

(뒷면)

(앞면)

<div data-bbox="181 1308 437 1397" style="border: 1px solid black; padding: 5px; margin-bottom: 10px;"> <p>주의 (편집순서 8)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>↑ (15포인트 고딕계열) ↑ 6cm ↓</p> </div>	<p>새우젓 중 키토산올리고당의 면역분석 및 해양수산부 ↑ 3cm ↓</p>	<div style="text-align: center; margin-bottom: 20px;"> <p>↑ 5cm ↓</p> </div> <p style="text-align: center;">새우젓 중 키토산올리고당의 면역분석 및 함량극대화(18 포인트 고딕계열) (중점과제명) Immunoassay and Enrichment of Chitooligosaccharides in Pickled Shrimps</p> <div style="text-align: center; margin-top: 40px;"> <p>2003. 9 (16포인트 고딕계열)</p> <p>한국식품개발연구원 (17포인트 명조계열)</p> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;"> <p>↓ 9cm ↑</p> <p style="text-align: center;">해 양 수 산 부(17포인트 명조계열)</p> <p style="text-align: center;">↓ 4cm ↑</p> </div>
---	--	--

제 출 문

해양수산부 장관 귀하

본 보고서를 “새우젓 중 키토산올리고당의 면역분석 및 함량극대화” 과제의 최종
보고서로 제출합니다.

2003 년 9 월 19 일

주관연구기관명 : 한국식품개발연구원

총괄연구책임자 : 손 동 화

연 구 원 : 조 진 호

연 구 원 : 홍 상 필

연 구 원 : 신 원 선

연 구 원 : 심 윤 영

연 구 원 : 곽 보 연

연 구 원 : 박 춘 욱

요 약 문

I. 제 목

새우젓 중 키토산올리고당의 면역분석 및 함량극대화

II. 연구개발의 목적 및 중요성

우리나라의 전통 수산물식품이자 조미소재인 새우젓은, 숙성시 새우 껍질의 키틴 성분도 함께 분해됨으로써 건강에 유익한 생리활성을 갖는 키토산올리고당이 많이 생성되어 있을 것으로 추정된다. 그러나 그 존재를 직접적으로 밝힌 연구결과가 보고된 바가 없다.

따라서, (1) 새우젓 중의 키토산올리고당을 검출하고자 특이항체를 이용한 면역분석법 (ELISA)을 개발하고자 하였다. 또한, (2) 새로운 분석법을 이용하여 시판 새우젓 중의 키토산올리고당 함량을 조사하는 한편, (3) 키토산올리고당의 함량을 최대한으로 높이는 새우젓의 생산방법을 개발하고자 하였다.

III. 연구개발 내용 및 범위

1. 시판 새우젓 중 키토산올리고당의 분석 [1차 년도]

- 키토산올리고당에 대한 특이항체의 생산
- 키토산올리고당의 면역분석 조건의 확립
- 새우젓의 시료전처리방법의 확립
- 산지별, 계절별 다양한 새우젓 시료의 수집, 확보
- 새우젓 시료중 키토산올리고당의 함량 분석

2. 키토산올리고당 함량을 극대화한 새우젓 생산 [2차 년도]

- 기존방법에 의한 실험실적 새우젓의 생산
- 새우젓 숙성기간별 키토산올리고당의 분석
- 키틴분해용 효소첨가에 의한 새우젓의 생산
- 키토산올리고당 함량을 극대화하는 처리조건의 확립
- 키토산올리고당 강화 새우젓의 기호성과 경제성의 분석

IV. 연구개발결과

1. 키토산올리고당의 면역분석법 (ELISA) 확립

새우젓 중 키토산올리고당 (chitooligosaccharide: COS)과 키토인올리고당 (*N*-acetylchitooligosaccharide: NACOS)의 검출을 위한 효소면역측정법 (enzymed-linked immunosorbent assay, ELISA)을 확립하고자 3 가지 올리고당 (COS6, NACOS6, 및 COSM)을 hapten으로 하여 이들을 BSA에 공유결합시켜 면역원을 준비하고, 각각 토끼에 면역하여 특이 항체를 생산하였다. 직접경합 ELISA (competitive direct ELISA: cdELISA)에 의한 검출한계는 $10^{-4} \sim 10^{-3}$ $\mu\text{g/ml}$ 으로 모두 양호하였다. cdELISA로 3종 항체의 교차반응성을 검토한 결과, 항COS6 항체와 항COSM 항체는 COS (2~6mer)를 잘 인식하였으나 NACOS는 거의 인식하지 못하였다. 또한 항NACOS6 항체는 앞의 두 항체와는 반대로 NACOS (3~6mer)를 잘 인식하였지만, COS에 대한 반응성은 상당히 낮게 나타났다.

2. 새우젓 시료의 처리조건 확립

3 종 항체를 이용한 cdELISA를 새우젓 중 COS와 NACOS의 분석에 적용한 결과, 새우젓 중 COS의 분석은 양호하였으나 NACOS의 분석수치는 상대적으로 매우 낮았다. 또한, COS의 분석에는 항COS6 항체보다는 항COSM 항체가 더욱 유용한 것으로 나타나 앞으로의 연구에는 주로 항COSM 항체를 이용한 COS의 분석을 시도하였다. 실제 새우젓 시료 중 함유된 높은 염농도 (20~25%)는 ELISA 분석을 방해하지만, 시료를 100배 이상 희석하면 방해현상이 거의 나타나지 않아 분석이 가능하였다. COS6을 최종농도로 10~300 $\mu\text{g/g}$ 첨가한 spike test에서 평균회수율이 $120 \pm 19\%$ 로 나타나, cdELISA에 의한 새우젓 중 COS 분석이 양호한 것으로 나타났다.

3. 시판 새우젓 중 키토산올리고당의 분석

한편, 시판 새우젓 시료를 92점을 수집하고 cdELISA로 분석한 결과, COS의 평균함량은 36.3 ± 20.7 $\mu\text{g COS6 equivalent/g}$ (이하, $\mu\text{g/g}$ 로 표시함)로 나타났다. 종류별로는 육젓 및 북새우젓 (40.3 ± 22.5 및 40.2 ± 21.6 $\mu\text{g/g}$), 산지별로는 광천산 및 곰소산 (47.1 ± 20.7 및 44.1 ± 21.8 $\mu\text{g/g}$)이 다른 새우젓보다 높게 나타났으며, 숙성 기간별로는 25~36개월 (44.9 ± 23.7 $\mu\text{g/g}$)이 24개월 이하보다 조금 높은 경향을 보였다. 하지만, 이들간의 통계적 유의성은 보이지 않았다.

4. 실험실적 새우젓의 생산 및 키토산올리고당의 분석

실험실적 새우젓을 생산하면서 경시적으로 COS 함량과 포르몰데 질소 (F-N)함량을 조사하였다. 본 실험에서 제조된 새우젓으로는 민물새우로 담근 토하젓과 젓새우로 담근 육젓과 동백하젓이었다. 이들로부터 생산된 COS의 평균함량을 비교해 본 결과, 토하젓(51.9 $\mu\text{g/g}$) > 육젓 (45.8 $\mu\text{g/g}$) > 동백하젓 (15.6 $\mu\text{g/g}$) 순으로 나타났다. 기간별 COS의 평균함량은 육젓의 경우 3개월 (62.1 $\mu\text{g/g}$) > 1개월 (43.6 $\mu\text{g/g}$) > 6개월 (31.5 $\mu\text{g/g}$) 순으로 나타났다. 최적 숙성온도는 육젓과 동백하젓의 경우 25°C 가, 토하젓의 경우 15°C 가 적합한 것으로 나타났다. 또한 염처리에 따른 25°C 에서 3개월간 숙성시킨 육젓의 COS 함량은, 20% 염처리 (94.7 μ

g/g) > 15% 염처리 (92.6 µg/g) > 25% 염처리 (69.9 µg/g) 순으로 나타났다.

다음으로 첨가물의 효과를 조사하였다. 토하젓의 경우 20% 염처리로 15°C에서 3개월간 숙성시켰을 때, 염만 첨가한 처리구 (178 µg/g)는 다른 첨가물을 추가로 처리한 구들보다 COS의 함량이 월등히 높았다. 육젓의 경우 20% 염처리로 25°C에서 3개월 숙성하였을 때, 염만 첨가한 처리구 (84.0 µg/g)에 비하여 exo-chitinase (En3) (150 µg/g)와 chitosanase (En1) (119 µg/g)를 추가로 처리한 구에서 COS의 함량이 가장 높게 나타났다. 동백하젓의 경우 20% 염처리로 25°C에서 3개월 숙성시 염만 첨가한 처리구 (17.4 µg/g)에 비하여 “밀기울 (WB) + chitin digest (CD)” (59.2 µg/g) > “En1 + En3 + protease (En5-40)” (53.7 µg/g) > “En3 + CD” (49.5 µg/g)의 순으로 높았다. 전체적으로 첨가물에 의한 COS의 함량 변화는 젓새우의 종류, 숙성온도, 기간, 염농도에 따라 다소 차이가 있는 것으로 나타나 이에 대해서는 추가적인 검토가 필요하다. 또한, 새우젓 중 COS와 포르몰테 질소 (F-N) 간에는 토하젓 (R=0.69), 육젓 (R=0.62), 동백하젓 (R=0.51)에서 모두 상관성이 있었으며, 분해도가 높을수록 COS의 함량은 대체로 높게 나타났다.

5. 담근 새우젓의 기호성 평가

시판 새우젓과 실험실적으로 생산한 새우젓에 대하여 관능검사를 실시하였다. 먼저 시판 새우젓 중 대표적인 것갈 4종에 대하여 각각 2점씩 총 8종을 평가한 결과, 종합적인 기호도는 육젓 (8.0점) > 오젓 (6.0점) > 추젓 (5.5점) > 수입산 (3점) 순으로 나타났다. 다음으로 실험실적으로 생산한 새우젓 중 대표적으로 동백하젓을 선택하여 COS함량이 높은 시료와 대조구를 포함한 8개의 시료를 대상으로 관능검사를 실시하였다. 조사항목별 기호성은 색, 짠냄새, 짠맛, 쓴맛, 질긴정도, 종합적인 기호도에서 모두 유의적인 차이를 보였다. 이중에서도 특히 종합적인 기호도는 밀기울 (WB)이 들어간 처리에서 유의적으로 낮게 나타났다. 한편, 기호도와 강도간의 단순상관(R)을 살펴볼 때 색이 진할수록 색의 기호도가 떨어졌으며 (R=-0.99, p<0.01), 종합적인 기호도도 떨어졌다(R=-0.93, p<0.001). 또한, COS 함량은 높을수록 짠맛의 기호도가 유의적으로 낮게 나타났다(R=-0.82, p<0.05).

6. 담근 새우젓의 경제성 평가

마지막으로 앞서 관능검사를 한, 실험적으로 생산한 8종의 동백하젓에 대하여 경제성을 첨가물을 중점적으로 단순 분석한 결과, COS함량 (59.2 µg/g)이 가장 높은 “WB + CD” (25°C) 처리의 경우 원가는 10,158원/kg으로 염만 첨가한 처리구 (control)의 원가인 10,000원과 별 차이가 없었지만 기호성이 너무 낮게 나타나 새우젓 생산에는 부적합하였다. 이와는 대조적으로 “En1 + En3 + En5-40” (25°C)의 경우는 기호성이 양호하고 COS의 함량은 높지만 원가가 18,815원/kg으로 매우 높게 나타나 이 경우도 부적합하였다. 그러나 “En3 + CD” (25°C)의 경우는 기호성과 COS함량이 높은 편이면서 생산원가 (12,950원/kg)는 그다지 높지 않아, COS 함량이 높은 새우젓 생산에 적합한 조건으로 최종 판단하였다.

V. 연구개발결과의 활용계획

새우젓 중 키토산올리고당의 분석법 확립과 키토산올리고당의 함량을 극대화한 새우젓 생산에 관한 본 연구는 세계최초로서 시도로서 독창성을 인정받을 수 있으며, 다음과 같은 활용이 가능할 것으로 생각한다.

1. 산업재산권 (특허출원), 2건

- 키토산올리고당(COS)에 대한 특이항체의 생산기술 및 이를 이용한 면역분석법
- COS함량을 극대화하는 새우젓의 생산기술

2. SCI 논문게재, 3건

- COS 분석을 위한 3종 항체의 특성
- ELISA에 의한 시판 새우젓 중 COS 함량
- COS 함량을 높인 새우젓의 생산

3. 학술대회발표, 3건

- 키토산올리고당(COS)에 대한 특이항체의 생산기술 및 이를 이용한 면역분석법
- 시판 새우젓 중의 COS 함량
- COS함량을 극대화하는 새우젓의 생산

4. 산업체에 기술이전

- 기호성과 경제성이 양호한 고품질, 고기능성, 고부가가치의 새우젓의 상품화에 활용
- 다만, 이를 위하여 부분적인 보완실험을 요함

5. 기타

- 특이항체를 이용한 분석방법의 know-how를 다른 수산식품의 분석에 활용
- 전통 새우젓의 우수성을 입증함으로써 전통식문화의 활성화에 활용
- 전통 새우젓의 기능성을 홍보함으로써 그 소비를 촉진하여 수산식품업의 발전에 활용
- 새우젓의 기능성을 홍보하여 국제적 식품으로서의 위상제고에 활용

목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

제 6 장 참고문헌

제 1 장 연구개발과제의 개요

젓갈은 어패류에 소금을 가하여 염장함으로써 부패균의 번식을 억제하고 자가분해 소화효소 또는 미생물의 효소작용에 의해 육질을 분해시킨 우리나라의 전통식품으로 제조 공정이 단순하고 숙성후의 제품은 독특한 감칠맛을 가지고 있어 옛부터 오늘에 이르기까지 밥반찬이나 김치 그리고 여러 음식의 조미소재로 많이 이용되어 왔다(김 등, 1990.; Lee, 1998).

국내 젓갈류의 생산량은 매년 증가추세를 보이고 있는데, 1995년에 1.6 만톤, 1999년에 4만톤으로 해마다 약 20%의 신장을 나타내고 있으며 제품의 다양화를 보이고 있다(해양수산연보). 특히 새우젓, 멸치젓, 명란젓의 생산량이 전체 젓갈류의 77% 이상을 점유하고 있고, 이중 새우젓의 생산량이 약 30%를 차지하고 있다. 이와 함께, 국내의 젓새우의 어획량은 1999년 연간 19,000톤이었으며 새우젓의 생산은 연간 8,900톤이었다. 새우젓은 멸치젓보다 5배 이상 고가이어서 (kg당 2만원가량) 새우젓의 시장은 1999년 연간 약 2,000억 원으로 전체 젓갈류의 절반 이상을 차지하였다.

한편, 젓갈의 제조원리 및 품질특성에 관한 과학적 연구가 본격적으로 이루어지기 시작한 것은 1950년대 후반이다. 새우젓 (salt-fermented shrimp, *saewoo-jeot*)은 담그는 시기에 따라 춘젓, 오젓, 육젓, 추젓, 그리고 동백하젓으로 불리우고 오젓과 육젓의 원료로 사용되는 젓새우 (*Acetes japonicus*)는 어체가 비교적 작고 내장에 강력한 소화효소가 들어 있다(Kim et al, 1990). 현재까지 새우젓에 관한 연구로는 새우젓의 합질소 성분에 관한 연구, 육류단백질이 분해특성과 정미성분에 관한 연구, 향기성분에 관한 연구, 새우젓에서 alkaline protease의 정제 및 특성 등에 관한 연구가 있다(Nam et al, 1998). 새우젓 숙성발효 시 독소 등의 유독한 물질이나 유해 미생물들은 숙성발효온도, 숙성발효기간, pH, 수분활성, 염농도 등에 영향을 받는다.

그러나, 기존의 연구결과들은 인위적 조절이 용이한 숙성발효 온도와 숙성발효기간, 염농도는 각각 큰 차이가 있었으며 이는 아직 우리나라의 새우젓 제조방법이 확립되지 않음을 입증하고 있다. 이는 과학적 생산기술의 연구개발 및 산업화 방안에 큰 장애가 되고 있다.

근년 젓갈류의 기능성에 대한 연구성과로서 혈압강하, 혈전생성저해, 항산화 등의 활성성분이 함유되어 있음이 보고되었다(Ryu, 1998). Chitosan은 고부가가치의 식품소재나 의약품으로 활용되는데, 최근 기능성 식품소재로 승인되어 국내 24개 건강보조식품 중 1, 2위의 매출실적을 나타낸 바 있는데, 전통 새우젓 중에 면역증강활성을 가진 chitosan이 강화된 새우젓을 생산함으로써, 새우젓의 판매증대 및 부가가치의 제고가 가능하다. 특히, 물에 용해성이 매우 낮은 chitosan과 달리, chitosan의 효소분해로 얻어지는 키토올리고당은 그 용해성이 우수하여 일부 생리활성이 더욱 효과적으로 발휘되고 있다.

COS는 β -1,4-D-glucosamine의 중합체인 chitosan의 oligomer로 면역부활성(Mikami et al, 1988; Ishitani et al, 1988), 항암성(Tokoro et al, 1988), 항균성(Suzuki et al, 1985), 칼슘흡수 촉진작용(Kim et al, 1997)등의 생리적 기능성을 갖는 올리고당이다. 이러한 COS이 기능성 식품소재로서 이용이 주목됨에 따라 일본 후생성은 여러 가지 생리적 기능에 대한 결과를 바탕으로 식품첨가제로써 승인하였다. 한편, 우리 나라에서도 식품첨가물로 승인되어 몇몇 제품에 첨가물로 사용되고 있는 실정이다.

기존의 COS 검출방법으로는 HPLC(Uchida et al, 19889)와 TLC(Yabuki et al, 1988; Yoshihara et al, 1992) 그리고 비색법(Moore, 1968; Rondle et al, 1955) 등이 있다. 이러한 방법들은 추출과 정제과정에서 시간을 많이 요할 뿐만 아니라 식품과 같은 matrix로부터 미량의 COS를 회수하기가 대단히 어렵다. 또한 COS는 chitin oligomer인 키틴올리고당 (*N*-acetylchitooligosaccharide: NACOS)와 달리 deacetylation되어 있어 HPLC에 의한 분석시 UV 검출기가 아닌 RI 검출기를 사용해야 하므로 낮은 농도에서 감도가 좋지 못하고 식품으로부터 추출하여 정량화할 경우 순수분리가 어려운 점이 있다. TLC에 의한 분석은 정량적이기 보다는 정성적이라 볼 수 있겠으나 HPLC의 경우와 마찬가지로 몇 단계의 분리를 거쳐야 하며 ninhydrin spray에 대해 특이적 반응으로 볼 수 없다. 비색법의 경우는 방해물질에 대해 영향을 많이 받는 단점이 있으며, oligomer에 대한 정량보다는 glucosamine monomer에 대한 검출이 우선적으로 일어나 oligomer의 정량여부가 정확하지 못하다. 이러한 문제점을 해결하기 위해서 chitooligosaccharide (COS)에 특이적인 항체를 생산하고 이 항체를 이용한 직접경합 효소면역측정법 (competitive direct enzymed-linked immunosorbent assay: cdELISA)을 확립하고 COS의 정량을 간단하고 빠르게 할 수 있는 방법을 보고하였다(Kim et al, 2000). 그러나, 정작 새우젓 중의 chitosan이나 COS의 존재 및 그 함량에 대한 연구는 거의 시도된 바가 없는 데, 그 까닭은 새우젓중 단백질 가수분해물 등의 방해작용으로 이들 성분의 분석이 거의 불가능하기 때문이다.

본 연구에서는 COS에 대한 3 종류의 다클론 항체를 생산하고 직접경합 ELISA에 의하여 항체의 특성을 조사하여 새우젓 중에 존재하는 COS 분석법의 최적조건을 새롭게 확립하였다. 또한 이를 이용한 새우젓중 COS의 함량분석, 나아가 COS의 함량을 극대화한 새우젓의 우수성을 밝히고 식품산업의 발전에 기여할 수 있을 것이다.

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 연구사례의 조사

1. 외국의 경우

젓갈을 식생활에 주로 이용하는 국가는 아시아권으로 동남아시아와 일본, 한국이 있다. 그러나 실제로 젓갈을 과학적인 연구결과에 기초하여 제품을 생산하고 있는 경우는 별로 없으며 각국의 전통적인 발효방법에 따른 재래식 방법에 약간의 제조 공정을 변형하여 생산하고 있는 실정이다. 전통적으로 새우껍질은 서양에서는 상처치료에 이용되었고 중국에서는 종기나 부스럼 등의 특효약으로, 일본에서는 화상 및 피부병의 치료에 이용되어왔다.

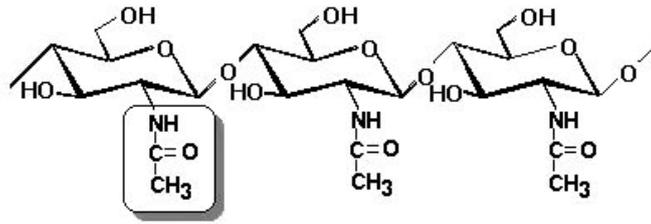
한편, 새우나 게 껍질의 단백질을 제거 후 얻어지는 키틴을 가수분해하여 만든 키토산 (또는, 키토산올리고당)은 혈중 콜레스테롤감소, 항혈전, 마크로파지 활성화증강, 감염에 대한 보호작용, 항암성, 면역부활성, 항균성 등 다양한 생리활성을 가지고 있다 (Sugano 등, 1980; Hirtano 등, 1985; Suzuki 등, 1984; Mikami 등, 1988). Chitin은 *N*-acetylglucosamine이 β -1, 4결합한 분자량 100만 이상의 천연 고분자 다당으로서 갑각류, 연체류, 곤충류, 균류 등에 다양하게 분포되어 있는 물질로 매년 1억톤 이상 생산되는 것으로 추정되고 있다(표 1).

표 1. 주요 생물의 키틴 함량.

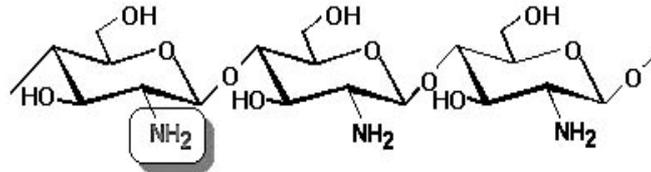
생물의 종류	키틴 함량(%)**
바다참게	26
털 게	18
물갯게	11
왕 게	35
홍 게	35
바다가재	12
보리새우	32
바다새우	42
중새우	25
대합	6
굴	4
오징어뼈	41
공팡이(Asp., Pen., Sac)	42(건물 세포벽 중량%)
빵효모	3(건물 세포벽 중량%)
버섯	19
곤충류(메뚜기/딱정벌레)	2~10

**껍질 혹은 세포벽의 건물중량비(%)

(A)



(B)



(C)

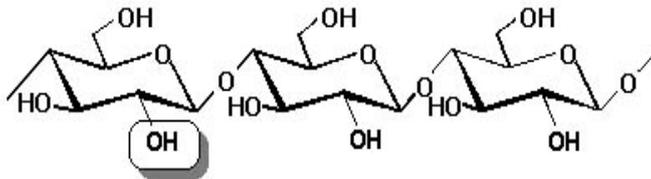


그림 1. Chemical structure of chitin (A), chitosan (B), and cellulose (C)

또한 chitin은 Cellulose와 유사한 구조를 가지고 있으나 분자 내에 아세틸아미노기를 가지는 특징이 있으며 이 아세틸아미노기의 분자간 수소결합이 대단히 강하기 때문에 화학약품에도 녹지 않는 특징을 보인다(그림 1).

Kato 등은 건강한 성인남자 7인에게 고염식(13.3g)과 고염식(13.3g)과 키토산(81% d.d.)을 함께 투여한 후 혈압을 측정하고 고염식이군을 투여 1시간이 경과 후 수축기 혈압이 상승한 반면 고염식과 함께 키토산을 투여한 시험군에서는 혈압의 변동이 관찰되지 않았으며 이는 키토산을 투여한 시험군에서는 혈압의 변동이 관찰되지 않았으며 이는 키토산의 $-NH_2$ 그룹($pK_a=6.4$)이 식염 중에 존재하는 Cl^- 이온을 흡착시키기 때문으로 추정하고 있다. 한편 홍 등은 키틴/키토산 올리고당이 *in Vitro* 상에서의 ACE 저해 활성과 SHR(Spontaneously hypertensive rat)에서의 혈압에 미치는 영향을 검토하고 키틴/키토산 올리고당은 모두 ACE 저해활성을 보이며 특히 3량체 키토산 올리고당의 ACE 저해활성(IC_{50})은 $0.9 \mu mole$ 수준으로 지금까지 ACE 활성이 우수하다고 보고된 합성 peptide(H_2)나 고혈압의 치료제인 Captopril 보다는 약간 낮았지만 각종 천연 peptide의 활성보다는 우수하거나 유사한 수준의 ACE 저해능력을 가진다고 하였다 (표 2). 또한 3량체 키토산 올리고당 2.14 mg/kg rat 을 SHR(Spontaneously hypertensive rat) 2개군에 대하여 강제 경구투여 후 혈압을 측정하고 투여 후 4시간 경에 모두 최저혈압을 보였으며 이때의 혈압강하는 $27 \pm 4.8 \text{ mmHg}$ 과 $36 \pm 4.3 \text{ mmHg}$ 로 감소하였다 (표 3). 이는 키틴/키토산 올리고당의 ACE 저해활성은 키틴/키토산 올리고당의 $-NH_2$ 와 분자크기와 관련이 있을 것으로 추정하고 있다.

표 2. Comparison of ACE inhibitory activity of chitosan oligomers with other materials¹⁾

Material	IC ₅₀ (umole)	Material	IC ₅₀ (umole)
Monomer	>100	Captopril	0.10
Dimmer	2.40	Captopril ²⁾³⁾	0.02~0.18
Trimer	0.90	Val-Ala-Pro ⁴⁾	2.00
Tetramer	>100	Glu-Trp-Pro-Arg-Pro-Gln-Ilu-Pro-Pro ⁵⁾	0.87
Pentamer	>100	Leu-Arg-Pro(H2) ⁶⁾	0.27
Hexamer	>100	(-)-Epigallocatechin gallate ⁷⁾	90

1)Hong et al. (1998), 2)5)Ondetti et al. (1977), 3)Patchett et al. (1980), 4)Maruyama et al. (1987), 6)Miyoshi et al. (1991), 7)Hara et al. (1987)

표 3. Systolic blood pressure reduction after administration of chitosan trimer to SHR

Aged group	No. of rats	Blood pressure before administration	Blood pressure reduction (mmHg)				
			1hr	2hr	3hr	4hr	5hr
8 week	5	175±3.9	10±4.9*	14±5.2	20±6.1	27±4.8	24±5.3
21 week	5	185±4.2	17±5.0	25±6.7	30±5.0	36±4.3	35±7.9

* 2.14 mg/kg dose of chitosan trimer was perorally administered.

키토산의 Hypocholesterolemic 활성은 Sugano 등(1980)에 의하여 최초로 보고되었고 이후 많은 연구자들에 의하여 키토산이 쥐 및 사람에게 경구투여 시 fecalis에 cholic 산의 배출이 증가하고 혈중 콜레스테롤이 감소되는 것으로 발표되고 있으며 이와 같은 키토산의 콜레스테롤 저하작용은 키토산이 식이섬유로서의 역할과 용액상에서 다가 양이온성을 나타내는 성질 및 분자량 등과 깊은 관련이 있는 것으로 생각되고 있다. Ikeda 등(1995)은 콜레스테롤을 함유한 사료를 14일간 투여한 쥐의 간의 혈중 콜레스테롤 함량을 살펴보았을 때(그림 2) 분자량 5kDa 이상(LP-5)에서 셀룰로오스와 비교하여 키토산 시료에서 콜레스테롤 함량이 감소하고 분자량 10kDa 이상에서는 이러한 현상이 더욱 뚜렷이 관찰되었다. 그러나 저분자량의 시료인 LP-2의 경우에는 콜레스테롤 저하효과가 거의 관찰되지 않았다. 그러므로 키토산과 키토산올리고당의 간 혈청 콜레스테롤을 저하효과는 분자량과 밀접한 관계가 있음을 보여주고 있다.

키토산/키토산은 고형암의 성장저지효과, 항체생산 증강, adjuvant로서의 기능성 등 항종양/항암 및 면역증강활성을 나타내고 있다. Suzukoi 등 Tokoro 등은 키토산 및 키토산 올리고당을 ddy마우스 이식 Sarcoma 180 고형종양과 BALB/C 계 마우스의 동일계 종양 Meth-A에 대하여 정맥 투여한 경우 6량체 키토산 혹은 6량체 키토산 올리고당이 강한 항종양효과를 나타내었다고 보고하였다(표 4). 현재 부분적으로 면역활성과 항종양 및 항암활성은 주로 6량체의 키토산/키토산이 중요한 역할을 하고 있는 것으로 평가되고 있으나 키토산/키토산의 분자량과 탈아세틸화도 영역에 걸친 연구 및 각종유도체 등에 대한 연구를 통해 이에 대한 상세한 기작이 구명될 수 있을 것이다.

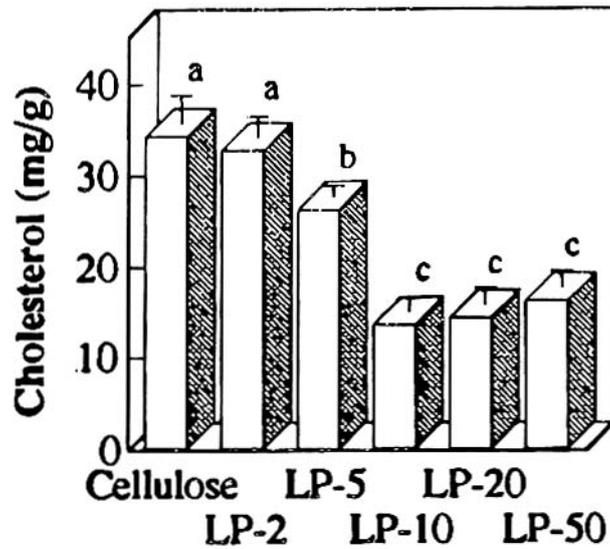


그림 2. Effect of chitosan hydrolyzates on liver cholesterol levels of rats fed cholesterol-enriched diets for 14 days. Molecular weight: LP-2 2,000; LP-5 5,000; LP-10 10,000; LP-20 20,000; LP-50 50,000(Adapted from Ikeda et al., 1995).

표 4. Antitumor effect of chitin/chitosan oligosaccharide*

Material	Intake of COS (mg/kg)	Wt. of tumor (g)	Inhibition (%)	Cured/treated mice
Mice(ddY) implanted		Sarcoma 180 tumor		
Control	-	3.51	0	0/9
Chitin hexamer	300	0.53	85	3/7
Chitin hexamer	500	0.00	100	8/8
Chitosan hexamer	300	0.23	93	4/8
Chitosan hexamer	500	0.00	100	7/7
Mice(BALB/c) implanted		Meth-A tumor		
Chitin hexamer	10	5.2	43	
Chitin hexamer	100	5.9	35	

(adapted from Tokoro et al., 1988; Suzuki et al., 1986)

따라서 키토산은 고부가가치의 식품소재나 의약품으로 활용되는데, 전통식품인 새우젓에는 새우껍질이 자연발효에 의한 가수분해로 생성되는 키토산 및 키토올리고당이 상당량 함유되어 있을 것으로 추측된다. 과거의 키틴은 화학적으로 강한 결정구조를 가져 용해성 및 반응성이 결여됨으로 인하여 오랫동안 이 물질에 대한 연구나 이용이 거의 이루어지지 않았으나 최근 Biomass로서 키틴 및 키토산에 대한 물성과 각종 기능에 대한 연구가 행해진 결과 키틴 및 키토산은 생체 및 공업분야에 응용가치가 매우 높은 물질로 평가되고 있다 (표 5).

표 5. Application of chitosan

Application	Examples
Water treatment Filtration	Removal of metal ions flocculant, Coagulant: protein, dyes, amino acids,
Pulp and paper	Surface treatment, Photographic paper, Carbonless copy paper
Medical Tumor inhibition,	Bandages, Sponges, Artificial blood vessels, Blood cholesterol control, Membranes, Dental/plaque inhibition, Skin burns/artificial skin
Cosmetics	Make-up powder, Nail polish, Moisturizers, Fixtures, Bath lotion, Face, hand and body cream, Tooth paste, Foam enhancing
Biotechnology	Enzyme immobilization, Protein separation, Chromatography, Cell recovery, Cell immobilization, Glucose electrode
Agriculture	Seed coating, Leaf coating, Fertilizer, Controlled agrochemical release
Food feed additive	Removal of dyes, solids, acids, Preservatives, Color stabilization, Animal
Membranes	Reverse osmosis, Permeability control, Solvent separation

(modified from Li, Q. et al., 1997)

한편, 키틴은 일반용매에 용해되지 않는 특성이 있고 키토산은 산에만 용해되고 물이나 alcohol에 녹지 않으며 키토산 용액은 점도가 높은 특징이 있다. 또한 키토산은 단백질이 존재하거나 pH가 상승시 응집되는 성질을 보이며 쓰거나 뚝은 맛을 나타내는 등 키틴 및 키토산은 물성이나 기호성 등에 제약이 있어서 식품 및 의약품 등 관련분야에 응용하기 위해서는 해결해야 할 과제가 많다. 키틴 및 키토산은 물에 용해되지 않으나 올리고당은 수용성을 보이며 분자의 크기로 볼 경우 키틴>키토산>올리고당의 순이다 (표 6). 기호적인 측면에서는 올리고당은 감미성을 나타내는 반면 키토산은 단백질이 존재하거나 pH가 상승 시 응집되는 성질을 보이며 쓰거나 뚝은 맛을 나타내는 등 키틴 및 키토산은 물성이나 기호성 등에 제약이 있어서 식품 및 의약품 등 관련분야에 응용하기 위해서는 해결해야 할 과제가 많다.

