

## Malthus를 이용한 原乳내의 총균수, 대장균군수, 저온성균수 측정

남은숙·정충일\*·강국희·정동관\*

성균관대학교 낙농학과, \*건국대학교 동물자원연구센터

### The Conductance Determination of Total, Coliform and Psychrotrophic bacteria Counts in Raw Milk by Using Malthus

Eun-Sook Nam, Choong-Il Chung\*, Kook-Hee Kang and Dong Kwan Jeong\*

Department of Dairy Science, Sung Kyun Kwan University, Suwon

\*Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University, Seoul

#### Abstract

This study was performed to obtain fast, consistent and reliable estimation system of bacterial counts of raw milk, which effectively related to the quality of sanitation and the condition of production at the farm. This study compared regression equation and correlation coefficient relationship between standard plate counts and data of Malthus conductance method for the detection time of total, psychrotrophs, coliform bacterial counts in raw milk. Regression equation (RE) between conductance detection time (Y) and total bacterial log counts (X) was  $Y=18.27651-2.07550X$ , with correlation coefficient  $-0.95(n=201)$ . In coliform, RE was  $Y=9.320848-1.15598X$  with correlation coefficient  $-0.90(n=207)$ . Psychrotrophs had the RE of  $Y=29.96008-3.02487$  with correlation coefficient  $-0.9(n=201)$ . This conductance method gave results more quickly and was less labor-intensive than traditional standard plate count method.

Key words: raw milk, conductance detection time, malthus

## 서 론

식품의 안전성확보를 위한 품질관리에 있어서 미생물학적 분석은 안전성, 품질에 대한 측정 등을 그 범주로 하며, 이미 낙농산업에서 이용되고 있는 품질관리의 한 부분인 HACCP(hazard analysis critical control points)의 검사와 마찬가지로 제품의 제조공정, 청결, 위생적인 공정의 효율성과 우유 및 유제품의 shelf-life와 keeping quality를 결정하는 것도 이 범주에 속한다<sup>(1)</sup>. 제품속의 세균수는 물론, 제품의 원자재내에 함유된 세균수의 신속한 측정이야 말로 양질의 원료선택이나 제조공정의 원활한 운영에도 필수적으로 요청되고 있다.

한편 원유중 세균수를 측정하기 위한 신속하고 효과적인 방법은 원유의 질을 개선하는데 필수적이며, 원유 생산의 위생기준과 농가에서의 원유저장, 유가공공장에서 가공 적합성 판정 및 고품질의 유제품생산을 유도한다는 점에서 매우 절실하다 할 것이다.

현재 미국에서 표준법으로 사용하고 있는 standard plate count(SPC)법은 30°C 72시간<sup>(2)</sup>, 저온성세균은 7°C

에서 10일간<sup>(3)</sup> 대장균은 32°C 24시간 배양후에<sup>(4)</sup> 그 결과를 알 수 있으므로 우유, 유제품의 품질관리상 시간적으로 많은 문제점을 안고 있으며, 또한 이미 원료가 제품 생산에 투입한 다음에 결과를 알 수 있어 사후검사로 밖에 활용되지 못하고 있어 최종제품의 품질에 대한 신뢰성이 결여될 수 있다<sup>(2,3,5,6)</sup>.

이는 주어진 시간에 일정한 온도에서 모든 세균이 다 자라지 못하며, 대부분의 세균이 먼저 성장한 세균에 의해 영양분이 부족하거나, 세포성장에 필요한 microenvironment의 변화 등의 영향을 받기 때문이다. 이러한 문제점을 해결하려는 노력이 오래전부터 계속되어 왔으며, 신속한 세균수 측정법은 plate count를 좀더 신속하게 처리할 수 있는 기법과 장치의 개발연구에 집중되어 왔다<sup>(7)</sup>.

최근 빠르고 분석적인 방법의 발전은 hygiene parameter로 총세균수를 측정하거나 shelf-life를 예측하고, 특별한 병원성 세균이나 그들의 대사물질을 감지하여 측정할 수도 있다. Conductance방법은 미생물의 생육과 미생물의 대사활성에 의해 간접적으로 측정하는 방법으로, 낮은 전하를 가진 물질이 높은 전하를 가진 물질로 분해되면서 배지내에서 일어나는 전기적 저항값의 변화를 측정하는 것이다<sup>(8)</sup>.

