	ND	5.89 ± 1.88 ^d
Sodium hydroxide, 5%	2.42 ± 0.02 ^a	1.59 ± 0.05 ^c	1.94 ± 0.06 ^c	ND	5.96 ± 0.13 ^d
Sodium bicarbonate, 5%	3.07 ± 0.29 ^a	6.22 ± 1.07 ^a	5.35 ± 1.04 ^{ab}	5.96 ± 0.25 ^b	20.60 ± 3.61 ^{ab}
Hydrochloric acid, 0.1%	2.48 ± 0.53 ^a	6.93 ± 0.90 ^a	3.01 ± 1.02 ^{bc}	6.77 ± 0.67 ^b	19.19 ± 0.02 ^b
Hydrogen peroxide, 5%	2.41 ± 0.12 ^a	4.32 ± 0.90 ^b	1.29 ± 0.33 ^{de}	0.82 ± 0.36 ^d	8.83 ± 3.43 ^{cd}
Acetone, 5%	1.93 ± 0.14 ^b	5.41 ± 0.82 ^b	1.95 ± 0.55 ^{cd}	4.60 ± 0.70 ^c	13.39 ± 2.21 ^c

¹⁾ Mean ± S.D. ²⁾ Not detected.

Values in the same column followed by different superscript letters are significantly different (p < 0.05).

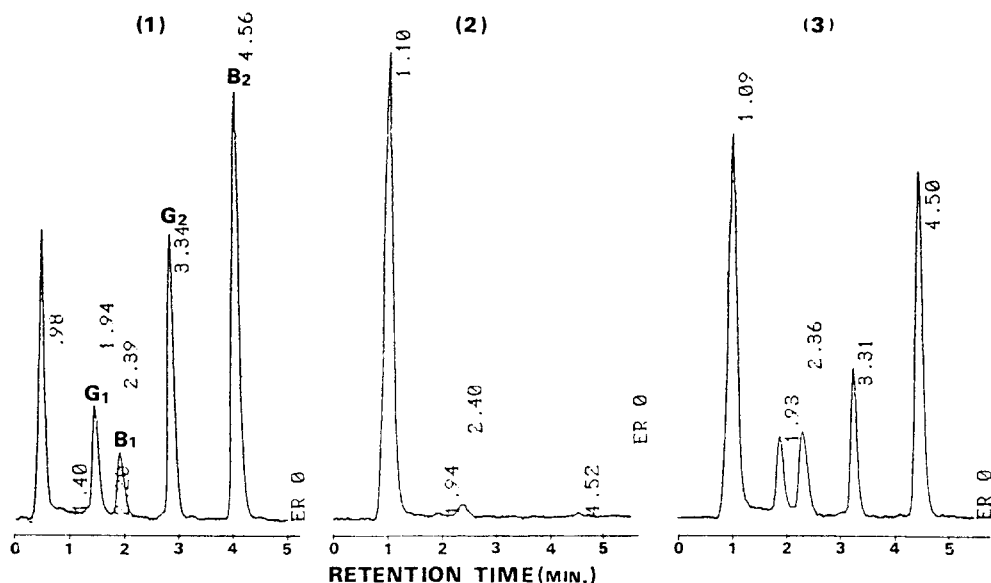


Fig. 1. HPLC chromatogram of aflatoxins of derivatized extract from #1. Initial sample of laboratory waste water, #2. Sample treated with 10% solution of sodium hypochlorite for 2 hours, #3. Sample treated with 5% solution of sodium bicarbonate for 2 hours.

모두 aflatoxins의 함량을 감소시켰으며, aflatoxin別 감소정도는 G_2 가 가장 높고 B_1 이 가장 낮아 B_1 이 가장 저항력이 큰 것으로 나타났다. 이는 현재까지 제시되고 있는 바와 같이 B_1 이 가장 독성이 강하고 G_2 가 가장 약하다는 점과 일치하고 있으며²⁾, 역시 B_1 化學的 處理에 있어서도 가장 어려움이 있음을 나타내고 있다.

