메주 유래 *Enterococcus faecium* 균주의 기능적 특성 및 안전성

오영민¹, 공하람¹, 정도원², 이종훈^{1*}

¹경기대학교 식품생물공학과

²동덕여자대학교 식품영양학과

Received: December 15, 2020 / Revised: January 4, 2021 / Accepted: January 5, 2021

Technological Characteristics and Safety of *Enterococcus faecium* Isolates from Meju, a Traditional Korean Fermented Soybean Food

Yeongmin Oh¹, Haram Kong¹, Do-Won Jeong², and Jong-Hoon Lee^{1*}

¹Department of Food Science and Biotechnology, Kyonggi University, Suwon 16227, Republic of Korea

²Department of Food and Nutrition, Dongduk Women's University, Seoul 02748, Republic of Korea

In this study, we assessed the technological characteristics and safety of 88 *Enterococcus faecium* strains isolated from meju; the strains possess the glutamate decarboxylase gene *gadAB* involved in γ -aminobutyric acid production. The study was conducted to evaluate the possibility of introducing *E. faecium* meju isolates as food fermentation starters. We observed that a NaCl concentration of 6% (w/v) facilitated the growth and acid production of all strains. At a NaCl concentration of 7%, 21 strains (24%) exhibited a low growth rate, 72 strains (82%) a weak acid production, and 16 strains (18%) showed no acid production. All strains exhibited protease activity at a NaCl concentration of 4%. At a NaCl concentration of 5%, 86 strains exhibited weak activity, and one strain showed no protease activity. We could not detect any lipase activity in the investigated strains. None of the strains exhibited an acquired antibiotic resistance to the seven antibiotics tested in the present study, namely ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, penicillin G, tetracycline, and vancomycin. We could identify the *Enterococcus* endocarditis antigen gene *efaA* and the tyrosine decarboxylase gene *tdc* contributing to tyramine production, in 88 meju isolates. We could not detect the *Enterococcus* surface protein gene *esp*, which is specifically possessed by human-originated *E. faecium* strains, in any of the 88 strains tested in the study.

Keywords: Meju, *Enterococcus faecium*, technological characteristic, antibiotic resistance, virulence factor

서 론

유산균 범주에 속하는 *Enterococcus* 속(genus) 박테리아는 2020년 7월 현재 National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) database에 63종(species)이 등록되어 있으며, *Enterococcus faecalis*와 *Enterococcus faecium*이 가장 많이 알려져 있는 종이다. *Enterococcus* 속은 사람과 동물의 장관 공생균으로 알려져 있으며[1], 대장균과 더불어 분변오염의 지표균으로 이용된다[2]. 그 외, 토양, 식물, 물 등 다양한 환경 및 발효 소시지,

치즈, 절임 과채류와 같은 식품에서의 검출이 보고되었다[3].

Enterococcus 속은 건강한 사람에게는 질병 관련 문제를 야기하지 않지만, 면역력이 저하된 사람에게는 요로감염증, 균혈증, 심내막염과 같은 질병을 유발할 수 있다고 보고되었다[4–6]. 항생제가 사용되는 병원과 축산, 양식 등의 환경에서 항생제 내성 *Enterococcus* 속 검출이 증가하고 있어, 여러 항생제에 대한 *Enterococcus* 속 내성균 발생은 대표적 위해요인으로 알려져 있다. 특히, vancomycin 내성 *Enterococcus* 속 균주의 발생은 치료의학분야의 문제점의 하나로 등장하였다. 항생제 내성 외에도 숙주의 특이적 및 비특이적 방어 메커니즘을 저해하는 인자 및 숙주로의 침입과 증식에 관여하는 인자들이 *Enterococcus* 속의 독성인자로 고려되고 있다. 독성인자를 보유한 균주는 직접적인 독소 생산을 통하여 병리학적 특성을 발현하기도 하지만, 간접적으로 염증을 생

*Corresponding author

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

E-mail: jhl@kgu.ac.kr

성하여 병리학적 특성을 나타내는 것으로 보고되었다[7].

지금까지 다양한 *Enterococcus* 속의 감염 및 병리학적 특성 관련 인자들이 보고되었고, 대표적 독성인자로는 용혈소 또는 세포용해소(cytolysin)로 알려진 β -hemolysin을 들 수 있다. 그 밖에도 숙주로의 부착 및 감염에 관여한다고 알려진 세포응집인자(aggregation substance, Agg), 세포의 콜라겐성 물질을 분해하는 단백질분해효소(gelatinase, GelE), 부착분자의 일종인 *Enterococcus* surface protein (Esp)과 *E. faecalis* 유래의 콜라겐 결합 adhesin (Ace) 등이 있다. 부착분자와 유사한 *Enterococcus* 심내막염 항원(EfaA) 및 *E. faecalis*의 선모 관련 단백질(endocarditis and biofilm-associated pili, Ebp) 또한 독성인자로 추정되고 있다. 또한, 다양한 발효식품에서 분리된 *Enterococcus* 속 박테리아가 biogenic amine의 한 종류 tyramine의 생산자로 보고된 바 있어, 인체에 유해한 병리학적 원인 제공 가능성이 보고되었다[8-10].

