

Resistance and Survival of *Cronobacter sakazakii* under Environmental Stress of Low Temperature

Se-Hun Kim¹, Sung-Ran Jang¹, Hyun-Jung Chung² and Woo-Suk Bang^{1,†}

¹Department of Food and Nutrition, Yeungnam University, 214-1 Dae-dong, Gyeongsan, 712-749, South Korea

²Department of Food and Nutrition, Inha University, 253 Younghyun-dong Nam-gu, Incheon 402-751, South Korea

저온 환경에서 *Cronobacter sakazakii*의 저항과 생존

김세훈¹ · 장성란¹ · 정현정² · 방우석^{1,†}

¹영남대학교 식품영양학과, ²인하대학교 식품영양학과

Abstract

Cronobacter sakazakii has been isolated from a wide range of environmental sources and from several foods of animal and plant origin. The objective of this study was to determine the resistance of *C. sakazakii* (ATCC 12868, ATCC 29004, and ATCC 29544) in cold, cold-freeze thaw, cold-acid, and cold starvation-freeze thaw stress. The number of *C. sakazakii* decreased to 1 log CFU/mL at 5°C (cold storage) for 10 days. When *C. sakazakii* was cultivated at a low temperature (13°C), the population of *C. sakazakii* ATCC 12868 and 29004 increased to 10⁹ CFU/mL, and the population of *C. sakazakii* ATCC 29544 increased to 10⁸ CFU/mL. For *C. sakazakii* ATCC 12868 and 29004, the cold-adapted cells (5°C 24 hr) decreased by 4 log CFU/mL, and the low-temperature-cultivated cells (13°C) decreased by 0.5 log CFU/mL. In this study, low-temperature cultivation enhanced the freeze-thaw cross-resistance due to the metabolic changes in the cells. Cold stress (5°C 48 hr, 13°C cultivation) enhanced the cold-acid cross-resistance. The cold-starved cells in the sterilized 0.1% peptone water enhanced the freeze-thaw cross-resistance with significant differences (p<0.05). Therefore, the increased tolerance of the cold-adapted or low-temperature-cultivated *C. sakazakii* cells to freeze-thaw, acid, or starvation suggests that such environments should be considered when processing minimally processed foods or foods with extended shelf life.

Key words : *Cronobacter sakazakii*, cold environment, response of cold adaptation, freeze-thaw resistance

서 론

*Cronobacter sakazakii*는 그람 음성(Gram-negative), 포자를 형성하지 않는 간균으로 Enterobacteriaceae과에 속한다. *C. sakazakii*는 유아에게 치명적인 영향을 주는 급성 기회 감염균으로 주로 생후 1개월 이내의 신생아, 조산아, 저체중아, 유아에게서 수막염, 패혈증, 신생아 괴사성 장염 등의 병을 일으키는 것으로 알려져 있다(1,2,3,4). 뿐만 아니라 뇌졸중 환자들에서도 *C. sakazakii*가 분리되었고, 비장애 중기가 있던 노인에게서 균에 의한 균혈증이 나타났다(5).

*C. sakazakii*는 조제분유, 영유아의 이유식에서 많이 검출

되는 것으로 알려져 있지만 그 외에 음료에서도 분리되었으며, 치즈, 소시지 등과 같은 동물성 식품 및 김, 허브, 차, 토마토, 야채 및 샐러드 등과 같은 식물성 식품 등 다양한 식품에서 발견되었다(6,7,8). 이와 같이 자연계에 다양하게 존재하는 *C. sakazakii*에 대해 산(9), 열(10), 건조, 살균소독제(11), 항생제(12,13) 등의 저항성에 대한 많은 연구가 조제분유나 이유식, 식품들에서 진행되어 왔다.

요즘 cold chain을 이용한 편의 식품을 쉽게 접할 수 있어 저온 환경에 노출될 기회가 증가되었고, 그에 따라 *C. sakazakii*에 오염될 가능성도 높아졌다. 다시 말해 식품이 생산되어 소비되기까지의 과정에서 냉장이나 냉동 상태로 보관되는 시간이 길어져 균의 cold adaptation 기회가 증가한 것이다(14).

저온에서 *C. sakazakii*의 성장과 생장을 알아본 선행 연구

[†]Corresponding author. E-mail : wsbang@ynu.ac.kr
Phone : 82-53-810-2877, Fax : 82-53-810-4768

는 저온 저장이 균의 잠재적인 성장에 미치는 영향(15), 수분활성, 분유 성분과 저온에 따른 생존(16), 저온 저장에 따른 신선편이 과일과 야채, 저온살균하지 않은 주스에서 변화(17) 등이 있다. 하지만 *C. sakazakii*의 냉장 저장 중의 변화와 저온-냉/해동, starvation-냉/해동 저항성, cold-acid 교차저항성에 대한 연구는 미비한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 *C. sakazakii*의 냉장 저장 중의 변화, 냉/해동 저항성, 저온 영향에 따른 산과의 교차저항성, starvation과 냉/해동 교차저항성에 대해 알아보려고 한다.

