

## *Enterococcus faecalis* 2B4-1 세포벽 성분 중 Polysaccharide Fraction의 종양세포 증식억제 효과

박상진 · 김정환 · 이경호 · 양종범<sup>1</sup> · 백영진<sup>2</sup> · 김창한\*  
건국대학교 동물자원연구센터, <sup>1</sup>동남보건대학 식품가공과  
<sup>2</sup>한국야쿠르트 중앙연구소

**Growth Inhibition of Polysaccharide Fraction in Cell Wall Components from *Enterococcus faecalis* 2B4-1 against Tumor Cell Lines.** Park, Sang-Jin, Jeong-Hwan Kim, Kyung-Ho Lee, Jong-Beom Yang, Young-Jin Baek, and Chang-Han Kim\*. *Animal Resources Research Center, Konkuk University, Seoul 143-701, Korea, <sup>1</sup>Department of Food Technology, DongNam Health College, Suwon 440-714, Korea, <sup>2</sup>Research and Development Center, Korea Yakult Co. Ltd., Yongin 449-900, Korea* - This study was developed to evaluate the growth inhibition effects of cell wall components of *Enterococcus faecalis* 2B4-1 obtained from feces of neonates against tumor cell lines. Polysaccharide fraction (PS) shown sensitive growth inhibition effect in the cell wall components was isolated and characterized. In growth inhibition effects, residue fraction of whole cell was shown sensitive level of percent survival about 30% when administrated at the concentration of 100 µg/ml, and that was more effective than that of supernatant fraction against the tumor cell lines, SNU-1, 3LL, FARROW and HEC-1-B. Sensitive growth inhibition effects against SNU-1, FARROW and HEC-1-B were performed by whole cell (WC) fraction from *Ent. faecalis* 2B4-1. Cytoplasm fraction (CP) of WC was shown non-inhibition effect, however, the other part of WC, precipitate of disrupted cell (PD), was sensitive against the tumor cell line mentioned above. Followed by separation to peptidoglycan fraction (PG) and polysaccharide fraction (PS) were all sensitive which the latter was shown more sensitive percent survival than the former. Composed sugars of polysaccharide fraction were determined to D-glucose, L-rhamnose and D-glucosamine, and the rate of composition was calculated to about 1:1:1 by the data of elemental analysis, IR, TLC and HPLC.

**Key words:** *Enterococcus faecalis*, growth inhibition effect, polysaccharide

숙주에 대해 일부 장내세균은 설사증의 예방과 치료, 세균효소의 활성 감소, 면역체계의 자극, 혈청 cholesterol의 조정, 장내 감염병원균의 증식억제 및 암 예방 등의 유용한 효과를 갖는 probiotics로 활용되고 있다 [5]. 이러한 기능을 보유하는 균으로 bifidobacteria와 lactobacilli 속의 유산균이 많이 보고되어 있다 [1, 2, 4, 14, 16]. 또한 enterococci 속은 새끼돼지의 설사예방이나 유해균 증식억제 등으로 주로 수의학분야에서 검토되었으며 [11], 유산간균과 enterococci의 혼합사용은 새끼돼지의 체중증가 및 장관내의 국부적인 면역반응의 향상 등을 가져 온다고 보고되어 있다 [19]. 한편 독일 및 스위스 등에서는 *Enterococcus faecium* SF68을 이용한 인체의 설사방지용 약제가 상품화되어 있다 [13].

장내세균 중에서 probiotics strain의 유용한 기능으로써 항종양활성의 효과는 아직까지 확립된 것은 아니나,

유산균을 중심으로 많이 보고되어 있으며, 그 활성의 본체는 세포벽 성분이라는 것이 밝혀져 있다 [20]. 즉 *Mycobacterium bovis*의 세포벽 성분에서 분리된 Bacillus Calmette-Gueri (BCG)의 면역활성화 기능과 항종양작용은 그 활성의 기본구조가 muramyl peptide (MDP)라는 것이 밝혀져, *Salmonella typhimurium* 유래의 lipopolysaccharide (LPS)와 함께 생물학적 실험에 이용되고 있다. 한편 Gram 양성균인 *Lactobacillus casei* YIT 9018의 세포벽 성분인 polysaccharide-peptidoglycan도 항암활성을 보유하고 있으며, 이의 화학적 조성은 glucose, rhamnose, glucosamine 및 galactosamine (1:2.1:0.9:0.9) 등으로 보고되어 있다 [9].

