

2. 3. 5-Triphenyl Terazolium Chloride(TTC) 환원시험법의 개선에 관한 연구 : disc plate method

정동수, 김동훈, 이상목

강원도가축위생시험소, 건국대학교 수의학과

A study on improvement of 2. 3. 5-Triphenyl Tetrazolium Chloride(TTC) reduction test : disc plate method

Dong-Su Chung, Dong-Hun Kim, Sang-Mog Lee

Kangwon-do Veterinary Service Laboratory, Kon KuK University

ABSTRACT

Triphenyl Tetrazolium Chloride(TTC) reduction test is simple and sensitive to some residual antibiotics (especially to penicillin) in milk, but comparatively insensible to sulfonamides. The volume of sample is also large.

Thus this study was undertaken to increase the detectable level of sulfonamides in raw milk.

In this study, we used small transparent plastic hole and pulp disc instead of 10ml test tube and made test medium in which was added 0.08% TTC, 0.3% agar, 10% skim milk, approximately 10^6 CFU/ml streptococcus thermophilus and 5ppm Trimethoprim to enhance the sensitivity for sulfonamides

The results of TTC reduction test by disc plate method were summarized as follows :

1. Sensitivity to residual sulfonamides were much higher than official TTC reduction test. Detectable limites of sulfamethazine, sulfamerazine, sulfathiazole, sulfachloropyridazine, sulfadimethoxine, sulfamonomethoxine, sulfadiazine and sulfaquinoxaline were 0.1-0.5ppm levels.
2. Detectable limites to some antibiotics were similar or good than that of official method as 0.005-0.1ppm to three β -lactams, 0.25-0.5ppm to one macrolide, 2-10ppm to three aminoglycosides, 0.2-0.5ppm to three tetracycline, 0.1-0.5ppm to chloramphenicol.
3. Only 0.1ml of milk was needed to test and the test medium could be stored approximately 7days in the refrigerator. So test procedure was convenient than official method.
4. These results suggest that disc plate method is more useful to detect bacterial growth inhibition substances including sulfonamides in raw milk.

*Key Words : Triphenyl Tetrazolium Chloride(TTC),
Residual antibiotics, Milk, Disk Plate method*

서 론

경제 성장과 국민의식수준의 향상으로 건강은 아주 중요한 과제이며 식품에 대한 안전성에 매우 높은 관심을 나타내고 있다. 특히 우유는 완전한 영양식품으로 유아부터 노약자에 이르기까지 온국민의 건강에 필수 식품으로서 자리잡고 있으며 그 소비량도 날로 증가하고 있다^{3, 16)}. 따라서 우유중에 잔류되는 항생물질 등에 대한 공중보건학적 문제를 심각히 고려하지 않을 수 없다.

항생물질은 열에 대단히 안정되므로 일반적인 시유나, 유제품의 살균조건에서는 거의 파괴되지 않고 그대로 잔류하며²⁵⁾, 항생물질이 함유된 우유를 매일 마실 경우 체내에 항생물질 내성균이 출현하고³⁰⁾, 항생물질 과민증(Anaphylaxis)이 되거나 혹은 장내 세균이 파괴되어 소화 기관의 세균총을 불안정하게 하며³⁵⁾, 조혈기계의 장애, 간장염, 신장장애, 면역체형성 저해, 청각 및 시각장애^{33, 41)}, 발암성 등 많은 부작용에 대한 연구 보고를 발표한바 있다^{23, 40)}.

이 같은 유해성 때문에 그 잔류여부를 검사하는 방법도 많이 연구되어 High Performance Liquid Chromatograph(HPLC), Gas Chromatograph(GC), Thinlayer Chromatograph(TLC) 등 정밀한 장비를 이용한 이화학적 방법과 항생물질에 감수성이 예민한 *B. subtilus*³⁸⁾, *sarcina lutea*³¹⁾, *streptococcus thermophilus*³⁷⁾, *Bacillus stearothermophilus*²⁹⁾ 등 세균을 이용하는 생물학적 방법이 있다.

생물학적 방법에는 세균증식에 따른 대사과정의 산물에 의해 indicator를 환원시켜 특정한 색을 나타내게 되는 원리를 이용한 dye reduction test³⁰⁾와 세균발육 억제대의 측정 원리를 이용한 disc assay method^{18, 22)} 등이 있으며 그중에는 TTC 환원시험법, cylinder plate method, paper disc method가 비교적 널리 사용되고 있는데⁸⁾ 이것은 검사비용이 저렴하고 많은 시료를 비교적 단시간내에 처리할 수 있어 편리하며 검출감도 또한 우수하여 screen test로써 적합한 장점을 지니고 있다.

우리나라에서도 세균발육 억제물질 검사법으로 TTC 환원시험법을 공정법으로 채택하고 있으며⁴⁾ 검사결과

양성으로 판정될 경우 해당목장에 대해서는 3일간 납유를 정지시키고 있다. 이 TTC 환원시험법은 검출감과 시험방법이 간단하여 편리한 반면, 설과제 등의 합성항균제에 대해서는 감수성이 대단히 낮기 때문에 많은 연구자들이 단점으로 지적하고 있다^{2, 10)}.

FDA에서 조사한 바에 의하면 미국내 10개 도시의 우유를 수거 검사한 결과 45%가 Sulfamethazine이 잔류하고 있었으며, 뉴욕의 지역에서 64건의 우유를 검사한 결과 약 40%가 설과제에 오염되어 있음을 보고한 바 있고³⁶⁾, 또한 Weber와 Smedley는 HPLC를 이용하여 49건을 우유중 11건이 Sulfamethazine이 잔류되어 있음을 확인하였다³²⁾.

