

젓갈 유래 Coagulase-Negative Staphylococci의 안전성 평가

정도원, 이종훈*
경기대학교 식품생물공학과

Received: January 5, 2015 / Revised: February 26, 2015 / Accepted: February 26, 2015

Safety Assessment of Coagulase-Negative Staphylococci from Jeotgal, a Korean High-Salt-Fermented Seafood Do-Won Jeong and Jong-Hoon Lee*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 443-760, Republic of Korea

Seventeen ampicillin-sensitive coagulase-negative staphylococci (CNS) isolates identified in jeotgal were subjected to assessments for antibiotic susceptibility and safety hazards. Fifteen of the 17 CNS strains exhibited phenotypic resistances to at least one antibiotic, and their prevailing resistance was to penicillin G. The *dfrA* gene for trimethoprim and *tetK* for tetracycline were amplified by PCR from the two strains, respectively. α -Hemolytic activity was not detected from the 17 strains, while five strains presented δ -hemolytic activity. Among the five strains, two strains exhibited β -hemolytic activity. Biofilm was formed from twelve strains. All of the tested phenotypic characteristics were expressed in a strain-specific manner.

Keywords: Jeotgal, coagulase-negative *Staphylococcus*, safety assessment, salt tolerance, antibiotic resistance, hemolysis, biofilm formation

미생물의 배양 및 순수분리 과정없이 시료에 존재하는 미생물 군집을 분석하는 배양 비의존적 미생물 군집 분석법이 지속적으로 발전하면서, 우리나라 전통발효식품의 미생물 군집 분석이 활발히 진행되고 있다. 김치나 장류에 비해 크게 관심의 대상이 되지 못했던 젓갈에 대한 미생물 군집 분석도 상당수 진행되어, 기존의 배양법으로 진행한 연구에서 언급되지 않았던, 다양한 미생물의 존재가 계속적으로 보고되고 있다[7, 16-20]. 16S rRNA 유전자의 부분염기서열 다양성에 근거하여 미생물상을 파악하는 배양 비의존적 미생물 군집 분석은 시료의 미생물상을 빠르게 확인할 수 있는 장점을 가지고 있으나, 16S rRNA 상동성이 높은 종(species) 수준에서의 분리에는 문제점을 가지고 있으며, 얻어진 정보를 산업적으로 활용하기 위해서는 미생물을 다시 한번 분리해야 하는 과정이 숙제로 남게 된다.

본 연구그룹은 젓갈의 속성발효 및 품질 균일화를 위한 종균 선발을 목표로 NaCl을 첨가한 다양한 배지를 이용하여 새우젓으로부터 295 균주를 순수 분리하여 동정한 결과, 다양한 *Staphylococcus* 속(genus) bacteria가 존재하고 있으며,

*Staphylococcus equorum*이 우점종이라는 결과를 얻게 되었고[6], 이 결과는 pyrosequencing 및 denaturing gradient gel electrophoresis 분석을 통하여 확인되었다[7, 17, 20]. 우점종 *S. equorum*은 높은 protease 및 lipase 활성을 가지고 있으며, 25% (w/v) 농도의 NaCl이 존재하는 배지에서도 생장하는 균주가 검출되고 있어, 젓갈발효의 종균으로 사용될 높은 가능성을 가지고 있다[14]. 그러나 우리나라에서는 아직 *S. equorum*이 발효용 종균으로 사용된 예가 없어 위해성에 대한 평가 및 식품의약품안전처의 사용허가가 필요한 실정이다. 본 연구그룹은 멸치젓 및 새우젓에서 분리한 185 *S. equorum* 균주에 대한 항생물질내성, 혈청 분해능, 바이오필름 형성, 바이오제닉아민 형성 등의 *in vitro* 안전성 평가를 통하여, 안전성 관련 특성이 균주 특이적으로 나타남을 확인하였고, 안전성 평가를 통하여 선발된 균주들의 식품용 미생물로서의 활용 가능성을 확인하였다[14].

