

Staphylococcus aureus에서 생성된 Enterotoxin B의 분리 및 정제

이정희·신현길·김종배·한재수

건국대학교 축산가공학과

Jeong-Hee Lee, Heuyn-Kil Shin, Jong-Bae Kim, and Jae-Soo Han

Purification of type B Staphylococcal enterotoxin

Department of Animal Products Science, Kon-Kuk University, Seoul, 133-140 Korea

ABSTRACT-Various methods such as gel-filtration on Sephadex G-50, 75, 100 Sephacryl, and Ultro gel, and ion-exchange chromatography on Amberlite and carboxymethyl (CM)-cellulose, and Fast Protein Liquid Chromatography (FPLC) were applied for the purification of enterotoxin B from *Staphylococcus aureus* ATCC 14458 and compared one another.

Ion-exchange chromatography on Amberlite resin was good enough to remove non-enterotoxin materials in culture, convenient to use and fast although the purity was less than 70%. However, CM-cellulose showed to be better purity and yield than those of Amberlite resin. The yields of these two resins for ion-exchange chromatography were about 70% and 75%, respectively.

When the gel-filtration methods on Sephadex G-50, 75, 100, Sephacryl, and Ultro gel were applied, the purities were about 90%. FPLC was found to be the most efficient method in terms of purity (96%) and speed. For the purification of sample with large volume, particularly, the combined method, gel-filtration after Amberlite can be also used efficiently. The purified toxin was found to be identical to type B enterotoxin used for reference standard by Ouchterlony immunodiffusion test.

Keywords □ enterotoxin B, Amberlite CG-50, yields, Ultro gel, Fast Protein Liquid chromatography.

*Staphylococcus aureus*로 부터 생성되는 enterotoxin은 물과 열에 쉽게 용해되는 단백질로서 A, B, C₁, C₂, C₃, D, E, F 등 8가지 type으로 분류되며, 분자량은 26,000~37,000 정도인 Single polypeptide chain이다¹⁾ 그중 enterotoxin B는 toxin A에 비해 독성이 약하며 분자량도 enterotoxin중 가장 작다. 그러나 식품에서의 생성량은 toxin A와 거의 같으며 toxin B만으로도 식중독이 발생할 수 있다^{1,2)}.

Enterotoxin은 다른 식품 toxin에 비해 특히 열에 대하여 내성이 크며 유기용매에도 안정하다. 그러므로 식품의 가열처리 후에도 그 독성은 쉽게

없어지지 않는다^{2,3)}

특히 enterotoxin은 생성하는 *Staphylococcus aureus*는 내열성이 강할 뿐만 아니라 낮은 수분활성도에서도 증식이 가능하다. 따라서 거의 모든 식품에서 식중독을 일으킬 수 있다⁴⁾.

Enterotoxin B의 분리 및 정제를 위한 연구는 1950년대 말부터 시작되었는데⁵⁾ 초기에는 주로 단백질 침전제에 의해 분리하였으나 60년대 부터는 이온교환수지 및 gel filtration을 이용하였고⁶⁻⁸⁾ 70년대 이후에는 gel filtration 및 Iso electric focusing 등을 이용하여 분리하였다^{3),9),10)}. 그러나 toxin의 물리·화학적 연구를 위해서는 순수하고 빠른 toxin의 분리가 필수적이다¹⁾.

따라서 본 연구는 가장 신속하고 정제도가 높은 분리방법을 모색하고 이온교환수지, gel filtra-

Received for publication 30 May; 1988
Reprint request; Dr. H.K. Shin at the above address

tion, 그리고 Fast Protein Liquid Chromatography(FPLC) 등을 이용하여 toxin을 분리함에 있어 각 방법을 비교분석하였다.

