

## 대장균의 내열성장독소 생산조절기전

### I. 장독성대장균의 내열성장독소생산에 인산염, 암모니아, 포도당 및

포도당 대사산물이 미치는 영향

서울대학교 의과대학 미생물학교실 및 암연구소

김익상 · 홍태의 · 이우곤 · 장우현

=Abstract=

### Regulation of Heat-Stable Enterotoxin Production in *Escherichia coli*

#### 1. Effects of Phosphate, Ammonia, Glucose, and Glucose Metabolites on the Heat-Stable Toxin Production by Enterotoxigenic *Escherichia coli*

Ik-Sang Kim, Tae-Yee Hong, Woo-Kon Lee and Woo-Hyun Chang

Department of Microbiology and Cancer Research Institute, College of Medicine  
Seoul National University, Seoul, Korea

Phosphate, ammonia, glucosamine, glucose, pyruvate, succinate, fumarate, malate and acetate were examined for their ability to control the heat-stable enterotoxin (ST) production in succinate salts medium or in M9 medium.

The results obtained were summarized as follows.

1. When the initial phosphate concentration was adjusted to 1.0mM, ST production was decreased to 80u/ml or less. But when the initial phosphate concentration was adjusted to 64mM or 100mM, enterotoxin production was 320u/ml.
2. When the initial ammonia concentration in the medium was adjusted to 1.0mM, no ST production and cell growth were observed. But when ammonia concentration was adjusted to 10mM, 19 mM, 38mM or 76mM, enterotoxin production was 320u/ml.
3. Among carbon sources, glucosamine, glucose, pyruvate, succinate, fumarate, malate and acetate, acetate supported the highest specific production (928 unit/O.D.) of heat-stable enterotoxin. From this results, we could assume that heat-stable enterotoxin production is controlled by stringent control mechanism.
4. When the pH of the succinate salts medium was kept between 6.2 to 6.5, no heat-stable enterotoxin production was observed, but when the pH of the medium was kept between pH 6.2 to 6.5, 267 unit/O.D. of heat-stable enterotoxin was produced.
5. Glucose inhibited the heat-stable enterotoxin production and the mechanism was assumed due to its capacity to lower the pH of the medium during catabolism and its high metabolic energy.

### 서론

장독성대장균은 소아설사, 여행자설사 및 신생아  
본 연구는 1984년도 문교부 학술연구 조성비로 이  
루어졌음.

축동물설사의 주요원인균으로 밝혀져 있으며 그 병  
원성은 장독성대장균이 생산하는 이열성장독소 (H-  
eat-Labile enterotoxin: LT) 또는 내열성장독소 (He-  
at-Stable enterotoxin: ST)에 기인하는 것으로 알려  
져 있다<sup>2, 15, 27, 28, 29</sup>.

이중 이열성장독소는 분자량이 11,000정도의 단

백질로서<sup>7,21</sup> 장내표피세포내의 *adenyl cyclase-cyclic AMP* 체계를 활성화시켜 설사를 유발하며<sup>16,17</sup> 높은 면역원성을 지니고 있는 반면에 내열성장독소는 분자량이 1,000-10,000 정도의 물질로서<sup>20</sup> 장내표피 세포내의 *guanylate cyclase-cyclic GMP* 체계를 활성화시켜 설사를 유발하며<sup>16</sup> 면역원성은 매우 낮은 것으로 보고되고 있다<sup>5,28</sup>.

장독성대장균의 내열성장독소생산능은 염색체에 존재하는 유전물질인 *plasmid*에 의해 관장되어지고 있다<sup>5,13,22</sup>.

세균은 주위환경변화에 따라 특정유전인자를 활성화시키거나 억제시킴으로써 그 환경에 불필요한 단백질생산이나 DNA 생산은 억제하고 필요한 단백질이나 DNA 합성은 증가시켜 환경에 적절히 대처할 수 있는 대사조절능력을 가지고 있으며 대사 조절기전에는 *catabolite* 억제기전, *stringent control* 등 *transcription* 단계를 조절하는 기전과 mRNA의 안정성을 변화시켜 *translation*을 억제하는 기전 및 최종대사산물에 의해 또는 중간대사 산물에 의해 특정효소의 활성도가 조절되어 대사를 조절하는 되먹이기 억제기전, *metabolite activation* 등이 있는 것으로 알려져 있다<sup>19</sup>. *Glucose*는 *cyclic AMP* 또는 중간대사산물을 통하여 *β-galactosidase*의 많은 유도성 단백질의 합성을 억제하는 것으로 밝혀져 있으며<sup>25,26,30</sup> 인산염은 *ATP* 생산 및 물질의 *phosphorylation*에 관계하여 세균의 물질대사조절에 중요한 역할을 하는 것으로 알려지고 있다. 또한 암모니아는 세균의 질소동화작용에 작용하여 세균의 물질대사에 영향을 주는 것으로 알려져 있으며<sup>23,24</sup> 탄소원도 *catabolite* 억제기전 또는 *stringent control* 기전에 의해 세균대사조절에 중요한 역할을 한다고 알려져 있다<sup>6,11</sup>.

