

Photostimulated luminescence-thermoluminescence 분석체계를 이용한 조사 처리된 건어류의 luminescence 판별 특성

김문영 · 김귀란 · 안재준 · 박건상¹ · 김은정¹ · 이경진¹ · 권중호*
경북대학교 식품공학부, ¹식품의약품안전청

Luminescence Detection Characteristics for Irradiated Dried Fishes Using PSL-TL System

Moon-Young Kim, Gui-Ran Kim, Jae-Jun Ahn, Kun-Sang Park¹, Eun-Jeong Kim¹,
Kyung-Jin Lee¹, and Joong-Ho Kwon*

School of Food Science & Biotechnology, Kyungpook National University

¹Korea Food & Drug Administration, Osong Health Technology Administration Complex

Abstract Photostimulated luminescence (PSL) and thermoluminescence (TL) analyses were conducted for the detection of different irradiated dried fishes. All the non-irradiated samples provided PSL counts of lower than 700 (negative: T₁). Clear identification of irradiated sample was only possible for irradiated anchovy with PSL counts >5000; however, the results were unsatisfactory (not positive) for irradiated cod, dried filefish, hairtail, and herring samples. The contaminating silicate minerals were obtained by density separation or acid hydrolysis to perform TL analysis, which resulted in a low intensity of TL glow curve with a maximum peak after 250°C for the non-irradiated samples that are irrespective of their kinds and methods for the mineral separation. The TL glow curves of high intensity with maximum peak in the temperature range of 150-250°C were observed for all the irradiated samples. However, better results of TL glow curves and particularly of the TL ratio (TL₁/TL₂) were obtained when the minerals were separated by an acid hydrolysis method.

Keywords: dried fish, irradiation, detection, luminescence, acid hydrolysis

서 론

최근 식생활의 변화로 건어류 및 수산가공품의 수요가 증가되고 있다. 이들 제품의 원료는 상당부분이 저개발국의 영세한 환경에서 제조되어 수입되고 있는 실정이므로 미생물과 해충의 오염 가능성이 크다(1). 지금까지 농식품의 위생적 유기체를 제거하기 위한 방법으로는 열처리와 화학약제의 사용이 가장 보편적이라고 할 수 있다. 하지만 이들 방법은 제품의 품질열화와 약제의 잔류성 등의 문제로 인해 사용이 점차 제한되고 있으며, 이에 대한 대안기술의 요구가 세계적으로 커지고 있으며(2,3), 건어류의 위생적 품질관리에 있어서 각별한 대책이 필요한 것으로 사료된다.

농식품의 조사처리기술(irradiation technology)은 이온화 에너지(감마선, 전자빔, X선)를 이용함으로써 비열(non-thermal) 및 비약제(non-chemical) 특성을 바탕으로 식품에 오염된 미생물이나 해충을 사멸하고, 신선식품의 선도를 연장할 수 있는 기술로 평가되어 농식품의 교역에서 유통안전성을 확보할 수 있는 대안으로

실용화가 확대되고 있다(4,5). 특히 식품조사기술(food irradiation)은 에너지의 투과성과 냉온처리 특성을 지나고 있어서 포장된 제품의 살균·살충 처리가 가능하여 제조장 할 필요가 없으며, 조사 처리시 식품의 온도 상승이 거의 없어서 성분의 파괴나 품질 변화를 최소화 할 수 있는 특징이 있다(6). 이에 따라 한국을 포함한 세계 50여 개국에서 200여 종의 농식품에 대해 조사처리의 이용을 허가하였고, 30여 개국에서는 상업적 규모로 조사처리식품(irradiated food)을 생산하고 있다(7). 한편 국내에서는 26개 품목(군)의 농식품에 대하여 감마선 조사처리를 허가하였고, 여기에는 건어류 분말의 위생화 처리(7 kGy 이하)도 포함되어 있다(8). 이와 함께 조사 처리된 식품에는 국제적 마크를 표시(labeling)하도록 의무화 하고, 나아가 조사처리 여부를 확인할 수 있는 확인시험법, 즉 광자극발광분석법(photostimulated luminescence, PSL), 열발광분석법(thermoluminescence, TL), 전자스핀공명법(electron spin resonance spectroscopy, ESR), GC-MS분석법(gas chromatography/mass spectrometry) 등을 고시하여 시행하고 있다(9).

