

*Salmonella typhimurium*에 對한 麴菌生産物質의 變異原性

鄭 鎬權 · 金 泰雲

建國大學校 微生物工學科

(1981년 12월 20일)

Mutagenicity of the Material from *Aspergillus* to *Salmonella typhimurium*

Hokwon Chung and Taewoon Kim

Department of Microbial Engineering, Kon Kuk University, Seoul 133

Abstract

Mutant strains of *Salmonella typhimurium* which require histidine for their growth sensitively, were easily revertant and lost the histidine requirement, when the strains contacted with some new mutagen. This work was carried out to determine the mutagenicity of kojic acid and emodin for the mutant strains of *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537, and TA 1538.

Through the metabolic activation with liver microsome enzyme system of rat (S-9), kojic acid was recognized as a strong mutagen for the strain of TA 98, while it responded weakly for the strain of TA 100. Without S-9 metabolic activation, kojic acid could not induce the mutation for the both strains of TA 98 and TA 100. Emodin was also recognized as a strong mutagen for the strain of TA 1537 through the metabolic activation with S-9 mix.

序 論

食品의 成分이나 汚染된 物質의 毒性이 近來 問題된 일은 대단히 많으며⁽¹⁻⁴⁾ 그 中에서도 곰팡이독(mycotoxin) 등 微生物이 生産하는 여러가지 物質은 새로운 毒性物質로 注目 받게 되었다⁵. 이같은 物質의 毒性試驗의 方法으로는 지금까지 Lehman⁽⁶⁾의 動物試驗法이 FDA에서 認定되어 널리 利用되고 있으나 動物의 個體差와 복잡성 때문에 많은 種類의 物質을 短時日에 毒性檢査를 하는 것은 難題이었다. 그런데 最近에는 物質의 一般의 毒性보다 發癌성과 關聯하여 細胞에 對한 變異原性 如何⁽⁷⁻⁹⁾가 더욱 問題視되게 되어 變異原性試驗에 微生物을 利用하는 方法이 論議되기에 이르렀다. 오래前부터 發癌物質이라고 알려진 것들이 細菌에 對해 突然變異를 일으키는 일이 많다는 것은 알려져 있었으나⁽¹⁷⁾, 代表的인 發癌物質이라 할 수 있는

benzpyrene이나 Azo色素類가 細菌에 對하여 突然變異를 일으키지 못했던 것이다⁽¹⁰⁾. 그런데 1970代 後期에 와서 Ames 등⁽¹⁰⁾은 化學物質의 細菌에 對한 突然變異誘發 可能性을 檢定하는 데 예민한 *Salmonella typhimurium* 數株를 開發하였다. 즉 이들 菌體는 強力하게 히스티딘(histidine) 要求性を 갖고 있으나 變異原性物質(毒性物質)과 接觸하면 쉽게 히스티딘 要求성이 없는 野生菌株로 환원되는 性質을 갖고 있어서 物質의 變異原性を 檢定하는 데 처음으로 利用하였던 것이다. 그 後 方法을 改良하여 즉 이같은 檢定系에 쥐肝의 마이크로솜(microsome) 分割 酵素系(S-9라 함)를 添加하면 檢體가 이 酵素系에서 代謝活性化되어 DNA水準의 變異를 일으키는 것을 發見하여 物質의 毒性檢定の 一次 선정方法으로 報告하였으며⁽¹¹⁾, 發癌性 物質의 약 80%가 變異原性임이 알려지게 되었다⁽¹²⁾.

著者들은 이같은 特性이 認定되어 있는 *Sal. typhimurium* TA 98等 菌株를 使用하여 韓國의 藥濁酒에서

쉽게 發見 될 수 있으며 *Aspergillus oryzae* 등이 多量 生産하⁽¹³⁾는 kojic acid과 *Asp. ochraceus*, *Asp. wentii* 등이 生産하고 leuteskyrin의 前驅物質로 알려져 있으며 漢藥劑 大黃의 抗菌性成分인 Emodin에 대하여 上記의 方法으로 그 毒性 즉 變異原性을 確認試驗한 結果를 얻었으므로 이에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

材 料

가. 使用菌株

本實驗에 使用한 菌株는 DNA損傷으로 因하여 一般의인 *Salmenelle typhimurium*에서 볼 수 없는 強力한 히스티딘의 要求性을 가졌으며 變異原性 物質의 接觸으로 쉽게 히스티딘 要求性을 상실하는 特性으로 開發된 *Salmonella typhimurium* TA 98, TA 100, TA 1535 TA 1537 및 TA 1538의 5株였으며 東京理科大学에서 分讓받은 것이었다. 菌體 TA 98, TA 1537 및 TA 1538은 frame shift 突然變異性이고 TA 100과 TA 1535는 one point 突然變異性인 것으로 인정되고 있는 것이었다.