재료 및 방법

Strains

본 연구에서 사용된 3개의 *Cronobacter* spp. (ATCC 12868, ATCC 29004, ATCC 29544)는 API 20E (BioMerieux, Marcy l'Etoile, France)를 이용하여 동정하였다. 각각의 실험 전 Stock culture로 -70℃에 보관된 균들을 꺼내 tryptic soy broth (TSB, Merck, Darmstadt, Germany)에 백금이로 접종하여 37℃의 배양기에서 20~24시간 배양하였다. 적어도 2번 이상 계대배양을 거친 정지기 균을 사용하였다. TSB에서 자란 정지기 균은 희석하여 tryptic soy agar (TSA, Merck, Darmstadt, Germany)로 pour plate를 하여 24시간 동안 배양기에서 배양한 후, 그 집락을 계수하여 10⁹ CFU/mL을 나타내는 것을 확인하였다.

Low temperature cultivation

시험균주 3개를 멸균된 9 mL의 TSB에서 37℃, 20~24시간 동안 계대 배양된 정지기 균을 희석하여 99 mL TSB에 초기 균수가 2 log CFU/mL이 되도록 하였다. 저온 배양기 (Sanyo Electric Co., Osaka, Japan)에서 13℃로 온도를 조정 한 후 8시간 간격으로 균의 성장 수준을 알아보았다. 매 8시간마다 1 mL씩 취해 9 mL의 0.1% 멸균 펩톤수(Bacto™ Peptone, Becton Dickinson Co, Sparks, USA)에 희석해 Pour plate를 하여 24시간 동안 37℃ 배양기에 배양한 후 집락을 계수하였고, 동시에 spectrophotometer(U-2000, Hitachi, Tokyo, Japan)를 통해 OD600값을 확인하였다.

Cold stress

시험균주 3개를 멸균된 9 mL의 TSB에서 37℃, 20~24시간 동안 배양한 후 최종 생균수가 5 log CFU/mL의 수준이 되도록 99 mL TSB에 희석하였다. 이때, 미리 냉장 보관한 용기와 멸균된 TSB를 사용하였고 5℃로 맞춰진 냉장고에 저장하였다. 5℃ 냉장고에 저장 후 0, 2, 4, 6, 8, 10일째에 1 mL를 취해 9 mL의 0.1% 멸균 펩톤수에 희석하여 TSA에 도말한 후 24시간 동안 37℃ 배양기에서 배양하여 형성된 집락을 계수하였다.

Determination of freeze-thaw resistance

균주 3개를 대조구 (37℃에서 배양한 것), 처리구 (5℃에 24시간 적응시킨 것, 13℃에서 배양한 것)로 이용하였다. 초기 균수가 5 log CFU/mL이 되도록 멸균된 99 mL TSB에 희석하여 각 샘플들을 50 mL Conical Centrifuge Tube (SPL Life science, Pocheon, Korea)에 담아 -20℃ 냉동실에 저장하였다. 샘플들을 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12일에 꺼내어 21℃로 맞춰진 항온수조 (WB-20E, Hitachi, Tokyo, Japan)에 30분간 해동시켰다(18). 샘플은 취한 후 바로 냉동실에 저장하였고, 0.1% 멸균 펩톤수 9 mL에 희석하여 TSA에 도말한 후 37℃의 배양기에서 24시간 동안 배양하여 형성된 집락을 확인하였다.

Determination of acid resistance

시험균주 3개를 대조구 (37℃에서 배양한 것), 처리구 (5℃에 2일간 적응시킨 것, 13℃에서 배양한 것)로 이용하였다. 먼저, HCl (Hydrochloric acid, DC chemical Co., Seoul, Korea)와 멸균 증류수를 이용하여 1 N HCl로 만들어 사용하였다. 실온 (22℃)과 pH 3.5로 맞추어진 TSB를 사용해 초기 균수를 5 log CFU/mL가 되게 하였다. 샘플들을 실온에 보관하면서 0, 2, 4, 6, 8, 10시간에 1 mL씩 취하였고 9 mL의 0.1% 멸균 펩톤수에 희석하였다. TSA에 도말한 후 37℃의 배양기에서 24시간 동안 배양하여 형성된 집락을 확인하였다.

Determination of starvation resistance

시험균주 3개를 대조구 (37℃ 배양기에서 배양하여 5℃ TSB배지에 2일간 적응시킨 것), 처리구 (5℃ 펩톤, 증류수에서 2일간 적응시킨 것)로 이용하였다. 각각 초기 균수가 5 log CFU/mL이 되도록 멸균된 99 mL TSB, 펩톤, 증류수에 희석하였다. 샘플을 50 mL Conical Centrifuge Tube에 담아 -20℃ 냉동실에 저장하였다. 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12일에 꺼내어 21℃로 맞춰진 항온수조에 30분간 해동시켜(18) 샘플을 취한 후 바로 냉동실에 저장하였다. TSA에 도말한 후 37℃의 배양기에서 24시간 동안 배양하여 형성된 집락을 계수하였다.

Statistical analysis

각 실험은 3번 반복실험을 수행하였고 SAS프로그램 (Version 9.1, SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여 통계 처리하였다. 회귀분석으로 D값 (일정한 온도에서 90%의 미생물을 사멸하는데 걸리는 시간)을 계산하였다. General linear model방법으로 처리군 간에 분산분석을 실시하였고, p<0.05로 나타내는 것으로 유의적인 차이가 있는 것을 확인하였다.

