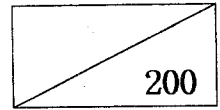


639.12
L2936

GA0060-0992

최 종
연구보고서



19916639

우유 항균물질 검사 Bio system 개발 연구

A study on the development of bio system for
the testing of antimicrobials in milk

연구기관

한국식품개발연구원

농 립 부

제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “우유 항균물질 검사 Bio system 개발 연구” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

1998. 12.

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 김 기 성(책임연구원)

연 구 원 : 임 상 동(선임연구원)

연 구 원 : 김 희 수(선임연구원)

연 구 원 : 최 인 옥(연 구 원)

연 구 원 : 진 여 상(위촉연구원)

연 구 원 : 하 종 숙(위촉연구원)

여 백

요 약 문

I. 제 목

우유 향균물질 검사 Biosystem 개발 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

현재 국내 원유검사에서는 검사비용이 저렴하고 실험시간이 3시간 가량 소요되는 TTC법을 대부분 원유 검사시에 활용하고 있으나 향균물질 검출감도가 낮고 다량의 원유시료를 사용하는 등 우유 향균물질을 검사에 문제점이 있다. 최근에는 다양한 종류의 검사키트가 수입되고 있으나 농가별 또는 개체별 우유 향균물질검사에는 검사비용이 높고 검출되는 향균물질의 종류가 제한되어 있다.

원유 향균물질검사는 지역별로 사용하는 방법이 다소간 차이가 있는데 대부분의 선진국에서는 disc assay법을 표준법으로 하고 통상법으로는 Delvo test, Charm test, BR test 등을 사용하고 있는데 국가별로 허용된 향균물질의 종류와 허용한계가 다르므로 표준법 및 통상법은 허용된 향균물질을 검색할 수 있어야 하며 향균물질검사의 경제성 등도 고려되어야 한다.

국내에서 사용하는 TTC법은 페니실린등 일부 향균물질만 검출이 가능하므로 이를 개량하여 향균물질 검출감도가 좋고 검출방법이 간편한 경제적인 우유 향균물질 검사법을 확립함으로써 효율적인 우유 향균물질 관리체계를 확립하고 국산 우유의 위생적 품질개선을 촉진하여 국내 낙농업 및 유가공산업의 국제경쟁력을 향상시키고자 함이 본 연구의 목적이다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 연구개발사업 목표

- 가. 우유 향균물질 검사를 위한 최적 미생물 선발 및 배양조건 확립
- 나. 향균물질 검사를 위한 발색 system 개발
- 다. 선발된 미생물과 발색 system을 혼합한 향균물질 검사법 확립

2. 연구의 내용 및 범위

가. 우유 향균물질 검사를 위한 최적 미생물 선발 및 배양조건 확립

- 1) 국내외 관련자료 및 문헌조사
- 2) 국내산 우유를 소재로 향균물질 검사용 최적 미생물 검색
- 3) 향균물질에 민감한 균주선발 및 특성조사
- 4) 선발균주 배양을 위한 배양조건 설정

나. 향균물질 검사를 위한 발색 system 개발

- 1) 우유검사 관련 국내외 실태조사
- 2) 향균물질 검사용 미생물 선발 및 특성조사
- 3) 지시약 선발 및 발색특성 조사
- 4) 미생물과 지시약을 혼합한 발색체계 확립 및 보완

다. 선발된 미생물과 발색 system을 혼합한 향균물질 검사법 확립

- 1) 우유검사관련 국내외 실태조사
- 2) 선발된 균주를 이용한 균주체 제조
- 3) 선발균주 배양을 위한 배지체 제조
- 4) 향균물질 검사 최적 복합체 제조
- 5) 균주체 배지체 발색제를 혼용한 향균물질 검사 bio system 확립

IV. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

1. 연구개발결과

가. 우유 항균물질 검사를 위한 최적 미생물 선발 및 배양조건 확립

1) 국내산 우유를 소재로 항균물질 검사용 최적 미생물 검색

분리된 807개의 균주 중 Gentamicin(1ppm), Sulfamethazine(5000ppm), Oxytetracycline(1ppm), Penicillin G(0.024ppm), Erythromycine(1ppm)에 감수성이 있는 균주는 107개 균주가 항균물질에 감수성이 있었다. 107개 균주를 대상으로 2차로 Sulfamethazine (0.01ppm), Sulfadimethoxine (0.01ppm), Sulfathiazole (0.01ppm), Oxytetracycline (0.1ppm), Penicillin G (0.024ppm), Erythromycine (1ppm), Chloramphenicol (0.1ppm)에 감수성 실험결과 15개의 균주가 선발되었다.

2) 항균물질에 민감한 균주선발 및 특성조사

선발된 15개의 균주중 10% 환원 탈지유(Difco)를 응고시키는 균주는 12개 균주로서 TTC test에 적용 가능한 균주로 선정하였다. Tryptic soy broth를 이용한 항균물질 감수성 실험과 TTC test/ TTC II test를 통해 항균물질에 감수성이 높은 것으로 나타난 8개 균주의 동정 결과는 *Lactobacillus para. paracasei* 2균주, *Lactobacillus brevis* 1균주, *Lactobacillus plantarum* 3균주, *Leuconostoc mesen. cremoris* 1균주, *Lactobacillus acidophilus* 1균주이었다.

3) 선발균주 배양을 위한 배양조건 설정

*S. thermophilus*를 포함한 총 9개의 균주를 온도별(30℃, 32℃, 35℃, 37℃), Glucose첨가(2%) 유무별로 3시간 간격으로 24시간 까지 배양하며 pH를 측정된 결과, 최적온도는 glucose를 첨가한 경우 37℃가 4개균주, 35℃가 4개균주, 32℃가 1개균주, 30℃는 없는 것으로 나타났으며, glucose를

첨가하지 않은 경우에는 37℃가 7개균주, 35℃가 1개균주, 32℃는 없었고, 30℃가 1개 균주로 나타나 전체적으로 37℃가 가장 적합한 배양온도로 나타났다.

나. 항균물질 검사를 위한 발색 system 개발

1) 항균물질 검사용 미생물 선발 및 특성조사

1차년도에서 807개 분리균주중 감수성있는 균주 21개와 2차년도에서 725개 분리균주중 43개 균주가 선발되어 총 64개균주를 항균물질검사용 균주로 선발하였다.

2) 지시약 선발 및 발색특성 조사

Brilliant blue 등 14종의 지시약을 대상으로 지시약의 색깔변화를 관찰한 결과 균주의 생장에 따라 색깔에 변화가 있는 지시약은 Resazurin, Methyl red, Phenol red, Bromocresol purple, Methylene blue 등 5가지 지시약 이었다. 그리고 지시약의 첨가량은 0.5ml와 0.75ml가 적합하였으며 발색변화의 과정에서 resazurin 0.005%, phenol red 0.01%, Methyl red는 0.01%, Bromocresol purple은 0.005%, Methylene blue는 0.005%가 항균물질 검사용 지시약의 적합한 농도로 설정되었다.

3) 미생물과 지시약을 혼합한 발색체계 확립 및 보완

5종류의 지시약중에서 단독으로 사용할 때는 Resazurin(0.005%)이 가장 우수하였으며 최종적으로 선발된 8균주를 이용하여 Resazurin을 기본으로 한 혼합지시약을 제조 및 실험한 결과 배지종류에 무관하게 가장 선명한 색깔변화를 나타낸 것은 Resazurin이었고, Resazurin + Methyl red (1:1)와 Resazurin + Bromocresol purple (1:1)이 다른 지시약에 비해 항균물질 유무에 따른 발색변화가 양호한 것으로 나타났다.

다. 선발된 미생물과 발색 system을 혼합한 항균물질 검사법 확립

1) 선발된 균주를 이용한 균주체 제조

Tryptic soy broth 및 skim milk 배지를 이용한 항균물질 감수성 실험과 배지별/지시약별 실험을 통해 항균물질에 감수성이 높고 시험액에서 활력이 좋은 것으로 나타난 최종 선발균주는 *Enterococcus casseliflavus* 2균주, *Enterococcus faecium* 4균주, *Lactobacillus plantarum* 1균주, *Lactobacillus cellobiosus* 1균주 및 *Streptococcus thermophilus* 1균주로 동정되었다. MRS broth와 Skim milk에 계대하면서 지시약실험의 starter로 사용한 결과 MRS배지에서 16시간 배양된 균액이 배양중 지시약 발색변화가 예민하여 우유 항균물질검사용 균주로 사용하는 것이 바람직하였다.

2) 선발균주 배양을 위한 배지체 제조

Resazurin(0.005%)을 지시약으로 사용하여 SPC broth, MRS broth, M17 broth, SPC + MRS(1:1), SPC + M17(1:1), MRS + M17(1:1), Skim milk), SPC + Skim milk(1:1), MRS + Skim milk(1:1), M17 + Skim milk(1:1) 등 각각의 배지를 대상으로 항균제 감수성 실험을 실시한 결과 MRS broth, M17 broth, MRS + Skim milk(1:1), SPC + Skim milk(1:1), MRS + Skim milk(1:1)가 항균물질에 대한 감수성이 잘 나타났고 특히 SPC와 Skim milk를 혼합한 배지에서 항균물질유무에 따른 지시약의 발색감도가 예민한 것으로 나타났다.

3) 항균물질 검사 최적 복합체 제조

배지별/지시약별 항균제 감수성 실험에서 선발된 배지 (SPC + Skim milk)와 지시약 (resazurin, methyl red, bromocresol purple)의 조성을 달리해 가며 균주의 항균제 감수성 정도와 균주의 생장에 따른 지시약의 발색변화를 조사한 결과 Skim milk와 SPC의 혼합비 차이에 따른 색깔변화는 큰 차이가 없었고, 다만 Skim milk의 혼합비가 높을수록 색깔이 탁하고 SPC의 혼합비가 높을수록 선명하였으며 지시약 중에서는 Resazurin이 색도변화가 가장 민감하였다.

4) 균주체 배지체 발색제를 혼용한 항균물질 검사 bio system 확립

우유 항균물질검사를 위한 bio system으로는 multiwell plate에 *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus cellobiosus* 등 분리된 균주 또는 *Streptococcus thermophilus* 균주를 MRS배지에서 배양한 균액 20ul, SPC + Skim milk 배지액 140ul, Resazurin(Resazurin + Methyl red {1:1} 또는 Resazurin + Bromocresol purple {1:1}) 지시약 60ul와 검사용 우유 40ul를 첨가하여 37℃에서 3시간 배양하고 지시약의 발색변화를 평가하는 것이 우유 항균물질검사를 위한 가장 실용적이고 경제적인 방법으로 판단되었다.

SUMMARY

Subject : A study on the development of bio system for the testing of antimicrobials in milk

This study was carried out to establish effective bio system for the detection of antimicrobials in milk. Lactic bacteria was isolated from the raw milk and selected based on the sensitivity of antimicrobials in milk. Various kinds of medium and indicators were tested its sensitivity on the antimicrobials and selected. Based on the results of sensitivity, lactic bacteria, medium and indicators were selected and antimicrobials testing bio system were established. The results obtained were summarized as follows:

1. Among 807 strains of lactic bacteria isolated from the raw milk, 15 were selected as a testing organism based on the sensitivity on the antibiotics(sulfamethazine 0.01 ppm, sulfadimetoxin 0.01 ppm, sulfathiazole 0.01 ppm, erythromycine 1 ppm, chloramphenicol 0.1 ppm).
2. Among 15 strains of lactic bacteria, 8 of them shown coagulability and sensitivity on the skim milk and tryptic soy broth. They were identified as *Lactobacillus para paracasei*, *Lactobacillus brevis*, *Lactobacillus plantarum*, *Leuconostoc mesen. cremoris*, *Lactobacillus acidophilus*.

3. Through the pH changes during the fermentation of lactic bacteria in skim milk at various temperatures, optimum temperature for the incubation of selected lactic bacteria were revealed as 37 °C.

4. Totally 64 strains of lactic bacteria were selected from 1532 strains of bacteria isolated from raw milk during 2 years study.

5. Various kinds of indicators(14) were tested its sensitivity for the antimicrobial testing and optimum indicator for the detection of antimicrobials were resazurin, methyl red and bromocresol purple and its optimum concentration and dosage were 0.1-0.005% and 0.5 ml respectively.

6. Practical indicator for the detection of antimicrobials were Resazurin, Resazurin + Methyl red(1:1) and Resazurin + Bromocresol purple(1:1) compared to the other kinds of indicators.

7. Through the sensitivity test on the tryptic soy broth and skim milk medium, selected strains were identified as *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus cellobiosus*, and *Streptococcus thermophilus*. And MRS broth was optimum medium for the preparation of starter cultures of selected lactic bacteria.

8. Through the various kinds of medium test with the Resazurin indicator, MRS broth, M17 broth, MRS + Skim milk(1:1) and SPC + Skim

milk were revealed as good medium and SPC+Skim milk was one of the best medium for the antimicrobial test in milk.

9. SPC+Skim milk and Resazurin were the optimum medium and indicator for the antimicrobial testing of raw milk.

10. The optimum bio system for the testing of antimicrobials in milk is composed of 20ul of lactic starter culture(*Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus cellobiosus*, *Streptococcus thermophilus*), 140ul of medium broth(SPC + Skim milk), 60ul of indicator solution(Resazurin, Methyl red, Bromocresol purple) and 40 ul of sample milk in the multiwell plate. The mixed solution of the multiwell plate is incubated at 37°C for 3 hours then the result will be defined according to the changes of indicator in the mixed solution.

여 백

CONTENTS

Chapter 1	Introduction -----	21
Part 1.	Objectives and scope of study -----	21
1.	Objectives of the study -----	21
2.	Scope of the Study -----	21
Part 2.	Trends of Raw milk quality and antimicrobial test -----	22
1.	Raw milk quality -----	22
2.	Antimicrobial testing -----	30
Chapter 2	Selection of strain and establishment of incubation condition -----	43
Part 1.	Introduction -----	43
Part 2.	Materials and Methods -----	44
1.	Isolation of lactic bacteria -----	44
2.	Preparation of antimicrobial solution -----	45
3.	antimicrobial sensitivity test -----	46
4.	selection of lactic bacteria for the TTC/TTC-II test ----	47
5.	Preparation of TTC/TTC-II solution -----	47
6.	TTC/TTC-II test with the selected lactic bacteria -----	48
7.	Identification of selected lactic bacteria -----	48
8.	Optimum incubation condition -----	49

Part 3. Results and discussion -----	49
1. Screening of bacteria for the antimicrobial test -----	49
2. Selection and Characterization of selected bacteria -----	57
3. Optimum incubation condition for antimicrobial test -----	65
 Chapter 3 Development of indicator for the antimicrobial test -----	 71
Part 1. Introduction -----	71
Part 2. Materials and Methods -----	73
1. Sensitivity test of 1st selected lactic bacteria -----	73
2. Screening of lactic bacteria from raw milk -----	74
3. Sensitivity test of 2nd selected lactic bacteria -----	74
4. Selection and characterization of indicator -----	75
5. Optimization of lactic bacteria and indicator -----	76
 Part 3. Results and discussion -----	 80
1. Selection and characterization of lactic bacteria -----	80
2. Selection and characterization of indicator -----	84
3. Optimization of lactic bacteria and indicator -----	92
 Chapter 4 Establishment of bio system with selected strain, medium and indicator -----	 105
Part 1. Introduction -----	105
Part 2. Materials and Methods -----	106
1. Identification of final selected lactic bacteria -----	106
2. Comparison of bacteria grown in MRS and skim milk -----	106

3. Sensitivity of selected bacteria at various medium -----	107
4. Establishment of optimum medium condition -----	111
5. Analysis of residual Sulfadrugs in milk by HPLC -----	112
6. Optimum mixture of bacteria, medium and indicator -----	113
Part 3. Results and discussion -----	114
1. Preparation of solution of selected lactic bacteria ----	114
2. Preparation of optimum medium -----	127
3. Preparation of mixture for the antimicrobial test -----	135
4. Bio system of bacteria, medium and indicator -----	141
References -----	153
Appendix 1. Trend of antimicrobial testing system in USA -----	159
2. Trend of antimicrobial testing system in Australia ----	162

여 백

목 차

제 1 장 서론 -----	21
제 1 절 연구개발의 목적과 범위 -----	21
1. 연구목적 -----	21
2. 연구범위 -----	21
제 2 절 원유품질 및 항균물질 검사 -----	22
1. 원유 품질 -----	22
2. 항균물질 검사 -----	30
제 2 장 우유/항균물질검사를 위한 최적미생물선발 및 배양조건확립 ---	43
제 1 절 서설 -----	43
제 2 절 재료 및 방법 -----	44
1. 국내 원유에서 젖산균의 분리 -----	44
2. 항균물질감수성 및 TTC II test와 지시약 실험을 위한 항균물질 용액 의 제조 -----	45
3. 항균물질 감수성 검사 -----	46
4. TTC / TTC II test에 적용 가능한 균주 선발 -----	47
5. TTC / TTC II test용 시약조제 -----	47
6. 항균물질에 감수성 있는 선발균주의 TTC / TTC II test -----	48
7. 최종 선발된 균주의 동정 -----	48
8. 선발균주의 최적 배양조건 설정 -----	49

제 3 절 결과 및 고찰 -----	49
1. 국내산 우유를 소재로 항균물질 검사용 최적 미생물 검색 -----	49
2. 항균물질에 민감한 균주선발 및 특성조사 -----	57
3. 선발균주 배양을 위한 배양조건 설정 -----	65
제 3 장 항균물질 검사를 위한 발색 system 개발 -----	71
제 1 절 서설 -----	71
제 2 절 재료 및 방법 -----	73
1. 1차년도 균주의 항균물질 감수성 재검사 -----	73
2. 국내 원유에서 젖산균의 분리 -----	74
3. 2차년도 균주의 항균물질 감수성 검사 -----	74
4. 선발균주 이용한 지시약 선발 및 발색 특성조사 -----	75
5. 미생물과 지시약을 혼합한 발색체계 확립 및 보완 -----	76
제 3 절 결과 및 고찰 -----	80
1. 항균물질 검사용 미생물 선발 및 특성조사 -----	80
2. 지시약 선발 및 발색특성 조사 -----	84
3. 미생물과 지시약을 혼합한 발색체계 확립 및 보완 -----	92
제 4 장 선발된 미생물과 발색system을 혼합한 항균물질검사법 확립 --	105
제 1 절 서설 -----	105
제 2 절 재료 및 방법 -----	106
1. 최종선발된 균주의 동정 -----	106
2. MRS 배양균주와 Skim milk 배양균주의 비교 -----	106
3. 선발된 균주의 배지별 감수성 실험 -----	107
4. 최적 배지조건 설정 -----	111

5. HPLC를 이용한 우유내 잔류 설파제 분석 -----	112
6. 최적의 균주/배지/지시약 혼합체 설정 -----	113
제 3 절 결과 및 고찰 -----	114
1. 선발된 균주를 이용한 균주체 제조 -----	114
2. 선발균주 배양을 위한 배지체 제조 -----	127
3. 항균물질 검사 최적 복합체 제조 -----	135
4. 균주체 배지체 발색제를 혼용한 항균물질 검사 bio system 확립 --	141
 참 고 문 헌 -----	 153
 부록 1. 미국출장조사 결과 요약 -----	 159
2. 호주출장조사 결과 요약 -----	162

여 백

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

1. 연구목적

현재 국내 원유검사에서는 검사비용이 저렴하고 실험시간이 3시간 가량 소요되는 TTC법을 대부분 원유 검사시에 활용하고 있으나 항균물질 검출감도가 낮고 다량의 원유시료를 사용하는 등 우유 항균물질을 검사에 문제점이 있다. 최근에는 다양한 종류의 검사키트가 수입되고 있으나 농가별 또는 개체별 우유 항균물질검사에는 검사비용이 높고 검출되는 항균물질의 종류가 제한되어 있다.

원유 항균물질검사는 지역별로 사용하는 방법이 다소간 차이가 있는데 대부분의 선진국에서는 disc assay법을 표준법으로 하고 통상법으로는 Delvo test, Charm test, BR test 등을 사용하고 있는데 국가별로 허용된 항균물질의 종류와 허용한계가 다르므로 표준법 및 통상법은 허용된 항균물질을 검색할 수 있어야 하며 항균물질검사의 경제성 등도 고려되어야 한다.

국내에서 사용하는 TTC법은 페니실린등 일부 항균물질만 검출이 가능하므로 이를 개량하여 항균물질 검출감도가 좋고 검출방법이 간편한 경제적인 우유 항균물질 검사법을 확립함으로써 효율적인 우유 항균물질 관리체계를 확립하고 국산 우유의 위생적 품질개선을 촉진하여 국내 낙농업 및 유가공산업의 국제경쟁력을 향상시키고자 함이 본 연구의 목적이다.

2. 연구범위

이 연구의 최종 목표는 우유 항균물질 검사를 위한 최적 미생물 선발 및 배양조건 확립, 항균물질 검사를 위한 발색 system 개발 및 선발된 미생물과 발색 system을 혼합한 항균물질 검사법 확립이다.

이 최종목표를 달성하기 위한 1차년도 연구개발 사업의 목적은 우유 향균물질 검사를 위한 최적 미생물 선발 및 배양조건 확립이며, 동 연도 연구의 내용은 국내산 우유를 소재로 향균물질 검사용 최종 미생물 검색, 향균물질에 민감한 균주선발 및 특성조사, 선발균주 배양을 위한 배양조건 설정이다. 2차년도의 연구목적은 향균물질 검사를 위한 발색 system 개발이며, 동 연도 연구의 내용은 향균물질 검사용 미생물 선발 및 특성조사, 지시약 선발 및 발색특성 조사, 미생물과 지시약을 혼합한 발색체계 확립 및 보완이다. 3차년도의 연구목적은 선발된 미생물과 발색 system을 혼합한 향균물질 검사법 확립이며, 동 연도 연구의 내용은 선발된 균주를 이용한 균주체 제조, 선발균주 배양을 위한 배지체 제조, 향균물질 검사 최적 복합체 제조 및 균주체 배지체 발색제를 혼용한 향균물질 검사 bio system 확립이다.

제2절 원유품질 및 향균물질 검사

1. 원유품질

1995년 1월부터 유제품의 수입이 전면 개방된 이래 국내 유제품은 품질 및 가격에서 외국제품과 경쟁하게 되었으나 각종 수입유제품에 크게 잠식되고 있다. 선진국에 비하여 짧은 역사를 갖고 있는 국내 낙농업 및 유가공 산업은 연간 200여 만톤의 우유를 생산 처리 및 가공하기에 이르러 물량에서는 비약적인 발전을 이룩하였으나 품질 및 가격에서는 선진국에 비해서 아직도 열악한 여건에 처해 있으며 이는 곧 유제품의 국제 경쟁력을 약화시키는 요인이 되고 있다. 우유 및 유제품의 국제 경쟁력을 향상시키기 위해서는 좋은 품질의 원유를 저렴한 가격으로 생산하는 일이 선행되어야 하고 아울러 선진화된 기술과 설비를 활용하여 국민의 기호에 맞는 양질의 유제

품을 생산하여야 가능한데 국내 유제품은 원유의 품질과 가격면에서 선진국과 많은 차이를 보이고 있어 국제 경쟁력에서 불리한 여건에 있다.

이에따라 원유의 위생적 품질개선의 필요성이 대두되어 1993년 6월부터 유질등급제를 실시한 이래 원유의 세균수는 크게 감소하여 1997년 현재 전체 원유의 75% 이상이 1등급이고, 4등급은 5%미만으로 크게 감소하여 4,5년전에 비해 세균수면에서 획기적인 유질개선이 이루어졌다. 그러나 체세포수는 세균수에 비해 크게 향상이 이루어지고 있지 않은 실정이다.

표 1. 낙농선진국의 원유검사 현황

검사항목	국 가	일 본	덴 마 크	영 국	미 국	캐 나 다	호 주 뉴 질 랜드
검사 형태		지역별 검사제도	중앙검사제도	중앙검사제도	지역별 검사제도	중앙검사제도	중앙검사제도
조성분 분석법		적외선 분석법	적외선 분석법	적외선 분석법	적외선 분석법	적외선 분석법	적외선 분석법
세균검사방법		Spiral count Breed count Bacto scan	Petri foss	Petri foss	Petri film Bacto scan 직접현미경 SPC법	Petri foss	Bacto scan 직접현미경 SPC법
체세포 검사법		Fossomatic	Fossomatic	Fossomatic	Fossomatic Somacount	Fossomatic	Fossomatic
항생물질 검사법		Disc assay 미생물작용 색소환원법 TTC법	미생물작용 색소환원법	미생물작용 색소환원법	Disc assay 미생물작용 색소환원법 면역항체법 Charm test	미생물작용 색소환원법 면역항체법 Charm test Disc Assay	Disc assay 미생물작용 색소환원법 Charm test
검사소 운영		지역별 검사소	중앙검사소 (1개소)	지역별 MMB지소	지역별 검사소	주별 검사소	주(섬)별 검사소
검사관장기관		유업기술협회	Dairy Board	MMB	주정부 주농무성	MMB	Dairy Corporation Board

주) 검사주기 : 3-4회/월 , 적외선 분석법 : Milkoscan, Multispec, 미생물 작용 색소 환원법 : Delvo test, BR test, Charm aim test, 면역 항체법 : Lactec test, Cite probe

표 2. 원유 위생등급 변동현황

시행일자	세 균			체 세 포			비 고	
	등급	세균수/ml	금액	등급	세균수/ml	금액		
'93. 6. 1	1	10만 미만	+39	1 2 3 등외	25만 미만	0		
	2	10~25만 미만	+16		25~50만 미만	0		
	3	25~50만 미만	+ 6		50~75만 미만	0		
	4	50~100만 이하	0		75만 초과	-11		
	등외	100만 초과	-11					
계		50	계		11			
'95.10.16	1A	3만 미만	+52	1 2 3 등외	20만 미만 20~50만 미만 50~75만 이하 75만 초과	0 0 0 -11		*세균수 등외 및 4등급 연속 3회 이상시 1일 납유정지
	1B	10만 미만	+41					
	2	10~25만 미만	+17					
	3	25~50만 미만	+ 9					
	4	50~100만 이하	0					
등외	100만 초과	-31						
계		83	계		11			
'96. 7. 1	1A	3만 미만	>11	1 2 3 4	20만 미만 20~50만 미만 50~60만 이하 60만 초과	+30 0 -10 -30		
	1B	10만 미만	>24					
	2	10~25만 미만	> 8					
	3	25~50만 이하	>40					
	4	50만 초과						
계		83	계		60			
'97. 3. 1	1A	3만 미만	>11	1 2 3	20만 미만 20~50만 이하 50만 초과	+30 0 -30		
	1B	10만 미만	>24					
	2	10~25만 미만	> 8					
	3	25~50만 이하	>40					
	4	50만 초과						
계		83	계		60			
'98. 1	1A	3만 미만	553					
	1B	10만 미만	540					
	2	10~25만 미만	512					
	3	25~50만 이하	502					
	4	50만 초과	419					

표 3. 세균수 등급의 각국 규정

국가	등급(ml 당)						집유 정지선	검사 주기
	1	2	3	4	5	6		
덴마크	3만미만	3만~10만미만	10만~30만이하	30만초과	-	-	40만초과	매주
영국	2만미만	2만~10만이하	10만초과	-	-	-	20만초과	매주
미국	2만5천이하	2만5천초과	-	-	-	-	30만초과	월1회
캐나다	5만미만	5만~7만5천이하	7만5천초과	-	-	-	10만초과	월1회
호주	2만미만	2만~5만이하	5만초과	-	-	-	5만초과	월2~4회
뉴질랜드	2만5천	2만5천~5만미만	5만~10만미만	10만~20만미만	20만~50만이하	50만초과	-	10일에1회
일본	30만이하	30만초과	-	-	-	-	100만초과	월1회
이스라엘	4만미만	4만~10만미만	10만~25만미만	25만~50만이하	50만초과	-	-	월2회
한국	10만미만	10만~25만미만	25만~50만미만	50만초과	-	-	-	월2회

주) - 일본 : 총균수(TBC : Total Bacterial Counts) 기준임

- 기타국 : 일반세균수(CFU : Colony Forming Units) 기준임

표 4. 체세포수 등급의 각국 규정

구분	등 급 (ml당)					집 유 정지선	검 사 주 기
	1	2	3	4	5		
덴마크	30만미란	30만~40만 미란	40만~75만 미란	75만이상	-	40만이상	매주
	+3 ore/kg	0	-3 ore/kg	-6 ore/kg			
영 국	40만미란	40만~50만 미란	50만~100 만미란	100만초과	-	-	매주
	0	-0.5ppl	-1.0ppl	-2.0ppl			
미 국	10만미란	30만~40만 미란	40만~75만 미란	75만이상	-	100만이상	월6회
	+\$20~\$80	+\$10~	0	-\$10~			
캐나다	50만미란	50만~60만 미란	60만~70만 미란	70만~75만 이하	-	75만초과	월1~4회
	0	-1/hl	-2/hl	-3/hl			
일 본	30만미란	30만~50만 이하	50만초과	-	-	100만초과	월2~3회
	0	-1~2 Yen	-2~5 Yen				
이 스 라 엘	30만미란	30만~50만 미란	50만~70만 미란	70만초과	-	-	월2회
	+0.5%	0	-1.0%	-2.0%			
한 국	20만미란	20만~50만 미란	50만초과	-	-	-	월2회
	+30원	0	-30원				
호 주	20만미란	20만~30만 미란	30만~50만 미란	50만초과	-	75만초과	-
	Varies						
뉴 질 랜 드	50만미란	50만~60만 미란	60만~80만 미란	80만~100만 미란	100만초과	-	10일에회
	Varies						

주) 자료원전 : IDF Bulletin No. 305/1995

표 5. 국내 원유 중 세균수 등급 분포

(단위 : count/ml,%)

년	등급		1등급<10만	2등급<25만	3등급<50만	4등급<100만	5등급>100만
1993. 6			26.7	18.7	15.5	17.6	21.5
1993			44.7	20.5	13.1	12.3	9.6
1994			60.4	18.7	9.9	7.1	4.1
1995			66.8	17.7	7.8	5.3	3.1
구 분	1등급		<25만	<50만	>50만	폐지	
	A<3만	B<10만					
1996	40.6	30.2	15.5	6.9	5.0		
1997	47.3	28.8	13.3	5.5	4.9		
1998	60.5	20.5	9.5	5.5	4.0		

표 6. 국내 원유 중 체세포수 등급 분포

(단위 : count/ml,%)

년	등급	1등급(<25만)	2등급(<50만)	3등급(<75만)	4등급(>75만)
	1993.6		30.03	34.17	17.87
1993		26.93	32.16	19.12	21.73
1994		26.65	32.77	22.39	18.11
1995.10		20	40	75	75
1995		23.28	33.81	25.18	17.72
1996상반기		23.4	30.46	31.35	14.75
1996.7		1등급(<20만)	2등급(<50만)	3등급(<60만)	4등급(>60만)
1996후		22.7	44.7	9.75	22.7
1997.3이후		1등급(<20만)	2등급(<50만)	3등급(<50만)	폐지
1998년		24.4	46.7	28.9	-

2. 항균물질 검사

가. 국내·외 항균물질 검사 현황

국내에서는 젖소의 유방염 치료 및 전신치료제로 다양한 항균제를 사용하며, 국내에서 사용되는 항균제 종류는 베타락탐계, 썰파계, 테트라사이클린계, 마크로라이드계, 아미노글루코사이드계 등 다양한 항균제를 복합 사용하고 있다. 국내에서 우유중의 항균물질 검사는 TTC법을 공정법으로 음성이어야 하며, TTC법은 베타락탐계(페니실린 등)항균제 검사에 효과적이거나 sulfa제 검출에는 한계가 있다. 따라서 이에대한 보완으로 목장의 원유는 TTC법으로 검사하고, 집유 탱크로리 및 발효유용 저유탱크의 원유를 검사하는데 Delvo test나 Penzyme test를 주로 이용하고 있다. 대부분의 낙농선진국에서는 비유젖소에 대한 항균물질 사용이 제한적으로 허용되며, 항균물질 검사에는 Disc Assay, Delvo test, BR test, Charm test, HPLC법을 활용하는데 검사법과 체계는 국가별로 다양하다(Van Eenennaam 등, 1993; Macaulay와 Packard, 1981; Read 등, 1971). 일반적으로 낙농가 원유의 항균제 검사는 미생물 이용 색소환원법(Delvo test, BR test) 또는 미생물 억제환 측정법(Disc Assay)으로 실시하고(Hammonds와 Adenwala, 1990), 양성유에 대해서는 정밀 분석검사(Charm test, HPLC test)를 실시하며, 유가공 공장에서 혼합유의 항균제 검사는 Lactec test, Charm test 등을 실시하고 있다. 우유중 항균물질 검사에는 미생물작용 색소환원법이 많이 활용되는 방법이며, 정확하고 신속한 검사를 위하여 항균제에 민감한 균을 선발하여 이용하는데 우유에서 잘 자라는 유산균을 주로 이용하고 있다. 잔류 항균물질 검출은 현재 매우 다양한 방법이 소개되고 있으며, 대부분의 방법은 kit화 되어 현재 시판되고 있다. 잔류 항균물질의 검사법은 각 원리에 따라 분류되고 있는데 크게 미생물 억제환 크기 비교법(Disk Assay), 미생물 작용에 의한 색소환원법(TTC, Delvo, BR, Charm AIM), 미생물의 항균물질에 대

한 수용체 이용법(Charm II), 효소에 의한 비색법(Penzyme), 및 면역항체법(Lactek, Cite Prove, Signal, Ez-Screen, Agri-Screen)등 다양하다(박, 1993; Bishop 등, 1990).