열발광분석법은 식품의 표면에 존재하는 무기물(silicate mineral)을 분리한 후, 저장된 에너지를 측정하여 조사여부를 판별하는 방법으로 재현성이 높고, 판별결과의 신뢰도가 높아 조사식품 확인방법 중 가장 널리 이용되고 있는 방법이다(10,11). 그러나 열발광분석법은 식품 자체가 판별마크가 아닌 무기물이 분리 가능한 식품에만 측정 가능하므로 전처리방법에 크게 의존한다. 따라서 Committee of European Normalization(CEN)(12)에서는 비중분리법과 산 가수분해법을 식품에 특성에 따라 선택적으로 이용하도록 권고하고 있다. 현재 많이 이용되고 있는 비중분리법은

*Corresponding author: Joong-Ho Kwon, School of Food Science & Biotechnology, Kyungpook National University, Daegu 702-701, Korea

Tel: 82-53-950-5775

Fax: 82-53-950-6772

E-mail: jhkwon@knu.ac.kr

Received July 3, 2012; revised November 21, 2012;

accepted December 17, 2012

전처리 시간이 길고 특히 일부 식품의 경우 무기물 분리가 어려운 단점이 있다. 또한, 일부 식품에서는 비 조사시료임에도 불구하고 조사유래의 glow curve가 나타난 사례가 보고되고 있어 (13,14), 비중분리법에 대한 방법적 개선에 대한 연구가 필요하다(4).

따라서 본 연구는 방사선 조사된 건조 어류 5종에 대하여 PSL 방법으로 조사처리 여부를 스크리닝 한 후 스크리닝한 후, 비중분리법(density separation, DS)과 산가수분해법(acid hydrolysis, AH)으로 처리한 마커 미네랄에 대해 TL glow curve 및 TL ratio를 비교 분석하여 두 가지 분석방법에 대하여 비교에 목적을 두고, 상대적으로 전처리 시간이 장시간 소요되는 전자스핀공명법과 GC-MS분석을 제외하였으며, 향후 건어류의 조사처리 여부 관별에 효율적인 방법을 마련하고자 하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에 사용된 건어류 5종(멸치, 대구, 갈치, 디포리, 쥐포)은 대구 대형시장에서 구입하였으며, 시료는 모두 시중에 판매되는 소비가 높은 제품으로써 포장된 그대로 사용하였다.

방사선 조사

건어류 5종의 감마선 조사는 한국원자력연구원 첨단방사선연구소의 Co-60 감마선 조사시설(100 kCi point source, AECL, IR-79, MDS Nordion International Co. Ltd., Ottawa, Canada)을 이용하여 실온에서 시간당 일정한 선량률로 0, 1, 5, 10 kGy의 총 흡수선량을 얻도록 하였다. 이때 흡수선량은 ceric/cerous dosimeter를 사용하였다. 재조사(re-irradiation)는 동일한 조사시설을 이용하여 1 kGy의 흡수선량을 얻도록 하였다.

