J. Fd Hyg. Safety 11(1), 35 - 39(1996)

Allylisothiocyanate가 *Aspergillus parasiticus* R-716의 aflatoxin 생성에 미치는 영향

김동술† · 정덕화*

*국립보건원, 경상대학교 식품공학과**

The Effects of Allylisothiocyanate on the Aflatoxin Production of *Aspergillus parasiticus* R-716

Dong-Sul Kim† and Duck-Hwa Chung*

Dept. of Microbiology, National Institute of Health

**Dept. of Food Science & Technology, Gyeongsang National University*

ABSTRACT — The effect of allylisothiocyanate, the major compound of radish on the growth of *Aspergillus parasiticus* R-716 and aflatoxin production, was investigated. An increase in the level of allylisothiocyanate results in a decrease both growth and aflatoxin per myclial weight, and the addition of 125 ppm allylisothiocynate completely inhibited the growth of this strain. The addition of allylisothiocyanate to the culture of R-716 strain delayed the production of aflatoxin. The inhibition of aflatoxin was more B-group than G-group and M-group during cultural period. The growth of strain and aflatoxin production were greatly affected by the addition of allylisothiocyanate.

Key words □ Allylisothiocyanate, *Aspergillus parasiticus*, Aflatoxin

Aflatoxin은 *Aspergillus flavus*와 *Aspergillus parasiticus*와 같은 균류에 의하여 생산되는 2차대사산물로서 발암, 돌연변이 및 기형발생 등을 유발하는 물질이다.[1] 이러한 균류는 자연계에 널리 퍼져 있으며 환경조건이 양호할 때 독소를 생성하여 많은 종류의 식품 및 사료를 오염시킨다.[2] 따라서 aflatoxin에 의하여 오염된 제품으로 인한 경제적 손실뿐만 아니라 가축과 인간에게 아주 치명적인 해를 끼치기 때문에 큰 관심이 되고 있다. 오늘날 식품산업에 있어서 독소 생성 균주들의 방지와 조절은 심각한 문제를 안고 있으며 대부분의 경우 aflatoxin 생성 억제의 물리, 화학적 조절에 대해서 연구되어 왔으며 인간과 가축에 심각한 건강 문제의 제기 때문에 천연성 비독성 물질에 대한 관심이 높아가고있다.[4] 천연식물이 함유하고 있는 자연적 저항인자를 이용하여 유해 미생물의 성장과 이들에 의한 mycotoxin생성을 방지함은 물론 식품의 저장성을 향상시키는 것은 매우 안전하고 효과적인 일이라고 생각된다. 이와같은 천연물이 유해 미생물의 생육에 미치는 환경에 대한 연구는 일찌기 Chamberland[5]가 cinnamon oil이 *Bacillus anthracis* 생육에 강력산 저해작용이 있음을 보고한 이래 여러 양념류 및 향신료의 특수성분들이 *Aspergillus*를 비롯한 유해 미생물의 생육 및 mycotoxin 생성에 미치는 환경에 대해 연구가 활발히 진행되고 있다.[6-11] 한편 국내에서는 혼합배양에 의한 aflatoxin의 생성능의 연구[12] 및 grapefruit에 의한 성장저해,[13] 된장, 고추가루 및 생약제에 의한 aflatoxin B_1에 대한 항돌연변이 효과,[14-16] 한약제에 의한 aflatoxin 생성 저해효과[17-18]를 확인한 바 있다. 본 연구자들은 전보[19]에서 무우를 비롯한 15종의 채소에 대해 chloroform으로 추출물을 조제하여 공시균의 aflatoxin 생성저해에 관한 논문을 발표한 바 있다. 본 실험에서는 전보[19]의 채소추출물 중 공시균이 생육 및 aflatoxin 생성에 효과를 나타낸 무우의 어떤 성분이 저해 작용을 갖는지를 조사한 결과를 발표하는 바이다.

재료 및 방법

실험재료

본실험에 사용된 공시균주는 진주를 비롯한 서부경남일

† Author to whom correspondence should be addressed.

원에서 수집한 균원시료로부터 분리하여 실험실에 보관중인 aflatoxin 생성균 *Aspergillus parasiticus* R-716 이었다. 또한 본 실험에 사용된 aflatoxin 표준품은 Israel의 Markor사 제품이었고, allyliosothiocyanate는 일본의 純正化學社에서 구입하였고 기타 시약은 특급시약을 사용하였다.

