

Staphylococcal Enterotoxin A의 분리 정제

이정희 · 신현길 · 김종배 · 김태종* · 윤화중*

건국대학교 축산가공학과, *수의학과

Purification of *Staphylococcal* Enterotoxin A

Jeong-Hee Lee, Hyun-Kil Shin, Jong-Bae Kim
Jae-Jong Kim and Hao-Jung Yoon

Department of Animal Product Science

*Department of Veterinary Medicine, Kon-kuk University, Seoul

Abstract

In order to investigate the most efficient and rapid method for the purification of enterotoxin A from *Staphylococcus aureus* M 7/1, various methods such as ion-exchange chromatography on Amberlite, and CM-cellulose, gel filtration on Sephadex G-50, 75, 100 and Sephacryl, and fast protein liquid chromatography (FPLC) were applied and compared in terms of purity and speed. Although ion-exchange chromatography on Amberlite resin was good enough to remove other materials in culture medium from enterotoxin, and convenient, and fast method, the purity of this method was less than 70%. However, carboxymethyl ion-exchange column showed to be better purity than that of Amberlite method. The yields of these two methods were about 70% and 75%, respectively. When gel filtration methods on Sephadex G-50, 75, 100 and Sephacryl were applied, the purity was about 90%. Fast protein liquid chromatography was found to be the most efficient method in terms of purity (97%) and speed. The combined method, gel filtration after CM-cellulose column (stepwise elution) treatment can be also used as a efficient method particularly for the purification of large volume of sample.

Key words: enterotoxin A, purification, CM-cellulose, Sephacryl, fast protein liquid chromatography

서 론

*Staphylococcus aureus*에 의해 생성되는 toxin의 type 중 enterotoxin A는 가장 독성이 강하며 사람에게 식중독을 야기하는 가장 중요한 toxin이다^(1,2). *Staphylococcus aureus*의 대사물질인 이 toxin은 세포의 표면에 형성되어 배지속으로 분비되며 endotoxin과는 화학적 및 생물학적 특성이 다르다^(3,4). 또한 *St. aureus*는 내염성이 강할 뿐만 아니라 낮은 수분활성도에서도 증식이 가능하며 염지식품이나 반건조식품 등과 같이 수분활성도가 낮은 식품뿐만 아니라 육·유가공품 등 거의 모든 식품에서 식중독을 일으킬 수 있는 원인균이다⁽⁵⁾.

Enterotoxin A를 분리하는 방법은 1960년대 초부터

연구가 시작되었다. 초기에는 유기용매에 의한 침전과 이온교환수지를 이용하는 방법이 사용되었으나 정제도가 낮았으며, 60~70년대 주로 이용돼 이온교환수지와 Sephadex를 이용한 gel filtration법 역시 정제도가 좋지 못하였다^(6,7).

최근들어 다양한 gel column을 사용하는 방법이 많이 연구되었지만 column 사용시 많은 시간이 필요하며 장시간 toxin의 분리시 독성의 약화와 단백질의 변성을 초래할 수 있다는 것이 문제되고 있다. 순수한 enterotoxin의 빠른 분리·정제는 toxin의 화학적 및 물리학적 특성에 관한 연구가 항체 생산시 매우 필요한 과정이다⁽⁹⁾.

따라서 본 연구에서는 가장 신속하고 정제도가 좋은 분리방법을 모색하고 gel filtration, 이온교환수지 그리고 FPLC 등을 이용하여 toxin을 분리함에 있어 각 방법을 비교 분석하였다.

Corresponding author: Heun-Kil Shin, Department of Animal product Science, Kon-kuk University, Mojin-dong, Seongdong-gu, Seoul 133-701

재료 및 방법

균주 및 toxin 생산

본 실험에 사용된 enterotoxin A 생산을 위한 균주는 독일연방정부 육연구소로부터 공급받은 *Staphylococcus aureus* M 7/1을 사용하였으며 toxin 생산을 위한 방법으로는 Shin 등⁽¹⁰⁾의 방법을 이용하였다. 배지의 종류는 다음과 같다.

