

## *Aspergillus awamori* var. *fumeus*가 생성하는 효소의 Aflatoxin 분해특성

이 찬 · 이성택<sup>1</sup> · 김영배\*

고려대학교 식품공학과, <sup>1</sup>한국과학기술원 생물공학과

### Aflatoxin Degradation by an Enzyme from *Aspergillus awamori* var. *fumeus*

Lee, Chan, Sung-Taik Lee<sup>1</sup> and Young-Bae Kim\*

Dept. of Food Technology, Korea University, Seoul 136-701, Korea

<sup>1</sup>Dept. of Biotechnology, Korea Advanced Institute of Science and  
Technology, Taedok Science Town, Taejon 305-701, Korea

**Abstract** — Some enzymatic characteristics of the aflatoxin degrading factor produced extracellularly by *Aspergillus awamori* var. *fumeus* were investigated. When aflatoxin B<sub>1</sub> was incubated with the culture filtrate of *A. awamori* var. *fumeus*, 60% of it was degraded within an hour. The degradation rate decreased with time and there was virtually no degradation after one hour. The apparent Michaelis constant ( $K_m$ ) determined by Lineweaver-Burk plot was 10.2  $\mu$ M. The optimum degradation was observed at 30°C and pH 5. For the degradation, molecular oxygen seemed to be required. The degradation was enhanced by the Co<sup>2+</sup>, but was inhibited by many other ions like Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, and Ba<sup>2+</sup>. The presence of either KCN or metyrapone inhibited the reaction while that of NaIO<sub>4</sub>, cytochrome C or NADPH showed no effect.

Aflatoxin은 *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* 등과 같은 곰팡이들에 의해 생성되는 곰팡이 독으로서, 특히 동물에 있어서 급성독성, 돌연변이 유발성, 발암성, 기형 유발성 물질로 잘 알려져 있다.

Aflatoxin은 산, 염기, 산화제와 같은 화학적 처리에 의해서 효과적으로 분해된다(1-3). 그러나 이러한 처리는 식품이나 사료의 영양소의 파괴는 물론 기호성에도 영향을 미치기 때문에 실제로 적용하기에는 문제가 있을 것으로 생각된다. 한편 aflatoxin은 일부 미생물의 배양중에 대사되어 감소하는데 *Absidia*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Penicillium*, 그리고 *Scopulariopsis* 등의 곰팡이 종류 다수와 *Corynebacterium*, *Flavobacterium*, *Nocardia*, *Streptococcus* 등의 세균류에서 다소 분해됨이 보고되고 있다(3, 4).

Doyle과 Marth는 *A. flavus*나 *A. parasiticus*에 의한 aflatoxin의 축적이 정점에 달한 후 다시 분해되는 현상은 이들 균주가 생성하는 균체내 효소들이 관여

한다고 제안하였고(8), 다른 한편으로는 lactoperoxidase에 의한 분해 가능성도 확인하였다(9). 또한 Hamid와 Smith는 이들 aflatoxin 분해효소는 cytochrome P-450 monooxygenase와 관련된 것으로 주장하고 있다(10).

김과 김(11)은 여러가지 koji 곰팡이(*A. awamori* var. *fumeus*, *A. kawachii*, *A. niger*, *A. oryzae*, *A. shiroyamii*)와 *A. flavus*의 혼합배양에서, *A. flavus*에 의한 aflatoxin의 생성이 70% 이상 99%까지도 감소됨을 밝히고 이는 koji 곰팡이의 배양 중에 aflatoxin을 분해하는 인자가 균체 밖으로 생성되고 있다고 하였다. 이어서 梁 등(12)은 *A. awamori* var. *fumeus*가 aflatoxin을 분해함에 균체의 효소가 관여한다고 제안하였다.

본 연구는 *A. awamori* var. *fumeus*의 배양 중에 균체 밖으로 생성되는 aflatoxin 분해인자의 효소로서의 특성을 조사하였기에 보고하는 바이다.

