

## 모유에서 분리한 *Enterococcus faecalis*의 다제내성 균에 대한 항용혈 및 항균 효과

이은지<sup>1</sup>, 이정은<sup>1</sup>, 조소연<sup>2</sup>, 김수빈<sup>3</sup>, 유두나<sup>4</sup>, 국무창<sup>2\*</sup>, 김애정<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>경기대학교 대학원 대체의학과

<sup>2</sup>배화여자대학교 식품영양학과

<sup>3</sup>중앙대학교 식품영양학과

<sup>4</sup>경희대학교 생명공학원

<sup>5</sup>경기대학교 대체의학대학원

Received: October 20, 2021 / Revised: November 12, 2021 / Accepted: November 22, 2021

### Anti-Hemolytic and Antimicrobial Effects against Multidrug-Resistant Bacteria of *Enterococcus faecalis* Isolated from Human Breast Milk

Eun-Ji Yi<sup>1</sup>, Jeong-eun Lee<sup>1</sup>, So-Yeon Jo<sup>2</sup>, Soo-bin Kim<sup>3</sup>, Du-na Yu<sup>4</sup>, Moochang Kook<sup>2\*</sup>, and Ae Jung Kim<sup>5\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Alternative Medicine, Kyonggi University, Seoul 03746, Republic of Korea

<sup>2</sup>Department of Food and Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 03039, Republic of Korea

<sup>3</sup>Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University, Anseong 17546, Republic of Korea

<sup>4</sup>Department of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 17104, Republic of Korea

<sup>5</sup>The Graduate School of Alternative Medicine, Kyonggi University, Seoul 03752, Republic of Korea

In this study, the hemolysis of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP strains, isolated from human breast milk, was investigated, and the anti-hemolytic and antimicrobial effects on multidrug-resistant (MDR) bacteria were investigated. The enzyme activity of *E. faecalis* BMSE-HMP 4 strains was measured, and it was found that the activities of esterase and esterase lipase were the highest. In addition, no hemolytic reaction was observed in any of the isolates. Subsequently, the anti-hemolytic activity against MDR strains causing hemolysis was evaluated. *E. faecalis* BMSE-HMP002 had the highest anti-hemolytic activity against *Staphylococcus aureus* CCARM 3855 at 75.71 ± 10.00%. The anti-hemolytic activity against *Escherichia coli* DC 2 CCARM 0238 and *Pseudomonas aeruginosa* CCARM 0223 showed that the activity of BMSE-HMP001 was highest at 76.92 ± 2.99% and 87.93 ± 1.93%, respectively. Examination of the antimicrobial effects against the MDR bacteria *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., and *E. faecalis* BMSE-HMP strains showed antimicrobial effects against both gram-positive and gram-negative strains. Breastfeeding delivers *enterococci* into the intestinal tract of newborns by lactation, and its usefulness is attracting attention as it has been reported that *enterococci* have a potential effect on neonatal immune development. In this study, the hemolytic and antimicrobial effects of *E. faecalis* BMSE-HMP strains on MDR bacteria were investigated, to confirm their potential as useful lactic acid bacteria. Additional studies on the antibiotic resistance and toxicity of the *E. faecalis* BMSE-HMP strains, isolated in this study, are necessary to prove it safe for use.

**Keywords:** Human breast milk, anti-hemolytic activity, antimicrobial effect, *Enterococcus faecalis*

#### \*Corresponding authors

M.C. Kook

Tel.: +82-2-399-0765, Fax: +82-2-737-6711

E-mail: bmse153@gmail.com

A. J. Kim

Tel.: +82-2-390-5044, Fax: +82-2-313-4131

E-mail: aj5249@naver.com

#### 서론

최근 항생제 오남용으로 인한 내성 박테리아의 출현은 세계적인 공중보건 문제로 대두되고 있다. 이러한 주요 항생제 내성균으로는 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), beta-lactamase 생성 장내세균속

(*Enterobacteriaceae*), multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* (MRPA) 등이 있다[1].

공생 박테리아로 건강한 인간의 약 30%에서 발견되는 공생 박테리아면서 장관독소, 표피박탈독소 등을 생성하여 피부염, 폐렴 및 패혈증을 유발하는 기회감염 균으로[2, 3], 숙주 세포의 plasma membrane을 손상시킬 수 있는 polypeptides 그룹을 포함하는 외독소를 분비하는데, 이러한 polypeptides에는  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ -hemolysin 및 leukocidin 등이 있다고 알려져 있다[4]. *Escherichia coli*는 인간의 장에서 흔히 발견되면서 병원 내 의료관련 감염을 일으키는 가장 흔한 균으로, 영국 및 유럽에서 혈류감염의 주요 원인이 되며[5], *E. coli*로 인한 패혈증 환자의 사망률은 9.71%로 보고되었다[6]. 대부분의 대변 내 대장균은 비병원성이거나, 장관독소 원성대장균(*enterotoxigenic E. coli*), 장관침투성대장균(*enteroinvasive E. coli*), 장병원성대장균(*enteropathogenic E. coli*), shiga 독소생성대장균(*shiga toxin-producing E. coli*), 장관출혈성대장균(*enterohemorrhagic E. coli*) 또는 장관병원성대장균(*enteroaggressive E. coli*)이 설사를 일으키며[7], 출혈성 장염, 방광염, 설사질환, 용혈성 요독증후군 등의 발생원인으로 인지되었다[8]. *P. aeruginosa*는 숙주 방어 메커니즘이 손상된 환자에게서 심각한 병원성을 보이는 기회감염균으로 생물막을 형성하여 많은 항생제에 내성을 지닐 수 있으며[9], pyocyanin과 같은 색소, proteolytic enzymes, 장관독소를 비롯한 많은 여러 독성 인자를 생성하여 폐부종, 출혈 등을 유발하는데, 특히 *P. aeruginosa*가 생산하는 proteolytic enzymes는 출혈 및 괴사, 안구감염에서의 각막 파괴를 유발하는 것으로 보고되었다[10].

