



Delvo test, Eclipse 100 및 Parallax를 이용한 산양유의 잔류항균물질 검출 비교

함준상* · 정석근 · 신지혜 · 한기성 · 채현석 · 유명모 · 안종남 · 허태영 ·
고상현¹ · 박광욱¹ · 최석호² · 이완규³

농촌진흥청 축산과학원, ¹(주)엠젠, ²상지대학교, ³충북대학교

Comparison of Antimicrobial Residue Detection in Goat Milk by the Delvo, Eclipse 100, and Parallax Tests

Jun-Sang Ham, Seok-Geun Jeong, Ji-Hye Shin, Gi-Sung Han, Hyun-Seok Chae,
Young-Mo Yoo, Jong-Nam Ahn, Tae-Young Hur, Sang-Hyun Ko¹, Kwang-Wook Park¹,
Seok-Ho Choi², and Wan-Kyu Lee³

National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea

¹MGEN, Seoul 153-023, Korea

²Sangji University, Wonju 220-702, Korea

³Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea

ABSTRACT

The aim of this work was to assess the Delvo test for the detection of antimicrobial residues in goat milk. A total of fifty six samples (eight farms, seven samplings each) were analyzed by the Delvo, Eclipse 100, and Parallax tests. None of the samples showed positive results with the Parallax test which is based on immuno-chemical methods. However, 37.5% of samples showed positive results with the Delvo test. 3.6% of samples showed positive results with the Eclipse 100 test, which is based on a microbiological method. The Delvo test is included in the 'standard methods for the examination of raw milk' by the National Veterinary Research and Quarantine Service as a microbiological method used for the detection of antimicrobial residues. Because "raw milk" is defined as 'milked state of cow, ewe and goat milk for sale or for processing' in the Animal Food Products Processing Law, the Delvo test should be excluded from the 'standard method for the examination of raw milk', or additional official documents referring to the Delvo test as not appropriate for the detection of antimicrobial residues of goat milk are required.

Key words : goat milk, antimicrobial residues, Delvo test

서 론

원유내 항생물질의 존재는 심각한 독성학적(Dewdney *et al.*, 1991; Currie *et al.*, 1998) 및 기술적 문제를 불러올 수 있다(Mourot and Loussourorn, 1981; Brady *et al.*, 1988). 게다가, 항생물질의 존재는 유제품 제조에 이용되는 미생물적 공정을 지체시킬 수 있다. 따라서 원유내 잔류물질 방지는 가공중 문제를 줄일 뿐만 아니라 소비자에 전이를 막을 수 있다는 점에서 기본적인 중요성을 갖는다.

최근에, 우유 내에 존재하는 잔류물질의 신속한 검출을 위한 여러 가지 방법들이 개발되었고(IDF, 1991), 원유검사 표준화요령(국립수의과학검역원, 2001)에서 미생물학적 방법으로 BsDA(Difco Lab.), BSDA(Charm Sci. Inc.), BR Test (Idetek Inc), Charm Test(Charm Sci. Inc), 그리고 Delvo Test(Gist-Brocades Inc.)가, 면역화학적 방법으로 Agri-Screen Test(Neogen corp.), CharmII Test(Charm Sci. Inc.), Cite Probe Test(IDEXX Corp), EZ-screen(EDITEK), Lac Tek(Idetek Inc.), Penzyme(Smithkline Beecham), Signal Foersite(Smithkline Beecham), Spot Test(Combridge Biotech)가 소개되어 있다. 그런데, 축산물가공처리법 제2조 4항에서 "원유"라 함은 판매 또는 판매를 위한 처리·가공을 목적으로 하는 착유상태의 우유와 양유를 말한다

*Corresponding author : Jun-Sang Ham, National Institute of Animal Science, RDA, Chuksangil 77, Omokchundong Kwonsungu, Suwon 441-706, Korea. Tel: 82-31-290-1692, Fax: 82-31-290-1697, E-mail: hamjs@rda.go.kr

고 정의되어 있어 원유검사표준화요령은 산양유에도 적용된다.

