

## 해수분리 *Vibrio cholerae* non-O1 FM-3의 Hemolysin

김신희 · 박미연 · 이용언\* · 조묘현\*\* · 장동석  
부경대학교 식품공학과, \*동아대학교 의과대학, \*\*마산전문대학 간호학과

### Characteristics of Hemolysin Produced by *Vibrio cholerae* non-O1 FM-3 Isolated from Sea Water

Shin-Hee KIM, Mi-Yeon PARK, Young-Eon LEE\*, Myo-Heon CHO\*\* and Dong-Suck CHANG

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

\*Department of Pharmacology, College of Medicine, Dong-A University, Pusan 602-103, Korea

\*\*Department of Nursing, Masan College, Masan 630-850, Korea

*Vibrio cholerae* non-O1 FM-3 was isolated from sea water, and it showed the same bacteriological characteristics as *Vibrio cholerae* non-O1 ATCC 25872. *V. cholerae* non-O1 FM-3 presented the highest hemolytic activity at stationary phase of its growth. The hemolytic activity was decreased in accordance with increasing of protease activity of its cultural supernatant.

The characteristics of the hemolysin produced by *V. cholerae* non-O1 FM-3 were investigated after partial purification with a Sephadex G-100 chromatography. The hemolytic activity of purified protein was stable at 4°C while it was completely lost by heating at 60°C for 30 min. The activity of hemolysin was increased by addition of divalent cations such as Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, and Mn<sup>2+</sup> while it was inhibited by additions of Zn<sup>2+</sup>.

When the hemolysin was incubated with suspensions of erythrocytes at 4°C and 37°C, respectively, hemolysis was not observed at 4°C but at 37°C. It means that hemolysis by purified hemolysin was temperature-dependent while its binding step of hemolysin to cell membrane was temperature-independent.

**Key words :** hemolysin, hemolytic activity, erythrocytes

## 서 론

*Vibrio cholerae* non-O1은 1980년대에 이르러 새롭게 연구되어지기 시작한 병원성 비브리오균의 하나로, 일본에서는 1982년 새로운 식중독 원인균으로 지정되었다 (Yotaku et al., 1992a).

*V. cholerae* non-O1 에 의한 임상증상은 콜레라와 같은 설사가 주된 경우와 설사증과 함께 복통, 발열, 구토 또는 출혈변을 병행하는 경우로 나눌 수 있다. 전자는 콜레라 독소 (cholera toxin, CT)와 유사한 독소가 병원인자로 추정되며 (Spira et al., 1983), 후자는 CT와 유사한 독소 외에 여러 가지 독소가 병원인자로 관여하는 것으로 추정되고 있다. *V. cholerae* non-O1은 CT와 유사한 독소 외에 장관독소로 대장균의 내열성 enterotoxin (heat-stable enterotoxin; ST)과 유사한 NAG-ST, 장염비브리오의 내열성 용혈독 (thermostable direct hemolysin; TDH)과 유사한 NAG-rTDH, protease와 관계있는 fluid-accumulating factor (FAF), Vero 독소 등을 생산하는 것으로 보고 (本田·山本, 1989; Honda, 1991; Nair et al., 1992)되고 있으며, 임상분리균주나 환경분리균주는 모두 콜레라독소를 가지고 있는 균주는 거의 없으며, 이 균에 의해 야

기되는 장관감염증세는 용혈독이 가지고 있는 장관독성에 의한 것으로 보고되고 있다. 특히, Yotaku et al. (1992b, 1992c)은 rabbit ligated intestinal loop test와 suckling mouse test를 실시한 결과 hemolysin이 장관의 fluid accumulation을 유도하며 다른 병원인자는 병원성의 주인공으로서 작용하지 않음을 밝히고 있다.

따라서, 본 논문에서는 해수에서 분리한 *V. cholerae* non-O1 FM-3 (Kim et al., 1997)이 생산하는 hemolysin의 특성에 관하여 조사한 결과를 보고하고자 한다.