이러한 내성 균을 비롯한 병원성 미생물에 의한 감염을 예방하기 위한 새로운 대안으로, 장내에서 면역작용을 나타내는 유산균으로 대표되는 probiotics 및 이들의 사균체와 대사산물인 post-biotics가 광범위하게 이용되고 있다[11]. 식품의약품안전처에서는 probiotics를 건강에 좋은 효과를 주는 살아있는 균으로 정의하면서 내산성 및 내담즙성을 보유하고, 장에서 유효한 효능을 나타내면서 비병원성 및 독성이 없어야 한다고 제한하였는데, 이 중 *Enterococcus* 속 유산균 일부는 항생제 내성 및 독성 유전자 등으로 인하여 식품 활용에 큰 제한이 되고 있다[12]. 따라서 2019년 이후 식약처에서는 ‘건강기능식품의 기준 및 규격’에 제시된 바와 같이 *Enterococcus*의 항생제 내성 유전자 및 독성 유전자가 없는 경우에 한하여 사용이 가능한 것으로 고시하고 있다.

Probiotics 고시형 균주인 *E. faecalis*와 *E. faecium*은 *Enterococcus* 속 박테리아로 gram positive, 통성혐기성, 내염성 균으로 유산균 범주에 포함된다. *Enterococcus* 속은 단백질 및 지질 분해활성이 있으며, 일부 *Enterococcus* 속은 *Listeria monocytogenes*, *S. aureus*, *Vibrio cholerae* 등의

식품 부패 또는 병원성 박테리아를 억제하는 bacteriocin을 생성하여 발효 종균으로 활용될 가능성이 높은 것으로 보고되었다[12, 13]. 이러한 *E. faecalis*와 *E. faecium*은 식품 보존제나 가축사료 첨가제로 사용되고 있으며, *E. faecalis* Symbioflor 1과 *E. faecium* SF68<sup>®</sup> (NCIMB 10415) 균주는 과민성 대장 증후군, 혈청 콜레스테롤 저하 및 면역 조절 효과가 입증되어 probiotics로서 장구균의 잠재적 효능이 연구되었다[14].

건강한 여성의 모유에는 *Enterococci*를 포함하여 다양한 세균이 존재하며[15], 많은 전문가들은 이러한 모유 내 세균들이 수유과정에서 신생아의 장관으로 전달되어 생애 초기 장내 미생물총 형성에 도움을 줄 것으로 추정하고 있다[16]. 특히 최근 연구에서 알레르기가 있는 신생아가 건강한 아기에 비해 장내 *Enterococci*의 수가 적은 것으로 밝혀지는 등 장내 *Enterococci*의 면역발달에 대한 잠재적인 역할이 강조되고 있어[17], 모유에서 분리한 *Enterococci*의 활용가치에 대한 기대감이 높아지고 있는 추세이다. 따라서, 본 연구에서는 항생제 내성 균주에 대항하는 유용한 유산균을 분리 및 동정하여 probiotics 또는 post-biotics로 활용하고자 한국인의 모유에서 유산균을 분리하고 다제내성균에 우수한 항용혈 및 항균효과를 보이는 균주를 선발하였다.

## 재료 및 방법

### 모유의 수집 및 보관

본 연구는 경기대학교 기관생명윤리위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받아 진행되었다(승인번호: KGU-20191018-HR-046-04). 본 연구에 사용한 모유는 2020년 2월부터 2021년 2월까지 대한민국에 거주 중인 만 20-39세의 출산 여성으로 임신 고위험군에 해당된 이력이 없고, 재태주수 37주-41주 사이에 출산한 건강한 산후 6개월 이하의 수유부 중, 사전에 연구내용에 대해 설명하고 충분히 숙지하여 이에 동의한 제공자를 대상으로 수집하였다. 모유는 유축기로 열탕소독한 젖병에 50 ml 이상 착유하여 멸균 튜브에 옮겨담았다. 이후 수집한 모유는 연구에 이용되기 전까지 -70℃의 deep-freezer에 보관하여 사용하였다.

### 균주의 분리 및 동정

모유를 Lactobacilli MRS broth (Difco Co., USA) 1 ml에 10% (v/v) 접종한 후 30℃에서 24시간동안 배양하여 증균한 후 MRS broth에 2% (v/v) 수준으로 접종하여 30℃에서 24시간 배양하였다. 이후 유산균 감별배지인 Bromo Cresol Purple (BCP) plate count agar (EIKEN chemical)에 희석도말하여 30℃에서 24시간 배양하였고, 산을 생성하여 주위에 노란색 환을 형성한 콜로니를 취해 이를 순수 분리

하였다. 분리한 균주는 생화학적 특성을 조사하기 위해 API ZYM kit (BioMérieux, France)를 이용하여 효소 활성 정도를 1-3으로 구분하였으며, 16S rRNA 염기서열을 분석하여 최종 동정하였다(Biofact Co., Korea). 염기서열 분석을 위해 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') primer와 PRISM 3730XL DNA analyser (Applied Biosystems, USA)를 사용하였으며 분석한 염기서열은 EzBioCloud의 16S database tool로 비교 분석하였다.

### 용혈성 확인

균주의 용혈성을 확인하기 위해 blood agar base (Kisan Bio Co., Korea)에 5% sheep blood (Kisan Bio Co.)를 첨가하여 blood agar plate를 제조하고, 균주를 희석도말하여 37°C에서 48시간 배양한 후 집락 주위로 형성되는 환의 형태에 따라 용혈성을 관찰하였다. 용혈성이 있는 내성 균주 *S. aureus* CCARM 3855, *E. coli* DC 2 CCARM 0238, *P. aeruginosa* CCARM 0223를 대조균으로 하여 Argyri 등[18]

의 방법에 따라 용혈성을 확인하였다.

