

韓國産 主要貝類에 대한 毒의 分布, 特性 및 除毒에 관한 研究 2. 진주담치에서 抽出한 PSP의 分離, 精製 및 特性에 관하여

張 東 錫 · 申 逸 湜 · 趙 鶴 來 · 朴 美 蓮 · 卞 在 亨* · 朴 榮 浩**
釜山水産大學 微生物學科

Studies on Distribution, Characterization and Detoxification of Paralytic Shellfish Poison (PSP) in Korea 2. Purification and Characterization of PSP Extracted from Cultured Sea Mussel, *Mytilus edulis*

Dong-Suck CHANG, Il-Shik SHIN, Hak-Rae CHO, Mi-Yeun PARK,
Jae-Hyeung PYEUN*, and Yeung-Ho PARK**
Department of Microbiology, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea

The Stability of PSP extracted from the intoxicated sea mussel, *Mytilus edulis* was evaluated by the change of heating conditions and pH of the PSP solution. Also the composition of the PSP extracted from the cultured sea mussel collected at Chungmu, Korea on March 12, 1986 was analyzed.

The extracted PSP was stable over the range of pH 2.0 to 4.0, but it was unstable above pH 4.5. For example, the toxicity of extracted PSP of pH 3.0 was only decreased less than 20% by the treatment at 121°C for 15min or at 100°C for 2 hours, but it was decreased more than 80% by the same treatment when the pH of the PSP solution was adjusted to 6.0.

The toxin was purified from the ethanolic extract of the digestive glands of the sampled sea mussel by Bio-gel P-2 and Bio-Rex 70 column chromatography. The toxic fractions obtained were analyzed by cellulose acetate membrane electrophoresis, TLC and HPLC.

The compositional analytical results of the PSP, most of the toxins were certified as GTX_{1,4}, while the toxicity of STX was only about 1/40 of that of GTX_s.

緒 論

麻痺性貝類毒(Paralytic shellfish poison, PSP)은 美國, 캐나다, 日本 등 세계 여러나라에서 널리 研究되고 있으며, 우리나라 南海岸에서 生産되고 있는 굴, 진주담치, 바지락, 피조개, 대합, 꼬막 등 主要貝

類 13種 506試料에 대한 貝類毒 分布調査 結果, 地域에 따라 다소 차이가 있었으나 2月과 5月 사이에 진주담치에서 檢出頻도가 제일 높은 것으로 밝혀졌다(張 등, 1988). 1986년에는 釜山 甘川灣 廢船底部에 부착되어 있던 진주담치를 먹고 人命被害 事故가 발생한 바도 있으며 養殖産 진주담치에 있어서

* 釜山水産大學 食品營養學科
(Department of Food and Nutrition, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea)

** 釜山水産大學 食品工學科
(Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea)

는 美國의 規制値(貝類肉 100g당 PSP가 80 μ g) 이상 이 檢出되는 試料도 3月에는 종종 나타나고 있어서 國民保健 衛生上 중요한 관심사로 여겨지고 있다. PSP는 構成成分上 saxitoxin (STX) 群과 gonyautoxin (GTX) 群으로 나누어 지며, STX, GTX₃ 등은 5,000MU/mg의 높은 毒性을 가지고 있는데 밝혀진 種類만도 10가지가 넘는다(野口, 1983). 毒化한 貝類로 부터 鹽酸으로 抽出된 PSP는 pH 2.0~4.0의 범위에서는 매우 安定하며 알카리측으로 갈수록 不安定하고 그 耐熱性도 약하여진다고 報告한 바 있다(Kawabata et al., 1962; 淺川·高本, 1983).

麻痺性貝類毒의 特性이나 成分組成에 관한 研究는 外國의 경우 Shimizu et al. (1978), Hau et al. (1979), Onoue et al. (1980, 1981), 野口 등 (1981), Kotaki et al. (1981, 1983), 淺川 등 (1986), Sullivan et al. (1985), Hwang et al. (1987) 등 많은 研究報告가 있으나 우리나라의 경우 감천만에서 中毒事故를 일으킨 진주담치에서 麻痺性貝類毒을 抽出하여 그 毒力이나 毒의 組成을 밝힌 張 등 (1987)의 研究 외에는 거의 報告가 없는 실정이다.

