

양식산 굴로부터 쓴맛 성분의 분리 및 성질

이종수

통영수산전문대학 수산가공과

Isolation and Some Properties of Bitter Taste Compounds from Cultured Oyster, *Crassostrea gigas*

Jong-Soo LEE

Department of Marine Food Science & Technology, Tongyeong Fisheries College, Tongyeong, Kyeongnam, 650-160, Korea

Five bitter taste compounds (OY-22, OY-23, OY-24, OY-25 and OY-26) were firstly isolated from cultured oyster (*Crassostrea gigas*) at Gamak Bay, Southern coast of Korea, between November, 1989 and January, 1990, and smoked-canned oyster, which were produced by the same oysters. They were presumed as cyclic peptides composed with 6 or 7 amino acids, including sulfur on the basis of NMR and MS spectra. Val and Leu in OY-24, Leu and Ile in OY-25 and tow leucines in OY-26 were detected from those each compounds, seperately, by the amino acid analysis. Another amino acids were thought as non-constititional amino acids.

They showed non-toxic to mice (100µg/20g mice i.p.) and non actibacterial activities to *Asp. niger* and *B. subtilis* (10µg/disk).

The chemical structures and other biological activities of them are now in studying.

Key words : oyster, peptide, bitter taste, amino acid

서론

우리나라 남해안은 패류 양식의 적지로 알려져 있으며, 특히 이곳에서 생산되는 양식굴은 맛과 품질이 뛰어나 생굴이나 다양한 가공품의 형태로 국내는 물론 여러나라에 수출되어 소비되고 있으나, 최근에는 점차 양식환경이 오염되고 빈번한 적조의 발생등으로 생산량이 점차 감소하는 추세에 있다(Ministry of Agriculture and Fisheries, 1993).

고착성 이매패인 굴은 양식의 경우라 하여도 인위적으로 먹이를 조절할 수 없고, 주변의 천연 식물 플랑크톤을 filter feeding 하며 성장하기 때문에 해수중의 먹이 생물인 플랑크톤의 조성이나 출현량이 굴의 성장에 있어서 중요한 역할을 하며, 특히 수확기에 있어서는 굴의 품질에도 매우 큰 영향을 준다. 이와 같은 플랑크톤과 관련된 굴의 품질 저하 현상에는 오래전부터 알려진 녹변(Kimura, 1969), 황변(Hata

et al., 1987), 적변(Hata et al., 1982)등 변색 현상이 있으며, 동결 저장중 불쾌미의 발생과 변색에 관한 보고(Hatano et al., 1990), 각종 유독 플랑크톤에 의한 굴의 유독화(Oshima et al., 1987; Hashimoto and Noguchi, 1989), 패류의 쓴맛 발생(Parry et al., 1989), 식초 절임시 유독 물질의 생성에 관한 보고(Sajiki, 1994) 등이 있다.

한편, 1989년 겨울철에 남해안 일부 해역에서 생산된 양식굴은 전례가 없었던 아가미의 회색화 현상 또는 강한 쓴맛을 나타내었다. 이 쓴맛의 경우는 생굴에서는 비교적 약하였으나, 탈수가 된 보일드 통조림이나 훈제 기름담금 통조림에서는 식용이 부적당 할 정도로 쓴맛이 강하여 품질상 문제가 발생하였으며, 이를 원료로 가공 수출한 일부 제품은 반품되는 등, 가공업계에 큰 손실을 초래하였다.

본 연구에서는 이와같은 굴의 쓴맛 성분의 원인 및 그 성분을 규명하고자 시도한 결과, 여러개의 쓴맛을

내는 성분을 분리 정제하였으며, 몇가지 성질을 조사 하였기에 보고하고자 한다.

재료 및 방법

시 료

본 실험에 사용한 쓴맛을 나타낸 굴(*Crassostrea gigas*)은 1989 년 12월 중순에 전남 가막만에서 채취한 생굴(1kg)과 이 시기에 채취한 굴을 원료로 제조한 훈제 기름 담금 통조림(10kg), 보일드 통조림(17kg)을 각각 시료로 사용하였다.

쓴맛의 검정 및 쓴맛성분의 분리

쓴맛의 검정은 시료의 일부를 여과지 조각에 흡수

시킨 다음 풍건하여 용매를 제거하고 입으로 맛을 보 아 쓴맛의 유무를 판정하였다.

