Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.
Vol. 26, No. 6, 471−475 (1998)

항종양활성을 지닌 *Enterococcus faecalis* 2B4-1의 분리 및 동정

박상진 · 임대석 · 윤상군[1] · 백영진[1] · 김창한*
건국대학교 동물자원연구센터, [1]한국야쿠르트 중앙연구소

Isolation and Identification of *Enterococcus faecalis* 2B4-1 Containing Antitumor Substances. Park, Sang-Jin, Dae-Seog Lim, Sang-Kun Yoon[1], Young-Jin Baek[1], and Chang-Han Kim*. *Animal Resources Research Center, Konkook University, Seoul 143-701, Korea, [1]Korea Yakult Co. Ltd., Research and Development Center, Komaeri, Kiheung-eup, Yongin-kun, Kyunggi-do 449-900, Korea* – The aim of the present research program was to develop a strain of gastrointestinal bacteria containing antitumor substances. Fecal samples were collected from neonates and a number of gastrointestinal bacteria were isolated from the fecal samples by applying selective agar for intestinal bacteria. Among 127 isolates, a strain 2B4-1 containing an antitumor substance against stomach cancer, SNU-1, was selected. The strain 2B4-1 was identified as a strain similar to *Enterococcus faecalis* NCTC 775 with respect to morphological characteristics, growth temperature, salt and acid tolerance, growth under facultative anaerobic conditions and utilization of carbon sources such as arabinose and melibiose and so on. However, it showed some differences such as a negative reaction to hippurate hydrolysis and negative reaction to β-hemolysis. We assigned to the strain 2B4-1 to *Enterococcus faecalis*.

Key words: gastrointestinal bacteria, *Enterococcus faecalis*, antitumor substances

최근 장내세균총(gastrointestinal microflora)은 생명과학, 수의학 및 의학연구에서 매우 중요하게 다루고 있으며, 장내세균총이 사람과 동물의 건강에 중요한 요소일 뿐만 아니라 식품분야에서 이용에도 중요한 역할을 하고 있다.

사람과 가축의 장내에 압도적으로 서식하고 있는 *Enterococcus* 속은 Schleifer 등[16]에 의해 처음으로 Lancefield group D fecal streptococci에서 구분되었는데, 그 일부가 opportunistic pathogen으로 식품에 대한 분변오염의 지표균으로 이용되기도 하나[8], 치즈의 첨가 starter[5], 새끼돼지의 설사방지 역할에 의한 probiotics 및 silage inoculants로서 이용되어 왔다[13]. 또한 Ohasi 등[11]은 BRM(biological response modifier) 제제로서의 가능성을 macrophage 및 neutrophile 활성을 중심으로 상품화된 *Streptococcus pyogenes* OK-432와 비교하여 보고하였으며, 그 후 항종양활성[10], leukopenia[6] 및 candidiasis[14] 등에서 유효한 가능성이 보고되었다.

본 연구에서는 장내세균으로부터 새로운 항종양물질 함유균주를 분리하기 위하여 신생아 분변으로부터 유산균의 일반적인 특성을 갖는 장내미생물을 탐색하였으며, 분리된 균주들중 우수한 항종양활성을 나타내는 분리균주, 2B4-1을 생화학적 방법과 미생물동정 kit, API 20 S system[7]을 이용하여 동정하였다.

*Corresponding author
Tel. 82-2-450-3679, Fax. 82-2-3436-0266
E-mail: chhan@kkucc.konkuk.ac.kr

재료 및 방법

장내세균의 분리

신생아 분변 10 g을 채취하여 그 중 1 g을 멸균증류수 10 ml에 넣어 약 1분간 vortexing한 후 방치한 다음, BCP(Difco)배지에 pour plating하여 37℃에서 2일간 배양하였다. 이를 MRS배지에 streaking하여 형성된 colony를 M17과 MILS(modified ILS)배지에서 배양하여 600 nm에서 흡광도가 1.0 이상이고 pH가 4.2 이하인 colony를 선택하여 gram 양성이고 catalase 음성인 colony만을 분리균주로 하였다.

