

프로바이오틱스 *Enterococcus faecium* CKDB003의 항생제 내성 및 안전성 평가

김 한 준^{*,**}, 강 순 아^{***,****}

^{*}호서대학교 벤처대학원 융합과학기술학과 박사과정 학생, ^{**}호서대학교 보건산업연구소 연구원,
^{***}호서대학교 벤처대학원 융합과학기술학과 교수, ^{****}호서대학교 보건산업연구소 소장

Antibiotic Resistance and Safety Assessment of *Enterococcus faecium* CKDB003 for Using as Probiotics

Han Jun Kim^{*,**} and †Soon Ah Kang^{***,****}

^{*}Ph.D. Student, Dept. of Convergence Science and Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

^{**}Researcher, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

^{***}Professor, Dept. of Convergence Science and Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

^{****}Director, Institute of Health Industry, Hoseo University, Seoul 06724, Korea

Abstract

In this study, a safety evaluation was conducted to confirm if the *Enterococcus faecium* CKDB003 strain obtained by selection from a mixed fermentation of fruit and milk is suitable for use as a probiotic. The MIC value for the 10 antibiotics specified in the EFSA guidance was below the acceptable cut-off value. The antibiotic resistance genes *aac(6)-li*, *eatA*, and *msr(C)* exist by whole genome sequencing, but are in the chromosome and not in the plasmid, thus confirming that there is no possibility of transmission to other microorganisms. It was confirmed that cytolysin (*cylA*, *cylB*, *cylI*, *cylL-l*, *cylL-s*, *cylM*, *cylR1*, *cylR2*), aggregation substance (*asal*, *aspI*), collagen adhesion (*ace*), enterococcal surface protein (*esp*), endocarditis antigen (*efaA*), hyaluronidase (*hyl*) and gelatinase (*gelE*) were not present in the genome by examining the genes of factors related to virulence. Also, the biochemical analysis showed no toxic enzyme activities, and no virulence genes were detected by the PCR method. Thus, the *E. faecium* CKDB003 strain can be safely used as a health functional food probiotic, based on the results of the safety assessment.

Key words: probiotics, *Enterococcus faecium* CKDB003, antibiotic resistance, safety assessment

서 론

유산균이 인체 건강에 미치는 유익한 효과에 대해 메치니 코프(Elie Metchnikoff)가 제시한 이후로 그동안 인체 내에 공생해 온 유익균의 존재를 이해하고 기능성을 규명하려는 연구가 지속되어왔다(Markowiak & Slizewaska 2017). 한편, 1954년 Vergio에 의해 항생제 위해성에 대한 비교 개념으로 프로바이오틱스(probiotics) 용어가 명명되었으며, 이는 경구 제로 복용하였을 때 인체에 유익하게 기능하는 미생물을 의미하였다. Lilly와 Stillwell은 1965년에 다른 미생물의 성장

을 활성화시켜주는 미생물이라고 정의하기도 하였다(Vergio FV 1954; Lilly & Stillwell 1965; FAO & WHO 2006; Zheng 등 2015; Markowiak & Slizewaska 2017). 현재 사용 중인 프로바이오틱스 개념은 2002년 국제식량기구(Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO)와 세계보건기구(World Health Organization, WHO)에 의해 채택 권고된 것으로서 적당한 양을 섭취하였을 때 숙주 건강에 이로운 작용을 하는 생균을 의미한다. 이와 더불어 WHO, FAO 및 European Food Safety Authority(EFSA)에서는 프로바이오틱스 균주를 선택하는 기준으로 안전성, 기능성 및

† Corresponding author: Soon Ah Kang, Professor, Dept. of Convergence Science and Technology, Graduate School of Venture, Hoseo University, Seoul 06724, Korea. Tel: +82-2-2059-2353, Fax: +82-2-2055-1405, E-mail: sakang@hoseo.edu

기술적인 유용성을 만족해야 한다고 제안하였다(Markowiak & Slizewaska 2017).

프로바이오틱스는 흔히 그람 양성 박테리아와 일부 효모 균주 중 하나 혹은 그 이상을 포함하며(Simon O 2005), 섭취 시 장내에서 젖산을 생성함으로써 pH를 낮추고 bacteriocin 및 H₂O₂ 등의 억제인자들을 생성하여 유해균인 병원균이나 부패균의 성장을 억제하는 기능을 가지고 있다(Park SJ 1999; Kang GH 2003; Ann YG 2011; Zheng 등 2015; Markowiak & Slizewaska 2017).

식품의약품안전처(MFDS)는 프로바이오틱스로 사용할 수 있는 5속 19종을 기능성 원료로 고시하여, ‘유산균 증식 및 유해균 억제와 배변활동 원활에 도움을 줄 수 있다’는 내용을 광고할 수 있도록 허용하고 있다. 5속 19종은 *Lactobacillus* 속 12종, *Bifidobacterium*속 4종, *Lactococcus*속 1종, *Streptococcus* 속 1종 및 *Enterococcus* 속 2종을 포함한다. 이들 중 특히 *Enterococcus* 속 유산균에 대한 안전성 문제가 대두되면서 해외에서 식품 및 사료용으로 사용을 금지하거나 안전성을 입증한 후 제한적으로 사용하도록 규제가 강화되고 있는 추세이다(EFSA 2012).

*Enterococci*는 건강인의 97%와 온혈 동물의 장관 내에 존재하는 정상 세균 군 무리의 일종(Oh 등 2008; Golob 등 2019)으로서 자연 환경에도 널리 분포되어 있고, 유산균을 생성하는 균이기도 하여 지중해지역의 발효음식인 치즈와 소세지 등의 발효 제품을 숙성시키면서 풍미를 생성시키는 특징이 있다. 그러므로 오랜 기간 동안 발효유 제품의 중균 첨가제(starter culture), 발효산업용의 중균 및 프로바이오틱스로 사용되어 왔다(Kim JW 2007; Oh 등 2008; Zheng 등 2015). 또한 프로바이오틱스나 의약품으로 복용 시 장관내에서 유익균을 증진시켜 유해균의 증식을 못하도록 하여 장을 안정화시킬 수 있고, 장 점막 부착성이 좋아 설사 예방제나 정장제로 사용되기도 하였다. 그러나 이 균은 병원에서 주로 감염이 발생하는 기회감염균이기도 하여 면역력이 정상인 건강한 사람에게는 감염에 의한 질병의 위험이 없으나, 면역성이 약한 만성 질환자가 수술한 후 원내 감염, 비뇨기 감염 및 균혈증 등을 발생시킬 수 있다는 보고도 있다(Oh 등 2008; Kwon 등 2009; Seong 등 2013; Hashem 등 2017). 또한 vancomycin을 비롯한 다양한 항생제에 내성을 가진 다제내성균(multidrug-resistant, MDR)으로도 보고되어 있어, 장내에 서식하는 기회 감염균 또는 병원성 미생물에 항생제 내성 유전자를 전파할 위험성이 있다(Kim MN 1998; Mathur & Singh 2005). 그러므로 유럽연합에서는 *Enterococcus* 속 미생물을 포함한 생균제들을 동물용 사료제(feed additive)로 사용하기 전에 항생제 내성 및 독성 인자를 평가하도록 규정하고 있다(EFSA 2012). 또한 FAO에서도 이와 같은 이유로

반코마이신 내성과 병독성 인자가 *Enterococcus*에 존재하지 않음을 균주 생산자가 증명하도록 권고하고 있다(Franz 등 2011; Sievert 등 2013).

국내에서도 프로바이오틱스의 위해성에 대한 논란(Lee JH 2013; Lee 등 2013; NECA 2016)과 국제적인 추세에 맞추어 식품의약품안전처에서는 2017년에 건강기능식품 상시적 재평가를 수행한 결과, *Enterococcus* 속 미생물의 경우 항생제 내성 및 독성 평가를 통하여 안전성을 입증하도록 의무화하였다(Kim JW 2007; MFDS 2017).

따라서 본 연구에서는 신규 분리한 *Enterococcus faecium* CKDB003 균주에 대해 항생제 최소억제 농도 검사와 독성효소 활성에 대한 생화학적 분석을 수행하였다. 추가로 전장유전체 분석을 통하여 항생제 내성 유전자 및 병독성 유전자의 존재에 대한 gene annotation을 실시함으로써 관련 유전자가 기회감염균 또는 병원성 미생물로 전이될 가능성을 조사하여 *E. faecium* CKDB003 균주의 안전성을 평가하였다.

