

원유 내 내냉성 미생물의 계절별, 지역별 분포 및 동정

신용국¹ · 이현아¹ · 오남수¹ · 남명수^{2*}

¹서울우유협동조합중앙연구소, ²충남대학교 농업생명과학대학 동물바이오시스템학과

Seasonal, regional distribution and identification of psychrotrophic bacteria in milk

Yong Kook Shin¹, Hyun Ah Lee¹, Nam Su Oh¹, Myoung Soo Nam^{2*}

¹R&D Center, Seoul Dairy Cooperative, Ansan Kyunggi-Do 425-839, Korea

²Lab. of Milk Food Biochemistry and Biotechnology, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea

Received on 19 February 2013, revised on 17 March 2013, accepted on 19 March 2013

Abstract : To investigate the distribution of psychrotrophic bacteria, raw milk was collected from farms in nine different regions located around Kyunggi province in South Korea at four different seasons. Psychrotrophic counts were higher in winter than in other seasons as 3.0×10^4 CFU/mL ($p < 0.05$). Among nine regions, the population in raw milk sampled from B region was in significantly greater numbers and those from C and D province were in significantly lower numbers than any other regions, 2.4×10^5 CFU/mL and 8.7×10^3 CFU/mL, respectively ($p < 0.05$). In addition, among 706 bacterial isolates, the predominant class was Gamma-proteobacteria (81.02%) and genus was *Pseudomonas* (32.34%), especially *Pseudomonas fluorescens* (39.46%). Compared to the regional predominance, *Acinetobacter johnsonii* in A region, *Pseudomonas fluorescens* in B region, *Enterobacter amnigenus* in C region, *Psychrobacter maritimus* in D region, *Acinetobacter johnsonii* in E region, *Acinetobacter haemolyticus* in F region, *Pseudomonas fluorescens* in G region, *Acinetobacter jounsonii* in H region, and *Pseudomonas mucidolens* in I region were found.

Key words : Psychrotrophic bacteria, Raw milk, Gamma-proteobacteria, *Pseudomonas fluorescens*

I. 서론

우유의 미생물학적 품질은 원유의 품질, 살균조건, 2차 오염 및 저장과 유통온도에 의해 영향을 받는다(IDF, 1993). 유제품에서 나타나는 미생물은 열처리를 함에도 불구하고 사멸되지 않고 살아있는 내열성 미생물과 우유의 포장용기와 공기로부터의 2차 오염 등으로 구분될 수 있고, 유제품의 품질은 주로 시유의 내냉성 미생물과 내열성 미생물수에 의하여 평가할 수 있다(Kwon *et al.*, 1998). 원유에 존재하는 내냉성 미생물의 수는 계절별과 지역별 차이를 보이고 있다. 미생물이 잘 성장할 수 있는 온도인 여름철이 겨울철보다 내냉성 미생물의 오염이 더 높다는 보고(Cousin, 1981; Sutherland and Murdoch, 1994)와 오히

려 겨울철에 위생관리가 소홀해지기 때문에 여름철보다 원유의 내냉성 미생물 오염 발생건수가 더 높다는 상반된 연구 결과(Kikuchi and Matsui, 1974b; Elionora and Malka, 2007; Maria *et al.*, 2010)가 발표되고 있다. 최근 우리나라 목장에도 냉각기가 설치되고 탱크로리에 의한 콜드체인시스템(cold chain system)이 도입되면서 원유의 미생물학적 품질이 크게 향상되었으나, 여전히 내냉성 미생물의 오염으로 인한 원유의 품질에는 악영향을 미치고 있다. 원유에서 가장 많이 검출되는 내냉성 미생물로는 그람 음성균인 *Pseudomonas* 속이며(Martins *et al.*, 2006), 그 외 *Achromobacter*(Credit *et al.*, 1972), *Acinetobacter* (Milliere and Veillet-Poncet, 1979), *Enterobacter* (Andrey and Frazier, 1959), *Escherichia*(Jayashankar *et al.*, 1966), *Flavobacterium*(Andrey and Frazier, 1959), *Serratia* (Ingraham, 1962) 등이 있다. 본 연구의 목적은 원유에 존

*Corresponding author: Tel: +82-42-821-5782

E-mail address: namsoo@cnu.ac.kr

재하는 계절별 및 지역별 내냉성 미생물의 분포 및 종류를 조사하기 위해서 수행하였다.