각 化學物質中 가장 유효한 것은 10% sodium hypochlorite 용액인 것으로 나타났다. Sodium hypochlorite의 10% 용액으로 2시간 동안 處理後의 aflatoxin B_1 , B_2 , G_1 , G_2 및 總 aflatoxin 함량은 초기

함량의 각각 42.3%, 10.2%, 13.3% 및 10.6%로 유의하게 낮아졌다($p < 0.05$). 本 實驗에서 廢水 處理에 설정된 각 化學物質의 농도는 이미 추측된 研究者들의 가정²⁾을 토대로 한 것으로, 특히 5% sodium bicarbonate의 경우는 aflatoxin에 폭로시에 人體의 중화, 무독화를 어느 정도 기대할 수 있는지를 평가하고자 하였으며 上記의 사용된 化學物質中 가장 약한 효과를 나타내었다.

따라서 한편으로 다른 化學物質의 경우 sodium hypochlorite와 같은 농도의 용액으로 또는 농도별로 處理를 시도해 보아야 할 필요성이 있으며 이는

Table 2. Effect of sodium hypochlorite concentration on the destruction of aflatoxins in laboratory waste water at 2 hours

Concentration of sodium hypochlorite (%)	Content of aflatoxin, ppb ¹⁾				
	B_1	B_2	G_1	G_2	Total
0	3.26 ± 0.84^d	7.64 ± 0.68^a	6.83 ± 0.05^a	11.39 ± 0.30^a	29.11 ± 1.87^a
1	2.58 ± 0.16^c	1.66 ± 0.02^b	1.90 ± 0.03^c	0.53 ± 0.04^b	6.67 ± 0.92^b
2	2.68 ± 0.17^c	1.74 ± 0.09^b	1.98 ± 0.02^b	0.53 ± 0.05^b	6.93 ± 0.99^b
3	1.91 ± 0.78^b	1.14 ± 0.04^c	1.02 ± 0.45^d	0.56 ± 0.09^b	4.63 ± 0.25^c
5	1.51 ± 0.13^b	0.84 ± 0.19^{cd}	1.01 ± 0.26^d	0.53 ± 0.05^b	4.01 ± 0.01^d
10	1.38 ± 0.24^b	0.78 ± 0.11^d	0.91 ± 0.29^d	ND ²⁾	3.08 ± 0.64^d

¹⁾ Mean \pm S.D. ²⁾ Not detected.

Values in the same column followed by different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

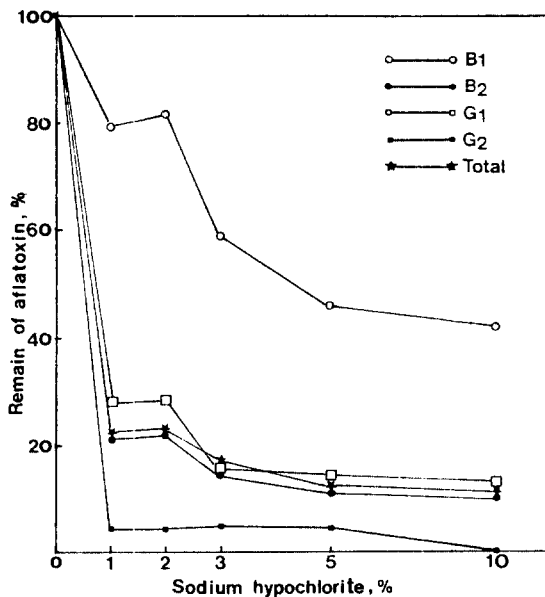


Fig. 2. Dose-related destruction of aflatoxins in laboratory wastewater by sodium hypochlorite treatment for 2 hours. Each point represent mean of three trials.

금후의 研究에 기대하는 바이다.

