J. Fd Hyg. Safety 14(4), 428–432 (1999)

태양광선에 의한 Aflatoxin의 감소 효과

변영희 · 김종규†
계명대학교 공중보건학과

Effect of Sunlight on the Reduction of Mycelia and Aflatoxins

Young-Hee Byun and Jong-Gyu Kim†
Department of Public Health, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

ABSTRACT – This study was performed to investigate the possible effect of sunlight on the reduction or degradation of mycelia and aflatoxins. The mycelia and aflatoxins were produced by *Aspergillus parasiticus* ATCC 15517 in a yeast-extract sucrose broth (YES) and potato-dextrose agar (PDA) and then exposed to sunlight. The weight of mycelia was decreased to 76.8% in 8 hours and to 66.7% in 168 hours($p<0.05$). The total aflatoxin level was significantly decreased to below 50% (46.3% in the YES broth and 49.6% in the PDA) in 8 hours ($p<0.05$). After 168 hours, a 90.4% degradation of aflatoxin in the YES broth and a 77.2% degradation of aflatoxin in the PDA was observed, respectively ($p<0.01$). The results showed that the degradation ratios of total aflatoxin level increased with increased exposure time to sunlight. These results indicate that sunlight could be an effective factor in aflatoxin degradation although its effect on mycelia was less pronounced.

Key words □ Aflatoxins, Mycelia, Sunlight, *Aspergillus parasiticus*

Aflatoxin은 *Aspergillus*속의 일부 균주에 의하여 생성되는 곰팡이 대사산물로서 인간과 동물에 위해를 나타냄은 물론 식품과 사료 등에 오염되어 경제적 손실을 야기하기도 한다.[1] Aflatoxin의 생성 균주로서는 일찍이 *Aspergillus flavus*와 *A. parasiticus*가 알려졌으며, 최근에는 *A. nomius*도 aflatoxin 생성능이 있는 것으로 제시되었다.[2] Aflatoxin은 동물에서 간에 강력한 발암성을 갖는 것으로 알려져 있고 또 인간에 있어서도 간암 (primary liver cancer)에 어느 정도 관련이 있는 것으로 추측되고 있다.[3]

Aflatoxin은 전세계적으로 식품과 사료 등에서 널리 발현되고 있으며, 그 생성 정도는 기질, 온도, pH, 수분, 환경 및 경쟁되는 microflora 등의 화학적, 생물학적, 그리고 물리적 요인들에 의해서 영향받는 것으로 알려져 있다. 화학적 요인들로서는 각종 약품과 억제제 등이 aflatoxin을 파괴시킬 수 있음이 연구되어 왔으며, 또 이들 중 몇 가지 방법은 소규모이기는 하나 실제로 응용되고 있다.[4] 한편 aflatoxin을 생성하는 곰팡이는 환경 중에서 다른 미생물과 공존하면서 생육하고 있으며, 공존하는 특정의 세균이나 다른 곰팡이 등이 aflatoxin 생성 곰팡이의 성장과 aflatoxin을 비롯한 mycotoxins의 생성을 억제시켰다는 연구 보고들도 있다.[5-7] Aflatoxin을 억제 또는 감소 및 파괴시킬 수 있는 물리적 인자로서는 온도 조절, 열 에너지의 이용, 햇빛에 노출, 및 자외선 조사 등이 주로 거론되어 왔다. Aflatoxin과 온도 조절에 대해서는 일부 연구자들이 고온에서의 aflatoxin의 파괴 또는 분해를 제시하는 등 몇 가지 결과가 보고되어 있다.[8] 그러나 햇빛에 의한 aflatoxin의 감소와 파괴에 대해서는 실용 가능한 방법임에도 불구하고 연구가 미흡하여 구체적인 실험 데이터의 축적이 절실히 필요하다. 따라서 본 연구에서는 자연의 태양광선이 유해 곰팡이 (*A. parasiticus*)에 의하여 생성된 aflatoxin을 감소 및 파괴시키는지의 여부를 시험하고, 그 효과를 측정하였다.

