Korean J. Food Sci. Ani. Resour.
Vol. 30, No. 1, pp. 120~123(2010)

ARTICLE

# 측정방법에 따른 국내산 산양유의 체세포수 비교

이승규 · 김민경 · 이연정 · 정석근 · 오미화 · 김동훈 · 박광욱[1] · 이완규[2] · 함준상*
농촌진흥청 국립축산과학원 축산물이용과, [1]순천대학교, [2]충북대학교

# Comparison of Measuring Methods for Somatic Cell Count in Goat Milk

Seung-Gyu Lee, Min-Kyung Kim, Yeon-Jeong Lee, Seok-Geun Jeong, Mi-Hwa Oh, Dong-Hun Kim, Kwang-Wook Park[1], Wan-Kyu Lee[2], and Jun-Sang Ham*
*Animal Products Research and Development Division, National Institute of Animal Science, RDA, Suwon 441-706, Korea*
*[1]Sunchon National University, Sunchon 540-742, Korea*
*[2]Chungbuk National University, Cheongju 361-763, Korea*

**Abstract**

The standard method for somatic cell counts in goat milk is the direct microscopic method after a pyronin Y-methyl stain. It has been reported, however, that are found to differ by measuring methods, but. A total of forty eight goat milk samples from eight farms were compared by pyronin Y-methyl stain, ADAM-SCC in National Institute of Animal Science, and Somacount 500 in Chungbuk Veterinary Service. The average SCC of the samples was $7.3\times10^5$ cells/mL by pyronin Y-methyl stain, $4.9\times10^5$ cells/mL by ADAM-SCC, and $11.6\times10^5$ cells/mL by Somacount 500. The correlations between the methods were not significant. SCC measuring equipment should be developed for reducing the SCC in goat milk, and pyronin Y-methyl green stain for estimating SCC in goat milk should be included in NVRQS Notice for livestock products processing and composition standards.

Key words: goat milk, somatic cell counts

## 서 론

축산물가공처리법 제2조 4항에서 “원유”라 함은 판매 또는 판매를 위한 처리 · 가공을 목적으로 하는 착유상태의 우유와 양유를 말하고, 제4조 2항의 규정에 의거 “원유의 위생등급기준”이 고시되어 있다(MIFAFF/NVRQS, 2002). “원유의 위생등급기준”에서 체세포수는 1급이 mL당 20만 미만, 2급이 20-35만 미만, 3급이 35-50만 미만, 4급이 50-75만 미만, 5급이 75만 초과로 규정되어 있어 산양유도 이를 준용해야 하나 국내 산양유의 체세포수 평균이 $1,559\times10^3$ cells/mL이므로 외국의 제도를 감안하여 1등급을 $1,000\times10^3$ cells/mL 이하로 개정되어야 한다고 주장된 바 있다(Shin *et al*., 2008). 그런데, 산양유의 체세포수는 측정방법에 따라 결과에 많은 차이가 있으며, 직접현미경검경법도 염색방법에 따라 2배 이상의 차이를 나타낸다고 보고된 바 있다. Dulin 등(1982)은 산양유의 체세포 측정법 비교에서 Pyronin-Y-methyl green stain에서 $3.40\times10^5$ cells/mL인 시료가 Fossomatic cell counter로 측정 시 $3.65\times10^5$ cells/mL, Wisconsin mastitis test에서 $4.94\times10^5$ cells/mL, Coulter counter에서 $6.44\times10^5$ cells/mL, Levowitz-Weber stain에서 $7.92\times10^5$ cells/mL로 나타났음을 보고하였다. 산양유에는 세포질 입자가 많기 때문에 DNA 특이적 세포 계수 방법(fluoro-optical electronic cell counter, DNA 특이 염색법을 이용한 체세포수 측정)만이 사용되어야 하며 pyronin Y-methyl green 염색법이 미국(Packard *et al.*, 1992)에서 뿐만 아니라 국제적인 공인 염색법으로 사용되고 있다(IDF, 1981; ISO, 1997).

본 연구에서는 국내산 산양유의 체세포수를 공식염색법인 pyronin Y-methyl green stain, 2008년 보고에 사용된 Somacount 500(Bentley Instruments, USA), 세포 핵 염색방법인 PI(propidium iodide) stain method를 사용하는 ADAM-SCC(Digital Bio technology, Korea)로 측정하여 결과를 비교하였다.

*Corresponding author : Jun-Sang Ham, National Institute of Animal Science RDA, Suwon 441-706, Korea. Tel: 82-31-290-1692, Fax: 82-31-290-1697, E-mail: hamjs@korea.kr

## 재료 및 방법

### 산양유 시료

(주)엠젠에 납유하는 8개 목장의 집합유를 2009년 1월부터 8월까지 3회에 걸쳐 총 48시료를 수집하여 충청북도 축산위생연구소에 체세포수 분석을 의뢰(Somacount 500, Bentley Instruments, USA)하였으며 동일한 시료를 직접검경법과 ADAM-SCC로 체세포수를 측정하였다.

