감 염 제 30 권 제 1 호 1998
Vol. 30, No. 1, 24 ~ 35

□원 저□

*Vibrio parahemolyticus bc-7*가 생산하는 Protease에 관한 연구

부산대학교 의과대학 미생물학교실

오양효 · 박영민 · 차미선 · 김민정

A Study about the Protease Produced by *Vibrio parahemolyticus bc-7*

Yang Hyo Oh, M.D., Ph.D, Mi Sun Cha, M.S. and Min Jung Kim, M.S.

Department of Microbiology, Pusan National University Medical College, Pusan, Korea

Background : Bacterial extracellular protease has been implicated as an important virulence factor in several infections. In *Vibrio sp.*, protease involvement has been demonstrated by the decreased virulence of protease-deficient mutants. We characterized the protease from *V. parahemolyticus bc-7* with purification.

Methods : 100 Vibrio isolates from sea water and sea products were studied. The bacteria grown in Brain Heart Infusion broth were screened for protease production by incubating on tryptic soy agar plate containing gelatin and subsequently flooding the plate with 12.5% $HgCl_2$-1M HCl. A clear zone indicated protease activity. Optimal conditions for protease production were determined by pH, temperature and NaCl concentration. Protease was purified from culture filtrates and its biological analysis was carried out.

Results : Out of Vibrio isolates studied, *V. parahemolyticus bc-7* produced protease in the highest titer. Maximal yields of the protease was obtained when the bacteria were grown in Brain Heart Infusion broth with initial pH of 8.0, 3% NaCl at 30℃. Production of the protease was optimal during the late exponential phase. Homogeneity of the purified protease was demonstrated by revealing a 65kDa band on SDS-PAGE. The protease was stable at 50℃ and 70% of the activity was lost by heating at 60℃ for 30 min. The protease was stable at a pH between 5～10, but under pH 4.0, the activity was lost completely.

Conclusion : General and serological studies are warranted to clarify the diffences and further characterize the protease as a virulence factor in *Vibrio sp.*

Key Words : *Vibrio parahemolyticus bc-7*, Protease

서 론

비브리오속은 해양에 서식하는 미생물로서 해수, 갯벌, 어류, 패류, 해조류와 각 종 해산물에 부착 서식하고 있는 호염성 세균이다. 이 균들 중 특히 사람에게 질병을 일으키는 것으로서 *V. cholerae*와 더불어 *V. vulnificus*, *V. furnissii, V. alginolyticus, V. damsela* 및 *V. mimcus* 등이 있으며, 이들 중 비교적 근래에 동정된 *V. mimicus*의 분류학적인 위치는 비브리오과의 비브리오속에 속하는 그람음성 간균으로서 전세계의 해안에 분포하고 있는 인체 병원균이며, 사람에게 다양한 형태의 병을 유발시킨다[1-3]. 인체 병원균으로 보고되고 있는 이들 비브리오속들은 해안의 해수와 어패류 등에서 분리되는데 *V. cholerae*(NAG *Vibrio*), *V. fluvialis, V. funissii, V. hollisae, V. mimicus, V. parahemolyticus* 등은 위장염을 일으켜 설사증을 유발하고[4-11], *V. damsela*는 주로 사람과 어류에 창상감염을 유발하며[4, 10, 11], *V. alginolyticus*는 원래 비병원성균으로 생각되었으나 최근에 창상감염, 중이염, 눈병 등을 유발하는 것으로 보고되었다[4, 9]. 그리고 *V. vulnificus*는 패혈증과 창상감염을 일으키며 치사율이 50% 이상으로 알려져 있다[12-16]. 또한 *V. metshnikovii*는 특별한 병원성을 규명하기는 어려우나 해양계외에 복막염과 담낭염이 있는 환자의 혈액과 만성질환이 있는 환

접수 : 1997년 10월 20일, 승인 : 1998년 1월 14일
교신저자 : 오양효. 부산광역시 서구 아미동 1가 10번지
부산대학교 의과대학 미생물학교실
Tel : 051)240-7710～1,
Fax : 051)243-2423

자의 뇨 등에서 분리되고 있다[4, 17]. 생화학적으로 비정형적인 *V. cholerea* 균주들을 DNA유연성 조사를 함으로써 당 비발효성인 균주는 몇 개의 독립된 종들로 구성되어 있음이 밝혀졌다. 1981년 Davis 등[8]은 DNA 유연관계 조사를 통하여 *V. cholerae* non-O1과 생화학적 성상이 다른 새로운 균주를 분리하여 *V. mimicus*라고 명명 하였는데, 이는 *V. cholerae*균주와의 유사성 때문이었다. 비브리오속 세균들의 병원성에 관한 연구는 세포외독소인 enterotoxin에 대해 주로 진행되어 왔는데, Davis 등[18]은 heat-labile 및 heat-stable enterotoxin의 생산에 대해 보고한 바가 있다. 현재까지 밝혀진 독소들은 choleratoxin-like enterotoxin[5, 6], heat-stable enterotoxin[7, 8], thermostable direct hemolysin-like hemolysin[9], protease 등[10]과 같은 병원성 인자들이 있다. 그 중에서 protease의 경우는 몇몇 병원균, 즉 *Pseudomonase aeruginosa, Serratia marcescens, V. cholerae* 등에 의해 야기되는 질병에 있어서 주요한 독성인자로 작용하며, 균의 독력과 관계된 요소이다[11-14]. 이러한 맥락에서 연구가 진행된 예로는 *P. aeruginosa*가 생산하는 'Zinc metalloprotease'의 경우이며 이 연구를 통해 (1) protease의 활성이 결여된 균주는 독력이 약하다. (2) protease 활성이 불완전한 균주에게 정제 protease를 첨가할 경우 독성이 강화된다. (3) protease에 특이적인 항혈청이 존재하면 독력이 감소된다는 것이 알려졌다[11, 12]. 또한 *V. cholerae*의 metalloprotease의 경우는 일단 이 균이 숙주내로 침입하면, 장상피점막의 보호층을 파괴시킴으로써 콜레라 장관독소의 활성을 증강시키는 역할을 하며, 이러한 protease의 역할에 의해 균이 장내부에서 집락화되는 것이 촉진된다. 반면 이 효소를 생산하지 못하는 돌연변이체의 경우 감염력이 현저히 떨어지는 것으로 밝혀져 있다[13, 14].

창상감염과 사람의 패혈증의 원인균인 *V. vulnificus*에 의해서 분비되는 세포외 효소인 protease는 collagen 및 elastin이 함유되어 있는 조직내로 균이 침투하여 퍼져나가는 것을 돕는다[15, 16]. 뿐만아니라 용혈소은 인체의 주요 병원균 예를들면, *V. vulnificus, A. hydrophila, V. alginolyticus* 등의 균에 있어서 주요한 병인론적 인자로 작용하고 있다[17-19].

비브리오속의 경우에 있어서도 이 균이 생산하는 독소인 용혈소 및 단백분해효소는 사람에게 치명적인 영향을 미친다. 따라서 병원성 비브리오속들이 생산하는 세포외 효소인 protease을 정제하고 그 효소학적인 성질을 규명하여 병원성 비브리오의 독력을 밝히고자 한다. 또한 이러한 연구결과를 바탕으로 하여 비브리오속 균들의 병리기전에 대해 좀 더 근접할 수 있는 계기를 마련하고자 한다.

재료 및 방법

1. 사용 균주

1997년 7월에서 10월 사이에 부산시내의 해산물 및 부산 연, 근해의 해수를 채수하여 비브리오를 분리하였다.