이와 같은 관점에서 최근 우수한 생리기능성을 가지는 동시에 수용성 혹은 유기용매 등에 용해가 가능하고 안전성이 높은 키틴 및 키토산 유도체에 대하여 많은 연구가 진행되고 있으며 유도체 가운데 특히 키틴 및 올리고당에 대한 관심이 집중되고 있다.

표 6. 키틴/키토산 및 올리고당의 일반적 특성

특성	키틴	키토산	올리고당
용해성	난용성	산용해성	수용성
생체흡수성	비흡수성	부분흡수	흡수성
기호성	-	뽀은맛	감미성
기능성	-	생체기능성	생체기능성
분자량	수백만	수만~백만	수백~수천

그러나, 정작 새우젓 중의 키토산이나 키토올리고당의 존재 및 그 함량에 대한 연구는 거의 시도된 바가 없는데, 그 까닭은 새우젓 중 단백질가수분해물 등의 방해작용으로 이들 성분의 분석이 거의 불가능하기 때문이다. 최근, 특이항체를 이용한 면역분석법이 개발되어 식품성분 등의 분석에 폭넓게 활용되고 있는데, 이는 분석시 방해물이 존재하여도 항체의 특이성을 이용하기 때문에 분석이 용이한 특징을 갖고 있다. 특이항체를 이용하여 비타민이나, 식품단백질, 미생물, 곰팡이독소 등의 면역분석법이 성공적으로 개발된 바 있으며, 일부 상품화된 검출키트의 활용도 가능하다.

그러므로 새우젓 중에 존재하는 키토산 및 키토올리고당의 분석법을 새롭게 확립하고, 이를 이용한 그 함량분석, 나아가 키토산이나 키토올리고당의 함량이 극대화된 새우젓의 개발이 요구된다. 이러한 연구를 통하여 우리 전통발효식품인 새우젓의 세계화를 위한 과학적 연구자료를 확보하고, 첨단 식품기술 확보로 식품산업의 국제 경쟁력을 제고할 수 있을 것이다. 다만, 일본의 경우도 어류단백질 유래의 ACE저해 펩타이드, 어류 다가불포화 지방산, 일부 풍미 향상과 관련된 연구는 이루어지고 있지만 새우를 발효시킨 젓갈 중의 키토산 (또는, 키토산올리고당)의 함량에 대한 연구보고는 거의 없다. 즉, 여태껏 키토산이나 키토산올리고당의 분석법이 확립되지 않아 이들을 다량 함유한 새우젓의 개발에 관한 연구가 아직까지 시도된 바가 없으며, 설령 시도하였더라도 그 효과를 분석할 수 없는 형편이었다.

2. 국내의 경우

젓갈은 현재까지 전승되어 온 전통수산물발효식품으로서 그 종류가 145여종에 달하며, 우리의 식생활 문화에서 안정된 소비 수요를 유지하고 있다. 또한 젓갈은 신선한 원료와 소금만으로 손쉽게 가공할 수 있는 제조방법의 단순 용이성 때문에 일시적으로 대량 어획되는 어류의 효과적인 저장수단으로 이용할 수 있다 (Kim 1996; Lee 등, 1998).

한편 젓갈은 어패류에 소금을 가하여 염장함으로써 부패균의 번식을 억제하고 자가분해 소화 효소 또는 미생물의 효소작용에 의해 육질을 분해시킨 우리나라 전통의 수산물발효식품으로 제조공정이 단순하고 숙성후의 제품은 독특한 감칠맛을 가지고 있어 옛부터 오늘에 이르기까지 밥반찬이나 김치 그리고 여러 음식의 조미소재로 많이 이용되어 왔다 (김 등, 1990).

근년 젓갈류의 기능성에 대한 연구성과로서 혈압강하, 혈전저해, 항산화 등의 성분이 함유되어 있음이 밝혀졌다 (장 등, 1998; 김 등, 1994; 김 등, 1993; 장 등, 1998; 김 등, 1996).

한편, 국내의 젓갈류 생산량은 매년 증가추세를 보이고 있는데, 1995년에 1.6 만톤, 1999년

에 4만톤으로 해마다 약 20%의 신장을 나타내고 있다. 이렇게 젓갈류는 중요한 조미식품으로서 소비증가와 함께 제품의 다양화를 보이고 있다 (수산연감; 해양수산통계연보). 젓갈의 발효과정 중에서 가장 큰 변화를 보이는 성분은 질소 화합물이다. 원료 어패육 중의 단백질은 일련의 효소적 가수분해 과정을 거쳐 펩타이드, 아미노산, 아민류, 암모니아 등과 같은 각종 저급 질소 화합물로 변화되어 젓갈 특유의 물성, 풍미, 냄새 등을 형성한다. 젓갈은 새우젓, 멸치젓, 명란젓의 생산량이 전체 젓갈류의 77% 이상을 점유하고 있고 이중 새우젓의 생산량이 약 30%를 차지하고 있다 (Min 1998). 특히, 아미노산 및 주요 영양원인 단백질의 중요한 원료중 하나인 젓갈류는 김치의 세계화에 발맞춰 김치의 부재료로 이용되어 그 수요가 증가 추세에 있다 (김 등, 1998; 김 등, 1997).

이와 함께, 국내의 젓새우의 어획량은 1999년 연간 19,000톤이며 새우젓의 생산은 연간 8,900톤으로 전체 젓갈류의 20%가량을 차지한다. 하지만, 주종을 차지하는 멸치젓보다 5배 이상 새우젓이 고가이어서(kg당 2만원가량) 새우젓의 시장은 1999년 연간 약 2,000억원으로 전체 젓갈류의 절반이상을 차지한다.

한편, 젓갈의 제조원리 및 품질특성에 관한 과학적 연구가 본격적으로 이루어지기 시작한 것은 1950년대 후반이다. 현재까지 새우젓에 관한 연구로는 새우젓의 함질소 엑스성분에 관한 연구, 육류단백질이 분해특성, 정미성분에 관한 연구, 향기성분에 관한 연구, 새우젓에서 alkaline protease의 정제 및 특성 등에 관한 연구가 보고되었다. 새우젓의 전통적인 제조방법은 원료 자체의 특성 때문에 어획직후 급속히 선도저하가 일어나 향미와 색택이 나타나기 때문에 어획직후 선상에서 제조되거나 25~40%에 상당하는 식염을 첨가하여 숙성 발효시 부패를 방지하고, 상온에서 수개월간 숙성발효 시키는 것이 일반적이다. 이와 같은 고염의 새우젓은 식미를 저하시키고 다량 섭취 시 고혈압, 신장병, 간경변증, 만성 신부전증 등의 문제 요인을 내포하고 있어 개인당 소비량을 증가시킬 수 없고 현대인의 소비패턴에 부응하기 어려워 기호에 적합한 저염 젓갈 개발에 대한 관심이 높아지고 있는 실정이다 (Mok 등, 2000).

새우젓 숙성발효 시 독소 등의 유독한 물질이나 유해 미생물들은 숙성발효온도, 숙성발효기간, pH, 수분활성, 염농도 등에 영향을 받는다. 그러나 기존의 연구결과들은 인위적 조절이 용이한 숙성발효 온도와 숙성발효기간, 염농도는 각각 큰 차이가 있었으며 이는 아직 우리나라의 새우젓 제조방법이 확립되지 않음을 입증하고 있다. 이는 과학적 생산기술의 연구개발 및 산업화 방안에 큰 장애가 되고 있다.

키토산은 고부가가치의 식품소재나 의약품으로 활용되는데, 최근 기능성 식품소재로 승인되어 국내 24개 건강보조식품 중 1, 2위의 매출실적을 나타낸 바 있는데, 전통 새우젓 중에 면역증강활성을 가진 키토산이 강화된 새우젓을 생산함으로써, 새우젓의 판매증대 및 부가가치의 제고가 가능하다.

즉, 근년 항체를 이용한 면역분석법이 식품성분분석에 널리 활용되고 있으며 전통장류(된장 및 간장)중 미생물유래의 키토산올리고당 분석방법은 본 신청과제의 연구책임자에 의하여 최초로 확립된 바 있다. 그러나, 새우젓 중 키토산올리고당의 면역분석법은 그 조건이 아직 확립되어 있지 않다.

3. 조사연구개발사례에 대한 평가

전통발효 식품인 김치, 된장, 간장의 기능성에 대한 연구가 많이 진행되었으나 새우젓의 기능성과 관련하여 키토산에 초점을 맞춘 연구는 아직 보고된 것이 적다.

다만, 어류단백질 유래 펩타이드의 기능성에 대한 연구가 활발히 이루어졌지만 (류 1997; 김 등, 1998), 여러 물질이 혼재하고 있는 새우젓 중의 키토산을 검출할 수 있는 분석방법이 개발되어 있지 않다.

특히, 물에 용해성이 매우 낮은 키토산과 달리, 키토산의 효소분해로 얻어지는 키토산올리고당은 그 용해성이 우수하여 일부 생리활성이 더욱 효과적으로 발휘되기도 하며 특이항체를 이용한 분석이 가능하다.

또한, 여태껏 키토산이나 키토산올리고당의 분석법이 확립되지 않아 이들을 다량 함유한 새우젓의 개발에 관한 연구도 아직까지 시도된 바 없으며, 설령 시도하였더라도 그 효과를 분석할 수 없는 형편이었다. 즉, 근년 항체를 이용한 면역분석법이 식품성분분석에 널리 활용되고 있으며 전통장류(된장 및 간장)중 미생물유래의 키토산올리고당 분석방법은 본 신청과제의 연구책임자에 의하여 최초로 확립된 바 있다. 그러나, 새우젓 중 키토산올리고당의 면역분석법은 그 조건이 아직 확립되어 있지 않다.

제 2 절 세부 기술사항의 검토분석

1. 국·내외 기술수준 비교

위에서 서술한대로 새우젓 중의 키토산올리고당 분석 및 생산기술은 국내외적으로 연구된 바 없으며, 오히려 미생물성 키토산올리고당의 분석 기술이 개발되어 있음으로 이를 잘 활용하면 새우젓 중의 키토산올리고당 분석이 가능할 것으로 예상된다.

2. 공정단위별로 주요 기술사항 및 그 기술수준의 분석평가

숙성방식에 따른 키토산올리고당의 생산성을 면밀히 검토한 다음, 최적조건을 도출하도록 해야 한다. 효소의 첨가에 의한 새우젓중 키토산올리고당의 함량을 높이는 방안을 강구할 필요가 있는데, 이때 효소의 종류 및 고염농도하에서의 효소작용에 대한 검토가 요망된다. 또한, 관능적 특성도 중요함으로 함께 검토해야 한다.

3. 기존 공정방법, 기술의 평가분석

가. 기술적인 평가 : 분석기술에서 예상되는 가장 큰 문제는 고염농도에 의한 항원항체반응의 방해작용이다. 효소처리에 의한 키토산올리고당의 함량 극대화를 위하여 적절한 효소종류의 선택 및 효과적인 효소반응조건의 확립을 잘 유도해야 한다.

나. 경제적인 평가 : 원료의 값이 수시로 변화하고 계절별로 원료의 특성이 있는데, 기존 새

우젓을 비교적 손쉽게 고부가치화하는 기술을 개발함으로써 비용을 증가하는 가격을 확보할 수 있을 것이다.

다. 산업기술에 미치는 과급효과 분석: 새우젓에도 기능성의 개념을 도입하여 건강지향적인 소비자 욕구를 충족할 수 있어 수요가 증대되고 관련산업의 활성화를 이룰 수 있을 것이다.

제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과

제 1 절 연구수행 방법

1. Hapten (올리고당)의 준비

키토산올리고당 (chitooligosaccharide: COS)와 키토산올리고당 (*N*-acetylchitooligosaccharide: NACOS)에 대한 면역분석법을 개발하기 위하여 3종의 hapten에 대한 항체를 생산하고자 하였다. 즉, Chitohexaose (COS6)와 *N*-acetylchitohexaose (NACOS6)는 Seikagaku사 로부터 구입하였으며, Chitooligosaccharide mixture (COSM)은 다음과 같은 방법으로 준비하였다.

가. COSM의 준비

신영 키토산(주)에서 공급받은 5% chitosan (98%, DDA, degree of deacetylation)에 chitosanase 3U를 사용하여 40 °C에서 24 시간동안 가수분해하여 COSM을 생산하였다(Fig. 1). 사용된 효소 (chitosanase)는 endo-type로, 최적온도는 60 °C이나 올리고당 제조 시 효소의 온도안정성을 고려하여 40 °C에서 반응하였다. 온도안정성은 40 °C에서 24시간 방치 후 90% 이상의 활성 유지하였다. Chitosan은 묽은 유기산 용액에서는 녹지만 알칼리의 pH가 되면 침전되는 성질을 이용하여 turbidity로 chitosanase에 의해 분해된 정도를 알 수 있다.

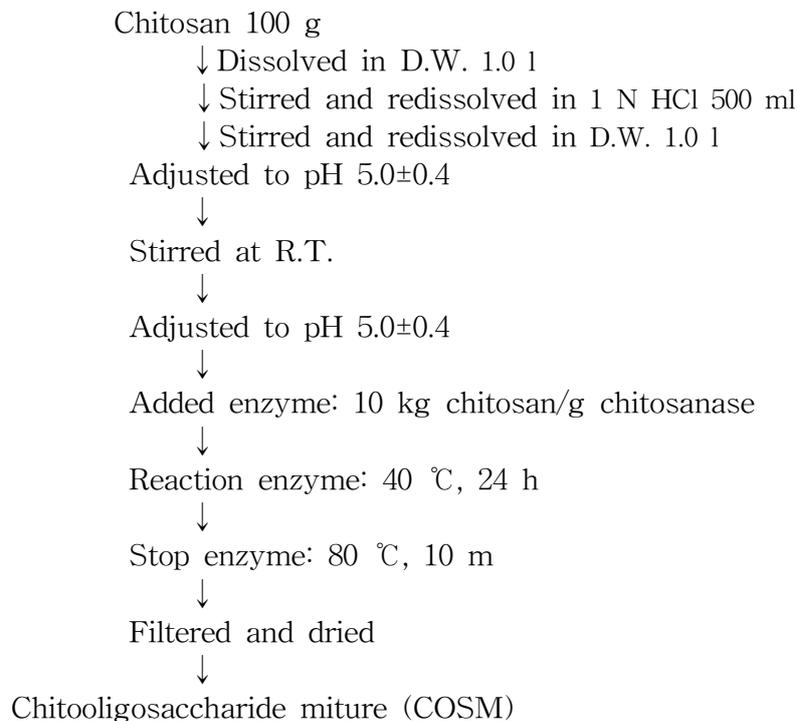


Fig. 1. Scheme for the preparation of COSM from chitosan.

또한 효소의 분해특성을 보기 위해 silicagel 60F TLC plate (Merk co.)상에서 효소 반응물을 전개시켰다. TLC의 용매의 조성은 Isopropyl alcohol : pyridine : acetic acid : water = 10 : 6 : 6 : 9 로 하였고 전개가 완료된 plates는 5% ninhydrin 액으로 분무한 후 가열하여 발색시켰다. 표준물질은 chitoooligosaccharides mixture (生化學工業(社))를 사용하였다. 이때 발색반응은 glucosamine (GlcN)의 amine기에 대하여 발색되므로 중합도 7이상에 대해서도 발색반응이 일어났으며 분해물로는 COS2~COS7만 관찰되었을 뿐 GlcN는 나타나지 않았다. 24시간 이상 (O/N)의 반응시간에서는 COS2에 대한 기질 이용속도가 가 빠르게 나타났다(Fig. 2).

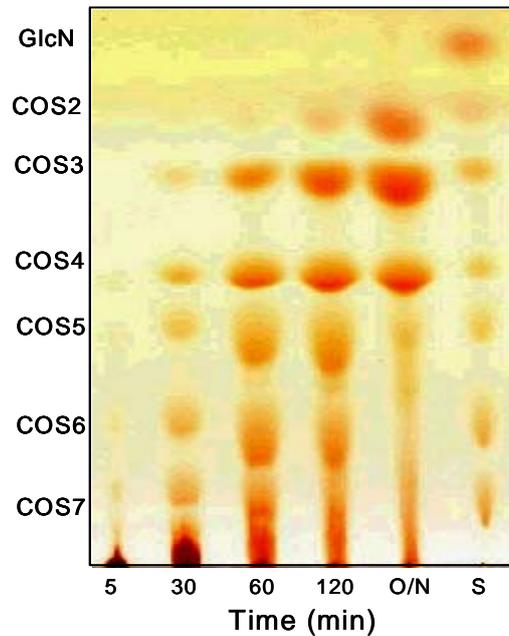


Fig. 2. Thin-layer chromatogram of chitosan hydrolysates.

Reaction condition is 3U enzyme/g chitosan, 5% chitosan, 40 °C, pH 5
O/N: over night 24 h

Chitosanase의 가수분해 산물로 작용기작을 보기 위해 기질로 5% chitosan (98%, DDA, degree of deacetylation)에 chitosanase 3U을 사용하여 40 °C에서 5분, 30분, 60분, 120분, 그리고 24 시간동안 가수분해 하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 chitosanas의 생성물은 24시간동안 부분 가수분해한 키토산이 COS2~COS7에 걸쳐 고르게 나타났다. 이 TLC상에서 부분가수분해로 효소 작용기작을 검토하여 HPLC로 최종분석하였다. HPLC분석은 COS의 분석을 위해 HPLC system을 이용하였으며 검출은 refractive index를 사용하였다(Table 1).

Table. 1. Analytical condition of HPLC for purified chitosan

Apparatus	: GILSON 132
Detector	: Refractive index (RI)
Detector temp.	: 40 °C
Column	: Amide-80
Column temp.	: 25 °C
Sensitivity	: 2
Flow rate	: 0.5ml/min
Mobile phase	: 250 mM phosphoric acid

HPLC에서 검출되는 COS는 COS2~COS7까지이지만 이들 중 COS2~COS6가 차지하는 비율은 약 63%였다. 그러나 GlcN와 COS8이상의 oligomer 분획은 검출되지 않았는데 이것은 HPLC 분석시 용매에 용해되지 못하는데 기인한 것으로 볼 수 있었다(Table. 2).

Table. 2. Composition of COSM analyzed by HPLC

COS	COS2	COS3	COS4	COS5	COS6	COS7	SUM
Activity(%)	2.64	14.55	17.40	18.78	12.62	6.80	72.79

2. 면역원의 제조

COS나 NACOS는 대체로 분자량이 2,000이하로서 단독으로는 항체생산을 유도할 수 없으므로 이들을 carrier protein과 공유결합시킨 것을 면역원으로 사용하였다. 항COS6와 항COSM 항체의 생산은 COS에 대한 특이항체는 앞선 연구방법을 응용하여 생산하였다(Stowell et al, 1981; Lonngren et al, 1976) (Fig. 3). 간략히 설명하면 COS6와 COSM을 EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide)의 존재 하에서 BSA와 반응시킴으로써 COS6-BSA와 COSM-BSA를 만들었다. 즉, 200 mg의 BSA를 2 ml의 증류수에 녹인 후 650 mg의 COSM을 빠르게 교반하면서 첨가하고 1N HCl로 pH 4.75가 되도록 조절한 뒤, EDPC용액 (315 mg/ml)을 30분에 걸쳐 점적하였다. 그리고 실온에서 0.5 N HCl로 pH 4.75가 되도록 조절한 뒤 6시간 후 pH 4.75를 확인하고 72시간 후 증류수에 대하여 투석하였다. 투석을 마친 후 냉동건조하여 면역원으로 사용하였다.

항NACOS6 항체의 생산은 NACOS6를 hapten으로 하고 carbonyldiimidazole (CDI)를 cross-linker로 사용하여 carrier protein (BSA)에 결합시킴으로써 면역원으로 제조하였다. CDI는 methyl sulfoxide, anhydrous하에서 NACOS6의 hydroxyl 기와 반응하여 intermediate를 만든 다음 carrier protein의 ε-amine기와 결합시켜 amide linkage를 형성시켰다(Hearn, 1987)(Fig. 4). 즉 25 mg의 NACOS6와 25 mg의 carbonyldiimidazole (CDI)를 150 μl methyl sulfoxide anhydrous에 2시간 실온에서 점적하였고 1 ml carbonate buffer에 20 mg의 BSA

녹인 후 점적한 용액 100 μ l를 혼합하여 투석하였다.

3. HRP conjugate의 제조

COS6-HRP와 COSM-HRP는 직접경합 ELISA에 사용하기 위한 COS6-HRP와 COSM-HRP를 준비하고자 1 mg periodate activated HRP를 0.2 M Na carbonate buffer로 pH 9.0로 적정한 후 0.5 mg의 COS6와 COSM를 첨가하여 2시간 반응시킨 다음 여기에 100 μ l의 환원제용액 (0.1 M NaHBr₄)을 첨가하여 4 $^{\circ}$ C에서 2시간 처리하였다 여기에 PBS에 투석한 뒤 sephadex G-25 (25 \times 1.5 cm)column으로 conjugate를 정제 회수하여 냉장하면서 사용하였다. NACOS6-HRP는 면역원 25 μ l을 준비하여 0.2 M Na carbonate buffer 1 ml에 peroxide (HRP) 50 mg 녹인 용액과 혼합 후, 4 $^{\circ}$ C에서 24시간 방치하였다. 여기에 PBS 투석한 뒤부터는 위와 동일하게 하였다.

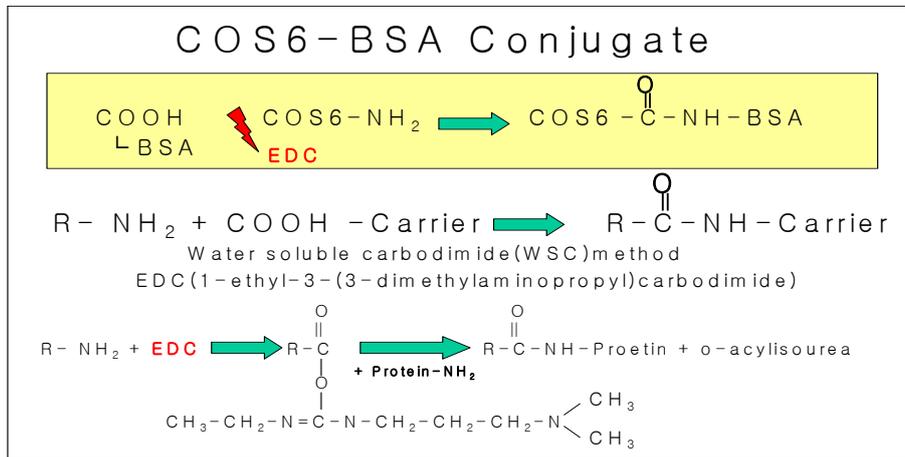


Fig. 3. Scheme for the preparation of COS6-BSA conjugate.

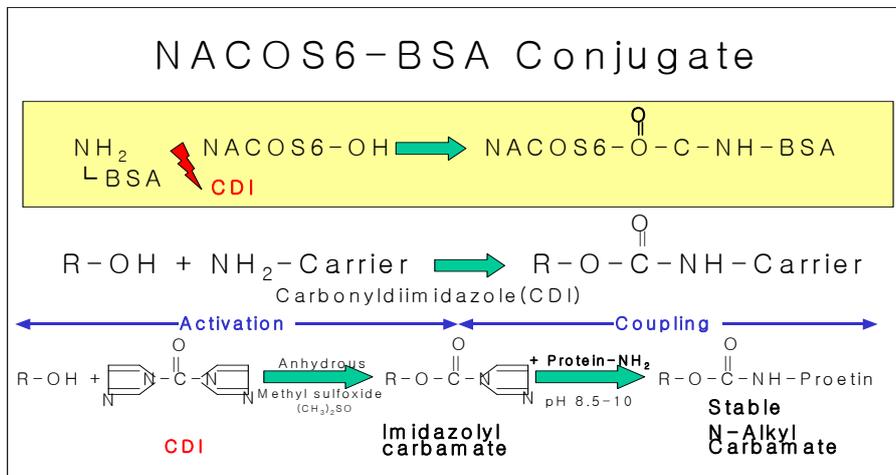


Fig. 4. Scheme for the preparation of NACOS6-BSA conjugate.

4. Chitosanase 활성측정

Chitosanase 활성(Iganacio et al, 1982)은 키토산 (Sigma) 용액으로부터 생성되는 환원당의 양을 dinitrosalicylic acid (DNS) 방법으로 측정하여 결정하였다. 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 녹인 1% chitosan 용액 300 μ l에 효소액 300 μ l을 첨가하고 50 $^{\circ}$ C에서 10 분간 반응하였다. 반응 후 10N NaOH 20 μ l을 첨가하여 교반시킨 다음 12,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 잔여기질과 반응상등액을 분리하였다. 이때 생성된 반응상등액 300 μ l에 1 ml DNS용액을 첨가한 후 끓는 물에서 5분간 가열하였다. 가열 후 충분히 식힌 다음 550 nm에서 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 환원당량을 정량하였다. 표준곡선은 D-glucosamine을 사용하여 환원당량을 결정하였다. chitosanase 활성단위 (U)는 주어진 조건에서 분당 1 μ mol의 glucosamine을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

5. SDS PAGE (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)

Laemmli의 방법(Laemmli, 1970)으로 SDS-PAGE를 실시하였다. Separating 겔의 농도는 polyacrylamide 8%를, stacking 겔은 5%를 사용하였다. SDS-PAGE에 의한 단백질의 분자량 측정은 표준 분자량 marker (myosin, 200 kDa; β -galactosidase, 116.2 kDa; phosphorylase b, 97.4 kDa; albumin, 66.2 kDa; ovalbumin)를 이용하였다. 단백질량은 BSA와 COSM-BSA, NACOS6-BSA, 그리고 COS6-BSA가 각각 0.5 μ g으로 하였으며 전기영동은 100 V, 12 mA에서 1시간 동안 수행되었고, 전기영동 후 단백질 염색은 coomassie brilliant blue R-250 (CB)로 염색하였다.

6. 특이항체의 생산

COS에 대한 다클론 특이항체 (polyclonal antibody)의 생산을 위하여 위에서 준비한 단백질을 PBs (0.25M Na_2HPO_4 , 0.75 M NaCl, pH 7.2)에 용해하여 면역하였다. 즉, COS6-BSA, NACOS-BSA 그리고 COSM-BSA의 3종을 각기 3마리씩의 토끼에 1회분의 면역원양을 500 μ g으로 하여 PBS에 용해시킨 후 Freund's complete adjuvant와 1:1로 혼합하고 Micro-mate[®] interchangeable syringe를 이용하여 emulsion을 만들었다. 그 다음, 이를 3마리 토끼의 뒷다리 발바닥에 각각 1 ml (0.5 mg/head)씩 피하주사를 하여 1차 면역을 실시하였다. 2차부터 4차까지의 추가면역은 2주 간격 (첫 면역 후 3, 5, 7주)으로 실시하였으며, Freund's incomplete adjuvant를 이용하여 emulsion을 제조한 다음, 1 ml (0.5 mg/head) 씩 토끼의 등이나 대퇴부에 나누어 피하주사 하였다. 면역 후 각각 1주일 후에 토끼의 귀정맥으로부터 마리 당 100 ml 가량씩 채혈하였다. 채혈 후 1시간 가량 실온에 방치하여 혈액을 응고시키고, 2시간 동안 냉장에서 방치한 다음, 원심분리 (3,000 rpm, 10분)하여 항혈청을 분리하여 sodium azide (NaN_3)를 0.02%되게 첨가하여 실험 전까지 냉동보관 하였다.

7. 효소면역측정법 (Enzyme-linked immunosorbent assay)

가. 비경합 ELISA (non-competitive indirect ELISA)

항체가 측정을 위해 다음과 같이 ELISA를 실시하였다. coating buffer (TRIZMA[®] PRE-SET CRYSTALS (tris hydroxymethyl) aminomethane 0.05 M, pH 9.0)에 용해시킨 면역원 (2 µg/ml)을 microplate에 각 well 당 100 µl씩 분주하여 4 °C의 냉장고에서 하룻밤 정치하였다. coating된 microplate를 washing buffer (phosphate buffered saline with Tween 20, PBST; 0.01 M phosphate buffer with 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, 0.05% Tween 20) 150 µl로 3회 세척한 후 생산된 3가지 종류의 항체는 1/10,000로 PBST에 희석한 다음 각 well 당 100 µl씩 첨가한 후 1 시간 동안 상온에서 항원-항체반응을 시켰다. 다시 washing buffer로 3회 세척한 후 2차 항체인 goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate를 1/10,000로 PBST에 희석하여 well 당 100 µl를 첨가하여 1시간 동안 상온에서 반응시켰다. 그 다음 well 당 100 µl의 기질 용액 (0.01% TMB in phosphate-citrate buffer pH 5.0, 0.001% H₂O₂)으로 상온에서 30분 동안 발색시킨 후, 2M H₂SO₄를 50 µl씩 각 well에 넣어 발색 반응을 중지시켰다. 발색정도는 microplate reader (THERMOmax, Molecular Devices, U.S.A.)로 흡광도 (450 nm)를 측정하였다. 각 시료 당 3개씩의 well를 사용하여 얻은 흡광도의 평균값으로 분석하였다.

나. 간접 경합 ELISA (competitive indirect ELISA: ciELISA)

시료 중 COS의 농도 측정을 하기 위해 확립한 ciELISA의 과정은 항체가 측정을 위한 과정과 동일하나 coating 후 항혈청과 COS용액 또는 NACOS용액을 1: 1 혼합액을 각각 well에 100 µl씩 넣고 상온에서 1시간 처리 후 상기의 기질용액을 처리하고 흡광도를 측정하였다.

다. 직접 경합 ELISA (competitive direct ELISA: cdELISA)

시료 중 COS의 농도 측정을 하기 위해 확립한 cdELISA의 과정은 capture protein으로 protein A/G (2 µg/ml)을 coating buffer에 용해시켜 microplate에 각 well 당 100 µl씩 분주하여 4 °C의 냉장고에서 하룻밤 정치하고. coating된 microplate를 washing buffer 150 µl로 3회 세척하였다. PBST에 희석된 항체 (1/5k)를 Well에 100 µl씩 넣고 상온에서 1시간 처리 후 COS6-HRP와 COS6용액을 1:1로 혼합후 각 Well에 100 µl씩 넣고 상온에서 1시간 처리 후 3회 세척한 다음 2차 항체 처리를 생략하는 점 외에는 위의 비경합 ELISA와 동일하게 하였다. 한편, 시료 중에 있는 COS의 양은 COSM을 표준 물질로 사용한 표준곡선을 이용해서 COSM equivalent로서 구하였다.

8. 교차 반응률의 계산

cdELISA의 교차 반응률은 사용한 표준 물질에 대하여 항체의 결합 정도가 50%되는 농도의 ELISA 값을 기준으로 하여 시험한 물질의 IC₅₀을 선정하고 다음과 같은 식에 의해 산출하였다.

$$\text{교차 반응률 (\%)} = \frac{\text{시험 물질의 IC}_{50}}{\text{표준 물질의 IC}_{50}} \times 100$$

9. 시판 새우젓 시료의 수집

본 실험에 사용된 시료는 시중에 유통되는 숙성기간 (염을 첨가하여 담그기 시작한 시점)이 1년 이하에서 2년 이상인 92종의 새우젓으로 가락동 농수산물시장, 롯데백화점, 인천광역시 남동구 논현동 소재 소래포구, 전남 신안군 지도읍 소재 송도, 그리고 전북 부안군 진서면 소재 곰소항에서 구입하여 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 냉동고에 보존하면서 각각 실험에 사용하였다 (Table 3).

10. 실험실적 새우젓 생산

키틴 등의 분해를 위하여 cellulase 등의 효소 첨가제를 사용하였을 때의 새우젓의 풍미는 상품가치와 관련하여 매우 중요하다. 그러므로 효소 등 처리에 의한 변화로서 COS 함량변화 이외에, 질소화합물 (아미노태질소)의 변화 및 관능적 특성 변화 등을 분석하였다.

가. 토하젓 (salt-fermented *toha* shrimps, *toha-jeot*)의 생산

전남 나주시 소재 자연 양식장에서 채집한 민물새우인 토하 (*toha*: 새뱅이, *Caridina denticulata* De HAAN) 2 kg에 식염 (천일염, 전남 신안군 제조) 20% (w/w)를 첨가하여 $5\text{ }^{\circ}\text{C}$, $15\text{ }^{\circ}\text{C}$, 그리고 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 에서 50일 동안 숙성하였다. 대조구로서는 생토하에 염처리를 하지 않고 500 ml square bottle에 넣고 두께 0.03 mm 폴리에틸렌 겹주머니에 넣어 동결저장 ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$)하였으며, 첨가된 효소들은 아미코젠(주)에서 제공받았다. 그리고 wheat bran (WB)은 천광사료 (인천시 서구)에서 제공받은 것으로 $-10\text{ }^{\circ}\text{C}$ 냉장창고에 저장하면서 실험에 사용하였다. 각 처리군 당 50g씩 하여 단계별로 채취한 모든 시료는 시료의 균일성을 유지하기 위해 waring blender로 60초간 균질화 시킨 후 500 ml square bottle에 넣고 밀봉하여 두께 0.03 mm 폴리에틸렌 겹주머니에 넣어 동결저장 ($-70\text{ }^{\circ}\text{C}$)하여 두고 분석시 일정량을 해동하여 실험에 사용하였다(Table 4, 5).

