

## 대장균의 내열성장독소생산에 관여하는 조건

### Conditions for Heat-stable Enterotoxin Production by Enterotoxigenic *Escherichia coli*

서울대학교 의과대학 미생물학교실

양남웅 · 김익상 · 장우현 · 이승훈

#### 서 론

소아설사와 여행자설사의 주요 원인균인 장독성 대장균은 내열성 장독소 또는 이열성 장독소를 생산하여 설사질환을 일으키는 것으로 알려져 있다(Sack, 1975; Gurwith등, 1977; Sack 등, 1975).

이열성 장독소(heat-labile toxin; LT)는 분자량이 11,000 정도의 단백질로서 콜레라독소와 항원구조가 유사하며(Gilligan등, 1983) 장내표피세포의 adenylyl cyclase를 활성화시켜 설사를 유발시키는 것으로 밝혀져 있으며(Evans등, 1972; Guerrant등, 1973) 내열성 장독소(heat-stable toxin; ST)는 보고자에 따라 분자량이 1,000에서 10,000까지 달리 보고되고 있으나(Kapitany등, 1979; Bywater, 1971) 대체로 메탄올용해성인 ST I 과 메탄올 비용해성인 ST II 의 2종류가 있는 것으로 밝혀져 있으며(Burgess등, 1978; Greenberg등, 1983) guanylate cyclase를 활성화시켜 설사를 유발시키는 것으로 알려져 있다.(Guerrant등, 1980; Field등, 1978) 장독성 대장균은 이열성 장독소 또는 내열성 장독소를 생산하는 성질만이 다른 대장균과 다를 뿐, 생화학적 성상이나 혈청형 등으로는 다른 비병원성 대장균과 구별되지 않아 장독성 대장균에 의한 설사질환의 진단은 이제까지 생물학적인 방법에만 의존하고 있는 실정이다(Aimoto등, 1982; Gianella등, 1976).

그러나 생물학적 독소 측정방법은 노력과 시간이 많이 요구되는 방법으로 임상검사방법으로는 부적당하여 이에 대한 대책이 시급히 요구되고 있다.

따라서 저자들은 보다 단순하면서도 많은 내열성 장독소를 생산할 수 있는 배양조건을 설정하여 내열성 장

독소의 순수정제를 용이하게 함으로써 내열성 장독소에 대한 특이 항체생산을 돕고자 이제까지 내열성 장독소 생산을 위해 고안된 Casamino-acid Yeast Extract Salt-2 Broth(Evans등, 1974) 및 장내세균 배양에 사용되는 합성배지(Neidhardt등, 1974)에서 배양조건과 배지성분의 조합을 달리하면서 내열성 장독소 생산량을 측정, 비교하여 내열성 장독소 생산에 알맞는 조건을 결정하여 보고한다.

#### 실험재료 및 방법

##### 1. 균 주

WHO collaborating center for phage Typing & Resistance of Enterobacteria, Division of Enteric Pathogens, Central Public Health Laboratory, London 에서 분양받은 *E. coli* 0148H28 (ST<sup>+</sup>LT<sup>+</sup>)를 내열성 장독소 생산균주로, *E. coli* 015H11 (ST<sup>-</sup>LT<sup>+</sup>)를 대조 균주로 각각 사용하였다.

##### 2. 배지제작 및 배양조건

Casamino-acid Yeast Extract Salt Broth-2(CYES-2) 배지는 Evans등 (1974)의 방법에 따라 제작하였으며 단순배지로 사용된 M9배지는 Neidhardt등, (1974)의 방법에 따라 각 성분의 저장액을 제작하고 사용전에 이들을 배합하여 5N NaOH용액으로 pH를 조정한 후, 기저배지로 사용하였다. 탄소 및 에너지원으로 배지에 첨가하는 glucosamine 및 각종 당류는 20%(wt/vol)의 저장액을 제작하여 여과 멸균한 후 (Millipore, 0.45  $\mu$ m), 4°C에 보관하면서 필요시에 꺼내어 사용하였다. 배양액에 접종하는 균주는 Nutrient Agar Slant배지에 배양하여 실온에서 보관하면서 필요시에 CYES-2배지 또는 M9배지에 3차 계대배양하여 대수기에 있는 균액을 취하여 배지 40ml당 0.1ml씩 접종하였다.

배양은 250ml 플라스크에 배지 40ml씩 넣고 균을 점

\* 접수일자 : 1984. 4. 16.

\* 이 연구는 1983년도 문교부학술연구조성비에 의해 이루어졌음.

