

남은 음식물 사료(건식)

M 9006-2012

Animal feed from food residue by dry processing method

1. 적용 범위 : 이 표준은 남은 음식물을 이용한 동물용 사료(건식)에 대하여 규정한다.

2. 용어 및 정의 : 이 표준의 목적을 위하여 다음을 정의한다.

2.1 남은 음식물 식품의 판매·유통과정에서 버려지는 음식물, 가정·식당 등 조리과정에서 식품을 다듬고 버리는 음식물, 먹고 남긴 음식물 및 식품을 보관했다가 유통기간 경과로 그냥 버려지는 농·축·수산물
의 음식물류.

2.2 남은 음식물을 이용한 동물용 사료(건식) 남은 음식물을 이용하여 건식 등의 방법에 의하여 동물용 사
료로 제조한 것으로, 사료관리법 상의 부적합한 사료원료를 이용한 경우는 제외한다.

2.3 남은 음식물을 이용한 동물용 건식 사료화 방법 남은 음식물을 이용한 건식 사료화 방법은 발효열이
나 기타 에너지를 이용하여 남은 음식물의 수분함량을 13% 이하로 감량시킨 방법으로 직열방법에 의한 것
은 제외한다. 위생적인 안전사료화를 위한 가열처리 공정은 100℃에서 30분 이상(단, 돼지사료는 심부온도 8
0℃에서 30분 이상) 처리하고 이물질 제거공정을 2회 이상 실시한다. 사료품질관리를 위하여 식품 가공부산
물, 균체, 효모, 박류, 곡류 부산물을 혼합할 수 있다.

3. 품질

남은 음식물을 이용한 건식 사료는 반추 동물에 사용을 금지하며, 품질기준은 다음 표 1에 따른다.

표 1 품질기준

구 분	물 질 명	기 준
유 해 물 질	납 (Pb)	20 mg/kg 이하
	카드뮴 (Cd)	2.5 mg/kg 이하
	수은 (Hg)	0.5 mg/kg 이하
	아플라톡신 B1	50 μ g/kg 이하
	살모넬라 (D그룹)	미검출
사 료 성 분	수 분	13 % 이하
	조단백질	사료성분 등록함량 표시
	조 섬유	사료성분 등록함량 표시
	조 지방	사료성분 등록함량 표시
	조 회 분	사료성분 등록함량 표시
	염 분	사료성분 등록함량 표시
	비단백태질소화합물	0.05 % 이하
	이 물 질(wt%)	2 % 이하

(주) 이물질은 비닐, 쇠붙이, 유리, 은박지, 고무, 플라스틱 등 비영양물질을 말함

4. 시험 방법 남은 음식물을 이용한 동물용 건식 사료의 시험은 사료관리법에 따른 아래의 시험방법에 따른다.

4.1 유해물질 분석

4.1.1 납(Pb)

4.1.1.1. 디티존(Dithizone)법

(1) 기 구

- a) 전기로
- b) 분광광도계
- c) 자체 크루시블
- d) 비이커
- e) 가열판
- f) 시계 접시
- g) 메스 플라스크
- h) 분액 여두

(2) 시 약

a) 구연산 암모늄(Ammonium citrate)용액 : 구연산 암모늄 45g에 증류수 100mL를 가하여 용해시킨 뒤 페놀프탈레인 지시약 2~3 방울을 가하여 적색이 될 때까지 암모니아수를 가한다. 납을 제거하기 위하여 이 용액에 추출용 디티존 클로로포름(Dithizone chloroform)용액 20mL를 넣고 흔들어 디티존 용액이 고유의 녹색을 유지할 때까지 같은 방법으로 반복 추출한 후 물층에 클로로포름 50mL를 넣고 2회 흔들어 섞은 후 물층을 분획하여 취한다.

b) 아황산 나트륨용액 : 아황산나트륨(최순품 무수) 15g에 증류수를 가하여 100mL로 한다(사용시에 제조한다). 이 용액에 디티존 클로로포름용액 20mL를 넣고 흔들어 디티존용액이 고유의 녹색을 유지할 때까지 같은 방법으로 반복추출 한 후 물층에 클로로포름 50mL를 넣고 2회 흔들어 섞은 후 물층을 분액하여 취한다.

c) 10%시안화 칼륨용액 : 시안화칼륨 50g에 증류수를 가해서 100mL로 한다. 이 용액을 추출용 디티존클로로포름 용액 20mL를 넣고 흔들어 디티존용액이 고유의 녹색을 유지할 때까지 같은 방법으로 반복 추출한 후 물층에 클로로포름 50mL를 넣고 2회 흔들어 섞은 후 물층을 분액하여 취한다. 단 용액중에 잔존하는 디티존을 제거하기 위하여 이 물층을 클로로포름으로 10~20회 반복하여 씻는다. 수용액에 증류수를 가하여 5배 희석하여 사용한다.

d) 묽은 시안화칼륨용액 : 10% - 시안화칼륨 용액 10mL에 증류수를 가하여 100mL로 한다. (사용시 제조한다)

e) 납(pb)표준용액 : 질산납(Lead Nitrate) 0.1598g을 질산(2.5 : 97.5)에 녹여 100mL로 하여 보존용액으로 한다. 사용시 이것을 질산(1:99)으로 10배 또는 1,000배로 희석하여 표준용액으로 한다. 납 표준용액 1mL = 10 μ g 또는 1 μ g, Pb

f) 추출용 디티존클로로포름 용액(시약정제용) : 디티존(분말) 0.03g을 취하여 클로로포름 100mL에 녹여 여기에 암모니아수(1:99) 100mL를 가하여 흔들어 섞은 후 물층을 분취한다. 다시 클로로포름 층을 암모니아수(1:99) 100mL씩으로 2회 동일하게 조작하여 물층을 합하고 클로로포름 20mL씩으로 3회 씻는다. 물층에 염산용액(1:1)을 가하여 약 산성으로 한 다음 클로로포름 200mL씩으로 2회 추출한다. 클로로포름 추출액을 합하고 클로로포름으로 전량을 1,000mL로 만들어 차광하여 냉암소에 보존한다

g) 디티존 벤젠용액(정량용) : 디티존 분말 0.05g을 벤젠 100mL에 녹이고 여기에 암모니아수(1:99) 100mL를 가하여 잘 흔들어 섞고 물층을 분취한다. 다시 벤젠층을 암모니아수(1:99) 100mL씩으로 2회 동일하게 조작하여 물층을 합하고 벤젠 20mL씩으로 물층을 3회 씻는다. 또 물층에 염산용액(1:1)을 가하여 약 산성으로 한 뒤 벤젠 200mL씩으로 2회 추출한다. 벤젠 추출액을 합하고 벤젠을 가하여 전량을 1,000mL로 하여 원액으로 한다. 원액벤젠으로 10배 희석한 용액에 대해서 벤젠을 대조액으로 하여 층장 10mm에서 파장 620nm부근의 흡수 극대 파장에서 흡광도 A를 측정한다. 이때 원액 1,000mL는 $70.6 \times A \text{mg}$ 의 디티존을 함유하게 된다. 사용시 원액 $[20,000 / (70.6 \times A)] \text{mL}$ 을 취하고 벤젠을 가하여 1,000mL로 하여 사용한다. 이 디티존 벤젠용액 1,000mL는 디티존 20mg을 함유하게되며 사용시에 제조한다.

