J. Fd Hyg. Safety 16(1), 33–36 (2001)

V. parahaemolyticus ATCC 17802에 의한 Alkaline Protease 생산조건(II)

양지영 · 한종흔† · 강현록 · 황미경 · 이재우 · 차재호*
부경대학교 수산과학대학 식품생명공학부
**부산대학교 자연과학대학 미생물학과*

Production Condition of Alkaline Protease by *V. parahaemolyticus ATCC 17802*(II)

Ji-Young Yang, Jong-Heun Han†, Hyun-Rok Kang, Mi-Kyong Hwang, Jae-Woo Lee and Jae-Ho Cha*
Div. Food Sci. & Biotechnology, College of Fishery Science, Pukyong National University, Pusan 608-737
Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan 609-735

ABSTRACT – *V. parahaemolyticus* possessed an extracellular alkaline protease activity during the stationary growth phase. Various factors such as initial pH of medium, incubation temperature and shaking rate were investigated for optimizing the production of alkaline protease from *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Maximal activity of the protease was obtained when the bacteria were grown in 2% skim milk medium in 0.1M tris/HCl buffer (pH 7.6). Maximal activity of the protease was obtained when the bacteria were grown at initial pH of 7.6, incubation temperature of 37°C and shaking rate of 250 rpm.

Key words □ *Vibrio*, protease, food poisining.

식중독으로 인한 사고가 매년 증가하고 있으며 이 중 세균에 의한 식중독이 대부분을 차지하고 있다. 식중독 사고 중 *Salmonella*와 *Vibrio* 그리고 포도상 구균에 의한 식중독 발생비율이 80% 이상으로 대부분을 차지하고 있는데 특히 우리나라에서는 생선의 소비가 많기 때문에 다른 나라와 달리 *Vibrio*에 의한 식중독 사고가 큰 비중을 차지하고 있다. 특히 많은 종류의 *Vibrio*균들은 사람에게 여러 질병을 일으키는 것으로 알려져 있는데[1,2,3] *V. cholerae, V. fluvialis,* V. *furnissii, V. mimicus, V. parahaemolyticus* 등은 위장염을 일으켜 설사증을 유발하며[4] *V. damsela*는 주로 사람과 어류에 창상감염을 유발하고 *V. alginolyticus*는 원래 비병원성균으로 생각되었으나 최근에 창상감염, 중이염, 눈병 등을 유발하는 것으로 보고되고 있다[4,5,6,7]. 또한 *V. vulnificus*는 패혈증과 창상감염을 일으키며 치사율이 50%이상인 것으로 알려져 있다. 이러한 병원성 세균에 의해 식중독이 일어나려면 우선적으로 병원성 세균이 숙주세포에 침입을 해야되고 이를 위해 숙주세포의 표면에 있는 여러 단백질층을 분해해야 한다. 이때 작용하는 단백질 분해효소가 이러한 병원성에 직·간접적으로 관여되어 진다고 생각되고 있으며, 비브리오균이 생산하는 여러 가지 단백질 분해효소가 인간이나 어류의 병원성에 관련되어진다고 보고되어지고 있다. 현재 *Vibrio*속 세균들의 병원성에 관한 연구는 세포외 독소인 enterotoxin에 대해 주로 진행되어 왔다[8,9]. 그러나 *Pseudomonas aeruginosa, Serratia marcescens*뿐만 아니라 *Vibrio* cholerae 등에 의해 야기되는 질병에 있어 enterotoxin뿐만 아니라 protease[10]도 주요한 독성인자로 작용하여 균의 독력과 관계된 요소로 알려져 있다[6,11,12]. 그러나 현재 세균성 식중독에 대한 연구는 주로 오염균의 종류 및 검출, 독소생성유무 및 역학조사 등에 한정되고 있다.

따라서 본 연구에서는 이러한 식중독 미생물중의 하나인 *Vibrio*균을 대상으로 이 균이 생산하는 protease의 생산조건에 대해 실험하였다.

재료 및 방법

균주

시험균주로서는 부경대학교 식품공학과에 보존되어 있는 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802를 사용하였다.

배지

배지는 2.0% skim milk(Difco)를 질소원으로 사용하고,

†Author to whom correspondence should be addressed.

여기에 NaCl 0.4 M과 $CaCl_2$ 2 mM을 첨가하여 배지를 조제·사용하였다.

