

## 魚肉의 K值와 核酸 關聯 物質의 分解 酵素에 關한 研究, -I

金俊平·金鍾培\*·朴一雄\*\*

中央大學校 産業大學 食品加工學科

\* 群山水產專門大學 水產加工學科

\*\* 群山開放大學 食品營養學科

(1988년 1월 14일 접수)

### Studies on K-value and Nucleotides-Degrading Enzymes in Fish Muscle, -I

June-Pyung Kim, Jong-Bae Kim\* and Il-Woong Park\*\*

*Dept. of Food Science and Technology, College of Industry, Chung Ang University, Seoul, 156-756, Korea*

*\*Dept. of Fisheries Processing, Kunsan National Fisheries Junior College, Kunsan, 573-400 Korea*

*\*\* Dept. of Food and Nutrition, Kunsan Open University, Kunsan, 573-400, Korea.*

(Received January 14, 1988)

#### Abstract

Estimation of fish freshness is very important in food industries, it was estimated from the concentration of nucleotides, ammonia, amines and volatile acids in fish meat. Changes in the K-values of 12 species of fish were observed during storage at 0°C. The range of differences in the K-value-increasing rate of chilled fish muscle among fish species might be wider for white-fleshed fishes than for dark-fleshed fishes. As to the 12 species of fish examined, the coefficient of correlation between them was calculated to be 0.77. The fish muscle will be contained an effective inhibitor of IMP-degrading enzymatic activity.

#### 緒 論

1980年代 韓國人이 1人 1日 攝取하고 있는 蛋白質은 67.4g이고 이중 動物性 蛋白質이 22.0g으로서 이들 動物性 蛋白質중 魚貝類 및 水產加工品이 차지하는 比重은 약 30% 程度이다.<sup>1)</sup> 最近 流通構造의 改善과 食文化의 發達로 우리나라 全域에 걸쳐 生鮮회 및 各種 加工品 또는 調味料로서 魚類를 利用하는 方法이 多樣해졌고 長壽 및 健康食品으로서의 利用도 增加하고 있어, 魚類加工의 産業技術 뿐만 아

니라 魚類의 食品化學의 研究分野의 發展에 加速의 인 影響을 미치고 있는 것으로 생각된다.<sup>2,5)</sup> 魚筋肉 Ex分(Extractives; 熱抽出物)에 있어서 風味 增進 및 成分에 關한 化學的 研究과 그들 筋肉의 化學的 性質에 關한 關聯 研究가 最近 發展되어 왔고 이런 分野에 있어서 研究되고 있는 魚類 筋肉 中の 代表的인 成分의 하나는 核酸 關聯物質이다.

잘 알려진 바와 같이 魚肉中の ATP는 死後 酵素의 作用을 받아 分解되고 IMP를 經유하여 HxR (inosine) 및 Hx(Hypoxanthin)으로 變한다. 이 變

化에 있어서 IMP의 磷酸 ester가 加水分解된 反應은 呈味成分의 손실뿐만 아니라 鮮度에 직접적인 影響을 주고 現在 이에 關한 研究가 많이 發表되었다.<sup>6)</sup>

Saito 등은 食事의 質과 魚類 筋肉에 있어서 脫磷酸이 되는 % 사이에 밀접한 關係를 證明하였고 그것은 K值이다.<sup>7)</sup> 또한 魚肉貯藏 中の 品質의 劣化에 關하여 核酸關聯 物質의 分解에 關한 報問이 發表되었고,<sup>8)</sup> IMP의 脫磷酸은 魚類 筋肉의 自己分解의 活性에 의존해 貯藏中의 重要하고도 官能的으로 感知할 수 있는 變化로 알려져 있다.

그러나 魚類 筋肉의 nucleotide-degrading 酵素의 活性에는 거의 注意를 기울이지 않고 있는 實情이다.

本 實驗에서는 魚類 筋肉에 있어서 K值의 增加率 및 IMP 分解酵素의 活性에 關한 情報를 얻고 IMP 分解酵素의 몇가지 性質에 있어서 魚類 사이의 特別한 差異點에 關하여 檢討하고자 하였다.

