

콩발효식품에서의 장구균과 항생제 내성특성

강태미 · 박종현[†]

가천대학교 식품생물공학과

Isolation and Antibiotic Susceptibility of *Enterococcus* spp. from Fermented Soy Paste

Tae-Mi Kang and Jong-Hyun Park[†]

Dept. of Food Science and Biotechnology, Gachon University, Gyeonggi-do 461-701, Korea

Abstract

To evaluate the antibiotic risk of *Enterococcus* in fermented soy paste, *Enterococcus* spp. were isolated and identified from 31 *Cheongkukjang* and 17 *Doenjang* samples. Exactly 123 *Enterococcus* spp., 119 from *Cheongkukjang* and four from *Doenjang*, were ultimately isolated. The most frequently collected *Enterococcus* isolates in *Cheongkukjang* were 69 strains of *E. faecium* and 20 strains of *E. faecalis*. All four *Enterococcus* spp. from *Doenjang* were identified as *E. faecium*. All isolates were sensitive to ampicillin, chloramphenicol, penicillin, and tetracycline. However, they showed broad spectra from sensitivity to resistance to erythromycin, ripampin, and streptomycin. Vancomycin minimum inhibition concentration (MIC) of *Enterococcus* spp. from *Cheongkukjang* ranged from 0.25 to 8 µg/mL. Almost all strains were sensitive to vancomycin, but eight strains showed intermediate resistance to vancomycin. Seventeen strains showing the highest MIC of 8 µg/mL among all isolates were evenly distributed among *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, and *E. casseliflavus*, in which the strong resistant genes of *vanA* and *vanB* for vancomycin were not detected. Overall antibiotic resistance of *Enterococcus* isolates was relatively low and particularly low vancomycin resistance was similar to those of *Enterococcus* isolates obtained from other foods. Therefore, the antibiotics resistance of *Enterococcus* and especially vancomycin-resistant *Enterococcus* spp. from *Cheongkukjang* and *Doenjang* is not hazardous.

Key words: *Enterococcus*, *Cheongkukjang*, *Doenjang*, antibiotic resistance, vancomycin

서 론

장구균 *Enterococcus*는 대부분의 포유동물과 조류의 장내 정상 세균총이며, 동물과 사람의 분변으로부터 배출되어 환경에 존재하는 가장 일반적인 세균 중의 하나이다. 중요한 특징은 환경으로 배출되는 다른 분변 내 세균과는 달리, 화학적 및 물리적 요인에 저항성이 강하여 숙주의 장내환경 밖에서도 오랫동안 생존할 수 있다(1). 장구균은 고병원성균은 아니지만 다양한 독소 인자들이 병원성에 관여되는 것으로 보고되고 있다. 대표적인 장구균의 독소 인자로는 cytolysin(hemolysin), aggregation substance, pheromone, lipoteichoic acid, protease(gelatinase), hyaluronidase, bacteriocin 등이 있다(2). 또한 장구균은 여러 항균제에 대해서 내성을 나타내기 때문에 항균제 치료를 받고 있는 환자들에게서 쉽게 생존하고 번식할 수 있다. 따라서 광범위 항균제를 투여 받은 면역저하 환자에게서 각종 기회감염을 유발할 수 있고, 높은 치사율을 보이는 것으로 알려져 있다.

1992년 미국의 National Nosocomial Infection Survey를

근거로 한 보고에 의하면 병원 감염 원인균 중 장구균의 발생 빈도가 12%로 *Escherichia coli*(16%) 다음으로 빈도를 보인다고 보고하였다(3,4). 장구균은 인체의 구강, 담도 및 질 등의 부위에 집락을 형성할 수 있으며, 장구균이 일으키는 감염증은 심내막염, 복강 내 감염, 요도감염 및 균혈증 등이고, *E. faecalis*의 감염이 80% 이상을 차지하고 있다(5). 장구균의 균종별 분리빈도는 *E. faecalis*가 80~90%, *E. faecium*이 5~10%이고, 나머지는 그 이외의 기타 장구균이 차지하는 것으로 알려져 있으나, 항균제 사용빈도의 증가와 약제 내성균의 증가로 최근에는 균종별 분리빈도가 변화되고 있는 것으로 보고되고 있다(6,7). 즉, 1990년대 이후에는 *E. faecium*의 분리빈도가 증가하는 추세에 있으며, *E. faecalis*와 *E. faecium* 이외의 균종들도 각종 감염병을 유발하는 것으로 보고되고 있다(8,9).

장구균의 가장 중요한 특징 중 하나는 그람 양성균 감염증 치료에 흔히 사용되는 각종 항생제에 대해 상대적인 또는 절대적인 내성을 보인다는 것이다. 염색체 내에 내재되어 있는 내인성 내성 이외에도 plasmid와 transposon 내에 암

[†]Corresponding author. E-mail: p5062@gachon.ac.kr
Phone: 82-31-750-5523, Fax: 82-31-750-5273

호화되어 있는 유전자의 획득으로 다양한 항생제에 대하여 새로운 내성을 보이는 이차적 획득 내성을 나타낸다(6). 장구균의 감염이 증가됨에 따라, β -lactam계와 aminoglycoside계 항균제에 대한 내성이 장구균에 널리 퍼져 있음이 알려졌다. Vancomycin은 β -lactam계 항균제에 과민반응을 갖고 있거나 β -lactam계 항균제에 내성이 있는 장구균 치료에 사용되어지고 있는데, 영국에서 vancomycin 내성 장구균(VRE) *E. faecalis*와 *E. faecium*을 최초로 분리 보고한 이래, 전 세계에 걸쳐 많은 VRE감염이 보고되었다(10,11). 미국의 경우, 병원 내 감염 장구균 중 VRE의 비중은 1989년 0.3%에서 1993년 7.9%로 급격한 증가를 보였으며(12), VRE 감염이 증가함에 미국 CDC는 VRE 전파방지를 위한 지침을 마련하였다(13).