재료 및 방법

1. 배지 조성

유산균 활성화를 위해 각각 deMan-Rogosa-Sharpe(MRS) 고체배지(diammonium citrate 2.0 g/L, dipotassium hydrogen phosphate 2.0 g/L, glucose 20.0 g/L, agar 12.0 g/L)와 MRS 액체배지(diammonium citrate 2.0 g/L, dipotassium hydrogen phosphate 2.0 g/L, glucose 20.0 g/L)를 121 °C에서 20분간 멸균하여 사용하였다. 한편, 유산균수 측정을 위한 고체배양 배지는 식품공전(MFDS 2018)에 등재되어 있는 bromocresol purple(BCP) 첨가 평판측정용 한천 배지를 사용하였다. 평판측정용 한천 배지에 도달하기 전 희석 용액으로는 0.85% 멸균 생리식염수를 사용하였다. 분말을 제조하기 위한 유산균 배양용 배지 조성은 glucose 30.0 g/L, yeast extract 20.0 g/L, KH₂PO₄ 1.0 g/L, Mg₂SO₄ 0.1 g/L, polyoxyethylene sorbitan monooleate 1.0 g/L이었다. 한편, 유산균 활성화와 유산균수 측정을 위한 배지 및 배양용 배지에 사용된 시약은 모두 (주)기산바이오텍(Seoul, Korea)으로부터 구입하였다.

2. 유산균 분리 및 동정

경기도 안산시의 마켓에서 판매되는 토마토와 키위를 구매 후 갈아 우유와 혼합된 발효물 희석액에서 채취한 시료를 식염수에 희석한 후 유산균을 분리하기 위한 고체배지인 MRS-BCP 평판배지에 도말하고, 37 °C에서 48시간 동안 배양하였다(Jeong 등 2008). 그 후 매끈하고 둥근 형태이며 주변이 노란색을 띠는 colony를 분리한 다음 그람염색을 실시하여 그람양성을 나타내는 colony를 선별하였다(Faisal 등

2017). 이들 중 그람양성의 특징을 보이면서 현미경을 통한 형태 관찰 시 난원형이나 구형인 colony를 선별한 후 (주)Solgent (Daejeon, Korea)에 동정을 위한 16S rRNA 염기 분석을 의뢰하였다. 그리고 분리한 유산균의 생리적 특성을 조사하기 위해 API 50 CHL kit(BNFkorea, Kimpo, Korea)를 이용하여 당 발효 특성을 분석하였다(Park YJ 2017).

3. 유산균 배양

시료에서 분리 후 동정을 통하여 선별한 *E. faecium* CKDB003 균주는 멸균된 10% 탈지분유 용액과 혼합한 다음 -70°C 에 frozen stock 형태로 냉동 보관하면서 사용하였다. 냉동 보관한 균주를 활성화하기 위해 MRS 고체배지에 선상도말평판법으로 도말하여 37°C 에서 24시간 동안 배양하였다. 고체배지에서 $0.8\ \mu\text{m}$ 내외의 mono-colony를 선별한 다음 MRS 액체배지에 접종하고, 37°C 에서 24시간 배양한 후 동일한 방법으로 추가 2회 계대 배양을 통하여 활성화시켜 실험에 사용하였다.

4. 항생제 내성 검사

유럽식품안전청(EFSA)의 가이드는 미생물의 항생제 내성 평가를 위해 우선적으로 10종의 항생제(ampicillin, vancomycin, gentamycin, kanamycin, streptomycin, erythromycin, clindamycin, tylosin, tetracycline, chloramphenicol)에 대해 항생제 최소 억제농도 검사법(minimum inhibitory concentration test, MIC test)을 실시하도록 Fig. 1처럼 규정하고 있다(EFSA 2012). 본 연구에서 상기의 항생제들에 대

한 MIC test의 cut-off value는 EFSA의 가이드를 기준으로 하였고, 미국의 Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)와 유럽의 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing(EUCAST)에 있는 항생제 내성 시험법을 적용하여 각각의 항생제 종류별 ETEST[®] strip (BioMérieux SA., Lyon, France)을 사용하였다. 다만, tylosin의 경우 E-test strip이 상용화되어 있지 않아 2진 희석법으로 실시하였다(CLSI 2002; CLSI 2012; EUCAST 2017).

5. 전장유전체 분석

항생제 내성인자 및 병독성 유전자 확인을 위해 DNA 추출 및 전장 유전체 해독(whole genome sequencing, WGS)을 (주)테라젠이텍스(Suwon, Korea)에서 분석하였다. PacBio RS II 플랫폼을 이용하여 유전체를 해독하였으며, Canu v1.6으로 조립하였다. 조립된 *E. faecium* CKDB003 유전체 서열의 주석달기(annotation)는 Prokka v1.10을 이용하여 수행하였다.

항생제 내성 유전자 유무는 2개의 항생제 내성 유전자 데이터베이스(Comprehensive Antibiotic Resistance Database (CARD), ResFinder 3.2)로 확인하였다(Cut off value: identity 70%, coverage 60%). 병독성 유전자 확인은 Virulence Factor Database(VFDB)의 *Enterococcus* 계열 병독성인자 DB를 이용하여 수행하였다. 또한, Uniprot에서 *Enterococcus* 속 유래 병독성 유전자에 대한 단백질 서열을 얻어 National Center for Biotechnology Information(NCBI)의 tBLASTn으로 비교 분석하여 이중 점검하였다(Cut off value: identity 70%, coverage 60%).

6. Hyaluronidase 활성 확인

E. faecium CKDB003이 hyaluronidase 활성을 갖는지 확인하기 위해 cultivation plate assay 방법(Smith & Willett 1968)을 변형하여 사용하였다. Hyaluronidase 활성 확인을 위하여 실험균은 준비된 plate 표면에 *E. faecium* CKDB003 배양액 20 μL 를 점적하고, positive control은 plate에 penicylinder (8 $\phi\times$ 10 mm)를 올려놓고 penicylinder에 각각의 hyaluronidase(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) 용액(0 unit/mL, 37 units/mL, 74 units/mL and 147 units/mL) 20 μL 를 점적하였다. 그 후 37°C 에서 12~18시간 반응시킨다. 각각의 plate에 2 N acetic acid 용액 5 mL를 부은 후 10분 동안 표면을 처리하여 히알루론산의 분해 여부를 관찰하였다(Smith & Willett 1968; Sandip & Bhushan 2017).

7. Gelatinase 활성 확인

E. faecium CKDB003이 gelatinase 활성이 있는지 검사하기 위해 Cevahir 등(2008)의 방법을 변형하여 사용하였다.

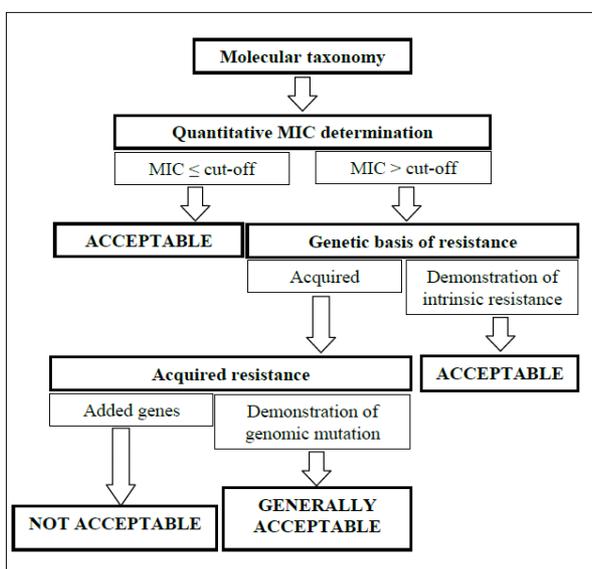


Fig. 1. Proposed scheme for the antimicrobial resistance assessment of a bacterial strain used as a feed additive.

Gelatinase를 생성하는 표준 균주인 *Staphylococcus aureus* ATCC 6538을 positive control로 하여 동일한 실험을 진행하였으며, 균을 접종하지 않은 배지를 negative control로 사용하였다.