쓴맛 성분의 분리는 생굴, 훈제 기름담금 통조림 및 보일드 통조림을 각각 별도의 시료로하여 정제를 행 하였다. 즉, 각 시료는 homogenizer로 갈아서 3배량의 acetone으로 3회 추출한 여액을 감압 농축하고, 이어서 hexane으로 탈지한 다음 chloroform으로 추출하여 수용성 물질을 제거하였다. chloroform층은 감압 농축 후, 염기성 알루미늄나 및 규산 칼럼을 이용하여 분획 하고, 관능적으로 맛을 보아가면서 쓴맛이 있는 획분 만을 모으고, 최종적으로는 ODS 칼럼을 이용한 고속 액체 chromatography(HPLC)를 반복하여 정제하였다. 이때 HPLC는 215nm에서 monitoring 하면서 정제하였으 며, 분리된 쓴맛성분은 각각, OY-22, 23, 24, 25, 26 으로 칭하였다(Fig. 1).

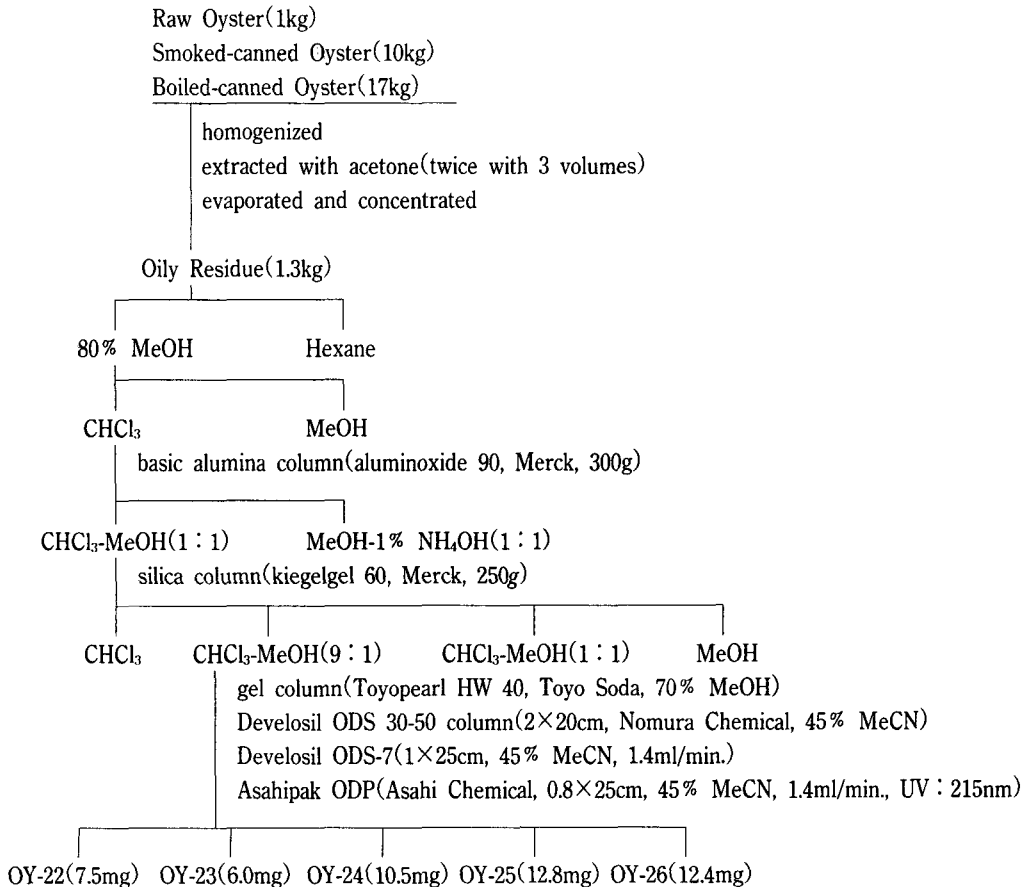


Fig. 1. Isolation and Purification Procedure of Bitter Taste Compounds from Oyster Samples.