광자극발광(PSL) 분석

PSL 측정방법은 방사선 조사에 의하여 흡수된 에너지를 적외선으로 자극하여 발산되는 광자를 계측하는 방법이다(15). PSL 측정에 사용되는 시료는 빛에 대한 노출을 최대한으로 줄이고 교차오염을 피하면서 1회용 페트리디쉬(직경 50 mm)에 시료를 약 710 g 고르게 펼쳐 담은 후 PSL system(pulsed PSL irradiated food screening system, SURRC, Scotland, UK)의 시료 챔버에 넣고 PSL photon count를 측정하였다. 방사선이 조사된 표준물질(파프리카 분말)과 조사되지 않은 표준물질을 사용하여 기기의 상태 및 측정 조건을 확인한 후 공 페트리디쉬로 기기의 오염 여부를 확인한 다음 시료 당 2회 반복으로 측정하였다(10). 측정 결과의 판정에 사용되는 threshold value는 $T_1=700$ counts/min와 $T_2=5000$ counts/min로, 측정값이 T_1 미만이면 음성(negative)으로, T_2 초과이면 양성(positive)으로 판정하고, 측정값이 T_1-T_2 의 값을

나타내면 중간(intermediate)로 판정하였다. 양성과 중간 시료는 최종 확인시험으로 열발광법(TL)에 따라 시험하여 판별하였다(16-18).

열발광(TL) 전처리 및 분석

비중분리법(Density separation method, DS)

TL 방법은 EN1788법(12)에 준하여 수행하였다. 즉, 시료 약 100 g을 취한 다음 증류수를 가하여 혼탁액을 만들고, 이 혼탁액을 초음파 교반기에서 5분간 처리한 후 nylon sieve(filtering mesh, 125 μ m)로 여과하여 일정 시간 정치시킨 후 잔사를 원심분리용기에 모았다. 여기에 비중이 높은 텅스텐나트륨용액(sodium metatungstate, density 2.0 g/cm³)을 5 mL을 첨가하여 초음파 교반기에서 처리한 후 2분 동안 원심분리(1000×g)하여 유기물을 제거하고 증류수로 세척하였다. 일반적으로 혼입된 mineral에는 carbonate를 함유하고 있으며, 이 carbonate는 재조사 후 측정 시 1차 측정에서의 glow curve peak에 대해 영향을 초래하므로 1 N HCl (Wako, Osaka, Japan) 2 mL를 가해 10분간 암소에서 정치하여 carbonate를 제거하였고 1 N NH₄OH(Wako, Osaka, Japan) 2 mL를 가해 중화시켰다. 중화된 mineral은 증류수로 충분히 세척한 후 acetone(Merck, Darmstadt, Germany)으로 다시 세척하여 건조시켰다. 건조된 mineral은 TL disc에 약 0.2-5.0 mg을 옮겨 담고 50°C 건조기에서 16시간 예열한 후 측정하였다(10).

산가수분해법(Acid hydrolysis method, AH)

산가수분해법에 의한 시료의 미네랄 분리는 EN1788법(12)에 준하여 실시하였다. 즉, 500 mL 등근 플라스크에 시료 약 50 g과 6 N HCl(Wako, Osaka, Japan) 200 mL를 가한 후 100°C에서 2시간 동안 가열하여 가수분해 시켰다. 가수분해 된 시료에 일정량의 증류수를 가하여 30분 동안 정치시킨 후 2분간 원심분리(1000×g)하여 유기물을 제거한 다음 증류수로 수 회 세척하였다. 세척 후 분리된 미네랄을 건조하여 TL disc에 약 0.2-5.0 mg을 옮겨 담은 후 50°C 건조기에서 16시간 예열한 후 측정하였다.

열발광 분석

TL/OSL SYSTEM(TL/OSL SYSTEM TL-DA-20, RISØ, Roskilde, Denmark)을 이용하여 실온에서부터 350°C까지 5°C/초의 속도로 온도를 상승시키면서 측정하였다. 일반적으로 방사선이 조사된 시료는 150-250°C에서 최대강도를 보이는 glow curve를 나타내지만, 비조사구는 특징적인 glow curve를 나타내지 않거나 300°C 이상에서 자연방사선에 의한 곡선을 나타낸다. 처음 측정 시 얻은 glow curve의 면적 값을 TL₁이라 하고 재조사 후 측정 해서 얻은 면적 값을 TL₂라 하며, 그 후 방사선 조사식품이 나타내는 TL glow curve 범위의 TL ratio(TL₁/TL₂)를 구하여 이

