

저해제가 *Vibrio parahaemolyticus* 균주의 생육 및 요소분해효소의 활성에 미치는 영향

김종숙 · 김영희*

동의대학교 미생물학과

Effect of Inhibitors on cell growth and urease activity of *Vibrio parahaemolyticus*

Jong-Sook Kim, Young-Hee Kim*

Department of Microbiology, Dong-Eui University Pusan, 614-714, Korea

Abstract

Effect of inhibitors on *Vibrio parahaemolyticus* cell growth and its urease activity was studied. The growth of the bacterium and the enzyme activity were inhibited by the addition of 0.02% *p*-hydroxymercuric benzoate, HgCl₂ and AgNO₃. However, same concentration of boric acid, thallium acetate and Pb(NO₃)₂ did not affect the cell growth but inhibited urease activity by 25%, 29%, and 38%, respectively. Acetohydroxamic acid was the most potent inhibitor on cell growth by inhibiting 40% but did not affect urease activity. To investigate the effect of inhibitors on urease activity, urease was purified and confirmed on SDS-PAGE. The purified urease was inhibited 100% by the addition of 1 mM acetohydroxamic acid and AgNO₃ but no inhibition was occurred by the addition of the same concentration of thallium acetate. And the addition of 0.01 mM of HgCl₂ and acetohydroxamic acid inhibited the purified urease activity by 39% and 24%, respectively. On 0.1 millimolar basis, acetohydroxamic acid and HgCl₂ inhibited 4 times more active in urease inhibition than *p*-hydroxymercuric benzoate whereas no inhibition was occurred either thallium acetate or Pb(NO₃)₂.

Key Words – *Vibrio parahaemolyticus*, urease, inhibitors

서 론

요소분해효소 (urease)는 여러 세균 및 식물로부터 생산되며 [8], 특히 병원성 세균의 경우 이 효소의 생산이 주요 병원성 지표 물질로 사용된다. 이 효소의 주요 기전은 요소를 암모니아와 carbamate로 가수분해하며 carbamate는 자동적으로 분해되어 또 다른 분자의 암모니아와 carbonic acid를 생산한다. 이 효소의 생산은 사람 및 동물의 요료와

장에 감염을 유발하는 독립인자로 작용하며, 특히, 위나 장 점막에 세포독성을 유발하고 이 효소를 생산하는 세균들이 강산이 분비되는 위나 장벽에 잘 부착할 수 있는 요인을 제공하여 미생물이 이곳에서 서식할 수 있게 하거나 생존 가능하게 한다 [8,10]. 한편 *Ureaplasma*의 경우에는 요소의 가수분해로 화학적 삼투압을 통하여 ATP 합성을 촉진시켜 에너지 대사에 주요 역할을 하는 것으로 알려져 있다 [2].

생육저해제의 역할은 여러 대사산물의 생산을 억제하거나 대사산물을 생산하는 생물체의 생육에 영향을 미치는 것으로 *in vivo*에 저해제 및 그 유도체들을 치료목적으로 적용하는 사례들이 있다 [4]. 지금까지 항 미생물 제제들이

*To whom all correspondence should be addressed

Tel : 051-890-1535, Fax : 051-890-1532

E-mail : yhkim@hyomin.dongueui.ac.kr

병원균의 생육저지 물질로 많이 사용되어져 왔으나 위 및 장내에서의 환경조건에 의하여 높은 효력을 나타낼 수 없는 경우가 있었는데 이것은 여러 세균에 의하여 생성되는 요소분해효소가 위 등의 산성환경에 pH를 높임으로서 이들의 생존에 적합한 환경을 지배한다는 이론이 뒷받침한다. 강력한 요소분해효소를 생산하는 세균으로 알려진 *Helicobacter pylori*의 경우에도 acetohydroxamic acid 및 그 유도체에 의한 저해효과가 증명되었는데, 연구 결과에 의하면 요소분해효소와 같은 효소의 생산에 의하여 pH를 증가시켜 최소저지농도를 더 낮춤으로서 점막에 쉽게 부착할 수 있게 된다는 결과를 보고하였다 [2]. 따라서 저해제의 사용은 이들 물질의 기능을 저하시켜 감염력을 떨어뜨리는 것이다.