한편, 발효육제품, 치즈, 유제품에서 우점으로 검출되는 *Enterococcus* 속은 지질 및 단백질 분해 활성, citrate 대사, 다당류 생성 능력을 보유하고 있어 발효식품에서 특유의 풍미와 물성을 나타낼 뿐만 아니라 bacteriocin을 생성하는 특성을 가지고 있다고 보고되었다[3, 11]. 또한 *Enterococcus* 속의 일부 균주들은 신경전달 물질인 γ -aminobutyric acid (GABA)를 생성한다고 보고되었으며[12], probiotics 제품으로 상품화되어 지속적으로 판매되고 있는 균주들도 있다[13]. 이러한 특성은 발효식품 유래 *Enterococcus* 속 균주들의 경우, 식품 재료로 활용되어도 사람의 건강에 문제를 일으킬 가능성이 높지 않음을 시사한다.

최근, 재래식 메주에서 *Enterococcus* 속의 우점이 보고되었고, 특히 *E. faecium*의 높은 빈도 검출이 보고되었다[14]. 이러한 결과는 *E. faecium*이 메주 숙성 및 풍미 형성에 기여하고 있으며 메주 및 대두 발효식품의 종균으로 활용될 수 있는 가능성을 시사한다. 본 실험에서는 우리나라 각지의 메주에서 분리한 *E. faecium* 균주의 기능적 특성 및 안전성 검토를 통하여 *E. faecium*의 발효식품용 종균으로써의 활용 가능성을 조명해 보았다.

재료 및 방법

균주 및 배양

본 실험에서는 메주로부터 분리하여 16S ribosomal RNA (16S rRNA) 유전자 염기서열 분석을 통하여 동정한 *E. durans* 17균주, *E. faecalis* 28균주, *E. faecium* 67균주와 Jang 등[14]이 분리하여 16S rRNA 유전자 및 guanylate kinase 유전자(*gmk*) 염기서열 분석을 통하여 *E. faecium*으로 동정한 163균주를 사용하였다. 사용된 *Enterococcus* 속

균주는 Difco tryptic soy agar (TSA; BD Diagnostic Systems, USA)와 Difco tryptic soy broth (TSB; BD Diagnostic Systems)를 사용하여 37°C에서 24시간 배양하였다. Erythromycin 내성 양성 대조균으로 사용한 *E. faecium* 2014-VREF-16과 *E. faecium* 2014-VREF-39 균주는 아시아태평양감염재단(Asia Pacific Foundation for Infectious Diseases, APFID)으로부터 분양받았다[15].

gmk 염기서열 분석

Enterococcus 속 균주 동정 검증은 *gmk* 염기서열 분석을 통하여 수행하였다. *gmk* 증폭은 50 μ l 반응계에서 template DNA 또는 소량의 colony, 10 mM dNTP, 1 U *Taq* polymerase (Inclone, Korea), 10 pmol의 primer를 첨가하여 T3000 thermocycler (Biometra, Germany)를 사용하여 수행하였다. *gmk* 증폭에 사용된 primer는 Jang 등[14]이 사용한 *gmkF* (5'-ATG KCA GAG CGT GGA TTA-3')와 *gmkR* (5'-GCC ATC ATT TCG ATT TCT KC-3')을 사용하였고, template DNA는 Genomic Plus DNA Prep Kit (Inclone)을 이용하여 추출하였다. 반응조건은 95°C에서 5분간 예비가열 후, 95°C에서 30초간 변성, 55°C에서 45초 annealing, 72°C에서 45초의 중합반응의 과정을 30회 반복하고, 그 후 72°C에서 5분간 처리한 후 4°C에서 반응을 중단시켰다. 증폭된 PCR 산물은 1.5% (w/v) agarose gel을 이용한 전기영동으로 확인하였으며, Gel & PCR Purification Kit (Inclone)를 이용하여 정제한 후, 수탁업체(Bionics, Korea)에 의뢰하여 염기서열을 결정하였다. 결정된 염기서열은 NCBI database의 BLAST program을 이용하여 GenBank에 등록된 염기서열정보를 대상으로 상동성 분석을 수행하였다.

GABA 생성 관련 glutamate decarboxylase 유전자 *gadA/B* 보유 확인

GABA 생성 관련 유전자 *gadA/B* 보유 확인을 위한 PCR primer는 GenBank에 등록된 *E. faecium* 균주의 *gadA/B* 염기서열을 고려하여 *gadF* (5'-CCT AAC CTG GTG ATC TCT TCT GG-3')와 *gadR* (5'-GCC ATA GTT GGC ATT TCT CCA CC-3')을 제작하였다. PCR 반응은 *gmk* 증폭과 동일한 방법으로 수행하였다.

GABA 정량 분석

GABA 생성 정량을 위한 균주 배양에는 sucrose 0.5% (w/v), Bacto yeast extract (BD Diagnostic Systems) 2%, monosodium glutamate (Tokyo Chemical Industry Co., Japan) 0.5% (w/v)가 첨가된 Difco MRS broth (BD Diagnostic Systems)를 pH 7.5로 조정하여 사용하였다[16].

