

원유중의 잔류항생물질 및 썬파제 조사

박병옥 · 백미순 · 권기호 · 우기방

경기도가축위생시험소

장기윤

국립동물검역소

Detection of Sulfa-Drugs and Antibiotics Residues in Raw Milk

Byoung-Ok Park, Mi-Soon Back, Ki-Ho Kwon, Ki-Bang Woo

Kyeonggi Veterinary Service Laboratory

Ki-Yoon Chang

National Animal Quarantine Service

Abstract

Antibiotic residues of raw milks collected in Anyang area were tested by TTC-reduction test, EEC-4plate method and TLC(SOS-kit) method to improve and monitor the quality of milk.

Antibiotic substances were not detected from 100 raw milk samples, but sulfamethazine was detected from only one sample(1.3PPM) by SOS test.

Unclassified anti-microbial substances were detected from 22 samples by EEC-4 plate method. EEC-4 plate test was useful to categorize the species of antibacterial substances and SOS test was useful to detect the sulfamethazine field screening test.

key words : Residues, Antibiotics, Raw milk, EEC-4plate, TLC(SOS)

서 론

인류가 개발한 식품 중에서 영양적으로 가장 완벽한 조성을 가진 식품으로 우유를 첫째로 치고 있으며 동서고금을 막론하고 최고급의 건강식품으로 인정하고 있다.

서구 유목민족의 오랜 낙농발달 역사에 비교하여 볼 때 우리나라는 1970년대 초부터 낙농산업이 발전하기 시작하여 20여년 동안 급속도로 양적인 성장을 이루었으며, 1990년도에는 원유 총 생산량이 166만톤에 이르러 국민 1인당 소비량이 연간 40kg수준에 다다르게 되었다. 원유 1kg을 유지방 3.7%기준으로 400원씩 환산하면 약 6,640억원의 원유대가 낙농가에 지급되는 것이며, 이것이 유제

품으로 가공되면 그 부가가치는 약 2조원을 상회하는 거대한 시장을 형성하는 것이다.

그러나, 최근들어 수요와 공급의 차질을 빚는 사태가 반복되고 지가상승과 목부구인난이 겹쳐 낙농을 포기하는 현상이 곳곳에서 나타나고 있다. 또한 우루과이 라운드협상이 진전되면서 낙농 선진국의 수입개방 압력이 거세지고 93년부터 시유까지 개방 스케줄에 포함되는 상황에 직면하여 국내 낙농산업의 자구책을 다시 한번 생각지 않을 수 없게 되었다.

현재 우리나라의 낙농산업은 행정관리 부처가 농림수산부와 보건사회부로 이원화되어 있어 소비자 대중이 요구하는 양질의 유제품을 생산 공급하는데 문제점을 내포하고 있다.

위생적이고 안전한 유제품 생산의 우선 조건은 원료우유의 위생적인 생산과 공정한 집유검사인 것이다. 이런 관점에서 국내 낙농산업이 낙농선진국의 수입개방 압력에 대비하여 가격면이나 품질면에서 경쟁할 수 있으려면 첫째, 낙농가에 대해 젖소의 생산능력 증진과 유질개선을 위한 간접적인 지원 방안이 모색되어야 할 것이며, 둘째로 목장위생검사와 각종 검사를 통한 원유등급제를 도입하여 A급 우유에 대해 보너스(유질 개선비)를 지급함으로써 생산의욕 고취와 국민보건에 직결되는 위생적이고 안전한 유제품을 공급할 수 있어야 한다.

미국의 Kosi kowski 등은 1960년 이전부터 우유중의 페니실린과 기타 항생제에 대해 표준시험방법 제정과 야의 신속검사방법의 개발을 연구보고하였다.¹⁾ 현재 우리나라는 축산물 위생처리법 시행규칙에 의거 원유중 세균발육억제물질 검사항목이 TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 색소 환원법에 의해 실시되고 있으나 전국적인 실태가 확실히 밝혀지지 않은 상태이며,²⁾ 이 검사방법은 신속 간편하지만 페니실린계열 이외의 켈파제 등의 합성항균제에 대해서는 감수성이 떨어지는 단점이 있다.³⁾

특히, 만성 유방염의 자가치료에 켈파메타진 주제의 유두삽입용 연고제가 무차별로 사용되고 일부 낙농가들은 켈파제가 TTC검사에 걸리지 않는다고 생각해서 남유금지 기간을 지키지 않는 경우가 종종 있어왔다.