종양세포주 및 사용배지

본 실험에서 사용한 종양세포주는 Calu-3(lung carcinoma, human), Hs-578T(breast carcinoma, human), SF-188(brain cancer, human), SNU-1(stomach cancer, human) 및 WiDr(colon carcinoma, human) 등이며, SF-188은 MEM(minimum essential medium, Gibco, USA)에 FBS(fetal bovine serum, Gibco, USA)를 10%, sodium pyruvate를 1% 첨가한 배지, SNU-1은 RPMI 1640(Gibco, USA)에 FBS를 10% 첨가한 배지, Calu-3는 MEM에 FBS를 10%, glutamine을 1%, sodium pyruvate를 1%, MEM vitamin을 1%, 그리고 penicillin/streptomycin을 1% 첨가한 배지, Hs-578T는

DMEM(Dulbecco's modified eagle medium, Gibco, USA)에 FBS를 10% 첨가한 배지들을 각각 사용하였다.

모든 세포는 25 cm^2 조직배양용 flask에 넣어 37℃, 5% CO_2 incubator에서 배양하였다. 세포수집은 0.25% trypsin/1 mM EDTA 용액을 이용하여 단세포로 만들었고, 세포수는 0.4% trypan blue 용액으로 염색한 후 Neubauer type hemocytometer(Superior, USA)를 사용하여 계수하였다.

Clonogenic assay법을 이용한 항종양활성 측정

항종양활성의 측정은 이 등[9]의 방법에 의하여 실시하였다. 즉 직경 35 mm 조직배양용 petridish에 0.5% agar를 함유하는 하층배지(Enriched MacCoy's 5A 40 ml, 3% tryptic soy broth 10 ml, 6.6 mg/ml asparagine 0.6 ml, 50 mg/ml DEAE-dextran 0.3 ml)를 주입하여 하층평판을 조제한 다음 CO_2 incubator에 보존하면서 사용하였다. 하층위에 0.3% agar를 함유하는 일정농도의 종양세포와 시료현탁액(Double-enriched CMRL 1066 2.0 ml, 약제 또는 멸균증류수 0.3 ml, 세포현탁액 0.5 ml)을 1 ml씩 주입시켜 중층평판을 만든 후 37℃, CO_2 incubator에서 배양하였다. 배양 10일에서 14일째의 평판에서 50 μm이상의 크기를 나타내는 colony를 현미경으로 계수하였다.

시료의 처리는 세포현탁액에 시료를 각 농도별로 첨가하는 연속노출법을 이용하였으며, 시료의 감수성은 시료처리평판과 비처리평판에 나타난 colony의 수를 비교하여 생존율을 %로 나타내었으며, 생존율이 30% 이하일 때를 항종양활성이 있는 것으로 판정하였다.

균주의 배양 및 시료처리

Fig. 1에서 보는 바와 같이, 분리균주를 MILS broth (0.5% peptone, 0.5% soytone, 0.5% yeast extract, 2% glucose, 0.1% sodium acetate, 0.2% sodium chloride, 0.1% tween 80, 0.3% tryptone, 0.5% salt solution: 11.5 % $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 2.4% $MnSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.68% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 6.6~6.8)에 접종하여 37℃에서 48시간 배양하였고, 그 중 2%의 전배양 seed를 MILS배지가 존재하는 50 *l* jar fermenter(Lab Pilot Fermenter Type LP 351, Bioengineering)에 접종하였으며 37℃에서 48시간 배양하였다. 배양이 완료된 배양액을 원심분리하고 균체와 상등액을 분리하였으며, 균체를 멸균증류수로 3회 세척한 후 동결건조하였다. 동결건조된 균체를 원액에서 2배씩 멸균증류수에 희석하여 최고 2배에서 최저 16배까지 희석하여 실험에 사용하였다.

