

복어 장내에서 분리한 신규 해양 미생물을 이용한 Tetrodotoxin 생산

윤성준 · 송성광 · 이명자¹ · 정동윤¹ · 김희숙 · 김동수 · 이은열*

경성대학교 공과대학 식품공학과
¹서울식품의약품안전청 시험분석실

Production of Tetrodotoxin Using Novel Marine Microorganism Isolated from Intestine of Pufferfish

Sung-Jun Yoon, Sung-Kwang Song, Myung-Ja Lee¹, Dong-Youn Jeong¹,
Hee-Sook Kim, Dong-Soo Kim, Eun Yeol Lee*

Department of Food Science and Technology, College of Engineering, Kyungshung University, Pusan 608-736, Korea
¹Test and Analytical Lab., Seoul Regional Food and Drug Administration, Seoul 135-090, Korea

Abstract

The production of tetrodotoxin (TTX) using *Vibrio* sp. YE-101, a novel marine microorganism isolated from the intestine of pufferfish, was investigated. Culture condition was optimized for the enhanced production of TTX using response surface methodology. The experimental sets of environmental conditions including pH, temperature and NaCl concentration were designed using central composite experimental design. The optimal conditions of pH, temperature and NaCl concentration were determined to be 8.1, 29.2°C, and 2.6 % (w/v), respectively. The relative growth extent could be enhanced up to 80%, and final mouse unit (MU) value of TTX was also enhanced up to 87% by response surface optimization.

Key words – Tetrodotoxin, *Vibrio* sp. YE-101, Mouse bioassay, Response surface analysis

서 론

복어독 (tetrodotoxin, TTX)은 5,000-6,000 MU(mouse unit)/mg 정도의 비독성을 가지는 대표적인 신경마비 독소이다[5]. TTX는 치명적인 독성으로 인하여 단순히 위험 물질로만 인식되어 오다가, 신경 생명과학의 발전과 더불어 신경전달 메카니즘 연구를 위한 고가의 생화학시약으로 그

수요가 증가되고 있다[1]. 최근에는 말기 암 환자용 진통제, 류마치스형 관절염 치료제, 근육 국소 이완제 등의 새로운 신약 개발을 위한 선도화합물로서의 가능성도 부각되고 있어 고가의 TTX를 효율적으로 생산할 수 있는 적절한 기술 개발이 요구되고 있다. 지금까지 TTX는 복어 폐기물로부터 직접 분리·정제하는 방법으로 제조되어 왔으나[4], 품질관리가 보다 용이한 생물공학적 생산방법 등의 새로운 제조 기술 개발이 필요하다.

복어를 포함하여 독성이 있는 해양 생물체의 기생 세균들을 대상으로 한 일련의 연구 결과 *Vibrio alginolyticus* 등

*To whom all correspondence should be addressed
Tel: 051-620-4716, Fax: 051-622-4986
E-mail: eylee@star.kyungshung.ac.kr

의 해양 미생물들로부터 TTX 및 관련 유도체인 anhydro TTX 생성능이 확인되었다[2,3,7,9]. *Vibrio* 계열뿐만 아니라 *Photobacterium* sp., *Aeromonas* sp., *Pseudomonas* sp. 등에서도 TTX 생성능이 확인되었다[12]. 따라서 이들 해양 미생물을 이용한 TTX의 생물공학적 생산의 가능성이 제기되고 있다. 그러나 국내에서는 TTX를 생성할 수 있는 해양 미생물의 분리·동정 및 이를 이용한 생물공학적 TTX 생산에 대한 연구가 미흡한 편이다. 또한, 기존에 보고된 해양 미생물에 의한 TTX 생성에 대한 연구들도 단순히 TTX 생성 여부 정도만을 확인하는 수준에 머무르고 있는 실정이다. TTX가 현재에는 생화학 시약으로만 사용되고 있지만 주름살 제거를 위한 안면 근육 국소마취제로도 응용되는 등 새로운 가능성이 밝혀지고 있으므로 해양 미생물을 이용한 TTX의 생물공학적 생산에 대한 연구는 의미가 있다. TTX의 효율적 생산을 위해서는 다량의 균체량 확보를 위한 배양 조건의 최적화가 중요하다. 주요 배양 조건들이 독립 변수로서 복잡한 상호 작용을 할 수 있으므로, 배양 조건의 변화가 세포 성장에 미치는 영향에 대해 반응 표면 분석법(response surface analysis)을 이용해 최적화시키는 연구가 많이 진행되어 왔다[11]. 반응 표면 분석을 위한 실험 계획법으로는 중심합성계획법(central composite design)이 주로 사용되는데, 요인 배치법보다 훨씬 적은 양의 실험회수를 가지며 기존의 회귀모형에 오류가 있는 경우 기존 실험치에 새로 구한 실험값만 추가시키면 된다는 장점 등이 있기 때문이다[10]. 따라서 본 연구에서는 해양 미생물을 이용한 생물공학적 TTX 생산을 위한 기초를 마련하고자 국내에서 유통되고 있는 활어 상태의 복어 내장으로부터 신규로 분리한 TTX 생성능이 있는 *Vibrio* sp. YE-101에 대하여 반응표면 분석법을 이용하여 배양 조건 최적화를 실시하여 보다 효율적인 TTX 생산을 시도하였다.