- 3% NZ-Amine NAK(Sheffield Co., U.S.A.)
- 3% Protein hydrolysate powder(Sigma, U.S.A)
- 0.001% Thiamine(Sigma, U.S.A)
- 0.001% Nicotinic acid(Sigma, U.S.A.)

Toxin의 분리를 위한 전처리 과정

Reiser⁽⁹⁾의 방법에 따라 배양액에서 세포를 원심분리(20,000g/10min)에 의하여 제거하고 상등액을 취하여, 증류수에 대해 4°C에서 24시간 부식(부식막, Mw 12,000, Union Carbide, U.S.A., width 13cm)하고 다시 원심분리(12,000g/15min)에 의해 부유물을 제거하였다.

이 액을 Polyethylene glycol(Mw 20,000, Sigma, U.S.A.)로서 4°C에서 농축하였으며, 이 농축물을 다시 20,000g로 원심분리함으로써 침전물을 제거한 다음, Amberlite CG-50, IRC-50 (Sigma, U.S.A.)과 CM-cellulose (Sigma, U.S.A.), Sephadex G-50, 75, 100 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), Sephacryl S-300 (Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Sweden), 그리고 FPLC(fast protein liquid chromatography) 등에 의하여 분리하였다.

Amberlite CG-50과 IRC-50

농축액에 equilibration buffer(0.05M phosphate buffer, pH 6.4)를 2배로 희석하고 H₃PO₄로서 pH를 6.4로 조정한 후 사용전 IM HCl, 증류수, IM NaOH로 활성화시킨 Amberlite 수지와 혼합, 1시간 교반하여 column(2.5×60cm)에 충전하였다.

Column 내의 배지성분을 제거하기 위하여 증류수로써 흡광도가 0으로 떨어질 때까지 씻어준 후 0.5M phosphate buffered saline(pH 6.8)으로 용출하였다. 용출속도는 3ml/min로, tube 당 10ml씩 fraction collector (Model KMC-2000, Korea)를 모아 U.V.-spectrophotometer(Spectronic-21, Bausch &

Lomb, Germany)를 사용하여 280m μ 에서 흡광도를 측정하였다.

Carboxy-methyl(CM) cellulose

Amberlite에 의한 1차 분리물과 분리를 거치지 않은 농축물에 대하여 CM-column을 사용하였다. 각 물질들은 50ml로 투석·농축하여 H₃PO₄로서 pH 5.7로 조정하고 IM NaOH, 증류수, IM HCl로 활성화시키고 0.01M phosphate buffer(pH 5.7)로 평형화시킨 수지를 충전한 column(2.2×40cm)에 주입하였다.

농축액들은 수지에 잠기게 하여 1시간 방치후 stepwise(0.01M-0.2M phosphate buffer)법과 0.2M phosphate buffer로 용출하였다. 용출속도는 3ml/min로, tube 당 각각 7ml, 5ml씩 fraction collector로 수집하여 280m μ 에서 흡광도를 측정하였다.

Sephadex G-50, 75, 100과 Sephacryl S-300을 사용한 gel filtration

Sephadex G-100을 용출액(0.01M phosphate buffer, pH 7.4)에 넣고 72시간 수화하여 column(2.2×100cm)에 충전하였으며 원심분리 상등액 및 Amberlite 수지, CM-cellulose 수지등을 거친 시료에 대해 분리도와 정제도를 조사하였다.

Fast protein liquid chromatography

이온교환수지와 gel filtration을 거친 시료의 분리도와 정제도를 조사하기 위하여 실시하였다.

Column은 Glas Pac, 300 SW(gel column, 2×30cm, LKB, Sweden)이며 용출액으로는 0.1M phosphate buffered saline(pH 7.0)을 사용하였다.

