J. Milk Sci. Biotechnol.
Vol. 33. No. 2, pp. 139~151(2015)

유가공 산업에서의 바이오필름 형성과 제어관리: 총설

정용화* · 정대학 · 백승천
서울우유협동조합 전략기술본부

The Formation and Control of the Biofilm in Dairy Industry: A Review

Yong Hwa Chung*, Dae Hak Chung and Seung Chun Baick
Strategic Technology & Engineering Management (STEM) Department, Seoul Dairy Cooperative, Seoul 131-704, Korea

Abstract

Biofilms are aggregates of microorganisms present in a self-produced matrix of extracellular polymeric substance (EPS) adhered to a surface. Formation of a biofilm in the environment on farms and in dairy plants comprises several stages: attachment, growth (development), and detachment. Generally, biofilms are harmful to humans and need to be controlled. Stainless steel (SS) surfaces that are untreated or are scratched comprise substrata that are especially vulnerable to biofilm formation; therefore, SS surfaces should be polished and sanitized. Various approaches are available for the destruction of biofilms; cleaning-in-place (CIP) is the method mainly used in dairy plants. Further study on optimum detergents, cleaning conditions, and methods for this purpose is needed.

Keywords: biofilm, CIP(cleaning in place), stainless steel

서 론

바이오필름(biofilm)은 국제순수응용화학연합(IUPAC)의 정의에 따르면, 세포 내에서 상호 점착하거나 또는 표면에 부착하는 세포외 중합체(다량체) 물질(EPS, extracellular polymeric substance)이 자가 생산된 기질 내에 빈번하게 내장된(embedded) 유기물의 응집체이다. Donlan(2002)은 비가역적으로 표면에 결합되고, 주로 다당류 물질의 기질로 에워싸인 미생물 세포의 결합체로 정의했다. 아울러 Chmielewski와 Frank(2003)는 Carpentier (1993)와 Wimpenny(1993)를 인용하여 바이오필름은 표면에 고착된 다음 이온적 EPS에 내장된 미생물체로 주로 구성되어 있다고 언명하였다.

즉, 바이오필름은 중합체 기질 속에 형성된 입체적 구조물로 고형 표면 위에 필름형태로 형성된 것으로, 이는 표면 위에서 세포 상호간에 점착되어 구조화된 유기물로, 이때 점착된 세포는 세포외 중합체 물질(EPS)의 자생성 기질 내에 종종 내장된다. 여기에서 표현되는 '표면'은 생물이건 무생물이건 무관하며, 'EPS'는 점액질(slime)이라고 불리는데, 이는 일반적으로 세포외 DNA, 단백질과 다당류의 중합체 결합물이다.

상기 내용은 백과 정(2000)에 의해 잘 설명되어 있고, 그 구체적 내용은 다음과 같다.

액체 내 존재하는 부유물질이 가라앉아 고체 표면에 접하게 되는데, 이러한 부유물질은 환경에 따라 화학적 성분이나 미생물로써 유기물과 무기물이 혼재되어 있으며, 생물학적으로는 거의 활성이 없는 것이다. 부유 물질 중 생물학적으로 활성이 있는 물질은 바이러스, 박테리아, 효모, 곰팡이 그리고 플랑크톤성의 생물들이다. 이들 물질은 생물학적 활성을 갖고 있지는 않으나, 주위 환경과의 상호 작용에 의해 생물학적 활성을 얻을 수 있다.

이러한 바이오필름은 나름대로 유·무익성을 가지고 있다.

These authors contributed equally to this study
* Corresponding author: Yong Hwa Chung, Strategic Technology & Engineering Management (STEM) Department, Seoul Dairy Cooperative, Seoul 131-704, Korea. Tel: +82-2-490-8650, Fax: +82-2-490-8619, E-mail: yhchung@seoulmilk.co.kr

따라서 바이오필름이 미생물의 접근 가능한 모든 종류의 도구, 기계, 장치 등에 형성될 수 있기 때문에 생물학적인 현상에 한정할 것이 아니라, 유가공을 포함한 식품가공, 의약학, 치의학, 환경공학, 토목건축공학, 도시공학 등의 각 분야에서 중요하게 다뤄져야 할 필요가 있다. 특히 유가공품은 직접 인체에 흡수되는 것으로써 바이오필름으로부터 생리적으로 큰 영향을 받게 되며, 이에 따라 공중보건에도 지대한 문제를 끼칠 수 있다. 본고에서는 바이오필름 형성 메커니즘과 이를 유가공 산업에서 제어관리할 수 있는 방안에 대해 고찰해 보기로 한다.

본 론

1. 바이오필름의 형성 메커니즘

바이오필름의 형성에 대한 연구는 ZoBell이 70여 년 전에 바이오필름에 대한 논의를 개시한 이후, 최근 30년간 넘게 광범위하게 이루어져 왔다(Donlan, 2001).

백과 정(2000)의 고찰에 의하면 바이오필름의 형성과정은 Marshall(1971)의 2단계(Phase) 모델과 이 모델을 확대, 발전시킨 Charaklis와 Cooksey(1983)의 5단계 모델로 설명될 수 있었다.

Mashall(1971)은 ZoBell(1943)의 제안을 실험을 통해 입증하였는데, 흡착(sorption)은 가역적 흡착과 비가역적 흡착의 두 단계로 대별된다고 하였다. 박테리아는 먼저 표면으로 유인되면서 시간이 경과하면 몇몇은 고착하게 된다. 먼저, 가역적 흡착은 표면에 박테리아의, 기본적으로 자발적인 흡착이다. 박테리아는 표면 근처에서 약하게 결합되어 있다. 또 브라운운동을 하고, 표면을 2.5% 염화나트륨으로 세정하면 제거된다. 그리고 비가역적인 흡착은 표면에 박테리아가 견고하게 점착된 것으로 브라운운동을 하지 않으며, 2.5% 염화나트륨으로도 제거되지 않는다. 박테리아 표면과 기층 표면 간의 중합체적 가교가 두 표면 사이의 반발 장벽을 극복하는 것으로 보여진다.

Charaklis와 Cooksey(1983)는 다음의 5단계로 바이오필름의 형성을 설명하였다.

즉, ① 습윤된 표면위로 유기 분자와 미생물 세포의 이동, ② 습윤된 표면위로 유기 분자가 흡착되어 조건부화 표면을 양성, ③ 조건부화된 표면에 미생물 세포의 부착, ④ 미생물 세포에 의한 대사작용, 이로써 보다 많이 발생되는 부착된 세포와 결합되어진 재료, ⑤ 바이오필름의 분리인데, 백과 정(2000)의 서술에 따르면, 희석 용액 내에서 반응 속도를 제한하는 비율제한단계는 미생물 세포나 영양물질의 전달과정으로, 이러한 작은 분자물질의 전달비율은 유체역학적인 힘, 마찰, 물질 유동 등에 의하여 조절되는 박테리아와 같은 큰 분자 물질보다도 빠르다. 액상에 부유하는 유기 물질이 처음에 기층에 쌓여서 점차로 작은 유기물 덩어리로 발전하게 된다. 미생물들이 이러한 작은 유기물질에 우선적으로 부착하게 되는지는 불분명하나, 기층에 형성된 작은 유기물 덩어리의 표면에 자유에너지, 전하, 중합체 물질의 성질, 양이온 등의 물질 간의 인력에 의하여 미생물의 부착이 일어나게 된다. 부착된 미생물의 생리적 과정은 산소 농도, 유체 흐름, 화학처리에 따른 바이오필름의 견고성에 영향을 받고, 이러한 요인들이 미생물의 성장 비율과 대사활동을 결정한다.

한편, Busscher와 van der Mei(1997), Gottenbos, van der Mei와 Busscher(1999), Bos, van der Mei와 Busscher(1999)는 바이오필름 형성에 있어서 보다 체계적인 이론을 정립하였다. Busscher(1997)는 모든 부착 작용은 이화학적인 작용의 영향을 받는다고 하였고, 이것의 기본적인 힘은 반데르발스력, 전자기력, 수소결합과 브라운 운동력이다. 분자 간의 모든 작용력은 상호작용하는 분자 간의 거리에 따라 독특한 쇠퇴를 가지는데(van Oss, 1995), Fig. 1에서 보듯이 이는 미생물 부착으로의 특별한 접근에서, 부착소(adhesion)로부터의 작용력이 고려되어야 하고, 실제 이들은 유기체로부터 발생된 작용력에 부가하여 항상 행동한다. 왼쪽 그림은 미생물체로부터 유래된 반데르발스력과 전자기력으로, 이는 특별한 부착소의 부착력과 비교될 경우에 무시되어서는 안되며, 오른쪽 그림은 미생물 세포상의 특별한 입체화학적 그룹과 유인적인 반데르발스력, 전자기력, 수소결합으로 구성된 기층 표면 사이의 특별한 결합으로 입체화학적 조합을 공동으로 형성한다.