재료 및 방법

실험 재료

균주 및 배지

본 실험에서 사용한 aflatoxin 생성 균주는 *Aspergillus parasiticus* ATCC 15517로서 한국종균협회에서 분양받아서

†Author to whom correspondence should be addressed.

사용하였다. 배지로는 균주의 활성화 및 포자현탁액의 조제를 위해서 potato-dextrose agar (PDA) (Difco laboratories, Detroit, MI)를, 배양을 위해서는 yeast-extract sucrose (YES) 배지를 각각 사용하였다.

시약 및 기구

실험에 사용된 aflatoxin 표준품은 Supelco Inc. (Bellefonte, PA) 제품이며, high performance liquid chromatography (HPLC) 분석을 위하여 HPLC용 methanol과 acetonitrile (Merck Co.)을 사용하였고, 기타 분석에 사용한 시약은 특급이상이었다. 포자수의 조절을 위하여 hematometer와 현미경(Nikon, HFX-II, Japan)을 사용하였다. Aflatoxin의 분리 및 분석을 위하여 HPLC (Waters, U. S. A.)를 사용하였다.

실험 방법

균주 활성화 및 포자현탁액의 조제

*A. parasiticus*는 분양 받아 PDA 사면배지에서 30°C에서 10일 동안 3회 연속 계대배양시켜 충분히 활성화시켰다. 활성화된 균주를 PDA 평판 배지에 접종하여 30°C에서 8일 동안 배양한 후, 형성된 포자에 멸균된 0.1% tween 80 용액 1 ml와 멸균수 5 ml를 가하고 흔들어서 포자를 씻어내는 조작을 3회 반복하였다. 포자수는 멸균수를 더 가하여 현미경으로 검경하면서 10^6/ml로 조절하여 배양에 사용하였다.

배양방법 및 시료의 조제

액체 배양을 위해서 시험관에 YES 배지를 일정량씩 가하여 121°C에서 15분 동안 고압증기 멸균하였다. 고체 배양을 위해서는 멸균 Petri dish에 멸균된 PDA를 일정량씩 분주하여 응고시켰다. 각 시험관 및 Petri dish에 *A. parasiticus* 포자현탁액을 무균적으로 접종하고 30°C에서 7일간 배양하여 aflatoxin을 생성시켰다.

액체 배양 후 배양물을 여과지 (Whatman No. 2)로 여과하여 배양액과 균체를 분리하고 각각을 시료로 준비하였다. 회수된 균체를 증류수로 반복 세척하고 수분을 여과지로 흡입한 후 항량이 되었을 때 중량을 측정하여 초기 균체량으로 하였으며, 이를 태양광선에 노출시킬 균체 시료로 하였다. 한편 배양액은 석영 시험관 (16×150 mm)에 일정량씩 취하여 태양광선에 노출시킬 시료로 하였다. 고체 배양에서 배양된 Petri dish는 그대로 시료로 하였다.

태양광선에 대한 노출

상기와 같이 aflatoxin을 생성시킨 액체 및 고체 배양물과 균체를 자연의 태양광선에 노출시켰다. 즉, 균체는 직접, 액체 배양물은 석영 시험관에 일정량씩 취하여, 그리고 고체 배양물은 배양된 Petri dish를 태양광선에 노출시켰다.

태양광선에의 조사는 US EPA guideline에 의한 광분해 방법[9]에 준하여 개방된 건물의 옥상에서 수행하였다. 나침반을 이용하여 정남향의 방향에서 태양을 향하여 30°경사지게 시료를 배치하고 실시하였다. 태양광선의 강도가 변화하므로 하루 중 낮의 시간을 8시간으로 보고 시간별로 노출시키면서, 균체의 중량을 측정하고 고체 및 액체 시료 중 aflatoxin의 함량을 분석하였다. 태양광선에의 총 노출시간은 168시간 (7일)이었다.

