

## 국내에서 분리한 *Cronobacter* spp.(*Enterobacter sakazakii*)의 건조내성 특성

이은진 · 류태화 · 박종현\*  
경원대학교 식품생물공학과

### Tolerance of Korean *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) Isolates to Dessiccation

Eunjin Lee, Tae Hwa Ryu, and Jong-Hyun Park\*

Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University

**Abstract** *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) is known to be highly resistant to dry conditions than any other Enterobacteriaceae. In this study, one hundred and ten Korean *Cronobacter* isolates were characterized to find out their survival characteristics under conditions of desiccation and humidity. Thirty percentage strains of the isolates showed high resistance to desiccation exposed on the metal surface for eight hours by half survival of the initial number, whereas less than 10% strains showed dry sensitivity by less one log scale survival among seven log scales. Finally, more than 90% of the strains consisted of dry-resistant and dry-intermediate groups. The same tendencies were evident in a 15-day exposure. Dry-resistant and intermediate strain groups showed 3 log scale survival among 5 log initial numbers in the powdered infant formula for 30 days, which were more resistant than on the above metal surface exposed. So, almost the isolate strains showed high resistance to dry condition. Dry-resistant and intermediate groups exposed on the metal surface formed a biofilm at the beginning, and the dry-sensitive group showed biofilm formation mainly only after a 7-day exposure. However, without a time difference in formation of biofilm, the dry-resistant and sensitive isolates seemed to similar biofilm formation activity. Most of the isolates showed very low survival at 75% relative humidity in 48 hours; however, they showed high resistance by 60% survival at 40% relative humidity. The *Cronobacter* isolates showed high resistance to desiccation on the metal surface and in the powdered infant formula, but low survival at high relative humidity. Therefore, high humidity may be a control method for *Cronobacter* in food processing environments.

**Key words:** *Cronobacter*, Korean isolate desiccation, humidity, resistance

## 서 론

*Cronobacter* spp.(*Enterobacter sakazakii*)는 유아에게 치명적인 영향을 주는 급성 기회감염균으로 주로 생후 1개월 이내의 신생아, 조산아, 저체중아, 유아에게서 수막염(neonatal meningitis), 패혈증(bacteremia), 신생아 괴사성 장염(necrotizing enterocolitis) 등의 병을 일으키는 것으로 알려졌다(1,4). 매우 드물게 감염되지만 이 세균에 감염된 영유아의 치사율이 33-80% 이상인 것으로 보고되어 매우 치명적인 세균으로 간주된다(5). *Cronobacter*는 원래 *E. sakazakii*로 명명되어 오다가 Iversen 등(6)에 의하여 *Cronobacter* spp.로 개명하도록 제안되었다. 영유아의 식용으로 사용되는 조제분유와 이유식은 비살균 공정으로 생산되는 식품이므로 *Cronobacter*에 의해 오염되기 쉽고 실제 한국의 영유아 식품에서도 오염되어 사회적으로 많은 파장을 일으키기도 하였다. *Cronobacter*는 조

제분유 혹은 유아식에서 주로 검출되는 것으로 알려져 있으나 그 외에도 토양, 쥐, 파리, 우유분말공장, 초콜릿공장과 집 등 주변 환경에서 자주 검출되는 미생물로 보고되었으며 식품공장을 포함한 다양한 인공 환경에서도 분리되었다(7,8).

이와 같이 자연계에 다양하게 분포되어 있고 유아에게 치명적인 영향을 주는 급성 기회감염균이기 때문에 최근에 그에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. Kandhai 등(7)에 따르면 조제분유 및 이유식의 공정 또는 미리 준비해 놓은 유아식의 *Cronobacter* 오염으로 조산아 또는 신생아들에게서 발병을 유발시키며 전문의들은 미리 물에 타 놓은 분유가 문제 시 된다고 보고하였다. *Cronobacter*의 감염량은  $10^3$ - $10^5$  CFU/g으로 예측하고 있는데 이것은 뇌수막염 병원성 미생물인 *Neisseria meningitidis*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogens* 4D 등의 감염량과 유사한 것으로 예측하고 있다(8,9). 국제기구인 International Commission for Microbiological Specification for Food(ICMSF)에서는 *Cronobacter*를 “Severe hazard for restricted population, life threatening or substantial chronic sequelae or long duration.”, 즉 한정된 사람들에게 매우 위험하며 만성 혹은 장기간 생명을 위협한다고 보고하였으며 많은 전문가들의 의견을 수렴하기 위하여 FAO/WHO는 영유아용 분말식품에 대한 위해에 대한 조사를 하도록 권고하고 있다(10). 이러한 급식용의 조제분유, 이유식과 더불어 선식 또한 유아의 성장기용 영양식으로 사용되고 있어 *Cronobacter*

\*Corresponding author: Jong-Hyun Park, Department of Food Science and Biotechnology, Kyungwon University, Seongnam, Gyeonggi 461-701, Korea  
Tel: 82-31-750-5523  
Fax: 82-31-750-5501  
E-mail: p5062@kyungwon.ac.kr  
Received August 22, 2009; revised September 28, 2009; accepted October 9, 2009

의 제어가 시급한 것으로 사료된다.

