

各種 食品中の 有毒性 真菌에 關한 研究(第5報)

— 食品(穀類)中에서 分離된 *Aspergillus*屬의 生理的 性質에 對하여 —

高春明 · 崔泰周 · 柳 駿

(延世大學校 醫科大學 微生物學敎室)

Studies on the Population of Toxigenic Fungi in Foodstuffs(V)

—Physiological Characteristics of *Aspergillus* spp. Isolated from Foodstuffs—

KOH, Choon Myung, Tae Joo CHOI, and Joon LEW

(Department of Microbiology, Yonsei University College of Medicine)

ABSTRACT

Thirtythree strains of the *Aspergillus* spp. isolated from foodstuffs were observed through some physiological characteristics for detection of identification key of *Aspergillus* spp.

- 1) Each strain of *Aspergillus* spp. had their specific characteristics and could be used for identification of species.
- 2) Excellent amylase-producing fungi were observed among the isolated strains of *Aspergillus* spp.
- 3) Amylase activities increased for one week incubation period.
- 4) In the tests of common characters of aflatoxin-producing fungi, some strains possess the common characters of aflatoxin-producing fungi among the 33 strains of *Aspergillus* spp., for example, conidial size, presence of sclerotia, kojic acid, and pigment production, coloration of phenol, reduction of methylene blue, etc.

緒 論

眞菌類의 分類는 現在까지도 形態學的 및 生理的 諸性質을 基準으로 하여 分類하고 있는 것이 보통이다.

Murakami(1965)等은 麴菌의 分類에 關한 研究中 形態 및 生理的 諸性質을 利用하여 菌의 分類를 試圖하였으며, Raper 및 Fennell(1965)도 形態的 諸性質을 分類의 基準方法의 하나로 삼았다.

柳 및 高(1971)도 上記 方法을 利用하여 *Aspergillus*屬의 生理的 性質을 檢査한 바 있다.

한편, 分離 菌株 中 mycotoxin을 分泌치 않으며, amylase 및 protease의 力價가 높은 菌株의 發見 및 開發은 微生物 工業에서 重要한 問題點이라 생각되며, 이와같은 研究는 여러 學者들에 依하여 行하여졌다고 볼 수 있으며, 現在도 進行중이라 할 수 있다. 또한, 此의 檢査方法 等도 現在 여러 가지 方法이 알려져 있으며 이에 依한 研究 結果 等도 發表되어 있다.

이에, 著者 等은 各種 穀類에서 一次的으로 *Aspergillus*屬으로 分離되어 純粹 培養되고 있는 菌株를 利用하여 生理的 諸性質을 調查하고 아울러 amylase力價가 높은 菌株의 發見과 同時에 이에 對한 몇가지 檢

査를 實施하였던 바 그 結果를 얻을 수 있었기에 여기 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 1. 實驗材料

實驗材料로서는 各種 穀類에서 分離된 70 株中에서 *Aspergillus* spp.로서 分類된 33 株를 使用하였다.

### 2. 實驗方法

#### 1) 總酸量(Total acidity)

50M/l의 Czapek-solution media에 接種하여 20日間 靜置 培養後 이 培養液 10m/l를 採取하여 0.1N NaOH 溶液으로서 滴定하여 測定하였다.

#### 2) Kojic acid

Kojic acid生成用 合成培地를 使用하여 菌接種 15日間 培養한 후 培養液 10m/l에 1% FeCl<sub>3</sub> 1m/l을 加하여 나타나는 色の 濃度를 colorimetric spectrophotometer(Bauch & Lomb, "Spectronic 20" diffraction grating type)로서 600m $\mu$ 에서 optical density (OD)를 測定하였다.