미생물학적 방법은 우유내 억제물질의 탐색에 널리 이용되며 신속하고, 사용이 간편하며, 경제적이다. 이중 몇종, 예를 들어 Brilliant Reduction Test(BRT)와 Delvo test는 *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*를 test strain으로 사용하며 EU의 품질관리 실험실에서 많이 사용된다(Molina *et al.*, 2003a). 그런데, 여러 연구에서(Macaulay와 Packard, 1981; Oliver *et al.*, 1984; Seymour *et al.*, 1988; Cullor, 1992; Halbert *et al.*, 1996) 미생물적 억제물질 실험 결과 '가양성 false-positive' 문제를 지적한바 있다. 이러한 결과는 내재적 항미생물제(예, lactoperoxidase, lactoferrin, 그리고 lysozyme 효소들)(Carlsson과 Bjrcck, 1987; Beukers, 1991; Schiffmann *et al.*, 1992), 높은 체세포수(Carlsson and Bjrcck, 1989; Tyler *et al.*, 1992; Van Eenennaam, 1993), 그리고 유리지방산(Mayra-Makinen, 1990)의 존재에 기인할 수 있다. 한편, Montero 등(2005)은 양유의 항생물질 검출에 있어서 '가양성' 문제를 지적하고, 양유 시료 분석을 위해 개발된 미생물학적 방법인 Eclipse100 test가 beta-lactam 항생제, sulfadimethoxine 및 sulfathiazole의 잔류 검출에 적절하다고 보고하였다. 따라서 본 연구에서는 미생물학적 방법으로 우유의 항생물질 검출을 위해 국내에서 많이 사용되는 Delvo test로 산양유를 분석하고 Eclipse100 test 및 면역화학적 방법인 Parallax test(Idetek Inc.)와 비교함으로써 Delvo test의 산양유 적용시 문제점을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

산양유

(주)엠젠에 납유하는 8개 목장에서 9월에서 11월에 생산된 산양유를 시료로 사용하였다.

일반성분

산양유의 단백질, 지방, 유당, 총고형분, 그리고 유리지방산 함량을 MilkoScan FT120(Foss, Denmark)로 측정하였다.

체세포수

산양유의 체세포수는 Fossomatic(Foss Electric, Hillerød, Denmark)으로 측정하였다.

항생물질 신속검출 시험

산양유 시료를 Delvo test(DSM Food Specialities, Dairy Ingredients, Delft, the Netherlands), Eclipse100 test(ZEU-Inmunotec, Zaragoza, Spain), 그리고 Parallax(Idetek Inc. U.S.A)로 사용자 매뉴얼에 따라 시험하였다. 잔류물질 검출을 위한 미생물적 억제실험 방법은 *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* 같은 미생물의 포자 생장 억제에 기초한다. 미생물의 생장은 배지 내에 존재하는 산-염기 지시제의 색깔 변화로 판정된다. Eclipse100 방법을 간략히 기술하면 다음과 같다. 제공된 용액 1 mL을 산양유 시료 1 mL과 혼합한 다음, 100 μ L를 microplate에 취해 4°C에서 1시간 동안 정치한다. 마이크로플레이트를 세척하고 64 \pm 1°C에서 음성 대조구(negative control)의 bromocresol purple의 색이 변할 때까지 2시간 15분에서 2시간 30분 동안 배양하고 결과를 판정한다.

통계분석

항생물질 신속검출 시험으로 판정한 산양유 시료의 체세포수를 양성과 음성으로 나누어 T-검정(SAS EG 3.0, Cary, NC) 하였다.

결과 및 고찰

산양유의 일반조성

시료로 사용된 산양유의 일반성분, 유리지방산 함량, 그리고 체세포수는 Table 1과 같다. 단백질 함량은 최저 2.82%에서 최고 4.30%, 지방함량은 최저 2.94%에서 최고 4.63%, 유당 함량은 최저 4.11%에서 최고 4.59%, 총고형분 함량은 최저 10.82%에서 최고 13.02%, 유리지방산 함량은 최저 0.73%에서 최고 2.42%를 나타내었다. 산양유의 유리지방산 함량은 우유의 유리지방산 함량 0.25%(Ham 등, 2005)에 비해 약 3-9배 이상 높은 수치로, 미생물적 억제물질 실험 결과 '가양성 false-positive' 문제 발생의 원

Table 1. General composition and free fatty acid content of the goat milk (N=4)