종한 후 37°C에서 New Brunswick rotatory shaker를 사용하여 24시간 진탕배양하였다(120rpm).

3. 내열성장독소량의 측정

Gianella 등 (1976)의 방법에 따라 Infant Mouse Assay법을 사용하였다. 요약하면, 각 배양액을 5,680 × g로 30분 원침하여 얻은 배양상청액을 생리식염수로 알맞게 2배 계단희석한 다음, 생후 만 3일된 젓먹이생쥐(ICR) 3마리에 25μl씩 경구투여하고 25°C에서 4시간 방치한 후, chloroform으로 희생시키고 해부하여 3마리의 장관부위의 합과 몸체부위의 합과의 비(gut/body ratio, G/B ratio)를 구하였다. 이때 경구투여한 배양상청액에는 배양상청액 1ml당 2% Evans Blue 용액 25μl를 섞어 투여함으로써 육안으로 배양상청액이 위내로 들어간 것을 확인하였다. 매 실험마다 이열성 장독소는 생산하나 내열성 장독소는 생산하지 않는 *E. coli* 015H11 strain을 동일 조건하에서 배양하여 대조군으로 삼았다. 저자들의 경우, 대조군주의 희석하지 않은 배양상청액 25μl를 먹인 총 22개의 대조군들의 G/B ratio 평균치가 0.0538±0.0018로서 모두가 0.06을 초과하지 않았으며 이 결과는 장등(1983)의 결과와 동일하였으므로 양성반응의 기준을 장등(1983)과 같이 G/B ratio 0.070이상으로 정하였다. 배지 1ml당 내열성 장독소량은, 25μl를 먹여 G/B ratio 0.07이상을 유발시키는 배양상청액 최소량을 1단위로 정하고 검사한 배양상청액의 최대희석배수에 40을 곱하여 배지 1ml당 내열성 장독소량을 결정하였다.

4. 장독성 대장균 증식측정

분광광도계(Spectronic 20)로 Optical Density(O.D)를 측정하여(590nm) 대장균증식을 관찰하였다.

성 적

1. CYES-2배지의 배양초기 pH가 균증식과 내열성 장독소생산에 미치는 영향

*E. coli* 0148H28(LT+, ST+) 균주를 pH가 7.0, 7.5, 8.0, 8.5 및 9.0으로 각각 조정된 CYES-2배지에 접종하고 24시간 진탕배양한 후, 각각의 pH, O.D 및 내열성 장독소량을 측정하였다(표 1).

배양초기의 pH가 7.0에 가까울수록 세균의 증식은 많았으나 내열성 장독소의 생산량은 pH 8.5 및 9.0으로 조정된 배지에서 1,280μ/ml로 가장 많았다. 또한 양초 O.D. 1당 내열성 장독소생산량(단위생산량)도 배 세균기의 pH가 8.5일 때 가장 많았다.

2. CYES-2배지에서의 균증식과 내열성장독소생산  
CYES-2배지에서 균증식과 내열성 장독소생산을 시간

Table 1. Effect of initial pH on growth and heat-stable toxin (ST) production in CYES-2 medium

Initial pH	O.D. at 24hr	pH at 24hr	ST (U/ml)*	ST (U/OD)
7.0	8.5	8.8	640	75.3
7.5	7.5	8.6	640	85.3
8.0	7.0	8.7	640	91.4
8.5	6.0	8.8	1,280	213.3
9.0	6.2	8.8	1,280	206.5

\*1 unit: minimal amount of heat-stable toxin that gives Gut/Body ratio more than 0.070.

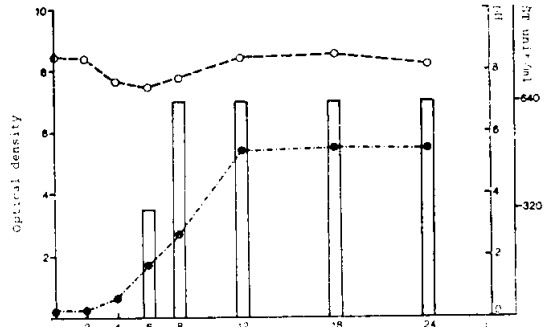


Fig. 1. Growth and ST production in CYES-2 medium. ●—●: optical density of culture fluid, ○—○: pH of culture fluid, □: heat-stable enterotoxin unit.