본 실험은 electronic conductance에 의한 Malthus를

Corresponding author: Choong-Il Chung, Animal Resources Research Center, Kon-Kuk University, Mojin-dong, Sungdong-Ku, Seoul 133-701, Korea

이용하는 원유내의 총균수, 저온성균수, 대장균균수를 측정한 SPC값과 conductance에 의한 Detection time(D.T.)과의 상관관계를 조사하여 표준방법의 대체 방법으로서의 적합성과 우유 유제품의 품질관리를 위해 신뢰할 수 있는 원유 평가 system을 얻는 것을 그 목적으로 한다.

**재료 및 방법**

**원유의 수집**

1993년 1월부터 1994년 6월까지 서울, 경기지역의 약 700개 목장에서 건국우유 처리장에 납유되는 우유를 사용하였으며, 착유후 검사시료는 Ice box를 이용하여, 4°C 이하로 운반되어 실험실까지 걸리는 시간은 약 5시간 정도이며, 실험실에 도착한 즉시 미생물 검사를 실시하였다.

**세균 검사**

**총균수측정 :** 원유를 무균적으로 1 ml 채취하여 0.1% peptone 용액에 10진법으로 희석하여 희석시료위에 SPC agar를 pour plating 방법으로 접종한 후 30°C 에서 72 hr

동안 배양하여 Quebec colony counter로 집락을 계수하였다<sup>(3)</sup>.

**대장균수 측정 :** American public health association (APHA) 방법<sup>(3)</sup>에 의해 Violet red bile agar(VRBA) 평판에 희석하여 접종하고 32°C 24시간 배양하여 Quebec colony count로 전형적인 암적색의 집락을 계수하였다.

**저온성균 측정 :** 시료의 저온성세균은 APHA<sup>(3)</sup>에 의해 SPC agar 평판에 희석시료를 접종하고 7°C 에서 10일간 배양후 집락을 계수하였다.

**Malthus method**

**기계사용 :** 세균수 측정에 사용한 기계는 건국대학교 낙농학과 미생물 실험실의 Malthus-2000으로 Fig. 1의 순서로 실험을 실시하였다.

**Reusable cell 준비**

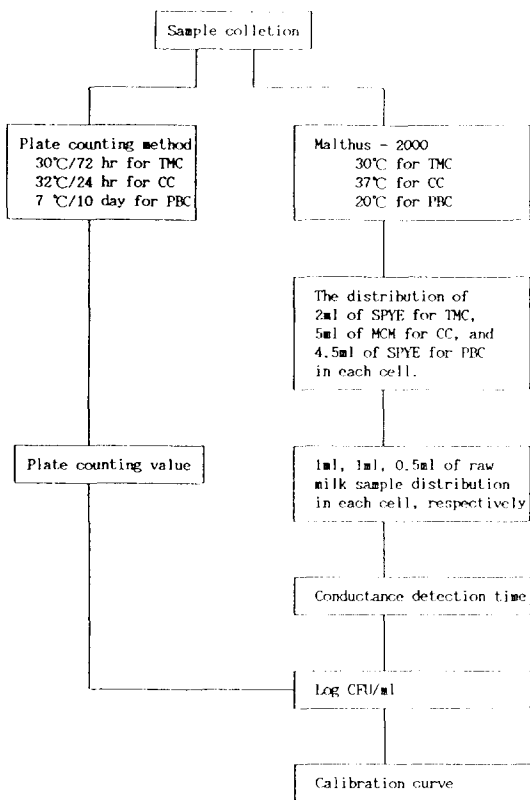
① Total microorganism count(TMC)–Malthus special peptone yeast extract broth(SPYE) (Table 1)을 2 ml씩 분주한 reusable cell에 원유 sample을 1 ml씩 duplicate로 접종한 후 30°C 에서 배양하여 산출된 D.T.과 Colony forming unit(CFU)와의 결과치를 입력하여 calibration curve를 얻었다.