지금까지 저해제로는 합성물질, 화합물 및 그 유도체들이 이용되어져 왔으며 이들 물질의 저해능 차이에 대한 연구는 아직도 진행중이다. 요소분해효소와 저해제의 관계에서 요소분해효소를 생산하여 위염을 유발하는 *Helicobacter pylori* [6]에 관한 연구가 집중되고 있는데 본 연구에서도 이러한 관점에서 장내세균의 장 부착에 영향을 미치는 요소분해효소를 생산하는 해양미생물이며 식중독 원인균인 *Vibrio parahaemolyticus* (이하 VP) [1,11,14]를 대상으로 요소분해효소 저해제가 균의 생육 및 효소활성에 미치는 상관 관계를 밝혀보고자 한다.

재료 및 방법

사용 균주 및 배지

해양 환경에서 분리한 VP KH410을 사용하였다 [5]. 기본배지로는 LB배지에 3% NaCl, 0.5% glucose, 0.2% 요소를 첨가하고 초기 pH를 5.5로 조정하여 배양을 유도하였으며 배양온도 37°C에 7시간 진탕 배양하였다.

세포 파쇄액

균체 파쇄액의 준비를 위하여 배양액을 원심분리하고 (3,000 X g, 10 min, 4°C) 그 침전물을 생리 식염수로 2회 세척하였다. 이를 인산 완충액 (20 mM, pH 7.0)으로 한번 더 세척 한 후, 같은 완충액에 재 현탁 시키고 균체를 얼음에 채운후 초음파 파쇄기 (Sonifer 250, Branson, USA)를 이용하여 파쇄시켰다 (50 duty cycles, output 4.0, 4 periods of

30 s). 파쇄액은 원심분리한 후 (10,000 X g, 20 min, 4°C) 그 상등액만을 효소활성 측정용 및 정제 과정에 사용하였다.

사용 저해제

사용 저해제로는 acetohydroxamic acid (AHA), thalium acetate, boric acid, Pb(NO₃)₂, HgCl₂, AgNO₃, 그리고 p-hydroxymercuric benzoate를 사용하였다. 각각의 농도는 균 배양액의 경우에는 0.02%를 첨가하고 효소활성이 최대에 이르는 [5] 37°C에서 7시간의 배양을 유도 한 후에 균체를 회수하여 사용하였다. 정제효소의 경우에는 각 저해제에 대하여 30 unit를 사용하고 각각의 저해제를 0.01 mM, 1 mM, 10 mM과 20 mM의 농도별로 첨가하였다. 효소와의 반응은 37°C에서 5분간 반응시킨 후 기질인 요소를 첨가하여 활성의 정도를 비교하였으며, 표준 요소분해효소는 식물 유래 jack bean urease (Sigma, Type c-3, 1200 IU/mg)를 사용하였다.

생육도 및 효소활성의 측정

균의 생육도는 분광광도계를 이용하여 600 nm에서의 흡광도로써 측정하였고, 단백질의 정량은 280 nm에서 행하였다. 요소분해효소 활성의 측정은 Weatherburn의 방법 [16]을 변형하여 기질인 요소가 분해되어 생성되는 암모니아를 hypochlorite 존재하에서 phenol과 반응시켜 indophenol로 전환시킨 후 나타나는 발색정도를 분광광도계로 540 nm에서 측정하여 정량 하였다. 이때 표준곡선은 ammonia chloride로 측정하였으며 1분 동안에 1 μM을 유리시키는데 필요한 요소분해효소의 양을 1 unit로 정하였다.

요소분해효소의 정제

요소분해효소는 대량 배양을 행한 후 DEAE-cellulose ion exchange chromatography, Sepharose CL-6B gel filtration 및 Oxirane-activated urea affinity column [3,17]의 방법을 변형하여 정제하였다. 전체 정제과정은 Fig. 1에 요약하였다. 정제 요소분해효소의 순도 검정을 위하여 SDS-PAGE를 Laemmli와 Osborn [9]의 방법에 따라 12%(w/v) polyacryl amide와 0.1%(w/v) SDS 가 함유된 separating gel 과 4%(w/v) polyacryl amide 와 0.1%(w/v) SDS 가 함유된 stacking gel을 만들어 사용하였다. 시료의 조제는 2% SDS와 β-mercaptoethanol을 함유하는 sample buffer와 정

