

Aspergillus parasiticus R-716의 生育, 脂質 및 Aflatoxin 生產에 미치는 마늘(*Allium sativum L.*) 엑기스의 影響

禹永淑 · 鄭德和*

晋州實業專門大學 · 慶尙大學校*

The Effects of Garlic (*Allium sativum L.*) Extract on Growth, Lipid and Aflatoxin Production by *Aspergillus parasiticus* R-716

Young Sook Woo, Duck Hwa Chung*

Jinju Technical College, Gyeongsang National University *

Abstract

The possible effects of garlic (*Allium sativum L.*) extract on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* R-716 were investigated. Various solvent extracts of garlic strongly inhibited growth and sporulation by *Aspergillus parasiticus* R-716, and effective solvents used for extraction of garlic were chloroform, benzene, and water-chloroform. The growth and aflatoxin production decreased with the increase in extract concentration, and extract equivalent 1.5g of raw garlic weight in 25ml SLS medium completely inhibited, and at a level of 1.25g garlic, total aflatoxin was reduced 64% (472 µg/25ml) of that produced in the control (1,352 µg/25ml). During cultivation inhibitory rate of growth was reduced from 89.1% to 40% and aflatoxin B₂, G₁ production increased with the laps of time. Especially garlic extract appeared to have a stimulatory effect on lipid accumulation on the contrary aflatoxin production.

I. 緒論

穀類에 기생하는 *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus* 屬 等의 2次代謝產物인 aflatoxin은 高等動物에 대해 큰 毒性을 나타내며 肝機能의

弱化와 더불어 높은 發癌力を 가진 物質로서 1960年의 飼料事件發生 後 aflatoxin의 汚染度減少와豫防에 대한 많은 研究가 進行되고 있다.¹⁾ 특히 農產物에서의 aflatoxin 汚染防止는 우선 aflatoxin 生成곰팡이를 除去하는 일이며, 이것은 環境의 調節, 化學的 抗곰팡이

藥品의 사용 및 農產物에 있어서의 自然的抵抗因子의 利用에 의해 可能하며, 그 중 環境의 調節 및 化學的 抗곰팡이藥品에 의한 aflatoxin 生成抑制에 관한 研究는 많이 되어 왔으나^{3,4)} 이로 인해 발생되는 生態學의 問題發生의 可能性 때문에 再考되어야 할 것이다. 따라서 藥草類를 비롯한 農產物이 含有하고 있는 自然的抵抗因子를 利用한 有害微生物生成防止에 관심이 대두되어, 일찌기 Chamberland⁴⁾ 는 Cinnamon oil 이 *Bacillus anthracis* 生育에 치명적인 淘害效果가 있음을 밝힌 것을 시작으로 많은 報文이 發表되었다.⁵⁾

그 후 Bachmann 等⁶⁾은 일반적으로 bacteria 보다 mold가 여러 양념류에 민감하여 *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus* 屬에 대한 실험으로 그效果를 관찰했으며, James 等⁷⁾도 cinnamon, cloves 및 mustard의 *Escherichia coli*에 대한 防腐作用을 조사하여 특히 cinnamon의 경우 상당량의 첨가로 防腐 및 殺菌作用이 있음을 확인하였고, Cavallito 等⁸⁾은 마늘의 抗微生物特性을 관찰한 결과 allicin이 그람양성 및 음성균에 모두 效果가 있음을 보고하였다. 최근에도 당근종자油(VCSO)와 그 化合物이 *Aspergillus parasiticus*의 生育과 aflatoxin 生성에 影響을 미친다는 Batt 等⁹⁾의 報告에서 geraniol, citral과 terpineol은 균의 生育을 淘害하였으나 培地의 초기 pH 4.0에서 terpinene과 limonene의 경우엔 生育抑制作用은 없었으나 aflatoxin 生成을 淘害하였는데 이것은 limonene과 terpinene이 일차

代謝作用을 變化시켜 초기生長을減少시킨 데에 그 원인이 있다고 하였다.