1) BsDA(*B. stearothermophilus* disk assay)는 공인시험방법으로 0.08IU/ml의 penicillin 농도를 2.5시간 내에 검출해 낸다(Gilbertson, 1995). 원유시료는 82℃로 2분간 처리하며, penicillinase 처리와 무처리로 최종 함유 여부를 결정한다(박, 1993).

2) 미생물 발육억제 반응 이용 측정

가) Charm Farm Test는 원유내 항균물질을 세균 발육억제를 이용한 색깔 변화에 의해 스크리닝하는데 이용되고 있고 검출감도가 높다(박, 1993).

나) Delvotest는 우유중의 잔류항균물질을 미생물작용 환원법으로 검출할 수 있도록 개발된 검사방법으로 사용이 매우 간편하며(Bishop 등, 1990), *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* 균주를 이용(Carlsson과 Björck, 1992)한 Delvotest P와 sulfa제 등의 항균물질에 대한 검출감도가 높도록 개발된 Delvotest SP가 있다.(Larocque, 1986). 원유와 시유 및 가공유 등 유제품외에 육즙, 혈청, 뇨 등의 다른 액상시료에 대해서도 잔류항균물질 검사가 가능하다(Bishop 등, 1990).

다) BR Test (Brilliant Black Reduction Test)는 TTC와 유사(박, 1993)하며 agar diffusion법과 색소환원법이 결합된 방법이다. (Bishop 등, 1990).

라) TTC test는 우유중에 항균물질이 잔류할 경우 시료에 시험균(*Streptococcus thermophilus*)을 첨가하여 배양하더라도 시험균이 증식하지 않아 TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium)가 환원되지 않지만, 우유 중에 항균물질이 없을 경우에는 접종한 시험균이 증식하여 TTC가 환원됨으로써 적색의 Triphenyl formazan이 형성된다. 따라서, TTC가 환원되어 적색으로 변화

면 항균물질이 잔류하지 않음을 나타내고, 우유의 빛깔이 변하지 않으면 항균물질의 양성으로 판정한다(Bishop 등, 1990).

식품공전의 방법에 따르면 항균물질을 농도별로 첨가한 10% 환원탈지유 9ml를 80℃에서 5분간 가열 처리하여 37℃로 냉각시킨 후 여기에 시험균액(10% 환원탈지유에 배양한 균액+동량의 증류수) 1ml를 첨가하여 37℃ 수조에서 2시간 배양시킨 후 TTC 4% 용액을 0.3ml 첨가하고 다시 37℃ 수조에서 배양하였다. TTC 시약은 시험균이 증식할 때 대사과정에서 생성되는 succinate dehydrogenase에 의해서 환원되어 triphenyl formazon을 형성하여 붉은 색을 띄게 되는데 배양 후 발색되지 않는 것은 항균물질 양성반응, 발색된 것은 음성반응으로 결과를 판독하였다. 시약은 7℃ 이하의 냉암소에 보관하였다(박, 1993). TTC법의 검출감도를 보완하여 잔류 설파제의 검출감도를 높이기 위해 TMP(trimethoprim)를 시험액에 첨가한 후 시험균주인 *Streptococcus thermophilus*에 의해 무색의 TTC가 산화환원반응 결과 적색의 triphenyl formazon의 형성유무를 확인하는 TTC II test는 시료가 양성일 경우 p-aminobenzoc acid(PABA)와 penicillinase를 첨가하여 설파제와 페니실린계 항균물질의 최종확인이 가능하도록 개량된 방법이다(Bishop 등, 1990).

3) Membrane-matrix 상에서 antibiotic-binding protein 이용 측정

β -lactam CITE Probe와 Tetracycline CITE Probe가 있다(박, 1993).

4) ELISA(면역항체법)이용 측정

ELISA법은 생체내의 항균물질과 같은 이물질의 존재여부에 따라 생기는 특이 항체를 효소와 기질의 색반응으로 검출하여 항균물질의 존재여부를 알아내는데 사용된다(Bishop 등, 1990; Charm과 Chi, 1986).

가) Lactek system은 원유 및 유제품내의 잔류 항균물질을 저렴한 가격으로 신속, 정확하게 실험실에서 정성 및 정량화할 수 있는 방법으로 우유

내에 잔류 항균물질이 있을 경우에는 잔류물이 항체와 결합하고 나머지 부분만이 효소와 결합하여 발색시 색 변화가 적어 항균물질 양성으로 판별된다(Bishop 등, 1990; 김 등, 1991).

나) Agri-Screen Test는 농가 및 실험용으로 적합한 방법으로 well을 이용한 polyclonal 항체에 기초를 둔 분석법이다(Bishop 등, 1990).

다) Signal T는 gentamicin, neomicin, sulfamethazine 3가지의 항균물질을 검출하는데 사용되며 잔류 항균물질에 high-affinity를 가진 항체가 well에 코팅되어 있어 항균물질과 효소의 접합체가 항체의 결합부위에 대해 시료내 잔류 항균물질과 경합하게 되어 색의 변화를 나타낸다(Bishop 등, 1990).

라) Cite prove법은 Cite 기구에 있는 섬유막위에서 시료내의 항균물질과 효소접합 항균물질이 항체에 대해 서로 경합을 하여 색의 변화가 나타나는 검사법이다 (Bishop 등, 1990).

마) Ez-Screen test는 5분만에 결과를 판정할 수 있으며 gentamicin, sulfadimethoxin, sulfamethazine의 검출이 가능하다(Bishop 등, 1990).

5) Charm II Test는 방사선 동위원소를 이용한 가장 민감한 시험방법으로 (박, 1993; Brady와 Katz, 1989), β -lactam계, macrolide계, sulfonamide계, aminoglycoside계, tetracycline계 및 chloramphenicol 등의 항균물질을 분석할 수 있다(Senyk, 1990; Collins-Thompson 등, 1988; Carlsson과 Björck, 1991). 이와 같이 계열별로 정량할 수 있는 장점이 있으나 기기설치비가 별도로 추가되는 부담이 따른다(Bishop 등, 1990).

6) Penzyme method는 β -lactam계 항생제를 효소에 의한 비색분석법으로 신속하게 검출해 내는 방법으로 유선염 등과 같은 질병의 예방과 치료에 광범위하게 사용된다(Bishop 등, 1990; Senyk, 1990; Suhren과 Walte, 1996).

표 7. 항균물질 검사방법별 요약표

방법	원리	검사시간	검사비용	검사가능 항생제	배양조건	대상시 료
Disc Assay	미생물 억제환 크기 비교법	100개/ 3.5-4시간	약50원/ 개	페니실린	64℃/ 2.5시간	우유
TTC	미생물 작용 환원법	100개/ 3-3.5시간	10원미만 /개	페니실린	83-87℃/ 5분, 37℃/ 2.5시간	우유
TTC II	미생물 작용 환원법	100개/ 3-3.5시간	30원미만 /개	페니실린, 설파제	83-87℃/ 5분, 37℃/ 2.5시간	우유
D e l i v o	P 미생물 작용 환원법	100개/ 3-3.5시간	2,000원/ 개	베타락탐계	64℃/ 2.5시간	유 및 유제품 , 노, 생육즙 , 혈청
		100개/ 3.5-4시간	2,000원/ 개	베타락탐계, 설파제	64℃/ 3시간	
BR	미생물 작용 환원법	100개/ 3.5-4시간	-	베타락탐계, 설파제, 아미노글리코사이드계, 마크로라이드계, 테트라사이클린계, 바시트라신, 클로람페니콜, 설펜아미이드계	64℃/ 2.75시간	우유 및 액상유 제품

방 법	원 리	검사시간	검사비용	검사가능 항생제	배양조건	대상 시료
Charm AIM	미생물 작용 환원법	96개/ 3.5-4시간	1,500원/ 개	베타락탐계, 설 파제, 테트라사 이클린계, 아미 노글리코사이드 계, 마크로라이 드계	65℃/ 3시간	우유
Charm II	미생물의 항균성 물질에 대한 수용체를 이용한 정량법	1개/ 8분	6,000원/ 개	베타락탐계37종 , 테트라사이클 린계8종, 마크로 라이드계7종, 아 미노글리코사이 드계6종, 설파제 18종, 마이코톡 신6종, 클로람페 니콜, 바시트라 신, 스펙티노마 이신, 노보바이 오신	85℃/ 3분	우유, 식육, 사료, 계란, 혈청, 노
Penzyme	효소에 의한 비색법	100개/ 1-1.5시간	2,000원/ 개	베타락탐계	47℃/ 15분	우유

방 법	원 리	검사시간	검사비용	검사가능 항생제	배양조건	대상시료
Lactek	면역 항체법	1개/ 7분	1,500원/ 개	베타락탐계, 설파메타진, 겐타마이신, 클로람페니콜 , 테트라사이 클린계	상온/ 3-4분	우유 및 유제품
Cite prove	면역 항체법	-	-	클로르테트라 사이클린, 겐 타마이신, 옥 시테트라사이 클린, 페니실 린, 설파디메 톡신, 설파메 타진, 설파시 오졸, 테트라 사이클린	-	우유
Signal	면역 항체법	-	-	겐타마이신, 네오마이신, 설파메타진	-	우유
Ez-Screen	면역 항체법	1개/ 5분	-	겐타마이신, 설파디메톡신 , 설파메타진	-	우유
Agri- screen	면역 항체법	-	-	설파메타진	-	우유

자료 : 김 등(1994)

표 8. 항균물질을 검출할 수 있는 신속검사법

항균물질 검사법		BR Test	Charm II	Charm Cowside	Charm Farm	CITE	Delvo test P	Delvo test SP	Disk Assay	EZ-Screen	LacTe-k	Penzy-me	Penz-yme III	Signal
베타 락탐계	페니실린	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	
	세파피린	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	
	클록사실린										○			
	세프티오퍼	○	○	○	○	○	○	○	○			○	○	
	암피실린	○	○	○	○	○	○	○	○		○	○	○	
	아목시실린	○	○	○	○	○	○	○			○	○	○	
테트라 사이클린계	테트라사이클린		○		○	○								
	클로르테트라사이클린		○			○								
마크로 라이드계	옥시테트라사이클린		○			○								
	에리스로마이신		○											
아미노 글리코사이드계	타이로신	○			○									
	설파메타진		○	○		○				○	○			○
	설파디메톡신		○	○	○	○				○				
	설파메라진		○	○										
	설파티아졸		○			○								
	설파디아진		○	○	○									
아미노 글리코사이드계	겐타마이신		○			○					○			○
	네오마이신				○		○							○
기타계	스트렙토마이신		○											
	노보바이오신		○											
	폴리마이신 B													
	스펙티노마이신		○											

주) 항균물질 검출 가능한 검사법을 "○"으로 표시

나. 원유의 항균물질 허용량

원유의 항균물질 허용량을 보면 표9와 같으며, 유럽에 비해 Codex규격이 허용 항균물질이 제한되어 있으며, 허용량도 더 강화하였다.

표 9. 원유의 항균물질 최대잔류 허용한계(MRLs) 와 안전치/허용치

(단위 : ppb)

계 열	항 균 물 질	Codex MRLs	EU MRLs	권장치/허용치
β-락탐계	페니실린	4	4	5/0
	암피실린		4	10/10
	아목시실린		4	10/10
	클록사실린		30	10/10
	디클록사실린		30	
	옥사실린		30	
	세프티오퍼	100	100	50/1,000
	세파피린			20/20
테트라사이클린계	클로르테트라 사이클린		100	30/0
	옥시테트라 사이클린	100	(총 테트라 사이클린계)	80/0
	테트라사이클린			10/0
	설파디미딘			10/10
	설파디메톡신	25	100	10/0
설 파 제	설파메라진		(총 설폰 아마이드계)	10/0
	설파티아졸			10/0
	설파디아진			10/0
	에리스로마이신		40	50/0
마크로라이드계	스피라마이신	100	200	
	타이로신		50	50/50
	겐타마이신	100		30/0
아미노글리코사이드계	네오마이신	500		150/150
	스트렙토마이신	200		125/0
기 타 계	답손		0	
	클로람페니콜		0	
	노보바이오신			0/0
	스펙티노마이신	200	200	100/100
	트리메토프림		50	30/0

주) Codex규격 및 유럽에서의 원유에 대한 항균물질 최대 잔류 허용기준임.

그러나 우리나라에서는 허용 항균물질에 대한 기준이 없이 TTC법에서 음성이어야 한다고 규정되어 있어 유방염 치료제로 여러 항생물질을 복합하여 사용함에 따라 항생물질의 종류를 검출하기가 쉽지 않은 실정이다.

다. 국내 원유내 항균물질 오염 및 검사법 비교

국내 원유의 항균물질 오염실태를 조사한 바에 따르면 Charm AIM 키트법과 Delvotest 키트법에서 양성반응을 나타낸 원유 105개를 대상으로 항균제별로 정량가능한 Lactek test 키트법으로 분석한 결과는 표10과 같다.

표 10. Charm AIM 및 Delvotest 키트법에서 양성반응을 나타낸 원유에서의 Lactek test 결과

	+	-	합계-개(%)
β -Lactam	1(0.25)	399(99.75)	400(100)
Tetracycline	17(4.25)	383(95.75)	
Chloramphenicol	33(8.25)	367(91.75)	
Sulfamethazine	48(12.00)	352(88.00)	

주) : + = 양성, - = 음성

표10에서 보는 바와 같이 4가지 계열의 항균물질 오염실태를 조사한 결과 β -Lactam은 양성인 0.25%, Tetracycline은 4.25%, Chloramphenicol은 8.25%, Sulfamethazine은 12%를 차지한 결과로 미루어 볼 때 과거에는 β -Lactam계인 Penicillin-G를 유방염 치료제로서 주로 사용하여 왔으나 최근에는 Sulfa제 및 Chloramphenicol을 주로 사용하고 있는 것으로 나타났다. 우유 잔류항균물질의 종류를 보면 다음 표 11과 같다.

표 11. 우유 잔류항균물질 종류

AMINOGLYCOSIDES	Amikacin Dihydrostreptomycin Gentamicin Kanamycin Neomycin Streptomycin
BACITRACIN	
BETA-LACTAMS	Amoxicillin Ampicillin Cefadroxil Cefotaxime Ceftiofur Cephalexin Cephaloridine Cephalosporin Cephapirin Cephradine Cloxacillin Dicloxicillin Hetacillin Nafcillin Oxacillin Penicillin Piperacillin Ticarcillin
CHLORAMPHENICOL	Florfenicol Thiamphenicol Chloramphenicol glucuronide Chloramphenicol
FOLIC ACID ANALOG	Methotrexate Pyrimethamine Trimethoprim
MACROLIDES	Clindamycin
LINCOSAMIDES	Erythromycin Lincomycin

Oleandomycin
Pirlimycin
Spiramycin
Tylosin

NOVOBIOCIN

SPECTINOMYCIN

SULFA DRUGS

Dapsone

Sulfabromomethazine
Sulfacetamide
Sulfachlorpyridazine
Sulfadiazine
Sulfadimethoxine
Sulfadoxine
Sulfaethoxypyridazine
Sulfamerazine
Sulfamethazine
Sulfamethizole
Sulfamethoxazole
Sulfanilamide
Sulfapyridine
Sulfaquinoxaline
Sulfathiazole
Sulfisoxazole

TETRACYCLINES

Chlortetracycline

Demeclocycline
Doxycycline
Methacycline
Minocycline
Oxytetracycline
Rolitetracycline
Tetracycline

여 백

제 2 장 우유 항균물질 검사를 위한 최적 미생물 선발 및 배양조건 확립

제1절 서설

국외로는 유제품의 시장개방으로 인해 외국의 저렴한 유제품이 국내로 유입되어 분유의 재고가 증가하고 있으며, 국내로는 고름우유 사건, 항생물질 검출사건, 분유내 항암물질 사건 등으로 인해 국내 유제품을 기피하기에 이르러 국내 낙농가는 커다란 위기에 처해 있다.

한편, 원유의 항생물질 검사는 TTC II가 농림부의 공인법으로 되어 있으나 보건복지부의 식품공전 상에는 Disc assay 또는 HPLC법이 공인법으로 되어 있어 표12에서 보는 바와 같이 TTC II 검출감도는 보건복지부 허용기준에 표 12. 항균제에 대한 TTC II 검출감도와 보건복지부 허용기준

항 균 제	TTC II 검출감도	보건복지부 허용기준
β-lactam 계	0.0024ppm	0.004ppm
Sulfa 제	0.05ppm	0.01ppm
Oxytetracycline	-	0.1ppm

β-lactam 계는 만족하고 있지만 Sulfa 제와 Oxytetracycline에 대해서는 검출감도가 낮아 유업체에서는 개별농가 원유는 TTC II를 사용하고 Bulk Tank는 가격은 고가이나 검출감도가 우수한 Charm AIM, Charm II, Delvo, Lactec, Penzyme test법을 병용하여 사용함으로써 검사비용이 막대한 실정이다. 또한 TTC II를 사용하는데 있어 종균활력에 따라 항균제 검출감도가 영향을 받고 있어 종균관리에 어려운 점이 있으며, 국내에서 유방염 치료제인 항균제 종류가 다양한데 비하여 검출범위가 좁아 효율적인 항균물질 검사법으로 한계가 있다. 따라서 가격이 저렴하고 검출감도가 우수한 검사법을 개발하여 kit화 하는 방안이 요구되고 있다.

제2절 재료 및 방법

1. 국내 원유에서 젖산균의 분리

경기 남부 지역 낙농가의 원유를 채취하여 sodium azide(Juncei chemical Co.Ltd)를 0.025% 넣고 35℃에서 24시간 배양시킨 다음 0.1% peptone (Difco) 희석수에서 $10^2 - 10^4$ 배 희석하여 sodium azide가 0.025%첨가된 MRS agar plate(표 13)에 0.2ml씩 평면도말하여 35℃에서 48시간 배양시킨다. 각 균락을 MRS agar plate에 3회 백금이로 도말한 후 35℃에서 48시간 호기배양하여 순수분리 하였다. 이렇게 순수분리된 균주는 MRS agar plate에 보관하면서 균주별 항균물질 감수성 및 TTC / TTC II test와 지시약 실험에 사용되었다.

표 13. 변형된 MRS agar 배지 성분 조성

Component	gram/liter
Bacto Proteose Peptone #3	10.0
Bacto Beef Extract	10.0
Bacto Yeast Extract	5.0
Bacto Dextrose	20.0
Tween 80	1.0
Ammonium Citrate	2.0
Sodium Acetate	5.0
Magnesium Sulfate	0.1
Manganese Sulfate	0.05
Dipotassium Phosphate	2.0
Sodium Azide	0.25
Bacto Agar	15.0

2. 항균물질 감수성 및 TTC II test와 지시약 실험을 위한 항균물질 용액의 제조

본 실험에 사용된 항균물질은 penicillin G, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfathiazole, sulfadimethoxine, erythromycine, chloramphenicol으로서 Sigma사(U.S.A)에서 구입하였으며 다음과 같은 농도의 항균제 용액을 제조하였다.

표 14. 항균물질의 농도와 제조방법

Antimicrobial agents	concentration(ppm)		Solvents
	first selection	second selection	
penicillin G	0.024	0.024	H ₂ O + NaOH
oxytetracycline	1	0.1	H ₂ O + NaOH
sulfamethazine	5,000	0.01	H ₂ O + NaOH
sulfathiazol	5,000	0.01	H ₂ O + NaOH
sulfadimethoxine	5,000	0.01	H ₂ O + NaOH
erythromycine	1	0.25	H ₂ O + Alcohol
chloramphenicol	5	0.1	H ₂ O + Alcohol

penicillin G 60ppm, oxytetracycline 100ppm, sulfamethazine 50ppm, sulfathiazole 50ppm, sulfadimethoxine 50ppm, erythromycine 260ppm, chloramphenicol 100ppm의 농도로 항균물질 stock solution을 제조하여 4℃ 이하에서 1주씩 냉장보관하면서 위의 농도로 희석하여 membrane filter(0.45µm, millipore Co. U.S.A)로 여과한 다음 실험에 사용하였다.

3. 항균물질 감수성 검사

항균물질 감수성 검사시 각 분리 보관균주를 MRS broth에서 2번 계대배양하여 활력을 준 후 MRS broth(Difco)에 접종하여 35℃에서 18시간 배양하고 0.1% peptone(Difco)용액에 $10^5 - 10^6$ cfu/ml 수준으로 희석하여 사용하였다. 일반적으로 항균물질 감수성 실험에서 실험균주의 MIC(minimum inhibitory concentration)는 two-fold macrodilution broth 방법(Koneman 등, 1988)을 사용하여 각각의 항균물질을 적당한 용매에 용해시킨 후 필요한 농도까지 희석하여 0.2% yeast extract(Difco)가 첨가된 tryptic soy broth(Difco)에 첨가한 후, 배양된 균주를 접종하여 35℃에서 48시간 배양하여 성장여부를 현탁도로 측정하였다(임 등, 1995). 이때 항균제는 oxytetracycline 1ppm, penicillin G 0.024ppm, sulfamethazine 5000ppm, sulfadimethoxine 5000ppm, sulfathiazole 5000ppm, erythromycine 1ppm, chloramphenicol 5ppm 농도로 시험에 사용되었고, 항균제는 Sigma Chemical Co. (USA)로부터 구매하여 사용하였다.

표 15. 변형된 Tryptic soy broth 배지의 성분조성

Component	gram/liter
Bacto tryptone	17
Bacto soytone	3
Bacto dextrose	2.5
Sodium chloride	5
Dipotassium phosphate	2.5
Yeast extract	2

4. TTC / TTC II test에 적용 가능한 균주 선발

항균물질 감수성 검사에서 감수성이 있는 것으로 선발된 균주를 MRS broth(Difco)에서 2번 계대하여 활력을 준 후 10% 환원 탈지유(Difco)에 접종하여 24시간 후의 응고 여부를 확인하였다.

5. TTC / TTC II test용 시약조제

가. TTC 용액

TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride, Sigma)와 멸균증류수를 1:25의 비율로 용해(4% 수용액)하여 7°C이하에서 냉장보관하면서 사용하되 2주 이내에 사용하였다.

나. TMP 용액

50.0mg의 TMP(trimethoprim, Sigma)를 100ml 용량플라스크에 취해 methanol 10ml에 녹이고 멸균증류수를 가하여 눈금 표시선까지 맞추어 500µg/ml가 되게한 후 1주일간 4°C이하에서 냉장보관하면서 멸균증류수로 1:9의 비율(10배)로 희석하여 50µg/ml용액을 시험용액으로 사용한다. 이때

시험용액은 membrane filter(0.45 μ m, millipore Co. U.S.A.)로 여과한 후 사용하였다.

6. 항균물질에 감수성 있는 선발균주의 TTC / TTC II test

항균물질 감수성 실험에서 선발되고 TTC test에 적용가능한 균주는 MRS 액체배지(Difco)에서 2회 이상 계대 배양하여 활력을 회복시킨 후 10% 환원 탈지유(Difco)에 5% 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 12시간 배양하여 이 균액을 10% 탈지유 배지로 1:1(v/v) 혼합하여 시험균액으로 사용하였다.

가. TTC test는 10% 환원탈지유(DIFCO)를 각 시험관에 8.2ml씩 취하고 이에 항균제 용액 0.8ml를 첨가하여 vortex mixer(Fisher scientific)로 15초간 고속으로 혼합한 다음 85 $^{\circ}$ C에서 5분간 열처리 한 후 냉각시킨다. 이때 negative control은 항균제를 첨가하지 않았다.

나. 10% 환원탈지유(DIFCO)를 각 시험관에 7.2ml씩 취하고 이에 TMP 1ml과 항균제 용액 0.8ml를 첨가하여 vortex mixer(Fisher scientific)로 15초간 고속으로 혼합한 다음 85 $^{\circ}$ C에서 5분간 열처리 한 후 냉각시킨다. 이때 negative control과 TMP control sample은 항균물질을 첨가하지 않고 negative control sample에는 TMP용액도 첨가하지 않았다. 준비된 시험액에 시험균액을 1ml씩 접종하여 잘 혼합한 후 37 $^{\circ}$ C incubator에서 2시간 배양하였다. 배양 후 4% TTC용액 0.3 ml씩을 첨가하여 잘 혼합한 다음 negative control과 TMP control sample의 색깔이 서로 가까울때(약 1시간) TMP control의 색상(도홍색)을 기준으로 하여 시료의 색상이 도홍색보다 현저히 열을 경우 항균물질 양성으로, 같거나 진하면 음성으로 판정하였다.

7. 최종 선발된 균주의 동정

항균물질에 대해 감수성이 있어 최종 선발된 균주는 MRS broth(Difco)에

2회 이상 계대배양하여 활력을 회복시킨 후 실험에 사용하였다. 젖산균의 동정은 Hammes 등(1992)의 방법에 의하여 실시하였다. 최종 선발된 균주는 Gram염색, 현미경(Olympus, Japan) 관찰과 API kit (API bioMerieux, France)를 이용하여 당발효 시험을 실시한 결과를 ATB identification system(bioMerieux, France)에 입력하여 젖산균의 genus와 species를 결정하였다.

8. 선발 균주의 최적 배양조건 설정

선발균주의 최적 배양조건 및 배지조건을 확립하기 위해 균주를 계대하여 활력을 준 후 10% 환원 탈지유(Difco)에 접종하여 온도별(30℃, 32℃, 35℃, 37℃), Glucose첨가(2%) 유무별로 pH meter(Orion, SA520)를 이용하여 pH를 측정하였는데, 이때 균주는 2% 접종하였고 온도별로 3시간 간격으로 24시간까지 배양하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 국내산 우유를 소재로 향균물질검사용 최적 미생물 검색

가. 원유에서 젖산균의 분리 상황

1차년도 국내 원유의 수집은 경기일대의 14지역에서 이루어졌고, 원유에서 분리된 젖산균은 681균주이었다. 그리고 한국식품개발연구원의 균주분양센터에서 126개 균주를 분양받아 총 807개의 균주를 분리 실험하였다. 그 상황은 다음과 같다.

