

참가자미의 저장 중 오염미생물 *Staphylococcus aureus*와 *Escherichia coli*의 생육에 미치는 Chitosan-ascorbate의 영향

김영숙 · 오승희¹ · 김순동^{2*}

대구대학교 식품영양학과, ¹포항대학 영양조리산업계열, ²대구가톨릭대학교 식품공학과

Inhibitory Effects of Chitosan - ascorbate on Growth of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* Contaminated in Flounder during Storage

Young-Sook Kim, Seung-Hee Oh¹ and Soon-Dong Kim^{2*}

Department of Food and Nutrition, Daegu University, Gyungsan 712-714, Korea

¹Department of Nutrition & prepared industrial Pohang College, Pohang 791-711, Korea

²Department of Food Science and Technology, Catholic University of Daegu, Gyungsan 712-702, Korea

Abstract

We performed an experiment of keeping the extension of raw and semi-dried flounder (*Pleuronectes herzensteini*). The effect of with (WG) or without gill (OG), drying degree (20% drying: 20D, 40% drying: 40D) and storage temperature(5°C) and 0.1% chitosan-ascorbate (CA) treatment of vacuum packaging flounder on the growth of contaminated microorganism during storage for 10 days were investigated. Total aerobacter (TA) in the OG-treated raw flounder was 0.29~0.44 log cycle lower than that of WG-treated flounder. Also, the number of *Staphylococcus aureus* (SA) and *E. coli* (EO) in OG were lower compared with WG. The number of TA, SA and EO in 20 D among 0 D, 20 D and 40 D stored at 5°C were lowest. Especially, the SA and EO was 0.13~0.53, 0.3~0.88, and 0.13~0.74 log cycle lower compared with raw flounder. The growth of TA, SA and EO separated from raw flounder in tryptic soy broth were completely inhibited by 0.1% CA. The anti-biotal effect of CA of two microorganisms SA and EO that separated from flounder, and the growth of all of them were 90% (SA), 96% (EO) inhibited at the 0.1% CA. The inhibition times at 37°C in soy broth was 36 hr. However when CA was added directly to flounder, it appeared inhibition effect to 0.88 log cycle. The effect of CA was better when gills removed and 20% drying.

Key words : flounder (*Pleuronectes herzensteini*), chitosan-ascorbate, drying degree, shelf-life, storage

서 론

참가자미(*Pleuronectes herzensteini*)는 가자미목 가자미과에 속하는 어종으로 열대 및 온대지역의 모래에 서식하는 해산어류로 우리나라 전 연안, 일본, 발해, 동중국해의 연안 등에 서식하여 경제적으로도 중요한 자원이다. 또한 우리나라에서는 주로 자망, 정치망 등에 의해 어획되는 상업적으로 중요한 어종의 하나이며, 형태적, 생태적으로도 독특하여 생물학적으로 많은 연구가 이루어지고 있다(1-3). 가

자미에 관한 연구로는 *P. flesus*(European flounder), *P. flesus* (Japanese flounder) 및 *P. lethostigma*(Southern flounder)를 중심으로 주로 생리, 생태적인 연구들이 보고되어 있으며 (4-6), *P. herzensteini*를 소재로 한 식품학적 측면의 연구는 부족하다. Shaban 등(7)은 *Kuruma prawn*을 동결저장 했을 때 저장온도가 높을수록, 저장기간이 길어질수록 drip 양이 증가한다고 보고하였으며, 생선의 저장 중 품질저하에 관련된 지표로는 microflora, pH, K-value 등이 복합적으로 관련되어 있다고 하였다(8). 식품의 저온저장은 미생물의 증식과 생화학적 변화를 억제시켜 저장기간을 연장하는 방법으로 저온저장법, 동결 및 냉장법(9) 등의 연구보고가

*Corresponding author. E-mail : kimsd@cu.ac.kr,
Phone : 82-53-850-3216, Fax : 82-53-850-3216