MRS broth에서 배양한 균주는 600 nm 파장 흡광도 0.5 조건으로 동일화 한 다음, GABA 정량 배지에 1% 접종하고 30℃에서 48시간 배양하였다. 배양액은 원심분리하여 상층액을 100 µl 취한 다음, 1 M sodium carbonate-sodium bicarbonate buffer (pH 10.0) 200 µl, 80 g/l 농도로 acetone에 용해시킨 dansyl chloride (Sigma-Aldrich, USA) 100 µl, 증류수 600 µl를 혼합하여 80℃에서 40분간 유도체화 시키고, 10% (v/v) acetic acid 100 µl을 첨가하여 반응을 종결시켰다. 반응액은 원심분리 후, 0.22 µm membrane filter (Merck Millipore, USA)로 여과하여 15 µl를 HPLC system (LC-2000Plus, JASCO, Japan)에 주입하여 254 nm, 30℃에서 분석하였다[17]. 시료 분리를 위한 고정상은 AccQ-Tag C18 column (3.9 mm × 150 mm × 4 µm; Waters, MA, USA)을 사용하였고, 이동상은 2개의 용매를 사용하였다. 용매 A는 tetrahydrofuran, methanol, 50 mM sodium acetate-acetic acid buffer (pH 6.2)를 1:15:84로 혼합하여 제조하였고, 용매 B는 methanol을 사용하였다. 용매 A와 B는 80:20, 45:55, 0:100의 비율로 각각 5분, 16분, 4분간 1 ml/min 유속으로 시료를 전개하였다[17]. GABA를 농도별로 제조한 표준곡선을 기준으로 GABA 생성을 정량하였고, 실험은 3반복 진행하였다.

기능적 특성 평가

내염성은 NaCl을 최종농도 6, 7, 8% (w/v)가 되도록 첨가한 TSA를 사용하여 확인하였다. 산 생성 활성은 glucose 1% (w/v)와 CaCO₃ 0.7% (w/v)를 첨가한 TSA에 NaCl을 5, 6, 7% (w/v) 농도로 첨가하여 확인하였다. 단백질을 분해효소 활성은 Difco skim milk (BD Diagnostic Systems)가 2% (w/v) 첨가된 TSA에 NaCl을 최종농도 3, 4, 5% (w/v)가 되도록 첨가하여 확인하였다. 지방분해효소 활성은 tributyrin (Sigma-Aldrich)을 1% (v/v) 첨가한 tributyrin agar (Sigma-Aldrich)에 NaCl을 최종농도 0, 2, 4% (w/v)로 첨가하여 확인하였다. 기능적 특성 평가를 위한 균주는 TSB에 배양하여 600 nm 파장에서 흡광도 0.5가 되도록 동일화 한 다음, 기능적 특성 평가를 위한 고체배지에 1 µl 접종하였다. 30℃에서 72시간 배양하여 각 배지에서의 생육 및 투명환의 생성으로 기능적 특성을 확인하였다.

항생제 최저생육저해농도(Minimal Inhibitory Concentrations) 결정

항생제 최저생육저해농도는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, <https://clsi.org>) 기준에 따라 액체배지 미량희석법(broth microdilution method)으로 결정하였다. 유산균 항생제 내성 평가에 빈번하게 사용되는 8종의 항생제(ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin,

erythromycin, gentamicin, penicillin G, tetracycline, vancomycin)를 대상으로 96 well microplate 상에서 Difco Mueller-Hinton broth (MHB; BD Diagnostic Systems)를 사용하여 최종 농도 0.5–32 mg/l가 되도록 2배수 연속 희석하였다. 균주는 TSB에서 두 번 배양하여 McFarland 표준탁도(bioMerieux, France) 0.5가 되도록 균수를 조정 한 뒤, MHB로 100배 희석하여 최종 균수가 5×10^5 CFU/ml이 되도록 접종하고, microplate를 35℃에서 20시간 배양하였다. 각 항생제에 대한 최저생육저해농도는 균체 생장을 저해하는 최저농도에서 결정하였다. 각 항생제의 생육저해농도 값이 European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST, <http://mic.eucast.org>)이 제시하는 breakpoint 값보다 높은 경우, 내성이 있는 것으로 평가하였으며, 실험은 3반복 진행하였다.

용혈활성 평가

α-용혈활성과 β-용혈활성은 rabbit blood (MB cell, Korea)와 sheep blood (MB cell)를 각각 5% (v/v) 첨가한 TSA를 사용하여 측정하였다. α-용혈활성은 30℃에서 24시간 배양하였고, β-용혈활성은 30℃에서 24시간 배양한 뒤 4℃에서 24시간 배양하는 cold shock 후, 결과를 확인하였다[18]. 24시간 배양 후, colony 주변에 투명환이 형성되는 경우, 용혈활성을 보유한 것으로 판단하였으며, 양성 대조군으로 *Staphylococcus aureus* USA300-p23을 사용하였다[19]. 용혈활성 실험은 3반복 수행하였다.

