

國內의 變質米에서 분리된 *Aspergillus flavus* 群의 Aflatoxin 生成能

李 寬 寧 · 李 瑞 來

韓國原子力研究所 農業生化學研究室

(1974년 7월 11일 수리)

Producibility of Aflatoxins by *Aspergillus flavus* Group Isolated from Deteriolated Rice in Korea

by

Kwanyoung Lee and Su Rae Lee

Agricultural Biochemistry Laboratory, Korea Atomic

Energy Research Institute, Seoul

(Received July 11, 1974)

Abstract

In order to investigate the producibility of aflatoxins by seven *Aspergillus flavus* strains isolated from deteriorated rice in Korea, polished rice was artificially inoculated and subjected to isolation and quantitation of the mycotoxin. It was proved that all strains were capable of producing aflatoxins, preferentially B₁ but no G₁ at all and their producibility was closely related to the color of culture media and chloroform extracts.

The strain producing the most aflatoxin was *A. flavus* var. *columnaris*, excreting 1 ppm on rice. Aflatoxin B₁ was isolated and identified by thin-layer chromatography, ultraviolet absorption spectra and derivative formation of water and acetate adducts.

서 론

식량과 飼料로 이용되고 있는 곡류에서 분리 同定된 곰팡이는 지금까지 200여종에 달하고 있으며 농산물의 종류에 따라 그들의 分布相과 遺傳의 특성이 서로 다르다는 것이 알려지고 있다.⁽¹⁾ 따라서 대량으로 저장된 농산물에 이들 곰팡이가 汚染되면 變質에 의한 경제적 손실을 가져오는 동시에 곰팡이의 유전적 특성에 의해 축적되는 毒性물질인 mycotoxin 이 국민보건상 크게 문제될 수 있는 것이다.^(2,3) 그러나 이들 有害곰팡이가 생산하는 수 많은 mycotoxin의 화학적 正體, 생성과정, 독성 및 피해상황에 대해서는 아직도 불분명한 점이 많으며,⁽⁴⁾ 미국 農務省은 이들 mycotoxin에 의한 害毒은 지금까지 農產物이나 食品에 존재한다고 알려진 어느것

보다도 더 클 것이라 推定하고 있다.⁽⁵⁾

이와같이 潛在的인 위험을 내포하고 있는 mycotoxin 이 크게 문제되기 시작한 것은 1960년 영국에서 십단마리의 칠면조가 메죽음을 당하면서 부터였다.⁽⁶⁾ 그런데 이것은 땅콩 飼料에 오염된 *Aspergillus flavus* group의 대사산물인 aflatoxin 에 의한 것으로서 이들의 理化學的 성질⁽⁷⁻⁹⁾, 發癌性특성^(10,11) 그리고 위험성⁽¹²⁾에 대한 것들이 곧 알려지게 되었다. 특히 aflatoxin B₁의 LD 50은 0.36-1 mg/kg (day-old-duckling)⁽¹³⁾ 으로서 가장 강력한 經口發癌性 물질로 확인되었으며 FAO에서는 食品에 있어서의 최대 허용량을 30 ppb로 정하고 있다⁽¹⁴⁾ 그리하여 mycotoxin의 문제는 豫防醫學의 견지에서 뿐만 아니라 農業生產의 입장에서 논의되고 있다. 특히 aflatoxin⁽¹⁵⁾ 은 生物學的, 化學的, 生化學的 및 病理學的의 연

구가 세계적으로 활발히 진행되고 있으며 농산물에서의 汚染調査, 管理 및 防除에 관한 노력이 傾注되고 있다.

지금까지 aflatoxin을 생산한다고 알려진 미생물로서는 *Aspergillus*屬과 *Penicillium*屬의 몇가지가 있으나 *A. flavus* group에 속하는 *A. flavus*와 *A. parasiticus* 중의 특정한 균주만이 널리 인정받고 있으며 같은 種에서도 aflatoxin의 생산능력에는 큰 차이가 있음이 보고 되었다. (13, 15, 16) Boller 및 Schroeder⁽¹⁷⁾는 미국내쌀에서 분리된 *A. flavus* 균주중 1/3정도가 쌀과 땅콩을 기질로 할 때 상당한 양의 aflatoxin을 생성할 수 있다고 하였고 Goldblatt⁽¹⁶⁾는 농산물에 있어서 *A. flavus*의 출현빈도가 높다고 하였다. 또 저장 농산물에 대한 aflatoxin의 汚染 여부를 검사하기 위하여 일련의 실험이 수행된 결과 땅콩, 면실, 소맥, 수수, 연맥, 옥수수, 대두, 대맥, Brazil nut, cassava, cocoa, cocoa bean, copra, locust bean, palm kernel, 쌀, 맥아, 견초등에서 미량 혹은 무시될 정도로 검출되었으나, aflatoxin을 생성할수 있는 유전적소질을 갖춘 균주에게 유리한 환경인자가 조성될 경우 치사량이상의 aflatoxin이 검출된다고 하였다. (2, 5, 18~20) 그리고 aflatoxin 생성능력이 있는 균주를 땅콩⁽²¹⁾, 분쇄소맥⁽²²⁾, corn meal⁽²³⁾, 쌀⁽²⁴⁾등에 인위적으로 접종시켜 대량의 aflatoxin을 얻는 방법이 알려지게 되었다. 또 aflatoxin의 생성에 영향을 미치는 환경인자로서 습도⁽²⁵⁾, 온도⁽²⁶⁾, 기질^(27, 28), 광선⁽²⁹⁾ 및 未知촉진물질^(30, 31)에 관한 연구가 있으며 특히 땅콩에 관한 종합적연구^(32, 33)가 보고된 바 있다.

