

복어로부터 복어독(Tetrodotoxin) 생성능이 있는 해양 미생물의 분리 및 동정

윤성준 · 차병윤 · 이명자* · 정동윤* · 송병권** · 김희숙 · 김동수 · 이은열[†]

경성대학교 공과대학 식품공학과
*서울식품의약품안전청 시험분석실
**부산식품의약품안전청 시험분석실

Isolation and Identification of Tetrodotoxin-producing Marine Microorganism from Pufferfish

Sung-Jun Yoon, Byung-Yoon Cha, Myung-Ja Lee*, Dong-Youn Jeong*, Byung-Kwon Song**,
Hee-Sook Kim, Dong-Soo Kim and Eun-Yeol Lee[†]

*Department of Food Science and Technology, College of Engineering,
Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea*

**Test and Analytical Lab., Seoul Regional Food and Drug Administration, Seoul 135-090, Korea*

***Test and Analytical Lab., Pusan Regional Food and Drug Administration, Pusan 608-080, Korea*

Abstract

A novel marine microorganism, *Vibrio* sp. YE-101, was isolated from pufferfish and investigated for its ability to synthesize tetrodotoxin (TTX). Various strains isolated from the intestine of pufferfish were grown on TCBS agar plate, and then cultured on Ocean Research Institute (ORI) medium supplemented with 3% NaCl at 23°C for 3 days. The cells were harvested, disrupted, fractionated by Bio-Gel P-2 column chromatography and then TTX-producing strain, *Vibrio* sp. YE-101, was identified using mouse bioassay. The isolated TTX from *Vibrio* sp. YE-101 was also analyzed and identified by HPLC and gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS). The mass fragmentation of trimethylsilyl derivatives of C₉-base of TTX from *Vibrio* sp. YE-101 was interpreted and the pattern of fragmentation was same with that of authentic standard. The purified TTX was also positive to the mouse bioassay, which clearly represents that *Vibrio* sp. YE-101 can synthesize TTX.

Key words – Tetrodotoxin, *Vibrio* sp., Pufferfish, Mouse bioassay

서 론

복어독인 tetrodotoxin (TTX)은 C₁₁H₁₇N₃O₈의 화학식을

가지는 amino perhydroquinazoline 계열의 비단백질성 신경마비 독소이다[8]. TTX의 비독성은 5,000-6,000 MU (mouse unit)/mg 정도이며, 대표적인 마비성 패독인

[†] Corresponding author

saxitoxin의 독성에 필적하며 NaCN의 약 1,000배에 해당되는 독성을 가지고 있다.

복어의 독생성 메커니즘에 대해서는 복어 체내에서 자체적으로 생합성한다는 내인설과 복어 장내 세균으로부터 TTX가 생산되어 축적되거나 먹이 사슬을 통하여 축적된다는 외인설이 있는데, 아직도 논의의 여지가 남아 있지만 외인설이 더 많은 인정을 받고 있다. Noguchi 등이 crab 장내로부터 분리 배양한 세균들이 TTX를 생성한다고 발표한 이래, *Fugu vermicularis*, *Carcinoscorpius rotundicauda*, *Astropecten polyacanthus*, *Octopus maculosus*, *Xanthin crab*, *Atergatis floridus* 등의 내장 공생 세균들을 대상으로 한 연구 결과 *Vibrio alginolyticus* 등의 해양 미생물에서 TTX 및 anhydro TTX 생산능이 확인되었다[1-3,7,9]. Yotsu 등은 복어 내장에서, Yasumoto 등은 석회조에서 분리한 *Pseudomonas* sp.로부터도 TTX 생성능을 확인하였다[5,6].

TTX는 신경전달 메커니즘 연구를 위한 고가의 생화학 시약으로도 수요가 증대되고 있으며[4,12], 또한 류마치스형 관절염 치료제, 말기 암환자의 진통 진정제, 국소 근육 이완제 등의 새로운 신약 개발을 위한 선도화합물로서의 가능성도 부각되고 있어 고가의 TTX를 저렴하게 생산할 수 있는 생물공학적 생산 방법 개발이 요구되고 있다. 그러나 국내에서는 복어로부터 TTX를 생성할 수 있는 미생물의 분리·동정 및 생물공학적 생산에 대한 연구는 매우 미흡한 편이다. 그리고 지금까지 보고된 해양 미생물을 이용한 TTX 생성에 대한 연구들도 단순히 TTX 생성 여부 정도만을 확인하는 수준에 머무르고 있는 실정이다. 따라서 해양 미생물을 이용한 생물공학적 TTX 생산을 위한 기초를 마련하고자 국내에서 유통되고 있는 활어 상태의 복어 내장으로부터 TTX 생성능이 있는 해양 미생물을 분리 및 동정하는 것이 본 논문의 연구목적이다.