분류학 상으로 *Staphylococcus* 속 bacteria에는 주요 식중독균 *Staphylococcus aureus*가 포함되어 있어 식품용으로의 사용에 있어 철저한 안전성 평가가 필요한 장애요인을 가지고 있다. 그러나 젓갈에서 분리된 *Staphylococcus* 속 bacteria는 *S. aureus*와는 달리 coagulase를 생성하지 않으며, 유럽에서는 소시지 및 육류의 발효에 종균으로 사용되고 있어 사용이력 측면에서의 안전성은 확보되었다고 할 수 있다[10, 11,

*Corresponding author

Tel: +82-31-249-9656, Fax: +82-31-253-1165

E-mail: jhl@kgu.ac.kr

© 2015, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

Table 1. Strains used in this study and their salt tolerance.

Strain	Species	Origin	Growth in NaCl (w/v)		
			15%	20%	25%
KM2016	<i>Staphylococcus arlettae</i>	Myeolchi-jeotgal	G	G	G
KM3058	<i>Staphylococcus arlettae</i>	Myeolchi-jeotgal	G	G	G
C6022	<i>Staphylococcus capitis</i>	Saeu-jeotgal	G	N	N
C5030	<i>Staphylococcus caprae</i>	Saeu-jeotgal	G	G	G
KM3086	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Myeolchi-jeotgal	G	N	N
KM2110	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	Myeolchi-jeotgal	G	N	N
KM3080	<i>Staphylococcus hominis</i>	Myeolchi-jeotgal	G	N	N
KM2036	<i>Staphylococcus nepalensis</i>	Myeolchi-jeotgal	G	G	G
KM3055	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Myeolchi-jeotgal	N	N	N
KS3076	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Saeu-jeotgal	G	N	N
KM2056	<i>Staphylococcus pasteurii</i>	Myeolchi-jeotgal	G	N	N
KS2073	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Saeu-jeotgal	G	G	G
C2029	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Saeu-jeotgal	G	G	W
KM2104	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Myeolchi-jeotgal	G	G	N
KM3109	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Myeolchi-jeotgal	G	G	G
KM1064	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Myeolchi-jeotgal	G	G	W
KM2032	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Myeolchi-jeotgal	G	G	G
KM1030	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Myeolchi-jeotgal	G	G	N
KS2082	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Saeu-jeotgal	G	G	N
KS2088	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Saeu-jeotgal	G	G	N
C8013	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Saeu-jeotgal	G	G	N
KS2080	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Saeu-jeotgal	G	G	N
KM1053	<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	Myeolchi-jeotgal	G	G	G
KM2045	<i>Staphylococcus vitulinus</i>	Myeolchi-jeotgal	G	G	N
KM2046	<i>Staphylococcus warneri</i>	Myeolchi-jeotgal	N	N	N
KM3084	<i>Staphylococcus warneri</i>	Myeolchi-jeotgal	N	N	N
C3044	<i>Staphylococcus warneri</i>	Saeu-jeotgal	N	N	N
KS3079	<i>Staphylococcus warneri</i>	Saeu-jeotgal	G	N	N
KM2047	<i>Staphylococcus warneri</i>	Myeolchi-jeotgal	N	N	N
KM3081	<i>Staphylococcus warneri</i>	Myeolchi-jeotgal	N	N	N

Abbreviations: G, growth; W, weak growth; N, non-growth.

23]. 최근에는 젓갈뿐만 아니라 장류에서도 coagulase를 생성하지 않는 *Staphylococcus*가 높은 빈도로 검출되고 있어 [15, 25], 안전성 평가에 근거한 미래가치 평가가 필요한 미생물로 기대된다. 본 연구에서는 젓갈에서 분리된 *S. equorum*을 제외한 coagulase-negative staphylococci (CNS)의 안전성 평가 결과를 보고한다.

선행연구[6]를 통하여 멸치젓과 새우젓으로부터 분리된 총 10종(species)의 30 CNS 균주를 tryptic soy agar (TSA)에 NaCl을 25% (w/v) 농도까지 첨가하여 배양한 결과,

*Staphylococcus warneri*를 제외한 9종의 균주들은 15% 이상의 NaCl 농도에서 생장이 가능하고, 내염성이 균주 특이적으로 나타남을 확인하였다(Table 1). 각각 2 균주 이하로 분리된 *Staphylococcus arlettae*와 *Staphylococcus caprae*, *Staphylococcus nepalensis*는 모두 25% NaCl이 첨가된 배지에서도 생장이 가능하였지만, 실험군이 많지 않아 종 특이적인 현상으로 보기에는 무리가 있다.

