생명과학회지
Korean J. Life Science, 8(2), 145-157, 1998

*Vibrio vulnificus ys-1*이 생산하는 hemolysin에 관한 연구

오양효 · 차미선 · 김민정†

부산대학교 의과대학 미생물학교실

Studies on the hemolysin produced by *Vibrio Vulnificus ys-1*

Yang-Hyo Oh, Mi-Sun Cha and Min-Jung Kim†

Department of Microbiology, College of Medicine Pusan National University, Pusan, 602-739

Abstract

We isolated 100 *Vibrio sp.* from marine products and sea water from July to September, 1997. We attemped on purification of hemolysin produced by *Vibrio sp.* The growth, hemolysin production patterns by the 100 strains of *Vibrio sp.* showed identical, in general. *V. vulnificus ys-1* produced hemolysin as the hightest titer. The optimal culture conditions for the hemolysin production by the *V. vulnificus ys-1* are followings ;

1. Hemolysin production was optimal during the late exponetial phage.
2. Maximal growth, hemolysin production were in heart infusion broth.
3. Maximal yields of hemolysin was obtained when the heart infusion broth had an initial pH of 8.0, 30℃, 3% NaCl.

Hemolysin was purified from culture filtrate of the strain by ammonium sulfate recipitation, ion exchange and hydrophobic interaction chromatography. The results were as follows ;

1. Homogeneity of the purified hemolysin was demonstrated by revealing single band on SDS-PAGE. The molecular weight of purified hemolysin was 45KDa.
2. The absorbance pattern in ultraviolet was typical of those seen with most protein with 280nm.
3. Purified hemolysin was stable at 50℃ but 70% of the activity was lost by heating for 30min at 60℃. Optimal temperature of purified hemolysin was 35℃.
4. Purified hemolysin was stable at the pH range of 6~9, but in the less the pH 5.0, above the pH 9.0, the hemolysin activity was lost completely.

Key words : *Virulence factor, Vibrio vulnificus ys-1, hemolysin purification*

† Corresponding author

서 론

호염성 미생물인 비브리오속은 해안의 해수와 어패류를 비롯한 각종 해산물에 분포하고 있으며 수온이 높은 여름철에 증가하는 경향이 있고 서식환경 조건인 수온, 염도, pH, 유기물량 등에 의해서 생존기간과 증식에 많은 영향을 받는 것으로 알려져 있다[1-3]. 30여종의 비브리오속 중에서 인간에게 병원성을 나타내는 것으로는 *V. parahemolyticus, V. alginolyticus, V. fluvialis, V. hollisae, V. damsela, V. vulnificus, V. furnissii, V. mimicus*와 *V. metschnikovii* 등이 포함된다[4-9]. 이런 병원성 비브리오속은 전세계 해양도시와 어촌을 중심으로 해수욕을 즐기고 생선회와 해산물을 즐겨먹는 국민들에게 식중독, 창상감염, 패혈증 등의 질환을 일으키고 있다[10-16]. 병원균이 독성을 갖게하는 인자로는 균이 생산하는 독소에 의해 균이 쉽게 침투하도록 하는 기작 및 인체의 방어 기전과 싸우며 여러 기관으로 퍼지도록 하는데 기여를 하는 여러가지 침습 능력을 들 수 있을 것이다. 1960년대 중반까지만 하더라도 병원성 세균으로서의 비브리오에 대한 관심은 *V. cholerae*에만 집중되어 있었으나, 그 이후로부터 현재까지 분류학자들은 점차 이들 비브리오종들을 동정하여 세분화하게 되었고 이들 중 다수의 균들은 인간에 있어서 중요한 병원균임을 시사하였다[4,17]. 비브리오속의 여러 균들중 *V. mimicus*는 비교적 최근에 비브리오속의 한 종으로서 분류되었으며, 이 균주는 사람에게 다양한 병을 유발시키는 것으로 알려져 있다[18]. 1983년 Shandera 등[19]은 해수에 노출된 환자로부터 *V. mimicus*를 분리하였으며, 이 환자들은 설사, 구역, 구토, 경련성 복통, 혈변, 열 등의 증상을 나타내었다고 한다. 또한 이 균은 terminal ileitis 및 여행자 설사병과도 관련된다는 보고가 있다[20,21]. *V. mimicus*에 의한 해산물과 관련된 위장관염 발생의 예가 일본에서 보고[22,23]되었으며, 이 균은 Toyama Prefecture의 수생환경 등지 및 어류로부터 분리가 되었다[24].

비브리오속 균들에게서 추정되는 병원성 인자로는 hemolysin[25], cytolysin[26], protease[27], phospholipase[28], siderophore[29]와 그 외의 여러 세포외 독소들이 있겠지만, 그 중에서도 주된 병원 인자로는 enterotoxin 및 hemolysin과 같은 용혈소와 조직의 괴사를 일으키도록 하는 proteolytic enzyme 등을 들 수 있다. 이 중에서 균이 생산하는 독소인 hemolysin 및 proteolytic enzyme은 사람에게 치명적인 영향을 미치는 것으로 사료된다. hemolysin 및 protease 등은 공통되는 병원성 인자로서 중요성을 가지고 있다. 1981년 Davis 등[18]은 heat-labile 및 heat-stable enterotoxin의 생산에 대해 보고한 바가 있다. 현재까지 밝혀진 독소들은 choleratoxin-like enterotoxin[30,31], heat-stable enterotoxin[32,33], thermostable direct hemolysin-like hemolysin[34], protease[35]등과 같은 병원성 인자들이 있다. 창상감염과 사람의 패혈증의 원인균인 *V. vulnificus*에 의해서 분비되는 세포외 효소인 protease는 collagen 및 elastin이 함유되어 있는 조직내로 균이 침투하여 퍼져나가는 것을 돕는다[36,37]. 뿐만아니라 hemolysin은 인체의 주요 병원균으로 *V. vulnificus*[38], *V. hydrophila*[39], *V. alginolyticus*[40]등의 균에 있어서 주요한 병인론적 인자로 작용하고 있다. 비브리오속의 경우에 있어서도 이 균이 생산하는 독소인 hemolysin 및 proteolytic enzyme은 사람에게 치명적인 영향을 미친다. 따라서 병원성 비브리오속이 생산하는 세포외 효소인 hemolysin을 정제하고 그 효소학적인 성질을 규명하여 병원성 비브리오의 독력을 밝히고자한다.

재료 및 방법

1. 사용 균주

1996년 7월에서 9월 사이에 부산시내의 해산물 및 부산연, 근해의 해수를 채수하여 비브리오를 분리하였다.

2. 사용배지

해산물로부터 비브리오속 균주의 분리를 위해 사용한 배지는 모두 Difco Laboratories Detroit Michigan USA의 제품으로 Alkaline peptone 수, TCBS agar 및 TSI, LIM agar등이며, hemolysin 생성능을 알아보기 위해 0.5% NaCl을 첨가한 Brain Heart Infusin(이하 BHI로 약함) 액체배지와 5% 면양적혈구를 가한 혈액한천배지를 사용하였다.