#### Kojic acid production medium

Glucose	100.0gm	CaCl <sub>2</sub>	0.1gm
Peptone	6.0gm	FeCl <sub>2</sub>	0.5gm
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.1gm	NaCl	trace
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.1gm	D.W.	1,000m/l

#### 3) 螢光性(Fluorescence)

3% Glucose含有 Czapek-solution agar slant에서 15日間 培養後 ultraviolet ray (3650Å)로 菌體의 裏面을 照射, 나타나는 螢光을 觀察하여 螢光의 種類를 調査하였다.

#### 4) Amylase力價 測定

Amylase力價 測定方法으로는 Willstätter-Schudel 方法을 變化시킨 柳(1970)等の cork borer 方法을 利用하여 1% 澱粉含有 Czapek-solution 固體 培地에 菌을 接種後 12時間, 1日, 2日, 3日, 4日 및 5日間 1日 間격으로 amylase力價를 測定하였으며, 이는 0.1N-iodine溶液으로서 iodine의 無色帶와 菌體의 크기와의 比로서 測定하였다.

#### 5) Protease力價 測定

Protease力價의 測定方法으로서는 Fuld-Gross方法을 利用하였으며, 0.1% casein 溶液의 2m/l와 protease 生成培地에 2週日間 培養한 培地를 酵素液으로 하여 酵素液을 二培法으로 희석시킨 후 이의 1m/l와 上記 casein液을 混合 38°C 水槽에서 1時間 作用시킨 다음 acetic acid-ethanol液 6滴을 加하여 混濁여부로서 比較 測定하였다.

#### 6) Phenol의 着色反應

Petri-dish에 2週日間 培養한 후 集落表面에 1% hydroquinone이나 pyrogallol의 5 m/l를 撤布하고 直射光線을 피하여 30°C에서 1日 放置후 集落 주변의 培地에 나타나는 色の 濃度로서 表示하였다.

#### 7) Methylene blue (MB)와 triphenyl tetrazolium chloride (TTC)의 還元 能力

##### (a) Methylene blue(MB) 還元力

Czapek-solution agar plate에 培養된 菌體를 cork-borer로서 採取한 후 이를 試驗管에 넣고 0.1 M phosphate buffer(pH 7.4)에 methylene blue가 0.0001% 含有되게 製造한 후, 이 methylene blue 3m/l를 시험관에 加하여 密栓한 뒤 30°C에서 放置, methylene blue溶液의 青色이 完全히 消失되는 時間을 測定하였다.

##### (b) TTC (triphenyl tetrazolium chloride) 還元力

이것 역시 methylene blue 還元力 檢査와 同一한 方法으로 試料를 準備한 후 0.1% TTC 溶液과 上記 0.1 M phosphate buffer 2m/l를 混合한 다음 密栓하여 30°C에서 放置, 菌體 裏面에 紅色이 나타나는데 要하는 時間을 測定하였다.

#### 8) Nitrate還元 實驗

이 實驗도 cork borer로서 採取한 菌體를 試驗管에 넣고 30% acetic acid 溶液에 녹인  $\alpha$ -naphthylamine과 역시 30% acetic acid溶液에 녹인 0.34% sulfanilic acid를 同量으로 混合한 후 이 混合液 4m/l를 시험관에 주입한 다음 80°C에서 2分間 加熱시켜 나타나는 淡紅色의 濃度를 比較 測定하였다.

結 果

1) 總酸量

總酸量에 對한 實驗成績을 보면, 0.1N NaOH溶液 소모량은 每 10ml當 3.0ml 使用된 菌株가 10株로서(30.3%) 首位였으며, 다음이 2.0ml 및 1.5ml 使用 菌株로서의 順位였으며, 1.0ml 使用된 菌株도 1株가 있었다.

2) Kojic acid

Kojic acid에 對한 實驗成績을 보면 總 33株中 菌株番號 63-1 및 5에서  $\Delta OD_{600}^{600}$  0.380으로 首位였으며, 다음이 49-1이 0.325, 40이 0.310의 順序이었고,  $\Delta OD_{600}^{600}$ 의 값이 0.300 以上인 菌株가 6株(18.1%), 0.200의 菌株가 15株(45.4%)로서 大部分이었으며, 0.200 以下の 菌株는 12株(36.3%)이었다.