결과 및 고찰

Cold stress of *C. sakazakii*

실험 결과 세 균주 (ATCC 12868, ATCC 29004, ATCC 29544) 모두 1 log CFU/mL 정도의 사멸을 보였고 균주들 간에 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 1). *C. sakazakii* ATCC 29004의 D값은 7.95일, ATCC 12868의 D값은 11.43일, ATCC 29544의 D값은 12.13일로 나타났다(Table 1). *C. sakazakii* ATCC 29004의 D값이 다른 두 균주보다 낮아 냉장 저장에서 더 민감한 것으로 나타났다. 5°C에 *C. sakazakii*를 저장하여 균이 성장하지 않은 것은 Nazarowec-white와 Farber(19)가 5.5°C 이하에서 *Cronobacter* spp.가 성장하지 않는다고 보고한 것과 같은 결과를 나타냈다.

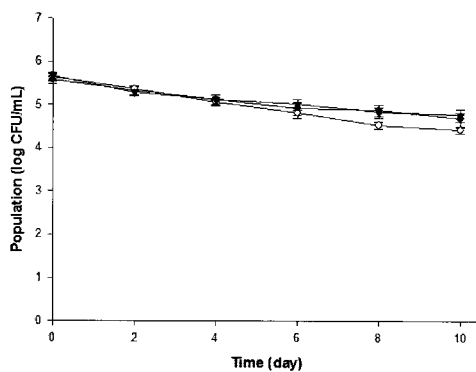


Fig. 1. Survival curve of *C. sakazakii* strains at 5°C.

●: *C. sakazakii* ATCC 12868, ○: *C. sakazakii* ATCC 29004, ▼: *C. sakazakii* ATCC 29544.

Table 1. D-value of *C. sakazakii* strains at 5°C storage.

Strains	D-value (day)
ATCC 12868	11.43±1.59
ATCC 29004	7.95±1.10
ATCC 29544	12.13±3.55

The results represent Mean ± S.D.

Low temperature cultivation

시험균주 3개를 13°C에서 배양한 결과 모든 균주에서 성장을 확인할 수 있었으나 균주마다 성장하는 정도는 달랐다. 미생물이 1 mL당 $10^8 \sim 10^{10}$ CFU/mL로 존재할 때 정지기에 도달하는데 *C. sakazakii* ATCC 29004는 5일째, *C. sakazakii* ATCC 12868은 7일째에 10^9 CFU/mL에 도달하였다. 하지만 *C. sakazakii* ATCC 29544는 두 균주와 다르게 5일 배양 후부터 30일 동안 10^9 CFU/mL에 도달하지 못하고 10^8 CFU/mL에 머문 것을 확인할 수 있었다. 13°C에서 배양한 균으로 교차저항성을 알아볼 때, 정지기 균을 사용하기

위해 *C. sakazakii* ATCC 29004, 12868은 5일 동안 배양한 것, *C. sakazakii* ATCC 12868은 7일 동안 배양한 것을 사용하였다. 13°C에서 균이 성장한 것은 12°C의 저온에서 물이나 우유에 infant cereal을 섞어 *C. sakazakii*를 접종해 균의 성장을 보고한 Lin 등(5)의 연구와 유사한 결과를 나타냈다. 반면 시료를 달리하여 12°C에서 저장한 연구에서는 균의 생장이 억제되었다고 보고하였다. *C. sakazakii*를 infant rice와 사과 주스 혼합액에 접종하여 수행한 연구(5)와 사과, 딸기, 양배추에 접종하여 7일간 저장한 연구(17)에서는 균의 생장이 저해되었다고 보고하였다. 사과와 딸기의 주요 산인 citric acid와 낮은 pH (4.0 이하), 양배추에서 생산되는 유기산인 lactic acid로 인한 pH의 감소 (pH 3.9)로 *C. sakazakii*의 성장을 저해한 것으로 보인다. *C. sakazakii*가 12~13°C의 저온에서 성장 시, 균의 성장을 저해하는 낮은 pH나 유기산이 존재하지 않는 환경에서 균의 생장이 가능한 것으로 사료된다.

Freeze-thaw resistance of *C. sakazakii*

C. sakazakii ATCC 12868, *C. sakazakii* ATCC 29004을 5°C에 24시간 저장한 것은 4 log CFU/mL 정도의 사멸을 보인 반면 13°C에서 배양한 것은 12일간 일정한 균수를 유지하였다(Fig. 2). 이는 저온 적응으로 이보다 낮은 온도에서 저항성이 증가하였다고 보고한 연구와 유사한 결과를 나타냈다(18, 21, 22). 13°C에서 배양으로 일정한 균수를 유지한 것은 저온에서 배양되면서 cold acclimation proteins이 유도되거나 세포막의 유동성을 증가시키기 위해 불포화 지방산의 조성을 높이는 등의 변화로 내성이 생겨 교차 저항성이 증가한 것으로 보인다(23). 하지만 *C. sakazakii* ATCC 29544는 다른 두 균주와는 다르게 저온에 적응시키거나 저온에 배양한 것 모두 4 log CFU/mL의 사멸을 보였다. 이는 환경이 변할 때 흔히 발생하는 조절 인자인 sigma factor로 인한 유전자 발현이 일어나지 않아 저항성을 나타내지 않은 것으로 사료된다(14).