우리나라도 설과제의 사용이 증가 추세에 있기에^{14, 15)} 현행 TTC환원 시험법으로는 설과제의 우유내 유입을 방지하기에 문제가 있다고 사료되며, 이같은 이유로 시유 및 각종 유제품을 통해서 설과제가 온 국민의 체내에 잔류될 가능성 매우 높은 것이다.

이러한 문제는 국민모두가 건강과 직결되는 중대한 사안으로 하루빨리 개선되어야 하겠다. 본 연구는 이러한 현행 TTC환원시험법의 주요단점인 설과제의 검출감도문제와 검사의 편리성을 향상시키기 위하여 설과제와 병용시 상승작용을 나타내는 Trimethoprim과 disc plate method를 이용하여 수행하였다.

그 결과 현행의 TTC환원시험법에 비해서 우수하고, 능률적인 성적을 얻어 보고하는 바이다.

재료 및 방법

1. 원 유

본 시험에 사용된 원유는 강원도 춘천군 소재 목장에서 항생제를 전혀 사용하지 않는 건강한 젖소를 선정하여 TTC검사로 음성임을 확인한 후 시험에 공하였다.

2. 시험균주

Streptococcus thermophilus ATCC 14485 균주를 선발하여 시험에 공하였다.

3. 사용배지

1) 계대 보존용 배지 : 0.5% lactose 함유 M17 se-

misolid agar

- 2) 증식용 배지 : 0.5% lactose 함유 M17 broth 37°C 18-24시간 배양시켜 시험균액으로 사용하였으며 이때 시험균주의 균수는 약 3.3×10^6 CFU/ml이었다.
- 3) 검사용 배지 : 0.08% TTC, 5ppm TMP, 10% skim milk 약 10^6 /ml 세균수 0.3% agar 함유 평판 배지로 직경 16mm, 높이 5mm의 얇고 투명한 원형의 플라스틱 hole에 0.4ml씩 분주된 것.

4. 재료 및 시약

| | |
|---|------------------|
| Sulfamethazine(SMT) | Sigma사 |
| Sulfamerazine(SMR) | 〃 |
| Sulfathiazole(STZ) | 〃 |
| Sulfamonomethoxine(SMM) | 〃 |
| Sulfaquinoxaline(SQX) | 〃 |
| Sulfadimethoxine(SDM) | 〃 |
| Sulfadiazine(SDZ) | Alpha Trading사 |
| Sulfachloropyridazine(SCP) | 〃 |
| Gentamycin | 〃 |
| Ampicillin | Chemo puro사 |
| Penicillin G | 〃 |
| Cephalexine | 〃 |
| Streptomycin | 〃 |
| Dihydrostreptomycin | 〃 |
| Chloramphenicol | 〃 |
| Chlorotetracycline | 〃 |
| Oxytetracycline | 〃 |
| Tetracycline | Sigma사 |
| Erythromycin | 〃 |
| Hydrogen peroxide(35%) | 〃 |
| Trimethoprim(TMP) | SHINYO CHEMICAL사 |
| 2, 3, 5-Triphenyl Tetrazolium Chloride(TTC) | 〃 |
| M17 broth | defco |
| Lactose | 〃 |
| Pulp disk 직경10mm, 두께 1mm | Advantec사 |

- 1) TTC 용액 : 8%의 TTC용액을 제조하여 4°C에 보관 하면서 약 2주간 사용하였다

- 2) MP 용액 : 50mg의 TMP를 100ml volumetric flask에 취해 0.5N HCl 10ml에 용해시킨후 증류수를 가하여 500 μ l/ml로 만든후 냉장보관 하면서 약 1주일간 사용하였다

5. 표준용액의 조제

각 항균제에 대한 표준용액은 표 1과 같이 적절한 용매와 희석액⁵을 이용하여 stock solution으로 제조한 후 2-3일간 냉장보관 하면서 사용하였다.

1) Spiked Sample

멸균시험관을 사용하여 원유에 표준용액을 첨가한 후 tube mixer를 이용하여 혼합, 희석하여 각 항균제별로 시험목적에 알맞도록 농도를 조정하여 제조하였다.

- 2) 10% skim milk를 조제하여 음성 대조용으로 사용하였다.

6. 검사용 배지 제조

검사용 편리성과 결과 판독을 쉽게하기 위해 직경 16mm, 높이 5mm의 얇고 투명한 원형의 plastic hole 하나에 한개의 pulp disc가 들어갈수 있도록 하였다.(photo 1, photo 2)

- 1) 총 배지 사용량의 1/2부피 증류수에 0.3% agar 되는 양을 취하여 잘 용해후 121°C 15분간 멸균
- 2) 총 배지 사용량의 1/2부피 증류수에 10% skim milk되는 양을 취하여 온수에 용해후 100°C에 10분간 멸균
- 3) 멸균된 skim milk를 멸균된 agar에 혼합한다.
- 4) 0.08% TTC용액, 시험균주 약 10^6 /ml 그리고 5ppm TMP용액이 되도록 첨가하여 magnetic bar를 이용하여 잘 혼합한다.
- 5) Micro pipette을 이용하여 각 hole에 0.4ml씩 분주한다.
- 6) 균화후 4°C 냉장 보관하여 약 7일정도 사용한다.

7. 검사과정

검사의 편리함과 결과 판독을 쉽게하기 위하여 직경 10mm, 두께 1mm의 pulp disc를 이용하였다.(photo 3)

- 1) Disc paper에 검사원유를 충분히 적신후 핀셋을

Table 1. Solvent and diluent of antimicrobial drugs

| Antimicrobial drugs | Solvent | Diluent |
|---|----------------------------------|---------------------------------|
| Sulfonamides | hot water + a little 10% NaOH | water |
| Ampicillin | 0.1M Phosphate buffer pH 8.0 | 0.1M Phosphate buffer pH 6.0 |
| Erythromycin | etanol | water |
| Kanamycin | 0.1M Phosphate buffer pH 8.0 | water |
| Gentamicin | 0.1M Phosphate buffer pH 6.0 | water |
| Cephalexin | | |
| Penicillin, Streptomycine | | |
| Tetracycline, Chloramphenicol | | |
| Dihydro Oxy Streptomycin, Tetracycline | water | water |

이용해 살며시 검사용 판넬 hole 중앙에 올려놓고 가볍게 누른다.

