

도계육 표면 내장 잔유물 오염 검사를 위한 형광 조사 및 방출파장 선정에 관한 연구

조병관 김문성

Study on Fluorescence Excitation and Emission Bands for Detection of Fecal Residue on Poultry Carcasses

B. Cho M. S. Kim

Abstract

Fecal contaminations on poultry carcasses, not easily discernable by human eyes, are potential harbor sites of pathogenic *Escherichia Coli* (*E. coli* O157:H7). Development of sensitive detection methods for fecal contamination is essential to ensure safe production of poultry products. Fluorescence has been shown to be very sensitive in detecting fecal and other biological substances that can harbor pathogens. In this study, fluorescence excitation-emission spectra of poultry fecal matter were compared with spectra for poultry skin and meat. Results indicated that the combinations of fluorescence intensities at the wavelength of 520 nm, 579 nm, 625 nm, and 635 nm with 411 nm excitation showed above 97% accuracy for differentiation of the contaminants from poultry tissues. Excitation and emission bands determined could be used for constructing a real-time fluorescence imaging device for detection of harmful residues on poultry carcasses.

Keywords : Poultry, Fecal residue, Fluorescence, Food safety

1. 서론

현재 년 약 6억 마리를 도계하여 가공하고 있는 한국의 도계가공 산업에서 도계육의 위생검사는 시행이 거의 이루어지고 있지 않거나 매우 형식적인 수준에 머물고 있다. 도계육 가공과정 중 내장적출 단계를 거친 도계육의 표면은 유해 미생물이 다량 함유된 내장 잔유물에 오염될 가능성이 매우 높다. 자동화된 기계로 내장을 제거할 때, 적절하지 못하게 절제된 내장기관에서 잔유물이 흘러나와 계육 표면을 오염시킬 수 있다. 일단 오염된 도계의 표면은 세척과정을 거치더라도 오염물 제거가 완벽하지 않아 도계육의 변질과 유해 미생물의 유포 및 서식 근원지가 된다(Park et al., 2002). 특히 세척

과정 중 물에 희석된 오염물질은 육안으로 검출이 더욱 어렵기 때문에 전문가의 육안 검사에 검출될 확률이 매우 낮다. 오염된 계육이 내장적출 후 냉각수에 침전되면 냉각수를 오염시켜 냉각수에 입수되는 다른 계육도 오염시키는 매우 위험한 결과가 초래될 수 있다. 따라서 유기배설물에 오염된 계육은 반드시 검출되어 오염된 부분이 완전히 제거되어야 한다(FSIS, 2004).

계육 위생검사 센싱 시스템에 관한 연구로서 미국 농무성 (USDA-ARS)에서의 반사광 다분광 영상기술을 이용한 연구가 진행되고 있다(Park et al., 2002, 2005). 그러나 반사광보다 유기 배설물에 대한 민감도가 우수한 형광 영상기술은 아직 계육 위생검사를 위해 연구 또는 상용화 되어 있지 않다.

This study was financially supported by research fund of Chungnam National University in 2006. This article was submitted for publication on 2008-03-25, reviewed on 2008-04-10, and approved for publication by editorial board of KSAM on 2008-04-10. The authors are Byoung-Kwan Cho, KSAM member, Assistant Professor, Dept. of Bioindustrial Machinery Engineering, Chungnam National University, Daejeon, Korea, and Moon S. Kim, Scientist, United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Food Safety Laboratory, Beltsville, MD, USA. Corresponding author: B. Cho, Assistant Professor, Department of Bioindustrial Machinery Engineering, Chungnam National University, Daejeon, 305-764, Korea; Fax: +82-42-823-6246; E-mail: <chobk@cnu.ac.kr>.

다만 과일표면에 존재하는 소의 유기 배설물 검출을 위해 형광기술이 이용되고 있지만 이 또한 고가 장비인 초분광 형광 영상장비가 사용되고 있다(Kim et al, 2001, 2002, 2007). 현재까지 계육 상에 존재하는 유기 배설물 검출을 위해 형광 영상기술이 이용된 사례는 발견되지 않았다. 따라서 유해 박테리아를 함유할 수 있는 유기 배설물의 도계육 표면 오염 가능성을 제거하여 식중독으로부터 소비자의 생명과 양계 산업을 보호할 수 있는 기술 개발 뿐만 아니라 기존의 육안에 의존하던 계육 위생검사를 정밀도가 향상된 자동화 방법으로 대체하여 계육 가공공장의 생산성을 향상시킬 수 있는 계육 표면 검사 시스템 연구개발이 요구되고 있다.

본 연구는 계육 표면에 존재하는 유기 배설물을 자동으로 검출할 수 있는 계육 표면 오염 형광 검사시스템 개발을 위한 기초연구로서 계육 유기물에 대한 형광특성을 분석하고 검사 시스템을 위한 최적 형광 조사광 및 방출 파장대를 제시하는데 그 목적이 있다.

2. 재료 및 방법

가. 실험재료

사육한 후 7주가 지난 육계를 10시간 동안 물과 사료급여를 중지한 후 도계 하였다. 도계과정을 거친 양계로부터 소화기 내장을 획득하고 각각의 다른 내장 기관(모래주머니/위, 십이지장, 소장, 맹장, 직장)에 존재하는 내장 잔류물을 채취하였다. 또한 오염되지 않은 계육에서 외피와 살을 채취하여 실험에 사용하였다.

