

*Cronobacter sakazakii*의 산 저항성

장성란 · 방우석*

영남대학교 식품영양학과

Acid Resistance of *Cronobacter sakazakii*

Sung-Ran Jang and Woo-Suk Bang*

Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea

Abstract

The objective of this study was to determine the resistance of *Cronobacter sakazakii* in acidic environments. The D-values of CAFM2 (ATCC 29544), EB 1, EB 5, and EB 41 at pH 2.5 in TSB were significantly ($p < 0.05$) higher when cells were adapted at pH 4.5 in TSB for 5-h then when cells were not adapted at pH 4.5 in TSB. The D-values of CAFM2, EB1, and EB 41 at pH 2.5 in TSB were significantly ($p < 0.05$) higher when cells were adapted at pH 4.5 in TSB for 10-h then when cells were not adapted at pH 4.5 in TSB. The D-values of CAFM2 and EB 1 at pH 2.5 in TSB were significantly ($p < 0.05$) higher when cells were adapted at pH 4.5 in TSB for 24-h then when cells were not adapted at pH 4.5 in TSB. The adaptation of *C. sakazakii* to mild acidic environments may result in increased resistance to severe acidic environments. The D-values of all test strains at pH 2.5 in TSB were significantly ($p < 0.05$) higher when cells were cultured at pH 4.5 then when they were cultured at pH 7.2 in TSB. These data indicate that cells cultured in mildly acidic environments may result in increased resistance to severe acidic environments. The acid adaptation of *C. sakazakii* showed an increased resistance to acidic environments. The acid adaptation response of *C. sakazakii* has important implications for food safety, which should be considered when food preservation measures are developed.

Key words: *Cronobacter sakazakii*, acid environment, response of acid adaptation, acid resistance

서론

*Cronobacter sakazakii*는 그람 음성의 무포자형성, 주모 운동성, 통성혐기성 간균으로 신생아 및 영유아와 고령의 환자, 면역이 저하된 환자에 영향을 미친다. *C. sakazakii*가 성인에게 감염될 경우는 세균혈증(bacteraemia), 패혈증(septicemia) 등의 질병을 일으키지만(Hawkins, 1991; Jimenez and Gimenez, 1982) 신생아 및 영유아에 비해 감염 사례가 많지 않다. 반면 *C. sakazakii*가 신생아 및 영유아에게 감염될 경우는 뇌수막염(meningitis), 세균혈증(bacteraemia), 패혈증(septicemia), 등의 질병을 일으키며(Bar-Oz *et al.*, 2001; Burdette and Santos, 2000; Van Acker *et al.*, 2001) 좋지 않은 예후로 인해 치사율이 40-80%에 달하는 것으로 보고하였다(Nazarowec-White and Farber, 1997).

건조 저항성이 뛰어난(Breeuwer *et al.*, 2003; Dancer *et al.*, 2009; Edelson-Mammel *et al.*, 2005; Farber and Forsythe, 2008) 균의 특성상 분유를 비롯한 건조식품에서 분리되고 있으며(Himelright *et al.*, 2002) 이외에도 곡류(Cottyn *et al.*, 2001), 채소(Soriano *et al.*, 2001), 식품공장(Kandhai *et al.*, 2004), 토양(Neelam *et al.*, 1987) 등의 환경에서 분리되고 있다. 따라서 *C. sakazakii*는 다양한 환경에서 생존하며 스트레스 환경에 노출될 가능성이 있으며 이는 안전성과 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

일반적으로 미생물은 산성 스트레스 환경에서 다양한 양상을 보이며 균주나 산의 종류와 같은 환경적 요인에 의해 영향을 받는다(Foster, 2000; Park *et al.*, 1996). 세포 외막이 손상되거나 세포막의 효소 활성 및 운반 단백질 혹은 세포질의 pH 항상성에 영향을 받으며 생장이 억제되거나(Brown *et al.*, 1997) 외부 환경에 대응하는 유전자의 발현으로 인해 생장이 이루어진다(Beales, 2004). 산성 환경에 적응한 *Aeromonas hydrophila*(Isonhood *et al.*, 2002), *Escherichia coli* O157:H7(Cheng *et al.*, 2003; Garren *et al.*, 1997; Leenanon and Drake, 2001; Leyer *et al.*, 1995),

