

아스콜빈산과 Aflatoxin B₁ 반응생성물의 돌연변이 유발성

권미향 · 박건영* · 최홍식 · 백형석¹

부산대학교 식품영양학과, ¹미생물학과

Mutagenicity of Reaction Products of Aflatoxin B₁ and Ascorbic Acid

Kweon, Mee-Hyang, Kun-Young Park*, Hong-Sik Cheigh and Hyung-Suk Baik¹

Department of Food Science and Nutrition,

¹Department of Microbiology, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea

Aflatoxin B₁ (AFB₁) was reacted with ascorbic acid (AA) alone, with AA plus cysteine and with AA plus cupric ion for 5 days (at 37°C and pH 5), and the mutagenicity of the reaction products was tested with *Salmonella typhimurium* TA 100. About 70% of AFB₁ induced mutagenesis was reduced when AFB₁ reacted with AA. This decreasing effect was more severe when AFB₁ reacted with AA plus cysteine. The mutagenicity of AFB₁ when reacted with AA plus cupric ion was almost completely inhibited, however, cupric ion itself was shown to enhance the mutagenicity of AFB₁. Therefore, AFB₁ may be degraded in the presence of AA under the given reaction condition and the reaction products was observed to have nonmutagenic effects on the bacterial mutagenicity trials.

Aflatoxin B₁ (AFB₁)은 AF 물질들 중에서도 돌연변이 유발성이 가장 강한 것으로, 생체 내외에서 간의 mixed function oxidase (MFO) system에 의하여 대사 활성화되어 친전자성의 AFB₁-2,3-epoxide로 전환되고 이것이 친핵성인 핵산이나 단백질과 함께 부가물을 형성함으로써 돌연변이 또는 암을 유발시킨다고 알려져 있다(1, 2). 그러나 AFB₁은 MFO에 의한 epoxidation 외에도 주위의 조건에 따라 hydration, hydroxylation 또는 o-demethylation 되어 돌연변이를 일으키지 않는 AFB_{2a}, AFQ₁ 및 AFP₁ 등으로 전환된다고도 하였다(3).

한편 아스콜빈산(ascorbic acid, AA)은 강한 환원력과 항산화적 특성을 지니고 있으며 아울러 발암성을 억제하거나 저해하는 작용이 있다고 보고된 바 있다(4, 5). 또한 AA는 AFB₁과 산성구분에서 상호반응할 때 상당량의 AFB₁이 파괴되며 pH가 낮아질수록 또 온도가 높아질수록 파괴의 정도가 증가되고 이 때 첨가된 산화제 및 환원제의 영향을 크게 받는다고 하였다(6). 그리고 AA

는 *Salmonella* assay system에 있어서 AFB₁의 돌연변이 유발성에 대하여 저해요소로 작용하며, 농도에 따라 다르나 500 μg의 AA를 0.1 μg의 AFB₁에 첨가할 때 AFB₁에 의한 돌연변이성이 완전히 저해된다고 보고된 바 있다(7).

본 연구에서는 전보(6, 7)에 이어 AA와 AFB₁의 반응생성물 그리고 산화제와 환원제 존재하에서 얻어진 동반응생성물들의 돌연변이 유발성에 대한 특성을 *Salmonella* assay system에서 확인하였으므로 그 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

사용균주

균주는 Dr. B.N. Ames (University of California, Berkeley, CA, USA)로부터 제공받은 *Salmonella typhimurium* strain TA 100을 사용하였으며 균주의 유전형질 확인, 보관 및 배양은 전보(7)에 준하였다.

반응물질의 조제 및 반응조건

Key words: Ascorbic acid, aflatoxin B₁, *Salmonella* assay system, mutagenicity, reaction products

*Corresponding author

AFB₁ (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) 용액 조제는 전보(6)에 준하여 UV spectrophotometer에서 조제하되, 용매 (benzene : acetonitrile, 98 : 2, v/v) 1 ml/당 200 μg의 AFB₁을 함유토록 조정된 용액을 nitrogen gas로 용매를 제거한 후 methanol로 다시 AFB₁ 용액(200 μg/ml)을 만들고, 필요한 양을 취해 용매를 제거한 후 살균한 dimethyl sulfoxide (DMSO, Aldrich Chemical Co., Milwaukee, WI, USA)에 녹이면서 적정 농도로 조정하여 사용하였다.