이 세균제어에 대한 가장 활발한 연구는 건조 저항성에 대한 연구이며 그 중 Breeuwer 등(11)은 25°C, Aw 0.934에서 2달 동안의 저장실험을 한 결과 *Cronobacter* 는 *Enterobacter agglomerans*, *E. coli*, *Salmonella typhimurium*, *S. enteritidis*에 비해 오랫동안 생존했으며 2달 후에도 90%가 사멸하였음을 보고하였다. Aw 0.23에서는 높은 수분활성도에 비해 더 오래 생존한 것으로 나타났는데 습도가 낮아수록 *Cronobacter*의 생존율이 높았다. 이는 *Cronobacter*의 유전자 중 건조 스트레스에 관여하는 유전자가 발현되기 때문이라고 보고하였다(11). Barron과 Forsythe(12)도 30개월간 건조조제분유에서 다른 장내세균들보다 건조내성이 크다고 보고하였다. 또한 Edelson-Mammel 등(13)은 조제분유의 높은 영양성분으로 인해 700일 이상 생존이 가능하다고 보고하였다. 또한 Gurtler와 Beuchat(14)가 *Cronobacter* 건조 시 Aw가 감소할수록 생존율이 높다고 보고하였다. 이렇게 *Cronobacter*가 분말형 건조식품이나 환경 등에서 오염이 높게 보고되는 것은 다른 미생물 혹은 다른 Enterobacteriaceae 중에 비하여 삼투압과 건조 스트레스에 높은 저항성을 가지기 때문인 것으로 알려지고 있다(15).

또 다른 원인으로는 *Cronobacter*의 biofilm 형성능력을 들 수 있는데 biofilm은 물리적 장벽을 형성함으로써 UV light, 삼투압 스트레스, 열처리, 영양고갈, 산, 세정액, 항생제, 항체 등의 환경 스트레스에 대하여 저항성을 높여준다(16). Lehner 등(17)은 56종의 *Cronobacter*중 23종의 균주가 유리표면에서, 33개 균주가 air-solid 표면에서, 16종의 균주가 두 가지 표면에서 모두 biofilm을 형성하는 것을 확인하였다. 열처리에 의한 제어 범은 Jung(18), Kim(19), Nazarowec-White 등(20,21)에 의해 연구되었으며 그 외의 *Cronobacter* 제어 연구로는 Nazarowec-White 등(22)의 연구로 조제분유에서의 오염되어 있는 *Cronobacter*에 감염되는 bacteriophage를 분리하여 감염을 방지하고자 하는 방법도 보고되었다.

본 연구에서는 국내의 건조분말 식품 등에서 분리하여 보관중인 *Cronobacter* spp.의 건조특성, 건조내성에 따른 biofilm 형성능력과 상대습도 조절 조건에서 *Cronobacter* spp.의 생존특성을 연구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 균주와 시약

본 연구에서 사용된 *Cronobacter* spp.는 국내에서 유통중인 조제분유, 이유식, 생식, 선식, 샐러드 등 비가열 섭취식품 160종의 시료로부터 분리, 동정되어 당 연구실의 균주은행에 보관되어 있는 112균주를 사용하였다(23). 생화학적, 생리학적 특성을 비교하기 위해 공시균주인 *C. muytjensii* ATCC 51329와 *Cronobacter* NCTC 2949를 사용하였으며 사용되는 시약은 특급 시약을 사용하였다.

### 건조내성에 따른 *Cronobacter*의 분류

공시균주인 *C. muytjensii* ATCC 51329와 *Cronobacter* NCTC 2949를 포함하여 112개의 건조분말 식품유래 분리균주를 대상 시험균주로 정하였다. 배양액은 각 균주를 10mL의 tryptic soy broth(TSB; Oxoid, Hampshire, UK)에서 37°C, 24시간 동안 전 배양시켜 각 균주를 7 log CFU/mL의 수준으로 초기 균수를 조정하였다. 7×7 cm<sup>2</sup>의 스테인레스스틸에 20 µL를 떨어뜨린 후 25°C, 상대습도 75%의 항온항습 인큐베이터(Daehan Scientific, Seoul, Korea)에서 노출시킨 후 0, 4, 8, 24, 48시간째에 50 µL 멸균 생리식염수로 20회씩 2회 pipetting하여 건조된 균체를 회수하여

TSA(Oxoid)에 도말한 후 37°C에서 24시간 동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수하였다. 스테인레스스틸상에서 8시간째에 7 log CFU/mL의 수준에서 1 log CFU/mL 이하의 생균수를 보인 균주를 건조 저내성그룹(dry-sensitive group)으로, 3 log CFU/mL 이상의 생균수를 보인 균주를 건조 내성그룹(dry-tolerant group)으로, 그 사이의 균주를 중간내성그룹(dry-intermediate group)으로 분류하였다. 장기적인 건조노출분석은 선정된 균주를 10 mL의 TSB에서 37°C, 24시간 동안 전배양시킨 후 7 log CFU/mL로 조정하여 12-well culture plate의 각 well에 200 µL씩 접종하여 상온에서 방치하면서 건조시켰다. 건조시간은 0, 6, 12, 24시간과 그 후 15일까지 건조시켰다. 각 시간 별로 각각의 well에 200 µL의 멸균 생리식염수로 pipetting하여 회수된 균체액에서 100 µL를 취해 TSA에 도말한 후 37°C에서 24시간 동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수하여 각 그룹간 평균과 표준편차를 계산하여 표기하였다.