Immunodiffusion test

정제도와 toxin의 존재여부를 확인하기 위하여 single radial immunodiffusion (SRID)을 실시하였으며, 정제도는 SRID로 측정된 toxin의 양을 흡광도에 대한 백분율로 표시하였다^(3,6-8). 항체의 생산은 Robbins 등⁽¹¹⁾의 방법에 따라 실시하였다.

결과 및 고찰

Amberlite 수지에 의한 분리·정제

Fig. 1과 같이 *Staphylococcus aureus* 배양액에서 세포를 제거하고 얻은 상등액을 Amberlite CG-50, IRC

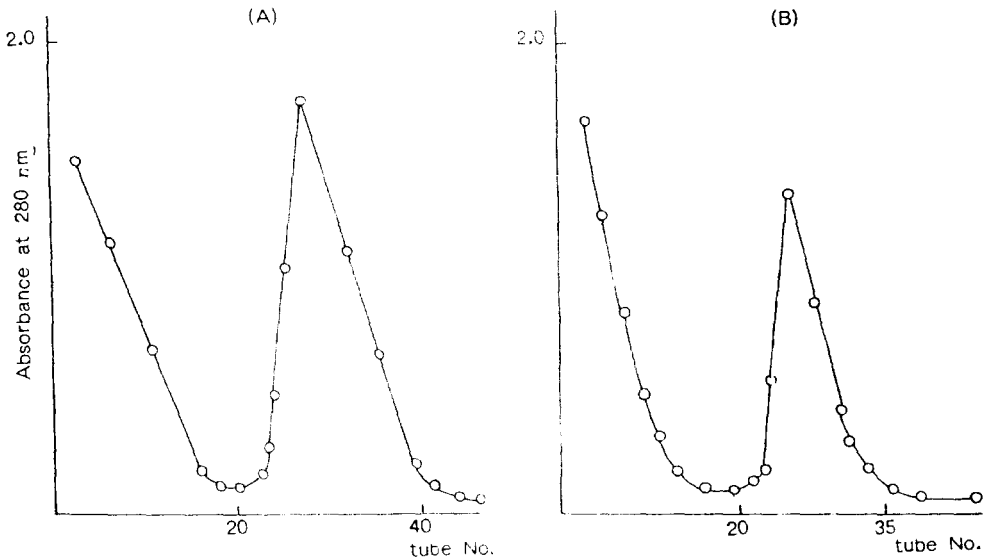


Fig. 1. Elution patterns of enterotoxin A by Amberlite CG-50 (A) and IRC-50(B).

-50 column에 의해 실험한 결과 1개의 분획이 나타났다. 이 분획은 SRID 결과 약 70%가 toxin인 분획으로 확인되었다. Amberlite IRC-50의 경우 CG-50과 거의 분획양상이 비슷하였으나 CG-50보다는 toxin의 양이 적게 분리되었다. 따라서 Amberlite 수지는 배지에서 toxin을 제거하는 데에는 간편하고 좋은 수지이나 정제도가 낮은 단점을 가지고 있다.

CM-cellulose에 의한 분리·정제

Fig. 2의 A는 Amberlite CG-50에 의한 1차 분리물을 CM-cellulose로, B는 한번도 분리를 거치지 않은 원심분리 상등액을 CM-cellulose로 처리한 결과이며 C는 stepwise 법으로 용출한 결과다.

원심분리 상등액을 CM-cellulose column에만 통과시킨 것은 Amberlite column의 경우와 같이 1개의 분획을 나타냈는데, Amberlite 경우 보다는 정제도에서 좋았고, Amberlite로서 1차 분리한 분리물을 CM-cellulose column에 통과시킨 것은 한개의 분획을 나타냈는데 toxin의 손실이 심하였다.

Fig. 2의 C는 stepwise 법으로 용출했을 때의 원심분리 상등액의 분획양상을 보여주고 있다. 이 결과 4개의 분획이 나타났으며 그중 2번째의 분획이 immunodiffusion 결과 toxin으로 확인되었다.

