

## 식품 내의 잔류 항생제에 대한 미생물학적 간이검사법의 평가 및 개선

박민희 · 김태운 · 조남욱 · 정지윤<sup>1</sup> · 이순호<sup>1</sup> · 이종옥<sup>1</sup> · 김해영\*  
경희대학교 생명자원과학연구원 및 생명공학원, <sup>1</sup>식품의약품안전청 식품잔류약품과

**Evaluation and Improvement of Bioassay for Residual Antibiotics in Foods.** Park, Min-Hee, Tae-Woon Kim, Nam-Uk Jo, Ji-Yoon Jeong<sup>1</sup>, Soon-Ho Lee<sup>1</sup>, Jong-Ok Lee<sup>1</sup>, and Hae-Young Kim\*. *Institute of Life Sciences & Resources and Graduate School of Biotechnology, Kyung Hee University, Yongin 446-701, Korea, <sup>1</sup>Pesticide & Veterinary Drug Residues Division, Korea Food and Drug Administration, Seoul 122-704, Korea* – For the screening of residual antibiotics in foods, bioassays and microbiological inhibitor tests are commonly applied. These methods are tested by the various susceptibility of bacteria against different kinds of antibiotics. However, the sensitivity of bioassay is generally insufficient to detect some residual antibiotics at level of interest. This study was performed to investigate the detection limit of variable antibiotics of the bioassay and to improve the sensitivity to some antibiotics. The sensitivity of bioassay using *Bacillus megaterium* ATCC 9885, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 11778 and *Geobacillus stearothermophilus* ATCC 10149 was low in the detection of macrolides, quinolones, chloramphenicol, and monensin. On the contrary, *Micrococcus luteus* ATCC 9341 showed high sensitivity to macrolides and *Escherichia coli* ATCC 11303 was highly sensitive to quinolones and aminoglycosides. Consequently, both strains would be useful to improve sensitivity of bioassay with a wide detection range.

**Key words:** Bioassay, antibiotics, screening

### 서 론

과학의 발달로 이루어진 업적 중의 하나인 항생제(antibiotics)는 무분별한 복용과 오용이나 남용으로 인해 더 이상 우리의 생명을 보장해 주지 못하는 항생제 내성이라는 문제를 초래하고 있다. 항생제의 올바른 사용은 이러한 이유로 매우 중요한 의미를 가지며, 세계가 일일 생활권의 글로벌 시대인 오늘날 세균도 이제는 국경 없이 확산되므로 국제적인 문제로 대두되고 있다[8]. 현재 우리나라에서는 항생제의 남용으로 인해 병원균의 항생제 내성 유발 비율이 다른 나라에 비해 월등히 높고, 축산물의 항생제 잔류 등 많은 문제가 대두되고 있다[9]. 우리나라의 항생제 사용량 중 50% 정도가 축, 수산업에 사용되고 항생제 내성률은 세계적으로 손꼽을 수 있을 정도로 높은 실정이다[7]. 뿐만 아니라, 항생제의 오남용으로 인한 식품에 잔류하는 항생제 문제로 소비자들의 건강을 위협하고 있다[9]. 이런 항생제의 남용을 규제하기 위한 국가 전문 기관의 신속하고 정확한 항생제 검출 시험법이 필요한 실정이며, 효율적으로 식품의 안전성을 관리하기 위해서는 대상 식품에 사용되고 있는 다양한 항생제들에 대하여 보다 체계적이고 정확한 연구가 필요하다.

