J. Fd Hyg. Safety 15(2), 176–178 (2000)

*V. parahaemolyticus*에 의한 Alkaline Protease 생산조건(I)

양지영[1] · 한종흔 · 강현록 · 황미경 · 차재호*
*부경대학교 수산과학대학 식품생명공학부 · *부산대학교 자연과학대학 미생물학과*

Cultural Condition of the Production of Alkaline Protease by *V. parahaemolyticus*(I)

Ji-Young Yang[1], Jong-Heun Han, Hyun-Rok Kang, Mi-Kyung Hwang 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 – *V. parahaemolyticus* possessed an extracellular alkaline protease activity during the stationary growth phase. Various factors such as nitrogen sources, the concentration of NaCl and metal ions were investigated for optimizing the production of alkaline protease from *V. parahaemolyticus* ATCC 17802. Among the nitrogen sources tested skim milk showed the distinct increase of the activity and the activity was the highest at 2% in final concentration after 60 hours incubation. The addition of NaCl and metal ions did not increase the alkaline protease activity. $CoCl_2$, $CuCl_2$, and HgCl rather highly inhibited alkaline protease production.

Key word □ *Vibrio*, Alkaline protease, Food poisoning

식중독으로 인한 사고가 매년 증가하고 있으며 이 중 세균성식중독이 대부분을 차지하고 있다. 특히 *Salmonella*와 *Vibrio*에 대한 발생비율이 높으며 위생발생건수는 줄어들고 있으나 대량생산 및 판매, 외식기회의 증가 등으로 사건당 환자수는 증가하며 대형화 되어가는 추세이다. 이러한 세균성 식중독은 일반적으로 미생물이 숙주세포에 침입을 하려면 우선적으로 숙주세포의 표면에 있는 여러 단백질층을 분해해야 하는데 이때 단백질 분해효소가 이러한 병원성에 직 · 간접적으로 관여되어 진다고 생각되고 있으며, 비브리오균이 분해하는 여러 가지 단백질 분해효소가 인간이나 어류의 병원성에 관련되어진다고 보고되어지고 있다. 현재 세균성 식중독에 대한 연구는 주로 오염균의 종류 및 검출, 독소생성유무 및 역학조사 등에 한정되고 있다.

따라서 본 연구에서는 이러한 식중독 미생물중의 하나인 비브리오균을 대상으로 이 균이 생산하는 protease의 생산조건을 검사하였다.

재료 및 방법

균주

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

배지

배지조성에 따른 효소 생산성을 비교하기 위해 peptone (Difco), tryptone(Difco), casamino acid(Difco), skim milk (Difco), phyton peptone(BBL)을 질소원으로 사용하고, 여기에 NaCl과 $CaCl_2$를 첨가하여 배지를 조제 · 사용하였다.

Alkaline protease activity 측정방법

배양액을 9,000 rpm, 4℃에서 30분간 원심분리한 후 상등액을 두 그룹으로 취해, 한그룹은 100 ℃의 끓는물에서 가열해 실활시킨다. 이 두 그룹에 1% azocasein (tris/HCl buffer (pH 9))을 첨가하여 40℃의 배양기에서 30분간 반응시킨 후 10% TCA용액을 첨가하고, 4℃에서 10분간 방치해 반응을 중지시킨다. 반응 중지시킨 후 생성된 단백질 침전물을 원심분리하여 제거하고, 상등액에 동량의 0.4 M NaOH을 가해 450 nm에서 O.D를 측정한다. 이때, 1unit는 40℃에서 30분간 반응시켰을 때 0.1의 O.D.를 증가시키는 효소의 양으로 정의하였다.

Alkaline protease 생산을 위한 배지 조성 조사

비브리오균의 생육에 필요한 배지조성(질소원 2.5%,

†Author to whom correspondence should be addressed.