한편, 바이오필름 형성에 대한 기존의 이론을 보다 발전시켜 Escher과 Characklis(1990)는 수성 환경에서의 바이오필름의 형성을 다음의 6단계로까지 구분하였다.

① 유기체가 존재할 때, 흡착된 구성분의 조건부적 필름이 1차 유기물의 도착에 앞서서 표면에 형성, ② 미생물은 분산,

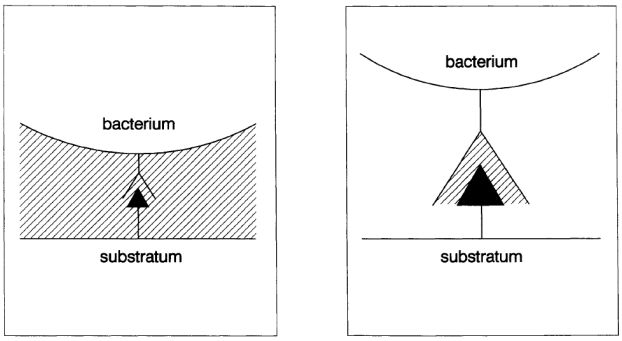

Fig. 1. (Left) Van der Waals and electrostatic forces originate from the entire body of a micro-organism. (Right) A specific bond between stereochemical groups on the microbial cell and substratum (reproduced from Busscher *et al*., 1997).

대류, 침착이나 능동운동을 통해 표면으로 이동, ③ 최초의 미생물 점착이 발생, ④ 점착된 미생물의 부착, 이는 엑소폴리머 생산과 세포 표면 구조의 전개를 통해 강화, ⑤ 부착된 미생물의 표면성장과 엑소폴리머의 계속되는 분비, ⑥ 바이오필름 유기체의 국소적 분산(이는 높은 수준의 유체 전단이나 다른 작용되는 분산력에 의해 발생)으로 각 단계를 설명하였다.

최근의 연구는 3단계, 4단계나 9단계 모델도 제시되었다. 3단계 모델의 경우, 바이오필름의 형성은 Fig. 2와 같이 설명된다. 즉, 바이오필름의 발달은 먼저 자유롭게 부유하는 플랑크톤성 세포가 표면에 접촉하면서 비가역적으로 부착하고, 다음, 초기에는 일반적으로 표면 위에 박층 박테리아 필름으로 형성되다가, 박테리아가 계속해서 기질 물질(EPS, 세포외 중합체 물질)을 생산하면 그것들은 두텁고 복잡한 구조로 형성된다는 것이다.

이후 Hall-Stoodley와 Stoodley(2002)는 상기 내용을 개선, 3단계 모델을 구체화하여 바이오필름의 라이프 사이클을 다음과 같이 정리하였다(Fig. 3).

① 최초 부착, ② 복합 바이오필름의 성장, ③ 분리(seeding 분산이라 불리는 결과), 이는 박테리아 덩어리나 박테리아 군집 내에서 집합현상(swarming phenomenon)에 의한 분리이다.

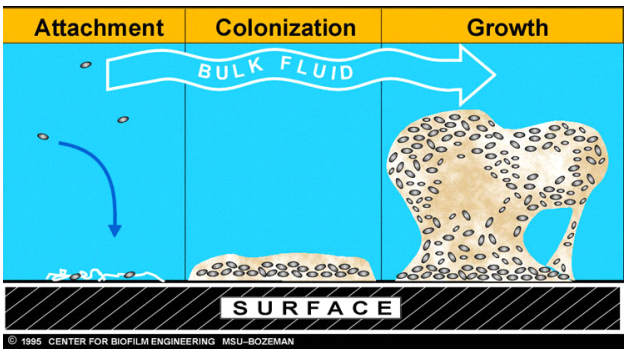

Fig. 2. Biofilm formation. Courtesy of the Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman.

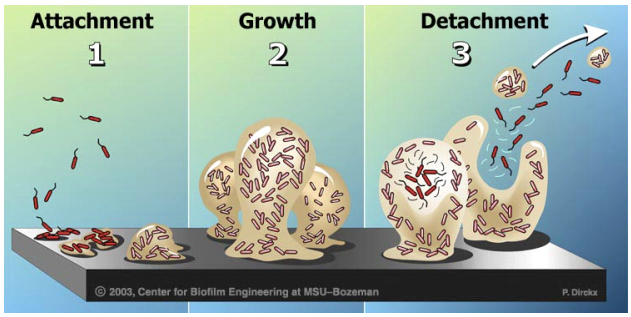

Fig. 3. Biofilm formation in 3 steps. Courtesy of the Center for Biofilm Engineering, Montana State University, Bozeman.

구조적으로, 바이오필름의 발달에는 여러 메커니즘이 있다. 먼저 표면 유동에 의해 부착된 세포가 재분배되어 발생한다. *Pseudomonas aeruginosa*의 경우, 편모와 타입4 선모 매개 경련운동 모두 표면 응집에 있어 중요한 역할을 한다. *Escherichia coli*에서는 편모, 타입1 선모와 curly fimbriae가 바이오필름 형성의 원인임을 보여주어 왔다. 다른 하나는 부착된 세포의 이분열에 의해 발생한다. 세포가 분열하면 딸세포는 세포덩어리를 형성하는 부착점 외곽으로, 상부로 뻗어간다. 한편, 표면결합 응집은 단일 세포나 세포그룹에 의해 일어나기도 한다. 그리고 바이오필름에서 넓은 부분의 흐름이나 표면위로 모든 균락의 회전운동(rolling)으로 생겨난 전단(shear)은 바이오필름을 성숙시켜 새로운 표면을 집락시키고, 그물(net)이나 유기화된 결(ripples)과 같은 2차적 구조를 형성한다. 바이오필름 형성에 있어서 이러한 상호공헌은 유기물, 집락화될 표면의 성질, 수성 환경의 물리적, 화학적 조건에 의존하게 된다(Hall- Stoodley and Stoodley, 2002). Stoodley 등(2002)은 5단계 모델도 제시하였는데, ① 표면으로 세포의 최초 부착, ② EPS의 생산. 이로써 보다 굳게 점착된 비가역적인 부착, ③ 바이오필름 구조물의 초기 발달, ④ 바이오필름 구조물의 성숙, ⑤ 바이오필름으로부터 단일 세포의 분리이다. Fig. 4 하단의 전자현미경 사진을 통해 보다 명확히 단계별 특성을 인지할 수 있다.

또한 바이오필름이 형성되는 4단계 메커니즘의 경우, Landini 등(2010)는 ① 표면에의 박테리아 점착, ② 미생물 균락 형성, ③ 바이오필름 성숙, ④ 분리(분산)의 순서로 정리하였고, Chandki 등(2011)도 치주 플라그에 있어서의 바이오필름 성장을 Fig. 5와 같이 4단계로 대별하여, ① 점착(lag 단계로 활성적이나

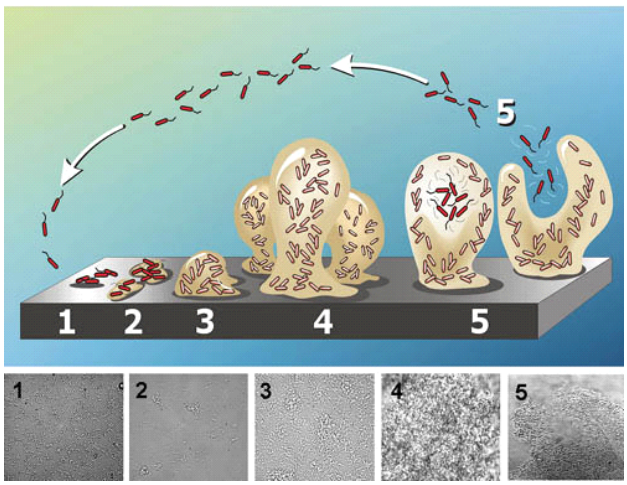

Fig. 4. Diagram showing the development of a biofilm as five stages process (reproduced from Stoodley *et al*., 2002).

