

ARTICLE

사균화 *Enterococcus* Species 첨가에 의한 요구르트 스타터
생장에 미치는 영향김성준¹ · 박동준^{2*} · 오세종^{1*}¹전남대학교 동물자원학부, ²한국식품연구원Effect of Heat-Killed *Enterococcus* Species on the
Viability of Yogurt StartersSeongjun Kim¹, Dong June Park^{2*}, and Sejong Oh^{1*}¹Division of Animal Science, Chonnam National University, Gwangju, Korea²Korea Food Research Institute, Wanju, Korea

Received: March 18, 2022

Revised: March 24, 2022

Accepted: March 24, 2022

*Corresponding author :
Dong June Park
Korea Food Research Institute, Wanju,
Korea
Tel : +82-63-219-9132
Fax : +82-63-219-9876
E-mail : djpark@kfri.re.kr

Sejong Oh
Division of Animal Science, Chonnam
National University, Gwangju, Korea
Tel : +82-62-530-2116
Fax : +82-62-520-2129
E-mail : soh@jnu.ac.kr

Copyright © 2022 Korean Society of
Dairy Science and Biotechnology.
This is an Open Access article distributed
under the terms of the Creative Commons
Attribution Non-Commercial License
(<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>)
which permits unrestricted non-commercial
use, distribution, and reproduction in any
medium, provided the original work is
properly cited.

ORCID

Seongjun Kim
<https://orcid.org/0000-0002-1790-3666>
Dong June Park
<https://orcid.org/0000-0001-9452-9391>
Sejong Oh
<https://orcid.org/0000-0002-5870-3038>

Abstract

Enterococcus species have been reported to produce unique flavoring ingredients in fermented dairy products. Generally, they were found in cheese and fermented dairy products. *Enterococcus* spp. produce extracellular polysaccharides and reduce blood cholesterol levels in humans. This study used heat-killed *E. faecalis* and *E. faecium* in yogurt production to increase safety during consumption. The addition of heat-killed *E. faecalis* and *E. faecium* to milk did not affect the fermentation time of yogurt production, the growth of starter cultures, and the viscosity of yogurt. These results concluded that heat-killed *Enterococcus*, rather than live *Enterococcus*, is sufficiently possible and even safer to be added to milk products. *Enterococcus* species could be used as a safe and functional food additive to fermented milk products and supplements in health foods.

Keywords

Enterococcus faecalis, *Enterococcus faecium*, yogurt, starter, probiotics

서론

프로바이오틱스(probiotics)에 이용되는 미생물에는 현재 23개의 속(genus)으로 세분화 된 *Lactobacillus* 속 유산균이 가장 많지만[1], 이외에도 *Bifidobacterium* 속, *Clostridium* 속, *Bacillus* 속, *Saccharomyces* 속, 그리고 *Enterococcus* 속 미생물들이 산업적으로 사용되고 있다 [2]. *Enterococcus* 속 미생물은 항체반응을 이용한 Lancefield 분류에 의해 D그룹 *Streptococcus* 로 분류되었지만, DNA-RNA 혼성화 동정법 연구가 발전되면서 *Enterococcus* 속으로 독립하게 되었다[3]. 이들 미생물은 6.5% NaCl 농도까지 내염성을 가지고 있으며, 60℃ 30분의 열처리에서도 생존이 가능하고 성장온도는 10℃-45℃로 알려져 있다[4,5]. *Enterococcus* 속 미생물은 현재까지 약 60종(species) 이상이 보고되었으며[6], *E. faecium*과 *E. faecalis*를 포함한 몇몇 종만이 프로바이오틱스로 사용된다.

*Enterococcus faecium*은 발효 유제품에서 특유의 향미성분을 생산하고 세포외 다당을 생산하고 혈중 콜레스테롤 저하 활성이 있는 것으로 보고되었으며, 자연치즈 및 다른 발효 유제품에서 흔히 검출되는 미생물이다. 우리나라의 경우 1990년대 중반부터 발효유제품에 *E. faecium*가 적용되었는데 한텐유가공의 가이오[7], 한국야쿠르트(현 (주)hy)의 메치니코프, 파스퇴르유업의 엔토로, 그리고 남양유업의 불가리스 노-스텔 등 대표적 제품들이다.