재료 및 방법

균주 및 toxin 생산—본 실험에 사용된 enterotoxin B 생산을 위한 균주는 독일연방정부 육연구소로부터 공급받은 *Staphylococcus aureus* ATCC 14458를 사용하였으며 toxin 생산을 위해서는 신등¹¹⁾의 방법을 이용하였다.

toxin의 분리 및 정제—시료의 전처리는 Reiser 등¹²⁾의 방법을 이용하여 실시하였고 이것을 요약하면 Fig. 1과 같다. Toxin의 분리방법은 전보¹³⁾와 같으며 분리 및 정제를 위해 사용된 column은 Table 1과 같다.

항체의 생산—Enterotoxin B를 0.01M phosphate buffer에 희석하고 Complete Freund's adjuvant(Sigma, No. P. -4258, U. S. A)와 1 ml이 되도록 혼합하여 intradermal site injection 방법에 의하여 1주일 간격으로 immuniza-

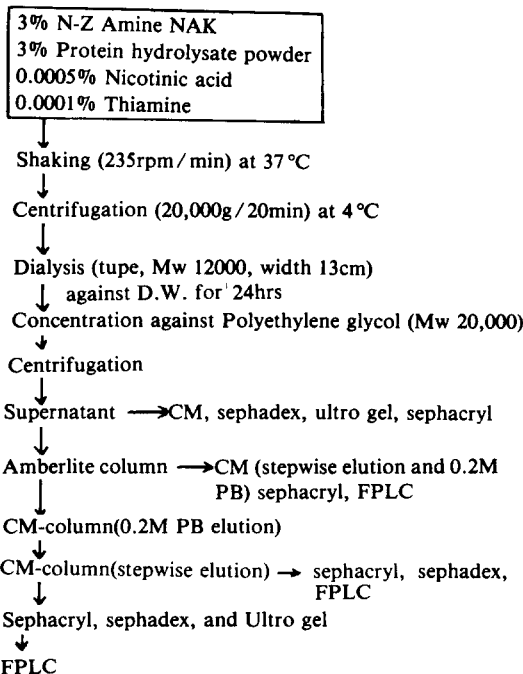


Fig. 1. Schematic diagram showing the preparation of enterotoxin B from medium.

Table 1. Names of resins used

Names of resins	Producers
Amberlite CG-50	Sigma, U.S.A.
Amberlite IRC-50	Sigma, U.S.A.
Carboxymethyl (CM)-cellulose	Sigma, U.S.A.
Sephadex G-50,75,100	Pharmacia Fine chemicals, Sweden
Sephacryl S-300	
Ultro gel 4A	
Fast Protein Liquid Chromatography	LKB, Sweden

tion 하였다¹⁴⁾. 주사의 양은 토끼에 대하여 1, 3, 5, 10, 25, 50 µg을 0, 8, 21, 28, 35, 42일 간격으로 주사하였으며 28일 후 부터 항체의 titer를 조사하였다.

Gel diffusion test—정제도와 toxin의 존재여부를 확인하기 위하여 microside gel diffusion test¹⁵⁾와 Single Radial Immunodiffusion¹¹⁾을 실시하였다.

Microslide gel diffusion test는 precoating된 microslide 위에 1.2% agarose를 부어서 제조하였고 gel 위에 등근 홈을 만든 후 항원과 항체를 분주하여 37°C의 incubator에서 48~72시간 반응시켰다. 반응후 남아있는 미반응 단백질을 제거하여 0.1%의 Coomassie brilliant blue R로 염색하고 1시간 후 destaining buffer로 탈색하여 확인하였다.

SRID법은 신등¹¹⁾의 방법을 이용하였으며, 정제도는 SRID에 의해 측정된 toxin의 양을 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다.