② Coliform count–Malthus coliform medium(MCM) (Table 2)을 5 ml씩 분주한 cell에 원유 sample 1 ml씩 duplicate로 접종하여 37°C 배양하여 산출된 D.T.와 VRBA에 의한 대장균수의 결과치를 입력하여 calibration curve를 얻었다.

③ Psychrotrophic bacteria count(PBC)–SPYE 4.5 ml씩 분주한 cell에 원유 sample을 0.5 ml씩 duplicate로 접종하여 20°C 배양하여 산출된 D.T.와 저온성균 측정의 결과치를 입력하여 calibration curve를 얻었다.

**Data 분석**

실험에서 얻어진 자료는 Statistical analysis system



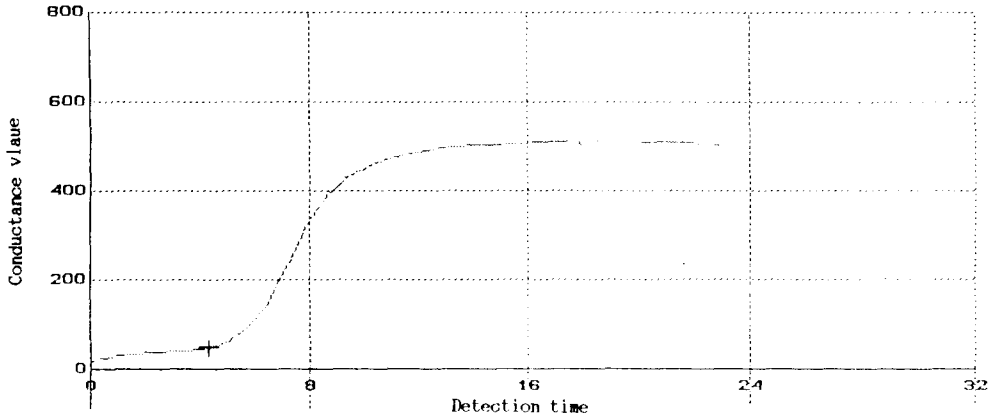
**Fig. 1. Scheme to make calibration curve by between plate counting value and malthus detection time**

**Table 1. Composition of SPYE medium**

|                          |           |
|--------------------------|-----------|
| Malthus peptone mix No.3 |           |
| Special peptone          | 10.0 g/L  |
| Yeast extract            | 5.0 g/L   |
| Glycerol                 | 150.0 g/L |
| Final pH                 | 7.3       |

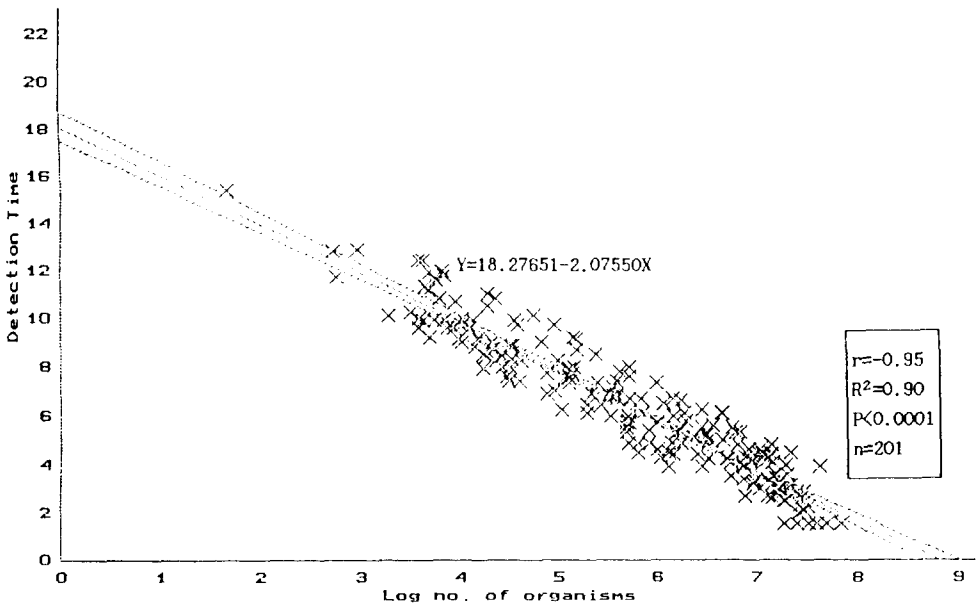
**Table 2. Composition of Malthus coliform medium**

