

국내 분유 및 영·유아식품에서 분리된 *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*)의 Biofilm 생성 특성 및 내산성 비교

김선애 · 이유미¹ · 오세욱² · 곽효선³ · 황인균³ · 강동현⁴ · 우건조 · 이민석*

고려대학교 생명과학대학 생명공학과, ²한국식품연구원 산업원천기술연구본부 안전성연구단,
³식품의약품 안전평가원 식품위해평가부 미생물과, ⁴워싱턴 주립대학교

Biofilm Formation and Low pH Viability of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) Isolated from Powdered Infant Formula and Infant Foods in Korea

Sun Ae Kim, Yu Mi Lee¹, Se Wook Oh², Hyo Sun Gwak³, In Gyun Hwang³,
Dong Hyun Kang⁴, Gun Jo Woo, and Min Suk Rhee*

Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University,
Seoul 136-713, Korea

²Food Safety Research Group, Division for Food Industry Platform Technology, Korea Food Research Institute,
Sungnam 463-746, Korea

³Food Microbiology Division, Food Safety Evaluation Department,

National Institute of Food and Drug Safety Evaluation, Seoul 122-020, Korea

⁴Department of Food Science and Human Nutrition, Washington State University, Pullman, WA 99164-6376, USA

Abstract

We investigated biofilm formation in various media, growth in low pH, and the hemolytic activity of 14 strains of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated from a variety of foods including powdered infant formula (n=75), infant cereal (n=100), honey (n=30), and other infant foods (n=100) in Korea. The *Cronobacter* spp. adhered and formed biofilms on polyethylene, and a greater extent of biofilm was observed in nutrient-rich media. No clear difference in biofilm-forming ability was noted among the media constituents and the pattern of biofilm formation was strain-dependent. Seven strains out of 14 strains (50%) grew at pH 4.1, indicating that the acid resistance of these *Cronobacter* spp. isolated in Korea was relatively low. Hemolytic activity was not observed in any of the strains. This study provides basic information for the physiological and biochemical characteristics of *Cronobacter* spp. isolated from a variety of infant foods in Korea.

Key words: *Cronobacter* spp., biofilm, low pH, hemolysis

서 론

최근 새로운 속인 *Cronobacter*로 재분류된(Iversen *et al.*, 2007) *Enterobacter sakazakii*는 영·유아 식품의 안전과 결부되어 국제적으로 크게 주목 받고 있다. *Cronobacter* spp.는 면역력이 약한 1세 이하의 영아나 생후 28일 이하의 신생아에게 주로 감염되며 수막염, 균혈증, 괴사성 대

장염이 주된 증상으로 심각한 경우 사망에까지 이를 수 있다(Arseni *et al.*, 1987; Bar-Oz *et al.*, 2001; Burdette and Santos, 2000; Muytjens and Kollee, 1982; Noriega *et al.*, 1990; Van Acker *et al.*, 2001; Willis and Robinson, 1988). 현재까지 정확한 오염경로는 밝혀지지 않았지만, 질병발생학적 연구를 통하여 조제분유나 우유와 같은 영·유아 식품이 *Cronobacter* spp.의 주요 매개체로 보고되고 있으며(Biering *et al.*, 1989; Himelright *et al.*, 2002; Iversen and Forsythe, 2004; Weir, 2002), 이 외에도 빵, 우유, 식육, 계란, 채소, 치즈, 향신료, 신선식품 등 다양한 식품(Cabassi *et al.*, 2004; El-Sharoud *et al.*, 2008; Gasse, 1999; Iversen and Forsythe, 2004; Jung and Park, 2006; Lafarge *et al.*, 2004; Soriano *et al.*, 2001)과

¹ Present address: Technical Laboratory, Givaudan Korea, Seoul 137-739, Korea

*Corresponding author : Min Suk Rhee, Division of Food Bioscience and Technology, College of Life Sciences and Biotechnology, Korea University, Seoul 136-713, Korea. Tel: 82-3290-3058, Fax: 82-2-925-1970, E-mail: rheems@korea.ac.kr