8. 용혈성 확인

E. faecium CKDB003이 용혈성을 갖는지 확인하기 위해 혈액천배지(blood agar)를 사용하여 Buxton R(2005)의 방법에 따라 진행하였다. 이를 위해 blood agar base(Kisanbio, Seoul, Korea)를 구입하여 활성화된 *E. faecium* CKDB003 균주 배양액을 실험균으로 10 µL씩 plate에 접종한 후 화염 멸균된 백금니로 선상도말평판법을 사용하여 도말하고, 37°C에서 24시간 배양한 다음 용혈성(β-hemolysis)을 확인하였다. Positive control로 β-hemolysis 능력이 있는 *Streptococcus pyogenes* ATCC 8668 표준 균주를 사용하여 동일한 실험을 진행하였다.

9. Auto-aggregation 활성 분석

Auto-aggregation 활성 분석을 위해 *E. faecium* CKDB003 균주를 MRS 배지 10 mL에 접종한 후 37°C에서 24시간 동안 배양한 다음 원심분리(5000×g, 20 min, 4°C)하였다. 그 후 pH 7.1의 phosphate buffer 식염수(10 mM Na₂HPO₄, 1 mM KH₂PO₄, 140 mM NaCl, 3 mM KCl)로 2회 세척하고, 동일한 buffer에 현탁한 다음 vortexing 후 37°C에서 5시간 동안 정치하였다. 정치한 용액의 흡광도를 OD₆₀₀에서 시간대별(0~5시간)로 측정하고, 다음의 계산식을 이용하여 auto-aggregation rate를 확인하였다(Garcia-Cayuela 등 2014; Veljović 등 2017).

$$\text{Auto-aggregation rate} = \{1 - (A_t/A_0)\} \times 100$$

A_t: *t*시간에서 흡광도

A₀: 0시간에서 흡광도

10. 혈소판 제조 및 응집반응

혈소판 응집 반응 확인을 위해 신선한 랫드 혈액(citrated whole blood)을 (주)제니아(Seongnam, Korea)로부터 구입하여 Lee & Park(1995)의 방법에 따라 혈소판을 제조한 다음 사용하였다. 혈소판 응집반응 결과의 흡광도를 이용하여 다음과 같이 투과도(T) 계산식에 따라 혈소판 응집도를 확인하였고, control로 suspending buffer만을 채운 큐벳의 흡광도를 사용하였으며, 혈소판 응집도를 100%로 설정하였다(Lee & Park 1995).

$$T = 1/10^{5A - 3A}$$

T: 투과도

5A: 응집반응 5분 후의 흡광도

3A: 응집반응 전 preincubation 3분 후의 흡광도

11. PCR법에 의한 유전자 확인

Polymerase chain reaction(PCR)법을 통해서도 병독성 인자의 유전자 검출 유무를 재확인하기 위해 활성화된 균주를 원심분리하여 상등액을 제거하고, PBS(WelGene, Daegu, Korea)로 2번 세척한 다음 균체만 회수한다. 균체의 세포벽 분해를 위하여 lysozyme(Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA)으로 처리한 다음 GeneAll Cell SV kit(GeneAll, Seoul, Korea)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. PCR 진행 여부를 확인하기 위한 방법으로 control로 *Enterococci*의 housekeeping gene인 *pheS*(phenylalanyl-tRNA synthase α-subunit)(Svec 등 2005)를 사용하였으며, PCR 검사반응은 병독성 인자들인 cytolysin, aggregation substance, hyaluronidase, gelatinase에 대해 Table 1에서와 같이 총 9 set primer의 forward 염기서열과 reverse 염기서열을 정하였다. 각각의 primer는 Cosmo-genetech(Seoul, Korea)에서 제작하였고, PCR 기기는 Qcyclor II(Quanta biotech, Beverly, MA, USA)를, PCR premix는 Accupower[®] PCR premix(Bioneer, Daejeon, Korea)를 사용하였다(Eaton & Gasson 2001; Vankerckhoven 등 2004; Seputiene 등 2012; Gozalan 등 2015; Iweriebor 등 2015; Hashem 등 2017; Suchi 등 2017).

12. 실험 통계 처리

본 실험에서 얻은 측정치의 통계학적 분석은 통계처리 컴퓨터 프로그램인 Graphpad prism 8(GraphPad Software, San Diego, CA, USA)과 SAS program version 9.3(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 평균(mean)±표준편차(standard deviation, SD)로 표시하였으며 ANOVA로 분석한 후 Duncan's multiple range test로 각 군간의 평균차이를 분석하였다.

결과 및 고찰

1. 균주 분리 및 동정

유산균을 분리하기 위하여 MRS-BCP 평판배지에 도말 후 배양한 결과, 매끈하고 둥근 형태이며 주변이 노란색을 띠는 콜로니 36개를 분리하였다. 이들 중 그람양성의 특징을 보이면서 현미경을 통한 형태 관찰 시 지름이 0.8 µm 내외의 난원형이나 구형인 균주 11종을 선별한 후 16S rRNA 염기 분석을 하였다. 그 결과, 표준 균주인 *E. faecium* strain DSM

Table 1. PCR primer sequences used to determine virulence genes in *E. faecium* CKDB003

Virulence factor	Gene	Sequence (5'→3')	Ampicon (bp)	Condition
Control	<i>pheS</i>	TCGTGACACAAAATCATGGAA AATTCGATCCATCCAGTGT	530	The same condition of each primers
		ACTCGGGGATTGATAGGC GCTGCTAAAGCTGCGCTT	688	
Cytolysin	<i>cyl</i>	GTGTTGAGGAAATGGAAGCGAT GGCTAGTTTCACTAGCCCTCT	424	Denaturation: 94°C, 30 sec Annealing: 58°C, 1 min Extension: 72°C, 1 min Final extention: 72°C, 10 min Cycles: 30
		CCAGCCAACATATGGCGGAATC CCTGTCGCAAGATCGACTGTA	529	Denaturation: 94°C, 1 min Annealing: 58°C, 45 sec Extension: 72°C, 2 min Final extention: 72°C, 10 min Cycles: 36
Aggregation substance	<i>asal</i>	GCACGCTATTACGAACTATGA TAAGAAAGAACATCACCACGA	375	Denaturation: 94°C, 1 min Annealing: 56°C, 1 min Extension: 72°C, 1 min Final extention: 72°C, 10 min Cycles: 30
		CCAGTAATCAGTCCAGAAACAACC AGCTTTTTTTCATTCTTGTTGTTGTT	406	Denaturation: 94°C, 1 min Annealing: 64°C, 1 min Extension: 72°C, 1 min Final extention: 72°C, 10 min Cycles: 30
	<i>as</i>	ACAGAAGAGCTGCAGGAAATG GACTGACGTCCAAGTTTCCAA	276	Denaturation: 94°C, 1 min Annealing: 56.5°C, 45 sec Extension: 72°C, 2 min Final extention: 72°C, 10 min Cycles: 35
Hyaluronidase	<i>hyl</i>	TATGACAATGCTTTTTGGGAT AGAGTGCACCCGAAATAATATA	213	Denaturation: 94°C, 1 min Annealing: 56°C, 1 min Extension: 72°C, 1 min Final extention: 72°C, 10 min Cycles: 30
		AGTTCATGCTATTTTCTTCAC CTTCATTATTTACACGTTTG	402	Denaturation: 94°C, 1 min Annealing: 50°C, 1 min Extension: 72°C, 1 min Final extention: 72°C, 10 min Cycles: 35
	<i>gelE</i>	GGTGAAGAAGTTACTCTGAC GGTATTGAGTTATGAGGGGC	704	Denaturation: 94°C, 1 min Annealing: 50°C, 1 min Extension: 72°C, 1 min Final extention: 72°C, 10 min Cycles: 30

20477과 100%의 유사도를 보인 1종을 선발하고, *E. faecium* CKDB003으로 명명하였다. *E. faecium* CKDB003의 생화학 적 특성 조사를 위해 API 50 CHL kit를 이용한 당 발효성 분석은 총 49개의 탄소원에 대하여 미생물 증식에 의해 산을 생성하고, pH가 낮아지면서 발생하는 색의 변화 여부를 관찰하였고, 이를 통해 각 탄소원의 발효 여부를 확인하였다. 그 결과, Table 2에서 나타난 것과 같이 49종의 당 중 glucose, fructose, galactose, mannose, mannitol 등 21종의 당을 이용한다는 것을 확인하였다.