|                              |     |
|------------------------------|-----|
| Malthus peptone<br>Mix No. 2 |     |
| Sodium lauryl sulphate       |     |
| NaCl                         |     |
| Lactose                      |     |
| Final pH                     | 7.3 |



**Fig. 2. Identification of detection time based on properties of the conductance pattern**

The detection time is the point at which conductance values change significantly from baseline values and is indicated by +



**Fig. 3. Regression line and correlation coefficient of data between SPC and the D.T. obtained from Malthus for estimating TMC in 201 raw milk samples**

(SAS) 통계 system을 이용하여 단순회기 방법으로 분석하였다<sup>9)</sup>.

**결과 및 고찰**

미생물 자동 측정장치인 Malthus의 원리는 Fig. 2에 서와 같이 baseline value로부터 conductance value가 변하는 점을 D.T.라 하며, 이에 대한 세균수를 초기 세균수라 하는데 이는 세균수가 증가함에 따라 conduct-

ance가 변하며 결과는 일반 세균의 성장곡선과 같이 나타난다. 초기 세균수가 많으면 D.T.가 빨리 일어나며, 초기 세균수가 적으면 D.T.가 늦게 일어나는데, 이는 원유내의 세균에 의해 낮은 저하를 가진 물질이 높은 전하를 가진 물질로 분해되기 때문이며, 여기서 calibration curve는 D.T.에 대한 log<sub>10</sub> number에 세균수를 대입시킨 것이다. Calibration curve는 SAS를 이용하여 분석한 것으로 모든 sample을 채택하였다. Graph의 X축은 ml당 log CFU 값이고, Y축은 detection time을

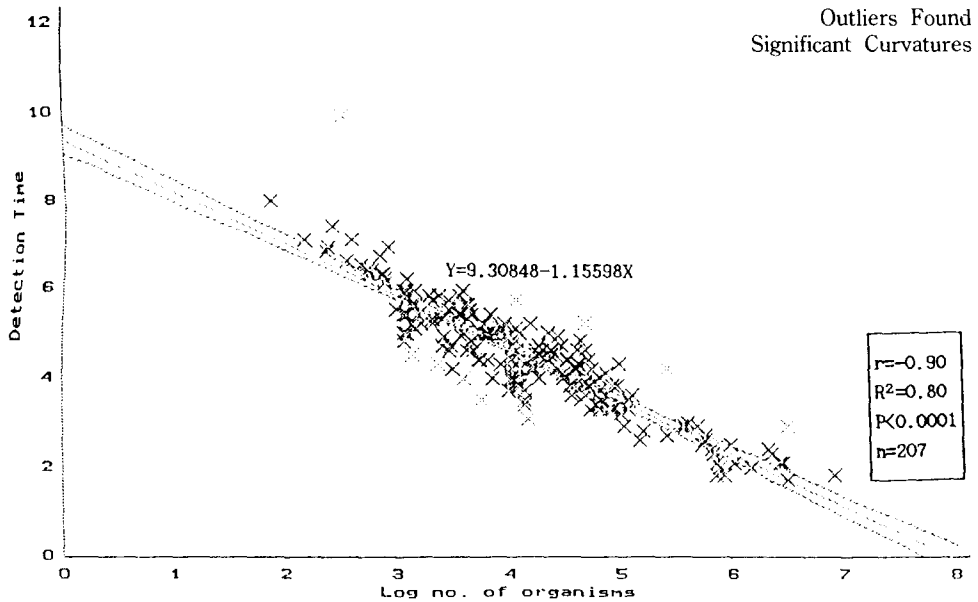


Fig. 4. Regression line and correlation coefficient of data between SPC and the D.T. obtained from Malthus for estimating coliform counts in 207 raw milk samples

