

# 우유의 미생물학적 품질과 2차오염 검출 방법

최 석 호  
상지대학교 응용동물과학부

## I. 서 론

축산물의 가공기준 및 성분규격(국립수의과학검역원)에 의하면 우유의 유통기간이 2002년 7월 1일부터 자유화 되어 유가공장이 자율적으로 유통기간을 결정할 수 있게 되었다. 반면에 소비자를 보호하기 위하여 우유의 세균수와 대장균군수의 한계와 병원균의 검출에 대한 규제는 강화되고 있으며 유가공장은 HACCP를 시행하여야 한다. 저장성이 개선된 우유가 관능적 및 미생물학적 품질이 우수하므로 소비를 증대시킬 수 있으며 또한 유통 중 우유의 부패에 의한 폐기를 방지할 수 있으므로 고품질 우유의 생산은 유가공장에 이익이 될 것이다. 또한 멸균우유의 수입이 자유로워짐에 따라 기존의 우유시장에 중대한 위협이 될 수 있다. 외국산 우유에 경쟁하기 위한 국산 우유의 품질 제고가 더욱 요구된다. 따라서 권장유통기한의 철폐는 유가공장으로 하여금 우유의 생산과 유통에 대한 전략을 새로 세우도록 강요하고 있다. 유가공장은 원유 생산, 우유의 제조와 품질 관리 및 유통환경의 개선에 의해 고품질 우유를 생산함으로써 유통기간을 연장하여야 한다. 또한 적절한 유통기간을 자율적으로 준수하여 열등한 품질의 우유가 소비자에게 도달하는 가능성을 차단하여야 한다. 이에 따라 우유의 미생물학적 품질을 평가하고 저장성을 예측할 필요가 있다.

우유의 품질은 풍미, 미생물학적 품질, 외래물질의 혼입, 영양학적 품질 및 환경오염물질의 유입 등의 요인 등에 의해 영향을 받는다(Harding, 1995). 우유의 품질과 상품성은 궁극적으로 소비자에 의한 평가에 의해 영향을 받는다. 소비자는 우유의 풍미뿐만 아니라 여론과 광고에 의지하여 우유의 영양학적 품질 및 환경오염물질 문제를 판단하고 구입한다. 우유의 풍미와 위생적 품질의 유지와 외래물질의 혼입 방지는 낙농가와 유가공장에서 수행할 수 있으나 환경오염물질의 오염은 전문기관에서 모니터링하는 제도를 도입하여 원유에로의 유입을 차단하여야 한다.

우유는 생산 직후의 세균수와 유통 중에 세균의 증식에 의한 세균수와 대장균군수의 증가 때문에 법적 성분규격에 미달될 수 있다. 또한 우유의 미생물학적 품질에 따라 우유의 풍미와 안전성이 결정된다. 우유의 미생물학적 품질은 원유의 미생물학적 품질, 살균조건, 2차오염, 저장과 유통온도에 의해 영향을 받는다. 이 중에서 2차오염은 우유의 저장성을 제한하는 가장 중요한 요인이다. 우유의 살균 후의 공정에서 일어나는 2차오염을 검출하기 위한 방법들이 개발되고 있으며 일부 국가에서는 사용하고 있다. 2차오염의 발생여부를 신속히 검출하여 우유의 살균 공정의 문제점을 개선함으로써 우유의 유통기간을 연장할 수 있다. 또한 이러한 방법의 결과들로부터 유통기간을 예측할 수 있다.

본 발표는 살균된 우유의 유통기간에 영향을 주는 미생물학적 품질을 결정하는 인자들에 대하여 토론하고 우유의 2차오염을 검출할 수 있는 방법들에 대하여 논하고자 한다.

## II. 우유의 미생물학적 품질

저온살균우유의 섭취로 인한 식중독은 많은 사례가 발표되고 있으나 UHT멸균우유는 없다. Salmonella,

*Campylobacter*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* 및 *Staphylococcus aureus*가 미국과 유럽에 발생한 살균우유 관련 식중독의 원인으로 보고되고 있다. 살균우유에 유입된 경로는 명확히 알려지지 않았지만 2차오염, 부적절한 살균온도와 시간, 오염된 첨가물, 비위생적 포장재에 의해 식중독을 일으켜 공중위생의 위해 요인이 될 수 있다(Vamam과 Sutherland, 1994). 미국 Illinois주에서는 살모넬라 식중독에 의하여 16,000명의 식중독 환자가 감염된바 있다(Phillips와 Griffiths, 1989).

