

마비성패류독의 생물학적 제독

1. 마비성패류독 분해세균의 분리 및 세균학적 특성

박미정 · 이희정 · 이태식 · 박정흠 · 장동석*
국립수산진흥원 위생가공연구소, *부경대학교 식품생명공학부

Isolation and Characterization of Paralytic Shellfish Poison Detoxification Bacteria

Mi Jung PARK, Hee Jung LEE, Tae Seek LEE
Jeong Heum PARK and Dong Suck JANG*

Sanitation & Processing Research Division, National Fisheries Research
& Development Institute, Pusan 619-900, Korea
*Division of Food Science & Biotechnology, Pukyong National University,
Pusan 608-737, Korea

For the establishment of biodetoxification method which can be acceptable for live bivalves, paralytic shellfish poison (PSP) detoxification bacteria were isolated from sea water and bivalves, and PSP detoxification activity and optimal growth condition of the isolated strains were investigated. From the bivalve and sea water samples, 8 strains of PSP detoxification bacteria were isolated. Of the isolated strains, CW-6 isolated from sea water shown strong PSP detoxification activity and decomposed completely 18 nmole/g of GTX2 after 3 days incubation in artificial medium. The selected stain CW-6 shown typical characteristics of the *Enterobacter* sp. and identified as *Enterobacter* sp. CW-6. Optimal growth condition of the *Enterobacter* sp. CW-6 were 35°C, pH 7 and NaCl 1%, respectively.

Key words: Paralytic shellfish poison, Bivalves, PSP detoxification bacteria

서 론

최근에 우리나라 남해안의 주요 패류양식장에서 마비성패류독(paralytic shellfish poison, PSP)이 매년 반복적으로 출현함에 따라 마비성패류독은 수산식품 특히 패류에서는 반드시 관리되어야 할 위생 안전 위해로 부각되고 있다. 마비성패류독은 인체에 대하여 매우 강력한 치사 독성을 나타내며, 구성성분은 carbamoyl toxin group (STX, neoSTX, GTX1~4), n-sulfocarbamoyl toxin group (GTX5, 6, C1~4), decarbamoyl toxin group (dcSTX, dcneoSTX, dcGTX1~4), deoxydecarbamoyl toxin group (doSTX, doGTX2, 3) 등 약 20여종으로 밝혀져 있다 (Oshima, 1995; Murakami and Noguchi, 2000).

마비성패류독은 내열성이 강하여 일반적인 가열조리로는 잘 파괴되지 않기 때문에 독화된 패류의 활용을 위하여 통조림이나, pH 조절가공 등 여러 가지 물리·화학적 제독 또는 감독 방법 확립에 관한 연구가 지속적으로 진행되고 있다 (Asakawa and Takagi, 1983; Takata et al., 1994; Mizuta et al., 1995; Kim et al., 1996; Shin et al., 1996).

그리고 물리·화학적 처리가 불가능한 살아있는 패류를 대상으로 한 인공 정화 또는 마비성패류독 분해능이 있는 세균을 이용한 생물학적 제독에 관한 연구도 지속적으로 실시되고 있다 (菊池 等, 1995).

본 연구에서는 마비성패류독에 의하여 독화된 패류의 생물학적

제독 방법을 확립하기 위하여 해수와 패류 중에서 마비성패류독 분해능이 있는 세균을 분리하고, 분리 균주의 마비성패류독 분해 활성, 세균학적 특성 및 배양 최적 조건 등을 조사하였다.

재료 및 방법

배지, 시약 및 표준독소

PSP 분해 세균의 분리, 배양 및 특성 시험에는 Difco社 및 Sigma社의 배지 및 시약을 사용하였으며, 시료 중의 독소 정량 및 정성에 사용된 표준독소 [carbamoyl-N-sulfo-11-hydroxysaxitoxin sulfate (CTX), gonyautoxin (GTX), saxitoxin (STX)]는 미국 FDA 및 일본 東北大學에서 분양 받아 사용하였다.

