J. Fd Hyg. Safety 11(2), 129 - 134(1996)

우유중 잔류 항생물질 분석방법에 관한 비교연구

백선영† · 김형일 · 박건상 · 김소희 · 권경란
국립보건원, 위생부, 식품미생물과

A Comparative Study of the Detectable Methods of Residual Antibiotics in Milk

Sun Young Baek†, Hyung Il Kim, Kun Sang Park, So Hee Kim, Kyung Ran Kwon
Division of Food Microbiology, Dept. of Hygiene, National Institude of Health, 5 Nokbundong, Eunpyungku, Seoul

ABSTRACT — Recently, as concern about the residual antibiotics in milk increase, the detection methods of residual antibiotics used extensevely at the present time were investigated and compared to their properties and the detection limits of variable antibiotics. At first, comparative tests of the detectable sensitivity of 4 test organisms, *B.cereus, B.subtilis, M.luteus, B. stearothermophilus* C-953, were performed by disc assay. As a result, *B.stearothermophilus* was the most sensitive strain of all other strains and showed the detect limit of 5-50 ppb for penicillins (PCs). And also, *B.subtilis* was showed the more effective detection limit, 200-400 ppb, for aminoglycosides (AGs) and *M.luteus* was showed predominant sensitivity , 50-500 ppb for macrolides(MLs) and *B.cereus* was the most sensitive strain for tetracyclines (TCs) and showed the detection limit of 100-400 ppb. Therefore, each test strains were showed a different sensitivity in the detection of the different antibiotic families. When the detection limit of disc assay and other methods were compared, TTCmethod was less sensitive than other methods showing 5-50 ppb detectable lebel for PCs. Also, for the detection of other antibiotic families TTC method was showed the worst sensitivity and Delvo and Charm Farm tests were similar to the detectable properties of AGs and MLs. Although disc assay was showed the similar detection limit for PCs with Delvo and Charm Farm, it was more widely effective for the detection of kanamycin, erythromycin, chlortetracycline, doxycycline, verginiamycin and so on than Delvo or Charm Farm. CharmII test was showed the best sensitivity for the most of antibiotics except neomycin and gentamycin. But it was necessary that different tests must be performed to each antibiotic family and so it was regarded that the effectiveness of that method was low.

Key word □ Residual antibiotics, Disc assay, TTC, Delvo, Charm Farm, Charm II

최근 경제성장에 따른 수입증대와 수입자유화에 따라 식생활에도 많은 변화가 생겨 점차 축 · 수산식품이 차지하는 비율이 뚜렷이 증가하고 있는 추세이다. 이에 따라 소비자는 양보다는 질적으로 다양하고 안전한 식품을 요구하게 되었으며, 소비량의 많은 부분을 외국으로 부터 수입에 의존하는 국내 여건으로도 이러한 축수산 식품에 대한 안정성 확보가 절실히 요구되고 있는 실정이다. 가축이나 양식어등에 동물약품으로 사용되는 항생물질은 가축의 질병예방과 치료를 위하여 경구투여제, 또는 주사제의 형태로 사용되거나 또는 발육촉진을 목적으로 사료첨가제로서 2~3개월간 장기적으로 사용되어질 수 있다.[1] 이러한 약품의 사용은 오늘날과 같은 집단사육의 형태에서는 피할 수 없는 형편이지만, 가축이나 양식어에 사용되어진 약품이 식품으로 이행되어 심각한 잔류문제를 야기할 수 있으므로 사용자는 용법, 용량, 휴약기간을 철저히 준수하여 식품 중의 잔류를 방지하기 위하여 노력을 기울여야한다. 축 · 수산 식품중의 잔류문제는 비단 국내뿐만 아니라 세계적인 관심의 대상으로서 FAO/WHO합동 식품 공전위원회는 식품중 동물약품 잔류분과위원회(Codex committee on residue of veterinary drug in food, CCRVDF)를 구성하고 축산물 중의 잔류 동물약품을 규제하기 위하여 1986년부터 미국에서 매년 회의가 개최되고 있다. 국내에서는 현재 식품공전의 공통 기준 및 규

† Author to whom correspondence should be addressed.

