



모니터링을 이용한 Slide Culture 곰팡이 시험법 검증

이희숙 · 박건상 · 신영민 · 이명자 · 임종미 · 유현정 · 김기현 · 조대현 · 김대병 · 김옥희*

부산지방식품의약품안전청 시험분석센터 식의약품분석팀

Verification of Mold Determination Method using Slide Culture by Monitoring

Hee Sook Lee, Kun Sang Park, Yeong Min Sin, Myung Ja Lee, Jong Mi Lim, Hyun Jeong You,
Ki Hyun Kim, Dae Hyun Cho, Dai Byung Kim, and Ok Hee Kim*

Busan Regional Korea Food & Drug Administration

(Received July 3, 2007/Accepted September 5, 2007)

ABSTRACT – Koji is steamed rice that has had koji-kin, or koji mold spores, cultivated onto it. The isolation, culture, and microscopic examination of molds in the koji require the use of the selective media and special microscopic slide techniques. If simple wet mount slides of molds were attempted, it became apparent that wet mount slides made from mold colonies usually don't reveal the arrangement of spores that is so necessary in identification. The process of merely transferring hyphae to a slide breaks up the hyphae and sporangiophores in such a way that identification becomes very difficult. The slide culture method is superior to wet mounts in that the hyphae, sporangiophores, and spores remain more or less intact when transferred. The procedure that will be used to produce a mold culture on a slide that can be observed directly on the slide. We investigated the contamination rate of *Penicillium* spp. on the 21 kinds of koji distributed at Korea. The contamination rate of *Penicillium* spp. were not detected at 21 products by slide culture method. These results will be used to reestablish a mold determination of koji and food in Food Additives Code.

Key words: slide culture, mold determination, microscopic features, *Penicillium* spp., koji

진균들은 주정생산이나 향생제, 면역 억제제 같은 이차 대사산물을 공급하기도 하지만, 작물 농업의 소실과 인체 감염을 통해 병을 일으키기도 한다. 최근 *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* 속 등의 Mycotoxin 생산 곰팡이들이 많이 알려지면서 식품첨가물의 안전성에 관한 소비자의 관심이 높아지고 있다. 우리나라의 전통발효식품의 기초가 되는 국, 중국 등(*Aspergillus*속, *Rhizopus* 속 등의 곰팡이류를 자연적 또는 인위적으로 번식시켜 제조)에서 잡균을 판단하는 곰팡이 시험법이 세균의 분리동정과 같은 방법으로는 확인이 어려워 새로운 분리배양 방법의 설정이 필요한 실정이다.

1990년대 들면서, 곰팡이류는 의학적으로 또는 농학적으로 중요한 종들의 분류 및 동정이 여러 분자유전학적인 방법을 이용하여 시도되고 있으나, 그 수가 아직 미미한 상태이며 대부분의 종들의 경우 형태학적인 방법에 의한

분류 및 동정이 유일한 수단인 상태이다. 또한, 종 동정을 시도할 때 참고할 기존 문헌들이 형태적인 특징들에 의존하고 있어서, 분자유전학적인 방법을 시도할 때에도 형태학적인 관찰은 종 동정의 마지막 단계로서 필수적으로 요구되고 있다.¹⁻³⁾

형태학적인 종 동정은 균사 및 집락의 색깔, 포자의 모양과 색깔 크기, 정낭 및 경자의 형태, 격벽의 유무, 자실체의 크기, 표면 상태, 색깔, 모양 등에 따라 Ainsworth 분류법, Kendrick and Carmichael 분류법, Barron 분류법, Barnett 분류법, Thom and Raper 분류법, Thom and Fennel 분류법에 의해 현미경으로 확인되고 있다.⁹⁻¹⁴⁾

분자유전학적 종 동정은 여러 유전자를 이용할 수 있으나, 현재 전세계적으로 축적되어 있는 데이터베이스가 Ribosomal RNA 유전자의 ITS(Internal transcribed spacer) 및 Large ribosomal RNA의 D1-D2 부분에 대하여 이루어져 왔기 때문에, 이 두 부분을 기본 단위로 염기서열을 분석한다. 종 다양성을 보기 위해서든지 아니면 이 두 부분의 염기서열이 종 수준을 구별할 정도로 변이가 안 일어난 분류군의 경우에는 RFLP(restriction fragment length polymorphism), AFLP(Amplified fragment length poly-

*Correspondence to: Ok Hee Kim, Center for Food & Drug Analysis, Busan Regional Korea Food & Drug Administration 123-7, Yongdang-Dong, Nam-Gu, Busan, Korea
Tel: 82-32-450-3251, Fax: 82-32-442-4622
E-mail: kimkfd@kfd.go.kr

Table 1. Slide culture method

- ① Petri dish에 멸균된 filter paper를 놓는다.
- ② Filter paper 위에 멸균된 U자형 유리봉을 놓는다.
- ③ Filter paper에 멸균증류수를 충분히 붓는다.
- ④ U자형 유리봉에 멸균된 slide glass를 놓는다.
- ⑤ Slide glass 위에 5 mm의 정방형으로 잘라진 Sabouraudès agar, Emmon's 배지, PDA 배지를 놓는다.
- ⑥ Agar block의 양쪽 모서리에 mold colony로부터 포자를 접종한다.
- ⑦ Agar block 위에 멸균된 cover glass를 덮는다.
- ⑧ Petri dish cover를 덮어서 실온(20-25°C)에서 48시간동안 배양한다.
- ⑨ 48시간후, 성장이 일어나면 균사체와 포자를 관찰할 수 있을 것이고, 성장이 완전하지 않다면 추가로 24-48시간동안 배양후 관찰하여야 한다.

morpism) 등의 방법을 이용한 DNA finger printing 방법을 사용하기도 한다. 그러나, 이러한 방법들은 비교 대상 균주 들을 모두 함께 실험해야 한다는 단점을 가지고 있다. 또한 분류군의 범위가 분류군마다 다른 경우가 많아서 *Penicillium* 같은 속은 다른 종이라도 ITS, D1-D2부분이 100%동일해서 더 빠른 진화속도를 가진 유전자나, 형태학적인 방법을 함께 병행해야하는 경우도 있다.^{15,16)}

따라서 본 연구에서는 분생자병의 형태, 정낭 및 경자의 형태, 격벽의 유무, 분생자의 형태 및 색깔 등의 관찰이 용이한 slide culture법을 식품첨가물공전의 국의 잡균 시험법과 비교 검토하고, 국내 중국에 대한 모니터링을 실시하여 시험법을 검증하고, 곰팡이 시험법 개정의 기초자료로 활용하고자 한다.

