

녹농균과 진균류의 생물학적 상호작용에 의한 Aflatoxin 류의 생성능과 성질 변화에 대한 연구

이 영 남 · 김 주 덕

연세대학교 의과대학 미생물학교실

Studies on Changes of Aflatoxin Productivity and Properties by a Pseudomonad

Young Nam Lee and Joo Deuk Kim

Department of Microbiology, Yonsei University, College of Medicine

Seoul 120, Korea

Abstract: Investigation on modification of aflatoxin structures by Pseudomonads was attempted as a biological detoxifying process of mycotoxins. Firstly, when any variation of aflatoxin yield of *Aspergillus parasiticus* in a mixed culture with *Pseudomonas aeruginosa* was examined, there was no noticeable effect by growth of Pseudomonads on aflatoxin yield of *Asperillus* sp. Secondly, when capacity of *Pseudomonas aeruginosa* utilizing aflatoxin as a carbon source for its growth was tested, there was some indication that aflatoxin might be used for growth of Pseudomonads. It was also noticed that the residual aflatoxin showed different migrating pattern compared with that of the intact aflatoxin by thin layer chromatography. Thirdly, the cell-free extract prepared from *Pseudomonas aeruginosa* grown in a glucose minimal medium supplemented with aflatoxin and the intact aflatoxins were incubated in the presence of Mg²⁺. After a certain length of incubation period, the reaction mixtures were applied on TLC plates. As a result, aflatoxins in the reaction mixture migrated differently as the control did. Such results may indicate that some changes of aflatoxin properties were induced by Pseudomonads.

서 론

*Aspergillus*속과 *Penicillium*속 등 10여종의 진균류가 성장 과정 중 2차 대사물질로 생산, 분비하는 aflatoxin류는 극소량으로도 독성을 발현하는 맹독성 물질로, 특히 간장, 위, 신장 등의 발암성은 문제시되고 있다. (Butler, 1966; Kurata, *et al.*, 1968; Wogan, 1966). coumarin핵을 모핵으로 갖고 있는 aflatoxin류는 구조의 차이에 따라 최소 6종으로 구분된다. (Schoental, 1967; Maggon, *et al.*, 1977). 1960년 영국에서 aflatoxin에 의한 십여만 마리의 칠면조가 간종양 등간 이상으로 폐죽음을 당한 보고가 있는 이래 (Sargent, *et al.*, 1961) aflatoxin에 관한 연구가 생화학, 생물학, 물리화학, 생합성 등 여러 방면에서 진행되었다 (Mag-

gon, *et al.*, 1977; Zamir & Ginsburg, 1979). aflatoxin은 유해한 *Aspergillus*속 등 독소생성균주가 오염된 쌀, 콩, 밀 등의 곡류나 간장, 된장 등 발효식품에서 상당량 검출되고 있음이 보고 된 바 (정 및 권, 1969), 이러한 식품류를 상용하는 우리 국민은 보건상 문제점을 안고 있을 수 있다. aflatoxins의 처리 및 제거, 또는 독성 감소를 목적으로 연구가 수행되어 열처리, 자외선 처리 등의 물리적 방법, 메칠아민, 수산화나트륨, 오존 등에 의한 화학적 방법, 곡류의 가온 처리 및 aeration으로 진균류의 침입 방지법 등 다수의 논문이 발표되었지만 (유등, 1969; 이등, 1973), 생물학적 상호작용에 근거를 둔 aflatoxin류의 생성 능력의 저하 및 aflatoxin류의 분해 및 제거에 대한 보고는 최소화하다.

Pseudomonas, *Arthrobacter*, *Mucrosporium*, *Micrococcus*속 등의 수종의 세균이 toluene, benzonate등 방

향족 물질의 유도체를 C₂나 C₄의 간단한 구조의 물질로 생물학적 분해함과 이 분해 산물을 영양 기질로 이용하여 성장함은 널리 알려졌다(Ornston, 1971; Lee, et al., 1978; Haller & Finn, 1978; McCormick, et al., 1978). 특히 *Pseudomonas*속의 몇몇 균주는 비교적 복잡한 구조의 방향족 물질이 고농도로 존재하는 특수 환경에서도 생존 가능한데 이는 *Pseudomonas*속의 탁월한 biodegradation 능력과 여러 종류의 물질을 영양 기질로 이용할 수 있는 대사의 다양성 때문이다(Ornston, 1971).