Table 1. Effect of inhibitors on the cell culture of *Vibrio parahaemolyticus* KH410

Inhibitors	pH	Cell growth (OD 600 nm)	Inhibition (%)*
Acetohydroxamic acid	5.3	1.83	100
AgNO ₃	5.5	0.12	100
Boric acid	6.5	3.07	25
Thallium acetate	6.0	4.02	29
<i>p</i> -hydroxymercuric benzoate	6.0	0.02	100
Pb(NO ₃) ₂	5.7	3.44	38
HgCl ₂	5.8	0.20	100
None	6.9	3.00	0

0.02 % of inhibitors were added to the basal medium. Cultivation was carried out for 7 hr at 37°C on a shaker. *; Results expressed as percentages of inhibition of specific urease activity compared with the urease activity with no inhibitor.

제 과정을 거친 효소를 섞어 100°C에서 5분간 끓인 후 15 mA에서 약 3시간 동안 전기영동한 후 gel을 coomassie 염색액으로 염색하고 단백질 밴드를 확인하였다. 이때 정제된 요소분해효소의 분자량을 측정하기 위하여 Bio-rad사의 middle molecular weight standard를 사용하였다.

결 과

균의 생육에 대한 저해제의 효과

균의 생육과 요소분해효소 저해제의 효과를 확인하기 위하여 기본배지에 각각의 저해제 농도를 0.02%로 첨가한 결과는 Table 1에 나타내었다. 균의 생육은 thallium acetate, boric acid 및 Pb(NO₃)₂의 첨가에 전혀 영향을 받지 않았으나 요소분해효소활성은 각각 29%, 25% 및 38%의 저해를 나타내었다. 한편 *p*-hydroxymercuric benzoate, HgCl₂ 그리고 AgNO₃의 첨가는 균의 생육에 큰 저해를 나타낼 뿐만 아니라 요소분해효소 활성에도 저해를 나타내었다. 한편 AHA는 균의 생육엔 40% 정도의 저해를 나타내었으며 효소활성에도 100% 저해를 나타내었다.

요소분해효소활성에 미치는 저해제 효과

요소분해효소는 Fig. 1의 정제과정을 거쳐서 30,000 unit/mg의 정제 효소액을 얻을 수 있었으며 정제된 효소 단백질을 SDS-PAGE로 확인 한 결과 85 kDa, 59 kDa, 그리고 41

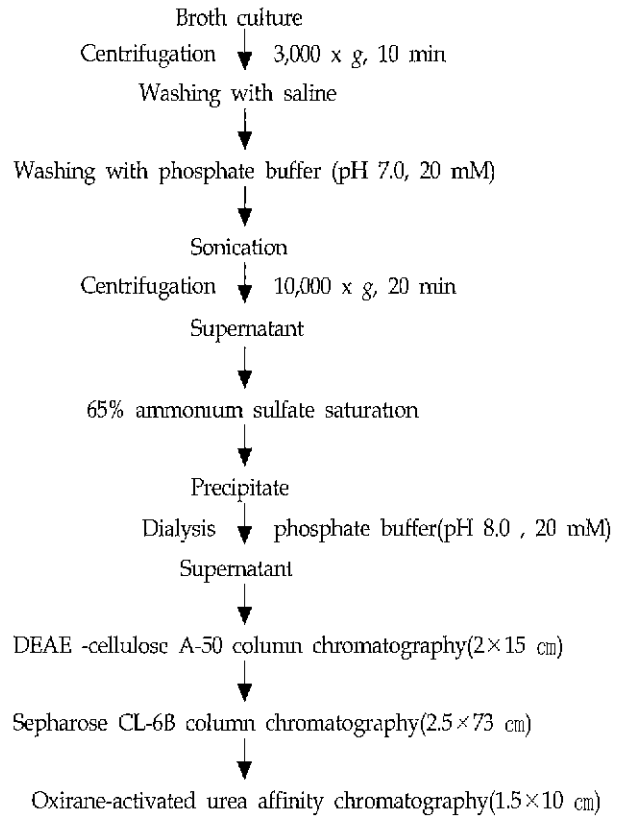


Fig. 1. Schematic procedure of purification of urease from *Vibrio parahaemolyticus* KH410.