우유의 부패는 두가지 요인에 의해 일어날 수 있다. 첫째로 2차오염에 의해 유입된 세균이고 두 번째로 저온살균에 의해 사멸되지 않는 내열성세균이다. 2차오염에 의해 유입되는 세균들은 살균제에 대해 내성이 있으며 스테인레스 스틸과 합성고무개스킷에 생물학적 박막을 형성하는 세균이다. 우유의 2차오염에 관련된 주된 세균은 *Enterobacter*, *Citrobacter* 및 *Hafnia* 등을 포함한 *Enterobacteriaceae*에 속하는 수인성 세균이다. 그러나 우유는 냉장되어 저장되므로 우유의 부패의 원인이 되는 세균은 *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* 등 *Acinetobacter*를 포함하는 그람음성 내냉성세균이다. 우유가 7°C 이하에서 저장될 때에 그람음성 내냉성세균들이 초기의 낮은 세균수로부터 급속히 성장하여 *Enterobacteriaceae* 보다 우점하기 때문이다. 그람음성 내냉성세균의 성장에 의해 단백질분해, 지방분해, 이취 생성, 우유의 응고 등이 일어난다. 내열성세균 중에서 *Bacillus*가 가장 중요하지만 살균우유의 부패에 미치는 영향은 제한적이다.

## 1. 원유의 미생물학적 품질

원유의 세균수가 1ml 당  $10^6$ - $10^7$ 에 도달하면 세균에 의해 형성된 유기산, 알데히드, 에스테르, 알코올 및 황과 질소를 함유한 휘발성 화합물과 같은 대사물질이 생산되어 저온살균우유 뿐만 아니라 UHT살균우유에 전달되므로 관능적 품질을 악화시킨다. 또한 세균으로 오염된 불결한 착유기 표면에 형성된 이취는 우유에 쉽게 흡수된다.

목장에서 우유가 냉장탱크에 저장되고 2-3일에 한번씩 집유됨에 따라 2-7°C에서 성장이 가능한 내냉성세균이 증식될 가능성이 크다. 그람음성 내냉성 세균에 의해 생산된 단백질분해효소와 지방분해효소는 살균에 의해 파괴되지 않으며 UHT 처리에 의해서도 부분적으로만 불활성된다. 이런 효소들은 유통기간이 짧고 냉장조건이 유지되는 경우에는 우유의 풍미에 큰 영향이 없으나 저장온도가 열악한 조건에서 유통기간을 연장시킬 경우에 품질에 악영향을 끼칠 수 있다.

특히 내냉성 세균의 지방분해효소는 우유의 유통기간 중에 품질을 악화시킬 수 있다. 유지방의 산패를 결정하는 측정치에 acid degree value(ADV)가 있다. 정상적인 우유의 ADV는 0.4-0.8이며 ADV가 1.0-1.4에 도달하면 민감한 사람에게 산패취가 감지되기 시작된다. ADV가 1.5에 도달하면 대부분의 사람들이 산패취를 느끼게된다(Zall, 1990).

냉장온도가 7°C 이하에서는 내냉성세균인 *Bacillus cereus*와 *Bacillus circulans*가 성장이 매우 낮으나 온도가 상승하면 성장이 활발해진다. 원유의 *Bacillus* 포자수는 1ml 당 5000을 초과하는 경우가 드물다. 우유의 초기 포자수가 1ml 당 1일 경우에 내냉성 포자형성세균들의 세대기간이 10°C에서 6시간일 경우에 6일 후에  $10^7$ 에 도달할 수 있으며 이에 따라 우유가 응고할 수 있다. 4°C에서 저장할 경우에는 16-27일 소요된다(IDF, 1993). 저온살균 우유에는 내냉성 포자형성세균이 생존해 있으므로 유통 중의 저장온도가 특히 중요하다.

살균에 적절한 원유의 선발을 위해 세균수, 대사물질의 양, 내열성 세균수를 사용할 수 있다. 일차적으로 원유에 세균이 유입되는 것을 방지하여야 고품질 원유를 생산할 수 있다. 일단 세균에 오염된 원유의 세균을 통제하는 것은 매우 어렵다. Barnard(1995)는 온도가 4°C 이상이고 세균수가 100,000/ml 이상이고 항균물질잔류검사 양성이고 뚜렷한 이취가 있으며 적정산도가 0.20% 이상인 원유는 저온살균우유의 제조에 사용할 수 없다고 주장하였다. 우수한 품질의 원유로부터 생산한 우유만이 상품성과 유통기간을 보증받을 수 있다.