본 연구에서는 전보 [12]에서 보고된 신생아의 분변에서 분리한 *Ent. faecalis* 2B4-1의 종양세포 증식억제 효과를 나타내는 성분을 규명하기 위한 연구의 일환으로, 균체를 추출하여 추출물과 잔사 별로, 또한 분획된 세포벽 성분 별로 종양세포 증식억제 효과를 관찰하였고, 증식억제 효과가 확인된 polysaccharide 분획의 구성 당 성분

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

을 분석하였다.

**재료 및 방법**

**균체 추출물의 조제**

신생아 분변에서 분리동정한 *Ent. faecalis* 2B4-1을 전보 [12]의 방법으로 균체를 조제하여 다음의 방법으로 추출하였다. Ethanol 또는 acetone에 의한 추출 시에는 동결건조된 분리균체 500 mg에 50 ml의 용매를 넣고 실온에서 12시간 동안 교반하여 원심분리(39,000×g, 20 min, 4℃)한 후, 상징액과 잔사를 각각 농축하여 동결건조하였다. 열수추출의 경우에는 동결건조된 분리균체 500 mg에 50 ml의 증류수를 첨가하여 100℃에서 30분간 추출한 후, 상기의 원심분리, 농축 및 동결건조 처리를 하였다. 이들 추출물의 clonogenic assay는 10 mg/ml의 농도로 멸균증류수에 용해하여 0.1 N NaOH용액의 소량 첨가로 pH 7.0으로 보정한 후, 상징액은 millipore filter(0.45 μm)로 제균하였고, 잔사는 100℃에서 30분간 살균처리하여 적용하였다.

**세포벽 성분의 분리**

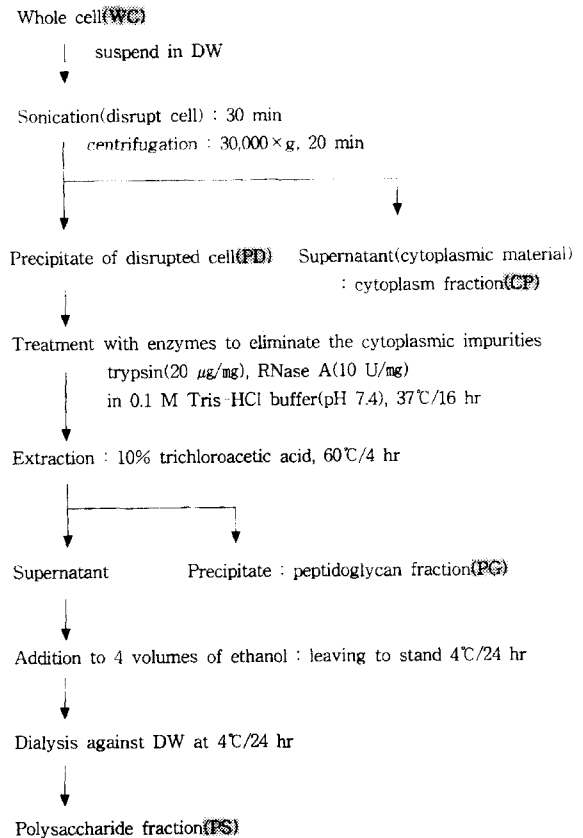
세포벽 성분의 분리는 Sato 등[15]의 방법에 따라 Fig. 1과 같이 실시하였다. 즉 동결건조된 균체를 50 mg/ml의 농도로 증류수에 현탁하여 30분간 초음파 처리한 다음, 원심분리(30,000×g, 20 min)하여 침전물(precipitate of disrupted cell, PD)과 상징액(cytoplasm fraction, CP)으로 분리하였다. 침전물은 37℃에서 16시간 효소처리(20 μg/mg trypsin and 10 U/mg RNase A)한 후, 여기에 10% trichloroacetic acid를 첨가하여 60℃에서 4시간 반응시켜 단백질을 침전시킨 후, 침전물을 peptidoglycan 성분(peptidoglycan fraction, PG)으로 하였다. 상징액에 4배량의 ethanol을 첨가하여 4℃에서 24시간 동안 정치시키고 원심분리하여 얻은 침전물을 4℃에서 24시간 투석시킨 다음, 동결건조하여 polysaccharide 성분(polysaccharide fraction, PS)으로 하였다.

**종양세포 증식억제 효과의 측정**

균체 추출물과 세포벽 성분의 종양세포 증식억제 효과 측정을 위한 종양세포주, 사용배지 및 clonogenic assay (CA)는 전보[12]와 같은 방법으로 실시하였다.