별로 관찰한 결과 그림 1과 같은 성적을 얻었다. 균증식은 배양 2시간 후부터 시작하여 배양 12시간 후에는 휴지기에 들어감을 알 수 있었으며 내열성 장독소의 생산은 배양 4시간 이후부터 시작되어 배양 8시간에 최대량을 보여주었다. 따라서 내열성 장독소의 생산은 균증식 초기부터 시작되어 균증식이 완료되기 4시간 이전에 이미 끝나는 것을 알 수 있었다(Fig. 1).

3. CYES-2 배지에 첨가된 각종 당이 내열성장독소생산에 미치는 영향

CYES-2배지에 glucose, galactose, fructose, lactose 및 sucrose를 각각 0.5%씩 첨가하고 균을 배양하여 이들 당들이 내열성 장독소생산에 미치는 영향을 관찰한 결과 glucose, fructose, lactose 및 sucrose 등은 내열성 장독소 생산량에 커다란 영향을 주지 않는 것으로 나타났다. galactose를 0.5% 첨가한 경우에는 내열성 장독소의 양이 1,280U/ml로서 대조군보다 다소 높았다(Table 2).

**Table 2.** Effect of sugars on ST production in CYES-2 medium.

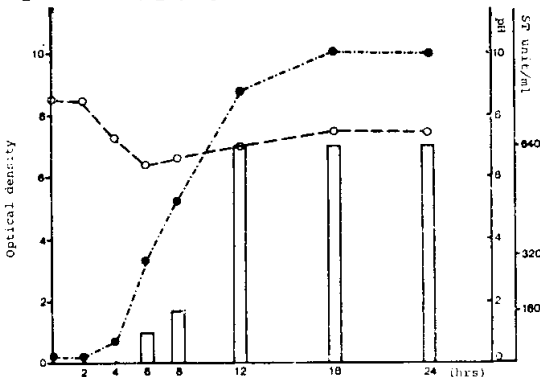
Sugar added	ST(U/ml)
Glucose (0.5%)	640
Galactose (0.5%)	1,280
Fructose (0.5%)	640
Lactose (0.5%)	640
Sucrose (0.5%)	640
Control	640

**4. CYES-2배지에 포도당의 첨가가 균증식과 내열성 장독소 생산에 미치는 영향**

포도당이 내열성 장독소 생산에 미치는 영향에 대해서 Mitchell등(1974)은 증가효과를 준다고 보고한 반면, Alderete등(1977), Johnson등(1978)은 억제효과를 가져온다고 보고하여 상반된 결과를 보이고 있어 이를 검증하기 위하여 CYES-2배지에 glucose를 0%, 0.5%, 1.0% 및 2.0%씩 각각 첨가하고 배양하여 균증식, 내열성 장독소 생산 및 pH변화 등을 관찰하였다(Table 3). glucose를 1.0%, 2.0%첨가한 배지에서는 균발육은 glucose를 첨가하지 않은 경우와 비슷하였으나 내열성 장독소의 생산은 전혀 관찰되지 않았으며 glucose를 0.5%첨가한 경우에는 균발육이 O.D. 9.1로 대조군의 O.D. 5.4보다 월등히 좋았으나 생산된 총 내열성 장독소량에는 커다란 차이가 관찰되지 않았다.

그러나 균 O.D. 1당 단위생산량은 glucose를 첨가하지 않은 경우에 118.5로서 glucose를 0.5%첨가한 경우의 70.3보다 다소 높았다(Table 3).

glucose가 내열성 장독소 생산에 미치는 영향을 더욱



**Fig. 2.** Growth and ST production in CYES-2 medium containing 0.5% glucose.

●-●: Optical Density of culture fluid  
○-○: pH of culture fluid.  
□: ST

**Table 3.** Effect of glucose concentration on ST production in CYES-2 medium.

Glucose concentration	O.D.	pH	ST(U/ml)	ST (U/O.D.)
0%	5.4	8.2	640	118.5
0.5%	9.1	8.1	640	70.3
1.0%	5.7	5.6	N.D.*	—
2.0%	4.9	5.0	N.D.	—

\*N.D.: not detected.