결과 및 고찰

이온교환수지에 의한 분리·정제—Amberlite column으로 처리한 결과 2개의 분획이 나타났는데 첫번째 분획은 배지와 소량의 toxin이 함유되어 있고 두번째 분획은 약 70%가 toxin인 분획으로 Immunodiffusion test 결과 확인하였다(Fig. 2). Amberlite CG-50과 IRC-50 모두 유사한 경향을 나타내었으나 IRC-50의 경우 두번째 분획에

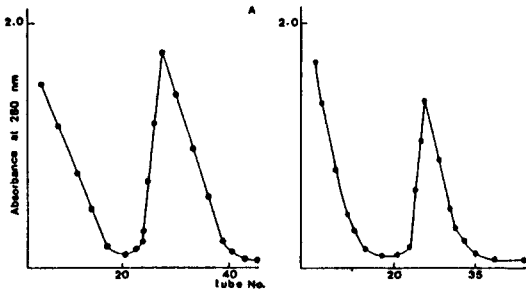


Fig. 2. Amberlite column (2.5 × 60cm) chromatography of supernatant from medium. Amberlite CG-50 (A) and IRC-50 (B). Flow rate was 3ml/min. Fraction volume was 10ml. The toxin was eluted with 0.5M PBS and equilibrated with 0.05M PB (pH 6.4).

서의 toxin양이 CG-50보다는 낮은 것으로 나타났다. 따라서 IRC-50은 toxin B를 분리하는데에는 적합치 못한 수지이다. 이것은 Schantz⁷⁾의 결과와 일치되는 것이며, Amberlite 수지로서 toxin을 분리한 분획에서는 미량의 배지가 함유되어 있

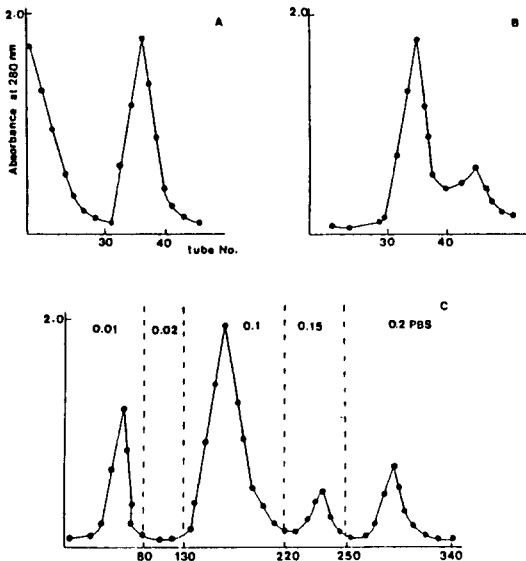


Fig. 3. CM-cellulose column chromatography of fractions of supernatant after centrifugation and eluted by PB (A) and stepwise (C); and fractions after Amberlite column and eluted by PB (B). Column size was 2.2 × 40cm. Flow rate was 3ml/min. Fraction volume was 5ml. The toxin was eluted with stepwise (0.01-0.2M PBS) and 0.2M PB.

음을 확인하였고 toxin A와 C의 분리시 결과와 일치하였다.

Fig. 3의 A와 B는 Amberlite column에 의한 1차 분리물과 분리를 거치지 않은 원심분리 상등액을 CM chromatography 한 결과로서 C는 원심분리 후 상등액의 분리도를 나타내었다. 원심분리 상등액을 CM chromatography (용출, 0.2M PB)한 결과 Amberlite column의 분획양상과 같이 2개의 분획이 나타났는데 2번째 분획이 정제도 75% 정도의 toxin을 함유하였으며 Amberlite column보다는 배지의 함유율이 적어 정제도는 우수하였고 Amberlite 수지에 의한 1차 분리물에서는 하나의 분획이 나타났다. 이 분획의 Immunodiffusion test 결과 정제도는 약간 향상되었으나 80% 이상을 넘지 못했다.

CM column을 stepwise 용출법으로 사용했을 때의 분획양상은 Fig. 3에 나타냈다. 한번의 분리도 거치지 않은 상등액을 CM chromatography 한 결과 4개의 분획이 나타났는데 그중 2번째 분획이 Immunodiffusion test 결과에 의해 toxin으로 확인됐다. 첫번째 분획은 배지가 대부분인 분획이며 toxin 분획 다음에 나타난 두개의 작은 분획은 고농도의 buffer 사용시에만 나타나는 분획으로 CM column을 0.2M PB로 용출시 제거되지 않고 항상 toxin 분획과 함께 나타나는 분획이다. 그러므로 이 두개의 작은 분획은 CM column을 stepwise 용출법으로 사용했을 때에만 toxin과의 분리가 가능하다. 이러한 결과는 Avena¹⁶⁾ 등의 2분획이 나타난다는 보고와는 다소 다른점이 있으나 용출 buffer의 농도차이 때문인 것으로 생각되며 정제도에 있어서는 Avena의 결과보다 우수하였다(85%).