Table 1. Physiological activities of representative strains

Strain No.	Production			Enzymes		Coloration		Reduction		
	Total acidity (0.1N NaOH ml/10ml)	Kojic acid $\Delta OD_{600}^{600}$	Fluorescence color	Amylase	Protease	Hydroquinone	Pyrogallol	Methylene blue	TTC	Nitrate
2	4.0	0.25	P	180.0	20.0	+++	++	+++++	+++++	-
3	3.5	0.24	G	192.0	40.0	+++	++++	+++	+++	-
4	1.5	0.25	G	0.0	80.0	++++	+++++	+++	-	-
5	4.0	0.38	G	101.8	160.0	+++	++++	+++	+++	-
6	1.5	0.16	G	4.8	160.0	++++	+++++	-	+	-
8	2.5	0.16	BG	232.0	80.0	++	+-	+++	+	-
9	3.0	0.26	G	4.8	80.0	++++	+++++	++++	+++	-
10	3.0	0.31	G	64.8	40.0	++++	++++	+++++	++	-
21	1.2	0.16	G	0.0	160.0	+++	++++	+++	++++	-
23-1	2.0	0.17	BG	83.3	40.0	+++	++++	+++	++	-
23-2	3.0	0.16	G	83.3	160.0	+++	+-	+++++	++++	-
24	3.5	0.25	G	184.0	40.0	++	+-	++++	+++	-
27-1	1.5	0.28	G	34.0	80.0	++	++	+++++	+++	-
27-2	2.0	0.16	G	6.3	40.0	+	-	++++	++	-
28	2.7	0.25	G	48.0	80.0	+++	+-	+	+	-
28-1	2.8	0.16	BG	27.8	40.0	-	++	+	-	-
33	2.4	0.16	G	6.3	20.0	++++	++++	+++++	+++++	-
35	2.5	0.25	BG	129.3	160.0	+++	+-	++	+	-
35-1	2.7	0.24	G	101.8	80.0	+++	+-	+++	++	-
40	5.0	0.31	G	198.0	160.0	++++	++++	-	-	-
42	2.0	0.16	B	48.0	40.0	++++	++++	++	+++	-
42-1	2.5	0.16	BG	27.8	20.0	++	++	++	+++	-
42-2	1.2	0.21	G	48.0	40.0	+++	++++	++++	+++	-
43	3.0	0.26	BG	27.8	40.0	-	++	++	+	-
44	2.0	0.17	G	429.0	80.0	+++	+-	-	+	-
49	3.0	0.16	BG	189.0	80.0	+	+-	++++	+++	++
49-1	1.5	0.33	G	64.0	80.0	++++	+-	+++	++	-
49-2	3.0	0.31	G	174.0	40.0	++++	++++	++++	++++	-
61	5.0	0.26	BG	198.0	20.0	++++	++++	-	+	-
63	1.5	0.25	G	76.0	80.0	++++	++++	-	+	-
63-1	3.0	0.38	G	146.8	40.0	++	+-	+	+	-
64	1.2	0.28	G	27.8	40.0	+++	+-	-	-	-
66	1.5	0.23	BG	87.8	20.0	++++	+-	+++	+	-

P:purple, G:green, BG:bluish green, B:blue.

3) 螢光性

螢光성에 對한 實驗成績을 보면, 靑綠色 (bluish green)과 綠黃色(greenish yellow)을 띄우고 있는 菌株들이 大部分이어서, 청록색을 띤 菌株가 10株(30.3%), 녹색을 띤 菌株가 21株(63.6%)이었고 그 외에 靑色 및 紫色을 나타내는 菌株가 各各 1株씩 있었다.