VRE는 vancomycin과 teicoplanin에 대한 내성 정도와 이들 항생제에 의한 내성 유도 여부에 따라 VanA, VanB, VanC, VanD 및 VacE의 표현형으로 나누어진다(14,15). VanA형과 VanB형은 주로 *E. faecalis*와 *E. faecium*에서 발견되며 plasmid를 통해 전파될 수 있고, 집단 감염을 일으킬 수 있으므로 감염관리가 필요하다(16). 이에 반해, 저농도 vancomycin에 내성을 갖는 VanC형은 운동성을 가진 장구균이 본래 가지고 있는 특성이며, VacC1형에는 *E. gallinarum*, VanC2형에는 *E. casseliflavus*, VanC3형에는 *E. flavescens*가 있다(17).

환경 중에 널리 분포되어 있는 장구균은 개인이나 국가에 따라 *E. faecalis*보다 *E. faecium*이 많기도 하지만 사람 장내의 주된 *Enterococcus* 종은 *E. faecalis*이다. 그러나 Mundt 등(18)은 많은 식품에 존재하는 일반적인 *E. faecalis*가 분변으로부터 직접적인 오염과 항상 관련되어 있는 것은 아니라고 하였다. 1992년 EU에서는 위생지표로서 coliform과 *E. coli*의 최대 수준을 확정하였지만, 장구균에 대해서는 제한을 두지 않았다(19). 더욱이 장구균은 식품산업에서 위생 지표로 중요성이 크지 않은 것으로 보인다. 그러나 장구균의 살균온도에 대한 저항성과 다른 기질에 대한 적응성 그리고 생육 조건은 원료로부터 가공된 식품에서 뿐만 아니라 가열 처리된 식품에서도 장구균이 생존할 수 있다. 또한 장구균은 식품의 가공 중에도 오염될 수 있기 때문에 식품 중 장구균의 관리가 중요한 부분이 되어야 한다는 것을 알 수 있다.

일반적으로 장구균은 채소와 올리브, 식물소재 등에서 많이 존재한다(20-22). 그러나 이와 같은 원료에서의 장구균의 분리와 특성에 관한 보고서가 부족한 실정이다. Ben Omar 등(23)은 스페인 식품으로부터 50개의 *Enterococcus* 균 집락을 분리하여 기능적 특성과 독성특성, 그리고 항생제 내성에 대한 연구를 하였으며 국내에서 Kang 등(24)과 Kim 등(25)이 신선채소, 가공곡류식품에서 분리하고 특성을 보고하였다.

최근 들어, 웰빙문화와 개인건강유지가 사회적 화두로 떠오르면서 소비자들은 특별한 열처리가 필요 없거나 간단한 열처리 등으로 최소 가공된 ready-to-eat food를 선호하는

경향이 증가하고 있다(26). 이와 같이 발효식품의 종류로 많이 사용되고 있지만 장구균은 자연환경에 널리 분포하고 있으며, 잠재적 병원성을 지니고 있다. 더욱이 VRE의 증가가 큰 문제로 대두되고 있으나 식품 중 장구균에 대한 연구가 많이 이루어지지 않고 있다.

따라서 본 연구는 우리의 기초식품인 청국장과 된장에 존재하는 *Enterococcus* spp.의 균종의 분포와 분리균의 항생제 감수성을 조사하여 유해여부를 판단하고자 하였다.

재료 및 방법

사용균주와 재료수집 및 전처리

국내 대형마트에서 유통되는 청국장 31종, 된장 17종 등 총 48종의 시료에서 *Enterococcus*를 분리하였다. 생화학적 특성을 확인하기 위하여 사용된 표준균주로는 *E. faecalis* KCTC 2011, *E. faecium* KCCM 12118을 사용하였다. 모든 시료는 clean bench에서 무균적으로 처리되었으며, 모든 검체를 다룰 때에는 멸균한 시약스푼, 가위, 칼을 이용하였다. 채취한 시료 25 g을 취하여 멸균백에 0.85% 멸균생리식염수와 같이 넣고 120초 동안 stomaker(IUL, Barcelona, Spain)를 이용하여 균질화한 후 1 mL을 시험 검액으로 사용하였고 실험과정에서 사용되는 배지 및 기구는 121°C에서 가압 멸균하여 사용하였다.

일반세균수 측정

잘 섞은 시료 1 g을 취하여 9 mL 0.85% 멸균생리식염수 용액에 넣어 10진 희석한 후 Plate Count Agar(PCA, Oxoid Ltd., Hampshire, England)를 분주 도말하여 37°C, 24시간 배양한 후 집락을 계수하였다.

Enterococcus 분리와 동정

잘 섞은 시료 1 g을 9 mL 0.85% 생리식염수 용액에 넣어 10진 희석하여 *Enterococcus* 선택배지인 Enterococcus agar(Difco, Bercon, Dickinson and Company, Sparks, MD, USA)에 분주 도말하여 37°C에서 24~72시간 배양한 후 검은색 집락 중 대표적인 것을 분리하여 동정하였다.

