

## 정장제, 신생아 분변 및 병원에서 분리한 장구균의 병독성인자 비교

이정현<sup>1</sup>, 황성우<sup>2</sup>, 강경란<sup>2</sup>, 김동희<sup>2</sup>, 김천규<sup>3\*</sup>

### Comparison of Virulence Factors of Enterococci from Intestinal Drugs, Infant Feces and Clinical Isolates

Jeong-Hyun Lee<sup>1</sup>, Sung-Woo Hwang<sup>2</sup>, Kyung-Ran Kang<sup>2</sup>, Dong Hee Kim<sup>2</sup>, and Chun-Gyu Kim<sup>3\*</sup>

접수: 2013년 2월 9일 / 게재승인: 2013년 2월 25일  
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Three isolates, *E. faecium* P1, P2 and P3, from intestinal drugs of three pharmaceutical companies, four clinical vancomycin resistant isolates, *E. faecium* V1, V2, V3 and *E. faecalis* V4, and three isolates, *E. faecalis* DW01, DW07 and DW14, from infant feces were tested for the presence of virulence genes, *ace*, *agg*, *esp*, *efaA*, *gelE*, *sprE*, *vanA* and *vanB* as well as *fsrABC*, regulatory genes of *gelE* and *sprE*, *cylMBA*, cytolysin activation genes and *cpd*, *cob* and *ccf*, pheromone genes by PCR and for their phenotype activities such as protease, biofilm formation, cell clumping and hemolysis. The genes encoding cell surface adherence proteins, *ace*, *agg*, *esp* and *efaA*, were predominantly amplified from the vancomycin resistant strain V4 and the fecal isolates DW01, DW07 and DW14. Both protease and biofilm formation activity were detected only from *E. faecalis* V4 from which the PCR products of *gelE* and *sprE* as well as *fsrABC* were amplified. The pheromone genes were amplified from the V4, DW01, DW07 and DW14 strains and these strains showed

clumping activity. Biofilm formation was observed from the strains DW01, DW07 and DW14, all of which produced PCR products of pheromone, and V4 as well. Whole cytolysin regulator genes were amplified from DW01, DW07 and DW14 and  $\beta$ -hemolysis activity was detected from these strains. Any virulence genes or activities except the pheromone gene *ccf* were not detected from the pharmaceutical isolates, *E. faecium* P1, P2 and P3.

**Keywords:** Virulence factor, Enterococcus, Biofilm, Clumping, Hemolysis

### 1. 서론

장구균 (Enterococcus)은 Lactobacillus, Bifidobacterium, Bacillus 등과 함께 정장제 (intestinal drugs), 생균제 (probiotics) 등으로 이용하고 있다. 이들은 변비, 복부 팽창감, 설사 등의 증상을 완화 또는 치료하기 위해 이용될 뿐만 아니라 항암작용, 혈장 콜레스테롤 강하, 혈압강하, 항생제로 인한 장내균총 불균형 조절, 면역기능 유지 등의 기능도 있음이 보고되고 있다 [1].

미생물은 유전자를 서로 교환할 수 있는 능력이 있기 때문에 정장제 또는 생균제로 이용하기 위해서는 병독성인자 (virulence factor) 또는 항생제 내성인자 등과 같은 유해인자를 보유하고 있지 않다는 것을 입증해야 한다 [2,3].

병원성 장구균은 인간의 조직에 부착하여 손상을 일으키고, 생물막을 형성하며, 용혈을 유발하는 병독성인자로 인해 요로관 감염, 세균성 심내막염, 치주염, 균혈증, 담즙관 감염,

<sup>1</sup>경상대학교 수의학과

<sup>1</sup>Department of Veterinary Medicine, Gyeongsang National University, Jinju 660-701, Korea

<sup>2</sup>대우제약(주) 중앙연구소

<sup>2</sup>R&D Center, Daewoo Pharmaceutical Company, Busan 604-836, Korea

<sup>3</sup>인제대학교 제약공학과

<sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Engineering, Inje University, Gimhae 621-749, Korea

Tel: +82-55-320-3397, Fax: +82-55-327-4955

e-mail: pecgkim@inje.ac.kr

뇌수막염 등과 같은 감염을 유발한다고 보고되고 있다 [2].

