

Cochlodinium polykrikoides 적조 조체의 생리활성 성분

이 종 수

경상대학교 수산대학 수산가공학과

Bioactive Components from Red Tide Plankton, *Cochlodinium polykrikoides*

Jong-Soo LEE

College of Fisheries, Gyeongsang National University, 445, Inpyeongdong, Tongyeong, Kyeongnam, 650-160 Korea

Large amounts (300 grams) of natural red tide plankton, *Cochlodinium polykrikoides*, was collected at the Yokji island coastal waters, Kyeongnam, Korea, on October, 1993. Using the bioassay systems, bioactive materials were screened from methanol extracts of *C. polykrikoides*.

Live *C. polykrikoides* was toxic to fishes, however, the water soluble and chloroform soluble fraction of their methanol extracts did not shown ichthyotoxicity (5 mg/ml), and toxicity to mice (50 mg, i.p.). These fractions did not show any peaks corresponding to paralytic shellfish toxins or diarrhetic shellfish toxins on the fluorometric HPLC chromatograms. Neither fractions did not show antibiotic activities by paper disk (10 mg/disc) test and chloroform soluble fraction showed only 20% growth inhibition activity on the Lymphoid P-388 at the concentration of 180 µg/ml.

Hemolytic activity was detected by both fractions. Fatty acid analysis by GC, GC/MS and proton NMR showed that the chloroform soluble fraction composed of 25.3% of DHA (docosahexaenoic acid) and 15.3% of EPA (eicosapentaenoic acid) as the hemolytic components.

Key words : red tide, *Cochlodinium*, hemolytic activity, bioactives, DHA, EPA

서 론

패류 양식의 보고로 알려진 우리나라 남해안에서는 규조류 및 각종 편모조류에 의한 적조 발생 회수가 80 년도에는 수회에 불과하였으나, 최근들어 오염의 증가와 부영양화로 연안 환경이 악화되어감에 따라, 90년대 이후에는 30여건 이상이 매년 발생하는 등 급증하고 있으며, 고밀도 적조로 그 규모도 대형화하는 추세로서 이로 인한 각종 양식 어패류의 대량 폐사등 산업적 피해도 막대한 량에 이르고 있다 (Cho, 1978; Cho, 1981; Park, 1982; Park et al., 1988; Kim, 1990; Kim et al., 1990; Kim et al., 1994). 이러한 적조는 우리나라 뿐 아니라, 전 세계적으로 발생되고 있는 현상이나 (Anderson, 1989) 아직까지 이에 대한 뚜렷한 예방이나 방지 대책은 보고되지 않았다. 이러한

적조를 일으키는 원인 생물중 특히 문제가 되는 것은 유독성 와편모조류로서 이들이 생산하는 유독성분들에 의하여 어패류가 폐사하거나 인체에 치명적인 영향을 주기도 하는 바, 이들이 생산하는 유독성분들이 알려진 것은 brevetoxin 등 극히 일부에 불과하며, 대부분은 아직까지 확인되지 않았다 (Fukuyo, 1984; Murakami and Yamaguchi, 1989). 또한, 일부의 유독성 플랑크톤들은 저밀도 이기는하나 경우에 따라 무독성 적조 생물들과 동시에 출현하여 문제가 되기도 한다.

1993년 9월말부터 10월에 걸쳐 경남 남해와 통영사이의 연안에서는 맹독성 적조 생물로 일컬어지는 *Cochlodinium polykrikoides*에 의하여 대규모의 고밀도 적조가 발생하였다 (10⁴ cells/ml 이상). 특히, 이 적조 현상은 일시적으로 소규모로 발생하였던 예년과 달리

1개월 이상 장기간에 걸쳐 발생하여 이 해역의 양식 생물들을 대량 폐사시켜 막대한 경제적 손실을 초래하였다.

*C. polykrikoides*는 길이 30~40 μm , 폭 20~30 μm 의 무각, 점액성 외편모조로서 8개 이하의 체인을 잘 형성하며 (Photo. 1) 겨울철에는 cyst로서 존재하고, 어패류를 폐사시키는 독소를 생성하는 것으로 알려져 있으나 유독 성분은 알려지지 않았다 (Murakami and Yamaguchi, 1989; Kim et al., 1993). 일본에서는 이 종에 의한 적조 발생시 적조 조체로부터 아연을 포집한 마비성 독소가 발견되어 큰 문제가 된 적이 있으며 (Onoue and Nozawa, 1989a), 우리나라의 남해안에서는 매년 상습적으로 적조를 야기하는 문제의 플랑크톤의 일종이다. 그러나, 이들 적조생물들은 대량 배양한다면 이들이 생산하는 각종 유용 생리활성 물질의 생산에 유용하게 이용할 수도 있다.

본 연구에서는 이 시기에 적조 발생시 *C. polykrikoides*의 천연 조체를 대량으로 채취하여 유독 성분의 존재 여부의 확인과 아울러 미세 조류의 이용에 관한 기초 자료를 얻음 목적으로 각종 유용 생리활성 물질의 검색을 행하였으며 용혈 활성 성분을 분리 정제하여 동정하였다.

