

모유 유래 유산균 *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP005의 다제내성 균에 대한 항균효과

이정은¹ · 김수빈² · 유두나³ · 조소연⁴ · 김애정⁵ · 국무창^{4,*}

¹경기대학교 일반대학원 대체의학과, ²중앙대학교 식품영양학과, ³경희대학교 생명공학원,
⁴배화여자대학교 식품영양학과, ⁵경기대학교 대체의학대학원

Antimicrobial effect of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP005 isolated from human breast milk against multidrug-resistant bacteria

Jeong-Eun Lee¹, Soo-bin Kim², Du-na Yu³, So-Yeon Jo⁴, Ae-Jung Kim⁵, and Moochang Kook^{4,*}

¹Department of Alternative Medicine, Kyonggi University

²Department of Food and Nutrition, Chung-Ang University

³Department of Biotechnology, Kyung Hee University

⁴Department of Food & Nutrition, Baewha Women's University

⁵The Graduate School of Alternative Medicine, Kyonggi University

Abstract In this study, *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP005 isolated from human breast milk demonstrated antimicrobial effects against multidrug-resistant (MDR) bacterial strains. The bacteriocin produced by *E. faecalis* BMSE-HMP005 was fractionated using reverse-phase high-performance liquid chromatography. This fraction showed antimicrobial effects against both gram-positive and gram-negative MDR bacteria. No hemolytic reactions were observed. *E. faecalis* BMSE-HMP005 was resistant to vancomycin; however, kanamycin, ampicillin, and erythromycin showed minimum inhibitory concentrations that were lower than the acceptable range provided by the European Food Safety Authority. For artificial gastric juice and bile acid, the survival rates were 98.67% and 95.70%, respectively. These results show the potential utility of *E. faecalis* BMSE-HMP005 as a probiotic with remarkable antimicrobial effects against MDR bacteria.

Keywords: human breast milk, *Enterococcus faecalis*, multidrug-resistant bacteria, lactic acid bacteria, antimicrobial effect

서 론

최근 세계보건기구(WHO)에서는 항생제 내성이 세계적인 공중 보건 문제로 인식되어 항생제 내성의 원인 및 전파경로를 식별하고, 새로운 항균제의 개발을 장려하면서, 내성 박테리아를 줄이기 위해 병원 감염 통제조치를 시행해야 한다고 제안하였다(Almeida-Santos 등, 2021; WHO, 2020). 또한 유럽 의약품청(European Medicines Agency), 식품의약처(Food and Drug Administration) 및 유럽 질병예방통제센터(European Center for Disease Prevention and Control) 등의 국제 보건 기관에서는 새로운 항균제 개발과 예방에 많은 지원을 하고 있으며, 항생제 사용을 줄이기 위해 bacteriophages, probiotics, lysins, antimicrobial peptides 등과 같은 대안이 연구되었다(Almeida-Santos 등, 2021).

유산균의 항균활성은 유기산, bacteriocin, hydrogen peroxide, antimicrobial enzyme 등에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다

(Mezaini 등, 2009). 그 중 항균 펩타이드인 bacteriocin은 일반적으로 박테리아에 의해 유도되는 물질로 리보솜으로 합성되며 유산균에 의해 주로 생산된다(Izquierdo 등, 2008). 특히, 잠재적인 probiotics로 연구된 *Enterococcus* 속 균주는 가장 큰 bacteriocin(enterocin) 생산 균주 중 하나로 알려져 있다(Almeida-Santos 등, 2021; Hanchi 등, 2018). 유산균에 의해 생성되는 대부분의 bacteriocin은 gram 양성균에 대한 억제활성을 보이는 것으로 알려져 있으나, 최근 enterocin에 대한 선행연구에서는 gram 양성균과 음성균을 모두 포함하여 광범위한 억제활성이 있는 것으로 보고되었다(De Kwaadsteniet 등, 2005; Kumar와 Srivastava, 2009; Line 등, 2008).

Enterococcus 속은 gram 양성, catalase 음성, 통성 혐기성 구균으로 담즙산(40%), NaCl (6.5%), 광범위한 pH (4.6-10.0) 및 온도 (5-65°C)를 견딜 수 있는 균으로 알려져 있다(Rahmani 등, 2020). 일부 장구균의 경우 많은 bacteriocin 유전자를 보유하여 다른 미생물 중에 대하여 우점할 수 있으며, 이러한 장구균의 특징은 병원성 박테리아에 대한 응용에 유용하게 이용될 수 있다(Hanchi 등, 2018; Henning 등, 2015).

모유에는 *Enterococcus* spp.을 포함하여 건강에 유익하고 잠재적으로 중요한 여러 종의 박테리아가 존재하는 것으로 알려져 있다(Hunt 등, 2011). 전문가들은 모유수유 과정에서 모유 내 박테리아가 신생아의 장관 내로 전달되어 생애 초기 장내 미생물총 형성

*Corresponding author: Moochang Kook, Department of Food & Nutrition, Baewha Women's University, Seoul 03039, Korea
Tel: +82-2-399-0765
Fax: +82-2-737-6711
E-mail: bmse153@gmail.com
Received December 23, 2021; revised February 10, 2022;
accepted February 21, 2022

에 도움을 주며, 출생 후 면역 발달을 위해 *Enterococcus* spp.와 같은 미생물의 잠재적인 역할에 대하여 보고한 바 있다(Blessing 등, 2020; Martín 등, 2004; Rahmani 등, 2020). 따라서, 본 연구에서는 항생제 내성 균주에 대하여 항균력이 우수한 모유 유래 유산균을 분리 및 동정하여, 발효과정에서 생산되는 항균물질에 의한 항균력을 분석하여 probiotics로써 잠재적인 가능성을 확인하였다.

재료 및 방법

모유시료의 수집 및 보관

본 연구에서 사용된 모유 시료의 수집은 경기대학교 기관생명윤리위원회(Institutional Review Board)의 승인을 받아 진행되었다(승인번호: KGU-20191018-HR-046-04). 인체 유래물 제공 대상자는 2020년 2월부터 2021년 2월에 출산한 만 20-39세 여성 중, 임신 고위험군에 해당된 이력이 없고, 재태주수 37-41주 사이에 출산한 산후 6개월 이하의 수유부를 대상으로 하였으며, 사전에 연구내용에 대하여 충분히 설명 후 이에 동의한 제공자를 대상으로 선정하였다. 대상자의 모유는 각각 1일 1회, 50 mL를 착유하여 멸균된 tube에 수집하였으며, 수집한 모유는 -70°C 의 deep-freezer에 보관하였다가 1 mL씩 무균적으로 소분하여 실험에 사용하였다.

