

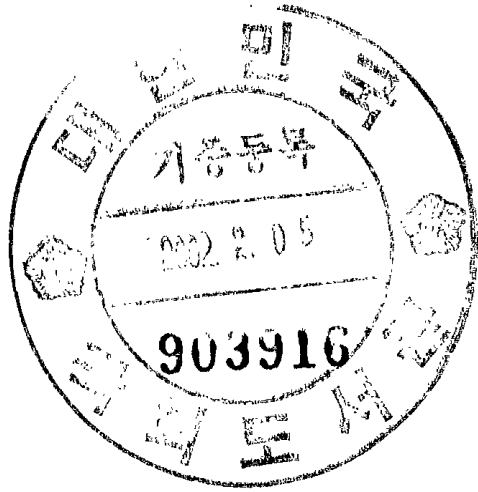
최 종
연구보고서

냉동우육과 신선 냉장우육의 판별법 개발

Development of the Differentiation Method between
Fresh Chilled Beef and Frozen Beef

주관 연구 기관
건국대학교

농 립 부



제 출 문

농림부 장관 귀하

본 보고서를 “냉동우유과 신선 냉장우유의 판별법 개발”에 관한 연구의 최종보고서로 제출합니다.

2001 년 12 월 27일

주관연구기관명 : 건국대학교

총괄연구책임자 : 이 치 호

연 구 원 : 최 봉 립

연 구 원 : 김 남 규

연 구 보 조 원 : 오 혜 선

연 구 보 조 원 : 이 은 정

연 구 보 조 원 : 김 병 현

연 구 보 조 원 : 남 혜 영

협동연구기관명 : 한국 소비자 보호원

협동연구책임자 : 서 정 희

협 동 연 구 원 : 홍 준 배

요 약 문

I. 제 목

냉동우유와 신선 냉장우유의 판별법 개발에 관한 연구

II. 연구개발의 목적 및 중요성

<연구개발의 목적>

국내에서 소비되고 있는 우유는 한우유, 홀스타인 유 및 수입 동결우유가 대부분이며 농축산물 수입 개방의 여파로 인하여 수입 동결우유의 소비량이 급격히 증가하고 있는 실정이다. 그러나 수입우유는 장기간 동결상태로 보관되는 구조 때문에 단기간 냉장상태로 유통되고 있는 국내산 우유에 비하여 기호성이 열등한 것으로 인식되어 있다.

그 원인으로는 품종, 사양조건, 성별 등 도축 전의 원인과 도축 후의 관리상태 즉, 냉동, 냉장, 숙성정도의 차이 등이 있을 수 있다. 또 국내에서 생산되는 우유가 수입 우유보다 기호성이 우수한 것은 소비자들의 기호성이 오래 전부터 길들여져 있는 것도 한가지 원인이라고 생각된다. 현실적으로 축산물 중 수입육에 의존도가 높은 우리나라에서는 유통 체계상 냉동육이 해동되고 재 동결되어 신선 냉장육으로 둔갑해 판매되고 있는 실정으로 식육 생산농가에는 상대적인 소득 손실과, 소비자들의 신선 냉장육 선택시 초래되는 혼란 및 불만 등을 해소하고 식육 유통의 올바른 유통 체계를 확립하기 위해서는 어떠한 정책적 대안보다도 먼저 판별법의 개발이 요구된다.

우리나라의 축산물의 수입 자유화와 외국산 축산물의 개방압력이 거세게 일고 있는 시점에서 특히 1995년도 통계에 의하면 국내 소비량 31만 톤 중의 약 50%에 이르는

15만톤 정도를 외국산 쇠고기 수입에 의존하고 있는 실정이다. 또한 냉동육 수입의 증가와 냉장육 유통기한이 90일로 설정되었다 하더라도 수입 냉장육인 경우 도살에서 소비자 단계까지 약 45일 이내여야만 수입 신선 냉장육 유통이 가능하나 현실적으로는 상대적인 장기간의 수송기간으로 인하여 수입 냉장육의 유통은 어렵다. 그러므로 수입 냉동육의 상태로 수입될 것은 자명한 일이다. 이에 따른 소비자 보호측면과 신선 냉장우육과 냉동우육을 구별할 수 있는 판별법을 확립해 정책적인 식품검사 기능 강화와 식육의 냉장 냉동상태의 표시 제도의 도입 등 식육 생산자 및 소비자를 동시에 보호하기 위한 본 판별법의 개발의 필요성이 시급히 요구된다.

국내적으로는 외국에 비해 상대적으로 소규모인 축산물의 생산으로 인해 국내소비 형태는 30일 이내로 비교적 짧은 기간에 국내산 한우육 등이 유통되고 있어 냉동 수입육이 신선 냉장육으로 판매될 경우 축산농가의 소득에도 큰 타격을 줄 것이다. 이에 반해 미국, 독일과 같은 나라들은 육의 소비형태에서 수입육에 의존하지 않더라도 이들 국가에서는 육의 냉장 냉동 상태를 표시하기 위한 식육 판별법을 연구해오고 있다. 우리나라와 대체로 여건이 비슷한 이웃 일본에서도 신선 냉장어육과 냉동어육을 판별하기 위한 연구를 주로 해 오고 있다. 국내에서는 지금까지는 주로 이종 단백질의 분석법 개발, 육의 신선도 검사법, 육질 판별, 한우육과 수입육의 판별법이 연구되어 왔으나, 신선 냉장육과 냉동육을 판별하기 위한 연구는 거의 전무한 실정에 있다.

따라서 본 연구는 냉동우육과 신선 냉장우육의 판별법을 개발하여 소비자들에게 신선 냉장육의 선택기회를 부여함으로써 식육 선택시 발생하는 피해방지는 물론, 외국산 냉동육 수입 개방 압력에 자체적으로 대비하도록 하며, 아울러 소비자보호원 등의 검사기관의 식육 검사체제의 확립 및 국내산 신선 냉장육 소비를 넓히고 쇠고기 수입개방에 따른 유통상의 국제 마찰을 해소시킬 수 있는 방안으로 즉석 판별법은 개발되어야 한다.

<연구개발의 중요성>

1) 기술적 측면

식육동결, 세포손상, 세포 내 물질 변화를 포착한 냉동우육과 신선 냉장우육의 판별법이 부재한 실정이며, 국내에서의 식육에 관한 연구는 주로 식육 제품의 제조, 가공, 저장중의 변화, 식육의 냉장, 냉동시의 변화, 식육의 사후변화, 이종 단백질의 구별 등이 주로 연구되었으며 최근에는 WTO체제이후 외국산 수입 농산물의 증가에 대비한 수입육과 한우육의 판별법이 연구되어 왔다.

이러한 연구는 국내의 제한된 연구범위로 그 제약성이 뒤따른다고 보고 있으나, 냉동우육과 신선 냉장우육을 구별하는데 필요한 좀더 범위를 확대해 생화학적인 측면이나 세포수준에서 이들 분석법 개발을 위한 기초적 근거, 즉 식육동결, 식육 내 세포손상, 손상 세포 내 물질 변화를 탐지할 수 있는 분석법 등을 식육 연구분야에 적극적으로 응용하여야 할 것이다.

식육의 유통 특성상 신속하고, 정확한 즉석 판별법이 요구된다. 식육은 그 특성상 그 성분이 유기물로 되어 있어 변화를 받기 쉬우며 부패하기 쉬워 cold chain이라는 유통적 특징과 체계를 가지고 있다. 특히, 크게 나누어 도살, 도매, 소매라는 과정에서 보면 주로 소매 과정에서 냉동우육을 해동해 다시 재동결 하거나 신선 냉장우육으로 둔갑해 판매하는 경우가 많아 그 즉석에서 무엇보다도 신속하고 정확한 판별법이 적용되어야 하므로 즉석에서 그것도 1시간 내에 측정 가능한 판별법을 개발할 필요가 있다.

또한 즉석 판별법에 대한 신뢰 보증을 위한 검증법의 개발이 동시에 요구된다. 모든 검사법에서 분석결과에 대한 신뢰성 보증을 대단히 중요하다. 특히, 이러한 신선 냉장우육과 냉동우육의 판별법처럼 검사기관, 판매자, 소비자간에 매우 예민한 결과를 초래할 수 있는 이러한 판별법에 대해서는 만약의 소송문제 등을 고려해 즉석 판별법의 결과에 대해 한층 더 신뢰성을 보증하는 검증법의 개발이 요구된다.

2) 경제·산업적 측면

식육 생산자와 소비자의 동시 보호책이 될 수 있는 판별법의 개발이 되어야 한다. 2001년 육류의 수입개방으로 수입산 육류와의 경쟁이 불가피한 시점에 있다. 외국 수입 냉동우육이 신선 냉장우육으로 둔갑해 판매된다면 이에 따른 가격변동으로 신선 냉장육을 주로 생산하는 국내 식육 소비업자는 상대적으로 불이익을 당할 것이며, 식육 소비자의 측면에서 보면 신선 냉장육을 구매할 가격(현재 돈육 목살인 경우 3,200원/Kg)으로 수입 냉동육(목살인 경우 2,200원/Kg)을 구입했다면 이것 또한 소비자에게는 큰 손해가 되지 않을 수 없다. 따라서 냉동우육과 신선 냉장우육을 정확히 판별할 수 있다면 식육 등급제도와 마찬가지로 정확한 표시제를 실시하고, 그 실시 여부를 판단할 이 판별법의 개발이 요구된다.

소비자 측면에서 냉동우육과 신선 냉동우육을 구별함으로써 식육시장에 개방에 따른 수입육의 물량의 조절이 가능하다. 식육의 특징으로 보면 장래는 수입육의 유통 또한 냉장육의 형태로 판매될 것이지만 수입육은 장기간을 요하는 수송 보관상의 특징을 갖고 있는 반면 국내산 쇠고기 등의 유통 사이클은 비교적 짧기 때문에 이에 대한 품질의 차별화를 기함으로써 자연스런 국제적 마찰 등을 해소함은 물론 국내 식육 생산농가의 보호는 물론 외국산 식육 수입을 조절할 수 있는 대책이 될 수 있다.

3) 사회·문화적 측면

수출 육류는 냉동육이 기본이지만 자국내 소비육류는 냉장육 유통이 일반화되어 있다(미국 90%, 일본 냉장육 취급소매업소 98.8%). 선진 외국에서는 신선 냉장육 및 냉동육의 라벨을 부착함으로써 축산물에 대한 소비자의 신뢰도 향상은 물론 식품 전반에 걸쳐 연구와 행정에 신뢰도를 축적할 수 있을 뿐만 아니라, 농산물 분야에서는 원산지 표시제를 실시하고 있고, 축산물 분야에서는 식육 등급제 및 부위별 판매가 실시되고 있다. 그러므로, 우리나라에서도 장래에는 식육에서의 신선 냉장육과 냉동육에서도 표시제가 도입될 필요성이 대두되고 있다. 이와 아울러 식육 검사기관의 정확한 판별법을 획득함으로써 감독, 감시이전에 식육 유통업자들은 신뢰 있는 상거래를 확립해 감으로써 행정의 신뢰는 물론 궁극적으로는 국내외적으로 식육 유통의 올바른 체계를 확립할 수 있는 계기를 만들 필요가 있다.

판별법의 개발로 인한 국내 축산생산농가의 보호함으로써 국내 농축산 진흥책의 계기가 될 수 있다.

Ⅲ. 연구개발 내용 및 범위

냉동육은 단백질의 변성에 의하여 품질이 저하되고 해동시 육즙 유출이 많이 발생하여 식용육으로 사용시 경제적 손실이 커, 국내 우육은 소비자의 기호에 맞추어 냉장육 위주로 유통되고 있다. 그러나, 수입육을 비롯한 일부 우육은 냉동상태로 유출되어 해동, 재냉동으로 이어지거나 신선 냉장육으로 둔갑해 판매되는 경우가 적지 않다.

따라서, 이러한 식육 유통상의 문제점을 해결하기 위하여 신선 냉장우육과 냉동우육을 판별하는 방법을 개발하는 것이 연구개발 목표다.

본 연구의 1차 년도의 주요 내용은 냉장과 냉동에 따른 우육 내의 차별화 되는 물질을 찾기 위하여 냉동에 의하여 근육세포 내에서 유출된 각 효소들의 활성을 비교하여 신선 냉장우육과 냉동우육을 판별하는 방법을 개발하고, 유통 현장에서 이와 관련된 설문 조사를 실시하고 본 판별법의 예비 적용을 실시하는 것이다. 2차 년도의 주요 내용은 이 판별법을 즉석에서 이용할 수 있도록 kit화하고, 실제 유통 현장에서 이 판별 kit의 적용성을 시험하는 것으로 구체적 내용은 다음과 같다.

<연차별 연구개발 목표와 내용>

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용
1차년도 (1999.12~ 2000.12)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 냉동우유과 신선 냉장우유의 판별법 개발(주관연구기관) ○ 냉동우유과 신선 냉장우유의 유통현장 조사(협동연구기관) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 건국대학교 <ul style="list-style-type: none"> - 냉장, 냉동, 해동조건 설정 - 육즙 채취방법의 확립 - 세포내 target물질의 선정 - 판별에 이용될 효소의 생화학적인 성질규명 - 판별을 위한 정색법 개발 ○ 한국소비자보호원 <ul style="list-style-type: none"> - 냉동우유과 신선 냉장우유의 판별법 관련 조사 및 대상처 선정 - 냉동우유과 신선 냉장우유의 유통현장 설문조사 - 예비simulation test - 결과분석

구 분	연구 개발 목표	연구 개발 내용
2차년도 (2000.12~ 2001.12)	<ul style="list-style-type: none"> ○ 냉동우유과 신선 냉장우유의 판별법 Kit화(주관연구기관) ○ 판별법 Kit의 현장적용(협동연구기관) 	<ul style="list-style-type: none"> ○ 건국대학교 <ul style="list-style-type: none"> - 분광광도계를 이용한 측정조건 및 분석치 도출 - 냉장·냉동 조건하에서 직접color test의 적용조사 - 즉석 판별 Kit의 개발 - 실제시료에 이용가능성 조사 ○ 한국소비자보호원 <ul style="list-style-type: none"> - 실제 유통현장에서 본 판별법의 적용시험 - 실제 설문조사와의 현장시료 채취후의 검사 결과와의 상관관계조사

IV. 연구개발 결과 및 활용에 대한 건의

본 판별법으로 기대할 수 있는 효과는 여기서 개발된 Kit를 국내외로 보급하여 수익을 창출할 수 있고, 수입육 개방 시대를 맞이하여 수입 냉동육과 국내 신선 냉장육을 차별화 함에 따른 소비자 보호의 역할을 수행할 수 있을 것이다.

또한 육류의 수출입시 냉장육의 품질 인증을 위한 법적인 근거 자료로도 활용할 수 있으며 식품 의약품 안전청, 소비자보호원 등의 검사 기관이 식육 유통물에 대한 검사시 활용하면 식육의 유통 체계의 확립에 기여할 것으로 보여진다.

이에 따라 냉장, 냉동육 상품의 규격화 및 표준화에 기술 제공을 하게 되고 소비자들의 확실한 믿음을 근거로 냉장육의 내수 소비 확대를 유도할 수 있고 농축산물 개방에 많은 영향을 받고 있는 식육 생산 농가의 소득 증대도 도모할 수 있을 것이다.

여기서 제시하고자 하는 구체적인 활용 방안으로는 판별법 kit를 상품화함으로써 유통 중에 냉장육으로 둔갑 판매되는 냉동육의 유통을 근절시킬 수 있고, 식육 유통 체계의 개선 및 소비자 인식 제고에 활용이 가능하다.

아울러 본 판별법은 우육(한우)에 대해서 실시하지만 기타 모든 축종의 신선 냉장육 및 냉동육 판별에도 이용할 가능성이 있다.

따라서, 이번 연구 개발 성공시 활용방안의 구체사항으로는 1) 판별법 kit 상품화 2) 냉장육 및 냉동육 표식제에 대한 법적 근거자료 제공, 3) 소비자보호원이나 국가 식품 검사기관 등이 현장검사에 적용, 4) 식육 유통체계 확립을 위한 정책 자료로 이용, 5) 판별법 기술의 국내보급과 해외수출, 6) 판별 전문기술인 양성 등을 들 수 있다.

<활용방안>

- 1) 판별법 kit의 상품화
- 2) 냉장육으로 둔갑 판매되는 냉동육 유통 근절
- 3) 식육유통체계의 개선 및 소비자 인식제고에 활용
- 4) 품질인증을 위한 근거자료로 활용

- 5) 본 판별법은 우육(한우)에 대해서 실시하지만 여러 축종의 신선 냉장육 및 냉동육 판별에 응용될 가능성이 있다.
- 6) 냉장, 냉동이라는 식품저장 중에 발생하는 일련의 식품 손상방지 연구에도 활용가능.
- 7) 간세포 등 정상세포의 변성지표로서 유용한 자료가 될 수 있음.
- 8) 착즙기를 시작품으로 제작하여 육의 물성 측정을 위한 특허출원을 고려할 수 있다.

<연구개발성공시 다음단계의 조치사항>

- 1) 판별법 kit 상품화
- 2) 냉장육 및 냉동육 표식제에 대한 법적 근거자료 제공
- 3) 소비자보호원이나 국가식품 검사기관 등이 현장검사에 적용
- 4) 식육 유통체계 확립을 위한 정책자료로 이용
- 5) 판별법 기술의 국내보급과 해외수출
- 6) 판별 전문기술인 양성

SUMMARY

These studies were performed to develop the differentiation method of between frozen beef and fresh chilled beef by using the measurement of enzyme activity of muscle cells in beef.

They are based on the theory that the damage caused to the muscle freezing results in the release of the mitochondrial enzymes, malate dehydrogenase and citrate synthase. Therefore we can make the differentiation method of the mitochondrial enzyme activities between fresh meat and thawed, frozen meat in the meat press juice.

This study included the following items, the increased enzyme activity in the meat press juice was measured by using spectrophotometer, and color test between cystine and DTNB(5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)) in the citrate synthase reaction, frozen beef showed more thick yellow than fresh beef in the development of Ellman reagent color reaction. Malate dehydrogenase activity under the same level of substrate concentration was measured over 10 minutes.