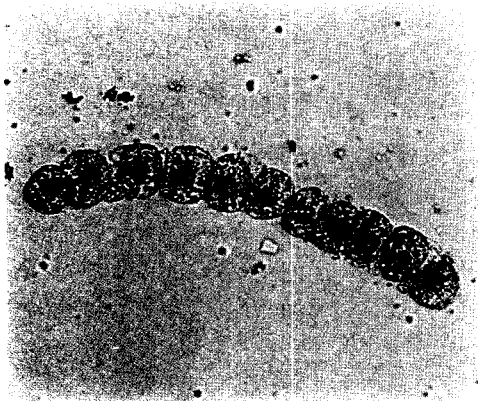


Photo 1. Living cells of chain-formed *Cochlodinium polykrikoides*.

재료 및 방법

재 료

1993년 9월 말부터 10월 말까지 경남 통영군 육지

도와 미륵도 사이에서 *C. polykrikoides* (Photo. 1)에 의한 대규모의 적조 발생시 10^4 cells/ml 이상의 고농도 적조 조체를 함유한 해수 약 300l를 5회에 걸쳐 채수하였다. 해수는 채수시마다 대형 플라스틱 용기에서 저속 (100 rpm)으로 1 시간 가량 회전하여 적조 조체를 응집 침전시켜 습증량 약 300g의 천연 *C. polykrikoides* 조체를 채집하여 -20°C 로 냉동 보관하여 시료로 사용하였다.

지용성 및 수용성 시료의 조제

천연 조체 시료는 해동후 초음파로 조체를 파괴하고 3배량의 MeOH를 가하여 격렬하게 흔들어 조체 성분을 추출하고 여과하였다. 여액은 감압 농축하여 30% MeOH 용액으로 조제하고 동량의 chloroform과 30% MeOH 층으로 분획하였다. 30% MeOH 획분은 다시 감압 농축하여 MeOH를 제거하고 chloroform으로 2회 재추출하였다. chloroform 층은 전부 합하여 농축한 조추출액 (0.65g)을 지용성 획분으로 하고, 나머지는 농축하여 수용성 획분 (6.1g)으로 하여 각종 실험에 사용하였다.

마우스 독성 시험

지용성 획분 일정량을 1% tween 60 용액에 현탁시키고 50 mg 상당량을 체중 16~20g의 ddY계 수컷 마우스의 복강에 주사하여 24 시간 이내의 사망 여부를 조사하였으며 (Yasumoto, 1982), 수용성 획분은 황성탄 (Wako Pure Chemical) 칼럼으로 탈염후 10 mg 상당량의 수용액을 동일계의 마우스에 주사하여 1 시간 이내의 사망 여부를 관찰하였다 (Environmental Health Bureau, 1978).

어독성분의 검색

수용성 획분의 추출물은 1, 2, 5 mg/ml 수용액으로 조제하고, 지용성 획분은 동일 농도의 현탁액으로하여 각각 10 ml씩 비커에 취하고 소형 구피 (체중 0.1g)를 2마리씩 넣어 5 시간 이내에 치사여부를 조사하였다.

항균성분의 검색

지용성 획분과 수용성 획분 소량씩을 각각 MeOH에 녹여 5 mg 상당량을 직경 0.8 cm의 paper disc (Toyo Roshi)에 흡수시키고 용매를 풍건후, 균주를

접종한 한천 배지에 있어 30°C에서 24 시간 배양하여 생육 저지원의 형성 유무를 조사하였다 (Lee et al., 1991). 사용한 균주인 그람 양성균 (*Bacillus subtilis*)과 음성균 (*Escherichia coli*)은 nutrient agar (Bacto) 평판 배지에서, 곰팡이 (*Aspergillus niger*)와 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)는 YM 한천 평판 배지 (Bacto)를 이용하였다.

마비성 독소 및 설사성 독소의 기기분석

수용성 획분중의 마비성 독소는 조추출액 1g 상당량을 활성탄 칼럼 (100 ml)에 흡착시키고 2배량의 증류수로 세척하여 염류를 제거한 다음 1% 초산을 포함한 20% EtOH 용액으로 추출하여 농축 건조하였다. 건조 시료는 0.1% 초산 수용액 2 ml로 정용하여 미리 10 ml의 MeOH와 증류수로 세척하여둔 Sep-pak ODS 칼럼 (Waters)을 통과시키고 한외 여과기 (Ultrafree GC3C, Millipore)에 넣어 원심분리 (10,000 rpm, 10분)하여 얻은 여액을 Oshima et al. (1989)의 방법에 따라 미량 형광 액체 크로마토그래피로 분석하였다. 한편, 설사성 독소는 지용성 획분 50 mg을 hexane과 80% MeOH로 분배하여 탈지하고, 80% MeOH 획분을 chloroform으로 추출하여 1 mg 상당량을 질소 기류하에서 건조후 Lee et al. (1987)의 방법에 준하여 ADAM (9-anthryldiazomethane)으로 형광 유도체화한 다음, 미량 형광 크로마토그래피로 분석하였다.