모유 유래 유산균의 분리 및 동정

모유 유래 유산균의 분리를 위해 수집한 모유를 Lactobacilli MRS broth (Difco Co., Sparks, MD, USA) 1 mL에 10% (v/v) 수준으로 접종하여 30°C 에서 24시간동안 배양 후 증균 하였다. 이후 MRS broth에 2% (v/v) 수준으로 재접종하여 30°C 에서 24

시간 배양하여 유산균 감별배지인 Bromo Cresol Purple (BCP) plate count agar (EIKEN chemical, Tokyo, Japan)에 확산도말하여 30°C 에서 24시간 배양하였고, 산을 생성하여 노란색 환을 형성한 집락을 취해 순수 분리하였다. 분리한 균주의 생화학적 특성을 확인하기 위해 API ZYM kit (BioMérieux, Craponne, France)를 이용하여 효소 활성 유무를 검토하였으며, 이후 16s rRNA 염기서열을 분석하여 최종 동정하였다(BIOFACT Co., Daejeon, Korea). 염기서열 분석을 위해 8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3'), 1492R (5'-TACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') primer와 PRISM 3730XL DNA analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 사용하였으며 분석한 염기서열은 EZBioCloud website (www.ezbiocloud.net) (Yoon 등, 2017)의 16S database tool로 비교 분석하였다.

지시균주 및 배양

항균활성 측정에 사용된 다제내성 균주는 *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., 및 *Enterobacter* spp. 등 총 20주로 각 균주와 항생제내성정보는 서울여자대학교로부터 제공받아 사용하였다(Table 1). 본 연구에서 수행한 모든 항균활성에 사용된 지시균주는 각각 Tryptone Soy Broth (TSB, Difco), MRS broth (Difco), Luria-Bertani broth (LB, Difco)에 2% (v/v) 수준으로 접종하여 37°C 에서 18시간 배양한 후, 0.85% sodium chloride (NaCl)에 10배씩 희석하여 지시균주의 최종농도가 10^6 CFU/mL인 배양액을 사용하였다.

Bacteriocin 생산 확인

유산균의 bacteriocin 생산 유무를 확인하기 위해 ammonium

Table 1. List of indicator strains

	Strains	Collection no.	Culture media	Antibiotics resistant ¹⁾
Gram positive	<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> 078	CCARM 0230	LB
<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 0219	TSB	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

¹⁾AMP; Ampicillin, Nor; Norfloxacin, GM; Gentamycin, Van; Vancomycin

hydroxide를 사용하여 pH 6.0으로 조정한 유산균 배양액의 항균력을 확인하였다. MRS broth (Difco)에 2% (v/v) 접종하여 30°C에서 18시간 배양하였으며, 이후 배양액의 pH를 조정 한 후, 5분간 원심분리(13,000×g) 하여 상층액을 취해 0.2 µm membrane filter (SM13P020SL, Hyundai micro Co., Seoul, Korea)로 여과한 것을 시료로 사용하였다. 지시균주는 gram 양성 및 gram 음성 다제내성 균주 7주에 대한 항균활성을 측정하였으며, disk diffusion 방법을 통해 clear zone을 확인하였다.

최소저해농도(Minimum Inhibitory Concentration, MIC)와 최소살균농도(Minimum Bactericidal Concentration, MBC)

지시균주에 대한 유산균 배양액의 최소저해농도(MIC) 및 최소살균농도(MBC)는 Wiegand 등(2008)의 액체배지 희석법(broth dilution method)을 이용하여 확인하였다. 유산균을 MRS broth에 2% (v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양 후, 5분간 원심분리(13,000×g)하여 상층액을 취해 0.2 µm membrane filter (Hyundai micro Co.)로 여과한 것을 시료로 사용하였다. MIC 및 MBC 측정을 위해 96-well microplate (cell culture plate, SPL life sciences Co., Ltd., Korea)에 액체배지와 시료를 첨가하여 2배씩 희석한 후, 지시균주를 분주하여 37°C에서 18시간 배양하였으며, 이후 TSA, MRS 및 LB agar plate에 희선도말하여 37°C에서 24시간 배양 후 colony 생성이 저해되는 최소농도를 MIC, colony 생성이 확인되지 않는 농도를 MBC로 설정하였다.

DNA량 측정

유산균 배양액 내 항균물질에 의한 다제내성 균주의 세포질 막 손상 여부를 확인하기 위해, Yasir 등(2019)의 방법을 참고하여 DNA 정량시험을 수행하였다. 다제내성 균주 *E. faecalis* CCARM 5171, *S. aureus* CCARM 3855, *E. coli* DC 2 CCARM 0238, *P. aeruginosa* CCARM 0223, *S. enterica* CCARM 0240, *K. oxytoca* CCARM 0248, *E. cloacae* P 99 CCARM 0252를 각각 MRS broth (Difco), TSB (Difco), LB (Difco)에 2% (v/v) 수준으로 접종하여 37°C에서 18시간 배양한 후, 5분간 원심분리(13,000×g)하여 상층액을 제거 후 pellet을 수거하였다. 이후 0.1 M phosphate buffered saline (PBS) 1250 µL를 첨가한 현탁액과 유산균 배양액의 MIC 및 MBC를 1:1 (v/v) 비율로 처리하였으며, 유산균 배양액을 첨가하지 않은 대조군은 PBS를 처리하였다. 이후 37°C에서 4시간 반응시킨 후, 5분간 원심분리(13,000×g)하여 상층액을 2 µL 취해 microvolume plate (Agilent BioTek Take3 microvolume plate, BioTek, USA)에 loading하여, 흡광도 260/280 nm에서 DNA량을 측정하였다.

RP-HPLC (Reverse-phase high performance liquid chromatography) 분석

역상 고정능 액체크로마토그래피 RP-HPLC를 이용하여 유산균 발효액의 lactic acid 및 bacteriocin을 분석하였다. 유산균을 MRS 액체배지에 2% (v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양 후, 5분간 원심분리(13,000×g)하여 0.2 µm filter (Hyundai micro Co.)로 여과한 상층액을 분석시료로 사용하였다. 유기산 분석에는 300×7.8 mm의 Aminex column (Aminex HPX-87H, Bio-Rad laboratories, Inc., USA)을 이용하였으며, mobile phase는 5 mM sulfuric acid, flow rate은 0.6 mL/min으로 하여, 210 nm에서 흡광도를 측정하여 검출하였다. 유기산은 배양액 내에서 가장 많이 검출되는 lactic acid의 standard와 비교하였다.

Bacteriocin 분석에는 Liu 등(2015)의 방법을 참고하여 분석하

였다. 150×4.6 mm의 ACE C18 column (ACE 5 C18, Avantor, Korea)을 이용하여 mobile phase는 A (water 95%, acetonitrile 5%, trifluoroacetic acid 0.1%), B (water 100%, trifluoroacetic acid 0.1%)로 하여, 0-10분까지는 A 100%, 10-45분까지는 A 30%, B 70%, 45-50분까지는 B 100%, 50-60분까지는 A 100%으로 gradient 조건을 적용하여 220 nm에서 흡광도를 측정하였다. 배양 전후 chromatogram의 bacteriocin으로 판단되는 retention time (RT)에서 fraction하여 disk diffusion에 의한 항균활성을 평가하였다.