2. 사용배지

해산물로부터 비브리오속 균주의 분리를 위해 사용한 배지는 alkaline peptone 수, TCBS agar, TSI, LIM agar 등이며, protease 생산능을 알아보기위해 1.5% NaCl을 첨가한 Brain Heart Infusin Broth(이하 BHI로 약함)를 사용하였는데. 모두 Difico Laboratories(Detroit Mishigan USA)의 제품이었다.

3. 사용 시약 및 기기

균의 배양을 위해 진탕배양기(120Rev.×6cm stroke, Vision Co. Ltd., Tokyo, Japan)를 사용하였으며, 배양상등액의 회수를 위해 냉각원심분리기(KONTRON CENTRICON T-24, Bromma, Swiss)를 사용하였다. 정제과정 중의 각 분획에 대한 단백질 농도 측정 및 균의 생육도 측정을 위해 분광광도계(Shimadzu U. V.-240, Kyoto, Japan)을 사용하였다. Protease의 활성측정을 위한 기질로는 casein(Junsei, Tokyo, Japan)을 사용하였으며, 효소반응 촉진을 위해 EYELA사의 항온수조를 이용하였다. Protease의 정제과정에 사용한 수지로는 DEAE-Sephadex A-50(Anion exchanger : Sigma Chemical Company St. Louis, USA) 및 Phenyl-Toyopearl 650M(Tosho, Tokyo, Japan)이었고 protease의 성질 규명을 위해 Protease inhibit set(Boehringer Mannhein Cat. No. 1206869)를 사용하였다.

분자량 측정을 위한 marker protein으로는 Prestained SDS-PAGE Standard(BioRad, low range, Calif, U.S.A)를 사용하였으며, 전기영동장치로는 BioRad Mini-protein Ⅱ를 사용하였다.

4. 효소활성측정법

1) 카제인에 대한 효소활성 측정

(1) 정성시험

고체배지 상에서 protease의 생산여부를 알아보기위해, 1% gelatin이 함유된 tryptic soy agar(Difico Laboratories Detroit Mishigan USA) 배지에 비브리오속 균주들을 접종하여 30℃에서 24시간 배양하였다. 그 후 평판배지에 12.5% $HgCl_2$-1M HCl 용액을 부어서 투명환이 생산되면 protease를 생산하는 것으로 판정하였다.

(2) 정량시험

0.02M Tris-HCl 완충액에 casein을 2% 되게 녹여 기질용액(pH 8.0)을 조제한 후, 기질 용액 500 μl에 효소액 500 μl를 첨가하여, 37℃ 항온수조에서 30분간 반응시켰다. 여기에 0.4M trichloroacetic acid(TCA)용액 1ml을 가하여 반응을 정지시키고, 20분간 정치시킨 후, 3,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 침전물을 제거하고 얻은 상등액 400 μl에 0.44M Na_2CO_3용액 2ml을 넣고, 2배 희석한 phenol reagent(Shinyo Pure Chemicals Co., LTD, Osaka, Japan) 800 μl를 가하여 잘 혼합한 후, 37℃ 항온수조에 20분간 방치하여 발색 반응이 일어나도록 한 후 540nm에서의 흡광도(A_{540})를 측정하는 한편, blank test를 하여 본시험과 540nm에서의 흡광도의 차로써 활성을 측정하였다. 표준곡선은 0.2N-HCl에 tyrosine 20 μg에서 120 μg을 녹여 같은 방법으로 결정하였다. Protease 활성의 1unit(PU)은 37℃에서 1분 동안 1 μg의 tyrosine을 생산하는 효소의 양으로 정의하였다.

5. 단백질 정량

효소 정제과정 중의 단백질 농도는 분광광도계를 사용하여 280nm에서의 흡광도(A_{280})로 나타내었고, 나머지의 단백질농도는 bovine serum albumin을 표준단백질로 하여 Bradford assay 방법[33]으로 측정하였다.

6. Protease 생산에 영향을 미치는 인자

비브리오속의 protease 생산에 영향을 미치는 인자에는 여러 가지가 있을 것으로 사료되지만 본 균주의 원래 서식처가 해양인 점을 고려하여 Na^+ 농도 및 온도, 초발 pH 등의 영향을 조사하였다.

1) 초발 pH의 영향

증균용 배지인 BHI배지를 각 pH별로 조정하여 18시간 진탕배양하여 protease활성을 검토하였다.

2) 온도의 영향

비브리오속은 해수의 온도가 높아지는 계절에 증식이 빠른 것으로 알려져 있다. 배양온도를 10℃에서 50℃까지 각 단계별로 조정하여 protease활성을 측정하였다.

3) Na^+의 영향

비브리오속의 성장에는 Na^+의 농도가 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 균주에 의해 생산되는 protease 역시 Na^+농도에 영향을 받는 지를 알아보기위해 BHI배지에 NaCl농도를 달리하여 18시간 진탕배양한 후 protease활성을 측정하였다.

7. Protease의 생산 및 정제

1) 배양조건

1.5% NaCl을 가한 BHI 액체배지를 500ml의 진탕플라스크에 분주하여 고압멸균한 후, 전배양한 배양액(A_{660}=1.8)을 접종하여 진탕배양 하였다. 배양 온도는 protease 생산에 가장 최적인 온도에서 균을 배양하며, 균배양 시간은 배양상등액에 대해 protease활성을 측정하여 효소의 활성이 가장 높아지는 시점까지를 배양시간으로 정하였다. 그 후 배양액을 냉각원심분리하여 상등액만을 회수하여 정제를 실시하였다.

2) 황산암모늄 친전

포화시키는 황산암모늄의 최종 농도는 예비 실험을 통하여 결정하였다. 황산암모늄 분말을 배양 상등액에 천천히 첨가하며 녹인 후 4℃에서 하룻밤 방치하였다. 이것을 냉각원심분리하여 침전물을 회수한 후 소량의 완충액에 녹여, 동일한 완충액으로 2내지 3일간 투석시키면서 수차례 완충액을 교환하였다.

3) Ion exchange chromatography

음이온 교환수지인 DEAE-Sephadex A-50 column chromatography에서 20mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex column(2.0×30cm)에 조효소액을 흡착시킨 후 column의 평형화에 사용한 완충액으로 충분히 용출시켜 비흡착된 단백질을 제거한 다음, 0M에서 1.0M의 Tris-HCl 완충액으로 흡착된 단백질을 용출시켰다. 용출된 각각의 분획에 대하여 280nm에서의 흡광도 및 각 효소의 활성을 알아보고 활성 부위만을 회수하여 정제 단계에 사용하였다.

4) Hydrophobic interaction chromatography

30% 황산암모늄을 함유하고 있는 20mM Tris-HCl 완

충액(pH 8.0)으로 충분히 평형화시킨 Phenyl-Toyopearl 650M column(2.0×7cm)에 이 효소액을 흡착시킨 후, 동일한 완충액으로 불순 단백질 및 비흡착된 단백질을 용출시켰다. 흡착된 단백질을 용출시키기 위해서는, 20mM Tris-HCl 완충액의 황산암모늄 농도를 20%, 10%, 0%로 농도를 달리하면서 용출을 하였다. 용출된 각각의 분획에 대하여 280nm에서의 흡광도 및 protease 활성을 알아보고 활성 부위만을 회수하여 다음의 정제 단계에 사용하였다.

8. 정제된 효소의 물리학적 및 효소학적 성질

1) 자외선 흡광도 측정

정제된 protease의 자외선 영역에서의 흡광도를 측정하였다.