병원(Masaki *et al.*, 2001), 식품 공장, 가정(Kandhai *et al.*, 2004)과 같은 환경에서도 분리되고 있다. 분유에서 검출되는 *Cronobacter* spp. 양은 100 g 당 0.36-66 CFU 수준의 미량이지만(Muytjens *et al.*, 1988; Simmons *et al.*, 1989) 균이 생육 가능한 온도로 분유를 제조하거나 부적절한 온도에서 보관하면 그 양이 급속하게 증가하여 문제를 일으킬 수 있다(Jang and Rhee, 2009). 또한, *Cronobacter* spp.는 건조 스트레스 환경에 대하여 강한 내성을 가지고 있어 분유나 이유식과 같은 분말 식품에서도 장시간 생존 가능하다(Edelson-Mammel *et al.*, 2005). 이에 따라 분유와 같은 영·유아식품에서 *Cronobacter* spp.의 효율적인 제어 및 관리가 필수적으로 요구되고 있다. FAO/WHO(2004)에서는 분유와 관련된 위해 미생물 중 *Cronobacter* spp.를 질병의 인과관계에 대한 증거가 확실한 Category A로 분류하고 있으며, FAO/WHO(2006)와 한국 식품의약품안전청은 영·유아용 분유 및 액상분유를 70°C 이상의 물로 조제하여 식품 내 존재할 수 있는 식중독세균이나 부패미생물을 사멸시킬 것을 권장하고 있다. 영·유아식품의 효율적인 안전성 관리를 위하여 *Cronobacter* spp.의 기본적인 생리·생화학적 특성 연구는 근본적인 연구과제이며, 특히 국내 생산 제품에서 *Cronobacter* spp. 검출에 따른 사회적 문제가 심각했던 것을 고려해보았을 때(Hwang *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2008), 국내 유통되는 제품에서 실제로 분리된 *Cronobacter* spp.의 연구는 필수적으로 선행되어야 한다.

Cronobacter spp.는 biofilm을 생성하는 것으로 알려져 있다(Iversen *et al.*, 2004). Biofilm이란 물질의 표면에 미생물이 고착된 군집을 이루어 존재하는 것으로(Castonguay *et al.*, 2006), biofilm을 생성하게 되면 건조, 산화, 살균제, 세척제, 항생제 등과 같은 스트레스에 대한 내성이 증가한다(Albesa *et al.*, 2004; Chang and Halverson, 2003; Hoyle and Costerton, 1991; Iversen *et al.*, 2004). *Cronobacter* spp.가 식품 공장의 설비나 기구에 biofilm을 생성하면 균의 제어 및 관리가 어려워지므로 생산 단계에서의 지속적인 오염을 초래할 가능성이 있으며, 이는 제품의 안전성에 큰 영향을 미칠 수 있다. 한편 *Cronobacter* spp.가 낮은 pH의 산성 환경에서도 생장 가능하다는 사실이 보고되고 있으나(Edelson-Mammel *et al.*, 2006) 국내에서 분리된 균주의 특성에 관한 연구는 이루어진 바 없다. 또한, 용혈성은 미생물의 중요한 독성인자로 간주되고 있으며(Finlay and Falkow, 1989) *E. coli*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae* 등 *Cronobacter* spp.와 유사한 많은 장내세균이 용혈소를 생성하는 것으로 알려져 있으나(Braun *et al.*, 1985; Holland *et al.*, 1990; Opal *et al.*, 1990; Simi *et al.*, 2003) 아직 *Cronobacter* spp.의 용혈성은 밝혀지지 않았다.

이에 본 연구에서는 2005년 국내 유통되는 분유(75건),

영·유아용 곡류 조제식(100건), 꿀(30건), 기타 영·유아식(영·유아용 레토르트 죽, 음료, 과자류 등, 100건)의 미생물 모니터링을 통하여(KFDA, 2005) 분리된 *Cronobacter* spp. 14개 국내 균주의 생리·생화학적 특성을 제시하고자 하였다. *Cronobacter* spp.의 주요 오염 매개체인 우유 및 분유의 성분을 고려하여 유성분의 양과 종류에 따른 biofilm 생성 능력 실험을 수행하고, 다양한 pH에서의 생장 및 용혈성을 관찰하였다.

재료 및 방법

실험 균주

본 실험에서는 국내에서 유통(2005년)되는 다양한 영·유아식에서 분리된 *Cronobacter* spp. 14개 균주를 사용하였다. 멸균된 buffered peptone water에 균주를 접종하고 37°C에서 하루 동안 비선택적으로 전배양시킨 후 Enterobacteriaceae enrichment broth(Oxoid, Hampshire, England)에서 37°C, 18시간 동안 선택적 증균배양을 실시하였다. 배양액을 Chromogenic Enterobacter sakazakii agar(DFI Formulation, Oxoid)에 희석도말 후 37°C에서 24시간 동안 배양하여 청록색의 집락을 확인하고, 전형적인 성상을 나타낸 양성 집락을 취하여 tryptic soy agar(TSA)에 희석도말하였다. 25°C에서 48-72시간 배양한 후 황색 집락 형성을 확인하고, 양성 집락에 대해 oxidase test(Oxidase Dry Slide, Difco, Becton Dickinson, Sparks, MD, USA)와 API 20E(Biomerieux, Marcy l'Etoile, France)를 통해 *Cronobacter* spp.임을 최종적으로 확인하였다. 확인된 균주는 20%의 glycerol을 함유한 tryptic soy broth(TSB) stock solution에 넣어 -70°C에 보관하였다. 실험에 사용할 균주는 TSA에 희석도말하여 37°C에서 18-24시간 동안 배양한 후 냉장 보관하였고, 2주일마다 한 번씩 배양하면서 실험에 사용하였다.