총 지방산 조성의 분석

지용성 획분 10 mg을 0.1N KOH MeOH 용액으로 가수분해후 불검화물을 제거하고 BF₃ MeOH 용액으로 methyl ester 유도체를 조제하여 capillary 칼럼 (Supelco WAX-10, 0.32 mm, i.d.×30 m)을 부착한 가스 크로마토그래피 (Shimadzu GC 14-A)로 분석하였다 (Fig. 1).

유리 아미노산의 분석

수용성 획분중의 유리 아미노산을 lithium 완충액을 용리액으로한 아미노산 분석기 (Biochrom 20, Pharmacia)에서 이온 교환 칼럼을 이용하여 분석하였다.

항종양성분의 검색

RPMI 1640 표준배지 (ICN) 90%, bovine serum

(Sigma) 10%, 복합 항생물질 (Penicillin G+Streptomycin sulfate, Sigma) 1%를 각각 여과 멸균하여 혼합 배양액에서 Mouse Lymphoid P388-D1 (Dainippon Seiyaku) 종양 세포를 배양하여, 2×10⁵ cells 농도가 되도록 조정된 세포 부유액 0.1 ml와 시료 일정량을 96 well micro plate에 주입하여 이산화탄소 배양기 (37°C, 5% 이산화탄소)에서 20시간 배양후 XTT (2, 3- bis (2-methoxy-4-nitro-5-sulphophenyl)-5-[(phenylamino)carbonyl]-2H-tetrazolium hydroxide, Sigma, 50 mg/ml)와 PMS (phenazine methosulfate, Sigma, 1.53 mg/ml) 각 1 µl와 배지 50 µl 혼합액을 가하고 다시 4시간 배양하여 450 nm에서 Micro Plate Reader (BIORAD model 450)로 흡광도를 측정하여 대조구와 비교하였다 (Scudiero et al., 1988).

용혈성의 검색 및 용혈 성분의 분리 정제

마우스의 혈액을 채취하여 0.85% 식염수 50 ml로 희석하고 원심분리 (1000 rpm, 5분)하여 혈구만을 모은 뒤, 0.5%가 되도록 혈구 용액을 조제하였다. 한편, 각 획분 시료 2 mg을 0.5% mouse 혈구 용액 1 ml에 첨가하여 35°C의 incubator에서 30분간 방치한후 원심분리하여 적혈구의 파괴 여부를 조사하였다 (Yasumoto et al., 1990).

용혈성이 확인된 지용성 획분 (300 mg)을 80% MeOH와 hexane으로 분배하여 중성지방을 제거한 다음, 80% MeOH은 감압 농축후 (61 mg), 규산 칼럼 (1 cm, i.d.×20 cm, Kieselgel 60, Merck)에서 chloroform, chloroform-MeOH (9:1), chloroform-MeOH (1:1), MeOH를 각각 순차적으로 칼럼 용적의 3배량씩 분획하였다. 그중 용혈성이 강한 chloroform 획분과 chloroform-MeOH (9:1) 획분을 합하여 LOP ODS 칼럼 (1 cm, i.d.×40 cm, Nomura Chemical Co.)에서 60%, 80%, 100% MeOH로 순차 용출시켰다. 활성이 강한 60%와 80% MeOH 용출구 (39.3 mg)는 다시 ODS 칼럼 (Develosil ODS-7, 1 cm, i.d.×25 cm, Nomura Chemical Co.)상에서 95% MeOH를 용매로하여 UV 215 nm에서 monitoring하면서 반복 정제 (Fig. 3)하여 성분 A (7.5 mg)와 B (10.4 mg)를 각각 분리하였다.

용혈성분의 동정

정제한 용혈성분은 BF₃ MeOH 용액으로 methyl

ester화하여 TLC (Thin Layer Chromatography) plate (Merck)상에서 chloroform-MeOH (95 : 5) 혼합용매로 전개하여 50% 황산-EtOH로 분무후 가열하여 표준 EPA 및 DHA의 methyl ester와 Rf 값을 비교하였으며, 지방산 분석시와 동일 조건하에서 가스크로마토그래피로 분석하여 지방산 methyl ester와의 용출 시간을 비교하였다. 한편, 질량 분석은 SPB-1 칼럼 (Supelco)을 부착한 GC/MS (GC-LC MASS Spectrometry, Cratos Profile HV-3, Cratos)에서 EI (Electronic Impacted Ionization) mode로, proton NMR은 500 MHz (Varian Unity-500, Varian)에서 CDCl₃를 용매로하여 각각 측정하였다.

결과 및 고찰

마우스 치사 독성, 어독성, 항균성 성분의 검색

지용성 획분은 설사성 패독 검사법에 준하였으며, 수용성 획분은 마비성 패독 검사법에 준하여 행하였다. 지용성 획분은 50 mg 상당량을 주사후 24 시간이 경과하는 동안 체중은 약간 감소하였으나, 사망하지는 않았다. 수용성 획분은 NaCl 등 무기염류가 다량 포함되어 있어 활성탄에 흡착한 성분만을 추출하여 독성 시험을 하였으나, 수용성 획분에서도 10 mg 상당량을 주사후 수시간이 경과하여도 특별한 이상 증상도 나타나지 않았다. 따라서, 일반적으로 맹독성 적조로 알려져 있는 것과는 달리 마우스를 치사시키는 강력한 유독 성분은 없는 것으로 보인다.

