

水産物에서 分離된 病原性 비브리오균의 溶血性毒素

張東錫 · 篠田純男*

釜山水産大學校 食品工學科 · *日本國岡山大學校藥學部

Toxin Produced by Pathogenic Vibrios Isolated from Sea Food

Dong-Suck CHANG · Sumio SHINODA*

Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan,
Pusan 608-737, Korea

*Faculty of Pharmaceutical Sciences, Okayama Universtiy, Okayama 700, Japan

Among the currently recognized pathogenic vibrios, *V. vulnificus* and *V. cholerae* non O1 are the most serious bacteria from the point of view of sea food hygiene in Korea. In this paper, the authors compared the hemolytic activities of the crude hemolysin produced by *V. vulnificus* and *V. cholerae* non O1 isolated from shellfish collected in Chungmoo, Korea.

The authors also attempted to improve the purification method of *V. vulnificus* hemolysin(VVH) and tried to make antiserum with the purified hemolysin.

VVH was produced in abundance in heart infusion broth containing 2% NaCl in a shaking cultivation process(140rpm) at 37°C for 15 hours. While hemolysin production patterns of *V. cholerae* non O1 were quite different by the strain during the culture times compared with the *V. vulnificus*. Hemolytic activity of the VVH on sheep erythrocytes was stronger than those of rabbit, but hemolytic activities of the hemolysin produced by *V. cholerae* non O1 on rabbit erythrocytes were as much as twice as strong as on those of sheep and horse.

VVH was purified by two steps of hydrophobic column chromatography on Phenyl-Sepharose HP with Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC). Purification fold and yield of VVH was much improved by changing the elution buffer's pH from 6.0 to 9.8 and adding 1% CHAPS(a zwitter ionic detergent) and 50% ethylene glycol to the 10mM glycine buffer during the repeated hydrophobic column chromatography. Homogeneity of the purified hemolysin was shown by polyacrylamide gel electrophoresis.

According to the five times repeated purification results, the specific activity was increased 27500 times and the yield was improved by 23.4% on average. About 250µg of purified hemolysin was harvested from the 2400ml of culture supernatant of *V. vulnificus*.

Molecular weight of VVH was estimated to be 50KDa by the SDS-PAGE and the neutralization scores of the obtained antiserum acting against VVH were 2000~8500.

緒 論

생선회를 비롯한 어패류를 즐겨먹는 우리나라에서 병원성 비브리오균으로 인한 중독사고는 여름철이면 연례행사처럼 문제가 일어나고 있어 이들

균이 식품위생상 차지하는 비중은 크다. 실제로 우리나라에서 비브리오균의 분포에 관한 연구는 많으나 (손 등, 1971; 설등, 1972; 장·김, 1977; 김·장, 1977; 장 등, 1986; 김 등, 1987) 이들 균이 생산한 용혈독소에 관한 연구는 거의 없다.

한편 외국에서는 이들 균의 분포조사는 말할 것도 없고 용혈독소나 여타 이들 균이 생산한 병원 인자에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(Shinoda *et al.*, 1985; Yamanaka *et al.*, 1987; Kreger *et al.*, 1988; Nair *et al.*, 1988; Yamanaka *et al.*, 1990; Koichiro *et al.*, 1990; Michiko *et al.*, 1991). 인체 건강에 관련이 깊은 10여종의 비브리오균이 있으나 우리나라에서 문제가 심각한 것은 *V. vulnificus*와 *V. cholerae* non O1을 들 수 있다. 특히 *V. vulnificus*의 경우 다른 균과 달라서 일단 오염되어 발증되었을 경우에는 치사율이 높기때문에 이 균에 관한 연구는 매우 중요하다. *V. vulnificus*균이 생산하는 균체의 독성 물질로는 용혈독소(hemolysin), protease, phospholipase A, siderophore 등을 들 수 있는데 *V. vulnificus*나 *V. cholerae* non O1이 생산하는 hemolysin에 대한 연구가 있었으나 순수 분리정제가 어렵거나 또는 정제되었을 경우에도 그 수율이 극히 낮은 문제점을 안고 있었다(Gray and Kreger, 1985; 山中 1990; 石田, 1991).