Aflatoxin 분석

시료 중의 aflatoxin 추출은 AOAC(Association of Official Analytical Chemists)법[10] 을 변형하여 수행하였다. 각 시료를 일정량 취하고 여기에 NaCl 및 동량의 methanol을 가한 후 chloroform을 가하여 시험관 교반기로 충분히 교반하여 aflatoxin을 추출하였다. Chloroform층을 분취한 후 다시 chloroform을 가하여 앞의 조작을 반복하고 24시간동안 정치시켰다. Chloroform층을 다시 분취하여 합해서 질소 gas 하에서 증발시키고 그 잔류물을 aflatoxin 정량을 위한 시료로 하였다.

Aflatoxin의 정량은 조제된 chloroform 추출 잔류물을 유도체화 시킨 후 injection solvent를 가하고 HPLC로써 분석하였다. HPLC system은 M510 pump, Rheodyne injector 및 M474 fluorescence detector로 구성하였다. 분석조건은 역상의 C_{18} column (15 cm×3.9 mm I.D.)을 실온에서 사용하였으며, 형광검출기의 여기 파장 365 nm, 방출파장 425 nm에서 25% acetonitrile의 이동상을 1.0 ml/min의 유속으로 흘려 aflatoxins을 분리 및 정량하였다.

자료의 처리 및 분석

각 실험군별 평균치와 표준편차를 계산하고 각 군의 평균치들간의 유의성 검정을 위하여 α=0.05에서 분산분석을 실시하였다. 유의성이 나타난 집단에 대하여는 다중비교검정법(multiple comparison test)으로서 Duncan's multiple range test를 실시한 내용을 가지고 각 군별 평균치의 유의성을 검정하였다.

결과 및 고찰

균체량에 대한 영향

*A. parasiticus*를 YES 배지에 접종하여 성장한 균체를 태양광선에 노출시키고 이를 경시적으로 관찰한 결과는

Table 1. Effect of sunlight on the weight of mycelia produced by *Aspergillus parasiticus* in yeast-extract sucrose broth

Exposure time (hours)	Mycelial weight (mg/5ml)	Reduction (%)
0	206.9±25.2[a]	0.0
8	159.0±8.2b[c]	23.2
24	146.6±3.7[c]	29.1
48	142.8±8.0[c]	31.0
72	141.4±7.5[c]	31.7
96	140.3±8.4[c]	32.2
120	139.6±3.6[c]	32.5
144	138.8± 5.4[c]	32.9
168	138.1± 5.7[c]	33.3

All values represent mean ± S.D.
Values in a column with different superscript letters are significantly different from each other ($p<0.05$).

Table 1에 나타내었다. 태양광선에 의한 균체의 감소 정도는 8시간 후에 23.2%의 유의한 감소를 ($p<0.05$), 24시간 후에 29.1%, 120시간 후에 32.5%, 그리고 168시간 후에 33.3%의 감소를 나타내었다. 따라서 7일 동안의 실험 기간 중 시간이 경과할수록 균체량은 감소하는 경향이었으나 8시간 후에는 더 유의한 감소는 일어나지 않았다.

곰팡이에 대한 제어 대책으로서 물리적 요인이나 생물학적 요인들 중 일부는 우리가 식품에 직접 적용해 볼 수 있는 방법이다. 본 실험에서 나타난 이러한 결과는 다른 생물학적 요인들, 특히 발효에 관여하는 세균에 의한 경우와 비교할 때에 그 효과가 상대적으로 미약하게 평가되었다. 식품 중에서 부패세균 등의 성장을 억제하여 식품의 저장 수명을 연장시키거나 보존성을 증강시키는 데 이용되고 있는 유산균 (*Lactobacillus casei*)의 경우 *A. parasiticus*와 혼합 배양하였을 때에 배양 5일까지 이 곰팡이는 대조군의 약 10% 정도로 성장 (약 80%억제)하였다.[11] 또 메주의 발효에 관여하는 *Bacillus subtilis*의 경우에는 배양 12일까지 대조군의 15%이하로 성장(85%이상 억제)하였다.[12] 한편 유산균 발효유의 경우 배지에 1% 이상으로 첨가되었을 때에 대조군에 비하여 유의한 성장 억제를 나타내었다.[11] 물론 이들은 곰팡이의 접종과 동시에 접종되어 초기부터 같은 계에서 함께 생육하여 곰팡이의 성장을 억제시키는 데 효과를 크게 발휘한 것으로 보인다.