Duncan's Multiple Range Test를 사용하였다.

II. 재료 및 방법

1. 계절별, 지역별 원유 시료와 총 내냉성 미생물의 측정 및 분리 배양

연구에 필요한 원유 시료는 계절별로 여름철 원유는 2010년 7월, 가을철 원유는 2010년 10월, 겨울철 원유는 2011년 1월, 봄철 원유는 2011년 4월에 공급받았다. 계절별로 원유는 경기 동부, 경기 동남부, 경기 동북부, 경기 서부, 경기남부, 경기북부, 경기중부, 안산, 경인지역 목장으로부터 공급받았으며, 시료는 냉장보관하였고 실험을 수행하기까지 2일이 넘지 않도록 하였다. 지역별 결과는 무작위로 A, B, C, D, E, F, G, H, I 지역으로 표기하였으며, 확보한 시료는 멸균생리식염수에 각 농도별로 희석하여 Standard methods(Wehr and Frank, 2004)에 따라 Plate count agar(Becton, Dickson and Company, Sparks, MD, USA)를 이용하여 7°C에서 10일 동안 배양하였다. 배양이 끝난 후, 각 원유시료의 총 내냉성미생물의 균수를 측정하였으며, 그 중 무작위로 colony를 선택하여 최소 3번 이상 plate에 계대배양하여 단일 colony를 취하였다. 지역별로 20개의 colony를 취하여, 총 9개 지역에서 한 계절에 총 180개의 균을 분리배양하였으며, 사계절, 9개 지역으로부터 총 720개의 균을 분리하여 동정에 사용하였다. 결과 분석을 위해 모든 통계처리는 Statistical Analysis System(SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)을 이용하여

2. 분자생물학적 방법에 의한 내냉성 미생물의 동정

분리배양한 colony들은 동정을 수행하기 위해 Applied Biosystems(Foster City, CA, USA)의 방법에 따라 PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)를 이용하여 genomic DNA를 추출하였다. 분리배양한 균에서 1 µL loop를 이용하여 colony를 취한 후, 100 µL reagent에 30초 동안 강하게 혼합하여 95°C에서 10분 동안 가열하였다. 그 후 13,000 rpm/min에서 2분 동안 원심분리하여 상정액을 DNA template로 사용하였다. PCR은 MicroSeq 500 16S rDNA Bacterial Identification PCR Kit(Applied Biosystems)를 사용하였으며(Table 1), 15 µL PCR master mix와 15 λ의 DNA template를 넣고 반응시켰다. PCR product를 2% agarose gel에 4 µL를 loading하여 100 V에서 2분 동안 전기영동하여 band를 확인하였다. 확인한 PCR product는 남은 dNTP와 primer를 제거하기 위해 ExoSAP-IT (USB, Cleveland, Ohio, USA)으로 세척한 뒤, Microseq 16S rDNA bacterial 500 Sequencing Kit(Applied Biosystems)를 사용하여 sequencing 하였다(Table 2). 모든 과정이 끝난 반응물 10 µL와 10 µL의 Hi-Di Formamide(Applied Biosystems)를 혼합하여 POP 6 polymer와 4×50 cm capillary를 장착한 3130 genetic analyzer(Applied Biosystems)를 사용하여 분석하였다. 모든 동정 결과는 MicroSeq library version 2.1(Applied Biosystems)을 통하여 처리하였다.

Table 1. Thermal cycling conditions for PCR.

Initial Step	35 Cycles			Final Extension	Final Step
	Melt	Anneal	Extend		
Hold	Cycle			Hold	Hold
95°C 10 min	95°C 30 sec	60°C 30 sec	72°C 45 sec	72°C 10 min	4°C ∞

Table 2. Thermal cycling conditions for sequencing.