재료 및 방법

복어 장내 공생 미생물 분리 및 배양

활어 상태의 복어 내장을 무균 상태에서 분리하여 멸균된 생리 식염수를 가해 10배로 희석한 후 homogenizer (Nissei AM-7, Japan)를 이용하여 균질화 시켰다. 장내 호염성 세균들이 잘 증식하는 것으로 알려진 TCBS 한천 평판을 사용하여 호염성 해양 미생물군들을 1차로 분리했다.

분리된 각종 균주는 3% NaCl이 첨가된 nutrient 한천 평판에서 계대배양했고, TTX 분리·정제를 위한 액체 배양은 ORI (Proteose peptone 2 g, Phytone peptone 2 g, Yeast extract 1 g, Citric acid 0.88 g, NaCl 30 g, Distilled water 1 L, pH 8.0) 배지를 사용하여 23°C에서 3일간 진탕 배양시켰다.

TTX 생성능이 있는 균주 스크리닝

장내 공생 미생물의 배양액을 5000 r.p.m.에서 10분간 원심분리하여 균체와 배양액을 분리하고, 균체를 0.1% (v/v) 초산 용액 30 ml를 가하고 sonicator (MISONIX XL, Japan)로 10분간 파쇄시킨 후 80°C에서 15~20분간 가열하여 TTX를 추출했다. 추출 용액을 5000 r.p.m.에서 10분간 원심분리하고, 상층을 Diaflo YM-2 membrane으로 한외여과 시킨 후 여과액을 vacuum evaporator로 5 ml 정도로 농축시켜 1 ml는 mouse bioassay용으로 사용했다. 나머지 추출 용액은 Bio-Gel P-2 (Bio-Rad Lab, 400 mesh) column chromatography를 이용하여 TTX 표준품과 일치하는 회분을 얻어 동결 건조시킨 후 2차 mouse bioassay, HPLC 및 GC-MS 분석에 사용하였다.

Mouse bioassay

독성시험을 위한 mouse bioassay는 일본후생성 지정법에 따라서 실시하였다. 파쇄한 미생물 균체에 0.1% 초산 용액을 25 ml 넣고 가열하여 충분히 독소를 추출한 후 여지(LOT, No. 5, Adventec Toyo, Japan)로 여과하고 잔사는 0.1% 초산 용액으로 다시 세정하여 여액과 합쳐 약 50 ml를 만들었다. 이 용액을 증류수로 알맞게 희석하여 ICR (Institute of Cancer Research)계 쥐(수컷, 18~20 g)의 복강에 1 ml를 주사하고 치사시간을 측정하여 MU(mouse unit) 단위로 독성치를 나타내었다. 1 MU는 주사한 후 30분 이내에 치사시킬 수 있는 TTX 양을 의미한다.

High performance liquid chromatography (HPLC) 분석

YMC-Pack AM-314 ODS column (6 mm ID × 300 mm)상에서 2 mM sodium 1-heptane sulfonate / 0.05 M potassium phosphate buffer (pH 7.0) 용액과 methanol의 혼합액 (99:1)을 이동상으로 1 ml/min의 속도로 용출시키

면서 4 N NaOH를 이용하여 100℃에서 C₉-base (2-amino-6-hydroxymethyl-8-hydroxyquinazoline)로 변환시킨 후 여기파장 380 nm, 형광파장 505 nm에서 형광검출기(spectrofluorometer, Gilson 121)로 검출하였다[11].

Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) 분석

균체로부터 정제한 TTX 획분을 1 ml로 농축하고, 1.5 N NaOH에 녹이고 80℃에서 45분간 가열하여 C₉-base 유도체로 전환시키고 20% HCl로 pH를 조정한 후 2 ml의 n-butanol로 3회 반복 추출하였다. 추출액을 동결건조시킨 후 N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamide (BSA) 용액에 넣고 실온에서 50분 정도 방치시켜 trimethylsilyl (TMS) 반응을 시켰다[10]. 이 유도체에 대한 GC-MS 분석은 HP-5989 MA (Hewlett-Packard, USA)를 사용하였으며, column은 Ultra-2(Cross Linked 5% Phenyl Methyl Silicone, 50 m × 0.2 mm × 0.11 μm), carrier gas는 He, flow rate는 1.0 ml/min, oven temperature는 140℃에서 300℃로 승온 분석 (4℃/min)을 실시하였다. Ion source temperature는 200℃이며 scanning mass range는 m/z 50-420 (at 2 sec) 간격으로 분석하였다.

균주 동정

분리한 균주는 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology와 Manual of Clinical Microbiology의 방법에 따라 동정하였다.

결과 및 고찰

TTX 생성능이 있는 해양 미생물 스크리닝

복어독을 생성할 수 있는 해양 미생물은 일반적으로 복어와 공생 관계를 가지고 있으며, 따라서 숙주 동물인 복어가 사멸한 경우 그 내부의 미생물군집에 큰 변화가 있을 수 있으므로 활어 상태의 복어로부터 미생물을 분리해야 한다. 활어 상태의 복어를 해부하여 내장 10 g을 분리하고, 멸균된 해수 20 ml를 첨가하여 무균의 homogenizer를 이용하여 균질화시켰다. 단계별로 희석하여 3% NaCl을 함유한 한천 평판에 도말하여 23℃에서 3일간 배양하였다. Plate counting 결과, 복어 장내에서의 호염성 세균

의 수는 약 4.52×10^7 cell/g 정도였다.

지금까지의 연구결과에 의하면 TTX 생성능이 있는 해양 미생물로는 *Vibrio* 계열이 많았으므로, *Vibrio* 균의 선택 배지라도 알려진 TCBS 한천 평판에 도말을 하여 단일 집락을 형성하는 균주들을 선택하고, 3% NaCl이 첨가된 250 ml의 ORI 배지에서 다시 배양한 후 TTX 추출 및 정제단계로 넘어갔다 (Fig. 1). 세포 배양액을 원심분리 한 후 세포 균체에는 0.1% 초산 용액 25 ml를 가하고 sonicator로 파쇄시킨 후 약 15~20분간 가열하여 독소가 추출되도록 하였다. 이 용액을 5000 r.p.m.에서 10분간 원심분리한 후 상층은 Diaflo YM-2 membrane을 이용하여 한외여과하고, 증발기를 이용해 약 5 ml 정도로 농축시켰다. 이렇게 제조된 용액 1 ml을 이용한 mouse bioassay를 통해 독소 생성 여부를 1차로 확인하였다 (Fig. 2). 기존의 연구에서는 주로 TTX를 분리·정제하지 않고 HPLC 또는 GC-MS를 이용하여 TTX peak를 검출하였으나, 배지 성분인 polypeptide, yeast extract 등에서도 TTX peak와 같은 머무름 시간을 가지는 peak가 검출되므로 문제가 될 수 있으므로 본 연구에서는 직접 mouse bioassay를 통해 TTX 생성능을 가진 미생물을 탐색하였다.

독소 성분이 있을 것으로 판정된 후보 시료는 TTX의 분리·정제를 위하여 Bio-Gel P-2 column에서 0.03 M의 초산 용액을 이용하여 획분시켰다. 각 획분을 2차 mouse assay를 통하여 독성이 있는 획분을 얻었다. 이러한 스크리닝 과정을 통하여 mouse bioassay 값이 8 MU로 TTX

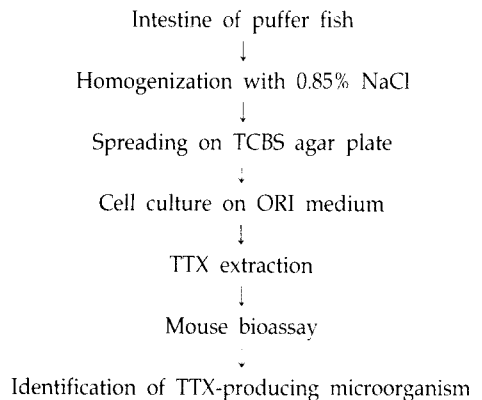


Fig. 1. Selection procedure of tetrodotoxin-producing marine microorganism from puffer fish.

