

수산식품의 신선도검사를 위한 Biosensor제조에 관한 연구

유미영 · 김경환 · 이재우* · 양지영†

부경대학교 식품생명공학부/수산식품연구소

*창원전문대학 식품과학계열

Study on Manufacture of Enzyme Biosensor for Fishery Freshness

Mi-Young Yoo, Kyoung-Hwan Kim, Jae-woo Lee* and Ji-Young Yang†

Faculty of Food Science and Biotechnology/Institute of Seafood Science,

Pukyong National University, Busan 608-737, Korea

*Department of Food Preparation, Changwon College, Changwon 641-771, Korea

서론

식품의 신선도관리는 매우 중요한 관리기준이 되어가고 있다. 최근 소비가 증대되고 생활유형이 대량화, 편리성이 강조되면서 대량유통의 형태로 점점 식품의 소비가 증대되어지고 있다. 특히 냉장냉동식품의 소비가 증대되면서, 이들 식품의 유통 중 관리상태에 따라 그 신선도의 차이에 매우 큰 영향을 받게 된다. 채소류, 과일류, 육류, 생선류등 이들 제품의 경우 특히 다른 가공식품들에 비해 그 신선도의 유지는 매우 중요하며 식품의 종류, 성분등에 따라 신선도의 관리기준은 다르게 판단되고 있다. 특히 생선류는 원료 그대로 또는 가공원료로서 이용되어지는데 특히 선도의 유지는 매우 중요한 품질요건이 된다. 어패류로 인한 식중독뿐 아니라 선도가 저하된 원료의 사용시 가공처리상에도 여러 문제점을 일으키며 가공제품의 품질에도 큰 영향을 미치게 된다.

수산물은 원료적 성분에 기인된 취약성 때문에 선도가 빨리 저하되어 부패되기 쉬운 특성을 갖고 있어 대부분 관능적 평가에 의해 선도를 평가하게 된다. 그러나, 최근 200해리 경제수역, 원양어장의 어업규제, 연근해 어장의 수산물 감소 등으로 인해 주로 외국에서 수입되어지고 있으며, 대량유통체제를 통한 원료의 유통뿐 아니라 수산가공품을 제조함에도 원료의 최저선도한계를 결정함에 있어 선도판정법은 매우 중요하게 검토되어야 하는 사항이다. 따라서 쉽게 부패되는 원료의 특성을 고려하여 불매 현장에서 가급적 빠른 시간 안에 선도의 판정을 나타낼 수 있는 방법이 필요하게 된다.

이러한 빠른 선도판정을 위한 한가지 방법으로서 biosensor를 이용하여 생선류의 선도판정에 대한 분석법 등

이 연구되어지고 있고 일부 상품화되어지고 있는 제품들도 있어 본 고에서는 biosensor를 이용한 생선류의 선도판정의 원리 및 기술개발 현황을 소개하고 biosensor에 의한 실험결과를 일부 소개하고자 한다.

수산물의 신선도측정의 중요성

수산물에서 신선도의 정의는 복합과정에 의해 진행되는 상태로써 한마디로 정의하기는 매우 힘들다. 통상 <인간의 건강상 안전성, 영양성, 기호성이 가장 우수한 상태>를 말하며, 어류의 사후강직현상 후 숙성과정을 통해 핵산물질이 IMP로 전환되는 과정이 지나면 부패과정을 거치게 된다. 즉, 생물학적, 화학적 변화에 의해 생성된 화합물을 지표로 하여 부패의 단계를 단순히 정의하기란 매우 힘든 측면이 있다.