있다. 최근에는 반건조 제품이 가공되어 시판되고 있어서 유통, 저장법에 대한 학술적인 연구가 요구되고 있으며, 해산물의 유통기간 연장방법으로는 modified atmosphere (MA) 포장과 진공포장을 겸용하여 활용되고 있다(10). 참가자미는 건조방법에 따라 영양과 품질이 크게 달라지며 (11), 양질의 제품을 제조하는 데는 냉풍건조법이 주로 이용된다(12). 참가자미의 내장과 아가미를 제거한 후 냉풍건조기를 사용하여 제조한 반건조제품의 MA저장법이 알려져 있다 (10). 특히 반건조제품은 건조제품보다 수분함량이 많아 조직이 유연하고 좋은 텍스처를 주는 반면 저장성이 낮은 문제점(13)을 보완하기 위하여, 자연건조, 열풍건조, 냉풍건조, 냉풍제습건조 등 다양한 건조방법이 활용되고 있으며, 가자미 반건조 제조에서는 냉풍건조법(14,15)이 활용되고 있다. 제조에 소요되는 시간은 자연건조는 360-480시간, 냉풍건조는 220-245 시간 정도이다. 감압건조는 40-60℃에서 4.5-8.3 시간이 소요되며 제조시간을 크게 단축시킬 수 있다 (2). 미생물 증식 억제 및 저장성을 높이기 위하여 본 연구에 사용한 chitosan-ascorbate(CA)는 ascorbic acid의 안정성 향상(13)과 체내 cholesterol 저하(12) 및 강한 항균효과(11,16)가 있는 것으로 알려져 있다. CA는 chitosan의 amino기와 ascorbic acid가 Schiff 반응에 의하여 생성한 염(17)으로 chitosan 분자가 가지는 -OH기와 -NH₂기에 의하여 식품내의 수분과 친화력을 가져 생체세포를 보호함으로써 식품의 저장성을 연장한다(11-13). 또한 CA는 체내에서 지질을 흡착하여서 배설시킴으로써 비만 예방과 cholesterol을 저하시키는 작용(14)을 하며 특히 항균효과에 영향을 미치고 (15,18), 수분과의 친화력으로 수분을 선택적으로 투과하여 chitosan 막을 보호하며 저장성을 연장 시킨다(19-21).

본 연구에서는 참가자미의 미생물 증식을 억제시켜 품질 보호와 유통기간 연장을 위한 기초적 자료를 마련하기 위하여 냉풍감압제습건조기장치를 사용하여, 아가미의 유무, 건조정도 및 저장온도 등을 조사함과 동시에 CA의 처리가 오염미생물 증식에 미치는 영향을 연구하였다.

재료 및 방법

재료

참가자미(*Pleuronectes herzensteini*)는 2008년 6월 동해안에서 어획된 것으로 평균개체의 중량이 200 g 내외의 것을 (주)오브에서 제공받아 실험에 공시하였다. Chitosan은 분자량 2025 kDa (Kumho, Co)를 사용하였으며, ascorbic acid는 Sigma 사(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였다.

참가자미 시료의 조제, CA의 처리 및 저장

참가자미는 아가미를 제거한 것(OG)과 제거하지 않은

것(WG)으로 구분하여 수돗물로 3회 세척한 후 chitosan-ascorbate(CA)를 처리하였다. CA는 Lee 등(20)의 방법에 따라 chitosan 1 g을 vortex 상에서 1% ascorbic acid 용액에 녹여 최종량을 100 mL로 하였으며 증류수로 10배 희석하여 참가자미 표면에 5 mL/100 g 농도로 분무하였다. 건조는 냉풍감압제습건조기장치 (Co) OF, humidity 40%, cold temperature 5-8℃, decompression 10 mmHg를 이용하여 초기중량에 대하여 0, 20, 40%를 건조하였으며 0.02 mm polyethylene film으로 진공포장하여 5℃에서 10일간 저장하면서 오염미생물의 수를 조사하였다(Fig. 1).

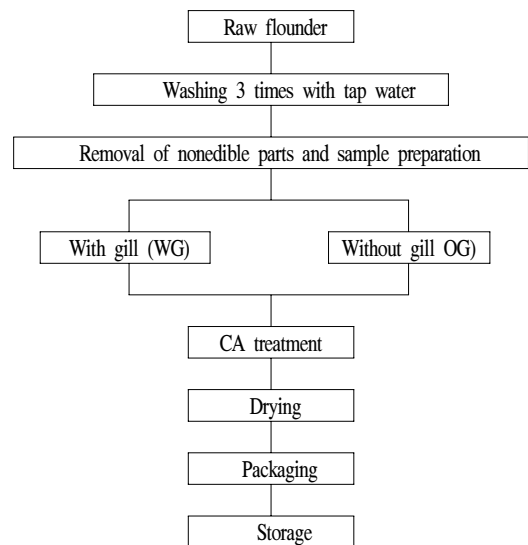


Fig. 1. Procedure of CA treated and semi-dried flounder sample preparation.