어독성의 경우에도 양 획분 모두 24 시간이 경과하여도 구피가 생존하여 실험 농도 (5 mg/ml) 이하에서는 어독성을 나타내지 않았다. 어류를 치사시키는 유독 성분으로서의 담수 적조로부터 polonicumtoxin (Oshima et al., 1989), Prymnesin (Igarashi et al., 1995) 등이 알려졌으며, 해산 적조 생물로부터는 brevetoxin (Baden, 1989), Goniodomin (Murakami et al., 1988)이 특이한 구조를 가진 신물질로 밝혀졌으며, *Noctiluca*로부터는 암모니아 (Okaichi and Nishio, 1976)가 보고되었으며, *Chattonella*속의 적조 생물로부터 다량의 각종 불포화 지방산들이 어독성분으로 동정되었다 (Nishio, 1982).

한편, *Cochlodinium*의 어독성에 대하여 Yuki and

Yoshimatsu (1989)는 *C. polykrikoides*를 인공 배양하여 살아있는 세포가 6,000 cells/ml의 농도에서는 어린 *Leignathus nuchalis*가 8시간만에 치사하였다고 보고하였으며, Hirayama and Abe (1979)는 이 플랑크톤에 의한 적조 해수는 어린 물고기에 대하여 어독성을 나타내나 동결건조한 조체의 아세톤 추출물은 어류에게 무독하다고 보고하여 본 연구 결과와 유사하였다. 따라서, *C. polykrikoides* 조체에는 어류에 대하여 유독한 물질이 매우 불안정한 상태로 존재하여 추출 정제시 파괴되어 무독화되거나, 또는 *Chattonella* 등과 같이 본래부터 유독 물질이 존재하는 것이 아니라 점액성이 강한 무각의 세포가 호흡시 어류의 아가미에 1차적으로 부착함으로써 가스교환 기능이 저하되고 산소가 결핍되기 때문에 결과적으로 질식에 의해 어류가 폐사하는 것으로 추정된다 (Yamaguchi, 1982; Murakami and Yamaguchi, 1989).

항균성의 검색에서, 지용성 획분은 그람 양성균이나 음성균 및 효모, 곰팡이등 어느군에도 생육 저지원은 형성되지 않았으며, 수용성 획분은 그람 양성균 (*B. subtilis*)에만 약간의 생육 저지원이 형성되었으나 48 시간 경과 후에는 생육 저지원이 소멸되었다. 따라서, *C. polykrikoides*의 조추출물 중에는 5 mg 이하의 농도에서 항균성이 없는 것으로 보아 특별히 강력한 항균 활성 물질은 존재하지 않는 것으로 추정되었다.

마비성 독소 및 설사성 독소의 기기 분석

수용성 획분에서 마우스 치사 성분은 검출되지 않았으나, 일본에서는 *C. polykrikoides* 천연 조체로부터 급속 아연이 결합된 마비성 독소 (carbamoyl-N-sulfo-11 α -hydroxyneosaxitoxin) 등이 함유되어 있는 것으로 보고된 적이 있어 (Onoue and Nozawa, 1989a), 미량의 마비성 독소의 존재 여부를 확인하기 위하여 미량 형광 크로마토그래피에 의하여 독성을 분석한 결과, 18 종류의 마비성 독소 성분중 어느것도 검출되지 않았으나, gonyautoxin-4 (용출시간, 6.75분) gonyautoxin-1 (용출시간, 9.10분) 사이에 커다란 미지 성분의 peak (용출시간, 6.96 분)가 출현되어 유독 성분의 가능성이 시사되었다 (Fig. 1). 그러나, saxitoxin의 분석 조건에서도 거의 비슷한 시간대에 peak가 출현하여 gonyautoxin류와는 다른 성분으로 추정되었다. 한편, 설사성 패류 독소 성분을 분석한 크로마토그램에서도

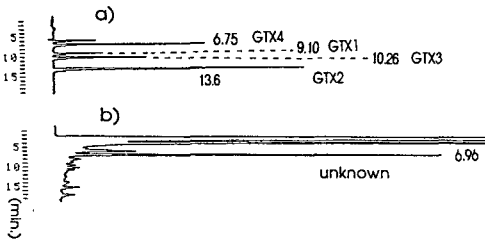


Fig. 1. Fluorometric HPLC chromatograms of gonyautoxin(GTX) group and *C. polykrikoides* extracts. (a) authentic GTXs, (b) *C. polykrikoides* extracts.

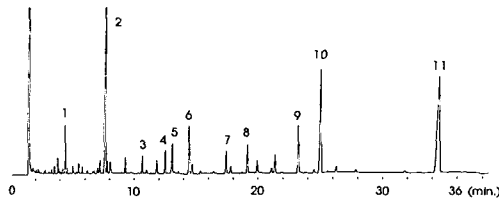


Fig. 2. GC chromatogram of total fatty acids in *C. polykrikoides* extracts(Supelco WAX-10, 0.32 mm i.d.×30 m, He gas: 1.5 kg/cm³, FID detector, 175°C 5 min., 2°C/min. increased to 220°C, 220°C 10 min., numbers present each fatty acids as shown in Table 1).