**Polysaccharide fraction의 특성분석**

원소분석은 Automatic elemental analyzer(Elemental Analysis system GmbH Vario EL)를 사용하였으며, IR spectrum은 시료를 KBr pellet 형태로 제조하여 FT-IR spectrometer(Perkin Elmer System 2000, FT-IR)에 의해 측정하였다. Polysaccharide fraction의 구성 당의 분석은 시료 2 mg을 2 N trifluoroacetic acid(TFA)



**Fig. 1. Procedure for the fractionation of cellular components of *Enterococcus faecalis* 2B4-1.**

0.2 ml에 용해하여 100℃에서 경시적으로 가수분해한 다음, TLC와 HPLC 분석을 통해 구성 단당류를 확인하였다.

TLC 분석시 TLC plate는 상품화된 silica gel 60 F 254(20×20 cm, MERCK)를 0.5 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 용액에 담긴 후 100℃에서 2시간 건조시켜 사용하였다[3]. 전개용매 A는 water, 2-propanol 및 acetone을 60:120:80의 비율로 혼합한 260 ml의 용매에 lactic acid 300 mg을 용해하여 조제하였으며, 전개용매 B는 A용액에 80 ml의 증류수를 더 첨가하였다. TLC상에 전개된 가수분해물의 발색은 2% p-anisaldehyde의 ethanol 용액을 분무하여 150℃에서 약 1분간 가열하여 표준 단당류의 R<sub>f</sub> 및 정색 등과 대조하여 판별하였다. HPLC 장치는 Hewlett Packard 1100 series(autoinjector, pump, UV detector 등)를 사용하였고, 검출파장은 191 nm이었다. 분리 column은 BONDCLONE 10 NH<sub>2</sub>(300×3.9 mm, Phenomenex)를 사용하였고, 이동상은 water:acetonitrile(20:80, v/v)이며 유속은 1.0 ml/min으로 실온에서 실시하였다.

**결과 및 고찰**

**균체추출물의 종양세포 증식억제 효과**

**Table 1. Percent survival in clonogenic assay of various tumor cell lines treated with solvent extract and residue (100 µg/ml) of *Enterococcus faecalis* 2B4-1 grown in M17 broth and MILS broth\***

Cell lines	Media	Solvents					
		Hot water		Ethanol		Acetone	
		Extract	Residue	Extract	Residue	Extract	Residue
SNU-1	M17	51	27	38	28	87	16
	MILS	45	16	36	18	80	10
3LL	M17	33	25	62	36	69	35
	MILS	79	22	36	21	72	32
FARROW	M17	47	24	71	42	76	26
	MILS	56	23	84	23	73	28
HEC-1-B	M17	89	20	85	59	91	38
	MILS	88	24	88	43	91	40

\*Means of three replicated trails(p<0.05), sensitive i.e. % survival ≤30.

증식배지 M17 broth[Difco Lab.:0.5% tryptone, 0.5% soytone, 0.5% meat digest, 0.25% yeast extract, 0.05% ascorbic acid, 0.025% magnesium sulfate, 1.9% disodium-β-glycerophosphate and 5.0% lactose solution(10%); pH 6.9±0.2]와 MILS broth[12]에서 배양된 *Ent. faecalis* 2B4-1의 균체를 열수, ethanol 및 acetone 등으로 각각 추출하여 그 상징액과 잔사 별로 각 종양세포주에 대한 CA를 실시하여 검토한 결과는 Table 1에 정리하였다. 종양세포 증식억제의 측정에 사용한 10종의 종양세포주 중 SNU-1, 3LL, FARROW 및 HEC-1-B 등은 열수, ethanol 및 acetone의 추출잔사에 의해 약 30% 전후로 생존하였으며, 이는 각 상징액과 비교하여 잔사성분이 현저한 종양세포 증식억제 효과를 나타내는 것이다. 한편 본 실험에서 검토된 나머지 6종의 종양세포주, SW-156, HEp-G2, SF-188, WiDr 및 CALU-3 등에 대한 상기 잔사 및 상징액의 증식억제 효과는 전

혀 나타나지 않았다(not shown).

각각의 증식배지에서 배양된 균체의 추출용매별 잔사의 농도를 500, 100 및 50 µg/ml로 조제한 후, 상기 조건에서 효과를 나타낸 SNU-1, 3LL, FARROW 및 HEC-1-B 등의 종양세포주에 대하여 농도별 효과를 측정된 결과는 Table 2에 나타낸 바와 같다. 즉, 추출잔사 100 µg/ml 이상의 농도에서 약 30% 전후의 종양세포 증식억제 효과를 얻을 수 있었으나, 50 µg/ml 농도에서는 모든 실험군에서 효과를 기대할 수 없었다.