양등<sup>23</sup> 및 Alderete와 Robertson<sup>24</sup>의 보고에 의하면 내열성장독소생산은 *glucose*에 의해 생산이 억제되며 배양조건에 따라 생산량이 크게 달라짐을 보고한 바 있다. 따라서 저자는 내열성장독소 생산에 영향을 주는 주요 요인들을 밝히고자, 일반적으로 세균의 2차 대사산물의 생산에 커다란 영향을 주는 것으로 알려진 인산염 및 암모니아의 배지내 농도를 변화시키고 탄소 및 에너지원으로서 *glucosamine*, *glucose* 및 *glucose* 중간대사산물을 사용하여 이 요인들이 장독성대장균의 내열성장독소생산에 미치는 영향을 조사, 분석하여 보고한다.

## 재료 및 방법

### 1. 균 주

WHO Collaborating Center for Phage Typing and Resistance of Enterobacteria, Division of Enteric Pathogens, Central Public Health Laboratory, London에서 분양받은 *E. coli* O148H11(LT+ST+)를 내열성장독소생산균주로 사용하였다.

### 2. 배지 및 배양조건

내열성장독소생산을 위한 배지로는 양등<sup>23</sup>이 보고한 *succinate salts* 배지 및 M9배지를 사용하였으며 배지의 조성을 간략하면, *succinate salts* 배지는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 22mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 42mM;  $\text{MgSO}_4$ , 1mM;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 19mM;  $\text{NaCl}$ , 9mM; sodium succinate, 0.5%로 구성되었으며 M9배지는  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 22mM;  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 42mM;  $\text{MgSO}_4$ , 1mM;  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 19mM;  $\text{NaCl}$ , 9mM;  $\text{CaCl}_2$ , 0.09mM 및 *glucose* 0.5%로 구성되었다(Table 1).

배양조기 배지의 pH는 8.5로 조정하였으며 접종균은 Casamino acid Yeast Extract 배지에 18시간 배양한 균을 다시 *succinate salt* 배지에 18시간씩 2회 계대배양한 후, *succinate salts* 배지로 2회 세척하여 사용하였다.

장독성대장균의 배양은 250ml 플라스크에 배지 40ml씩, 또는 2,000ml 플라스크에 배지 500ml을 넣고 세척한 균액을 O.D.(Optical Density, 파장 590nm, Spectronic 20)가 0.02또는 0.2가 되도록 식균한 후 New Brunswick Rotary Shaker를 사용하여 37°C에서 24시간 진탕배양하였다(120rpm). 배양중 세균 배양액의 pH를 일정하게 유지할 필요가 있을 경우에는 5N NaOH용액 또는 5N HCl 용액을 사용하여 pH를 교정하였으며 이때 pH변동범위는 알칼리 상태를 유지코자할 때는 pH 7.9에서 8.5 사이였으며 산상태를 유지코자할 때는 pH 6.2에서 6.5 사이였다.

Table 1. Composition of M9 Medium<sup>a</sup>

Component	Concentration
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	22 mM
$\text{Na}_2\text{HPO}_4$	42 mM
$\text{NH}_4\text{Cl}$	19 mM
$\text{MgSO}_4$	1 mM
$\text{NaCl}$	9 mM
$\text{CaCl}_2$	0.09 mM
(Glucose	0.5%) <sup>b</sup>

<sup>a</sup>Cited from "Culture Medium for Enterobacteria" (Neidhardt et al., 1974).

<sup>b</sup>In succinate salts medium, glucose is substituted for succinate.

### 3. 내열성장독소량의 측정

Gianella<sup>11)</sup>의 방법에 따라 Suckling Mouse Assay 법을 사용하였다. 요약하면 각 배양액을 5,680g 로 30분 원침하여 얻은 배양상청액을 일정비율로 희석하고 이 희석액을 생후 만 3일된 ICR 순계젓먹이 생쥐 3마리에 각각 25 $\mu$ l씩 경구투여하고 25°C에서 4시간 방치한 후 chloroform으로 회생시켜 해부한 다음, 장관을 적출하여 3마리의 장관무게의 합과 몸체무게의 합을 측정하여 장관무게의 합과 몸체무게의 합과의 비율을 구하였다(Gut/Body ratio or G/B ratio). 이때 경구투여한 배양상청액에는 배양상청액 1ml당 2% Evans Blue용액 25 $\mu$ l를 섞어 투여함으로써 육안으로 배양상청액이 위내에 들어간 것을 확인하였다.