이와 같은 外國의 많은 報告과는 달리 國內에서는 참싸리¹⁰⁾, 팽나무버섯 等¹¹⁾에 대한 藥理實驗을 비롯하여 최근 朴等¹²⁾의 人蔘製品添加가 aflatoxin 生產에 미치는 영향에 대한 報告가 있으나 아직도 藥草 및 農產物이 含有한 自然的抵抗因子에 의한 mycotoxin 污染防止와 관련된 研究는 매우 미흡한 실정이다. 著者 等은 양념 및 藥材로 널리 利用되고 있는 마늘(*Allium sativum L.*)액기스가 供試菌의 生育, 脂質 및 aflatoxin 生成에 미치는 影響을 調查하여 그 效果를 報告하는 바이다.

II. 材料 및 方法

1. 供試菌株 및 培地

供試菌株는 慶尙大學校 食品衛生學教室에서 變質米로부터 分離同定하여 保管中인 *Aspergillus parasiticus* R-716을 使用하였으며, 培養에 使用된 基本培地는 Matles 等¹³⁾의 SLS 培地를 참고한 것으로 그組成은 Table 1과 같다.

2. 마늘액기스의 造製

實驗에 使用된 마늘은 市中에서 구입한 것으로 마늘 30g에 각종 유기용매(chloroform, petroleum ether, benzene, n-hexane) 50 ml를 가하여 磨碎한 후 2.5時間 진탕시켜 抽出하여 여과한 chloroform 층을 분획하거나,

Table 1. Modified SLS medium for the production of aflatoxin.

Sucrose	85 g/l	ZnSO ₄ · 6H ₂ O	75 mg
L-Asparagin	10 g	Na ₂ B ₄ O ₇	10 mg
(NH ₄) ₂ SO ₄	3.5 g	FeSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg
KH ₂ PO ₄	2 g	MnCl ₂ · 4H ₂ O	5 mg
MgSO ₄ · 6H ₂ O	1 g	Ammonium molybdate	2 mg
CaCl ₂ · 2H ₂ O	75 mg	Initial pH	4.5

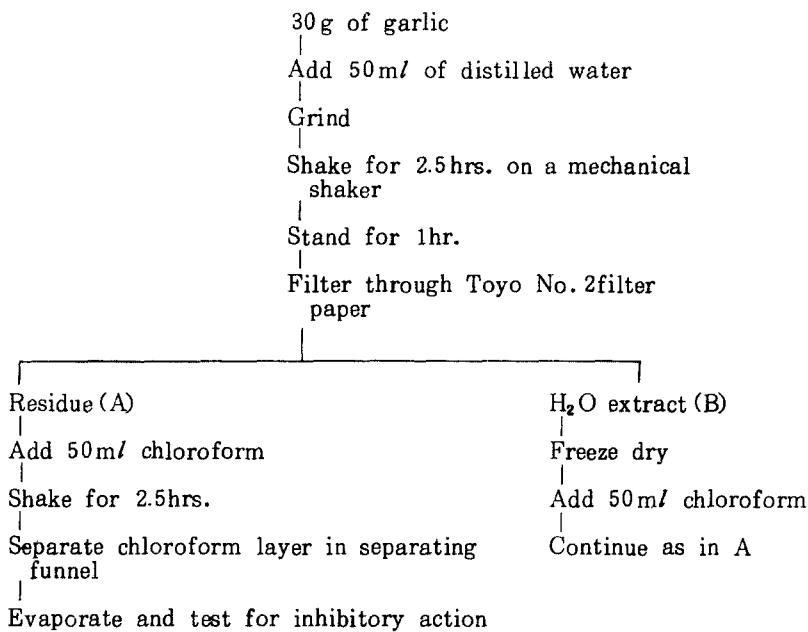


Fig. 1. Extraction procedure of garlic using water chloroform separately.

Fig. 1과 같이 처리하여 chloroform층을 분획한 다음抽出物을減壓濃縮하여冷暗所에貯藏하고 필요에 따라 95% ethanol에 녹여使用하였다.