생선류의 경우 다른 식품과는 달리 탄수화물이 적고 단백질이 많은 식품으로서 이로 인한 신선도의 저하가 크게 우려되고 있다. 또한, 생선류에 들어 있는 핵산물질들은 숙성과 부패라는 과정을 거치면서 변화되는 성분으로서 그 변화된 정도에 따라 구분되어야 하는 특성을 동시에 갖고 있는 식품이므로 수산물의 신선도 측정은 수산물로 발생할 수 있는 식중독의 관리를 위해 필요하다. 통상 관능적으로 선도를 판별하나 외관상 선도가 양호하여도 유리 histidine이 미생물증식에 의해 생성된 histamine의 경우 알레르기성 식중독을 일으키게 된다. 따라서, 관능적 평가뿐 아니라 식중독미생물검출법, histamine의 검출법과 같은 분석도 필요하게 된다(1).

또한, 생선류는 가공원료로 사용되어지는데 원료의 선도가 가공제품의 품질에 매우 큰 영향을 미치게 된다. 이

†Corresponding author. E-mail: jyayang@pknu.ac.kr
Phone: 051-620-6419, Fax: 051-622-9248

렇게 원료육의 선도판리는 적절한 원료량의 확보 및 처리 능력에 따른 원료량의 결정 등 합리적 공장운동을 위해서는 원료의 선도판정이 반드시 필수적으로 따르게 된다. ATP가 가수분해되는 정도는 K값에 의해 결정되어지는 판별법으로서 가공육의 경우 K값보다는 VBN값으로 초기부패를 판별하는 것이 적절한 방법으로 알려져 있으며 K값의 경우 선어(횡감)로서의 선도판정에 적절한 판별법으로 알려져 있다(2).

수산물은 한정된 시기와 장소에서 생산되어지고 생산량의 변동이 매우 크며, 부패하기 쉬운 특성을 지니고 있다. 이러한 수산물의 유통영역을 넓히고 이용기간을 연장시키며 어획물을 효율적으로 관리한다는 측면에서는 신속하고 정확한 신선도 측정법의 개발은 매우 중요한 관심 분야이다.

표 1은 신선도측정법에 따른 수산물의 부패와 관련된 지표들을 정리한 것이다.

신선도 측정 방법

생선류의 부패는 매우 복잡한 기작에 의해 진행되는 것으로 알려져 있다. 해당과정, 단백질변성 및 분해, 지질의 산화 등이 각각 다른 반응속도로 진행되고 그 결과 세균증식이 활발해지면 균에서 생성된 효소가 반대로 여러 화학반응에 관여하게 된다. 따라서, 화학반응의 결과 생성 또는 소멸되는 물질을 분석함으로써 생선류의 상태를 알 수 있다. 이러한 지표를 화학적 지표라 하며, 휘발성염기질소(VBN), K 값등이 포함된다. 이에 반해 생물학적 지표로서 생균수를 들 수 있으며 물리적 지표로서는 세포내액의 용출이 어육의 전기저항에 변화를 주는 것으로 간주하여 어육의 전기저항치를 들 수 있다. 이러한 지표들은 어떤 경우라도 관능검사의 결과와의 상관성을 구하는 것이 필요하다. 선도지표를 측정할 수 있는 지표를 최근 藤井建夫(9)에 의해 나누어 보면 1) 단일성분 또는 단순한 반응계에 의해 생성된 복합성분을 지표로 하는 경우 : VBN 측정법, TMA 측정법, polyamine 측정법, K값, 유기산 측정법 2)

복합반응계가 관여한 결과를 지표로 하는 경우 : 관능검사법, 전기저항 측정법, 생균수 측정법, 완충능센서법, 비파괴형선도 측정센서법 3) 양식어의 건강진단용 센서 4) 복합지표를 이용한 선도평가시스템 4) 기타 : 근원섬유단백질의 염용해성, ATPase 활성 측정법 등을 들 수 있다(3-16).

수산물 신선도 측정의 원리

수산물의 신선도 측정은 여러 가지가 있으나 그림 1에서와 같이 VBN이나 TMA의 측정법보다도 K값의 측정이 신선도를 측정함에 더 적절함을 알 수 있다. 이러한 K값은 어육 중 핵산관련물질의 변화에 기인하는 것으로 어육 중의 ATP가 그림 2와 같이 변화하게 된다(17-27).