Biofilm 생성능력 측정

분유나 우유의 성분이 *Cronobacter* spp.의 biofilm 생성에 미치는 영향을 분석하고자 lactose, whey, casein 3가지 성분의 비율과 skim milk(Difco)의 농도에 따라 5가지 media를 제조하여 biofilm 생성 능력을 비교하였다. 1:8로 희석된 skim milk의 lactose, whey protein, casein 양을 skim milk 수준으로 맞추기 위하여 lactose(Difco), whey protein concentrate(80%, Danmark Protein, Worthington, OH, USA), casein hydrolysate(Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA)를 희석한 skim milk에 첨가하여 제조하였다. 즉, 희석하지 않은 skim milk, 1:8로 희석한 skim milk(1:8), 1:8로 희석한 skim milk에 lactose 첨가(1:8L), 1:8로 희석한 skim milk에 whey 첨가(1:8W), 1:8로 희석한 skim milk에 casein을 첨가(1:8C)한 5가지 media를 제

Table 1. Composition of growth media for biofilm experiment (g/100 g milk)

Ingredients	Skim milk	1:8 ¹⁾	1:8L ²⁾	1:8W ³⁾	1:8C ⁴⁾
Lactose	4.68	0.59	4.68	0.59	0.59
Whey protein concentrate (80%)	2.62	0.33	0.33	2.62	0.33
Casein hydrolysate	0.58	0.07	0.07	0.07	0.58

¹⁾1:8 diluted skim milk.

²⁾1:8 diluted skim milk with addition of lactose.

³⁾1:8 diluted skim milk with addition of whey protein.

⁴⁾1:8 diluted skim milk with addition of casein.

조하여 실험에 사용하였으며, 자세한 성분 비율은 Table 1에 나타내었다.

분리균주에 대한 biofilm 생성 실험은 Stepanoviæ 등 (Stepanoviæ *et al.*, 2004)의 방법에 의거하여 수행하였으며, 96-well microtiter plate(Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)를 이용하였다. 배양 중 수분 공급을 위해 microtiter plate의 바깥쪽 well에 멸균 증류수를 300 µL씩 분주하고 위에 준비한 5가지 media를 microtiter plate의 각 well에 230 µL씩 분주한 후 TSB에 배양한 *Cronobacter* spp. 배양액을 20 µL씩 접종하였다. 이때 media에 균을 접종하지 않은 것을 음성 대조구로 설정하였다. 수분증발을 방지하고자 plate를 parafilm으로 감싸고 37°C에서 24시간 배양한 후 well의 media를 제거하고, 멸균 증류수 300 µL로 well을 3-4회 세척하였다. Plate를 완전히 건조한 후 각 well에 1% crystal violet 용액을 250 µL씩 분주하고 15분 동안 정치하여 생성된 biofilm을 염색하였으며, 염색한 crystal violet 용액이 스며 나오지 않을 때까지 멸균 증류수로 완전히 세척 후 건조하였다. Well에 33% (v/v) glacial acetic acid를 300 µL씩 분주하여 crystal violet을 유리시킨 후, microplate reader(VERSAmax, Molecular Devices, CA, USA)를 이용하여 570 nm(OD₅₇₀)에서 흡광도를 측정하였다.

내산성 비교

Cronobacter spp.의 내산성을 비교하기 위하여 최적 pH 조건을 포함한 다양한 산성 pH의 배지를 제조하였다. pH meter(MP220 basic; Mettler Toledo, Greifensee, Switzerland)를 사용하여 pH 7.2, 4.5, 4.3, 4.1, 3.9인 TSB를 제조(10 M HCl 또는 10 M NaOH 첨가)하고 121.1°C에서 가압 멸균하였다. TSB를 멸균하는 과정에서 pH의 변화가 있을 수 있으므로 멸균이 끝난 후 다시 한번 pH를 보정하였다. 실험에 사용하는 균주를 각각 TSB에 접종하여 37°C에서 12시간 동안 배양하고, 이를 TSB로 100배 희석하여 균희석액을 준비하였다.

Microtiter plate의 바깥쪽 well에 멸균 증류수를 300 µL씩 분주하고 TSB 200 µL를 well에 분주한 후 준비한 균희석액을 각 well에 2 µL씩 접종하여 plate를 parafilm으로 감싸고 37°C에서 배양하였다. 24, 48시간 배양 후 600 nm

(OD₆₀₀)에서 각 well의 흡광도를 microplate reader를 이용하여 측정하였다. 실험 결과는 흡광도의 변화량(ΔOD_{600})이 0.01보다 작으면 (-), 0.01 < ΔOD_{600} < 0.10이면 (+), 0.10 < ΔOD_{600} < 1.00이면 (++) , ΔOD_{600} > 1.00이면 (+++)으로 표시하여 나타내었다.