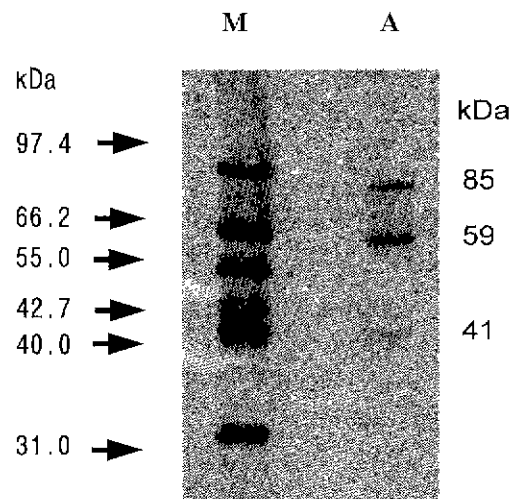


Fig. 2. SDS-PAGE of the purified urease from *Vibrio parahaemolyticus* KH410.

M ; Molecular weight marker, A ; Purified urease

kDa 크기의 3 밴드를 확인 할 수 있었다 (Fig. 2). 각각의

Table 2. Effect of inhibitors on urease activity

Inhibitors	Conc. of Inhibitors (mM)	Inhibition(%)*	
		VP urease	Jack bean urease
Acetohydroxamic acid	0.01	23.6	57.2
	0.1	63.9	82.4
	1	100	87.2
AgNO ₃	0.01	0	0
	0.1	31.3	0
	0.5	100	75.2
	1	100	100
Boric acid	0.01	0	0
	0.1	25.4	0
	1	51.9	0
	5	100	27.4
	10	100	64.9
<i>p</i> -hydroxymercuric benzoate	0.01	0	0
	0.1	15.4	0
	1	25.8	18.4
	2	100	100
Thallium acetate	0.1	0	17.4
	1	0	19.1
	10	0	20.8
	20	17.1	33.8
Pb(NO ₃) ₂	0.1	0	0
	1	15.8	0
	10	76.9	66.3
	20	100	100
HgCl ₂	0.001	9.1	0
	0.01	39.1	11.4
	0.1	62.7	67.9
	0.2	100	100

Inhibitors were added to the reaction mixture containing the purified urease preparation at 37°C, 5 min prior to the addition of urea. *; Results expressed as percentages of inhibition of specific activity in a control reaction mixture with no inhibitor.

저해제의 농도를 다르게 하여 정제된 요소분해효소의 활성화에 미치는 영향에 대한 결과는 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 보는 바와 같이 VP 요소분해효소는 0.1 mM의 AHA의 첨가시에는 63.9%, 1 mM의 첨가 시에는 100%의 저해를 나타내었다. 한편 0.1 mM의 *p*-hydroxymercuric benzoate 첨가 시에는 15.4%의 저해를 나타내었으며 1

mM의 경우에는 25.8%의 저해를 나타내어 jack bean urease와 유사한 저해력을 나타내었다. 그리고 10 mM과 20 mM의 Pb(NO₃)₂을 첨가한 경우에는 표준 jack bean urease와는 비교적 큰 차이를 나타내지 않았음을 볼 수 있었다. 또한 1 mM의 AgNO₃의 첨가 시에는 VP 요소분해효소와 jack bean urease 모두 100%의 큰 저해를 나타내었다. 10 mM의 thallium acetate의 첨가 시에는 jack bean urease가 21%의 저해를 나타낸 것에 비하여 VP 요소분해효소는 저해를 나타내지 않았으며 10 mM이하의 농도는 효소활성에 전혀 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다. 1 mM의 boric acid 첨가 시에는 jack bean urease의 경우 영향을 미치지 않는 반면 VP 요소분해효소에는 같은 농도에서 51.9%의 저해를 나타내었다.