따라서 본 연구에서는 우리나라에서 분리된 *V. vulnificus*와 *V. cholerae* non O1균이 생산한 용혈독소의 활성을 비교하고 특히 치사율이 높은 패혈증 비브리오균인 *V. vulnificus*가 생산한 hemolysin의 정제도와 수율을 높히는 방법을 개발하고 이에 얻어진 순수 정제독으로 항혈청을 만들어 이 균으로 인한 식중독 예방과 비브리오균 용혈독소 연구에 필요한 자료를 제공하고자 한다.

材料 및 方法

1. 使用菌株

우리나라 연안의 어패류에서 1992년 여름에 분리한 *V. vulnificus*, *V. cholerae* non O1 9208F, *V. cholerae* non O1 9208K 균주를 사용하였다. 균의 분리방법은 FDA의 BAM 7th ed (1992)에 준하였다. *V. cholerae* non O1 9208F 균주와 9208K 균주는 *V. cholerae* non O1으로 동정된 균주에서 각각 분리원과 용혈활성이 다르므로 편의상 lab. code number를 붙여 명명하였다.

2. 용혈독소의 활성측정

용혈독소의 활성측정은 Shinoda *et al.*(1985)의 방법을 모방하여 실시하였다. 즉 10mM Tris-HCl buffer(pH 7.5)에 140mM NaCl, 0.01% bovine serum albumin(Fraction V, Sigma Chemical Co.), 0.04% NaN₃와 0.1% CHAPS(Wako Chemicals Co.,

Osaka Japan)을 포함한 용액을 활성측정용 buffer로 사용하였다. 준비된 각 용혈독소 측정시료를 단계별로 희석한 시료 1ml와 1% 면양적혈구 현탁액 1ml를 혼합하여 37℃에서 1시간 가온한 다음 1,000×g에서 5분동안 원심분리하여 상정액을 취하여 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 대조구의 50% 용혈반응을 일으키는 독소량을 1 hemolytic unit(HU)로 정의하고 시료중의 hemolysin량을 구하였다.

3. 용혈독소의 정제

전배양한 *V. vulnificus*를 NaCl의 농도가 2% 되게 조정된 heart infusion broth(HI broth, Difco, U.S.A)에 37℃에서 15시간 배양하여 7,000×g, 4℃에서 20분간 원심분리한 상정액에 ammonium sulfate를 60% 포화되게 가하여 5시간 방치후 7,000×g에서 40분간 원심분리하여 얻은 precipitate를 20mM phosphate buffer(pH 6.0)에 녹인 다음 12,000×g, 4℃에서 30분간 원심분리하여 얻은 상정액을 조독소로 하였다. 이렇게 얻어진 조독소에 대하여 용혈활성을 측정된 다음 Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC, pharmacia LKB, Biotechnology)에 Hi-Load 16/10 Phenyl- Sepharose HP column을 이용하여 분획하였다.

이때 시작 buffer로는 10mM phosphate buffer(pH 6.0)를 그리고 종료 buffer로는 50% ethylene-glycol을 포함한 10mM glycine buffer(pH 9.8)을 써서 분획하여 용혈활성이 있는 획분을 모아서 amicon 농축을 실시한 다음 10mM glycine buffer(pH 9.8)에 넣어 하루밤 방치시킨다.

이상과 같이 처리된 시료는 일차 column chromatography 때와 마찬가지로 분획하였다. 이때 시작 buffer로는 10mM glycine buffer(pH 9.8)에서 불순단백질 또는 독소에 결합되어있는 색소를 제거한 다음 종료 buffer인 10mM glycine buffer에 50% ethyleneglycol과 1% CHAPS가 포함된 용매로 분획하여 활성이 있는 획분을 amicon 농축을 하여 표품으로 하였다.