내열성장독소생산 판정기준은 장동<sup>12)</sup>과 같이 배양상청액 25 $\mu$ l를 경구투여하여 G/B ratio가 0.070 이상이 되는 경우를 양성으로 정하였으며 배양상청액 1ml당 내열성장독소량은 G/B ratio가 0.070 이상을 유발시키는 최소량의 배양상청액을 1 단위로 정하여 배양상청액의 희석배수에 40(1,000 $\mu$ l/25 $\mu$ l)를 곱하여 산정하였다.

### 4. 장독성대장균증식의 측정

분광광도계(spectronic 20)로 배양액의 O.D. (파장 590nm)를 측정하여 대장균의 증식을 관찰하였다.

### 5. 배양액내의 포도당농도측정

균배양액을 5,680g에서 30분간 냉장원침하여 얻은 배양상청액 10 $\mu$ l를 포도당 측정시약(Trinder®; Gilford Diagnostics) 4ml에 넣고 잘 섞은 후, 25°C에서 18분간 반응시킨 다음 분광광도계(spectronic 20)로 O.D.(파장 505nm)를 측정하여 배양액내의 포도당농도를 산정하였다.

## 성 적

#### 1. 인산염의 농도가 ST생산에 미치는 영향

Succinate salts 배지내의 인산염은 농도를 0.01mM 부터 100mM까지 변화시켜 세균을 배양하여 균 증식, ST생산량 및 pH변화를 관찰하였다.

인산염의 농도가 0.01mM인 경우에는 ST는 물론 균증식도 관찰되지 않았다.

인산염의 농도가 0.1mM인 경우에도 균증식은 O.D.가 0.51로서 인산염의 농도가 64mM인균의 약 50%에 이르렀으나 ST는 생산되지 않았으며 인산염의 농도가 1.0mM인 경우에도 균증식은 배지내 인

산염의 농도가 64mM인균의 약 80%에 이르렀으나 생산된 ST의 양은 80unit/ml로서 64mM인균의 약 25%에 지나지 않았다. 인산염의 농도가 10mM인 경우에는 균증식은 64mM인균과 비슷하였으나 생산된 ST의 양은 64mM인균의 약 50%에 지나지 않았다. 인산염의 농도를 10mM로 높이어 준 경우에는 균증식 및 ST생산이 인산염농도가 64mM인 균과 커다란 차이가 없었다(Table 2). 이 결과에서 인산염의 과다는 ST생산을 억제하지 않았다는 것을 알 수 있었으며 오히려 인산염의 부족은 ST생산을 억제한다는 결론을 얻었다.

#### 2. 암모니아농도가 ST생산에 미치는 영향

Succinate salts 배지에 암모니아농도를 1mM부터 76mM까지 변화시켜 장독성대장균을 배양하고 균증식, ST 생산량 및 pH변화를 관찰하였다(Table 3).

배지내 암모니아농도가 1mM인 경우에는 균증식 및 ST 생산이 관찰되지 않았으며 암모니아농도가 10mM, 38mM, 76mM인 경우에는 균 증식 및 ST 생산량이 암모니아 농도가 19mM인 대조군과 차이가 없었다(Table 3).

#### 3. Glucosamine 및 각종 탄수화물이 ST 생산에 미치는 영향

M9배지에 탄소 및 에너지원으로 glucosamine,

**Table 2.** Influence of phosphate concentration on ST production

Concentration (mM)	final pH	Growth (O.D. at 590 nm)	ST (u/ml)
0.01	8.5	0.01	0
0.1	8.5	0.51	0
1	8.6	0.81	80
10	8.6	1.00	160
64	8.7	1.06	320
100	8.7	1.04	320

**Table 3.** Influence of ammonium ion concentration on ST production

Concentration (mM)	final pH	Growth (O.D. at 590 nm)	ST (u/ml)
1	8.0	0.02	0
10	8.8	1.42	320
19	9.1	1.36	320
38	8.8	1.39	320
76	8.5	1.32	320

**Table 4.** Effects of carbon sources on ST production

Carbon sources	final pH	Growth (O.D. at 590 nm)	ST (u/ml)	Specific production (u/O.D.)
Glucosamine (0.5%)	7.4	5.5	1,280	233
Glucose (0.5%)	5.5	4.5	0	0
Pyruvate (0.5%)	8.7	1.8	320	172
Succinate (0.5%)	9.1	1.2	320	262
Fumarate (0.5%)	9.1	1.2	640	524
Malate (0.5%)	9.0	1.2	640	524
Acetate (0.5%)	9.3	0.7	640	928

glucose, pyruvate, succinate, fumarate, malate 및 acetate를 각각 0.5%씩 넣고 장독성대장균을 배양한 후 균중식, ST생산량 및 pH 변화를 관찰하여 표 4의 성적을 얻었다(Table 4).