Melt	25 Cycles		Extend	Final Step
	Anneal	Cycle		
96°C 10 sec	50°C 5 sec	60°C 4 min	4°C ∞	

III. 결과 및 고찰

1. 계절별 및 지역별 원유의 총 내냉성 미생물 균수 변화

내냉성 미생물의 총 균수를 측정하여 계절별 분포를 비교해 본 결과, 겨울철 원유에서 3.0×10^4 CFU/mL로 가장 높은 균수가 검출되었고, 여름철 원유에서 8.7×10^3 CFU/mL, 가을철 원유에서 5.9×10^3 CFU/mL가 검출되었으며, 봄철 원유에서 3.9×10^3 CFU/mL로 가장 낮게 균이 검출되었다($p < 0.05$) (Fig. 1). 이 결과는 Elionora와 Malka (2007)의 연구와도 유사한 결과로 나타났는데, 이 연구진들은 이스라엘에서 1월, 4월, 7월 및 9월에 집유한 원유로부터 내냉성 미생물과 중온성 미생물을 분리하여 균수를 측정하여 비교하였다. 실험 결과는 본 연구와 유사하게 계절적 변이를 보였으며, 겨울철 원유에서 가장 높은 수준의 균수가 검출되었고, 봄철 원유에서 가장 낮은 수준의 균수가 검출되었다. 또한 Maria 등(2010)이 보고한 연구 결과와 유사하게 여름철에 비해 겨울철 원유에서 더 높은 내냉성 미생물 균수가 측정되었으며, 전체적인 균수 분포는 2.0×10^5 CFU/mL에서 1.6×10^7 CFU/mL 사이였다. 이는 본 연구 결과에서 균수분포가 3.9×10^3 CFU/mL에서 3.0×10^4 CFU/mL인 것과 비교하였을 때 본 연구 결과보다 더 높은 수준의 균수로 나타났다. 또한 Lee 등(1990a)이 보고한 바에 따르면 1년 동안 경상남도 북부지역의 한 집유소에서 집유한 원유의 내냉성 미생물 분포를 측정 한 결과, 본 연구 결과와 동일하게 겨울철에 가장 높은 균수가 측정되었다. 이 연구에서는 총 내냉성 미생물수의 범위가

$3.5 \times 10^4 \sim 9.4 \times 10^6$ CFU/mL로 나타났으며, 평균 1.5×10^6 CFU/mL로 나타나 본 실험 결과보다 더 높은 수준임을 알 수 있었다. 또한 Lee 등(1990b)은 경기 지방의 농장으로부터 수집한 원유 시료에 내냉성 미생물이 1.2×10^6 CFU/mL의 수준으로 존재한다고 발표하였다. 본 연구 결과와 비교했을 때, 더 높은 수준임을 알 수 있었다. 일본의 Kikuchi와 Matsui(1974b)의 연구에서는 봄, 여름 및 겨울철의 원유 내 내냉성 미생물수의 변화를 측정 한 결과, 여름철 원유에서 가장 낮은 수준의 균이 검출되었고 겨울철 원유에서 가장 높은 수준의 균이 검출되었다. 이는 여름철에 특히 착유 기구와 냉각기 등의 세척과 살균이 철저하기 때문이라고 보고하였다. 그러나 Cousin(1981)의 연구에 따르면, 여름철에 미생물이 최적의 생장을 할 수 있는 온도이며 위생적 관리의 소홀로 인하여 일반적으로 겨울철보다 더 많은 균수가 검출된다는 결과가 발표되었다. Sutherland와 Murdoch (1994)는 겨울철 원유에서보다 여름철 원유에서 내냉성 미생물이 더 많이 검출되고, 이는 중온성 미생물과 내냉성 미생물간의 길항작용 때문으로, 여름철에 중온성 미생물의 증식이 감소하고, 이에 상대적으로 내냉성 미생물이 여름철에 더 활발하게 증식할 수 있기 때문인 것으로 분석하였다. 이처럼 원유에 존재하는 내냉성 미생물의 계절별 분포는 나라별로 다른 추이를 나타내고 있으며, 원유 집유 조건에 따라라도 계절별 분포에 차이를 나타내고 있음을 알 수 있었다. 각 지역별 균수를 비교한 결과는 B 지역 원유에서 2.4×10^5 CFU/mL로 유의적으로 가장 높은 균수가 검출되었고, C 지역과 D 지역 원유에서 8.7×10^3 CFU/mL로 9개 지역 중 유의적으로 가장 낮은 균수가 검출되었다($p < 0.05$) (Fig. 2). 나머지 지역은 I 지역에서 6.2×10^4 CFU/mL, A