재료 및 방법

복어 장내 기생 미생물의 배양

TTX 생성능이 있는 해양 미생물 *Vibrio* sp. YE-101은 3% NaCl이 첨가된 nutrient 한천 평판에서 계대배양했고, TTX 생산을 위한 액체 배양은 ORI 기본배지(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)를 사용하

여 23°C에서 48 시간 진탕 배양하였다[8].

Mouse bioassay

TTX 독성시험은 일본 후생성 표준법인 mouse bioassay 법을 이용하였다[6]. 파쇄한 미생물 균체에 0.1% 초산 용액 25 ml를 넣고 가열하여 충분히 독소를 추출한 후 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 30 분 이내에 치사시킬 수 있는 TTX 양을 의미한다.

탄소원, pH, NaCl 농도 및 배양온도의 영향

Vibrio sp. YE-101 균체 배양을 위한 탄소원의 영향을 살펴보기 위하여 기존 문헌치의 최적 배양 조건인 pH 8, 5%(w/v) NaCl 및 27°C에서 48시간 배양 한 후 600 nm에서 optical density (O.D.)를 측정하였다. pH, NaCl 농도 및 배양온도는 5~9, 1~9%(w/v), 19~35°C로 각각 조절한 후 O.D.를 측정하여 그 영향을 분석하였다.

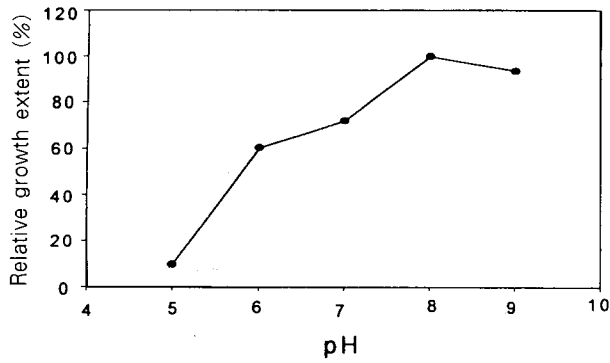
발효조 운전

TTX 생산을 위한 *Vibrio* sp. YE-101 균체 배양은 5 L 발효조(KFC-5L, 한국발효기, 한국)를 이용하였으며, 반응표면 분석을 통해 얻은 최적 배양조건에서 배양을 실시하였고 교반속도는 300 rpm을 유지하였다.