### 조제분유내에서의 건조내성 측정

*C. muytjensii* ATCC 51329와 *Cronobacter* NCTC 2949를 포함한 112개의 분리 균주를 대상으로 *Cronobacter*가 검출되지 않은 조제분유(Namyang, Seoul, Korea) 10g의 시료에 spiking 하여 30일 동안 저장하였다. 사용된 균주는 10 mL의 TSB에서 37°C 24시간 동안 전배양시킨 균주를 최종 생균수가 5-6 log CFU/mL의 수준이 되도록 희석한 후 100 µL를 조제분유에 첨가하여 멩치지 않게 고무 섞은 후 실온에서 저장하면서 초기 생균수와 30일 후의 생균수를 측정하여 그 변화를 측정하였다.

### 건조에 따른 biofilm 형성분석

대상 균주로는 건조내성에 따른 *Cronobacter*의 분류에서의 고내성그룹과 저내성그룹의 대표적 세 균주씩을 시험균주로 하였다. Biofilm 측정방법으로는 crystal violet의 OD를 측정하는 12-well plastic plate(Becton Dickinson Labware, Franklin Lakes, NJ, USA)법을 이용하여 측정하였고 각 그룹간 평균과 표준편차를 계산하여 표기하였다. TSB 10 mL에 *Cronobacter*를 접종하여 37°C에서 하루 밤 전배양된 균체를 12-well tissue culture test plate의 각 well에 2 mL씩 접종하여 다시 배양하였다. 일정시간 항온조에서 노출된 test plate의 부유세균과 배양액을 aspirator를 이용하여 제거한 후 빈 well을 2.5 mL 생리식염수로 격렬하게 진탕하여 3번 세척하였다. 잔여 식염수를 제거한 후 2 mL의 99% methanol을 각 well에 분주하고 15분 동안 방치하여 biofilm을 표면에 부착시켰다. Methanol 제거 후 완전히 건조시키고 각 well마다 2 mL의 1% crystal violet(Hucker, Sigma, St. Louis, MO, USA) solution 분주 후 5분 동안 방치하여 biofilm을 염색하였다(24). Crystal violet solution을 제거하고 건조한 후 2.5 mL 증류수로 1회 세척하고 33%(v/v) glacial acetic acid를 1.6 mL씩 분주하여 착색된 crystal violet을 용출시켜 570 nm에서 microtiter plate reader(Tecan, Sunrise, A Graham, Salzburg, Austria)로 흡광도를 측정하였다.

### 습도에 대한 *Cronobacter*의 내성분석

38개의 분리균주(고내성균주 13, 중간내성균주 22, 저내성균주 3균주)와 2개의 공시균주 *C. muytjensii* ATCC 51329와 *Cronobacter* NCTC 2949를 대상균주로 선정하여 상대습도 변화에 따른 생존균수를 분석하였다. 10 mL의 TSB에서 37°C, 24시간 동안 전배양시킨 각 균주를 7 log CFU/mL의 수준으로 초기 균수를 조정하였다. 7×7 cm<sup>2</sup>의 스테인레스스틸에 20 µL를 떨어뜨렸으며

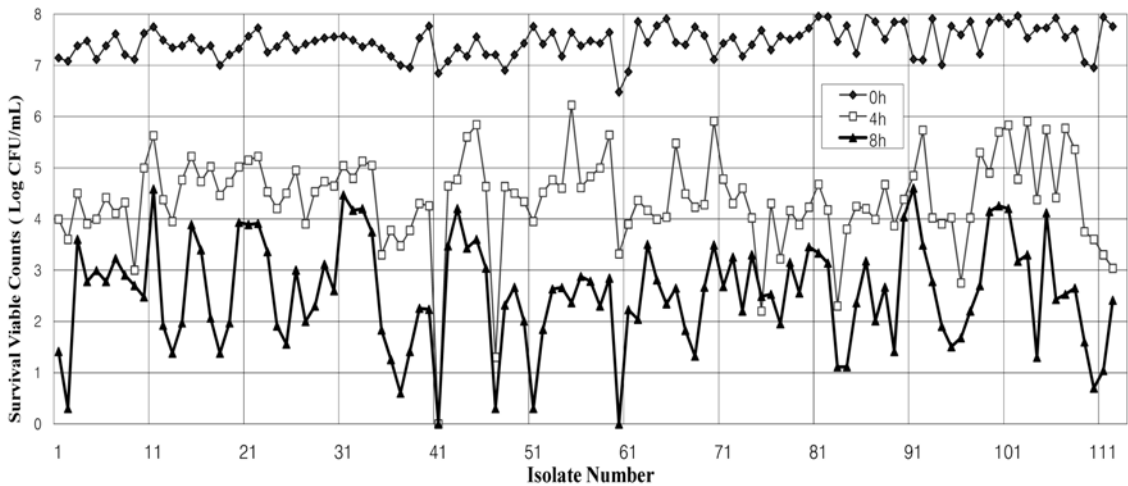


Fig. 1. Dry resistant pattern of 112 *Cronobacter* spp. at 25°C and 75% relative humidity according to each exposed times of 0, 4, and 8 hours.

25°C에서 상대습도(relative humidity, RH) 75%, 40%의 항온항습 인큐베이터에서 0, 4, 8, 24, 48시간 노출시킨 후 각각 50 µL 멸균 생리식염수로 20회씩 2회 pipetting하여 건조된 균체를 회수하여 TSA에 도말한 후 37°C에서 24시간 동안 회복 및 배양을 하여 형성된 집락을 계수하였다.

