

## 각종 화학기질이 분리된 *Enterobacter sp.*의 열저항성에 미치는 효과

정영건<sup>†</sup> · 권오진

영남대학교 식품가공학과

### Effects of Various Chemical Substrates on Heat Resistance of Isolated *Enterobacter sp.*

Yung-Gun Chung<sup>†</sup> and Oh-Jin Kwon

Dept. of Food Science and Technology, Yeungnam University, Gyeongsan 713-749, Korea

#### Abstract

To pursue the various properties of *Enterobacter sp.*, which may give an outbreak of food-borne disease to man, isolated from the meats and the small intestines of wild mice, and to offer the significant data in the fields of food hygiene and public health this study was carried, 5 strains of *Enterobacter sp.* were isolated from the above samples. 5 strains isolated from sample sources were 1 strain (*E. aerogenes*) from the beeves, 2 strains (*E. aerogenes*, *E. intermedium*) from the pork and 2 strains (*E. aerogenes*, *E. cloacae*) from the small intestines of wild mice. Of total isolated 89 strains, including non-*Enterobacter sp.*, these numbers of 5 isolates were showed as 5.6% of dection rate. On heating at temperature of 55°C for 30min., these 5 strains were generally more resisted in the 0.1M phosphate buffer when such chemical substrates as 0.1M glycine, 5% mannitol or 5% sorbitol was added to it whereas they were appeared weaker resistances in 0.1M phosphate buffer when 1% sodium citrate, 1% casein, 10% sodium chloride or 0.1M cystein was infused into it.

Key words : *Enterobacter sp.*, heat resistance

#### 서 론

*Enterobacter*는 장내세균과에 속하는 Gram음성 간균이며 methyl red 반응이 음성, Voges-proskaur반응이 양성인 점이 *E. coli*와 다르고 모두 운동성이 있어 *Klebsiella*와 구별된다. 그러나 구균과는 달리 형태적 관찰로서 타 장내 세균과의 구별은 불가능하다.

*Enterobacter*는 1967년전까지 *Aerobacter*로 취급하였으나 1967년 Ewing<sup>1)</sup>에 의해 *Enterobacter*로 구분되어 1984년 Noel<sup>2)</sup>에 의해 *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *E. agglomerans*, *E. gergoviae*, *E. intermedium*, *E. sakazakii*의 6종으로 분류되었다. *Enterobacter*는 사람과 동물의 장내에서는 *E. coli*보다 적게 검출되나 토양, 물, 식품 중에 널리 분포되어 있으며 특히 식품에서 검출율이 높다<sup>3)</sup>.

*Enterobacter*는 전반적으로 식품에 대한 부패작용은

<sup>†</sup>To whom all correspondence shoud be addressed

*E. coli*와 같이 약하나 *E. aerogenes*는 *E. coli*보다 gas 생산량이 많으므로 치아즈나 우유등에서 이균에 의한 gas 발생의 위협이 매우 높다.

*Enterobacter*에 대한 연구는 1931년 Grimes와 Henratty<sup>9</sup>가 유제품에서 처음 분리한 이래 많은 학자들에 의해 연구가 활발히 수행되어져 왔다<sup>5~10</sup>.

*Enterobacter*는 식품매개성 질병에 관여하고 설사를 수반한 환자에서도 높은 빈도로 검출되어지며<sup>9</sup> 생체 방어력이 저하되었을 때나 강력한 항생제를 사용한 후 이균에 의한 감염증이 유발되기도 하며 요로감염증, 폐렴증, 폐화농증 등에서도 분리되어져 역학적인 문제가 야기되어지고 있다<sup>9</sup>.

특히, 최근에 *Enterobacter*가 항생물질과 화학약품에 대한 내성이 점차 상승되고 있는 것으로 보고<sup>11~14</sup> 되어지고 있어 그 원인의 분석규명이 요구되어지고 있다. 이러한 관점에서 동물의 육과 장에서 *Enterobacter*를 분리, 동정하고 각종 화학기질이 *Enterobacter*의 열저항성에 미치는 영향을 조사하여 공중위생 및 식품위생학적인 기초자료를 제시하고자 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 재료

공시재료는 대구지역 58개소의 식육판매점에서 구입한 우육과 돈육, 경산근교에서 서식하는 야생쥐 48마리의 장내용물을 이용하였다.