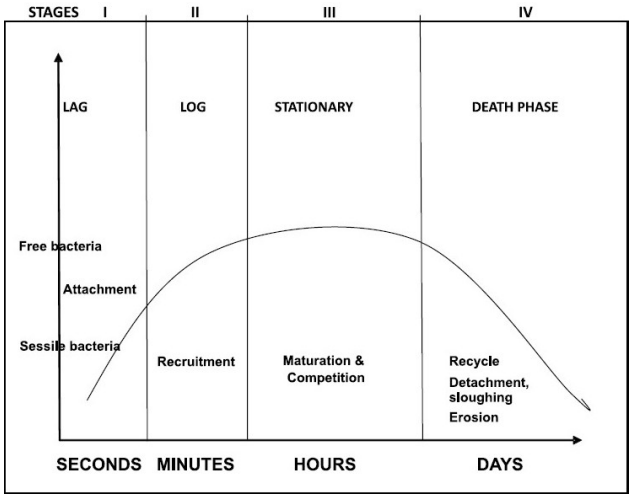

Fig. 5. Four stages of dental plaque biofilm growth (reproduced from Chandki *et al*, 2011).

대사적으로 감소), ② 성장(log 단계로 지수적인 성장), ③ 성숙(정체) 바이오필름 성숙, ④ 분산(사멸)으로 제시하였다.

9단계 모델은 Breyers와 Ratner(2004)에 의해 구체적으로 제시되었는데, 형성 프로세스는 Fig. 6과 같다. ① 대량의 용액에 존재하거나, 표면에 의도적으로 코팅된 거대분자에 의한 점착 표면의 사전 조건부화, ② 용액으로부터 표면으로의 플랑크톤성 세포의 이동, ③ 표면에서의 세포 흡착, ④ 가역적으로 흡착된 세포의 탈착, ⑤ 표면으로 박테리아 세포의 비가역적인 흡착, ⑥ 세포-세포 간 신호 분자의 생산, ⑦ 바이오필름으로, 그 내부에서 기질의 이동, ⑧ 바이오필름 결합 세포에 의한 기질 대사작용과 바이오필름으로부터 산물의 이동, 이 과정들은 세포 성장, 증식, EPS 생산이 수반된다. ⑨ 분리나 탈피 등에 의해 바이오필름의 제거가 이루어진다(Simões *et al*., 2009).

지금과 같이 살펴본 바에 의하면, 각각 전개되는 바이오필름 형성에 관해서는 그 단계를 구분함에 다양한 이론이 있지만, 부착-성장-분리로 구성되는 근본적인 원리는 상당히 유사

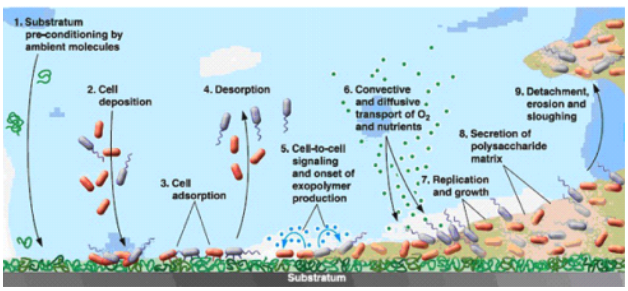

Fig. 6. Biofilm formation in 9 stages (reproduced from Simões *et al*., 2010).

하다고 결론을 내릴 수 있다.

한편, 바이오필름의 형성에 있어서 기층과 세포 표면 양자의 특성을 긴밀히 고찰함이 필요한데, 기층은 테플론, 다양한 플라스틱, 라텍스와 실리콘과 같은 소수성(hydrophobic) 재료부터 유리나 금속과 같이 상당히 대전된 친수성(hydrophilic) 재료까지 전반적이기 때문이다. 어떤 재료(예를 들면, 수도 파이프, 환경 표면)는 타 재료(예를 들면, 실리콘이나 또는 테플론 도관)가 보다 매끈할 때 상당히 거칠거나 또는 부드럽다. 기층의 특성은 매우 중요한데, 이는 미생물의 부착률과 크기에 중대한 영향을 미치기 때문이다. Fletcher와 Loeb(1979), Pringle과 Fletcher(1983), Characklis 등(1990), Quirynen 등(2000)의 연구에 의하면, 일반적으로 보다 거칠고, 소수성인 재질은 바이오필름의 발달이 보다 신속하게 이루어졌다.

아울러 기층의 특성에 부가하여, 세포 표면의 특성도 중요하다. 예를 들면 편모(flagella), 선모(pili, fimbriae) 또는 당질층(glycocalyx)의 존재는 미생물 부착율에 영향을 미친다. 이는 미생물 세포는 모든 재료에 공통되는 반발력을 이겨야 하며, 이러한 부가물들은 보다 영구적인 부착메커니즘이 안착될 때까지 세포가 부착될 수 있게 해준다. Kober 등(1989)은 돌연변이와 야생성 유기체를 비교하여 편모의 존재가 표면에 그램 음성 박테리아의 부착을 촉진시킴을 밝혔다. Rosenberg 등(1982)의 연구는 부착에 있어서의 선모의 중요성을 보여주었고, Christensen 등(1994)도 세포 표면 소수성이 부착에 중요함을 보여주었다(Donlan, 2001).

2. 유가공 산업에서의 바이오필름 유해성

바이오필름은 유해성과 유익성의 이중적인 측면을 갖고 있다. 예를 들면 환경관리의 경우, trackling bed filter를 이용한 폐수처리에서 필터에 부착되는 미생물 유래의 바이오필름은 폐수내 존재하는 유무기질을 제거함으로써 폐수를 정화하고 재생하는 데 중요한 역할을 한다(백과 정, 2000). 그러나 여기서는 바이오필름의 유익성에 대해서 논의하지 않을 것이다.

이미 살펴본 바와 같이, 바이오필름의 구성체는 다양한 미생물로 여기에는 병균성과 부패성 미생물이 포함된다. 유가공 산업에 있어서 주로 우려되는 것은 병원성인 *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Escherichia coli*와 *Listeria monocytogen* 등이 함유된 바이오필름으로, 이는 스테인레스 스틸, 플라스틱, 에폭시 레진, 고무 등 유가공 공장 현장에 사용되는 모든 재질의 표면에서 생겨날 수 있다. 즉, 유가공 공장에서 바이오필름은 모든 습한 표면에서 발생되고, 여기에는 저장탱크, 충전포장설비, 콘베이어 벨트, 트롤리 바퀴, 배수구, 구조물 바닥과 천정 등 모두가 망라된다. 바이오필름은 소독 세제나 다른 항생제의 효과를 감소시키고, 존재

하는 미생물에 따라서는 유제품을 병균으로 오염시키기거나, 유통기한을 감소시키기도 하고, 금속 표면의 부식, 파이프 내의 차단, 열전달의 저하를 가져온다.

한편, 원유(raw milk)에서 발견되는 병원성 미생물에 의해 발생되는 각종 질환은 호주 뉴사우스웨일즈 식품청 자료에 의하면 Table 1과 같으며, 유제품에서 유래하는 병원성 미생물은 Table 2에 제시하였다(www.foodauthority.nsw.gov.au).

Table 1, 2에서 볼 수 있듯이, 유가공 공장에서 발견될 수 있는 유해 병원성 미생물이 상당하므로 원유나 유제품의 바이오필름 관리제어는 높은 수준으로 이루어져야 한다.

Marchand 등(2012)은 기존의 연구를 집약하여 유가공 산업(목장~공장)에서 발생되는 바이오필름의 미생물학적 문제를 정리하였는데, Table 3과 같다.