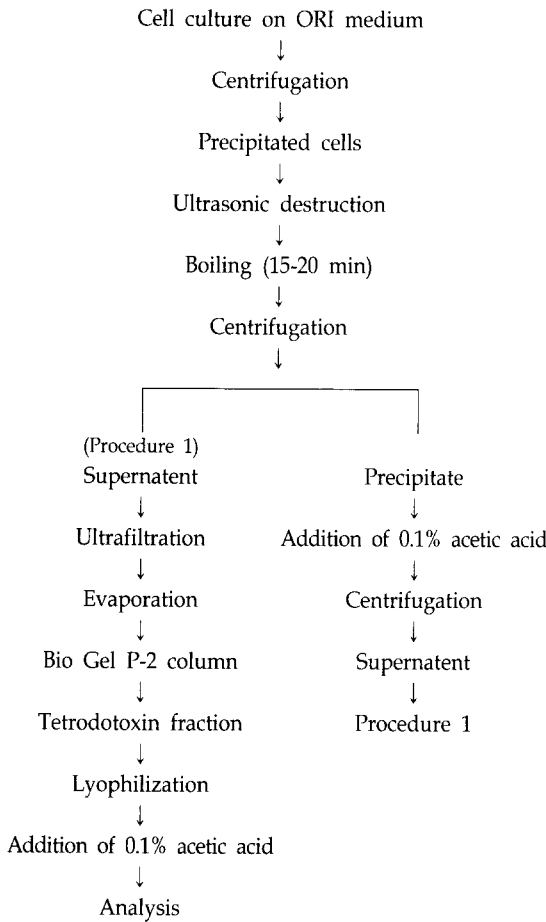


Fig. 2. Procedure for the isolation of tetrodotoxin from marine microorganism.

생성능이 높은 균주인 YE-101를 얻을 수 있었다.

균주 특성 분석 및 동정

분리된 균주는 rod 형태 ($W \times L = 0.5 \times 1.5 \mu\text{m}$)로 Gram-negative 균주였다. 편모가 있어 운동성이 있으며, spore는 없고, TCBS 한천 평판에서의 집락 색깔은 노란색이었다. Oxidase 및 nitrase는 양성이고 gelatinase 분해 활성은 없었다. GC content는 약 42.5% 정도였으며 약 8% NaCl 농도에서도 성장을 보였다 (Table 1). Glucose, sucrose, maltose, mannitol, sorbitol 등을 분해하여 산을 생성하며, lactate, arabinose 등에 대해서는 음성이었다.

Table 1. Biochemical and nutritional characteristics of the isolated strain YE-101

Characteristics	Strain YE-101
<i>Biochemical characteristics</i>	
Rod shape	-
Gram's stain	-
Oxidase	+
Nitrate	+
Motility	+
Gelatinase	-
G+C mole content	42.5
0% NaCl	-
3% NaCl	+
6% NaCl	+
8% NaCl	+
10% NaCl	-
<i>Nutritional characteristics</i>	
Glucose	+
Arabinose	-
Sucrose	+
Mannitol	+
Sorbitol	+
N-acetyl-glucosamine	+
Maltose	+
Lactate	-

이와같은 생화학 및 영양적인 특성과 Bergey's manual 등을 근거로 하여 분리된 균주를 *Vibro* 계열로 동정하였으며, *Vibro* sp. YE-101로 명명하였다.

HPLC를 이용한 TTX 분석

보다 정확한 TTX 생성능 확인 및 TTX 정성 분석을 위해 preparative scale로 TTX를 분리·정제하였는데, YE-101 균주를 27°C에서 3일간 5 L 정도 배양한 후 위에 제시되어 있는 과정으로 TTX를 분리·정제한 후 동결건조 시켰다. 동결건조 시킨 TTX는 알카리 처리 과정을 거쳐 C₉-base로 변화시켜 여기파장 380 nm와 형광파장 505 nm에서 형광검출기로 TTX 및 그 유도체를 검출할 수 있었다. TTX 표준품을 HPLC로 분석해보면, 4개의 peak가 검출되는데 이는 TTX 머무름 시간, (7.18 min) 및 그 유도체들이다. TTX는 tetrodonic acid (TDA), 4-epi TTX 및 anhydro TTX 등의 유도체를 가지고 있는데, 각각의 머무

름 시간은 4.56 min, 7.98 min 그리고 8.57 min이다 (Fig. 3 a). *Vibrio* sp. YE-101로부터 얻은 시료의 HPLC 분석 결과에서도 TDA, TTX 및 anhydro TTX peak 및 작은 농도의 4-epi TTX peak를 얻을 수 있었다. 표준품과 시료의 HPLC 분석에서 약간의 차이는 미생물에 따라 4-epi TTX의 함유 비율이 주로 변하며, 경우에 따라서는 peak로 잡히지 않는 경우도 있었다.