그리고 AA (Hoffman La-Roche, Nutley, NJ, USA) 용액은 미리 멸균 증류수에 AA를 농도별로 녹이고 cap vial에서 이를 0.45 μm의 membrane filter (Sartorius membrane filter ; size 25, No.127)로서 무균적으로 여과하여 매실험마다 조제하였다. 한편 AFB₁과 AA와의 반응생성물은 전보(6)에서 얻어진 결과를 참조하여 다음과 같이 조제 반응시켜 얻었다(8). 즉, 0.5 M succinate buffer (pH 5)로서 0.5 M AA와 10 μg/ml AFB₁의 농도로 조정하여 37°C에서 5일간 반응시켰으며, cupric ion (CuSO₄·5H₂O ; 2.5 ppm) 및 L-cysteine (12.5 ppm) 역시 같은 방법으로 같은 조건에서 각각 반응시켰고, 이때 사용한 시약은 Junsei Chemical Co. (Tokyo, Japan)에서 구입한 것이었다.

돌연변이성 시험

S 9 fraction, S 9 mixture, 사용배지 및 소요시약의 조제는 Maron과 Ames의 방법에(9) 따라 행하였으며 돌연변이성 시험은 Matsushima 등의 방법(10)에 따라 전보(7)와 같이 하되, 반응생성물은 먼저 무균적으로 20배, 40배, 60배로 희석하여 실시하였다.

결과 및 고찰

반응용액들의 돌연변이성

시험균주 TA 100 및 기타 사용된 반응용액들의 revertant에 대하여 살펴본 결과는 Table 1과 같다. 즉, 시험균주의 spontaneous revertant 수는 125로서 기존의 연구결과와 잘 일치하였으며(9) 사용된 반응용액들 즉, AA, succinate buffer, DMSO, methanol, cupric ion, cysteine 등은 다같이 spontaneous reversion의 영역에서 벗어나지 않았고 또 시험균주에 대하여 돌연변이성을 나타내지 않았다. 그리고 AFB₁의 경우 revertant의 수가 1209으로서 spontaneous revertant의 약 10배나 되고 돌연변이성을 나타내었으며 이러한 결과는 전보(7)의 결과와 같은 경향을 보여주었다.

Table 1. Reversion of *Salmonella typhimurium* TA100 in the presence of several test chemicals

Test chemicals	Revertants/plate ^a	Mutagenicity
Spontaneous reversion	125	- ^b
Aflatoxin B ₁ (0.1 ug/plate)	1209	+
Ascorbic acid (500 ug/plate)	170	-
Succinate buffer	123	-
Dimethyl sulfoxide	122	-
Methanol	132	-
Cu ⁺⁺ (CuSO ₄ 5H ₂ O)	138	-
L-Cysteine	135	-

^a Mean revertant value of two separate experiments with triplicate plates.

^b Negative mutagenicity based on yield of two times as many revertants below spontaneous mutation rate.

AA와 AFB₁ 반응생성물의 돌연변이성

AA (0.5 M)와 AFB₁ (10 μg/ml) 반응생성물 (pH 5.0, 0.5 M succinate buffer에서 37°C, 5일간 반응)을 20배, 40배, 60배로 희석한 후 균주 TA 100에 대한 돌연변이 검정시험 결과를 보면 Fig. 1과 같다. 이때 대조구로 0.5 M succinate buffer에 동일농도의 AFB₁을 위의 조건에서 처리한 것과 또한, 동일농도의 AA 단독의 용액도 같은 조건에서 처리하여 함께 검토해 보았다.

먼저 20배로 희석하여 처리하였을 때, 대조구의 AFB₁은 약 600개의 revertant가 생겼으나 AFB₁과 AA 반응생성물에서는 약 160개로서 돌연변이성이 73%나 감소되었다. 그리고 40배, 60배로 희석되면서 대조구의 AFB₁은 270, 110개의 revertant가 생겼으며 희석 정도에 따라 감소되는 반면에 AFB₁ 및 AA 반응생성물에서는 희석에 따라 돌연변이성이 완전히 없어지면서, negative control 범위로 revertant가 감소되었다.