이러한 *Pseudomonas*속의 미생물의 생화학적 대사의 특성을 바탕으로 *Pseudomonas*균과 aflatoxin생성 *Aspergillus*속 균주의 혼합 배양시 *Pseudomonas*속이 진균류의 aflatoxin생성에 미치는 영향과 *Pseudomonas*가 유리 aflatoxin의 구조나 성질의 변화를 야기시킬 수 있는지를 살펴 봄으로 생물학적 방법에 의한 aflatoxin류의 제거처리의 가능성을 실험해 보았다.

실험 재료 및 방법

1) 균 주

실험에 사용한 균주는 *Aspergillus parasiticus* ATCC 15517과 *Pseudomonas aeruginosa* PAO이다.

2) 배 지

*Aspergillus*균의 기본 배양배지로는 Czapek-Dox배지(Shih & Marth, 1974)를, *Pseudomonas*속의 기본 배양배지로는 50mM 인산완충용액에 minimal salt와 한정량의 glucose (0.2% 또는 0.4%)을 첨가한 배지(pH 6.8)나 50mM 인산완충용액에 0.5%의 yeast-extract를 넣은 배지를 사용하였다(Lee & Lessie, 1974). 상기 배지에 추출한 aflatoxin액 0.2ml을 넣어 aflatoxins 첨가한 배지로 사용하였다. *Pseudomonas*속의 성장도는 540nm의 filter를 사용, Klett-Summerson photoelectric colorimeter로 측정하였다.

3) Aflatoxin의 추출

문헌에 준하여 클로로포름과 메탄올로 추출했다(Shih & Marth, 1974). *Aspergillus* 배양여과액 20ml에 40ml의 클로로포름을 가하고 진탕한 후, 분액여두로 클로로포름층만 모았다. 이 조작을 세번 반복하였다. 균사체는 클로로포름 50ml, 메탄올 100ml과 증류수 40ml을 가한 다음 Waring blender로 수분간 마쇄한 후 여과하고 여과액 중에서 클로로포름층만 모은 뒤 methanol-water잔액은 클로로포름으로 재추출하였다. 클로로포름 추출액을 모두 합하여 rotary evaporator로 감압

증발농축하여 aflatoxin 추출액을 준비하였다.

4) *Pseudomonas*속의 cell-free extract

*Pseudomonas*속 배양액 500ml을 고속원심분리하여 균체를 모은 뒤 50mM 인산완충액(pH 6.8)로 두번 세척한 뒤, 5ml의 인산완충액에 균체를 부유하고 초음파로 분쇄한 후 고속원심분리로 cell-free extract를 마련하였다. cell-free extract 1.15ml과 aflatoxin 0.2ml을 0.15ml의 Mg²⁺(10⁻³M)존재하여 실온에서 일정시간 방치한 뒤 TLC상에 전개시켰다.

5) TLC

Silica gel G : MeOH : H₂O = 1 : 1 : 1의 비율로 섞어 20×20cm 유리판에 50μ두께로 TLC판을 준비한 뒤 일정량의 시료를 적재하고 전개용매로 클로로포름-메탄올-물(98-1-1)을 사용해 10~12cm정도 전개시켰다. 전개된 aflatoxin류의 분포는 U.V. 등으로 확인하였다.