*Corresponding author: Woo-Suk Bang, Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, Gyeongsan 712-749, Korea. Tel: 82-53-810-2877, Fax: 82-53-810-4768, E-mail: wsbang@ynu.ac.kr

Enterococcus faecalis(Flahaut *et al.*, 1996), *Lactobacillus* (De Angelis and Gobbetti, 2004), *Lactococcus lactis*(Sanders *et al.*, 1999), *Listeria monocytogenes*(Davis *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2003), *Salmonella*(Foster, 1991; Foster and Hall, 1991), *Vibrio vulnificus*(Bang and Drake, 2005; Ferreira *et al.*, 2003)는 또 다른 산성 스트레스 환경 뿐만 아니라 alcohol, cold, heat, osmotic, oxidative와 같은 다른 종류의 스트레스 환경에서의 교차 저항성도 증가한 것으로 보고하였다. 이러한 미생물은 과일주스(Cheng and Chou, 2001), 소시지(Leyer *et al.*, 1995), 치즈(Leyer and Johnson, 1993), 오렌지주스, 샐러드드레싱, 요거트(Gahan *et al.*, 1996), 케찹(Tsai and Ingham, 1997)과 같은 다양한 산성 식품에서 분리되고 있다.

*C. sakazakii*의 연구를 보면 pH 4.5 환경하에서 실험균주 72개가 모두 성장하였고(Dancer *et al.*, 2009; Kim *et al.*, 2009), pH 3.9에서는 실험균주 72개 중 57개의 균주가 성장하였다(Dancer *et al.*, 2009). 뿐만 아니라 pH 3.5에서는 10^1 CFU/mL 이하의 낮은 수준으로 생장이 감소하여 산 저항성이 높은 것으로 보고가 되었다(Edelson-Mammel *et al.*, 2006). 따라서 *C. sakazakii*는 식품을 비롯한 다양한 산성 환경에서 생존할 수 있으며 식품 가공 산업에 있어서 식품의 안전성 확보를 위한 방안으로 산 처리를 가열 처리 다음으로 많이 사용하고 있으므로 *C. sakazakii*의 산성 스트레스 환경에서의 기본적인 특성에 관한 연구가 필요하며, 현재 산 저항성과 관련된 스트레스를 유발하는 환경에서의 교차 저항성에 관한 연구가 미비한 실정이므로 이에 대한 고찰이 필요할 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 미생물의 생육조건에 영향을 주는 산성 환경에서 *C. sakazakii* 표준균주를 비롯하여 다양한 환경에서 분리된 4종의 야생균주의 산성 환경에서의 기본적인 생리학적 특성과 더불어 약산성 환경에 노출된 경우 이와 같은 환경에서 성장한 *C. sakazakii*의 강산성 환경에서의 저항성 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

Microorganism

표준균주 *C. sakazakii* CAFM2(ATCC 29544)는 중앙대학교 식품가공학과로부터 분양받았으며 4종의 야생균주 *C. sakazakii* EB 1(분변에서 분리), EB 5(사람의 인후부에서 분리), EB 7(선식에서 분리), EB 41(토양에서 분리)은 경기도 보건환경 연구원으로부터 제공받아 실험에 사용하였다. *C. sakazakii* 균주를 확인하기 위하여 생화학적 동정 방법인 API 20E(BioMérieux, France)로 판정 후에 실험에 사용하였다. 모든 균주는 tryptic soy agar(TSA, Merck, Germany)에 희석 도말 후 37°C에서 24시간 배양한 후 5°C

의 냉장온도에서 짧은 기간 보관한 후 필요 시에 사용하였다. 멸균된 tryptic soy broth(TSB, Merck, Germany)에 접종 후 37°C의 배양기에서 20-24시간 동안 배양하였고 동일한 방법으로 적어도 3번 이상의 연속 배양을 거친 정지기에 속하는 균주를 실험에 사용하였으며 평판배양도말을 통해 10^{8-9} CFU/mL로 성장하는 것을 확인하였다.

Media

고체 배지는 TSA, 액체 배지는 TSB이며 희석용액은 0.1% peptone(Bacto™ Peptone, Becton Dickinson Co., USA) 9 mL을 사용하였다. 실온(20-22°C)에서 멸균기(HVE-50, Hirayama Co., Saitama, Japan)로 멸균된 TSB의 pH는 7.2로 측정되었으며 이를 모든 실험에서의 control pH로 설정하였다.