이 결과에 있어서 20% 희석의 경우 대조구보다 AA와의 반응에서 AFB₁의 돌연변이성이 73%나 감소되었는데, 이는 전보(6)에서 같은 조건으로 반응하였을 때 AFB₁이 66% 파괴되어 감소되었다는 사실과 비교하여 보면, 다소 차이는 있으나 AA에 의한 AFB₁의 파괴와 AFB₁의 돌연변이성 감소와의 사이에는 상관성이 있다고 사료되었다. AA에 의한 AFB₁의 파괴는 AA 자체의 산화에 의한 산화생성물들의 영향으로 판단되고, AA 산화생성물들은 free radical, singlet oxygen, hydrogen peroxide, 여러 가지 종류의 유기산 등이 알려져 있다(11). 그러나 본 실험에서와 같이 동일농도의 AA 용액

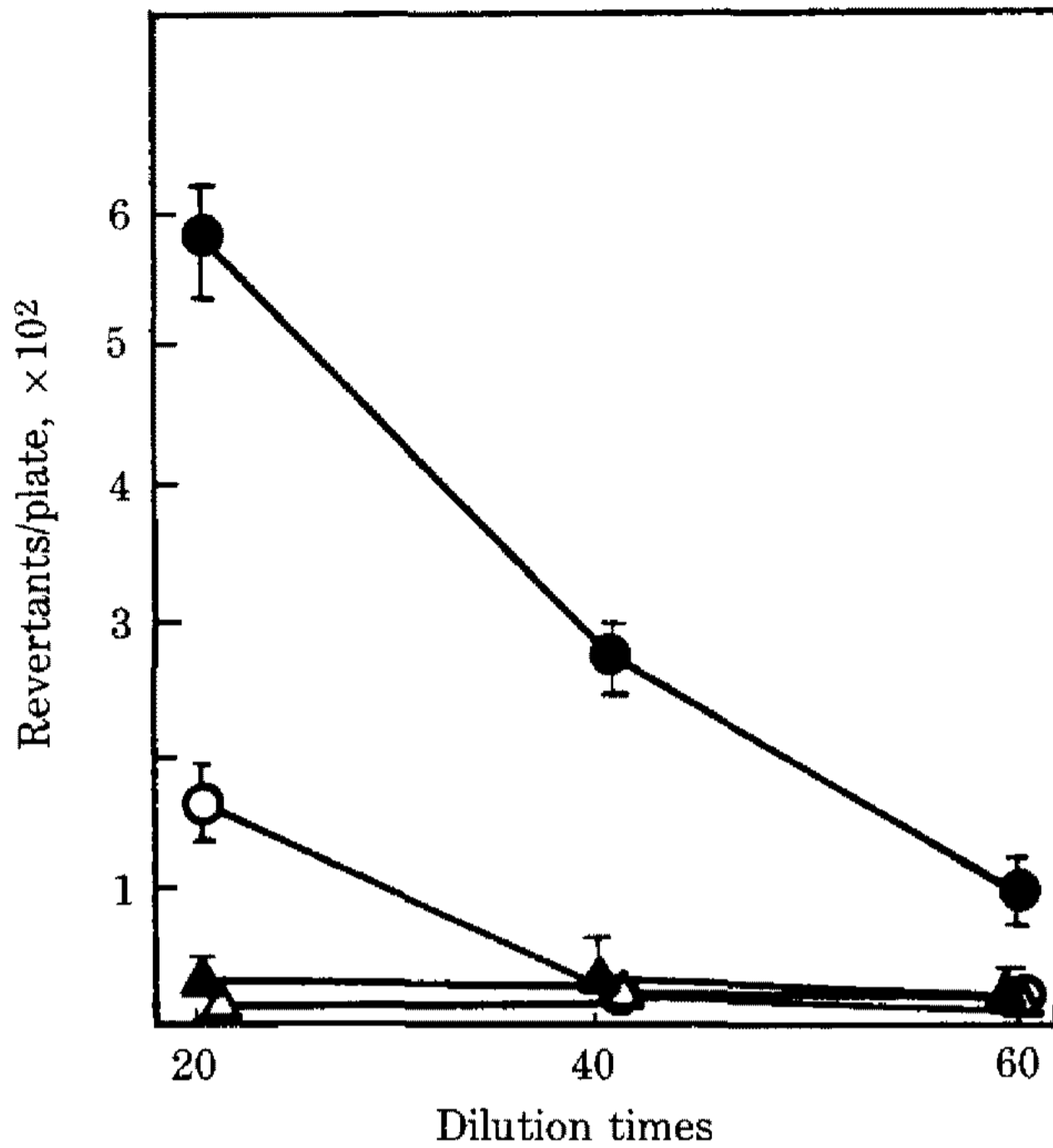


Fig. 1. Mutagenic action of the reaction mixtures of aflatoxin B₁ (AFB₁) and ascorbic acid (AA) in *Salmonella typhimurium* TA100.