용혈성 확인

분리균주의 용혈성을 확인하기 위해 blood agar base (Kisan Bio Co., Seoul, Korea)에 5% sheep blood (Kisan Bio Co., Seoul, Korea)를 첨가한 blood agar plate에 분리균주와 양성대조 균인 *S. aureus* KCCM 11335, *P. aeruginosa* KCTC 2513, *S. aureus* CCARM 3855, *P. aeruginosa* CCARM 0223을 희선도말하여 37°C에서 48시간 배양하였다. 이후 Argyri 등(2013)의 방법에 따라 집락 주위로 형성되는 용혈성을 확인하였다.

항생제 감수성 확인

분리균주의 항생제에 대한 감수성 측정에는 Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) guidelines (2018)을 따라 broth micro-dilution assay에 의해 측정하였다. 유럽식품안전청 (European Food Safety Authority, EFSA)의 guidelines 기준으로 5종의 항생제(vancomycin, kanamycin, ampicillin, tetracycline, erythromycin)에 대한 최소억제농도(MIC)를 평가하였다. 각각의 항생제는 EFSA에서 규정된 용매의 stock solution을 제조한 후 0.2 µm filter (Hyundai micro Co.)로 여과하여 실험에 사용하였다. 유산균은 MRS broth에 2% (v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양 후, 0.85% NaCl에 10-fold dilution하여 유산균의 최종농도가 10⁶ CFU/mL인 균액을 사용하였다. 96-well microplate (SPL life sciences Co., Ltd)에 MRS broth를 100 µL씩 분주한 후, 각 항생제 용액의 농도를 2-fold dilution하여 분주하였으며, 이후 균액을 10 µL씩 각 well에 접종하여 30°C에서 48시간 배양 후, 균 증식이 시작되기 전 농도를 MIC로 판정하였다.

내산성 및 내담즙성

모유 유래 유산균의 내산성 및 내담즙성 확인은 Jose 등(2015)의 방법을 참고하여 실험하였다. MRS broth에 유산균을 2% (v/v) 접종하여 30°C에서 24시간 배양한 후, 5분간 원심분리(13,000×g)하여 상층액을 제거하고, PBS (pH 7.0)에 2회 세척한 pellet을 회수하였다. 이후 1 N HCl을 이용해 pH 2.0으로 조정 한 MRS broth 1mL을 첨가하여 내산성 측정에 사용하였고, 0.3% (w/v) bile salts를 첨가한 MRS broth 1mL을 첨가하여 내담즙성 측정에 사용하였다. 각각 30°C에서 3시간 배양 후 0.85% NaCl에 10배씩 희석하여, MRS agar plate에 분주하였다. 이후 30°C에서 24시간 배양하여 형성된 colony의 수를 확인하였다. 위 과정을 3회 반복하여 평균값 및 표준편차를 구하여 내산성 및 내담즙성을 확인하였다.

통계분석

본 연구에서는 생화학적 특성을 제외한 모든 실험을 3회 이상 반복 수행 하였으며, 실험결과는 SPSS (Statistical Package for the Social Science, Ver. 20, SPSS Inc., Chicago, IL, USA)를 이용하여 통계분석 하였다. 각 실험군에 대한 유의적 차이는 독립표본 t-test를 실시하여 $p < 0.05$ 수준에서 유의성을 검토하였다.

결과 및 고찰

모유 유래 유산균의 분리 및 동정

본 연구에서는 모유 유래 유산균을 분리하기 위해 국내 수유부 여성을 대상으로 모유를 수집하여 유산균 5주를 분리하였으며, 그 중 분리균 BMSE-HMP005의 16S rRNA 유전자 염기서열 분석결과, *Enterococcus faecalis* ATCC 19433과 99.93%의 상동성을 보였다(Supplementary Fig. 1). API ZYM kit를 이용한 *E. faecalis* BMSE-HMP005의 효소 활성 확인 결과, esterase, esterase lipase, leucine arylamidase, acid phosphatase, naphthol-AS-BI-phosphohydrolase에 대한 활성을 보였다(Table 2). 지질에 대한 가수분해 효소인 esterase 및 esterase lipase에 대하여 우수한 활성을 보였으며, 반면 valine arylamidase, cystine arylamidase, α -chymotrypsin 활성은 약하게 나타났다. 또한 Dabek 등(2008)에 의하면, β -glucuronidase는 장내에서 발암성 화합물로 이어질 수 있어 발암위험을 증가시키는 것으로 보고한 바 있다. 분리균주의 경우 β -glucuronidase에 대한 활성은 negative로 나타나, 발암위험의 가능성은 우려되지 않는 것으로 판단된다. 건강한 여성의 모유에는 *Staphylococci*, *Lactobacilli*, *Streptococci*, *Enterococci*, *Bifidobacteria* spp. 등의 박테리아가 존재하며, 일부 박테리아는 장내에서 probiotics의 특성을 나타내는 것으로 보고되었다(Bagci 등, 2019; Blessing 등, 2020). *Enterococcus* spp. 중에서 특히 *E. faecalis*와 *E. faecium*은 흔한 종으로 발견되며(Rahmani 등, 2020), 장내 뿐만 아니라 발효식품에서도 존재하는데, 일부 균주는 병원성 및 부패균을 억제하는 것으로 보고되었다(Baccouri 등, 2019). 따라서, 본 연구에서 분리한 모유 유래 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP005의 유용 유산균으로써 활용 가능성을 확인하였다.

Bacteriocin 생산 확인

유산균 배양액의 항균효과는 lactic acid, bacteriocin, hydrogen peroxide 등에 의해 나타나는 것으로 알려져 있으며, 본 연구에서는 배양액 내 lactic acid에 의한 항균효과를 배제하고, 분리균주의 bacteriocin 생산 여부를 확인하고자 ammonium hydroxide를 이용하여 pH 6.0으로 조정된 배양액의 항균활성을 측정하였다. 그 결과, 다제내성 균주 7에 대하여 모두 항균력이 확인되었다(Supplementary Fig. 2). 이와 같은 결과는 *E. faecalis* BMSE-HMP005 배양액의 항균효과가 lactic acid 뿐만 아니라, 유산균 발효 중 생성된 항균물질에 기인하여 나타난 것으로, *E. faecalis* BMSE-HMP005가 생산하는 bacteriocin의 가능성을 보여준다.