총균수, *S. aureus* 및 *E. coli* 수의 측정

저장중인 가자미 일정부위의 껍질부위를 일정량 절취하여 0.5%의 NaCl을 함유하는 0.1% peptone수로 희석하여 총균수는 Petri-film Aerobic Count Plate(PAC, 3M, USA), *S. aureus* 및 *E. coli*는 Petri-film E. coli/Coliform Count Plate(PEC, 3M, USA)에 각각 접종하여 37±1℃에서 24-36시간 배양한 후 colony수를 계측하였으며 colony forming unit(log CFU/g)로 나타내었다.

참가자미로부터 균주의 분리

참가자미를 채취하여 0.1% peptone 수를 사용하여 시료를 희석하여 분리원으로 사용하였다. Tryptic Soy Broth(Difco, USA)에 접종하여 활성화 시킨 후 균수측정용 선택배지에서 균주를 분리하였으며 colony의 성장이 우수한 균주를 선택하여 aerobacter, *S. aureus*, *E. coli*의 성장실험에 공시하였다.

CA의 항균효과

가자미로부터 분리한 aerobacter, *S. aureus* 및 *E. coli*의

colony를 soy broth (Difco, USA)에 접종한 후 CA의 농도를 0-0.1%로 조정하여 37°C의 shaking incubator에서 36시간 배양한 배양액을 total aerobacter, *S. aureus* 및 *E. coli*의 측정시와 동일한 방법으로 측정하였다.

현미경관찰

균의 현미경관찰은 배양액을 원심분리하여 얻은 균체를 Camera를 부착한 Optical Microscope (Carl Zeiss, Germany)를 사용하여 400배율로 검경하였다.

통계처리

분석은 3회 반복으로 측정하여 평균치와 표준편차로 나타내었으며, 유의성 검증은 version 12의 SPSS (Statistical Package for Social Sciences, SPSS Inc., Chicago, IL, USA) soft-ware package를 이용하여 Duncan's multiple range test를 행하였다.

결과 및 고찰

아가미 유무에 따른 저장중의 균수변화

참가지미의 아가미를 제거하지 않은 것(WG)과 제거한 것(OG)으로 구분하여 진공포장하여 5°C에서 저장하면서 총균수(TA), *S. aureus*(SA), *E. coli*(EO)의 균수 변화를 조사하였다(Fig. 2). 그 결과 총균수(log CFU/g)는 WG에서는 저장 0일과 5일째에 각각 3.52 및 3.78 log CFU/g이, 10일째

는 4.67 log CFU/g이 검출되었다. OG에서는 0일째와 5일째에 각각 3.01 및 3.49 log CFU/g가, 10일째는 4.23 log CFU/g로 WG에 비하여 0일째는 0.41 log cycle이, 5일째는 0.29 log cycle이, 10일째는 0.44 log cycle이 각각 감소되었다. SA는 OG 및 WG 모두에서 0일째는 검출되지 않았다. 그러나 5일째부터는 WG 및 OG 모두에서 균이 검출되었는데 WG에서는 5일째 0.60 log CFU/g, 10일째는 1.04 log CFU/g이 검출되었다. OG에서는 5일째 0.47 log CFU/g, 10일째 0.90 log CFU/g이 검출되었다. 아가미를 제거한 OG에서는 WG에서보다 0.13-0.14 log cycle이 낮았다. *E. coli* (log CFU/g) 경우도 0일째는 WG 및 OG 모두에서 검출되지 않았다. 그러나 WG에서는 5일과 10일째 각각 0.60 및 0.90이었으나, OG에서는 0.30 및 0.47로 조사되었으며 OG에서 5일과 10일에 각각 0.3-0.43 log cycle이 감소되었다. 즉 아가미를 제거한 군에서 총호기성균, *S. aureus* 및 *E. coli*의 수가 낮았다. 이러한 현상은 먹이활동을 행하는 주 기관이 아가미로 타 부위에 비하여 오염균수가 많기 때문이라 생각된다. Yang과 Lee(10)는 참가지미의 내장과 아가미를 제거한 후 일반포장하여 5°C에서 5일간 저장하였을 때의 오염균수가 4.0×10^3 이었다고 보고한 것과 비교하면 본 연구에서는 5일째 3.01 log CFU/g로 이들의 연구보다 0.59 log cycle이 낮았다.