- 2) 각 hole마다 원유를 원유를 적신 disc paper를 1)과 동일한 방법으로 처리한다.
- 3) 맨 마지막 hole이나 첫 hole에 제조된 10% skim milk에 disc paper를 적신후 대조용으로 사용한다.
→세균발육 억제물질이 전혀 들어있지 않기때문에 그 hole의 색을 기준으로 판정한다.(음성기준)
- 4) 37°C 항온기에서 약 4시간정도 감작시킨다.

8. 검사결과의 판정(photo 4, 5, 6, 7)

- 1) 4시간후 검사용 배지를 항온기에서 꺼내 발색여부를 관찰하였다.(photo 4)
-배지를 뒤집어 관찰해야 편리함.
- 2) 대조용 hole의 색과 검사 시료용 hole의 색을 비교한다.
양성 : 대조와 비교하여 발색의 정도가 열거나, 발색이 없던 경우
예)
①hole 전체의 색이 변치 않음 : 검사배지 고유

색(유백색)

- ② disc paper 밑의 색은 변치 않았으나 주위는 도홍색
- ③ disc paper 밑의 전부는 아니지만 중심부만 유백색
- ④ disc paper 밑의 색이 대조군에 비해서 발색 정도가 객관적으로 충분히 열다고 인정되는 경우
음성 : 대조용 disc paper의 색과 검사용 disc paper의 색이 동일할때나 검사용 disc paper의 색이 더 짙을 때.
* 대조군의 발색이 충분히 되지 않았을 경우 30분-1시간 더 항온기에 작용시킨후 상기 서술방법과 동일하게 판정한다.

결 과

본 연구결과와 비교하기 위해 Neal과 Calbert(1955)에 의해 보고된 TTC환원시험법 검출농도를 조사해본 결과 Penicillin G는 0.04IU/ml, Dihydrostreptomycin과 streptomycin은 4ppm Chlorotetracycline은 0.2ppm, Oxytetracycline은 0.2-0.3ppm 등이었으며 Sulfa제에

대한 타 연구자의 TTC환원시험에 대한 검출농도 조사에서 정¹⁰은 Sulfaquinoxaline 3,600ppm, sulfamethazine 3,850ppm, sulfadimethoxine 3,100ppm, sulfamonomethoxine 1,150ppm 이상에서 김등²은 sulfamethazine 3,000ppm 이상 농도에서 양성을 나타낸다고 보고 하였으며, 김¹은 sulfamerazine, sulfamethazine, sulfadimethoxine은 3,000ppm에서도 음성 반응을 보였고, 조등¹¹은 sulfamethazine 5,000ppm, sulfachloropyridazine 500ppm 이상이 함유될 때 양성으로 검출이 가능하다고 보고 하였다.

이와같이 연구자간에 다소 수치적 차이는 있으나 고농도의 설파제가 원유에 유입되었을 경우에 만이 TTC 환원시험에서 검출이 가능하다는 것은 공통된 결과이다. TTC환원시험법이 편리하고 비교적 저농도에서 세균발육 억제물질 검출할 수 있어 효율적인 반면 이처럼 설파제에 대한 검출 감도가 낮기 때문에 이를 보완하는 방법이 연구되고 있으며, 식육중 잔류 항생물질 검사법의 screen test인 bioassay 법에서는 설파제의 검출 감도를 높이기 위해 TMP를 첨가하여 사용하고 있다^{6, 13}.

이 TMP는 설파제와 함께사용할 경우 상승작용을 나타내는데 이는 설파제가 PABA(Paraamino benzoic acid)의 경쟁적 길항제로서 균의 엽산합성에 필요한 PABA 이용을 방해하고 TMP가 환원 효소인 dihydrofolate reductase를 선택적으로 억제함으로써 균의 엽산

합성 과정을 연속적으로 저해하기 때문이다^{11, 27}.

또한 TMP는 자체로도 항균력이 있기 때문에 시험균주에 따라 적절한 농도를 설정하여야 한다. 시험균주인 *S. thermophilus*에 대한 감수성 농도를 구하기 위해 원유에 TMP를 1, 2.5, 5, 10, 25, 50ppm이 되도록 첨가하여 TTC환원 시험을 한 결과 5ppm이하에서는 시험균의 증식에 크게 영향이 없었으나, 10ppm에서는 발색의 차이가 인정되었으며, 25ppm 이상에서는 시험균의 발육이 완전히 억제됨을 알수 있었다. 이 결과는 김등², 조등¹¹과 유사한 성적이었다.

검사 시료의 양을 줄이기 위해 disc plate method를 응용하여 10% skim milk에 TMP가 5µg/ml, 세균수 약 10⁶~, TTC용액 0.08% 그리고 agar를 첨가하여 고체화시킨 검사용배지를 제조하였으며, pulp disc를 이용한 방법으로 검사시료의 양을 0.1~이하로 줄였다. 기존의 TTC환원시험법을 disc plate method로 변형 개선하여 수행한 원유중 잔류설파제 검출시험 결과는 표 2와 같았다.

