J. Fd Hyg. Safety 13(3), 313 - 317(1998)

한국산 전통 간장과 된장의 숙성중 aflatoxin의 변화와 그 특징-제1보. 경쟁 미생물(*Bacillus subtilis*)이 *Aspergillus parasiticus*의 성장과 aflatoxin 생성에 미치는 영향

김종규† · 노우섭*

*계명대학교 자연과학대학 공중보건학과, *한국식품위생연구원*

Changes of Aflatoxins During the Ripening of Korean Soy Paste and Soy Sauce and the Characteristics of the Changes-Part 1. Effect of *Bacillus subtilis* on the Growth and Aflatoxin Production of *Aspergillus parasiticus*

Jong-Gyu Kim† and Woo-Sup Roh*

Department of Public Health, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

**Institute of Food Hygiene, Seoul 156-060, Korea*

ABSTRACT — **This study was performed to investigate the possible effect of** *Bacillus subtilis* which is the predominant species of bacteria in Korean soy sauce, soy paste, and Meju (soybean cake) on the growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* ATCC 15517. The microorganisms were grown in a modified APT broth and incubated at 30°C for 12 days. Aflatoxins were determined using high performance liquid chromatography (HPLC). A remarkable inhibition of the growth of *Aspergillus parasiticus* was observed during the incubation period when in the presence of *B. subtilis* (mixed culture). Dry mycelial weight in the mixed culture was significantly reduced by 85.3% in comparison to the control at the end of the incubation period ($p<0.01$). Lower levels of aflatoxins were found in the mixed culture than in the monoculture. At the end of the incubation period aflatoxin production was significantly inhibited by more than 50% ($p<0.05$). These results indicate that *B. subtilis* mainly inhibites the growth and aflatoxin production of toxigenic *Aspergillus* in Meju, soy sauce and soy paste. Although its effect on aflatoxin production was less pronounced, we could expect more inhibition by another bacteria related with fermentation in Meju.

Key words □ Aflatoxin, *Aspergillus parasiticus, Bacillus subtilis*, HPLC

Aflatoxins는 *Aspergillus*속 중에서 *Aspergillus flavus, A. parasiticus* 및 *A. nomius* 등의 균주에 의하여 생성되는 곰팡이 대사산물로서[1-3] 인체와 동물에 치명적인 위해를 줄 수 있는 것으로 평가되고 있다. Aflatoxins는 동물에서 간에 강력한 발암성을 갖는 것으로 알려져 있고 인간에 있어서도 간암(primary liver cancer)에 어느 정도 관련이 있는 것으로 추측되고 있으며 급성 간염, Reye's syndrome, 영양불량성 질환의 유발 등이 보고되고 있다.[4-6] Aflatoxins에 의한 이러한 위해는 대개 이들 곰팡이 또는 aflatoxin으로 오염된 곡물과 사료를 섭취함으로부터 기인되는 것으로 본다. 수종의 aflatoxins는 전세계적으로 식품과 사료 등에서 광범위하게 발현되고 있으며, 이는 건강위해 뿐만 아니라 식량자원의 손실 등 막대한 경제적 피해를 야기하는 것으로 나타나고 있다.[1]

식품과 사료 등에서 aflatoxin이 생성되는 정도는 해당 기질, 온도, pH, 수분, 및 경쟁되는 마이크로플로라(microflora) 등의 환경 요인들에 의해서 다르게 나타난다. 따라서 aflatoxin을 감소 또는 제거시키고 또 그 생성 균주를 억제하고자 하는 노력으로서 다양한 화학적, 생물학적, 그리고 물리적 요인을 이용한 방법들이 제시되어 왔다. Aflatoxins

† Author to whom correspondence should be addressed.