## 2. 살균 조건

우유의 살균방법으로 저온살균과 UHT 살균으로 구분할 수 있으며 저온살균을 더 세분화하여 저온장시간

표 1. 살균우유의 2차오염 원인과 예방대책

원 인	경 로	예방 대책
원료유	직접오염	- 살균기계의 정확한 제조, 가동과 유지
	간접오염-공장환경, 작업원	- 유가공장의 올바른 설계 - 통행제한, 수작업에 의한 우유 처리 금지
공장환경	간접오염-기계, 작업원, 포장재	- 동물, 토양, 물 등 외부환경에 의한 공장환경 오염 방지
		- 공장의 원유처리구역으로부터 살균우유구역으로의 오염 - 올바른 환경 위생
작업원	직접오염-질병에 감염된 작업원	- 감염된 작업원의 근무 금지 및 질병 치료 - 올바른 위생습관 유지
	간접오염-공장 환경, 외부 환경	- 보호 작업복 및 신발의 착용 - 외부 축산물의 반입 금지
기계	직접오염-원유 접촉, 생물학적 박막	- 기계의 오염 방지 - 가동시간을 8시간 이하로 제한 - 기계의 올바른 세척과 살균 실시
포장재	직접오염-우유병	- 우유병의 올바른 세척 및 살균 - 포장재의 오염 방지

(LTLT) 살균과 고온단시간(HTST) 살균으로 나눌 수 있다. 저온살균의 목적은 우유의 화학적, 물리적 및 관능적 변화를 최소화하면서 병원성 세균을 사멸시켜 위해를 방지하고 부패성 세균을 감소시켜 저장성을 증대함에 있다. UHT 처리는 상온에서 성장할 수 있는 포자형성세균을 비롯한 모든 병원성 세균 및 부패성 세균을 사멸시킴으로서 상업적 멸균을 달성함에 목적이 있다. UHT 멸균우유는 UHT 처리한 우유를 멸균 처리한 용기에 무균 상태에서 충전한 우유이며 UHT 살균우유는 청결한 살균우유용 용기에 충전한 우유이다.

우유의 안전성과 저장성을 증대하기 위하여 살균장치를 올바르게 설계하고 가동할 필요가 있다. 1) 우유의 살균 처리 온도와 유지시간을 준수하고 이를 기록계에 지속적으로 기록하여 기계의 정상적인 작동을 확인하여야 한다. 2) 살균온도에 도달하지 못한 우유는 역류밸브에 의해 자동적으로 밸런스 탱크에 돌려보내어 적절히 살균되지 않는 우유가 통과되지 못하도록 안전장치가 설계되어 있어야 한다. 3) 열교환기의 재생부에서 살균된 우유의 압력이 원유의 압력보다 높도록 기계가 가동되어 원유가 개스킷 등을 통해 우유로 들어오는 것을 방지한다. 4) 개스킷의 마모, 역류밸브의 부적절한 작동 등과 같은 기계와 부속품의 기능 변화와 기계의 위치 변경 등이 있을 때에 우유의 살균온도와 시간 그리고 원유의 우유 내로의 유입여부를 확인하여야 한다.

저온살균은 결핵균, 파상열균 등의 병원성세균 및 살모넬라, 리스테리아 등의 식중독균을 파괴하기 위하여 설계되었다. 저온살균에 의해서 Bacillus 포자를 포함한 Microbacterium, Micrococcus, Streptococcus thermophilus 등 일부 내열성 세균이 파괴되지 않는다. 이 세균들에 의한 원유의 오염도는 저온살균된 우유의 세균수에 직접적으로 영향을 준다. 또한 Bacillus cereus와 같은 내열성 포자형성세균들은 살균 후 냉장 온도가 8℃ 이상으로 상승하면 증식하기 때문에 우유의 유통기간을 단축할 수 있다. 반면에 모든 그람음성세균은 사멸된다. 저온살균에 의해 생존하는 유일한 그람음성세균은 Alcaligenes tolerans이다.

한편 국내에서 생산되는 대부분의 UHT살균우유에서는 UHT 공정에 의해 내열성세균 뿐만 아니라 포자형성세균도 사멸함으로 생산 직후의 세균수가 1ml 당 거의 0에 육박한다. UHT살균우유는 원유의 미생물학적 품질에 거의 상관없이 미생물학적 품질과 저장성이 우수하다.

### 3. 2차오염(post-pasteurization contamination)

우유의 저장성에 있어 가장 중요한 인자는 우유가 열처리공정에서 가열부를 지난 후 우유파이프, 저장탱크 및

충전기에서 일어나는 2차오염(재오염)이다. 건강한 유방의 유선세포에서 생산되어 유선포에 저장되어 있는 젖은 무균상태이다. 목장에서 생산과 착유될 때에 유방염, 유두관 및 착유기로부터 오염되는 것을 1차오염이라 한다면, 유가공장에서 살균된 우유가 다시 오염되는 것을 2차오염이라 한다.

살균된 우유가 원유 또는 다른 원인에 의해서 2차오염이 되는 것을 최소화되도록 열교환기를 비롯한 유가공기계들이 설계되고 제조되어야 한다. 또한 공장 전체의 환경과 가동 여건을 개선하여 2차오염의 가능성을 감소시켜야 한다. 사람의 직접적인 접촉이 없이 우유는 밀폐된 파이프와 기계를 통하여 살균 처리되거나 살균된 우유에 2차오염이 일어나 공중보전에 위해를 일으키며 우유의 부패를 유발한다. 우유가 2차오염되는 원인, 경로 및 방지대책은 표 1과 같다(Varnam과 Sutherland, 1994).