### 균의 분리 및 동정

균의 분리는 Edward와 Ewing<sup>10</sup>의 방법에 따라 육과 장내용물을 각 1g을 균질화하여 Tetrathionate broth (Difco)에 37°C, 24시간 증균 배양하고, 그 1백금이를 MacConkey agar (Difco)에 희선도말하여 적색 혹은 적자색의 짐락을 선별하여 Triple sugar iron agar (Difco, 이하 TSI)에 천자, 37°C, 24시간 확인배양 후, 사면부에 yellow, 고충부에 yellow 혹은 yellow 및 gas 생성 균주만을 분리하여 Bergey's manual<sup>11</sup>을 참조하여 동정하였다.

### 균 혼탁액 조제

분리균을 Trypticase soy broth (Difco, 이하 TSB)에

접종하여 37°C, 24시간 배양한 후 배양액을 저온 원심분리(3000ppm)하여 상동액은 버리고 균체는 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)을 첨가하여 2회 수세한 다음, 상기 phosphate buffer로 재현탁하여 사용하였다.

### 배지별 열저항성 검사

배지별 열저항성검사는 Moats 등<sup>12</sup>의 방법에 따라 10ml의 tube(13×100mm)에 5.4ml의 시험배지와 0.6ml의 균 혼탁액을 혼합한 후 파라핀으로 완전히 밀봉하여 55°C의 수욕조에서 35분간 열처리하였다. 열처리된 접종관을 ice water로 5°C까지 재빨리 냉각한 다음 0.1% peptone-용액으로 희석하여 TSB에 접종한 후 37°C, 24시간 배양하여 짐락의 수를 측정하여 배지별 열저항성을 검사하였다. 이때 사용된 시험배지는 arginine, cystein, glycine, sodium citrate, NaCl, tryptone, lactose, casein, yeast extract, sorbitol, mannitol등의 화학기질을 0.1M phosphate buffer(pH 7.0)에 완전히 용해시켜 0.1N NaOH로 pH 6.8~7.0 되게 조절한 후, 0.2μm filter (Nalgene)로 여과하여 사용하였다.

## 결과 및 고찰

### 균의 분리 및 동정

선별된 89균주 중 운동성이 있고 Voges-proskauer와 citrate반응이 음성이며 기타의 생화학적 성상이 Bergey's manual상 *Enterobacter*와 일치하는 균주는 5주가 분리, 동정되어 본 실험의 공시균주로 사용하였다. Table 1은 분리된 5균주에 대한 생화학적 특징을 나타내었다.

CM-1, PM-1, RS-1은 indol, methyl red 반응이 음성이고 Voges-proskauer, Simmon's citrate, lysine decarboxylase 반응이 양성이며 TSI에서 사면부에 yellow와 고충부에 gas를 생성하고 기타의 생화학적 특징도 Bergey's manual상의 *Enterobacter aerogenes*와 일치하였다. PM-2는 indol 반응이 음성이고 Voges-proskauer와 Simmon's citrate반응이 양성이며 arginine dihydrolase, esculin hydrolysis가 의양성 반응으로서 *Enterobacter intermedium*였다.