Adjustment of pH

농도 35.4%, 비중 1.18, 분자량 36.45의 HCl(Hydrochloric acid, DC chemical Co., Korea)을 멸균 증류수와 혼합하여 1 N로 조제하였고 이를 사용하여 실험에 필요한 모든 pH 조정이 이루어졌다. 예비 실험을 통해 각각의 pH에 따른 1 N HCl의 필요량을 pH meter(420A, Orion research Inc., USA)로 측정하였다.

Growth of *C. sakazakii* under different acid conditions

Control TSB에 접종 후 37°C에서 20-24시간의 배양을 거친 10^8 - 10^9 CFU/mL의 정지기 균주를 10^4 - 10^5 CFU/mL 수준으로 희석한 후 1 mL 취하여 99 mL의 pH 4.0, pH 4.5, pH 7.2의 TSB에 접종하였다. 접종된 TSB 용기를 37°C의 항온수조(WB-20E, Jeio Tech, Korea)에 보관하면서 접종 직후와 24시간 후에 샘플링하여 600 nm에서 흡광도를 측정(U-2000, Hitachi, Japan)하였다.

Survival of *C. sakazakii* under different acid conditions

Control TSB에 접종 후 37°C에서 20-24시간의 배양을 거친 정지기의 균주를 1 mL 취하여 동일한 pH의 TSB에서 10^6 - 10^7 CFU/mL 수준으로 희석한 후 다시 1 mL 취하여 99 mL의 pH 3.5, pH 4.0, pH 4.5의 TSB에 접종하였다. 접종된 TSB가 담긴 용기를 20-22°C의 실온에 보관하면서 접종 직후와 2, 4, 6, 8, 10시간마다 샘플링 하였다. 각각의 샘플링 시점에서 샘플링 하여 TSA로 pour plate한 후 37°C에서 24-48시간 배양한 후에 30-300개 사이의 집락의 수를 계산하였다. 각 실험의 대조군은 control TSB에서 배양된 정지기의 균주를 동일한 pH의 TSB를 이용하여 10^4 - 10^5 CFU/mL 수준으로 희석한 후 1 mL 샘플링 하여 이후 동일한 과정을 거친 후 집락의 수를 계산하였다.

Survival of *C. sakazakii* under different adaptation time

Control TSB에 접종 후 37°C에서 20-24시간의 배양을 거친 정지기의 균주를 1 mL 취하여 원심분리기(Micro17TR, Hanil Science Industrial, Incheon, Korea)로 원심분리(2450 g, 2 min) 한 후 상등액을 모두 걷어내고 pH 4.5 TSB에 접종하였다. 접종된 TSB가 담긴 용기를 20-22°C의 실온에 보관하면서 5, 10시간마다 샘플링 하였다. 각각의 샘플링 시점에서 1 mL 취한 후 pH 2.5 TSB에 접종하여 90, 180, 270, 360초마다 다시 샘플링 하여 TSA로 평균 주입한 후 37°C에서 24-48시간 배양한 후에 30-300개 사이의 집락의 수를 계산하였다. 각 실험의 대조군은 pH 4.5 TSB에 접종된 균주를 동일한 pH의 TSB에서 10^4 - 10^5 CFU/mL 수준으로 희석한 후 1 mL 샘플링 하여 이후 동일한 과정을 거친 후 집락의 수를 계산하였다.

Survival of *C. sakazakii* under different cultivation conditions

약산성 환경의 pH 4.5 TSB에 각각 접종 후 37°C에서 20-24시간의 배양을 거친 정지기의 균주를 1 mL 취하여 배양할 때와 동일한 pH 4.5 TSB에서 10^6 - 10^7 CFU/mL 수준으로 희석한 후 다시 1 mL 취하여 99 mL의 pH 2.5 TSB에 접종하였다. 접종된 TSB가 담긴 용기를 20-22°C의 실온에 보관하면서 90, 180, 270, 360초마다 샘플링 하여 TSA로 pour plate한 후 37°C에서 24-48시간 배양한 후에 30-300개 사이의 집락의 수를 계산하였다. 각 실험의 대조군은 pH 4.5 TSB에서 배양된 정지기의 균주를 동일한 pH의 TSB에서 10^4 - 10^5 CFU/mL 수준으로 희석한 후 1 mL 샘플링 하여 이후 동일한 과정을 거친 후 집락의 수를 계산하였다.