포자현탁액 조제

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

분리균주의 배양

Aflatoxin 생성배지인 SLS 배지[19] 25 m*l*를 300 m*l* 삼각 flask에 넣고 살균한 다음 allylisothiocyanate를 비롯한 첨가물을 적당한 농도로 첨가하고 상기의 포자현탁액 0.5 m*l*를 무균적으로 접종한 다음 경시적으로 공시균의 생육 및 aflatoxin 생성에 미치는 영향을 조사하였다.

Aflatoxin 추출 및 정제

시료중의 aflatoxin추출은 AOAC법[20]에 준하였다. 즉, 액체배지 25 m*l*에 동량의 chloroform을 가하여 2.5시간 진탕시켜 추출하였다. 이 추출물을 2.5시간 진탕시킨 다음 규조토를 균일하게 깐 Buchner funnel로 여과한 후 분액여두로 분획하여 chloroform층만 분리한 후 50 m*l*로 감압농축해서 column chromatography를 하였다. 먼저 glass filter가 부착된 22×300 m*l* column에 무수 Na_2SO_4 5 g을 가하고 chloroform을 1/2정도 채웠다. 그 위에 chloroform으로 현탁하여 활성화된 silicagel 10 g을 가하여 15분간 방치한 다음 15 g의 무수 Na_2SO_4를 다시 첨가하였다. 이렇게 충진된 column에 chloroform 추출물 50 m*l*를 흡착시킨 후 유속 10~20 m*l*/min.가 되게 질소 gas로 조 절하여 n-hexane 150 m*l*와 ethylether 150 m*l*로 지방과 색소를 제거하였으며, column에 흡착된 aflatoxin은 chloroform: methanol(97:3)의 혼합액으로 용출시켜 이 용출액을 감압농축하여 소량의 chloroform으로 vial에 씻어넣어 진공건조기에서 상온 건조하였다. 정제된 건조물은 1 m*l*의 benzene: acetonitrile(98:2)을 가하고 1분간 진탕한 다음 활성화된 0.25 mm silicagel H plate에 10 μ*l*씩 spotting하고 50°C에서 30분간 plate를 다시 활성화시켜서 24±1°C로 조절된 암실에서 chloroform: acetone(9:1) 혼합액을 전개용매로 하여 약 40분간 표준 aflatoxin과 같이 전개시켰다. 분리가 완료되면 plate를 꺼내어 용매를 완전히 날려 보낸뒤 자외선등(UVSL 25 ultraviolet product, INS., U.S.A.)의 365 nm에서 표준품과 비교하였고 TLC chromatogram상에서 Rf치 및 형광색이 표준 aflatoxin과 유사한 spot는 용출하여 분광광도계로 흡수극대를 조사하였다.

Table 1. Condition of high performance liquid chromatography for the analysis of aflatoxin

Type	WATER MODEL 244
Detector	UV 365 nm
Column	Bondapak C18
Flow rate	1 m*l*/min.
Solvent	H_2O:MeOH:Acetonitrile=50:25:10
Chart speed	0.5 cm/min
Sensitivity	0.01~0.5 Aufs*

* Absorbance unit full scale.

Aflatoxin의 정량

Aflatoxin은 high pressure liquid chromatography(HPLC)를 이용하여 Table 1와 같은 조건으로 분석하였다.

결과 및 고찰

각종 무우성분의 영향

무우의 water-chloroform 추출물이 공시균의 생육 및 aflatoxin 생성을 저해하는 전보의 결과를 토대로 본 실험에서는 무우의 어떤 성분이 저해작용을 갖는가를 조사하였다. 즉, 지금까지 무우의 특수성분으로 밝혀진 methanthiol, allyl compound(allylisothiocyanate), hexanol 및 buthyl sulfide 등의 표준물질을 살균한 SLS 배지 25 m*l*에 50, 100, 250 및 500 ppm 씩을 각각 첨가하여 농도에 따른 공시균의 생육 및 aflatoxin 생성에 대한 영향을 조사하였다. 그 결과 Table 2에서와 같이 buthyl sulfide 및 hexanol은 모든 시험구에서 대체로 공시균의 생육을 저해하지는 못하였으나, methanthiol 및 allylisothiocyanate 첨가구에서는 저해효과를 나타내었고, 특히 allylisothiocyanate 250 ppm 에서는 생육이 완전 억제 되었다.

aflatoxin 생성에 대한 영향은 Table 3과 같이 buthyl sulfide는 생육에서와 마찬가지로 촉진하였으며 hexanol도 aflatoxin 생성억제에 별다른 효과가 없었다. Methanethiol 구에서는 50, 100 및 250 ppm 첨가로 대조구에 비해 각각 98, 82, 46%가 생성되었고, 균체 g당 aflatoxin 생성은 각각