Barnard(1995)에 의하면 우유의 2차오염 방지를 위해 저온살균기를 비롯하여 충전기의 완충탱크까지 모든 기계의 표면이 76.7℃에서 최소한 5분간 유지되어야 한다. 이를 위해서 기계에 유입되는 열수의 온도는 93.2℃까지도 달하여야 하며 순환과 배수될 때의 온도가 82.3℃에서 10분간을 유지하여야 한다. 열수 다음에 21-31℃의 염소살균액 또는 옥소살균액을 5-10분간 순환시킨 다음 완전히 배수하여 살균을 완료한다.

1ℓ의 용기에 충전된 우유에 1개의 그람음성세균이 존재함으로써 우유의 부패를 유발할 수 있다. 만약에 우유가 그람음성세균으로 오염이 되지 않았다면 내열성 포자형성세균에 의해 부패된다. 2차오염된 우유의 저장가능기간

표 2. 10일간 냉장된 후 세균수가 높은 국산 우유로부터 분리한 세균

세 균	균주수
<i>Pseudomonas</i>	15
<i>Acinetobacter</i>	3
<i>Aeromonas hydrophilia/caviae</i>	2
<i>Moellerella</i>	1
<i>Serratia</i>	1
미동정 균주	5
전체	27

표 3. 우유의 미생물학적 품질에 관련된 세균의 세대기간

세 균	세대기간 (h)			
	4℃	6℃	8℃	10℃
<i>Pseudomonas</i> sp.	6.0	4.7	3.8	3.2
<i>Pseudomonas</i> sp.	8.0	5.6	4.0	3.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	8.0	5.5	3.7	2.6
<i>Achromobacter</i> sp.	10.0	7.5	5.3	4.3
<i>Enterobacter hafniae</i>	12.0	8.0	5.3	4.0
<i>Klebsiella aerogenes</i>	>30.0	14.0	6.5	4.0
<i>Streptococcus cremoris</i>	-	-	8.5	5.6
<i>Streptococcus lactis</i>	>30.0	>30.0	11.0	6.0
<i>Bacillus circulans</i>	22.0	16.0	12.5	9.5
<i>Bacillus cereus</i>	>30.0	>30.0	6.5	4.0
<i>Alcaligenes tolerans</i>	>30.0	>30.0	13.0	8.0

표 4. 저장 중 우유의 세균수 변화

살균 처리	저장기간 (일)	세균수 (CFU/ml)			
		7℃	10℃	13℃	15℃
LTLT	0	2,900	2,900	1,300	2,900
	3	2,400	4,000	140,000	18,000,000
	5	3,300	79,000	32,000,000	21,000,000
	10	3,300	16,000,000	-	-
HTST	0	1,700	1,700	290	1,700
	3	1,500	1,800	44,000	17,000,000
	5	1,600	18,000	12,000,000	42,000,000
	10	9,700	23,000,000	-	-
UHT	0	4	4	0	0
	3	3	0	2,000	400
	5	0	0	1,700,000	32,000,000
	10	26	<2,500	-	-

은 4℃에서 보존할 때에 4-9일이나, 오염되지 않은 우유는 57일에 이른다고 하였다(Mourgre와 Auclair, 1973). 8℃에서 보존할 때에 오염된 우유는 4-7일이고 오염안된 우유는 21일이었다.

우유의 2차오염에 의해 Enterobacteriaceae, Streptococcus, Pseudomonas, Flavobacterium 등의 그람양성세균과 그람음성세균들이 우유에 유입된다. 대부분의 2차오염의 세균이 수인성 세균이며 혼합 균종이다. 그러나 일반적으로 유가공장에서 우유가 위생적인 환경에서 처리되어서 우유에 세균 오염도가 낮아짐에 따라 오염된 세균의 종류가 작아진다. 그러므로 분에 의한 2차오염의 지시균으로 사용하는 대장균군은 낮은 세균수로 2차오염된 우유를 검출하지 못할 수 있다.

우유는 냉장온도에서 저장되므로 그람음성 내냉성세균이 저장기간을 결정하는 요인이 되고 있다. 그람음성 내냉성세균은 낮은 온도에 세대기간이 짧기 때문에 단기간에 우유를 부패시킬 수 있다. 7℃에서 10일간 저장한 후 세균수가 10<sup>6</sup>/ml 이상인 국산 우유에서 분리한 세균 중 50% 이상을 Pseudomonas가 차지하고 Acinetobacter, Aeromonas가 다음으로 많았다(표 2)(최, 1999).