Table 3. The sources of commercial salt-fermented shrimps used in this study

No.	Sample		Area	Fermentation beginning time	No.	Sample		Area	Fermentation beginning time
	English name	Korean name				English name	Korean name		
1	<i>Ojeot</i>	오젓	Mokpo	2000.6	47	<i>Seha-jeot</i>	세하젓	Kwangchun	2001.9
2	<i>Ojeot</i>	오젓	Mokpo	2001.6	48	<i>Seha-jeot</i>	세하젓	Kwangchun	2002.3
3	<i>Ojeot</i>	오젓	Mokpo	2001.6	49	<i>Seha-jeot</i>	세하젓	Chido	2001.3
4	<i>Ojeot</i>	오젓	Mokpo	2001.6	50	<i>Seha-jeot</i>	세하젓	Mokpo	2001.3
5	<i>Ojeot</i>	오젓	Mokpo	2001.6	51	<i>Chujeot</i>	추젓	Mokpo	2000.9
6	<i>Ojeot</i>	오젓	Kanghwa	2001.6	52	<i>Chujeot</i>	추젓	Mokpo	2000.9
7	<i>Ojeot</i>	오젓	Kanghwa	2001.6	53	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2000.9
8	<i>Ojeot</i>	오젓	Chido	2002.6	54	<i>Chujeot</i>	추젓	Chido	2001.9
9	<i>Ojeot</i>	오젓	Kwangchun	2000.6	55	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
10	<i>Ojeot</i>	오젓	Kwangchun	2001.6	56	<i>Chujeot</i>	추젓	Mokpo	2001.9
11	<i>Ojeot</i>	오젓	Gomso	2001.8	57	<i>Chujeot</i>	추젓	Kwangchun	2000.9
12	<i>Ojeot</i>	오젓	Kanghwa	2002.6	58	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
13	<i>Ojeot</i>	오젓	Kanghwa	2002.5	59	<i>Chujeot</i>	추젓	Mokpo	2001.9
14	<i>Yugjeot</i>	육젓	Mokpo	2000.7	60	<i>Chujeot</i>	추젓	Kwangchun	2001.9
15	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kwangchun	2000.7	61	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
16	<i>Yugjeot</i>	육젓	Mokpo	2000.7	62	<i>Chujeot</i>	추젓	Chido	2001.9
17	<i>Yugjeot</i>	육젓	Mokpo	2001.7	63	<i>Chujeot</i>	추젓	Chido	2001.9
18	<i>Yugjeot</i>	육젓	Mokpo	2001.7	64	<i>Chujeot</i>	추젓	Kwangchun	2001.9
19	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kwangchun	2001.7	65	<i>Chujeot</i>	추젓	Kwangchun	2001.9
20	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kanghwa	2001.7	66	<i>Chujeot</i>	추젓	Gomso	2001.9
21	<i>Yugjeot</i>	육젓	Mokpo	2001.7	67	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
22	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kanghwa	2001.7	68	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.8
23	<i>Yugjeot</i>	육젓	Mokpo	2001.7	69	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
24	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kwangchun	2001.7	70	<i>Chujeot</i>	추젓	Gomso	2001.9
25	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kwangchun	2001.7	71	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
26	<i>Yugjeot</i>	육젓	Chido	2001.7	72	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
27	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kwangchun	2001.7	73	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
28	<i>Yugjeot</i>	육젓	Chido	2002.7	74	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
29	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kwangchun	2001.7	75	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.8
30	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kwangchun	2000.7	76	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2000.2
31	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kwangchun	2001.7	77	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2002.8
32	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kwangchun	2001.7	78	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
33	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kanghwa	2002.7	79	<i>Chujeot</i>	추젓	Kanghwa	2001.9
34	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kanghwa	2001.7	80	<i>Gogaemi-jeot</i>	고개미젓	Gomso	2002.5
35	<i>Yugjeot</i>	육젓	Chido	2001.7	81	<i>Gonjaengi-jeot</i>	곤쟁이젓	Mokpo	2001.1
36	<i>Yugjeot</i>	육젓	Mokpo	2001.7	82	<i>Detdegi-jeot</i>	뎃테기젓	Kwangchun	2002.3
37	<i>Yugjeot</i>	육젓	Mokpo	2001.7	83	<i>Chuldaegi-jeot</i>	철때기젓	Kanghwa	2000.8
38	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kanghwa	2002.7	84	<i>Mix-jeot</i>	혼합	Gomso	2000.6
39	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kanghwa	2002.7	85	Foreign	수입젓	China	2000.2
40	<i>Yugjeot</i>	육젓	Kanghwa	2001.7	86	Foreign	수입젓	China	2001.1
41	<i>Bugsaewoo-jeot</i>	북새우젓	Chido	2002.7	87	Foreign	수입젓	China	2001.3
42	<i>Bugsaewoo-jeot</i>	북새우젓	Chido	2002.7	88	Foreign	수입젓	China	2001.1
43	<i>Bugsaewoo-jeot</i>	북새우젓	Chido	2001.7	89	Foreign	수입젓	China	2001.9
44	<i>Bugsaewoo-jeot</i>	북새우젓	Gomso	2002.7	90	Foreign	수입젓	Vietnam	2000.2
45	<i>Bugsaewoo-jeot</i>	북새우젓	Chido	2001.7	91	Foreign	수입젓	Vietnam	2001.6
46	<i>Seha-jeot</i>	세하젓	Kwangchun	2002.3	92	Foreign	수입젓	Vietnam	2001.1

Table 4. Treatment conditions of enzymes

No.	1	2	3	4	5	
Enzyme	Chitosanase	Exo-chitinase	Endo-chitinase	Cellulase	Protease	
Product name	Chimax-O35	Chimax-N-Exo	Chimax-N-Endo	Celluclast 1.5 L FG	Flavourzyme 500 MG	
Company	Amicogen			Novozyme		
Preparation	Bacillus sp.	Cellulomonas sp. strain GM13	Cellulomonas sp. strain GM13	Trichoderma reesei	Aspergillus oryzae	
Mode of action	Endo-cleavage type	Exo-cleavage type	Endo-cleavage type	Endo-cleavage type	Endoprotease and exopeptidase complex type	
Catalysis	Breakdown of chitosan into chitobiose, chitotriose and higher oligosaccharides	Breakdown of chitin into its monomeric unit, N-acetyl glucosamine	Breakdown of chitin into its dimeric unit	Breakdown of cellulose into glucose, cellobiose and higher glucose	Breakdown of cellulose into glucose, cellobiose and higher glucose	
Molecular weight	45,000 Da	54,000 Da	63,000 Da	-	-	
Optimum pH	4.5~6.0	6.0	7.0	4.5~6.0	5.0~7.0	
pH stability	4.5~8.0	7.0~8.0	4.0~8.0	4.5~8.0	7.0	
Optimum Temp.	60 °C	55 °C	60 °C	50 °C~60 °C	50 °C	
Temp. stability	More than 90% activity remains after 24 hr incubation at 40°C	More than 90% activity remains after 1 hr incubation at 40°C	More than 90% activity remains after 24 hr incubation at 45°C	-	-	
Activity	Chitosanase, 35,000 U/g	Exo-chitinase, 2,000 U/g	Endo-Chitinase, 8,000 U/g	Endo-glucanase, 700 EGU/g	500 LAPU ¹⁾ /g	
Shape	White powder	Yellow powder	Brown powder	Brown liquid	Brown powder	
Application	Hydrolyzing chitosan	Hydrolyzing chitin		Hydrolyzing cellulose	Hydrolyzing protein	
Treat-ment conc.	C.D. ²⁾	2 mg /100 g shrimps	4 mg /100 g shrimps	4 mg /100 g shrimps	-	-
	A.J. ³⁾	3 mg /100 g shrimps	1.5 mg /100 g shrimps	1.5 mg /100 g shrimps	-	-
	A.C. ⁴⁾	4 mg /100 g shrimps	-	4 mg /100 g shrimps	40 µl /100 g shrimps	40 mg or 400mg /100 g shrimps

¹⁾LAPU is Leucine amino peptidase units.

²⁾S.T. is salt-fermented *toha* shrimp (*Caridina denticulata*).

³⁾A.J. is salt-fermented shrimp (*Acetes japonicus*, *yugjeot*).

⁴⁾A.C. is salt-fermented shrimp (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*).

Table 5. Treatment conditions for the preparation of experimental salt-fermented *toha* shrimps (*Caridina denticulata*, *toha-jeot*)

No.	NaCl	Temp.	Addition
1	0%	-70 °C	Control
2	20%	5 °C	Control
3			Chitosanase (En1) ¹⁾ + Exo-chitinase (En2) ²⁾
4			Wheat bran (WB)
5			Control
6		Chitosanase (En1)	
7		Exo-chitinase (En2)	
8		Endo-chitinase (En3) ³⁾	
9		Chitosanase (En1) + Exo-chitinase (En2)	
10		Wheat bran (WB) ⁴⁾	
11		Wheat bran (WB) + Chitosanase (En1)	
12		Wheat bran (WB) + Exo-chitinase (En2)	
13		Wheat bran (WB) + Endo-chitinase (En3)	
14		Wheat bran (WB) + Chitosanase (En1) + Exo-chitinase (En2)	
15		Ground	
16		Ground : Chitosanase (En1) + Exo-chitinase (En2)	
17		Ground : Wheat bran (WB)	
18		25 °C	Control
19			Chitosanase (En1)
20			Exo-chitinase (En2)
21			Endo-chitinase (En3)
22			Wheat bran (WB)

³⁾En1~En3 were added to *toha* shrimps according to enzymes shown in Table 4.

⁴⁾WB (finally 3%, w/w) was added to *toha* shrimps.

나. 육젓 (salt-fermented shrimps, *yugjeot*)의 생산

전남 신안시 지도에서 채집한 젓새우 (*Acetes japonicus*) 4.5 kg에 식염 15, 20, 그리고 25% (w/w)를 첨가하여 5 °C, 15 °C, 그리고 25 °C에서 숙성하였다. 각 처리군 당 70g씩 단 계별로 채취한 모든 시료는 토하젓 생산과 동일하게 사용하였다 (Table 6).

Table 6. Treatment conditions for the preparation of experimental salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus*, *yugjeot*)

No.	NaCl	Temp.	Addition
1	0%	-70 °C	Control
2	15% or 20% or 25%	5 °C	Control
3			Chitosanase (En1) ¹⁾ + Exo-chitinase (En2) ²⁾
4			Wheat bran (WB)
5			Control
6		Chitosanase (En1)	
7		Exo-chitinase (En2)	
8		Endo-chitinase (En3) ³⁾	
9		Chitosanase (En1) + Exo-chitinase (En2)	
10		Wheat bran (WB) ⁴⁾	
11		Wheat bran (WB) + Chitosanase (En1)	
12		Wheat bran (WB) + Exo-chitinase (En2)	
13		Wheat bran (WB) + Endo-chitinase (En3)	
14		Wheat bran (WB) + Chitosanase (En1) + Exo-chitinase (En2)	
15		Ground	
16		Ground : Chitosanase (En1) + Exo-chitinase (En2)	
17		Ground : Wheat bran (WB)	
18		25 °C	Control
19			Chitosanase (En1)
20			Exo-chitinase (En2)
21			Endo-chitinase (En3)
22			Chitosanase (En1) + Exo-chitinase (En2)
23			Wheat bran (WB)

^{1),2),3)}En1 ~ En3 were added to shrimps according to enzymes shown in Table 4.

⁴⁾WB (finally 3%, w/w) was added.

다. 동백하젓 (salt-fermented shrimps, *dongbaegha-jeot*)의 생산

인천광역시 남동구 소재에서 채집한 동백하 (*Acetes chinensis*) 6.5kg에 식염 20% (w/w)를 첨가하여 15 °C와 25 °C에서 숙성하였다. 첨가된 효소들은 아미코젠(주)에서 제공받았고 cellulase (En4)와 protease (En5)는 Novozymes에서 제공받았으며, 열처리되지 않는 키틴 분해물 (chitin digest, CD)은 충남 천안시 소재 (주)이지바이오 시스템에서 제공받았다. 각 처리군 당 150g씩 단계별로 채취한 모든 시료는 토하젓과 동일하게 사용하였다 (Table 7).

Table 7. Treatment conditions for the preparation of experimental salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*)

No.	NaCl	Temp.	Addition
1	0%	-70℃	Control
2	20%	15℃	Control
3			Chitosanase (En1) ¹⁾
4			Endo-chitinase (En3) ²⁾
5			Cellulase (En4) ³⁾
6			Protease-40 (En5-40) ⁴⁾
7			Wheat bran (WB) ⁵⁾
8			Chitin digest (CD) ⁶⁾
9		or	Chitosanase (En1) + Endo-chitinase (En3)
10			Exo-chitinase (En3) + Cellulase (En4)
11		20℃	Exo-chitinase (En3) + Protease-40 (En5-40)
12			Chitosanase (En1) + Endo-chitinase (En3) + Protease-40 (En5-40)
13			Endo-chitinase (En3) + Wheat bran (WB)
14			Chitosanase (En1) + Endo-chitinase (En3) + Wheat bran (WB)
15			Endo-chitinase (En3) + Chitin digest (CD)
16			Chitosanase (En1) + Endo-chitinase (En3) + Chitin digest (CD)
17			Wheat bran (WB) + Chitin digest (CD)
18			Protease-400 (En5-400)
19			Endo-chitinase (En3) + Protease-400 (En5-400)
20			Chitosanase (En1) + Endo-chitinase (En3) + Protease-400 (En5-400)

^{1),2),3),4)} Enzymes were added to shrimps according to enzymes shown in Table 4.

⁵⁾WB (finally 3%, w/w) and ⁶⁾CD (finally 3%, w/w) were added.

11. 새우젓의 일반성분 분석

가. 수분

시료 1 g을 항량을 아는 수분 수기에 넣고 100~105℃에서 1~2시간 건조하고 내부 온도가 설정온도까지 도달한 후부터 시간을 측정하였다.

나. 염도

Mohr법에 의한 식염 (NaCl)의 정량으로 시료 5 g을 250 ml volumetric flask에 취한 후 증류수로 녹여준 후 건조여과지로 여과 후 5 ml를 취하였다. 비이커에 지시약으로 2% K₂CrO₄ 1 ml를 넣었다. 그 후 뷰렛에 0.02N-AgNO₃를 넣어 위의 시료를 적정하여 염도를 구하였다.

다. 아미노태질소

아미노태질소 (NH₂-N)는 포르몰태질소에서 암모니아태질소를 뺀 것으로 분석하였다. 포르몰태질소는 시료 1 g을 비이커에 취하고 증류수 100 ml에 용해시킨 후 0.1N NaOH용액을 한 방울 씩 떨어뜨려 pH를 8.4로 적정하였다. 여기에 20 ml 중성 CH₂O solution을 첨가한 후 0.5% C₂₀H₁₄O₄을 1 ml 첨가하여 다시 0.1N NaOH 용액으로 적정하여 pH 8.4에 도달하는 시점을 종말점 (연분홍색)으로 하여 정확히 중화시켰다. 계산은 다음 식으로 하였다.

$$\text{포르몰태질소 (mg \%)} = \frac{(A-B) \times 1.4 \times F \times 100}{S}$$

A: CH₂O solution을 첨가한 후 (중화) 본 실험에 소비된 0.1N NaOH solution ml 수

B: CH₂O solution을 첨가한 후 바탕실험에서 소비된 0.1N NaOH solution ml

F: 0.1 N NaOH solution의 역가

S: 시료 채취량 (g)

1.4mg 포르몰태 질소 = 0.1 N NaOH 1 ml

다음으로 암모니아태질소 (NH₃-N)는 시료 1g을 비이커에 취하고 증류수 100 ml에 용해시킨 후 1시간을 진탕하여 걸러 거른액 중에서 20 ml를 취하여 단백질 정량 실린더 (Kjeldahl flasks)에 넣었다. 여기에 30% NaOH 20 ml과 silicone에 수지를 3 ml를 넣고 증류장치에서 6 분간 증류하였다. 증류액은 3% boric acid (H₃BO₃) 50 ml가 있는 비이커에 받아 0.02 N HCl 용액으로 적정하였다 계산은 다음 식으로 하였다.

$$\text{암모니아태질소 (mg \%)} = \frac{(A-B) \times 1.4 \times F \times 100 \times (C/D)}{S}$$

A : Sample solution 중화에 소비된 0.02 N HCl solution ml 수

B : 바탕실험에서 소비된 0.02 N HCl solution ml 수

C : 증류수로 희석한 ml 수

D : 거른액 중 취한 ml 수

F : 0.02 N HCl solution의 역가

S : 시료 채취량 (g)

1.4 mg 암모니아태 질소 = 0.02 N HCl 1 ml

12. 새우젓 시료중 키토산올리고당의 함량 분석

우선 새우젓 중의 chitosan의 존재유무를 확인하고자 TLC 분석을 행하였으며, COS의 분석을 위하여 ELISA를 행하였다.

가. TLC에 의한 chitosan의 분석

목포산 새우젓을 Fig. 5과 같이 처리하여 TLC의 분석용으로 사용하였다. TLC의 용매의 조성은 Isopropyl alcohol : pyridine : acetic acid : water = 10 : 6 : 6 : 9 로 하였고 전개가 완료된 plates는 5% ninhydrin 액으로 분무한 후 가열하여 발색시켰다. 표준물질은 chitooligosaccharides mixture(生化學工業(社))를 사용하였다.

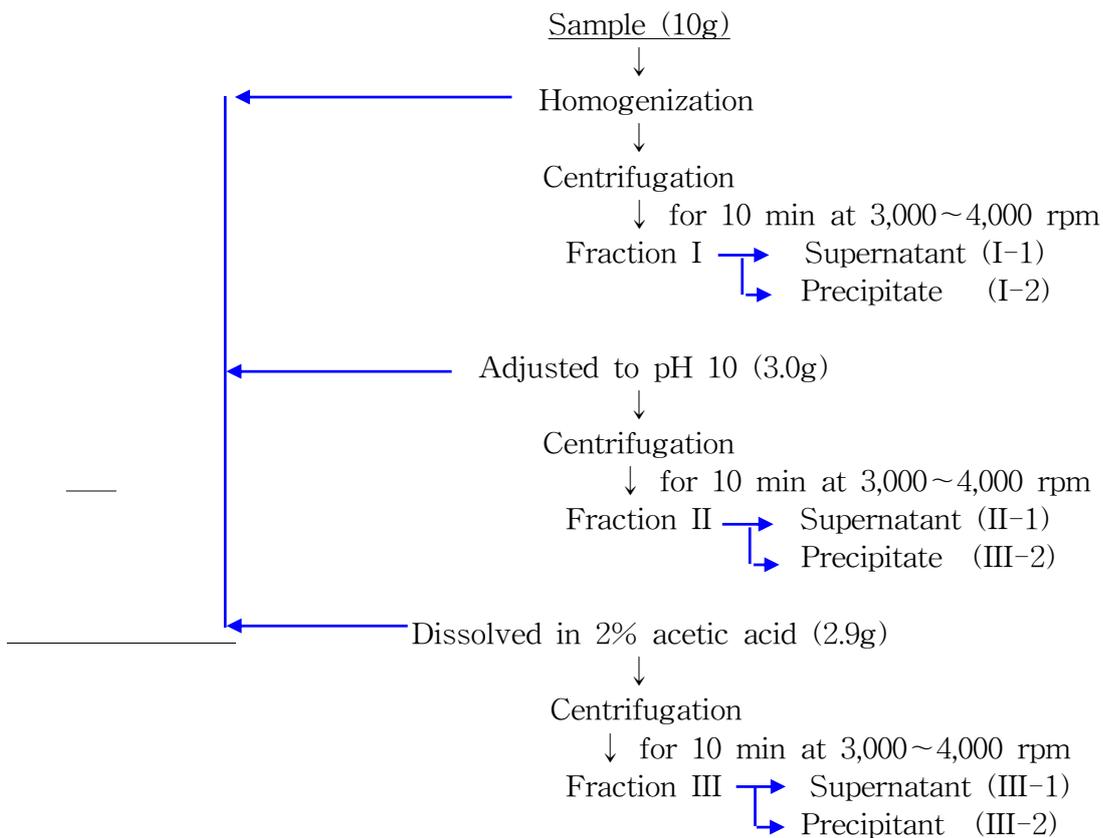


Fig. 5. Scheme for the extraction of chitosan from salt-fermented shrimps.

나. Spike Test

새우젓에 인위적으로 첨가한 키토산올리고당의 함량을 ELISA로 분석하여 그 결과를 검토하여 새우젓 중 키토올리고당 분석에 적용가능성을 확인하기 위한 검출법으로 지도산 (육젓) 새우젓 6g을 3분간 분쇄한 후 5 g을 취하여 3,000 rpm에서 10분간 원심분리하여 상징액 500 µl에 COS6 용액을 최종 농도가 300, 100, 30, 10, 3, 그리고 0 ppm의 농도로 각각 첨가한 후 하루동안 4 °C에서 정치시킨 후 이를 100배, 1,000배 희석하여 cdELISA를 수행하고 standard curve상의 직선 구간에 있는 ELISA값을 택하여 그 시료의 COS 양으로 환산하였다.

다. COS의 분석에 의한 시료의 처리

새우젓 92종 3 g씩을 10배 volume의 추출용매로 PBST buffer를 넣고 homogenizer로

11,000 rpm에서 2분간 혼합하여 용해시키고 세게 vortexing한 후 1 ml을 microhigh speed centrifuge (10,000 rpm, 10 min)로 원심분리하여 상정액을 취하였다. 이를 냉동 보관하면서 필요시 새우젓 상정액을 PBST buffer로 1/100로 희석하여 cdELISA를 실시하였으며, COS6을 표준물질로 사용한 표준곡선을 이용해서 COS6 equivalent로서 구하였다.

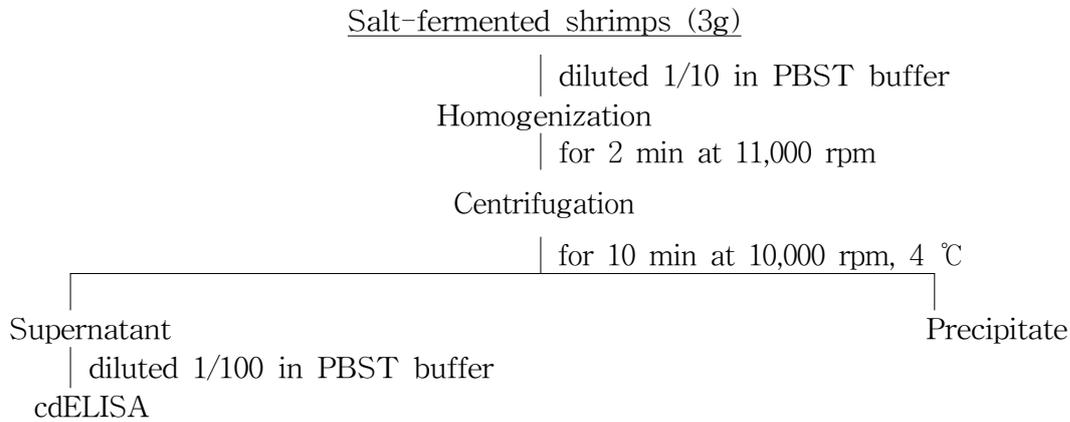


Fig. 6. Scheme for preparation of salt-fermented shrimps for COS assay

13. 관능검사

척도묘사법 (descriptive analysis with scaling)을 이용하여 Table 8과 같은 설문지에 의해 9점 평가법으로 조사하였다. 담근 새우젓 시료를 투명한 유리용기에 3 g 씩 담고 약 1 ml의 국물을 부은 후 훈련된 관능검사 31명 요원에게 유리관 속에 넣어 제시하였으며, 각자의 샘플은 유리뚜껑을 열어서 관능검사를 실시하였다. 조사항목은 기호도와 강도를 나누어 색 (color), 짠냄새 (salty odor), 짠맛 (salty taste), 쓴맛 (bitter taste), 질긴정도 (toughness)을 각각 평가하였고 마지막으로 종합적인 기호도 (overall acceptance)를 조사하였다.

점수 평가방법은 색조는 시료의 고유의 투명한 정도에서 발효되어 변화한 색깔을 평가하였으며 짠냄새는 숨을 짧고 힘있게 3~4번 들이마시면서 냄새를 맡은 후에 그 정도를 평가하도록 하였으며 짠맛과 쓴맛은 여러 차례 어금니로 씹고 빨은 후에 그 강도를 평가하도록 하였다. 그리고 질긴정도는 앞니를 사용하여 시료를 2~3회 씹었을 때 드는 힘의 정도를 평가하였다. 기호도는 1=Extremely bad; 2=Very bad; 3=Moderately bad; 4=Slightly bad; 5=moderate; 6=Slightly good; 7=Moderately good; 8=Very good; 9=Extremely good으로 하였으며, 강도는 1=Extremely bland; 2=Very bland; 3=Moderately bland; 4=Slightly bland; 5=moderate; 6=Slightly intense; 7=Moderately intense; 8=Very intense; 9=Extremely intense로 scoring test 하였다. 검사는 8개 시료를 한번에 평가하는데서 오는 감각의 둔화현상을 줄이기 위하여 불완전 블록계획에 의해 실시하여 한번에 한 검사원이 4개의 시료를 평가하도록 하였다. 다만, 시판 새우젓은 담근 새우젓과 같은 방법으로 하였으며 관능검사 요원은 줄였으며 조사항목 중 강도는 생략하였다.

Table 8. Sensory evaluation sheet of salt-fermented shrimps

새우젓의 관능검사지

200 . . .

이름 : _____

먼저, 물로 입가심을 하신 후, 왼쪽의 시료부터 평가해주십시오. 각 항목에 대한 귀하의 의견을 가장 잘 표현한 난에 시료번호를 적어 주십시오.

기 호 도	강 도
색 (Color) () () () () () () () () () () 싫다 좋다	색 (Color) () () () () () () () () () () 없음 대단히 강함
짠냄새 (Salty odor) () () () () () () () () () () 싫다 좋다	짠냄새 (Salty odor) () () () () () () () () () () 없음 대단히 강함
짠맛 (Salty taste) () () () () () () () () () () 싫다 좋다	짠맛 (Salty taste) () () () () () () () () () () 없음 대단히 강함
쓴맛 (Bitter taste) () () () () () () () () () () 싫다 좋다	쓴맛 (Bitter taste) () () () () () () () () () () 없음 대단히 강함
질긴정도 (Toughness) () () () () () () () () () () 싫다 좋다	질긴정도 (Toughness) () () () () () () () () () () 없음 대단히 강함
종합적인 기호도 (Overall acceptance) () () () () () () () () () () 싫다 좋다.	

14. 통계분석

SAS General Linear Model (SAS, 1996)을 이용하여 Duncan의 다중검정, 단순회귀상관계수 및 단순 상관을 구하였다.

제 2 절 연구수행 결과 및 고찰

1. 새우젓중 키토산올리고당의 검출을 위한 면역분석법 확립

실험방법에서 명기한 바와 같이 COS 및 NACOS의 분석을 위하여 COS6 (100% deacetylation), NACOS6 (100% acetylation), COSM (chitosan의 저분자분해물)을 hapten으로 한 3종의 면역원을 준비하고 이에 대하여 생산한 항체를 면역분석법의 확립에 활용하였다.

가. 면역원의 준비 및 항체의 생산

ELISA 법으로 COS를 정량하기 위해서는 특이성과 결합력이 뛰어난 항COS 항체가 필요하다. COS는 분자량이 2,000이상이 되지 못하고 당쇄만으로 구성되어 있어 항체생산을 유도할 수 없으므로, 이를 hapten으로 하고 BSA를 carrier protein으로 하여 EDPC를 사용하여 결합시켰다. EDPC는 BSA의 carboxyl과 반응하여 intermediate를 만든 다음 COS의 amine기와 결합시켜 amide linkage를 형성하게 한 후 urea의 형태로 떨어지게 된다. 3종류의 hapten을 결합시킨 면역원으로 COS6, NACOS6 및 COSM를 BSA에 공유결합시켜 준비한 각각의 conjugate들에 대하여 SDS-PAGE를 실시하였다. Fig. 7에서와 같이 NACOS6-BSA는 BSA부근의 위쪽 밴드가 강하게 나타내었으나, COSM-BSA는 전체적으로 퍼지고 흐린 밴드가 나타났고 BSA에 COSM가 결합하여 더 positive한 분자가 된 것으로 볼 수 있었으며 COS6-BSA는 분자량이 66 kDa에서 200 kDa까지 넓게 끌렸다. 이러한 사실로부터 COS6의 결합으로 인하여 BSA의 분자량이 커진 것을 알 수 있었다.

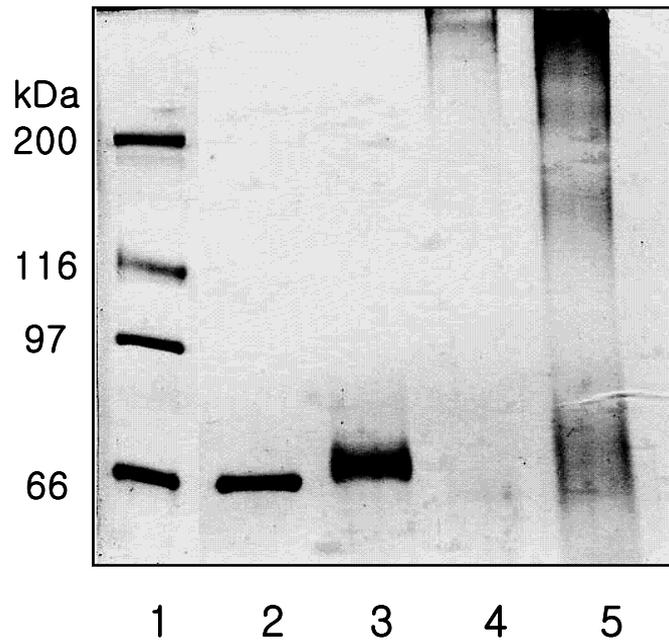


Fig. 7. SDS-PAGE patterns of NACOS6-BSA, COSM-BSA, and COS6-BSA conjugates.

Electrophoresis was done on polyacrylamide gel (8%) at pH 8.8 in Tris buffer. Lane 1, Molecular weight marker (kDa); lane 2, Bovine serum albumin; lane 3, NACOS6-BSA conjugate; lane 4, COSM-BSA conjugate; lane 5, COS6-BSA conjugate.

앞서 준비된 COS6-BSA, NACOS6-BSA 및 COSM-BSA를 각각 세 마리의 토끼에 수 차례 면역하여 생산한 항혈청을 1/10,000로 희석한 다음, 그 항체를 비경합 간접 ELISA로 조사한 결과, 3차와 4차 항혈청의 항체가 대체로 양호하게 생산되었음을 확인 할 수 있었다 (Fig 8~10).

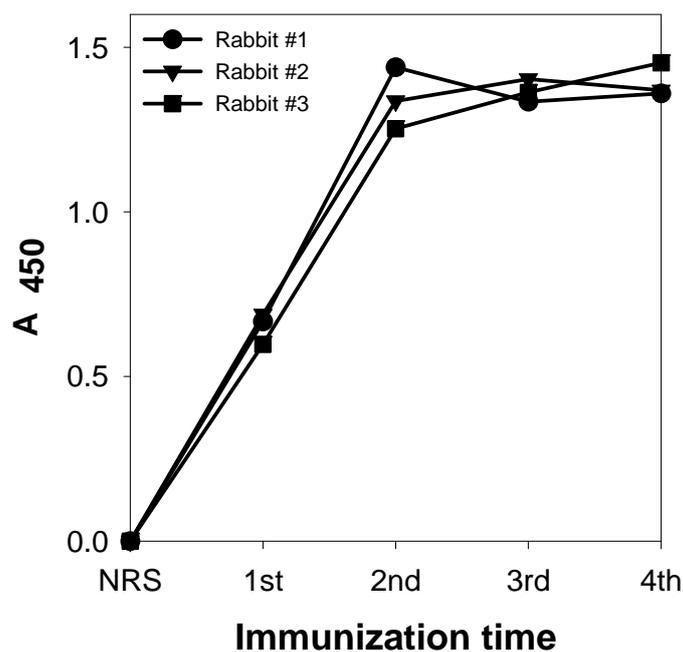


Fig. 8. Production of anti-COS6 antibodies as determined non-competitive ELISA. Each rabbit was immunized with COS6-BSA on week 0, 2, 4, and 6 and bled on 7 days later after each immunization. NRS: normal rabbit serum

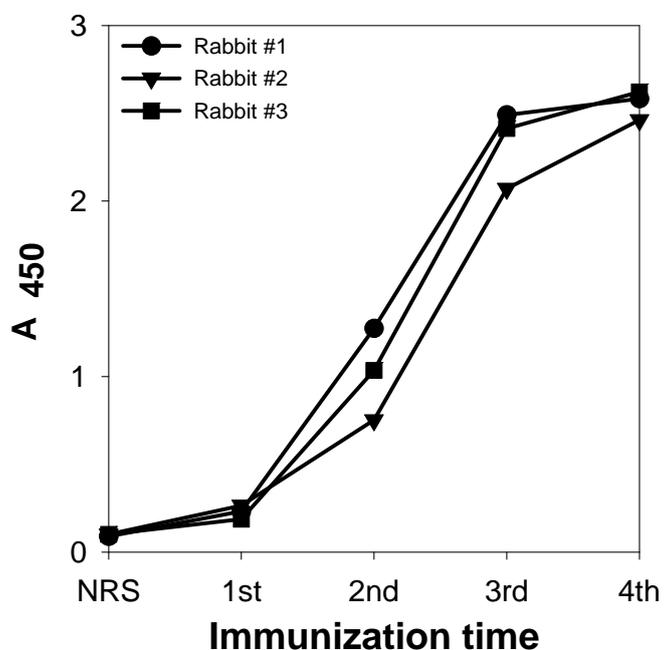


Fig. 9. Production of anti-NACOS6 antibodies as determined non-competitive ELISA. Each rabbit was immunized with NACOS6-BSA on week 0, 2, 4, 7, and 9 and bled on 7 days later after each immunization. NRS: normal rabbit serum.