GC-MS를 이용한 TTX 분석

TTX의 C₉-base (M_w=191) 유도체는 quinazoline ring 구조에 두 개의 수산기 및 한 개의 아미노기를 가지고 있어 휘발성이 약해 GC-MS 분석이 용이하지 않으므로, 휘발성을 증가시키고 안정된 구조를 가지게 하기 위하여 우선 TMS-C₉-base 유도체로 바꾼 후 GC-MS 분석을 실시하였다. Fig. 4는 표준품 TTX의 C₉-base-(TMS)₃와 분리한 TTX 시료의 C₉-base-(TMS)₃에 대한 GC-MS 스펙트럼이다. C₉-base의 3개의 기능기를 TMS 유도체로 변화시키면 분자량은 407로 증가하게 되므로 m/e 407에서 molecular ion peak가 발생했고, m/e 392에서 base peak가 발생한 것을 볼 수 있었다. Base peak인 m/e 392는 유도체로부터 CH₃기가 떨어져 나간 peak ([M-CH₃]⁺)이며, m/e 147은 [(CH₃)₃Si-O-Si(CH₃)₃]⁺, 그리고 m/e 73은 [Si(CH₃)₃]⁺로부터

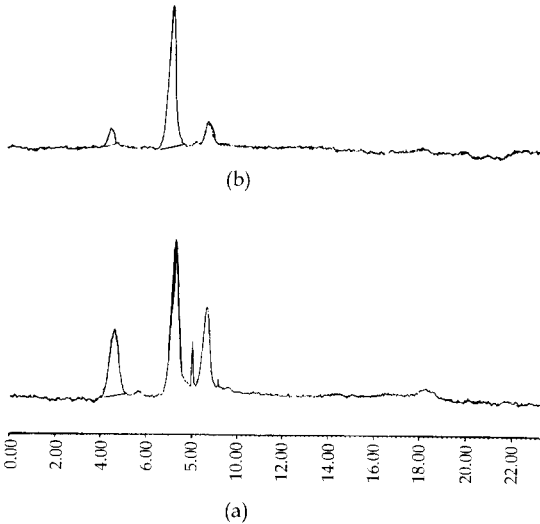
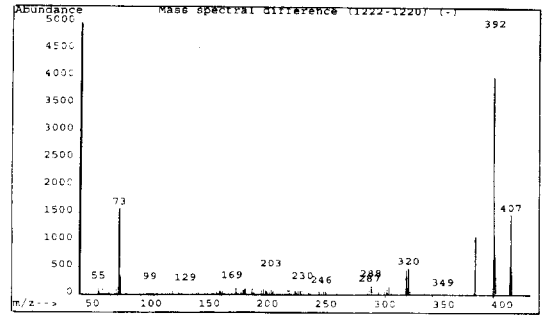
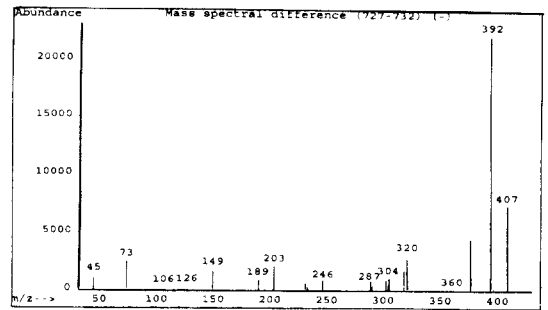


Fig. 3. HPLC analysis of authentic tetrodotoxin (a) and the isolated TTX from *Vibrio* sp. YE-101 cell (b).



(b)



(a)

Fig. 4. GC-MS analysis of authentic tetrodotoxin (a) and the isolated TTX from *Vibrio* sp. YE-101 cell (b).