PCR을 통한 독성인자 유전자 보유 확인

Enterococcus 속의 잠재적 독성인자의 유전자로 알려진 *ace*, *agg*, *efaA*, *esp*, *gelE* 증폭을 위한 primer는 기존에 보고된 primer 서열을 사용하였고(Table 1), erythromycin 내성 유전자(*ermA*, *ermB*)와 tyramine 생성 관련 tyrosine decarboxylase 유전자(*tdc*)는 GenBank에 등록된 *E. faecium*의 *ermA*, *ermB*, *tdc* 염기서열을 고려하여 제작하였다(Table 1). PCR 반응은 *gmk* 증폭과 동일한 방법으로 진행하였으며, 증폭된 PCR 산물은 염기서열 분석을 통하여 확인하였다.

결 과

gmk 염기서열 분석을 통한 *Enterococcus* 속 균주의 재동정

*E. durans*와 *E. faecium*의 16S rRNA 유전자 염기서열은 99.6% 상동성을 보유하고 있어, 16S rRNA 염기서열 분석만으로 결정된 본 실험실 보유 *Enterococcus* 속 균주의 동정에 의문이 제기된다. 따라서, 16S rRNA 유전자 염기서열 분석을 통하여 동정된 *E. durans* 17균주, *E. faecalis* 28균주,

Table 1. PCR primers used for the detection of genes of potential virulence factors.

Target gene	Gene product	Sequence (5'-3')	Annealing temp. (°C)	Amplicon size (bp)	Reference
<i>ace</i>	Collagen binding protein	AAAGTAGAATTAGATCCACAC TCTATCACATTCGGTTGCG	56	320	[29]
<i>agg</i>	Aggregation substance	AAGAAAAAGAAGTAGACCAA AAACGGCAAGACAAGTAAATA	58	1553	[29]
<i>efaA</i>	Adhesin like <i>Enterococcus</i> endocarditis antigen A	AACAGATCCGCATGAATA CATTTTCATCATCTGATAGTA	52	735	[29]
<i>esp</i>	<i>Enterococcus</i> surface protein	TTACCAAGATGGTTCTGTAGGCAC CCAAGTATACTTAGCATCTTTTGG	56	1141	[29]
<i>gelE</i>	Gelatinase	AGTTCATGTCTATTTTCTTCAC CTTCATTATTTACACGTTTG	56	402	[29]
<i>tdc</i>	Tyrosine decarboxylase	GAAGGWTCAAAAGCHGGDGC GCHCGTTCCATRCMTCATC	57	546	This study
<i>ermA</i>	23S rRNA (adenine 2085-N6)-dimethyltransferase	CCAGAAAAACCTAAAGACACGC GCATGCTTCAAAGCCTGTCCG	59	607	This study
<i>ermB</i>	23S rRNA (adenine 2085-N6)-dimethyltransferase	CGAGTGAAAAAGTACTCAACC GGCGTGTTTCATTGCTTGATG	53	575	This study

E. faecium 67균주의 *gmk* 염기서열 분석 결과, *E. durans*로 동정되었던 16균주가 *E. faecium*으로 확인되었다. *E. faecalis* 경우, *gmk* 염기서열 분석을 통해 기존 동정의 유효성이 확인되었다. *E. faecium*으로 동정되었던 12균주의 동정 오류가 확인되어, 총 112균주 중 71균주가 *E. faecium*으로 확인되었다.

***gadA/B* 보유 균주의 존재**

본 연구에서 *gmk* 염기서열 분석을 통하여 재동정한 *E. faecium* 71균주와 Jang 등[14]이 선발한 *E. faecium* 163균주를 대상으로 *gadA/B* 보유를 PCR로 확인한 결과, 총 234균주 중 88균주로부터 예상 크기(436 bp)의 DNA 단편이 증폭되었다. 이들의 염기서열은 완전한 유전체 정보가 보고된 *E. faecium* NCTC7174 균주(accession: GCA_900637035.1)의 *gadA/B*와 99.7% 이상의 상동성을 나타냈다. *gadA/B* 보유

88균주 중, 10균주를 임의로 선발하여 GABA 생성을 확인한 결과, 가장 높은 GABA 생성을 나타낸 균주는 0.55 ± 0.04 g/l, 가장 낮은 생성을 나타낸 균주는 0.33 ± 0.01 g/l를 생성하여 10균주 모두가 GABA를 생성하는 것으로 확인되었다. 따라서, *gadA/B* 보유 균주는 GABA를 생성할 것으로 추정된다.

***gadA/B* 보유 균주들의 기능적 특성**

본 연구에서는 단백질과 지방의 함량이 높고 미생물이 이용가능한 당을 보유하고 있는 대두의 특성과 NaCl 농도 10% 이상에서 제조되는 우리나라 대두 발효식품의 염도를 고려하여 *gadA/B*를 보유하고 있는 *E. faecium* 88균주를 대상으로 내염성, 산 생성, 단백질 및 지방 분해 활성을 NaCl과 각 효소의 기질이 첨가된 TSA 상에서의 생육 및 기질의 분해를 통하여 확인하였다(Table 2). 6% NaCl 농도에서는 모든

Table 2. Effects of NaCl on the technological characteristics of 88 *E. faecium* strains from meju.

Activity	Growth			Acid production			Protease activity			Lipase activity		
	6%	7%	8%	5%	6%	7%	3%	4%	5%	0%	2%	4%
++	88	67		88	87		88	86	1			
+		16			1	28		2	32			
W		5				44			54			
-						16			1	88	88	88
N			88									

+, positive activity; W, weak activity; -, negative activity; N, non-growth.