나. 檢査用 試藥

고오지산과 emodin은 각각 Kanto 製 및 Merk社의 特級試藥用이었다.

다. 使用 培地

① Nutrient broth

Difco製로 菌株의 保存 및 繼代用으로 使用하였다.

② 最少鹽類 글루코오스 寒天培地

本實驗用 基礎培地로는 다음의 20배 鹽類混合物(A 溶液)을 사용하였으며, 平板培地를 만들 때는 다음의 C용액에 B 溶液을 1 ml 混合하여 使用하였다.

A용액: 20배 鹽類溶液으로 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 10g, KH_2PO_4 100g, $\text{Na}_3\text{-citrate}$ 5g, KOH 25g을 500 ml의 증류수에 녹인 다음 pH 7.0되게 0.1 M KOH 와 HCl 용액으로 조정하고 가압멸균하였다.

B용액: $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10% 용액을 만들어 가압멸균하였다.

C용액: A용액 50 ml, 글루코오스 5g 그리고 寒天 15g을 1000 ml 증류수에 溶解하여 가압멸균하였다.

③ Top 寒天培地

0.5%의 소금용액에 0.6%의 寒天을 加하여 充分히 溶解시키고 가압멸균하였다. 1 mM 히스티딘과 1 mM의 비오틴 용액을 同量 混合하여 0.22μ의 Millipore filter로 濾過하여 얻은 溶液을 위의 寒天溶液에 10% 되게 混合하고 45°C에 保管하였다.

라. S-9 混合物의 準備

Spragne-Dawlig계의 生後 7週(體重 약 200 g)된 หนู를 使用하여 그 肝의 代謝活性酵素系(S-9)를 準備하였다. 즉 供試用으로 도살 4日前부터 每日 腹腔內에 phenolbarbital을 注射하였는데 첫날은 1 ml의 生理的 食鹽水에 10mg의 phenolbarbitol을 녹인 다음 그 0.6 ml를 投入하였고 以後 3日間은 1 ml 生理的 食鹽水에 phenol-barbitol 20 mg을 녹이고 그 0.6 ml씩을 每日 定期的으로 注射하였다. 處理된 쥐의 肝은 注射器를 使用하여 冷却된 生理的 食鹽水를 肝動脈에 通過시켜 肝臟內 血液을 除去시켰고 肝을 摘出하여 0.5 M 鹽化칼륨 水溶液에 세척하여 肝外部 血液을 除去하였다. 洗滌한 肝臟은 그 重量을 확인하고 微細하게 잘라서 3 倍量的 冷却된 0.15 M 鹽化칼륨 水溶液을 加하여 水水로 冷却시키면서 均質機로 均質化하고 冷却高速遠心分離機를 使用하여 9000G로 10分間 遠沈한 다음 그 上澄液 分劃物(S-9 分劃)을 모았다. 그리고 S-9 max는 다음과 같이 제조하였다. 즉 S-9分劃 3.0 ml, 160mM MgCl_2 0.5 ml, 660mM KCl 0.5 ml, 250 mM phosphate buffer 4 ml NADP^+ 30.6 mg 그리고 glucose-6-phosphate 15.2 mg을 증류수 1 ml와 잘 混合하여 S-9 mix의 量이 9 ml되게 하여 전기의 Millipore filter로 여과하였다.

다. 供試菌의 懸濁液 調製

供試의 菌株를 各各 nutrient broth에 培養하여 그 濃度를 Mc Farlent의 barium sulfate stand suspension⁽¹⁶⁾에 比유하여 $1 \sim 2 \times 10^7/\text{ml}$ 되게 조정하였다.

方 法

가. 供試菌株의 特性確認試驗(豫備實驗)

供試菌株인 *Salomonella typhimurium* TA 98 등은 自然條件에서도 突然變異性이 크기 때문에 本實驗 直前에 그 特性이 유지되고 있는가를 確認하여야 하므로⁽¹⁰⁻¹²⁾ 다음과 같은 方法으로 아미노산要求性 藥劑耐性因子(R-factor plasmid)의 有無 그리고 認定된 變異原性 物質에 對한 變異性을 確認試驗하였다.

