

Saponin이 *Aspergillus parasiticus*의 발육과 Aflatoxin生合成에 미치는 효과

박재림* · 임광식 · 이종근

부산여자대학* 부산대학교

Effects of crude Saponin on growth and Aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*

Bahk, Jae-Rim*, Kwang-Sik Im and Jong-Kun Lee

Pusan Women's University* and Pusan National University

The research was carried out for the purpose of finding effects of herbal saponins on aflatoxin synthesis by *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999. *A. parasiticus* with 10^6 conidia were grown at 30°C for 9 days on the enriched medium that is optimum for the growth and aflatoxins production by the mold. The inhibitory effect on the growth and aflatoxins produced by the mold occurred in the presence of 0.36% of crude red-ginseng saponin showing both the growth and aflatoxins production come to 62.3% (growth), 38.7% (aflatoxin B₁) and 22.9% (aflatoxin G₁) of the control. The next effective saponin to inhibit the growth and aflatoxins production was from burdock seeds. However, saponin extracted from honeysuckle flowers had no inhibitory effect. The mold caused no changes in the pH of the medium when it contained red-ginseng saponin. Red-ginseng saponin was more effective than the white-ginseng in inhibiting both the growth and aflatoxin production.

근래 천연유기화합물의 분리정제법과 물리화학적 구조결정방법의 비약적인 발전에 힘입어 saponin에 대한 연구가 새롭게 주목을 끌게 되었다. 특히 약학영역의 동양 약용식물의 재인식에 따라 미개발 분야였던 saponin을 함유한 생약의 응용개발에 관한 연구가 생화학 및 약리학분야의 상호협력에 의하여 전개되고 있다. Saponin의 생물활성에 대하여 Tschesche와 Wulff(1973), Shibata(1977) 등이 종설에서 많은 것을 언급하였다. Saponin은 ① monodesmoside와 같은 물질의 강력한 용혈작용, ② digitonin, F-gitonin, diosin등과 같은 물질의 용혈성과 cholesterol을 함유한 세포기관의 막투과성을 비가역적으로 변화시키는 작용, ③ 인삼

ginsenoside Rg₂ 등이 가지는 혈구응집작용, ④ 菌体膜의 cholesterol과 복합체를 형성하는 항균작용, ⑤ 항종양성기능, 등이 알려져 있으나 약용식물의 종류에 따라 saponin의 성분과 량 그리고 효능이 각각 다르다.

Saponin을 함유한 생약의 약효는 거담, 鎮咳, 소염, 해열, 건위, 진정, 이뇨, 강장, 강정, 排膿, 痛癢 등으로 알려져 있다. 본 실험에서는 선행연구(Bahk and Marth, 1983)의 결과에 따라 홍삼, 백삼, 금은화 및 牛蒡子(Grieve and Lley, 1974; Llewellyn, 1981)의 조saponin을 추출하여 이 saponin들이 *Aspergillus parasiticus*의 발육과 aflatoxin 대사(Goldblatt, 1969, Steyne, 1980; Marth and Doyle, 1979)에

미치는 효과를 측정하고자 한다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 이용된 곰팡이는 미국 North Regional Research Center에서 분양된 *Aspergillus parasiticus* NRRL 2999로써 aflatoxin 생산능력이 뛰어난 균주다.

배지조성

공시균주의 발육 및 aflatoxin 생산에 미치는 생약 saponin의 효과를 측정하기 위하여 이용된 배지의 조성과 pH 조정은 Doyle과 Marth (1980)의 방법을 따랐다.

조 saponin의 분리

본 실험에 사용된 생약 saponin은 金銀花 (*Lonicera japonica* Thunberg; honeysuckle flower), 牛蒡子 (*Arctium lappa* L.; burdock seed), 인삼(panax C. A. Meyer; ginseng)에서 추출된 것이며, 금은화와 우방자의 조 saponin은 Fig. 1과 같은 방법을 이용하였다. 우방자의 粗末(2kg)을 methanol 2l에 3회 환류 가열하여 추출하고 농축하여 methanol extract (800g)을 얻었다. 이것을 n-butanol/H₂O (1:1)