## 재료 및 방법

### 조독소액의 조제

Nair et al. (1992)의 방법을 변형하여 조독소액을 조제하였다. Brain Heart Infusion (BHI) broth (pH 7.0, NaCl 0.5%) 에 전배양한 *V. cholerae* non-O1 FM-3를 10<sup>4</sup>~10<sup>5</sup> cells/ml 정도 접종한 후, 37°C에서 진탕배양하면서 매 시간마다 배양액 5 ml를 취해 3,000×g, 10분간 원심분리하여 얻은 배양 상청액을 hemolysin 실험용 조독소액으로 하였다.

### 적혈구 현탁액의 조제

신선한 sheep blood를 원심관에 넣고 3,000×g에서 5분간 원심분리를 행하여 혈장을 제거한 후 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)로 3~4번 세척하여 얻은 순수한 적혈구를 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 최종농도 1% 되게 현탁하여 용혈활성 검사에 사용하였다.

### 용혈활성의 측정

*V. cholerae* non-O1 FM-3이 생산하는 hemolysin의 독력은 Yamamoto et al. (1984)과 Chang and Shinoda (1994)의 방법에 준하여 실험하였다. 활성측정용액으로는 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 140 mM NaCl, 0.04% NaN<sub>3</sub>, 0.01% bovine serum albumin을 첨가하여 사용하였다. 활성측정용액으로 각 단계별로 희석한 hemolysin과 1% 적혈구 현탁액을 동량 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 3,000×g에서 5분간 원심분리하여 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 완전 용혈을 일으키는 100% 용혈구로는 0.1% Triton X-100을, 비용혈 대조구로는 활성측정용액을 각각 적혈구 현탁액과 동량 혼합하여 37°C에서 1시간 반응시킨 후 3,000×g에서 5분간 원심분리한 후, 540 nm에서 흡광도를 측정하였다. 완전용혈구의 50%의 용혈을 나타내는 hemolysin의 양을 1 hemolysin unit (1 HU)로 하여 결과를 산출하였다.

### Protease 활성 측정

*V. cholerae* non-O1 FM-3의 증식 중 균체의부로 생산되는 hemolysin의 용혈활성에 영향을 미치는 protease의 활성을 측정하였다. 위와 같이 처리한 조독소액을 조효소액으로하여 Anson et al. (1938)의 방법에 준하여 protease의 활성을 측정하였다.

시험관에 인산완충용액 (pH 7.0) 1.5 ml, 0.02% casein 기질용액 0.5 ml, 조효소액 0.5 ml를 가하여 37°C로 조절된 항온수조에서 20분간 반응시켰다. 반응 후 5% trichloroacetic acid 용액 2.5 ml를 가하고 실온에서 방치한 후 3,500×g, 20분 원심분리하였다. 상청액 1 ml를 취하여 0.55 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0.5 ml를 가한 후, 다시 3배 희석된 Folin-Ciocalteus phenol 시약 0.5 ml를 가하여 실온에서 30분간 발색시켜 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

### Hemolysin의 정제

*V. cholerae* non-O1 FM-3이 생산하는 hemolysin의 정제 방법은 Fig. 1에 나타내었다. 균은 0.5% NaCl을 첨가한 5 ml의 BHI broth에서 전배양한 후, 500 ml BHI broth에 접종하여 37°C에서 진탕배양하였다. 배양액을 7,000×g에

서 20분간 원심분리하여 얻은 상청액에 ammonium sulfate를 60% 포화가 되도록 첨가하여 4°C에서 서서히 교반하면서 하룻밤동안 단백질을 석출시킨 다음 7,000×g에서 40분간 원심분리하였다. 이와 같이 얻은 precipitate를 배지성분을 완전히 제거하기 위하여 60% ammonium sulfate 용액으로 한번 더 수세한 다음 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 현탁시켜 12,000×g에서 30분간 원심분리하여 상청액을 얻었다. 투석 후, Sephadex G-100 gel column chromatography로 분획하였다. 용출액은 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0, 1 mM EDTA, 3 mM NaN<sub>3</sub>, 0.2 M NaCl 0.25 M Glucose)를 사용하여 7 ml/h의 유속으로 1분획당 5 ml 씩 분획하고 그 중에서 가장 높은 용혈활성을 보인 획분을 회수하여 독소의 안정성 검사에 사용하였다.

