

총설

Enterococcus 속 박테리아의 안전성과 식품발효용 종균 개발의 방향성

이종훈^{1,*}

¹경기대학교 식품생물공학과

Safety of the genus *Enterococcus* and the development of food fermentation starters in Korea: Current status and future steps

Jong-Hoon Lee^{1,*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University

Abstract Bacteria of the genus *Enterococcus* are of importance in food fermentations as well as their use as probiotics in humans and livestock. However, they are also important nosocomial pathogens that cause infections. Some strains are resistant to multiple antibiotics and possess virulence factors. The role of *Enterococcus* species in disease has raised issues on their safety for use in foods or as probiotics. First, this review summarized the positive and negative traits of *Enterococcus* spp. to illustrate the controversial nature of this bacterial genus and discussed the current genomic approaches can eliminate pathogenic strains. Then, this review examined the current status of starter development for traditional food fermentations and the regulation on the approval of novel food microorganisms in Korea to point out problems in the regulation. Based on the conclusions from the studies on *Enterococcus* spp., we suggested the direction of safety assessment of novel food microorganisms in Korea.

Keywords: *Enterococcus*, starter development, safety assessment, novel food microorganism

서론

발효를 통하여 유산을 생성하는 *Enterococcus* 속(genus) 박테리아는 유산균 범주에 포함된다. 항체반응을 이용한 Lancefield 분류에 의해 *Enterococcus* 속은 D그룹 *Streptococcus*로 분류되었지만, DNA-DNA 및 DNA-RNA 혼성화 연구가 박테리아 동정에 도입되면서 *Enterococcus* 속으로 독립하게 되었다(Schleifer와 Kilper-Balz, 1984). 대부분의 *Enterococcus* 종(species)은 6.5% NaCl 농도까지 내염성을 가지고 있으며, 60°C에서 30분 생존이 가능하고, 성장온도는 10-45°C로 알려져 있으며 넓은 pH 범위에서 생육이 가능하다(Flahaut 등, 1996; Moellering, 1992). 그람 양성 통성혐기성 박테리아 *Enterococcus*는 포유류 및 조류의 장관 공생균으로 분변으로 방출되어 토양, 물, 식물체, 식품과 같은 광범위한 자연계에서 쉽게 분리되며, 대장균과 함께 식품의 분변오염지표세균으로 활용된다(Hanchi 등, 2018; Klein, 2003). 다양한 환경에서의 빈번한 *Enterococcus* 검출은 화학적 및 물리적 요인에 대한 강한 저항성으로 숙주의 장관환경 밖에서도 오랫동안 생존할 수 있기 때문으로 추정하고 있다(Giraffa, 2002).

치즈 및 유제품, 발효유제품에서 빈번히 검출되는 *Enterococcus*는 단백질 및 지질 분해활성, 다당류 생성, citrate 대사 능력을 보유하고 있어 발효식품에서 특유의 풍미와 물성을 나타낼 뿐만

아니라 박테리오신(bacteriocin)을 생성하는 특성을 가지고 있어 식품발효의 종균으로 활용될 높은 가능성이 보고되었고(Giraffa, 2003), 건강기능성을 보유한 균주들이 발굴되어 프로바이오틱스(probiotics)로 상품화 된 예도 있다. 건강한 사람에게 문제가 되지 않는 *Enterococcus*는 식품산업에서 활용이 기대되는 긍정적 측면을 가지고 있지만, 면역이 약화된 사람에게는 위장염, 요로감염증, 심내막염, 뇌수막염 등의 원인이 될 수 있어 위해균의 측면 또한 계속적으로 부각되고 있다(Moellering, 1992).

본 총설에서는 다양한 발효식품에서 우점으로 검출되는 *Enterococcus*의 식품산업에서의 활용을 위하여 긍정적 및 부정적 측면에 대한 정보를 제공하고, 부정적인 측면을 보유하지 않은 안전한 균주를 선별하여 활용할 수 있는 방향을 검토하였다. 또한, *Enterococcus* 연구에서 도출된 결과를 바탕으로 전통발효식품의 종균화가 활발하게 추진되고 있는 우리나라에서 신규 식품용 미생물의 안전한 활용을 위한 안전성 평가 방향을 제시하였다.

발효식품과 *Enterococcus* 속

치즈

그리스, 이태리, 스페인, 포르투갈 등의 지중해 지역에서 염소, 양, 물소 등의 반추동물 젖을 원료로 만들어진 치즈와 *Enterococcus* 속 박테리아의 관련성이 보고되었다(Giraffa, 2003). 발효유제품에서의 빈번한 *Enterococcus* 검출은 발효유제품 가공과정에서 사람이나 동물의 분변 오염에 기인하는 것으로 알려져 있지만, 간접적으로는 세척 및 가공에 사용되는 물과 용기의 오염 또한 원인으로 고려되고 있다. 치즈의 종류에 따라 차이가 있지만 10⁴에서 10⁷ CFU/g 수준의 *Enterococcus*가 검출되었고, 일부 치즈에서는 *E. faecium*과 *E. faecalis*가 우점종으로 알려졌다. *Enterococcus* 검

*Corresponding author: Jong-Hoon Lee, Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Korea
Tel: +82-31-249-9656
Fax: +82-31-253-1165
Email: jhl@kgu.ac.kr
Received November 20, 2019; revised December 2, 2019;
accepted December 2, 2019

출 수준과 치즈의 관능특성에 대한 상관성은 아직 결론이 도출되지 않았지만, 단백질 및 지질 분해활성과 diacetyl을 비롯한 다양한 향기성분 생성이 치즈 품질에 도움을 주는 것으로 보고되었다(Foulquié Moreno 등, 2006).

또한 *Enterococcus*는 식중독균 *Listeria*와 *Clostridium* 속 뿐만 아니라 *Escherichia coli* 및 *Vibrio cholerae* 등의 생육을 저해하는 박테리오파지를 생산하는 것으로 보고되어 식품발효용 종균제 및 혼합종균제로 검토되고 있으며, 이들이 생산한 박테리오파지 자체의 식품 적용에 대한 관심도 높다(Foulquié Moreno 등, 2006). *Enterococcus* 종균제 및 혼합종균제를 다양한 치즈제조에 첨가하여 이들을 산업적으로 활용하려는 많은 연구가 진행되었지만, 병원감염의 주요 원인균이라는 보고가 지속적으로 발표되고 있어 산업적 활용은 신중하게 진행되고 있다(Franz 등, 2011).

육제품

육제품에서 검출되는 *Enterococcus*는 도살과정에서 동물의 장관에 존재하던 *Enterococcus*가 오염되는 것으로 알려져 있다. 주로 *E. faecalis*와 *E. faecium*이 비살균 육제품 뿐만 아니라 가공육이나 소시지에서도 검출되는 것으로 보고되었다. 도살한 동물에서 검출되는 *Enterococcus*의 수는 100 cm² 당 10⁴-10⁸ CFU 수준으로 보고되었다. 가공육 제조과정의 열처리와 비교적 내열성이 높은 *Enterococcus*를 선택적으로 증식시키는 결과를 낳기도 한다.

*Enterococcus*는 살라미(salami)와 같은 발효육제품에서도 검출되는데, 종균제의 사용과 관계없이 숙성된 제품으로부터 10³-10⁵ CFU/g 수준의 검출이 보고되었다. 지중해 지역에서 소규모로 제조되는 전통발효육제품은 종균제 첨가 없이 자연발효에 의해 제조되는데, 발효과정에서 *Enterococcus* 및 *Lactobacillus*와 같은 유산균과 coagulase 음성 *Staphylococcus* 그리고 효모의 공존이 확인되었다. 이러한 장인이 만든 전통발효육제품은 오랜 섭취이력을 통하여 안전성이 입증되었다. 발효육제품에서의 *Enterococcus* 기능 연구는 발효육제품 대비 많이 진행되지 않았지만, *Enterococcus*의 당, 단백질, 지방 분해활성이 발효육류의 풍미 형성에 기여하는 것으로 알려져 있고, metmyoglobin 저감화에도 기여하는 것으로 알려져 있다(Franz 등, 2011).