Toxin 분획 다음에 나타난 두개의 작은 분획은 고농도

의 용출액에서만 나타나는 분획으로 고농도로 용출시 toxin과 함께 항상 나타나게 됨으로 적당한 농도로서의 용출이 요구된다(2,3,4,7,8).

CM-cellulose 수지는 Amberlite CG-50, IRC-50에 비해 정제도는 우수하나 toxin 양의 손실이 심하였고, 또한 많은 용출시간이 요구되었다.

Gel filtration에 의한 분리·정제

Fig. 3은 Sephadex G-100을 사용하여 각 분리물간에 분획양상을 나타낸 것으로 A는 투석·원심분리를 거친 상등액을 직접 gel filtration 한 결과인데 6개의 크고 작은 분획을 나타내었다. 첫번째 분획은 배지성분이 대부분이고, 네번째 분획이 single immunodiffusion 결과 toxin으로 확인되었으며 그 외의 분획은 확인되지 않았다. Amberlite CG-50으로서 분리한 1차 분리물은 gel filtration 한 결과(B) 4개의 분획으로 줄어 들었는데 세번째 분획이 toxin으로 확인되었다. Amberlite에 의해 1차로 분리된 분리물은 배지와 toxin 분획 사이의 분획들이 줄어 들었다는 것을 알 수 있으며 toxin 뒤쪽의 분획에는 거의 영향을 미치지 못하는 것으로 나타났다.

0.2M phosphate buffer를 CM-cellulose column으로 용출했을 때에는 3개의 분획이 나타났는데(C), 먼저 Amberlite CG-50 column에 의해 분리하고 2차 CM-cellulose 수지에 의해 분리한 분리물은 3개의 분획을