균주의 동정

형태학적 특성 분석 분리균주, 2B4-1의 형태학적 특성분석은 MILS 배지를 이용하여 배양한 균체를 slide glass에 도말하여 위상차현미경으로 1,000배로 관찰 및 촬영하였다.

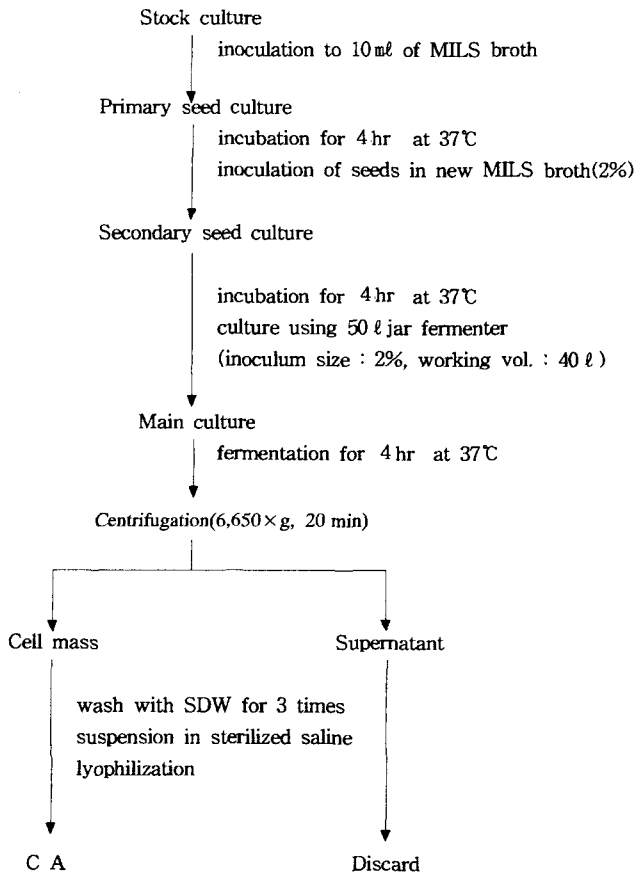

Fig. 1. Culture procedure for the screening of isolates with antitumor effect.

생화학적 특성 분석 내산성 실험은 MILS broth를 이용하여 37℃에서 18시간 동안 배양하여 원심분리한 후 회수한 균체를 pH 2.3의 phosphate buffer 10 ml에 현탁시켜 2시간 배양시킨 후, 10배 희석법에 의해 희석한 시료를 MILS agar배지에 분주하여 37℃에서 48시간 동안 배양한 다음 대조군과 생육도를 비교하였다.

내담즙성 실험은 내산성 분리균주를 pH 2.3 phosphate buffer 10 ml에서 6시간 배양시킨후 0.15% oxgall(Difco)이 포함된 MRS배지에 분주한 다음 37℃에서 2일간 혐기배양한 후 나타난 colony를 대조군과 비교하여 내담즙성을 보유한 분리균으로 판정하였다.

효소활성 실험은 MILS배지에서 37℃, 18시간 배양한 분리균주를 생리식염수로 희석하여 10^5~10^6 cfu/ml 수준의 시료를 조제한 후 API ZYM kit(API bioMerieux, France)[3]를 이용하여 37℃에서 8시간 배양한 다음 효소반응시켰다. 효소활성은 표준색상표를 비교하여 0~5의 수치로 표시하였으며, 대조구이외의 alkaline phos-

Table 1. Percent survival in clonogenic assay of various tumor cell lines treated with whole cell (1 mg/ml) of isolates

Cell lines	2B6-1	4B8-3	4B12-1	4B12-3	2B4-1
SNU-1	25*	20*	27*	23*	17*
RAJI	64	63	96	77	45
3LL	73	55	62	36	28*
FARROW	47	34	71	42	25*
HEC-1-B	89	48	85	59	30*
SW-156	100	100	68	100	100
HEp-G2	100	57	87	78	72
SF-188	74	89	100	98	100
WiDr	100	90	67	73	66
CALU-3	82	100	96	93	69

*sensitive i.e. % survival≤30.

phatase, esterase, esterase lipase, lipase, leucine arylamidase, valine arylamidase, trypsin, acid phosphatase, β-glucuronidase 및 β-glucosidase 효소의 활성을 측정하였다.