격에 "식품은 항생물질, 합성항균제 및 홀몬제를 함유해서는 아니된다."라고 규정하고 있으며, 다만 소,돼지,닭 등의 근육부위에 대하여 18종의 항생물질에 대한 허용기준이 설정되어 있다. 그러나 아직 우유에 대하여는 허용기준이나 실험방법이 설정되어 있지 않은 실정이다. 우유의 잔류 항생물질에 관한 시험방법으로는 현재 농림수산부의 원유중 항생물질 검사방법인 TTC시험[2] 을 비롯하여 미생물을 이용한 disc assay, kit로 시판되고 있는 Charm test, Delvo, Lactek, Penzyme test 등 다양하며, 이들 시험법은 시험방법이나 검출되는 약제, 검출감도 등이 매우 상이하다. 그러나 이에 대한 평가나 분석이 전혀 되어 있지 않은 상태에서 유가공 업체나 연구기관에서 사용되어 지고 있는 실정이며, 대부분 외국에서 수입된 고가의 시약이라는 점을 고려 할때 이들에 대한 철저한 평가가 이루어져야 할 것으로 사료된다. 이에 본 실험에서는 현재 잔류 항생물질 검사 방법으로 가장 많이 사용되어지고 있는 미생물 시험법(disc assay)을[3,4,5,6] 중심으로 시험방법의 특성 및 각 시험균에 대한 검출감도를 비교 조사하여 이 실험 방법의 우유중 항생물질 검사 방법으로서의 유효성을 검토하였으며, 기타 다른 시험 방법인 TTC나 Delvo, Charm Farm, Charm II test에 대하여도 각 계열의 항생물질에 대한 검출 감도를 비교,조사 하였다.

재료 및 방법

사용균주

Streptococcus thermophilus, Bacillus cereus var. *mycoides* ATCC 11778, *Bacillus subtilus* ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* C-953을 국립보건원 세균과에서 분양받아 사용하였다.(이하 *S.thermophilus, B.cereus, B.subtilis*, C-953으로 명시하였다.)

배지

Nutrient agar, Antibiotic medium No.2(pH6.5±0.05), Antibiotic medium No.5 (pH 7.9±0.1), Antibiotic medium No. 8 (pH 5.85±0.05)(이하 NA, AM 2, AM 5, AM 8으로 명시하였음), Skim milk powder 등의 합성 배지(Difco Co.)를 구입하여 사용하였다.

시약 및 기구

2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC,sigma), Delvo (sp), Charm Farm, CharmII 시약 kit. paper disc - 직경 10 mm, 두께 1.1 mm, 흡수량 0.068±0.001 m*l*(Toyo Co.Japan) petridish - 95×20 mm

항생물질표준품

Oxytetracycline(OTC), Chlortetracycline(CTC), Doxytetracycline(DC), Tetracycline(TC), Spiramycin(SP), Oleandomycin(OM), Erythromycin(EM), Tylosin(TS), Penicillin G(PCG), Ampicillin(ABPC), Cloxacillin(CLX), Streptomycin(SM), Neomycin(NM), Kanamycin(KM), Gentamycin(GM), Bacitracin(BC), Verginiamycin(VGM), Chloramphenicol(CP), Novobiocin(NB) 등 총 19개의 항생제를 Sigma사 또는 USP제품을 사용하였다.

Disc assay용 시험평판제조

*B.cereus, B.subtilis, B.stearothermophilus*는 포자액을 만들어[7] 적당히 희석하여 사용하였으며, *M.luteus*는 시험용 평판 제조 전일에 NA에 계대배양한 후 식염수에 균을 부유시켜 시험용 균액으로 사용하였다. 희석된 시험용 균액을 멸균후 50°C정도로 식힌 항생물질 검사용 배지 100 m*l*당 1 m*l*씩 접종한 뒤 혼합하여 petridish에 8 m*l*씩 분주하여 굳힌것을 시험용 평판으로 사용하였다.