검토된 2종류의 균체 증식용 배지의 영향에 있어서, 전반적으로 MILS broth의 경우가 M17 broth를 사용하였을 때 보다 다소 양호한 증식억제 효과를 나타내었으나, 검토된 열수, ethanol 및 acetone 등의 추출용매별 차이는 크게 인정되지 않았다.

**세포벽 분획물의 종양세포 증식억제 효과**

**Table 2. Percent survival in clonogenic assay of various tumor cell lines treated with residue of *Enterococcus faecalis* 2B4-1 grown in M17 broth and MILS broth\***

Cell lines	Medium	Solvents								
		Hot water			Ethanol			Acetone		
		Concentration of residue (µg/ml)								
		500	100	50	500	100	50	500	100	50
SNU-1	M17	15	27	78	19	28	95	6	16	89
	MILS	7	16	70	9	18	90	4	10	85
3LL	M17	10	25	99	25	36	98	25	35	94
	MILS	9	22	90	14	21	95	23	32	99
FARROW	M17	12	24	94	18	42	96	15	26	99
	MILS	10	23	95	14	23	94	16	28	90
HEC-1-B	M17	5	20	89	36	59	100	21	38	85
	MILS	12	24	89	30	43	95	29	40	90

\*Means of three replicated trails (p<0.05), sensitive i.e. % survival ≤30.

**Table 3. Percent survival in clonogenic assay of various tumor cell lines treated with cellular components of *Enterococcus faecalis* 2B4-1 (100 µg/ml)\***

Cell lines	PS	PG	CP	PD	WC	Filtrates**
SNU-1	20	28	69	25	17	66
RAJI	65	89	81	50	37	60
3LL	80	73	93	75	28	75
FARROW	28	51	99	27	25	85
HEC-1-B	38	51	58	36	30	56
SW-156	76	69	82	68	100	78
HEp-G2	89	77	94	86	72	84
SF-188	92	100	90	81	100	79
WiDr	63	58	100	100	66	100
CALU-3	100	100	100	96	69	83

\*Means of three replicated trails (p<0.05), sensitive i.e. % survival ≤30, \*\*adjusted to pH 7.0, PS, polysaccharide fraction; PG, peptidoglycan fraction; CP, cytoplasm fraction; PD, precipitate of disrupted cell; WC, whole cell.

*Ent. faecalis* 2B4-1의 세포벽 성분을 분획하여 각 분획물의 종양세포 증식억제 효과를 검사한 결과는 Table 3에 나타내었다. 본 실험에서 검토된 종양세포주 10종 중 SW-156, HEp-G2, SF-188, WiDr 및 CALU-3 등에 대하여는 *Ent. faecalis* 2B4-1의 whole cell(WC) 뿐만 아니라 그의 세포벽 분획물에 의한 종양세포 증식억제 효과는 거의 나타나지 않았으나, SNU-1, RAJI, 3LL, FARROW 및 HEC-1-B 등의 종양세포주에 대하여는 WC에서 약 20~30% 전후의 현저한 증식억제 효과를 보였다.

상기 효과를 보인 WC를 세분하여 얻은 cytoplasm fraction(CP)에서는 전혀 효과를 보이지 않은 반면에 CP를 제외한 disrupted cell precipitate(PD)에서 효과를 나타내었고, 이 PD를 다시 세분한 peptidoglycan(PG)와 polysaccharide fraction(PS)에 있어서, SNU-1에 대하여는 PS와 PG 모두 30% 이하의 증식 억제율을 보였으며, FARROW와 HEC-1-B는 PD분획중 PG보다는 PS에서 보다 우세한 효과를 나타내었다. 한편 WC에서 30%전후의 효과를 나타낸 RAJI와 3LL의 경우, WC의 분획인 CP 및 PD(PG, PS) 등에서는 그에 상응하는 효과를 나타내지 못하였는데, 이와 같이 WC와 WC의 세부 분획과의 비교에서 오히려 세부 분획물의 효과가 약해지는 점은 분획시의 물리적 손상과 전후처리 조건 등의 영향에 의한 것으로 사료된다. 또한 세포벽 각 분획의 농도에 따른 SNU-1과 FARROW의 증식억제 효과는 100 µg/ml 이상의 농도에서 10~30%의 증식억제 효과를 보였고, 50 µg/ml의 농도에서는 거의 효과를 나타내지 않았다(Table 4).