本 研究에는 韓國產 主要貝類中에서 麻痺性貝類毒으로 深하게 毒化된 진주담치를 試料로 택하여 抽出한 毒素으로써 pH, 加熱處理條件에 따른 毒性의 變化를 測定하고, 抽出한 毒素을 分離精製하여 electrophoresis, thin layer chromatography (TLC), high performance liquid chromatography (HPLC)로 분석한 結果를 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 試料

加熱이나 pH의 變化에 따른 毒性의 變化를 測定한 試料는 1986年 3月 釜山에서 人命被害事故의 原因이 되었던 自然產 진주담치와 1986年 3月 12日 忠武에서 採取한 養殖產 진주담치였는데 그 毒力은 전자는 2,640 μ g/100g of edible meat이었고, 후자의 경우는 175 μ g/100g of digestive gland이었다.

2. 標準毒素 및 實驗動物

標準貝類毒은 日本 東京大學 水産化學研究室에서 분양받은 GTX₃, STX₃를 使用하였으며 實驗動物은 體重 18~20g 되는 ICR계 mouse 숫컷을 使用하였다.

3. 毒素의 抽出 및 毒性檢査

毒素의 抽出 및 動物試驗을 통한 毒性檢査는 張 등 (1988)이 報告한 前報에 準하였다.

4. 加熱에 의한 抽出毒素의 毒力變化

毒化된 진주담치에서 抽出한 毒素을 screw cap tube에 分注한 다음 高壓蒸氣滅菌器에서 121 $^{\circ}$ C에 도달한 후 5分, 10分, 15分씩 加熱處理하여 對照區와 비교 검토하는 한편 같은 방법으로 100 $^{\circ}$ C에서 5分, 30分, 60分, 120分間 加熱한 다음 動物試驗을 통하여 毒性의 變化를 測定하였다.

5. pH에 따른 耐熱性的 變化

抽出된 PSP 溶液을 10ml씩 分注하여 HCl과 NaOH로 pH를 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 4.5, 5.0, 6.0으로 調整하여 모두 같은 量이 되도록 調整한 다음 高壓蒸氣滅菌器에서 15分間 處理하여 動物試驗을 통하여 毒性의 變化를 測定하였다.

6. 毒素의 分離 및 精製

毒素의 分離 및 精製는 Noguchi et al. (1981)에 準하였는데 精製過程은 Fig. 1과 같다.

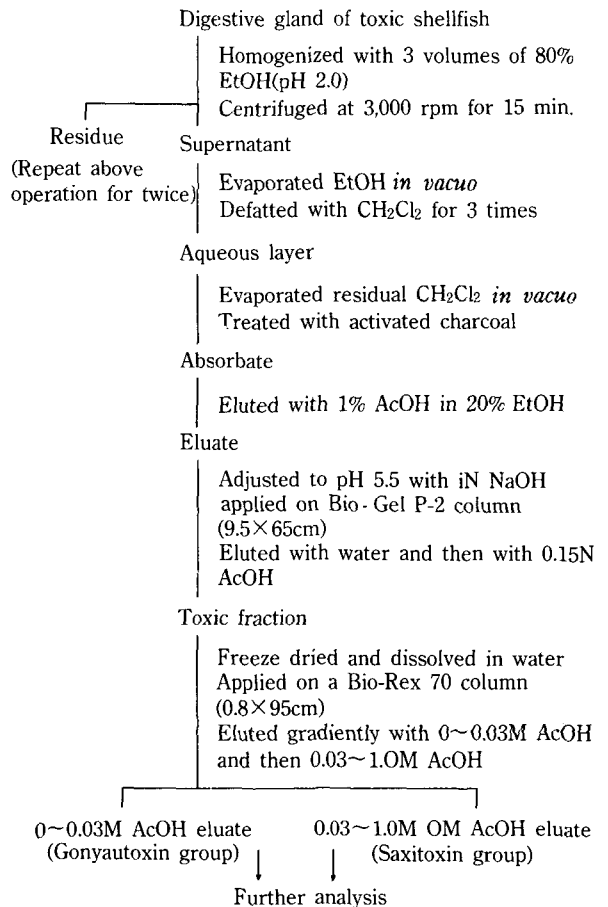


Fig. 1. Purification procedure for the paralytic shellfish toxin.

