

소 장관 유래 *Enterococcus faecium*의 *Enterobacter sakazakii*에 대한 생육저해활성

박주희 · 윤성식¹ · 박영서*

경원대학교 식품생물공학과, 경원대학교 동물병원성미생물유전자은행

¹연세대학교 생물자원공학과, ¹연세대학교 생리활성소재연구소

Growth Inhibitory Activity of *Enterococcus faecium* Isolated from Bovine Intestinal Tract against *Enterobacter sakazakii*

Ju Hui Park, Sung-Sik Yoon¹, and Young-Seo Park*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea

Gene Bank of Animal Pathogens, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea

¹Department of Biological Resources and Technology, Yonsei University, Wonju 220-710, Korea

¹Institute of Functional Biomaterials and Biotechnology, Yonsei University, Seoul 120-749, Korea

ABSTRACT

A lactic acid bacterium showing growth inhibitory activity against *Enterobacter sakazakii* was isolated from bovine intestinal tracts. From biochemical and molecular biological studies, the isolate was identified and named as *Enterococcus faecium* JH95. This strain was resistant to kanamycin and streptomycin at a concentration of 100 µg/mL. *E. faecium* JH95 had high antimicrobial activity against food-borne pathogens such as *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, and *Clostridium perfringens*. The culture supernatant of this strain did not have antimicrobial activity. The culture broth of this strain failed to show the antimicrobial activity by heat treatment at 100°C for 5 min or by protease treatments for 2 hr. This result suggested that the putative antimicrobial substance produced by *E. faecium* JH95 is likely a protein which is not secreted into culture medium.

Key words : *Enterococcus faecium*, *Enterobacter sakazakii*, antimicrobial activity, minimal inhibitory concentration

서 론

*Enterobacter sakazakii*는 면역력이 약한 신생아와 유아에게 수막염, 패혈증과 괴사성 장염 등을 일으키는 기회 감염균으로, 유아 사망률이 40-80%인 심각한 위해 미생물이다(Farmer *et al.*, 1980; Lai, 2001; Urmernyi and Franklin, 1961; Willis and Robinson, 1998). *E. sakazakii*는 매우 드물게 증상은 약하게 보이지만 성인에게도 감염된다는 보고도 있는데 감염 시, 전신마비, 성장장애, 시력과 청력의 장애 등 치명적인 증상이 나타나는 것으로 보고된다(Burdette and Santos, 2000; Gallagher and Ball, 1991;

Kleiman *et al.*, 1981; Muytjens *et al.*, 1983; Ries *et al.*, 1994; Gutlrer *et al.*, 2005).

*E. sakazakii*는 Gram 음성균으로 운동성을 가지며, 포자를 형성하지 않는 직선형의 간균으로 Enterobacteriaceae과에 속한다(Monroe and Tift, 1979; Muytjens *et al.*, 1983; Nazarowec-White and Farber, 1997). *E. sakazakii*의 자연 서식지는 정확히 알려진 바는 없지만 토양, 진흙, 동물의 분변, 사람의 분변, 식물 등 다양한 범위에서 발견되고 있으며, 최근에는 곤충의 소화관에서도 발견되었다고 보고된 바 있다(Hamilton *et al.*, 2003; Kuzina *et al.*, 2001). 또한 식품공장 같은 인위적 환경에서 검출되고 있다(Kandhai *et al.*, 2004a; Kandhai *et al.*, 2004b; Muytjens *et al.*, 1983). 최근 국내뿐만 아니라 국외에서도 조제 분유에서 *E. sakazakii*가 검출되어 사회적으로 큰 이슈가 되어 조제 분유와 이유식에서 *E. sakazakii*를 제거하려는 노력이 큰 관심이 되고 있다. *E. sakazakii*는 plastic 표면뿐만 아니라

*Corresponding author : Young-Seo Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam 461-701, Korea. Tel: 82-31-750-5378, Fax: 82-31-750-5273, E-mail: ypark@kyungwon.ac.kr

latex, silicon 등에 biofilm을 형성하는 특징이 있고(Iversen *et al.*, 2004), 대부분의 다른 Enterobacteriaceae보다 열에 대한 저항성이 더 높으며 건조한 환경에서도 살아갈 수 있으며(Nazarowec-White and Farber, 1997), 6-45°C의 넓은 온도 범위에서 생육이 가능하기 때문에(Iversen *et al.*, 2004), 조제 분유와 같은 식품 중에 *E. sakazakii*의 오염을 막거나 생육을 저해하는 것이 쉽지 않다.