상대습도에 따른 생존수의 사멸을 imaging analysis하기 위하여 공초점 레이저 주사현미경(confocal laser scanning microscope, CLSM, MRC-1024, Bio-Rad, Hertfordshire, UK)으로 촬영하였다(25). 대상균주로 공시균주인 *C. mytjensii* ATCC 51329를 사용하였으며 대조군으로 TSB 배양액을 사용하였고 75%, 40% RH에서 24시간 동안 슬라이드그래스에서 건조시켰다. LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit(L7007, for microscopy, Molecular Probes, Invitrogen™, Carlsbad, CA, USA)를 사용하여 균체를 형광으로 염색시켰다. 두 개의 molecular probe component A (SYTO 9 dye, 1.67 mM/propidium iodide, 1.67 mM)와 component B(SYTO 9 dye, 1.67 mM/propidium iodide, 18.3 mM)를 1:2.5로 혼합한 후 혼합용액과 멸균 D.W.를 1:4로 혼합하여 건조 표면에 가한 후 15분 동안 암소에서 반응시켰다. 형광 probe는 생균과 사균에 특이하게 결합되는 것을 두 개의 파장으로 촬영한 후 두 이미지를 merging시켰다. 생균은 초록으로, 사균은 적색으로 imaging하게 된다.

### 결과 및 고찰

#### 건조내성에 따른 *Cronobacter*의 분류

*Cronobacter*를 25°C와 상대습도 75%에서 스테인레스스틸 표면에 8시간 노출 후의 생존에 대하여 *Cronobacter* NCTC 2949, *C. mytjensii* ATCC 51329 두 공시균주를 포함한 112균주 건조내성 실험을 수행하였다. 그 결과 사용한 112개 균주 중 7개 균주는 7 log CFU/mL 수준에서 8시간만에 1 log CFU/mL 생존수로 떨어지는 건조에 약한 저내성그룹(dry sensitive group)으로, 8시간 건조 후 3 log CFU/mL 정도의 생존을 보이는 37균주는 고내성 그룹(dry tolerant group)으로, 그 중간 생존율을 보이는 68개 균주를 중간내성그룹(dry intermediate group)으로 분류하였다(Fig. 1). 국내 식품에서 분리한 *Cronobacter*는 건조에 대하여 90% 이상이 건조에 대한 중간 정도의 이상의 내성을 갖고 있는 것으로 분석

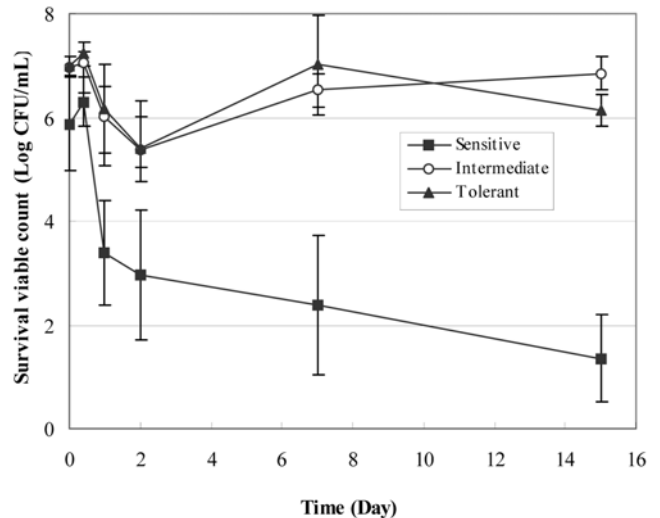


Fig. 2. Viable count comparison of *Cronobacter* spp. for different resistant groups exposed on plastic surface at each time for 15 days. Nine strains of resistant (R-21, R-72, R-86), intermediate (I-12, I-40, I-97), and sensitive strains (S-2, S-37, S-110) from each groups to desiccation were selected and tested.

되었고 건조에 약한 균주는 10% 이내의 적은 수를 보였다. 각 건조내성 그룹별로 대표적 3균주씩을 선정하여 12-well microtiteplate의 플라스틱 표면상에서의 15일의 장기간 상온 방치 시에 따른 생존수의 변화를 측정하였을 때 건조 1일 후부터는 세 그룹 모두 감소 경향을 보이나 저내성그룹은 고내성그룹에 비해 3 log CFU/mL 이상 사멸하였으며 시간이 지날수록 감소 추세를 이어갔다. 하지만 고내성그룹과 중간내성그룹은 2일 건조 후 생존수가 증가하거나 유지되는 경향을 보였다. 따라서 단기 노출분류에 의한 중간내성그룹에 속하는 균주들도 장기적으로는 상당한 건조 내성을 보여 주고 있었다. 따라서 금속과 플라스틱 표면 건조에서 단기 및 장기간의 건조노출에 대하여 식품에서 분리된 10% 미만의 균주만 건조에 약한 것으로 나타났고 90% 이상의 *Cronobacter* 균주는 건조에 강한 저항성을 나타내는 것으로 사료된다(Fig. 2).