백과 정(2000)의 고찰에 의하면, 호주 뉴사우스웨일즈 낙농

Table 1. Pathogenic microorganisms detected in raw milk

	Microorganism	Disease
Enterobacteriaceae	Pathogenic *Escherichia coli* (eg EHEC, STEC)	Gastroenteritis, other complications involve Haemolytic uraemic syndrome (HUS) and Thrombotic thrombocytopenic purpura (TTP)
	Salmonella	Gastroenteritis, typhoid fever
	Shigella	Dysentery
	Tersinia enterocolitica	Gastroenteritis
	Cronobacter sakazakii	Meningitis in premature infants
Vivrionaceae and Campylobacter	*Campylobacter jejuni*	Gastroenteritis
	Aeromonas hydrophila	Gastroenteritis
Other Gram-negatives	*Pseudomonas aeruginosa*	Gastroenteritis
	Brucella spp.	Brucellosis (Bang's Disease)
Gram-positive sporeformers	*Bacillus cereus*	Gastroenteritis
	Bacillus anthracis	Anthrax
	Clostridium perfringens	Gastroenteritis
	Clostridium botulinum	Botulism
Gram-positive cocci	*Staphylococcus aureus*	Emetic intoxication
	Streptococcus agalactiae	Sore throat
	Streptococcus pyogenes	Scarlet fever/sore throat
	Streptococcus zooepidemicus	Pharyngitis, nephritic sequelae
Miscellaneous Gram-positives	*Listeria monocytogenes*	Listeriosis (various manifestations)
	Corynebacterium spp.	Diphtheria
	Mycobacterium bovis	Tuberculosis
	Mycobacterium tuberculosis	Tuberculosis
	Mycobacterium paratuberculosis	Johne's disease (ruminants), Crohn's disease (unproven in humans)
Rickettsia	*Coxiella burnetii*	Q fever
Viral	Enteroviruses, including polioviruses and Coxsackie virus, Rotaviruses	Enteric infection
	Foot and mouth disease virus	Foot-and-mouth disease (not a hyman disease)
	Hepatitis virus	Hepatitis virus
Fungi	Mould (and associated aflatoxins)	Mycotoxicoses
Protozoan parasites	*Cryptosporidium parvum*	Cryptosporidiosis
	Entamoeba histolytica	Amoebiasis
	Giardia lamblia	Giardiasis
	Toxoplasma gondii	Toxoplasmosis

Adapted from Boor, 1997. Reproduced from Food Authority, NSW, Australia

Table 2. Microbiological hazards in dairy products

Pathogens	Significance in dairy products
Pathogenic *Escherichia coli*	Pathogenic strains of *E. coli* can be found in cattle and may enter milk through faecal contamination. Is destroyed by pasteurisation.
Salmonella	*Salmonella* is occasionally present in raw milk but is destroyed by pasteurisation. Can contaminate products after pasteurisation, with non-airy ingredients a source of contamination. Frequently isolated in milk powder.
Tersinia enterocolitica	*Y. enterocolitica* is destroyed by pasteurisation and its presence in heat treated milk products is due to environmental contamination after heat treatment. *Y. enterocolitica* is able to grow in dairy products held at refrigeration temperatures and therefore may be considered as a hazard in prolonged shelf life products.
Campylobacter spp.	*Campylobacter* spp. is destroyed by pasteurisation and its presence in milk products is due to environmental contamination after heat treatment. Not normally able to grow in foods.
Bacillus cereus	Vegetative cells of *B. cereus* do not survive pasteurisation, however spores will survive. *B. sereus* is rapidly outgrown by psychrotrophic bacteria at refrigeration temperatures. However, in the absence of a competitive microflora, growth to levels of concern is possible.
Clostridium botulinum	Vegetative cells of *C. botulinum* do not survive pasteurisation, however spores will survive. Will only grow under anaerobic conditions.
Staphylococcus aureus	May enter raw milk through udder infection. *S. aureus* is destroyed by pasteurisation, however toxins are heat stable. *S. aureus* does not grow well at refregeration temperatures or compete with starter cultures.
Listeria monocytogenes	*L. monocytogenes* is destroyed by pasteurisation. Its presence in dairy products is due to post-pasteurisation contamination. Can grow in milk products at refregeration temperatures.
Cronobacter sakazakii (formerly *Enterobacter sakazakii*)	*C. sakazakii* will not survive pasteurisation. Recontamination of powdered infant formula during manufacture is a risk. *C. sakazakii* cannot grow in a dry substrate, but it can survive for long periods of time and is a potential hazard when the powder is reconstituted and held at favourable temperatures. contamination and subsequent growth may occur during reconstitution and preparation.

Adapted from FSANZ, 2006. Reproduced from Food Authority, NSW, Australia

Table 3. Overview of biofilm problem areas at dairy farms and dairy processing plants

Sampling points	Materials	Type of bacteria[1]						
		P	A	S	B	LAB	E	L
Bance tank	Steel	-	-	-	+	-	+	-
Aging tank	Steel	-	-	+	-	-	-	-
Feeding unit	*	-	-	-	+	+	+	-
Conveyer belt of packaging machine	Rubber	+	-	-	-	+	+	-
Floor drain	*	-	-	-	-	-	+	+
Doormat	*	-	+	-	-	+	+	+
Ultrafiltration membranes	Steel	-	-	-	-	+	-	-
Silo, welded joints	Steel	+	-	+	+	-	-	*
Valves	Steel	-	-	-	-	+	-	*
Air separators, inside	Steel	+	-	+	+	+	-	*
Tank truck, valve, gaskets	Rubber	+	-	+	+	-	-	*
Tank truck, air separator	Steel	+	-	-	-	-	+	*
Tank truck, air separator, gasket	Rubber	-	-	+	+	-	+	*
Bulk tank outlet on farm	Steel	*	-	*	*	*	*	+
Rubber lines	Rubber	*	-	*	*	*	*	+
Shot milking tube	Rubber	+	-	+	-	+	+	-

1 P: *Pseudomonas*, A: *Aeromonas*, S: *Staphylococcus*, B: *Bacillus*, E: *Enterobacteriaceae*, L: *Listeria*

Wirtanen (2004), Teixeira *et al.* (2005), Agarwal *et al.* (2006), Gunduz and Tuncel (2006). Reproduced from Marchand *et al.* (2012)

공사의 Peter Sutherland(현재 Danone Nutricia ANZ 소속)는 *Listeria*에 의해 형성된 바이오필름을 제거하는데 $3,600의 비용이 들며, 상품화되어 제품이 출하되었을 때 문제는 더 이상 언급할 필요가 없을 정도로 손해가 크다고 하였다. 또한 미국 질병통제연구소(CDC)의 연구를 통해 Real Raw Milk Facts 실무그룹이 작성한 자료에 의하면 미국 내에 미살균 우유와 치즈에서 1998년에서 2009년까지 119건의 병균에 의한 오염 사고가 있었고, 이로 인해 2명이 사망하고, 2,147명이 질환을 겪었다. 따라서 유가공 산업에서 바이오필름의 제거를 포함한 제어관리는 매우 중요하다.

3. 바이오필름과 유가공 공장 설비 등의 표면: 스테인레스 스틸을 중심으로

식품산업에서 설비 표면에 미생물의 부착과 이에 따른 바이오필름의 발달은 심각한 이슈로서, 이는 유통기한 감소, 변질과 질병을 야기시키는 교차오염을 잠재적으로 발생시키기 때문이다.

몇몇의 연구는 표면의 거친 정도와 박테리아의 부착 능력과의 상관관계가 없음을 보여주기도 하나, Lattore 등(2010)이 수행한 실험에서 착유 설비에서의 *L. monocytogens*가 함유된 바이오필름의 존재는 잠재적 오염원이었다. 설비의 전자현미경 주사를 통해 박테리아의 개별적, 집단적 존재를 볼 수 있었고, 이는 주로 흠집(scratched) 난 표면에 결합되어 있다고 상정되었다.

도쿄해양대학 Ortega 등(2008)이 실시한 스테인레스 스틸(SUS304) 표면 위에 미생물로 *S. epidermidis*를 점착한 실험 결과, 표면 거칠기, crevice의 존재, 부유액 매개 내 유기물 성분의 존재, 오염원 세포 농도가 의미 있는 영향을 주고 있다. 표면 위의 세포 점착은 매우 짧은 시간 내에서도 일어나고, 점차 증가하다가 세포 부유액의 농도에 무관하게 3시간 내에 최고치에 도달했다. 실험 내용 중 미생물 부유액의 초기 세포 농도가 점착에 미치는 영향을 실험하기 위해 type A로 동일하게 준비된 3개의 시편에 각각 (a) 10^4 CFU/mL, (b) 10^3 CFU/mL, (c) 10^2 CFU/mL로 초기 세포 농도를 달리 했을 때, 초기 농도가 높은 경우인 (a)에서 미생물 카운트가 높았다(Fig. 7).

또, 표면 거칠기에 따른 점착의 영향을 실험하였다. 3개의 스테인레스 스틸 시편(type A, B, C)의 표면 거칠기를 달리하여(*Ra*=0.04~1.37 μm)(여기서 *Ra*는 평균 거칠기(Average Roughness)로 μm 단위) 회오리식(whirlpool) 물 세정(2,000 rpm, 15 min)의 처리 전후의 점착된 *S. epidermidis* 세포의 밀도를 비교하였다. 실험 통계에 의하면 스테인레스 스틸 표면에 보다 많이 점착될수록 스테인레스 스틸의 표면 연마도는 낮았다(*Ra*=1.37 μm) 회오리 물 세정을 처리한 후에도 가장 거친 스테인레스 스틸(*Ra*=1.37 μm) 표면에서 *S. epidermidis*의 잔류 정도가 의미있게 높았다.