2) 분자량 측정

정제된 protease의 분자량을 측정하기 위해 Laemmli의 방법[34]에 준해 SDS-PAGE를 하였다. Separating 겔의 조제를 위해서는 5% T, 3.3% C인 acrylamide 용액과 0.4% SDS를 함유하는 1.5M Tris-HCl 완충액(pH 8.8)을 사용하여 12% polyacrylamide 겔을 조제하고, stacking 겔은 5% T, 3.3% C인 acrylamide 용액 및 0.4% SDS를 함유하는 0.5M Tris-HCl 완충액(pH 6.8)을 사용하여 5% 겔을 조제하였다. 시료의 조제는 2% SDS 및 β-mercaptoethanol을 함유하는 sample buffer와 정제된 효소를 섞어서 100℃에서 5분간 끓인 후 전기영동을 실시하였다.

3) 온도 안전성 시험

효소 1ml(5units/ml)을 0.02M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 준비한 후, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃, 75℃ 및 80℃에서 각각 30분간 열처리하여 잔존활성을 측정하였다. 2% casein용액을 사용하여 protease활성을 측정하였다.

4) 최적 반응온도

정제된 효소 500 μl(4units/ml)와 기질용액을 동량으로 섞은 후, 20℃에서 80℃까지의 각 단계별 온도에서 30분간 반응시킨 후 잔존활성을 측정하였다.

5) pH 안전성 시험

효소 50 μl(0.1mg/gl)를 950 μl의 각종 완충액(pH 3.0~pH 10.0, 0.02M)들과 혼합하여 최종 pH를 3.0에서 10.0까지 각 단계별로 조정하였다. 이 반응액을 20℃에서 24시간 방치한 후, 700 μl를 취하여 0.02M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로써 pH 8.0으로 일정하게 맞춘 다음 잔존활성을 측정하였다.

6) 효소반응의 최적 pH

Casein에 대한 효소반응의 최적 pH를 알아보기 위하여, pH 5.0에서 10.0 범위의 여러 완충액에 casein을 2% 되게 녹인 후, 이것을 기질용액으로 사용하였다. 준비한 각각의 기질용액들과 Tris-HCl 완충액(0.01M, pH 8.0)으로 희석하여 준비한 정제된 효소액(0.01mg/ml)을 동량으로 섞은 후 잔존활성을 측정하였다.

결 과

1. 사용 균주

1997년 7월에서 10월 사이에 부산시내의 해수 및 해산물로 부터 *V. parahemolyticus* 23주, *V. mimicus* 12주, *V. alginolyticus* 14주, *V. vulnificus* 21주, *V. furnissii* 15주, *V. damsela* 15주 도합 100 균주가 분리되었다.

Table 1. Purification of Protease from *V. parahemolyticus bc-7*

Purification step	Volume(ml)	Total protein(mg)	Total activity(PU[a])	Specific activity (PU/mg)	Relative purification[b]	Yield[c](%)
Culture supernatant	1110	14541.0	18737	1.3	1.0	100
Ammonium sulphate precipitate	18	311.4	20736	66.6	51.2	111
DEAE-Sephadex A-50	85	52.0	19584	376.6	289.7	105
Phenyl-Toyopearl 650M	4	6.3	11949	1896.7	1459.0	85

[a] : One protease unit(PU) is defined as the amount of the protease which produced 1 μg of tyrosin per min at 37℃.
[b] : The specific activity of culture supernatant was used as the standard and assigned the value of 1.
[c] : The total protease activity of culture supernatant was assigned the value of 100%, and the total activity from each step was compared with that of culture supernatant.

2. Protease 생산 확인

비브리오속 균주들의 protease생산 여부를 알아보기위하여 1% 젤라틴이 함유된 tryptic soy agar(TSA)배지에 전배양액을 접종하고, 30℃에서 18시간 배양한 후 12.5% $HgCl_2$-1M HCl 용액을 부어서 투명환이 생산되는 지의 여부를 관찰하여, protease생산능을 판정한 결과 Fig. 1과 같았다. *V. parahaemolyticus* 23균주중에서 16균주(69.5 %), *V. mimicus* 12균주중에서 9균주(75%), *V. alginolyticus* 14균주중에서 11균주(78.5%), *V. vulnificus* 21균주중에서 15균주(71%), *V. furnissii* 15균주중에서 10균주(66.6%), *V. damsela* 15균주중에서 10균주(66.6%)로 각각 protease생산능은 비교적 높은 것으로 나타났다. 이 중 *V. alginolyticus*균이 78.5%로 가장 높은 protease생산능을 나타내었다. Protease를 생산하는 균주들를 대상으로 protease활성을 측정한 결과, *V. parahemolyticus bc-7*의 활성이 가장 높게 나타났다 따라서 본 실험의 공시균주로 정하여 실험을 실시하였다.

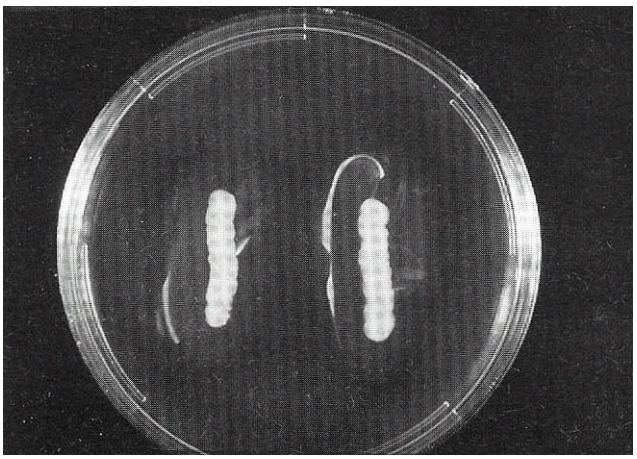

Fig. 1. Protease production was determined by culture *V. parahemolyticus bc-7* on tryptic soy agar containing 1% gelatin from overnight and by using 12.5% $HgCl_2$-HCl.

3. Protease 생산에 영향을 미치는 인자

1) 초발 pH의 영향

증균용 배지인 BHI배지를 각 pH별로 조정하여 18시간 진탕배양한 후 protease생산능을 검토한 결과 Fig. 2에서와 같이 pH 8에서 pH 9 사이에서 protease의 생산이 가장 많았다.

2) 온도의 영향

배양온도를 10℃에서 50℃까지 각 단계별로 조정하여 protease 생산능을 측정한 결과 Fig. 3에서와 같이, 30℃에서 가장 많았으며, 40℃이상에서는 생산능이 급격히 떨어지는 것을 알 수 있었다.

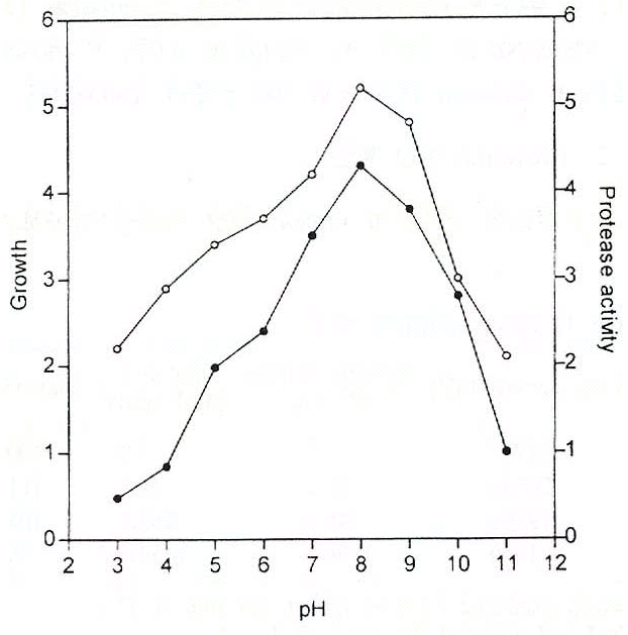

Fig. 2. Effect of pH on the growth and protease production of *V. parahemolyticus bc-7* from culture supernatant.
● : growth, ○ : protease activity.