결과적으로 본 연구에서 *Ent. faecalis* 2B4-1의 균체와 세포벽 분획물을 10종의 종양세포주에 대해 직접적인 증식억제 효과의 보유여부를 CA를 통해 측정 한 바, WC의

**Table 4. Percent survival in clonogenic assay of tumor cell lines of SNU-1 and FARROW treated with cellular components of *Enterococcus faecalis* 2B4-1\***

Fractions	Concentrations (µg/ml)	Cell lines	
		SNU-1	FARROW
PS	500	14	20
	100	20	28
	50	89	93
PG	500	22	32
	100	30	51
	50	85	90
PD	500	15	17
	100	24	25
	50	85	90
WC	500	7	10
	100	19	24
	50	75	94

\*Means of three replicated trails (p<0.05), sensitive i.e. % survival ≤30, PS, polysaccharide fraction; PG, peptidoglycan fraction; PD, precipitate of disrupted cell; WC, whole cell.

CP 분획에서는 전혀 효과가 없었던 반면, PD분획에서 효과를 보였다. 또한 이 PD분획을 세분한 PS와 PG 모두에서 증식억제 효과를 보였으나 PS분획이 다소 효과적인 결과를 얻었다.

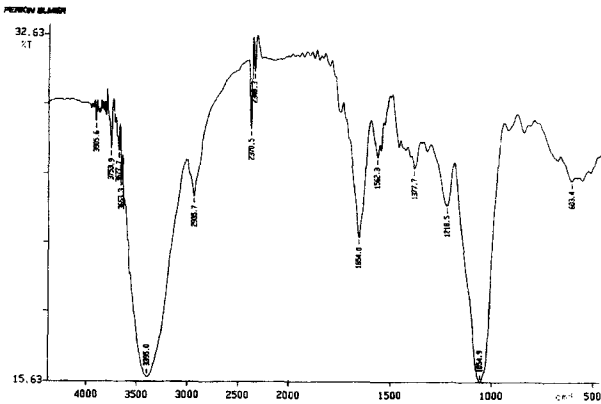
한편, Sekine 등[17]은 *in vitro* 실험에서 *Bifidobacterium infantis*에 의한 Meth A와 P388 암세포에 대한 DNA합성 저해를 검토한 결과, 1 mg의 농도까지 전혀 저해하지 않았다고 보고하였고, Manjunath 등[7]은 Trypanblue dye-exclusion test를 통해 *L. casei* D-34의 배양 여액이 HeLa, HEp-2 및 HFS-9의 종양세포주에 34~36%의 증식억제 효과를 가졌다고 하였다. 일반적으로 세균 유래의 종양세포 증식억제 효과의 본체는 대부분 세포벽 성분에 함유되어 있는 것으로 보고되어 있다[9, 20]. Yanagawa 등[21]은 biological response modifier (BRM) 제제의 작용 mechanism을 분석하기 위해 *in vitro* 상에서 sensitivity test 결과, OK-432와 bestatin은 약하게 cytotoxic하나 종양세포 증식억제에 효과적이라 하였다. Morinaga 등[8]은 *Eubacterium lentum*(TYH-11)은 Ehrlich ascites에 대해 직접적인 증식억제는 보이지 않았으나, *Serratia marcescens*(TY-142)는 증식억제 효과를 보였다고 하여, 이러한 결과들은 균주의 배양, 처리 및 검색방법 등의 차이에서 기인하는 것으로 사료된다.

**Polysaccharide fraction(PS)의 특성**

WC의 최종분획물로서 PG보다 효과적인 종양세포 증식억제 효과가 확인된 PS의 일부 이화학적 특성을 확인하여 Table 5에 정리하였다. 외관은 무정형의 분말로서, ninhydrin 양성반응의 amine이나 amide류의 존재를 확

**Table 5. Physico-chemical properties of polysaccharide fraction from *Enterococcus faecalis* 2B4-1**

Items	Properties
Appearance	amorphous powder
Elemental analysis (%)	C:38.7, H:6.7, N:3.2
Ninhydrin reaction	positive
IR(KBr) $\text{cm}^{-1}$	3395, 2935, 1054
Components of monosaccharide units	D-glucose, L-rhamnose, D-glucosamine



