

분광분석법을 이용한 우유의 체세포수 측정기술 개발

최창현 김용주 김기성 최태현

Development of Measuring Technique for Somatic Cell Count in Raw Milk by Spectroscopy

C. H. Choi Y. J. Kim K. S. Kim T. H. Choi

Abstract

The objective of this study was to develop models to predict SCC (somatic cell count) in unhomogenized milk by visible and near-infrared (NIR) spectroscopic technique. Total of 100 milk samples were collected from dairy farms and preserved to minimize propagation of bacteria cells during transportation. Reductive reagents such as methyl red, methylene blue, bromocresol purple, phenol red and resazurin were added to milk samples, and then colors of milk were changed based on SCC of milk. For optimal reductive reagents, reaction time was controlled at 3 level of reaction time. A spectrophotometer was used to measure reflectance spectra from milk samples. The partial least square (PLS) models were developed to predict SCC of unhomogenized milk. The PLS results showed that milk samples with reductive reagents had a good correlation between predicted and measured SCC at 5 minutes of reaction time in the visible range. The PLS models with resazurin reagent had the best performance in 400~600 nm. The prediction results of milk samples with resazurin had 0.86 of correlation coefficient and 14,184 cell/mL of SEP.

Keywords : Milk, Somatic cell, Reflectance, Reductive reagents, Spectrophotometer

1. 서론

국내의 낙농산업은 타 식품산업에 비해 비교적 짧은 역사 속에서 급속한 성장을 이룩하였다. 국내 경산우의 산유량은 1995년에는 6,427 kg/두, 1999년에는 7,247 kg/두, 2000년에는 7,355 kg/두로 지속적인 생산량의 증가를 보이고 있으며, 연평균 소비량도 2~3% 정도로 계속적인 증가를 보이고 있다(한국낙농육우협회, 2002). 그러나 우유 생산량과 소비량이 계속적인 증가를 보이는 반면, 값싸고 품질이 우수한 수입 유제품의 지속적인 증가로 인해 우유의 자급률은 오히려 하락하여 국내산 우유의 수급불균형현상을 초래하고 있다(국립수

의과학검역원, 2004). 그러므로 국내 우유의 수급률을 조절하고 우유의 국제 경쟁력을 높이기 위해서는 고품질 우유의 생산이 필요한 실정이다.

고품질 우유란 풍미가 좋고 단백질, 지방과 같은 우유성분 함량이 풍부하며 세균수와 체세포수가 적은 신선한 우유를 말한다. 특히 우유 체세포수의 증가는 전체적인 유량을 감소시키고 유성분 중 지방, 유당, 단백질, 카제인의 감소와 나트륨, 염소의 증가를 가져오는 등 우유 품질에 영향을 미쳐 축산농가의 경제적 손실을 크게 증가시키고 우유의 경제적 가치를 떨어뜨린다(Tsenkova et al., 2001). 또한 우유의 체세포수는 젖소의 유방염 진단의 지표로도 사용이 가능하여 현장

This study was conducted by the research fund supported by the Agricultural R&D Center (ARPC), Ministry of Agriculture and Forestry. The article was submitted for publication on 2008-04-18, reviewed on 2008-05-13, and approved for publication by editorial board of KSAM on 2008-06-03. The authors are Chang Hyun Choi, Professor, KSAM member, Yong Joo Kim, Research Assistant Professor, KSAM member, Dept. of Bio-Mechatronic Engineering SungKyunKwan University, Suwon, Korea, Kee Sung Kim, Principal Researcher, Korea Food Research Institute, and Tae Hyun Choi, Researcher, KSAM member, Dept. of Bio-Mechatronic Engineering SungKyunKwan University, Suwon, Korea. Corresponding author: Y. J. Kim, Research Assistant Professor, Dept. of Bio-Mechatronic Engineering SungKyunKwan University, Suwon, 440-746, Korea; Fax: +82-31-290-7834; E-mail: <babina@skku.edu>.

에서 정확하고 신속한 체세포수의 측정을 통한 우유의 품질 관리가 필요한 실정이다.