고 찰

호염성인 VP 균에 의한 주요 병원성 발현 여부로 세포 외 인자인 내열성 용혈독 및 그들의 유전적 특성이 연구되어져 왔다. 이 균의 새로운 병원성 인자인 요소분해효소의 생산성은 이미 여러 미생물이 생산하는 것으로서 병원성 세균의 중요 지표 인자로 알려져 있고, 또한 이 효소를 생산하는 VP의 특성은 분리원, 지역, 혈청형에 따라 다양한 양상을 보여주고 있다 [7]. VP 균에 의해 생산되는 요소분해효소가 이 균의 새로운 병원성 인자로 등장함에 따라 그에 대한 관심이 커지고 있으며 일반적으로 VP는 요소분해효소를 생산하지 않는다고 보고되었으나 Abbott는 몇몇 임상 분리 주에서 이 효소의 생산을 보고하였고 [1] 그 후 여러 분리 원으로부터 요소분해효소를 생산하는 균주를 분리함으로써 확인이 되었다. VP 균이 생산하는 요소분해효소는 세포내 인자로서 병원성이 일부 밝혀졌으며 [2], 아직까지 확실한 병원성에 대한 규명이나 효소 화학적 사례에 관한 보고는 제한적이며, Orasa의 VP 요소분해효소 생성은 유전자와 관계가 있다는 [11,13] 주장이 주목되어 지고 있다.

VP의 병원성 인자인 요소분해효소는 기질인 요소에 의존하는 유도효소로서 [5] 활성화는 세포질 분획물과 연관이 있다. 따라서 효소의 정제를 위하여 균체 파쇄법이 적용되어졌는데 Cai 등이 제안한 water extraction 방법보다 [3] 회수율이 높은 초음파 파쇄법을 시도하여 좋은 결과를 얻

을 수 있었다. 한편 정제후의 효소의 양상은 SDS-PAGE상에서 85 kDa, 59 kDa, 및 41 kDa를 확인하였는데 이는 Cai 등[3]의 결과와 유사하였다.

요소분해효소는 nickel을 함유하는 효소로서 이 효소에 대한 저해제의 역할은 이 이온에 작용함으로써 저해력에 영향을 나타내는 것으로 알려져 있다 [7]. 지금까지 식물 요소분해효소의 대표격인 jack bean urease의 경우에는 subunit 당 2개의 nickel 이온을 가지고 있으며, 금속이온은 산소와 질소 착염에 의해 결합되어 있다고 하였다 [7]. Soy bean urease의 경우엔 크기나 구조, nickel 함량이 jack bean urease와 유사하다고 하였으나 미생물 요소분해효소는 이와는 다르다고 보고하였다 [7]. 지금까지 강력한 요소분해효소를 생산하는 *Helicobacter pylori*와 *Ureaplasma*의 저해제와의 관계를 밝힌 자료들이 많이 알려져 있으나 [12,15] VP와 저해제에 관한 자료는 없다.

따라서 본 연구는 기존의 요소분해효소와 관련된 저해제 및 새로운 저해물질의 탐색을 목적으로 실험한 결과로서 저해제가 VP의 생육에 미치는 영향으로는 *p*-hydroxymercuric benzoate, HgCl₂ 그리고 AgNO₃ 첨가에는 생육이 억제되었으며 반면 thallium acetate, boric acid, 그리고 Pb(NO₃)₂의 첨가 시에는 균의 생육에는 전혀 지장을 나타내지 않았으며 각각 71%, 75% 그리고 62%의 잔존 활성을 나타내었다. 그러나 AHA는 균의 생육에 영향을 미치면서 요소분해효소의 완전 억제를 유도하여 AHA가 강력한 저해제로서 *U. urealyticum*의 생육을 방해한다는 보고와 [2] 일치하는 결과를 나타냄을 볼 수 있었다.

정제효소에 대한 저해제의 영향은 첨가 저해제의 농도에 따라 각기 다른 양상을 나타내었다. 0.1 mM의 HgCl₂, AgNO₃ 첨가 시에는 VP 요소분해효소가 각각 62.7%, 31.3%의 저해를 나타내었고 같은 농도의 AHA와 *p*-hydroxymercuric benzoate의 첨가 시에는 각각 63.9%, 15.4%의 저해율을 볼 수 있었는데 이는 *Helicobacter pylori* 요소분해효소가 HgCl₂, Pb(NO₃)₂, Ag(NO₃)₂의 첨가에 대하여 20% 정도의 활성을 나타내었고 jack bean urease에는 효과가 없었다 라는 결과와 [8] 비교시는 낮은 저해효과를 나타냈다. 효소에 대한 AHA는 금속 착염제로서 요소분해효소의 nickel active site에 결합되어 저해의 유도가 이루어지고, Ag⁺, Hg²⁺는 요소분해효소의 활성을 크게 저해하며 이런