이들 제품들은 국내 최초의 기능성 발효유제품으로 제품에 함유된 *E. faecium*이 혈중 콜레스테롤을 낮추어 심혈관계 질환의 예방에 도움을 준다고 광고하였다. 그러나 *E. faecium*의 안전성 문제가 발생함에 따라 제품 출시 후 얼마 안 가서 모두 자취를 감추었다.

2021년, 식품의약품안전처에서는 프로바이오틱스 식품의 안전성평가 가이드를 제시하였는데 프로바이오틱스 식품에 함유된 *E. faecium*와 *E. faecalis*의 경우 항생제 내성 및 독성유전자 확인 시험을 통해 유전자유무를 확인하도록 의무화 하였다[8]. 그 이유는 일부 Strain은 요도감염(urinary tract infection), 세균성심내막염(bacterial endocarditis), 및 수막염(meningitis) 등을 일으킬 수 있으며, 반코마이신(vancomycin) 내성 유전자를 가지고 있는 경우도 있기 때문이다. 항생제 내성 유전자를 가지고 있으면 세균 감염시 항생제의 효과가 나타나지 않을 수 있으며, 장내에서는 항생제 내성 유전자의 전이가 발생할 수 있으므로 식품에 사용해오던 미생물이라 할지라도 미생물이 가진 항생제 내성의 특성을 파악하는 것은 매우 중요하다. 발효유제품은 식품공전상 유가공품에 해당이 되며 일부 기능성을 인정받은 발효유제품만이 건강기능식품 범주에 포함되지만, 안전성 문제는 건강기능식품뿐만 아니라 식품과 가축사료에도 중요한 이슈이기 때문에 식품의약품안전처 가이드를 따르는 것이 타당하다.

유산균은 대사과정 중에 기질의 존재시 시트르산(citric acid)을 생산하는데, 시트르산을 대사하는 능력은 유산균에 존재하는 플라스미드와 관련이 있다. 시트르산은 고도로 산화된 기질이기 때문에 분해 과정에서 강력한 환원제인 NADH를 생성시키지 못하며, 이로 인해 젖산 이외의 대사 최종 생성물이 생성된다. 디아세틸(diacetyl), 아세트알데히드(acetaldehyde), 아세트인(acetoin)과 같은 최종 산물은 매우 뚜렷한 향미 특성을 가지고 있으며 발효식품의 관능적 특성에 상당한 영향을 미친다. 그러나 디아세틸과 같은 성분들은 치즈, 발효유, 크림 및 버터의 향미 특성을 결정하지만 양조 과정과 와인 산업에서 중요한 비호감 화합물로 간주되어 왔다[9]. 발효유제품에는 살아있는 유산균을 스타터(Starter)로 하여 발효시키는데 유산균을 사멸시킨 경우에는 이러한 향미성분 생산을 기대할 수 없어 사균체 첨가시 제품에 영향을 미치지 않는 범위내에서 첨가가 바람직하다.

Enterococcus 속 유산균은 유제품뿐만 아니라 우리나라 전통 발효 식품에도 존재하는 미생물이지만, 기능성이 인정된 균주의 경우에는 발효식품이 이용이 가능할 것이다. 따라서 본 연구에서는 *Enterococcus* 속 유산균의 요구르트 배양에 적용할 수 있는 자료를 제시하고자 1차적으로 생균이 아닌 사균을 이용한 발효유 제조에 적용하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 사용배지

전보[10]에서 보고된 유아 분변에서 분리한 균주와 전라남도 지역에서 확보한 가정용 김치에서 분리하여 동정이 완료된 *E. faecalis* 12종과 *E. faecium* 2종을 실험 대상으로 하였다. 선발된 *E. faecalis*와 *E. faecium*은 MRS 배지에서 37°C, 18시간 배양한 후 2회 이상 계대하여 사용하였다.

