

소양호에서의 남조류 독소, 마이크로시스틴의 정량 분석

李貞愛 · 李素英 · 表東震*
강원대학교 자연과학대학 화학과
(2002. 9. 13 접수)

Quantitative Analysis of Microcystins, Cyanobacterial Toxins in Soyang Lake

Jungae Lee, Soyoung Lee, and Dongjin Pyo*
Department of chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
(Received September 13, 2002)

요 약. 남조류 독소인 마이크로시스틴은 호수에서 매우 미량 존재하기 때문에 이를 정확히 정량 분석하기가 쉽지 않다. 본 연구에서는 소양호에서 채취한 물시료 중에 포함된 남조류 독소, 마이크로시스틴을 정량 분석하기 위하여 두 가지 서로 다른 정량 분석법을 시도하였으며 이 둘의 정량 결과를 비교·분석하였다. 첫째는 고체상 추출과 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 이용한 분석법을 이용하였으며 둘째는 마이크로시스틴의 단일클론항체를 이용한 효소면역흡착분석법(Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA)을 이용하였다.

주제어: 남조류독소, 마이크로시스틴, 정량분석

ABSTRACT. It is very difficult to analyze the microcystins, cyanobacterial toxins quantitatively since it exists in a trace level in lakes. In this paper, two different analytical methods were tried to analyze the microcystins, cyanobacterial toxins quantitatively in water samples collected in Soyang lake. The first method was solid phase extraction method followed by High Performance Liquid Chromatography(HPLC), and the second method was Enzyme-Linked Immunosorbent Assay(ELISA) using the monoclonal antibody of microcystin.

Keywords: Cyanobacterial toxin, Microcystin, Quantitative analysis

서 론

최근에 국내 여러 호수의 부영양화가 가속화되어 가고 그에 따라 남조류가 대량 증식하는 현상이 나타나고 있다. 남조류의 발생은 호수 부영양화나 오염상태를 나타내기 때문에 오래전부터 이에 대한 생리·생태학적 연구가 진행되어 왔다. 여름철에 이러한 남조류의 번성은 유용수의 불쾌한 냄새와 맛을 내는 원인이 되기도 하고, 더욱 심각한 것은 물고기와 가축 그리고 인간에게 강한 독성을 나타내는 독소를 발생시킨다는 사실이다. 독성이 있는 남조류의 출현은 1870년대에 오스트레일리아에서 일어났던 Nodularia에 의한 동물의 죽음에

서 최초로 보고되었고,¹ 이후 미국, 캐나다, 영국 등 많은 나라에서 동물에 대한 피해가 보고된 바 있다.²

독성을 일으키는 주요한 남수의 남조류는 Anabaena, Aphanizomeno, Microcystis 등이 있고, 독소는 크게 신경독소(neurotoxins)와 간장독소(liver toxins)로 나눌 수 있다. Anabaena와 Aphanizomeno는 신경독소를, Anabaena의 일부와 Microcystis는 간장독소를 함유하고 있다.

독소를 발생시키는 남조류 중에서 세계적으로 가장 먼저 알려지고 대표적인 것은 Microcystis aeruginosa종으로 국내의 대부분 부영양호에서 하계에 우점종으로 나타나고 있다. 이 종에 의한 가축의 피해는 이미 1940