K값으로 나타내는 신선도측정법은 어육의 근육 중에 있는 ATP가 분해되어 생성된 생성물들의 함량을 나타낸 정도를 나타낸다. 일반적으로 어육의 사후강직 및 숙성 중 ATP를 ADP, AMP, IMP로 분해시키게 되며 부패과정 중 inosine은 IMP dehydrogenase(IMPDH)에 의해 hypoxanthine(HxR)으로 분해되고 hypoxanthine(Hx)은 nucleoside phosphorylase(NP)에 의해 xanthine으로 분해되고 xanthine은 xanthine oxidase(XO)에 의해 uric acid로 분해된다(28-30). 따라서 K값을 효소법에 의해 구하고자 할

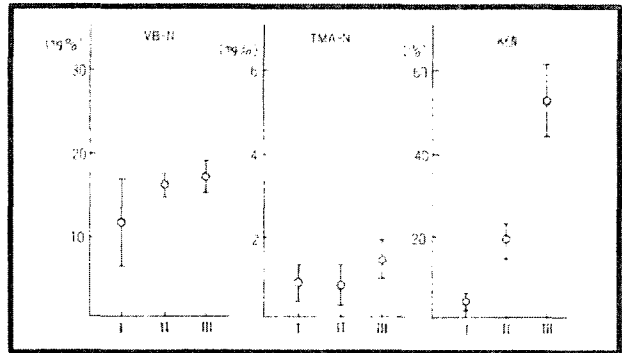


그림 1. 각종 신선도 측정법의 비교

I: 사후직후 어육 II: 고급일식당의 어육 III: 대중일식당의 어육

표 1. 신선도 측정법에 따른 수산물의 부패판정의 일반적 기준

원리	방법	사료상태		비고
		신선한 것	부패한 것	
물리적	관능	신선	부패	객관적 판정
	pH	7.1	5.6	시료 전처리가 필요
화학적	VBN	9 mg/100 g	85 mg/100 g	전처리 시간이 길다
	TMA	2 mg/100 g	7 mg/100 g	
	K-value	18%	54%	
	histamine	5 mg/100 g	95 mg/100 g	
세균학적	배양법	2.0×10^1	3.5×10^7	측정시간이 오래 걸리고(2~3일) 준비작업이 복잡

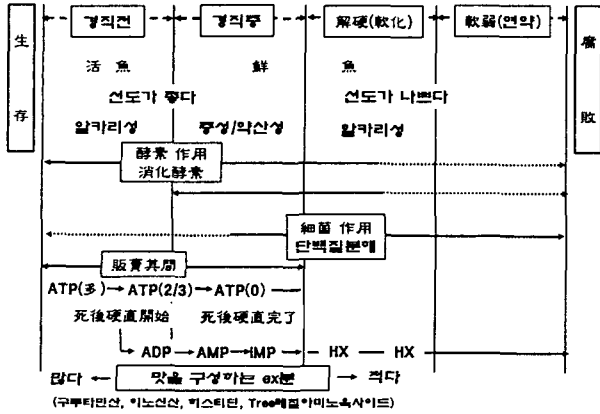


그림 2. 어육의 사후강직 및 부패 과정중 ATP관련물질의 변화

경우 3가지 효소가 관여하게 되는 것이다. 따라서 K값은 아래와 같은 식으로 계산한다.