이에 본 저자 등은 평소 유방염 검사나 집유검사를 수행하면서 국내에서도 하루 빨리 원유중의 잔류항생물질에 대한 고감도의 검출방법을 도입해야 할 것이라 느꼈던 중, 최근 육류에 대한 유해잔류물질 검사의 강화를 계기로 TTC색소 환원법, 유럽공동체의 육류검사 공인방법인 EEC-4-plate 법 및 미국의 돼지고기 중 켈파제 간이 신속 검사법인 SOS법(Sulfa-on-Site)를 이용하여 원유중의 항생물질 및 켈파제 검출방법을 비교 검토한 바 유의성 있는 결과를 얻었기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

공시재료

경기도 안양인근의 100개 목장에서 당일 착유한

원유를 무작위로 수집하여 4℃ 냉장고에 5시간 보관후 82℃ 항온수조에서 2분 30초간 pasteurization^{6,7)} 한 후 37℃로 냉각시켜 실험에 공하였다.

시험방법

TTC색소 환원시험

본 시험은 축산물 시험방법(농림수산부 고시)를 적용하였다.⁸⁾ 원유시료 9ml를 각각 시험관에 취한 다음 시험균액(*Streptococcus thermophilus*) 1ml씩 가하여 37℃ 항온수조에서 2시간 배양한 후, TTC(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride) 용액을 0.3ml 가하여 다시 37℃ 항온수조에서 30분간 배양하였다.

적색으로 착색되었을 때는 음성으로 백색으로 변화가 없으면 양성으로 판정하였다.

EEC four plate method

본 시험은 수육중 잔류물질 시험방법(농림수산부 고시 제89-33호, '89.5. 22)중 식육중의 항생물질 간이검사 제2법을 적용하였다.^{9,10)}

Bacillus subtilis 포자액의 조제

Bacillus subtilis BGA(Robert von Ostertag Institute)를 가축위생연구소로부터 분양받아 Nutrient agar에서 계대배양하여 Nutrient agar평판의 Roux 병에 이식한 후 30℃에서 10일간 배양한 다음 0.8%멸균식염수로 집균하였다.

집균액은 3000rpm에서 10분간 2회 원심분리 세척하여 잔사를 다시 0.8%멸균 식염수에 부유시켜 70℃에서 30분간 가열하였다.

이 포자액은 Nutrient agar에서 표준평판배양법으로 측정하여 1ml당 10⁷의 포자를 함유하는 농도(10⁷CFU)로 희석하여 사용하였다.

Sarcinia lutea 균액의 조제

Sarcinia lutea(ATCC 9341)은 역시 가축위생연구소로부터 분양받아 Nutrient agar에서 37℃로 계대배양한 종균을 Brain Heart Infusion broth에 이식하여 37℃에서 24시간 배양하였다.

시험용 평판배지의 조제

시험용 배지는 Nutrient agar를 멸균한 후 50℃ 정도로 식혀 0.1N HCl 및 0.1N NaOH를 사용하여 각각의 배지를 pH6.0, pH7.2, pH8.0(*B. subtilis*용) 및 pH8.0(*S. lutea*용)으로 만들고 pH7.2배지에는

trimethoprim(sigma T7883)을 배지 1ml당 0.05 μ g (0.05 μ g TMP / ml agar)되게 첨가하였다.

각각의 배지에는 1 l 당 균액을 1ml씩 가하여 배지 1ml당 10⁴CFU용액이 되도록 하였다.

이 균액을 혼합한 배지용액을 멸균 페트리디쉬에 13ml씩 분주하여 두께가 2mm가 되도록 굳힌 다음 시험에 사용하였다.

시료의 검사

시료를 안과용 편셋을 사용하여 우유검사용 디스크(日本 동양여지, 직경 8mm×1.5mm)에 적당히(0.07~0.08 μ l) 적신 후 즉시 꺼내어 미리 준비한 시험용 평판배지위에 부착시켜 B. subtilis는 30℃, S. lutea는 37℃에서 18시간정도 배양하였다.