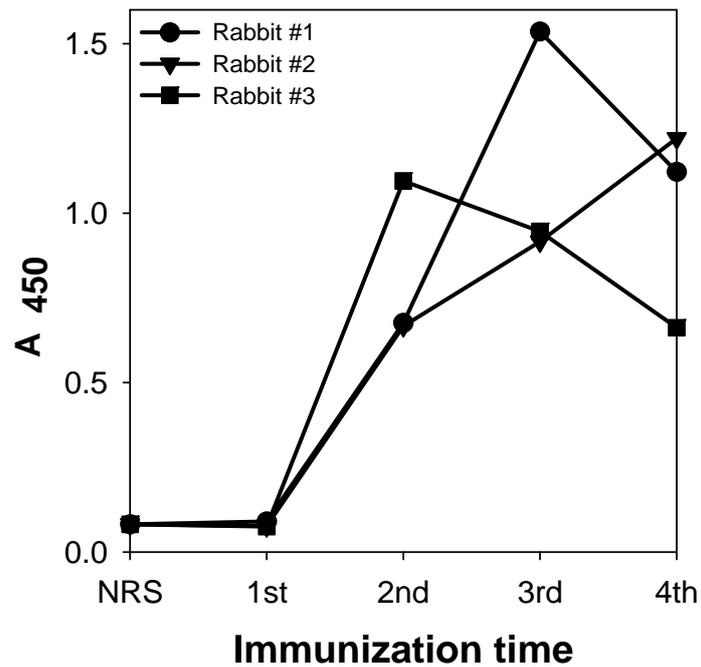


Fig. 10. Production of anti-COSM antibodies as determined non-competitive ELISA. Each rabbit was immunized with COSM-BSA on week 0, 2, 4, 6, and 8 and bled on 7 days later after each immunization. NRS: normal rabbit serum.

나. 경합ELISA의 확립

cdELISA로 분석하기 위하여 protein A/G를 capture protein으로 이용하여 항COSM 항체와 COSM-HRP를 사용한 cdELISA의 표준곡선은 Fig. 12와 같다. 이 경우 검출범위는 $10^{-3} \sim 10^0 \mu\text{g/ml}$ 로, ciELISA에서 $10^0 \sim 50 \mu\text{g/ml}$ 보다는 높은 감도를 나타냈다(Fig. 11). 그리하여 이후 실험은 모두 cdELISA로 분석하였다. 또한 항COS6 항체를 이용하여 COS6에 대한 ELISA의 표준곡선을 구하였을 때, 검출한계는 $10^{-3} \mu\text{g/ml}$ 이고 검출범위는 $10^{-3} \sim 10^0 \mu\text{g/ml}$ 사이인 것으로 나타났으며 항NACOS6 항체의 검출한계는 $10^{-4} \mu\text{g/ml}$ 이고 검출범위는 $10^{-4} \sim 10^{-1} \mu\text{g/ml}$ 사이로 나타났다. 항NACOS6 항체가 감도가 가장 우수하였다.

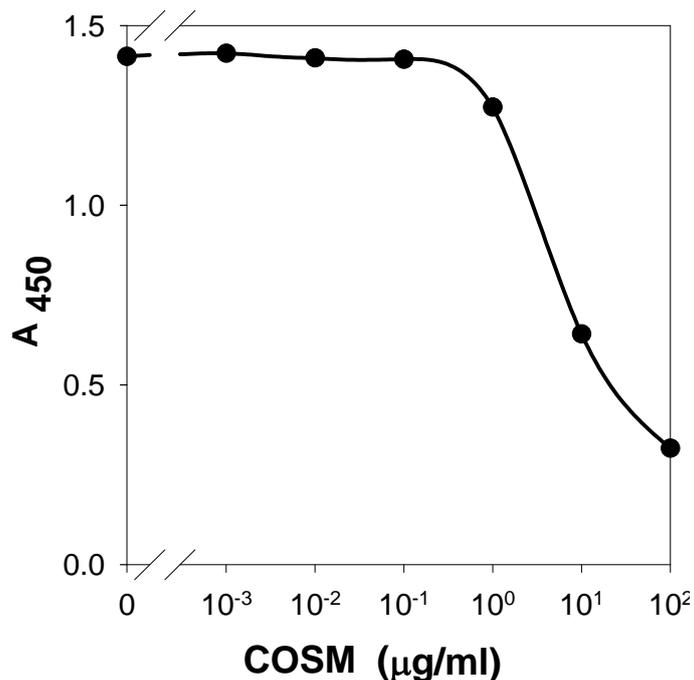


Fig. 11. Standard curve of ciELISA for COSM.

In competitive indirect ELISA (ciELISA), each well of polystyrene microtiter plates (#446612, Nunc, Roskilde, Denmark) was coated with 100 µl of COSM-BSA (2 µg/ml) in a coating buffer (0.02M Tris, 0.15M NaCl buffer, pH 9.0). Antigen-treated plates were incubated for overnight at 4 °C and each well was washed three times with 150 µl of a washing buffer (0.02M Tris, 0.15M NaCl buffer, pH 7.4, with 0.02% Tween 20). To each well 100 µl of 1:1 (COSM : antiserum (3th #1 rabbit serum) diluted to 1/5,000 in the washing buffer containing 1% BSA) was added and left for 1hr. After washing three times, 100 µl of goat anti-rabbit IgG-HRP conjugate (#A6154, Sigma Chemical Co.) as a secondary antibody was added to each well and left for 1hr. Then, to each washed well 100 µl of a substrate solution (0.01% TMB, 0.05M phosphate citrate buffer, pH 5, 0.002% hydrogen peroxide) was added, developed at room temperature for 30min, and stopped with 50 µl of 2M H₂SO₄. The O.D. was determined at 450nm with microplate reader (THERMOmax™, Molecular Devices Co. (U.S.A.), Sunnyvale, CA).

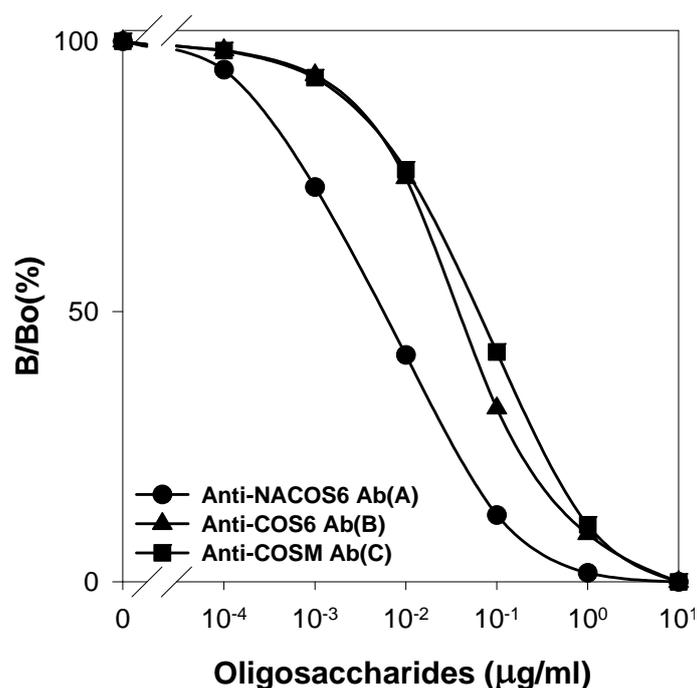


Fig. 12. Standard curves of cdELISA for COS6 and/or NACOS6. B/Bo means relative binding of NACOS6-HRP, COS6-HRP, and COSM-HRP in the presence of COS6 and/or NACOS6 as follow.

(A) cdELISA, each well of the plates was coated with 100 µl of protein A/G was coated (2 µg/ml) in the coating buffer overnight at 4 °C. After washing three times, each well was coated with 100 µl the anti-NACOS6 antibody (Ab) (1/5,000 in the washing buffer). After washing three times, each well was added with 100 µl of 1:1 (NACOS6 : NACOS6-HRP diluted to 1/3,000 in the washing buffer) mixture and stood for 1 hr at R.T. Then, to each washed well the substrate solution (H₂O₂/TMB) was added, developed for 30 min, and finally the absorbance was measured.

(B) cdELISA was performed according to the procedure same as in (A) except the anti-COS6-BSA Ab, COS6, and COS6-HRP were used instead of the anti-NACOS6 Ab, NACOS6, and NACOS6-HRP, respectively.

(C) cdELISA was performed according to the procedure same as in (A) except the anti-COSM-BSA Ab, COS6, and COSM-HRP were used instead of the anti-NACOS6 Ab, NACOS6, and NACOS6-HRP, respectively.

다. 교차반응

항COS6 항체의 교차반응은 항COS6 항체의 특성을 조사하기 위하여 oligomer의 중합도에 따른 표준곡선을 보았다. glucosamine (GlcN), chitobiose (COS2), chitotriose (COS3), chitotetraose (COS4), chitopentaose (COS5), chitohexaose (COS6) 그리고 chitooligosaccharides mixture (COSM)의 chitooligosacchride (COS)와 *N*-acetylglucosamine (NAGlcN), *N*-acetylchitobiose (NACOS2), *N*-acetylchitotriose (NACOS3), *N*-acetylchitotetraose (NACOS4), *N*-acetylchitopentaose (NACOS5), 그리고 *N*-acetylchitohexaose (NACOS6)의 *N*-acetylchitooligosacchride (NACOS)에 대한 특이항체의 교차반응을 cdELISA로 검토하였을 때, COS6를 기준으로 하여 각각의 COS와 NACOS에 대한 교차반응을 $\mu\text{g/ml}$ unit으로 나타낸 결과, COS2, COS3, COS4, COS5, COS6 그리고 COSM은 항체에 대한 COS6-HRP의 결합을 저해하였으며 각각의 IC₅₀값 (0.40, 0.16, 0.08, 0.09, 0.06 그리고 0.10 $\mu\text{g/ml}$)으로부터 그 교차반응율은 13.8, 34.4, 68.8, 61.1, 100 그리고 55.6%로 나타났다(Fig. 13, Table 9). 그러나 다른 *N*-acetylchitooligosaccharides (NACOS)의 경우는 교차반응이 0.1% 이하로 거의 반응성을 보이지 않았다. COS는 중합도가 커질수록 교차반응율이 높아졌는데 반하여 NACOS는 COS6검출에 영향을 미치지 못하였다.

항NACOS6 항체는 NACOS6를 기준으로하여 각각의 COS와 NACOS에 대한 교차반응을 $\mu\text{g/ml}$ unit으로 나타낸 결과, NACOS3, NACOS4, NACOS5, 그리고 NACOS6는 항체에 대한 NACOS6-HRP의 결합을 저해하였으며 각각의 IC₅₀값 (0.039, 0.0064, 0.0085, 그리고 0.0099 $\mu\text{g/ml}$)으로부터 그 교차반응율은 25.4, 155, 116, 그리고 100 %로 나타났다 (Fig. 14, Table 10). 특히 NACOS4와 NACOS6가 NACOS6보다 교차율이 높게 나타났다. 그리고 다른 chitooligosaccharides (COS)의 경우는 교차반응이 0.05% 이하로 거의 반응성을 보이지 않았다. 항NACOS6 항체는 항COS6 항체와 항COSM 항체와 달리 chitosan oligomer에 대한 종합적인 교차반응은 상당히 낮아 실제 COS의 검출에 영향을 미치지 못할 것이다.

마지막으로 항COSM 항체의 경우 이 항체는 COSM를 기준으로하여 각각의 COS와 NACOS에 대한 교차반응을 $\mu\text{g/ml}$ unit으로 나타낸 결과, COS2, COS3, COS4, COS5, COS6 그리고 COSM은 항체에 대한 COSM-HRP의 결합을 저해하였으며 각각의 IC₅₀값(0.23, 0.24, 0.20, 0.19, 0.11, 그리고 0.11 $\mu\text{g/ml}$)으로부터 그 교차반응율은 48.9, 45.8, 55.0, 57.9, 100, 그리고 100%로 나타났다(Fig. 15, Table 11). 특히 항COSM 항체는 COSM의 교차반응율이 항COS6보다 잘 인식하는 것으로 나타나 식품 중 COS 검출 시 다른 당류에 의한 영향을 낮춰 분석의 신뢰도를 높일 수 있는 특이성이 높은 것으로 나타났다. 그리고 다른 *N*-acetylchitooligosaccharides (NACOS)의 경우는 교차반응이 0.2% 이하로 거의 반응성을 보이지 않았다. 이러한 교차반응은 Kim 등(2000)의 경우와 유사한 경향을 보였다.

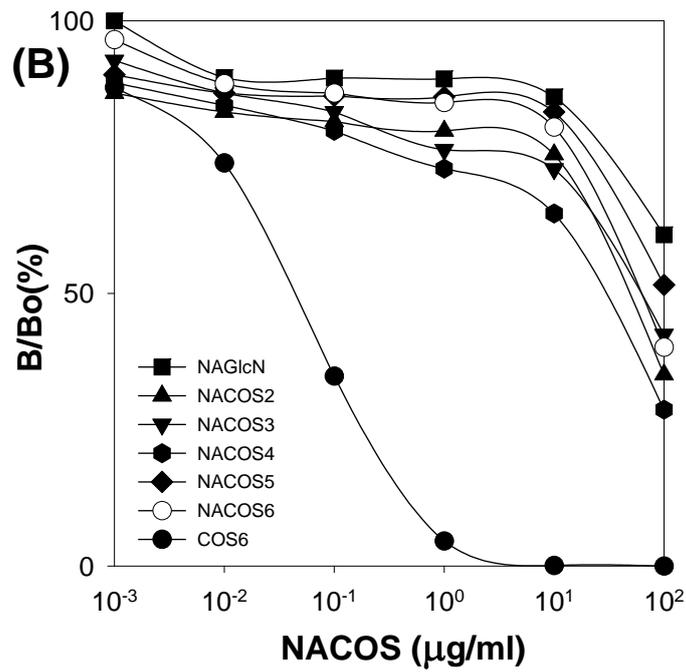
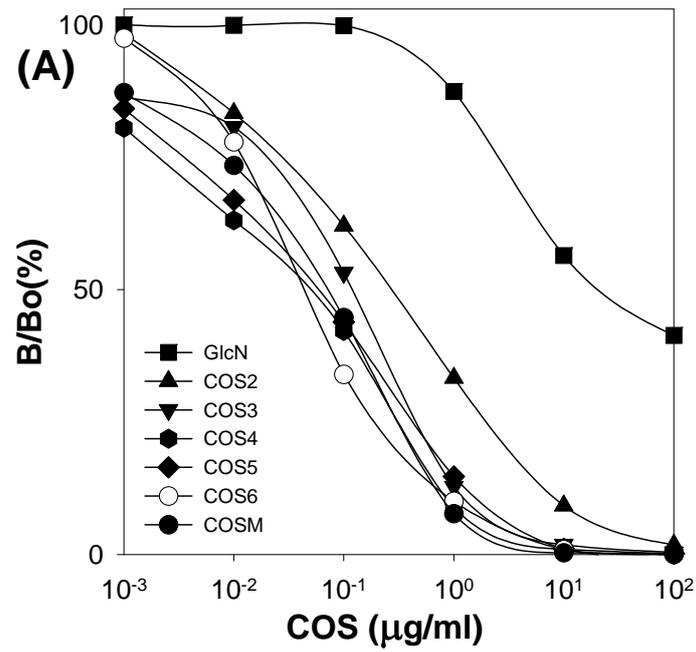


Fig. 13. Inhibition of COSs (A) and NACOSs (B) on the binding of COS6-HRP to the anti-COS6 Ab as determined by cdELISA. B/Bo means relative binding of COS6-HRP in the presence of oligosaccharides.

Table 9. Cross-reactivity of the anti-COS6 antibody towards oligosaccharides as measured by cdELISA

Oligosaccharides	Oligosaccharides displacing 50% COS6-HRP ($\mu\text{g/ml}$)	Cross-reactivity ^a (%)
GlcN	54	0.1
COS2	0.40	13.8
COS3	0.16	34.4
COS4	0.08	68.8
COS5	0.09	61.1
COS6	0.06	100
COSM	0.10	55.6
NAGlcN	330	0.02
NACOS2	68	0.09
NACOS3	98	0.06
NACOS4	47	0.13
NACOS5	156	0.04
NACOS6	85	0.07

^a
$$\frac{\text{Conc. of COS6 displacing 50\% of COS6-HRP}}{\text{Conc. of oligosaccharides displacing 50\% of COS6-HRP}} \times 100$$

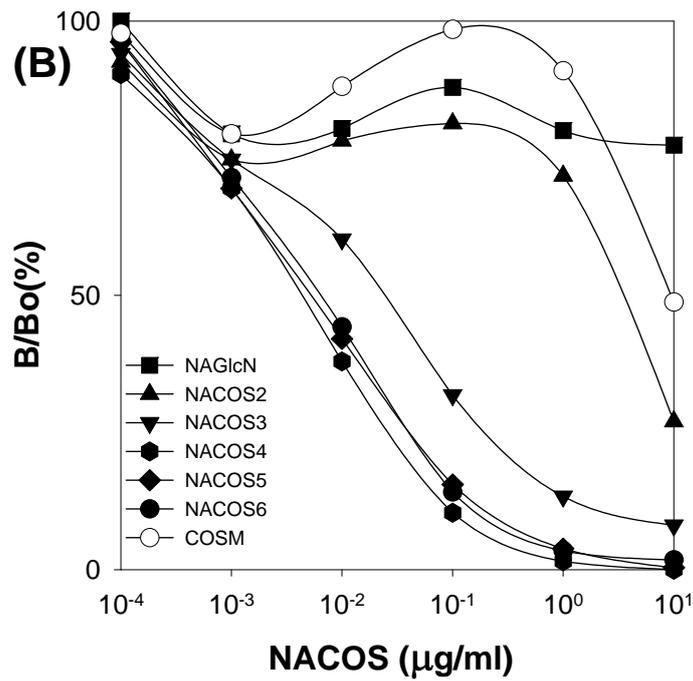
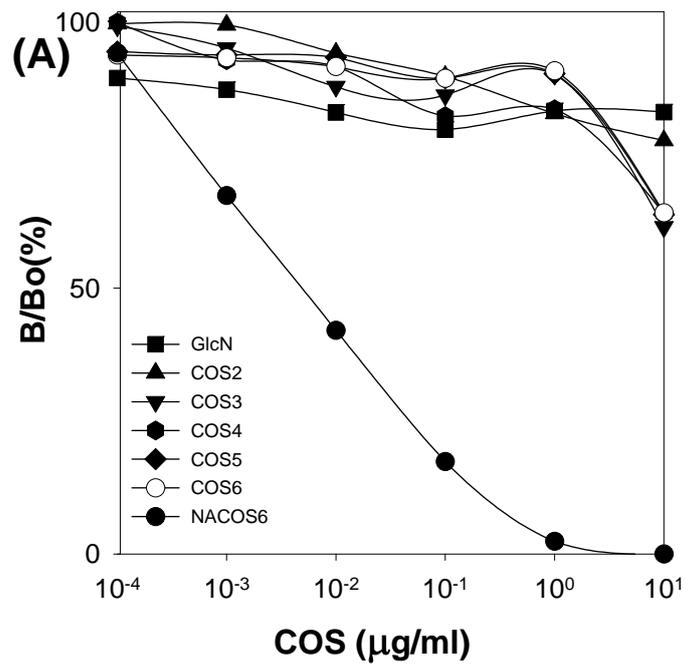


Fig. 14. Inhibition of COSs (A) and NACOSs (B) on the binding of NACOS6-HRP to the anti-NACOS6 Ab as determined by cdELISA. B/Bo means relative binding of NACOS6-HRP in the presence of oligosaccharides.

Table 10. Cross-reactivity of the anti-NACOS6-BSA antibody towards oligosaccharides as measured by cdELISA

Oligosaccharides	Oligosaccharides displacing 50% NACOS6-HRP ($\mu\text{g/ml}$)	Cross-reactivity ^a (%)
GlcN	N.D. ^b	0.00
COS2	N.D.	0.00
COS3	23	0.03
COS4	50	0.01
COS5	32	0.02
COS6	37	0.02
COSM	13	0.05
NAGlcN	N.D.	0.00
NACOS2	4.7	0.21
NACOS3	0.039	25.4
NACOS4	0.0064	155
NACOS5	0.0085	116
NACOS6	0.0099	100

^a Conc. of NACOS6 displacing 50% of NACOS6-HRP

Conc. of oligosaccharides displacing 50% of NACOS6-HRP $\times 100$

^bNot determinable

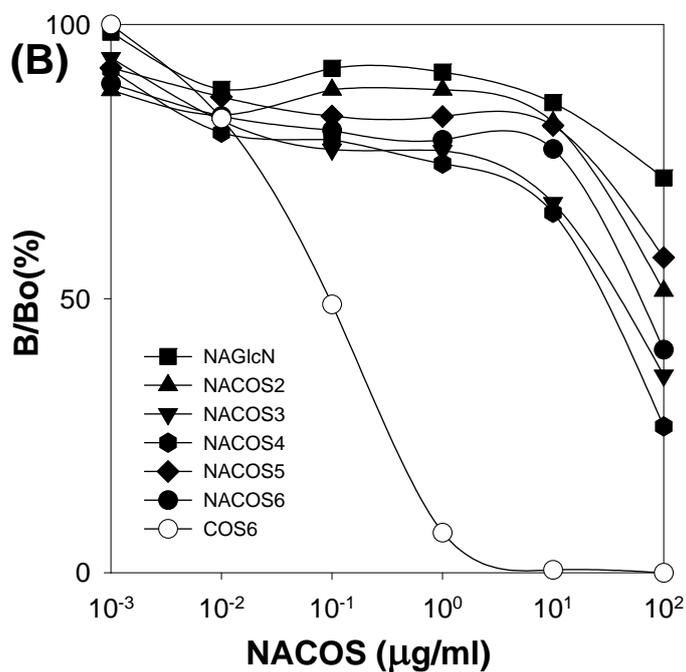
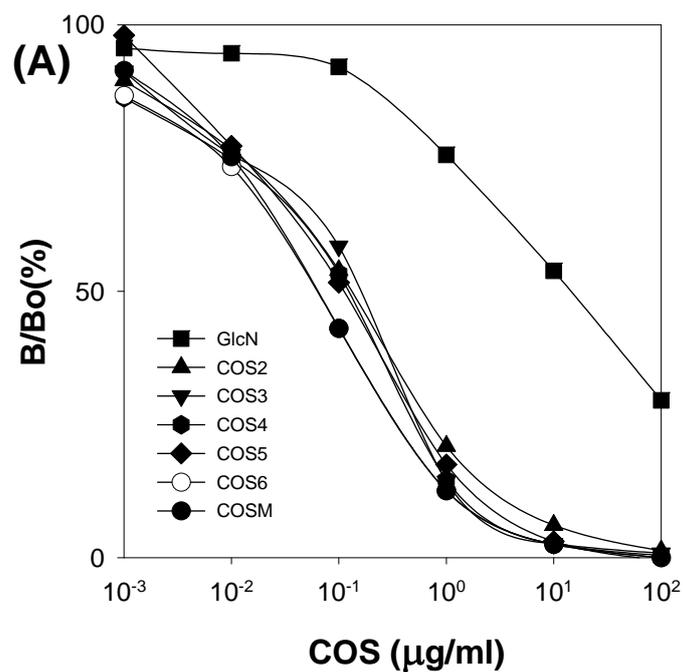


Fig. 15. Inhibition of COSs (A) and NACOSs (B) on the binding of COSM-HRP to the anti-COSM Ab as determined by cELISA. B/Bo means relative binding of COSM-HRP in the presence of oligosaccharides.

Table 11. Cross-reactivity of the anti-COSM-BSA antibody towards oligosaccharides as measured by cdELISA

Oligosaccharides	Oligosaccharides displacing	Cross-reactivity ^a
	50% COSM-HRP ($\mu\text{g/ml}$)	(%)
GlcN	40	0.28
COS2	0.23	48.9
COS3	0.24	45.8
COS4	0.20	55.0
COS5	0.19	57.9
COS6	0.11	100
COSM	0.11	100
NAGlcN	3100 ^b	<0.06 ^b
NACOS2	155	0.07
NACOS3	51	0.22
NACOS4	39	0.28
NACOS5	215	0.05
NACOS6	76	0.14

^a $\frac{\text{Conc. of COS6 displacing 50\% of COSM-HRP}}{\text{Conc. of oligosaccharides displacing 50\% of COSM-HRP}} \times 100$

^bNot measured for out of boundary in Fig. 15 and the value was extrapolated.

라. 새우젓중 키토올리고당의 분석조건 확립

(1) 항체 3종에 따른 COS 분석능 비교

현재 특이항체를 이용한 면역분석법이 식품성분분석에 널리 활용되고 있으며 전통장류(된장 및 간장)중 미생물유래의 COS 분석방법은 이미 확립된 바 있다(Eum et al, 2003). 본 연구에서는 생산된 3가지 항체를 이용한 ELISA로서 새우젓중 분석에 적용하였다. 그 결과 항COSM 항체가 반응성이 가장 우수하여 새우젓 중 COS분석법 개발에 이용하였다(Table 12). 이것은 Kim 등(2000)이 연구한 결과와 비교했을 때 약 10배 정도의 검출한계가 향상된 것으로 나타났다. 이는 직접결합 ELISA에 사용되는 COSM-HRP conjugate가 Kim 등(2000)이 제조한 것보다 더 좋은 결합 반응을 보여주었기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 NACOS의 분석에는 검출이 매우 낮아 항COSM 항체로 COS 만을 분석하였다. 따라서 생산한 항체 중 반응성이 우수한 항COSM 항체를 이용하여 분석법이 확립되지 않아 직접 분석이 곤란하였던 새우젓중 COS의 분석을 ELISA를 이용하여 최초로 시도하였다. 다만 COS의 함량표시는 ELISA 분석시 표준물질로 사용한 COS6를 기준으로 나타내었고, NACOS의 함량표시는 표준물질로 NACOS6를 기준으로 나타내어 실제로는 COS6 equivalent와 NACOS6 equivalent를 의미하고 있다.

Table 12. Comparison of COS and NACOS contents as determined by cdELISAs using three antibodies

Sample No. ¹⁾	cdELISA		
	Anti-COS6 (A)	Anti-COSM (B)	Anti-NACOS6 (C)
	COS6 equiv.	COS6 equiv., ²⁾	NACOS6 equiv., ³⁾
	µg/g		
1	3.2	9.4	1.1
2	7.4	9.0	1.8
3	15.0	35.0	1.5
4	5.3	11.0	1.3
5	17.5	18.0	3.7
6	4.9	27.0	0.7
7	19.5	28.5	3.5
8	8.3	16.5	0.6
9	8.0	14.5	0.5
10	2.7	21.0	0.2
11	12.0	17.0	1.9
12	11.0	19.0	0.1
Overall ⁴⁾	9.6 ± 5.3	18.8 ± 7.6	1.7 ± 1.5

¹⁾All of the samples were *yugjeot* (*Acetes japonicus*) of Chido.

(A) cdELISA, each well of the plates was coated with 100 µl of protein A/G was coated (2 µg/ml) in the coating buffer overnight at 4 °C. After washing three times, each well was coated with 100 µl the anti-COS6 antibody (Ab) (1/5,000 in the washing buffer). After washing three times, each well was added with 100 µl of 1:1 (COS6 or samples : COS6-HRP conjugate diluted to 1/15,000 in the washing buffer) mixture and stood for 1 hr at R.T. Then, to each washed well the substrate solution (H₂O₂/TMB) was added, developed for 30 min, and finally the absorbance in 450 nm was measured.

(B) cdELISA was performed according to the procedure same as in cdELISA(A) except the anti-COSM-BSA Ab (1/5,000), COS6, and COSM-HRP (1/10,000) were used instead of the anti-COS6 Ab, COS6, and COS6-HRP, respectively,

(C) cdELISA was performed according to the procedure same as in cdELISA (A) except the anti-NACOS6-BSA Ab (1/3,000), NACOS6, and NACOS6-HRP (1/3,000) were used instead of the anti-COS6 Ab, COS6, and COS6-HRP, respectively.

²⁾The COS as COS6 equivalent was determined in reference to the standard curves of cdELISA (A) and (B).

³⁾The NACOS as NACOS6 equivalent was determined in reference to the standard curves of cdELISA (C).

⁴⁾Mean ± S.D.

(2) 염에 의한 방해작용의 해결

새우젓은 염을 고농도 (20~25%)로 함유하고 있으므로 ELISA 분석 시 염에 의한 방해작용을 해결하고자 그 영향을 조사하기 위하여 NaCl의 농도별 표준곡선의 영향을 조사하였다 (Fig. 16). 그 결과, NaCl의 농도가 10%일 때에는 항원항체 반응이 다소 감소하나 0.3% 이하

에서는 큰 영향이 없음을 확인하였다. 그러므로 식염함량 20% 가량의 새우젓을 100배 이상 희석하면 방해현상이 거의 나타나지 않아 ELISA분석이 가능하였다.

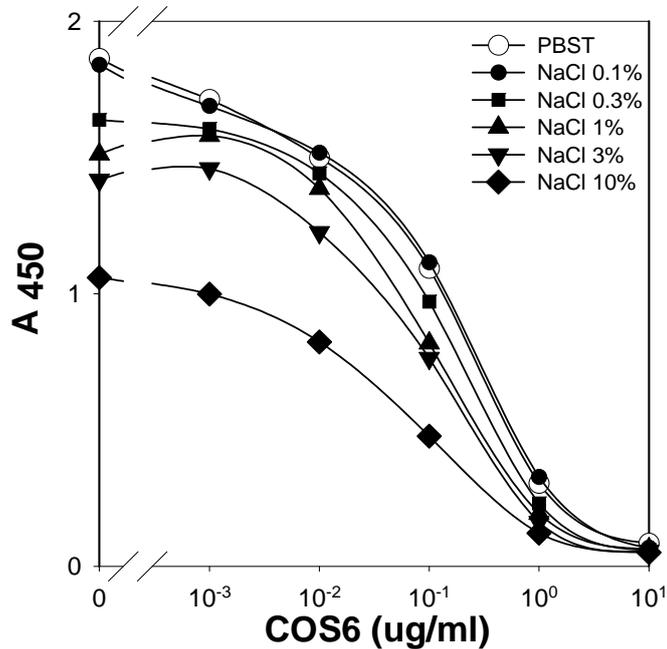


Fig. 16. Effect of salt on standard curves of cdELISA for COS.

A 1:1 mixture (COS6 : COSM-HRP conjugate diluted to 1/1,000 in the PBST buffer) was added to the anti-COSM-BSA antibody-coated plate. After 1 h, the plate was washed, the substrate solution (H₂O₂/TMB) was added and developed for 30 min, and finally the absorbance at 450 nm was measured. NaCl (finally 0.1~10%) was added to the PBST buffer..

(3) Spike test

새우젓 중의 COS 분석에 ELISA를 적용할 수 있을지를 검토하였다. 즉, 새우젓에 인위적으로 COS를 10~300 µg/g 최종농도로 첨가한 다음, COS의 함량을 cdELISA로 분석하였다. 그 결과, 분석의 평균회수율은 120%로 나타나 비교적 양호하였다. 이는 새우젓 중 COS의 함량이 10~300 µg/g 범위에서 cdELISA에 의해 측정 가능한 것으로 나타났다(Table 13).

Table 13. Recovery of COS spiked into salt-fermented shrimps¹⁾ as determined by cdELISA²⁾

COS6 added, ($\mu\text{g/g}$)	COS6 equiv., detected ³⁾ ($\mu\text{g/g}$)	Recovery (%)
10	10 \pm 2 (22.6)	99.7
30	30 \pm 3 (10.1)	102
100	140 \pm 27 (19.5)	140
300	416 \pm 49 (11.8)	139
Overall recovery, %		120
S.D., %		19
C.V., %		16

¹⁾*Yugjeot (Acetes japonicus)* of Chido was used.

²⁾cdELISA was performed according to the same procedure as described in Table 12-B.

³⁾(COS6 detected after spiked) - (COS6 detected before spiked). Mean of interassay (n=3) \pm S.D. (C.V.).