건조율에 따른 CA의 영향

냉풍감압제습건조 장치를 이용하여 초기중량의 0%(raw: 0D), 20%(20D) 및 40%(40D)를 각각 건조시킨 후 진공포장하여 5°C에서 저장하면서 균수를 조사한 결과는 Fig. 3과 같다. 생참가지미(Fig. 3A)의 경우, 총호기성균수(log CFU/g)는 CA를 처리하지 않았을 때는 0일째 3.52, 5일째 3.97, 10일째 5.36 이었으며, CA를 처리하였을 때는 0일째 3.13, 5일째 3.44, 10일째 5.12로 조사되었다. *S. aureus*는 CA를 처리, 무처리 모두 0일째는 검출되지 않았다. 그러나 5일째는 CA 무처리구에서는 5일째와 10일째에 각각 0.6 및 1.04이었으며, CA를 처리하였을 때는 5일째 0.47, 10일째 0.95가 검출되었다. *E. coli*는 0일째 CA처리 무처리 모두 검출되지 않았으나 5일째 CA 무처리에서는 3.6, 10일째는 0.9로 나타났으며, CA처리 5일째와 10일째는 각각 0.3과 0.77으로 무처리에 비하여 균수가 현저하게 적었다. 20%건조(Fig. 3B)의 경우, 총호기성균수(log CFU/g)는 CA무처리에서는 0, 5 및 10일째 각각 3.52, 3.97 및 5.36이었으나 CA처리구에서는 각각 3.13, 3.44 및 5.12이었다. *E. coli*에서는 저장기간 중 0일째 CA 처리, 무처리 모두 균의 검출이 없었다. 그러나 무처리에서는 저장 5일째와 10일째는 0.9와 1.4 log CFU/g이 검출되었으며, CA처리구는 5일째와 10일째에 각각 0.7 및 1.11 log CFU/g이 검출되었다. 즉, 참가지미의 저장 중 CA 처리구는 무처리에 비하여 총호기성균수는 0.24-0.53 log cycle이, *S. aureus*는 0.3-0.471 log cycle이, *E.*

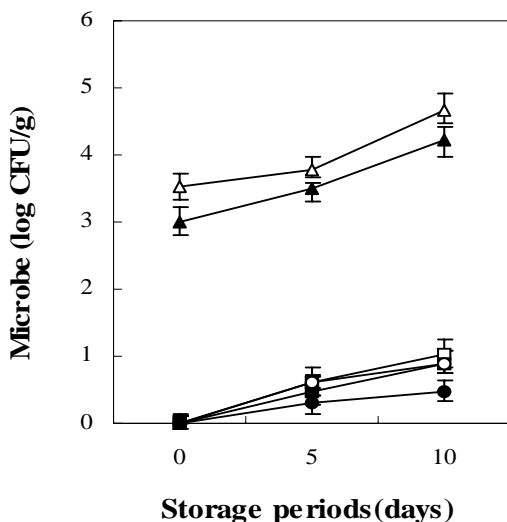


Fig. 2. Changes in number of microbe contaminated in the CA treated and vacuum packaged raw flounder with or without gill during storage at 5°C.

Values are mean±standard deviation of triplicate determination. Symbols: △: non-treatment(total aerobacter), □: non-treatment(*S. aureus*), ○: non-treatment(*E. coli*), ▲: CA treatment(total aerobacter), ■: CA treatment(*S. aureus*), ●: CA treatment(*E. coli*).