Farm	Protein	Fat	Lactose	Total solid	Free Fatty acid
A	2.97 \pm 0.04	3.46 \pm 0.30	4.26 \pm 0.05	11.07 \pm 0.09	1.78 \pm 0.68
B	2.99 \pm 0.19	3.50 \pm 0.60	4.40 \pm 0.16	11.24 \pm 0.47	1.56 \pm 0.49
C	3.23 \pm 0.23	3.69 \pm 0.32	4.52 \pm 0.04	12.03 \pm 0.48	1.43 \pm 0.44
D	3.02 \pm 0.10	3.58 \pm 0.34	4.25 \pm 0.14	11.50 \pm 0.54	1.41 \pm 0.24
E	3.16 \pm 0.35	3.68 \pm 0.70	4.48 \pm 0.01	11.83 \pm 0.93	1.07 \pm 0.05
F	3.08 \pm 0.10	3.49 \pm 0.53	4.45 \pm 0.07	11.60 \pm 0.66	1.15 \pm 0.45
G	3.01 \pm 0.10	3.39 \pm 0.36	4.35 \pm 0.08	11.43 \pm 0.48	1.19 \pm 0.25
H	3.34 \pm 0.07	4.28 \pm 0.39	4.49 \pm 0.12	12.58 \pm 0.50	1.02 \pm 0.18

인중 하나가 될 수 있다(Mayra-Makinen, 1990).

항생물질 신속검출

산양유의 잔류물질을 파라룩스, Eclipse100, Delvo test 3가지 방법으로 분석한 결과는 Table 2와 같다. 면역화학적 방법인 파라룩스의 경우 모든 시료에서 음성으로 나타났으나, 동일한 시료에서 Eclipse100이나 Delvo test의 경우 양성(+)이 나타났다. Eclipse100의 경우 3.57%(56시료중 2시료)의 양성율을 나타냈으며 Delvo test의 경우 37.5%(56시료중 21시료)의 양성율을 나타내었다. Molina 등(2003a)은 보존제를 사용하지 않은 시료(BRT-AiM 96.3%와 Delvo test 97.7%)와 비교시 acidiol로 보존된 시료(BRT-AiM 90.2%와 Delvo test 91.1%)에서 미생물적 억제 방법의 특이성이 낮아진다고 보고하였으며, Delvo test(Althaus *et al.*, 2002)와 BRT-AiM(Molina *et al.*, 2003b) 같은 미생물적 방법은 베타락탐 잔류물질 검출에는 좋은 민감성을 보였으나 다른 그룹의 항생물질 검출력이 낮다는 점을 주목해야 한다고 주장하였다. Montero 등(2005)은 Eclipse100이 양유에 있어 특이성이 높고 ‘가양성’ 문제가 없다고 보고하였으며, 항균물질의 검출한계는 ampicillin 7 µg/kg, cloxacillin 68 µg/kg, oxacillin 28 µg/kg, penicillin ‘G’ 5 µg/kg, cephalixin 115 µg/kg, cefoperazone 110 µg/kg, sulfadimethoxine 170 µg/kg, 그리고 sulfathiazole 250 µg/kg이라고 보고하였다. 그런데, aminoglycosides, macrolides, tetracyclines, 그리고 quinolones는 *B. stearothermophilus* var. *calidolactis*의 민감도가 낮아 EU에서 설정된 허용한계(MRLs)에서 검출되지 않아 개선이 필요하다고 보고하였다. 본 실험에 사용된 산양유는 목장의 집합유로 항생제 농도를 알 수는 없으나 면역화학적 방법인 파라룩스 테스트 결과에서 음성으로 판정된 시료가 37.5%의 양성율을 보인 Delvo test는 산양유의 잔류항균물질 신속검출 방법으로 적합하지 않은 것으로 생각된다.

체세포수와 잔류항균물질 신속검출결과

미생물적 억제물질 실험 결과 ‘가양성 false-positive’ 문제는 lactoperoxidase, lactoferrin, 그리고 lysozyme 효소들

같은 내재적 항미생물제와 높은 유리지방산 함량과 함께 높은 체세포수의 존재 때문으로 보고된바 있다. 이중 높은 체세포수는 검출방법이 특정 미생물의 포자 성장에 기초한다는 점을 고려할 때 설득력이 높지 않다. Table 3의 체세포수를 Table 2의 결과에 따라 양성(+)과 음성(-)으로 나누어 T-검정을 실시한 결과 양성그룹의 평균 체세포수는 1,509.1±157.94이었으며 음성그룹은 1,660.8±157.94를 나타내었으며 통계적 유의성이 인정되지 않았다($p>0.05$). 그런데, H 농장의 경우 분석 3회차부터 양성을 나타낼 뿐만 아니라 체세포수도 낮게 나타나 실제로 항생물질의 사용이 의심된다. H 농장의 성적을 제외하고 분석시 양성그룹