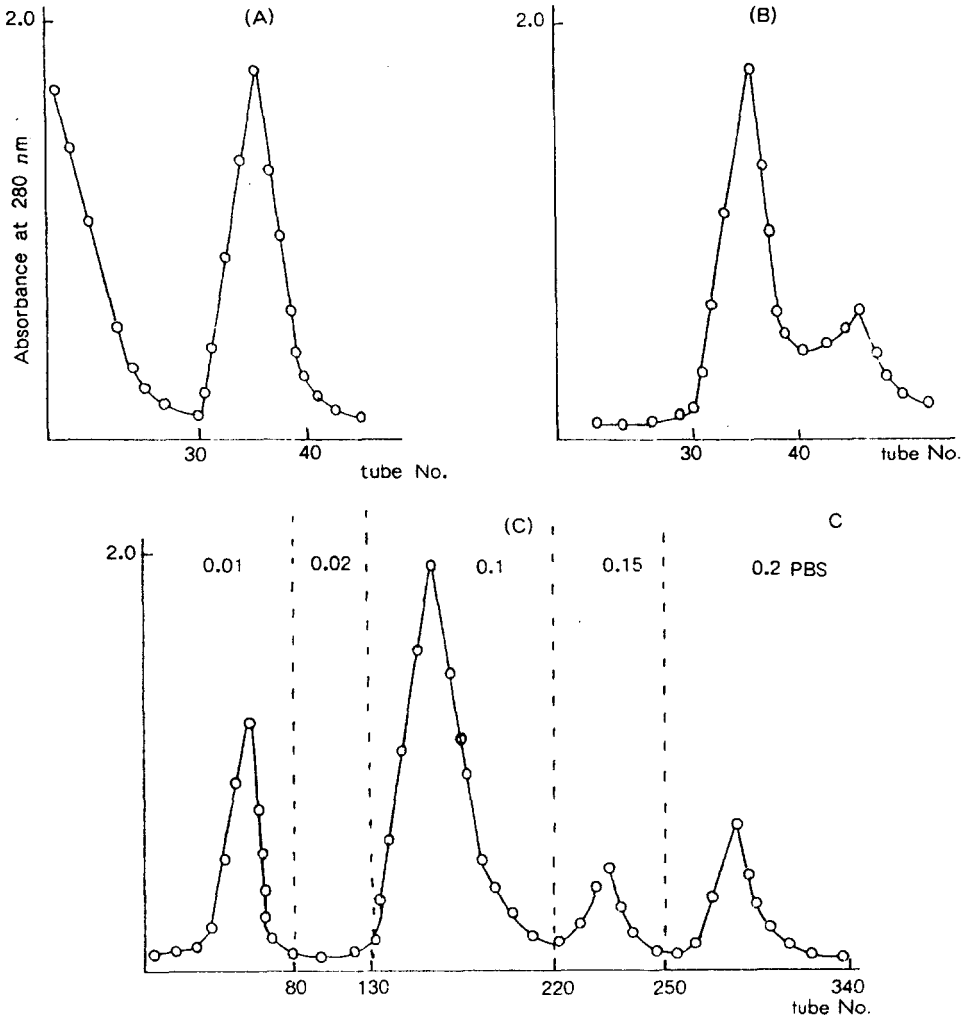


Fig. 2. CM-cellulose column chromatography of enterotoxin A from fractions of supernatant after centrifugation and eluted by phosphate buffer (A) and stepwise (C), and fractions after Amberlite column and eluted by phosphate buffer (B).

나타냈으며 toxin 분획을 제외하고는 나머지 분획이 많이 줄어 들었다. 또한, CM-cellulose 수지 (stepwise 용출법)로 1차 분리한 분리물은 2개의 분획만을 나타냈으며 (C), Amberlite CG-50 수지와 CM-cellulose (stepwise 용출법)로서 분리하고 sephadex G-100으로 처리한 G와 0.2M phosphate buffer와 stepwise법으로 용출시킨 CM-cellulose column 용출물을 sephadex G-100으로 처리한 F는 하나의 분획을 보여 주었다.

이들 결과로 미루어 볼 때 Amberlite CG-50, IRC-50 수지는 toxin 분획을 중심으로 앞의 분획을 주로 제

거하고 CM-cellulose 수지의 경우는 주로 뒤쪽의 분획을 제거하는 것으로 나타났는데 CM-cellulose 수지를 stepwise법으로 용출할 때에는 앞·뒤쪽의 분획들이 모두 많이 제거된다는 것을 알 수 있다.

Fig. 3중 A, B, D의 처음 분획은 배지성분인데 toxin을 분리하는 처음 과정으로 CM-cellulose (stepwise 용출법) column을 사용하지 않고서는 배지성분과 toxin을 완전히 분리하기는 힘든 것으로 생각된다. 그러나 stepwise 용출법은 한번으로도 정제도가 뛰어난 toxin을 얻을 수 있으며 다만 분리할 수 있는 toxin의