재료 및 방법

식품첨가물공전의 국, 중국의 잡균(*Penicillium*속) 시험법과 확립된 시험법 비교

식품첨가물공전 중 국의 잡균 시험법 - 국, 중국 0.15~0.2 g을 취하여 미리 살균한 액체배지(300 ml 삼각플라스크에 물 55 ml, 제일인산칼륨 0.025 g 및 덱스트린 1 g을 가하여 솜으로 막개한 다음 압력 15 psi로 20분간 고압살균한다)에 넣고 30° 항온기에서 5일간 배양한 후 현미경으로 관찰할 때, 잡균(*Penicillium*속)은 음성이어야 한다. 단, 잡균(*Penicillium*속)에 대한 판정은 30° 항온기에서 5일간 배

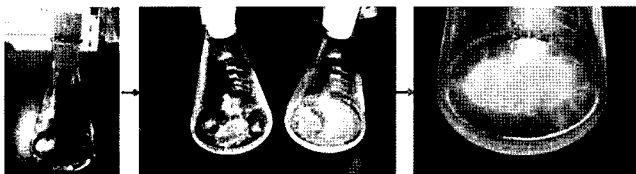


Fig. 1. The determination of *Penicillium* spp. contamination from koji by Food Additives Code.

양한 후 현미경으로 관찰할 때 푸른곰팡이(*Penicillium*속)가 확인되면 양성, 푸른곰팡이가 확인되지 않으면 24시간 더 배양하여 현미경으로 관찰할 때 푸른 곰팡이가 확인되면 양성, 확인되지 않으면 음성으로 한다(Fig. 1).

곰팡이 순수분리를 위한 slide culture 시험법 - 곰팡이의 분리, 배양 및 현미경관찰에는 적절한 선택배지와 특별한 현미경적인 슬라이드 기술이 필요하다. 만약, 곰팡이에서도 일반적인 slide 도말방법을 사용한다면, 곰팡이 확인에 필수적인 포자의 배열의 확인이 어렵다. 균사체를 slide에 옮기는 과정에서 균사(hyphae)나 포자낭병(sporangiophores)이 흐트러져 곰팡이 종류 확인이 어렵게 한다. Slide culture법은 일반 평판도말법에 비해서 균사, 포자낭병 및 분생자병의 관찰이 용이하였다. 곰팡이 분리배양에 사용되어 지는 배지는 potato dextrose agar, sabouraudès agar, cornmeal agar 및 Czapek solution agar가 사용되어진다.³⁾ 실험과정은 slide 위에서 직접 곰팡이 배양이 가능하도록 멸균된 PDA배지 조각(정방형, 5 mm)에 곰팡이 colony로부터 포자를 접종하였다. 접종된 slide를 수분이 공급된 petri dish에 넣어서 20~25°C에서 배양하면서 현미경 관찰을 실시한다.¹⁷⁾ 배양 1일 후부터 균사생성방법, 포자의 생성여부, 포자낭병의 형태 및 분생자병의 생성을 관찰하면서 푸른곰팡이(*Penicillium*속) 오염여부를 확인한다. 과정을 간단히 요약하여 도식화하면 Table 1, Fig. 2와 같다.

Slide culture법을 이용한 대표적인 곰팡이의 형태학적 관찰

확립된 slide culture법이 *Penicillium* 속 외의 곰팡이 균주의 형태학적 관찰에도 유용하게 이용될 수 있는지 검토하기 위해 식품관련 대표적 곰팡이를 문헌조사하고, Korean Collection for Type Cultures (KCTC)에서 각 곰팡이 종을 분양받아 slide culture를 이용하여 현미경 특징을 관찰하였다.

식품에 관련된 대표적 곰팡이 중에서 곰팡이 생산균주들을 중심으로 *Aspergillus*속(5종), *Penicillium*속(6종), *Rhizopus*

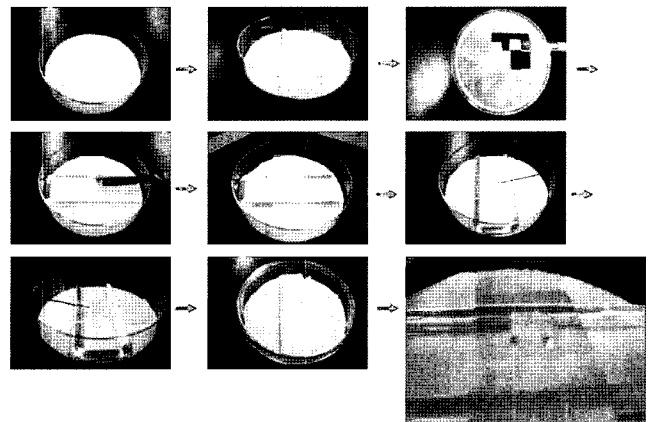


Fig. 2. The process of slide culture.