Table 2. Detection of antimicrobial agents by Parallax, Eclipse100, and Delvo test

Sample (Farm)	Method	No. of analysis						
		1	2	3	4	5	6	7
A	Parallax	-	-	-	-	-	-	-
	Eclipse100	-	-	-	-	+	-	-
	Delvo	+	-	-	-	+	-	-
B	Parallax	-	-	-	-	-	-	-
	Eclipse100	-	-	-	-	-	-	-
	Delvo	-	-	+	-	-	+	+
C	Parallax	-	-	-	-	-	-	-
	Eclipse100	-	-	-	-	-	-	-
	Delvo	-	-	-	+	-	-	-
D	Parallax	-	-	-	-	-	-	-
	Eclipse100	-	-	-	-	-	-	-
	Delvo	+	-	-	+	-	+	-
E	Parallax	-	-	-	-	-	-	-
	Eclipse100	-	-	-	-	-	-	-
	Delvo	+	-	+	+	-	-	-
F	Parallax	-	-	-	-	-	-	-
	Eclipse100	-	-	-	-	-	-	-
	Delvo	+	-	-	+	+	-	-
G	Parallax	-	-	-	-	-	-	-
	Eclipse100	-	-	-	-	-	-	-
	Delvo	-	-	-	-	+	-	-
H	Parallax	-	-	-	-	-	-	-
	Eclipse100	-	-	+	-	-	-	-
	Delvo	-	-	+	+	+	+	+

Table 3. Somatic cells of the goat milk samples

(Unit : 1,000 cells/mL)

Sample (Farm)	No. of analysis						
	1	2	3	4	5	6	7
A	2,252	1,847	1,853	1,313	2,738	3,949	4,284
B	1,739	1,859	1,835	823	776	813	1,559
C	2,832	2,457	2,248	2,182	1,036	967	492
D	2,715	1,786	3,990	1,761	1,407	1,052	1,139
E	2,369	1,769	2,081	1,955	1,959	792	2,513
F	1,925	1,380	1,930	1,013	1,091	703	1,374
G	1,801	1,508	693	1,076	697	428	1,366
H	902	1,136	644	997	664	718	630

1,699.7±168.03보다 높아졌으나 통계적 유의성은 인정되지 않았다($p>0.05$). 따라서 높은 체세포수의 존재가 미생물적 억제물질 실험에서 가양성 결과를 일으키는지 여부는 좀 더 많은 시료의 분석이 필요하다고 생각된다.

요 약

본 연구는 우유내 잔류물질 검사에 신속검출법으로 많이 사용되는 Delvo test가 산양우의 잔류물질 검사에도 적합한지 확인하기 위해 수행되었다. 8개 산양유목장 원유를 7회에 걸쳐 총 56개 시료를 Delvo test, Eclipse100, 그리고 Parallax로 분석하였다. 면역화학적 방법인 파라루스에서는 양성 시료가 전혀 검출되지 않았으나 Delvo test에서는 37.5%의 양성율을 나타내었고 같은 미생물적 검출법인 Eclipse100에서는 3.6%의 양성율을 나타내었다. Delvo test는 국립수의과학검역원에서 발간한 원유검사표준화요령에 미생물학적 잔류물질 신속검출법으로 기재되어 있고, 축산물가공처리법상 “원유”의 정의가 ‘판매 또는 판매를 위한 처리·가공을 목적으로 하는 착유상태의 우유와 양유를 말한다’는 점을 고려할 때 Delvo test를 원유검사표준화요령에서 제외시키거나 Delvo test가 산양우의 잔류물질 신속검출법으로 적합하지 않다는 근거가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

