Journal of the Korean Chemical Society
2004, *Vol. 48, No. 5*
Printed in the Republic of Korea

화학적 산화제를 이용한 남조류 독소, 마이크로시스틴 LR의 분해연구

표동진* · 김은정
강원대학교 자연과학대학 화학과
(2004. 3. 10 접수)

A Study on the Degradation of Cyanobacterial Toxin, Microcystin LR Using Chemical Oxidants

Dongjin Pyo* and Eunjung Kim
Department of chemistry, Kangwon National University, Chuncheon 200-701, Korea
(Received March 10, 2004)

요 약. 남조류 독소인 마이크로시스틴은 여름철 우리나라 여러 호수들에 존재하여 물고기와 가축 그리고 인간에게 강한 독성을 나타내는 독소이다. 본 연구에서는 화학적 산화제인 염소(Cl_2), 과망간산칼륨($KMnO_4$), 과산화수소수(H_2O_2)를 이용하여 마이크로시스틴중 가장 독성이 강한 마이크로시스틴 LR의 분해실험을 시도하였다. 수중 마이크로시스틴LR의 농도 측정은 마이크로시스틴 LR의 단일클론항체를 이용한 효소면역흡착분석법으로 측정하였다. 실험결과 염소는 마이크로시스틴 LR의 농도 800 pg/mL, Cl_2의 농도 12 ppm, 암소방치시간 40분, pH 7에서 가장 잘 분해되었으며, 또한 pH 8 이상에서는 독소 파괴가 눈에 띄게 감소하였다. 과망간산칼륨의 경우 마이크로시스틴 LR의 농도 2000 pg/mL, $KMnO_4$의 농도 1.2 ppm, 암소방치시간 60분, pH 7에서 가장 잘 분해되었다. 그러나 과산화수소수에 의한 마이크로시스틴 LR의 분해는 느린 화학 반응 속도 때문에 효과적이지 못함을 알수 있었다.

주제어: 남조류 독소, 마이크로시스틴, 분해, 산화제

ABSTRACT. Cyanobacterial toxins, microcystins which exist in korean lakes show strong toxicity to fish, cattles and human. In this study, we tried to degrade microcystin LR using various chemical oxidants, Chlorine, Potassium permanganate and Hydrogen Peroxide. The detection method for the concentrations of microcystin LR in water samples was Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) method using the monoclonal antibody of microcystin. Chlorine degraded microcystin LR effectively at the concentration of 800 pg/mL microcystin LR and 12 ppm chlorine. The reaction took 40 minutes at pH 7. Potassium Permanganate also degraded microcystin LR successfully at the concentration of 2000 pg/mL microcystin LR and 1.2 ppm chlorine. The degradation reaction took 60 minutes at pH 7. In the case of hydrogen peroxide, the degradation rate of microcystin LR was very slow because of the slow reaction rate.

Keywords: Cyanobacterial toxin, Microcystin, Degradation, Oxidants

서 론

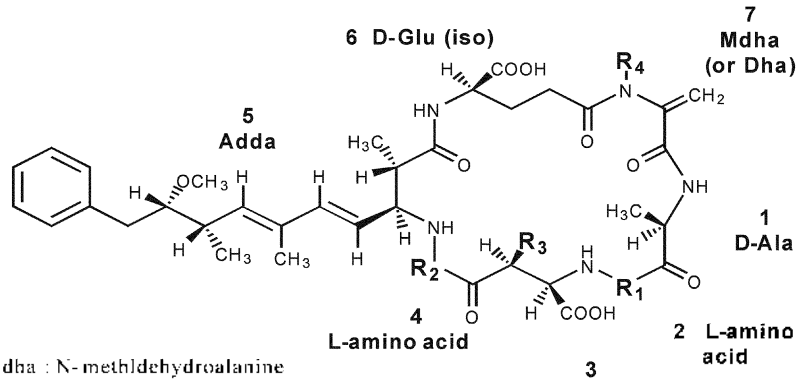
최근에 국내 여러 호수의 부영양화가 가속화되어 가고 그에 따라 남조류가 대량 증식하는 현상이 나타나고 있다. 남조류의 발생은 호수 부영양화나 오염상태를 나타내기 때문에 오래전부터 이에 대한 생리 · 생태학적 연구가 진행되어 왔다. 여름철에 이러한 남조류의 번성은 음용수의 불쾌한 냄새와 맛을 내는 원인이 되기도 하고, 더욱 심각한 것은 물고기와 가축 그리고 인간에게 강한 독성을 나타내는 독소를 발생시킨다는 사실이다.

