*J. Fd Hyg. Safety 11(2), 97 - 101(1997)*

# Allylisothiocyanate첨가가 *Aspergillus parasiticus* R-716의 배양중 효소활성에 미치는 영향

김성영†
안동전문대학 식품과학과

# Effect of Allylisothiocyanate on the Enzyme Activities During the Culture of *Aspergillus parasiticus* R-716

**Sung-Young Kim†**
*Dept. of Food Science, Andong Junior College, Andong, 760-820, Korea*

**ABSTRACT**—Effect of allylisothiocyanate on the enzyme activities including malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase, NADPH and acetyl CoA which were related to aflatoxin production of *Aspergillus parasticus* R-716 were invetigated. The activities of malate dehydrogenase (EC.1.1.1.37), isocitrate dehydrogenase (E.C.1.1.1.42) and NADPH oxidase (E.C.1.6.99.1) indicated relatively high in the 50 ppm allylisothiocyanate-added-culture. In contrast, the activity of acetyl CoA in the 50 ppm allylisothiocyanate-added-culture showed rather lower level through the cultivation.

**Key words** *Aspergillus parasiticus*, aflatoxin, malate dehydrogenase.

*Aspergillus flavus* 및 *Aspergillus parasiticus*가 생산하는 2차 대사산물인 aflatoxin은 발암유기력이 높은 물질로 알려진 후 여러 식품에서의 오염가능성으로 많은 연구가 되어왔으며,[1-3] 최근에는 인위적으로 이들 물질을 분해시키거나 생성자체를 억제시키려는 노력의 일환으로 약초류를 포함한 농산물이 함유하고있는 특수성분이 미생물의 생육 및 곰팡이독소와 같은 대사산물의 축적을 억제하는 작용이 있음에 근거하여 연구가 활기를 띄고 있다. 즉, Swamianthan 등[4]은 white potato에서 caffeic acid와 비슷하나 ortho-dihydroxy기가 없는 hydroxy cinamic acid가 *Aspergillus parasiticus*의 생육 및 afltoxin생성에 대해 저해력이 높다고 하였으며, Hitokoto 등[5]은 후추의 chloroform 추출물과 고춧가루가, Sharma 등[6]은 양파추출물이, Nortowicz 등[7]은 coffee bean에서 추출한 cafein이 각각 *Aspergillus flavus* 또는 *Aspergillus parasiticus*의 aflatoxin 생성을 억제한다고 보고하였다. 이와 같은 외국에서의 다양한 연구와는 달리 국내에서는 식품에서의 유해곰팡이의 분리 및 분리균의 유해물질 생성에 관한 연구[8-12]가 일부 이루워졌을 뿐 실제 식품에 오염된 aflatoxin의 체계적인 조사나 오염예방에 대한 연구는 미흡한 실정이다. 이러한 실정을 감안하여 저자 등도 식품을 비롯한 천연자원으로부터 aflatoxin 생성균을 광범위하게 분리한 바있고,[13] 분리균중 aflatoxin 생성능이 강한 균주를 공시균으로하여 채소를 비롯한 농산물의 추출물이 공시균의 생육과 aflatoxin 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 그 중 가장 저해효과가 크게 나타난 채소는 무우였으며,[14] 그 원인물질은 무우가 함유하고 있는 allylisothiocyanate임을 밝힌바 있다.[15-16] 본보에서는 allylisothiocyanate의 첨가가 공시균의 지질, 단백질 등의 대사산물의 합성에 미치는 영향을 조사한 전보[17]에 이어 afltoxin합성과 관계가 있는 malate dehydrogenase 등의 몇가지 효소활성에 미치는 영향을 조사하여 그 결과를 보고하는 바이다.

†To whom correspondence should be addressed.