**Key words:** Aflatoxin degrading enzyme, *Aspergillus awamori* var. *fumeus*

\*Corresponding author

#### 재료 및 방법

미생물 균주 및 배양방법

사용한 미생물 균주 *Aspergillus awamori* var. *fumeus*는 이화여자대학교로부터 분양받아 potato dextrose agar(PDA) 사면에서 7일간 28°C 에서 배양한 후 냉장고에 보관하였다. 사용 전에 PDA 사면에서 7일간 배양하여 활성화시킨 곰팡이로 포자 현탁액을 제조하여 50 ml의 yeast extract sucrose(YES) 배지에  $1 \times 10^6$ 씩 접종하여 28°C 에서 정지 배양하였다. 자세한 방법은 이미 보고한 바와 같다(11).

**시약**

Aflatoxin B<sub>1</sub>, NADPH, NaIO<sub>4</sub>, cytochrome C 그리고 metyrapone(2-methyl-1,2-di-3-pyridyl-1-propa-none)은 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다.

**Aflatoxin의 분해반응**

*A. awamori* var. *fumeus*를 5일 배양한 후 이를 Whatman No. 4 여과지로 여과하여 얻은 여액을 조효소액으로서 사용하였다. Aflatoxin B<sub>1</sub> 16~20 µg을 absolute ethanol 100 µl에 녹여 50 ml 삼각 플라스크에 넣고, 900 µl의 0.2 M 초산 완충용액(pH 5)과 조효소액 5 ml를 가하고 혼합하여 100 rpm의 속도로 진탕하면서 30°C 에서 20분간 반응시켰다. 반응은 100°C 로 5분 동안 가열 처리하여 정지시켰다. pH값을 4~5 및 6~8로 조정할 때에는 각각 0.033 M 초산 완충용액 및 0.033 M 인산 완충용액을 사용하였다.

**Aflatoxin의 분석**

Aflatoxin 분해반응물은 10 ml chloroform으로 3회 추출하고 이들을 모아 무수 망초로 탈수시킨 다음 va-

cuum evaporator로 농축시켰다. 농축액을 silica gel HF<sub>254</sub> 박층에서 acetone-chloroform(1:9)로 전개하여 표준물질의 형광 강도와와의 비교에 의한 목적법으로 aflatoxin B<sub>1</sub>을 정량하였다(11).

**결과 및 고찰**

**반응시간에 따른 aflatoxin의 분해**

조효소액과 반응시 반응액에 남아있는 aflatoxin B<sub>1</sub> 농도의 시간에 따른 변화는 Fig. 1과 같다. Aflatoxin의 분해속도는 처음 15분 동안에 가장 빨랐으며 이후에는 점차 늦어져 60분 이후에는 거의 변화가 없었다. 이때 60% 정도의 aflatoxin이 분해되는 것으로 측정되었다.

**Aflatoxin 농도가 분해속도에 미치는 영향**

Aflatoxin의 농도를 달리하여 조효소액과 20분간 반응시키는 동안의 aflatoxin 분해속도의 변화를 조사하여 그 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 기질농도와 반응속도는 각각을 역수로 취하여 표시한 소위 Lineweaver-Burk plotting에서 직선관계를 보였으며 이때 이 직선의 연장선에 의하여 구한 겉보기 Michaelis 상수(K<sub>m</sub>)값은 10.2 µM로 나타났다.

**분해반응에 미치는 금속이온의 영향**

금속이온의 영향을 조사하기 위하여 각종 금속의 염을 1 mM 농도로 첨가한 후 aflatoxin의 분해율을 비교하여 Table 1에 나타내었다. 시험한 금속이온 중 Co<sup>2+</sup>가 20% 정도의 촉진을 보였으며 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 Ba<sup>2+</sup> 따위의 2가 이온들은 20~40% 정도 반응을 저해하였다. 특히 Fe<sup>2+</sup>에 의하여 60% 이상 저해되었으며 K<sup>+</sup>나 Na<sup>+</sup> 등의 1가 이온은 영