3. 사용 시약 및 기기

균의 배양을 위해 진탕배양기(120Rev.×6cm stroke, Vision Co. Ltd.)를 사용하였으며, 배양상등액의 회수를 위해 냉각원심분리기(KONTRON CENTRICON T-24, Swiss)를 사용하였다. 정제과정 중의 각 분획에 대한 단백질 농도 측정 및 균의 생육도 측정을 위해 분광광도계(Shimadzu

recording spectrophotometer U.V.-240)을 사용하였다. Hemolysin의 정제과정에 사용한 수지로는 DEAE-Sephadex A-50(Anion exchanger : (Sigma Chemical Company P.O. Box 14508, ST. Louis, MO 63178 USA) 및 Sephadex G-150(Sigma Chemical Company P.O. Box 14508, ST. Louis, MO 63178 USA) : Hydroxyapatite (calsium phosphate hydroxide) type I.(Sigma Chemical Company P.O. Box 14508, ST. Louis, MO 63178 USA)을 사용하였고, hemolysin의 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)를 사용하였으며, 전기영동장치로는 BioRad Mini-protein II를 사용하였다.

4. 용혈활성 측정

용혈소와 2% 사람 적혈구 부유액을 동량 혼합하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 원심분리하여 상청액을 540nm에서의 흡광도로 측정하였다. 이 때 반응액의 희석시에는 0.1M NaCl을 함유한 인산 완충액(pH 7.0)을 사용하였다. 각 반응시에 1% TritonX-100에 의한 용혈의 흡광도를 100% 용혈로 정하였다[41].

5. 단백질 정량

Lowry법[42]에 의하여 folin-phenol 시약에 의한 bovine serum albumin의 표준곡선을 작성한 다음, 시료의 흡광도를 540nm에서 측정하여 표준곡선에 의거, 단백질량을 측정하였다.

6. Hemolysin 생성에 영향을 미치는 인자

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

① 초발 pH의 영향

증균용 배지인 BHI배지를 각 pH별로 조정하여 18시간 진탕배양하여 hemolysin 활성을 검토하였다.

② 온도의 영향

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

③ Na^+의 영향

비브리오속의 생육에는 Na^+의 농도가 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 균주에 의해 생성되는 hemolysin 역시 Na^+농도에 영향을 받는 지를 알아보기 위해 BHI배지에 NaCl농도를 달리하여 18시간 진탕배양한 후 hemolysin 활성을 측정하였다.

7. Hemolysin정제

1) 배양조건

0.5% NaCl을 가한 BHI 액체배를 500mℓ 진탕플라스크에 분주하여 고압멸균한 후, 전배양한 배양액(A_{660}=2.0)을 접종하여 진탕배양하였다. 배양온도는 hemolysin의 생성에 가장 최적인 온도에서 균을 배양하였으며, 균배양 시간은 배양상등액에 대해 hemolysin활성을 측정하여 효소의 활성이 가장 높아지는 시점까지를 배양시간으로 정하였다. 그 후 배양액을 냉각원심분리 하여 상등액만을 회수하여 정제를 실시하였다.

2) 황산암모늄 침전

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 2~3일간 투석시키면서 수차례 완충액을 교환하였다.

3) Ion exchange chromatography

충분히 투석한 황산암모늄 침전물을 10,000rpm으로 10분간(r=10cm) 원심분리하여 불용성 침전물을 제거시킨 후, 0.1M NaCl을 가한 pH 7.6의 0.01M phosphate buffer로 평형화 시킨 DEAE-Sephadex A-50 column에 흡착시켰다. 동일 완충액으로 비흡착 단백질을 충분히 용출시킨 다음, 0.1M에서 0.8M의 NaCl을 가한 0.01M phosphate buffer로 흡착 단백질을 용출시켰다. 이때의 유속은 시간당 25mℓ로 하였으며 1개의 분획은 5mℓ로 하였다. 용출된 각각의 분획에 대하여 280nm에서의 흡광도 및 각 효소의 활성을 알아보고 활성 부위만을 회수하여 다음의 정제 단계에 사용하였다.

4) Hydrophobic interaction chromatography

Ion exchange chromatography하여 모은 활성부위를 0.1 M NaCl을 함유한 0.01M의 인산완충액으로 충분히 평형화시킨 hydroxyapatite column(1.8×4.0)에 흡착시켜 0.1M NaCl을 함유한 0.02M 인산완충액(pH 6.8)로 비흡착단백질을 충분히 용출시킨 다음 인산완충액을 0.02M에서 0.15 M로 직선구배시켜 흡착단백질을 용출시켰다. 이때 유속은 분당 0.2㎖로 하였으며, 1개의 분획은 2.5㎖ 하였다.

9. 정제된 효소의 물리학적 및 효소학적 성질

1) Ultraviolet adsorption spectrum

정제된 hemolysin의 자외선 영역에서의 흡광도를 측정하였다.

2) 분자량 측정

Separating gel의 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 gel은 5% T, 3.3% C인 acrylamide 용액 및 0.4% SDS를 함유하는 0.5M Tris-HCl 완충액(pH 6.8)을 사용하여 5% 겔을 조제한다. 시료의 조제는 2% SDS 및 β-mercaptoethanol을 함유하는 sample buffer와 정제된 효소를 섞어서 100℃에서 5분간 boiling 한 후 전기영동을 실시하였다.

3) 효소의 내열성

정제된 hemolysin의 내열성 정도를 측정하기 위해 hemolysin을 인산완충액으로 희석하여 37℃에서 30분, 50℃에서 10분, 70℃에서 5분, 100℃에서 1분간 각각 가열하고 적혈구 부유액과 37℃에서 1시간 반응시킨 후 그 잔존활성을 측정하였다.

4) 온도안정성

*V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위해, 효소 1㎖(5units/㎖)을 0.02M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 준비한 후, 30℃, 35℃, 40℃, 45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃ 및 80℃에서 각각 30분간 열처리한 후 잔존활성을 측정하였다. 사용하는 기질용액으로는 2% 사람 적혈구 부유액을 사용하여 hemolysin 활성을 측정하였다.

5) 최적 반응온도

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

6) pH 안전성 시험

효소 50μℓ(0.1㎎/㎖)를 950μℓ의 각종 완충액(pH 3.0에서 pH 10.0, 0.02M)들과 혼합하여 최종 pH를 3.0에서 10.0까지 단계별로 조정하였다. 이 반응액을 20℃에서 24시간 방치한 후, 700μℓ를 취하여 0.02M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)으로써 pH 8.0으로 일정하게 맞춘 다음 잔존활성을 측정하였다. 효소 반응의 최적 pH를 알아보기 위하여, pH 6.0에서 pH 10.0까지의 범위의 여러 완충용액에 기질용액을 준비하였다. 각각의 기질용액들과 Tris-HCl 완충액(0.01M, pH 8.0)으로 희석하여 준비한 정제된 효소액(0.01㎎/㎖)을 동량으로 섞은 후 앞에서 기술한 활성 측정법에 따라 잔존활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

1. 사용 균주

1996년 7월 9월 사이에 부산시내의 해수 및 해산물로부터 *V. parahaemolyticus* 23주, *V. mimicus* 12주, *V. alginolyticus* 14주, *V. vulnificus* 21주, *V. furnissii* 15주, *V. damsela* 15주 도합 100 균주가 분리되었다.