(4) 새우젓의 고형분과 액즙중의 COS함량 비교

시판 새우젓 92종 중 지도산 육젓 5종을 고형분과 액즙, 그리고 고형분과 액즙을 혼합한 새우젓을 3반복하여 분석한 결과 COS 함량은 고형분 (73 $\mu\text{g/g}$)과 액즙 (20 $\mu\text{g/g}$), 그리고 혼합한 군 (38 $\mu\text{g/g}$)을 비교시 고형분의 COS함량이 높았으나, 실제 새우젓 섭취가 고형분만으로 이루어지지 않으므로 고형분과 액즙이 혼합한 군이 실험하기에 적당한 것으로 사료되어 채택하였다 (Table 14).

Table 14. COS contents of samples from commercial salt-fermented shrimps¹⁾ as determined by cdELISA²⁾

Part	Sample					
	COS6 equiv. ($\mu\text{g/g}$) ³⁾					
	1	2	3	4	5	Mean \pm S.D. (C.V.,%)
Solid	53.5	110.0	67.5	93.5	40.5	73 \pm 26 (18.6)
Juice	2.9	40.5	16.5	31.1	7.0	20 \pm 14 (2.8)
Whole	20.6	91.5	24.4	39.0	15.6	38 \pm 28 (10.6)

¹⁾All of the samples were *yugjeot (Acetes japonicus)* of Chido.

²⁾cdELISA was performed according to the same procedure as described in Table 12-B.

³⁾Mean of interassay (n=3).

2. 시판 새우젓 시료의 COS 함량 및 특성

우선 새우젓 중의 chitosan의 존재유무를 확인하고자 TLC 분석을 행하였으며, 이어서 COS의 분석을 위하여 ELISA를 행하였다.

가. TLC에 의한 chitosan의 분석

앞에서 개발된 COS의 ELISA분석법으로 새우젓 시료 중 COS를 직접 분석하기는 어렵다. 왜냐하면 염 및 새우성분이 항원항체 반응을 방해함으로써 정확한 정량분석이 방해받기 때문이다. 또한 TLC에 의한 새우젓 시료 중 chitosan의 분석을 위해 spot 부분과 전개된 올리고당 표준품 (GlcN~COS6)의 발색정도를 관찰하였을 때 시료로부터 분해된 COS를 확인하기 어려웠다. Chitosan은 용해성이 낮아 새우젓의 상징액 중에 존재하더라도 직접적인 분석이 어려운 것으로 생각되었다(Fig. 17).

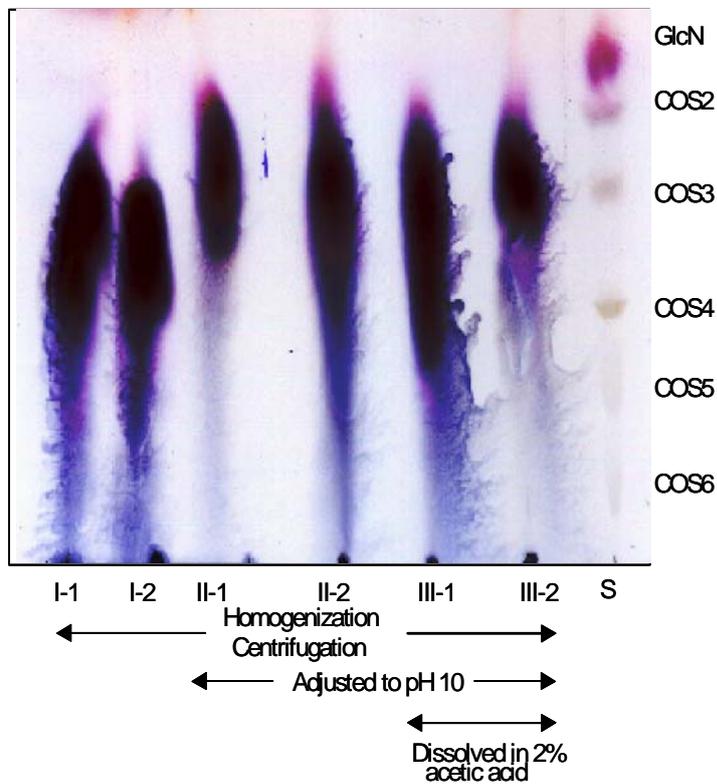


Fig. 17. Thin-layer chromatogram of chitosan separated from salt-fermented shrimps. (*Acetes japonicus, yugjeot*) of Mokpo was used. Lane I, salt-fermented shrimps homogenized and centrifuged; lane II, salt-fermented shrimps adjusted to pH 10; lane III, salt-fermented shrimps dissolved in 2% acid; lane S, standard chitosan-oligosacchrides mixture. 1 and 2 were supernatant and precipitate, respectively.

나. ELISA에 의한 COS의 분석

새우젓 중 COS의 함량을 ELISA로 분석하였다. 그 대표적인 분석의 예를 Fig. 12.에 나타내었다. 시판 새우젓 시료를 92점을 수집하여 분석한 결과, COS의 평균함량은 $36.3 \pm 20.7 \mu\text{g/g}$ 농도의 "COS6 equivalent"가 함유되어 있는 것으로 나타났다. 종류별로는 육젓 ($40.3 \pm 22.58 \mu\text{g/g}$), 산지별로는 광천산 ($47.1 \pm 20.7 \mu\text{g/g}$), 그리고 숙성기간별로는 25~36개월 산 ($44.9 \pm 23.7 \mu\text{g/g}$)이 조금 높은 경향을 보였다. 하지만, 이들 가운데 통계적 유의적 차이를 보이지 않았다(Table 15~17).

한편 기타 젓갈(토하젓, 게간장, 그리고 게장등)은 전체적으로 매우 낮은 함량을 보였다 (Table 18) 특히 토하젓의 경우 다른 젓갈들보다 조금 높은 경향은 보이나 역시 시판 새우젓 보다는 절반정도의 COS 함량임을 확인할 수 있었다. Park 등(1996)은 토하젓의 숙성과정 중 저분자량의 chitin oligosaccharide를 Gel Permeation Chromatography (GPC)분석 시스템으로 분자량을 분포를 조사한 결과하였는데, 이는 COS를 직접 분석한 것으로는 보기 힘들며 아마도 단백질의 분해정도를 측정한 것으로 분자량을 검증한 결과로는 논리적으로 설명하기에 무리가 있다. 이에 비해 본 연구는 ELISA로 COS를 직접 분석한 최초의 방법임을 확인할 수 있었다.

Table 15. COS contents of commercial salt-fermented shrimps classified by sort

Sample	Range, COS6 equiv. ($\mu\text{g/g}$) ¹⁾	Mean \pm SD (n), COS6 equiv. ($\mu\text{g/g}$)	
<i>Ojeot</i> (오젓)	12.5~69.0	34.1 \pm 18.8 (13)	36.3 \pm 20.7 (92)
<i>Yugjeot</i> (육젓)	11.3~90.0	40.3 \pm 22.5 (27)	
<i>Bugsaewoo-jeot</i> (북새우젓)	19.4~74.0	40.2 \pm 21.6 (5)	
<i>Seha-jeot</i> (세하젓)	1.5~52.0	26.4 \pm 19.5 (5)	
<i>Chujeot</i> (추젓)	4.2~90.0	39.7 \pm 19.5 (29)	
Others ²⁾	6.0~42.2	22.6 \pm 12.7 (5)	
Foreign ³⁾	8.2~64.0	26.5 \pm 16.7 (8)	

¹⁾The content of COS in the sample was determined by cdELISA and expressed as COS6 equivalent.

²⁾Others (n=5) were *detdegi-jeot* (뎃데기젓), *gogaemi-jeot* (고개미젓), *chuldaegi-jeot* (철때기젓), *mix-jeot* (혼합젓), and *gonjaengi-jeot* (곤쟁이젓).

³⁾Foreign was from China (n=5) and Vietnam (n=3).

Table 16. COS contents of commercial salt-fermented shrimps classified by area

Area	Range, COS6 equiv. ($\mu\text{g/g}$) ¹⁾	Mean \pm SD (n), COS6 equiv. ($\mu\text{g/g}$)		
Kanghwa	4.2~81.0	30.6 \pm 16.9 (28)	37.2 \pm 20.9 (84)	36.3 \pm 20.7 (92)
Kwangchun	12.5~86.0	47.1 \pm 20.7 (18)		
Gomso	12.0~74.0	44.1 \pm 21.8 (6)		
Chido	11.3~68.0	35.7 \pm 19.5 (13)		
Mokpo	1.5~90.0	35.5 \pm 22.7 (19)		
Foreign ²⁾	8.2~64.0	26.5 \pm 16.7 (8)	26.5 \pm 16.7 (8)	

¹⁾The content of COS in the sample was determined by cdELISA and expressed as COS6 equivalent.

²⁾Foreign was from China (n=5) and Vietnam (n=3).

Table 17. COS contents of commercial salt-fermented shrimps¹⁾ classified by fermentation period

Fermentation (month)	Range, COS6 equiv. ($\mu\text{g/g}$) ²⁾	Mean \pm SD (n), COS6 equiv. ($\mu\text{g/g}$)	
25 - 36	12.0~90.0	44.9 \pm 23.7 (19)	36.3 \pm 20.7 (92)
17 - 23	1.5~90.0	35.2 \pm 17.5 (58)	
7 - 11	11.3~74.0	29.6 \pm 5.6 (15)	

¹⁾Samples assayed Feb. 17, 2003.

²⁾The content of COS in the sample was determined by cdELISA and expressed as COS6 equivalent.

Table 18. COS contents of salt-fermented *toha* shrimps and crab product.

Sample		Area		COS6 equiv. (µg/g)
English name	Korean name	English name	Korean name	
Salt-fermented <i>toha</i> shrimp	토하젓	Naju	나주	17.3
<i>Crab-kanjang</i>	게간장	Youngdeok	영덕	9.0
<i>Crab-jang</i>	게장	Youngdeok	영덕	3.7
<i>Hot crab-jang</i>	매운게장	Youngdeok	영덕	9.5
<i>Stone crab-jang</i>	돌게장	Youngdeok	영덕	N.D. ¹⁾

¹⁾Not determinable.

다. 일반성분 분석

(1) 수분

시판 새우젓 등 젓갈의 수분 함량을 분석하였다. Table 4에 나타난 바와 같이 목포산 추젓이 72.8%로 가장 많은 수분을 함유하였고, 중국산 (71.1%) > 목포산 오젓 (71.0%) > 목포산 육젓 (70.7%) 순이었다. 이는 농촌진흥청 식품분석표의 육젓 (67.6%)과 추젓 (67.6%)에 비해 많은 수분을 함유하고 있었다(Table 19).

(2) 염도

시중에서 시판되는 새우젓의 염도를 측정한 결과, 16.3~26.7%로 제품에 따라 크기는 10%정도의 염도의 차이를 보였다. 시판 새우젓의 염도를 조사한 결과, 베트남산이 23.9%로 가장 높았고 그 다음으로 강화산 추젓 (23.7%) 순이었다(Table 19). 이는 Park 등(Park et al, 1996)이 보고한 평균 24.1%와 거의 일치했다. 특히 염도가 최소일때 COS의 함량을 최대치를 나타냈는데, 19.9%와 22.8%로 염도가 낮게 나타난 목포산 추젓 (53.2 µg/g)과 육젓 (46.1 µg/g)로 대체로 COS의 함량이 높아지는 것으로 나타났다.

(3) 아미노태질소

젓갈의 감칠맛에 큰 영향을 미치는 아미노태 질소량은 포르몰태 질소량에서 암모니아태 질소량을 뺀 수치로 분석하였다. 그 결과 Table 19에서 보는 바와 같이 아미노태질소가 가장 낮은 베트남산 (0.06%)과 중국산 (0.08%)의 경우 염농도가 각각 23.9%와 23.0%로 나타나 아미노태질소가 낮을수록 염농도는 대체로 높은 결과를 보였다. 이는 Mok 등(2000)이 보고한 결과와 비슷한 결과로 아마도 새우젓에 함유된 질소 화합물은 주로 단백질 및 그 분해산물인데 이 중 수용성 질소와 아미노태질소는 젓갈 숙성중의 단백질 분해의 중요한 지표가 될 것으

로 생각된다.

(4) COS의 함량

새우젓 중 COS의 함량을 ELISA로 분석하여 다른 성분과의 관계를 비교하였다. 가장 높은 COS의 함량을 보인 목포산 추젓 (53.2 µg/g)과 육젓 (46.1 µg/g)은 아미노태질소 함량이 각각 0.36%와 0.29%로 높았으며 염도는 19.9%와 22.8%로 비교적 낮았다. 이는 염농도와 아미노태 질소가 COS의 함량에 다소 영향을 주는 것으로 사료된다.

Table 19. Proximate compositions of salt-fermented shrimps

Sample ¹⁾	Area	NaCl	Total Solid	Moisture	Formol-N	Ammonia-N	Amino-N	COS6 equiv. (µg/g) ³⁾
		% ²⁾						
<i>Ojeot</i> (오젓)	Mokpo	22.1	30.0	70.0	0.61	0.19	0.42	37.5
<i>Ojeot</i> (오젓)	Mokpo	23.1	29.0	71.0	0.37	0.11	0.26	25.0
<i>Yugjeot</i> (육젓)	Kwangchun	22.9	29.6	70.4	0.49	0.12	0.38	34.0
<i>Yugjeot</i> (육젓)	Mokpo	22.8	29.3	70.7	0.47	0.18	0.29	46.1
<i>Chujeot</i> (추젓)	Kanghwa	23.7	30.7	69.2	0.41	0.12	0.28	37.5
<i>Chujeot</i> (추젓)	Mokpo	19.9	31.2	68.8	0.42	0.06	0.36	53.2
Foreign	China	23.0	28.9	71.1	0.32	0.24	0.08	23.0
Foreign	Vietnam	23.9	31.1	68.9	0.38	0.32	0.06	26.5
Mean		22.7	30.0	70.0	0.43	0.17	0.27	35.4

¹⁾Salt-fermented shrimps were selected from 92 samples full.

^{2),3)}Mean of interassay (n=3).

³⁾cdELISA was performed according to the same procedure as described in Table 12-C. The content of COS in the sample was determined by cdELISA and expressed as COS6 equivalent.

다. 관능검사

Table 20에서와 같이 목포산 육젓이 기호도와 관능검사 모두 가장 양호하였는데 살이 통통하고 부드럽고 깨끗하였으며 다른 종에 비해 새우크기가 컸다. 다음으로 광천산 육젓으로 역시 육젓을 가장 선호하는 것으로 나타났다. 육젓 (8.5점)이 월등히 높은 기호도를 보이며 오젓 (6점)과 추젓 (5.3점)은 비슷하고 가장 낮은 기호도로는 수입산 (베트남, 3.0점)으로 나타났다.

Table 20. Results of sensory score of commercial salt-fermented shrimps

Sample ¹⁾	Area	Mean scores ²⁾					
		Color	Salty odor	Tough -ness	Bitter taste	Salty taste	Overall acceptance
<i>Ojeot</i> (오젓)	Mokpo	7.0	6.5	7.0	6.5	6.0	6.0
<i>Ojeot</i> (오젓)	Mokpo	6.5	6.0	7.5	6.5	6.5	6.0
<i>Yugjeot</i> (육젓)	Kwangchun	7.0	7.0	6.5	8.0	7.5	8.5
<i>Yugjeot</i> (육젓)	Mokpo	8.0	7.0	7.0	8.0	8.5	7.5
<i>Chujeot</i> (추젓)	Mokpo	4.0	7.0	6.0	8.5	8.0	6.0
<i>Chujeot</i> (추젓)	Kanghwa	5.0	6.0	6.0	5.0	6.0	5.0
Foreign	China	3.0	5.0	5.0	5.0	6.0	3.0
Foreign	Vietnam	2.0	7.0	2.5	4.0	3.0	3.0

¹⁾Salt-fermented shrimps were selected from 92 samples full.

²⁾As the value increases from 1 to 9, the acceptability characteristics increases.

3. COS 함량을 높이기 위한 실험실적 새우젓 생산 및 그 특성

가. COS 함량

(1) 토하젓

토하젓은 원래 전남지방의 청정한 하천이나 오염되지 않은 논도랑에서 서식하는 민물 새우 중 새뱅이(김, 1997)를 주원료로 한 젓갈으로서 옛날 (약 400년 이전)부터 살아있는 토하를 그 껍질이 붙어 있는 채로 20~30%의 식염에 절여 3개월 이상 숙성시킨 다음 파, 마늘, 참깨, 참기름, 그리고 찹쌀밥 등의 알맞은 양념을 하여 반찬으로 애용해오면서 그 맛이 우수하다고 알려져 왔다(박, 1993). 본 실험은 이 새우젓 중에 COS의 함량을 높이기 위하여 식염첨가 (20%) 이외에 밀기울이나 효소의 첨가, 미생물의 접종, 새우의 마쇄 등 여러 가지 처리를 하고 그 효과를 조사할 필요가 있다. 우선적으로 그 시도들의 성공적 가능성을 파악하기 위한 초보적인 처리를 민물새우 (토하)를 대상으로 실시하였다(Fig. 18).

그 결과, 처리 3개월 경과한 시점에서 다음과 같은 결과를 얻을 수 있었다: (1) 발효를 하지 않더라도 생토하에는 COS가 포함되어 있는 것으로 추측된다. (2) 그러나 처리 및 보관 중에 분해가 일어나 그것의 분자량이 작아졌다. (3) Control에 비해 5 °C와 15 °C 보다 25 °C 처리온도에서 토하젓 중 COS의 함량이 대체로 증가했다. (4) 20% 염처리로 15°C에서 3개월간 숙성시킨 무처리군이 다른 첨가군보다 COS함량 (178.0 µg/g)이 월등히 높았다. 이는 토하젓 자체의 enzyme이 풍부하여 추가적으로 다른 처리를 하지 않아도 가능한 것으로 나타났다. (5) 마쇄 처리는 COS 생산에 효과가 없는 것으로 보였다. (6) 시간적으로 1개월 (50.5 µg/g) 보다 3개월 (53.3 µg/g) 경과 시 평균 COS 함량이 조금 높게 나타났다. (7) 마쇄 처리는 1개월 경과 시 COS함량이 매우 증가하였다. (8) 밀기울 첨가군은 5 °C와 15 °C에 비해 25 °C에서 COS 함량이 높게 나타났는데, 5 °C의 경우 1개월 (12.3 µg/g)과 3개월 (29.8 µg/g) 모두 낮은 COS 함량을 나타냈고, 15 °C도 역시 1개월 (5.2 µg/g)과 3개월 (21.0 µg/g) 모두 낮은 반면, 25 °C의 경우는 1개월 (165.0 µg/g)과 3개월 (175.0 µg/g)의 숙성기간 모두 고르게 COS 함량이 높게 나타났다. 군 당 50g에서 달별로 3g씩 sampling 하였으므로 전체적인 분석치라고 생각하긴 힘들지만 이상의 점들은 단지 그 가능성으로서 본 실험에서 명확히 밝혀야 할 것이다. 또한, 새우젓의 종류에 따른 원료의 생물학적 품종이 정확히 구분되어 있지는 않으나 품종별로 주 서식지와 형태에 있어서 다소 차이가 나기 때문에 어느 정도 구분은 가능한 점을 감안하면 민물새우젓 (토하젓)의 경우 젓새우와 종의 차이는 대체적인 토하의 특수성을 고려하여 다음 실험을 통해 검토하였다.

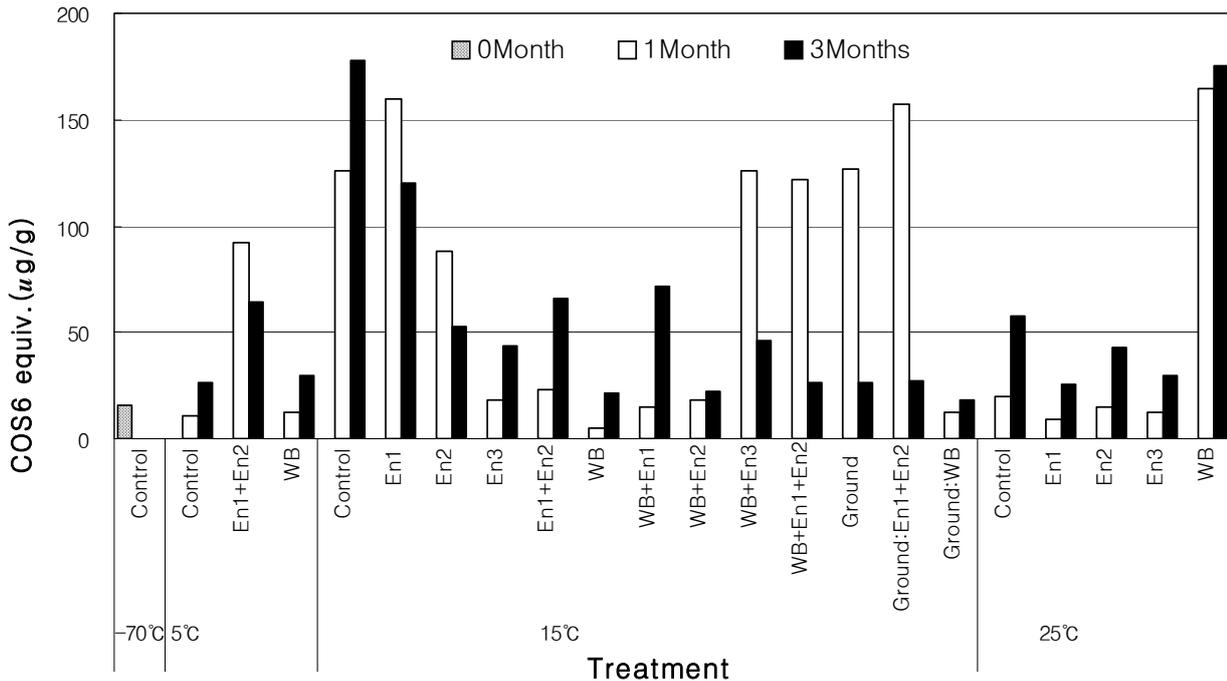


Fig. 18. COS contents of salt-fermented *toha* shrimps (*Caridina denticulata*) during ripening. Salt (finally 20% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 5.

(2) 육젓

육젓으로 생산한 새우의 학명은 *Acetes japonicus*으로 남해서부에서 서식하는 젓새우로 여기는 음력 6월이다¹⁾. 본 실험에 사용한 육젓은 어체가 크고 살이 통통하고 우유처럼 뽀얀색으로 깨끗하고 싱싱한 육젓용 젓새우를 선택하여 6개월간 숙성하여 COS 함량 변화를 알아보았다. Fig. 19~21의 실험결과와 같이 온도별로는 5 °C에서 chitosanase (En1) + endo-chitinase (En3)를 함께 처리한 군이 염농도 15% (92.0 µg/g), 20% (84.0 µg/g), 그리고 25% (72.0 µg/g) 모두에서 3개월 숙성시 대체로 COS 함량이 높게 나타났다. 또한 염농도 25%의 경우 6개월에서 매우 낮은 COS 함량을 보였다. 이는 monomer로 분해되어 COS2~7의 hapten으로 면역한 antibody가 인식을 못하는 건 아닌지 사료된다. 마지막으로 25 °C는 chitosanase (En1)과 endo-chitinase (En3)처리군, 그리고 chitosanase (En1) + exo-chitinase (En2)를 처리한 군은 모든 염농도에서 높은 COS 함량을 보였다. 밀기울 (WB)처리군은 25%만 제외하면 15%와 20% 염농도에서 높은 COS함량 보였다. 특히 15% 염농도에서는 25 °C, 3개월 숙성시 coltrol의 46.0 µg/g에 비해 127.0 µg/g로 약 3배정도가 높았다. 그리고 endo-chitinase (En3) 처리군은 온도와 염농도에 관계없이 모두 높았다(25%, 15 °C은 예외로 나타남). 또한 대조구의 경우 15%와 20% 염처리를 하여 15 °C온도 조건에서 3개월간 숙성시 각각 96.0 µg/g와 88.0 µg/g로 비교적 높은 COS 함량을 보였다. 그리고 마쇄처리에서는 토하젓의 경우와 일치하였는데 1개월숙성의 COS 함량이 높았다가 3개월과 6개월에서 대체로 COS 함량이 감소하는 경향을 보였다. 이는 마쇄로 인해 초기에 발효 또는 미생물의 반응이 활발히 이루어져 효소작용으로 COS 생산이 많아졌으며 시간이 지날수록 작은 분자로 분해되어 항체의 인식이 잘 이루어지지 않았을 것으로 추측된다.

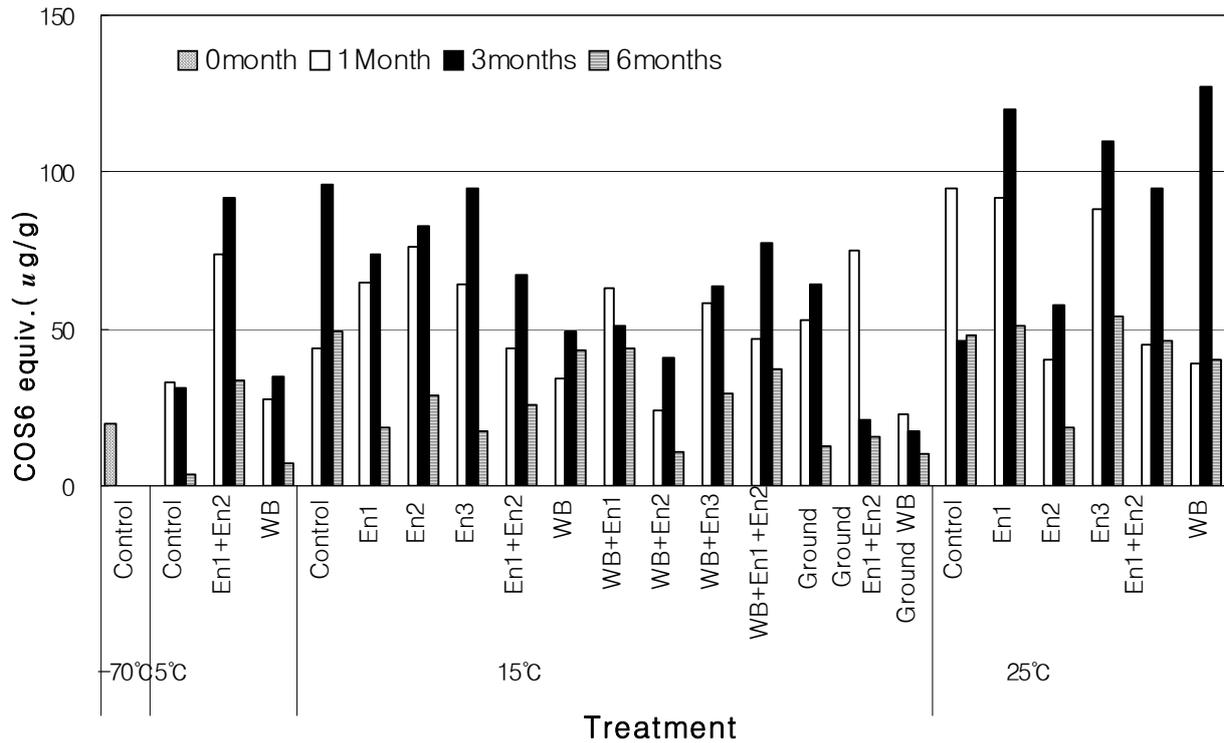


Fig. 19. COS contents salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus, yugjeot*) during ripening. Salt (finally 15% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 6.

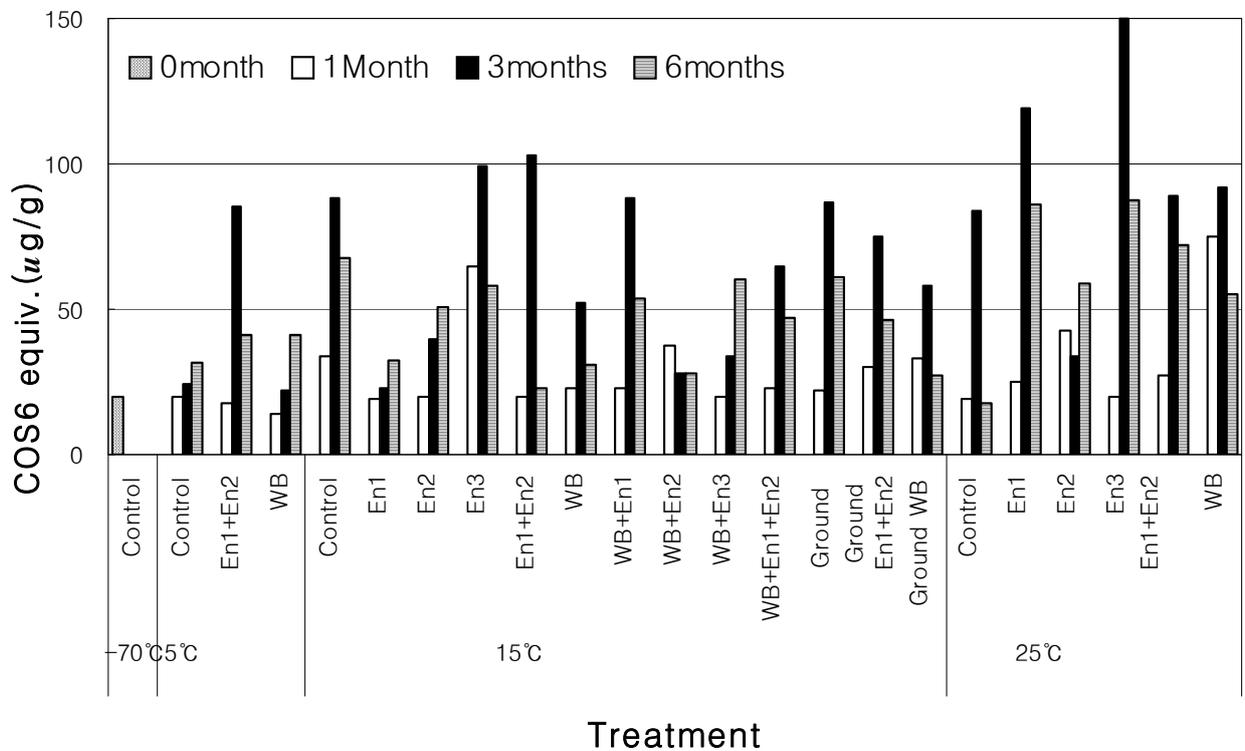


Fig. 20. COS contents salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus, yugjeot*) during ripening. Salt (finally 20% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 6.

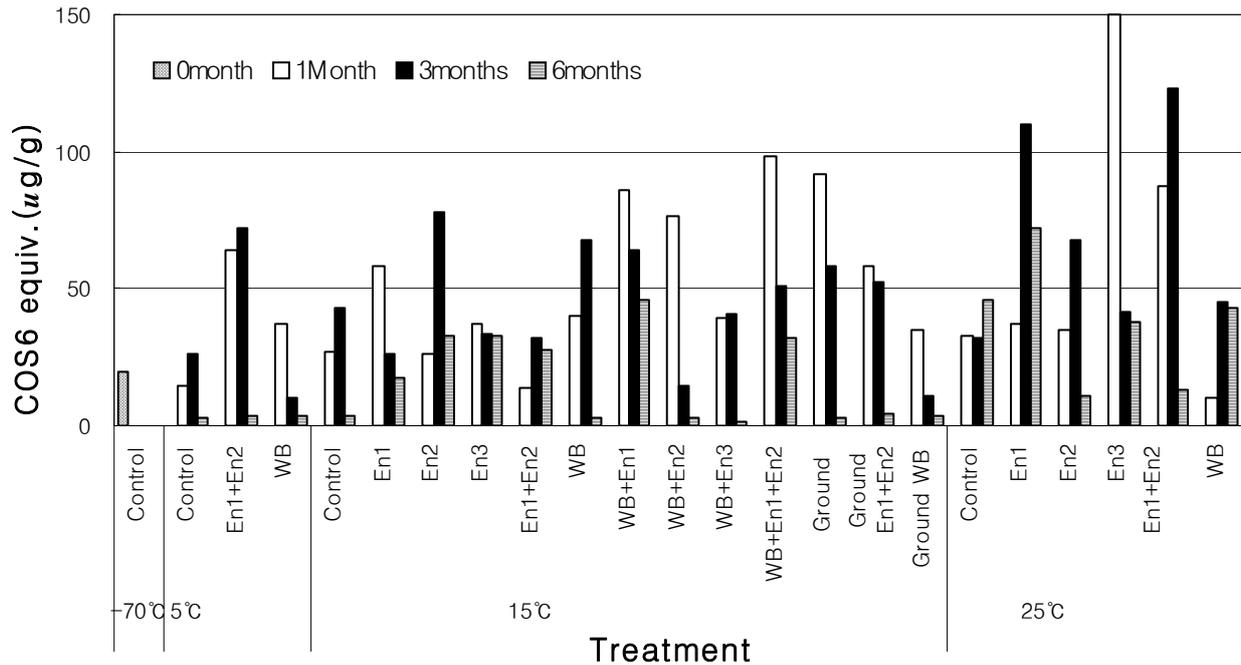


Fig. 21. COS contents salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus*, *yugjeot*) during ripening. Salt (finally 25% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 6.