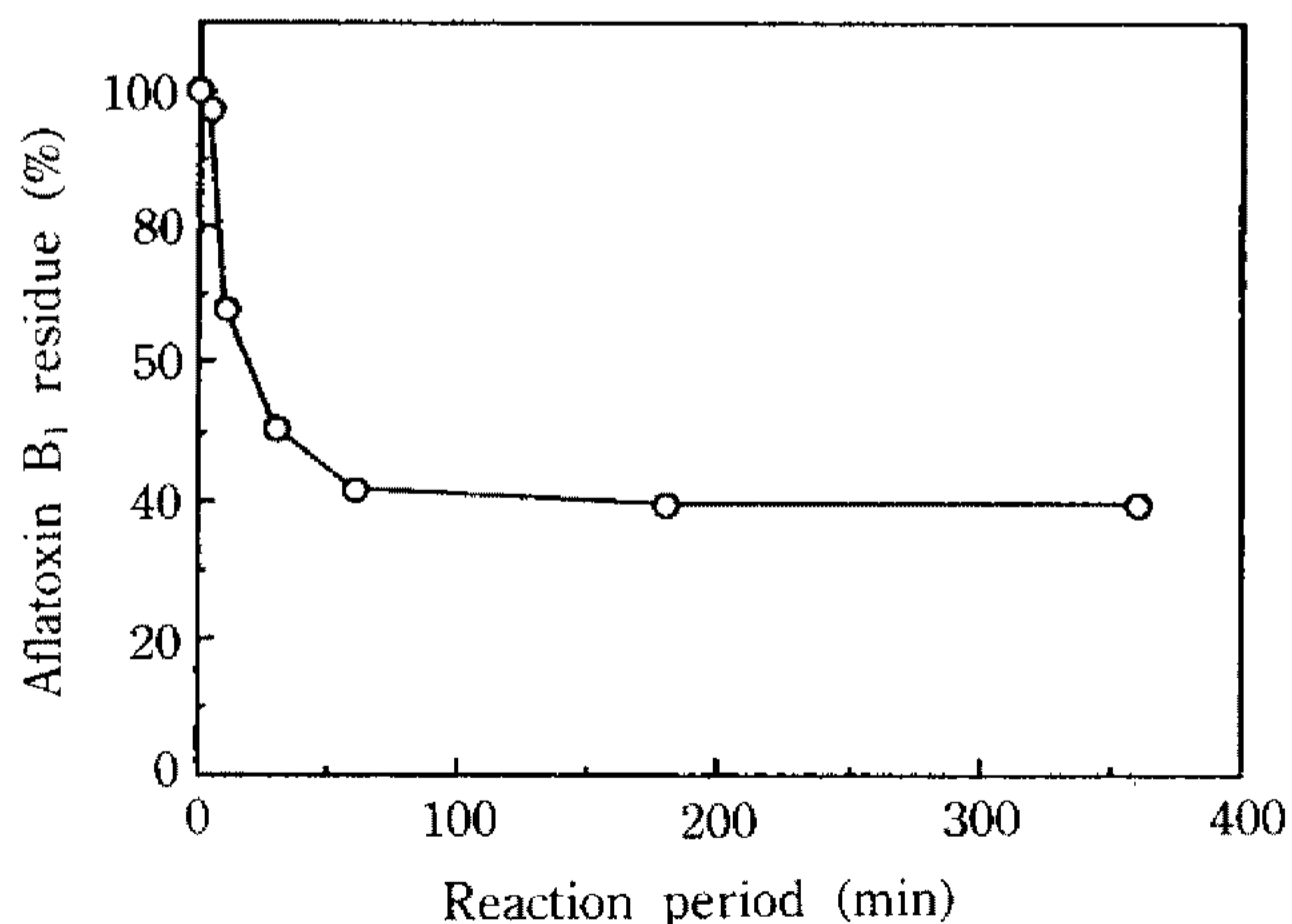


Fig. 1. Effect of incubation periods on aflatoxin B<sub>1</sub> degradation by the culture filtrate of *Aspergillus awamori* var. *fumeus*.