Table 2. Saccharometabolism of *E. faecium* CKDB003

Characteristics	Activity ¹⁾	Characteristics	Activity
Temoin	+	Esculine, citrate de fer	+
Glycerol	w	Salicine	+
Erythritol	-	D-Cellobiose	+
D-Arabinose	-	D-Maltose	+
L-Arabinose	+	D-Lactose	+
D-Ribose	+	D-Melibiose	+
D-Xylose	-	D-Saccharose	+
L-Xylose	-	D-Trehalose	+
D-Adonitol	-	Inuline	-
Methyl-βD-Xylopyranoside	-	D-Melezitose	-
D-Glactose	+	D-Raffinose	-
D-Glucose	+	Amidon	-
D-Fructose	+	Glycogene	-
D-Mannose	+	Xylitol	-
L-Sorbose	-	Gentiobiose	+
L-Rhamnose	-	D-Turanose	-
Dulcitol	-	D-Lyxose	-
Inositol	-	D-Tagatose	-
D-Mannitol	+	D-Fucose	-
D-Sorbitol	-	L-Fucose	-
Methyl-αD-Mannopyranoside	-	D-Arabitol	-
Methyl-αD-Glucopyranoside	-	L-Arabitol	-
N-Acetylglucosamine	+	Potassium gluconate	-
Amygdaline	+	Potassium 2-ceto gluconate	-
Arbutine	+	Potassium 5-ceto gluconate	-

¹⁾ The + was marked when the each activity was detected (+: positive activity, -: negative activity, w: weak reaction).

2. 항생제 최소 억제농도 검사에 의한 항생제 내성

EFSA 가이드נס에 따르면 MIC 값이 항생제 종류별로 설정된 cut-off values보다 같거나 낮으면($S \leq \times \text{mg/L}$) 감수성 (Susceptible, S)으로 판단하고, cut-off values보다 높은($R > \times \text{mg/L}$) MIC 값을 보여주면 내성 (Resistant, R)으로 판단한다 (EFSA 2012). Table 3과 Fig. 2에서와 같이 ampicillin을 포함한 항생제들의 *E. faecium* CKDB003 균주에 대한 MIC test를 진행한 결과, 각 항생제의 cut-off values 대비 2.9~25.0% 수준의 MIC 값을 보였기 때문에 10종의 항생제 모두에 대해 내성이 아닌 감수성으로 분류되었다. 따라서 EFSA 가이드נס과 Fig. 1의 의사결정도에 따라 *E. faecium* CKDB003 균주는 프로바이오틱스로서 사용할 수 있는 것으로 분류된다. 하지만 이와 같이 감수성을 나타내더라도 약한 정도의 항생제 내성이 존재하므로 이러한 현상이 내재 내성인지 확인하기 위해 *E. faecium* 균주의 항생제 내성에 관한 선행 연구내용을 조사하였다.

기존 식품용으로 사용되는 *E. faecium* TM39, *E. faecium* YF5, *E. faecium* KQ 2.6, *E. faecium* SF68 및 *E. faecium* BGG09-28 균주들에 대해 보고된 항생제 내성 결과들을 EFSA에 규정한 기준에 적용 시 모두가 감수성이나 내성을 보였다 (Tsai 등 2004; Mathur & Singh 2005; Tan 등 2013; Zheng 등 2015; Veljović 등 2017). 이러한 결과로 보아 *E. faecium* 중 EFSA 가이드נס에 따라 감수성이나 내성으로 분류할 수 있는 균주들이 다수 존재하며, *E. faecium* CKDB003도 상기의 10가지 항생제들에 대해 내재내성을 가질 가능성이 높은 것으로 추정된다.

3. 전장유전체 분석을 통한 항생제 내성 유전자와 병독성 유전자 평가

E. faecium CKDB003 균주의 전장 유전체 분석 결과, Table 4와 Fig. 3에서 보여주는 바와 같이 염색체 DNA 1개 (2,533,713 bp)와 플라스미드 DNA 1개 (198,173 bp)로 구성되어 있으며, GC 함량이 38.1%이었다. 또한 gene annotation 결과, 전체 유전자는 2,735개로 예측되었으며, CDS (coding sequence)가 2,646개, rRNA 18개, tRNA 70개, tmRNA 1개로 구성되어 있었다.

10종의 항생제에 대한 항생제 내성 유전자 확인을 위해 2개의 항생제 내성 유전자 database (CARD, ResFinder)를 이용하여 비교 분석한 결과, 공통적으로 5종의 항생제 (vancomycin, ampicillin, tetracycline, chloramphenicol, clindamycin)의 내성 유전자가 부재함을 확인하였지만, gentamycin, kanamycin, streptomycin이 포함된 aminoglycoside 계열 항생제 내성 유전자인 *aac(6)-li*가 있음을 확인하였다. 한편, erythromycin, tylosin이 포함된 macrolide 계열 항생제 내성 유전자

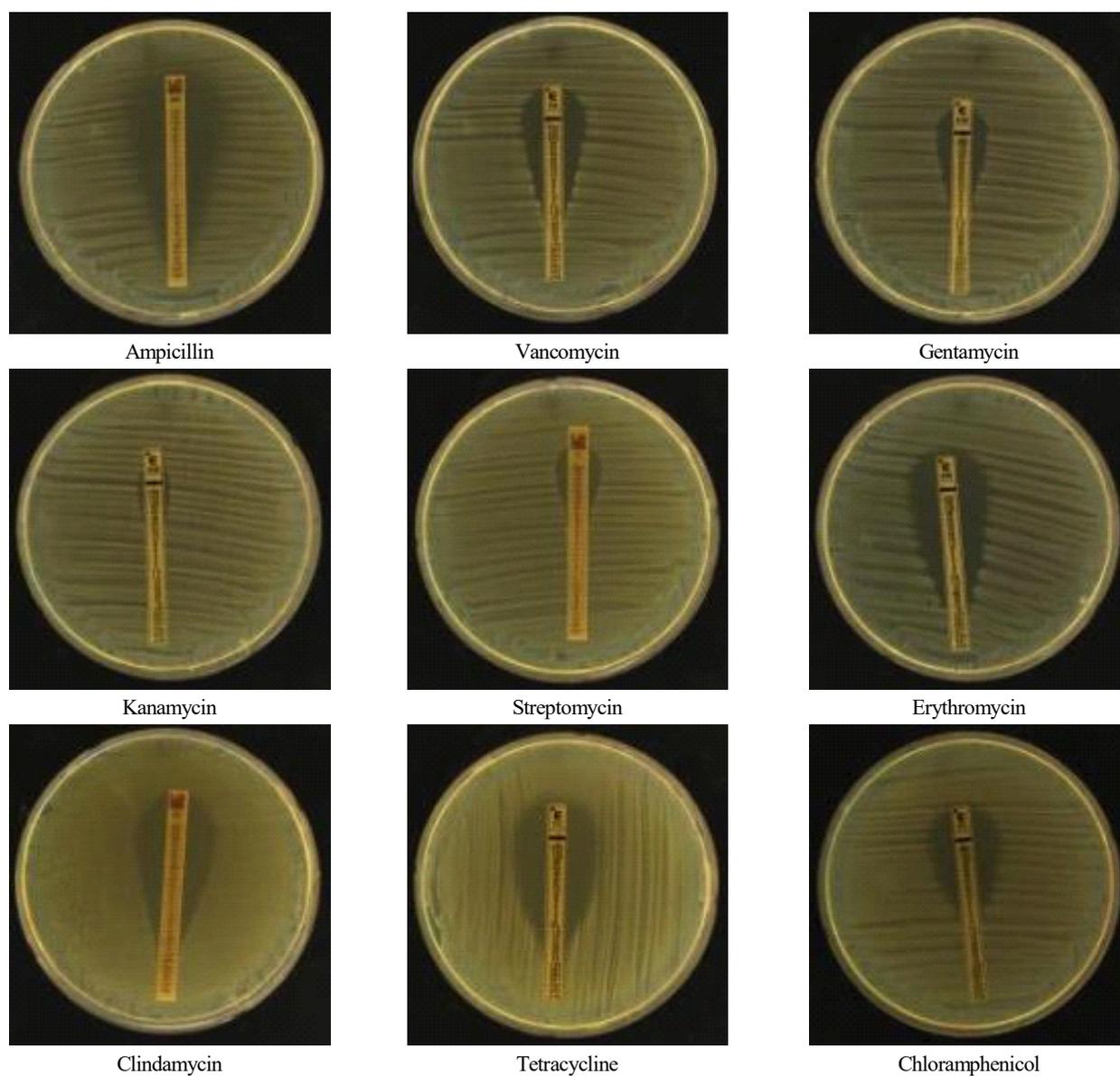
Table 3. Antibiotic susceptibility values for *E. faecium* CKDB003 obtained by MIC test