### Pyronin Y-methyl Green Stain

0.01 mL의 산양유를 취하여 슬라이드글라스 위에 직경 10-mm 원 모양으로 도말하고 40-45°C에서 건조한 후에 염색법(FDA)에 따라 염색하였다. 간략하게, Carnoy's 고정액(60 mL 클로르포름, 20 mL 빙초산, 120 mL 에틸알콜 혼합)에 5분, 50% 에탄올 1분, 30% 에탄올 1분, 증류수 1분, pyronin Y-methyl 염색액(1.0 g pyronin Y, 0.56 g methyl green, 196 mL 증류수를 혼합하고 사용전 Whatman No.1으로 여과하고 갈색병에 보관) 6분, N-부틸알콜과 xylene으로 각각 신속히 세척후 건조하여 현미경(Zeiss, Germany)으로 관찰하였다. 시료당 10개의 화면에서 체세포수를 계수하여 화면의 면적×10으로 나누고 78.5(원의 면적)와 100(1 mL로 환산)을 곱하여 1 mL당 체세포수를 계산하였다.

### ADAM-SCC

산양유 0.1 mL을 전용 시약이 담긴 튜브(Digital Bio Technology, Korea)에 첨가하여 혼합한 후 전용 플라스틱 칩에 눈금 선까지 시료를 주입하고 ADAM-SCC에 장착하여 결과를 출력하였다.

### 통계분석

측정된 산양유의 체세포수 자료는 SAS EG프로그램(SAS, EG 3.0, Cary, NC)의 일원분산분석으로 분석하였으며, 처리구간 평균은 Duncan의 다중검정을 이용하여 유의성을 검정하였다.

## 결과 및 고찰

분석 방법에 따른 산양유의 체세포수는 Table 1과 같다. Pyronin Y-methyl green stain으로 측정 시 48시료의 평균 체세포수는 $7.3\times10^5$ cells/mL이었으며, 최대값, 최소값은 각각 17.7과 $2.3\times10^5$ cells/mL이었다. 그런데, 축산위생연구소에 의뢰하여 측정한 체세포 값은 평균 $11.6\times10^5$ cells/mL이고 최대값, 최소값은 각각 22.8과 $5.0\times10^5$ cells/mL로 나타났다. 이는 이전에(Shin *et al.*, 2008) 보고되었던 전체 평균 $15.6\times10^5$ cells/mL보다 높으며 봄철 평균인 $11.1\times10^5$과 유사한 수준이다. 따라서, Somacount 500에 의한 산양유의 체세포 측정시 pyronin Y-methyl green stain에 의한 직접검경법보다 약 1.6배 과대평가되는 것으로 생각된다. Somacount 500의 측정원리는 Laser-based flow cytometry (Bentlyinstrument)로써 Fossomatic cell counter와 유사하다. Fossomatic cell counter 같은 fluor-optical electronic 세포계수에서 산양유 시료는 40°C에서 1-5일 후에 분석하여야 하며, 신선한 시료는 DNA를 ethidium bromide로 염색하기 위해 60°C에서 15분 가열이 필요하다(Miller *et al.*, 1986)고 주장하였다. 반면, ADAM-SCC에 의한 분석 시 산양유 시료의 평균 체세포수는 $4.9\times10^5$ cells/mL이고 최대, 최소값은 각각 13.5와 $0.7\times10^5$ cells/mL을 나타내어 직접검경법보다 2/3으로 과소평가되는 것으로 나타났다.

**Table 1. Comparison of methods for estimating somatic cell count in goat milk.**

| Method | No. of cells ($\times10^5$/mL) | Max. | Min. |
|---|---|---|---|
| Pyronin Y-methyl green stain | 7.3±2.5[b] | 17.7 | 2.3 |
| Somacounter 500 | 11.6±3.8[a] | 22.8 | 5.0 |
| ADAM-SCC | 4.9±3.9[c] | 13.5 | 0.7 |

[a-c] Means with different superscripts in the same column represent significant difference at $p<0.01$.

ADAM-SCC는 세포핵을 염색한 후에 CCD 카메라로 90장의 형광이미지를 판독하는 장비(Digital Bio, 2009)로서, 우유 체세포 분석의 경우 수의과학검역원에서 성능 유효성을 인증받은 바 있다(직접검경법과 $R^2=0.95$). 그런데, 산양유의 경우 ADAM-SCC로 측정한 체세포수와 pyronin Y-methyl green stain으로 측정한 체세포수간에 상관관계가 인정되지 않았다($R^2=0.0011$, Fig. 1).