*coli*는 0.13 log cycle이 각각 낮았다. 40% 건조(Fig. 3C)시킨 경우, 총호기성균수는 CA 무처리에서는 0일째 3.52, 5일째는 3.75, 10일째는 4.98 log CFU/g이 검출되었으며, CA를 처리한 구에서는 0-10일 사이에 2.89, 3.01 및 4.54 log CFU/g가 검출되었다. *S. aureus*에서는 0일째는 CA 처리, 무처리 모두 검출되지 않았다. 그러나 CA 무처리에서는 5일째와 10일째에 각각 0.3 및 0.47 log CFU/g가, CA 처리시는 0.3-0.47log CFU/g가 검출되었다. *E. coli*에서는 0일째는 CA 처리 유무 모두 검출되지 않았다. 그러나 5 및 10일째는 무처리에서는 각각 0.3과 0.77 log CFU/g가 조사되었으며, CA처리구에서는 0.3 및 0.6 log CFU/g가 검출되었다. 즉, CA처리구는 무처리에 비하여 총호기성균수는 0.44- 0.74, *S. aureus*와 *E. coli*는 0.17 log cycle이 억제되었다. 건조도별 CA처리효과를 조사한 결과 생것은 0.13-0.53 log CFU/g, 20% 건조는 0.3-0.88 log CFU/g, 40%건조는 0.13-0.74 log CFU/g로 조사되었으며 20%건조가 CA의 항균효과가 가장 높았다. 가장 바람직한 건조도 20%건조조건에서 저장한 결과 총호기성균수는 5일째 2.57, 10일째 3.65 log CFU/g로 조사되었다. Yang과 Lee(22)는 반건 참가자미의 포장저장 실험에서 합기포장 시료는 저장 5일째 4.0×10^3 , CO₂로 충전 포장하여 5°C에서 10일간 저장하였을 때의 총균수는 6.7×10^4 로 보고하였다.

본 연구에서 CA를 처리한 20% 건조는 Yang과 Lee(10)의 보고와 비교할 때 1 log cycle 정도 높은 항균력을 보여주고 있다. 또한 일반적으로 어육의 생균수가 $10^5/g$ 이 되면 부패 초기점(Nonaka)이며 이러한 점을 고려할 때 CA처리 20% 건조는 5°C에서 10일까지는 위생적으로 안전한 것으로 판단되나 병원성미생물의 오염 방지에 대한 연구가 요망된다. Data에는 나타나지 않았으나 13일째는 미생물의 오염

도가 급격히 10^{9-10} 이상으로 상승하여 부패가 시작되었다. 이러한 상황을 볼 때 가자미를 어획한 직후 최대한 빠른 시간에 CA와 같은 천연 항균제의 처리 필요성이 요망된다.

참가자미로부터 분리한 미생물의 생육에 미치는 CA처리 효과

CA의 처리가 가자미에 오염된 미생물의 생육에 미치는 영향을 관찰하기 위하여 참가자미로부터 분리한 *S. aureus*와 *E. coli*의 colony를 채취하여 tryptic soy broth에서 배양하여 CA를 0.1%의 농도를 발육초기, 중기, 후기에 각각 첨가하여, 세균의 형태와 사멸의 변화를 광학현미경으로 관찰한 것이다. Fig. 4A는 대조구(CA 무첨가)로 *S. aureus* 균주를 접종하여 37°C에서 36시간 배양한 것으로 총균수는 5.9×10^6 이었다. Fig. 4B는 배양초기 3시간째 CA를 0.1%되게 첨가한 것이며, Fig. 4C는 배양중기(6시간째)에 CA를 0.1%되게 첨가, Fig. 4D는 배양후기(24시간째)에 CA를 0.1%되게 첨가한것이며 모두 36시간 동안 배양한 후 형태를 관찰하였다. Fig. 4B에서 보는바와 같이 세포의 형태가 CA 영향으로 괴사(화살표시)되는 것을 볼 수 있으며 세포수가 90%(Table 1)가 사멸하였다. CA를 첨가하였을 때는 aerobacter와 *S. aureus* 및 *E. coli*의 생육이 완전히 억제되었다. 그러나 가자미 표면에 CA를 처리하였을 때는 CA의 항균효과가 14-60%정도 감소되었다. 이러한 현상은 가자미 표면에서의 오염미생물은 spore의 휴면상태로 잔존할 가능성도 있다. CA 첨가는 0.1% 이상의 농도를 가자미의 표면에 처리할 경우는 떫은맛 등 가자미의 관능적 품질에 영향을 미쳤다. Fig. 4C는 *S. aureus*가 붕괴되어가는 것을 볼 수 있으나 Fig. 4B보다는 항균력이 떨어져서 *S. aureus*에서는 68%(Table 1)를 저해하였다. 그러나 배양후기에는