3. 胞子懸濁液

供試菌을 GPA斜面培養基에 28°C에서 8일 동안 3회連續繼代培養시켜 충분히活性화시킨 후 0.1% Tween 80 1ml와 滅菌水 5ml를 가하여 흔들어서胞子를 씻어내는 조작을 3회 반복하여胞子를 수집한 후適當量의滅菌水를添加하여顯微鏡으로胞子數를 ml當 $10^6 \sim 10^7$ 개로 조절하였다.

4. 培養方法

평판배양은 agar가添加된基本培地 10ml를殺菌한 후 마늘액기스를濃度別(0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6, 0.7g 마늘/10ml培地)로添加하여 평판한 다음無菌的으로 단일 colony를形成하도록 접종하여 28°C에서 15일간培養하였

고, 液體培養은基本培地 25ml를 300ml △flask에 넣고殺菌한 다음 마늘액기스를濃度別(0.5, 0.75, 1.0, 1.25, 1.5g 마늘/25ml培地)로添加하여胞子懸濁液 0.5ml를接種하여 28°C에서 12일간 배양하였다.

5. 生育度 및 기타測定

菌의生育度測定은 평판배양의 경우 15일 후 colony의 크기를 관찰하였고, 液體培養時は乾燥重量法으로 비교하였는데, 即培養液을 Toyo No. 2여과지로여과하여 50°C에서 24時間乾燥시켜放冷한 후恒量이된무게에서여과지무게를제한것을菌體量으로하였다. 또한脂質含量은 soxhlet抽出法으로, pH는 pH meter로서測定하였다.

6. Aflatoxin의精製 및定量

培養物에서의 aflatoxin精製는 AOAC法¹⁴⁾에준하였다. 즉 25ml의液體培地에同量의chloroform을加하여30分間격離히진탕시켜

Toyo No. 2여지 위에 5m/l의 규조토를 깐 Buchner funnel로 여과하여 분액여두에서 chloroform충만 分離한 후 増壓濃縮하여 column chromatography를 實施하였다. 먼저 glass filter가 부착된 22×300mm column에 5g의 無水 Na_2SO_4 를 가하고 chloroform을 1/2 정도 채웠다. 그 위에 chloroform으로 懸濁하여活性化된 silica gel 10g을 가하여 15분간 방치한 다음 15g의 無水 Na_2SO_4 를 다시 添加하였다. 이렇게 충진된 column에 chloroform抽出物 50m/l를 흡착시킨 후 질소가스로 유속 10~20m/min.로 조절하여 150m/l의 n-hexane과 150m/l의 ethyl ether로 脂肪과 色素를 제거하였으며 column에 흡착된 aflatoxin은 chloroform/methanol (97/3)의

Table 2. Condition of HPLC for the analysis of aflatoxin.

Type	Waters Model 244
Detector	UV 365nm
Column	μ Bondapak C ₁₈
Flow Rate	1mL/min.
Solvent	H ₂ O/NaOH/Acetonitrile = 50/25/10
Chart Speed	0.5 cm/min.
Sensitivity	0.01~0.5 Aufs*

* Absorbance unit full scale

혼합액으로 용출시켜 수거하였다. 이 용출액을 갑암농축하여 소량의 chloroform으로 vial에 옮기고 진공상태에서 전조하였다. aflatoxin 정량은 HPLC(high pressure liquid chromatography)法¹⁵⁾으로 정량하였고, 使用한 aflatoxin 표준품은 이스라엘의 Marko chemical社製品이었고 分析을 위한 기기조건은 Table 2와 같다.

III. 結果 및 考察

1. 抽出方法의 影響

마늘속에 含有되어 있는 各種 成分을 chloroform, p-ether, benzene, n-hexane 및 water-chloroform 等의 有機溶媒法으로抽出한 후 진공농축하여 조제한 엑기스를 마늘 2g에 해당되도록 培養液에 添加하여抽出方法에 따른 供試菌의 生育 및 aflatoxin 생성에 미치는 영향을 조사한 결과 Table 3과 같이 각 실험구에서 공히 크게 淫害現象을 보였으며, 그 중 p-ether, n-hexane 시험구에서는 약간의生育을 보였으나, chloroform, benzene, water-chloroform 시험구에서는 완전히 저해되었다.

