

## *Aspergillus flavus*에 의한 Aflatoxin 生産能에 Steroidal Carbamate Derivatives가 미치는 影響

鄭升才·徐明子

釜山大學校 食品營養學科

### Effects of Steroidal Carbamate Derivatives on the Aflatoxin Productivity by *Aspergillus flavus*

Seung-Jae Jung and Myung-Ja Suh

Department of Food and Nutrition, Busan National University, Pusan 600, Korea

**Abstract:** Experiments were conducted to study effects of steroidal carbamate derivatives upon mycelial growth and aflatoxin production by *Aspergillus flavus* ATCC 15517. The basal medium was supplemented with various concentrations of these compounds and inoculated with spores. The developing cultures were incubated for 11 days at 28°C without agitation. Aflatoxins were extracted with chloroform, separated by thin layer chromatography, and quantitated by ultraviolet spectrophotometry. At a concentration of 50 mg per 30 ml of medium, stigmasteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate, cholesteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate, 5 $\alpha$ -cholestan-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate and  $\beta$ -sitosteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate were the most effective in reducing aflatoxin production by *Aspergillus flavus*. However, cholest-4-ene-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate, at a concentration of 100 mg per 30 ml, significantly decreased aflatoxin production. There was no significant inhibition of mycelial growth by the addition of the various concentrations of these compounds.

**Keywords:** *Aspergillus flavus*, Aflatoxin production, Steroidal carbamates.

Aflatoxin은 強力한 經口性 發癌物質로서(Wogan, 1966) 穀類나 動物사료에 汚染되었을 경우 가축류의 肝에 致命的인 機能 및 기질적 손상을 주는 重要한 病理學的 變化를 招來하며, 사람에게는 肝肥大, 肝纖維化, 急性肝炎을 일으키는 病因과 關聯이 있음이 報告되었다(Wogan *et al.*, 1966; Butler *et al.*, 1977).

Aflatoxin 生産菌株로서는 自然中에 흔히 存在하는 眞菌類의 一種인 *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Penicillium puberulum* 등의 特定菌株가 認定되고 있으며, 만일 生成에 有利한 환경요소가 造成될 경우 이들에 의해 致死量 以上の aflatoxin이 檢出된다고 하였다.

Aflatoxin은 穀類 등의 食品을 基質로 하여 生成되기 때문에 이의 解毒處理는 公衆衛生上 極히 重要하다

고 볼 수 있다. 따라서 aflatoxin生成에 영향을 미치는 因子나 毒性除去에 대한 研究가 國內外 여러 學者들에 의하여 進行되어 왔다. 즉 Schroeder 등(1974)과 Hsieh (1973)는 有機磷劑 殺蟲劑인 dechlorovos로서, Tragger 등(1967)의 phenol성 항산화제(BHA, BHT, PG)에 의한 化學的인 處理外에도 日光照射 및 紫外線照射(吳, 1976)에 의한 物理的인 處理法과 Ciegler 등(1966), 金 등(1976), 徐(1979)에 의한 微生物學的인 處理法 등이 報告된 바 있다. 이와 같이 aflatoxin의 degradation, detoxification, inactivation에 관해 많은 研究가 行해져 왔으며(Ciegler *et al.*, 1968; Davis *et al.*, 1967; Itoh *et al.*, 1980; Marsh *et al.*, 1975; Yang, 1972), 특히 여러 抗菌劑나 抗微生物劑 등의 處理로 상당한 效果를 가져왔다(Marth *et al.*, 1979).

그러나 이러한 aflatoxin 생산의 阻害效果에 抗菌 및 抗癌性이 있는 N-(2-chloroethyl) carbamate와 sterol 유도체를 결합시켜 合成된 steroidal carbamate derivatives에 관한 研究는 아직 報告된 바 없으므로 著者 등은 이들 化合物이 aflatoxin 생산에 어떠한 영향을 미치는가를 研究하였기에 그 結果를 報告하는 바이다.

## 材料 및 方法

### 實驗 材料

#### 1) 使用 菌株

韓國菌種協會에서 分讓받은 *Aspergillus flavus* ATCC 15517(以下 *Asp. flavus*로 略記)를 實驗에 使用하였다.

#### 2) 基本 培地

培地는 pH 6.0으로 조정된 chemically defined medium(Reddy, 1971) (以下 C.D. medium으로 略記)을 使用하였다.