2. 내산성 및 담즙산 내성 평가

선발 *E. faecalis*와 *E. faecium*의 내산성과 담즙산내성의 평가는 Sim 등[11]에서 사용한 방법을 사용하여 평가하였다. 내산성은 pH를 3으로 조정된 MRS 배지에 pepsin을 1,000 unit/mL이 되도록 첨가하여 내산성 평가용 인공위액을 제조한 다음 인공위액에서 2시간 배양한 다음 생균수를 측정하여 대조군 생균수 대비 2 Log 이하 감소한 경우를 +++, 2-3 Log 이하 감소한 경우를 ++, 3-4 Log 감소한 경우를 +로 각각 표시하였다.

담즙산내성은 MRS agar에 여과제균된 Oxgall 용액을 0.5% 첨가하여 대조군과 비교하여

colony 수의 90% 이상인 경우를 ++로, 50%-90% 이상인 경우를 +, 50% 이하인 경우를 -로 각각 표시하였다.

3. *Enterococcus* 균주의 용혈성 평가

배양된 *E. faecalis*와 *E. faecium*을 백금으로 한 콜로니 취해 5% Defibrinated sheep blood (Kisanbio, Korea)를 첨가한 MRS 배지에서 37°C 24시간 배양하여 집락주변으로 투명한 환의 생성 여부로 용혈성을 판정하였다.

4. 사균체의 제조

*E. faecalis*와 *E. faecium*을 MRS(BD Difco, USA) 배지에서 18시간 배양한 후 원심 분리 후 균체를 회수하여 5×10^9 CFU/mL가 되도록 멸균 saline으로 조정하였다. 그 다음 85°C에서 10분간 열처리를 하여 세포를 사멸시킨 사균체 시료의 생균수를 조사하여 집락이 없는 것을 확인한 다음 시료로 사용하였다.

5. 요구르트 제조

본 실험에 사용한 요구르트 스타터(Starter)는 실험실에서 냉동 보관중인 3종류의 유산균을 이용하였다. *Bifidobacterium longum*은 0.02%의 yeast extract를 첨가하여 멸균된 11% 환원탈지유 37°C에서 18시간 배양한 후 우유에 첨가하였으며, *Lactobacillus acidophilus*와 *Streptococcus thermophilus*는 11% 환원탈지유에 접종한 후 40°C에서 18시간 배양한 후 요구르트 스타터로 사용하였다[11].

요구르트는 시판 우유(Seoul Dairy)에 탈지분유를 첨가하여 무지유고형분을 11%로 조정한 다음 열처리(92°C-95°C, 20분) 한 후 바로 냉각시켰다. 여기에 미리 제조한 사균체 0.1%(v/v; 사균 세포 기준 약 1×10^7 CFU/mL)와 요구르트 스타터 0.05%(v/w)를 각각 첨가하여 40°C에서 배양하였다. 배양유의 pH가 4.5에 도달하면 배양을 종료하였으며 이를 냉각하여 요구르트를 제조하였다.

6. 생균수 측정

유산균 스타터의 생균수는 Oh 등[12]의 방법에 따라 다음과 같이 수행하였다. *L. acidophilus*는 dextrose를 maltose로 대체한 MRS 배지(BD, USA)를 제조하여 37°C에서 48시간 배양 후 집락(colony)을 계수하였다. *S. thermophilus*는 M17 배지(BD, USA)를 사용하여 43°C에서 24시간 배양 후 생균수를 평가하였으며, *B. longum*의 생균수는 BL 배지에 항생제 용액을 첨가하여 한 배지에서 혐기성 배양기(Anaerobic incubator FA-6R, Hirayama Manufacturing Corp. Japan)에서 2일간 배양한 후 집락을 계수하였다.

7. 점도 측정

점도는 회전점도계(Brookefield LVT, Brookfield Ametek, USA)를 이용하여 30 rpm에서 spindle No. 4를 사용하여 30초와 60초 후의 측정값을 cps로 표시하였다[12].