이러한 결과들은 유해 곰팡이가 성장하기 전에 억제 수단을 강구하는 것이 훨씬 효과적임을 실제로 증명하는 것이다. 따라서 식품 중에 곰팡이가 오염되었을 때에는 가능한 초기에 이를 제거하여야 하며, 나아가 식품의 곰팡이 오염을 차단하여야 함을 제시한다.

Aflatoxin 함량의 감소 효과

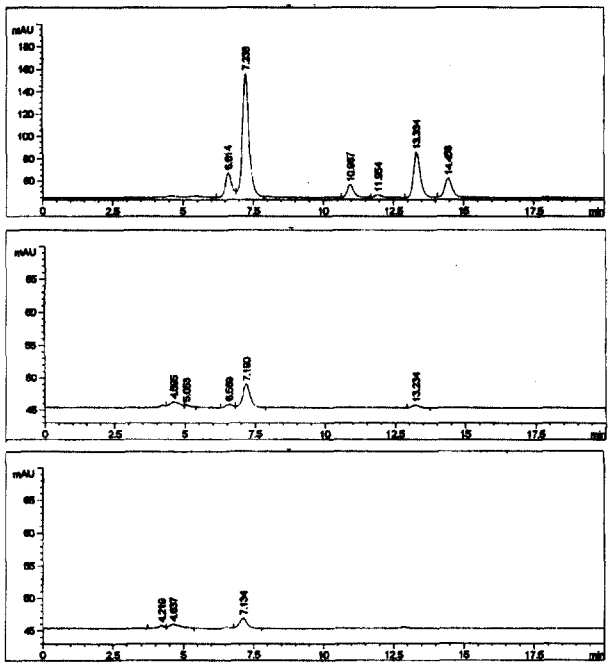

Fig. 1. HPLC chromatograms of aflatoxins. Standards (upper), samples exposed to sunlight for 8 hours (middle), and 168 hours (lower).

*A. parasiticus*를 YES 배지 및 PDA 배지에 접종하여 생산된 aflatoxin을 태양광선에 노출시키고 이를 경시적으로 관찰한 결과는 Fig. 1, Table 2 및 Table 3에 나타내었다.

하루 중 낮의 시간을 8시간으로 보아 태양광선에 노출시킨 결과 YES 배지에서는 총 aflatoxin (B_1, B_2, G_1, 및 G_2)이 53.7%의 유의한 감소를, 그리고 PDA 배지에서는 50.4%의 유의한 감소를 나타내었다 ($p<0.05$). 계속 노출시킨 결과, YES 배지에서는 총 aflatoxin이 24시간 후에 62.6% ($p<0.05$), 120시간 후에 81.7% ($p<0.01$), 그리고 168시간 후에 90.4% ($p<0.01$)의 유의한 감소를 나타내었다.

Table 2. Effect of sunlight on the degradation of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* in yeast-extract sucrose broth

Exposure time (hours)	Total Aflatoxin (ppm)	Reduction (%)
0	480.0±14.1[a]	0.0
8	222.5±3.5[b]	53.7
24	179.5±3.5[c]	62.6
48	165.0±5.7[c]	65.6
72	143.0±17.0[c]	70.2
96	118.5±16.3[c]	74.3
120	88.0±11.3[d]	81.7
144	73.0±2.8[d]	84.8
168	46.3±7.1[e]	90.4

Foot notes are the same as in Table 1.

Table 3. Effect of sunlight on the degradation of aflatoxin produced by *Aspergillus parasiticus* in potato-dextrose agar

Exposure time (hours)	Total Aflatoxin (ppm)	Reduction (%)
0	248.8 ± 11.3[a]	0.0
8	125.5 ± 3.5[b]	50.4
24	101.7 ± 3.8[c]	58.7
48	96.0 ± 4.3[c]	61.5
72	89.5 ± 2.1[c]	64.2
96	83.6 ± 7.7[cd]	67.0
120	78.0 ± 2.8[d]	68.5
144	68.0 ± 8.5[d]	72.6
168	56.5 ± 6.4[d]	77.2

Foot notes are the same as in Table 1.