이때 정제된 표품은 sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis(SDS-PAGE)로 정제도를 확인하였다.

4. Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE)

SDS-PAGE는 Laemmli(1970)의 방법에 따라 10% acrylamide gel로서 행하였으며 염색은 0.5%

coomassie brilliant blue로서 행하였다.

5. 단백질정량

단백질정량은 Lowry et al(1951)의 방법에 준하였다.

6. 항혈청제조

정제된 *V. vulnificus* hemolysin(VVH) 2.0ml(340 µg protein)에 Freund's complete adjuvant(Difco, U.S.A) 3.0ml를 혼합하여 체중 3.5Kg되는 토끼 등부위皮下에 주사하고 이 조작을 2주일 간격으로 세번 반복한 다음 최종 투여후 7일째에 항혈청가를 조사한 다음 모든 피를 채혈하여 항혈청을 얻어 56℃에서 30분간 非動化하여 抗體價의 측정 및 Ouchterlony(1949) 방법에 따라 double gel diffusion test를 행하였다.

7. 抗體價 測定

각 단계 희석한 항혈청 0.5ml에 4HU/ml의 VVH 용액을 0.5ml를 가하여 37℃에서 20분간 가온한 다음 1% 면양적혈구현탁액 1ml를 가해서 37℃에서 60분간 가온 후 1,000×g에서 5분간 원심분리하여 상정액을 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 이때 VVH 2HU에 의한 용혈을 50%억제할 때 혈청의 희석배율을 수치로 환산하여 抗體價로 나타내었다.

結果 및 考察

1. 病原性비브리오균의 溶血性

*V. vulnificus*균과 *V. cholerae* non O1 9208K, *V. cholerae* non O1 9208F 균을 HI broth에서 37℃에서 24시간까지 진탕배양하면서 溶血性을 測定한 結果 균종에 따라 毒素의 溶血度가 차이가 있었다. 이때 균들이 생산하는 protease의 영향을 알아보기 위하여 protease 생산억제제인 EGTA[o-o-bis(2-aminoethyl) ethyleneglycol -NNN'N' tetra acetic acid, Wako Chemical Co.,Japan]를 첨가하지 않고 배양하여 溶血活性度를 測定하였다. *V. vulnificus*의 경우 배양 10시간만에 140HU/ml로 되었다가 15시간 경과후에는 24시간까지 별 변화가 없었으며 *V. cholerae* non O1의 경우는 9208K 균주는 제일 활성이 강하였으며 24시간까지 계속 증가하여 300HU/ml에 달하였고 9208F균주는 15시간 경과후 감소하기 시작하여 24시간째에는 150HU/ml에서 약 1/6로 감소하여 균종에 따라 큰차이가 있었는데 이는 이들

균주가 생산하는 protease에 영향받는 것으로 추정된다(Table 1).

病原性 비브리오균이 生産한 溶血毒素은 動物의 종류에 따라 溶血性이 차이가 있었다(Table 2).

*V. vulnificus*의 경우 면양피의 적혈구에 대한 활성을 100%로 할 때 馬赤血球에 대해서는 33.3%, 토끼적혈구에 대해서는 20.0%로 감소하였는데 *V. cholerae* non O1 균주에서는 면양이나 말의 적혈구에 대한 溶血毒性보다는 토끼의 적혈구에 대하여 약 2배의 강도를 나타내었다.

石田(1991)도 *V. cholerae* non O1과 비슷한 *V. mimicus* E-33 균주가 생산한 溶血毒素의 活性을 測定한 結果 말적혈구에 대한 溶血度를 100으로 할 때 토끼적혈구에 대하여 81, 면양적혈구에 대하여 34였다고 보고한 바 있다. 이상의 結果에서 알 수 있듯이 病原性비브리오균이 생산한 溶血毒素은 균종에 따라 또 動物의 혈액에 따라 차이가 있음을 알 수 있었다.

Table 1. Comparison of hemolytic activity(HU/ml) of hemolysin produced from Vibrios by shaking culture at 37 in HI broth.