저온살균에서 사멸되지 않는 내열성세균 중 내냉성세균인 Bacillus는 냉장 저장된 우유에서 성장이 제한적이며 그람음성세균에 의해 우점된다. 따라서 우유의 저장성에 영향을 주는 주 요인은 2차오염에 의해 우유에 유입된 그람음성 내냉성세균이다. 그러므로 우유의 2차오염을 통제하는 방법을 확보하는 것은 우유의 품질과 저장성을 관리함에 있어 매우 중요하다.

#### 4. 저장과 유통 온도

우유의 오염 세균과 내열성 세균의 성장률은 온도에 의해 영향을 받는다. 냉장 저장 할 때에 약간의 온도 상승에 의해 성장률이 영향을 받는다. 저장온도가 3℃ 상승함으로써 저장가능기간이 50% 감소한다. 표 3에 일부 중요한 세균의 세대기간을 보여주고 있다.

표 4은 국산 시유를 저장할 때에 살균방법과 저장온도에 따른 세균수의 변화를 보여주고 있다(권과 최, 1998). 저온살균우유는 7℃에서는 10일에도 세균수가 낮게 유지되나 10℃에서는 급격하게 증가함을 알 수 있다. 반면에 UHT 살균우유는 10℃에서 세균수의 변화가 없었다. 이러한 결과로부터 저온살균우유는 온도의 상승에 따라 저장

성이 급격히 감소함을 알 수 있으며 이는 10℃에서 저장하는 저온살균우유에서 내생성 *Bacillus*가 성장하는 것으로 사료되며 UHT 살균우유에는 포자형성세균이 사멸되었기 때문에 세균수의 증가가 적은 것으로 추정된다.

UHT살균우유는 저온살균우유에 비해 유통 중의 저장온도가 10℃까지 상승하더라도 비교적 저장성이 우수함을 알 수 있다. 반면에 저온살균우유의 유통기간을 연장하기 위해서는 최소한 7℃이하로 유통중의 저장온도를 낮추어야만 할 것이다. 여름철에 우유를 전시하고 있는 개방식 냉장고의 온도가 10℃ 보다 높아 우유의 저장성에 문제를 일으킬 수 있으므로 이에 대한 대책이 필요하다.

### III. 우유의 2차오염 검출 방법

#### 1. 총세균수

Tryptone, yeast extract, 포도당 및 탈지분유를 함유한 비선택성 성분을 함유한 한천 배지를 45℃로 냉각시킨 후 십진법으로 희석한 우유 시료를 섞어 평판을 만든다. 평판은 30℃에서 72시간 또는 32℃에서 48시간 배양한 후 형성된 세균 집락을 계수하여 희석 배율을 곱하여 우유 1ml 당 총세균수로 환산한다.

살균 직후의 우유의 총세균수는 내열성세균을 측정하는 것이다. 이러한 내열성 세균에는 *Bacillus*와 같은 포자형성세균과 *Microbacterium lactinum*, *micrococci*, *Streptococcus thermophilus*를 포함하고 있다. 이러한 세균들은 7℃ 이하에서 살균우유의 부패에 영향을 미치지 않는다. 2차오염에 의해 유입되는 세균수는 매우 적어 총세균수에 영향을 미치지 못한다. 따라서 총세균수는 2차오염의 기준으로서 사용할 수 없다. 반면에 유통기간 최종일에서의 또는 5-10일 저장기간 후의 총세균수로부터 그람음성세균의 저장기간 동안의 성장을 측정할 수 있다.

따라서 신선한 살균우유의 총세균수는 2차오염 여부를 가리켜 주지 못한다. 반면에 5-7일간 저장된 우유의 총세균수는 제조 후 8-10일이 지나서야 알 수 있으므로 품질관리에 도움이 될 수 없다.

#### 2. 대장균군수

대장균군은 유당을 이용하여 산과 가스를 생성하는 그람음성세균이며 포자를 형성하지 않는 호기성 또는 조건 혐기성인 간균이다. 저온살균에 의해 사멸되므로 2차오염에 의해 우유에 유입된다. 우유의 비위생적인 제조 공정을 가리키는 지시균이며 우유의 부패를 일으키는 원인균중의 하나이다. 선택배지를 사용하며 한천배지에서 계수하거나 액체배지에서 배양하여 최확수법을 이용하여 정량한다.

대장균군수는 오염도가 심한 우유에서는 제조공정의 위생 여부를 추정하는 기준이 될 수 있으며 이에 따라 저장기간을 추정할 수 있다. 그러나 2차오염에 의해 우유에 유입되는 세균의 수준이 낮아짐에 따라 2차오염 세균에 대장균군이 없을 수 있어 2차오염 여부를 민감하게 검출할 수 없는 결점이 있다. 반면에 대장균군수는 표준방법이 설정되어 있고 법적으로 규격화되어 있기 때문에 많이 사용되고 있다.