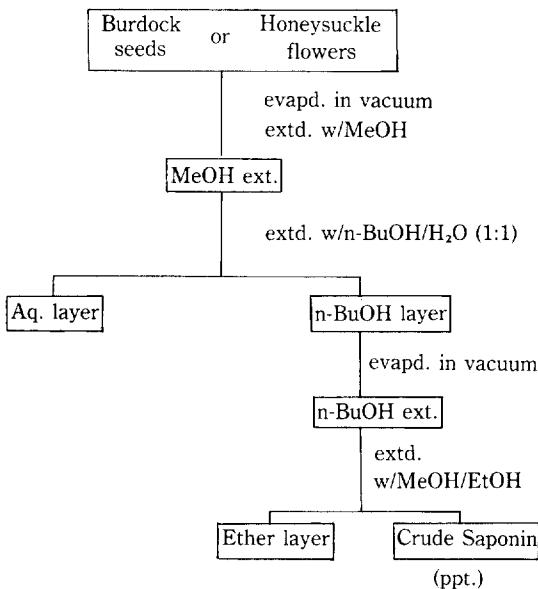


Fig. 1. Extraction procedure of crude saponin from burdock seeds and honeysuckle flowers.

의 혼합용매에 분배시켜 n-butanol 층을 얻고 이것을 농축하여 n-butanol extract(25g)을 얻은 후 가급적 소량의 methanol에 녹인 다음 다량의 ether에 적가하여 침전(crude saponin, 12g)을 얻었다. 금은화의 조 saponin추출은 금은화(3kg)를 상기와 같은 방법으로 n-butanol extract (75g)를 얻었으나 ether용액중에서 침전물을 생성치 않았으므로 이 용액을 감압증류하여 실험에 사용하였다.

본 실험에 이용된 인삼은 6년근이며 인삼의 조 saponin은 Shibata의 방법에 의하여 분리하였다. 상기 생약의 조 saponin을 증류수에 용해시켜 멸균된 배지에 무균적으로 첨가했다. Saponin 첨가량은 금은화와 우방자는 0.3%와 0.03%, 홍삼과 백삼은 0.36%와 0.036%가 되도록 조정하였다.

배양

Mycological agar에 보존된 균주를 2회에 걸쳐 활성화시킨후 mycological agar (Difco)에서 30°C (Lin et al., 1977; Holmguist et al., 1983) 9일간 배양하여 형성된 포자를 멸균한 0.1% Tween 80 용액에 수집하였다. Conidia의 수는 mycological agar를 이용한 평판추가법을 이용하여 산정하였고 125ml Erlenmeyer flask에 28ml의 배지와 농도가 조절된 생약 saponin 1ml 그리고 10⁶ conidia (Sharma et al., 1980)가 포함된 0.1% Tween 80 현탁액 1ml을 넣어서 30°C의 압조 (Bennett et al., 1981)에서 9일간 배양하였다.

pH 측정

Mycelia mat 아래층의 배지가 pH 측정에 사용되었으며 이용된 pH meter는 Model 10, Corning Scientific Instruments, Corning, New York 였다.

균체의 발육측정

*A. parasiticus*의 발육측정은 건조균체측정방법에 의하여 실시했다. Whatman No. 1 여과지 (직경 12.5cm)를 modified Büchner funnel에 고정시킨 다음 125ml의 Erlenmeyer flask에서 발육한 mycelia와 배지를 125ml의 separate funnel에 여과한 다음 10ml 정도의 증류수로써 배양기와 mycelia 및 여과지를 3회 반

복하여 세척했다(Yousef and Marth, 1980). Mycelia를 포함한 여과지를 Büchner funnel에서 분리한 후 50°C (Schindler, 1977)에서 24시간 건조시키고 desiccator에 24시간 방냉하여 중량을 측정하였다.