Antibiotics ¹⁾	AMP	VAN	GEN	KAN	STR	ERY	CLI	TYL ²⁾	TET	CHL
MIC cut-off value (mg/L)	2	4	32	1,024	128	4	4	4	4	16
Susceptibility value ³⁾ (mg/L)	0.08±0.03	0.75±0.00	5.00±1.73	29.30±4.61	32.00±0.00	0.29±0.17	0.24±0.05	1.00±0.00	0.25±0.00	4.00±0.00
Detection rate (%)	4.2±1.8	18.8±0.0	15.6±5.4	2.9±0.5	25.0±0.0	7.3±4.5	6.0±1.3	25.0±0.0	6.3±0.0	25.0±0.0

¹⁾ AMP, Ampicillin; VAN, Vancomycin; GEN, Gentamycin; KAN, Kanamycin; STR; Streptomycin; ERY, Erythromycin; CLI, Clindamycin; TYL, Tylosin; TET, Tetracycline; CHL, Chloramphenicol.

²⁾ The tylosin susceptibility value was determined by two-fold dilution method.

³⁾ Values are mean±S.D. of three replicates.

**Fig. 2. Comparison of MIC test for *E. faecium* CKDB003 using various antibiotics.**

4. Hyaluronidase 활성

Hyaluronidase는 히알루론산의 글리코시드 결합을 가수 분해하는 효소로 결합조직이나 피부의 세포사이에 존재하고 있는 히알루론산을 분해해서 조직으로의 침입, 확산을 용이하게 한다. *E. faecium* CKDB003이 hyaluronidase 활성을 갖는지 확인하기 위해 고체배지에서 히알루론산을 분해하는 활성을 관찰하였다(Fig. 4). 그림에 보이는 것처럼 음성대조군의 경우 변화가 없었으나, 양성대조군에서는 히알루론산이 분해된 결과, 농도별로 clear zone이 선명하게 나타남을 알 수 있었다. 한편, *E. faecium* CKDB003의 배양액을 처리한 실험군의 경우 점적부위가 분해되지 않는 별다른 변화를 보이지 않아 *E. faecium* CKDB003은 hyaluronidase 활성을 갖지 않는 것으로 추정할 수 있다.

5. Gelatinase 활성

Gelatinase는 젤라틴을 분해하는 단백질 분해효소로서 병원성 미생물에 의해 분비되어 biofilm을 형성하는 것으로 알려져 있으며, 특히 생체 내에서 콜라겐, 피브리노겐 및 면역

에 관여하는 보체 등 다양한 종류의 단백질을 분해함으로써 숙주에 독성을 발휘한다. 또한 특히 광범위한 단백질분해 활성 때문에 숙주의 면역시스템을 교란시키고, 심내막염을 유발하는 등의 문제를 유발하는 것으로 알려져 있다(Thurlow 등 2010).

실험 방법에 따라 시험관을 똑바로 세워 배지의 응고 여부를 관찰한 결과, gelatinase 생성 균주를 접종한 positive control 시험관에서는 배지가 응고되지 않았고, 균을 접종하지 않은 negative control 시험관 및 *E. faecium* CKDB003을 접종한 시험관의 배지는 모두 응고되는 결과를 보여주었다. 따라서 본 실험조건에서 *E. faecium* CKDB003은 gelatinase 활성이 없는 것으로 판단된다(Fig. 5).

6. 용혈성 확인

용혈성이란 어떤 병원균이나 질환이 적혈구를 파괴하는 성질이나 특성을 뜻하며, 용혈을 일으키는 세균의 성질에 따라 크게 α , β , γ -hemolysis로 나눌 수 있다. α -hemolysis는 적혈구와 헤모글로빈의 부분적 용해로 배양 후 colony 주변을

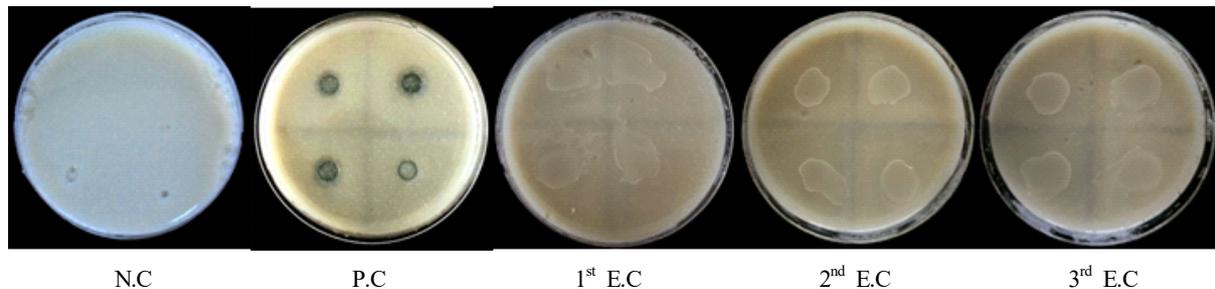


Fig. 4. Investigation of hyaluronidase activity from the culture broth of *E. faecium* CKDB003 and its supernatant. N.C: Negative control, P.C: Positive control(Test is hyaluronidase. Lower right, upper left, lower left and upper right, 0 unit/mL, 37 units/mL, 74 units/mL and 147 units/mL, respectively.), E.F: *E. faecium* CKDB003 dripping (triplicate experiment).

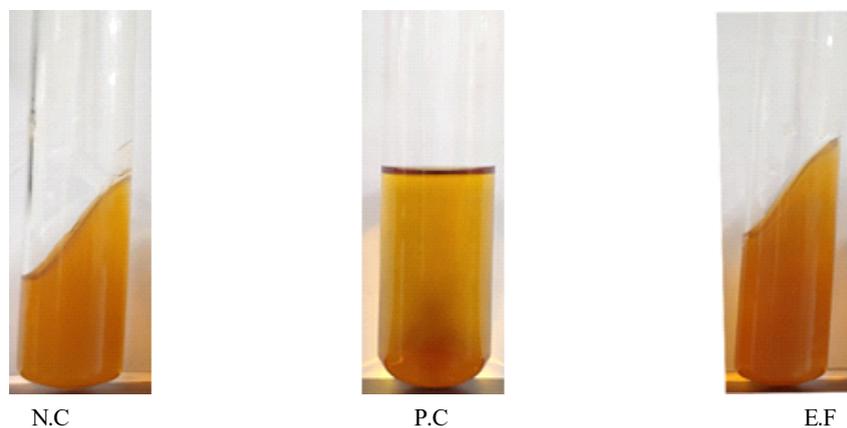


Fig. 5. Comparison of gelatinase activities between P.C and *E. faecium* CKDB003. N.C: Negative control, P.C: Positive control, *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, E.F: *E. faecium* CKDB003 inoculation.

녹색으로 변화시키며, β -hemolysis는 적혈구와 헤모글로빈이 완전 용해되어 배양 후 colony 주변이 투명하게 변한다. γ -hemolysis는 용혈을 일으키지 않으며, colony 주변에 아무런 변화가 없는 것이 특징이다. 이들 중 특히 문제가 되는 것은 β -hemolysis로서 cytolysin이라고 불리는 β -hemolysin-bacteriocin을 생산하는 *Enterococcus*는 환자의 감염률을 5배 증가시키는 것으로 보고되었다(Franz 등 2011).

실험 결과, 양성대조군의 경우 β -hemolysis 능력이 있는 *Streptococcus pyogenes* ATCC 8668로서 도말한 균주 주변에 적혈구가 분해되어 투명하게 변화하였으며, 실험군의 경우 도말한 균주 주변의 색깔 변화가 없어 cytolysin의 활성이 없는 γ -hemolysis로 결론지을 수 있었다(Fig. 6).