## 실험재료 및 방법

### 공시균주

본 실험에 사용된 공시균주는 진주를 비롯한 서부경남 일원에서 수집한 균원시료로부터 분리하여 실험실에 보관중인 aflatoxin 생성균 *Aspergillus parasiticus* R-716이었다. 또한 본 실험에 사용된 afatoxin 표준품은 Israel의 Markor

사 제품이었고, malate dehydrogenase(MDH), citrate synthetase(CS), NAD, NADP 및 NADPH는 Sigma사 제품이며 allyliosothiocyanate는 일본의 純正化學社에서 구입하였으며 기타 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 포자현탁액 조제

공시균주를 glucose peptone agar(GPA) 사면배지에서 28°C, 8일간 3회 연속 계대배양시켜 충분히 활성화시킨 후 0.1% Tween 80용액 1 m*l*와 멸균수 5 m*l*를 가한 다음 충분히 진탕하여 포자를 씻어내고 적당량의 멸균수를 첨가하여 haematometer로 포자수를 $10^6 \sim 10^7$/m*l*로 조정하여 포자현탁액을 조제하였다. 이 포자현탁액 0.5 m*l*를 각 배지에 접종하였다.

### 공시균주의 배양

Aflatoxin 생성배지인 SLS배지 25 m*l*를 300 m*l* 삼각 flask에 넣고 살균하여 allylisothiocyanate를 50 ppm 첨가하고 상기의 포자현탁액 0.5 m*l*를 무균적으로 접종한 다음, 정치적으로 배양하면서 공시균의 각종 효소활성에 미치는 영향을 조사하였다.

### 효소활성의 측정

**조효소액의 조제** — 일정량의 균체를 차가운 0.1M tris-HCl buffer(pH 7.4 단, malate dehydrogenase 측정용은 0.05 M glycine buffer: pH 10.09) 및 sea sand와 함께 예냉시킨 motor에 넣고 잘 마쇄한 다음 10,000 rpm으로 10분간 냉동원심분리하여 얻은 상징액을 조효소액으로 사용하였다.

**Malate dehydrogenase 활성** — Malate dehydrogenase(EC. 1.1.1.37)의 활성은 methods of enzymatic analysis[18]를 참조하였다. 즉, 0.1M tris-HCl buffer(pH7.4) 1.0 m*l*, 0.05 M L-malate 0.5 m*l*, NAD(mg/m*l*) 0.5 m*l* 및 조효소액 1.0 m*l*을 첨가하여 25°C에서 2분간 반응시켰다. 생성된 NADH의 양을 spectrophotometer로 340 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 흡광도 0.01의 증가를 1 unit로 계산하여 상대활성도로 표시하였다.

**Isocitrate dehydrogenase 활성** — Isocitrate dehydrogenase (EC.1.1.1.42)의 활성은 Chung 등의 효소측정방법[19]을 참조하였다. 즉, 0.1M tris-HCl buffer(pH 7.4)와 4.6 mM DL-isocitrate의 혼합용액 2.5 m*l*, 10 mM NADP와 0.12 M $MnSO_4$ 혼합용액 0.1 m*l* 및 조효소액 0.5 m*l*을 25°C에서 반응시켰다. 효소의 활성단위는 같은 방법으로 표시하였다.

**NADPH oxidase의 활성** — NADPH oxidase(EC.1.6.99.1)의 활성은 Hart 등의 방법[20]을 참조하였다. 즉, 0.1 M tris-HCl (pH 7.4) 2.5 m*l*, 0.36 μM NADPH용액 0.3 m*l* 및 조효소액 0.2 m*l*를 넣고 25°C에서 2분간 반응시킨 다음 NADPH의 감소량을 흡광도로 측정하고, 이때의 효소활성은 흡광도 0.01의 감소를 1 unit로 계산하여 상대활성도로 표시하였다.