국내에 있어서는 쌀을 위시한 곡류를 主食으로 하며 곰팡이 醱酵食品을 많이 섭취하는 한국인의 癌發生率과 관련시켜 많은 관심을 불러 일으켰다. 이에 따라 식물중 aflatoxin의 有無와 이에서 분리한 곰팡이의 aflatoxin 生成能에 대한 檢索이 1969년부터 수행되어 왔다. 그리하여 李 등⁽³⁴⁾은 15점의 大豆醱酵食品을 조사한 결과 6개 시료에서 TLC상에서 aflatoxin B₁과 동일한 Rf 값을 가 지나 자외선스펙트럼이 상이한 aflatoxin 유사물질을 검출하였으며, 鄭 및 權⁽³⁵⁾은 35점의 식품을 檢索한 결과 TLC상의 Rf값으로 보아 aflatoxin G₁과 G₂의 존재를 확인하였고 시료에서 분리한 *A. flavus*의 액체배지에서는 B₁, B₂, G₁, G₂를 모두 확인하였다고 주장하였다. 또한 이 등⁽³⁶⁾은 곡류와 발효식품 228점을 檢索한 결과 TLC 상의 Rf 값으로 보아 aflatoxin과 동일한 물질이 발견되었으나 자외선 흡수스펙트럼이 표준품과 일치하지 않으므로 aflatoxin 관련물질이라 推定하였으며 이들 식품에서 *A. flavus*의 출현빈도가 매우 높았다고 하였다. 한편 이 등⁽³⁷⁾은 발효식품에서 분리한 *A. flavus* 15균주, 高 등^(38, 39)은 곡류에서 분리한 *Aspergillus*屬 58균주의 aflatoxin 生成能을 시험한 결과 각각 *A. flavus*의 3균주가 TLC상에서 Rf값이 비슷한 aflatoxin 유사물질을 分泌하는 것으로 推定하였다. 결국 국내에서 이루어진 aflatoxin 檢索에 관한 모든 연구를 보면 TLC 상에서 Rf 값

이 비슷한 형광성물질을 발견하였으나 자외선 흡수스펙트럼이 표준품과 일치함을 증명하지 못하였으므로 aflatoxin의 존재나 生成菌株에 대한 推測을 벗어나지 못하고 있는 형편이다.

따라서 본 연구는 한국식품중에 aflatoxin의 존재와 生成菌株의 유무를 確定짓기 위하여 착수되었다. 그리하여 우선 국내의 變質米에서 분리 同定된 *A. flavus* 菌株를 인위적으로 쌀에 배양하여 aflatoxin의 生成量을 分別 定量하였고 생성된 aflatoxin B₁을 정제후 자외선 흡수스펙트럼과 유도체합성에 의하여 同定 하였으므로 이에 그 결과를 보고한다.

재료 및 방법

1. 미생물 균주 및 시약

본 실험에 사용한 곰팡이는 韓 洞^(40, 41)이 국내의 變質米에서 분리 동정한 *Aspergillus flavus* group 으로서 *A. flavus* var. *columnaris*와 *A. flavus* 6균주 이다.

Aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ 표준품은 Calbiochem 회사제품이고, TLC 용 silica gel G, silica gel H 및 column chromatography 용 silica gel (0.05~0.2 mm)은 Merck 회사제품이며, 기타 시약은 모두 특급품을 사용하였다.

2. 미생물의 보존 및 배양방법

모든 균주는 potato-dextrose-agar 사면배양기⁽²⁴⁾에 28°C에서 6일간씩 3회 연속 계대하여 충분히 활성화시킨 것을 사용하였다.

쌀에 이들 균주를 배양할 때는 Shotwell 등⁽²⁴⁾의 방법에 준하였다. 즉 50 g의 백미를 300 ml 삼각후라스크에 취한 후 수도물을 20 ml 가하고 가끔 흔들어주면서 2시간 동안 충분히 적신후, 15 psi에서 15분간 가압살균을 행하였다. 이에 균을 접종하여 회전식 진탕배양기(Yanagimoto M-24, 180 rev/min)로 28°C에서 6일간 배양했으며, 2일마다 2 ml의 살균수를 무균적으로 첨가해 주었다. 배양도중에 쌀입자가 균사에 의하여 엉키지 않도록 주의하였으며, 배양이 끝난것은 신속히 가압살균하여 포자를 죽인후 5°C의 어두운 곳에 보관하였다. 靜置배양시는 하루에 한번 손으로 진탕하여 엉킨 균사를 풀어 주었다.

3. Aflatoxin의 分離 및 定量法

가) 시료의 추출

Mislivec 등⁽¹⁵⁾의 방법에 준하였다. 즉 *A. flavus*가 배양된 쌀 50 g에 20 ml의 증류수를 가하여 충분히 적시고, 250 ml의 chloroform을 가하여 waring blender로 5분간 추출하였다. 이 추출물을 가제와 여지 (Toyo No. 2)로 여과한 후 무수 Na₂SO₄로 탈수하고 질소캐스 존재하에 감압농축 하였다. 이 시료를 곧 사용하지 않을 경우는 밀폐하여 5°C의 어두운 곳에 보관 하였다.

나) Column chromatography

AOAC 법 (26.019)⁽⁴²⁾에 의하여 실시하였다. 즉 chloroform을 1/2정도 채운 22×300 mm column에 glass wool로 평면을 고르게 만든 후, 5 g의 무수 Na₂SO₄, 10 g의 silica gel (0.05~0.2 mm), 15 g의 무수 Na₂SO₄를 차례대로 채운 후 50 ml의 chloroform에 녹인 추출시료를 column에 흡착시켰다. 그후 질소캐스를 사용해서 column의 유속을 10~20 ml/min 정도로 하여 150 ml hexane, 150 ml ethyl ether로 연속적으로 column을 세척한 후, column에 흡착된 aflatoxin은 chloroform : methanol (97:3) 150 ml로 용출시켜 수집하였다. 이 용출액은 N₂ 캐스 존재하에 감압농축하여 소량의 chloroform에 의하여 4-dram vial에 정량적으로 옮기며 질소캐스 존재하에 aluminum foil로 칸막이한 steam bath 상에서 증발건조시켰다.