Table 1. Photostimulated luminescence determinations of gamma-irradiated dried fish

(Unit: photon counts/min)

Sample	Irradiation dose (kGy)			
	0	1	5	10
Anchovy	327±2 ¹⁾ (-) ²⁾	73534±1242(+)	493352±39365(+)	397674±33860(+)
Cod	335±11(-)	2786±2221(M)	3294±493(M)	2306±350(M)
Dried filefish	280±2(-)	896±536(M)	376±5(-)	1067±107(M)
Hairtail	288±7(-)	669±1(-)	1357±1075(M)	791±93(M)
Herring	249±15(-)	585±53(-)	1446±31(M)	15026±8861(+)

¹⁾Means±SD (n=2).

²⁾Threshold value: $T_1=700$, $T_2=5000$, (-)< T_1 , T_1 <(M)< T_2 , (+)> T_2 .

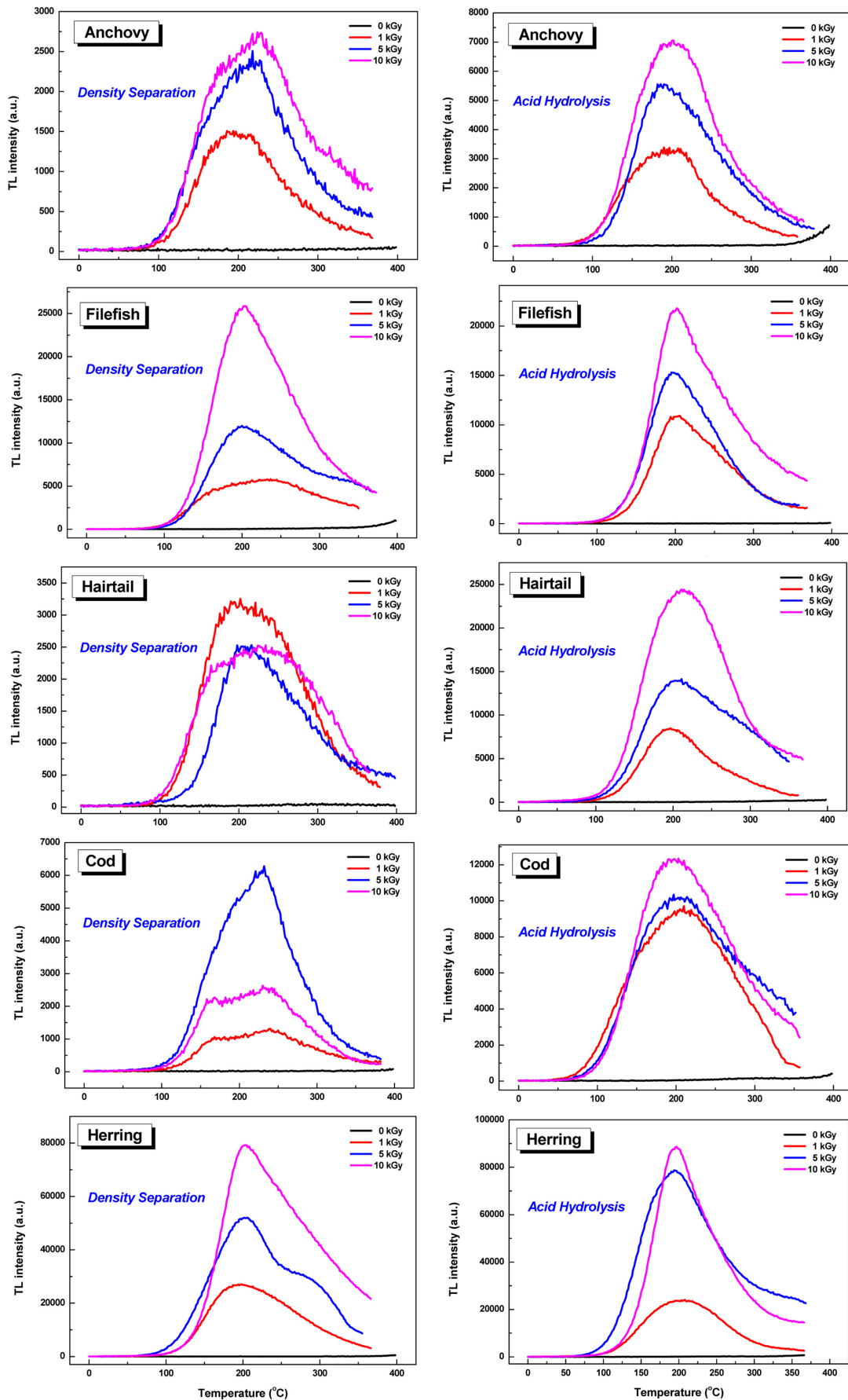


Fig. 1. TL glow curves of minerals separated from irradiated dried fishery products at different mineral separation methods.

ratio를 threshold value로 이용하면 조사 여부 확인이 가능하며, 이론상 흡수선량 예측을 가능하게 해준다(19). 이러한 1차 TL 측정에서 TL ratio 산출까지의 일련의 과정을 normalization이라 하며, TL ratio 값이 0.1 이하이면 비조사구로, 0.1 이상이면 조사구로 판단하였으며(10), TL 측정 시 판별결과에 대한 신뢰성을 얻기 위하여 blank test를 동시에 실시하여 이것의 TL glow curve 면적 값을 구해 blank 평균값에 표준편차의 3배수를 더하여 MDL (Minimal detectable integrated TL intensity)을 구하였고, 각 시료의 TL₂값이 MDL의 10배를 넘으면 유효한 시험결과로 받아들였다.