Table 2. Culture condition of fungi strains

순번	KCTC 번호	균주명	최적배지	최적배양온도(°C)
1	6905	<i>Aspergillus flavus</i>	Potato dextrose Agar	24
2	6909	<i>Aspergillus oryzae</i>	Potato dextrose Agar	24
3	6911	<i>Aspergillus niger</i>	Potato dextrose Agar	24
4	6926	<i>Scopulariopsis brevicaulis</i>	Potato dextrose Agar	24
5	6928	<i>Penicillium chrysogenum</i>	Malt extract Agar	24
6	6940	<i>Rhizopus oryzae</i>	Potato dextrose Agar	26
7	6945	<i>Rhizopus oryzae</i>	Potato dextrose Agar	26
8	6951	<i>Trichoderma viride</i>	Potato dextrose Agar	24
9	6953	<i>Trichothecium roseum</i>	Potato dextrose Agar	26
10	6990	<i>Penicillium citrinum</i>	Potato dextrose Agar	24
11	6015	<i>Aspergillus versicolor</i>	Oatmeal Agar	24
12	6062	<i>Rhizopus oryzae</i>	Potato dextrose Agar	26
13	6080	<i>Penicillium roquefortii</i>	Potato dextrose Agar	24
14	6102	<i>Penicillium camembertii</i>	Potato dextrose Agar	26
15	6121	<i>Monascus purpureus</i>	Potato dextrose Agar	24
16	6165	<i>Mucor hiemalis</i>	Potato dextrose Agar	24
17	6166	<i>Bipolaris sacchari</i>	Potato dextrose Agar	24
18	6171	<i>Cladosporium fulvum</i>	Potato dextrose Agar	24
19	6174	<i>Rhizopus oryzae</i>	Potato dextrose Agar	26
20	6195	<i>Geotrichum candidum</i>	YM Agar	25
21	6437	<i>Penicillium italicum</i> var <i>italicum</i>	Potato dextrose Agar	24
22	6405	<i>Penicillium islandicum</i>	Potato dextrose Agar	24
23	6376	<i>Aspergillus sojae</i>	Potato sucrose Agar	24
24	6529	<i>Paecilomyces variotii</i>	Malt extract Agar	25
25	16776	<i>Nigrospora sphaerica</i>	Potato dextrose Agar	25
26	26019	<i>Verticillium biguttatum</i>	Potato dextrose Agar	24
27	6158	<i>Fusarium avenaceum</i>	Potato sucrose Agar	24
28	6492	<i>Alternaria mali</i>	Corn meal Agar	24

속(4종)등 16속 28종을 분양받아 관찰하였으며, 각 균주의 최적배지와 배양온도는 Table 2와 같다.

국내 유통되는 곡자, 입국 모니터링으로 잡균(*Penicillium* 속)의 오염실태조사

새로운 시험법을 이용하여 수입 또는 국내 유통되는 곡자, 입국 등을 수거하여 황국, 백국 등과 잡균의 형태학적 특징 및 미세구조를 비교하여 잡균의 오염실태를 조사하였다.

결과 및 고찰

식품첨가물공전의 국의 잡균시험법과 확립된 곰팡이 시험법과 비교 검토

곰팡이가 호기성이기 때문에 식품첨가물 공전의 시험법으로 배양하면, 액체배지 표면에 퍼서 자라 있는 것을 관찰할 수 있다. 또한 현미경 관찰을 위해 곰팡이 colony로부터 slide에 도말하였을 경우, 균사의 형태, 포자의 형태 배열, 포자낭병의 형태가 깨어져 관찰되는 포자가 황국과 백국의 *Aspergillus*속에서 유래한 것인지, *Rhizopus*속인지 또는 잡균인 *Penicillium*속에서 유래된 포자인지를 전혀 확

인하기 어려웠다. 액체 배양상에서 관찰되는 균총의 색깔로 어느 정도 짐작할 수는 있으나, 같은 종이라 할지라도 배양 조건(온도, 영양상태 등)에 따라 다른 색깔을 나타낼 수 있으므로 절대적인 관찰법이라 할 수 없다. 대표적인 황국에서 잡균오염여부를 확인한 결과 현미경적 특징은

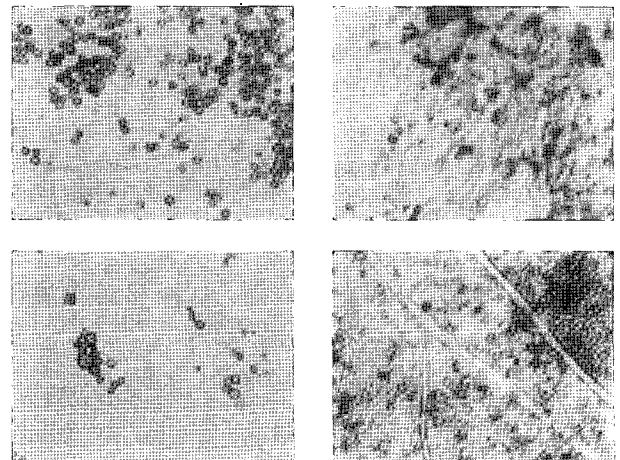


Fig. 3. The microscopic observation of koji by Food Additives Code Method.

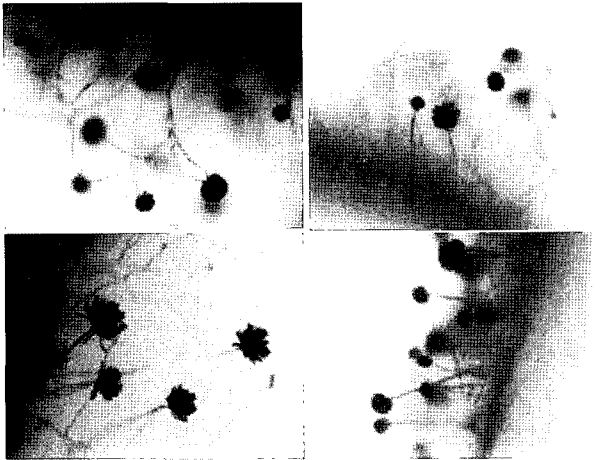


Fig. 4. The microscopic observation of koji by slide culture method.

Fig. 3과 같으며, 포자가 균사와 분리되어 형태가 흐트러져 있어 잡균 오염여부의 판단이 어려웠다.

이와는 달리, Slide culture 방법을 이용한 경우 슬라이드 상의 Agar block에서 대략적인 특유의 균층 색깔이나, 향기, 색소분비 등을 관찰할 수 있어 황국에서 푸른색의 잡균의 오염여부를 육안으로 확인하는데 용이하였다. 또한 현미경으로 관찰했을 때는, 분생자와 분생자병, 포자와 포자낭병 및 균사 등의 형태가 삼차원적인 원형을 유지하고 있어 형태학적인 차이를 보이는 황국과 잡균 즉, *Penicillium*속 오염여부를 쉽게 확인할 수 있을 것이다(Fig. 4).