다) Thin-layer chromatography

(1) 정성용 TLC

Engstrom⁽⁴³⁾ 과 Beljaars 및 Fabry⁽⁴⁴⁾의 방법을 채택하였다. 즉 250 ml 용량의 유리마개 있는 삼각후라스코에 24 g의 silica gel H와 50 ml의 중류수를 가하여 1분정도 심하게 흔들어 잘 섞은 후 0.25 mm 두께의 plate(20×20 cm) 5개를 제조하였다. 실온에서 12시간 방치후 사용직전에 120°C에서 1시간 활성화시켰다. chloroform 추출물 또는 column으로 정제한 시료를 적당량의 benzene:acetonitrile (98:2)에 녹여 spotting 한후, 50°C에서 30분간 plate를 다시 활성화 시켜서, 새로 혼합한 chloroform : trichloroethylene : n-amyl alcohol : formic acid (80 : 15 : 4 : 1)로 전개시켰다. plate의 3/4까지 용매 전단부를 이동시킨 후 chamber 뚜껑을 약간 열은채 15분간 연속전개를 시키므로 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂의 分離能이 아주 좋았다. 전개용매로서는 chloroform : acetone (9 : 1)도 사용하였다. 이 조작은 모두 빛을 차단시킨 hood 안에서 수행하였으며 분리된 aflatoxin의 spot는 암실에서 자외선등 (Ultra-Violet Products 회사 UVSL-25)의 長波長으로 표준품과 비교하여 정성하였다.

(2) 정량용 TLC

예비적으로 정성이 끝난 시료는 질소캐스 존재하에 steam bath 상에서 다시 증발 건조시켜 benzene:acetonitrile (98 : 2)로 정량 범위에 들어오도록 농도를 조절하고 IAEA⁽⁴⁵⁾ 및 AOAC (26.020-d)⁽⁴²⁾에 의한 목적법 (visual analysis)으로 정량하였다. 즉 한 plate 상에 분석할 시료를 3, 7, 10 μ씩 spotting한 후 그 옆에 농도를 알고 있는 표준 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ 용액을 각각 1, 5, 10 μ씩 일정한 간격으로 spotting해서 전개시켰다. 전개가 끝난 plate는 암실에서 10분간 방치하여 전개용매를 날려보낸후 자외선등으로 未知시료의 형광강도와 표준품의 형광강도를 비교해서 시료중의 aflato-

xin 농도를 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{Aflatoxin 농도 (ppb 또는 } \mu\text{g/kg sample)} = \frac{SxYxV}{XxW}$$

S : 미지 시료의 형광강도와 같은 표준용액의 μ수

Y : 표준 aflatoxin 용액의 농도 (μg/ml)

V : 미지 시료의 최종 희석 μ수

X : 표준 aflatoxin 용액과 형광강도가 같은 미지 시료의 μ수

W : column에 주입한 시료의 사용 g수

본 실험에 사용한 표준 aflatoxin 용액의 농도는 표준품을 methanol에 녹인 후 AOAC 법 (26.009)⁽⁴²⁾에 의하여 정하였다. 즉 Beckman DU-2 分光光度計 (correction factor=0.96)에 의하여 파장 360 mμ 부근에서의 최대흡광도를 측정하고 분자량과 몰 흡광도 (molar absorptivity)에 의하여 계산하였다. 본 실험에 사용한 표준 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂ 용액의 농도는 각각 0.97, 0.46, 0.95, 0.44 μg/ml benzene:acetonitrile (98 : 2) 용액이었다. 이 표준용액은 이중병속에 밀폐하여 -17°C에 보관하였고 실험시에는 실온으로 유지한 후 사용하였다.

4. Aflatoxin B₁의 이화학적 동정

자의선 흡수스펙트럼을 위해서는 정제된 aflatoxin B₁ 용액의 농도를 分光光度法에 의하여 10 μg/ml 정도로 조절하고 Beckman DU-2 분광광도계에 의하여 200~400 mμ에서의 흡광도를 측정하였다.

Aflatoxin B₁의 유도체로서는 AOAC 법 (26.054, 26.055)⁽⁴²⁾에 의한 water adduct와 acetate adduct를 합성하여 TLC로 동정하였다. 즉 정제된 aflatoxin B₁ 0.25 μg과 표준 aflatoxin B₁ 0.1 μg을 각각 2개씩 4개의 1/2-dram vial에 취하였다. 그후 시료와 표준품이 각각 들어있는 2개의 vial에는 100 μl의 중류수와 한방울의 진한 염산을 가하고, 나머지 2개의 vial에는 250 μl의 acetic anhydride와 한방울의 진한 염산을 가하여 screw cap으로 밀봉하여 심하게 흔들어준 후 10분간 steam bath 상에서 때때로 흔들어주며 반응시켰다. 그후 steam bath 상에서 뚜껑을 열고 질소캐스를 유입시켜주면서 용매를 증발시켰다. 각 vial에 20 μl의 benzene:acetonitrile (98 : 2)을 가하여 잘 흔들어 녹인후, silica gel H plate 상에 10 μ씩 spotting하여 chloroform : acetone (9 : 1)과 isopropyl alcohol : acetone : chloroform (3 : 10 : 87)의 전개용매로 전개시켰다. 전개가 끝난 plate는 암실에서 10분간 방치한 후 자외선등을 사용하여 표준품과 정제된 aflatoxin B₁ 유도체의 R_f 값을 비교하였다.

결과 및 고찰

1. Aflatoxin의 分離 및 定量

Aflatoxin의 화학적 분석은 흔히 이들이 갖고있는 형

광성을 이용한 thin-layer chromatography 에 의하고 있다. 이때 사용되는 흡착제로는 silica gel MN GHR, Applied Science Adsorbosil 1 또는 5, Mallinckrodt Silic AR 4G 또는 7G 등이 公認되고 있으며, 다른 흡착제를 사용할 경우는 aflatoxin 표준품의 분리능력을 세밀히 검토할 필요가 있는 것이다. (AOAC, 26.020).⁽⁴²⁾ 연이나 흡착제로서 silica gel H (Merck)는 Engstrom⁽⁴³⁾에 의하여 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂의 우수한 분리능이 검토되었고 Beljaars 및 Fabry⁽⁴⁴⁾는 이들 aflatoxin 의 정량에 silica gel MN GHR과 silica gel H는 우수했으나 silica gel G는 부적당하다고 하였다.