년대에 보고되었고, 이것이 발생시키는 독소는 Microcystin 이라고 불리우는 고리형태의 펩타이드 구조³⁾를 가진 간장독소임이 밝혀졌다. Ashworth와 Mason(1946)은 Microcystin을 쥐에 투여했을 때, 간장에 피가 맺히는 울혈(鬱血, hepatocyte necrosis) 현상을 최초로 인식하였으며, 이것이 미치는 영향은 주로 간장에 출혈을 일으켜서 죽게 된다는 것이 확인되었다.⁴⁾ 남조류에서 발생 되는 간장독소 중에 해수(brackish water)에 서식하는 Nodularia spumigena에서 나오는 nodularin이라는 물질도 그 구조가 밝혀졌다.⁵⁾ 최근 연구결과에 의하면 Nodularin과 Microcystin은 인산화탄백질의 활동을 억제함^{6,7)}으로써 간암을 유발시키는 성질이 있음이 보고되었다.⁸⁾ 지금까지 알려진 20여가지의 Microcystins는 모두 공통된 구조적인 특징을 가지고 있다. 즉, 모두 7개의 펩타이드(peptide)가 고리를 이룬 형태를 취하고 있으며, 기본적인 구조는 γ -linked D-glu-tamic acid(Glu), N-methyldehydroalanine(Mdha), 하나의 β -amino acid, 3-amino-9-methoxy-10-phenyl-2,3,8-trimethyldeca-4,6-dienoic acid(Adda) 그리고 두 개의 L-amino acids로 구성되어 있다. Nodularin은 Microcystins과 구조가 비슷하나 5개의 펩타이드 고리를 이루고 있는 것이 다르다고 할 수 있다. Fig. 1은 대표적인 남조류 독소인 Microcystin RR과 LR, YR의 구조를 보여준다.

이러한 남조류의 독소에 대하여 호주, 일본, 미국 등

의 선진국에서는 분석방법에 대한 많은 연구와 함께 인체 및 어패류에 미치는 영향, 효과적인 제거방법 등이 활발히 연구되고 있으나, 국내에서는 이에 대한 연구가 미미한 실정이다. 우리나라 대부분의 호수들은 부영양화가 되면서 유기물 함량이 증가하고, 수중산소고갈과 조류 현존량의 증가 및 식물플랑크톤의 종조성 변화를 초래하며 남조류가 늦여름에 심한 번성을 형성하고 있다. 중영양호 수준이던 소양호에서도 1986년 남조류가 처음 출현한 이후 매년 증가추세에 있다.¹⁰⁾ 이러한 호수들은 우리나라의 경우 국민의 상수원으로 사용되는 경우가 많기 때문에 위에서 언급한 조류 독소에 대한 연구가 시급히 이루어져야 하는 실정이다.

본 연구에서는 이를 위해 실제 소양호에서 호수 시료를 일정 기간동안(3월에서 8월) 취수해 ODS 카트리지에 농축시켜 HPLC로 확인하였고, 이와 더불어 마이크로시스틴의 단일클론항체를 이용한 효소면역흡착분석법(ELISA)¹¹⁾을 이용하여 정량하였다.

실 험

ODS 카트리지를 이용한 고체상 추출법과 HPLC를 이용한 마이크로시스틴의 정량 분석

수중 마이크로시스틴의 농축 및 추출을 위해 비극성의 ODS(Octadecylsilane, C18, J.T. Baker) 카트리지를

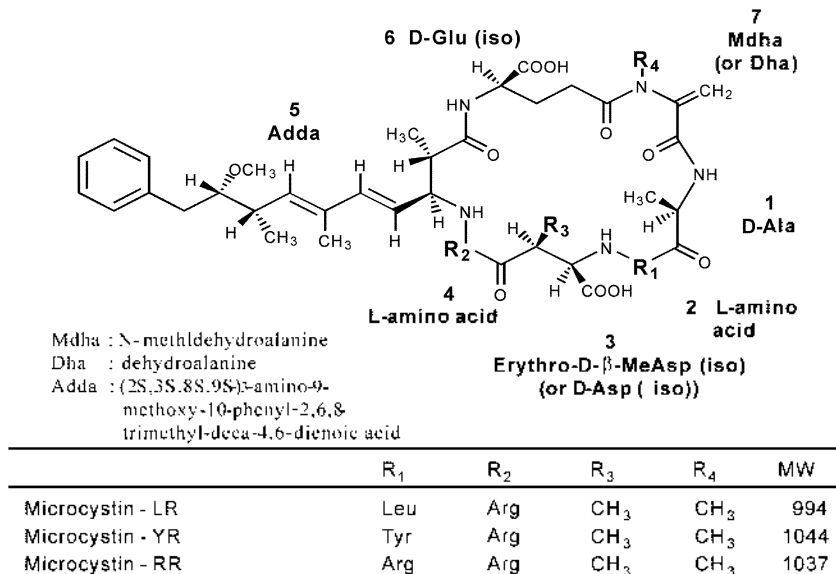


Fig. 1. Structures of Microcystins.