현재 사용되는 유해 잔류물질 분석방법은 HPLC, GC, HPLC/MS/MS, 비색법, ELISA, TLC 등이 있으나 대부분이 고가의 장비를 필요로 하는 기기분석으로 사용이 복잡하다는 단점을 지니고 있다[3]. 이에 반해 미생물 간이 시험법은 비용이 저렴하며 간단하게 많은 시료를 동시에 검사 할 수 있다는 장점을 지니고 있다[13]. 또한, 계열별 항생제 검출에 정확도가 높은 미생물 간이 시험법을 이용하면 비교적 검사 시간 및 절차를 줄일 수 있으므로 대량의 제품에 대하여 빠르고 정확하게 식품에 잔류하고 있는 항생제를 검출 할 수 있게 된다. 일반적으로 많이 사용되고 있는 항생제 간이 시험법은 4가지 미생물(*B. cereus* ATCC 11778, *B. stearothermophilus* ATCC 10149, *B. megaterium* ATCC 9885, *B. subtilis* ATCC 6633)을 이용하는 시험법으로 다양한 항생제 및 합성항균제 계열 중 일부 계열은 확인할 수 없고, 검출 가능한 잔류량 등을 파악할 수 없는 등의 한계가 있다. 그러나 지속적인 식품에서의 항생제 검출로 사회적인 이슈가 되고 있는 식품 잔류 항생제의 경우 많은 종류의 항생제들이 식품에 사용 되고 있다. 따라서 대상 식품에 사용되고 있는 수십 가지의 다양한 항생제들에 대하여 보다 체계적이고 정확하게 모니터링 하기 위해서는 다양한 계열의 항생제 및 합성항균제를 정성적으로 확인할 수 있으며, 감도와 정확도가 높은 시험법 개발이 필요하다. 이러한 간이 시험법이 개발될 경우 다량의 시료에 대한 항생제 및 합성 항균제의 신속한 스크리닝 검사가 가능해 질 것이며, 항생제 및 합

\*Corresponding author

Tel: 82-31-201-2660, Fax: 82-31-205-6091

E-mail: hykim@khu.ac.kr

성 항균제의 신속한 검사를 통해 관리 가능한 잔류 동물 약품이 증가될 것이다.

이에 본 연구는 현재 주로 사용되고 있는 미생물을 이용한 간이시험법보다 더 많은 잔류 항생제 및 합성항균제를 검출할 수 있고, 물질별 최저검출한계 등을 제시하여 보다 신속하고 정확한 잔류 항생제 및 합성항균제 관리를 위한 개선된 시험법을 제시하고자 하였다.

**재료 및 방법**

**표준시약**

본 실험에서는 tetracycline와 oxytetracycline, erythromycin, ampicillin, neomycin, sulfadimethoxine, chloramphenicol, monensin, novobiocin 등의 항생제와(Table 1) trimethoprim(TMP)은 Sigma사(St Louis, MO, USA) 제품을 사용하였으며, 이외의 시험 용액 및 시약 등도 이들과 동등한 규격품을 사용하였다. 실험기구로는 Advantec 사(Toyo Roshi Kaisha, Japan)의 paper disk(직경 10 mm), BBL사(Claix, France)의 streptomycin sensi-disk(직경 6 mm, 10 µg, S10), petridish(90×15 mm, SPL 10090), caliper(Mitutoyo)을 사용하였다. 배지로는 계대용으로 nutrient agar는 Criterion사

**Table 1. Solvent and diluted solution of each antibacterial agent.**

Antibacterial agent	Solvent
Tetracyclines	Tetracycline 1N HCl
	Oxytetracycline 1N HCl
	Chlortetracycline 1M NaOH
Macrolides	Erythromycin Ethanol
	Spiramycin Methanol
	Tylosin Methanol
Penicillins	Ampicillin H <sub>2</sub> O
	Penicillin G Methanol
	Cloxacillin H <sub>2</sub> O
Amino-glycosides	Neomycin -
	Gentamycin H <sub>2</sub> O
	Streptomycin H <sub>2</sub> O
Sulfonamides	Sulfadimethoxine 1M Ammonium hydroxide
	Sulfamerazine 1M Ammonium hydroxide
	Sulfathiazole 1M NaOH
Quinolones	Flumequine 1M Ammonium hydroxide
	Enrofloxacin methanol
	Oxolinic acid 0.5M sodium hydroxide
Cephalosporins	Cefazolin H <sub>2</sub> O
	Cefoperazone H <sub>2</sub> O
Peptides	Bacitracin H <sub>2</sub> O
Others	Monensin Methanol
	Novobiocin H <sub>2</sub> O
	Chloramphenicol Ethanol