다양한 발효육제품으로부터 박테리오파지를 생산하는 *Enterococcus*가 분리되어, 이들을 육제품가공 환경에서의 동물 분변오염과 관련이 깊은 *Listeria*의 억제 목적을 목적으로 활용하려는 시도가 진행되었다. *E. faecalis* 및 *E. faecium* 균주를 발효육제품의 종균으로 첨가한 결과, *Listeria*의 생육 저해에 효과가 있었고, 풍미에 문제를 일으키지 않는 것으로 보고되어 우수한 발효육제품의 종균으로 거론되고 있으며, 이들이 생산한 박테리오파지에 의한 *Listeria* 저해효과 또한 보고되었다. 하지만 *Listeria* 저해효과는 항상 일정하게 나타나지 않아 박테리오파지의 적용 대상 미생물 및 효과의 최적 조건에 대한 세밀한 연구가 필요한 것으로 알려져 있다(Franz 등, 2011).

올리브 및 채소 발효식품

육제품이나 육제품에서의 *Enterococcus* 연구에는 미치지 못하나, 올리브를 중심으로 한 채소 발효식품에서도 높은 빈도로 *Enterococcus*가 검출되는 것으로 알려져 있다. 스페인의 녹색 올리브 발효에서 *E. faecalis* 및 *E. faecium*가 높은 빈도로 검출되었다. 올리브 발효에서 검출되는 유산균은 *Lactobacillus*가 주를 이루고 있지만, *Enterococcus*도 상당수 검출되는 것으로 보고되었다(Franz 등, 2011). 채소 발효식품의 경우, 사우어크라우트(sauerkraut), 토마토 주스, 강낭콩, 케이퍼베리(caper berry) 등에서

의 검출이 보고되었다(M'hir 등, 2012).

김치

유산균 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella* 속 박테리아가 한국의 대표적 발효채류 김치의 주요 발효균이라 결론은 1980년경부터 수행된 배양법 기반의 김치 미생물 분리 및 동정 연구 및 2000년경부터 시작된 배양 비의존적 미생물상 연구로부터 확립되었다(Jung 등, 2014; Patra 등, 2016). *Enterococcus*의 존재는 배양법 기반의 다수 연구에서 보고되었지만(Lee 등, 1992; Lim 등, 1989; Mheen과 Kwon, 1984; Shin 등, 1996), microarray 분석법(Bae 등, 2005)을 적용한 경우를 제외하고, 16S ribosomal DNA clone 분석, pyrosequencing 등의 배양 비의존적 미생물 분석법을 적용한 김치 미생물상 연구에서는 그 존재가 확인되지 않은 점으로 미루어 김치발효에서 *Enterococcus*는 *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Weissella* 대비 검출 빈도나 역할이 크지 않을 수 있지만, 김치로부터의 분리는 어렵지 않은 것으로 추정된다. 김치발효용 종균 개발을 목표로 박테리오파지를 생산하는 *Enterococcus* 균주를 분리하여 김치에서의 적용성을 검토한 연구가 진행되었으나, 현재 종균으로는 사용되고 있지는 않다(Ha와 Cha, 1994; Moon 등, 2004). 또한 김치로부터 분리한 *E. faecium* 균주를 프로바이오틱스로 개발하기 위한 면역활성 연구도 보고된 바 있다(Rho 등, 2017).

장류

김치의 경우와 마찬가지로 한국의 대표적 콩발효식품 메주 및 장류의 우점종 규명 및 종균 개발을 목표로 미생물 분리 및 동정 연구가 진행되어, 가장 빈번하게 검출된 *Aspergillus* 속 곰팡이와 *Bacillus* 속 박테리아가 메주 및 장류 발효 우점 미생물로 보고되었다(Choi 등, 2003; Kang 등, 2000; Kwon 등, 1986; Yoo 등, 1999). 한편, 배양 비의존적 미생물상 연구가 진행되면서 이들 외에도 다양한 곰팡이와 박테리아의 메주와 장류 발효 관련성이 확인되었고, 특히 유산균 *Enterococcus* 속과 *Tetragenococcus* 속 및 coagulase 음성 *Staphylococcus* 박테리아의 깊은 관련성이 확인되었다(Kim 등, 2011a, b). 이러한 결과는 배양법을 이용한 미생물상 연구에서 다양한 배지 및 배양 조건이 도입되지 않았고, 점질물을 생성하는 *Bacillus*의 생육이 다양한 박테리아의 분리 및 동정에 방해요인으로 작용한 것으로 사료된다. 다양한 배지를 배양법에 도입하여 된장발효 과정의 박테리아 천이를 모니터링한 본 연구자의 연구에서는 *Bacillus* 외에도 *Enterococcus*, *Tetragenococcus* 및 coagulase 음성 *Staphylococcus*의 존재를 확인하였다(Jeong 등, 2014). 또한 우리나라 각 지역에서 수집한 메주의 미생물상 연구에서 *Enterococcus*의 우점을 확인하였으며, 분리된 대부분의 *Enterococcus* 속 박테리아가 *E. faecium*으로 확인되었다(Jang 등, 2019). 메주로부터 분리된 *Enterococcus*의 박테리오파지를 식품용 보존제로 활용하기 위한 연구가 진행되었고(Lee 등, 2005; Lim 등, 2005), 장류발효 종균으로 사용하기 위한 *Enterococcus*의 안전성 및 기능성에 대한 연구가 진행되었지만(Jeong 등, 2015, 2017; Lee와 Park, 2012; Lee 등, 2017), 산업적으로 활용 단계에 도달하진 못했다.

프로바이오틱스로 개발된 *Enterococcus* 균주

프로바이오틱스는 인간을 포함한 숙주의 장내균총을 개선하고 건강증진효과를 부여할 수 있는 살아있는 미생물 제제를 의미한다. 프로바이오틱스는 의약품 형태 뿐만 아니라 발효유, 유아식

등의 식품 형태로 제품화되고 있다. 인간 장관 유래 *Lactobacillus* 및 *Bifidobacterium* 균주들이 프로바이오틱스의 주를 이루고 있지만, *E. faecium*과 *E. faecalis* 뿐만 아니라 *Streptococcus thermophilus*, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Pediococcus acidilactici*, *Sporolactobacillus inulinus*, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus* var. *toyoi*, yeast *Saccharomyces boulardii* 등도 프로바이오틱스로 사용된 바 있다(Holzappel 등, 1998). *E. faecium*과 *E. faecalis* 균주들의 경우, 사람의 식이보조제나 가축사료 첨가제로 사용되고 있고, *E. faecium* SF68과 *E. faecalis* Symbioflor 1 균주가 성공적으로 상품화되었다. 항생물질 복용에 따른 설사에 대한 효능이 입증된 *E. faecium* SF68 균주는 스위스 DSM (<https://www.dsm.com>)에서 Cylactin이라는 이름으로 상품화되어 지속적으로 판매되고 있다. 덴마크 MD Foods (<https://mdfoods.net>)는 SF 68 균주를 첨가한 GAIO라는 발효유제품을 상품화하였다. 독일 SymbioPharm (<https://www.symbiopharm.de>)은 만성비염과 기관지염, 천식 등의 질환에 대한 면역활성 증강에 효과가 입증된 *E. faecalis* Symbioflor 1 균주를 Symbioflor 1이라는 이름으로 판매하고 있으며, 이 제품은 어린 학생들을 대상으로 한 실험을 통하여 알레르기성비염 치료에 도움이 된다는 점이 통계학적으로 증명되었다(Habermann 등, 2002). *Enterococcus*의 건강기능성은 다양한 분야에서 입증되었지만, 항생제 내성 유전자의 획득 및 질병 관련성은 프로바이오틱스 사용에 있어 여전히 논란이 되고 있다.