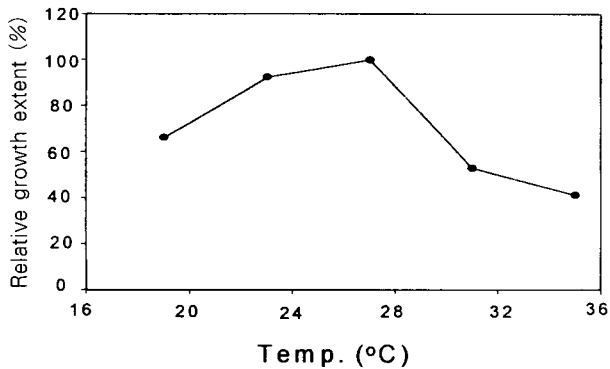
결과 및 고찰

탄소원, pH, 배양 온도, NaCl 농도의 영향

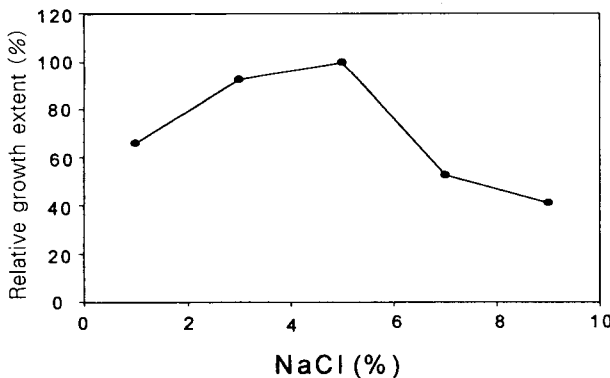
ORI 기본 배지의 탄소원인 citrate 이외에 glucose, acetate, lactate를 탄소원으로 사용하여 *Vibrio* sp. YE-101을 배양한 결과, citrate 보다는 glucose를 5.0 g/L로 첨가해준 경우 가장 높은 균체 성장을 보여 glucose를 기본 탄소원으로 사용하기로 하였다. pH 변화에 따른 *Vibrio* sp. YE-101의 성장을 살펴 본 결과 pH 8.0에서 균체의 생장이 가장 좋은 것으로 확인되었다 (Fig. 1 (a)). 약알칼리성에서 균체의 생장이 좋은 반면, 산성 조건에서는 균체 성장능이 억제됨을 알 수 있었다. YE-101 증식에 미치는 배양 온도의 영



(a)



(b)



(c)

Fig. 1. Effect of pH (a), temperature (b), and NaCl concentration (c) on the relative growth extent of *Vibrio* sp. YE-101.

향을 살펴본 결과, 배양 온도 변화에 따른 생장의 영향은 그다지 크지 않음을 알 수 있었고, 실험 구간에서의 최적 온도는 약 27°C 정도였다 (Fig. 1 (b)). *Vibrio* sp. YE-101은 복어 장내에서 분리된 해양 미생물이므로 NaCl 농도가 균체 생장에 미치는 영향도 조사하였다. YE-101은 3.0~5.0%

(w/v) 범위의 NaCl 농도에서 생장이 가장 활발하였으며 7.0 % (w/v) 이상에서는 감소하는 경향을 나타냄을 알 수 있었다 (Fig. 1 (c)).

최적 배양조건 결정을 위한 실험 계획

중요 배양 조건인 NaCl 농도, pH, 배양 온도 등은 모두 요인변수로 서로 복합적인 상호 작용을 할 수 있으므로 이러한 배양 조건의 변화가 균체 생장에 미치는 영향을 반응 표면 분석법을 이용하여 분석하고 최적 배양 조건을 결정하기로 하였다. 배양 조건에 따른 균체 생장의 반응표면이 곡면으로 표현될 것으로 예상되어 2차 회귀모형을 사용하기로 하였으며, 반응 표면 분석을 위한 실험 계획법으로는 중심합성계획법을 사용하였다. 세 개의 요인변수인 NaCl 농도, pH, 배양 온도를 -2, -1, 0, 1, 2의 다섯 단계로 부호화하고 여섯 개의 축점을 포함하여 Table 1과 같은 실험 level을 결정하고 15가지 종류의 실험점을 구성하였다. 중심점은 (0, 0, 0), 축점은 (- α , 0, 0), (α , 0, 0), (0, - α , 0), (0, α , 0), (0, 0, - α), (0, 0, α)로 설정하였고, 8개의 요인 실험점으로는 (-1, -1, -1), (-1, -1, 1), (-1, 1, -1), (-1, 1, 1), (1, -1, -1), (1, -1, 1), (1, 1, -1), (1, 1, 1)을 사용하였다. 세포 배양과 각 조건과의 관계를 결정짓기 위한 2차 회귀 모형은 다음과 같은 식을 사용하였다.