(Santa maria, CA, USA), 증균용으로 tryptic soy broth는 (Difco, Detroit, MI, USA), 아포제조용으로 A-K #2 sporulating(BBL) 또는 Nutrient agar(MnSO<sub>4</sub>H<sub>2</sub>O 0.005% 첨가), 시험용 배지로는 Difco사의 Mueller-Hinton agar(pH 7.3±0.1, MH), Antibiotic medium No. 2(pH 6.55±0.05, #2), Antibiotic medium No.5(pH 7.9±0.1, #5), Antibiotic medium No.8(pH 5.85±0.05, #8), Merck사(Darmstadt, Germany)의 Test agar pH 6.0(TA)과 pH 8.0 혹은 증류수 1 L당 peptone 6.9 g, NaCl 5.1 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 g, Agar 13 g(EEC agar)을 사용하였다.

**시험용 균주**

실험에 사용될 균주는 총 6가지로 Table 2에 나타내었다. 항생물질 간이검사법에 사용되는 시험용 균주인 *Bacillus megaterium* ATCC 9885, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Bacillus cereus*. var. *mycoides* ATCC 11778, *Bacillus stearothermophilus* var. *B. calidolactis* ATCC 10149 등은 식품 의약품안전청에서 분양 받았고, *Escherichia coli* ATCC 11303, *Micrococcus luteus*(*Kocuria rhizophila*) ATCC 9341 균주 2종은 한국 미생물 보존센터(KCCM)에서 분양 받았다[12].

**아포부유액 조제**

Nutrient agar에 계대 보관되어 온 *B. megaterium* ATCC 9885, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus*. var. *mycoides* ATCC 11778, *B. stearothermophilus* var. *B. calidolactis* ATCC 10149 시험균주들을 멸균생리식염수 5 mL에 현탁시킨 후 nutrient agar 300 mL를 넣어 굳힌 배양병(Roux bottle)에 접종하여 *B. megaterium* ATCC 9885, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 11778은 37°C, *B. stearothermophilus* ATCC 10149는 55°C에서 1일간 배양하였다. 배양 후 멸균생리식염수 2-3 mL에 현탁시킨 후 아포조제용 배지 300 mL를 넣어 굳힌 배양병(Roux bottle)에 접종하여

**Table 2. Media and bacterial strains used in the microbial antibiotics screening test.**

Plate name	Bacterium	Growth medium
MH	<i>Bacillus megaterium</i> ATCC 9885	Mueller-Hinton agar
#2	<i>Geobacillus stearothermophilus</i> ( <i>Bacillus stearothermophilus</i> ) ATCC 10149	Antibiotic medium #2
#5	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC	Antibiotic medium #5
#8	<i>Bacillus cereus</i> ATCC	Antibiotic medium #8
TA	<i>Escherichia coli</i> ATCC 11303	Test agar pH 6.0
M	<i>Micrococcus luteus</i> ( <i>Kocuria rhizophila</i> ) ATCC 9341	EEC-agar pH 8.0

*B. megaterium* ATCC 9885, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 11778는 37°C 1일간 배양한 후 실온에서 6일, *B. stearothermophilus* ATCC 10149는 55°C에서 1주일간 아포를 형성시켰다. 멸균 유리구슬과 멸균증류수 25 mL를 넣어 집균한 후 *B. megaterium* ATCC 9885, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 11778는 65°C에서 30분간, *B. stearothermophilus* ATCC 10149는 85°C에서 15분간 가열한 후 *B. megaterium* ATCC 9885는 분당 15,000 × g으로 20분간, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 11778, *B. stearothermophilus* ATCC 10149는 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상층액을 제거한 다음 다시 멸균증류수에 부유시켜 세척을 3회 이상 반복하고 잔사를 멸균증류수에 부유시켜 65°C에서 30분간, 85°C에서 15분간 재 가열하였다. 이 농후한 아포부유액들 중에서 *B. megaterium*은 표준 평판희석법으로 균수를 측정한 후 아포농도를 2×10<sup>6</sup> CFU/mL가 되도록 희석하여 사용하였다. *B. subtilis*와 *B. cereus*는 MacFaland No.1, *B. stearothermophilus*는 MacFaland No.2 정도 되게 희석소분하여 냉장보관하여 사용하였다[6].