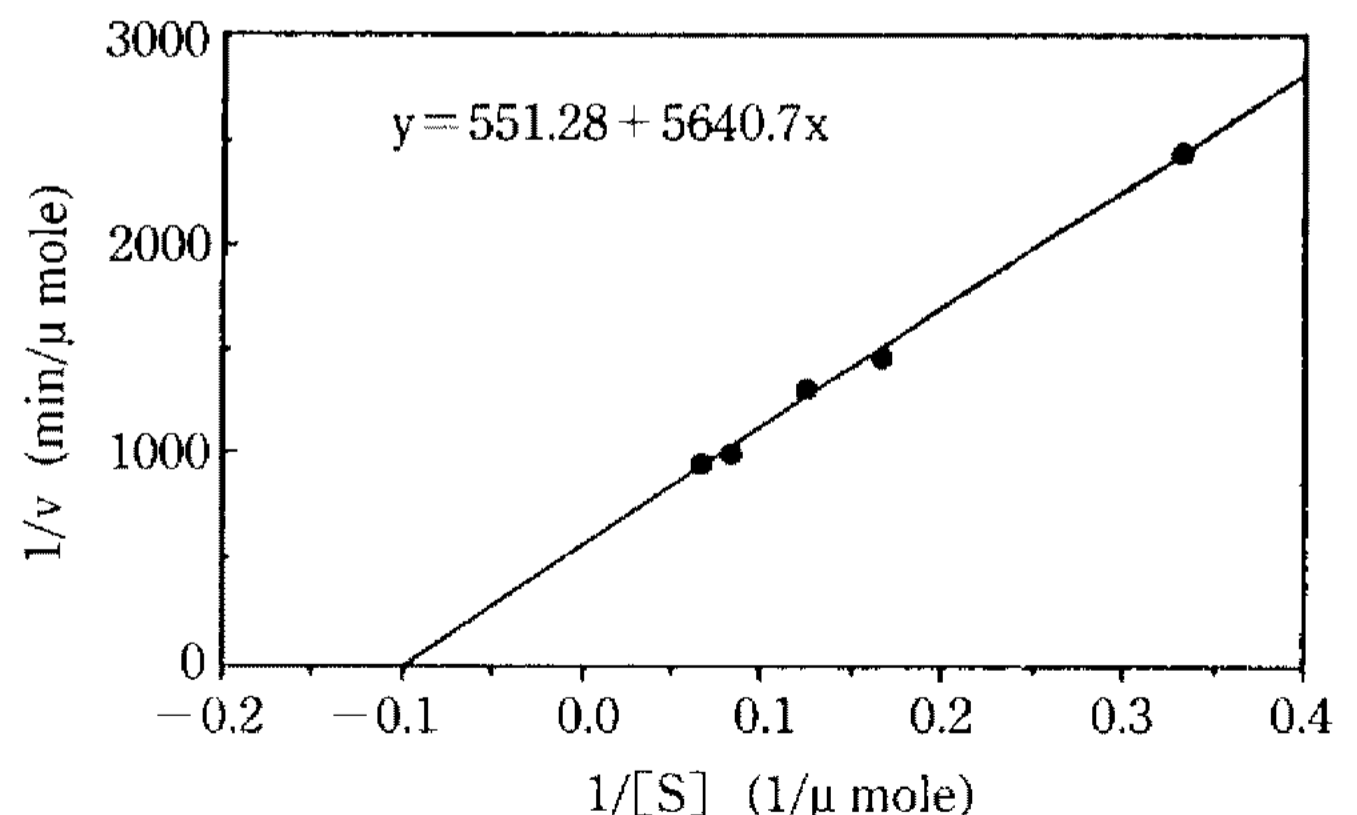


Fig. 2. Effect of aflatoxin B<sub>1</sub> concentration on its degradation by the culture filtrate of *Aspergillus awamori* var. *fumeus*.