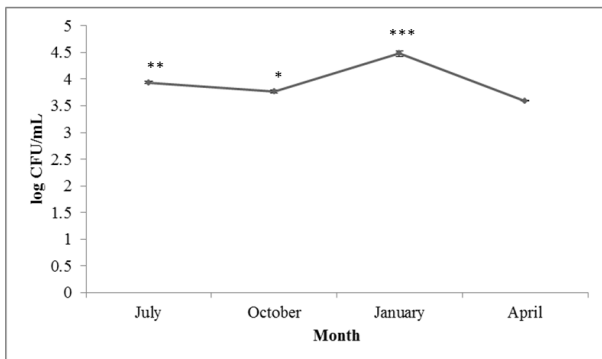


Fig. 1. Seasonal variation in the numbers of psychrotrophic bacteria.

July; summer, October; fall, January; winter, April; spring
 $*p < 0.05$ vs April, $**p < 0.05$ vs October, $***p < 0.05$ vs July.

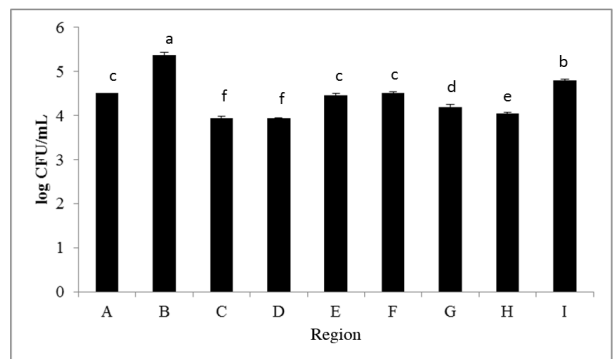


Fig. 2. Counts of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk sampled from different provinces. A ~ I; different regions. Significant differences expressed as different letters were analyzed using Duncan's multiple range test ($p < 0.05$)

지역과 F 지역에서 3.2×10^4 CFU/mL, E 지역에서 2.9×10^4 CFU/mL, G 지역에서 1.6×10^4 CFU/mL, H 지역에서 1.1×10^4 CFU/mL, C 지역에서 8.9×10^3 CFU/mL의 균이 원유에서 검출되었다. 또한 전체적인 균수 분포는 8.7×10^3 CFU/mL에서 2.4×10^5 CFU/mL 사이로 나타났다.

2. 내냉성 미생물의 계절별 및 지역별 분포

720개의 분리배양한 내냉성 미생물 중 총 706개의 균을 동정하였고 총 87가지의 서로 다른 종이 분석되었으며, 동

정 결과는 Table 3과 같다. *Pseudomonas fluorescens*가 81개로 가장 높은 검출 빈도수를 나타내었으며, *Acinetobacter* genomospecies가 61개, *Acinetobacter johnsonii*가 58개, *Psychrobacter maritimus*가 53개 순으로 높은 검출 빈도수를 나타내었다. 동정된 psychrotrophic bacteria의 지역별 검출 빈도수가 높은 균주는 A 지역은 12개의 *Acinetobacter johnsonii*가, B 지역은 22개의 *Pseudomonas fluorescens*, C 지역은 13개의 *Enterobacter amnigenus*, D 지역은 19개의 *Psychrobacter maritimus*, E 지역은 19개의 *Acinetobacter johnsonii*, F 지역은 8개의 *Acinetobacter*

Table 3. Summary of psychrotrophic bacteria from raw milk over four seasons.