## 材料 및 方法

### 1. 試料

농어 Sea-bass (*Lateolabrax japonicus*), 광어 Bastard (*Paralichthys olivaceus*), 도미 Red-sea bream (*Chrysophrys major*), 민어 Croaker (*Nibea imbricatus*), 붕어 Crusian carp (*Carassius carassius*), 승어 Mullet (*Mugil cephalus*), 갯장어 Sea eel (*Muraenesox cinereus*), 가물치 Snake head (*Channa argus*), 말쭉치 File fish (*Navodon modestus*), 삼치 Spanish mackerel (*Scomberomorus niphonius*), 꽁치 Saury (*Cololabis saira*), 고등어 Mackerel (*Scomber japonicus*) 등 12種의 魚類를 活魚 또는 아주 新鮮한 市販品을 購入하거나 特別히 產地로부터 購入하여 前報<sup>9)</sup>와 같이 fillet 하고 冷却된 1.5% NaCl 溶液으로 씻고 닦아낸 후 polyethylene bags (0.3mm × 30 cm × 45 cm)에 包裝하여 碎氷을 채운 密封容器에 넣어 貯藏하고 매일 溫度 유지와 녹은 얼음으로부터의 汚染을 防止하기 爲해 얼음을 再供給하였다.

### 2. K值의 測定

前報<sup>9)</sup>와 같은 方法으로 抽出, 定量하고 이와 併

行하여 北田<sup>10)</sup>의 HPLC 方法을 施行하였다.

### 3. IMP 分解活性和 P-NPP (P-nitrophenyl phosphate) 分解의 測定

魚肉을 3倍量의 蒸溜水에 5分間 均質化 시키고 (10,000 rpm) 얻어진 均質物과 이 均質物을 10,000 × g에서 30分間 遠心分離하고 얻어진 上層液을 各 各 cellulose-tube (Visking Co)에 넣어 4°C에서 脫이온 水에 對하여 충분히 透析하고, 內部 부유물을 酵素의 反應 試驗에 試料로 使用하였다.

分解活性的 測定을 爲해 筋肉 均質物 即, 위의 抽出 酵素 試料液 1ml, 2.5ml의 0.01M-veronal-acetate buffer와 0.5ml의 40mM IMP 또는 P-NPP 등의 混合物를 몇개의 條件下에서 施行하고 8% TCA 溶液 2ml를 加하여 反應을 停止시켰다.<sup>11)</sup>

濾過後, 濾液의 一定量을 取해 反應時에 遊離된 無機磷酸은 IMP 分解活性的 爲해 youngburg-youngburg 方法<sup>12)</sup>에 의해 定量되었다.

P-NPP 分解活性的 爲해 反應後 0.2N NaOH 1ml를 加하여 反應을 停止시키고 純水를 加하여 5ml로 定容후 遊離된 p-nitrophenyl 量을 400m $\mu$  吸光度로부터 求하였다.<sup>13)</sup>

## 結果 및 考察

### 1. Ion exchange와 HPLC에 의한 chromatogram

Ion exchange 에 의한 chromatogram과 HPLC 에 의한 chromatogram은 各 各 Fig.1, Fig.2 와 같다. Fig.1, Fig.2에서 分劃된 各 化合物의 回收率은 95.8~101.4%, 94~102%로써 比較的 만족한 結果를 얻었으며 HPLC에 의한 迅速定量 方法은 IMP의 分離가 조금 나빠졌고 Ion-exchange chromatography 보다 높은 溫度에서 測定하여 回收率은 떨어졌으나 retention time은 ion-exchange chromatography의 3時間보다 훨씬 짧은 25分 정도였다.

### 2. 0°C貯藏中 血合肉과 普通肉의 K值의 變化

新鮮한 고등어肉을 0°C에서 貯藏하고 K值를 測定한 結果는 Fig.3과 같다.