병독성인자의 유전자 교환에 의한 전파 가능성으로 인해 장구균의 안전성에 대한 확인이 필요하지만 판매되고 있는 정장제 및 생균제에 대한 병독성인자의 확인실험은 부족한 실정이다. 본 연구는 국내외에서 정장제로 많이 이용되고 있지만 최근 안전성이 논란이 되고 있는 장구균을 대상으로 병독성인자를 확인 및 비교하고자 하였다. 이를 위해 국내에서 정장제로 판매하고 있는 세 종류 제품에서 분리한 장구균, 병원에서 분리한 vancomycin 내성균 및 신생아에서 분리한 장구균 등으로부터 병독성 인자와 유해효소의 존재를 확인 및 비교하였다.

장구균의 병독성인자로써 세포벽 표면단백질인 Ace (adhesin to collagen of *E. faecalis*), Agg (aggregation substance), Esp (enterococcal surface protein) 및 EfaA (*Enterococcus faecalis* antigen A) 등과 분해단백질인 GelE (gelatinase), SprE (serine protease) 및 cytolysin 등이 있다 [4].

Vancomycin에 대한 내성의 원인이 되는 VanA, VanB 등도 정장제로 이용하는 장구균에 존재하면 안 되는 인자이다. 장구균이 *vanA* 유전자를 보유할 경우 vancomycin과 teicoplanin 모두에 대해 내성을 보이며 *vanB* 유전자를 보유할 경우 vancomycin에 내성을 보이지만 teicoplanin에는 감수성을 보인다. Vancomycin 내성균주는 항생제 사용에 의해 선택적으로 증식될 수 있기 때문에 내성균주가 병독성인자를 보유하고 있을 경우 감염성 질환이 확산될 확률이 높아진다 [5].

Ace는 collagen에 결합하여 장구균의 조직부착을 도우며, Agg는 세포외기질에 부착되어 감염을 유발한다. 페로몬을 분비하는 균주는 접합 (conjugation)에 의한 유전자 전이 및 *agg*의 발현을 유인할 수 있기 때문에 잠재적인 병독성인자로 분류하며 현재까지 Cpd, Cob, Ccf를 포함하는 7 종류의 페로몬이 분리되었다 [6]. Esp는 요로 및 심장카테터에서 장구균의 군집과 유지를 돕고 생물막 형성에도 역할을 하는 것으로 보고되었다. EfaA는 *E. faecalis*에서 심내막염 유발 가능한 adhesin으로 알려져 있지만 *E. faecium*에서는 그 기능이 명확하지 않다 [7].

GelE와 SprE는 protease로 gelatin, casein, collagen, fibrin 등에 대한 광범위한 분해활성이 있으며 생물막 형성에 관여하고 동물감염 모델에서 병원성을 증가시키는 것으로 알려졌다. GelE와 SprE는 2성분 조절유전자인 *fsrABC*에 의해 발현이 조절된다 [8]. Cytolysin은 *cyIMBA* 유전자에 의해 활성화 및 분비되어 적혈구 및 식세포를 분해하는 활성을 보인다. 균주가 Cytolysin에 대해 활성이 있으면서 항생제 내성인 경우 병원성이 증가하는 결과가 발표되기도 하였다 [9].

본 연구에서는 정장제의 안전성을 평가하기 위해서 병독성 유전자의 존재를 PCR로 탐색하였으며 병독성인자인 Agg, GelE, SprE, cytolysin, 페로몬의 경우 생화학 실험을 통해 활성을 측정하였다. 미생물이 장내에서 유해효소를 생산하면 효소반응 생성물로 인한 질병 가능성이 있기 때문에 azoreductase, nitrate reductase, cysteine desulfurase, coagulase, DNase, urease, lipase 등의 유해효소에 대한 활성실험도 실시

하였다 [10].

