

색소첨가 NIR을 이용한 우유 체세포수 측정법 개발

김기성* · 노해원 · 임상동 · 최창현¹ · 김용주¹

한국식품연구원, ¹성균관대학교 바이오메카트로닉스학과

Development of Rapid Somatic Cell Counting Method by Using Dye Adding NIR Spectroscopy

Kee-Sung Kim*, Hae-Won Noh, Sang-Dong Lim, Chang-Hyun Choi¹, and Yong-Joo Kim¹

Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746, Korea

¹Biomechatronics Engineering Sungkyungwan University, Suwon 440-746, Korea

ABSTRACT

To develop the somatic cell counting NIR Spectrum method within a range of 400-2500 nm, eosin-Y, methyl red, methylene blue, resazurin and amido black 10B were tested at 0.01% in raw milk. The PLS (Partial Least Square) results are summarized as follows: Correlation coefficients of the calibration model measurements by NIR spectroscopy in raw milk for eosin-Y, methyl red, methylene blue, resazurin and amido black 10B were 0.78, 0.65, 0.63, 0.65, 0.98 and 0.99, respectively. The correlation coefficients of the prediction model measurements by NIR spectroscopy in raw milk for eosin-Y, methyl red, methylene blue, resazurin and amido black 10B were 0.49, 0.21, 0.36, 0.47, 0.95 and 0.98 respectively. Based on these results, amido black 10B was the best additive for the NIRS somatic cell count method.

Key words : somatic cell count, NIR spectroscopy, raw milk, dye addition

서 론

현재 국내 원유대의 산정은 원유 지방함량 및 세균수와 체세포수에 따라 차등 유대가 결정되고 있으며, 체세포수는 일반적으로 우유의 위생적 품질을 평가할 때 사용되고 있다(An *et al.*, 2004). Somore 등(2003)은 정상적인 원유에서는 그 수준이 낮지만 체세포수의 증가는 세균 감염에 의한 유질 감소로 이어져 체세포수는 도태의 주요한 요인이 된다고 보고하였고, 원유 체세포수와 유방염과의 상관도가 높다는 연구가 보고되고 있어(Lund *et al.*, 1999), 원유 체세포수의 관리는 유방염에 대한 중요한 지표라 할 수 있다(Heringstah *et al.*, 2003).

원유의 체세포 검사는 직접현미경법(Christensen, 1981; Dohoo and Meek, 1982)과 Fossmatic법(Herald *et al.*, 1977; Poutre and Lerondellel, 1982)을 주로 이용하고 있으나, 직접현미경법은 많은 시간과 노력이 들어 다수의 샘플

플을 처리하기에 부적합하며(Kim *et al.*, 2006), Fossmatic법은 고가의 체세포 측정기기를 이용하여 체세포수 검사의 표준으로 이용(Tsenkova *et al.*, 2001)되고 있으나, 경제적인 면에서 매우 제한적이다(Kim *et al.*, 2006). 반면, 근적외선 분광광도계를 이용한 분석은 간편신속하고 비용이 저렴하며(Chun and Cho, 2007), 액체시료의 경우 고체시료의 측정시보다 재현성이 우수하고 기기가 매우 안정적이며(Jung *et al.*, 2000), 시료를 전처리 없이 동시에 여러 분석 항목을 신속하게 측정 할 수 있는 장점을 가지고 있다(Noh *et al.*, 2004).

근적외선 분광광도계를 이용 측정된 원유 실험에서 Tsenkova 등(1992)은 낮은 파장 영역에서 원유의 유방염발견이 성공적으로 이루어 진다고 보고 하였으며, Purnomoadi 등(1999)은 원유 지방과 단백질 측정 결과 1,100-2,500 nm 영역에서 Milkoscan(Foss, Denmark)결과와의 상관도가 각 0.97, 0.94로 매우 정확한 결과를 보였으며, Pravdova 등(2001)은 NIRS을 이용한 원유 체세포수 측정의 기초 연구에서 400-1,100 nm 영역에서 측정 후 PLS (partial least squares), Robust PLS와 UVE-PLS(uninformative variable elimination-partial least squares) 등의 회

*Corresponding author : Kee-Sung Kim. Korea Food Research Institute, Seongnam 463-746. Korea. Tel: 82-31-780-9081, Fax: 82-31-780-9160, E-mail: keeskim@kfri.re.kr