다제내성 균주에 대한 MIC 및 MBC

항생제 오남용으로 인한 내성 박테리아의 출현은 전세계적인 공중보건 문제로 대두되고 있으며, 세 가지 계열 이상의 항생제에 내성을 보이는 다제내성(multi-drug resistance, MDR), 한 두 가지 계열을 제외한 모든 항생제에 내성을 보이는 광범위 내성(extensively drug resistance, XDR) 및 모든 계열의 항생제에 내성을 보이는 극한 광범위내성(pan-drug resistance, PDR) 병원체의 확산은 공중보건에 심각한 위기를 일으킨다(Brunel과 Guery, 2017). 항생제 내성 균주가 증가하면 감염을 치료하기 위한 항균제가 더 적어지며, Vivas 등(2019)은 새로운 항생제가 개발되거나 발견되지 않을 경우 2050년까지 유효한 항생제가 없을 것으로 추정하고 있다. 따라서, 항생제 내성 균주의 문제를 해결하기 위해, 모유 유래 유산균인 *E. faecalis* BMSE-HMP005 배양액의 다제내성 균주 20주(*Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.)에 대한

Table 2. Enzyme assay for biochemical reactions of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP005 using API ZYM kit

Enzyme Assayed For	BMSE-HMP005
Control	Colorless or color of the sample if it has an intense coloration
Alkaline phosphatase	- ¹⁾
Esterase (C4)	+
Esterase Lipase (C8)	+
Lipase (C14)	-
Leucine arylamidase	+
Valine arylamidase	w
Cystine arylamidase	w
Trypsin	-
α -chymotrypsin	w
Acid phosphatase	+
Naphthol-AS-BI-phosphohydrolase	+
α -galactosidase	-
β -glucuronidase	-
β -glucosidase	-
α -glucosidase	-
N-acetyl- β -glucosaminidase	-
α -mannosidase	-
α -fucosidase	-

¹⁾ -: negative, +; positive, w; weak positive

항균효과를 검토하였다. Ampicillin, norfloxacin, gentamycin, vancomycin 등의 항생제에 내성이 있는 다제내성 균주 20주에 대한 MBC 및 MIC는 Table 3과 같다. Gram 양성 및 gram 음성균에서 모두 MIC 및 MBC가 확인되었으며, gram 양성 다제내성 균주에 비해 gram 음성 다제내성 균주에 대한 항균효과가 더 큰 것으로 나타났다. 특히 *E. faecalis* CCARM 5171, *E. faecium* CCARM 5262에 대한 MIC는 >4.32 mg/mL로, MBC는 >17.26 mg/mL로 확인되어 항생제 내성 *Enterococcus* spp.에 대한 우수한 항균효과가 확인되었다. 따라서 이와 같은 결과로부터 *E. faecalis* BMSE-HMP005의 다제내성 균에 대한 우수한 항균효과를 입증할 수 있으며, 앞으로 배양액 내 항균물질에 대한 추가 분석이 필요할 것으로 판단된다.

DNA량 측정

유산균이 생산하는 bacteriocin은 세포막의 기공형성, 세포벽 또는 단백질 합성의 억제, 세포 DNA의 분해 등 여러 메커니즘에 의해 표적 박테리아를 사멸한다(Phumisantiphong 등, 2017). 본 연구에서는 모유 유래 유산균인 *E. faecalis* BMSE-HMP005 배양액이 *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp. 등의 다제내성 균주 20주에 대하여 모두 항균효과가 나타났음을 확인하였다. 따라서 유산균이 생산하는 항균물질이 다제내성 균주의 세포막 손상에 의한 세포 내 DNA/RNA 누출에 미치는 영향을 확인하고자 하였다. 다제내성 균주 *E. faecalis* CCARM 5171, *S. aureus* CCARM 3855, *E. coli* DC 2 CCARM 0238, *P. aeruginosa* CCARM 0223, *S. enterica* CCARM 0240, *K. oxytoca* CCARM

Table 3. Determination of the MIC and MBC of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP005 against multidrug-resistant bacteria

	Strain	MIC ¹⁾ (mg/mL)	MBC ²⁾ (mg/mL)
Gram +	<i>Enterococcus faecalis</i> CCARM 5171	>4.32 ³⁾	17.26
	<i>Enterococcus faecium</i> CCARM 5262	>4.32	17.26
	<i>Staphylococcus aureus</i> 285 CCARM 0204	>2.16	17.26
	<i>Staphylococcus aureus</i> 503 CCARM 0205	>2.16	4.32
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3855	>2.16	8.63
	<i>Staphylococcus aureus</i> CCARM 3089	>2.16	8.63
Gram -	<i>Escherichia coli</i> 078 CCARM 0230	>2.16	4.32
	<i>Escherichia coli</i> DC 0 CCARM 0237	>1.08	4.32
	<i>Escherichia coli</i> DC 2 CCARM 0238	>1.08	4.32
	<i>Escherichia coli</i> TEM CCARM 0235	>1.08	4.32
	<i>Escherichia coli</i> 1507 CCARM 0236	>1.08	4.32
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0219	>2.16	8.63
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0223	>2.16	4.32
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0224	>2.16	8.63
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> CCARM 0225	>2.16	17.26
	<i>Salmonella enterica</i> CCARM 0240	>2.16	17.26
	<i>Klebsiella oxytoca</i> CCARM 0248	>2.16	4.32
	<i>Klebsiella aerogenes</i> 1522E CCARM 0249	>2.16	4.32
	<i>Enterobacter cloacae</i> P 99 CCARM 0252	>2.16	8.63
	<i>Enterobacter cloacae</i> 1321E CCARM 0253	>2.16	17.26

¹⁾MIC: Minimum inhibitory concentration,

²⁾MBC: Minimum bactericidal concentration,

³⁾The concentration of crude protein of cell-free supernatant of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP005 isolated from human breast milk.

0248, *E. cloacae* P 99 CCARM 0252에 유산균 배양액의 MIC 및 MBC를 처리 후, 누출된 DNA량을 대조군과 비교하였다(Fig. 1). 그 결과, 다제내성 균주 7주에서 모두 MIC 처리하였을 때 대조군 보다 누출된 DNA량이 크게 증가하였고($p < 0.001$), MIC 보다 MBC 처리하였을 때의 누출된 DNA량이 더 증가한 것으로 확인되어($p < 0.001$) 모유 유래 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP005의 다제내성 균주에 대한 항균효과는 세포막 손상에 기인한 것으로 추정할 수 있었다.