표 16. 국내원유에서 균주분리 상황

지 역	분 리 균 주 (개)	지 역	분 리 균 주 (개)
백 압	29	정 남	33
용 인	53	만 선	31
곤 지 압	43	칠 보	20
안 녕 리	56	동 탄	36
포 곡	46	양 산	30
광 교	41	황 산	29
오 산	55	태 안	46
기 타	133	균주분양센터 분양균주	126

나. 항균물질 감수성 검사

Tryptic soy broth(Difco)에 0.2% yeast extract(Difco)를 첨가하여 121℃에서 15분간 멸균한 후 Penicillin G(0.024ppm), Oxytetracycline(0.1ppm), Sulfamethazine(0.01ppm), Sulfadimethoxine(0.01ppm), Sulfathiazole(0.01ppm), Erythromycine(0.25ppm), Chloramphenicol(0.1ppm)을 첨가하여, MRS broth (Difco)에서 18시간 배양시킨 균주를 $10^5 - 10^6$ 수준으로 접종한 후 48시간 배양하여 성장정도를 육안으로 관찰하였다. 그 결과 총 807개의 균주중 107개 균주가 항균물질에 감수성이 있었고 그 감수성 정도는 다음과 같다.

표 17. 107균주의 항균물질 감수성 정도

균주 No.	Penicillin G	Oxytetra-cycline	Sulfame-thiazine	Sulfadi-metoxin	Sulfa-thiazole	Erythro-mycine	Chloram-phenicol
곤지암1-3	+	+	+	+	+	-	+
곤지암2-2	+	+	+	+	+	-	+
곤지암5-1	+	+	+	+	+	-	+
곤지암5-2	+	+	+	±	+	-	+
곤지암5-4	+	+	+	+	+	-	+
곤지암9-1	+	+	+	+	+	-	+
곤지암10-1	+	+	+	+	+	-	+
광고19-1	+	+	+	+	+	-	+
광고4-1	+	+	+	+	+	-	+
광고6-3	+	+	+	±	+	-	+
용인4-1	+	+	+	+	+	-	+
용인5-1	+	+	+	+	+	-	+
용인10-1	+	+	+	+	+	-	+
용인10-2	+	+	+	+	+	-	+
용인15-1	+	+	+	+	+	-	+
용인15-2	+	+	+	+	+	-	+
용인15-3	+	+	+	+	+	-	+
용인16-2	+	+	+	+	+	-	+
용인22-3	+	+	+	+	+	-	+

주) + : 성장. ± : 의성장. - : 비성장

균주 No.	Penicillin G	Oxytetra-cycline	Sulfame-thazine	Sulfadi-metoxin	Sulfa-thiazole	Erythro-mycine	Chloram-phenicol
용인23-1	+	+	+	+	+	-	+
용인24-1	+	+	+	+	+	-	+
용인26-3	+	+	+	+	+	-	+
백암2-2	+	+	+	+	+	-	+
백암4-3	+	+	+	+	+	-	+
백암4-4	+	+	+	+	+	-	+
백암7-1	+	+	+	+	+	-	+
백암10-1	+	+	+	+	+	-	+
백암12-6	-	-	-	-	-	-	-
백암13-2	-	-	-	-	-	-	-
백암13-3	+	+	+	+	+	-	+
백암13-4	+	+	-	+	+	-	-
백암13-6	+	+	+	+	+	-	+
백암13-7	+	+	+	+	+	-	+
백암13-8	+	+	+	+	+	-	+
동탄1-1	+	+	+	+	+	-	+
동탄2-2	+	+	+	+	+	-	+
오산15-2	+	+	+	+	+	+	+

균주 No.	Penicillin G	Oxytetra -cycline	Sulfame -thazine	Sulfadi -metoxin	Sulfa -thiazole	Erythro -mycin	Chloram -phenicol
서울56-2	+	+	+	+	+	-	+
서울56-3	+	+	±	+	+	-	+
서울56-5	-	-	-	-	-	-	-
서울56-6	+	-	-	-	-	-	-
서울130-3	+	+	±	±	+	-	+
서울215-3	±	±	-	-	+	-	±
서울218-1	+	+	+	+	+	-	+
서울218-2	+	+	+	+	+	-	+
서울232-1	+	+	+	+	+	-	+
서울232-3	-	-	-	-	-	-	±
서울233-3	+	+	+	+	+	+	+
서울237-1	+	+	+	+	+	-	+
서울239-1	+	+	+	+	+	-	+
서울243-1	+	±	±	+	±	-	±
서울243-3	+	+	+	+	+	+	+
서울243-4	+	+	+	+	+	-	±
서울268-1	-	-	-	±	-	-	-
서울284-2	+	+	+	+	+	+	+

군주 No.	Penicillin G	Oxytetra -cycline	Sulfame -thazine	Sulfadi -metoxin	Sulfa -thiazole	Erythro -mycin	Chloram -phenicol
서울284-1	+	+	+	+	+	-	+
서울295-1	+	+	+	+	+	-	+
서울295-2	+	+	+	+	+	-	+
서울295-3	+	+	+	+	+	-	+
서울295-4	+	+	+	+	+	-	+
서울299-3	+	+	+	+	+	-	+
서울299-4	+	+	+	+	+	-	+
서울299-5	+	+	+	+	+	-	+
서울299-6	+	+	+	+	+	-	+
서울309-2	-	-	-	-	-	-	-
서울346-2	+	+	+	+	+	-	+
서울346-5	+	+	+	+	+	-	+
서울372-1	+	+	+	+	+	-	+
1	±	±	±	±	±	-	±
2	+	+	+	+	+	-	+
3	+	+	+	+	+	-	+
4	+	+	+	+	+	-	+
7	+	+	+	+	+	-	+

균주 No.	Penicillin G	Oxytetra -cycline	Sulfame -thazine	Sulfadi -metoxin	Sulfa- thiazole	Erythro- mycin	Chloram -phenicol
생물673	+	+	+	+	+	-	+
생물228	+	+	+	+	+	-	+
생물704	+	+	+	+	+	-	+
생물699	+	+	+	+	+	-	+
생물393	+	+	+	+	+	+	+
생물217	+	+	+	+	+	-	+
생물341	+	+	+	+	+	-	+
생물493	+	+	+	+	+	+	+
생물491	+	+	+	+	+	-	+
생물695	+	+	+	+	+	-	+
생물425	+	+	+	+	+	+	+
생물698	+	+	+	+	+	+	+
생물231	+	+	+	+	+	+	+
생물164	+	+	+	+	+	+	+
생물229	+	+	+	+	+	+	+
생물234	+	+	+	+	+	-	+
생물163	+	+	+	+	+	+	+

균주 No.	Penicillin G	Oxytetra -cycline	Sulfame -thazine	Sulfadi -metoxin	Sulfa -thiazole	Erythro -mycin	Chloram -phenicol
생물466	+	+	+	+	+	-	+
생물659	+	+	+	+	+	-	+
생물230	+	+	+	+	+	+	+
생물347	+	+	+	+	+	+	+
생물235	+	+	+	+	+	+	+
30°C 생물672	+	+	+	+	+	+	+
생물665	+	+	+	+	+	+	+
생물128	+	+	+	+	+	-	+
생물467	+	+	+	+	+	+	+
생물203	+	+	+	+	+	+	+
생물661	+	+	+	+	+	+	+
생물671	+	+	+	+	+	+	+
생물708	+	+	+	+	+	+	+
생물507	±	±	±	±	±	-	+
생물674	+	+	+	+	+	-	±
생물473	+	+	+	+	+	+	+
생물476	+	+	+	+	+	+	+

2. 항균물질에 민감한 균주선발 및 특성조사

가. TTC / TTC II 방법에 적용 가능한 균주 선발

Tryptic soy broth(Difco)배지에서 항균제 감수성이 있는 것으로 판정된 균주가 TTC / TTC II test에 적용 가능한지를 알아보기 위해 10% 환원탈지유(Difco)에서 선발균주의 응고여부를 실험한 결과는 다음과 같다.

표 18. 선발된 균주의 환원탈지유 응고여부

Lactic bacteria	coagulation	selected bacteria for TTC / TTC II method
광고6-3	+	0
백암12-6	+	0
1	-	
백암13-2	+	0
백암13-4	+	0
서울56-3	+	0
서울56-5	+	0
서울56-6	+	0
서울215-3	+	0
서울232-3	+	0
서울243-1	-	
서울243-4	-	
서울268-1	+	0
서울309-2	+	0
생물507	+	0

주) + : 응고, - : 응고 않됨

항균물질에 감수성이 있어 선발된 15개의 균주중 MRS broth에서 10% 환원탈지유로 계대하여 배양하였을 때 12개의 균주가 응고되어 이 12개 균주를 TTC test에 적용 가능한 균주로 선정하였다. 이는 10% 환원 탈지유에서 첫

산균이 성장하게 되면 산이 생성되어 pH 4.6정도가 되면 등전점 (isoelectric point)이 pH 4.6인 탈지유내의 케이신이라는 단백질이 침전하게 된다(김 등, 1979). 따라서 탈지유에서 응고가 일어난 균주는 탈지유에서 생장이 가능하다는 의미이고, 이에 반해 응고가 일어나지 않는 것은 균의 활력이 약하거나 탈지유에 적응할 수 없는 것으로 판단되어 이 연구에서는 원유의 항균물질 감수성에 이용될 균주를 선발할 목적이므로 우유에서 응고력이 있는 즉 적응력이 있는 균주를 선발하였다.

나. 항균물질에 감수성이 있어 선발된 균주의 TTC / TTC II test 결과

Tryptic soy broth를 이용한 항균물질 감수성 실험에서 감수성이 있고, 10% 환원 탈지유에서 응고력을 보여 skim milk에서 활력이 있는 12개의 균주를 보건복지부에서 제시한 허용 기준농도에서 TTC / TTC II test를 실시한 결과는 다음과 같다.

표 19. 선발균주를 이용한 TTC 실험

Lactic bacteria	Antimicrobial agents							
	blank	Penici- -illinG	Erythr- -mycin	Oxytetra- cycline	Chloram- phenicol	Sulfame- thazine	Sulfadi- methoxine	Sulfa- thiazol
광교6-3	+	±	±	+	+	+	+	±
백암12-6	+	+	±	+	+	+	±	+
백암13-2	+	+	+	+	+	+	+	+
백암13-4	+	+	+	+	+	+	+	+
서울56-3	+	+	+	+	+	+	+	+
서울56-5	+	±	±	±	+	±	±	±
서울56-6	+	±	±	±	±	±	±	±
서울215-3	+	+	±	+	+	+	+	+
서울232-3	+	+	±	+	+	+	+	+
서울268-1	+	+	±	+	+	+	+	+
서울309-2	+	+	+	+	+	+	+	+
생물507	+	±	±	±	±	±	-	-
<i>S. thermophilus</i>	+	+	±	±	+	+	±	±

주) + : 분홍색, ± : 약한분홍색, - : 흰색

표 20. 선발균주를 이용한 TTC II 실험

Lactic bacteria	Antimicrobial agents								
	blank	TMP blank	Penicill -in G	Erythro- mycin	Oxytetra- cycline	Chloram- phenicol	Sulfame- thazine	Sulfa- methoxine	Sulfa- thiazol
광교6-3	+	+	-	-	+	+	+	-	-
백암12-6	+	+	-	-	-	-	-	-	+
백암13-2	+	+	+	-	-	+	+	-	-
백암13-4	+	+	-	-	-	-	-	-	+
서울56-3	+	+	+	±	+	±	+	±	+
서울56-5	+	+	+	±	-	+	+	±	-
서울56-6	+	+	+	-	+	-	-	±	+
서울215-3	+	+	+	±	+	±	±	±	±
서울232-3	+	+	±	±	±	±	±	±	±
서울268-1	+	+	±	±	±	±	±	±	±
서울309-2	+	+	+	±	+	±	+	+	±
생물507	+	+	-	-	-	-	+	+	-
<i>S. thermophilus</i>	+	+	±	-	±	±	±	-	±

주) + : 분홍색, ± : 약한분홍색, - : 흰색

앞에서 보는 바와같이 항균물질에 감수성이 있어 선발된 12개 균주를 TTC 방법과 TMP(Trimethoprim, Sigma)를 시험액에 첨가한 TTC II 방법에 따라 실험한 결과 전반적으로 TTC II 방법이 TTC 방법보다 항균물질에 대한 감수성이 더 높은 것으로 나타났다. 이와같이 TTC II 방법에 첨가되는 TMP는 균주의 생장을 억제시키는 효과가 있어 TTC 방법에서 검출감도가 낮았던 sulfa제의 검출감도를 높이기 위해 개량된 TTC II 방법에 첨가되고 있다(조 등, 1989).

다. 최종 선발된 균주의 동정

Tryptic soy broth(Difco)를 이용한 항균물질 감수성 실험과 TTC test/ TTC II test를 통해 항균물질에 감수성이 높은 것으로 나타난 8개 균주의 Gram 염색 결과는 모두 Gram 양성이고 rod형으로 나타났다. 따라서 API 50 CHL kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 당발효 실험을 하였고 그 결과를 ATB identification system(bioMerieux, France)에 입력한 결과 다음 표21과 같이 동정되었다.

표 21. 선발된 균주의 API동정 결과

Lactic bacteria Tests	광교 6-3	백암 12-6	백암 13-4	서울 56-3	서울 56-5	서울 56-6	서울 309-2	생물 507
Glycerol	-	-	-	-	-	-	-	-
Erythritol	-	-	-	-	-	-	-	-
D Arabinose	-	-	-	-	-	-	-	-
L Arabinose	-	-	-	-	+	-	-	-
Ribose	+	+	+	+	+	-	-	+
D Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
L Xylose	-	-	-	-	-	-	-	-
Adonitol	-	-	-	-	-	-	-	-
β -Methyl-D Xyloside	-	-	-	-	-	-	-	-
Galactose	+	+	+	+	+	-	+	+
Glucose	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	-	+	+
Mannose	+	+	+	+	+	-	+	+
Sorbose	-	-	+	+	-	-	-	-
Rhamnose	+	-	-	-	-	-	-	-
Dulcitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Inositol	-	-	-	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+	-	-	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	-	+

Lactic bacteria Tests	광교 6-3	백암 12-6	백암 13-4	서울 56-3	서울 56-5	서울 56-6	서울 309-2	생물 507
α-Methyl-D Mannoside	-	-	-	-	-	-	-	+
α-Methyl-D Glucoside	-	-	-	-	-	-	-	-
N Acetyl Glucosamine	+	+	+	+	+	-	+	+
Amygdalin	+	+	+	+	+	-	-	+
Arbutin	+	+	+	+	+	-	-	+
Esculin	+	+	+	+	+	+	+	+
Salicin	+	+	+	+	+	-	-	+
Cellobiose	+	+	+	+	+	-	-	+
Maltose	+	+	+	+	+	-	+	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+
Melibiose	-	+	+	-	+	-	-	+
Sucrose	+	+	+	+	+	-	+	+
Trehalose	+	+	+	+	+	-	+	+
Inulin	+	+	-	+	-	-	-	-
Melezitose	+	+	+	+	+	-	-	-
Raffinose	-	+	+	+	-	-	+	+
Starch	-	-	-	-	-	-	-	-
Glycogen	-	-	-	-	-	-	-	-
Xylitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gentiobiose	-	+	-	+	-	-	-	-
D Turanose	+	+	+	+	+	-	-	+
D Lyxose	-	-	-	-	-	-	-	-
D Tagatose	+	+	+	+	-	-	-	-
D Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
L Fucose	-	-	-	-	-	-	-	-
D Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-
L Arabitol	-	-	-	-	-	-	-	-
Gluconate	-	-	-	-	-	-	-	-
2 Ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-
5 Ketogluconate	-	-	-	-	-	-	-	-

주) + : 색깔변화, - : 색깔변화없음

앞에서 Gram 염색과 현미경(Olympus, Japan) 관찰 그리고 API kit를 이용한 균주의 동정과정에서 밝혀진 결과는 다음과 같다.

표 22. 선발된 균주의 동정 결과

Lactic bacteria	동 정
광교 6-3	<i>Lactobacillus para. paracasei</i>
백암12-6	<i>Lactobacillus brevis</i>
백암13-4	<i>Lactobacillus plantarum</i>
서울56-3	<i>Lactobacillus para. paracasei</i>
서울56-5	<i>Lactobacillus plantarum</i>
서울56-6	<i>Leuconostoc mesen. cremoris</i>
서울309-2	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
생물 507	<i>Lactobacillus plantarum</i>

오 등(1996)에 따르면 *S. thermophilus*가 다른 lactic acid bacteria에 비해 일반적으로 향균물질에 감수성이 높다고 보고 되었으나, 본 연구에서 선발된 균주들은 7개의 *Lactobacillus*와 1개의 *Leuconostoc*이었다. 이 중 *Lactobacillus brevis*와 *Leuconostoc*은 젖산 이외에 소량의 acetic acid와 CO₂를 생성하는 heterofermenter이고 나머지 균주들은 주로 젖산을 생산하는 homofermenter였다. 특히 *Lactobacillus plantarum*은 여러 계열의 향균물질에 감수성을 나타내고 있어 특정 계열의 향균물질에 국한되는 검출한계를 지니고 있는 기존의 방법들을 개선할 수 있으리라 기대된다.

3. 선발균주 배양을 위한 배양조건 설정

탈지유 배지에 존재하는 당류는 주로 lactose로서 이는 배양중 유산균에 의해 cell내로 흡수되어 β -galactosidase나 β -P-galactosidase에 의해 glucose나 galactose 또는 galactose-6-phosphate로 분해 이용되며 유산균의 종류에 따라서는 galactose를 세포밖으로 유리시키기도 한다(이 등, 1988). O' Leary 등(1976)은 glucose와 lactose를 함께 탄소원으로 이용한 배지에서 *S. thermophilus*는 초기 lactose 이용도가 높은 반면 glucose는 거의 이용하지 않았고 *L. bulgaricus*는 glucose를 먼저 이용하고 고갈된 후 lactose를 이용하는 것으로 보고하였다. 이 등(1988)의 실험에 의하면 젖산균들이 lactose 분해로 생긴 두 개의 단당류중 glucose를 선택적으로 이용한다고 보고되었다. 그리고 탈지유내의 lactose를 분해시키는 능력이 없으면서 항균제에 감수성이 있는 균주의 존재 가능성을 알아보기 위해 배지의 당류 구성에 변화를 주어 균주의 적정 성장 조건을 찾고자 하였다.

*S. thermophilus*를 포함한 총 9개의 균주를 온도별(30°C, 32°C, 35°C, 37°C), Glucose첨가(2%) 유무별로 3시간 간격으로 24시간 까지 배양하며 pH를 측정한 결과는 다음 표23과 표24와 같다.

선발된 균주의 성장 pH를 측정한 결과 최적온도는 glucose를 첨가한 경우 37°C가 4개균주, 35°C가 4개균주, 32°C가 1개균주, 30°C는 없는 것으로 나타났으며, glucose를 첨가하지 않은 경우에는 37°C가 7개균주, 35°C가 1개균주, 32°C는 없었고, 30°C가 1개 균주로 나타나 전체적으로 37°C가 가장 많은 분포를 보였다.

표 23. 선발된 균주를 접종한 skim milk(glucose 첨가)의 pH 변화

Lactic bacteria	time temp	0h	3h	6h	9h	12h	15h	24h
	광교6-3	30℃	6.55	6.34	6.42	6.37	6.30	6.21
32℃		6.55	6.36	6.44	6.38	6.32	6.20	5.81
35℃		6.55	6.42	6.37	6.26	6.12	5.97	5.49
37℃		6.55	6.37	6.39	6.27	6.18	5.99	5.50
백암12-6	30℃	6.55	6.35	6.43	6.43	6.42	6.40	6.28
	32℃	6.55	6.37	6.46	6.46	6.40	6.41	6.17
	35℃	6.55	6.45	6.43	6.39	6.26	6.18	5.57
	37℃	6.55	6.42	6.44	6.36	6.28	6.00	5.07
서울309-2	30℃	6.55	6.39	6.45	6.44	6.45	6.45	6.41
	32℃	6.55	6.40	6.45	6.45	6.39	6.43	6.34
	35℃	6.55	6.49	6.49	6.46	6.43	6.43	6.04
	37℃	6.55	6.46	6.49	6.37	6.47	6.40	5.78
생물507	30℃	6.55	6.41	6.43	6.41	6.35	6.28	5.94
	32℃	6.55	6.43	6.44	6.38	6.31	6.19	5.84
	35℃	6.55	6.47	6.45	6.33	6.16	6.03	5.66
	37℃	6.55	6.38	6.34	6.19	6.15	6.09	5.60

Lactic bacteria	time temp	0h	3h	6h	9h	12h	15h	24h
	백암13-4	30°C	6.55	6.35	6.37	6.30	6.19	6.09
32°C		6.55	6.40	6.42	6.31	6.20	6.05	5.59
35°C		6.55	6.47	6.36	6.25	6.04	5.83	5.15
37°C		6.55	6.41	6.39	6.25	6.15	5.85	5.30
서울56-3	30°C	6.55	6.47	6.46	6.37	6.26	6.21	6.15
	32°C	6.55	6.47	6.46	6.37	6.20	6.11	6.06
	35°C	6.55	6.50	6.50	6.39	6.25	6.16	6.14
	37°C	6.55	6.48	6.47	6.33	6.28	6.21	6.10
서울56-5	30°C	6.55	6.41	6.43	6.41	6.35	6.28	5.94
	32°C	6.55	6.43	6.44	6.38	6.31	6.19	5.84
	35°C	6.55	6.47	6.45	6.33	6.16	6.03	5.66
	37°C	6.55	6.41	6.40	6.23	6.13	5.93	5.56
서울56-6	30°C	6.55	6.42	6.45	6.40	6.34	6.20	5.97
	32°C	6.55	6.44	6.45	6.41	6.32	6.24	5.95
	35°C	6.55	6.47	6.43	6.33	6.16	5.99	5.24
	37°C	6.55	6.41	6.39	6.26	6.13	5.99	5.70
<i>S. thermo</i> <i>-philus</i>	30°C	6.55	6.33	5.93	5.53	5.28	5.11	4.79
	32°C	6.55	6.21	5.74	5.40	5.16	5.01	4.72
	35°C	6.55	6.13	5.52	5.20	4.96	4.82	4.64
	37°C	6.55	5.98	5.32	5.08	4.83	4.66	4.45

표 24. 선발된 균주를 접종한 skim milk(glucose무첨가)의 pH변화.

Lactic bacteria	time temp	0h	3h	6h	9h	12h	15h	24h
	광교6-3	30℃	6.53	6.42	6.42	6.35	6.30	6.21
32℃		6.53	6.49	6.49	6.41	6.35	6.22	5.95
35℃		6.53	6.46	6.41	6.31	6.20	6.05	5.65
37℃		6.53	6.46	6.39	6.29	6.15	6.01	5.57
백암12-6	30℃	6.53	6.28	6.39	6.36	6.34	6.29	6.06
	32℃	6.53	6.40	6.49	6.46	6.40	6.29	5.83
	35℃	6.53	6.45	6.43	6.34	6.18	5.99	5.21
	37℃	6.53	6.49	6.46	6.38	6.22	5.94	5.10
서울309-2	30℃	6.53	6.41	6.49	6.46	6.46	6.44	6.27
	32℃	6.53	6.49	6.54	6.53	6.54	6.49	6.21
	35℃	6.53	6.51	6.49	6.49	6.40	6.30	5.59
	37℃	6.53	6.48	6.51	6.49	6.43	6.28	5.10
생물507	30℃	6.53	6.40	6.43	6.35	6.28	6.08	5.83
	32℃	6.53	6.50	6.51	6.45	6.36	6.22	5.70
	35℃	6.53	6.53	6.47	6.36	6.24	6.05	5.65
	37℃	6.53	6.44	6.43	6.31	6.23	6.12	5.58

Lactic bacteria	time	0h	3h	6h	9h	12h	15h	24h
	temp							
백암13-4	30°C	6.53	6.40	6.43	6.35	6.28	6.18	5.83
	32°C	6.53	6.50	6.51	6.45	6.36	6.22	5.70
	35°C	6.53	6.53	6.47	6.36	6.24	6.05	5.56
	37°C	6.53	6.54	6.49	6.36	6.21	6.05	5.45
서울56-3	30°C	6.53	6.41	6.40	6.21	6.14	6.04	5.99
	32°C	6.53	6.43	6.38	6.13	6.15	6.01	6.01
	35°C	6.53	6.50	6.43	6.27	6.18	6.14	6.02
	37°C	6.53	6.41	6.34	6.23	6.11	6.00	6.00
서울56-5	30°C	6.53	6.41	6.44	6.36	6.28	6.15	5.74
	32°C	6.53	6.46	6.44	6.32	6.22	6.00	5.52
	35°C	6.53	6.44	6.39	6.25	6.10	5.91	5.51
	37°C	6.53	6.51	6.43	6.29	6.12	5.93	5.52
서울56-6	30°C	6.53	6.43	6.37	6.40	6.36	6.29	6.03
	32°C	6.53	6.45	6.50	6.47	6.42	6.29	5.97
	35°C	6.53	6.46	6.51	6.44	6.33	6.19	5.89
	37°C	6.53	6.47	6.44	6.35	6.20	6.05	5.75
<i>S. thermo-philus</i>	30°C	6.53	6.26	5.81	5.48	5.28	5.06	4.75
	32°C	6.53	6.24	5.68	5.38	5.08	4.99	4.70
	35°C	6.53	6.12	5.44	5.12	4.88	4.70	4.50
	37°C	6.53	5.94	5.35	5.00	4.70	4.60	4.38

앞에서 실험한 균주들의 61%가 37°C에서 가장 빠른 산생성을 보여 원유에서 분리한 젖산균들의 성장은 37°C에서 가장 좋은 것으로 나타났고 이로 인해 앞으로의 실험은 37°C에서 실행하기로 하였다. 그리고 각 균주별로 배지에 glucose의 첨가 여부에 따른 37°C에서의 pH변화를 살펴보면 다음과 같다.

표 25. 균주별로 배지에 glucose의 첨가 여부에 따른 37°C에서의 pH변화

Lactic bacteria	Glucose	pH at 0h	pH at 24h	Lactic bacteria	Glucose	pH at 0h	pH at 24h
서울56-6	G +	6.55	5.70	서울56-5	G +	6.55	5.56
	G -		5.75		G -		5.52
서울56-3	G +	6.55	6.10	서울309-2	G +	6.55	5.78
	G -		6.00		G -		5.10
광교6-3	G +	6.55	5.50	생물507	G +	6.55	5.60
	G -		5.57		G -		5.58
백암12-6	G +	6.55	5.07	<i>S. thermo-philus</i>	G +	6.55	4.45
	G -		5.10		G -		4.38
백암13-4	G +	6.55	5.30				
	G -		5.45				

주) + : glucose첨가, - : glucose 무첨가

9개 균주중에서 실험배지에 glucose를 첨가할때 pH변화가 많이 일어난 균주가 4균주, glucose를 첨가하지 않았을 때는 5균주로 실험배지에 glucose의 첨가가 균의 산생성에 커다란 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

제3장 항균물질 검사를 위한 발색 system 개발

제1절 서설

젖소의 유방내로 병원성 세균이 침입하게 되면 유방조직에 염증을 가져오며 이러한 상태를 유방염이라고 부르는데, 이와 같이 유선조직의 염증상태로 인하여 우유 중에는 소위 말하는 '체세포수'가 증가하게 된다. 이에 따라 체세포수를 측정함으로써 유방염을 진단하는 기술은 세계적으로 가장 널리 이용되고 있다(Fox 등, 1995; Gutierrez 등, 1990; Watts 등, 1995). 현재 선진 낙농국가에서는 이미 오래 전부터 체세포수 측정법에 의한 유방염 진단 및 등급제를 실시하고 있어 우유의 위생적인 측면에 높은 관심을 기울이고 있는 실정이다. 따라서 원유 중 함유 체세포를 줄이는 길이 일등급 원유를 생산하는 길이며, 이같은 일등급 원유는 유방염을 없앴으로써 세균 및 체세포를 없애 나가는 것과 직결되는 것이다(박, 1993).

일반적으로 유방염 치료에는 주로 항균물질을 함유하고 있는 유방염 치료제를 사용해 왔는데, 이때 항균물질이 우유에 잔류하는 경우가 있다(Marth와 Ellickson, 1959). 또한 대부분의 항균물질은 열처리에 상당한 저항성을 나타내어 비록 미량이라 할지라도 원유에 잔류된 항균물질이 starter로 사용되는 유산균의 성장을 억제하거나 배양을 지연시켜서 발효유 생산에 많은 지장을 초래하고 있다(Kosikowski, 1982; Tamime과 Robinson, 1985; Valladao와 Sandine, 1994; Krienke, 1950; 박 등, 1984; Schiffmann 등, 1992).