Gel filtration에 의한 분리·정제—Fig. 4는 sephacryl을 사용하여 각 분리물간에 분획양상을 나타내었다. Fig. 4중 F는 배지에서 원심분리를 거친 상등액을 gel filtration 한 결과인데 6개의 분획을 나타내었다. 첫번째 분획은 배지이며, 네번째 분획이 toxin으로 확인되었고 그 외의 분획은 확인되지 않았다. 그러나 각 분획들이 서로 겹치고 있어 정제도는 좋지 못했다. G는 Amberlite에 의한 1차 분리물을 gel filtration 한 결과로서 4개의 분획으로 줄어 들었는데 세번째 분획이 toxin이다.

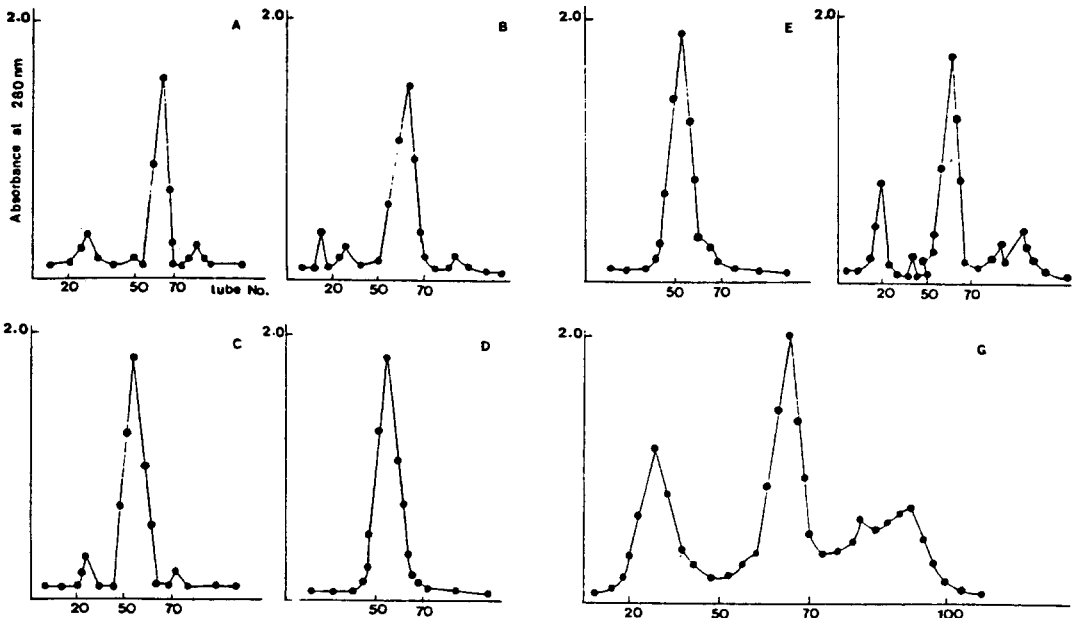


Fig. 4. Gel filtration of enterotoxin B on sephacryl s-300 fractions treated by various methods.