① 아미노酸 要求性

前記의 같이 제조한 0.5 mM 히스티딘-바오틴 용액을 最少글루코오스 培地에 10배부터 10進段階로 10⁴ 배까지 희석하고 *Sal. typhimurium* TA 98 등 供試, 5菌株를 各各 接種하여 37°C에서 24時間 培養하였다. 또 이때 同一한 條件에서 變異原性 物質인 2-(2-furyl)-3-(5-nitro-2-furyl) acry amide (AF-2)를 0.1 μg/plate의 濃度로 添加한 變異陽性 對照局에 菌株 TA 98을 接種 培養하여 發生되는 콜로니(colony)數를 서로 比較하였든 바 AF-2에 依하여 復歸突然變異가 일어나서 히스티딘 要求性이 없어진 陽性 對照區에서는 콜로니數가 plate 等 300~1000이었으나 供試의 5菌株는 自

然變異에 依해서 發生된 콜로니數는 10~60정도로 매우 낮은 數值를 보였으므로 이들 菌株는 모두 變異原性 物質을 確認하는 本 實驗에 利用할 수 있는 것으로 認定되었다. 그런데 이 히스티딘要求性 實驗에서 모든 菌株는 變異陽性 對照區까지도 히스티딘濃度가 $0.5 \text{ mM} \times 10^{-5}$ 以下에서는 전혀 콜로니를 形成하지 못하였다. 따라서 本 實驗에서 tap agar 조제나 히스티딘 要求性 試驗은 그 濃度가 $0.5 \text{ mM} \times 10^{-4}$ 부터 $0.5 \text{ mM} \times 10^{-1}$ 사이에서 調節됨이 合理的이라 思料되었다.

② 藥劑耐性 因子의 有無

Nutrient agar 平均培地에 供試菌株 懸濁液을 고르게 塗抹接種하고 $10 \mu\text{g}$ ampicillin disk를 부착하여 37°C 에서 24時間 培養하였다. *Sal. typhimurium* TA 98과 TA 100은 逆明한 環狀이 없었으며 耐性因子가 認定되었으므로 TA 1535, 및 TA 1537은 逆明環이 分明했고 耐性이 없었다. 즉 이들 菌株는 元來의 特性을 그대로 유지하고 있음이 확인되었다.

③ 變異原性 物質에 對한 陽性對照試驗⁽¹¹⁻¹⁶⁾

여러가지 變異原性 物質에 依하여 復歸突然變異가 可能한 菌株인가를 確認하기 위하여 전기의 히스티딘-비오린 용액을 最少 글루코오스배지에 $0.5 \text{ mM} \times 10^{-1}$ 농도로 희석하고 菌株 TA 98에 對해서는⁽²⁰⁾ AF-2 $0.1 \mu\text{g}/\text{plate}$, TA 100에는 AF2 $0.05 \mu\text{g}/\text{plate}$, TA 1535에는 1-ethyl-2-nitro-3-nitroguanidine (ENNG) $25 \mu\text{g}/\text{plate}$, TA 1537에는 9-amino-acridine $200 \mu\text{g}/\text{plate}$, 그리고 TA 1538에는 2-nitro-fluorene $50 \mu\text{g}/\text{plate}$ 농도로 各各 變異原性 物質을 加하고 아미노酸 要求性 試驗과 같은 방법으로 培養하여 發生한 plate當 콜로니를 計測하였다. 試驗結果로 供試의 5菌株는 모두 plate當 1000 以上の 콜로니가 發生하였으므로 이들 物質에 依하여 아미노酸 要求性을 상실하는 復歸突然變異가 쉽게 일어나는 性質이 殘存하여 本 實驗에 使用될 수 있는 菌株임이 확인되었다.