The differentiation methods between frozen beef and fresh chilled beef studied by measurement of protein concentration of meat press juice, WHC(water holding capacity), mitochondrial malate dehydrogenase and citrate synthase activities, including the on-the-spot application test, and Ellman reagent color reaction,

Samples for frozen beef and fresh chilled beef were stored at 4, -4, -18, -77°C during the period of 15 days, respectively.

For these experiments, meat press machine using air pressure was especially manufactured, and sufficient drip amount(about 0.15 ml/g) was obtained under a pressure of 8 kg/cm² when used 1.5g of beef sample and meat press machine.

The obtained results from these experiments are as the followings;

- 1) Protein concentration of meat press juice was uniformly measured from 35.85 mg/ml to 72.87 mg/ml, and increased significantly ($p < 0.05$) freezing at below -18°C .
- 2) The drip % was performed by using measurement of WHC
- 3) WHC was significantly ($p < 0.05$) different between thawed, frozen beef and fresh chilled beef. WHC of fresh chilled beef was significantly ($p < 0.05$) increased compared with that of frozen beef at -77°C
- 4) Citrate synthase activity of frozen meat ($-18, -77^{\circ}\text{C}$) was significantly higher ($p < 0.05$) than that of fresh chilled beef and frozen beef at -4°C
- 5) In the Ellman reagent color reaction, the color (yellow) concentration of frozen beef ($-18, -77^{\circ}\text{C}$) was thicker than that of fresh chilled beef.
- 6) Mitochondrial malate dehydrogenase activity of frozen beef ($-18, -77^{\circ}\text{C}$) was significantly higher ($p < 0.05$) than that of fresh chilled beef and frozen beef at -4°C .
- 7) In the mitochondrial malate dehydrogenase activity, enzyme activity of frozen beef ($-18, -77^{\circ}\text{C}$) had a special reaction which enzyme activity disappeared after 5 minutes. But fresh chilled beef had not shown this tendency.
- 8) From the measurement of mitochondrial malate dehydrogenase and citrate synthase activities in the on-the-spot application test, this differentiation method had 94% of probability which differentiated fresh chilled beef from thawed, frozen beef.

On the basis of these results, it suggest that, this differentiation methods are can apply which allows a reliable differentiation between non-frozen(fresh) beef and frozen, thawed beef.

CONTENTS

Chapter 1: Introduction

- 1: The purpose and scope of the study

Chapter 2 : Development of differentiation methods between frozen beef and fresh chilled beef

1. Determination of chilling, freezing, and thawing conditions
 - A. Detection of the temperature and time of maximum ice crystallization zone
 - B. Confirmation of chilling and freezing conditions
2. Establishment of the methods of extracting meat juice
 - A. Investigation of the amount of meat juice dripping naturally from beef
 - B. Extraction of meat press juice by meat press machine
 - C. Examination of the ingredients of meat press juice by centrifugation
3. Establishment of assortment of measurable enzymes in muscle cells
 - A. Observation of changes in meat texture during chilling and freezing
 - B. Detection of various enzyme activities in meat press juice
 - C. Selection of measurable enzymes in muscle cells
4. The examination of the biochemical characterization of enzymes used in differentiation between frozen and fresh chilled beef
 - A. Determination of the optimum pH and temperature for enzyme reaction
 - B. Investigation of substrate specificity in target enzymes
 - C. Establishment of the reaction rate of enzymes(K_m , V_{max} value)
5. Development of color test for differentiation between frozen beef and fresh

chilled beef

A. Establishment of the conditions of a rapid color test for enzyme reaction

Chapter 3 : Development of test kit of differentiation between frozen beef and fresh chilled beef

1. Establishment of measurement conditions and analysis values by using spectrophotometer

A. Measurement of mitochondrial malate dehydrogenase activity

B. Measurement of citrate synthase activity

C. Establishment of standard curve by substrate concentration

D. The examination of the correlation between meat press juice amount and enzyme activity

2. Investigation of color test under the condition of chilling and freezing

A. Direct enforcement of a color test under the condition of chilling and freezing

B. Rapid differentiation method of investigation using meat juice naturally dripping condition of chilling and freezing

3. Development of rapid test kit of differentiation

A. Development of reagents and paper for the fixed color domestic animals

B. Commercialization of test kit of differentiation

4. Investigation of the utilization possibility for the actual test materials

A. Investigation of the utilization possibility for other domestic animals

Chapter 4 : The survey of frozen beef and fresh chilled beef on present market and comparison of organoleptic properties

1. Investigation of differentiation method between frozen beef and fresh chilled beef, and selection of the targeted places
2. The survey of frozen beef and fresh chilled beef on market
 - A. Investigation of the present market and organoleptic properties
 - B. Recommendation of solution to present problems

Chapter 5 : The survey of frozen beef and fresh chilled beef on present market and comparison of organoleptic properties

1. The application test of differentiation method on the circulation spot
 - A. A verification experiment using the actual freezing meat, and the investigation of the strength and swiftness
2. The correlation investigation between the actual questionnaire and the examination results from gathering on-the-spot test materials
 - A. Comparison of the survey with the experiment using test kit of differentiation

목 차

제 1 장 서 론

제1절 연구개발의 목적과 범위

제 2 장 냉동우유와 신선 냉장우유의 판별법 개발

제1절 냉장, 냉동, 해동조건 설정

가. 최대 빙결정 생성대의 온도 및 시간 확인

나. 냉장 조건과 냉동 조건의 설정

제2절 유즙의 채취방법 확립

가. 우유의 자연 유출 drip량의 조사

나. 착즙기에 의한 우유 유즙 채취

다. 원심분리에 의한 우유 drip의 성분조사

제3절 측정가능 근육 세포내 효소종 선별 확립

가. 냉장, 냉동시 유조직의 변화 관찰

나. 유즙 중 각종 효소 활성 검출

다. 근육 세포 내 측정가능 효소 종 선별

제4절 판별에 이용될 효소의 생화학적인 성질 규명

가. 효소반응의 최적 pH 및 최적온도 결정

나. 효소의 기질 특이성 조사

다. 효소의 반응속도(K_m , V_{max} 치) 확립

제5절 판별을 위한 정색법 개발

가. 효소반응의 신속한 color test 조건확립

제 3 장 냉동우유과 신선 냉장우유의 판별법 Kit화

제1절 분광 광도계를 이용한 측정조건 및 분석치 도출

- 가. Mitochondrial malate dehydrogenase 활성측정
- 나. Citrate synthase 활성측정
- 다. 기질농도별 검량선 작성
- 라. 육즙량과 효소활성의 상관관계 규명

제2절 냉장, 냉동 조건 하에서 color test의 적용여부 조사

- 가. 냉장, 냉동 조건 하에서 직접 color test의 실시
- 나. 냉장, 냉동하의 자연 발생 drip육즙을 이용 즉석 판별조사

제3절 즉석 판별 Kit의 개발

- 가. 정색반응 시약 및 시험지의 개발
- 나. 판별 Kit의 상품화

제4절 실제시료에 이용가능성 조사

- 가. 타 축종에 이용가능성 타진

제 4 장 냉동우유과 신선 냉장우유의 유통현장 조사 및 관능적 특성 설문조사

제1절 냉동우유과 신선 냉장우유의 판별법 관련조사 및 대상처 선정

제2절 냉동우유과 신선 냉장우유의 유통현장 설문조사

- 가. 유통현황 및 관능특성 조사

제3절 예비 simulation test 및 결과분석

- 가. 판별법 적용성 타진
- 나. 문제점 해결방안 제시

제 5 장 판별법 Kit의 현장적용

제1절 실제 유통현장에서 본 판별법의 적용시험

가. 실제 냉동육을 이용한 검증실험 감도, 신속성 조사

제2절 실제 설문조사와 현장시료 채취후의 검사 결과와의 상관관계 조사

가. 설문조사와 판별 Kit 결과의 비교

제 1 장 서 론

제 1 절 연구개발의 목적과 범위

본 판별법 개발연구의 목적은 냉동우유와 신선 냉장우유를 식별하는 즉석 분석방법 및 검증법을 개발함으로써 국내의 축산물의 유통체계를 확립해 식육생산자 및 식육소비자를 동시에 보호하고 유통과정에서 발생하는 오염원을 제거해 국민건강에 일익을 담당하고자 한다.

본 연구의 성과여부를 뒷받침하기 위하여 학문적으로 규명되어야 할 부분도 특허출원시 필요하다고 생각하므로 생화학적인 결과를 본 연구 중에서 제시하고자 한다.

본 연구의 개발기술 중 식육 세포 내에서의 물질 변화의 연구결과는 기타 어류 등에도 응용이 가능하며 또한 나아가서는 냉동시 발생하는 여러 가지 세포손상에 대한 연구는 식품의 동결방지 연구에 역으로 기여할 가능성이 크다. 결국 신선 냉장우유와 냉동우유를 구별해 내어 국내의 식육 유통상 발생하는 냉동, 해동, 재냉동으로 이어지거나 냉동육이 신선 냉장육으로 둔갑해 판매되는 등의 유통체계상의 문제점을 지적해 냄으로써 식육 유통체계를 획기적으로 개선시키는 것이 최종목표다. 즉, 소비자보호 및 유통질서 확보의 차원에서 즉석 판별법 kit를 개발하여 이를 유통현장에 적용하도록 하고, 아울러 이러한 결과를 이용하여 냉장 냉동육의 유통체계 확립과 안전성 확보 및 품질인증제도에 이용함으로써 식육 유통체계를 개선시키고자 하는 것이다.

제 2 장 냉동우육과 신선 냉장우육의 판별법 개발

제1절 냉장, 냉동, 해동조건 설정

가. 최대 빙결정 생성대의 온도 및 시간 확인

냉동 온도는 일반적으로 빙결정 형성온도 이상의 온도라고 말할 수 있으므로, 본 실험을 시작하기에 앞서 우선 최대 빙결정 생성시간대의 온도와 시간을 결정하고자 하였다. 냉동식품의 품질은 냉동 곡선 중 최대 빙결정 생성대를 통과하는 시간에 의하여 결정되므로 30~35분간 이내에 통과하는 급속 동결과 35분 이상 걸려 동결되는 완만 동결로 나누어 최대 빙결정 생성대를 측정하였다.

동결점은 식품 중에 빙결점이 생기기 시작하는 온도로서 우육은 $-0.6\sim-1.2^{\circ}\text{C}$ 인 것으로 나타났다. 또, 우육의 대부분의 수분(80%이상)이 빙결되는 범위는 최대 빙결정 생성대로 할 수 있으며 이 온도는 대략 $-1\sim-5^{\circ}\text{C}$ 인 것으로 확인되었다.

나. 냉장 조건과 냉동 조건의 설정

상기의 결과를 토대로 연구계획서에는 냉장과 냉동상태 설정을 위하여 많은 단계의 온도변화를 계획하였으나 냉장우육은 $5^{\circ}\text{C}\sim-1^{\circ}\text{C}$ 에서 저장하고, 냉동우육은 급속동결을 위해 -18°C 에서 동결해도 판별에는 지장이 없는 것으로 나타나 간략화 하였으며, 실험에 적합한 냉장육과 냉동육은 1.5g이었으므로 실제 해동시간은 상온(25°C)에서 3~4시간 해동하면 충분한 것으로 판명되었다.

제2절 육즙의 채취방법 확립

냉동육과 냉장육을 조직 및 세포 내에 존재하는 효소를 추출하여 분석한다면 냉동에 의한 육의 상태변화 보다는 이러한 물리적인 방법에 의한 변화가 더욱 클 것으로 예상되었기 때문에, 동결에 의하여 생성되는 drip을 채취하여 효소활성 측정의 시료로 하였다.

시료를 채취하는 방법으로 자연drip의 발생량과 인위적으로 압력을 가하여 생성되는 drip량을 측정하였다. 냉동육과 냉장육의 자연유출drip량 조사와 착즙기에 의한 우육 육즙 채취와 원심분리에 의한 우육 drip량 조사로 나누어 최상의 육즙 채취방법을 선정하고자 하였다.

가. 우육의 자연 유출 drip량의 조사

자연적으로 유출된 육즙을 이용하였을 때, 분석이 가능한가를 보기 위하여, 우선 식육 해동후 생성되는 자연적인 drip량의 무게를 측정 비교하였다. 우육의 부위별로 유출 drip량이 틀린 것으로 나타났지만, 하루만에 생성되는 drip량은 냉장육이나 냉동육 20g을 기준으로 하였을 때 거의 생성되지 않았고 해동후 2일만에 약 20 μ l 정도 추출되는 것으로 나타났다. 이는 대량으로 분석하기에는 양이 부족하고 시간이 걸리는 것으로 판명되었다.

나. 착즙기에 의한 우육 육즙 채취

이 실험을 위해 착즙기를 국내에서 처음으로 시작품으로 제작하였고 실용신안이나 특허출원을 예정하고 있다.

냉동우육과 신선 냉장우육의 4개 부위(사태, 우둔, 양지, 등심)를 선정하여 1 sample 당 5g, 3g, 2g, 1.5g 및 1.0g의 식육을 제작된 착즙기에 넣고 8kg/cm²의 압력을 가하여 착즙을 하였다.

근육으로부터 압출 압력에 의하여 유출 발생이 drip의 양과 단백질 농도를 측정하였고, 육즙을 채취하기 위한 최적의 조건을 찾았다. 실험결과 5g과 3g을 이용했을 때 육즙의 양은 각각 0.029ml와 0.075g 이었으며 2g, 1.5g 및 1.0g의 경우는 각각 0.124ml, 0.145ml 및 0.098ml이었다. 2g이하를 육즙 채취에 이용하는 것이 대체로 채취량이 많았으며, 그 중에서도 1.5g의 8kg의 압력으로 1분간 압착하였을 때 가장 채취의 효율이 좋은 것으로 나타났다. (Table. 1)

Table 1. Released of meat press juice amounts from fresh chilled beef sample(shank) weighed differently.

sample weight (g)	meat press juice amount (ml/g)
5.0±0.17 ^a	0.029±0.01 ^a
3.0±0.17 ^a	0.075±0.11 ^a
2.0±0.19 ^a	0.115±0.04 ^a
1.5±0.1 ^a	0.145±0.02 ^a
1.0±0.19 ^a	0.098±0.05 ^a

^aValues are the mean+S.D. (n-3)

이상의 실험에서 얻은 결과는 10g의 갈지 않은 육을 10 kg per cm²의 압력으로 육즙의 시료를 채취하는 일반적인 결과와 비교하여 볼 때, 본 실험을 위하여 제작된 착즙기를 이용하면 1/7에 해당하는 시료 양으로 많은 육즙을 효과적으로 채취할 수 있었다. 따라서 이후의 실험에서는 1.5g의 육을 냉장·냉동하여 실험에 임하였다.

다. 원심분리에 의한 우육 drip의 성분조사

냉동 우육과 신선 냉장우육을 원심분리의 속도와 시간을 설정하여 식육 고형분과 육즙을 분리하고 효소 활성을 조사하여 이용 가능한 조건을 도출하고자 하였다.

자연적으로도 시간이 경과하면 drip이 발생하나 그 양이 분석하기에는 충분치 못하므로, 적은 육으로부터 분석이 가능한 양을 신속하게 추출하려고 착즙기를 이용하지 않고 냉각 원심기를 이용하여 간단히 즙을 분리하는 것을 계획하였다. 각각의 육조각 1.5g을 3,000 rpm에서 10분간 원심 분리하였다.

그러나, 이 경우는 착즙기 보다 추출된 육즙의 양이 약 50 μ l로 착즙기 사용의 경우 보다 적었다. 이는 원심분리에 의하여 육즙의 분리는 잘 이루어지나 마지막 수집하는 과정에서 다시 육으로 회수되어 전 육즙량이 얻어지지 못한 것으로 나타났다. 성분조사는 너무 광범위한 표현이 되겠으나 본래 의도는 단백질의 함량 조사를 의미하였다.

각 부위별 냉동우육과 신선 냉장우육의 육즙내 단백질의 함량은 Table 2, 3, 4, 5에서 나타내었다. 단백질 함량은 일정하게 35.83 mg/ml에서 72.87 mg/ml의 범위로 나타났으며, 우둔 부위가 전체적으로 높은 단백질 함량을 보였고, 나머지 부위(사태, 등심, 양지)간에는 유의차가 나타나지 않았다($p>0.05$).

또한 동일 저장 기간동안의 온도별 차이점은 모든 부위에서 1일에서 5일 저장기간 동안은 육즙 내 단백질 함량은 증가하지만 유의적 차이는 없었다($p>0.05$). 그러나 7일 저장 이후에 냉장 저장육 보다 -4°C 를 제외한 냉동 저장육($-18, -77^{\circ}\text{C}$)에서 유의적으로 높은 단백질 함량을 나타내었다($p<0.05$).

따라서 이러한 결과로 육이 동결될 때 Ice crystal이 근세포 조직 내에 생성되어 이것에 의해 더 많은 근육 내 세포조직에 손상을 입게되어 세포내의 단백질이 유출된다는 실험 결과와도 상응하며, 결국 동결 저장 후 해동한 우육의 drip내에 상대적으로 많은 단백질 함량이 나타난다는 것과 냉동 후 해동하는 것은 냉장 보관한 것에 비해 더 많은 단백질 유출을 일으켜 육의 품질저하를 가져옴을 알 수 있었다.

Table 2. Changes of protein concentration in meat press juice between frozen beef and fresh chilled beef of Shank during storage with different temperature

Days	Temperature (°C)*			
	4	-4	-18	-77
1	37.86 ± 0.32 ^{cd}	38.63 ± 0.23 ^{bcd}	41.05 ± 0.37 ^{bc}	45.93 ± 1.96 ^{ad}
3	36.95 ± 1.60 ^{cd}	43.67 ± 0.59 ^{bc}	46.25 ± 0.87 ^{ab¹}	48.54 ± 0.27 ^{ac¹}
5	48.28 ± 0.46 ^{ab¹}	49.7 ± 0.09 ^{aA¹}	49.57 ± 1.83 ^{aA¹}	50.80 ± 0.09 ^{ac}
7	44.12 ± 1.78 ^{bc}	47.25 ± 0.27 ^{ab¹}	50.06 ± 2.15 ^{aA¹}	49.96 ± 0.46 ^{ac¹}
10	42.96 ± 2.42 ^{cd}	45.93 ± 1.87 ^{bc¹}	50.86 ± 0.11 ^{bA¹}	56.02 ± 2.10 ^{ab¹}
12	51.73 ± 0.68 ^{bA}	52.44 ± 1.96 ^{bA}	54.54 ± 0.27 ^{bA¹}	58.28 ± 0.19 ^{ab¹}
15	45.51 ± 0.73 ^{bc¹}	44.44 ± 4.43 ^{bc}	48.83 ± 3.79 ^{b¹}	68.86 ± 2.38 ^{aA}

* Each value represents an average from three trials.