Somacount 500의 경우도 직접검경법과 상관관계가 인정되지 않았다($R^2=0.0522$, Fig. 2). 체세포 측정장비를 구비하지 못한 산양유 가공업체는 축산위생연구소에 체세포 측정을 의뢰하고 있는 바, Somacount 500에 의해 과대평가되는 체세포수에 의해서는 "원유의 위생등급기준"을 적용하기는 어려울 것으로 생각된다. Somacount 500과

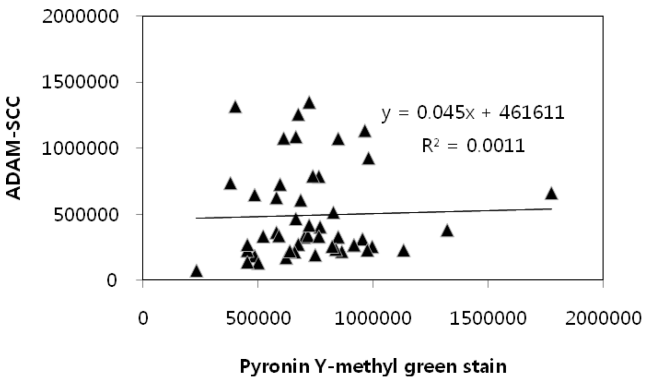


**Fig. 1. Correlation between the somatic cell count measured by pyronin Y-methyl green stain and ADAM-SCC.**

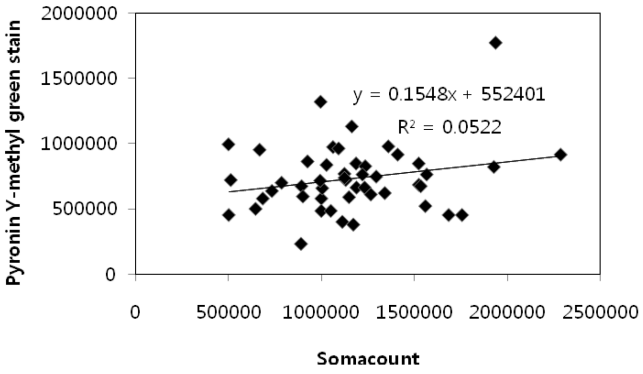


**Fig. 2. Correlation between the somatic cell count measured by pyronin Y-methyl green stain and Somacount 500.**

ADAM-SCC는 모두 우유의 체세포 측정에 널리 이용되는 장비이나 두 장비간의 상관관계 도 인정되지 않았다 ($R^2$=0.0241, Fig. 3).

"축산물의 가공기준 및 성분규격"(MIFAFF/NVRQS, 2008)에서는 원유중 체세포수 측정법으로 직적현미경검사법을 규정하고 있으며 이 방법과 95% 이상의 상관관계를 나타내는 기기이용법을 적용할 수도 있다고 규정하고 있다. 그런데, 염색액으로는 NewMan 염색액을 규정하고 있어 산양유에는 적용되기 어려울 것으로 생각된다. NewMan 염색법은 염색액으로 메틸렌블루를 사용하는데 우유에서는 Levowitz-Weber 변형법으로 사용되며 산양유에서는 pyronin Y-methyl stain보다 2배 이상 과대평가된다고 보고되었기 때문이다(Dulin *et al.*, 1982). 체세포수의 공식측정방법으로 직접검경법이 규정되어 있으나 직접검경법은 시간과 노력이 많이 소요되는 관계로 원유의 품질관리에 적용하기는 어려우며, 실제에 있어서는 기기적 측정법이 널리 이용되고 있다. 따라서, 산양유의 체세포 측정에 사용할 수 있는 장비의 개발이 필요하며 이를 위해서는 "축산물의 가공기준 및 성분규격"의 염색액에 pyronin Y-methyl stain도 추가로 규정해야 할 것으로 생각된다.