표 2에서 보는바와 같이 최소검출 범위는 0.1-0.5 ppm으로 현행의 TTC환원 시험법으로 시험한 정¹⁰, 김등², 김¹, 조등¹¹의 성적과 비교해 매우 높은 수준의 검출상승 효과가 인정되었으며, 설파제 이외의 항균제로 유티균 연고와 주사제로 흔히 사용되는 몇가지를 선정하여 검출 감도를 조사한 결과 표 3과 같이 기존의 TTC시험법에 비해 우수 하거나 유사한 감도를 나타

Table 2. Minimum Detectable Range of sulfonamides in raw milk by improved TTC reduction test(disc plate method)

| Sulfonamides | MDR (ppm) |
|-----------------------|-----------|
| Sulfamethazine | 0.1-0.5 |
| Sulfamerazine | 0.1-0.5 |
| Sulfadiazine | 0.1-0.5 |
| Sulfadimethoxine | 0.1-0.5 |
| Sulfamonomethoxine | 0.1-0.5 |
| Sulfaquinoxaline | 0.1-0.5 |
| Sulfathiazole | 0.1-0.5 |
| Sulfachloropyridazine | 0.1-0.5 |

* MDR : Minimum Detectable Range

Table 3. Minimum Detectable Range of antibiotics in raw milk by improved TTC reduction test(disc plate method)

| Antibiotics | MDR(ppm) | Antibiotics | MDR(ppm) |
|--------------------|-------------|-------------------------------|------------------|
| β -Lactams | | Macrolides | |
| penicillin G | 0.005-0.025 | Erythromycin | 0.25-0.5 |
| Ampicillin | 0.05-0.1 | Aminoglycosides | |
| Cephalexin | 0.05-0.1 | Dihydrostreptomycin | 2-5 |
| Tetracycline | | streptomycin | 2-5 |
| Chlorotetracycline | 0.2-0.5 | Gentamicin | 5-10 |
| Oxytetracycline | 0.2-0.5 | Others | |
| tetracycline | 0.2-0.5 | Chloramphenicol | 0.1-0.5 |
| | | H ₂ O ₂ | 10 ⁻³ |

*MDR : Minimum Detctable Range

내었다.

3종의 β -Lactam계의 최저 검출농도는 0.005-0.1ppm³ 종의 Teteacycline계가 0.2-0.5ppm, 1종의 Macrolide계가 0.25ppm-0.5ppm 감도를 보여 기타 세균발육 억제 물질에도 유효함이 인정되었다.

고 찰

기존의 TTC 시험과정을 살펴보면 우선 검사 시료의 양이 다른 검사법에 비해 많기 때문에 불편하고 매일 전국적인 검사가 이루어 지므로 검사로 인한 손실도 적지 않을 것이다.

집유장에서는 매일 같은 검사 과정을 처음부터 반복 하여야 하는 번거로움이 있고, 특히 전술한 바와 같이 설과제의 검출감도가 매우 낮은 문제점이 있다.

검사시료의 양을 줄이기 위해 pulp disc를 이용하여 항생제 등의 잔류여부를 검출할수 있는 paper plate법 즉 agar와 균주를 동시에 혼합하여 plate를 제조 한후 pulp disc를 원유에 적서 검사용 평판에서 결과를 판정하는 방법으로 현행 TTC법에 적용하여 개선하여본 결과,검사 시료의 양을 0.1ml 이하로 줄일수 있었다. agar의 혼합비율을 정하기위해 agar함량에 따른 TTC의 환원시간을 조사한 결과, agar의함량이 높을수록 환원 즉,발색시간은 지연됨을 알수있었다.

따라서 결과판정시간과 plate의 경도등을 고려하여

agar의 함량은 0.3%로 정하였으며, 결과판정시 발색여 부를 쉽게 판단할수 있도록 agar base로 10% skim milk를 사용하였다.

기존의 TTC환원시험법에서는 시험균주의 증식에 10%skim milk를 사용하고 있으나,본 시험에서는 lactic streptococci의 배양에 적합하도록 고안된 M17 broth에 0.5% lactose를 첨가하여 균주를 증식, 계대하였다²⁾.

증식성의 경우 10% skim milk와 유사한 약 10⁸/ml의 균수를 보였으나 배지의 사용량, 보존성, 사용의 편리성 등은 10% skim milk보다 훨씬 우수한 것으로 사료된다.

S.thermophilus는 60°C에서 30분간 생존할수 있는 내열성,호열성균이기 때문에 균주의 첨가온도는 비교적 선택이 넓으나 활력을 고려하여 45°C정도에서 TTC용액과 같이 약 10⁶ml의 균수가 되도록 첨가하고 TMP는 검사용 hole에 분주직전 혼합하는 것이 좋으리라 생각 된다.

Neal과 Calbert(1955)가 보고한것 처럼 TTC 환원법의 검출감도는 시험균주의 활력이 중요한 요인이 되기 때문에 균주의 일관성 유지를 위해 M17 broth와 plate에서 2차 연속 계대하여 활력이 왕성한 균만을 선택하여 semiloslid agar에 보관하며 사용하였다.

TTC시약은 redox indicator로 사용되는게 통상 0.01% 함량으로 사용한다.

이 TTC는 산화된 형태에서 무색이며, 세균대사

등에 의해 불용성의 붉은 triphenylformazan으로 환원된다.

이 불용성 formazan의 형성은 불가역 반응이어서 일단 환원되면은 그 색은 지속된다²⁴.

기존의 TTC법은 4% TTC용액을 원유 9ml에 0.3ml 첨가하나 본 시험에서는 8% TTC용액을 100ml에 1ml의 비율 즉 0.08%로 기존의 TTC함량의 0.133%보다 다소 적은양이 첨가되었다. 이것은 적량의 TTC가 함유되면 TTC농도를 증가시켜도 발색에는 거의 영향이 없기 때문이다.

검사용 배지는 직경 16mm, 높이 5mm 투명의 얇은 플라스틱 원형 hole에 micropipette을 이용하여 0.4ml씩 분주 제조하여 냉장보관 하면서 1주일 사용하였으나 보관상태에 따라 2주까지도 사용할수 있었다.

검사시 편셋을 이용 pulp disc에 원유를 충분히 적셔 제조된 배지위에 놓고 disc의 중앙을 살며시 눌러서 disc 밑면의 기포를 제거한다.