^a Values with different small letters superscript in the same storage period were significantly different (P<0.05). Values with different capital letters superscript in the various storage temperature were significantly different (P<0.05).

* Unit - mg/ml

Table 3. Changes of protein concentration in meat press juice between frozen beef and fresh chilled beef of Loin during storage with different temperature

Days	Temperature(°C)*			
	4	-4	-18	-77
1	42.47 ± 2.19 ^{bA¹}	32.25 ± 1.05 ^{cd}	44.83 ± 2.78 ^{ab¹}	48.66 ± 0.15 ^{ad}
3	48.73 ± 6.84 ^{aA¹}	49.25 ± 6.11 ^{ab¹}	47.89 ± 2.46 ^{ac¹}	50.02 ± 0.55 ^{ac¹}
5	38.63 ± 0.23 ^{b¹}	37.86 ± 0.32 ^{bc¹}	53.47 ± 1.78 ^{ab¹}	55.70 ± 0.46 ^{ab¹}
7	47.18 ± 2.19 ^{bA¹}	36.96 ± 1.60 ^{cd}	49.54 ± 2.78 ^{ab¹}	53.37 ± 0.28 ^{ab¹}
10	49.12 ± 2.65 ^{aA¹}	50.47 ± 3.56 ^{ab¹}	58.35 ± 4.93 ^{aA¹}	53.80 ± 0.32 ^{ab¹}
12	45.02 ± 0.50 ^{bA¹}	54.89 ± 3.70 ^{ab¹}	50.57 ± 0.41 ^{ab¹}	47.60 ± 4.43 ^{ab¹}
15	58.86 ± 7.76 ^{aA}	70.54 ± 3.83 ^{aA}	63.57 ± 0.09 ^{aA}	62.47 ± 1.64 ^{aA}

* Each value represents an average from three trials.

^a Values with different small letters superscript in the same storage period were significantly different (P<0.05). Values with different capital letters superscript in the various storage temperature were significantly different (P<0.05).

* Unit - mg/ml

Table 4. Changes of protein concentration in meat press juice between frozen beef and fresh chilled beef of Flank during storage with different temperature

Days	Temperature(°C)*			
	4	-4	-18	-77
1	45.06 ± 3.10 ^{aCD}	44.38 ± 4.33 ^{aCD}	50.25 ± 0.87 ^{aB}	47.7 ± 2.92 ^{aC}
3	43.67 ± 0.59 ^{bD}	36.96 ± 0.82 ^{cD}	49.54 ± 3.38 ^{abB}	53.37 ± 4.38 ^{aC}
5	52.28 ± 2.19 ^{aAB}	52.8 ± 2.74 ^{aAB}	49.5 ± 2.19 ^{aB}	53.89 ± 0.18 ^{aBC}
7	49.12 ± 1.19 ^{aBC}	51.12 ± 4.11 ^{aBC}	50.99 ± 1.83 ^{aB}	53.57 ± 0.64 ^{aBC}
10	42.67 ± 2.64 ^{cD}	52.54 ± 1.83 ^{bAB}	52.70 ± 2.33 ^{bB}	65.6 ± 3.70 ^{aA}
12	43.67 ± 0.59 ^{cD}	45.57 ± 0.82 ^{cBC}	68.86 ± 3.38 ^{aA}	59.67 ± 0.96 ^{bAB}
15	54.54 ± 0.18 ^{bA}	60.05 ± 4.88 ^{abA}	65.7 ± 1.55 ^{aA}	65.99 ± 4.97 ^{aA}

* Each value represents an average from three trials.

^a Values with different small letter superscript in the same storage period are significantly different (P<0.05).
Values with different capital letter superscript in the various storage temperature are significantly different (P<0.05).

* Unit - mg/ml

Table 5. Changes of protein concentration in meat press juice between frozen beef and fresh chilled beef of Round during storage with different temperature

Days	Temperature(°C)*			
	4	-4	-18	-77
1	51.19 ± 4.74 ^{aA}	45.83 ± 1.73 ^{aCD}	45.26 ± 3.73 ^{aC}	48.21 ± 2.01 ^{aC}
3	47.60 ± 1.05 ^{bA}	43.67 ± 3.33 ^{bD}	54.34 ± 1.83 ^{aB}	55.99 ± 1.78 ^{aBC}
5	50.51 ± 1.05 ^{aA}	50.25 ± 2.78 ^{aC}	54.15 ± 2.65 ^{aB}	54.73 ± 1.04 ^{aBC}
7	44.31 ± 4.24 ^{bA}	58.28 ± 0.26 ^{aB}	52.64 ± 0.50 ^{aB}	55.28 ± 0.87 ^{aBC}
10	51.86 ± 1.41 ^{bA}	50.57 ± 0.59 ^{bC}	50.60 ± 0.64 ^{bBC}	59.54 ± 4.15 ^{aB}
12	47.60 ± 1.05 ^{bA}	43.67 ± 3.33 ^{bD}	54.34 ± 1.83 ^{bB}	72.57 ± 5.45 ^{aA}
15	52.41 ± 2.83 ^{bA}	67.70 ± 1.64 ^{aA}	66.28 ± 4.56 ^{aA}	70.41 ± 1.04 ^{aA}

* Each value represents an average from three trials.

* Values with different small letter superscript in the same storage period are significantly different (P<0.05).
Values with different capital letter superscript in the various storage temperature are significantly different (P<0.05).

* Unit - mg/ml

제3절 측정가능 근육 세포내 효소종 선별

본 연구에서는 동결에 의하여 변성이 되는 근육 세포내 효소의 활성 변화에 착안하여, 채취한 육즙을 이용하여 효소활성을 측정하고 이를 판별을 위한 kit화까지 연결시키기 위한 target물질로 선정하고자 하였다.

그리고, 효소활성을 측정하는 것 외에 산화환원 물질간의 변화를 추정하여 좋은 결과를 얻으면 쉽게 판별용 시험지를 kit로써 만들 수 있기 때문에 육 중에 존재하는 산화환원물질을 찾아 그 변화를 추적하였다. 냉장이나 냉동육 drip중의 cytochrom C나 Heme분자의 산화에 의하여 생성되는 몰식자산 에틸량을 540nm에서 측정하여 비교하였으나 차이가 없었다.

또, 냉동육과 냉장육을 아무 처리 없이 쉽게 판별할 수 있는 방법으로 판단되어 냉동육과 냉장육의 drip 50 μ l를 각각 1ml의 cell에 첨가하여 UV/vis spectrophotometer로 200~900 nm의 범위에서 각각의 peak변화를 scanning하였다. 1회의 실험에서는 냉동육과 냉장육간의 peak차이가 나타났으나 다른 부위의 다른 sample을 이용하여 측정하였을 때는 scanning peak에 차이가 나타나지 않았다. 계속되는 실험을 통해서 미토콘드리아 내에 존재하는 효소인 mitochondrial malate dehydrogenase와 citrate synthase의 활성차이가 냉장육과 냉동육 간에 특이적으로 나타나는 것을 찾아 이 두 효소를 측정가능 효소 종으로 선택하여 실험에 임하였다.

Table 6. Comparison of various enzyme activities between fresh chilled beef and frozen beef

Enzyme	fresh chilled beef	frozen beef	possibility for differentiation
β -hydroxyacyl-CoA- dehydrogenase	4.584	8.393	○
Acid phosphatase	0.010	0.010	×
Glutamate dehydrogenase	0.091	0.578	○
5'-Nucleotidase	0.007	0.001	○
Succinate dehydrogenase	0.098	0.085	×
Alkaline phosphatase	0.090	0.087	×
β -Glucuronidase	0.884	0.993	×
β -hydroxybutyrate dehydrogenase	0.598	0.531	×
Cathepsin	0.733	0.717	×
Ca ²⁺ -ATPase	0.430	0.128	○
Mg ²⁺ -ATPase	0.038	0.132	×
Lipoamide dehydrogenase	0.015	0.031	×
Malate dehydrogenase	15.15	23.48	○
Citrate synthase	0.096	0.207	○
Diaphorase	0.140	0.197	×

* Each value is the mean of triplicate determinations. (n=3)

* ○ and × express available or unavailable enzyme to distinct fresh chilled beef and frozen beef

* All values are represented to net absorbance except β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase and malate dehydrogenase which are used Unit/ml unit

가. 냉장, 냉동시 육조직의 변화 관찰

냉장·냉동후의 일어나는 육조직의 빙결정의 상태 등 외관변화를 관찰하였으나, 냉동후 해동한 sample과 냉장육 간의 뚜렷한 차이를 발견하지 못하였다.

나. 육즙 중 각종 효소 활성 검출

근육의 착즙 drip에서 쉽게 검출되는 조건을 충족할 수 있는 식육 세포조직내의 효소종을 조사하였다.

일반적으로, 동결에 의하여 mitochondria와 lysosome과립구 등이 파괴되는 것으로 알려져 있으므로 효소들이 냉동에 의하여 영향을 받을 가능성이 충분히 있으므로, mitochondria에 존재하는 glutamate dehydrogenase, malate dehydrogenase, β -hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase (HADH) 및 β -hydroxybutyrate-dehydrogenase (HBDH) 등의 효소활성을 측정하였다. 마찬가지로 lysosome이 동결에 의하여 파괴될 때, 유출될 것으로 예상되는 대표적 표지효소(marker enzyme)인 acid phosphatase와 β -glucuronidase의 효소활성을 측정하였다. 이외에 근육과 microsome획분에 존재하는 alkaline phosphatase, cathepsin, 5'-nucleotidase, cytochrome c reductase등의 효소활성도 측정하였다.

이상의 효소들의 활성을 측정한 결과, 냉장·냉동육의 육즙에 활성차이를 나타내는 것은 Hydroxyacyl-CoA-dehydrogenase(HADH)를 비롯하여 Glutamate dehydrogenase, 5'-nucleotidase등이었고, 그 나머지 효소활성들은 냉장·냉동의 활성차이를 나타내지 않거나 검출되지 않았다. 2차년도에서, Ca^{2+} -ATPase를 비롯하여 mitochondria에 존재하는 다른 효소활성들을 측정하였고, 그 결과 mitochondrial malate dehydrogenase에서 5분 반응 후에 냉장, 냉동육 간에 특이적인 차이점을 도출할 수 있었고, 또한 citrate synthase의 활성도 조사에서도 냉장육과 냉동육 간에 활성이 특이적으로 나타나는 것을 발견할 수 있었다.

다. 근육 세포 내 측정가능 효소종 선별

Glutamate dehydrogenase, 5'-nucleotidase, cytochrome c oxidase등이 냉장육 보다는 냉동육의 육즙에서 효소활성이 높게 나타났으나, 저장기간별로 활성의 변화가 심

하여 판별에 필요한 절대적 효소활성 수치를 결정할 수 없어, 냉동육 판별에는 부적합한 것으로 나타났다. 측정결과, HADH의 활성은 냉장육에서는 전혀 검출이 되지 않으나 냉동육에서는 3.5 Unit/ml 이상으로 뚜렷이 효소활성이 검출되어 일반적으로 유통되는 신선육과 냉동우육은 판별할 수 있는 방법으로 나타났다.

그러나 HADH(β -hydroxyacyl-CoA dehydrogenase)를 이용한 차이점 도출 연구에서는 -12°C 이하에서 저장된 육에서는 가능하나 그 이상의 온도에서 저장된 것에서는 판별하기 힘들다는 결론을 얻게 되었고, 또한 효소 활성 측정시 기질의 단가가 너무 높았기 때문에 실제 유통현장에서 쉽게 이용하기가 쉽지 않았다.

그래서 우리는 기질의 단가가 낮고, 쉽게 육즙내에서 검출되며, 특이적인 반응을 하는 효소종을 더 선별하기 위해 노력하였고, 그 결과 malate dehydrogenase와 citrate synthase를 선정하여 실험하게 되었다.

Mitochondrial malate dehydrogenase(EC 1.1.1.37)의 생체 내 Citric cycle상에서의 기작은 다음과 같다.



Isozyme인 mitochondrial malate dehydrogenase(NAD^+ oxidoreductase, E.C.1.1.1.37)의 냉장, 냉동육에서 해동에 의해 유출되는 육즙의 저장 기간별 저장 온도별 활성의 특이성, 그리고 부위별 활성의 차이점을 도출하기 위하여 효소 활성을 측정하였고 그 assay방법은 Siegel, L 등의 방법을 수정해서 이용하였다.

여기에 사용된 모든 시약은 Sigma Chemical Co(USA)에서 구입하여 실험에 이용하였다.

0.1M potassium phosphate buffer(0.1M K_2HPO_4 를 만든 후, 0.1M KH_2PO_4 로 pH를 보정)를 pH 7.4로 보정한 후 2.5ml, 0.12M Glycine-NaOH(pH 10)와 0.3ml, 0.85M L-Malic acid(1N NaOH로 pH 7.4로 보정), 0.2ml, 37.5mM NAD^+ (pH 6.5)를 미리 준비된 Test tube에 넣은 후 28°C Water bath에서 10분간 Pre-incubation 시킨 후 1cm light path cuvette에 옮겨, 미리 제조한 Buffer를 이용해서 10배로 희석한 $50\mu\text{l}$, 육즙을 이 효소 반응액에 넣어서 흡광도 340nm에서 10분간 UV-spectrophotometer(AN-

ALAB, UVS-30NP, KOREA)를 이용하여 흡광도 변화를 조사하였고, stopwatch를 작동시킨 후 정확히 1분이 경과 할 때마다 흡광도를 기록하였다.

이 효소활성(Unit/ml)은 다음과 같이 계산하여 분당 체적 활성으로 나타내었다.

$$\text{Unit/ml} = \frac{V}{\epsilon \times d \times v} \times \Delta E/\text{min} \times \text{dilution factor}$$

V = volume(3.05ml)

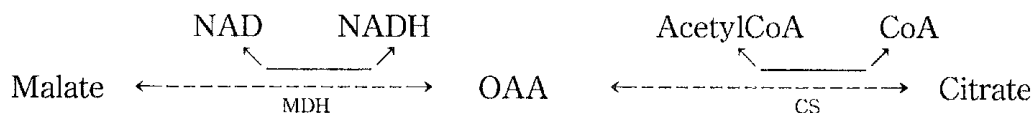
ϵ = extinction coefficient for NADH at 340nm(6.3)

d = light path of the cuvette(here 1cm)

v = volume of the meat juice(0.05ml)

Dilution factor = 10 folds

Citrate synthase(CS)(EC 1.1.1.37)의 생체 내 Citric cycle 내에서의 기작은 다음과 같다.



Citrate synthase는 냉장, 냉동육에서 해동에 의해 유출되는 육즙의 저장 기간별 저장 온도별 활성의 특이성, 그리고 부위별 활성의 차이점을 도출하기 위하여 효소활성을 측정하였고, 그 assay방법은 Srere 등(1963)의 방법을 수정하여 이용하였다.

여기에 사용된 모든 시약은 Sigma Chemical Co(USA)에서 구입하여 실험에 이용하였다.

100mM Tri-HCl buffer(100mM Tri([hydroxymethyl]aminomethane)를 만든 후, 0.1N HCl로 pH를 보정)를 pH 7.5로 보정한 후 0.77ml, 0.2mM acetyl-CoA 0.05ml, 0.5mM OAA(oxaloacetic acid) 0.05ml, 1mM DTNB(5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic

acid)) 100ml을 미리 준비된 Test tube에 넣은 후 미리 제조한 Buffer를 이용해서 100배로 희석한 50 μ l, meat press juice를 이 효소 반응액에 넣어서 흡광도 412nm에서 5분간 UV-spectrophotometer(ANALAB, UVS-30NP, KOREA)를 이용하여 흡광도 변화를 조사하였고, stopwatch를 작동시킨 후 정확히 1분이 경과 할 때마다 흡광도를 기록하였다. 이때 모든 시약은 미리 제조한 Tri-HCl buffer에 희석을 하여 사용하였으며 모든 반응이나 조작은 실온에서 실시하였다.

이 효소활성(Unit/ml)은 다음과 같이 계산하여 분당 체적 활성으로 나타내었다.

$$\text{Unit/ml} = \Delta E/\text{min} \times \text{dilution factor}$$

Dilution factor = 100 folds

제4절 판별에 이용될 효소의 생화학적인 성질 규명

가. 효소반응의 최적 pH 및 최적온도 결정

본 연구에서는 신선 냉장육과 냉동육의 판별을 목적으로 하기에 육즙내 존재하는 두 가지 효소인 mitochondrial malate dehydrogenase와 citrate synthase 두 가지 효소의 반응 최적 pH와 최적 온도에 관한 연구는 필수적이다. 우선 이 두 가지 효소에 관한 연구는 많이 이루어져 있는 관계로 효소반응의 최적 pH와 최적 온도는 참고 문헌에 나타나 있는 실험 방법들을 토대로 그 방법들을 수정하면서 적절한 pH와 최적 온도를 도출해 실험에 임하였다. 두 가지 효소 모두 생체내 존재하는 효소이기 때문에 최적 pH는 mitochondrial malate dehydrogenase는 pH 7.5 citrate synthase는 pH 7.1이었고, 최적 온도는 37 $^{\circ}$ C와 20 $^{\circ}$ C이었다.

더 자세한 세부사항에 관해서는 효소의 활성측정에서 자세하게 기술하였다.