Strain	Culture time(hr).		
	10	15	24
<i>V. vulnificus</i>	140	200	220
<i>V. cholerae</i> non O1 9208K	240	260	300
<i>V. cholerae</i> non O1 9208F	160	150	25

* These Vibrio strains were isolated from shellfish collected from southern coast of Korea and hemolytic activity was measured per ml of culture supernatant with sheep erythrocytes.

Table 2. Relative hemolytic activity(%) of Vibrios hemolysin on erythrocytes of animals.

Strain	Erythrocytes		
	Sheep	Horse	Rabbit
<i>V. vulnificus</i>	100(200)	33.3	20.2
<i>V. cholerae</i> non O1 9208K	100(260)	95.8	200.0
<i>V. cholerae</i> non O1 9208F	100(150)	103.1	187.5

* Numbers in parenthesis means HU/ml of the culture supernatant of the strain cultured at 37℃ for 15hours in HI broth.

2. *V. vulnificus* hemolysin(VVH)의 精製

HI broth에 *V. vulnificus*를 15시간 배양하여 앞에 기술한 방법으로 hemolysin을 정제한 결과는 2400 ml배양액당 약 230 μ g전후의 정제된 VVH를 얻을 수 있었다.

Gray and Kreger(1985)는 hydrophobic chromatography하여 pH 9.8에서 정제하였으나 이와같은 높은 pH에서는 VVH의 흡착율이 아주 낮았다. 또한山中(1990)는 그의 학위논문에서 VVH를 1차 hydrophobic column chromatography하고 2차로 mono-Q anion ion exchange chromatography하여 정제하였는데 수율은 2.3%였으며 purification fold는 1000에도 미치지 못하였다.

본 연구에서는 배양상징액을 황산 암모늄으로 염석하여 20mM phosphate buffer에 녹인 crude hemolysin을 1차 chromatography한 결과 hemolysin은 column에 잘 흡착되었고 hemolysin 이외의 많은 단백질이 용출되었으며 50% ethylene glycol을 포함한 10mM glycine buffer(pH 9.8)로 용출시킨 결과 깨끗한 peak가 나타났으며 peak 전후의 획분에서는 극히 미량의 용혈독소가 용출되었으나 VVH에는 색소 성분이 그대로 남아 있었다. 이를 detergent의 일종인 CHAPS로 처리하여 다시 chromatography하여 획분을 얻었다(Fig. 2). 이때 50% ethylene glycol와 1% CHAPS가 포함된 10mM glycine buffer(pH 9.8)로 elution시켰을 때 깨끗한 peak로 나타났으며 용혈활성 또한 peak fraction No. 11에서 대부분의 hemolysin을 얻을 수 있었는데 이것을 amicon 농축을 거쳐서 표품으로 하였다.

이렇게하여 얻은 표품 VVH를 SDS-PAGE한 결과 Fig. 3에서와 같이 단일 band로 나타나 잘 정제되었음을 알 수 있었으며 분자량은 50kDa로 추정되었다. 이는 Okada *et al.*(1987)이 보고한 36kDa, Gray and Kreger(1985)가 보고한 56kDa과는 차이가 있었으나山中(1990)가 보고한 50kDa과는 일치하였다.

일련의 정제과정중의 단계별 VVH의 단백질 비활성 수율 및 정제도는 Table 3과 같다. 전 배양된 *V. vulnificus*균을 2400ml의 HI broth에 15시간 배양하였을 때 배양 상징액중의 hemolysin activity는 17.7HU/mg-protein이었는데 1차 hydrophobic column chromatography 했을 때 24193HU/mg-protein으로 약 1,400배 활성이 높아졌으며 완전 정제품의 경우 364900HU/mg-protein으로 20,000배 이상 증가하였으며 수율은 20.4%였다. 이는山中(1990)

가 보고한 purification fold 1,000배나 수율 2.3%에 비하면 월등히 양호한 결과로서 순수 VVH로서 항혈청이나 특성시험등 VVH에 대한 추가연구에 크

