J. Fd Hyg. Safety 15(2), 173–175 (2000)

비브리오 속의 단백질 분해능에 관한 연구

양지영[1] · 한종흔 · 이재우 · 김수광* · 차재호*
*부경대학교 수산과학대학 식품생명공학부 · *부산대학교 자연과학대학 미생물학과*

Study on the Proteolytic Activities of Pathogenic *Vibrio* sp.

Ji-Young Yang[1], Jong-Heun Han, Jae-Woo Lee, Soo-Kwang Kim* and Jaeho 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 – Nine strains of pathogenic *Vibrio* sp. of clinical and environmental origin were examined for the degradation of gelatin, casein and hemolysin which is important to the virulence of this bacterium. Culture filtrates of all nine strains of *Vibrio* exhibited proteolytic activities. Especially, four strains of *V. parahaemolyticus* and one *V. alginolyticus* showed strong gelatin-degrading activity. In terms of hemolytic activity, three *V. parahaemolyticus* and *V. mimicus* showed strong β-hemolysis whereas those of strains of *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus* examined lacked this activity.

Key word □ *Vibrio*, Extracellular enzyme, Hemolysis, Proteolysis

매년 많은 식중독 사고가 발생하고 있으며 특히 어패류의 소비가 많은 우리 나라에서는 *Salmonella* 다음으로 *Vibrio*에 의한 식중독 사고가 많이 일어나고 있다. 일반적으로 미생물이 숙주세포에 침입을 하려면 우선적으로 숙주세포의 표면에 있는 여러 단백질층을 분해해야 하는데 이때 단백질 분해효소가 이러한 pathogenecity에 직 · 간접적으로 관여한다고 생각되고 있으며, 비브리오균이 분해하는 여러 가지 단백질 분해효소가 인간이나 어류의 pathogenecity에 관련되어진다고 보고되어지고 있다.

따라서 본 연구에서는 미리 확보된 여러 가지의 비브리오균들 중 gelatin분해능, hemolytic activity, azocasein 분해 활성실험을 통해 그 양상을 조사하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주

시험균주로서는 부산대학교 미생물학과에 보존되어 있는 *V. vulnificus* ATCC 27562, *V. fluvialis* KCTC 2473, *V. furnissii* 분리균주, *V. mimicus* ATCC 33653, *V. parahaemolyticus* 04와 부경대학교 식품공학과에 보존되여 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. parahaemolyticus* 분리균주(1), *V. parahaemolyticus* 분리균주(2), *V. alginolyticus* 분리균주를 사용하였다.

배지 및 시약

본 연구에 사용한 tryptic soy agar는 Difco사의 제품을 사용하였으며, azocasein은 Sigma사의 제품을 사용하였다. 그외 시약들은 1급이상의 것들을 사용하였다.

Gelatin 분해 활성 실험

1% gelatin이 함유된 tryptic soy agar배지에 비브리오균들을 접종한 후 37°C에서 24시간 배양한다. 그 후 평판배지에 12.5% $HgCl_2$-1M HCl용액을 부어서 clear zone이 형성되면 protease를 생성하는 것으로 판명하였다.

Hemolytic activity 측정 실험

Sheep blood를 함유한 agar 배지에 비브리오균들을 접종하여서, 37°C에서 24시간 배양 후 clear zone이 형성되면 hemolytic activity가 있는 것으로 판명하였다.

Azocasein assay

0.02 M Tris-HCl 완충액에 azocasein을 1%되게 녹여 기질용액을 조제한 후, 기질용액 480 μl에 효소액 120 μl을 첨가하여 30°C에서 30분 동안 반응시켰다. 여기에 10%

†Author to whom correspondence should be addressed.

Trichloroacetic acid 600 μl을 가하여 반응을 정지시키고, 30분 동안 정치시킨 후 15,000 rpm에서 10분 동안 원심분리하여 침전물을 제거시키고 얻은 상등액 800 μl에, 1.8N NaOH 200 μl를 첨가해 중화시킨 후 420 nm에서 흡광도를 관찰하는 한편, blank test를 하여 본 실험과 420 nm에서의 흡광도의 차로써 활성을 측정하였다. 효소활성의 1unit는 30 ℃에서 30분 동안 반응 후 420 nm에서 흡광도가 0.01 증가할 때 1unit로 정의하였다.