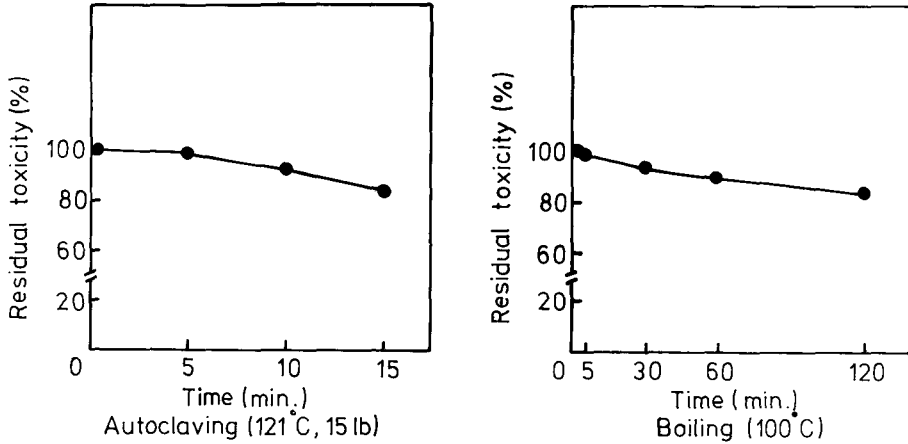


Fig. 2. Effect of heat treatment on the toxicity of extracted PSP.

動物試驗을 통하여 毒性이 강한 진주담치를 選別한 다음 이를 貝類의 中腸腺을 取하여 pH 2.0으로 調整된 80% ethanol을 3倍量 加하여 homogenize 한 다음 遠心分離하여 上澄液을 取하고 眞空濃縮機에서 ethanol을 除去하였다. 그리고 다시 CH₂Cl₂를 써서 分液漏斗로써 脂肪除去 작업을 여러번 되풀이하여 毒素를 모아서 活性炭素處理, Bio-Gel P-2 column에서 分劃하여 毒性이 강한 劃分을 모아서 眞空濃縮하고 다시 Bio-Rex 70 column으로 處理하였는데 이 때 GTX群은 0~0.03M 酢酸으로 線形狀 濃度勾配法으로 溶離시켰으며 STX群은 0.03~1.0M 酢酸으로 分劃하여 各群에서 毒性을 나타내는 劃分을 捕集 濃縮하여 電氣泳動, TLC 및 HPLC의 各 分析用試料로 하였다.

7. 電氣泳動 (Electrophoresis)

電氣泳動은 5×18cm cellulose acetate strips (chemotron, Italy)를 썼으며 0.9mA/cm로 30分 실시한 다음, 冷風으로 말리고 다시 1% H₂O₂를 噴霧하여 110°C에서 5分間 加熱處理한 후 365nm의 U.V. light 하에서 관찰하여 毒의 組成을 확인하였다.

8. Thin Layer Chromatography

TLC 分析은 10×10cm Whatman LPH-K plate를 썼으며 展開溶媒는 pyridine-ethylacetate-acetic acid-water (15:5:3:4)를 사용하였다. 이때 TLC plate는 使用前에 110°C에서 5分間 加熱한 다음 U.V. light 하에서 관찰하였다.

9. High Performance Liquid Chromatography

PSP의 HPLC 分析은 Hitachi HPLC 638-50에 650-

10M fluorescence spectro-photometer를 연결하여 使用하였다. 1% methanol-0.05M potassium phosphate (pH 7.0)에 2mM heptane sulfonic acid를 加한 것을 ion pairing reagent로 쓰고 反應液은 0.05M periodic acid와 2N KOH-2.5M ammonium formate formamide (1:4:5)를 使用하였다.

結果 및 考察

1. 加熱에 의한 PSP의 毒力變化

毒化된 진주담치에서 抽出한 PSP에 대한 加熱의 影響을 調査한 結果는 Fig. 2와 같다.

鹽酸 抽出法으로 얻어진 PSP毒素는 pH 3.0 附近인데 121°C에서 autoclaving하였을 때 毒性의 變化는 크지 않았다. 즉, 5分 處理한 경우 2%, 10分 處理하였을 경우에는 7%, 15分間 處理에서는 約 15%가 減少하였다. 한편 같은 毒素溶液을 100°C에서는 2시간까지 加熱하여도 16% 정도 밖에 減少하지 않았다. 즉 抽出된 PSP 溶液은 pH 3.0 附近에서 121°C, 15分 處理나 100°C에서 2시간까지 加熱處理하여도 그 減少率은 加熱前 毒性의 20%에도 未達되어 酸性溶液에서는 熱에 安定함을 알 수 있었다.