RP-HPLC를 이용한 유기산 및 bacteriocin 분석

유산균의 항균활성은 유기산, bacteriocin, hydrogen peroxide, antimicrobial enzyme 등에 의해 나타나는 것으로 알려져 있다 (Mezaini 등, 2009). 그 중 항균 펩타이드(antimicrobial peptides, AMPs)는 최근 항생제의 대안으로 주목받고 있으며, bacteriocin은 일반적으로 안전하다고 알려진(GRAS) 유산균에 의해 생성된다 (Cleveland 등, 2001; Phumisantiphong 등, 2017). 본 연구에서는 모유 유래 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP005 배양액의 다제내성 균주에 대한 넓은 항균 스펙트럼이 확인되어 항균물질에 대한 분석을 수행하고자 하였다. 유산균이 생산하는 lactic acid는 산성 환경을 조성하여 병원성 박테리아에 대한 항균력을 나타낸다 (Byakika 등, 2019). 따라서 *E. faecalis* BMSE-HMP005 배양액의 lactic acid 생성량을 분석하기 위해 lactic acid standard와 배양액 chromatogram의 peak를 비교하였다. 그 결과, retention time 12 min에서 배양액 내 lactic acid가 확인되었다(Supplementary Fig. 3). 또한 RP-HPLC를 이용하여 배양액의 bacteriocin을 분석한 결

과, retention time 22 min에서 bacteriocin peak가 확인되었으며, 이에 대한 분획(fraction)은 gram 양성 및 gram 음성 균주에서 모두 항균효과가 나타났다(Fig. 2). *Enterococcus* 속 균주는 가장 큰 bacteriocin (enterocin) 생산 균주 중 하나이며, 유산균이 생산하는 대부분의 bacteriocin은 gram 양성균에 대한 억제활성을 보이는 것으로 알려져 있다(Almeida-Santos 등, 2021; Hanchi 등, 2018). Bacteriocin은 병원성 박테리아의 세포막 손상을 유발하는데, 대부분의 경우 gram 양성균을 억제하고, gram 음성균의 외부 lipopolysaccharide 막은 bacteriocin이 세포 내 유입되는 것을 차단하는 것으로 알려져 있으나, 최근 enterocin에 대한 선행연구에서는 gram 양성과 음성균을 모두 포함하여 광범위한 억제활성이 있는 것으로 보고된 바 있다(Byakika 등, 2019; De Kwaadsteniet 등, 2005; Kumar와 Srivastava, 2009; Line 등, 2008). 따라서 본 연구결과는 *E. faecalis* BMSE-HMP005의 광범위한 항균효과가 균주에 의해 생산된 bacteriocin에 의해 나타났다고 보여진다.

***E. faecalis* BMSE-HMP005의 용혈성 확인**

Probiotics 및 유산균은 안전성과 모든 제한사항에 부합하는지 확인하는 것이 가장 중요한 요소가 된다(Salminen 등, 1998). *Enterococcus* spp. 중 다양한 균주에서 세포독성을 지니지 않는 균주가 확인되었으나, 일부 균주에서 기회감염 또는 병원성을 띠거나 세포용해소(cytolysin)인 β -hemolysin과 같은 독성인자를 가지는 것으로 알려져 있어 안전성 확보가 강조되고 있다(Braňek과 Smaoui, 2019; Ferchichi 등, 2021). 따라서 본 연구에서는 분리한 모유 유래 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP005의 용혈성 유무를

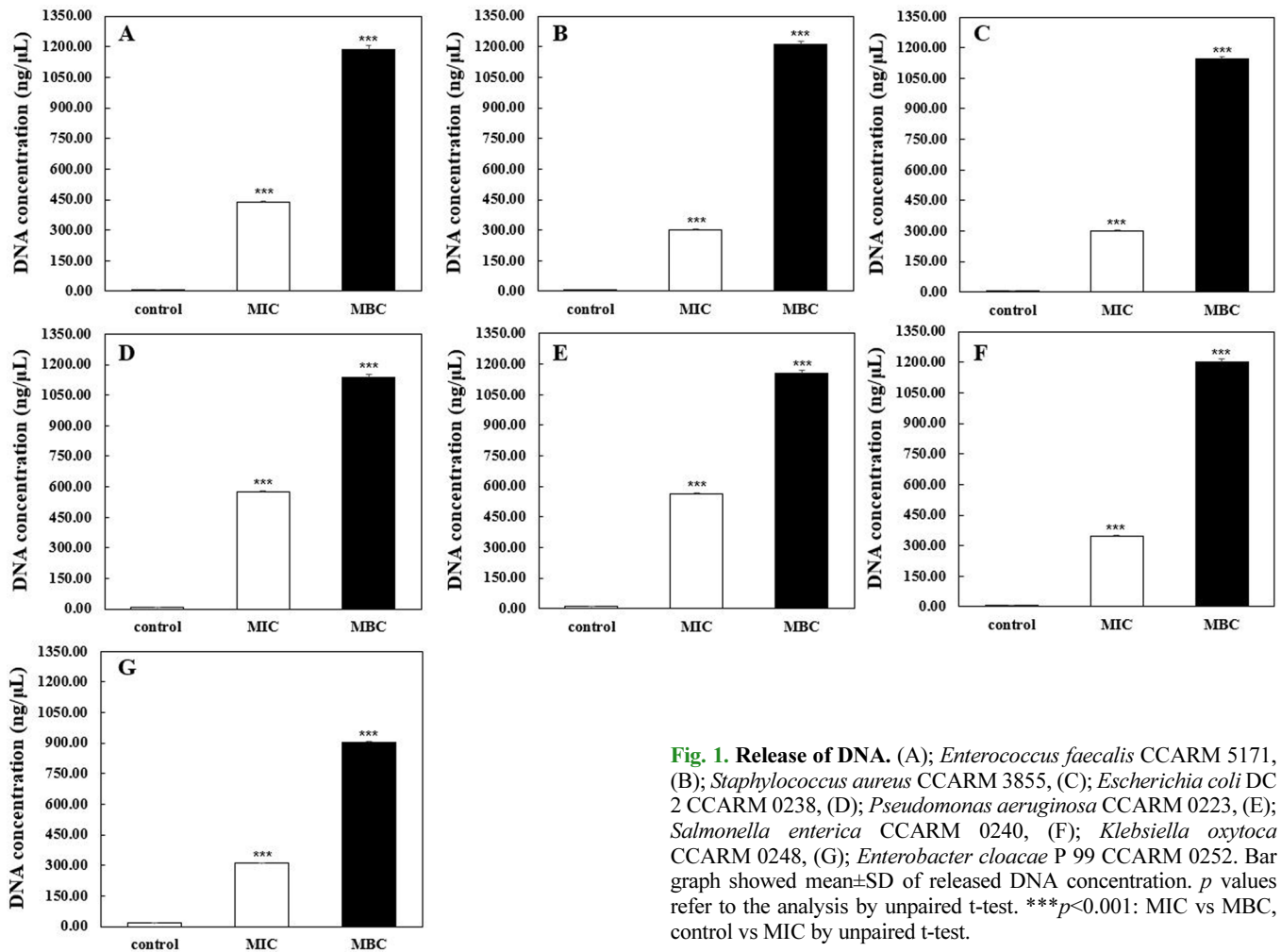


Fig. 1. Release of DNA. (A); *Enterococcus faecalis* CCARM 5171, (B); *Staphylococcus aureus* CCARM 3855, (C); *Escherichia coli* DC 2 CCARM 0238, (D); *Pseudomonas aeruginosa* CCARM 0223, (E); *Salmonella enterica* CCARM 0240, (F); *Klebsiella oxytoca* CCARM 0248, (G); *Enterobacter cloacae* P 99 CCARM 0252. Bar graph showed mean±SD of released DNA concentration. *p* values refer to the analysis by unpaired t-test. ****p*<0.001: MIC vs MBC, control vs MIC by unpaired t-test.