유산균 중 하나인 *Enterococcus faecium*은 치즈 산업과 장내 균총의 균형을 개선시키는 프로바이오틱으로 쓰이고 있으며 사람과 동물의 위장염을 치료하는 데에도 사용되고 있다(Casaus *et al.*, 1997; Franz *et al.*, 2002; Franz *et al.*, 1999). 식품 중에 오염된 *E. sakazakii*의 생육을 GRAS(generally recognized as safe) 미생물인 유산균으로 제어할 수 있다면 항생제를 사용하거나 열처리하는 것에 비해 안전하고 제품의 특성을 유지 또는 개선시킬 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 본 연구에서는 소 장관에서 분리한 유산균 중에서 *E. sakazakii*의 생육을 억제시키는 유산균을 탐색하여 동정하였으며 균주의 생리적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용 균주와 배양

본 연구에 사용된 유산균은 경원대학교 생물제어공학실험실에서 분양받은 소 장관에서 분리한 유산균 100여 주를 이용하였고, 모든 유산균은 Lactobacilli MRS(Difco, Detroit, MI, USA)에 1%(w/v) cystein-HCl과 0.1%(w/v) resazurin을 첨가한 배지(이하 MRS배지)를 사용하여 37°C에서 혐기적 조건에서 하룻밤 배양시켰다. 식중독 미생물들은 Tryptic soy broth(TSB, Difco) 배지를 사용하여 37°C에서 배양시켰으며, *Clostridium perfringens*는 혐기적 조건에서, 나머지 균주들은 호기적 조건에서 하룻밤 배양시켰다. 고체배지를 제조할 경우에는 액체배지에 한천을 1.5%(w/v) 첨가하였다.

균주 동정

분리된 균주의 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(Buchanan and Gibbons, 1974)에 기초하여 형태학적, 생리학적 특성을 조사하였다. 균주의 탄소원 이용도를 조사하기 위하여 API 50CH kit(Biomérieux, Marcy l'Etoile, France)를 사용하였고, 세포벽 지방산 조성은 한국균협회 부설 한국미생물보존센터(KCCM)에 의뢰하여 분석하였다.

분리 균주의 16S rRNA 염기서열을 이용한 동정을 수행하기 위하여 균주로부터 genomic DNA를 Rodriguez 등(1983)의 방법을 사용하여 분리하여 template DNA로 사용하였으며, 16S rRNA의 유전자를 polymerase chain

reaction(PCR)에 의해 cloning하기 위하여 8F(5'-AGAGTTT GATCATGGCTCAG-3'), 15R(5'-AAGGAGGTGATCCAA CCGCA-3')을 primer로 사용하였다. PCR은 AccuPower PreMix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하여 PCR sprint (Hybaid Ltd., London, UK)로 반응시켰다. PCR 조건은 94°C에서 2분(1 cycle), 94°C에서 30초, 60°C에서 1분, 72°C에서 1분(35 cycle), 72°C에서 7분간 반응시켰다. PCR 산물은 agarose gel 전기영동으로 확인하였는데 100 V에서 25-40 분간 전기영동한 후 254 nm의 자외선 조명하에서 관찰하였다. 사진촬영은 UV-filter와 orange filter가 장착된 디지털카메라(C4040Z, Olympus America Inc., Center Valley, PA, USA)를 이용하였다. DNA 단편의 회수는 Bioneer사(Daejeon, Korea)의 AccuPrep Gel Purification Kit를 사용하여 제조사의 manual에 따라 수행하였다. PCR 산물의 염기서열 결정은 Macrogen사(Seoul, Korea)에 의뢰하여 Applied Biosystems사(Foster City, CA, USA)의 ABI PRISM BigDye™ Terminator Cycle Sequencing Kit를 사용하여 MJ Reserch사(Reno, NV, USA)의 PTC-225 Peltier Thermal Cycler와 ABI PRISM 3730 XL Analyzer를 이용하였다. DNA 염기서열의 분석은 InfoMax Inc.(Bethesda, MD, USA)의 Vector NTI Suite 7.1 program을 사용하여 수행하였으며 DNA 염기서열의 homology 분석은 BLASTN online program(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)을 이용하였다. Phylogenetic tree는 MEGA4 program(Center for Evolutionary Functional Genomics, The Biodesign Institute, Tempe, AZ, USA)을 이용하여 작성하였다.