결과판정

배양이 완료된 평판을 꺼내어 디스크주변의 세균 발육 저지원의 직경을 Caliper를 사용하여 0.1mm단위 까지 측정하고 하나 또는 그 이상의 평판에서 세균 발육 저지원이 10mm이상을 보인 시료를 양성으로 판정하였으며, 저지원의 명확도를 ++, +, ±로 표시하였다.

Thin Layer Chromatography(TLC법)

본 TLC법은 미농무성 산하 식품안전검사청(FSIS)에서 개발한 SOS(Sulfa on Site) test kit를 이용하였다.⁵⁾

시료의 전처리

원유 1ml에 동량의 Acetone을 가하여 3,000rpm에서 5분간 원심분리한 후 상청액 0.25 μ l를 TLCplate에 점적하였다.

셀파메타진 대조군 시험

표준 셀파메타진 용액을 고농도(1.3ppm)와 낮은 농도(0.4ppm)로 만들고, 각각 Methanol과 원유 및 아세톤으로 전처리하여 대조군으로 사용하였다.

전개요령

시료가 점적된 TLC plate를 Methanol전개조에서 1차 전개한 후 Ethylacetate에서 4cm선까지 2차 전개한다. 10분간 실온에서 말린 다음 Fluorescamine을 갈고루 분사한 후 암실상자에서 10분간 발색시켜 UV램프를 이용하여 형광밴드 형성유무를 관독하였다.

결과판정

표준혼합용액 반점과 같은 Rf치 범위에서 밝거나 비슷한 sulfamethazine표준품 0.4ppm의 반점보다

강한 형광대를 나타낼 때 양성으로 판정하였다.

※ Sulfamethazine의 Rf치=0.74

결 과

TTC, EEC 및 SOS에 의한 원유중의 잔류항생물질 검사

100건의 원유시료에 대하여 각각 TTC색소환원법과 EEC-4plate평판배양법 및 박충크로마토 그래피(TLC : SOS)로 잔류항생물질을 조사한 결과 TTC법에서는 전부가 음성으로 나타났으나 EEC-4 plate에서는 22건에서 세균발육저지원이 형성되었고 이중 1건은 SOS test에서 셀파메타진 양성으로 판정되었다(표1).

Table 1. Comparison with 3 methods for detecting antibiotic residues in raw milk

Number of tested sample	Method*		
	TTC	EEC-4plate	TLC(SOS)
100	—	22	1

* TTC : 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride reduction test

EEC : European Communities

TLC(SOS) : Thin Layer Chromatography

(Sulfa-on Site test : USDA-FSIS)

EEC-4 plate에 의한 항생제감수성 disk의 예비반응시험

9종의 항생제감수성시험 disk(Difco)를 이용하여 EEC-4plate법의 적용여부를 예비시험한 결과 penicillin 계통은 pH 6.0 BS 및 pH8.0 BS배지에서 주변이 뚜렷한 세균발육저지원이 형성되었으며 streptomycin, gentamycin 등 Aminoglycoside계열의 항생물질은 pH6.0 BS, pH7.2 BS, pH8.0 BS에서 뚜렷하였으나 pH8.0 SI에서는 세균발육저지원이 관찰되지 않았다. 특히 sulfonamides 등은 trimethoprim이 첨가된 pH7.2 BS 배지에서만 뚜렷한 세균발육저지원을 형성하였다(표2).

Table 2. Inhibition diameter characteristics of reference antimicrobial substances from EEC-4plate method

Antibiotics	Concentration* (Difco disk)	Inhibition diameter(mm)			
		pH6.0BS	pH7.2BS	pH8.0BS	pH8.0SL
penicillin	10	32.7(++)	15.6(++)	26.6(+)	—
ampicillin	10	36.1(++)	21.5(++)	30.3(+)	—
streptomycin	10	22.0(++)	21.7(++)	31.0(+)	32.0(±)
gentamicin	10	22.2(++)	34.3(+)	—	—
amikacin	30	24.0(++)	32.5(++)	33.0(±)	—
colistin	10	11.4(+)	13.2(++)	13.5(+)	16.0(±)
cephalothin	30	53.7(±)	—	—	—
chloramphenicol	30	30.6(+)	23.7(+)	33.0(±)	—
sulfonamides	300	—	31.2(++)	—	—

* Concentration of penicillin in IU / ml, all others in μg / ml
 (++) : Inhibition zone of which is clear.