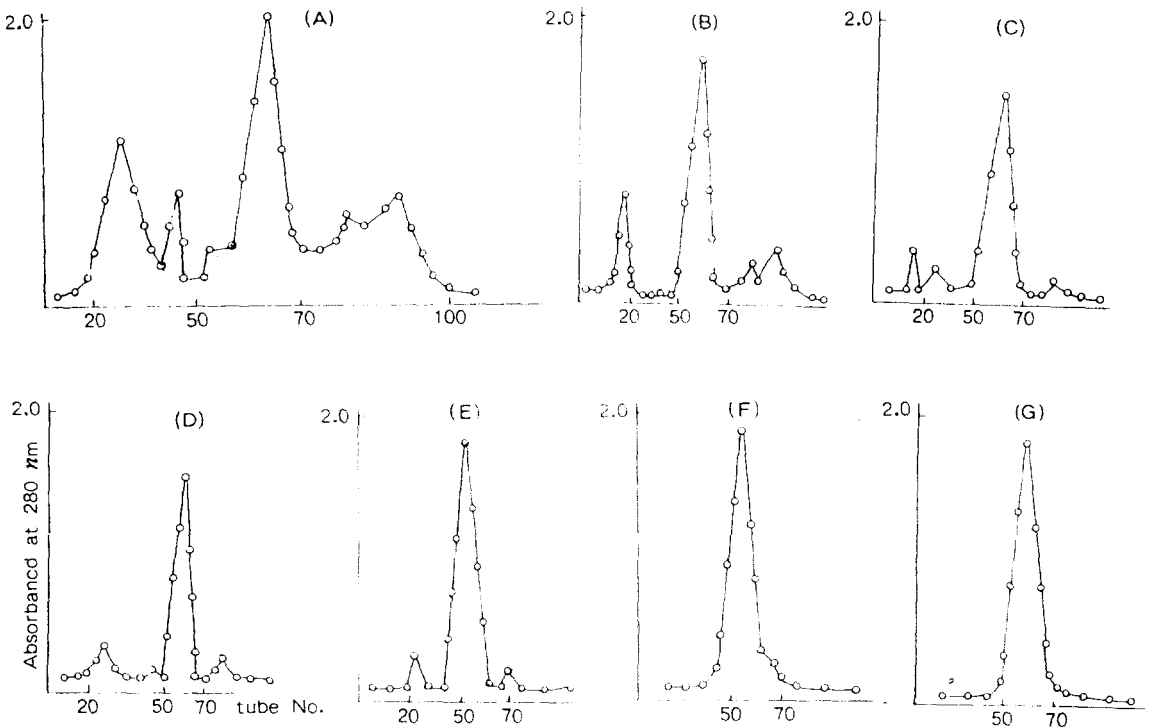


Fig. 3. Gel filtration of enterotoxin A on Sephadex G-100 fractions treated by various methods.

A. Supernatant from medium

B. Amberlite column chromatography

C. CM-column chromatography eluted by 0.2M phosphate buffer

D. Amberlite and CM-column chromatography

E. CM-column chromatography by stepwise elution

F. CM-column chromatography both PB and stepwise elution

G. Amberlite and CM-column chromatography with stepwise elution

양이 줄어드는 단점이 있다.

Sephadex G-50, 75의 결과도 G-100과 거의 유사하였으나 Sephacryl S-300의 경우는 Sephadex G-50, 75, 100보다는 정제도에 있어서 뛰어나다.

Amberlite 나 CM-cellulose 수지로 한번만 분리한 후 gel filtration을 실시하면 90% 이상의 정제도를 가진 toxin을 분리할 수 있지만 그 중 1차 Amberlite CG-50, IRC-50에 의한 분리물은 gel filtration 사용 후에도 정제도는 나쁘다.

FPLC에 의한 분리·정제

위 실험결과의 분리도와 정제도를 조사하기 위하여 실시한 실험결과는 Fig. 4에 나타내었다.

배지를 원심분리하여 상등액을 주입한 결과 13분대에 나타나야 하는 toxin 분획을 제외하고도 sephadex 나

sephacryl로도 분리할 수 없었던 분획들이 나타났고 Amberlite 나 CM-cellulose 수지를 사용한 분리물도 같은 경향을 보였으나 toxin 분획 이외의 분획은 현저히 줄어들었다. 그러나 한번이라도 분리를 거친 분리물들은 toxin 분획을 명확하게 볼 수 있었다.

CM-cellulose 수지를 사용한 분리물들은 Sephadex G-100에 의한 gel filtration의 결과와 같이 toxin 분획을 중심으로 주로 위의 분획이 제거되었고 Amberlite 수지를 사용했을 때에는 앞의 분획이 제거된다는 것을 더욱 명확히 알 수 있었다.

하나의 분획을 나타내었던 gel filtration 분리물에도 2~3개의 분획을 가지고 있었다.

Fig. 5은 FPLC에서 분리된 각 분획을 immunodiffusion test 한 결과로서 13분대의 분획이 toxin임을 확인하였다.