독성이 있는 남조류의 출현은 1870년대에 오스트레일리아에서 일어났던 Nodularia에 의한 동물의 죽음에서 최초로 보고되었고,[1] 이후 미국, 캐나다, 영국 등 많은 나라에서 동물에 대한 피해가 보고된 바 있다.[2]

독성을 일으키는 주요한 담수의 남조류는 Anabaena, Aphanizomeno, Microcystis 등이 있고, 독소는 크게 신경독소(neurotoxins)와 간장독소(hepatotoxins)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 1940년대에 보고되었고, 이것이 발생시키는 독소는 Microcystin이라고 불리우는 고리형태의 펩타이드 구조[3,4]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 죽게된다는 것이 확인되었다.[5] 남조류에서 발생되는 간장독소 중에 해수(brackish water)에 서식하는 Nodularia spumigena에서 나오는 nodularin이라는 물질도 그 구조가 밝혀졌다.[6] 최근 연구결과에 의하면 Nodularin과 Microcystin은 인산화단백질의 활동을 억제함[7,8]으로써 간암을 유발시키는 성질이 있음이 보고되었다.[9] 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-tamicacid(Glu), N-methyldehydro-alanine(Mdha), 하나의 β-aminoacid, 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 등의 선진국에서는 분석방법에 대한 많은 연구와 함께 인체 및 어패류에 미치는 영향, 효과적인 제거방법 등이 활발히 연구되고 있으나, 국내에서는 이에 대한 연구가 미미한 실정이다. 염소에 의한 마이크로시스틴의 분해는 0.3-0.5 ug/L의 작은 농도에서는 거의 효과가 없었지만,[10] pH 8 이하에서 30분간 접촉시켰을 때에 매우 효과적이었다.[11] 과망간산칼륨의 경우는 마이크로시스틴 LR을 30분간 접촉시켰을 때 95%의 제거율을 보였



Mdha : N-methldehydroalanine
Dha : dehydroalanine
Adda : (2S,3S,8S,9S)-3-amino-9-methoxy -10-phenyl-2,6,8-trimethyl -deca-4,6-dienoic acid

	R_1	R_2	R_3	R_4	MW
Microcystin - LR	Leu	Arg	CH_3	CH_3	994
Microcystin - YR	Tyr	Arg	CH_3	CH_3	1044
Microcystin - RR	Arg	Arg	CH_3	CH_3	1037

Fig. 1. 마이크로시스틴의 구조.

지만 세포속으로는 침투하지는 못한다는 것이 관찰되었다.[12] 과산화수소수의 경우 30분간 접촉시켰을 때 고작 50%의 분해율을 보였다.[13] 그러나 이러한 연구들은 고감도 수중 마이크로시스틴 농도의 측정법의 부재로 인해 많은 어려움을 겪었다.

본 연구에서는 지금까지의 측정법과는 다른 농축과정이 전혀 필요하지 않는 새로운 측정법으로 화학적 산화제인 염소(Cl_2), 과망간산칼륨($KMnO_4$), 과산화수소수(H_2O_2)를 이용한 마이크로시스틴중 가장 독성이 강한 마이크로시스틴 LR의 분해실험을 시도하였다. 마이크로시스틴의 화학적 구조로 볼때 페닐기 부분에 이중결합 두개가 짝을 이루고 있기 때문에 화학적 산화제를 사용하면 마이크로시스틴을 쉽게 분해시킬 수 있음을 예상할 수 있다. 수중 마이크로시스틴 LR의 농도 측정은 마이크로시스틴 LR의 단일클론항체를 이용한 효소면역흡착분석(ELISA)법으로 측정하였다.

실 험

염소에 의한 마이크로시스틴의 분해

본 실험에서는 염소처리에 의한 마이크로시스틴 제거실험을 위해서 표준염소용액을 만들어 사용하였다. 표준염소용액은 1L volumetric flask에 chlorine free water를 소량 가한 후 NaOCl(10% NaOCl solution) 21 ml를 피펫으로 정확히 가하여 플라스크 내벽에 닿지 않도록 주의하여 가한 다음 다시 chlorine free water를 가해 전체의 양을 1 L로 1000 ppm 표준용액을 만든다.