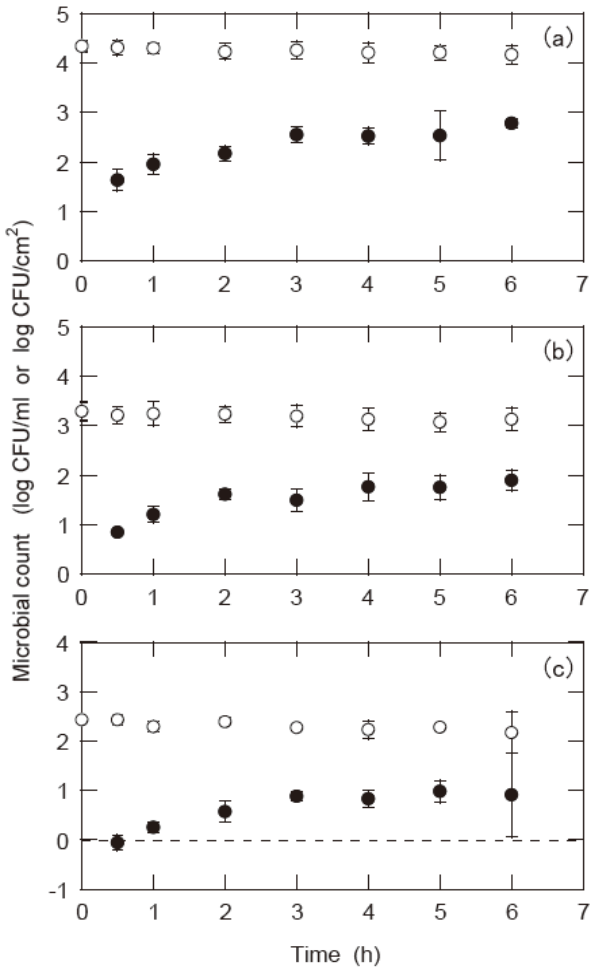

Fig. 7. Viable cell numbers of *S. epidermidis* in suspension(○) (log CFU/cm^2) and on type A stainless steel plate(●)(log CFU/cm^2) (reproduced from Ortega *et al*., 2008).

회오리식 물 세정 후 type A와 type B의 표면에 있어서, 표면 세포 밀도 차이는 근소했고, 이 차이는 통계적으로 무의미한 것이다. 일반적으로 회오리식 물 세정 후에도 부착된 세포의 약 20~50%는 계속 잔류하였다(Fig. 8).

Ortega 등(2008)의 실험 결과는 유가공 공장 설비에서 주로 사용되는 스테인레스 스틸에 있어서 표면 가공의 중요성을 알려주면서 아울러 스테인레스 스틸 표면에 있는 바이오필름의 제거는 단순히 물 세정(유체역학적 충격을 포함하여)만으로는 충분하지 않음을 시사해준다. 또한 바이오필름의 생장에 초기 위생 환경이 중요함을 보여주고 있다.

또한 Arnold와 Bailey(2000)도 실험을 통해 스테인레스 스틸의 정밀한 표면 가공이 박테리아 부착과 바이오필름 형성을 감소시키는 결과를 보여주었다. 1) 무처리, 2) 모래 분사(sand blasting) 처리, 3) 사포(sanding) 처리, 4) 전기연마(electropolishing)

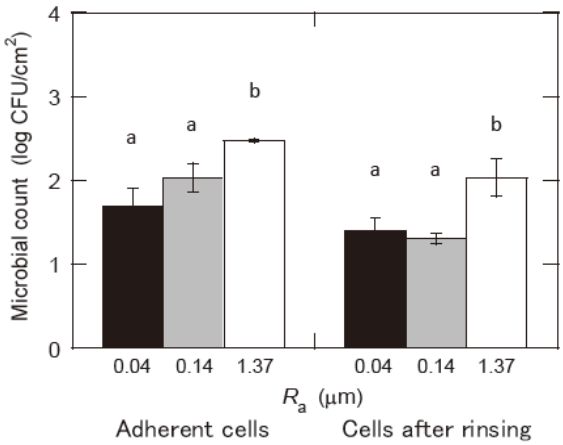

Fig. 8. Comparison of numbers of *S. epidermidis* cells on stainless steel plate of varying surface roughness before and after whirlpool water rinsing (2,000 rpm, 15 min). Each value is a mean of three tests in duplicate (reproduced from Ortega *et al*., 2008).

의 4가지 금속 시편을 그릴 잔해(broiler carcasses)에 동등한 조건으로 처리했을 때 나타난 구체적인 결과는 Table 4와 Fig. 9에서 볼 수 있다. 실험 결과를 보면 전기연마 < 사포 < 모래분사 < 무처리 순으로 스테인레스 스틸에서의 미생물 오염이 높아짐을 알 수 있다.

상기 두 연구 결과를 스테인레스 스틸이 주로 사용되는 유가공공장 제조 환경에 유추하여 볼 때, 유제품 제조 시 이용되는 각종 설비, 배관의 표면 관리(특히 유제품 접촉면)와 청결이 바이오필름의 형성과 매우 밀접함을 알 수 있다.

Bryers(1987)와 Boulange-Peterman 등(1993)은 상당한 표면 장력 수치가 박테리아 점착을 촉진시킴을 발견했다. 박테리아 세포의 최대 부착은 높은 자유 표면 에너지나 표면의 습윤도에 결정된다. 스테인레스 스틸, 유리와 같은 높은 자유표면에너지를 가진 표면은 보다 친수적이다. 이러한 표면은 일

Table 4. Effect of surface treatments on the distribution and prevalence of bacterial contamination on stainless steel

Surface treatment	Dispersed cells[1]	Clump[1]
Untreated control[2]	1,867	25
Sandblasted	1,534^{+}	16^{+}
Sanded	1,217***	12*
Electropolished	118***	0***

Reproduced from Arnold and Bailey (2000)
[1] Mean values are triplicate measurements from each of two trial.
[2] Untreateted control was type 304 stainless steel with a 2B mill finish.
Values within a column that are different from finish 2B:
$^{+}P<0.10$, $*P<0.05$, $***P<0.001$

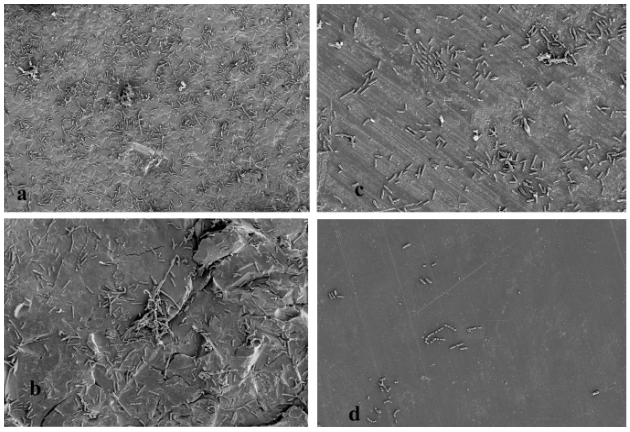

Fig. 9. Scanning electrtron micrographs of stainless steel surfaces after exposure to bacterial populations from the poultry processing environment (magnification = 1,000×). Untreated stainless steel type 304, 2B shows attachment and accumulation of bacterial cells from broiler carcase rinse. a) Bacteria accumulated less on surfaces that were b) sandblasted, or c) sanded. Under the same conditions electropolished stainless steel d) showed the least bacterial attachment (reproduced from Arnold & Bailey, 2000).

반적으로 테플론, 나일론, Buna-N 고무, 불소처리된 중합체와 같은 소수성 표면에 비해 박테리아 부착과 바이오필름 형성이 이루어진다(Blackman and Frank, 1996; Hyde *et al*., 1997; Mafu *et al*., 1990; Snide and Carballo, 2000). Smoot와 Pierson(1998)은 *L. monocytogens*의 최초 부착은 스테인레스 스틸이 고무에 비해 더 빠르게 일어남을 관찰했는데, 이에 비해 접착 강도는 고무가 높았다. Bos 등(2000)은 부착에 있어서 자유 표면 에너지의 중요성에 대한 추가적인 증거를 보고하였는데, 박테리아 점착은 주로 스테인레스 스틸 표면의 친수-소수 간극(interface)의 친수성 부분에서 발생함을 발견하였다.