Statistical analysis

모든 실험은 3회 반복 수행하여 얻어진 결과이다. 결과에 대한 통계분석처리는 SAS program(Version 9.1, SAS Institute Inc., USA)을 사용하였다. 회귀분석(PROC REG 절차)으로 D값(일정한 처리 조건에서 90%의 미생물을 사멸하는데 걸리는 시간)을 계산하였다. General linear model 방법으로 처리군 간의 분산분석을 실시한 후 각 실험 간의 유의성 검정은 5% 수준($p < 0.05$)에서 이루어졌다.

결과 및 고찰

Growth of *C. sakazakii* under different acid conditions

일반적으로 균을 배양하는 pH 7.2 TSB에서는 모든 균주의 흡광도가 1.0 이상으로 나타났다. 이와 마찬가지로 pH 4.5 TSB에서는 균주에 따라 흡광도 변화가 차이를 보

였지만 모든 균주가 성장한 것으로 나타났다. 반면 pH 4.0 TSB에서 EB 5, EB 7 그리고 EB 41은 성장하였지만 나머지 균주의 흡광도 변화가 0.01 이하의 미미한 수준으로 생장이 제한된 것으로 나타났다. 이와 유사한 pH 4.1에서 표준 균주 및 국외에서 분리된 균주는 72개의 실험 균주 중 69개의 균주가 성장하였고(Dancer *et al.*, 2009), 분유 및 영유아 식품에서 분리된 균주는 14개의 실험균주 중 7개의 균주가 성장하였다(Kim *et al.*, 2009). 동일한 *C. sakazakii* 야생균주라고 할지라도 human에서 분리된 EB 5, food에서 분리된 EB 7, soil에서 분리된 EB 41은 stool에서 분리된 EB 1에 비해 낮은 산성 환경에서 생장이 가능한 것으로 나타났다. 국내 분리 균주가 국외 분리 균주보다 산성 환경에서 저항성이 낮은 것으로 보고하였으며(Kim *et al.*, 2009) brain heart infusion(BHI) 배지(pH 3.5)에서 생장이 이루어졌지만(Ibrahim *et al.*, 2005) 이유식(pH 4.3)에서 생장이 이루어지지 않은 것처럼(Richard *et al.*, 2005)배지나 시료에 따라서도 산 저항성이 차이를 보이는 것으로 보고하였다.

Survival of *C. sakazakii* under different acid conditions

균종에 따라 차이가 있지만 pH 4.5에서 pH 10 사이의 액체배지에서 생장이 가능한 것으로 보고한 것(Breeuwer *et al.*, 2003)과 마찬가지로 pH 4.5 TSB에서 균의 수가 증가하였다(Fig. 1). 균을 배양하는 TSB의 pH가 7.2임을 감안하면 pH 4.5에서 pH 7.2 사이의 TSB에서는 성장 속도는 영향을 받지만 생장은 가능할 것으로 생각된다. 하지만 pH 4.0 이하의 TSB에서는 EB 5와 EB 7을 제외한 나머지 균주의 균의 감소가 시작되었다. 특히 pH 3.5 TSB에서는 모든 균주가 5시간 되는 시점에 10^1 CFU/mL 이하의 수준으로 감소하였다. 이는 Edelson-Mammel 등(2006)의 연구에서 대부분의 실험 균주가 10^1 CFU/mL 이하의 수준으로 감소하여 산성 환경에서 높은 저항성을 나타낸다고 보고한 것과 유사한 결과이다. 산성 환경에 대한 저항성은 균주별로 차이를 보이는 것으로 나타났다. 이는 동일한 표준균주라고 할지라도 분리된 환경의 차이에서 기인한 것으로 판단된다.