현재 체세포수 측정의 표준이 되는 검사법은 우유를 슬라이드에 직접 도말하여 검사하는 직접현미경법으로 각각의 우유 시료를 직접 도말하고 염색하여 현미경으로 검사해야 하므로 번거로울 뿐 아니라 많은 시간과 노력이 요구되어 등급별 유대를 지불하는 현행제도하에서 대량의 우유 시료를 검사하기에는 비효율적이다. 따라서 현재 여러 낙농선진국에서는 우유 증 세포에 형광시약(Ethidium bromide)을 코팅시킨 후, 할로겐램프로 측정하는 체세포수 측정 장비(Fossomatic FT6000, Foss, Denmark)를 사용하는데, 이것은 신속한 체세포수의 측정이 가능하다는 장점이 있으나 인체에 유해한 염색시약을 사용하므로 전문가를 필요로 하며, 장비의 가격이 비싸 개별 축산 농가에 보급하기는 어려운 실정이다(Berglund et al., 2002).

따라서 본 연구는 현장에서 실시간 우유의 체세포수 측정이 가능한 시스템 개발을 위한 기초 연구로써, 우유 시료에 현재 사용되고 있는 형광 시약 외에 체세포수와 반응하는 반응 시약을 선정하여 근적외선 분광법으로 체세포수의 측정기술을 개발하는 것을 목적으로 한다.

2. 재료 및 방법

가. 우유 시료

우유 시료는 한국식품연구원과 협조하여 대부분 2007년 10월~12월경에 낙농 농가에서 수집한 시료를 중심으로 체세포수의 범위가 1~5등급까지 각 등급별의 시료를 포함하도록 총 100개의 시료를 선별하였다. 체세포수 검사는 주변 환경 변화에 따른 미생물의 번식을 억제하기 위해 우유 시료에 방부제 처리를 하여 표준화된 체세포수 측정 장비로 측정하였고 측정이 완료된 우유 시료는 50 mL의 저장용기에 담아 스펙트럼 측정을 위해 이동하였다.

체세포수에 영향을 미치는 반응 시약을 선정하기 위하여 미생물 측정을 위한 염료환원 시험법에 사용되는 methyl red,

methylene blue, bromocresol purple, phenol red와 resazurin의 5가지 시약을 이용하였다. 염료환원 시험법은 우유의 미생물들이 유성분을 산화에 이용하면서 발생하는 전자를 산소 또는 염료분자로 전달하여 환원시키는 능력을 이용한 방법으로 환원시간은 우유내의 미생물수와 반비례하며, 체세포수가 많아지면 환원시간이 빨라지는 특징이 있다(한국식품연구원, 2006). 우유 시료는 반응 시약을 혼합하지 않은 시료와 반응 시약을 혼합한 우유 시료를 포함하여 총 6가지의 시료를 준비하였다. 우유와 시약의 체적비는 염료환원 시험법에 사용되는 우유와 시약의 혼합비(20:1)와(한국낙농공학연구센터, 1993) 스펙트럼 측정을 위한 샘플 셀의 체적을 고려하여 우유와 시약을 5 mL과 0.25 mL로 혼합하였다.

나. 스펙트럼 측정

실험은 그림 1과 같이 방부제 처리한 우유 시료를 사용하였으며, 온도에 따른 유성분의 영향을 줄이기 위해 우유의 온도를 40°C로 유지한 후에(Tsenkova et al., 1999) 하나의 우유 시료에 대해 반응 시약을 첨가하지 않은 시료와 반응 시약을 첨가한 총 6종류의 시료를 사용하였다. 반사 스펙트럼은 우유 시료와 반응 시약의 반응 시간에 따른 체세포수 예측 성능을 구명하기 위해 각각의 우유 시료에 대해 반응 시간을 3수준으로 설정하여 측정하였다. 이때, 각각의 반응 시약에 대한 우유 시료는 일반적으로 20~100 mL의 체적에 대해 30분~2시간 사이의 반응 시간을 가지므로 본 연구에서는 사용하는 우유 시료의 체적(5 mL)을 고려하고 현장에서 실시간 우유 체세포수의 측정이 가능하도록 반응 시간을 0분, 5분, 10분으로 설정하였다.