사용하였다. 실험에 사용된 호수 시료는 2002년 3월부터 8월까지 소양호에서 약 10 L 정도를 취수하여 사용하였다.

호수 시료 6 L를 3개의 channel을 만들어서 ODS 카트리지를 이용하여 농축·추출하였다. 호수 시료는 Peristaltic pump에 의하여 유속을 일정하게 유지한 채 ODS 카트리지를 통과시킨다. 이때, 카트리지를 통과하는 유속은 2.5 mL/min이고, 6L의 시료(배양시료)를 각각 3개의 ODS 카트리지로 통과시키면 대략 10시간정도 걸리게 된다. 시료를 농축할 때 유의사항은 시료가 시료보관 용기로부터 ODS 카트리지로 떨어지는 속도와 peristaltic pump에 의해 유출되는 속도를 잘 맞추어서 조절해 주어야 한다. 그렇지 않으면 보관용기에서 시료가 넘치게 되므로 적당한 유속 조절이 아주 중요하다. 또 한가지 중요한 것은 실험과정은 호수 시료를 ODS 카트리지에 통과시키기 전에 GF/C microfiber filter로 여과하고, pH 7정도로 조정하는 것이다. 그 이유는 마이크로시스틴 RR, LR은 pH에 상당한 영향을 받는데, 이는 아미노산 화학구조상 산, 염기하에서는 구조의 변화가 예상되므로 pH에 따라 ODS 카트리지에 흡착되는 정도가 변하기 때문이다. 따라서, 시료의 pH를 7 정도로 맞춰주는 것이 매우 중요한 시료 전처리 과정이라고 할 수 있다.

이와 같이 pH가 조절된 시료를 100% Methanol 15 mL와 H₂O 15 mL로 환성화시킨 ODS 카트리지에 통과시킨다. 시료를 통과시킨 후 Methanol : 0.05 M phosphate buffer pH 2.4(4:6) 10 mL, Isopropanol:0.01 M phosphate buffer pH 2.1(2:8) 3 mL, H₂O 10 mL로 씻어준 후 90% Methanol 수용액 20 mL로 용리시킨다. 용리액을 회전증발기로 농축하고, Methanol 1 mL로 녹여서 HPLC로 확인한다.

본 실험에 사용한 HPLC는 주입기와 다용매 운반체계(multisolvent delivery system)를 갖춘 Beckman사 제품으로 Beckman 116 펌프(SYSTEM GOLD Programmable Solvent Module 126, Beckman Instruments, Inc., San Ramon, U.S.A)와 Beckman 126 Detector(SYSTEM GOLD Programmable Detector Module 166, Beckman Instruments, Inc., San Ramon, U.S.A)를 갖추고 있으며, 컬럼(column)은 분석용으로 Waters Spherisorb S5 ODS2 (4.6×150 mm)을 사용하였다. 이동상은 [Methanol:acetonitrile=50:50]:0.025 M phosphate buffer (pH 2.9)=44:56이며, 유속은 1.0 mL/min, 주입량은 10 µL이고, 검출과장은 UV 238 nm에서 측정하였다(Fig. 2).

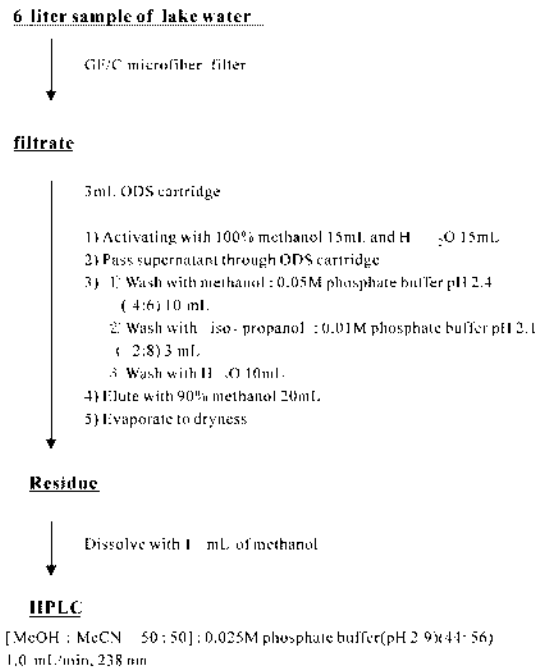


Fig. 2. Quantitative analysis of microcystin using ODS cartridge and HPLC.