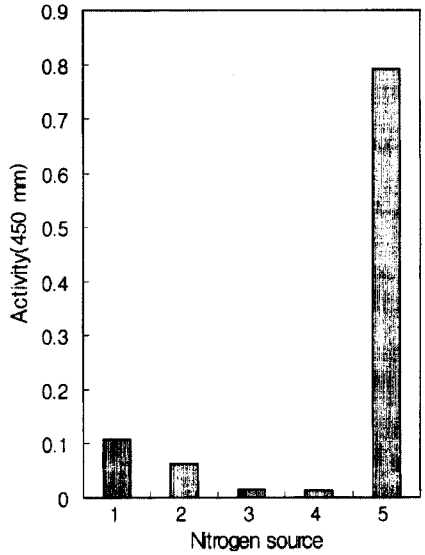

Fig. 1. Effect of nitrogen sources on the protease activity
(1 : peptone, 2 : tryptone, 3 : casamino acid, 4 : phyton peptone, 5 : skim milk)

NaCl 0.4 M, $CaCl_2$ 2 mM, pH 7.6)을 선정한 후 *Vibrio parahaemolyticus* ATCC 17802에 의한 alkaline protease의 생산을 위한 배지조성에 관하여 조사하였는데, 먼저 여러 질소원에 따라 실험하여 질소원을 선택하고, 선택된 질소원의 최적농도를 결정한다. 결정된 농도의 질소원에 NaCl과 다른 금속이온에 대한 영향을 조사하였다.

결과 및 고찰

질소원의 종류에 따른 변화

질소원의 종류에 따른 변화는 Fig. 1.에서 보는 것과 같이 skim milk에서 활성이 8unit정도로 가장 높게 나타났고, peptone과 tryptone에서는 활성이 1unit전후로 아주 낮게 나타났으며, casamino acid와 phyton peptone에서는 활성이 거의 나타나지 않았다. Skim milk는 60시간 전후, 나머지는 25시간 전후에서 최고 활성이 나타났다. Skim milk외의 질소원들은 casein을 소화효소로 분해시킨 것이고, phyton peptone은 soybean meal을 분해시킨 것이기 때문에 protease의 생산을 유도하는 성질이 작고, skim milk는 casein을 주단백질로 하는 질소원이기 때문에 protease의 생산 유도효과가 큰 것으로 보여진다.[5]