API 20 S system kit를 이용한 동정 최종 동정을 위하여 API 20 S system kit(API bioMerieux, France) [1, 7]를 이용하여 동정하였다.

결과 및 고찰

항종양활성을 나타내는 분리균주의 선별

Enterococcus 속의 분리배지는 Baron 등[2]과 Reuter [12] 등이 selective agent로 sodium azide 함유된 citrate azide tween carbonate agar, kanamycin aesculin azide agar 등을 추천한 바 있는데, 본 실험의 경우에는 산업적 이용을 고려하여 분변에서 유산균 분리 시에 사용하는 M17과 MILS로서 신생아 분변으로부터 장내세균 127 균주를 분리하였다. 분리한 장내세균들을 MILS배지에서 2일간 전배양한 후 2%의 전배양액을 다른 MILS 배지에 접종하여 2일간 배양한 다음 균체를 얻었다. 각각의 균주들의 배양균체를 Table 1의 검정종양세포들에 대해 항종양활성을 측정한 결과, 항종양활성을 나타내는 분리균주는 27균주였으며, 그 중 비교적 강한 항종양활성을 보이는 균주는 5균주였다. 5균주 중 위암세포주, SNU-1에 선택적으로 강한 항종양활성을 나타내는 2B4-1 균주를 공시균주로 최종 선별하였으며, 그 외 4균주와 비교실험을 진행하였다.

분리균주 2B4-1의 동정

형태학적 특성 분리균주 2B4-1의 형태학적 특성은 MILS배지에서 배양한 균체를 위상차현미경(×1,000)으로 관찰한 결과, pairs나 short chains의 구균의 형태로 관찰되었다(Fig. 2).

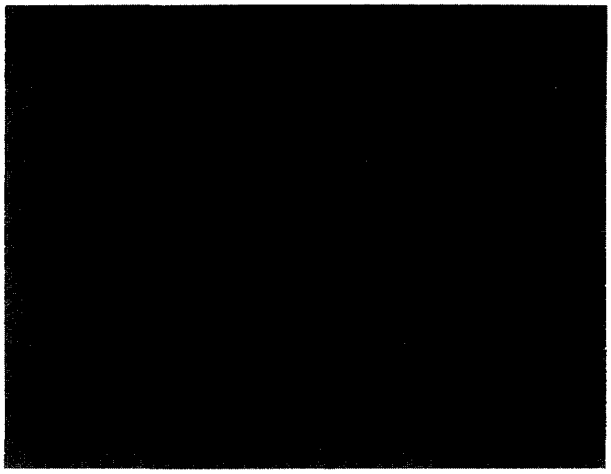

Fig. 2. Microphotograph of *Enterococcus feacalis* 2B4-1.

Table 2. Survival cell count of isolates concerning to acid resistance

Isolates	Acid resistance*		Bile resistance*	
	0 hr	2 hr	0 hr	6 hr
2B4-1	1.6×10^7	1.0×10^6	2.0×10^8	1.0×10^7
2B6-1	6.7×10^6	1.2×10^4	8.8×10^8	2.0×10^6
4B8-3	2.6×10^6	4.0×10^5	1.1×10^9	2.5×10^7
4B12-1	1.5×10^7	1.0×10^4	1.4×10^8	2.1×10^5
4B12-3	1.6×10^7	1.0×10^4	1.1×10^8	3.7×10^5

*Survival cell count(cfu/ml) after incubating in phosphate buffer for 2 hr, and 6 hr, respectively.