나. 효소의 기질 특이성 조사

Mitochondrial malate dehydrogenase는 L-malic acid을 기질로 하여 oxaloacetate를 생성한다. 이 반응은 생체 내 시트르산 회로에서 이루어지는 반응으로서 malate dehydrogenase의 기작으로 이루어진다. 효소가 엄청난 촉매력을 가지고 있으며, 그 촉매력은 일반적으로 합성 촉매보다 훨씬 더 강하다. malate dehydrogenase 역시 반응 부산물을 만들지 않으면서 특이적 화학 반응을 촉진한다. 그리고 이 효소는 단일 치환반응 효소로서 정해진 순서에 따라서 한가지 반응을 한다고 알려져 있다. 더 자세한 효소의 기질 특이성에 대해서 mitochondrial malate dehydrogenase의 Km과 Vmax치를 측정하여 확립하였다.

다. 효소의 반응속도(Km, Vmax 치) 확립

본 연구에서는 mitochondrial malate dehydrogenase에 대한 모든 조건을 만족시키는 범위에서 반응속도를 최대 속도 Vmax에 접근시키기 위해 최대의 기질농도를 이용하여 Vmax와 Km을 구하였다. 그 결과로 Km과 Vmax를 Fig 1에 나타내었다.

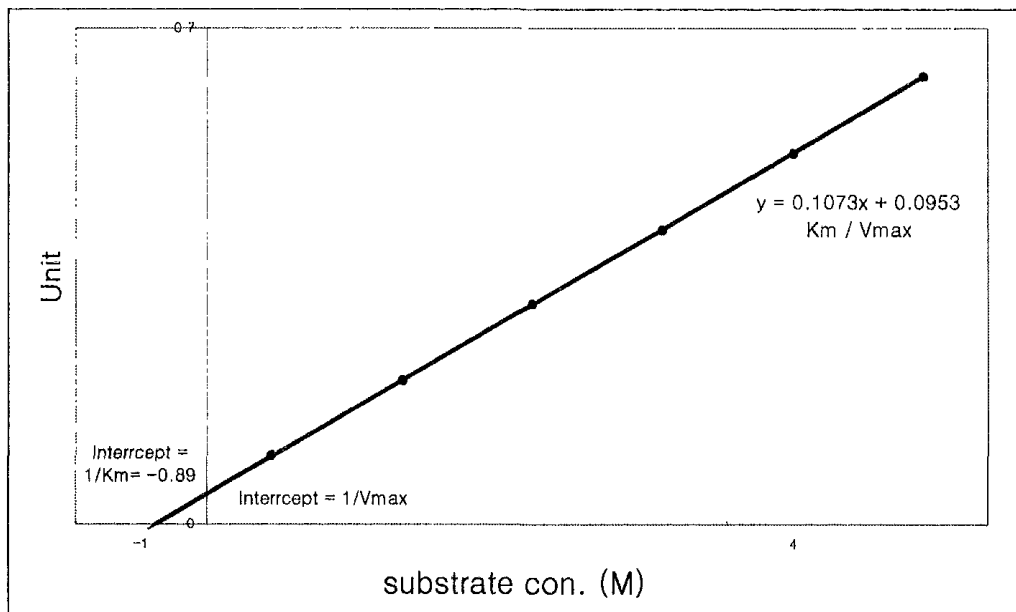


Fig 1. The measurement of Vmax and Km value of mitochondrial malate dehydrogenase in meat press juice

Fig 1. 은 효소의 반응속도를 Lineweaver-Burk법 즉 이중역수표시로 나타내었다. 이 값으로 mitochondrial malate dehydrogenase가 기질 농도에 대해 반응하는 값의 근사치를 얻을 수 있었다.

그 결과 mitochondrial malate dehydrogenase의 최대 속도의 절반 값이 매우 낮은 농도에서 나타남을 알 수 있었고, mitochondria malate dehydrogenase는 Km값이 비교적 낮아서 쉽게 효소와 기질의 복합체를 형성하는 효소라는 것을 알 수 있었다.

본 실험은 세포 외에서 인위적으로 이루어진 것이므로 기질에 대한 포화정도가 세포 내에서 보다 높다는 것을 감안한다면, Fig 2.에서 보는 바와 같이 meat press juice내의 mitochondrial malate dehydrogenase Vmax 값은 $0.6318 \mu\text{mol}/\text{min} \cdot \text{Km}$ 0.005M으로 실험결과에서 알 수 있었다.

제5절 판별을 위한 정색법 개발

가. 효소반응의 신속한 color test 조건확립

주로 단백질 중의 SH기 정량에 이용되는 시약인 DTNB(5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid))는 Fig 3.에서 보는 바와 같이 약알칼리성에서 SH기와 반응한다. SH기 1mol로 부터 1mol의 2-nitro-5-mercapto 안식향산을 만들어 이온화된 것은 황색(yellow)으로 발색된다. 이것을 412nm의 흡광도의 측정을 통하여 SH기의 수를 정량하는데 우리는 이번 실험에서 이러한 방법을 응용하여 흡광도를 측정하는 방법 대신 백색의 정색반응 시험지(Whatman 2)에 반응액을 spotting하여 비색계로 그 색의 변화를 시간별로 관찰하였다.

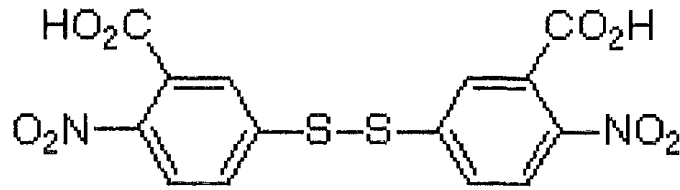


Fig 2. Transformation of structure in Ellman reagent color reaction.

정색반응의 재료 및 실험 방법은 다음과 같다.

100mM Tri-HCl buffer(100mM Tri([hydroxymethyl]aminomethane)를 만든 후, 0.1N HCl로 pH 7.5로 보정한 후 0.77ml, 0.2mM acetyl-CoA 0.03ml, 0.5mM OAA (oxaloacetic acid) 0.05ml, 1mM DTNB(5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid)) 100ml을 미리 준비된 Test tube에 넣은 후 미리 제조한 Buffer를 이용해서 1000배로 희석한 50 μ l, meat press juice를 이 효소 반응액에 넣어서 조제한 용액을 사용하였다. 이때 모든 시약은 미리 제조한 Tri-HCl buffer에 희석을 하여 사용하였다.

Ellman법을 이용하여, citrate synthase의 반응에서 생성되는 SH기와 DTNB와의 반응을 토대로 정색반응을 실시하였다. 이 효소 반응액 100 μ l을 정색반응 시험지(Whatman 2)에 spotting후 dry oven에서 완전히 건조를 시켰다.

완전히 건조된 정색반응 시험지(Whatman 2)를 UV lamp를 이용하여 2 ~ 3분 정도 UV를 조사한다. 이 때 DTNB와 UV간의 화학 반응이 일어나서 노란색을 생성하는데, 이 반응이 일어나기 전까지 처리구에서 DTNB와 citrate synthase의 활성에 의해 생성된 SH간의 반응으로 생성되는 yellow color를 시간별로 stop watch를 이용하여 측정하였다. 우리는 이 방법을 통하여 color test의 조건을 확립하였다.

제 3 장 냉동우육과 신선 냉장우육의 판별법 Kit화

제1절 분광 광도계를 이용한 측정조건 및 분석치 도출

가. Mitochondrial malate dehydrogenase 활성 측정

각 부위별로 저장온도에 따른 mitochondrial malate dehydrogenase 활성을 비교해 보았다(Table. 7). 냉장육과 냉동육 간의 mitochondrial malate dehydrogenase의 분당 활성도는 사태의 경우 냉장 저장육은 23.63 Unit/ml의 활성을 나타내었고, -4°C 는 20.91 Unit/ml, -18°C 는 26.43 Unit/ml 그리고 -77°C 는 25.90 Unit/ml의 활성을 나타내었다. 동일한 부위에서 저장 온도에 따른 효소의 활성은 냉장 저장육보다 -4°C 를 제외한 냉동 저장 온도(-18°C , -77°C)에서 모두 유의적으로 높은 효소의 활성을 나타내었다($p < 0.05$). 동일한 저장 온도에서 각 부위간에 활성의 차이점은 -77°C 에서 냉동 저장한 육이 유의적 차이 없이 가장 높은 효소 활성을 나타내었고, 그 저장 온도를 제외하고는 모두 유의성 있는 변화량을 나타내었다($p < 0.05$) 따라서 저장 온도가 낮아질수록 활성은 부위에 상관없이 유의적으로 증가한다는 사실을 확인할 수 있었다. 그러나 냉장육과 -4°C 간에서 활성의 유의적 차이를 발견할 수 없었는데, 이것은 -5°C 에서는 muscle 내의 freezable water 중 80%가 얼게되고, mitochondria의 damage는 20%의 남아있는 수분이 어는 동안 발생하게 된다고 알려져 있는 원리에 의한 것으로 해석된다. 또한 해동시 $0 \sim -5^{\circ}\text{C}$ 범위 온도대가 freezing때보다 오래 지속되지만 $0 \sim -5^{\circ}\text{C}$ 의 범위에서는 mitochondria damage에 많은 영향을 주지 않는다는 사실과도 부합된다.

각 부위에 대한 변화량 차이에서는 모든 부위의 -77°C 냉동 저장한 육의 경우 그 차이에 대한 각 부위별 유의차가 없었으며, 등심을 제외하고는 모두 온도대별로 유의적 차이가 없는 것으로 결과를 얻게 되었다($p > 0.05$).

등심의 경우는 육즙기를 통한 meat press juice 채취시 다량의 지방성분의 유입으로 인하여 어떠한 간섭물질이나 저장 중 지방 성분의 변성에 의해 정상적인 활성을 나타내지 못했다고 생각된다.

여기서 부위별로 유의적이지는 않지만 활성의 차이가 났는데, 부위별로 효소 활성이 다른 것은 myoglobin content와 관련이 있다고 알려져 있다.

또 냉장육의 경우에도 mitochondria inner membrane에 존재하는 mitochondrial malate dehydrogenase 활성이 측정되었는데, mitochondria는 sample을 cutting 할 때

손상을 입게되어 meat press juice 내로 그 내부의 효소가 유입될 수 있으므로 일반적으로 냉장육의 경우에도 mitochondria 내에 존재하는 효소의 활성이 측정될 수 있다는 사실과도 실험결과가 일치하는 것을 볼 수 있었다.

실험군의 meat press juice내 mitochondrial malate dehydrogenase의 활성은 10분간 흡광도 변화량을 조사함으로써 계산되었다. 여기서 특이한 점은 등심을 제외한 모든 부위에서 효소반응개시 3분 후에 -4°C 에서 동결 저장한 육을 제외하고 동결 저장육의 효소 활성이 떨어지는 것을 확인 할 수 있었고, 5분 반응 후에는 그 효소의 활성을 발견할 수 없었다(Fig. 3, 4, 5, 6). 또한 냉장육의 경우는 12분 반응 후 활성이 정지되는 것으로 실험결과 알 수 있었다.

이러한 결과를 토대로 저장기간에 따른 부위별 mitochondrial malate dehydrogenase의 활성을 측정하였다(Fig. 7, 8, 9, 10).

15일간 냉장, 냉동육을 온도에 따라(4 , -4 , -18 , -77°C) 저장하면서 그 활성을 측정하였는데. 저장 기간이 길어져도 그 활성의 차이는 유의적으로 변화하지 않고($p > 0.05$), 모든 실험군(사태, 등심, 양지, 우둔 부위)에서도 유사한 활성을 유지하였다($p > 0.05$). 이러한 결과는 -60°C 이상 냉동 저장 시 냉동육의 활성은 증가하나 유의적으로 많은 양의 효소들이 유출되지 않는다는 사실을 입증시켜줄 수 있는 경향을 보였다. 또한 냉장, 냉동육 판별에 이용되는 효소의 조건인 저장기간 동안 활성이 떨어지지 않는 경향도 나타내고 있다.

Table. 7 Influence of freezing conditions on the activity of mitochondrial malate dehydrogenase in the meat press juice from various parts of beef

	Temperature(°C)			
	4	-4	-18	-77
Shank	23.34 ± 0.41 ^{bA}	20.91 ± 0.41 ^{cA}	26.43 ± 0.14 ^{aA}	25.90 ± 0.21 ^{aA}
Flank	17.09 ± 0.07 ^{cl3}	20.67 ± 0.34 ^{bA}	26.43 ± 0.69 ^{aA}	26.19 ± 0.48 ^{aA}
Round	18.06 ± 0.62 ^{bl3}	17.24 ± 0.27 ^{bl3}	28.03 ± 0.89 ^{aA}	27.11 ± 5.75 ^{aA}
Loin	15.15 ± 0.21 ^{cl}	14.04 ± 0.41 ^{cl}	20.72 ± 0.55 ^{bl3}	23.48 ± 0.21 ^{aA}

* Each value represents an average from three trials.

* Values with different small letter superscript in the same storage period are significantly different (P<0.05).
 Values with different capital letter superscript in the various storage temperature are significantly different (P<0.05).

* Unit - unit of enzyme activity

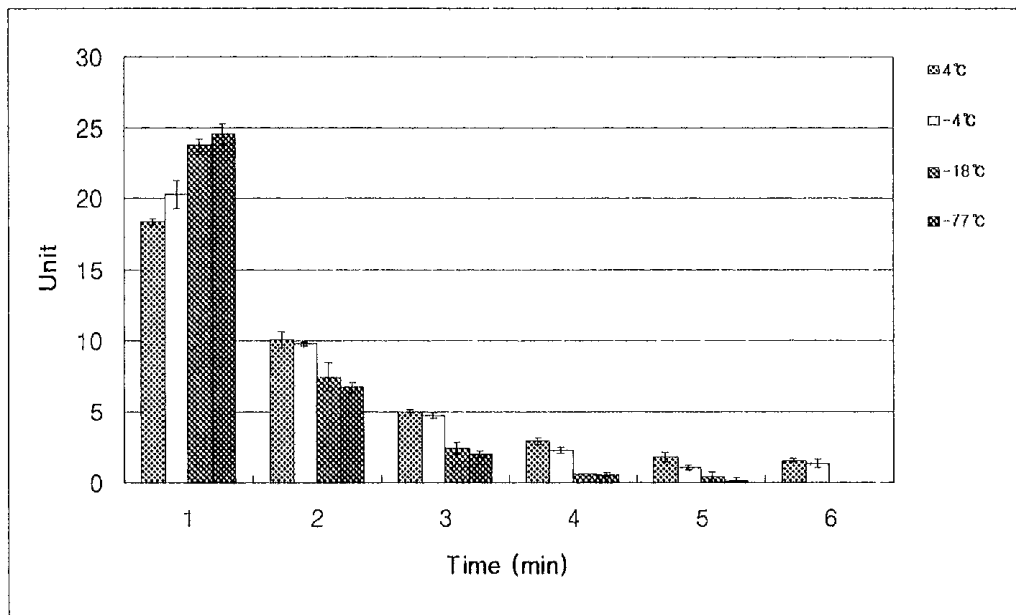


Fig. 3 Mitochondrial malate dehydrogenase activity in the meat press juice from Round

- * Each value represents an average of three trials.
- * Bars with different letter differ significantly(P<0.05).
- * Unit = unit of enzyme activity(U/ml)

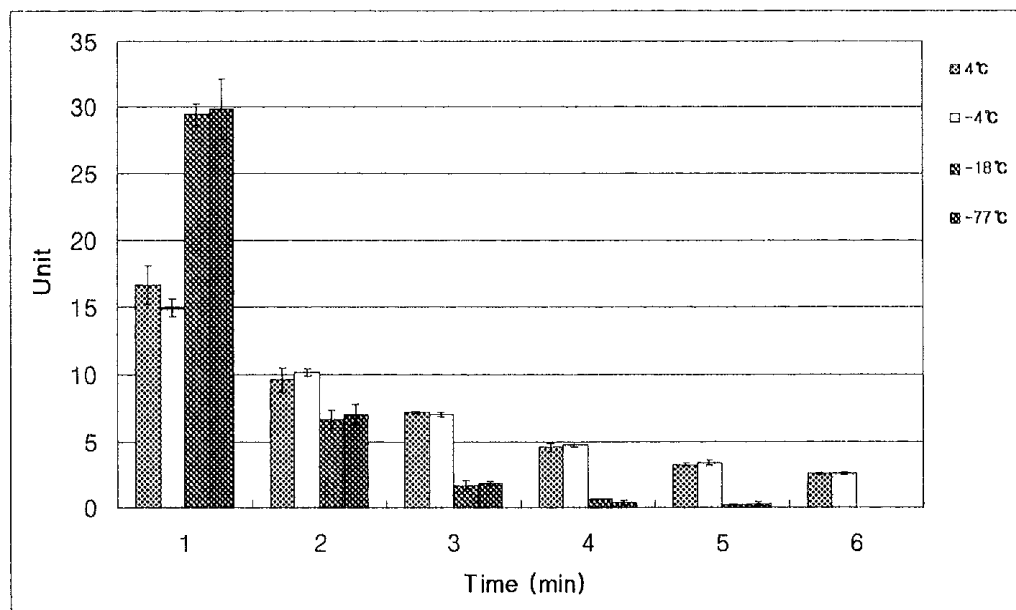


Fig. 4 Mitochondrial malate dehydrogenase activity in the meat press juice from Shank

- * Each value represents an average of three trials.
- * Bars with different letter differ significantly(P<0.05).
- * Unit = unit of enzyme activity(U/ml)