### Hemolysin의 안정성

#### 1) 온도

Hemolysin의 온도에 대한 안정성을 검토하기 위하여 hemolysin액을 4, 20, 35, 50, 60°C에 보관하면서 시간경과에 따른 용혈활성의 변화를 측정하였다. 결과는 초기 용혈활성을 100으로 하였을 때, 저장 후 잔존하는 용혈활성을 백분율로 나타내었다.

#### 2) pH

Hemolysin의 pH에 대한 안정성을 검토하기 위하여 pH 5.0에서 pH 9.0에 이르기까지 1.0 간격으로 조절한 후 가장 안정한 온도인 4°C에서 정치하면서 매 시간마다 잔존활성을 조사하였다.

### 양이온의 영향

Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>의 각 2가 양이온과 K<sup>+</sup>, Na<sup>+</sup>의 1가 양이온의 존재하에서 2 HU의 hemolysin과 1%의 양 적혈구 현탁액을 가하여 37°C, 1시간 반응 후 1,600×g에서 5분간 원심분리하여 상청액의 용혈도를 540 nm의 흡광도에서 상대적으로 비교하였다.

### 용혈반응의 온도 의존성

Hemolysin의 작용에 있어서 용혈반응의 온도 의존성에 대하여 Miyake et al. (1989)의 방법에 준하여 실험하였다. 양 적혈구 현탁액 1 ml에 hemolysin (100 HU)을 첨가한 시료를 37°C에서 1시간 반응한 경우와, 4°C에서 1시간 정치한 후 원심분리하여 세정한 다음 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.0)에 현탁시킨 현탁액을 37°C로 옮겨 다시 1시간 반응시킨 경우로 나누어 실험하여 활성을 조사하였다.

### 결과 및 고찰

#### Hemolysin의 용혈활성의 변화

*V. cholerae* non-O1 FM-3의 배양 상청액 중의 hemolysin의 용혈활성의 변화를 Fig. 2에 나타내었다. hemolysin의 용혈활성의 변화 측정에 가장 좋은 결과를 보인 BHI broth (pH 7.0, 0.5% NaCl)를 사용하여 최적 반응 온도인 37°C에서 적혈구 현탁액과 조독소를 반응시킨 후 용혈활성의 변화를 측정하였다. 유도기를 지나 대수증식기에 접어들면서 균체외로 생산되는 hemolysin의 용혈활성이 나타나기 시작하여 대수증식기가 지속되는 동안 용

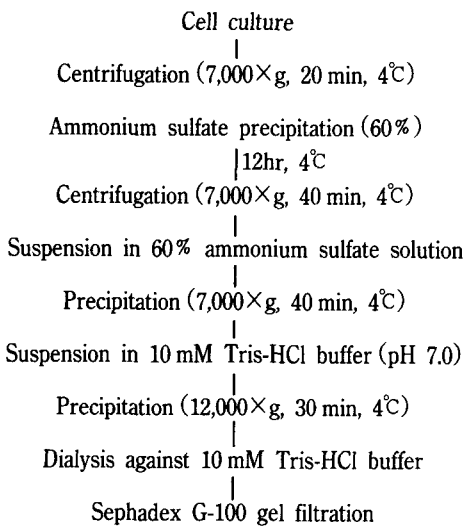


Fig. 1. Purification scheme for the hemolysin produced by *V. cholerae* non-O1 FM-3.