설사성 패류 독소의 주성분인 okadaic acid나 dinophysistoxin-1 (Lee et al., 1989) 어느것도 검출되지 않아 패류 독소의 존재는 확인되지 않았다.

항종양 활성 물질의 검색

마우스 lymphoid P-388 종양 세포에 대한 생육 저지효과를 XTT법에 의하여 조사하였다. XTT는 살아 있는 세포의 미토콘드리아에 존재하는 효소에 의하

여 tetrazolium환이 개환되어 생성되는 formazane의 양을 비색법으로 측정하는 것으로서 본 시료의 지용성 획분에서는 180 µg/ml의 농도에서 약 20%의 생육 저지 효과를 나타내었으나, 이는 동일한 종양 세포에 대한 ED₅₀이 *Gymnodinium mikimotoi* 추출물의 경우 4.0×10⁻² µg/ml인데 비하여 매우 약하고, 시료량이 너무 많아 활성 물질에 의한 것 보다는 과다한 잔사량 자체의 영향이 크기 때문에 항종양 활성성분도 없는 것으로 추정된다.

지방산 조성

지용성 획분중의 총 지방산을 분석한 크로마토그램과 주요 지방산의 조성은 Fig. 2 및 Table 1에 나타내었다. 총 지방산 중에서 ω-3 계열의 고도 불포화 지방산인 EPA (eicosapentaenoic acid, C_{20:5}, n-3)가 15.3%, DHA (docosahexaenoic acid, C_{22:6}, n-3)가 25.3%로서 이들 두 지방산 함량이 40.6%나 차지하여 다른 조류에 비하여 총 지방산 중에서 차지하는 비율이 높아 (Kayama et al., 1980), 고도 불포화 지방산의 생산 자원으로서 이용 가능성을 시사하였다.

유리 아미노산 분석

조체중의 이상 아미노산의 존재 여부를 확인하기 위하여 유리 아미노산을 분석한 크로마토그램상에서는 taurine을 비롯한 9개의 아미노산이 검출되었으며, cystine 및 Isoleucine의 peak와 비슷한 용출 시간인 64.6분과 71.8 분에 이들 아미노산보다 broad한 미동정 peak가 각각 나타나 특이한 아미노산의 존재가 추정되었다.

Table 1. Major fatty acid composition in *Cochlodinium polykrikoides* extracts

Peak No.	Fatty acid	Composition (Area %)	Peak No.	Fatty acid	Composition (Area %)
1	14 : 0	2.5	7	18 : 4, n-3	2.3
2	16 : 0	25.3	8	20 : 1, n-11	3.0
3	16 : 3, n-3	1.4	9	20 : 3, n-3	5.7
4	18 : 0	2.2	10	20 : 5, n-3	15.3
5	18 : 1, n-9	3.1	11	22 : 6, n-3	25.3
6	18 : 2, n-6	4.8			

용혈 성분의 분리 및 정제

지용성 및 수용성 획분 시료 공히 용혈 활성을 나타내었으나, 본 실험에서는 우선 지용성 획분의 용혈 성분의 정제를 시도하였다. 실리카 칼럼에서 용혈성은 chloroform 및 chloroform-MeOH (9 : 1) 획분이 20 µg/ml에서, chloroform-MeOH (1 : 1) 및 MeOH 획분에서는 80 µg/ml 이상에서 활성을 나타내어 극성이 낮은 획분의 활성이 강하였다.

한편, ODS 칼럼에서는 peak A 와 B의 두 획분에서 강한 활성 (10µg/ml)을 나타내어 (Fig. 3), A 와 B 두 개의 성분을 각각 분리, 정제하였다. 그러나, 정제후에도 시간이 경과하면 다시 황갈색으로 변색되어 매우 불안정한 물질로 추정 되었다.

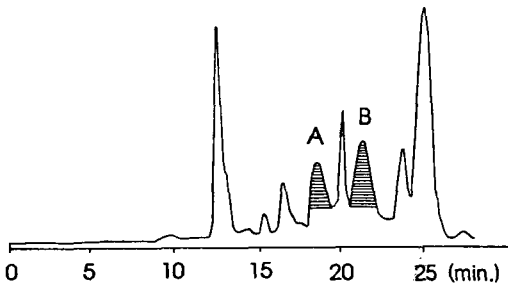


Fig. 3. Elution pattern of hemolytic component A and B on the HPLC(Develosil-ODS, 1×25 cm, 95% MeOH, 1.4 ml/min., UV: 215 nm).

용혈성분의 동정

용혈성분 A와 B의 methyl ester들은 TLC상에서 표준품 EPA, DHA의 methyl ester와 동일한 Rf 값 (Rf: 0.83)을 나타내어 구분하기가 어려웠으나, GC에서 분석한 결과, 성분 A 와 B는 각각 EPA 및 DHA와 용출 시간이 일치하였다 (Fig. 4). 또한, EI mode 에서 측정 한 GC/MS spectrum에서도 성분 A는 EPA methyl ester와 동일한 분자량인 316 m/z에, 성분 B는 DHA의 methyl ester의 분자량인 342 m/z에 각각 M⁺의 ion peak를 나타내어 이들 용혈 성분이 EPA 및 DHA로 판명되었다.