Alkaline protease activity 측정방법

배양액을 9,000 rpm으로 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 후 상등액을 두 그룹으로 나누어, 한 그룹은 100°C의 끓는 물에서 중탕해 효소활성을 실활시킨다. 실활시킨 그룹과 실활시키지 않은 그룹에 1% azocasein(in 0.1 M tris/HCl buffer, pH 9.0)을 첨가하여 40°C의 배양기에서 30분간 반응시킨 후 10% TCA용액을 첨가하고, 4°C에서 10분간 방치해 반응을 중지시킨다. 반응을 중지시킨 후 생성된 단백질 침전물을 원심분리하여 제거하고, 상등액에 동량의 0.4 M NaOH을 가해 450 nm에서 O.D를 측정하였다. 이때 효소활성 1unit는 40°C에서 30분간 반응시켰을 때 0.1의 O.D를 증가시키는 효소의 양으로 정의하였다[13,14].

Alkaline protease 생산을 위한 배양조건 조사

*Vibrio*균에 의한 alkaline protease 생산을 위해 필요한 성분인 2.0% skim milk, NaCl 0.4 M과 $CaCl_2$ 2 mM를 포함한 배지에서 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802에 의한 alkaline protease의 생산을 위한 배양조건에 관하여 조사하였는데, 배지의 초기 pH에 따른 영향을 조사하였고, 배양온도와 배양시 진탕속도에 따른 영향도 조사하였다.

결과 및 고찰

배지의 초기 pH에 따른 변화

배지의 초기 pH에 따른 변화는 Fig. 1에서 보는 것과 같이 pH 7.6에서 60시간 배양한 후에는 8.1unit, 72시간 배양한 후에는 7.4unit로 활성이 가장 높게 나타났다. pH 7.0과 8.0에서는 활성이 5unit 전후로 나타났고, pH 9.0에서는 활성이 1.8unit로 매우 낮게 나타났으며 반면 pH 6.0과 10.0에서는 활성이 전혀 나타나지 않았다. Protease활성을 측정하는 방법과 효소의 활성에 대한 단위가 달라 정확히 비교하기는 힘드나, Susan[13] 등은 이번 실험결과와 같게 pH 7.6 부근에서 protease활성이 0.25unit로 가장 높게 나타났다고 하였고, Hiroki 등[15]은 pH 7.3 부근에서 protease활성이 26.7 unit로 가장 높다고 하였다. 또한 오[16] 등은 pH 8.0 부근에서 protease의 활성이 5.2unit로 높게 나타났다고 하였다. 다른 연구 결과들[14,17,18]에서도 모두 약알칼리인 pH 7에서 8사이에서 protease의 생산량이 많았다고 하였다.

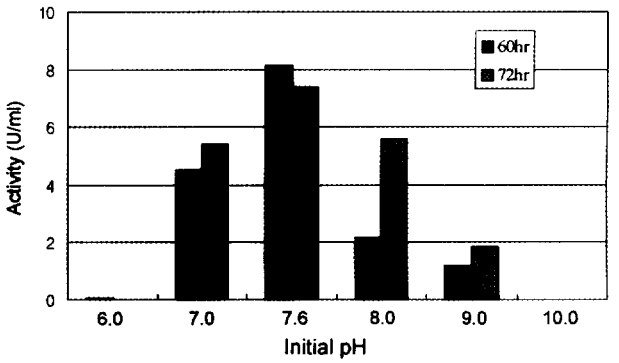

Fig. 1. Effect of initial pH on alkaline protease activity by *Vibro parahaemolyticus* ATCC 17802.

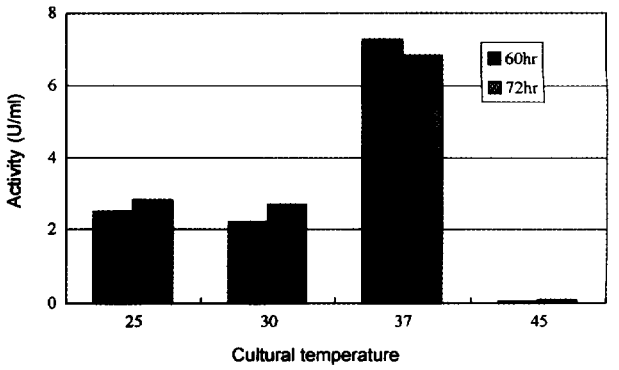

Fig. 2. Effect of temperature on alkaline protease activity by *Vibro parahaemolyticus* ATCC 17802.