한편, *E. faecium*의 species-specific primer인 EM1A(5'-TTGAGGCAGACCAGATTGACG-3'), EM1B(5'-TATGAC AGCGACTCCGATTCC-3')(Cheng *et al.*, 1997)를 이용하여 *E. faecium* KCCM 12118과 *Bifidobacterium longum* A24의 16S rRNA 유전자의 염기서열과 비교하여 종 수준의 동정을 실시하였고 이때의 PCR 조건은 94°C에서 4분(1 cycle), 94°C에서 30초, 55°C에서 40초, 72°C에서 1분(25 cycle), 72°C에서 8분간 반응시켰다.

최소저해농도 검사

E. faecium JH95의 생육에 대한 최소저해농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 결정하기 위하여 MRS 배지에 *E. faecium* JH95 종배양액을 1%(v/v) 접종한 후 erythromycin, kanamycin, ampicillin, rifampin, chloramphenicol, streptomycin, vancomycin, tetracycline(Sigma Co., St. Louis, MO, USA)을 각각 2배 희석법으로 첨가한 다음 37°C에서 혐기적 조건으로 24시간 배양하였다.

항균활성 검사

분리균주의 항생효과를 알아보기 위하여 검정균주로 6

가지 대표적인 식중독 미생물(*Listeria monocytogenes* KCCM 40307, *Salmonella typhimurium* ATCC 12023, *Escherichia coli* O157:H7 NCTC 12079, *Staphylococcus aureus* ATCC 14458, *C. perfringens* KCCM12098, *E. sakazakii* ATCC 51329)과 5가지 유산균(*Bifidobacterium longum* KCCM 11953, *Lactobacillus acidophilus* KFRI 128, *Lactobacillus casei* KCCM 12452, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus thermophilus* KCCM 40430)을 사용하였다. Bottom agar는 MRS agar를 사용하였고, top agar로는 식중독 미생물의 경우에는 0.8%(w/v) agar를 첨가한 TSB 4 mL를, 유산균의 경우에는 0.8%(w/v) agar를 첨가한 MRS 배지 4 mL를 사용하였다. Top agar에 검정균을 각각 25 µL씩 첨가하여 bottom agar에 overlay하여 균한 다음, micropipette tip을 사용하여 top agar에 원형의 구멍을 만들어 *E. faecium* 균주 배양액을 20 µL씩 주입한 후, *C. perfringens*와 유산균은 혐기적 조건에서, 나머지 균주는 호기적 조건으로 37°C에서 하룻밤 배양시켜 *E. faecium* 균주 주변의 생육 저해환을 관찰하였다.

생육저해물질 조사

생육저해물질 조사를 위해 배양 상등액과 세포 추출액의 항균활성을 조사하였다. 배양액 1 mL를 13,000×g에서 1분간 원심분리한 후의 상등액을 배양 상등액으로 사용하였고, 세포 추출액은 배양액 3 mL를 13,000×g에서 1분간 원심분리하여 얻은 세포를 600 µL의 10 mM Tris-Cl(pH 8.0)로 현탁시킨 후, VCX400 sonicator(Sonics & Materials Inc., Newtown, CT, USA)를 사용하여 10초씩 5번 sonication 한 뒤 13,000×g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상등액으로 사용하였다. 세포 추출액과 배양액은 각각 100°C에서 5분간 처리하여 항균활성 검사를 실시하였고, 세포 추출액과 배양액을 pH 3과 pH 7로 조정하여 pepsin(Roche, Swiss)과 trypsin(Roche), α-chymotrypsin (Fluka, Swiss), pronase(Roche)를 각각 1 µg/mL되도록 첨가하여 37°C에서 2시간 반응시킨 다음 6가지 식중독균에 대한 항균활성을 조사하였다.