귀분석법으로 상관도를 비교하여 각 0.79, 0.85와 0.87 값을 나타낸다고 보고하였으며, Tsenkova 등(2001)은 원유 체세포 검사에 대한 새로운 진단 기법 연구에서 NIRS의 1,100-2,500 nm 영역에서 측정시 표준법과의 검증상관도가 0.85, 검증오차가 0.38의 결과를 나타낸다고 보고하였다. 또한, 원유의 체세포수 측정을 위해서 Brennan 등(2003)은 유제품의 처리 과정 중 NIRS를 이용한 온라인 처리 검사법 연구를 보고한 바 있다.

본 연구에서는 근적외선 분광광도계를 이용한 우유 체세포수 측정의 정확도를 높이기 위해 eosin-Y, methyl red, methylen blue, resazurin 및 amido black 10B 등의 5가지 색소를 첨가한 원유의 근적외선 스펙트럼을 측정하여 원유 체세포수 측정을 위한 최적조건을 설정하는데 목적이 있다.

재료 및 방법

원유 시료

체세포수 검사용 원유 시료는 2006년 12월-2007년 2월 중 경기지방에서 집유된 원유를 사용했으며, 체세포수 등급별 시료를 균등하게 분포하도록 수집하였다. 시료의 미생물의 번식을 억제하기 위한 보존제(Broad Spectrum Micro tabs II, D&F Co.)를 원유 40 mL당 1정을 첨가 하였다 (Choi *et al.*, 2006).

색소처리

보존제 처리된 원유 시료는 40°C로 유지한 후(Tsenkova *et al.*, 2001) eosin-Y($C_{20}H_6Br_4Na_2O_5$, Junsei Co.), methyl red($C_{15}H_{15}N_3O_2$, Sigma Co.), methylen blue($C_6H_{18}N_3ClS \cdot 4H_2O$, Syakuri Co.), resazurin($C_{12}H_6NO_4Na$, Sigma Co.) 및 amido black 10B($C_{22}H_{14}N_6Na_2O_9$, Hayashi Co.) 등의 5가지 색소를 The Merck Index(1983)에 따라 0.1% 용액을 제조하여 원유에 0.01% 각각 첨가하였다.

성분분석 및 체세포수 검사

서울우유에서 사용중인 체세포수 검사장비인 Combifoss

(Foss, FT-6000, Denmark)를 이용하여 단백질, 지방, 유당 함량 정량 및 체세포수를 측정하였다.

근적외선 스펙트럼 측정

보존제 처리한 원유는 5°C 이하로 운반 1일 이내에 스펙트럼 측정을 완료했다. Fig. 1과 같이 원유 시료에 사용되는 색소를 원유에 첨가하여 5분간 반응 후(Kim *et al.*, 2006) 가시광선/근적외선 영역의 고성능 분광광도계(NIRS 6500, Foss, USA)를 이용하여 400-2,500 nm 영역에서 2 nm 간격으로 반사 스펙트럼을 측정하였다.

데이터 분석

각각의 첨가색소에 대한 예측 모델을 개발한 전처리 과정으로 스펙트럼과 분할간격 및 평활화 간격을 변화시킨 미분 스펙트럼을 사용하였고, 부분최소자승(partial least square, PLS)를 이용하여 분석하였다. 분석에 사용된 전처리 및 분석은 Unscrambler(Camo, Norway)를 이용하였다. 또한, 시료의 예측 값을 줄이기 위하여 체세포수에 상용 로그(Log)를 취한 것을 예측 값으로 하여 모델을 개발하였다(Kim *et al.*, 2006).

결과 및 고찰

원유 조성 및 체세포수 등급별 분포도

본 실험에서 수집된 198개의 원유시료 중 100개의 원유 시료는 고정모델 개발에 사용되었고, 98개의 원유시료는 검증모델 개발에 사용되었으며, 그 조성 및 체세포수의 평균, 최소, 최대, 표준편차 값은 Table 1과 같다. 교정부 모델과 검증부 모델에 사용된 시료 성분의 평균값은 유사한 범위를 보이고 있다.