Glucosamine을 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우, 균중식은 O.D. 5.5로서 실험한 군 중에서 가장 많았으며 ST생산량도 1,280u/ml로서 가장 많았으나 단위 ST생산량 (specific production, unit / O.D.)은 233u/O.D.로서 비교적 낮았다. Pyruvate를 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우에는 ST생산량은 320u/ml이었으며 단위 ST생산량은 172u / O.D.로서 실험군중 가장 낮았다. 또 succinate를 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우에는 ST생산량은 320 u/ml로 비교적 적었으나 단위 ST생산량은 262u / O.D.로서 glucosamine을 사용한 경우와 비슷하였다. Fumarate, malate 및 acetate를 각각 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우에는 ST생산량이 모두 640u /ml로서 비슷하였으나 단위 ST생산량은 acetate를 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우에 928u / O.D.로서 가장 높았다(Table 4).

ST생산량은 O.D. 5.5로서 가장 균중식이 많은 glucosamine을 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우에 280u/ml로서 가장 많았으나 단위 ST생산량은 O. D. 0.7로서 균중식이 가장 적은 acetate를 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우에 928u/O.D.로서 가장 많은 본 실험결과에서 ST생산에는 세균에 의해 쉽게 빨리 대사되어 세균의 증식을 돕는 탄소 및 에너지원이 적합치 않다는 것을 알 수 있었다.

또한 glucose를 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우에는 균중식은 O.D. 4.5로서 매우 많았으나 ST는 전혀 생산되지 않음이 관찰되었으며 이때 배양액의 pH는 5.5로서 다른 경우와는 달리 산성화되어 있음을 관찰할 수 있었다.

#### 4. 배지의 pH가 ST생산에 미치는 영향

Glucose를 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우 균

**Table 5.** Effects of pH on ST production in succinate salts medium

pH	Growth (O.D. at 590 nm)	ST (u/ml)
8.5	1.2	320
6.5	1.8	0

중식은 많으나 ST가 전혀 생산되지 않았던 표 4의 결과에서 배양액의 pH저하가 ST생산에 억제효과를 주었는지를 확인하기 위하여 succinate salts 배지의 pH를 7.9에서 8.5사이로 또 6.2에서 6.5사이로 각각 유지시키면서 균중식 및 ST생산량을 측정하여 표 5의 결과를 얻었다(Table 5).

배지의 pH를 7.9에서 8.5사이로 유지시킨 경우에는 균중식은 O.D. 1.2였으며 ST생산량은 320u / ml이었다. 반면에 배지의 pH를 6.2에서 6.5사이로 유지시킨 경우에는 균중식은 O.D. 1.8로서 배지의 pH를 7.9에서 8.5사이로 유지시킨 경우보다 다소 높았으나 ST는 전혀 생산되지 않음을 관찰할 수 있었다.

본 실험의 결과에서 배지의 낮은 pH는 ST 생산을 억제함을 알 수 있었다.

#### 5. Succinate Salts 배지에 첨가된 glucose 농도가 ST생산에 미치는 영향

Glucose는 여러종류의 유도성호소생산을 억제하는 것으로 알려져 있으며 glucose를 탄소 및 에너지원으로 사용하여 ST생산을 관찰한 표 4의 결과에서도 glucose는 ST생산을 크게 억제하는 것으로 나타났다. Glucose의 ST생산억제효과를 세밀히 관찰하기 위하여 succinate salts 배지에 glucose를 각각 0.1%, 0.3%, 0.5%, 1%되게 첨가하고 균중식, ST생산량 및 pH변화를 관찰하여 표 6의 성적을 얻었다.

Glucose를 0.1% 및 0.3%되게 첨가해준 배지에서 ST생산량은 320u/ml로서 glucose를 넣지 않은

**Table 6. Effects of glucose concentration on ST production in succinate salts medium**

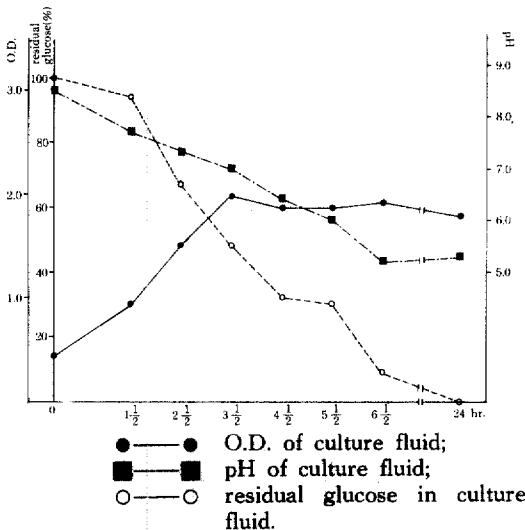
Glucose concentration (%)	final pH	O.D.	ST (u/ml)	Specific production (u/OD)
0	9.1	1.14	320	280
0.1	8.8	2.11	320	152
0.3	8.4	3.49	320	92
0.5	6.7	4.60	0	0
1.0	5.2	3.80	0	0