Aflatoxin의 추출

실험에 이용된 곰팡이의 증식 정도를 측정하기 위하여 이용된 균체 및 여과지를 제외한 잔사를 40ml의 chloroform을 이용하여 잔류 aflatoxin을 용해시켜 modified Büchner funnel을 통하여 separate funnel에 가한 후 이 내용물을 2분간 잘 흔든 다음 정치하여 chloroform phase를 round bottom flask에 수집하였다. 완전한 용출을 위하여 2회 반복하여 용출하고, round bottom flask에 수집된 120ml의 용액을 vacuum evaporator (model R 110, Büchi, Switzerland)를 이용하여 chloroform을 제거시키고 남은 film을 methanol (AR)에 용해시켜 volumetric flask (25, 50, 100ml)에 옮겨 정량에 사용하였다.

Aflatoxin의 정량

Aflatoxin의 정량(Stubblefield and Shotwell, 1977; Davis and Diener, 1980)은 HPLC absorbance detector (M 440), data modul (M 730, Waters Associates Inc., Milford, Massachusetts)를 이용하였고, column은 reverse phase μ -Bondapak C₁₈을 이용하고, mobile phase는 acetonitrile/water (35+65, v/v)를 사용하여 UV 365nm에서 측정 (Fig. 2 참조) 하였다.

Aflatoxin 축적능력

Aflatoxin을 생산하여 축적하는 능력을 파악하기 위하여 2차 대사산물의 생산지수를 산정

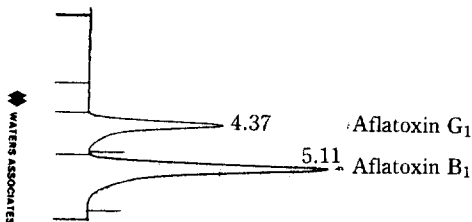


Fig. 2. HPLC chromatogram and external standard quantiation for aflatoxin B₁ and G₁.

하는 Brown과 Vass의 model (Yousef and Marth, 1983)에 기초를 둔 아래의 식을 이용하여 그 지수를 측정하였다.

$$K = \frac{\text{Maximum aflatoxin accumulation (mg)}}{\text{Maximum growth of the mold (g)}}$$

결과 및 고찰

균체의 발육

선정된 생약의 조 saponin을 강화배지에 첨가하여 30°C 9일간 배양한 *A. parasiticus*의 발육상태는 Fig. 3과 같다. 백삼 saponin 만이 대조군(4표본 평균치)보다 발육이 좋았으며 홍삼 saponin 첨가배지에서는 발육이 현저하게 억제 되었으며, 최대발육이 다른 saponin 첨가배지에서보다 2일 늦게 나타났다. 홍삼 saponin 첨가배지에서는 배양 9일에도 포자형성을 관찰할 수 없었고, 금은화 saponin은 다른 saponin 첨가배지에서보다 발육정도의 변화가 컸다.

배지의 pH 변화

*A. parasiticus*의 발육에 이용된 배지의 pH 변화는 일반적으로 급격히 감소되어 배양 제 4일에 최저 수준에 이르고, 이어서 다시 상승하지만 홍삼 saponin 0.36% 첨가배지에서는 배

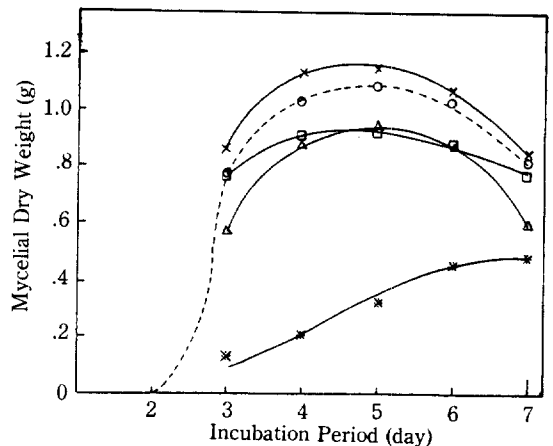


Fig. 3. Mycelial dry weight (g/30 ml) of *A. parasiticus* grown at 30°C when the medium contained 0.3% or 0.36% (ginseng) of herbal saponins and was inoculated with 10⁶ conidia. Herbal saponins are from burdock (□-□), honeysuckle flower (△-△), ginseng saponin red (*-*) or white (X-X), and control (C-O).