Table 2. Inhibitory effect of various compounds on the growth of *Aspergillus parasiticus* R-716

Compound	Conc. (ppm)	Color. of chloroform extract	pH	Mycelin dry weight (g/25 ml)	% Control
Control		yellow	2.3	0.985	100
Butylsulfide	50	yellow	2.2	0.994	101
	100	yellow	2.1	0.986	100
	250	yellow	2.3	1.004	102
	500	yellow	2.2	0.993	101
Hexanol	50	yellow	2.1	0.991	101
	100	yellow	2.2	1.083	110
	250	yellow	1.9	1.003	102
	500	pale yellow	2.3	0.908	92
Methanethiol	50	yellow	2.3	0.935	95
	100	yellow	2.5	0.778	79
	250	pale yellow	3.1	0.493	50
	500	white	4.5	-	-
Allylisothiocyanate	50	pale yellow	2.7	0.748	76
	100	whitish yellow	3.2	0.334	34
	250	white	4.3	-	-
	500	white	4.4	-	-

Table 3. Inhibitory effect of various compounds on aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus* R-716

Compound	Conc. (ppm)	Aflatoxin (μg/25 ml)					
		B_1	B_2	G_1	G_2	Total	% Control
Control		781	143	376	74	1364	100
Butylsulfide	50	768	107	546	11	1432	105
	100	727	265	327	85	1404	103
	250	633	240	411		1459	107
	500	769	192	374	275	1418	104
Hexanol	50	852	127	335	48	1362	100
	100	655	104	472		1409	103
	250	687	254	403	178	1401	103
	500	919	107	267	57	1323	97
Methanethiol	50	574	96	406		1336	98
	100	582	104	347	162	1118	82
	250	356	75	189	85	636	46
	500	-	-	-	16	-	-
Allylisothiocyanate	50	492	84	258	25	859	63
	100	172	26	56	-	254	18
	250	-	-	-	-	-	-
	500	-	-	-	-	-	-

1427, 1437 및 1290 μg으로 나타났다. 이에 비해 allylisothiocyanate 첨가구는 50, 100 ppm 시험구에서 각각 대조구의 63, 18%의 생성비를 나타내었을 뿐만 아니라, 균체 g당 aflatoxin 생성도 1148 및 760 μg의 aflatoxin을 생성하여 대조구보다 낮은 값을 보였다. 이 결과를 토대로 공시균의 생육 및 aflatoxin 생성에 대한 억제효과는 추출물속에 함유된 allylisothiocyanate에 의한 것으로 추정할 수 있었다.

Allylisothiocyanate의 농도별 첨가에 따른 효과

allylisothiocyanate를 0, 10, 25, 50, 75, 100 및 125 ppm을 첨가하여 공시균의 생육과 aflatoxin 생성정도를 검토하였다. 그 결과 Table 4에서와 같이 농도의 상승에 따라 급격한 저해를 나타내었고, 125 ppm에서는 공시균의 생육과 aflatoxin 생성을 거의 볼 수 없었다. 이와같은 현상은 당근종자유[9]에서와 마찬가지로, 대수기에서 allylisothiocyanate와 같은 항균제에 의해 일차적으로 균체성장이 억제되고, 그 결과 효소계에 이상이 생겨 대사작용의 지연으로 aflatoxin 등의 2차대사산물의 축적이 감소되는 것으로 생각된다. 최근 Hitokoto 등[21]은 cloves와 all spice가 Aspergillus속의 생육을 저해했다고 보고했으나, 앞서 기술한 바와같이 대체로 항균작용과 관련된 보문이 주류를 이루었고, 이와같은 식물의 천연저항인자를 곰팡이의 aflatoxin 생합성과 관

Table 4. Effect of different concentrations of allylisothiocyanate on growth and accumulation of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* R-716

Label of allylisothiocyanate (ppm)	Mycellium (g/25 m*l*)	Aflatoxin (μg/25 m*l*)					
		B_1	B_2	G_1	G_2	To-	% Control
Control	0.985	781	143	376	74	1364	100
10	0.925	856	75	322	42	1295	95
25	0.817	525	106	78	95	1104	87
50	0.748	492	87	258	22	859	63
75	0.581	355	88	94	17	554	40
100	0.334	172	26	56	-	254	18
125	-*	-	-	-	-	-	

* No detectable aflatoxin.