반사 스펙트럼은 각각의 우유 시료에 대해 그림 2와 같은 고성능의 분광분석기(Model 6500, NIRSystem, USA)의 horizontal 모듈과 샘플 셀 및 반사판을 이용하여 400~2,498 nm의 과장 영역에서 2 nm 간격으로 측정하였다. 반사 스펙트럼은 분광분석기를 이용하여 기준(Reference) 스펙트럼을 측정하고 우유 시료를 샘플 셀에 부은 후, 반사판을 넣고 우유 시료가 완전히 정지하면 반사 스펙트럼을 측정하는 방법으로 반응 시

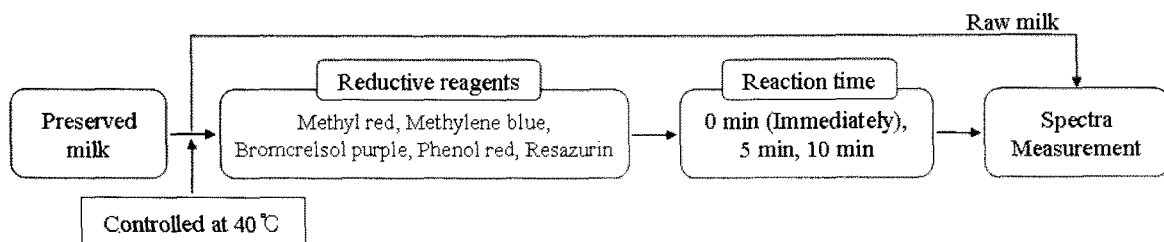


Fig. 1 Schematic of experiment condition for spectra measurements.

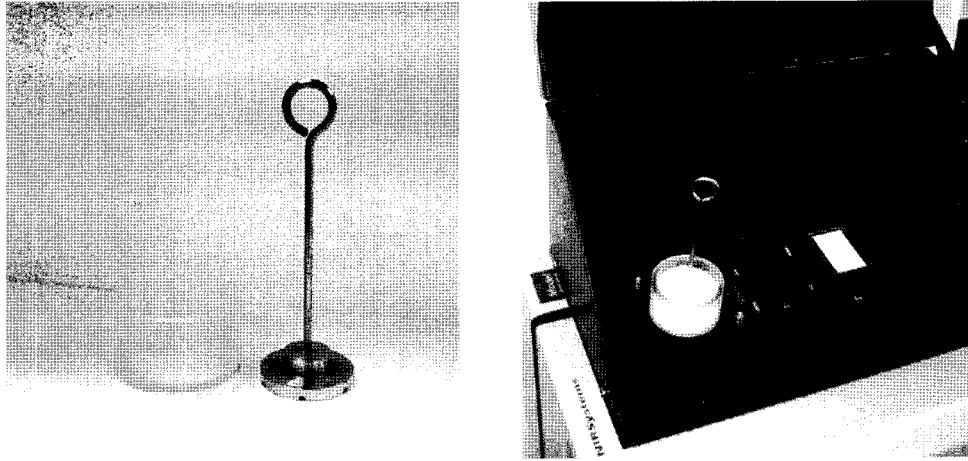


Fig. 2 Sample cell, reflectance plate (left) and horizontal type spectrophotometer (right) for reflectance spectra measurements.

약을 첨가하지 않은 우유 시료와 각각의 반응 시약에 반응 시간을 3수준으로 설정한 우유 시료를 포함하여 모두 1,600점의 시료를 측정하였다. 기준 스펙트럼은 항상 일정한 흡광도를 나타내는 세라믹판을 이용하였으며, 반사 스펙트럼은 시료에 광선을 32회 주사하여 평균한 스펙트럼을 흡광도(log(I/R))로 변환하여 저장하였다.

샘플 셀은 지름 50 mm, 높이 30 mm의 크기로 바닥은 두께 3 mm의 수정으로 제작하였고 반사판은 지름 35 mm의 알루미늄으로 평평하게 제작한 후 반사율을 높이기 위해 금으로 도금하였다. 이때 반사판의 높이는 우유 시료가 다른 액체 시료 보다 투과도가 낮은 것을 고려하여(Chen et al., 1999) 광투과거리(Pass-length)를 1 mm로 제작하였다.

다. 체세포수 예측모델 개발

반응 시약의 첨가 유·무와 반응 시간에 따른 체세포수의 예측 모델을 개발하기 위해 전체 스펙트럼 개수의 50%를 교정부로, 50%를 검증부로 분류하였다. 스펙트럼을 체세포수의 크기 순서로 정렬한 후에 순차적으로 교정부와 검증부로 분류하여 교정부와 검증부의 체세포수가 유사한 크기와 범위를 갖도록 조정하였다. 예측 모델은 다양한 화학적 성분조성을 갖는 시료 분석에 적합한 부분최소자승법(Partial Least Squares,