결 과

1. 내산성, 담즙산내성, 및 용혈성

실험에 사용된 *E. faecalis*와 *E. faecium* 균주들은 비교적 내산성이 우수하였으며, 균주에 따라서 담즙산 내성은 다소 차이를 보였다(Table 1). 특히, 6, 10, 13번 균주의 경우 내산성과 담즙산내



성이 아주 우수한 것으로 확인되어 향후 프로바이오틱스로써의 이용성이 높은 균주로 판단되었다.

용혈성 평가는 적혈구가 파괴되어 헤모글로빈이 외부로 유출되는 것을 평가하는 것으로 미생물에 의한 용혈성은 α -hemolysis(불완전 용혈), β -hemolysis(완전 용혈), γ -hemolysis(용혈 없음)로 분류하며, 용혈을 일으키지 않은 γ -용혈성을 지녀야 식품에 사용할 수 있다. 실험에 사용한 14개 균주 중에서 *E. faecalis* 10개 균주와 *E. faecium* 1개 균주에서 β -용혈성을 나타내었는데, 비록 유아 분변과 김치에서 분리하였더라도 식품에 사용이 어려울 것으로 판단되었다. 본 연구에서 *E. faecalis* 와 *E. faecium*를 불활성화 시킨 사균으로 사용을 하지만 γ -용혈성을 보인 10번과 13번 균주를 요구르트에 적용하는 것으로 최종 선발하였다(Table 1).

2. 요구르트 배양

요구르트 배양 중 pH 변화는 Fig. 1에 나타난 바와 같다. 우유의 pH는 6.6에서 배양 2시간에 pH 5.9 정도에 이르렀으며 배양 4시간에 pH 4.7 부근까지 저하된 것으로 나타났으며 사균체 *E. faecalis*와 사균체 *E. faecium*의 첨가여부에 관계없이 대조구와 유사한 pH 감소를 보였다. 요구르트 종료 pH에(pH 4.5) 도달하는 시간은 무첨가 한 대조구는 5시간 10분, *E. faecalis* 첨가구는 5시간 8분, *E. faecium* 첨가구는 5시간 15분으로 각각 나타났다(data were not shown). 발효유의 배양시간은 온도와 스타터의 접종수준에 따라 차이가 있는데 동일 스타터 첨가시 배양온도 37°C보다 42°C-45°C면 배양시간이 다소 짧아진다. 이는 발효유의 주된 발효균이 *S. thermophilus*이기 때문인데, *Lactobacillus*의 생육 또한 향미성분 생산에 중요하기 때문에 이를 고려하여 최적의 배양온도를 설정한다. 현재 요구르트 제조시 산업적으로 이용되는 배양온도는 40°C-42°C이며, 장기간 배양하는 야쿠르트 제품은 34°C-37°C를 사용한다.

3. 생균수 및 점도

요구르트 배양에 사용된 스타터의 초기 접종농도는 *S. thermophilus*의 경우 약 10^7 CFU/mL(7 Log) 수준이었으며 배양종료시에 대조구, 사균체 *E. faecalis* 첨가구, 사균체 *E. faecium* 첨가구의 생균수는 각각 9.11, 9.37, 및 9.09 Log CFU/mL로 나타나 모든 실험구에서 10^9 CFU/mL 이상으로 농후발효유 생균수 기준인 10^8 CFU/mL 보다 높게 측정되었다(Fig. 2).