普通肉은 貯藏 0日에서 2.3%, 4日에서 16.2%

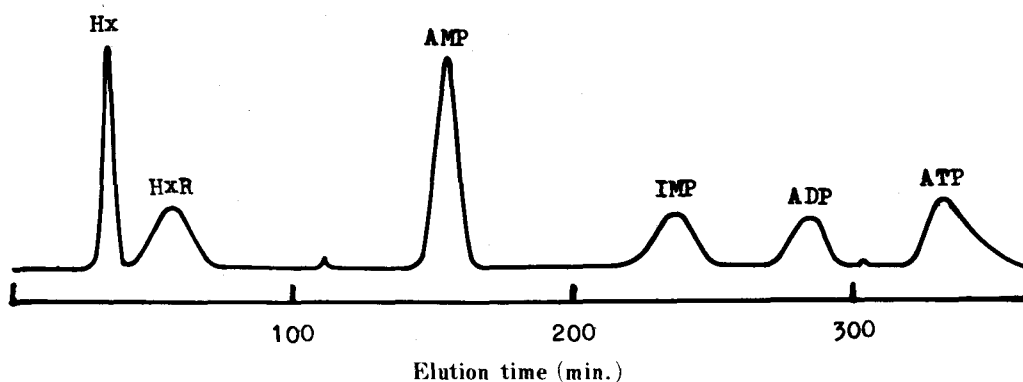


Fig. 1. Chromatogram of ATP related standard compounds. Separation of authentic Hx, HxR, IMP, AMP, ADP, and ATP. A mixture was separated on AG 1×4 (Cl) column by concave gradient elution at a flow rate of 1ml/min. Abbreviations are as follows; Hx: hypoxanthin, HxR: inosine, IMP: inosine monophosphate, AMP: adenosine monophosphate, ADP: adenosine diphosphate, ATP: adenosine triphosphate.

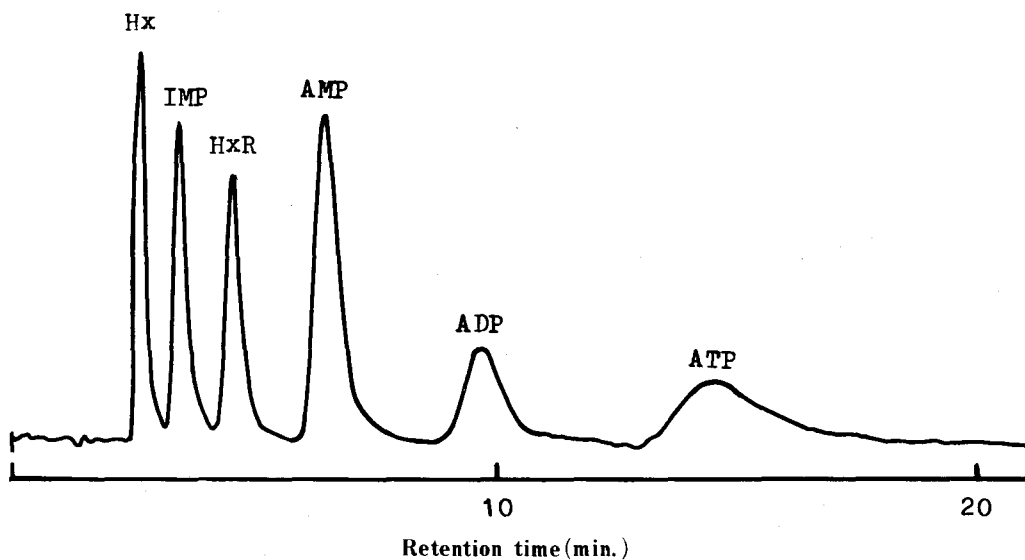


Fig. 2. High performance liquid chromatogram of authentic mixture of ATP and its related compounds.

Condition; Column: u-Bondapack  $C_{18}$  (3.9 mm id×30cm)

Mobile phase: 1% triethylamine phosphoric acid (pH6.5)

Flow rate: 0.8ml per min. Detector: UV detector (254nm)

Sample size: 5 $\mu$ l Temp: 5 $^{\circ}$ C AUFS: 0.32

로써 거의 직線的으로 氷藏日數에 比例하는 緩慢한 增加를 보여 鮮度判定 指標로써 比較의 良好한 便이며, 血合肉은 貯藏 1日에 73%로써 內山等<sup>14)</sup> 이 報告한 初期腐敗 60%를 넘어 鮮度判定으로써 부적당한 것으로 思料된다.