한편 PDA 배지에서는 24시간 후에 58.7% ($p<0.05$), 120시간 후에 68.5% ($p<0.01$), 그리고 168시간 후에 77.2% ($p<0.01$)의 유의한 감소를 나타내었다.

이와 같이 노출 시간이 경과함에 따라 aflatoxin 함량도 감소되었으며, 24시간 경과 후에는 8시간 후에 비하여 유의하게, 또 120시간 경과 후에는 24시간에 후에 비하여 유의하게 감소되어, 균체의 감소 정도에 비하여 aflatoxin 감소의 효과가 훨씬 크게 나타나고 있다.

일반적으로 이 두가지 배지에서 *A. parasiticus*를 접종 배양하였을 때, 7일 후에 aflatoxin의 생성이 거의 최대치에 달하며 완료되는 것으로 보고되어 있다.[8] 그러나 본 연구의 결과에서는 168시간 (7일) 경과 후에 액체 배지에서는 9.6%, 그리고 고체 배지에서는 22.8%가 남아 있어 완전한 분해를 볼 수 없었다. 즉 식품이나 사료 등에 *A. parasiticus*가 오염되어 aflatoxin이 생성되었을 때, 이를 태양 광선을 이용하여 분해 또는 제거시키려면 생성에 걸린 시간보다 더 많은 시간과 노력이 필요하다는 바를 실증하는 결과라고 할 수 있다.

한편 앞에서 비교한 일부 발효 세균들의 경우, *L. casei*는 배양 말기에 aflatoxin B_1을 7.74%, aflatoxin G_1을 11.84% 감소시켰다.[11] 또 *B. subtilis*는 aflatoxin B_1을 19.9%, aflatoxin G_1을 79.1% 감소시켰다.[12] 한편 유산균 발효유가 배지에 0.1% 첨가되었을 때에 대조군에 비하여 총 aflatoxin이 유의한 감소를 나타내었다.[11] Aflatoxins의 제거 및 파괴에 비교적 유효한 방법으로 일부 학자들에 의하여 화학물질의 사용법이 제시되어 있다. 특히 암모니아와 일부 산화제의 유용성이 제시된 바 있다. 땅콩 식이에 암모니아 가스를 30-60분 동안 노출시켰을 때에 aflatoxin B_1이 97% 감소되었으며 면실 제품에 4% 암모니아를 65분 동안 노출시켰을 때 총 aflatoxin이 98% 감소되었다.[13] 과망간산칼륨 ($KMnO_4$)이나 차아염소산나트륨(NaOCl)을 과산화수소와 함께 처리하였을 때에는 이보다 신속하게 파괴될 수 있는 것으로 보고 있다.[4] 그러나 이러한 방법들을 기구나 집기 등의 처리 또는 동물의 사료에 이용할 수는 있으되 실제로 인간이 먹는 식품에 적용하기에는 무리가 있다.

이에 비하여 본 연구에서 나타난 결과는 자연의 태양광선 등을 이용하는 물리적 방법이 aflatoxin의 파괴 또는 감소에 크게 기여할 수 있다는 바를 제시한다. 비록 7일 동안 aflatoxin의 완벽한 감소 또는 파괴를 관찰하지는 못하였으나 안전하고 경제적인 방법이며 또 어느 곳에서나 실행할 수 있는 방법이다. 다만 본 연구에서는 aflatoxins가 완전히 분해되는 시점까지 관찰하지 못하였으며, 이는 차기의 연구에 기대한다. 또한 앞으로의 연구에서는 태양광선 중에서도 어떤 전리 방사선이 가장 유효한가를 밝혀야 하는 과제도 남아 있다.

감사의 말씀

이 연구는 계명대학교 대학원 학생 학술연구장학금에 의한 것이며, 이에 감사드립니다.