그러나 국내에서 지금까지 aflatoxin 분석에 사용한 흡착제는 모두 silica gel G였다. 비록 Nabney와 Nesbitt⁽⁴⁶⁾는 silica gel G plate를 ethyl ether로 일차 전개시켜 불순물을 제거하였고李 등^(34, 36)은 methanol로 세척한 silica gel G를 사용하였으나, 본 실험에서는 이러한 처리가 aflatoxin B₁, B₂, G₁, G₂의 분리능에 아무런 영향을 주지 못하였다. Fig. 1은 silica gel G와 silica gel H plate를 사용하여 aflatoxin 표준품과 *A. flavus var. columnaris*를 싼에 인위적으로 배양해서 얻은 chloroform 추출물중의 aflatoxin 분리능력을 보여준 것이다. 흡착제로서 silica gel G는 어느 전개용매에 의해서도 aflatoxin B₁, B₂, G₁과 G₂를 뚜렷히 분리시키지 못하였고 methanol로 세척한 silica gel G 역시 마찬가지였다. 그러나 silica gel H plate는 4개의 aflatoxin 성분을 뚜렷히 분리시켰으며, chloroform : acetone (9 : 1)을 전개용매로 사용한 경우 이들 spot가 약간 인접되어 있긴 하나 뚜렷한 원형상태의 좋은 분리가 일어났고, chloroform:trichloroethylene : n-amyl alcohol : formic acid (80 : 15 : 4 : 1)은 내성분간에 더 큰 분리가 일어나며 특히 aflatoxin B₁의 분리능이 현저하였다. 따라서 전개용매로서 前者는 목측법에 의한 정량에 사용하였고 後者は aflatoxin B₁만을 TLC 상에서 다량으로 정제할 때 사용하였다. 또 *A. flavus* group을 싼에 배양하여 얻은 chloroform 추출액의 TLC를 관찰해 보면 aflatoxin 표준품과 비슷한 Rf 값 부근에 여러가지 형광성 물질이 함께 나타났다. 따라서 silica gel G는 aflatoxin B와 G group의 정성적인 검색에는 사용할 수 있겠으나 각 성분의 분별정량에는 부적당하다고 생각된다.

현재 AOAC 법으로 인정받고 있는 aflatoxin의 정량 방법은 각 성분을 TLC 상에서 분리한 후 표준품의 형광강도와 비교하는 것으로 실험이 복잡하고 실험오차가 상당히 큰 편이다. Eppley 등⁽⁴⁷⁾은 peanut 시료에 10~50 ppb의 표준 aflatoxin B₁을 첨가하여 AOAC 법으로 정량한 결과 회수율이 평균 47%였고 aflatoxin의 함량에 따라 회수율이 달라진다고 하였다. 이와같이 낮은 회수율은 추출과정, column chromatography, TLC 그리고 aflatoxin 자체의 변성등에서 유래되는 오차라고 생각되며 좀 더 간단하면서도 정확한 분석방법은 아직 설정

되지 못하고 있는 형편이다. 본 실험에서는 쌀 50 g에 50 및 100 ppb의 표준 aflatoxin B₁을 첨가하여 회수율을 검토한 결과 chloroform 추출만의 경우는 85~92%, silica gel column으로 정제한 경우는 35~40%로 떨어졌다. 그러나 본 논문에 제시한 값은 회수율을 감안하지 않고 實測值를 그대로 표시한 것이다.

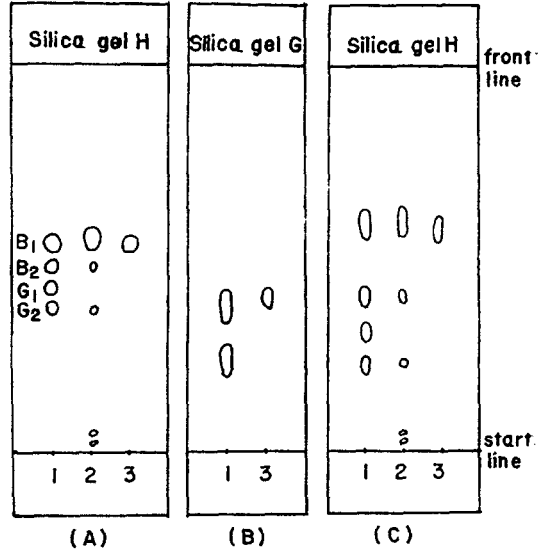


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of aflatoxins from *A. flavus var. columnaris* grown on rice
 Adsorbent: (A) (C), silica gel H; (B), silica gel G, washed with methanol
 Developing solvent: (A) (B), chloroform : acetone(9 : 1) ; (C), chloroform : trichloroethylene : n-amyl alcohol : formic acid (80 : 15 : 4 : 1)
 Sample: 1, mixture of authentic aflatoxins
 2, chloroform extracts from inoculated rice
 3, authentic aflatoxin B₁