생화학적 특성 Table 2에서 보는 바와 같이 내산성 시험결과, 모든 분리균주들의 생존율이 감소되는 경향을 보였으며, 분리균주 4B12-1과 4B12-3는 각각, 대조구 1.5×10^7, 1.6×10^7 cfu/ml에 비해 1.0×10^4, 1.0×10^4 cfu/ml로 생존율이 급격히 감소된 반면, 분리균주 2B4-1은 대조구 1.6×10^7 cfu/ml와 비교해 볼 때, 1.0×10^6 cfu/ml로 10^1 정도 감소를 보였다.

내산성이 양호한 분리균 2B4-1의 내담즙성은 대조구 2.0×10^8 cfu/ml에서 1.0×10^7 cfu/ml로 10^1 정도 감소를 보여 양호한 것으로 판정하였으나 나머지 분리균들은 모두 10^2~10^3 cfu/ml의 급격한 감소를 보여 내담즙성이 약한 것으로 판정되었다.

분리균주들의 효소활성은 API ZYM kit를 사용하여 실시하였으며 그 결과는 Table 3에서 보는 바와 같다. 특히, 대장암 유발효소인 β-glucuronidase와 β-glucosidase 활성에 대해서 분리균주 2B4-1은 전혀 활성을 나타내지 않는 것으로 볼 때, 대장암유발 carcinogenic microorganism은 아닌 것으로 사료되었다.

API 20 S system kit를 이용한 동정 Table 4에서 보는 바와 같이 21 units의 동정실험을 실시한 결과, 분리균주 2B4-1은 *Enterococcus faecalis*와 % ID value가 99.9

Table 3. Enzyme patterns of isolates

Enzymes	Isolates				
	2B6-1	4B8-3	4B12-1	4B12-3	2B4-1
Control	0	0	0	0	0
Lipase	1	1	1	1	1
Trypsin	0	1	0	0	0
Chymotrypsin	2	2	2	2	0
Acid phosphatase	2	5	4	4	4
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	1	5	2	1	5
α-galactosidase	1	0	1	1	0
β-galactosidase	0	2	2	2	0
β-glucuronidase	0	0	0	0	0
α-glucosidase	0	1	0	0	2
β-glucosidase	0	0	1	1	0
N-acetyl-β-glucosaminidase	0	1	0	0	0
α-mannosidase	0	0	0	0	2
α-fucosidase	0	0	0	0	0

*A value ranging from 0 to 5 is assigned to the standard color. Zero represents a negative reaction; 5 a reaction of maximum intensity. Values 1 through 4 represent intermediate reactions depending on the level of intensity. The approximate activity may be estimated from the color strength; 1 corresponds to the liberation of 5 nM, 2 to 10 nM, 3 to 20 nM, 4 to 30 nM and 5 to 40 nM or more.

%의 높은 일치율을 나타내었다.

최종 동정된 분리균주 2B4-1과 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology[15]의 type strain, *Enterococcus faecalis* NCTC 775와의 비교 data는 Table 5에서 보는 바와 같이 온도대별 성장률, 내염성, 내산성, tetrazolium의 환원성, potassium tellurite의 환원성 및 arabinose와 melibiose 등의 당 이용성면에서 일치된 결과를 보였다. 그러나 hippurate hydrolysis test에 있어서, 분리균주 2B4-1은 type strain(*Enterococcus faecalis* NCTC 775)이 양성반응을 보인 반면, 음성반응을 나타내었는데, Knudtson 등[8]은 균주에 따라 상이하다고 보고하였다. Anaerobic system(BBL, Gas Pak 100)에서 배양한 결과 분리균주 2B4-1은 생육하여 facultative anaerobe로 판정하였다. *Enterococcus faecalis*의 용혈성은 Baron 등[2]과 Schleifer 등[16]이 보고한 바에 의하면, 대부분

Table 5. Comparison of diagnostic characteristics between *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecalis* 2B4-1