나. 變異性實驗(本實驗)

① Plate法

代謝活性化法에 依하지 않는 경우: 滅菌된 試驗管에 懸體溶液을 0.1 ml 넣고 0.1 M 의 sodium phosphate buffer (pH 7.4)를 0.5 ml 넣은 다음 前記와 같이 培養한 供試菌株 懸탁액을 0.1 ml 加했다. 여기에 2 ml 의 調製된 Top agar를 加하고 거품이 나지 않게 잘 混合하여 準備된 plate培地(最少鹽類 글루코오스 寒天培地) 위에 고르게 鋪치고 遮光한 後 48時間 37°C 에서 培養하고 plate上에 供試菌株의 生育阻害 如何를 實體顯微鏡으로 관찰하였다. 그리고 復歸突然變異에 依하여 生じた 콜로니數를 콜로니계수기로 計測하였다.

代謝活性化法에 依한 경우: 滅菌된 試驗管에 懸體溶液

0.1 ml 를 넣고 S-9 mix 0.5 ml 을 加한 다음 供試菌株 懸탁액 0.1 ml 를 top agar 2 ml 와 같이 잘 加하여 混合하였으며 培養과 檢査는 前記와 같이 하였다.

② Preincubation法

代謝活性化法에 依한 경우와 依하지 않는 두가지를 試驗하였다⁽¹⁰⁻¹⁶⁾. 이는 plate法에서 top agar를 넣기 前에 37°C 에서 20分間 靜置배양한 後에 Top agar를 넣었으며 그외의 실험 순서나 방법은 plate法에서와 같이 하였다.

結果 및 考察

Kojic acid의 變異原性

Sal. typhimurium TA 98, TA 100, TA1535, TA 1537 그리고 TA 1538 菌株들에 對한 Kojic acid의 變異原性 試驗에서 쥐의 肝타이로솜 酵素系의 代謝活性化에 依하지 않는 plate法에서 얻은 結果는 Table 1에서 보는 바와 같았다. 즉 TA 1535, TA 1537, 두 菌株의 경우는 kojic acid의 濃度가 plate當 $500 \mu\text{g}$, 또는 $1000 \mu\text{g}$ 에서는 多少 높은 變異 콜로니數를 볼 수 있었으나 Kojic acid를 添加하지 않았던 對照區에서도 自然突然變異에 依한 콜로니數를 相當히 볼 수가 있어서 큰 差를 認定하기 어려웠다. 그러나 S-9 mix에 依한 代謝活性化를 거친 경우에서는 Fig. 1에서 보는 바와 같이 菌株 TA 98은 Kojic acid의 濃度가 plate當 $50 \mu\text{g}$ 에서 부터는 變異콜로니數가 현저히 증가하여 明確한 突然變異의 結果를 나타내고 있었다.

따라서 이 結果는 히스티딘의 要求性이 큰 菌株인 TA 98이 Kojic acid에 依하여 損傷 DNA^(11,12)가 回復되어 一般 *Sal. typhimurium*과 같이 히스티딘 要求性을 상실한 때문이라고 思料되었다. 또 $1000 \mu\text{g}$ 에서는 콜로니數가 急激히 감소하는 것을 볼 수 있는데 이것

Table 1. Mutagenicity of *Salmonella typhimurium* in various concentration of kojic acid

(Unit: Revertant colonies per plate)

Test strains	Concentration of kojic acid									
	$\mu\text{g}/\text{plate}$	0	0.5	1	5	10	50	100	500	1000
TA 98	21	31	30	33	32	28	57	102	54	
TA 100	87	151	134	178	193	170	178	301	338	
TA 1535	16	18	24	21	9	21	33	103	105	
TA 1537	4	5	4	6	12	16	20	126	183	
TA 1538	20	24	27	19	25	32	28	37	34	

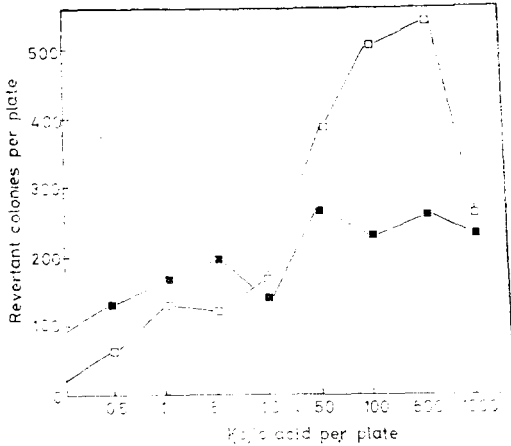


Fig. 1. Response of *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 to various concentration of kojic acid
 —□—, TA 98 with S-9; —■—, TA 100 with S-9

은 高濃度의 Kojic acid는 殺菌力이 있으므로 나타나 는 현상으로 볼 수 있었다⁽¹³⁾.