2. *A. flavus* group에 의한 aflatoxin의 生成能

國內의 變質米에서 분리한 *A. flavus* 7균주를 싼에 인위적으로 배양하여 aflatoxin의 생성능을 조사한 결과는 Table 1과 같다. 이들 균주는 생성량에 있어서 서로 큰 차이가 있었으나 모두 aflatoxin을 생성하였다. 특히 경기도 華城郡에서 수집한 변질미에서 분리된 *A. flavus var. columnaris*는 1,119 ppb의 aflatoxin을 생성하였고 그중 aflatoxin B₁은 1,081 ppb 이었다. 한편 *A. flavus* SN-7은 720 ppb, *A. flavus* SN-11은 293 ppb의 aflatoxin을 생성하였으나 기타의 4균주는 미량만을 생성할 뿐이었다. *A. flavus var. columnaris*는 Shotwell 등⁽²⁴⁾이 *A. flavus* NRRL 2999를 싼에 배양하여 얻은 aflatoxin의 양에 비하여 200~1000분의 1 정도의 적은 양을 생성하였다. 그러나 국내의 변질미에서 분리된 균주들이 모

두 aflatoxin B₁을 생성할 수 있는 유전적 소질을 가진다고 할 수 있으므로 aflatoxin의 생성에 유리한 환경조건이 형성되거나, 미지의 축진물질이 공존하게 된다면 다량의 aflatoxin이 축적될 가능성이 있게 된다. 한편 aflatoxin을 미량 생산하는 4 균주는 TLC에서 aflatoxin 주위에 여러가지 형광성 물질을 관찰할 수 있었다. 이들은 Schroeder 등⁽⁴⁸⁾이 지적했듯이 aflatoxin과 유사한 대사산물들이 아닌가 생각된다.

Table 2는 A. flavus group을 배양하는 도중 배양기와 chloroform 추출액의 색깔을 aflatoxin의 생성능력과 비교 해본 것이다. 즉 회색의 potato-dextrose-agar 배양기에서 색깔에 아무런 영향도 안주는 3균주는 aflatoxin을 많이 생성하였으나, 배양기의 색깔을 적황색으로 변화시키는 4 균주는 aflatoxin을 미량만 생성하였다. 이들 균주를 쌀에 진탕배양할 경우는 정치배양시에 비하여 약 10배 이상의 aflatoxin이 축적되었으며 진탕배양시에는 쌀입자가 노란색이나 갈색으로 변화되나, 정치배양시에는 녹색의 포자가 생성되었다. 또 진탕배양시 쌀입

자의 색이 갈색으로 변하면 aflatoxin의 함량이 높았고 노란색으로 변하면 낮았다. 그러나 이들의 chloroform 추출액의 색깔을 보면 aflatoxin 함량이 높은 것은 밝은 노란색이었고 아주 낮은 것은 적황색이었다. 따라서 이들 균주를 배양하는 도중의 색깔의 변화를 관찰하므로서 aflatoxin의 생성능력을 정성적으로 추정할 수 있으며 색소의 생성은 aflatoxin의 생합성과정과 밀접한 관계가 있으리라 推理된다.

이러한 현상은 Schindler 등⁽²⁶⁾과 Mateles 및 Adye⁽⁴⁹⁾들도 A. flavus group을 액체배양한 후, 균사체와 배양액의 색깔 그리고 배양액의 chloroform 추출액에 있는 노란색소가 aflatoxin의 함량과 밀접한 관계가 있다고 지적한 바와 잘 일치하고 있다. 그러나 이와는 반대로 potato-dextrose-agar 배양기를 적황색으로 변화시키는 균주가 aflatoxin을 거의 생성 못한다는 것은 흥미있는 점이다. Hesseltine 등⁽⁵⁰⁾은 A. flavus NRRL 2999를 액체배양시 aflatoxin은 주로 胞子에서 검출되었다고 하였고 최근 Schroeder 등⁽⁴⁸⁾은 aflatoxin의 생성을 阻害하는 것으

Table 1. Production of aflatoxin on rice by A. flavus strains isolated from deteriorated rice in Korea¹⁾

Strain	Aflatoxin in shaking culture (ppb) ²⁾					Aflatoxin in stationary culture (ppb) ³⁾				
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	total	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	total
A. flavus var. columnaris	1081.7	25.8	nil	11.7	1119.2	116.4	nil	nil	3.5	119.9
A. flavus SN-7	705.6	7.4	nil	7.1	720.1	83.2	nil	nil	2.4	85.6
A. flavus SN-8	trace	nil	nil	7.7	7.7	—	—	—	—	nil
A. flavus SN-9	trace	6.8	nil	trace	6.8	—	—	—	—	nil
A. flavus SN-10	trace	nil	nil	trace	trace	—	—	—	—	nil
A. flavus SN-11	285.4	nil	nil	8.2	293.6	15.2	nil	nil	nil	15.2
A. flavus SN-12	5.8	nil	nil	trace	5.8	—	—	—	—	nil

1) Aflatoxin was assayed by eliminating column chromatography process.

2) Incubated on a rotary shaker (180 rev/min) at 28°C for 6 days.

3) Allowed to stand but shaking once a day by hand at 28°C for 6 days.

Table 2. Relationship between the aflatoxin production and color change by A. flavus strains

Strain	Total aflatoxin* (ppb)	Color of potato-dextrose agar slant	Color of rice grain in shaking culture	Color of chloroform extract
A. flavus var. columnaris	1119.2	light gray	dark brown	yellow
A. flavus SN-7	720.1	//	//	//
A. flavus SN-11	293.6	//	//	//
A. flavus SN-8	7.7	reddish yellow	yellow	reddish yellow
A. flavus SN-9	6.8	//	//	//
A. flavus SN-10	trace	//	//	//
A. flavus SN-12	5.8	//	//	//

로 생각되는 오렌지 색소를 분리하여 versiconal acetate 라 동정하였으며, aflatoxin 이나 versicolorin 의 생산을 정지 시킬 수 있는 중간 대사산물일 것이라 추정하였다.