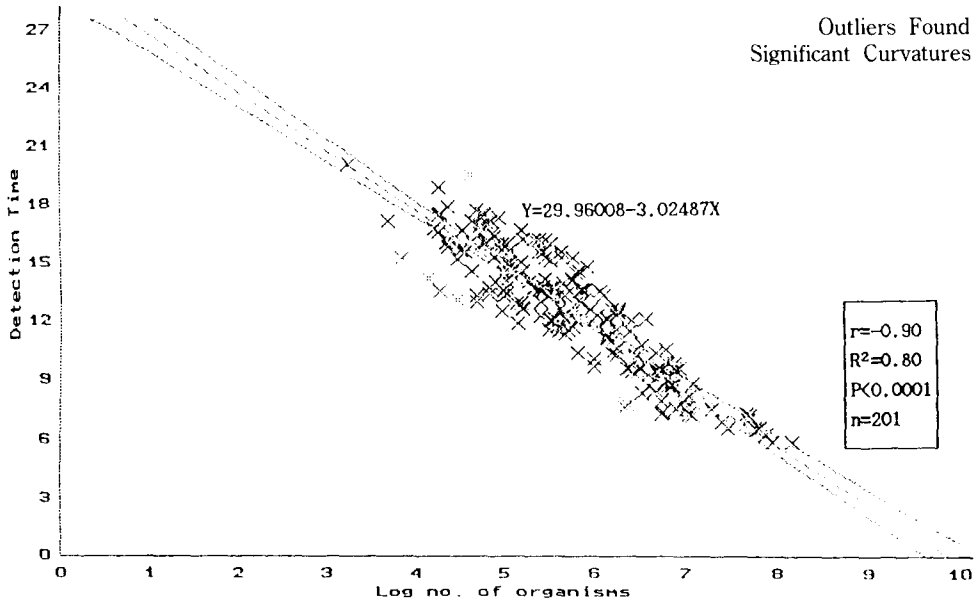


Fig. 5. Regression line and correlation coefficient of data between SPC and the D.T. obtained from Malthus for estimating psychrotrophic counts in 201 raw milk samples

나타냈다.

Fig. 3은 총 201개의 원유 sample를 준비하여 standard plate counts와 conductance detection time으로 TMC와 SPC의 상관관계를 나타낸 것이다. Regression equation은  $Y=18.27651-2.07750X$ 이며 correlation coefficient

는  $-0.95$ ,  $R^2=0.90$ 으로 상당히 높은 상관관계를 얻을 수 있었다.

$10^5$  CFU/ml의 원유 sample을 fail level의 한 예로 선택할 때 상응하는 D.T.는 약 9시간 정도 걸리는데, 6시간 이전에 감지된 sample의 세균수는  $10^6$ /ml 이상임을

알 수 있었다.

낙농제품에 있어 coliform의 존재는 상당히 의미있는 것으로 비록 coliform의 수가 표준법에 의해 잘 검출되었다 하더라도 그것을 분변계 오염의 개념으로만 유제품에 적용한다는 것은 논쟁의 여지가 있다<sup>(10)</sup>. 왜냐하면 분변이외의 주위환경에도 coliform이 많이 존재하며, 이들이 식품내에도 쉽게 오염되기 때문이다. 그럼에도 불구하고 낙농산업에서는 유제품의 안전성을 측정하기 위해서 오랫동안 coliform test를 채택하여 왔다<sup>(11)</sup>.

Fig. 4는 총 207개의 원유 sample내의 coliform bacteria를 VRBA colony counts와 D.T.의 상관관계를 나타낸 것이다. Regression equation은  $Y=9.320848-1.15508X$ 이며 correlation coefficient는  $-0.90$ 로 나타났다.

표준방법에 의한 coliform bacteria는  $32 \pm 2^{\circ}C$  24 hrs 배양시켜 colony를 얻는데 비해, conductance 방법은 9 시간내에 원유 sample의 초기 대장균 군수를 알 수 있다.