마우스 독성 시험

정제한 각 성분의 일정량을 1% tween 60에 현탁시키고 각각 50 μ g, 100 μ g 상당량을 20g 중량의 마우스(ddY계, 수컷) 복강에 주사하여 24시간 이내에 사망 여부를 관찰하였다(Yasumoto, 1982).

항균성 시험

각 성분 10 μ g의 항균성을 paper disk법(Lee et al., 1991)에 의하여 각 균주의 생육 저지 여부를 조사하였다. 이때 균주는 *Aspergillus niger*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*를 각각 이용하였다.

정색 반응

쓴맛 성분을 silica plate 에 spotting 한 다음, 2% ninhydrin용액 또는 dragendorff시약(Sigma)을 분부하고 120 $^{\circ}$ C에서 가열하여 발색 여부를 관찰하였다.

질량 분석 및 핵자기 공명(NMR) spectrum의 측정
각 성분의 질량 분석은 fast atom bombardment (FAB)-MS(JMS-DX 303 HF Mass Spectrometer, Nihon Denshi) 에서 양이온 mode로 분석하였으며, glycerol을 matrix로 사용하였다.

¹H NMR spectrum의 측정은 CD₃CN을 용매로하여 400MHz(JEOL GSX 400 NMR Spectrometer, Nihon Bunko) 에서 측정하였다.

아미노산 분석

쓴맛 성분의 아미노산 분석은 prelabel법인 DABS (4-dimethylaminoazoben-zene-4-sulfonyl chloride) 아미노산법(Lammens and Verzele, 1978; Hirano, 1987)에 준하였다. 즉, 정제한 시료를 MeOH 용액으로하고 그중 시료의 1 μ g 상당량을 각각 시료관에 넣고 건조한 다음 질소 가스로 치환하였다. 이어서, 밀폐된 용기내에 시료관과 6N 염산을 함께 넣고 130 $^{\circ}$ C에서 1 시간 동안 염산 증기로 가수분해한 다음 분해물을 건조하고, DABS 시약 kit(Beckman)로 반응시켜 DABS 아미노산 유도체를 조제하였다. 이 유도체 용액의 일정량을 Ultraspher DABS 칼럼을 이용한 아미노산 자동 분석기(Beckman)로 436nm에서 monitoring 하면서 표준품과 비교 분석하였다(Fig. 3).

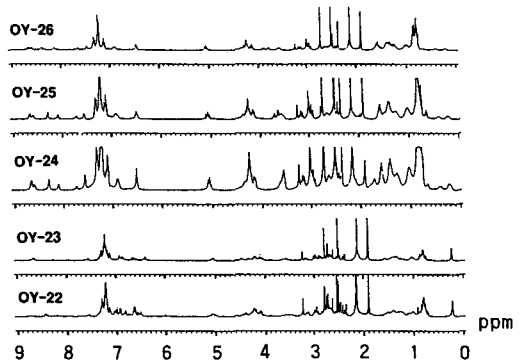


Fig. 3. Chromatogram of DABS-Amino acids of the OY-24(Acid hydrolysate).

column: Beckman Ultraspher DABS(4.6 \times 20 cm); solvent, A: 4% DMF in 10 mM citric acid buffer(pH: 6.5), B: A-4% DMF in MeCN(3:7); flow: 1.4 ml/min.; UV: 436 nm; gradient, 25% B soln.(start) \rightarrow 56%(17.2 min.) \rightarrow 86%(17.3 min.-20.7 min.) \rightarrow 100%(20.8 min-23.2 min.) \rightarrow 100% B soln.(end)

결과 및 고찰

쓴맛의 발생 및 성상

가막만의 굴 양식장에서 생산된 굴이 쓴맛을 나타낸 것은 1989년 겨울철인 11월과 1990년 1월 사이의 일시적인 기간이었다. 일반적으로 굴은 포란기인 5~6월 사이에 생식소에서 아린맛이 나타나는 일이 있으나 저수온기이며 플랑크톤 조성이 복잡하지 않은 겨울철에 나타난 이와같은 현상은 남해안에서 굴 양식이 시작된 이래 처음 발생한 것이다. 굴의 부위별로 쓴맛을 비교해본 결과, 쓴맛은 굴의 소화기관에 해당하는 중장선에 국한되어 있어 굴 자체에서 생성된 것이 아니고, 먹이 생물에서 유래하여 굴의 체내에 축적되었을 가능성이 시사되었다.