EEC-4plate test에 의한 원유중 항균성물질 조사

4종의 평판배지중 한 곳 이상에서 세균발육저지원이 관찰된 원유시료는 모두 22건이었으며 10.0mm 이상의 시료를 양성으로 판정하였다. 세균발육저지원의 평균 직경은 $11.9 \pm 1.5\text{mm}$ 로 대부분이 이 범위안에 포함되었다. pH6.0 BS 배지에서 6건, pH7.2 BS 14건, pH8.0 BS 16건이 관찰되었으며, pH8.0 S.I에서는 20건이 관찰되었으나 세균발육저지원의 한계가 뚜렷하지 않았다(표3).

설파제 및 항생물질의 간이분리동정을 위한

EEC-4plate법의 유용성을 예비검토하기 위해 4종의 배지별로 분류한 결과 pH7.2 BS, pH8.0 BS, pH8.0 SI에서 세균발육저지원이 관찰된 것이 9건(40.9%)로 가장 많았고, 특히 76번 시료는 pH6.0 BS, pH8.0 BS, pH8.0 SI에서는 세균발육저지원이 형성되지 않으면서 Trimethoprim첨가 pH7.2 BS배지에서만 10.4mm의 뚜렷한 저지원이 관찰되었는바 SOS test에서 밝은 형광반점이 관찰되어 1.3PPM 이상의 설파메타진이 함유되어 있음을 알 수 있었다(표4).

Table 4. Identification of antibacterial substances from the milk by EEC-4plate method

pH6.0 BS	pH7.2 BS	pH8.0 BS	pH8.0 BS	Number of Samples	
—	+	+	+	9	(40.9)
+	+	+	+	4	(18.2)
—	—	—	+	4	(18.2)
—	—	+	+	2	(9.1)
+	—	+	—	1	(4.5)
+	—	+	+	1	(4.5)
—	+	—	—	1*	(4.5)
Total				22	(100.0)

* Sample I.D. No. is 76. (Sulfamethazin positive)

Table 3. Screening of antibacterial activity on EEC-4plate method from raw milk

Sample ID.No.	pH6.0 BS	pH7.2 BS	pH8.0 BS	pH8.0 S.I
31	-		---	10.5
32	--	12.0	10.5	12.0
36			--	13.5(++)
38	--	11.0	10.4	12.0
39	-	10.5	10.7	11.2
40		11.3	11.0	11.1
41	-	10.5	10.9	11.5
42		11.1	11.0	12.7
44	--	11.0(++)	10.1	12.5(++)
46	18.0	10.2	11.0	13.4(++)
47	14.0	10.2	10.5	12.1
48	13.1(++)	10.4	10.1	13.0
55	15.5(++)		11.5	—
57			--	12.5(++)
61	12.0	11.2	---	13.2
76*		10.4(++)		
84	10.7(++)	11.0	10.5	12.3
85		12.0	11.1	14.0
89				14.0
91			10.3	13.3
92			10.5	11.3
93		11.0	10.7	12.6
Total	6	14	16	20

* Sulfamethazin positive(>1.3PPM) on SOS test

고 찰

우유중에 잔류되는 항균성물질은 배합사료나 근육주사 등으로 젖소에 투입된 후 체내대사 등을 거쳐 우유 중에 잔류되기도 하지만 대개는 유방염의 치료시 연고제의 형태로 직접 유방내로 주입된 후 납유납지기간(휴약기간 3일)을 무시하고 다른 우유와 섞어서 납유할 때 문제를 야기시킨다.