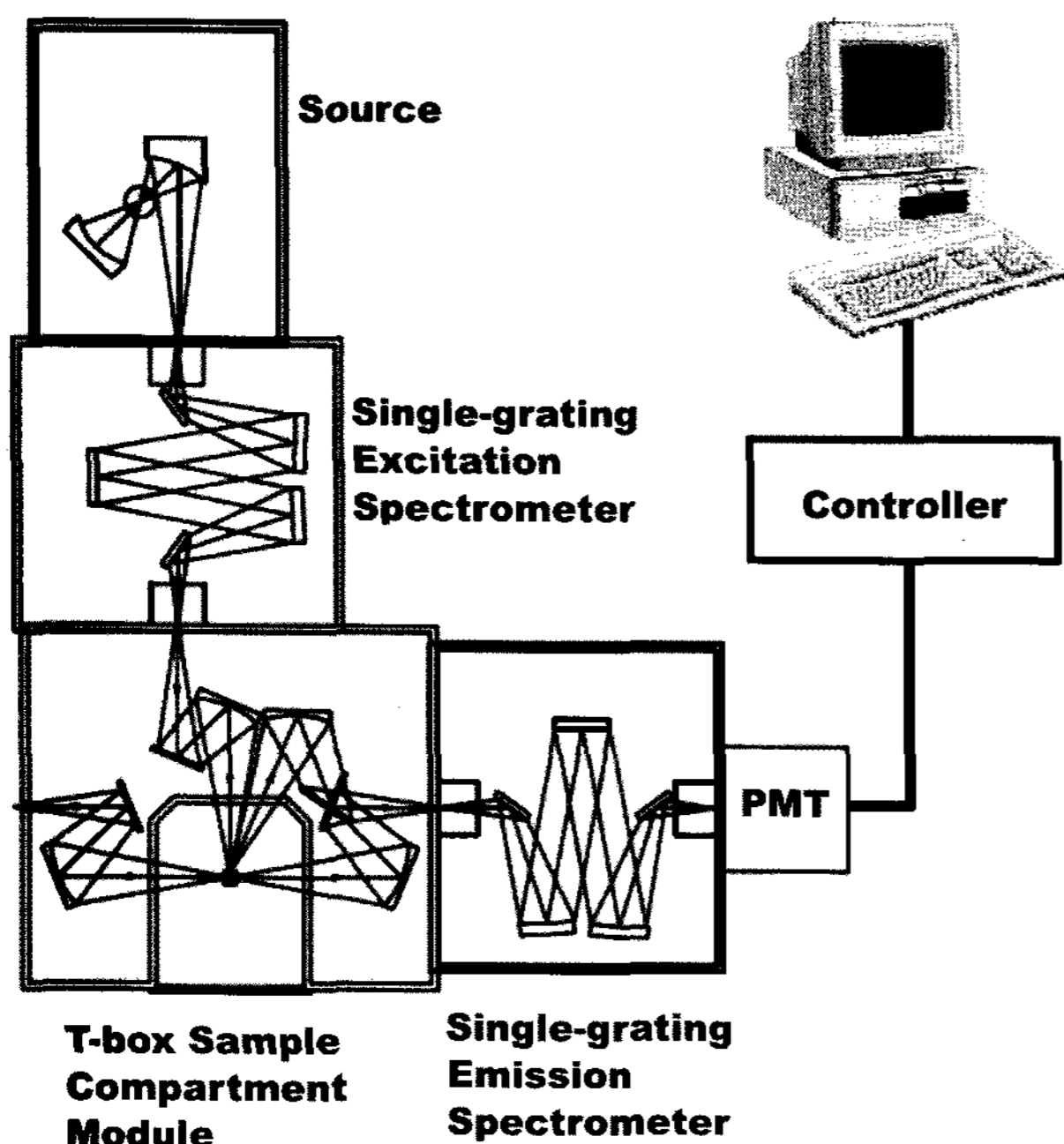


Fig. 1 The components of spectrofluorometer.

실험에 사용하였다. 시료를 큐벳에 넣어 형광광도계(Fluorolog III, Horiba Industries, Edison, N.J., USA)로 형광특성을 측정하였다(Fig. 1). 실험에 사용한 시료는 총 306개(모래주머니/위: 30개, 십이지장: 51개, 소장: 52개, 맹장: 51개, 직장: 22개, 외피: 50개, 계육: 50개)이며 이중 무작위 228개(75%)는 예측모델 개발을 위해 사용하였고 나머지 78개(25%)는 검증에 사용하였다. 시료의 개수가 부위별로 다른 것은 모래주머니/위와 직장 내의 잔류량이 경우에 따라 매우 적어 채취하지 못한 경우가 많았기 때문이다.

나. 형광스펙트럼 측정

형광광도계는 시료에 특정 파장대의 빛을 투사하면 형광물질의 고유 진동주파수에 상응하는 빛이 방출되는 원리를 이용하여 시료에 함유된 형광물질의 양을 측정하는 기기이다. 그림 2는 십이지장에서 추출된 내장 잔류물의 형광특성 그래프이다. 이 그래프에서 나타난 것과 같이 특정한 파장의 광이 물질에 조사되면 조사된 파장보다 긴 파장의 형광이 방출되게 된다. 방출되는 형광은 구성 물질에 따라 다른 파장에서 다른 광도를 가지고 방출되므로 각 조사파장에 대한 방출스펙트럼이 형성된다. 조사광을 350 nm에서 650 nm까지 5 nm 간격으로 시료에 조사를 한 후 방사되는 350 nm에서 750 nm까지의 스펙트럼을 2 nm 간격으로 측정하였다. 측정된 형광 조사 및 방출스펙트럼은 상대 형광광도값(Relative Fluorescence Intensity, RFI)과 함께 3차원 그래프로 나타낼 수 있다. 본 연구에서 측정한 형광광도값은 photomultiplier tube (PMT)로 유입되는 광자(photon)의 수를 측정한 절대 형광값이 아니라 PMT를 통해 증폭된 후 검출된 광자의 수를 측정한 상대 형광광도값이다.