1987년 9~10월 중에 Australia의 남부에 있는 Port Phillip Bay 에서도 담치 조개, 굴, 가리비 등의 패류에서 이와 유사한 쓴맛과 폐사 현상이 발생하였으며, 특히 많은량의 담치조개가 식용에 부적합하여 폐기되는 사례가 발생하였다(Parry et al., 1989). 또한, 이들은 출현한 플랑크톤의 종류별 출현량과 쓴맛과의 상관 관계로 부터 이 시기에 대량으로 출현한 규조류의 *Rhizosolenia chunii*가 원인 생물이라고 보고 하였으나,

원인 성분등에 대하여는 알려지지 않았다. 우리나라의 경우는 이 시기에 *R. chunii*는 동정되지 않았으며 *Rhizosolenia* sp.가 우점종으로 나타나지도 않아(Nat'l Yosu Fish. Univ. 1991) 이와 동일종에 의한것은 아닌 것으로 추정되며, 플랑크톤의 monitoring에 의하여 원인 생물을 밝혀야 할 것이다.

일반적으로 동물성 식품에서 쓴맛을 나타내는 물질 들로서는 담즙산, 다량의 무기 염류, alkaloid, 배당체, 황화합물, ketone류, 일부의 L형 아미노산이 알려져 있으며(Shiba, 1976), 물질에 따라 쓴맛에 약간씩 차이가 있다. 꿀의 경우는 아미노산계통의 쓴맛에 유사 하였으며, 역치는 OY-25에서 6 μ M 농도로서 입안에서 수시간 동안 지속 되었다.

아미노산 중에서는 Arg를 제외하고 소수성의 Trp, Phe, Tyr, Val, Leu, Ile, Pro등이 쓴맛을 가지며, 이들이 조합된 peptide들도 역시 쓴맛을 나타내는데, 이러한 쓴맛을 가지는 peptide들은 치-즈와 같은 우유 발효 제품이나 단백질의 가수분해물에서도 생성되어 품질상의 문제가 되고 있으며(Shiba, 1976), Shinoda et al(1987)은 합성한 peptide들의 쓴맛을 조사하고, 이들은 감미를 내는 아미노산을 화학적으로 수식하여 쓴맛을 제거할 수 있다고 하였다. 또, 다량의 식염에 의하여 masking되기는 하지만 수산 발효 식품인 젓갈 류에서도 단백질이 분해되어 이들 peptide들이 생성 되기도 한다.

쓴맛 성분의 분리 정제

분리 정제 과정에 있어서 쓴맛 성분은 hexane층에 불용이었으며, chloroform층에 녹고, 염기성 알루미나 칼럼상에서는 chloroform-MeOH (1:1) 희분에 용출되어, 이들이 비수용성이며 말단의 carboxyl기를 갖고 있지않음을 나타내었다. 또한, ninhydrin정색반응에서는 음성이었으나, dragendorff시약에서는 양성을 나타내어 3급 또는 4급 질소의 존재가 시사되었다. 분리의 마지막인 역상계의 칼럼에서는 용출 시간이 조금씩 다른 여러개의 peak가 나타나 여러개의 성분이 존재하는 것으로 추정되었으며, 재크로마토그래피를 통하여 5개의 성분이 백색 분말로서 단리되었으나, 분리되지 않은 그외의 미량 성분들도 포함된 것으로 보인다.

쓴맛 성분들의 물리 화학적 성질

이들 5개의 성분들은 물에 녹지않고, MeOH, EtOH, chloroform 및 acetonitrile 에 가용성 분말로서 결정은 생성되지 않았다. 이들의 ¹H NMR spectrum을 비교한 것을 Fig. 2에 나타내었다.

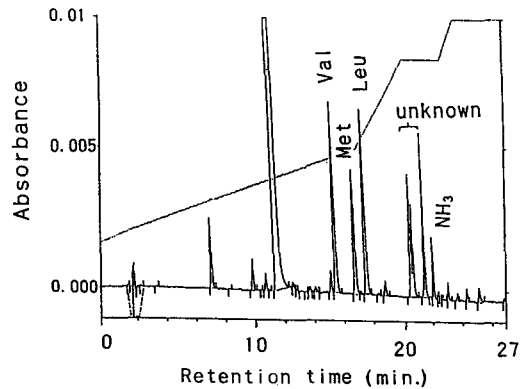


Fig. 2. ¹H NMR Spectra of Bitter Taste Compounds(CD₃CN, 400 MHz).