우유중의 잔류항생물질은 원래 치즈나 요구르트 등 유가공품의 제조시 발효이상을 일으키는 문제때문에 낙농선진국의 경우 1957년 이전부터 Bioassay 등 신속하고 감도높은 항생제검출기법을 연구하여

왔다.^{6,7,13)} 미국의 Ginn¹⁴⁾ 등은 1978년 5,200건의 원유샘플을 Difco disc Assay로 검사하여 48건(0.92%)의 양성반응을 얻었다고 보고하였으며, 네델란드의 OS¹⁵⁾ 등은 신속진단키트(Delvo-test-p-multi)로 원유중의 penicillin을 0.03~0.1IU까지 검출할 수 있었으며 시간당 400건의 시료를 처리할 수 있다고 하였다.

유가공품 Starter균주인 *Bacillus stearothermophilus* (ATCC 7953)를 이용한 TTC시험이나 *B. subtilis*, *S. lutea*, *E. coli* 등을 이용한 몇몇의 Bioassay 법은 penicillin계열의 항생물질을 검출하는데는 효과가 있다고 보고하였으나^{13,14,15)} 썰파제 등 합성항균제

에 대한 보고는 많지 않다.²¹⁾

썰파제는 미농무성 식품안전검사청에서 작성한 화학물질 평가시스템(Compound Evaluation System : CES)에 <B-1> 등급으로 분류되어 있는데¹⁶⁾ 이는 중등도 의 물질자체 유해성과 매우 높은 <1> 식품에의 노출가능성을 가진 화학물질이라는 뜻이다. 축산식품 및 사료중의 썰파메타진 분석방법은 Bratton Marshal 비색법^{17, 23)}, 박충크로마토그래피¹⁸⁾, 액체크로마토그래피(HPLC)¹⁹⁾ 등이 있는데 현재 국내에서는 수출용 돼지고기에 대해 SOS test (USDA-FSIS 개발)를 Screen test용으로 많이 사용하고 있다.^{12, 20)}

본 시험조사 결과 EEC-4plate에서 항생제 감수성 디스크(Difco)의 세균발육저지원은 박²¹⁾과 장¹²⁾ 등이 표준항생물질을 사용하여 얻은 성적들과 비교해 볼때 대체로 유사하였으며, sulfonamides나 Aminoglycoside 계열의 합성항균제는 야외간이 Screen test시 대조용으로 사용해도 무방하리라 생각된다. 또한 원유중의 썰파제를 신속하게 검출해내기 위하여 야외 Screen test로써 EEC test나 SOS test의 유용성을 입증하고자 하였으나 검사시료건수가 부족하여 통계상의 유의성 검정이 다소 미흡하였다. 그러나 EEC와 SOS에서 일치된 성적을 나타낸 썰파메타진 검출결과를 기초자료를 삼아 추후 지역과 계절별로 검사대상을 확대 실시하고 HPLC 등을 이용한 정밀분석이 보완되면 보다 정확한 국내산 원유중의 항생물질 잔류실태를 파악할 수 있을 것이라고 사료된다.

결 론

유방염등의 치료와 사료효율 증진을 목적으로 젖소에 투여되는 동물약품으로 인한 원유중의 항균성물질 잔류실태를 파악하기 위하여 본소관내 집유장에 남유되는 목장원유에 대하여 TTC색소환원법, EEC-4평판배지법 및 박충크로마토그래피법(TLC : SOS Kit)로 비교검사한 바 다음과 같은 결과를 얻었다.

1. 총 100건의 원유시료를 검사한 결과 TTC법에서는 전부가 음성(0%)으로 나타났으며 EEC-4plate법에서는 22건(22%)에서 세균발육저지원이 관찰되었으며 TLC(SOS Kit)법에서는 1건(1%)의 썰파

메타진 양성이 검색되었다.

2. 9종의 항생제 감수성시험디스크(Difco)를 이용한 EEC-4plate 배지상의 세균발육저지원 관찰시험 결과 pH6.0 BS, pH7.2 BS, pH8.0 BS, pH8.0, SI 배지별로 다소 유의성있는 차이를 보여 항균성물질의 간이분리동정법으로 유용함을 알 수 있었다.

3. 썰파제의 Screening을 위한 EEC-4plate법의 유용성을 확인키위해 SOS-Kit를 이용한 썰파메타진 잔류확인검사 결과 pH6.0 BS, pH8.0 BS, pH8.0 SI에서는 세균발육저지원이 형성되지 않고 Trimethoprim 첨가 pH7.2 BS에서만 뚜렷한 저지원이 형성된 1건의 시료가 SOS에서 썰파메타진 양성 반응과 일치하였다.