2. Sodium hypochlorite 농도별 aflatoxin 감소정도

Aflatoxin 감소를 위하여 사용될 수 있는 sodium hypochlorite의 최소한의 농도를 설정하기 위하여 이 용액의 농도별로 aflatoxin의 감소 정도를 실험한 결과는 Table 2 및 Fig. 2와 같다.

Sodium hypochlorite 1%, 2%, 3%, 5% 및 10% 용액으로써 2시간 동안 廢水를 처리한 결과, 농도가 증가할수록 aflatoxin은 감소되는 경향을 나타내었다. 1% 용액은 aflatoxin B₂, G₁ 및 G₂를 유의하게 감소시켰으며($p < 0.05$), aflatoxin B₁은 3% 이상의

용액에서 유의하게 감소되는 것으로($p < 0.05$) 나타났다. 10% 용액은 모든 aflatoxins를 더욱 감소시켰으나 5% 용액일 때와 비교하여 더 유의한 차이를 보이지 않았다.

따라서 본 研究에서 시도한 廢水인 경우 5% sodium hypochlorite 용액으로 aflatoxin 處理를 함이 타당한 것으로 생각되었으며, 기타 試料의 處理 경우에도 경제적 측면을 생각한다면 이러한 결과를 고려해 보아야 할 것으로 판단되었다.

한편, 본 實驗에서 나타난 결과는 Draughon 등⁶⁾의 결과와 일치하는 면을 보이고 있다. 즉 20 μ g의 aflatoxin B₁에 11 mg의 NaClO를 처리한 결과, 그 형광성이 3.8%로 감소되었으며, NaClO 0~11 mg의 처리에 있어서 NaClO의 양이 증가할수록 형광성이 낮아졌다고 보고되었으며 이러한 결과와 본 研究의 결과는 이 化學物質의 유용성을 뒷받침하고 있다.

3. 處理 時間別 aflatoxin 감소정도

前記의 결과에서 化學物質中 aflatoxin 감소능력이나 경제적 측면에서 가장 적당할 것으로 판정된 5% sodium hypochlorite 용액으로써 處理時間別로 aflatoxin의 감소정도를 평가하였다. 5% 용액으로 廢水를 처리하여 2시간, 48시간 및 72시간에 각각 aflatoxin의 함량을 측정한 결과 aflatoxin 감소에 유효한 시간을 관찰할 수 있었다. 즉 Table 3에서 보는 바와 같이 48시간 후에는 B₁만이 초기 함량의 41.1% 잔류하였으며 B₂, G₁ 및 G₂가 검출되지 아니하였고 72시간 후에는 모든 aflatoxin이 검출되지 아니하였다.

이상의 결과들은 實驗室에서 방출되는 aflatoxin 함유 廢水 뿐만 아니라 초자기구 및 일회용 제품, 그리고 실험대와 측정장치 등에도 aflatoxin의 감소를 위하여 본 實驗에서 시도된 化學的 處理 方法의 적용이 가능함을 제시할 수 있겠으며, 나아가서는 무독화에 응용될 수 있음을 시사하고 있다. 그러나

Table 3. Effect of incubation time on the destruction of aflatoxins in laboratory waste water treated with 5% of sodium hypochlorite

Duration of treatment (hours)	Content of aflatoxin, ppb ¹⁾				
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Total
0	3.26 ± 0.84 ^a	7.64 ± 0.68 ^a	6.83 ± 0.05 ^a	11.39 ± 0.30 ^a	29.11 ± 1.87 ^a
2	1.51 ± 0.13 ^b	0.84 ± 0.19 ^b	1.01 ± 0.26 ^b	0.53 ± 0.05 ^b	4.01 ± 0.01 ^b
48	1.34 ± 0.16 ^b	ND	ND	ND	1.33 ± 0.01 ^c
72	ND ²⁾	ND	ND	ND	ND

¹⁾ Mean ± S.D. ²⁾ Not detected.