마비성패류독 구성성분 분석 및 정제

시료 중의 마비성패류독의 함량 및 구성성분은 Oshima (1995)의 post-column을 이용한 미량 형광 HPLC법으로 분석하였다. 마비성패류독의 정제는 Sugawara et al. (1997)의 방법에 준하였다.

마비성패류독 분해 균주의 분리 및 동정

달각한 진주담치에 0.5% peptone水를 첨가하여 blender로 90초간 균질화한 전처리 패류 시료와 해수 시료를 peptone 회석수로 적절히 단계 회석하여 marine agar (Difco社) 평판배지에 일정량 접종하고 conradi봉으로 균일하게 도말한 후 25°C에서 3일간 배

양한 후 생성되는 균집락 각각에 대하여 마비성패류독 분해능을 조사하였다.

균주의 독소 분해능은 정제한 GTX1, 4와 GTX2, 3을 각각 일정량 첨가한 marine broth (Difco社)에 시험 균주를 접종하고 25℃에서 3일간 배양한 후 배지상의 잔존 독소를 HPLC로 측정하여 확인하였다. 시험 균주의 동정을 위한 생화학적 시험은 MacFaddin et al. (1960), Krieg et al. (1984) 등의 방법에 준하였다.

시험 균주의 배양학적 특성

시험 균주의 증식에 미치는 온도, pH, 염분의 영향은 nutrient broth (Difco社)를 사용한 각각의 배양조건에서 48시간 배양한 후 균 증식의 정도를 spectrophotometer로 660 nm에서 측정하였다. 균 증식의 정도는 온도 10~45℃, pH 4~11, 염분 0~6% 등의 조건에서 측정하였다.

결과 및 고찰

마비성패류독 분해 균주의 분리 및 동정

Kotaki et al. (1985), 菊池 等 (1995), Sugawara et al. (1997)은 *Acinetobacter* sp., *Pseudomonas* sp., *Vibrio* sp. 등의 해양세균 및 *Enterobacter*속의 몇몇 균주가 PSP 분해능이 있는 것으로 확인하였으며, 각 시험 균주의 독소 분해능은 사용기질이나 배양온도 등 배양조건에 따라 달라질 수 있는 것으로 보고한 바 있다. 그리고 이들 연구자들은 독소 분해능이 있는 균주를 먹이생물과 같이 투여하여, 투입된 세균에 의한 독화 패류의 감독이나 제독 방법을 확립하고자 하는 연구들을 진행하고 있다. 이러한 생물학적 제독 방법은 열처리나 화학적 처리가 불가능한 독화된 패류 생체에 적절히 활용될 수 있기 때문에, 독화 패류의 제독을 위한 효율적인 방안 모색에 상당한 긍정적 가능성이 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 독소분해능이 있는 세균을 활용하여 생물학적 제독 방법을 확립하고자, 해수나 패류 중에서 마비성패류독 분해능이 있는 세균을 분리하고, 분리된 세균의 효율적 활용을 위하여 선발 균주에 대한 최적 배양조건 등을 조사하였다.

1998년 4월 경남 진해만 가덕도 해역에서 채취한 진주담치와 8월 경남 창선 해역의 진주담치 및 해수 중에서 분리한 25균주에 대한 마비성패류독 분해능 시험 결과를 Table 1에 나타내었다. 진주담치와 해수에서 분리된 총 25균주에 대한 각 독소 group 분해 활성 측정 결과, 총 8균주의 마비성패류독 분해 활성 세균이 분리되었다.

Table 1. Isolation of PSP detoxification bacteria

| Collected Area | Sampled Date | Sample | No. of isolated strain |
|----------------|--------------|-----------|----------------------------------|
| Kadeok Is. | 1998. 4. 14 | Mussel | 2 ¹⁾ /8 ²⁾ |
| Changseon | 1998. 8. 19 | Mussel | 3/11 |
| Changseon | 1998. 8. 19 | Sea water | 3/6 |

¹⁾No. of positive strain,

²⁾No. of tested strain.