Characteristics	*E. faecalis* NCTC775	*E. faecalis* 2B4-1
Hippurate hydrolysis	+	-
Growth in 0.1% methylene blue milk	+	+
Growth at 10℃	+	+
Growth at 45℃	+	+
Growth at 6.5% NaCl	+	+
Growth at pH9.6	+	+
Growth with 40% bile	+	+
Reduction of tetrazolium	+	+
Reduction of potassium tellurite	+	+
Tyrosine decarboxylated	+	+
Obligate anaerobe	-	-
Arabinose	-	-
Arbutin	-	-
Melibiose	-	-
Melezitose	+	+
Sorbose	-	-
α-hemolysis	-	+
β-hemolysis	+	-

Table 4. API 20 STREP test for identification of isolated strain 2B4-1

Tests	Substrates	Results	Tests	Substrates	Results
VP	Pyruvate	+	RIB	ribose	+
HIP	Hippurate	-	ARA	L-arabinose	-
ESC	Esculin	+	MAN	mannitol	+
PYRA	Pyrrolidonyl 2-naphthylamide	+	SOR	sorbitol	+
α-GAL	6-Bromo-2-naphthyl α-D-galactopyranoside	-	LAC	lactose	+
β-GUR	Naphthol AS-BI β-D-glucuronate	-	TRE	trehalose	+
β-GAL	2-naphthyl-β-D-galactopyranoside	-	INU	inulin	-
PAL	2-naphthyl phosphate	-	RAF	raffinose	-
LAP	L-leucine-2-naphthylamide	+	AMD	starch	+
ADH	Arginine	+	GLYG	glycogen	-
β-HEM	β-hemolysis	-			

Significant taxa	% ID*	T**	Atypical tests	Results
Enterococcus faecalis	99.9	1.00	0	excellent identification
next choice *Enterococcus faecium*	0.1	0.56	3	-

*the percentage of identification **an estimate of how closely the profile corresponds to the most typical set of reactions for the stated taxon.

α-hemolysis이고 극히 일부가 β-hemolysis인데, type strain은 양성반응을 보인 반면, 분리균주 2B4-1은 음성반응, 즉 녹색변을 형성하는 α-hemolysis를 나타내었다. 따라서 분리균주 2B4-1은 *Enterococcus faecalis* NCTC 775와는 약간 다른 형질을 나타내는 변종으로 사료되어 *Enterococcus faecalis* 2B4-1으로 동정하였다.

현재까지 *Enterococcus faecalis*는 항진균 및 면역증강 효과[11, 14] 등에 대한 활성에 대해서 보고된 반면, 위암세포주, SNU-1에 대해서 *in vitro* 활성을 나타낸 보고자료는 전무한 상태이므로 새로운 항암효과 연구에 대한 가치가 매우 높을 뿐만 아니라, 금후 활성물질에 대한 분석 및 구조결정 실험을 통해 새로운 물질임을 기대하고 있다.

요 약

신생아 분변으로부터 장내세균 127균주를 분리하였다. 각각의 균주들의 배양균체를 검정종양세포들에 대해 항종양활성을 측정한 결과, 항종양활성을 나타내는 분리균주는 27균주였고, 그 중 비교적 강한 항종양활성을 보이는 균주는 5균주였으며, 5균주중 위암세포주, SNU-1에 선택적으로 강한 항종양활성을 나타내는 2B4-1 균주를 최종분리하였다. API 20 S system kit를 이용하여 분리균주 2B4-1을 동정한 결과, *Enterococcus faecalis*와 99.9 %의 % ID value를 나타내었다. 동정된 분리균주 2B4-1과 type strain, *Enterococcus faecalis* NCTC 775와의 생리생화학적 특성들을 비교해 본 결과, 온도별대 성장률, 내염성, 내산성, arabinose 등의 당 이용성 및 통성혐기 상태에서의 생육 등에서는 일치된 결과를 나타내었으나 hippurate hydrolysis test의 음성반응 및 β-hemolysis test의 음성반응을 나타낸 것으로 보아 *Enterococcus faecalis* NCTC 775와 2가지의 다른 특성을 나타내었다. 따라서 분리균주 2B4-1은 *Enterococcus faecalis* NCTC 775와는 약간의 특성이 다른 변종으로 확인되어 *Enterococcus faecalis* 2B4-1으로 동정하였다.

