

Aspergillus parasiticus R-716의 aflatoxin생합성에 미치는 temperature cycling의 영향

정영철 · 성낙계* · 이용욱** · 정덕화*

농촌진흥청 농업기술연구소, 경상대학교*, 서울대학교 보건대학원**

The Effects of Temperature Cycling on the Production of Aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* R-716

Young-Chul Chug, Nack-Kie Sung* Young-Uk Lee** and Duck-Hwa Chung*

Institute of Agricultural Sciences, ORD, Gyeongsang Nat. Univ*, Chinju 620-15, Korea
School of Public Health, Seoul National University** Seoul 110, Korea

ABSTRACT-This study was designed to observe the effects of temperature cycling on the aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* R-716 in modified SLS medium. Temperature cycling resulted in total aflatoxin production more than did constant incubation at either 28°C, which was considered to be optimum for aflatoxin production, or 17.5°C, which had the same total thermal input as the temperature cycling. The aflatoxin biosynthesis correlated with the color intensity of media, but was controversial with lipid biosynthesis, and aflatoxin concentration is not related to changes in the fatty acid compositions of used strain.

Keywords □ *Aspergillus parasiticus* R-716, Aflatoxin production, Temperature cycling

가축의 肝에 치명적인 손상을 주는 것으로 알려진 aflatoxin은 *Aspergillus* 속 및 *Penicillium* 속 등과 어떤 진균류가 생산하는 2 차 대사산물로서 이미 발암물질로 알려진 dimethyl-nitrosoamine보다도 약 3750배의 높은 발암유기력을 나타낸다고 발표된 후¹⁾, 사료는 물론 양곡이나 여러 식품이 aflatoxin에 오염될 가능성으로 관심을 크게 끌게 되었다²⁾.

이러한 aflatoxin의 식품과 사료에서의 생성은 물리적, 화학적 및 생물학적 요인에 영향을 받으며, 그 중 물리적 요인은 온도, pH, 습도, 통기, 배양시간, 배양방법, 햇빛 및 mechanical damage 등이 있고, 화학적 요인으로는 미량원소를 포함한 영양원이며, 생물학적 요인으로는 균주의 종

류, 균의 경쟁적 증식 및 미생물의 detoxification 등을 들 수 있다^{3,4,5)}.

이들 요인 중 온도의 영향은 균의 증식과 aflatoxin 생성에 가장 중요한 인자로 작용하는데, 7.5°C와 40°C 이상에서는 대체로 aflatoxin이 생성되지 않는 것으로 보고되고 있다⁶⁾. 그러나, 이제까지의 온도와 관련된 연구는 거의 일정한 온도에서 행하여져 왔다.

그런데, 실험실에 일정한 조건과 온도에서 aflatoxin 생성균을 배양하는 것보다 낮과 밤의 온도차와 여러가지 환경인자를 받고 있는 농산물과 발효식품에서 더 많은 aflatoxin이 생성되는 경우가 흔히 있다^{7,8)}. 본보에서는 전보⁹⁾에 이어 공시균(*Aspergillus parasiticus* R-716)을 합성배지에서 temperature cycling 시키면서 공시균의 aflatoxin 생성에 미치는 영향을 검토하여 그 결과를 보고하는 바이다.

Received for publication 17 December 1986 ;
accepted 29 December 1986

Reprint Requests; Dr.D.H. Chung, Dept. of Food Engineering, Gyeongsang Nat. Univ. Chinju city.

재료 및 방법

공시균주—공시균주는 전보⁹⁾에서와 같이 본 대학교 식품위생학교실에서 변질미로부터 분리 동정하여 보관중인 *Aspergillus parasiticus* R-176을 사용하였다.

배양방법—1) 포자현탁액: 공시균주를 GPA 사면배지에서 28°C, 8일간 3회 연속 계대배양시켜 충분히 활성화 시킨 후 0.1% tween 80 용액 1 ml과 멸균수 5 ml을 가한 다음 충분히 진탕하여 포자를 씻어내어 포자현탁액을 조제하였다. 여기에 적당량의 멸균수를 첨가하여 현미경으로 포자수를 10⁶~10⁷ ml로 조정하여 각 배지에서 0.5 ml씩 접종하였다. 2) 공시균의 배양: sucrose low salt(SLS) 배지 25 ml을 300 ml 삼각플라스크에 넣고 살균한 다음 상기의 포자현탁액 0.5 ml을 무균적으로 접종한 다음 aflatoxin 최대 생성 온도인 28°C에서 일정하게 배양하거나, aflatoxin 최대 생성 온도인 28°C에서 12시간 cycling시키고, 또는 cycling 할 때와 동일한 total thermal input을 가지는 17.5°C에서 배양하면서 공시균의 aflatoxin 생성 여부를 검토하였다.