$$K값(\%) = [(HxR + Hx) / (ATP + ADP + AMP + IMP + HxR + Hx)] \times 100$$

이 값은 작을수록 선도가 좋으며 클수록 선도가 저하됨을 나타내는 것으로서 현재까지 어육의 신선도를 나타내는 지표로 널리 사용되고 있다. 그러나 그 방법이 복잡하여 일반적으로 숙달되지 않으면 안되는 방법으로서 숙달자가 분석을 하여도 2내지 3시간 정도가 소요된다. 또한 그 분석비용도 일본의 경우 7,000엔에서 8,000엔 정도가 들게되므로 단가가 높지 않은 생선류의 경우 이 분석법으로 분석하기에는 좀 무리가 있는 형편이다. 그러나 선도유지에 신경을 써서 판매하는 유통업자, 수산가공업자를 비롯하여 수산관련 시험연구소 및 기관 등에서는 신선도를 수치화할 수 있는 K값을 간단히 측정할 수 있는 방법들에 많은 관심을 갖게 된다.

K값을 측정하기 위해 ATP 가수분해물의 측정을 위한 방법으로는 고속액체크로마토그래피나 간이컬럼법을 사용하는 분리법과 UV법, 비색법, 선도시험지법, 효소전극법을 사용한 효소법으로 구분할 수 있는데, 반응의 특이성과 신속성 때문에 최근 효소법을 이용한 방법에 대한 연구 결과들이 보고되고 있다.

Biosensor의 중요성

일반적인 신선도 측정법은 방법이 복잡하거나 시간이 오래 걸리는 단점이 있다. 최근 효소고정화기술 등이 발전하면서(31-34) 어류의 신선도에 영향을 주는 효소들을 이용하여 선도지의 형태로 일본에서 수입하여 시판되고 있으며 최근에는 효소전극을 이용한 선도측정장치개발에 관한 연구보고가 증가하는 상태이다(7-10,13,14). 그림 3은 선도지의 측정방법에 대한 개요이며 그림 3과 그림 4는