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 균주

표준균주로 *E. faecalis* S1 (ATCC29212)과 *E. faecium* S2 (ATCC19434), 병원에서 분리한 세 종류의 vancomycin 내성 *E. faecium* V1, V2, V3와 V583으로 알려진 내성 균주 *E. faecalis* V4 (ATCC700802), 신생아 분변으로부터 분리한 세 종류의 *E. faecalis* 균주 DW01, DW07 및 DW14, 국내에서 의약품으로 이용하고 있는 정장제 세 가지 제품에서 분리한 *E. faecium* P1, P2 및 P3를 사용하였다. ATCC 균주는 종균은행에서 분양 받았으며 DW 균주는 신생아의 변에서 분리하였고, P 균주는 제품에서 분리하였다. 실험 대상균주는 현미경 분석, 선택배지 분리배양, 16S rDNA 염기서열 분석 및 API 키트를 이용한 실험을 실시하여 균주동정을 하였지만 이 결과는 본 연구에 포함하지 않았다.

### 2.2. PCR 반응

Total DNA를 분리하기 위해 균주를 TSB 3 mL에 접종한 후 37°C에서 12시간 배양하였다. 7500 rpm으로 3분 동안 원심분리 하여 균을 모은 다음 문헌에 알려진 방법으로 total DNA를 분리하였다 [11]. PCR에 이용한 primer는 NCBI의 유전자은행에서 해당 유전자 염기서열을 참조하여 제작 의뢰하였다 (Table 1). PCR을 수행하기 위한 조성은 2.5 mM dNTP 4 µL, 10 X PCR buffer 2.5 µL, total DNA 0.5 µL, DMSO 1.5 µL, primer (F) 20 pmol 0.5 µL, primer(R) 20 pmol 0.5 µL, 증류수 15 µL, nTaq<sup>tm</sup> polymerase (Bio-Rad, USA) 0.5 µL이다. PCR 과정에서 cycle I은 95°C에서 7분, cycle II (30 cycle)는 95°C에서 1분, 55°C에서 1분, 72°C에서 1분, cycle III는 72°C에서 7분 수행하였다. PCR 기계는 Eppendorf Gene Cycler (Germany, Hamburg)를 사용하였다. PCR에 사용한 primer 합성은 (주)바이오닉스에 의뢰하였다.

### 2.3. Gelatinase와 Serine protease 활성측정

Gelatinase 측정을 위해 3% gelatin 배지 (peptone 0.5%, yeast extract 0.3%, gelatin 3%, agar 1.5%), serine protease 측정을 위해 skim milk 배지 (skim milk 2%, beef extract 0.3%, peptone 0.5%, agar 1.5%)에 균을 접종하고 37°C에서 24-48 시간 배양하였다. 0.5 mL Frazier 용액 (mercuric chloride 15 g, 38% 염산용액 20 mL, 증류수 100 mL)을 배지에 넣었을 때 균 주위에 투명환이 생기면 양성반응이다 [12].

### 2.4. Hemolysis 측정

Thermo Fisher Scientific Inc. (UK, Hampshire)의 Oxoid 혈액천 배지 (Lab-Lemco powder 1%, peptone 1%, sodium chloride 0.5%, sheep blood 5%, agar 1.5%)에 균을 접종하고 37°C에서 48시간 혐기성 배양하였다 [13].

**Table 1.** PCR primers for detection of virulence genes

Gene <sup>1)</sup>	Primer sequence (5' to 3')	Gene bank accession number	Anticipated product size (bp)
<i>ace</i>	AAGTAGAATTAGATCACACTCTATCACATTCGGTTGCG	JF512475.1	320
<i>agg</i>	AAGAAAAAGAAGTAGACCAACAACGGCAAGACAAGTAAATA	X17214.1	1,150
<i>gelE</i>	ACCCCGIATCATTGGTTTACGCATTGCTTTTCCATC	EU862241.3	419
<i>sprE</i>	GTCAATCGGAAGAATCACTGCTGGCACAGCGGATA	HE574483.1	649
<i>fsrA</i>	CTAAGTAAAGAAATAGTGCCTTGAATGAGTGAACAAATGGCTATTTA	HE574483.1	743
<i>fsrB</i>	CATCAGACCTTGGATGACGACGGAATACGATCATCGTGTG	HE574483.1	854
<i>fsrC</i>	CAACCGTGCTCTTCTGGATTAGAGTAAACATTGATCAAGATTGA	HE574483.1	1,140
<i>cylM</i>	CTGATGGAAAGAAGATAGTATTGAGTTGGTCTGATTACATT	L37110.1	742
<i>cylB</i>	ATTCCCTACCTATGTTCTGTTAAATAAACTCTTCTTTTCCAAC	L37110.1	843
<i>cylA</i>	TGGATGATAGTGATAGGAAGTTCTACAGTAAATCTTTCGTC	L37110.1	517
<i>esp</i>	TTGCTAATGCTAGTCCACGACCGCGTCAACACTTGCATTGCCGAA	AF034779.1	933
<i>efaAfs</i>	GACAGACCCTCACGAATAAGTTCATCATGCTGTAGTA	CP002621.1	705
<i>efsAfm</i>	AACAGATCCGCATGAATACATTCATCATCTGATAGTA	AF042288.1	735
<i>cpd</i>	TACGGCTCTGGCTTACTATGGTGGGTATTTTTCAATTC	HF558530.1	782
<i>cob</i>	TTGTCATAAAGAGTGGTCATAACATTCAGCAAACAAAGC	HF558530.1	1,405
<i>ccf</i>	AGCCGCTAAAATCGGTAAAATGGGAATTGAGTAGTGAAGAAG	HF558530.1	543
<i>vanA</i>	TTGGGGTTGCTCAGAGGAGCTTCGTTCAATGCGG	JN207933.1	931
<i>vanB</i>	AATGCGGGGAGGATGGTGC GGATGCGGAAGATACCGTGGC	JF411081.1	446