결과 및 고찰

비브리오균의 단백질 분해 효소의 검색

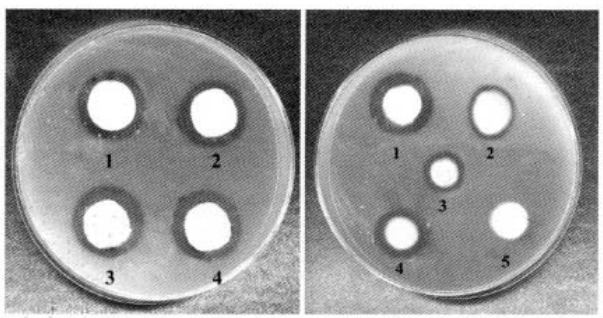
기확보된 균주에 대하여 단백질 분해능을 조사하기 위하여 gelatin 분해능, hemolytic activity, azocasein 분해 확인실험 등을 통해 높은 효소활성을 보이는 9개 균주를 비교, 실험하였다.

Gelatin 분해 확인 실험

1% gelatin이 함유된 tryptic soy agar 배지에서 gelatin 분해능을 조사한 결과는 Fig. 1과 같았다. 조사된 9종의 *Vibrio* 속 균주 중에서 4종의 *V. parahaemolyticus*와 *V. alginolyticus*에서 활성이 크게 나타났으며 *V. mimicus*와 *V. furnissii*에서도 중간정도의 활성을 보여주었고 *V. vulnificus*에서는 미약한 활성을 보여주었다. 조사된 9종의 *Vibrio*속에서 유일하게 *V. fluvialis*에서만이 활성을 나타내지 않았다.

Hemolytic activity 측정 실험

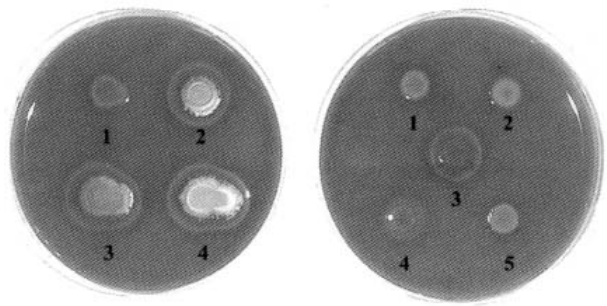
Sheep blood를 함유한 agar 배지에 hemolytic activity를 조사한 결과는 Fig. 2와 같았다. 조사된 9종의 *Vibrio*속 균주 중에서 4종의 *V. parahaemolyticus*중 *V. parahaemolyticus* O4에서는 haemolytic 활성이 음성으로 나타났으며, 그 외에는 높은 haemolytic 활성을 보여주었다. *V. mimicus*와 *V. furnissi*에서는 haemolytic 활성을 보여주었으나 그외 *V. alginolyticus*, *V. fluvialis*, *V. vulnificus*에서는 haemolytic 활성을 나타내지 않았다. 또한 sheep blood를 분해시킨 pattern은 형태로 보아 β-hemolysis로 관찰되었다.



1 : ***parahaemolyticus* 04**
2 : ***parahaemolyticus* ATCC 17802**
3 : ***parahaemolyticus* 분리균주(1)**
4 : ***parahaemolyticus* 분리균주(2)**

1 : ***alginolyticus* 분리균주**
2 : ***vulnificus* ATCC 27562**
3 : ***mimicus* ATCC 33653**
4 : ***furnissii* 분리균주**
5 : ***fluvialis* KCTC 2473**

Fig. 1. Proteolytic activity of *Vibrio* sp. in gelatin agar plate



1 : ***parahaemolyticus* 04**
2 : ***parahaemolyticus* ATCC 17802**
3 : ***parahaemolyticus* 분리균주(1)**
4 : ***parahaemolyticus* 분리균주(2)**

1 : ***vulnificus ATCC 27562***
2 : ***alginolyticus* 분리균주**
3 : ***mimicus* ATCC 33653**
4 : ***furnissii* 분리균주**
5 : ***fluvialis* KCTC 2473**

Fig. 2. Hemolytic activity of *Vibrio* sp. in sheep blood agar plate

Azocasein assay

배양액으로부터 azocasein분해활성을 측정한 결과는 Table 1과 같았다. 조사된 9종 모두에서 azocaein분해활성이 검출되었으며 106.6에서 210.1 EU/ml의 활성을 보여주고 있었으며, 그 중 *V. paramaemolyticus* 분리균주(2)가 210 EU/ml, *V. paramaemolyticus* ATCC 17802가 203.0 EU/ml로 다른 균주에 비해 높은 활성을 보여 주었다.