균주별로 D값을 보면 *C. sakazakii* ATCC 12868, 29004는 두 균주 모두 13°C에서 배양한 균의 D값이 66.48일, 121.77일로 가장 높았다(Table 2). 저온에 전 처리되지 않았거나 5°C에서 24시간 적응시킨 것에 비해 13°C에서 배양한 경우 냉/해동 환경에서 더 높은 생존율을 나타냈다. *C. sakazakii* ATCC 29544는 5°C에 적응한 것의 D값이 3.14일로 가장 높게 나타났으며 유의적인 차이가 있었다($p < 0.05$). 이는 Goldstein 등(24)과 Willimsky 등(25)이 미생물이 저온에 전 처리하였을 때 저온에 적응된 균들이 냉동 환경에서 생존이 높아진다고 보고한 것과 유사한 결과를 나타냈다. Stress 환경별로 살펴보면, 5°C에 적응시킨 것은 *C. sakazakii* ATCC 12868의 D값이 3.60일, 13°C에서 배양한 것에서는 *C. sakazakii* ATCC 29004의 D값이 121.77일로 가장 높게 나타났다.

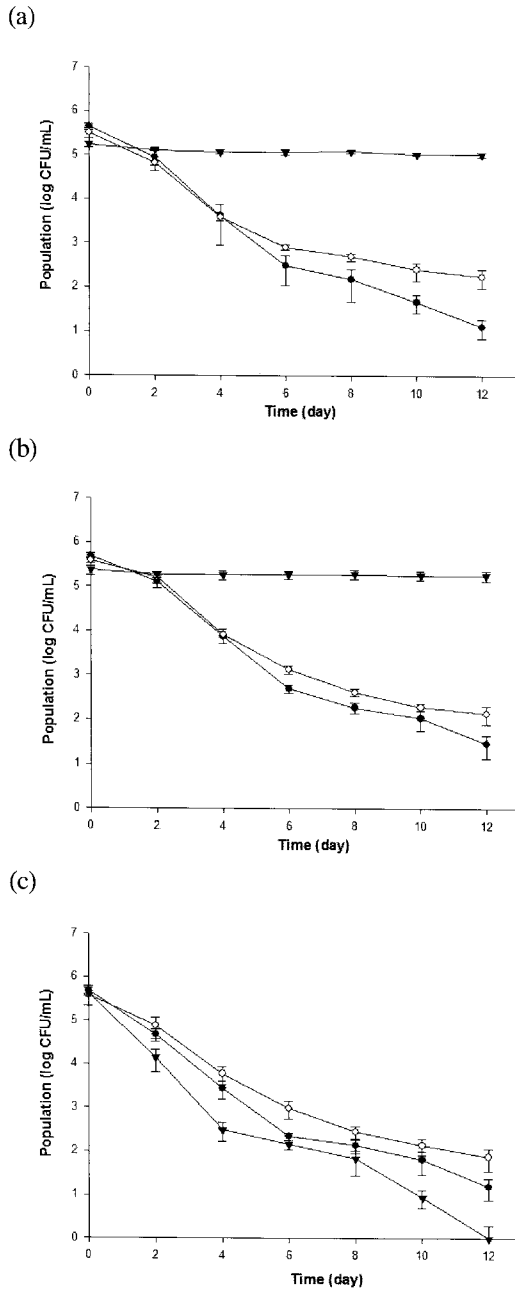


Fig. 2. Survival curve of *C. sakazakii* (a) ATCC 12868, (b) ATCC 29004, (c) ATCC 29544 at freeze-thaw.

●: Control strains, ○: Cold adapted strains at 5°C, ▼: Low temperature cultivated strains at 13°C.

저온 환경처럼 산, 염, 온도 등의 환경에 노출되었던 미생물에 다른 환경의 스트레스가 가해졌을 때 일부 균주들은 교차보호로 인해 내성이 강해진다고 보고되었다(26). *C. sakazakii*의 경우 저온 환경에 적응하거나 배양되어 저온 환경에서 내성이 증가되어 냉/해동 반복 실험을 했을 때 대조구보다 교차저항성이 증가된 것으로 사료된다.

Cold-acid resistance of *C. sakazakii*

대조구의 경우 10시간 동안 1~2 log CFU/mL의 사멸을

Table 2. D-value of *C. sakazakii* strains at freeze-thaw resistance. (day)

Strains	D-value		
	Control	Cold stress	Low temperature cultivation
ATCC 12868	2.65±0.23 ^{1)B(A2)}	3.60±0.26 ^{bA}	66.48±17.80 ^{AB}
ATCC 29004	2.70±0.18 ^{bA}	3.23±0.23 ^{bB}	121.77±39.74 ^{aA}
ATCC 29544	2.73±0.27 ^{bA}	3.14±0.13 ^{ab}	2.55±0.25 ^{cb}

¹⁾The results represent Mean±S.D.

²⁾Means with same letter are not significantly different at p<0.05 level by Dunnett's test; A-B: means Dunnett's test for different stresses (column), a-b: means Dunnett's test for different strains (row).