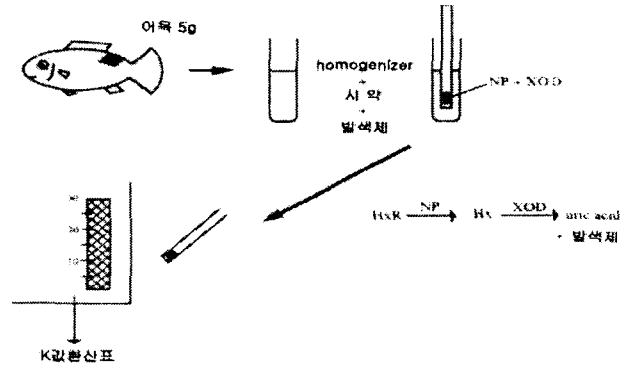


그림 3. 신선도 선도지에 의한 어육선도 측정과정

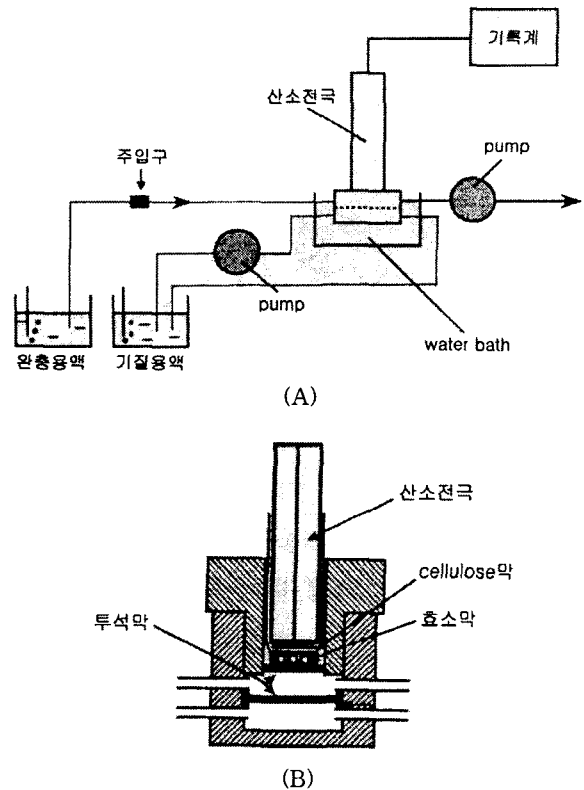


그림 4. Biosensor에 의한 어류신선도 측정장치의 개요 (A): 전체 시스템 (B): Flow cell의 구조

biosensor의 측정개요를 나타내고 있다. 두 장치 모두 K값과 관련이 있는 효소들을 이용하고 있다. 이러한 장치들은 고가이나 반응에 특이성이 있으며, 신속한 특징을 지니고 있어 향후 어류의 선도관리에 많이 사용되는 방법으로 고려되어지고 있다. 그러나 국내에서는 아직 그 연구가 초기 단계에 있으며 대량 소비추세를 고려하여 볼 때, 어류유통에 있어 반드시 국내개발을 고려해야할 기술로 여겨진다.

어류 신선도측정을 위한 Biosensor의 제조 및 결과

선도지 제조 및 선도 측정 결과 : 어류의 신선도 측정

을 위하여 xanthine oxidase와 nucleoside phosphorylase는 Sigma사로부터 구입하여 사용하였으며 발색제 및 반응안정제를 사용하여 크로마토그래피 여지에 효소를 고정화시켜 선도지를 제조하였다. 어육 시료 0.2 g에서 0.5 g을 취하여 시료량의 10배 정도 전처리액을 첨가 후 시료를 분쇄시킨 후 용액을 제조한 선도지에 떨어뜨려 10분간 실온에 방치 후 발색정도를 표준곡선에 비교하여 K값을 계산하였다. 그림 5는 IMP 표준용액에 대한 선도지측정법에 의한 발색관계를 나타낸 결과로서 상관계수 0.9654로서 매우 높은 상관관계를 보여주고 있다. 따라서 제조한 선도지에 의한 발색정도는 IMP의 농도에 비례함을 알 수 있었다. 그림 6은 간이컬럼을 사용하여 흡광도를 재는 방법과 선도지를 사용하여 측정된 방법에 의한 K값들에 대한 상관관계를 나타낸 것으로 상관계수 0.9937로 높은 값을 나타내었다. 한 시료측정을 일반흡광도에 의한 분석할 경우 4시간 정도가 소요되는 것에 반해 선도지에 의한 방법은 30분 정도가 소요되어 매우 유용한 방법임을 알 수 있었다.