The vertical bars represent one standard deviation of three samples.

Symbols: AFB₁ (●), AFB₁+AA (○), AA (▲), AFB_{2a} (△)

단독으로는 같은 처리에서도 전연 돌연변이성이 나타나지 않음으로 (Fig. 1) 단순히 AA 산화생성물에 의한 것은 아니고, 그 생성물이 AFB₁에 영향을 주었기 때문으로 사료된다. 전보의 연구에서 이미 AA가 존재할 때 일어나는 AFB₁의 파괴는 AA 산화생성물에 의한 것으로 추정하였고 또 이 때 AFB₁의 분해와 더불어 AFB_{2a}의 생성을 잠정적으로 확인한 바 있다(6). 이미 알려진 바와 같이 AFB_{2a}는 AFB₁과는 달리 돌연변이 유발성을 나타내지 않는 물질로 보고된 바 있으며(12), 본 연구 결과 (Fig. 1)에서도 역시 돌연변이 유발성은 없었다.

한편, *Salmonella* assay system에 의한 돌연변이 유발성 검정단계에서 AA를 5~20 μg/plate로 첨가하였을 때 이에 상응하는 AFB₁의 농도에 따라 돌연변이 현상이 상당 수준 감소하였다는 이전의 보고(7) 역시 본 실험의 결과와 일치하였다.

산화환원제 존재하에서 동 반응생성물의 돌연변이성

AA의 산화를 촉매하는 금속이온인 Cu²⁺ (CuSO₄·5H₂O)의 존재하에서 AA 용액과 AFB₁ 용액과의 동일 조건에서 반응처리한 반응생성물을 같은 방법으로 희석하여 이의 돌연변이 유발성을 살펴본 결과는 Fig. 2와 같

