

병원성 비브리오균의 용혈독소와 단백분해효소에 관한 연구

박미연 · 김현진 · 장동석
부경대학교 식품공학과

서론

병원성 비브리오균의 병원인자에는 hemolysin, protease, phospholipase A₂, siderophore 외에도 콜레라균만이 생산하는 cholera toxin 등이 있다. 이 중에서도 대부분의 병원성 비브리오균에서 생성되는 대표적인 인자는 hemolysin과 protease로 알려져 있다. Hemolysin은 혈액을 분해하는 독소로서 병원성 비브리오균의 분리·동정에 널리 이용되고 있다. Hemolysin은 균의 배양초기에서부터 서서히 생성되기 시작하여 대수증식기 말에 최대의 활성을 나타내며 안정기에 접어들면서 활성이 급격히 감소되는 것으로 보고되고 있다 (Kim et al., 1997).

따라서, 본 연구에서는 hemolysin과 protease를 모두 생성하는 *Vibrio cholerae* non O1 5균주와 *V. vulnificus* 2균주를 대상으로 protease가 hemolysin의 활성에 미치는 영향을 조사하였으며, Ca²⁺, Mg²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Ni⁺, K⁺, Na⁺ 등의 양이온의 이들 효소의 활성에 미치는 영향을 조사한 결과를 보고하고자 한다.

재료 및 방법

조독소액의 조제 : Brain Heart Infusion (BHI) broth 에 균을 접종하고 37°C에서 진탕배양하면서 매 시간마다 배양상청액 (7,000 ×g, 20분)의 hemolytic activity와 protease activity를 측정하여 각 효소의 최대활성 시기를 조사하였다. 또한 배양상청액 중의 activity가 최대일 때 배양액 (2L)을 원심분리하고, 배양상청액을 ammonium sulfate를 60% 포화되도록 첨가하여 4°C에서 하루밤 단백질을 석출시켜 원심분리 (12,000 ×g, 30분)한 후, 침전물을 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0) 30 ml에 녹여 -20°C에 보관하면서 조독소액으로 사용하였다.

Hemolytic activity 측정 : Hemolysin의 활성은 Yamamoto et al. (1994)의 방법에 준하였다. 활성측정용 용액으로는 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 140 mM NaCl, 0.04% NaN₃, 0.01% bovine serum albumin을 첨가하여 hemolysin 활성을 측정하였

다. 즉, 활성측정용액으로 단계별로 희석한 조독소액과 1% sheep erythrocytes를 동량혼합하여 37°C에서 1시간 반응시킨후 원심분리(3,000 ×g, 5분)한 상청액의 혈색소를 540 nm에서의 흡광도로 측정하고 상대활성을 조사하였다. 이 때 positive 대조구로서는 1% sheep erythrocytes를 D.W와 1:1 반응시킨 것, negative 대조구로서는 1% sheep erythrocytes와 활성측정용액을 1:1로 반응시킨 것을 사용하였다.

단백분해효소활성 : 단백질분해효소의 활성은 Denkin and Nelson (1999) 의 방법에 준하였다. 위의 활성측정용액 (1 ml) 에 azocasein (1%)과 희석한 조독소액을 첨가하여 37°C에서 30분간 반응시킨 후 10% trichloroacetic acid 1 ml을 첨가하여 반응을 중지시키고 원심분리 (3,500 ×g, 30 min)한 후 상청액 1.6 ml에 1.8 N NaOH를 0.4 ml 가하여 420 nm에서의 흡광도를 측정하므로써 단백질분해효소활성을 조사하였다.

양이온이 효소활성에 미치는 영향 : Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} 의 2가 양이온과 Ni^{+} , K^{+} , Na^{+} 의 1가 양이온을 최종농도가 2mM되도록 활성측정용액에 첨가하고 각각의 양이온이 hemolysin 및 protease의 활성에 미치는 영향을 조사하였다.

결과 및 요약

V. cholerae non O1 5균주와 *V. vulnificus* 2균주는 모두 대수증식기 초기부터 hemolysin 활성이 나타나기 시작하였다. *V. cholerae* non O1 5균주 중 2균주는 대수증식기 중기에 최대 활성을 나타내었으며 이후 급격히 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나 나머지 3균주는 대수증식기 중기에서부터 안정기에 걸쳐 최대활성이 안정적으로 유지되다가 이후 아주 서서히 감소하는 경향을 나타내었다. *V. vulnificus*의 경우에도 대수증식기 중기에서 부터 안정기에 걸쳐 안정된 활성을 나타내었으며, 그 이후 hemolysin의 활성이 서서히 감소하였다. 이 시기의 조독소액의 단백질분해활성을 조사한 결과, hemolysin 활성이 단백질 분해 효소의 생성과 동시에 감소되는 것을 알 수 있었다. 또한 이들 hemolysin과 protease 대한 양이온의 영향을 조사한 결과, 이들 효소는 양이온의 영향을 거의 받지 않는 것으로 나타났다.

참고문헌

- 김신희, 박미연, 이용연, 조묘현, 장동석. 1997. 해수분리 *Vibrio cholerae* non-O1 FM-3의 Hemolysin. 한국수산학회지, 30(4), 556~561.
- Park, K.S., T. Iida, Y. Yamaichi, K. Yamamoto, and T. Honda. 2000. Genetic Characterization of DNA Region Containing the trh and ure Genes of *Vibrio parahaemolyticus*. Infect. Immun. 68:5742-5748.
- Denkin, S.M. and D.R. Nelson. 1999. Induction of protease activity in *Vibrio anguillarum* by gastrointestinal mucus. Appl. Environ. Microbiol, 65, 3555~3560.