#### 3. 기타 세균수

대장균군수 대신에 좀 더 넓은 범위의 세균을 측정함으로써 2차오염의 검출을 위한 민감도를 증가시킬 수 있다. 이러한 세균 집단에는 *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, 내생성세균, 그람음성세균이 있다. 이를 위해 선택배지 또는 낮은 배양온도를 이용하여 평판배양하여 계수하는 방법이 사용되고 있다. 대부분의 방법이 표준화되어 있지 않으며 단지 저온성세균 만이 표준방법이 제안되고 있으나 7℃에서 10일간 배양하여야 하는 단점이 있다. 실험에 장시간이 소요되며 오염도가 낮은 우유에서는 민감하게 검출하지 못한다.

#### 4. 예비배양방법

위생적으로 신선하게 생산된 우유에는 오염된 그람음성 내생성세균이 매우 적다, 그러나 우유 1ℓ 당 1개의 내

표 5. 예비배양법에 의한 세균수와 저장가능기간의 관계

예비배양법 세균수 (/ml)	추정 저장가능기간 (일)
<1,000	>14
1,000~200,000	10~14
>200,000	<10

냉성세균이 오염된 경우에도 우유의 저장성을 단축시킬 수 있다. 매우 낮은 수의 세균을 직접 평판법을 이용하여 검출하는 것은 불가능하다. 따라서 민감도를 높이기 위하여 우유를 적절한 조건에서 예비배양한 후에 검출할 수 있다. 구체적으로 말하면, 포장용기에 있는 그대로 또는 10-100ml의 우유를 21-25℃의 낮은 온도에서 18-25시간 예비 배양하여 오염된 그람음성 내냉성 세균을 증식시킨다. 이때에 선택성 시약 또는 선택성 배지를 첨가하여 그람양성세균의 성장을 억제시킬 수 있다. 예비배양된 우유는 비선택성 또는 선택성 평판에서 점종하거나 계수할 수 있으며 또한 세균의 대사물질 또는 대사활력을 측정하는 방법을 이용하여 검출할 수 있다. 이러한 방법에는 ATP 방법, 전기저항법, 효소법, 색소환원법이 있다.

예비배양방법들은 총세균수법과 대장균수법에 비해서 2차오염과 저장성을 더 정확히 검출하고 예측할 수 있다. 그러나 2차오염이 검출된 우유의 저장성이 반드시 저장성이 낮을 것이라고 예상할 수는 없다. 우유의 2차오염된 세균수가 적으면 오염된 세균의 종류가 한정되므로 오염된 세균의 냉장온도에서의 세대기간에 따라 우유의 저장성이 결정된다. 따라서 우유의 예비배양온도를 낮추면 저장성을 예측할 수 있는 확률이 높아지나 한정된 예비배양 시간내에 오염된 세균이 성장할 수 없는 문제점이 있다. 반면에 높은 예비배양온도를 사용하여 짧은 시간 안에 실험 결과를 알 수 있을 때에 실제로 공정상의 문제를 찾아 사전에 2차오염을 차단할 수 있으므로, 가능하면 예비배양을 단축하거나 신속한 검출방법을 사용하는 것이 바람직하다. 우유의 저장성에 직접적으로 영향을 미치는 그람음성 내냉성세균의 검출하기 위하여, 예비배양에서 우점할 수 있는 그람양성세균과 중온성 Enterobacteriaceae를 억제하는 선택성 배지 또는 선택성 시약을 사용할 수 있다. 이와 같이 적절한 예비배양온도, 선택배지 및 검출방법을 선택함으로써 2차오염을 신속히 검출하고 저장성을 예측할 수 있다(Bishop과 White, 1986; IDF, 1995; White, 1993).

### (1) 평판계수

일정량의 우유를 25℃ 또는 상온에서 24시간 배양한 다음에 violet red bile agar 또는 benzalkonium chloride를 함유하는 평판배지에 이식하여 집락의 형성 여부를 측정함으로써 우유의 2차오염 여부를 민감하게 측정할 수 있다 (IDF, 1993). 이 방법의 결과로부터 우유의 저장성을 절대적으로 추정하기 어려우나 2차오염을 효율적으로 검출할 수 있어 우유의 위생적인 생산을 유도할 수 있는 장점이 있다. 단점은 실험에 2일이 소요되며 benzalkonium chloride를 함유한 평판배지에서 *Bacillus cereus*가 집락을 형성하는 경우가 있으므로 이를 분별하여야 한다.