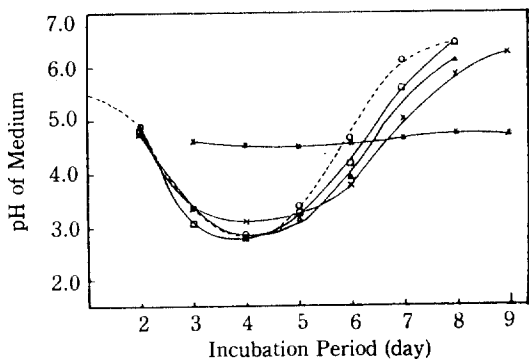


Fig. 4. Changes in pH of the medium caused by growth of *A. parasiticus* at 30°C. Symbols are the same as in Fig. 3.

양초기에서 말기까지 pH의 변화가 거의 없었다(Fig. 4). 이는 홍삼 saponin의 성분에 의한 pH 완충기능에 의한 것이거나, 홍삼 saponin 첨가로 인하여 이 곰팡이의 발육이 억제되어 독소의 생산 및 축적이 억제되므로써 배지중의 pH 변화에 영향을 미칠 수 있는 성분의 변화가 없었던 것으로 해석된다. 그러나 홍삼 saponin 0.036% 첨가배지에서는 대조군과 비슷한 수준의 변화를 나타내었다.

Table 1. Growth, pH and aflatoxin production by *A. parasiticus* in a medium containing herbal saponin.

Treatment	Dry weight (g/30 ml)	pH of medium	Aflatoxins (μg/30 ml of medium)	
			B ₁	G ₁
Control	1.06 (5)	2.84 (4)	1216.85 (4)	651.5 (4)
Burdock seed ¹	0.95 (5)	2.88 (4)	1126.13 (4)	555.2 (4)
Burdock seed ²	0.91 (5)	3.0 (4)	1021.7 (4)	548.68 (4)
Ginseng (white) ¹	1.13 (5)	3.05 (4)	1133.77 (5)	436.1 (7)
Ginseng (white) ²	1.23 (6)	2.95 (4)	1279.0 (6)	670.96 (7)
Ginseng (red) ¹	0.66 (7)	4.5 (8)	288.6 (5)	90.75 (7)
Ginseng (red) ²	1.15 (6)	3.1 (4)	1236.84 (6)	545.42 (7)
Honeysuckle flower ¹	0.95 (5)	2.85 (4)	1185.08 (4)	629.33 (4)
Honeysuckle flower ²	0.94 (5)	2.77 (4)	1298.35 (4)	724.1 (4)

¹indicates the concentration of herbal saponin in the medium as of 0.3% except ginseng saponin 0.36%.

²indicates 0.03% except ginseng saponin 0.036%.

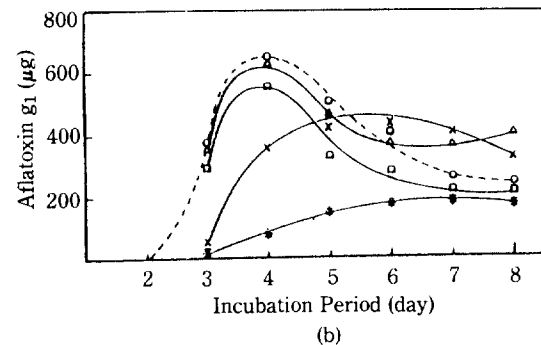
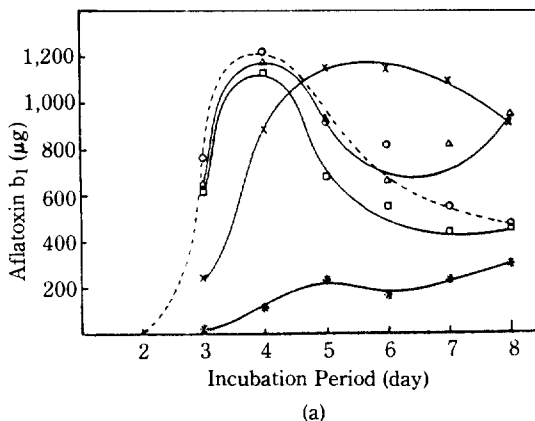


Fig. 5. Aflatoxin (ug/30 ml of medium) accumulated by *A. parasiticus* at 30°C when the medium contained 0.3% or 0.36% (ginseng) of selected herbal saponins and was inoculated with 10⁶ conidia. Symbols are the same as in Fig. 3.; (a) aflatoxin B₁; (b) aflatoxin G₁.