PLS)을 이용하여 우유 시료의 스펙트럼과 체세포수와 의 상관관계를 분석하였다(Pravdova et al., 2001). PLS 분석은 상용 프로그램인 Unscrambler(Camo, Norway)를 사용하였으며, 반응 시약에 따른 예측 모델을 개발하기 위해 원시 스펙트럼(Raw spectrum)과 빛의 산란을 보정하기 위한 수처리 방법(Mathematical treatment)인 다분산보정(Multiplicative Scatter Correction, MSC)을 사용하였다. 또한 PLS 모델은 개발된 모델의 신뢰성을 높이기 위해 교차검증(Cross validation)을 이용하였으며, 최대 팩터 수(Factor)를 20으로 설정하고 각각의 팩터에 대한 상관계수(R)와 교정부 오차(Standard Error of Calibration, SEC)를 비교하여 최적 모델을 개발하였다. 또한 개발된 모델의 예측성능은 검증부 상관계수(R)와 검증부 오차(Standard Error of Prediction, SEP)를 이용하여 평가하였다.

3. 결과 및 고찰

가. 우유 시료의 분포

표준화된 체세포수 측정 장비로 표 1과 같이 체세포수를 측정하여 1~5등급까지의 체세포수 등급으로 분류하였다. 측정된 우유 시료의 체세포수는 15,000~1,322,000개의 범위를 보이고 있으며, 체세포수 등급은 전체 시료 100점 중 38점이

Table 1 Grade and measured values of tested SCC in milk

Grade	Somatic cell count	Number of samples	Avg.	Min.	Max.	Std. Dev.
1 grade	< 200,000	38	123,750	15,000	188,000	28,528
2 grade	< 350,000	22	255,123	240,000	332,000	15,812
3 grade	< 500,000	18	310,231	362,000	454,000	18,412
4 grade	< 750,000	12	612,523	521,000	705,000	31,233
5 grade	≥ 750,000	10	1,124,571	810,000	1,322,000	102,412
Total		100	344,954	15,000	1,322,000	282,775

1등급, 22점이 2등급, 18점이 3등급, 12점이 4등급, 10점이 5등급으로 나타나 상대적으로 고품질 우유 시료를 더 많이 포함하고 있음을 알 수 있다.

나. 스펙트럼 측정 결과

반응 시약을 첨가하지 않은 우유 시료와 반응 시약을 첨가한 우유 시료의 가시광선/근적외선 영역의 스펙트럼은 그림 3과 같이 측정되었다. 전체적인 스펙트럼은 400~800 nm 영역의 가시광선 영역에서, 1,400~1,600 nm와 1,900~2,100 nm의 근적외선 영역에서 흡광도 차이를 보이고 있다. 400~800 nm 영역의 흡광도는 시약의 첨가 유·무 및 반응 시약의 종류에 따라 차이를 보이고 있으며, 1,400~1,600 nm와 1,900~2,100 nm 영역의 흡광도 차이는 주로 빛의 산란에 의한 오차 (Laporte and Papuin, 1999)로 본 연구에서는 다분산보정을 이용하여 스펙트럼을 보정하였다.

반응 시간에 따른 스펙트럼의 흡광도는 그림 4와 같이 400~1,400 nm의 영역에서 resazurin을 첨가한 우유 시료에 대해 반응 시간이 증가함에 따라 흡광도가 점차 감소하는 경향을

보였다. 반응 시간의 증가에 따른 흡광도의 감소는 모든 종류의 시약에서 유사하게 나타났으며, 이것은 사용한 염료환원 시약이 우유의 미생물 등을 환원시킴에 따라 반응 시약의 농도가 점점 없어졌기 때문으로 판단된다.

체세포수의 크기 및 등급에 따른 스펙트럼의 흡광도는 그림 5와 같이 전체 영역에서 일정한 경향을 보이지 않고 나타났으며, 특히 가시광선 영역에서는 흡광도가 교차하여 나타나 스펙트럼을 이용하여 체세포수 등급에 따른 정확한 흡광도 차이를 구분할 수 없었다.

다. 체세포수 예측모델 개발

반응 시약의 첨가 유·무와 반응 시간에 따른 체세포수의 예측 모델을 표 2와 같이 개발하였다. 전체적인 체세포수 예측 모델은 가시광선 영역에서 가장 좋은 상관관계를 보여주고 있어 가시광선 영역 스펙트럼을 이용하여 체세포수의 예측이 가능함을 알 수 있다.