$$y = \beta_0 + \beta_1X_1 + \beta_2X_2 + \beta_3X_3 + \beta_{12}X_1X_2 + \beta_{13}X_1X_3 + \beta_{23}X_2X_3 + \beta_{11}X_1^2 + \beta_{22}X_2^2 + \beta_{33}X_3^2 \quad (1)$$

여기서 y는 세포 배양액의 O.D. 값이며 X_1 , X_2 , X_3 는 각각 pH, 배양 온도, NaCl 농도이며 β_0 는 절편, β_n 은 2차 회귀 계수이다.

중심합성법에 의한 표면반응 분석

위에 제시되어 있는 각각의 실험점에서 3번의 반복 실험

Table 1. Levels of culture conditions in experimental design for the cultivation of *Vibrio* sp. YE-101

β_n	Culture conditions	Level				
		-2	-1	0	1	2
β_1	pH	6	7	8	9	10
β_2	Temperature(°C)	19	23	27	31	35
β_3	NaCl(%)	1	3	5	7	9

험을 통해 얻은 결과를 산술 평균하여 실험 데이터를 구하였으며 (Table 2), SAS (Statistical Analysis System) 프로그램을 이용하여 반응표면 분석을 실시하였다. O.D.를 나타내는 반응변수 y 에 대한 표면반응 분석 결과, R-square 값이 0.9795로서 요인변수인 pH, 배양 온도, NaCl 농도에 따른 세포배양액의 O.D. 변화가 잘 설명될 수 있음을 알 수 있었다. 또한, 각각의 요인 변수의 변화에 따른 반응변수인 O.D.의 반응표면은 2차 회귀 분석을 통해 다음과 같이 결정할 수 있었다.

$$y = 1.6659 + 0.3561X_1 + 0.1651X_2 - 0.2474X_3 + 0.0290X_1X_2 - 0.0305X_1X_3 + 0.0352X_2X_3 - 0.1851X_1^2 - 0.1387X_2^2 - 0.1077X_3^2 \quad (2)$$

해양 미생물 배양에서의 요인변수인 pH, 온도, NaCl 농도가 균체 성장에 미치는 영향의 상대적 중요성을 알 수 있는 F-ratio 값에 대한 분산 분석을 실시한 결과, pH의 F-ratio 값이 28.138로 가장 높게 나와 *Vibrio* sp. YE-101의 생장은 pH에 의해 가장 많은 영향을 받고 있음을 알 수 있었다 (Table 3). 그 다음으로는 NaCl 농도, 배양온도 순

Table 2. Experimental data of optical density of *Vibrio* sp. YE-101 cultivated under the different culture conditions

Exp. No.	Culture conditions			Data value
	pH	Temp. (°C)	NaCl conc. (%(w/v))	
1	7	23	3	1.056
2	9	23	3	1.763
3	7	31	3	1.172
4	9	31	3	1.953
5	7	23	7	0.626
6	9	23	7	1.169
7	7	31	7	0.841
8	9	31	7	1.569
9	8	27	5	1.604
10	6	27	5	0.153
11	10	27	5	1.636
12	8	19	5	0.643
13	8	35	5	1.517
14	8	27	1	1.752
15	8	27	9	0.656

Table 3. Analysis of variance for regression model

Culture condition	F-Ratio	Prob > F
pH	28.138	0.0035*
Temperature (°C)	7.315	0.0399**
NaCl (%(w/v))	13.385	0.0138**

Significant at *1 % level and **5 % level.

서였으며, 각 인자들은 유의수준 10 %이내에서 유의성이 인정됨을 알 수 있었다.