Enterococcus agar에서 검은색 집락을 분리하여 5% 면양혈액이 첨가된 tryptic soy agar(Difco)에 배양 후 그람양성 구균의 균주만을 선별하여 45°C에서의 생육여부, 6.5% NaCl 존재하의 생육, catalase 생성유무를 분석하였다. 45°C에서의 배양성은 시험하려는 균을 nutrient agar(Difco)에 접종하고 45±0.5°C에 24시간 동안 배양한 후 성장여부를 관찰하였으며, 6.5% NaCl 저항성은 시험하려는 균은 6.5% NaCl이 첨가된 nutrient agar에 접종하여 37±0.5°C에 24시간 동안 배양한 후 성장여부를 분석하였다. 아울러 *Enterococcus*에 특이적 primer인 Ent1(5'-TAC TGA CAA ACC ATT CAT GAT G-3')과 Ent2(5'-AAC TTC GTC AAC GCG AAC-3')를 이용하여 PCR로 속(genus)을 동정하였다

(27-29). 그리고 API 20 Strep kit(bioMericeux, Marcy I'Etoile, France)와 자동화 미생물 동정장치인 Vitek II(bio-Mericeux)의 결과를 종합하여 *Enterococcus*의 종(species)을 동정하였다.

항생제 감수성 측정

분리한 *Enterococcus*의 항생제 감수성은 disk diffusion test와 한천 희석방법을 이용하여 수행하였다(30). 대상 항생제는 National Committee for Clinical Laboratory Standards(NCCLS)에서 *Enterococcus*의 항생제 검사로 추천된 vancomycin, penicillin, chloramphenicol, tetracycline, rifampicin, streptomycin, ampicillin과 erythromycin을 사용하였다(31). Muller-Hilton(MH) broth(Oxoid)에서 배양된 배양액을 MH 한천배지에 항생제를 단계별로 희석하여 첨가한 배지에 점종기구를 이용하여 점종한 후 37°C에서 24시간 배양하였다. 최소생육저해농도(minimum inhibitory concentration, MIC)는 각각의 항생제가 첨가된 배지에서 균주가 증식하지 않는 최소농도로 결정하였다. 또한 disk diffusion test를 위해서는 MH에서 전배양된 분리균주를 MH 한천배지 위의 disk에 분주하여 37°C에서 24시간 배양하였다.

Multiplex PCR에 의한 vancomycin 유전자 검출

실험에서 사용한 6개의 oligonucleotide primers는 Dutka-Malen 등(32)의 *vanA*, *vanB*, *varC1*, *varC2*를 사용하였다. TSA(Difco)에 *Enterococcus*를 37°C에서 18시간 배양하였다. 배양된 *Enterococcus*를 Accuprep® genomic DNA extraction kit(Bioneer, Daejeon, Korea)로 genomic DNA를 정제하였다. 정제된 template DNA를 Gene cycler(Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA)를 이용하여 증폭하였다. Multiplex PCR 증폭산물은 전기영동한 후 UV transilluminator (Seolin Biotech, Suwon, Korea)에서 결과를 확인하였다.

결과 및 고찰

청국장과 된장의 일반세균수

한국에서 주요 콩 발효식품인 청국장은 평균 9 log CFU/g 이상의 일반세균이 검출되었으며, 된장은 그보다 2 log CFU/g 낮은 7 log CFU/g 검출되었다. 청국장이 된장보다 2 log CFU/g 정도 더 많은 세균이 존재하는 것으로 나타났다(Table 1). 일반적으로 이들 식품에 대한 일반세균의 미생물 개별 기준규격은 없고 *Bacillus cereus*와 *Clostridium perfringens*에 대한 규격만이 제시되어 있다(33). Yoon(34)에 의하면 청국장은 8.0~9.1 log CFU/g, 된장의 7.8~8.9 log

Table 1. Total aerobic mesophilic count of fermented soy paste

Sample (No.)	Total aerobic mesophilic bacteria (log CFU/g)		
	Mean	Minimum	Maximum
<i>Cheongkukjang</i> (31)	9.03±1.23	7.30	11.12
<i>Doenjang</i> (17)	7.71±0.93	6.00	9.08

CFU/g 정도의 총 균수가 보고되어 있으며 분석된 청국장과 된장에는 이와 비슷한 미생물이 함유되어 있는 것으로 나타났다.

Enterococcus spp. 분리와 동정

Enterococcus agar에서 검은색 집락을 선택하여 45°C에서의 생육, 6.5% NaCl 존재하의 생육, catalase 생성유무를 확인한 후 *Enterococcus*에 특이적 primer인 Ent1, Ent2를 이용하여 PCR을 수행하였다(Table 2). 종(species)의 동정을 위해서는 VitekII과 API 20 strep kit의 결과를 종합하여 분리한 *Enterococcus*를 동정하였다. 청국장 31개 모든 시료로부터 *Enterococcus*를 분리하였으며 *Enterococcus*이 평균 5 log CFU/g 이상이 존재하였다. 한편 된장에서는 17개 시료 중에서 2개 제품(12%)에서만 *Enterococcus*를 분리하였고 평균 0.3 log CFU/g이 존재하였다. 청국장에서는 매우 높은 *Enterococcus*가 존재하고 있으며 다양한 *Enterococcus*를 분리할 수가 있었다. 그러나 된장의 경우에는 *Enterococcus*가 아주 적게 함유되어 있음을 알 수가 있었다.