### 항용혈 효능 측정

유산균 배양액의 항용혈능 측정에는 Bezerra 등[19]의 방법을 참고하였다. 유산균을 MRS broth에 2% (v/v) 수준으로 접종하여 30°C에서 24시간 배양하였으며, 균주 배양액은 5분간 원심분리(13,000 ×g)하여 상등액을 취한 후 0.2 μm membrane filter (SM13P020SL, Hyundai micro Co., Korea)로 여과하여 항용혈능 측정시료로 사용하였다. Hemolysin을 생산하는 균주 3종 중 *S. aureus* CCARM 3855와 *P. aeruginosa* CCARM 0223는 Tryptone Soy Broth (TSB)(Difco)에 *E. coli* DC 2 CCARM 0238는 Luria-Bertani (LB) broth (Difco)에 각각 2% (v/v) 수준으로 접종하여 37°C에서 24시간 배양하였다. 이후 5분간 원심분리(13,000 ×g)하여 상등액을 취하고 0.2 μm membrane filter (Hyundai micro Co.)로 여과하여 hemolysin을 포함하는 배양액을 사용하였다. 항용혈 활성 측정을 위하여 0.1 M Phosphate Buffered Saline (PBS) 용액 (pH 7.0) 775 μl에 defibrinated

**Table 1. List of indicator strains.**

	Strains	Collection no.	Culture media	Antibiotics resistant <sup>1)</sup>
Gram positive	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCCM 11335	TSB	-
	<i>Staphylococcus aureus</i>	KCTC 3881	TSB	-
	<i>Enterococcus faecalis</i>	CCARM 5171	MRS	Amp, Nor, GM, Van
	<i>Enterococcus faecium</i>	CCARM 5262	MRS	Amp, Nor, GM, Van
	<i>Staphylococcus aureus</i> 285	CCARM 0204	TSB	Amp, Nor, GM
	<i>Staphylococcus aureus</i> 503	CCARM 0205	TSB	Amp, Nor, GM
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CCARM 3855	TSB	Amp, Nor, GM
	<i>Staphylococcus aureus</i>	CCARM 3089	TSB	Amp, Nor, GM
	Gram negative	<i>Escherichia coli</i>	KCTC 2571	LB
<i>Escherichia coli</i>		KCTC 1039	LB	-
<i>Escherichia coli</i> 078		CCARM 0230	LB	Amp, Nor, GM
<i>Escherichia coli</i> DC 0		CCARM 0237	LB	Amp, Nor, GM
<i>Escherichia coli</i> DC 2		CCARM 0238	LB	Amp, Nor, GM
<i>Escherichia coli</i> TEM		CCARM 0235	LB	Amp, Nor, GM
<i>Escherichia coli</i> 1507		CCARM 0236	LB	Amp, Nor, GM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		CCARM 0223	TSB	Amp, Nor, GM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		CCARM 0224	TSB	Amp, Nor, GM
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>		CCARM 0225	TSB	Amp, Nor, GM
<i>Salmonella enterica</i>		CCARM 0240	TSB	Amp, Nor, GM
<i>Klebsiella oxytoca</i>		CCARM 0248	TSB	Amp, Nor, GM
<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522E		CCARM 0249	TSB	Amp, Nor, GM
<i>Enterobacter cloacae</i> P 99		CCARM 0252	TSB	Amp, Nor, GM
<i>Enterobacter cloacae</i> 1321E		CCARM 0253	TSB	Amp, Nor, GM

<sup>1)</sup>AMP; Ampicillin, Nor; Norfloxacin, GM; Gentamycin, Van; Vancomycin.

sheep blood (Kisan Bio Co.) 25  $\mu$ l와 hemolysin을 포함하는 배양액과 시료를 각각 100  $\mu$ l씩 첨가 후 혼합하여, 33°C에서 24시간 반응하고 5분간 원심분리(20,000  $\times$ g)한 후 상등액을 취해 UV/VIS-spectrophotometer (BioTek, USA)를 이용하여 543 nm에서 흡광도를 측정하여 아래와 같이 실험군(A<sub>0</sub>), 음성대조군(blank, A) 및 양성대조군(B) 간의 흡광도비(%)로 항용혈 값을 계산하였다.

$$\text{Anti-hemolytic activity (\%)} = 100 - \{(A_0 - A)/B\} \times 100$$

### 항균활성 및 최소저해농도(Minimal Inhibitory Concentration, MIC)와 최소살균농도(Minimum Bactericidal Concentration, MBC) 측정

항균활성 측정에 사용된 지시균주는 *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. 및 *Enterobacter* spp. 등 총 23주로 각 균주와 관련정보는 서울여자대학교로부터 제공받아 사용하였으며 Table 1에 표기하였다. 지시균주는 각각 TSB, MRS broth 및 LB broth에 2% (v/v) 수준으로 접종하여 37°C에서 18시간 배양하였으며, 지시균주에 대한 유산균의 항균활성 측정 및 최소저해농도는 Wiegand 등[20]의 액체배지 희석법(broth dilution method)을 이용하여 확인하였다. 유산균을 MRS broth에 2% (v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후 5분간 원심분리(13,000  $\times$ g) 하여 상등액을 취해 0.2  $\mu$ m membrane filter (Hyundai micro Co.)로 여과한 것을 시료로 사용하였으며, 실험에 사용한 지시균주는 균수를 10<sup>6</sup> CFU/ml로 조절하여 사용하였다. 최소저해농도(MIC) 측정을 위해 96-well microplate (cell culture plate, SPL life sciences Co., Ltd., Korea)에 액체배지와 시료를 첨가하여 2-fold dilution한 후 지시균주를 분주하고 37°C에서 18시간 배양하여 생육 저해정도를 확인하였다. 이후, TSA, LB agar plate에 희선도말하여 37°C에서 24시간 배양하여 콜로니 생성이 저해되는 최소농도를 최소저해농도(MIC), 콜로니 생성이 확인되지 않는 농도를 최소살균농도(MBC)로 설정하였다.