각 시험방법의 검출감도 비교시험

배지용으로 시판되고 있는 skim milk powder를 10배 희석하여 음성대조액으로 사용하였으며 그 액에 각 항생물질을 농도별로 희석하여 검액을 만든 후 각 시험방법에 따라 시험하였다.(Fig.1)

결과 및 고찰

미생물 시험법 (disc assay)

현재 미국,일본등에서 우유중 잔류 항생물질 검사에 관한 공정시험법[8,9]으로 널리 사용되어지는 방법으로서, 항생물질의 존재시 시험균의 생육을 억제하여 억제대(inhibition zone)를 형성하는 원리를 이용한 방법이다. 그러므로 이론적으로 시험균을 다양하게 사용할 수록 광범위한 종류의 항생물질에 대해 검출감도가 높아질 수 있다. 따라서, 본 실험에서는 기존의 시험법에서 주로 사용되어지고 있는 *B. stearothermophilus*에 *B.cereus, B.subtilis, M.luteus* 3개의 균을 포함시켜 각 균의 검출감도를 비교하였으며(Table 1) 배지의 두께, 균의 농도가 검출감도에 미치는 영향을 조사하였다. 그 결과 본 실험은 TTC나 Delvo등과 같이 1개 균을 이용한 시험방법에 비하여 다양한 계열의 항생물질에 검출감도가 비교적 좋았으며(Table 2) 균에 따라 각 항생물질에 대한 감수성이 다르므로 검사 결과 양성시 그 계열 및 함유량의 추정이 어느정도 가능하고 시험비용이 매우 저렴한 장점이 있다. 그러나, 사용한 균의 농도, 배지의 두께 ,

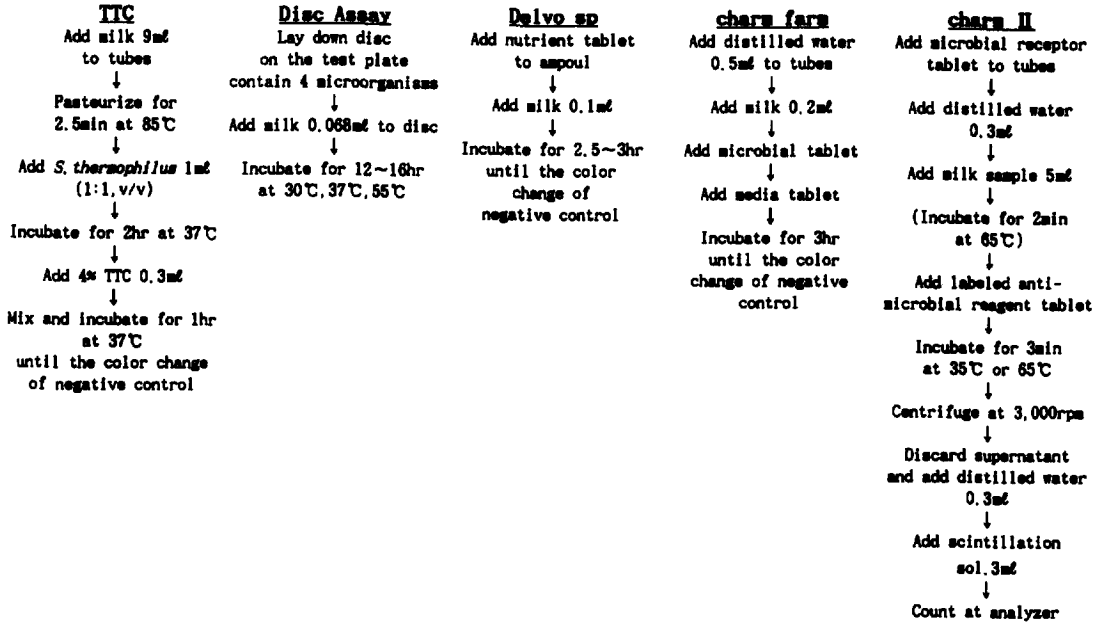

Fig. 1. Schematic procedure of various methods

Table 1. Comparison of minimum detectable lebels(MDL) of antibiotics according to the test organisms in disc assay