를 생성하는 곰팡이는 환경 중에서 대개 그들의 성장과 aflatoxin 생성에 영향을 미칠 수 있는 다른 미생물과 공존하며 상호작용을 갖는다. 이러한 상호작용은 영양분의 가용성을 변화시키기도 하며, 또 곰팡이의 성장과 aflatoxin 생성에 영향을 미칠 수 있는 부산물의 생산을 변화시키게 된다. 실제로 일부 세균 등의 미생물이 aflatoxin 생성 곰팡이의 성장과 aflatoxins를 비롯한 mycotoxins의 생성을 억제시켰음이 보고되었다.[7-9]

한국인은 전통적으로 다양한 발효 식품을 일상적으로 섭취하고 있다. 발효식품과 제품은 그 제조 중에 곰팡이에 오염될 수 있는 바, 알맞은 조건이 되면 이들은 aflatoxin을 비롯한 mycotoxin을 생성할 수 있다.[10-14] 이러한 논리에서 과거로부터 한국인의 암 발생이 발효 식품 중 특히 된장과 관련이 있는 것으로 제시되기도 하였으며 그 대표적인 것이 Crane 등의 보고이다.[15] 그러나 한편으로 한국 된장에는 항암성 등 유익효과가 있는 것으로 추측되고 있어 앞으로 더 진전된 연구를 통하여 이러한 상반된 측면이 보완되어야 할 필요가 있다. 따라서 본 연구에서는 한국인의 전통 간장과 된장 및 그 재료인 메주에서 거의 전 세균군을 이루는 것으로[16,17] 나타나고 있는 *Bacillus subtilis*를 aflatoxin 생성 곰팡이인 *Aspergillus parasiticus*와 경합시켜 그 성장과 aflatoxin 생성에 미치는 억제 효과를 보고한다.

재료 및 방법

균주

본 실험에서 사용한 균주로서 aflatoxin 생성 곰팡이는 *Aspergillus parasiticus* ATCC 15517을 American Type Culture Collection으로부터 분양 받았다. 또한 경합시킬 세균은 *Bacillus subtilis* KCCM 11316을 한국종균협회로부터 분양 받아 사용하였다.

균주 활성화 및 포자현탁액의 조제

*A. parasiticus*는 potato-dextrose agar(PDA)(Difco laboratories, Detroit, MI)의 사면배지에서 28°C로 10일 동안 3회 연속 계대배양시켜 충분히 활성화시켰다. 활성화된 균주를 PDA 평판 배지에 접종하여 28°C로 7일 동안 배양한 후, 형성된 포자에 멸균된 0.1% tween 80 용액 1 ml와 멸균수 5 ml를 가하고 흔들어서 포자를 씻어내는 조작을 3회 반복하였다. 멸균수를 더 가하여 hemacytometer와 현미경(Nikon, HFX-II, Japan)을 사용해서 검경하면서 포자 수를 10^6/ml로 조절하여 배양에 사용하였다. *Bacillus subtilis*는 Nutrient broth(Difco Lab.)에서 28°C로 3회 연속 계대배양한 후 다시 6시간 배양하여 얻은 균액을 실험에 사용하였다.

배양방법

두 균주의 단독 및 혼합배양을 위해서 APT broth(Difco Lab.)에 glucose를 7%로 첨가한 배지(변형 APT 배지)를 사용하였다. 소형 시험관에 변형 APT 배지를 일정량씩 가하여 121°C, 15 lb하에서 15분 동안 고압증기멸균하였다. 여기에 *A. parasiticus* 포자현탁액과 *B. subtilis* 균액을 무균적으로 접종하여 30°C에서 12일간 정치 배양하면서 경시적으로 관찰하였다.

균의 생육도 측정

*A. parasiticus*의 생육도는 건조 균체 측정방법에 의해 실시하였다. 즉, 배양물을 고압증기멸균한 후 여과지로 여과한 다음 균체를 회수하여 증류수로 반복 세척하였다. 이를 50°C에서 24시간 동안 건조시키고 데시케이터에서 방냉한 후 항량을 측정하였다.

배양액의 pH 측정

배양에 따른 pH 변화를 관찰하고자 pH meter(Orion EA 920, U.S.A.)로써 배양액의 pH를 측정하였다.

Aflatoxin의 추출

시료중의 aflatoxin 추출은 AOAC(Association of Official Analytical Chemists)법[18]을 변형하여 수행하였다. 배양이 끝난 배양물을 시험관에 일정량 취하였다. 여기에 NaCl을 가하고, 동량의 methanol과 chloroform을 가한 후 시험관 교반기로 충분히 교반하여 aflatoxin을 추출하였다. Chloroform 층을 분취한 후 다시 chloroform을 가하여 앞의 조작을 반복하고 24시간 동안 정치시켰다. Chloroform층을 합하여 질소 gas하에서 증발시키고 그 잔류물을 aflatoxin 분리 및 정량을 위한 시료로 하였다.