그러나 一般的으로 붉은살魚에서 血合肉이 차지하는 比率는 31.1~0.5%로 그 含量이 比較的 적은 便이므로 K값으로써 魚肉全體의으로 鮮度判定에는 지장이 없을 것으로 思料된다.

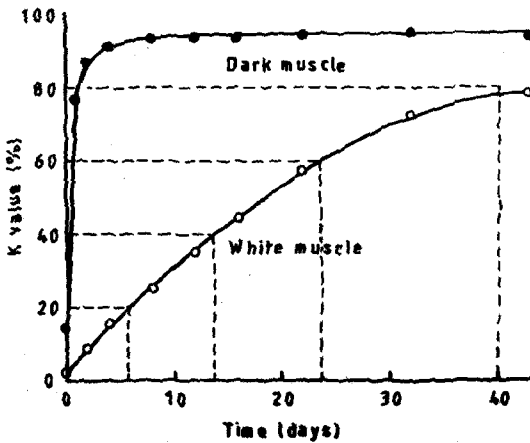


Fig. 3. Changes of K-value of the mackerel during storage at 0°C.

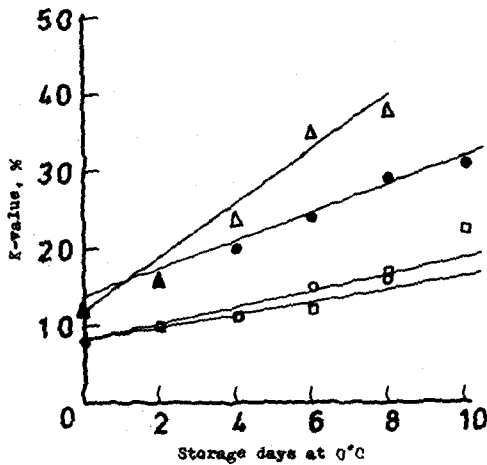


Fig. 4. Changes in K-value of various fishes during storage at 0°C.

□—□ Sea-bass      ○—○ Red-sea bream  
 ▲—▲ Bastard      ●—● Croaker

### 3. 0°C貯藏中 여러 魚肉의 K值의 變化

Fig. 4, 5, 6에 흰살魚肉과 붉은살魚肉의 0°C貯藏中 K值의 變化를 表示하였다.

실제 직線的으로 增加하지는 않았으나 魚種間의 比較를 爲해 直線으로 곳고 경사로부터의 變化速度,

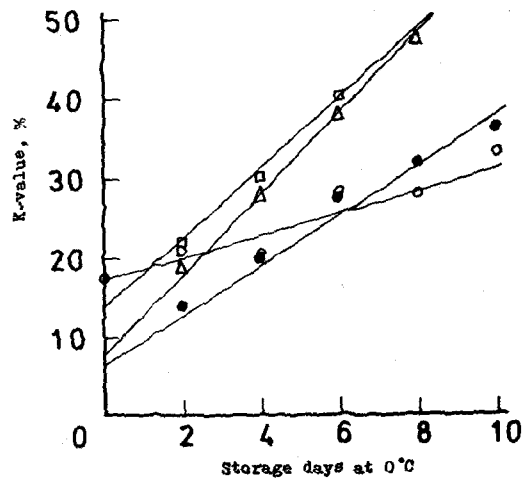


Fig. 5. Changes in K-value of various fishes during storage at 0°C.

□—□ Sea eel      ○—○ Mullet  
 ▲—▲ Crucian carp      ●—● Snake head

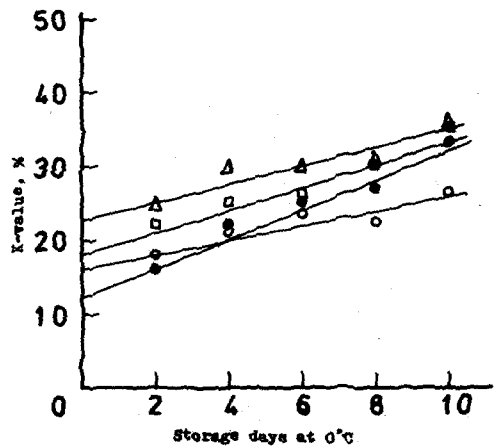


Fig. 6. Changes in K-value of various fishes during storage at 0°C.