이상과 같이 gelatin분해능, 용혈능 그리고 azocasein 분해능에 대한 병원성 비브리오균들의 특성을 Table 2에 나타내었다. 조사된 9종의 비브리오균들이 용혈능에서는 각각의 균마다 활성생산에 차이를 보여주었으며 단백질원으로

Table 1. The azocasein activity of pathogenic *Vibrio* sp.

Vibrio sp.	효소 활성 (EU : enzyme unit)
V. alginolyticus 분리균주 (피조개)	111.6 EU/ml
V. fluvialis KCTC 2473	106.6 EU/ml
V. furnissii 분리균주 (해수)	115.8 EU/ml
V. mimicus ATCC 33653	123.3 EU/ml
V. parahaemolyticus 04	110.0 EU/ml
V. parahaemolyticus ATCC 17802	203.0 EU/ml
V. parahaemolyticus 분리균주(1)	192.5 EU/ml
V. parahaemolyticus 분리균주(2)	210.0 EU/ml
V. vulnificus ATCC 27562	112.5 EU/ml

Table 2. The comparison of virulence from pathogenic *Vibrio* sp.

Vibrio sp.	hemolysis	proteolysis	
		gelatin	azocasein
V. alginolyticus 분리균주	-	+++	+
V. fluvialis KCTC 2473	-	-	+
V. furnissii 분리균주	++	++	++
V. mimicus ATCC 33653	+++	++	++
V. parahaemolyticus 04	-	+++	+
V. parahaemolyticus ATCC 17802	+++	+++	+
V. parahaemolyticus 분리균주(1)	+++	+++	+
V. parahaemolyticus 분리균주(2)	+++	+++	+
V. vulnificus ATCC 27562	-	+	++

서 gelatin 이나 azocasein을 분해하는 특성은 대부분 보여주는 것으로 조사되었다.

감사의 말

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

국문요약

V. parahaemolyticus 종류들이 gelatin분해 확인 실험에서 큰 clear zone을 형성했고, *V. alginolyticus* 분리균주도 *V. parahaemolyticus*와 비슷한 clear zone을 형성했다. *V. fluvialis* KCTC 2473은 clear zone을 형성하지 못했다. Hemolytic activity측정 실험에서는 *V. parahaemolyticus* 분리균주(2)가 가장 활성이 크게 나타났고, *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. parahaemolyticus* 분리균주(1)과 *V. mimicus* ATCC 33653도 높은 활성을 나타냈으며, 나머지 다른 비브리오균은 활성이 나타나지 않았다. Azocasein 분해 활성 실험에서는 *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, 분리균주(1), 분리균주(2)는 200EU/ml전후로 활성이 높게 나타났고, 나머지는 110EU/ml전후로 활성이 상대적으로 낮게 나타났다.

참고문헌

1. Chia-Yin Lee, Shiun_cheng Su and Ren-Bao Liaw : Molecular analysis of an extracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus*, Microbiology, 141, 1941, 2569-2576
2. 오양호, 박영민, 차미선, 김민정 : *Vibrio parahaemolyticus* bc-7가 생산하는 protease에 관한 연구., 감염 제30권 제1호 Vol. 30, No. 1, 24-35(1998)
3. Susan Long, M. A. Mothibeli, F. T. Robb and D. R. Woods : Regulation of Extracellular Alkaline Protease Activity by Histidine in a Callagenolytic *Vibrio alginolyticus* Strain., *Journal of General Microbiology*, **127**, 193-199 (1981)
4. Graham C. Reid, David R. Wood, and Frand T. Robb : Peptone Induction and Rifampin-Insensitive Collagenase Production by *Vibrio alginolyticus*., *Journal of Bacteriology*, May, p447-454 (1980)
5. Graham C. Reid, David R. Wood, and Frand T. Robb : Peptone Induction and Rifampin-Insensitive Collagenase Production by Vibrio alginolyticus, *Journal of Bacteriology*, May, p447-454 (1980)
6. Hiroki Inamura, Toshihiro Nakai, and Kiyokuni Muroga : An Extracellular Protease Produced by *Vibrio anguillarum*, Bulletin of the Japanese Society Fisheries, **51**(12), 1915-1920 (1985)
7. Joseph R. Merkel and Jose;h H. Dreisbach : Purification and Characterization of a Marine Vacterial Collagenase, *Biochemistry* **17**(14), 2857-2863 (1978)
8. Shin-idhi Miyoshi, Kazuhiro Sasahara, Seiko Akamatsu, M. Monzur Rahman, Takashi Katsu, Ken-ichi Tomochika and Sumio Shinoda : Purification and Characterization of a Hemolysin Produced by *Vibrio mimicus*, Infection and Immunity, **65**(5), May, 1830-1835 (1997)