2. Hemolysin 생성 여부

비브리오속 균주들의 hemolysin 생성 여부를 알아보기 위하여, 5% 면양 적혈구를 가한 혈액한천 배지상에서 균을 접종하고 18에서 24시간 배양하여 용혈현상을 관찰하였다(그림 1).

그 결과, *V. parahaemolyticus* 23균주중에서 16균주(70%), *V. mimicus* 12균주중에서 10균주(83%), *V. alginolyticus* 14균주중에서 12균주(85%), *V. vulnificus* 21균주중에서 19균주(90%), *V. furnissii* 15균주중에서 10균주(66.6%), *V. damsela* 15균주중에서 12균주(80%)로 각각 hemolysin생성능은 비교적 높은 것으로 나타났으며, 그 중 특히 *V. vulnificus*균주들이 생성능이 높은 것으로 나타났다. 이 중 특히 hemolysin 활성이 높은 *V. vulnificus ys-1*를 본 실험의 공시균주로 정하고 다음의 실험들을 계속 진행해 나갔다.

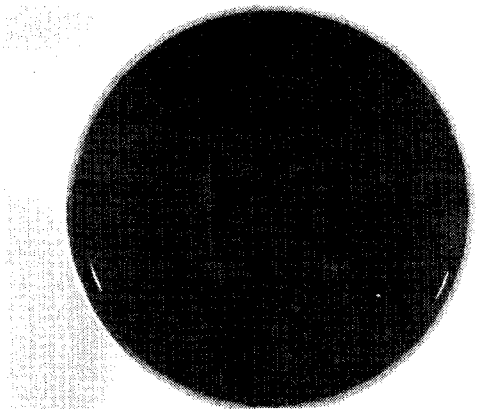

Fig. 1. Hemolysis on the 5% sheep erythrocyte added blood agar after culture of 18 hours.

3. Hemolysin 생성에 영향을 미치는 인자

① 초발 pH의 영향

증균용 배지인 BHI배지를 각 pH별로 조정하여 18시간 진탕배양한 후 hemolysin 생성능을 검토한 결과, 그림 2에서와 같이 pH 7에서 pH 9 사이에서 hemolysin의 생성이 우수한 것으로 나타났다.

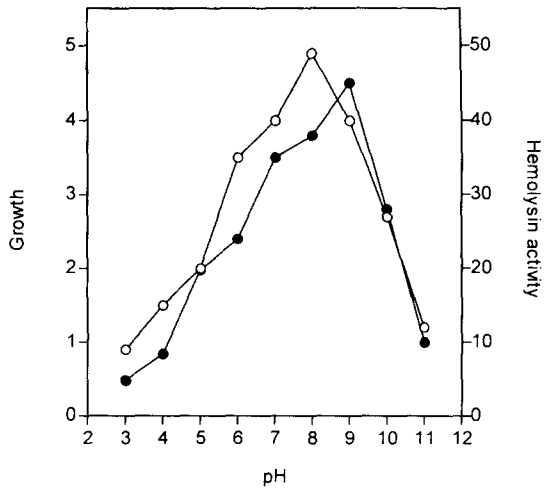

Fig. 2. Effect of pH on the growth and hemolysin production of *V. vulnificus ys-1.*

● : growth, ○ : hemolysin activity

② 온도의 영향

비브리오속은 해수의 온도가 높아지는 계절에 증식이 빠른 것으로 알려져 있다. 배양온도를 10℃에서 50℃까지 각 단계별로 조정하여 hemolysin 생성능을 측정한 결과, 그림 3에서와 같이 30℃에서 활성이 높게 나타났고 40℃이후에서는 생성능이 급격히 떨어지는 것을 알 수 있다.

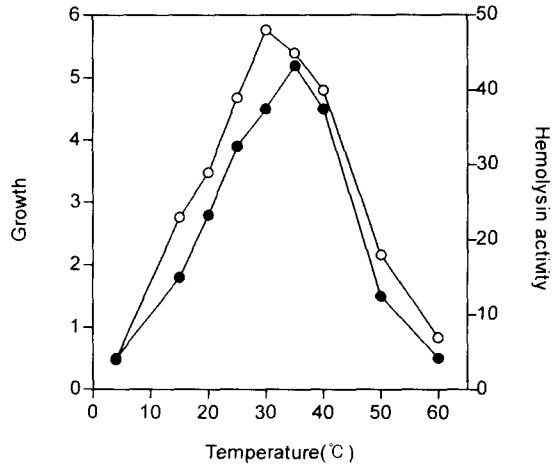

Fig. 3. Effect of temperature on the growth and protease production of *V. vulnificus ys-1.*

● : growth, ○ : hemolysin activity

③ Na^+의 영향

비브리오속의 생육에는 Na^+의 농도가 관여하는 것으로 알려져 있다. 본 균주에 의해 생성되는 hemolysin 역시 Na^+농도에 영향을 받는 지를 알아보기위해 BHI배지에 NaCl농도를 각기 달리하여 18시간 진탕배양한 후 hemolysin 활성을 측정한 결과는 그림 4와 같이 나타났다. NaCl 농도가 3%일때 hemolysin 생성이 가장 높게 나타났고 대체로 2%에서 4%일 때 높은 hemolysin생성능을 보여 주었다.

4. 배양시간에 따른 hemolysin 생성

3% NaCl을 첨가한 BHI 배지을 pH 8.5로 맞추어 500 mℓ 진탕플라스크에 100mℓ넣고 여기에 *V. vulnificus* ys-1 전배양액(A_{660}=1.0)을 1mℓ 접종하여, 30℃에서 진탕배

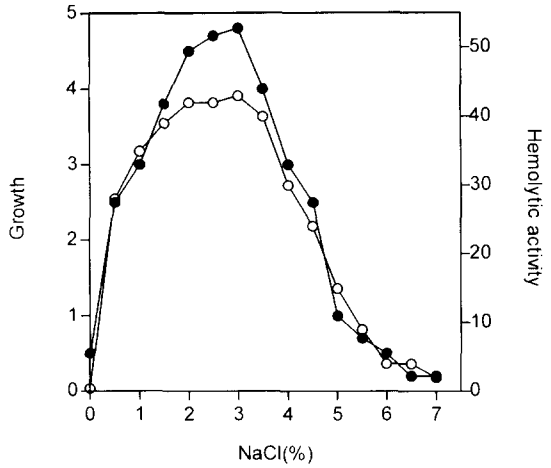

Fig. 4. Effect of NaCl on the growth and hemolysin production of *V. vulnificus ys-1*.
● : growth, ○ : hemolysin activity

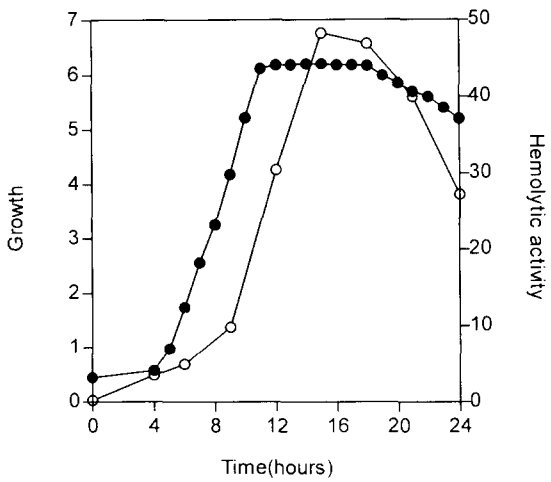

Fig. 5. Growth and hemolysin production by *V. vulnificus ys-1*.
● : growth, ○ : hemolysin activity

양하면서, 배양 4시간째부터 1시간 간격으로 배양액 2㎖씩 채취하여, 균의 생육도 및 hemolysin의 활성을 알아보았다. 균의 생육도는 660nm 에서의 흡광도로 나타내었고, hemolysin의 활성은 용혈소와 2% 사람 적혈구 부유액을 동량 혼합하여 37℃에서 1시간 반응시킨 후 원심분리하여 상청액을 540nm에서의 흡광도로 측정하였다. 그 결과 그림 5에서 보는 바와 같이 용혈소는 대수증식기 중기인 배양 6시간째 부터 생산이 증가하기 시작하여 정지기인 15시간에서 18시간째에 최고치에 이르렀고, 20시간 이후에는 급격히 감소하는 것으로 나타났다.