한편, 이들을 500 MHz에서 측정 한 proton NMR의 spectrum들을 Fig. 5, 6에 나타내었다. 성분 A는 methyl ester의 signal (σ: 3.68, s)을 포함한 서로 다른 조건에 있는 7개의 proton signal들이, 그리고, 성분 B

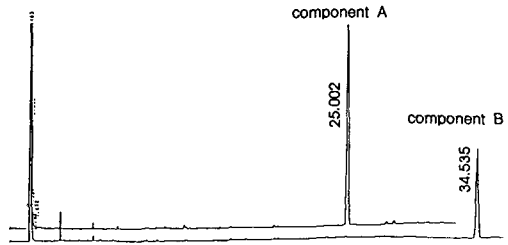


Fig. 4. GC chromatograms of hemolytic components A and B(methyl esters).

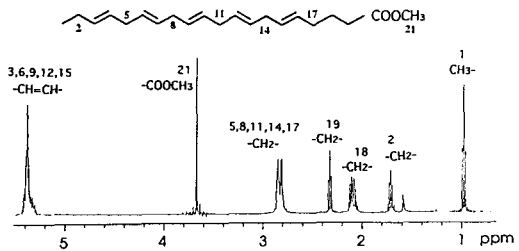


Fig. 5. Proton NMR spectrum of methylated hemolytic component A(500 MHz, CDCl₃).

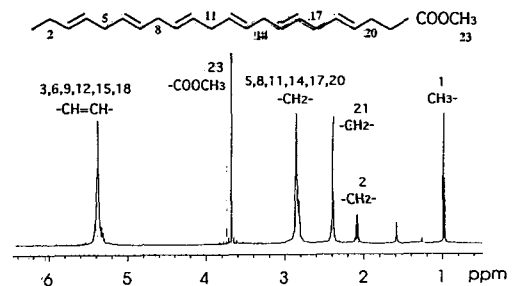


Fig. 6. Proton NMR spectrum of methylated hemolytic component B(500 MHz, CDCl₃).

는 6개의 signal이 각각 EPA, DHA의 것과 일치하였다. 이상의 GC, MS, NMR의 분석 결과, 이들을 각각 EPA, DHA로 동정할 수 있었다.

플랑크톤중의 용혈성과 어독성을 동시에 나타내는 성분들로서는 여러개의 복합 당지질들이 *Prymnesium parvum*, *Amphidinium carteri*, *Chrysochromulina polylepis* 등에서 발견되어 (Kozakai et al., 1982, Yasumoto et al., 1990), hemolysin류로 명명되었으며, 노르웨이 산 *Gyrodinium aureorum* 에서는 지방산의 일종인 octadecapentaenoic acid (C_{18:5})를 동정되었다 (Yasumoto et al., 1990). *C. polykrikoides* 추출물은 어독성도 없었을뿐 아니라, 규산 칼럼에서도 이들 당지질이

chloroform-MeOH (1:1)나 MeOH 희분에 용출되는데 비하여 극성이 낮은 희분에 용해성이 강하여 이들 hemolysin류는 매우 적거나 없는 것으로 추정된다.

그러나, Onoue and Nozawa (1989b)는 일본 Kago-shima만에서 채취한 *Chattonella*, *Cochlodinium*, *Gymnodinium*의 적조 조체를 chloroform-EtOH (2:1)로 추출한 추출물에서 신경독소, hemolysin, hemagglutinin 등 3개의 희분이 있다고 하여 본 실험과는 다른 결과를 나타내었는 바, 금후 보다 많은 시료를 확보하여 수용성 희분 및 규산 칼립상에서의 다른 희분들도 상세하게 검토할 필요가 있다.

일반적으로 적조 생물들은 양식 생물에 피해를 주기 때문에 단지 유해한 것으로만 인식되어 적조 발생을 예방하거나, 적조 제거에 대한 연구들이 주로 이루어지고 있으며 최근에는 각종 세균이나 바이러스에 의한 적조 방제법등이 보고되었다 (Ishida, 1994). 그러나, 적조 생물들은 폭발적인 증식력을 갖고 있으며, 수권의 기초 생산을 담당하는 미이용 생물 집단의 하나로서, 이들의 특성을 잘 이용한다면, 적조 생물이나 이들이 생산하는 유용한 대사산물들은 식량, 사료, 의약품, 화공 원료, 환경 정화등 다방면으로 활용이 가능하다. 이미 녹조의 *Chlorella*, *Dunaliella*, 남조의 *Spirulina*, 홍조의 *Porphyridium* 등은 대규모 배양에 의하여 여러나라에서 건강식품, 사료등의 용도로 산업화되어 있다 (Yamaguchi, 1992). *Cochlodinium*의 경우는 무독성 종으로 대량 배양한다면 최근 생리활성 물질로서 각광을 받고있는 고도 불포화 지방산의 EPA, DHA를 다량 함유하므로 이들의 생산 자원으로서 이용이 기대된다.