#### 3) 試料

實驗에 使用한 steroidal carbamate derivatives는 釜山大學校 自然大學 化學科 有機化學教室에서 제공받은 것으로서 stigmasteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate, cholesteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate,  $\beta$ -sitosteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate, 5 $\alpha$ -cholestan-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate, cholest-4-ene-3-one-oximino N-(2-chloroethyl) carbamate이다.

### 實驗 方法

#### 1) 培養法

斜面 C.D. 培養배지를 常法에 따라 멸균한 후 Lindner 小滴法으로 단포자 분리한 *Asp. flavus*을 배지에 접종하여 28°C에서 5日間씩 연속 3회 계대배양하여 充分히 活性化된 것을 種菌으로 使用하였다.

本 培養에 있어서는 基本培地 30 ml을 200 ml Erlenmeyer flask에 넣고 여기에 試料의 分散을 돕기 위해 tween 80 2 drops를 加한뒤 15 Lb/in<sup>2</sup> 15分間 고압멸균한후 absolute ethanol에 용해시킨 5種의 steroidal carbamate derivatives를 농도별로 10, 30, 50, 100 mg씩 培地에 첨가하고, 여기에 계대배양한 種菌 *Asp. flavus*胞子が 1.0×10<sup>5</sup> ml가 되도록 현탁한 것을 1 ml씩 각각 접종하여, 28°C에서 11日間 靜치배양하였다. 對照群으로는 기본배지에 ethanol 1 ml와 tween 80 2 drops를 加한 것으로 사용하였다.

#### 2) 菌體量 測定法

菌體의 生長은 건조 菌체량으로 나타내었다. 즉, 배

양액으로부터 菌體를 分離시킨다음, dry oven에서 105°C 12~18 hrs. 건조시켜 重量이 된 菌體의 무게를 재어 기본배지 30 ml當으로 나타내었다.

#### 3) Aflatoxin의 抽出 및 定量

美國 AOAC 公定法에 準하여 實施하였다. 試料에 n-hexane을 加하여 脫脂하고 chloroform으로 抽出한것을 column chromatography法에 依하여 淨제시킨 뒤 水蒸氣浴上에서 蒸發乾固시킨다음 thin layer chromatography法에 의하여 toluene: isoamyl alcohol: methanol (90:32:3 v/v)을 展開溶媒로 하여 乾게 분리시켰다. 이것을 자외선 照射로 표준 aflatoxin의 Rf値와 一致된部分을 分離하여 methanol로 抽出하고, UV spectrophotometer로 波長 265 nm에서의 最大吸光度를 測定하고 표준 aflatoxin(Makor제)과 비교 확인한 다음 分子量과 molar absorbance에 依해서 定量하였다.

## 結果 및 考察

기본배지에 steroidal carbamate derivatives를 10, 30, 50, 100 mg씩 각각 첨가하여 *Asp. flavus*를 接種하고 28°C에서 11日間 배양하였을때의 aflatoxin 生産能과 菌生長度에 關하여 實驗한 結果는 다음과 같다.

Stigmasteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate의 첨가가 aflatoxin 生産能에 미치는 영향은 Table I, Fig. 1에 나타낸 바와 같다. 즉 10 mg 첨가군에서는 대조군에 비해 약 9% 감소 되었으며, 30 mg과 50 mg 첨가군에서는 50%, 51%의 감소율로 비슷하게 aflatoxin 生産이 억제 되었으며, 100 mg 첨가군은 70%의 높은 감소율을 나타내었다. 따라서 농도가 높아짐에 따라 aflatoxin 生産의 저해효과가 큼이 밝혀졌다.

Stigmasteryl N-(2-chloroethyl) carbamate 첨가군에 대한 菌體 生長度는 Table VI, Fig. 2에서 보는 바와 같이 대조군에 비해 첨가농도가 높아짐에 따라 좋은 生長을 보였다.

Cholesteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate첨가에 의한 aflatoxin 生産의 영향은 Table II, Fig. 1에서와 같이 대조군에 비해 10 mg 첨가군에서는 약 70% 감소되었으며, 30 mg 첨가군에서는 85%의 감소율, 50 mg 첨가군과 100 mg 첨가군은 84%, 76%로, 30 mg 첨가군에서 보다 오히려 14%, 43%정도 aflatoxin 生産이 증가하였다. 특히 低濃度의 경우가 高濃度 添加群보다 비교적 감소효과는 큰 편이었다.

Cholesteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate 첨가에 의

**Table I.** Effects of various concentrations of stigmasteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate on the production of aflatoxin by *Asp. flavus* incubated in C.D. medium at 28°C for 11 days.