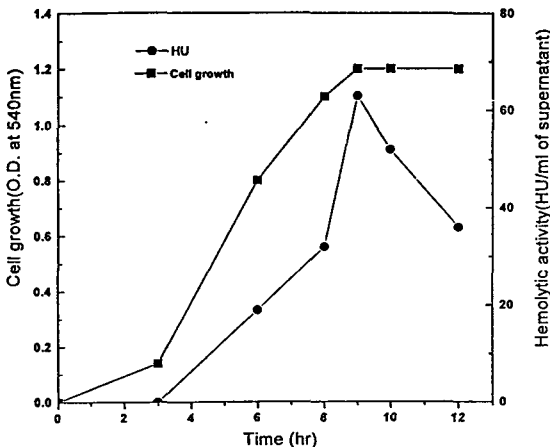


Fig. 2. Patterns of cell growth and hemolysin production of *V. cholerae* non-O1 FM-3 during the shaking culture (140 cycles/min) in BHI broth at 37°C.

혈활성이 지속적으로 증가하는 경향을 나타내었다. 배양 9시간째 균의 증식이 정지기에 들어가면서 가장 높은 63 HU를 나타내었고, 그 이후로는 급격히 감소하는 경향을 나타내었다.

#### Protease의 영향

일정 시간 간격으로 배양액을 취하여 원심분리한 상청액으로부터 protease 활성과 hemolysin의 활성을 측정하여 그 관련성을 살펴본 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 배양 9시간째 가장 높은 용혈활성을 보인 지점에서 protease의 활성이 나타나기 시작하여 이 후 protease의 활성이 점차적으로 증가하면서 용혈활성은 감소하는 결과가 나타났다.

따라서, 본 균주는 hemolysin과 함께 protease도 생산하는 균주로 확인되었다. 균의 증식이 사멸기에 접어들고 영양성분이 고갈되는 지점에서 protease가 균체외로 분비되고, 이에 의해 배양 상청액 중의 hemolysin이 변성, 실활되는 것으로 추측된다.

#### Hemolysin의 정제

Iwanaga and Ichinose (1991)의 방법에 준하여 Sephadex G-100 gel column chromatography를 행한 결과는 Fig. 4와 같다. 각 회분의 용혈활성을 측정된 결과, 가장 높은 용혈활성을 보인 9번 회분을 정제표품으로하여 이 hemolysin의 특성을 조사하였다.

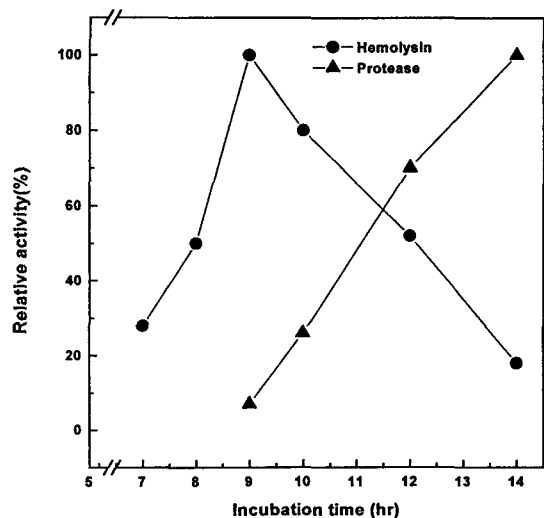


Fig. 3. Relationship between protease and hemolysin production of *V. cholerae* non-O1 FM-3.