이는 결과 판정시 기포부분이 발색에 영향을 주기 때문이다.

검사 결과의 판정은 통상 4시간 정도이며, 세균발육 억제물질의 농도가 높을 수록 무색부분이 많으며 낮을 수록 좁아지고, 잔류농도에 따라 disc 밑면만이 무색일 경우도 있으며, 대조군과 비교하여 발색이 현저히 열은 경우도 있다.

보통 원유검사중 생물학적 방법을 이용시 80-100°C에서 약 5분간 저온살균을 실시하는데 이것은 원유중의 비특이적 억제물질에 의한 비특이 반응을 제거 하기위한 방법으로 사용되고 있다^{25, 27}.

그러나 본시험에서는 검사 시료의 양을 0.1ml 이하로 최소화 했기 때문에 기존의 TTC법에 비해 비특이적 양성의 위험을 충분히 제거되었다고 생각되며, 실제로 저온살균을 하지 않고 기존 TTC검사와 병행하여본 결과 같은 성적을 나타내었다. 본 연구는 현행 TTC환원 시험법의 단점인 검사 시료의 과다(9ml), 저농도의 설파제를 검출못하는 문제점,검사의 번거로움 등을 보완키위해 수행한바 검출 감도와 편리함에 있어서 충분히 활용가치가 있다고 사료되며 더욱 효율적으로 현행의 TTC환원 시험법의 단점을 보완하기 위해서는 보다 지속적인 연구가 필요하리라 생각된다.

결 론

현재 우리나라에서 원유중 세균발육억제물질의 공정 검사법인 2,3,5-riphenyl Tetrazolium Chloride(TTC)환원 시험법은 편리하고 우수한 검사법이나, 검사시료의 양이 9ml로 타시험법에 비해 많고 검사과정상의 번거로움이 있으며, 특히 설파제에 대해서는 검출감도가 좋지않아 단점으로 지적되어 왔다.

이같은 단점을 보완하기 위해 설파제와 병용시 상승작용을 나타내는 Trimethoprim(TMP)와 pulp disc를 이용하여 현행 TTC환원시험법을 disc plate method로 개선하였다.

즉 10% skim milk에 TMP 5ppm, agar 0.3%, 균주 약 10⁶/ml, 0.08% TTC용액이 되도록 첨가후 직경 16mm, 높이 5mm원형의 얇은 투명플라스틱 hole에 0.4ml씩 분주하여 검사용배지를 제조하고 배지에 원유를 적신 펄프디스크를 올려놓는 방법으로 TTC시험법을 변환시켜보았다. 이 disc plate method에 의한 원유에서의 TTC시험 결과는 다음과 같았다.

다 음

1. Sulfaquinoxaline, sulfadimethoxine sulfadiazine sulfathiazole sulfamethazine,sulfamerazine sulfamethoxyypyridazine 그리고 sulfamonomethoxine은 0.1-0.5ppm으로 기존의 TTC환원시험법의 검출한계 500-5,000ppm에 비해서 매우 높은 검출감도를 나타내었다.
2. 설파제 이외의 항생제로 3종의β-lactam계 0.005-0.1ppm

| | |
|----------------------|-------------|
| 1종의 Macrolides계 | 0.25-0.5ppm |
| 3종의 Aminoglycosides계 | 2-10ppm |
| 3종의 Tetracycline계 | 0.2-0.5ppm |
| 기타 Chloramphenicol | 0.1-0.5ppm |

 H₂O₂가 10⁻³에서 양성을 나타내 기존의 TTC환원 시험법의 검출성적에 유사하거나 우수한 검출감도를 나타내었다.
3. 검사시료의 양은 0.1ml이하로 줄어었고, 검사배지는 최소 7일정도 보관하면서 사용할수가 있어 기존의

- 검사법에 비해 편리하였다.
4. 원유중 설파제를 포함하여 세균발육억제 물질의 검출에 disc plate method를 활용하면 더욱 효율적인 검사법이 되리라 생각한다.