경우와 유의한 차이가 없었으나 단위 ST 생산량은 각각 152u/O.D. 및 92u/O.D.로서 glucose를 넣지 않은 군에 비해 크게 감소하였다. 또 glucose를 0.5%, 1%되게 첨가해준 군에서는 균중식은 각각 O.D. 4.60 및 3.80으로 glucose를 넣지않은 군의 1.14에 비해 크게 증가하였으나 ST생산은 관찰되지 않았다(Table 6).

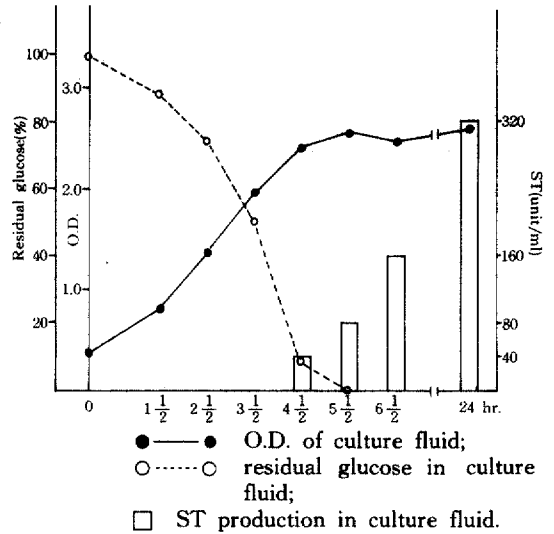
또한 ST가 측정되지 않았던 glucose 0.5%, 1.0% 첨가배지의 배양후 pH는 각각 6.7 및 5.2로서 glucose를 첨가하지 않은 군의 9.1에 비해 크게 낮았으나 glucose를 0.1%, 0.3%되게 첨가하여 배양한 배양액의 pH는 각각 8.8 및 8.4로서 pH변화가 크지 않았다(Table 6).

### 5. M9배지에서 pH의 조절이 ST생산에 미치는 영향

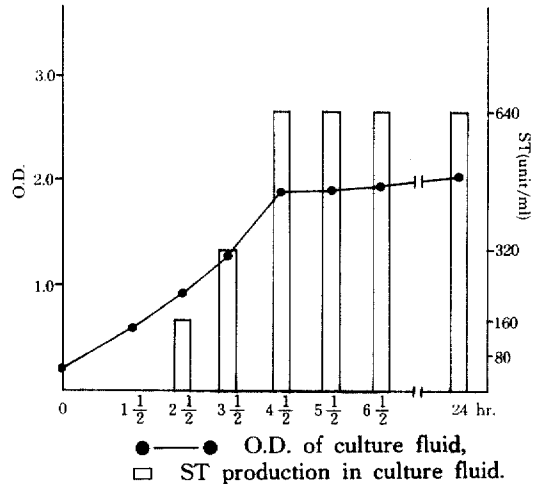
표 6에서 glucose를 0.5% 및 1%씩 첨가해준 경우에 ST생산이 전혀 관찰되지 않았으며 이때의 균



**Fig. 1. Growth, pH and residual glucose in M9 medium (pH uncontrolled).**



**Fig. 2. Growth, ST production and residual glucose in M9 medium (pH controlled).**



**Fig. 3. Growth and ST production in glucosamine salts medium.**

배양액 pH가 각각 6.7 및 5.2로서 glucose를 첨가하지 않은 군에 비해 크게 감소한 결과에서 glucose의 ST생산억제기전이 pH저하에 의한 것인지를 확인하기 위하여 탄소 및 에너지원으로는 glucose만이 0.5%들어있는 M9배지에서 배양기간중 계속 pH를 7.9에서 8.5사이로 유지시키면서 ST생산, 균중식, pH변화(pH를 교정하지 않았던 대조군, 그림 1) 및 균배양액내의 잔류 glucose 농도를 측정하여 그림 2의 결과를 얻었다. pH를 조절하지 않은 대조군에서는 균배양액의 pH가 배양직후부터 급격히 감소하여 배양 6시간 30분후에는 5.2로 최저에 도달하였으며 ST는 배양 24시간후에도 생산되지 않았다 (Fig. 1). 반면에 pH를 교정해준 균배양액에서는 배

**Table 7.** Effect of glucose analogues on ST production in succinate salts medium

Glucose analogues added	final pH	Growth (O.D. at 590 nm)	ST(u/ml)
None	9.3	1.23	320
Alpha-methylglucose(1%)	9.4	1.18	320
2-dexoy-glucose(1%)	9.0	1.00	320
2-deoxy-glucose(0.1%)	9.1	0.97	320

양 4 시간 30분후에 ST가 생산되었으며 배양 6 시간 30분 후에는 160u/ml, 배양 24시간후에는 320u/ml의 ST가 생산되었다.