Aflatoxin의 생산 및 축적

*A. parasiticus*가 급격히 발육하면 생산된 aflatoxin의 량도 급격히 증가하고 정지기에 도달하면 급격히 감소됨을 볼 수 있었다(Fig. 3, Fig. 5 a & b). 한편 발육이 최대치에 도달하면 pH가 최저치를 나타내고, 최대치에 도달한 발육 상태는 그 감소정도가 aflatoxin 감소폭 만큼 크지는 않았다. 백삼 saponin 첨가배지에서는 aflatoxin B₁ 생산량이 대조군의 93.2%에 상당했으나 aflatoxin G₁ 생산량은 대조군의 .66.97%에 불과하였다(Table 1 참조). Fig. 5 a·b에서와 같이 홍삼 saponin은 *A. parasiticus*의 발육과 aflatoxin B₁과 G₁의 생산을 현저하게 억제한 것으로 나타났다.

Aflatoxin 생산능력

Aflatoxin의 생산량과 균체의 발육정도를 단

Table 2. Ability for aflatoxin production by *A. parasiticus* in the medium containing herbal saponin.

Treatment	Index for maximum aflatoxin production			
	B ₁	percent of control	G ₁	percent of control
Control	1.267	100	0.679	100
Burdock seed1*	1.185	93.5	0.584	86.01
Burdock seed2**	1.123	88.6	0.603	88.8
Ginseng white1*	1.11	87.6	0.429	63.2
Ginseng white2**	1.147	90.5	0.607	89.4
Ginseng red1*	0.49	38.7	0.151	22.9
Ginseng red2**	1.183	93.4	0.513	75.6
Honeysuckle flower1*	1.247	98.4	0.662	97.5
Honeysuckle flower2**	1.381	109.0	0.77	113.4

* indicates 0.3% of herbal saponin contained in the medium.

**indicates 0.03% of the saponin.

* indicates 0.36% of herbal saponin contained in the medium.

**indicates 0.036% of the saponin.

일화하거나 별개로 분리하여 해석함에는 무리가 있다. 그러므로 발육정도에 따라 aflatoxin을 생산하여 축적하고 있는 정도를 대비로 한 지수를 계산하여 그 결과를 판단하고 해석함이

마땅하다. 이를 위해서 Brown과 Vass의 model이 적합하며 최대발육치와 최대 aflatoxin 축적량을 측정 후 식에 의하여 얻은 지수는 Table 2와 같다. Table 2에서 금은화 0.03% 첨가배지를 제외하고는 모든 saponin 첨가배지에서 농도에 관계없이 aflatoxin 생산능력이 대조군에 미치지 못했다. 환언하면 대부분의 saponin이 정도의 차이는 있으나 억제기능을 갖는 것으로 해석된다. 그러나 금은화 saponin 0.3% 첨가배지에서는 대조군의 98.4% (AF·B₁)와 97.5% (AF·G₁)로써 대조군과 대등하다고 볼 수 있다. 결과적으로 금은화 saponin은 금은화 extract 실험시에 나타냈던 aflatoxin 생산 억제효과를⁽³⁾ 갖지 못하며, 이는 saponin 성분이 아닌 다른 억제기능을 갖는 성분이 있음을 나타낸다. 이 성분을 밝히기 위하여 계속적인 연구가 기대된다.

한편 홍삼 saponin 첨가배지와 백삼 saponin 첨가배지에서 현격한 aflatoxin 생산능력의 차이를 나타낸 것은 홍삼제조 과정의 steaming 중 어떤 성분의 전환이 있어서 항진균성을 갖게 되었거나, 백삼 제조과정에서 잔뿌리 제거와 표피박리중에 유효성분의 유실로 인한 것이 그 원인인 것으로 본다.

요 약

*Aspergillus parasiticus*의 발육과 aflatoxin 생산에 미치는 생약 extract의 효과에 따라 선정된 생약 금은화, 우방자 및 인삼의 조 saponin이 균체의 발육과 aflatoxin 생산능력에 미치는 효과를 측정하기 위하여 강화배지에 30°C 9일간 배양하였다.