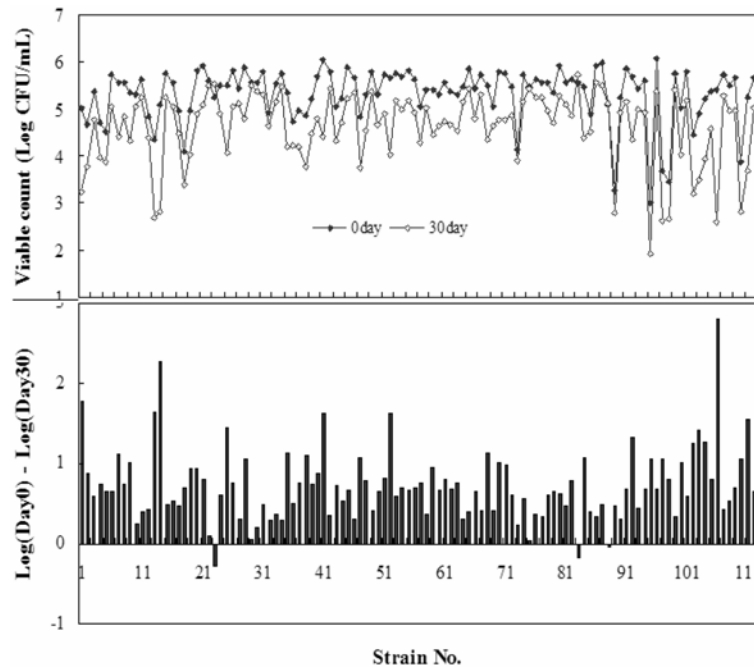


Fig. 3. Survival of *Cronobacter* spp. spiked in powdered infant formula after a month.

#### 조제분유에서의 건조내성 특성

*Cronobacter*가 검출되지 않은 조제분유 시료에 5-6 log CFU/mL의 수준이 되도록 *C. mytjensii* ATCC 51329와 *Cronobacter* NCTC 2949를 포함한 112개의 분리균주를 spiking하여 고루 섞은 후 실온에서 보관하면서 30일 후의 생균수 변화를 분석하였다. 금속과 플라스틱 표면에서의 건조특성에 따른 분류와 마찬가지로 *Cronobacter* 건조 고내성그룹과 중간내성그룹은 30일 이후에도 5 log CFU/mL에서 3 log CFU/mL 이상의 생균수를 나타내었다(Fig. 3). 오히려 표면건조 노출 때보다 더 생존율이 높아 조제분유에서는 더 내성이 증가함을 할 수가 있었다. Barron과 Forsythe(12)는 건조상태의 조제분유에 *Cronobacter* 야생균주 10가지를 7 log CFU/mL 수준으로 spiking하여 30개월간 저장실험을 한 결과, 10균주 중 한 균주는 1년 안에 모두 사멸하였으나 두 균주는 30개월까지 2 log CFU/mL 이상의 생균을 유지하고 있었으며 나머지 일곱 균주는 20개월에서 30개월 내에 사멸하여 건조내성이 크다고 보고하였다. 30개월에서 생존을 보이는 두 내성 균주의 사멸 패턴으로는 4개월까지 급속한 사멸곡선을 그리다가 6개월 이후에 안정적으로 2-3 log CFU/mL 수준을 유지한 것으로 나타났다. 또한 Edelson-Mammel 등(13)은 조제분유의 높은 영양성분으로 인해 700일 이상 *Cronobacter*의 생존이 가능하다고 보고였다. 또한 Gurtler 등(26)은 *Cronobacter* 건조 시  $A_w$ 가 감소할수록 생존률이 높다고 보고하였으며 조제분유의  $A_w$ 는 0.2로 나타나 조제분유에 오염된 *Cronobacter*가 균 자체의 건조내성 특성과 분유의 낮은 수분 활성도와 고영양적 환경이 복합적으로 작용하여 높은 생존률을 보인 것으로 사료된다. 따라서 대부분의 *Cronobacter*는 조제분유 등의 영양분이 많은 건조분말 식품에서 생존율이 아주 높아서 이 세균의 오염을 줄이는 제어관리가 필요함을 알 수 있었다.

#### 건조특성에 따른 biofilm 형성 특성

12-well plastic plate 법으로 건조환경에서의 biofilm 형성을 고내성그룹과 저내성그룹에서 대표적인 세균주씩 선별하여 측정하

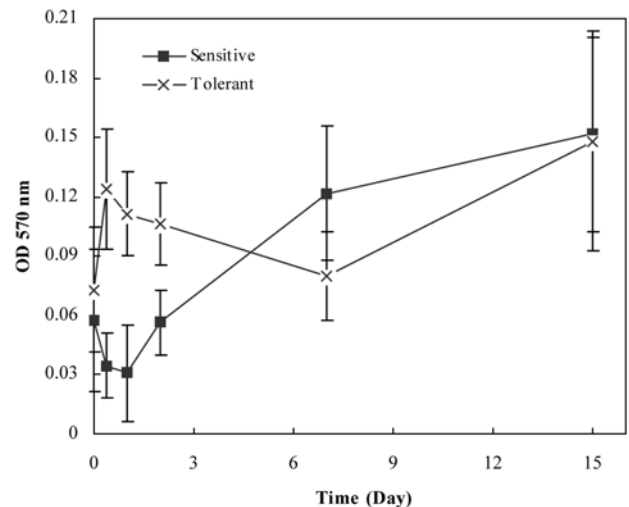
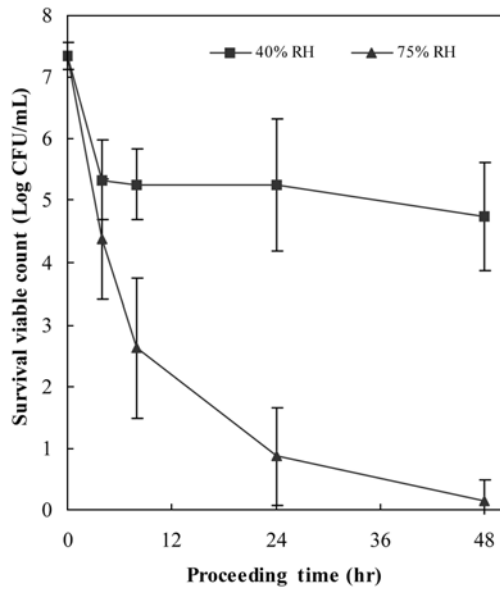