전 성분 모두에서 7.2ppm 부근에 유사한 여러개의 signal들이 관측되어 방향족 성분이 공통적으로 들어 있음을 나타내었으며, SO-methyl기의 proton으로 추정되는 singlet이 2.5ppm 부근에 관측되었다(Kusumi and Ohtani, 1993). 이것은 후술하는 아미노산 분석 결과 나타난 Met의 존재로서도 간접적으로 증명되었다. 이들 spectrum의 전체적인 형상과 말단의 carboxyl기나 아미노기가 존재하지 않는 것으로 보아 이들 성분들은 유사한 골격을 가진 소수성의 환상 peptide로 추측되었다.

한편, 양이온 mode에서 glycerol을 matrix로하여 측정된 FAB-MS의 결과와 황(S)이 1개 존재하는 것으로 가정하여 HIRFAB-MS를 측정하여 계산한 각 원소의 성분 조성을 Table 1에 나타내었다. 이들은 각 성분들의 분자량 및 질소의 수로 보아 아미노산이 6~7개 결합한 것으로 추정되었다.

이들 성분을 각각 6N 염산으로 가수분해한 다음, DABS 아미노산법에 의하여 아미노산을 분석하고, 구성 아미노산 표준품과 비교한 결과, OY-24에서는 Val과 Leu, OY-25에서는 Ile과 Leu, OY-26에서는 2분자의 Leu이 각각 검출되었으며, Met가 공통적으로 확인되었다. 따라서, 질량 분석에서 OY-25와 OY-26의 분자량이 835로 같은것은 OY-25에 들어있는 Ile이

Table 1. Elemental Compositions of Bitter Taste Compounds by HIRMS

Compounds	Mass(M+H) ⁺	mDa	Calc. Mass	DBE	C	H	O	N	S
OY-22	838.4162	+1.1	838.417324	16.5	42	60	7	9	1
OY-23	852.4311	+1.9	852.432974	16.5	43	62	7	9	1
OY-24	822.4202	+2.2	822.422409	16.5	42	60	7	8	1
OY-25	836.4356	+2.5	836.438059	16.5	43	62	7	8	1
OY-26	836.4348	+3.3	836.438059	16.5	43	62	7	8	1

OY-26 에서는 동일한 분자량을 가진 Leu으로 치환되어 있기 때문에 보인다. 한편, SO-Met (methionine sulfoxide)는 염산으로 가수 분해하면 Met로 환원되기 때문에 SO-Met의 경우도 산으로 가수분해후 아미노산을 분석하면 Met로 검출된다(Kikuchi et al., 1992). 따라서, proton NMR spectrum상에서 SO-methyl로 추정되는 signal도 실제로는 SO-Met에 들어있는 것이지만, 산 가수분해후 분석한 결과에서는 Met로 검출된 것으로 보인다. OY-22 및 OY-23 도 마찬가지로 분석하였으나 Val 이외는 확인할 수가 없었다. 따라서, Val, Leu, Ile 이외는 비구성 아미노산으로 되어있는 것으로 생각된다. OY-24 가수분해물의 아미노산을 DABS 아미노산법으로 분석한 크로마토그램을 대표적으로 Fig. 3에 나타내었다.

마우스 독성 및 생리 활성

쓴맛 성분들의 유독성 여부를 알아보기 위하여 설사성 패류독 검사법에 준하여 이들을 마우스 복강내에 주사하였으나 100µg 이하에서는 마우스에 대한 급성 치사 독성을 나타내지 않았으며, 이들을 함유한 굴 혼제 통조림등 가공 식품의 섭취에 의한 식중독도 보고되지 않았다. Australia에서도 쓴맛을 가진 패류들에 마우스 치사 독성이나, 이로 인한 식중독은 없었다고 하였다(Parry et al., 1989). 그러나, 장기간 다량으로 섭취시에 인체에 어떠한 영향을 줄 수도 있을 것이다.