2012년 4월 10일자 식품의약품안전처의 우리나라 유통 축·수산식품에서 검출되는 항생제 내성균 분포실태조사 결과

보도자료에 따르면 대장균의 경우, ampicillin 내성이 가장 높은 빈도로 나타났고, 다음으로 tetracycline 내성이 높게 검출되었다(<http://www.mfds.go.kr/>). 따라서 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<http://www.eucast.org/>)이 제시한 *Staphylococcus saprophyticus*의 ampicillin에 의한 최소생육저해농도(Minimum Inhibitory Concentration)에 근거하여 32 µg/ml ampicillin을 첨가한 TSA, 30°C에서 내성균의 존재를 검토한 결과, 13 균주가 내성을 가지고 있는 것으로 나타났다(data not shown). Ampicillin 내성을 나타낸 13 균주는 획득형 항생물질내성 유전자 보유 가능성이 높아 종균으로써의 활용 가능성이 낮은 것으로 판단하여, 감수성인 17 CNS 균주의 항생물질내성 평가를 disc diffusion 법을 이용하여 수행하였다. 내성 평가를 위한 균주 배양은 Mueller-Hinton agar (BD Diagnostic Systems, USA), 30°C에서 24시간 수행하였고, Clinical and Laboratory Standards Institute (<http://www.clsi.org/>)와 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing의 평가 기준을 적용하였다. 항생물질내성 평가에 사용한 14종의 항생물질 amikacin (30 µg), cefoxitin (30 µg), chloramphenicol (30 µg), ciprofloxacin (5 µg), erythromycin (15 µg), gentamicin (10 µg), lincomycin (15 µg), linezolid (10 µg), ofloxacin (5 µg), oxacillin (1 µg), penicillin G (10 units), rifampicin (5 µg), tetracycline (30 µg), trimethoprim (5 µg) disc는 Oxoid (Basingstoke, Hants, UK)로부터 구입

하였다.

Amikacin, ciprofloxacin, ofloxacin, oxacillin, rifampicin에 대한 내성은 실험에 사용한 모든 균주로부터 나타나지 않았고, penicillin G 내성 균주가 가장 높은 빈도로 검출되었다(Table 2). 항생물질내성을 평가한 모든 *S. saprophyticus* 균주가 penicillin G에 대한 내성을 나타낸 것으로 보아 *S. saprophyticus*는 종 특이적인 penicillin G 내성을 가지고 있으며, 내성 유전자가 chromosomal DNA에 존재할 것으로 추정된다. 한편, *Staphylococcus pasteurii*의 penicillin G 내성은 2 균주 중, 1 균주에서만 검출되어 균주 특이적인 현상으로 나타났고, KS3076 균주는 모든 항생물질에 대하여 감수성인 반면, KM2056 균주는 3개 항생물질에 대한 복수의 내성을 나타내었다. 따라서 KM2056 균주는 환경으로부터 획득한 항생물질내성 인자를 보유하고 있는 것으로 추정된다. 복수의 항생물질내성을 보유한 균주들은 획득형 항생물질내성 인자의 보유 가능성이 높지만, *S. caprae*와 *Staphylococcus epidermidis*는 실험 대상 균주의 수가 많지 않아 표현형만으로 획득형 내성 인자의 보유를 판단하기는 불가능하다.

Bacteria의 항생물질내성 인자는 내재형(intrinsic)과 획득형(acquired)으로 구분되며, 항생물질 노출 환경에서 내성 유전자를 보유한 다른 bacteria로부터 수평이동(horizontal transfer)에 의하여 전이되는 획득형 내성 인자가 위해성이 있는 것으로 평가되고 있다[24]. 획득형 항생물질내성 유전자를 보유하고 있는 미생물이 식품발효용 종균이나 probiotics

Table 2. Antibiotic resistance profiles of the ampicillin-sensitive 17 CNS isolates from jeotgal.