이들 청국장 시료에서 *Enterococcus* 119균주를 분리할 수가 있었다. 이들은 *E. faecium* 69균주(58%), *E. faecalis* 20균주(16.8%), *E. gallinarum* 7균주(5.9%), *E. casseliflavus* 11균주(9.2%) 등으로 동정되었으며, 동정이 되지 않는 *Enterococcus*는 12균주(10.1%)로 나타났다. 된장 2개의 시료에서 *Enterococcus* 4균주를 분리하였고 이들은 모두 *E. faecium*으로 동정되었다. 콩 발효식품인 청국장과 된장에서는 *E. faecium*이 우점종이었고 다음으로 *E. faecalis*가 주류를 이루고 있었다.

동물유래의 식품에서 분리되는 *Enterococcus*는 *E. faecalis*가 *E. faecium*보다 더 많이 검출되는 것으로 보고되었다(35). Klein 등(36)은 쇠고기와 돼지고기 111군에서 *Enterococcus*를 분리한 결과, *E. faecium*이 90%로 가장 많이 검출되었으며, Stobbering 등(11)은 칠면조에서 주로 *E. faecium*과 *E. faecalis* 등을 검출하였다. Cho 등(37)이 동물로부터 *Enterococcus*를 분리한 결과 *E. faecium*이 29%로 검출되었으며, 소에서는 *E. hirae*가, 돼지와 닭에서는 *E. faecalis* 그리고 개에서는 *E. faecium*이 가장 많이 검출하였다. 동물 유래

Table 2. Prevalence and isolation of *Enterococcus* spp. from fermented soy pastes

Sample	<i>Enterococcus</i> sample No. (%)	Isolated <i>Enterococcus</i> spp.	Total <i>Enterococcus</i> No. (log CFU/g)		
			Mean	Minimum	Maximum
<i>Cheongkukjang</i>	31/31 (100)	119	5.95±1.60	3.51	8.46
<i>Doenjang</i>	2/17 (12)	4	0.39±1.10	0	3.48

*Enterococcus*와는 달리 Randazzo 등(38)은 올리브에서 *E. faecium*, *E. casseliflavus*, *E. hirae* 등을 검출하였다. 그러나 샐러드, 새싹채소 신선식품 등의 최소가공식품 및 ready-to-eat foods와 식물성 발효식품에서의 *Enterococcus*의 오염분석에 대한 연구가 많이 보고되어 있지 않다. 샐러드와 새싹채소에서는 *E. casseliflavus*가 각각 52.3%와 54.5%로 가장 많이 검출(39)되었으며, 조제분유, 이유식에서는 *E. faecium*이 각각 95.9%와 92.3%로 가장 많이 검출되었다. 따라서 동물 및 발효식품에서는 *E. faecium*과 *E. faecalis*가 주로 검출되고 신선채소류는 *E. casseliflavus* 등이 주종을 이루고 있어 식품의 원료에 따라 *Enterococcus*의 분포가 상이한 것으로 보인다. 따라서 동식물 가공식품에서는 신선채소류과 달리 환경 stress에 강한 내성을 가지는 *E. faecium*과 *E. faecalis*가 우점종으로 존재하게 되는 것으로 보인다.

분리 *Enterococcus* spp.의 항생제 감수성 특성

Ampicillin, chloramphenicol, erythromycin, penicillin, rifampin, streptomycin, tetracycline, vancomycin에 대한 청국장과 된장 유래 *Enterococcus*의 감수성을 NCCLS의 disk diffusion method로 분석하였다(31)(Table 3~5). 총 분

리균주 123개 *Enterococcus*는 ampicillin, chloramphenicol, penicillin, tetracycline에 내성이 낮게 나타났다. Penicillin 저농도 내성 *E. faecalis*와 *E. faecium*은 본래 penicillin에 낮은 친화도를 갖는 penicillin-binding protein(PBP5) 때문에 penicillin에 민감성을 갖는다(40). *Enterococcus*의 고농도 penicillin 내성은 PBP5의 과잉 생성과 PBP5에서 아미노산이 치환되는 것과 관련이 있으며, *E. faecium*에서 가장 많이 관찰된다고 한다. 그리고 erythromycin, ripampin, streptomycin 등에서는 *Enterococcus*가 내성이 있는 것으로부터 민감성이 있는 것까지 다양하게 분포하였다. Erythromycin은 중간정도의 내성균주가 많았고 ripampin의 경우는 고르게 분포되었으나 streptomycin은 내성균주가 제일 많았다. 그런데 가장 강력한 항생제인 vancomycin에 중간정도의 내성을 보이는 균주가 청국장에서 검출되었으나 이 정도의 내성은 청국장의 안전성에는 문제가 되지 않을 것으로 보인다. Ripampin에 내성을 보이는 균종은 주로 *E. faecalis*, *E. faecium* 등에서 보였고 MIC 64 µg/mL 이상의 내성을 보여 주었으며 streptomycin도 비슷한 경향을 보여 주었다.