- A: Amberlite and CM-column chromatography
 B: CM-column chromatography eluted by 0.2M PB
 C: CM-column chromatography by stepwise elution
 D: Amberlite and CM-column chromatography with stepwise elution
 E: CM-column chromatography both PB and stepwise elution
 F: supernatant from medium

Amberlite에 의한 1차 분리물은 Fig에서와 같이 배지와 toxin 분획사이의 분획들이 줄어 들었다는 것을 알 수 있으며 toxin 뒤쪽의 분획은 거의 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났고 CM column을 0.2M PB로 용출한 분리물은 3개의 분획이 나타났으며 먼저 Amberlite로서 1차 분리하고 다시 CM column(용출, 0.2M PB)에 의해 분리한 분리물은 3개의 분획이 나타났으나 toxin 분획을 중심으로 앞·뒤의 분획은 미세하였다. 그러나 CM column을 stepwise법으로 용출했을 때의 분리물은 2개의 분획만을 나타냈으며, Fig. 4중 D와 E는 하나의 분획을 보여주고 있다.

이러한 결과로 미루어 볼 때 Amberlite 수지는 toxin 분획을 중심으로 앞의 분획을 주로 제거하고 CM 수지의 경우는 주로 뒤쪽의 분획을 제거하는 특징을 가지며 CM 수지를 stepwise법으로 용출할 때에는 앞·뒤에 관계없이 거의 제거된다는 것을 알 수 있다. 이것은 toxin A와 C의 분리과

정에서 나타난 특징과 동일한 것으로 Amberlite나 CM column으로 toxin을 분리할 때 이러한 수지의 특징을 이용하면 toxin의 정제도를 향상시킬 수 있으리라 생각된다.

F의 처음 분획은 배지로서, 배지에서 toxin을 분리하는 처음과정은 CM column을 stepwise법으로 용출할 때를 제외하고는 배지와 toxin을 완전분리하기는 힘든 것으로 생각된다. 따라서 gel filtration을 실시하기 전에 이온교환수지를 먼저 거친 후 gel column을 사용하면 정제도를 90% 이상 향상시킬 수 있다.

Sephadex G-95, 100 그리고 Ultro gel 모두 유사한 결과를 나타내었으나 정제도에 있어서는 Ultro gel이 가장 우수하였다(Fig. 5). 그러나 sephadex G-50은 gel column중 가장 분리도가 나빠 sephacryl column에서 나타난 분획들이 거의 서로 겹치는 분획양상을 보였고 정제도도 나빴다. 이것은 sephadex G-50이 toxin을 분리하는

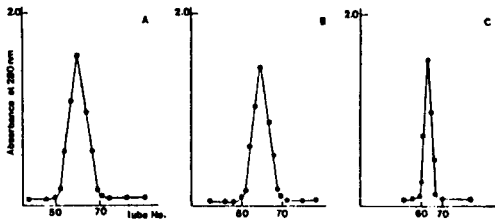


Fig. 5. Gel filtration of Enterotoxin B on sephadex G-75 (A), G-100 (B), and ultro gel (C) of fraction of Amberlite and CM-column chromatography with stepwise elution. All conditions were as same as sephacryl.

데에는 좋지 않다는 것을 나타낸다. Toxin을 분리하는데 있어서 이온교환수지와 gel filtration을 차례로 실시하면 정제도는 90% 이상으로 매우 높았으나 이온교환수지를 거치지 않고 직접 gel filtration을 실시하면 정제도와 분리도 모두 떨어졌다.

FPLC에 의한 분리·정제— 위 실험결과와 분리도와 정제도를 조사하기 위하여 실시한 실험결과는 Fig. 6에 나타냈다.

배지를 원심분리하여 상등액을 주입한 결과 13분대에 나타나야 하는 toxin 분획을 제외하고도 sephacryl과 Ultro gel로도 분리할 수 없었던 분획들이 나타났고 Amberlite나 CM수지를 한번 사용한 분리물들은 toxin 분획 이외의 분획이 현저히 줄어들었다(A, B). C에서 보는 바와 같이 IRC-50으로 분리한 분리물은 Amberlite CG-50보다 더 많은 분획을 볼 수 있고 CM수지를 gradient법으로 용출했을 때의 분리물은 toxin 이외의 분획이 현저히 감소하였다(D). 그러나 한번이라도 분리를 거친 분리물들은 toxin 분획을 명확히 볼 수 있었다.

