

*Aspergillus parasiticus*의 Aflatoxin 생성과 돌연변이
유발능에 미치는 인삼 Saponin의 영향

백형석·구재관·전홍기
부산대학교 자연과학대학 미생물학과

**The Effects of Ginseng Saponin on Aflatoxin Production and
the Mutagenicity in *Aspergillus parasiticus***

Baik, Hyung-Suk, Jae-Gwan Gu and Hong-Ki Jun

Department of Microbiology, College of Natural Sciences,
Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

ABSTRACT: The effect of ginseng saponin on aflatoxin(AF) production by *Aspergillus parasiticus* NRRL2999 and the mutagenicity of produced aflatoxin. The production of aflatoxin were decreased by the addition of ginseng saponin and the most effective concentration was 0.05%. The ratio of aflatoxin B₁ and aflatoxin G₁ were not changed by the addition of ginseng saponin. For the mutagenicity test, Ames method were adopted. Mutagenicity of mycelial aflatoxin was decreased by the addition of ginseng saponin on TA98, but not changed on TA100. Mutagenicity of excreted aflatoxin to broth was slightly increased by the saponin on TA98, but decreased on TA100.

KEY WORDS □ *Aspergillus parasiticus*, Aflatoxin, Ginseng Saponin, Mutagenicity.

Aflatoxin(AF)은 *Aspergillus flavus*와 그 유연종들에 의해 2차 대사산물로 생성되는 Mycotoxin 중의 하나이다(Aust 등, 1974), 1960년대 영국에서 약 10만 마리의 칠면조가 단시간에 중독사하는 turkey X-disease 사고가 발생하였는데 이는 칠면조에 사용한 사료중에 *Asp. flavus*가 오염되어 이 곰팡이가 분비하는 독소에 의한 것으로 밝혀졌다. 비슷한 시기에 미국에서도 송어의 간중만연 사건이 발생하였는데 이것도 역시 사료중의 목화씨 껍묵에 오염된 곰팡이가 그 원인임이 밝혀지면서 AF가 처음으로 알려지게 되었다(Halver, 1969).

AF는 사람이나 동물이 섭취할 경우 미량이 체내에 흡수되어도 각종 암을 일으킬 수 있으며 기형 발생인자, 돌연변이 유발물질, 간 독소로 작용하는 물질로 밝혀졌는데 AF 가운데 중요한 화합물로는 자외선 하에서 강하게 발광하는 B₁, B₂,

G₁, G₂들이며 그외 M₁, M₂, B_{2a}, G_{2a}, parasiticol, aflatoxicol과 GM₁ 등이 소량 존재한다(Patterson, 1977).

특히 AFB₁은 지금까지 알려진 발암물질중 가장 발암성이 강한 독성물질로 알려졌는데(Heathcote 등, 1979) 암 유발 원인은 생체내 간의 microsomal enzyme system 가운데 mixed function oxidase에 의해 대사활성되어 친전자성인 핵산(RNA, DNA)이나 단백질과 함께 첨가 생성물들을 형성함으로써 이들 물질을 불활성 또는 돌연변이를 일으키기 때문이라고 한다(Singer 등, 1983).

한편 인삼은 생약제 중 우리의 생활과 밀접한 관계가 있으므로 그 유효성분에 대해 많은 분석과 연구가 진행되어 왔으나(Shibata 등, 1963; Sanda 등, 1974; Shibata, 1966; Shibata 1974) 인삼의 유효성분이 AF 생성에 미치는 영향에 대해서

는 연구 검토하였으나 AF의 돌연변이 유발능에 대한 인삼 saponin의 연구는 극히 미미한 상태이다. 따라서 본 연구는 *Asp. parasiticus*의 AF 생성과 생성된 AF의 돌연변이 유발능에 인삼 saponin이 어떠한 영향을 미치는가를 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 실험에 AF 생성을 위해서 사용한 균주로는 미국 USDA Northern Regional Research Laboratory에서 공급받은 *Asp. parasiticus* NRRL 2999를 사용했으며 AF의 돌연변이 유발능 검토를 위해서는 *Salmonella typhimurium* LT-2의 histidine auxotroph인 TA 98, TA 100을 사용했는데 이는 B.N. Ames로부터 제공 받은 것이다.