References

1. Appelbaum, P. C., P. S. Chaurushiya, M. R. Jacob, and A. Duffett. 1984. Evaluation of the rapid strep system for species identification of streptococci. *J. Clin. Microbiol.* **19**: 588–591.
2. Baron, E. J., L. A. Peterson, and S. M. Finegold. 1994. Streptococci and related genera, pp. 333–352. *Diagnostic Microbiology* (9th ed.). Mosby-Year Books Inc., St. Louis.
3. Desjardins, M. L. and D. Roy. 1990. Growth of bifidobacteria and their enzyme profiles. *J. Dairy Sci.* **73**: 299–307.
4. Devriese, L. A., M. A. Collins, and R. Wirth. 1992. The Genus *Enterococcus*, pp. 1465–1481. *In* Baron, A., H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder, and K. H. Schleifer (eds.), *The Procaryotes* (2nd ed., vol. 2). Springer-Verlag, New York.
5. Garg, S. K. and B. K. Mital. 1991. Enterococci in milk and milk products. *Crit. Rev. Microbiol.* **18**: 15–45.
6. Hasegawa, T., Y. Ogura, T. Inomata, Y. Murakumo, T. Yamamoto, S. Abe, and H. Yamaguchi. 1994. Effect of orally administered heat-killed *Enterococcus faecalis* FK-23 preparation on leukopenia in mice treated with cyclophosphamide. *J. Vet. Med. Sci.* **56**: 1203–1206.
7. Jorgensen, J. H., S. A. Crawford, and G. A. Alexander. 1983. Rapid identification of group D streptococci with the API 20S system. *J. Clin. Microbiol.* **17**: 1096–1098.
8. Knudtson, L. M. and P. A. Hartman. 1992. Routine procedures for isolation and identification of enterococci and fecal streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3027–3031.
9. Lee, B. W., M. S. Lee, K. M. Park, C. H. Kim, P. U. Ahn, and C. U. Choi. 1992. Anticancer activities of the extract from the mycelia of *Coriolus versicolor*. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **20**: 311–315.
10. Ohasi, K., K. Satonaka, T. Yamamoto, M. Yamazaki, S. Kimura, S. Abe, and H. Yamaguchi. 1992. Antitumor activity of *Enterococcus faecalis* FK-23 preparation against murine syngeneic tumors. *Yakugaku Zasshi* **113**: 396–398.
11. Ohasi K., H. Veda, M. Yamazaki, S. Kimura, S. Abe, and H. Yamaguchi. 1992. Activity of *Enterococcus faecalis* (FK-23) preparation as a biological response modifier. *Yakugaku Zasshi* **112**: 919–925.
12. Reuter, G. 1992. Culture media for enterococci and group D-streptococci. *Int. J. Fd. Microbiol.* **17**: 101–111.
13. Salminen, S., M. Deighton, and S. Gorbach. 1993. Lactic aicd bacteria in health and disease, pp. 199–356. *In* S. Salminen and A. von Wright(eds.), *Lactic Acid Bacteria*. Marcel Dekker Inc., New York.
14. Satonaka, K., K. Ohashi, T. Nohmi, T. Yamamoto, S. Abe, K. Uchida, and H. Yamaguchi. 1996. Prophylactic effect of *Enterococcus faecalis* FK-23 preparation on experimental candidiasis in mice. *Microbiol. Immunol.* **40**: 217–222.
15. Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Vol. 2, pp. 1063–1065. Williams and Wilkins Press, Baltimore.
16. Schleifer, K. H. and R. Kilpper-B lz. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Intl. J. Syst. Bacteriol.* **34**: 31–34.

(Received September 1, 1998)