(3) 시료액 제조 : 건식(회화)법

a) 건조시료 2~10g을 30mL 크루시블에 취하여 건조기에서 건조한 후 전기곤로 상에서 예비 회화한다.

b) 약 250℃로 가열된 전기곤로에 넣고 온도를 높여 완전히 회화할 때까지 500℃이하로 가열한다.

c) 24시간 후 아직 회화가 충분히 되지 않은 경우에는 질산용액(1 : 1) 2~5mL를 가하여 증발건고 시킨 다음 회화를 계속하여 (경우에 따라 반복) 완전히 회화시킨다.

d) 방냉 후 크루시블 내의 회분이 튀지 않도록 조심스럽게 증류수로 적신 후 농염산 2~4mL를 가하여 수조상 또는 건조기에서 건고 시킨다

e) 건조시킨 후 농염산 2mL를 가하고 가온 하여 녹인 후에 불용물이 잔존할 때에는 유리여과기로 여과한다

f) 유리여과기내의 잔류물에 소량의 염산을 넣은 다음 농염산과 50% 구연산 암모늄용액을 1:1로 섞은 용액 적당량을 넣고 가열한 후 다시 40% 초산암모늄 용액 0.5~1mL 씩으로 반복하여 씻어 세척액에 합하여 일정량으로 만들어 50~100mL를 시료액으로 한다.

(4) 측 정

- a) 시료액 50mL을 취하여 구연산암모늄용액 2mL 및 메틸레드 지시약 2방울을 가하고 용액이 황색(pH 8.5~10)을 나타낼 때까지 암모니아수를 떨어뜨려 넣고() 증류수로 전량을 100mL 정도로 한다.
- b) 여기에 10% 시안화칼륨 용액 10mL와 아황산나트륨 용액 10mL를 가하여 혼합하고 수조상에서 10분간 가열한다.
- c) 방냉 후 암모니아수 1.5mL를 가한 다음 분액여두에 옮기고 정량용 디티존 벤젠용액 10mL를 가한다.
- d) 분액여두로 1분간 강하게 진탕한 다음 분리된 물층을 제거한 후 벤젠층을 다른 분액여두로 옮긴다.
- e) 다시 1% 시안화칼륨 용액 40mL를 가하여 30초간 강하게 흔들어 섞은 다음 물층을 버리고 벤젠층을 받는다(필요하면 건조 여과지로 여과)
- f) 여과액 즉 벤젠 층에 대하여 층장 10mm에서 파장 525nm부근의 흡수극대 파장으로 흡광도 및 공시험의 흡광도를 측정한다.
- g) 동시에 납 표준용액 10mL(Pb 10 μ g), 증류수 10mL에 대하여 동일하게 조작하여 각각 흡광도를 측정한다(대조액은 벤젠을 사용한다).

(5) 계 산

$$\text{납(ppm)} = 10 \times \frac{A - A_b}{A_s - A_c} \times \text{희석배수} \times \frac{1}{w(g)}$$

※ 10 : Pb 10 μ g

A : 시료액의 흡광도

A_s : 표준용액의 흡광도

A_b : 공시험의 흡광도

A_c : 증류수의 흡광도

W : 시료무게

4.1.1.2. 원자 흡광분광광도계법 (Atomic absorption spectrophotometry)

(1) 기 구

- a) 원자흡광분광광도계
- b) 전기로
- c) 자체 크루시블
- d) 톨비커
- e) 가열판
- f) 시계접시
- g) 메스 플라스크
- h) 세척병
- i) 분액 여두

(2) 시 약

- a) **납(Pb)표준액** : 원자흡광분광광도계용 납 표준품(1,000ppm)을 희석하여 2, 4, 6, 8ppm으로 만든다.
- b) **요오드칼륨용액** : 요오드칼륨(KI) 68.3g을 증류수로 녹여 100mL로 한다
- c) **1N-염산** : 농염산 87mL를 증류수로 희석하여 1,000mL로 한다

(3) 시료액의 조제

시료 10~20g을 50mL 자제크루시블에 정확히 취하고 곤로위에서 예비회화시킨 후 500℃ 전기로에서 48~72 시간 회화한 다음 방냉 후 소량의 증류수로 회분을 씻어 200mL 툴비커에 넣고 다시 염산용액(1:1) 30mL로 크루시블을 씻어 툴비커에 넣은 다음 시계접시를 덮고 가열판에서 분해액이 무색이 될때까지 가열분해 후 시계접시를 열고 증발건고 시킨 후 방냉하고 뜨거운 증류수로 씻어 100mL 메스플라스크에 넣고 방냉한 다음 표전을 증류수로 맞추어 시료액으로 한다.

* 분해시 완전분해가 안되었으면 질산 5mL와 과염소산 5mL를 넣어 완전분해가 될 때까지 분해한다.

무기질 시료의 경우 시료 0.5~2g을 취하여 200mL 삼각 플라스크에 넣고 염산용액(1:1) 30mL를 가하고 분해액이 1/2로 줄어 들 때까지 가열 용해 후 뜨거운 증류수로 100mL 메스플라스크에 No 6. 여과지를 사용하여 여과한 후 시료액으로 사용한다.

(4) 측 정

시료액 일정량(5~30mL)를 분액여두에 취하고 85%인산 14mL와 요오드칼륨 용액 5mL를 가하고 다시 증류수 50mL를 넣고 진탕 혼합 후 5분간 방치하고 MIBK(Methyl Isobutyl Ketone) 10mL를 정확히 가하고 3~5 분간 진탕, 정치 후 MIBK층(상층)을 원자흡광광도계 파장 283.3nm에서 흡광도를 측정한다. 이 때 공시험을 행하여 보정한다.

(5) 계 산

$$\text{납(ppm)} = \frac{\text{시료액의 흡광도} / \text{1ppm 기준 흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)}}$$

4.1.2 카드뮴(Cd)**4.1.2.1 원자흡광분광광도계법(Atomic absorption spectro photometry)****(1) 기 구**

- a) 원자 흡광분광광도계
- b) 전기로
- c) 자제 크루시블
- d) 툴비커
- e) 가열판
- f) 시계접시
- g) 메스 플라스크
- h) 분액 여두

(2) 시 약

- a) **카드뮴(Cd) 표준액** : 원자흡광광도계용 카드뮴 표준원액(1,000ppm)을 희석하여 사용한다.
- b) **요오드화 칼륨용액** : 요드화 칼륨(KI) 68.3g을 증류수로 녹여 100mL로 한다.
- c) **1N-염산** : 농염산 87mL를 증류수로 희석하여 1,000mL로 한다.

(3) 시료액의 조제

시료 10~20g을 50mL 자제 크루시블에 정확히 취하고 곤로 위에서 예비회화시킨 후 500℃ 전기로에서 하루밤 태우고 방냉 후 소량의 증류수로 회분을 씻어 툴 비커에 넣고 다시 질산 5mL와 과염소산 5mL로 크루시블을 씻어 툴비커에 넣은 후 시계접시를 덮고 가열판에서 분해액이 무색이 될 때까지 가열분해 후 100mL 메스플라

스크 시계접시를 열고 증발 건고 시킨 후 방냉하고 1N-염산 10mL 가하여 가열용해 후 표선을 증류수로 맞추어 시료액으로 한다. 무기질시료의 경우 시료 0.5~1g을 취하여 100mL 삼각 플라스크에 넣고 염산(1 : 1) 20mL를 가하고 분해액이 1/2로 줄어 들 때까지 가열용해 후 뜨거운 증류수로 여과하여 일정량으로 만들어 시료액으로 한다.

(4) 측 정

시료액 일정량(5~30mL)를 분액여두에 취하고 85%인산 14mL와 요오드화 칼륨 용액 5mL를 가하고 다시 증류수 50mL를 넣고 진탕 혼합한 후 5분간 방치하고 MIBK(Methyl Isobutyl Ketone) 10mL를 정확히 가하고 3~5분간 진탕 정치 후 MIBK층(상층)을 원자흡광광도계 파장 228.8nm에서 흡광도를 측정한다. 이 때 공시험을 행하여 보정한다.