*L. acidophilus*는 본 실험에서 접종수준이 10^6 CFU/mL(6 Log) 수준으로 낮아 배양 종료시 생균수는 전부 10^7 CFU/mL 초반으로 나타나 성장이 많이 이루어지지 않았으며 처리군간 유의적 차이는 없었다(Fig. 3). *B. longum*은 접종수준이 경우 약 10^7 CFU/mL(7 Log) 정도이었고, 배양 종료시

Table 1. Result of probiotic characteristics

Strain	Bile tolerance	Acid tolerance	Identification	Hemolysis	Ref.
1	++	++	<i>Enterococcus faecalis</i>	β -Hemolysis	[12]
2	+	++	<i>Enterococcus faecalis</i>	β -Hemolysis	[12]
3	++	++	<i>Enterococcus faecalis</i>	α -Hemolysis	[12]
4	-	++	<i>Enterococcus faecalis</i>	α -Hemolysis	[12]
5	+	++	<i>Enterococcus faecalis</i>	α -Hemolysis	[12]
6	++	+++	<i>Enterococcus faecalis</i>	α -Hemolysis	[12]
7	+	+++	<i>Enterococcus faecalis</i>	α -Hemolysis	[12]
8	++	++	<i>Enterococcus faecalis</i>	α -Hemolysis	[12]
9	-	+++	<i>Enterococcus faecalis</i>	α -Hemolysis	[12]
10	+++	+++	<i>Enterococcus faecalis</i>	α -Hemolysis	[12]
11	++	++	<i>Enterococcus faecium</i>	γ -Hemolysis	Lab isolate
12	++	++	<i>Enterococcus faecalis</i>	γ -Hemolysis	Lab isolate
13	++	+++	<i>Enterococcus faecalis</i>	γ -Hemolysis	Lab isolate
14	+	++	<i>Enterococcus faecium</i>	β -Hemolysis	Lab isolate

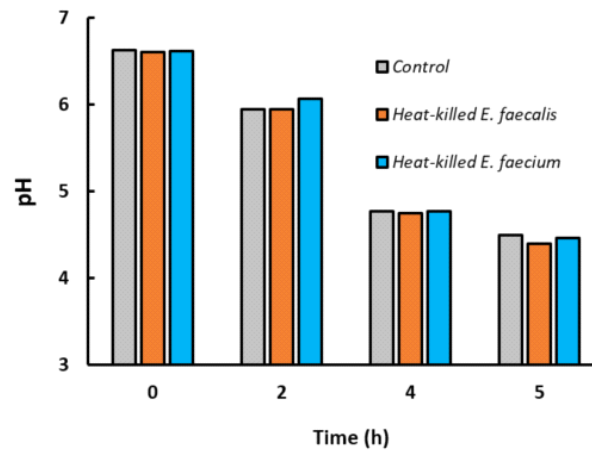


Fig. 1. pH decline curve during yogurt fermentation.

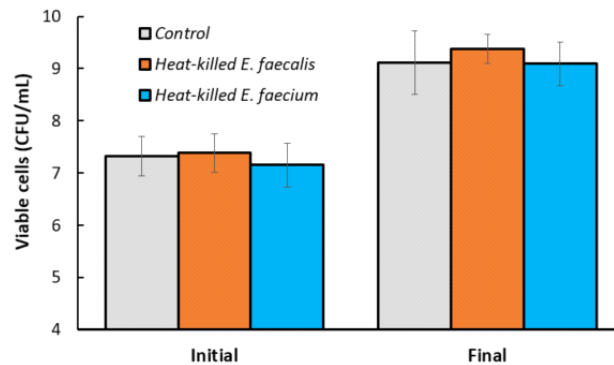


Fig. 2. Viable cells of *Streptococcus thermophilus* during yogurt fermentation.

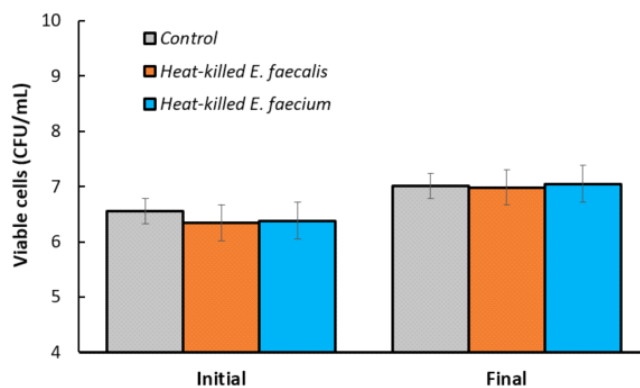


Fig. 3. Viable cells of *Lactobacillus acidophilus* during yogurt fermentation.