명확하게 하기 위하여 glucose를 0.5% 첨가한 배지에서 시간별로 균증식과 내열성 장독소 생산량을 관찰하였다(Fig. 2).

glucose를 0.5%첨가한 경우, 균증식은 배양 2시간후부터 시작되어 배양 12시간에 휴지기에 들어감을 관찰할 수 있었으며 내열성 장독소생산은 배양 4시간후에 시작되어 배양 12시간에 최대량에 도달함을 알 수 있었다(Fig. 2). 이를 glucose를 첨가하지 않은 배지내에서의 균증식과 내열성 장독소 생산을 시간별로 관찰한 Fig. 1과 비교하여 보면 세균증식의 시작과 휴지기의 시작은 glucose를 0.5%첨가한 경우와 glucose를 첨가하지 않은 경우 서로 비슷한 양상을 보이니 균증식은 glucose를 0.5% 첨가한 경우에 월등히 좋음을 알 수 있었으며 내열성장 독소의 생산은 glucose를 첨가하지 않은 경우, 배양 6시간후에 320U/ml, 배양 8시간후에는 640U/ml로서 이미 최대량에 달해 배양초기에 내열성 장독소 생산이 이루어지는 반면 glucose를 0.5% 첨가한 경우에는 배양시 6간에 80U/ml, 배양 8시간에 160U/ml, 배양 12시간에 640U/ml로서 glucose의 첨가는 내열성 장독소의 생산을 억제하거나 지연시킴을 관찰할 수 있었다.

**5. 합성배지에서 각종 탄소원이 균증식과 내열성 장독소 생산에 미치는 영향.**

합성배지에서 내열성장독소를 생산할 수 있는 조건을 마련하고자 Neidhardt등(1974)이 사용한 M9배지, M63배지, modified Werkman 배지 및 A배지에 각각(Table 4) 식균하고 37°C에서 진탕배양한 결과 M9배지에서 O.D. 1이상의 균증식이 관찰되었다. 따라서 M9배지에 사용한 배지성분중 탄소원을 달리하여 균증식과 내열성 장독소 생산변화를 관찰한 결과, 표 5의 성적을 얻었다. glucose를 0.5% 첨가하여 탄소원 및 에너지원으로 사용한 경우 균증식은 O.D. 3.5로서 매우 좋았으나 내열성 장독소는 검출되지 않았다. 또한 lactose를 0.5% 첨가하여 배양한 경우에도 내열성 장독소는 검출되지 않았으며 galactose를 0.5%첨가하여 배양한 경우에도 내열성 장독소 생산은 40U/ml로 매우 낮았다. 반

**Table 4.** Medium for Enterobacteria\*

Component	Comp. of Medium (mM)			
	M9	M63	Modified Werkman	A
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	22	100	100	33
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>				60
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	42		50	
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		15	15	8
NH <sub>4</sub> Cl	19			
MgSO <sub>4</sub>	1	1	1	1
FeSO <sub>4</sub>		2×10 <sup>-3</sup>		
CaCl <sub>2</sub>	0.09		0.09	
NaCl	9			

\*Cited from "Culture medium for enterobacteria" (Neidhardt: et al, 1974)

**Table 5.** Effect of carbon sources on ST production in M9 medium.

Carbon sources	O.D.	pH	ST (U/ml)	Unit production
Glucose (0.5%)	3.5	6.6	N.D.*	—
Galactose (0.5%)	3.4	6.5	40	11.8
Fructose (0.5%)	3.0	6.8	320	106.7
Lactose (0.5%)	3.5	6.5	N.D.	—
Glycerol (0.5%)	2.0	5.0	320	100.0
Sodium lactate (0.5%)	3.6	8.1	640	177.8
Sodium succinate (0.5%)	1.2	9.5	640	533.3
Glucosamine (0.5%)	3.8	7.2	1,280	336.8

\*N.D.: Not detected.

면에 glucosamine을 탄소원 및 에너지원으로 사용한 경우에는 균증식도 O.D. 3.8로 비교적 좋았으며 내열성 장독소 생산량도 1,280U/ml로 가장 높았다. 또한 sodium succinate를 탄소원 및 에너지원으로 사용한 경우, 균증식을 O.D. 1.2로 낮았으나 내열성 장독소는 640U/ml로 높았으며 단위생산량도 533.3U로 가장 높았다.

**6. M9배지에서 glucosamine의 농도와 각종 이온의 제거가 내열성 장독소 생산에 미치는 영향**

M9배지에서 glucosamine의 농도를 달리하고 각종 이온을 제거하였을 때, 내열성 장독소의 생산량과 균증식을 관찰한 결과 Table 6의 성적을 얻었다. glucosamine의 농도를 0.2%, 0.5%, 1.0%로 달리하여 균증식과 내열성 장독소 생산을 관찰한 결과, glucosamine의 농도가 높아짐에 따라 균증식은 많아지나 내열성 장독소생산은 0.5%일때 1,280U/ml로 최대량에 달하며