Survival of *C. sakazakii* under different adaptation time

약산성 환경의 pH 4.5 TSB에서 적응하지 않은 경우 강산성 환경인 pH 2.5 TSB에서의 D값은 최소 1.33분에서 최대 1.53분으로 나타났다(Fig. 2). CAFM2와 EB 1은 pH 4.5 TSB에서 적응한 경우 D값이 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). EB 5는 5시간 동안 적응한 경우, EB 41은 5시간과 10시간 동안 적응한 경우 D값이 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). EB 7을 제외한 모든 균주가 약산성 환경의

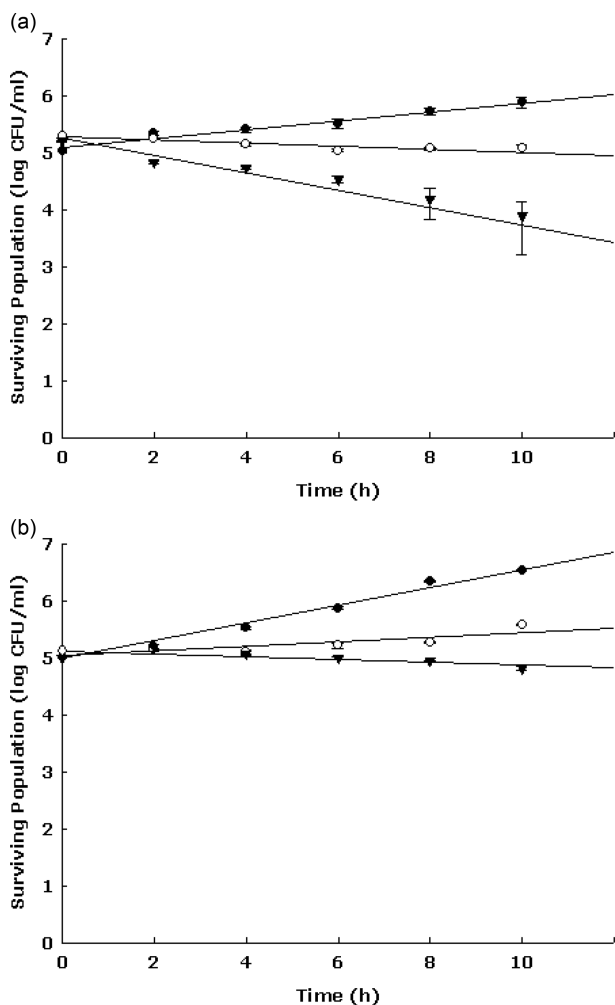


Fig. 1. Survival curves of (a) *C. sakazakii* CAFM2 (=ATCC 29544) and (b) *C. sakazakii* EB 7 at pH 4.5 TSB (●), pH 4.0 TSB (○), pH 3.5 TSB (▼). Bars represent standard error of the mean. Data points are the means from triplicate experiments.

pH 4.5 TSB에 적응하는 경우 강산성 환경에서의 D값이 증가하는 것으로 나타났다. 뿐만 아니라 강산성 환경에서의 저항성은 약산성 환경에서의 적응시간에 따라 다른 저항성을 보였다.

*C. sakazakii*는 *E. coli*(Cheng *et al.*, 2003; Garren *et al.*, 1997; Leenanon and Drake, 2001; Leyer *et al.*, 1995)와 같은 병원성 균주와 마찬가지로 약산성 환경에 적응하는 경우 강산성 환경에서의 저항성이 증가하는 것으로 나타났다. *C. sakazakii*의 산 저항성에 관한 명확한 mechanism은 제시되지 않고 있다. 하지만 *E. coli*처럼 정지거나 스트레스 상태에서 유발되는 RpoS와 같은 sigma factor에 의해 보호받는 것(Henge-Aronis, 2002; Loewen *et al.*, 1998; Robert *et al.*, 1993)으로 유추해 볼 수 있으며 추후 이와 관련된 연구가 수행되어야 할 것으로 판단된다.

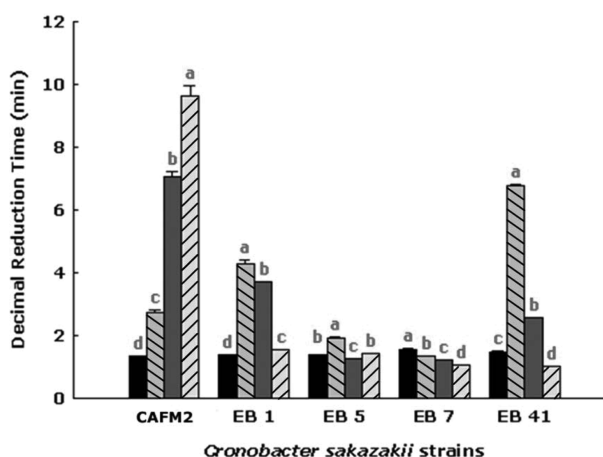


Fig. 2. D-values of *C. sakazakii* strains at pH 2.5 TSB under different adaptation time. 0 h (■), 5 h (▨), 10 h (■), 24 h (▩). Values followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Dunnett's test.