<sup>1)</sup>*ace*, adhesion to collagen of *E. faecalis*; *agg*, aggregation substance gene; *gelE*, gelatinase; *sprE*, serine protease; *fsrABC*, two-component regulator system of *gelE* and *sprE*; *cytA*, cytolysin activation, *cylM*, cytolysin modification, *cylB*, cytolysin transport; *efaAfs*, *E. faecalis* antigen A; *efsAfm*, *E. faecium* antigen A; *cpd/cob/ccf*, sex pheromones; *esp*, enterococcal surface protein; *vanAB*, vancomycin resistance determinants A and B.

## 2.5. 생물막 형성 측정

Kristich 등의 방법을 약간 변형하여 측정하였다 [14]. TSB 3 mL에 균을 접종한 후, 37°C에서 16시간 배양하였다. 균 배양액 10 µL와 1% glucose 포함하는 TSB 1 mL를 24-well 배양판에 넣고 37°C에서 24시간 교반없이 배양하였다. 증류수 3 mL로 배양판을 5회 씻어준 후 1% crystal violet 용액 500 µL로 15분 동안 염색한 뒤 수돗물로 5회 세척하였다. 95% ethanol 2.5 mL로 탈색하고 OD<sub>570</sub>에서 흡광도를 측정하였다.

## 2.6. 페로몬 용액 제조 및 응집 (clumping) 측정

페로몬을 분비하는 DW01 균주에서 Jayanti 등의 방법을 이용하여 페로몬 용액을 얻은 후 응집실험에 이용하였다 [15]. 응집실험을 위해 BHI (brain heart infusion) 한천배지에서 키운 대장균주 콜로니 한 개를 BHI 배지 3 mL에 접종하여 5 × 10<sup>8</sup>/mL까지 키운 후 이 배양액 0.5 mL에 페로몬 용액 0.5 mL을 첨가하였다. 혼합액을 37°C에서 3시간 교반 배양 후 위상차 현미경으로 관찰하였다.

## 2.7. 유해효소 활성측정

Azoreductase 활성은 Rafii [16] 등의 방법에 따라 실험하였으며, coagulase (BD BBL™ coagulase plasma, USA, NJ, Cat No.240827)와 DNase (BD BBL™ DNase test agar, USA, NJ, Cat No.211179)는 활성측정 키트를 구매하여 제조사의 방법에 따라 측정하였다. Nitrate reductase, cysteine desulfurase, lipase, urease의 활성은 문헌 [10]의 방법에 따라 측정하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 장구균 병독성 유전자 및 활성 분석

PCR 방법으로 확인한 균주들의 병독성인자에 대한 유전자 분석 결과를 Table 2에 제시하였다. 장구균의 표면단백질로서 부착, 응집을 유발하는 병독성 유전자인 *ace*, *agg*, *esp*, *efaA*의 PCR 산물은 실험대상 균주 모두에서 한 가지 이상 발견되었다.