Gel filtration의 결과와 같이 CM수지를 사용한 분리물들은 toxin 분획을 중심으로 주로 뒤의 분획이 제거되었고 Amberlite 수지를 사용했을 때에는 앞의 분획이 제거된다는 것을 더욱 명확히 알 수 있었다.

하나의 분획을 나타내었던 gel filtration 분리물에도 2~3개의 분획이 더 나타났다. 따라서 FPLC는 위에 사용된 column중 가장 분리도와 정제도(95% 이상)가 우수하며 적은 양으로도 분

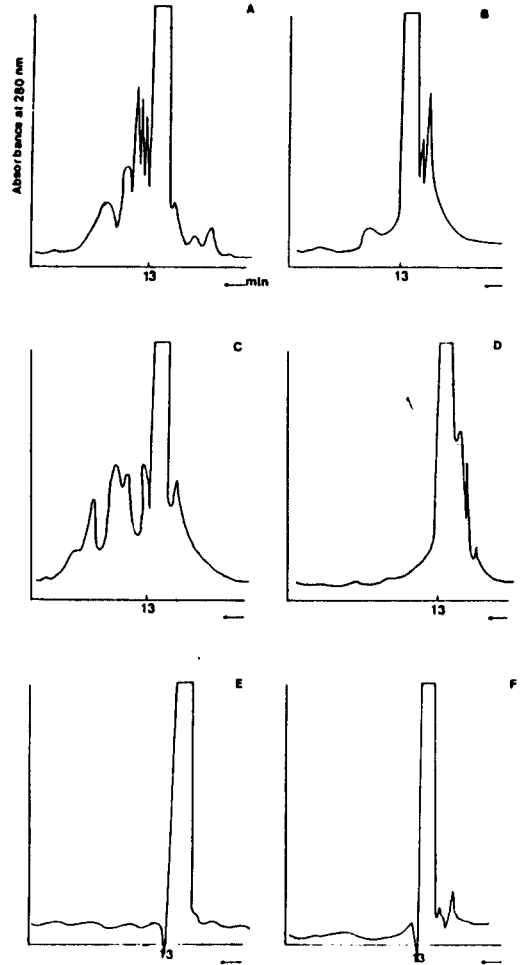


Fig. 6. FPLC of fractions after Amberlite CG-50 column (A); CM-column chromatography by PB elution (B); Amberlite IRC-50 column (C); CM-column chromatography by gradient (D); Standard as a reference (E); and after gel filtration on Ultro gel (F).

FPLC column (Glas Pac. 300 sw, 2 × 30 cm) was conditioned with 0.1M PBS (pH 6.8) and eluted with same buffer. Flow rate 1ml/min and injection volume was 5-30ul. Chart speed was 5mm/min and AUFS 0.1/2.0.

석이 가능하다. 위에 언급한 column중 먼저 어느 한 column에 통과시킨 후 FPLC를 사용하면 단 시간내에 95% 이상의 정제도를 가진 toxin을 분리하는 것이 가능하였다. 이것은 toxin A의 분리에서 나타난 결과와 유사한 양상을 나타냈다¹³⁾.

분리능력에 있어 FPLC는 시료 주입량이 적어

많은 양을 분리하고자 할 때 고가의 column을 사용해야 하는 단점은 있으나 소량으로 단시간내에 가장 분리도를 높게 정제할 수 있는 장점을 가지고 있어 이 방법의 폭넓은 이용이 기대된다.

국문 요약

본 실험은 *Staphylococcus aureus*로 부터 생성되는 enterotoxin B의 분리 및 정제를 위하여 각종 분리방법을 비교조사하였다.