5. *V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin의 정제

*V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin을 그림 6과 같은 과정으로 정제하였다.

1) 배양상등액

정제의 전단계인 배양상등액을 회수하기위해 0.5% NaCl을 가한 BHI 액체배지를 pH 8.5로하여 고압멸균한 후, 전배양한 배양액(A_{660}=2.0)을 접종하여 30℃에서 18시간 동안 200rpm으로 진탕배양 시켰다. 그 후 배양액을 냉각 원심분리 하여 상등액만을 회수하여 정제를 실시하였다. 총 배지 용량은 1.7ℓ를 사용하였고, 배양 후 이로부터 회수된 배양상등액은 1,6ℓ이었다. 배양상등액의 단백질량은 18.04 ㎎/㎖이었으며, hemolysin 활성은 47units/㎖이었다(표 1).

2) 황산암모늄 침전 및 투석

회수한 배양상청액에 황산암모늄 분말을 천천히 첨가하여 포화농도 50%(350g/ℓ)가 되도록 녹인 후, 4℃에서 16시간에서 18시간 교반시켜 10,000rpm으로 원심분리하여 상청액을 제거하고 60㎖의 증류수에 용해시켰다. 이 용액을 다시 황산암모늄으로 40% 포화(280g/ℓ)시켜 4℃에서 18시간 방치한 후 10,000rpm으로 냉각원심분리하여 침전물을 회수한 후 0.1M NaCl을 가한 pH 7.6의 0.01M phosphate buffer 15㎖에 용해시켰다. 단백용액 중의 염을 제거해 주기위해 동일 완충액으로 2~3일간 투석시킨 후 이것을 조효소액으로 사용하였다. 1600㎖의 배양 상등액으로부터 30㎖의 황산암모늄 침전물을 얻었고 이때의 총 단백질량은 1.667㎎이었고, hemolysin활성은 51,662HU였다(표 1).

3) Ion exchange chromatography

충분히 투석한 황산암모늄 침전물을 10,000rpm으로 10분간(r=10cm) 원심분리하여 불용성 침전물을 제거시킨 후, 0.1M NaCl을 가한 pH 7.6의 0.01M 인산완충액으로 평형화 시킨 DEAE-Sephadex A-50 column에 흡착시켰다. 동일 완충액으로 비흡착 단백질을 충분히 용출시킨 다음, 0.1M에서 0.8M의 NaCl을 가한 0.01M phosphate buffer로 흡착 단백질을 용출시켰다. 이때의 유속은 시간당 25㎖로 하였으며 1개의 분획은 5㎖로 하였다. 용출된 각각의 분획에 대하여 280nm에서의 흡광도와 각 효소의 활성을 측정

Table 1. Purification of hemolysin by *V. vulnificus ys-1*

Purification step	Volume (mℓ)	Total protein (mg)	Total activity ([a]HU)	Special activity (HU)	[b]Relative purification n(HU/mℓ)	[c]Yield (%)
Culture supernatant	1610	28864	75200	2.61	1.0	100
Ammonium sulfate precipitate	30	1677	51662	31.0	11.2	68
DEAE-Sephadex A-50	90	69.6	15030	215.95	82.7	20
Hydroxyapatite	27.5	5	4153	830	318.0	5.5

a ; Hemolysin Unit

b ; The specific activity of culture supernatant was taken as the standard and assigned the value of 1.

c ; The total activity of culture supernatant was assigned the value of 100%, and the total activity from each step was compared with the culture supernatant total activity.

하여 활성부위만을 모았다. 그 결과 그림 7에서와 같이 용혈활성은 식염농도 0.3~0.4M 부근에서 나타났으며 활성

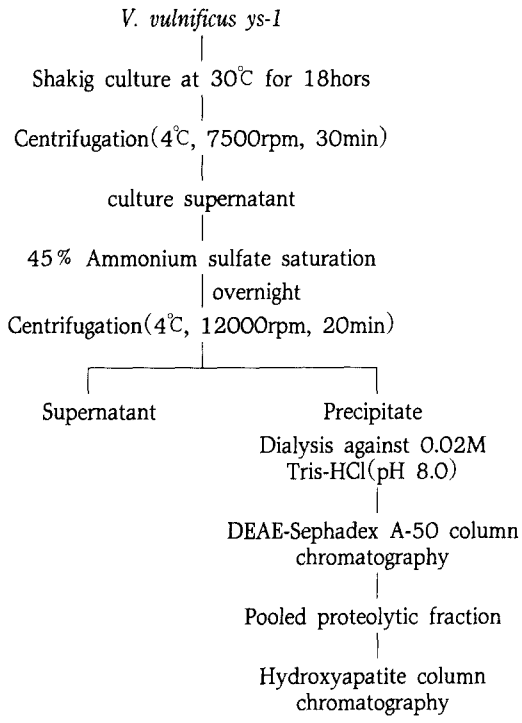

Fig. 6. Flow diagram of the purification of hemolysin from *V. vulnificus ys-1*.

부분인 45번에서 52번 부분을 모아 다음 정제과정에 사용하였다. 이 과정에서 얻어진 hemolysin의 비활성은 216 HU/O.D.280nm였고 전단계에 비해 83배 정제되었으며 회수율은 20%였다(표 1).

4) Hydrophobic interaction chromatography

Ion exchange chromatography 하여 모은 활성부위를 0.1M NaCl을 함유한 0.01M 인산완충액으로 충분히 평형화시킨 hydroxyapatite column(1.8×4.0)에 흡착시켜 0.1M NaCl을 함유한 0,02M 인산완충액(pH 6.8)로 비흡착단백질을 충분히 용출시킨 다음 인산완충액을 0.02M에서 0.15M로 직선구배시켜 흡착단백질을 용출시켰다. 이때 유속은 분당 0.2mℓ로 하였으며, 1개의 분획은 2.5mℓ로 하였다. 그 양상은 그림 8에서와 보는 바와 같이 hemolysin의 활성부분은 인산완충용액의 농도가 0.04M일때 용출되었고 활성부위는 16번에서 18번 부위였다. 이 부위를 모아 hemolysin의 물리, 화학적 성질 및 효소학적 성상을 밝히는데 사용하였다.