보인 반면, 처리구는 10시간 동안 0.5 log CFU/mL의 사멸을 보일 정도로 높은 생존율을 보였다(Fig. 3). *C. sakazakii* ATCC 12868에서는 대조구와 처리구의 생존율 차이가 2 log CFU/mL로 다른 균주들에 비해 가장 많이 나타났으며 대조구와 5°C에 2일간 적응시킨 것에서는 유의적으로 생존율이 증가하였다(p<0.05). *C. sakazakii* ATCC 29004는 대조구와 처리구 사이에 생존율 차이가 1 log CFU/mL로 나타났으며 대조구와 5°C에 2일간 적응시킨 것, 대조구와 13°C에서 배양한 것에서 각각 유의적인 차이가 나타났다(p<0.05). 다른 두 균주보다 5°C에 적응시킨 것과 13°C에서 배양한 것 모두 산성에서 교차저항성이 큰 것을 알 수 있었다.

모든 균주에서 대조구에 비해 5°C에 적응시킨 것과 13°C에서 배양한 것의 D값이 증가하였다(Table 3). *C. sakazakii* ATCC 12868과 29004는 13°C에서 배양한 것의 D값이 41.45시간, 138.93시간, ATCC 29544는 5°C에서 적응한 것의 D값이 45.03시간으로 산성 환경에서 교차저항성이 가장 큰 것을 볼 수 있었다. Campbell 등(27)이 *E. coli* O157:H7으로 cold-acid 교차저항을 연구한 결과 저온 저장과 저장 기간이 산 내성에 영향을 준다는 보고와 유사했으며, *E. coli*의 내성이 증가한 것은 대체 전사 인자 *rpoS*의 유도 때문인 것으로 알려졌다(28). *C. sakazakii*의 cold-acid 교차저항성 실험 결과 산 환경에서 저항성이 증가한 것은 저온 환경에서 적응

Table 3. D-value of *C. sakazakii* strains at cold-acid (pH 3.5) resistance. (hr)

Strains	D-value		
	Control	Cold stress	Low temperature cultivation
ATCC 12868	5.32±0.16 ^{1)B(B2)}	25.87±4.46 ^{aAB}	41.45±3.15 ^{aAB}
ATCC 29004	11.91±0.57 ^{bA}	65.61±19.06 ^{aA}	138.93±47.84 ^{aA}
ATCC 29544	13.29±4.63 ^{bA}	45.03±6.04 ^{ab}	24.59±2.06 ^{ab}

¹⁾The results represent Mean±S.D.

²⁾Means with same letter are not significantly different at p<0.05 level by Dunnett's test; A-B: means Dunnett's test for different stresses (column), a-b: means Dunnett's test for different strains (row).

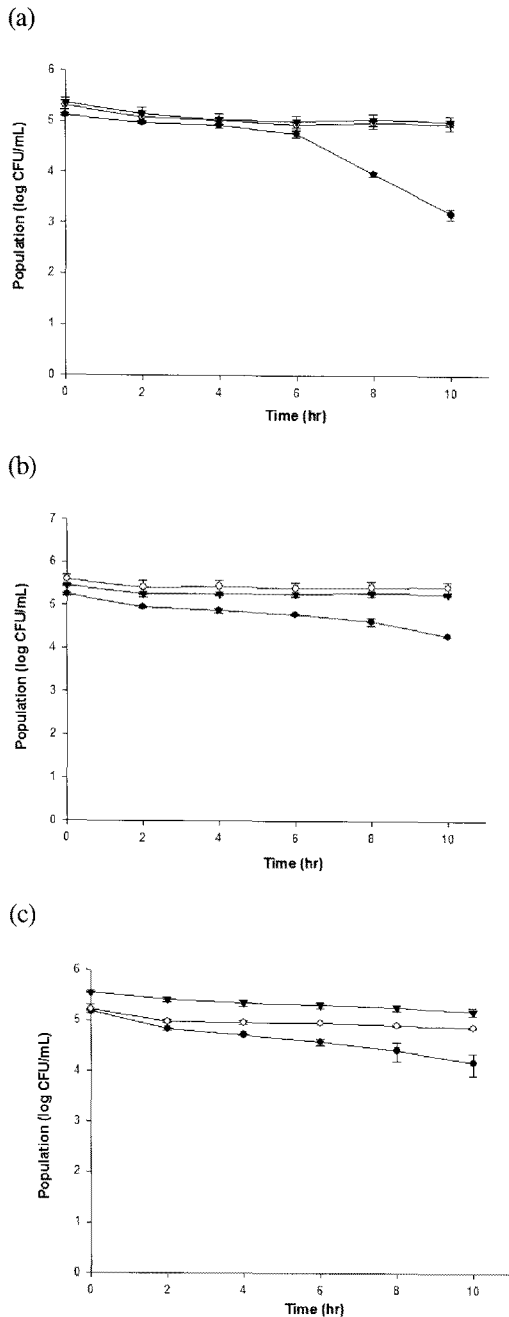


Fig. 3. Survival curve of *C. sakazakii* (a) ATCC 12868, (b) ATCC 29004, (c) ATCC 29544 at cold-acid.

●: Control strains, ○: Cold adapted strains at 5°C, ▼: Low temperature cultivated strains at 13°C.

하며 유도된 유전물질이 영향을 미친 것으로 사료된다.