그리고 분리된 각 균주의 마비성패류독 분해능 측정 결과를 Fig. 1~3에 나타내었다. 균주의 독소 분해능 측정은 정제된 PSP 구성 성분 중 GTX1~4를 대상으로 실시하였으며, 각 구성성분은 완전한 분리가 어려워 GTX1과 4, 그리고 GTX2와 3의 혼합물을 사용하였다. 시험 균주별 독소 분해능 및 각 독소 혼합물에 대한 분해 활성은 매우 다양하였다. 즉, 시험대상의 8개 분리 균주 중 GTX1, 4 혼합물에 대한 분해 활성은 경남 창선 해역의 해수에서 분리한 CW-2가 가장 강력하였고, 다음이 가덕도 진주담치에서 분리한 KM-1, 창선 해수에서 분리한 CW-6 순이었다. 특히 CW-2와 KM-1 균주는 66.2 nmole/g의 GTX1을 배양 3일만에 완전히 분해하는 높은 독소 분해 활성을 나타내었다.

또한 CW-6 균주도 같은 농도의 GTX1, 4 혼합물을 배양 3일만

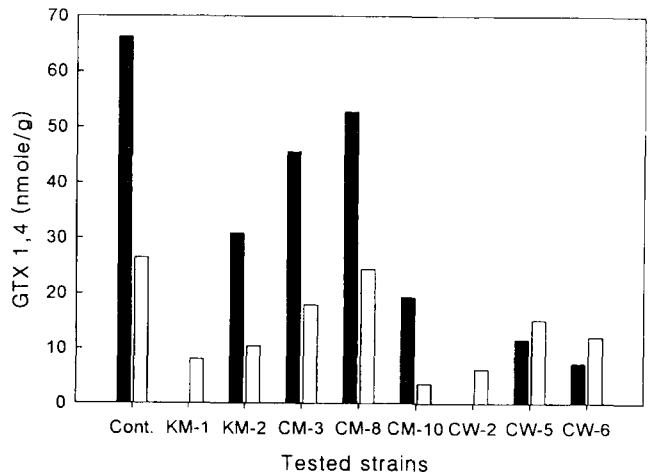


Fig. 1. Comparison of PSP detoxification activity of the tested strains against GTX1, 4 incubated for 3 days at 25°C. ■, GTX1; □, GTX4.

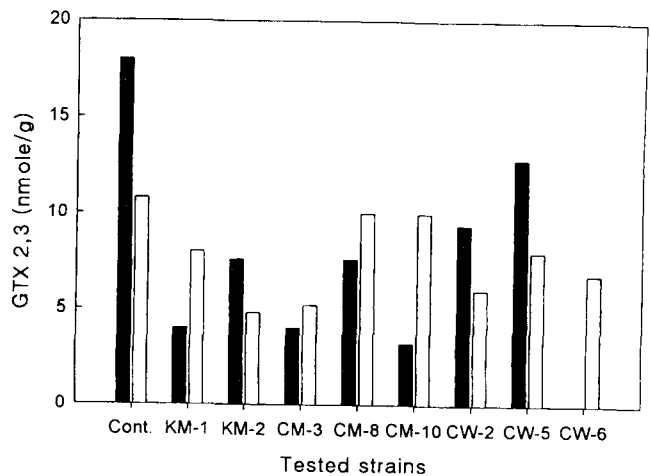


Fig. 2. Comparison of PSP detoxification activity of the tested strains against GTX2, 3 incubated for 3 days at 25°C. ■, GTX2; □, GTX3.