Boulange-Peterman 등(1993)은 자유에너지(극력과 반데르발스력)뿐만 아니라, 박테리아의 전개 압력(βE)도 점착에 영향을 주는 것으로 파악하였다. Boulange-Peterman 등(1993), Snide와 Carballo(2000) 또한 그 표면이 일시적으로 변화됨을 증명하였다. 알칼리와 강산(4M 질산)으로 세정하면 표면이 친수적으로 되는데 반해, 약산은 소수성으로 되는 효과를 가져왔다. 스테인레스 스틸이 공기나 물에 노출되면 산화크롬층을 형성하여 부동태화 된다. 유기물이 산화층에 부착되면 박테리아가 부착될 조건화된 기층이 만들어진다(Verran *et al*., 2000). 대다수의 경우, 박테리아는 소수성보다는 친수성인 표면에 더 점착하나, 부착도에 있어서의 실질적인 유의성 차는 없었다(Blackman and Frank, 1996; Cunliffe *et al*., 2000; Hyde*et al*., 1997; Sinde and Carbalio, 2000).

한편, Holah와 Thorne(1990)에 의하면 다양하게 가공된 스

테인레스 스틸(type 304)은 제조 장비, 설비에 고무, 테플론과 나일론 등은 가스켓류, 다양한 기구, 부품 등에 사용되는데, 반복 사용으로 표면이 마모되었을 때 박테리아 등의 포집성이 증가되었다. 이러한 조건은 박테리아가 증식되고, 살균소독은 저하되는 사각지대를 가져온다. 몇몇의 연구자들은 스테인레스 스틸의 평균적인 표면 거칠기(*Ra*)와 세포의 부착이 상호 연관되지 않음을 보여주기도 하였으나, 표면 거칠기의 다른 측정형태인 표면 결함(Rdin과 Rmax)은 유기물의 잔류와 제거에 있어 밀접함을 보여주고 있다(Frank and Chmielewski, 2001) Holah와 Thorne(1990) 또한 표면 결함은 박테리아 부착에 있어 유의성 있게 증가됨을 증명하였다. 한편, 비가역적인 부착에 필요한 세포와 기층과의 접촉 시간은 Lunden 등(2000)에 의해 단지 짧은 시간만 소요됨이 밝혀졌다.

상기의 내용에 대해 Simões(2010)는 Donlan(2002)의 고찰을 기본으로 하여 Table 5와 같이 체계적으로 정리하였다.

결론적으로 스테인레스 스틸, 고무 등의 재료가 사용되는 유가공 설비나 부품류에 있어서 바이오필름 형성은 표면 결함의 요인이 크다고 할 수 있다.

4. 유가공 공장에서의 바이오필름 제어관리

Gibson 등(1999), Jessen과 Lammert(2003)는 유제품의 주 오염원은 부적절한 세정과 설비 소독에 기인한다고 하였다(Simões *et al*., 2009). 이는 바이오필름은 적절한 세정과 소독으로써 제거될 수 있다는 의미로 많은 연구자에 의해 연구되어 왔다.

Simões 등(2009)이 고찰한 바와 같이, 유가공에서의 바이오필름은 박테리아성 EPS와 주로 단백질과 인산칼슘인 우유 잔류물로 두드러진다(Flint *et al*., 1997; Mittelman, 1998). 유가공 설비에서 바이오필름이 형성되면 식품이 변질되고, 장비가 손상되며, 이로 인해 심각한 위생 문제와 경제적 손실을 초래하게 된다(백 and 정, 2000; Bremer *et al*., 2006; Gram *et al*., 2007). 바이오필름의 미생물은 파이프라인과 탱크 내에서 금속 부식을 가져오는 화학적, 생물학적 반응을 촉진하고, 또한 바이오필름이 판형살균기(PHE)와 파이프라인에서 충분히 두꺼워진다면 열전달 효율을 감소시킬 수 있다(Mittelman, 1998; Vieira *et al*., 1993).

5. CIP와 COP 세척으로 바이오필름 제거

상기 살펴본 바와 같이 바이오필름의 제거는 반드시 필요한데, 이를 위해 유가공 공장에서 통상 사용되는 운영조작이 CIP(Cleaning-In-Place)이다. CIP는 작업자의 수작업에 의한 분해나 장비의 해체 없이 이루어지는 세척의 완벽한 과정이다.

Fig. 10은 유가공 공장에서 실제적으로 운영되는 CIP 시스템의 다이어그램이다. 유가공 공장에서 CIP 세척을 실시해야 할 대상은 유제품 처리에 관련된 모든 설비가 되며, Fig. 10에서 볼 수 있듯이 모든 가공 설비는 중앙집중화 된 CIP 스테이션에 연결되어 있게 된다. CIP 공급원과 원격일 경우에는 개별적 CIP 스테이션을 구비하여 세척을 실행하게 된다. 기계적인 CIP 세척에 대해서는 업계에서 표준화가 되어 있으나, 세부적인 사항은 앞으로도 학계에서도 보다 심화된 연구가 필요하다.

Marchand 등(2012)이 Tetra Pak의 Bylund(1995)를 인용하여 제시한 CIP 세척공정은 Table 6과 같으며, 이는 유가공 공장에서 실제적으로 적용되는 것이다.

1959년 Henkel의 과학자인 Herbert Sinner가 고안한 Sinner's circle에 의하면 세척에 있어서 중요한 요소는 세제(또는 화학적 에너지), 시간, 기계적 에너지 그리고 온도이다. 이는 당

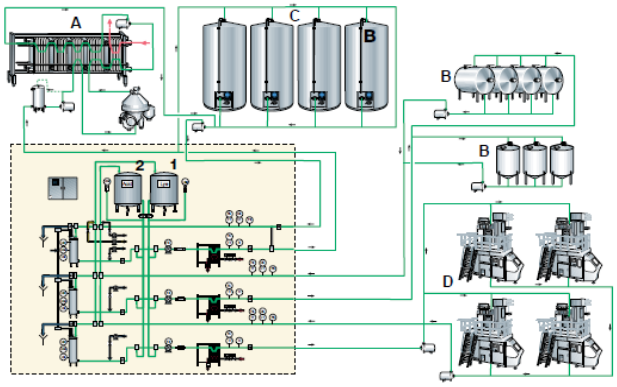

Fig. 10. Principle of the centralized CIP system. Reproduced from www.tetrapak.com. A: Milk treatment, B: Tank garden, C: Silo tanks, D: Filling machines, 1: Tank for alkaline detergent, 2: Tank for acid detergent

Table 5. Variables important in cell attachment, biofilm formation and development

Adhesion surface	Bulk fluid	Cell
	Flow velocity	
Texture or roughness	pH	Cell surface hydrophobicity
Hydrophobicity	Temperature	Extracellular appendages
Charge	Cations	Extracellular polymeric substances
Conditioning film	Presence of antimicrobial products	Signaling molecules
	Nutrient availability	

Based on Donlan (2002). Reproduced from Simões *et al.* (2010)

Table 6. Examples of dairy CIP programs

CIP wash steps for circuits with pasteurizers and other equipment with heated surfaces (UHT, and others)
1. Rinsing with warm water for about 10 min.
2. Circulation of an alkaline detergent solution (0.5~1.5%) for about 30 min at 75℃.
3. Rinsing out alkaline detergent with warm water for about 5 min.
4. Circulation of (nitric) acid solution(0.5~1.0%) for about 20 min at 70℃.
5. Postrinsing with cold water.
6. Gradual cooling with cold water for about 8 min.
CIP wash steps for circuits with pipe systems, tanks, and other process equipment with no heated surfaces
1. Rinsing with warm water for about 3 min.
2. Circulation of a 0.5~1.5% alkaline detergent at 75℃ for about 10 min.
3. Rinsing with warm water for about 10 min.
4. Disinfection with hot water 90~95℃ for 5 min.
5. Gradual cooling with cold tap water for about 10 (normally no cooling for tanks).

Adapted from Bylund (1995). Reproduced from Marchand (2012)

시 세탁의 효율을 연구하는 과정에서 정리된 것으로, 바이오필름을 제거함에 있어, 특히 CIP에 있어서 기본 원리라 하겠다. Simões(2010)의 고찰에 의하면 CIP 효율에 영향을 주는 많은 요인이 있는데, 여기에는 바이오필름층의 성질, 세척제 조성, 농도와 시간, 세척 온도, 유속 및 유체역학, 세척 표면의 특성이 있다.