菌株 TA 100은 Kojic acid의 濃度가 增加함에 따라 서 점차 變異 콜로니數도 증가하는 傾向이었으나 對照 區에서도 自然的 變異에 의한 콜로니數가 많았으므로, 變異原性を 認定하기 어려웠다. 그러나 이 結果는 突 然變異의 可能性을 排除하지는 못하는 程度라고 思料 되었다. Kojic acid는 韓國의 藥濁酒에서도 檢出되고 *Aspergillus*屬⁽¹³⁾의 여러가지 菌株가 쉽게 生産하는 酸 으로 그 殺菌力을 認定 利用하기도 하나 本實驗의 結果로 變異原性 物質임이 확실하므로 發癌性 여부도 확 인할 必要가 있는 物質이라고 思料되었다.

Emodin의 變異原性

Emodin은 anthraquinon系 物質로서 毒性物質일 뿐 아니라 發癌性이 確認된 곰팡이독(mycotxin)인 luteo-skyrin⁽³⁾의 前驅物質로 알려지고 tar系 色素類와도 유

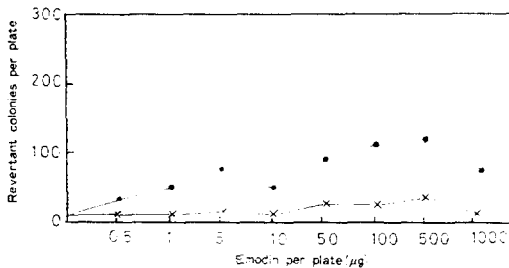


Fig. 2. Response of *Salmonella typhimurium* TA 100 to various concentrations of Emodin
 —○—, with S-9; —×—, without S-9

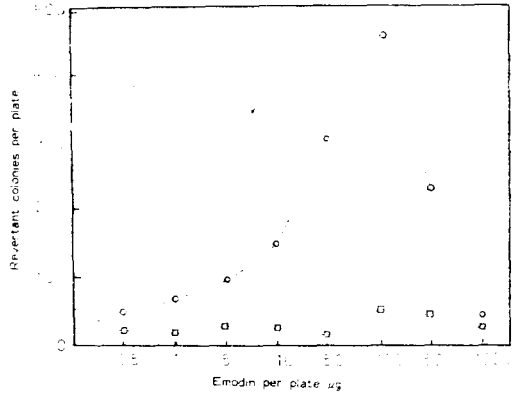


Fig. 3. Response of *Salmonella typhimurium* TA 1537 to various concentrations of Emodin
 —○—, with S-9; —□—, without S-9

사한 構造를 갖고 있어서 그 毒性이 注目되는 物質이 다⁽²¹⁾. 또 이 物質은 漢藥材인 大黃에 多量 含有된 黃色結晶의 物質로 殺菌力도 漢方에서 알려져 있으며 우리 生活와 密接한 物質인 것이다. 菌株 TA 100에 對한 emodin의 變異原性試驗에서 代謝活性에 依하지 않는 경우 試驗結果는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 그 濃度에 關係없이 始終 變化가 없었으나 S-9 mix에 依한 代謝活性化를 거친 경우는 plate當 濃度가 50 µg에서 부터 약간의 變異 콜로니數의 增加가 보였다. 그러나 變異原性を 認定할만큼 뚜렷한 變化라 볼 수 없었다. 反面에 菌株 TA 1537에 對한 試驗 結果는 Fig. 3에서 보는 바와 같이 S-9 mix 代謝活性化를 거치지 않은 경우 는 變化가 없었으나 代謝活性化 거친 경우는 10 µg/plate의 濃度에서 부터 變化가 크게 나타났고 100 µg/plate의 濃度에서는 극심한 變化를 볼 수 있었다. 이 結果는 菌株 TA 1537의 大部分의 菌體가 emodin에 依하여 쉽게 突然變異되어 히스티딘의 要求性を 상실 하고 一般의인 *Sal. typhimurium* 菌株의 性質로 回復 된 것이라 볼 수 있었다. 또 高濃度에서 變異 콜로니 數가 크게 감소되는 것은 Kojic acid의 경우와 같이 그 殺菌力에 依한 結果라고 思料되었다.