균주가 성장하였고, 산 생성도 확인되었다. 7% NaCl 농도에서는 모든 균주가 성장하였으나, 21균주(24%)는 낮은 성장을 나타냈고, 산 생성은 6% NaCl 농도에서 보다 약하게 나타났으며 16균주(18%)의 산 생성은 확인할 수 없었다. 8% NaCl 농도에서 성장하는 균주는 확인되지 않았다. 메주에서 분리한 *E. faecium* 균주들은 TSA, 30°C 조건에서 72시간 배양하면 7% NaCl 농도에서도 colony 확인이 가능하지만, 생육은 빠르지 않은 것으로 나타났다. 모든 균주의 단백질 분해 활성은 4% NaCl 농도에서 확인되었지만, 5% NaCl 농도에서는 1균주를 제외한 나머지 균주는 약한 활성을 나타냈고, 활성을 나타내지 않는 균주도 확인되었다. 한편, 지방 분해 활성은 NaCl을 첨가하지 않은 배지에서도 모든 균주의 활성이 나타나지 않았다.

항생제 내성

E. faecium 88균주의 8종 항생제(ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, erythromycin, gentamicin, penicillin G, tetracycline, vancomycin)에 대한 최저생육저해농도 평가 결과를 Table 3에 제시하였다. 모든 균주는 erythromycin을 제외한 7종 항생제의 breakpoint를 초과한 농도에서 성장하지 못하는 것으로 보아 7종 항생제에 대한 내성이 없는 것으로 확인되었다. Erythromycin에 대한 내성을 나타낸 18균주(20%)는 breakpoint (4 mg/l)보다 최대 4배 높은 erythromycin 16 mg/l의 농도에서 내성을 나타냈다. 한편, erythromycin 내성 균주 *E. faecium* 2014-VREF-16과 *E. faecium* 2014-VREF-39은 128 mg/l 이상의 erythromycin 농도에서 내성을 나타냈다. 2020년 7월 기준 NCBI database에 완전한 유전체 정보가 공개된 *E. faecium* 135균주의 유전체 정보를 분석한 결과, *ermA* 또는 *ermB*를 보유한 87균주(64%)의 존재가 확인되었다(data not shown). *E. faecium*이 보유한 *ermA*, *ermB*를 증폭할 수 있는 PCR

primer를 제작하여 해당 유전자를 증폭한 결과, 메주 유래 88균주는 *ermA* 및 *ermB*를 보유하지 않은 것으로 확인되었지만, erythromycin 내성 양성 대조균 *E. faecium* 2014-VREF-16과 *E. faecium* 2014-VREF-39은 두 유전자를 모두 보유하는 것으로 확인되었다(data not shown).

용혈활성

E. faecium 88균주를 대상으로 α -용혈활성과 β -용혈활성에 대하여 표현형으로 확인한 결과, 모든 균주가 활성을 갖지 않는 것으로 확인되었다(data not shown). 한편, 용혈활성 양성 대조균으로 사용한 *S. aureus* USA 300-p23 균주는 α -용혈활성과 β -용혈활성을 나타냈다.

독성인자 유전자의 존재

Enterococcus 속의 잠재적 독성인자 유전자 *ace*, *agg*, *efaA*, *esp*, *gelE*와 tyramine 생성 유전자 *tdc*의 보유를 메주 유래 *E. faecium* 88균주를 대상으로 검토하였다. 88균주 모두에서 *efaA* 및 *tdc*가 증폭되었지만, *ace*, *agg*, *esp*, *gelE*는 증폭되지 않았다. 한편, 사람의 장관에서 분리한 2014-VREF-16과 2014-VREF-39 균주에서는 *efaA*, *esp*, *tdc* 유전자가 증폭되었다.

고 찰

본 연구에서는 *E. faecium* 234균주 중, 88균주의 *gadA/B* 보유를 확인하였다. NCBI database에서 완전한 유전체 정보가 공개된 *E. faecium* 135균주를 대상으로 *gadA/B* 보유를 검토한 결과, 26균주의 보유가 확인되었다(2020년 7월 기준; data not shown). 또한, 각 균주 *gadA/B*의 chromosomal DNA 상 위치는 상이함을 확인하였으며, *gadA/B* 주변에서 Insertion Sequence (IS) element의 존재를 확인하였다(Fig. 1).

Table 3. MIC distribution to eight antibiotics of 88 *E. faecium* strains from meju.

Antibiotic	Number of strains with MIC (mg/l)									Breakpoint (mg/l) ^a
	0.5	1	2	4	8	16	32	64	128	
Ampicillin	1		25	62						4
Chloramphenicol				1	83	4				32
Ciprofloxacin	49	2	10	27						8
Erythromycin			7	63	17	1				4
Gentamicin			27	32	29					32
Penicillin G	1		2	25	39	21				16
Tetracycline	88									4
Vancomycin	69	17	2							4

^aThe recommended breakpoint values for *Enterococcus faecium* provided by the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (<http://mic.eucast.org>) in 2020.