### 통계학적 분석

본 연구에서는 균주의 분리과정을 제외하고 모든 실험을 3회 이상 반복 수행하였으며, 결과는 SPSS (Statistical Package for the Social Science, Ver. 20, SPSS Inc., USA)을 이용하여 통계분석 하였다. 각 실험군에 대한 분석은 분산분석(ANOVA)을 실시하여  $p < 0.05$  수준에서 유의성을 검토하였고, 시료들의 특성에 대한 유의적인 차이는 Duncan's multiple range test로 검증하였다.

## 결과 및 고찰

### 모유 유래 유산균의 분리 및 동정

본 연구에서는 모유유래 유용 유산균을 분리하기 위해 국내 건강한 수유부 여성을 대상으로부터 모유 샘플을 수집하여 모유 내 유산균을 분리하였다. 분리 균주의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과, 분리 균주 BMSE-HMP001, HMP002, HMP003, HMP004는 *Enterococcus faecalis* ATCC 19433과 각각 99.79%, 99.72%, 99.86%, 99.79%의 상동성을 보였다(data not shown). 또한 API ZYM kit를 이용한 *E. faecalis* BMSE-HMP 4주의 효소활성 측정결과, 균주 모두 esterase, esterase lipase, leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase 활성을 가지는 것으로 나타났으며(Table 2), 그 중, 지질에 대한 가수분해 효소인 esterase 및 esterase lipase에 대한 활성이 우수하였다. Blessing 등[15]은 건강한 여성의 모유에서 *Staphylococci*, *Lactobacilli*, *Streptococci*, *Enterococci* 등의 박테리아가 쉽게 분리될 수 있다고 하였으며, Bagci 등[21]은 인간의 모유에서 가장 일반적으로 분리되는 *Streptococci*, *Enterococci*, *Lactobacilli*, *Bifidobacteria* spp. 중 일부 박테리아는 잠재적인 프로바이오틱스의 특성을 나타내어 장내 미생물총의 발달에 중요한 역할을 하는 것으로 보고하였다. 따라서, 본 연구에서 분리한 *E. faecalis* BMSE-HMP 4주의 유용 유산균으로써 가능성을 확인하고자 하였다.

### *E. faecalis* BMSE-HMP strains의 용혈성 확인

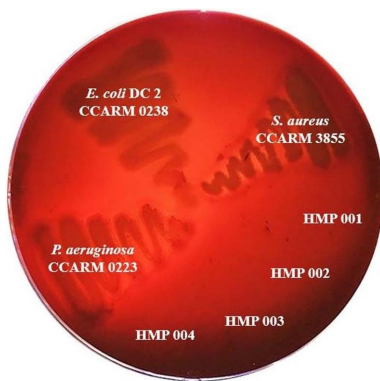
모유에서 분리한 *E. faecalis*의 용혈성을 확인한 결과, 양성대조군인 *S. aureus* CCARM 3855, *E. coli* DC 2 CCARM 0238 및 *P. aeruginosa* CCARM 0223은 용혈반응이 확인되었으나, 모유에서 분리한 *E. faecalis* BMSE-HMP 4주는 모든 균주에서 용혈반응이 나타나지 않았다(Fig. 1). *Enterococcus* 속(genus) 박테리아의 대표적인 독성인자로는 용혈소 또는 세포 용혈소(cytolysin)인  $\beta$ -hemolysin이 있다[22, 23]. Semedo 등[24]은 분리된 *E. faecalis*의 60%가  $\beta$ -hemolysin을 생성하였음을 보고하였고, Furumura 등[25]의 연구에서 분리한 *E. faecalis* 균주 중 75%가 용혈성이 있다고 보고하였다. 반면, Jeong 등[26]이 메주에서 분리한 *E. faecalis*와 *E. faecium*에서 모두 용혈반응이 나타나지 않았음을 보고하였고, 또한 Baccouri 등[27]의 연구에서 프로바이오틱스 균주 *E. faecalis* Symbioflor 1과 치즈에서 분리한 *E. faecalis* OB14 및 OB15 모두 적혈구 용혈을 나타내지 않는 것으로 보고한 바 있다. 모유에서 분리한 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP 4주 또한 용혈반응이 나타나지 않아 선행연구와 유사한 결과를



**Table 2. Enzyme assay for major biochemical reactions of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP strains using API ZYM kit.**

Enzyme Assayed For	HMP001	HMP002	HMP003	HMP004
Control	Colorless or color of the sample if it has an intense coloration			
Alkaline phosphatase	- <sup>1)</sup>	-	-	-
Esterase (C4)	3	3	3	3
Esterase lipase (C8)	3	3	3	3
Lipase (C14)	-	-	-	-
Leucine arylamidase	2	2	1	1
Valine arylamidase	-	-	-	-
Crystine arylamidase	-	-	-	-
Trypsin	-	-	-	-
$\alpha$ -chymotrypsin	w <sup>2)</sup>	w	w	w
Acid phosphatase	2	3	1	1
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	2	3	1	1
$\alpha$ -galactosidase	-	-	-	-
$\beta$ -glucuronidase	-	-	-	-
$\beta$ -glucosidase	-	-	-	-
$\alpha$ -glucosidase	-	-	-	-
N-acetyl- $\beta$ -glucosaminidase	-	-	-	-
$\alpha$ -mannosidase	-	-	-	-
$\alpha$ -fucosidase	-	-	-	-

<sup>1)</sup>-; negative, <sup>2)</sup>w; weak positive.