Carl¹⁶⁾ 등도 당근을 여러 유기용매로 추출하여 실험한 결과 chloroform 추출법이 가장 효

Table 3. Effect of various solvent extracts of garlic on growth and aflatoxin production by *Asp. parasiticus* R-716.

Solvent	Dry weight (g/25mL)	Colony diameter (cm)	pH	Sporulation	Aflatoxin	
					Total ($\mu\text{g}/25\text{mL}$)	Inhibition (%)
Control	0.994	5.9	2.3	+++	1,352	—
Chloroform	—	—	4.3	—	—	100
p-Ether	0.246	1.4	4.1	—	436	68
Benzene	—	—	4.5	—	—	100
n-Hexane	0.396	2.3	3.4	+	627	54
Water-Chloroform	—	—	4.5	—	—	100

과적이었으며 당근 75g의 chloroform 엑스를 첨가하여 *Asp. parasiticus* NRRL 2999의胞子形成이 1주일 이상 완전히 저해됨을 報告하였다.

평판배양의 경우도 배양 15일 후 Fig. 2 처럼 p-ether 실험구는 8일 후, n-hexane 실험구는 약 5일경부터 colony의 形成이 시작되었으나, 다른 유기용매 실험구에서는 배양 15일까지 colony의 形成을 보이지 않았다.

2. 엑스濃縮別 添加에 따른影響

Water-chloroform抽出法에 의해 조제된 마늘엑스의 濃度別 添加에 따른 菌의 生育을 살펴보면 Table 4에서 보는 바와 같이 마늘엑스濃度의 증가에 따라 저해도가 증가되어 마늘 15g에 해당되는 첨가구에서는 완전히 生

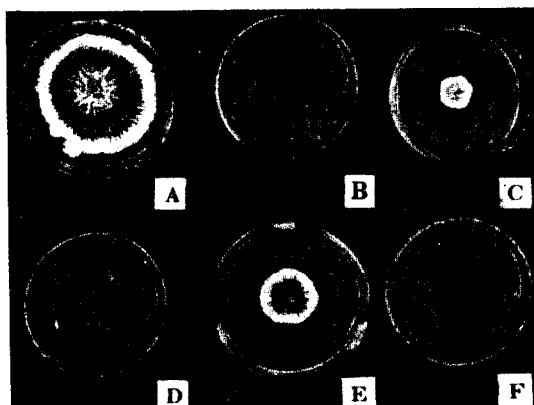


Fig. 2. Effect of various solvent extracts of garlic on growth of plate cultivation by *Asp. parasiticus* R-716.
A: control, B: chloroform,
C: p-ether, D: benzene,
E: n-hexane, F: water-chloroform.

Table 4. Effect of water-chloroform extract of garlic on growth by *Asp. parasiticus* R-716.

Conc.	Mycelium		Color of CHCl ₃ extract	pH	Sporulation	Colony	
	Dry weight (g/ 25 ml)	% Control				Diameter (cm)	Inhibition (%)
0	0.985	100	yellow	2.3	+++	5.8	0
0.5	0.945	96	yellow	2.5	+++	5.4	7
0.75	0.812	82	yellow	2.2	+++	3.8	35
1.0	0.581	59	pale yellow	2.8	+	1.9	67
1.25	0.329	33	white	3.0	-	1.2	79
1.5	-	-	-	4.3	-	-	100

Table 5. Effect of water-chloroform extract of garlic on aflatoxin production by *Asp. parasiticus* R-716.

Conc.	Aflatoxin ($\mu\text{g}/25 \text{ ml}$)					Aflatoxin/mycelium ($\mu\text{g}/\text{g}$)
	B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Total	
0	762	123	393	75	1,352	1,372
0.5	832	188	315	64	1,399	1,480
0.75	873	140	261	32	1,206	1,485
1.0	555	134	187	52	928	1,597
1.25	329	32	121	15	497	1,510
1.5	-	-	-	-	-	-

육이潤害되었으며, 0.75g 첨가구까지도 포자 및 colony 형성이 매우 불량하였고, pH는 濃度의 증가에 따라 대체로 높았다.