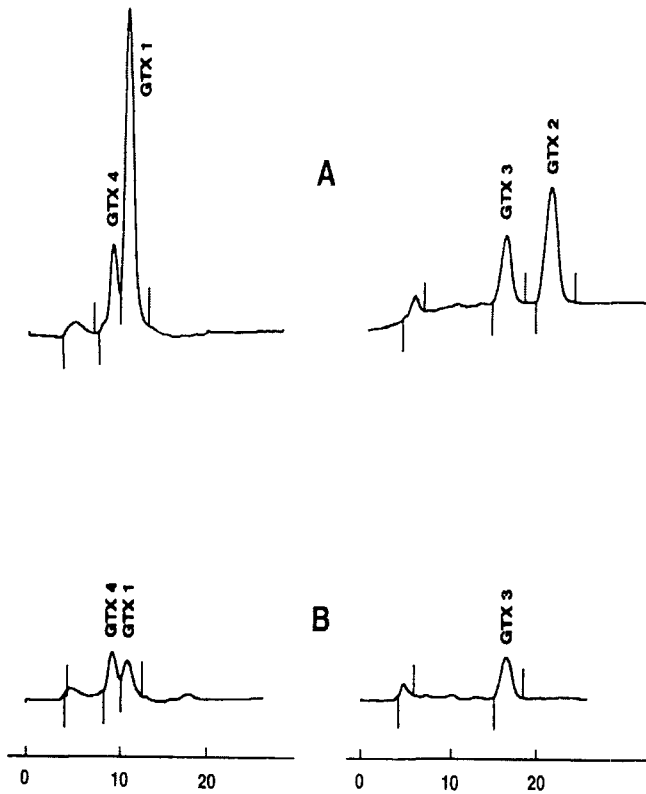


Fig. 3. PSP decomposition activity of the tested strain CW-6 at 25°C after 3 days incubation. A, Control; B, After 3 day.

에 각각 88.9, 54.1%를 분해하였다.

한편 GTX2, 3 혼합물에 대한 분해 활성은 CW-6 균주가 가장 강하였다. 이 균주는 18 nmole/g 농도의 GTX 2를 배양 3일만에 100% 분해하였다. 그러나 나머지 7균주의 GTX 2, 3 혼합물에 대한 분해활성은 27.7~68.0%로 상대적으로 낮았다. 따라서 본 시험에서는 GTX1, 4 및 GTX2, 3 혼합물 모두에 높은 분해 활성을 나타내는 CW-6를 시험 균주로 선발하였다.

해수 및 패류 중에서 분리된 8균주 중 마비성패류독 분해 활성이 가장 강한 것으로 확인된 CW-6 균주에 대한 생화학적 특성 시험 결과를 Table 2에 나타내었다.

시험 균주 CW-6는 arginine decarboxylase 양성, lysine decarboxylase 음성, ONPG test 양성, Voges-Proskauer test 양성 등 *Enterobacter*속의 전형적인 특징 (MacFaddin et al., 1960; Krieg et al., 1984)을 나타내어 *Enterobacter* sp. CW-6로 명명하였다.

마비성패류독 분해 균주 *Enterobacter* sp. CW-6의 배양 특성 시험 균주 *Enterobacter* sp. CW-6를 nutrient broth에 접종하고 온도, pH, 염분 등을 달리한 각각의 배양조건에서 증식의 정도를 비교한 결과를 Fig. 4~6에 나타내었다. *Enterobacter* sp. CW-6는 20~40°C에서 양호한 증식 상태를 나타내었으며, 최적 증식 온도는 35°C였다. 그리고 시험 균주 *Enterobacter* sp. CW-6는 pH 7~9에서 왕성하게 증식하였으며, pH 7~8에서 최적 증식 상태를 나타