Klare 등(41)은 동물 유래 vancomycin 내성 *E. faecium*

Table 3. Antibiotic susceptibility of *Enterococcus* spp. from fermented soy pastes

Sample (Isolated <i>Enterococcus</i> spp.)	Susceptibility level ¹⁾	Ratio of susceptibility to each antibiotics (%)								
		A ²⁾	C	E	P	R	S	T	V	
Cheongkukjang (119)	S	100	98.3	12.6	100	35.3	7.6	94.1	93.3	
	I	0	1.7	65.6	0	25.2	37	0	6.7	
	R	0	0	21.8	0	39.5	55.4	5.9	0	
Doenjang (4)	S	100	100	0	100	0	0	100	100	
	I	0	0	75	0	0	0	0	0	
	R	0	0	25	0	100	100	0	0	

¹⁾S, sensitive; I, intermediate; R, resistant.

²⁾A, ampicillin; C, chloramphenicol; E, erythromycin; P, penicillin; R, rifampin; S, streptomycin; T, tetracycline; V, vancomycin.

Table 4. Minimum inhibitory concentrations of *Enterococcus* spp. on rifampin from fermented soy pastes

Sample	Species (Isolated No.)	Strain distribution at each MIC (µg/mL)										Range
		0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64	>64	
Cheongkukjang	<i>E. faecalis</i> (20)					4	1	8	5	2		4~64
	<i>E. faecium</i> (69)	15	1	2		4	10	15	12	9	1	0.25~>64
	<i>E. gallinarum</i> (7)	2		1		1		2		1		0.25~64
	<i>E. casseliflavus</i> (11)	6	1			1		1	2			0.25~32
	N.D ¹⁾ (12)	3	1		1		2	5				0.25~16
Doenjang	<i>E. faecium</i> (4)								1	1	2	32~>64

¹⁾N.D indicates the unidentified *Enterococcus*.

Table 5. Minimum inhibitory concentrations of *Enterococcus* spp. on streptomycin from fermented soy pastes

Sample	Species (Isolated No.)	Strain distribution at each MIC (µg/mL)									Range	
		0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	64		>64
Cheongkukjang	<i>E. faecalis</i> (20)							1		4	15	16~>64
	<i>E. faecium</i> (69)				1			4	35	25	4	2~>64
	<i>E. gallinarum</i> (7)							1	6			16~32
	<i>E. casseliflavus</i> (11)							9	1	1		16~64
	N.D ¹⁾ (12)							3	4	3	2	16~>64
Doenjang	<i>E. faecium</i> (4)									3	1	64~>64

¹⁾N.D indicates the unidentified *Enterococcus*.

Table 6. Minimum inhibitory concentrations of *Enterococcus* spp. on vancomycin from fermented soy pastes

Sample	Species (Isolated No.)	Strain distribution at each MIC ($\mu\text{g/mL}$)								Range
		0.25	0.5	1	2	4	8	16	32	
Cheongkukjang	<i>E. faecalis</i> (20)			3	9	7	1			1~8
	<i>E. faecium</i> (69)	2	5	47	6	5	4			0.25~8
	<i>E. gallinarum</i> (7)			1	1	3	2			1~8
	<i>E. casseliflavus</i> (11)	1		1			9			0.25~8
	N.D ¹⁾ (12)	4		4	2	1	1			0.25~8
Doenjang	<i>E. faecium</i> (4)			4						1

¹⁾N.D indicates the unidentified *Enterococcus*.

8균주의 항생제 감수성 결과, penicillin에는 내성, chloramphenicol과 rifampin에는 민감성을 나타냄을 확인하였다. 쇠고기와 돼지고기에서 분리한 *Enterococcus*의 항생제 감수성 검사결과, penicillin, tetracycline, ciprofloxacin, chloramphenicol 및 rifampin에 민감성을 보였다(1). 그리고 Pavia 등(42)이 소, 닭, 칠면조, 양 및 돼지 등의 고기에서 분리한 *Enterococcus*의 항생제 감수성 결과, 민감성이 있는 항생제는 ampicillin과 rifampin이었으며, 대부분이 tetracycline에 내성을 보였다.

그러므로 각각의 지역과 분리식품에 따라 *Enterococcus*의 항생제 감수성에 차이를 보이는 것은 *Enterococcus*가 항생제에 노출된 정도와 사용된 항생제 사용실태에 따른 차이에 기인한 것으로 보인다.

분리 *Enterococcus* spp.의 vancomycin MIC와 vancomycin 내성유전자

Vancomycin-resistant *Enterococcus*(VRE)는 VanA, VanB, VanC, VanD 및 VanE의 5가지 표현형이 있는데, VanA형은 *E. faecalis*와 *E. faecium*에 흔하며, 고농도의 vancomycin(MIC, 64~1,000 $\mu\text{g/mL}$)에 내성을 보이며, VanB형은 VanA 형과는 달리 vancomycin에 대해서 다양한 범위의 내성(MIC, 4~1,000 $\mu\text{g/mL}$)을 보인다. VanC형은 *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* 및 *E. flavescens*에서 관찰되는데, 최근 보고된 VanE형과 함께 vancomycin에 대해서 저농도 내성(MIC, 4~32 $\mu\text{g/mL}$)을 나타낸다(43).