**Table 6.** Effect of glycosamine and salts concentration on ST production in M9 medium.

Component added and/or subtracted	O.D	pH	ST (U/ml)	Unit production
0.2% glucosamine 3 CaCl <sub>2</sub> & NH <sub>4</sub> Cl	2.0	8.2	640	320.0
0.5% glucosamine 3 CaCl <sub>2</sub> & NH <sub>4</sub> Cl	3.6	7.7	1,280	355.6
1.0% glucosamine 3 CaCl & NH <sub>4</sub> Cl	5.0	6.5	1,280	256.0
0.5% glucosamine 3 MgSO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4	8.2	N.D.*	—
0.5% glycosamine 3 MgSO <sub>4</sub> (MgCl <sub>2</sub> )	0.3	8.2	N.D.	—
0.5% glucosamine	3.8	7.2	1,280	336.8

\*N.D.: Not detected

glucosamine의 농도를 1.0%로 증가시킨 경우에도 내열성 장독소 생산이 증가되지 않음을 알 수 있었다.

CaCl<sub>2</sub>와 NH<sub>4</sub>Cl을 제거한 경우에 내열성 장독소 생산에는 커다란 변화가 없었으나 MgSO<sub>4</sub>를 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 대체하여 Mg<sup>#</sup>을 제거한 경우나 MgSO<sub>4</sub>를 MgCl<sub>2</sub>로 대체하여 SO<sub>4</sub><sup>=</sup>을 제거한 경우에는 균증식과 내열성 장독소 생산이 전혀 이루어지지 않아 Mg<sup>#</sup>과 SO<sub>4</sub><sup>=</sup>은 균증식과 내열성 장독소 생산에 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있었다. 따라서 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 22mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 42mM, MgSO<sub>4</sub> 1mM 및 glucosamine 0.5%로 구성된 배지가 내열성 장독소 생산에 가장 적합한 것으로 판정하고 이를 glucosamine salt배지라고 명명하였다.

**7. glucosamine salt배지에서 배양초기의 pH가 세균의 증식과 내열성 장독소 생산에 미치는 영향**

glucosamine salt배지의 배양초기 pH가 균증식과 내열성 장독소 생산에 미치는 영향을 알아보기 위하여 glucosamine을 0.5%넣은 배지의 pH를 7.0, 7.5, 8.5, 9.0으로 각각 조정하고 식균하여 균증식과 내열성 장독소 생산을 관찰한 결과 Table 7의 성적을 얻었다. 배양초기의 pH가 8.5인 경우 내열성 장독소 생산량은 1,280 U/ml로 가장 많았으며 균증식도 O.D. 5.5로 가장 좋

**Table 7.** Effect of initial pH on ST production in glucosamine salt medium

Initial pH	O.D.	Final pH	ST(U/ml)	ST (U/O.D.)
7.0	4.5	5.3	320	71.1
7.5	4.5	5.4	640	142.2
8.5	5.5	6.6	1,280	232.7
9.0	5.0	6.4	640	128.0