배양물의 분석—1) Aflatoxin의 정제 및 정량: 배양물의 aflatoxin 정제 및 정량은 전보⁹⁾에 준하였다. 2) 지질의 분석: ① 지질의 추출: 상기의 방법으로 얻은 건조균체를 마쇄하여 soxhlet 장치를 이용하여 diethylether로서 지질을 추출하여 조지질을 얻었다. ② 지방산의 분리 및 정량: 지방산의 분석은 일본 유화학협회에서 제정한 기준 유지시험법¹⁰⁾에 따라 실시하였다. 즉, 추출한

Table 1. GLC conditions for fatty acid analysis.

Items	Conditions
Instrument	Shimadzu GC-6A
Column	15% DEGS, glass 2m×3mm ID
Detector	Flame Ionization Detector
Column temp.	168°C
Detector temp.	180°C
Carrier gas	N ₂ , 60ml/min.
Chart speed	5 mm/min

Table 2. Relative retention times of the authentic specimens of fatty acids.

Fatty acids	RRT ^{a)}	Fatty acids	RRT
C _{12:0}	0.26	C _{18:0}	2.09
C _{14:0}	0.51	C _{18:1}	2.27
C _{16:0}	1.00 ^{b)}	C _{18:2}	2.69
C _{16:1}	1.17	C _{18:3}	3.64

a): Relative Retention Time.

b): Retention time for palmitic acid (7 min.) is taken as 1.00.

지질 0.5g에 0.3% 황산 ethanol 용액 30 ml을 가하여 12시간 환류시켜 가수분해한 후, 이 용액에 10% alcohol성 KOH 용액 30 ml을 가하여 30분간 검화하고 diethyl ether로서 불검화물을 제거한 다음 물층을 methyl orange 지시약을 사용하여 0.1N HCl로서 산성화한 후 diethyl ether 30 ml로 반복 추출하여 diethyl ether를 제거하여 지방산을 얻었다.

분리된 지방산에 1% p-toluene sulfonic acid와 methanol 용액으로 methyl 화한 후 diethyl ether로서 지방산 methyl ether를 분리하여 감압 농축한 다음 Table 1과 같은 조건에서 GLC를 실시하였다. 이 분석에서 얻은 지방산의 각 peak는 palmitic acid 보유시간(7 min)을 기준으로 하여 Table 2와 같이 표준 지방산 보유시간비(RRT)로서 비교 동정하였다. 3) 기타 물질의 분석: 전보⁹⁾에 준하였다.

결과 및 고찰

이제까지 대부분의 연구자들은 aflatoxin 생성 곰팡이의 온도에 대한 영향을 거의 일정한 온도 조건에서 조사하였다. 그러나, 실험실에서 일정한 온도로 배양하는 것보다 낮과 밤의 온도차와 여러 가지 환경인자의 영향을 받고 있는 농산물과 발효 식품에서 더 많은 aflatoxin이 생성되는 예가 흔히 있다⁵⁾. 따라서 온도를 바꾸어 가며 배양하는 temperature cycling을 합성배지에 적용하여 aflatoxin과 lipid 생합성을 비교 검토하였다.

우선 온도와 배양시간에 따라 aflatoxin의 생성능과 균중식 및 pH 변화를 비교하기 위해 28°C에

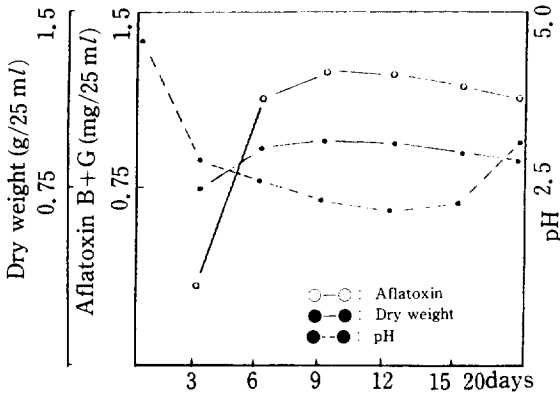


Fig. 1. Relationship of aflatoxin production, dry weight and pH during incubation of *A. parasiticus* in SLS medium at 28°C.