Antibiotics		Detectable levels(ppb)			
		B.cereus	*B.subtilis*	*M.luteus*	C-953
PCs	PCG	>50	>50	50	5
	ABPC	>50	>50	100	5
	CLX	>100	>100	>100	20
AGs	SM	800	400	>1600	800
	NM	1600	200	>1600	400
	GM	800	200	>1600	400
	KM	1000	400	>1600	800
MLs	EM	>1000	400	50	250
	SP	>1000	>1000	500	250
	OM	>1000	1000	500	>1000
	TS	>1000	1000	250	500
TCs	OTC	400	800	>1000	>1000
	TC	400	800	>1000	>1000
	CTC	100	400	>1000	800
	DC	100	400	>1000	800
Peptides	BC	>2000	>2000	2000	2000
	VGM	>2000	>2000	250	1000
Others	CP	>5000	>5000	5000	>5000
	NB	>1000	>1000	1000	>1000

Table 2. Comparision of minimum detectable level(MDL) of antibiotics according to the various methods in milk

Antibiotics		Detectable levels(ppb)				
		TTC	Delvo(sp)	Charm Farm	Charm II	Disc assay(test arganism)
PCs	PCG	20	5	5	2.5	5(C-953)
	ABPC	20	5	5	5	5
	CLX	>50	30	10	15	20
AGs	SM	>1600	800	400	25	400(*B.subtilis*)
	NM	>1600	400	100	>2000	200
	GM	>1600	400	400	25	200
	KM	>1600	>1600	1600	2000	400
MLs	EM	*ND	100	500	10	50(*M.luteus*)
	SP	ND	2000	2000	50	500
	OM	ND	2000	>2000	500	500
	TS	1000	100	250	100	250
TCs	OTC	600	400	600	25	400(*B.cereus*)
	TC	600	400	200	25	400
	CTC	400	200	400	10	100
	DC	400	200	200	10	100
Peptides	BC	ND	>2000	>2000	ND	2000(*M.luteus*)
	VGM	ND	500	1000	ND	2500
Others	CP	ND	5000	5000	1	5000(*M.luteus*)
	NB	ND	2000	1000	50	>1000

*Not determined

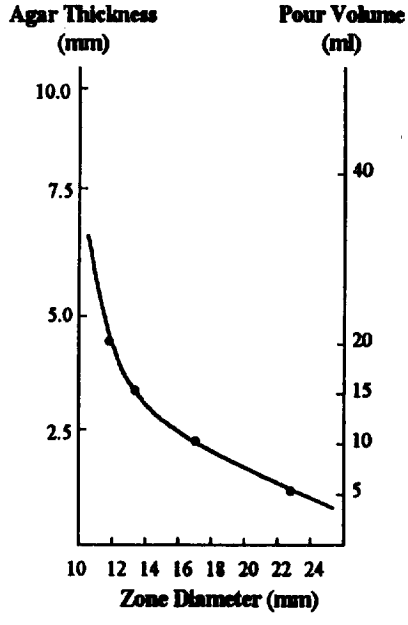

Fig. 2. Dependence of inhibition zone diameter upon pour volume and agar thickness.