소의 유방염을 치료하기 위해 사용되는 항균물질은 현재까지 약 1,000여종이 알려져 있는데 penicillin, streptomycin, neomycin, chloramphenicol, tetracycline, sulphonamide, cloxacillin 및 ampicillin 등이 유방염 치료목적으로 널리 사용되고 있다. 이러한 항균물질들은 주로 젖산

균의 생장에 세포막의 구조와 투과, 세포내 단백질, 탄수화물, 지질의 물질 대사, 세포내 에너지 대사, 효소와 인산화 반응, 그리고 세포 분열에 있어 DNA와 RNA의 합성 등에 영향을 끼쳐 우유의 품질과 생산량에 영향을 끼친다. 또한 요구르트 제조 과정에서 항균물질의 주영양은 균주간의 공생관계를 방해하거나 산생성의 속도를 늦추는 것이다. 이러한 문제를 해결하기 위해서는 항균물질이 없는 우유로 요구르트를 제조해야 하고 penicillin의 활성을 억제하기 위해 penicillinase나 penicillinase 생성균을 첨가하거나 열처리를 해야하며 antibiotic-resistant yoghurt strain을 사용해야 하는데 이러한 첨가물들로 인해 제품의 질에 변화를 일으킬 수 있으므로 무엇보다 중요한 것은 항균물질이 없는 우유를 사용해야 한다(김 등, 1991).

이러한 항균물질은 보통 유방염 치료, 항균물질에 오염된 사료, 부적절한 항균물질의 먹이, calving 이후의 감염을 방지하기 위한 bolluses의 사용, 그리고 식수에의 항균물질 첨가 등의 과정을 통해 우유에 잔류될 수 있다. (Brady와 Katz, 1988).

특히 유방염, 분만시의 감염 그리고 기타 여러가지의 감염을 치료 및 예방하기 위하여 목장에서 널리 사용되고 있는 penicillin은(Ryan 등, 1986) 사람들에게 매우 민감하여 국민 건강에 큰 영향을 미치고 있다. 우유에서 이러한 잔류 항균물질의 검출에 Streptococcus와 Bacillus가 많이 사용되며 (Chagonda와 Ndikuweraca, 1989; Chen과 Chang, 1994; Vidal과 Collins-thompson, 1987), 특히 *S. thermophilus*는 종에 따라 감수성에 변화가 있을 수 있고(Reinbold와 Reddy, 1974), penicillin에 대해서만 정확하게 적용될 뿐 다른 항균물질에 대해서는 감수성이 높지 않은 단점이 있다.

젖산균에 대한 항균물질 감수성 실험은 대부분 *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*와 *S. salivarius subsp. thermophilus*에 대한 실험이었고

(Reinbold와 Reddy, 1974; Sozzi와 Smiley, 1980), *L. acidophilus*와 *L. casei*에 대한 항균물질 감수성 실험은 거의 수행되지 않았다.

현재 국내 유업체에서는 검사비용이 저렴하고 실험시간이 3시간 가량 소요되는 TTC법을 거의 대부분 원유 검사시에 활용하고 있으나 항균물질의 검출 감도가 낮아 전반적인 항균물질을 검사하는데 문제점이 있다. 따라서 최근에는 검출감도가 높고 검사시간도 짧으며 여러 항균물질을 동시에 검사할 수 있는 검사키트(Charm과 Chi, 1982; Bishop과 White, 1984)가 많이 나와 있으나 농가별 원유의 항균물질을 검사하는데 검사비용이 높다는 제약이 따른다.

또한, 유업체에서 집유 탱크로리 및 발효유용 저유탱크의 원유를 검사하는데 Delvo검사법이나 Penzyme검사법을 일반적으로 활용하고 있으나 이 검사법 역시 검사시간이 짧고 β -lactam 계열의 검출감도가 높은 장점이 있는 반면 검사비용이 높고 sulfa제 등에는 검출감도가 낮은 단점이 있다.

따라서 이의 단점을 보완하여 발효유제품과 우유의 품질향상, 생산 효율성 증가 등을 기하고 신속성, 특이성, 민감도, 정확도, 간편함, 그리고 경제성 등의 장점들을 가진 우유내 항균물질 검사 kit 개발이 요구되고 있다.

제2절 재료 및 방법

1. 1차년도 균주의 항균물질 감수성 재검사

원유에서의 분리 균주 및 생물 공학부의 분양 균주를 MRS broth(Difco)에 접종하여 37°C, 30°C incubator에서 배양한 후 활력이 가장 좋을 때 0.02% yeast extract(Difco)가 첨가된 tryptic soy broth(Difco)에 10^5 - 10^6 수준으로 접종하여 48시간 배양 후 혼탁도 정도를 육안으로 관찰하였다. 이 때 항균제는 Sigma(U.S.A.)사로부터 구입한 penicillin G(0.024ppm),

oxytetracycline(0.1ppm), sulfamethazine(0.01ppm), sulfathiazole(0.01ppm), sulfadimethoxine(0.01ppm)를 사용하였으며, 각 농도와 각 농도의 10배 농도를 tryptic soy broth에 첨가하여 실험하였다. 또한 MRS broth에서 활력이 있는 균주를 skim milk에 접종하여 37℃와 30℃ incubator에서 배양한 후 활력이 가장 좋을 때 위의 항균물질을 각 농도와 10배의 농도에서 혼합하여 skim milk(Difco)에 첨가하여 감수성 실험을 하였다. 감수성의 유무는 skim milk의 응고 여부로 판별하였다.

2. 국내 원유에서 젖산균의 분리

경기 남부 지역 낙농가의 원유를 채취하여 sodium azide(Junsei chemical Co. Ltd)를 0.025% 첨가하고 35℃에서 24시간 배양시킨 다음 0.1% peptone(Difco) 희석수에서 10^2 - 10^4 배 희석하여 sodium azide가 0.025% 첨가된 MRS agar plate에 0.2ml씩 평면도말하여 35℃에서 48시간 배양시킨다. 각 균락을 MRS agar plate에 3회 백금이로 도말한 후 35℃에서 48시간 호기 배양하여 순수분리 하였다. 이렇게 순수분리된 균주는 MRS agar plate에 보관하면서 균주별 항균물질 감수성 및 TTC / TTC II test와 지시약 실험에 사용되었다.

3. 2차년도 균주의 항균물질 감수성 검사

원유에서 분리된 균주를 MRS broth(Difco)에 접종하여 37℃ incubator에서 배양한 후 활력이 가장 좋을 때 skim milk(Difco)에 5% 접종하여 24시간 배양한 다음 항균물질이 첨가된 skim milk에 5% 접종하여 48시간 배양 후 응고 정도를 육안으로 관찰하였다. 이때 항균제는 penicillin G (0.024ppm), oxytetracycline(0.1ppm), sulfamethazine(0.01ppm), sulfathiazole(0.01ppm), sulfadimethoxine(0.01ppm)를 사용하였으며 각 농도와

각 농도의 10배 농도를 혼합 및 membrane filter(0.45 μ m. Whatman)를 이용하여 여과한 후 skim milk에 첨가하여 실험하였다.

4. 선발균주 이용한 지시약 선발 및 발색특성조사

1/2차년도에 수집된 원유에서 분리된 균주중 Tryptic soy broth(Difco)와 skim milk(Difco)를 이용한 항균제 감수성 실험에서 감수성이 있는 것으로 선발된 균주를 MRS broth(Difco)에서 skim milk에 접종하여 활력이 있는 상태에서 starter로 사용하여 지시약 선발실험을 하였다. 이때 사용된 지시약에는 Brilliant blue(Bio-Rad), Methyl orange(Janssen chemica), Methyl violet(Wako chemical), Azolitmin(Litmus. BDH chemical), Resazurin(Sigma), Bromophenol blue(Showa chemical), Methyl red(Sigma), Phenol red(Crown), Bromocresol purple(Junsei chemical), Methylene blue(Samchun chemical), Bromocresol green(Junsei chemical), Phenolphthalein(Samchun chemical), Crystal violet(Junsei chemical), Safranin O(Junsei chemical)이 있으며 각 지시약의 농도를 달리해가며 항균제 감수성 실험에 적절한 지시약과 적정농도를 선발하였다.

표 26. 지시약의 특성

지시약	농도 (%)	용해성	변화 pH
Brilliant blue	0.1	수용성	
Methyl orange	0.1	수용성	3.1~4.4
Methyl violet	0.05	수용성	0.1~1.5~3.2
Azolitmin(Litmus)	0.2	수용성	5.0~8.0
Resazurin	0.1	수용성	3.8~6.5
Bromophenol blue	0.1	Alcohol용성	3.0~4.6
Methyl red	0.2	Alcohol용성	4.2~6.3
Phenol red	0.1	Alcohol용성	6.8~8.0
Bromocresol purple	0.1	Alcohol용성	5.2~6.8
Methylene blue	0.1	Alcohol용성	
Bromocresol green	0.1	Alcohol용성	3.8~5.4
Phenolphthalein	0.1	Alcohol용성	8.2~10.0
Crystal violet	10		
Safranine 0	0.25		

5. 미생물과 지시약을 혼합한 발색체계 확립 및 보완

가. 선발된 균주를 이용한 최적 지시약선발 및 발색특성 조사

1/2차년도 항균제 감수성 실험에서 감수성이 있는 것으로 밝혀진 균주들에 대하여 1차 선발된 지시약별 항균제 감수성 판정정도를 알아보았다.

사용된 지시약은 Phenol red(0.1%), Methyl red(0.01%), Resazurin(0.005%), Bromocresol purple(0.005%), Methylene blue(0.005%) 등 5종류이며, 지시약의 제조방법은 다음 표27과 같다. Phenol red와 Bromocresol purple은 100% alcohol에, Methylene blue는 50% alcohol에 녹인 후 증류수

로 희석하였고, Methyl red는 100% alcohol에 녹인 후 alcohol에 희석하였으며, Resazurin은 증류수에 녹여서 사용하였다.

실험에 사용된 항균제 농도는 Oxytetracycline(0.1ppm), Penicillin G (0.024ppm), Sulfamethazine(0.01ppm), Sulfathiazole(0.01ppm), Sulfadimethoxine(0.01ppm)으로 Sigma(U. S. A.)사에서 구입하여 사용하였으며, 실험직전에 stock solution을 희석하여 membrane filter(0.45 μ m, Whatman)로 여과한 후 사용하였다.

표 27. 지시약 제조방법

색 소 체	제 조 방 법
Phenol red (0.1%)	100% alcohol에 녹인 후 증류수로 희석하여 사용
Methyl red (0.01%)	100% alcohol에 녹인 후 100% alcohol로 희석하여 사용
Resazurin (0.005%)	증류수에 녹인 후 증류수로 희석하여 사용
Bromocresol purple (0.005%)	100% alcohol에 녹인 후 증류수로 희석하여 사용
Methylene blue (0.005%)	50% alcohol에 녹인 후 증류수로 희석하여 사용

나. 혼합지시약을 이용한 지시약 조건 설정

앞에서 실험한 Phenol red(0.1%), Methyl red(0.01%), Resazurin (0.005%), Bromocresol purple(0.005%), Methylene blue(0.005%) 등 5종류의 지시약을 감수성 정도의 색깔 변화가 가장 용이한 resazurin을 기본으로 하여 1:1로 혼합한 혼합지시약을 제조한 다음 선발된 균주를 접종하여 항균제 감수성 판정 정도를 조사하였다.

표 28. Resazurin을 기본으로한 혼합지시약 성분

색 소 체	구 성 성 분 (/ 100ml)
Resazurin (100)	0.005g Resazurin
Resazurin + Phenol red (50 + 50)	0.0025g Resazurin + 0.05g Phenol red
Resazurin + Methylene blue (50 + 50)	0.0025g Resazurin + 0.0025g Methylene blue
Resazurin + Methyl red (50 + 50)	0.0025g Resazurin + 0.005g Methyl red
Resazurin + Bromocresol purple (50 + 50)	0.0025g Resazurin + 0.0025g Bromocresol purple

위에서 실험에 사용한 Phenol red(0.1%), Methyl red(0.01%), Resazurin (0.005%), Bromocresol purple(0.005%), Methylene blue(0.005%) 등 지시약 간의 혼합 지시약 중 항균제 감수성 정도를 관찰하기에 용이한 3가지 지시약 Methyl red(0.01%), Resazurin(0.005%), Bromocresol purple (0.005%)으로 지시약간의 조성을 달리한 혼합 지시약을 제조, 접종균주의 항균제 감수성 정도를 관찰하기에 용이한 지시약 조건을 조사하였다.

표 29. 3종의 지시약을 수준별 첨가한 혼합 지시약 성분

색 소 체	구 성 성 분 (/ 100ml)
Methyl red (100)	0.01g Methyl red
Resazurin (100)	0.005g Resazurin
Bromocresol purple (100)	0.005g Bromocresol purple
Resazurin + Methyl red (25 + 75)	0.00125g Resazurin + 0.0075g Methyl red
Resazurin + Methyl red (50 + 50)	0.0025g Resazurin + 0.005g Methyl red
Resazurin + Methyl red (75 + 25)	0.00375g Resazurin + 0.0025g Methyl red
Resazurin + Bromocresol purple (25 + 75)	0.00125g Resazurin + 0.00375g Bromocresol purple
Resazurin + Bromocresol purple (50 + 50)	0.0025g Resazurin + 0.0025g Bromocresol purple
Resazurin + Bromocresol purple (75 + 25)	0.00375g Resazurin + 0.00125g Bromocresol purple

제3절 결과 및 고찰

1. 항균물질검사용 미생물선발 및 특성조사

가. 1차년도 수집 원유에서 분리한 807개 균주의 항균물질 감수성 재검사

1996년도 원유에서 분리된 균주 및 생물 공학부의 분양 보관 균주를 MRS broth에 접종하여 37℃, 30℃ incubator에서 배양한 후 활력이 가장 좋을 때 0.02% yeast extract가 첨가된 tryptic soy broth에 10^5 - 10^6 수준으로 접종하여 48시간 배양 후 혼탁도 정도를 육안으로 관찰하였고, 또한 MRS broth에서 활력이 있는 균주를 skim milk에 접종하여 37℃, 30℃ incubator에서 배양한 후 활력이 가장 좋을 때 접종하여 항균물질 감수성의 유무를 skim milk의 응고 여부로 판별하였다.

이때 첨가된 항균제는 penicillin G(0.024 ppm) oxytetracycline(0.1ppm), sulfamethazine(0.01ppm), sulfathiazole(0.01ppm), sulfadimethoxine(0.01ppm)를 사용하였으며 각 농도와 각 농도의 10배 농도를 tryptic soy broth에 첨가하여 실험하였다.

시험배지에 접종된 균주의 항균물질에 대한 감수성 여부를 조사한 결과 총 807개의 균주중 21개의 균주가 항균물질에 감수성을 보였고, 그 감수성 정도는 다음 표30과 같다.

표 30. 21개 균주의 항균물질 감수성 정도

균주번호	MRS 성장여 부	Antibiotic sensitivity test (Tryptic soy broth 이용)			Skim milk 응고 여부	Antibiotic sensitivity test (skim milk 이용)	
		blank	regular	regular x10		regular	regular x10
용인4-1	o	+	+	+	o	+	-
포곡9-5	o	+	+	+	o	+	-
광교7-2	o	+	+	+	o	+	-
9-1	o	+	+	+	o	+	-
14-3	o	+	+	+	o	+	-
오산3-1	o	+	+	+	o	+	-
7-2	o	+	+	+	o	+	-
15-2	o	+	+	+	o	+	-
오산17-1	o	+	+	+	o	+	-
17-2	o	+	+	+	o	+	-
동탄4-1	o	+	+	+	o	+	-
황산4-1	o	+	+	+	o	+	-
황산12-1	o	+	+	+	o	+	-
2	o	+	+	-			
3	o	+	+	-			
서울56-3	o	+	+	-			
368-2	o	+	+	+	o	+	-
376-2	o	+	+	+	o	+	-
생물425	o	+	+	-	o	+	+
163	o	+	+	+	o	+	-
125	o	+	-	-	o	+	+

주) o : 성장(MRS), 응고(Skim milk). + : 성장. - : 비성장

나. 국내 원유에서의 젖산균 분리

2차년도 국내 원유의 수집은 경기일대의 16지역에서 이루어졌고 원유에서 분리된 젖산균은 725균주이었다. 그 상황은 다음과 같다.

표 31. 국내 원유에서 균주 분리 상황

지 역	분 리 균 주 (개)	지 역	분 리 균 주 (개)
용 인	60	곤 지 암	28
오 향	32	퇴 촌	71
광 교	66	양 재	106
안 녕 리	37	원 삼	11
구 성	42	동 탄	39
황 산	35	태 안	22
기 안	35	양 지	38
칠 보	80	백 암	23

다. 2차년도 균주의 항균물질 감수성 검사

국내 원유에서 분리한 균주를 MRS broth에 접종하여 37°C incubator에서 배양한 후 활력이 가장 좋을 때 skim milk에 5% 접종하고, 24시간 배양한 다음 항균물질이 첨가된 skim milk에 5% 접종하여 48시간 배양 후 응고 정도를 육안으로 관찰한 결과 총 725개의 균주 중 43개의 균주가 항균물질의 regular 및 regular × 10 농도에서 감수성을 보였는데 그 감수성 정도는 다음 표32와 같다.

표 32. 43균주의 항균제 감수성 정도

균주번호	Antibiotic sensitivity test (skim milk 이용)		균주번호	Antibiotic sensitivity test (skim milk 이용)	
	regular	regular ×10		regular	regular ×10
용인1-2	+	-	곤지암7-2	+	-
오향3-1	+	-	9-3	+	-
5-3	+	-	퇴촌4-1	+	-
5-5	-	-	양재5-2	+	-
6-1	+	-	8-4	+	-
8-3	+	-	11-1	-	-
10-1	-	-	동탄2-2	+	-
11-1	+	-	6-1	+	-
광교17-1	+	-	7-2	+	-
18-1	+	-	태안1-2	+	-
19-2	+	-	1-3	+	-
19-3	+	-	3-2	-	-
30-2	+	-	4-1	+	-
구성8-1	+	-	6-3	+	-
9-1	+	-	8-1	+	-
황산9-2	+	-	10-1	+	-
12-1	+	-	용인16-2	+	-
14-1	±	-	양지7-1	+	-
기안5-2	+	-	양재36-2	+	-
8-2	+	-	양지15-1	+	-
11-1	-	-	15-2	+	-
13-1	±	-			

주) + : 성장. - : 비성장

2. 지시약 선별 및 발색 특성조사

균주의 항균제 감수성 정도를 측정하기에 적절한 지시약을 선별하기 위해 활력이 좋고 항균제에 대한 감수성도 높은 TTC균주(냉장 보관)를 skim milk에 2회 계대(2% 접종)한 후 37°C에서 배양하여 활력이 좋을 때 시험액에 10% 접종하여 지시약 실험을 하였다.

실험에 사용한 지시약은 Brilliant blue(BIO-RAD), Methyl orange(Janssen Chimica), Methyl violet(Wako Chemical), Azolitmin(Litmus, BDH Chemical), Resazurin(Sigma), Bromophenol blue(Showa Chemical), Methyl red(Sigma), Phenol red(Crown), Bromocresol purple(Junsei Chemical), Methylene blue(Samchun Chemical), Bromocresol green(Junsei Chemical), Phenolphthalein(Samchun Chemical), Crystal violet(Junsei Chemical), Safranin O(Junsei Chemical) 등 14종이며, 각 지시약의 농도를 달리해 가며 항균제 감수성 실험에 적절한 지시약과 적정농도를 선별하였다.

각 지시약은 TTC II 실험의 방법과 같이 균주접종(10%) 및 배양(37°C water bath) 2시간 후에 아래 표33의 농도로 skim milk 5ml에 각각 0.3ml, 0.5ml, 0.75ml 및 1ml씩 넣어 시간이 경과됨에 따른 지시약의 색깔 변화를 관찰한 결과 균주의 생장에 따라 색깔 변화가 있는 지시약은 Resazurin, Methyl red, Phenol red, Bromocresol purple, Methylene blue이었다. 그리고 지시약의 첨가량에서는 0.3ml 첨가의 경우 색깔의 변화정도가 얇았고, 1ml 첨가의 경우는 0.5ml와 0.75ml 첨가의 경우보다 시험액의 색깔이 너무 진하여 색깔 변화를 관찰하는데 어려움이 있었다.

표 33. 지시약의 종류와 시간에 따른 색깔변화

지시약 (%)	0hr	1hr 후	4hr 후	8hr 후	
Brilliant blue	0.1	깊은파란색	-	-	
Phenolphthalein	0.1	흰색	-	-	
Methyl red	0.2	노란색	탁한주황색	주황색	0.3, 0.5ml은 주황색 1ml은 노란색
	0.0004	흰색	-	-	
Resazurin	0.1	파란색	연한보라색	흰색	흰색
	0.0005	연한회색	-	-	
Bromocresol purple	0.1	파란색	탁한연두	탁한연두	탁한연두
Phenol red	0.1	탁한주황	탁한노랑 (주황에가까움)	탁한노랑	0.3, 0.5ml은 노란색 1ml은 주황색
	0.0004	흰색	-	-	
Methylene blue	0.1	파란색	파란색	진하늘색	진하늘색
	0.0004	연한연두색	-	-	
Methyl orange	0.1	노란색	-	-	
Methyl violet	0.05	보라색	-	-	
Bromocresol green	0.1	파란색	-	-	
Bromophenol blue	0.1	파란색	-	-	
Crystal violet	10	보라색	-	-	
Safranin O	0.25	다홍색	-	-	
Litmus	0.2	보라색	-	-	

실험에 사용한 지시약 중에서 균주의 생장에 따라 색깔이 변하는 5개의 지시약 Resazurin, Methyl red, Phenol red, Bromocresol purple, Methylene blue를 선발하여 3가지 농도로 제조하여 Skim milk에 첨가한 결과 고농도의 지시약에서는 색이 진하였고, 중농도와 저농도에서는 skim milk에 첨가한 색이 거의 비슷하였다. 또한, 저농도 이하의 농도에서는 skim milk의 흰색 때문에 지시약의 색이 눈에 띄지 않아 실험에서 제외하였다.

TTC균주, 생425, 오산3-1, 황산12-1, 광고14-3 균주를 skim milk에 계대하여 활력을 준 후 85℃에서 5분간 살균한 시험액(skim milk)에 각각 0.5ml, 1ml씩 접종하여 37℃에서 2시간 배양한 후 각 지시약을 각각의 농도로 첨가하여 색의 변화정도를 육안으로 관찰한 결과(표34) 접종균주의 양을 0.5ml와 1ml로 했을 때 지시약의 색 변화 양상에는 커다란 영향을 미치지 못했고 단지 색 변화의 반응이 1ml 접종에서 조금 빨랐다.

색 변화의 과정에서 resazurin 0.1%는 색깔이 진하여 0.01%와 0.005%에서 보다 색 변화가 느리게 나타났고, phenol red 0.01%와 0.005%는 색의 변화 전후의 색깔이 비슷하여 0.1%가 가장 적절하였으며, Methyl red는 0.01%, Bromocresol purple은 0.005% 그리고 Methylene blue는 0.005%가 항균제 감수성 정도를 판별하는데 지시약의 적정 농도로 선발되었다.

표 34. 5개 선발지시약의 농도별 실험

균주(첨가량)		TTC		
		Blank	지시약 첨가 1 시간 후	
			0.5ml 접종	1ml 접종
Methyl red	0.2%	노란색 (낮은 농도는 열어짐)	주황	진주황
	0.02%		주황 + 분홍	주황 + 분홍
	0.01%		주황 + 분홍	주황 + 분홍
Resazurin	0.1%	남색 (낮은 농도는 열어짐)	분홍	이주엷은분홍
	0.01%		엷은분홍	흰색
	0.005%		엷은분홍	흰색
Bromocresol purple	0.1%	탁하고 짙은 하늘색	탁하고 짙은 연두	연두
	0.01%	(낮은 농도는 열어짐)	엷은 연두	흰색 가까운 연두
	0.005%		흰색 가까운 연두	아주 흰색 가까운 연두
Phenol red	0.1%	탁한 붉은색 (낮은 농도는 열어짐)	노랑	노랑
	0.01%		엷은 노랑(밝은)	엷은 노랑(밝은)
	0.005%		더 엷은 노랑(밝은)	더 엷은 노랑(밝은)
Methylene blue	0.1%	파란색 (낮은 농도는 열어짐)	-	-
	0.01%		-	-
	0.005%		-	-

균주(첨가량)		생물 425		
		Blank	지시약 첨가 1 시간 후	
			0.5ml 접종	1ml 접종
Methyl red	0.2%	노란색 (낮은농도는 열어짐)	주황	진주황
	0.02%		주황 + 분홍	주황 + 분홍
	0.01%		주황 + 분홍	주황 + 분홍
Resazurin	0.1%	남색 (낮은농도는 열어짐)	분홍	아주얇은분홍
	0.01%		얇은분홍	흰색
	0.005%		얇은분홍	흰색
Bromocresol purple	0.1%	탁하고 짙은 하늘색	탁하고 짙은 연두	연두
	0.01%	(낮은농도는 열어짐)	얇은 연두	흰색 가까운 연두
	0.005%		흰색 가까운 연두	아주 흰색 가까운 연두
Phenol red	0.1%	탁한붉은색 (낮은농도는 열어짐)	노랑	노랑
	0.01%		얇은 노랑(밝은)	얇은 노랑(밝은)
	0.005%		더 얇은 노랑(밝은)	더 얇은 노랑(밝은)
Methylene blue	0.1%	파란색 (낮은농도는 열어짐)	-	-
	0.01%		-	-
	0.005%		-	-

지시약		균주(첨가량)	오산 3-1		
			Blank	지시약 첨가 1 시간 후	
			0.5ml 접종	1ml 접종	
Methyl red	0.2%	노란색 (낮은농도는 열어짐)	주황	진주황	
	0.02%		주황 + 노랑	주황 + 분홍	
	0.01%		주황 + 노랑	주황 + 분홍	
Resazurin	0.1%	남색 (낮은농도는 열어짐)	보라	보라 (3시간후에 분홍)	
	0.01%		분홍	분홍	
	0.005%		분홍	분홍	
Bromocresol purple	0.1%	탁하고 짙은 하늘색	탁하고 짙은 연두	연두	
	0.01%	(낮은농도는 열어짐)	얇은 연두	흰색 가까운 연두	
	0.005%		흰색 가까운 연두	이주 흰색 가까운 연두	
Phenol red	0.1%	탁한 붉은색 (낮은농도는 열어짐)	노랑 + 주황	노랑	
	0.01%		얇은 노랑(밝은)	얇은 노랑(밝은)	
	0.005%		더 얇은 노랑(밝은)	더 얇은 노랑(밝은)	
Methylene blue	0.1%	피란색 (낮은농도는 열어짐)	-	-	
	0.01%		-	-	
	0.005%		-	-	

지시약		항산 12-1		
		Blank	지시약 첨가 1 시간 후	
			0.5ml 접종	1ml 접종
Methyl red	0.2%	노란색	주황	진주황
	0.02%	(낮은농도는 열어짐)	주황 + 노랑	주황 분홍
	0.01%		주황 + 노랑	주황 분홍
Resazurin	0.1%	남색	보라	보라
	0.01%	(낮은농도는 열어짐)	분홍	(3시간후에 분홍) 분홍
	0.005%		분홍	분홍
Bromocresol purple	0.1%	탁하고 짙은 하늘색	탁하고 짙은 연두	연두
	0.01%	(낮은농도는 열어짐)	얇은 연두	흰색 가까운 연두
	0.005%		흰색 가까운 연두	아주 흰색 가까운 연두
Phenol red	0.1%	탁한 붉은색	노랑 + 주황	노랑
	0.01%	(낮은농도는 열어짐)	얇은 노랑(밝은)	얇은 노랑(밝은)
	0.005%		더 얇은 노랑(밝은)	더 얇은 노랑(밝은)
Methylene blue	0.1%	파란색	-	어둡고 탁한 피랑색
	0.01%	(낮은농도는 열어짐)	-	-
	0.005%		-	-

균주(첨가량)		광교 14-3		
		Blank	지시약 첨가 1 시간 후	
			0.5ml 접종	1ml 접종
Methyl red	0.2%	노란색 (낮은농도는 열어짐)	주황	진주황
	0.02%		주황 + 노랑 (3시간후에 하얀색)	주황 + 분홍 (3시간후에 하얀색)
	0.01%		주황 + 노랑 (3시간후에 하얀색)	주황 + 분홍 (3시간후에 하얀색)
Resazurin	0.1%	남색 (낮은농도는 열어짐)	보라 (3시간후에 분홍)	보라 (3시간후에 분홍)
	0.01%		분홍 (3시간후에 옅은분홍)	분홍 (3시간후에 하얀색)
	0.005%		분홍 (3시간후에 하얀색)	분홍 (3시간후에 하얀색)
Bromocresol purple	0.1%	탁하고 짙은 하늘색	탁하고 짙은 연두	연두
	0.01%	(낮은농도는 열어짐)	옅은 연두	흰색 가까운 연두
	0.005%		흰색 가까운 연두	이주 흰색 가까운 연두
Phenol red	0.1%	탁한 붉은색 (낮은농도는 열어짐)	노랑 + 주황	노랑
	0.01%		옅은 노랑(밝은)	옅은 노랑(밝은)
	0.005%		더 옅은 노랑(밝은)	더 옅은 노랑(밝은)
Methylene blue	0.1%	파란색 (낮은농도는 열어짐)	-	-
	0.01%		-	-
	0.005%		3시간후에 하얀색	-

3. 미생물과 지시약을 혼합한 발색 체계 확립 및 보완

가. 선발된 균주에 대한 선발 지시약의 최적조건 설정

1/2차년도 항균제 감수성 실험에서 감수성이 있는 것으로 밝혀진 균주들에 대하여 1차 선발된 지시약별 즉, Phenol red(0.1%), Methyl red(0.01%), Resazurin(0.005%), Bromocresol purple(0.005%), Methylene blue(0.005%)에 대하여 항균제 감수성 실험을 실시한 결과, Resazurin(0.005%)이 균주의 성장여부에 따른 색깔 변화를 관찰하기가 가장 용이하였고, 그 다음으로 Methyl red(0.01%)와 Bromocresol purple(0.005%)이 색깔 변화가 좋았다. 이에 반해 Phenol red(0.1%)와 Methylene blue(0.005%)는 균주의 성장에 따른 지시약의 색깔 변화가 뚜렷하지 않았다.