한편, 이들이 가지고 있는 생리 활성의 하나로서 항균 활성 여부를 그람 음성균(*E. coli*), 양성균(*B. subtilis*) 및 곰팡이(*Asp. niger*)를 대상으로 조사하였으나, 각 성분 모두 10µg/disk 이하에서는 전혀 항균 활성을 나타내지 않았다.

최근에는 식품 단백질 유래의 opioid활성이나 각종 기능을 지닌 기능성 peptide(Chiba and Yoshigawa, 1992)들이 주목을 받고 있으며, 특히, 혈압 조절과 관

련이 있는 것으로 알려진 ACE 저해 peptide들이 수산 단백질의 가수분해물로부터 발견되고 있다(Kim et al., 1994). 또한, 항종양 활성을 가지며 의약품으로 개발이 진행중인 환상 peptide의 didemnin을 비롯한 여러가지 생리활성 peptide들이 수산물로부터 발견되었다(Ireland et al., 1989; Fusetani and Matsunaga, 1993). 굴에서 발견된 환상 peptide도 단순한 쓴맛 이외에 어떠한 형태의 생리 활성을 가지고 있을 것으로 추정되어, 항종양 활성 및 수종의 활성을 조사중에 있다.

이상의 연구 결과, 1989년 겨울철에 전남 가막만에서 발생한 굴의 쓴맛 원인 물질이 처음으로 분리 정제되어, 부분 구조 및 몇가지 성질이 밝혀졌다. 현재 이차원 NMR spectrum을 토대로 정확한 구조를 해석 중에 있으며, 급후, 생리 활성 및 쓴맛의 억제등 다양한 측면에서 더 많은 연구가 이루어져야 하겠다.

요 약

1989년 11월 부터 1990년 1월 사이에 전남 가막만에서 채취한 양식 굴 및 이를 원료로 제조된 혼제 기름담금 통조림, 보일드 통조림에서 강한 쓴맛이 나타나 품질상 문제가 발생하였는바, 본 연구에서는 이러한 쓴맛의 원인 물질을 규명하고자 시도하였다.

이들 시료의 아세톤 추출액을 액-액 분배, 알루미늄, 규산 및 ODS 등의 각종 칼럼을 이용하여 정제한 결과, 5개의 쓴맛성분을 분리하였으며, 이들은 질량분석(FAB-MS)으로 부터 분자량이 각각, OY-22 : 837, OY-23 : 851, OY-24 : 821, OY-25, OY-26 : 835 이었으며, proton NMR spectrum 및 각종 기기분석 결과, 6~7개의 아미노산으로 이루어진 환상 peptide로 추정되었다. 또한, 아미노산 분석으로부터 OY-24에서는 Val,

Leu 이, OY-25에서는 Leu, Ile이, OY-26에서는 Leu, Leu이 각각 확인되었으며, 나머지는 이상 아미노산으로 생각되었다.

이들 성분들은 마우스에 대하여 급성독성은 없었으며(100 μ g/20g mice, I.P.), *Asp. niger*, *E. coli*, *Bac. subtilis* 에 대하여는 항균성도 없었다(10 μ g/disk). 현재, 각종 생리활성 및 정확한 구조를 검토중에 있다.