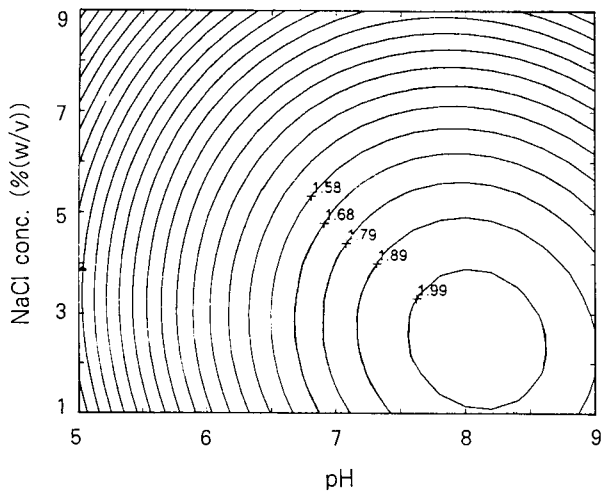
Vibrio sp. YE-101 배양 최적 조건 결정

배양 조건인 pH, 온도, NaCl 농도에 따른 *Vibrio* sp. YE-101 균체 성장에 대한 반응 표면 회귀식은 stationary point를 가지고 있었으며, 이 값에서 반응변수인 O.D. 값이 최대가 될 것으로 예측되었다. 최대의 균체 성장을 주는 최적 배양조건은 pH 8.1, NaCl 농도 2.6 %(w/v) 및 온도 29.2°C로 결정되었으며, 이 때의 O.D. 값은 2.0 이었다.

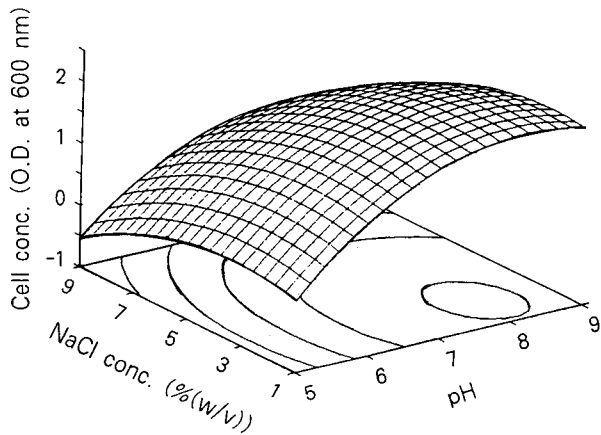
독립변수 중 F-ratio 값이 가장 적어 균체 배양에 가장 적은 영향을 주는 변수인 온도를 28.1°C로 정하고, pH와 NaCl 농도에 따른 O.D. 값 변화를 살펴보기 위하여 contour plot을 실시하였다. Fig. 2 (a)에서와 같이 1.99 정도의 O.D. 값을 주는 pH 영역은 7.6 - 8.7 사이이고 NaCl 농도는 1.2 - 3.9 %(w/v) 범위임을 알 수 있었다. 같은 조건에서 반응 표면 회귀식을 이용하여 pH와 NaCl 농도에 따른 O.D. 값의 변화에 대한 3차원 반응표면을 Fig. 2 (b)에서 나타내고 있다. 기존 문헌치의 배양 조건에서는 균체 배양 결과치와 비교해보면, 최적 pH 범위는 유사하였으나 NaCl 농도의 경우 반응 표면 분석 결과치가 다소 낮은 범위에서 높은 농도의 균체를 얻을 수 있음을 알 수 있었다.

Vibrio sp. YE-101 회분식 배양 및 TTX 생산

반응표면분석을 통해 얻은 최적 배양조건에서 *Vibrio* sp. YE-101를 회분 배양하고 TTX 생성을 측정하였다. Fig. 3에서와 같이 *Vibrio* sp. YE-101의 균체 성장과 TTX 생성과의 관계는 전형적인 이차대사산물의 생성 형태라기보다는 혼합 산물 생산 형태를 보이고 있어, TTX의 생성능이 있는 다량의 균체 확보를 위한 배양 조건 최적화가 중요함을 확인할 수 있었다. 기존 조건에서의 균체 배양시 성장 지연기가 약 12시간 정도를 보였으나, 반응표면 분석을 통해 얻은 최



(a)



(b)

Fig. 2. Contour map (a) and response surface (b) of optical density with respect to pH and NaCl concentration.