질소원의 농도에 따른 변화

질소원의 농도에 따른 변화를 보면, Fig. 2.에서와 같이 0%에서 활성이 전혀 나타나지 않다가, 1%와 2%에서 비교

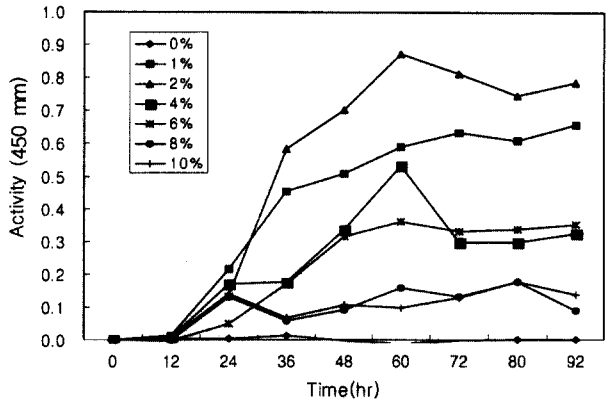

Fig. 2. Effect of the concentration of skim milk on the protease activity

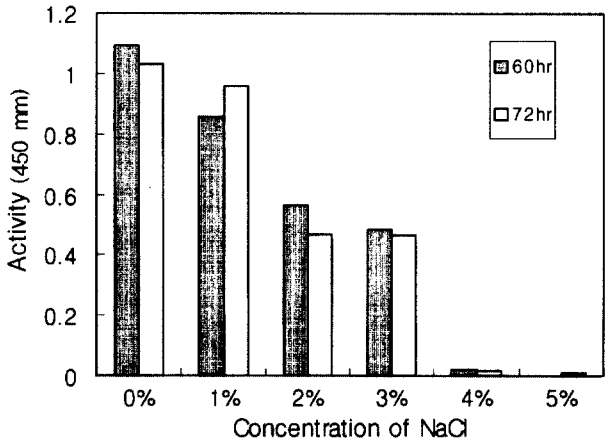

Fig. 3. Effect of NaCl concentration on the protease activity

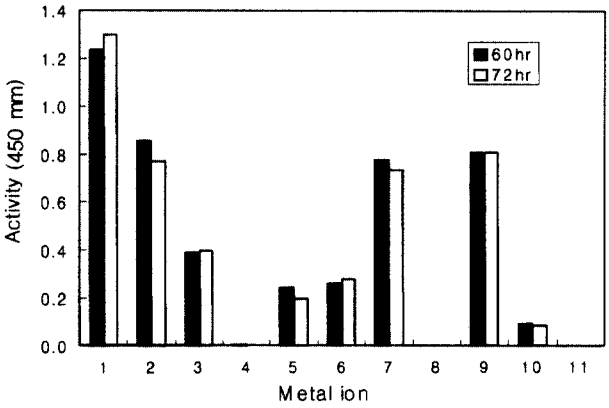

Fig. 4. Effect of the concentration of metal ions on the protease activity
(1 : control, 2 : NaCl, 3 : $CaCl_2$, 4 : CoCl, 5 : KCl, 6 : $MnSO_4$, 7 : FeSO4, 8 : $CuCl_2$, 9 : $AlCl_2$, 10 : $ZnSO_4$, 11 : HgCl)

적 활성이 높게 나타났고, 4%이상의 농도에서는 농도가 높아질수록 활성이 저하되는 현상이 나타났다. 특히 2%에서 60시간 전후로 활성이 가장 높게 나타났다. 이는 과다한 양의 skim milk는 오히려 mass transfer를 방해하여 균체생육을 저해시키며 기질저해에 의한 protease 생합성을 방해하는 것으로 보여진다.

NaCl의 농도에 따른 변화

NaCl의 농도에 따른 변화를 보면 Fig. 3.에서와 같이 0%일 때 활성이 가장 높게 나타났고, 농도가 높아질수록 활성이 낮아졌다.

금속이온에 따른 변화

금속이온에 따른 변화를 보면 Fig. 4.에서와 같이 NaCl과 금속이온이 전혀 들어가지 않았을 때 활성이 가장 높게 나타났으나, 금속이온을 첨가하므로써 활성이 떨어졌고, $CoCl_2$, $CuCl_2$, HgCl을 첨가 했을때는 활성이 전혀 나타나지 않았다. 일반적으로 금속이온은 따로 첨가되지 않아도 배지 속에는 충분한 양이 포함되어있으나, 금속이온을 따로 첨가하므로써 배지의 염의 평형을 깨트리고 따라서 배지의 성분을 응집시켜 균의 효소생성에 저해영향을 끼치는 것으로 생각된다.

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 질소원의 종류, skim milk농도, NaCl농도, 금속이온의 종류를 조사하였다. 질소원인 peptone, tryptone, casamino acid, skim milk, phyton peptone중에서는 skim milk에서 활성이 월등히 높게 나타났고, skim milk의 농도에 따른 실험에서는 2%일 때 활성이 가장 높게 나타났다. NaCl의 농도에 따른 실험에서는 0%일 때 활성이 가장 높았고 농도가 높아질수록 활성이 낮아졌다. 금속이온에 따른 활성을 보면 금속이온이 들어가지 않았을 때 활성이 가장 높게 나타났고, 금속이온을 첨가하므로써 활성이 급격히 떨어졌다. 또한 $CoCl_2$, $CuCl_2$, HgCl가 첨가되었을 때는 활성이 전혀 나타나지 않았다

참고문헌

1. Susan Long, M. A. Mothibeli, F. T. Robb and D. R. Woods: Regulation ofExtracellular Alkaline Protease Activity by Histidine in a Callagenolytic *Vibrio alginolyticus* Strain., *Journal of General Microbiology*, **127**, p193-199 (1981)
2. Graham C. Reid, David R. Wood, and Frand T. Robb : Peptone Induction andRifampin-Insensitive Collagenase Production by *Vibrio alginolyticus*., Journal of Bacteriology, May, p447-454 (1980)
3. 오양호, 박영민, 차미선, 김민정 : *Vibrio parahaemolyticus bc-7*가 생산하는 protease에 관한 연구., 감염, **30**(1), 24-35 (1998)
4. Chia-Yin Lee, Shiun_cheng Su and Ren-Bao Liaw: Molecular analysis of anextracellular protease gene from *Vibrio parahaemolyticus*., Microbiology, **141**, 2569-2576 (1941)
5. Graham C. Reid, David R. Wood, and Frand T. Robb : Peptone Induction andRifampin-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. 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, **82**(96), 598-600 (1996)
8. Joseph R. Merkel and Jose;h H. Dreisbach : Purification and Characterization of aMarine Vacterial Collagenase, Biochemistry **17**(14), 2857-2863 (1978)
9. 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, Vol. 65, No.5, May , p1830-1835 (1997).
10. 김선희 : 미생물학 실습(기초편), p193-212 (1992)