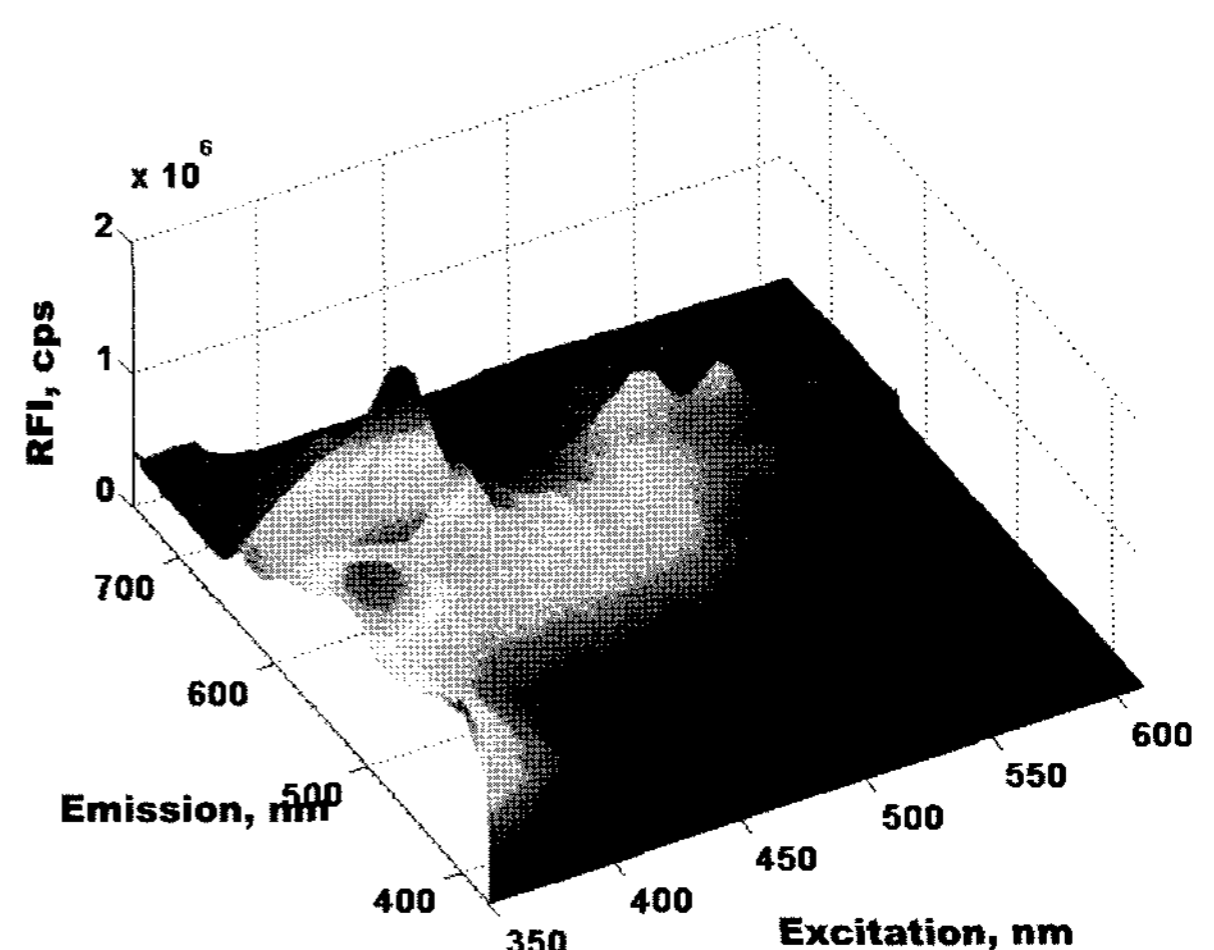


Fig. 2 Representative fluorescence excitation and emission characteristics of poultry fece from the duodunum.

다. 주성분 분석을 통한 주요 파장 선정

형광스펙트럼에서 내장 잔유물과 외피 및 계육 구분을 위한 특정 파장 선정을 위해 주성분 분석(Principal Component Analysis, PCA)을 사용하였다. 주성분 분석은 다차원 데이터에서 원래 정보를 유지하면서 저차원의 데이터로 압축시키는 다변량 데이터 처리 방법 중 하나이다. 이 방법은 데이터의 변수들이 선형결합을 통해 형성되는 새로운 주성분을 찾는 통계적 방법이며 데이터의 특징을 잘 표현하는 고유의 성분들을 취함으로 데이터의 차원을 줄이고 분석을 용이하게 할 수 있는 장점이 있다. 본 연구에서 변수로 사용되는 파장 별 주성분의 가중값(Loading Weights)은 해당 파장의 변이를 반영하게 되는데, 가중값이 클수록 그 파장에서 주성분 값의 변이가 크게 된다는 것을 알 수 있게 된다. 데이터의 특징을 잘 나타내는 주성분 중 큰 변이를 보이는 파장을 선택하여 이용하였다. 주성분 분석을 위한 계산은 Matlab 소프트웨어 (version 7.0.4, The Mathworks, Natick, MA, USA)를 이용하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 양계 소화기 내장별 유기 잔유물에 대한 형광특성

양계의 내장 잔유물 중 위/십이지장, 맹장, 직장, 외피, 그리고 계육에서 추출된 시료에 대한 조사광에 따른 방출스펙트럼을 2차원 그래프로 그림 3에 나타내었다. 십이지장에서 추출된 시료와 비슷한 결과를 보인 소장 추출 시료의 그래프는 생략하였다. 형광 방출스펙트럼에서 가장 두드러진 특징으로는 내장 별 추출물에 상관없이 411 nm의 광을 조사했을 때 635 nm 부근에서 피크가 나타나는 것을 발견할 수 있었다. 또한 700 nm 부근에서도 피크가 발생하는 것을 볼 수 있는데, 이 피크는 635 nm 대의 피크보다는 광도가 약하였다. 십이지장과 소장의 경우는 579 nm 부근에서 피크가 추가로 나타났다. 조사광이 411 nm일 때 방출스펙트럼의 635 nm 부근에서 가장 뚜렷한 피크를 나타내었지만, 411 nm보다 낮은 자외선 영역(360-410 nm)의 조사광에서도 635 nm 대의 피크가 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 635 nm와 700 nm 부근에