반응 시약을 첨가하지 않은 경우의 체세포수 예측 모델은 400~800 nm에서 가장 좋은 상관관계를 보이고 있으며, 검증

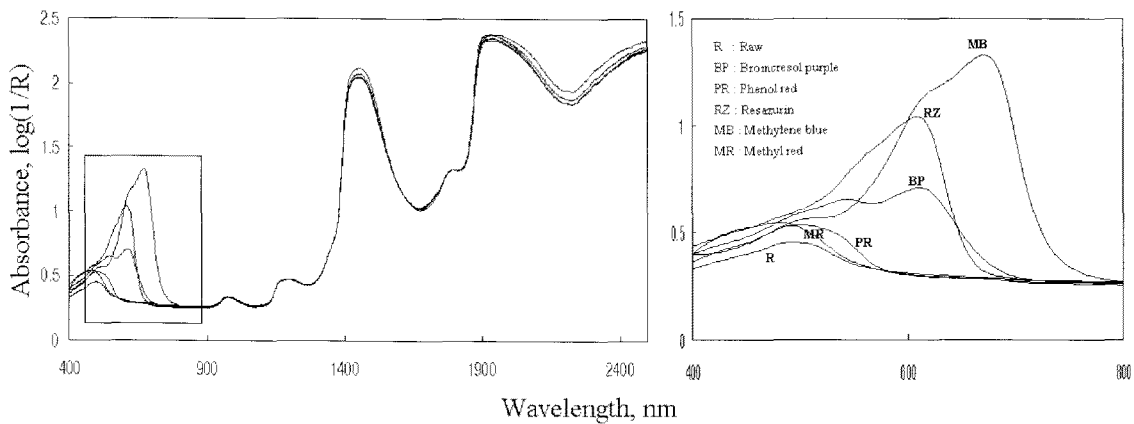


Fig. 3 Absorbance spectra of raw milk at different reductive reagents.

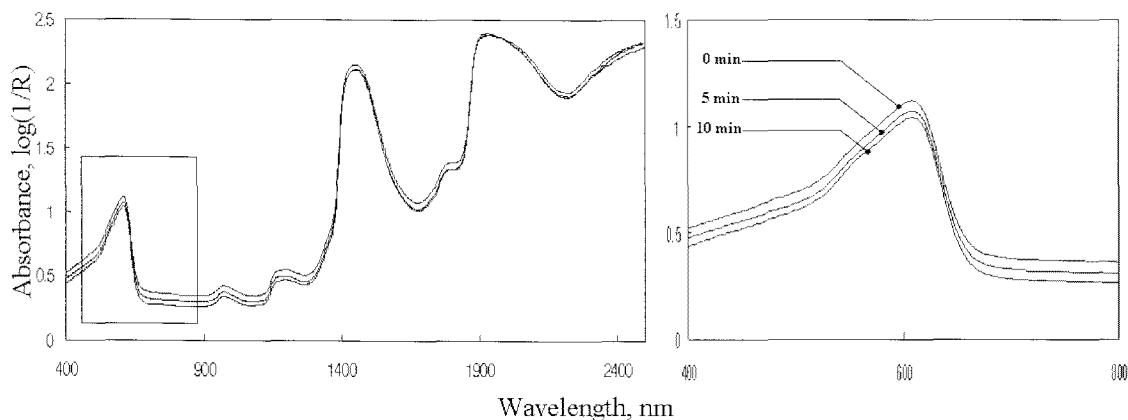


Fig. 4 Absorbance spectra of raw milk with resazurin at different reaction time.