요 약

무각류의 외편모조인 *C. polykrikoides*에 의한 적조는 맹독성으로 알려져 있으며, 이로 인한 어패류의 폐사로 매년 막대한 손실을 초래하고 있어, 어패류 폐사의 원인 독성분을 규명하고, 유용 조류로서 활용하기 위한 기초 자료를 얻음 목적으로 93년 10월 경남 통영군 육지도 인근에서 발생한 적조시 채취한 천연 조체를 시료로 수종의 생리활성을 검색하였다.

MeOH 추출물의 마우스 치사 독성은 없었으며 (지

용성 희분: 50 mg, 수용성 희분: 10 mg), 미량 형광 HPLC 분석에서도 마비성이나 설사성 패류독은 검출되지 않았다. 또한, 5 mg/ml의 농도에서는 어독성을 나타내지 않았으며, 항균성도 없었다 (10 mg/disc). P-388 종양 세포에 대하여는 지용성 희분이 180 µg/ml의 농도에서 20%의 생육 저지활성을 나타내었고, 아미노산 분석에서 2개의 미확인 아미노산이 검출되었다. 용혈활성을 나타내는 성분은 지용성, 수용성 양 희분에 모두 존재하였으며, 지용성 희분중의 성분으로서 EPA와 DHA가 동정되었고, 이들이 총지방산의 40.6%를 차지하여 고도 불포화 지방산 자원으로서 이용 가능성을 시사하였다.

감사의 글

본 연구는 1994년도 한국학술진흥재단 공모과제 연구비에 의하여 수행되었으므로 이에 감사드립니다. 시료 채취에 협조하여 주신 국립수산진흥원 통영연구소의 박정흠 소장님과 전영렬 연구사님, 지방산을 분석하여 주신 본대학 최병대 교수님과 NMR을 측정하여 주신 한국 해양연구소의 정지형 박사님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Anderson, D. M. 1989. Toxic algal blooms and red tides: A global perspective. in Red Tides, T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto, eds. Elsevier, New York, pp. 11~16.
- Baden, D. G. 1989. Brevetoxins, unique polyether dinoflagellate toxins, FASEB J., 3, 1807~1817.
- Cho, C. H. 1978. On the *Gonyaulax* red tide in Jinhae Bay. Bull. Korean Fish. Soc., 11, 111~114 (in Korean).
- Cho, C. H. 1981. On the *Gymnodinium* red tide in Jinhae Bay. Bull. Korean Fish. Soc., 14, 227~232.
- Environmental Health Bureau. 1978. Bioassay for the determination of paralytic shellfish toxins. in Shokuhin Eisei Kensa Shisin, Ministry of Health

- and Welfare, ed. Nippon Shokuhin Eisei Kensa Kyokai, Tokyo, pp. 240~244 (in Japanese).
- Fukuyo, Y. 1984. Toxic plankton. Bull. Plankt. Soc. Japan, 30th Aniv. Volume, 27~32.
- Hirayama, K. and T. Abe. 1979. Red tide and toxicity occurred in Nagasaki coastal waters between 1976-78. in Research Report on Ministry of Agriculture and Fishery. Japan, pp. 28~32 (in Japanese).
- Igarashi, T. Y. Oshima, M. Murata and T. Yasumoto. 1995. Chemical studies on prymnesins isolated from *Prymnesium parvum*. in Harmful Marine Algal Blooms, P. Lassus, G. Arzul, E. Erard, P. Gentien and C. Marcaillou, eds. Lavoisier, Intercept Ltd., Paris, pp. 303~308.
- Kayama, M., S. Araki and S. Sato. 1989. Lipids of marine plants. in Marine Biogenic Lipids, Fats, and Oils. Vol. 2, R.G. Ackman, ed., CRC Press, Florida, pp. 4~48.
- Ishida, Y. 1994. Microbial control of red tide microalgae and its prospect. in Prevention and Control of Red Tide Microalgae by Microorganisms. (Suisangaku Series No. 99), Nippon Suisangakkai, ed. Koseisha Koseigaku, Tokyo, pp. 9~21.
- Kim, H. G. 1990. Characteristics of flagellate red tide and environmental conditions in Masan Bay. Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency, 43, 1~40 (in Korean).
- Kim, H. G., J. S. Park and S. G. Lee. 1990. Coastal algal blooms caused by the cyst-forming dinoflagellates. Bull. Korean Fish. Soc., 23, 468~474.
- Kim, H. K., J. S. Park, S. G. Lee and K. H. An. 1993. Illustrations of planktons responsible for the blooms in Korean coastal waters. Yemunsa, Pusan, p. 35 (in Korean).
- Kim, H. G., J. S. Park, B. A. Kim, S. S. Lee, S. K. Lee, K. H. An, J. M. Shim, P. Y. Lee, C. M. Kwang, H. G. Choi, J. S. Park, G. Y. Kim, C. G. Kwang, Y. C. Park and J. Y. Seo. 1994. A study on red tide mechanism and harmful algal blooms in Korean coastal waters. Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency, 117, 110~117 (in Korean).
- Kozakai, H., Y. Oshima and T. Yasumoto. 1982. Isolation and structural elucidation of hemolysin from the phytoflagellate *Prymnesium parvum*. Agric. Biol. Chem., 46, 233~236.
- Lee, J. S., T. Yanagi, R. Kenma and T. Yasumoto. 1987. Determination of diarrhetic shellfish toxins by a fluorometric high performance liquid chromatography. Agric. Biol. Chem., 877~881.
- Lee, J. S., M. Murata and T. Yasumoto. 1989. Analytical methods for determination of diarrhetic shellfish toxins. in Mycotoxins and Phycotoxins, S. Natori, K. Hashimoto and Y. Ueno, eds. Elsevier, Amsterdam, pp. 327~334.
- Lee, J. S., I. S. Kim and S. K. Moon. 1991. Antibacterial, antifungal components from some Korean marine sponges. Bull. Korean Fish. Soc., 24, 193~202.
- Murakami, M., K. Makabe and K. Yamaguchi. 1988. Goniiodomin A, a novel polyether macrolide from the dinoflagellate *Goniodoma pseudogonyaulax*. Tetrahedron Lett., 29, 1149~1152.
- Murakami, M. and K. Yamaguchi. 1989. Toxicity of red tides. Research for Water Pollution. 12, 757~762 (in Japanese).
- Nishio, S. 1982. Ichthyotoxicity. in Toxic Phytoplankton-Occurrence, Mode of Action, and Toxins (Suisangaku series No. 42). Nippon Suisan Gakkai, ed. Koseisha Koseigaku, Tokyo, pp. 50~61.
- Okaichi, T. and S. Nishio. 1976. Toxicity of *Noctiluca miliaris*. Bull. Plant. Soc. Japan, 43, 75~80 (in Japanese).
- Onoue Y. and K. Nozawa. 1989a. Zinc-bound PSP toxins separated from *Cochlodinium* red tide, in Mycotoxins and Phycotoxins '88, S. Natori, K. Hashimoto and Y. Ueno, eds. Elsevier, Amsterdam, pp. 359~366.
- Onoue Y. and K. Nozawa. 1989b. Separation of