**Fig. 2. Infra-red absorption spectrum of polysaccharide fraction from *Enterococcus faecalis* 2B4-1.**

인하였다. 또한 원소분석에서는 C 38.7%, H 6.7%, N 3.2% 및 O 51.4%의 비율로 구성되어 있는 것으로 나타났다. 한편 IR spectrum(Fig. 2)에 있어서는 broad한  $3395\text{ cm}^{-1}$ 에서  $-\text{OH}(-\text{NH}_2)$ ,  $2935\text{ cm}^{-1}$ 에서의 C-H bent 및  $1054\text{ cm}^{-1}$ 의 강한 흡수 band로 부터 polysaccharide 에서 볼 수 있는 alicyclic 화합물의 전형적인 pattern을 확인할 수 있었다. Shiomi 등[18]에 의하면 Kefir grain 에서 분리한 수용성 polysaccharide의 원소구성은 C 41.8%, H 6.2% 및 N 0.2%이하이며, IR-spectrum은  $890\text{ cm}^{-1}$ 에 강한 흡수 band가 있어  $\beta$ -glycosidic bond가 존재함을 암시하였으나, 본 PS의 분석결과는 IR흡수대가 상이하여  $\beta$ -glycosidic bond의 존재 가능성은 희박한 것으로 생각되었다.

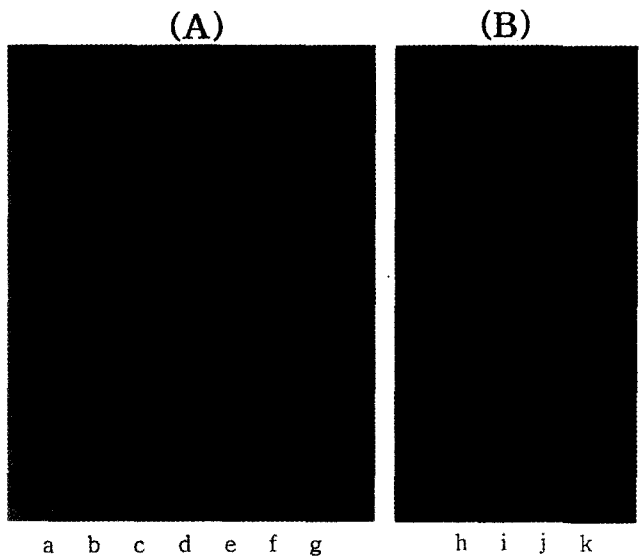
PS의 구성 당 성분을 파악하기 위하여 2 N trifluoroacetic acid(TFA)로 가수분해를 한 후 가수분해물의 경시적인 변화를 TLC에 전개하여 추적한 결과(Fig. 3), 산 가수분해 30분 후부터 가수분해에 의한 구성 단당류가 나타나기 시작하였고, 24시간 이후의 가수분해물은 점차 분해되는 것으로 확인되어, 가수분해 1~3시간 대의 전개 spots가 PS의 구성 당을 가장 잘 나타낸 것으로 판단하였다. 또한 구성 단당류의 정성확인을 위해 가수분해물 3시간대의 전개 spots를 N-acetylmuramic acid, D-mannose, L-rhamnose, D-glucose, D-galactose 및 N-acetyl-D-galactosamine 등의 표준물질과 비교 검토한



**Fig. 3. Thin layer chromatogram of 2 N TFA-hydrolyzate of polysaccharide fraction purified from *Enterococcus faecalis* 2B4-1 on silica gel plate (reaction times : a, 0; b, 0.5; c, 1; d, 3; e, 8; f, 24; g, 48 hr).**

\*TLC conditions

- ① TLC plate : damp pre-coated silica gel plates in 0.5 M  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  followed by drying, commercially available silica gel 60  $\text{F}_{254}$ , MERCK.
- ② developing solvent : dissolve 300 mg of lactic acid in water (60 ml), 2-propanol (120 ml) and acetone (80 ml).
- ③ detection method : 2% *p*-anisaldehyde reagent in ethanol.



**Fig. 4. Identification of sugar components of polysaccharide fraction possessed in *Enterococcus faecalis* 2B4-1 on silica gel TLC plate(standard sugar derivatives: a, N-acetyl muramic acid; b, D-mannose; c, L-rhamnose; d, TFA-hydrolyzate (3 hr); e, D-glucose; f, D-galactose; g, N-acetyl-D-galactosamine; h, TFA-hydrolyzate (3 hr); i, glucosamine; j, D-glucuronic acid, k; D-galacturonic acid).**

(A) TLC conditions were equal to Fig. 3. (B) Developing solvent: dissolve 300 mg of lactic acid in 2-propanol (120 ml), water(140 ml) and acetone (80 ml). Other conditions were equal to Fig. 3.