**Table 1.** Effect of various metal ions on the degradation of aflatoxin B<sub>1</sub> by the culture filtrate of *Aspergillus awamori* var. *fumeus*

Metal ions	Relative activity (%)
None	100
KCl	100
NaCl	94
CaCl <sub>2</sub>	61
MgCl <sub>2</sub>	83
ZnSO <sub>4</sub>	72
FeSO <sub>4</sub>	36
CuCl <sub>2</sub>	61
BaCl <sub>2</sub>	83
CoCl <sub>2</sub>	122
MnCl <sub>2</sub>	100

**Table 2.** Effect of aeration on the degradation of aflatoxin by the culture filtrate of *Aspergillus awamori* var. *fumeus*

Treatment	Without aeration	With aeration	N <sub>2</sub> gas blowing
Degradation (%)	0	17	3

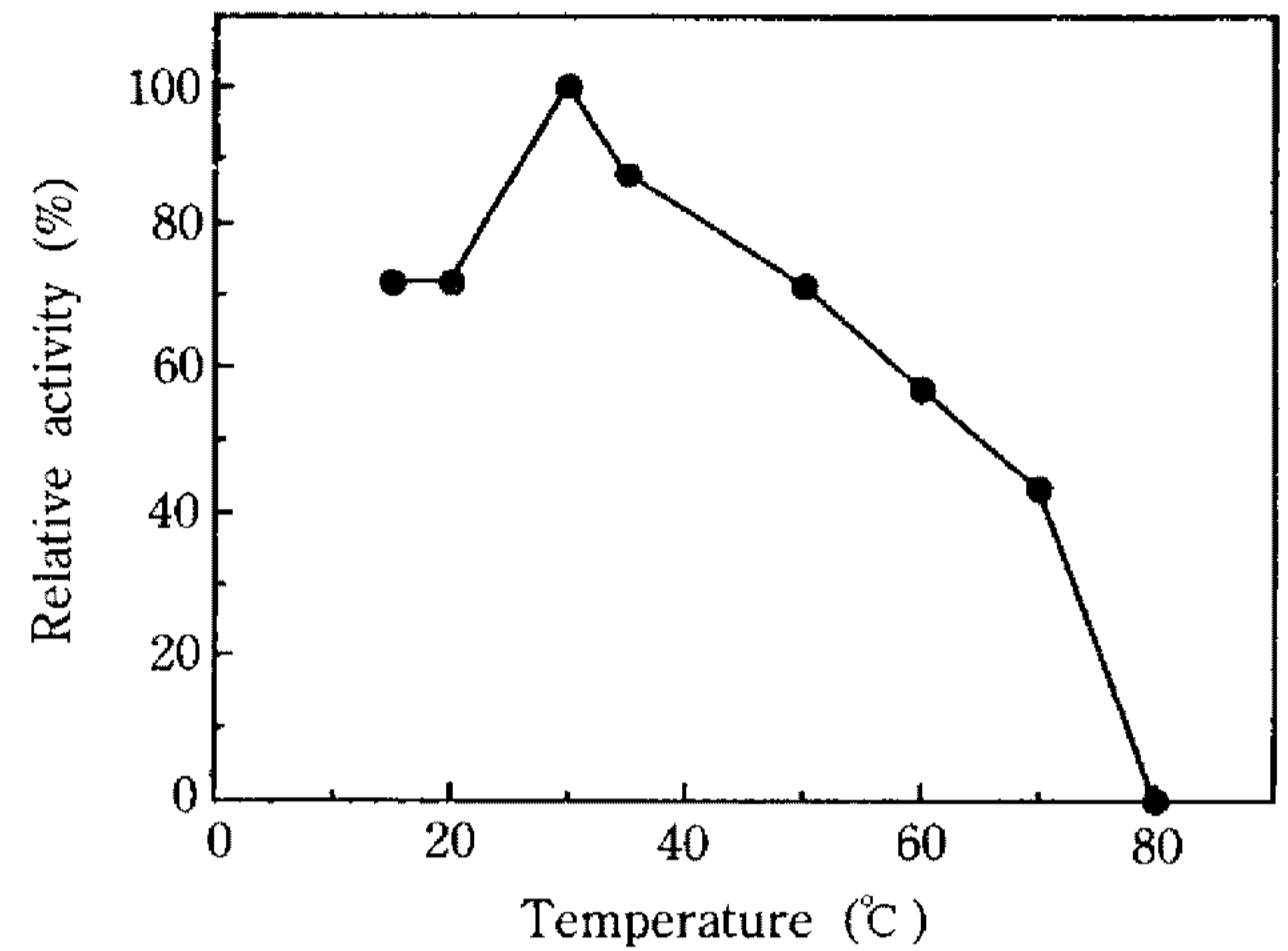
향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