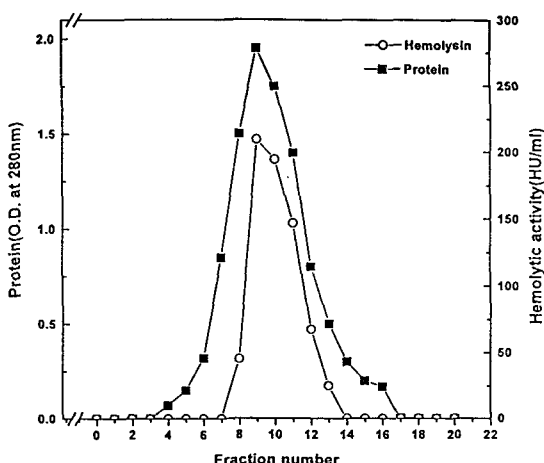


Fig. 4. Chromatograms of the hemolysin produced by *V. cholerae* non-O1 FM-3 on Sephadex G-100.

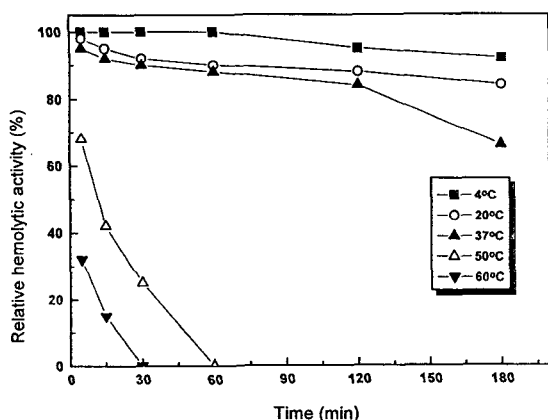


Fig. 5. Change of hemolytic activity of the hemolysin from *V. cholerae* non-O1 FM-3 by incubation time and temperature.

정제 hemolysin의 안정성

1) 온도

Hemolysin을 4, 20, 35, 50, 60°C의 온도에 정치하면서 시간경과별 용혈활성이 급격히 감소하였고, 변화를 측정하여 온도 안정성을 살펴본 결과는 Fig. 5와 같다.

이 독소는 60°C에서 15분간 정치하였을 때 용혈활성이 급격히 감소하였고, 30분 경과시 용혈활성이 완전히 소실되었으므로 내열성이 약한 독소임을 확인하였다. 50°C에서도 비교적 불안정하여 1시간 경과시 용혈활성이 완전히 소실되었다. 37°C와 20°C에서는 비교적 용혈활성이 안정하였으나, 시간경과에 따라 용혈활성이 완만히 감소하는 경향을 나타내었다. 그러나, 4°C에서는 1시간 경과 후에도 용혈활성이 그대로 유지되었으며 3시간 경과

시에도 90% 정도의 용혈활성을 유지하여 4°C에서 가장 안정한 것으로 나타났다.

이와 같은 결과는 本田·山本 (1989)의 보고와는 차이가 있었다. 그들은 *V. cholerae* non-O1 이 생산하는 NAG-ST 독소를 정제한 후 온도의 안정성을 실험하였을 때, 100°C에서 30분간 가열하여도 용혈활성이 감소하지 않았다고 보고하였다. Shinoda et al. (1993) 은 *V. mimicus*의 이열성 hemolysin의 경우 60°C에서 5, 15, 30분간 가열하였을 때 잔존하는 용혈활성은 13.5, 5.2, 0%로 급격히 소실되는 경향을 나타내었다고 보고한 바 있으며, 자연환경에서 분리한 *V. cholerae* non-O1균주의 경우 60°C에서 15분간 가열로 용혈활성이 완전히 소실되었다는 Iwanaga and Ichinose (1991)의 결과와 일치하였다.

2) pH

각 pH별로 조절한 hemolysin을 가장 안정한 온도대였던 4°C에서 1시간 정치한 후 용혈활성을 측정된 결과는 Fig. 6과 같다. Hemolysin은 pH 7.0에서 가장 안정하였고 pH 6.0에서도 비교적 안정하였으나, pH 5.0, 8.0, 그리고 9.0에서는 급격한 감소를 보여 중성의 영역에서 비교적 안정한 경향을 나타내었다.

양이온의 영향

1가 양이온과 2가 양이온이 hemolysin에 미치는 영향을 살펴본 결과는 Table 1과 같다.