효소를 이용한 바이오센서의 제조 및 선도 측정 결과 : K값과 관련된 3가지 효소 IMP dehydrogenase, nucleo-

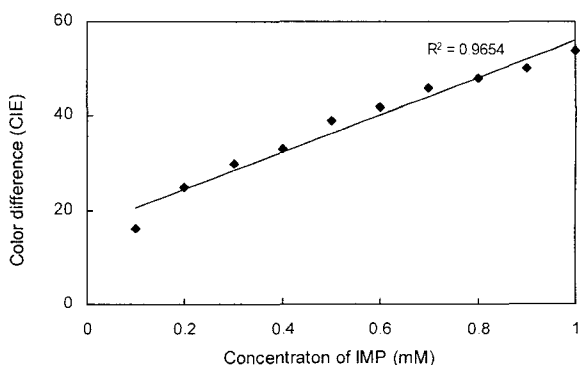


그림 5. 핵산물질 IMP에 대한 선도지 발색과의 상관관계

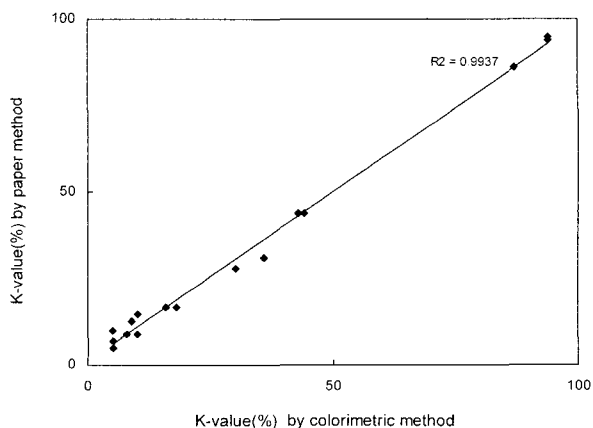


그림 6. K값 측정을 위한 일반분광법에 대한 선도지분석법의 상관관계

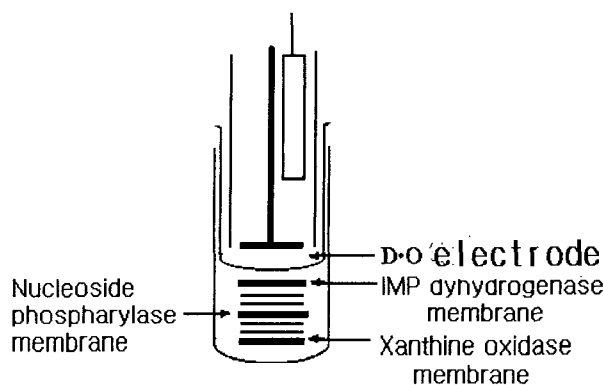


그림 7. 어류신선도 biosensor 전극의 개요

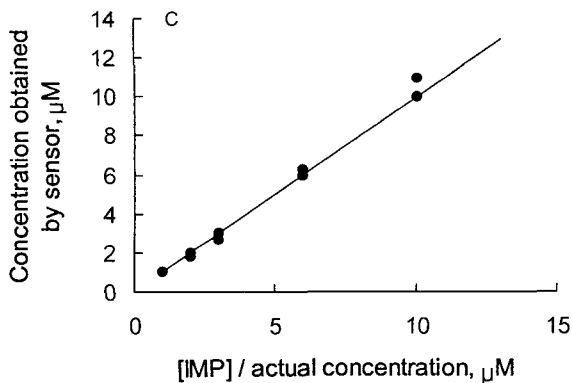
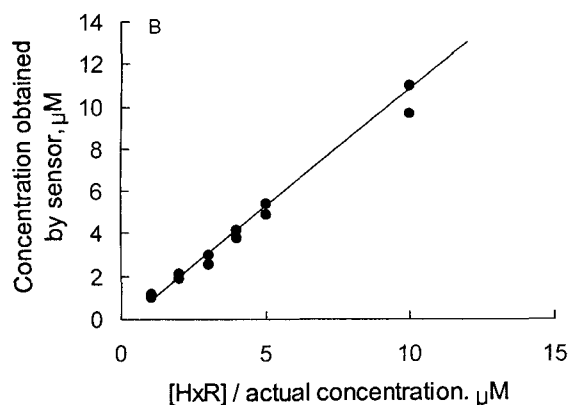
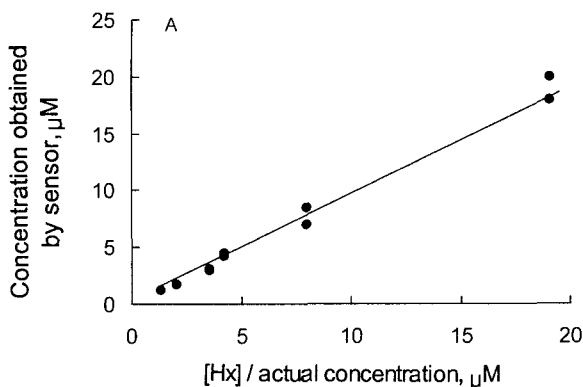


그림 8. 효소 biosensor에 의한 ATP 분해 관련 물질의 정량 곡선

side phosphorylase, xanthine oxidase를 membrane에 고정화시킨 후 이를 조합하여 산소전극에 그림 7과 같이 biosensor를 제조하여 선도측정을 행하였다. 그림 8은 ATP 가수분해물인 hypoxanthine, xanthine, uric acid를 biosensor를 이용하여 측정한 결과로서 직선의 상관관계를 보여주었으며 실제농도와 일치하는 값을 나타내었다. 이 방법은 선도지와는 달리 산소전극을 이용한 방법으로 효소막의 안정성 및 완충용액등의 측정조건에 따른 calibration curve를 주기적으로 확인할 필요성이 있다.