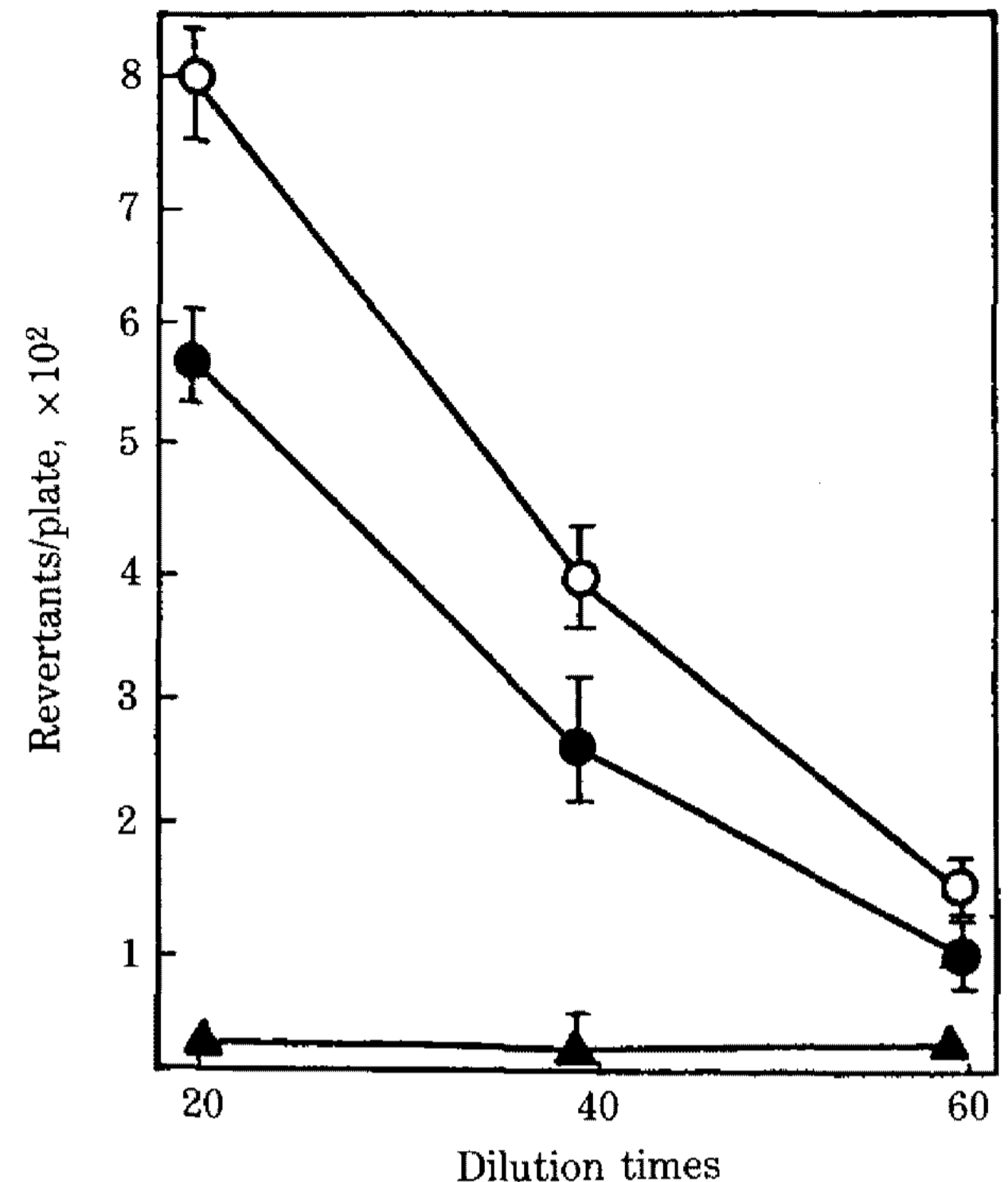


Fig. 2. Mutagenic action of the reaction mixtures of aflatoxin B₁ (AFB₁) and ascorbic acid (AA) containing cupric ion in *Salmonella typhimurium* TA100.

The vertical bars represent one standard deviation of three samples.

Symbols: AFB₁ (●), AFB₁+Cu⁺⁺ (○), AFB₁+AA (▲), AFB₁+AA+Cu⁺⁺ (△)

다. 이 때 대조구로서 AFB₁구, 그리고 AFB₁+Cu²⁺구 용액들도 같은 방법으로 함께 살펴 보았다.

먼저 20배 희석의 경우 positive control인 AFB₁구는 revertant가 약 600개 생겼는데 Cu²⁺존재하에 AA+AFB₁구의 경우는 거의 spontaneous reversion 영역에 포함되어 돌연변이 유발성을 나타내지 않았다. 반면에 Cu²⁺만을 첨가한 AFB₁구는 오히려 revertant가 증가되어 AFB₁ 자체의 유발성보다도 1.4배나 되었다. 이와 같은 결과 중 Cu²⁺존재하의 AA+AFB₁구의 반응생성물에서 revertant가 거의 나타나지 않은 것은, Cu²⁺으로 인한 AA의 산화촉진에 의한 AFB₁의 분해에 의한 것으로 판단되며, 분해파괴된다는 사실은 이미 전보에서 밝힌 바 있다(6). 그러나 동 반응에서 AA가 존재하지 않은 상태에서 Cu²⁺만을 첨가한 AFB₁에서 돌연변이성이 증가된 것은, Cu²⁺이 AFB₁의 epoxidation을 유도했거나 microsomal enzyme의 AFB₁ 대사활성을 촉진했으리라 추측된다. 그리고 희석배율 증가에 의한 전반적인 경향은 앞에서 살펴본 Fig. 1의 내용과 같은 경향을 나타내었다.