점에서는 대조구, *E. faecalis* 사균첨가구, *E. faecium* 사균첨가구의 생균수가 8.12, 8.47 및 8.32 Log CFU/mL로 나타났다. 따라서 5시간 정도의 단기 배양에서는 2 Log 이상 성장한 *S. thermophilus*이 가장 빠른 성장을 보였으며, *L. acidophilus*와 *B. longum*는 1 Log 정도 증가하는 것으로

확인되었다. 본 연구에서는 3종의 혼합스타터로 제조한 발효유에 사균체의 첨가 효과를 평가한 것으로 실험결과에서 나타났듯이 사균체를 첨가한 경우에는 *S. thermophilus*, *L. acidophilus*, 및 *B. longum*의 요구르트 스타터 성장에는 영향을 주지 않아 발효유의 첨가에 가능한 것으로 판단되었다 (Fig. 4). *L. casei*나 *L. bulgaricus*를 스타터로 사용하여 제조하는 발효유의 경우에서도 사균체의 첨가에 영향이 없을 것으로 추정되지만 이를 이용한 추가적인 성장효과를 평가할 필요가 있다.

요구르트의 점성은 발효유의 품질 특성이 매우 중요한 요소로 본 실험에서도 점성을 평가하였는데 Fig. 5에서 보는 바와 같이 실험구별 점도는 차이가 나타나지 않았다.

고찰

Enterococcus 속은 사람, 동물의 장내에 존재하며 유제품과 프로바이오틱스에 사용되는 종류로는 *E. faecalis*와 *E. faecium*뿐이다. 이들 균주 들은 과거에 *Streptococcus* 속으로 분류되었다가 1984년 현재의 *Enterococcus* 속으로 재분류되었다. *Enterococcus* 속 유산균은 6.5% NaCl 농도에서 생육이 가능하며, pH 9.6, 0.04% tellurite에서 생육이 가능한 것이 특징이며, 몇몇 종은 유방염과 같은 질병을 일으키는 것으로 알려져 있다. 일부 *Enterococcus faecium*은 강력한 항생제로

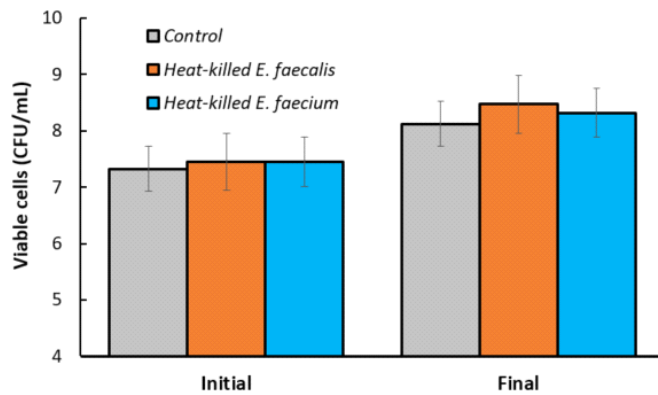


Fig. 4. Viable cells of *Bifidobacterium longum* during yogurt fermentation.

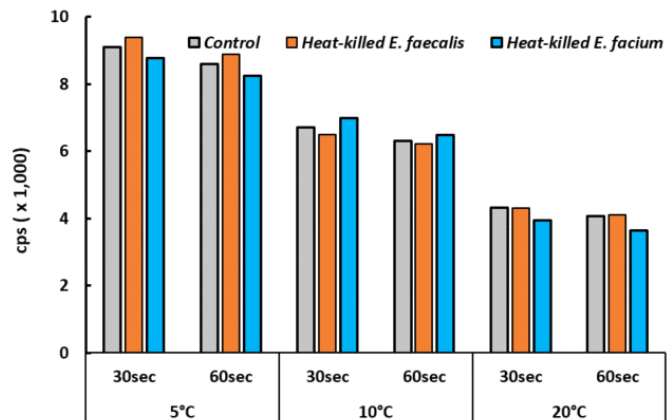


Fig. 5. Apparent viscosity of yogurt containing heat-killed *Etreptococcus faecalis* and *Enterococcus faecium*.