금속이온은 환원제로서 역할을 하여 효소 활성을 저해시키는 것으로 알려져 있는데 이 결과는 *Helicobacter pylori*의 실험결과에서도 유사성을 볼 수 있다 [8]. 효소구성상 sulfhydryl group과 반응하는 중금속은 *Ureaplasma* [2]와 jack bean urease 모두의 활성을 저해하였는데 0.5 M의 AgNO₃는 jack bean urease 보다 VP 요소분해효소에 더 강력하게 저해작용을 나타내었다. 한편 thallium acetate는 저 농도에서는 VP 요소분해효소 활성에 대한 저해를 관찰할 수 없었다. 또한 20 mM의 thallium acetate를 첨가하였을 때 jack bean urease는 33.8%, VP 요소분해효소는 17.1%의 저해력을 나타내었는데 저 농도에서도 저해를 나타내는 jack bean urease와는 다른 성상을 볼 수 있었다. Boric acid는 저 농도에서도 VP 요소분해효소에 저해력을 나타내었는데, 1 mM의 농도에서 jack bean urease가 전혀 저해 받지 않은 결과와 비교시 VP 요소분해효소는 51.9%의 저해력을 나타내는 양상을 보였다.

지금까지 요소분해효소의 저해제로는 항 세균성 항생물질이 많이 사용되었는데 항생물질과 요소분해효소 저해제로 알려진 AHA를 대상으로 같은 균에 대한 비교 실험에서는 AHA가 10% 더 저해력이 높은 것으로 판명되었는데 [4] 본 연구의 결과는 jack bean urease와의 비교 실험에서는 VP 요소분해효소와 jack bean urease에 대하여 비슷한 저해력을 가진다는 것을 볼 수 있었으며 0.01 mM 농도에서는 VP 요소분해효소에 대한 저해력이 23.6%로 더 높았다. 이 같은 효소활성의 저해는 강한 치료 효과를 기대할 수 있으며 Matthew [7]는 요소분해효소의 여러 저해제에 대한 감수성의 차이는 미생물유래이든 식물 유래이든 활성 부위의 차이 때문인 것으로 설명하였다 [15].

이상의 결과를 종합하여 볼 때 지금까지 알려진 요소분해효소의 강력한 저해제인 AHA가 VP의 생육에도 강력한 억제 물질로 밝혀졌으며 정제 요소분해효소에서는 boric acid가 잠정적인 저해제로 판명이 되었다. 지금까지의 저해제와 VP 요소분해효소에서의 결과를 *in vivo* 실험을 통하면 병원성에서나 감염에서의 이 효소의 역할을 더욱 자세히 설명할 수 있을 것으로 보이며 더욱 다양한 물질을 대상으로 저해효과를 비교하여 저해제를 이용한 강력한 감염균 치료제의 개발에 이용하여야 할 것으로 보인다.

요 약

요소분해효소를 생산하는 호염균인 *Vibrio parahaemolyticus*를 대상으로 균의 생육과 균이 생산하는 병원성 인자로 밝혀진 요소분해효소와 저해제 사이의 상관 관계를 검토하여 보았다. 요소분해효소의 저해제로 알려진 *p*-hydroxy-mercuric benzoate, HgCl₂, 그리고 AgNO₃의 0.02% 첨가는 균의 생육과 효소활성을 완전히 저해하였으나, 같은 농도의 boric acid, thallium acetate, Pb(NO₃)₂는 각각 25%, 29%, 그리고 38%의 효소활성에 저해를 나타내었으며 균의 생육에는 영향을 미치지 않았다. 한편 AHA의 경우 균의 생육에는 40% 저해를 나타내었으나 효소활성은 100% 저해하여 효과적인 저해제 임이 밝혀졌다. 저해제의 효과를 확인하고자 요소분해효소를 정제하여 SDS-PAGE로 확인하였다. 정제효소에 대한 저해제의 효과에서는 0.01 mM의 AHA와 HgCl₂ 첨가 시에는 효소활성이 각각 24% 및 39% 저해되었으나, thallium acetate의 경우 10 mM의 농도 첨가에도 효소활성에는 영향을 주지 못하였다. 한편 0.1 M의 저해제 첨가에서는 효소에 대하여 AHA와 HgCl₂는 Pb(NO₃)₂보다 약 4배의 높은 저해력을 나타내었으나 같은 농도의 thallium acetate와 Pb(NO₃)₂는 전혀 영향을 미치지 못하였다.