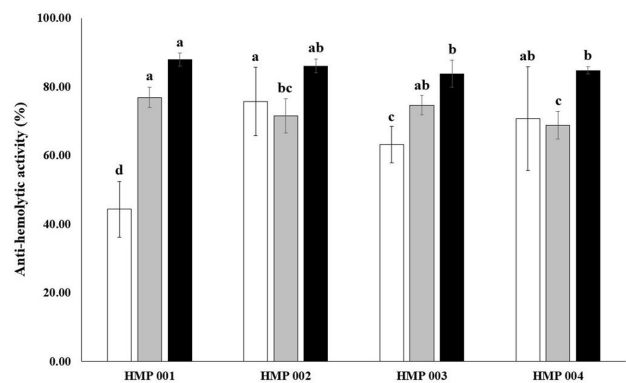


**Fig. 1. Hemolysis of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP strains from human breast milk.**

보였으며, 장구균의 용혈성 유무는 균주의 개별적인 특성에 의한 것으로 판단된다.

***E. faecalis* BMSE-HMP strains의 항용혈 효능**

*S. aureus*, *E. coli* 및 *P. aeruginosa* 는 병원성을 띠는 단백질인 hemolysin을 분비하고, 그 중  $\alpha$ -hemolysin은 포유동물의 신체 일부에서 중요한 독성 인자로 작용하여 여러 임상 감염에서 독성을 강화하는 것으로 보고되었으며,  $\beta$ -



**Fig. 2. Anti-hemolytic activity of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP strains from human breast milk.** □; *S. aureus* CCARM 3855, ■; *E. coli* DC 2 CCARM 0238, ■; *P. aeruginosa* CCARM 0223. Data are expressed as mean values and standard deviations (means  $\pm$  SD) and were determined from triplicate trials. Significantly different values ( $p < 0.05$ ) calculated analysis of variance (ANOVA) technique using Duncan's multiple range test on SPSS program.

hemolysin 또한 감염된 동물 모델에서 중요한 것으로 알려져 있다[28-30]. 따라서 박테리아가 생산하는 hemolysin에 의한 질환을 예방하기 위해, *S. aureus* CCARM 3855, *E. coli* DC 2 CCARM 0238, *P. aeruginosa* CCARM 0223가

유발하는 용혈에 대하여 *E. faecalis* BMSE-HMP 4주 배양액의 억제효과를 확인하고자 하였다. *S. aureus* CCARM 3855에 대한 항용혈 활성은 HMP002가  $75.71 \pm 10.00\%$ 로 가장 높았으며 다음으로 HMP004 ( $70.72 \pm 15.15\%$ ), HMP003 ( $63.27 \pm 5.30\%$ ), HMP001 ( $44.35 \pm 8.15\%$ ) 순이었다(Fig. 2). *E. coli* DC 2 CCARM 0238에 대한 항용혈 활성은 HMP001이  $76.92 \pm 2.99\%$ 로 가장 높았으며, HMP003 ( $74.65 \pm 2.82\%$ ), HMP002 ( $71.59 \pm 4.98\%$ ), HMP004 ( $68.87 \pm 4.01\%$ ) 순으로 나타났다. *P. aeruginosa* CCARM 0223에서도 HMP001이  $87.93 \pm 1.93\%$ 로 가장 높게 나타났으며, HMP002 ( $86.08 \pm 1.97\%$ ), HMP004 ( $84.80 \pm 1.07\%$ ), HMP003 ( $83.82 \pm 3.98\%$ ) 순으로 항용혈 활성을 보였다. 용혈 유발 균에 따라 *E. faecalis* BMSE-HMP strains의 항용혈 활성을 비교해 보면 그람 음성균인 *P. aeruginosa*에서  $85.66 \pm 1.77\%$ 로 가장 높게 나타났으며, 다음으로는 *E. coli* DC 2 CCARM 0238에 대한 항용혈 활성이  $73.01 \pm 3.52\%$ 의 결과를 보였으며, 그람 양성균인 *S. aureus* CCARM 3855에 대한 항용혈 활성이  $63.51 \pm 13.76\%$ 로 확인되었다. 내성 균주 *P. aeruginosa* CCARM 0223는 집락 주변에 녹색환을 생성하여  $\alpha$ -hemolysis로, *S. aureus* CCARM 3855와 *E. coli*

DC 2 CCARM 0238는 집락 주변에 황색 투명환을 생성하여  $\beta$ -hemolysis로 확인되었다. 본 연구결과, *E. faecalis* BMSE-HMP strains의 항용혈 효능이 *P. aeruginosa* CCARM 0223에서 가장 우수한 것으로 보아  $\beta$ -hemolysin 보다  $\alpha$ -hemolysin에 대한 억제 효능이 우수한 것으로 생각된다. Pakdeesiriwong 등[31]은 *E. faecalis* 균주가 *S. aureus*의 용혈반응을 약 70%의 수준으로 억제한다고 보고하였으며, Vitkova와 Votava [32]는 일부 *E. faecalis* 균주가 protease 유사물질을 생산하여 *S. aureus*의  $\beta$ -hemolysin에 의한 용혈을 억제한다고 보고한 바 있다. 본 연구에서는 *E. faecalis* BMSE-HMP strains이 *S. aureus* 뿐만 아니라 *E. coli* 및 *P. aeruginosa*에서 높은 항용혈 효과를 보여 다제내성 균에 의한 용혈질환 예방에 효과적이며 유용 유산균으로의 활용 가능성을 보여주었다.