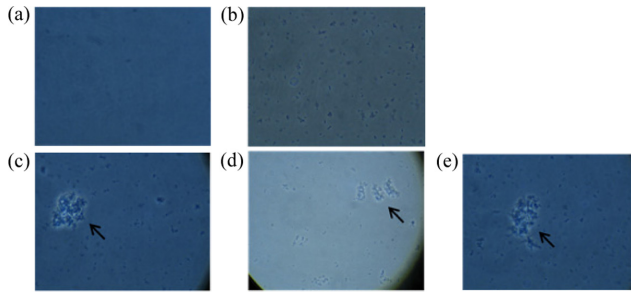
Collagen에 결합하는 단백질을 암호화하는 *ace*는 vancomycin 내성균주인 *E. faecalis* V4 및 표준균주인 *E. faecalis* S1에 존재하였지만 정상제에서 분리한 균주를 포함한 다른 균주에서는 발견되지 않았다.

장 및 신장 상피세포에 부착을 돕는 *agg* 유전자는 vancomycin 내성균주인 *E. faecalis* V4와 신생아 분변에서 분리한 *E. faecalis* DW01, DW07 및 DW14 균주에서 확인하였다. *Agg*는 페로몬을 분비하는 균주에 의해 발현이 유도되어 균주간의 응집을 돕기 때문에 페로몬 유전자인 *cpd*, *cob*, *ccf*를 보유하는 균주인 DW01의 발효액을 멸균 여과하여 얻은 상등액을 응집실험에 이용하였다 (Fig. 1). *agg* 유전자가 확인된 *E. faecalis* V4, DW07 및 DW14 균주는 응집반응을 보였지만 *agg* PCR 산물을 얻지 못한 정상제 분리균주 *E. faecium* P1은 응집반응을 보이지 않았다. Dunny 등이 발표한 결과 [17]와 같은 응집반응을 얻은 것으로 보아 페로몬 유전자를 보유하는 균주 *E. faecalis* DW01의 상등액에 의해 *agg* 유전자가 발현되어 응집반응이 일어난 것으로 해석할 수 있는 결과이다.

**Table 2.** Virulence genes identified by PCR from Enterococci

Strains	Virulence factors																	
	<i>ace</i>	<i>agg</i>	<i>cpd</i>	<i>cob</i>	<i>ccf</i>	<i>gelE</i>	<i>sprE</i>	<i>fsrA</i>	<i>fsrB</i>	<i>fsrC</i>	<i>cylM</i>	<i>cylB</i>	<i>cylA</i>	<i>esp</i>	<i>efaAfs</i>	<i>efaAfm</i>	<i>vanA</i>	<i>vanB</i>
<i>E. faecium</i> P1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecium</i> P2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecium</i> P3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>E. faecium</i> V1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-
<i>E. faecium</i> V2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>E. faecium</i> V3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-
<i>E. faecalis</i> V4	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+
<i>E. faecalis</i> DW01	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> DW07	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> DW14	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-
<i>E. faecalis</i> S1	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-
<i>E. faecium</i> S2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

The virulence factors were marked as + when the anticipated sizes of PCR products were obtained.



**Fig. 1.** Appearance of clumping cells induced by supernatant from *E. faecalis* DW01 containing the sex pheromone genes. (a) Control (supernatant of DW01), (b) *E. faecium* P1, (c) *E. faecalis* V4, (d) *E. faecalis* DW07, (e) *E. faecalis* DW14. Arrows show the clumping.

페로몬을 분비하는 균주는 병독성 유전자 또는 항생제내성 유전자의 전이를 유발할 수 있기 때문에 잠재적인 위험인자이며 본 연구대상의 균주 중에서는 정장제 분리 균주인 *E. faecium* P1과 vancomycin 내성균주인 *E. faecalis* V1만이 페로몬 유전자를 보유하고 있지 않았다. 페로몬 유전자인 *ccf*가 발견된 정장제 분리균주 *E. faecium* P2와 P3의 경우 유전자 전이의 가능성을 확인하는 실험을 통해 안전성을 확인해

야 할 것이다.