알려진 반코마이신에 내성을 가지고 있는데 이를 반코마이신 내성 장구(알)균(Vancomycin resistant *Enterococcus faecium*)이라 부르며 사용에 주의를 기울여야 한다.

본 연구에서 사균체를 이용하였는데 많은 생균에 대한 많은 연구에서 위해성에 대한 논란이 있기 때문이다. 마우스를 이용한 연구에서 *E. faecium* YF5를 1.0×10^{12} CFU/mL 수준으로 1일 2회, 8일간 경구 투여했을 때 마우스가 사망하였다는 보고가 있으며, *E. faecium* TM39를 1.0×10^{12} , 5.0×10^{11} , 2.0×10^{10} CFU/kg bw의 용량으로 5주령 랫드에 28일간 투여 후 대조군과 비교시 사료 섭취, 음수량, 성장률, 및 장기무게에 대한 차이가 없었고 최고 섭취 용량에서도 어떠한 독성이 나타나지 않는 것으로 평가되었다는 보고도 있다[13,14].

*E. faecalis*와 *E. faecium*은 다양한 환경조건에서 생육이 가능한 것으로 알려져 있는데 생육 저해 요인들에 대한 방어기전을 가지고 있기 때문이며 특히 교차보호작용(cross-protection) 때문으로 보고하였다. Fernandez 등[15]의 연구결과에 따르면, 유기산으로 적응시킨 경우 *E. faecium* ATCC 49624의 성장은 유기산 종류에 따라 다소 생육이 다르게 나타났지만 내열성을 증가시켰다. 아스코르브산(ascorbic acid)으로 적응을 시켰을 때 사멸시간이 약 1.3배 높게 나타났으며, 젖산(lactic acid), 사과산(malic acid), 및 염산(hydrochloric acid)으로 각각 적응시킨 경우에는 약 2-3배, 아세트산(acetic acid)과 구연산(citric acid)으로 적응시켰을 때는 약 5배 정도 내열성이 높았다. 이러한 결과는 산에 의한 적응여부가 식품 제조공정에서 *E. faecium*의 사멸이 효과적으로 이루어지지 않을 수 있음을 시사하는 것이다.

Kang 등[16]은 *E. faecalis* EF-2001 사균체를 발효유 첨가하였을 때 나타나는 항염증 효과를 조사하였는데 Nitric oxide(NO)의 생성 억제에 경우 발효유에서 NO 생성을 저해하는 경향을 나타냈다. 또한, 사균을 첨가하지 않은 대조군보다 사균을 첨가한 발효유에서 NO 생성을 더욱 저해하는 결과를 나타내었다. Prostaglandin E2의 억제율 측정결과도 $15 \mu\text{g/mL}$ 의 농도에서 PGE2 분비량을 감소시킴을 확인하였으며, 일반 발효유보다 사균이 첨가된 발효유에서 더욱 억제됨을 확인하였다. 이와 같은 결과는 발효유와 같은 식품에 기능성이 입증된 사균을 첨가시 유의한 작용을 할 수 있음을 시사하는 것이다.

발효유의 품질 특성에 스타터로 첨가된 유산균은 향미성분의 생산으로 긍정적인 영향을 주는데 *Enterococcus* 속 유산균을 사균화시켜 첨가한 경우 이러한 효과를 볼 수 없다. 그러나 Table 1에서 보는 바와 같이 β -용혈성을 지닌 균주도 김치 및 분변에서 분리한 다수의 균주가 있을 수 있다는 점과 교차 보호작용에 의하여 또 다른 stress에 저항성을 보일 수도 있다는 점 등으로 생균으로의 첨가는 좀 더 신중을 기해야 할 것으로 생각된다.