RS-2는 indol, methyl red 반응이 음성이고 Voges-proskauer, Simmon's citrate, arginine dihydrolase가

Table 1. Biochemical characteristics of *Enterobacter* sp. isolated from the meat and intestine of wild mice

Biochemical characteristics	Strain	CM <sup>a</sup> -1	PM <sup>a</sup> -1	PM-2	RS <sup>a</sup> -1	RS-2
IP		-	-	-	-	-
MR		-	-	d	-	-
VP		+	+	+	+	+
SC		+	+	+	+	+
TSI	A/AG	A/AG	A/AG	A/AG	A/AG	A/A
Urease	-	-	d	-	-	d
PD	-	-	-	d	-	-
LD	+	+	-	+	-	-
AD	-	-	d	-	+	-
Motility	+	+	+	+	+	+
GL	-	-	-	-	-	-
KCN	+	+	+	+	+	+
MU	+	+	+	+	+	+
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> ~ NO <sub>2</sub>	+	+	+	+	+	+
EH	+	+	d	+	-	d
Acid from:						
Sucrose	+	+	d	+	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+
Maltose	+	+	+	+	+	+
Manitol	+	+	+	+	+	+
Dulcitol	-	-	d	+	+	+ <sup>w</sup>
Arabinose	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+
Rhamnose	+	+	+	+	+	+

Symbols: IP, Indol production; MR, Methyl red; VP, Voges-proskauer; SC, Simmon's citrate; TSI, Triple sugar iron agar; PD, Phenylalanine deaminase; LD, Lysine decarboxylase; AD, Arginine dihydrolase; GL, Gelatin liquefaction at 22°C; MU, Malonate utilization; EH, Esculin hydrolysis; +, 90~100% of strains are positive; -, 0~10% positive; d, 26~75% positive; w, Weak reactions

<sup>a</sup>: Beef, <sup>b</sup>: Pork, <sup>c</sup>: Wild mice-small intestine

Table 2. Incidence of *Enterobacter* sp. isolated from the meat and intestine of wild mice

Experimental animals	Isolated body site	No. of strains isolated	No. of detected(%)
Cow	meat	19	1
Pig	meat	26	2
Wild mice	colon	26	0
	small-intestine	17	2
	caecum	11	0
Total		99	5 (5.62%)

양성이었으며 sucrose를 포함한 모든 당을 분해하여 *Enterobacter cloacae*로 동정되었다.

Table 2는 *Enterobacter*의 분리를 나타낸 것으로 우육에서는 분리한 19균주 중 1주, 돈육에서는 26균주 중 2주가 분리되었고 야생쥐의 대장 및 맹장부위에서는 분리되지 않았으나 소장에서는 17균주 중 2주를 분리하였다. 분리균 89균주 중 *Enterobacter*가 5주가

분리되어 분리율은 5.62%로 나타났다.

#### 배지별 열저항성 검사

Table 3은 대조구로서 분리균을 TSB와 phosphate buffer로 각각 접종하여 화학기질을 첨가하지 않고 55°C, 30분 열처리, 비열처리를 하여 균수를 나타내었다. 열처리한 대조구는 열처리하지 않은 대조구에서 보다 균수가 현저히 감소되었으며 특히 TSB에서 보다 더 감소하였다. 이는 분리균들이 열에 약한 protein 분자가 배지성분과의 복합작용으로 열에 대한 안정성이 증가하기 때문으로 생각된다<sup>[3]</sup>.

각종 화학기질을 첨가한 배지에서의 열저항성검사 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다.

분리균들은 아미노산 기질 중 cystein이 첨가된 배지에서는 glycine이나 arginine이 첨가된 배지에서 보다 열에 대한 저항성이 약하였는데 이는 S-S bond가

Table 3. Effect of controls on survival of *Enterobacter* sp. during heating at 55°C for 30min

Control	Strains	Counts/ml	Survival in indicated medium /survival in PO <sub>4</sub> buffer	
Unheated control	CM-1	$7.4 \times 10^7$		
	PM-1	$2.9 \times 10^7$		
	PM-2	$1.9 \times 10^7$		
	RS-1	$2.1 \times 10^7$		
	RS-2	$1.8 \times 10^7$		
	phosphate buffer (0.1M, pH 7.0)			
	CM-1	$2.7 \times 10^7$		
	PM-1	$1.6 \times 10^7$		
	PM-2	$1.4 \times 10^7$		
	RS-1	$2.5 \times 10^7$		
Heated control	RS-2	$2.4 \times 10^7$		
	TSB	CM-1	$2.1 \times 10^6$	7000
		PM-1	$2.0 \times 10^5$	11111
		PM-2	$4.4 \times 10^5$	4783
		RS-1	$1.3 \times 10^6$	4194
		RS-2	$1.8 \times 10^6$	7500
	phosphate buffer (0.1M, pH 7.0)	CM-1	30	1.0
		PM-1	18	1.0
		PM-2	92	1.0
		RS-1	31	1.0
		RS-2	24	1.0