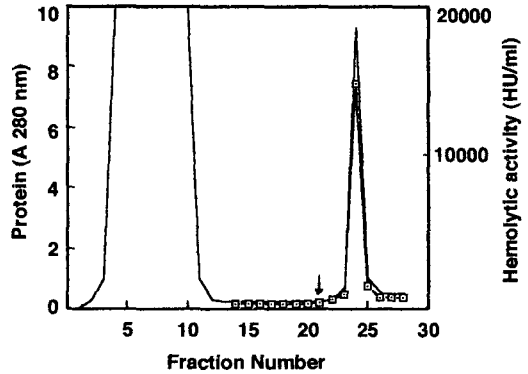


Fig. 1. Phenyl-sepharose HP 16/10 column chromatography of VVH with FPLC(I). Column was washed with 10mMPB(pH 6.0), then VVH was eluted with 10mM GB(pH 9.8) contained 50% ethyleneglycol(↓). Flow rate was 1.0ml/min and 10ml was collected in each fraction. Symbols: (—) absorbance at 280nm, (□-□) hemolytic activity.

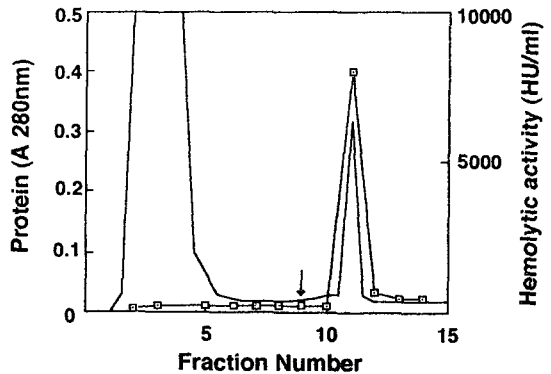


Fig. 2. Phenyl-sepharose HP 16/10 column chromatography of VVH with FPLC(II). VVH obtained from first column chromatography was treated with 1% CHAPS-10mM GB(pH 9.8) and loaded on the same column washed with 1% CHAPS-10mM GB(pH 9.8) and then VVH was eluted with 50% ethyleneglycol-1% CHAPS-10mM GB(pH 9.8↓). Flow rate, Fraction volume and symbols are same as in Fig. 1

게 기여할 수 있을 것으로 기대된다(Table 4).

그리고 다섯차례에 걸쳐 HI broth 2,400ml씩 *V. vulnificus*를 배양하여 VVH를 정제한 결과 purification fold는 16,900~52,300배로 평균 27,460배 였으며 specific activity는 평균 334,600HU/mg-protein 였으며, 1회 정제에 2,400ml의 배양상징액에서 195 µg~264µg의 순수한 VVH를 얻을 수 있었으며 수율은 18.2~33%로써 평균 23.4%였다(Table 4).

3. 항혈청(VVH antiserum)

정제된 VVH를 Freund's complete adjuvant와 1:1.5되게하여 1회에 5ml씩 emulsify하여 3회에 걸쳐 토끼에 접종하였는데 이때 접종된 총 VVH량은 약 1mg-protein에 해당하였다. 만들어진 antiserum의 항혈청가를 측정한 결과 2000~8500이였으며 이를 다시 double gel diffusion결과 단일 침강선을 형성하여 순수품임이 확인되었다(Data not shown). 이상과 같이 높은 수율과 순수정제로 만들어진 抗血清은 毒性研究와 함께 *Vibrio*균의 신속판별이나 또는 이 균에 의한 감염후의 발증억제효과 실험을

실시하여 활용방안을 강구하는 좋은 자료가 될 것으로 생각된다.