확인하였다. 그 결과, 양성대조군인 *S. aureus* KCCM 11335, *P. aeruginosa* KCTC 2513, *S. aureus* CCARM 3855, *P. aeruginosa* CCARM 0223은 용혈반응이 확인되었으나, 모유에서 분리한 *E. faecalis* BMSE-HMP005는 용혈반응이 나타나지 않았다(Fig. 3). Zhang 등(2016)의 연구에서는 유아의 대변에서 분리한 *E. faecalis* 22주 중 11주에서 용혈성이 보였다고 보고한 바 있다. 반면, Baccouri 등(2019)은 probiotics 균주로 사용되는 *E. faecalis* Symbioflor 1과 발효식품에서 분리한 *E. faecalis* OB14 및 OB15 모두 적혈구 용혈을 나타내지 않다고 보고하여 본 연구결과와 유사하였다. 본 연구에서 분리한 *E. faecalis* BMSE-HMP005 또한 용혈반응이 나타나지 않아 산업적 적용을 기대할 수 있다.

항생제에 대한 감수성

장구균의 경우 vancomycin에 대한 내성 비율이 약 5%로 vancomycin 내성 유전자가 많이 발견되며 kanamycin 및 tetracycline 등에 대한 내성 유전자 또한 보고된 바 있다(Miller 등, 2015). 본 연구에서 분리한 모유 유래 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP005의 항생제 감수성 시험 결과, vancomycin에 대해서는 내성을 보였고, kanamycin, ampicillin, tetracycline, erythromycin에 대한 MIC는 Table 4와 같다. EFSA의 guideline의 항생제 MIC를 기준으로 kanamycin (>0.058), ampicillin (>0.002), erythromycin (>0.002)은 허용범위보다 낮은 MIC가 확인되었으며, tetracycline의 경우 허용범위보다 다소 높은 농도에서 저해되었다. 건강한 여성의 모유

에서 분리한 *Enterococcus* spp.의 경우 ampicillin에 감수성이 있었으나 erythromycin에 대부분 내성이 있는 것으로 보고된 바 있다(Huang 등, 2019; Jimenez 등, 2013). 따라서 이와 같은 연구결과를 바탕으로 유산균이 가질 수 있는 특이인 항생제 내성 유전자에 대한 추가적인 연구가 필요할 것이다.

E. faecalis BMSE-HMP005의 내산성 및 내담즙성

Probiotics의 가장 중요한 특성에는 위산 및 담즙산에 대한 내성, 장 점막에 대한 부착능, 위장관에서의 집락화, 항균물질 생산 및 병원체에 대한 억제 등이 있다(Salminen 등, 1998). 특히, 유산균이 위장관을 통과하는 동안 생존하기 위해서는 위산 및 담즙산에 대한 내성이 중요하다(Ouwehand 등, 2002). 따라서 본 연구에서 분리한 모유 유래 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP005의 probiotics 가능성을 확인하기 위해 내산성 및 내담즙성을 확인하였다(Fig. 4). *E. faecalis* BMSE-HMP005를 24시간 배양하였을 때 균수는 $9.77 \pm 0.11 \log \text{CFU/mL}$ 였으며, pH 2.0 조건에서 3시간 후 균수는 $9.64 \pm 0.15 \log \text{CFU/mL}$ 로 약 98.67%의 생존율을 보이는 것으로 확인되었다. 또한 0.3% bile acid 조건에서 3시간 후 균수는 $9.35 \pm 0.27 \log \text{CFU/mL}$ 로 약 95.70%의 생존율을 보이는 것으로 확인되어 *E. faecalis* BMSE-HMP005는 낮은 pH와 담즙 환경에서 생존능력을 보유하는 것을 알 수 있으며, 이는 probiotics로써 잠재적인 가능성을 보여준다.