ST생산이 시작된 배양 4 시간 30분후는 균배양액의 O.D.가 2.40으로 균중식이 정지기 초기에 들어간 때와 일치하였으며 이때 균배양액내의 포도당은 배양초기 glucose(0.5%)의 약 9%만이 남아있었다(Fig. 2).

따라서 ST의 생산이 균중식과 관계가 있는지 또는 배지내의 glucose 농도에 의해 영향을 받는지를 알기 위하여 glucose와 비슷한 구조를 지니고 있는 glucosamine을 탄소 및 에너지원으로 넣은 배지에서 배양액의 pH를 7.9에서 8.5사이로 유지시키면서 배양시간별로 균중식과 ST 생산량을 측정하였다(Fig. 3).

Glucosamine을 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우에는 glucose를 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우와는 달리 세균중식이 대수기에 있는 배양 2 시간 30분후에 이미 ST생산이 시작되어 세균의 증식이 정지기 에 들어가기 시작한 배양 4 시간 30분 후에는 640u/ml의 ST가 생산됨을 관찰할 수 있었다. 본 실험결과에서 ST의 생산은 균중식 단계와는 커다란 연관성이 없으며 배양액내에 남아있는 glucose의 양과 관계가 있음을 추정할 수 있었다.

### 6. $\alpha$ -methylglucose와 2-deoxy-glucose가 ST생산에 미치는 영향

Glucose 유사체로서 *E. coli*의 세포내에서 대사되는 양은 c-AMP생산을 억제하는 것으로 알려진  $\alpha$ -methylglucose 및 2-deoxy-glucose를 succinate salts 배지에 각각 1%되게 첨가하고 균중식, ST생산 및 pH변화를 관찰하였다(Table 7).

$\alpha$ -methylglucose, 2-deoxy-glucose를 1% 첨가한 경우에도 ST생산량은 320u/ml로서 대조군과 동일하였으며 균중식 및 균배양액의 pH변화에도 커다란 차이는 없었다(Table 7).

## 고 찰

세균내의 많은 효소중에서 환경에 따라 필요한 효

소는 생산을 유도하고 불필요한 효소는 생산을 억제하는 세균의 대사조절능력은 세균의 생존에 대사능력이 가장 중요한 역할을 한다는 관점에서 볼 때 매우 당연한 현상으로 여겨지고 있으나 그 조절기전은 매우 다양하고 복잡하여 극히 일부의 예에서만 그 조절기전이 밝혀져 있다.

일반적으로 세균의 대사조절기전은 substrate induction, feedback inhibition, catabolite inhibition 및 stringent control 기전등이 있는 것으로 알려져 있다<sup>1)</sup>.

장독성대장균의 내열성장독소생산도 그 생산이 plasmid에 의해 관장되어지고 있으며 특정배양 조건에서만 생산되는 점으로 보아 배양환경에 따라 생산이 유도되는 유도성 효소에 의해 만들어 진다고 추측된다.

본 실험에서는 ATP생산 및 대사물질의 phosphorylation에 관계하여 세균의 2차대사산물의 생산에 영향을 주는 인산염, 아미노산생산에 중요한 역할을 하는 glutamine synthetase에 직접적으로 영향을 주는 암모니아, catabolite 억제현상을 일으키는 대표적인 당인 glucose와 glucose 중간대사산물들 및 배지의 pH가 ST생산에 미치는 영향을 관찰함으로써 ST생산에 영향을 주는 주요인들을 파악하고자 하였다.

Succinate salts 배지에서 인산염의 농도변화가 ST생산에 미치는 영향을 관찰한 표2, 암모니아의 농도변화가 ST생산에 미치는 영향을 관찰한 표3의 결과에서 인산염의 과다나 암모니아이온의 과다가 ST생산 및 균중식에 커다란 영향을 주지 않음을 관찰할 수 있었다.