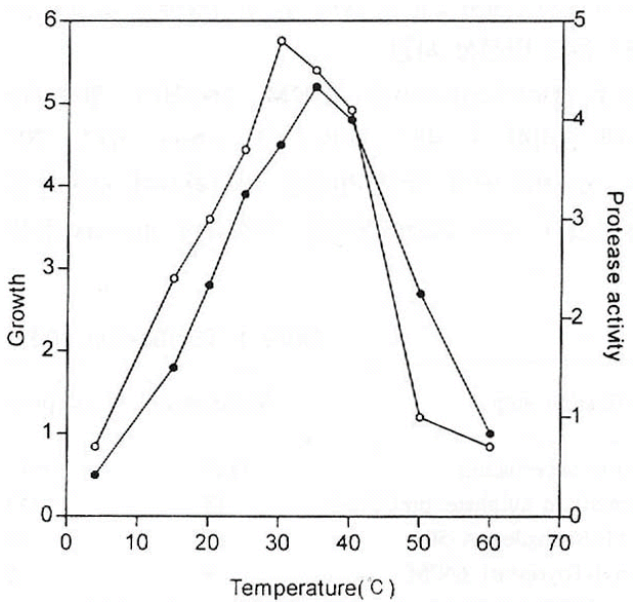

Fig. 3. Effect of temperature on the growth and protease production of *V. parahemolyticus bc-7* from culture supernatant.
● :growth, ○ :protease activity.

3) Na^+의 영향

BHI배지에 NaCl농도를 각기 달리하여 18시간 진탕배양한 후, protease 활성을 측정한 결과, Fig. 4와 같이 나타났다. NaCl농도가 3%일 때 protease 생산이 가장 많았고 대체로 2%에서 4%일 때 높은 protease생산능을 보여 주었다.

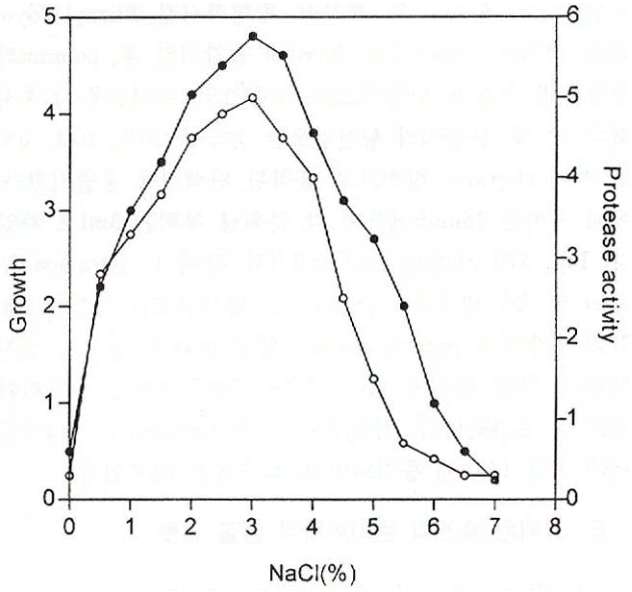

Fig. 4. Effect of NaCl on the growth and protease production of *V. parahemolyticus bc-7 from* culture supernatant.
●:growth, ○:protease activity.

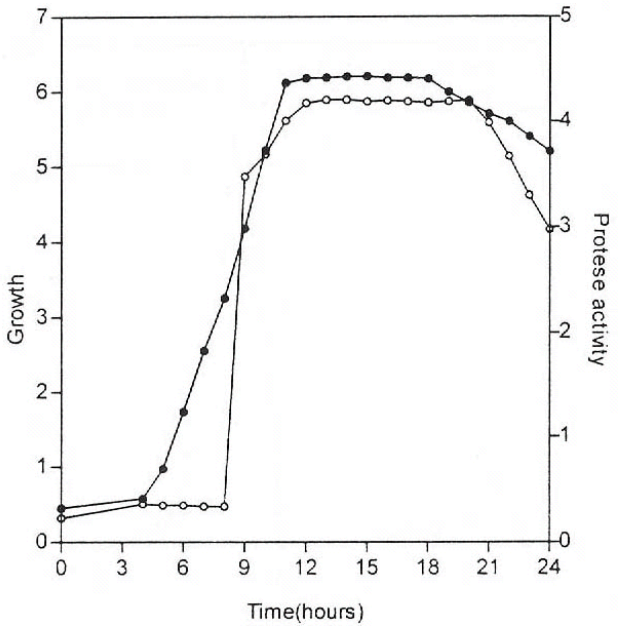

Fig. 5. Growth and protease production by *V. parahemolyticus bc-7* from culture supernatant
●: growth, ○: protease activity.

4. 배양시간에 따른 protease 생산

3% NaCl을 첨가한 BHI 배지를 pH 8.5로 맞추어 500ml 진탕플라스크에 100ml 넣고 여기에 *V. parahemolyticus bc-7* 전배양액(A_{660}=1.0)을 1ml 접종하여, 30℃에서 진탕배양하였다. 배양 4시간째부터 1시간 간격으로 배양액을 2ml씩 채취하여, 균의 증식정도 및 protease의 활성을 알아보았다. 균의 증식정도는 660nm 파장으로 측정하였다. Protease의 활성을 casein에 대한 배양상등액의 활성으로 측정한 결과, Fig. 5와 같았다. 대수증식기 중기인 배양 9시간에 도달하여 protease활성이 나타나기 시작하였으며, 대수증식기 말기 및 정지기에 이르면서 효소의 생산이 점차 증가하여 배양 18시간에 이르러 최대로 되고 그 이후 다소 감소하는 것으로 나타났다.

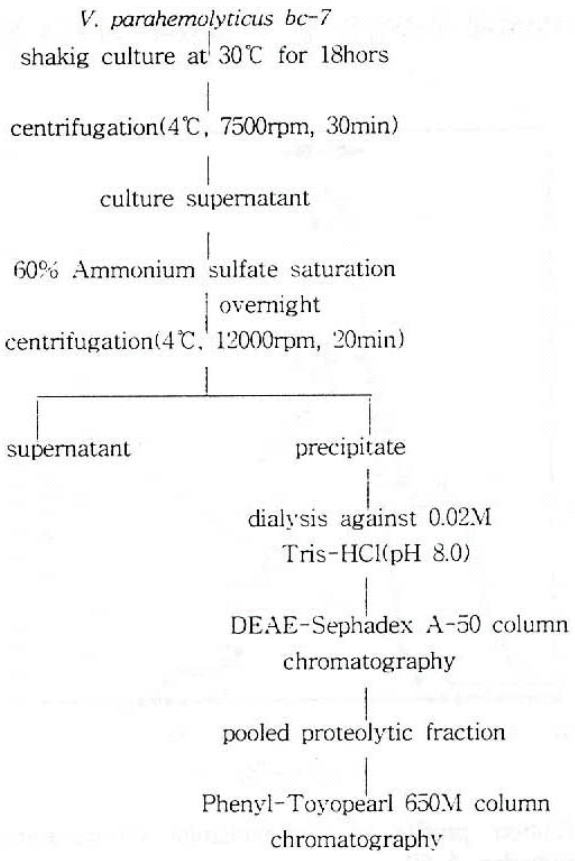

Fig. 6. Flow diagram of the purified of protease from *V. parahemolyticus bc-7.*

5. *V. parahemolyticus bc-7*가 생산하는 protease 정제

1) 배양 상등액

*V. parahemolyticus bc-7*균주를 3% NaCl이 첨가된 BHI에 접종하여 30℃에서 20시간 진탕배양한 후 4℃, 7500rpm, 30min로 냉각원심분리하여 상등액만을 회수하였다. 총 배지 용량은 1.2L를 사용하였으며 회수된 상등액은 1,100ml 였다. 배양 상등액의 단백질량은 13.1mg/ml 이었으며, protease 활성은 16.88units/ml 이었다.