□—□ Mackerel      ○—○ Saury  
 ▲—▲ File fish      ●—● Spanish mackerel

즉, Fig. 4, 5에서 흰살魚肉의 K值의 變化는 약 1 ~ 10%, Fig. 6에서 붉은살魚肉의 K值의 變化는 약 1.5 ~ 4.2%로써 대부분의 魚種은 貯藏期間에 比例하여 K值의 增大가 점차 加速化되는 경향을 나타내었고, K值의 變化速度 比, 즉, 最低速度와 最高速度의 比는 흰살魚는 약 10배, 붉은살魚는 약 3배로서 低溫貯藏中 魚種에 따라 筋肉의 K值의 增加率에 있어서 差異의 範圍는 검은살 魚類보다 흰살 魚類가 넓을 것이라는 內山의 假定과 잘 一致한다.<sup>15)</sup>

4. 魚肉의 K值에 미치는 IMP分解酵素의 影響

K值의 變化를 支配하는 要因이 魚種에 따라 다른지는 확실치 않다. K值의 上昇이 급격한 魚類의 抽出液을 K值의 上昇이 緩慢한 魚肉에 加하여도 K值의 變化는 아무런 影響을 받지 않는다<sup>16)</sup>는 Ehira等의 報告와 같이 ATP 關聯 化合物의 分解에 關하여

는 酵素活性의 強弱만으로도 說明되지 않는다.<sup>16)</sup> 그러나 磷酸基를 가지지 않는 HxR에서는 魚種間의 特異성이 없다.<sup>15)</sup> 잘 알려져 있는 것과 같이 adenosine nucleotide의 含量은 漁獲 혹은 即殺時의 苦痛에 強한 影響을 받고, 그 含量의 多小에 關係없이 약 3日 정도에 모두 消失된다.<sup>15)</sup>

本 實驗에서도 위에 언급한 魚種들 사이의 K值 增加率에 있어서 그 差異를 說明할 目的으로 IMP 分解酵素 活性들을 homogenate에 對하여 0°C, PH 6.0에서 測定하였다. homogenate를 遠心分離하여 얻어진 上清液에 對하여도 같은 方法으로 活性를 測定하고 兩 酵素活性의 比, 즉, IMP 分解酵素의 抽出率을 算出하고 그 結果를 Table 1에 나타내었다.

抽出率은 30~86%로 魚種間에 差異가 있다. 魚種中의 IMP 分解에 5'-N tase (5'-nucleotidase)와 P mase (phosphomonoesterase)가 關여하고 있고

Table 1. IMP-degrading enzymatic activities in various fish muscles and their extractabilities.

No.	Species of fishes	IMP-degrading enzymatic activity ( $\mu\text{g Pi/day/g}$ , at 0°C)		Extractability (B)/(A), %
		Muscle homo genate (A)	Muscle extract * (B)	
1	농어 (Sea-bass)	47	16	34.04
2	광어 (Bastard)	78	30	38.46
3	도미 (Red-sea bream)	40	14	35.00
4	민어 (Croaker)	71	28	39.44
5	붕어 (Crusian carp)	117	101	86.32
6	숭어 (Mullet)	50	20	40.00
7	갯장어 (Sea eel)	140	74	52.86
8	가물치 (Snake head)	121	89	73.55
9	말퀴퀴 (File fish)	110	47	42.72
10	삼치 (Spanish mackerel)	90	27	30.00
11	꽂치 (Saury)	54	20	37.03
12	고등어 (Mackerel)	61	22	36.06

\* Muscle extract was prepared by centrifugation of muscle homogenate at 9000×g for 20min