(5) 계 산

$$\text{카드뮴(ppm)} = \frac{\text{시료액의 흡광도} / 1\text{ppm 기준 흡광도} \times \text{희석배수}}{\text{시료중량(g)}}$$

4.1.3 수은(Hg) 자동분석기법(Mercury Analyzer SP)

(1) 기 구

- a) 전기로
- b) 직시친청
- c) 수은자동분석기
- d) 자체 크루시블,
- e) 마이크로피펫

(2) 시 약

a) 산화알루미늄 : 750℃ 전기로에서 2시간이상 가열 처리한 다음 데시케이터내에서 공기 중 수은이 오염되지 않도록 하여 방냉시킨다.

b) 수산화칼슘, 탄산나트륨시약(1:1) : 무게비율로 1:1혼합하여 잘 섞고 적당량을 750℃ 전기로에서 2시간이상 가열 처리한 다음 데시케이터내에서 공기 중 수은이 오염되지 않도록 방냉한다.

c) 완충용액 : 염소(Cl)가 들어가지 않은 pH : 6.86 완충용액을 사용한다.

(3) 시료처리

a) 고체시료 : 750℃ 전기로에서 위 시약과 동일 처리한 보트에 ②시약을 깔고 그 위에 배합사료는 0.1g, 단미사료는 0.05g 취하여 깔고 ②시약으로 덮고 그 위에 ①시약을 깔고 다시 ②시약으로 덮는다.

b) **액체시료** : 상기와 동일 처리한 보트에 ①시약을 깔고 그 위에 액상시료 100~1000 μ l를 정확히 취한 다음 다시 ①시약을 덮고 그 위를 ②시약으로 덮는다.

(4) 방 법

수은전용분석기(Mercury atomizer)의 글라스 캡을 열고, 시료 처리보트를 밀어 넣어 캡을 닫은 다음 작동 스위치를 누르고, 측정량을 ng으로 기록한다.

(5) 계 산

$$\text{수은량(ppm)} = \text{시료 측정량(ng)} / \text{시료량(mg)}$$

4.1.4 아플라톡신 B1

4.1.4.1. 아플라톡신(Aflatoxin)의 정량법

4.1.4.1.1. HPLC 법

(1) 기 구

- a) HPLC
- b) 호모게나이저
- c) 진공펌프
- d) 로타리 증발기
- e) 여과병
- f) 깔대기
- g) 분액 여두
- h) 칼럼(22×300mm)
- i) 항온 수조
- j) 바이알(vial)
- k) 메스플라스크
- l) 메스 실린더
- m) 흡피펫

(2) 시 약

- a) **메탄올(Methanol)** : 특급품 또는 HPLC 등급품 원액을 사용
- b) **n-헥산(n-Hexane)** : 특급품 또는 HPLC 등급품 원액을 사용
- c) **세라이트(Celite)** : 545 또는 이와 동등품
- d) **클로로포름(Chloroform)** : 특급품 또는 HPLC 등급품 원액을 사용
- e) **무수 황산소다(Sodium Sulfate Anhydro, Na₂SO₄)** : 1시간 건조후 사용
- f) **실리카겔(SilicaGel)** : Kiesel Gel 60(Merck사제 Art 7734)또는 이와 동등품을 105℃에서 1시간 건조시킨 후 증류수 1%를 첨가하고 1일 이상 경과 후 사용
- g) **클로로포름 메탄올(Chloroform Methanol)액** : 클로로포름과 메탄올(97 : 3)의 비율로 혼합
- h) **아플라톡신 표준품** : 아플라톡신 표준품 B1, B2, G1, G2를 벤젠-아세트니트릴(98 : 2)로 용해 희석하여

사용한다.

i) 3불화 초산(Trifluoro acetic acid) : 특급품 또는 HPLC 등급품 원액을 사용

j) 증류수(Distilled water) : HPLC 등급품 원액을 사용

k) 아세토니트릴(Acetonitrile) : HPLC 등급품 원액을 사용

(3) 시료액의 조제

a) 시료 50g을 삼각플라스크에 취하고 메탄올 150mL와 증류수 100mL 및 n-헥산 100mL를 가하고 30분간 진 추출한다.

b) No.2 여과지에 세라이트 545를 넣은 후 흡인하면서 추출액을 여과하고 메탄올과 증류수가 합쳐진 층(하층) 50mL를 취하여 250mL 분액여두에 넣고 n-헥산 100mL를 가하여 5분간 진탕 후, 액층을 분리시켜 하층을 다른 분액여두에 옮기고 클로로포름 50mL를 가하고 5분간 진탕 후 액을 분리시켜 클로로포름층(하층)을 취한다.

c) 메탄올과 증류수가 합쳐진 층에 상기의 조작을 2회 더 반복한 후 클로로포름을 합하여 무수 황산나트륨에 통과시키면서 여과하여 탈수 후 회전식 증발기로 50°C에서 클로로포름을 증발 건조한다.

d) 칼럼(22×300mm)의 하부에 그라스 울(glass wool)로 막고 클로로포름을 넣어 기포를 제거한 후 무수 황산나트륨 5g, 실리카겔(Art, 7734) 10g을 넣은 후 다시 기포를 제거하고 30분간 방치한 다음 무수 황산나트륨 15g을 넣은 후 클로로포름을 칼럼 상층까지 적하 한다.

e) 증발건조된 증발 플라스크에 클로로포름 10mL정도 넣어 용해하여 컬럼에 붓는다. 이와 같은 방법을 3회 반복한다. 이때 클로로포름 양이 실리카겔층 높이와 비슷하게 하는 것이 좋다.

f) 추출액을 적하하고 n-헥산 150mL 및 에테르 150mL로 탈지한 후 칼럼 하부에 증발 플라스크를 받치고 컬럼에 흡착된 아플라톡신을 클로로포름+메탄올(97+3) 200mL로 용출하고 회전식 증발기로 50°C에서 증발 건조한다.

g) 증발건조된 아플라톡신을 클로로포름에 소량씩 3~4회 용해하여 바이알(vial)에 넣고 50°C 항온수조에서 N₂ gas를 주입시키면서 증발건고 시킨 후 3불화 초산 100μL를 가하고 마개를 막은 후 1분 후에 증발건고 시킨다.

h) 바이알에 메탄올 회석량의 1/2정도 넣고 완전히 용해한 후 증류수를 메탄올과 동량 가하고 혼합시킨 후 0.45μm여과지로 여과하여 시료액으로 한다.

(4) 측 정

고속액체크로마토그래피로 다음 조건에 의하여 측정한다.

Column : Reverse phase C₁₈ Column(4.6m×25cm)

Mobile phase : H₂O + Methanol + CH₃CN(66+19+25)

Detector : Fluorescence Detector

Excitation Filter 338nm

Emission Filter 425nm

Flow rate : 0.96mL/min 또는 2mL/min

4.1.4.1.2. T.L.C법(Thin Layer Chromatography)

HPLC 방법 과정에서와 같이 증발건고 시킨 후 벤젠+아세토니트릴(CH_3CN) (98+2)용액 $200\mu\text{l}$ 로 용해하여 시료액으로 하고 TLC판(Merck Art.5553-7)에 점적하여(이 때 표준품도 점적한다) TLC챔버(Chamber)에 전개 용매() [클로로포름(90) : 아세톤(10)] 를 100mL 가하고 TLC판을 넣어 전개 거리가 10cm 정도 되면 TLC판을 꺼내 암소()에서 5분간 말린 후 UV램프(UV Lamp) 장파장(365nm) 에서 측정한다.

4.1.4.1.3. 효소면역 측정방법

AOAC에 등재된 분석방법에 따른다.