#### 다제내성 균주에 대한 항균활성 및 MIC 및 MBC 농도

치료목적으로 사용되는 항생제의 사용빈도와 농도는 증가하는 추세이며, 무분별한 항생제 오남용으로 인한 항생제 내성 균주가 증가하여 문제점이 제기되고 있다[33]. 항생제 내성에는 세 가지 계열 이상의 항생제에 내성을 보이는 약제

**Table 3. Antimicrobial effects of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP strains against multi-drug resistant organisms.**

	Strain	HMP 001	HMP 002	HMP 003	HMP 004
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11335	+ <sup>1)</sup>	+	+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 3881	+	+	+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> 285 CCARM 0204	+	+	+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> 503 CCARM 0205	+	+	+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3855	+	+	+	+
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3089	+	w <sup>3)</sup>	- <sup>2)</sup>	+
	Gram -	<i>Escherichia coli</i> KCTC 2571	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> KCTC 1039		+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 078 CCARM 0230		+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> DC 0 CCARM 0237		+	+	+	-
<i>Escherichia coli</i> DC 2 CCARM 0238		+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> TEM CCARM 0235		+	+	+	+
<i>Escherichia coli</i> 1507 CCARM 0236		+	+	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0223		+	+	+	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0224		+	w	-	+
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0225		+	w	+	+
<i>Salmonella enterica</i> CCARM 0240		+	w	+	+
<i>Klebsiella oxytoca</i> CCARM 0248		+	+	-	+
<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522E CCARM 0249		+	+	+	+
<i>Enterobacter cloacae</i> P 99 CCARM 0252		+	w	-	+
<i>Enterobacter cloacae</i> 1321E CCARM 0253		+	w	-	-

<sup>1)</sup>+, <sup>2)</sup>negative, <sup>3)</sup>w; weak positive.

**Table 4. Determination for MIC and MBC of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP001 and HMP002 against multi-drug resistant bacteria.**

	Strain	MIC <sup>1)</sup> (mg/ml)		MBC <sup>2)</sup> (mg/ml)	
		HMP 001	HMP 002	HMP 001	HMP 002
Gram +	<i>Staphylococcus aureus</i> KCCM 11335	> 5.24	>45.72	41.88	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> KCTC 3881	>10.47	>45.72	20.94	-
	<i>Enterococcus faecalis</i> CCARM 5171	>20.94	-	-	-
	<i>Enterococcus faecium</i> CCARM 5262	>20.94	>45.72	41.88	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> 285 CCARM 0204	>10.47	-	41.88	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> 503 CCARM 0205	>10.47	-	41.88	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3855	>10.47	>45.72	41.88	-
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3089	>10.47	>45.72	41.88	-
Gram -	<i>Escherichia coli</i> KCTC 2571	>5.24	>11.43	10.47	-
	<i>Escherichia coli</i> KCTC 1039	>5.24	>11.43	10.47	-
	<i>Escherichia coli</i> 078 CCARM 0230	>10.47	>45.72	-	-
	<i>Escherichia coli</i> DC 0 CCARM 0237	>5.24	>22.86	41.88	-
	<i>Escherichia coli</i> DC 2 CCARM 0238	>5.24	>22.86	41.88	-
	<i>Escherichia coli</i> TEM CCARM 0235	>5.24	>22.86	41.88	-
	<i>Escherichia coli</i> 1507 CCARM 0236	>5.24	>22.86	41.88	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0223	>10.47	>45.72	41.88	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0224	>10.47	>45.72	41.88	-
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0225	>10.47	>45.72	41.88	-
	<i>Salmonella enterica</i> CCARM 0240	>5.24	>45.72	41.88	-
	<i>Klebsiella oxytoca</i> CCARM 0248	>10.47	>45.72	41.88	-
	<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522E CCARM 0249	>10.47	>45.72	41.88	-
	<i>Enterobacter cloacae</i> P 99 CCARM 0252	>10.47	>45.72	41.88	-
	<i>Enterobacter cloacae</i> 1321E CCARM 0253	>10.47	>45.72	41.88	-

<sup>1)</sup>MIC: Minimum inhibitory concentration, <sup>2)</sup>MBC: Minimum bactericidal concentration.

다제내성(multi-drug resistance, MDR), 한 두 가지 계열을 제외한 모든 항생제에 내성인 광범위 내성(extensively drug resistance, XDR) 및 모든 계열의 항생제에 내성을 보이는 극한 광범위내성(pandrug resistance, PDR)이 있으며, 이는 전세계적인 문제로 대두되었다[34]. 따라서, 항생제 내성 균주의 문제를 해결하기 위해, 모유유래 유산균인 *E. faecalis* BMSE-HMP001 외 3주 배양액의 다제내성 균주에 대한 항균효과를 검토하였다. *E. faecalis* BMSE-HMP 4주는 실험에 사용한 지시균주 21주(*Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. 및 *Enterobacter* spp.) 모두에서 항균활성을 보였으며, 그 중 HMP001과 HMP002가 가장 우수한 항균력을 보였다(Table 3). 다제내성 균에 대해 가장 우수한 항균력을 보인 *E. faecalis* BMSE-HMP001과 BMSE-HMP002의 최소저해농도(MIC)와 최소살균농도(MBC)를 확인하였다(Table 4). 그 결과, *E. faecalis* BMSE-HMP002의 배양액 보다 BMSE-

HMP001 배양액의 항균력이 더 우수한 것으로 확인되었다. 또한 *E. faecalis* BMSE-HMP001은 다제내성 균 중 그람 양성균주에 대한 MIC (>5.24–20.94 mg/ml) 및 MBC (20.94 or 41.88 mg/ml)가 그람 음성균주에 대한 MIC (>5.24–10.47 mg/ml) 및 MBC (10.47 or 41.88 mg/ml)보다 높은 것으로 확인되어 그람 음성균주에 대한 저해효과가 더 큰 것으로 생각된다. 그람 양성균인 *E. faecalis* CCARM 5171에 대한 BMSE-HMP001의 MBC는 측정범위 내에서 확인되지 않았으나, *E. faecium* CCARM 5262에 대한 MBC는 41.88 mg/ml, MIC가 >20.94 mg/ml로 같은 *Enterococcus* 속의 다제내성 균에 대한 항균효과가 확인되었다. 또한 *S. aureus* 285 CCARM 0204와 *S. aureus* 285 CCARM 0205에서는 모두 BMSE-HMP001의 MIC가 >10.47 mg/ml, MBC가 41.88 mg/ml로 확인되었다. 다제내성 균 중 그람 음성균에 대한 BMSE-HMP001의 MBC는 *E. coli* 078 CCARM 0230을 제외하고 41.88 mg/ml로 확인되었으며, *E.*