결과 및 고찰

균주 선정과 동정

*E. sakazakii*에 생육저해활성을 나타내는 유산균을 탐색하기 위하여 소 장관 유래의 유산균 100 여주를 대상으로 *E. sakazakii*에 대한 항균활성을 측정된 결과, 95번 균주가 항균활성을 나타내어 본 연구에 사용하였다. 선정된 균주를 동정하기 위하여 형태학적, 생리학적 특성을 조사한 결과, 본 균주는 광학현미경 상에서 쌍구균 또는 짧은 연쇄상 구균으로 관찰되었고(결과 미제시), 운동성이 없으며 Gram 염색과 KOH test를 통하여 Gram 양성세균으로 확

인되었다. 포자염색에서는 음성반응을 나타내어 무아포균이며, catalase test에서 음성 반응을 나타내어 전형적인 유산균의 형태적, 생리적 특징을 지니고 있었다. Gelatinase test에서는 음성반응을 나타내었으며 포도당으로부터 gas를 생성하지 않아 정상유산발효(homo lactic acid fermentation)를 하는 것으로 확인되었다. 또한 pH 4.4와 pH 9.6, 10°C와 45°C, 그리고 6.5% NaCl 존재 하에서도 생육이 가능하여 *Enterococcus* sp.에 속하는 것으로 나타났다. API kit를 이용하여 탄소원의 이용성을 조사한 결과 D-glucose, D-fructose, D-galactose, D-lactose, D-mannose, D-ribose, L-arabinose, D-melibiose, D-saccharose, D-raffinose, D-maltitol 등을 탄소원으로 이용한 반면, glycerol, xylose, L-sorbose, inositol, xylitol, fucose 등은 이용하지 못하여 *Enterococcus faecium*의 특성과 일치하였다(Manero and Blanch, 1999). 세포벽 지방산 함량을 조사한 결과 C18:1 w9c/w7c가 32.03%로 가장 높았으며 그 다음으로 C16:1 w7c/C15:0 iso 2 OH가 15.30%, C14:0이 7.74%, C18:0이 7.20%, C19:0 cyclo w8c가 7.15%의 순으로 존재하여 대부분의 *Enterococcus* sp.가 지니는 지방산 함량과 매우 유사하였다(결과 미제시)(Lang et al., 2001; Ryu et al., 2001).

또한, *E. faecium*의 종 특이적 PCR primer인 EM1A, EM1B를 이용하여 PCR을 수행한 결과 Fig. 2에 나타낸 바와 같이 표준 균주인 *E. faecium* KCCM 12118과 동일하게 658 bp의 PCR 산물을 확인할 수 있었다. 이상의 형태학적, 생리적, 분자유전학적 분석과 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(Buchana and Gibbons, 1974)의 자료를 통하여 95번 균주를 *Enterococcus faecium* JH95로

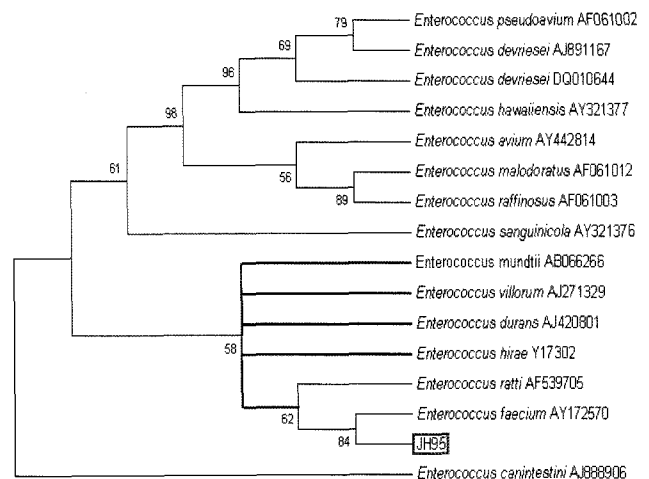


Fig. 1. Dendrogram of 16S rDNA sequence of strain JH95.



Fig. 2. Agarose gel electrophoresis of PCR products obtained after amplification of total DNA with the species-specific primers (EM1A, EM1B). Lanes 1, 500 bp DNA ladder; 2, *E. faecium* KCCM 12118; 3, strain JH95; 4, *B. longum* A24.

동정 및 명명하였다.