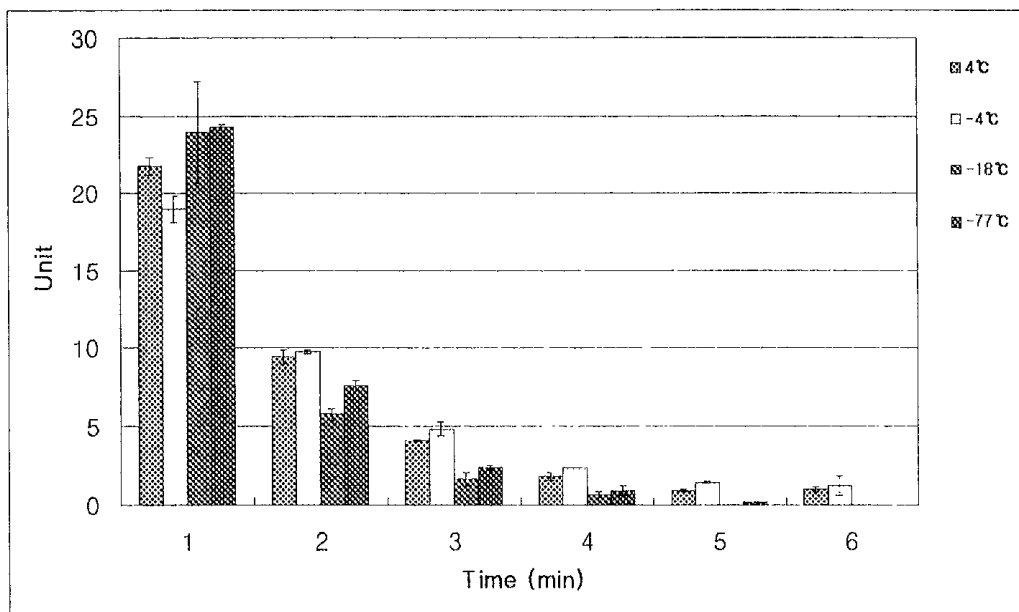


Fig. 5 Mitochondrial malate dehydrogenase activity in the meat press juice from Flank

- * Each value represents an average of three trials.
- * Bars with different letter differ significantly(P<0.05).
- * Unit = unit of enzyme activity(U/ml)

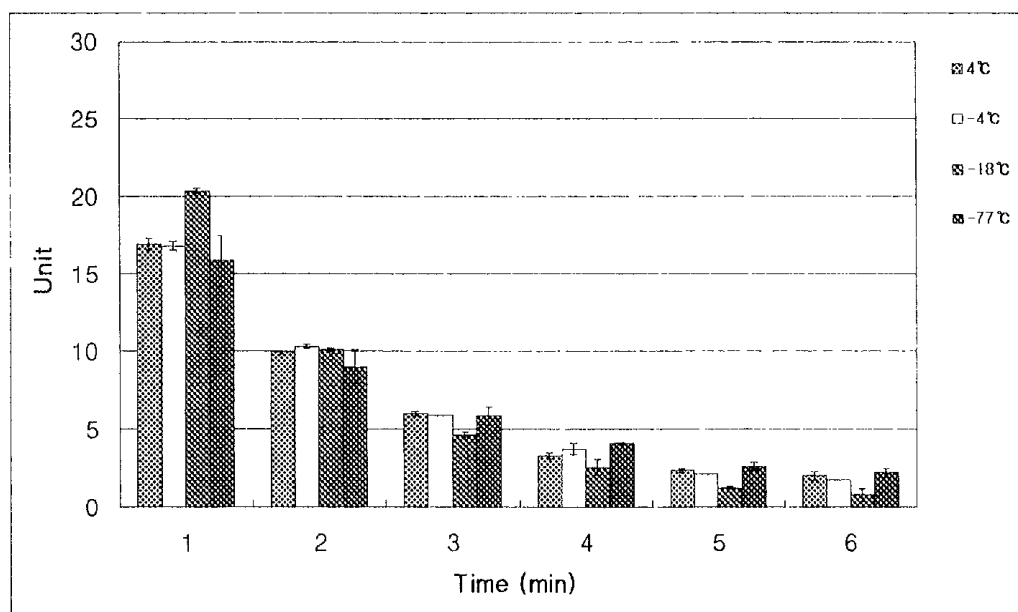


Fig. 6 Mitochondrial malate dehydrogenase activity in the meat press juice from Loin

- * Each value represents an average of three trials.
- * Bars with different letter differ significantly(P<0.05).
- * Unit = unit of enzyme activity(U/ml)

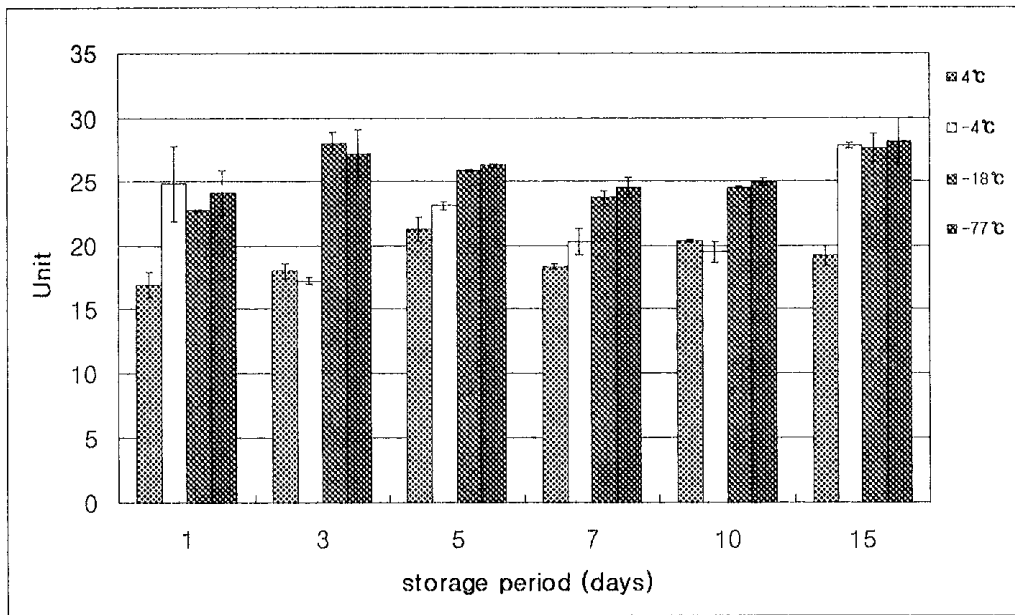


Fig. 7 Changes of mitochondrial malate dehydrogenase activity of meat press juice from Round during storage period

* Each value represents an average of three trials.
 * Bars with different letter differ significantly ($P < 0.05$).
 * Unit = unit of enzyme activity (U/ml)

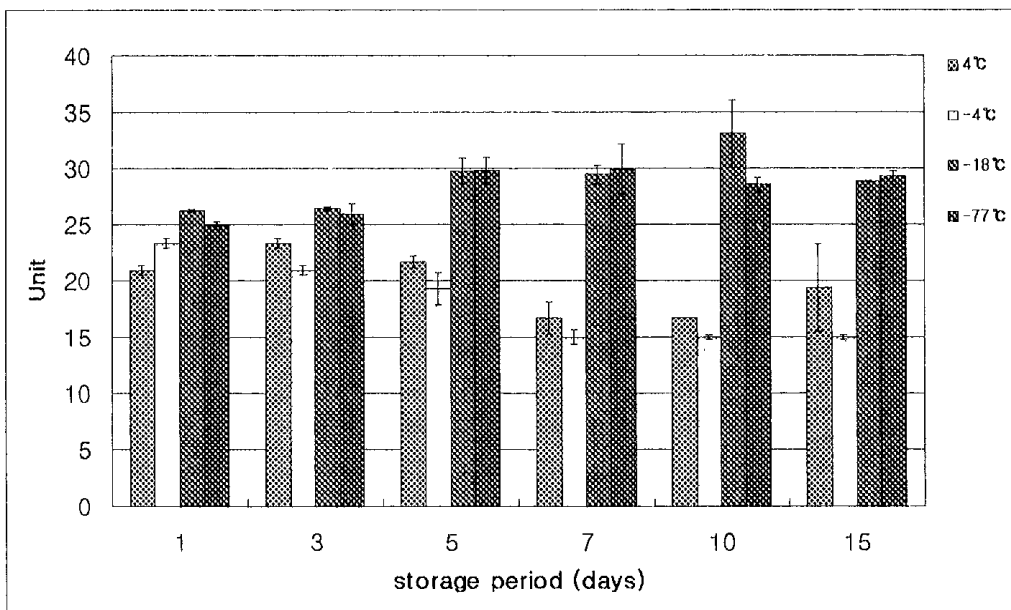


Fig. 8 Changes of mitochondrial malate dehydrogenase activity of meat press juice from Shank during storage period

* Each value represents an average of three trials.
 * Bars with different letter differ significantly ($P < 0.05$).
 * Unit = unit of enzyme activity (U/ml)

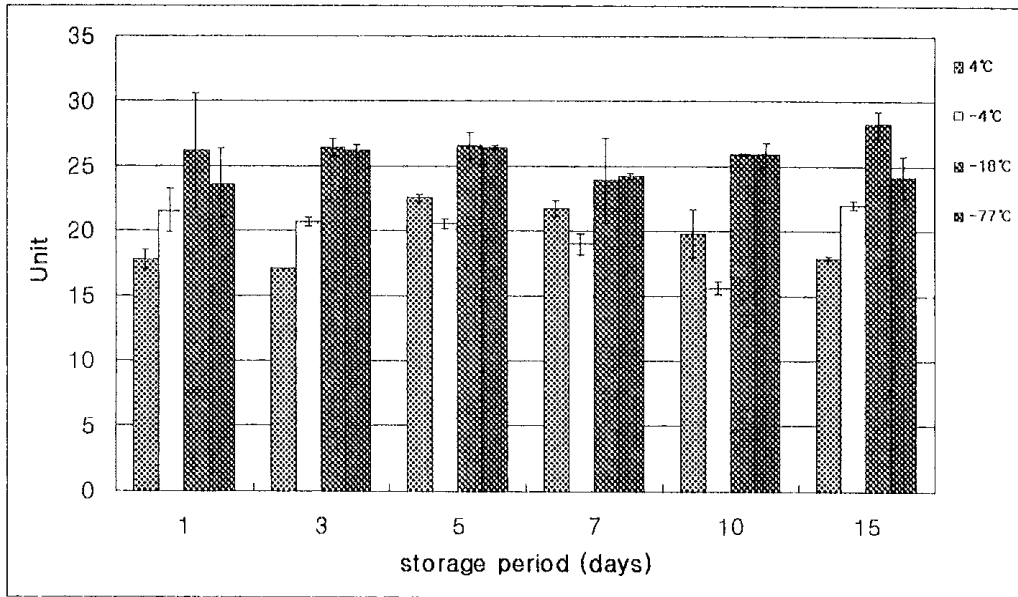


Fig. 9 Changes of mitochondrial malate dehydrogenase activity of meat press juice from Flank during storage period

- * Each value represents an average of three trials.
- * Bars with different letter differ significantly(P<0.05).
- * Unit = unit of enzyme activity(U/ml)

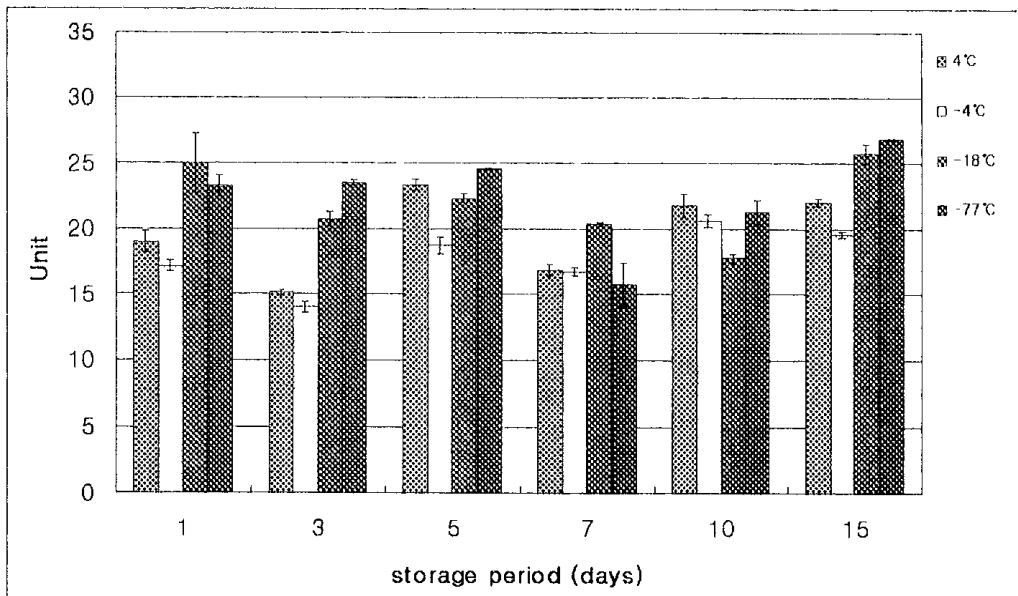


Fig. 10 Changes of mitochondrial malate dehydrogenase activity of meat press juice from Loin during storage period

- * Each value represents an average of three trials.
- * Bars with different letter differ significantly(P<0.05).
- * Unit = unit of enzyme activity(U/ml)

나. Citrate synthase 효소 활성

각 부위별로 저장온도에 따른 citrate synthase 활성을 비교해 보았다(Table. 8).

냉장육과 냉동육 간의 citrate synthase의 분당 활성도는 사태의 경우 냉장 저장육은 0.960 Unit/ml의 활성을 나타내었고, -4°C 는 0.980 Unit/ml, -18°C 는 2.510 Unit/ml 그리고 -77°C 는 2.070 Unit/ml의 활성을 나타내었다. 동일한 부위에서 저장 온도에 따른 효소의 활성은 냉장육보다 -4°C 를 제외한 냉동 저장 온도(-18°C , -77°C)에서 모두 유의적으로 높은 효소의 활성을 나타내었다($p < 0.05$). 동일한 저장 온도에서 각 부위간에 활성의 차이점은 -18°C , -77°C 에서 부위간의 유의적인 차이 없이 가장 높은 효소 활성을 나타내었고, 그 저장 온도를 제외하고는 모두 유의성 있는 변화량을 나타내었다($p < 0.05$).

실험군의 meat press juice내 citrate synthase의 활성은 5분간 흡광도 변화량을 조사함으로써 계산되었다.

이러한 결과를 토대로 저장기간에 따른 부위별 citrate synthase의 활성을 측정하였다.(Fig. 11, 12, 13, 14)

15일간 냉장, 냉동육을 온도에 따라(4°C , -4°C , -18°C , -77°C) 저장하면서 그 활성을 측정하였는데, 저장 기간이 길어짐에 따라 그 활성의 차이가 감소하는 경향이 있었으나 유의적 차이는 발견할 수 없었으며($p > 0.05$), 모든 실험군(사태, 등심, 양지, 우둔 부위)에서도 유의적으로 유사한 활성을 유지하였다($p > 0.05$). 그리고 동일한 부위에서 효소의 활성은 냉장이나, -4°C 인 경우보다는 -18°C , -77°C 에서 유의적으로 큰 차이를 보였다($p < 0.05$). 이러한 결과로 미루어 citrate synthase도 mitochondrial malate dehydrogenase와 함께 냉장, 냉동육 판별에 이용될 수 있는 효소의 조건에 부합된다고 결론 내릴 수 있었다.

Table. 8 Influence of freezing conditions on the activity of citrate synthase in the meat press juice from various parts of beef

	Temperature(°C)			
	4	-4	-18	-77
Shank	0.960±0.170 ^h	0.980±0.113 ^h	2.510±0.467 ^c	2.070±0.099 ^b
Flank	0.600±0.057 ^h	1.120±0.141 ^h	2.850±0.321 ^c	2.740±0.509 ^a
Round	0.920±0.000 ^h	1.850±0.014 ^h	2.930±0.354 ^c	2.110±0.042 ^{dc}
Loin	0.690±0.071 ^h	1.010±0.071 ^{ci}	2.790±0.297 ^c	2.950±0.042 ^{dc}

* Each value represents an average from three trials.

* Values with different small letter superscript in the same storage period are significantly different (P<0.05).

Values with different capital letter superscript in the various storage temperature are significantly different (P<0.05).

* Unit - unit of enzyme activity

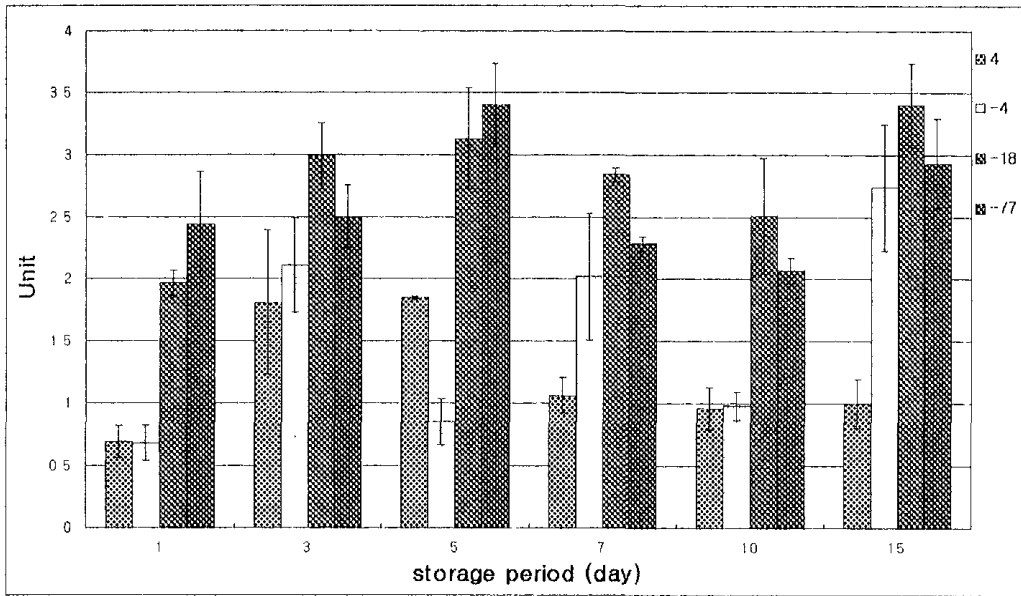


Fig. 11 Changes of Citrate synthase activity of meat press juice from Round during storage period

- * Each value represents an average of three trials.
- * Bars with different letter differ significantly ($P < 0.05$).
- * Unit = unit of enzyme activity (U/ml)