4.1.5. 살모넬라(*Salmonella*) D그룹

4.1.5.1 항혈청에 의한 검사법

(1) 증균 및 분리

a) 시료 10g을 Selenite broth와 BHI(Brain Heart Infusion) broth 100mL에 각각 접종하고 37°C 에서 18~24시간(BHI는 4~6시간 예비배양 후 배양액 약 1~2mL를 Tetrathionate broth 10mL에 접종하여 42°C 로 18~24시간) 배양한다.

b) 배양액 1~2 백금이를 SS(*Salmonella* & *Shigella*)agar와 MacConkey agar에 도말하여 24시간 배양하여 살모넬라로 의심되는 집락을 관찰한다. 이때 살모넬라 집락의 특징은 MacConkey agar에서 작고 무색을 나타내며 SS agar에서는 작고 무색을 나타내거나 H_2S 의 생성으로 중앙에 검은점을 형성한다.

c) 살모넬라로 의심되는 집락을 TSI(Triple Sugar Iron)agar(혹은 KIA)에 천자 및 사면 접종하여 24시간 배양 후 배양조건이 알칼리(사면)/산성(천자)이거나 알칼리(사면)/산성(천자), H_2S 생성으로 나타난 것을 생화학 검사를 실시한다.

(2) 생화학 검사

생화학검사는 우선 Urea 반응검사와 Phenylalanine 반응검사를 실시하여 음성을 나타내는 균에 대해 진행하며 살모넬라의 일반적인 생화학적 반응은 다음과 같다.

균		<i>Salmonella</i>	<i>S. typhosa</i>
성상			
TSI agar (KIA)	Glucose	+	+
	Lactose	-	-
	Sucrose	-	-
	gas 형성	+	-
	H_2S 생성	+	(±)
Indole		-	-
Methyl Red		+	+
Voges Proskauer		-	-
Citrate		(±)	(±)
Urea		-	-
KCN		-	-
운동성		+	+
Phenylalanine		-	-
Gelatin 액화		-	-

※ (±)는 양성 이거나 음성

(3) 혈청군(Serogroup)결정 시험

이상의 생화학 검사결과 살모넬라로 판단되는 균들의 혈청학적 검사를 실시하는데 먼저 O항원 다가 (Polyvalent) 항혈청(Difco)으로 슬라이드 응집반응을 실시하여 Polygroup을 결정한 후 단일(Single) 항혈청(Difco) 슬라이드 응집반응을 통해 혈청군(Serogroup)을 결정하여 D group 여부를 확인한다.

4.1.5.2 키트(Kit)에 의한 간이 검사법**(1) 기 구**

- a) 고압멸균기, 시험관(10mL, 20mL용량), 판독기
- b) 삼각플라스크
- c) 배양기 (2대)
- d) 탈지면
- e) 멸균기

(2) 배양액의 조제

- a) **Buffered peptone water 용액** : 시약 20g을 1 L 증류수나 비 이온수에 녹이고 멸균하여 사용한다.
- b) **Tetrathionate broth** : 시약 4.6g을 증류수 100mL로 녹이고 끓을 때까지 가열한다. 서서히 방냉시켜 60℃이하로 식힌 후 Iodine용액을 2mL 넣는다.
- c) **Selenite broth** : Selenite broth 2.3g을 증류수 100mL에 용해하여 끓을 때까지 가열한 후 방냉한다.
- d) **Iodine용액** : 5g KI를 증류수 20mL로 녹인 용액에 Iodine Crystal 6g을 넣고 녹인다.
- e) **M-broth(혹은 GN broth)** : 시약 3.62g을 증류수 100mL에 넣고 1분간 끓여 멸균 및 용해시킨다.

(3) 시료액의 배양

- a) 시료 25g을 칭량하여 멸균한 300mL 삼각플라스크에 넣고 멸균한 225mL Buffered peptone water를 혼합하여 37℃에서 18~24시간 배양한다.
- b) 배양액 1mL씩 분취하여 10mL의 Selenite cystine broth와 Tetrathionate broth에 각각 혼합하여 Selenite cystine broth 시험관은 37℃에서 Tetrathionate broth 시험관은 42℃±0.5에서 18~24시간 배양한다.
- c) 각각의 선택배양액 1mL를 분취하여 멸균한 10mL의 M-broth와 혼합하여 42℃±0.5에서 4~6시간 배양한다.
- d) 오염이 덜한 시료인 경우에는 b)와 c)의 배양시간을 바꾸어 행한다.

(4) 방 법

- a) *Salmonella* kit를 냉장상태에서 실온으로 방치한다.
- b) M-broth 배양액을 1mL씩 시험관에 분취하여 옮겨 멸균하고 실온으로 식힌다.

- c) 각각의 Well에 양성음성 기준물 100 μ l와 시료 100 μ l를 취하여 첨가한 후 시료의 위치를 기록하고 실온에서 30분간 배양한다.
- d) Well buffer로 3회, 증류수로 1회 세척한 후 물기를 제거한다.
- e) 각각의 Well working conjugate 100 μ l씩 첨가한 후 실온에서 30분간 배양한다.
- f) 각각의 Well에 TMB Substrate 100 μ l씩 첨가한 후 실온암실에서 30분간 배양한다.
- g) IN H₂SO₄ 50 μ l를 각각의 Well에 첨가한 후 10~15분내에 판독기로 읽는다.

4.2 성분분석

4.2.1 수분 (Moisture)

4.2.1.1. 가열 감량법

(1)기 구

- a) 건조기
- b) 데시케이터
- c) 알루미늄 칭량병(crucible)
- d) 화학저울

(2)측 정

- a) **가루상태의 시료** : 미리 건조하여 항량을 구한 알루미늄제 칭량병에 시료 2~5g을 정확히 칭량하여 항온 건조기로 135 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C로 정확히 2시간 또는 105~110 $^{\circ}$ C에서 항량이 될 때까지 건조시켜 데시케이터내에서 30분간 방냉한 다음 무게를 달아 감량을 수분함량으로 한다. 단, 요소제는 75 $^{\circ}$ C에서 4시간 건조한다. (어즙 흡착사료, 당 흡착사료, 글루텐피드는 105 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C에서 3시간 건조)

$$\text{수분(\%)} = \frac{\text{건조전 중량(칭량병+시료)} - \text{건조후 중량(칭량병+시료)}}{\text{시료중량}} \times 100$$

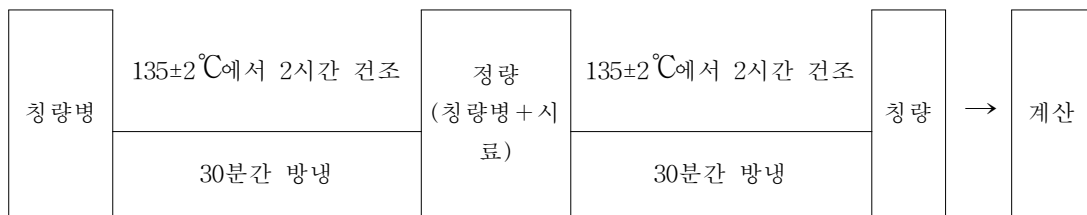
- b) **수분이 높은 시료** : 미리 항량으로 한 대형 칭량병에 일정량의 시료를 달아 60~80 $^{\circ}$ C의 건조기내에서 48시간 예비 건조한 다음 실험실내 상온에서 24일간 방치하여 원물(풍건물)의 수분함량을 구한 후 분쇄하여 다시 이 분쇄된 시료를 (1)항 가루상태의 시료와 동일한 방법으로 수분을 정량한 후 다음방식에 따라 수분함량을 구한다

$$W = W_1 + \frac{(100 - W_1) \times W_2}{100}$$

W : 원물의 수분함량(%)

W₁ : 예비건조시의 감량(%)

W₂ : 풍건물 공시품의 수분함량(%)



4.2.1.2. 증류법 (톨루엔 증류법) : 휘발성 성분이나 지질이 많고 수분이 많아서 건조하면 피막이 생기는 시료에 대한 수분 정량법이다

(1) 기구 및 시약

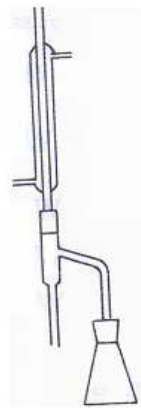
증류식 수분측정장치, 톨루엔, 해사(건조된 것)

(2) 시약

톨루엔 또는 톨루엔과 자일렌 혼합액(2:1) 일반품도 사용가능 하나 물을 함유하지 않아야 하며 미리 무수황산나트륨 소량과 혼합, 진탕하여 탈수시켜 놓는다.