결 론

우리나라를 비롯하여 일본의 경우 수산물을 횡감으로 먹는 국가로서 매년 5월에서 10월 사이에는 식중독의 발생이 빈번한 시기로서 수산물의 과학적인 선도관리는 매우 중요한 비중을 차지하게 된다. 또한, 수산물의 자원고갈과 더불어 국외로부터 수입되는 물량이 증가하게 되고 이에 원료의 보관 운송 중 어육의 선도 저하는 위생적인 측면 외에도 수산가공품의 제조에 있어 품질에도 미치는 영향이 크다 하겠다. 그럼에도 관능적인 평가에 의해서만 관리되고 있는 현실을 비추어 볼 때 보다 신속하고 과학적이며 경제성이 있는 분석법의 개발은 매우 시급한 과제이기도 한 것이다. 최근 biosensor의 관심 및 연구가 활발해지면서 수산물의 선도측정을 위한 연구들이 보고되고 있고 특히, 일본의 경우 선도지 뿐 아니라 biosensor장치의 판매도 이루어지고 있는 실정이다. 우리 나라의 경우, 대형유통업체 및 가공식품업체에서 선도유지를 위해 사용중에 있으나 선도지의 경우 공급이 안정적이지 않으며 biosensor장치의 경우 고가로 판매되고 있는 단점을 갖고 있다. 본 연구에서는 상품화 단계는 아니지만 효소고정화법에 의한 선도지 및 biosensor를 이용하여 선도의 측정에서 신뢰성이 있음을 알 수 있었으나 아직도 해결해야 할 과제들은 많이 남아있다 하겠다.

감사의 글

본 논문은 2000학년도 부경대학교 기성회 학술연구비 지원 및 2002년 BB21 사업 지원에 의해서 수행되었습니다.