Table 2. Biochemical characteristics of the tested strain CW-6

| Characteristics | Strain Tested strain CW-6 | <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047 |
|-----------------------|---------------------------|--|
| Gram stain | - | - |
| Shape | rod | rod |
| Spore | - | - |
| Oxidase | - | - |
| Catalase | + | + |
| Nitrate reduction | + | + |
| Indole | - | - |
| Voges-Proskauer test | + | + |
| Decarboxylase: | | |
| Lysine | - | - |
| Ornithine | + | + |
| Arginine | + | + |
| Urease | - | - |
| Methyl red | - | - |
| O/F test | + / + | |
| Gelatinase | - | + |
| Motility | + | + |
| Acid production from: | | |
| L-Arabinose | + | + |
| D-Mannitol | + | + |
| L-Rhamnose | + | + |
| Sucrose | + | + |
| Cellobiose | + | + |
| Sorbitol | + | + |
| Melibiose | + | + |
| Inositol | + | |
| Glucose | + | |
| Amygdaline | + | |
| ONPG test | + | + |
| Citrate utilization | + | + |
| Tryptophan deaminase | - | - |
| Bile esculine test | + | - |

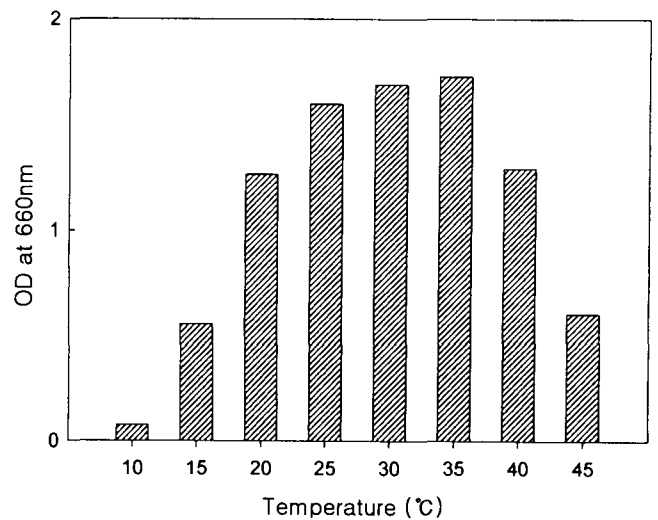


Fig. 4. Effect of temperature on the growth of *Enterobacter* sp. CW-6 in nutrient broth after 48 hours culture.

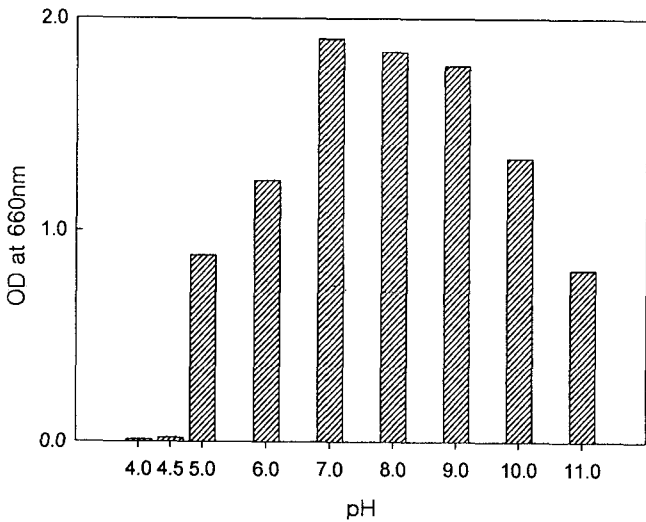


Fig. 5. Effect of pH on the growth of *Enterobacter* sp. CW-6 in nutrient broth after 48 hours culture at 35°C.



Fig. 6. Effect of NaCl on the growth of *Enterobacter* sp. CW-6 in nutrient broth after 48 hours culture at 35°C.

내었다. 그리고 pH 10에서도 최적 증식 상태의 70.4%의 증식을 나타내었다. 한편 시험 균주는 염분 1%에서 최적 증식 상태를 나타내었으며, 6%까지 염분이 증가할수록 증식의 정도는 점차 감소하였다.

요 약

PSP 분해 활성 세균을 이용한 마비성패류독의 생물학적 제독 방법을 확립하기 위하여 진주담치 및 해수에서 마비성패류독 분해능이 있는 균주를 분리하였으며, 분리 균주의 독소 분해 활성 및 세균학적 특성 시험을 실시한 결과는 다음과 같다.