결과 및 고찰

우선 chemically defined medium (Lee & Lessie, 1974; Shih & Marth, 1974)에서 *Aspergillus*속과 *Pseudomonas*속의 단독 배양 및 혼합 배양을 시도, 각각의 미생물의 성장도 및 생성된 aflatoxins의 변화를 관찰하였다. 혼합 배양시 진균류, 녹농균 각각의 성장 속도는 각균을 단독 배양할 때에 비해 현저한 차이가 없었다. 혼합 배양후 산생된 aflatoxin을 클로로포름-메탄올 등 유기용매로 추출 분리한 후(Shih & Marth, 1974) 단독 배양조건 및 혼합 배양조건 아래서 산생된 aflatoxin을 silica gel G를 사용해 thin layer chromatography로 검색 조사한 바 aflatoxin류의 양의 변화나 TLC상의 migrating pattern에 별다른 변화를 볼 수 없었다.

제한된 양의 포도당이 함유된 minimal salt medium과 0.5% yeast ex.를 함유한 인산완충용액에, 유기용매로 추출 분리한 aflatoxin류를 일정량 가한 뒤 이에 *Pseudomonas aeruginosa*를 진탕배양, 각각에서의 녹농균의 성장도를 측정하고(Table I), 각각으로부터 잔여 aflatoxin류를 유기용매로 재추출하여 aflatoxin의 성질 변화의 유무를 TLC에서 살펴 보았다(Fig. 1).

Table I에서 볼 수 있듯이 aflatoxin류를 가한 쪽에서 녹농균의 growth yield가 다소 높은 것은 첨가해준 aflatoxin류가 녹농균 성장에 탄소원으로 이용되었을 가능성을 제시한다. Fig. 1은 잔여 aflatoxin의 TLC에서의 전개상으로 aflatoxin류의 TCL 상에서의 전개성질이 상이한 것으로 보아 *Pseudomonas*속에 의한 aflatoxin

Table I. Growth yield of *Pseudomonas aeruginosa* with and without aflatoxin in the medium.

Medium	Glucose		Yeast Ex	
	Aflatoxin added	No Aflatoxin added	Aflatoxin added	No Aflatoxin added
Growth Yield*	1.6×10^3	1.3×10^3	50×10^3	44×10^3

* Growth yield was expressed as bacterial Klett unit/M of glucose or bacterial klett unit/g of yeast extract in 1-ml of the media.

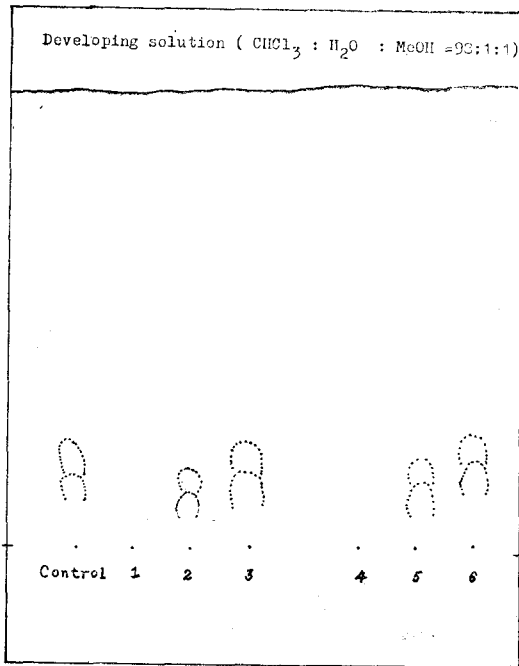


Fig. 1. Thin layer chromatography of aflatoxins on silica gel G. S: starting line. 1&4: culture supernatants of *P. aeruginosa* grown in the glucose-minimal medium and in yeast extract medium, respectively. 2 & 5: Residual aflatoxins in the culture supernatants of *P. aeruginosa* grown in the aflatoxin supplemented glucose-minimal medium and yeast extract medium, respectively. 3&6: Aflatoxins recovered from the aflatoxin supplemented glucose-minimal medium and yeast extract medium, respectively. These were controls for the experiments of 2 & 5. Control: Standard aflatoxins used in the experiments. Developing solution ($\text{CHCl}_3 : \text{H}_2\text{O} : \text{MeOH} = 98:1:1$)

toxin의 성질의 변화를 추측할 수 있다.