3. 배양시간과 온도에 따른 aflatoxin 의 生成能

곡류에서 분리된 *A. flavus* group 이 성장할 수 있는 온도범위는 6~46°C 로서 수분, 영양원, 산소의 공급량 등 여러인자에 의해 변화될 수 있다. (13) Schroeder 및 Hein(51)은 rough rice에 *A. flavus*를 배양하여 온도와 시간에 따른 aflatoxin 의 생성량을 관찰한 바 온도가 20°C 에서 35°C 로 증가할수록, 최대의 aflatoxin 을 얻을 수 있는 시간은 반대로 짧아진다고 하였다. 따라서 국내의 변질미에서 분리된 *A. flavus var. columnaris*에 대한 온도의 효과를 검토하기 위하여 20°C, 28°C, 35°C 의 세가지 온도에서 12일간 쌀에 진탕 배양하면서 aflatoxin 의 생성을 조사하여 Fig. 2와 같은 결과를 얻었다.

본 균주에 있어서 Schroeder 및 Hein(51)이 지적한 온도의 효과는 20°C~28°C에서만 관찰할 수 있었고 35°C에서는 오히려 감소하였다. 즉, 20°C에서는 10~12일에 그리고 28°C에서는 6일만에 최대의 aflatoxin B₁을 생성하였다. 국내에서 분리된 *A. flavus*는 외국에서 분리된 균주들에 비하여 aflatoxin 생성에 필요한 최적온도가 낮는데 이러한 차이는 각 균주가 생육하는 기후조건에 적용된 유전적 소질에 의한다고 생각된다. 한편 Schroeder 및 Hein(51)과 Sorenson 등 (52)은 쌀에 *A. flavus*를 배양할 경우 온도에 따라서 aflatoxin B₁과 G₁의 생성비율이 달라짐을 관찰하였는 바, 32°C의 고온에서는 aflatoxin B₁이 증가하고 20°C의 저온으로 갈수록 G₁의 양이 증가하여 B₁/G₁의 비율이 달라진다고 하였다

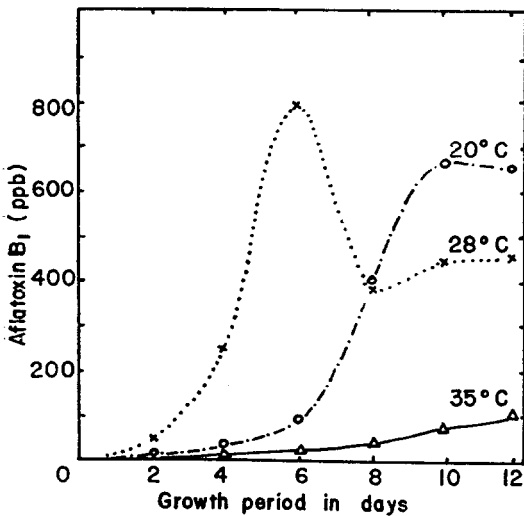


Fig. 2. Time-course formation of aflatoxin B₁ by *A. flavus var. columnaris* on sterilized rice by shaking culture at different temperatures

그러나 *A. flavus var. columnaris*에서는 이러한 효과를 관찰할 수 없었는데 그 원인은 이 균주가 aflatoxin B₁에 비하여 aflatoxin G₁을 너무 미량 생산하기 때문이 아닐까 생각된다. Shotwell 등(24)은 *A. flavus* NRRL 2999를 쌀에 진탕배양하여 28°C에서 4~5일만에 최대의 aflatoxin을 얻었다고 하였으나 *A. flavus var. columnaris*는 28°C에서 6일에 최대의 aflatoxin 생성을 보였으며 8일경에 나타나는 급격한 aflatoxin의 감소에 대하여는 좀 더 검토해 볼 문제라 생각된다.

4. 分離된 aflatoxin B₁의 자외선 吸收스펙트럼

*A. flavus var. columnaris*를 쌀에 배양시켜 얻은 chloroform 추출액을 silica gel column으로 정제한 후 silica gel H plate상에 분리된 aflatoxin B₁을 methanol로 용출시켜 얻은 aflatoxin B₁과 표준품의 자외선 흡수스펙트럼은 Fig. 3과 같다. 표준품과 추출된 aflatoxin B₁의 농도는 分光光度法(42)에 의하여 360 mμ 파장에서 10 μg/ml 정도로 조절하여 정하였다. Fig. 3에 나타난 곡선 A는 silica gel H 자체를 methanol로 용출해서 얻은 것으로서 300 mμ이하에서 吸收帶를 형성하고 있었다. 이것은李 등(34,36)이 사용한 methanol로 세척한 silica gel G와 유사한 것으로, silica gel H는 methanol로 세척하지 않아도 aflatoxin B₁의 스펙트럼을 그릴 수 있었다.

한편 표준 aflatoxin B₁ 용액과 표준품을 silica gel H plate 상에 전개시킨 후 methanol로 용출하여 얻은 aflatoxin B₁의 자외선 흡수스펙트럼은 각각 곡선 B 및 C와

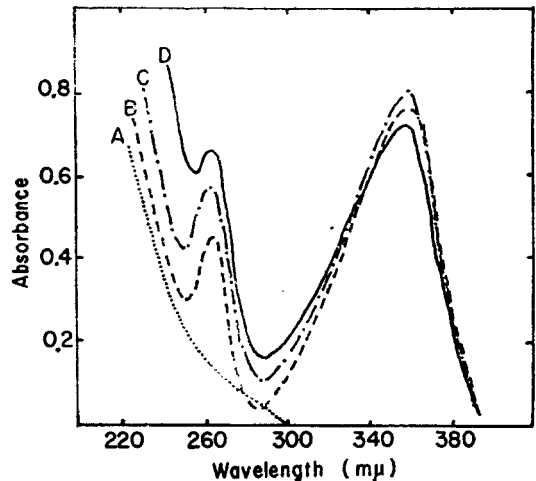


Fig. 3. Ultraviolet absorption spectra of aflatoxin B₁ in methanol
Curve A: methanol eluate of silica gel H plate
Curve B: authentic aflatoxin B₁ (10.8 μg/ml)
Curve C: authentic aflatoxin B₁ eluted from silica gel H plate (11.2 μg/ml)
Curve D: isolated aflatoxin B₁ eluted from silica gel H plate (9.6 μg/ml)

한다. 이 두 곡선은 형태가 거의 비슷하였으나 265 mμ 근처에서는 silica gel H 자체가 갖고있는 형광물질의 영향을 받아 silica gel H plate에서 용출한 표준 aflatoxin B₁은 표준용액에 비하여 약간 흡광도가 증가하였다. 또 A. flavus var. columnaris가 생성한 aflatoxin B₁의 자외선 흡수스펙트럼은 곡선 D로서, 표준품과 같이 360 mμ과 265 mμ에서 최대흡수대를 나타내었다. 이것은 Hartley 등⁽⁸⁾의 보고와 일치하는 것으로서, 쌀에서 추출된 aflatoxin B₁이 265 mμ부분에서 표준품 보다도 더 높은 흡광도를 갖는것은 정제된 aflatoxin B₁자체에 남아있는 불순물과 silical gel H가 함유하고 있는 형광성 물질때문이라 생각된다.