(3) 동백하젓

주 서식지가 황해연안인 동백하의 학명은 *Acetes chinensis*로 겨울철에 채집하여 3개월간 숙성하여 동백하젓을 생산하였다. 숙성기간은 육젓 실험으로 3개월이 가장 높은 COS 함량으로 보였으며 6개월에서 급격히 떨어지는 실험을 바탕으로 3개월로 결정하였다. 이는 종이 다르므로 100% 단정할 수 없지만 예비경험으로 실험을 설계하였다. 숙성온도 5 °C는 너무 낮아 생략하였고 15 °C와 25 °C만으로 실험하였다. 15 °C는 상품의 저온 숙성을 위해 사용하였으며, COS 함량을 높이고자 25 °C의 온도 조건을 사용하였다(Fig. 22, 23). 1개월 숙성된 cellulase (En4)와 chitin digest (CD)처리군은 31.8 µg/g과 35.0 µg/g로 3개월 (5.0 µg/g, 11.4 µg/g)에 비해 모두 COS의 분해가 초반에 빠르게 나타났다. 특히 40 mg > 400 mg의 순으로 COS 함량을 보였으며 40 mg (w/w)정도가 적당한 효소 농도로 나타났다. 복합적 두 가지 이상 처리군에서는 En3과 En4를 함께 처리한 군에서 3개월 숙성시 29.5 µg/g로 나타났다. 이는 En1을 대체한 En4를 처리한 결과 COS 함량이 더 높아진 것으로 나타났다. WB의 상승효과는 chitosanase (En1)과 endo-chitinase (En3)를 함께 처리한 구에서 44.0 µg/g로 3개월 숙성처리구 중에 가장 높은 COS 함량을 보였다.

25 °C 처리군에서는 효소첨가의 영향으로 분해되어 생기는 COS 함량이 15 °C와는 반대로 3개월에서 높아지는 것으로 보아 효소작용은 최적 온도조건이 25 °C에 가까운 것으로 생각되며 전체적으로 효소작용이 온도의 영향으로 COS가 늦게 분해되어 3개월 동안 숙성 시 높아진 COS 함량을 보였다. WB 처리군은 대체로 높은 COS 함량을 보이는데 특히 WB + CD 처리군이 59.2 µg/g로 가장 높은 COS 함량을 보였다. 그 다음으로 protease (En5-40)과 함께 처리한 En1과 En3은 53.7 µg/g로 두 번째로 COS 함량이 높았다. 이는 단백질분해효소인

En5-40이 미생물을 잘 자라게 하거나, chitin의 아세틸아미노기의 단단한 수소결합을 deacetylase의 역할(Win et al, 2001)로서 En5-40이 대신하여 En1과 En3의 접근을 용이하게 마련하는 작용을 할 것으로 사료된다.

숙성기간별로는 1개월 (9.1 µg/g)보다는 3개월 (22.1 µg/g)의 COS 함량이 높았다. 이는 육젓과 비슷한 경향을 보였다. 온도 숙성의 차이로 보아 미생물과 효소는 온도의 영향을 받을 것이고 첨가한 천일염은 해양 미생물의 보고 (동아일보 2002. 6. 19)로 바닷물 자체가 미생물덩어리로 보여진다. 이 미생물들이 25 °C에서 효소와 상승작용을 하는 것이 아닌지 생각되면 확인 바는 없지만 분석이 이루어지지 않은 최초의 분석임을 감안 할 때 현재의 분석으로는 최선의 분석방법이다.

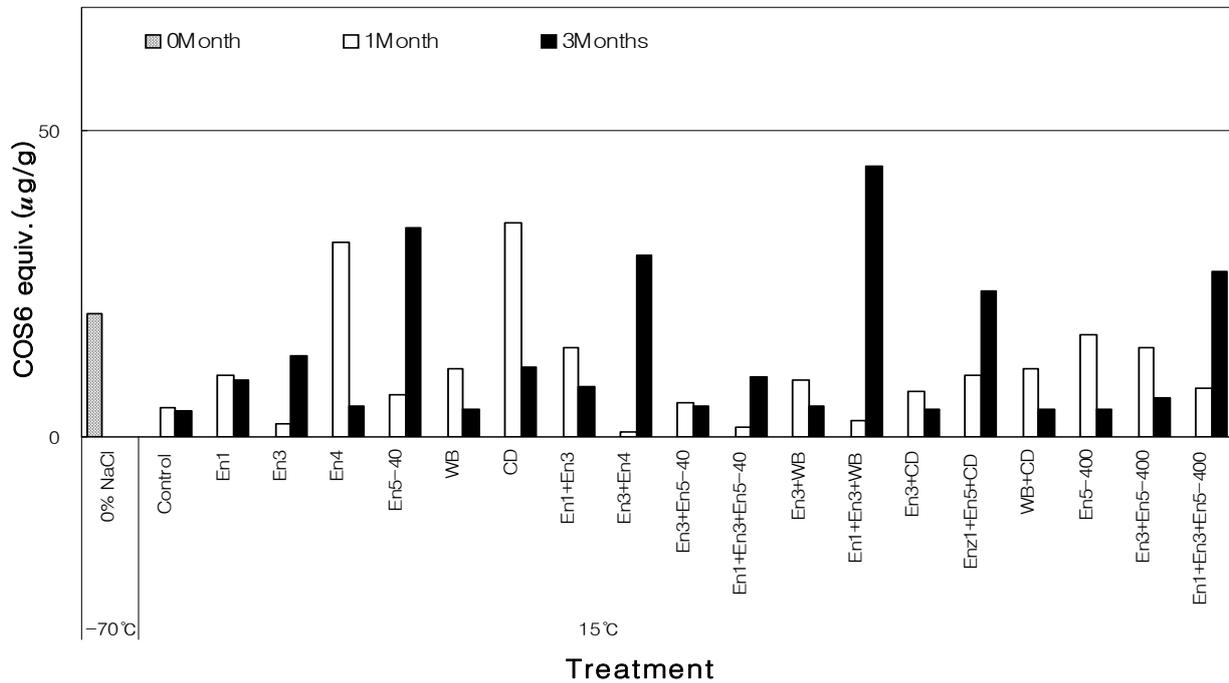


Fig. 22. COS contents salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis, dongbaegha-jeot*) during ripening at 15 °C. Salt (finally 20% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 7.

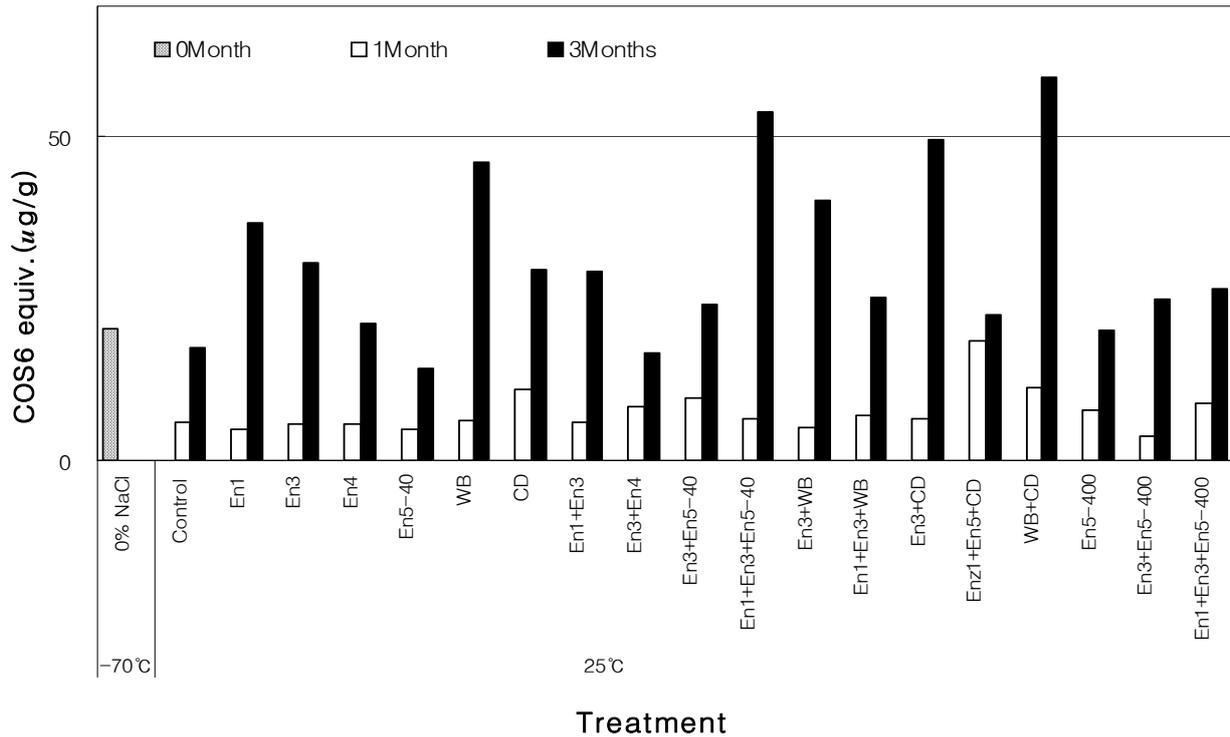


Fig. 23. COS contents salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis, dongbaegha-jeot*) during ripening at 25 °C. Salt (finally 20% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 7.

육젓과 동백하젓용 생새우 (NaCl 0%)의 COS함량이 비교적 비슷한 결과로 나타났는데, 육젓은 20.0 µg/g, 동백하젓은 20.2 µg/g로 거의 비슷한 수준이었다. 이는 발효를 하지 않은 생새우에서도 COS가 포함되었다. COS가 검출된다는 것은 처리 및 보관에 의하여 미생물의 분해가 많았을 것으로 생각된다. 그리고 NaCl 농도는 온도에 의존적인데 특히 25 °C의 En3 처리한 군이 대체로 COS 함량이 높았다. 이는 NaCl농도에 따른 효소들의 상대활성도 측정 시 20% NaCl농도에서는 En1은 0, En2는 13, 그리고 En3은 83%로 En3이 가장 높은 활성도가 나타난 것으로 뒷받침한다(Table 21). Endo-chitinase (En3)은 side부터 breakdown 시키는 endo-cleavage type로 효소가 전구체를 분해하여 COS 함량을 높이게 하는 것으로 생각된다. 토하젓과 젓새우의 생새우 (NaCl 0%)는 COS함량이 비교적 높은 결과로 나타났으며 25 °C 숙성온도에서 endo-chitinase (En3)과 wheat bran (WB) 처리군이 대체로 높은 COS 함량이 나타났다.

전체적으로 COS 함량이 고르게 높은 새우종은 육젓이었으며 어체가 작고 연약하여 분해속도가 빠른 동백하젓은 토하젓과 육젓의 생산과 비교 시 쉽게 분해되는 경향을 보여서 COS함량이 높을 것이라고 기대하였으나, 가장 낮은 COS함량을 나타냈다. 이로서 처리군의 염도별·온도별 연관성으로 볼 때 COS의 함량을 극대화한 새우젓 생산방법으로는 육젓용 젓새우로 (*Acetes japonicus, yugjeot*)의 20% 염처리를 하여 25 °C에서 3개월 동안 숙성하여 En3와 WB를 처리한 새우젓이 가장 적합하였다. 이는 바닷 새우 (육젓, 동백하)를 중심으로 한 연구로서 토하젓은 민물새우로 예비적인 실험으로 참조하였다.

Table. 21. Effect of salt on relative activity of chitosanase and chitinases

Enzyme \ NaCl	0%	5%	10%	15%	20%
Chitosanase	100	35	3.5	0.9	0
Exo-chitinase	100	45	30	18	13
Endo-chitinase	100	93	89	85	83

나. 포르몰태 질소

아미노태 질소의 정량법으로 포르몰태 질소법으로 정량하였는데 암모니아태 질소가 포함된 것으로 새우젓 숙성 중 분해정도를 알아보는 지표이므로 사용하였다.

(1) 토하젓

숙성기간 1개월과 3개월의 각 처리군 별 F-N 총 함량은 거의 비슷하였다. 15 °C 숙성 온도의 마쇄처리인 chitosanase (En1)와 exo-chitinase (En2)을 함께 처리한 처리군에서 비교적 높은 COS 함량을 보였으며 25 °C 숙성 온도에서는 wheat bran (WB) 처리군이 높은 F-N 함량 보였다(Fig. 24).

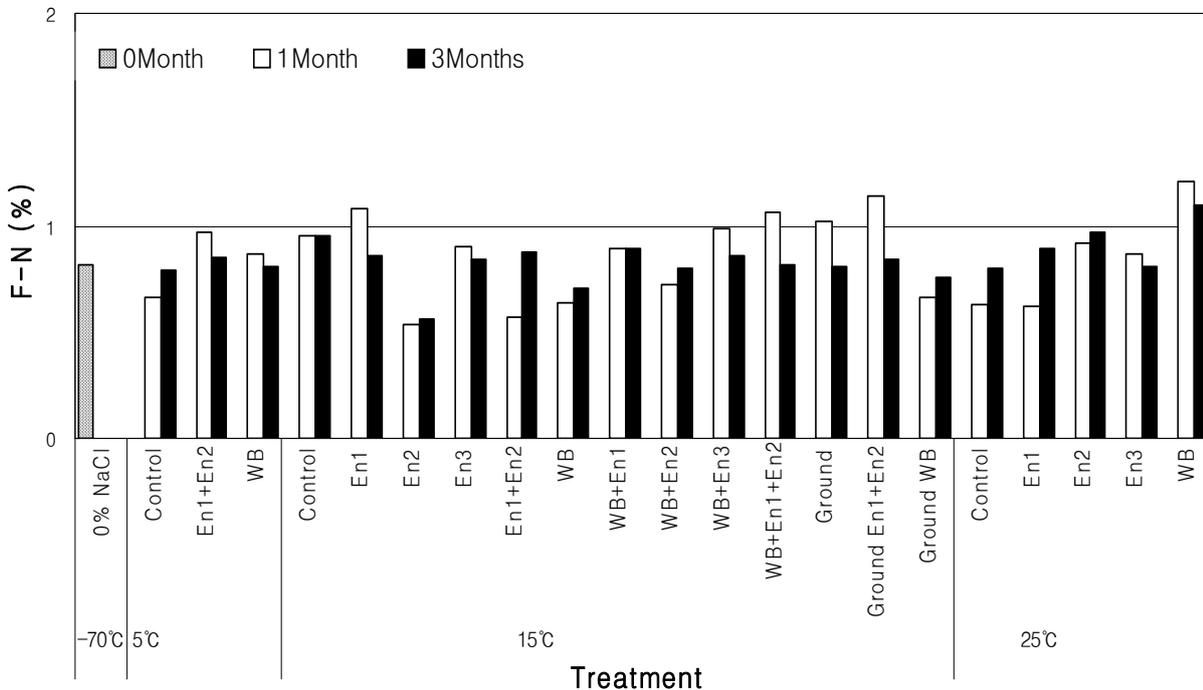


Fig. 24. Formol nitrogen (F-N) contents of salt-fermented *toha* shrimps (*Caridina denticulata*, *toha-jeot*) during ripening. Salt (finally 20% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 3.

(2) 육젓

F-N함량은 5 °C 숙성온도에서는 chitosanase (En1) + exo-chitinase (En2) 처리를 제외하고는 control과 거의 비슷한 결과를 보였고, 15 °C의 숙성온도의 마쇄처리는 염농도 15%, 25% 그리고 20%는 모두 대체로 숙성기간이 길어질수록 점차 감소하는 경향을 보였으며 F-N 생산에 그다지 큰 효과는 없었고 염농도 25%의 경우 6개월에서 매우 낮은 F-N 함량을 보였다. 25 °C에서는 chitosanase (En1), endo-chitinase (En3)처리, 그리고 chitosanase (En1) + exo-chitinase (En2) 처리의 25 °C 숙성온도에서 높은 F-N 함량을 보였으나 25% 염 처리군에서는 제외로 나타났고, wheat bran (WB)처리군은 25%만 제외하면 15%와 20% 염농도에서 높은 F-N함량 보였다.

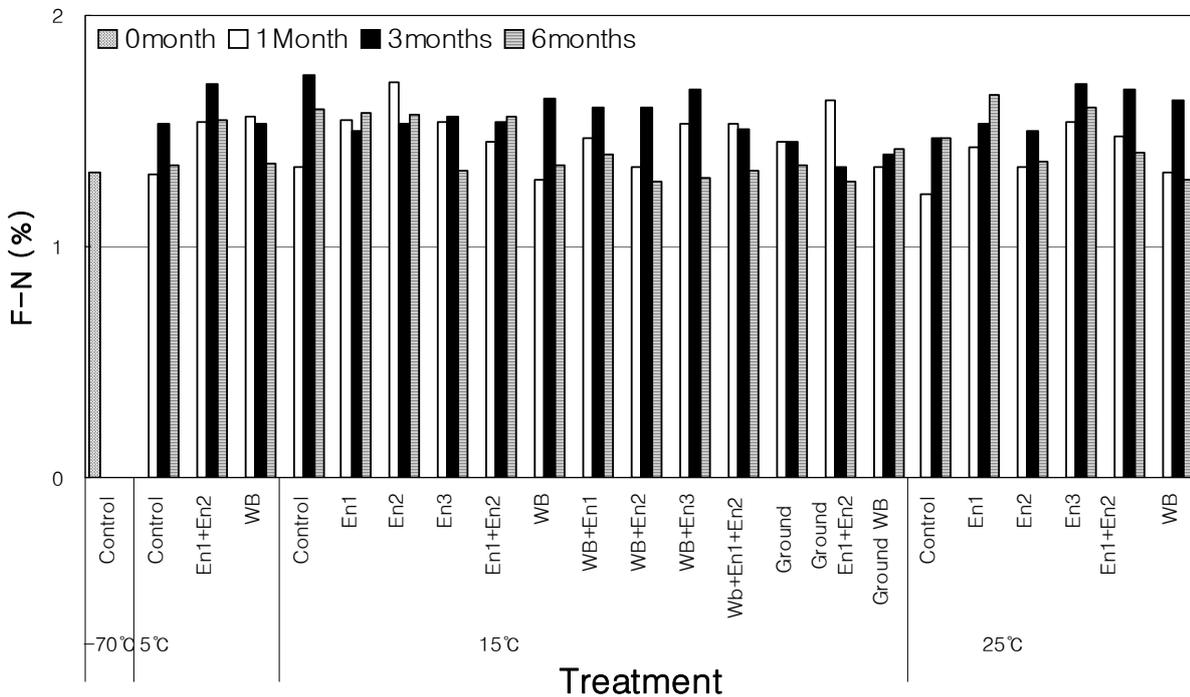


Fig. 25. Formol nitrogen (F-N) contents salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus*, *yugjeot*) during ripening. Salt (finally 15% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 4.

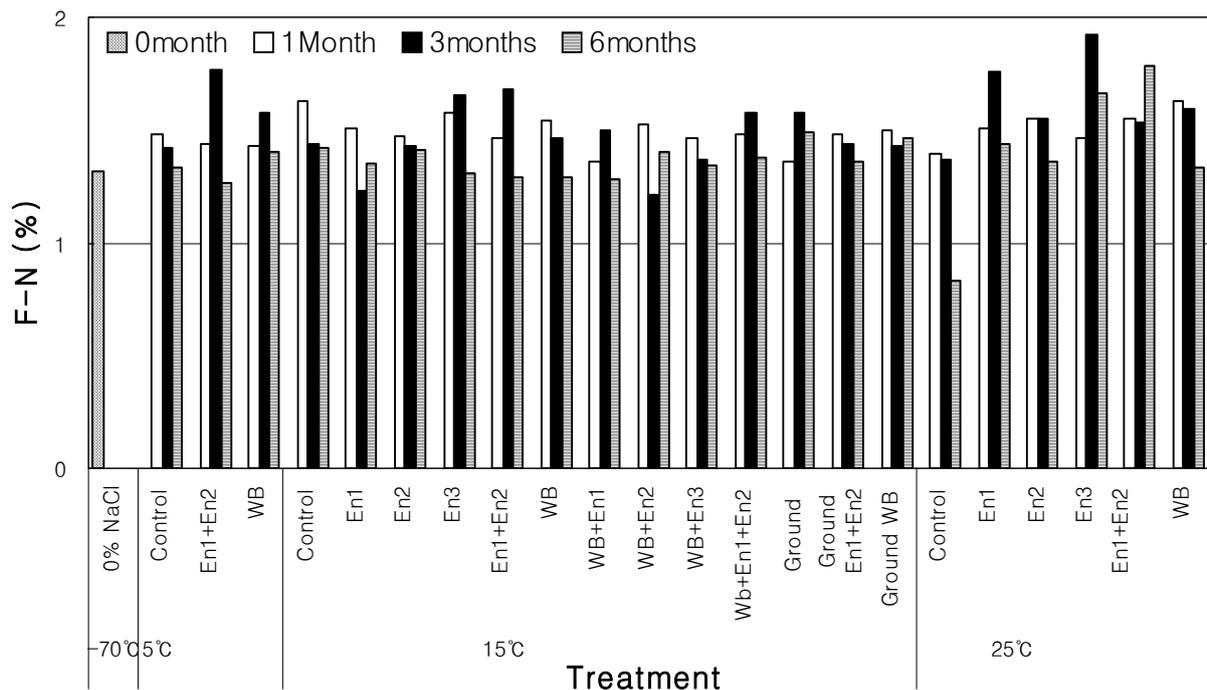


Fig. 26. Formol nitrogen (F-N) contents salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus, yugjeot*) during ripening. Salt (finally 20% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 4.

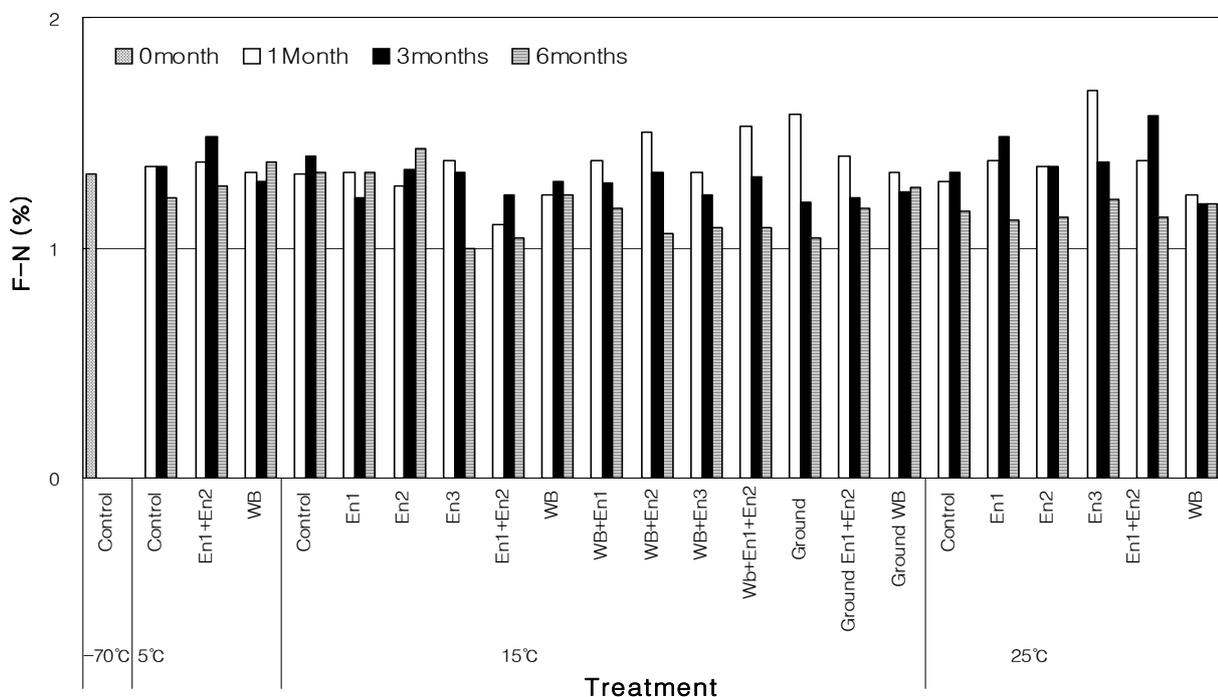


Fig. 27. Formol nitrogen (F-N) contents salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus, yugjeot*) during ripening. Salt (finally 25% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 4.

(3) 동백하젓

15 °C 숙성온도에서는 protease (En5-40) 처리군의 경우 40 mg > 400 mg의 순으로 F-N 함량을 보였으며, chitosanase (En1), endo-chitinase (En3) 처리, 그리고 wheat bran (WB) 처리군의 경우 숙성기간에 따라 증가하는 경향을 보이며 3개월 숙성의 F-N 함량은 1.64%로 가장 높은 경향을 보였다. 25 °C 숙성온도에서는 효소첨가의 영향으로 분해되어 생기는 F-N 함량이 15 °C와는 반대로 3개월에서 높아지는 것으로 보아 온도 영향으로 F-N이 늦게 분해되었다고 생각되며 전체적으로 3개월 숙성 시 높아진 F-N 함량을 보였다 또한 chitosanase (En1)와 endo-chitinase (En3) 처리군은 육젓의 생산과 마찬가지로 F-N 함량이 높은 것으로 나타났다. wheat bran (WB) 그리고 wheat bran (WB) + chitin digest (CD) 처리군과 exo-chitinase (En3) + wheat bran (WB) 처리군의 F-N 함량이 대체로 높게 나타났다. Protease (En5-40) 처리군의 경우 15 °C와는 반대의 결과로 40 mg 농도가 400 mg 농도보다 3개월 숙성에서 F-N의 함량이 눈에 띄게 감소하였다. NH₃ 냄새가 육젓보다 심한 것으로 보아 동백하젓이 NH₃-N 함량이 많을 것으로 사료된다.

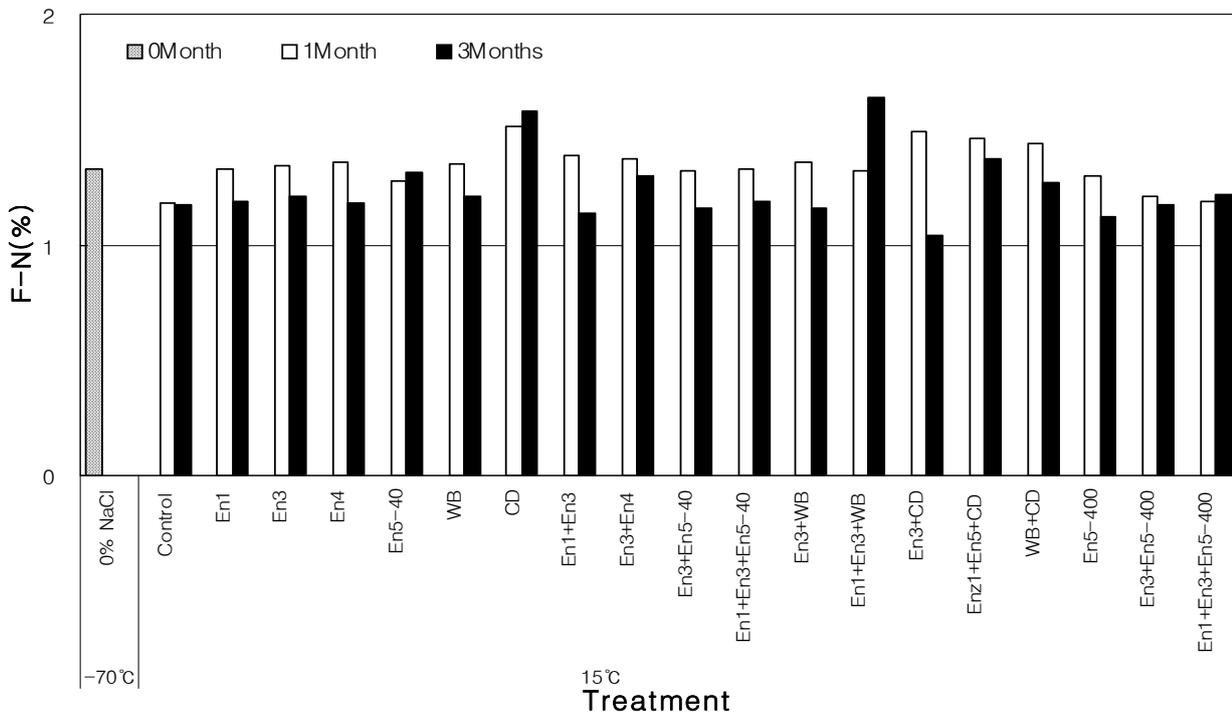


Fig. 28. Formol nitrogen (F-N) contents salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*) during ripening at 15 °C. Salt (finally 20% level) were added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 5.

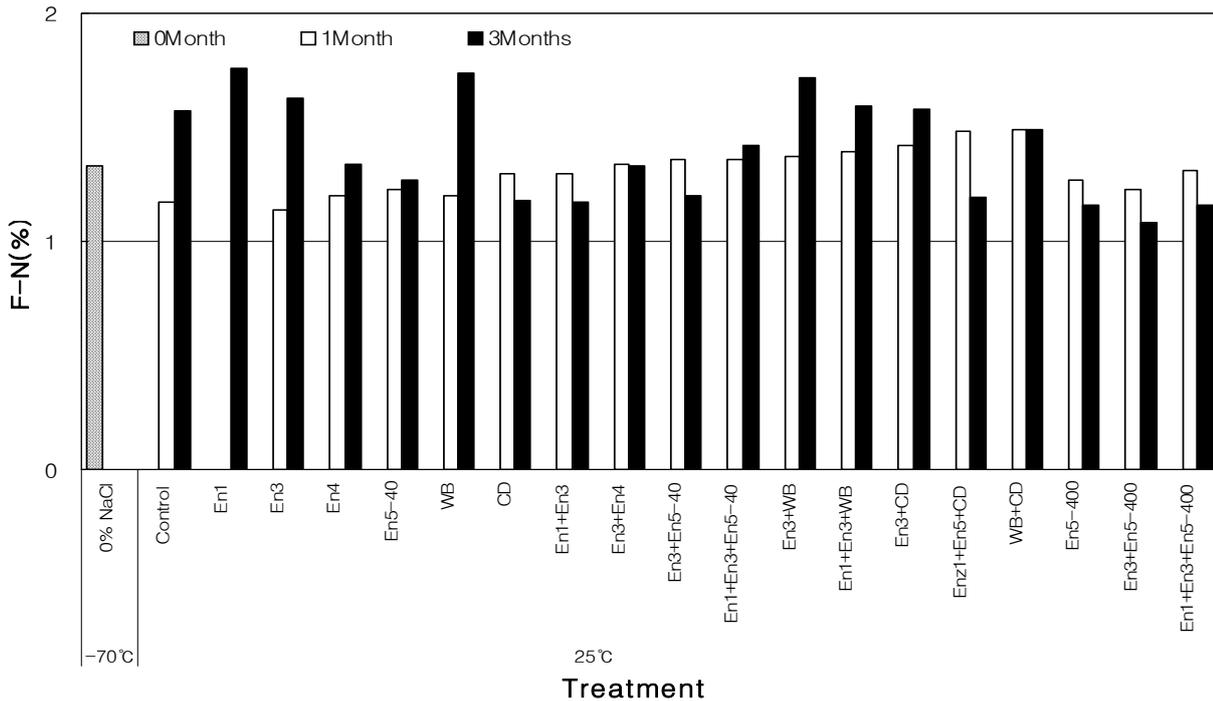


Fig. 29. Formol nitrogen (F-N) contents salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*) during ripening at 25 °C. Salt (finally 20% level) was added to shrimps in every treatment. Treatment conditions were shown in Table 5.

젓새우인 육젓과 동백하젓은 COS과 F-N의 함량은 비례관계가 있으며 숙성기간별로 F-N 함량이 COS함량과 비슷하였다. 생새우 (NaCl 0%)의 F-N 함량이 육젓과 동백하젓 모두 높은 결과로 나타났다 (육젓: 1.32%, 동백하젓: 1.33%). 이는 발효를 하지 않은 생새우에서도 F-N가 포함되나 처리 및 보관에 의하여 미생물의 분해가 많았을 것으로 생각된다. 그리고 NaCl 농도 15%, 20%, 그리고 25%의 25 °C에서 En3을 첨가한 처리군이 대체로 COS 함량이 높았다. 민물 새우와 젓새우는 COS과 F-N의 함량은 비례관계가 있으며 숙성 기간별로 F-N이 COS함량과 비슷하였다. 생새우 (NaCl 0%)의 F-N 함량이 비교적 높은 결과로 나타났으며 25 °C 숙성온도에 wheat bran (WB) 처리군이 대체로 유효하였다. 그리고 3개월 숙성시 25°C 염농도별 평균 F-N함량은 15% 염처리 (1.59%) > 20% 염처리 (1.56%) > 25% 염처리 (1.34%)의 순으로 나타났다. 이는 Mok 등²⁷⁾의 보고와 같이 발효기간 전반에 걸쳐 낮은 염농도에서 높은 값을 보였다. 이로서 처리군의 염도별 · 온도별 연관성으로 볼 때 COS의 함량을 극대화한 새우젓 생산방법으로는 육젓 (*Acetes japonicus*, *yugjeot*)의 20% 염 처리로 25 °C에서 3개월 동안 숙성하여 endo-chitinase (En3)와 wheat bran (WB)를 처리한 새우젓이 가장 적합하였다.

다음으로 새우젓 중 COS와 F-N간에는 토하젓 (R=0.69), 육젓 (R=0.62), 그리고 동백하젓 (R=0.51) 모두 상관성이 있었으며, 토하젓의 경우가 대체로 높았다(Fig. 30~32).