우유를 21℃에서 18시간 예비배양한 후에 1000배 희석한 시료를 petrifilm 또는 표준평판배지에 접종하여 21℃에서 48시간 배양하여 집락을 계수하는 방법이 있다(White 등, 1993). 우유에 그람양성세균의 성장이 왕성할 때에는 우유에 benzalkonium chloride를 첨가할 것을 권장하고 있다. 이 방법의 결과로부터 표 4과 같이 저장가능기간을 추정할 수 있으나 유가공장의 조건에 따라 다를 수 있으므로 관능검사를 실시하여 저장가능기간과 이 방법간의 상관관계를 설정하여야 하는 단점이 있으며 실험에 소요되는 시간이 2-3일이 소요된다.

### (2) 대사물질 또는 활력 측정

예비배양에 의해 성장한 세균을 한천배지에서 배양하여 형성된 집락을 계수하는 전통적인 세균수 측정법은 장시간의 배양시간을 요구하여 신속성이 떨어지며 노동력과 시약의 요구량이 크므로 품질관리 방법으로서 적절하

지 못하다. 세균의 대사물질과 활력을 측정하는 것이 신속하고 저장성을 예측할 수 있는 더 정확한 방법일 수 있다. 세균의 대사물질과 활력을 측정하는 방법에는 ATP bioluminescence 방법, 전기저항법 및 색소환원법이 있다.

ATP bioluminescence 방법은 원유의 세균수 뿐만 아니라 시유의 2차오염 여부를 측정함에 응용된다(Griffiths, 1993). 시유의 2차오염 여부를 검출하기 위하여 내냉성 그람음성세균의 성장이 유리하도록 Benzalkon A, crystal violet, nisin, 및 penicillin과 같은 그람양성세균의 억제제를 첨가하여 시유를 배양한 후에 ATP를 측정한다(Baustista 등, 1992; Phillips와 Griffiths, 1985; Waes와 Bossuyt, 1982).

ATP bioluminescence 방법은 민감도가 낮아  $10^6$ CFU/ml 이상의 세균수를 가진 우유를 검출할 수 있다. 민감도를 높이기 위하여 미세균성 ATP를 제거하고 세균을 선택적으로 농축하기 위하여 nylon filter를 이용하는 방법이 있다(Reybroeck과 Schram, 1995). 이 방법은  $10^4$ CFU/ml의 세균수까지 검출할 수 있도록 민감도가 높다(Reybroeck과 Schram, 1995; Baustista 등, 1992). 이 방법은 25시간 이내에 실험을 완료할 수 있는 장점이 있으나 그러나 측정 기계와 시약이 비싸 일상적인 품질관리 방법으로서 부적절하다.

배지에 우유를 첨가하고 Bactometer에서 배양을 시작한 후 배지의 전기 저항의 급격히 상승을 시작하는 시간을 detection time(DT)이라 한다. 세균이 적은 우유는 DT가 크고 세균이 많은 우유는 그 반대다. 이러한 전기저항법(Bishop 등, 1984; Visser와 de Groot, 1984)을 이용하여 Byrne 등(1989)은 sodium deoxycholate, crystal violet, benzalkonium chloride를 첨가한 nutrient broth 또는 dairy gram negative(DGN) 배지를 우유에 섞어 21°C에서 18시간 예비배양한 후에 전기저항법으로 측정한 DT가 우유의 저장성과 높은 상관관계를 보였다. 예비배양이외 Bactometer에서 48시간이 추가로 소요되므로 72시간이 소요되는 문제점이 있다.

예비배양된 우유의 일부에 색소환원물질인 TTC(trimethyltetrazolium chloride) 또는 resazurin을 첨가하여 배양하면서 색이 변하는 시간을 측정하여 2차오염을 검출하는 방법이다(IDF, 1993; 최, 1999). 우유에 sodium deoxycholate와 cetrimide를 함유한 Trypticase soy broth를 섞은 후에 21-25°C에서 18시간 예비배양한 후에 resazurin을 첨가하여 30°C에서 배양하면서 색의 변화를 관찰하여 2차오염을 검출할 수 있었으며 실험에 소요되는 시간이 24-28시간이었다(최, 1999).

#### IV. 결론

우유의 미생물학적 품질을 개선하고 유통기간을 증가시키기 위하여 원유의 미생물학적 품질을 향상시키고 올바른 살균조건을 준수하고 2차오염을 방지하며 유통 중의 저장온도를 냉장온도로 유지하여야 한다. 이 중에서 2차오염은 우유의 저장성을 감소시키는 가장 큰 요인이므로 원유, 공장환경, 작업원, 기계 및 포장재로부터의 오염을 차단하여야 한다. 또한 그람음성 내냉성세균을 신속하고 민감하게 검출하는 방법을 도입하여 오염된 우유가 유통되는 것을 방지하고 가공상의 문제를 빠른 시일 안에 교정하여야 한다.