*coli*, *Salmonella enterica*, *P. aeruginosa*, *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. 순서로 저해효과가 큰 것으로 나타났다. 유산균의 항균활성은 유산균에 의해 생성되는 유기산, bacteriocin, 항생물질 등에 의한 것으로 병원성 세균과 부패 세균을 억제하는 것으로 보고된 바 있다[35]. Park 등[36]이 원유에서 분리한 *E. faecalis* 균주는 *E. coli*와 *S. aureus*에 대한 큰 억제효과가 있다고 하였고, Hong 등[37]의 연구에서 bacteriocin 생산 균주를 확인한 결과, 분변유래 *E. faecalis*와 *E. faecium*이 가장 많은 범위를 차지하여 장내 미생물에서 항균활성이 우수한 균주가 존재할 것임을 보고하였다. 본 연구에서 모유에서 분리한 *E. faecalis* 4주의 다제내성 균주에 대한 항균력을 검토한 결과, 모든 지시균주에 대한 항균력이 있는 것으로 나타났으며, 분리균 4주 중 *E. faecalis* BMSE-HMP001과 HMP002가 가장 우수한 항균력을 보였으며, 또한 다제내성 균에 대한 우수한 항균효과를 입증한 것에 의의를 두어 이로 인한 감염 예방에 효과적인 것으로 기대된다.

## 요 약

본 연구에서는 국내 건강한 산모의 모유에서 분리한 *E. faecalis* BMSE-HMP 4주의 용혈여부와 다제내성 균에 대한 항용혈 효능 및 항균 효과를 확인하였다. 분리 균주의 효소 활성을 측정 결과, *E. faecalis* BMSE-HMP 4주는 지질에 대한 가수분해 효소인 esterase 및 esterase lipase에 대한 활성이 우수하였다. 용혈여부를 확인한 결과, 분리균 모두 용혈반응이 나타나지 않았다. 또한 용혈을 일으키는 다제내성 균주에 대한 항용혈 효능을 검토한 결과, *S. aureus* CCARM 3855에 대한 항용혈 효능은 BMSE-HMP002가 75.71 ± 10.00%로 가장 높았으며, *E. coli* DC 2 CCARM 0238과 *P. aeruginosa* CCARM 0223에 대한 항용혈 효능은 BMSE-HMP001이 각각 76.92 ± 2.99%와 87.93 ± 1.93%로 가장 높게 나타났다. 다제내성균 *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp. 및 *Enterobacter* spp.에 대한 항균활성을 검토한 결과, *E. faecalis* BMSE-HMP 4주는 그람 양성균주와 그람 음성균주에서 모두 항균력을 보였으며, 분리균 4주 중에서는 BMSE-HMP001과 BMSE-HMP002가 가장 우수한 결과를 보였다. 본 연구에서는 모유유래 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP 4주의 안전성과 다제내성 균에 의한 용혈 및 항균 효과를 검토하여 유용 유산균으로써 가능성을 확인하였으며, *Enterococcus* 균주는 항생제 내성 유전자 및 독성 유전자가 없는 경우에 한하여 사용이 가능한 것으로 고시된 바와 같이 본 연구에서 분리한 모유유래 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP 4주의 항생제 내성 및 독성에 대한 추가적인 연구를

통해 안전성에 대한 입증이 필요할 것으로 생각된다.

## Acknowledgments

This work has supported by the National Research Foundation of Korea (NRF) grant funded by the Korea government (MSIT) (No. NRF-2019R1FA105839).

## Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

## References

1. Park SH. 2018. Management of multi-drug resistant organisms in healthcare settings. *J. Korean Med. Assoc.* **1**: 26-35.
2. Kim TU, Kim DH, Kim YT. 2005. Antibiotic resistance patterns of *Staphylococcus aureus* and methicillin resistant *S. aureus* isolated from the specimen of elementary school students. *J. Exp. Biomed. Sci.* **11**: 525-531.
3. Olchowik-Grabarek E, Sekowski S, Bitiucki M, Dobrzynska I, Shlyonsky V, Ionov M, et al. 2020. Inhibition of interaction between *Staphylococcus aureus*  $\alpha$ -hemolysin and erythrocytes membrane by hydrolysable tannins: structure-related activity study. *Sci. Rep.* **10**: 11168.
4. Vandenesch F, Lina G, Henry T. 2012. *Staphylococcus aureus* hemolysins, bi-component leukocidins, and cytolytic peptides: a redundant arsenal of membrane-damaging virulence factors?. *Front. Cell Infect. Microbiol.* **2**: 12.
5. Kourtis AP, Sheriff EA, Weiner-Lastinger LM, Elmore K, Preston LE, Dudeck M, et al. 2020. Antibiotic multidrug resistance of *Escherichia coli* causing device-and procedure-related infections in the United States reported to the national healthcare safety network, 2013–2017. *Clin. Infect. Dis.* **73**: e4552-e4559.
6. Kim YA, Lee SS, Son YJ, Park YS. 2018. Epidemiology and clinical significance of microorganisms from bloodstream infections for the past 10 years. *Korean J. Natl. Health Insurance Service Ilsan Hospital.* **17**: 1-7.
7. Shim JO. 2012. Differential diagnosis of acute diarrheal disorders in children. *J. Korean Med. Assoc.* **55**: 516-524.
8. Kang CI, Kim JE, Park DW, Kim BN, Ha US, Lee SJ, et al. 2018. Guidelines for the antibiotic use in urinary tract infections. *Infect. Chemother.* **50**: 67-100.
9. Teerapo K, Roytrakul S, Sistanarain A, Kunthalert D. 2019. A scorpion venom peptide derivative BmKn-22 with potent antibiofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa*. *PLoS One* **14**: e0218479.
10. Liu PV. 1974. Extracellular toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Infect. Dis.* **130**: 94-99.
11. Kim WS, Yang AR. 2016. Antibacterial activity by *Lactobacillus bulgaricus* SP5 against pathogenic bacteria. *Korean J. Org. Agric.* **24**: 497-510.