Bremer 등(2006)은 유가공 공장을 실험실 조건하에서 재현하여 CIP 작업을 실험하였는데, 이 결과에 의하면, 표준 CIP (물 린스 → 65℃의 1% 수산화나트륨 10분 → 물 린스 → 65℃의 1% 질산 10분 → 물 린스)로는 완벽하게 제거되지 못했다. 가성 보조제의 첨가로 표준CIP보다 바이오필름 제거가 향상되었고, 질산을 산복합제로 대체 사용한 경우 세척 효율이 증대되었다. 이 결과는 현재 일반적으로 사용되는 세제보다 더 세척 효율을 증대시키기 위해서는 첨가제나 복합제가 사용되어야 할 필요성을 강조하는 것으로 해석될 수 있으며, 향후 계속 논의되어야 한다.

Bartlett 등(1995)은 세라믹 멤브레인의 CIP 실험을 통해 산/알칼리 순서 세척의 효과를 보여주었는데, 실험 결과에 의하면 0.3 wt% 질산은 낮은 플럭스(flux) 회수를 보였고, 이어진 0.2 wt% 수산화나트륨은 60%의 플럭스 회수를 보였다. 순서를 바꾸어 0.2 wt% 농도의 수산화나트륨으로는 58%, 0.3 wt% 농도의 질산으로는 64%의 최종 플럭스 회수율을 보였다(Fig. 11). 이는 기존 유가공 공장에서 사용되던 세제 사용 순서가 정합함을 보여준 것이라 하겠으며, 수산화나트륨의 세정력이 질산보다 월등함을 보여주는 것이다. 아울러 조제된(formulated) 세제(Ultrasil 11)의 사용으로는 세라믹 멤브레인에서 WPC 제거 효율은 80%에 이르러서 복합세제의 능력이 더 높음을 알 수 있다(Fig. 12).

상기의 CIP에 의한 화학적 세척에 부가하여 솔질과 같은

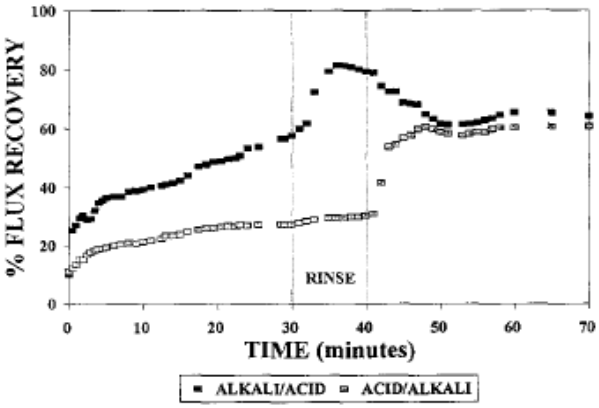

Fig. 11. Effect of alkali/acid sequence upon a 1 μm ceramic membrane cleaned using 0.3 wt% nitric acid and 0.2 wt% sodium hydroxide at 50℃ with a TMP of 0.5 bar and a CFV of 1.6 ms^{-1} (reproduced from Bird *et al*., 1995).

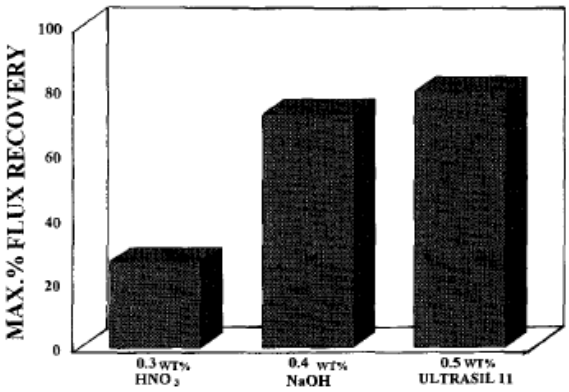

Fig. 12. Efficiency of simple and formulated cleaning chemicals for the removal of WPC deposits from a 0.1 μm ceramic membrane at 50℃ with a TMP of 0.5 bar and a CFV of 1.6 ms^{-1} (reproduced from Bird *et al*., 1995).

기계적 동작이 실시된다면 바이오필름의 제거가 보다 효율적으로 이루어질 수 있다. COP(cleaning out of place) 세척에는 COP 탱크의 순환수, 브러시, scrubber, scraper 등과 같은 도구가 필요하나, 브러시 등은 스테인레스 스틸 표면에 흠집(scratch)을 내어 오히려 바이오필름의 형성을 촉진시킬 수 있다.

다시 Simões(2010)에 의하면, Walton(2008)은 세척의 기본 원리를 다음과 같이 정리하였다.

① 세척될 설비의 물리적 성질과 구조를 고려할 것, ② 제거할 불순물의 성질 특성을 평가할 것, ③ 제거될 불순물에 적합한 세제를 선택할 것, ④ 불순물과 세제를 같이 구비할 것, ⑤ 세제와 불순물의 잔류물을 완전히 린스할 것, ⑥ 생산 활동의 종료 후 가급적 조속히 세척작업을 실시할 것, ⑦ 필요시 미생물 오염수준을 감소시키기 위해 설비가 생산 작업으로 전환하기 전에 소독·살균 작업을 시행할 것이다. 이는 유가공 공장을 설계하고 운영할 경우에 기본적으로 준수함이 바람직하다.

몇몇의 실험으로 바이오필름을 제거함에 있어 통상적인 산성 세제보다 복합세제가 효율이 높다는 것이 실증되었는 바이는 향후 추가적인 연구가 필요하다.

6. 기타 방법으로 바이오필름 제거

Srey(2012)의 고찰에 의하면 바이오필름을 제거하는 방법이 다양하다. 화학적 방법으로써 차아염소산나트륨(NaClO), 과산화수소(H_2O_2), 오존(ozone), 과산화아세트산과 같은 화학물질 등이 바이오필름을 제거하는데 효과적으로 사용될 수 있으나, 환경, 보건위생 문제를 감안하여야 한다. 기타 방법으로 나타난 것은 초음파 처리(ultrasonification)인데, 초음파 처리와 다른 처리 기술을 결합한 방법이 권장된다. 기타 효소나 파아지(phages)를 이용한 방법도 있다. 이러한 몇 가지 신기술과 그린테크닉에 대한 연구는 계속 진행될 것이다.

7. 향후 연구가 진행되어야 할 과제

유제품의 변질, 부패, 품질 부적합 등의 식품안전적인 이슈에 바이오필름의 유해성은 이미 상당히 논의되어왔다. 사회적인 공중 보건위생 이슈를 떠나서라도 유가공 공장에서는 바이오필름의 형성 억제와 제거에 충분한 활동을 실시하여야 한다. 따라서 앞으로도 바이오필름에 대한 연구는 지속적으로 수행되어야 한다. 향후 계속 연구가 진행되어야 할 과제는 다음과 같다.

- 유가공 산업 현장(특히, 공장)에서 바이오필름의 초기 생성을 어떻게 억제할 것인가.
- 형성된 바이오필름의 제거를 위한 유가공 공장의 shop-level의 가장 경제적, 효과적인 방법은 무엇인가.
- CIP 공정에서 사용될 수 있는 가장 바람직한 세제는 무엇인가.
- CIP 세척 조건에서 최적 효율의 농도, 압력, 온도, 시간은 어떠한가.

결 론

바이오필름(biofilm)은 유기물의 응집체로써 습한 유가공 공장 작업장의 모든 재질 표면에서 형성될 수 있다. 바이오필름의 형성은 학설에 따라 다양한 단계로 이루어지지만, 크게 유기물(세포)의 표면 부착, 구조 발달 및 성숙, 바이오필름 덩어리에서 단일 세포의 분리로 구별될 수 있고, 여기서 최초 부착되는 표면(기층)의 특성이 매우 중요하며, 형성된 것을 제거하는 것이 반드시 필요하다. 본문에서 이미 논의된 바와 같이, 바이오필름의 형성을 억제하기 위해서 환경적으로 최초 유기물의 농도가 감소되어야 하며, 모든 재료 표면의 관리가 이루어져야 하는데, 주로 이용되는 스테인레스 스틸과 고무 등의 경우 접촉면에 결함이 없도록 해야 하며, 스테인레스 스틸의 경우 (접촉)표면의 정밀한 가공 처리가 필요하다.

바이오필름은 유제품의 변질, 부패를 발생시켜 공중 보건위생상의 큰 이슈를 야기시키며, 가동 설비의 손상도 가져오므로 유가공 공장에서는 반드시 제어관리 되어야 하는데, 이를 위해 유가공 공장에서는 다양한 방법을 사용하고 있다. 대표적인 사례가 CIP(Cleaning-in-Place) 세척으로써 물-알칼리성 세제-물-산성 세제-물의 공정을 거쳐 세척이 이루어진다. 이러한 CIP 세척은 계속 기술적으로 발전시켜야 하는데, 구체적으로는 세제의 종류와 첨가제, 최적 효율의 농도, 압력, 온도, 시간 등이 향후 연구되어야 할 과제이다.