따라서 5종류의 지시약 중에서 단독으로 사용할 때는 Resazurin(0.005%)이 가장 우수하였고, Methyl red(0.01%)와 Bromocresol purple(0.005%)도 사용 가능성이 있었다. 이후에 개개의 지시약이 아닌 혼합지시약을 제조하여 균주의 항균제 감수성 판정정도를 실험하였다.

표 35. 지시약별 항균제 감수성 결과

색소종류 균주종류	Penol red		Methyl red		Resazurin		Bromocresol purple		Methylene blue	
	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr
오산7-2	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
오산5-2	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	자주	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
오산7-1	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
서울56-5	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	핑크	암하늘	암연두	청녹색	청녹색
서울268-1	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
서울239-1	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	핑크	암하늘	암연두	청녹색	청녹색
황산4-1	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	연자주	암하늘	암연두	청녹색	청녹색

균주종류	Penol red		Methyl red		Resazurin		Bromocresol purple		Methylene blue	
	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr
동탄7-2	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	연지주	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
생물303	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	연지주	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
황산2-1(1)	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	진핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
기안1-1	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	진핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
양개B-4	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
양개B-2	갈색	갈색	회노랑	연노랑	보라	핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
태안0-1	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	암핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색

색소종류 균주종류	Penol red		Methyl red		Resazurin		Bromocresol purple		Methylene blue	
	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr
태안 8-1	갈색	진갈색	호란노랑	연노랑	보라	연핑크	암하늘	암연두	청녹색	청녹색
구성 9-1	갈색	진갈색	호란노랑	연노랑	보라	핑크	암하늘	암연두	청녹색	청녹색
양지 7-1	갈색	진갈색	호란노랑	연노랑	보라	핑크	암하늘	연연두	청녹색	청녹색
양지 15-1	갈색	진갈색	호란노랑	연노랑	보라	진핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
양지 15-2	갈색	진갈색	호란노랑	연노랑	보라	진핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
서울 368-2	갈색	진갈색	호란노랑	연노랑	보라	핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색
곤지암 7-2	갈색	진갈색	호란노랑	연노랑	보라	진핑크	암하늘	암하늘	청녹색	청녹색

색소종류 균주종류	Penol red		Methyl red		Resazurin		Bromocresol purple		Methylene blue	
	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr
퇴촌 4-1	갈색	진갈색	회노랑	노랑	보라	핑크	임하늘	임하늘	청녹색	청녹색
광교 30-2	갈색	진갈색	회노랑	노랑	보라	진핑크	임하늘	임연두	청녹색	청녹색
오향 10-1	갈색	진갈색	회노랑	노랑	보라	핑크	임하늘	임하늘	청녹색	청녹색
오향 8-3	갈색	진갈색	회노랑	노랑	보라	진핑크	임하늘	임연두	청녹색	청녹색
구성 8-1	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	핑크	임하늘	임하늘	청녹색	청녹색
오향 11-1	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	핑크	임하늘	임하늘	청녹색	청녹색
광교 10-2	갈색	진갈색	회노랑	연노랑	보라	핑크	임하늘	임하늘	청녹색	청녹색

나. 혼합지시약을 이용한 지시약 조건 설정

최종적으로 선발된 8균주를 이용하여 Resazurin을 기본으로한 혼합지시약을 제조 및 실험한 결과 배지의 종류에 상관없이 가장 선명한 색깔 변화를 나타낸 것은 Resazurin(100)이었고, Resazurin + Methyl red (50+50)와 Resazurin + Bromocresol purple (50+50)이 다른 혼합지시약에 비해 색깔변화가 좋았다. 개개의 지시약에서도 균주의 생장에 따른 색깔의 변화가 잘 나타나지 않았던 Phenol red와 Methylene blue는 혼합지시약인 Resazurin + Phenol red (50+50)와 Resazurin + Methylene blue(50+50)에서도 역시 색깔의 변화를 관찰하기가 용이하지 않았다.

표 36. 5개 선발 지시약의 혼합지시약 실험

* STANDARD의 색깔

지시약 배 지	Resazurin (100)		Resazurin + Phenol red (50 + 50)		Resazurin + Methyl red (50 + 50)		Resazurin + Bromocresol purple (50 + 50)		Resazurin + Methylene blue (50 + 50)	
	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr	0 hr	3 hr
SKIM MILK (100)	자주 보라	연 분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	흰 보라	흰 보라	남색	남색
SKIM+SPC (50 + 50)	자주 보라	연 분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	흰 보라	암흰 보라	남색	남색
SPC (100)	자주 보라	연 분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	보라	암 보라	남색	남색

주) Resazurin(0.005%), Phenol red(0.1%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%), Methylene blue(0.005%)

황산 12-1(1), 양지 15-1, 양지 7-1, 광교 17-1

지시약 배지	Resazurin (100)		Resazurin + Phenol red (50 + 50)		Resazurin + Methyl red (50 + 50)		Resazurin + Bromocresol purple (50 + 50)		Resazurin + Methylene blue (50 + 50)	
	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
SKIM MILK (100)	자주보라	연 분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	흰 보라	흰 분홍	남색	남색
SKIM+SPC (50 + 50)	자주보라	연연분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	흰 보라	암흰분홍	남색	남색
SPC (100)	자주보라	연 분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	보라	암 분홍	남색	남색

주) Resazurin(0.005%), Phenol red(0.1%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%), Methylene blue(0.005%)

오산7-2

배 지	Resazurin (100)		Resazurin + Phenol red (50 + 50)		Resazurin + Methyl red (50 + 50)		Resazurin + Bromocresol purple (50 + 50)		Resazurin + Methylene blue (50 + 50)	
	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
	SKIM MILK (100)	자주보라	연 분홍	암 글색	글색	암 연두	연 다홍	흰 보라	흰 분홍	남색
SKIM+SPC (50 + 50)	자주보라	연연분홍	암 글색	글색	암 연두	연 다홍	흰 보라	암흰분홍	남색	남색
SPC (100)	자주보라	연 분홍	암 글색	글색	암 연두	연 다홍	보라	암 분홍	남색	남색

주) Resazurin(0.005%), Phenol red(0.1%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%), Methylene blue(0.005%)

황산 14-1

지시약 배지	Resazurin (100)		Resazurin + Phenol red (50 + 50)		Resazurin + Methyl red (50 + 50)		Resazurin + Bromocresol purple (50 + 50)		Resazurin + Methylene blue (50 + 50)	
	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
	SKIM MILK (100)	자주보라	연연분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	흰 보라	연흰 노랑	남색
SKIM+SPC (50 + 50)	자주보라	연 분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	흰 보라	연흰 노랑	남색	남색
SPC (100)	자주보라	연 노랑	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	보라	연흰 노랑	남색	남색

주) Resazurin(0.005%), Phenol red(0.1%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%), Methylene blue(0.005%)

양지 15-2

배 지	지시약	Resazurin (100)		Resazurin + Phenol red (50 + 50)		Resazurin + Methyl red (50 + 50)		Resazurin + Bromocresol purple (50 + 50)		Resazurin + Methylene blue (50 + 50)	
		0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
SKIM MILK (100)		자주보라	연 분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	흰 보라	흰 분홍	남색	남색
SKIM+SPC (50 + 50)		자주보라	연연분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	흰 보라	암흰분홍	남색	남색
SPC (100)		자주보라	연 분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	보라	연 노랑	남색	남색

주) Resazurin(0.005%), Phenol red(0.1%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%), Methylene blue(0.005%)

광고 19-2

지시약 배 지	Resazurin (100)		Resazurin + Phenol red (50 + 50)		Resazurin + Methyl red (50 + 50)		Resazurin + Bromocresol purple (50 + 50)		Resazurin + Methylene blue (50 + 50)	
	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
SKIM MILK (100)	자주보라	연 분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	흰 보라	연흰노랑	남색	남색
SKIM+SPC (50 + 50)	자주보라	연연분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	흰 보라	흰 분홍	남색	남색
SPC (100)	자주보라	연 분홍	암 갈색	갈색	암 연두	연 다홍	보라	암흰 분홍	남색	남색

주) Resazurin(0.005%), Phenol red(0.1%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%), Methylene blue(0.005%)

여 백

제 4 장 선발된 미생물과 발색 system을

혼합한 항균물질 검사법 확립

제1절 서설

최근에는 우유 및 유제품에 대한 국민들의 관심도가 높아지고 있으며 특히 우유의 위생적 품질은 소비자의 제품선택에 영향을 주는 중요한 요소이므로 우유의 위생적 품질검사를 위한 실용적인 방법을 개발 사용하여 우유의 위생적 품질향상은 유제품의 국제경쟁력을 향상하는데 큰 역할을 할 수 있다.

우유에 잔류하는 항균물질은 대부분의 선진국에서 매우 엄격하게 그 기준을 설정하고 또한 검사 체계와 방법을 운영하고 있는데 항균물질의 종류에 따라서 허용여부와 범위가 차이가 있고 검사방법도 국가별로 차이가 있다. 대부분의 나라에서는 disc assay, charm II test, 미생물작용 색소 환원법, 면역항체법 또는 TTC법으로 검사하고 있으나 TTC법은 적용범위가 좁아 널리 쓰이지 않는 실정이며 국내에서 사용하고 있는 TTC법도 이러한 점을 고려하여 실용성을 개선하는 것이 바람직한데 잔류 항균물질 농도가 허용범위를 넘게되면 대부분의 국가에서는 집유정지등 강력한 조치로 엄격하게 관리하고 있다.

원유의 검사주기는 검사항목에 따라 차이가 있는데 유조성분, 세균수 및 체세포수 검사는 1주 - 2주 간격으로 검사하는 경우가 많고 잔류 항균물질 검사는 2주 - 4주 간격으로 실시하는 경우가 많다. 국내에서도 유질개선을 촉진하기 위하여 유질변화를 고려한 검사방법과 주기로 개선하는 것이 바람직하므로 검사주기를 항목별로 1주 1회 - 2주 1회 범위로 조정하고 잔류 항균물질 검사는 실용성 있는 방법으로 시행하는 것이 필요하다.

국내에서도 낙농선진국의 우유검사방법 및 체계를 조사 분석하고 우유의 위생적 품질 검사방법과 체계를 개선하여 기존 TTC법을 대체할 수 있는 정확하고 실용성 있는 개선된 방법 개발 및 실용화가 필요하며 이를 위한 연구개발이 절실히 요구되는 실정이다.

제2절 재료 및 방법

1. 최종 선발된 균주의 동정

항균물질에 대해 감수성이 있고 배지별/지시약별 실험에서 최종 선발된 균주는 MRS broth(Difco)에 2회 이상 계대배양하여 활력을 회복시킨 후 Gram 염색, 현미경(Olympus, Japan) 관찰과 API kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 당발효 시험을 실시한 결과를 ATB identification system (bioMerieux, France)에 입력하여 젖산균의 genus와 species를 결정하였다.

2. MRS 배양균주와 Skim milk 배양균주의 비교

항균제 감수성 실험 및 지시약 실험에서 최종 선발된 균주와 선발된 배지/지시약을 이용하여 실험에 사용되는 균액의 종류에 따른 감수성 정도와 실험시간의 단축정도를 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다.

이때 사용된 배지는 Skim milk(100%, Difco), Skim milk + SPC(50% + 50%, Difco), SPC(100%, Difco) 3가지이고, 지시약으로는 Methyl red(0.01%, Sigma), Resazurin(0.005%, Sigma), Bromocresol purple(0.005%, Junsei chemical) 3가지 지시약을 선발하여 실험에 사용하였다.

균액의 활력과 감수성 정도를 알아보기 위해 동일균주를 MRS broth와 Skim milk에 접종하여 배양한 후 MRS 균액과 Skim milk 균액을 접종하여 37°C에서 3시간 배양한 후 지시약의 색깔 변화를 비교 관찰하였다.

3. 선발된 균주의 배지별 감수성 실험

1/2차년도 항균제 감수성 실험에서 감수성이 있는 것으로 밝혀진 균주들에 대하여 배지별 항균제 감수성 실험을 실시하였다.

배지의 종류는 SPC broth(100%, Difco), MRS broth(100%, Difco), M17 broth(100%, Difco), SPC + MRS(50% + 50%), SPC + M17(50% + 50%), MRS + M17(50% + 50%), SPC + Skim milk(50% + 50%), Skim milk(100%, Difco), MRS + Skim milk(50% + 50%), M17 + Skim milk(50% + 50%)로 사용하였다.

각 배지를 제조하여 멸균기에서 121℃, 15분간 멸균시킨 후 사용하였고, 혼합배지는 각 배지를 제조한 후 혼합하여 멸균하였다. 이때 M17 broth는 멸균후에 50℃로 식힌 후 멸균된 10% lactose solution(Difco)을 넣어 잘 섞은 후에 사용하였다. 10% lactose solution은 멸균기에서 멸균하지 않고 membrane filter(0.45µm, Whatman)를 이용하여 여과하여 사용하였다.

그리고 배지별 감수성 실험을 실시하였는데 기준으로 사용된 지시약은 Resazurin(0.005%)이었다.

96 multiwell plate(sterile)에 multichannel pipettor를 이용하여 항균제가 첨가된 우유 시료를 40µl 첨가한 후 위의 각 종류별 배지를 140µl씩 첨가하였고, 이때 TMP첨가 처리구는 배지120µl와 TMP20µl를 혼합하여 첨가하였다. 배지 첨가후 각 지시약을 60µl씩 첨가하여 plate준비를 완료한 후 시험균주를 20µl 접종하여 37℃ waterbath에서 3시간 배양 후 색깔 변화를 관찰하였는데 이 과정을 그림1에 나타내었다.

표 37. 배지별 성분 조성

배 지	성 분 조 성 (/ 1)
SPC broth (100)	Bacto tryptone 5g, Bacto yeast extract 2.5g, Bacto dextrose 1g
MRS broth (100)	Bacto proteose peptone No.3 10g, Bacto beef extract 10g, Bacto yeast extract 5g, Bacto dextrose 20g, Tween 80 1g, Ammonium citrate 2g, Sodium acetate 5g, Magnesium sulfate 0.1g, Manganese sulfate 0.05g, Dipotassium phosphate 2g
M17 broth (100)	Bacto tryptone 5g, Bacto soytone 5g, Meat digest 5g, Yeast digest 2.5g, Ascorbic acid 0.5g, Magnesium sulfate 0.25g, Disodium-β-glycerophosphate 19g, 10% lactose solution 50ml
SPC+MRS (50+50)	Bacto proteose peptone No.3 5g, Bacto beef extract 5g, Bacto yeast extract 3.75g, Bacto dextrose 10.5g, Tween 80 0.5g, Ammonium citrate 1g, Sodium acetate 2.5g, Magnesium sulfate 0.05g, Manganese sulfate 0.025g, Dipotassium phosphate 1g, Bacto tryptone 5g
SPC+M17 (50+50)	Bacto tryptone 5g, Bacto soytone 2.5g, Meat digest 2.5g, Yeast digest 1.25g, Ascorbic acid 0.25g, Magnesium sulfate 0.125g, Disodium-β-glycerophosphate 9.5g, 10% lactose solution 25ml, Bacto yeast extract 1.25g, Bacto dextrose 0.5g

배 지	성 분 조 성 (/ 1)
MRS+M17 (50+50)	Bacto proteose peptone No.3 5g, Bacto beef extract 5g, Bacto yeast extract 2.5g, Bacto dextrose 10g, Tween 80 0.5g, Ammonium citrate 1g, Sodium acetate 2.5g, Magnesium sulfate 0.175g, Manganese sulfate 0.025g, Dipotassium phosphate 1g, Bacto tryptone 2.5g, Bacto soytone 2.5g, Meat digest 2.5g, Yeast digest 1.25g, Ascorbic acid 0.25g, Disodium-β-glycerophosphate 9.5g, 10% lactose solution 25ml
Skim Milk (100)	Skim milk 100g
Skim+SPC (50+50)	Skim milk 50g, Bacto trytone 2.5g, Bacto yeast extract 1.25g, Bacto dextrose 0.5g
Skim+MRS (50+50)	Skim milk 50g, Bacto proteose peptone No.3 5g, Bacto beef extrat 5g, Bacto yeast extrat 2.5g, Bacto dextrose 10g, Tween 80 0.5g, Ammonium citrate 1g, Sodium acetate 2.5g, Magnesium sulfate 0.05g, Manganese sulfat 0.025g, Dipotassium phosphate 1g
Skim+M17 (50+50)	Skim milk 50g, Bacto tryptone 2.5g, Bacto soytone 2.5g, Meat digest 2.5g, Yeast digest 1.25g, Ascorbic acid 0.25g, Magnesium sulfate 0.125g, Disodium-β-glycerophosphate 9.5g, 10% lactose solution 25ml

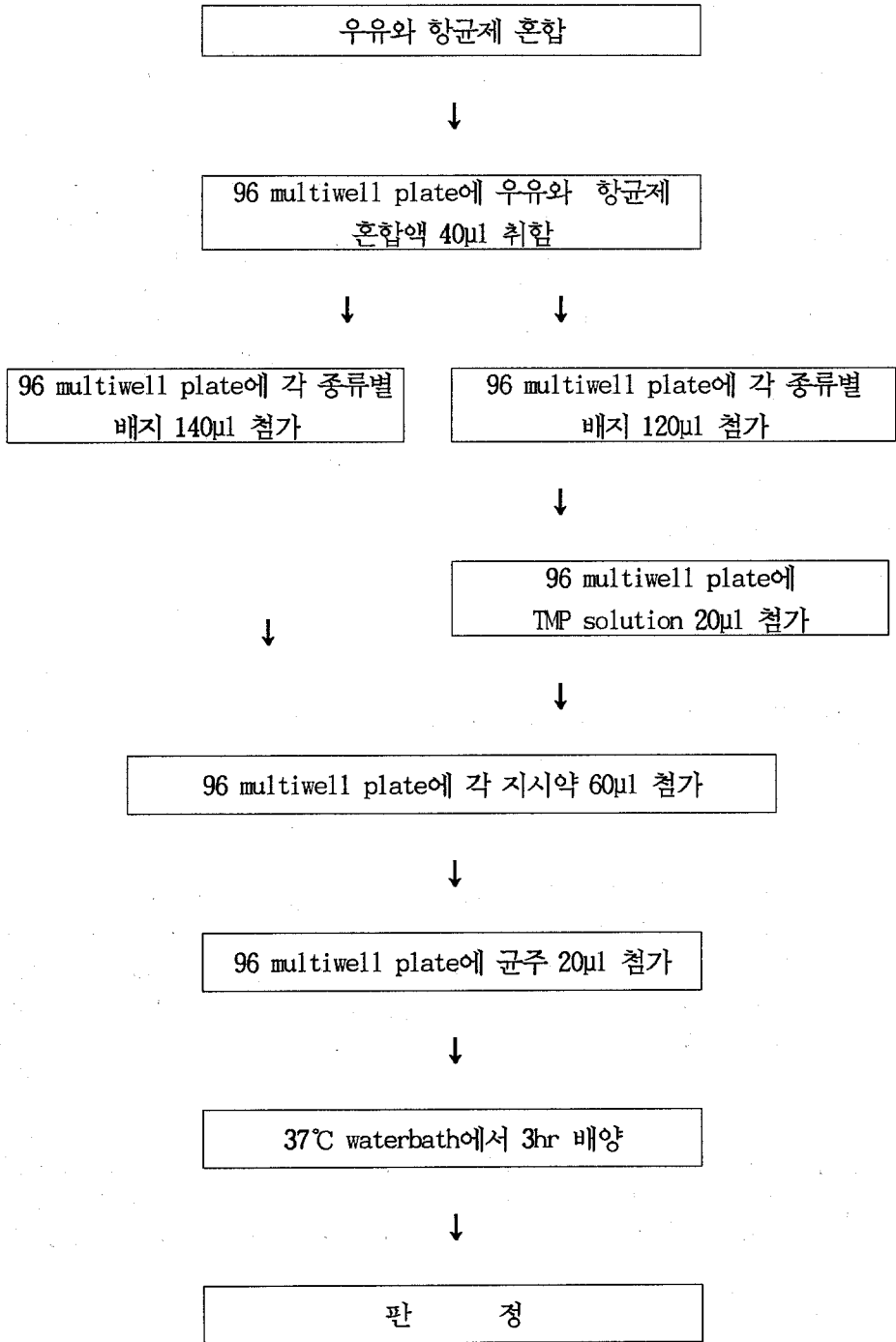


그림 1. 선발된 균주의 배지별·지시약별 감수성 실험

4. 최적 배지조건 설정

앞에서 실험에 사용한 배지의 종류 중 SPC broth와 skim milk를 선별하여 두 배지의 조성을 달리해가며 접종균주의 항균제 감수성과 활력정도를 조사하였다. 이때 배지는 제조 및 혼합하여 멸균기에서 121℃ / 15분간 멸균하여 실험에 사용하였다. 그리고 실험에 사용되는 항균제는 Oxytetracycline(0.1ppm), Penicillin G (0.024ppm), Sulfamethazine(0.01ppm), Sulfathiazole(0.01ppm), Sulfadimethoxine(0.01ppm)의 농도로 제조 및 혼합하여 membrane filter(0.45μm, Whatman)로 여과한 후 사용하였다.

표 38. 배지별 성분조성

배 지	성 분 조 성 (/ l)
Skim milk (100)	Skim milk 100g
Skim milk + SPC (75 + 25)	Skim milk 75g, Bacto tryptone 1.25g, Bacto yeast extract 0.625g, Bacto dextrose 0.25g
Skim milk + SPC (50 + 50)	Skim milk 50g, Bacto tryptone 2.5g, Bacto yeast extract 1.25g, Bacto dextrose 0.5g
Skim milk + SPC (25 + 75)	Skim milk 25g, Bacto tryptone 3.75g, Bacto yeast extract 1.875g, Bacto dextrose 0.75g
SPC broth (100)	Bacto tryptone 5g, Bacto yeast extract 2.5g, Bacto dextrose 1g

5. HPLC를 이용한 우유내 잔류 설파제 분석

가. 표준시약 제조

각 표준 합성항균물질은 Sigma사(St. Louis, MO, USA)의 sulfamerazine, sulfadimethoxine, sulfathiazole 각 10mg을 100ml의 methanol에 용해하여 100 μ g/ml stock solution을 제조하였다. 표준혼합용액(mixture of standards)은 각 stock solution을 1ml씩을 취한 뒤 methanol을 가하여 100ml로 정용하여 1 μ g/ml 용액을 제조하였다.

나. 시료 전처리

- 1) 10ml의 우유 시료를 125ml 분액여두에 취한다.
- 2) 50ml의 추출액(클로르포름-아세톤(2+1, volume/volume) 혼합액)을 분액여두에 넣고 1분간 격렬하게 혼합한다.
- 3) 조심스럽게 마개를 열어 vent시킨다.
- 4) 다시 1분간 격렬하게 흔들어주고 vent시킨후 1분간 정치하여 분리시키고, 반복하여 흔들어 준후 5분간 정치하여 층을 분리시킨다.
- 5) 추출액(클로르포름-아세톤층)을 취하고 여과하여 등근 플라스크로 모은다.
- 6) 분액여두에 25ml의 추출액을 가한 뒤 2-5의 방법으로 반복하여 2차 추출한다.
- 7) 여과지를 5 ml의 추출액으로 2회 반복하여 씻어 등근 플라스크로 모은다.
- 8) 추출액을 rotary evaporator로 32 $^{\circ}$ C에서 농축하여 용매를 제거한다.
- 9) 0.1 M potassium dihydrogen phosphate 용액 1ml을 가하고 1분간 강하게 vortex 한다.
- 10) 즉시 hexane 5ml을 가하고 1분간 vortex 한다.
- 11) 2분간 정치하여 층이 분리되도록 하고 다시 1분간 vortex 한후 15분

이상 정치하여 층이 분리되도록 하고 물층을 취한다.

12) 물층을 0.45 μm filter로 여과한 후 LC로 주입하였다.

다. HPLC 분석조건

Table 39. Operating conditions for sulfonamides by HPLC

Instrument	JASCO HPLC system(JASCO Co. Ltd., Japan)
Column	CrestPak C ₁₈ S(150 mm x 4.6 I.D.)(JASCO, Japan)
Eluent	0.017 M H ₃ PO ₄ /acetonitrile (70/30)
Flow rate	1.0ml/min
Detector	UV(270nm)
Column Temp.	35°C
Attenuation	512 mV F.S
Sample size	20 μl

6. 최적의 균주/배지/지시약 혼합체 설정

배지별/지시약별 항균제 감수성 실험에서 최종 선발된 8균주와 최적 배지조건으로 선발된 SPC broth(Difco)와 skim milk(Difco), 그리고 최적 지시약조건으로 선발된 Resazurin(0.005%), Bromocresol purple(0.005%)을 혼합실험하여 최적의 균주/배지/지시약 혼합체 조건을 설정하였다.

이때 96 multiwell plate(sterile)에 multichannel pipettor를 이용하여 항균제가 첨가된 우유 시료를 40 μl 첨가한 후 위의 각 종류별 배지를 140 μl 씩 첨가하였고, 이때 TMP첨가 처리구는 배지120 μl 와 TMP20 μl 를 혼합하여 첨가하였다. 배지 첨가후 각 지시약을 60 μl 씩 첨가하여 plate준비를 완료한 후 시험균주를 20 μl 접종하여 37°C waterbath에서 3시간 배양 후 색깔 변화를 관찰하였다.

제3절 결과 및 고찰

1. 선발된 균주를 이용한 균주체 제조

가. 최종선발균주의 동정 결과

Tryptic soy broth(Difco) / skim milk(Difco)를 이용한 항균물질 감수성 실험과 배지별 / 지시약별 실험을 통해 항균물질에 감수성이 높고 시험액에서 활력이 좋은 것으로 나타난 최종 선발균주를 Gram염색하여 현미경(Olympus, Japan)으로 관찰한 결과 모두 Gram양성이었다. 그리고 형태적으로 2개 균주는 rod형이고, 6개 균주는 Streptococcus이었다. 이에 rod형 균주는 API 50 CHL kit(API bioMerieux, France), streptococcus형 균주는 API Strep kit(API bioMerieux, France)를 이용하여 당발효 실험을 하였다.

균주의 동정결과 선발균주들은 *Enterococcus casseliflavus* 2균주, *Enterococcus faecium* 4균주, *Lactobacillus plantarum* 1균주, *Lactobacillus cellobiosus* 1균주로 분류되었고 그 결과는 다음 표40과 표41과 같다.

표 40. 선발된 균주의 50 CHL API동정 결과

Lactic bacteria Tests	오산 7-2	황산 14-1
Glycerol	-	-
Erythritol	-	-
D Arabinose	-	-
L Arabinose	+	-
Ribose	+	+
D Xylose	+	-
L Xylose	-	-
Adonitol	-	-
β-Methyl-D Xyloside	-	-
Galactose	+	+
Glucose	+	+
Fructose	+	+

Lactic bacteria Tests	오산 7-2	황산 14-1
Mannose	-	+
Sorbose	-	-
Rhamnose	-	+
Dulcitol	-	-
Inositol	-	-
Mannitol	-	+
Sorbitol	-	+
α-Methyl-D Mannoside	+	+
α-Methyl-D Glucoside	-	-
N Acetyl Glucosamine	-	+
Amygdalin	-	+
Arbutin	-	+
Esculin	+	+
Salicin	-	+
Cellobiose	+	+
Maltose	+	+
Lactose	+	+
Melibiose	+	+
Sucrose	+	+
Trehalose	-	+
Inulin	-	+
Melezitose	-	+
Raffinose	+	+
Starch	-	-
Glycogen	-	-
Xylitol	-	-
Gentiobiose	-	+
D Turanose	-	+
D Lyxose	-	-
D Tagatose	-	-
D Fucose	-	-
L Fucose	-	-
D Arabitol	-	+
L Arabitol	-	-
Gluconate	+	+
2 Ketogluconate	-	-
5 Ketogluconate	-	-

주) + : 색깔변화, - : 색깔변화없음

표 41. 선발된 균주의 20 Strep API 동정 결과

Lactic bacteria Tests	양지 7-1	양지 15-1	양지 15-2
VP	+	+	+
HIP	-	-	-
ESC	+	+	+
PYRA	+	+	+
dGAL	+	+	+
βGUR	-	-	-
βGAL	+	+	+
PAL	-	-	-
LAP	+	+	+
ADH	+	+	+
RIB	+	+	+
ARA	+	+	+
MAN	+	+	+
SOR	-	-	-
LAC	+	+	+
TRE	+	+	+
INU	-	-	-
RAF	-	-	-
AMD	-	-	-
GLYG	-	-	-

주) + : 색깔변화, - : 색깔변화없음

Lactic bacteria Tests	광교 17-1	광교 19-2	황산 12-1(1)
VP	+	+	+
HIP	-	-	-
ESC	+	+	+
PYRA	+	+	+
α GAL	-	-	+
β GUR	-	-	-
β GAL	+	+	+
PAL	-	-	-
LAP	+	+	+
ADH	+	+	+
RIB	+	+	+
ARA	+	+	+
MAN	+	+	+
SOR	-	-	-
LAC	+	+	+
TRE	+	+	+
INU	-	-	-
RAF	+	-	+
AMD	-	+	+
GLYG	-	-	-

주) + : 색깔변화, - : 색깔변화없음

표 42. 최종선발균주의 동정 결과

균 주	Gram +/-	형 태	동 정
광 교 17-1	Gram +	Streptococcus	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
광 교 19-2	Gram +	Streptococcus	<i>Enterococcus faecium</i>
양 지 7-1	Gram +	Streptococcus	<i>Enterococcus faecium</i>
양 지 15-1	Gram +	Streptococcus	<i>Enterococcus faecium</i>
양 지 15-2	Gram +	Streptococcus	<i>Enterococcus faecium</i>
황 산 12-1(1)	Gram +	Streptococcus	<i>Enterococcus casseliflavus</i>
황 산 14-1	Gram +	rod	<i>Lactobacillus plantarum</i>
오 산 7-2	Gram +	rod	<i>Lactobacillus cellobiosus</i>

나. MRS 배양균주와 Skim milk 배양균주의 비교

항균제 감수성 실험 및 지시약 실험에서 최종 선발된 균주와 선발된 배지/지시약을 이용하여 실험에 사용되는 균액의 종류에 따른 감수성 정도와 실험시간의 단축정도를 알아보기 위해 다음과 같이 실험하였다.