Enterococcus faecium

Fig. 1. Structures of genes surrounding the annotated *gadA/B* in 26 *E. faecium* genomes (analysis of data available in July 2020). Abbreviations: *gadA/B*, glutamate decarboxylase gene; *gadC*, glutamate/gamma aminobutyrate antiporter gene; *tdk*, thymidine kinase gene; *dndE*, DNA sulfur modification gene; *alr*, alanine racemase gene; *mazF*, endoribonuclease gene; HP, hypothetical protein gene; UP, uncharacterized protein gene. IS elements, IS1201, IS257, and IS30A, are presented with black arrows.

이러한 결과는 *E. faecium*의 *gadA/B*는 다른 박테리아로부터 수평이동에 의해 획득하였음을 시사한다.

미생물에 의한 대두 발효 과정에서 대두의 단백질 및 지방, 당을 이용하여 생성된 아미노산, 지방산, pyrazine 성분 등이 발효산물에 긍정적인 영향을 주는 것으로 보고되었다 [20–23]. 메주 유래 *E. faecium* 균주의 내염성, 산 생성 및 단백질 분해 활성은 NaCl 농도 증가에 따라 감소하였고, 8% 이상의 NaCl 농도에서는 생육하지 못하는 것으로 보아 메주 숙성 과정에는 *E. faecium*이 기여하지만, 메주를 이용하여 염도 10% 이상의 장류를 제조하는 과정에서는 기능적 특성을 발휘하지 못하는 것으로 추정된다. 유전체 정보가 공개된 *E. faecium* 135균주의 유전체 정보로부터 esterase 및 lipase 유전자로 annotation된 유전자 다수의 보유가 확인되어 지방 분해 활성을 나타낼 높은 가능성을 가지고 있으나, 메주 유래 *E. faecium* 균주들의 지방 분해 활성은 NaCl을 첨가하지 않은 배지에서도 활성이 나타나지 않았다. *E. faecium*이 생산하는 esterase 또는 lipase는 tributyrin을 분해하지 못할 가능성이 있으며, Katz 등[24]은 *E. faecium*이 세포내 lipase를 생산하는 것으로 보고하였다. 향후 다른 종류의 지방을 기질로 사용한 추가적인 lipase 활성 측정 실험을 통하여 지방 분해 관련 특성을 검토해야 할 필요성이 제기된다.

항생제 내성 평가에서 18균주(20%)는 erythromycin에 대

해 breakpoint 보다 최대 4배 높은 농도에서 내성을 나타냈다. Ammor 등[25]은 획득형 erythromycin 내성 유전자를 보유한 *Lactobacillus* 속 균주의 erythromycin 내성은 breakpoint 대비 64배 이상 증가하는 것으로 보고하였다. 따라서, 본 실험에서 확인된 18균주의 erythromycin 내성은 transferable plasmid 또는 transposon에 의한 내성 유전자 획득이 아닌 균주 특이적 생리 특성에 기인한 것으로 추정된다.

Enterococcus 속의 잠재적 독성인자 유전자 중, 메주 유래 *E. faecium* 균주는 *efaA*와 *tdc*를 보유하는 것으로 확인되었다. 완전한 유전체 정보가 공개된 *E. faecium* 135균주 중, 사람 및 식품 기원의 균주는 각각 68균주와 8균주로 확인되었고, 이들 76균주 모두는 *efaA* 및 *tdc*를 보유하고 있었지만, *ace*, *agg*, *gelE*를 보유한 균주는 존재하지 않았다(Table 4). 한편, 사람 유래의 68균주 중 54균주(80%)가 *efaA*, *tdc*와 함께 *Enterococcus* surface protein 유전자 *esp*를 보유하지만, 식품 유래 균주는 *esp*를 보유하고 있지 않으며, 메주 유래 균주도 보유하지 않는 것으로 확인되었다. 따라서 메주에서 분리된 *E. faecium* 균주의 경우, *Enterococcus* 심내막염 항원 (EfaA)과 tyrosine decarboxylase에 의해서 생성된 tyramine이 잠재적 위해요소로 고려된다. *E. faecalis*의 EfaA는 동물모델에서 병원성을 나타낸다고 보고되었으나[26, 27], *E.*

Table 4. Genes of potential virulence factors identified in the complete-genome-published *E. faecium* strains of human and food origins (analysis of data available in July 2020).

Origin	Source	Number of strains in database	Number of virulence gene possessors					
			<i>ace</i>	<i>agg</i>	<i>efaA</i>	<i>esp</i>	<i>gelE</i>	<i>tdc</i>
Human	Blood	20			20	18		20
	Rectal swab	4			4	4		4
	Urine	5			5	5		5
	Feces	11			11	6		11
	Rectum	2			2	2		2
	Pus	4			4	2		4
	Others	22			22	17		22
Food	Meju	1			1			1
	Fermented dairy products	2			2			2
	Chinese sausages	1			1			1
	Chicken	2			2			2
	Others	2			2			2