그람음성 psychrotrophic bacteria수는 청결, 계절적 요인, 사용하는 물의 위생상태에 따라 다르다. 좋은 위생상태에서도 소수의 그람음성 psychrotrophic bacteria가 존재하는데, 착유 후에도 이들이 존재하며, 저온성균은 bulk tank의 저장온도( $3 \sim 5^{\circ}C$ )에서도 증식이 가능하다.

양질의 원유라도  $10^3$ 에서  $10^4$  CFU/ml의 저온성균이 존재하며, 저온성균이  $10^4$  CFU/ml의 수준에 이르면 관능결함이 생긴다<sup>(11,12)</sup>.  $10^6$  CFU/ml시에는 유제품의 이상취가 발생하거나 수율이 감소한다. 따라서 원유 초기의 PBC를 아는 것이 중요하다<sup>(13)</sup>.

Fig. 5는  $7^{\circ}C$  10일간 배양한 저온성균수와  $20^{\circ}C$ 에서 48시간 배양하여 얻어진 D.T.와의 상관관계를 나타낸 것이다. SAS에 의해 얻어진 regression equation은  $Y=29.96008-3.024877X$ 로 correlation coefficient  $-0.90$ 로 나타났다.

Electronic methods 중 impedance는  $10^5$ /ml의 중온성균을 측정하는 데는 4시간, 저온성균은 21시간, 총균수는 16시간이면 검출된다고 하였다<sup>(14)</sup>. 본 연구에서 Malthus의 conductance를 이용한 검사결과와 검출하는 시간에 차이가 있음을 알 수 있었다. 우유내의 세균수를 측정하는 방법이 최근 10년 동안 많이 연구 발전되어 왔으며, 또한 이들에 대한 낙농산업에 적용여부도 조사되어 왔었다.

Electronic conductance method는 다른 세균수를 측정하기 위한 새로운 시도이며, 이것은 static situation의 단순한 측정보다는 dynamic metabolic activity를 측정하는 방법으로 이들의 정보는 미생물 group의 분류와 약제에 대한 민감성을 측정하는 데도 쓰인다<sup>(15)</sup>.

Plate count가 유제품의 품질을 세균수로만 측정하는 것에 비해 Malthus conductance method는 metabolic activity를 측정하여 세균수를 모두 감지하는 것으로 Conductance의 변화에 의한 분석은 세균의 성장과 대사활성을 평가하기에 유용한 방법이며, 배지에서 electro-

**Table 3. Analysis of variance of total microorganism counts (TMC), coliform bacteria, psychrotrophic bacteria count (PBC)**

| Items           | df  | SS       | MS       | F        | P      |
|-----------------|-----|----------|----------|----------|--------|
| <b>TMA</b>      |     |          |          |          |        |
| Total           | 200 | 333.3978 | 1.6670   |          |        |
| Regression      | 1   | 300.6180 | 300.6180 | 1824.995 | 0.0001 |
| Error           | 199 | 32.7798  | 0.1647   |          |        |
| <b>Coliform</b> |     |          |          |          |        |
| Total           | 206 | 200.1627 | 0.9717   |          |        |
| Regression      | 1   | 157.8521 | 157.8521 | 764.813  | 0.0001 |
| Error           | 205 | 42.3106  | 0.2064   |          |        |
| <b>PBC</b>      |     |          |          |          |        |
| Total           | 200 | 178.1459 | 0.8907   |          |        |
| Regression      | 1   | 143.1734 | 143.1734 | 814.683  | 0.0001 |
| Error           | 199 | 34.9725  | 0.1757   |          |        |

chemical의 변화로 우유나 유제품에 있어서 microbiological quality를 평가하는데 성공하였다<sup>(7,16,17)</sup>. 따라서 이 electronic conductance method가 우유의 위생적 품질을 측정하는데 매우 중요한 역할을 하는 것으로 생각하며, 우유내 세균의 대사활성을 자동적으로 monitoring한다는 것은 제조공정 중의 품질을 관리할 수 있는 유용한 방법으로써, conductance technique은 빠르고 자동적으로 많은 sample을 분석하고 평가할 수 있으며, 종래의 원유 검사방법의 대체방법으로 사용할 수 있으리라 생각한다.