우선 마이크로시스틴 LR 농도와 염소 농도 선정을 위한 실험을 하였는데, 마이크로시스틴 LR 농도를 각각 500, 800, 1000 pg/mL로 하고, 염소 농도는 0~20 ppm으로 하였다. 방치 시간은 임의로 30분으로 하였다. 위의 실험에서 마이크로시스틴 LR 농도가 800 pg/mL와 염소농도가 12 ppm에서 가장 잘 분해 되었다. 따라서 반응시간을 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100, 120분으로 하여 다시 한 번 실험하였다. 이때, 방치시간 40분 일 때 분해가 가장 잘됨을 알 수 있었다. pH에 의한 변화에 대해서도 알아보기 위하여 pH 3~10까지 보정하여 40분간 방치하여 실험하였다.

과망간산칼륨에 의한 마이크로시스틴의 분해

과망간산칼륨에 의한 마이크로시스틴 제거 실험은 1 L의 volumetric flask에 $KMnO_4$ 시약을 0.1 g 가한 후 100ppm으로 만들어 희석하여 사용하였다. 과망간산칼륨에 의한 분해실험에서도 먼저 마이크로시스틴 LR 농도와 염소 농도 선정을 위한 실험을 하였다. 마이크로시스틴 LR 농도를 각각 500, 800, 1000, 2000 pg/mL로 하고, 과망간산칼륨의 농도는 0~2 ppm으로 하였다. 방치시간은 임의로 30분으로 하였다. 위의 실험에서 마이크로시스틴 LR 농도가 2000 pg/mL에서 과망간산칼륨의 농도가 1.2 ppm에서 가장 잘 분해되었다. 이것을 반응조건으로 잡고 앞의 염소에 의한 분해실험에서와 마찬가지로 방치시간별, pH별로 실험해 보았다.

과산화수소에 의한 마이크로시스틴의 분해

과산화수소에 의한 마이크로시스틴의 분해 실험에서도 과산화수소의 농도를 100 ppm으로 하여 희석하여 사용하였다. 우선 마이크로시스틴 LR의 농도를 2000 pg/mL으로 하고, 과산화수소의 농도를 20~90 ppm으로 하여 30분간 방치하여 실험하였다.

ELISA를 이용한 마이크로시스틴 LR의 정량 분석

ELISA Kit의 탐지원리는 competition assay 방법을 사용하였다. 이 방법은 마이크로시스틴의 항체에 대한 경쟁 원리를 이용하여 마이크로시스틴의 농도를 측정하는 방법이다. 먼저 마이크로시스틴에 대한 단일클론항체를 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 항체와 섞어준다. 이 때, 효소와 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 반비례한다. ELISA 방법을 이용한 마이크로시스틴의 정량분석은 다음과 같이 진행되었다.

화학적 산화제를 가한 물시료를 GF/C microfiber filter로 여과하고, pH를 7정도로 조정한다. 그 이유는 pH 양극단에서의 마이크로시스틴 구조 변화와 탐지용 효소

인 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 H20로 희석하여 1600, 800, 400, 200, 100, 50 pg/mL의 6가지의 농도로 희석하였다.

이렇게 준비한 표준물질과 불시료를 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 충분하게 일어나도록하기 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(0.2M EDTA, pH 8.0) 100 μL를 첨가하여 효소촉매반응을 통한 발색기질의 색변화를 Microplate reader 630 nm(BIO-RAD, model 550 reader)로 측정한다(*Fig.* 2).

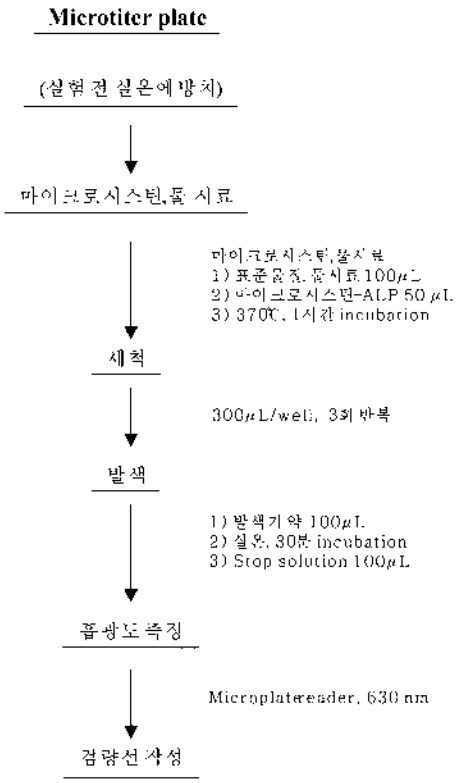


Fig. 2. 마이크로시스틴 측정을 위한 경쟁적 ELISA 방법의 실험 과정.