황국의 현미경상의 특징을 살펴보면, 전형적인 누룩곰팡이 형태를 보여주고 있으며 국의 잡균인 *Penicillium* 속의 곰팡이와는 다른 형태를 확인할 수 있었다. 이 새로운 시험법인 슬라이드 배양이 곰팡이의 형태학적 특징인 포자낭병의 형태, 분생자의 형태, 정낭 및 경자의 형태 및 격벽의 유무 등의 관찰에 용이한 방법임을 알 수 있었고, 식품첨가물공전의 이물(곰팡이)시험법으로 적용가능성을 확인하였다.

Slide culture법을 이용한 대표적 곰팡이의 형태학적 관찰

본 slide culture법이 일반적 곰팡이의 형태학적 관찰에도 적합한지 알아보기 위해, 분양받은 각 균주를 PDA배지를 포함한 최적 배지상에 3점 접종하여, 최적 배양 온도에서 2-7일간 배양하면서 집락의 특징 (plate상의 surface color, backside color)을 관찰하였다(Fig. 5). 또한, Slide culture법을 이용하여 배양 1일후부터 현미경으로 관찰하였고, microscopic features인 포자의 형태, 색깔, 격벽의 유무 및 분생자병 등의 미세구조를 관찰하였으며, 이를 바탕으로 곰팡이 분류에 이용할 수 있다.

Slide culture를 이용하여 *Aspergillus*속(5종), *Penicillium*속(6종), *Rhizopus*속 등 10속 19종을 관찰하였으며 그 중

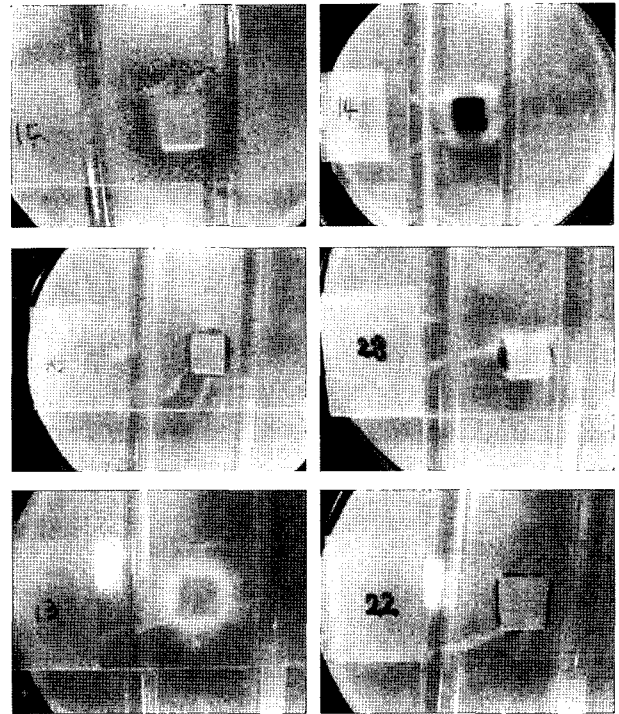


Fig. 5. The features of fungi colony on the slide culture.

에서 몇몇의 형태학적 관찰시 균의 특징은 다음과 같다.¹⁷⁻²⁰⁾

Aspergillus oryzae - Colony는 간혹 띠 모양의 반문이 있으며 균사는 격벽이 있고 보통 무색 분지상 균사로 된다. 영양균사는 기질에 침투하며 생식균주는 공기 중에 신장한다. 현미경으로 포자 관찰시 포자의 모양은 공중으로 곧게 선 균사의 끝이 부풀어있는 머리 모양의 표면에 작

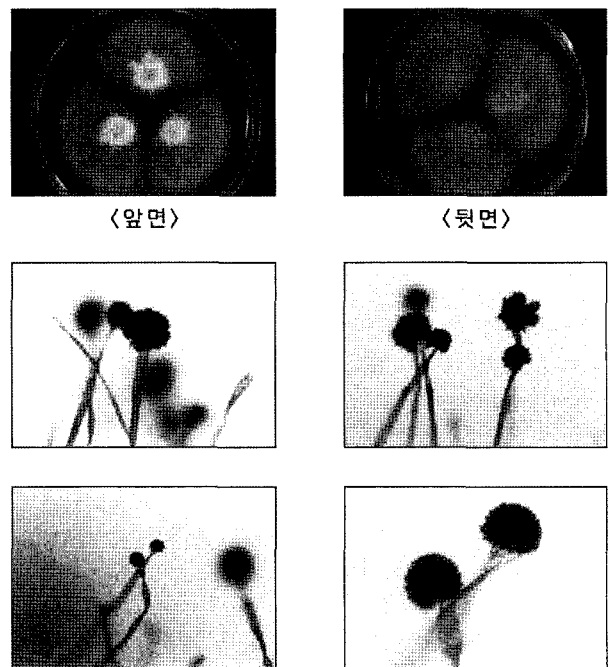


Fig. 6. Microscopic appearance and culture of *Aspergillus oryzae*.

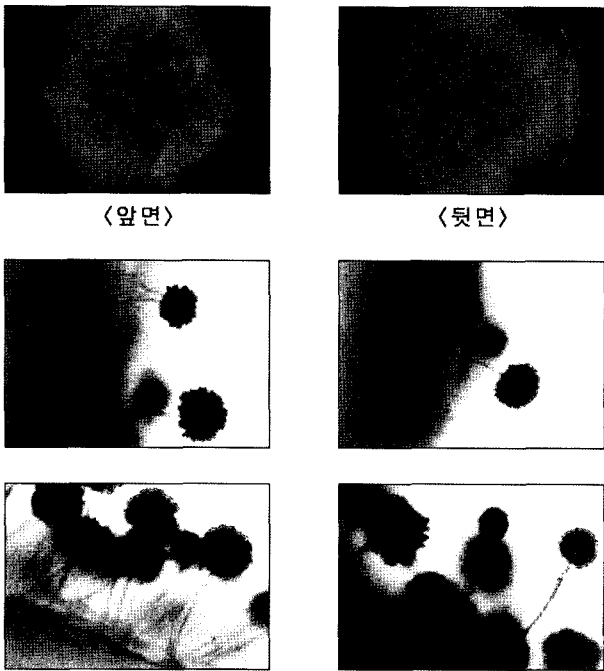


Fig. 7. Microscopic appearance and culture of *Aspergillus niger*.