사용배지

AT생성이 가장 좋다고 보고된 2% yeast extract, 15% sucrose의 Yeast Extract Sucrose(YES)배지를 AF의 생성을 위해서 사용하였고(Davis 등, 1966) AF의 돌연변이 유발능 검토에는 Vogel-Bonner medium을 사용했다(Ames 등, 1983).

S9 mixture solution의 조제

AF의 돌연변이 유발능 검토에 사용된 S9 mixture solution의 조제는 Ames 등(1983)의 방법에 따랐다.

인삼성분

인삼 saponin은 한국인삼연초연구소에서 공급받아 사용하였는데 그 순도는 95% 이상이다.

포자 현탁액 조제

4°C에서 보관중이던 *Asp. parasiticus*를 Potato Dextrose Agar(PDA) slant에 1백금이 접종하여 28°C에서 7일동안 2회 계대배양한 후 포자 현탁액 제조에 이용하였다. 포자 현탁액은 slant에 멸균수 10 ml를 넣고 백금으로 포자를 모은 후 4겹의 cheese cloth에 여과하여 멸균수 100 ml를 가해 희석하였다. 포자수는 Haemocytometer로 계산하여 약 3×10^6 conidia/ml 되도록 조정하였다.

배지 멸균 및 접종

20 ml의 YES 배지를 100 ml 삼각flask에 넣고 상법에 따라 멸균하였으며, 인삼 saponin은 오염

을 최소화 하기 위해 membrane filter한 후 배지에 첨가하여 사용하였다. YES 배지 20 ml에 3×10^6 conidia/ml의 포자현탁액 1.0 ml를 접종하여 28°C에서 9일간 정치 배양하였다.

pH 측정

균체를 제거하고 난 배양액의 pH는 Perkin-Elmer Metrion III pH meter(Coleman)로 측정하였다.

건조 균체량 측정

배양후 포자를 사멸시키기 위해 121°C에서 30초 동안 가압 증기 멸균하였으며 80°C dry oven에서 8시간 동안 건조시켜 미리 무게를 달아둔 filter paper(Toyo, No. 2, TOYO ROSHI CO., LTD)로 균체와 배양액을 분리하였다. 균체에 잔존한 배양액을 제거하기 위해 멸균수로 3회 세척한 후 80°C, dry oven에서 8시간 동안 건조시켜 균체량을 측정하였다.

AF 추출 및 분석

AF 추출 방법은 Marth 등(1971)의 방법에 따랐다. Vial에 추출된 AF을 일정량의 CHCl_3 로 용해시켜 두께 0.25 mm의 silica gel(Merk 60 G, MERCK)을 입힌 20×20 cm의 유리판에 spotting하여 전개용매로 toluene: acetic acid: 90% formic acid(60:30:10, v/v/v)를 사용하였으며 상승법에 의해 전개한 후 UV(ATTO-자외선 검출기, Atto-株式會社)하에서 AF 표준품과 비교, 확인하였다. TLC에서 분리한 AF은 Dual Wavelength TLC Scanner(Shimadzu CS-930)를 이용하여 정량하였다.

AF의 돌연변이 유발능 실험

추출된 균체와 배양액의 AF을 돌연변이 유발능이 가장 큰 AFB_1 을 기준으로 하여 plate당 0.1 μg 을 첨가할 수 있도록 DMSO(dimethylsulfoxide)에 희석하여 본 실험에 사용하였다.

본 실험은 Ames의 Salmonella/microsome test를 이용하였으며 전반적인 과정은 Ames 등의 방법에 따라 행하였다(Ames 등, 1983).