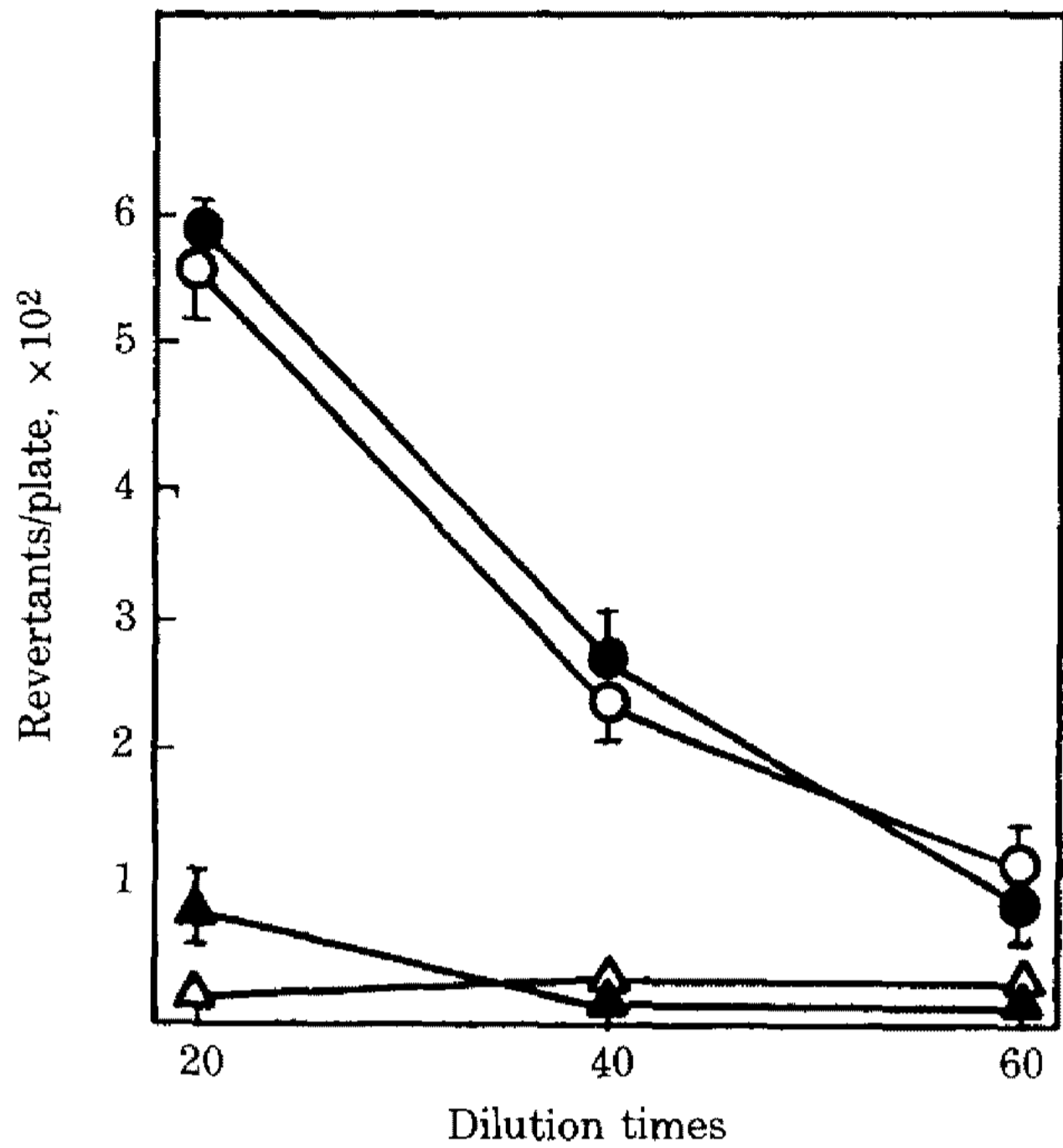


Fig. 3. Mutagenic action of the reaction mixtures of aflatoxin B₁ (AFB₁) and ascorbic acid (AA) containing cysteine in *Salmonella typhimurium* TA100.

The vertical bars represent one standard deviation of three samples.

Symbols: AFB₁ (●), AFB₁ + Cysteine (○), Cysteine + AA (△), AFB₁ + AA + Cysteine (▲)

한편, AA 자체는 돌연변이 유발성이 없으나 AA + Cu²⁺에서 약간의 돌연변이성이 나타났다는 보고도 있으나(13) 이는 본 실험과의 반응조건 차이라고 생각되며 특히, Cu²⁺의 농도 차이에 의한 결과라고 판단된다.

그리고 AA의 환원을 촉진하는 cysteine도 Cu²⁺과 같은 조건으로 돌연변이성을 검토해 보았는데 그 결과는 Fig. 3과 같다.

Cysteine의 존재하에 AA와 반응한 AFB₁의 revertant는 AFB₁ 단독보다는 현저히 낮아졌으나, AA + AFB₁보다는 약간 낮고(Fig. 1 참조) Cu²⁺ + AA + AFB₁보다는 약간 높은 경향(Fig. 2 참조)을 보였다. 그리고 cysteine만 첨가된 AFB₁의 revertant는 AFB₁ 자체의 돌연변이성과 거의 동일하게 나타나 동 반응체계에서 cysteine(12.5 ppm 수준)에 의한 돌연변이성의 감소현상은 없었다. 그리고 AA + cysteine 구에서는 거의 돌연변이성을 나타내지 않았으며, 기타 회석배율에 따라 감소되거나 나타나지 않은 것은 앞서와 같은 경향이였다.