결과 및 고찰

마이크로시스틴 LR에 대한 염소처리

염소에 의한 마이크로시스틴 분해 실험은 염소의 농도별, 방치시간별, pH별로 실험 해 보았다. *Fig.* 3-5는 염소처리시 마이크로시스틴의 분해에 의한 회수율을 나타낸 그래프이다.

염소에 의한 마이크로시스틴의 분해는 *Fig.* 3에서 보는 바와 같이 마이크로시스틴 LR농도가 800 pg/mL에서 Cl_2의 농도가 12 ppm일 때 가장 잘 분해 되었고, 약 90%로 분해 되었다. 염소 방치 시간에 따른 마이크로시스틴 LR의 분해는 *Fig.* 4와 같이 40분일 때 가장 잘 분해 되었다. 또한 *Fig.* 5에서 처럼 pH에 의한 마이크로시스틴의 분해는 pH는 7에서 가장 잘 분해 되었다.

Fig. 5를 보면 pH 8이상에서는 마이크로시스틴 LR의 분해가 눈에 띄게 감소함을 알 수 있는데 이것은 독소파괴가 pH에 의존적임을 추측할 수 있다. pH 8 이상의 독소파괴에서 이러한 감소는 hypochlorous acid(HClO)와 hypochlorite ion(ClO^-)의 평형농도에 관한 것으로 설명할 수 있다. 산은 아주 강한 산화제이나, HClO의 농도는 pH 증가에 따라 매우 빠르게 감소한다. 반약, 불충분한 완충수에 NaOCl, Ca(OCl)$_2$를 많은양 공급할

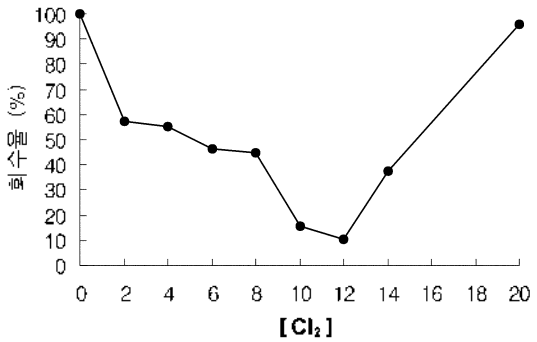


Fig. 3. 염소처리시 염소 농도에 따른 마이크로시스틴의 회수율.

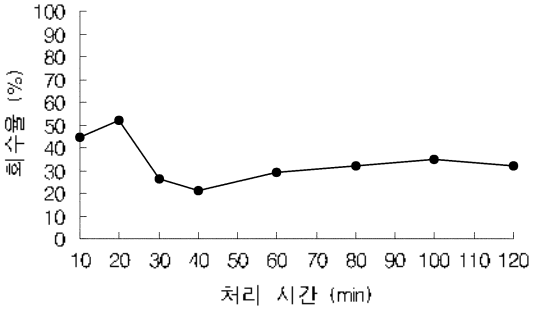


Fig. 4. 염소처리시 처리시간에 따른 회수율 변화.

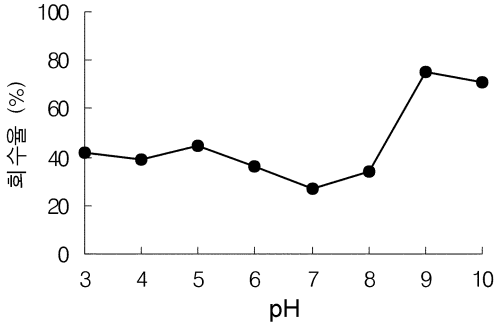


Fig. 5. 염소처리시 pH에

경우, 그때의 pH를 보정하지 않는다면 독소제거는 감소될 것이다. 이번 실험을 통해 염소가 마이크로시스틴과 같은 간장독소의 제거에 효과적임을 알 수 있었다.