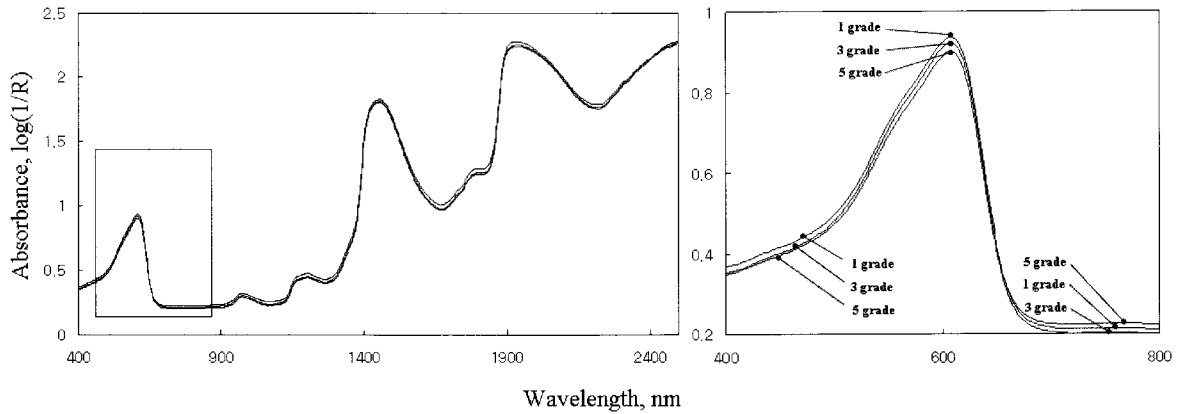


Fig. 5 Absorbance spectra of raw milk with resazurin by difference of SCC grade.

Table 2 PLS results for SCC in milk at different reductive reagents and reaction time.

Reaction time	Reductive reagents	Wavelength (nm)	Calibration			Prediction	
			PC	R	SEC	R	SEP
-	Raw	400~800	10	0.55	365,151	0.50	338,153
0 min	methyl red	400~800	8	0.65	288,658	0.56	295,454
	methylene blue	500~800	9	0.66	275,685	0.58	288,546
	bromocresol purple	500~800	8	0.58	305,111	0.51	312,151
	phenol red	500~800	8	0.59	312,187	0.52	333,185
	resazurin	700~900	8	0.70	258,151	0.66	285,152
5 min	methyl red	500~900	11	0.88	181,588	0.86	188,158
	methylene blue	400~800	10	0.87	192,179	0.85	192,185
	bromocresol purple	500~800	10	0.65	282,358	0.58	292,655
	phenol red	500~800	9	0.68	298,577	0.62	301,587
	resazurin	500~800	8	0.93	155,158	0.90	165,152
10 min	methyl red	400~700	13	0.71	277,949	0.68	289,545
	methylene blue	500~900	15	0.70	258,187	0.69	268,157
	bromocresol purple	600~800	12	0.66	299,225	0.61	301,518
	phenol red	400~900	12	0.61	289,750	0.60	299,151
	resazurin	400~800	12	0.75	271,414	0.71	288,254

Number of calibration: 50 Number of prediction: 50

결과 상관계수는 0.50, 오차는 338,153개로 나타나 반응 시약을 첨가한 경우보다 낮은 검증결과를 보여주고 있어 우유 시료만을 이용하여 체세포수의 예측이 어려움을 알 수 있다.

반응 시간에 따른 체세포수 예측 모델은 반응 시간을 5분으로 설정한 경우가 가장 좋은 상관관계를 보이고 있으며, 반응 시간을 0분으로 하여 반응 시약을 첨가한 즉시 스펙트럼을 측정할 경우가 반응 시간이 10분인 경우 보다 상대적으로 낮은 상관관계를 보이고 있다. 이것은 우유 시료와 반응 시약이 염료환원반응을 일으키기 위해 적당한 시간이 필요하기 때문에 우수한 체세포수 예측 모델을 개발하기 위해서는 적절한 반응 시간의 설정이 필요함을 알 수 있다.

반응 시간을 5분으로 하여 체세포수 예측 모델을 개발한 결과 methyl red 시약을 사용한 경우 500~900 nm에서 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, 검증 결과 상관계수는 0.86, 오차는 188,158개로 나타났다. methylene blue 시약을 사용하여 예측 모델을 개발한 결과 400~800 nm에서 좋은 상관관계를 보이고 있으며, 검증 결과 상관계수는 0.85, 오차는 192,185개로 나타났다. methyl red, methylene blue 시약을 사용한 경우의 체세포수 예측 성능은 유사하게 나타났으나 검증부 상관계수가 다소 낮게 나와 모델의 신뢰성을 높이기 위해서는 다양한 분석 방법의 적용이 필요할 것으로 판단된다. bromocresol purple와 phenol red 시약을 사용한 경우의 예

측 성능은 모두 500~800 nm에서 상관관계가 있는 것으로 나타났다. 검증 결과 상관계수는 0.58, 0.62, 오차는 292,655 개, 301,587개로 낮은 상관관계를 보이고 있어 체세포수 예측을 위한 반응 시약으로서 사용하기 어려운 것으로 판단된다. 우유 시료에 resazurin 시약을 첨가한 경우 500~800 nm 영역에서 상관관계가 있는 것으로 나타났으며, 검증 결과 상관계수는 0.90, 오차는 165,152개로 가장 우수한 상관관계를 보이고 있어 우유 시료에 resazurin 시약 첨가하여 우유 체세포수의 측정이 가능함을 알 수 있다.