2) 황산암모늄 침전 및 투석

회수한 배양상등액에 황산암모늄 분말을 60%되게 포화시킨 후 4℃에서 18시간 방치한 후 4℃, 12000rpm, 20min로 냉각원심분리하여 생산된 침전물을 모아 20mM Tris-HCl(pH 8.0)에 녹여 동일한 완충액으로 투석한 후 이것을 조효소액으로 사용하였다. 조효소액의 비활성은 66.6units/mg이었으며, 배양상등액에 비해 51.2배 증가되었고 회수율은 111%로 나타났다.

3) DEAE-Sephadex A-50 column chromatograp0hy

조효소액을 10,000rpm으로 15분간 원심분리하여 불용성 침전물을 제거시킨 후 20mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로 평형화시킨 DEAE-Sephadex A-50 column(2.0×30cm)에 조효소액을 흡착시켰다. 흡착이 끝난 후 column의 평형화에 사용했던 완충액으로 충분히 용출시켜 비흡착된 단백질을 제거한 다음, Tris-HCl 완충액(0.02M, pH 8.0)의 NaCl 농도를 0M에서 1.0M까지 직선구배를 걸어 흡착된 단백질을 용출시켰다. 이 때의 유속은 25ml/h이었으며, 각 분획의 부피는 5ml로 하였다. DEAE-Sephadex A-50 column으로부터의 정제과정을 Fig. 6에 도시하였다. 각 분획에 대해 A_{280}과 protease활성을 측정한 결과 32번에서 42번 사이의 부분이 protein peak와 활성 peak가 비교적 일치하여 이 부분을 모아 다음 정제단계에 사용하였다. Protease는 완충액의 NaCl 농도가 0.3M일때 용출됨을 알 수 있었다. 회수된 활성부위의 총부피는 50ml이었고, 총 단백질량은 52.0mg이었며, 비활성은 376.6units/ml로 배양상등액에 비해 289.7배 증가되었고 회수율은 105%였다.

4) Phenyl-Toyopearl 650M column chromatography

DEAE-Sephadex A-50 column chromatography하여 모은 활성부위를 20mM Tris-HCl 완충액(pH 8.0, 30% 황산암모늄 함유)으로 충분히 평형화시킨 Phenyl-Toyopearl 650M column(2.0×7cm)에 흡착시킨 후, column의 평형화에 사용한 완충액으로 비흡착된 단백질을 용출시켰다. 그 후 완충액의 황산암모늄 농도를 20%, 10%, 0%로 하여 stepwise 방식으로 흡착된 단백질을 용출시

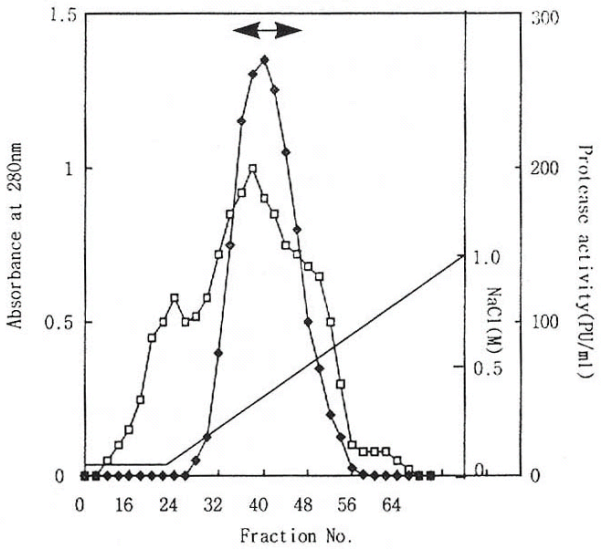

Fig. 7. Elution profile of ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50.
□ : absorbance at 280nm, ◆ : protease activity
↔ : fractions concentrated for further purification

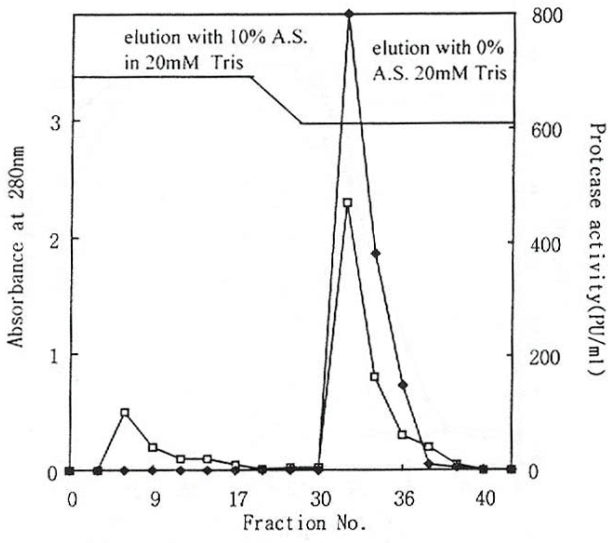

Fig. 8. Elution profile of chromatography on Phenyl-Toyopearl 650M.
□ : absorbance at 280㎚, ◆ : protease activity.

켰다. 이때 유속은 25ml/h였으며 각 분획당 부피는 3ml로 하였다. Fig. 7의 elution profile에서와 같이 *V. parahemolyticus bc-7*가 생산하는 protease는 황산암모늄 농도가 0%일때 용출되며 protein peak와 활성 peak는 정확히 일치하였다. 가장 활성이 높은 부분인 32번 분획을 회수하여 -20℃에 보관하였다. 비활성은 1896.7 units/ml로 배양상등액에 비해 1459배 증가되었고, 회수율은 85%였다.

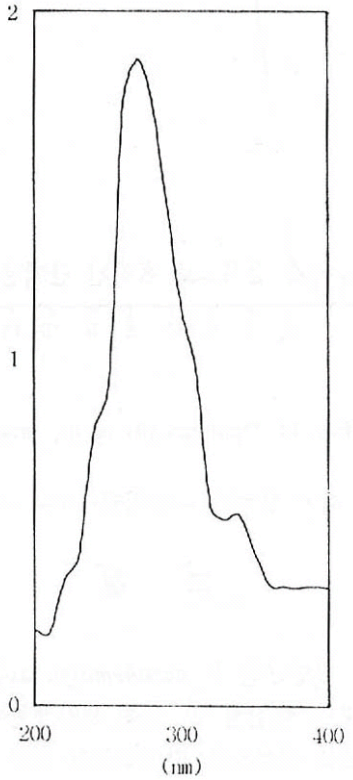

Fig. 9. Ultraviolet adsorption spectrum of the purified protease.