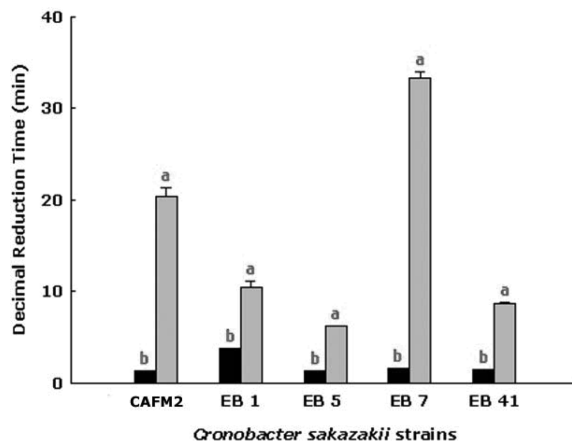


Fig. 3. D-values of *C. sakazakii* strains at pH 2.5 TSB under different cultivation condition. pH 7.2 (■), pH 4.5 (■). Values followed by different letters are significantly different ($p < 0.05$) by Dunnett's test.

Survival of *C. sakazakii* under different cultivation conditions

약산성 환경의 pH 4.5 TSB에서 배양한 경우 pH 2.5 TSB에서의 D값이 pH 7.2 TSB에서 배양한 경우에 비해 증가하였다(Fig. 3). CAFM2의 D값은 20.36분으로 나타났고, 야생균주의 D값은 6.21분에서 33.26분으로 나타났다. 모든 균주가 pH 4.5 TSB에서 배양한 경우 pH 2.5 TSB에서의 D값이 유의적으로 증가하였다($p < 0.05$). 야생균주 중에서 EB7이 산에 대한 저항성이 가장 크게 나타났고 EB5가 산에 대한 저항성이 가장 작은 것으로 나타났다 ($p < 0.05$). 동일한 pH라고 할지라도 산성 환경에서 적응한 경우보다 배양한 경우 강산성 환경에서의 D값이 높은 것은 온도의 영향이 적지 않을 것으로 판단된다. 특히 산성 환경에 적응한 경우 다른 스트레스 환경에서 교차 저항성이 증가하므로(Leyer and Johnson, 1993; Ryu and Bechat,

1998; Wong *et al.*, 1998) 추후 산과 온도의 교차 저항성에 관한 후속 연구가 수반되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구는 표준균주 *C. sakazakii*(CAF2M)와 4개의 야생 균주(EB 1, EB 5, EB 7, EB 41)를 사용하여 pH를 조정 한 산성 환경에서의 저항성을 살펴보았다. *C. sakazakii*는 pH 4.5 TSB에서 5시간, 10시간 동안 적응한 경우, pH 4.5 TSB에서 적응하지 않은 경우와 비교하여 EB 7을 제외한 모든 균주가 pH 2.5 TSB에서의 D값이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 따라서 약산성 환경에서 적응한 균주는 강산성 환경에서의 저항성이 증가하였다. *C. sakazakii*는 pH 4.5 TSB에서 배양한 경우, pH 7.2 TSB에서 배양한 경우와 비교하여 모든 균주가 pH 2.5 TSB에서의 D값이 유의적으로 높게 나타났다($p < 0.05$). 따라서 약산성 환경에서 배양한 균주는 강산성 환경에서의 저항성이 증가하였다. 본 연구를 통해 *C. sakazakii*는 약산성 환경에 적응한 경우 강산성 환경에서의 저항성이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 acid adaptation response는 *C. sakazakii*와 관련된 식품 가공 산업에서의 hurdle technology를 적용하는데 있어서 안전성 확보와 관련된 시사점을 제공할 수 있을 것으로 판단된다.