용혈성

TSA를 제조하여 121°C에서 15분간 멸균하고 50°C로 냉각시킨 후 배지 부피의 5%에 해당하는 horse blood(SR0048, Oxoid)를 첨가하였다. TSA와 blood를 골고루 섞어 멸균된 배양접시에 약 25 mL씩 분주하여 응고시켰다. *Cronobacter* spp. 배양액을 멸균 백금이로 취하여 획선도말하고 37°C에서 24시간 배양하여 집락 주위에 투명환을 형성하면 양성, 투명환을 형성하지 않으면 음성으로 판정하였다.

통계분석

모든 실험은 3회 반복 수행하였으며, SAS program(SAS, Version 8.1, SAS Inst. Inc., 2001, Cary, NC., USA)의 분산분석을 실시하였으며, 유의성 검정은($p < 0.05$) Duncan의 다중검정법을 이용하였다.

결과 및 고찰

Biofilm 생성 능력

국내 분유류 및 영·유아 식품에서 분리한 *Cronobacter* spp. 14개 균주의 media에 따른 biofilm 생성 실험 결과는 Table 2에 나타내었다. 실험결과 microtiter plate에 biofilm을 생성하는 것으로 나타나 *Cronobacter* spp.가 polyethylene에 부착하여 biofilm을 생성할 수 있음을 알 수 있었다. Skim milk에서 14개 균주의 흡광도는 2.93-25.38 범위로 최대 9배의 차이를 보여 균주마다 biofilm 생성 능력의 차이가 큰 것으로 나타났다. Skim milk를 1:8로 희석한 경우에는 skim milk보다 최소 10, 최대 130, 평균 30배로 흡광도가 크게 감소하였으며, 1:8로 희석한 skim milk+lactose(1:8L), 1:8로 희석한 skim milk+whey(1:8W), 1:8로 희석한 skim milk+casein(1:8C)에서도 skim milk보다 흡광도가 감소하여 biofilm이 약하게 생성되었다. 이러한 결과를 살펴볼 때 *Cronobacter* spp.의 biofilm은 영양성분이 풍

Table 2. Mean OD₅₇₀ of stained biofilms of 14 strains of *Cronobacter* spp. isolated from Korean powdered milk and infant foods in various media (n=3)

Isolate number	Skim milk	1:8 ¹⁾	1:8L ²⁾	1:8W ³⁾	1:8C ⁴⁾
1	8.42	0.27	0.38	0.37	0.40
2	6.59	0.38	0.51	0.38	0.82
3	5.28	0.22	0.44	0.22	0.22
4	25.38	0.20	0.80	0.23	0.23
5	4.15	0.28	0.40	0.32	0.26
6	6.33	0.70	0.84	0.32	0.59
7	7.92	0.41	1.32	0.49	0.60
8	13.64	0.46	0.68	0.46	0.46
9	3.42	0.32	0.28	0.28	0.31
10	5.22	0.41	0.40	0.42	0.34
11	2.93	0.29	0.50	0.24	0.32
12	10.03	0.31	0.42	0.51	0.46
13	11.67	0.23	0.40	0.32	0.28
14	22.37	0.66	1.14	0.70	0.43
Average±SD	9.53±6.83	0.37±0.15	0.61±0.31	0.38±0.13	0.41±0.17

¹⁾1:8 diluted skim milk.

²⁾1:8 diluted skim milk with addition of lactose.

³⁾1:8 diluted skim milk with addition of whey protein.

⁴⁾1:8 diluted skim milk with addition of casein.

부할수록 강하게 생성됨을 알 수 있었다. 영양성분의 종류에 따른 차이를 비교하고자 1:8L, 1:8C, 1:8W를 대상으로 유의성 검정을 실시한 결과, 1:8L에서 다른 media보다 유의적으로 biofilm을 강하게 생성하였으며($p<0.05$) 다른 media간에는 유의적 차이가 나타나지 않았다. 1:8L, 1:8C, 1:8W, 1:8의 순서로 biofilm을 강하게 생성하는 경향을 보였지만 모든 균주가 위와 같은 순서를 나타내는 것은 아니었다.

본 연구진과의 국외 공동연구에서는(KFDA, 2005) 국외 분리균주(FDA에서 식품 및 환자의 검체로부터 분리한 68개 균주)와 4가지 표준균주(ATCC 12868, 29004, 29544, 51329), 총 72개의 *Cronobacter* spp. 균주를 사용하여 각 배지에서 biofilm 생성을 측정하였다. 그 결과 본 연구와 마찬가지로 *Cronobacter* spp.는 skim milk에서 가장 강한 biofilm 생성을 나타내었다. 영양성분의 종류에 따라서는 1:8W, 1:8C, 1:8L, 1:8의 순서로 biofilm을 강하게 생성하였는데, 이는 본 연구 결과와는 다른 경향이지만 모든 균주가 위와 같은 경향을 나타낸 것은 아니었다. 따라서 국내·외 균주의 결과를 종합해볼 때 *Cronobacter* spp.의 biofilm 생성 차이는 배지의 구성성분보다는 각 균주별 특성에 의한 것으로 판단된다.