(3) 장치

증류식 수분 정량장치(A.O.A.C.형)



**그림4-2 증류식
수분정량장치
(A.O.A.C 형)**

(4) 방법

a) 일정량의 시료(수분량이 3~4mL정도 되게 시료를 취함)를 정확하게 달아 증류식 수분 정량장치의 증류 플라스크(세척하여 건조시킨 증류 flask)에 넣고(점성시료일 경우는 유산지나 알루미늄박에 싸서 넣어도 좋음), 톨루엔을 시료가 잠길 만큼 부어주고(이때 튀는 것을 막기 위해 해사를 넣어줌), 환류냉각관과 수분측정관을 연결한다. 냉각관 상부로부터 톨루엔을 주입하여 수분측정관을 완전히 채운 다음 냉각수를 흐르게 하고 가열을 시작한다.

b) 처음에는 1초당 2방울씩 떨어지게 하다가 4방울 정도 떨어지게 가열온도를 조절한다. 냉각된 유출액은 두 종류의 액으로 분리되며 하층의 물은 눈금관에 모이고 상층의 톨루엔은 측관에서 플라스크로 되넘어 갔다가 다시 물과 함께 유출되어 넘어온다. 물이 거의 다 유출되면 유출액은 투명하게 되는데 이 때 점적병의 스포이드를 써서 냉각관 상부에서부터 톨루엔을 부어넣어 냉각관 내벽에 묻어있는 물방울을 씻어 내린다. 물의 유출이 끝날 때까지 세정과 증류를 계속하여 15분 간격으로 물의 유출 상태를 조사하여 더 이상 눈금의 변

화가 없으면 물의 유출이 끝난 것으로 간주한다(수분이 더 이상 유출되지 않을 때 다시 톨루엔을 냉각관 상부로부터 주입하고 얼마간 더 증류한다).

c) 가열이 끝난 뒤 냉각관 내부나 수분 측정관에 붙어있는 수분을 수분 측정관(눈금부위)으로 떨어뜨린다. 물의 유출이 끝나면 눈금관 부분이 따뜻하게 되므로 실온까지 냉각시켜 분리된 물의 양을 판독하여 아래의 공식에 의거 수분함량을 구한다.

$$\text{수 분(\%)} = \frac{\text{눈금관의 물의양(mL)}}{\text{시료채취량(g)}} \times 100$$

4.2.2. 조단백질(Crude protein)

4.2.2.1. 켈달(Kjeldahl) 법

(1) 기구

- a) 분해 및 증류장치(Kjeldahl nitrogen digestion & distillation apparatus)
- b) 켈달 플라스크(Kjeldahl flask)
- c) 메스 실린더
- d) 삼각 플라스크
- e) 저울
- f) 자석 교반기
- g) 피펫

(2) 시약

a) 0.1N 염산용액(HCl) : 농염산(비중 1.18) 8.7mL를 1000mL 메스플라스크에 넣고 증류수로 표선까지 채우고 혼합하여 만든다.

※ 염산농도가 35.5%, 비중 1.18 인 것으로 1N 염산을 만들려면 아래의 계산식에 의하여 소요량을 구할 수 있다

$$1\text{N 염산용액} = \frac{36.465(\text{염산분자량}) \times 100}{35.5(\text{염산\%농도}) \times 1.18(\text{염산비중})} = 87.05\text{mL}/1000\text{mL}$$

※ 0.1N 염산용액의 표정() : 표준 탄산나트륨을 260~270℃에서 약 1시간 가열한 다음 데시케이터내에서 30분간 방냉한다. 이 중에서 1.5g을 정확히 무게를 단 다음 250mL 메스플라스크의 표선까지 증류수를 가해 혼합한다. 이중 25mL를 삼각플라스크에 취하여 메틸오렌지 두 방울을 가하고 0.1N 염산용액으로 적정한다. 황색으로 변하면 담홍색이 될 때까지 일단 2~3분간 끓이고 냉각한 다음 다시 담홍색이 될 때까지 적정하여 이때 소비된 0.1N 염산용액의 소비 mL로부터 다음과 같이 0.1N 염산용액의 factor를 구한다.

$$\text{Factor(F)} = 188.67 \times \frac{x}{b}$$

x : 탄산나트륨의 무게(g)

b : 적정에 사용된 0.1N 염산 용액 소비량(mL)

- b) **분해촉진제** : 황산칼륨(Potassium Sulfate) 9g에 황산동(Copper Sulfate) 1g의 비율로 유발()에서 완전히 혼합한다
- c) **수산화나트륨(Sodium hydroxide) 혼합액** : 수산화나트륨 500g과 치오황산나트륨(Sodium thiosulfate) 100g을 증류수 1000mL에 녹인다
- d) **지시약** : 브로모크레졸그린(Bromocresol green) 0.5g과 메틸레드(Methyl red) 0.1g을 95%이상의 에탄올(Ethanol) 300mL에 용해하여 만든다.
- e) **4% 붕산(Boric acid)용액** : 붕산 40g을 증류수에 용해하여 1,000mL로 만든 후 d)의 지시약 4mL를 가하여 혼합한다
- (3) **시료액의 조제(분해)** : 시료 0.5~1g을 500mL 분해 플라스크에 취하고 분해촉진제 7~8g(10g)을 가하여 잘 혼합한 후 H₂SO₄ 10mL를 서서히 가해서 잘 혼합한다. 이를 처음에는 거품이 넘치지 않도록 서서히 가열하다가 거품이 나지 않으면 투명하게 될 때까지 강하게 가열하여 분해시킨다(분해시간 50~90분).

(4) 증류

300mL 삼각플라스크에 4%붕산용액 25~75mL(21~63% 조단백질에 해당)를 취하고 지시약 2~3방울을 가하여 냉각기의 관 끝이 붕산용액에 잠기도록 받쳐 놓는다. 그 후 냉각된 분해액에 증류수 200mL와 아연립(粒) 2~3개를 넣고 수산화나트륨 혼합액 45mL를 가한 다음 즉시 증류장치에 연결하고 서서히 가열하여 증류하는데 분해액의 양이 약 2/3로 줄어들거나 증류액이 120~150mL 될 때까지 증류한다

(4) 적정

증류하여 받은 액을 0.1N-염산용액으로 적정하면 종말점(end point)부근에서 무색으로 변하며 1~2방울 더 가하여 적갈색으로 변할 때의 0.1N 염산용액 소비 mL수를 읽는다

(5) 계산

0.1N 염산용액 1mL는 질소(N)0.00140067g에 상당하므로 조단백질 함량은 다음과 같이 계산한다.

$$\text{조단백질}(\%) = 0.00140067 \times T \times F \times 6.25 \times 100/W$$

T : 0.1N 염산용액 적정치(mL) - Blank 적정치

F : 0.1N 염산용액의 Factor

W : 시료무게(g)

4.2.2.2. 자동분석법(Kjeltec Method)

(1) 기구 및 시약

- 분해장치
- 시료주입 및 증류장치
- 화학저울
- 자석교반기
- 메스플라스크
- 메스실린더
- 분해병
- 분해병스탠드
- 시약 분주기
- 황산(시약 1급)

(2) 시약의 조제

a) **0.1N 염산** : 농염산(비중 1.18) 87mL를 증류수로 희석 10 L로 하고 factor를 구하였다.