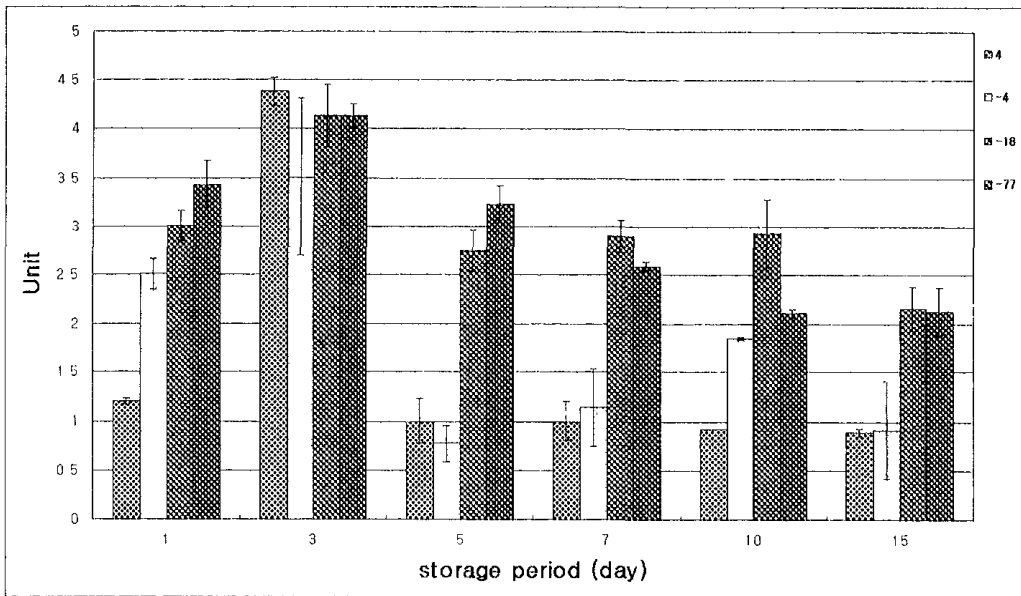


Fig. 12 Changes of Citrate synthase activity of meat press juice from Shank during storage period

- * Each value represents an average of three trials.
- * Bars with different letter differ significantly ($P < 0.05$).
- * Unit = unit of enzyme activity (U/ml)

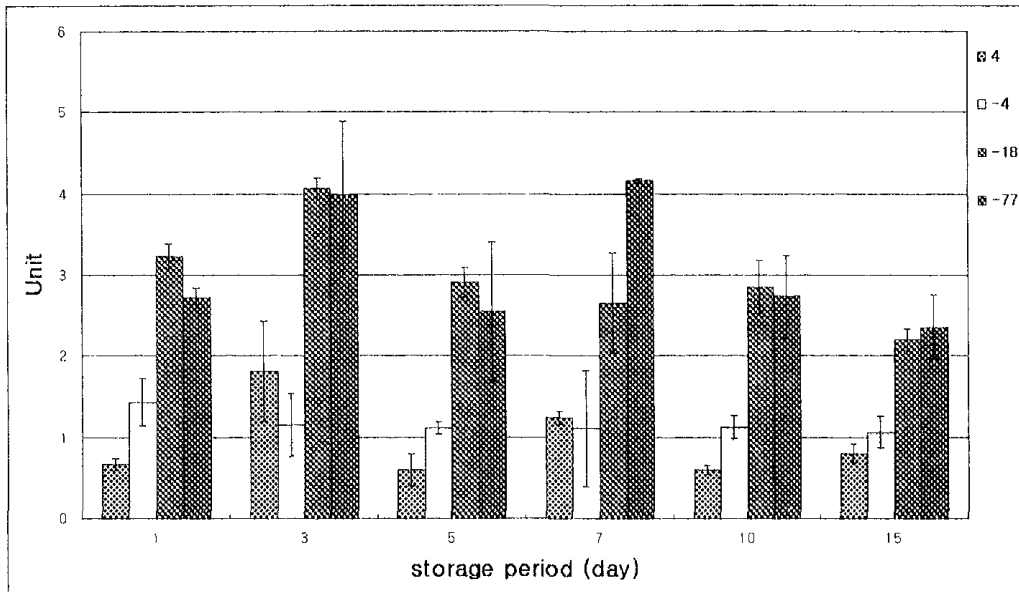


Fig. 13 Changes of Citrate synthase activity of meat press juice from Flank during storage period

- * Each value represents an average of three trials.
- * Bars with different letter differ significantly ($P < 0.05$).
- * Unit = unit of enzyme activity (U/ml)

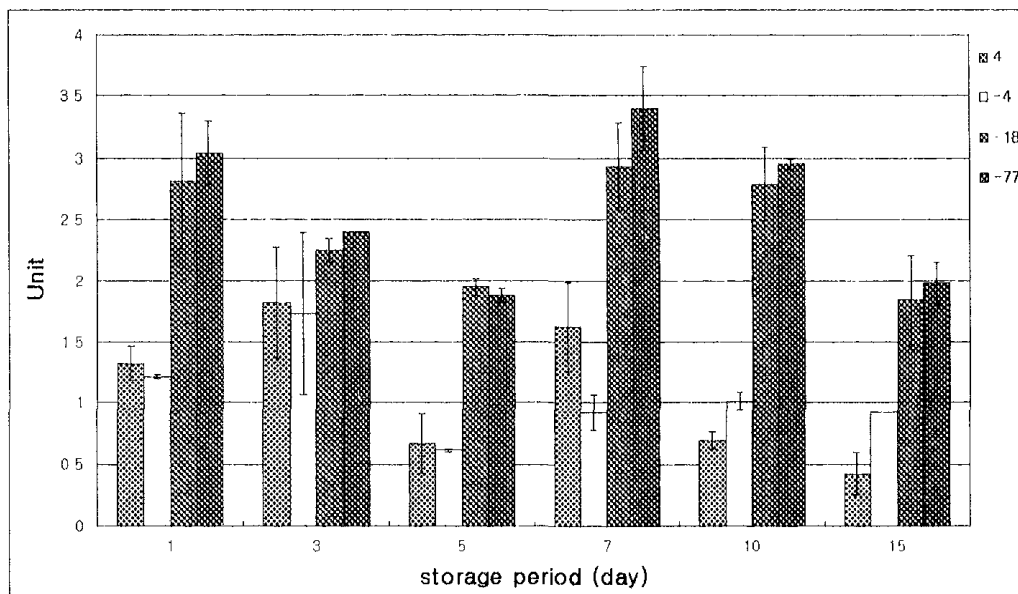


Fig. 14 Changes of Citrate synthase activity of meat press juice from Loin during storage period

- * Each value represents an average of three trials.
- * Bars with different letter differ significantly ($P < 0.05$).
- * Unit = unit of enzyme activity (U/ml)

다. 기질농도별 검량선 작성

본 실험에서 mitochondrial malate dehydrogenase의 기질 농도별 검량선을 구하여 각 농도에 대한 효소 활성의 차이를 규명하였다.

Mitochondrial malate dehydrogenase의 특성상 기질농도 보다는 반응 속도에 민감하게 반응하는 효소이기 때문에 분당 흡광도 변화량으로 그 활성의 차이를 규명하여 검량선을 도출하였다. 본 실험의 목적이 냉장육과 냉동육의 판별에 있기 때문에 냉장육과 냉동육이 기질농도별 차이를 보려고 하였으나, 냉장육과 냉동육에는 차이가 없었다. 하지만 분당 활성치를 unit/ml로 나타내었을 때는 냉장육과 냉동육이 차이를 보였다.

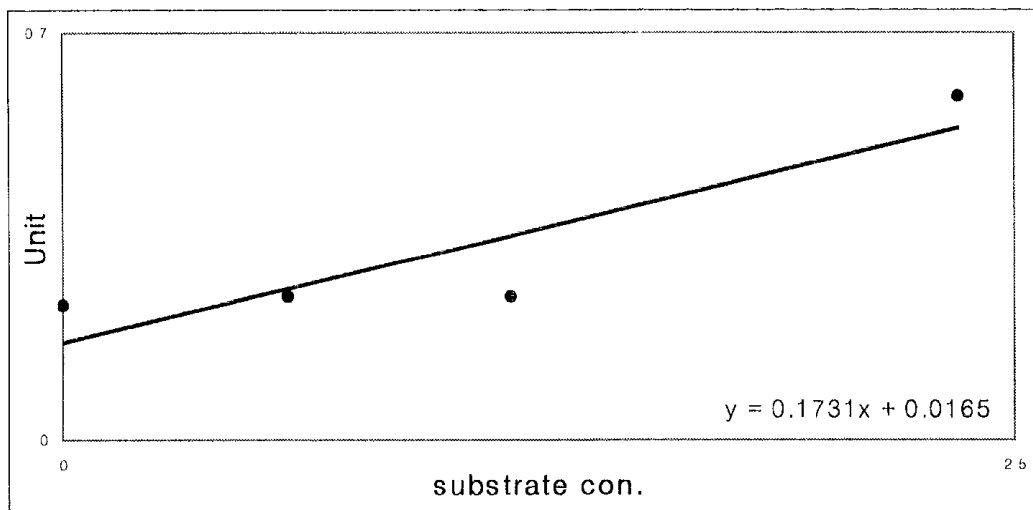


Fig 15. Substrate content mitochondrial malate dehydrogenase activity of meat press juice.

Fig 15.은 meat press juice내에 존재하는 mitochondrial malate dehydrogenase의 5분간 변화한 흡광도를 unit/ml로 나타내었을 때 변화한 효소활성을 나타낸 그래프이다. 그림에서 보듯이 기질 농도가 증가함에 따라 효소의 활성도 측정의 지표인 흡광도가 커지는 것을 알 수 있다. 그러나 5분간 변화한 흡광도의 변화를 효소의 활성단

위(unit/ml)로 나타내었을 때는 냉장육과 냉동육간의 활성의 변화량이 같거나 비슷하게 나타나기 때문에 기질의 농도 변화량만으로는 냉장육과 냉동육을 판별하기에는 부적합한 것으로 사려된다.

라. 육즙량과 효소활성의 상관관계 규명

일반적으로 냉동육의 경우 냉장육보다 육즙량, 해동감량 그리고 보수력의 변화에서 냉동 저장온도가 낮아짐에 따라 더 많은 변화량을 나타내었다. 하지만 Table 1.에서 나타낸 바와 같이 착즙기를 이용하여 발생하는 육즙의 양을 측정된 결과와 그 결과 발생하는 육즙으로 측정된 냉장육과 냉동육간의 효소의 활성도 차이는 육즙의 양과는 아무런 관계가 없는 것으로 나타났다. 효소 활성에 관여하는 인자로는 냉동 저장시의 저장온도나 냉동속도(fast freezing and slow freezing), 그리고 해동 조건(fast thawing and slow thawing)이 작용한다는 것은 이미 연구되어 알려져 있다. 본 연구에서는 육의 양을 각기 다르게 하여 8kg/m^2 의 힘으로 압착하여 발생하는 육즙을 가지고 실험에 임하였고, 그 결과 육즙의 양과 효소 활성과의 비례적 상관관계는 성립되지 않았고, 냉동 저장온도에 따른 차이점만이 도출되었다.

제2절 냉장, 냉동조건 하에서 color test의 적용여부 조사

가. 냉장, 냉동조건 하에서 직접 color test의 실시

Ellman reagent color test의 조건에 따라 각각 4°C , -18°C 에서 일주일간 저장한 20개의 우육을 공시재료로 하여 color test를 실시하였다.

전술한 citrate synthase 활성 측정 실험방법에 의거한 대로 효소 반응을 실시한 후, 그 반응액을 정색반응 시험지(Whatman 2)에 spotting하여 dry oven에서 완전히 건조를 시킨 다음 UV에 조사한 상태에서 색의 변화(yellow)를 측정하였다. 2분 경과 후부터 반응정도를 측정할 수 있었고, 이때 냉동육의 경우 냉장육보다 더 빨리 ring 형태의 yellow color를 생성하였고, 그 색도 더 진한 노란색을 띠게 되었다(Fig.). UV lamp에 5분 이상 노출시킬 경우 냉장육도 냉동육과 같이 yellow color를 형성하게 되며, 그 이후에는 냉장육과 냉동육을 판별할 수 없게 된다.

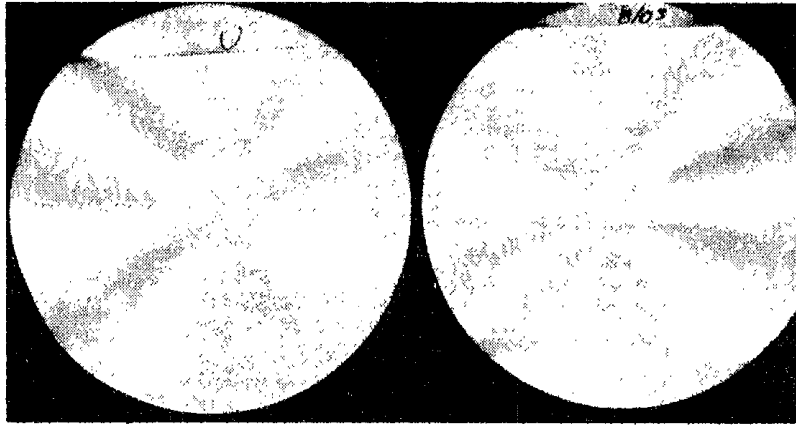


Fig 16. Changes of the color between fresh chilled beef and frozen beef

*Left : Fresh chilled beef, Right : Frozen beef

그림에서 보는 바와 같이 냉동육에서 채취한 drip의 경우에는 냉장육에 비해 그 색의 변화가 뚜렷하다는 것을 알 수 있다.

비색계를 이용하여 비교한 결과 냉장육의 경우에는 비색계에서 1번의 밝기를 나타내었으며, 냉동육의 경우 3, 4번의 색도를 나타내었다(Fig 16). 그러나 UV lamp에 5분 이상 조사되면 냉장육과 냉동육간의 판별이 어려워지고, DTNB자체만 spotting한 대조구도 UV와 반응하여 yellow color를 생성하기 때문에 5분내에 신속한 판별이 요구되었다.

Table 9.은 육을 구입하여 각각의 온도 별로 저장한 후 color test의 적용도를 실험한 결과를 나타낸 것이다.

Table 9. Application of color test in meat press juice between fresh chilled beef and frozen beef

	fresh chilled beef	frozen beef
samples	20	20
○	12	11
×	8	9

이 실험의 결과 냉동육과 신선 냉장육간의 color test의 판별의 정확도는 70%정도로 알 수 있었다.

제3절 즉석 판별 Kit의 개발

가. 정색반응 시약 및 시험지의 개발

정색반응법의 현장적용을 위해 Ellman법을 citrate synthase의 반응 실험에 적용하여 여기에 사용한 시약을 정색반응 시약으로 확립하였다. 시약의 제조는 다음과 같다.

100mM Tri-HCl buffer(100mM Tri([hydroxymethyl]aminomethane)(pH7.5)	0.77ml
0.2mM Acetoacetyl-CoA	0.03ml
0.5mM OAA(oxaloacetic acid)	0.05ml
1mM DTNB(5,5'-dithio-bis(2-nitrobenzoic acid))	0.10ml
Sample: Buffer를 이용해서 1000배로 희석	0.05ml

Ellman법을 응용하여 실시한 정색 반응법은 citrate synthase의 활성 측정 반응 조건과 동일한 방법으로 효소의 반응을 최적화(최적 온도, 최적 pH)하여 실시하였고, 그 효소 반응액을 color test에 적용하였다. UV/Vis spectrophotometer를 이용하면 흡광

도의 변화를 통해 효소의 활성을 구할 수 있었고, color test는 반응시킨 용액 100 μ l을 정색반응 시험지(Whatman 2)에 spotting후 dry oven에서 완전히 건조를 시켜 정색 반응을 위한 시험지로 이용하였다.

완전히 건조된 정색반응 시험지(Whatman 2)를 UV lamp를 이용하여 2 ~ 3 분 정도 UV를 조사시켰다. 이때 DTNB와 SH간의 반응이 일어나서 노란색을 띠게 되는데, 냉동육의 경우 효소 활성 측정의 결과, 냉장육보다 활성이 크기 때문에 더 많은 SH가 효소 반응의 결과 생성되게 되며, 그 결과 많은 양의 DTNB와 SH간의 결합 생성물을 발견할 수 있어, 생성물인 yellow color가 냉장육과 비교하여 많이 나타나게 되었다. 이 방법을 응용하여 color test의 조건으로 확립하였다.

그러나 이 정색법은 정확도, 경제적인 측면에서 문제가 제기 되었다.

따라서 본 연구에서 육즙내 mitochondrial malate dehydrogenase의 효소활성의 특이적인 방법을 이용하여 kit에 응용하였다. mitochondrial malate dehydrogenase의 경우 효소활성이 5분 정도의 시간이 경과되면 냉동육의 경우 활성이 정지하고, 냉장육의 경우는 효소의 활성이 12분간 지속되었다. 우리는 이것을 응용하여 5min. reaction stopping kit로 이용하기로 하였고, 현장적용 실험에도 이 실험방법을 이용하여 실시하게 되었다.

나. 판별 Kit의 상품화

Mitochondrial malate dehydrogenase의 효소활성의 특이성을 이용하여 5min. reaction stopping kit을 현장에 적용할 수 있는 가능성은 충분히 가능하다 사려된다.

Kit에 이용되는 기질인 L-malic acid의 단가가 다른 효소들에 비해 상당히 낮고, 효소의 적정 반응온도가 상온이며, 5분 효소반응 후 냉장육과 냉동육간의 차이점이 확실하게 도출되므로, 즉석에서 판별이 가능하다는 간편함이 그 이유이다.

따라서 이러한 장점을 토대로 특허를 출원하여 즉석에서 냉장육과 냉동육을 판별할 수 있는 Kit로써 상품화 할 계획이다.

제4절 실제시료에 이용가능성 조사

가. 타 축종에 이용가능성 타진

우리는 이번 실험을 통해 한우육을 공시재료로 하여 mitochondrial malate dehydrogenase 활성 측정과 citrate synthase 활성 차이 도출, 그리고 Ellman reagent color test를 실시하였다. 그 결과 한우육에서는 효소활성 차이를 이용할 경우 90%이상의 판별력을 나타내었고, Ellman test를 이용한 color test의 판별법에서는 65%정도 냉장육과 냉동육간의 차이를 구별할 수 있었다.