참고문헌

1. Kosikowski FV and Ledford RA. 1960. Test for antibiotics in milk. J Am Vet Med Assoc. 4 : 297 ~ 299
2. 김교준, 김홍수, 소경택 등. 1973. 2, 3, 5-Triphenyl Tetrazolium Chloride(T.T.C) Test에 의한 우유 중의 항생물질 검출에 관하여 대한수의학회지 13(1) : 53 ~ 62
3. 한국수의공중보건학회. 1986. 방부제 및 세균발육억제물질 검사법. 수의공중보건학. 서울 문운당. 718 ~ 719.
4. Bogaerts R and Wolf F. 1980. A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat. Fleischwirtsch. 60(4) : 672 ~ 673
5. U.S.D.A-FSIS. 1987. Swine urine screen sulfation-site test kit, the scientific basis on SOS. Environmental Diagnostics, Inc. 4.
6. Liska BJ. 1960. A direct microscopic method for detecting antibiotic activity in milk. Journal of milk and food technology. 23 : 117 ~ 121
7. A GAL(NSW). 1987 Antibiotics in milk and milk products. AGAL-microbiological methods. Australia
8. 농림수산부. 1976. 축산물 시험방법. 농림수산부 고시 제2894호
9. 농림수산부. 1989. 수육중 잔류물질 시험방법

- 및 허용기준. 농림수산부 고시 제89-33호
10. 박종명. 1988. 축산식품 중의 잔류물질 검사법. 서울. 현대출판사. 77~82, 9~15.
 11. Bossuyt R, Van Renterghem R and Waes G 1976. Identification of antibiotic residues in milk by thin-layer chromatography. *Journal of Chromatography*. 124 : 37-42.
 12. 장기윤. 1990. 돼지에 잔류된 설파제의 미생물학적 스크리닝법에 관한 연구. 건국대학교 대학원 논문집. 18~19.
 13. Stanley E. 1978(1). Antibiotic Detection method. United states patent. Penicillin Assays, Inc. Boston, Mass. Appl No. 914, 414.
 14. Ginn RE, Tatini S and Packard VS Jr. 1978. Comparative evaluation of the Difco disc assay method for detecting Penicillin in milk and milk products. *Journal of food production*. 41(5) : 361~363
 15. Os JL Van and Beukers R. 1979. A multitest system for detection of antibiotics in milk. *Journal of food production* 43(7) : 510~511.
 16. 박종명, 정상희. 1991. 미국의 화학물질평가시스템, 대한수의사회지. 27(1) : 47~54.
 17. Bratton AC, Marshall EK. 1939. A new coupling component for sulfonamide determination. *J of Bio che.* 128 : 537-550.
 18. Sigel C W, Woolley JI and Nichol CA. 1975. Specific TLC tissue residue determination of sulfadiazine following fluorescamine derivatization *J pharm sci* 64 : 973~976
 19. Cox BL and Krzeminski LF. 1982. High pressure liquid chromatographic determination of sulfamethazin in pork tissue. *JAOC*. 65 : 1311~1315.
 20. 황인진, 박병옥, 우기방. 1990. SOS test kit 및 HPLC법에 의한 도축돈의 뇨, 신장 및 근육내 설파메타진 잔류량조사. *한국가축위생학회지*. 13(1) : 21~26.
 21. 박종명, 손성완, 조태행. 1990. 돼지고기 및 닭고기 중의 잔류항생물질 조사. *농시논문집(가축위생편)* 32(2) : 16~22.
 22. Davis W W and STOUT TR. 1971. Disc plate method of microbiological Antibiotic Assay. *Applied Microbiology*. 10 : 666~670.
 23. Selzer G B and Banes D. 1963. The detection and Estimation of Sulfonamide residues in milk. *Journal of the AOAC* 46(4) : 703~707.
 24. Read RB, Bradshaw JG and Brazis AR. 1970. Detection of Sulfa Drugs and antibiotics in milk. *Applied microbiology*. 21(5) : 806~808.