서 12시간, 7°C에서 12시간 cycling 한 것과 cycling 할 때와 동일한 total thermal input를 갖는 17.5°C에서 실험하였다.

그 결과 Fig.1과 같이 28°C에서는 건조균체량이 배양 6일까지 급격히 증가하다가 완만하게 되었고, pH는 Detory¹⁴⁾의 결과와 같이 aflatoxin이 최대 생성된 9일째에 pH 2.3으로 최소가 되었다가 시간이 경과함에 따라 증가하였다.

또한, temperature cycling의 경우는 Fig.2와 같이 28°C보다 pH가 급격히 감소하였고, 건조균체량은 9일째까지 1013 mg/25 ml로 증가한 반

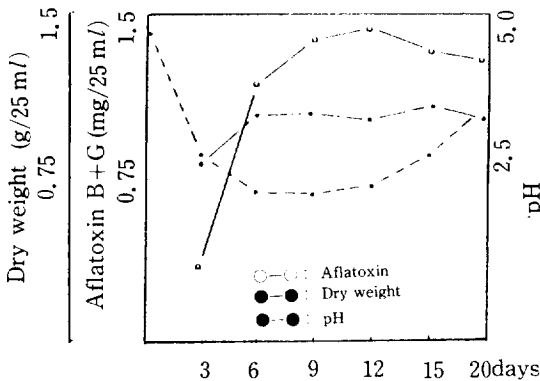


Fig. 2. Relationship of aflatoxin production, dry weight and pH during incubation of *A. parasiticus* in SLS medium at temp. cycling.

면 aflatoxin은 12일째에 1521 $\mu\text{g}/25\text{m}^3$ 이 생성되어 28°C 배양시보다 18%나 증가된 것으로 나타났다.

17.5°C에서는 Fig.3과 같이 pH 변화가 다소 완만하였으며, 균체량은 다른 시험구와 달리 15일까지 계속 증가하였고, aflatoxin 생성은 1284 $\mu\text{g}/25\text{m}^3$ 로서 가장 적게 나타났다.

그런데, 실제로 한국인이 주식으로 하고 있는 곡류와 발효식품은 거의 다 낮과 밤, 저장 또는 전 열시의 온도차를 받고 있으므로 공시균과 같은 aflatoxin 생성 균주가 일단 오염된 경우 다량의 aflatoxin이 생성될 가능성은 매우 높다고 할 수 있다.

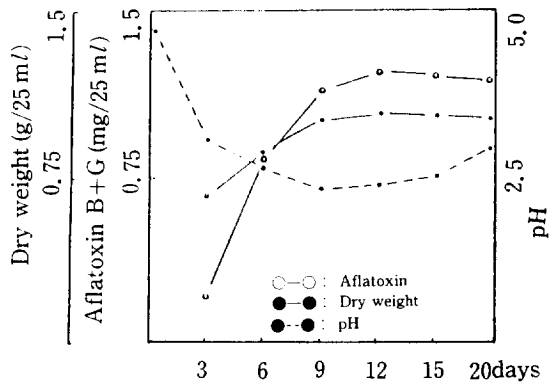


Fig. 3. Relationship of aflatoxin production, dry weight and pH during incubation of *A. parasiticus* in SLS medium at 17.5°C.

또한, 배양온도를 달리하였을 때의 공시균은 aflatoxin 함량과 지질 생성량을 살펴보면 Table 3과 같았다. 28°C에서는 정지기로 들어감에 따라 지질의 축적은 4.11%에서 3.12%로 감소되고, aflatoxin 생성이 증가하는 경향을 보여주었다.

또한, cycling 한 것은 시간이 경과함에 따라 지질의 축적은 28°C보다 현저히 감소하고, 대신에 aflatoxin 생성이 급격히 증가하였다. 17°C에서는 유도기에서 28°C와 cycling 한 것에 비해서 지질의 생성은 높은 반면 aflatoxin 생성이 현저히 작았다. 이와같이, 처리온도에 따라 다소 차이는 있지만 aflatoxin과 지질의 생합성은 반대현상을 보여

Table 3. Aflatoxin production and growth of *Asp. parasiticus* in SLS medium during incubation at different temperature programs.