결과 및 고찰

인삼 saponin을 농도별로 첨가했을 때의 증식과 최종 pH

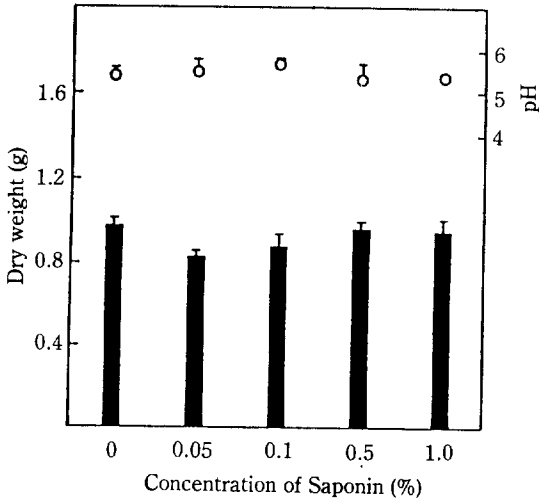


Fig. 1. Growth and final pH by *Aspergillus parasiticus* in YES medium containing various levels of saponin(%) after 9 days at 28°C (○: pH, ■: Dry weight)

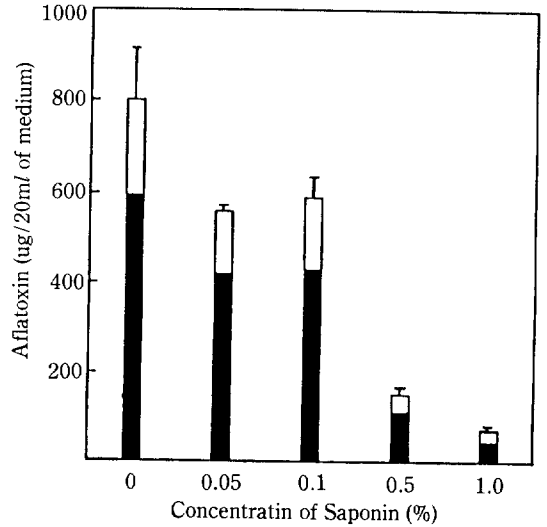


Fig. 2. Aflatoxin production in Mycelium by *Aspergillus parasiticus* in YES medium containing various levels of saponin (%) after 9 days at 28°C (□; AFG₁ ■; AFB₁)

Fig. 1에 나타난 것처럼, AF 생성량이 가장 많다고 보고된 9일간 28°C에서 배양하여(전등, 1986) AF 생성에 대한 saponin 첨가 효과를 조사하였다. 농도별로 첨가된 saponin에 의해서 건조중량은 큰 변화가 없었으나 특이적으로 0.05%의 saponin이 첨가된 경우에는 대조군에 비해 약 15% 정도 감소하였다. 그리고 pH는 5.5 부근에서 큰 변화를 볼 수가 없었다.

인삼 saponin을 농도별로 배양액에 첨가했을 때 균체내의 AF 생성

첨가된 saponin의 농도가 높을수록 균체내 AF의 생성량은 대조군에 비해 각각 30%, 25%, 80%, 85%가 감소하였으며 0.05% saponin이 첨가된 경우는 0.1% saponin 첨가된 경우보다 조금 더 많은 감소를 알 수가 있었다(Fig. 2).

그리고 AF 종류별로 생성비율을 보면 AFB₁과 AFG₁은 대조군과 별차이를 보이지 않았다.

인삼 saponin을 농도별로 배양액에 첨가했을 때 배양액에서의 AF 생성

Fig. 3에서와 같이 대조군에 비해서 saponin 첨가시 각각 13%, 27%, 85%, 90%가 감소하였으며 AFB₁과 AFG₁의 비율도 균체내에서 보다는 B₁의 생성비율이 약간 높게 나타났다.

이상의 결과를 토대로 AF 생성에 미치는 인삼

saponin의 영향을 검토해 볼 때, 인삼 saponin은 *Asp. parasiticus*에 의한 AF 생성을 저해하지만 AFB₁의 생성비는 거의 변화하지 않는 것으로 나타났다.