최소생육저해농도 검사

여러 가지 항생물질에 의한 *E. faecium* JH95의 최소생육저해농도(minimal inhibitory concentration, MIC)를 검사하기 위하여 여러 가지 종류의 항생제를 배지에 첨가하여 검사한 결과 kanamycin과 streptomycin에 대해서는 100 µg/mL까지 매우 높은 내성을 보였고 tetracycline은 0.125 µg/mL에서도(결과 미제시) 감수성을 보였다. 항생물질의 최소저해농도는 erythromycin 20 µg/mL, ampicillin 10 µg/mL, rifampin 20 µg/mL, chloramphenicol 5 µg/mL, vancomycin 80 µg/mL로 나타났다(Table 1). Clinical and Laboratory Standards Institute의 guideline(Shryock *et al.*, 2002)에 의하면 *E. faecalis*의 경우 ampicillin에 의한 MIC가 0.5-2 µg/mL일 경우 ampicillin에 대해 감수성을 나타낸다고 규정하고 있어 본 균주는 ampicillin에 대해 내성이 있음을 알 수 있었다. 한편 chloramphenicol에 대해서는 4-16 µg/mL의 MIC를 나타낼 경우 감수성이 있다고 규정하고 있으므로 본 균주는 chloramphenicol에 대해서 감수성을 알 수 있었다.

대부분의 enterococci에서 β-lactam계에 속하는 ampicillin의 최소저해농도는 1-16 µg/mL 정도로 0.006-0.25 µg/mL의 최소저해농도를 갖는 streptococci와는 대조적이다. 그러나 최근 임상에서 분리되는 enterococci의 ampicillin에 대한 내성이 높아지고 있는데 최소저해농도가 256 µg/mL 또는 그 이상이고, 몇몇 병원에서는 분리된 *E. faecium* 중 90% 이상이 32 µg/mL 이상이었다(Gilmore *et al.*, 2002). Gentamicin, tobramycin, amikacin, kanamycin, netilmicin, dibekacin과 같은 aminoglycoside계 항생물질 중 gentamicin의 경우 MIC가 보통 6-64 µg/mL 정도인 것에 반해 enterococci에 내성 관련 효소가 존재할 경우 종종 2,000 µg/mL까지 내성이 증가하고, 임상분리된 enterococci 중

Table 1. Minimal inhibitory concentration of antibiotics on the growth of *E. faecium* JH95

Antibiotic	(Unit: µg/mL)							
	1.25	2.5	5	10	20	40	80	100
Erythromycin	+ ¹⁾	+	+	+	- ²⁾	-	-	-
Kanamycin	+	+	+	+	+	+	+	+
Ampicillin	+	+	+	-	-	-	-	-
Rifampin	+	+	+	+	-	-	-	-
Chloramphenicol	+	+	-	-	-	-	-	-
Streptomycin	+	+	+	+	+	+	+	+
Vancomycin	+	+	+	+	+	+	-	-
Tetracycline	-	-	-	-	-	-	-	-

¹⁾ + : Growth

²⁾ - : Non-growth

90% 이상이 gentamicin에 2,000 µg/mL 이상의 최소저해농도를 나타내었다. 또한 일반적인 streptomycin의 경우 4,000-16,000 µg/mL의 최소저해농도를 나타내는데, streptomycin의 결합이 감소하여 30S ribosomal subunit이 변화하게 되면 *E. faecalis*의 내성도 변하게 되어 128,000 µg/mL의 최소저해농도를 갖게 된다. Glycopeptide계의 vancomycin은 6가지의 내성 유전자 type을 갖고 있는데 type마다 최소저해농도가 조금씩 달라 2-1,000 µg/mL까지 다양하게 나타난다고 보고되고 있다(Gilmore *et al.*, 2001).

항균활성 검사

식중독 미생물과 유산균에 대한 *E. faecium* JH95의 항균활성을 조사한 결과 Table 2에서와 같이 *E. faecium* JH95는 *L. monocytogenes*에 대하여 가장 높은 항균 활성을 나타내었고 그 다음으로는 *C. perfringens*와 *E. sakazakii*에 대하여 높은 항균 활성을 나타내었으며 *S. typhimurium*, *S. aureus*와 *E. coli* O157:H7에 대해서는 중간 수준의 활성을 나타내었다. 유산균을 검정균으로 하여 항균 활성을 측정된 결과 조사한 모든 유산균에 대하여 항균활성을 나타

Table 2. Growth inhibition of *E. faecium* JH95 against food pathogens and lactic acid bacteria

Indicator strain	Growth inhibition zone (diameter, mm)
<i>Clostridium perfringens</i> KCCM 12098	18
<i>Enterobacter sakazakii</i> ATCC 51329	16
<i>Escherichia coli</i> O157 NCTC 12079	13
<i>Listeria monocytogenes</i> KCCM 40307	22
<i>Salmonella typhimurium</i> ATCC 12023	13
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 14458	13
<i>Bifidobacterium longum</i> KCCM 11953	- ¹⁾
<i>Lactobacillus acidophilus</i> KFRI 128	-
<i>Lactobacillus casei</i> KCCM 12452	-
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	-
<i>Lactobacillus thermophilus</i> KCCM 40430	-

¹⁾: Not detected.