참 고 문 헌

1. Abbott, S. L., C. Powers, C. A. Kaysner, Y. Takeda, M. Ishibashi, S. W. Joseph, J. Janda and M. Jarda. 1989. Emergence of a restricted Bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the west coast of the United States and Mexico. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2891-2893.
2. Blanchard, A., S. Razin, G. E. Kenny and M. F. Barile. 1988. Characteristics of *Ureaplasma urealyticum* urease. *J. Bacteriol.* **170**(6), 2692-2697.
3. Cai, Y. and N. Yuxing. 1996. Purification, characterization, and pathogenicity of urease produced by *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Clin. Laboratory Analysis* **10**, 70-73.
4. Hamilton-Miller, J. M. T. and R. A. Gargan. 1979. Rapid screening for urease inhibitors. *Investigative Urology* **16**(5), 327-329.
5. Kim, J. S. and Y. H. Kim. 2000. Isolation of urease positive *Vibrio parahaemolyticus* and urease production. *Kor. J. Life Science.* **10**(1), 94-100.
6. Logan, R. P. H. 1996. The chemotherapeutic effects of H⁺/K⁺ inhibitors on *Helicobacter pylori* infection. *Pharmacol. Ther.* **69**(1), 79-83.
7. Matthew J. T. and R. P. Hausinger. 1987. Purification and characterization of the nickel-containing multicomponent urease from *Klebsiella aerogenes*. *J. Biol. Chem.* **262**(13), 5963-5967.
8. Hirofumi, N., S. Takenish and Y. Watanabe. 1984. Purification and properties of urease from *Brevibacterium ammoniagenes*. *Agri. Biol. Chem.* **48**(6), 1495-1502.
9. Laemunli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
10. McCoy, D., A. Cetin and R. P. Hausinger. 1992. Characterization of urease from *Sporosarcina ureae*. *Arch. Microbiol.* **157**, 411-416.
11. Oberhofer, T., R. John and K. Podgore. 1982. Urea-hydrolyzing *Vibrio parahaemolyticus* associated with acute gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* **6**(3), 581-583.
12. Odake, S., T. Morikawa, M. Tsuchiya, L. Imamura and K. Kobashi. 1994. Inhibition of *Helicobacter pylori* urease activity by hydroxamic acid derivatives. *Biol. Pharm. Bull.* **17**(10), 1329-1332.
13. Orasa, S., M. Ishibashi, T. Iida, N. Nettip, S. Supavej, B. Eampokalap, M. Makino and T. Honda. 1995. Urease production correlates with possession of the *trh* gene in *Vibrio parahaemolyticus* strains isolated in Thailand. *J. Infect. Dis.* **172**, 1405-1408.
14. Sakazaki, R., S. Iwanami and H. Fukumi. 1963. Studies on the enteropathogenic facultatively, halophilic bacteria *Vibrio parahaemolyticus*. I. Morphological, cultural and biochemical properties and its taxonomical position. *Jpn. J. Sci. Biol.* **16**, 161-188.
15. Smoot D., H. L. T. Mobley, G. R. Chippendale, J. F. Lewison and J. H. Resau. 1990. *Helicobacter pylori* urease activity is toxic to Human gastric epithelial cells. *Infect. and Immun.* **58**(6), 1992-1994.
16. Weatherburn, M. W. 1967. Phenol-hypochlorite reaction for determination of ammonia, *Anal. Chem.* **39**, 971-974.
17. Wong, B. L. and C. R. Shobe. 1974. Single step purification of urease by affinity chromatography. *Can. J. Microbiol.* **20**, 623-630.