*faecium*의 EfaA의 독성은 아직 보고된 바 없다. 또한, 다수의 연구에서 *E. faecalis*와 *E. faecium*의 EfaA 아미노산 서열의 유사성이 높지 않음을 보고하였으며, 서열의 차이는 기능적 차이를 초래할 수 있음을 언급하였다[26, 28, 29]. 본 연구의 메주에서 분리한 88균주는 모두 tyrosine decarboxylase 유전자 *tdc*를 보유하고 있는 것으로 확인되었다. 모든 균주가 tyramine 생성 관련 유전자 *tdc*를 보유하고 있어 발효과정에서 tyramine이 생성될 가능성이 제기되지만, 전세계적으로 histamine과 달리 tyramine에 대해서 별도의 규제는 이루어지지 않고 있다. 또한, 식품에서의 biogenic amine 규제는 어류의 신선도를 파악하기 위한 품질기준으로 고려되고 있어, 발효과정에서 생성되는 biogenic amine에 동일한 기준을 적용하면, 규제의 대상이 크게 확대될 수 있다. 현재까지 대두 발효식품에서 tyramine이 검출된다는 보고는 있으나, 건강상의 문제가 보고된 바는 없어, 섭취에 의한 위험이 발생할 가능성은 낮다고 판단된다.

GABA 생성 유전자를 보유한 메주 유래 *E. faecium* 88균주를 대상으로 기능적 특성 및 안전성 평가를 진행한 결과, 항생제 내성, 용혈활성, *Enterococcus* 속의 잠재적 독성인자 유전자 보유 측면에서 문제가 없는 것으로 확인되었지만, tyramine을 생성할 가능성이 제기되어 종균 활용에서의 걸림돌이 될 수 있다. Ladero 등[30]의 연구에서 *E. durans*, *E. faecalis*, *E. faecium*의 *tdc* 보유를 종 특이적(species-specific) 현상으로 보고한 바 있지만, *tdc*를 보유하고 있지 않거나 활성을 나타내지 않는 균주의 존재도 보고되었다[9, 10, 31]. 따라서, *tdc*를 보유하고 있지 않아 tyrosine

decarboxylase 활성을 나타내지 않는 메주 유래의 균주가 선발된다면 대두 발효산업에서 유용하게 활용될 것으로 예상된다.

요 약

γ -Aminobutyric acid 생성에 관여하는 glutamate decarboxylase 유전자 *gadA/B*를 보유한 메주 유래 *Enterococcus faecium* 88균주를 대상으로 기능적 특성 및 안전성 평가를 진행하여 메주 유래 *E. faecium*의 발효식품용 종균으로써의 활용 가능성을 검토하였다. 6% NaCl 농도(w/v)에서 모든 균주의 생장 및 산 생성이 확인되었다. 7% NaCl 농도에서는 21균주(24%)가 낮은 생장을 나타냈으며, 72균주(82%)가 약한 산 생성 활성을 나타냈고, 16균주(18%)는 산 생성을 나타내지 않았다. 4% NaCl 농도에서는 모든 균주가 단백질 분해 활성을 나타냈지만, 5% NaCl 농도에서 86균주(98%)가 약한 활성을 나타냈고, 1균주(1%)는 활성을 나타내지 않았다. 지방 분해 활성은 모든 균주에서 나타나지 않았다. 모든 균주가 7종의 항생제(ampicillin, chloramphenicol, ciprofloxacin, gentamicin, penicillin G, tetracycline, vancomycin)에 대해 획득형 항생제 내성을 나타내지 않았다. *Enterococcus* 심내막염 항원 유전자 *efaA* 및 tyramine 생성에 관여하는 tyrosine decarboxylase 유전자 *tdc*가 메주 유래 88균주에서 발견되었지만, 사람 기원 *E. faecium* 균주가 특이적으로 보유하고 있는 *Enterococcus* surface protein 유전자 *esp*는 발견되지 않았다.

Acknowledgments

This research was supported by the Basic Science Research Program through the National Research Foundation of Korea (NRF), funded by the Ministry of Education (NRF-2016R1D1A1B01011421 and NRF2019R1A2C1003639). Haram Kong was supported by Kyonggi University's Graduate Research Assistantship 2021.