#### 균 현탁액 조제

제대 보관되어 온 *M. luteus*(*Kocuria rhizophila*) ATCC 9341, *Escherichia coli* ATCC 11303균주를 시험일 하루 전 tryptic soy broth 20 mL에 직경 2 mm 백금이로 1 loopful을 접종하여 *M. luteus*(*Kocuria rhizophila*) ATCC 9341는 32°C에서 *E. coli* ATCC 11303는 37°C 항온수조에서 16시간 진탕 배양하였다. 이 균액 1 mL를 19 mL의 멸균증류수에 희석하여 사용(균 농도는 약 2×10<sup>7</sup> CFU/mL)하였으며, 이 희석균액은 냉장 보관하면서 약 1주일간 사용하였다[1].

#### 시험용 평판의 조제

시험용 평판은 고온증기멸균 후 약 45~50°C로 가온시킨 뒤, MH배지에는 *B. megaterium*, #2 배지에는 *B. stearothermophilus*, #5 배지에는 *B. subtilis*, #8 배지에는 *B. cereus*, 그리고 TA 배지에는 *E. coli*, EEC agar pH 8.0에는 *M. luteus* 균액을 각각 해당 배지량의 1%씩 가하여 혼합한 후 8 mL씩 petridish에 분주하여 제작하였다. 이때 MH 배지의 경우 희석한 아포액을 첨가함과 동시에 TMP 10.0 µg/mL 용액도 함께 배지 100 mL당 1 mL를 첨가하였다[4].

시험할 때마다 streptomycin sensi-disk를 이용하여 각 시험용 평판의 감도를 확인하였다. 시험용 평판에 S10을 올려 놓은 뒤에 *B. megaterium*는 45°C, *B. subtilis*와 *E. coli*는 37°C, *B. cereus*와 *M. luteus*는 30°C, *B. stearothermophilus*는 55°C에서 16-18시간 배양하였다. *B. megaterium*, *B. subtilis*, *B. cereus*, *B. stearothermophilus*의 평판에서는 sensi-disk의 억제대의 직경이 각 20 mm, *E. coli*와 *M. luteus*의 평판에서는 각 12 mm 이상 되는 평판을 사용하였다[4].

#### 항생제 희석 용액 제조

각 plate 들의 항생제 잔류 수치를 알아보기 위해 100 mg의 각 항생제를 100 mL의 용량플라스크에 취해 적합한 용매로 10 mL로 녹인 뒤에 멸균증류수로 표시선까지 맞추어 혼합하여 100 µg/mL의 stock solution을 만들고, 50, 25, 10, 5 µg/mL 등의 농도들로 희석하였다[2, 11]. 각각의 항생제들의 용매 및 희석 용액은 Table 1에 나타내었다.

#### 시험결과판정

Paper disk에 각 농도들을 80 µL씩 분주하여 배지 위에 올리고, *B. megaterium*는 45°C, *B. subtilis*와 *E. coli*는 37°C, *B. cereus*와 *M. luteus*는 30°C, *B. stearothermophilus*는 55°C에서 16-18시간 배양하였다. 배양 후 미생물의 생육이 억제된 inhibition zone을 caliper를 사용하여 직경이 12 mm 이상인 것을 양성으로 판정하였다.