Glucosamine, glucose 및 glucose 중간대사산물인 pyruvate, succinate, fumarate, malate 및 acetate를 탄소 및 에너지원으로 사용하여 ST생산을 관찰한 표4의 결과를 보면 acetate를 사용한 경우에 가장 높은 단위 ST생산량을 보였으며 malate, succinate, glucosamine 및 pyruvate 순서로 단위 ST생산량이 감소되었다. 균중식에 부적당한 acetate를 탄소 및 에너지원으로 사용하는 경우에 가장 높은 단위 ST생산을 얻을 수 있으며 glucosamine 또는 pyruvate 등 비교적 균중식에 적합한 당을 탄소 및 에너지원

으로 사용하는 경우에는 단위 ST 생산량이 크게 감소하는 본 결과에서 ST의 생산은 세균의 증식에 도움이 적은 탄소 및 에너지원에서 세균을 배양할 때 세포내에 축적되어 세균대사조절에 영향을 주는 guanosine-5 diphosphate, 3 diphosphate를 통한 stringent 조절기전에 의해 크게 영향을 받는 것으로 추정되었다.

Glucose는 많은 유도성효소생산을 억제하는 것으로 알려져 있으며<sup>22,23)</sup> 양동<sup>1)</sup> Alderete와 Robertson<sup>4)</sup>은 장독성대장균의 ST생산도 glucose에 의한 catabolite 억제제를 받는다고 보고한 바 있다. 본 실험에서도 glucose를 탄소 및 에너지원으로 사용한 경우 ST생산이 전혀 관찰되지 않았으며(Table 4) succinate salts배지에 glucose를 0.5% 이상 첨가한 경우에도 ST생산이 관찰되지 않아(Table 6) glucose가 ST생산을 억제함을 알 수 있었다.

Alderete과 Robertson<sup>4)</sup>은 glucose에 의한 ST생산억제 현상이 cyclic AMP 생산억제에 의한 것이라고 시사한 바 있다.

본 실험에서도 glucose의 cyclic AMP 생산억제에 의한 ST생산억제현상을 확인하기 위하여 대사되지는 않으나 세포내 cyclic AMP생산을 크게 억제하는 것으로 알려진  $\alpha$ -methylglucose와 2-deoxy-glucose를<sup>24)</sup> succinate salts배지에 각각 1%되게 첨가하고 ST생산을 관찰하였으나  $\alpha$ -methylglucose나 2-deoxy-glucose에 의한 ST생산억제 현상은 관찰할 수 없었다(Table 7). 반면에 glucose를 첨가하거나 탄소 및 에너지원으로 사용하더라도 배양액의 pH가 alkali 상태를 유지하는 경우에는 ST생산이 이루어진다는 결과를 얻었으며(Table 6, Fig. 2) 이 결과와 세균의 발육에 적합한 탄소 및 에너지원수록 단위 ST생산량이 감소하는 표 4의 결과를 종합하여 볼 때 glucose의 ST생산억제기전은 glucose가 가지고 있는 높은 에너지와 세균에 의해 쉽게 대사될 수 있는 성질 및 대사시 배양액의 pH를 저하시키는 성질에 기인한다고 사료되었다.

### 결 론

장독성대장균의 내열성장독소생산에 영향을 미치는 주요요인들을 밝히기 위하여 succinate salts 배지 또는 M9 배지에서 인산염의 농도 및 암모니아 농도를 달리하고 glucose, glucosamine 및 glucose 중간대사산물을 탄소 및 에너지원으로 사용하여 이 요인들이 내열성장독소생산에 미치는 영향을 관찰하여 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 배지내의 인산염농도가 10mM 이하인 경우에

는 내열성장독소생산이 억제되었으며 인산염의 농도가 64mM, 100mM인 경우에는 320u/ml의 내열성장독소가 생산되었다.

2. 배지내의 암모니아농도가 1mM인 경우에는 세균증식 및 내열성장독소생산이 없었으나 10mM 부터 76mM사이인 경우에는 320u/ml의 내열성장독소가 생산되었다.

3. 탄소 및 에너지원으로 사용된 glucosamine, glucose, pyruvate, succinate, fumarate, malate 및 acetate 중에서 단위내열성장독소생산량은 acetate를 사용한 경우에 가장 많았으며 fumarate succinate, glucosamine, pyruvate 및 glucose순으로 낮아 내열성장독소생산은 stringent control을 받는 것으로 추정되었다.

4. Succinate salts 배지의 pH를 8.5로 유지시켰을 경우에는 내열성장독소가 생산되었으나 pH를 6.5 이하로 유지시키는 경우에는 생산되지 않았다.

5. Succinate salts배지에 첨가된 glucose는 내열성장독소생산을 억제하였으며 억제기전은 glucose가 대사되면서 배양액의 pH를 낮추는 성질과 glucose가 갖고있는 높은 대사에너지때문인 것으로 추정되었다.