198개의 원유시료의 체세포수 분포도는 Table 2와 같다. 1-3등급에서 25% 전후의 시료를 분포 시켰고, 4등급은 15.2%, 5등급은 7.6%의 적은수의 시료를 분포시켜 국내 원유 체세포수 분포도와 유사한 경향을 보이도록 하였다.

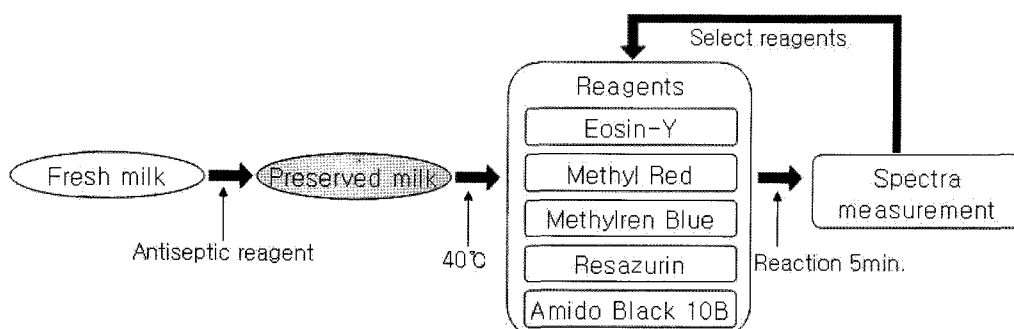


Fig. 1. Experiment condition for somatic cell count with reagents in NIR Spectroscopy.

Table 1. Range mean and standard deviation (SD) of fat, protein, lactose and somatic cell count (SCC) of examined milk samples measured by reference method

Parameter and set of sample	Number of sample	Mean	SD	Min	Max
Fat %					
Calibration set	100	4.31	0.69	2.48	6.09
Prediction set	98	4.21	0.82	2.17	8.09
Protein %					
Calibration set	100	3.39	0.34	2.65	4.49
Prediction set	98	3.39	0.27	1.76	4.17
Lactose %					
Calibration set	100	4.74	0.21	4.17	5.20
Prediction set	98	4.73	0.21	3.65	5.11
SCC(Log)					
Calibration set	100	5.59	2.59	4.18	6.52
Prediction set	98	5.56	2.40	4.26	6.13

*Fat, protein, lactose and SCC was determined by Combi Foss FT-6000 (Denmark).

첨가색소에 따른 영역별 스펙트럼의 차이

가시광선(근적외선 영역의 스펙트럼은 Fig. 2와 같이 400-600 nm의 가시광선 영역과 1,400-1,600 nm, 1,900-2,100 nm의 근적외선 영역에서 차이를 보이며, 특히 400-900 nm 가시광선 영역에서의 흡광도의 차이가 크데, raw milk와

methyl red첨가원유는 그 값이 가장 낮았고 eosin-Y, amido black 10B, resazurin을 첨가된 원유 순으로 흡광도가 높아지며, methylen blue가 첨가된 원유의 흡광도가 가장 높게 나타났다.

검량식의 작성

측정된 198개의 스펙트럼 중 50%를 검량식 작성에 사용하였으며, 나머지 50%의 데이터를 이용하여 검량식의 예측 모델을 검증하였다. 교정부 모델은 오버슈트되는 것을 방지하기 위해 교차검증(cross validation)을 수행하여 개발하였다. 또한 factor에 변화에 따른 교정부 오차(SEC, standard error of calibration)의 변화를 관찰하여 최소 개수의 factor를 선정하는 방법으로 상관도(R²)를 계산하였다.

근적외선 분광광도계를 이용하여 원유 및 색소첨가된 원유의 스펙트럼 측정하여 표준법과의 검량식을 작성한 교정부 모델 결과는 Table 3과 같다. 각 처리영역별 높은 상관도는 400-600 nm 영역의 원유(raw milk)에서 상관도가(R²) 0.78, 교정부 오차(SEC)가 0.27로 나타났고, eosin-Y는 400-600 nm 영역에서 상관도가 0.65, 오차가 0.41로 나타났으며, methyl red는 400-2,100 nm 영역에서 상관도가 0.63, 오차가 0.31이며, methylene blue는 400-2,100 nm 영역에서 상관도가 0.65, 오차가 0.30이로 raw milk보다도 낮은 상관도를 나타내고 있다. Resazurin은 400- 2,100 nm