Strain	Species	A	Ce	C	Cp	E	Gm	L	Lz	O	Ox	P	R	Te	T
C5030	<i>S. caprae</i>	S	R	S	S	R	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KM2110	<i>S. epidermidis</i>	S	R	R	S	R	R	R	S	S	S	S	S	S	R
KM2036	<i>S. nepalensis</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
KS3076	<i>S. pasteurii</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
KM2056	<i>S. pasteurii</i>	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	S	S	R
C2029	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
KM2104	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
KM3109	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
KM1064	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
KM2032	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
KM1030	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	S	S
KS2082	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
KS2088	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
C8013	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
KS2080	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S
KM1053	<i>S. saprophyticus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	S	R	S
KM2045	<i>S. vitulinus</i>	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Abbreviations: A, amikacin; Ce, cefoxitin; C, chloramphenicol; Cp, ciprofloxacin; E, erythromycin; Gm, gentamicin; L, lincomycin; Lz, linezolid; O, ofloxacin; Ox, oxacillin; P, penicillin G; R, rifampicin; T, trimethoprim; Te, tetracycline.

Table 3. The oligonucleotides for the identification of antibiotic resistance genes.

Class	Antibiotics	Gene	Oligonucleotide sequence (5' - 3')		Size (bp)	Reference	
			Forward	Reverse			
I	Gentamicin	<i>aphA</i>	GCGCGGATCTTTAAATGGAGTGT	AAGCTGGTGGGAGAAAATGAAAAC	411	This study (NC_017331.1)	
	Chloramphenicol	<i>cat</i>	CCAGCAAACACTACGTATAGCATTAC	GATGAAGCTGCAAGGCAACTGG	499	This study (X60827)	
	Linezolid	<i>cfr</i>	GCTACAGGCGACATTGGATT	CTGCCCTTCGTTTGCTTCT	570	This study (JN97096.1)	
	Erythromycin		<i>ermA</i>	GTTCAAGAACAATCAATACAGAG	GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	421	[21]
			<i>ermB</i>	CCGTTTACGAAATTGGAACAGGTAAGGGC	GAATCGAGACTTGAGTGTGC	359	[21]
			<i>ermC</i>	GCTAATATTGTTTAAATCGTCAATTCC	GGATCAGGAAAAGGACATTTTAC	572	[21]
			<i>msrA</i>	GGCACAATAAGAGTGTTTAAAGG	AAGTTATATCATGAATAGATTGTCCTGTT	323	[21]
			<i>mphC</i>	GAGCTACCAGAGGAGCCTGACG	CATACGCCGATTCTCCTGAT	940	[22]
	Lincomycin	<i>lnuA</i>	GGTGGCTGGGGGGTAGATGTATTAAGTGG	GTTCTTTTGAATACATGGTATTTTTCGATC	310	[21]	
	Tetracycline		<i>tetK</i>	TTAGGTGAAGGGTTAGGTCC	GCAAACCTATTCCAGAAGCA	718	[1]
<i>tetM</i>			ACAGAAAGCTTATTATATAAC	TGGCGTGTCTATGATGTTTAC	171	[2]	
II	Penicillin	<i>blaZ</i>	AAGAGATTTGCCTATGCTTC	GCTTGACCACTTTTATCAGC	518	[21]	
		<i>pbp</i>	GTTGCTATATCTGGCGGACGTG	TGAAGCAGAACCACCAAGTA	386	This study (DQ413595.1)	
III	Trimethoprim	<i>dfpA</i>	CGAAGCAATGATTGACCAGG	TTCCCTTTTCTACGCACTAAATG	185	This study (NC_014369.1)	

Classification categories based on reaction mechanisms: I, protein synthesis inhibitor; II, cell envelope antibiotics; III, folate pathway inhibitor.

로 사용될 경우, 식품이나 장관을 매개로 위해미생물에게 항생물질내성 인자를 전파할 수 있는 가능성이 높아지기 때문에, 식품용 미생물 선별과정에서 반드시 검증되어야 할 항목이다[3, 5].