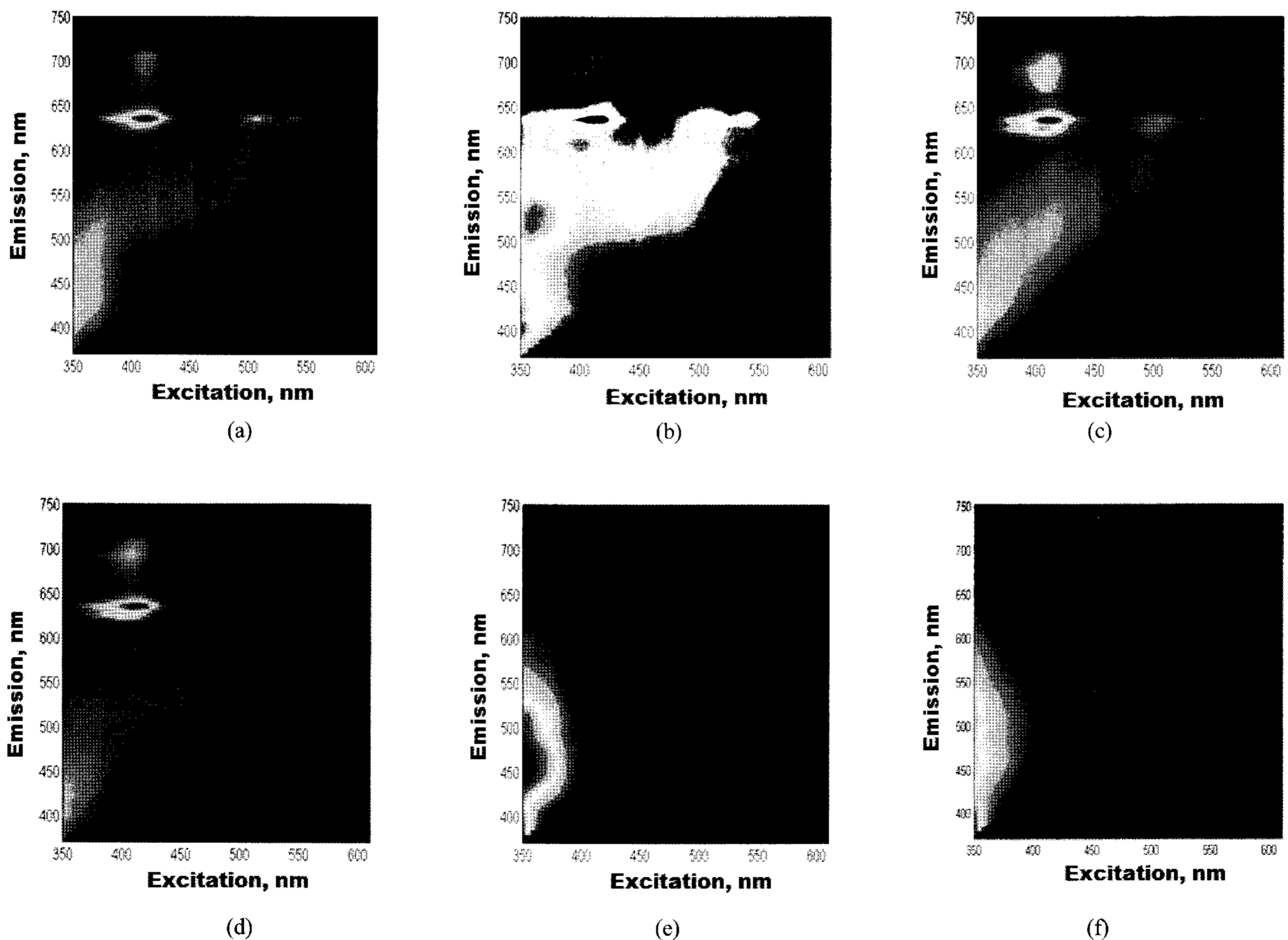


Fig. 3 Representative contour plots of fluorescence ExEm matrices of poultry feces from (a) ingesta, (b) duodenum, (c) ceca, (d) colon, (e) skin, and (f) meat.

서 형광이 강하게 나타나는 이유는 양계 내장 잔유물에 고유하게 포함된 프로토포르피린(Protoporphyrin IX) 성분 때문인 것으로 판단된다.

방출스펙트럼에서 579 nm과 635 nm에서 피크를 발생시키는 광파장을 확인하기 위해 조사광을 변화시키면서 두 방출 파장에서 각각 나타나는 형광 방출강도를 그래프로 나타내었다(Fig. 4). 조사광이 411 nm일 때 각각의 두 방출파장에서 가장 높은 형광값이 나타났다. 따라서 형광 방사스펙트럼에서 579 nm, 635 nm에서의 피크를 발생시키는 조사광은 411 nm로 분석되었다.