참고문헌

1. 김승룡 : 원유위생에 관한 실험적 연구, 건국대학교 대학원 논문집, 1992
2. 김영수, 황대홍 : Sulfamethazine 및 Trimethoprim 이 원유의 TTC 검사에 미치는 영향에 관한 연구, 가축위생 제15권 제2호 : 101-108, 1992
3. 농림수산부 : DAIRY STATISTICS p61-62, 1991
4. 농수산부 : 축산물 시험방법, 농수산부고시 제85호-48호 p134, 1985
5. 대한미생물학회 : 의학미생물학실습 서홍출판사 p 315, 1983
6. 박종명 : 축산식품중의 잔류물질 검사법, 도서출판 상록 p29-36, 1991
7. 수의법규 : 축산물위생처리법, 선진문화사, p144, 1991
8. 야쿠르트 과학성에 관한 연구자료 : 발효유증의 항생물질 검출방법 한국야쿠르트유업 연구실, p87-96, 1979
9. 이장락 : 수의약리학 서울대학교 출판부 p371-373, 1988
10. 정일승 : 설펜아미드제제가 우유의 T.T.C 테스트에 미치는 영향에 관한 연구, 건국대학교 대학원 논문집, 1989
11. 조병훈, 김봉환, 손성관, 진남섭, 박종명 : 원유중 잔류설파제의 검출을 위한 2,3,5-tryphenyl tetrazolium chloride (TTC) 환원시험법의 개량, 한국수의공중보건 학회지 : 제17권 제1호 p77-86, 1993
12. 축산업 협동조합중앙회 : 착유 환경과 원유 위생 관리 p1-10, 1992
13. 한국과학기술원 : 축산식품내 유해잔류물질검사와 육과 분석방법개발에 관한 연구, p463-478, 1992
14. 한국동물약품협회 : 동물약품생산판매통계 p7-9, 1984
15. 한국동물약품공업협동조합 : 동물약품등 판매실적 p19-20, 1987
16. 한국수의공중보건학회편 : 수의공중보건학 p452-454, 1990
17. 황대익, 조중순 : 우유의 Triphenyl tetrazolium Chloride 환원시험법에 대한 각종 화학물질의 영향 한국수의공중보건학회지 : 제2권 제1호 p15-18
18. Arret, B and Kirshbaum, A : A rapid disk assay method for detecting penicillin in milk. J Milk and Food Tech. 22 : 329-331, 1959
19. Bable, FJ : Slow acid production by lactic cultures : A review J Dairy sci, 38 : 705-729, 1955
20. Bergey's manual of systematic bacteriology p1069-1070, 1984
21. Betty E. Terzaghi and W.Z, Sandine : Improve medium for lactic streptococci and their bacterophage, Applied Microbiology june p807-813, 1975
22. Cerny, J and Morris, RL : Modified disk assay method for detecting antibiotics in milk. J milk and Food Tech. 18 : 281-283, 1955
23. Charm, SE, Zomer, E and Salter, R : Confirmation in northeast U.S. market milk, J Food Port, 51 : 920-924, 1988
24. Difco Manual : 10th. p939-940, 1984
25. Durbin, CG : Antibiotics in food preservation, Am J Public Health 46 : 1306-1308, 1956
26. Ella M. Barnes etal : Dairy streptococci National Insutitute for Research in Dairying, Shinfield, Reading, Berkshire, England, p386-391, 1987
27. Gerald L, Mardell and Merle and Merle A, Sande : sulfonamides, Trimethoprim-sulfamethoxazole, and agerts for urinary tract znfectrons. The pharmacological Basis of therapeutics. 16th Macmillam Pub. 10. NY : 1095-1105, 1980 2 : 177-189,
28. Hiller AJ, and Jago GR : Metabolism of streptococcus, The Austrian Journal March, vol37, p22~25, 1982

29. Igarashi, RT, Baughman RW, Nelson FE, and Hartman PA : Rapid antibiotic assay method using *Bacillus stearothermophilus*. *J Milk and Food Technol.* 24 : 143~146.
30. Johns, CK and Berzins, I : Observations on the determination of antibiotics in milk, *J Milk and Food Tech.* 19 : 14~17, 1956
31. Kornfeld, Karolus, JM and JJ, : Effect of the base layer in the cylinder plate Method for analysis of penicillin. *J Food protect.* 40 : 459~461, 1977.
32. Lyselarocque, Germain carignan and Stzphzn Sved : sulfamethazine(Sulfadimidine) residues in Canadian consumer milk. *J ASSOC Off Anal Chem, Vol73, No 3, p365~367, 1990*
33. Mandell, GL and Sande, HA : Antimicrobial agents. p.1106, Goodman and Gilman. *The pharmacological Basis of Therapeutics*
34. Marth, EH and BE. Ellickson : Antibiotic residues in milk and products-A review. *J Milk and Food Technol,* 22 : 241~249, 1959.
35. Marth, EH : Antibiotic in milk-A review. II Method for detection of antibiotic in milk. *J Milk and Food Technol,* 24 : 36~44, 1961
36. Michael D, Smedley and John D, Weber : Liquid Chromatographic determination of multiple sulfonamid residues in bovine milk, *J ASSOC Off Anal Chem, Vol73, NO 6, p875~879, 1990*
37. Neal, CE and HE, Calbert : The use of 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride as a test for antibiotic substances in milk. *J Daily Sci,* 38 : 629~633, 1955.
38. RB, Rdad, JR, JG. Bradshaw, AA. Swartzentruber and AR. Brazis : *Applied Microbiology,* May p806~808. 1971.
39. Vickers, HR, L, Bagratuni and S Alexander : Dermatitis caused by penicillin in milk. *The Lancet* 1 : 358, 1958.
40. Weber, JD and Smedley, MD : Liquid chromatographic determination of sulfamethazine in milk. *J ASSOC Off Anal Chem,* 72 : 445~447, 1989
41. WHO Thechemical Report Series 788 : Thirty-fourth Report of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives, Evaluation of certain veterinary drug residues in food. p.32, WHO, Genova, 1989

LEGENDS OF PHOTOS

Photo 1. Thin transparent plastic hole fannel(9016mm, depth 5mm)