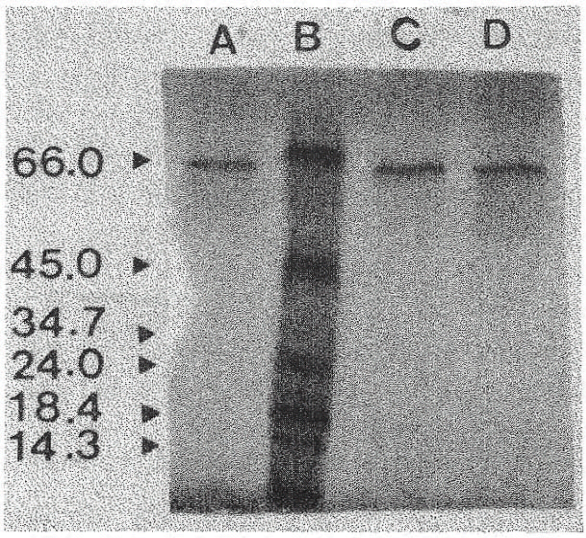

Fig. 10. SDS-PAGE of the purified protein. B : molecular weight marker. A ,C ,D : purified enzyme.

6. 정제된 효소의 물리화학적 성질 검토

1) Ultraviolet absorption spectrum

정제된 *V. parahemolyticus bc-7* protease의 자외선 영역에서의 흡광도를 측정한 결과, 단백질의 전형적인 양상을 나타내었고 280nm에서 최대 흡광도를 나타내었다(Fig. 9).

2) 분자량 측정

2%의 SDS 및 β-mercaptoethanol을 함유하는 sample buffer와 정제된 효소를 혼합하여 100℃에서 5분간 boiling하여 전기영동을 실시하여 분자량을 측정하였다. 그 결과 정제된 protease의 분자량은 65KD이었다(Fig. 10).

3) 온도 안정성 시험

*V. parahemolyticus bc-7*가 생산하는 protease의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위해, 정제된 효소 1ml (5units/ml)을 pH 8.0의 0.02M Tris-HCl완충액에 준비한 후, 20℃에서 80℃까지의 각 온도에서 30분간 방치한 후 casein에 대한 효소의 활성을 측정한 결과 Fig. 7과 같았

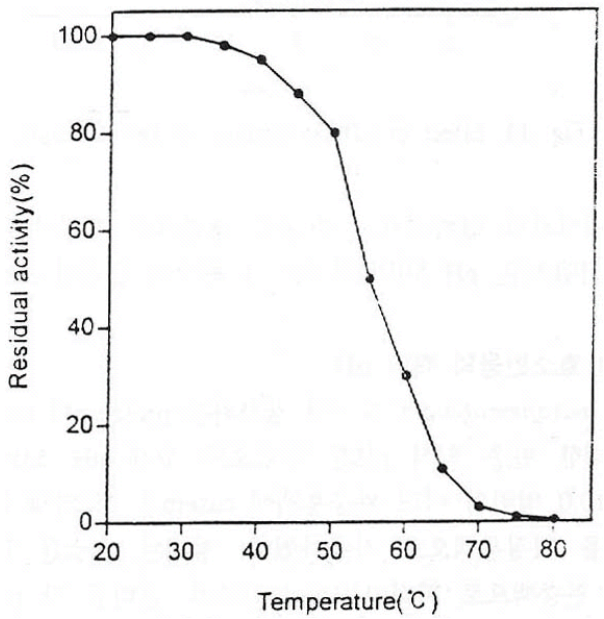

Fig. 11. Thermal stability of the protease.

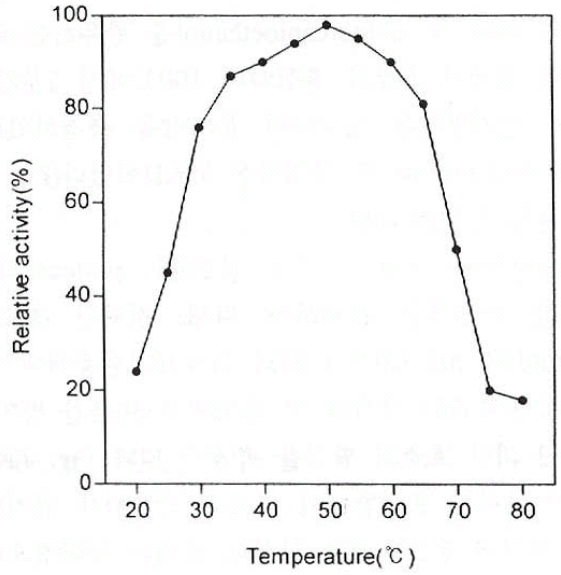

Fig. 12. Optimum temperature of the protease.

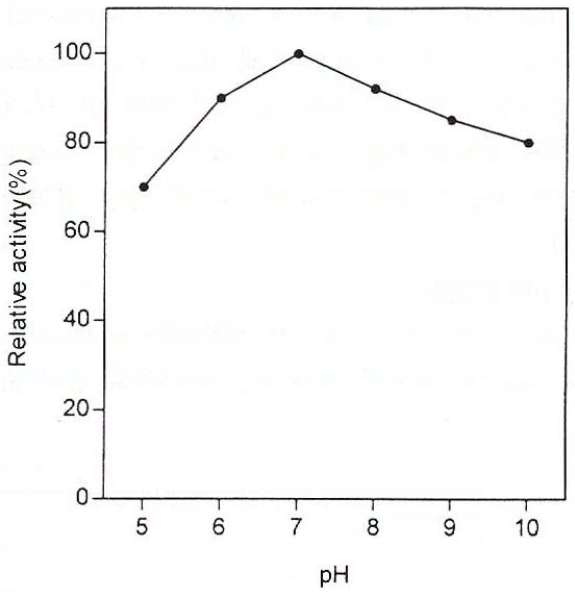

Fig. 13. Effect of pH on stability of the protesae.

다. 50℃까지는 효소활성이 비교적 안정하게 유지되었지만 그 이상의 온도에서는 활성이 급격히 떨어졌으며, 70℃이상에서는 활성이 완전히 소실되었다.

4) 최적반응 온도

*V. parahemolyticus bc-7*가 생산하는 protease의 최적 반응온도를 알아보기 위해 정제 효소 0.5ml(4units/ml)과 기질용액을 동량으로 섞은 후, 20℃에서 80℃까지의 각

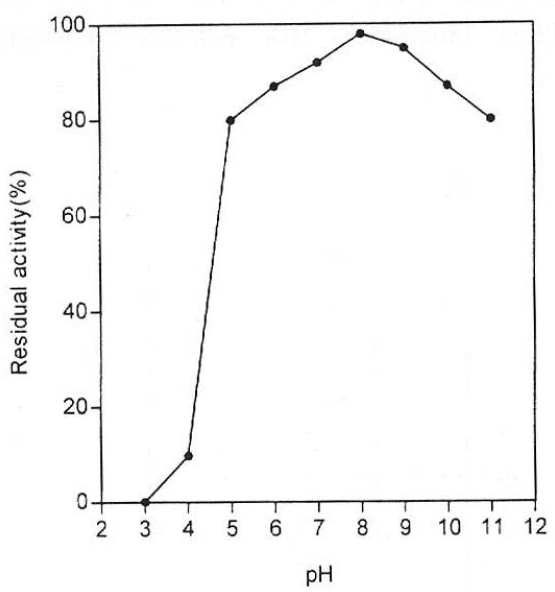

Fig. 14. Optimum pH of the protease.

온도에서 30분간 반응시킨 후 casein에 대한 활성을 측정한 결과, Fig. 12같이 50℃에서 가장 높은 활성을 보여 주었다.