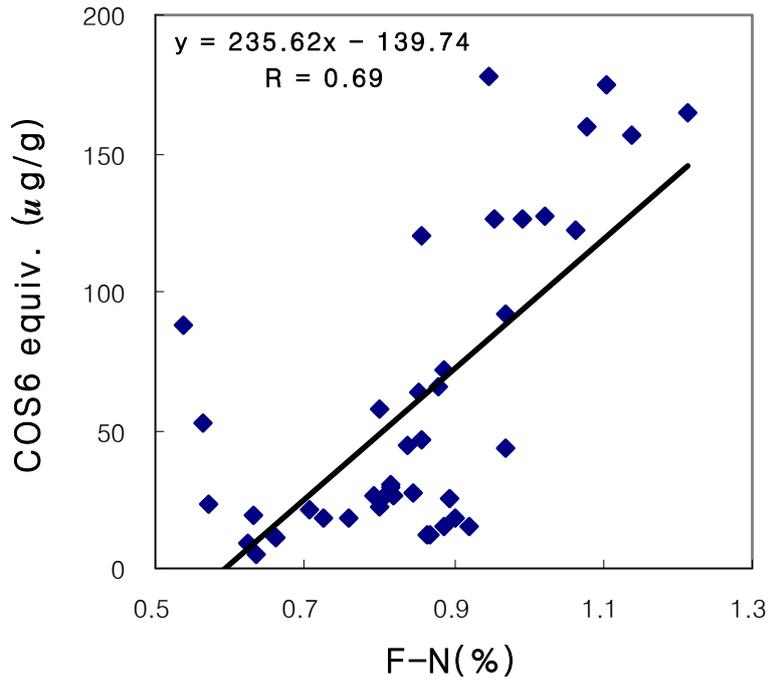


Fig. 30. Relationship between COS and F-N of salt-fermented *toha* shrimps (*Caridina denticulata*, *toha-jeot*).

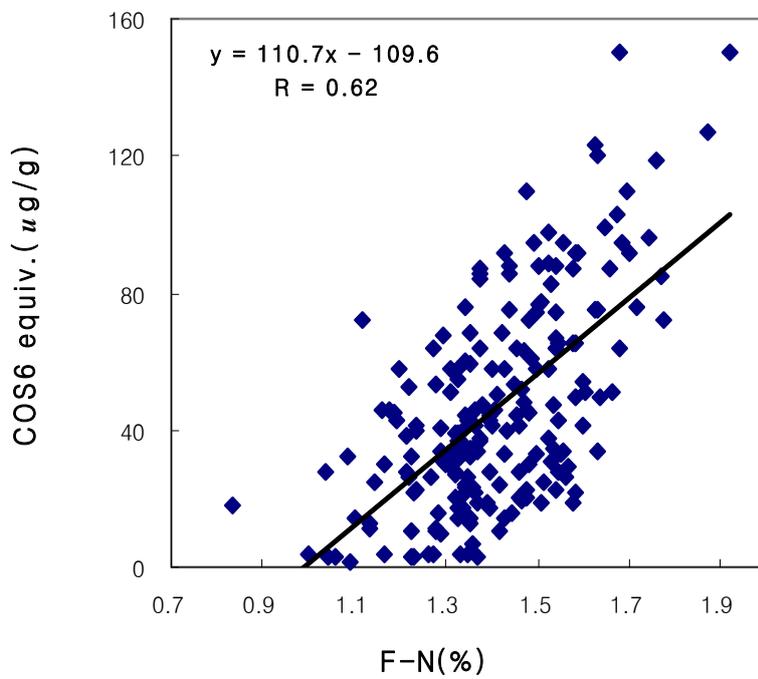


Fig. 31. Relationship between COS and F-N of salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus*, *yugjeot*).

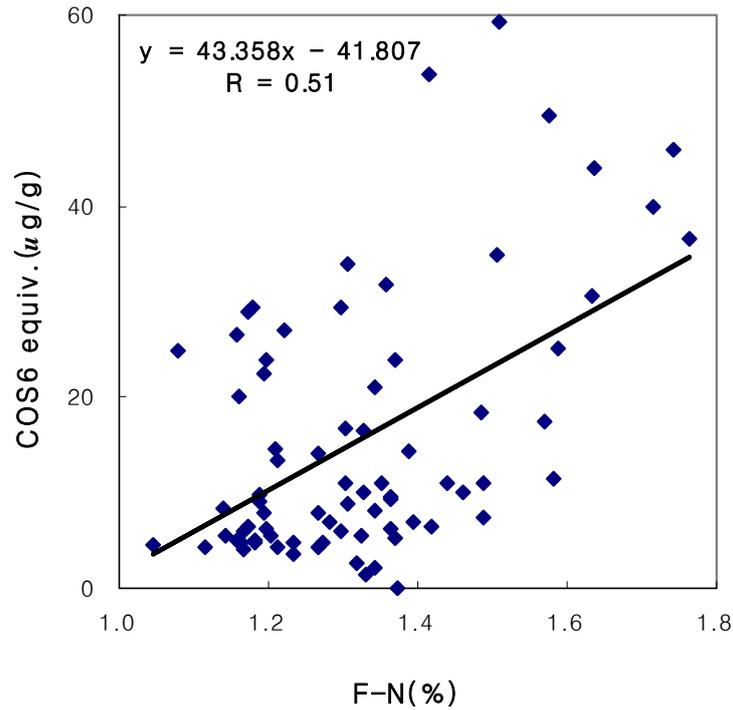


Fig. 32. Relationship between COS and F-N of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*)

이상과 같이 요약하면 같이 분해속도가 빠른 동백하젓 (15.6 µg/g)은 토하젓 (51.9 µg/g)과 육젓 (46.8 µg/g)에 비해 쉽게 분해되는 경향을 보였으나, COS함량은 가장 낮았다(Table 22, 26, 27). 전체적으로 COS 함량이 고르게 높은 새우의 품종은 육젓이었으며 가장 높은 COS 함량은 토하젓으로 나타났다. 실험실적으로 생산한 토하젓의 COS함량은 시판 새우젓보다 1.7 배 정도의 COS 함량을 보여주었다(시판 새우젓 36.3 µg/g, Table 22). 육젓의 경우 숙성기간 별로는 15%, 20%, 그리고 25% 염처리 모두의 평균 COS 함량은 6개월 (31.5 µg/g)<1개월 (43.6 µg/g)<3개월 (62.1 µg/g) 순이었다(Table 26). 6개월 숙성에서 COS 함량의 감소는 가장 긴 숙성기간으로 외관상 COS가 줄어든 것 같았다. 다만, 20%에서는 3개월 (94.7 µg/g)이 1개월 (34.9 µg/g) 보다 2.7배 높았다. 따라서 일반적으로 처리온도 25°C에서 COS의 생산이 대체로 효과적일 것이라 생각된다.

Table 22. Contents of COS and F-N of salt-fermented *toha* shrimps (*Caridina denticulata*, *toha-jeot*)¹⁾.

Fermentation Temp.	1 Month		3 Months		Average	
	F-N	COS	F-N	COS	F-N	COS
	%	µg/g ²⁾	%	µg/g	%	µg/g
5 °C	0.83	38.4	0.82	39.9	0.83	39.2
15 °C	0.86	68.9	0.81	53.8	0.84	61.4
25 °C	0.92	44.1	0.92	66.2	0.89	55.2
Average	0.85	50.5	0.84	53.3	0.85	51.9

¹⁾Salt (finally 20%) was added to *toha* shrimps.

²⁾The COS as COS6 equivalent was determined in reference to the standard curves of cdELISA.

Table 23. Contents of COS and F-N of salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus*, *yugjeot*)¹⁾.

Fermentation Temp.	1 Month		3 Months		6 Months		Average	
	F-N	COS	F-N	COS	F-N	COS	F-N	COS
	%	µg/g ²⁾	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g
5 °C	1.39	44.8	1.59	52.6	1.42	14.6	1.46	37.3
15 °C	1.48	51.5	1.54	61.6	1.41	26.4	1.48	46.5
25 °C	1.43	66.6	1.64	92.6	1.47	43.0	1.51	67.4
Average	1.43	54.3	1.59	68.9	1.43	28.0	1.48	50.4

¹⁾Salt (finally 15%) was added to shrimps.

²⁾The COS as COS6 equivalent was determined in reference to the standard curves of cdELISA.

Table 24. Contents of COS and F-N of salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus*, *yugjeot*)¹⁾.

Fermentation Temp.	1 Month		3 Months		6 Months		Average	
	F-N	COS	F-N	COS	F-N	COS	F-N	COS
	%	µg/g ²⁾	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g
5 °C	1.45	16.7	1.59	43.8	1.40	37.8	1.48	32.8
15 °C	1.49	28.2	1.46	64.5	1.36	45.0	1.44	45.9
25 °C	1.51	34.9	1.62	94.7	1.40	62.9	1.51	64.2
Average	1.48	26.6	1.56	67.7	1.39	48.6	1.48	47.6

¹⁾Salt (finally 20%) was added to shrimps.

²⁾The COS as COS6 equivalent was determined in reference to the standard curves of cdELISA.

Table 25. Contents of COS and F-N of salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus*, *yugjeot*)¹⁾.

Fermentation Temp.	1 Month		3 Months		6 Months		Average	
	F-N	COS	F-N	COS	F-N	COS	F-N	COS
	%	µg/g ²⁾	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g
5 °C	1.35	38.5	1.37	36.0	1.29	3.2	1.34	25.9
15 °C	1.36	52.9	1.28	43.9	1.17	13.9	1.27	36.9
25 °C	1.38	58.7	1.39	69.9	1.16	37.2	1.31	55.3
Average	1.36	50.0	1.34	49.9	1.20	18.1	1.30	39.4

¹⁾Salt (finally 25%) was added to shrimps.

²⁾The COS as COS6 equivalent was determined in reference to the standard curves of cdELISA.

Table 26. Contents of COS and F-N of salt-fermented shrimps (*Acetes japonicus*, *yugjeot*)¹⁾.

Fermentation Temp.	1 Month		3 Months		6 Months		Average	
	F-N	COS	F-N	COS	F-N	COS	F-N	COS
	%	µg/g ²⁾	%	µg/g	%	µg/g	%	µg/g
5 °C	1.40	33.3	1.52	44.1	1.37	18.6	1.43	32.0
15 °C	1.44	44.2	1.43	56.6	1.32	28.4	1.40	43.1
25 °C	1.44	53.4	1.55	85.7	1.34	47.7	1.44	62.3
Average	1.42	43.6	1.50	62.1	1.34	31.5	1.42	45.8

¹⁾Salt (finally 15, 20, and 25%) was added to shrimps.

²⁾The COS as COS6 equivalent was determined in reference to the standard curves of cdELISA.

Table 27. Contents of COS and F-N of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*)¹⁾.

Fermentation Temp.	1 Month		3 Months		Average	
	F-N	COS	F-N	COS	F-N	COS
	%	µg/g ²⁾	%	µg/g	%	µg/g
15 °C	1.34	10.7	1.24	13.1	1.29	11.9
25 °C	1.31	7.5	1.40	30.8	1.36	19.2
Average	1.33	9.1	1.32	22.1	1.33	15.6

¹⁾Salt (finally 20%) was added to shrimps.

²⁾The COS as COS6 equivalent was determined in reference to the standard curves of cdELISA.

다. 관능특성

실험적으로 생산한 새우젓 중 대표적으로 동백하젓 (20% 염농도)을 첨가하여 15 °C와 25 °C에서 140일간 숙성시켜 COS함량이 높은 시료 6종과 와 control 2종을 포함한 8개의 시료를 대상으로 관능검사를 실시하였다(Table 28). 검사 대상은 남자 13명, 여자 18명으로 각각 41.9%, 58.1%의 비율 나타났고. 이중 연령 대는 20대와 30대이 각각 26명, 5명으로 그 비율은 각각 83.9%와 16.1.2%의 비율로 20대가 가장 많이 설문조사에 응답하였다.

Table 28. List of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*) for sensory test

Temp.	Treatment	F-N (%) ¹⁾	COS (µg/g) ²⁾
15 °C	Control	1.17±0.01	4.1±0.4
	En5-40	1.31±0.03	34.0±1.0
	En3 + En4	1.30±0.04	29.5±5.5
	En1 + En3 + WB	1.64±0.09	44.0±3.0
25 °C	Control	1.57±0.00	17.4±8.6
	En1 + En3 + En5-40	1.42±0.13	53.7±4.0
	En3 + CD	1.58±0.10	49.5±6.4
	WB + CD	1.51±0.06	59.2±2.6

¹⁾Mean of interassay (n=2) ± S.D.

²⁾The COS as COS6 equivalent was determined in reference to the standard curves of cdELISA. Mean of interassay (n=3) ± S.D.

(1) 기호도

조사한 결과 기호도는 첫갈색 ($p<0.001$), 짠 냄새 ($p<0.005$), 짠 맛 ($p<0.01$), 쓴 맛 ($p<0.001$), 질긴 정도 ($p<0.001$), 그리고 종합적인 기호도 ($p<0.001$)에서 모두 유의적인 차이를 보였다(Table 29, Fig. 33~34). 종합적인 기호도는 15 °C의 대조구, En5-40 및 En3 + En4가 5.10~5.68점으로 En1 + En3 + WB (4.10점)보다 다소 높은 유의적인 차이를 나타냈고, 25 °C 숙성온도의 경우 대조구, En1 + En3 + En5-40 및 En3 + CD가 5.35~6.52점으로 WB + chitin digest (CD)처리구보다 높게 나타났고 WB + CD는 2.3점으로 가장 낮게 나타났다. 또한, 쓴맛의 기호도가 3.68점으로 가장 낮은 WB + CD (25°C)의 경우 COS함량 (59.2 µg/g)이 가장 높은 시료로 분해촉진으로 인한 쓴맛의 상승작용으로 기인된다.

Table 29. Acceptability scores of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbae-ga-jeot*)

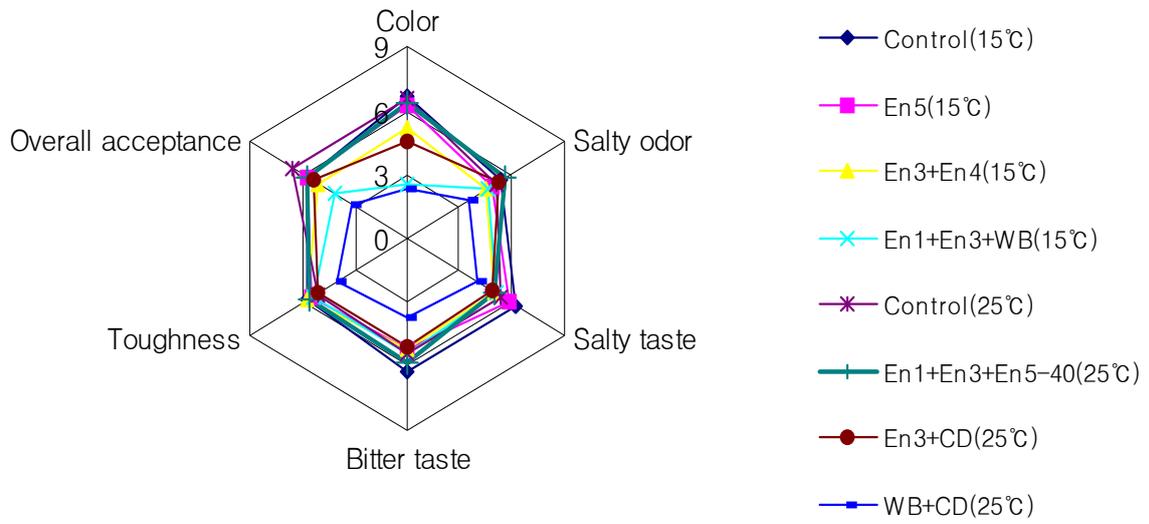
Temp.	Treatment	Color ^{***}	Salty odor ^{***}	Salty taste ^{**}	Bitter taste ^{***}	Toughness ^{***}	Overall acceptance ^{***}
15 °C	Cosntrol	6.71±1.47 ^a	5.45±2.29 ^a	6.29±1.70 ^a	6.29±1.40 ^a	5.74±1.61 ^a	5.68±1.66 ^a
	En5-40	6.23±1.45 ^a	4.87±2.05 ^a	5.84±1.95 ^{ab}	5.19±1.78 ^b	5.48±1.59 ^a	5.77±1.59 ^a
	En3+En4	5.19±2.01 ^b	4.55 ±1.84 ^{ab}	5.00±1.90 ^{bc}	5.16±1.70 ^b	5.77±1.48 ^a	5.10±1.96 ^a
	En1+En3+WB	2.58±1.82 ^c	4.68±2.37 ^a	5.03±2.14 ^{bc}	5.39±1.89 ^{ab}	5.39±1.94 ^a	4.10±2.10 ^b
25 °C	Control	6.52±1.77 ^a	5.03±1.70 ^a	5.35±2.07 ^{ab}	5.39±1.69 ^{ab}	5.16±1.79 ^a	6.52±1.77 ^a
	En1+En3+En5-40	6.32±1.42 ^a	5.61±1.73 ^a	5.00±1.83 ^{bc}	5.81±1.60 ^{ab}	5.58±1.73 ^a	5.74±1.55 ^a
	En3+CD	4.55±1.52 ^b	5.32±1.62 ^a	4.90±1.78 ^{bc}	5.12±1.80 ^b	5.12±1.61 ^a	5.35±1.60 ^a
	WB+CD	2.32±1.56 ^c	3.58±2.16 ^b	4.00±2.28 ^c	3.68±1.66 ^c	4.00±1.55 ^b	3.16±1.73 ^c

Salt-fermented shrimps were *dongbae-ga-jeot* (*Acetes chinensis*).

As the value increases from 1 to 9, the acceptability characteristics increases.

^{a,b,c}Means±S.D are significantly different in the same column within same item (^{**} $p<0.005$ and ^{***} $p<0.001$).

(A)



(B)

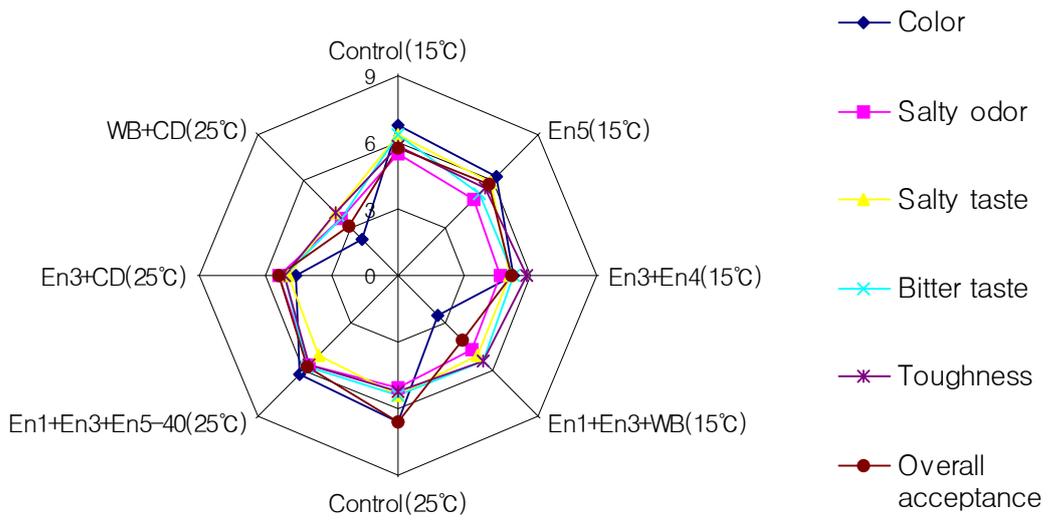
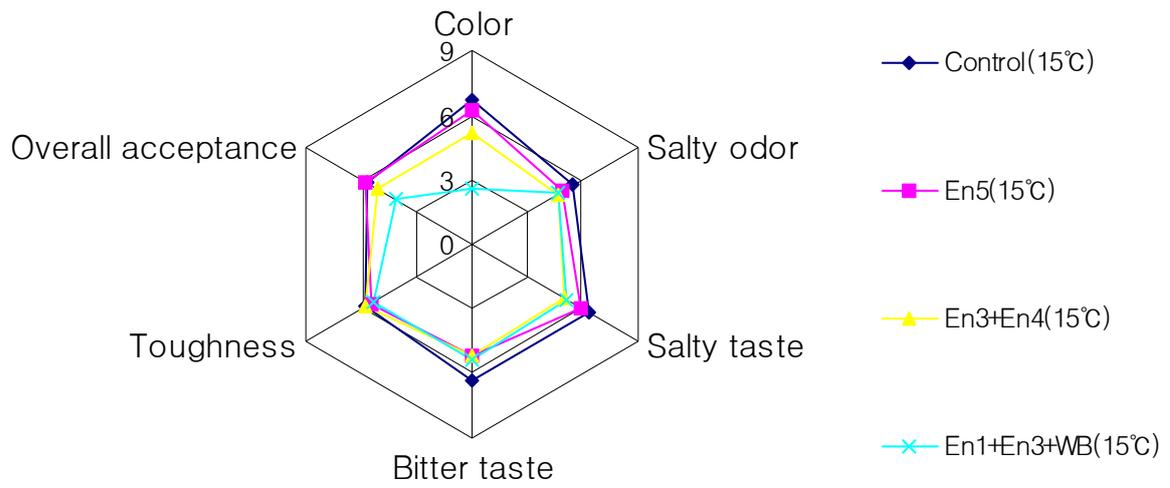


Fig. 33. Diagram of acceptability scores of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*)

(A)



(B)

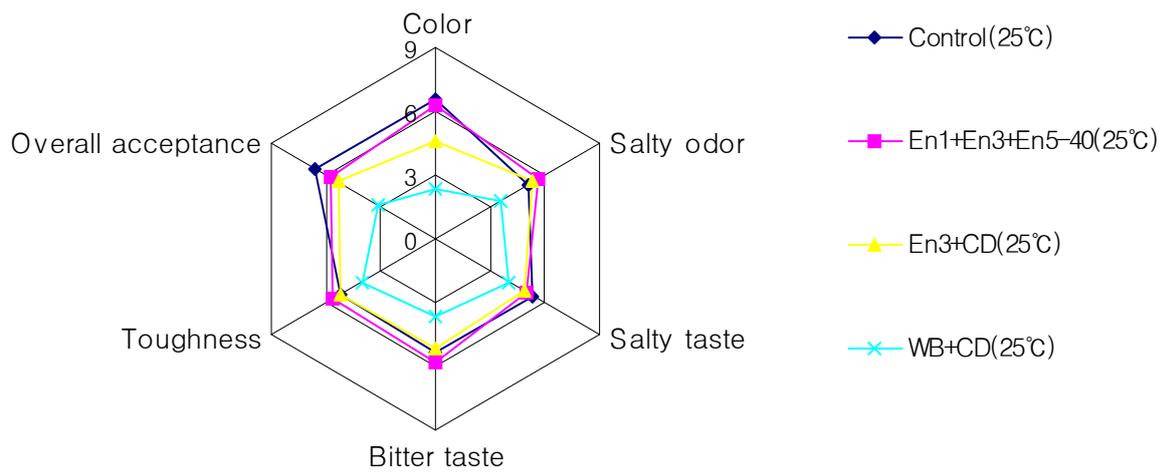


Fig. 34. Diagram of acceptability scores of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*)

(2)강도

짠냄새 (5.00~5.97점), 짠맛 (5.22~6.29점), 그리고 질긴정도 (4.19~4.97점)는 시험구간의 유의적인 차이가 나타나지 않았지만 색에서는 대조구가 숙성온도 15 °C에서는 4.32점, 25 °C에서는 4.94점에 비해 En1 + En3 + WB (15 °C)와 WB + CD (25 °C)은 7.32~7.71점으로 가장 높은 수준이었다(p<0.001)(Table 30, Fig. 35~36). 쓴맛은 15 °C의 대조군이 3.48로 가장 낮게 나타났으며, WB + CD (25 °C)이 가장 높게 나타났다(p<0.01 단, 쓴맛의 25 °C 대조구는 En1 과 En3 + En5-40)처리구 보다는 쓴맛이 강하다).

Table 30. Intensity scores of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis, dongbaegha-jeot*)

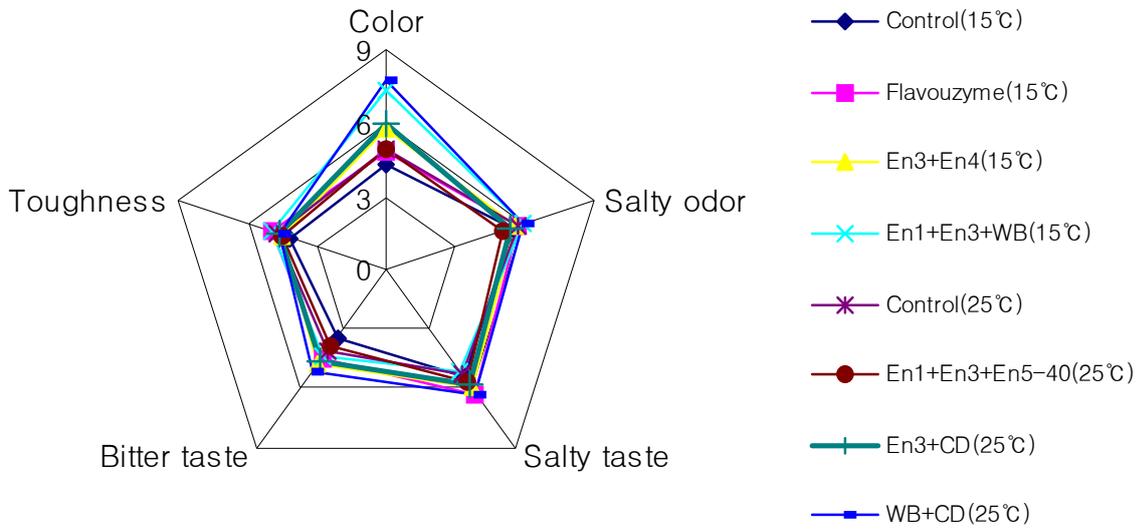
Temp.	Treatment	Color ^{***}	Salty odor	Salty taste	Bitter taste ^{**}	Toughness
15 °C	Cosntrol	4.32±1.80 ^d	5.52±1.75	5.48±1.88	3.48±1.67 ^c	4.19±1.40
	En5-40	4.81±1.30 ^{cd}	5.74±1.93	6.29±1.35	4.48±1.69 ^{abc}	4.94±1.69
	En3+En4	5.74±1.75 ^{bc}	5.61±1.84	5.97±1.58	4.77±1.86 ^{ab}	4.45±1.77
	En1+En3+WB	7.32±2.21 ^a	5.94±2.52	5.23±1.94	4.42±2.09 ^{abc}	4.97±1.96
25 °C	Control	4.94±1.59 ^{cd}	5.77±1.96	5.35±2.04	4.06±1.77 ^{bc}	4.74±1.91
	En1+En3+En5-40	4.94±1.53 ^{cd}	5.00±1.97	5.78±1.54	3.90±1.67 ^{bc}	4.55±1.71
	En3+CD	5.94±1.39 ^b	5.42±1.65	5.81±1.70	4.74±1.73 ^{ab}	4.58±1.48
	WB+CD	7.71±2.36 ^a	5.97±2.14	6.23±2.00	5.13±2.16 ^a	4.65±2.36

Salt-fermented shrimps were *dongbaegha-jeot* (*Acetes chinensis*).

As the value increases from 1 to 9, the acceptability characteristics increases.

^{a,b,c}Means±S.D are significantly different in the same column within same item (^{**}p<0.01 and ^{***}p<0.001).

(A)



(B)

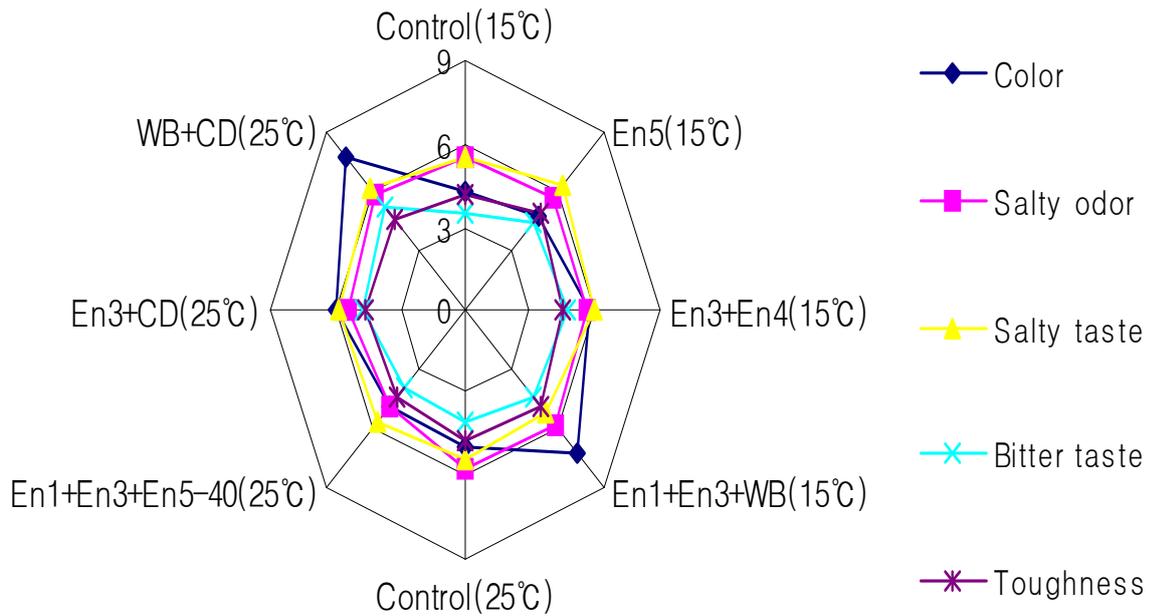
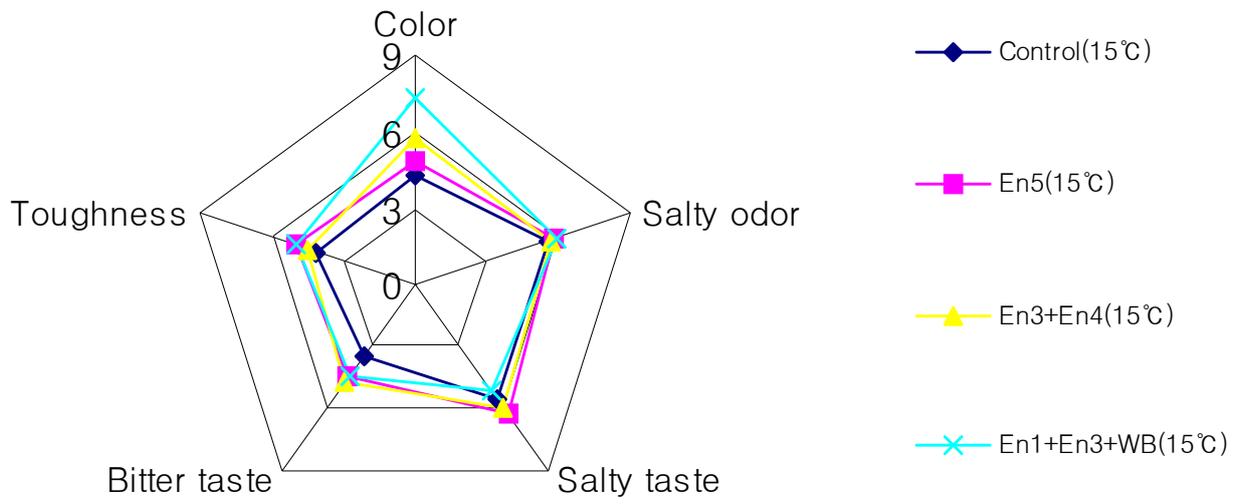


Fig. 35. Diagram of Intensity scores of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*)

(A)



(B)

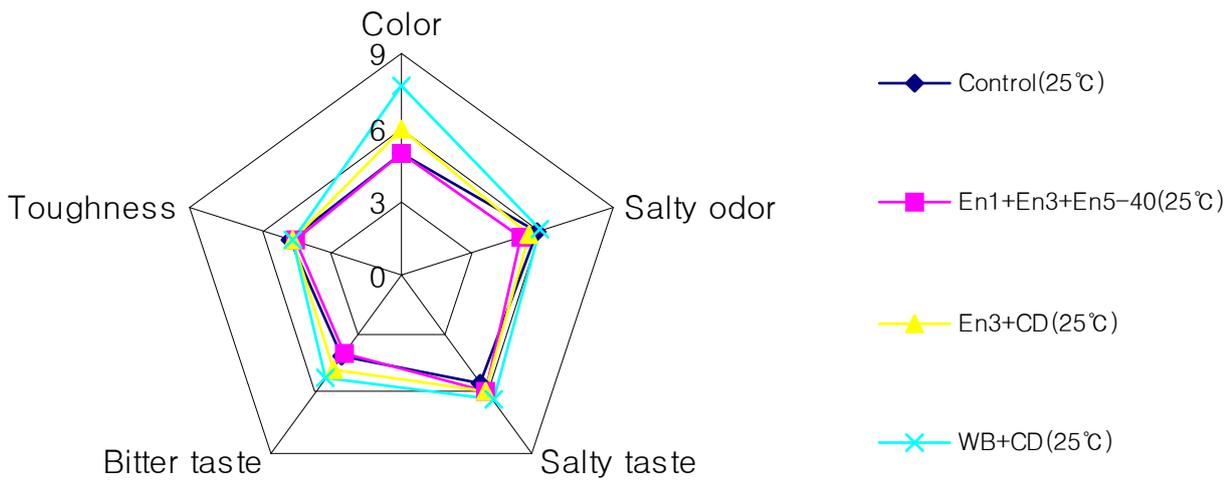


Fig. 36. Diagram of intensity scores of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*).