한편, 전보(6)에서는 AA + AFB₁ 반응에서보다 cysteine + AA + AFB₁ 반응에서 AFB₁의 파괴는 저해되

어, 전자의 조건에서 76% 그리고 후자의 반응에서는 43%의 파괴율을 보이므로서, 본 실험의 돌연변이성의 경향(Fig. 3)과는 다른 결과를 보였다. 이러한 결과는 대단히 흥미있는 것으로서 이에 대한 여러 가지 추론이 가능하나, 보다 완벽한 보완 연구에 의하여 다음 기회에 증명될 수 있을 것으로 사료된다.

요 약

아스콜빈산(Ascorbic acid, AA)과 Aflatoxin B₁ (AFB₁)의 반응생성물(37°C, pH5에서 5일간 반응) 그리고 산화제(cupric ion, Cu²⁺)와 환원제(cysteine) 존재하에서 얻어진 동 반응생성물의 돌연변이 유발성에 대한 특성을 *Salmonella* assay system에 의하여 살펴보았다. AA와 AFB₁의 반응생성물의 돌연변이 유발성은 대조군인 AFB₁의 경우보다 73% 감소하였고, Cu²⁺이 첨가된 AA와 AFB₁ 반응생성물의 돌연변이 유발성은 더욱 감소되어 거의 돌연변이성을 나타내지 않았다. 그리고 cysteine의 존재하의 AA와 AFB₁ 반응생성물의 돌연변이 유발성은 AFB₁ 단독보다는 현저히 낮아졌으나, AA + AFB₁ 반응생성물보다는 약간 낮고, Cu²⁺ + AA + AFB₁ 반응생성물보다는 약간 높은 경향을 보였다. 그러므로 AA와 AFB₁의 반응 체계에 있어서 AA는 AFB₁의 분해 또는 전환에 영향을 주고 있으며 동 반응생성물은 AFB₁ 단독이 갖는 돌연변이 유발성보다는 현저히 낮았고 이 때 산화환원제의 존재 역시 돌연변이성에 영향을 주었다.

참고문헌

1. Heathcote, J.G. and J.R. Hibbert: Aflatoxins: Chemical and Biological Aspects, Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, 83 (1978).
2. 박건영 : 한국영양식량학회지, 13, 117(1984).
3. Loveland, P.M., R.A. Coulombe, L.M. Libbey, N.E. Pawlowski, R.O. Sinnhuber, J.E. Nixon and G.S. Bailey: *Food. Chem. Toxic.*, 27, 557 (1983).
4. Camerun, E., L. Pauling and B. Leibovitz: *Cancer Res.*, 39, 633 (1979).
5. Walters, C.L.: Vitamin C (Counsell, J.N. and D.H. Horning, ed.), Elsevier Science Publishing Co., Amsterdam, 199 (1981).
6. 박건영, 권미향 : 한국영양식량학회지, 16, 1(1987).
7. Park, K.Y., M.H. Kweon, H.S. Baik and H.S. Cheigh: *Environmental Mutagens and Carcinogens*, 8, 13 (1988).
8. Friedman, M., C.M. Wehr and J.J. Macgregor: *Food*

- Chemical Toxic.*, **20**, 887 (1982).
9. Maron, D.M. and B.N. Ames: *Mutat. Res.*, **113**, 173 (1983).
 10. Matsushima, T., T. Sugimura, M. Nagao, T. Yahagi, A. Shirai and M. Sawamura: Short-Term test systems for Detection Carcinogens (Norpoth, K.N. and R.C. Garner, ed.), Springer-Verlag, Berlin, 273 (1980).
 11. Machlin, L.J.: Handbook of Vitamins; Nutritional, Biological and Clinical Aspects, Marcel Dekker Inc., New York, 204 (1984).
 12. Hsieh, D.P.H., J.J.Z.A. Wong, C. Michas and B.H. Rubner: Origins of Human Cancer (Haiatt, H.H., J.D. Watson and J.A. Winsten ed.) Cold Spring Harbor Laboratory, Book B, 697 (1979).
 13. Norkus, E.P., W. Kuenzig and A.H. Conney: *Mutat. Res.*, **117**, 183 (1983).

(Received August 21, 1990)