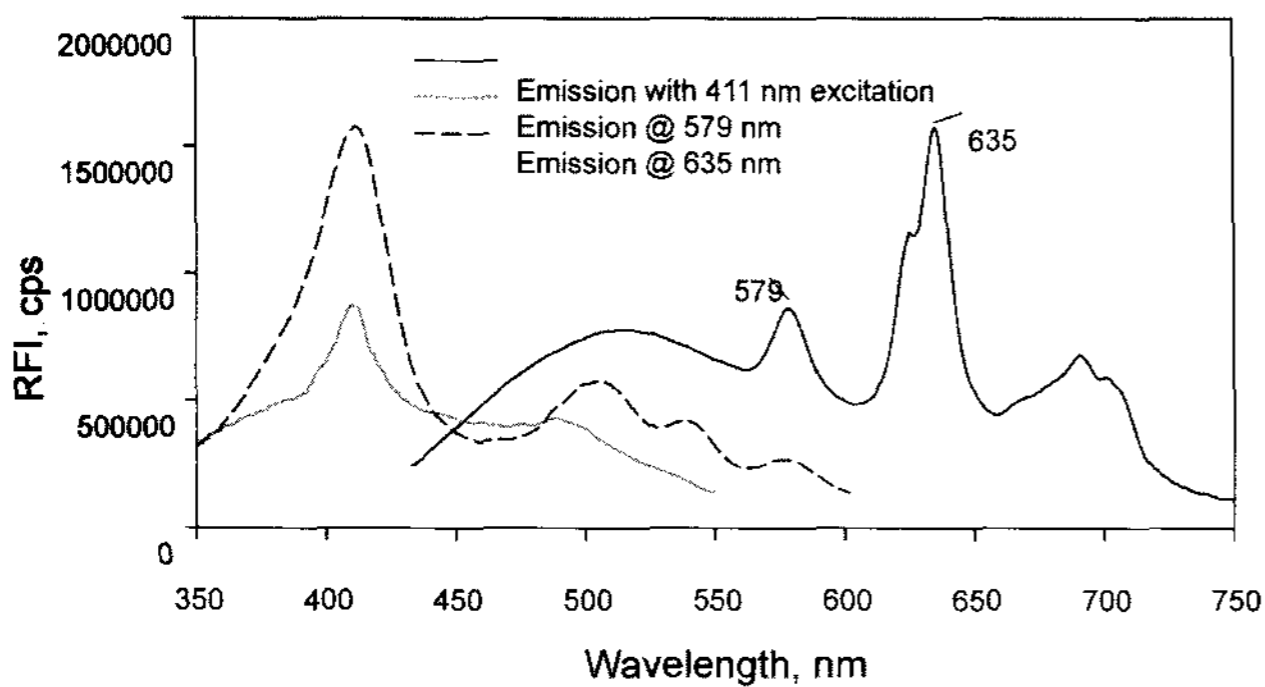


Fig. 4 Excitation (left portions of graphs, gray and dotted lines) and emission spectra (right portions of graphs, black lines) for fecal samples. Emission spectra were acquired at excitation maxima, and excitation spectra were measured at emission maxima (Kim et al., 2006).

방출스펙트럼에서 가장 특징적으로 나타나는 635 nm 피크를 생성하는 411 nm의 광원을 이용하여 각 계육 유기물의 형광 방출스펙트럼을 1 nm 간격으로 측정하여 평균으로 나타내었다(Fig. 5). 외피, 계육에 대한 형광 방출스펙트럼에서는 635 nm 근처에서 피크가 관찰되지 않은 반면, 내장 잔유물의

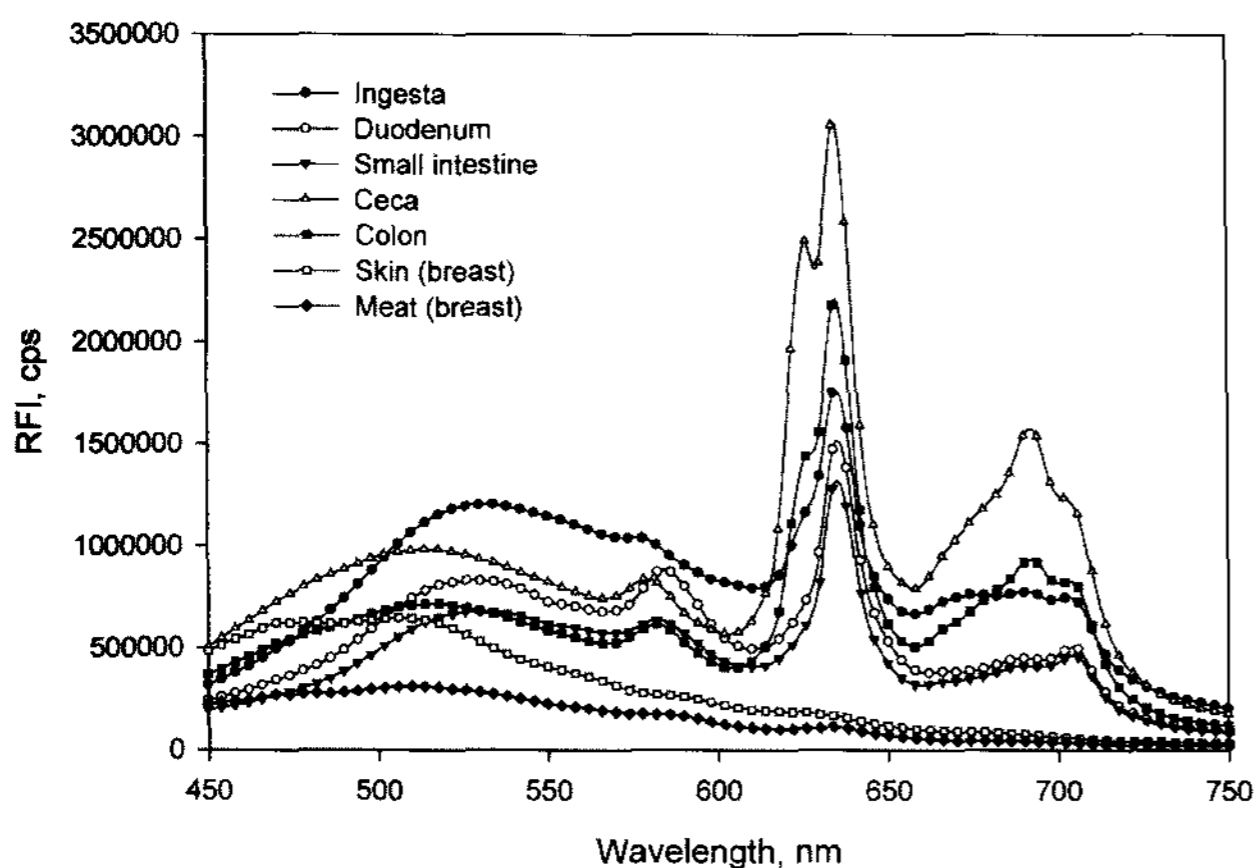


Fig. 5 Representative fluorescence emission spectra for poultry skin, meat, and feces from different locations of digestive tract.