#### 분해반응에 미치는 산소의 영향

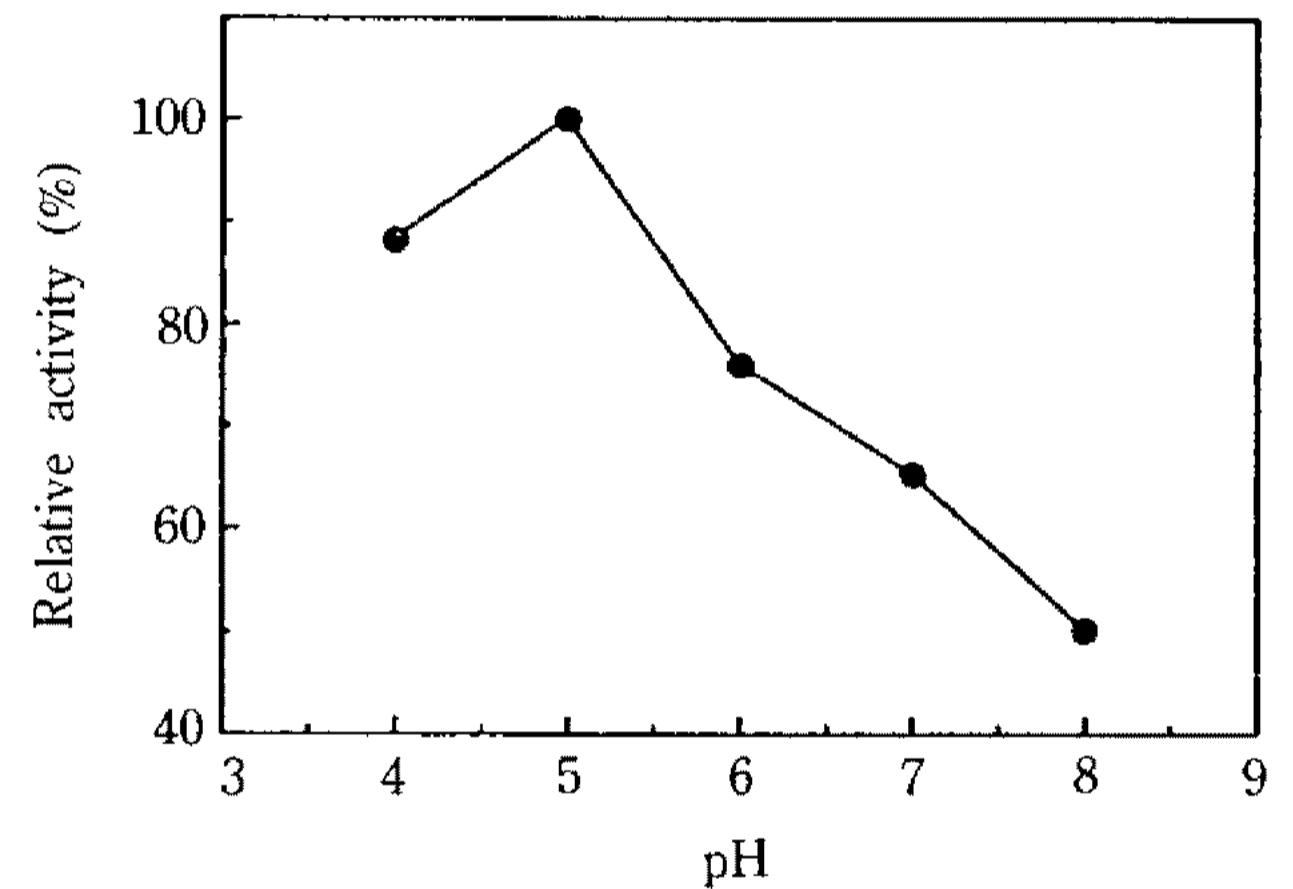
반응중에 공기를 주입시킴으로써 산소의 영향을 조사한 결과는 Table 2와 같다. 질소로 채운 후 밀봉한 경우와 진탕효과를 감안하기 위하여 질소를 주입시켜 반응액의 혼합을 용이하게 한 경우에는 반응 후에 각각 전혀 분해되지 않았거나 3% 정도의 감소가 이루어진 것으로 측정된 반면, 공기를 주입시킨 경우에는 17%의 분해율을 보였다. 분석방법상 3% 정도의 감소는 분해로 보기 어렵다고 판단된다. 통기시에만 aflatoxin의 분해가 이루어진 점은 이 반응에 분자상의 산소가 요구되는 증거로 볼 수 있다. 이 산소가 기질에 흡입되는지, 혹은 전자 수용체로 작용하는지 등의 반응기작을 밝히는 추사가 요구되는 바이다.