한편 aflatoxin 생성은 菌體의 生育抑制程度에 비례하여 급격히 減少하였으나 Table 5에 서처럼 菌體 g當 aflatoxin 生成量은 오히려 대조구에 비해 첨가구에서 오히려 높게 나타났다.

또한 aflatoxin의 구성을 살펴보면 농도의 증가에 따라 대조구에 비해 aflatoxin B₁ group의 함량이 많았는데 이는 대조구보다 늦은 2次代謝作用으로 B₂, G₁, G₂에로의 전환이 이루어지지 않은 것으로 사료된다.

3. 마늘엑기스 添加에 따른 경시적 배양

마늘 1.0g에 해당되는 water-chloroform 혼기스를 첨가하여 3, 6, 8, 12일마다 경시적으로供試菌의生育 및 物質生成을 비교하였다. 생육현상을 살펴보면 Fig. 3에서처럼 균의 생육이 불량하여 대조구의 경우 3일까지 대체로 균의 총식이 이루어져 $0.753\text{g}/25\text{mL}$ 를 보인데 비해 첨가구에서는 3일째 $0.084\text{g}/25\text{mL}$ 로서 약 89%

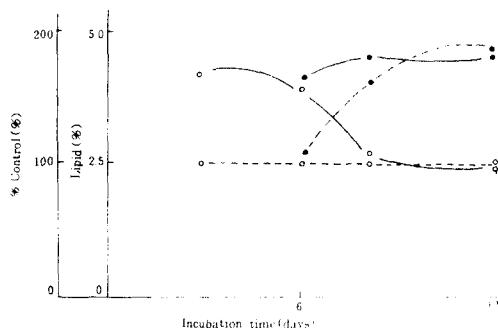
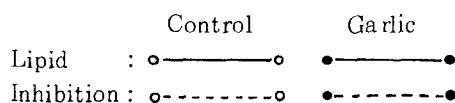


Fig. 4. Effect of water-chloroform extract equivalent 1.0g of garlic on formation of lipid during incubation by *Asp. parasiticus* R-716.



%가 저해되다가 6일 이후에 증식이 거의 이 루어져 8일에는 대조구, 첨가구 각각 0.987, 0.581g/25ml로서 마늘의 생육저해를 뚜렷이 관찰할 수 있었다.

또한 Fig. 4에서 보는 바와 같이 지질의 함량은 대조구에 비해 높게 나타났으며, 대조구는

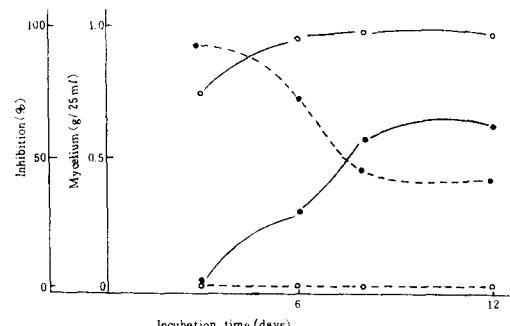


Fig. 3. Effect of water-chloroform extract equivalent 1.0g of garlic on growth during incubation by *Asp. parasiticus*
R-716.

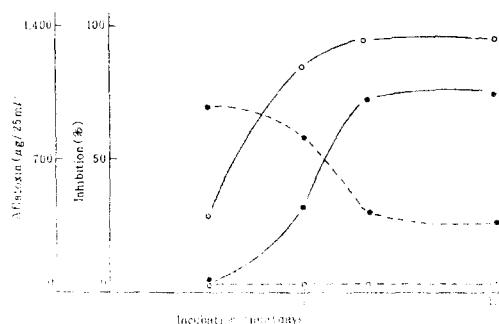
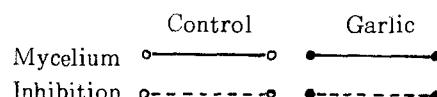
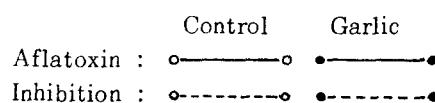


Fig. 5. Effect of water-chloroform extract equivalent 1.0 g of garlic on aflatoxin production during incubation by *Asp. parasiticus* R-716.