적 조건에서는 약 3시간 정도의 지연기를 거친 후 대수 성장기에 접어들고 있음을 관찰 할 수 있었다. 최종 O.D. 값은 약 2.3 정도로 반응표면분석법에서 예측한 값과 유사하였다. 이와 같이 반응표면 분석법을 이용한 배양 조건 최적화를 통해 기존 결과 대비 최종 O.D. 값을 약 80% 증가시킬 수 있었고, 최종 O.D. 값에 도달되는 시간도 반 정도로 줄일 수 있었다. TTX도 균체 생장이 대수 성장기를 거치면서 생성되기 시작하였으며, 균체 농도가 높아짐에 따라 생성된 TTX의 양도 증가되어 약 87% 정도 향상된 결과를 얻을 수 있었다.

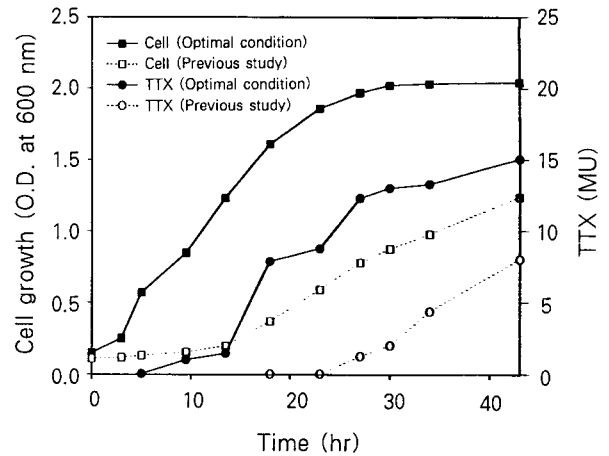


Fig. 3. Batch cultivation of *Vibrio* sp. YE-101 under the optimal condition determined by response surface analysis.

요 약

본 연구에서는 복어 장내에서 분리하여 TTX 생성능이 확인된 해양 미생물인 *Vibrio* sp. YE-101의 배양 조건 최적화를 실시하였다. 주요 배양 조건인 pH, 온도, NaCl 농도에 대하여 중심합성계획법을 이용하여 실험점을 결정하였고, 각 조건에서 얻은 실험치를 quadratic least-square regression을 실시하여 최적 배양 조건을 결정하였다. 최적 pH, 온도, NaCl 농도는 각각 8.1, 29.2°C, 2.6 %(w/v)로 결정되었으며, 이 조건에서 균체 배양을 실시한 결과 기존 실험치 대비 최종 O.D. 값이 약 80% 정도 증가되었다. 또한, 생성된 최종 TTX 농도도 약 15 MU 정도로 약 87% 정도 증가시킬 수 있었다.

감사의 글

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

참고 문헌

1. 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.
2. 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.
 3. 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 pufferfish. *Toxicon.* **25**, 225-228.
 4. Hwang, D. F., T. Noguchi, O. Arakawa, T. Abe and K. Hashimoto. 1988. Toxicological studies on several species of puffer in Taiwan. *Nippon Suisan Gakkaishi.* **54**, 2001-2008.
 5. Kao, C. Y. 1966. Tetrodotoxin, saxitoxin, and their significance in the study of excitation phenomena. *Pharmacol. Rev.* **18**, 997-1049.
 6. Kawabata, T. 1978. Assay method for tetrodotoxin, pp.232-240, In Food hygiene examination manual, Vol. 2, Japan Food Hygiene Association. Tokyo.
 7. 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.
 8. Matsumura, K. 1995. Reexamination of tetrodotoxin production by bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 3468-3470.
 9. Miyazawa, K., M. Higashiyama, K. Hori, T. Noguchi, K. Ito and K. Hashimoto. 1987. Distribution of tetrodotoxin in various organs of the starfish *Astropecten polyacanthus*. *Mar. Biol.* **96**, 385.
 10. 박성현. 1990. 현대실험계획법. pp.575-625, 민영사.
 11. Mudahar, G. S., R. T. Toledo, J. D. Floros and J. J. Jen. 1989. Optimization of carrot dehydration process using response surface methodology. *J. Food Sci.* **54**, 714-719.
 12. Shida, Y. and K. Hashimoto. 1987. Marine bacteria which produce tetrodotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 1714-1715.