5) pH 안정성

*V. parahemolyticus bc-7*가 생산하는 protease의 pH에 대한 안정성을 조사한 결과 Fig. 13에서와 같이 pH 5에서 10까지의 범위에서는 비교적 안정하여 활성이 거의 유지되었지만, pH 5미만에서는 그 활성이 급격히 소실되었다.

6) 효소반응의 최적 pH

*V. parahemolyticus bc-7*가 생산하는 protease의 casein에 대한 반응 최적 pH를 알아보기 위해 pH 5.0에서 pH 10.0 범위의 여러 완충용액에 casein을 2%되게 녹여 이것을 기질용액으로 사용하였다. 정제된 효소를 Tris- HCl 완충액으로 희석(0.01mg/ml)하여, 준비된 각 pH의 기질용액과 동량으로 섞은 후 잔존 활성을 측정한 결과, pH 7.0에서 최고 활성을 나타내었다(Fig. 14).

고 찰

식중독의 원인균인 *V. parahemolyticus*는 해양서식 미생물로서 해수, 해산물 및 각종 해양생물에 부착하여 서식하는 호염성 세균으로, 발병빈도가 높은 감염형 식중독

의 원인균이다. 근래에는 식중독 원인균인 *V. parahemolyticus* 외에 창상감염, 패혈증의 원인이 되는 다른 비브리오종의 분리, 동정이 활발히 진행되고 있다[2, 30]. 그러나 그 중에서도 감염형 식중독의 원인균인 *V. parahemolyticus*에 의한 식중독의 발생 보고는 끊이지 않고 있는 실정이다. *V. parahemolyticus*는 상피세포에 부착할 수 있는 감수성 물질인 장관독소를 생산하여, 장관막의 adenyl cyclase를 활성화 시킴으로써 숙주세포내의 cyclic AMP의 농도를 높인다[35]. 이렇게 높아진 cyclic AMP의 농도로 인해 조직 및 결장 내에서 비 정상적인 전해질 이동이 야기된다. 그리하여 세포의 정상적인 조절 작용이 와해되어 산증을 유발하거나 순환계로 부터의 수분 공급을 충분치 못하게 한다. 이와같은 장관독소는 일부 그람음성균에 의해 생산되는 것으로 균이 대수증식기에 이를 때 단백질 성분인 이 독소가 분비되어 포유동물의 체내에서 여러 세포를 파괴하는 것으로 알려져 있다. 장내세균에 의해 생산, 분비되는 장관독소에 관한 연구는 여러 균주를 대상으로 연구된 바 있다. 또한, 지금까지 식중독의 원인균인 *V. parahemolyticus*가 생산하는 세포용해물질의 일종인 용혈소에 대한 정제 및 그 성질이 보고 되어 왔으나, 대부분이 환자 분리주에서 유래하였다. 따라서 본 실험자는 이 균주의 원래 서식처가 해양인 점을 고려하여, 해양에서 균주를 분리해 내고, 그 균주의 protease 생산을 위한 최적 조건을 알아보는 한편, protease를 정제하여 그 성질을 규명하고자, 부산시내의 해수 및 해산물로 부터 비브리오속 100균주를 분리해내고 공시균주인 *V. parahemolyticus bc-7*의 protease 생산을 위한 최적조건을 조사하였다. 그 결과, *V. parahemolyticus bc-7*의 protease는 30℃에서 pH 8.0, 3% NaCl을 첨가하여 배양하였을 때 생산이 가장 우수하였다. 이 결과는 본 공시균주의 서식처가 해양인 점을 고려해 볼 때 해양환경과 유사한 조건일 때 protease의 생산이 우수하다는 것을 알 수 있었다. 그리고 *V. parahemolyticus bc-7*이 생산하는 protease를 정제하였는데, Sephadex G-100 column chromatography 후에는 수율도 낮았으며, 활성이 급격히 감소하여 정제과정에 사용하지 않았고, 그 대신 Phenyl-Toyopearl 650M을 사용하여 hydrophobic interaction chromatography를 행한 결과, 비활성은 1896.7 unit/ml로써 배양상등액에 비해 1459배 정제된 효소를 얻을 수 있었으며 수율은 85%로 매우 높았다. 또한 정제된 protease의 분자량 측정을 위해 SDS-PAGE를 실시하였는데 65kD 이었다. *V. parahemolyticus bc-7*가 생산하는 protease는 *V. vulnificus* 및 *A. hydrophila* 등이 생산하는 protease와 성질이 유사한 것으로 나타났다. 즉 효소활성의 최적 pH는 7.5였고, pH 5.0에서 10.0 범위에서 비교적 안정하였는데, 특히 pH 8.0이상의 알칼리 영역에서 오히려 더욱 안정하였다.

앞으로 본 실험을 더욱 진전시켜 실험동물 및 어류에 대한 독성을 밝히는 한편, *V. parahemolyticus bc-7*이 숙주내로 침입하여 질병을 유발하는 병리기전을 분자적 수준에서 연구되어야 할 것이며, protease가 작용하는 표적기관에 대해서도 더욱 심도있게 연구되어야 할 것으로 사료된다.

요 약

목 적 : 세포외 효소인 protease는 몇몇 병원균, 즉 *Pseudomonase aeruginosa, Serratia marcescens, Vibrio cholerae* 등에 의해 야기되는 질병에 있어서 주요한 독성인자로 작용하며, 균의 독력과 관계된 요소이다. 비브리오 속의 경우, protease 생산능이 결여된 변이주에서는 독력이 현저히 감소된다는 사실이 여러 연구자에 의해 밝혀졌다. 그러나 protease 생산능과 병원성과와 관련성을 명백히 입증하기 위해서는 효소의 정제 및 특이 항혈청을 포함하는 실험적 근거가 필요하다. 따라서 1997년 7월에서 10월 사이에 부산시내의 해수 및 해산물로부터 비브리오속 100균주를 분리하여, protease를 정제하여 물리화학적 특성을 밝히고자 하였다.

방 법 : 분리된 비브리오속 균주들의 protease생산 여부를 알아보기 위하여 1% 젤라틴이 함유된 tryptic soy agar 배지에 전배양액을 접종하고, 30℃에서 18시간 배양하여 12.5% $HgCl_2$-1M HCl 용액을 부어서 투명환이 생산되는 지의 여부로 판정하였다. 또한 casein에 대한 protease의 활성을 측정하고, 활성이 가장 높은 균주를 대상으 로 pH, 온도 및 NaCl 농도가 protease 생산에 미치는 영향을 조사하고, 최적조건하에서 생산된 protease를 유안침전, DEAE-Sephadex A-50 및 Phenyl-Toyopearl 650M column chromatography를 실시하여 정제하고, 정제된 효소의 분자량, 온도 안정성 및 pH 안정성 등 물리화학적 성상을 규명하였다.

결 과 : 분리된 100균주를 대상으로 protease 생산능 및 활성을 측정한 결과, *V. parahemolyticus bc-7*이 pro-

tease 생산능이 가장 우수하였고, 이 공시균주는 초발 pH 8.0에서 pH 9.0, NaCl 농도가 3%, 배양온도 30℃에서 protease 생산이 가장 우수한 것으로 나타났다. *V. parahemolyticus bc-7*이 생산하는 protease는 배양 9시간째부터 그 활성이 나타나기 시작하여 대수증식기 말기 및 정지기에 이르러 최대로 되었으며, 그 이후 점차 감소하였다. 정제과정을 거치는 동안 비활성은 1896.7units/ml로 배양상등액에 비해 1459.0배 정제되었다. 수율은85%로 나타났다. 정제된 *V. parahemolyticus bc-7*가 생산한 protease의 자외선 영역에서의 흡광도는 단백질의 전형적인 양상을 나타내었고 280nm에서 최대흡광도를 나타내었으며, SDS-PAGE를 실시한 결과 정제된 protease의 분자량은 65KD 이었다. 또한 정제된 protease는 60℃까지 활성이 비교적 안정되게 유지되었고 최적반응 온도는 50℃였으며, pH 5에서 pH 10범위에서 비교적 안정하였으나 pH 4.0이하에서는 활성이 소실되었으며, 최적 pH는 7.0이었다.