면역학적 분석법인 ELISA를 이용한 마이크로시스틴의 정량 분석

ELISA Kit의 탐지원리는 competition assay 방법을 사용하였다. 이 방법은 마이크로시스틴의 항체에 대한 경쟁 원리를 이용하여 마이크로시스틴의 농도를 측정하는 방법이다. 먼저 마이크로시스틴에 대한 단일클론 항체를 plate의 solid phase에 고정화시킨다. 동시에 마이크로시스틴에 탐지용 효소를 부착하여 효소가 결합되지 않은 마이크로시스틴과 경쟁을 유도한다. 사용한 탐지용 효소는 alkaline phosphatase(ALP)이다. 마이크로시스틴의 측정은 시료와 마이크로시스틴-ALP 결합체를 일정 비율로 섞은 다음 고정화된 항체에 섞어준다. 이 때, 효소가 결합되지 않은 마이크로시스틴과 ALP가 부착된 마이크로시스틴은 경쟁적으로 항체와 결합하게 된다. 만약 시료 속에 포함된 효소가 결합되지 않은 마이크로시스틴이 많으면, ALP가 부착된 마이크로시스틴이 적은 비율로 항체와 결합할 것이고, 효소가 결합되지 않은 마이크로시스틴의 양이 적으면 상대적으로 많은 마이크로시스틴-ALP 결합체가 solid phase에 고정화된 항체에 결합할 것이다. 항체와 결합되지 않은 마이크로시스틴-ALP를 세척하여 제거한 후 효소반응을

진행하면 결합한 효소양을 측정할 수 있을 것이고, 이 양은 시료 속에 포함되어 있는 마이크로시스틴양에 반 비례한다. ELISA 방법을 이용한 마이크로시스틴의 정량분석은 다음과 같이 진행되었다.

먼저, 호수 시료의 전처리 과정은 농축 실험의 과정과 같이 적당량을 GF/C microfibre filter로 여과하고, pH를 7정도로 조정한다. 그 이유는: 앞에서 말한 pH 양 극단에서의 마이크로시스틴 구조 변화와 담자용 효소인 ALP의 촉매부위가 파괴되는 것을 방지하기 위해서이다. 그 다음으로는 마이크로시스틴의 항체가 고정된 Microtiter plate(Greiner Labortechnik, Polystyrene, 96-well)를 실온에 30분정도 방치한다. 다음 단계로는: 검량선을 작성하기 위해 마이크로시스틴 표준물질을 마이크로시스틴 RR로 사용하였으며 pH 7.0의 H₂O로 희석하여 1600, 800, 400, 200, 100, 50 pg/ml의 6가지의 농도로 희석하였다.

이렇게 준비한 표준물질과 호수 시료를 100 µl씩 첨가한다. 마이크로시스틴-ALP 결합체는 PBS(Phosphate buffer saline, pH 7.2)로 희석하여 각 well당 50 µl씩 첨가한다. 그런 후, Microtiter plate 표면에 제한된 양으로 고정화된 항체와 마이크로시스틴, 마이크로시스틴-ALP 결합체와의 경쟁적인 면역반응이 충분히 일어나도록 하기 위하여 1시간동안 37 °C에서 incubation한다. 면역반응 후 반응하지 않은 마이크로시스틴, 마이크로시스틴-ALP 결합체를 세척액(0.2% Tween 20/PBS)으로 300 µl/well씩 3회 반복하여 세척 과정을 통해 분리한다. 그 다음으로는 효소발색기질(KPL, Bluephos phosphatase solution A, B)을 100 µl씩 첨가한 후 실온에서 30분 정도 발색시킨다. 마지막으로 발색을 멈추기 위한 Stop solution(0.2 M EDTA, pH 8.0) 100 µl를 첨가하여 효소촉매반응을 통한 발색기질의 색변화를 Microplate reader 630 nm(BIO-RAD, model 550 reader)로 측정한다(Fig. 3).