Concentration (mg)	Production of aflatoxin (μg/ml)				
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	Total
0	8.99	3.30	6.20	2.62	21.11
10	9.02	2.66	6.03	1.65	19.36
30	6.25	1.08	2.81	0.54	10.68
50	5.82	0.97	3.39	0.36	10.54
100	4.26	0.19	2.21	0.04	6.70

**Table II.** Effects of various concentrations of cholesteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate on the production of aflatoxin by *Asp. flavus* incubated in C.D. medium at 28°C for 11 days.

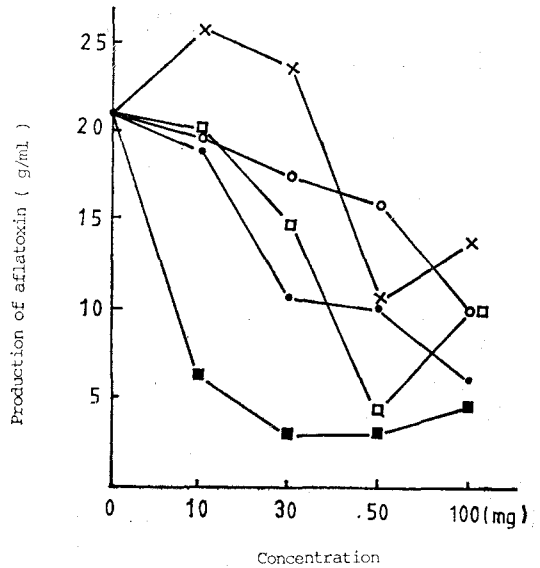
Concentration (mg)	Production of aflatoxin (μg/ml)				
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	Total
0	8.99	3.30	6.20	2.62	21.11
10	2.10	1.26	2.02	1.14	6.52
30	1.71	0.34	1.38	0.23	3.12
50	1.48	0.59	1.23	0.26	3.56
100	3.42	0.21	1.16	0.17	5.10

**Table III.** Effects of various concentrations of β-sitosteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate on the production of aflatoxin by *Asp. flavus* incubated in C.D. medium at 28°C for 11 days.

Concentration (mg)	Production of aflatoxin (μg/ml)				
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	Total
0	8.99	3.30	6.20	2.62	21.11
10	7.54	2.03	9.26	1.83	20.66
30	4.29	1.32	8.21	1.14	14.96
50	1.36	0.15	3.02	0.08	4.61
100	2.77	1.43	5.21	0.89	10.30

한 菌體生長度를 Table VI, Fig. 2에서 보면 대조군에 비해 10 mg, 30 mg의 낮은 농도에서는 菌體生長이 크게 低調하였으나 100 mg 첨가농도에서는 상당히 좋은 生長을 나타내었다.

β-Sitosteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate를 배지에



**Fig. 1.** Effects of various concentrations of steroidal carbamate derivatives on the production of aflatoxin by *Asp. flavus*.

- Stigmasteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate
- Cholesteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate
- β-Sitosteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate
- ×— 5α-Cholestan-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate
- Cholest-4-ene-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate

농도별로 添加한 경우의 aflatoxin 生産量을 Table III, Fig. 1에서 보면 10 mg 첨가군에서는 3%의 감소율을, 30% 첨가군에서는 29% 감소율을 나타내었고, 50 mg 첨가군에 있어서는 78%로, aflatoxin 生産이 대조군에 비해 크게 감소 되었다. 또한 100 mg 첨가농도에서는

**Table IV.** Effects of various concentrations of 5α-cholestan-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate on the production of aflatoxin by *Asp. flavus* incubated in C.D. medium at 28°C for 11 days.

Concentration (mg)	Production of aflatoxin (μg/ml)				
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	Total
0	8.99	3.30	6.20	2.62	21.11
10	10.43	3.05	9.24	2.82	25.54
30	10.36	2.14	9.71	1.35	23.56
50	6.01	0.97	3.26	0.32	10.56
100	7.39	1.02	5.12	0.83	14.36

약 52%로서, 50 mg 첨가군 보다는 오히려 45%정도 aflatoxin 量이 증가되는 경향이 나타내었으나 全體的으로는 對照群에 比해서 감소 되었다. 따라서 이 化合物의 aflatoxin 生産能에 대한 영향은 50 mg 첨가군에서 가장 큰 生産억제 효과를 나타내었다.

$\beta$ -Sitosteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate 添加에 따른 菌體生長度는 Table VI, Fig. 2에 나타낸 바와 같이 30 mg 첨가군에서는 대조군에서보다 낮은 生長을 나타내었으며 그 밖의 모든 첨가군에서는 菌體生長이 良好한 편이었다.