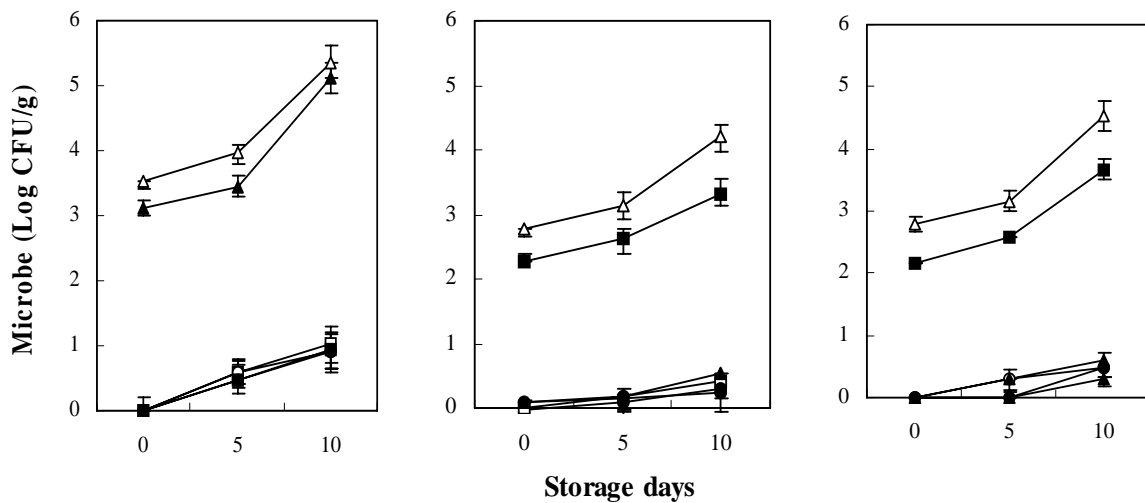


Fig. 3. Changes in number of microbe contaminated in flounder with different drying degree(A: raw, B; 20% drying, C: 40% drying) during storage at 5°C.

Values are mean±standard deviation of triplicate determination. Symbols: △; non-treatment(total aerobacter), □; non-treatment(*S. aureus*), ○; non-treatment(*E. coli*), ▲; CA treatment(total aerobacter), ■; CA treatment(*S. aureus*), ●; CA treatment(*E. coli*).

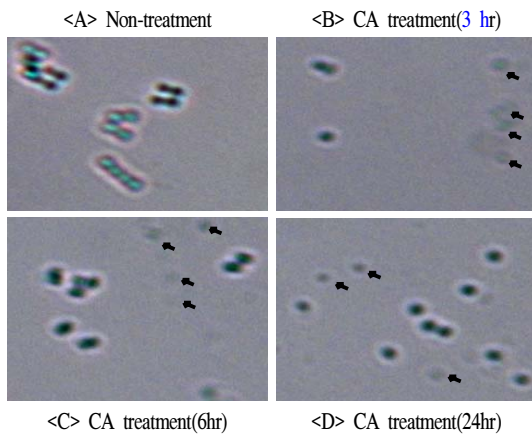


Fig. 4. Morphological characteristics($\times 400$) of *S. aureus* separated from flounder treated with 0.1% CA.

Bacteria adsorption, the cultures were fed with maintenance tryptic soy broth, to which CA were added immediately at 0.1%, and they were incubated at 37°C for 36hr. After initial incubation for 3 hr, 6hr and 24hr at 37°C CA was added to the cultures.

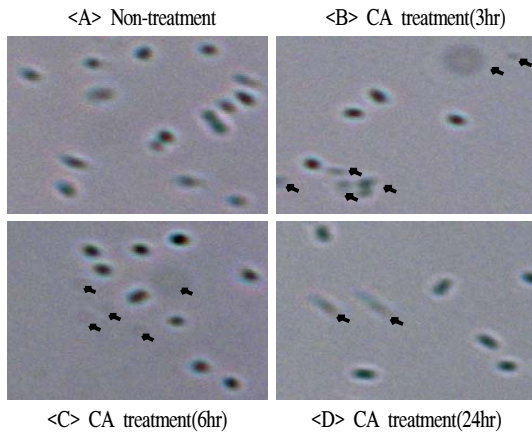


Fig. 5. Morphological characteristics($\times 400$) of *E. coli* separated from flounder treated with 0.1% CA.

Bacteria adsorption, the cultures were fed with maintenance tryptic soy broth, to which CA derivatives were added immediately at 0.1%, and they were incubated at 37°C for 36hr. After initial incubation for 3hr, 6hr and 24hr at 37°C CA was added to the cultures.