청국장에서 분리된 *Enterococcus*의 vancomycin MIC 범위는 0.25~8 $\mu\text{g/mL}$ 로 나타났으며, 119균주 중 *E. faecalis* 8균주, *E. faecium* 9균주, *E. gallinarum* 5균주, *E. casseliflavus* 9균주, *Enterococcus* spp. 2균주가 MIC 8 $\mu\text{g/mL}$ 의 저농도 내성(27.7%)을 보였다(Table 6). 된장에서 분리된 *E. faecium* 4균주가 모두 vancomycin에 민감성을 보여 주었다. 비롯 MIC 8 $\mu\text{g/mL}$ 정도의 낮은 내성이지만 특정 종에 한정되어 있지 않고 *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* 등에 고르게 분포되어 있음을 알 수가 있었다. 이들 17종의 저농도 vancomycin 내성 *Enterococcus*의 내성 유전자형 구별을 신속하게 하기 위하여 *Enterococcus*의 vancomycin 내성 유전자의 primer로 *vanA*, *vanB*, *vanC1* 및 *vanC2*의 유전자 검출을 동시에 할 수 있는 multiplex PCR 기법을 수행하였다. 이 내성균주 중 11균주가 439 bp 크기의

vanC2 유전자 증폭산물을 확인하였다. 그리고 7균주는 882 bp 크기의 *vanC1* 유전자 증폭산물을 확인할 수 있었는데 *vanC1*과 *vanC2*는 vancomycin에 대해 저농도 내성을 나타내는 유전자이며, 저농도 내성을 가진 분리균들을 확인할 수 있었다. 모든 분리균주에서 고농도 vancomycin 내성 유전자인 *vanA*와 *vanB*는 검출되지 않았다(Fig. 1).

Chadwick 등(44)은 닭과 돼지고기 및 쇠고기에서 VRE를 분리하였으며, 식품유통을 거쳐 *vanA* 유전자가 전이될 수 있을 것이라 하였다. 또한 VRE는 농가의 동물이나 조리지 않은 닭에서도 Bates 등(45)에 의해 분리되었으며, 환자의 피와 소변에서 분리한 VRE와 같은 ribotyping 패턴을 갖고 있었다. Klein 등(36)이 쇠고기와 돼지고기에서 분리한 *Enterococcus* 중 0.5%가 VRE이며, 임상분리균과 다른 항생제 내성양상을 발견하였다고 하였다. 국내의 경우에는 1997년 이후 동물 유래 VRE의 분리 보고가 있었다. Seo 등(46)은 1999년에 돼지와 닭 분변 1,091 중 닭 분변에서 11주의 VRE를 보고하였다. Cho 등(47)은 소, 돼지, 닭 및 개 등의 분변에서 분리한 *Enterococcus* 122개 균주 중 고농도 vancomycin 내성 균주는 없었으나, 저농도 vancomycin 내성을 보이는 *E. gallinarum*과 *E. casseliflavus* 등을 분리하였다. *Enterococcus*는 자연환경에 널리 분포하고 있는 만큼 이러한 농축산 식품에는 VRE가 존재할 수 있으나 본 연구의 결과 이들 청국장, 된장 등 콩 발효식품에서 분리된 *Enterococcus*

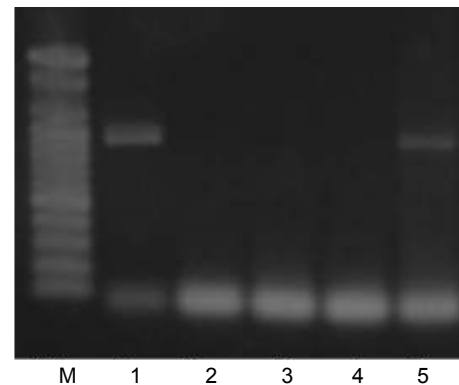


Fig. 1. Vancomycin gene analysis of isolated *Enterococcus* from Cheongkukjang with *vanA*, *vanB*, *vanC1*, and *vanC2* primers by multiplex PCR. Lanes: M, 100 bp DNA ladder marker; 1 and 5, *Enterococcus vanC1* strain; 2~4, non-*van* gene harboring *Enterococcus* spp.

는 vancomycin에 대한 내성정도가 높지 않아 안전성이 있는 것으로 보인다.

요 약

콩 발효식품인 청국장과 된장에서 분리한 *Enterococcus* 의 항생제 내성을 평가하고자 31개의 청국장과 17개의 된장 으로부터 *Enterococcus*를 분리, 동정한 후 항생제 내성특성을 분석하였다. 모든 청국장 시료에서 119균주, 된장시료에서 4균주, 총 123개의 *Enterococcus*를 분리하였고 가장 많이 분리된 종은 청국장에서는 *E. faecium* 69균주, *E. faecalis* 20균주 등이며 된장시료에서 분리한 4균주는 모두 *E. faecium*으로 동정되었다. 총 123개의 *Enterococcus*는 ampicillin, chloramphenicol, penicillin, tetracycline에 내성이 낮게 나타났다. 그리고 erythromycin, ripampin, streptomycin 등에게는 내성이 높은 것으로부터 민감성이 있는 것까지 다양하게 분포하였다. 청국장에서 분리된 *Enterococcus*의 vancomycin MIC 범위는 0.25~8 µg/mL로 나타났으며, MIC 8 µg/mL 정도의 낮은 내성균 17균주가 *E. faecalis*, *E. faecium*, *E. gallinarum*, *E. casseliflavus* 등에 고르게 분포되어 있음을 알 수가 있었다. 모든 분리균주에서 고농도 vancomycin 내성유전자인 *vanA*, *vanB*는 검출되지 않았다. 본 연구의 결과 *Enterococcus*는 자연환경에 널리 분포하고 있는 만큼 가공식품에는 항생제 내성균주와 vancomycin-resistant *Enterococcus*가 존재할 수 있으나 이들 청국장, 된장 등의 콩 발효식품 *Enterococcus*에는 주요 항생제에 내성정도가 높지 않아 항생제 안전성이 있는 것으로 보인다.