결론적으로, 사균화된 *E. faecalis*와 *E. faecium*의 첨가는 요구르트 배양의 배양시간에 영향을 주지 못하였으며, 스타터 유산균의 생육에서도 영향을 주지 못하였다. 이러한 결과로 볼 때 기능성이 입증된 *Enterococcus*는 사균으로 이용이 충분히 가능한 것으로 나타났다. 본 연구에서와 같이 *Enterococcus*는 생균으로 이용하는 것보다 사균으로 식품에 첨가하여 사용하는 것이 보다 안전성을 확보하는 것이며, 발효유 스타터 성장에도 영향을 미치지 않았기 때문에 발효유와 같은 기능성 식품 첨가물로의 활용이 가능한 것으로 생각되었다.

Conflict of Interest

The authors declare no potential conflict of interest.

감사의 글

본 연구는 한국식품연구원(Korea Food Research Institute) 연구사업(과제번호: E 0145101-04)

에 의해 이루어진 것임.

References

1. Zheng J, Wittouck S, Salvetti E, Franz CMAP, Harris HMB, Mattarelli P, et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *Int J Syst Evol Microbiol*. 2020;70:2782-2858.
2. Oh SJ. Probiotics and prolongation of life. *J Dairy Sci Biotechnol*. 2008;26:31-37.
3. Schleifer KH, Kilpper-Bälz R. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *Int J Syst Evol Microbiol*. 1984;34:31-34.
4. 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*. 1996;138:49-54.
5. Moellering RC Jr. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis*. 1992;14:1173-1176.
6. LPSN. Genus *Enterococcus* [Internet]. 2022 [cited 2022 Feb 28]. Available from: <https://lpsn.dsmz.de/genus/enterococcus>
7. Bertolami MC, Farnworth ER. The properties of *Enterococcus faecium* and the fermented milk product Gaio[®]. In: Farnworth ER, editor. *Handbook of fermented functional foods. Functional foods and nutraceuticals*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2003. p. 59-76.
8. Ministry of Food and Drug Safety. Health functional food functional ingredients probiotics safety evaluation guide [Internet]. 2022 [cited 2022 Feb 28]. Available from: https://www.mfds.go.kr/brd/m_1060/view.do?seq=14866
9. Sarantinopoulos P, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E. Citrate metabolism by *Enterococcus faecalis* FAIR-E 229. *Appl Environ Microbiol*. 2001;67:5482-5487.
10. Kim S, Oh S. Comparison of acid and bile tolerances for *Enterococcus faecalis* isolated from infant feces. *Curr Top Lact Acid Bact Probiotics*. 2016;4:14-18.
11. Sim JH, Oh SJ, Kim SK, Baek YJ. Comparative tests on the acid tolerance of some lactic-acid-bacteria species isolated from lactic fermented products. *Korean J Food Sci Technol*. 1995;27:101-104.
12. Oh SJ, Lim KS, Huh CS, Baek YJ. A study on the effects of β -galactosidase treatment on the growth of yogurt starters in milk. *Korean J Dairy Sci*. 1991;13:282-290.
13. Tan Q, Xu H, Aguilar ZP, Peng S, Dong S, Wang B, et al. Safety assessment and probiotic evaluation of *Enterococcus faecium* YF5 isolated from sourdough. *J Food Sci*. 2013;78:M587-M593.
14. Tsai CC, Liu TH, Chen MH, Tsai CC, Tsen HY. Toxicity evaluation for an *Enterococcus faecium* strain TM39 in vitro and in vivo. *Food Chem Toxicol*. 2004;42:1601-1609.
15. Fernández A, Alvarez-Ordóñez A, López M, Bernardo A. Effects of organic acids on thermal inactivation of acid and cold stressed *Enterococcus faecium*. *Food Microbiol*.

- 2009;26:497-503.
16. Kang HJ, Kim TW, Jhoo JW, Kim GY. Anti-inflammatory effects of fermented milk supplemented with heat-killed *Enterococcus faecalis* EF-2001 probiotics. *J Dairy Sci Biotechnol.* 2020;38:112-120.