결 론 : 비브리오 속이 생산하는 세포외 효소인 protease에 관한 다양한 연구들이 진행되어 왔지만 아직까지 그 병리기전 및 독성에 관해서는 정확하게 밝혀지지 않고 있다. 따라서 계속적인 연구를 통해 실험동물 및 어류에 대한 독성을 밝히는 한편, 분리균주가 숙주내로 침입하여 질병을 유발하는 병리기전을 분자적 수준에서 연구되어야 할 것이며, protease가 작용하는 표적기관에 대해서도 더욱 심도있게 연구되어야 할 것으로 사료된다.

참 고 문 헌

1) Harper HA, Rodwell VW and Mayes PA : *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 JD, Warner RA and Cleland DR : *Distribution and ecology of Vibrio vulnificus and otherlactose-fermenting marine vibrios in coastal waters of the southeastern United States. Appl Environ Microbiol 44:1404, 1982*
4) Farmer JJ Ⅲ, Hickman-brenner FW and Kelly MT : *Manual of Clinical Microbiology 4th ed. American Society for Microbiology Washington D.C., 1985*
5) Brenner DJ, Hickman-Brenner FW, Lee JV, Steigerwalt AG, Fanning GR, 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, 1983*
6) Lee JV, Shread P, Furniss AL and Bryant TN. *Taxonomy and description of Vibrio flubialis sp. nov. (synonym group F Vibrios, group EF 6). J Appl Bacteriol 50:73, 1981*
7) Hickman FW, Farmenr JJ Ⅲ, Hollis DG, Fannig GR, Steigerwalt AG, Weaver RE and Brenner DJ : *Identification of Vibrio hollisae sp. nov. from patients with diarrhea. J Clin Microbiol 15:395, 1985*
8) Shandera WX, Johnston JM, Davis BR and Blake PA : *Disease from infection with Vibrio mimicus, newly recognized Vibrio species. Ann Intern Med 93:169, 1983*
9) Sakazaki R and Shimada T : *Vibrio species as causative agents of food-borne infection. Developments in Food Microbiology 2, p123, 1986*
10) Kreger A : *Cytolytic activity and virulence of Vibrio damsela. Infect Immun 44:326, 1984*
11) Love M, Teebken-Fisher D, Hose JE, Farmmer JJ Ⅲ, Hickman FW and Fanning GR : *Vibrio damsela, a marine bacterium, cause skin lesions on the damselfish Chromis punctipinnis. Science 214:1139, 1981*
12) Blake PA : *Clinical features and an epidemiological study of Vibrio vulnificus infections. J Infect Dis 149:558, 1984*
13) Desmond FP, Janda JM, Adams FI and Botton EJ : *Comparative studies and laboratory diagnosis of Vibrio vulnificus, an invasive Vibrio sp. J Clin Microbiol 19:122, 1984*
14) Farmmer JJ Ⅲ : *Vibrio("Beneckea") vulnificus, the bacterium associated with sepsis, septicemia, and the sea. Lancet Ⅱ:903, 1979*
15) Kelly MT and Avery DM : *Lactose-positive Vibrio in seawater cause of pneumonia and septicemia in a drawing victim. J Clin Microbiol 11:278, 1980*
16) Tacket CO, Barret TJ, Mann JM, Roberts MA and Blake PA : *Wound infections caused by Vibrio vulnificus, a marine Vibrio, in sland areas of the USA. J Clin Microbiol 19:197, 1984*
17) Lee JV, Donovan TJ and Furniss AL : *Characterization, taxonomy, and emended description of Vibrio metschnikovii. Int J Syst Bacteriol 23:99, 1978*
18) Davis BR, Fanning R and Madden JM : *Characterization of biochemically atypical Vibrio cholerae strains and designation of a new pathogenic species, Vibrio mimicus. Clin Microbiol 14:631-639, 1981*
19) Pira WM and Fedorkacray PJ : *Purification of enterotoxins from Vibrio mimicus that appear to be identical to cholera toxin. Infect Immun 45:679-684, 1984*
20) Chowdhury MAR, Aziz KM, Kay BA, Rahim : *Toxin*

production by Vibrio mimicus strains isolated from human and environmental sources in Bangladesh. J Clin Microbiol 25(11):2200-2203, 1987

21) Arita M, Honda T, Miwatan T, Takeda T, Takao T and Shimonishi Y : *Purification and characterization of a heat-stable enterotoxin of Vibrio mimicus. FEMS Microbiol Lett 79:105-110, 1991*

22) Peina Y, Ogawa A and Ramamurthy T : *Vibrio mimicus are the reservoirs of the heat-stable enterotoxin gene (NAG-ST) among species of the genus Vibrio. World J Microbiol Biotech, 1993(in press)*

23) Nishibuchi M, Khaeomaneeian V, Honda T, Kaper JB and Miwatani T : *Comparative analysis of the hemolysin genes of Vibrio cholerae non-O1, V. mimicus and V. hollisae that are similar to the tdh gene of V. parahemolyticus. FEMS Microbiol Lett 67:251-256, 1990*

24) Chowdhury MAR, MIyoshi S and Shinoda S : *Vascular permeability enhancement by Vibrio mimicus protease and the mechanisms of action. Microbiol Immunol 35:1049-1058, 1991*

25) Holder IA and Haidaris CG : *Experimental studies of the pathogenesis of infectious dueto Pseudomonas aeruginosa; extracellular protease and elastase as in vivo virulence factors. Can J Microbiol 25:593-599, 1979*

26) Snell KI, A Holder, SA Leppla and CB Saelinger : *Role of exotoxin and protease as possible virulence factors in experimental infections with Pseudomonas aeruginosa. Infect Immun 19:839-845, 1978*

27) Lyerly, DC Gray and Kreger A : *Characterization of rabbit corneal damage produced by Serratia kerattis and by a Serratia protease. Infect Immun 33:927-932, 1981*

28) Schneider DR and Parker CD : *Isolation and characterization of protease-deficient mutants of Vibrio cholerae. J Infect Dis 138:143-151, 1978*

29) Wickboldt LG and Sanders CV : *Vibrio vulnificus infection. Case report and update since 1970. J Am Acad Dermatol 9:243-251, 1983*

30) Kothary MK and Kreger AS : *Production and partial characterization of an elastolytic protease of Vibrio vulnificus. Infect Immun 50(2):534-54, 1985*

31) Asao T, Kinoshita Y, Kozaki S, Uemura T, Sakaguchi G : *Purification and some propeties of Aeromonas hydrophila hemolysin. Infect Immun 46(1):122-127 1984*

32) Miyoshi N, Shimizu C, Miyoshi S, Shinoda S : *Purification and characterization of Vibrio vulnificus protease. Microbiol Immunol 31(4):13-25, 1987*

33) Bradford MM : *A rapid and sensitive method for the quantitation of protein-dye binding Anal Biochem 72:248-254, 1976*

34) Laemmli UK : *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature(London) 227:680-685, 1965*

35) Pelczar MJ, Chan ECS, Krieg NR : *Host microbe interactions : The process of infection. p687 Microbiology 5th ed Mcgrow-Hill book company New York, 1986*