12. Lee JH. 2020. Safety of the genus *Enterococcus* and the development of food fermentation starters in Korea: Current status and future steps. *Korean J. Food Sci. Technol.* **52**: 11-18.
13. Giraffa G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 215-222.
14. Zommiti M, Cambronel M, Maillot O, Barreau M, Sebei K, Feuilloley M, et al. 2018. Evaluation of probiotic properties and safety of *Enterococcus faecium* isolated from artisanal tunisian meat "Dried Ossban". *Front. Microbiol.* **9**: 1685.
15. Blessing EN, Chukwuemeka IS, David UC, Onuawuchi UG. 2020. Antibacterial properties of probiotics bacterial isolated from human breast milk. *WNOFNS* **29**: 290-297.
16. Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín ML, Olivares, et al. 2004. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Technol.* **15**: 121-127.
17. Rahmani M, Saffari F, Aboubakri O, Mansouri S. 2020. *Enterococci* from breast-fed infants exert higher antibacterial effects than those from adults: A comparative study. *Hum. Microbiome J.* **17**: 100072.
18. Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ, et al. 2013. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. *Food Microbiol.* **33**: 282-291.
19. Bezerra Filho CM, Nascimento da Silva LC, Vanusa da Silva M, Lobner-Olesen A, Struve C, Krofelt KA, et al. 2020. Antimicrobial and antivirulence action of *Eugenia brejoensis* essential oil *in vitro* and *in vivo* invertebrate models. *Front. Microbiol.* **11**: 424.
20. Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. 2008. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nat. Protoc.* **2**: 163-175.
21. Bagci U, Togay SO, Temiz A, Ay M. 2019. Probiotic characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from human milk and colostrum. *Folia Microbiol.* **64**: 735-750.
22. Braïek OB, Smaoui S. 2019. *Enterococci*: Between emerging pathogens and potential probiotics. *Biomed. Res. Int.* **2019**: 5938210.
23. Oh YM, Kong HR, Jeong DW, Lee JH. 2020. Technological characteristics and safety of *Enterococcus faecium* isolates from Meju, a traditional Korean fermented soybean food. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **49**: 255-263.
24. Semedo T, Santos MA, Martins P, Lopes MFS, Marques JJF, Tenreiro R, et al. 2003. Comparative study using type strains and clinical and food isolates to examine hemolytic activity and occurrence of the *cyl* operon in *Enterococci*. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 2569-2576.
25. Furumura MT, Figueiredo PMS, Carbonell GV, Darini ALdaC, Yano T. 2006. Virulence-associated characteristics of *Enterococcus faecalis* strains isolated from clinical sources. *Braz. J. Microbiol.* **37**: 230-236.
26. Jeong MR, Jeong DW, Lee JH. 2015. Safety and biotechnological properties of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from Meju. *Appl. Biol. Chem.* **58**: 813-820.
27. Baccouri O, Boukerb AM, Farhat LB, Zébré A, Zimmermann K, Domann E, et al. 2019. Probiotic potential and safety evaluation of *Enterococcus faecalis* OB14 and OB15, isolated from traditional Tunisian testouri cheese and rigouta, using physiological and genomic analysis. *Front. Microbiol.* **10**: 881.
28. Schwan WR, Langhorne MH, Ritchie HD, Stover CK. 2003. Loss of hemolysin expression in *Staphylococcus aureus* agr mutants correlates with selective survival during mixed infections in murine abscesses and wounds. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **38**: 23-28.
29. Bhakdi S, Mackman N, Menestrina G, Gray L, Hugo F, Seeger W, et al. 1988. The hemolysin of *Escherichia coli*. *Eur. J. Epidemiol.* **4**: 135-143.
30. May AK, Gleason TG, Sawyer RG, Pruett TL. 2000. Contribution of *Escherichia coli* alpha-hemolysin to bacterial virulence and to intraperitoneal alterations in peritonitis. *Infect. Immun.* **1**: 176-186.
31. Pakdeesirivong N, Rangdist S, Chumkiew S, Jamklang M. 2020. Hemolytic activity inhibition of *Staphylococcus aureus* hemolysins by secreted molecules from *Enterococcus faecalis* strains R1, R3, and R7. *SUT IVCST* **28**: 450-455.
32. Vitkova A, Votava M. 2005. Inhibition of hemolytic activity of *Staphylococcus aureus* 3-hemolysin by an exosubstance produced by some *Enterococcus faecalis* strains. *Epidemiol. Mikrobiol. Immunol.* **54**: 11-15.
33. Moon BY, Lee SK, Park JH. 2006. Antibiotic resistant characteristics of *Bifidobacterium* from Korean intestine origin and commercial yogurts. *Korean J. Food Sci. Technol.* **38**: 313-316.
34. Shin EJ. 2017. Antimicrobials and antimicrobial resistant super-bacteria. *Ewha Med. J.* **40**: 99-103.
35. Jung SE, Kim SH. 2015. Probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from commercial raw *Makgeolli*. *Korean J. Food Sci. Technol.* **47**: 44-50.
36. Park SY, Cho SA, Han NR, Lim SD. 2014. Physiological characteristics and anti-obesity effect of *Enterococcus faecalis* MD366 isolated from raw milk. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* **32**: 147-156.
37. Hong SW, Bae HJ, Chang JH, Kim SY, Choi EY, Park BY, et al. 2013. Isolation and identification of bacteriocin-producing lactic acid bacteria. *Korean J. Dairy Sci. Technol.* **31**: 153-159.