5 $\alpha$ -Cholestan-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate의 添加는 Table IV, Fig. 1에서 보는 바와 같이 낮은 농도에서는 대조군에 비해 aflatoxin 生産이 증가하였으나 높은 농도에서는 감소현상이 나타내었다. 즉 10 mg 첨가군에서는 21%증가, 30 mg첨가군은 12% 증가, 50 mg 첨가군은 50%의 감소, 100 mg 첨가군은 32% 감소되었다. 이러한 경향은 첨가농도에 따

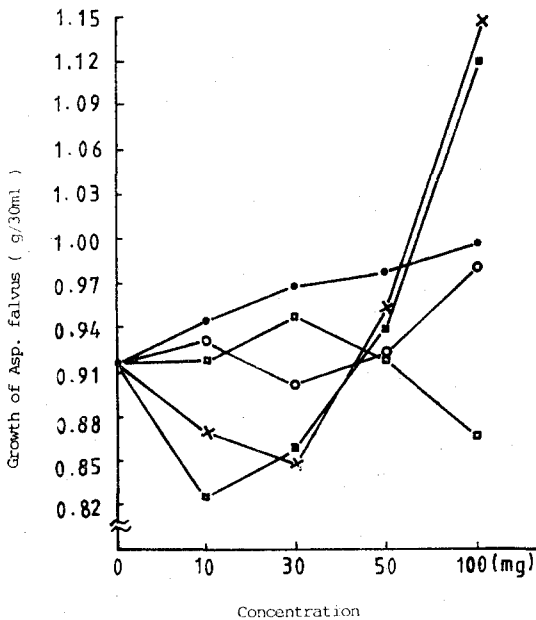


Fig. 2. The growth of *Asp. flavus* in medium containing various concentrations of steroidal carbamate derivatives.

- Stigmasteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate
- Cholesteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate
- $\beta$ -Sitosteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate
- ×— 5 $\alpha$ -Cholestan-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate
- Cholest-4-ene-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate

Table V. Effects of various concentrations of cholest-4-ene-3-one-oximino N-(2-chloroethyl) carbamate on the production of aflatoxin by *Asp. flavus* incubated in C.D. medium at 28°C for 11 days.

Concentration (mg)	Production of aflatoxin ( $\mu$ g/ml)				
	B <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	Total
0	8.99	3.30	6.20	2.62	21.11
10	8.71	3.10	5.92	2.22	19.96
30	8.19	2.58	5.51	2.06	18.34
50	8.02	2.13	4.66	1.95	16.76
100	5.60	1.73	2.04	0.88	10.25

른 aflatoxin 生産量이  $\beta$ -sitosteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate 첨가군에서와 마찬가지로 50 mg 첨가군에서 크게 억제 되었다.

5 $\alpha$ -Cholestan-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate 첨가에 의한 菌體生長度는 Table VI, Fig. 2에서 보는 바와 같이 10 mg, 30 mg 첨가군에서는 대조군에 비하여 菌體生長이 低調하였으나 50 mg, 100 mg 첨가군에서는 대조군에 비해 良好한 生長을 나타내었다.

Cholest-4-ene-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate를 각 농도별로 첨가하였을때의 aflatoxin 生産能에 대한 영향은 Table V, Fig. 1과 같다.

10 mg 첨가군에서는 대조군에 비해 약 6%의 감소율을 보여주었으며, 30 mg 첨가군은 13%, 50 mg 첨가군은 21%, 100 mg첨가군은 52%의 감소율로서, aflatoxin 生産은 농도가 높아짐에 따라 감소 되었다.

菌體生長度의 경우는 Table VI, Fig. 2에서와 같이 10 mg, 30 mg, 50 mg 첨가농도에서는 대조군에 비해 약간 良好한 경향이였으나 100 mg 첨가군에서는 菌體生長이 低調하였다.

이와 같이 steroidal carbamate derivatives는 *Asp. flavus*에 의한 aflatoxin 生産을 억제하는 효과가 있음이 밝혀졌으며, 이 效果는 抗菌 및 抗癌성이 예상되는 2-chloroethyl carbamate에 起因되는 것이 아닌가 사료된다. 또한 이들 化合物의 첨가농도에 따른 aflatoxin 生産能과 菌體生長度 사이에는 아무런 相關성이 없다는 Ciegler(1966)의 報告와 유사한 結果를 얻었다.