배지로 부터 enterotoxin B를 추출하는 방법중 Amberlite CG-50 수지가 가장 간편하고 빠른 방법이었고 CM수지는 Amberlite 수지에 비해 용출력이 떨어졌으며 분리할 수 있는 toxin의 양은 적었으나 정제도에 있어서는 약 75%로 toxin을 분리하는 처음 단계로서는 높은 편이었다. CM column을 gradient 용출법으로 사용했을 때에는 하나의 column을 사용해 분리한 분리물중 정제도가 85%로 가장 높았고, 용출 buffer의 농도폭을 넓히는 것이 정제도를 높이기 위한 바람직한 방법이었다. 이 실험에 사용한 Sephadex G-50, 75, 100, Sephacryl, Ultro gel 등의 gel filtration 방법중 Ultro gel에 의한 분리방법이 정제도에 있어서는 가장 우수했으며, 이온교환수지를 먼저 사용한 분리물에서는 모두 90% 이상의 toxin을 얻을 수 있었지만, 한번의 분리도 거치지 않은 배지는 분리도와 정제도에서 현저히 떨어졌고, Sephadex G-50은 gel column중 정제도가 가장 낮았다. FPLC는 위의 분리·정제 방법중 가장 빠른 방법이며, 적은 양의 시료로도 측정이 가능하였고 정제도는 95% 이상이었다.

참고문헌

- Bergdoll, M.S., Huang, I-Y., and Schantz, E.J.: Chemistry of the Staphylococcal enterotoxins. *J. Agr. Food Chem.*, **22**, 9 (1974).
- Riemann, H., Lee, W.H., and Cenigeorgis, C.: Control of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus* in semi-preserved meat products. *J. Milk Food Technol.*, **35**, 514 (1972).
- Reiser, R.F., Robbins, R.N., Khoe, G.P., and Bergdoll, M.S.: Purification and some physicochemical properties of toxic shock toxin. *Biochem.*, **22**, 3907 (1983).
- Minor, T.F. and Martn, E.H.: *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food intoxications. a review. *J. Milk Food Technol.*, **35**, 228 (1972).
- Bergdoll, M.S., Sugiyama, H., and Dack, G.M.: Staphylococcal enterotoxin. *Arch. Biochem. Biophys.*, **85**, 62 (1959).
- Frea, J.I., Mc Coy, E., and Strong, F.M.: Purification of type B staphylococcal enterotoxin. *J. Bacteriol.*, **86**, 1308 (1963).
- Schantz, E.J., Roessler, W.G., Wagman, J. Spero, L., Dunnery, D.A., and Bergdoll, M.S.: Purification of staphylococcal enterotoxin B. *Biochem.*, **4**, 1011 (1965).
- Hallander, H.O.: Purification of staphylococcal enterotoxin B. *Acta. Path. et Microbiol. Scandinav.*, **67**, 117 (1966).
- Robern, H., Stanislava Stavric and Nester Dickie: The application of QAE sephadex for the purification of two staphylococcal enterotoxins. *Biochimica et Biophysica Acta*, **393**, 134 (1975).
- Melconian, A.K., Flandrois, J-P., and Fleurette, J.: Modified method for production and purification of SEB. *Appl. Environ. Microbiol.*, **45**, 1140 (1983).
- 신현길, 이정희, 서선우: Staphylococcal enterotoxin의 생성조건에 관한 연구. 건국대학교 축산과학연구소 논문집 제 12집 (1987).
- Reiser, R.F. and Bergdoll, M.S.: Identification, purification, and some physicochemical properties of staphylococcal enterotoxin C₃. *Infect. Immun.*, **625** (1984).
- 이정희, 신현길, 김종배: Staphylococcal

enterotoxins의 분리 및 정제. 1. Staphylococcal enterotoxin A의 분리 및 정제, 한국식품과학회.

14. Robbins, R.N., and Bergdoll, M.S.: Production of rabbit antisera to the staphylococcal enterotoxins. *J. Food Prot.*, **47**, 172 (1984).
15. Bennett, R.W., and Mc Lean, F.: Collaborative study of the serological identification of staphylococcal enterotoxins by the microslide gel double diffusion test. *J.A.O.-A.C.*, **59**, 597 (1976).
16. Avena, R.M., and Bergdoll, M.S.: Purification and some physicochemical properties of enterotoxin C, *Staphylococcus aureus* strain 361. *Biochem.*, **6**, 1474 (1967).