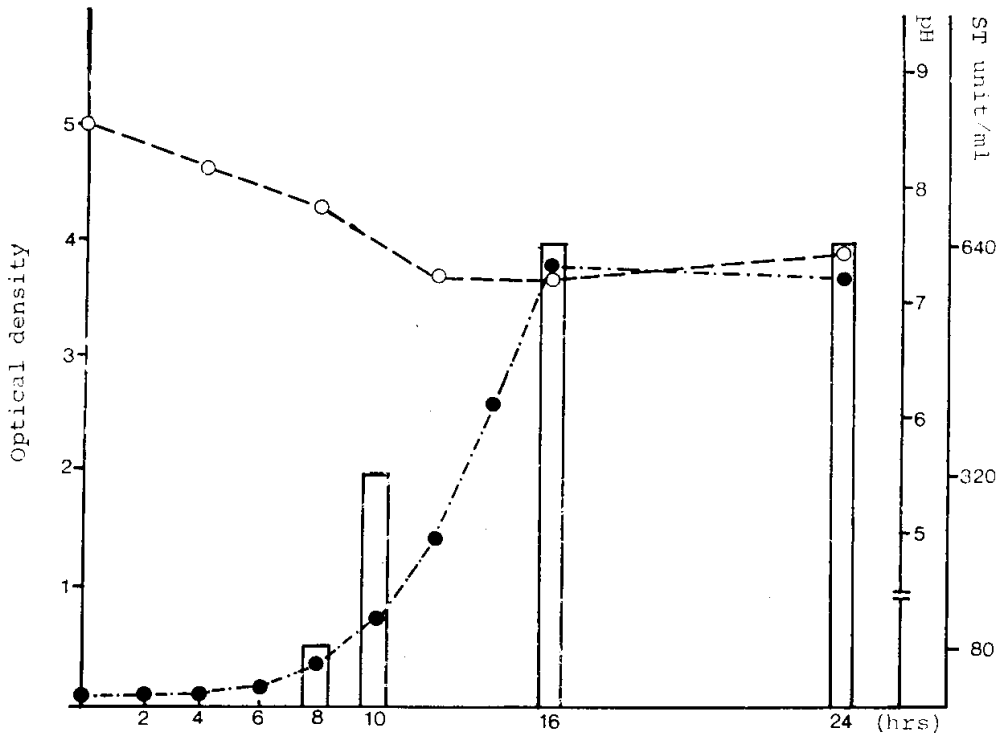


Fig. 3. Growth and ST production in glucosamine salt medium.

●—●: Optical density of culture fluid, ○—○: pH of culture fluid □: ST

았으며 장독소의 단위생산량도 232.7U로서 가장 높았다(Table 7).

### 8. glucosamine salt배지에서의 균증식과 내열성 장독소 생산

glucosamine을 0.5% 넣어 탄소원과 에너지원으로 한 합성배지에서 시간별로 균증식과 내열성 장독소 생산변화를 관찰하여 Fig. 3. 과 같은 성적을 얻었다. glucosamine salt배지에서의 균증식은 배양 6시간 이후에 시작되어 배양 16시간에 휴지기에 들어 갔으며 내열성 장독소 생산은 배양 6시간 이후에 시작되어 배양 16시간에 최대량에 도달하여 glucosamine salt 배지에서는 CYES-2배지에서와는 달리 균증식이 서서히 이루어지며 내열성 장독소 생산도 비교적 늦게 시작되어 균증식이 거의 끝날 무렵인 배양 16시간에 최대량에 도달함을 알 수 있었다. (Fig. 3)

### 고 안

내열성 장독소 정제를 위한 전단계로서 내열성 장독소를 다량 생산하면서도 그 조성이 단순한 배지를 제작하고자 CYES-2 배지에서 배양초기의 pH, 각종 당의

첨가가 내열성 장독소 생산에 미치는 영향, 포도당이 내열성 장독소 생산에 미치는 영향을 관찰하고 이를 기초로 내열성 장독소 생산에 적합한 합성배지를 제작하였으며 합성배지에서 다시 조건을 달리하면서 내열성 장독소 생산에 영향을 미치는 조건들을 관찰하였다. 내열성 장독소 생산에 적합한 배지로  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  42mM,  $\text{MgSO}_4$  1mM,  $\text{NaCl}$  9mM, glucosamine 0.5%로 구성된 glucosamine salts medium을 결정하였으며 이 배지내에서의 내열성장독소생산량은 CYES-2배지와 동일하거나 많았다.

Johnson등(1978)은 배양기간동안 pH를 8.5로 유지하는 것이 내열성 장독소 생산에 중요하다고 보고하고 있다. 저자들의 실험에서도 CYES-2배지에서 배양초기의 pH를 달리하여 내열성 장독소 생산을 관찰한 결과 pH가 7.0에 가까울수록 균증식은 많아지나 내열성 장독소 생산량 및 세균 O.D. 1당 단위생산량은 감소함을 관찰할 수 있어 (Table 1) 내열성 장독소 생산을 위해서는 배양초기의 pH를 8.5로 조정하는 것이 가장 좋다는 Johnson 등(1978)의 결과와 동일한 결론을 얻을 수 있었다.

그러나 합성배지에서의 배양초기의 pH가 내열성 장독소 생산 및 균증식에 미치는 영향을 관찰한 표7의 결

과에서는 내열성 장독소 생산이 배양초기의 pH가 8.5인 경우에 가장 많은 점은 동일하나 균종식은 CYES-2 배지에서와는 달리 배양초기의 pH가 8.5인 경우에 가장 많아 일부 다른 면을 보여 주고 있다(Table 7).