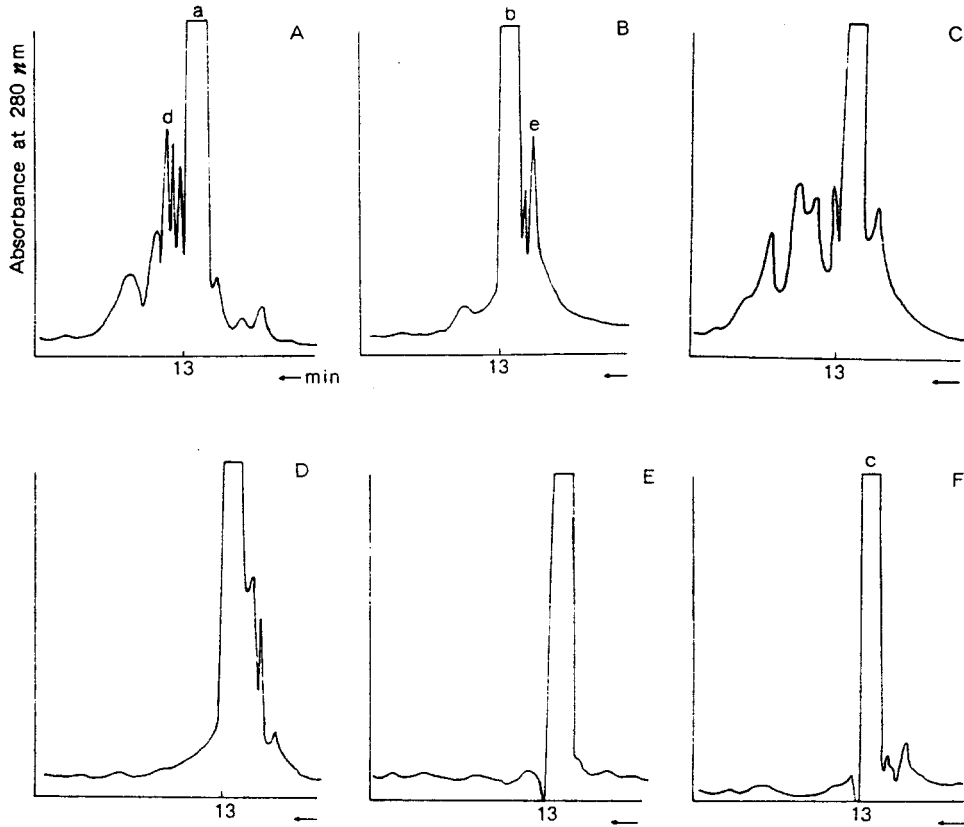


Fig. 4. FPLC of enterotoxin A from fractions after Amberlite column (A); CM-column chromatography by PB elution (B) and stepwise elution (C); after gel filtration on Sephadex G-100 (D) and Sephacryl (F); and standard (E) as a reference. Flow rate 1ml/1min and injection volume was 5-0 μ l.

분리능력에 있어서 FPLC는 시료 주입량이 적어 많은 양을 분리하고자 할 때 고가의 column을 사용해야 하는 단점이 있으나 소량으로 단시간내에 가장 분리도를 높게 정제할 수 있는 장점이 있어 이 방법의 폭넓은 이용이 기대된다.

요 약

본 실험은 *Staphylococcus aureus*로부터 생성되는 enterotoxin A의 분리를 위하여 각종 분리방법을 조사하였고 그 특성들을 상호 비교하였던 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

Amberlite 수지는 배지로부터 처음 toxin을 분리하는 데에는 간편한 수지이나 정제도에 있어서는 약 70%

수준으로 다른 방법들에 비해 낮은 편이었다. CM-cellulose 수지는 0.2M phosphate buffer로 용출했을 때 75% 정도의 정제도를 가진 toxin을 분리할 수 있었으나 stepwise법으로 용출했을 때에는 80% 이상으로 정제도를 높일 수 있었고 Amberlite 수지와 함께 사용했을 때에는 90% 정도의 toxin을 얻을 수 있었다. Amberlite나 CM-cellulose 수지로 정제한 후 gel filtration을 실시하면 정제도를 더 높일 수 있었다. FPLC는 분리도와 정제도에서 가장 우수하였으며 FPLC의 결과에 따라 Amberlite 수지는 toxin분획을 중심으로 앞의 분획을 그리고 CM-cellulose 수지는 뒤의 분획을 주로 제거하는 특징을 가진다. 따라서 위의 column중 하나만 사용한 후 FPLC를 사용하면 95% 이상의 toxin을 분리하는 것이 가능하였다.