감사의 글

이 연구는 2009학년도 영남대학교 학술연구조성비(209-A-054-043)에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Bang, W. and Drake, M. A. (2005) Acid adaptation of *Vibrio vulnificus* and subsequent impact on stress tolerance. *Food Microbiol.* **22**, 301-309.
- Bar-Oz, B., Preminger, A., Peleg, O., Block, C., and Arad, I. (2001) *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. *Acta Paediatr.* **90**, 356-358.
- Beales, N. (2004) Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress : a review. *Comp. Rev. Food Sci. F.* **3**, 1-20.
- Breeuwer, P., Lardeau, A., Peterz, M., and Joosten, H. M. (2003) Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. *J. Appl. Microbiol.* **95**, 967-973.
- Brown, J. L., Ross, T., McMeekin, T. A., and Nichols, P. D. (1997) Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. *Int. J. Food Microbiol.* **37**, 163-173.
- Burdette, J. H. and Santos, C. (2000) *Enterobacter sakazakii* brain abscess in the neonate : the importance of neuroradiologic imaging. *Pediatr. Radiol.* **30**, 33-34.
- Cheng, H. Y. and Chou, C. C. (2001) Acid adaptation and temperature effect on the survival of *Escherichia coli* O157:H7 in acidic fruit juice and lactic fermented milk product. *J. Food Microbiol.* **70**, 189-195.
- Cheng, H. Y., Yu, R. C., and Chou, C. C. (2003) Increased acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by acid adaptation time and conditions of acid challenge. *J. Food Res. Int.* **36**:49-56.
- Cottyn, B., Regalado, E., Lannot, B., de Cleene, M., Mew, T. W., and Swings, J. (2001) Bacteria populations associated with rice seed in the tropical environment. *J. Phytopathol.* **91**, 282-292.
- Dancer, G. I., Mah, J. H., Rhee, M. S., Hwang, I. G., and Kang, D. H. (2009) Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. *J. Appl. Microbiol.* **107**, 1606-1614.
- Davis, M. J., Coote, P. J., and O'Byrne, C. P. (1996) Acid tolerance in *Listeria monocytogenes* : the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth phase-dependent acid resistance. *J. Microbiol.* **142**, 2975-2982.
- De Angelis, M. and Gobetti, M. (2004) Environmental stress responses in *Lactobacillus*: a review. *Proteomics* **4**, 106-122.
- Edelson-Mammel, S. G., Porteous, M. K., and Buchanan, R. L. (2005) Survival of *Enterobacter sakazakii* in dehydrated powdered infant formula. *J. Food Prot.* **68**, 1900-1902.
- Edelson-Mammel, S. G., 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.
- Farber, J. M. and Forsythe, S. J. (2008) *Enterobacter sakazakii*. ASM press, Washington DC, USA, pp. 15-19.
- Ferreira, A., Sue, D., O'Byrne, C. P., and Boor, K. J. (2003) Role of *Listeria monocytogenes* σ^B in survival of lethal acidic conditions and in the acquired acid tolerance response. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 2692-2698.
- Flahaut, S., Hartke, A., Giard, J. C., Benachour, A., Boutibonnes, P., and Auffray, Y. (1996) Relationship between stress response toward bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS Microb. Lett.* **138**, 49-54.
- Foster, J. W. (1991) *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *J. Bacteriol.* **173**, 6896-902.
- Foster, J. W. (2000) Microbial responses to acid stress. In: Storz G, Hengge-Aronis R (eds) Bacterial stress responses. ASM Press, Washington DC, USA, pp. 99-116.
- Foster, J. W. and Hall, H. K. (1991) Inducible pH homeostasis and the acid tolerance response of *Salmonella thyphimurium*. *J. Bacteriol.* **173**, 5129-5135.
- Gahan, C. G. M., O'Driscoll, B., and Hill, C. (1996) Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* can enhance survival in acidic foods and during milk fermentation. *Appl. Environ. Microb.* **62**, 3128-3132.
- Garren, D. M., Harrison, M. A., and Russell, S. M. (1997) Retention of acid tolerance and acid shock responses of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates. *J.*