### 참 고 문 헌

- 1) 양남웅, 김익상, 장우현, 이승훈: 대장균의 내열성장독소생산에 관여하는 조건. 서울의대잡지, 25: 139, 1984.
- 2) 장우현, 김문교, 양남웅, 최명식, 고헌욱, 서정기: 내열성장독소생산 대장균의 판정. 대한미생물학회지, 18:(1): 53, 1983.
- 3) Alderete JF and Robertson DC: Purification and chemical characterization of the heat-stable enterotoxin produced by porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 19: 1021, 1978.
- 4) Alderete JF and Robertson DC: Repression of enterotoxin synthesis in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 17: 629, 1977.
- 5) Burgess MN, Bywater RJ, Cowley CM, Mullan NA and Newsome PM: Biological evaluation of methanol soluble heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21: 526, 1978.
- 6) Cashel M: Regulation of bacterial ppGpp and pppGpp. *Ann. Rev. Microbiol.* 29: 301, 1975.
- 7) Clements JD and Finkelstein RA: Isolation

- and characterization of homogenous heat-labile enterotoxins with high specific activity from *Escherichia coli* cultures. *Infect. Immun.* **24**: 760, 1979.
- 8) Donta ST, Moon HW and Whip SC: Detection of heat-labile *Escherichia coli* enterotoxin with the use of adrenal cells in tissue cultures. *Science.* **183**: 334, 1973.
  - 9) Epstein W, Rothman-Denes LB and Hesse J: Adenosine 3', 5' cyclic monophosphate as mediators of catabolic repression in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A.* **72**: 2300, 1975.
  - 10) Evans DJ Jr, Chen LC, Curlin GT and Evans DG: Stimulation of adenyl cyclase by *Escherichia coli* enterotoxin. *Nature (London) New. Biol.* **236**: 137, 1972.
  - 11) Gallant AJ: Stringent control in *E. coli*. *Ann. Rev. Genet.* **13**: 393, 1979.
  - 12) Gianella RA: Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: characterization of the model. *Infect. Immun.* **14**: 95, 1976.
  - 13) Greenberg RN, Dunn JA and Guerrant RA: Reduction of the secretory response to *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin by thiol and disulfide compound. *Infect. Immun.* **41**: 174, 1983.
  - 14) Guerrant RL, Ganguly U, Casper AGT, Moore EJ, Pierce NF and Carpenter CCJ: 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, 1973.
  - 15) Guerrant RL, Brunton LL, Schnaitman TR: Rebhun LI and Gilman AG: Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: a rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **10**: 320, 1974.
  - 16) Guerrant RL, Hughes JM, Chang B, Robertson DC and Murad F: 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, 1980.
  - 17) Gyles CL, Magdalene S, and Stanley F: The enterotoxin plasmids of *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **130**: 40, 1974.
  - 18) Gyles CL: Heat-labile and heat-stable forms of the enterotoxin from *E. coli* strains enteropathogenic for pigs. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **176**: 314, 1969.
  - 19) Joklik KW, Willet HP and Amos DB: Zinsser Microbiology, 18th ed., p. 139. Appleton-Century-Crofts, 1984.
  - 20) Kapitan RA, Forsyth GW, Scott A, McKenzie SF and Worthington RW: Isolation and partial characterization of two different heat-stable enterotoxin produced by bovine and porcine strains of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **26**: 173, 1979.
  - 21) Kunkel SL and Robertson DC: Purification and chemical characterization of the heat labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **25**: 586, 1976.
  - 22) Magasanik B: Catabolite repression. Cold Spring Harbor Symp. *Quant. Biol.* **26**: 259, 1961.
  - 23) Mecke O and Holzer H: Repression and inactivation of glutamine synthetase in *Escherichia coli* by NH<sub>4</sub><sup>+</sup>. *Biochem. Biophys. Acta.* **122**: 341, 1966.
  - 24) Miller RE and Stadtman ER: Glutamine synthetase from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **247**: 7407, 1972.
  - 25) Neidhardt FC and Magasanik B: Inhibition of glucose on enzyme formations. *Nature.* **178**: 801, 1956.
  - 26) Paigen K: Phenomenon of transient repression in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **91**: 1201, 1966.
  - 27) Sack DA, McLaughlin JC, Sack RB, Orskov F and Orskov I: Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients at a hospital in Dacca. *J. Infect. Dis.* **135**: 275, 1977.
  - 28) Sack RB: Human diarrheal diseases caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **29**: 333, 1975.
  - 29) Smith HW and Sheila H: Studies on *Escherichia coli* enterotoxin. *J. Path. Bact.* **93**: 531, 1967.
  - 30) Tyler B, Loomis WF Jr. and Magasanick B: Transient repression of the lac operon. *J. Bacteriol.* **94**: 2001, 1967.



- 31) Tyler B and Magasanik B: Physiological basis of transient repression of catabolic enzyme in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **102**:411,1970.
- 32) Yamamoto T and Yokoda T: Cloning of deoxyribonucleic acid regions encoding a heat-labile and heat-stable enterotoxin originating from an enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of human origin. *J. Bacteriol.* **143**: 652, 1980.