Fig. 4. Comparison biofilm formation capability for dry-sensitive/tolerant strains of *Cronobacter* spp. by microtiter plate method. Mean values with SD for six representative strains (R-21, R-72, R-86, S-2, S-37 and S-110) from dry tolerant group and sensitive group were shown.

였다(Fig. 4). 고내성그룹 균주의 biofilm 생성량은 초기 12시간에 급속한 증가를 보였으며 그 후 일주일까지는 시간이 지남에 따라 감소하는 경향을 보이다가 15일까지는 다시 증가하는 경향을 보였다. 저내성그룹 균주의 경우에는 건조영향에 따라 균체의 사멸에 의해 biofilm 전체의 양이 줄어들었고 그 중 건조에 적응되어 살아남은 일부의 균체가 강하게 biofilm을 생성한 것으로 보이는데 건조 15일에 가까워질수록 biofilm양이 고내성균주들과 거의 같아지는 것을 볼 때에 이와 같은 결과를 유추할 수 있다. 대부분의 세균들은 물체의 표면에 부착하면 biofilm을 생성하여 환경스트레스에 대한 저항성을 높이게 된다(27,28). *Cronobacter*도 스테인레스스틸, polyvinyl chloride, 실리콘, 락테스, 유리 등에 부



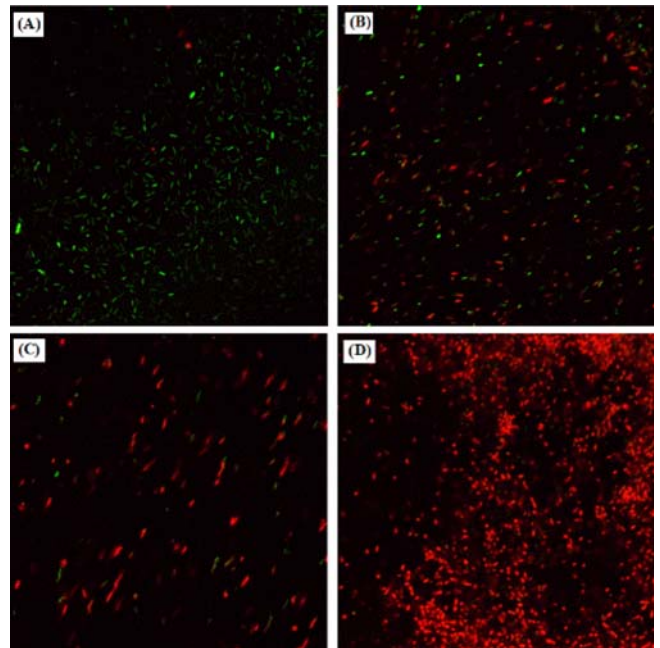
**Fig. 5. Viable count of *Cronobacter* spp. on stainless steel at 25°C under 40% and 75% relative humidity.** Forty isolates including three dry-sensitive strains were exposed in the different relative humidity and the viability was determined.

착하여 biofilm을 생성하는 것으로 보고되어 있다(17,29). 이러한 biofilm은 식품제조현장에서 이 세균의 제어를 어렵게 하는 요인이 되기도 하며 특히 살균소독제에 대한 저항성을 높여서 이 세균에 대한 위해 가능성이 더 높아지게 되게 한다(30,31). 그러므로 biofilm은 건조 스트레스에 저항하는 하나의 *Cronobacter*의 생육적응 수단일 것으로 보이며 고내성 균주와 저내성 균주의 건조내성에 대한 biofilm생성의 시간적인 차이만 존재하고 대부분의 *Cronobacter*는 건조 스트레스에 대하여 biofilm을 형성시키는 특성을 가지고 있는 것으로 보인다.

**상대습도에 따른 *Cronobacter*의 생존특성**

38개의 분리균주와 2개의 공시균주로 건조 시 상대습도에 따른 제어가 가능한지 알아보기 위한 연구를 수행하였다. 스테인레스스틸 위에 7 log CFU/mL 수준의 *Cronobacter*를 접종한 후 항온항습 인큐베이터에서 온도 25, 상대습도(relative humidity, RH) 75%와 40%로 설정한 후 노출시간에 따라 그 생균수를 측정하였다. 75% RH의 경우에는 8시간까지 7 log CFU/mL에서 5 log의 급격한 감소를 보이다가 8시간 이후부터 감소 기울기가 완만히 지나 24-48시간 내에 모두 사멸하는 것으로 나타났다. 반면 40% RH의 경우 8시간째 약 2 log가 사멸한 후 24시간까지는 확연한 증가나 감소 없이 비슷하게 5 log CFU/mL 정도의 생균수를 유지하였으며 48시간째에도 4-5 log CFU/mL 수준의 생균수를 유지하였다(Fig. 5).