본 연구에서는 CNS 균주들이 내성을 나타낸 cefoxitin, chloramphenicol, erythromycin, gentamicin, lincomycin, linezolid, penicillin G, tetracycline, trimethoprim 내성 관련 유전자들 중, plasmid나 transposon과 같은 전이 가능한 형태의 DNA에 존재하는 것으로 알려진 유전자들을 PCR로 증폭해 보았다. 각 균주들의 genomic DNA는 DNeasy Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany)를 이용하여 추출하였고, PCR 반응은 T3000 Thermocycler (Biometra, Germany)를 사용하였다. 각 유전자의 증폭을 위한 PCR primer는 기존의 연구에서 *Staphylococcus* 속 항생물질내성 유전자 증폭에 사용한 것들을 채택하였고, *aphA*, *cat*, *cfr*, *pbp*, *dfrA* 유전자의 증폭을 위한 primer는 *Staphylococcus* 속 bacteria에서 알려진 해당 유전자의 염기서열을 비교하여 구축하였다(Table 3). PCR 반응계에는 template DNA, 100 mM dNTP, 0.5 μ M의 primer, 1 U *Taq* polymerase (Roche, Germany)를 첨가하였고, PCR 반응은 95°C에서 5분간 예비가열 후, 95°C에서 1분간 변성, 57°C에서 30초 annealing, 72°C에서 1분 중합반응의 과정을 30회 반복하였고, 마지막에 72°C에서 5분간 처리한 후 반응을 중단시켰다. 증폭된 PCR 산물은 PCR product purification kit (SolGent, Korea)을 사용하여 정제한 후, 수탁업체(GenoTech, Korea)에 의뢰하여 각 유전자 증폭에 사용한 primer를 이용하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)에 등록된 염기서열 정보를 대상으로 nucleotide blast search를 통해 상동성 분석을 수행하였다.

Ampicillin 감수성의 17 균주를 대상으로 14개 항생물질내성 유전자의 존재를 PCR 증폭으로 확인해 본 결과, trimethoprim 내성을 나타낸 *S. pasteurii* KM2056 균주로부터 *dfrA* 유전자가 증폭되었고, tetracycline 내성을 보유한 *S. saprophyticus* KM1053 균주로부터는 *tetK* 유전자가 증폭되었지만, 다른 항생물질내성 유전자들은 증폭되지 않았다(data not shown). 증폭된 *dfrA*, *tetK* 유전자는 *S. aureus*의 plasmid pSK1과 pPM1에 각각 존재하는 것으로 보고되었고[9, 12], 염기서열로부터 추정되는 아미노산서열은 *Staphylococcus* 속에서 발견되는 trimethoprim, tetracycline 내성 인자의 아미노산서열과 97% 이상의 상동성을 나타내었다. 가장 많은 수의 penicillin G 내성 균주의 존재가 확인되었지만, *blaZ* 및 *pbp* 유전자는 증폭되지 않았다. 이와 같이 항생물질내성을 나타낸 균주들로부터 내성 유전자가 증폭되지 않은 원인은 PCR primer와 PCR 조건의 부적합성에 의한 결과로 볼 수도 있겠지만, 항생물질내성이 다양한 기작에 의한 결과로

나타나기 때문에 다른 유전자가 내성에 관여할 것으로 추정된다.

Bacteria가 보유한 획득형 항생물질내성 유전자에 의한 잠재적인 위험성이 보고되면서, bacteria의 안전성 평가에 있어 항생물질내성 평가는 필수 항목으로 자리잡았다. 그러나 CNS를 육제품 발효의 종균으로 사용하는 유럽에서도 아직 항생물질내성을 제외한 CNS의 안전성 평가 항목을 확실히 제시하고 있지는 않다. 한편 식품에서 검출되는 대부분의 CNS는 사람의 건강을 위협하는 위해성이 없는 것으로 보고되었지만, CNS의 한 종(species)인 *S. epidermidis*는 면역이 떨어진 사람에게 감염을 일으키는 기회감염균으로 알려져 있다[26]. 본 연구에서는 *S. epidermidis*의 안전성 평가에 적용되고 있는 용혈활성 및 biofilm 형성을 젓갈 유래의 CNS의 안전성 평가에 적용해 보았다.