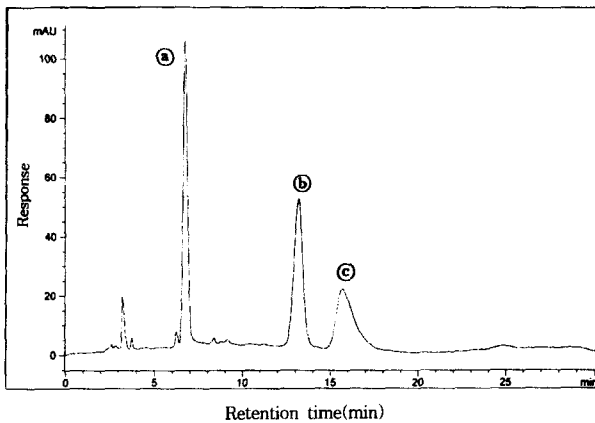


Fig. 5. HPLC chromatogram of 2 N TFA-hydrolyzate of polysaccharide possessed in *Enterococcus faecalis* 2B4-1. (a), L-rhamnose (6.7 min); (b), D-glucose (13.2 min); (c), D-glucosamine(15.7 min)

결과(Fig. 4, A), 구성 단당류는 D-glucose(Rf 0.54)와 L-rhamnose(Rf 0.76)로 구성되었음을 알 수 있었고, 이의 전개 spots 하단에 나타난 spot(Rf 0.1~0.2)를 확인하기 위해 전개조건을 달리하여 D-glucosamine, D-glucuronic acid 및 D-galacturonic acid 등의 표준물질과 비교한 결과(Fig. 4, B), D-glucosamine(Rf 0.25~0.39)이 존재함을 확인하였다. 따라서 이 PS는 3종의 단당류 즉 D-glucose, L-rhamnose 및 D-glucosamine로 구성되어 있음을 확인할 수 있었다.

한편, PS의 2N TFA에 의한 가수분해물(3 hr)을 HPLC에 적용하여 TLC 분석결과에서 얻은 표준물질로 비교 분석한 결과는 Fig. 5에서 보는 바와 같다. 즉 peak (a)는 L-rhamnose, (b)는 D-glucose, (c)는 D-glucosamine으로서 그 구성비는 약 1:1:1로 확인되었다. 이들 3종 단당류의 구성비는 PS의 원소분석 결과(Table 5)와도 거의 일치하는 것으로 나타났다.

Oda 등[10]은 *L. helveticus* var. *jugurti*가 생성한 항암 활성을 보유한 mucous polysaccharide의 구성 당은 glucose와 galactose(2:1)이었다고 하였으며, Ikawa 등[6]은 *Streptococcus faecalis* R의 세포벽에는 glucose와 rhamnose가 존재하고 galactose는 구성 당이 아니라고 하였는데, 이러한 단당류의 종류와 구성비의 차이점은 균주나 분리정제 방법의 상이에 기인된 것으로 사료된다.

## 요 약

신생아의 분변에서 분리·동정된 *Enterococcus faecalis* 2B4-1의 세포벽 성분 에 의한 종양세포 증식억제 효과 및 활성분획인 polysaccharide fraction의 성분분석을 검토하였다.

균체추출물의 종양세포 증식억제 효과는 추출 상징액

보다 추출잔사에서 효과적으로 나타나, 100 µg/ml 이상에서 종양세포 SNU-1, 3LL, FARROW 및 HEC-1-B 등에 대하여 30% 전후의 생존율을 보였다. 열수, ethanol 및 acetone 등의 추출 용매별 활성의 차이는 인정되지 않았으나, 증식배지 M 17보다 MILS 배지상에서 균체로부터 우세한 활성을 보였다.

*Ent. faecalis* 2B4-1 세포벽 성분중 SNU-1, FARROW 및 HEC-1-B 등의 종양세포주에 대해 증식억제 효과를 나타낸 whole cell(WC)을 분획한 결과, cytoplasm fraction(CP)에서는 전혀 증식억제 효과가 없었으나, 침전물인 PD분획에서 활성을 보였다. 이 disrupted cell precipitate(PD)분획을 다시 세분한 경우, peptidoglycan(PG)와 polysaccharide fraction(PS) 모두에서 활성을 나타냈으나, PG보다 PS의 분획이 다소 우세한 억제 효과가 있음이 인정되었다.

Polysaccharide fraction의 구성 단당류는 원소분석, IR spectrum, TLC 및 HPLC 등의 결과에 의해, D-glucose, L-rhamnose 및 D-glucosamine이고, 그 구성비는 약 1:1:1로 확인되었다.