Enterococcus 속의 병원성

건강한 사람에게 *Enterococcus*는 문제가 되지 않지만, 면역이 저하된 사람에게는 위장염, 요로감염증, 심내막염, 균혈증, 뇌수막염 등의 원인이 될 수 있다고 알려져 있고(Giraffa, 2002), 미국에서는 병원 내 기회감염의 약 12%를 차지하는 원인 박테리아로 보고된 바 있다(de Fatima Silva Lopes 등, 2005; Richards 등, 2000). *Enterococcus*의 대표적 병원성은 여러 항생제에 대한 내성균의 발생을 들 수 있다. 박테리아의 항생제 내성은 항생제가 사용되는 병원과 식품생산을 위한 축산, 양식 등의 환경에서 내성 박테리아의 선택적 증식을 촉진할 뿐만 아니라, 치료를 위한 항생제 사용을 무력화 할 수 있는 결과를 초래할 수 있어, 세계적으로 항생제 오남용에 대한 감시를 진행하고 있다. 특히 vancomycin 내성 *Enterococcus* 균주의 등장은 치료의학분야의 세계적인 문제점으로 등장하였다. 항생제 내성 외에도 숙주의 특이적 및 비특이적 방어 메커니즘을 저해하는 인자 및 숙주로의 침입과 증식에 관여하는 인자들도 *Enterococcus*의 독성인자에 포함된다. 독성인자를 보유한 균주는 직접적인 독소 생산을 통하여 병리학적 특성을 발현하기도 하지만, 간접적으로 염증을 생성하여 병리학적 특성을 나타낸다(Johnson, 1994). 따라서 지금까지 보고된 *Enterococcus*의 독성인자는 감염 및 병리학적 특성 관련 인자를 포함한다.

용혈소 또는 세포용해소(cytolysin)로 불리는 β -hemolysin은 *Enterococcus*의 주요 독성인자의 하나로 알려져 있다. 동물실험에서 세포용해소 보유 병원성 균주의 독성은 비보유 균주보다 높은 것으로 보고되었다(Chow 등, 1993; Gilmore 등, 1994; Jett 등, 1992; Jett 등, 1994). 또 다른 주요 독성인자는 세포응집인자(aggregation substance)를 들 수 있다. Pheromone 반응성 플라스미드에 암호화된 부착분자(adhesin)의 일종인 세포응집인자는 *E. faecalis* 세포의 응집을 유도하여, 세포응집인자 유전자가 암호화된 플라스미드의 전달을 용이하게 한다고 보고되었다(Clewell,

1993). 세포실험을 통하여 *E. faecalis*의 세포응집인자는 숙주 부착 및 감염을 용이하게 한다는 결과도 보고되었으며, 감염의 여러 단계에서 작용하는 것으로 확인되었다(Kreft 등, 1992; Olmsted 등, 1994). 세포응집인자는 숙주세포로의 부착 뿐만 아니라 숙주 세포에서의 생존과 이동에도 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 단백질분해효소의 일종인 gelatinase는 세포의 콜라겐성 물질을 분해한다. 동물실험을 통하여 gelatinase를 생산하는 *E. faecalis* 균주는 세포독성이 증가하는 것으로 확인되었고(Roberts 등, 2004; Singh 등, 1998), gelatinase는 세포의 fibrin을 분해하여 숙주세포에 손상을 주어 박테리아의 이동과 확산에 영향을 주는 것으로 알려져 있다. 그 외에도 부착분자의 일종인 *Enterococcus* surface protein (Esp)과 *E. faecalis* 유래의 콜라겐 결합 adhesin (Ace) 등이 있고(Rich 등, 1999; Shankar 등, 1999), 이들은 *E. faecalis*의 바이오필름 형성에 관여하는 것으로 보고되었다(Toledo-Arana 등, 2001). 부착분자와 유사한 *Enterococcus* 심내막염 항원(EfaA)은 *Streptococcus* 유래 심내막염 관련 인자 FimA, SsaB, ScaA, PsaA와 높은 유사성을 가지고 있어, 독성인자로 추정되고 있다(Lowe 등, 1995). *Enterococcus* 선모(pili) 또한 상피세포 부착과 심내막염에 작용하는 것으로 알려져 있다. *E. faecalis*의 선모 관련 단백질 Ebp (endocarditis and biofilm-associated pili)의 유전자 *ebp*는 바이오필름 형성에 영향을 주는 것으로 알려져 있다(Nallapareddy 등, 2006).

병원성 *Enterococcus*에서는 유전자 수평이동을 통하여 획득한 유전자군(genomic island) 또는 독성유전자군(pathogenicity islands)이 발견된다. *E. faecium*에서 발견된 150 kbp 크기의 독성유전자군은 *Enterococcus* surface protein의 정보를 암호화하는 *esp* 유전자를 포함하는 것으로 보고되었으며(Leavis 등, 2004), *esp* 유전자가 포함된 독성유전자군은 병원에서 분리된 균주로부터 빈번하게 검출되고 있다. 결합조직이나 피부세포 사이에 존재하는 히알루론산을 분해하는 효소 hyaluronidase의 *hyl* 유전자가 병원에서 분리된 *E. faecium*으로부터 유전자군 형태로 발견되었다. 히알루론산을 분해해서, 조직으로의 침입, 확산을 용이하게 하고 있다고 생각하는 이 효소의 유전자는 항생제 내성 유전자 및 선모 유전자와 함께 플라스미드에서 발견된다(Laverde Gomez 등, 2011). Shankar 등(2002)이 보고한 *E. faecalis*의 독성유전자군에는 *Enterococcus* surface protein, 세포용해소, 응집인자, 담즙산 분해효소 등의 유전자가 존재하는 것으로 보고되었다.

병원성 Enterococcus 균주의 유전적 특성

식품 유래 *Enterococcus*의 독성인자 연구 및 유전적 상관성 연구를 통하여 식품 유래 균주의 독성인자 보유는 균주 특이적인 현상으로 확인되었고, 독성의 발현은 단순히 특정 독성인자 유전자 보유에 의해 나타나는 현상이 아닌 여러 인자들에 의한 복합적인 현상으로 이해되고 있다. 대체로 병원성 균주들의 독성인자 관련 유전자는 insertion sequence element, transposon, 박테리오파지, 독성유전자군 등의 이동형 유전인자(mobile genetic element)의 형태로 획득하는 것으로 보고되었고, 독성인자 유전자의 획득은 숙주에서의 생존에 도움을 주는 것으로 알려져 있다. 따라서 이러한 새로운 독성인자 유전자를 받아들인 균주들은 새로운 유전적 계통을 형성하는 방향으로 진화하게 된다.

다양한 분리원에서 얻어진 *E. faecalis* 균주들을 대상으로 다수의 세포유지 유전자(housekeeping 유전자) 염기서열의 차이를 비교하여 특정 미생물 종의 균주간 유전적 상관관계 규명에 활용되는 multilocus sequence typing (MLST) 분석을 진행하여 집단

내에서의 유전적 상관관계를 분석한 결과, 유전형집단(clonal cluster, CC) CC2, CC8, CC9가 항생제 내성 유전자 및 독성유전자군을 다수 포함하고 있으며, 세계적으로 확산되어 있음을 확인하였다(McBride 등, 2007). 유전자 획득 및 소실은 특정 환경에서의 적응성을 높이는 원동력으로 추정되고 있으며, 병원 유래 *E. faecium*의 경우 이동형 유전인자를 통해서 다수의 유전자를 받아들이는 것으로 알려져 있다(Leavis 등, 2007; van Schaik 등, 2010).