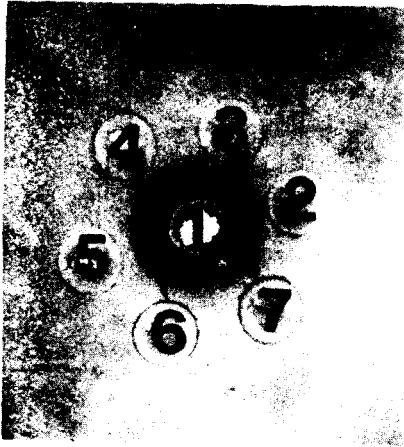


Fig. 5. Immunodiffusion analysis of various fraction of enterotoxin A from fast protein liquid chromatography.

- 1: Rabbit anti-staphylococcal enterotoxin A
- 2: Standard of staphylococcal enterotoxin A
- 3: Fraction a of FPLC after Amberlite column
- 4: Fraction b of FPLC after CM-column chromatography by phosphate buffer elution
- 5: Fraction c of FPLC after gel filtration on sephacryl
- 6: Fraction d of FPLC after Amberlite column
- 7: Fraction e of FPLC after CM-column chromatography by phosphate buffer elution

감사의 말

본 연구는 *Staphylococcal enterotoxin*의 분리 정제 및 그 정량을 위한 면역분석법 개발과 그 이용에 관한 연구의 제1보로 1987년 한국과학재단 연구비로 수행된 것이다. 저자들은 연구비를 지원해준 한국과학재단에 심심한 사의를 표하는 바이다.

문헌

1. Bergdoll, M.S., Huang, I-Y and Schantz, E.J.

Chemistry of enterotoxins. *J. Agr. Food Chem.*, **22**, 9(1974)

2. Chu, F.S. and Bergdoll, M.S. : Purification and Characterization of SEA. *Biochem.*, **5**, 3281(1966)
3. Genigeorgis, C., Martin, S. and Riemann, H. : Initiation of Staphylococcal growth in laboratory media. *Applied Microbiol.*, **29**, 934(1971)
4. Borja, C.R. and Bergdoll, M.S. : Some physical, immunological, and toxin properties. *Biochem.*, **7**, 75(1969)
5. Riemann, H., Lee, W.H. and Genigeorgis, C. : Control of Staphylococci and Clostridium in food. *J. Milk Food Technol.*, **35**, 514(1972)
6. Bergdoll, M.S., Sugiyama, H., and Deck, G.M. : Purification of Staphylococcal enterotoxin A. *Arch. Biochem. Biochem. Biophys.*, **85**, 62(1959)
7. Schantz, E.J., Roessler, W.G. and Spero, L. : Purification and some chemical and physical properties of SEA. *Biochem.*, **22**, 3907(1983)
8. Reiser, R.F., Robbins, R.N., Khoe, C.F. and Bergdoll, M.S. : Purification and some physicochemical properties of toxic shock toxin. *Biochem.*, **11**, 360(1972)
9. Robern, H., Stanislava Stavric and Nester Dickie : The application of AE-sephadex for the purification of two Staphylococcal enterotoxins. 1. Purification of enterotoxin C₂. *Biochimica et Biophysica Acta*, **393**, 134(1975)
10. 신현길·이정희·서선우 : Staphylococcal enterotoxins의 생성조건. 건국대학교 축산과학연구소 논문집, 제 12집. (1987)
11. Robbins, R.N. and Bergdoll, M.S. : Production of rabbit antisera to the staphylococcal enterotoxins. *J Food Prot.*, **47**, 172(1984)

(1988년 5월 20일 접수)