감사의 글

본 연구는 2012년도 가천대학교 학술연구비 지원에 의한 결과이며 이에 감사드립니다.

문 헌

1. Kuhn I, Iversen A, Burman LG, Olsson-Liljequist B, Franklin A, Finn M, Aarestrup F, Seyfarth AM, Blanch AR, Taylor H, Caplin J, Moreno MA, Dominguez L, Mollby R. 2000. Epidemiology and ecology of enterococci, with special reference to antibiotic resistant strains, in animals, humans and the environment. Example of an ongoing project within the European research programme. *Inter J Antimicrob Agents* 14: 337-342.
2. Jett BD, Huycke MM, Gilmore MS. 1994. Virulence of enterococci. *Clin Microbiol Rev* 7: 462-478.
3. Moellering RC. 1992. Emergence of *Enterococcus* as a significant pathogen. *Clin Infect Dis* 14: 1173-1178.
4. Linden PK, Miller CB. 1999. Vancomycin-resistant enterococci: the clinical effect of a common nosocomial pathogen. *Diagn Micro Infect* 33: 113-120.
5. Gin AS, Zhanel GG. 1996. Vancomycin-resistant enterococci.

- Annals Pharmacother* 30: 615-624.
6. Murray BE. 1990. The life and times of *Enterococcus*. *Clin Microbiol Rev* 3: 46-65.
7. Schaberg DR, Culver DH, Gaynes RP. 1991. Major trends in the microbial etiology of nosocomial infection. *Am J Med* 912: 72S-75S.
8. Sternm CS, Carvalho Mda G, Teixeira LM. 1994. Characterization of enterococci isolated from human and nonhuman sources in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis* 20: 61-67.
9. Iwen PC, Kelly DM, Linder J, Hinrichs SH, Dominguez EA, Rupp ME, Patil KD. 1997. Change in prevalence and antibiotic resistance of *Enterococcus* species isolated from blood cultures over an 8-year period. *Antimicrob Agents Chemother* 41: 494-495.
10. Uttley AHC, Collins CH, Naidoo J, George RC. 1988. Vancomycin-resistant enterococci. *Lancet* I: 57-58.
11. Stobbering E, van den Bogaard A, London N, Driessen C, Top J, Willens R. 1999. Enterococci with glycopeptide resistance in turkeys, turkey farmers, turkey slaughterers, and urban residents in the south of the Netherlands: evidence for transmission of vancomycin resistance from animals to humans? *Antimicrob Agents Chemother* 43: 2215-2221.
12. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1993. Nosocomial enterococci resistant to vancomycin: United States, 1989-1993. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 42: 597-599.
13. Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 1995. Recommendations for preventing the spread of vancomycin resistance. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 44: 1-19.
14. Al-Obeid S, Gutmann L, Shlaes DM, Williamson R, Collatx E. 1990. Comparison of vancomycin-inducible proteins from four strain of enterococci. *FEMS Microbiol Lett* 70: 101-106.
15. van Caesele P, Giercks S, Wylie J, Boyd D, Mulvey M, Amin S, Ofner-Agostini M. 2001. Identification of the first vancomycin-resistant *Enterococcus faecalis* harbouring *vanE* in Canada. *Can Commun Dis Rep* 27: 101-104.
16. Chow JW, Kuritza A, Shlase DM, Green M, Sahm DF, Zervos MJ. 1993. Clonal spread of vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* between patients in three hospitals in two states. *J Clin Microbiol* 31: 1609-1611.
17. Toye B, Shymanski J, Bobrowska M, Woods W, Ramotar K. 1997. Clinical and epidemiological significance of enterococci intrinsically resistant to vancomycin (possessing the *vanC* genotype). *J Clin Microbiol* 35: 3166-3170.
18. Mundt OJ. 1986. Enterococci. In *Manual of Systematic Bacteriology*. Sneath PHA, Mair NS, Sharpe ME, Holt JG, eds. Bergey's Williams and Wilkins, Baltimore, MD, USA. Vol 2, p 1063-1065.
19. Anonymous. 1992. EEC council directive of 16 June 1992 on milk hygiene (92/46EEC). *Off J Eur Comm* L268/1, 14.9.1992.
20. Mundt OJ. 1963. Occurrence of enterococci on plants in a wide environment. *Appl Microbiol* 11: 141-144.
21. Franz CMAP, Holzapfel WH, Stiles ME. 1990. Enterococci at the crossroads of food safety? *Int J Food Microbiol* 23: 119-123.
22. Giraffa G. 2002. Enterococci from foods. *FEMS Microbiol Rev* 26: 163-171.
23. Ben Omar N, Castro A, Lucas R, Abriouel H, Yousif NMK, Franz CMAP, Holzapfel WH, Pérez-Pulido R, Martínez-Cañero M, Gálvez A. 2004. Functional and safety aspects of Enterococci isolated from different Spanish foods. *Syst Appl Microbiol* 27: 118-130.