내지 않았다.

우리나라의 경우 2006년에 조제분유에서 *E. sakazakii*가 검출되어 사회적인 문제가 된 적이 있는데, *E. sakazakii*의 오염은 분유를 제조하는 원료의 오염, 살균공정 후의 오염, 조유나 수유전의 오염이 주 원인으로 알려져 있다. *E. sakazakii*에 대한 위험군은 6개월 미만의 영유아 중 특히 면역결핍 영아, 28일령 미만 영아, 2.5 kg 미만의 저체중아이다. 식품의약품안전청은 2008년 1월, 6개월 이하 영유아 이유식 제품에 대한 모니터링을 실시한 결과, 국내 유통 중인 12개 제품 중 4개 제품에서 낮은 수준(0.36-2.3 CFU/100 g)의 *E. sakazakii*가 검출돼 해당업체에 조속한 자진회수를 요청한 바 있으며, 6개월 이하 영유아용 이유식에 대해 기준규격 설정 시까지 *E. sakazakii*에 대해 '불검출'로 권장규격을 설정해 운영하기로 하였다. 현재까지 *E. sakazakii*에 항균활성을 나타내는 유산균은 보고된 바가 없는데, 본 연구에 사용된 *E. faecium* JH95는 일반 식중독 미생물뿐만 아니라 *E. sakazakii*에 대한 생육저해활을 나타내어, 분유 제조 공정 중에 첨가하여 유산균 자체의 성장효과뿐만 아니라 *E. sakazakii*에 대한 생육제어 등 유아공 산업에 응용할 수 있을 것으로 기대된다.

저해물질 조사

많은 종류의 유산균은 식중독 미생물에 대해 항균활성이 있는 것은 알려져 있다. 이들 유산균들은 bacteriocin을 생산함으로써 항균활성은 지니게 되는데, bacteriocin은 미생물에 의해 2차 대사산물이 아니라 ribosome에 의한 생합성 물질로 독성이 없는 물질이다(Salminen *et al.*, 2004). *Lactococcus lactis*에 의해 생산되는 bacteriocin중 하나인 nisin은 일부의 유산균, *L. monocytogenes*, *S. aureus*이나 spore를 형성하는 *B. cereus*, *Clostridium* sp.에 항균활성이 있고, bavaricin, carnobacteriocin, enterocin, sakacin, lactacin, plantaricin, acidocin 등의 bacteriocin은 일부의 유산균과 *Listeria* sp., *C. perfringens*, *S. aureus* 등에 항균활성이 있는 것으로 알려져 있다(Salminen *et al.*, 2004).

본 연구에 사용된 균주의 배양 상등액과 세포 추출액에 대한 항균활성 검사를 한 결과 배양 상등액에서는 항균활성이 나타나지 않았고, 세포 추출액에서는 배양액보다 약한 항균성이 나타났다. 배양액과 세포 추출액을 각각 100°C에서 반응시킨 후 항균활성 검사를 한 결과, 식중독 미생물에 대한 생육 저해환이 생성되지 않아 항생능력이 소실됨을 알 수 있었으며, 이로부터 생육저해물질은 가열에 의해 활성을 잃는 것으로 확인되었다. 한편, pepsin, trypsin, α -chymotrypsin 및 pronase로 배양액을 처리한 후 *E. sakazakii*, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. typhimurium*, *S. aureus*와 *C. perfringens*에 대한 생육저해효과를 조사한 결과, 사용된 모든 단백질 가수분해효소에 의해 생육저해효과가 소실됨에 따라 생육저해물질이 단백질인 것으로

추정할 수 있었다(결과 미제시).