배지의 pH등에 의하여 많은 영향을 받으므로 실험자에 따라 검출감도가 크게 차이가 날 수 있으며, 균 배양 시간이 12~18시간이 소요되고 비특이 반응이 나타날 수 있는 단점이 있다.[10,11] 각 균의 항생제에 대한 검출 감도를 보면 Penicillin계열의 경우 C-953 균이 5~50 ppb로 다른 균에 비하여 감도가 월등히 높았으며, Aminoglycoside계의 경우 *B.subtilis*(200~400 ppb)가, Macrolide계의 경우 *M.luteus* (50~500 ppb)가, Tetracycline계의 경우 *B.cereus*(100~400 ppb)가 다른 균에 비하여 높은 감도를 나타내었으며, 그 외 VGM 및 NB에 대하여는 *M.luteus*가 각각 250 ppb, 1000 ppb를 나타내어 다른 시험균에 비하여 비교적 높은 검출감도를 나타내었다. 그러나 BC와 CP에 대하여는 4개의 시험균 모두 검출감도가 2ppm 이상이 되므로 이 시험방법이 검출방법으로 적합하지 않았으며, 이들 물질의 검출을 위하여 더욱 감도가 좋은 새로운 균주의 개발이나 다른 시험방법이 병행되어져야 할 것으로 사료된다. 또한 시험평판 제조시 배지의 양이나 두께의 영향을 조사하여 본 결과(Fig. 2) 배지의 양을 5 m*l*로 하였을때 저지환의 직경이 22 mm이었으나 배지의 양을 20 m*l*로 하였을 때 저지환이 거의 보이지 않아 검출 감도는 시험용 배지의 양이 적을 수록, 평판의

두께가 얇을 수록 , 균의 농도가 적을 수록 높게 나타남을 알수있다.

TTC 시험방법

현재 원유의 항생물질 검출에 관한 공정 시험방법인 TTC시험법은 *S.thermophilus* 1개의 균을 이용하여 검체중 항생물질의 존재 유 · 무에 따라 균이 성장에 영향을 받아 지표시약(indicator)인 TTC의 환원여부에 따라 우유의 색이 바뀌는 색소환원법으로, 시험조작이 간단하고(3~4시간 소요) 가격이 저렴한 장점이 있어 원유의 간이시험법으로 많이 사용되고 있으나, 다른 우유 시험방법에 비하여 검출감도가 매우 떨어진다. Penicillin계의 경우 PCG와 ABPC가 약20 ppb정도의 검출감도를 보였으며, CLX는 50ppb이상의 검출감도를 나타내었다. 이러한 감도는 CODEX나 미국, EU 등의 PC, ABPC, CLX 의 허용기준이 4 ppb, 10 ppb, 30 ppb인 것을 감안할 때 감도가 못미치는 것으로 나타났다. 기타 Aminoglycoside계가 1600ppb이상, Tetracycline계가 400 ppb이상으로 검출감도가 매우 낮았으며, 이 실험방법의 특성상 균의 농도 및 상태에 따라 검출감도가 실험시마다 매우 상이하게 나타날 수 있었다.

Delvo(sp) test

이 실험방법은 다양한 항균성 물질에 넓은 감수성을 나타내는 균주로 알려진 *B.stearothermophilus*균을 이용한 색소환원법으로 kit로 시판되고 있으며, 현재 사용되어지고 있는 검사방법중 가장 시험조작이 간단한 장점이 있으며, 검출감도 면에서는 Penicillin계열의 PCG는 5 ppb, ABPC 5 ppb, CLX 30 ppb로 감도가 외국의 허용기준치를 만족할 만 하였으며, Aminoglycoside계에서는 NM, GM이 400 ppb, SM은 800 ppb이었으며 KM은 1600 ppb 이상의 검출감도를 나타내 감도가 낮은 편이었다. Macrolide계의 EM과 TS는 100 ppb로 감도가 비교적 우수하였으나, SP와 OM은 2000 ppb로 감도가 떨어졌다. Tetracycline계는 200~400 ppb로 Codex의 OTC 적용기준인 100 ppb에 못미치는 검출감도를 보였다. 기타 국내의 동물의약품으로 많이 사용되고 있는 BC, VGM 등은 500~2000 ppb이상으로 감도가 매우 낮았다.