## REFERENCES

- Berg, R. D. 1998. Probiotics, prebiotics or 'conbiotics'?. *Trends Microbiol.* **6**: 89-92.
- Biller, J. A, A. J. Katz, A. F. Flores, T. M. Buie, and S. L. Gorbach. 1995. Treatment of recurrent *Cl. difficile* colitis with *Lactobacillus* GG. *J. Pediatric Gastroenterol. Nut.* **21**: 224-226.
- Chaplin, M. F. 1986. Monosaccharides, pp. 1-36. In M. F. Chaplin and J. F. Kennedy(eds.), *Carbohydrate analysis*. IRL Press Ltd., Oxford.
- Custy, F. F. and M. S. Khem. 1990. Anticarcinogenic and immunological properties of dietary lactobacilli. *J. Food Protect.* **53**: 704-710.
- Guarner, F. and G. J. Schaafsma. 1998. Short communication probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* **39**: 237-238.
- Ikawa, M. and E. E. Snell. 1960. Cell wall composition of lactic acid bacteria. *J. Bio. Chem.* **235**: 1376-1382.
- Manjunath, M. and B. Ranganath. 1989. A cytotoxic substance produced by a wild culture of *Lactobacillus casei* D-34 against tumor cells. *Indian J. Exper. Biol.* **27**: 141-145.
- Morinaga, S., K. Sakamoto, and K. Konishi. 1988. Antitumor activity and its properties of *Eubacterium lentum*. *Jpn. J. Cancer Res.* **79**: 117-124.
- Nomoto, K., M. Nagaoka, T. Yokokura, and M. Mutai. 1989. Augmentation of resistance of mice to bacterial infection by a polysaccharide-peptidoglycan complex(PSPG) extracted from *L. casei*. *Biotherapy* **1**: 169-177.
- Oda, M., H. Hasegawa, S. Komatsu, M. Kambe, and F. Tsuchiya. 1983. Anti-tumor polysaccharide from *Lacto*.

- bacillus* sp. *Agri. Biol. Chem.* **47**: 1623–1625.
11. Ozawa, K., K. Yabu-uchi, K. Yamanaka, Y. Yamashita, S. Nomura, and I. Oku. 1983. Effect of *Streptococcus faecalis* BIO-4R in intestinal flora of weanling piglets and calves. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1513–1518.
  12. Park, S. J., D. S. Lim, S. K. Yoon, Y. J. Baek, and C. H. Kim. 1998. Isolation and identification of *Enterococcus faecalis* 2B4-1 containing antitumor substances. *Kor. J. Appl. Microbiol.* **26**: 471–475.
  13. Reuter, G. 1997. Present and future of probiotics in Germany and in central Europe. *Biosci. Microflora* **16**: 43–51.
  14. Sanders, M. E. 1993. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: Significance to fluid milk products containing cultures. *J. Dairy Sci.* **76**: 1819–1828.
  15. Sato, K., H. Saito, H. Tomioka, and T. Yokokura. 1988. Enhancement of host resistance against *Listeria* infection by *Lactobacillus casei*: Efficacy of cell wall preparation of *Lactobacillus casei*. *Microbiol. Immunol.* **32**: 1189–1200.
  16. Schiffrin, E., F. Rochat, H. Link-Amster, J. Acechimann, and A. Donnet-Hugues. 1995. Immunomodulation of blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. *J. Dairy Sci.* **78**: 491–497.
  17. Sekine, K., T. Toida, M. Saito, M. Kuboyama, T. Kawashima, and Y. Hashimoto. 1985. A new morphologically characterized cell wall preparation (whole peptidoglycan) from *B. infantis* with a higher efficacy on the regression of an established tumor in mice. *Cancer Res.* **45**: 1300–1307.
  18. Shiomi, M., K. Sasaki, M. Murofushi, and K. Aibara. 1982. Antitumor activity in mice of orally administered polysaccharide from kefir grain. *Japan J. Med. Sci. Biol.* **35**: 75–80.
  19. Tortuero, F., J. Rioperez, E. Fernandez, and L. Rodriguez. 1995. Response of piglets to oral administration of lactic acid bacteria. *J. Fd. Protect.* **58**: 1369–1374.
  20. Tsuyuki, S., S. Yamazaki, H. Akashiba, H. Kamimura, K. Sekine, T. Toida, M. Saito, T. Kawashima, and K. Ueda. 1991. Tumor-suppressive effect of a cell wall preparation, WPG, from *Bifidobacterium infantis* in germfree and flora-bearing mice. *Bifidobacteria Microflora* **10**: 43–52.
  21. Yanagawa, T., M. Oguro, T. Tagaki, and K. Takenaga. 1984. Direct antitumor activity of biological response modifiers (BRM) proven by *in vitro* sensitivity test. *Gan To Kagaku Ryoho* **11**: 2155–2162.

(Received December 7, 1998)