병원 유래 *E. faecium*의 대표적 병원성 유전형집단 CC17의 경우, *esp* 유전자, vancomycin 내성 유전자, 콜라겐 결합인자 유전자를 포함하는 60 kbp 크기 이상의 독성유전자군을 가지고 있으며, 유전형집단 CC17 계통의 균주는 현재 식품에서도 검출되는 것으로 보고되었다(Lopez 등, 2009). 다양한 환경에서 분리된 *Enterococcus*는 다양한 유전형을 가지고 있지만, 이동형 유전자의 형태로 항생물질 내성 유전자나 독성인자 유전자를 받아들이는 능력을 가지고 있어 병원성 유전형집단으로 발전하는 것으로 추측하고 있다. 이동형 유전인자의 형태로 전이되는 유전자들은 항생제 내성 유전자 외에도 세포표면구조, 대사, 독성 관련 유전자가 포함되며, 아직 *Enterococcus*의 병원성을 이해할 수 있는 독성인자 유전자 및 관련 유전자 획득 기작이 완전히 밝혀지지 않은 상태에 있다.

그러나, *E. faecium* SF68와 *E. faecalis* Symbioflor 1의 경우 높은 용량의 균을 한꺼번에 섭취함에도 불구하고 20년 이상 문제를 일으키지 않고 프로바이오틱스로 판매되고 있다. *E. faecium* SF68는 독성인자 유전자를 보유하고 있지 않고, 세포융집인자 유전자도 보유하고 있지 않으며, 혈관상피세포에 결합하지 않는 것으로 보고되었다(Chisari 등, 1992; Kayser, 2003). *E. faecalis* Symbioflor 1 균주와 병원성 *E. faecalis* V583 균주의 유전체를 비교한 결과, 병원성 균주가 보유한 세포용해소, Esp, gelatinase, hyaluronidase, peptide antibiotic AS-48 유전자를 Symbioflor 1 균주는 보유하지 않은 것으로 확인되었지만, 세포융집인자, 콜라겐 결합 단백질 등의 유전자가 확인되었다(Domann 등, 2007). Symbioflor 1 균주가 보유한 독성인자 유전자는 근집화와 관련된 특성으로 건강기능성 발현의 요인으로 추정되고 있다.

Enterococcus 속의 규제

유럽연합(EU)에서는 인가미생물목록(positive list)을 통하여 동물사료 첨가용 미생물을 규제하고 있다. 2011년 독일에서는 유럽연합 인가미생물목록을 포함하는 동물사료용 미생물목록(Feed additives: microorganisms)을 발표하였고, 이 목록에 *Enterococcus* 속 박테리아가 포함되어 있다(Federal Office for Consumer Protection and Food Safety, <http://www.bvl.bund.de/>). 미국에서는 사료 첨가용 프로바이오틱스를 Direct Fed Microorganisms (DFM)이라 칭하고, The Association of American Feed Control Officials (AAFCO)에서 DFM 목록을 발표하였는데, 여기에 *E. faecium*을 포함한 6개 종의 *Enterococcus*가 등재되어 있지만, *E. faecalis*는 목록에 없다. 유럽과 미국에서는 *Enterococcus*를 사료 첨가용 프로바이오틱스로 허용하고 있다.

2000년 경까지 유럽연합에는 사료용과는 달리 식품에 사용하는 미생물에 대한 특별한 규정이 존재하지 않았는데, European Food Safety Authority (EFSA)는 Scientific Committee on Animal Nutrition (SCAN), Scientific Committee on Food (SCF), Scientific Committee on Plants (SCP)의 전문가 그룹을 2002년과 2003년에 소집하여 식품이나 사료에 사용될 미생물의 안전성 평가를 위한 Qualified Presumption of Safety (QPS) 개념을 제안하

였다(EFSA, 2005). EFSA는 QPS 규격을 통하여 식품 및 사료용 미생물의 안전성을 평가하고, 안전하다고 평가된 미생물 단위(종 또는 속)는 사용 용도를 제한하지 않는다. QPS에 의해 안전성이 확보된 미생물 단위는 QPS list에 등록되고, 이 목록은 매년 업데이트된다(<http://www.efsa.eu.int/>). QPS list에 등록된 미생물 단위는 일반적인 안전성이 입증되었기 때문에 균주 수준에서의 특이적 안전성 문제가 없다면 식품에 사용 가능하다. 한편 등록되지 않은 미생물 단위에 대해서는 평가가 필요한 모든 안전성이 검증되어야 한다. 현재, QPS list에 등재된 *Enterococcus* 속 박테리아는 없지만, 미생물의 산업적 이용을 포함하는 역사적 사용 이력, 주요 분포 생태계, 질병 관련성, 안전성 등의 과학적 정보에 근거하여 안전성이 확보된 균주의 사용은 가능하다.

Generally Recognized As Safe (GRAS)는 미국 Food and Drug Administration (FDA)가 오랜 사용이력 및 전문가들의 평가를 통하여 일반적으로 안전하다고 판단되는 식품원료 및 식품첨가물을 관리하는 규격(status)이다. GRAS 시스템이 시행되기 시작한 1958년 이전부터 사용한 물질에 대해서는 사전승인(prior sanction) 물질로 간주해 안전성 평가 없이 GRAS로 인정되었지만, 현재는 안전성에 대한 과학적 근거 자료에 대한 전문가들의 심사를 통하여 인정된다. GRAS notification program은 식품원료 및 식품첨가물의 안전성을 증명하는 과정으로, GRAS로 인증된 식품원료는 GRAS notice inventory에 등재되어 FDA homepage (<http://www.fda.gov>)에 공개된다. GRAS 규격은 식품에 첨가하는 원료 자체에 대한 안전성을 제공하는 것이 아닌, 특정용도에서의 안전성을 의미하기 때문에 항상 용도를 지정해야 한다. 또한 GRAS 규격은 QPS 규격과는 달리 미생물 단위의 안전성이 아닌 특정 균주의 안정성을 의미한다. *Bifidobacterium*, *Lactobacillus* 속의 약 20여 균주가 GRAS로 인정되었지만, *Enterococcus* 속의 균주는 GRAS로 인정된 바 없다.

우리나라에는 식품용 미생물 허가에 대한 구체적 법령은 없지만, 현재 식품발효를 위해 사용되는 종균은 식품원료 목록에 등재된 미생물 만이 사용 가능하다. 식품원료로 허가되지 않은 새로운 식품원료 및 미생물은 안전성을 입증하여 식품의약품안전처로부터 사용에 대한 인정을 받아야 한다. *Enterococcus* 속의 경우, *E. faecalis* 사균체가 제한적으로 식품원료로 허가되어 있다(Table 1). 한편, 프로바이오틱스로 개발하고자 할 경우, 건강기능성식품법에 따라 안전성과 기능성을 입증해야 한다. 현재 건강기능성식품법은 *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium* 속의 19종을 기준규격형으로 허가하고 있으며, *E. faecium*과 *E. faecalis*가 허가되어 있다. 그 외의 미생물의 경우 개별인증형으로 허가를 받아야 한다.

우리나라의 종균 산업화

우리나라 김치, 된장, 젓갈 등의 전통발효식품은 자연발효를 기반으로 지역과 가정에 따라 고유한 제조법으로 만들어지고 있으나, 경제 및 사회 변화에 의해 상업적 대량생산의 방향으로 진행되고 있다. 전통발효식품의 상업적 생산과 관련한 문제점 해결을 위하여 다양한 연구가 시도되었고, 종균의 사용은 가장 바람직한 해결책의 하나로 주목받고 있다.