### Acetyl CoA 측정

UV-spectrophotometry assay[21]를 참고하여 우선 시료 조제를 위하여 일정량의 균체를 동결건조하여 0.5 N 냉과염소산을 가하고 빙냉하면서 균질화하였다. 내용물의 1/10에 해당하는 4 M 냉과염소산을 가하여 혼합한 후 5분간 정치하고 8N $Ca(OH)_2$로 중화시켜 생성된 과염소산칼륨은 4000 rpm에서 5분간 원심분리하여 상징액을 합해 정용한 것을 분석시료로 하였다. 즉, 상기의 시료 0.8 m*l*과 200 mM tris buffer 0.8 m*l*, 5mM L-malate용액 0.1 m*l* 및 NAD 용액 0.3 m*l*를 시험관에 넣고 혼합하여 5분간 정치시킨 후 1.25 μg/m*l* MDH용액 5 μ*l*를 가하여 5분간 반응시켰고, 다시 1.07g/m*l* CS용액 5 μ*l*를 가하여 5분간 반응 후 생성된 NADH를 340 nm에서 반응단계별로 흡광도를 측정하여 acetyl CoA로 환산하였다.

## 결과 및 고찰

무우속에 함유된 allylisothiocyanate가 공시균의 sterigmatocystin, 지질 및 단백질 등의 생합성에 영향을 주는 것으로 밝혀진 전보[17]에 이어 본 보에서는 aflatoxin을 비롯한 2차 대사산물의 축적이 TCA회로 중간대사산물의 합성과도 깊은 연관성이 있을 것으로 보아 TCA회로상의 몇가지 효소 활성을 비교 측정하여 allylisothiocycante첨가에 따른 영향을 조사하였다. 먼저 malate dehydrogenase(EC.1.1.1.

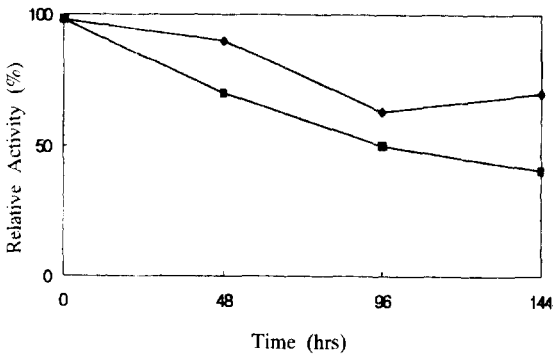


**Fig. 1. Effect of allylisothiocyanate on enzyme activities of *Aspergillus parasiticus* R-716 precultured for 3 days in SLS medium.**
Malate dehydrogenase (EC.1.1.1.37): control (■—■), SLS+allylisothiocyanate (◆—◆)

37)의 활성을 살펴 본 결과 Fig. 1에서 보는 바와같이 allylisothiocyanate 50ppm의 첨가 시험군이 모든 구간에서 활성이 높았으나, 시간의 경과에 따라 대조군과 함께 효소활성이 감소되는 것으로 나타났고, 특히 배양 144시간 후에는 대조군보다 약 40% 이상의 효소활성을 보였다.

한편 isocitrate dehydrogenase(EC.1.1.1.42)의 활성은 Fig. 2와 같이 대조군에서 배양 48시간까지 첨가군보다 높다가 그 이후로 오히려 낮게 나타났으며, 시간이 경과하여 144시간에는 첨가군의 활성이 약 2배 정도 높게 나타났다.

전보[17]에서도 공시균주의 citrate의 합성이 대조군에서는 2.1 mg%의 함량을 보이다가 배양 96시간에는 1.5 mg%로 오히려 감소하였으나 allyisothiocyanate 첨가군은 오히려 계속 증가하는 경향을 보여 본 연구에서 첨가군의 isocitrate dehydrogenase 활성과 유사한 경향이었다. 이와 같이 allyisothiocyanate의 첨가에 의해 TCA 회로와 관련효소의 활성이 정상적인 배양에서의 경우와 다르게 나타남을 알 수 있었다.