Closest relative in MicroSeq Library	Isolated Number
<i>Pseudomonas fluorescens</i> A(bt)ATCC=17554	73
<i>Acinetobacter johnsonii</i>	58
<i>Psychrobacter maritimus</i>	53
<i>Pseudomonas mucidolens</i>	43
<i>Acinetobacter</i> genomospecies 10	39
<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	34
<i>Enterobacter amnigenus</i>	30
<i>Pantoea agglomerans</i> ATCC=27155	27
<i>Sphingobacterium faecium</i>	22
<i>Rahnella aquatilis</i>	20
<i>Psychrobacter faecalis</i>	16
<i>Pseudomonas asplenii</i>	16
<i>Chryseobacterium shigense</i>	15
<i>Pseudomonas brenneri</i>	13
<i>Serratia liquefaciens</i>	12
<i>Janthinobacterium lividum</i> ATCC=12473	11
<i>Rhodococcus baikonurensis</i>	11
<i>Hafnia alvei</i>	10
<i>Acinetobacter</i> genomospecies 9	9
<i>Acinetobacter</i> genomospecies 11	9
<i>Raoultella planticola</i> ATCC=33558	9
<i>Serratia quinivorans</i>	8
<i>Chryseobacterium scophthalmum</i>	7
<i>Serratia grimesii</i>	7
<i>Pseudomonas marginallis</i>	6
<i>Acinetobacter baumannii</i>	6
<i>Arthrobacter ruscicus</i>	5
<i>Pedobacter heparinus</i>	5
<i>Acidovorax delafieldii</i>	5
<i>Pseudomonas fragi</i>	5
<i>Microbacterium liquefaciens</i>	5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC=9027	4
<i>Chryseobacterium gleum</i>	4
<i>Pseudomonas fulva</i>	4
<i>Pseudomonas fluorescens</i> G(bt)ATCC=17573	4
<i>Acinetobacter hwoffii</i>	4
<i>Acinetobacter</i> genomospecies 3	4
<i>Pseudomonas fluorescens</i> ATCC=13525	4
<i>Serratia ficaria</i>	4

Table 3. Summary of psychrotrophic bacteria from raw milk over four seasons. (continue)

Closest relative in MicroSeq Library	Isolated Number
<i>Pseudomonas lundensis</i>	3
<i>Chryseobacterium joostei</i>	3
<i>Arthrobacter pascens</i>	3
<i>Pseudomonas veronii</i>	3
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ATCC=35586	3
<i>Chryseobacterium indoltheticum</i>	3
<i>Raoultella omithinolytica</i>	3
<i>Arthrobacter sulfureus</i> ATCC=19098	2
<i>Flavobacterium saccharophilum</i>	2
<i>Stenotrophomonas rhizophila</i>	2
<i>Rhodococcus erythropolis</i> ATCC=4277	2
<i>Yersinia intermedia</i>	2
<i>Serratia fonticola</i>	2
<i>Chryseobacterium wanjuae</i>	2
<i>Raoultella terrigena</i>	2
<i>Brevundimonas diminuta</i>	2
<i>Streptococcus salivarius thermophilus</i> ATCC=19258	2
<i>Obesumbacterium proteus</i>	2
<i>Sphingomonas sanguinis</i>	2
<i>Enterobacter nimipressuralis</i>	2
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	2
<i>Pseudomonas poae</i>	2
<i>Curtobacterium flaccumfaciens</i>	2
<i>Carnobacterium maltaromaticum</i> ATCC=27865	2
<i>Pseudomonas viridiflava</i>	2
<i>Chryseobacterium balustinum</i>	1
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1
<i>Pseudomonas extremorientalis</i>	1
<i>Lactococcus lactis cremoris</i> ATCC=19257	1
<i>Streptococcus parauberis</i>	1
<i>Serratia plymuthica</i>	1
<i>Escherichia coli</i> ATCC=35382	1
<i>Gordonia terrae</i>	1
<i>Pantoea dispersa</i>	1
<i>Lactococcus raffinolactis</i>	1
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	1
<i>Exiguobacterium oxidotolerans</i>	1
<i>Leclercia adecarboxylata</i>	1
<i>Azorhizophilus paspali</i>	1
<i>Kluyvera cryocrescens</i>	1
<i>Kluyvera intermedia</i>	1
<i>Pseudomonas chlororaphis</i>	1
<i>Acinetobacter gerneri</i>	1
<i>Aeromonas media</i>	1
<i>Pseudomonas agarici</i>	1
<i>Moraxella osloensis</i>	1
<i>Kocuria varians</i>	1
<i>Exiguobacterium acetylicum</i>	1
<i>Rhodococcus erythropolis</i> DSM=43933	1
<i>Yersinia kristensenii</i>	1
<i>Brochothrix thermolyticus</i>	1
<i>Buttiauxella agrestis</i>	1
<i>Yersinia aldovae</i>	1
Total	706