Iversen 등(2004)은 분유에서 배양한 *Cronobacter* spp.가 분유 급여 설비나 제조 환경에서 많이 사용되는 latex, polycarbonate, silicon, stainless steel에 부착할 수 있으며, stainless steel보다 latex, silicon, polycarbonate의 표면에서 biofilm을 더 많이 형성한다고 보고하였다. 또한 감염의 원인이 될 수 있는 *Cronobacter* spp.의 biofilm 생성을 막으

려면 모든 용기와 기구는 가능한 사용 후 바로 세척해야 한다고 권고하였다.

한편, 미생물에 의한 extracellular polymeric substance (EPS)의 생성은 식품 표면에 미생물의 부착이나 집락화에 영향을 미침으로써 biofilm 생성과 관련이 있는 것으로 알려져 있다(Kumar and Anand, 1998). *Cronobacter* spp.는 EPS의 일종인 capsular material을 생성하는 것으로 알려져 있으며(Scheepe-Leberkühne and Wagner, 1986), Iversen 등(2004)은 capsule을 생성하는 *Cronobacter* spp. 균주가 생성하지 않는 균주보다 높은 밀도의 biofilm을 생성한다는 것을 확인하여 exopolysaccharide capsular material의 생산으로 인하여 미생물의 부착력이 더 강화될 수 있다고 추측하였다. 반면 이와는 대조적으로 capsule이 biofilm의 생산에 영향을 미치지 않거나 저해한다는 연구 결과도 있다(Dancer *et al.*, 2009; Joseph and Wright, 2004; Schembri *et al.*, 2004). Dancer 등(2009)은 TSA 상에서 *Cronobacter* spp.의 biofilm 생성 시 capsule이 관찰되지 않아 capsular polysaccharide가 biofilm matrix의 중요한 구성성분은 아니라고 주장하였다. 또한 *Vibrio vulnificus*, *E. coli* K12, *Klebsiella pneumoniae*의 경우, 그들이 생성하는 capsule이 균의 부착 능력이나 biofilm의 생성을 저해하는 것으로 보고되었다(Joseph and Wright, 2004; Schembri *et al.*, 2004). 이와 같이 많은 연구에서 biofilm 생성에 미치는 EPS의 작용 기작은 아직 확실히 밝혀지지 않았으며, *Cronobacter* spp.의 biofilm 생성에 미치는 EPS의 작용 기작 또한 많은 연구가 필요할 것으로 생각된다.

내산성 비교

14개 분리균주의 pH에 따른 성장 실험 결과는 Table 3에 나타내었다. pH 7.2, 4.5, 4.3에서는 모든 균주가, pH 4.1에서는 14개 중 7개(50%)의 균주가 성장하였으며 pH 3.9에서는 모든 균주의 생장이 억제되었다. 국외 분리균주와 표준균주를 대상으로 한 실험(KFDA, 2005)에서는 총 72개의 균주 중 pH 4.5에서는 모든 균주가 성장하였고 pH 4.3에서는 71개(98.61%), pH 4.1에서는 69개(95.83%), pH 3.9에서는 57개(79.17%)의 균주가 성장하여, 대부분의 *Cronobacter* spp.는 산에 대한 내성이 강한 것으로 나타났다. Edelson-Mammel 등(2006)은 pH 3.5에서 *Cronobacter* spp. 12개 중 10개의 균주가 약 0.5 log 수준의 낮은 감소를 보여 산성 환경에서의 강한 내성을 나타낸다고 보고하였다. 국내 분리균주는 국외 균주보다는 산에 대한 저항성이 비교적 낮은 것으로 나타났으며, 이는 최저 성장 pH가 3.9로 보고되고 있는 *E. coli*(Presser *et al.*, 1998)나 *Salmonella typhimurium*(Koutsoumanis *et al.*, 2004)과 같은 다른 장내 세균과 비슷한 수준이었다. *Cronobacter* spp.의 내산성은 *Cronobacter* spp.가 자연환경에 널리 퍼져 존재할 수 있으며 식품의 산성 조건이 *Cronobacter* spp.에 대한 안전성을 보장할 수 없다는 것을 시사한다. *Cronobacter* spp.의 내산성 원인은 정확히 밝혀지지 않았지만 *E. coli*나 *Salmonella*처럼 RpoS와 같은 sigma factor가 shock gene을 발현시켜 산의 자극으로부터 보호하거나(Small *et al.*, 1994; Lee *et al.*, 1995) TSB에 존재하는 아미노산(glutamate, arginine, lysine decarboxylase)이 세포질의 pH를 증가시켜

Table 3. Hemolytic activity and growth of *Cronobacter* spp. isolated from Korean powdered infant formula and infant foods after 24 h at 37°C, in TSB pH 7.2, 4.5, 4.3, 4.1, and 3.9 adjusted with hydrochloric acid and sodium hydroxide.