예비배양법을 이용하여 그람음성 내냉성세균에 의한 우유의 2차오염을 검출할 수 있는 방법들이 제시되고 있다. 2차오염을 정확히 검출하고 저장성도 부분적으로 추정할 수 있는 신속한 방법을 채택하여 우유의 저장성과 위생적 품질을 관리할 수 있어야 한다. 우유의 2차오염, 저장기간 및 안전성을 신속히 검사함으로써 우유의 유통기간을 결정하고 우유 살균공정을 개선할 수 있다.

#### 감사의 글

이 연구는 1996년도 농림기술특정연구과제 지원에 의해 수행되었습니다.



## V. 참고문헌

1. Barnard, S.E. 1995. Extending the keeping quality of fluid milk to 21 days. *Dairy, Food and Environ. Sanit.* 15:12-16.
2. Baustista, D. A., L. McIntyre, L. Laleye, and M. W. Griffiths. 1992. The application of ATP bioluminescence for the assessment of milk quality and factory hygiene. *J. Rapid Methods Automat. Microbiol.*, 1:179-193.
3. Bishop, J.R., and C.H. White. 1986. Assessment of dairy product quality and potential shelf life - a review. *J. Food Prot.*, 49:739-753.
4. Bishop, J.R., C.H. White, and R. Firstenberg-Eden. 1984. Rapid impedimetric method for determining the potential shelf-life of pasteurized whole milk. *J. Food Prot.*, 47:471-475.
5. Bishop, J.R., and C.H. White. 1985. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing bacterial numbers and metabolites. *J. Food Prot.*, 48:663-667.
6. Byrne, Jr, R.D., J.R. Bishop, and J.W. Boling. 1989a. Estimation of potential shelf-life of pasteurized fluid milk utilizing a selective preliminary incubation. *J. Food Prot.*, 52:805-807.
7. Harding, F. 1995. *Milk quality.* Blackie Academic and Professionals. London.
8. IDF. 1993. Catalogue of tests for the detection of post-pasteurization contamination of milk. *Bulletin of the IDF* 281, pp13-34.
9. Mourgues, R. and I. Auclair. 1973. Keeping quality of aseptically packed pasteurized milk during storage at 4 °C and 8 °C. *Lait* 53(528):481-490.
10. Phillips, J. D. and M. W. Griffiths. 1985. Bioluminescence and impedimetric methods for assessing shelf-life of pasteurized milk and cream. *Food Microbiol.* 2:39-51.
11. Phillips, J. D. and M. W. Griffiths. 1989. Pasteurized dairy products-the constraints imposed by environmental bacterial contamination. in J. O. Nriagu and M S. Simmons, ed. *Advances in Environmental Science and Technology: Food Contamination from Environmental Sources.* p. 387. John Willey and Sons, New York.
12. Reybroeck, W. and E. Schram. 1995. Improved filtration method to assess bacteriological quality of raw milk based on bioluminescence of adenosine triphosphate. *Neth. Milk Dairy J.*, 49:1-14
13. Varnam, A.H., and J.P. Sutherland. 1994. *Milk and milk products - technology, chemistry and microbiology.* Chapman and Hall. London.
14. Visser, I. J. R. and J. M. F. H. de Groote. 1984. The Malthus microbiological growth analyzer as an aid in the detection of post-pasteurization contamination of pasteurized milk. *Neth. Milk Dairy J.*, 38:151-156.
15. Waes, G.M., and R.G. Bossuyt. 1982. Usefulness of the benzalkon-crystal violet-ATP method for predicting the keeping quality of pasteurized milk. *J. Food Prot.*, 45:928-931.
16. White, C. H. 1993. Rapid methods for estimation and prediction of shelf-life of milk and dairy products. *J. Dairy Sci.*, 76:3126-3132.
17. White, C. H., J. R. Bishop, and D. M. Morgan. 1993. Microbiological methods for dairy products. In R. T. Marshall, ed. *Standard methods for the examination of dairy products.* pp. 287-308. American Public Health Association.
18. Zall, R. R. 1990. Control and destruction of microorganisms. (in *Dairy Microbiology* vol. 1. R. K. Robinson ed.) Elsevier Applied Science, London.
19. 권우혁, 최석호. 1998. 열처리 방법과 저장 온도에 의한 시유의 세균수, 저장가능기간, 및 가용성 유청단백질의 변화. *한국낙농학회지*, 20:133-142.
20. 최석호. 1999. 고품질 우유의 생산 기술 개발. 최종연구보고서. 농림부.
21. 최석호, 권우혁, 최정준, 이승배. 1999. ATP-bioluminescence와 전기저항법을 이용한 시유 의 2차오염 검출법에 관한 연구. *한국낙농학회지*. 21:221-230.
22. 최석호, 최정준, 이승배. 1999. 색소환원법에 의한 시유의 2차오염 검출을 위한 그람음성세 균 선택성 배지. *한국낙농학회지*, 21:231-240.