Stress 환경별로 D값을 비교하였을 때, 5°C에 적응시킨 것과 13°C에서 배양한 것을 pH 3.5에 노출시켰을 때 D값이 대조구에 비해 높게 나타났으며 유의적인 차이가 나타났다 (p<0.05). 5°C에 적응시킨 것과 13°C에서 배양한 것이 산 환경에서 생존할 때 *C. sakazakii* ATCC 29004의 D값이 각각 65.61시간, 138.93시간으로 가장 높게 나타나 다른 두 균주 보다 저온으로 인한 교차저항성이 가장 많이 증가하

였다.

*C. sakazakii*의 pH에서 최저 성장 수준을 3.9로 보고하였 고(29), *E. coli*, *S. Typhimurium*은 3.9(30), *Y. enterocolitica*는 4.0(31)이라고 보고하였다. 본 실험에서 조정 한 pH는 *C. sakazakii*의 최저 성장 수준인 pH 3.9보다 낮은 pH 3.5로 모든 대조균은 생존율이 감소하는 것으로 나타났다. 반면 5°C에 적응하거나 13°C에서 배양된 처리구는 균의 생존이 일정하게 유지되었음을 확인할 수 있었다. *C. sakazakii*를

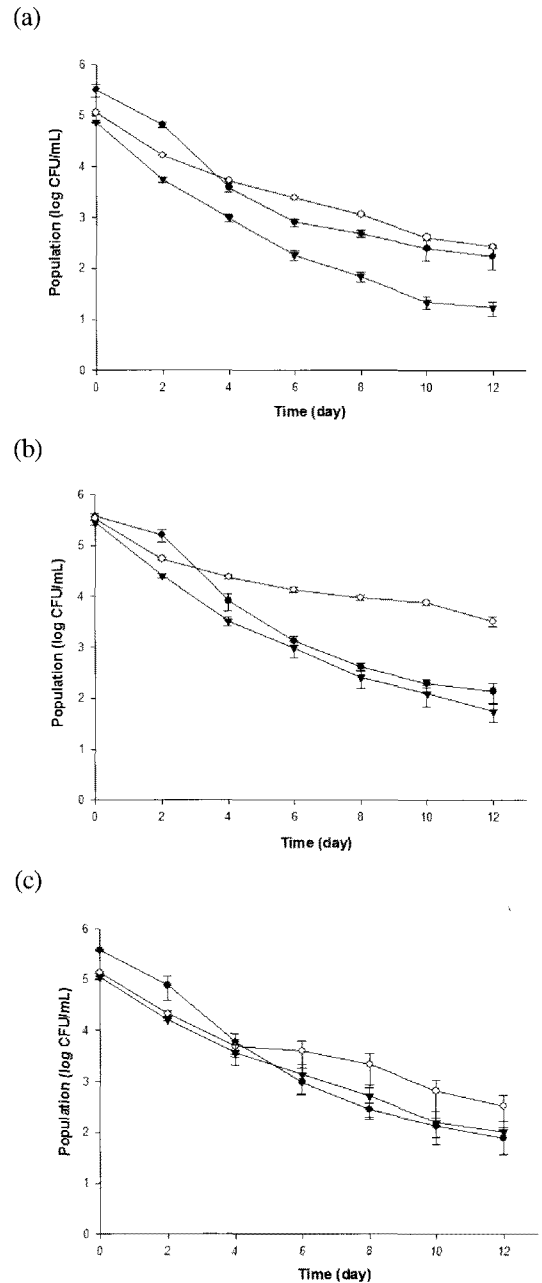


Fig. 4. Survival curve of *C. sakazakii* (a) ATCC 12868, (b) ATCC 29004, (c) ATCC 29544 at starvation-freeze thaw.

●: Control strains(Cultivated strains at 37°C to 5°C TSB during 48 hr storage), ○: Starvated strains at 5°C sterilized 0.1% peptone water during 48 hr, ▼: Starvated strains at 5°C sterilized distilled water during 48h.

이용한 cold-acid 교차저항을 수행하였을 때 냉/해동 교차저항 실험과 유사하게 저온에서 적응이나 배양으로 내성이 증가하여 산 환경에서 높은 생존율을 나타내는 것으로 사료된다.

Starvation-freeze thaw resistance of *C. sakazakii*

모든 균주에서 12일 저장 기간 동안 생존율이 감소하였지만, 0.1% 멸균 펩톤수로 starvation 전 처리를 하였을 때 냉/해동 환경에서 생존율이 높게 나타났다(Fig. 4). 멸균 펩톤수 (0.1%)를 이용하여 starvation한 *C. sakazakii* ATCC 29004의 D값이 6.76일로 ATCC 12868의 4.78일, ATCC 29544의 3.97일보다 높은 수치를 나타내어 starvation으로 인한 냉/해동 환경에서 저항성이 가장 높았고, 유의적인 차이가 있었다($p < 0.05$, Table 4). 이는 *Vivrio vulnificus*, *E. coli*를 starvation 전 처리한 후 냉/해동 실험을 하여 냉/해동 환경에서 교차저항성이 증가한 연구와 유사한 결과를 나타냈다(18, 21).

Table 4. D-value of *C. sakazakii* strains at starvation-freeze thaw resistance.