5'-N tase가 잉어에서는 特定の 細胞顆粒, 膜의 性狀, 5'-N tase나 P Mase의 含有比率에 差異가 있을 것으로 推料된다.<sup>11)</sup> homogenate로부터 定量된 活性은 40~140  $\mu\text{g, Pi/g/day}$ 로써 魚種에 따라 약 3.5

배의 差가 있으며 대부분 K值의 變化速度가 큰 魚種은 本 酵素活性도 큰 傾向이 있으며 分散分析의 F 값은 14.39로써 K值의 變化速度와 本 酵素活性間의 相關係數는 0.77이었으며 이는 1%에서의 F值

가 10.04로서 高度의 有意性이 認定되었다. 그러므로 이 結果는 貯藏中 魚肉에 있어서 K值의 增加率은 魚肉의 IMP 分解酵素 活性에 의해서 주로 調節

되어 진다는 것을 가르킨다. 또한 K值의 變化率과 IMP 分解酵素 活性과의 關係는 Fig.7, Table 2와 같다. Fig.7에서의 點線은 回歸直線이 아니고 原點

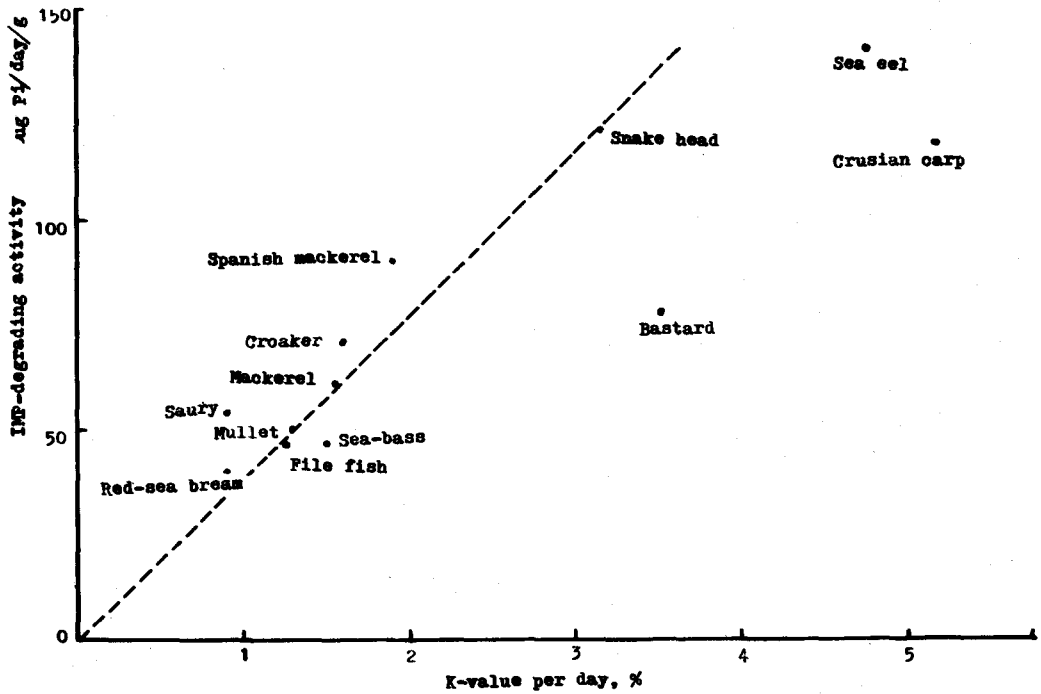


Fig. 7. Relationship between K-value increasing rates and IMP-degrading activities in various fish muscles at 0°C.

Table 2. Value in changing rate of the K-value and enzy-matic activities of the muscle homogenate during storage at 0°C.