스펙트럼에서는 뚜렷한 피크가 나타남을 볼 수 있다. 외피 및 계육의 경우는 UV-A(320 nm - 400 nm)를 조사했을 때 약 400 nm에서 550 nm까지의 파장대에서 형광이 발생하는 것을 확인할 수 있었다.

411 nm의 조사광을 통해 나타나는 방출스펙트럼을 이용하여 내장 잔유물과 외피 및 계육을 구분하기 위해서는 구분하고자 하는 시료의 스펙트럼 차이를 잘 반영하는 파장을 선정하여야 한다. 주성분 분석법을 이용하여 스펙트럼의 변이가 큰 파장을 조사하였다. 그림 6은 파장 별로 나타나는 주성분의 가중값 그래프이다. 가중값이 클수록 해당 파장에서의 형광광도값의 변이가 크다. 제 1주성분에서는 635 nm에서 가중값이 가장 크게 나타났고, 제 2주성분에서는 520 nm와 635 nm에서, 제 4주성분에서는 625 nm와 635 nm에서, 제 5주성분에서는 579 nm에서 가중값이 크게 나타났다. 제 3주성분은 특징적인 피크가 나타나지 않았다. 방출스펙트럼의 변이를 가장 잘 나타내는 주요 파장으로 520 nm, 579 nm, 625 nm, 그리고 635 nm를 선정하여 내장 잔유물과 계육 유기물을 구분하는 기준 파장으로 이용하였다.

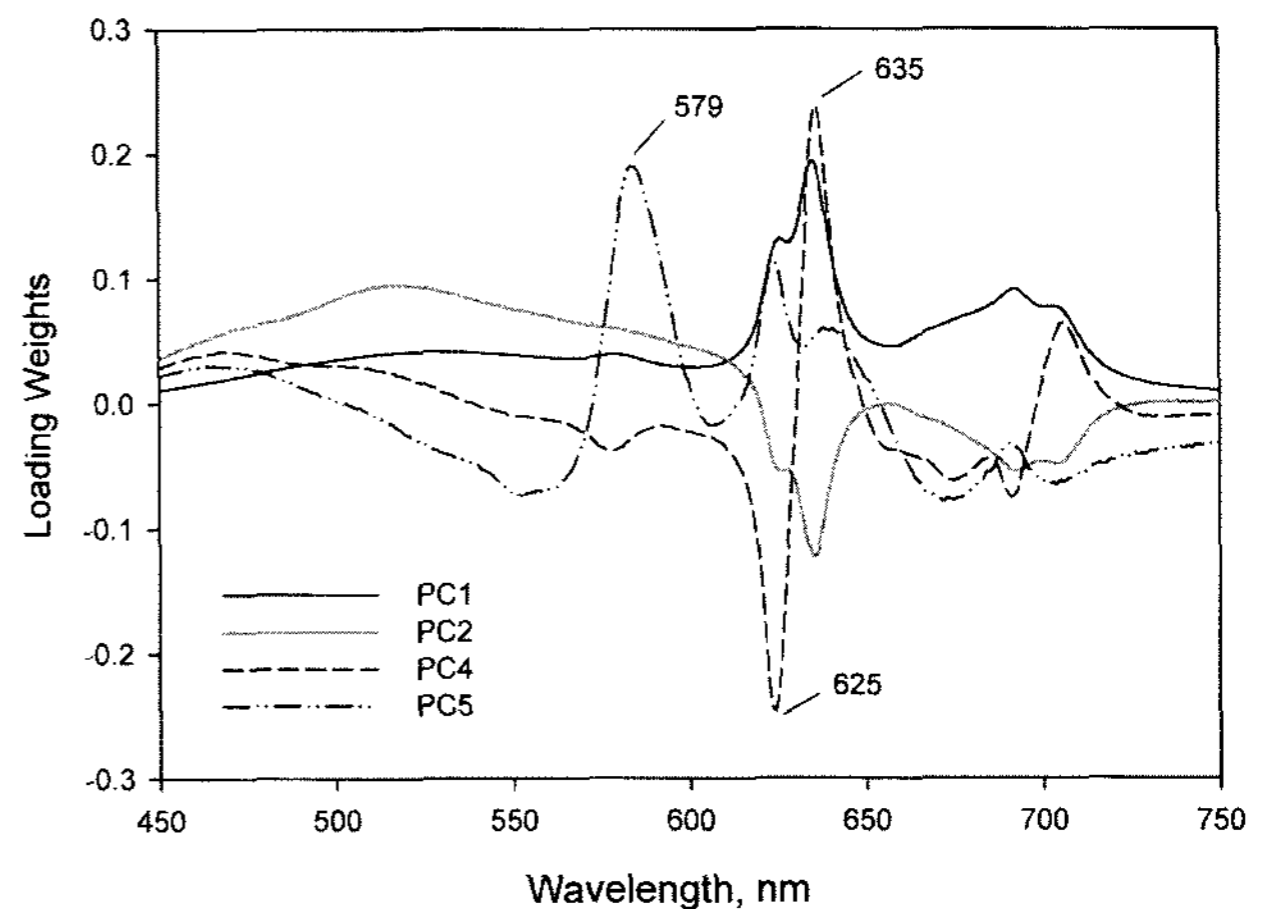


Fig. 6 Spectral weighing coefficients for principal components (PCs). The dominant wavelengths are indicated on the graph.