46% 정도 의 비교적 낮은 항균성을 나타내었다(Table 1). *E. coli* 는 colony를 채취하여 배양한 것을 Fig. 5A 및 Table 1에서 보는 바와 같이 5.4×10^6 의 균주가 증식하였다. Fig. 5B는 CA를 배양초기(3시간째)에 첨가하였으며, Fig. 5C는 배양중기(6시간째)에 CA를 첨가하였다. 그리고 Fig. 5D에서는 배양후(24시간째)에 CA를 첨가하여 균의 형태변화를 관찰하였다. Fig. 5B에서 보는바와 같이 세포의 형태가 CA 영향으로 괴사(화살표시)되는 것을 볼 수 있으며 세포 수가 96%(Fig. 5B 화살표 표시와 Table 1)가 사멸하였다. Fig. 5C는 *E. coli*가 붕괴되어가는 것을 볼 수 있으나, Fig. 5B 보다는 항균력이 떨어져서 *E. coli*는 75%(Fig. 5C에서 화살표 표시와 Table 1)까지 생육이 억제되었다. 배양후기에는 54%(Fig. 5D와 Table 1)의 항균성을 나타내었다. 이러

한 결과는 *E. coli*(gram negative)와 *S. aureus*(gram positive)의 생육에 미치는 chitosan(3 kDa 및 628 kDa)의 표면처리에 서 저분자의 경우는 *S. aureus*와 *E. coli*를 모두 저해하나 고분자는 *S. aureus*보다 *E. coli*의 생육을 더 크게 저해 한다는 보고(23)와 유사하다.

Table 1. Effect of CA-addition time in the tryptic soy broth after incubation on the growth of microorganisms separated from flounder

Strains	Time of CA addition (hr)			
	0	3	6	24
<i>S. aureus</i>	100	90	68	46%
<i>E. coli</i>	100	96	75	54%

Bacteria adsorption, the cultures were fed with maintenance tryptic soy broth, to which CA were added immediately at 0.1%. They were incubated at 37°C for 36 hr. Then, the yield of inactivity in the culture fluids were determined by colony formation as described under materials and methods.

요 약

참가자미의 저장 중 오염미생물(total aerobacter, *Staphylococcus aureus*, *E. coli*)의 생육에 미치는 0.1% chitosan-ascorbate (CA) 의 영향을 조사하였다. 참가자미는 아가미를 제거한 것(OG)과 제거하지 않은 것(WG), 건조도를 0%(0 D), 20% 건조(20 D), 40% 건조(40 D)로 구분하였으며 처리 후 진공 포장하여 5°C에서 10일간 저장하였다. 저장중 총호기성 균수(log CFU/g)는 OG가 WG에 비하여 0.29-0.44 log cycle이 낮았다. *S. aureus*(log CFU/g)는 CA처리구가 무처리에 비하여 0.13-0.14 log cycle이 억제되었으며, *E. coli*에서도 0.3-0.43 log cycle이 낮았다. 0 D, 20 D 및 40 D를 비교한 결과, total aerobacter, *S. aureus* 및 *E. coli* 모두 20D에서 가장 낮았으며 total aerobacter의 경우는 생것에 비하여 0.13-0.53 log cycle이 억제되었다. 건조도 20 D의 CA처리는 무처리에 비하여 0.13-0.53이 억제되었다. 40 D에서도 CA 처리는 무처리에 비하여 0.3-0.88 log cycle이 감소되었다. 참가자미로부터 분리한 *S. aureus*의 배양액에 CA를 첨가한 결과 세포가 붕괴되어 사멸해가는 것을 볼 수 있었다. 배양 초기와 중기(3-6 hr)에 CA의 첨가는 생육을 68-90% 억제하였으나 배양후기(24 hr)에는 46%가 억제되었다. *E. coli*에서는 배양초기와 중기(3-6 hr)에는 75-96%가 억제되었으며, 배양후기에는 54%가 억제되었다. 본 연구에서 CA는 *E. coli*와 *S. aureus* 모두를 저해하지만 *E. coli*의 생육이 더 크게 저해되었다.