4) Amylase力價 測定

Amylase力價 測定成績을 보면 33株中 菌株番第 44가 429.00unit로서 首位였으며, 다음 8이 232.00unit, 40 및 61이 198.00 unit이었으며, 大部分의 菌株들이 amylase力價 100~200 unit 사이에 속하고 있었고 (11株), 1~99 unit 사이에 屬하는 菌株가 20株이었으며, amylase力價가 없는 菌株도 2株나 있었다.

특히, 높은 amylase力價를 나타낸 菌株中 菌株番號 44, 40 및 8에 對하여 amylase力價와 培養時間과의 關係를 比較 觀察하였

던 바, 1주일간의 實驗중 時間이 경과하면 서 amylase力價는 增加하는 現象을 나타내었다.

5) Protease力價 測定

Protease力價 測定에 對한 成績을 보면, 實驗 菌株中 7株(21.2%)가 160unit이었으며, 大部分의 菌株가 40~80unit로서 21株 (63.6%)이었으며, 5株(15.1%)는 20unit를 나타내었다.

6) Hydroquinone 및 pyrogallol의 着色反應

Pyrogallol 및 hydroquinone의 着色反應에 對한 실험성적을 보면, 大部分의 菌株들이 pyrogallol 및 hydroquinone에 對하여 착색반응을 나타내었으나, 착색반응을 나타내지 않는 菌株가 pyrogallol에서는 1株 (3.03%), hydroquinone에서는 2株(6.06%)이었다.

7) Methylene blue 및 TTC(triphenyl tetrazolium chloride)의 還元能力

Table 2. Physiological activities of reference strains

Generic Name	Production			Enzymes		Coloration		Reduction		
	Total acidity (0.1N NaOH/16ml)	Kojic acid	Fluorescence color	Amylase activity	Protease activity	Hydroquinone	Pyrogallol	Methylene blue	TTC	Nitrate
<i>Aspergillus flavus</i> ATCC 15517	6.0	0.1	G	190.0	40.0	+++	---	+++	+	-
<i>Asp. oryzae</i> RIB 430	2.1	0.1	B	235.0	40.0	+++	++	-	-	-
<i>Asp. oryzae</i> RIB 1031	4.7	0.1	G	329.0	20.0	+++	+++	-	-	-
<i>Asp. oryzae</i> var. <i>brunneus</i> RIB 1172	2.4	0.1	None	242.0	60.0	+++	+++	-	-	-
<i>Asp. parasiticus</i> RIB 1037	5.8	0.3	G	198.0	80.0	-	-	+++	++++	-
<i>Asp. tamarisii</i> RIB 3005	2.6	0.3	G	192.0	40.0	-	-	++++	++++	-
<i>Asp. parasiticus</i> RIB 1045	7.0	0.1	G	189.0	40.0	+++	+++	-	-	-
<i>Asp. toxicarius</i> RIB 4002	3.9	0.3	G	156.0	80.0	-	-	+++	-	-
<i>Asp. oryzae</i> var. <i>viride</i> RIB 128	7.8	0.3	G	225.0	40.0	-	-	+++	-	-

G: green, B: blue.

(a) Methylene blue의 환원력

Methylene blue의 환원능에 대한 實驗成績을 보면, 1時間 以內에 methylene blue를 탈색시키는 菌株가 5株(15.1%), 3時間 以內가 6株(18.1%), 6時間 以內가 9株(27.2%)이었으며 脫色能이 없는 菌株도 7株(21.2%)나 있었다.

(b) T.T.C.의 환원력

Triphenyl tetrazolium chloride(T.T.C.)의 환원능에 대한 成績을 보면, 3時間內에 赤色으로 變化시키는 菌株가 2株(6.06%), 6時間內가 3株(9.09%), 9時間內가 7株(21.2%) 그리고 20時間 以上이 15株이었으며 환원능력이 없는 菌株가 4株(12.1%)이었다.

8) Nitrate還元 實驗

Nitrate 환원 실험성적을 보면, 菌株番號 49를 제외하고는 모든 菌株가 共히 환원능력이 음성이었다(Table 1 및 2).