Values in the same column followed by different superscript letters are significantly different ($p < 0.05$).

한편 sodium hypochlorite는 그 자체가 신장 독성 등 人體에 危害 作用을 유발하는 측면을 지니고 있으므로 aflatoxin이 함유된 飮食物이나 음용수, 飼料 등을 무독화 시키는데 사용되어서는 안된다는 각별한 주의가 필요하다.

IV. 結 論

實驗室 廢水中의 aflatoxin 감소를 위하여 化學的 處理를 시도하고 immunoaffinity HPLC로써 aflatoxins를 분석하였다. 초기 시료의 aflatoxin 함량은 B₁, B₂, G₁ 및 G₂가 각각 3.26 ppb, 7.64 ppb, 6.83 ppb 및 11.39 ppb로서 總 aflatoxin 함량은 29.11 ppb였다. 10% sodium hypochlorite, 28% ammonium hydroxide, 5% sodium hydroxide, 5% sodium bicarbonate, 0.1% hydrochloric acid, 5% hydrogen peroxide 및 5% acetone을 사용하여 2시간 동안 처리한 結果 10% sodium hypochlorite가 가장 좋은 效果를 나타내었다(p<0.05). Sodium hypochlorite 농도별로 aflatoxin 감소를 비교한 結果 1%에서 B₂, G₁ 및 G₂에 대하여 유의한 감소를, 그리고 3%에서 B₁에 대하여 유의한 감소를 나타내었으며(p<0.05), 5% 이상에서는 더 이상의 유의한 감소는 나타나지 않았다. 5% sodium hypochlorite로써 處理 時間別 비교를 한 結果, 48시간에 B₂, G₁ 및 G₂가 그리고 72시간에 B₁이 검출되지 않았다.

參考文獻

- 1) Anon, Mycotoxins, Environmental health criteria 11, world Health Organization, Geneva (1979).
- 2) Smith, J. E. and Moss, M. O., Mycotoxins, formation, analysis, and significance, John Wiley and Sons Ltd., New York (1985).
- 3) Paulsen, M. R., Brusewitz, G. H., Clary, B. L., Odell, G. V. and Pominski, J., Aflatoxin content and skin removal of Spanish peanuts as affected by treatments with chemicals, water spray, heated air, and liquid nitrogen, *J. Food Sci.* **41**, 667-671 (1976).
- 4) Buchanan, R. L. Jr. *et al.*, Effect of sodium acetate on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999, *J. Food Sci.* **41**, 128-132 (1976).
- 5) Hagler, W. M. Jr., Hutchins, J. E. and Hamilton, P. B., Destruction of aflatoxin in corn with sodium bisulfite, *J. Food Prot.* **45**, 1287-1291 (1982).
- 6) Draughon, F. A. and Childs, E. A., Chemical and biological evaluation of aflatoxin after treatment with sodium hypochlorite, sodium hydroxide and ammonium hydroxide, *J. Food Prot.* **45**, 703-706 (1982).
- 7) Price, R. L., Lough, O. G. and Brown, W. H., Ammoniation of whole cottonseed at atmospheric pressure and ambient temperature to reduce aflatoxin M₁ in milk, *J. Food Prot.* **45**, 341-344 (1982).
- 8) Norred, W. P., Ammonia treatment to destroy aflatoxins in corn, *J. Food Prot.* **45**, 972-976 (1982).
- 9) Applebaum, R. S. and Marth, E. H., Inactivation of aflatoxin M₁ in milk using hydrogen peroxide and hydrogen peroxide plus riboflavin or lactoperoxidase, *J. Food Prot.* **45**, 557-560 (1982).
- 10) Samarajeewa, U., Sen, S. C., Fernando, S. Y., Ahmed, E. M. and Wei, C. I., Inactivation of aflatoxin B₁ in corn meal, copra meal and peanuts by chlorine gas treatment, *Fd Chem. Toxic.* **29**, 41-47 (1991).

(Received August 12, 1992)