결과 및 고찰

ODS 카트리지를 이용한 유속별 마이크로시스틴의 농축

ODS 카트리지를 이용하여 실제 소양호 시료의 마이크로시스틴을 효율적으로 농축하여 추출하기 위해 유속을 바꿔가며 실험을 하였다. 실험은 마이크로시스틴의 농도를 미리 알고 있는 인공 배양된 시료(NIE:R 10020)를 사용하였으며 유속은 2, 2.5, 3, 3.5 mL/min으

Microtiter plate

(실험 전 실온에 방치)

마이크로시스틴, 호수시료

- 마이크로시스틴, 호수시료
1) 표준물질, 호수시료 100µL
2) 마이크로시스틴-ALP 50µL
3) 37°C, 1시간 incubation

세척

300µL/well, 3회 반복

발색

- 1) 발색기 약 100µL
2) 실온, 30분 incubation
3) Stop solution 100µL

흡광도 측정

Microplatereader, 630 nm

검량선 작성

Fig. 3. Experimental procedure of competitive ELISA for microcystin.

Table 1. The amount of microcystin RR adsorbed on ODS cartridge using various flow rates (unit: peak area)

Flow rate (mL/min)	Microcystin RR
2.0	1.24
2.5	1.55
3.0	0.74
3.5	0.12

로 바꿔가며 ODS 카트리지에 흡착되는 마이크로시스틴의 양을 측정하였다. 유속을 달리하여 실험한 결과 유속 2.5 mL/min에서 최대 흡착량을 보였다(Table 1). 유속이 2.5 mL/min보다 빨라짐에 따라 흡착되는 마이크로시스틴의 양이 급격히 감소됨을 보였다.

Table 2. Quantitative analysis of water samples in Soyang Lake

Sample	HPLC (pg/ml.)	ELISA (pg/ml.)
March 12th 2002	93.3	100
April 8th 2002	111.7	150.8
May 13th 2002	205	235.8
June 19th 2002	241.7	257.7
July 12th 2002	478.3	388.4
August 20th 2002	ND	ND

HPLC 를 이용한 소양호 시료의 정량 분석

앞의 실험결과로부터 얻은 최적화된 유속으로 실제 3월부터 8월까지의 소양호 시료 6L를 ODS 카트리지로 농축, 추출한 후 HPLC로 분석한 결과 Table 2와 같은 분석 결과를 얻을 수 있었다. 각 시료에 대한 실제 크

로마토그램은 Fig. 4에 나타나 있다. 크로마토그램에서 알 수 있듯이 소양호에서는 Retention time이 11분에서 12분 사이인 마이크로시스틴 RR만이 미량으로 검출되었다. Table 2의 분석 결과를 보면 3월부터 7월까지의 마이크로시스틴 RR의 양이 점점 증가하는 추세였으나, 8월에는 마이크로시스틴 RR의 피크가 검출되지 않았다. 그 이유는 2002년 8월에 이상기후로 인한 장마가 계속되어 남조류가 거의 없어졌기 때문이라 생각된다.

ELISA 방법을 이용한 소양호 시료의 마이크로시스틴 정량 분석

실제 3월부터 8월까지의 소양호 시료를 ELISA 방법을 이용한 마이크로시스틴의 정량 방법은 다음과 같다. 측정된 흡광도(Optical Density) 결과와 마이크로시스틴