이러한 結果는 Kawabata et al. (1962) 이 毒化된 生貝類를 물에 굽거나 튀겨서 먹어도 中毒이 된다고 報告한 結果와 一致하였다.

2. pH에 따른 耐熱性的 變化

PSP가 가장 安定한 pH인 3.0을 對照區로 하여 pH變化에 따른 毒性의 變化를 調査한 結果는 Fig.

3과 같다.

즉, 진주담치에서 抽出한 PSP 溶液의 pH를 調整한 후, 121°C에서 15分間 autoclaving 하였을 때 毒性의 變化는 pH 2.0과 4.0에서는 對照區에 比하여 各各 8%, 10%의 다소 낮은 減少率을 보인 반면 pH 4.5이상에서는 急激히 減少하여 pH 6.0의 경우에는 約 80%의 높은 감소율을 보였다.

이상의 結果로 볼 때 진주담치의 PSP 毒素의 pH 3.0에서 가장 安定하고, pH 2.0~4.0에서는 比較의 安定하나 pH 4.5 이상에서는 不安定한 것을 알 수

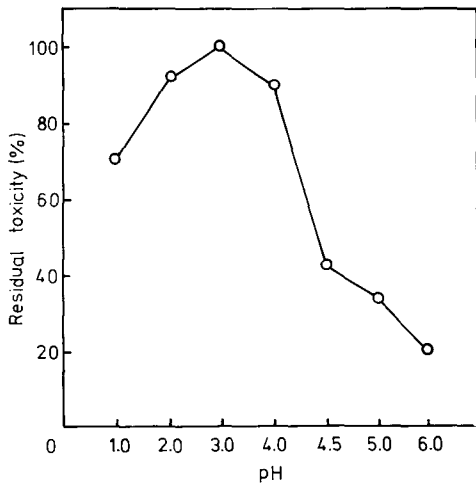


Fig. 3. Change in toxicity of extracted PSP in autoclaving at 121°C for 15min. by the pH of the solution.

있었다. 그리고 家庭에서 진주담치를 料理할 때는 中性附近에서 끓이게 되므로 毒素의 파괴가 많을 것으로 思料되는데 家庭의 一般 調理法으로는 毒素가 쉽게 파괴되지 않는다고 報告한 Kawabata et al. (1962)의 報告와는 차이가 많다.

Buckly et al. (1976)은 *Gonyaulax tamarensis*에서 分離된 毒素를 pH 8.2, 93°C에서 30分間 加熱하였을 때 그 毒素가 파괴되었다고 報告하였으며, Kawabata et al. (1962)은 methanol로 抽出한 毒素溶液과 pH 7.0의 M/20 Sørensen phosphate buffer를 1 : 9로 섞어 試驗管에 넣어 加熱한 結果, 100°C, 60分間 加熱에서는 50%가 減少하였고, 120°C, 20分間 加熱하였을 때는 完全히 파괴되었다고 報告하였다. 또한 淺川·高木 (1983)는 非加熱條件에서도 pH 變化만으로 毒性이 6.0에서 40%, 7.0에서 47%, 8.0에서 53%가 減少하였고, pH 8.0, 110°C, 30分 加熱에서는 約 87%가 減少하였다고 報告하였는데 本 實驗의 結果도 이러한 結果들과 유사한 경향을 나타내었다.

PSP가 熱에는 比較的 安定하나 pH에는 매우 敏感하고, 특히 낮은 pH보다 높은 pH에서, 低温보다 高温에서 分解가 촉진되어 加熱條件보다는 pH가 毒素의 安定성에 깊은 關係가 있음을 알 수 있었다.

3. PSP의 分離 및 精製

PSP의 分離精製는 Fig. 1에서와 같이 Bio-Rex 70 column (0.8×95cm)에 mini-micropump (Kyowa Sumitsu Co, LTD Japan, KHU 52II)를 연결시켜 1ml/min의 流速으로 分割하였는데 그 結果는 Fig. 4와 같다.