남해안 패류양식장에서 채취한 진주담치 및 해수 중에서 마비성패류독 분해능이 있는 8균주를 분리하였으며, 분리균주 중 GTX 1~4 혼합물 전반에 대하여 폭넓은 분해 활성을 나타낸 CW-6를

시험 균주로 선발하였다. 선발 균주 CW-6는 배양 3일만에 18 nmole/g의 GTX2를 완전히 분해하는 강한 독소 분해 활성을 나타내었다.

선발 균주 CW-6는 생화학적 특성 시험 결과, *Enterobacter*속으로 동정되어 *Enterobacter* sp. CW-6로 명명하였으며, 이 균주는 20~40°C, pH 7~9에서 왕성하게 증식하는 전형적인 중온세균의 특징과 염분농도 6%에서도 최적 증식의 46.8% 정도 증식 가능한 내염성을 나타내었다.

참 고 문 헌

Asakawa, M. and M. Takagi. 1983. The effects of pH and heating on PSP, relating to boiling or canning process of toxic scallops. 北大水产集报, 34, 260~263 (in Japanese).

Kim, Y.M., S.H. Choi, S.J. Kim, S.B. Suh, H.S. Byun, D.S. Chang and I.S. Shin. 1996. 1. Toxicity change in paralytic shellfish poison-infested blue mussel, *Mytilus edulis* and oyster, *Crassostrea gigas* during boiling and canning process. J. Korean Fish. Soc., 29, 893~899.

Kotaki, Y., Y. Oshima and T. Yasumoto. 1985. Bacterial transformation of paralytic shellfish toxins in coral reef crabs and a marine snail. Nippon Suisan Gakkaishi, 51, 1009~1013.

Krieg, M. and J.G. Holt. 1984. Bergey's manual of systematic bacteriology, Vol. 1, Williams and Wilkins, ed. Baltimore, pp. 465~469.

McFaddin, E.F., M.L. Schfer, J.E. Campbell, K.H. Lewis, E.J. Jensen and E.J. Schantz. 1960. Public health significance of paralytic shellfish poison. Adv. in Food Res. 10, Academic Press, pp. 135~179.

Mizuta, M., K. Takata, T. Monden, T. Yoneda and S. Yamauchi. 1995. Reduction in toxicity of PSP infested oyster during canning process. J. Food Hyg. Soc. Jap., 36, 423~427 (in Japanese).

Murakami, R. and T. Noguchi. 2000. Paralytic shellfish poison. J. Food Hyg. Soc. Jap., 41, 1~10 (in Japanese).

Oshima, Y. 1995. Postcolumn derivatization liquid chromatographic method for paralytic shellfish toxins. J. AOAC International, 78, 528~532.

Shin, I.S., S.H. Choi, T.S. Lee, H.J. Lee, J.H. Kim, J.S. Lee and Y.M. Kim. 1996. 2. Change of toxin composition and specific toxicity in paralytic shellfish toxins of blue mussel, *Mytilus edulis* and oyster, *Crassostrea gigas* from Woepori, Koje, Korea during canning process. J. Korean Fish. Soc., 29, 900~908.

Sugawara, A., T. Imamura, S. Aso and K. Ebitani. 1997. Change of a paralytic shellfish poison by the marine bacteria living in the intestine of the Japanese surf clam, *Pseudocardium sybillae*, and the brown sole, *Pleuronectes herzensteini*. Sci. Rep. Hokkaido Fish. Exp. Stn., 50, 35~42 (in Japanese).

Takata, K., M. Mizuta and T. Monden. 1994. Reduction in toxicity of PSP infested oyster by heat treatment. J. Food Hyg. Soc. Jap., 35, 624~630 (in Japanese).

菊池慎太郎, 館脇正和. 1995. 麻痺性貝毒を微生物により無毒化する. 化学と生物, 33, 563~565.

2000년 9월 23일 접수
2000년 11월 20일 수리