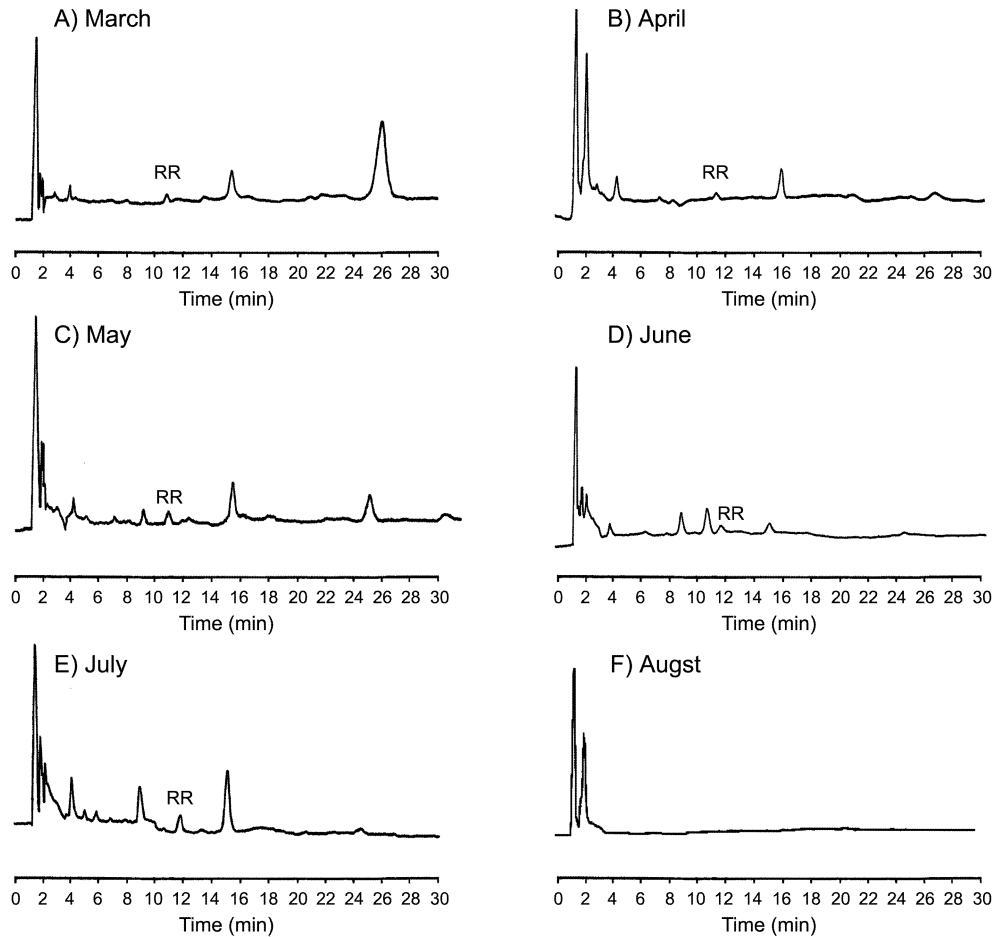


Fig. 4. Chromatograms of each month in Soyang Lake (2002) (A) March 12th, (B) April 8th, (C) May 13th, (D) June 19th, (E) July 12th, (F) August 20 th.

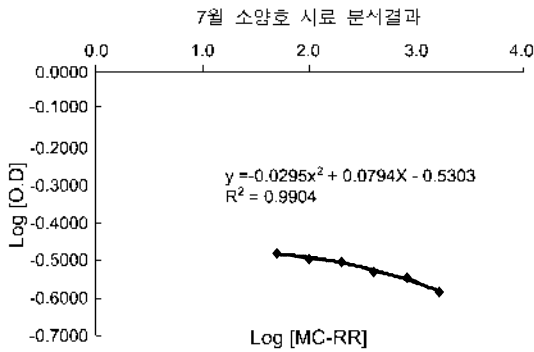


Fig. 5. Calibration curve of ELISA.

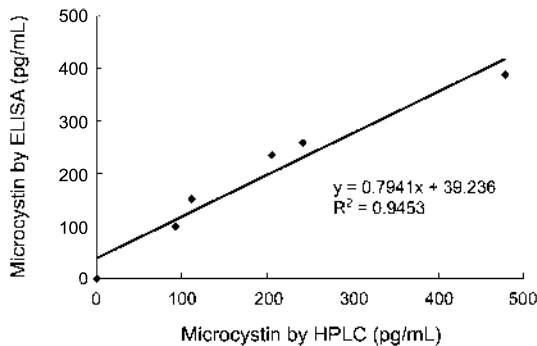


Fig. 6. Correlation between HPLC and ELISA.