- Althaus, R.L., Molina, P., Molina, A., Torres, A., and Fernandez, N. (2002) Detection[®] limits of antimicrobial agents in ewe milk by Delvotest. *Milchwissenschaft*. **57**, 660-664.
- Beukers, R. (1991) Some special aspects of Delvotest[®]. In: Inhibitory Substances in Milk-Current Analytical Practice. IDF Bull. No. 283. Ind Dairy Fed., Brussels, Belgium, pp. 20-23.
- Brady, M. S. and Katz, S. E. (1988) Antibiotic/antimicrobial residues in milk. *J. Food Prot.* **51**, 8-11.
- Carlsson, A. and Bjrcck, L. (1987) The effect of some indigenous antibacterial factors in milk on the growth of *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis*. *Milchwissenschaft*. **42**, 283-285.
- Carlsson, A. and Bjrcck, L. (1989) Lactoferrin and lysozyme in milk during acute mastitis and their inhibitory effect in Delvotest. *J. Dairy Sci.* **72**, 3166-3174.
- Cullor, J. S. (1992) Test for identifying antibiotic residues in milk: how well do they work? *Vet. Med.* **87**, 1235-1241.
- Currie, D., Lynas, L., Kennedy, G., and Mc Caughey, J. (1998) Evaluation of modified EC four plate method to detect antimicrobial drugs. *Food Addit Contam.* **15**(6), 651-660.
- Dewdney, J. M., Maes, L., Raynaud, J. P., Blanc, F., Scheid, J. P., Jackson, T., Lens, S., and Verschuere, C. (1991) Risk assessment of antibiotic residues of beta-lactams and macrolides in food-products with regard to their immunoallergic potential. *Food Chem. Toxicol.* **29**, 477-483.
- Halbert, L. W., Erskine, R. J. Barlett, P. C., and Johnson, G. L. (1996) Incidence of false positives results for assays used to detect antibiotics in milk. *J. Food Prot.* **8**, 886-888.
- Ham, J. S., Noh, Y. B., Kim, S. I., Kim, H. S., Jeong, S. G., Chae, H. S., Ahn, J. N., Jo, Cheorun, and Lee, W. K. (2005) Changes of chemical, bacteriological, and allergenicity of raw milk by gamma irradiation. *J. Korean Dairy Technol. Sci.* **23**, 93-98.
- International Dairy Federation. (1991) Detection and confirmation of inhibitors in milk and milk products. IDF. Bull. No. 258. Int. Dairy Fed., Brussels, Belgium.
- Macaulay, D. M. and Packard, V. S. (1981) Evaluation of methods used to detect antibiotic residues in milk. *J. Food Prot.* **44**, 696-698.
- Myr-Mkinen, A. (1990) T-101 test for antibiotic residues in milk. *Scand. Dairy Inf.* **2**, 38-39.
- Molina, M. P., Althaus, R. L., Balasch, S., Torres, A., Peris, C., and Fernandez, N. (2003a) Evaluation of screening test for detection of antimicrobial residues in ewe milk. *J. Dairy Sci.* **86**, 1947-1952.
- Molina, M. P., Althaus, R. L., Torres, A., Peris, C., and Fernandez, N. (2003b) Antimicrobial agent detection in ewe milk by the microbial inhibitor test(Brilliant Black Reduction Test - BRT-Aim). *Int. Dairy J.* **13**, 821-826.
- Montero, A., Althaus, R. L., Molina, A., Berruga, I., and Molina, M. P. (2005) Detection of antimicrobial agents by a specific microbiological method (Eclipse100) for ewe milk. *Small Ruminant Res.* **57**(2-3), 229-237.
- Mourot, D. and Loussourorn, S. (1981) Sensibilitdes ferments lactiques aux antibiotics utilis en mdicine vtrinaire. *Rec. Med. Vt.* **157**, 175-177.
- Oliver, S. P., Duby, R. T., Prange, R. W., and Tritscler, J. P. (1984) Residues in colostrum following antibiotic dry cow therapy. *J. Dairy Sci.* **67**, 3081-3083.
- Schiffmann, A. P., Schtz, M., and Wiesner, H. (1992) False negative and positive results in testing for inhibitory substances in milk. Factors influencing the brilliant black reduction test (BRT). *Milchwissenschaft*. **47**, 770-772.
- Seymour, H., Jones, G. M., and Gilliard, M. L. (1988) Comparisons of on-farm screening test for detection or antibiotics residues. *J. Dairy Sci.* **71**, 539-544.
- Tyler, J. W., Cullor, J. S., Erskine, R. J., Smith, W. L., Dellinger, J., and McClure, .K. (1992) Milk antimicrobial drug residue assay results in cattle with experimental, endotoxin-induced mastitis. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* **201**, 1378-1381.
- Van Eenennaam, A. L., Cullor, J. S., Perani, L., Cardner, T. A., Smith, W. L., Dellinger, J., Guterbock, W. M., and Jensen, L. (1993) Evaluation of milk antibiotic residue screening test in cattle with occurring clinical mastitis. *J. Dairy Sci.* **76**, 3041-3053.
- 농림부 국립수의과학검역원. 2001. 원유검사표준화요령. pp. 10-12.