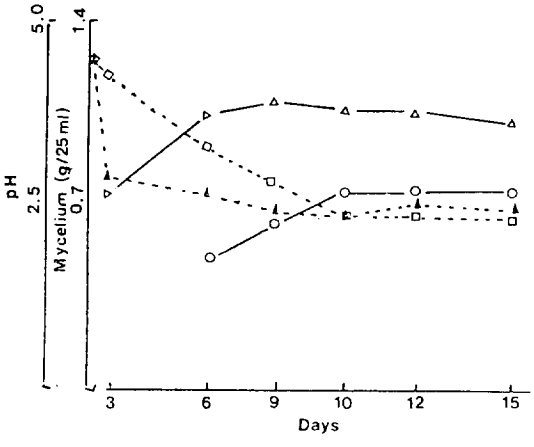

Fig. 1. Effect of different concentrations of allylisothiocyanate on growth and pH during cultivation of *Aspergillus parasiticus* R-716.

	Control	SLS + allyl.
Mycelium:	△-△	□-□
pH:	●-●	▲-▲

련지어 조사한 것은 거의 볼 수 없다.

Allylisothiocyanate의 첨가 영향

50 ppm의 allylisothiocyanate를 배양액에 첨가하여 15일간 배양하면서 allylisothiocyanate의 영향을 조사하였다.

Table 5. Effect of allylisothiocyanate on aflatoxin production during incubation of *Aspergillus parasiticus* R-716

Media	Mycellium (g/25 m*l*)	Aflatoxin (μg/25 m*l*)				
		B_1	B_2	G_1	G_2	Total
SLS	3	262	13	83	17	375
	6	839	82	217	30	1228
	8	762	123	392	75	1352
	10	782	121	354	104	1361
	12	683	139	421	115	1358
	15	582	153	428	140	1303
SLS-allylisothiocyanate (50 ppm)	3	-	-	-	-	-
	6	148	19	51	-	218
	8	390	52	137	36	615
	10	492	187	158	22	854
	12	380	191	208	83	862
	15	381	184	219	92	866

Fig. 1에서와 같이 대조구의 경우 3일까지 대체로 균의 증식이 이루어져 0.735 g/250 m*l*를 보였으나, 첨가구의 경우는 거의 생육이 시작되지 않았다가 6일째에는 0.439 g/25 m*l*로 대조구의 44%에 불과하고, 10일째는 0.745 g/25 m*l*이 되어 대조구의 약 76%가 되는 증식을 보였다. 또한 pH는 균의 증식과 더불어 급격히 떨어져 6일 이후에는 대체로 3.0이하를 유지하였다.

Aflatoxin함량은 Table 5에서 보는 바와 같이, 첨가구의 경우 강한 생육저해현상의 영향으로 배양 6일째에도 경우 218 μg/25 m*l*, 12일째는 862 μg/25 m*l*이 생성되었다. 또한 배양 기간 중의 aflatoxin 종류별 함량은 Table 5처럼 전체적으로는 aflatoxin B군의 함량이 많았으나, 시간의 경과에 따라 그 분포비는 변화하여 점차 감소하였다. 대조구에서는 이와같은 경향이 현저하여, 배양 8일째는 aflatoxin B군의 함량비가 65%에서 57%로 감소한 반면, 첨가구에서는 그 변화가 완만하여 15일째에도 전체의 65%가 aflatoxin B group으로 나타나, allylisothiocyanate 첨가로 생육저해에 따른 mycotoxin 생성의 지연을 초래하였다. aflatoxin B_1에서의 다른 aflatoxin에로의 전환을 비롯한 전체적인 대사진행이 원활하지 못함을 생각할 수 있었다.

국문요약

Aflatoxin 생성균인 *Aspergillus parasiticus* R-716의 생육 및 aflatoxin 생성에 무우의 중요 성분인 allylisothiocyanate가 미치는 영향을 조사하였다. Allylisothiocyanate의 첨가 농도 증가로 공시균의 생육 및 균체

g당 aflatoxin 생성이 현저히 감소하였고 특히 125 ppm 첨가에서 생육이 완전히 억제되었다. 또한 배양기간 중의 aflatoxin 종류별 변화를 살펴보면 aflatoxin G군, M군에 비하여 aflatoxin B군의 변화가 컸으며 시간의 경과에 따라 aflatoxin B군의 분포비는 대조구에서 현저히 감소한 반면 첨가구에서는 완만하게 변화하여 allylisothiocyanate 첨가가 공시균의 생육저해는 물론 aflatoxin 생성을 지연시키는 것으로 나타났다.