7. 정제된 효소의 물리화학적 성질 검토

1) Ultraviolet absorption spectrum

정제된 *V. vulnificus ys-1* hemolysin의 자외선 영역에서의 흡광도를 측정한 결과 단백질의 전형적인 양상을 나타내었고 280nm에서 최대 흡광도를 나타내었다(그림 9).

2) 분자량 측정

정제된 hemolysin의 분자량을 측정하기위해 Laemmli의 방법[43]에 준해 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. 2% SDS 및 β-mercaptoethanol을 함유하는 sample buffer와

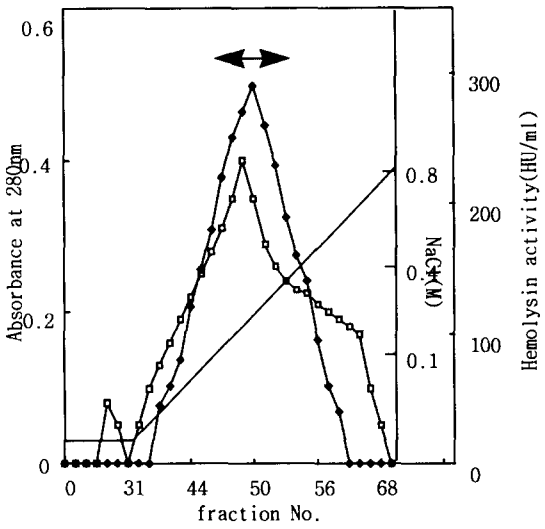

Fig. 7. Elution profile of ion-exchange chromatography on DEAE-Sephadex A-50.
－□－ : absorbance at 280nm, －◆－ : protease activity ↔ : indicates the fractions concentrated for further purification

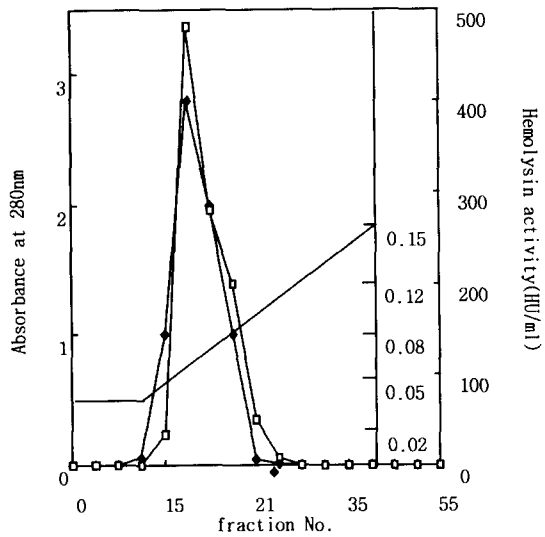

Fig. 8. Elution profile of chromatography on hydroxyapatite.
－□－ : absorbance at 280nm, －◆－ : hemolysin activity

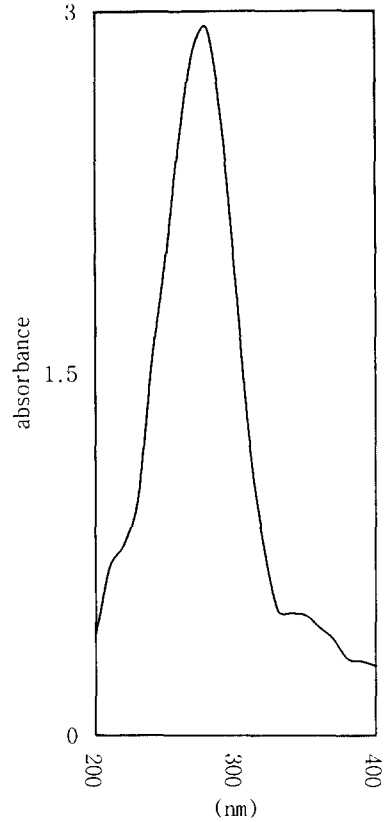

Fig. 9. Ultraviolet adsorption spectrum of purified hemolysin.

정제된 효소를 혼합하여 100℃에서 5분간 boiling하여 전기영동을 실시하여 분자량을 측정하였다. 그 결과 정제된 hemolysin의 분자량은 45KD이었다(그림 10).

3) 효소의 내열성

정제된 hemolysin의 내열성 정도를 측정하기 위해 정제된 효소를 37℃에서 30분, 50℃에서 10분, 70℃에서 5분, 100℃에서 1분간 각각 가열한 후 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 50℃에서 10분간의 가열로 잔존활성이 20%였고, 70℃, 5분간의 가열로 활성이 완전히 소실되었으므로 이열성으로 나타났다(표 2).

4) 온도 안정성 시험

*V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin의 온도에 대한 안정성을 조사하기 위해, 효소 1㎖(5units/㎖)을 0.02M Tris-HCl 완충액(pH 8.0)에 준비한 후, 30℃, 35℃, 40℃,

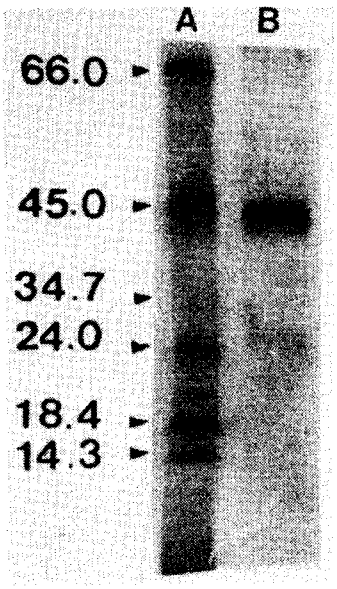

Fig. 10. SDS-PAGE of the purified hemolysin.
A : molecular weight marker
B : Purified enzyme

Table 2. Effect of heat on hemolysin by *V. vulnificus ys-1*

Treatment		Relative hemolytic activity
None		100
37℃	30min	100
50℃	10min	20
70℃	5min	0
100$	1min	0

45℃, 50℃, 55℃, 60℃, 65℃, 70℃ 및 80℃에서 각각 30분간 열처리한 후 잔존활성을 측정하였다. 사용하는 기질용액으로는 2% 사람 적혈구 부유액을 사용하여 hemolysin 활성을 측정하였다. 그 결과 그림 11에서와 같이 50℃까지는 효소활성이 비교적 안정하게 유지되었지만 그 이상의 온도에서는 활성이 급격히 떨어져, 70℃이상에서는 활성이 거의 소실되었다.

5) 최적반응 온도

*V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin의 최적 반응온도를 알아보기 위해 정제 효소 0.5l(4units/ml)과 기질용액을 동량으로 섞은 후, 20℃에서 80℃의 각 온도에서 30분간 반응킨 후 잔존활성을 측정하였다.그 결과 그림 12에서와 같이 35℃에서 가장 높은 활성을 보여 주었다.