주성분 분석을 통해 선정된 4개의 파장을 이용하여 오염물질인 내장 잔유물과 오염되지 않은 도계유기물을 구분할 수 있는 최적 방출 파장 조합을 조사하였다. 411 nm의 광을 조사한 후 획득된 형광 방출스펙트럼에서 4개의 파장의 형광광도값을 여러 조합으로 계산하였다. 계산된 값에서 오염물질과 도계유기물을 구분하기 위한 경계값 산출을 위해 그림 7에서와 같이 표준편차를 고려한 경계값을 산출하였다. 두 그룹의 표준편차의 비를 고려하면 경계값이 표준편차가 큰 그룹보다 표준편차가 작은 그룹의 평균값에 더 가깝게 위치하게 된다. 그림의 공식에서는 평균값을 나타내고는 표준편차

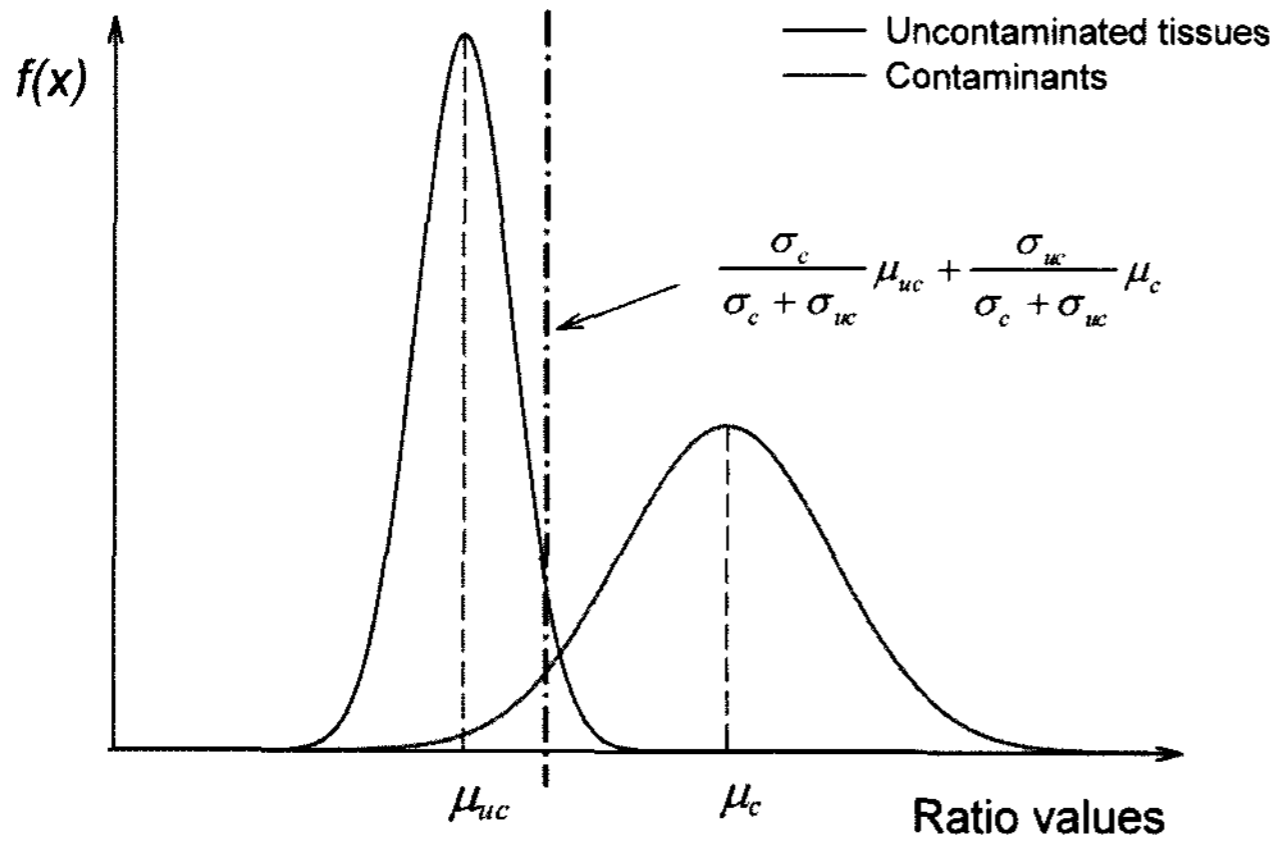


Fig. 7 Illustration of the method used to determine the separation values. The normal curve for feces (mean μ_c) is shown on the right and the curve for uncontaminated organic matters (mean μ_{uc}) is shown on the left.

를 나타낸다.

형광 방출스펙트럼의 주요 파장 광도값의 조합 결과를 그래프로 나타내면 그림 8과 같다. 방출스펙트럼에서 한 개의 파장만을 사용할 경우는 635 nm가 가장 적합하였고, 두 개 파장의 형광 광도값의 비를 이용할 경우는 520 nm와 579 nm의 광도값을 이용하는 것이 효과적이었다. 보다 정교한 조합을 사용하면 대체적으로 정확도가 올라가지만 두 개의 파장을 이용한 경우의 정확도와 비슷한 수준이었다. 각 파장 조합별 예측과 검증 결과를 표 1에 나타내었다. 한 개의 파장을 사용했을 경우 520 nm와 579 nm에서는 다소 낮은 정확도를 보였고, 나머지 625 nm와 635 nm에서는 97%가 넘는 높은 정확도를 보였다. 두 개 이상의 파장 조합을 사용했을 경우는 한 개 파장을 사용했을 때 보다 다소 높은 정확도를 보였으나 그 차이는 3% 이내로 매우 적은 수준이었다. 그림 8에서 F520, F580, F625, F635는 각각의 형광파장 520 nm, 580 nm, 625 nm, 그리고 635 nm에서의 형광광도를 나타낸다.