Aflatoxin의 분석

Aflatoxin의 정량 분석은 HPLC를 이용하여 수행하였다. 상기와 같이 조제된 chloroform 추출 잔류물에 trifluoroacetic acid를 가하여 유도체화시킨 후 여기에 주입 용매를 가하여 HPLC 분석을 위한 시료로 하였다. HPLC system(Waters, MA)의 구성은 M510 pump, Rheodyne injector, M746 integrator 및 M474 fluorescence detector를 사용하였다. 측정 조건으로는 역상의 C_{18} column(15 cm × 3.9 mm I.D.)을 실온에서 사용하였으며, 형광검출기의 여기 파장 365 nm, 방출 파장 425 nm에서 20% acetonitrile의 이동상을 1.0 ml/min의 유속으로 흘려 aflatoxins의 분리를 시도하고 정량하였다. 실험에 사용된 aflatoxin 표준품은 Supelco Inc.(Bellefonte, PA) 제품이었다.

자료의 처리 및 분석

각 실험군별 평균치와 표준편차를 계산하고 각 군의 평균치들간의 유의성 검정을 위하여 α=0.01 또는 α=0.05에서 분산분석을 실시하였다. 유의성이 나타난 경우에 대하여는 중비교검정법(multiple comparison test)으로서 Duncan's multiple range test를 실시한 내용을 가지고 각 군별 평균치의 유의차를 검정하였다.

결과 및 고찰

*Aspergillus parasiticus*의 성장에 미치는 억제 효과

곰팡이(*A. parasiticus*)와 세균(*B. subtilis*)을 단독 배양(대조군) 및 혼합 배양하여 경시적으로 성장을 관찰한 결과는 다음과 같다. *A. parasiticus*의 성장을 건조 균체량으로 측정한 결과 혼합 배양시에는 곰팡이만을 단독 배양하였을 때보다 균체의 성장이 배양 초기로부터 현저하게 감소하였다(Fig. 1). 즉, 건조 균체량은 배양 말기에 대조군의 14.7%로 매우 유의하게 낮았다($p<0.01$). 배양액의 pH는 모든 군에서 배양 초기로부터 점차 낮아져 6일째에 최저값을 보이다가 다시 증가하는 경향을 보였다. 한편 혼합 배양시에는 단독 배양시 보다 낮은 경향을 보였다(Fig. 2).

본 연구의 이러한 결과에서 나타나는 바와 유사하게 수종의 세균이 곰팡이의 성장을 억제한다는 보고가 있다. 특히

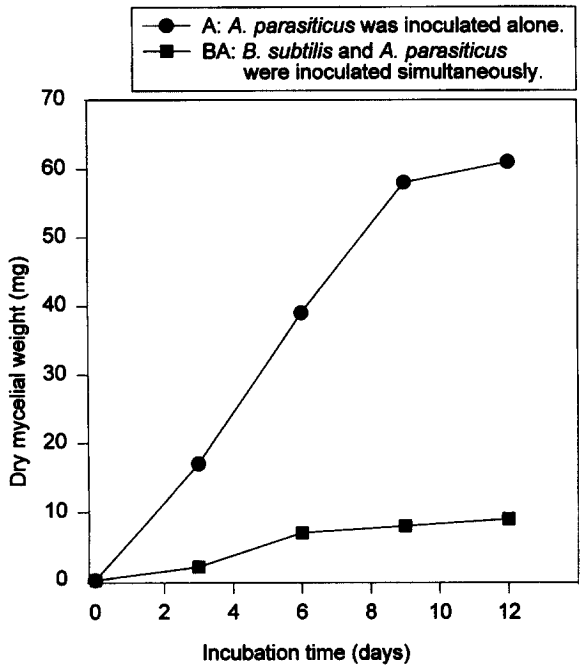

Fig. 1. Mycelial growth of *A. parasiticus* in a modified APT broth with and without *B. subtilis*.