은 알갱이가 조밀하게 보인다. 분생자는 일반적으로 녹색, 갈색 내지 흑색이다.

균총의 색깔이 백색에서 황색으로 되며 오래되면 황녹색으로 변한다.^{3,4)}

Aspergillus niger - 포자는 흑색, 흑갈색 또는 자갈색을 띠고, 경자는 보통 2단이다. 많은 균주는 균핵(Sclerotia)을

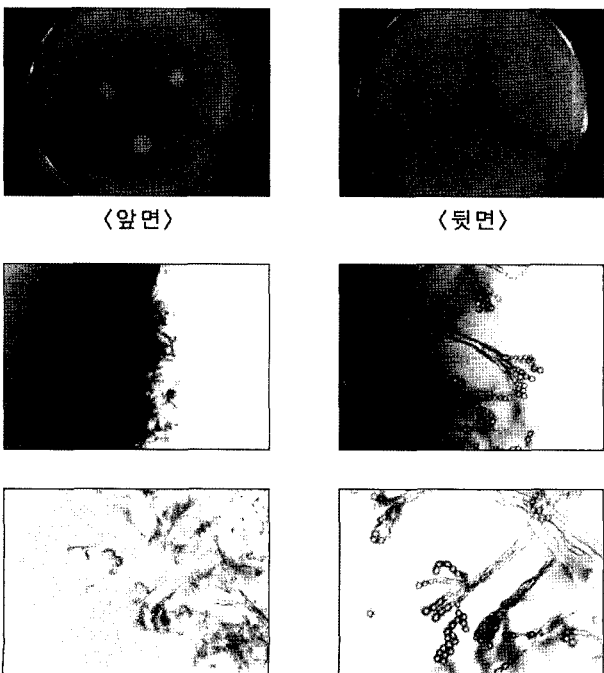


Fig. 8. Microscopic appearance and culture of *Penicillium roquefortii*.

형성하며 회색, 흑색을 나타낸다. 집락의 형태는 양모 같 으며, 초기 백색 내지 황색, 점차 흑색, 뒷면은 백색에서 황색을 띤다. 현미경적 특징은 정낭전체에 두 줄의 분생 자가 방사형으로 배열되어 있다.^{3,4)}

Penicillium roquefortii - 배양시 치즈 특유의 녹색반점을 형성하며 비대칭형의 빗자루 추상체(penicillus)모양을 가진다.^{3,4)}

Rhizopus oryzae - 배양 특성은 회백색의 균총을 형성하며 전분당화력 및 유기산 생성능이 뛰어나다. 포복지가 옆으로 뻗으며 빠른 속도로 증식한다. Sabouraud dextrose agar에서 실온에 배양했을 때 백색이며 조밀하고 솜털모양의 기증균사를 빠르게 형성한다. 시간이 지나면서 갈색 또는 흑색의 포자낭이 된다.

현미경적 관찰시 균사는 무격벽이며, Stolon 및 rhizoid를 갖는다. 포자낭병은 가근이 발생하는 node로부터 신장한다. 포자낭은 크고 보통 흑색이다. 많은 솜털 모양의 균사체가 발달하며 Perti dish를 가득차게 한다.^{3,4)}

Bipolaris sacchari - 집락 증식 속도가 빠른 배양 특성이 있으며, 집락표면의 색은 처음엔 회색빛 갈색에서 점차 검게 변한다. 뒷면은 또한 검정색을 띤다. 주변에 회색빛을 띄며 표면이 검다.

현미경적 관찰시 균사는 격벽을 가지며 갈색을 띤다. 분생자는 갈색의 단순하거나 가지형을 가진다. 대분생자가

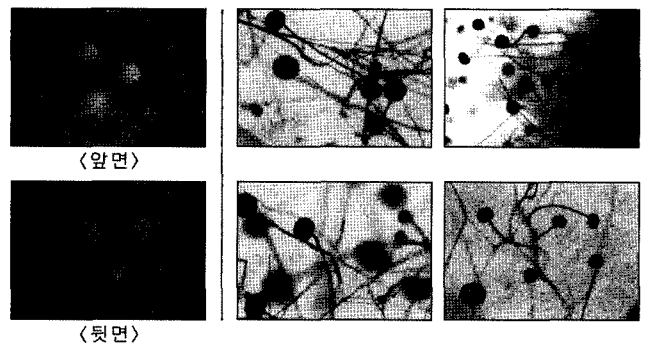


Fig. 9. Microscopic appearance and culture of *Rhizopus oryzae*.

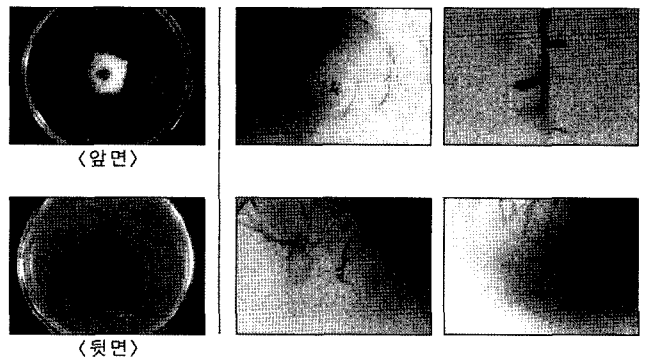


Fig. 10. Microscopic appearance and culture of *Bipolaris sacchari*.