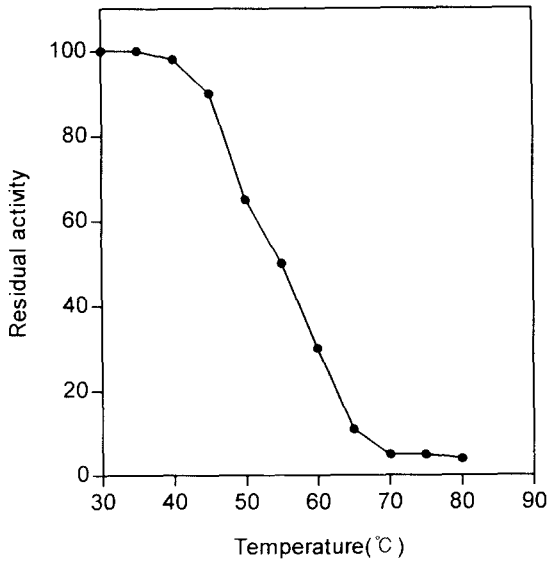

Fig. 11. Thermal stability of enzyme.

6) pH 안정성

효소 반응의 최적 pH를 알아보기 위하여, pH 6.0에서

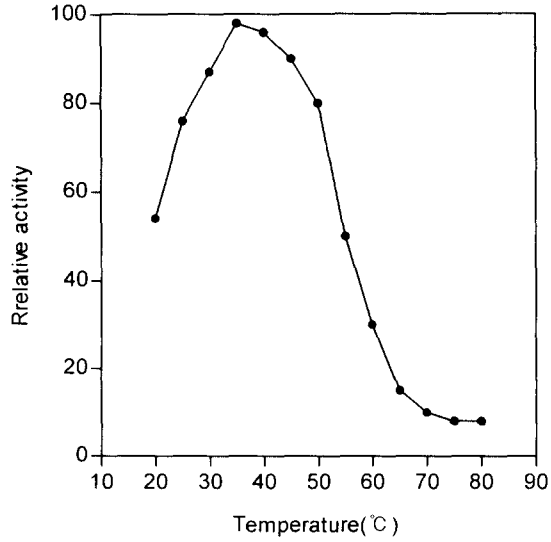

Fig. 12. Optimum temperature of enzyme

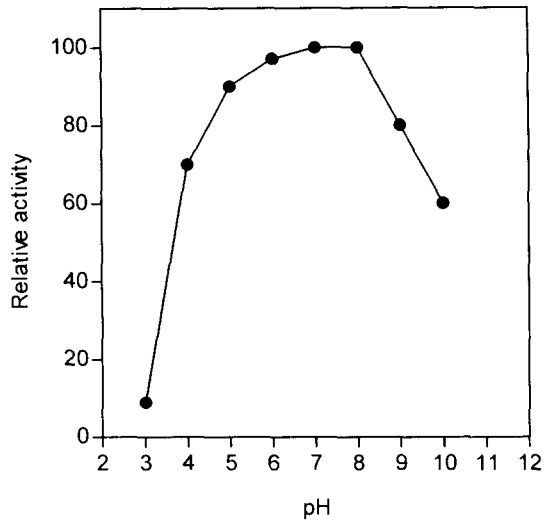

Fig. 13. Effect of pH on the hemolysin stability.

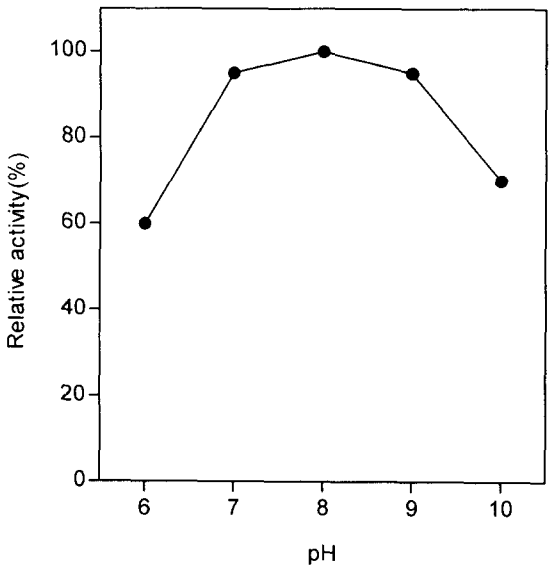

Fig. 14. Optimum pH of the enzyme.

pH 10.0 범위의 여러 완충용액에 기질용액을 준비하고 각각의 기질용액들과 Tris-HCl 완충액(0.01M, pH 8.0)으로 희석하여 준비한 정제된 효소액(0.01㎎/㎖)을 동량으로 섞은 후 잔존활성을 측정하였다. 그 결과 그림 13에서와 같이 pH 9.0에서 가장 높은 활성을 보여주었다. pH 5.0부터 8.0사이에서는 비교적 안정하였으며, pH 4.0이하, pH 9.0이상에서는 활성이 급격히 떨어지는 것을 알 수 있었다.

7) 최적 pH

*V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin의 최적 pH를 알아보기 위해 pH 6.0에서 pH 10.0까지의 범위의 여러 완충용액에 기질용액을 준비하고 각각의 기질용액들과 Tris-HCl 완충액(0.01M, pH 8.0)으로 희석하여 준비한 정제된 효소액(0.01㎎/㎖)을 동량으로 섞은 잔존활성을 측정한 결과 pH 8.0에서 가장 높은 활성을 보여주었다. (그림 14)

고 찰

*V. vulnificus*는 원발성 패혈증과 창상감염의 형태로 사람에게서 병을 일으킨다. 후자는 별다른 기저질환이 없는 정상인에서도 발병하지만 전자의 경우에는 거의 전부에서 간경변 등의 간질환을 가지고 있거나 습관성 과음 등으로 간기능에 이상이 있는 환자들에서 발병하고, 일단 발병하면 급속하게 진행하여 높은 사망률을 초래하는 치명적인 질환이다. *V. vulnificus*는 일단 감수성이 있는 환자에서 구강을 통해 침투하여 18내지 24시간 이후에 식중독 증상과 같은 미열, 구토, 전신권태와 설사를 동반하는 초기증상을 나타내고, 그 후 혈류에 침입하여 생육 증식함으로써 패혈증을 일으켜 혈구파괴와 독소에 의한 중독증으로 사망하게 된다. 창상감염의 경우는 피부상처가 있을 경우 피부에 침입함으로써 발생하게 되는데, 일단 균이 침입하게되면 부종, 발작 및 수포 등의 초기증상이 나타난 후 국소피부가 썩어가는 피부괴사로 진행된다.