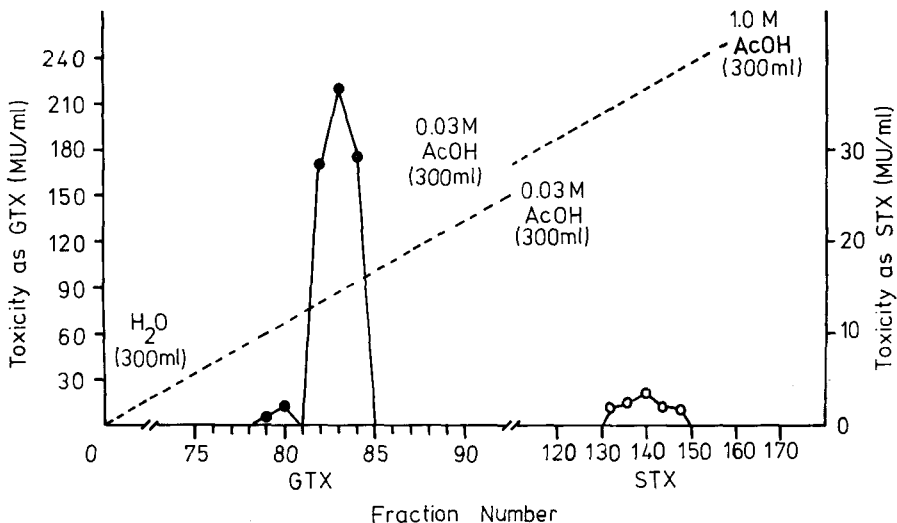


Fig. 4. Elution profile of *M. edulis* toxins from a Bio-Rex 70 column (0.8x96 cm).

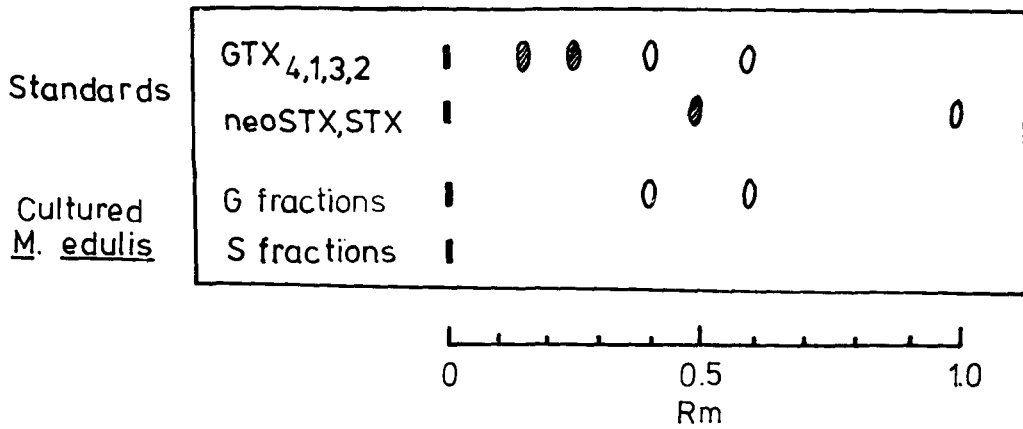


Fig. 5. Electrophoresis of *M. edulis* toxins fractionated with Bio-Rex 70 column, along with authentic toxins.

Electrophoresis was performed on 5×18cm width for 30min.

● : Greenish yellow fluorescence.

○ : Blue fluorescence.

G fraction : eluted in Bio-Rex 70 as GTXs.

S fraction : eluted in Bio-Rex 70 as STXs.

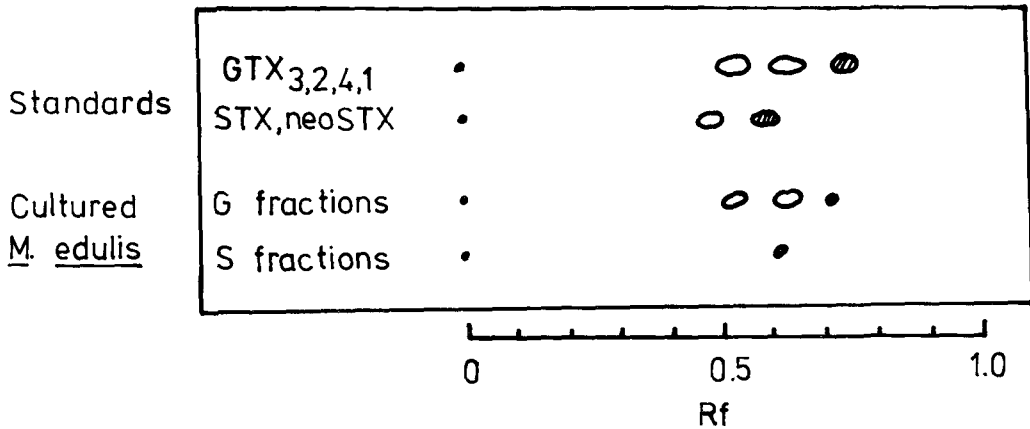


Fig. 6. Thin Layer Chromatography of *M. edulis* toxins.