이때 사용된 배지는 Skim milk (100%), Skim milk + SPC (50% + 50%), SPC (100%) 3가지이고, 지시약으로는 Methyl red (0.01%), Resazurin(0.005%), Bromocresol purple(0.005%) 3가지 지시약을 선발하여 실험에 사용하였다.

균액의 활력과 감수성정도를 알아보기 위해 MRS 배지에서 배양된 균주, Skim milk 배지에서 배양된 균주를 접종하여 지시약의 색깔 변화를 비교 관찰하였다.

위 균주들을 MRS broth와 Skim milk에 계대하면서 색소실험의 starter로 사용한 결과 MRS배지에서 배양된 균주의 경우 실험시작 2시간만에 색소의 변화가 확실하게 일어나고 Skim milk균주의 경우는 3시간후에 색소의 색깔 변화가 일어나 위에서 사용된 배지의 종류에 상관없이 감수성이 있는 MRS 배지에서 배양된 균주를 starter로 사용하면 실험시간을 단축할 수 있으리라 생각된다.

표 43. 선발된 배지/지시약에 대한 MRS 배양균주와 Skim milk 배양균주의 비교

균 주	MRS 배양균주						SKIM MILK 배양균주					
지 시 약	Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)		Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)	
향균제농도 배 지	regular	regular X 10	regular	regular X 10	regular	regular X 10	regular	regular X 10	regular	regular X 10	regular	regular X 10
SKIM MILK (100%)	다홍	다홍	자주 보라	자주 보라	흰연두	흰연두	주황	주황	보라	보라	탁한 하늘	탁한 하늘
SKIM+SPC (50% + 50%)	다홍	다홍	자주 보라	자주 보라	암연두	암연두	주황	주황	보라	보라	어두운 흰보라	어두운 흰보라
SPC (100%)	다홍	다홍	자주 보라	자주 보라	탁한 연두	탁한 연두	노랑	노랑	보라	보라	어두운 흰보라	어두운 흰보라

표 44. 항균제가 첨가되지 않은 standard의 3시간 배양후의 색깔변화

균 주	MRS 배양균주						SKIM MILK 배양균주					
지 시 약	Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)		Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)	
항균제 농도	regular	regular X 10	regular	regular X 10	regular	regular X 10	regular	regular X 10	regular	regular X 10	regular	regular X 10
배 지												
SKIM MILK (100%)	탁한 다홍	아주 흐린 다홍	핑크	핑크	흰연두	흰연두	노랑	노랑	핑크	핑크	흰연두	흰연두
SKIM+SPC (50% + 50%)	탁한 주황	탁한 주황	핑크	핑크	흰연두	흰연두	탁한 노랑	탁한 노랑	보라	보라	흰연두	흰연두
SPC (100%)	다홍	다홍	맑고 흐린 핑크	맑고 흐린 핑크	연연두	흰연두	맑은 노랑	맑은 노랑	보라	보라	흰연두	흰연두

표 45. 최종선발균주를 배지별 3시간 배양후의 색깔변화

광고17-1, 황산14-1

균 주	MRS 배양균주						SKIM MILK 배양균주					
	Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)		Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)	
배 지	배양시간		배양시간		배양시간		배양시간		배양시간		배양시간	
	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
SKIM MILK (100%)	다홍	다홍	자주 보라	핑크	흰연두	흰연두	주황	주황	보라	진핑크	탁한 하늘	흰연두
SKIM+SPC (50% + 50%)	다홍	다홍	자주 보라	핑크	암연두	흰연두	주황	탁한 노랑	보라	보라	어두운 흰보라	흰연두
SPC (100%)	다홍	다홍	자주 보라	맑고 흐린 주황	탁한 연두	맑고 어두운 연두	노랑	탁한 노랑	보라	보라	어두운 흰보라	흰연두

광고19-2

균 주	MRS 배양균주						SKIM MILK 배양균주					
지 시 약	Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)		Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)	
배양시간 배 지	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
SKIM MILK (100%)	다홍	다홍	자주 보라	엷은 핑크	흰연두	흰연두	주황	흰주황	보라	자주 보라	탁한 하늘	탁한 하늘
SKIM+SPC (50% + 50%)	다홍	다홍	자주 보라	암핑크	암연두	흰연두	주황	흰주황	보라	보라	어두운 흰보라	암하늘
SPC (100%)	다홍	다홍	자주 보라	엷고 맑은 핑크	탁한 연두	흰연두	노랑	흰주황	보라	보라	어두운 흰보라	암하늘

양지15-1, 양지15-2, 황산12-1(1)

균 주	MRS 배양균주						SKIM MILK 배양균주					
지시약	Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)		Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)	
배양시간 배 지	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
SKIM MILK (100%)	다홍	탁한 주황	자주 보라	얇은 핑크	흰연두	흰연두	주황	흰주황	보라	핑크	탁한 하늘	탁한 하늘
SKIM+SPC (50% + 50%)	다홍	탁하고 맑은 주황	자주 보라	얇은 핑크	암연두	흰연두	주황	흰주황	보라	보라	어두운 흰보라	암하늘
SPC (100%)	다홍	노랑	자주 보라	맑고 흐린 핑크	탁한 연두	흰연두	노랑	흰주황	보라	보라	어두운 흰보라	암하늘

오산7-2

균 주	MRS 배양균주						SKIM MILK 배양균주					
지 시 약	Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)		Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)	
배 지 배양시간	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
SKIM MILK (100%)	다홍	탁한 다홍	자주 보라	살색	흰연두	흰연두	주황	엷은 탁한 주황	보라	자주 보라	탁한 하늘	흰하늘
SKIM+SPC (50% + 50%)	다홍	탁한 다홍	자주 보라	살색	암연두	암연두	주황	노랑	보라	보라	어두운 흰보라	암하늘
SPC (100%)	다홍	다홍	자주 보라	맑은 보라	탁한 연두	암연두	노랑	노랑	보라	보라	어두운 흰보라	암하늘

양지7-1

균 주	MRS 배양균주						SKIM MILK 배양균주					
지 시 약	Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)		Methyl red (0.01%)		Resazurin (0.005%)		Bromocresol purple (0.005%)	
배 지	배양시간		배양시간		배양시간		배양시간		배양시간		배양시간	
	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
SKIM MILK (100%)	다홍	다홍	자주 보라	연핑크	흰연두	흰연두	주황	노랑	보라	자주 보라	탁한 하늘	흰하늘
SKIM+SPC (50% + 50%)	다홍	다홍	자주 보라	연핑크	암연두	흰연두	주황	노랑	보라	보라	어두운 흰보라	암하늘
SPC (100%)	다홍	다홍	자주 보라	연핑크	탁한 연두	흰연두	노랑	노랑	보라	보라	어두운 흰보라	암하늘

2. 선발균주 배양을 위한 배지체 제조

가. 선발된 균주의 배지별 감수성 실험

1/2차년도 항균제 감수성 실험에서 감수성이 있는 것으로 밝혀진 균주들에 대하여 Resazurin(0.005%)을 지시약으로 사용하여 배지별 즉, SPC broth(100), MRS broth(100), M17 broth(100), SPC+MRS(50+50), SPC+M17(50+50), MRS+M17(50+50), SPC+Skim milk(50+50), Skim milk(100), MRS+Skim milk(50+50), M17+Skim milk(50+50) 항균제 감수성 실험을 실시한 결과 MRS broth(100), M17 broth(100), SPC+Skim milk(50+50), MRS+Skim milk(50+50)의 배지에서 항균제에 대한 균주의 감수성이 잘 나타나는 경향을 보였다. 그러나 배지와 지시약을 혼합하여 균주의 항균제에 대한 감수성을 관찰할 때 MRS broth와 M17 broth는 배지 특유의 갈색을 띠기 때문에 지시약의 색깔변화를 관찰하는데 어려움이 있었다. 따라서 배지의 종류에서는 SPC와 Skim milk를 선발하여 그 조성을 달리해가며 지시약과의 혼합실험을 실시하였다.

표 46. 배지별 항균제 감수성 결과

배지종류 균주종류	SKIM MILK (100)	SPC broth (100)	MRS broth (100)	M17 broth (100)	SKIM + SPC (50:50)	SKIM + MRS (50:50)	SKIM + M17 (50:50)	SPC + MRS (50:50)	SPC + M17 (50:50)	MRS + M17 (50:50)
오산 7-2	+	-	-	-	+	+	-	+	+	+
오산 15-2	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+
오산 17-1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
서울 56-5	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+
서울 268-1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
서울 239-1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
황산 14-1	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-

주) + : 감수성 양성 - : 감수성 음성, 사용된 기준 지시약은 Resazurin(0.005%)임.

배지종류 균주종류	SKIM MILK (100)	SPC broth (100)	MRS broth (100)	M17 broth (100)	SKIM + SPC (50+50)	SKIM + MRS (50+50)	SKIM + M17 (50+50)	SPC + MRS (50+50)	SPC + M17 (50+50)	MRS + M17 (50+50)
동탄 7-2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
생물 393	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
황산 12-1(1)	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
기안 11-1	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
양재 8-4	-	-	+	+	-	-	-	-	+	+
양재 5-2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
태안 10-1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

배지종류 균주종류	SKIM MILK (100)	SPC broth (100)	MRS broth (100)	M17 broth (100)	SKIM + SPC (50:50)	SKIM + MRS (50:50)	SKIM + M17 (50:50)	SPC + MRS (50:50)	SPC + M17 (50:50)	MRS + M17 (50:50)
태안 8-1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
구성 9-1	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
양지 7-1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
양지 15-1	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
양지 15-2	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
서울 368-2	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
곤지암 7-2	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-

배지종류 균주종류	SKIM MILK (100)	SPC broth (100)	MRS broth (100)	M17 broth (100)	SKIM + SPC (50:50)	SKIM + MRS (50:50)	SKIM + M17 (50:50)	SPC + MRS (50:50)	SPC + M17 (50:50)	MRS + M17 (50:50)
퇴촌 4-1	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
광교 30-2	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-
오향 10-1	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
오향 8-3	-	-	+	+	-	+	-	-	-	-
구성 8-1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
오향 11-1	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
광교 10-2	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-

나. 최적 배지조건 설정

앞에서 사용된 배지 SPC, MRS, M17, Skim milk, 그리고 여러 혼합배지 중에서 균주의 활력과 항균제 감수성 실험에서 최종적으로 선발된 SPC(Difco)와 Skim milk(Difco)를 이용하여 두 배지간의 혼합비 조성에 차이를 두어 선발균주의 항균제 감수성 정도를 조사한 결과 일반적으로 Skim milk와 SPC의 혼합배지보다는 단독 배지에서 균주의 항균제 감수성이 높게 나타났다.

표 47. 배지 종류별 균주 감수성 비교

배 지 균 주	Skim milk (100)	Skim milk + SPC (75 + 25)	Skim milk + SPC (50 + 50)	Skim milk + SPC (25 + 75)	SPC broth (100)
양지7-1 <i>Enterococcus faecium</i>	±	-	-	-	±
양지15-1 <i>Lc. lactis lactis</i>	±	-	-	-	±
양지15-2 <i>Enterococcus avium</i>	±	-	-	-	±
광교17-1 <i>Enterococcus avium</i>	±	-	-	-	±
광교19-2 <i>Lc. lactis lactis</i>	±	-	-	-	±
오산7-2 <i>Lactobacillus fermentum</i>	-	-	-	-	-
황산12-1 <i>Enterococcus avium</i>	±	-	-	-	±
황산14-1 <i>Lactobacillus plantarum</i>	-	-	-	-	-
<i>Streptococcus thermophilus</i>	+	-	-	-	+

주) + : 감수성 양성, ± : 감수성 중성, - : 감수성 음성

이때 지시약은 Resazurin (0.005%)을 사용하였고, 항균제 농도는 기준농도의 10배 (Penicillin G 0.24ppm, Oxytetracycline 1ppm, Sulfamethazine 0.1ppm, Sulfathiazole 0.1ppm, Sulfadimethoxine 0.1ppm)로 사용하였다.

한편, 우유내 잔류할 가능성이 있는 Sulfa계열의 항균물질에 대하여 HPLC를 이용하여 분석한 결과 sulfathiazole의 retention time은 2.375분, sulfamerazine은 3.083분, sulfadimethoxine은 8.058분으로 나타났다.

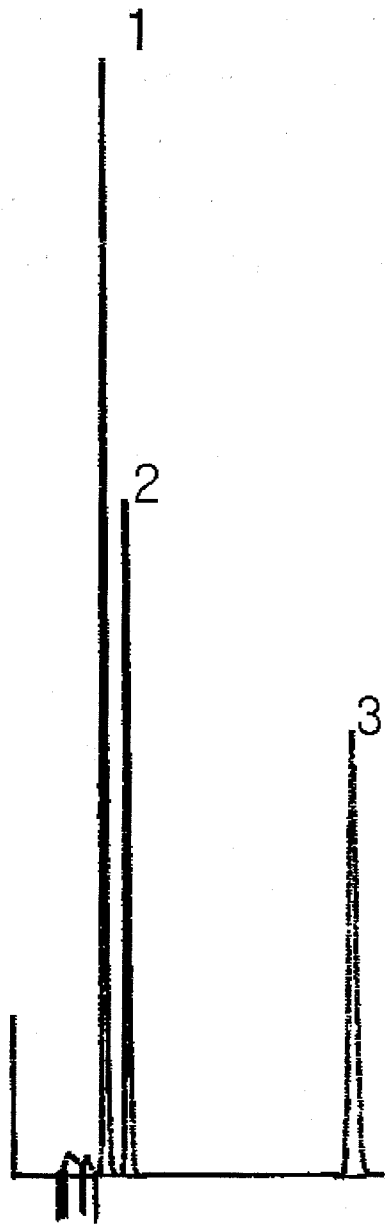


Fig. 2. HPLC chromatogram of sulfonamides

1. sulfathiazole 2. sulfamerazine 3. sulfadimethoxine

3. 항균물질 검사 최적 복합체 제조

배지별/지시약별 항균제 감수성 실험에서 선발된 배지 (SPC, Skim milk)와 지시약 (resazurin, methyl red, bromocresol purple)의 조성을 달리해가며 균주의 항균제 감수성 정도와 균주의 생장에 따른 지시약의 색깔변화를 조사한 결과는 다음 표 48과 같다.

표 48. 선발 배지별/지시약별 항균제 감수성 검사

* STANDARD의 색깔 (배양 3hr후)

지시약	Resazurin		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple	
	Resazurin (100)	(25+75)	(25+75)	(50+50)	(50+50)	(75+25)	(75+25)	(75+25)	(25+75)	(25+75)	(50+50)	(50+50)	(75+25)	(75+25)
배지	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
Skim milk (100)	자주 보라	분홍	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 분홍	암 하늘	분홍	하늘	흰색	흰 보라	흰 분홍	갈은 하늘	분홍
Skim milk + SPC (75+25)	자주 보라	분홍	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 분홍	암 하늘	분홍	하늘	흰색	흰 보라	흰 분홍	갈은 하늘	흰 분홍
Skim milk + SPC (50+50)	자주 보라	분홍	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 갈색	암 하늘	분홍	하늘	이주 엷은 흰 보라	흰 보라	흰 분홍	갈은 하늘	분홍
Skim milk + SPC (25+75)	자주 보라	분홍	암 카키	카키 주황	암 연두	흰 갈색	암 하늘	분홍	하늘	이주 엷은 흰 보라	보라	흰 분홍	갈은 하늘	분홍
SPC (100)	자주 보라	분홍	암 카키	주황	암 연두	흰 분홍	암 하늘	분홍	하늘	흰 노랑	보라	흰 분홍	갈은 하늘	흰 분홍

주) Resazurin(0.005%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%)

양지7-1, 양지15-1, 양지15-2, 광고17-1, 광고19-2

지시약	Resazurin		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple	
	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
배지	Resazurin (100)		+Methyl red (25+75)		+Methyl red (50+50)		+Methyl red (75+25)		+Bromocresol purple (25+75)		+Bromocresol purple (50+50)		+Bromocresol purple (75+25)	
Skim milk (100)	자주 보라	약한 자주	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 주황	암 하늘	분홍	하늘	흰 노랑	흰 보라	흰 분홍	흰 하늘	짙은 분홍
Skim milk + SPC (75+25)	자주 보라	분홍	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 주황	암 하늘	분홍	하늘	흰 노랑	흰 보라	흰 분홍	흰 하늘	짙은 분홍
Skim milk + SPC (50+50)	자주 보라	분홍	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 주황	암 하늘	분홍	하늘	흰 노랑	흰 보라	흰 분홍	흰 하늘	짙은 분홍
Skim milk + SPC (25+75)	자주 보라	분홍	암 카키	주황 연두	암 주황	암 하늘	약간 진 분홍	하늘	흰 노랑	흰 보라	흰 분홍	흰 하늘	짙은 분홍	
SPC (100)	자주 보라	약한 자주	암 카키	주황 연두	암 주황	암 하늘	약간 진 분홍	하늘	흰 노랑	흰 보라	흰 분홍	흰 하늘	약간 짙은 분홍	

주) Resazurin(0.005%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%)

황산12-1(1)

지시약	Resazurin		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple	
	(100)	(25+75)	(25+75)	(50+50)	(50+50)	(75+25)	(75+25)	(25+75)	(25+75)	(50+50)	(50+50)	(75+25)	(75+25)	(75+25)
배지	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
Skim milk (100)	자주 보라	약한 자주 빛 분홍	흰 카키	주황 연두	암 연두	흰 주황	암 하늘	분홍 하늘	하늘	이주	흰 보라	흰 분홍	짙은 하늘	분홍 하늘
Skim milk + SPC (75+25)	자주 보라	분홍	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 주황	암 하늘	분홍 하늘	하늘	이주	흰 보라	흰 분홍	짙은 하늘	분홍 하늘
Skim milk + SPC (50+50)	자주 보라	분홍	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 주황	암 하늘	분홍 하늘	하늘	이주	흰 보라	흰 분홍	짙은 하늘	분홍 하늘
Skim milk + SPC (25+75)	자주 보라	분홍	암 카키	주황 연두	암 연두	흰 주황	암 하늘	약간 진 분홍	하늘	이주	보라	흰 분홍	짙은 하늘	분홍 하늘
SPC (100)	자주 보라	약한 자주 빛 분홍	암 카키	주황 연두	암 연두	주황 하늘	암 하늘	약간 진 분홍	하늘	이주	보라	흰 노란 분홍	짙은 하늘	약간 진 분홍

주) Resazurin(0.005%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%)

오산7-2

지시약	Resazurin		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple	
	(100)	(25+75)	(25+75)	(50+50)	(50+50)	(75+25)	(75+25)	(75+25)	(25+75)	(25+75)	(50+50)	(50+50)	(75+25)	(75+25)
배지	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
Skim milk (100)	자주 보라	분홍	흰 카키	주황	암 연두	주황	암 하늘	분홍	하늘	노랑	흰 보라	어두운 분홍	짙은 하늘	분홍
Skim milk + SPC (75+25)	자주 보라	분홍	흰 카키	주황	암 연두	주황	암 하늘	분홍	하늘	노랑	흰 보라	어두운 분홍	짙은 하늘	분홍
Skim milk + SPC (50+50)	자주 보라	분홍	흰 카키	주황	암 연두	어두운 주황	암 하늘	분홍	하늘	노랑	흰 보라	어두운 분홍	짙은 하늘	분홍
Skim milk + SPC (25+75)	자주 보라	분홍	암 카키	어두운 주황	암 연두	어두운 주황	암 하늘	약간 진 분홍	하늘	노랑	보라	어두운 분홍	짙은 하늘	분홍
SPC (100)	자주 보라	분홍	암 카키	어두운 주황	암 연두	어두운 주황	암 하늘	약간 진 분홍	하늘	노랑	보라	어두운 분홍	짙은 노란 하늘	약간 진 분홍

주) Resazurin(0.005%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%)

3hr후의 색깔변화가 다른 균주들에 비해 일반적으로 보라색이 첨가된 어두운 경향이였다.

황산14-1

지시약	Resazurin		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple	
	(100)	(25+75)	(50+50)	(50+50)	(75+25)	(75+25)	(75+25)	(25+75)	(25+75)	(50+50)	(50+50)	(75+25)	(75+25)	(75+25)
배지	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr
Skim milk (100)	자주 보라	분홍	흰 카키	흐린 주황	암 연두	흰 주황	암 하늘	분홍	하늘	흰 노랑	흰 보라	흰 분홍	흰 하늘	짙은 분홍
Skim milk + SPC (75+25)	자주 보라	분홍	흰 카키	흐린 주황	암 연두	흰 주황	암 하늘	분홍	하늘	흰 노랑	흰 보라	흰 분홍	흰 하늘	짙은 분홍
Skim milk + SPC (50+50)	자주 보라	분홍	흰 카키	흐린 주황	암 연두	흰 주황	암 하늘	분홍	하늘	흰 노랑	흰 보라	흰 분홍	흰 하늘	짙은 분홍
Skim milk + SPC (25+75)	자주 보라	분홍	암 카키	맑은 주황	암 연두	주황	암 하늘	진 분홍	하늘	흰 노랑	보라	흰 분홍	흰 하늘	짙은 분홍
SPC (100)	자주 보라	분홍	암 카키	맑은 주황	암 연두	주황	암 하늘	진 분홍	하늘	흰 노랑	보라	흰 분홍	흰 하늘	진 분홍

주) Resazurin(0.005%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%)

황산14-1은 다른 균주들에 비해 선명한 경향을 띠었다.

Streptococcus thermophilus

지시약	Resazurin		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Methyl red		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple		Resazurin +Bromocresol purple		
	Resazurin (100)	(25+75)	+Methyl red (25+75)	+Methyl red (50+50)	+Methyl red (75+25)	+Methyl red (25+75)	+Bromocresol purple (25+75)	+Bromocresol purple (50+50)	+Bromocresol purple (75+25)	+Bromocresol purple (25+75)	+Bromocresol purple (50+50)	+Bromocresol purple (75+25)	+Bromocresol purple (25+75)	+Bromocresol purple (50+50)	
배지	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	0hr	3hr	
Skim milk (100)	자주 보라	보라	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 분홍	암 하늘	흰 분홍	하늘 흰색	하늘	흰색	흰	얇은 보라	짙은 자주	분홍 하늘
Skim milk + SPC (75+25)	자주 보라	자주 빛 분홍	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 갈색	암 하늘	흰 분홍	하늘	자주 빛 흰색	하늘	흰 보라	얇은 자주	짙은 자주	분홍 빛
Skim milk + SPC (50+50)	자주 보라	분홍	흰 카키	흰 주황	암 연두	흰 갈색	암 하늘	흰 분홍	자주 빛	하늘	흰색	흰 보라	얇은 자주	짙은 자주	분홍 하늘
Skim milk + SPC (25+75)	자주 보라	자주 빛 분홍	암 카키	흰 주황	암 연두	흰 갈색	암 하늘	흰 분홍	자주 빛	하늘	흰색	자주 빛	얇은 자주	짙은 자주	분홍 빛
SPC (100)	자주 보라	자주 보라	암 카키	주황	암 연두	암 연두	암 하늘	자주 빛	하늘	자주 빛	흰색	자주 빛	얇은 자주	짙은 자주	분홍 하늘

주) Resazurin(0.005%), Methyl red(0.01%), Bromocresol purple(0.005%)

0hr때 배지와 지시약의 혼합에서 Skim milk(100), Skim milk + SPC(25+75), Skim milk + SPC(50+50), Skim milk + SPC(75+25), SPC(100)간에 지시약과의 혼합색깔 차이는 없었고, 다만 skim milk + SPC(25+75)와 SPC(100)에서 전반적으로 색깔이 진하게 나타났는데 이는 맑은색을 띠는 SPC의 함유율이 높기 때문으로 사료된다.

색소반응이 빨리 나타나는 MRS 배지에서 배양된 균주를 starter로 하여 색소의 색깔변화를 관찰한 결과 배지의 종류에 상관없이 가장 선명한 색깔변화를 나타낸 것은 Resazurin(100)이었고 Resazurin + Methyl red (50+50)와 Resazurin + Bromocresol purple (50+50)이 다른 혼합색소에 비해 색깔변화가 좋았다.

따라서 배지에서는 SPC, Skim milk를, 색소에서는 Resazurin, Methyl red, Bromocresol purple의 혼합비를 조절하여 최종실험한 결과 Skim milk와 SPC의 혼합비의 차이에 따른 색깔변화는 큰 차이가 없었고, 다만 Skim milk의 혼합비가 높을수록 색깔이 탁하고 SPC의 혼합비가 높을수록 선명함에 따라 SPC가 색깔차이를 구분하기가 약간 용이하였다. 색소체 중에서는 Resazurin (100)이 가장 적절하였고 Resazurin + Bromocresol purple (25 : 75)도 균주의 감수성 정도를 관찰하기가 용이하였다.

4. 균주체 배지체 발색제를 혼용한 항균물질검사 bio system 확립

1/2차년도에 실시한 원유에서의 젖산균 분리 및 항균제에 대한 감수성 실험에서 활력이 좋고 항균제에 감수성도 좋은(기준농도의 10배수준) 균주를 최종적으로 8균주 선발하였다.

최종선발균주는 *Enterococcus casseliflavus* 2균주, *Enterococcus faecium* 4균주, *Lactobacillus plantarum* 1균주, *Lactobacillus cellobiosus* 1균주로 분리 동정되었다.

위 균주들을 MRS broth와 Skim milk에 계대하면서 색소실험의 starter로 사용한 결과 MRS 배지에서 배양된 균주의 경우 실험시작 2시간만에 색소의 변화가 뚜렷하게 일어나고 Skim milk 배지에서 배양된 균주의 경우는 3시간 후에 색소의 색깔변화가 일어나 위에서 사용된 배지의 종류에 상관없이 감수성이 있는 MRS 배지에서 배양된 균주를 starter로 사용하면 실험시간을 단축할 수 있으리라 생각된다.

배지의 종류에서는 SPC, MRS, M17, Skim milk를 단독 또는 혼합사용한 결과 균주의 성장 및 색소의 색깔변화에 SPC, Skim milk가 적절하였다.

색소반응이 빨리 나타나는 MRS 배지에서 배양된 균주를 starter로 하여 색소의 색깔변화를 관찰한 결과 배지의 종류에 상관없이 가장 선명한 색깔변화를 나타낸 것은 Resazurin(100)이었고 Resazurin + Methyl red (50+50)와 Resazurin + Bromocresol purple (50+50)이 다른 혼합색소에 비해 색깔변화가 좋았다.

따라서 배지에서는 SPC 와 Skim milk를, 색소에서는 Resazurin, Methyl red, Bromocresol purple의 혼합비를 조절하여 최종실험하였다. 그 결과 Skim milk와 SPC의 혼합비의 차이에 따른 색깔변화의 큰 차이는 없었고 다만 Skim milk의 혼합비가 높을수록 색깔이 탁하고 SPC의 혼합비가 높을수록 선명하여 색깔차이를 구분하기가 약간 용이하였다. 색소체 중에서는 Resazurin(100)이 가장 적절하였고 Resazurin + Bromocresol purple (25:75)도 균주의 감수성 정도를 관찰하기가 용이하였으며 MRS배지에서 계대된 균주를 색소실험의 starter로 하여 배지는 SPC, Skim milk를, 색소는 Resazurin를 이용하여 kit제조하는 것이 가장 우수하였다.

결론적으로 우유 항균물질검사를 위한 bio system으로는 multiwell plate에 *Enterococcus casseliflavus*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus cellobiosus* 등 분리된 균주 또는 *Streptococcus thermophilus* 균주를 MRS배지에서 배양한 균액 20ul, SPC + Skim milk 배지액 140ul, Resazurin(Resazurin + Methyl red {1:1} 또는 Resazurin + Bromocresol purple {1:1}) 지시약 60ul와 검사용 우유 40ul를 첨가하여 37℃에서 3시간 배양하고 지시약의 발색변화를 평가하는 것이 우유 항균물질 검사를 위한 가장 실용적이고 경제적인 방법으로 판단되었다.