## 결 과

#### 간이검사법의 최저 한계 검출치

4개 균주를 사용하는 일반적인 간이검사법으로 9가지 계열로 이루어진 총 19가지의 항생제에 대한 최저한계 검출치를 측정하였고 그 결과는 Table 3에 나타내었다. 실험 결과, 잔류 허용 기준이 1.2~0.1 mg/kg인 tetracycline 계열의 경우, 실험 균주인 *B. stearothermophilus*를 이용한 #2 배지와 *B. cereus*를 이용한 #8 배지에서 최저 0.05 µg/mL까지 검출 가능했다. 주로 *B. stearothermophilus* 균주를 이용한 #2 배지에서 높은 검출 감도를 나타내는 것을 볼 수 있었다. Penicillin계의 ampicillin, penicillin G, cloxacillin도 0.005~0.05 µg/mL의 최저 검출 한계로 0.3~0.004 mg/kg인 잔류 허용 기준을 충족시켰다. 또한 잔류 허용 기준이 1.0 mg/kg인 novobiocin의 경우 *B. stearothermophilus*의 배지에서 0.25 µg/mL까지의 높은 검출 감도를 나타내었다. 그러나 peptide계의 bacitracin이나 aminoglycoside계의 neomycin, gentamicin, streptomycin의 경우 *B. stearothermophilus*를 이용한 #2 배지에서 비교적 높은 검출 감도를 나타냈으나 잔류 허용 기준을 충족시키지는 못했다. Sulfonamide계의 항생제들은 다른 균주를 이용한 배지들에 대해서는 상당히 낮은 검출 감도를 나타내지만 *B. megaterium*를 이용한 MH 배지에서는 0.1~0.5 µg/mL정도로 잔류 허용 기준을 거의 충족시켰다. MH 배지는 재현성이 좋고, 대부분의 병원균이 잘 자라고 또한 다른 배지에 비해 sulfonamide, trimethoprim, tetracycline에 대한 억제 성분이 거의 없기 때문에 sulfonamides를 검출하는데 효과적이었다[4].

총 9가지 계열의 항생제 중 6가지 계열에 대해서는 잔류 허용기준 수준의 농도를 검출할 수 있었으나, 일부 계열은 검출감도가 잔류허용기준 수준이상인 것도 있었다.

**Table 3. Minimum detection levels of antibiotics using by current bioassay.**

Antibiotics group	Antibiotics	Minimum detection level (µg/mL)			
		MH ( <i>B. megaterium</i> )	#2 ( <i>B. stearothersophilus</i> )	#5 ( <i>B. subtilis</i> )	#8 ( <i>B. cereus</i> )
Tetracyclines	Tetracycline	0.5	0.25	1	0.25
	Oxytetracycline	0.5	1	2.5	0.25
	Chlortetracycline	0.5	0.25	1	0.05
Macrolides	Erythromycin	0.25	2.5	0.1	2.5
	Spiramycin	2.5	2.5	2.5	2.5
	Tylosin	0.5	0.25	2.5	5
Penicillins	Ampicillin	0.25	0.005	50	25
	Penicillin G	2.5	0.005	50	25
	Cloxacillin	0.1	0.05	>100	>100
Aminoglycosides	Neomycin	0.5	50	5	100
	Gentamycin	0.05	50	2.5	25
	Streptomycin	0.1	10	0.25	2.5
Polypeptides	Bacitracin	2.5	1	50	100
Polyethers	Monensin	10	0.25	25	1
Chloramphenicol	Chloramphenicol	5	25	10	5
Novobiocin	Novobiocin	5	0.25	50	0.5
Sulfonamides	Sulfadimethoxine	0.1	50	>100	>100
	Sulfamerazine	0.5	50	>100	>100
	Sulfathiazole	0.25	25	>100	>100

**Table 4. Comparison of minimum detection levels of antibiotics in test organisms by the current and improved bioassay.**

Antibacterial agent	MRL (mg/kg)	Minimum detectable levels (µg/mL)						
		MH	#2	#5	#8	<i>M. luteus</i>	<i>E. coli</i>	
MLs	Erythromycin	0.125~0.1	0.25	2.5	0.1	2.5	0.05	>100
	Spiramycin	0.8~0.2	2.5	2.5	2.5	2.5	0.25	>100
	Tylosin	0.2	0.5	0.25	2.5	5	0.25	>100
PCs	Ampicillin	0.05~0.01	0.25	0.005	50	20	0.025	0.025
	Penicillin G	0.05~0.004	2.5	0.005	50	25	0.05	0.05
	Cloxacillin	0.3~0.03	0.1	0.05	>100	>100	2.5	0.025
AGs	Neomycin	10~0.1	0.5	50	5	100	10	0.1
	Gentamicin	5.0~0.1	0.05	50	2.5	25	5	0.05
	Streptomycin	1.0~0.2	0.1	10	0.25	2.5	2.5	0.1
QNs	Flumequine	1.5~0.2	10	50	100	>100	>100	0.5
	Enrofloxacin	0.3~0.05	0.5	2.5	1	2.5	10	0.25
	Oxolinic acid	0.15~0.05	5	50	25	2.5	>100	0.025