Isolate number	pH					Hemolytic activity
	7.2	4.5	4.3	4.1	3.9	
1	++	++	++	-	-	N
2	+++	+++	+++	+	-	N
3	+++	++	++	-	-	N
4	+++	+++	++	+	-	N
5	+++	+++	+++	+	-	N
6	+++	+++	+++	-	-	N
7	++	++	++	+	-	N
8	+++	++	++	-	-	N
9	+++	+++	+++	-	-	N
10	++	++	++	-	-	N
11	++	++	++	-	-	N
12	+++	+++	++	+	-	N
13	++	+++	++	+	-	N
14	+++	+++	+++	++	-	N

-, the change in OD₆₀₀ (ΔOD_{600}) < 0.01; +, 0.01 < ΔOD_{600} < 0.10; ++, 0.10 < ΔOD_{600} < 1.00; +++, ΔOD_{600} > 1.00; N, negative.

산에 대한 저항성을 나타내는 것으로(Richard and Foster, 2004) 추측해 볼 수 있으며, 이와 관련하여 향후 *Cronobacter* spp.의 내산성 작용기전 규명 등의 연구가 뒷받침되어야 할 것으로 생각된다.

용혈성

국내에서 유통되는 다양한 영·유아식에서 분리한 *Cronobacter* spp. 14개 균주 모두 투명환을 형성하지 않아 용혈성을 나타내지 않았다. 국외 분리균주 및 표준균주 또한 용혈성을 나타내지 않아(KFDA, 2005) *Cronobacter* spp.는 용혈소를 생성하지 않는 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 국내에서 시판되고 있는 분유 및 영·유아식품에서 분리한 *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) 14개 균주의 biofilm 생성 능력, 산성 환경에서의 성장, 용혈성을 관찰하였다. 연구 결과, 14개의 분리균주는 polyethylene에서 biofilm을 생성하였으며 영양성분이 풍부할수록 biofilm을 강하게 생성하였다. 영양성분의 종류에 따른 biofilm 생성 능력 차이는 뚜렷한 경향을 나타내지 않았으며, *Cronobacter* spp.의 biofilm 생성 능력은 균주별 특성에 의한 것으로 판단된다. 다양한 pH 환경에서 성장 특성을 관찰한 결과, 14개 중 7개의 균주(50%)가 pH 4.1에서도 성장할 수 있어 국외 균주에 비해 내산성이 비교적 낮게 나타났다. 한편 분리된 모든 균주에서 용혈성은 관찰되지 않았다. 본 연구는 국내 영·유아용 식품에서 분리된 *Cronobacter* spp.의 생리·생화학적 특성을 제시하였으며 이는 향후 *Cronobacter* spp. 연구 및 관련 식품산업의 저감화 기술 개발에 기초 자료로 활용될 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 2005년 용역연구사업의 지원에 의하여 이루어진 바 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Albesa, I., Becerra, M. C., Battán, P. C., and Páez, P. L. (2004) Oxidative stress involved in the antibacterial action of different antibiotics. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 605-609.
- Arseni, A., Malamou-Ladas, E., Koutsia, C., Xanthou, M., and Trika, E. (1987) Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. *J. Hosp. Infect.* **9**, 143-150.
- Bar-Oz, B., Preminger, A., Peleg, O., Block, C., and Arad, I. (2001) *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn.