以上 論述한 바와 같이 Kojic acid의 경우는 韓國의 藥濁酒에, emodin은 大黃等 漢方藥材에 많이 含有되어 있어서 우리 生活에 흔히 接觸되는 物質인 바이들이 變異原性試驗에서 陽性으로 확인되었으므로 發癌性的 如否도 追究할 必要가 있다고 볼 수 있으며 發癌性이 없다고 확인되어도 이들 物質을 多量 또는 高濃度로 계속적으로 接觸하는 것은 問題點이 있다고 볼 수 있는 것이다. 또 이같은 方法으로 우리 生活에서 接觸되

는 유사한 여러가지 物質의 變異原性檢定도 時急한 일 이라 하겠다.

要 約

突然變異 유발 物質에 의하여 DNA損傷을 입고 野生菌株에서 볼 수 없었던 Histidine의 要求性이 強하게 나타나는 Salmonella typhimurium 菌株 등은 損傷 DNA 回復性이 예민하여 毒性 可能的 物質과 接觸하면 쉽게 DNA變異를 일으켜 히스티딘 要求性이 없는 野生菌株로 復歸되는 원리가 最近에 Ames等에 의하여 밝혀졌다. 本研究은 이같은 정질이 標準화된 Sal. typhimurium TA 98, TA 100, TA 1535, TA 1537 및 TA 1538을 利用하여 Asp. oryzae, Asp. kawachi 등이 生産하고 藥酒에 혼한 麴酸(Kojic acid)과 Asp. ochraceus, Asp. wentii 등이 生産하고 luteoskyrin의 친구물질로 알려져 있으며 또 澱粉劑 大의 抗菌成分인 emodin에 對하여 變異原性を 實驗 檢定한 結果는 다음과 같다.

1. 위의 肝 microsome 酵素系(S-9)의 代謝활성을 거치지 않는 경우 kojic acid는 菌株 TA 98와 TA 100에 對하여 變異가 認定되지 않았다.

2. S-9 代謝活性을 거친 Kojic acid는 菌株 TA 100의 경우는 약간 變異가 있었으나 認定하기 어려웠고 菌株 TA 98에 對하여는 큰 變異를 認定할 수 있었다.

3. Emodin도 S-9 代謝活性을 거칠 경우 菌株 TA 1537에 對하여 현저한 變異를 일으키고 있었다.

文 獻

1. 水谷泰久 等 : 日食衛誌, 15(4), 252 (1974)
2. 小田嶋成和 : 日食衛誌, 15(6), 419 (1974)
3. 上野芳夫 : 日食衛誌, 21(5), 339 (1980)

4. 岸美智子 外 4人 : 日食衛誌, 16(5), 318 (1975)
5. Ueno, Y. and Kubta, K.: *Cancer Res.*, 38, 536 (1978)
6. Lehman, A. J., et al.: *Appraisal of the safety of Chemicals in foods, drugs and Cosmetics*, FDA Report (1958)
7. Boyland, E.: *Progr. Exptl. Tumor Res.*, 11, 222 (1969)
8. Epstein, S. S.: *Cancer Res.*, 34, 2425 (1974)
9. Ashby, J. and Styls, A.: *Nature*, 271, 452(1978)
10. Ames, B. N., Mc Cann, I. and Yamasaki, E.: *Mutation Res.*, 31, 347 (1975)
11. Ames, B. N., and Furton, W. F.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 70, 2281 (1973)
12. McCann, J. and Ames, B. N.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.*, 73, 950 (1976)
13. Sacto, Y.: *J. Ferment. Technol.*, 46, 411 (1968)
14. Glaz, E. T., Csaruyi, E. and Glyimesi, J.: *Nature*, 212, 617 (1966)
15. Ueno, Y. and Ishikawa, I.: *Appl. Microbiol.*, 18, 406 (1968)
16. 日勞働省 化學物質 調査科: Mutagen and Toxicity, 8, 64 (1979)
17. Yahagi, T.: *Protein. Nucltic acid. Euzyme*, 20, 1178 (1975)
18. Lennette, E.H., Spaulding, E. H. and Truant, T. P.: *Clinical Microbiology*. Academic press, New York, p. 933 (1975)
19. Yahagi, T., Degawa, M. and Seino, Y.: *Cancer Letters*, 1, 91 (1975)
20. Serres, F. J. and Shelby, M.: *Science*, 203, 563 (1979)