제한된 량의 포도당(0.2%)와 소량의 aflatoxin류를 함유한 minimal salt medium에서 배양된 *Pseudomonas aeruginosa* 균체를 초음파로 분쇄 후 얻은 cell-free extract

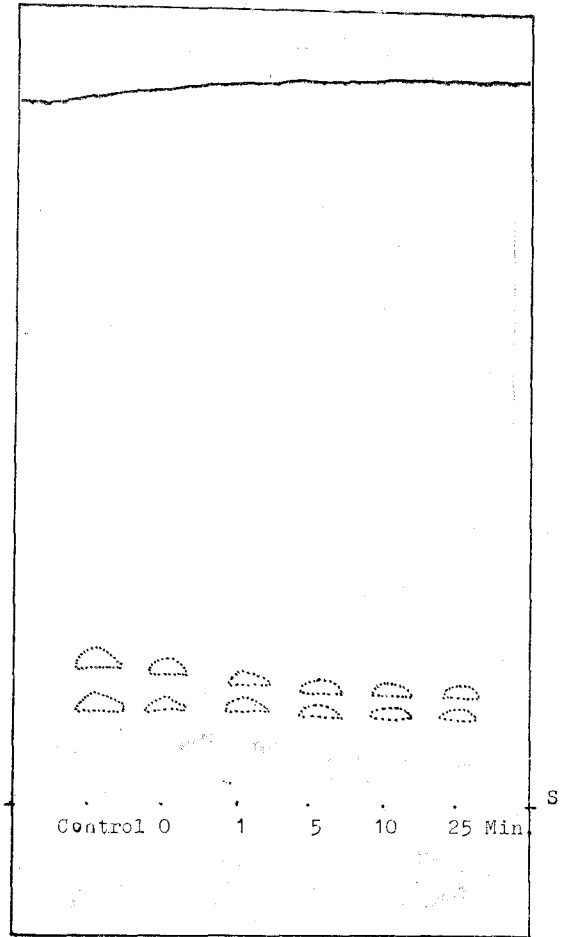


Fig. 2. Thin layer chromatography of the reaction mixtures of cell-free extract of *P. aeruginosa* and aflatoxins.

Control: aflatoxins used in the experiments. The reaction mixtures were spotted on TLC plates after a given length of incubation time at room temperature.

속에 aflatoxin류의 성질을 변화시킬 능력이 있는지 알아보기 위해 cell free extract와 aflatoxin류를 Mg^{2+} 존재 하에 0, 1, 5, 10, 25분간 작용 시킨 뒤 그 혼합물을 TLC에 전개시켜 본 바 Fig. 2에서 볼 수 있듯이 TLC상에서

aflatoxin류의 전개능에 차이가 있음을 알 수 있다.

결 론

강력한 heptocarcinogen의 하나인 aflatoxin류를 분비하는 *Aspergillus*속과 간단한 탄소, 질소, 무기질 등의 영양원으로 성장이 가능한 *Pseudomonas*속간의 aflatoxin류 생산면에 생물학적 상호작용은 없는 듯하다.

그러나 진균류가 산생한 aflatoxin류를 추출 분리하여 녹농균의 배양배지에 첨가하고 균을 배양 한 후 배양액속에 잔존한 aflatoxin의 TCL상의 전개양상이 정상 대조균의 것과 다른 점으로 보아 *Pseudomonas*속에 의한 aflatoxin류의 구조변화를 추측할 수 있다. 또 cell-free extract속에도 aflatoxin류의 구조를 변화시킬 수 있는 성분이 있음을 알 수 있다. 그러나 cell free extract가 aflatoxin류의 구조를 변화 시키는 것에 대한 kinetics와 cell-free extract속의 성분의 성질 규명 등에 관해서 좀더 자세히 구체적으로 연구되어야 할 것이다. 그리고 변화받은 aflatoxin류의 생산물에 대해서도 생물학적, 화학적, 물리적 등 연구분야에서 연구되어야 할 것이다. 이번 실험 결과를 가지고 녹농균에 의한 aflatoxin의 탈독성 및 독성 감소 내지 제거에 대한 뚜렷한 방법을 제시하기는 미흡하나 녹농균이 aflatoxin을 영양기질로 이용할 수 있는 점과 녹농균에 의한 aflatoxin류의 성질 변화가 야기 될수 있는 점 등의 관찰은 녹농균에 의한 진균독소의 생물적 분해연구에 밝은 면을 제시하고 있다.