- Food Prot.* **60**, 1478-1482.
23. Hawkins, R. E., Lissner, C. R., and Sanford, J. P. (1991) *Enterobacter sakazakii* bacteremia in an adult. *South. Med. J.* **84**, 793-795.
24. Hengge-Aronis, R. (2002) Signal transduction and regulatory mechanisms involved in control of the sigma S (*rpoS*) subunit of RNA polymerase. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**, 373-395.
25. Himelright, I., Harris, E., Lorch, V., and Anderson, M. (2002) *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula - Tennessee, 2001. *J. Am. Med. Assoc.* **287**, 2204-2205.
26. Ibrahim, S. A., Salameh, M. M., Seo, C. W., Tse, T. S. F., and Yang, H. (2005) Acid resistance of *Enterobacter sakazakii*. IFT Annual Meeting July 15-20 - New Orleans, Louisiana. Session 89-E.
27. Isonhood, J. H., Gerard, P. D., Leenanon, B., and Drake, M. A. (2002) Stress responses of *Aeromonas hydrophila* following environmental challenges. *J. Food Microbiol.* **19**, 285-293.
28. Jimenez, E. B. and Gimenez, C. (1982) Septic shock due to *Enterobacter sakazakii*. *Clin. Microbiol. Newsl.* **4**, 30.
29. 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.
30. Kim, S. A., Lee, Y. M., Oh, S. W., Gwak, H. S., Hwang, I. G., Kang, D. H., Woo, G. J., and Rhee, M. S. (2009) Biofilm formation and low pH viability of *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated from powdered infant formula and infant foods in Korea. *Korea J. Food Sci.* **29**, 702-708.
31. Leenanon, B. and Drake, M. A. (2001) Acid stress, starvation, and cold stress affect poststress behavior of *Escherichia coli* O157:H7 and nonpathogenic *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* **64**, 970-974.
32. Leyer, G. J., Wang, L. L., and Johnson, E. A. (1995) Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microb.* **61**, 3752-3755.
33. Leyer, G. L. and Johnson, E. A. (1993) Acid adaptation induces cross protection against environmental stresses in *Salmonella* Typhimurium. *Appl. Environ. Microb.* **59**, 1842-1847.
34. Loewen, P. C., Hu, B., Strutinsky, J., and Sparling, R. (1998) Regulation in the *rpoS* regulon of *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* **44**, 707-717.
35. Nazarowec-White, M. and Farber, J. M. (1997) Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. *J. Food Prot.* **60**, 226-230.
36. Neelam, M., Nawaz, Z., and Riazuddin, S. (1987) Hydrocarbon bio degradation biochemical characterization of bacteria isolated from local soils. *Pak. J. Sci. Ind. Res.* **30**, 382-385.
37. Park, Y. K., Bearson, B., Bang, S. H., Bang, I. S., and Foster, J. W. (1996) Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *J. Mol. Microbiol.* **20**, 605-611.
38. Richards, G. M., Gurtler, J. B., and Beuchat, L. R. (2005) Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant rice cereal reconstituted with water, milk, lipid infant formula or apple juice. *J. Appl. Microbiol.* **99**, 844-850.
39. Robert, K., Deborah, A. S., and Antonio, T. (1993) The stationary phase of the bacterial life cycle. *Ann. Rev. Microbiol.* **47**, 855-874.
40. Ryu, J. H. and Beuchat, L. R. (1998) Influence of acid tolerance responses on survival growth and thermal cross protection of *Escherichia coli* O157:H7 in acidified media and fruits juices. *Int. J. Food Microbiol.* **45**, 185-193.
41. Sanders, J. W., Venema, G., and Kok, J. (1999) Environmental stress response in *Lactococcus lactis*. *FEMS Microbiol. Rev.* **23**, 483-501.
42. 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. *J. Food Microbiol.* **18**, 159-163.
43. Tsai, Y. W. and Ingham, S. C. (1997) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* spp. in acidic condiments. *J. Food Prot.* **60**, 751-755.
44. Van Acker, J., de Smet, F., Muyldermans, G., Bougatef, A., Naessens, A., and Lauwer, S. (2001) Outbreak of necrotizing enterocolitis associated with *Enterobacter sakazakii* in powdered milk formula. *J. Clin. Microbiol.* **39**, 293-297.
45. Wong, H. C., Peng, P. Y., Han, J. M., Chang, C. Y., and Lan, S. L. (1998) Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* **66**, 3066-3071.

(Received 2011.3.22/Revised 1st 2011.6.2, 2nd 2011.6.27/
Accepted 2011.7.8)