보인다.²⁾

Geotrichum(Oospora) candidum - 백색 내지 크림색의 생육을 나타낸다. 배양 4일만에 성숙한 집락으로 신속발육하며, 25°C에서 어린 집락은 백색, 습윤한 집락이며 쉽게 뒤틀 수 있다. 점차 가장자리로 부터 균사가 형성되어 잔디 모양을 나타낸다. 일부 균주는 짧은 솜털모양의 백색 기증균사를 형성한다.

현미경적 관찰시 균사는 격벽을 갖고 보통 분기되어있다. 가성균사 없이 진성균사만 형성하며 다양한 크기(4~10 μm)의 장방형으로 분절된 분절포자가 보인다.²⁾

Trichothecium roseum - 배양 특성은 양모상의 백색, 황록색, 녹색 colony로 흰색에서 분홍색의 표면을 나타낸다.

현미경적 관찰시 두가지 세포로 이루어진 분생자를 가지며 균사는 격벽이 있고, 성숙균체는 녹색이다. 분생포자가 경자 끝에 덩이를 이루면서 착생한다.²⁾

Mucor hiemalis - 배양 특성은 털곰팡이로 균사가 공기중으로 길게 뻗어 솜털 같은 집락을 형성한다. 무성생식으로 포자낭포자를 형성하고 유성생식으로 접합포자를 형성한다. 접합균류에 속한다.

현미경적 관찰시 균사가 털 모양의 검은색이다. 포자낭병이 균사 임의 부위에서 발생하며 균사 곳곳에 포자낭을 형성한다. 기균사가 포자낭병으로 변화한다. 한 부위

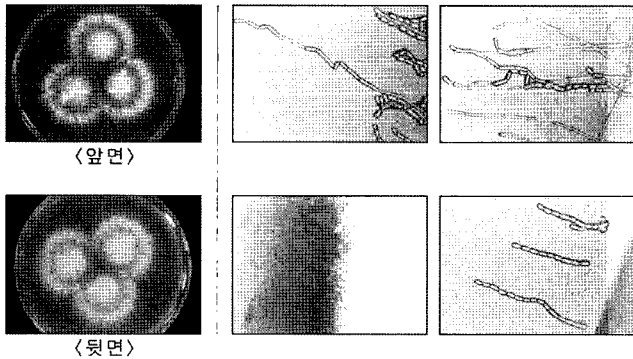


Fig. 11. Microscopic appearance and culture of *Geotrichum (Oospora) candidum*.

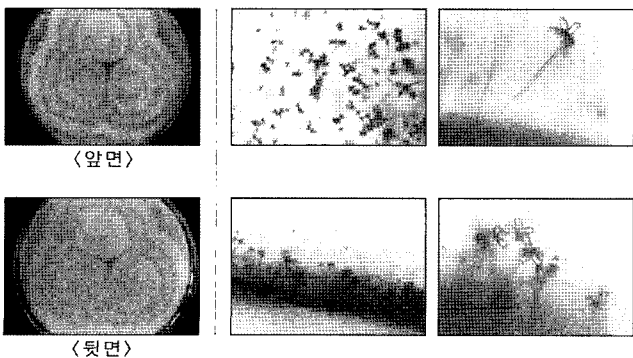


Fig. 12. Microscopic appearance and culture of *Trichothecium roseum*.

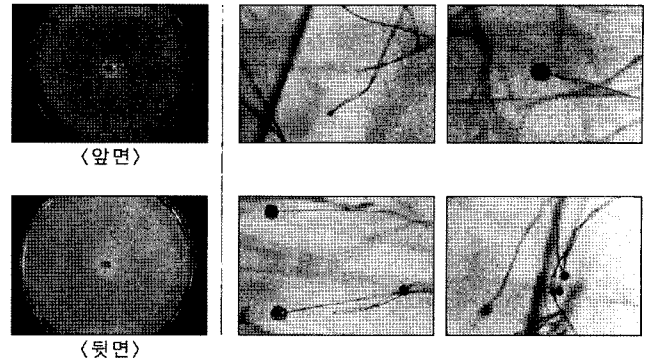


Fig. 13. Microscopic appearance and culture of *Mucor hiemalis*.

에서 한 개만 형성하며, 분지도 가능하다. 포복지와 가근이 없다.^{1,3,4)}

최적 배지상에서의 집락의 특징과 slide culture에서의 현미경 관찰을 통해서 대표적 곰팡이의 구별이 가능하였으며, 이는 slide culture 방법이 국, 중국에서의 잡균 (*Penicillium spp.*) 뿐만 아니라, 식품에서의 곰팡이 이물검사 등에도 이용될 수 있음을 보여준다.

국내 유통되는 곡자, 입국을 모니터링하여 잡균 (Penicillium 속)의 오염실태 조사

우리나라의 발효식품 (양조곡주, 장류 등) 제조에 필요한 국인 *Aspergillus*속의 자연계에 흔히 존재하는 *Penicillium*속이 오염되면, 맛과 풍미가 떨어질 뿐 아니라 종에 따라 곰팡이 독소를 생산하여 체내에 치명적인 영향을 미칠 수 있다. 이를 방지하기 위해 식품첨가물의 국에서의 *Penicillium*속 오염여부를 정확히 판단하는 것이 중요하다. 따라서, 국, 중국에서 잡균을 더 용이하고 정확하게 구별하기 위해 본 연구에서 확립된 slide culture법의 유용성을 파악하고자 모니터링을 실시하였다.

국내에서 제조되거나 수입된 곡자, 입국을 시중에서 이상수거 또는 무상 분양받아 총 21건에 대해 slide culture 시험법을 이용하여 잡균의 오염실태를 조사하였다. 기존의 식품첨가물의 잡균 시험법과는 달리 곰팡이 미세구조의 형태적 관찰이 용이함을 확인하였다. 그 결과는 Table 3과 같았다(*Penicillium spp.* 검출율 = 0%).