산양유에는 자연적으로 체세포수가 높으며 비감염적 원인으로 체세포수가 증가하므로 체세포수가 유방염을 예측

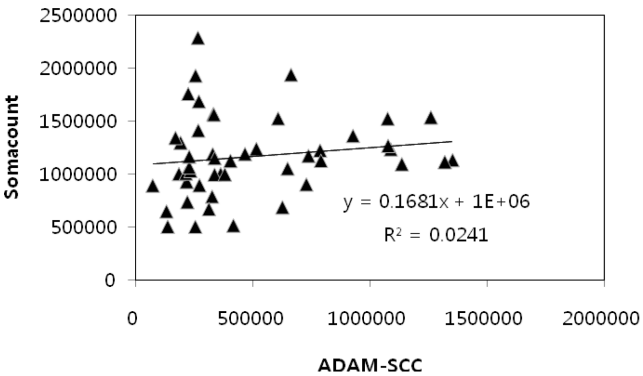


**Fig. 3. Correlation between the somatic cell count measured by ADAM-SCC and Somacount 500.**

하는데 적절한 방법이 아니라고 주장하는 연구자들도 있으며(Haenlein and Hinckley, 1995), EU에서 산양농가 원유의 법적 체세포수 기준도 아직 규정되지 않고 있다. 그런데, 우리나라 축산물가공처리법에서 규정한 원유의 범위에 산양유가 포함된다고 생각되나 "원유의 위생등급기준"(MIFAFF/NVRQS, 2002)을 산양유에 적용하기에는 기준이 너무 엄격하므로 산양유의 적용을 유예하거나 별도의 기준을 마련해야 할 것으로 생각된다.

## 요 약

산양유의 체세포수는 측정방법에 따라 많은 차이가 보고되고 있으나 국제적인 표준방법으로 pyronin Y-methyl green stain에 의한 직접현미경법이 사용되고 있다. 8개 목장 총 48개 시료를 pyronin Y-methyl green stain에 의한 직접검경법, 국립축산과학원에서 보유중인 ADAM-SCC, 충청북도 축산위생연구소에서 보유중인 Somacount 500으로 측정하여 결과를 비교하였다. Pyronin Y-methyl green stain 측정시 전체 평균은 $7.3\times10^5$ cells/mL인 반면 ADAM-SCC와 Somacaount 500은 각각 $4.9\times10^5$과 $11.6\times10^5$ cells/mL로 나타나 과소 또는 과대평가되는 결과를 보였다. 직접현미경법과 ADAM-SCC또는 Somacaount 500과의 상관계수는 각각 0.0332 또는 0.2285로 매우 낮으며 장비간의 상관계수도 0.1552로 매우 낮게 나타났다. 산양유의 체세포수 저감을 위해서는 측정장비의 개발이 필요하며 장비를 표준화하기 위한 표준측정법으로 pyronin Y-methyl green stain의 채택이 필요하다.

## 참고문헌

1. Bently Instrumnets. Somacount 300 & 500: High volume instruments that deliver exceptional precision. Available from: http://www.bentleyinstruments.com/PDFs/Soma300500.pdf. Accessed Feb. 10. 2010.
2. Digital Bio. ADAM-SCC. Available from: http://www.digital-bio.com/product/product01_1.php. Accessed Feb. 10. 2010.
3. Dulin, A. M., Paape, M. J., and Wergin, W. P. (1982) Differentiation and enumeration of somatic cells in goat milk. *J. Food Prot*. **45**, 435-439.
4. Food and Drug Administration. Direct microscopic somatic cell count. Available from: http://www.fda.gov/downloads/AboutFDA/ReportsManualsForms/Forms/UCM071153.pdf. Accessed Feb. 10. 2010.
5. Haenlein, G. F. W. and Hinckley, L. S. (1995) Goat milk somatic cell count situation in USA. *Int. J. Anim. Sci.* **10**, 305-310.
6. IDF. (1981) Laboratory methos for use in mastitis work. Bulletin No. 132. International Dairy Federation, Brussels.
7. ISO. (1997) Milk – Enumeration of somatic cells-Part 1: Microscopic. ISO13366. International Standards Organiza-

tion, Geneva.
8. Miller, R. H., Paape, M. J., and Action, J. C. (1986) Comparison of milk somatic cell counts by Coulter and Fossomatic Counters. *J. Dairy Sci.* **69,** 1942-1946.
9. Packard Jr., V. S., Tatini, S., Fugua, R., Heady, J., and Gilman, C. (1992) Direct microscopic methods for bacteria or somatic cells. In: Methods for the examination of dairy products, R. T. Marshall, ed., 16th ed. Am. Public Health Assoc., Washington, DC. pp. 309-321.
10. Shin, J. H., Jeong, S. G, Han, G. S., Jang, A., Chae, H. S., Yoo, Y. M., Ahn, J. N., Woo, K. T., Choi, S. H., Lee, W. K., and Ham, J. S. (2008) Study on the somatic cell count grade of goat milk in Korea. *Korean J. Food Sci. Ani. Resour.* **28**, 574-579.
11. MIFAFF/NVRQS (2002) Raw milk sanitation grading Standards (NVRQS Notice 2002-4).
12. MIFAFF/NVRQS (2008) Livestock products processing and composition Standards (NVRQS Notice 2008-27).

(Received 2009.10.11/Revised 1st 2010.2.9,
2nd 2010.2.10/Accepted 2010.2.10)