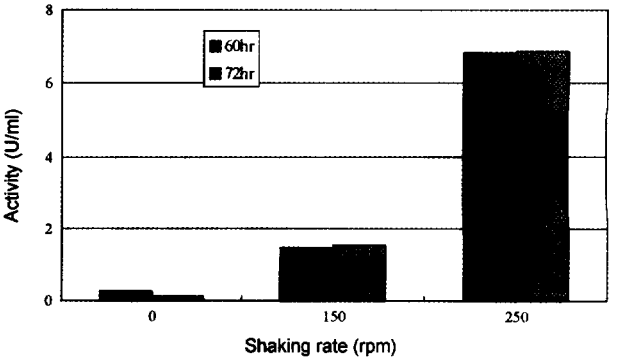

Fig. 3. Effect of Shaking rate on alkaline protease activity by *Vibro parahaemolyticus* ATCC 17802.

배양 온도에 따른 변화

배양온도에 따른 변화는 Fig. 2에서 보는 것과 같이 37°C에서 60시간 배양한 후에는 7.3unit, 72시간 배양한 후에는 6.9unit로 활성이 가장 높게 나타났고, 25°C와 30°C에서 배양한 경우에는 활성이 2.5unit 전후로 낮게 나타났다. 45°C에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. Liu 등[17]은 이 논문의 실험 결과와 다르게 27°C에서 배양할 때 protease의 활성이 가장 높았다고 하였고, Hiroki 등[15]도 25°C에서 protease의 생산량이 26.7unit로 가장 높았다고 하였다. 오[16] 등은 30°C

에서 protease의 활성이 4.8unit로 높았다고 하였다. 그리고 많은 연구 논문[13,14,17,18,19]에서도 protease의 생산량은 30℃이하에서 높았다고 하였다. 반면에 Lee 등[20]과 같이 35℃ 부근에서 protease의 생산량이 많았다고 하는 연구 결과들도 있었다.

배양시 진탕속도에 따른 변화

진탕속도에 따른 변화는 Fig. 3에서 보는 것과 같이 250 rpm에서 60시간 배양한 후에는 6.8unit, 72시간 배양한 후에는 6.9unit로 활성이 가장 높게 나타났고, 150 rpm에서는 활성이 1.5unit 전후로 아주 낮아졌다가 정치 배양한 경우에는 활성이 거의 나타나지 않았다. Patricia 등[14]은 130 rpm에서 배양을 하였으나, Susan 등[13]은 이 논문의 결과와 같이 250 rpm에서 protease활성이 0.25unit로 가장 높았다고 하였다. 대부분의 연구에서 진탕배양을 하는 것으로 보아 protease의 생산에 산소가 중요한 인자로 작용하는 것으로 사료된다.

감사의 말

이 논문은 1999년도 한국과학재단 특정기초연구과제(1999-2-220-002-3)의 연구비에 의해 수행된 연구결과의 일부로 그 지원에 감사드립니다.

국문요약

*V. parahaemolyticus*를 균주로 alkaline protease생산을 위한 배지의 초기 pH, 배양온도 그리고 배양시 진탕속도에 따른 영향을 조사하였다. 배지의 초기 pH에 따른 변화는 pH 7.6에서 60시간, 72시간 배양한 후에는 8.1unit, 7.4unit로 활성이 가장 높게 나타났고, pH 7.0, 8.0 그리고 9.0에서는 활성이 크게 낮아졌으며, pH 6.0과 10.0에서는 활성이 전혀 나타나지 않았다. 배양온도에 따른 변화를 보면 37℃에서 60시간, 72시간 배양한 후에는 7.3unit, 6.9unit로 활성이 가장 높게 나타났고, 25℃와 30℃에서 배양한 경우에는 2.5unit 전후로 활성이 크게 낮아졌으며, 45℃에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. 배양시 진탕속도에 따른 변화를 보면 250 rpm에서 60시간, 72시간 배양한 후에는 6.8unit, 6.9unit로 활성이 가장 높게 나타났고, 150rpm에서는 활성이 1.5unit 전후로 급격히 낮아졌으며 정치 배양한 경우에는 활성이 거의 나타나지 않았다.