실험결과 분석

본 연구에서 측정된 결과는 Origin 8.0 software(Origin Lab. Co., Northampton, MA, USA)을 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

건어류의 광자극발광 PSL 특성

건 어류 5종의 조사여부를 스크리닝하기 위하여 PSL방법을 측정된 결과 Table 1과 같다. 비 조사시료에서 건조 어류 5종은 모두 700 이하의 photon counts(PCs)를 나타내어 모두 비 조사시료로 확인 가능하였다. 조사된 갈치, 쥐포, 대구의 경우 모두 음성(negative) 또는 중간값(intermediate)을 나타내어 TL 확인 시험에 의한 확증이 필요하였다. 또한 디포리는 5 kGy 이하의 선량에서는 중간값 이하로 나타났고, 10 kGy 시료에서 5000 이상의 PCs(양성, positive)를 나타내어 조사여부 확인이 가능하였다. 조사된 멸치는 모두 5000 이상의 높은 PCs로 양성을 나타내어 PSL 적용이 가능한 것으로 판단되었다. EN13751(17)에 따르면 허브, 향신료 등은 700 이하를 비 조사시료로 5000 이상을 조사시료로 판정토록 권고 하고 있으며, 수산물의 경우 1000 이하를 비 조사시료로 4000 이상을 조사시료로 판별토록 기준을 정하고 있다. 본 실험에서 사용된 건조어류의 경우 두 조건 모두 적용하기 어려운 것으로 판단되었다. 또한 조사선량의 증가에 따라 photon count는 증가하지 않았지만, screening 방법으로 적용이 가능하였다. 건 멸치의 PSL 결과 비조사구에서 음성을 조사구에서 양성 값을 나타내었으며, 이는 Chung 등(20)의 PSL을 이용한 방사선 조사된 건멸치 판별 실험과 유사한 결과를 나타내었다.