*Esp*는 장구균 요로감염에서 균주집락 형성 및 생물막 형성을 유발하는 단백질로 알려져 있으며 본 실험결과에서는 정장제 분리균주 *E. faecium* P1, P2, P3와 *E. faecium* S2 및 *E. faecalis* V4를 제외한 vancomycin 내성균주 *E. faecium* V1, V2, V3 및 신생아 분변 분리 균주 *E. faecalis* DW01, DW07, DW14에서 *esp* PCR 산물을 얻었다.

*efaA* 유전자는 V1 균주를 제외한 모든 균주에서 발견되었다. *EfaA*는 *E. faecalis*에서 심내막염 유발 가능한 adhesin으로 알려져 있지만 *E. faecium*에서는 그 기능이 명확하지 않다 [7]. *E. faecalis*와 *E. faecium*의 *EfaA* 아미노산 서열은 73% 정도의 유사성을 보이기 때문에 이 단백질의 아미노산 서열 일치 정도에 따라 *E. faecalis*와 *E. faecium*를 동정할 수 있는 기준으로 이용하기도 한다 [18].

*gelE*와 *sprE*는 단백질 분해 활성과 생물막 형성에 관여하는 유전자이다. 두 유전자는 *E. faecalis*인 V4, DW01, DW07, DW14 및 S1 균주에서 발견되었지만 *E. faecium*에서는 발견되지 않았다. *gelE*와 *sprE*를 보유하는 균주를 이용한 활성 실험을 실시하였지만 *E. faecalis* V4만이 단백질 분해활성을 보였다 (Table 3). *gelE*와 *sprE*가 발현되기 위해서는 조절유전

**Table 3.** Biochemical assays for virulence factors and virulence enzymes

Strains	Gelatinase (GelE)	Protease (SprE)	Biofilm formation	Hemolysis	Azoreductase
<i>E. faecium</i> P1	-	-	0.147	-	-
<i>E. faecium</i> P2	-	-	0.158	-	-
<i>E. faecium</i> P3	-	-	0.162	-	-
<i>E. faecium</i> V1	-	-	0.144	-	+
<i>E. faecium</i> V2	-	-	0.135	-	+
<i>E. faecium</i> V3	-	-	0.131	-	+
<i>E. faecalis</i> V4	+	+	0.419	-	+
<i>E. faecalis</i> DW01	-	-	0.846	+	+
<i>E. faecalis</i> DW07	-	-	0.699	+	+
<i>E. faecalis</i> DW14	-	-	0.489	+	+
<i>E. faecalis</i> S1	-	-	0.463	-	+
<i>E. faecium</i> S2	-	-	0.19	-	+

The + was marked when the each activity was detected.

자인 *fsrABC*가 필요하지만 단백질 분해활성을 보이는 V4 균주만이 이 유전자를 보유하고 있으며 이는 활성실험을 통해 얻은 결과와 일치하는 것이다.

생물막 형성에 관여하는 유전자는 *gelE*, *sprE* 및 *esp* 이지만, *esp* 유전자는 배양조건에 따라 생물막 형성정도가 다를 수 있다고 보고되었다 [19]. 생물막 형성과 유전자에 대한 연관성을 확인하기 위해 실험대상 균주에 대한 생물막 형성 정도를 측정하였다. Table 3에서 알 수 있는 것처럼 생물막 형성이 상대적으로 많은 균주는 *E. faecalis* V4 및 *E. faecalis* DW01, DW07, DW14 및 S1 균주였다. V4 균주의 생물막 형성은 *gelE*와 *sprE* 유전자를 연관시킬 수 있지만 *esp* 유전자의 경우는 생물막 형성이 적은 균주에도 존재하는 것으로 판단할 때 연관관계를 찾을 수 없었다. 발표된 자료에 의하면 페로몬을 분비하는 균주는 생물막 형성이 증가한다는 결과 [15]가 있으며 이를 실험대상 균주에 적용할 경우 페로몬 유전자인 *cpd*와 *ccf*를 모두 보유하는 균주인 *E. faecalis* V4, DW01, DW07, DW14 및 S1 모두 생물막 형성이 많은 것을 확인할 수 있었다. 본 실험대상 중 생물막 형성이 상대적으로 적은 균주는 모두 *E. faecium* 이고 생물막 형성이 많은 균주는 *E. faecalis* 였으며 이와 같은 결과는 다른 논문에서도 발표되었다 [20].