考 察

眞菌類의 分類는 現在까지도 形態學的 및 生理的 諸性質 등을 基準으로 하여 分類의 key를 삼고 있다.

1965年 Murakami 등은 眞菌類中 形態 및 生理的 諸性質을 中心으로 하여 *Aspergillus*屬의 分類를 試圖하였으며 그중 特히 aflatoxin 分泌 菌株에 對하여는 그들이 가지고 있는 共通 特性을 제시한 바 있다.

Murakami (1965) 등은 86株의 *Aspergillus*屬을 對象으로 生理的인 諸性質을 조사하여 分裂子(conidium)의 roughness의

有無가 amylase의 力價와 關係가 있으며 동시에 aflatoxin 分泌와도 關聯性을 가지고 있다고 主張하였다.

또한 type culture에서의 實驗 結果 生理的인 性狀을 利用하여 同定의 可能性을 추구할 수 있다고 發表하였다.

柳 및 高(1971)도 57株의 *Aspergillus*屬을 分離, 生理的 諸性質을 조사하여 그중 Murakami 등이 主張한 aflatoxin 分泌 菌株가 가지고 있는 共通 特性을 含有한 菌株들을 觀察할 수 있었다고 發表하였는데 (conidial size, kojic acid, pigment 生成, sclerotia의 有無, phenol의 着色, methylene blue의 還元能 등), 本 實驗에서도 이와 유사한 結果를 얻을 수 있어 對照 群으로 使用한 數種의 菌株와도 비슷한 性質을 갖고 있는 菌株들의 觀察이 可能하였다.

한편, amylase 力價 實驗에서 一週日 培養時間의 경과중 amylase 力價의 증가현상 등은 他 研究者 등의 報告와 同一하였으며 cork-borer를 利用하는 方法과 iodine의 着色帶의 크기의 比率로서 力價를 測定하는 方法은 amylase의 定性的 方法에 依한 測定方法으로 使用이 可能하다고 보았다.

以上 實驗을 종합하여 볼 때 生理的 諸性質을 利用한 菌 分類의 可能性은 內包되어 있다고는 할 수 있겠으나 이는 좀 더 多角的인 面에서 研究가 進行되어야 할 것으로 생각된다.

摘 要

各種 穀類에서 分離된 *Aspergillus*屬을 利用하여 生理的 諸性質을 조사하였던 바 다음과 같은 結論을 얻었다.

- 1) 各 菌株들은 各各 그들의 特性을 가지고 있었으며 이로서 菌同定의 可能性을 나타내었다.
- 2) Amylase力價 測定結果에서 보면 比較的 力價가 높은 菌株들이 관찰되었으며, 이는 一週間의 培養時間의 경과에 따라 力價가 증가하였으나 protease의 力價는 우수한 菌株를 發見키가 어려웠다.
- 3) Iodine의 着色帶와 非着色帶의 比率에 依한 力價의 定性的인 測定이 可能하였다.

## 引用文獻

1. 柳駿, 高春明, 1971. 韓國 저장식품의 有毒性物質과 그 防止에 關한 研究. 延世論叢, 8, 3.
2. 柳洲鉉, 秋慶姬, 洪允命, 有馬啓, 1970. 澱粉利用에 關한 研究. I, Starch agar-gel-plate를 利用한 amylase活性 測定法. 한국식품과학회지, 2, 67.
3. 村上英也, 鈴木寫, 長繩眞琴, 大脇京子, 1965. 麹菌の分類學的 研究. II, 黃麹菌の生理性質について. 醸試報, 137, 12.
4. 村上英也, 牧野正則, 萩野宥人, 1967. 麹菌の分類學的 研究. III, 各種の type culture について. 醸試報, 139, 16.
5. Raper, K.B., and Fennell, D.I., 1965. The genus *Aspergillus*. Williams and Wilkins Co., Baltimore, Md.