Mitochondrial malate dehydrogenase의 경우, 모든 축종의 근육 세포내 mitochondria에 존재하므로 타 축종에도 이용 가능성이 높지만, citrate synthase의 경우는 전자와 마찬가지로 모든 축종의 근육 세포내에 존재하지만, 돈육의 경우, 특히 PSE육의 경우에는 여러 가지 영향(특히 pH)으로 인하여 citrate synthase의 유출량이 현저하게 줄어들기 때문에 냉장, 냉동육을 구분하기 위한 효소로써 적합하지 않다고 알려져 있다. 그리고 이번 연구개발과제가 원래 3년 계획으로 신청하였으나 2년으로 줄게 되어 다양한 축종에 적용할 시간적 여유가 부족하였음을 아쉽게 생각한다.

제 4 장 냉동우유와 신선 냉장우유의 유통현장 조사 및 관능적 특성 설문조사

제1절 냉동우유와 신선 냉장우유의 판별법 관련조사 및 대상처 선정

냉동우유와 신선 냉장우유의 유통현황 및 문제점 분석을 위하여 자료 조사를 하며 시험 모의집단을 설정하였다. 조사대상은 정육점 20곳, 대형할인점 및 백화점 20곳, 한우전문판매점 5곳, 한우전문식당 5곳을 정하였다(Table. 10). 또한 한우유와 수입유의 유통 현황과 냉장 우유와 냉동 우유의 특성에 대하여 조사하였다.

축산물에 대한 소비자 인식 설문 조사를 2000년 7월부터 9월까지 3개월 간에 걸쳐 서울시 및 수도권에 거주하고 있는 20대에서 70대의 500명 주부들을 대상으로 직접 설문지를 배부하여 조사를 실시한 후 SAS를 이용하여 통계적인 분석을 시도하였다.

Table. 10 냉장우유과 냉동우유의 판별법에 관한 대상처 선정

재래시장의 정육점	백화점 및 할인매장	한우전문판매장	한우전문식당
신당중앙시장(중앙정육점)	농협하나로클럽 (서초점)	축협중앙회 (성내판매점)	서촌별장 (양재동)
한양시장(대원상사)	LG 마트(송파점)	축협중앙회 (중곡판매점)	신천식당 (방배동)
연희시장(농협연희)	삼성플라자(분당점)	축협중앙회 (마포판매점)	산수식당 (성남)
남대문시장(남대문)	김스클럽(강동점)	축협중앙회 (상계판매점)	
중부시장(우량정육점)	현대백화점(압구정점)	축협중앙회 (목동판매점)	
광장시장(제일정육점)	뉴코아백화점(잠원점)		
방림종합시장 (방배정육점)	Wal-Mart(강남점)		
명도시장(안성정육점)	갤러리아백화점 (압구정점)		
사당남성시장 (한우고향정육점)	까루푸(구월점)		
구로시장(축산정육점)	E-마트(창동점)		
영동시장(대우정육점)	미도파백화점(상계점)		
신촌시장(토종한우직매장)	한화마트(부평점)		
창동시장(축산물공판장)	이천일아울렛		
동원시장(엄마손정육)	마그넷(강변점)		
화양시장(은혜축산)	롯데백화점(본점)		
중곡제일시장(신흥정육점)	그랜드마트(신촌점)		
강동종합시장(오성정육점)	신세계백화점 (영등포점)		
둔촌종합시장 (대하축산물직판장)	롯데백화점(영등포점)		
면목시장(영칠식육센터)	경방필백화점(본점)		
가락도매시장(중앙식품)	행복한세상(본점)		

제2절 냉동우육과 신선 냉장우육의 유통현장 설문조사

쇠고기의 기호성은 국민 전통적 식문화와 소비자의식에 따라 다르기 때문에 소비시장 가치기준에 의한 쇠고기 생산이 육류산업발전에 중요하다. 오늘날 소득 수준이 향상됨에 따라 농·축산물에 대한 소비자의 기호도 상당히 변화하여, 보다 다양하고 맛있는 제품을 원함에 따라 쇠고기의 공급도 이러한 소비자의 기호 변화에 대응하지 않을 수 없게 되었다.

따라서 본 조사는 도시 지역에 거주하고 있는 소비자들을 대상으로 축산물의 일반적인 설문내용과 냉장육과 냉동육에 관한 것들에 대한 내용으로 소비자의 인식도를 조사함으로써 쇠고기 냉동육과 냉장육의 판별법의 기초 자료로 이용하고자 실시하였다.

가. 유통현황 및 관능특성 조사

<한우육 유통현황>

농가에서 생산된 소는 산지 수집상이 농가로부터 수집하여 거래되고(문전거래), 산지도축장을 통하여 도축된 후 식육점에 공급하는 형태가 주류를 형성(67%)하고 있다. 축산단지, 전업농가에서는 농·축협을 통하여 축산물 도매시장 또는 축산물 공판장에 계통출하 하거나 직접 출하(19%)하고 있다.

또한, 축산물 도매시장(공판장)에 출하된 가축은 도축과정을 거쳐 지육(뼈있는 고기)형태로 중도매인 또는 매참인에게 경매되어 식육판매점 또는 대량 실수요자에게 공급하고 있다. 또한 축산물 도매시장이 없는 지역에서는 중간수집상 또는 식육판매업소에서 직접 구매한 가축을 의뢰 도축한 후 지육형태로 식육판매업소에 공급한다. 축산물 종합처리장과 부분육 가공업체는 출하된 가축을 도축한 후 부분육으로 분할 정형한 후 브랜드 육으로 생산하여 수출하고 내수용 부분육은 가맹점, 백화점, 식육소매점 등에 부분육으로 거래하고 있다.

중도매인 또는 매참인이 축산물 도매시장에서 경락된 지육을 식육판매업소에 공급하고 골발하여 정육형태로 요식 업소 및 일반 소비자에게 판매한다. 이때 식육판매업

소는 백화점, 슈퍼마켓, 할인매점, 농협 직매장, 한우고기 전문판매점, 일반식육점 등 다양한 형태로 구성되어 있다.

<수입육의 유통현황>

1967년 관세 및 무역에 관한 일반협정(GATT)에 가입한 이래 1975년까지 쇠고기를 자급하여 왔으나, 수급조절용으로 1976년에 694톤을 수입한 이후 1993년의 UR 타결로 우리나라의 쇠고기 수입자유화 일정은 확정되었으며 이후 매년 수입 킬로그램을 정하여 주요 수입 대상국인 미국, 캐나다, 호주, 뉴질랜드로부터 수입하고 있다.

수입쇠고기 유통에는 수급용과 SBS용으로 나뉜다. 국내 축산물 수급 및 가격안정을 위한 수급조절용 수입쇠고기는 축산물 유통사업단으로부터 농협중앙회가 일괄 인수하여 고급육은 도매시장에 상장하여 공매를 하고 있으며, 일반육은 농협(중앙회, 회원조합, 자회사)과 한국냉장에 원료육으로 공급하여 포장육으로 가공판매하고 있으며, 또한 SBS (업계간 자율거래, Simultaneous Buy & Sell Tender System)란 UR과 관련하여 외국의 쇠고기 주요수출국과 한국 정부간에 체결된 쇠고기 수입방식의 하나로써 쇠고기 수출업자와 실수요자간에 자율적으로 거래할 수 있도록 만든 수입쇠고기 업계간 자율거래제도로써, 정부의 연간 총 수입 킬로그램 물량을 시행초년부터 수입 자유화 시까지 매년 10%씩 증가시켜 SBS 수입 킬로그램 물량으로 할당되어 있다. 농림부에서는 SBS 수입 킬로그램 물량을 쇠고기 실수요단체인 8개의 슈퍼 그룹별로 배정하여 자체적으로 수입하여 판매토록 하고 있다.

판매방침 및 가격은 국내 한우가격과 도매시장 경락가격 및 소비자 수요동향 등을 종합적으로 감안하여 수시로 조정하고 적기에 수입, 보관, 방출함으로써 경쟁력이 취약한 국내 축산업을 보호하고 축산인 및 소비자를 동시에 보호하는데 주안점을 두고 있다.

<소비자의 관능적 특성 설문조사>

본 설문조사는 2000년 7월부터 9월까지 3개월간에 걸쳐 서울시 및 수도권에 거주하고 있는 20대에서 60대의 500명 주부들을 대상으로 직접 설문지를 배부하여 조사를 실시하였다.

설문 응답자의 연령은 20대가 4.8%, 30대는 26.8%이었으며, 또한 40대는 44.0%이었고, 50대는 22.2%이었으며, 60대 이상은 2.2%으로 나타나 중년층이 대부분을 차지하였다. 가족수로는 2인 가족이 3.8%이었고, 3인 가족이 14.8%를 차지하였으며, 4인 가족이 51.6%이었다. 또한 5인 가족이 20.8%, 6인 가족 이상이 9.0%인 것으로 나타났다. 설문 응답자의 월 평균 수입은 100만원 이하인 가정이 8.7%이었고, 200만 이하인 가정이 43.8%이었으며, 또한 300만원 이하인 가정이 31.3%, 400만원이하인 가정이 8.4%이었고, 400만원 초과인 가정은 7.8%로 나타났다(Table. 11).

Table. 11 설문조사 응답자의 분포 현황(%)

나이	20세 이상	30세 이상	40세 이상	50세 이상	60세이상
	4.8	26.8	44.0	22.2	2.2
월수입	1,000,000원 이하	1,000,000원 초과 ~2,000,000원 이하	2,000,000원 초과 ~3,000,000원 이하	3,000,000원 초과 ~4,000,000원 이하	4,000,000원초과
	8.7	43.8	31.3	8.4	7.8
가족수	2명이하	3명이하	4명이하	5명이하	6명이상
	3.8	14.8	51.6	20.8	9.0

소비자들의 쇠고기 구입형태는 요리목적에 따라 즉석에서 썬 고기를 65.8%가 선호하였으며, 덩어리 고기를 16.0%가, 찢어놓은 고기는 10.8%, 포장육은 7.4%로 조사되었다. 80% 소비자는 비 포장육을 원했으며, 포장육을 9%가 선호하였다고 보고하였다.

주로 소비자들은 비 포장육을 선호하고 있으며, 그때마다 요리목적에 따라 즉석에서 썬 고기를 선호하는 것으로 나타났다(Table. 12).

Table. 12 쇠고기 구입형태 (%)

덩어리 고기	포장육	찢어놓은 고기	요리목적에 따라 즉석에서 썬 고기
16.0	7.4	10.8	65.8

선호하는 부위에 대해 알아본 결과, 대부분의 소비자들은 쇠고기 부위 중에서 등심을 가장 많이 선호하였고(32.0%), 그 다음이 양지(20.6%), 안심(16.9%), 갈비(11.7%), 사태(8.7%) 순으로 나타났다. 여러 연구와 비교해 유사한 결과를 얻을 수 있었다. 그 결과 소비자들의 최고 선호부위는 등심인 것을 알 수 있었다(Table. 13).

Table. 13 쇠고기 구입시 선호부위 (%)

안심	양지	등심	갈비	사태	목심	차돌박이	채끝	설도	기타
16.9	20.6	32.0	11.7	8.7	3.3	2.5	2.9	0.1	1.3

냉동·냉장 축산물에 관한 질문에서는 냉동 상태의 쇠고기를 냉장 쇠고기를 더욱 선호(80.8%)한 것으로 나타났으며 냉동 쇠고기를 선호하는 소비자는 8.0%에 지나지 않았다(Table. 14). 또한 소비자들은 냉동 쇠고기(21.4%)보다는 냉장 쇠고기를 자주 구입(68.0%)하는 것으로 나타났다. 이 이유에 대해서는 54.8%의 소비자가 주로 맛이 좋기 때문이라고 응답하였고, 23.4%는 위생적이고 안전한 것이라고 하였으며, 13.0%가 요리하기가 좋아서 냉장육을 선호한다고 응답하였다(Table. 15).

Table. 14 냉장 또는 냉동육의 선호도 (%)

냉장상태	냉동상태	상관없음	기타
80.8	8.0	11.0	0.2

Table. 15 실제로 어느 것을 자주 구입하는가 (%)

냉장상태	냉동상태	서로 동일하게	기타
68.0	21.4	10.0	0.6

냉장·냉동육은 어떻게 구분하는가에 대한 응답은 59.4%의 소비자가 쇠고기의 냉장, 냉동상태 확인을 고기의 형태(냉장 및 냉동상태 육안으로 판단)로 구분한다고 하였으며, 21.6%의 응답자가 판매원에게 문의하고, 13.4%의 응답자는 고기의 색깔로 판단한다고 응답하였다. 또한 육질(3.6%), 고기의 물기(1.6) 등으로도 응답하였다(Table. 16).

Table. 16 냉장·냉동상태를 확인하는 방법 (%)

고기의 형태 (육안으로 판단)	고기색깔	육질	고기의 물기	판매원에게 문의	기타
59.4	13.4	3.6	1.6	21.6	0.4

냉장 쇠고기와 냉동 쇠고기의 맛을 비교할 때 냉장 쇠고기가 맛이 매우 좋다고 하는 것은 36.4%, 조금 맛이 좋다는 것은 42.6%, 비슷한 의견은 9.6%을 보였다. 또한 냉동 쇠고기가 맛이 좋다고 응답한 소비자는 1.8%에 지나지 않았으며, 모르겠다 라고 응답한 소비자는 9.4%로 나타났다(Table. 17). 구입한 냉장육에 대한 만족수준에 대하여 매우 만족한다는 응답자는 11.6%, 조금 만족한다는 응답자가 41.6%, 보통이라는 응답자는 43.2%로 나타났다. 또한 매우 불만족하다고 응답한 소비자는 0.8%에 지나지 않은 것으로 나타나 비교적 냉장 쇠고기에 대부분의 소비자가 불만은 없는 것으로 나타났다(Table. 18).

Table. 17 냉장쇠고기와 냉동쇠고기의 맛의 비교 (%)

냉장쇠고기가 맛이 좋음	조금 좋음	비슷함	냉동쇠고기가 매우 맛이 좋음	냉동쇠고기가 조금 맛이 좋음	모르겠음
36.5	42.7	9.6	0.2	1.6	9.4

Table. 18 구입한 냉장쇠고기의 만족 수준 (%)

매우 만족	조금 만족	보통	조금 불만족	기타
11.6	41.6	43.2	2.2	1.4

냉장 쇠고기를 구입한 후 냉동 상태의 쇠고기를 속여서 판매한 것이라고 의심한 적이 있는가에 대한 질문에서 자주 의심한 소비자는 3.0%이었고, 가끔 의심한 소비자가 50.4%, 거의 의심하지 않은 소비자가 40.6%로 나타났다. 50%이상의 소비자가 냉동상태의 쇠고기를 녹여 부정 판매할 것이라고 의심을 하였다(Table. 19). 이에 대해 어떠한 점에 부정판매를 하였다고 의심을 했는가에 대한 질문에는 쇠고기에 흘러나오는 물기에서 소비자의 28.8%가 의심을 했으며, 맛에서 24.7%, 고기색깔에서 22.8%의 소비자가 응답하였다. 또한 육질에 대해서도 15.5%의 소비자가 의심을 가지는 요인이 되었으며 냄새에 대해서는 6.4%의 소비자가 응답하였다. 주로 미각(25.0%)보다는 시각(67.4%)적인 것으로 의심을 한다고 이번 조사에서 나타났다. 의심한 경우 어떤 조치를 취하는 가에 대한 질문에 대해서는 문제삼지 않고 먹는다고 응답한 소비자가 67.0%가 응답하였으며(Table. 20), 교환 및 환불을 요구한 소비자는 19.5%가, 소비자 센터에 등에 고발하였다는 소비자는 1.5%에 지나지 않았다. 대부분의 소비자는 적극적인 행동보다는 소극적인 행동을 나타내었다.

Table. 19 구입한 쇠고기 중 쇠고기를 속여서 판매한 것으로 의심 여부 (%)

자주 의심	가끔 의심	거의 의심하지 않음	전혀 의심하지 않음	기타
3.0	50.4	40.6	5.8	0.2

Table. 20 의심한 경우 어떤 면에서 의심이 갔는가 (%)

맛	고기 색깔	육질	쇠고기에서 나오는 물기	냄새	기타
25.0	23.1	15.5	28.8	6.4	1.2

냉장 쇠고기인지 냉동 쇠고기인지 확인하는 방법의 개발이 필요할까라는 질문에 필요하다고 대답한 소비자는 92.6%로 대부분의 소비자가 냉장육 및 냉동육 판별법이 개발되기를 원하는 것으로 나타났다(Table. 21).

Table. 21 냉장, 냉동육 판별 시험법 필요성 (%)

매우 필요	조금 필요	거의 필요없음	전혀 필요없음	기타
45.4	47.2	6.2	0.6	0.6

결론적으로 소비자들은 육안으로 냉장육인지 냉동육을 냉장육으로 판매하는 것인지 구분할 수 없었으며, 소비자들도 냉장육 및 냉동육의 판별법이 개발되어 냉동우육이 냉장우육으로 둔갑 판매되는 유통질서를 바로 잡을 수 있기를 원하였다.

제3절 예비 simulation test 및 결과분석

가. 판별법 적용성 타진

냉장육과 냉동육간의 특이적 성질이 보이는 두 효소종(mitochondrial malate dehydrogenase, citrate synthase)을 이용하여 전자는 5분간의 효소 활성의 특이점을 기준으로 효소 활성을 측정하여 판별법으로 추진하였고, 후자의 경우는 color test와 효소 활성도 측정을 병행하여 냉장, 냉동육간의 판별법으로 예비 simulation test를 실

시하였다. 본 실험의 공시재료는 위생적으로 처리된 한우 사태, 등심, 양지 및 우둔 냉장육을 농협(면목동, 서울)으로부터 구입하였고, 구입한 신선 냉장 상태의 한우 사태, 등심, 양지, 우둔 부위를 과도한 지방과 결합조직을 제거하여 실험에 공시하였다.

구입한 육을 냉장, 냉동 저장하면서 실험에 의해 선정된 두 효소의 활성과 Ellman test를 이용한 color test를 실시한 결과, 냉장육과 냉동육 간의 확실한 차이를 볼 수 있었다. 따라서 이 두 효소 중을 중심으로 실험에 임하였고, 판별법 적용이 가능하다고 판명하였다.

나. 문제점 해결방안 제시

이 실험에서 판별법에 적용 가능한 효소의 조건은

- 1) 냉동과 해동처리에 의해 유출되는 효소일 것
- 2) 효소의 활성이 저장 기간동안 급격히 줄어들지 않을 것
- 3) 효소가 육즙 내에서 쉽게 활성을 측정할 수 있을 것이었다.