Bacteria의 용혈독소(hemolysin)에 의해서 일어나는 용혈 현상은 α , β , δ 형으로 구분된다. α 형의 용혈은 horse blood (KisanBio, Korea)를 5% (v/v) 첨가한 TSA를 이용하여 37°C에서 24시간 배양한 후, 형성된 투명한으로 활성을 판단하였고, β 와 δ 형의 용혈현상은 sheep blood (BBL Microbiology systems, USA)를 5% (v/v) 첨가한 TSA를 이용하였다. β 형의 용혈독소는 37°C에서 활성을 나타내지 않기 때문에 37°C, 24시간 배양 후, 4°C에서 12시간 추가적 배양을 진행한 후에 활성을 판단하였다. δ 형의 용혈독소는 β 형의 용혈독소 존재 하에서만 활성을 나타내기 때문에, β 형의 용혈독소만을 생성하는 *S. aureus* RN4220 균주가 교차하도록 희석배양하여 교차지점에서 나타나는 투명환을 통하여 활성을 확인하였다[27]. *S. aureus* 균주 Newman [4]과 USA300-P23 [13]을 용혈현상 확인을 위한 대조균으로 사용하였고, 모든 활성은 3반복 실험을 통하여 검증하였다.

적혈구에 구멍을 형성하여 파괴시키는 α 형 용혈활성은 모든 CNS 균주가 가지고 있지 않았지만, 적혈구의 sphingomyelin을 분해시키는 β 형 용혈은 두 균주의 *S. pasteurii*만이 활성을 나타내었고, β 형 용혈활성의 상승작용에 기여하는 δ 형의 용혈활성은 두 균주의 *S. pasteurii*와 세 균주의 *S. saprophyticus*로부터 나타났다(Table 4). β 형 용혈활성을 가지고 있는 두 균주의 *S. pasteurii*는 δ 형의 용혈활성을 동시에 나타내었다. 두 *S. pasteurii* 균주가 동일한 용혈활성 경향을 나타내었지만, 평가 대상 균주의 수가 많지 않아 종 특이적인 현상으로 평가할 근거는 미약하다. 한편 *S. saprophyticus*의 경우에는 균주 특이적인 용혈 양상을 나타내었고, 앞서 보고한 *S. equorum*의 용혈현상도 균주 특이적인 양상으로 나타난 것으로 보아 CNS 균주들의 용혈현상은 균주 특이적인 특성일 가능성이 높다[14].

미생물이 생성하는 biofilm 자체는 위해성을 가지고 있지 않지만, biofilm을 형성하는 식품부패균이나 식중독균은 식

Table 4. Hemolytic activities and biofilm formations of the 17 ampicillin-sensitive CNS isolates from jeotgal.

Strain	Species	α -Hemolytic activity	β -Hemolytic activity	δ -Hemolytic activity	Biofilm formation
C5030	<i>S. caprae</i>	-	-	-	-
KM2110	<i>S. epidermidis</i>	-	-	-	-
KM2036	<i>S. nepalensis</i>	-	-	-	-
KS3076	<i>S. pasteurii</i>	-	+	+	+
KM2056	<i>S. pasteurii</i>	-	+	+	+
KM2104	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	+
KM3109	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	w
KS2080	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	+
KM1064	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	+
KM1053	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	+	w
KM1030	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	+	-
C8013	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	+
KM2032	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	+	w
KS2084	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	+
KS2082	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	-
C2029	<i>S. saprophyticus</i>	-	-	-	+
KM2045	<i>S. vitulinus</i>	-	-	-	+

Abbreviations: +, positive; -, negative; w, weak activity.

폼자체 또는 식품 보존용기로의 부착을 통해 생존율이 높아 지기 때문에 위생 및 식품안전의 측면에서는 검증이 필요한 항목이다. Biofilm 형성 평가를 위하여 tryptic soy broth에서 활성화 시킨 균주는 0.5% glucose를 첨가한 tryptic soy broth에 0.5% 접종한 다음, 96-well microtiter plate의 각 well에 200 μ l 분주하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 배양이 끝나면 plate로부터 배지를 제거한 후, 건조하여 0.1% safranin 용액으로 염색하여 biofilm의 형성을 확인하였다[8]. Biofilm 형성을 평가한 17 균주 중, 12 균주가 biofilm을 형성하였고, *S. saprophyticus*의 biofilm 형성 양상으로부터 biofilm 형성 또한 균주 특이적으로 일어남을 확인하였다 (Table 4).