인삼 saponin 첨가가 균체 AF의 돌연변이 유발능에 미치는 영향

Table 1에서와 같이 TA 98로 행한 실험에서는 첨가된 saponin의 양이 증가할수록 plate당 revertant의 수는 급격하게 감소하였으며 특이적으

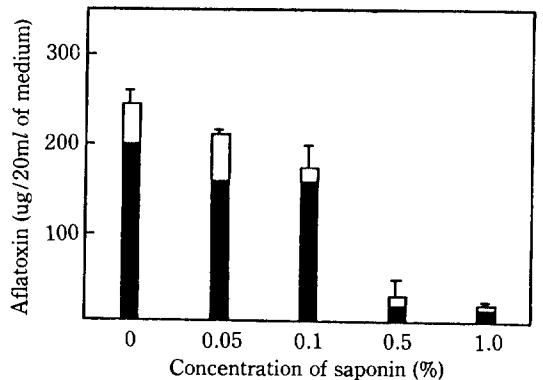


Fig. 3. Aflatoxin production in broth by *Aspergillus parasiticus* in YES medium containing various levels of saponin (%) after 9 days at 28°C (□; AFG₁, ■; AFB₁)

Table 1. Effect of saponin on the mutagenic activity of mycelium aflatoxin in *Salmonella typhimurium* LT-2 TA98

Saponin Conc. (μ g)	Revertants per plate				
	A	B	C	D	E
0	449	489	610	519	479
50	519	606	683	547	971
100	389	442	358	512	380
500	343	397	346	376	295
1000	183	302	338	211	210

Aflatoxin extracted in YES medium containing various levels of saponin: 0%(A), 0.05%(B), 0.1%(C), 0.5%(D), 1.0%(E).

Table 2. Effect of saponin on the mutagenic activity of mycelium aflatoxin in *Salmonella typhimurium* LT-2 TA100

Saponin Conc. (μ g)	Revertants per plate				
	A	B	C	D	E
0	275	312	370	303	257
50	250	255	250	235	221
100	276	402	229	316	292
500	250	340	284	371	314
1000	308	319	318	293	258

Aflatoxin extracted in YES medium containing various levels of saponin: 0%(A), 0.05%(B), 0.1%(C), 0.5%(D), 1.0%(E).

로 plate당 50 μ g의 saponin이 첨가된 경우에는 약간의 증가가 있었다. 또한 TA 100에 행한 실험에서는 Table 2와 같이 거의 변화가 없었다.

인삼 saponin 첨가가 배양액의 AF 돌연변이 유발능에 미치는 영향

TA 98로 행한 배양액 AF의 돌연변이 유발능에 미치는 인삼 saponin의 영향에 대한 결과는 Table 3과 같다. saponin의 첨가로 인해 오히려 plate 당

Table 3. Effect of saponin on the mutagenic activity of broth aflatoxin in *Salmonella typhimurium* LT-2 TA98

Saponin Conc. (μ g)	Revertants per plate				
	A	B	C	D	E
0	556	544	556	582	597
50	652	608	591	845	634
100	611	644	631	677	794
500	654	707	662	906	795
1000	654	655	604	798	610

Aflatoxin extracted in YES medium containing various levels of saponin: 0%(A), 0.05%(B), 0.1%(C), 0.5%(D), 1.0%(E).

Table 4. Effect of saponin on the mutagenic activity of broth aflatoxin in *Salmonella typhimurium* LT-2 TA100

Saponin Conc. (μ g)	Revertants per plate				
	A	B	C	D	E
0	735	799	805	978	892
50	823	775	762	754	862
100	749	742	696	790	781
500	731	777	623	749	752
1000	686	792	677	773	565

Aflatoxin extracted in YES medium containing various levels of saponin: 0%(A), 0.05%(B), 0.1%(C), 0.5%(D), 1.0%(E).

revertant의 수는 약간 증가하는 것으로 나타났으며 TA 100으로 행한 실험에서는 첨가한 saponin의 양이 증가할수록 revertant의 수는 감소했다 (Table 4).