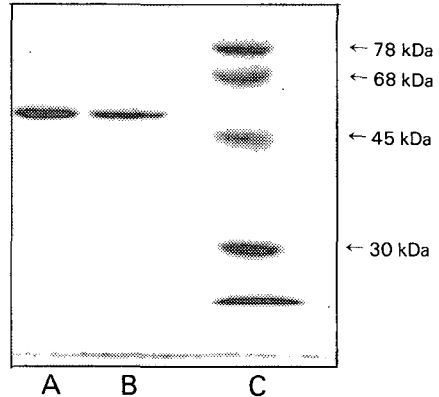


Fig. 3. SDS-PAGE of purified *V. vulnificus* hemolysin. Electrophoresis was carried out at 1mA/gel. Lane A, B: purified VVH, Lane C: molecular weight marker protein.

Table 3. Purification results of hemolysin produced by *V. vulnificus* isolated from shellfish harvested in Chung-mu, KOREA.

Purification step	Volume (ml)	Total hemolytic activity with SRBC(HU)	Total protein (mg)	Specific activity HU/mg-p	Purification fold	Yield (%)
Supernatant in HI broth	2400	408000	23040	17.7	1	100
60% ammonium sulfate ppt. 20mM phosphate buffer	30	360000	979.2	367.6	20.8	88.2
1次 phenyl-sepharose column chromatography	10.6	159000	6.572	24193	1367	38.9
2次 phenyl-sepharose column chromatography	2.6	83200	0.228	364900	20616	20.4

The strain was shaking cultured in HI broth contained 2% NaCl at 37°C for 15hrs

Table 4. Five times purification results of VVH with phenyl-sepharose HP column chromatography

Experinent code No.	Purification fold	Specific activity (HU/mg-protein)	Harvested purified VVH(µ)	Yield (%)
A	16900	178000	204	21.7
B	24060	323000	264	18.2
C	52300	381000	273	33.0
D	20600	364000	228	20.4
E	23400	427000	195	23.7
Average	27460	334600	232	23.4

要約

우리나라 남해연안 어패류에서 *V. vulnificus*, *V. cholerae* non O1 균을 분리하여 이들 균이 생산한 溶血毒素의 活性을 검토하고 특히 致死率이 높은 패혈증 원인균인 *V. vulnificus*균이 생산한 菌體外蛋白毒素인 hemolysin을 분리정제하고 얻어진 毒素를 利用하여 抗血清을 만들었다.

1. *V. vulnificus* hemolysin(VVH)은 HI broth에서 37℃, 15~24hr 진탕배양으로 잘 생산되었으며 *V. cholerae* non O1 균의 경우는 배양 15시간까지는 hemolysin 생산이 증가되었으나 15시간 경과 후에는 균중에 따라 증가되는 것도 있었고 경과 시간에 따라 오히려 감소하는 균주도 있었다.

2. *V. vulnificus*가 생산한 hemolysin은 면양적혈구에 대한 溶血活性이 강하고 토끼적혈구에 대하여는 약하였으나 *V. cholerae* non O1 균주는 토끼적혈구에 대한 溶血活性이 면양이나 말 적혈구에 대한 활성보다 2배정도 강하였다.

3. VVH는 hydrophobic Phenyl-Sepharose HP column을 이용하여 washing buffer와 elution buffer의 성분과 pH를 조정하면서 1% CHAPS를 이용하여 2차에 걸쳐 column chromatography한 결과 정제도와 수율이 매우 좋아졌다. 본 방법으로 다섯 차례에 걸쳐 정제한 결과 정제된 VVH의 specific activity는 16900~52300배로 평균 27,000배 이상 증가하였으며 수율도 18.2~33.0%로 평균 23.4%나 되었다.

실제로, *V. vulnificus* 배양액 2400ml로부터 정제된 hemolysin을 250 μ g정도 만들 수 있어서 패혈증 비브리오팀 연구에 크게 이바지 할수 있을 것으로 사료된다.

4. 정제된 VVH를 SDS-PAGE한 결과 분자량은 50KDa 이었으며 토끼를 이용해서 만든 抗血清의 抗體價는 2000~8500이었다.

參考文獻

FDA. 1992. Bacteriological Analytical Manual 7th Ed. Food and Drug Administration. U. S. A. pp. 111~138.