Slide culture를 이용한 국내에 유통되는 대표적 국, 중국의 형태학적 관찰은 Fig. 14와 같다. Fig. 14(A)는 백국, (B)는 황국, (D)는 *Rhizopus*속이 단일 접종된 국, 중국을 배양한 것이고, (C)는 *Aspergillus* 속과 *Rhizopus* 속이 혼합접종된 중국을 배양한 것이다. 같은 slide culture 상에서 확연히 다른 두 속이 함께 배양되어 있음을 관찰할 수 있다. 이것은 국, 중국에서 잡균(*Penicillium*속) 또한 쉽게 구별할 수 있음을 의미한다.

결과적으로, 본 연구에서 확립된 slide culture법은 현미경 상에서 포자나 포자생성과정을 관찰할 수 있어, *Penicillium*

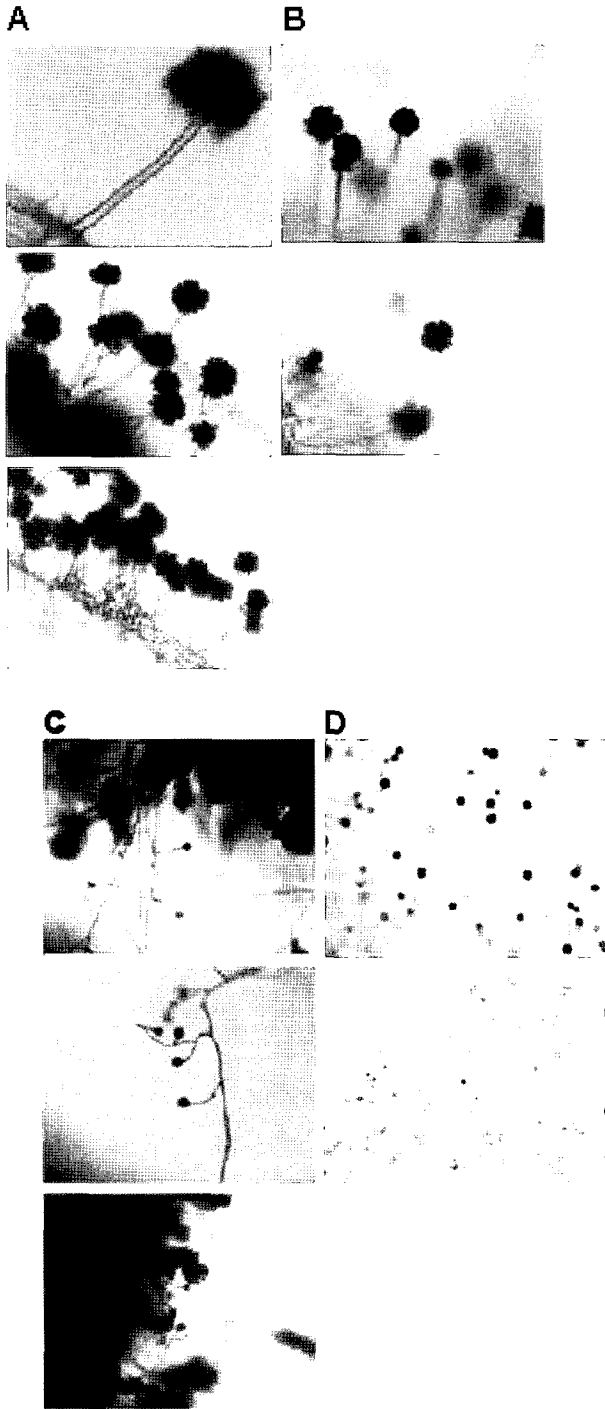


Fig. 14. Microscopic appearance of *Aspergillus kawachii*(A), *Aspergillus oryzae*(B), *Rhizopus* 속 and *Aspergillus* 속 (C), *Rhizopus* 속 (D) from koji, using slide culture method.

속의 오염을 확인하는데 적합한 방법임을 확인하였다. 또한 시중에 유통되고 있는 곡자, 입국의 모니터링을 실시한 결과 *Aspergillus*속과 *Rhizopus*속을 관찰할 수 있었고 *Penicillium*속의 오염은 관찰되지 않았다.

현재 곰팡이 분류에 있어 sequencing²¹⁾을 이용하는 방법이 많이 보고되고 있으나 많은 시간이 요구되며 최종적인

Table 3. The detection of *Penicillium* spp. contamination on the 21 kinds of koji distributed at Korea

순번	제품명	수거 건수	<i>Penicillium</i> spp. 검출 여부
1	황국/JM사	1	음성
2	누룩, 백국/CM(주)	2	음성
3	누룩/HK 연구소	1	음성
4	입국/SK(주)	1	음성
5	누룩/JSY(주)	1	음성
6	Konno Moyashi/DS(주)	5	음성
7	<i>Asp. oryzae</i> /CS(주)	1	음성
8	누룩/KSD	1	음성
9	재래누룩, 백국, 바이오누룩, 개량누룩	4	음성
10	누룩/JJ	3	음성
11	누룩/KJ(주)	1	음성
합계		21건	

확인 은 결국 형태학적 관찰에 의존한다. membrane 등의 재료와 새로운 장치를 이용하여 고배율이나 염색을 통해서도 곰팡이 형태의 in situ microscopic examination이 가능함이 보고되고 있으며²²⁾, 배지에 따른 균사나 포자 형태 등에 대한 논문들이 보고되고 있어^{23,24)}, 앞으로 본 연구의 slide culture법에도 적용하여 보완해 나갈 수 있을 것이다.

Slide culture 이용한 곰팡이의 형태학적 분류는 식품제조 과정 중이나, 보관 중에 오염되어 인체에 유해할 수 있는 곰팡이를 사전에 검출하여 위해물질로부터 안전을 지키는데 도움이 될 것이다. 또한 이러한 곰팡이 이물 검사법을 통해 국외, 국내 식품에서 곰팡이 검사가 활성화되도록 유도하고 식품안전성 확보 및 관리 방안 수립에 기초자료로 이용되게 하고자 한다.

식품 중의 곰팡이를 신속 정확히 분리, 동정할 수 있는 슬라이드 배양법은 앞으로 곰팡이 독소 생성 곰팡이의 분리, 분류, 생성억제 방지와 체계적인 모니터링, 고춧가루 내의 곰팡이 연구 등에 많은 도움이 될 것으로 사료된다.