TLC was performed on silica gel LHP-X plate(Whatman) using a solvent system of pyridine-ethylacetate-acetic acid-water(15 : 5 : 3 : 4). Symbols are same in Fig. 5.

0~0.03M acetic acid로 分割하여 毒性 割分으로 확인된 fraction No. 79, 80, 82, 83, 84는 GTX 群이며, 0.03~1M acetic acid로 分割한 것은 STX 群인데, STX群은 Fig. 4에서 보는 바와 같이 GTX群에 비하여 微量이었으며, fraction No. 132~148까지 넓게 分布되어 있었다. 動物試驗 結果 GTX群은 STX群의 約 40배에 달하는 毒力을 가지고 있었다 (Fig.4).

그리고 Bio-Rex 70 column에서 溶出된 GTX群과 STX群을 다시 모아 眞空凍結乾燥시킨 뒤 電氣泳動, TLC, HPLC로 分析한 結果는 Fig. 5, 6, 7, 8과 같다.

電氣泳動 結果 Fig. 5와 같이, 標準 GTX群의 이동거리는 GTX 4, 1, 3, 2의 順이었고 STX群보다 이동거리는 짧았다. 그리고 U.V. light 하에서는 GTX 4, 1은 黃綠色을 띠고 GTX 3, 2는 靑色螢光을 나타

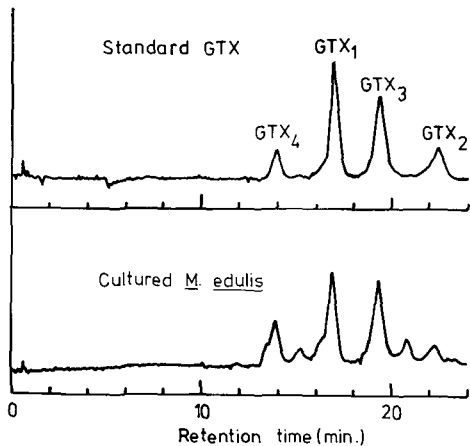


Fig. 7. HPLC pattern of toxic fractions of purified PSP extracted from cultured *M. edulis* (Fr. No. 79, 80 derived from Fig. 4).

내었다. 그리고 STX은 GTX 3, 2와 비슷한 靑色螢光을 내면서 鮮明하게 나타났다.

TLC分析에서는 GTX₃과 GTX₁의 R_f 値는 各各 0.52, 0.72이었으나 GTX₂와 GTX₄의 R_f 値는 0.64附近이었다. 本試料의 경우 TLC 分析에서 극히 微量이지만 電氣泳動에서는 나타나지 않은 neo-STX이 나타나기는 하였으나, 主成分은 GTX₁₋₄임을 알 수 있었고 (Fig. 6), HPLC 分析結果에서도 fraction number 79, 80의 경우는 GTX₁₋₄에 해당되는 peak가 나타났으나 (Fig. 7), fraction 82~84에서는 GTX_{2, 3}만이 鮮明하게 나타났다 (Fig. 8).

이로써 1986年 3月 12日 忠武에서 採取한 養殖産 진주담치의 PSP 主成分은 GTX₁₋₄임을 알 수 있었다.

張 등 (1986)에 의하면 1986年 3月 부산 감천만에 서 人命被害事故를 일으켰던 自然産 진주담치도 主成分이 GTX₁₋₄라고 報告하여 本實驗에 提供된 養殖産 진주담치의 毒素成分과 自然産 진주담치의 毒素成分은 一致하는 것으로 나타났다.

한편 日本沿岸에서 棲息하는 굴과 가리비의 경우는 STX群은 微量이고 GTX群이 主成分인 것으로 나타났고 (Onoue et al., 1981; Ueda et al., 1982), 또한 美國의 Alaska 地方에서 採取된 진주담치에서도 GTX群이 主成分인 것으로 나타나 本實驗의 結果와 一致하는 경향을 보였다.