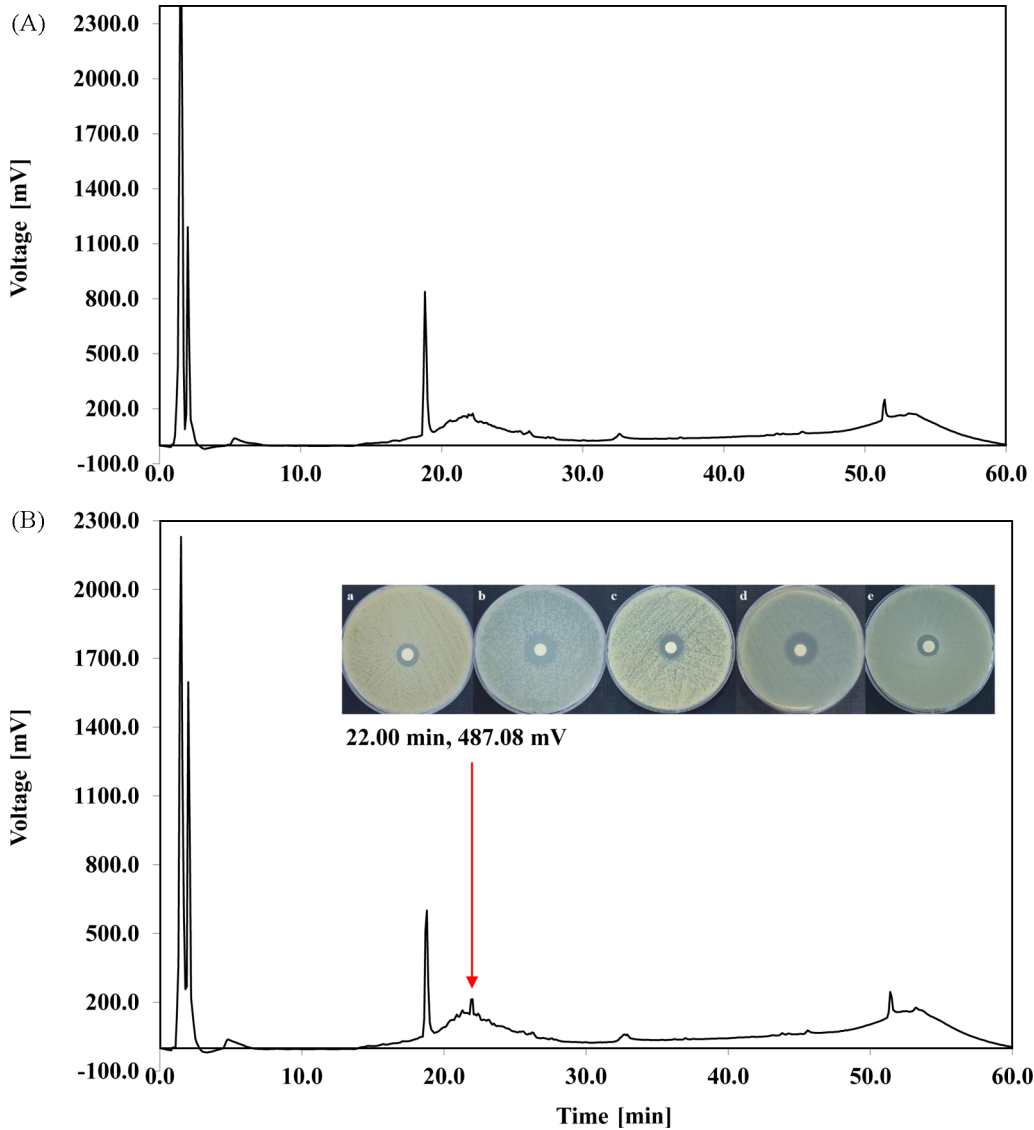


Fig. 2. RP-HPLC chromatogram of a cultured supernatant from *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP005 using ACE C18 column. The retention time of a bacteriocin as metabolite was 22.00 min. (A); MRS broth, (B); supernatant. Indicators for the antimicrobial assay were (a); *S. aureus* KCCM 11335, (b); *E. coli* KCTC 2571, (c); *S. aureus* CCARM 3855, (d); *E. coli* DC 2 CCARM 0238, (e); *P. aeruginosa* CCARM 0223.



Fig. 3. Hemolysis of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP005 isolated from human breast milk.

Table 4. Antibiotic sensitivity and resistance of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP005

Antibiotics	MIC (mg/mL)
Vancomycin	R ¹⁾
Kanamycin	>0.058
Ampicillin	>0.002
Tetracycline	>0.019
Erythromycin	>0.002

¹⁾R; Resistant

요 약

본 연구에서는 모유 유래 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP005의 다제내성 균주에 대한 항균효과 및 probiotics로써 잠재적인 가능성을 확인하였다. *E. faecalis* BMSE-HMP005는 다제내성 균주 20

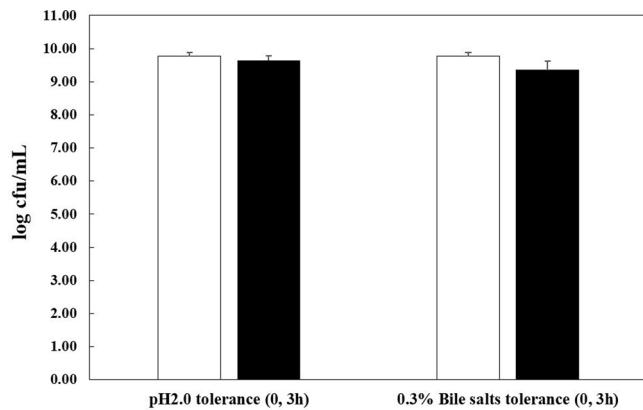


Fig. 4. Survival effects of pH 2.0 and 0.3% bile acid of *Enterococcus faecalis* BMSE-HMP005 isolated from human breast milk. Data are presented as mean±SD of three independent experiments. □; 0 time, ■; after 3 hours.

주(*Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Escherichia* spp., *Pseudomonas* spp., *Salmonella* spp., *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp.)에서 모두 MBC가 확인되어 다제내성 균주에 대한 우수한 항균효과를 입증하였다. 또한 RP-HPLC를 이용하여 배양액 내 bacteriocin을 확인하였으며, 이에 대한 분석은 gram 양성 및 gram 음성균주에서 모두 항균력이 나타나, *E. faecalis* BMSE-HMP005가 생산하는 bacteriocin의 광범위한 항균 스펙트럼을 입증하였다. *E. faecalis* BMSE-HMP005는 발암 화합물을 유발하는 β -glucuronidase에 대한 활성과 용혈성은 나타나지 않아 안전한 것으로 판단된다. *E. faecalis* BMSE-HMP005는 vancomycin에 대해서는 내성을 보이거나, kanamycin (>0.058), ampicillin (>0.002), erythromycin (>0.002)은 EFSA 기준의 허용범위보다 낮은 MIC가 확인되었다. 또한 인공위액(pH 2.0) 및 인공 담즙산(0.3% bile acid) 조건에서 각각 98.67%, 95.70%의 생존율을 보였다. 이와 같은 결과는 본 연구에서 분리된 모유 유래 유산균 *E. faecalis* BMSE-HMP005가 다제내성 균주에 대한 우수한 항균활성을 갖는 probiotics로써 잠재적인 가능성을 보여준다. 따라서 건강기능식품의 기준 및 규격에 제시된 바와 같이 *Enterococcus* spp.는 항생제 내성 및 독성 유전자가 없는 경우에 한하여 probiotics로 사용이 가능한 고시하고 있어 *E. faecalis* BMSE-HMP005의 안전성에 대한 추가적인 검증이 필요할 것으로 판단된다.

Acknowledgments

본 연구는 2019년도 과학기술정보통신부의 재원으로 한국연구재단 이공분야 기초연구사업의 지원으로 수행되었다(과제번호 NRF-2019R1FA105839).

References

Almeida-Santos AC, Novais C, Peixe L, Freitas AR. *Enterococcus* spp. as a producer and target of bacteriocins: A double-edged sword in the antimicrobial resistance crisis context. *Antibiotics* 10: 1215 (2021)

Argyri AA, Zoumpopoulou G, Karatzas KAG, Tsakalidou E, Nychas GJE, Panagou EZ, Tassou CC. Selection of potential probiotic lactic acid bacteria from fermented olives by in vitro tests. *Food Microbiol.* 33: 282-29 (2013)

Baccouri O, Boukerb AM, Farhat LB, Zébré A, Zimmermann K,

Domann E, Cambronel M, Barreau M, Maillot O, Rincé I, Muller C, Marzouki MN, Feuilloy M, Abidi F, Connil N. 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 (2019)

Bagci U, Togay SO, Temiz A, Ay M. Probiotic characteristics of bacteriocin-producing *Enterococcus faecium* strains isolated from human milk and colostrum. *Folia Microbiologica.* 64: 735-750 (2019)

Blessing EN, Chukwuemeka IS, David UC, Onuawuchi UG. Antibacterial properties of probiotics bacterial isolated from human breast milk. *WNOFNS.* 29: 290-297 (2020)