본 연구에서 평가한 CNS 30 균주 중, 모든 평가 항목을 동시에 만족시키는 균주는 도출되지 않았지만, 각 균주에 대한 평가 결과가 균주 특이적으로 나타남을 확인하였다. 따라서 많은 수의 균주가 확보되면 모든 평가 항목을 만족하는 균주가 도출될 수 있을 것으로 예상된다. 향후, CNS 균주를 식품산업에 활용하기 위해서는 안전성 평가와 함께 우수한 기능성 규명을 위한 지속적인 연구가 필요하다.

요 약

젓갈로부터 분리된 ampicillin 감수성, coagulase 음성 *Staphylococcus* 속 17 균주의 항생물질내성 및 위해성을 평

가하였다. 15 균주는 한 종류 이상의 항생물질에 대한 내성을 나타내었고, penicillin G 내성 균주가 가장 높은 빈도로 검출되었다. PCR 증폭에 의한 항생물질내성 유전자 존재 확인 결과, trimethoprim 내성 관련 *dhfrA* 유전자와 tetracycline 내성 관련 *tetK* 유전자를 각각 보유한 두 균주가 확인되었다. α 형 용혈활성은 검출되지 않았지만, 다섯 균주가 δ 형의 용혈을 나타내었고, 그 중 두 균주는 β 형 용혈활성을 나타냈으며, 12 균주가 biofilm을 형성하였다. 본 실험에서 수행한 모든 안전성 평가 결과는 균주 특이적으로 나타났다.

Acknowledgments

This research was supported by Kyonggi University Research Grant 2014.

References

1. Aarestrup FM, Agerso Y, Gerner-Smidt P, Madsen M, Jensen LB. 2000. Comparison of antimicrobial resistance phenotypes and resistance genes in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* from humans in the community, broilers, and pigs in Denmark. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **37**: 127-137.
2. Aminov RI, Garrigues-Jeanjean N, Mackie RI. 2001. Molecular ecology of tetracycline resistance: development and validation of primers for detection of tetracycline resistance genes encoding ribosomal protection proteins. *Appl. Environ. Micro-*