Table 2. Distribution of raw milk samples at different somatic cell grade

Quality Grade	Range of SCC	Number of sample	Propotion (%)	Average SCC	Average SCC (Log)
1 Grade	<200,000	54	27.3	98,491	4.99
2 Grade	<350,000	49	24.7	274,204	5.44
3 Grade	<500,000	50	25.3	412,980	5.62
4 Grade	≤ 750,000	30	15.2	591,767	5.77
5 Grade	>750,000	15	7.6	1,133,063	6.05
Total		198	100.0	376,879	5.58

*SCC=Somatic Cell Count

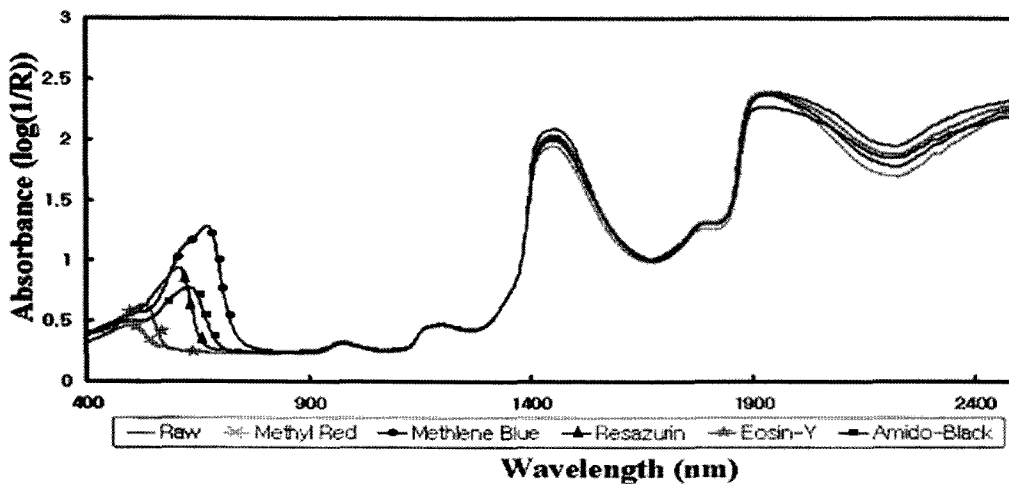


Fig. 2. Reflectance spectra of visible/near-infrared spectrum of milk with different reagents.

Table 3. Correlation coefficient of calibration of NIR spectrum with standard method in raw milk by adding different reagents

Milk Sample	Wavelength (nm)	Calibration			
		F	N	R ²	SEC(Log)
Raw milk	400-2100	4	100	0.55	0.36
	400-600	8		0.78	0.27
	1400-1600	1		0.10	0.43
	1900-2100	1		0.11	0.43
Eosin-Y added	400-2100	1	100	0.58	0.33
	400-600	4		0.65	0.41
	1400-1600	1		0.28	0.39
	1900-2100	1		0.51	0.35
Methyl red added	400-2100	2	100	0.63	0.31
	400-600	1		0.44	0.36
	1400-1600	2		0.51	0.34
	1900-2100	1		0.54	0.33
Methylene blue added	400-2100	2	100	0.65	0.30
	400-600	1		0.45	0.35
	1400-1600	2		0.47	0.35
	1900-2100	1		0.52	0.31
Resazurin added	400-2100	7	100	0.98	0.08
	400-600	8		0.92	0.17
	1400-1600	4		0.85	0.21
	1900-2100	7		0.95	0.13
Amido black 10B added	400-2100	9	100	0.99	0.04
	400-600	4		0.87	0.19
	1400-1600	9		0.91	0.16
	1900-2100	7		0.94	0.13

*F=Factor, N=Number, R²= Coefficiency of multiple correlation. SEC=Standard error of calibration.

영역에서 상관도가 0.98, 오차가 0.08로 높은 상관도를 보여주고 있고, amido black 10B 첨가시 400-2,100 nm 영역에서 상관도가 0.99, 오차가 0.04로 가장 높은 상관도를 보여주고 있다.