Strains	D-value (day)		
	Control	Sterilized 0.1% peptone water	Sterilized distilled water
ATCC 12868	3.51±0.31 ^{1)ba2)}	4.78±0.18 ^{ab}	3.23±0.52 ^{ba}
ATCC 29004	3.18±0.24 ^{ba}	6.76±0.51 ^{aA}	3.15±0.50 ^{ba}
ATCC 29544	3.09±0.16 ^{ba}	3.97±1.71 ^{ab}	3.10±1.31 ^{ba}

¹⁾The results represent Mean±S.D.

²⁾Means with same letter are not significantly different at $p < 0.05$ level by Dunnett's test; A-B: means Dunnett's test for different stresses (column), a-b: means Dunnett's test for different strains (row).

펩톤수에 starvation하였을 때 교차저항성이 증가한 것은 미생물이 아미노산, 펩티드와 프로테오스 같은 수용성 합 질소화합물을 흡수해 질소원이나 탄소원으로 이용하여 저항성이 증가된 것으로 보인다. 그러나 멸균 증류수에서 starvation하여 냉/해동 환경에 노출되었을 때 대조구와 비슷한 D값을 나타내어 멸균 증류수로 starvation하였을 때는 냉/해동 환경에서 교차저항성이 증가하지 않는 것으로 나타났다. 따라서 starvation의 조건 또한 최소한의 영양소들이 존재할 경우에 다른 stress 환경에 대해 저항성에 영향을 주리라 사료된다.

미생물들이 starvation 환경에서 살아남기 위해 세포 크기 감소와 포자 형성과 같은 세포 형태 변화, 세포 안팎의 단백질 성분과 지방산 조성 변화, proteases, lipases, glutamine synthetase, alkaline phosphatase 등 특정 효소를 생산한다고 보고하였다(32, 33, 34). *C. sakazakii*이 starvation 환경에서 생존하기 위한 메커니즘의 변화로 저항성이 증가한 것으로

사료된다.

요 약

C. sakazakii ATCC 12868, 29004, 29544를 이용하여 저온 저장 중의 변화를 살펴보고 저온과 냉/해동, 저온과 산, 저온에서 starvation한 것과 냉/해동의 교차저항에 대해 알아보았다. *C. sakazakii*를 5°C에서 10일간 저장하였을 때 모든 균주들에서 1 log CFU/mL의 사멸을 보였다. *C. sakazakii*를 13°C에서 배양한 결과, *C. sakazakii* ATCC 12868, 29004는 각각 7일째, 5일째에 10⁹ CFU/mL을 나타냈고 *C. sakazakii* ATCC 29544는 5일 배양 후부터 30일 동안 10⁹ CFU/mL에 도달하지 못하고 10⁸ CFU/mL를 유지하였다. 저온과 냉/해동의 교차저항 결과, *C. sakazakii* ATCC 12868, 29004에서 대조구와 5°C에서 2일간 저장한 것은 4 log CFU/mL의 사멸을 보였고 13°C에서 배양한 것은 일정한 균수를 유지하였다. 저온과 산의 교차저항 실험에서 *C. sakazakii* ATCC 29544를 제외하고 다른 두 균주에서 대조구에 비해 5°C에서 2일간 저장한 것, 13°C에서 배양한 것은 일정하게 높은 생존율을 보였다. *C. sakazakii*는 멸균된 5°C 0.1% 펩톤수에서 starvation한 것이 5°C의 TSB배지와 멸균된 증류수에서 starvation한 것보다 냉/해동 환경에서 D값이 가장 높게 나타났다. *C. sakazakii*는 5°C에서 균의 생장이 저해되었지만 13°C에서 *C. sakazakii*의 생장이 가능하였다. 이 연구 결과는 저온에서 적응하거나 저온에서 배양된 *C. sakazakii*의 다른 환경에서 교차저항성을 알아보는 데 유용한 기초 자료로 사용될 수 있을 것이다.

감사의 글

이 연구는 2009학년도 영남대학교 연구조교 지원비에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Aresni A, Malamou-Ladas E, Koutsia C, Xanthou M, Trika E (1987) Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. J Hosp Infect, 9, 143-150
2. Bar-Oz B, Preminger A, Peleg O, Block C, Arad I (2001) *Enterobacter sakazakii* infection in the newborn. Acta Paediatr, 90, 356-358
3. Ben-Hamouda T, Foulon T, Ben-Cheikh-Masmoudi A, Fendri C, Belhadj O, Gen-Mahrez K (2003) Molecular epidemiology of an outbreak of multiresistant *Klebsiella*