참 고 문 헌

1. Yokoyama Y. 1994. Postmortem changes of ATP and its related compounds and freshness indices in spear squid *Doryteuthis bleekeri* muscles. *Fisheries Sci* 60: 583-587.
2. 박영호, 장동석, 김선봉. 1997. 수산가공이용학. 형설출판사. p 399.
3. Tsuchimoto M, Misima T, Utsugi T, Kitajima S, Yada S and Yasuda M. 1985. Method of quantitative analysis of ATP related compounds on the rough sea-method of high-performance liquid chromatography using reversed-phase column. *Bull Jap Soc Sci Fisheries* 51: 1363-1369.
4. Suwetja IK, Hori K, Miyazawa K and Ito K. 1989. Changes in content of ATP-related compounds, homarine, trigonelline in marine invertebrates during ice storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 559-566.
5. Watanabe E, Endo H, Hayashi T and Toyama K. 1986. Simultaneous determination of hypoxanthine and inosine with an enzyme sensor. *Biosensors* 2: 235-244.
6. Hu S and Liu CC. 1997. Amperometric sensor for fish freshness based on immobilized multi-enzyme modified electrode. *Electroanalysis* 9: 1229-1233.
7. 박성현, 권태하. 1993. 생선의 신선도 측정을 위한 반도체 센서. *어업기술* 29: 263-269.
8. 太田靜行. 1990. 水産物の 鮮度保持. 筑波書房. p 40.
9. 渡邊悦生. 1998. 魚介類の 鮮度と 加工,貯藏. 成山堂書店. p 61.
10. Li NH. 1994. Development of a trimethylamine gas biosensor system. *Biosensors and Bioelectronics* 9: 593-599.
11. 山中英明. 1989. 高速液體クロマトグラフィによる赤身魚中のホリアミン類の同時定量及び鮮度の判定. *食衛誌* 30: 396-400.
12. Yamanaka H. 1989. Cadaverine as a potential index for decomposition of Salomonid fishes. *J Food Hyg Soc Japan* 30: 170-174.
13. Karube I. 1984. Determination of fish freshness with an enzyme sensor system. *J Agric Food Chem* 32: 314-319.
14. 李寧俊. 1992. 魚介鮮度計測用pHセンサシステムの試作. *日水誌* 58: 2039-2044.
15. Ohashi E. 1991. Characterization of common squid using several freshness indicator. *J Food Sci* 56: 161-163.
16. 山中英明. 1995. 高速液體クロマトグラフ, 魚介類の鮮度判定と品質保持, 渡生編. 恒星社厚生閣, 東京. p 16-17.
17. Watabe S. 1991. Post-mortem changes in ATP, creatine phosphate, and lactate in sardine muscle. *J Food Sci* 56: 151-153.
18. Iwamoto M. 1987. Effect of storage temperature on rigor-mortis and ATP degradation in plaice *Paralichthys olivaceus* muscle. *J Food Sci* 52: 1514-1517.
19. Iwamoto M. 1988. ATP and creatine phosphate breakdown in spiked plaice muscle during storage, and activities of some enzymes involved. *J Food Sci* 53: 1662-1665.
20. Watabe S. 1989. Rigor-mortis progress of sardine and mackerel in association with ATP degradation and lactate accumulation. *Nippon Suisan Gakkaishi* 55: 1833-1839.
21. Seki N, Watanabe T. 1984. Connectin content and its post-mortem changes in fish muscle. *J Biochem* 95: 1161-1167.
22. Ando M. 1991. Validity of a punctuative test for evaluating the change in muscle firmness of fish during ice

- storage. *Nippon Suisan Gakkaishi* 57: 2341.
23. Ando M. 1991. Post-mortem tenderization of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle caused by gradual disintegration of the extracellular matrix structure. *J Sci Food Agric* 55: 589-597.
24. Sato K. 1997. Involvement of Type V Collagen in softening of fish muscle during short-term. *J Agric Food Chem* 45: 343-348.
25. Sato K. 1991. Type V collagen in trout (*Salmo gairdneri*) muscle and its solubility change during chilled storage of muscle. *J Agric Food Chem* 39: 1222-1225.
26. 山下倫明. 1994. 産卵期サケの肉質軟化機構に関する研究. *日水誌* 60: 439-442.
27. Toyohara H. 1993. Elevated activity of cathepsin L-like protease in the jellied meat of Japanese Flounder. *Nippon Suisan Gakkaishi* 59: 1909-1914.
28. Ling L. 2001. Xanthine oxidase, B180 medical laboratories free radical and radiation biology program. The University of Iowa.
29. Choi HS. 1998. Purification and partial characterization of purine nucleoside phosphorylase from *Serratia marcescens*. *Biosci Biotechnol Biochem* 62: 667-671.
30. 방선권, 신종란, 최병범. 2000. *Serratia marcescens* purine nucleoside phosphorylase의 정제와 특성. *Kor J Appl Microbiol Biotechnol* 28: 251-257.
31. 홍성현, 김태진, 정용섭, 김승욱, 윤정원. 1995. 바이오센서용 CTA와 PCL 혼합막에의 효소고정화 기법의 개발. *한국생물공학회지* 10: 468-474.
32. 양지영, 정영희. 2001. 미생물자원을 이용한 Biosensor. *식품산업과 영양* 6: 15-20.
33. 정윤수. 1994. Biosensor. *도서출판고려의학*. p 91.
34. 渡生. 1992. GTPおよびGOT活性計測用酵素センサの開発. *日水誌* 56: 1493-1498.