새우젓 관능평가간의 단순상관(R)은 기호도와 강도를 살펴볼 때 젓갈색이 진할수록 기호도가 떨어졌으며(R=-0.99, p<0.01), 종합적인 기호도도 떨어졌다(R=-0.93, p<0.001). 짠 냄새가 강할수록 짠 냄새에 대한 기호도가 떨어졌으며(R=-0.77, p<0.05), 쓴맛이 진할수록 색깔, 짠 냄새, 짠 맛, 그리고 쓴 맛의 기호도가 유의적으로 낮아졌다(p<0.05)(각각 R=-0.72, R=-0.77, R=-0.77, 그리고 R=-0.89). COS의 함량은 높을수록 짠맛의 기호도가 -0.82의 부의 단순상관을 보였다(p<0.05).

한편, 다음으로 관능평가간의 단순회귀 상관계수(R²)를 살펴보면 기호도와 강도는 높은 회귀상관계수를 나타냈다. 젓갈색 강도와 기호도의 젓갈색과 종합적인 기호도의 회귀 상관계수는 각각 0.98 (p<0.001), 0.87 (p<0.001)로 매우 높았다. 그리고 쓴 맛의 강도와 쓴맛의 기호도와의 상관성은 0.80 (p<0.01)로 상관성이 높았다. 이로써 새우젓 관능 평가에서 젓갈색의 강도와 기호도의 상관도가 매우 높은 수준을 나타냈다. 이상의 관능검사를 종합하면 기호도는 보통수준이므로 제품화되기 위해서는 제품의 개선이 필요하며 향후 별도의 연구가 추가적으로 필요하다고 생각된다.

Table 31. Coefficient of correlation(R) between acceptability and intensity of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis, dongbaegha-jeot*)

Part		Intensity					COS
		Color	Salty odor	Salty taste	Bitter taste	Toughness	
Acceptability	Color	-0.99***	-0.58	-0.08	-0.72*	-0.38	-0.65
	Salty odor	-0.77*	-0.77*	-0.44	-0.77*	-0.30	-0.37
	Salty taste	-0.82*	-0.20	-0.30	-0.77*	-0.23	-0.82*
	Bitter taste	-0.76*	-0.55	-0.59	-0.89**	-0.35	-0.63
	Toughness	-0.69	-0.49	-0.34	-0.62	-0.24	-0.55
	Overall acceptance	-0.93***	-0.69	-0.09	-0.64	-0.29	-0.49

*,**,*** Significant at p<0.05, p<0.01, and p<0.001, respectively.

Table 32. Coefficient of determination(R^2) between acceptability and intensity of salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis, dongbaegha-jeot*)

Part		Intensity					COS
		Color	Salty odor	Salty taste	Bitter taste	Toughness	
Acceptability	Color	0.98 ^{***}	0.33	0.01	0.51 [*]	0.14	0.42
	Salty odor	0.60 [*]	0.59 [*]	0.19	0.60 [*]	0.09	0.13
	Salty taste	0.67 [*]	0.04	0.09	0.59 [*]	0.05	0.68 [*]
	Bitter taste	0.57 [*]	0.31	0.35	0.80 ^{**}	0.12	0.39
	Toughness	0.47	0.24	0.12	0.38	0.06	0.30
	Overall acceptance	0.87 ^{***}	0.47	0.01	0.41	0.08	0.24

^{***}^{***}Significant at $p < 0.05$, $p < 0.01$, and $p < 0.001$, respectively.

라. 생산한 새우젓의 경제성 검토

실험적으로 생산한 8종의 동백하젓에 대한 경제성분석을 하였다. En1~En3는 70,000~150,000원/g, En4는 20,000원/L, En5는 37,000원/kg, WB는 250원/kg과 CD는 5,000원/kg으로 나타나 En1~En3의 단가가 상대적으로 매우 높았다(Table 33). 본 연구에서 생산한 새우젓의 경제성분석을 위한 원가 산출에는 재료비, 인건비, 동력비, 감가상각비, 적정이윤 등을 고려하지 않고 단순화하여 첨가물에 의한 원가 상승만을 고려하였다. 즉, COS함량이 가장 높은 WB + CD (25℃)처리의 경우 원가는 10,158원/kg으로 나타났는데, 이는 동백하젓 1 kg의 단가인 10,000원에 30 g 밀기울 (3%)의 단가인 7.5원과 30 g CD (3%)의 단가인 150원을 더하여 산출한 것이다. 다른 동백하젓도 이와 같은 방법으로 산출하였다(Table 34).

COS 함량이 가장 높은 WB + CD (59.2 µg/g)는 원가는 10,158원으로 낮았지만, 기호성이 3.16점으로 매우 낮아 새우젓 생산에는 부적합하였다(Table 35). 이와는 대조적으로 En1 + En3 + En5-40 (25℃)의 경우는 COS의 함량 (53.7 µg/g)은 높지만 단가가 18,815원/kg 매우 높게 나타나 이 경우도 부적합하였다. 그러나, En3 + CD (25℃)의 경우는 COS 함량 (49.5 µg/g)이 비교적 높으면서 생산단가 (12,950원/kg)도 그다지 높지 않아 새우젓 생산에 적합한 조건으로 판단하였다.

Table 33. Cost of shrimps, enzyme, and additives

Part		Product name	Cost (Won)	Company
Fermented shrimp	Salt-fermented <i>toha</i> shrimps	<i>Toha-jeot</i>	66,000/kg	-
	Salt-fermented shrimps	<i>Yugjeot</i>	30,000/kg	-
	Salt-fermented shrimps	<i>Dongbaegha-jeot</i>	10,000/kg	-
	Other	<i>Ojeot</i>	15,000/kg	-
<i>Chujeot</i>		10,000/kg		
Enzyme	Chitosanase (En1)	Chimax-O35	150,000/g	Amicogen
	Exo-chitinase (En2)	Chimax-N-Exo	80,000/g	
	Endo-chitinase (En3)	Chimax-N-Endo	70,000/g	
	Cellulase (En4)	Celluclast 1.5 L FG	20,000/l	Novozyme
	Protease (En5)	Flavourzyme 500 MG	37,000/kg	
Others	Wheat bran (WB)	-	250/kg	-
	Chitjn digest (CD)	-	5,000/kg	EASY BIO System, Inc.

Table 34. Calculation for Economic analysis of experimental salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis, dongbaegha-jeot*)

Temp.	Treatment	Calculation		Total cost (won/kg)
		Shrimp	Additives	
15 °C	Cosntrol	10,000	0	10,000
	En5-40	10,000	14.8원/En-40 400 mg	10,015
	En3+En4	10,000	2,800원/En3 40 mg + 8원/En3 400 µl	12,808
	En1+En3+WB	10,000	6,000원/En1 40 mg + 2,800원/En3 40 mg + 7.5원/WB 30 g	18,808
25 °C	Control	10,000	0	10,000
	En1+En3+En5-40	10,000	6,000원/En1 40 mg + 2,800원/En3 40 mg + 14.8원/En-40 400 mg	18,815
	En3+CD	10,000	2,800원/En3 40 mg + 150원/ CD 30 g	12,950
	WB+CD	10,000	7.5원/WB 30 g + 150원/ CD 30 g	10,158

Table 35. Summary for economic analysis of experimental salt-fermented shrimps (*Acetes chinensis*, *dongbaegha-jeot*)

Temp.	Treatment	COS ($\mu\text{g/g}$) ¹⁾	Overall acceptance Mean ²⁾	Cost (won/kg)
15 °C	Cosntrol	4.1	5.68	10,000
	En5-40	34.0	5.77	10,015
	En3+En4	29.5	5.10	12,808
	En1+En3+WB	44.0	4.10	18,808
25 °C	Control	17.4	6.52	10,000
	En1+En3+En5-40	53.7	5.74	18,815
	En3+CD	49.5	5.35	12,950
	WB+CD	59.2	3.16	10,158

¹⁾The COS as COS6 equivalent was determined in reference to the standard curves of cdELISA.

²⁾Sensory evaluation test were shown in Table 29.

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

1. 연구계획 대비 실적

(1 년차)
연구 계획 VS 실적

<ol style="list-style-type: none"> 1. 키토산올리고당 (COS)에 대한 특이항체의 생산 2. 키토산올리고당의 면역분석 조건의 확립 3. 새우젓의 시료전처리 방법의 확립 4. 산지별, 계절별 다양한 새우젓 시료의 수집, 확보 5. 새우젓 시료중 키토산올리고당의 함량 분석 	→	<p>생산 완료, 3종: COS6, COSM, NACOS6 조건의 확립</p> <p>전처리방법 확립</p> <p>시료 92점 확보</p> <p>평균 $36 \pm 21 \mu\text{g/g}$ 범위 $1.5 \sim 90 \mu\text{g/g}$</p>
---	---	---

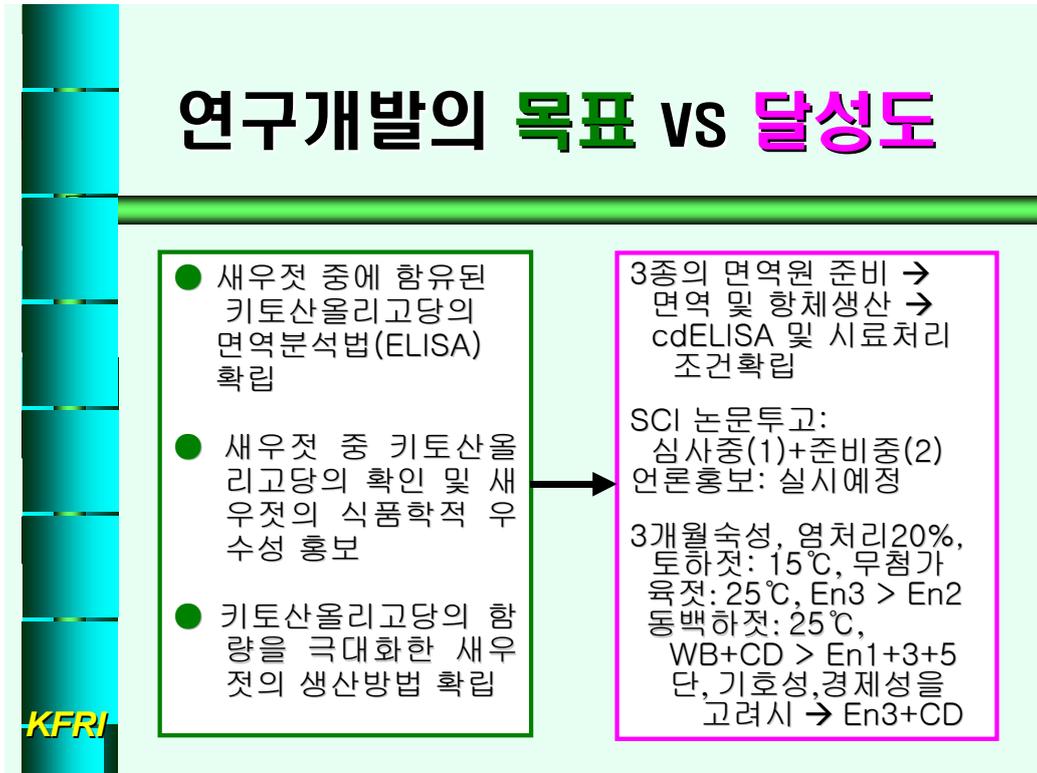
KFR/

(2 년차)
연구 계획 VS 실적

<ol style="list-style-type: none"> 1. 기존방법에 의한 실험실적 새우젓의 생산 2. 새우젓 숙성기간별 키토산올리고당의 분석 3. 키틴분해용 효소첨가에 의한 새우젓의 생산 4. 키토산올리고당 함량을 극대화하는 처리조건 확립 5. 키토산올리고당 강화 새우젓의 경제성 분석 	→	<p>생산 완료, 3종: 토하젓, 육젓, 동백하젓</p> <p>Chitosanase 효소 등을 첨가하고 3~6개월 숙성: COS, F-N 분석 관능평가</p> <p>처리조건의 검토 완료</p> <p>경제성분석 완료</p>
--	---	---

KFR/

2. 연구개발목표 대비 달성도



3. 관련분야에의 기여도

- 가. 기존에 불가능하였던 새우젓의 키토산올리고당 분석 가능
- 나. 항체를 이용한 분석방법을 수산식품에 응용함으로써 이 분야 학문발전에 기여
- 다. 새우젓의 기능성을 발굴하여 우수성을 입증
- 라. 전통 새우젓의 우수성을 입증함으로써 전통식문화의 활성화에 기여
- 마. 키토산올리고당 고함유 새우젓의 신생산기술 확립
- 바. 새우젓의 기능성이 향상으로 국민건강 증진에 기여
- 사. 새우젓의 기능성을 홍보하여 국제적 식품으로서의 위상제고
- 아. 생리조절기능을 홍보함으로써 새우젓의 소비 확대

자. 새우젓의 부가가치를 향상시켜 상품성 제고

차. 수산식품산업의 발전과 소득증대에 기여

새우젓의 국내시장규모는 연간 약 2,000억원이며 홍보효과로 인한 가격상승 5%를 가정하면 약 100억원의 소득증대 효과가 기대되며 기능성이 강화된 새우젓 제품을 개발함으로써 새우젓의 부가가치를 향상시킬 것이다.

또한, COS 함량이 높은 새우젓을 적극적으로 생산하여 판매하는 경우의 경제적 이익을 동백하젓을 예로 들어 산출해 보면, 효소등 첨가로 새우젓 가격이 30% 원가 상승을 예상할 수 있었다; (생산원가 13,000원/kg, COS함량 49.5 ug/g) : (일반 동백하젓: 10,000원/kg, COS함량 17.4ug/g). 이는 생산자입장에서 이익을 추가하여 판매단가가 상승하더라도 관측효과에 의한 소비자의 구매증대로 수익증대가 기대되며 (가정: 판매가 15,000원/kg 판매수익증대 2,000원/kg), 그에 따라 전체 매출액이 1,500억원으로 상승한다면 소득증대효과는 약 200억원에 이를 것으로 추측된다.

제 5 장 연구개발결과의 활용계획

새우젓 중 키토산올리고당의 분석법 확립과 키토산올리고당의 함량을 극대화한 새우젓 생산에 관한 본 연구는 세계최초로서 시도로서 독창성을 인정받을 수 있으며, 다음과 같은 활용이 가능할 것으로 생각한다.

1. 핵심기술 또는 연구결과

가. 키토산올리고당(COS)에 대한 특이항체의 생산기술

- COS6, COSM, NACOS6를 hapten으로 하고 이들을 각각 carrier protein (BSA)에 결합하여 면역원을 생산함.
- 이들 면역원을 실험동물에 주입하여 특이항체를 생산함.
- 특이항체를 protein A column 등을 이용하여 정제함.

나. COS의 면역분석법

- 위에서 생산한 특이항체를 이용하여 COS (및 NACOS)의 면역분석법 (ELISA)를 확립함.
- 새우젓 중 COS의 ELISA분석을 위한 시료의 전처리 조건 등 제반 조건을 확립함으로써 효과적인 분석법을 개발함.

다. 시판 새우젓중의 COS 함량 분석 및 비교

- ELISA를 이용하여 시판 새우젓 중 COS 함량을 최초로 분석함.
- 그 분석치는 평균 36 ug (COS6 equivalent)/g로 나타남.
- 새우젓의 종류별로 육젓에서 가장 높은 함량을 보였음.

라. COS함량을 극대화하는 새우젓의 생산기술

- COS 함량을 높이는 새우젓 생산의 일반적인 조건으로서, 새우의 종류, 염처리농도, 숙성 온도, 숙성기간 등을 밝힘.
- COS 함량이 높은 새우젓의 생산을 위하여, 효소나 첨가물의 처리 효과를 밝힘.
- 이상의 결과에 기초하여 COS 함량이 높고, 기호성과 경제성이 우수한 새우젓의 생산기술의 기반을 확보함.

2. 산업재산권 (특허출원), 2건

- 키토산올리고당(COS)에 대한 특이항체의 생산기술 및 이를 이용한 면역분석법
- COS함량을 극대화하는 새우젓의 생산기술

3. SCI 논문게재, 3건

- COS 분석을 위한 3종 항체의 특성
- ELISA에 의한 시판 새우젓 중 COS 함량

- COS 함량을 높인 새우젓의 생산

4. 학술대회발표, 3건

- 키토산올리고당(COS)에 대한 특이항체의 생산기술 및 이를 이용한 면역분석법
- 시판 새우젓 중의 COS 함량
- COS함량을 극대화하는 새우젓의 생산

5. 산업체에 기술이전

- 기호성과 경제성이 양호한 고품질, 고기능성, 고부가가치의 새우젓의 상품화에 활용
- 다만, 이를 위하여 부분적인 보완실험을 요함

제 6 장 참고문헌

1. 강인수. 1998. 멸치발효 액화물 가공식품의 개발. 농림부 농림기술관리센터 연차보고서
2. 구재근, 김영명, 이영철, 김동수. 1990. 숙성 정어리액젓의 정미성분. 한국수산학회지, 23(2):Pp. 87-92
3. 김병목. 1988. 새우젓 숙성중의 단백질 특성변화에 관한 연구. 한국식품과학회지, 20(6):Pp. 883-889
4. 김선봉, 이태기, 박영범, 염동민, 김외경, 변한석, 박영호. 1993. 수산발효식품 중의 Angiotensin-I 전환 효소 저해제의 특성. 한국수산학회지, 26(4):Pp 321-329
5. 김선봉, 이태기, 박영호. 1994. 멸치육 단백질 효소가수분해물로부터 Angiotensin 전환효소 저해제의 분리 및 그 특성. 한국수산학회지, 27(1): Pp.1-6
6. 김영만, 강민철, 홍정화. 1995. 저염젓갈류의 품질평가 방법에 관한 연구. 한국수산학회지, 28(3): Pp.301-308
7. 김영명. 1997. 한국 전통 김치의 우수성 발굴 및 국제식품화를 위한 젓갈 및 어패류 첨가 효과 규명 과 기능성 첨가소재의 개발. 농림부 농림기술관리센터 연차보고서
8. 김영명, 김동수. 한국의 젓갈, 그 원료와 제품. 한국식품개발연구원. 173-208 (1990)
9. 김은미, 김영명, 조진호, 우순자: 젓갈 및 수산물 첨가 김치에 대한 주부의 기호도 및 의식조사에 관한 연구, 한국식생활학회지, 13:19-26 (1998)
10. 김은정, 차용준. 1996. 참치 가공부산물로부터 단백질 분해효소를 이용한 기능성 천연조미료 제재의 개발. 한국식품영양과학회지, 25(4):Pp. 608-616
11. 김태진, 유효동, 이두석, 장영순, 서상복, 염동민. 1996. 마수어 열수추출물 및 효소가수분해물의 Angiotensin-I 전환효소 저해작용. 한국식품영양과학회지, 25(5):Pp 871-877
12. 김훈수 한국동물도감. 제19권 동물편(새우류), 문교부, 서울, 147 (1997)
13. 류병호. 1998. Antioxidative activity on human low density lipoprotein oxidation by bacillus sp. BH-96 isolated from fermented anchovy. Food science and biotechnology 7(2): Pp.148-153
14. 류홍수. 1997. 양식 어육단백질 가수 분해물을 이용한 medical diet 개발. 농림부 농림기술관리센터 연차보고서
15. 박원기 광주시사. 광주시청, 제2권, 1006 (1993)
16. 박춘규, 박정임. 1997. 시판 토하젓의 함질소 엑스성분 조성 및 품질지표에 관한 연구. 한국식품과학회지, 29(2):Pp 230-239
17. 박춘규. 1995. 멸치액젓의 맛 성분 조성 및 품질표준화에 관한 연구. 식품과학회지, 27(4): Pp.471-477
18. 변재형, 정보영, 황금소. 1976. 멸치 젓갈 숙성중의 dimethylamine의 생성. 한국수산학회지, 9(4):Pp 223-231
19. 수산연감: 수산진흥회 (각 연도)
20. 오광수. 1995. 멸치액젓의 품질비교 및 품질지표 성분에 관한 연구. 한국식품과학회지, 27(4): Pp.487-494
21. 오세욱, 김영명, 남은정, 조진호. 1997. 새우젓의 육류단백질 분해 특성. 한국식품과학회지, 29(6):Pp. 1191-1195
22. 오세욱, 이남혁, 김영명, 남은정, 조진호. 1997. 멸치육의 물간법 중 염침투 특성. 한국식품과학회지, 29(6):Pp. 1196-1201
23. 이응호, 차용준, 이정수. 1983. 저염수산발효식품의 가공에 관한 연구. 한국수산학회지, 16(2):Pp.

24. 이종갑, 최위균. 1974. 멸치 젓갈 숙성에 따른 미생물상의 변화에 대하여. 한국수산학회지, 7(3):Pp.105-113
25. 이철호, 이응호, 임무현, 김수현, 채규수, 이근우, 고경희: 우리나라 수산발효기술의 특색, 한국식문화학회지, 1: 267-278 (1986)
26. 장영렬, 김원극, 권익부, 이현용. 1998. 젓갈류로부터 혈전용해 균주의 분리 및 동정. 한국식품과학회지, 30(3):Pp. 655-659
27. 장영렬. 1998. 젓갈류로부터 혈전용해 균주의 분리 및 동정. 한국식품과학회지, 30(3): Pp.655-659
28. 조진호, 오세욱, 김영명, 정동효, 김정임. 1997. 저염 오징어젓갈 숙성중 젓산균의 변화. 한국식품과학회지, 29(6):Pp. 1208-1212
29. 차성관. 1997. 전통 발효 식품의 미생물자원 발굴 및 보존 연구. 농림수산기술관리센터 연차보고서
30. 차용준. 1985. 저식염 멸치젓과 조기젓 제조조건 및 제품의 품질에 관한 연구. 부산수산대학 대학원 박사학위 청구논문
31. 최임순, 김구영. 1984. 가염 및 분해기간에 따른 멸치의 가수분해. 한국 식품과학회지, 16(1):Pp. 23-28
32. 해양수산통계연보: 해양수산부 (각 연도)
33. 허성호. 1996. 젓갈 제품의 미생물학적 품질표준화에 관한 고찰. J. Korean society of food science and nutrition, 25(5): Pp.885-891
34. Cherl-Ho Lee. 1993. Fish Fermentation Technology in Korea
35. Christian Milo and Werner Grosch. 1995. Detection of odor defects in boiled cod and trout by gas chromatography-olfactometry of headspace sample. J. Agric. Food Chem. 43(2):Pp. 459-462
36. David B. Josephson, Robert C. Lindsay, and David A. Stuibler. 1984. Biogenesis of Lipid-derived volatile aroma compounds in the emerald shiner. J. Agric. Food Chem, 32(6):Pp 1347-1352
37. Eum, B. W., B. Y. Kwak, S. Y. Kim, D. H. Shon, and K. H. Lee. Enhancement of chitooligosaccharides in *Doenjang* (soybean paste) and *Kanjang* (Soy Sauce using *Bacillus subtilis* Koji and *Rhizopus oryzae* Koji *Korean J. food sci. technol.* 35: (2) 291-296 (2003)
38. Good, R.A. and Lorenz, E.: Nutrition and cellular immunity. *Int. J. Immunopharmacol.* 14: 361-366 (1992)
39. Hearn, M. T. W., *Meth. Enzymol.* 135, 102-117 (1987)
40. Hiroshi MATSUFUJI. 1994. Angiotensin I-converting enzyme inhibitory peptides in an alkaline protease hydrolyzate derived from sardine muscle. *Biosci.Biotech.Biochem.* 58(12): 2244-2245
41. Iganacio, G., R. A. Ecosio, and P. A. Fisher. 1982. Bioconversion of shellfish chitin waste: pertreatment, Enzyme perduction, process design, and economic analysis. *J Food sci.* 47:901-911
42. Ishitani, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. Transglutaminase activity of macrophages induced with chitohexaose and N-acetylchitohexaose. *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo.* 35: 183-187 (1988)
43. Junko Sajiki and Katsuhiko Takahashi. 1992. Free fatty acids inducing mouse lethal toxicity in lipid extracts of *Engraulis japonica*, the Japanese anchovy. *Lipids.* 27(12): Pp.988-992
44. Kim S. K. and Jeon, Y. J. Antitumor, antibacterial and calcium absorption acceleration effects of chitosan oligosaccharides prepared by using ultrafiltration membrane enzyme reactor. *Korean J. chitin and chitosan.* 2(3): 60-78 (1997)
45. Kim, H.D., H.J. Lee, Z.I. Shin, H.S. Nam, and H.J. Woo. 1995. Anticancer effects of hydrophobic

- peptides derived from a cheese slurry. *Food Biotechnol.* 4(4):268-272
46. Kim, S. Y., Shon, D. H. and Lee, K. H. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of chitooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64(4): 696-701 (2000)
 47. Kim, Song E, Tongkun Pai and Hyong Joo Lee. 1998. Cytotoxic effects of the peptide from traditional Korean soy sauce on tumor cell lines. *Food Sci. Biotechnol.* 7(2):75-79
 48. Kim, Y. M., and Kim D. S. Fermented seafood of Korea(in korea). Changjo press, Seoul, 9 (1990)
 49. Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-682
 50. Lee, H. J. Anticancer activity of soybean peptides. International symposium on Soybean peptides and Human Health. KoSFoST. Nov. 6. Seoul. Korea 13-21 (1998)
 51. Lönngren, J., I. J. Goldstein, and J. E. Neiderhuber. 1976. Aldonate coupling, a simple procedure for the preparation of carbohydrate-protein conjugates for studies of carbohydrate-binding proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 175: 661-669
 52. Mikami, T., Tokoro, A., Suzuki, K., Suzuki, S. and Suzuki, M. Interferon inducing activity of chitooligosaccharides. *Tohoku Yakka Daigaku Kenkyu Nempo.* 35: 177-182 (1988)
 53. Mitsuya Shimoda, Rossana R. Peralta, and Yutaka Osajima. 1996. Further identification of volatile compounds in fish sauce. *J. Agric. Food Chem.* 44(11):Pp. 3606-3610
 54. Mitsuya Shimoda, Rossana R. Peralta, and Yutaka Osajima. 1996. Headspace gas analysis of fish sauce. *J. Agric. Food Chem.* 44(11):Pp. 3601-3605
 55. Mok, C. K., J. Y. Lee, K. T. Song, S. Y. Kim, S. B. Lim, and G. J. Woo. Changes in physicochemical properties of salted and fermented shrimp at different salt levels. *Korean J. food sci. technol.* 32: 187-191 (2000)
 56. Moore, S. Amino acid analysis: Aqueous dimethyl sulfoxide as solvent for the ninhydrin reaction. *J. Biol. Chem.* 243(23), 6281-6283 (1968)
 57. Nam. E. J., S. W. Oh, J. H. Jo, Y. M. Kim, and C. B. Yang. Purification and characterization of alkaline protease from *saewoo-jeot*, salted and fermented shrimp (*Acetes japonicus*) (1998)
 58. Norlita G. Sanceda, Tadao Kurata and Nobuhiko Arakawa. 1984 Fractionation and identification of volatile compounds in patis, a philippine fish sauce. *Agric. Biol. Chem.*, 48(12):Pp. 3047-3052
 59. Norlita G. Sanceda, Tadao Kurata and Nobuhiko Arakawa. 1986. Study on volatile compounds of fish sauces-shottsuru, Nampla and Noucman. *Agric. Biol. Chem.*, 50(5):Pp. 1201-1208
 60. Norlita G. Sanceda, Tadao Kurata and Nobuhiko Arakawa. 1990. Overall quality and sensory acceptance of a lysine-fortified fish sauce. *J. of Food Science*, 55(4):Pp 983-988
 61. Park C. K., W. J. Kim , K. S. Kim, and J. N. Park. Extractive nitrogenous constituents in commercial *Saeujeot*, a salted and fermented shrimp (*Acetes japonicus*) *Korean J. food sci. technol.* 32: 1135-1141 (1996)
 62. Park. W. K., Y. H. Park., H. K. Kim, and B. H. Park. *J. Korean soc. food sci. Nutr.* 25:(5) 791-795 (1996)
 63. Rondle, C. J. M. and Morgan, W. T. J. The determination of glucosamine and galactosamine. *Biochem. J.* 61: 586-589 (1955)
 64. Ryu. B. H., Antioxidative activity on human low density lipoprotein oxidation by bacillus sp. BH-96 isolated from fermented anchovy. *Food science and biotechnology* 7 (2): 148-153 (1998)
 65. SAS. SAS user's guide, statistics (version 6.1 ed). SAS Inst, Inc., Cary, NC. (1996)
 66. Shoji Konosu, Katsuko Watanabe, and Tetsuji Shimizu. 1974. Distribution of nitrogenous constituents in the muscle extracts of eight species of fish. *Bulletin of the Japanese Society of*

Scientific Fishheries, 40(9):Pp. 909-915

67. Solis-Pereyra, B., Attouri, N., and Lemonnier, D.: Role of food in the stimulation of cytokine production. *An. J. Clin. Nutr.* 66: 521S-525S (1997)

68. Steinkraws, K.H.: Handbook of indigenous fermented foods. Macel Dekker, Inc. New York, 435-438 (1983)

69. Stowell, C. P. and Y. C. Lee. 1981. Neoglycoproteins: the preparation and application of synthetic glycoprotein. *Adv. carbohydr. chem. biochem.* 37: 225-281

70. Suzuki, K., A. Tokoro, Y. Okawa, S. Suzuki, and M. Suzuki. 1985. Enhancing effect of *N*-acetylchitoligosaccharides on the active oxygen-generating and microbicidal activities of peritoneal exudate cells in mice. *Chem. Pharm. Bull.* 33: 886-888

71. Tae-Ick Mheen. 1993. Microbiology of Salt-fermented Fishery Products in Korea

Thomson, A. (ed): The cytokine handbook. Academic Press Inc., New York (1994)

72. Tokoro, A., Tatewaki, N., Suzuki, K., Mikami, T., Suzuki, S. and Suzuki, M. Growth-inhibitory effect of *N*-acetylchitohexaose and chitohexaose against Meth-A solid tumor. *Chem. Pharm. Bull.* 36(2): 784-790 (1988)

73. Torrence, R.F. (ed): Biological response modifiers. Academic Press Inc., New York (1985)

Uchida, Y., Izume, M. and Ohtakara, A. Purification and enzymatic properties of chitosanase from *Bacillus* sp. No. 7-M. *Bull. Fac. Agr. Saga Univ.* 66:105-116 (1989)

74. Win N. N., and W. F. Stevens. Shrimp chitin as substrate for fungal chitin deacetylase. *Microbiol Biotechnol* 57: 334-341 (2001)

75. Yabuki, M., Uchiyama, A., Suzuki, K., Ando, A. and Fuji, T. Purification and properties of chitosanase from *Bacillus circulans* MH-H1. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 34:255-270 (1988)

76. Yoshihara, K., Hosokawa, J., Kubo, T., Nishiyama, M. and Koab, Y. Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-14. *Biosci. Biotech. Biochem.* 56(6): 972-973 (1992)

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

본문 작성 요령

1. 본문의 순서는 장, 절, 1, 가, (1), (가), ①, ㉠, 등으로 하고,
 - 장은 17 포인트 고딕계열
 - 절은 15 포인트 명조계열
 - 본문은 11 포인트 명조계열로 한다. 단, 본문의 내용 중 중요부문은 고딕계열을 사용할 수 있다.
2. 장은 원칙적으로 페이지를 바꾸어 시작한다.
3. 본문은 11 포인트 횡으로 작성한다.
4. 페이지 번호는 하단 중앙 끝에 11 포인트로 한다.
5. 각주는 해당 페이지 하단에 8포인트 활자로 표기하며, 본문과 구분토록 한다.
6. 페이지 수는 편집순서 2의 제출문부터 시작한다.
 - 단, 삽입물이 있을 때는 그 삽입물의 크기에 불문하고 1면을 한 페이지로 하여 일련 번호를 붙인다.
7. 한글, 한문, 영문을 혼용한다.
8. 뒷면지에 주의문을 넣는다.
9. 참고문헌(reference) 인용의 경우 본문 중에 사용처를 반드시 표시한다.

주 의

1. 이 보고서는 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 해양수산부에서 시행한 수산특정연구개발사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.

[부 표]

인 쇄 내 용

I. 인쇄규격

1. 크 기 : A₄ 용지
2. 제 본 : 좌철
3. 용 지 : ○ 표지 200 g/m. 양면 아트지
○ 내용 80 g/m. 모조지
4. 인쇄방식 :
 - 1) 표지 : 바탕 백색, 활자 흑색
 - 2) 내용 : 흑색 지정활자로 인쇄한다

II. 편집순서

1. 표 지
2. 제출문
3. 요약문
4. Summary
5. Contents
6. 목 차
7. 본 문
8. 연구결과활용계획
9. 뒷면지

III. 참고사항

- 전자조판 인쇄시에는 이 요령에 준한다.