24. Kang TM, Cho SK, Park JH. 2008. Antibiotic resistances of *Enterococcus* isolated from salad and sprout. *Kor J Microbiol Biotechnol* 36: 142-148.
25. Kim SH, Kim JS, Park JH. 2007. Antibiotic resistance of *Enterococcus* isolated from the processed grain foods, *Saesik* and *Sunsik*. *Food Sci Biotechnol* 16: 470-476.
26. Bae HJ, Lee JH, Oh SI. 2003. Effect of applying pretreatment methods before cooking for decreasing the microbiological hazard of cooked dried fish in foodservice establishments. *Korean J Sci Food Cookery Sci* 19: 555-561.
27. Jones ME, Geus G, Ortisi G, Sahn DF, Critchley IA, Goglio A. 2002. Proficiency of Italian clinical laboratories in detecting reduced glycopeptide susceptibility in *Enterococcus* and *Staphylococcus* spp. using routine laboratory methodologies. *Clin Microbiol Infect* 8: 101-111.
28. Sahn DF, Free L, Smith C, Eveland M, Mundy LM. 1997. Rapid characterization schemes for surveillance isolates of vancomycin-resistant enterococci. *J Clin Microbiol* 35: 2026-2030.
29. Danbing KE, Picard FJ, Martineau F, Menard C, Roy PH, Ouellette M, Bergeron MG. 1999. Development of a PCR assay for rapid detection of enterococci. *J Clin Microbiol* 11: 3497-3503.
30. Zarazaga M, Saenz Y, Portillo A, Tenorio C, Ruiz-Larrea F, Campo RD, Baquero F, Torres C. 1999. *In vitro* activities of ketolide HMR 3647, mactolides, and other antibiotics against *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, and *Pediococcus* isolates. *Antimicrob Agent Chemother* 43: 3039-3041.
31. National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS). 2008. Performance standards for antimicrobial susceptibility test; approved standards M2-A9 and M7-A7 8th ed. CLSI document. CLSI, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
32. Dukta-Malen S, Evers S, Courvalin P. 1995. Detection of glycopeptide resistance genotypes and identification to the species level of clinically relevant enterococci by PCR. *J Clin Microbiol* 33: 24-27.
33. Korea Food & Drug Administration. Korea Food Code. <http://www.kfda.go.kr>. Accessed on Jan. 30, 2012.
34. Yoon MY. 2008. Evaluation of lactic acid bacteria as starter cultures for fermented soymilk. *PhD Dissertation*. Korea University, Seoul, Korea. p 53.
35. Kundtson LM, Hartman PA. 1993. Enterococci in pork processing. *J Food Prot* 56: 6-9.
36. Klein G, Park A, Reuter G. 1998. Antibiotic resistance patterns of enterococci and occurrence of vancomycin-resistant enterococci in raw minced beef and pork in Germany. *Appl Environ Microbiol* 64: 1825-1830.
37. Cho YS, Lee HS, Kim JM, Ryu PD, Park YH, Yoo HS, Lee MH. 2003. Comparison of antimicrobial susceptibility of vancomycin resistant enterococci from animals and human. *Kor J Vet Publ Hlth* 27: 17-29.
38. Randazzo CL, Restuccia C, Romano AD, Caggia C. 2004. *Lactobacillus casei*, dominant species in naturally fermented sicilian green olives. *Int J Food Microbiol* 90: 9-14.
39. Kang TM. 2008. *Enterococcus* microflora analysis for foods and antibiotic resistance. *MS Thesis*. Kyungwon University, Seongnam, Korea. p 23.
40. Fackalm RR, Collins MD. 1989. Identification of *Enterococcus* species isolated from human infections by a conventional test scheme. *J Clin Microbiol* 27: 731-734.
41. Klare I, Heier H, Claus H, Reissbrodt R, Witte W. 1995. vanA-mediated high-level glycopeptide resistance in *Enterococcus faecium* from animal husbandry. *FEMS Microbiol Lett* 125: 165-172.
42. Pavia M, Nobile CGA, Salpietro L, Angellillo IF. 2000. Vancomycin resistance and antibiotic susceptibility of enterococci in raw meat. *J Food Prot* 7: 912-915.
43. Gordts B, van Landuyt H, Ieven M, Vandamme P, Goossens H. 1995. Vancomycin-resistant enterococci colonizing the intestinal tracts of hospitalized patients. *J Clin Microbiol* 33: 2842-2846.
44. Chadwick PR, Woodford N, Kaczmarek EB, Gray S, Barrell RA, Oppenheim, BA. 1996. Glycopeptide-resistant enterococci isolated from uncooked meat. *J Antimicrob Chemother* 38: 908-909.
45. Bates J, Jordens JZ, Griffiths DT. 1994. Farm animals as a putative reservoir for vancomycin-resistant enterococci infection in man. *J Antimicrob Chemother* 34: 507-516.
46. Seo KS, Song DJ, Gwyther MM, Park YH. 1999. Development of multiplex PCR for detection of vancomycin resistant enterococci (VRE) and epidemiological application in Korea. *Korean J Vet Res* 39: 343-352.
47. Cho YS, Lee HS, Kim JM, Ryu PD, Park YH, Yoo HS, Lee MH. 2003. Comparison of antimicrobial susceptibility of vancomycin resistant enterococci from animals and human. *Kor J Vet Publ Hlth* 27: 17-29.

(2012년 2월 3일 접수; 2012년 3월 5일 채택)