Table 1 Results of classifications for contaminants and uncontaminated chicken tissues

Band-ratio	Separation value	Accuracy (%)	
		Calib.	Valid.
F520	687090	71.5	82.1
F579	428260	88.2	87.2
F625	233980	96.5	97.4
F635	234730	97.4	97.4
F579 / F520	0.656	98.2	98.7
F625 / F520	0.398	96.1	98.7
F625 / F579	0.714	86.4	89.7
F635 / F520	0.471	96.5	97.4
F635 / F579	0.759	93.9	97.4
(F579-F520) / (F579+F520)	-0.192	98.7	94.9
(F625-F520) / (F625+F520)	-0.386	99.6	100.0
(F635-F520) / (F635+F520)	-0.254	95.6	98.7
(F635-F579) / (F635+F579)	-0.084	95.6	98.7

4. 요약 및 결론

도계육 유기물에 대한 형광특성을 분석하고 내장 잔유물과 외피 및 계육을 구분할 수 있는 형광 조사파장 및 방출파장을 조사하였다. 조사광이 411 nm에서 내장 잔유물의 방출파장이 가장 특징적으로 나타나는 것을 확인할 수 있었다. 방출스펙트럼을 PCA방법으로 분석한 결과 520 nm, 579 nm, 625 nm, 그리고 635 nm를 이용하는 것이 가장 적절하였고 이 파장들의 형광 광도값을 조합하여 이용한 경우 내장 잔유물과 외피와 계육의 구별이 97% 이상 정확하게 이루어졌다. 특히 411 nm의 조사광을 이용할 경우 635 nm에서 방출되는 형광 값 만을 이용하여도 내장 잔유물과 외피 및 계육이 두 개 이상의 파장 조합의 경우와 비슷한 정확도(> 97%)로 구분되었다. 따라서 계육 표면 오염검사를 위한 형광 검사시스템을 구축할 경우 비용과 정확성을 고려해 볼 때, 411 nm 대의 조사

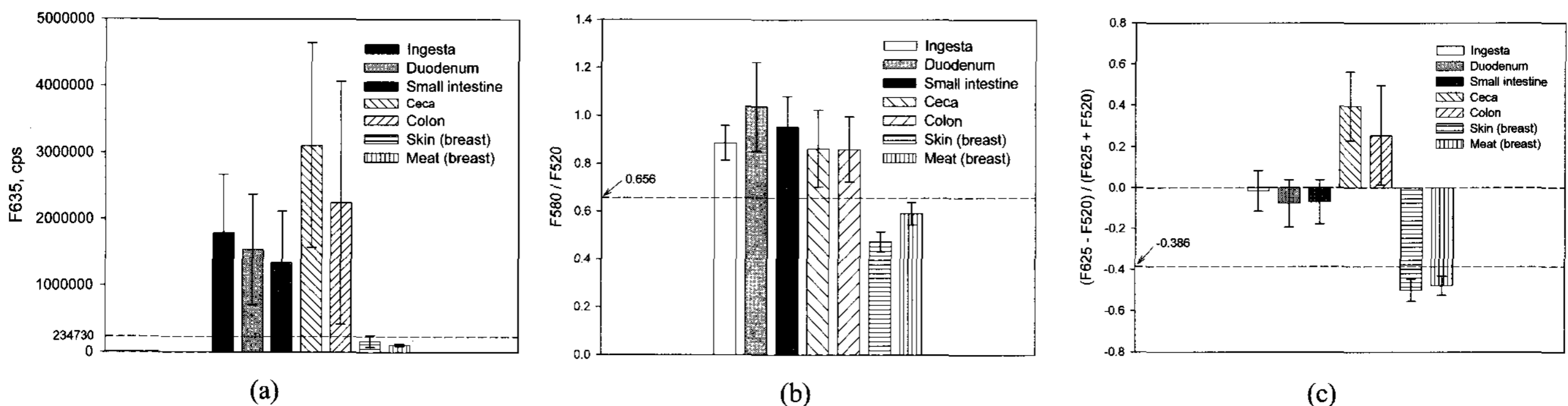


Fig. 8 Mean intensities of a wavelength (a) and various wavelength combinations (b, and c) of poultry fecal matters and uncontaminated organic matters. Error bars indicate standard deviations.

광과 중심파장이 635 nm인 필터를 사용하는 단일 카메라 검사시스템으로도 정확도가 높은 검사시스템 구성이 가능하리라 판단된다.

참 고 문 헌

1. Food Safety and Inspection Service (FSIS). 2004. Livestock post-mortem inspection activities-enforcing the zero tolerances for fecal materials, ingesta, and milk. FSIS Directive 6420.2, <http://www.fais.usda.gov>.
2. Kim, M. S., A. M. Lefcourt, Y. Chen, I. Kim, K. Chao and D. Chan. 2002. Multispectral detection of fecal contamination on apples based on hyperspectral imagery - part 2: application of fluorescence imaging. *Transactions of the ASAE* 45(6): 2039-2047.
3. Kim, M. S., B. Cho, K. Chao, A. M. Lefcourt, Y. Liu and Y. Chen. 2006. Detection of contaminants on poultry processing plant equipment using laser-induced fluorescence imaging, *Key Engineering Materials* 321-323:1157-1162.
4. Kim, M. S., Y. Chen, B. Cho, K. Chao, C. Yang, A. M. Lefcourt and D. Chan. 2007. Hyperspectral reflectance and fluorescence line-scan imaging for online defect and fecal contamination inspection of apples. *Sensing and Instrumentation for Food Quality and Safety* 1(3):151-159.
5. Kim, M. S., Y. Chen and P. M. Mehl. 2001. Hyperspectral reflectance and fluorescence imaging system for food quality and safety. *Transactions of the ASAE* 44(3):721-729.
6. Park, B., K. C. Lawrence, W. R. Windham and D. P. Smith. 2005. Detection of cecal contaminations in visceral cavity of broiler carcasses using hyperspectral imaging. *Applied Engineering in Agriculture* 21(4):627-635.
7. Park, B., K. C. Lawrence, W. R. Windham and R. J. Buhr. 2002. Hyperspectral imaging for detection fecal and ingesta contaminations on poultry carcasses. *Transactions of the ASAE* 45(6):2017-2026.