감사의 글

귀중한 통조림 시료를 제공하여 주신 동림 식품(주)의 이 정태 공장장님께 감사드리며, NMR spectrum 측정과 질량 분석을 하여주신 일본 Tohoku 대학의 M. Murata 조수와 여러가지 조언과 연구에 편의를 제공하여 주신 T. Yasumoto 교수께 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Chiba, H., M. Yoshigawa. 1991. Biologically Active Peptides originated from Food Protein. *Bioscience to Biotechnology*. 29, 454~458. (in Japanese)
- Fusetani, N. and S. Matsunaga. 1993. Bioactive Sponge Peptide. In *Marine Natural Products Chemistry*. Chem. Rev. 93, 1793~1806.
- Hashimoto, K. and T. Noguchi. 1989. Recent Studies on Paralytic Shellfish poison in Japan. *Pure and Appl. Chem.* 61. 7~18.
- Hata, M., M. Hata, K. Nakamura and H. Fujiwara. 1982. Brick-red Coloration of Oyster *Crassostrea gigas*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 48, 975~979. (in Japanese)
- Hata, M., I. Matsumoto, M. Itoh, M. Hata and S. Akashige. 1987. Yellowish Coloration of Oyster *Crassostrea gigas*. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 53, 677~680. (in Japanese)
- Hatano, M., H. Iida, K. Seki and K. Takahashi. 1990. Occurrence of Unacceptable Taste and Coloring of Giant Pacific Oyster. *Nippon Suisan Gakkai-shi*, 56, 1481~1484. (in Japanese)
- Hirano, H. 1985. Non-prelabelling method-DABSYL-Amino acid. *Zoku-Seikagaku Zikken Kouza*. 2. *Protein Chemistry*(ed. by Jap. Soc. Biochem.). pp. 207~209. (in Japanese)
- Ireland, C.M., T.F. Molinski, D.M.Roll, T.M. Zabriskie, T.C. Mackee, J.C. Swer-Swersey and M.P. Foster. 1989. Natural Product Peptides from Marine Organisms. In *Bioorganic Marine Chemistry*(ed. by P.J. Scheuer), Springer-Verlag, Berlin, pp. 1~46.
- Kikuchi, Y., K. Ono and N. Tamiya. 1992. Ligament. *Protein Nucleic acid Enzyme*. 37, 1404~1413. (in Japanese)
- Kim, S. B., T. G. Lee, Y. B. Park, D. M. Yeom, Y. K. Kim, J. R. Do and Y. H. Park. 1994. Isolation and Characteristics of Angiotensin-I Converting Enzyme Inhibitory Activity of Peptic Hydrolysates of Anchovy Muscle Protein. *Bull. Korean Fish. Soc.*, 27, 1~6. (in Korean)
- Kimura, T. 1969. Study on Greening of canned Oyster. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 35, 67~76. (in Japanese)
- Kusumi, T. and I. Ohtani. 1993. NMR Chemical Shift Data. Kodansha Scientific. Tokyo. Japan. p. 158. (in Japanese)
- Lammens, J. and M. Verzele. 1978. Rapid and Easy HPLC Analysis of Amino Acids. *Chromatographia*. 11, 376~378.
- Lee, J.S., I.S. Kim and S.K. Moon. 1991. Antibacterial, Antifungal Components in Some Korean Sponges. *Bull. Korean. Fish. Soc.* 24, 193~202.
- Ministry of Agriculture and Fisheries. 1993. Agriculture and Fisheries Statistics Bureau. Korea. p. 291. (in Korean)
- Oshima, Y. M. Hasegawa, T. Yasumoto, G. Hallegraef and S. Blackburn. 1987. Dinoflagellate *Gymnodinium caenatum* as The Source of Paralytic Shellfish Toxins In Tasmanian Shellfish. *Toxicon*, 25, 1105~1111.
- Parry, G.D., J.S. Langdon and J.M. Huisman. 1989. Toxic effects of a bloom of the diatom *Rhizosolenia chunii* on shellfish in Port Phillip Bay,

- Southern Australia. *Marine Biology*, 102, 25~41.
- Sajiki, J. 1994. Formation of Free Polyunsaturated Fatty Acids and Their Metabolites in Oyster, *Crassostrea gigas*, by Treatment with Acetate. *J. Agric. Food Chem.* 42, 1519~1524.
- Shiba, T. 1976. Chemistry of Bitterness and Pungency. *Chemistry of Taste and Smell. Kagaku Sogetsu*, 14(ed. by Jap. Chem. Soc.), Gakkai Shuppan Center. Japan. pp. 129~156. (in Japanese)
- Shinoda, I., Y. Noshio, K. Kouge, M. Ishibashi, H. Okai, K. Tatsumi and E. Kikuchi. 1987. Variation in Bitterness Potency When Introducing Gly-Gly Residue into Bitter Peptides. *Agric. Biol. Chem.*, 51, 2103~2110.
- Yasumoto, T. 1982. Method for the Bioassay of Diarrhetic Shellfish Toxin. *Food Sanitation Research.* 31, 515~522. (in Japanese)
- Yosu Nat'l. Fish. Univ. 1991. Report of Environmental Pollution Status and Preservation Policy in Gamak Bay. *Bull. Mar. Sci. Inst., Yosu Nat'l. Fish. Univ.* pp. 676~682. (in Korean)
-
- 1994년 10월 12일 접수
1995년 1월 5일 수리