Gray, L. D., and A. S. Kreger. 1985. Purification and characterization of an extracellular cytolytic toxin produced by *V. vulnificus*. Infect. Immun. 48, 62~72.

Koichiro, Y., Y. Ichinoe, H. Shinagawa, K. Makirw, T. Honda and T. Miwatani. 1990. Two-step processing for activation of the cytolytic/hemolysin of *V. cholerae* O1 biotype El Tor: Nucleotide sequence of the structural gene(hly A) and characterization of the processed products. Infect. Immun. 58, 4106~4116.

Kreger, A. S., M. H. Kothary and L. D. Gray. 1988. Cytolytic toxins of *V. vulnificus* and *V. damsela* pp. 176~189. in "Tools in Enzymology" edited by Harshman, S., Academic Press, Inc. New York.

Laemmli, U. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680~685.

Lowry, O. H., N. J. Rosenbrough, A. L. Farr and R. J. Randall. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 198, 265~275.

Michiko, A., T. Honda, T. Miwatami, T. Takao and Y. Shimonishi. 1991. Purification and characterization of a heat stable enterotoxin of *V. mimicus*. FEMS Microbiology Letters. 79, 105~110.

Nair, G. B., Y. Oku, Y. Takeda, A. Ghosh and T. Takeda. 1988. Toxin profiles of *V. cholerae* non O1 from environmental sources in calcutta, India. Appl. Environ. Microbiol., 54(12), 3180~3182.

Okada, K., S. Miake, T. Moriya, M. Mitsuhashi and K. Amako. 1987. Variability of hemolysin produced by *V. vulnificus*. J. Gen. Microbiol., 133, 2853~2857.

Ouchterlony, O. 1949. Antigen-antibody reaction in gels. Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavia. 26, 505~515.

Shinoda, S., S. Miyoshi, H. Yamanaka and N. Miyoshi. 1985. Some properties of *V. vulnificus* hemolysin. Microbiol. Immunol. 29, 583~590.

Yamanaka, H., T. Satoh, and S. Shinoda. 1987. Preparation of specific antiserum against *V. vulnificus* hemolysin by immunization with the hemolysin bound liposomes. FEMS Microbiology Letters. 41, 313~316.

Yamanaka, H., K. Sugiyama, H. Furuta, S. Miyoshi and S. Shinoda. 1990. Cytolytic action of *V. vul-*

- nificus hemolysin on mast cells from rat peritoneal cavity. J. Med. Microbiol. 32, 39~43.
- 金榮萬, 張東錫. 1977. 부산연안의 *V. vulnificus* 분포에 관한 연구. 釜山水大研報. 17, 45~54.
- 金榮萬, 申逸湜, 張東錫. 1987. 한국연안의 *V. vulnificus* 분포에 관한 연구. 韓水誌. 20(6), 591~600.
- 설성용, 박청옥, 탁연부, 전도기. 1972. *V. parahemolyticus*에 의한 집단식중독 예: 국립보건연구원보. 8, 75~90.
- 손중용, 유재근, 김배원, 민창홍. 1971. 식중독환자에서 분리한 장염미브리오균에 관한 연구. 국립보건연구원보. 8, 75~90.
- 張東錫, 金成駿. 1977. 腸炎미브리오균의 分布 및 出現의 特性에 관한 研究. 국립수산진흥원연구보고. 19, 7~52
- 張東錫, 申逸湜, 崔承泰, 金榮萬. 1986. *V. vulnificus*의 分布 및 細菌學的 特性. 韓水誌. 19(2), 118~126.
- 山中浩泰. 1990. 病原性海洋細菌 *V. vulnificus*의 產生するhemolysin에關する研究. 日本國岡山大藥學部學位論文. pp. 49~65.
- 石田和. 1991. *V. mimicus*가 產生する溶血毒素에關する研究. 日本國岡山大藥學部. 學位論文. pp. 23~28
-
- 1994년 2월 5일 접수
1994년 3월 12일 수리