또한 acetate를 비롯한 aflatoxin 전구물질을 aflatoxin으로 전환시키는데 필요한 것으로 알려져 있는 NADPH의 함량을 NADPH oxidase의 활성으로 비교 측정한 결과는 Fig. 3과 같이 나타났다. 대조군의 경우 48시간에 가장 낮은 활성을 보여 첨가군보다 30% 정도가 낮은 활성을 나타내다가 그후 증가하였으며 첨가군의 경우는 훨씬 높게 나타났다. Aflatoxin 생성과 관련된 효소는 대수기 후기에 활성이 증가하기 시작하여 정지기로 들어가면서 가장 강하게 나타났으며 이때 NADPH의 소요가 증가된다. 그 이유는 실험의 결과 균체내 NADPH level은 증가하게 되어 aflatoxin합성에 이용될 것으로 생각된다. 또한 이러한 결과는 전보[17]에서 aflatoxin과 동일한 전구체인 acethyl CoA로부터 합성

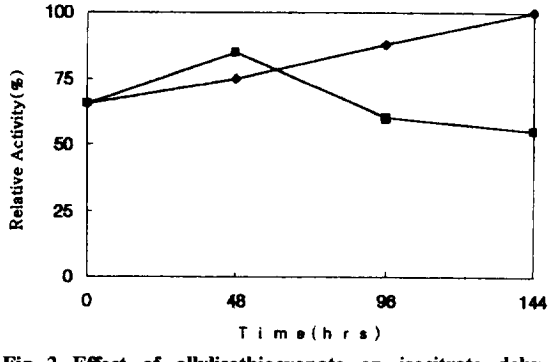


**Fig. 2. Effect of allylisothiocyanate on isocitrate dehydrogenase of *Aspergillus parasiticus* r-716 precultured for 3 days in SLS medium.**
control: ■—■, SLS+allylisothiocyanate: ◆—◆

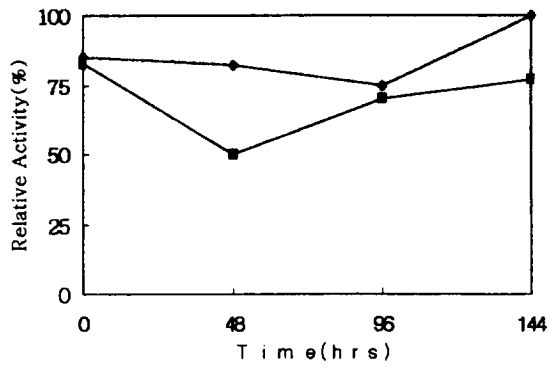


**Fig. 3. Effect of allylisothiocyanate on NADPH oxidae activity of *Aspergillus parasiticus* R-716 precultured for 3 days in SLS medium.**
control: ■—■, SLS+allylisothiocyanate: ◆—◆

되는 지질의 함량이 allyisothiocyanate 첨가로 완만하지만 계속 증가되어 나타나 불완전한 배양조건 하에서는 오히려 균체외 지질의 함량이 높은 경향과도 일치하였으며 이는 대수기를 지났다고 하여도 정상적인 배양에서와 같은 물질대사의 전환이 어려울 것으로 보고한 Gupta 등[22]의 견해와도 같은 경향을 보였다.

Vidya 등[23]도 aflatoxin 생성에 따른 각종 산화효소의 활성을 측정해본 결과 Zn 결핍구에서는 정상배지에서 보다 NADPH oxidase의 활성이 크게 나타났으며 그때의 NADPH/NADP와 aflatoxin 함량은 감소하였다고 하였다. Aflatoxin 생성균주의 정상적인 배양시 고농도의 NADPH가 필요하다는 견해는 Singh 등[24]이 *Aspergillus parasiticus*