검량식의 검증

작성된 검량식의 정확도를 확인하기 위하여 50%의 검증용 시료를 이용하여 검증부 모델을 작성 검증한 결과는 Table 4과 같다. 각 처리 영역별로 상관도가 높은 결과를 비교해 보면 원유(raw milk)는 400-600 nm의 영역에서의 상관도(R²)가 0.49, 검증부 오차(SEP)가 0.42이며(Fig. 3), eosin-Y는 400-600 nm 영역에서 상관도는 0.21 오차가 0.45로 나타났고(Fig. 4), methyl red는 400-2,100 nm 영역에서 상관도가 0.36, 오차는 0.39로(Fig. 5) 시약을 첨가하지 않은 원유의 검증 결과 보다 매우 낮은 상관도를 나타냈다. methylen blue는 400-2,100 nm 영역에서 상관도가 0.47, 오차가 0.37로 다소 낮은 상관도를 나타냈고(Fig. 6), 반면, resazurin은 400-2,100 nm 영역에서 상관도가 0.95,

Table 4. Correlation coefficient of prediction of NIR spectrum with standard method in raw milk by adding different reagents

Milk Sample	Wavelength (nm)	Prediction		
		N	R ²	SEP(Log)
Raw milk	400-2100	98	0.23	0.45
	400-600		0.49	0.42
	1400-1600		0.10	0.44
	1900-2100		0.15	0.43
Eosin-Y added	400-2100	98	0.13	0.47
	400-600		0.21	0.45
	1400-1600		0.10	0.45
	1900-2100		0.03	0.45
Methyl red added	400-2100	98	0.36	0.39
	400-600		0.24	0.40
	1400-1600		0.27	0.40
	1900-2100		0.21	0.42
Methylene blue added	400-2100	98	0.47	0.37
	400-600		0.36	0.39
	1400-1600		0.34	0.40
	1900-2100		0.34	0.40
Resazurin added	400-2100	98	0.95	0.13
	400-600		0.86	0.21
	1400-1600		0.83	0.23
	1900-2100		0.91	0.17
Amido black 10B added	400-2100	98	0.98	0.09
	400-600		0.85	0.21
	1400-1600		0.89	0.18
	1900-2100		0.86	0.21

*N=Number, R²=Coefficiency of multiple correlation. SEC=Standard error of calibration.

오차가 0.13으로 좋은 상관도를 나타내고 있으며(Fig. 7), amido black 10B를 첨가하여 모델 검증 결과 전체영역에서 상관도는 0.98, 오차는 0.09로 가장 높은 상관도를 보여 매우 좋은 검증력을 보여주고 있다(Fig. 8). Tsenkova 등(2001)은 1,100-2,500 nm 영역에서 raw milk의 체세포수를 측정하는 결과 교정부 모델에서의 상관도(R²)가 0.87, 교정부 오차(SEC)가 0.36이며, 검증부 모델에서의 검증결과 상관도(R²)가 0.85, 검증부 오차(SEP)가 0.38로 나타나 본 실험보다 우수한 결과를 나타냈다. 이는 Tsenkova 등(2001)의 실험에서 이용된 원유샘플의 SCC (Log)의 교정부 모델에서 사용된 표준편차는 0.69, 검증부 모델에서 사용된 표준편차는 0.77로 Table 1의 값과 비교해 본 실험에서 사용된 샘플보다 우수한 반복성을 보이는 샘플을 사용해 상관도가 높게 나온다고 판단된다. 본 실험에서는 근적외선 분광광도계를 이용하여 amido black 10B 색소를 첨가한 원유 체세포수를 Fossmatic법으로 측정하는 체세포수와 검량식 검증 결과 상관도(R²)가 0.98이며, 검증부 오차(SEP)가 0.09로 매우 좋은 결과를 나타내 효과적인 체