건어류의 TL glow curve 특성

분석 방법에 따른 TL glow curve의 특성을 비교하기 위하여 시료를 0-10 kGy로 조사한 후 비조사시료를 대조구로 하여 비중 분리법(density separation, DS)법과 산 가수분해법(acid hydrolysis, AH)으로 비교하였다. 두 가지 방법에 따라 추출된 미네랄을 사용하여 TL 측정된 결과 Fig. 1에서와 같이 두 방법 모두 방사선 조사되지 않은 시료는 자연방사선에 의해서 300°C 부근에서 최고 peak를 가지는 glow curve를 나타내었고, TL intensity는 DS 방법보다 AH방법에서 더 낮게 나타났는데, 이는 AH법의 열처리에 의하여 광물질에 trap되어 있는 에너지가 일부 소실된 것으로 판단된다(21-23). Carmichael 등(24)의 연구결과에서 새우, 가재등 수산물에 대해 DS 및 AH법으로 전처리 후 TL 측정된 결과, AH 방법에서 TL intensity는 감소하였으나, 두 방법 모두 조사여부의 판별에는 영향을 미치지 않았다. 1, 5, 10 kGy 조사구에서는 150-250°C의 부근에서 특유의 glow curve를 나타내었다. 이러한 결과를 볼 때 방사선이 조사되지 않은 시료와 조사된 시료에서 TL glow curve의 온도범위와 TL intensity의 차이가 명확하게 나타나 비조사구와 조사구간의 차이가 분명하여 조사여부 판별이 가능

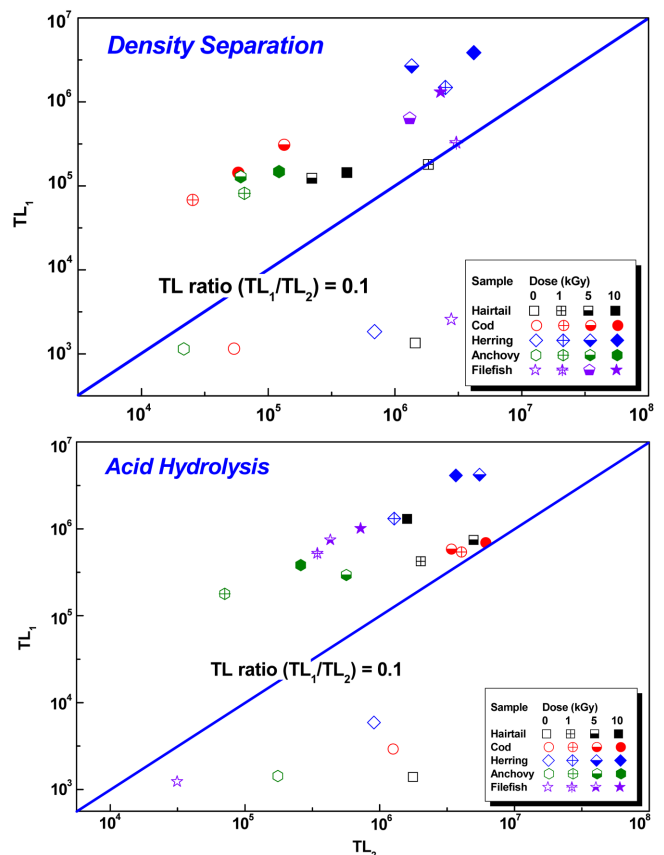


Fig. 2. TL ratio (TL₁/TL₂) of minerals separated from irradiated dried fishery products at different mineral separation methods.

하였다. 하지만 AH법으로 분리한 glow curve는 DS법으로 분리한 glow curve에 비해 매우 분명하게 나타났는데, 이는 AH법에서 사용한 강산(6 N, HCl)으로 인해 건조 어류에 존재할 수 있는 빠나 유기물이 완전히 제거된 결과라 판단되었으며(14), 본 실험에서는 DS법보다 AH법의 glow curve가 조사판정에 있어 정확성이 더 높았다.