Conflicts of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

- Klein G. 2003. Taxonomy, ecology and antibiotic resistance of enterococci from food and the gastro-intestinal tract. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 123-131.
- Wheeler AL, Hartel PG, Godfrey DG, Hill JL, Segars WI. 2002. Potential of *Enterococcus faecalis* as a human fecal indicator for microbial source tracking. *J. Environ. Qual.* **31**: 1286-1293.
- Giraffa G. 2003. Functionality of enterococci in dairy products. *Int. J. Food Microbiol.* **88**: 215-222.
- Franz CM, Holzapfel WH, Stiles ME. 1999. *Enterococci* at the crossroads of food safety? *Int. J. Food Microbiol.* **47**: 1-24.
- Zheng B, Tomita H, Inoue T, Ike Y. 2009. Isolation of VanB-type *Enterococcus faecalis* strains from nosocomial infections: first report of the isolation and identification of the pheromone-responsive plasmids pMG2200, Encoding VanB-type vancomycin resistance and a Bac41-type bacteriocin, and pMG2201, encoding erythromycin resistance and cytolysin (Hly/Bac). *Antimicrob. Agents Chemother.* **53**: 735-747.
- Sava IG, Heikens E, Huebner J. 2010. Pathogenesis and immunity in enterococcal infections. *Clin. Microbiol. Infect.* **16**: 533-540.
- Johnson AP. 1994. The pathogenicity of enterococci. *J. Antimicrob. Chemother.* **33**: 1083-1089.
- Burdychova R, Komprda T. 2007. Biogenic amine-forming microbial communities in cheese. *FEMS Microbiol. Lett.* **276**: 149-155.
- Muñoz-Atienza E, Landeta G, de las Rivas B, Gómez-Sala B, Muñoz R, Hernández PE, et al. 2011. Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *Int. J. Food Microbiol.* **146**: 212-216.
- Trivedi K, Borkovcová I, Karpíšková R. 2009. Tyramine production by enterococci from various foodstuffs: a threat to the consumers. *Czech. J. Food Sci.* **27**: 357-360.
- Sarantinopoulos P, Kalantzopoulos G, Tsakalidou E. 2002. Effect of *Enterococcus faecium* on microbiological, physicochemical and sensory characteristics of Greek Feta cheese. *Int. J. Food Microbiol.* **76**: 93-105.
- Dhakar R, Bajpai VK, Baek KH. 2012. Production of gaba (γ -aminobutyric acid) by microorganisms: a review. *Braz. J. Microbiol.* **43**: 1230-1241.
- Canganella F, Paganini S, Ovidi M, Vettraino AM, Bevilacqua L, Massa S, et al. 1997. A microbiology investigation on probiotic pharmaceutical products used for human health. *Microbiol. Res.* **152**: 171-179.
- Jang M, Jeong DW, Lee JH. 2019. Identification of the predominant *Bacillus*, *Enterococcus*, and *Staphylococcus* species in meju, a spontaneously fermented soybean product. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **47**: 1-5.
- Kim HM, Chung DR, Cho SY, Huh K, Kang CI, Peck KR. 2020. Emergence of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* ST1421 lacking the *pstS* gene in Korea. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **39**: 1349-1356.
- Lim HS, Cha IT, Lee H, Seo MJ. 2016. Optimization of γ -aminobutyric acid production by *Enterococcus faecium* JK29 isolated from a traditional fermented foods. *Microbiol. Biotechnol. Lett.* **44**: 26-33.
- Yu P, Ren Q, Wang X, Huang X. 2019. Enhanced biosynthesis of γ -aminobutyric acid (GABA) in *Escherichia coli* by pathway engineering. *Biochem. Eng. J.* **141**: 252-258.
- Jeong M, Jeong DW, Lee JH. 2015. Safety and biotechnological properties of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolates from Meju. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* **58**: 813-820.
- Jeong DW, Cho H, Lee H, Li C, Garza J, Fried M, et al. 2011. Identification of the P3 promoter and distinct roles of the two promoters of the SaeRS two-component system in *Staphylococcus aureus*. *J. Bacteriol.* **193**: 4672-4684.
- Sarkar PK, Cook PE, Owens JD. 1993. *Bacillus* fermentation of soybeans. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 295-299.
- Besson I, Creuly C, Gros JB, Larroche C. 1997. Pyrazine production by *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation on soybeans. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **47**: 498-495.
- Jeong DW, Heo S, Lee B, Lee H, Jeong K, Her JY, et al. 2017. 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.
- Jeong DW, Jeong K, Lee H, Kim CT, Heo S, Oh Y, et al. 2020. Effects of *Enterococcus faecium* and *Staphylococcus succinus* starters on the production of volatile compounds during doenjang fermentation. *LWT-Food Sci. Technol.* **122**: 108996.
- Katz M, Medina R, Gonzalez S, Oliver G. 2002. Esterolytic and lipolytic activities of lactic acid bacteria isolated from ewe's milk and cheese. *J. Food Prot.* **65**: 1997-2001.
- Ammor MS, Flórez AB, van Hoek AH, de Los Reyes-Gavilán CG, Aarts HJ, Margolles A, et al. 2008. Molecular characterization of intrinsic and acquired antibiotic resistance in lactic acid bacteria and bifidobacteria. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **14**: 6-15.
- Singh KV, Coque TM, Weinstock GM, Murray BE. 1998. In vivo testing of an *Enterococcus faecalis* *efaA* mutant and use of *efaA* homologs for species identification. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **21**: 323-331.
- Mohamed JA, Huang W, Nallapareddy SR, Teng F, Murray BE. 2004. Influence of origin of isolates, especially endocarditis isolates, and various genes on biofilm formation by *Enterococcus*

- faecalis*. *Infect. Immun.* **72**: 3658-3663.
28. 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.
29. Cariolato D, Andrighetto C, Lombardi A. 2008. Occurrence of virulence factors and antibiotic resistances in *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* collected from dairy and human samples in North Italy. *Food Control* **19**: 886-892.
30. Ladero V, Fernández M, Calles-Enríquez M, Sánchez-Llana E, Cañedo E, Cruz Martín MC, et al. 2012. Is the production of the biogenic amines tyramine and putrescine a species-level trait in enterococci? *Food Microbiol.* **30**: 132-138.
31. Bhardwaj A, Gupta H, Iyer R, Naresh K, Malik RK. 2009. Tyramine-producing enterococci are equally detected on tyramine production medium, by quantification of tyramine by HPLC, or by *tdc* gene-targeted PCR. *Dairy Sci. Technol.* **89**: 601-611.