참고문헌

1. Harper H.A., Rodwell V.W. and Mayes P.A.: Review of physiological chemistry 17th ed.. *Lange*(1979).
2. Kreger A. and Lockwood D. : Detection of extracellular toxin (s) produced by *Vibrio vulnificus*. *Infect. Immun.*, **33**, 583 (1981).
3. Oliver J.D., Warner R.A. and Cleland D.R.: Distribution and ecology of *Vibrio vulnificus* and other lactose-fermenting marine *vibrios* in coastal waters of the southeastern United states. *Appl. Environ. Microbiol.*, **44**, 1404(1982).
4. Farmer J.J.III., Hickman-Brenner F.W., Kell M.T.: Manual of clinical microbiology 4th ed.. *American Society for Microbiology Washington D.C.*(1985).
5. Sakazaki R. and Shimada T.: *Vibrio* species as causative agents of food-bome infection. *Developments in Food Microbiology*, **2**, 123(1986).
6. Blake P.A.: Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *Dis.*, **149**, 558(1984).
7. Tacket C.O., Barret T.J., mann J.M., Roberts M.A. and Blake P.A.: Wound infections caused by *Vibrio vulnificus*, a marine *Vibrio*, in land areas of the U.S.A.. *J. Clin. microbiol.*, **19**, 197(1984).
8. Brenner D.J., Hickman-brenner F.W., Lee, Steigerwalt A.G., Fanning G.R., Hollis DG et al.: *Vibrio furnissii*(formerly aerogenic biogroup of *vibrio fluvialis*) a new species isolated from human feces and the environment. *J. Clin. Microbiol.*, **18**, 816(1986).
9. Lee J.V., Shread P., Furniss A.L. and Bryant T.N.: Taxonomy and description of *Vibrio flubialis sp.* nov(synonym group F *Vibrios*, group EF 6). *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 73(1981).
10. Kreger A.: Cytolytic activity and virulence of *Vibrio damsela*. *Infect. Immun.*, 44-326(1984).
11. Desmond F.P., Janda J.M., Adam F.I. and Botton E.J.: Comparative studies and laboratory of *Vibrio vulnificus*, an invasive *Vibrio sp.*. *J. Clin. Microbiol.*, **19**, 122(1984).
12. Farmmer J.J.III: *Vibrio vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicemia, and sea. *Lancet* II:903(1979).
13. Susan Long, M.A. Mothibeli, F.T. Robb and D.R. Woods: Regulation of Extracellular Alkaline Protease Activity by Histidine in a Collagenolytic *Vibrio alginolyticus* Strain. *Journal of General Microbiology*, **127**, p193-199(1981).
14. Ptricia Hare, T. Scott-Burden and D.R. Woods: Characterization of extracellular alkaline protease and collagenase induction in

Vibrio alginolyticus. Journal of General Microbiology, **129**, 1141-1147(1983).

15. Kazuo Ohishi, Masaaki Yamagishi, Toshiya ohta, Mitsuaki Suzuki, Hitoshi Izumida, Hiroshi Sano, Miyuki Nishijma, and Tan Miwa : Purification and properties of two chitinases from *Vibrio alginolyticus. Journal of Fermentation and Bioengineering*, Vol. 82, No.6, p598-600(1996).
16. 오양호, 박영민, 차미선, 김민정: *Vibrio parahaemolyticus bc-7*가 생산하는 protease에 관한 연구. 감염 제30권 제1호 Vol. 30, No. 1, p24-35(1998).
17. Ping-Chung Liu, Kuo-Kau Lee, Chi-Chung Tu and Shin-Nam Chen: Purification and characterization of a cysteine protease produced by pathogenic luminous. *Current Microbiology*, Vol. 35, p.32-39(1997).
18. Kuo-Kau Lee, Shu-Ru Yu and Ping-Chung Liu: Alkaline serine protease is an exotoxin of *Vibrio alginolyticus* in Kuruma Prawn, *Penaeus japonicus. Current Microbiology*, Vol. 34, p. 110-117(1997).
19. Joseph R. Merkel and Joseph H. Dreisbach: Purification and characterization of a marine bacterial collagenase. *Biochemistry*, Vol.17, No.14, p.2857-2863(1978).
20. Chia-Yin Lee, Shiun_cheng Su and Ren-Bao Liaw: Molecular analysis of an extracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus. Microbiology*, **141**, p.2569-2576(1941).