이상의 實驗結果에서 steroidal carbamate derivatives 化合物이 *Asp. flavus*에 의한 aflatoxin 生産을 억제하는 mechanism에 대하여서는 앞으로 연구 개발하여야 할 흥미있는 과제라 사료된다.

**Table VI.** The growth of *Asp. flavus* in medium containing various concentrations of steroidal carbamate derivatives.

Concentration (mg)	Weight of mycelium (g/30 ml)				
	0	10	30	50	100
Stigmasteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate	0.918	0.946	0.971	0.980	0.998
Cholesteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate	0.918	0.822	0.864	0.932	1.127
$\beta$ -Sitosteryl-N-(2-chloroethyl) carbamate	0.918	0.931	0.908	0.925	0.980
5 $\alpha$ -Cholestan-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate	0.918	0.871	0.856	0.959	1.155
Cholest-4-ene-3-one-oximino-N-(2-chloroethyl) carbamate	0.918	0.926	0.954	0.923	0.873

문 헌

Butler, W.H., Neal, G.E. (1977): Mode of action and human health aspect of aflatoxin carcinogenesis. *Pure Applied Chem.* 49:1747.

Ciegler, A. and Peterson, R.E. (1968): Aflatoxin detoxification: Hydroxydihydro-aflatoxin B. *Appl. Microbiol.* 16:665-666.

Ciegler, A., Peterson, R.E. and Hall, H.H. (1966): Microbial detoxification of aflatoxin. *Appl. Microbiol.* 14:934-949.

Davis, N.D. and Diener, U.L. (1967): Inhibition of aflatoxin synthesis by p-aminobenzoic acid, potassium sulfite, potassium fluoride. *Appl. Microbiol.* 15:1517-1518.

Davis, N.D., Diener, U.L. and Aghihortri, V.P. (1965): Production of aflatoxin B and G in chemically defined medium. *Mycopathologia ET. Mycologia Applicata* 31:251-256.

Hsieh, D.P.H. (1973): Inhibition of aflatoxin biosynthesis of dichlorovos. *J. Agr. Food Chem.* 21:468-470.

Itoh, Y., Morishita, Y. and Aibara, K. (1980): Modification of aflatoxin B<sub>1</sub> in alkaline pH solutions. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 54:527-534.

Marth, E.H. and Doyle, M.P. (1979): Update on molds: Degration of aflatoxin. *J. Food Technol.* Jan: 81-87.

Marsh, P.B., Marion, E.S. and Many, W. T. (1975): Effect of trace metal on the production of aflatoxins by *Aspergillus parasiticus*. *App. Microbiol.* 30:52-57.

Reddy, T.V., Viswanathan, L. and Venkitasubpa-  
manian, T.A. (1971): High aflatoxin production on a chemically defined medium. *Applied Microbiol.* 22:393-396.

Schroeder, H.W., Cole, R.J., Grigsby, R.D. and Hein, H.Jr. (1974): Inhibition of aflatoxin production and tentative identification of an aflatoxin intermediate "versiconal acetate" from treatment with dichlorovos. *Appl. Microbiol.* 27:394-399.

Tragger, W. and Stoloff, L. (1967): Possible reaction for aflatoxin detoxification. *J. Agr. Food Chem.* 15:679-681.

Wogan, G.N. (1966): Chemical nature and biological effects of aflatoxin. *Bac. Rev.* 30:460-470.

Yang, C.Y. (1972): Comparative studies on the detoxification of aflatoxin by sodium hypochlorite and commercial bleaches. *Appl. Microbiol.* 24:885-890.

김운주, 정용, 권숙표(1976): 진균류의 상호작용에 의한 aflatoxin 생성능에 관한 연구. 예방의학회지 9: 77-86.

서명자(1979): *Bacillus subtilis*와 *Aspergillus flavus*의 상호작용에 의한 aflatoxin 생성능에 관한 연구 (제 1 보). 미생물학회지 17:16-24.

서명자(1979): *Bacillus subtilis*와 *Asp. flavus*의 상호작용에 의한 aflatoxin 생성능에 관한 연구(제 2 보). 미생물학회지 17:72-80.

오유진(1976): 일광조사 효과에 의한 메주중의 aflatoxin B<sub>1</sub>의 파괴 및 그 독성에 관한 연구. 충북대학교 논문집 11: 153.

이정희, 정영채, 정용(1973): 각종 처리에 의한 aflatoxin의 분해에 관한 연구. 한국식품과학회지 5:201-205.

<Received September 3, 1985;

Accepted October 7, 1985>