7. Auto-aggregation 활성 분석

프로바이오틱스가 장점막에 부착하는 성질은 장내에서 생존하면서 효과를 발휘하기 위한 특성 중의 하나로 프로바이오틱스 균주를 선발하기 위한 기준으로 간주되고 있다(Garcia-Cayuela 등 2014). 뿐만 아니라 프로바이오틱스의 장 점막 부착 능력은 병원성 미생물들이 장 점막에 부착하는 것을 억제하여 군집화(colonization)를 방지함으로써 유해균들을 장으로부터 배출시키는데 기여할 수 있다. 그리고 프로바이오틱스 장 부착능의 정도를 실험관에서 알 수 있는 방법으로 박테리아의 자가응집(auto-aggregation, clumping) 능력을 측정하는 방법이 사용되고 있다(Garcia-Cayuela 등 2014).

한편으로 병원성 미생물의 경우, 자가응집 능력이 높을수록 장점막에서 군집을 형성하여 항생제에 저항성을 보이면서 동시에 숙주세포로의 침입 가능성이 증가하기 때문에 자가응집 특성은 독성 인자로 간주된다(Thurlo 등 2010). 따라서 자가응집능력은 프로바이오틱스로서 바람직한 특성인 동시에 지나치게 높은 자가응집능력은 숙주에 유해한 특성일 수 있다.

Veljović 등(2017)은 다양한 *Enterococcus faecium* 균주들

을 사용하여 30°C에서 5시간 동안 정치하면서 자가응집능력을 비교 분석하였고, 그 결과 cells의 80% 이상이 침전되면 strong auto-aggregation, 60% 정도 침전 시에는 medium auto-aggregation, 40% 이하로 침전 시에는 low auto-aggregation으로 구분하였다(Garcia-Cayuela 등 2014; Veljović 등 2017). 본 연구에서 *E. faecium* CKDB003을 MRS 배지에서 배양 후 원심분리한 다음 phosphate buffer로 세척 후 자가응집능력을 측정할 결과, 30°C에서 5시간이 지난 후 22.3±0.9%임을 확인하였다(Fig. 7). 따라서 *E. faecium* CKDB003은 low auto-aggregation 특성을 갖는 것으로 결론지을 수 있기 때문에 숙주에 유해하지 않은 안전한 균주로 판단된다.

8. 혈소판 응집 반응 확인

재료 및 방법의 계산식에 따라 산출한 control의 혈소판 응집도를 100%로 설정하였다. 실험군의 경우 control과 마

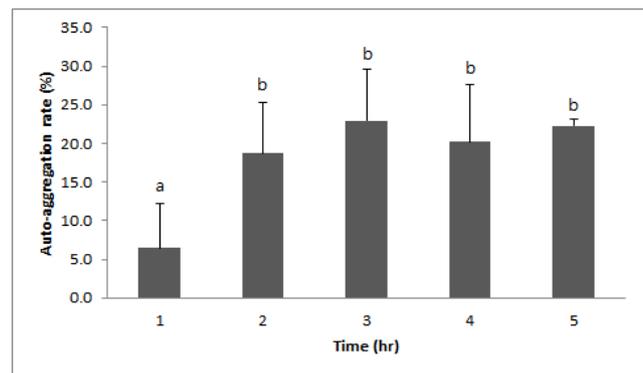


Fig. 7. Auto-aggregation rate of *E. faecium* CKDB003 in phosphate-buffered solution. Results were expressed as the mean±SD of triplicate experiments. Values with different letters within a column are significantly different at $p=0.05$ as determined by Duncan's multiple range tests. ^{a,b}Mean with different superscripts are significantly different by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests ($p<0.05$).

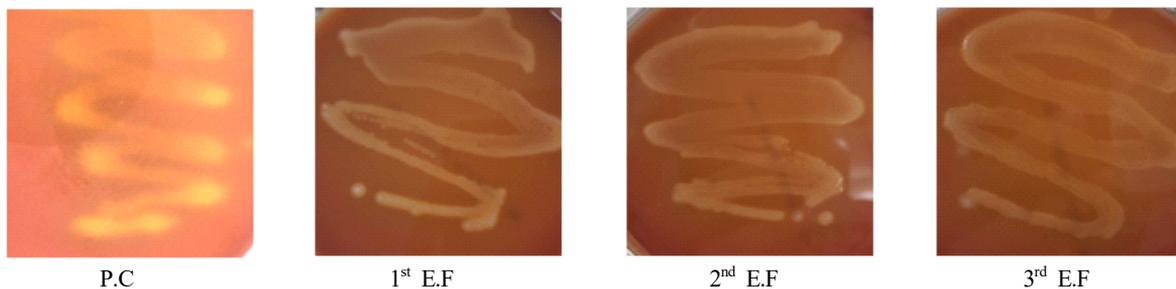


Fig. 6. Investigation of hemolysis activity using P.C and *E. faecium* CKDB003. P.C: Positive control, *Streptococcus pyogenes* ATCC 8668 streaking, E.F: *E. faecium* CKDB003 streaking (triplicate experiment).

찬가지로 혈소판과 CaCl₂를 첨가하고, 추가로 *E. faecium* CKDB003 생균수가 각각 1×10⁷ CFU/mL와 1×10⁸ CFU/mL가 되도록 첨가한 용액을 반응시킨 후 혈소판 응집도를 분석한 결과, 혈소판 응집도는 각각 92.0%, 82.4%로 나타났다 (Table 5). 이러한 결과로부터 *E. faecium* CKDB003 균주는 ADP로 유도되는 혈소판 응집 활성이 없고, 오히려 혈소판 응집에 대해 소폭 억제하였음을 알 수 있었다.

Table 5. Measurement of platelet aggregation rate

Experimental groups	Platelet aggregation rate (unit: %)
Control	100.0 ^a
<i>E. faecium</i> CKDB003 (1×10 ⁷ CFU/mL)	92.0 ^b
<i>E. faecium</i> CKDB003 (1×10 ⁸ CFU/mL)	82.4 ^c

^{a-c}Mean with different superscripts are significantly different by one-way ANOVA followed by Duncan's multiple range tests ($p < 0.05$).

9. PCR을 통한 병독성 유전자 분석

E. faecium CKDB003 균주의 병독성 인자의 유전자 보유 여부를 추가로 확인하고자 PCR도 수행하였다. 대표적인 cytolysin(*cyl*), hyaluronidase(*hyl*), aggregation substance(*asa1*, *as*), 및 gelatinase(*gelE*)에 상응하는 primer를 사용하여 5개의 병독성 유전자 보유 여부를 확인하였다. 그 결과, *E. faecium* CKDB003 균주에는 해당 병독성 유전자가 모두 부재함이 확인되었다(Fig. 8).

한편, 기존에 식품용으로 사용되는 여러 *E. faecium* strain들의 안전성 평가는 주로 PCR 방법에 의한 병독성 유전자와 항생제 내성 유전자들이 평가된 선행 보고가 있었다. 즉 *E. faecium* KQ 2.6경우에는 *gelE*, *esp*, *asa1*, *cylA*, *efaA*, *hyl*의 병독성 유전자들을 검사한 결과 존재하지 않는다고 하였으며(Zheng 등 2015), *E. faecium* YF5는 *cylA*, *gelE*, *ace*, *agg*, *esp*, *vanA* 인자들이 음성임을 확인하였다(Tan 등 2013). *E. faecium* BGG09-28 역시 *E. faecium* KQ 2.6의 결과와 일치하였다고 하였으며(Tsai 등 2004; Veljović 등 2017), *E. faecium*