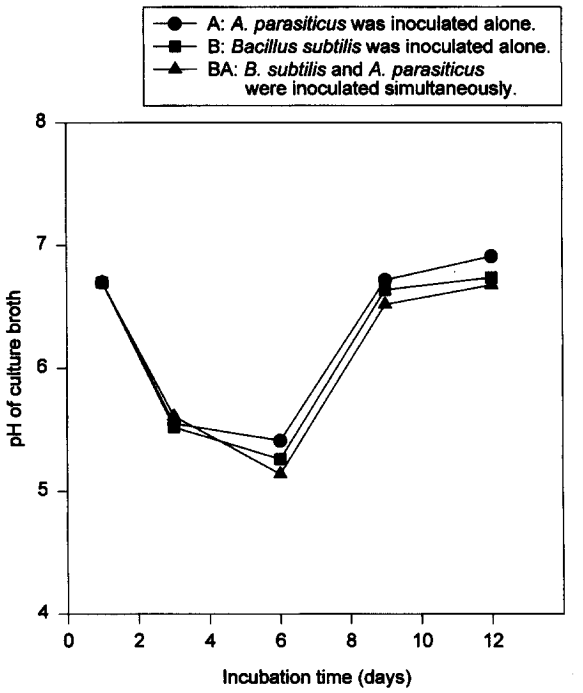

Fig. 2. Changes of pH of a modified APT broth caused by the growth of *A. parasiticus* with and without *B. subtilis*.

발효에 관여하는 유산균 중 일부 세균이 곰팡이에 억제적 역할을 하는 것으로 보고된 바가 있다. 신 등[19]은 *L. casei*와 *L. bulgaricus*가 *Penicillium citrinum*의 성장을 억제시켰다고 보고하였다. Batish[20] 등은 *Lactococcus lactis* subsp *diacetylactis*와 *Streptococcus thermophilus*가 *A. parasiticus* 및 *A. fumigatus*에 억제 효과를 가짐을 보고하였다. 또 김 등[21]은 *L. casei*가 *A. parasiticus*의 성장을 억제시켰음을 보고하였는 바, 이들의 결과에서는 곰팡이의 성장이 배양 초기로부터 5일까지는 거의 억제되었으나 배양 말기에는 대조군에 비하여 유의하게 차이를 보이지 않아 젖산균이 곰팡이의 성장을 매우 지연시킨 것으로 볼 수 있다. 그러나 본 연구에서 *B. subtilis*와 *A. parasiticus*를 혼합 배양한 경우에 *A. parasiticus*만을 단독 배양한 경우보다 배양 초기로부터 말기에 이르기까지 시종 일관 현저한 성장 감소가 관찰되어 그 억제 효과가 매우 큼을 알 수 있었다. *B. subtilis*는 재래식 간장, 된장, 그리고 메주 등에 존재하는 세균군에서 우점종을 이루는 것으로 알려져 있다.[16,17] 따라서 메주의 발효에 관여하는 세균보다는 간장과 된장, 그리고 그 원료인 메주에 상재하는 세균에 의한 곰팡이의 억제 효과가 훨씬 큰 것으로 볼 수 있다.

Aflatoxin 생성에 미치는 억제 효과

한편 단독 배양과 혼합 배양에서 경시적으로 aflatoxin의

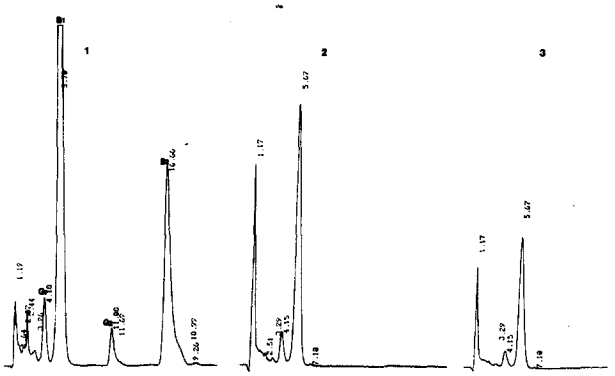

Fig. 3. HPLC chromatograms of aflatoxins. (1) standard, (2) sample extract of control (monoculture), (3) sample extract of mixed culture.