건어류의 TL ratio 특성

TL 미네랄 분리방법에 대한 건조어류 5종의 추출한 미네랄에 대한 TL glow curve의 normalization을 위해서 1차 glow curve (TL₁)를 측정된 다음 다시 재조사(1 kGy)를 실시하여 2차 glow curve(TL₂)를 측정하였다. TL ratio(integrated TL₁/integrated TL₂)의 산출 결과 Fig. 2에서와 같이 나타내었다. DS법과 AH법 모두 비 조사시료에서는 0.1 보다 작은 값을 나타내어 비 조사시료임을 확인할 수 있었다. 조사시료의 경우 DS법은 일부시료를 제외하고 모든 시료에서 0.1 이상의 값을 나타내었으나, 1 kGy 조사된 갈치에서 0.1 이하의 값(negative)을 나타내어 저 선량으로 조사된 건조갈치는 DS법에 의한 TL ratio의 적용이 부적합하였다. AH 방법은 조사시료에서는 0.1 보다 높은 값을 나타내어 이미 설정한 비조사구(0.1 이하)와 조사구(0.1 이상) TL ratio 기준에 따라 조사 여부 확인이 가능하였다. Delincée(25)는 TL을 이용한 방사선 조사된 향신료, 과일과 채소 판별 실험에서 재조사 방법에 의한 normalization이 결과의 신뢰성을 더욱 증가시켰다고 보고하였다. 또한 Khan과 Delincée(26)는 방사선 조사된 대추야자로부터 mineral을 분리하여 TL 측정에 의해 방사선 조사여부를 확인하

고 입증하는 방법으로 threshold value를 설정하여 정확한 조사여부의 확인 가능성을 보고하였으며, 본 실험에서는 AH법으로 분리한 방법이 일치하는 결과를 보였다.

요 약

건어류의 조사처리 여부 확인을 위하여 PSL-TL 체계의 방법으로 분석하였다. 비조사 시료에서는 모두 700 보다 낮은 PCs를 나타내었고 조사된 멸치는 5000 이상의 PCs를 나타내었으나 조사된 대구, 쥐포, 디포리, 갈치는 비 조사 값을 나타내었다. TL분석에 이용되는 광물질을 얻기 위해 비중분리법과 산가수분해법을 이용하였으며, 그 결과 비 조사시료에서는 250°C 이상의 범위에서 낮은 intensity와 peak를 나타냈으며 조사된 시료에서는 150-250°C 범위에서 높은 intensity와 peak를 나타내었다. 그러나 특히, acid hydrolysis 방법으로 미네랄을 분리하였을 때 TL ratio (TL_1/TL_2)와 TL glow curve 결과가 보다 정확한 결과를 얻을 수 있었다.

감사의 글

이 논문은 2012년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 연구(과제번호: 2010-0004932)이며, 이에 감사드립니다.