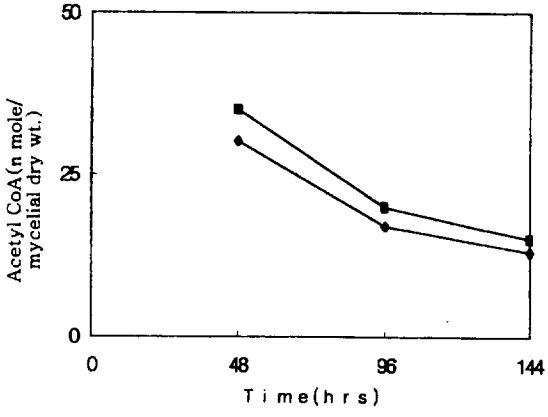


**Fig. 4. Effect of allylisothiocyanate onacetyl Co-A accumulation of *Aspergillus parasiticus* R-716 precultured for 3 days in SLS medium.**
control: ■—■, SLS+allylisothiocyanate: ◆—◆

의 cell free extract에서 sterigmatocystin이 aflatoxin으로 전환될 때 NADPH가 크게 영향을 준다고 보고한 후 Gupta 등[22]도 이것을 인정한 바이다. 뿐만아니라 독소가 acetate에서 polyketide pathway를 통하여 합성되는 것과 관련하여 acetyl CoA함량을 조사한바 Fig. 4에서와 같이 배양 48시간 후 대조군이 배양전기간을 통하여 대체로 높게 나타났다.

이상의 결과를 종합해 볼 때 정상적인 배양에서와는 달리 배양액내에 allyisothiocyanate를 첨가할 경우 균의 생육에 불합리한 환경이 조성되어 생육억제현상이 일어남은 물론 효소계의 이상으로 제2차 대사의 진행이 지연됨으로써 결과적으로 전보에서 나타난 바와 같이 배양액 내의 aflatoxin 함량이 줄어든 것으로 생각된다.[16]

## 국문요약

무우속에 함유되어 allylisothiocyanate의 첨가가 *Aspergillus parasiticus* R-716의 배양시 aflatoxin생성과 관련있는 TCA회로상의 몇가지 효소 즉 malate dehydrogenase, isocitrate dehydrogenase 및 NADPH oxidae 등의 효소활성과 acetyl CoA의 함량을 조사하였다. 그결과 *Aspergillus parasiticus* R-716의 배양에서 균체내 malate dehydrogenase(EC.1.1.1.37), isocitrate dehydrogenase(E.C.1.1.1.42) 및 NADPH oxidae(E.C.1.6.99.1) 등의 효소활성은 50 ppm의 allylisothiocyanate의 첨가로 다소 높은 수준으로 나타났으나 균체내 acetyl CoA함량을 배양기간을 통하여 오히려 낮은 수준을 나타내었다.