Cytolysin은 혈구세포 용혈 활성을 보이며 *CylMBA*에 의해 활성화되고 분비되기 때문에 이 단백질을 암호화하는 *cylMBA* 유전자의 존재를 PCR로 확인하였다 (Table 2). 온전한 *cylMBA*는 신생아 분변에서 분리한 균주인 *E. faecalis* DW01, DW07, DW14에서만 발견되었다. Cytolysin의 활성을 확인하기 위해서 혈액배지를 이용한 용혈실험을 실시한 결과 예상한 대로 *E. faecalis* DW01, DW07, DW14 균주만이 b-용혈 활성을 보였다 (Table 3).

Vancomycin 내성균주인 *E. faecium* V1, V2 및 V3 균주에서는 *vanA* 유전자, *E. faecalis* V4 균주에서는 *vanB* 유전자가 존재하였지만 다른 실험대상 균주에서는 내성유전자가 발견되지 않았다.

전체적으로 병독성 유전자는 본 실험대상 균주 중 *E. faecium* 보다는 *E. faecalis*에서 발견빈도가 높았으며 특히 신생아 분변에서 분리한 장구균에서 병독성 유전자가 높은 빈도로 발견된 것으로 보아 생활주변에서 병원성 장구균의 분포가 생각보다 심각할 수 있음을 보여주었다.

정장제 분리균주는 다른 균주와 비교할 때 병독성 유전자 PCR 산물이 존재하지 않아 상대적으로 안전성이 확인되었다고 할 수 있지만, 조직내 부착이나 괴사 유발 가능성 여부는 동물실험을 통해 확인할 필요가 있으며 이는 다음 연구과제로 수행할 예정이다.

### 3.2. 유해효소 활성 분석

미생물이 장내에서 유해효소를 생산하면 효소반응 생성물로 인해 여러 가지 질병이 유발된다. 본 연구에서는 유해효소로 azoreductase, cysteine desulfurase, coagulase, nitrate reductase, urease, lipase, DNase 등의 효소활성 실험을 실시

하였다.

Azoreductase 활성만이 정장제 분리균주를 제외한 모든 균주에서 확인되었으며 cysteine desulfurase, coagulase, nitrate reductase, urease, lipase, DNase 활성은 탐지되지 않았다 (Table 3). Azoreductase는 아조기를 포함하는 화합물을 발암물질인 방향족아민으로 환원시키는 유해효소이다. 아조화합물 중에서 특히 아조염료화합물이 직물, 의약품, 음식, 화장품 등의 여러 분야에서 사용이 되고 있는데, 장내 미생물에 의해 아조염료화합물이 분해되면 페닐아민 또는 나프틸아민이 생성되며 이들은 장점막에 존재하는 효소에 의해 산화되어 발암물질을 생성한다 [16].

## 4. 결론

의약품 정장제에서 분리한 *E. faecium* P1, P2, P3균주와 vancomycin 내성 *E. faecium* V1, V2, V3 및 *E. faecalis* V4 균주, 신생아 분변에서 분리한 *E. faecalis* DW01, DW07, DW14 균주에서 병독성 유전자의 존재 및 활성, 유해효소의 활성을 비교하여 정장제의 안전성에 대한 분석을 실시하였다.

정장제에서 분리한 균주에서는 페로몬 유전자인 *ccf*를 제외하고 병독성 유전자 및 활성 그리고 유해효소의 활성이 발견되지 않았으나 신생아 분변 분리 균주 및 vancomycin 내성 균주에서는 *ace*, *agg*, *cpd*, *cob*, *ccf*, *gelE*, *sprE*, *fsrABC*, *cylMBA*, *esp*, *cfAfs*, *vanA*, *vanB* 등의 유전자 및 유해효소로 azoreductase 활성이 발견되었다. 유전자의 존재를 입증하기 위한 활성실험에서는 gelatinase, serine protease, 생물막 형성, 응집반응 활성, 용혈활성 등이 발견되었다. 페로몬 유전자인 *ccf*가 발견된 *E. faecium* P2와 P3 균주의 경우 유전자 전이의 가능성이 있을 수 있으므로 이에 대한 안전성 검증이 필요하다.

## 감사

본 논문은 2004년 인제대학교 학술조성연구비 보조에 의한 것임.