시간의 경과에 따라 減少한 반면 첨가구는 증가하여 8일 후에는 각각 2.71, 4.41%로 나타났다.

특히 aflatoxin과 지질은 동일전구체인 acetyl Co A에서 합성되므로 두 성분의 含量에 깊은 관계가 있을 것으로 생각되어 aflatoxin含量과 비교하여 살펴본 결과, Fig. 5에서와 같이 배양초기엔 72% 저해를 보이다가 시간의 경과에 따라 저해도가 점차 감소하여 培養 8일 후에는 대조구의 $1352\mu\text{g}/25\text{mL}$ 에 비해 첨가구는 $928\mu\text{g}/25\text{mL}$ 로서 32%의 저해를 나타내었고, 지질의 함량과 비교하면 Detry 등¹⁷⁾의 報告와 같이 서로 상반되는 경향을 보였다. 한편 aflatoxin의 균체 g當 함량은 Table 6에서와 같이 배양 6일째는 대조구 및 첨가구

에서 각각 $1242\mu\text{g}/\text{g}$, $1683\mu\text{g}/\text{g}$ 인 것을 비롯하여 대체로 첨가구가 오히려 높게 나타났다.

aflatoxin 종류별 함량을 살펴보면 초기에는 B₁의 함량이 약 70%를 차지하였으나 시간의 경과에 따라 G₁, B₂ 등의 함량비가 점차 증가하여 12일째는 40~50%의 분포를 나타내었다. 마늘이 *Penicillium commune*의 ochratoxin A等의 毒素生成을 직접법으로 测定한다는 Appleton 等¹⁸⁾의 경우와는 달리 aflatoxin 함량의 減少는 마늘의 抗菌作用에 의해 初期代謝作用에 變化를 일으켜 菌體成長을 抑制시킴에 따라 일어난 것으로 생각되나 앞으로 이 같은 天然物에 의한 抗微生物作用 및 作用機作에 대한 체계적인 研究가 필요한 것으로 사료되는 바이다.

Table 6. Effect of water-chloroform extract of garlic on aflatoxin production during incubation of *Asp. parasiticus* R-716.

Days	Conc.	Aflatoxin ($\mu\text{g}/25\text{mL}$)					Aflatoxin/Mycelium ($\mu\text{g}/\text{g}$)
		B ₁	B ₂	G ₁	G ₂	Total	
3	{ 0	262	13	83	17	395	510
	{ 0.1	76	14	32	—	108	1,285
6	{ 0	839	82	217	30	1,228	1,242
	{ 0.1	317	53	106	19	495	1,683
8	{ 0	762	123	393	75	1,352	1,369
	{ 0.1	555	134	187	52	928	1,597
12	{ 0	683	179	421	75	1,358	1,378
	{ 0.1	437	207	306	93	943	1,590

IV. 要約 및 結論

양념 및 藥材로 널리 이용되고 있는 마늘 (*Allium sativum L.*)의 water chloroform액 기스가 供試菌 (*Aspergillus parasiticus* R-716)의 生育, 脂質 및 aflatoxin의 생성에 미치는 영향을 調査한 結果는 다음과 같다.

1. 마늘의 有機酸及 抽出物은 供試菌의 生育과 胞子形成을 강하게 沢害하였고 抽出에 使用

하는 溶媒는 chloroform, benzene, water-chloroform이 效果的이었다.