5. 誘導體합성에 의한 aflatoxin B₁의 同定

A. flavus var. columnaris의 쌀 배양물에서 정제한 aflatoxin B₁과 표준 aflatoxin B₁의 water adduct 및 acetate adduct를 동시에 합성하여 TLC로 비교한 결과

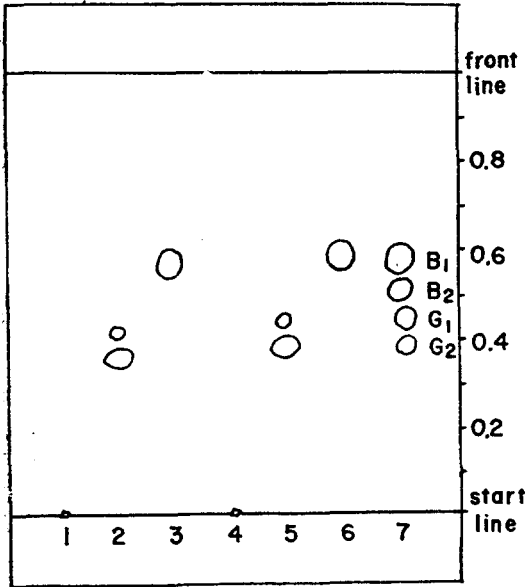


Fig. 4. Thin-layer chromatogram of water and acetate derivatives from authentic and isolated aflatoxin B₁
 Developing solvent: chloroform : acetone (9 : 1)
 Adsorbent: silica gel H
 Sample: 1, water adduct of authentic aflatoxin B₁
 2, acetate adduct of authentic aflatoxin B₁
 3, authentic aflatoxin B₁ itself
 4, water adduct of isolated aflatoxin B₁
 5, acetate adduct of isolated aflatoxin B₁
 6, isolated aflatoxin B₁ itself
 7, resolution reference for authentic aflatoxins (B₁, B₂, G₁ and G₂)

는 Fig. 4와 같다. 표준품의 acetate 유도체는 aflatoxin G₁과 G₂부근에 2개의 인접된 spot로 나타났으며 윗쪽의 것보다 아래쪽의 것이 약간 크며 더 강한 형광을 보여주었다. 한편 표준품의 water adduct는 原點부근에 아주 적으면서도 뚜렷히 밝은 형광을 내는 특이한 spot로 나타났다. A. flavus var. columnaris의 배양물에서 정제한 aflatoxin B₁시료의 water adduct와 acetate adduct 역시 표준품과 같은 TLC 상의 특징을 보여주었다. Stubblefield⁽⁵³⁾ 등이 지적한 바와 같이 chloroform:acetone (9 : 1)의 전개용매는 water adduct를 原點 부근에서 잘 분리시키지 못했으나, isopropyl alcohol:acetone:chloroform (3 : 10 : 87)은 Rf 0.1의 위치로 이동시킴을 관찰할 수 있었다.

요 약

국내의 變質米에서 분리 同定된 Aspergillus flavus 7 균주의 aflatoxin 生成能을 조사하기 위하여 쌀에 인위적으로 배양후 추출, 분리, 정량한 결과 모든 균주가 aflatoxin 특히 B₁을 많이 생성하였고 G₁은 생성하지 못하였다. 이들 균주의 aflatoxin 生成能은 배양기의 변색 과정 및 chloroform 추출액의 색깔과 밀접한 관계가 있었다.

Aflatoxin을 가장 많이 생성한 균주는 A. flavus var. columnaris로서 쌀에서 최고 1 ppm의 aflatoxin B₁을 생성하였으며 정제된 aflatoxin B₁은 자외선 吸收 스펙트럼과 water 및 acetate adduct에 의한 誘導體형성에 의하여 同定하였다.

본 연구에 사용한 곰팡이 균주를 分讓하여 주신 서울대학교 농과대학 曹惠鉉박사에게 깊은 謝意를 표한다.

참 고 문 헌

- 1) Christensen, C. M.: *Botan. Rev.*, **23**, 108 (1957).
- 2) Wilson, B. J.: *The Safety of Foods*, edited by Ayres, J. C. et al., AVI Pub. Co., Westport, Conn., Chapter 20 (1968).
- 3) 栗飯原 景昭: *Japan Analyst*, **21**, 1681 (1972).
- 4) 諸岡信一: *食品衛生學雜誌 (日本)*, **12**, 459 (1971).
- 5) Anonymous: *A National Program of Research for Food Safety*, Report from USDA, 30 pp. (1968).
- 6) Allcroft, R. and Carnaghan, R. B. A.: *Chem. Ind. (London)*, **50**, 7 (1963).
- 7) Carnaghan, R. B. A., Hartley, R. D. and O'Kelly, J.: *Nature*, **198**, 1101 (1963).
- 8) Hartley, R. D., Nesbitt, B. F. and O'Kelly, J.: *Nature*, **198**, 1056 (1963).