결론적으로 유가공 공장에서 바이오필름의 형성과 제어관리를 위해서는 먼저 그 생장 조건을 억제시키고, 생성된 바이오필름은 초기에 제거시킴이 필요하며, 이를 위해 재질 표면 관리나 CIP 세척의 중요하다.

감사의 글

본 고찰을 작성하는데 문헌 정리 등의 도움을 준 서울우유협동조합 전략기술본부 기술지원팀 홍봄 계장에게 특별한 감사를 표하며, 본문 중 일부 그래픽(Fig. 2, 3)을 사용할 수 있게 해준 미국 몬태나주립대학교(Bozeman)의 바이오필름공학센터(Center for Biofilm Engineering)에도 깊은 사의를 표한다.

참고문헌

1. Arnold, J. W. and Bailey, G. W. 2000. Surface finishes on stainless steel reduce bacterial attachment and early biofilm

formation: scanning electron and atomic force microscopy study. Poultry Science 79:1839-1845.

2. Arnold, J. W. and Suzuki, O. 2003. Effects of corrosive treatment on stainless steel surface finishes and bacterial attachment. Transactions of the ASAE Bol. 46(6):1595-1602.
3. Bartlett, M., Bird, M. R. and Howell, J. A. 1995. An experimental study for the development of a qualitative membrane cleaning model. J. Membrane Science 105:147-157.
4. Blková, H., Babák, V., Seydlová, R., Pavlík, I. and Schlegelová, J. 2008. Biofilms and hygiene on dairy farms and in the dairy industry: sanitation chemical products and their effectiveness on biofilms - a review. Czech F. Food Sci. 26:309-323.
5. Bos, R., van der Mei, H. C. and Busscher, H. J. 1999. Physicochemistry of initial microbial adhesive interactions - its mechanisms and methods for study. FEMS Microbiology Review 23:179-230.
6. Bremer, P. J., Fillery, S. and McQuillan, A. J. 2006. Laboratory scale clean-in-place (CIP) studies on the effectiveness of different caustic and acid wash steps on the removal of dairy biofilms. Int. J. Food Microbiol. 106(3):254-262.
7. Busscher, H. J. and van der Mei, H. C. 1997. Physico-chemical interactions in initial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. Adv. Dent. Res. 11(1):24-32.
8. Busscher, H. J., Norde, W. and van der Mei, H. C. 2008. Specific molecular recognition and nonspecific contributions to bacterial interaction forces. Applied and Environmental Microbiology: 2559-2564.
9. Champagne, C. P., Laing, R. R., Roy, D. and Mafu, A. A. 1994. Psychrotrophs in dairy products: their effects and their control. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 34(1):1-30.
10. Chandki, R., Banthia, P. and Banthia, R. 2011. Biofilms: a microbial home. Journal of Indian Society of Periodontology 15(2):111-114.
11. Characklis, W. G. 1981. Fouling biofilm development: a process analysis. Biotechnology and bioengineering, Vol. XXI II:1923-1960.
12. Chmielewsik, R. A. N. and Frank, J. F. 2003. Biofilm formation and control in food processing facilities. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 2:23-32.
13. Cortés, M. E., Bonilla, J. C. and Sinisterra, R. D. 2011. Biofilm formation, control and novel strategies for eradication. Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances:896-905.
14. Costertion, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C. and Ehrlich, G. 2003. The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. J. Clin. Invest. 112:1466-1477.
15. Costerton, J. and Lewandowski, Z. 1995. Microbial biofilms. Annu. Rev. Microbiol. 49:711-45.
16. Costerton, J. W., Camper, A. K., Stewart, P. S., Zelver, N. and Dirckx, M. E. The Problem: not just bacteria-bacterial biofilms. Available at: www.kemmfg.com
17. Donlan, R. M. 2001. Biofilm formation: A clinically relevant microbiological process. Clinical Infectious Diseases 33:1387-1392.
18. Donlan, R. M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. Emerging Infectious Diseases 8(9):881-890.
19. Dufour, M., Simmonds, R. S. and Bremer, P. J. 2004. Development of a laboratory scale clean-in-place system to test the effectiveness of “natural” antimicrobials against dairy biofilms. J. Food Prot. 67(7):1438-1443.
20. Flemming, H. -C. and Ridgway, H. 2008. Biofilm control: conventional and alternative approaches. Springer Series on Biofilms, doi:10.1007/7142_2008_20.
21. Gibson, H., Taylor, J. H., Hall, K. E. and Holah, J. T. 1999. Effectiveness of cleaning techniques used in the food industry in terms of the removal of bacterial biofilms. Journal of Applied Microbiology 87:41-48.
22. Gottenbos, B., van der Mei, H. C. and Busscher, H. J. 1999. Models for studying initial adhesion and surface growth in biofilm formation on surfaces. Methods in Enzymology 310: 523-533.
23. Hall-Stoodley, L. and Stoodley, P. 2002. Developmental regulation of microbial biofilms. Current Opinion in Biotechnology 13:228-233
24. Hudson, A., Wong, T. and Lake, R. 2003. Pasteurisation of dairy products: times, temperatures and evidence for control of pathogens. New Zealand Food Safety Authority.
25. Kumar, C. G. and Anand, S. K. 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. International Journal of Food Microbiology 42:9-27.
26. Landini, P., Antoniani, D., Burgess, J. G. and Nijland, R. 2010. Molecular mechanisms of compounds affecting bacterial biofilm formation and dispersal. Appl. Microbiol. Biotechnol. 86(3):813-23.

27. Lindel, I. D., Elter, C., Heuer, W., Heidenblut, T., Stiesch, M., Schwestka-Polly, R. and Demling, A. P. 2011. Comparative analysis of long-term biofilm formation on metal and ceramic brackets. Angle Orthod. 87:907-914.
28. Marchand, S., Block, J. E., Jonghe, V. D., Coorevits, A., Heyndrickx, M. and Herman, L. 2012. Boifilm formation in milk production and processing environments; influence on milk quality and safety. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 11:133-147.
29. Marques, S. C., Rezende, J. O. S., Alves, L. A., Silva, B. C., Alves, E., Abreu, L. R. and Piccoli, R. H. 2007. Formation of biofilms by *Staphylococcus aureus* on stainless steel and glass surfaces and its resistance to some selected chemical sanitizers. Brazilian Journal of Microbiology 38:538-543.
30. Marshall, K. C., Stout, R. and Mitchell, R. 1971. Mechanism of the initial events in the sorption of marine bacteria to surfaces. Journal of General Microbiology 68:337-348.
31. Mittelman, M. W. 1998. Symposium: biofilms: development and control. J. Dariy Sci. 81:2760-2764.
32. O'Toole, G., Kaplan, H. B. and Kolter, R. 2000. Biofilm formation as microbial. Annu. Rev. Microbiol. 54:49-79.
33. Ortega, M. P., Hagiwara, T., Watanabe, H. and Sakiyama, T. 2008. Factors affecting adhesion of *Staphylococcus epidermidis* to stainless steel surface. Japan Journal of Food Engineering 9(4):251-259.
34. Parkar, S. G., Flint, S. H. and Brooks, J. D. 2004. Evaluation of the effect of cleaning regimes on biofilms of thermophilic bacilli on stainless steel. Journal of Applied Microbiology 96:110-116.
35. Percival, S. L., Malic, S., Cruz, H. and Willians, D. W. 2011. Introduction to biofilms. Springer Series on Biofilms 6:41-68.
36. Sheffield, C. L., Crippen, T. L., Poole, T. L. and Beier, R. C. 2012. Destruction of single species biofilms of *Escherichia coli* or *Klebsiella pneumonia* subsp. *pneumoniae* by dextranase, lactoferrin, and lysozyme. International Microbiology 15:183-187.
37. Simões, M., Simões L. C. and Vieira, M. J.2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. Food Science and Technology 43:573-583.
38. Srey, S., Jahid, L. K. and Ha, S. D. 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. Food Control 31:572-585.
39. Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G. and Costerton, J. W. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. Annu. Rev. Microbiol. 56:187-209.
40. Wilson, M. 2001. Bacterial biofilms and human disease. Science Progress 84(3):235-254.
41. 백승천, 정운현. 2000. 유가공 환경에서의 미생물유래 Biofilm. 한국동물자원과학회지 42(2):203-214.
42. www.foodauthority.nsw.gov.au
43. www.realmilkfacts.com
44. www.tetrapak.com

Received 31 May, 2015
Revised 17 June, 2015
Accepted 19 June, 2015