일반적으로 glucose 첨가는 cyclic AMP의존성 operon에 의한 물질생산에 억제효과를 주는 것으로 알려져 있다(Gallo등 1972; Epstein등, 1975). 또한 Alderate등(1977) 및 Johnson등(1978)은 내열성 장독소 생산에도 glucose는 억제효과를 준다고 보고한 바 있다. 이를 검증하기 위하여 CYES-2 배지에 각각 농도를 달리하여 glucose를 첨가하여 내열성 장독소 생산변화를 관찰한 본 실험에서도 glucose를 1.0%이상 첨가한 경우에는 내열성 장독소 생산이 전혀 이루어지지 않았으며 glucose를 0.5%첨가한 경우에는 전체 내열성 장독소 생산량에는 커다란 영향을 주지 않으나 내열성 장독소 생산이 지연되며 단위생산량도 감소한 결과를 보여(Fig. 2, Table 3), glucose는 내열성 장독소 생산에 억제효과를 지닌다는 결론을 얻을 수 있었다. 그러나 glucose가 내열성 장독소 생산을 억제하는 것이 포도당 대사산물에 의한 catabolite control인지, 아니면 포도당대사에 의해 유발되는 pH의 저하가 내열성 장독소 생산을 억제하는지는 Table 2, Fig. 3의 결과로는 확실하지 않았다.

그러나 합성배지에서 cyclic AMP를 유도하는 정도가 서로 다른 glucose, galactose, lactose, fructose, glycerol, sodium lactate, sodium succinate 및 glucosamine을 탄소원 및 에너지원으로 사용하여 내열성 장독소 생산량 변화를 관찰한 Table 5의 결과를 보면 cyclic AMP를 가장 많이 유발시키는 glucosamine을(Epstein 등, 1975) 탄소원으로 사용한 경우, 1,280U/ml의 내열성 장독소가 생산되었으며 cyclic AMP를 많이 유도하는 sodium succinate, sodium lactate, glycerol 경우, (Epstein 등, 1975) 320~640U/ml의 비교적 많은 내열성 장독소가 생산된 반면, cyclic AMP 생산을 억제하는 포도당을 탄소원으로 한 경우에는 내열성 장독소가 전혀 생산되지 않아 포도당이 내열성 장독소 생산을 억제하는 현상은 catabolite control에 의한 것으로 추정된다. 그러나 cyclic AMP를 많이 유도하는 lactose 및 galactose를 탄소원으로 사용한 경우에도 내열성 장독소 생산은 0~40U/ml로 매우 낮아 glucose에 의한 내열성 장독소 생산억제는 cyclic AMP생산억제에만 의존하는 것은 아닌 것으로 사료되며 이에 대한 추가연구가 필요하다고 여겨진다

## 결론

장독성 대장균의 내열성 장독소 생산에 알맞는 합성 배지(glucosamine salts medium)를 제작하고 CYES배지와 glucosamine salts 배지에서 내열성 장독소 생산에 영향을 미치는 조건을 관찰한 결과 아래와 같은 성적을 얻었다.

1. 장독성 대장균의 내열성 장독소 생산에는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  22mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  42mM,  $\text{MgSO}_4$  1mM, NaCl 9mM, glucosamine 0.5%로 구성된 glucosamine salts medium이 가장 적합하였다.
2. 장독성 대장균의 내열성 장독소 생산에는 배양초기의 pH가 중요하였으며 CYES-2 배지 및 glucosamine salts 배지에서 모두 pH8.5가 가장 적합하였다.
3. glucose의 첨가는 내열성 장독소 생산을 억제시키거나 지연시켰으며 억제기전은 catabolite control기전으로 추정되었다.

## —Abstract—

### Conditions for Heat-stable Enterotoxin Production by Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Nam Ung Yang, Ik Sang Kim, Woo-Hyun Chang and Seung Hoon Lee  
Department of Microbiology, College of Medicine, Seoul National University

A new minimal medium for heat-stable soxin(ST) production has been developed. It supports the production of ST of enterotoxigenic *E. coli* equivalent or better than a complex Casamino-acid Yeast Extract medium. The minimal medium consists of basal salts, NaCl,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4$  and glucosamine.

Other seven different carbon sources were examined for their ability to support the synthesis of ST.

No ST activity was observed when glucose or lactose was used as carbon source, but when fructose, or glycerol was used as carbon source, significant amount of ST was produced.

Sodium succinate and sodium lactate support high production of ST though lower than glucosamine. The data suggest that ST synthesis is repressed by

glucose via catabolite control but not entirely by cyclic AMP.