**추가 균주를 이용한 간이 검사법의 검출 감도 향상 실험**

기존의 간이검사법의 검출 감도를 향상하기 위해서 여러 가지 미생물을 이용한 간이검사법들을 조사하였다. 유럽에서 사용되고 있는 EEC-4 plate 법과 다섯 가지 균주를 이용한 STAR(Five-plate test)법[5], 여섯 가지 균주를 사용한 six-plate법[10] 등을 조사하여 간이 검사법의 감도를 보완할 *E. coli* ATCC 11303와 *M. luteus*(*Kocuria rhizophila*) ATCC 9341 두 가지 균주를 선별하였다. 또한 quinolone계

와 cephalosporin계의 총 다섯 가지의 항생제를 추가하였다. 이와 같이 향상된 bioassay 방법을 사용하여 24가지의 항생제로 실험한 결과를 Table 4에 나타내었다. 추가된 항생제에 대해 검출 감도를 알아본 결과, quinolone계의 항생제의 경우 4가지 균주를 이용한 실험에서는 잔류 허용 기준을 충족시키지 못하는 낮은 검출 감도를 나타냈으나 cephalosporin계의 항생제들은 *B. stearothersophilus*를 이용하는 #2 배지에서 잔류 허용 기준에 해당되는 높은 검출 감도를 나타내

었다. 새로 추가된 균주인 *M. luteus*(*Kocuria rhizophila*) ATCC 9341는 현재 사용되고 있는 간이 검사법에서는 검출 감도가 좋지 않았던 macrolide계열의 검출 감도가 0.25~0.05 µg/mL 정도로 잔류 허용 기준과 거의 일치하는 것으로 나타났다. 또한, *E. coli* ATCC 11303의 경우 새로 추가된 quinolone계의 잔류 허용 기준에 해당되는 높은 검출 감도를 가지고 있었을 뿐만 아니라 penicillin계, aminoglycoside계에 대해서도 높은 검출 감도를 가지고 있음을 확인하였다. 하지만 *B. subtilis* ATCC 6633는 잔류 항생제 정성시험을 위한 미생물 균주로 활용도가 낮았다.

## 고 찰

현재 우리나라의 미생물을 이용한 식품에서의 항생제 잔류 물질 검사법은 *B. megaterium* ATCC 9885, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, *B. stearothermophilus* var. *B. calidolactis* ATCC 10149의 4가지 균주를 통하여 생육억제 여부를 이용하는 실험방법을 사용하고 있다. 본 연구에서는 기존에 제시된 실험방법을 이용하여 9가지 계열의 총 19가지 항생제에 대한 최저 한계 검출치에 대해 조사하였다. 결과를 보면 9가지 계열 중 6가지 계열인 tetracyclines, penicillins, aminoglycosides, sulfonamides, peptides, novobiocin에 대해서는 잔류 허용 기준을 충족시키는 높은 감도를 나타내었으나 나머지 3가지 macrolides, monensin, chloramphenicol에 대해서는 비교적 감도가 낮았다. 또한, 국내 축·수산물에 대한 항생제 및 합성항균제 잔류허용기준은 2007년 10월 기준으로 항생물질 25종, 합성 항균제 21종으로 설정되어 있어 이를 보완하고자 quinolones, cephalosporins계열 항생제를 추가하여 실험하였다. 추가한 두 가지의 항생제 중 quinolones계열은 일부 낮은 농도의 잔류허용기준 수준은 검출하지 못하는 것도 있었으나, cephalosporins계열의 경우는 *B. stearothermophilus*를 이용한 #2 배지에서 잔류 허용 기준을 충족시키는 높은 감도를 나타내었다.