4. 요약 및 결론

본 연구는 염료환원시험법에 사용되는 반응 시약을 선정하여 근적외선 분광법으로 체세포수의 측정기술을 개발하기 위해 수행되었다. 반응 시약의 첨가 유·무에 따른 체세포수의 예측 모델을 개발하였고 반응 시간을 0분, 5분, 10분의 3수준으로 하여 반응 시간이 체세포수 예측 모델에 미치는 영향을 구명하였으며, 그 구체적인 결과는 다음과 같다.

- (1) 체세포수 예측 모델은 반응 시약의 첨가 유·무와 반응 시간에 관계없이 모두 가시광선 영역에서 가장 좋은 상관관계를 보여 가시광선 영역의 스펙트럼을 이용하여 체세포수의 예측이 가능함을 알 수 있다.
- (2) 반응 시약을 첨가하지 않은 경우의 체세포수 예측 모델은 400~800 nm에서 가장 좋은 상관관계를 보였으나 검증 결과 상관계수는 0.50, 오차는 338,153개로 나타나 우유의 체세포수를 예측하기에는 어려운 것으로 나타났다.
- (3) 반응 시간에 따른 체세포수 예측 모델은 반응 시간을 5분으로 설정한 경우가 가장 좋은 상관관계를 보였으며, methyl red와 methylene blue 시약을 사용한 경우 검증부 상관계수는 0.86, 0.85, 검증부 오차는 188,158 개, 192,185개로 나타나 모델의 신뢰성을 높이기 위해서는 다양한 분석 방법의 적용이 필요할 것으로 판단된다. bromcresol purple, phenol red 시약을 사용한 경우

검증부 상관계수는 0.58, 0.62, 검증부 오차는 292,655 개, 301,587개로 낮은 상관관계를 보이고 있어 체세포수 예측을 위한 반응 시약으로서 사용하기 어려운 것으로 나타났다. resazurin 시약을 사용한 경우 검증부 상관계수는 0.90, 검증부 오차는 165,152개로 가장 우수한 상관관계를 보이고 있어 resazurin 시약을 사용하면 우유 체세포수 예측 성능을 향상시킬 수 있음을 알 수 있다.

참고 문헌

1. Berglund, I., G. Pettersson and S. Sjaunja. 2002. Automatic milking: effects on somatic cell count and teat end-quality. *Livestock Production Science* 78:115-124.
2. Chen, J. Y., C. Iyo and S. Kawano. 1999. Development of calibration with sample cell compensation for determining the fat content of unhomogenized raw milk by a simple near infrared transmittance method. *Journal of Near Infrared Spectroscopy* 7:265-273.
3. Laporte M. and P. Paquin. 1999. Near-infrared analysis of fat, protein, and casein in cow's milk. *Journal of Agriculture Food Chemistry* 47:2600-2605.
4. Pravdova, V., B. Walczak, D. L. Massart, S. Kawano, K. Toyoda and R. Tsenkova. 2001. Calibration of somatic cell count in milk based on near-infrared spectroscopy. *Analytica Chimica Acta* 450:131-141.
5. Tsenkova, R., S. Atanassova, K. Toyoda, Y. Ozaki, K. Itoh and T. Fearn. 1999. Near-infrared spectroscopy for dairy management: measurement of unhomogenized milk composition. *Journal of Dairy Science* 82:2344-2351.
6. Tsenkova, R., S. Atanassova, Y. Ozaki, K. Toyoda and K. Itoh. 2001. Near-infrared spectroscopy for biomonitoring influence of somatic cell count on cow's milk composition analysis. *International Dairy* 11:779-783.
7. 국립수의과학검역원. 2004. 우유가 산정체계 기준 변화에 따른 체세포수 관리대책. 서울.
8. 한국낙농공학연구센터. 1993. 낙농식품가공학.
9. 한국낙농육우협회. 2002. 우유의 수급안정 대책 방안.
10. 한국식품연구원. 2006. 근적외선을 이용한 우유 체세포수 검사법 개선연구.