#### 분해반응에 미치는 온도 및 pH의 영향

Aflatoxin을 20분간 조효소액과 함께 반응시킬 때, 반응온도가 분해에 미치는 영향을 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 분해반응은 30°C 부근에서 최적이었으며 50°C를 넘으면 반응이 크게 저해되고 80°C에서는 전혀



**Fig. 3.** Effect of temperature on aflatoxin B<sub>1</sub> degradation by the culture filtrate of *A. awamori* var. *fumeus*.



**Fig. 4.** Effect of pH on aflatoxin B<sub>1</sub> degradation by the culture filtrate of *A. awamori* var. *fumeus*.

활성이 나타나지 않았다. 또한 15~20°C에서도 70%의 수준으로 반응이 감소하였다.

한편, 반응에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과는 Fig. 4에서 볼 수 있듯이 최적 pH는 5 부근이며 pH 8에서도 50% 정도의 활성이 나타났다.

#### 몇가지 화합물이 반응에 미치는 영향

Hamid와 Smith(10)는 aflatoxin이 *A. flavus*의 균체내에 존재하는 cytochrome P-450 monooxygenase에 의하여 분해된다고 하였다. *A. awamori* var. *fumeus*가 균체외로 분비하는 물질에 의한 분해도 산소의 존재가 요구되므로 monooxygenase의 일종인가를 시험하기 위하여 0.2 mM NADPH, 0.1 mM cytochrome C, 3 mM NaIO<sub>4</sub>, 10 mM KCN 및 16 mM metyrapone과 같은 전형적인 cytochrome P-450의 촉진제 및 저해제를 첨가하여 15분간의 분해반응에

**Table 3. Influence of some effectors for cytochrome P-450 monooxygenase on the aflatoxin B<sub>1</sub> degradation by the culture filtrate of *Aspergillus awamori* var. *fumeus***

Effectors	Degradation rate (%)	
	Without* crude enzyme	With** crude enzyme
None	0	29
NaIO <sub>4</sub>	15	42
KCN	3	15
Cytochrome C	4	31
NADPH	4	29
Methyrapone	23	29

The basal reaction mixture consisted of 15.1 µg aflatoxin B<sub>1</sub> in 100 µl ethanol and 900 µl 0.2 M acetate buffer (pH 5).

\*Added with 5 ml water for control

\*\*Added with 5 ml culture filtrate of *A. awamori* var. *fumeus*

미치는 영향을 조사한 결과는 Table 3과 같다. 조효소에 의한 분해반응은 KCN에 의하여 저해되고 metyrapone도 저해제로 작용한다고 생각되었다. 그러나 NaIO<sub>4</sub>와 cytochrome C는 촉진제로서의 효과를 보이지 않았다. 그리고 NADPH의 첨가도 반응에 영향을 미치지 않았다. 대조구로서 조효소를 첨가하지 않은 경우에도 aflatoxin이 감소된 것으로 측정되었는데, NaIO<sub>4</sub>는 산화력 때문에 그 자체로도 aflatoxin을 분해함이 보고되고 있으나(10) metyrapone의 경우에는 분석에 영향을 미친 결과로 생각되나 추사가 필요하다. 기타 5% 미만의 감소는 분석방법의 문제로 감안되어야 한다고 생각한다. 이상의 결과에서 cytochrome P-450 monooxygenase의 전형적인 촉진제에 의한 촉진 효과가 나타나지 않았으며, 특히 기질의 하나인 NADPH의 첨가도 영향이 없는 것으로 미루어 *Aspergillus awamori* var. *fumeus*가 균체 밖으로 생산하는 aflatoxin 분해인자는 monooxygenase와는 다른 것으로 생각된다.