## REFERENCES

1. Reid, G. J., Jass, M. T. Sebulsky, and J. K. McCormick (2003) Potential uses of probiotics in clinical practice. *Clin. Microbiol. Rev.* 16(4): 658-672.
2. Jett, B. D., M. M. Huycke, and M. S. Gilmore (1994) Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7(4): 462-478.
3. Report of a Joint FAO/WHO Working Group (2002) Guidelines for the evaluation of probiotics in food. 1-11.
4. Virulence factors of pathogenic bacteria. the State Key Laboratory

- for Molecular Virology and Genetic Engineering, Institute of Pathogen Biology, CAMS&PUMC. <http://www.mgc.ac.cn/cgi-bin/VFs/genus.cgi?Genus=Enterococcus>
5. Mundy, L. M. D. F. Sahm, and M. Gilmore (2000) Relationships between enterococcal virulence and antimicrobial resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 13: 513-522.
  6. Clewell, D. B. F. Y. An, S. E. Flanagan, M. Antiporta, and G. M. Dunny (2000) Enterococcal sex pheromone precursors are part of signal sequences for surface lipoproteins. *Mol. Microbiol.* 35: 246-247.
  7. Low, Y. L. N. S. Jakubovics, J. C. Flatman, H. F. Jenkinson, and A. W. Smith (2003) Manganese-dependent regulation of the endocarditis-associated virulence factor EfaA of *Enterococcus faecalis*. *J. Med. Microbiol.* 52: 113-119.
  8. Hancock, L. E. and M. Perego (2004) The *Enterococcus faecalis* *fsr* two-component system controls biofilm development through production of gelatinase. *J. Bacteriol.* 186: 5629-5639.
  9. Huycke, M. M. C. A. Spiegel, and M. S. Gilmore (1991) Bacteremia caused by hemolytic, high-level gentamicin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 35: 1626-1634.
  10. Cappuccino, J. G. and N. Sherman (2008) Microbiology a laboratory manual. 8th ed. Perason Benjamin Cummings. USA.
  11. Lewington, J. S., D. Greenaway, and B. J. Spillane. 1987. Rapid small scale preparation of bacterial genomic DNA suitable for cloning and hybridization analysis. *Lett. Appl. Microbiol.* 5: 51-53.
  12. Qin, X., K. V. Singh, G. M. Weinstock, and B. E. Murray (2000) Effect of *Enterococcus faecalis* *fsr* genes on production of gelatinase and a serine protease and virulence. *Infect. Immun.* 68: 2579-2586.
  13. Çetin, E. T. (1963) Hemolysin-inhibiting substance in *Staphylococcus aureus* strains. *J. Bacteriol.* 86: 407-413.
  14. Kristich, C. J., Y.-H. Li, D. G. Cvitkovitch, and G. M. Dunny (2004) Esp-Independent Biofilm Formation by *Enterococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* 186: 154-163.
  15. Jayanthi, S., M. Ananthasubramanian, and B. Appalaraju (2008) Assessment of pheromone response in biofilm forming clinical isolates of high level gentamicin resistant *Enterococcus faecalis*. *Indian J. Med. Microbiol.* 26: 248-251.
  16. Rafii, F., W. Franklin, and C. E. Cerniglia (1990) Azoreductase activity of anaerobic bacteria isolated from human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2146-2151.
  17. Dunny, G. M. B. L. Brown, and D. B. Clewell (1978) Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*: evidence for a bacterial sex pheromone. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 75: 3479-3483.
  18. Kavindra V. Singh, Teresa M. Coque et al. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *Immunology and Medical Microbiology.* 1998, 21: 323-331.
  19. Van Wamel, W. J. A. P. Hendrickx, M. J. Bonten, J. Top, G. Posthuma, and R. J. Willems (2007) Growth condition-dependent Esp expression by *Enterococcus faecium* affects initial adherence and biofilm formation. *Infect. Immun.* 75: 924-931.
  20. Baldassarri, L. R. Cecchini, L. Bertuccini, M. G. Ammendolia, F. Iosi, C. R. Arciola, L. Montanaro, R. Di Rosa, G. Gherardi, G. Dicuonzo, G. Orefici, and R. Creti (2001) *Enterococcus* spp. produces slime and survives in rat peritoneal macrophages. *Med. Microbiol. Immunol.* 190: 113-120.