Photo 2. Test medium fannel

Photo 3. Pulp disc on the test medium which is wetted by raw milk

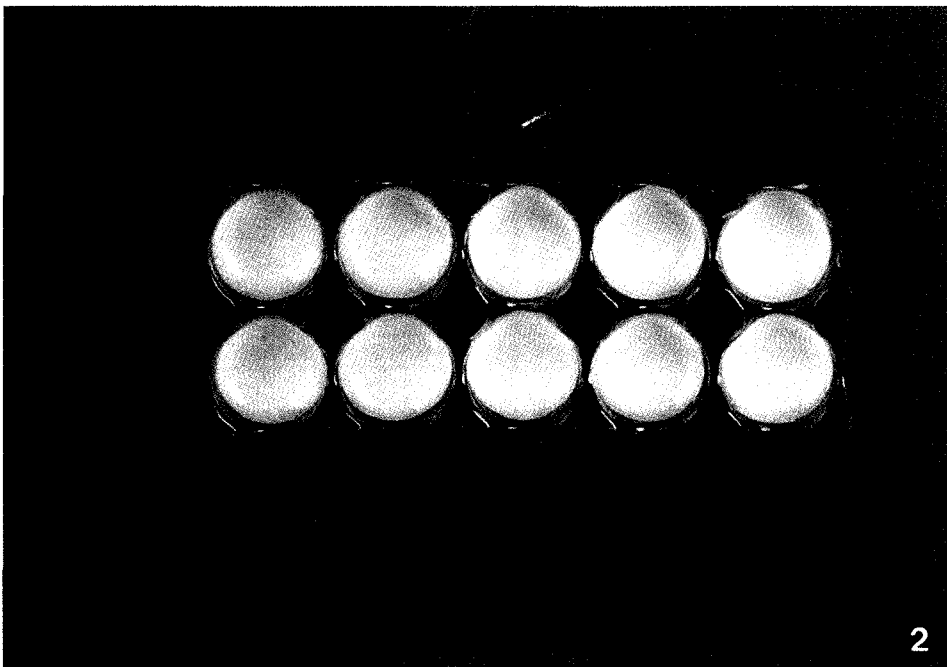
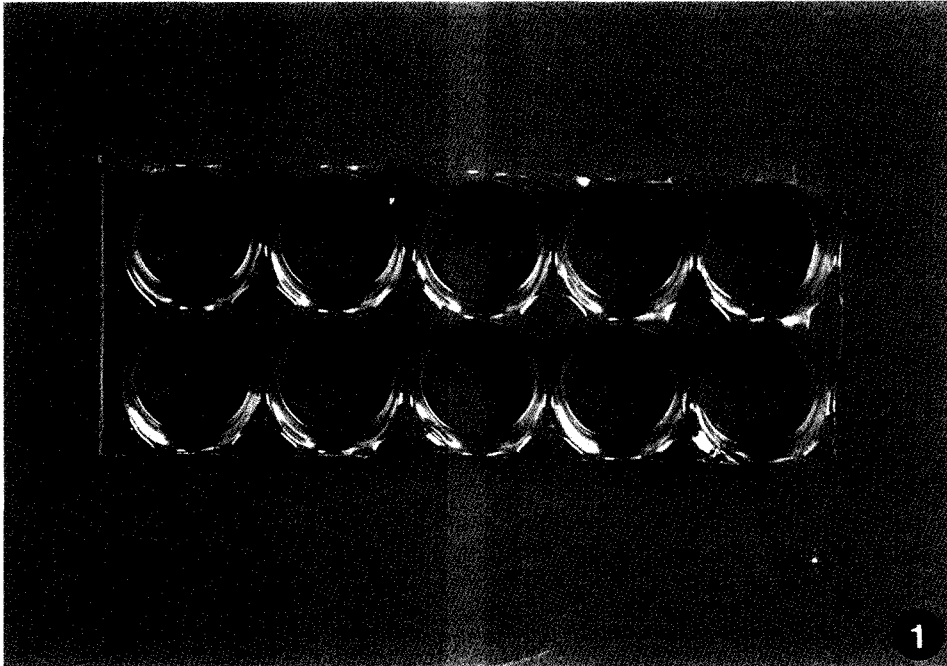
Photo 4. Test medium after approximatly 4 hour in 37°C : reddish-negative front side of test medium white positive

Photo 5. Test medium after approximatly 4 hour in 37°C : reddish-negative front side of test medium white positive

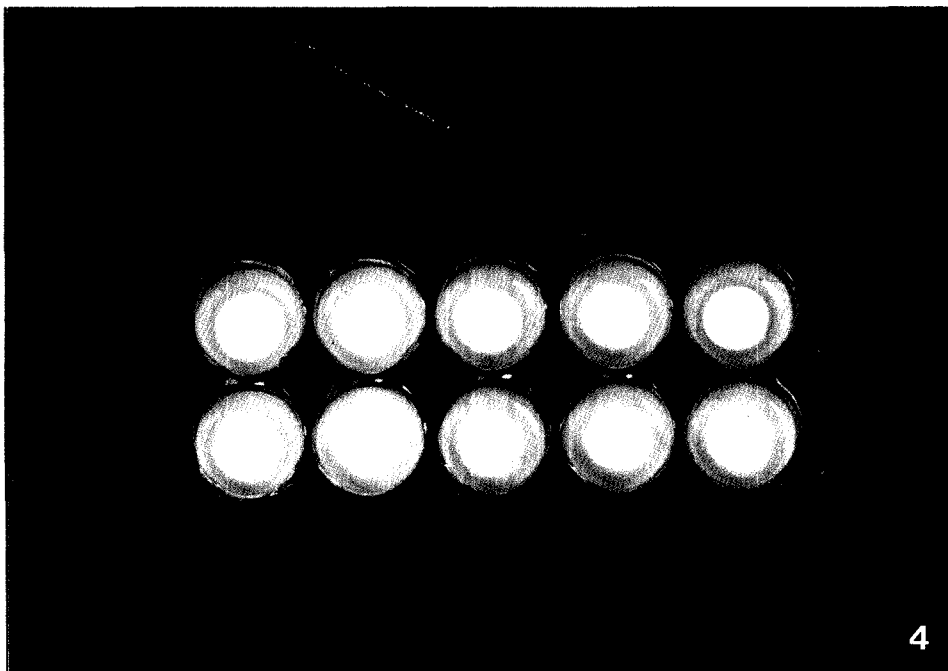
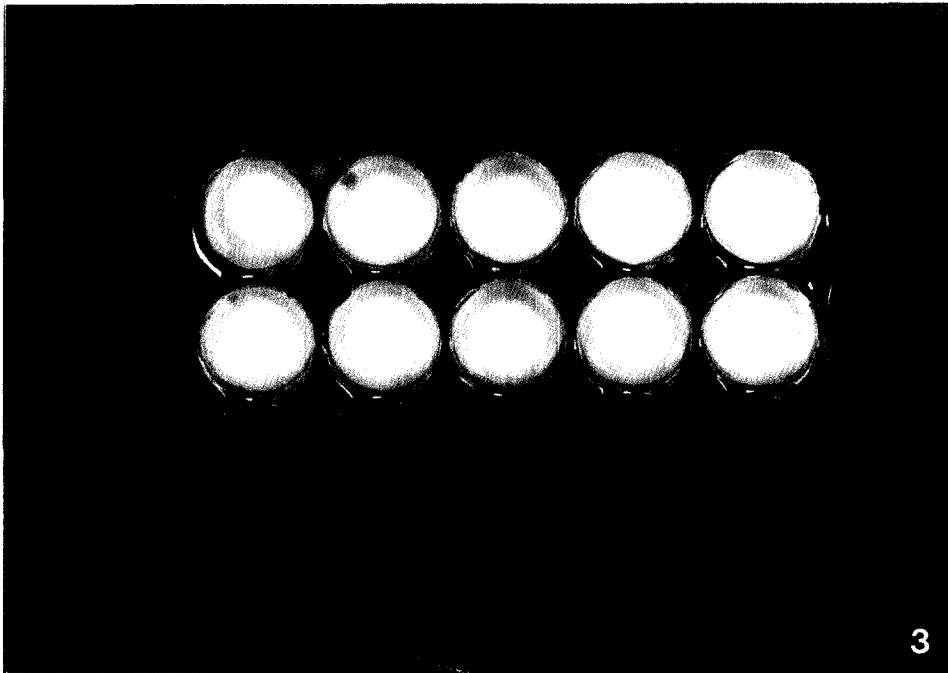
Photo 6. Test medium after approximatly 4 hour in 37°C : reddish-negative back side of test medium white positive