Charm Farm test

이 시험방법 역시 Delvo test와 마찬가지로 *B.stearothermophilus*를 사용하여 균의 성장 유무에 따라 색소(indicator)가 발색되는 색소환원법을 이용한 방법으로 kit화 되어 시험조작이 매우 간편한 장점이 있다.(약 3시간 소요). 검출감도는 Penicillin계의 PCG, ABPC, CLX에 대하여 각각 5, 5, 10 ppb의 검출감도를 나타내 외국의 허용기준에 모두 만족되었고, Aminoglycoside계의 경우 NM은 100 ppb로 다른 시험 방법에 비하여 검출감도가 좋았으며, SM과 GM은 400 ppb, KM은 1600 ppb로 *B.subtilis*를 이용한 disc assay에 비하여 감도가 낮았다. Macrolide, Tetracycline계열의 항생물질의 검출감도는 각각 250~2000 ppb이상, 200~600 ppb로 나타나 Delvo test와 유사한 검출감도를, disc assay에 비하여는 낮은 검출감도를 나타내었다.

Charm II test

이 실험 방법은 각 계열의 항생물질에 대한 미생물 수용체(microbial receptor)에 대하여 검체 중의 항생물질과 시약으로서의 동위원소 부착 항생물질(antibiotic tracer reagent)을 경쟁적으로 반응시켜 tracer의 부착 정도를 scintillation counter로 판독하는 방법이다. 이 방법은 각 계열마다 시약과 시험방법이 달라 미지의 항생물질을 검출하기 위해서는 전 계열의 시험을 실시해야 하므로 시간과 경비의 소요가 많아 screening test로는 어려운 점이 있다.그러나 검출감도 면에 있어서는 Penicillin계 2.5~15 ppb, Tetracycline계 10~25 ppb, EM 10 ppb, SP 50 ppb, TS 100 ppb 및 CP 1 ppb, NB 50 ppb로 다른 시험법에 비해 월등히 높았다 (Table 2). 다만, NM 등 Aminoglycoside계열의 항생물질에 대하여는 검출감도가 떨어졌고, BC나 VGM 등의 검출은 불가능한 단점이 있었다.

이상의 결과를 종합하여 볼때 Penicillin계열의 항생물질에 대하여는 TTC실험이 검출감도 면에서 다소 떨어지나 다른 모든 실험방법의 검출감도는 우수하였다. Aminoglycoside계와 Macrolide, Tetracycline, Polypeptide계의 항생물질에 대해서는 TTC는 검출감도가 현저히 떨어졌고, Charm II test는 월등히 높았으며, Delvo(sp), Charm Farm은 검출감도가 유사한반면, Disc assay는 두 방법에 비하여 약간 높은 검출감도를 나타내었다.그러나 CP와 NB의 검출에 있어서 Charm II를 제외한 모든 시험법에서 검출감도가 매우 떨어졌다.

검출감도 이외의 면에서 볼 때 kit화 된 Delvo나 Charm Farm, Charm II는 시험방법이 매우 간단하고 신속하나 검사비용이 비싼 단점이 있는 반면, 기존의 TTC나 Disc assay등과 같이 미생물을 이용한 시험방법은 균의 배양, 관리 등 시험방법이 번거롭고 실험자에 따른 결과의 차이가 심하며, 식품의 종류에 따라 적용할 수 없는 품목이 많은점 등 단점이 있는 반면, 시험가격이 매우 저렴한 장점이 있다. 그러나, 최근 식품중 오염물질에 대한 관심이 높아지고, 식품의 종류가 다양해지며, 검사건수가 많아짐에 따라 기존의 방법만이 아니라 시험방법이 신속,간단하고 검출감도가 우

수한 kit의 사용은 불가피할 것으로 사료된다.[12,13] 현재 시판 중인 모든 검사용 kit가 고가의 수입품인 점을 고려할 때 이들에 대한 국가기관의 철저한 품질평가와 더불어 사용이 간편하고 신속한 검사방법의 국내개발이 시급하다고 사료된다.