- Acta Paediatr.* **90**, 356-358.
4. Biering, G., Karlsson, S., Clark, N. C., Jonsdottir, K. E., Ludvigsson, P., and Steingrimsdottir, O. (1989) Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. *J. Clin. Microbiol.* **27**, 2054-2056.
 5. Braun, V., Günther, H., Neuß, B., and Tautz, C. (1985) Hemolytic activity of *Serratia marcescens*. *Arch. Microbiol.* **141**, 371-376.
 6. Burdette, J. H. and Santos, C. (2000) *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate: the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.* **30**, 33-34.
 7. Cabassi, C. S., Taddei, S., Predari, G., Galvani, G., Ghidini, F., Schiano, E., and Cavirani, S. (2004) Bacteriologic findings in ostrich (*Struthio camelus*) eggs from farms with reproductive failures. *Avian Dis.* **48**, 716-722.
 8. Castonguay, M. H., van der Schaaf, S., Koester, W., Krooneman, J., van der Meer, W., Harmsen, H., and Landini, P. (2006) Biofilm formation by *Escherichia coli* is stimulated by synergistic interactions and co-adhesion mechanisms with adherence-proficient bacteria. *Res. Microbiol.* **157**, 471-478.
 9. Chang, W. S. and Halverson, L. J. (2003) Reduced water availability influences the dynamics, development, and ultrastructural properties of *Pseudomonas putida* biofilms. *J. Bacteriol.* **185**, 6199-6204.
 10. Dancer, G. I., Mah, J. H., and Kang, D. H. (2009) Influences of milk components on biofilm formation of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*). *Lett. Appl. Microbiol.* **48**, 718-725.
 11. Edelson-Mammel, S., Porteous, M. K., and Buchanan, R. L. (2006) Acid resistance of twelve strains of *Enterobacter sakazakii*, and the impact of habituating the cells to an acidic environment. *J. Food Sci.* **71**, 201-207.
 12. Edelson-Mammel, S. G., Porteous, M. K., and Buchanan, R. L. (2005) Survival of *Enterobacter sakazakii* in a dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **68**, 1900-1902.
 13. El-Sharoud, W. M., El-Din, M. Z., Ziada, D. M., Ahmed, S. F., and Klena, J. D. (2008) Surveillance and genotyping of *Enterobacter sakazakii* suggest its potential transmission from milk powder into imitation recombined soft cheese. *J. Appl. Microbiol.* **105**, 559-566.
 14. Finlay, B. B. and Falkow, S. (1989) Common themes in microbial pathogenicity. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **53**, 210-230.
 15. Food and Agriculture Organization-World Health Organization (FAO/WHO) (2004) *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula; meeting report. Microbiological risk assessment series 6. World Health Organization-Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva and Rome. WHO press, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6/en/>.
 16. Food and Agriculture Organization-World Health Organization (FAO/WHO) (2006) *Enterobacter sakazakii* and *Salmonella* in powdered infant formula; meeting report. Microbiological risk assessment series 10. World Health Organization-Food and Agriculture Organization of the United Nations, Geneva and Rome. WHO press, Geneva, Switzerland. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra10/en/>.
 17. Gassem, M. A. A. (1999) Study of the micro-organisms associated with the fermented bread (khamir) produced from sorghum in Gizan region, Saudi Arabia. *J. Appl. Microbiol.* **86**, 221-225.
 18. Himelright, I., Harris, E., Lorch, V., Anderson, M., Jones, T., Craig, A., Kuehnert, M., Forster, T., Arduino, M., Jensen, B., and Jernigan, D. (2002) *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant Formula - Tennessee, 2001 (Reprinted from MMWR, vol 51, pp 297-300, 2002). *JAMA* **287**, 2204-2205.
 19. Holland, I. B., Kenny, B., and Blight, M. (1990) Haemolysin secretion from *E. coli*. *Biochimie* **72**, 131-141.
 20. Hoyle, B. D. and Costerton, J. W. (1991) Bacterial resistance to antibiotics: The role of biofilms. *Prog. Drug. Res.* **37**, 91-105.
 21. Hwang, J. H., Lee, J. Y., and Park, J. H. (2008) Microbiological quality and potential pathogen monitoring for powdered infant formulas from the local market. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **28**, 555-561.
 22. Iversen, C. and Forsythe, S. (2004) Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol.* **21**, 771-777.
 23. Iversen, C., Lane, M., and Forsythe, S. J. (2004) The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, 378-382.
 24. Iversen, C., Lehner, A., Mullane, N., Bidlas, E., Cleenwerck, I., Marugg, J., Fanning, S., Stephan, R., and Joosten, H. (2007) The taxonomy of *Enterobacter sakazakii*: proposal of a new genus *Cronobacter* gen. nov. and descriptions of *Cronobacter sakazakii* comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *sakazakii*, comb. nov., *Cronobacter sakazakii* subsp. *malonaticus* subsp. nov., *Cronobacter turicensis* sp. nov., *Cronobacter muytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov. and *Cronobacter genomospecies* 1. *BMC Evol. Biol.* **7**, 64.
 25. Jang, H. I. and Rhee, M. S. (2009) Inhibitory effect of caprylic acid and mild heat on *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) in reconstituted infant formula and determination of injury by flow cytometry. *Int. J. Food Microbiol.* **133**, 113-120.
 26. Joseph, L. A. and Wright, A. C. (2004) Expression of *Vibrio vulnificus* capsular polysaccharide inhibits biofilm formation. *J. Bacteriol.* **186**, 889-893.
 27. Jung, M. K. and Park, J. H. (2006) Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas. *Food Sci. Biotechnol.* **15**, 152-157.
 28. Kandhai, M. C., Reij, M. W., Gorris, L. G., Guillaume-Gentil, O., and van Schothorst, M. (2004) Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet* **363**, 39-40.
 29. Koutsoumanis, K. P., Kendall, P. A., and Sofos, J. N. (2004)