- pneumoniae* in a Tunisian neonatal ward. J Med Microbiol, 52, 427-433
4. El-Sharoud WM, O'Brien S, Negredo C, Iversen C, Fanning S, Healy B (2009) Characterization of *Cronobacter* recovered from dried milk and related products. BMC Microbiol, 9, 24-32
 5. Lin LC, Beuchat LR (2007) Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant cereal as affected by composition, reconstitution liquid, and storage temperature. J Food Prot, 70, 1410-1422
 6. Beuchat LR, Kim HK, Gurtler JB, Lin LC, Ryu JH, Richards GM (2009) *Cronobacter sakazakii* in foods and factors affecting its survival, growth, and inactivation. Int J Food Microbiol, 204-213
 7. Miriam F (2007) *Enterobacter sakazakii* in food and beverages (other than infant formula and milk powder). Int J Food Microbiol, 116, 1-10
 8. Iversen C, Forsythe SJ (2003) Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, and emergent pathogen associated with infant milk formula. Trends Food Sci Technol, 14, 443-454
 9. Dancer GI, Mah JH, Rhee MS, Hwang IG, Kang DH (2009) Resistance of *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.) to environmental stresses. J Applied Microbiol, 107, 1606-1614
 10. Edelson-Mammel SG, Buchanas RL (2004) Thermal inactivation of *Enterobacter sakazakii* in rehydrated infant formula. J Food Prot, 67, 60-63
 11. Lee EJ, Ryu TH, Park JH (2009) Tolerance of Korean *Cronobacter* spp. (*Enterobacter sakazakii*) isolated to desiccation. Korean J Food Sci Technol, 41, 681-686
 12. Lee SY, Jin HH (2008) Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. Letters in Applied Microbiol, 47, 315-321
 13. Stock I, Wiedemann B (2002) Natural antibiotic susceptibility of *Enterobacter amnigenus*, *Enterobacter cancerogenus*, *Enterobacter gergoviae* and *Enterobacter sakazakii* strains. Clin Microbiol Infect, 8, 564-578
 14. Abee T, Wouters JA (1999) Microbial stress response in minimal processing. Int J Food Microbiol, 50, 65-91
 15. Rosset P, Noel V, Morelli E (2007) Time-temperature profiles of infant milk formula in hospitals and analysis of *Enterobacter sakazakii* growth. Food Control, 18, 1412-1418
 16. Gurtler JB, Beuchat LR (2007) Survival of *Enterobacter sakazakii* in powdered infant formula as affected by composition, water activity, and temperature. J Food Prot, 70, 1579-1586
 17. Kim HK, Beuchat LR (2005) Survival and growth of *Enterobacter sakazakii* on fresh-cut fruits and vegetables and in unpasteurized juices as affected by storage temperature. J Food Prot, 68, 2541-2552
 18. Leenanon B, Drake MA (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
 19. Nazarowec-White M, Farber JM (1997) Incidence, survival, and growth of *Enterobacter sakazakii* in infant formula. J Food Prot, 60, 226-230
 20. Walker SJ (1990) Growth characteristics of food poisoning organism at sub-optimal temperatures. In: Chilled Foods: the revolution in freshness. Zeuthen P, Cheftel JC, Erikson C, Cromley T, Linko R, Paulus K (Editors), Elsevier Applied Science, London, England, p 159-162
 21. Bang WS, Drake MA (2002) Resistance of cold- and starvation-stressed *Vibrio vulnificus* to heat and freeze-thaw exposure. J Food Prot, 65, 975-980
 22. Ferrer M, Chemikova TN, Yakimov MM, Golyshin PN, Timmis KN (2003) Chaperonins govern growth of *Escherichia coli* at low temperatures. Nat Biotechnol, 21, 1266-1267
 23. Berry ED, Foegeding PM (1997) Cold temperature adaptation and growth of microorganisms. J Food Prot, 60, 1583-1594
 24. Goldstein J, Pollitt NS, Inouye M (1990) Major cold-shock protein of *Escherichia coli*. Proc Natl Acad Sci USA, 87, 283-287
 25. Willmsky G, Bang H, Fischer G, Marahiel M (1992) Characterization of *csxB*, a *Bacillus subtilis* inducible cold shock gene affecting cell viability at low temperatures. J Bacteriol, 174, 6326-6335
 26. Gurtler JB, Beuchat LR (2007) Growth of *Enterobacter sakazakii* in reconstituted infant formula as affected by composition and temperature. J Food Prot, 70, 2095-2103
 27. Campbell J, Bang W, Isonhood J, Gerard PD, Drake MA (2004) Effects of salt, acid, and MSG on cold storage survival and subsequent acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. Food Microbiol, 21, 727-735
 28. Elhanafi D, Leenanon B, Bang W, Drake MA (2004) Impact of cold and cold-acid stress on poststress tolerance and virulence factor expression of *Escherichia coli* O157:H7. J Food Prot, 67, 19-26

29. Farber JM, Forsythe SJ (2008) *Enterobacter sakazakii*. ASM press, Washington DC, USA, p 15-19
30. Koutsoumanis KP, Kendall PA, Sofos JN (2004) Modeling the boundaries of growth of *Salmonella typhimurium* in broth as function of temperature, water activity, and pH. *J Food Prot*, 67, 53-59
31. De Koning-Ward TF, Robins-Browne RM (1995) Contribution of urease to acid tolerance in *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun*, 63, 3790-3795
32. Kjelleberg S, Hermansson M, Marden P (1987) The transient phase between growth and nongrowth of heterotrophic bacteria, with emphasis on the marine environment. *Annu Rev Microbiol*, 41, 25-49
33. Martin A, Auger EA, Blum PH, Schultz JE (1989) Genetic basis of starvation survival in nondifferentiating bacteria. *Annu Rev Microbiol*, 43, 293-316
34. Siegele DA, Kolter R (1992) Life after log. *J Bacteriol* 174, 345-348

(접수 2011년 2월 1일 수정 2011년 7월 26일 채택 2011년 7월 29일)