터 나온 peak임을 확인할 수 있었다. 결과적으로 표준품 TTX의 GC-MS상에서의 fragmentation 형태와 미생물로부터 분리·정제한 TTX 시료의 fragmentation 형태가 동일하고, HPLC 및 mouse bioassay 결과로부터 신규로 분리·동정한 *Vibrio* sp. YE-101 균주가 TTX 생성능이 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

요 약

활어상태의 복어 내장에서 TCBS 배지를 이용하여 분리한 공생 미생물들을 3% NaCl이 포함된 ORI 배지에서 3일간 배양한 후, 세포 파쇄, 한외여과, Bio-Gel P-2 column 및 mouse bioassay를 거쳐 TTX 생성능이 있는 해양 미생물인 YE-101을 분리하였다. 스크리닝된 균주는 garm-negative rod 형태로 oxidase 활성이 있고 운동성이 있으며 3-8%(w/v) NaCl 농도에서 자랐으며 GC content는 약

42.5%로 분석되어 *Vibrio* sp. YE-101로 동정되었다. *Vibrio* sp. YE-101 순수배양액으로부터 분리·정제한 시료를 mouse bioassay, HPLC, GC-MS로 분석하여 TTX 생성능을 확인하였다.

감사의 글

본 논문은 한국학술진흥재단의 지원(과제번호: 1998-023-H00026)에 의하여 연구되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Arakawa, O., Y. Deguchi, K. Hashimoto, J. K. Jeon, T. Noguich, Y. Shida and H. Sugita. 1986. Occurrence of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin in *Vibro*. sp. isolated from the intestines of *Xanthid crab*, *Atergatis floridus*. *Biochem (Tokyo)*. **99**, 311-314.
2. Arakawa, O., Y. Deguchi, K. Hashimoto, D. F. Hwang, T. Noguchi, Y. Shida and H. Suigita. 1987. *Vibrio alginolyticus*, a tetrodotoxin-producing bacterium, in the intestines of the fish *Fugu vermicularis*, *Mar. Biol.* **94**, 625-630.
3. Arakawa, O., K. Hashimoto, A. Kungsuwan, T. Noguchi, Y. Shida, U. Simidu and K. Tsukamoto. 1988. Tetrodotoxin-producing bacteria from the horseshoe crab *Carcinoscorpius rotundicuda*. *Nippon Suisan Gakkaishi*. **54**, 1799-1802.
4. Arakawa, O., K. Hashimoto and T. Noguchi. 1989. Tetrodotoxin, with special reference to its origin and

- the mechanism involved in toxification of puffers. *J. Food Hyg. Soc. Jpn.* **30**, 281-288.
5. Endo, A., Y. Kotaki, T. Michishita, T. Yasumoto, D. Yasumura and M. Yotsu. 1986. Bacterial production of tetrodotoxin and anhydrotetrodotoxin. *Agric. Biol. Chem.* **50**, 793-795.
6. Endo, A., Y. Meguro, M. Murata, H. Naoki, T. Tamazaki, T. Yasumoto and M. Yotsu. 1987. Production of tetrodotoxin and its derivatives by *Pseudomonas* sp. isolated from the skin of a puffer-fish. *Toxicon*. **25**, 225-228.
7. Hashimoto, K., D. F. Hwang, T. Noguchi, Y. Shida and U. Simidu. 1987. Marine bacteria which produce tetrodotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1714-1715.
8. Kao, C. Y. 1966. Tetrodotoxin, saxitoxin, and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev.* **18**, 997-1049.
9. Kita-Tsukamoto, K., U. Simidu, T. Yasumoto and M. Yotsu. 1990. Taxonomy of four marine bacterial strains that produce tetrodotoxin. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **40**, 331-336.
10. Kotoku, S. and K. Suenaga. 1980. Detection of tetrodotoxin in autopsy materials by gas chromatography. *Arch. Toxicol.* **44**, 291-297.
11. Michishita, T. and T. Yasumoto. 1985. Fluorometric determination of tetrodotoxin by high performance liquid chromatography. *Agric. Biol. Chem.* **49**, 3077-3080.
12. Moore, J. W., T. Narahashi and T. I. Shaw. 1967. An upper limit to the number of sodium channels in nerve membrane. *J. Physiol.* **188**, 99-105.