Kreger와 Lockwood[44]는 *V. vulnificus*의 배양 상등액에 항원성을 가진 이열성의 세포독소와 단백분해효소가 존재함을 증명하고, 세포독소를 부분정제하여 분리된 독소가 포유동물의 적혈구를 파괴하고 세포독성이 있으며 피부의 혈관 투가성을 증가시키고 마우스에 치명적이라는 사실을 밝혀냈다. 그들은 이러한 사실들이 *V. vulnificus* 감염시 나타나는 임상증상들과 부합되고, 독성이 강한 균주에서 독소의 생산이 더 많다는 점에서 독소가 *V. vulnificus* 감염증의 병인으로써 중요하다고 강조하였다. *V. vulnificus*는 다른 비브리오속들과는 달리 패혈증을 잘 일으키는데, 이는 다른 비브리오속들에 비해 혈청의 살균작용에 대하여 상대적으로

내성을 나타내고, 혈청 보체계를 활성화시키는 정도가 낮으며, 병원성이 높은 균주들은 호중구의 탐식작용에 별로 영향을 받지 않는 등의 특성에 기인하는 것으로 알려져 있다. 따라서, *V. vulnificus*가 감염증을 일으켰을 때, 어떤 숙주조직이 어떻게 파괴되어 특징적인 병태생리가 초래되는 지를 규명하기 위한 일련의 연구는 가장 먼저 외독소를 분리하여 작용기전을 알아내는 것으로 부터 시작해야 할 것이다. 특히 외독소 중에서 보다 초기에 생성되며 급성 독성을 나타내고 단위 무게당 독성도 더 강하다고 알려진 hemolysin을 분리하여 *V. vulnificus* 패혈증에 있어서의 병인론적 역할에 대한 조사가 이루어져야할 것이다. 그러므로 본 연구에서는 부산시내의 해산물 및 해수로 부터 비브리오속 100균주를 분리하고, 그 중에서 *V. vulnificus* ys-1의 hemolysin생성을 위한 환경요인을 조사하였는데, 30℃에서 pH 8.0, 3% NaCl을 첨가되었을 때 즉, 해양과 비슷한 환경이 주어졌을 때 hemolysin의 생성이 높게 나타났다. 또한 *V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin을 분리, 정제하였는데 본 공시균주에 의한 hemolysin의 생성은 대수증식기 말기에 생성되기 시작하여 정지기 초기에 최대 생성을 나타내어 일반적인 다른 독소물질의 생성시기와 비슷하였다. 그리고 분리, 정제된 *V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin은 60℃에서 5분간의 열처리에 의해 실활하여 이열성을 보여주었고, SDS-PAGE에 의해 측정된 분자량은 56kD였으며, subunit는 존재하지 않아 monomer인 것으로 판단되었다. hemolysin은 세포막에 작은 구멍을 내어 colloid-osmotic hemolysis를 일으키는 것으로 알려져 있다. 또한 hemolysin은 cholesterol과 결합하는 특성이 있고, 용혈을 일으키기 위해서는 세포막의 지질과 작용해야 하리라는 관점에서 보면 hemolysin은 반드시 구조상 소수성 부위를 가질 것으로 짐작된다. 본 연구에서도 hemolysin을 정제하여 용액상태로 냉장고에 장기간 방치하면 활성이 소실되면서 침전물이 발견되었다. 또한 정제 후 SDS-PAGE를 실시할 때까지 시간이 지연될수록 주 band외에 미세한 부 band가 관찰되기도 하였다. 이는 수용액 상태로 용해되어 있는 hemolysin이 시간이 지남에 따라 소수성 결합을 통해 서로 결합하여 trimer를 형성하기 때문에 발생하는 현상으로 추정할 수 있다.

본 실험은 공시균주인 *V. vulnificus ys-1*가 생성하는 용혈소를 분리, 정제하여 그 효소학적 성질을 규명하였다. 그러나 향후 포유동물 및 어류등에 대한 치사효과 및 독성을 조사하는 한편, 용혈소 생성에 관여하는 유전자의 검색에 관한 연구를 심도있게 진행함으로써, 본 균에 의한 집단 감염이 발생하였을 경우에 신속한 대응과 병리기전을 확인할 수 있게되리라 사료된다.

요 약

1996년 7월에서 9월 사이에 부산시내의 해수 및 해산물로부터 *V. parahemolyticus* 23주, *V. mimicus* 12주, *V. alginolyticus* 14주, *V. vulnificus* 21주, *V. funissii* 15주, V. damsela 15주 도합 100균주를 분리해내었다. 분리된 100균주 중 hemolysin을 생성하는 균주는 모두 72주였으며, 이 중 hemolysin의 활성이 가장 우수한 *V. vulnificus* 균주를 공시균으로 정하고 이 균주를 대상으로 실험을 진행하였다. 분리된 균주들의 hemolysin생성 여부를 확인한고, 활성을 측정한 결과 *V. vulnificus ys-1*이 가장 높은 활성을 나타내었다. 따라서 이 균주를 대상으로 hemolysin생성에 영향을 미치는 인자를 조사하는 한편 이 *V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin를 정제하고 정제된 효소의 물리적, 효소학적인 성질을 규명한 결과 다음과 같았다.

1. *V. vulnificus ys-1* 균주는 초발 pH 8.0-9.0, NaCl 농도가 3%, 배양온도 30℃에서 hemolysin 생성이 가장 우수한 것으로 나타났다.
2. *V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin는 대수증식기 중기인 배양 6시간째 부터 생산이 증가하기 시작하여 정지기에 이르러 최고치에 이르고, 20시간 이후에는 급격히 감소하였다.
3. 정제과정을 거치는 동안 배양상등액에 비해 318배 정제되었고, 수율은 5.5%였다.
4. 정제된 *V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin의 자외선 영역에서의 흡광도는 단백질의 전형적인 양상을 나타내었고 280nm에서 최대흡광도를 나타내었다.
5. SDS-PAGE를 통해 hemolysin의 정제를 확인한 결과 단일 band를 관찰할 수 있었고 분자량은 45KD이었다.
6. 정제된 *V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin는 50℃까지 활성이 비교적 안정되게 유지되었고 그 이상의 온도에서는 활성이 급격히 떨어졌으며, 최적반응 온도는 35℃였다.
7. 정제된 *V. vulnificus ys-1*이 생성하는 hemolysin는 pH

6.0에서 pH 9.0 사이에서 비교적 안정하였으며 pH 5.0 이하, pH 9.0이상에서는 활성이 급격히 떨어졌으며 효소반응의 최적 pH는 9.0이었다.