참고문헌

1. Kim, I.S. and Youn, C.H. (1994). Taxonomic revision of the flounders (pisces: *Pleuronectiformes*) from Korea. Korean J. Ichthyol., 6, 99-131
2. Oh, S.H. and Kim, D.J. (1995) The change in content of constitutive lipid and fatty acid of pacific saury during natural freezing dry (Kwameekee). Korean J. Food Nutr., 8, 239-252
3. Hyung, K.C., Park, K.Y., Lee, S.I., Park, H.W., Kwon, H.C. and Choi, S.H. (2006) Maturity and spawning of brown sole *Pleuronectes herzensteini* (Jordan et synder) in the east sea of korea. Korean J. Ichthyol., 18, 363-367
4. Derek, S.L., Timothy, W.D., Brett, L.P. and Kevin, C.J. (2006) Oxidative stress response of European flounder (*Platichthys flesus*) to cadmium determined by a custom cDNA microarray, Mar. Environ. Res., 62, 33 - 44
5. Carter, C.G., Houlihan, D.F. and Owen, S.F. (1998) Protein synthesis, nitrogen excretion and long-term growth of juvenile *Pleuronectes flesus*. J. Fish. Bio., 53, 272-284
6. Adam, L.J., John, G., Harry, D.V., Jessica, M., Craig, S.V., and Russell. B.J. (2004) Induction of diploid gynogenesis in southern flounder (*Paralichthys lethostigma*) with homologous and heterologous sperm. Aquaculture, 237, 499-516
7. Shaban, K., Ochiai, Y., Watanabe, S. and Hashimoto, K. (1987) Quality changes in kuruma prawn during frozen and ice storage. Nippon Suisan Gakkishi, 53, 291-296
8. Ehira, S. and Uchiyama, H. (1974) Fresh-lowering rates of cod and sea breams viewed from changes in bacterial count, total volatile base and trimethylamine nitrogen and ATP related compounds. Bull. Japan. Soc. Sci. Fish., 40, 479-487
9. Park, C. S. and Choi, K.H. (1997) Changes in the freshness of frozen-thawed fish fillet during cold storage. Korean J. Food Nutr., 10, 553-558
10. Yang, S.T., Lee, H.S. (1999) Shelf-life extension of semi-dried right-eyed flounder using modified atmosphere packaging. Korean J. Food Sci. Technol., 31, 712-789
11. Muzzarelli, R.A.A., Tanfani, F. and Emanuelli, M. (1984). Chelating derivatives of chitosan obtained by reaction with ascorbic acid. Carbohydr. Polym., 4, 137-151
12. Fuji, T. (1995) Advantages of modified atmosphere packaging and its history (in Japanese). Nippon Suisan Gakkaishi, 61, 89-90
13. Yang, S.T. (1999) Preparatipn of seasoned and semi-dried right-eyed flounder and quality of its product during storage. Korean J. Life Sci., 9, 44-49
14. Kifune, K. (1991) Clinical application of chitin artificial skin advances on chitin and chitosan, Proc. of 5th International Conference on Chitin and Chitosan, Princeton, NJ, USA
15. Kim, S.D. (2007) Preparation of chitosan-ascorbate power and its containing products enhanced with antioxidant activity, antimicrobial, and heat and pH stability, Korean Patent, No. 10-0711109
16. Hwang, H.Y., Rhim J.W. and Nam, S.Y. (2005) Functional chitosan membranes for pervaporation, J. Chitin Chitosan, 10, 179-191
17. Kim, O.S., Choi, Y.S., Yim., M.J. and Cho, S.Y. (2005) Effect of native and degraded chitosan on keeping quality of the steamed scallop adductor muscle. J. Chitin Chitosan, 10, 221-225
18. Yang, B.G., Lee, J., Kim, S.H. and Jeon, Y.J. (2004) Antimicrobial effect of chitosan and chito-oligosaccharides against bacterial diseases of cultured flounder. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 33, 236-243
19. Oh, S.H., Jung, Y.K., Kim, S.H and Kim, S.D. (2007) Quality characteristics of sliced raw-fish washed by different methods durin storage. Korean J. Food Preserv., 14, 571-577
20. Lee, S.B., Lee, Y.K. and Kim, S.D. (2006) Solubility, antioxidantive and antimicrobial activity of chitosan-ascorbate. J. Korean Soc. Food Sci. Nutr., 35, 973-986
21. Herbert, A. and Joel, L.S. (1993) Sensory evaluation practices. 2nd Ed. Academic Press, USA, 68-75
22. Nonaka, J., Hashimoto, H., Takabashi, H. and Suyama, M. (1971) Freshness determination method of fish and shellfish. In seafood science (in Japanese), Koseishow Koseigak, 72-77
23. Eaton, P., Fernandes J.C., Pereira, E., Pintado, M.E. and Xavier, M.F. (2008) Atomic force microscopy study of the antibacterial effects of chitosans on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. Ultramicroscopy, 108, 1128 - 1134