2. 마늘의 water-chloroform액 기스 첨가 농도의 증가에 따라 供試菌의 生育과 aflatoxin含量은 減少하였고, 마늘 1.5g에 해당되는 엑기스의 첨가로 완전히 沢害되었고, 1.25g 수준의 첨가구에서는 aflatoxin含量은 $497\mu\text{g}/25\text{mL}$ 로서 대조구의 $1,352\mu\text{g}/25\text{mL}$ 에 비해 64%가 減少되었으나 균체 g當 aflatoxin含量은 첨가구가 오히려 높았다.

3. 마늘 1.0g의 엑기스첨가에 따른 生育沮害度는 초기에는 89.1%이었으나 12일 후는 감소하여 0.593g/25ml로서 대조구의 60%菌體生成을 보였다.

4. 脂質含量은 aflatoxin含量과 반대현상을 보여 培養 8일 후 첨가구는 4.41%로서 대조구의 2.71%보다 오히려 높았으며 培養初期엔 aflatoxin B₁이 약 70%로 많은 양을 차지하였으나 12일 후는 50%로減少한 반면 B₂, G₁의 含量이 증가되었다.

参考文献

1. Sargeant, K., A. Sheridan, J.O'kelly, and R.B.A. Carnaghan,: Toxicity associated with certain samples of ground nuts, Nature, 192:1096~1099, 1961.
2. Bean, G.A., Klarman, W.L., Rambo, G.W. and Sanford, J.B.: Dimethyl sulfoxide inhibition of aflatoxin synthesis by *A. flavus*, Phytopathology, 61 : 380~384, 1971.
3. Hsieh, D.P.H.: Inhibition of aflatoxin biosynthesis by dichlorovos, J. Agr. Food Chem., 21:468~471, 1973.
4. Chamberland, M.: Les essences au point de vue de leurs propriétés antiseptique, Ann. Inst. Pasteur, 1:153~157, 1887.
5. Fabian, F.W., Kreh, C.F., and Little, N.W.: Role of spices in pickled food spoilage, Food Res., 4 : 269~273, 1939.
6. Bachmann, F.M.: The inhibitory action of certain spices on the growth of microorganisms, J. Ind. Eng. Chem., 8:620~623, 1916.
7. James, L.H.: Reducing the microbial content of spices, Food Inds., 10:428 ~431, 1938.
8. Cavallito, C.J. and Bailey, J.H.: Allicin, the antimicrobial principle of *Allium sativum*. Isolation, physical properties and antimicrobial action, J. Am. Chem. Soc., 66:1950~1954, 1944.
9. Batt, C., M. Solberg and M. Ceponis : Effect of volatile components of carrot seed oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*, J. Food Sci., 48:762~764, 1983.
10. 조봉진 : 참싸리 樹幹エキス의 抗真菌作用, 忠北大學校 大學院 碩士學位請求論文, 1982.
11. 禹洛植 : 팽나무버섯의 抗癌成分에 관한研究, 淑明女子大學校 大學院 博士學位請求論文, 1982.
12. Bahk, J.R. and J.K. Lee, : Growth and synthesis of aflatoxin by *Aspergillus parasiticus* in the presence of ginseng products with reduced minor elements, Kor. J. Env. Hlth. Soc., 10(1): 78~86, 1984.
13. Mateles, R.I., and J.C. Adye, : Production of aflatoxins in submerged culture, Appl. Microbiol., 13:208~211, 1965.
14. Association of official analytical chemists: Official methods of analysis, : 26~29, 1980.
15. Dong, M.W. and J.L. Dicesare : Improved food analysis using high-speed liquid chromatography, Food technology : 58~62, 1983.
16. Carl, B., Myron, S. and Michael, C. :

- Inhibition of aflatoxin production by
carrot root extract, J. Food Science,
45:1210~1213, 1980.
17. Detroy, R. W. and C. W. Hesseltine :Se-
condary biosynthesis of aflatoxin B₁ in
Aspergillus parasiticus, Can. J.Micro-
biol., 16:959~963, 1970.
18. Appleton, J. A. and Tansey, M. R.:In-
hibition of growth of zoopathogenic
fungi by garlic extracts, Mycologia, 67
: 882~887, 1965.