문 헌

- National Fisheries Products Quality Inspection Service. Imported fishery in statistical data. Available from: <http://www.qia.go.kr>. Accessed May 3, 2004.
- Akram K, Kwon JH. Food irradiation for mushrooms. J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem. 53: 257-265 (2010)
- UNEP. Montreal Protocol on Substances that Deplete the Ozone Layer. 1994 Report of the Methyl bromide Technical Options Committee, Nairobi, Kenya. pp. 293-298 (1995)
- Kwon JH, Chung HW, Kim BK, Ahn JJ, Kim GR, Jo D, Ahn KA. Research and application of identification methods for irradiated foods. Food Safety 6: 11-27 (2011)
- Kume T, Furuta M, Todoriki S, Uenoyama N, Kobayashi Y. Status of food irradiation in the world. Radiat. Phys. Chem. 78: 222-226 (2009)
- WHO. Wholesomeness of irradiated food. Report of Joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee. Technical Report Series 659, World Health Organization, Geneva, Switzerland. p. 34 (1981)
- International Atomic Energy Agency (IAEA). Food irradiation clearance database. Available From: <http://nucleus.iaea.org>. Accessed Feb. 17, 2009.
- IAEA. International Atomic Energy Agency Homepage. Available from: <http://www.iaea.org/icgfi>. Accessed Jan. 13, 2010.
- KFDA. Notification on the detection methods for irradiated food. No. 2009-44. Korea Food & Drug Administration, Cheongwon, Korea (2009)
- KFDA. Food Code. Korea Food and Drug Administration, Seoul, Korea. pp. 10-8-41 (2010)
- Akram K, Ahn JJ, Kwon JH. Analytical methods for the identification of irradiated foods. pp. 1-48. In: Ionizing Radiation: Applications, Sources and Biological Effects. Belotserkovsky E, Ostaltsov Z (eds). Nova Science Publishers, New York, NY, USA (2012)
- CEN. Foodstuffs - Thermoluminescence detection of irradiated food from which silicate minerals can be isolated. Committee of European Normalization, Brussels, Belgium (2001)
- Kyung HK, Ahn JJ, Akram K, Kwon JH. Thermoluminescence analyses of irradiated dried sea foods using different methods of mineral separation. Radiat. Phys. Chem. 81: 1224-1226 (2012)
- Sekiguchi M, Nakagawa S, Yunoki S. Detection of irradiation history of seasoning mixes composed of dried fish and its extract. Bull. Tokyo Metropolitan Indus. Technol. Res. Institute 4: 24-27 (2009)
- Ahn JJ, Kim GR, Akram K, Kim KS, Kwon JH. Effect of storage conditions on photostimulated luminescence of irradiated garlic and potatoes. Food Res. Int. 47: 315-320 (2012)
- Ahn JJ, Akram K, Kim GR, Kim KS, Kwon JH. Luminescence characteristics of minerals separated from irradiated onions during storage under different light conditions. Radiat. Phys. Chem. 81: 1215-1219 (2012)
- CEN. Foodstuffs - Detection of irradiated food using photostimulated luminescence. Committee of European Normalization, Brussels, Belgium (2009)
- Akram K, Ahn JJ, Kim GR, Kwon JH. Applicability of different analytical methods for the identification of gamma-irradiated fresh mushrooms during storage. Food Sci. Biotechnol. 21: 573-579 (2012)
- Akram K, Ahn JJ, Baek JY, Yoon SR, Kwon JH. Absorbed-dose estimation and quality attributes of irradiated *shiitake* mushroom. J. Sci. Food Agr. 93: 634-640 (2013)
- Chung HW, Delincée H, Kwon JH. The application of different detection methods for irradiated dried anchovy and shrimp. Radiat. Phys. Chem. 63: 411-414 (2002)
- Ahn JJ, Akram K, Lee J, Kim KS, Kwon JH. Identification of a gamma-irradiated ingredient in Korean barbecue sauce by thermoluminescence analysis before and after pasteurization. J. Food Sci. 77: C476-C480 (2012)
- Ahn JJ, Akram K, Kwak JY, Jeong MS, Jang YD, Kwon JH. Radiation-induced thermoluminescence characteristics of feldspar following different heat and microwave treatment. J. Lumin. 132: 1964-1968 (2012)
- Lee J, Kausar T, Kim BK, Kwon JH. Detection of γ -irradiated sesame seeds before and after roasting by analyzing photostimulated luminescence, thermoluminescence, and electron spin resonance. J. Agr. Food Chem. 56: 7187-7188 (2008)
- Carmichael LA, Sanderson DCW. The use of acid hydrolysis for extracting minerals from shellfish for thermoluminescence detection of irradiation. Food Chem. 68: 233-238 (2000)
- Delincée H. Control of irradiated foods: Recent developments in analytical methods. Radiat. Phys. Chem. 42: 351-357 (1993)
- Khan HM, Delincée H. Detection of irradiation treatment of dates using thermoluminescence of mineral contaminants. Radiat. Phys. Chem. 46: 717-720 (1995)