- biol.* **67**: 22-32.
3. Ammor MS, Mayo B. 2007. Selection criteria for lactic acid bacteria to be used as functional starter cultures in dry sausage production: An update. *Meat Sci.* **76**: 138-146.
 4. Duthie ES, Lorenz LL. 1952. Staphylococcal coagulase: mode of action and antigenicity. *J. Gen. Microbiol.* **6**: 95-107.
 5. EFSA. 2004. Scientific colloquium summary report: Qualified Presumption of Safety of microorganisms in food and feed. <http://www.efsa.europa.eu/>.
 6. Guan L, Cho KH, Lee JH. 2011. Analysis of the cultivable bacterial community in jeotgal, a Korean salted and fermented seafood, and identification of its dominant bacteria. *Food Microbiol.* **28**: 101-113.
 7. Han KI, Kim YH, Hwang SG, Jung EG, Patnaik BB, Han YS, et al. 2014. Bacterial community dynamics of salted and fermented shrimp based on denaturing gradient gel electrophoresis. *J. Food Sci.* **79**: M2516-2522.
 8. Heilmann C, Schweitzer O, Gerke C, Vanittanakom N, Mack D, Gotz F. 1996. Molecular basis of intercellular adhesion in the biofilm-forming *Staphylococcus epidermidis*. *Mol. Microbiol.* **20**: 1083-1091.
 9. Hung WC, Takano T, Higuchi W, Iwao Y, Khokhlova O, Teng LJ, et al. 2012. Comparative genomics of community-acquired ST59 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in Taiwan: novel mobile resistance structures with IS1216V. *PLoS One* **7**: e46987.
 10. Janssens M, Myter N, De Vuyst L, Leroy F. 2012. Species diversity and metabolic impact of the microbiota are low in spontaneously acidified Belgian sausages with an added starter culture of *Staphylococcus carnosus*. *Food Microbiol.* **29**: 167-177.
 11. Janssens M, Myter N, De Vuyst L, Leroy F. 2013. Community dynamics of coagulase-negative staphylococci during spontaneous artisan-type meat fermentations differ between smoking and moulding treatments. *Int. J. Food Microbiol.* **166**: 168-175.
 12. Jensen SO, Apisiridej S, Kwong SM, Yang YH, Skurray RA, Firth N. 2010. Analysis of the prototypical *Staphylococcus aureus* multiresistance plasmid pSK1. *Plasmid* **64**: 135-142.
 13. Jeong DW, Cho H, Lee H, Li C, Garza J, Fried M, et al. 2011. Identification of the P3 promoter and distinct roles of the two promoters of the SaeRS two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **193**: 4672-4684.
 14. Jeong DW, Han S, Lee JH. 2014. Safety and technological characterization of *Staphylococcus equorum* isolates from jeotgal, a Korean high-salt-fermented seafood, for starter development. *Int. J. Food Microbiol.* **188**: 108-115.
 15. Jeong DW, Kim HR, Jung G, Han S, Kim CT, Lee JH. 2014. Bacterial community migration in the ripening of doenjang, a traditional Korean fermented soybean food. *J. Microbiol. Biotechnol.* **24**: 648-660.
 16. Jung J, Choi S, Jeon CO, Park W. 2013. Pyrosequencing-based analysis of the bacterial community in Korean traditional seafood, *ojingeo jeotgal*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **23**: 1428-1433.
 17. Jung JY, Lee SH, Lee HJ, Jeon CO. 2013. Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: traditional Korean salted seafood. *Food Microbiol.* **34**: 360-368.
 18. Jung J, Lee SH, Jin HM, Jeon CO, Park W. 2014. Pyrosequencing-based analysis of bacterial community and metabolites profiles in Korean traditional seafood fermentation: a flatfish-fermented seafood. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **78**: 908-910.
 19. Kim MS, Park EJ. 2014. Bacterial communities of traditional salted and fermented seafoods from Jeju island of Korea using 16S rRNA gene clone library analysis. *J. Food Sci.* **79**: M927-934.
 20. Lee SH, Jung JY, Jeon CO. 2014. Microbial successions and metabolite changes during fermentation of salted shrimp (saeu-jeot) with different salt concentrations. *PLoS One* **9**: e90115.
 21. Lina G, Quaglia A, Reverdy ME, Leclercq R, Vandenesch F, Etienne J. 1999. Distribution of genes encoding resistance to macrolides, lincosamides, and streptogramins among staphylococci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **43**: 1062-1066.
 22. Luthje P, Schwarz S. 2006. Antimicrobial resistance of coagulase-negative staphylococci from bovine subclinical mastitis with particular reference to macrolide-lincosamide resistance phenotypes and genotypes. *J. Antimicrob. Chemother.* **57**: 966-969.
 23. Marty E, Bodenmann C, Buchs J, Hadorn R, Eugster-Meier E, Lacroix C, et al. 2012. Prevalence of antibiotic resistance in coagulase-negative staphylococci from spontaneously fermented meat products and safety assessment for new starters. *Int. J. Food Microbiol.* **159**: 74-83.
 24. Mathur S, Singh R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int. J. Food Microbiol.* **105**: 281-295.
 25. Nam YD, Lee SY, Lim SI. 2012. Microbial community analysis of Korean soybean pastes by next-generation sequencing. *Int. J. Food Microbiol.* **155**: 36-42.
 26. Otto M. 2009. *Staphylococcus epidermidis* — the 'accidental' pathogen. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**: 555-567.
 27. Traber K, Novick R. 2006. A slipped-mispairing mutation in AgrA of laboratory strains and clinical isolates results in delayed activation of agr and failure to translate delta- and alpha-haemolysins. *Mol. Microbiol.* **59**: 1519-1530.