여 백

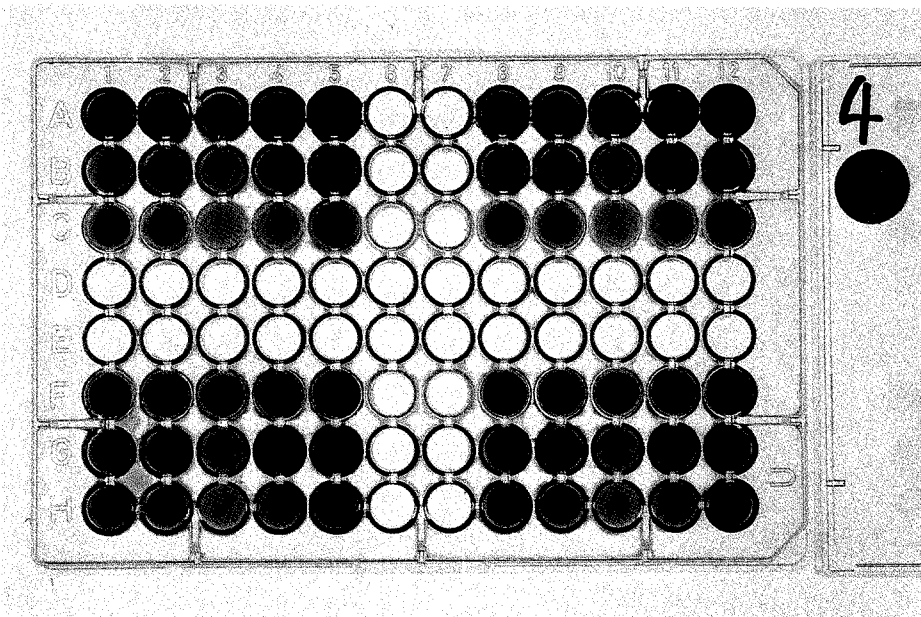
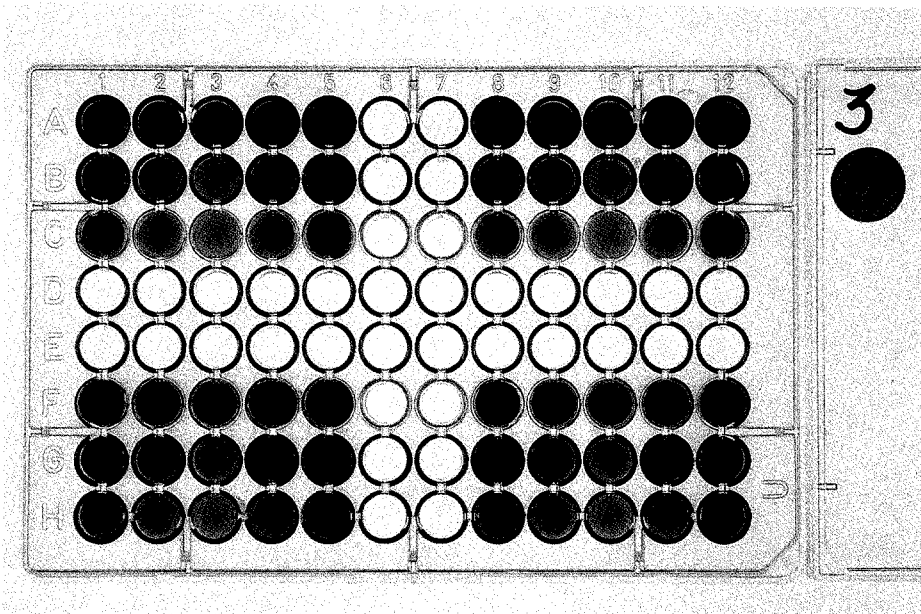


사진1. 지시약 종류에 따른 농도별 항균제검사 전(3) 후(4)의 색도변화

여 백

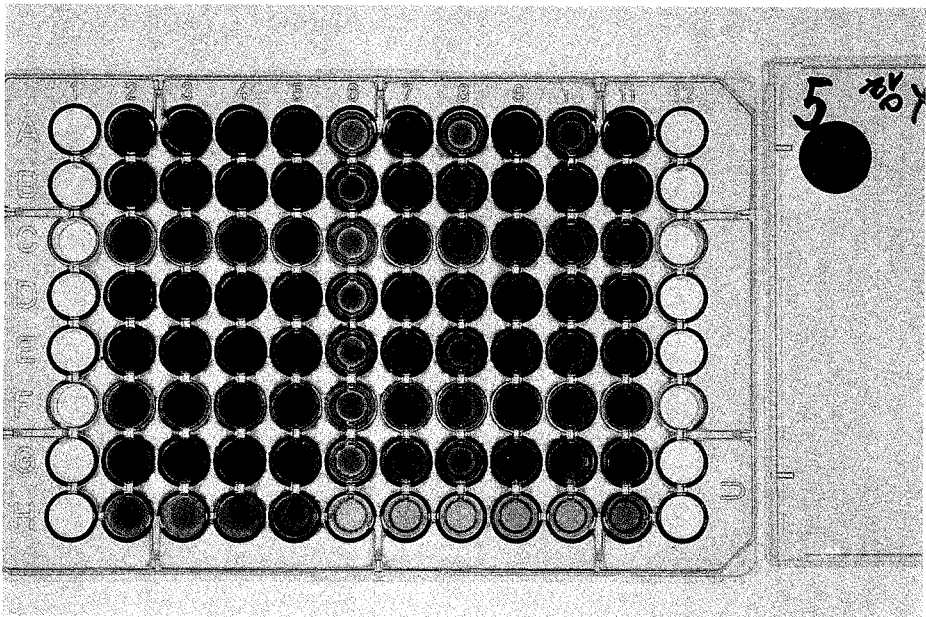
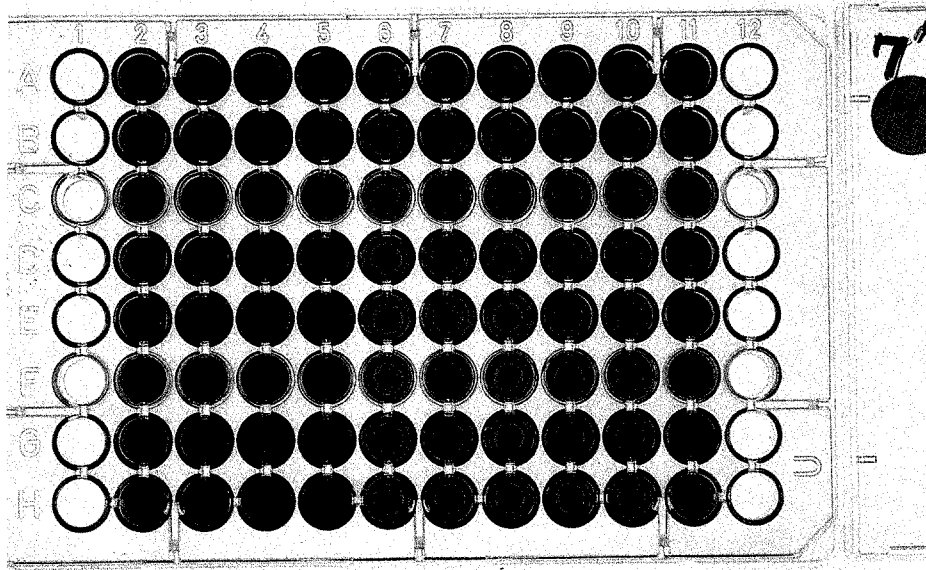


사진2. 배지 종류별 균주에 따른 항균제검사 전(7) 후(5)의 색도변화

여 백

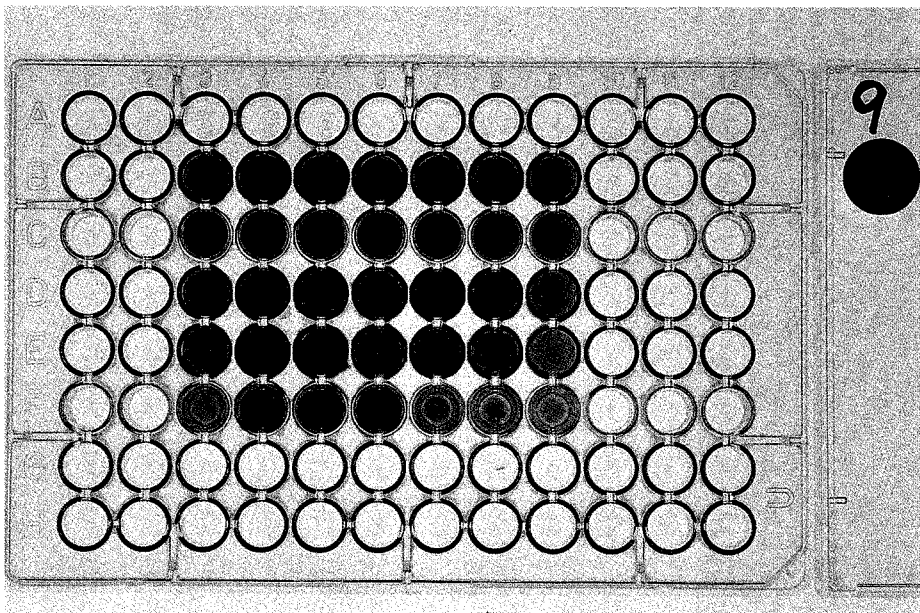
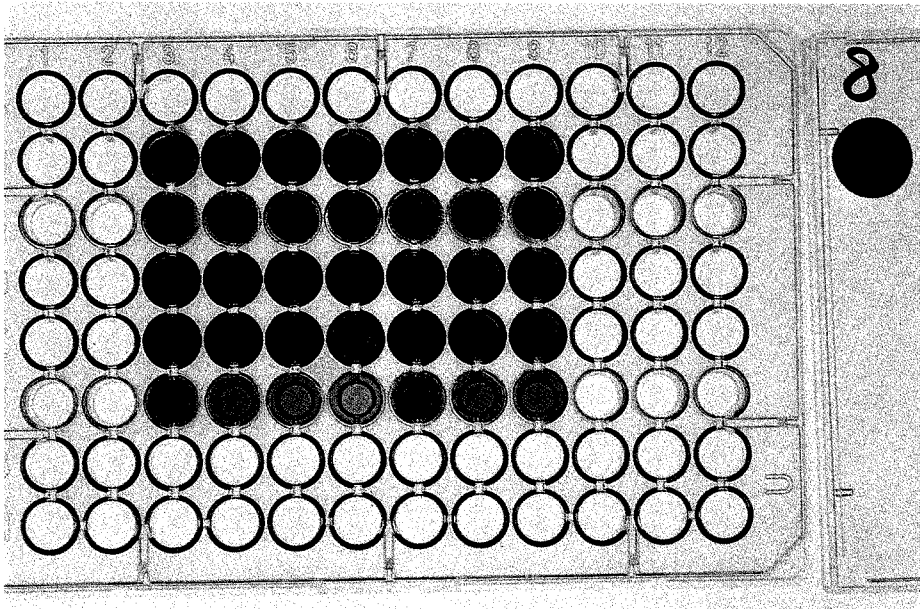


사진3. 배지 및 지시약 종류별 항균제검사 전(8) 후(9)의 색도변화

여 백

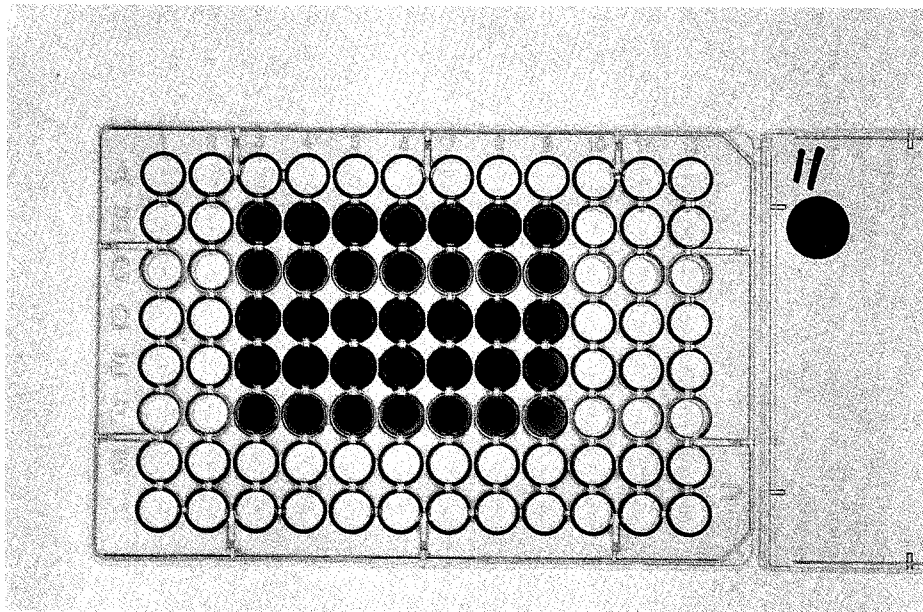
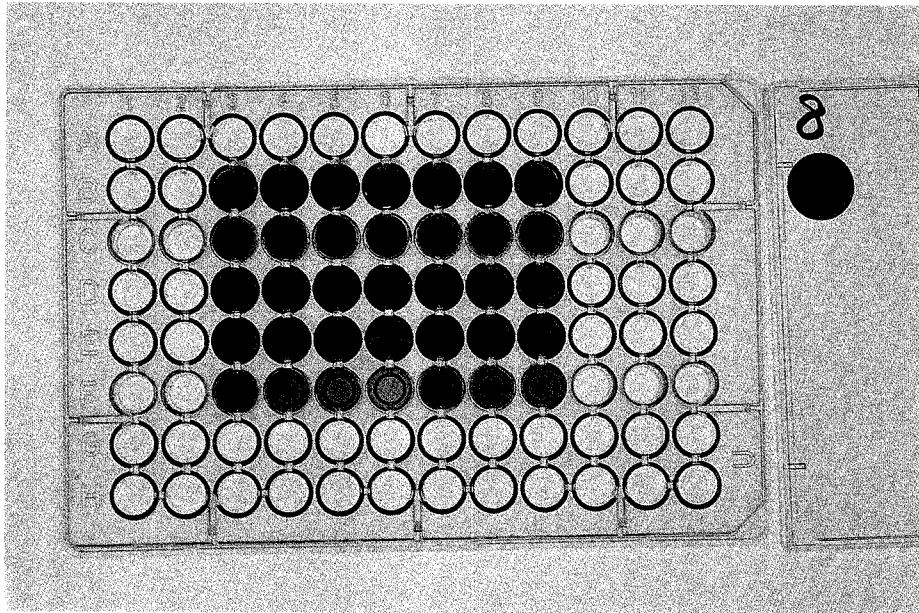


사진4. 배지 및 지시약 종류별 항균제검사 전(8) 후(11)의 색도변화

여 백

참 고 문 헌

1. Bishop, J. R., G. F. Senyk and S. E. Duncan. 1990. Standard method for the examination of Dairy products : Detection of antibiotic/drug residues in milk and dairy products. 16th ed. APHA. Washington, D.C.
2. Bishop, J. R., and C. H. White. 1984. Antibiotic residue detection in milk - A review. J. of Food Prot. 47(8) : 647-652.
3. Brady, M. S., and S. E. Katz. 1988. Antibiotic/Antimicrobial Residues in milk. J. of Food Prot. 51(1) : 8-11.
4. Brady, M. S., and S. E. Katz. 1989. A microbial assay system for the confirmation of results of receptor assays for antibiotic residues in milk. J. of Food Prot. 52(3) : 198 - 201.
5. Carlsson, A., and L. Björck. 1991. Charm Test II for confirmation of inhibitory substances detected by different microbial assays in herd milk. J. of Food Prot. 54(1) : 32-36.
6. Carlsson, A., and L. Björck. 1992. Liquid chromatography verification of tetracycline residues in milk and influence of milk fat lipolysis on the detection of antibiotic residues by microbial assay and the Charm II test. J. Food Prot. 55(5) : 374-378.
7. Chagonda, L. S., and J. Ndiwuera. 1989. Antibiotic residues in milk supplies in Zimbabwe. J. of Food Prot. 52(10) : 731-732.
8. Charm, S. E., and R. K. Chi. 1982. Rapid screening assay for

- beta-lactam antibiotics in milk : Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem. 65(5) : 1186-1192.
9. Charm, S. E., and R. K. Chi. 1986. Rapid receptor assay for antibiotics in milk - Collaborative study(β -lactams, macrolides, streptomycin, tetracyclines, sulonamides, chloramphenicol and novobiocin). Abstract No. 254, 100th AOAC Annual International Meeting, Sept. 15-18.
 10. Chen, H. C., and T. C. Chang. 1994. Detection of penicillin G in milk using a conductimetric method. J. Dairy Sci. 77(6): 1515-1520.
 11. Collins-Thompson, D. L., D. S. Wood and I. Q. Thomson. 1988. Detection of antibiotic residues in consumer milk supplies in North America using the Charm Test II procedure. J. Food Prot. 51 : 632-633.
 12. Fox, L. K., S. T. Chester, J. W. Hallberg, S. C. Nickerson, J. W. Pankey, and L. D. Weaver. 1995. Survey of Intramammary Infections in Dairy Heifers at Breeding Age and First Parturition. J. Dairy Sci. 78 : 1619-1628.
 13. Gilbertson, T. J., R. L. Mejeur, F. S. Yein and P. S. Jaglan. 1995. Modified microbiological method for the screening of antibiotics in milk. J. Dairy Sci. 78: 1032-1038.
 14. Gutierrez, L. M., M. L. Garcia Lopez, A. Otero, M. C. Garcia Fernandez, and B. Moreno. 1990. Incidence of staphylococci in ovine mastitic milk and antibiotic susceptibility of the strains. Milchwissenschaft. 45(12) : 778-781.

15. Hammes, W. P., N. Weiss, and W. Holzappel. 1992. The Genera Lactobacilli and Carnobacterium, pp.1563-1578. In The Prokaryotes. 2nd Edition. Springer-Verlag. New york.
16. Hammonds, S. J., and F. Adenwala. 1990. Antibiotic sensitivity testing of bacteria by microcolony inhibition and image analysis. Letters in applied microbiology. 10 : 27-29.
17. Koneman, E. W., S. D. Allen, V. R. Dowell, W. M. Janda, H. M. Sommer, and W. C. Winn. 1988. Antimicrobial susceptibility testing. Colortals and textbook of diagnostic microbiology. 3rd ed. J. B. Lippincott Company. Philadelphia.
18. Kosikowski, F. 1982. Cheese and fermented milk products. Edwards Brothers, Inc., Ann Arbor, Michigan.
19. Krienke, W. A. 1950. Effects on acid production by lactic starters of various "Drugs" in milk from mastitis treated cows. Milk Plant Monthly. 39(4) : 32.
20. Larocque, L. and G. A. Neville. 1986. A practical evaluation of the Delvo test P multi plate test in screening raw milk for antibiotics. J. Food Prot. 49(11) : 868-870.
21. Macaulay, D. M., and V. S. Packard. 1981. Evaluation of methods used to detect antibiotic residues in milk. J. Food Prot. 44(9) : 696-698.
22. Marth, E. H., and B. E. Ellickson. 1959. Antibiotic residues in milk and milk products : A review. J. Milk Food Technol. 22 : 241-249.
23. O' Leary, V. S., and J. H. Woychik. 1976. Utilization of lactose,

- glucose and galactose by a mixed culture of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in milk treated with lactase enzyme. Appl. Environ. Microbiol. 32 : 89-94.
24. Read, R. B., J. G. Bradshaw, A. A. Swartzentruber, and A. R. Brazis. 1971. Detection of sulfa drugs and antibiotics in milk. J. Appl. Microbiol. 21(5) : 806-808.
 25. Reinbold G. W., and M. S. Reddy. 1974. Sensitivity or resistance dairy starter and associated microorganisms to selected antibiotics. J. Milk Food Technol. 37(10) : 517-521.
 26. Ryan, J. J., E. E. Wildman, A. H. Duthie, and H. V. Atherton. 1986. Detection of penicillin, cephalosporin, and cloxacillin in commingled raw milk by the Spot test. J. Dairy Sci. 69 : 1510-1517.
 27. Schiffmann, A. P., M. Schutz and H. U. Wiesner. 1992. False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. 1. The influence of antibiotic residues in bulk milk on lactic acid production of starter cultures. Milchwissenschaft. 47(11) : 712-715.
 28. Senyk, G. F., J. H. Davidson, J. M. Brown, E. R. Hallstead, and J. W. Sherbon. 1990. Comparison of rapid tests used to detect antibiotic residues in milk. J. Food Prot. 53(2) : 158-164.
 29. Sozzi, T., and M. B. Smiley. 1980. Antibiotic resistances of yogurt starter cultures *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus*. Appl. Environ. Microbiol. 40(5): 862-865.

30. Suhren, J. R., and H. G. Walte. 1996. Detection of β -lactam antibiotics in milk by the Penzyme-test. *Milchwissenschaft*. 51(5) : 269-273.
31. Tamime, A. Y. and R. K. Robinson. 1985. Microbiology of yoghurt starter culture. *Yoghurt science and technology*. Pergaman. Oxford, Newyork, Toronto, Sydney, paris, Frankfurt. p.284-286.
32. Valladao, M. and W. E. Sandine. 1994. Standardized Method for determining the effect of various antibiotics on Lactococcal cultures. *J. of Food Prot.* 57(3) : 235-239.
33. Van Eenennaam, A. L., J. S. Cullor, L. Penari, I. A. Gardner, W. L. Smith, J. Dellinger, and W. M. Guterbock. 1993. Evaluation of milk antibiotic rescreening tests in cattle with naturally occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* 76(10) : 3041-3053.
34. Vidal, C. A. and D. L. Collins-thompson. 1987. Resistance and sensitivity of meat lactia acid bacteria to antibiotics. *J. of Food prot.* 50(9) : 737-740.
35. Watts, J. L., S. A. Salmon, and R. J. Yancey. 1995. Antimicrobial susceptibility of Microorganisms Isolated from the Mammary Grands of Dairy Heifers. *J. of Dairy Sci.* 78 : 1637-1648.
36. 김기성, 임상동, 김희수, 이찬, 정순희, 박민홍. 1994. 원유 품질 개선 방향. *한국유가공연구지*. 12(1) : 11-19.
37. 김영교, 김영주, 김현욱. 1979. 우유와 유제품의 과학. 선진문화사. p.42-48.
38. 김은아, 곽해수, 박정남, 정충일. 1991. 우유에 내재하는 항생물질

검출방법의 비교. 한국낙농학회지. 13(2) : 110-115.

39. 박승용, 김전한, 권일경, 김현욱. 1984. 한국에서 분리된 젖산박테리아의 항생물질 감수성에 관한 연구. 한국낙농학회지. 6(1) : 78-84.
40. 박용호. 1993. 우유의 위생학적 환경과 검사현황. 한국식품위생학회지. 8(2) : 33-39.
41. 오세종, 임광세, 허철성, 백영진. 1996. 유방염 치료제가 호상요구르트 유산균 배양에 미치는 영향. 한국낙농학회지. 18(1) : 25-30.
42. 이수원, 한지섭, 김상교. 1988. Yoghurt 제조용 유산균의 배양 기간 중 배지중의 당조성 변화. 한국낙농학회지. 10(1) : 13-20.
43. 임광세, 허철성, 백영진. 1995. 발효유 제조에 사용되는 항생제 감수성에 관한 연구. 한국낙농학회지. 17(1) : 43-50.
44. 조병훈, 김봉환, 손성완, 진남섭, 박종명. 1989. 원유중 잔류 설파제의 검출을 위한 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride(TTC) 환원시험법의 개량. 한국수의공중보건학회지. 17(1) : 77-86.

부록 1

미국 출장조사 결과 요약

본 과제 수행 중 미국의 관련 기업체, 대학 및 연구소를 방문하여 미국의 잔류항균물질 검사방법 개발현황을 조사하였으며 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. IdeTek사 방문조사

원유의 잔류항균물질 검사키트를 개발·판매하고 있는 IdeTek 본사 및 공장을 방문하여 Mark Platshon(President), Amit Kumar(New technology project manager) 및 Richard K. Lankow(Director, Environmental product) 박사를 만나 조사활동을 하였음.

가. IdeTek사 현황

- 소재지 : 1245 Reamwood Avenue, Sunnyvale, CA 94089
(Tel : 408-745-0544)
- 규모 : 조사자가 방문한 본사에는 연구실, 분석실, 제품제조실, 품질관리실, 제품 저장창고가 건물 1개동에 유기적으로 배치되어 있음.
- 직원 : 본사에 80명, 미국 및 세계 주요국가에 설치되어 있는 지사에 1,400명 근무중.
- 연혁 : 1983년 설립되어 식품 및 의약품관련 검사키트를 개발
1983년 - 1985년 *Trichina spiralis parasite* 검사키트 개발
1989년 우유의 잔류항균물질 검사키트(Lactek kit)를 개발하였으며
1990년에 미국과 영국에서 공식 검사방법의 하나로 인정받았으며 이후 캐나다와 이탈리아에서도 공식 검사방법으로 인정받음. 이후 잔류

항균물질 검사방법 및 키트개발에 주력하고 있음.

1996년 Idex사(1983년 창립)와 합병하여 Idex사는 주로 미국지역을 IdeTek사는 주로 해외지역을 관장하고 있음.

나. 잔류항균물질 검사방법 및 키트 개발현황

○ 기존의 Lactek방법은 잔류항균물질 검사과정이 일부 수작업으로 이루어졌으나 최근 전 과정을 자동화하여 검사시간 단축, 편리성 제고, 검사결과 정확성을 높였음.

○ 검사키트 개발과정은 검사이론을 정립한 후 검사키트를 개발하고 시제품을 제작하여 user에게 배포하여 현장에서 시험하는 과정을 거친 후 결점을 보완하여 최종적으로 제품을 개발하고 있음.

○ 한 종류의 제품개발에 책임자 1인이 시초부터 완제품 개발 및 상품화 이후까지 책임을 지고 관여하고 있음.

○ 미국정부에서는 우유내의 β -lactam계 항생물질에 대해서 엄격하게 관리하고 있으며 다른 항균물질(Tetracyclin, Gentamycin 등)에 관여하는 낮은 빈도로 필요에 따라 관리하고 있음.

○ 식품종류별 잔류항균물질 관장기관이 다름.

우유의 잔류항균물질은 FDA, 식육과 주스종류는 USDA, 그리고 식수에 관여하는 EPA가 관장.

○ 미국내 검사체계는 연방정부가 전체적인 규정을 정하고 각 주정부의 관련기관에서 실제 검사 업무를 관장하되 연방정부에서 각 주정부에 대해서 unknown sample testing을 실시하고 있음.

2. 코넬대학, Northeast DHIA, NCSU 방문조사

코넬대학의 Barbano 교수, Northeast Dairy Herd Improvement Association의 John W. Malaney씨(Milk Analysis Lab Manager), North Carolina State University의 Duane K. Larick교수를 만나 조사활동을 하였음.

- 코넬대학의 Barbano교수 연구실을 방문하여 최근 개발된 우유검사 관리프로그램에 관한 시연 및 설명을 들었으며, 미국의 잔류항균물질 검사현황에 관한 조사수행. 미국의 주정부에서는 우유검사를 담당하는 검사소를 인증하여 원유검사업무를 수행하며 검사에 문제점이 발생하였을 경우에는 주정부에서 관여함.

- Northeast DHIA를 방문하여 원유검사방법 및 검사시스템에 관한 조사수행.

- 북캐롤라이나주립대학의 Department of Food Science를 방문 Duane K. Larick교수를 만나 유가공연구현황 및 설비조사.

- 농가별 원유검사는 주기적으로 실시하며 집유차 원유는 유가공공장에서 가공전에 항균물질 검사를 실시하여 검사결과가 잔류항균물질 음성인 원유만 가공에 사용함.

- 잔류항균물질 양성유인 경우 원인제공 낙농가를 추적하여 정밀검사를 실시함.

- 미국에서는 법적으로 규정되어 있는 소수의 항생제만을 젖소의 유방염 등 질병치료에 사용하고 있으며 주로 Penicillin 계통임.

- 따라서 우유내 잔류항균물질 검사도 제한된 항균물질에 관한 것이므로 비교적 검사키트 개발이 용이함.

부록 2

호주 출장조사 결과 요약

본 과제 수행 중 호주의 관련 연구소 및 품질검사소를 방문하여 책임자 및 실무자를 대상으로 원유의 향생물질 등 집유검사 및 품질관리 현황을 조사하였으며 결과를 요약하면 다음과 같다.

호주 낙농업 현황

1. 원유생산량 : 8,716백만 리터(1995/1996년기준)

- 22% 시유용 나머지 78%는 가공용으로 사용됨
- 원유생산분포 : Victoria(62%), New South Wales(12.8%) Queensland (8.6%), South Australia(5.9%), Tasmania(5.9%) Western Australia주 (3.9%)
- 두당 평균 원유생산량 : 4,589리터/년
- 유제품 생산량 : 치즈(268,020톤), 버터(85,569톤), 버터오일(59,914톤), 탈지분유(214,527톤), 분말버터유(13,970톤), 케이신(5,687톤), 유청분말 및 농축유청단백(47,284톤), 연유(106,507톤), 크림(212,167k1), 요구르트(93,246톤), 아이스크림(202,736k1)

2. Victoria 집유검사 현황

- Victoria 주에서는 원유 용도에 따라서 차등적용하며 가공용 원유는 시유용 원유보다 높은 유대를 적용하고 가공용도에 따라 차등유가 적용함.
- 원유검사항목은 성분검사, 세균검사, 체세포검사, 향생물질검사, 침전물검사이며, 원유의 성분검사는 단백질, 지방 등 일반성분을 제외선 분석기로 실시함.