Photo 7. Test medium after approximatly 4 hour in 37°C : reddish-negative back side of test medium white positive

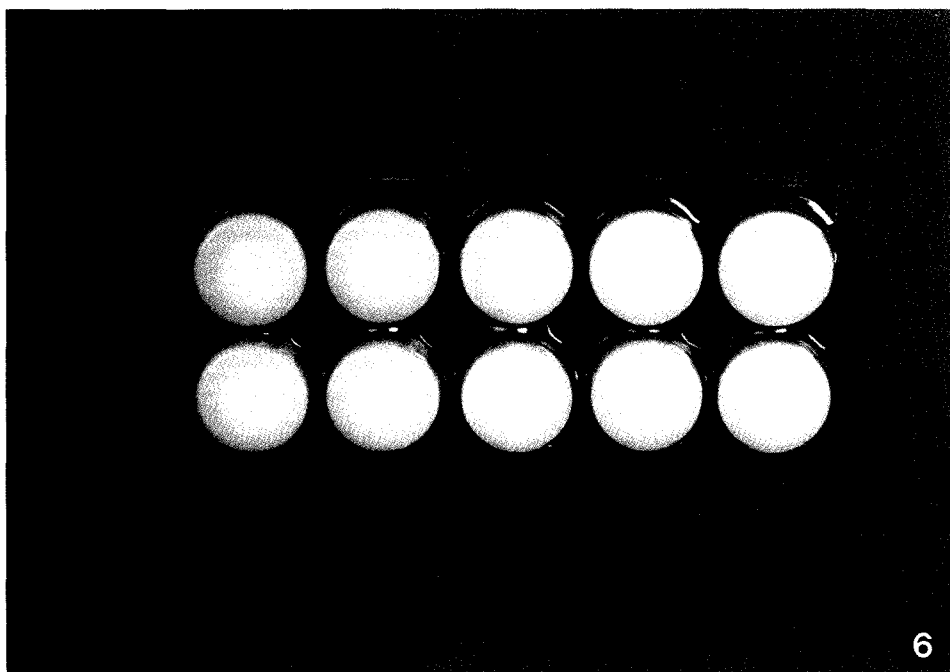
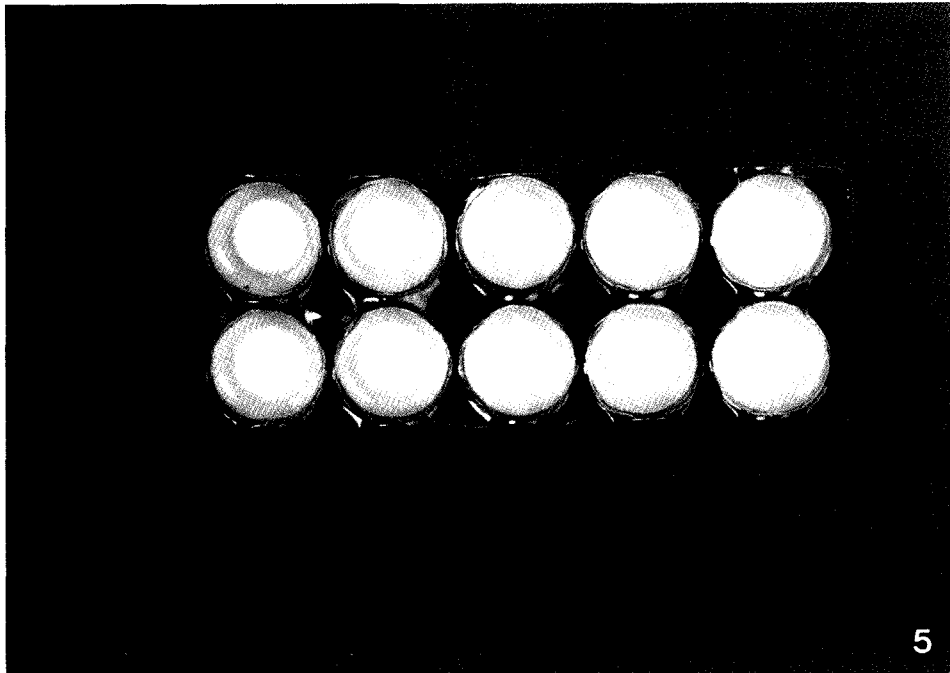
PHOTOS I



PHOTOS II



PHOTOS III



PHOTOS IV