상대습도에 따른 생균수의 사멸을 Backlight kit를 사용하여 confocal laser scanning microscope로 촬영한 결과인 Fig. 6을 보면 (A)는 대조군으로 사용한 *C. muytjensii* ATCC 51329의 배양액에서 빨간색으로 보이는 사균(dead cell) 몇 개를 제외한 모든 세포가 초록색으로 살아있는 세포임을 보여준다. 25°C, 40% RH에서 24시간 건조시킨 (B)의 경우에는 생균:사균 비율이 약 1:1 정도로 나타나며 (C)의 경우 25°C, 75% RH에서 24시간 건조시킨 결과로 몇 개의 초록색으로 표시되는 생체효소를 제외한 모든 세포가 적색으로 사멸한 것을 볼 수 있다. (D)는 37°C와 고습에서



**Fig. 6. Image of confocal laser scanning microscope (CLSM) with dry-sensitive *C. muytjensii* ATCC 51329 for 24 hours.** Green, live cell; red, dead cell; (A), control, 37°C TSB overnight culture; (B), dry at 25°C with 40% relative humidity; (C), dry with 25°C in 75% relative humidity; (D), dry at 37°C with high humidity for 24 hours.

24시간동안 건조시킨 *Cronobacter*로써 생균세포가 없이 모두 적색으로 보여 고습일수록 세포의 사멸이 증가함을 확인하였다. Gurtler 등(26)이 *Cronobacter* 건조 시 Aw가 높을수록 생존률이 낮다고 보고한 것과 동일한 결과였으며 건조식품인 조제분유 등의 생산현장 환경에서 오염된 *Cronobacter*의 제어관리에 활용이 가능하리라 사료된다. Mullane 등(32)은 조제분유와 그 공정중의 *Cronobacter*의 오염도를 분석한 결과 분리된 *Cronobacter*의 70% 이상이 공정 중에서 분리하였으며 특히 분유 건조공정과 포장공정이 이들 세균의 주요 오염장소라는 것을 보고하였다. 따라서 이 작업환경 공간이 주요한 오염경로인 것으로 제시하였다. 그러므로 이와 같은 상대습도와 작업온도를 조절하여 *Cronobacter*의 오염경감에 기여할 수 있으리라 사료된다.

**요 약**

*Cronobacter* spp.(*Enterbacter sakazakii*)의 건조저항성은 다른 장내 세균들보다 강한 특성을 가지고 있는 것으로 알려져 있다. 본 연구는 국내 식품으로부터 분리한 110개의 *Cronobacter*균주로부터 건조내성 특성을 분석하고 여러 상대습도에서의 생존특성을 연구하고자 하였다. 국내 식품에서 분리한 *Cronobacter* 110균주 중 8시간 급속표면 건조노출에 대하여 초기균수의 약 절반정도 생존하는 고내성그룹이 30%, 대부분이 사멸하는 저내성그룹이 약 10%를 차지하여 전체 균주 중 중간정도 이상의 내성을 가지는 균주가 90% 이상을 차지하고 있었다. 15일간 장기 건조노출에 경우도 비슷한 경향을 보여 주었다. 조제분유에서 *Cronobacter* 건조 노출의 경우 고내성그룹과 중간내성그룹은 30일 이후에도 5 log CFU/mL에서 3 log CFU/mL 이상의 생균수를 나타내었다. 오히려 급속 표면건조 때보다 더 생존율이 높아 조제분유에서는 더 내성이 증가함을 할 수가 있었다. 따라서 국내 식품에서 분리

한 대부분의 *Cronobacter*도 건조에 강한 내성을 가지고 있는 것으로 보인다. 건조환경에서의 biofilm 형성능력은 고내성과 중간내성그룹 균주는 노출초기에서부터 biofilm 생성이 이루어졌다. 그러나 저내성그룹 균주의 경우에는 biofilm의 형성이 증가하지 않다가 7일 후 biofilm 생성이 많아지는 것으로 분석되었다. 따라서 *Cronobacter*의 biofilm 형성능은 각 그룹간 biofilm 생성의 시간적인 차이만 존재하고 대부분의 *Cronobacter*는 건조스트레스에서 biofilm 형성능이 비슷한 것으로 보인다. *Cronobacter*는 건조 금속표면의 75%의 상대습도에서 24-48시간 내에 모두 사멸하는 것으로 나타났으나 40% 상대습도에서는 초기균수의 60% 생존수를 유지하여 낮은 상대습도에 강한 저항특성을 보여주었다. 대부분의 *Cronobacter*는 건조에 강한 내성을 가지고 있어 조제분유 등의 건조식품에서 오랫동안 살아 있을 수 있으나 습도가 높은 환경에서는 사멸이 많이 일어나는 것으로 사료된다. 그러므로 식품생산현장에서 습도를 조절하여 *Cronobacter*를 제어할 수 있을 것으로 보인다.

## 감사의 글

본 연구는 2008년도 농림기술관리센터의 지원에 의해 이루어진 연구(108147-02-1-CG000)의 일부로 이에 감사드립니다.