참 고 문 헌

1. Kelly, M. T. : Effect of temperature and salinity on Vibrio(*Beneckea*) vulnificus accurance in Gulf Coast environment. *Appl. Environ.. Microbiol.,* **44**, 20(1982).
2. Oliver, J. D., Warner, R. A. and Cleland, D. R. : Distribution of Vibrio vulnificus and other lactose-fermenting Vibrios in the marine environment. *Appl, Environ, Microbiol.* **45**, 985(1983).
3. Sakazaki, R. and Shimada, T. : Vibrio species as causative agents of food-borne infection, p.123, In Robison RK(ed.), *Developments in Food Microbiology 2.*, Elservier Applied Science Publishers, Landon and New York(1986).
4. Blake, P. A., Weaver, R. E., and Hollis, D. G. : Disease of humans(other than cholera) caused by vibrios. *Ann. Rev. Microbiol.,* **34**, pp.341−367(1980).
5. English, V. L. and Lindebrg, R. B. : isolation of *Vibrio alginoliticus* from wounds and blood of a burn patient. *Am. J. Med. Techol.,* **43**, pp.989−993(1977).
6. Huq, M. I., Alam, A.K.M.F., Brenner, D. J. and Morris, G. K. : Isolation of vibrio-like group, EF-6, from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.,* **11**, 621(1980).
7. Morris, J. G., Miller, H. G. and Wilson, R. : Illness caused by *Vibrio damsela* and *Vibrio hollisae. Lancet.,* **1**, 1294−1297(1982).
8. Blake, P. A., Merson, M. G., Weaver, R. E., Hollis, D. G. and Heublein, P. C. : Disease caused by a marine Vibrio : Clinical characteristics and epidemiology. *N. Engl. J. Med.,* **300**, 1−5, (1979).
9. Jean-Jacques, W. Rajashekaraiah, K. R., Farmer, J. J., Hickman, F. W., Morris, J. G. and Kallick, C. A. : *Vibrio metschnikovii* bacterium in a patient with cholescystitis. *J. Clin. Microbiol.,* **14**, 711−712(1981).
10. Blake, P. A. : Clinical features and an epidemiological study of *Vibrio vulnificus* infections. *J. Infect. Dis.,* **149**, 558(1984).
11. Brenner, D. J., Hickman-Brenner, F. W., Lee, J. V., Steigerwalt, A. G., Fanning, G. R., Hollis, D. G., Fa6 rmer, JJ-III. Weaver, R. E., Joseph, S. W. and Seidler, R. J. : *Vibrio furnissii*(formely aerogeic biogroup of *Vibrio fluvialis*), a new species isolated from human feces and the environment. *J. Clin. Microbiol.,* **18**, 816(1983).
12. Farmer, J. J. III. Kickman-brenner, F. W. and Kelly, M. T. : Vibrio, p.282, In Lennette EH, Balows A, Hausler Jr, W. J. and Shadomy, J. H.,(ed.), *Manual of Clinical Microbiology,* 4th ed. American Society for Microbiology, Washigton, D.C.(1985).
13. Hickman, Farmen, J. J. III. Hollis, D. G., Fanning, G. R., Steigerwalt, A. G., Weaver, R. E. ※and Brenner, D. J. : Identification of *Vibrio hollisae* sp. nov. from patients with diarrhea. *J. Clin. Microbiol,* **15**, 395(1982).
14. Lee, J. V., Donovan, T. J. and Furniss, A. L. : Characterization, taxonomy, and emended description of *Vibrio metschnikovii, Int. J. Syst. Bacteriol.,* **23**, 99(1978).
15. Lee, J. V., Shread, P. Furniss, A. L. and Bryant, T. N. : Toxonomy and description of *Vibrio fluvialis* sp. nov. (synonym group F Vibrios, group EF 6). *J. Appl. Bacteriol.,* **50**, 73(1981).
16. Love, M. Teebken-Fisher, D. Hose, J. E., Farmer, J. J. III. Hickman, F. W. and Fanning, G. R. : *Vibrio damsela,* a marine bacterium, *Chromis punctipinnis. Science.,* **214**, 1139(1981).
17. Morris, J. G., Wilson, R. and Davis, B. R. : Non-O group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in the united states. *Ann. intern. Med.,* **94**, 656−658(1981).
18. Davis, B. R., Fanning, R. and Madden, J. M. : Charaterization of biochemically atypical Vibrio cholerea strains and designation of a new pathogenic species, *Vibrio mimicus. Clin. Microbiol.,* **14**, 631−639(1981).
19. Shandera, M. D. and Wayne, X. : Disease from infection with *Vibrio mimicus,* a newly recognized Vibrio species. *Annals of internal Meicine.,* **99**, 169−171(1983).
20. Watsky, D. *Clin. Microbiol. Newsl.,* **5**, 41−43(1983).
21. Chowdhury, MAR. KMS., Aziz, B. A., Kay, and Rahim, Z. : *Vibrio mimicus* in gastroenteritis : a case report. *Bangladesh J. Microbiol.,* 3, 25−27(1986).
22. Muramatsu, K. Wada, M. Kobayashi, M. Shimada, T. and Sakazaki R. : A food-born outbreak of infection possibly with *Vibrio cholerae* serovar 6. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.,* **55**, 1−6(in Japanese).
23. Shimada, T. et al. : Sporadic and collective case of food poisoning caused by sucrose non-fermenting *Vibrio cholerae* serovar 41. *J. Jpn. Assoc. Infect. Dis.,* **54** : 226(in Japanese).

24. Sakazaki, R. et al. : Ecology of non-O1 *Vibrio cholerae* in Toyama prefeture. *Microbiol. Immunol.*, **28**, 311-325(1984).
25. Baselaki, V.S.R.A. Medina, and Parker, C. D. : In vivo and in vitro characterization of virulence-deficient mutants of *Vibrio cholerae. Infect. Immun.*, **24**, 111-116(1979).
26. Wickboldt, L. G. and Sanders, C. V. : *Vibrio vulnificus* infection. Case report and update since 1970. *J. Am. Acad. Dermatol.*, **23**, 243-251(1983).
27. Kosary, M. K. and Kreger, A. S. : Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus. Infect. Immun.*, **50(2)**, 534-540 (1985).
28. Edward, PD, J. Michael Janda, Frederic, I. A. and Edward, J. B. : Comparative studies and laboratory diagnosis of *Vibrio vulnificus*, an invasive Vibrio sp. *J. Clin. Microbio.*, **19(2)**, 122-125(1984).
29. Larsen, J. L. : *Vibrio anguillarum* : Infection of temperature, pH, NaCl concentration and incubation time on growth. *J. Appl. Bact.*, **57**, 237-246(19 84).
30. Spira, W. M. and Fedorkacray, P. J. : Purification of enterotoxins from *Vibrio mimicus* that appear to be identical to cholera toxin. *Infect Immun.*, **45**, 679-684(1984).
31. Chowdhury, MAR. et al. : Toxin production by *Vibrio mimicus* strains isolated from human and environmental sources in Bangladesh. *Journal of Clinical Microbiology*, Nov., 2200-2203(1987).
32. 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).
33. 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).
34. Nishibuchi, M., Khaeomaneeian, V., Honda, T., Kaper, J. B. 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(1991).
35. Chowdhury, MAR., Mlyoshi, S. and Shinoda, S. : Vascular permeability enhancement by *Vibrio mimicus* protease and the mechanisms of action. *Microbiol. Immunol.*, **35**, 1049-1058(1991).
36. Wickboldt, L. G. and Sanders, C. V. : *Vibrio vulnificus* infection. Case report and update since 1970. *J. AM. Acad. Dermatol.*, **9**, 243-251(1983).
37. Kothary, M. K. and Kreger, A. S. : Production and partial characterization of an elastolytic protease of *Vibrio vulnificus. Infect. Immun.*, **50(2)**, 534-554 (1985).
38. Farmer, J. J. : *Vibrio*("*Beneckea*") *vulnificus*, the bacterium associated with sepsis, septicemia, and the sea. *Lancet*, **2**, 903(1979).
39. Tsutomu *et al.* : Purification and some properties of *Aeromonas hydrophila* hemolysin. *Infect. Immun.*, **46** (1), 122-127(1984).
40. Miyoshi *et al.* : Purification and characterization of *Vibrio vulnificus* protease. *Microbiol. Immun.*, **31(4)**, 13-25(1987).
41. Yasami, M. : Purification and Characterization of *Vibrio metschnikovii* cytolysin. *Infect, Immune.*, **56**, 954(1988).
42. Terrance, G. et al. : The Tools of Biochemistry, 53 -55, Spectrophotometry(1977).
43. Laemmli, U. K. : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature(London)*, **227**, 680-685(1965).
44. Kreger, A. and Lockwood, D. : Detection of extracelluar toxin(s) produced by *V. vulnificus. Infect. Immun*, **33**, 583-590(1981).