Heating solution : 0.6ml of cell suspension in 5.4ml of test medium

Table 4. Effect of chemical substrates on survival of *Enterobacter* sp. during heating at 55°C for 30min

Chemical substrates	Strains	Counts/ml	Survival in indicated medium /survival in PO <sub>4</sub> buffer
L-Amino acids (0.1M)	Arginine	CM-1	203
		PM-1	22
		PM-2	20
		RS-1	54
		RS-2	73
	Cystein	CM-1	20
		PM-1	40
		PM-2	28
		RS-1	10
		RS-2	20
Glycine	Glycine	CM-1	2000
		PM-1	4030
		PM-2	1920
		RS-1	1280
		RS-2	1680
	L-Amino acid mixtures	CM-1	6
		PM-1	5
		PM-2	7
		RS-1	17
		RS-2	1
Sodium citrate (1%)	CM-1	0.2	
	PM-1	0.3	
	PM-2	0.08	
	RS-1	0.5	
NaCl (5%, 10%)	RS-2	0.04	
	CM-1	50, 12	2, 0.4
	PM-1	86, 10	5, 0.6
	PM-2	221, 88	2, 0.9

Chemical substrates	Strains	Counts/ml	Survival in indicated medium /survival in PO <sub>4</sub> buffer
Proteins and peptides (1%)	RS-1	36, 15	1, 0.5
	RS-2	20, 5	0.8, 0.2
Tryptone	CM-1	230	8
	PM-1	691	38
	PM-2	432	5
	RS-1	121	4
	RS-2	979	41
Casein	CM-1	20	0.7
	PM-1	4	0.2
	PM-2	28	0.3
	RS-1	1	0.03
	RS-2	20	0.8
Yeast extract	CM-1	210	7
	PM-1	100	6
	PM-2	86	0.9
	RS-1	63	2
	RS-2	182	8
Carbohydrates (5%)			
Sorbitol	CM-1	962	32
	PM-1	1821	101
	PM-2	1021	11
	RS-1	621	20
	RS-2	1650	69
Mannitol	CM-1	1728	58
	PM-1	3456	192
	PM-2	896	10
	RS-1	330	11
Lactose	RS-2	2880	120
	CM-1	748	25
	PM-1	230	13
	PM-2	174	2
	RS-1	259	8
	RS-2	1151	48

해리된 cystein<sup>10</sup> 좀더 열에 대해서 불안정 하기 때문인 것으로 생각된다<sup>11</sup>. Sodium citrate를 첨가한 배지에서는 sodium citrate가 Mg<sup>2+</sup>와 Ca<sup>2+</sup>이온을 세포 밖으로 유리시켜 분리균들은 다른 아미노산 기질보다 훨씬 더 열에 대해 안정하지 않음을 알 수 있었고 NaCl을 첨가한 배지에서는 5% 보다 10%에서 약 10 배 이상으로 균수가 감소 되었지만 sodium citrate보다 열저항성이 강하였다.

단백질과 peptide 기질에서는 casein이 tryptone이나 yeast extract보다 열저항성이 약하였는데 이는 cystein의 경우와 마찬가지로 S-S bond가 해리되어 분리균들이 열에 대한 저항성을 가지지 못하게 하기 때문으로 사료된다. 당을 첨가한 배지에서는 다른 화학기질을 첨가한 배지에서 보다 전체적으로 열저항성이 강하여 Moats 등<sup>12</sup>의 보고와 일치하였다.