* factor 구하는 방법 : 표준탄산나트륨(Sodium carbonate)을 260~270℃에서 약 1시간 동안 가열한 다음 데시케이터 내에서 30분간 방냉하여 이 중에서 1.5g을 정확히 칭량하고 증류수로 용해 후 250mL 메스플라스크의 표선을 추고 혼합한 후 이 중 25mL를 취하여 메틸 오렌지(Methyl orange) 두 방울을 가하고 0.1N 염산을 서서히 떨어뜨려 황색에서 담홍색이 될 때 일단 2~3분간 끓이고 냉각 후 다시 담홍색이 될 때까지 적정한다. 이 때 소비된 0.1N 염산용액의 소비mL로부터 다음과 같이 0.1N 염산용액의 factor를 구한다.

$$\text{Factor(F)} = 188.67 \times \frac{X}{b}$$

X : 탄산나트륨의 중량(g),

b : 적정에 사용된 0.1N HCl 용량(mL)

b) **분해촉진제** : 황산칼륨(Potassium sulfate : K_2SO_4) 10g에 황산동(Copper sulfate : $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{SO}$) 1g의 비율로 유발()에서 완전히 혼합한다.

c) **40% 수산화나트륨용액** : 수산화나트륨(Sodium hydroxide : NaOH) 4kg을 증류수에 녹여 10 L로 한다.

d) **1% 붕산용액** : 붕산(Boric acid : H_3BO_3) 100g을 증류수에 용해하여 10 L로 하고 여기에 브로모크레졸 그린과 메틸레드 용액(Bromocresol green 100mg과 Methyl red 100mg을 각각 Methanol 100mL에 용해) 각각 100mL와 70mL를 가한다.

(3) **시료액의 조제(분해)** : 시료 0.7~1g을 분해병에 취하고 분해촉진제 7~8g을 가하여 잘 혼합한 황산(Sulfuric acid, H_2SO_4) 10mL를 서서히 가해서 잘 혼합한다. 이를 처음에는 거품이 넘치지 않도록 서서히 가열하다가 거품이 나지 않으면 투명하게 될 때까지 강하게 가열하여 분해시킨다.

(4) **분석방법(기기 작동방법)** : 자동분석기의 작동방법에 따라 측정한다

4.2.2.3. 자동분석법(Dumas method)**(1) 기구 및 시약**

a) 고온 연소장치

b) 질소수집장치(측정장치를 갖추고 있어야 하며 기기 장치에 적합한 약세사리 및 시약)

c) 저울

(2) 시료의 준비

30 sieve체를 통과한 시료로서 뚜껑이 있는 시료병에 보관한다.

(3) 방법

a) 기기의 조작법에 따라서 기기를 가동시킨다.

b) 연소로가 온도평형을 유지한 다음 시작하여 정상가동 여부를 확인한다. 이때 연소로의 온도는 권장 적정 온도 범위(850~1050℃) 이내에 있어야 한다.

c) 연소로 아래 부분에는 stainless steel screen과 glass wool을 삽입한 다음 연소관을 준비한다.

d) 적정량의 시료를 시료용기(tin foil 또는 boat)에 취한다.

e) 무게를 달 때는 무게변화를 방지하기 위해 가급적 1분 이내에 완료한다.

- f) 시료를 취한 시료 용기를 시료 주입장치를 이용하여 기기 분석을 한다.
- g) 표준시약을 이용하여 표준곡선을 구한 다음 시료의 농도를 구한다.
- h) 질소 함량에 단백질 환산계수를 곱하여 조단백질 함량을 구한다.

4.2.3. 조섬유(Crude fiber)

(1) 기구

- a) 정온건조기
- b) 전기로(Muffle furnace)
- c) 톨비이커(tall besker, 200mL 눈금)
- d) 유리여과기(1G2)
- e) 스텐레스금망(0.044mm)
- f) 세척병
- g) 여과대
- h) 진공펌프 또는 수류펌프
- i) 조섬유 자비기
- j) 데시케이터

(2) 시약의 제조

- a) 5% 황산액(H_2SO_4 , w/v) : 농황산(비중1.84) 27.2mL를 증류수에 희석하여 1,000mL로 한다.
- b) 5% 수산화나트륨액($NaOH$, w/v) : 수산화나트륨 50g을 증류수에 용해하여 1,000mL로 한다.

(3) 정량법

- a) 시료 1~2g(지방함량이 많은 것은 탈지하거나 조지방을 정량한 후 남은 찌꺼기 시료 잔사를 사용)을 500mL 톨비이커에 취하고 5% 황산액 50mL와 증류수 150mL를 가하고 거품방지제 2~3방울 떨어뜨린 다음 30분간 끓인 후 스텐레스 금망(0.044mm)으로 여과하여 잔사()를 산성이 완전히 없어질 때까지 뜨거운 증류수로 여러번 세척한다.
- b) 산 불용해물은 증류수 130~140mL로 톨비이커에 씻어 넣고 5% 수산화나트륨용액 50mL를 가한 다음 200mL 표선까지 증류수로 채운다.
- c) 다시 30분간 끓이고 No.5A 여과지 또는 유리여과기 1G2(135℃에서 2시간 건조하여 항량을 구한 것)로 여과하는데 알칼리성이 없어질 때까지 뜨거운 증류수로 세척한 다음 다시 95% 에틸알콜로 3회, 에틸에테르로 2회 세척하고 95~100℃에서 2시간 예비 건조한 다음 135±2℃에서 2시간 건조 후 데시케이터내에서 30분간 방냉한 다음 칭량후 5A여과지에 사용시에는 자제크루시블(600℃ 전기로에서 2시간 태워 항량을 구한 것)에 넣고, 유리여과기의 경우 직접 전기로에 넣어 600℃에서 2시간 회화하고 40분간 데시케이터내에서 방냉한 후 무게를 측정한다.

(4) 계 산

$$\text{조섬유}(\%) = \frac{d - a}{s} \times 100$$

d : 분해후 여과한 잔사의 건조중량(g)

a : 잔사를 회화한후 남은 회분량(g)

s : 공시료의 중량(g)

4.2.4. 조지방(Crude fat, ether extract)

4.2.4.1. 에테르 추출법(Ether extract)

(1) 기구 및 시약

- a) 지방 추출장치(soxhlet extractor)
- b) 건조기
- c) 데시케이터
- d) 여과지(No. 2)
- e) 에틸 에테르

(2) 추출

지방 정량병을 95~100℃에서 2시간정도 건조하고 데시케이터 내에서 30분간 방냉 후 칭량()하고 시료 2~3g을 여과지(No.2)에 싸서 95~100℃에서 2시간 건조시킨 다음 지방추출장치에 넣고 에테르를 부어 80℃로 가열하여 8시간 지방을 추출한 다음 에테르를 회수하고 지방 정량병을 95~100℃에서 3시간 건조 후 데시케이터 내에서 40분간 방냉 후 칭량하여 지방 정량병의 중량을 감()한 것을 시료량에 대한 백분율을 구하여 조지방 함량으로 한다.