한편, 小澤 (1985)에 의하면 毒素生成原因 플랑크톤에는 Protogonyautoxin (PX)이라는 低毒性 成分이 存在하며 毒素抽出 過程에서 酸分解에 의하여 PX₁이 GTX₁으로 PX₂는 GTX₃으로 바뀌고 毒性도 強하

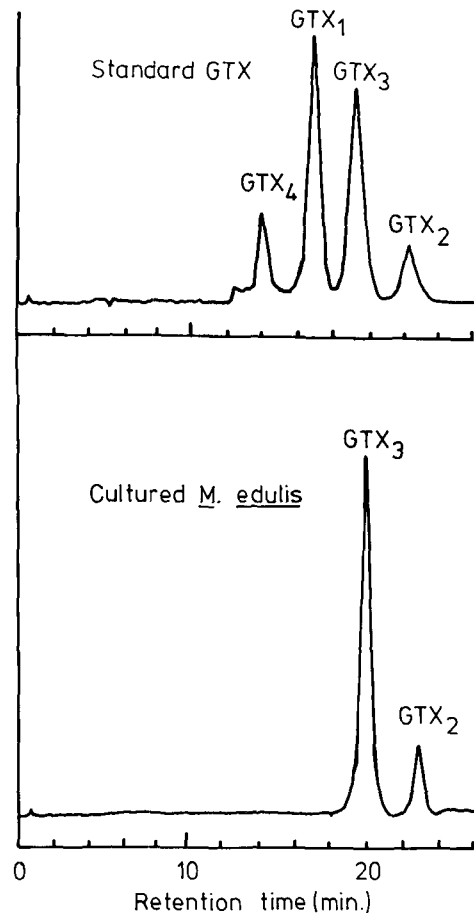


Fig. 8. HPLC pattern of toxic fractions of purified PSP extracted from cultured *M. edulis* (Fr. No. 82, 83, 84 derived from Fig. 4).

여진다고 報告하였다. 또한, 淺川 등 (1986)은 PSP 溶液을 加壓處理 (121°C, 15min)하여 毒素組成變化를 調査한 結果, GTX₁은 GTX₂로 GTX₃은 STX으로, GTX₁은 neo-STX을 거쳐 STX으로 變化된다고 推定 하였으며, GTX₅, GTX₈, GTX₈ epimer는 温和한 條件에 의하여 carbamoyl基에 結合하고 있는 SO₃가 離脫하여 GTX₅가 STX으로, GTX₈이 GTX₃으로 GTX₈의 epimer는 GTX₂로 各各 變換하고 그 毒性도 各各 約10倍 가량 上昇하는 것으로 報告하였다. 이들 成分은 通常 微量成分으로 存在하지만 食品加工의 경우 前處理, 加熱法 등에 의하여 最終生成物의 PSP總量, 組成 등이 현저히 變化하는 것으로 예상 되기 때문에 이들 成分에 대하여서도 계속적인 檢討가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

要 約

韓國 南海岸에서 生産되는 主要 貝類中에서 PSP 含量이 比較的 높은 진주담치를 試料로 擇하여 抽出한 毒素에 대한 pH變化和 加熱處理하였을때의 毒素의 安定性を 檢討하고, 抽出된 毒素을 活性炭素 處理, Bio-Gel P-2 및 Bio-Rex 70의 各 column chromatography로 分離精製하여 electrophoresis, TLC 및 HPLC로 分析한 結果는 다음과 같다.

1. 抽出된 PSP의 pH는 3.0부근이었으며 이 PSP를 121℃ 15분과 100℃로 2시간 處理하였을때 約 20%가 파괴되었다.
2. PSP는 121℃에서 15分 處理하였을 때 pH 2.0~4.0 범위에서는 安定하였으나 pH 4.5이상에서는 不安定하였으며 pH 6.0에서는 80%가 不活性化되었다.
3. 忠武 一圓에서 生産되는 養殖 진주담치에서 分離된 PSP는 主로 GTX 1, 2, 3, 4이었으며, STX群 毒素은 GTX群의 約 1/40에 不過하였다.

謝 辭

本 研究는 1985年度 前半期 韓國科學財團 IBRD 借款研究費 支援資金에 의하여 이루어졌음을 밝히며 아울러 感謝를 드립니다.