농도를 Log-Log 관계로 환산하여 검량선을 작성하고, 이로부터 실제 시료인 소양호의 마이크로시스틴 농도를 구할 수 있었다. Fig. 5는 소양호의 7월달에 해당하는 검량선이다. 이 ELISA 방법에 이용된 단일클론항체의 특성은 마이크로시스틴의 Adda 부분이 항체가 인지하는 항원 부분이 된다는 것이다. 따라서, 마이크로시스틴 LR, RR, YR이 Adda 부분을 공통적으로 가지고 있기에 ELISA 방법으로 얻은 측정치는 시료 속에 존재하는 총 마이크로시스틴의 양을 나타내는 것이다. 실제 소양강 시료들을 ODS 카트리지를 농축 과정을 거쳐 마이크로시스틴 정량 분석결과와 ELISA 방법으로부터 얻은 분석결과를 비교, 분석해 본 결과 좋은 상관관계를 얻을 수 있었다(Fig. 6).

결 론

소양호 물 시료 중의 마이크로시스틴을 ODS 카트리지에 농축하여 HPLC로 확인하는 방법과 면역반응을

이용한 ELISA 방법을 가지고 효과적으로 정량 분석할 수 있었다. 이러한 두 가지 분석 방법들은 서로 좋은 상관관계를 보이며 일치된 분석결과를 보여주었다. 한 가지 특징적인 것은 HPLC 분석의 결과, 소양호의 경우 마이크로시스틴 RR만이 검출되었다. 이와 같이 단일종의 마이크로시스틴이 주종을 이루는 시료의 경우 ELISA 방법으로 마이크로시스틴을 정량 분석하는 것이 고체상 추출법과 HPLC를 사용하는 방법에 비해 더 효율적이라는 결론에 도달할 수 있다. 왜냐하면 ELISA 방법은 시료의 전처리 과정이 필요없으며 높은 특이성으로 인해 감도가 좋고 휴대하기 편하며 실험방법이 간단하고 분석소요 시간이 짧은 장점들이 있기 때문이다.

이 논문은 2001년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2001-002-D00220).

인용 문헌

- Francis, G. *Nature (London)*, **1878**, *18*, 11.
- Schwimmer, M.; Schwimmer, D. In *medical aspects of phyecology*; Jackson, D. F., Ed.; Algae, Man and Environment, Syracuse Univ. Press: **1968**, 358, 279.
- Botes, D. P.; Viljoen, C. C.; Kruger, M.; Wessels, P. L.; Williams, D. H. *Toxicol.* **1982**, *20*, 1037.
- Botes, D. P.; Tainman, A. A.; Wessels, P. L.; Viljoen, C. C.; Kruger, M.; Williams, D. H.; San-tikam, S.; Smith, R. J.; Hammond, S. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1984**, *1*, 2311.
- Sandstrm, A.; Glemarec, C.; Meriluoto, J. A. O.; Eriksson, J. E.; Chattopadhyaya, J. *Toxicol.* **1990**, *28*, 535.
- Yoshizawa, S.; Matsushima, R.; Watanabe, M. F.; Harada, K. I.; Ichihara, A.; Carmichael, W. W.; Fujiki, H. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **1990**, *116*, 609.
- Matsushima, R.; Yoshizawa, S.; Watanabe, M. F.; Harada, K. I.; Furusawa, M.; Carmichael, W. W.; Fujiki, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *171*, 867.
- Wang, H. B.; Zhu, H. G. *Bioned Environ. Sci.* **1996**, *9*, 46.
- Falconer, I. R.; Humpage, A. R. *Phycologia*, **1996**, *35*(6), 74.
- Cho, K. S.; Kim, B. C.; Hco, W. M.; Cho, S. J. *Korean Journal of Limnology*; **1989**, *22*(3), 179.
- Carmichael, W. W. *J. Appl. Bacteriol.* **1992**, *72*, 445.