No	Species of fishes	Changing ratio of the K-value	Enzymatic activity
1	농어 (Sea-bass)	1.50	47
2	광어 (Bastard)	3.50	78
3	도미 (Red-sea bream)	0.85	40
4	민어 (Croaker)	1.60	71
5	붕어 (Crusian carp)	5.15	117
6	송어 (Mullet)	1.30	50
7	갯장어 (Sea eel)	4.75	140
8	가물치 (Snake head)	3.15	121
9	말쥐치 (File fish)	1.25	110
10	삼치 (Spanish mackerel)	1.90	90
11	꽁치 (Saury)	0.90	54
12	고등어 (Mackerel)	1.55	61

을 通하고 이들 點들을 兩分하게끔 하는 線이고 이 點線의 勾配는 K值의 變化速度와 本 酵素 活性과의 平均的인 比를 나타내는 것으로 된다. 대체적으로 K值의 變化速度가 적은 魚種에서는 點이 전부 點線보다 왼쪽에 있고 이것은 比較的 낮은 K值의 增加率을 가진 魚類는 K值의 變化速度와 IMP의 分解酵素 活性比가 平均値보다 큰 것이고, 이것은 보다 낮은 K值의 增加率을 가지는 魚類에서의 IMP의 分解酵素的 活性이 더 큰 K值의 增加率을 가지는 魚類에 있어서 보다 어떤 알려지지 않은 mechanism에 의해 더욱 強하게 抑制되고 있는 것을 나타낸다.

5. IMP分解酵素的 pH에 關한 影響

畜肉이나 魚肉 抽出物의 IMP 分解酵素 活性의 pH 活性曲線들은 아주 複雜한 形態를 보이고 이들 筋肉

에 있어 IMP 分解에 關與하는 酵素는 두 種類 以上의 存在를 暗示하고 있다.<sup>13,17,18,19)</sup> 그러나 魚肉에 있어 IMP 分解酵素들의 分布에 關한 情報은 아직 充分치 못하다.

12 種의 魚肉에 있어 IMP 分解酵素의 活性에 미치는 pH 影響을 pH 3~11의 範圍에서 調査한 結

果는 Fig.8 과 같다.

이 역시 아주 複雜한 形狀을 나타내고 있으나 대개 3~4 가지 型으로 大別되고 3~11의 pH 領域에서 pH 活性曲線의 形狀들은 서로 아주 비슷하고 대부분 pH 5~7 範圍에서 活性 peak를 보이고 있으나 가물치의 경우는 弱알카리성인 pH8 附近에서