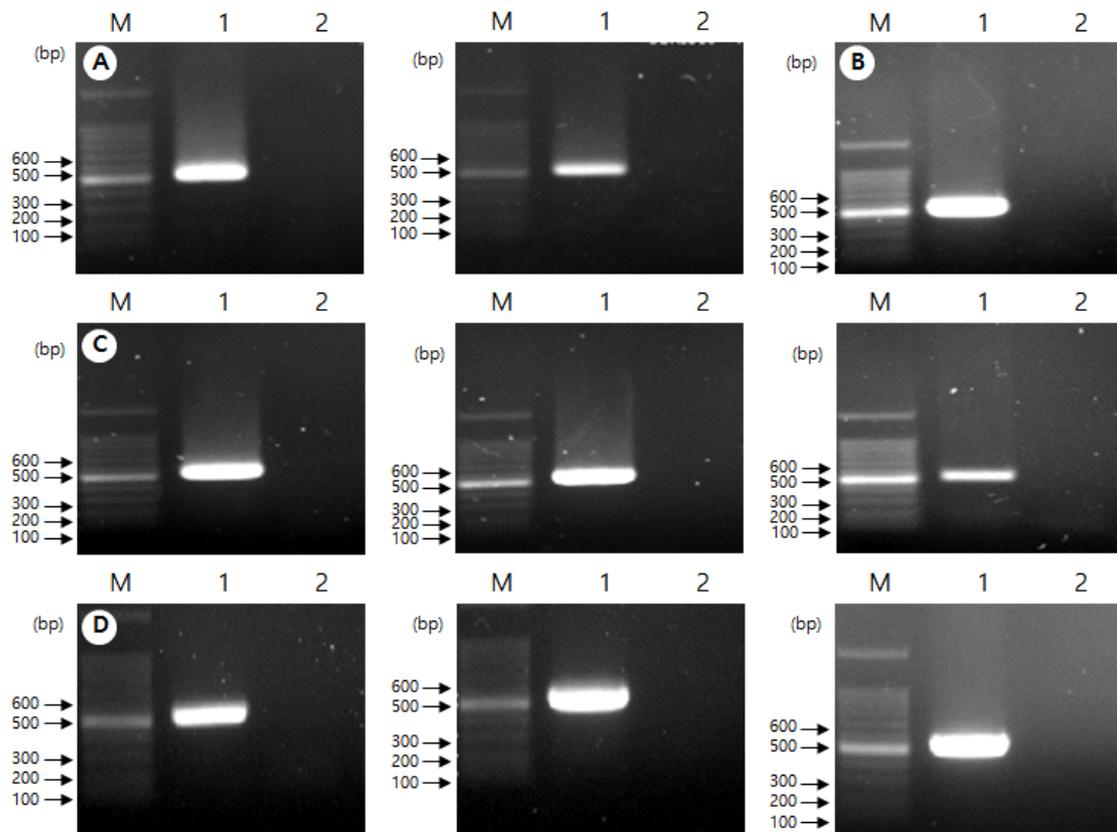


Fig. 8. Results of *E. faecium* CKDB003 using primers directed against (A) 688 bp and 424 bp fragments of the *cyl* gene (B) 276 bp fragment of the *hyl* gene (C) 529 bp and 375 bp fragments of the *asa1* gene, 406 bp fragment of the *as* gene (D) 213 bp, 402 bp and 704 bp fragments of the *gelE* gene. Lane M: size marker, Lane 1: control (*pheS* gene), Lane 2: *E. faecium* CKDB003.

SF68도 병독성 인자가 없다고 보고되었다(Kayser FH 2003). 또한 vancomycin에 감수성을 보인다는 *E. faecium* strain TM39도 항생제 내성 유전자 *vanA*와 *vanB*의 대해서 PCR법에 의해 음성임을 보고하였다(Kariyama 등 2000; Tsai 등 2004). 따라서 *E. faecium* CKDB003 균주의 전장 유전체 분석과 PCR법에 의한 결과는 선행 보고된 균주들처럼 병독성 인자의 유전자들과 항생제 내성 유전자가 부재함을 확인할 수 있었다.

요약 및 결론

*Enterococci*는 사람과 동물의 장관내에 존재하는 정상 세균군 무리의 일종으로서 자연 환경에도 널리 분포되어 있고, 젖산을 생성하는 유산균으로서 발효식품과 프로바이오틱스 제품으로 널리 사용되고 있다. 그러나 이 균은 면역성이 약한 만성 질환자에게 수술 후 원내 감염, 비뇨기 감염 및 균혈증 등을 발생시킬 수도 있는 주요 원인균이면서 vancomycin을 비롯한 다양한 항생제에 내성을 가진 다제내성균으로도 알려져 있다. 따라서 본 연구에서는 신규로 분리한 *E. faecium* CKDB003 균주에 대해 안전성을 평가할 목적으로 식품의약품안전처가 제안하고 의무화한 항생제내성 유전자 및 병독성 유전자 평가를 수행하였다. *E. faecium* CKDB003 균주에 대해 항생제 최소억제농도검사(MIC test)를 수행한 결과, EFSA 가이드스에 규정된 10종의 항생제들에 대해 허용 수준인 MIC cut-off value의 이하로 확인되었다. 그리고 항생제 내성 유전자 및 병독성 유전자를 확인하기 위한 전장 유전체 분석 결과, 항생제들 중 aminoglycoside 계열 항생제 내성 유전자인 *aac(6')-li*과 macrolide 계열 항생제 내성 유전자인 *eatAv*, *msr(C)*가 존재하는 것이 확인되었으나, 이는 chromosome내에 존재하고 plasmid에는 존재하지 않아 전이 가능성이 없는 것으로 확인되었다. 추가로 병독성 인자들의 유전자인 cytolysin(*cytA*, *cytB*, *cytII*, *cytL-l*, *cytL-s*, *cytM*, *cytRI*, *cytR2*), aggregation substance (*asaI*, *aspI*), collagen adhesion(*ace*), enterococcal surface protein(*esp*), endocarditis antigen(*efaA*), hyaluronidase(*hyl*) 및 gelatinase(*gelE*)가 부재함을 확인하였다. 또한 독성효소 활성에 대한 생화학적 분석 결과는 모두 활성이 없는 것으로 나타났으며, PCR법에 의해서도 병독성 인자들인 cytolysin, aggregation substance, hyaluronidase, gelatinase 유전자들이 검출되지 않았다. 따라서 *E. faecium* CKDB003 균주는 항생제 최소억제농도 검사, 전장유전체 분석 및 생화학적 시험에 의한 활성 확인 결과, 건강기능식품 프로바이오틱스 균주로서 안전하게 사용 가능한 것으로 결론지을 수 있다.

References

- Ann YG. 2011. Probiotic lactic acid bacteria. *Korean J Food Nutr* 24:817-832
- Buxton R. 2005. Blood Agar Plates and Hemolysis Protocols. pp.1-9. American Society for Microbiology
- Cevahir N, Demir M, Kaleli I, Gurbuz M, Tikvesli S. 2008. Evaluation of biofilm production, gelatinase activity, and mannose-resistant hemagglutination in *Acinetobacter baumannii* strains. *J Microbiol Immunol Infect* 41:513-518
- Choi MK, Choi SS. 2017. Analysis of antimicrobial resistance pattern and distribution of multi-drug efflux pump genes and virulence genes in *Enterococcus faecalis* isolated from retail meat in Seoul. *J Food Hyg Saf* 32: 135-140
- Chuang ON, Schlievert PM, Wells CL, Manias DA, Tripp TJ, Dunny GM. 2009. Multiple functional domains of *Enterococcus faecalis* aggregation substance *asc10* contribute to endocarditis virulence. *Infect Immun* 77:539-548
- CLSI. 2002. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard. 2nd ed. pp.1-107. Clinical and Laboratory Standards Institute
- CLSI. 2012. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. Clinical and Laboratory Standards Institute
- Eaton TJ, Gasson MJ. 2001. Molecular screening of *Enterococcus* virulence determinants and potential for genetic exchange between food and medical isolates. *Appl Environ Microbiol* 67:1628-1635
- European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing [EUCAST]. 2017. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method 2017. Available from https://eucastrg.org/ast_of_bacteria/previous_versions_of_documents/ [cited 07 December 2018]
- European Food Safety Authority [EFSA]. 2012. Guidance on the assessment of bacterial susceptibility to antimicrobials of human and veterinary importance. *EFSA J* 10:2740-2750
- Faisal M, Akram S, Ashraf M, Ali S, Kazmi SI. 2017. Isolation of gram-positive bacteria from different sources and evaluation of their probiotic properties. *J Med Microbiol Infect Dis* 5:12-16