**요 약**

본 실험은 원유내의 세균을 빠르고, 일관성있고, 신뢰성이 있는 평가 system을 얻기 위함이며, 원유 내의 총균수와 저온성균수, 대장균군수를 malthus의 detection time과 regression equation과 상관관계를 조사하였다. Conductance method는 종래의 plate count method보다 빠르고 자동적이며, 노동력을 최대한 절감할 수 있다. 그 결과는 다음과 같다.

1. Conductance detection time을 (Y), total bacterial log count를 (X)라고 할 때 regression equation  $Y=18.27651-2.07550X$ , 상관계수는  $-0.95(n=201)$ 로 나타났다.

2. Conductance detection time을 (Y), coliform bacterial log counts를 (X)라고 할 때 regression equation  $Y=9.32048-1.15598X$ , 상관계수는  $-0.90(n=207)$ 로 나타났다.

3. Conductance detection time을 (Y), psychrotrophic bacterial log counts를 (X)라 할 때 regression equation  $Y=29.96008-3.02487X$ , 상관계수는  $-0.90(n=201)$ 로 나타났다.

**문 헌**

1. Vasavada, C.P.: Rapid methods and automation in

- dairy microbiology. *J. Dairy Sci.*, **76**, 3101(1993)
2. International Dairy Federation. Methods for assessing the bacteriological quality of raw milk from the farm. IDF Bulletin No.256(1991)
  3. A.P.H.A.: *Standard methods for the examination of dairy products*. 15th Ed. American Public Health Association, Washington, D.C.(1985)
  4. Adams, D.M., Barach, J.T. and Speck, M.L.: Heat resistant proteases produced in milk by psychrotrophic bacteria of dairy origine. *J. Dairy Sci.*, **58**, 828(1975)
  5. Maxy, R.B. and Paul, R.J.: Evaluating the microflora of raw milk *J. Dairy Sci.*, **68**(Suppl. 1), 63(1985) Abstr.
  6. Maxy, R.B. and Paul, R.J.: Evaluation of microflora quality of raw milk. *J. Food Prot.*, **50**, 47(1987)
  7. Gnau, S. and Luedecke, L.O.: Impedance measurements in raw milk as an alternative to the standard plate count. *J. Food Prot.*, **45**(1), 4(1982)
  8. Owens, J.D.: Formulation of culture media for conductimetric assays: Theoretical considerations. *J. General Microbiol.*, **131**, 3055(1985)
  9. SAS Institute. Sas/stat user's guide relase 6.03. p.773-876(1991)
  10. Krumperman, P.H.: Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. *Appl. Environ. Microbiol.*, **46**, 165(1983)
  11. Zall, R.P., Chen, J.H. and Murphy, S.C.: Estimating the number of psychrotrophs in milk using the direct microscopic method. *J. Cult. Dairy Prod.*, **17**(5), 24 (1982)
  12. Thomas, S.B. and Drice, R.G.: Psychrotrophic bacteria in refrigerated pasteurised milk. *Dairy Ind.*, **34**, 430 (1969)
  13. Tatini, S.R., Christile, P., El-habaz, A. and Griffiths, M.W.: Rapid detection of psychrotrophic bacteria in manufacturing.
  14. Firstenberg-Eden, R. and Tricarico, M.K.: Impedimetric determination of total, mesophilic and psychrotrophic counts in raw milk. *J. Food Sci.*, **48**, 1750(1983)
  15. Richards, J.C.S., Jason, A.C., Hobbs, G., Gibson, D.M. and Christile, R.H.: Electronic measurement of bacterial growth. *J. Phys. E. Sci. Instrum.*, **1**, 560(1978)
  16. Bishop, J.R. and Juan, N.A.: Improved method of quality assesment of raw milk. *J. Food Prot.*, **51**, 9(1988)
  17. Firstenberg-Eden, R., Vansise, M.L., Zindulis, J. and Kahn, P.: Impedimetric estimation of coliform in dairy products. *J. Food Sci.*, **49**, 1449(1984)

---

(1994년 9월 23일 접수)