백삼 saponin 첨가배지만이 균체발육이 대조군 보다 좋았다. 그러나 홍삼 saponin 0.36% 첨가배지에서의 균체 발육은 대조군의 62.3%로 나타났으나, aflatoxin 생산능력은 aflatoxin B₁이 대조군의 38.7%, aflatoxin G₁이 22.9%로 좋은 억제효과를 나타냈다. 우방자 saponin은 홍삼 saponin보다 억제효과가 못하지만 홍삼 saponin과 같이 균체의 발육과 aflatoxin 생산을 모두 억제하는 것으로 나타났다. 한편 extract에서 나타났던 금은화의 aflatoxin 생산 억제효과는 본 saponin 실험에서는 나타나지 않았다.

REFERENCES

1. Bahk, J-r and E. H. Marth, 1983. Aflatoxin production is inhibited by selected herbal drugs. *Mycopathologia* 83, 129-134.
2. Bennett, J. W., J. J. Dunn and C. I. Goldsman, 1981. Influence of white light on production of aflatoxin and anthraquinones in *A. parasiticus*. *Appl. Environm. Microbiol.*, 44, 488-491.
3. Davis, N. D. and U. L. Diener, 1980. Confir-

- matory test for high pressure liquid chromatographic determination of aflatoxin B₁. *J. AOAC.*, **63**, 107-109.
4. Doyle, M. P. and E. H. Marth, 1980. Aflatoxin is degraded at different temperature and pH values by mycelia of *Aspergillus parasiticus*. *European J. Appl. Environm. Microbiol.*, **40**, 333-336.
 5. Goldblatt, L. A., 1969. Aflatoxin. Academic Press, P 152-184.
 6. Holmquist, G. U., H. W. Walker and H. M. Stahr, 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Food Science* **48**, 778-782.
 7. Lin, Y. C., J. C. Ayres and P. E. Koehler, 1977. Influence of temperature cycling on the production of aflatoxins B₁ and G₁ by *Aspergillus parasiticus*. *J. Food Prot.*, **40**, 39-40.
 8. Llewellyn, G. C., M. L. Burkett and T. Eadie, 1981. Potential mold growth, aflatoxin production, and antimycotic activity of selected natural spices and herbs. *J. AOAC*, **64**, 955-960.
 9. Marth E. H. and M. P. Doyle, 1979. Update on molds; Degradation of aflatoxin. *J. Food Technol.*, **33**, 81-86.
 10. Schindler, A. F., 1977. Temperature limits for production of aflatoxin by twenty-five isolates of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. **J. Food Prot.**, **40**, 39-40.
 11. Sharma, A., A. G. Bahere, S. R. Padwal-Desai and G. B. Nadkarini, 1980. Influence of inoculum size of *A. parasiticus* spores on aflatoxin production. *Appl. Environm. Microbiol.*, **40**, 989-993.
 12. Shibata, S., 1977. New natural products and plant drugs with pharmacological or therapeutical activity. Wagner, H. and P. Wolff, Springer-Verlag, 177-196.
 13. Steyn, P. S., 1980. The biosynthesis of mycotoxins. Academic press, 105-156.
 14. Stubblefield, R. D. and O. L. Shotwell, 1977. Reverse phase analytical and preparative high pressure liquid chromatography of aflatoxin. *J. AOAC.*, **66**, 784-790.
 15. Tschesche, R. and G. Wulff, 1973. Fortschritte der chemie organischer naturstoffe. Herz, W., H. Griesenbach and G. W. Kirby, 462-606.
 16. Yousef, A. E. and E. H. Marth, 1980. Growth and synthesis of afltoxin by *A. parasiticus* in the presence of sorbic acid. *J. Food Prot.*, **44**, 736-742.
 17. Yousef, A.E. and E.H. Marth, 1983. Kinetics of aflatoxin biosynthesis by *A. parasiticus* in the presence of Na⁺-palmitol-L-lysil-L-lysine-ethyl ester dihydrochloride or dichlorovos. *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 671-685.

(Received July 26, 1985)