이상의 결과를 종합해 볼 때 인삼 saponin은 *Asp. parasiticus*의 균체 AF의 돌연변이 유발능에 저해작용을 하는 것으로 사료되었다.

적 요

Aspergillus parasiticus NRRL 2999의 aflatoxin 생성에 미치는 인삼 saponin의 영향을 조사하고 생성된 aflatoxin이 돌연변이에 미치는 영향을 Ames의 *Salmonella typhimurium* LT2 균주인 TA 98과 TA 100을 사용하여 실험하였다. aflatoxin의 생성은 인삼 saponin의 첨가 농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였으며 0.05%의 인삼 saponin을 첨가했을 때가 가장 효과적이었다. 그리고 생성된 AF B₁과 G₁의 비율은 대조군과 별차이를 보이지 않았다.

또한 생성된 aflatoxin에 인삼 saponin을 plate당 50, 100, 500, 1000 μ g 첨가하여 Ames test 했을 때 균체에서 추출한 aflatoxin은 frame-shift mutant인 TA 98에 대하여 첨가된 인삼 saponin의 양이 증가함에 따라 mutagenicity가 감소하였으

나 base substitution mutant인 TA 100에는 영향을 미치지 못했다. 한편 배양액에서 추출한 aflatoxin의 경우, 첨가된 인삼 saponin의 양이 증가함에 따라 TA 98의 mutagenicity는 약간 증가하는 경향이었으며 TA 100의 경우는 감소하는 경향을 나타내었다.

REFERENCES

1. Ames, B.N. and Maron, D.M., 1983. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutation Research.*, **113**, 173-215.
2. Aust, S.D., 1974. In *Mycotoxins* Ed. Elsevier Scientific Publishing Co. Amsterdam.
3. Davis, N.D., Diener, U.L. and Eldridge, D.W., 1966. Production of Aflatoxin B₁ and G₁ by *Aspergillus flavus* in a Semisynthetic Medium. *Appl. Environ. Microbiol.*, **14**, 378-380.
4. Halver, J.E. 1969. In *Aflatoxin* Ed. Goldblatt, L.A., Academic Press, New York.
5. Heathcote, J.C. and Hibbert, J.R., 1978. In *Aflatoxins: Chemical and Biological Aspects*. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam.
6. Jun, H.K., Park, K.Y. and Jo, Y.B., 1986. Effects of Ginseng Saponin and Its Related Materials on Aflatoxin Production by *Aspergillus Parasitius* NRRL 2999 in Semi-Synthetic Media. *Kor. Jour. Microbiol.*, **24**, 288-294.
7. Marth, E.H. and Shih, C.N., 1971. A procedure for rapid recovery of Aflatoxin from cheese and other food. *J. of Milk and Food Technol.*, **34**, 119-123.
8. Patterson, D.S.P., In *Mycotoxin Funge, Mycotoxins, Mycotoxicoses* Marcel Dekker, Inc., New York and Basel, 1, 136.
9. Sanda, S., S. Shibata, N. Kado, J. Shoji and O. Tanaka, 1974. Studies on the saponins of ginseng. *Chem. Pharm. Bull.*, **22**, 421-428.
10. Shibata, S., M. Fujita, I. Itakawa, O. Tanaka and T. Ishii, 1963. Constituents of Japanese and Chinese crude drugs. *Chem. Pharm. Bull.*, **11**, 751-761.
11. Shibata, S., T. Ando and O. Tanaka, 1966. Chemical Studies on the oriental plant drugs. *Chem. Pharm. Bull.*, **14**, 1161-1197.
12. Shibata, S., 1974. Proceeding of International Ginseng Symposium. p. 69.
13. Singer, B. and Grunberger, D., 1983. In *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens*, Plenum Press, New York and London, 181.

(Received Feb. 22, 1988)