## REFERENCES

- Aimoto, S., T. Takao, Y. Shimonishi, S. Hara, T. Takeda, Y. Takeda, and T. Miwatani: *Amino acid sequence of heat-stable enterotoxin produced by human enterotoxigenic E. coli*. *Eur. J. Biochem.*, **129**:257-263, 1982.
- Alderlete, J.F., and D.C. Rebertson: *Repression of heat-stable enterotoxin synthesis in enterotoxigenic Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **17**:629-633, 1977.
- Burgess, M.N., R.J. Bywater, C.M. Cowley, N.A. Mullan, and P.M. Newsome: *Biological evaluation of methanol-soluble, heat-stable, Escherichia coli enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves*. *Infect. Immun.*, **21**:526-531, 1978.
- Bywater, R.J.: *Dialysis and ultrafiltration of a heat-stable enterotoxin from Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.*, **5**:337-343, 1971.
- 장우현, 김문교, 양남웅, 최명식, 고헌욱, 서정기: 내열성장독소생산 대장균의 환경, 대한미생물학회지, **18**(1):53-58, 1983.
- Epstein, W., L.B. Rothman-Denes, and J. Hesse: *Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate as mediators of catabolite repression in Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **72**:2300-2304, 1975.
- Evans, D.J. Jr., D.G. Evans, and S.L. Gorbach: *Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic Escherichia coli isolated from man*. *Infect. Immun.*, **8**:725-730, 1974.
- Evans, D.J., Jr., L.C. Chen, G.T. Curlin, and D.G. Evans: *Stimulation of adenyl cyclase by Escherichia coli enterotoxin*. *Nature (London) New Biol.*, **236**:137-138, 1972.
- Field, M., L.H. Graf, Jr., W.J. Laird, and P.L. Smith: *Heat-stable enterotoxin of Escherichia coli; In vitro effect on guanylate cyclase activity, cyclic GMP concentration and ion transport in small intestine*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **75**:2800-2804, 1978.
- Gallo, M. and E. Katz: *Regulation of secondary metabolite biosynthesis. Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose*. *J. Bacteriol.*, **109**:659-667, 1972.
- Gianella, R.A.: *Suckling mouse model for detection of heat-stable Escherichia coli enterotoxin: Characteristics of the model*. *Infect. Immun.*, **14**:95-99, 1976.
- Gilligan, P.H., J.C. Brown, and D.C. Rebertson: *Immunological relationships between cholera toxin and Escherichia coli Heat-labile Enterotoxin*. *Infect. Immun.*, **42**:683-691, 1983.
- Greenberg, R.N., J.A., Dunn, R.A. Guerrant: *Reduction of the secretory response to Escherichia coli heat-stable enterotoxin by thiol and disulfide compound*. *Infect. Immun.*, **41**:174-180, 1983.
- Guerrant, R.L., J.M. Hughes, B. Chang, D.C. Robertson, and F. Murad: *Activation of intestinal guanylate cyclase by heat-stable enterotoxin of Escherichia coli: studies of tissue specificity, potential receptors and intermediates*. *J. Infect. Dis.*, **142**:220-228, 1980.
- Guerrant, R.L., U. Ganguly, A.G.T. Casper, E.J. Moore, N.F. Pierce, and C.C.J. Carpenter: *Effect of Escherichia coli on fluid transport across canine small bowel: Mechanism and time-course with enterotoxin and whole bacterial cells*. *J. Clin. Invest.*, **52**:1707-1714, 1973.
- Gurwith, M.J., and T.W. Williams: *Gastroenteritis in children: a two year review in Manitoba 1. Etiology*. *J. Infect. Dis.*, **136**:239-247, 1977.
- Johnson, W.M., H. Lior, and K.G. Johnson: *Heat-Stable enterotoxin from Escherichia coli; factors involved in growth and toxin production*. *Infect. Immun.*, **20**:352-359, 1978.
- Kapitany, R.A., G.W. Forsyth, A. Scott, S.F. McKenzie, and R.W. Worthington: *Isolation and partial characterization of two different heat-stable enterotoxin produced by bovine and porcine strains of Enterotoxigenic Escherichia coli*. *Infect. Immun.*, **26**:173-177, 1979.
- Klipstein, F.A., C.S. Lee, and R.F. Engert: *Assay of Escherichia coli enterotoxins by in vivo perfusion of the rat jejunum*. *Infect. Immun.*, **14**:1004-1010, 1976.
- Mitchell, I. DeG., M.J. Tame and R. Kenworthy: *Conditions for the production of Escherichia coli enterotoxin in a defined medium*. *J. Med. Micro-*

*biol.*, 7:395-491, 1974.

Neidhardt, F.C., P.L. Bloch, and D.F. Smith: *Culture medium for enterobacteria* *J. Bacteriol.*, 119:736-747, 1974.

Sack, R.B.: *Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic E. coli.* *Annu. Rev. Microbiol.*, 29:333-

351, 1975.

Sack, D.A., J.G. Wells, M.H. Merson, R.B. Sack, and G.K. Morris: *Diarrhea associated with heat-stable enterotoxin-producing strains of Escherichia coli.* *Lancet*, ii:239-241, 1975.