식품 중 곰팡이의 분리 동정을 신속, 정확하게 할 수 있는 slide culture법에 대한 지속적인 연구수행으로, 앞으로 곰팡이 독소연구와 곰팡이 독소의 독성평가, 곰팡이 독소 오염 예방 대책수립에 도움이 될 것이고, 고춧가루 내의 곰팡이검사와 곡류 중의 밀기울을 최근 건강 보조식품에 사용하는 경우가 있으므로 곡류를 사용한 건강보조식품에 대한 모니터링에서도 곰팡이의 형태학적 관찰이 필요할 것으로 사료된다.

요 약

우리나라의 전통발효식품의 기초가 되는 곡자는 낱곡류에 *Aspergillus*속, *Rhizopus*속 등 곰팡이류, 효모 및 기타 미생물이 자연적으로 번식하여 효소를 함유하는 것이고,

입국은 곡류를 증자한 후 *Aspergillus*속, *Rhizopus*속 등 곰팡이를 번식시켜 효소를 함유하는 것이다. 식품첨가물공전 천연첨가물 중 국(입국) 시험항목에서 잠균(*Penicillium*속)의 오염확인이 어려워 새로운 곰팡이 시험법의 확립이 필요하다. 그래서 곰팡이 특유의 포자, 분생자병 또는 균사의 격벽유무 등의 관찰이 용이한 slide culture법을 확립하였다. Slide culture 법은 slide glass 위에 정방형의 잘라진 배지를 놓고, 양쪽 모서리에 포자를 접종하고 배양되는 과정동안 포자, 균사체 및 격벽 등을 관찰하였다. Slide culture법을 이용하여 대표적인 식품 관련 곰팡이의 형태학적 특징을 확인하여, 시중에서 유통되는 수입 또는 국내 생산되는 곡자, 입국 등을 수거하여 *Penicillium*속 오염 여부를 모니터링하였으며, 그 결과 *Penicillium*속의 오염율은 0%였음을 확인하였다. 최종적으로 식품첨가물공전의 국 중 잠균시험법 등 곰팡이시험법 제·개정의 기초자료로 활용하고자 한다.

감사의 글

본 논문은 2006년도 식품의약품안전청 연구사업인 “Slide culture을 이용한 곰팡이(mold) 시험법 확립 및 검증” 결과의 일부이며, 연구비의 지원에 감사하는 바이다.

참고문헌

- 고연진, 김기덕, 김병섭: 식물병리학, 월드사이언스, 서울 (2006).
- 김영권, 김태운, 김신무, 김성권: 임상진균학, 고려의학, 서울 (2000).
- 박희문, 신현동, 오덕철, 윤권상, 이종규: 기초균류학, 월드사이언스, 서울, pp. 1-220 (2000).
- 이재동: 균학연구, 균류의 분류, 3판, 구덕인쇄사, pp. 67-89 (1991).
- Lane, D.J., Pace, B., Olsen, G.J., Stahl, D.A., Sogin, M.L. and Pace, N.R.: Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Natl Acad. Sci.*, **82**, 6955-6959 (1985).
- McGinnis, M.R., Current topics in medical mycology, Springer-Verlag, New York (1987).
- Medlin, L.H., Elwood, J., Stickel, S. and Sogin, M.L.: The characterization of enzymatically amplified eukaryotic 16S-like rRNA-coding regions, *Gene*, **71**, 491-499 (1988).
- Meinkoth, J., Wahl, G.: Hybridization of nucleic acids immobilized on solid supports. *Anal. Biochem.*, **138**, 267-284 (1984).
- Ainsworth, G.C., Sparrow and Sussman A.S.: The Fungi; An Advanced Treatise, Vol. a and b, Academic press, New York, (1973).
- An, W.G.: Taxonomic studies of cellulose decomposing Fungi Imperfecti, Pusan National University, (1988).
- Barron, G.L.: The genera of hyphomycetes from soil, Williams and Wilkins company. Baltimore, (1968).
- Barnett, H.L. and Hunter, B.B.: Illustrated genera of Imperfect fungi, Burgess Publishing company. Minneapolis, (1972).
- Kendrick, B.: Taxonomy of fungi imperfecti, University Toronto Press, (1971).
- Raper, K.B., Fennel, D.I.: The Genus *Aspergillus*, Williams and Wilkins company, (1965).
- http://biocc.ngic.re.kr/Biocourse/Biowiki/index.php/RNA_sequence_databases
- 정원진 박사: 곰팡이 분류, http://www.microid.co.kr/lecture/fungi_tax.htm
- Harold J. Benson: Microbiological applications. Fungi: Yeasts and Molds, Slide culture: Molds, 7th Ed. WCB/McGraw-Hill companies, Boston, pp. 40-97 (1998).
- International mycological institute : *Descriptions of Fungi and Bacteria* [Nos. 841-1300(1986-1996)], Kluwer Academic Publishers, England, (1996).
- Miguel Mlloa: Illustrated dictionary of mycology. The American Phytopathological Society, Minnesota, pp. 7-447 (2000).
- Deacon J.W., 한국균학회: 균학개론. 월드사이언스, 서울, pp. 1-50 (1999).
- Guarro, J., Gene, J. and Stchigel, A.M.: Developments in fungal taxonomy. *Clinical Microbiology Reviews*, **12**, 454-500 (1999).
- Barry, D.J., Chan, C., Williams, G.A.: Nitrocellulose as a general tool for fungal slide mounts. *J. Clin. Microbiol.* **45**, 1074-1075 (2007)
- Guinea, J., Peláez, T., Alcalá, L., L., Bouza, E.: Evaluation of Czapeck agar and Sabouraud dextrose agar for the culture of airborne *Aspergillus* conidia. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **53**, 333-334 (2005)
- Jaimez, J., Fente, C.A., Franco, C.M., Cepeda, A., Vázquez, B.I.: Application of a modified culture medium for the simultaneous counting of molds and yeasts and detection of aflatoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Prot.* **66**, 311-318 (2003)