Table 4. Predominant psychrotrophic bacteria by regional groups.

Province	Predominant isolated bacteria	Isolated counts
A	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	12
B	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A(bt)ATCC=17554	21
C	<i>Enterobacter amnigenus</i>	13
D	<i>Psychrobacter maritimus</i>	19
E	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	19
F	<i>Acinetobacter haemolyticus</i>	8
G	<i>Pseudomonas fluorescens</i> A(bt)ATCC=17554	20
H	<i>Acinetobacter johnsonii</i>	9
I	<i>Pseudomonas mucidolens</i>	17

Table 5. Classification of identified psychrotrophic bacteria based on class and genus.

Class	Genus	No. tested
Gammaproteobacteria	<i>Pseudomonas</i>	185
	<i>Acinetobacter</i>	164
	<i>Psychrobacter</i>	69
	<i>Serratia</i>	34
	<i>Enterobacter</i>	32
	<i>Pantoea</i>	28
	<i>Rahnella</i>	20
	<i>Raoultella</i>	14
	<i>Hafnia</i>	10
	<i>Yersinia</i>	4
	<i>Kluyvera</i>	2
	<i>Obesumbacterium</i>	2
	<i>Stenotrophomonas</i>	2
	<i>Aeromonas</i>	1
	<i>Azorhizophilus</i>	1
	<i>Escherichia</i>	1
<i>Moraxella</i>	1	
<i>Leclercia</i>	1	
<i>Buttiauxella</i>	1	
Flavobacteria	<i>Cryseobacterium</i>	37
	<i>Flavobacterium</i>	2
Actinobacteridae	<i>Rhodococcus</i>	14
	<i>Arthrobacter</i>	10
	<i>Microbacterium</i>	5
	<i>Curtobacterium</i>	2
	<i>Gordonia</i>	1
	<i>Kocuria</i>	1
Sphingobacteria	<i>Sphingobacterium</i>	22
	<i>Pedobacter</i>	5
Bacillales	<i>Exiguobacterium</i>	2
	<i>Brochothrix</i>	1
Alphaproteobacteria	<i>Sphingomonas</i>	2
	<i>Brevundimonas</i>	2
Betaproteobacteria	<i>Janthinobacterium</i>	11
	<i>Acidovorax</i>	5
Lactobacillales	<i>Carnobacterium</i>	5
	<i>Streptococcus</i>	3
	<i>Lactococcus</i>	3
	<i>Lactobacillus</i>	1