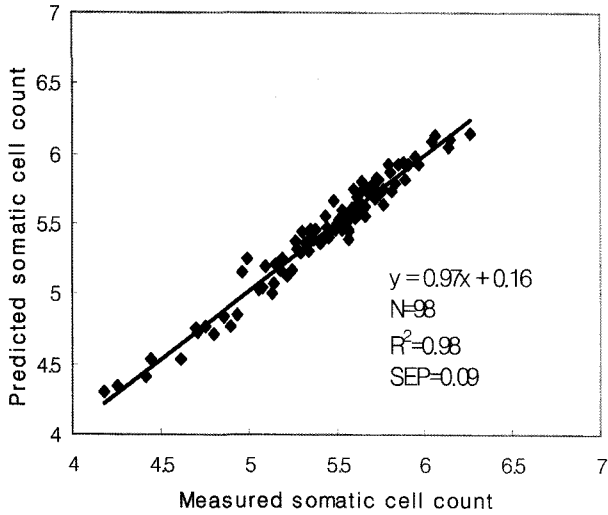


Fig. 3. Prediction of SCC of raw milk with amido black 10B at 400-2100 nm.

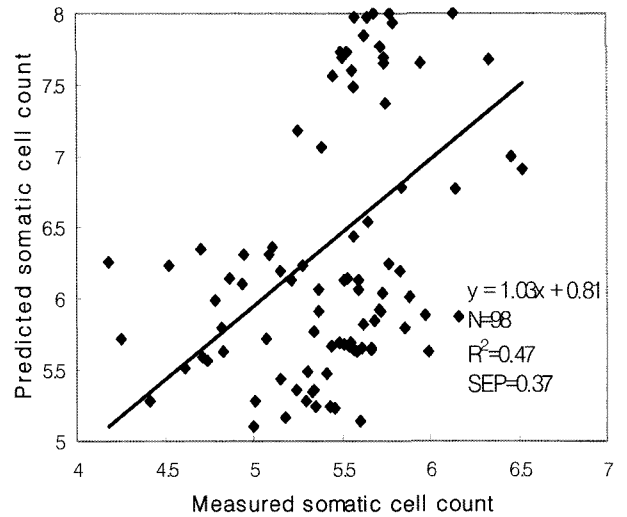


Fig. 4. Prediction of SCC of raw milk with methylen blue at 400-2100 nm.

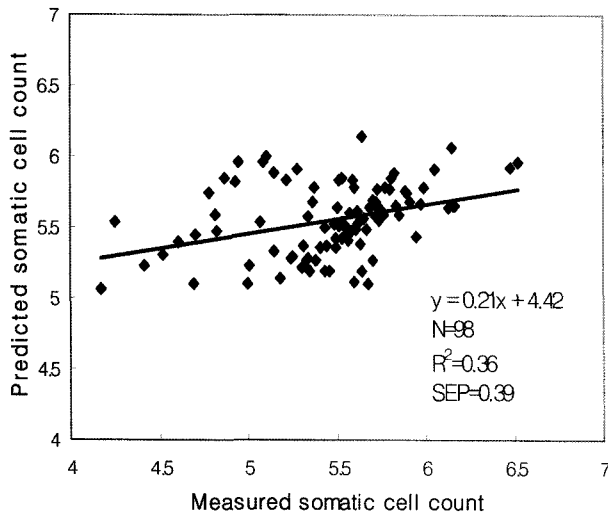


Fig. 5. Prediction of SCC of raw milk with methyl red at 400-2100 nm.

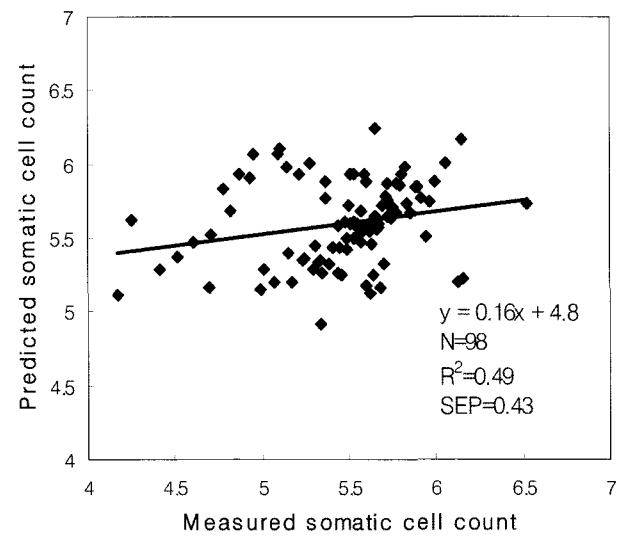


Fig. 6. Prediction of SCC by raw milk at 400-600 nm.