이상의 결과로 균주별 열저항성이 약한 화학기질은 CM-1, RM-2, RS-2가 sodium citrate에, PM-1, RS-1은 casein이였고, 열저항성이 강한 화학기질은 CM-1, PM-1, PM-2, RS-1은 glycine에, RS-2는 mannitol이였다.

## 요약

식육 및 야생쥐의 장으로부터 식품매개성 질병에 관여하는 *Enterobacter*를 분리하여 그 특징을 구명하면서 공중위생 및 식품위생학적으로 기초자료를 제시하고자 본 연구를 실시하여 다음과 같은 결론을 얻었다. *Enterobacter*는 우육에서 1주 (*E. aerogenes*), 돈육에서 2주 (*E. aerogenes*, *E. intermedium*), 야생쥐의

소장에서 2주 (*E. aerogenes*, *E. cloacae*)가 동정되어 총 분리된 89균주에 대한 분리율은 5.62%이었다. 분리된 *Enterobacter*를 각종 화학기질이 첨가된 배지에서 55°C, 35분간 열처리한 결과, 전반적으로 0.1M glycine, 5% mannitol 그리고 5% sorbitol이 첨가된 배지에서는 열저항성이 강하였고 1% sodium citrate, 1% casein, 10% NaCl 그리고 0.1M cystein이 첨가된 배지에서는 열저항성이 약하였다.

## 문 헌

1. Ewing, W. H. : Revised definitions for the family Enterobacteriaceae, its tribes and genera. Monography Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia (1967)
2. Noel, R. K. : Bergey's manual of systematic bacteriology, 1, p. 465 (1984)
3. 황규찬, 심우만, 박인숙 : 식품미생물학. 교문사, p. 105 (1982)
4. Grimes, M. and Hennerty, A. J. : A study of bacteria belonging to the subgenus *Aerobacter*. *Sci. Proc. R. Dublin Soc.*, 20, 89 (1931)
5. Fife, M. A., Ewing, W. H. and Davis, B. R. : The biochemical reactions of the tribe *Klebsiella*. Publication from the Center for Disease Control (Formerly the Communicable Disease Center), Atlanta, Georgia (1965)
6. Toala, R., Lee, T. H., Wilcox, C. and Finland, M. : Susceptibility of *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* to 19 antimicrobial agents *in vitro*. *Amer. J. Med. Sci.*, 260, 44 (1970)

7. Kelch, W. J. and Lee, J. S. : Antibiotic resistance patterns of gram-negative bacteria isolated from environmental sources. *Appl. Environ. Microbiol.*, 30, 450 (1978)
8. Campbell, L. M. and Roth, I. L. : Methyl violet ; A selective agent for differentiation of *Klebsiella pneumoniae* from *Enterobacter aerogenes* and other gram-negative organisms. *Appl. Microbiol.*, 30, 258 (1975)
9. Stiles, M. E. and Ng, L. K. : Biochemical characteristics and identification of Enterobacteriaceae isolated from meat. *Appl. Environ. Microbiol.*, 41, 639 (1981)
10. Edward, P. R. and Ewing, W. H. : Identification of Enterobacteriaceae, 3rd ed. Burgess Publishing Co. Minneapolis, p. 381 (1972)
11. Bell, J. B., Macrae, W. R. and Ellelott, G. E. : Incidence of R-factors in coliform fecal coliform and *Salmonella* populations of the red river in Canada. *Appl. Environ. Microbiol.*, 486 (1980)
12. Moat, W. A., Roger, D. and Edwards, V. M. : Survival of *Salmonella anatum* heated in various media. *Appl. Microbiol.*, 21, 476 (1971)
13. 東京大學 醫學研究所 : 細菌學 實習提要, 日本東京, p. 469 (1958)
14. Frazier, W. C. and Westhoff, D. C. : Food microbiology, 4nd ed., McGraw-Hill Book Company, New York, p. 56 (1988)
15. Harrigan, W. F. and Micance, E. : Laboratory methods in food and dairy microbiology, p. 252 (1976)
16. Difco Laboratories : Difco manual, 10th ed., p. 836 (1982)

(1991년 2월 21일 접수)