현재의 잔류 항생제 간이검사법의 검출 감도의 개선 및 검출 계열을 확대시키기 위하여 *E. coli* ATCC 11303와 *M. luteus*(*Kocuria rhizophila*) ATCC 9341를 추가하였고, 두 가지 계열의 항생제를 추가하였다. 추가 균주를 통하여 11 계열 총 24개의 항생제에 대한 최저 한계 검출치를 알아보았다. 그 결과 현재 사용되고 있는 4가지 균주를 이용한 간이검사법에서는 잔류 허용 기준을 충족시키지 못했던 계열들을 어느 정도 보완할 수 있었다. 우선 macrolides는 50S ribosome의 23S rRNA에 가역적으로 결합하여 사슬연장 반응과 단백질 합성하는 정균성 약물로서 주로 그람 양성균에 항균력을 가지고 있다[4]. 이에 *M. luteus*는 그람 양성의 구균으로 macrolides의 검출 감도를 높이는데 활용되었다. 현재의 방법에서 잔류 허용 기준을 충족시키지 못했던

macrolides계열의 검출 한계치가 *M. luteus*(*K. rhizophila*) ATCC 9341의 균주 사용시 최저 검출 한계치가 0.05~0.25 µg/mL로 검출 감도를 향상 시킬 수 있었다. 새로이 추가된 항생제인 quinolones는 분자량이 적은 친수성 분자로 그람음성세균의 porin을 쉽게 통과한다[4]. Oxolinic acid와 같은 quinolones의 1세대는 그람음성세균에서만 항균 효과가 있었다. Quinolones는 그람음성균주에서는 주로 DNA gyrase 억제로 작용하며 그것은 세균의 DNA를 느슨하게 만들거나 풀어지게 하여 염색체 복제를 중단시킴으로써 세포 분열과 유전자 발현을 못하게 한다[4]. 이러한 이유로 새로이 추가된 균주 *Escherichia coli* ATCC 11303는 quinolones계열에 대한 잔류허용기준을 충족시키는 높은 검출 감도뿐만 아니라 penicillins, aminoglycosides계열들에 대한 높은 감도 또한 확인할 수 있었다. 하지만 monensin의 잔류허용기준은 0.05 mg/kg이나 최저 검출한계는 0.25 µg/mL로 감도가 낮은 편이고, chloramphenicol은 기준이 “불검출”로 미생물을 이용한 간이시험법의 이용보다는 기기분석방법으로 검출하는 것이 더욱 효과적일 것으로 판단된다. 따라서 추가 균주를 통하여 quinolones, macrolides 계열들에 대한 검출 감도는 보완되었으나 monensin과 chloramphenicol에 정성시험법은 추가 연구가 필요할 것으로 생각된다.

## 요 약

식품 내의 잔류 항생물질의 검사는 주로 미생물의 생육 억제 여부를 통한 생물학적인 분석을 이용한다. 이러한 방법은 여러 가지 계열의 항생제들에 대한 미생물의 민감성을 토대로 이용되고 있다. 그러나 현재 사용하고 있는 미생물 들로는 동물용의약품으로 허가되어 식용동물에 사용되고 있는 점점 다양해지는 항생제 및 합성항균제를 식품에서 모두 검출할 수는 없다는 한계가 있다. 그러므로 본 연구는 검출 가능한 항생제 및 합성항균제 계열의 범위를 확대하고, 각 약품별 감도를 증진시키기 위한 새로운 방법들을 조사하였다. *B. megaterium* ATCC 9885, *B. subtilis* ATCC 6633, *B. cereus* ATCC 11778 and *Geobacillus stearothermophilus* (*B. stearothermophilus*) ATCC 10149를 사용한 검사의 민감성은 macrolides, quinolones와 monensin, chloramphenicol에 대한 검출 감도가 낮았다. 반면에 *M. luteus*(*K. rhizophila*) ATCC 9341는 macrolides에 대한 높은 검출 감도를 나타냈고, *E. coli* ATCC 11303는 quinolones와 aminoglycosides에 대한 높은 민감성을 나타냈다. 결론적으로, 두 균주의 추가로 검출가능한 항생제 및 합성항균제의 범위를 확대하였으며, 검출감도를 높일 수 있게 되었다.