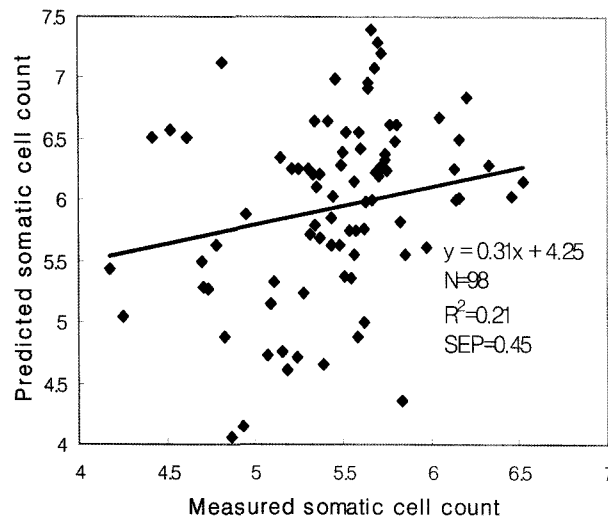


Fig. 7. Prediction of SCC of raw milk with eosin-Y at 400-600 nm.

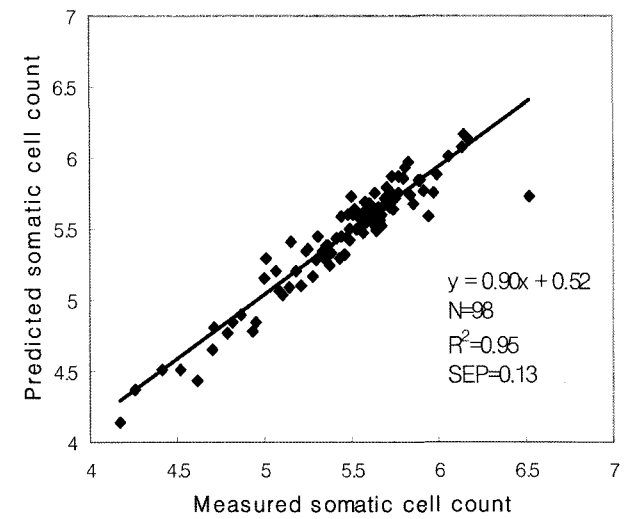


Fig. 8. Prediction of SCC of raw milk with resazurin at 400-2100 nm.

세포수 측정을 위한 첨가 색소로 평가 되었다.

본 실험 결과를 응용하여 Amido black 10B를 우유에 첨가해 근적외선 분광광도계로 측정하면 효율적인 우유 체세포수 측정이 가능할 것으로 판단된다.

요 약

본 연구에서는 근적외선 분광광도계를 이용하여 원유의 체세포수 측정에 필요한 최적의 색소를 선정하기 위하여 eosin-Y, methyl red, methylen blue, resazurin 및 amido black 10B 등의 5가지 색소를 0.01% 첨가 후 근적외선 분광광도계를 이용하여 400-2,500 nm 영역에서 측정하였으며, PLS(partial least squar)분석 결과는 다음과 같다. 교정부 모델에서의 상관도는 raw milk 0.78, eosin-Y 0.65, methyl red 0.63, methylen blue 0.65, resazurin 0.98 그리고 amido black 10B는 0.99 였다. 또한, 검증부 모델에서의 상관도는 raw milk 0.49, eosin-Y 0.21, methyl red 0.36, methylen blue 0.47, resazurin 0.95 그리고 amido black 10B는 0.98 였다. 위 결과를 종합해 보면, amido black 10B를 첨가한 경우 검증부 모델의 상관도는 0.98, 검증부 오차(SEP)는 0.09로 가장 우수한 결과를 보였다.