(3) 계 산

$$\text{조지방(\%)} = \frac{\text{추출후 지방 정량병중량} - \text{추출전 지방 정량병중량}}{\text{시 료 중 량}} \times 100$$

4.2.4.2. 산분해 에테르추출법 <팽화사료(extrusion) 및 보호지방의 정량>

(1) 기구 및 시약

- a) 비이커
- b) 수조
- c) 분액깔대기
- d) 데시케이터
- e) 지방추출장치(soxhlet extractor)
- f) 에틸알콜
- g) 에틸에테르
- h) 염산

(2) 추출

분석시료 2g을 300mL 비이커에 정확히 취하고 에틸알콜 2mL가하여 혼합하고 염산용액(4+1) 20mL를 넣고 시계접시를 덮어 70~80℃ 수욕상(water bath)에서 60분간 가끔 흔들어주면서 가온한다. 방냉 후 내용물을 250mL 분액깔대기에 옮기고 비이커에 에틸알콜 10mL, 에틸에테르 25mL순으로 씻어 분액깔대기에 넣고 다시 에틸에테르 75mL를 가하여 3분간 진탕한다. 정치 후 하층(수층)의 액을 다른 분액깔대기에 옮기고 상층의 에테르층은 탈지면으로 여과하여 지방병에 받고 에테르를 회수한다. 이와 같이 에테르 추출은 3회 이상 반복하여 지방을 모은 후 지방병을 95~100℃에서 3시간 동안 건조하고 데시케이터 내에서 40분간 방냉 후 칭량()하여 지방병의 중량을 감한 것을 시료량에 대한 백분율을 구하여 조지방 함량으로 한다.

4.2.4.3. 황혈염 추출법 <유지방(乳脂肪)정량법>

(1) 기구 및 시약

삼각 플라스크, 수조, 유발, 그 외 에테르 추출법과 동일, 해사(sea sand), 염산용액(2+1), 황혈염용액(황혈

염(Potassium ferrocyanide) 15g을 증류수에 녹여 1,000mL로 한다), 초산아연 용액(초산 아연(Zinc acetate) 320g 증류수에 녹여 1,000mL로 한다)

(2) 추출

시료 5g을 200mL 삼각플라스크에 취하고 증류수 50mL를 가한 후 중탕으로 용해 후 염산용액(2:1) 1mL를 가하고 15분간 서서히 끓인다. 냉각 후 황혈염 용액 5mL, 초산아연용액 5mL를 넣어 잘 혼합하고 침전물을 Whatman No 2 여과지로 여과 후 증류수로 2~3회 씻어주고 여과지의 침전물에 해사 5g을 가하여 잘 혼합시켜 98~100℃에서 건조시키고 유발에 옮겨 균등히 갈아서 분말로 하여 내용물을 원통여과지에 옮기고 유발에 부착된 분말은 에테르로 축여서 탈지면으로 닦아 원통여과지에 넣고 속시렛 장치에 연결하여 에테르추출법과 동일한 방법으로 추출한다.

4.2.5. 조회분(Crude ash)

(1) 기구

- a) 전기로
- b) 자체 크루시블
- c) 데시케이터
- d) 직시천평

(2) 정량법

600℃ 전기로에서 1~2시간 태운 크루시블을 데시케이터내에서 40분간 방냉 후 칭량한 다음 시료 2~3g을 취하여 전기로 또는 가스버너로 열을 가하여 예비 회화시킨 후 600℃ 전기로에 넣어 2시간 태운 다음 데시케이터내에서 40분간 방냉 후 칭량하여 이 중량으로부터 크루시블의 중량을 감()한 것을 조회분 함량으로 한다.

(3) 계 산

$$\text{조회분(\%)} = \frac{\text{회화 후 무게(시료+크루시블)} - \text{크루시블 무게}}{\text{시료중량(g)}} \times 100$$

4.2.6.. 염분(NaCl)

4.2.6.1. 적정법

(1) 시약의 조제

- a) 활성탄(Activated charcoal)
- b) 에틸에테르(Diethyl ether)
- c) 질산(Nitric acid)
- d) 황산철 암모늄(Ammonium ferric sulfate) 포화용액
- e) Carrez 용액 I : 증류수에 2수염의 초산아연(Zinc acetate dihydrate) 21.9g을 녹이고 여기에 빙초산(Glacial acetic acid) 3mL를 가하고 증류수로 100mL까지 희석하여 만든다.
- f) Carrez 용액 II : 황혈염(Potassium ferrocyanide) 10.6g을 증류수에 녹여 100mL로 만든다.
- g) 0.1N-치오시안산 암모늄용액(Ammonium thiocyanate) 또는 0.1N-치오시안산칼륨용액(Potassium thiocyanate) (0.1N-용액은 순수한 KSCN 약 9.7g을 증류수에 녹여 1,000mL로 만든다.)

* 표정: 이미 표정한 0.1N-질산은 용액 20mL를 삼각플라스크에 취하고 진한 질산 0.5mL와 황산철 암모늄(Ammonium ferric sulfate) 포화용액을 1mL 가한 다음 뷰렛으로부터 치오시안칼륨(KSCN) 표준용액을 적하한다. 액이 백색에서 미홍색으로 되는 점에서 적정을 끝낸다. 적정에 소요된 치오시안산칼륨용액의

mL수가 VmL 이라면 0.1N-치오시안산 칼륨용액의 $F_{SCN} = 20.0 \times F_{Ag}/V$ 이다.

h) 0.1N-질산은 용액 : 특급질산은 17.0g을 증류수에 녹여 1,000mL로 만든다.

* 표정: 특급염화칼륨을 100~120℃에서 2시간 건조하여 데시케이터에서 방냉하여 3.7g을 정확히 취하여 증류수에 녹여 500mL로 만든다. 염화칼륨의 양을 a g이라고 하면

0.1N - 염화칼륨 용액의 역가는 $F_{Cl} = a/3.728$ 이다.

삼각플라스크에 0.1N-염화칼륨 기준용액을 정확히 20mL 취하여 1% 옥살산칼륨용액 5방울을 가하고 뷰렛에서 질산은 표준용액을 적하하여 염화은의 침전을 함유한 황백색액이 오렌지색으로 되는 점을 종말점으로 한다.

적정에 소요된 표준용액을 a mL, 사용한 염화칼륨 기준액을 b mL, 그 역가를 F_{Cl} 로 하면 0.1N-질산은 표준액의 역가는 $F_{Ag} = F_{Cl} \times b/a$ (여기에서 b = 20이다.)

(2) 시료액의 조제

a) 유기물이 전혀 없는 시료

10g미만(Cl 함량이 3g미만)의 시료를 500mL 메스플라스크에 넣고 증류수(약 20℃) 400mL를 가하고 믹서(Mixer)에서 30분간 혼합한 다음 증류수로 표선까지 채우고 혼합한 다음 여과한다.

b) 유기물이 포함된 시료

시료 5g을 250mL 메스플라스크에 넣고 활성탄(Activated charcoal) 1g을 넣고 약 20℃의 증류수 200mL까지 채우고 여과한다. Carrez용액 I 5mL를 넣어 잘 혼합하고 다시 Carrez용액 II 5mL를 넣는다. 30분간 믹서에서 혼합한 다음 250mL까지 증류수로 채우고 여과한다.

(3) 방 법

a) 앞에서 얻은 용액 25~100mL(Cl 함량이 150mg이하)에 질산 (Nitric acid) 5mL와 포화 황산철암모늄 (Ammonium ferric sulfate)용액 5mL를 넣는다.

b) 여기에 과잉의 질산은을 넣는다.

c) 에테르 5mL를 넣고 침전물이 응고되도록 강하게 흔들어 준다.

d) 남아있는 질산은 용액(10mL)을 0.1N-치오시안(Thiocyanate) 용액으로 적갈색이 약 1분간 지속될 때까지 적정한다.