haemolyticus, G 지역은 20개의 *Pseudomonas fluorescens*, H 지역은 9개의 *Acinetobacter johnsonii*, I 지역은 17개의 *Pseudomonas mucidolens*로 나타났다(Table 4). 동정된 균을 강(class)과 속(genus)을 기준으로 분류하였는데, Gamma-proteobacteria 강이 572개로 가장 우세하였고, 그 중 특히 *Pseudomonas* 속이 185개로 가장 높은 검출빈도수를 나타내었으며 *Acinetobacter* 속이 164개로 그 다음으로 높게 나타났다(Table 5). Martins 등(2006)은 원유의 내냉성 미생물 오염발생 원인균으로 가장 빈번하게 검출되는 균이 *Pseudomonas* 속이라는 연구 결과를 발표하였으며, Gunasekera 등(2003), Wiedmann 등(2000) 및 Chen 등(2002)도 원유에서 가장 많이 검출되는 내냉성 미생물은 *Pseudomonas* 속으로 보고하였다. 또한 Touch와 Deeth (2009)의 연구에서도 *Pseudomonas* 속이 원유에서 내냉성 미생물 중 성장 속도가 다른 균들에 비해 빠르기 때문에 가장 높은 빈도수를 차지하고 있으며, 특히 그 중 *Pseudomonas fluorescens*와 *Pseudomonas fragi*가 가장 빈번하게 검출된다고 보고하였다. Lee 등(1990b)에 따르면 경기지방의 농장으로부터 수집한 원유 시료에서 분리한 내냉성 미생물 중 *Pseudomonas* 속이 44.1%를 차지했다. 또한 Shin 등(1993)은 원유에서 분리한 총 200개의 내냉성 미생물 중 그람음성균은 160개(80.0%)로 나타났으며 그 중 *Pseudomonas* 속이 128개(64.0%)로 가장 높은 비율을 나타냈고, 특히 *P. fluorescens*가 85개(66.5%)로 대부분을 차지하였다. So 등(1992)의 보고에서도 원유에서 분리한 300개의 내냉성 미생물 중 49%가 *Pseudomonas* 속으로 동정되었는데 이는 본 연구와 동일한 결과임을 알 수 있었다. Kikuchi와 Matsui(1974)의 보고에서도 1년 동안 집유한 원유의 내냉성 미생물 중 82.1%로 *Pseudomonas* 속이 가장 높은 비율을 나타냈다. 또한 Kato 등(1976)은 월별로 원유 내 검출되는 내냉성 미생물 빈도수를 측정하였는데 6월부터 12월까지 집유한 원유의 내냉성 미생물의 분리동정 결과는 *Streptococcus* 균종의 경우 11월에 가장 많이 검출되었고, *Pseudomonas* 속의 경우 12월에, *Achromobacter* 속의 경우 7월에, *Flavobacterium* 속의 경우 10월에 가장 높은 수준의 균이 검출되었다고 보고하였다.

IV. 요약

본 연구는 원유의 내냉성 미생물의 계절별 분포에 관해 조사하기 위해서 수행하였다. 내냉성 미생물은 최적 생장

온도가 30°C 근처이지만, 7°C 이하에서도 생존가능한 균으로 *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas* 속 등이 있다. 원유로부터 분리한 총 내냉성 미생물 균수는 다른 계절에 비해 겨울철 원유에서 3.0×10^4 CFU/mL로 가장 높은 수준으로 검출되었고, 다른 지역에 비해 B 지역에서 2.4×10^5 CFU/mL로 유의적으로 높은 균수가 측정되었다 ($p < 0.05$). 분리한 총 706개의 균을 동정한 결과는 Gamma-proteobacteria 강이 전체의 81.02%로 가장 우세하였고, 그 중 *Pseudomonas* 속이 32.34%로 가장 높은 검출 빈도수를 나타내었으며, 특히 *Pseudomonas fluorescens*가 39.46%로 가장 우세하였다. 동정된 내냉성 미생물의 지역별 분포는 A 지역은 12개의 *Acinetobacter johnsonii*, B 지역은 21개의 *Pseudomonas fluorescens*, C 지역은 13개의 *Enterobacter amnigenus*, D 지역은 19개의 *Psychrobacter maritimus*, E 지역은 19개의 *Acinetobacter johnsonii*, F 지역은 8개의 *Acinetobacter haemolyticus*, G 지역은 20개의 *Pseudomonas fluorescens*, H 지역은 9개의 *Acinetobacter johnsonii*, I 지역은 17개의 *Pseudomonas mucidolens*가 높은 검출 빈도수를 나타내었다.