우리나라 전통식품 세계화의 대표적 식품으로 자리매김한 김치의 상품성 증진을 위한 종균 개발은 성공적으로 진행되어 대 단위 김치 제조업체에서는 종균을 사용한 제품을 출시하고 있다. 또한, 김치로부터 분리된 유산균주의 건강기능성을 규명하여 건강기능식품으로 상업화에 성공한 예도 있다. 김치 유래 유산균이

Table 1. Partial list of microorganisms approved for food use in Korea

Genus	Species	Qualification
<i>Lactobacillus</i>	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. brevis</i> , <i>L. bulgaricus</i> , <i>L. caucasicus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. crispatus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. delbrueckii</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. gasseri</i> , <i>L. helveticus</i> , <i>L. hilgardii</i> , <i>L. johnsonii</i> , <i>L. kefirifaciens</i> , <i>L. kefirii</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. leichmannii</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>L. paraplantarum</i> , <i>L. pentosus</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. perolens</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. sakei</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. sanfranciscensis</i>	<i>L. sanfranciscensis</i> is allowed only for bread dough make.
<i>Bacillus</i>	<i>B. amyloliquefaciens</i> (<i>B. velezensis</i>), <i>B. coagulans</i> , <i>B. natto</i> , <i>B. polyfermenticus</i> , <i>B. subtilis</i> (<i>B. globigii</i> , <i>B. natto</i>)	
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecalis</i>	Dead cell is allowed.
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leu. citreum</i> , <i>Leu. kimchii</i> , <i>Leu. mesenteroides</i> , <i>Leu. paramesenteroides</i> , <i>Leu. pseudomesenteroides</i>	
<i>Pediococcus</i>	<i>P. acidilactici</i> , <i>P. parvulus</i> , <i>P. pentosaceus</i> , <i>Tetragenococcus halophilus</i> (formerly <i>P. halophilus</i>)	
<i>Saccharomyces</i>	<i>S. cerevisiae</i> , <i>S. carlsbergensis</i> , <i>S. lactis</i> , <i>S. rouxii</i>	
<i>Staphylococcus</i>	<i>S. carnosus</i> , <i>S. vitulinus</i> , <i>S. xylosus</i>	Allowed only for fermented meat production
<i>Weissella</i>	<i>W. cibaria</i> , <i>W. confusa</i> , <i>W. koreensis</i>	

종균 및 프로바이오틱스로 산업화에 성공한 이유는 오랜 기간의 김치발효 미생물연구를 통하여 개발된 종균 및 프로바이오틱스의 기능성이 과학적으로 뒷받침되었기 때문이지만, 김치발효를 담당하는 유산균 대부분 종이 식품원료로 허가되어 있어 산업화 과정에서 필요한 식품의약품안전처 인허가 과정이 생략될 수 있었던 점이 주요 요인 중의 하나로 생각된다.

개량식 된장의 품질은 코지(koji) 사용으로 품질 균일화가 달성되었지만 곰팡이가 단조롭고 재래식 대비 영양적으로 부족한 부분을 극복해야 한다. 한편, 메주를 사용하는 재래식 담금에서는 메주 및 된장의 품질 균일화 및 안전성 측면에서 취약한 부분이 있다. 따라서 장류의 품질 균일화 및 품질증진을 위하여 우점종으로 알려진 *B. subtilis*를 중심으로 한 *Bacillus* 균주를 종균으로 사용하려는 노력들이 진행되고 있다. 그러나, 최근의 메주 및 장류 미생물상 연구에서는 *B. subtilis* 외에도 *B. amyloliquefaciens*, *B. licheniformis*, *B. sonorensis*, *B. methylotrophicus* 등의 우점이 확인되었다(Jeong 등, 2014; Kim 등, 2011a; Kim 등, 2011b). 또한 최근의 메주로부터 *Bacillus*를 분리 및 동정 연구에서 *B. velezensis*, *B. sonorensis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* 순의 우점이 확인되었다(Jang 등, 2019). 이러한 결과는 분자수준의 연구를 통한 박테리아 동정기술의 발달로 근연종의 구분이 용이해짐에 따라 새로운 *Bacillus* 종의 등록이 증가했을 뿐만 아니라, 근연종 동정에 유전체정보가 활용되면서 박테리아의 분류학적 위치가 계속적으로 변경되고 있기 때문이다(Dunlap 등, 2015, 2016; Fan 등, 2017). *B. velezensis*가 메주의 우점종이라는 결과는 *B. methylotrophicus*, *B. amyloliquefaciens* subsp. *plantarum*, *B. oryzicola*가 *B. velezensis*로 통합된 결과를 반영하고 있다(Dunlap 등, 2016; Fan 등, 2017).

식품의약품안전처는 빠르게 변하고 있는 과학적 변화를 수용하여 *B. amyloliquefaciens*의 근연종 *B. velezensis*를 식품원료에 포함시켰고, 현재 *B. amyloliquefaciens*, *B. coagulans*, *B. natto*, *B. polyfermenticus*, *B. subtilis* (*B. globigii*, *B. natto*)를 식품용으로 허가하고 있지만, 메주 및 장류에서 우점종으로 검출되는 *B. licheniformis*를 비롯한 다수의 *Bacillus* 종이 식품원료로 등록되지 못했다(Table 1). 따라서 제시되지 않은 *Bacillus* 속의 새로운 균주를 종균으로 사용하기 위해서는 안전성 자료를 첨부하여 식품의약품안전처의 인정을 받아야 한다.

최근의 메주 및 장류 연구에서는 *Bacillus* 속 외에도 *Enterococ-*

cus 속 유산균, *coagulase* 음성 *Staphylococcus*를 포함한 다양한 미생물의 존재가 장류 발효에 영향을 미칠 수 있다는 점이 지속적으로 보고되고 있다. 따라서, 고품질 장류를 위한 종균 개발에 있어 이들의 도입을 고려해야 할 시점에 있다.

김치와 장류 외에도 배양 비의존적 미생물상 분석이 전통발효 식품에 적용되면서 기존 연구에서 알려지지 않았던 다양한 미생물의 존재가 전통발효식품의 발효에 관여하는 것으로 알려지고 있다. 한 예로 고염에서 숙성되는 것갈과 *coagulase* 음성 *Staphylococcus*의 발효 관련성을 들 수 있다(Guan 등, 2011; Jung 등, 2013a; Jung 등, 2013b). *Coagulase* 음성 *Staphylococcus*는 고염에서 발효되는 유럽의 육류 및 소시지 발효 우점종으로 알려져 있으며, *S. carnosus*가 종균 첨가제로 상용화된 예도 있다(<https://www.sausagemaker.com/bactoferm-f-rm-52-p/11-1310>). 우리나라에서는 *S. carnosus*, *S. vitulinus*, *S. xylosus*가 발효육류 제조에 한하여 허용되고 있다(Table 1). *Coagulase* 음성 *Staphylococcus*는 아직 식품발효용 미생물로 주목받지 못하고 있지만 추가적인 과학적 안전성 검증을 통하여 고염발효용 종균으로 산업화될 가능성이 높은 미생물로 사료된다.

우리나라의 신규 식품용 미생물 허가

세계적으로 기존에는 사용되지 않았던 새로운 식품원료의 사용이 늘면서 국내에서도 새로운 식품원료(novel food)에 대하여 체계적인 안전성 평가를 거친 후 식품에 사용하도록 하는 제도 마련의 필요성이 제기되어 왔다. 2009년 8월 12일 ‘식품위생법 시행규칙’이 개정 공포되면서 기존에 섭취하지 않았던 새로운 원료를 식품원료로 사용하고자 하는 경우에는 식품의약품안전청장이 정하는 자료를 구비하여 안전성 평가를 받아야 하며, 식품의약품안전청장이 안전성 평가를 실시하여 안전성에 문제가 없는 경우에는 식품의 원료로서 한시적으로 사용할 수 있게 되었다. 따라서 새로운 원료를 식품 원료로 사용하고자 하는 경우에는 질의를 통한 유권해석을 받는 것이 아니라 한시적 인정제도를 이용하여야 한다.