文 獻

Buckley, L. J., M. Ikawa and J. J. Sasner, Jr. 1976. Isolation of *Gonyaulax tamarensis* toxins from soft shell clams (*Mya arenaria*) and a thin-layer chromatographic-fluorometric method for their detection. J. Agric. Food Chem. 24(1), 107~111.

Hwang, D. F., T. Noguchi, Y. Nagashima, I. C. Liao and K. Hashimoto. 1987. Occurrence of paralytic shellfish poison in the purple clam, *Soletelina diphos* (bivalve). Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 53 (4), 623~626.

Hau, C. P., A. Marchand, Y. Shimizu and G. G. Sims. 1979. Paralytic shellfish toxins in the scallop, *Placopecten magellanicus*, in the bay of Fundy. J. Fish Res. Bd Can. 36, 32~36.

Kawabata, T., T. Yoshida and Y. Kubota. 1962. Paralytic shellfish poison-I, A note on the shellfish poisoning occurred in Ofunato city, Iwate Prefecture in May, 1961. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.

23(3), 344~351.

Kotaki, Y., M. Tajiri, Y. Oshima and T. Yasumoto. 1983. Identification of a calcareous red alga as the primary source of paralytic shellfish toxins in coral reef crabs and gastropods. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 49(2), 283~286.

Noguchi, T., Y. Ueda, K. Hashimoto and H. Seto. 1981. Isolation and Characterization of gonyautoxin-1 from the toxic digestive gland of scallop *Patinopeoton yessoensis*. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47(9), 1227~1231.

Onoue, Y., T. Noguchi, J. Maruyama, Y. Ueda, K. Hashimoto and T. Ikeda. 1981. Comparison of PSP composition between toxic oysters and *Protogonyaulax catenella* from Senzaki bay, Yamaguchi prefecture. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 47(10), 1347~1350.

Onoue, Y., T. Noguchi and K. Hashimoto. 1980. Studies on paralytic shellfish poison from the oyster cultured in Senzaki bay, Yamaguchi prefecture. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 46(8), 1031~1034.

Shimizu, Y., W. E. Fallon, J. C. Wokell, D. Gerber, Jr. and E. J. Gauglitz, Jr. 1978. Analysis of toxic mussels (*Mytilus* sp.) from the Alaskan inside passage. J. Agr. Food Chem. 26(4), 878~881.

Sullivan, J. J., J. Jonas-Davies and L. L. Kentala. 1985. The determination of PSP toxins by HPLC and autoanalyzer. "Toxic dinoflagellates", Anderson, D. M., A. W. White and D. G. Baden, ed. Elsevier Science Publishing. pp. 175~280.

Ueda, Y., T. Noguchi, Y. Onoue, K. Koyama, M. Kono and K. Hashimoto. 1982. Occurrence of PSP-infested scallops in Ofunato bay during 1976~1979 and investigation of responsible plankton. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 48(3), 455~458.

張東錫·申逸澁·卞在亨·朴榮浩. 1987. 진주담치의 痲痺性毒에 관한 研究—1986年 釜山 감천만 中毒事故를 중심으로— 韓水誌 20(4), 293~299.

張東錫·申逸澁·趙鶴來·金知會·卞在亨·朴榮浩. 1988. 韓國産 主要貝類에 대한 毒의 分布, 特性 및 除毒에 관한 研究 1. 痲痺性貝類毒의 分布에 관하여. 韓水誌 21(2), 113~126.

淺川 學·高本光造. 1983. 痲痺性貝毒에 對する pH, 加熱의 影響—毒化ホタテガイのホイル加工, 缶詰加工に關連して—. 北大水産彙報 34(3), 260~263.

淺川 學·飯田 優·大石圭一. 1986. 麻痺性貝毒成分の加壓加熱處理による組成變化について～毒化ホタテガイの缶詰加工に関連して～. 北大水産彙報 37(3), 252～256.

小澤千東子. 1985. 最近の麻痺性貝毒研究. 東海區水産試験所業績 C-230, 29～36.

野口玉雄. 1983. 麻痺性貝毒. 衛生化學 29, 10～15.

野口玉雄·河野迪子·上田要一·橋本周久. 1981. 有毒ホタテカイ473からのまひ性貝毒の主成分. Gonyautoxin-2の單離と諸性狀. 日本化學會誌(5), 652～658.

1988년 6월 4일 접수

1988년 7월11일 수리