## 감사의 글

본 연구는 식품의약품안전청 용역연구 과제인 ‘미생물을

이용한 항생제 및 합성항균제 간이시험법 개선 연구' 사업의 지원으로 수행되었으며 박민희 학생은 경희대학교 2008년 1차 우수연구논문 장학금 지원이 되었으며 이에 감사드립니다.

## REFERENCES

1. Cho, B. H., N. S. Jin, S. W. Son, H. G. Kang, H. S. Lee, J. H. Kim, and B. H. Kim. 1996. Evaluation of EEC 4-Plate test for the sensitivity and identification of families of antimicrobial drugs in meat. *J. Fd. Hyg. Safety* **11**: 307-314.
2. Cho, B. H., C. M. Lim, S. M. Yun, S. J. Park, B. H. Kim, and S. W. Son. 2005. Microbiological inhibition test for screening of fluoroquinolone residues in chicken tissue and eggs. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* **29**: 37-44.
3. Chu, K. S., U. P. Oh, I. Y. Choi, H. J. Song, and H. S. Chai. 1997. Detection of residual sulfamethazine in serum, urine and muscle of slaughtered pigs. *Kor. J. Vet. Serv.* **20**: 161-168.
4. Eo, Y., H. Y. Kim, and K. J. Yoon. 2007. Antimicrobial agents and antimicrobial susceptibility test, 1st ed., pp. 9-348. Korean studies information Co. Ltd., Korea.
5. Gaudin, V., P. Maris, R. Fuselier, J. L. Ribouchon, N. Cadieu, and A. Rault. 2004. Validation of a microbiological method: the STAR protocol, a five-plate test, for the screening of antibiotic residues in milk. *Fd. Add. Conta.* **21**: 422-433.
6. Jung, S. H., J. W. Kim, and S. G. Sohn. 1999. Comparison of detectable levels for screening residual antibacterial agents by bioassay. *J. Kor. Fish. Soc.* **32**: 256-260.
7. Jung, Y. H. 2008. Production tendency of antimicrobial resistant bacteria from animal from environment in Korea. *Kor. J. of Environ. Agric. Workshop Proceeding*, pp. 35-40.
8. Kim, S. H., Y. H. Park. 2008. Antimicrobial resistance and food safety. *Kor. J. Fd. Hyg. Safe* **3**: 30-36
9. Kwon, Y. I., T. W. Kim, H. Y. Kim, Y. H. Chang, H. S. Kwak, C. J. Woo, and Y. H. Chung. 2007. Monitoring of antimicrobial resistant bacteria from animal farm environments in Korea. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **35**: 17-25.
10. Myllyniemi, A. L., L. Nuotio, E. Lindfors, R. Rannikko, A. Niemic, and C. Bckmanc. 2001. A microbiological six-plate method for the identification of certain antibiotic groups in incurred kidney and muscle samples. *Analyst* **126**: 641-646.
11. Okerman, L., V. H. Johan, and D. Z. Lieven. 2007. Stability of frozen stock solutions of beta-lactam antibiotics, cephalosporins, tetracyclines and quinolones used in antibiotic residue screening and antibiotic susceptibility testing. *Anal. Chim. Acta.* **586**: 284-288.
12. Son, S. W., B. H. Cho, N. S. Jin, H. S. Lee, S. H. Yook, J. H. Kim, J. J. Lee, and Y. S. Lee. 1996. Development of *Bacillus megaterium* disk assay kit for the determination of antibacterial residues in animal tissues. *J. Fd. Hyg. Safety* **11**: 315-321.
13. Son, S. W., E. Zomer, S. E. Charm, F. M. Clydesdale, B. H. Cho, B. S. Lee, J. M. Park, J. C. Rhee, and Y. S. Lee. 1999. Paper-disk assay based on agar diffusion method for detecting quinolones in foods of animal origin. *Kor. J. Vet. Publ. Hlth.* **23**: 251-259.

(Received Oct. 15, 2008/Accepted Nov. 26, 2008)