Noonpakdee 등 (2003)에 의하면 대표적인 bacteriocin인 nisin은 100°C에서 비교적 안정적이고, α -chymotrypsin과 proteinase K에 의해 불활성화되고 그 이외의 단백질 가수분해효소에는 안정한 것으로 알려져 있다. 본 균주가 지니는 생육저해물질은 열에 불안정하고 단백질 가수분해효소에 불활성되는 것으로 보아 nisin이 아닌 것으로 판단되었다. Nisin은 주로 *L. lactis*가 생산하는 것으로 보고되고 있으며(Salminen *et al.*, 2004), *Enterococcus* sp.가 생산하는 bacteriocin은 enterocin으로 알려져 있는데, enterocin은 열에 안정적인 특징을 가지고 있는 것으로 알려져 있어(Salminen *et al.*, 2004) 본 균주는 enterocin을 생산하지 않는 것으로 판단되었다.

일반적으로 bacteriocin은 배양 상등액에 존재하는 것으로 알려져 있는데, 본 연구에 사용된 *E. faecium* JH95의 배양 상등액에서는 항균활성이 나타나지 않고 오직 배양액에서 활성이 나타나는 것으로 보아 본 균주가 생산하는 생육저해물질은 세포 외로 분비되지 않고 세포막 등에 결합된 상태로 존재하는 것으로 추측되나, 향후 보다 깊은 연구가 필요할 것으로 판단된다.

요 약

소 장관으로부터 분리한 유산균 중에서 *Enterobacter sakazakii*에 생육저해활성을 나타내는 균주를 분리한 후 동정한 결과 *Enterococcus faecium*으로 동정되었고 *E. faecium* JH95로 명명하였다. 본 균주는 kanamycin과 streptomycin에 대해 100 μ g/mL까지 매우 높은 내성을 나타내었다. 본 균주의 배양액은 *L. monocytogenes*, *C. perfringens*와 *E. sakazakii*에 대하여 높은 항균 활성을 나타내었으며, *S. typhimurium*, *S. aureus*와 *E. coli* O157:H7에 대해서도 항균활성을 나타내었다. 본 균주의 배양 상등액은 항균활성을 보이지 않았으며, 배양액이 지니고 있는 항균활성은 100°C에서 5분간 가열하거나 단백질 가수분해효소 처리에 의해 소실되어 식중독 미생물에 대한 생육저해물질이 단백질인 것으로 추정되었다.

감사의 글

이 연구는 2007년도 경원대학교 지원에 의한 결과임

참고문헌

1. Buchanan, R. E. and Gibbons, M. E. (1974) *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (8th ed). The Williams & Wilkins Co., Baltimore, USA.
2. Burdette, J. H. and Santos, C. (2000) *Enterobacter sakazakii*

- brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.* **30**, 33-34.
3. Casaus, P., Nilsen, T., Cintas, L. M., Nes, I. F., Hernandez, P. E., and Holo, H. (1997) Enterocin B, a new bacteriocin from *Enterococcus faecium* T136 which can act synergistically with enterocin A. *Microbiology* **143**, 2287-2294.
 4. Cheng, S., McCleskey, F. K., Gress, M. J., Petroziello, J. M., Liu, R., Namdari, H., Beninga, K., Salmen, A., and Delvecchio, V. G. (1997) A PCR assay for identification of *Enterococcus faecium*. *J. Clin. Microbiol.* **35**, 1248-1250.
 5. Farmer, J. J., Asbury, M. A., Hickman, F. W., and Brenner, D. J. (1980) The Enterobacteriaceae Study Group: *Enterobacter sakazakii*, new species of Enterobacteriaceae isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **30**, 569-584.
 6. Franz, C. M. A. P., Grube, A., Herrmann, A., Abiouel, H., Strke, J., Lombardi, A., Tauscher, B., and Holzappel, W. H. (2002) Biochemical and genetic characterization of the two-peptide bacteriocin enterocin 1071 produced by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 309. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 2550-2554.
 7. Franz, C. M. A. P., Holzappel, W. H., and Stiles, M. E. (1999) Enterococci at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**, 1-24.
 8. Gallagher, P. G. and Ball, W. S. (1991) Cerebral infarctions due to CNS infection with *Enterobacter sakazakii*. *Pediatr. Radiol.* **21**, 135-136.
 9. Gilmore, M. S., Clewell, D. B., Courvalin, P., Dunny, G. M., Murray, B. E. and Rice, L. B. (2002) The Enterococci : pathogenesis, molecular biology and antibiotic resistance. ASM Press, Washington, DC., USA, pp 355-383.
 10. Gurtler, J. B., Kornacki, J. L., and Beuchat, L. R. (2005) *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* **104**, 1-34.
 11. Hamilton, J. V., Lehane, M. J., and Braig, H. R. (2003) Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. *Emerg. Infect. Dis.* **9**, 1355-1356.
 12. Iversen, C., Lane, M., and Forsythe, S. J. (2004) The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Appl. Microbiol. Lett.* **38**, 378-382.
 13. Kandhai, M. C., Reij, M. W., Gorris, L. G. M., Guillaume-Gentil, O., and van Schothorst, M. (2004a) Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet* **363**, 39-40.
 14. Kandhai, M. C., Reij, M. W., van Puyvelde, K., Guillaume-Gentil, O., Beumer, R. R., and van Schothorst, M. (2004b) A new protocol for the detection of *Enterobacter sakazakii* applied to environmental samples. *J. Food Prot.* **67**, 1207-1270.
 15. Kleiman, M. B., Allen, S. D., Neal, P., and Reynolds, J. (1981) Meningoencephalitis and compartmentalization of the cerebral ventricles caused by *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* **14**, 352-354.
 16. Kuzina, L. V., Peloquin, J. J., Vacek, D. C., and Miller, T. A. (2001) Isolation and identification of bacteria associated with adult laboratory Mexican fruit flies, *Anastrepha ludens* (Diptera: Tephritidae). *Curr. Microbiol.* **42**, 290-294.
 17. Lai, K. K. (2001) *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults: case reports and a review of the literature. *Med. Baltimore* **80**, 113-122.
 18. Lang, M. M., Ingham, S. C., and Ingham, B. H. (2001) Differentiation of *Enterococcus* spp. by cell membrane fatty acid methyl ester profiling, biotyping and ribotyping. *Lett. Appl. Microbiol.* **33**, 65-70.
 19. Manero, A. and Blanch, A. R. (1999) Identification of *Enterococcus* spp. with a biochemical key. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 4423-4430.
 20. Monroe, P. W. and Tift, W. L. (1979) Bacteremia associated with *Enterobacter sakazakii* (yellow, pigmented *Enterobacter cloacae*). *J. Clin. Microbiol.* **10**, 850-851.
 21. Muytjens, H. L., Zanen, H. C., Sonderkamp, H. J., Kolee, L. A., Wachsmuth, I. K., and Farmer, J. J. (1983) Analysis of eight cases of neonatal meningitis and sepsis due to *Enterobacter sakazakii*. *J. Clin. Microbiol.* **18**, 115-120.
 22. Nazarowec-White, M. and Farber, J. M. (1997) *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **34**, 103-113.
 23. Noonpakdee, W., Snavitarangkna, C., Jumriangrit, P., Sonomoto, K., and Panyim, S. (2003) Isolation of nisin-producing *Lactococcus lactis* WNC 20 strain from *nham*, a traditional Thai fermented sausage. *Int. J. Food Microbiol.* **81**, 137-145.
 24. Ries, M., Harms, D., and Scharf, J. (1994) Multiple cerebral infarcts with resulting multicystic encephalomalacia in a premature infant with *Enterobacter sakazakii* meningitis. *Clin. Pediatr.* **206**, 184-186.
 25. Rodriguez, R. L. and Tait, R. C. (1983) Recombinant DNA techniques, An Introduction. Addison-Wesley Pub, MA, USA, pp 162-163.
 26. Ryu, H-W., Kang, K-H., Pan, J-G., and Chang, H-N. (2001) Characteristics and glycerol metabolism of fumarate-reducing *Enterococcus faecalis* RYK1. *Biotech. Bioeng.* **72**, 119-124.
 27. Salminen, S., von Wright, A., and Ouwehand, A. (2004) Lactic acid bacteria: Microbiological and Functional Aspects. 3rd ed, Revised and Expanded, USA, pp 380-387.
 28. Shryock, T. R., Apley, M., Jones, R. N., Lein, D. H., Thornsberry, C., Walker, R. D., Watts, J. L., and White, D. G. (2002) Performance standards for Antimicrobial Disk and Dilution susceptibility Test for Bacteria isolated from Animals. Approved standards. 2nd ed. Wayne, PA, USA, Vol. 22, 63.
 29. Urmenyi, A. M. C. and Franklin, A. W. (1961) Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet* **1**, 313-315.
 30. Willis, J. and Robinson, J. E. (1998) *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 196-199.