Temp.			Days of growth					
			3	6	9	12	15	20
28°C	Aflatoxin ($\mu\text{g}/25\text{ml}$)	B 1	262	893	771	671	537	487
		B 2	13	91	101	141	159	216
		G 1	79	215	382	391	407	407
		G 2	21	29	97	145	91	168
		Total	375	1228	1351	1348	1292	1268
	Color		+	++	++	++	++	+++
	Lipid (%)		3.92	4.01	3.12	2.92	2.64	2.51
28°C ~ 7°C	Aflatoxin ($\mu\text{g}/25\text{ml}$)	B 1	283	876	785	752	602	543
		B 2	38	139	161	219	102	117
		G 1	53	274	392	425	468	492
		G 2	11	41	158	125	238	164
		Total	385	1330	1496	1521	1403	1316
	Color		+	++	++	++	++	+++
	Lipid (%)		3.89	3.64	2.89	2.64	2.45	2.52
17.5°C	Aflatoxin ($\mu\text{g}/25\text{ml}$)	B 1	182	573	702	621	536	483
		B 2	12	114	139	102	154	133
		G 1	11	169	318	465	482	494
		G 2	-	15	52	105	112	125
		Total	205	871	1211	1293	1284	1240
	Color		+	+	++	++	++	++
	Lipid (%)		3.96	4.11	4.01	3.78	3.42	3.03

⊕ : very pale yellow

⊕⊕ : pale yellow

⊕⊕⊕ : yellow

주었는데, 이 결과는 Weinberg¹¹⁾를 비롯한 여러 연구자의 결과^{12, 13, 14)}와 유사하였다.

또한 aflatoxin 과 색소는 다같이 2 차 대사산물 이므로 chloroform 추출액의 색깔을 aflatoxin 함량과 비교해 본 결과 앞서 확인한 바와 같이 chloroform 추출액의 색깔이 밝은 노란색일수록 aflatoxin 함량이 많았으나 너무 진한 경우는 오히려 감소하는 경향이였다.

또한, temperature cycling 이 공시균이 생성한 지방의 지방산 조성에 어떤 영향을 미치는가를 관찰하기 위하여 지방산 조성을 분석하였다. 그 결과 Table 4와 같이 각 처리온도에 대한 지방산 조성은 뚜렷한 변화 없었으며, 모든 시험구에서 C_{16:0}, C_{18:1}, C_{18:2}의 지방산 분포가 크게 나타났다. 이상에서 보는 바와 같이 액체배지에서는

temperature cycling 을 적용한 경우가 28°C, 또는 17.5°C로 일정하게 배양하는 것 보다 aflatoxin 생성이 많았다.

Shih¹⁵⁾ 등도 glucose 와 nitrogen 농도 및 배양 온도를 다르게 하여 aflatoxin 과 지질 생합성과 관계를 연구한 결과 aflatoxin 과 지질 생성과는 서로 반대현상을 나타내었다고 보고하였다.

이러한 결과로 미루어 보아 쌀에서 분리된 공시균은 aflatoxin 생산성이 클 뿐 아니라 특히 온도 등의 외적 요인의 변화에 따라 aflatoxin 생성이 크게 증가하는 것으로 나타나, 만약 이와같이 균이 농산물에 오염될 경우 여름에 고온 다습하고, 낮과 밤의 기온 차가 심한 우리나라의 독특한 여건을 고려해 볼 때 문제의 심각성을 우려해 보지 않을 수 없다. 이러한 우리 실정을 감안할 때 전국적

Table 4. Changes in the composition of total fatty acid during incubation of *A. parasiticus* at different temp.

Temperature program	Fatty acids									
	14 : 0 0.49	14 : 1 0.58	16 : 0 1.00	16 : 1 1.16	17 : 1 1.83	18 : 0 2.03	18 : 1 2.21	18 : 2 2.65	18 : 3 3.54	
28°C	3	1.3	Tr	17.9	3.1	1.2	2.9	26.1	46.2	1.3
	6	Tr	1.2	18.6	2.6	Tr	1.2	30.9	43.4	2.1
	9	Tr	1.6	20.1	2.6	Tr	1.7	30.7	41.5	1.8
	12	Tr	Tr	21.5	1.9	1.0	1.6	32.2	40.6	1.2
	15	1.6	Tr	19.0	2.0	Tr	1.8	31.2	42.8	1.6
	20	1.4	2.1	18.8	Tr	2.5	2.1	32.6	38.5	2.0
28°C ~ 7°C	3	1.5	Tr	20.1	2.6	1.9	1.8	30.1	39.7	2.3
	6	Tr	Tr	19.3	1.3	1.2	2.6	32.8	41.1	1.7
	9	Tr	Tr	21.5	2.7	Tr	1.9	30.6	40.8	1.5
	12	Tr	2.6	22.7	3.2	1.0	1.3	29.1	38.5	1.6
	15	1.1	Tr	18.2	4.0	2.0	2.1	29.6	39.2	3.8
	20	Tr	2.7	20.1	4.3	1.8	2.6	32.1	34.4	2.0
17.5°C	3	Tr	1.8	18.2	Tr	3.2	2.3	28.3	44.1	2.1
	6	Tr	1.1	18.9	1.7	1.4	Tr	24.8	50.2	1.9
	9	2.3	Tr	21.5	Tr	2.0	4.6	29.5	38.0	2.1
	12	1.5	2.1	21.7	2.2	Tr	2.1	32.1	37.3	1.0
	15	Tr	3.5	24.5	3.4	1.6	2.6	26.1	34.1	4.2
	20	Tr	Tr	20.6	2.3	2.0	3.2	33.1	35.1	3.7