Braňek OB, Smaoui S. *Enterococci*: Between emerging pathogens and potential probiotics. *Biomed. Res. Int.* 2019: 1-13 (2019)

Brunel AS, Guery B. Multidrug resistant (or antimicrobial-resistant) pathogens-alternatives to new antibiotics? *Swiss Med. Wkly.* 147: w14553 (2017)

Byakika S, Mukisa IM, Mugabi R, Muyanja C. Antimicrobial activity of lactic acid bacteria starters against acid tolerant, antibiotic resistant, and potentially virulent *E. coli* isolated from a fermented sorghum-millet beverage. *Int. J. Microbiol.* 2019: 2013539 (2019)

Cleveland J, Montville TJ, Nes IF, Chikindas M. Bacteriocins: safe, natural antimicrobials for food preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 71: 1-20 (2001)

Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 11th ed. Replaces M07-A10 (2018)

Dabek M, McCrae SI, Stevens VJ, Duncan SH, Louis P. Distribution of β -glucosidase and β -glucuronidase activity and of β -glucuronidase gene gus in human colonic bacteria. *FEMS Microbiology Ecology.* 66: 487-495 (2008)

De Kwaadsteniet M, Todorov SD, Knoetze H, Dicks LMT. Characterization of a 3944 Da bacteriocin, produced by *Enterococcus mundtii* ST15, with activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* 105: 433-44 (2005)

Ferchichi M, Sebei K, Boukerb AM, Karray-Bourouai N, Chevalier S, Feuilloy MGJ, Connil N, Zommiti M. *Enterococcus* spp.: Is it a bad choice for a good use—a conundrum to solve? *Microorganisms.* 9: 2222 (2021)

Hanchi H, Mottawea W, Sebei K, Hammami R. The genus *Enterococcus*: Between probiotic potential and safety concerns—An update. *Front. Microbiol.* 9: 1791 (2018)

Henning C, Gautam D, Muriana P. Identification of multiple bacteriocins in *Enterococcus* spp. using an *Enterococcus*-specific bacteriocin PCR array. *Microorganisms* 3: 1-16 (2015)

Huang MS, Cheng CC, Tseng SY, Lin YL, Lo HM, Chen PW. Most commensally bacterial strains in human milk of healthy mothers display multiple antibiotic resistance. *Microbiologyopen.* 8: e00618 (2019)

Hunt KM, Foster JA, Forney LJ, Schütte UME, Beck DL, Abdo Z, Fox LK, Williams JE, McGuire MK, McGuire MA. Characterization of the diversity and temporal stability of bacterial communities in human milk. *PLoS One.* 6: e21313 (2011)

Izquierdo E, Bednarczyk A, Schaeffer C, Cai Y, Marchioni E, Dorselaer AV, Ennahar S. Production of enterocins L50A, L50B, and IT, a new enterocin, by *Enterococcus faecium* IT62, a strain isolated from Italian ryegrass in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1917-23 (2008)

Jimenez E, Delgado S, Fernandez L, Garcia N, Albuja M, Gomez A, Rodriguez JM. Assessment of the bacterial diversity of human colostrum and screening of *Staphylococcal* and *Enterococcal* populations for potential virulence factors. *Research in Microbiology.* 159: 595-601 (2008)

Jose NM, Bunt CR, Hussain MA. Comparison of microbiological and probiotic characteristics of *Lactobacilli* isolates from dairy food products and animal rumen contents. *Microorganisms.* 3: 198-212 (2015)

Kumar M, Srivastava S. Antilisterial activity of a broad-spectrum bacteriocin, enterocin LR/6 from *Enterococcus faecium* LR/6. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 162: 698-706 (2009)

- Line JE, Svetoch EA, Eruslanov BV, Perelygin VV, Mitsevich EV, Mitsevich IP, Levchuk VP, Svetoch OE, Seal BS, Siragusa GR, Stern NJ. Isolation and purification of enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52: 1094-1100 (2008)
- Liu G, Ren L, Song Z, Wang C, Sun B. Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium animalis* BB04 from centenarians' intestine. *Food Control.* 50: 889-895 (2015)
- Martín R, Langa S, Reviriego C, Jiménez E, Marín M L, Olivares, Julio B, Jesús J, Leonides, F, Jordi X, Juan M. The commensal microflora of human milk: new perspectives for food bacteriotherapy and probiotics. *Trends Food Sci. Tech.* 15.3-4: 121-127 (2004)
- Mezaini A, Chihib NE, Bouras AD, Nedjar-arroume N, Hornez JP. Antibacterial activity of some lactic acid bacteria isolated from an algerian dairy product. *J. Environ. Public Health.* 2009: 678495 (2009)
- Miller WR, Munita JM, Arias CA. Mechanisms of antibiotic resistance in *enterococci*. *Expert Rev. Anti. Infect. Ther.* 12: 1221-1236 (2015)
- Ouwehand AC, Salminen S, Isolauri E. Probiotics: an overview of beneficial effects. *Antonie van Leeuwenhoek.* 82: 279-289 (2002)
- Phumisantiphong U, Siripanichgon K, Reamtong O, Diraphat P. A novel bacteriocin from *Enterococcus faecalis* 478 exhibits a potent activity against vancomycin-resistant enterococci. *PLoS One.* 12: e0186415 (2017)
- Rahmani M, Saffari F, Aboubakri O, Mansouri S. *Enterococci* from breast-fed infants exert higher antibacterial effects than those from adults: A comparative study. *Hum. Microbiome J.* 17: 100072 (2020)
- Salminen S, Ouwehand ACO, Isolauri E. Clinical applications of probiotic bacteria. *Int. Dairy Journal.* 8: 563-572 (1998)
- Vivas R, Teixeira-Barbosa AA, Dolabela SS, Jain S. Multidrug-resistant bacteria and alternative methods to control them: An overview. *Microb. Drug Resist.* 25: 1-19 (2019)
- Wiegand I, Hilpert K, Hancock RE. Agar and broth dilution methods to determine the minimal inhibitory concentration (MIC) of antimicrobial substances. *Nature protocols.* 3.2: 163-175 (2008)
- Yasir M, Dutta D, Wilcox MDP. Mode of action of the antimicrobial peptide Mel4 is independent of *Staphylococcus aureus* cell membrane permeability. *PLoS One.* 14: e0215703 (2019)
- Yoon SH, Ha SM, Kwon S, Lim J, Kim Y, Seo H, Chun J. Introducing EzBioCloud: A taxonomically united database of 16S rRNA and whole genome assemblies. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 67: 1613-1617 (2017)
- Zhang F, Jiang M, Wan C, Chen X, Chen X, Tao X, Shah NP, Wei H. Screening probiotic strains for safety: Evaluation of virulence and antimicrobial susceptibility of *enterococci* from healthy Chinese infants. *J. Dairy Sci.* 99: 1-9 (2016)