생성량을 HPLC로 분리 및 정량한 결과는 Fig. 3 및 Table 1과 같다. Aflatoxin 측정 결과 *B. subtilis*와 *A. parasiticus*를 혼합 배양하였을 때에는 *A. parasiticus*의 단독 배양시보다 aflatoxin의 생성이 훨씬 감소되었다. 즉 *B. subtilis*는 *A. parasiticus*에 의한 aflatoxin 생성을 억제시킨 것으로 나타났다. 배양 말기에 생성된 총 aflatoxin의 양은 *A. parasiticus* 단독 배양의 경우 24.965 μg/ml이었으나 혼합배양의 경우에는 12.380 μg/ml로서 50.4%의 감소를 보여 유의한 차이를 보였다($p<0.05$). Aflatoxin B_1은 19.9%($p<0.05$), 그리고 G_1은 79.1%가 각각 감소되었다. 또 혼합 배양시에 aflatoxin B_2와 G_2는 검출되지 않아 완전히 억제된 것으로 보인다. 이러한 억제적 영향은 *B. subtilis*와 *A. parasiticus*의 혼합 배양중 *B. subtilis*의 생육에 의한 배양계의 변화로 aflatoxin 합성에 관여하는 효소계와 생합성계의 작용이 원만하지 못하여 aflatoxin 생성이 감소 또는 저해되는 것으로 볼 수 있다. 또한 *B. subtilis*의 대사산물에 의한 영향도 고려해 볼 수 있겠으며, 이를 규명하기 위해서는 보다 구체적인 생화학적 기전에 대한 연구가 필요하다.

유사한 연구로서 Wiseman 등[9]은 *Str. lactis*가, 또 EL-Gendy 등[22]과 김 등[21]은 *L. casei*가 *A. parasiticus*에 의한 aflatoxin 생성을 억제하였음을 보고하였다. 그러나 이들의 보고에서는 해당 유산균이 미치는 억제적 영향이 본 연구에서 *B. subtilis*가 aflatoxin 생성을 억제시킨 정도보다 미약하였다.

Table 1. Growth of organisms, pH, and aflatoxin production by *A. parasiticus* in monoculture and mixed culture in a modified APT broth after 12 days at 30°C

Cultures	Mycelial weight (mg)	pH	Aflatoxin (ppm)				
			B_1	B_2	G_1	G_2	Total
A	61.1[a]	6.91[a]	12.850	9.998	1.988	0.129	24.965[a]
B	–	6.74[b]	–	–	–	–	–
AB	9.0[b]	6.68[b]	10.293	2.087	ND	ND	12.380[b]

A: *Aspergillus parasiticus* was inoculated alone.
B: *B. subtilis* was inoculated alone.
BA: *B. subtilis* and *Aspergillus parasiticus* were inoculated simultaneously.
NS: No significant difference was found between groups.
Values in a column with different superscript letters are significantly different ($p<0.05$).
Each value represents the mean of five samples.

이상과 같이 간장과 된장, 그리고 그 원료인 메주 등에서 상재균으로 나타나는 *B. subtilis*는 유해 곰팡이인 *A. parasiticus*의 성장과 aflatoxin의 생성을 억제하는 것이 충분히 인정된다. 한편 이 두 균주가 혼합 배양되었을 때에 곰팡이 성장은 거의 완벽하게 억제되었으나 aflatoxin 생성 억제는 50.4%에 그쳤다. 그러나 메주의 발효 중에는 *B. subtilis* 뿐만 아니라 앞에서 고찰된 발효 세균 등의 마이크로플로라가 존재할 것이므로 이들 또한 발암성 물질인 aflatoxin의 생성을 함께 저해할 것으로 기대된다.

감사의 말씀

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제 연구비에 의하여 연구되었으며, 이에 감사드립니다.

국문요약

본 연구는 한국 전통 간장과 된장 및 메주 등에서 주된 상재균으로 나타나는 *B. subtilis*가 *Aspergillus parasiticus*의 성장과 발암물질(aflatoxin) 생성에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 수행되었다. 변형 APT 배지를 사용하여 30°C에서 12일 동안 *B. subtilis* KCCM 11316과 *Aspergillus parasiticus* ATCC 15517를 단독 배양(대조군) 및 혼합 배양하고 그 성장과 배양물의 변화를 경시적으로 관찰하였으며 HPLC에 의하여 aflatoxin을 분석하였다. 혼합 배양시에는 곰팡이의 건조 균체량이 배양 직후로부터 배양 말기에 이르기까지 현저하게 억제되

었으며, 배양 말기에 단독 배양시보다 85.3% 감소되었다($p<0.01$). Aflatoxin의 생성량도 배양 말기에 대조군에 비하여 50% 이상 감소되었다($p<0.05$). 이로부터 ***Bacillus subtilis***는 메주 및 간장과 된장에 있어서 유해 곰팡이의 생육과 aflatoxin 생성을 주도적으로 억제하는 것을 알 수 있다. Aflatoxin 생성에 대한 억제 효과는 곰팡이의 성장에 대한 억제 효과보다 낮게 나타났으나 메주 중에는 다른 발효 관련 세균들이 함께 존재하는 바, 이들에 의한 억제적 영향도 기대된다.