## 참고문헌

1. Lin, J. K., Miller, E. C. and Miller, J. A.: 2,3-Dihydro-2-(guan-7-yl)-3-hydroxy aflatoxin $B_1$, a major acid hydrolysis product of aflatoxin $B_1$-DNA or ribosomal RNA adducts formed in hepatic microsome-mediated reaction in rat liver *in vivo, Canacer Research,* **37**, 4430 (1977).
2. Groopman, J. D., Donahue, P.R. and Zhu, J.: Aflatoxin metabolism in human; Detection of metabolites and nucleic acid in urine by immunoaffinity chromatography, *Proc. Natl. Acad. Scius.,* **82**, 6492 (1985).
3. Wyllie, T. D., and Morehouse, L. G.: Mycotoxic Fungi, Mycotoxicoses, Vol. 1, Dekker: 136. (1978)
4. Swamiathan, B. and Koehler, P. E.: Isolation of inhibitor of *Aspergillus parasiticus* from white potato, *J. of Food Sci.,* **41**, 313 (1976).
5. Hitokoto, H., Moruzumi, S., Wauke, T., Sakai, S. and Ueno, I.: Inhibitory effects of condiments and herbal drugs on the growth, *Mycopathologia,* **66**(3), 161 (1978).
6. Sharma, A., Tewari, G. M., Shrikhanda, A. J., Padwal-Desat, S. R. and Bandyopadhyay, C.: Inhibition of aflatoxin producing fungi by onion extracts, *J. Food Sci.,* **44**, 1945 (1979).
7. Nartowicz, V.B., Buchanan, R. L. and Segall, S.: Alatoxin production in regular and decaffeinated coffee beans, *J. Food Sci.,* **44**(2), 446 (1979).
8. 이태령, 이상규: 식품 중 유독성 대사산물에 관하여(제1보). 수종의 한국 대두발효 식품 중 aflatoxin 유무의 검색에 관하여, 한국식품과학회지, **1**, 78 (1969).
9. 정용, 권숙표: 한국발효식품 중 aflatoxin의 함유에 관한 연구, 대한예방의학회지, **2**(1), 1 (1969).
10. 이관령, 이서래: 국내의 변질미에서 분리된 *Aspergillus flavus*의 aflatoxin 생성능, 식품과학회지, **6**(3), 196 (1974).
11. 김용화, 황보정숙, 이서래: 몇가지 한국 식품 중 aflatoxin의 검출, 한국식품과학회지, **9**(1), 73 (1977).
12. 주현규, 권우건: 저장건시 중의 유독성 곰팡이에 관한 연구, 한국산업미생물학회지, **8**(4), 237 (1980).
13. 송재영, 여명재, 정덕화: 천연자원으로부터 aflatoxin생성균의 검색 및 동정,경상대학교 농어촌개발연구소보, **14**, 37 (1995).
14. 정덕화, 김찬조: *Aspergillus parasiticus* R-716의 생육 및 aflatoxin 생성에 미치는 채소추출물의 영향, 대한위생학회지, **1**(1), 109 (1986).
15. 정덕화, 김종규, 장진규, 최수철: *Aspergillus parasiticus* R-716의 aflatoxin 생성저해물질에 관한 연구, 한국식품위생학회지, **1**(1), 23 (1986).
16. 김동술, 정덕화: Allylisothiocyanate가 *Aspergillus parasiticus* R-716의 aflatoxin 생성에 미치는 영향, 한국식품위생학회지, **11**(4), 1996.
17. 강성조, 여명재, 이은일, 송재영, 정덕화 : Allylisothiocyanate첨가가 aflatoxin생성 곰팡이 대사산물의 생합성에 미치는 영향, 동아시아식생활학회, **6**(1), 51 (1996).
18. Hans Ulrich Bergmeyer: Methods of enzymatic analysis, *Academic press,* **2**, 613 (1974).

19. Chung K. T., T. S. Yu and J. K. Kim: Some properties of malic enzyme from malo-alcholic yeasts, *Kor, J. Food Sci. Tech.*, **15**(4), 404 (1983).
20. Hart L. G. and Fouts J. R.: Studies on the possible mechanisms by which chlordane stimulates hepatic microsomal drug metabolism, *Biochem. Pharmac.*, **14**, 263 (1965).
21. Hans Ulrich Bergmeyer : Methods of enzymatic analysis, *Academic press*, **2**, 623 (1974).
22. Gupta, S. R., Viswanathan, L. and Venkitasubramanian, T. A.: A comparative study of the lipids of a toxigenic and a nontoxigenic strain of *Aspergillus flavus, Indian J. Biochem*, 7, 108 (1670).
23. Vidya M. Rao, K. K. Naggon and T. A. Venkitasubrasmanian: Oxidases in *Aspergillus parasiticus* in relation to aflatoxin biosynthesis, *Toxicon*, **18**, 279 (1980).
24. Singh R. and Hsieh D. P. H. : Enzymatic conversion of sterigmatocystin into aflatoxin B1 by cell free extracts of *Aspergillus parasiticus, Appl. Environ. Microbiol.*, **31**, 743 (1976).