신규 식품용 미생물은 식품원료의 한시적 인정 신청 대상으로 신청서와 함께 제반 자료를 제출해야 하는데, 신청 대상의 안전성이 인정의 관건이다. 안전성 자료는 당해원료가 인체에 위해가 없음을 확인할 수 있는 과학적 자료를 제출하여야 하고, 안전성

에 관한 자료는 섭취 근거 자료, 관련 물질 및 해당 성분, 농·축·수산물 등에 대한 안전성 정보 자료, 영양평가자료(영양성분의 흡수·분포·대사·배설 등에 영향을 미치는 지를 평가한 자료) 등 인체영향 자료, 독성시험자료 등을 사용할 수 있다. 독성시험자료의 경우 1) 우수실험실운영규정(Good Laboratory Practice, GLP)에 따라 운영된 기관에서 실시하고, 경제협력개발기구(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)에서 정하고 있는 독성시험방법(OECD Test Guideline)에 따르거나 이에 준하여 시험한 보고서를 사용할 수 있다. 2) 독성시험자료는 단회투여독성시험(설치류, 비설치류), 3개월 반복투여독성시험(설치류), 유전독성시험(복귀돌연변이시험, 염색체이상시험, 소핵시험)에 관한 자료를 제출해야 하며 상기 실험결과에 따라 필요한 경우에 한하여 생식독성시험, 항원성시험, 면역독성시험, 발암성시험에 관한 자료를 제출한다.

결 론

다양한 환경에서 검출되는 *Enterococcus* 속 박테리아는 다양한 식품에서 우점으로 검출되며 우수한 발효특성과 건강기능성이 보고되고 있어 식품산업에서 활용될 수 있는 높은 가능성을 가지고 있다. 그러나 항생제 내성 및 독성인자 유전자의 높은 획득 능력은 병원성 균주의 출현을 야기하여 식품 유래 균주 활용에 큰 제한이 되고 있다. 20년 이상 *E. faecium* SF68과 *E. faecalis* Symbioflor 균주가 프로바이오틱스로 문제를 일으키지 않고 계속적으로 유통되고 있다는 점으로 미루어 *Enterococcus* 균주가 안전성이 입증된다면 식품산업에서 활용될 수 있는 좋은 예를 보여주고 있다. 또한 *Enterococcus* 속의 산업적 활용은 균주 수준에서 검토되어야 함을 시사한다. 지금까지 축적된 *Enterococcus*의 병원성 연구결과는 몇가지 독성인자 유전자의 존재만으로 병원성을 나타내는 것이 아니라, 이동형 유전인자에 포함된 항생제 내성 및 독성인자 유전자가 병원성을 나타내는 것으로 보고되었다. MLST 기반의 *Enterococcus* 유전적 계통연구와 병원성 연구를 종합하면 항생제 내성 및 독성인자 유전자가 포함된 이동형 유전인자 보유 균주가 병원성 유전형으로 진화하여 병원 내에서의 감염의 원인이 되는 것으로 알려져 있다.

따라서, 지금까지 보고된 *E. faecium*과 *E. faecalis*를 중심으로 한 *Enterococcus* 속의 MLST 데이터와 함께 식품용 후보 균주의 병원성을 검토한다면 신규 개발 식품용 미생물의 안전성 검증에 유효한 결과를 도출할 수 있을 것으로 사료된다. 뿐만 아니라 유전체분석 기술이 빠르게 진보하고 있어, *E. faecium*과 *E. faecalis*에 대한 유전체정보가 빠르게 축적되고 있다. 유전체정보 기반의 *Enterococcus* 유전계통분석은 MLST를 통한 유전계통분석을 대체하여, *Enterococcus*의 유전형과 분리원, 병원성, 기능성에 대한 상관관계를 세밀하게 제시하여 보다 정확한 안전성 및 기능성 정보 제공이 가능할 것으로 예상된다.

현재, 유전체정보 기반의 *Enterococcus* 안전성 연구는 독성인자 유전자의 확인에는 신뢰성이 입증되었지만, 독성인자 유전자 발현에서는 의문이 제기된다. 생물은 특정 환경에서의 반응 기작이 병원성을 포함한 생리적 특성 발현에 영향을 미친다는 점을 고려하여, 환경요인에 따른 전사체(transcriptome) 연구를 진행한다면 *Enterococcus*의 위해성 결정에 큰 도움을 줄 수 있다. 이러한 연구는 새로운 식품용 균주의 발굴 뿐만 아니라 병원성 *Enterococcus* 감염에 대한 치료법 개발에도 큰 도움이 될 수 있다.

우리나라 전통발효식품의 상용화 및 대규모 제조의 증가에 따른 품질 균일화 및 속성발효를 위한 종균 개발 및 종균제 사용

필요성은 증가하고 있지만, 종균의 안전성 규명을 통한 새로운 식품발효용 종균의 식품원료 인정은 거의 진행되지 못하고 있다. 신규 식품용 미생물의 식품원료 인정을 위한 [식품원료 한시적 인정제도]가 마련되어 있지만, 현실적으로 제도의 활용에는 어려움이 있기 때문이다. 식품의약품안전처는 International Dairy Federation, 미국 FDA, 유럽연합 EFSA 등의 국제적 공인기관이 인정한 미생물에 대해서는 사용목적에 한하여 식품원료로 인정하는 유연성을 보여주고 있으나, 우리나라와 서구의 발효식품은 원료의 차이에서 발생하는 미생물상의 차이가 나타나고 있어 우리나라 및 아시아 지역에서만 섭취하는 발효식품 유래 미생물의 식품원료 인정에는 도움이 되지 못하고 있다. 특히 아시아 지역의 종균 연구 및 산업화는 서구에 미치지 못하고 있어 새로운 미생물의 식품 사용이력으로 참고가 되지 못하는 실정이다.

특정 균주의 용도를 한정하여 안전성을 평가하는 미국 FDA GRAS 규격과 달리 우리나라 [식품원료 한시적 인정제도]는 안전성을 평가하는 미생물과 대상 식품에 대한 구체적 언급이 없기 때문에 막대한 비용이 소요되는 독성시험 진행 대상의 결정에 어려움이 있다. 건강기능식품 소재인 프로바이오틱스와는 달리 식품원료로 인정을 받아야 하는 식품용 미생물의 경우, 독성시험의 진행 대상에 대한 보다 구체적인 언급이 필요하다고 사료된다.

오랜 기간의 사용이력으로 안전성이 증명된 *Lactobacillus* 속 유산균의 경우에도 항생물질 내성을 유발할 수 있는 플라스미드와 transposon과 같은 이동형 유전인자를 보유하고 있다는 연구 결과가 지속적으로 보고되고 있어, 이들의 사용을 위한 안전성 연구는 계속 증가하고 있다(Charteris 등, 1998; Mathur와 Singh, 2005; Temmerman 등, 2003; Teuber 등, 1999). 따라서 중 수준의 인가미생물목록을 제시하는 현재의 식품용 미생물 관리제도의 균주 수준 관리로의 전환을 고려해 볼 필요성이 있다.

마지막으로 우리나라 전통발효식품산업의 상황을 고려하면 막대한 비용을 지불하고 새로운 식품용 미생물을 식품원료로 인정받아 생산에 도입할 수 있는 업체는 거의 없다. 이러한 관점에서 막대한 비용이 소요되는 독성시험을 간소화 할 수 있는 과학적 방안의 모색이 필요하다.

식품산업에서의 유용성과 병원성이라는 양면성을 가지고 있는 *Enterococcus* 속 박테리아의 예와 같이 지속적으로 발전하고 있는 유전체분석 기술을 비롯한 오믹스(omics) 기술을 활용하여 우리나라 전통발효식품 우점 미생물의 안전성 및 기능성 연구를 진행한다. 막대한 비용이 드는 독성시험의 비용을 줄이고, 실험실에서 도출한 과학적 근거를 기반으로 신규 식품용 미생물의 안전성 확보가 가능할 것으로 사료된다.