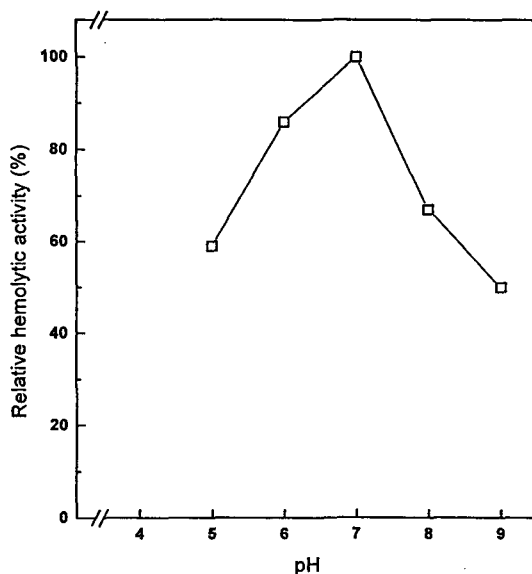


Fig. 6. Effect of pH on the activity of the hemolysin produced by *V. cholerae* non-O1 FM-3. Hemolysin was treated at various pH for 1 hr.

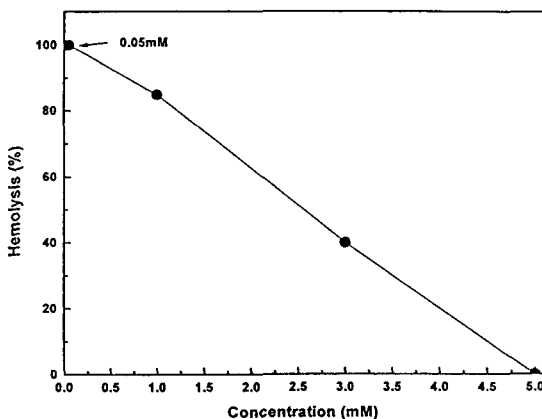
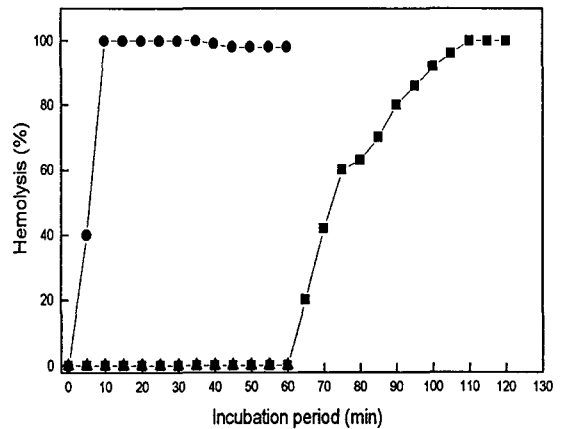
**Table 1. Effect of cations on the hemolytic activity of the hemolysin produced by *V. cholerae* non-O1 FM-3**

Cation	Relative hemolytic activity			
	2 mM	5 mM	20 mM	50 mM
Control	100	100	100	100
Na <sup>+</sup>	127	138	155	172
K <sup>+</sup>	111	133	144	144
Ca <sup>2+</sup>	466	500	527	556
Mg <sup>2+</sup>	417	728	1339	2122
Mn <sup>2+</sup>	62	322	562	4466
Zn <sup>2+</sup>	59	0	0	0

Reaction mixture of hemolysin and sheep erythrocytes was incubated at 37°C for 1 hr under the presence of different cations.

Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>의 1가 양이온을 첨가하였을 때는 점진적으로 용혈활성이 촉진되었다. Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> 양이온을 첨가하였을 때 용혈활성이 훨씬 촉진되었고 특히 Mn<sup>2+</sup>을 첨가하였을 때 두드러진 결과를 나타내었다. 이는 *V. mimicus*의 hemolysin (Shinoda et al., 1993)과 *V. vulnificus*의 hemolysin (吳, 1994)의 경우, 2가 양이온의 첨가에 의해 용혈활성이 저해된다는 보고와는 상반된 결과였으며, *V. parahaemolyticus*의 용혈작용에 있어서 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> 등 2가 양이온을 첨가하면 용혈작용이 촉진된다는本田와 山本 (1989)의 결과와는 일치하였다.

반면, Fig. 7에서처럼 같은 2가 양이온이지만 Zn<sup>2+</sup>의 첨가에 의해서는 용혈작용이 100% 저해됨이 확인되었고, 용혈작용을 50% 저해하는 농도를 나타내는 ID50은 2.3 mM로 나타났다. 이는 *V. metschnikovii*의 hemolysin의 경우 용혈작용에 반응을 촉진하는 Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>와 같은 이온과 반응을 저해하는 Zn<sup>2+</sup> 등의 이온으로 나누어 진다는 Miyake et al. (1989)의 보고와 일치하는 결과였다.

**Fig. 7. Inhibitory effect of Zn<sup>2+</sup> on hemolytic action.****Fig. 8. Temperature-dependent hemolysis induced by *V. cholerae* non-O1 FM-3. Erythrocytes was incubated with the hemolysin (2HU/ml) at 37°C (●) and 4°C (▲) for 60 min. After 60 min incubation, the suspension incubated at 4°C was centrifuged and the precipitate was washed, suspended in 10 mM Tris-HCl buffer and incubated at 37°C (■).**

#### 온도 의존성

각각 다른 온도대에서 적혈구 현탁액과 hemolysin을 반응시킨 결과는 Fig. 8과 같다.

용혈현상은 4°C에서는 나타나지 않았지만 최대 용혈활성온도인 37°C에서는 관찰되었다. 그러나 4°C에서 1시간 hemolysin과 반응시킨 적혈구를 원심분리하여 세정하고 다시 회수한 후 37°C에서 재반응시켰을 때는 100% 용혈이 일어났다. 이것은 4°C에서 온도와 관계없이 적혈구막에 hemolysin이 결합하였음을 나타내며, 반면 용혈작용에는 37°C의 온도가 필요함을 알 수 있었다.

*V. cholerae* non-O1이 생산하는 hemolysin은 *V. mimicus* (石田, 1991)나 *V. vulnificus* (吳, 1994)가 생산하는 hemolysin과 같은 결과를 나타냄을 알 수 있었다. 즉, 제1

단계는 온도 비의존적인 단계로 적혈구막에 hemolysin이 결합하며, 제2단계로 온도 의존적으로 hemolysin이 적혈구 막에 소공을 형성함에 의하여 용혈을 일으킨다고 사료된다.

요 약

해수로부터 분리한 *V. cholerae* non-O1 FM-3 이 생산하는 hemolysin의 특성에 관하여 연구한 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. *V. cholerae* non-O1 FM-3이 생산하는 hemolysin은 대수증식기일 때 가장 높은 활성을 나타내었으며, Sephadex G-100 gel column chromatography로 부분정제한 후 hemolysin의 특성을 실험한 결과, pH 7.0, 4℃에서 가장 안정하였으며, 60℃, 30분 가열에 의해 완전히 실패되었다.

2. 적혈구와 hemolysin이 반응할 때, Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>과 같은 1가 양이온을 첨가하면 약간의 활성증가를 보였으며, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>과 같은 2가 양이온을 첨가하였을 때 급격한 활성증가를 보였고, 반면 Zn<sup>2+</sup> 첨가시에는 급격히 활성이 저하되었다.

3. 적혈구 현탁액과 hemolysin을 각각 다른 온도대에서 반응시킨 결과, 4℃에서도 온도와 관계없이 적혈구막과 hemolysin의 결합이 가능한 온도 비의존적인 제1단계와, 용혈활성의 최적온도대인 37℃에서만 용혈작용이 일어나는 온도 의존적인 제2단계로 나누어졌다.