(4) 계 산

$$\text{염분}(\%) = W/\text{시료무게(g)} \times 1/1000 \times 100$$

$$W : 5.844 \times (V_1 \times F_{Ag} - V_2 \times F_{scn})$$

$$W : \text{염화나트륨 mg}$$

$$V_1 : 0.1N - \text{질산은 용액 mL}$$

$$V_2 : 0.1N - \text{치오시안산 암모늄 용액, 또는 } 0.1N - \text{치오시안산 칼륨용액 mL}$$

$$F_{Ag} : 0.1N - \text{질산은 용액의 역가}$$

$$F_{scn} : 0.1N - \text{치오시안산 칼륨 용액의 역가}$$

4.2.6.2. 퀀타법(Quantab chloride Titrator)

(1) 기구

a) 삼각 플라스크

b) 비이커

(2) 시 약 키타(No.1176)

(3) 시료액의 조제

시료 5g을 300mL 삼각플라스크에 취하고 뜨거운 증류수 45mL를 가하여 잘 흔들면서 염분을 용해시킨 후 비이커에 No.5A여과지로 여과하여 시료액으로 한다.

(4) 측 정

시료액에 키타(No.1176)을 담그고 가운데의 색이 녹색으로 변하면서 위로 올라가 가로줄이 완전히 변하면 반응이 끝난 것으로 보고 키타를 꺼내어 황색으로 변한 점의 눈금을 읽어 계산하는데 염분의 농도가 높으면 시료액을 희석하여 측정한다.

(5) 계 산

눈금을 읽은 수치를 표에서 찾아 그때의 함량에 희석배수를 곱한다

4.2.7. 비단백태질소화합물

4.2.7.1 증 류 법

(1) 시약의 조제 : 조단백질과 동일

(2) 시료액의 조제

시료(배합사료) 20g을 250mL 메스플라스크에 취하고 0.1N-염산용액 200mL를 가하여 30분간 진탕한 다음 0.1N-염산용액으로 표준선을 맞추고 건조 여과지로 여과한다.

(3) 방법

시료액 25mL를 증류플라스크에 취하여 메틸레드 지시약 2~3방울을 가한 다음 0.5% 가성소다 용액으로 중화(pH 5.6~5.8)시키고 우레아제(Urease) 0.1g을 가하여 마개를 막은 다음 40~50℃ 항온수조에서 1시간 작용시키고 냉각한 다음 산화마그네슘 3g과 액체 파라핀 2mL를 가하고 조단백질 정량법과 같이 증류 및 적정하고 별도로 공시험을 행한다.

(4) 계 산

조단백질 분석법에 준하여 질소(N) 함량을 구하고 계수로써 2.14를 곱하여 요소의 양을 산출한다.

$$\text{요소}(\%) = \frac{[(0.1N\text{염산적정량} - \text{공시험적정량}) \times F \times 0.140067 \times 2.14 \times 10]}{\text{시료무게}(g)}$$

F : 0.1N - 염산의 factor

10 : 희석배수

4.2.7.2 비 색 법

(1) 시약의 조제

a) 파라디메틸아미노벤즈알데히드(P-Dimethylaminobenzaldehyde)용액 : DMAB 16.0g을 에탄올 1,000mL에 용해한 다음 염산 100mL를 가한다. 약 1개월 동안 안정하며 새로운 용액을 이용할 때는 새로운 표준곡선을 작성한다.

b) 초산아연 용액 : 초산아연 22.0g을 증류수에 녹인 다음 초산 3mL를 가하고 100mL로 희석하여 만든다.

c) 황혈염(Potassium ferrioxanide)용액 : 황혈염 10.6g을 증류수에 용해하고 100mL로 희석하여 만든다.

d) 식물성 활성탄(Vegetable charcoal)

e) **인산 완충액(Phosphate buffer solution)** : 무수 제1인산칼륨 3.403g과 무수 제2인산칼륨 4.355g을 증류수 100mL에 각각 용해한 다음 각 용액을 서로 혼합하고 1,000mL로 희석하여 만든다(pH 7.0).

f) **요소표준액**

- 저장액 - 5mg/mL : 요소 5.000±0.001g을 증류수에 녹이고 1,000mL 희석하여 만든다.
- 검정액 - 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1.0, 1.2, 1.4, 1.6, 1.8 및 2.0mg의 요소가 5mL에 함유 되도록 다음과 같이 준비한다. 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18 및 20mL의 저장액을 250mL의 메스플라스크에 넣고 인산완충액으로 표선까지 희석하여 만든다.
- 표준액 : 1.0mg요소/5mL를 함유하는 용액을 표준으로 사용 24℃이하에서 저장해야 하며 1주일간 안정한다.

(2) **표준곡선 작성**

- a) 검정액 5mL를 25mL의 시험관에 넣고 각각 DMAB액 5mL를 넣는다.
- b) 여기에 완충액 5mL와 DMAB액 5mL를 넣은 공시험액을 만든다.
- c) 25℃에서 10분간 방치한 다음 파장 420nm에서 요소농도에 따른 흡광도를 측정한다. 요소농도에 따라서 흡광도는 직선이 얻어져야 하며 그렇지 않은 경우는 새로운 DMAB액을 이용하며 되풀이한다.

(3) **방법**

- a) 500mL 메스플라스크에 분쇄한 시료 0.1g과 활성탄 1g, 증류수 250mL, 초산아연용액 5mL 및 황혈용액 5mL를 넣는다.
- b) 30분간 흔든 다음 증류수로 표선까지 채우고 침전이 생길 때까지 정치한다.
- c) Whatman No. 40 여과하고 여액 5mL에 DMAB 5mL를 넣어 잘 흔든다.
- d) 25℃에서 10분간 방치한 다음 420nm에서 흡광도를 읽는다.

(4) **계 산**

$$\text{요소(\%)} = (1.0 \times \text{시료의 흡광도} \times 100) / \text{표준액의 흡광도} \times \text{시료의 무게(mg)} \times 100$$

$$\text{※ } 1.0 = \text{표준액 중 요소 mg수}$$

$$100(\text{분자}) = \text{희석배수}$$

5. **표 시**

다음 사항을 사료의 포장에 표시하여야 한다. 판매용이 아닌 경우 혹은 포장하지 않고 사용하는 경우에는 다 음사항을 표시한 문서를 사용자 및 이해 관계자에게 제공하여야 한다.

5.1 **표시 사항**

- (1) 사료의 명칭
- (2) 사료의 형태
- (3) 사료의 성분 및 함량
- (4) 사용한 원료의 명칭 및 비율
- (5) 주의사항
- (6) 권장사항
- (7) 실중량 kg
- (8) 제조년월일
- (9) 상호(공장명칭), 공장소재지 및 전화번호

5.2 표시 방법

- (1) 사료의 명칭은 음식물쓰레기를 이용한 동물용 건식 사료로 표시한다.
- (2) 사료의 형태는 사료 내용물의 처리된 형태를 표시한다.
- (3) 주의사항은 해당사료의 사용 시 주의사항을 표시한다. 또한 다음내용을 부가한다.
 - a) “본 사료는 음식물 쓰레기를 이용한 동물사료로서 소 등 반추동물에 대해서는 급여해서는 안됩니다. ”
 - b) “본 사료 단독으로 가축 급여 시 영양소의 부족이 예상되므로 급여대상별 필요영양소의 보충을 위한 사료배합이 필요합니다”
- (4) 실중량은 제품의 실중량을 정확하게 표시하여야 하며 포대에는 “kg”, 비포장 대량 수송시에는 “톤”으로 표시한다.
- (5) 제조년월일은 제조 포장된 일자를 기준하여 정확하게 표시한다.

제 정 자 : 기술표준원장

제 정 : 2001년 12월 24일

개 정 : 2012년 04월 03일

관련근거 : 기술표준원 고시 제2009-125호(2009. 04. 01.)

담당부서 : 기술표준원 기술표준정책국 신기술지원과

이 표준에 대한 의견 또는 질문은 기술표준원 신기술지원과(Tel. 02-509-7287)로 연락하여 주십시오.

경기도 과천시 중앙동 2번지