마이크로시스틴 LR에 대한 과망간산칼륨처리

과망간산칼륨은 비교적 강산화제이고 수처리에서 철과 망간의 산화에 이용된다. 과망간산칼륨에 의한 마이크로시스틴의 분해 실험은 과망간산칼륨의 농도별, 방치시간별, pH별로 실험해 보았다. *Fig.* 6-8은 과망간산칼륨처리시 마이크로시스틴의 분해에 의한 회수율을 나타낸 그래프이다. *Fig.* 6에서와 같이 과망간산칼륨의

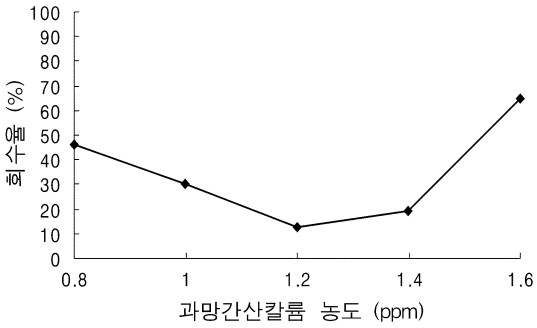


Fig. 6. 과망간산칼륨처리시 과망간산칼륨 농도에 따른 회수율.

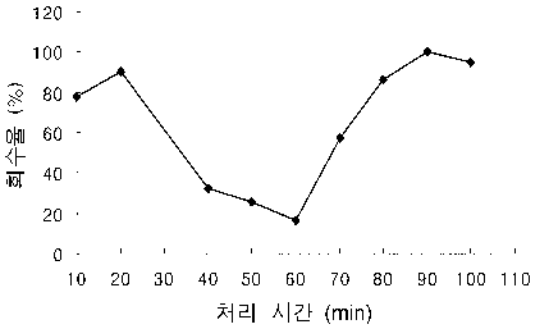


Fig. 7. 과망간산칼륨처리시 처리시간에 따른 회수율 변화.

1.2 ppm의 공급은 접촉시간 약 30분 후에 마이크로시스틴 LR 2000 pg/mL의 농도에서 약 87% 제거 되었다. 과망간산칼륨은 강산화제로서 마이크로시스티니LR농도 2000 pg/mL 즉, 많은 양의 마이크로시스틴을 과망간산칼륨의 농도 1.2 ppm 굉장히 적은 양으로 분해한다. 이것은 조류의 독소 제거 방법으로 간단하고 효과적인 방법이라고 할 수 있다. 염소 방치 시간에 따른 마이크로시스틴의 분해는 *Fig.* 7에서 보는 바와 같이 60분 방치하였을 때 가장 잘 분해 되는데 약 84%분해 됨을 볼수 있다. 또한 pH에 의한 분해는 *Fig.* 8에서 보는 바와 같이 pH 7에서 가장 잘 분해 되는 것을 볼 수 있다.

마이크로시스틴 LR에 대한 과산화수소처리

Fig. 9는 과산화수소처리시 마이크로시스틴의 회수율을 나타낸 그래프이다.

Fig. 9에서 보는 바와 같이 과산화수소에 의한 마이크로시스틴 LR의 분해는 마이크로시스틴LR농도 2000 pg/mL에서 과산화수소와 30분간 방치시켰을 때 과산화수소의 농도에 관계없이 제거가 되지 않음을 알 수 있었다. 과산화수소에 의한 마이크로시스틴LR의 제거 실험은 농도에 따른 경향성도 보이지 않았고 거의 제거가 되지 않았기 때문에 염소 방치시간이나 pH에

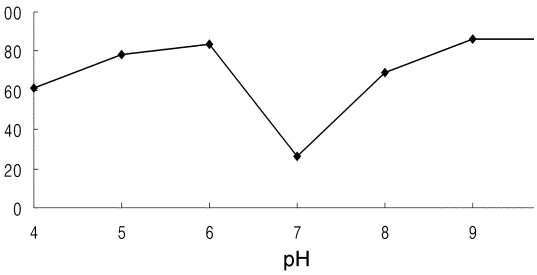


Fig. 8. 과망간산칼륨처리시 pH에 따른 회수율 변화.