참고문헌

1. Ellis, W.O., Smith, J.P. and Simpson, B.K.: Aflatoxin in food: occurrence, biosynthesis, effects on organisms, detection, and methods of control. Crit. Rev. *Food Sic. Nutrition,* **30**, 403-439 (1991).
2. Diener, U. L., Hesseltine, C.W., Ayres, J.C., Carlton, W. W.,Cole, R.J., Goldbllat, L.A., Hamilton, P.B., Hsieh, D. P.H., Marth, E.H., Mirocha, C.J., Pier, A.C., Sinnhuber, R.O. and Wallin, J.R.: Aflatoxin: everybody's poison. *Sci. Food Agric.*, Jan. 8-13 (1987).
3. Park, D.L.: Controlling aflatoxin in food and feed. *Food Technology,* **47**, 92-96 (1993).
4. Samarajeewa, U., Sen, A.C., Cohen, M.D. and Wei, C.L.: Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods. *J. Food Prot.* **53**, 489-501 (1990).
5. Chamberland, M.: Les essences au point devue de leurs propritietes antiseptique. *Ann. Inst. Pasteur,* **1**, 153-168 (1887).
6. Llewellyn, G.C., Burkett, M.E. and Eadie, T.: Potential mold growth, aflatoxin production and mycotic activity of selected natural spices and herbs. *J. Assoc. Office. Anal. Chem.,* **64**, 955-959 (1981).
7. Madhyastha, M.S., and Bhat, R.V.: Evaluation of substrate potentiality and inhibitory effects to identify high risk spices for aflatoxin contamination *J. Food Sci.,* **50**, 376-378 (1985).
8. Buchanan, R. L., Harry, M. A. and Gealt, M. A.: Caffeine inhibition of sterigmatocystin, citrinin and patulin production. *J. Food Sci.,* **48**, 1226-1231 (1983).
9. Batt, C., Solberg, M. and Ceponis, M.: Effect of volatile components of carrots seed oil on growth and aflatoxin production by *Asp. parasiticus. J. Food Sci.,* **48**, 762-768 (1983).
10. Bahk, J.R. and Marth, E.H.: Growth and synthesis of aflatoxin by *Asp. parasiticus* in the presence of ginseng products. *J. Food Prot.,* **46**, 210-213 (1983).
11. James, L.H.: Reducing the microbial content of spices. *Food Inds.,* **10**, 428-435 (1938).
12. 서명자: Bacillus subtillus와 Asp. flavus에 의한 aflatoxin 생성능에 관한 연구, 한국미생물 학회지, **17**, 16-24 (1979).
13. Cho, S. H., Chung, D. H., Seo, I. W., Lee, H. S., Hwang, B. H. and Park, W. P.: Inhibitory effects of grapefruit seed extract on growth and aflatoxin production of *Aspergillus parasiticus. Kor. J. Food. Hygiene,* **7**, 15-19 (1992).
14. 박건영, 문숙희, 백형석, 최홍식: 된장의 Aflatoxin B1에 대한 항돌연변이 효과, 한국영양식량학회지, **19**, 156 (1990).
15. 김소희, 박건영, 서명자: Salmonella assay system에서 고추가루에 의한 Aflatoxin B_1의 돌연변이 유발 저해효과, 한국영양식량학회지, **20**, 156-159 (1991).
16. Moon, S.H., Park, K.Y., Chung, H.Y. and Young, H.S.: Antimutagenic effect of traditional herbal drugs on the Aflatoxin B_1, *J. Food Hyg. Safety,* **10**, 219-225 (1995).
17. 서명자, 김석영: *Asp. parasiticus*에 의한 aflatoxin 생성능에 인삼과 pH가 미치는 영향, 부산대학교 가정대학 연구보고, **7**, 95-101 (1981).
18. Koo, S. H., Lee, Y. W., Chung, D. H. and Kim, J. G.: The effect of Oriential Herbs on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* R-716. *Kor. J. Food Hygiene,* **3**, 89-95 (1988).
19. Chung, D. H., Kim, J. K., J, J. K. and Choi, S. C.: Studies on the inhibitor of aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* R-716. *Kor. J. Food Hygiene,* **1**, 23-28 (1986).
20. AOAC: Official Methods of Analysis. 12th Ed. pp200-256 (1979).
21. Hitokoto, H., Moruzumi, S., Wauke, T., Sakai, S. and Ueno, I.: Inhibitory effects of condiments and herbal drugs on the growth. *Mycopathologia,* **66**, 161-167 (1978).