요 약

발효식품의 우점종 *Enterococcus* 속 박테리아는 식품발효에 중요한 역할을 담당할 뿐만 아니라 사람과 가축의 프로바이오틱스로 사용되는 긍정적 측면을 가지고 있지만, 균혈증, 심내막염 등의 병원감염을 일으키는 병원균으로도 알려져 있다. 또한 여러 항생제에 대한 내성균주와 부착분자, 선모, 용혈소 등의 독성인자 보유 균주들이 발견되고 있어 식품용 미생물 및 프로바이오틱스로서의 적합성에 의문이 제기되고 있다. 본 총설에서는 우선 *Enterococcus*의 긍정적 및 부정적 측면에 대한 정보를 제공하여 논란이 되고 있는 문제점을 제시하였고, 유전체 연구를 통하여 부정적인 측면을 보유하지 않은 식품산업에서 활용할 수 있는 균주 선발 방향을 검토하였다. 또한 우리나라 전통발효식품용 종균

개발 현황과 신규 식품용 미생물 인허가 제도를 검토하여 문제점을 파악하였다. 결론으로 *Enterococcus* 연구결과에 근거 우리나라 신규 식품용 미생물의 안전성 평가 방향성을 제시하였다.

감사의 글

이 논문은 2018학년도 경기대학교 연구년 수혜로 연구되었음.

References

- Bae JW, Rhee SK, Park JR, Chung WH, Nam YD, Lee I, Kim H, Park YH. Development and evaluation of genome-probing microarrays for monitoring lactic acid bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 8825-8835 (2005)
- Charteris WP, Kelly PM, Morelli L, Collins JK. Antibiotic susceptibility of potentially probiotic *Lactobacillus* species. *J. Food Prot.* 61: 1636-1643 (1998)
- Chisari G, Lo Bue AM, Drago L, Abbiati R, Gismondo MR. Adhesion capacity of *Enterococcus faecium* (SF 68) and *Enterococcus faecalis* to various substrates. *G. Ital. Chemioter.* 39: 11-15 (1992)
- Choi KK, Cui CB, Ham SS, Lee DS. Isolation, identification and growth characteristics of main strain related to meju fermentation. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 32: 818-824 (2003)
- Chow JW, Thal LA, Perri MB, Vazquez JA, Donabedian SM, Clewell DB, Zervos MJ. Plasmid-associated hemolysin and aggregation substance production contribute to virulence in experimental enterococcal endocarditis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 37: 2474-2477 (1993)
- Clewell DB. Bacterial sex pheromone-induced plasmid transfer. *Cell* 73: 9-12 (1993)
- de Fatima Silva Lopes M, Ribeiro T, Abrantes M, Figueiredo Marques JJ, Tenreiro R, Crespo MT. Antimicrobial resistance profiles of dairy and clinical isolates and type strains of enterococci. *Int. J. Food Microbiol.* 103: 191-198 (2005)
- Domann E, Hain T, Ghai R, Billion A, Kuenne C, Zimmermann K, Chakraborty T. Comparative genomic analysis for the presence of potential enterococcal virulence factors in the probiotic *Enterococcus faecalis* strain Symbioflor 1. *Int. J. Med. Microbiol.* 297: 533-539 (2007)
- Dunlap CA, Kim SJ, Kwon SW, Rooney AP. *Bacillus velezensis* is not a later heterotypic synonym of *Bacillus amyloliquefaciens*; *Bacillus methylotrophicus*, *Bacillus amyloliquefaciens* subsp. *plantarum* and '*Bacillus oryzicola*' are later heterotypic synonyms of *Bacillus velezensis* based on phylogenomics. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 66: 1212-1217 (2016)
- Dunlap CA, Kwon SW, Rooney AP, Kim SJ. *Bacillus paralicheniformis* sp. nov., isolated from fermented soybean paste. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65: 3487-3492 (2015)
- EFSA. Scientific colloquium summary report: Qualified Presumption of Safety of microorganisms in food and feed. <http://www.efsa.europa.eu/> (2005)
- Fan B, Blom J, Klenk HP, Borriss R. *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus velezensis*, and *Bacillus siamensis* form an "Operational Group *B. amyloliquefaciens*" within the *B. subtilis* species complex. *Front. Microbiol.* 8: 22 (2017)
- Flahaut S, Hartke A, Giard JC, Benachour A, Boutibonnes P, Auffray Y. Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 138: 49-54 (1996)
- Foulquié Moreno MR, Sarantinopoulos P, Tsakalidou E, De Vuyst L. The role and application of enterococci in food and health. *Int. J. Food Microbiol.* 106: 1-24 (2006)
- Franz CM, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Gálvez A. Enterococci as probiotics and their implications in food safety. *Int. J. Food Microbiol.* 151: 125-140 (2011)
- Gilmore MS, Segarra RA, Booth MC, Bogie CP, Hall LR, Clewell DB. Genetic structure of the *Enterococcus faecalis* plasmid pAD1-encoded cytolytic toxin system and its relationship to lantibiotic determinants. *J. Bacteriol.* 176: 7335-7344 (1994)
- Giraffa G. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol. Rev.* 26: 163-171 (2002)
- Giraffa G. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 215-222 (2003)
- Guan L, Cho KH, Lee JH. 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 (2011)
- Ha DM, Cha DS. Novel starter culture for kimchi, using bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strain. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 22: 550-556 (1994)
- Haber mann W, Zimmermann K, Skabaris H, Kunze R, Rusch V. Reduction of acute recurrence in patients with chronic recurrent hypertrophic sinusitis by treatment with a bacterial immunostimulant (*Enterococcus faecalis* bacteria of human origin). *Arzneimittelforschung* 52: 622-627 (2002)
- Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R. The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns—an update. *Front. Microbiol.* 9: 1791 (2018)
- Holzapfel WH, Haberer P, Snel J, Schillinger U, Huis in't Veld JHJ. Overview of gut flora and probiotics. *Int. J. Food Microbiol.* 41: 85-101 (1998)
- Jang MH, Jeong DW, Lee JH. Identification of the predominant *Bacillus*, *Enterococcus*, and *Staphylococcus* species in meju, a spontaneously fermented soybean product. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* 47: 359-363 (2019)
- Jeong DW, Heo S, Lee B, Lee H, Jeong K, Her JY, Lee KG, Lee JH. Effects of the predominant bacteria from meju and doenjang on the production of volatile compounds during soybean fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 262: 8-13 (2017)
- Jeong MR, Jeong DW, Lee JH. Safety and biotechnological properties of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from meju. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 58: 813-820 (2015)
- Jeong DW, Kim HR, Jung G, Han S, Kim CT, Lee JH. Bacterial community migration in the ripening of doenjang, a traditional Korean fermented soybean food. *J. Microbiol. Biotechnol.* 24: 648-660 (2014)
- Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. Virulence of enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 462-478 (1994)
- Jett BD, Jensen HG, Nordquist RE, Gilmore MS. Contribution of the pAD1-encoded cytolytic toxin to the severity of experimental *Enterococcus faecalis* endophthalmitis. *Infect. Immun.* 60: 2445-2452 (1992)
- Johnson AP. The pathogenicity of enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* 33: 1083-1089 (1994)
- Jung J, Choi S, Jeon CO, Park W. Pyrosequencing-based analysis of the bacterial community in Korean traditional seafood, ojingeo jeotgal. *J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 1428-1433 (2013a)
- Jung JY, Lee SH, Jeon CO. Kimchi microflora: history, current status, and perspectives for industrial kimchi production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98: 2385-2393 (2014)
- Jung JY, Lee SH, Lee HJ, Jeon CO. Microbial succession and metabolite changes during fermentation of saeu-jeot: traditional Korean salted seafood. *Food Microbiol.* 34: 360-368 (2013b)
- Kang MJ, Kim SH, Joo HK, Lee GS, Yim MH. Isolation and identification of microorganisms producing the soy protein hydrolyzing enzyme from traditional *mejus*. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* 43: 86-94 (2000)
- Kayser FH. Safety aspects of enterococci from the medical point of view. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 255-262 (2003)
- Kim YS, Jeong DY, Hwang YT, Uhm TB. Bacterial community profiling during the manufacturing process of traditional soybean paste by pyrosequencing method. *Korean J. Microbiol.* 47: 275-280 (2011a)
- Kim YS, Kim MC, Kwon SW, Kim SJ, Park IC, Ka JO, Weon HY. Analyses of bacterial communities in meju, a Korean traditional fermented soybean bricks, by cultivation-based and pyrosequencing methods. *J. Microbiol.* 49: 340-348 (2011b)
- Klein G. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* 88: 123-131 (2003)
- Kreft B, Marre R, Schramm U, Wirth R. Aggregation substance of