- 세균검사는 Bactoscan법, 체세포검사는 형광염색법 Fossomatic으로 실시함.
- 액상유제품 제조용 원유는 알콜검사, 산도검사 등을 실시하여 원유 가공 중 가열에 따른 안정성 여부를 사전에 검사하여 액상유제품 품질향상을 이룩함.
- 원유의 항생물질검사는 집유차를 대상으로 가공전 검사를 실시하고, 양성유 경우 추적검사를 실시하여 원인농가를 판별하며 항생제 양성유는 원유 항균제 검사결과가 음성일때 까지 집유정지함.
- 우유의 항생물질검사는 페니실린계를 중심으로 검사를 실시 하는데 항생물질검사는 Disc assay, Delvo test, Charm test 등을 사용하며 항생제 양성 여부를 판단함.
- 기타 오염물질(살균소독제)의 오염여부검사를 위하여 요오드 검사를 실시하며 양성유는 유제품가공에 이용하지 않음.
- 호주원유는 세균수 25000-50000/ml 수준 체세포는 40만이하 수준임.
- 음용유제품 제조용 원유는 세균수 5만이하를 사용함.
- 살균유 유통기간은 10일(냉장) 멸균유 유통기간은 6개월(실온)임.

3. New South Wales 집유검사 현황

- 낙농연구소 역할 : 원유검사용 표준시료제조, 관련교육실시
- Farm HACCP 필요성 : 농가 60%가 참여하고 있음.
- DHI프로그램은 전체 농가의 65%수준에서 진행중임.
- NSW주는 시유중심이고, 빅토리아주는 가공유제품을 많이 생산함.
- NSW주의 우유처리비율 : 시유 대 가공비율은 50 대 50
- NSW주의 우유처리 형태 : 20% 수출, 80% 내수
- 시유용 원유는 Dairy Corporation이 가공공장에 공급

- 원유에서 체세포수 현황 : 20만이하/ml(40%), 20-40만/ml(55%), 40만 이상/ml(5%)
- 세균검사는 Bactoscan을 활용하며 내열성 세균검사도 실시함.
- 항생물질 검사는 delvo test, disc assay법 Pen.G 0.03mg/ml(MRL)기준임.
- 원유가는 백색유 0.5\$, 멸균유 0.35\$, 가공유 0.28\$ 수준이고, 제품가격은 백색시유 1.2\$, 멸균유 1.0\$ 수준임.
- NSW 우유검사는 성분검사, 세균검사, 체세포검사, 항생물질 검사를 실시하며, 항생물질 검사는 페니실린계, 설파제, 테트라싸이클린계 등을 주로 대상으로 실시하며 신속검사법 연구 추진중임.
- 그외에 빙점검사, 세균검사(직경법), 온도검사 등을 실시함
- 음용유의 품질은 원유품질, 살균방법, 저장온도 등에 따라서 유통기간이 달라지며 유지방분리, 침전, 색택변화, 단백질변성, 지방산패 등이 발생하면 상품성이 없다고 판단함.
- 우유가격은 유고형분과 유량에 따라서 지불되는데 음용유는 유량을 기준으로 결정되며(2.6\$/L) 가공유는 단백질(4.64\$/Kg) 지방(2.06\$/Kg) 기준으로 하여 결정됨.
- 낙농가에서는 유대계산을 음용유 10%, 가공유 90% 비율로 유대 정산함
- 시유 품질기준은 지방 3.5%, 단백질 3.1% 이상, 세균수 5만이하/ml, 대장균 음성/ml, 빙점=-0.52℃
- 멸균유용 원유는 알콜검사, 응고검사 실시하여 가공유통중 품질변화를 예방함.
- 멸균시유는 30℃ 2주, 55℃ 1주일간 보존후 미생물검사를 실시하여 품질을 확인하고 30℃에서 3일후 Lumac으로 신속세균검사를 실시하기도 함.

- 멸균유 가공온도는 104-145℃에서 2-3초간 가열함.
- 멸균유는 2주간 저장시험(30℃, 55℃), 수송 3주, 현지도착에 5주일 소비됨.

4. Australian Quarantine & Inspection Service

- 주업무 : 식품품질규격에 관한 국내검사와 수출검사, 우유 및 유제품 품질관리 및 수출검사
- 유제품 수출은 Export Control Act 1982에 따라 주정부 Dairy Authority에서 1996. 7월부터 대행함.
- 수출축산물에 관하여 AQIS는 동물질병, 주정부는 식품품질을 인증하며, AQIS는 육류의 품질을 인증하며, 유제품은 주정부에 위임함.
- 식품관련 업무위반 경력이 있는 경우는 수출 허가를 하지 않음.
- 호주규격은 Codex 등 국제규격 뿐만아니라 관련국 규격도 만족시키는데 최근에 호주는 수년내에 뉴질랜드와 공통 위생 및 품질규격 운영할 예정이다.
- 수출품회사는 HACCP를 적용해야 함.
- 수산물, 낙농품, 계란은 동물건강 식품품질 관련 AQIS와 주정부 허가받음.
- 품질인증 절차: HACCP, ISO 9000, Quality manual(자재관리, 공정관리, 제품관리, 위생절차, 병해충관리, 설비관리, 교정 및 서류관리) 만족해야 함.
- 검사빈도는 회사등급 따라 A, B, C, D 등급으로 나누고 HACCP 위험정도 따라 Low, Medium, High로 나누어 설정함.

표 1. 검사주기

Risk Category	Establish rating			
	A	B	C	D
Low	1년	6개월	4개월	2개월
Medium	5개월	3개월	6주	1개월
High	4개월	2개월	1개월	2주

* A, B, C등급: 수출가능, D등급: 검사후 수출, E등급: 수출금지

- HACCP는 1년에 3회 검사하며, 공장에서 문제점의 심각정도에 따라서 당일 또는 4개월간의 시간 여유를 주고 개선시킴.
- 호주에서는 유가공공장의 70%가 HACCP을 적용하고 있음.
- AQIS와 낙농공사 공동 현장조사하고 문제시 농무성과 협조함.
- 낙농가의 가축위생은 농무성 관련업무임.
- 세균과 항균제는 주 1회, 농약과 Iodine은 1년 1회, 빙점검사는 2주 1회 검사하며, 잔류물질은 허용치의 1/3이상 초과시 자주검사. 이때 AQIS, ISO 등의 rule에 따라 실시함.

Method Detection at "Safe" Levels

<u>Agri-Screen</u>	None.
<u>BR Test</u>	Penicillin. Cephapirin. Ceftiofur. Ampicillin. Amoxicillin. Tylosin.
<u>Charm II</u>	Penicillin. Cephapirin. Ceftiofur. Ampicillin. Amoxicillin. Tetracycline. Chlortetracycline. Oxytetracycline. Erythromycin. Sulfamethazine. Sulfadimethoxine. Sulfamerazine. Sulfadiazole. Novomycin. Gentamycin. Streptomycin. Spectinomycin (30).
<u>Charm cowside</u>	Penicillin. Cephapirin. Ceftiofur. Ampicillin. Amoxicillin. Sulfamethazine. Sulfadimethoxine. Sulfamerazine. Sulfadiazine
<u>Charm Farm</u>	Penicillin. Cephapirin. Ceftiofur. Ampicillin. Amoxicillin. Tylosin. Sulfadimethoxine. Sulfadiazine. Neomycin.
<u>CITE</u>	Penicillin. Cephapirin. Ceftiofur. Ampicillin. Amoxicillin. Tetracycline. Chlortetracycline. Oxytetracycline. Erythromycin. Sulfamethazine. Sulfadimethoxine. Sulfathiazole. Gentamicin.
<u>Delvotest P/SP</u>	Penicillin/Penicillin. Cephapirin/Cephapirin. Ceftiofur/Ceftiofur. Ampicillin/Ampicillin. Amoxicillin/Amoxicillin. Neomycin/
<u>Disc Assay</u>	Penicillin. Cephapirin. Ceftiofur. Ampicillin.
<u>EZ-Screen</u>	Sulfamethazine. Sulfadimethoxine.
<u>Penzyme</u>	Penicillin. Cephapirin. Ceftiofur. Ampicillin. Amoxicillin.
<u>Penzyme III</u>	Penicillin. Cephapirin. Ceftiofur. Ampicillin. Amoxicillin.
<u>LacTek</u>	Penicillin. Cephapirin. Ceftiofur. Ampicillin. Amoxicillin. Sulfamethazine. Gentamicin.
<u>Signal</u>	Sulfamethazine. Gentamicin. Neomycin.

검사방법별 항균물질 최소검출한계 (제시수준) (단위 : ppb)

Residue	Safe / Tolerance	Agri-screen	EZ-Screen	BR-Test	Charm II	Charm Cowside	Charm Farm	CITE	Delvotest P	Delvotest SP	Disc Assay	LacTek	Penzyme	Penzyme III	Signal
Penicillin	10/0			1.5	2	4.8	3	5	2	2	4.8	5	4		
Cephapirin	20/0				3		15	8	8	8	8				
Cloxacillin	10/0				12		40	80	20	20	50				
Ceftiofur	1000/0				12		15		50	50	75				
Ampicillin	10/0				3		5	8	4	4	10				
Amoxicillin	10/0							10	3	3	8				
Tetracycline	80/0			250	1.2		50	20	200	200	980				
Chlor tetracycline	30/0				3		150	40	500	500	1,000				
Oxy tetracycline	30/				30		80	40	200	200	1,000				
Erythromycin	50/0			50	20		200		400	400	2,000				
Tylosin	/50				10		50		100	100	1,000				
Sulfa methazine	10/	10	10	100	5	10	15	5	50,000	500	> 1,000	10			10
Sulfa dimethoxine	10/10		10		2		10	5	50,000	100	> 1,000				
Sulfa merazine	10/				4		15		50,000		> 1,000				
Sulfathiazole	10/				2		10	5	50,000	100	> 1,000				
Sulfadiazine	10/				1		10		50,000	250	> 1,000				
Novobiocin	/100				30		750		500	500	1,000				
Polymixin B	/														
Gentamycin	30/		100	500	20			30	250	250	460	10			10
Neomycin	150/								1,000	1,000	800				10
Streptomycin	125/				2.5		800		4,000	4,000	1,000				
Spectinomycin	/				20		1,500				1,000				

산류항균물질 검출한계¹

	DRUG					
	Amoxillin	Ampicillin	Ceftiofur	Cephaprin	Cloxacillin	Penicillin
Tolerance or Safe Level	10ppb	10ppb	50ppb ²	20ppb	10ppb	5ppb
SCREENING TEST						
Charm II tablet Competitive Assay	10	9	25	4.5	/~70	4.8
Charm Farm Test	10	10	25	20	/40	5
Charm II Tablet Segquential Assay	10	8	23	4.5	/~50	4.8
Charm II Tablet Transit Test	10	9	13	4.5	/~80	4.8
Carm Rapid Inhibition Test	4.5	4.5	50	16	/~25	3
CharmI/Cowside II Tablet	10	10	~40	8	/~50	4.8
Charm II Tablet Quantitative Assay*	1.4	1.5	2	1	10	1
Charm <i>B.stearothermophilus</i> Tablet Disk Assay*	10	6.5	/~75	11	/~48	4.8
Cite Probe Beta Lactam Test*	/12	/12	50 ³	8	/~100	5
Delvo Test P*	8	10	~50	8	/~30	3
Delvo-X-Press	10	10	10	10	/50	5
LacTek B-L	10	8	ND	~16	8	5
LacTek CEF	ND	ND	50	ND	ND	ND
Penzyme III Test	8	10	/80	8	/~80	5
Penzyme milk Test	8	10	/~95	8	/80	5
Sanp Test	10	10	50 ⁴	8	/~50	5

Penicillin Detection*

Methods		ppb					MLD ^b
		Claimed MLD	0	2.5	5	10	
BR Test		1.5	0 ^a	0	4	15	≤10
Charm II		2	0	15	15	15	≤2.5
Charm Cowside		4.8	0	8	15	15	≤5
Charm Farm		3	0	15	15	15	≤2.5
CITE	Visual	5	0	1	13	15	≤5
	Instrument ⁺		0	0	11	15	≤10
Delvotest p		2	0	15	15	15	≤2.5
Delvotest SP		2	0	11	15	15	≤5
Disc Assay ^c		4.8	0	0(1) ^d	13(2)	15	≤5
LacTek		5	0	6	15	15	≤5
Penzyme		4	0	1	11	15	≤10
Penzyme III			0	12	15	15	≤5

* "Safe" level of 10 ppb.

^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm. ^d Zones ≥ 14mm but 16mm.

⁺ Reader result from pre-release instrument prototype

Cephapirin Detection*

Methods		ppb						MLD ^b
		Claimed MLD	0	5	10	20	50	
BR Test			0 ^a	0	15	15	15	≤10
Charm II		3	0	15	15	15	15	≤5
Charm Cowside			0	15	15	15	15	≤5
Charm Farm		15	0	0	4	15	15	≤20
CITE	Visual	8	0	13	15	15	15	≤5
	Instrument		0	11	15	15	15	≤10
Delvotest P		8	0	0	15	15	15	≤10
Delvotest SP		8	0	15	15	15	15	≤5
Disc Assay ^c		8	0	0(3) ^d	15	15	15	≤10
LacTek			0	6	15	15	15	≤10
Penzyme			0	12	15	15	15	≤10
Penzyme III			0	14	15	15	15	≤5

* "Safe" level of 20 ppb.

^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

^d Zones ≥ 14mm but ≤16mm.

Cloxacillin Detection*

Methods		ppb							MLD ^b
		Claimed MLD	0	5	10	20	50	100	
BR Test			0 ^a	0	0	0	7	15	≤100
Charm II		12	0	2	5	15	15	15	≤20
Charm Cowside			0	0	1	1	15	15	≤50
Charm Farm		40	0	0	1	3	15	15	≤50
CITE	Visual	80	0	1	0	0	3	15	≤100
	Instrument		0	1	0	0	1	15	≤100
Delvotest P		20	0	0	0	0	15	15	≤50
Delvotest SP		20	0	0	0	0	15	15	≤50
Disc Assay ^c		50	0	0	0	0	13(2) ^d	15	≤50
LacTek			0	8	14	15	15	15	≤10
Penzyme			0	1	2	8	15	15	≤50
Penzyme III			0	0	0	13	15	15	≤20

* "Safe" level of 10 ppb.

^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

^d Zones ≥ 14mm but ≤16mm.

Ceftiofur Detection*

Methods		ppb							MLD ^b
		Claimed MLD	0	5	10	20	50	100	
BR Test			0 ^a	0	0	0	7	15	≤100
Charm II		12	0	15	15	15	15	15	≤5
Charm Cowside			0	12	15	15	15	15	≤10
Charm Farm		15	0	1	5	11	15	15	≤50
CITE	Visual		0	0	14	15	15	15	≤10
	Instrument		0	0	12	15	15	15	≤20
Delvotest P		50	0	0	0	0	15	15	≤50
Delvotest SP		50	0	0	0	0	12	15	≤100
Disc Assay ^c		75	0	0	0	0	0	15	≤100
LacTek			0	0	2	0	1	0	> 100
Penzyme			0	0	1	6	14	15	≤50
Penzyme III			0	0	0	0	15	15	≤50

* "Safe" level of 1,000 ppb.

^a# Number out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

Ampicillin Detection*

Methods		ppb					MLD ^b
		Claimed MLD	0	5	10	50	
BR Test			0 ^a	5	15	15	≤10
Charm II		3	0	15	15	15	≤5
Charm Cowside			0	8	15	15	≤10
Charm Farm		5	0	15	15	15	≤5
CITE	Visual	8	0	0	15	15	≤10
	Instrument		0	0	15	15	≤10
Delvotest P		4	0	0	15	15	≤10
Delvotest SP		4	0	0	15	15	≤10
Disc Assay ^c		10	0	0	15	15	≤10
LacTek			0	12	15	15	≤10
Penzyme			0	5	14	15	≤10
Penzyme III			0	5	15	15	≤10

* "Safe" level of 10 ppb.

^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

Amoxicillin Detection*

Methods		ppb					MLD ^b
		Claimed MLD	0	5	10	50	
BR Test			0 ^a	15	15	15	≤5
Charm II			0	15	15	15	≤5
Charm Cowside			0	5	15	15	≤10
Charm Farm			0	15	15	15	≤5
CITE	Visual	10	0	8	15	15	≤10
	Instrument		0	5	15	15	≤10
Delvotest P		3	0	2	15	15	≤10
Delvotest SP		3	0	9	15	15	≤10
Disc Assay ^c		8	0	0(7) ^d	10(5)	15	≤50
LacTek			0	14	15	15	≤5
Penzyme			0	13	15	15	≤5
Penzyme III			0	15	15	15	≤5

* "Safe" level of 10 ppb.

^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

^d Zones ≥ 14mm but ≤16mm.

Tetracycline Detection*

Methods		ppb							MLD ^b
		Claimed MLD	0	5	30	80	250	1,000	
BR Test		250	0 ^a	0	0	0	2	13	≤1,000
Charm II		1.2	0	15	15	15	15	15	≤5
Charm Farm ⁺		50	0	0	6	15	15	15	≤50
CITE	Visual	20	0	0	15	15	15	15	≤30
	Instrument		0	0	15	15	15	15	≤30
Delvotest P [@]		200	0	0	0	0	5	15	≤420
Delvotest SP		200	0	0	0	0	0	0	> 1,000
Disc Assay ^c		980	0	0	0	0	0(2) ^d	11(4)	> 1,000

* "Safe" level of 80 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

^d Zones ≥ 14mm but ≤16mm. ⁺15 at 50 ppb. [@] 15 at 420 ppb

Chlortetracycline Detection*

Methods		ppb							MLD ^b
		Claimed MLD	0	5	30	80	250	1,000	
BR Test			0 ^a	0	0	0	0	0	> 1,000
Charm II		3	0	15	15	15	15	15	≤5
Charm Farm [†]		150	0	0	5	12	15	15	≤150
CITE	Visual	40	0	0	15	15	15	13	≤30
	Instrument		0	0	15	15	15	15	≤30
Delvotest P [@]		500	0	0	0	0	0	15	≤420
Delvotest SP		500	0	0	0	0	0	0	> 1,000
Disc Assay ^c		1,000	0	0	0	0	0	5(7) ^d	> 1,000

* "Safe" level of 30 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

^d Zones ≥ 14mm but ≤16mm. [†]15 at 150 ppb. [@] 15 at 420 ppb

Oxytetracycline Detection*

Methods		ppb						MLD ^b
		Claimed MLD	0	30	80	250	1,000	
BR Test				0	1	3	15	≤1,000
Charm II		30	0 ^a	15	15	15	15	≤30
Charm Farm		80	0	0	15	15	15	≤80
CITE	Visual	40	0	13	15	15	15	≤30
	Instrument		0	15	15	15	15	≤30
Delvotest P ⁺		200	0	0	0	5	15	≤200
Delvotest SP		200	0	0	0	0	0	≤1,000
Disc Assay ^c		1,000	0	0	0	0(3) ^d	14(1)	≤1,000

* "Safe" level of 30 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

^d Zones ≥ 14mm but 16mm. ⁺15 at 50 ppb.

Erythromycin Detection*

Methods	ppb					
	Claimed MLD	0	50	100	1,000	MLD ^p
BR Test	50	0 ^a	3	8	15	≤1,000
Charm II	20	0	13	15	15	≤50
Charm Farm	200	0	0	0	15	≤1,000
Delvotest P ⁺	400	0	0	0	15	≤400
Delvotest SP ⁺	400	0	0	0	15	≤400
Disc Assay ^c	1,000	0	0	0	15	≤1,000

* "Safe" level of 50 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15.

^c Zones ≥ 16mm. ⁺15 at 50 ppb.

Tylosin Detection*

Methods	ppb					
	Claimed MLD	0	50	100	1,000	MLD ^b
BR Test		0 ^a	15	15	15	≤50
Charm II ⁺	10	0	0	0	15	≤150
Charm Farm	50	0	13	15	15	≤50
Delvotest p	100	0	1	15	15	≤100
Delvotest SP	100	0	0	15	15	≤100
Disc Assay ^c	1,000	0	0	0(6) ^d	15	≤1,000

* "Safe" level of 50 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

^d Zones ≥ 14mm but 16mm. ⁺15 at 150 ppb.

Novobiocin Detection*

Methods	ppb						
	Claimed MLD	0	10	100	500	1,000	MLD ^b
BR Test		0 ^a	0	0	0		> 1,000
Charm II	30	0	0	15	0	15	≤100
Charm Farm [†]	750	0	0	0	0	15	≤750
Delvotest p	500	0	0	0	10	15	≤1,000
Delvotest SP	500	0	0	0	0	0	> 1,000
Disc Assay ^c	1,000	0	0	0	0	0(1) ^d	> 1,000

* "Safe" level of 100 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15.

^c Zones ≥ 16mm. [†]15 at 750 ppb.

Polymixin B Detection *

Methods	ppb					
	Claimed MLD	0	10	100	1,000	MLD ^b
BR Test		0 ^a	0	0	0	> 1,000
Charm Farm		0	0	0	0	> 1,000
Delvotest p		0	0	0	0	> 1,000
Delvotest SP		0	0	0	0	> 1,000
Disc Assay ^c		0	0	0	0	> 1,000

* "Safe" level of 30 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

Sulfamethazine Detection*

Methods		ppb						
		Claimed MLD	0	5	10	100	1,000	MLD ^b
Agri	Screen ^b							
	Visual	10	0 ^a	0	0	15	15	≤100
	Instrument		0	0	0	15	15	≤100
BR Test		100	0	0	0	12	15	≤1,000
Charm II		5	2 ⁺	14	15	15	15	≤5
Charm Cowside		10	0	4	14	15	15	≤10
Charm Farm [@]		15	0	1	10	15	15	≤20
CITE	dimethoxine		0	0	0	0	0	> 1,000
	thiazol		0	0	0	0	0	> 1,000
	methazine	5	0	15	15	15	15	≤5
Delvotest P		50,000	0	0	0	0	0	> 1,000
Delvotest SP		500	0	0	0	3	15	≤1,000
Disc Assay ^c		> 1,000	0	0	0	0	0	> 1,000
EZ	Screen							
	methazine	10	0	7	15	15	15	≤10
	dimethoxine		0	0	0	0	0	> 1,000
LacTek		10	0	5	15	15	15	≤10
Signal		10	0	12	15	15	15	≤10

* "Safe" level of 10 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

⁺ pellet loss. @ 14 at 20 ppb. \$ 0 at 15 ppb and 9 at 25 ppb

Sulfamerazine Detection *

Methods		ppb						
		Claimed MLD	0	5	10	100	1,000	MLD ^b
Agri	Screen							
	Visual		0 ^a	0	0	0	15	≤1,000
	Instrument		0	0	0	0	15	≤1,000
BR Test			0	0	0	6	15	≤1,000
Charm II		4	2 ⁺	15	15	15	15	≤5
Charm Cowside			0	15	15	15	15	≤5
Charm Farm		15	0	1	3	15	15	≤100
CITE	dimethoxine		0	0	0	0	0	> 1,000
	thiazol		0	0	0	0	0	> 1,000
	methazine		0	0	0	13	15	≤100
Delvotest P			0	0	0	3	5	> 1,000
Delvotest SP			0	0	0	0	15	≤1,000
Disc Assay ^c		> 1,000	0	0	0	0	0	> 1,000
EZ	Screen							
	methazine		1	0	6	15	15	≤100
	dimethoxine		0	0	0	0	5	> 1,000
LacTek			1	5	8	15	15	≤100
Signal			0	0	0	0	0	> 1,000

* "Safe" level of 10 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15.

^c Zones ≥ 16mm. ⁺pellet loss.

Sulfathiazole Detection*

Methods		ppb						
		Claimed MLD	0	5	10	100	1,000	MLD ^p
Agri	Screen							
	Visual		0 ^a	0	0	0	0	> 1,000
	Instrument		0	0	0	0	0	> 1,000
BR Test			0	0	0	10	15	≤1,000
Charm II		2	0	15	15	15	15	≤5
Charm Cowside			0	12	12	15	15	≤100
Charm Farm		10	0	0	12	15	15	≤100
CITE	dimethoxine		0	0	0	0	0	> 1,000
	thiazol	5	0	3	15	15	15	≤10
	methazine		0	0	0	0	0	> 1,000
Delvotest P		50,000	0	0	0	0	0	> 1,000
Delvotest SP		100	0	0	0	0	15	≤1,000
Disc Assay ^c		> 1,000	0	0	0	0	0	> 1,000
EZ	Screen							
	methazine		0	0	0	0	0	> 1,000
	dimethoxine		0	0	0	0	0	> 1,000
LacTek			0	0	0	1	2	> 1,000
Signal			0	0	0	0	0	> 1,000

* "Safe" level of 10 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

Sulfadiazine Detection*

Methods		ppb						
		Claimed MLD	0	5	10	100	1,000	MLD ^b
Agri	Screen							
	Visual		0 ^a	0	0	0	0	> 1,000
	Instrument		0	0	0	0	0	> 1,000
BR Test			0	0	0	10	15	≤1,000
Charm II		1	2 ⁺	15	15	15	15	≤5
Charm Cowside			0	15	14	15	15	≤5
Charm Farm		10	0	10	14	15	15	≤10
CITE	dimethoxine		0	0	0	0	0	> 1,000
	thiazol		0	0	0	0	0	> 1,000
	methazine		0	0	0	3	15	≤ 1,000
Delvotest P		50,000	0	0	0	0	5	> 1,000
Delvotest SP [®]		250	0	1	1	7	15	≤250
Disc Assay ^c		> 1,000	0	0	0	0	0	> 1,000
EZ	Screen							
	methazine		0	0	0	0	0	> 1,000
	dimethoxine		0	0	0	0	0	> 1,000
LacTek			1	1	2	7	11	> 1,000
Signal			0	0	0	0	0	> 1,000

* "Safe" level of 10 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

⁺pellet loss. @ 15 at 250 ppb.

Sulfadimethoxine Detection*

Methods		ppb						
		Claimed MLD	0	5	10	100	1,000	MLD ^b
Agri	Screen							
	Visual		0 ^a	0	0	0	5	≤1,000
	instrument		0	0	0	0	3	≤ 1,000
BR Test			0	0	1	13	15	≤100
Charm II		2	1 ⁺	15	15	15	15	≤5
Charm Cowside			0	11	15	15	15	≤10
Charm Farm		10	0	3	14	15	15	≤10
CITE	dimethoxine	5	0	11	15	15	15	≤10
	thiazol		0	0	0	0	0	> 1,000
	methazine		0	0	0	5	10	> 1,000
Delvotest P		50,000	0	0	0	0	2	> 1,000
Delvotest SP		100	0	0	0	3	15	≤1,000
Disc Assay ^c		> 1,000	0	0	0	0	0	> 1,000
EZ	Screen							
	methazine		2	0	4	3	15	≤ 1,000
	dimethoxine	10	0	15	15	13	15	≤5
LacTek			0	0	4	13	15	≤100
Signal			0	0	0	0	0	> 1,000

* "Safe" level of 10 ppb. ^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

⁺ pellet loss.

Gentamycin Detection*

Methods		ppb						MLD ^b
		Claimed MLD	0	10	30	150	500	
BR Test		500	0 ^a	0	1	1	6	> 500
Charm II		20	0	4	15	15	15	≤30
Charm Farm			0	0	0	13	15	≤150
CITE	Visual	30	0	3	15	15	15	≤30
	Instrument		0	3	13	15	15	≤30
Delvotest P		250	0	0	2	13	15	≤150
Delvotest SP ⁺		250	0	0	0	0	15	≤250
Disc ssay ^c		460	0	0	0	0	13(2) ^d	≤500
EZ-Screen ^e		100						
LacTek		10	0	3	15	15	15	≤30
Signal		10	0	0	15	15	15	≤30

* "Safe" level of 30 ppb.

^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

^d Zones ≥ 14mm but 16mm.

^e Kits not available at time of analysis. ⁺ 15 at 250 ppb

Neomycin Detection*

Methods		ppb						MLD ^b
		Claimed MLD	0	10	30	150	500	
BR Test			0 ^a	0	1	1	6	> 500
Charm II			0	0	0	2	2	> 500
Charm Farm			0	0	0	15	15	≤150
CITE	Visual		0	0	0	0	0	> 500
	Instrument		0	0	0	0	0	> 500
Delvotest P		1,000	0	0	0	15	15	≤150
Delvotest SP		1,000	0	0	0	6	15	≤500
Disc ssay ^c		800	0	0	0	0	0	> 500
LacTek			0	0	0	0	0	> 500
Signal		10	0	15	15	15	15	≤10

* "Safe" level of 150 ppb.

^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

Streptomycin Detection*

Methods		ppb							MLD ^b
		Claimed MLD	0	10	30	150	500	1,000	
BR Test		400	0 ^a	0	0	0	0	0	> 1,000
Charm II		2.5	0	15	15	15	15	15	≤10
Charm Farm			1	0	0	2	7	10	> 1,000
CITE	Visual		0	0	0	0	0	0	> 1,000
	Instrument		0	0	0	0	0	0	> 1,000
Delvotest P		4,000	0	0	0	0	0	0	> 1,000
Delvotest SP		4,000	0	0	0	6	0	0	> 1,000
Disc ssay ^c		1,000	0	0	0	0	0	0	> 1,000
LacTek			0	0	0	0	1	0	> 1,000

* "Safe" level of 125 ppb.

^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.

Spectinomycin Detection*

Methods		ppb							MLD ^b
		Claimed MLD	0	10	30	150	500	1,000	
BR Test			0 ^a	0	0	0	0	0	> 1,000
Charm II		20	0	5	15	15	15	15	≤30
Charm Farm		1,500	0	0	0	0	3	4	> 1,000
CITE	Visual		0	0	0	0	0	0	> 1,000
	Instrument		0	0	0	0	0	0	> 1,000
Delvotest P			0	0	0	0	0	0	> 1,000
Delvotest SP			0	0	0	0	0	0	> 1,000
Disc ssay ^c		1,000	0	0	0	0	0	0	> 1,000
LacTek			0	0	0	0	0	0	> 1,000

* "Safe" level of

^a# out of 15. ^b≥13 out of 15. ^c Zones ≥ 16mm.