참고 문헌

- Andrey J, Frazier WC. 1959. Psychrophiles in milk held two days in farm bulk cooling tanks. *Journal of Dairy Science* 42:1781-1784.
- Chen L, Daniel RM, Coolbear T. 2002. Detection and impact of protease and lipase activities in milk and milk powders. *International Dairy Journal* 13:255-275.
- Cousin MA. 1981. Presence and activity of psychrotrophic microorganisms in milk and dairy products: A review. *Journal of Food Protection* 45:172-207.
- Credit C, Hedeman R, Heywood P, Westhoff D. 1972. Identification of bacteria isolated from pasteurized milk following refrigerated storage. *Journal of Milk Food and Technology* 35:708-709.
- Elionora H, Malka H. 2007. Culturable psychrotrophic bacterial communities in raw milk and their proteolytic and lipolytic traits. *Applied and Environmental Microbiology* 73:7162-7168.
- Gunasekera TS, Dorsch MR, Slade MB, Veal DA. 2003. Specific detection of *Pseudomonas* spp. in milk by fluorescence in situ hybridization using ribosomal RNA directed probes. *Journal of Applied Microbiology* 94:936-945.
- IDF. 1993. Catalogue of tests for the detection of post-pasteurization contamination of milk. *Bulletin of the IDF* 281:13-34.

- Ingraham JL. 1962. Temperature relationships. In *The bacteria*, edited by Gunsalus I. C. & Stanier R. Y. pp. 265-296. New York: Academic Press.
- Jayashankar SR, Dundani AT, Iya KK. 1966. Studies on psychrophilic bacteria in milk. International Dairy Congress 17:539-545.
- Kato Y, Shimazaki K-I, Sukegawa K. 1976. Examination on bacteria in raw milk stored in bulk cooler. Research Bulletin. Obihiro University. 10:165-171.
- Kikuchi M, Matsui Y. 1974. Transition of the number of bacteria and bacterial flora in bulk-cooled milk. Japanese Journal of Dairy Science 45:592-596.
- Kwon SH, Ahn JJ, Kwak HS. 1998. Quality changes in various heat-treated market milks during storage. Korean Dairy Technology 16:90-97.
- Lee KC, Shon SK, Ahn DW. 1990a. A study on the microbiological quality of raw milk in the north of Kyungnam area. Korean Journal of Veterinary Service.13:27-31.
- Lee YY, So YM, Yoon, SS, Oh DH. 1990b. Occurance of psychrotrophic bacteria and isolation of protease producing psychrotrophs in raw milk. Korean Journal of Dairy Science 12:342-349.
- Maria FBLN, Rosane SCF, Rita DNW, Eduardo CT, Adriano B. 2010. Proteolytic activity among psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. International Journal of Dairy Technology 63:41-46.
- Martins ML, Pinto CL, Rocha RB, Araujo EF, Vanetti MC. 2006. Genetic diversity of gram-negative, proteolytic, psychrotrophic bacteria isolated from refrigerated raw milk. Int. Journal of Food Microbiology 111:144-148.
- Milliere JB, Veillet-Poncet L. 1979. Détermination de la flore bactérienne caséolytique psychrotrophe des laits crus réfrigérés. Le Lait 59:56-78.
- Shin YK, Kwak HS, Kim JW. 1993. Identification of psychrotrophic bacteria in raw milk. Korean Journal of Dairy Science 15:87-94.
- So MH, Yoon SS, Kim YB. 1992. Psychrotrophic microflora in raw milk and their proteolytic and lipolytic ability. Korean Journal of Dairy Science 14:43-51.
- Sutherland AD, Murdoch R. 1994. Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus* sp. International Journal of Food Microbiology 21:279-292.
- Touch V, Deeth HC. 2009. Microbiology of raw and market milks. In *Milk processing and quality management*, edited by Adnan Y. T. pp. 50-58. Blackwell publishing.
- Wehr HM, Frank JF. 2004. Standards methods for the examination of dairy products. pp.153-168. Washinton DC: American public health association.
- Wiedmann M, Weilmeier D, Dineen SS, Ralyea R, Boor KJ. 2000. Molecular and phenotypic characterization of *Pseudomonas* spp. isolated from milk. Applied and Environmental Microbiology 66:2085-2095.