- Enterococcus faecalis* mediates adhesion to cultured renal tubular cells. *Infect. Immun.* 60: 25-30 (1992)
- Kwon OJ, Kim JK, Chung YG. The characteristics of bacteria isolated from ordinary Korean soy sauce and soybean paste. *J. Korean Agri. Chem. Soc.* 29: 422-428 (1986)
- Laverde Gomez JA, van Schaik W, Freitas AR, Coque TM, Weaver KE, Francia MV, Witte W, Werner G. A multiresistance megaplasmid pLG1 bearing a *hyl*_{Efm} genomic island in hospital *Enterococcus faecium* isolates. *Int. J. Med. Microbiol.* 301: 165-175 (2011)
- Leavis H, Top J, Shankar N, Borgen K, Bonten M, van Embden J, Willems RJ. A novel putative enterococcal pathogenicity island linked to the *esp* virulence gene of *Enterococcus faecium* and associated with epidemicity. *J. Bacteriol.* 186: 672-682 (2004)
- Leavis HL, Willems RJ, van Wamel WJ, Schuren FH, Caspers MP, Bonten MJ. Insertion sequence-driven diversification creates a globally dispersed emerging multiresistant subspecies of *E. faecium*. *PLoS Pathog.* 3: e7 (2007)
- Lee CW, Ko CY, Ha DM. Microfloral changes of the lactic acid bacteria during kimchi fermentation and identification of the isolates. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 20: 102-109 (1992)
- Lee JG, Lee GJ, Lim SM. Partial purification of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* MJ-14 isolated from *meju*. *J. Food Hyg. Saf.* 20: 211-216 (2005)
- Lee YD, Park JH. Rapid fermentation starter *Enterococcus faecium* of soybean for soy-sauce like product. *Korean J. Food Nutr.* 25: 188-195 (2012)
- Lee JH, Shin D, Lee B, Lee H, Lee I, Jeong DW. Genetic diversity and antibiotic resistance of *Enterococcus faecalis* isolates from traditional Korean fermented soybean foods. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 916-924 (2017)
- Lim CR, Park HK, Han HU. Reevaluation of isolation and identification of gram-positive bacteria in kimchi. *Korean J. Microbiol.* 27: 404-413 (1989)
- Lim SM, Park MY, Chang DS. Characterization of bacteriocin produced by *Enterococcus faecium* MJ-1 isolated from *meju*. *Food Sci. Biotechnol.* 14: 49-57 (2005)
- Lopez M, Saenz Y, Rojo-Bezares B, Martinez S, del Campo R, Ruiz-Larrea F, Zarazaga M, Torres C. Detection of *vanA* and *vanB2*-containing enterococci from food samples in Spain, including *Enterococcus faecium* strains of CC17 and the new singleton ST425. *Int. J. Food Microbiol.* 133: 172-178 (2009)
- Lowe AM, Lambert PA, Smith AW. Cloning of an *Enterococcus faecalis* endocarditis antigen: homology with adhesins from some oral streptococci. *Infect. Immun.* 63: 703-706 (1995)
- Mathur S, Singh R. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 281-295 (2005)
- McBride SM, Fischetti VA, LeBlanc DJ, Moellering RC, Gilmore MS. Genetic diversity among *Enterococcus faecalis*. *PloS One* 2: e582 (2007)
- Mheen TI, Kwon TW. Effect of temperature and salt concentration on kimchi fermentation. *Korean J. Food Sci. Technol.* 16: 443-450 (1984)
- M'hir S, Minervini F, Di Cagno R, Chammem N, Hamdi M. Technological, functional and safety aspects of enterococci in fermented vegetable products: a mini-review. *Ann. Microbiol.* 62: 469-481 (2012)
- Moellering RC Jr. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin. Infect. Dis.* 14: 1173-1176 (1992)
- Moon GS, Kang CH, Pyun YR, Kim WJ. Isolation, identification, and characterization of a bacteriocin-producing *Enterococcus* sp. from kimchi and its application to kimchi fermentation. *J. Microbiol. Biotechnol.* 14: 924-931 (2004)
- Nallapareddy SR, Singh KV, Sillanpää J, Garsin DA, Höök M, Erlandsen SL, Murray BE. Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *J. Clin. Invest.* 116: 2799-2807 (2006)
- Olmsted SB, Dunny GM, Erlandsen SL, Wells CL. A plasmid-encoded surface protein on *Enterococcus faecalis* augments its internalization by cultured intestinal epithelial cells. *J. Infect. Dis.* 170: 1549-1556 (1994)
- Patra JK, Das G, Paramithiotis S, Shin HS. Kimchi and other widely consumed traditional fermented foods of Korea: a review. *Front. Microbiol.* 7: 1493 (2016)
- Rho MK, Kim YE, Rho HI, Kim TR, Kim YB, Sung WK, Kim TW, Kim DO, Kang H. *Enterococcus faecium* FC-K derived from kimchi is a probiotic strain that shows anti-allergic activity. *J. Microbiol. Biotechnol.* 27: 1071-1077 (2017)
- Rich RL, Kreikemeyer B, Owens RT, LaBrenz S, Narayana SV, Weinstock GM, Murray BE, Höök M. Ace is a collagen-binding MSCRAMM from *Enterococcus faecalis*. *J. Biol. Chem.* 274: 26939-26945 (1999)
- Richards MJ, Edwards JR, Culver DH, Gaynes RP. Nosocomial infections in combined medical-surgical intensive care units in the United States. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* 21: 510-515 (2000)
- Roberts JC, Singh KV, Okhuysen PC, Murray BE. Molecular epidemiology of the *fsr* locus and of gelatinase production among different subsets of *Enterococcus faecalis* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 42: 2317-2320 (2004)
- Schleifer KH, Kilpper-Balz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. re. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 34: 31-34 (1984)
- Shankar N, Baghdayan AS, Gilmore MS. Modulation of virulence within a pathogenicity island in vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis*. *Nature* 417: 746-750 (2002)
- Shankar V, Baghdayan AS, Huycke MM, Lindahl G, Gilmore MS. Infection-derived *Enterococcus faecalis* strains are enriched in *esp*, a gene encoding a novel surface protein. *Infect. Immun.* 67: 193-200 (1999)
- Shin DH, Kim MS, Han JS, Lim DK, Bak WS. Changes of chemical composition and microflora in commercial kimchi. *Korean J. Food Sci. Technol.* 28: 137-145 (1996)
- Singh KV, Qin X, Weinstock GM, Murray BE. Generation and testing of mutants of *Enterococcus faecalis* in a mouse peritonitis model. *J. Infect. Dis.* 178: 1416-1420 (1998)
- Temmerman R, Pot B, Huys G, Swings J. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *Int. J. Food Microbiol.* 81: 1-10 (2003)
- Teuber M, Meile L, Schwarz F. Acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria from food. *Antonie Van Leeuwenhoek* 76: 115-137 (1999)
- Toledo-Arana A, Valle J, Solano C, Arrizubieta MJ, Cacarella C, Lamata M, Amorena B, Leiva J, Penadés JR, Lasa I. The enterococcal surface protein, Esp, is involved in *Enterococcus faecalis* biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 67: 4538-4545 (2001)
- van Schaik W, Top J, Riley DR, Boekhorst J, Vrijenhoek JE, Schapendonk CM, Hendrickx AP, Nijman IJ, Bonten MJ, Tettelin H, Willems RJ. Pyrosequencing-based genome analysis of the nosocomial pathogen *Enterococcus faecium* and identification of a large transferable pathogenicity island. *BMC Genomics* 11: 239-246 (2010)
- Yoo SK, Cho WH, Kang SM, Lee SH. Isolation and identification of microorganisms in Korean traditional soybean paste and soybean sauce. *Korean J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 113-117 (1999)