인 규모로 aflatoxin의 오염상태와 aflatoxin 생성균의 검색은 물론 배양학적 조건들을 조사하는

동시에 aflatoxin의 오염 억제방안을 체계적으로 연구할 필요성이 절실히 요청되는 바이다.

국문 요약

공시균의 생육과 aflatoxin 생성에 미치는 temperature cycling의 영향을 조사하기 위해 temperature cycling(28°C에서 12시간, 7°C에서 12시간) aflatoxin 최대 생성 온도인 28°C 및 temperature cycling 할 때와 동일한 input를 가지는 17.5°C의 세 가지 온도 시험구로 나누어 실험하였다. 그 결과 SLS 배지에서 temperature cycling을 행함으로써 28°C와 17.5°C에서 일정하게 배양하는 것보다 공시균의 aflatoxin 생성이 증가되었다. 공시균의 aflatoxin 생합성은 색소 생성과는 밀접한 관계가 있는 반면 지질 생성과는 상반된 현상을 보였으며, 지방산 조성과는 뚜렷한 연관성을 보이지 않았다.

참고문헌

1. Wogan, G.N., and Newbern, P.M.: Dose response characteristics of Aflatoxin B₁ carcinogenesis in the rat., *Cancer Res.*, **27**, 2370(1967).
2. Sargeant, K., Sheridan, A., O'Kelly, J. and Carnaghan, R.B.A.: Toxicity associated with certain samples of ground nuts, *Nature*, **192**, 1096(1961).
3. Austwick, P.K.C., and Ayerst, G.: Toxic products in ground nuts, ground meal micro-

- flora and toxicity, *Chem. Ind. (London)*, **2**, 55(1963).
4. Majumder, S.K., Nardsimban, K.S. and Parpia, H.A.B.: Microecological factors of microbial spoilage and the occurrence of mycotoxins on stored grains, mycotoxin in foodstuffs, G.A. Wogan editor, 27(1965).
 5. Schroeder, H.W. and Hein, H. Jr.: Effect of temperature cycling on the production of aflatoxin, *Appl. Microbiol.*, **16**: 988, **15**, 441(1967).
 6. Schindler A. F., John Palmer G. and Eisenberg, W.V.: Aflatoxin production by *Aspergillus flavus* related to various temperature, *Appl. Microbiol.*, **15**, 1006(1967).
 7. Stutz, H. K., and Krumperman, P.H.: Effects of temperature cycling on the production of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **32**, 327(1967).
 8. Park K.Y., and Bullerman, L.B.: Increased aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* under condition of cycling temperature, *J. Food Science* **46**, 1147(1981).
 9. Chung, D.H., Kim, J.K., Jang, J.K. and Choi S.C.: Studies on the inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* R-716, *Kor. J. Food Hygiene* **1**(1), 23(1986).
 10. 日本油化学会, 基準油脂試験法, 朝倉書店, 東京, 163(1966).
 11. Weinberg, E.D.: Biosynthesis of secondary metabolites, roles of trace metals, *Adv. Microb. Physiol.*, **4**, 1(1970).
 12. Rambo, G.N. Beam: Sterols and fatty acids of aflatoxin and non aflatoxin producing isolates of *Aspergillus*, *Phytochemistry* **13**, 195(1974).
 13. Shih, C.N., and Marth, E.H.: Some cultural conditions that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*, *Appl. Microbiol.*, **27**, 452(1974).
 14. Detroy, R.W., and Hesseltine, C.W.: Net synthesis of C¹⁴-labelled lipid and aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*, *Ind. Microbiol.*, **15**, 124(1969).