참고문헌

1. Bullerman, L.B.: Significance of mycotoxins to food safety and human health, *J. Food Prot.,* **42**, 65-86 (1979).
2. 이용욱, 김종규: 식품위생관리, 한국방송대학교출판부, pp. 114-117 (1997).
3. 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. of Microbiol.* **53**, 147-158 (1987).
4. 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 (1985).
5. Krishnamachari, K., Bhat, R.V., Nagarajan, V. and Tilak, T.B.G.: Hepatitis due to aflatoxicosis. An outbreak in western India, *Lancet,* **I**, 1061-1063 (1975).
6. Devries, H.R., Maxwell, S.M. and Hendrickse, R.G.: Aflatoxin excretion in children with kwashiorkor or marasmic kwashiorkor: A clinical investigation, *Mycopathologia,* **110**, 1-9 (1990).
7. Hurst, A.: Biosynthesis of the antibiotic nisin by whole *Streptococcus lactis* organisms, *J. Gen. Microbiol.,* **44**, 209-220 (1966).
8. 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).
9. 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).
10. Alvarez-Barrea, Pearson, V.A.M., Price, J.F., Gray, Y.I. and Aust, S.D.: Some factors influencing aflatoxin production in fermented sausages, *J. Food Sci.,* **47**, 1773-1775 (1982).
11. Bullerman, L.B.: Incidence of mycotoxic molds in domestic and imported cheese, *J. of Food Safety.,* **2**, 47-58 (1980).
12. Bullerman, L.B., Hartman, P.A. and Ayres, J.C.: Aflatoxin production in meats. I. Stored meats, *Appl. Microbiol.,* **18**, 714-717 (1969a).
13. Bullerman, L.B., Hartman, P.A. and Ayres, J.C.: Aflatoxin production in meats. II. Aged dry salami and aged country hams, *Appl. Microbiol.,* **18**, 718-722 (1969b).
14. Jordano, R., Jordral, M., Martinez, P., Salmeron, J. and Pozo, R.: Aflatoxin producing strains of *Aspergillus flavus* in yogurt, *J. Food Prot.,* **52**, 823-824 (1989).
15. Crane, P.S., Rhee, U. and Steel, D.J.: Experiences with 1079 cases of cancer of the stomach seen in Korea from 1962 to 1968, *Amer. J. Surgery,* **120**, 747-751 (1970).
16. 조덕현, 이우진: 한국 재래식 간장의 발효 미생물에 관한 연구-한국 재래식 메주의 발효 미생물군에 대하여, 한국농화학회지, **13**, 35-42 (1970).
17. 이우진, 조덕현: 한국 재래식 간장의 발효 미생물에 관한 연구-한국 재래식 간장의 담금 중에 있어서의 발효미생물군 소재에 관한 연구, 한국농화학회지, **14**, 137-148 (1971).
18. Association of Official Analytical Chemists: Official methods of analysis, 15th ed., AOAC, pp. 1185-1205 (1990).
19. 신동균, 이용욱, 김종규, 정덕화: *Penicillium citrinum*의 생성과 citrinin 생성에 미치는 젖산균의 영향에 관한 연구, 한국식품위생학회지, **6**(3, 4), 119-126 (1991).
20. Batish, V.K., Grover, S. and Ram, L.: Screening lactic acid starter cultures for antifungal activity, *Cult. Dairy Products J.,* **May**, 21-25 (1989).
21. 김종규, 이용욱: 유산균과 그 발효유가 *Aspergillus parasiticus*의 생육과 aflatoxin 생성에 미치는 영향, 한국식품위생안전성학회지, **13**(2), 164-170 (1998).
22. EL Gendy, S.M. and Marth, E.H.: Growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999 in the presence of lactic acid and at different pH values, *J. Food Prot.,* **50**, 940-944 (1987).