여기서 먼저 측정했던 다른 효소 종들과는 달리 우리가 실험결과를 토대로 선정한 2종의 효소는 판별법에 적용 가능한 효소의 조건에 모두 부합되는 결과를 얻어 문제점이 발견되지 않았다. 그러나 citrate synthase를 이용한 color test에서 냉장육과 냉동육간의 차이점이 도출되었지만, 냉장, 냉동육 판별 확률(70%)이 조금 떨어지는 경향을 나타내어서 이것에 대한 보완이 요구되었다.

제 5 장 판별법 Kit의 현장적용

제1절 실제 유통현장에서 본 판별법의 적용시험

가. 실제 냉동육을 이용한 검증실험 감도, 신속성 조사

냉동 우육과 신선 냉장우육의 판별을 위한 예비 simulation test 결과의 상관관계 분석을 하고자 하였다. 서울시내 재래 시장 20곳과 서울시내 및 수도권 백화점 및 대형 유통 할인점 20곳, 농협 한우 전문 판매점 5곳, 서울시내 위치하고 있는 한우 전문 음식점 5곳의 시료 등 총 50곳의 쇠고기를 구입하여 실험을 하였다.

Mitochondrial malate dehydrogenase 와 citrate synthase의 활성도 측정을 이용한 판별법의 경우 90%이상 냉장, 냉동육을 판별할 수 있었다. 또한 이 두 효소종을 병행하여 판별법에 이용할 경우, 95%이상 판별이 가능한 것으로 사려되었다.

Ellman test법을 이용한 citrate synthase의 color test의 경우, 냉장, 냉동육 간의 판별이 가능하고, 신속(2~3분)하였으나 효소 활성을 이용한 판별법 보다는 판별할 수 있는 확률(70%)이 낮아짐을 알 수 있었다.

제2절 실제 설문조사와 현장시료 채취후의 검사 결과와의 상관관계 조사

가. 설문조사와 판별 Kit 결과의 비교

서울시내 재래 시장 20곳의 20장소의 정육점과 서울시내 및 수도권에 위치한 백화점 및 대형 할인 매장 20곳 그리고 농협 한우 전문 판매점 5곳과 서울시내에 위치하고 있는 한우 전문 음식점 5곳의 시료를 판매한 상인 등 총 50명에게 냉장육에 대한 판매 현황 및 냉동 우육과 냉장 우육의 둔갑 판매 현황에 대한 설문조사를 실시하였다. 50곳 모두 냉장육 만을 취급하며 냉장육은 냉장육으로만 판매했고 있으며, 냉동육을 냉장육으로 판매했다는 않는다고 설문에 대답하였다.

농협 한우 전문 판매점에서 판매하는 시료를 대조구로 설정하여 냉장육, -18℃에서 3시간 냉동시킨 우육, 6시간 냉동시킨 우육, 9시간 냉동시킨 우육, 12시간 냉동시킨 우육, 24시간 냉동시킨 우육을 각각 실험하였다. 실험결과 냉장육과 3시간 냉동시킨 우육을 제외하고는 5분 활성 측정후 반응이 사라지는 결과를 얻을 수 있어, 계속해서 mitochondrial malate dehydrogenase 활성 측정을 위한 대조구로 이용하였다.

서울시내 재래 시장 20곳 각각의 정육점 및 서울 및 수도권 백화점 및 대형 할인 매장과 그리고 서울 시내 농협 한우 전문 판매점과 한우 전문 음식점에서 판매하고 있는 쇠고기를 대상으로 malate dehydrogenase 활성을 측정하였다. 재래 시장에서 판매되고 있는 쇠고기 및 농협 한우 전문 판매점과 한우 전문 음식점에서 판매하는 쇠고기는 malate dehydrogenase activity가 천천히 감소하였으며, 반응 5분 뒤에서는 반응이 계속적으로 이루어지고 있어 냉장 우육임을 확인할 수 있었으나, 백화점 및 대형 할인 매장에서 판매하고 있는 쇠고기에 대한 malate dehydrogenase 활성을 측정한 경우에는 20개 시료 중에 3곳의 시료가 malate dehydrogenase 활성이 급격히 감소하는 것을 관찰할 수 있었으며, 냉동 제품을 냉장제품으로 둔갑 판매한 것으로 보였다. 그 결과는 Fig.17-1, 17-2, 18-1, 18-2, 191에서 자세하게 기술하였다.

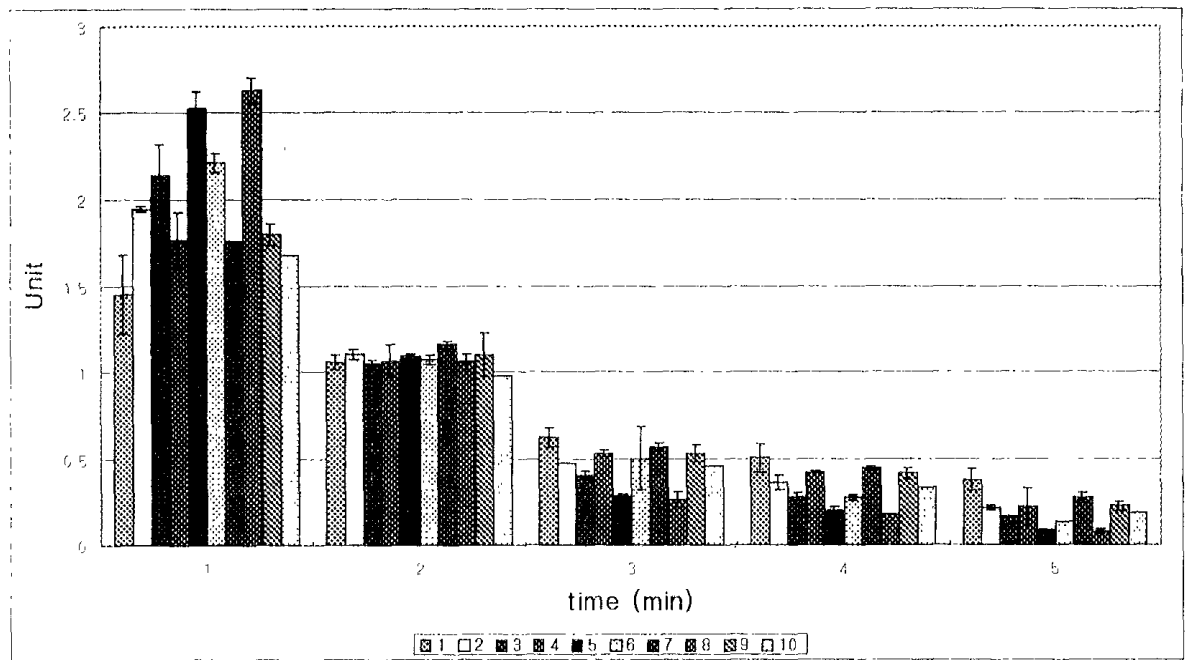


Fig 17-1. Changes of mitochondrial malate dehydrogenase activity in fresh chilled beef from conventional market.

*numbers are represented various sample

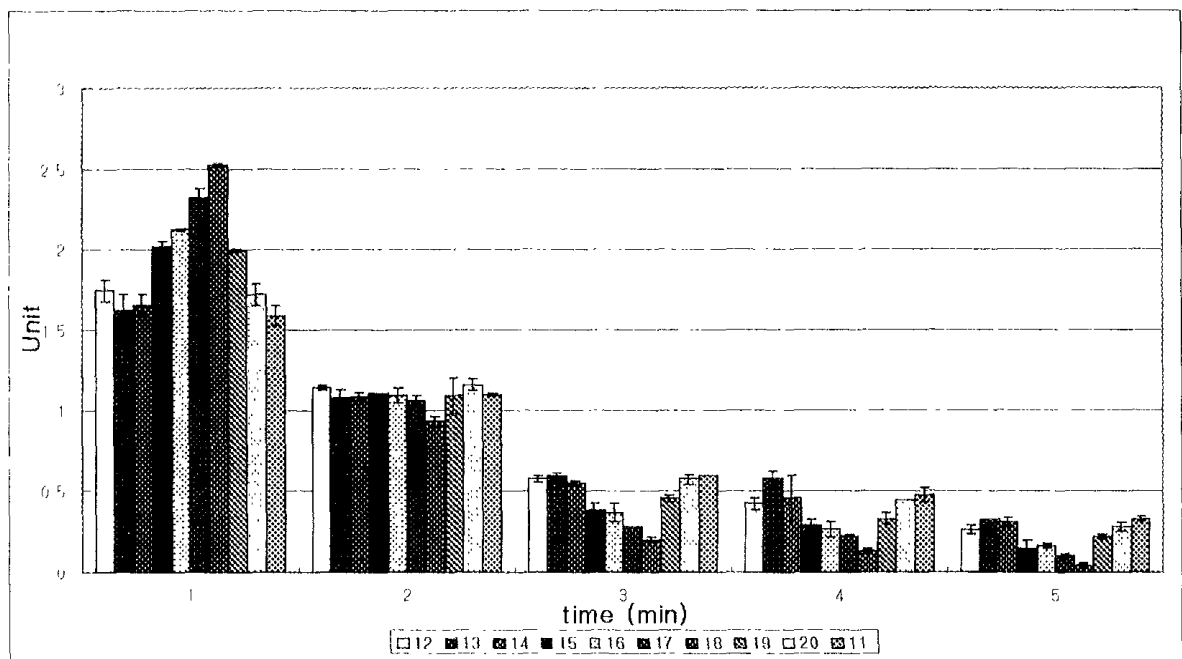


Fig 17-2. Changes of mitochondrial malate dehydrogenase activity in fresh chilled beef to buy the local markets.

*numbers are represented various sample

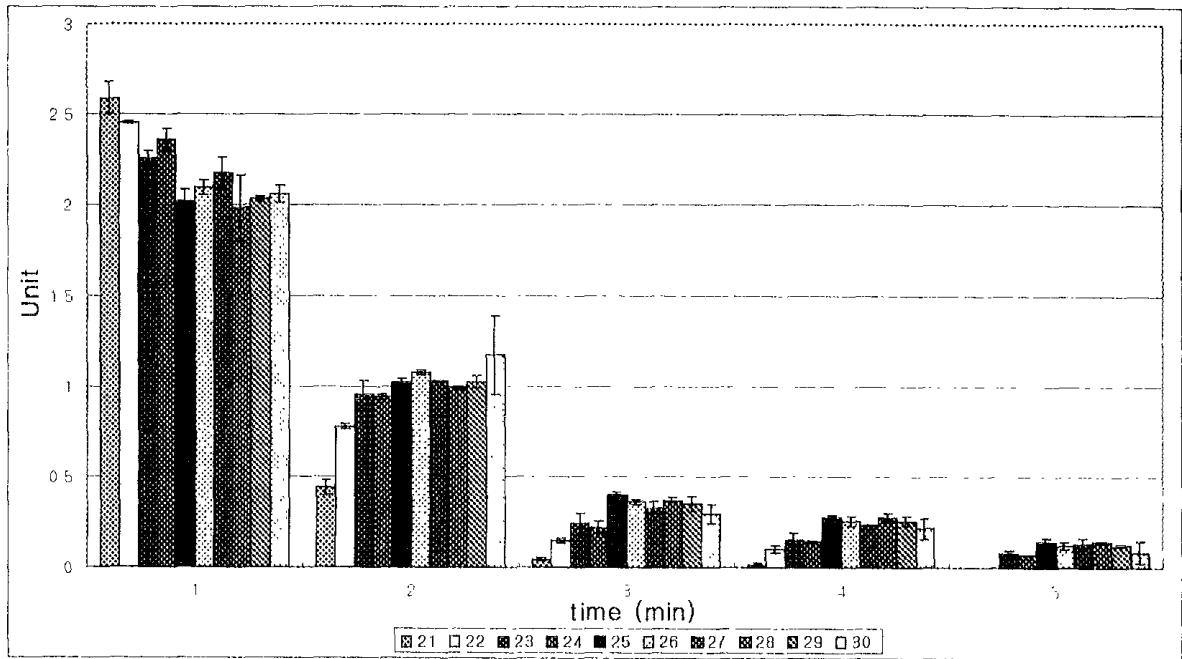


Fig 18-1. Changes of mitochondrial malate dehydrogenase activity in fresh chilled beef to buy department stores.

*numbers are represented various sample

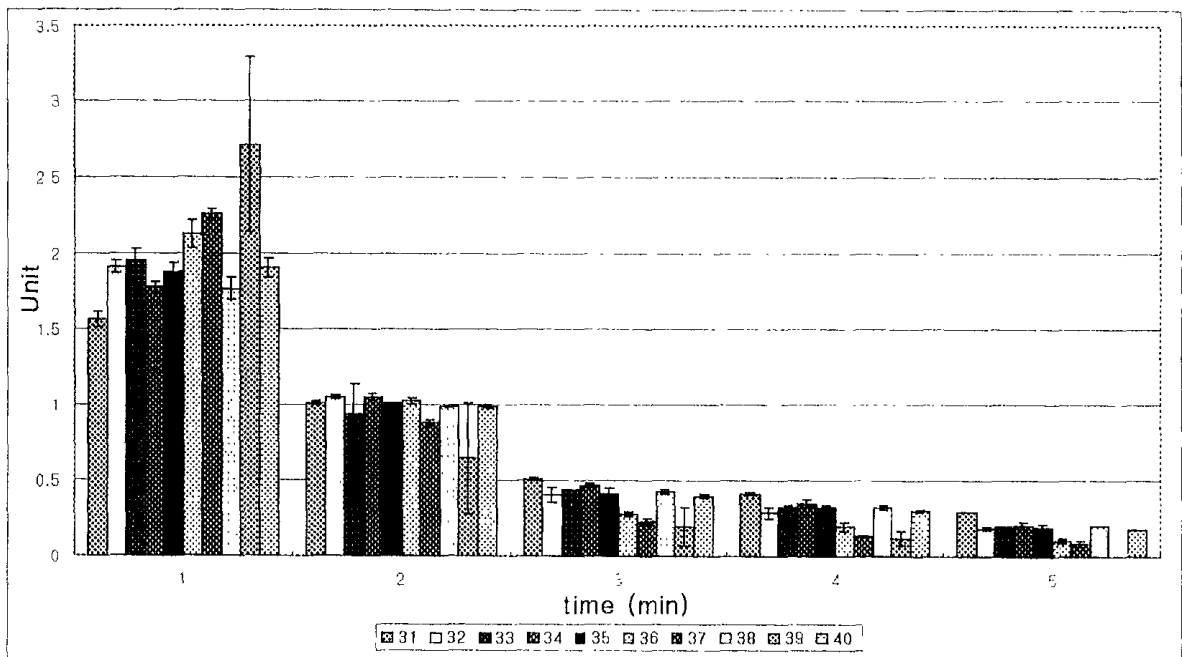


Fig 18-2. Changes of mitochondrial malate dehydrogenase activity in fresh chilled beef to buy department stores.

*numbers are represented various sample

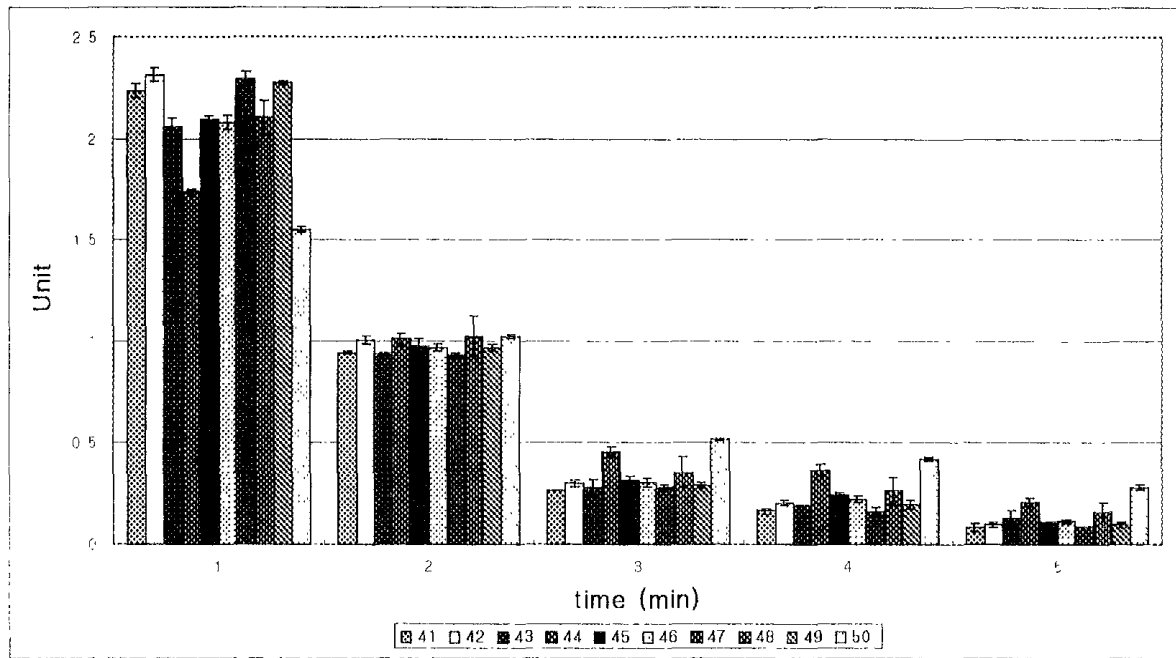


Fig 19. Changes of mitochondrial malate dehydrogenase activity in fresh chilled beef to buy restaurants

*numbers are represented various sample

설문 조사에서는 50명의 판매인들 모두 냉장육 만을 판매하며, 냉동육을 냉장육으로 둔갑판매는 하지 않는다고 응답하였으나, 본 실험에서는 총 50개 시료 중에서 3개의 시료 즉 6%가 냉동육에서 나타나는 반응이 일어나, 설문 조사와는 상이한 결과를 보여주고 있었다. 이러한 실험 방법의 확립으로 인해 소비자에게 냉장육과 냉동육에 대한 불신을 불식시키고, 신뢰를 더욱 높일 수 있을 것으로 사려된다.