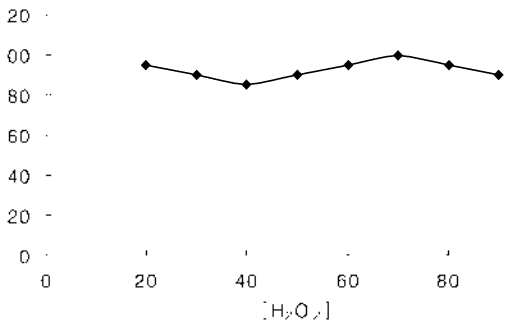


Fig. 9. 과산화수소처리시 과산화수소 농도에 따른 회수율.

따른 실험을 하지 않았다. 이런 실험 결과는 과산화수소의 경우 느린 화학 반응 속도 때문에 수처리에서도 그것만으로 산화제로써 이용되지 않는다는 사실과도 부합된다. 이러한 점이 또한 마이크로시스틴과의 반응성이 좋지 않은 것에 대한 이유가 된다. 과산화수소는 각 과정의 산화효율을 개선하기 위해서 오존과 자외선 두 가지와 결합시켜 이용되고 있다.

결 론

본 연구에서는 화학적 산화제인 염소(Cl_2), 과망간산칼륨($KMnO_4$), 이산화수소수(H_2O_2)를 이용하여 마이크로시스틴중 가장 독성이 강한 마이크로시스틴 LR의 분해실험을 시도하였다. 예상했던데로 마이크로시스틴의 페닐기 부분에 있는 두개의 이중결합이 화학적 산화제의 공격을 받아 분해되는 것을 관찰할 수 있었다. 특히 염소와 과망간산칼륨의 경우 마이크로시스틴 LR의 분해에 매우 효과적이었다. 그러나 과산화수소수에 의한 마이크로시스틴 LR의 분해는 느린 화학 반응 속도 때문에 효과적이지 못함을 알수 있었다. 이러한 연구결과들은 향후 조류독소의 수처리과정에 매우 요긴하게 응용될 수 있으리라 여겨진다.

본 연구는 보건복지부 보건의료기술진흥사업의 지원에 의하여 이루어진 것임(과제고유번호: 02-PJ1-PG3-20205-0001).

인 용 문 헌

1. Francis, G. Nature (London). **1878**, *18*, 11.
2. Schwimmer, M.; Schwimmer, D., In *medical as-pects of phycology*; Jackson, D. F., Ed.; Algae, Man and Environment, syracuse Univ. Press; 1968; Vol. 358, p 279.
3. Botes, D. P.; Viljoen, C. C.; Kruger, M.; Wessels, P. L.; Williams, D. H. *Toxicon*, **1982**, *20*, 1037.
4. Botes, D. P.; Tainman, A. A.; Wessels, P. L.; Viljoen, C. C.; Kruger, M.; Williams, D. H.; Santikarn, S.; Smith, R. J.; Hammond, S. J. *J. Chem. Soc., Perkin Trans.* **1984**, *1*, 2311.
5. Sandstrm, A.; Glemarec, C.; Meriluoto, J. A. O.; Eriksson, J. E.; Chattopadhyaya, J. *Toxicon*, **1990**, *28*, 535.
6. 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.
7. Matsushima, R.; Yoshizawa, S.; Watanabe, M. F.; Harada, K. I.; Furusawa, M.; Carmichael, W. W.; Fujiki, H. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1990**, *171*, 867.
8. Wang, H. B.; Zhu, H. G. *Biomed. Environ. Sci.* **1996**, *9*, 46.
9. Falconer, I. R.; Humpage, A. R. *Phycologia*, **1996**, *35*(6), 74.
10. Lambert, T. W.; Holmes, C. F.; Hrudey, S. E. Wat. Res. **1996**, *30*, 1411.
11. Nicholson, B. C.; Rositano, J.; Burch, M. D. Wat. Res. **1994**, *28*, 1297.
12. Rositano, J. The Destruction of Cyanobactrial Peptide Toxins by Oxidants used in Water Treatment. **1996**, Report 110.
13. Rositano, J.; Nicholson, B. C. Water Treatment Techniques for removal of Cyanobactrial Toxin from Water. **1994**, 55 pp.