- 9) Asao, T., Buechi, G., Abdel-Kader, M. M., Chang, S. B., Wick, E. L. and Wogan, G. N.: *J. Am. Chem. Soc.*, **87**, 882 (1965).
- 10) Wilson, B. J. and Wilson, C. H.: *Science*, **144**, 177, (1964).
- 11) Wogan, G. N.: *Bacteriol. Rev.*, **30**, 460 (1966).
- 12) Wogan, G. M.: *Federation Proc.*, **27**, 932 (1968).
- 13) Goldblatt, L. A.: *Aflatoxin*, Academic Press, New York (1969).
- 14) Anonymous: *Nature*, **212**, 1512 (1966).
- 15) Mislivec, P. B., Hunter, J. M. and Tuite, J.: *Appl. Microbiol.*, **16**, 1053 (1968).
- 16) Goldblatt, L. A.: *Conference on Protein-Rich Food Products from Oilseeds*, ARS, USDA, p. 50 (1969).
- 17) Bolter, R. A. and Schroeder, H. W.: *Cereal Sci. Today*, **11**, 342 (1966).
- 18) Schroeder, H. W.: *Proc. Mycotoxin Research Seminar*, Washington, D. C., June (1967).
- 19) Ashworth, L. T., Mcmeans, T. L. Jr., Pyle, J. L., Brown, C. M., Osgood, J. J. and Ponton, R. E.: *Phytopathology*, **58**, 102 (1968).
- 20) Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Burmeister, H. R., Kwolek, W. F., Shannon, G. M. and Hall, H. H.: *Cereal Chem.*, **46**, 446 & 454 (1969).
- 21) Codner, R. C., Sargeant, K and Yeo, R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **5**, 185 (1963).
- 22) Chang, S. B., Abdel-Kader, M. M., Wick, E. L. and Wogan, G. N.: *Science*, **142**, 1911 (1963).
- 23) Van der Merwe, K. J., Fourie, L. and Scott, De B.: *Chem. Ind. (London)*, 1160 (1963).
- 24) Shotwell, O. L., Hesseltine, C. W., Stubblefield, R. D., and Sorenson, W. G.: *Appl. Microbiol.*, **14**, 425 (1966).
- 25) Diener, U. L. and Davis, N. D.: *J. Am. Oil Chemists' Soc.*, **44**, 259 (1967).
- 26) Schindler, A. F., Palmer, J. G. and Eisenberg, W. V.: *Appl. Microbiol.*, **15**, 1006 (1967).
- 27) Cieglet, A., Peterson, R. E., Logoda, A. A. and Hall, M. H.: *Appl. Microbiol.*, **14**, 826 (1966).
- 28) Wilderman, J. D., Stoloff, L. and Jacobs, R.: *Biotechnol. Bioeng.*, **14**, 492 (1967).
- 29) Joffe, A. Z. and Liskin, N.: *Appl. Microbiol.*, **18**, 517 (1969).
- 30) Reddy, T. V., Viswanathan, L. and Venkatasuramian, T. A.: *Appl. Microbiol.*, **22**, 393 (1971).
- 31) Schroeder, M. W.: *Appl. Microbiol.*, **14**, 381 (1966).
- 32) Pettit, R. E. and Taber, R. A.: *Appl. Microbiol.*, **16**, 1230 (1968).
- 33) Nagarajan, V., and Bhat, R. V.: *Appl. Microbiol.*, **25**, 319 (1973).
- 34) 李泰寧, 李相圭: 한국식품과학회지, **1**, 78 (1969).
- 35) 鄭勇, 權應杓: 豫防醫學會誌, **2**, 1 (1969).
- 36) 이근배, 이장규, 김찬수, 유준, 심길순, 성호경, 전세열, 이회성, 조신애, 이금자: 과학기술처 1970년도 연구개발사업보고서, MOST-R-70-84-PM, 41pp. (1970).
- 37) 이배함, 전영연, 최태주, 주현규, 김상재, 정성구: 建國大學校 學術誌, **12**, 807 (1971).
- 38) 高春明, 崔泰周, 柳駿: 韓國菌學會誌, **1**, 17 (1973).
- 39) 柳駿, 高春明: 延世論叢(延世大學校 大學院), **8**, (부록), 1 (1971).
- 40) 曹惠鉉, 全在根, 金永培: 한국농화학회지, **15**, 193 (1972).
- 41) 金永培, 曹惠鉉: 한국농화학회지, **17**, 54 (1974).
- 42) AOAC: *Official Methods of Analysis*, 11th Ed., p. 429 (197).
- 43) Engstrom, G. W.: *J. Chromatog*, **44**, 128 (1969).
- 44) Beljaars, P. R., and Fabry, F. H. M.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, **55**, 775 (1972).
- 45) FAO/IAEA/IAMS: *Technical Reports Series No. 104, Microbiological Specification and Testing Methods for Irradiated Food*, IAEA, p. 64 (1970).
- 46) Nabney, N., and Nesbitt, B. F.: *Analyst*, **90**, 155 (1965).
- 47) Eppley, R. M., Stoloff, L., and Campbell, A. D.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, **51**, 67 (1968).
- 48) Schroeder, H. W., Cole, R. J., Grigsby, R. D., and Hein, H., Jr.: *Appl. Microbiol.*, **27**, 394 (1974).
- 49) Mateles, R. I., and Adye, J. C.: *Appl. Microbiol.*, **13**, 208 (1965).
- 50) Hesseltine, C. W., Shotwell, O. L., Ellis, J. J., and Stubblefield, R. D.: *Bacteriol. Rev.*, **30**, 795 (1966).
- 51) Schroeder, H. W., and Hein, H., Jr.: *Appl. Microbiol.*, **15**, 441 (1967).
- 52) Sorenson, W.G., Hesseltine, C.W., and Shotwell, O. L.: *Mycopathol. Mycol. Appl. Biol.*, **33**, 49 (1967).
- 53) Stubblefield, R. D., Shotwell, O. L., and Shannon, G. M.: *J. Assoc. Offic. Anal. Chemists*, **55**, 762 (1972).