## 문헌

- Guillaume-Gentil O, Sonnard V, Kandhai MC, Marugg JD, Joosten H. A Simple and rapid cultural method for detection of *Enterobacter sakazakii* in environmental samples. *J. Food Protect.* 68: 64-69 (2005)
- Arad I, Baras M, Gofin R, Bar-Oz B, Peleg O. Dose parity affect the neonatal outcome of very-low-birth-weight infants? *Eur. J. Obstet. Gyn. R. B.* 94: 283-289 (2001)
- Farmer JJ, Asbury MA, Hickman FW, Brenner DJ. The *Enterobacteriaceae* study group. *Enterobacter sakazakii*: A new species of "*Enterobacteriaceae*" isolated from clinical specimens. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 30: 369-58 (1980)
- Jung MK, Park JH. Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 152-155 (2006)
- Iversen C, Forsythe SJ. Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Food Sci. Technol.* 14: 443-454 (2003)
- Iversen C, Lehner A, Mullane N, Bidlas E, Cleenwerck I, Marugg J, Fanning S, Stephan R, Joosten H. 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 mytjensii* sp. nov., *Cronobacter dublinensis* sp. nov., and *Cronobacter* genomospecies 1. *BMC Evol. Biol.* 7: 64-67 (2007)
- Gurtler JB, Komacki JL, Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 1-34 (2005)
- Park JH, Jung MK. Food safety by *Enterobacter sakazakii*: Newly emergent pathogen from infant formula foods. *Trends Agric. Life Sci.* 3: 44-53 (2005)
- International Commission on Microbiological Specification for Foods (ICMSF). *Microbiological Testing in Food Safety Management*. Vol. 7. Academic/Plenum Publisher, New York, NY, USA (2002)
- Nazarowec-White M. Biological characterization of *Enterobacter sakazakii*. PhD thesis, University of Ottawa, Ottawa, Canada (1998)
- Breeuwer P, Lardeau A, Peterz M, Joosten HM. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol.* 95: 967-973 (2003)
- Barron JC, Forsythe SJ. Dry stress and survival time of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Protect.* 70: 2111-2117 (2007)
- Edelson-Mammel SG, Porteous MK, Buchanan RL. Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Protect.* 68: 1900-1902 (2005)
- Gurtler JB, Beuchat LR. Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. *J. Food Protect.* 70: 1579-1586 (2007)
- Lehner A, Stephan R. Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J. Food Protect.* 67: 2850-2857 (2004)
- O'Toole GA, Kaplan HB, Kolter R. Biofilm formation as microbial development. *Annu. Rev. Microbiol.* 54: 49-79 (2000)
- Lehner A, Riedel K, Eberl L, Breeuwer P, Diep B, Stephan R. Biofilm formation, extracellular polysaccharide production, and cell-to-cell signaling in various *Enterobacter sakazakii* strains: Aspect promoting environmental persistence. *J. Food Protect.* 68: 2287-2294 (2005)
- Jung MK, Park JH. Prevalence and thermal stability of *Enterobacter sakazakii* from unprocessed ready-to-eat agricultural products and powdered infant formulas. *Food Sci. Biotechnol.* 15: 152-155 (2006)
- Kim SH, Park JH. Thermal resistance and inactivation of *Enterobacter sakazakii* Isolates during rehydration of powdered infant formula. *J. Microbiol. Biotechnol.* 17: 364-368 (2007)
- Nazarowec-White M, Farber JM. Thermal tolerance of *Enterobacter sakazakii* on reconstituted dried- infant formula. *Lett. Appl. Microbiol.* 24: 9-13 (1997)
- Nazarowec-White M, McKeller RC, Piyasena P. Predictive modeling of *Enterobacter sakazakii* inactivation in bovine milk during high-temperature short-time pasteurization. *Food. Res. Int.* 32: 375-379 (1999)
- Kim KP, Klumpp J, Loessner MJ. *Enterobacter sakazakii* bacteriophage can prevent bacterial growth in reconstituted infant formula. *Int. J. Food Microbiol.* 115: 195-203 (2007)
- KFDA. Monitoring of Food-borne Pathogens on Ready-to-Eat *Sunsik*. Korea Food & Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 15-21 (2006).
- Vasseur P, Vallet-Gely I, Soscia C, Genin S, Filloux A. The pel genes of the *Pseudomonas aeruginosa* PAK strain are involved in early and late stage of biofilm formation. *Microbiology* 151: 985-997 (2005)
- Invitrogen™ LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kits. Available from: <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp07007.pdf>. Accessed Oct. 23, 2006.
- Gurtler JB, Komacki JL, Beuchat LR. *Enterobacter sakazakii*: A coliform of increased concern to infant health. *Int. J. Food Microbiol.* 104: 1-34 (2005)
- Kumar, CG, Anand SK. Significance of microbial biofilms in food industry: A review. *Int. J. Food Microbiol.* 42: 9-27 (1998)
- Ryu, JH, Kim H, Beuchat LR. Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *J. Food Protect.* 67: 2123-2131 (2004)
- Iversen C, Lane M, Forsythe SJ. The growth profile, thermotolerance, and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.* 38: 378-382 (2004)
- Frank JF, Ehlers J, Wicker L. Removal of *Listeria monocytogenes* and poultry soil-containing biofilms using chemical cleaning and sanitizing agents under static conditions. *Food Prot. Trends* 23: 654-663 (2003)
- Norwood DE, Gilmour A. The growth and resistance to sodium hypochlorite of *Listeria monocytogenes* in a steady-state multispecies biofilm. *J. Appl. Microbiol.* 88: 512-520 (2000)
- Mullane NR, Whyte P, Wall PG, Quinn T, Fanning S. Application of pulsed-field gel electrophoresis to characterize and trace the prevalence of *Enterobacter sakazakii* in an infant formula processing facility. *Int. J. Food Microbiol.* 116: 73-81 (2007)