## 요 약

*Aspergillus awamori* var. *fumeus*가 균체 밖으로 생산하는 aflatoxin 분해인자의 효소적 특성을 조사하기 위하여 그 배양 여액을 aflatoxin B<sub>1</sub>과 반응시킨 결과 1시간 동안 60%의 기질을 분해하였다. 반응속

도는 초기에 가장 높았으며 시간이 지날수록 낮아졌다. 반응속도와 기질농도의 관계는 이중역수 식에서 직선을 보이며 겉보기 K<sub>m</sub>은 10.2 µM로 측정되었다. 최적온도 및 최적 pH는 각각 30°C 및 5로 나타났다. 반응은 분자상 산소를 요구하며 Co<sup>2+</sup>에 의해서 촉진되나 Fe<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> 및 Ba<sup>2+</sup> 등의 이온에 의하여 저해되었다. 또한 KCN과 metyrapone에 의하여 저해되나, NaIO<sub>4</sub>, cytochrome C 및 NADPH에 의한 영향은 관찰되지 않았다.

## 감사의 글

본 실험은 1989년 학술진흥재단의 지원으로 이루어졌으며 사용된 *A. awamori* var. *fumeus*는 이화여대 이서래 박사님께서 분양해 주셨습니다. 깊은 감사를 드립니다.

## 참고문헌

1. Trager, W. and L. Stoloff. 1967. Possible reactions for aflatoxin detoxification. *J. Agr. Food Chem.* **15**: 679-681.
2. Marth, E.H. and M.P. Doyle. 1979. Update on molds: degradation of aflatoxin. *Food Technol. Jan.*: 81-87.
3. Mann, G.E., H.K. Gardner, Jr., A.N. Booth and M.R. Gumbmann. 1971. Aflatoxin inactivation: chemical and biological properties of ammonia and methylamine treated cottonseed meal. *J. Agr. Food Chem.* **19**: 1155-1158.
4. Detroy, R.W. and C.W. Hesseltine. 1970. Aflatoxinol: structure of a new transformation product of aflatoxin B<sub>1</sub>. *Can. J. Biochem.* **48**: 830-832.
5. Cole, R.J., J.W. Kirksey and B.R. Blankenship. 1972. Conversion of aflatoxin B<sub>1</sub> to isomeric hydroxy compounds by *Rhizopus* spp. *J. Agr. Food Chem.* **20**: 1100-1102.
6. Mann, R. and H.-J. Rehm. 1977. Abbau von Aflatoxin B<sub>1</sub> durch verschiedene mikroorganismen. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **163**: 39-43.
7. Lillehoj, E.B., A. Ciegler and H.H. Hall. 1967. Aflatoxin B<sub>1</sub> uptake by *Flavobacterium aurantiacum* and resulting toxic effects. *J. Bacteriol.* **93**: 464-471.
8. Doyle, M.P. and E.H. Marth. 1978. Aflatoxin is degraded by fragmented and intact mycelia of *Aspergillus parasiticus* grown 5 to 18 days with and without agitation. *J. Food Prot.* **41**: 549-555.

9. Doyle, M.P. and E.H. Marth. 1978. Degradation of aflatoxin by lactoperoxidase. *Z. Lebensm. Unters.-Forsch.* **166**: 271-273.
10. Hamid, A.B. and J.E. Smith. 1987. Degradation of aflatoxin by *Aspergillus flavus*. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 2023-2029.
11. 김성택, 김영배. 1986. 몇가지 고오지 곰팡이가 *Aspergillus flavus*에 의한 aflatoxin 생성에 미치는 영향. *한국농화학회지* **29**: 255-265.
12. Yang, J.O., S.T. Lee and Y.B. Kim. 1988. Aflatoxin degradation by *Aspergillus awamori* var. *fumeus*. *J. Kor. Agric. Chem.* **31**: 182-186.

(Received June 3, 1992)