국문요약

물리적 요인이 발암물질 (aflatoxin) 감소 및 파괴에 미치는 영향의 일환으로 자연의 태양광선이 곰팡이 균체 및 aflatoxin을 감소시키는 바를 시험하였다. *A. parasiticus* ATCC 15517을 yeast-extract sucrose (YES)배지 및 potato-dextrose agar (PDA)에 접종하여 균체를 성장시키고 aflatoxin을 생성시켰다. 이를 태양광선에 노출시키고 168시간동안 경시적으로 관찰하였다. 곰팡이의 균체량은 8시간후에 23.2% 감소되었으며 168시간 후에는 33.3% 감소되었다 ($p<0.05$). 총 aflatoxin은 8시간 후에는 YES 배지 및 PDA에서 모두 50%이하로 감소되었으며 ($p<0.05$), 168시간 후에는 YES 배지에서는 9.6%로 그리고 PDA에서는 22.8%로 감소되었다 ($p<0.01$). 이로부터 태양광선에 의한 곰팡이 균체의 감소 정도는 미약하나 aflatoxin의 분해 정도는 그 효과를 기대할 수 있는 수준인 것으로 평가된다.

참고문헌

1. Bullerman, L. B.: Significance of mycotoxins to food safety and human health. *J. Food Prot.*, **42**, 65-86 (1979).
2. Kurtzman, C. D., Horn, B. W., and Hesseltine, C. W.: *Aspergillus nomius*, a new aflatoxin producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamari*. *J. Microbiol.*, **53**, 147-158 (1987).
3. Van Rensburg, S. J., Cook-Mozuffari, P., Van Schalkwyk, D. J., Van Der Watt, J. J., Vincent, T. J., and Pruchase, I. F.: Hepatocellular carcinoma and dietary aflatoxin in Mozambique and Transkei. Br. *J. Cancer*, **51**, 713-726 (1985).
4. Castegnaro, M., Hunt, D. C., Sansone, E. B., Schuller, P. L., Siriwardana, M. G., Telling, G. M., Van Egmond, H. P., and Walker, E. A.,: Laboratory Decontamination and Destruction of Aflatoxins B_1, B_2, G_1 and G_2 in Laboratory Wastes. International Agency for Research on Cancer, IARC Scientific Publications, Lyon (1980).
5. Hurst, A.: Biosynthesis of the antibiotic nisin by whole *Streptococcus lactis* organisms. *J. Gen. Microbiol.* **44**, 209-220 (1966).
6. Karunaraten, A., Wezenberg, E., and Bullerman, L. B.: Inhibition of mold growth and aflatoxin production by *Lactobacillus* spp., *J. Food Prot.*, **53**, 230-236 (1990).
7. Wiseman, D. W. and Marth, E. H.: Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* when in the presence of *Streptococcus lactis*. *Mycopathologia*, **73**, 49-56 (1981).
8. Smith, J. E. and Moss, M. O.: Mycotoxins-Formation, Analysis and Significance. John Wiley & Sons, New York, pp. 133-137 (1985).
9. US Environmental Protection Agency: EPA guideline 40 CFR 795.70. Indirect Photolysis Screening Test-Sunlight photolysis in waters containing dossolved humic substances. US EPA (1997)
10. Association of Official Analytical Chemists: Official Methods of Analysis, 15th ed. AOAC, Arlington, pp. 1185-1205 (1990).
11. 김종규, 이용욱: 유산균과 그 발효유가 *Aspergillus parasiticus*의 생육과 aflatoxin 생성에 미치는 영향, 한국식품위생안전성학회지 **13**(2), 164-170 (1998)
12. 김종규, 노우섭: 한국산 전통 간장과 된장의 숙성중 aflatoxin의 변화와 그 특징-제1보. 경쟁미생물(*Bacillus subtilis*)이 *Aspergillus parasiticus*의 생육과 aflatoxin 생성에 미치는 영향, 한국식품위생안전성학회지 **13**(3), 313-317 (1998)
13. Cucullin, A. F., Lee, L. S. Pans, W. A. Jr. and Stanly, J. B.: Ammoniation of aflatoxin B_1. *J. Agri. Food. Chem.* **24**, 408-414 (1976)