- toxins from harmful red tides occurring along the coast of Kagoshima Prefecture. in Red tides, T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto, eds. Elsevier, New York, pp. 367~370.
- Oshima, Y., K. Sugino and T. Yasumoto. 1989. Latest advances in HPLC analysis of paralytic shellfish toxins. in Mycotoxins and Phycotoxins '88, S. Natori, K. Hashimoto and Y. Ueno, eds. Elsevier, Amsterdam, 319~326.
- Oshima, Y., H. Minami, Y. Takano and T. Yasumoto. 1989. Ichthyotoxins in a freshwater dinoflagellate *Peridinium polonicum*. in Red tides, T. Okaichi, D.M. Anderson and T. Nemoto, eds. Elsevier, New York, pp. 375~378.
- Park, J. S. 1982. Studies on the characteristics of red tide and environmental conditions in Jinhae Bay. Bull. Fish. Res. Dev. Agency, 28, 55~88 (in Korean).
- Park, J. S., H. G. Kim and S. G. Lee. 1988. Red tide occurrence and succession of its causative organisms in Jinhae Bay. Bull. Nat. Fish. Res. Dev. Agency, 41, 1~26 (in Korean).
- Scudiero, D. A., R. H. Shoemaker, K. D. Paull, A. Monks, S. Tierney, T. H. Nofziger, M. J. Currens, D. Seniff and M.R. Boyd. 1988. Evaluation of a soluble tetrazolium/formazan assay for cell growth and drug sensitivity in culture using human and tumor cell lines. Cancer Research, 48, 4827~4833.
- Yamaguchi, K. 1982. Mechanism of mass mortality of fish. in Toxic phytoplankton-Occurrence, Mode of Action, and Toxins(Suisangaku series No. 42). Nippon Suisan Gakkai, ed. Koseisha koseigaku, Tokyo, pp. 62~72 (in Japanese).
- Yamaguchi, K. 1992. Present situation and future directions. in Utilization of Microalgae(Suisangaku series No. 91). Nippon Suisan Gakkai, ed. Koseisha Koseigaku, Tokyo, pp. 9~17 (in Japanese).
- Yasumoto, T. 1982. Method for the bioassay of diarrhetic shellfish toxin. Food Sanitation Research, 31, 515~522 (in Japanese).
- Yasumoto, T., B. Underdal, T. Aune, V. Hormazabal, O. M. Skulberg and Y. Oshima. 1990. Screening for hemolytic and ichthyotoxic compounds of *Chrysochromulina polylepis* and *Gyrodinium aureorum* from Norwegian coastal waters. in Toxic Marine Phytoplankton, E. Graneli, Bo Sundstrom, L. Edler and D. M. Anderson, eds. Elsevier, New York, pp. 436~440.
- Yuki, K. and S. Yoshimatsu. 1989. Two fish-killing species of *Cochlodinium* from Harima nada, Seto inland sea, Japan. in Red Tides, T. Okaichi, D. M. Anderson and T. Nemoto, eds. Elsevier, New York, pp. 451~454.

1995년 10월 23일 접수

1996년 1월 27일 수리