참 고 문 헌

Anson, M.L. 1938. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin. *J. Physic.*, 22, 79~89.  
 Chang, D.S. and S. Shinoda. Toxin Produced by Pathogenic Vibrios Isolated from sea Food. *Bull. Korean Fish. Soc.* 27 (2), 107~113 (in Korean).  
 Honda T. 1991. Pathogenesis, genes and toxins of genus Vibrios. *Medical Immunology*, 21 (3,4), 313~323.  
 Iwanaga M. and Y. Ichinose. 1991. An aberrant hemolysin of *Vibrio cholerae* Non-O1. *Microbiol Immunol.*, 35 (9), 705~715.  
 Kim, S.H., M.Y. Park, U.K. Park, Y.M. Kim and D.S. Physiological and ecological characteristics of hemolytic Vibrios and development of sanitary coun-

termeasure of raw fisheries foods : 3. Growth factor and antibiotic susceptibility of *Vibrio cholerae* non-O1 FM-3 isolated from sea water. *Bull. Korean Fish. Soc.*, in press (in Korean).  
 Miyake M., T. Honda and T. Miwatani. 1989. Effect of divalent cations and saccharides on *Vibrio Metschnikovii* Cytolysin Induced Hemolysis of Rabbit Erythrocytes. *Inf. Immunity*, 57 (1), 158~163.  
 Nair, G.B., Y. Oku, Y. Takeda and A. Ghosh. 1992. Toxin profiles of *Vibrio cholerae* non-O1 from environmental sources in Calcutta, India. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 (12), 3180~3182.  
 Shinoda, S., K. Ishida, E.G. Oh, K. Sasahara, S. Miyoshi, M. A. R. Chowdury and T. Yasuda. 1993. Studies on haemolytic action of haemolysin produced by *Vibrio mimicus*. *Microbiology and Immunology*, 37, 405~409.  
 Spira, W.M., P.J. Fedorka-Cray and P. Dettbore. 1983. Colonization of the rabbit small intestine by clinical and environmental isolates of Non-O1 *Vibrio cholerae* and *V. mimicus*. *Inf. Immunity*, 41 (3), 1175~1183.  
 Yamamoto K., T. Honda, Y. Takeda and T. Miwatani. 1984. Non-O1 *Vibrio cholerae* hemolysin: Purification, partial characterization, and immunological relatedness to El Tor hemolysin. *Inf. Immunity*, 45 (1), 192~196.  
 Yotaku G., H. Kodama and S. Sato. 1992a. Studies on the enteropathogenic mechanism of non-O1 *Vibrio cholerae*. I. Enteropathogenicity of clinical and environmental isolates. *Kanshogaku-Zasshi*, 65 (5), 531~536.  
 Yotaku G., H. Kodama and S. Sato. 1992b. Studies on the enteropathogenic mechanism of non-O1 *Vibrio cholerae*. III. Production of enteroreactive toxins. *Kansenshogaku-Zasshi*, 65 (7), 781~787.  
 Yotaku G., H. Kodama and S. Sato. 1992c. Studies on the enteropathogenic mechanism of non-O1 *Vibrio cholerae*. IV. Role of hemolysin. *Kansenshogaku-Zasshi*, 65 (8), 897~904.  
 本田武司, 山本耕一郎. 1989. *Vibrio cholerae* non-O1의 産生する多様な病原毒素. *醫學細菌學* 5巻. p.294~323.  
 石田和彦. 1991. *Vibrio mimicus*가 産生する溶血毒素에 關する研究. 岡山大學大學院自然科學研究科 碩士學位論文.  
 吳銀倞. 1994. *Vibrio vulnificus*의 産生する溶血毒素 (Hemolysin)에 關する研究. 岡山大學大學院自然科學研究科 博士學位論文.

1997년 2월 25일 접수  
 1997년 6월 30일 수리