감 사 드 립

이 연구에 소요된 경비는 아산사회복지사업재단의 연구 개발 지원금(1978~1979)으로 충당되었습니다. 본 실험을 하는 데 많은 도움을 준 연세대학교 공해연구소 정용 교수와 연세대학교 의과대학 미생물학교실의 심우남 학사에게 깊은 감사사를 드립니다.

참 고 문 헌

Butlner, W.H.(1966): Carcinoma of the glandular stomach in rats given diets containing aflatoxin. *Nature* 209, 90.
 Haller, H.D. and Finn,R.K.(1978): Kinetics of biodegradation of para-nitrobenzonate and inhibition by benzonate in a *Pseudomonad*. *Appl. Environm. Microbiol.* 35, 890.
 Kurata, H., Tanabe, H., Kanota, K., Udagawa, S., Ichinoe, M.(1968): Studies on the population of toxigenic fungi in foodstuffs; Aflatoxin producing fungi isolated from foodstuffs in Japan. *J. Food*

Hygi. Soc. Japan 9, 29.
 Lee, Y-L. T, Spaenins, V.L. and Dagley, S.(1978): Catabolism of 2,4,5-trimethoxybenzoic acid & 3-methoxycrotonic acid. *Appl. Environm Microbiol.* 35, 817.
 Lee, Y.N. and Lessie, T.G.(1974): Purification and characterization of the two 6-phosphogluconate dehydrogenase species from *Pseudomonas multivivans*. *J. Bact.* 120, 1043.
 Maggon, K.K., Gupta, S.K., and Venkitasubramanian, T.A. (1977): Biosynthesis of aflatoxins. *Bact. Rev.* 41, 822.
 McCormick, N.G., Cornell, J.H., and Kaplan, A.M. (1978): Identification of biotransformation products from 2,4-dinitrotoluene. *Bact. Rev.* 40, 23.
 Ornston, L.N., (1971): Regulation of catabolic pathways in *Pseudomonads*. *Bact. Rev.* 35, 87.
 Reddy, T.V., Visivanathan, L., and Venkitasubramanian, T.A.(1971): High aflatoxin production on a chemically defined medium. *Appl. Microbiol.* 22, 393.
 Sargent, K., Sheridan A., O'Kelly, J.,and Carnaghan-R.B.A.(1961): Toxicity associated with certain sample of groundnuts, *Nature* 192, 1096.
 Schoental, R.O.(1967): Aflatoxins. *Ann. Rev. Pharmacol.* 7, 343.
 Shih, C.N., and Marth, E.H.(1974): Some cultural conditions that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Microbiol.* 27, 452.
 Wogan, G.N.(1966): Chemical nature and biological effects of the aflatoxin. *Bacteriol. Rev.* 30, 460.
 Zamir, L.O., and Ginsburg, R.(1979): Aflatoxin biosynthesis; Detection of transient, acetate dependent intermediates in *Aspergillus* by kinetic pulse labeling, *J. Bact.* 138, 684.
 유준, 고춘명, 권속표, 정용(1969): 한국 저장 식품중의 유독성 물질과 그 방지에 관한 연구; 장유중의 Aflatoxin에 관하여. 연세논총 7, 191.
 이정희, 정영채, 정용(1973): 각종 처리에 의한 Aflatoxin의 분해에 관한 연구. 한국식품화학회지 5, 201.
 정용, 권속표(1969): 한국 발효식품 중 Aflatoxins 함유에 관한 연구. 예방의학회지 2, 1.

<Received 6 January 1980>