- FAO, WHO. 2006. Probiotics in Food. pp.1-56. Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization
- Franz CMAP, Huch M, Abriouel H, Holzapfel W, Galvez A. 2011. *Enterococci* as probiotics and their implications in food safety. *Int J Food Microbiol* 151:125-140
- Garcia-Cayuela T, Korany AM, Bustos I, Cadinanos LPG, Requena T, Pelaez C, Martinez-Cuesta MC. 2014. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Res Int* 57: 44-50
- Golob M, Pate M, Kušar D, Dermota U, Avberšek J, Papič B, Zdovc I. 2019. Antimicrobial resistance and virulence genes in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from humans and retail red meat. *Bio Med Res Int* 2019:2815279
- Gozalan A, Coskun-Ari FF, Ozdem B, Unaldi O, Celikbilek N, Kirca F, Aydogan S, Muderris T, Guven T, Acikgoz ZC, Durmaz R. 2015. Molecular characterization of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* strains isolated from carriage and clinical samples in a tertiary hospital, Turkey. *J Med Microbiol* 64:759-766
- Hashem YA, Amin HM, Essam TM, Yassin AS, Aziz RK. 2017. Biofilm formation in *Enterococci*: Genotype-phenotype correlations and inhibition by vancomycin. *Nat Sci Rep* 7:1-12
- Iweriebor BC, Obi LC, Okoh AI. 2015. Virulence and antimicrobial resistance factors of *Enterococcus* spp. isolated from fecal samples from piggery farms in Eastern Cape, South Africa. *BMC Microbiol* 15:136-147
- Jeong EG, Lee JC, Seo JY, Kim SY, Kim WS, Yun WH, Kim YS, Pi SH, You HK, Shin HS. 2008. Inhibitory effects of *Enterococcus faecium* isolated from Korean infants on oral pathogens. *J Korean Acad Periodontol* 38:31-40
- Kang GH. 2003. Characteristics and industrial use of lactic acid bacteria. *Korean J Food Nutr* 16:86-92
- Kariyama R, Mitsuhata R, Chow JW, Clewell DB, Kumon H. 2000. Simple and reliable multiplex PCR assay for surveillance isolates of vancomycin-resistant *Enterococci*. *J Clin Microbiol* 38:3092-3095
- Kayser FH. 2003. Safety aspects of *Enterococci* from the medical point of view. *Int J Food Microbiol* 88:255-262
- Kim JW. 2007. The antimicrobial resistance of nosocomial *Enterococcus faecium* infection in patients received probiotics containing *Enterococcus faecium*. *J Korean Soc Parenter Enteral Nutr* 1:13-18
- Kim MN. 1998. Isolation and characterization of the vancomycin resistant-*Enterococcus faecium*. Master's Thesis, Konkuk Univ. Seoul. Korea
- Kwon JY, Kim TH, Lee EJ, Jeon MH, Choo EJ, Park YH, Lee SH, Park H, Park H, Park H, Bae S, Baek A. 2009. Clinical features of enterococcal bacteremia. *Soonchunhyang Med Sci* 15:71-78
- Lee JH, Hwang SW, Kang KR, Kim DH, Kim CG. 2013. Comparison of virulence factors of *Enterococci* from intestinal drugs, infant feces and clinical isolates. *Korean Soc Biotechnol Bioeng J* 28:54-59
- Lee JH, Park HJ. 1995. Effects of lipophilic fraction from korean red ginseng on platelet aggregation and blood coagulation in rats fed with corn oil and beef tallow diet. *Korean J Ginseng Sci* 19:206-211
- Lee JH. 2013. Research on safety evaluation system and standards for food microorganisms in several countries to ensure food safety. In General Statement of Basic Research Projects. pp.616-635. Youlchon Foundation
- Lilly DM, Stillwell RH. 1965. Probiotics: Growth promoting factors produced by microorganisms. *Science* 147:747-748
- Markowiak P, Slizewaska K. 2017. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on human health. *Nutrients* 9: 1021-1051
- Mathur S, Singh R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol* 105:281-295
- Ministry of Food and Drug Safety [MFDS]. 2017. Report on re-evaluation of health functional food. Available from https://www.mfds.go.kr/brd/m_74/view.do?seq=40062 [cited 19 February 2018]
- Ministry of Food and Drug Safety [MFDS]. 2018. Korean Food Standards Codex. Available from https://www.foodsafetykorea.go.kr/foodcode/01_01.jsp [cited 30 December 2018]
- NECA. 2016. Study on the Safe Use of Probiotics. pp. 1-258. National Evidence based Healthcare Collaborating Agency
- Oh JY, Her SH, Seol SY, Lee YC, Lee JC, Kim JM, Cho DT. 2008. Antimicrobial resistance and multilocus sequence typing of vancomycin-resistant *Enterococcus*

- faecium* isolated from clinical specimens. *J Bacteriol Virol* 38:19-27
- Park SJ. 1999. Isolation, identification and bioactivity of *Enterococcus faecalis* 2B4-1. Ph.D. Thesis, Kon-Kuk Univ. Seoul. Korea
- Park YJ. 2017. Isolation and characterization of Kimchi lactic acid showing antibacterial activity. *Korean J Hum Ecol* 26:547-558
- Sandip P, Bhushan C. 2017. A simple, rapid and sensitive plate assay for detection of microbial hyaluronidase activity. *J Basic Microbiol* 57:358-361
- Sava IG, Heikens E, Huebner J. 2010. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin Microbiol Infect* 16:533-540
- Seong JU, Cha SB, Ryu KH, Choi KS, Park JC. 2013. Distribution characteristics and antibiotics resistance of *Enterococcus* spp. in Nakdong river. *Korean J Ecol Environ* 46:360-366
- Seputiene V, Bogdaite A, Ruzauskas M, Suziedeliene E. 2012. Antibiotic resistance genes and virulence factors in *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* from diseased farm animals pigs, cattle and poultry. *Pol J Vet Sci* 15:431-438
- Sievert DM, Ricks P, Edwards JR, Schneider A, Patel J, Srinivasan A, Kallen A, Limbago B, Fridkin S, National Healthcare Safety Network (NHSN) Team and Participating NHSN Facilities. 2013. Antimicrobial-resistant pathogens associated with healthcare-associated infections: Summary of data reported to the National Healthcare Safety Network at the Centers for Disease Control and Prevention, 2009-2010. *Infect Control Hosp Epidemiol* 34:1-14
- Simon O. 2005. Micro-organisms as feed additives-probiotics. *Adv Pork Prod* 16:161-167
- Smith RF, Willett NP. 1968. Rapid plate method for screening hyaluronidase and chondroitin sulfatase-producing microorganisms. *J Appl Microbiol* 16:1434-1436
- Suchi SE, Shamsuzzaman SM, Uddin BMM, Yusuf MA. 2017. Detection of virulence factors and antimicrobial resistance in *Enterococci* isolated from urinary tract infection. *Bangladesh J Infect Dis* 4:30-34
- Svec P, Vancanneyt M, Koort J, Naser SM, Hoste B, Vihavainen E, Vandamme P, Swings J, Bjorkroth J. 2005. *Enterococcus devriesei* sp. nov., associated with animal sources. *Int J Syst Evol Microbiol* 55:2479-2484
- Tan Q, Xu H, Aguilar ZP, Peng S, Dong S, Wang B, Li P, Chen T, Xu F, Wei H. 2013. Safety assessment and probiotic evaluation of *Enterococcus faecium* YF5 isolated from sourdough. *J Food Sci* 78:M587-M593
- Thurlow LR, Thomas VC, Narayanan S, Olson S, Fleming SD, Hancock LE. 2010. Gelatinase contributes to the pathogenesis of endocarditis caused by *Enterococcus faecalis*. *Infect Immun* 78:4936-4943
- Tsai CC, Liu TH, Chen MH, Tsai CC, Tsen HY. 2004. Toxicity evaluation for an *Enterococcus faecium* strain TM39 *in vitro* and *in vivo*. *Food Chem Toxicol* 42:1601-1609
- Vankerckhoven V, Autgaerden TV, Vael C, Lammens C, Chapelle S, Rossi R, Jabes D, Goossens H. 2004. Development of a multiplex PCR for the detection of *asa1*, *gelE*, *cylA*, *esp*, and *hyl* genes in *Enterococci* and survey for virulence determinants among European hospital isolates of *Enterococcus faecium*. *J Clin Microbiol* 42:4473-4479
- Veljović K, Popović N, Miljković M, Tolinački M, Terzić-Vidojević A, Kojić M. 2017. Novel aggregation promoting factor *aggE* contributes to the probiotic properties of *Enterococcus faecium* BGG09-28. *Front Microbiol* 8:1-14
- Vergio FV. 1954. Anti-und probiotika. *Hippokrates* 25:116-119
- Zheng W, Zhang Y, Lu HM, Li DT, Zhang ZL, Tang ZX, Shi LE. 2015. Antimicrobial activity and safety evaluation of *Enterococcus faecium* KQ 2.6 isolated from peacock feces. *BMC Biotechnol* 15:30

Received 02 April, 2020

Revised 24 April, 2020

Accepted 11 May, 2020