참고문헌

- Ahn, B. S., Kie, K. S., Suh., K. H., Yeo, M. J., Lee, J. M., Jeon, S. B., Park, S. B., and Kim, H. S. (2004) The effect on somatic cell score and milk components by days in holstein dairy cows. *Korean J. Anim. Sci. Technol.* **46**, 925-936.
- Brennan. D., Alderman J., Sattler. L., O'Connor. B., and O'Mathuna. C. (2003) Issues in development of NIR micro spectrometer system for on-line process monitoring of milk product. *Measurement* **33**, 67-74.
- Choi C. H., Kim Y J., Kim J. M., and Kim K. S. (2006) Prediction of somatic cell count in raw milk by reflectance spectra. *Proceed. Japan-Korea Joint Symp. on Near Infrared Spectroscopy*, pp. 250-251.
- Choi C. H., Kim Y. J., Kim J. H., Nam. E. H., and Kim K. S. (2006) Development of measuring technique for somatic cell count in raw milk by near infrared spectroscopy. *Proceed. Korean Biosystems Eng. Conf., Suwon, Korea*, **11**, 361-365.
- Christensen, D. A. (1981) Foss electric information, applied cell counting for optimum dairy production. *Hillared Botrykeri*. **1**, 48.
- Chun, J. U. and Cho, K. C (2007) Discrimination of Korean and Japanese green tea products using NIR spectroscopy. *J. Kor. Tea Soc.* **13**, 93-104.
- Dohhoo, I. R. and Meek, A. H. (1982) Somatic cell counts in bovine milk. *J. Can. Vat.* **23**, 119-125.
- Herald, C. W., Jones, G. M., Nickerson, S. C., Patterson, W. N., and Vinson, N. E. (1977) Preliminary evaluation of the fossomatic cell counter for analysis of individual cow samples in a centraltesting laboratory. *J. Food. Prot.* **40**, 5223-5226.
- Heringstad, B., Chang, Y. M., Gialnola, D., and Klemetsdal, G. (2003) Genetic analysis of longitudinal trajectory of clinical mastitis in first-lactation Norwegian cattle. *J. Dairy Sci.* **76**, 2676.
- Jung, H. I. and Kim, H. J. (2000) Near-infrared spectroscopy: Principles. *Anal. Sci. Technol.* **13**, 1-14.
- Lund, M. S., Jensen, J., and Pertersen, P. H. (1999) Estimation of genetic and phenotypic parameters for clinical mastitis, somatic cell production deviance, and protein yield in dairy cattle using Gibbs sampling. *J. Dairy Sci.* **82**, 1045.
- Noh M. J., Jeong J. I., Min S. S., Park Y. S., and Kim S. J. (2004) A study on the determination of adulteration of sea-same oil by near infrared spectroscopy. *Korean J. Food Technol.* **36**, 527-530.
- Poutrel, B. and Lerondelle, C. (1982) Cell content of goat milk: California mastitis test, coulter counter, and fossmatic method for predicting half infection. *J. Dairy Sci.* **66**, 2575-2579.
- Pravdova. V., Walczak. B., Massart. D. L., Kawano. S., Toyoda. K., and Tsenkova. R. (2001) Calibration of somatic cell count in milk based on near-infrared spectroscopy. *Anal. Chim. Acta* **450**, 131-141.
- Purnomoadi, A., Keshab K., Batajoo, Koichiro Ueda, and Fuminori Terada. (1999) Influence of feed source on determination of fat and protein in milk by near-infrared spectroscopy. *Int. Dairy J.* **9**, 447-452.
- Samore, A. S., Schneidder, M. del P., Canvesi, F., Bangnato, A., and Groen, A. F. (2003) Relationship between somatic cell count and functional longevity assessed using survival analysis in Italian Holstein-Friesian cows. *Livest. Prod. Sci.* **80**, 211.
- Tsenkove. R., Atanassove. S., Kawano. R., and Toyoda. K. (2001) Somatic cell count determination in cow's milk by near-infrared spectroscopy: A new diagnostic tool. *J. Anim. Sci.* **79**, 2550-2557.
- Tsenkove. R., Yordanov, K. I., and Shinde, Y. (1992) Near-infrared spectroscopy for evaluating milk quality. In: *Prospects for Atomic Milking. EAAP Publ.* **65**, Pudoc, Wageningen, The Netherlands, pp. 185-192.
- Windholz, M. (1983) *The Merck Index 10th ed.*, Merck & Co., Inc.
- 김기성, 임상동, 양승용, 신미순, 최창현, 김용주, 김재민 (2006) 근적외선을 이용한 우유 체세포수 검사법 개선 연구 보고서. 한국식품연구원. pp. 8-32.

(2008. 2. 13. 접수/2008. 3. 13. 채택)