국문요약

최근 우유중 잔류 항생물질에 대한 관심이 높아짐에 따라 현재 사용되어 지고 있는 검사방법들에 대한 특성 및 각 항생물질의 검출감도에 대한 비교조사를 실시하였다. 먼저 *B.cereus, B.subtilis, M.luteus, B. stearothermophilus* 등 4개의 균을 이용한 disc assay 시 각 균의 우유 중 항생물질의 검출감도를 비교하였다. 그 결과 Penicillin계의 항생물질의 경우 *B.stearothermophilus*가 5~50ppb의 검출감도를 보여 다른 3개의 균에 비하여 월등히 높은 감도를 나타내었으며, Aminoglycoside계의 경우 *B.subtilis*가 200~400ppb의 검출감도를, Macrolide계의 경우 *M.luteus*가 50~500ppb, Tetracycline계의 경우 *B.cereus*가 100~400ppb로 다른균에 비하여 높은 검출 감도를 나타내 각 시험균은 항생물질 계열에 따른 많은 감수성의 차이를 나타내었다. Disc assay와 다른 시험방법의 검출감도를 비교하여 보았을때, Penicillin계 항생물질에 대하여는 TTC실험이 감도면에서 약간 떨어졌으나, 다른 모든 실험방법이 5~50ppb정도의 비교적 우수한 검출감도를 보였으며, 기타 다른 계열에 있어서는 TTC는 모든계열에서 가장 낮은 검출감도를 보였고, Delvo와 Charm Farm test는 Aminoglycoside계, Macrolide계 등에 대해 거의 유사한 검출양상을 나타내었다. Disc assay는 Penicillin계에 대하여는 Delvo나 Charm Farm과 유사한 검출감도를 보였으나, KM, EM, CTC, DC, VGM등의 항생제는 Delvo나 Charm Farm보다 높은 검출 감도를 보여 비교적 광범위한 종류의 항생제의 검출이 가능한 것으로 나타났다. Charm II test는 NM과 KM등을 제외한 대부분의 계열에 있어서 다른 시험방법에 비하여 월등히 높은 검출감도를 보였으나, 각 계열마다 별도의 시험을 하여야 하므로 screening test로서의 실효성은 떨어지는 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 畜産生物科學安全研究所 : 動物用醫藥品飼料添加物 畜水産物への殘留とその分析法(1985).
2. 농림수산부 고시 제1993-13호 : 축산물 시험방법(1993)
3. Johnston, R. W., Reaner, R. H., Harris, E. W., Fugate, H. G. and schwab, B. : A new screnning method for the detection of antibiotic residues in meat and poultry tissues. *J. Food Protect,* **44** : 828-831(1981)
4. Brady, M. S. and Katz, S. E. : Simplified plate diffusion for microbial assays of antibiotics. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.,* **70** : 641-646(1987)
5. Kraack, J., and Tolle, A. : Brilliant schwarz-reduck tionstest mit Bac. stearothermophilus var.calidolactis zum Nochweis Von Hemmstoffen in der Milch. *Milchwissenschaft,* **22** : 669-673(1967).
6. Smither, R. : Bacterial inhibitors formed during the adventitious growth of microorganisms in chicken liver and pig kidney. *J. Appl. Microbiol.,* **45** : 267-277(1978).
7. 보건복지부 : 식품공전(1995).
8. U. S. Department of Health and Human Service : Pasteurized milk ordinance(1993).
9. 日本食品衛生協會 : 食品衛生檢查指針(1991)
10. Daris, W. W. and stout, T. R. 1971. Disc plate method of microbiological antibiotics assay, I. Factors influencing variability and error. *Appl. Microbiol.,* **22** : 659-665(1971).
11. Davis, W. W. and stout, T. R. : Disc plate method of microbiological antibiotics assay, II, Novel procedure offering improved accuracy. *Appl. Microbiol.,* **22** : 666-670(1971).
12. Lee, S. M. and Richman, S. : Thoughts on the use of immunoassay techniques for perticide residues analysis. *J. Assoc. Off. Anal.*
13. Charm, S. E. : Microbial receptor assay for rapid detection and identification of seven families of antimicrobial drugs in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.,* **71** : 304-316(1988).