- Modeling the boundaries of growth of *Salmonella* Typhimurium in broth as a function of temperature, water activity, and pH. *J. Food Prot.* **67**, 53-59.
30. Kumar, C. G. and Anand, S. K. (1998) Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *Int. J. Food Microbiol.* **42**, 9-27.
 31. Lafarge, V., Ogier, J. C., Girard, V., Maladen, V., Leveau, J. Y., Gruss, A., and Delacroix-Buchet, A. (2004) Raw cow milk bacterial population shifts attributable to refrigeration. *Appl. Environ. Microbiol.* **70**, 5644-5650.
 32. Lee, I. S., Lin, J., Hall, H. K., Bearson, B., and Foster, J. W. (1995) The stationary-phase sigma factor σ^S (RpoS) is required for a sustained acid tolerance response in virulent *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **17**, 155-167.
 33. Masaki, H., Asoh, N., Tao, M., Ikeda, H., Degawa, S., Matsumoto, K., Inokuchi, K., Watanabe, K., Watanabe, H., and Oishi, K. (2001) Detection of gram-negative bacteria in patients and hospital environment at a room in geriatric wards under the infection control against MRSA. *Kansenshogaku Zasshi.* **75**, 144-150.
 34. Muytjens, H. L. and Kollee, L. A. (1982) Neonatal meningitis due to *Enterobacter sakazakii*. *Tijdschr Kindergeneesk* **50**, 110-112.
 35. Muytjens, H. L., Roelofs-Willems, H., and Jaspar, G. H. (1988) Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family Enterobacteriaceae. *J. Clin. Microbiol.* **26**, 743-746.
 36. Noriega, F. R., Kotloff, K. L., Martin, M. A., and Schwalbe, R. S. (1990) Nosocomial bacteremia caused by *Enterobacter sakazakii* and *Leuconostoc mesenteroides* resulting from extrinsic contamination of infant formula. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **9**, 447-449.
 37. Opal, S. M., Cross, A. S., Gemski, P., and Lyhte, L. W. (1990) Aerobactin and α -hemolysin as virulence determinants in *Escherichia coli* isolated from human blood, urine, and stool. *J. Infect. Dis.* **161**, 794-796.
 38. Park, J. H., Yoon, S. S., and Park, Y. S. (2008) Growth inhibitory activity of *Enterococcus faecium* isolated from bovine intestinal tract against *Enterobacter sakazakii*. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **28**, 99-104.
 39. Presser, K. A., Ross, T., and Ratkowsky, D. A. (1998) Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 1773-1779.
 40. Richard, H. and Foster, J. W. (2004) *Escherichia coli* glutamate- and arginine-dependent acid resistance systems increase internal pH and reverse transmembrane potential. *J. Bacteriol.* **186**, 6032-6041.
 41. Scheepe-Leberkühne, M. and Wagner, F. (1986) Optimization and preliminary characterization of an exopolysaccharide synthesized by *Enterobacter sakazakii*. *Biotechnol. Lett.* **8**, 695-700.
 42. Schembri, M. A., Dalsgaard, D., and Klemm, P. (2004) Capsule shields the function of short bacterial adhesins. *J. Bacteriol.* **186**, 1249-1257.
 43. Simi, S., Carbonell, G. V., Falcon, R. M., Gatti, M. S. V., Joazeiro, P. P., Darini, A. L., and Yano, T. (2003) A low molecular weight enterotoxigenic hemolysin from clinical *Enterobacter cloacae*. *Can. J. Microbiol.* **49**, 479.
 44. Simmons, B. P., Gelfand, M. S., Haas, M., Metts, L., and Ferguson, J. (1989) *Enterobacter sakazakii* infections in neonates associated with intrinsic contamination of a powdered infant formula. *Infect. Control Hosp. Epidemiol.* **10**, 398-401.
 45. Small, P., Blankenhorn, D., Welty, D., Zinser, E., and Slonczewski, J. (1994) Acid and base resistance in *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*: role of *rpoS* and growth pH. *J. Bacteriol.* **176**, 1729-1737.
 46. Soriano, J. M., Rico, H., Molto, J. C., and Manes, J. (2001) Incidence of microbial flora in lettuce, meat and Spanish potato omelette from restaurants. *Food Microbiol.* **18**, 159-163.
 47. Stepanović, S., Ćirković, I., Ranin, L., and Svabić-Vlahović, M. (2004) Biofilm formation by *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* on plastic surface. *Lett. Appl. Microbiol.* **38**, 428-432.
 48. Van Acker, J., De Smet, F., Muyldermans, G., Bougatef, A., Naessens, A., and Lauwers, S. (2001) Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 293-297.
 49. Weir, E. (2002) Powdered infant formula and fatal infection with *Enterobacter sakazakii*. *Can. Med. Assoc. J.* **166**, 1570-1570.
 50. Willis, J. and Robinson, J. E. (1988) *Enterobacter sakazakii* meningitis in neonates. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **7**, 196-199.
 51. KFPA (2005) 분유류/영유아용 식품의 미생물 관리. 연구 결과보고서.

(Received 2009.7.17/Revised 2009.10.16/Accepted 2009.10.31)