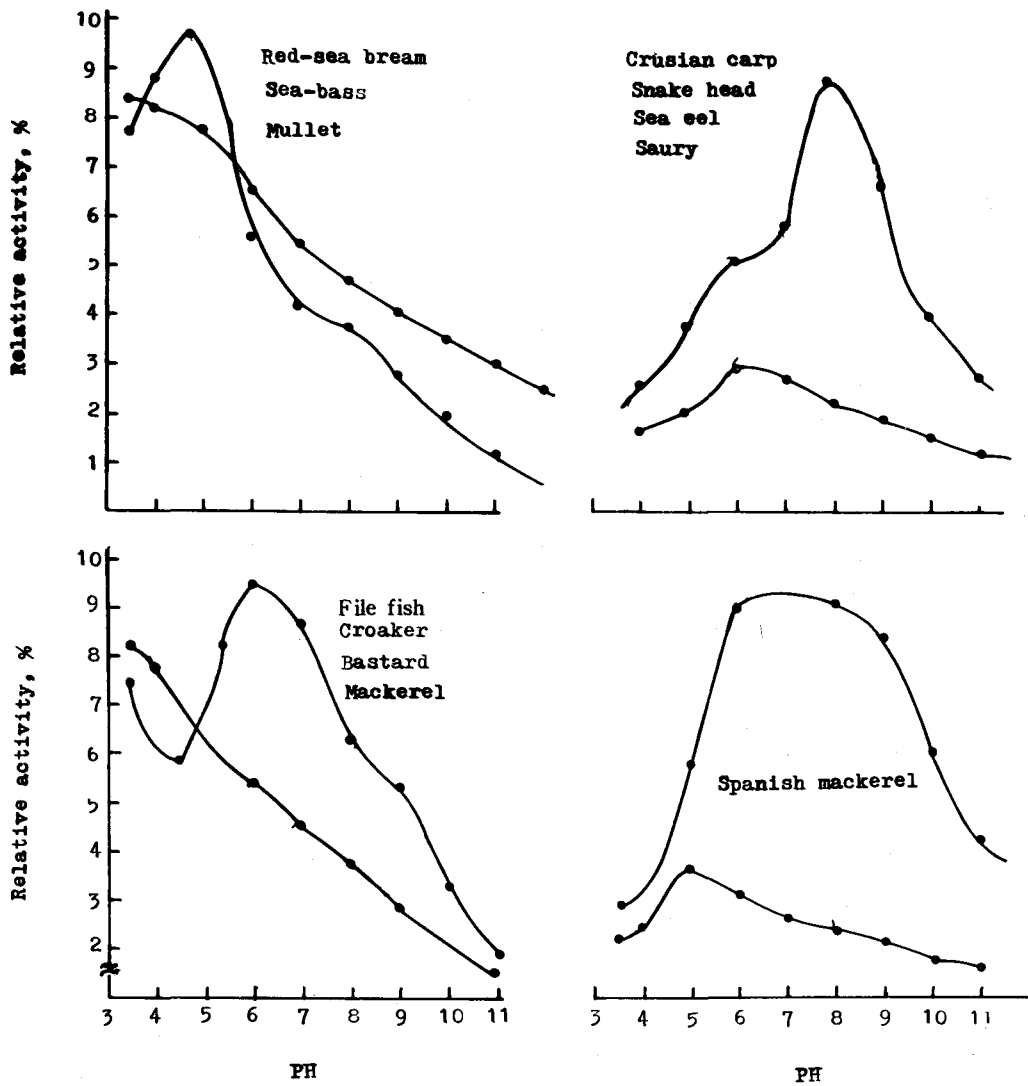


Fig. 8. Effect of pH on IMP and p-NPP degrading enzymatic activities of muscle homogenates.

- : IMP-degrading activity
- : p-NPP-degrading activity  $P_i/\mu\text{mol/ml}$

강한 활성을 보이고 있다.

도미, 농어, 송어는 pH 4~5 사이에서 가장 강한 활성을 가지나 알카리 쪽으로 갈수록 활성이 약해지고, 고등어, 말쥐치, 민어, 광어는 pH 6 附近에서 강한 활성을, 꽁치, 갯장어, 가물치, 붕어는 pH 8 附近의 弱알카리성에서, 삼치는 弱酸性에서 極大值를 보이는 것 같으나 확실치 못하다.

이와 같이 魚肉 中の IMP 分解에 關한 酵素의 pH 活性曲線은 魚種에 따라 다르고 複雜한 形態를 나타내고 있는 것은 抽出物에 含有된 不純物의 影響이 야닌가 思料된다.

5'-Nucleotides 의 脫磷酸(dephosphorylation) 에 關與하는 酵素로써는 alkaline phosphatase 인 (EC 3.1, 3.1), acid phosphatase 인 (EC 3.1, 3.2), 그리고, 5'-Nucleotidase 인 (EC 3.1, 3.5) 등이 있다.

한편 P-NPP 分解酵素의 活性은 Fig. 8에서와 같이 alkali 領域에서 매우 낮다. 그러므로 魚肉에서 IMP 脫磷酸 活性을 가지는 酵素들은 acid-phosphatase 와 5'-Nucleotidase 라고 생각된다. Fig. 8에서 본 바와 같이 IMP 分解를 爲해 pH 活性 curve의 形狀에서 特別한 差異는 acid-phosphatase 에 對한 5'-Nucleotidase 의 活性率과 이들 酵素들의 性質에 있어 特別한 差에 起因한다고 생각된다. 試驗된 試料들에 있어서도 IMP 分解 活性은 대체로 6보다 더 높은 領域에서 P-NPP 分解活性 보다 一般적으로 높다. 대구肉의 5'-N tase는 pH 7.6<sup>20)</sup> 잉어肉의 5'-N tase는 pH 7.5에서 最大值를<sup>11)</sup> 를, 다랑어의 5'-N tase는 Mg<sup>2+</sup> 存在下에서 pH 5.5~6.0 에 左右對稱形의 약간 複雜한 pH 活性曲線을 나타내지만 Fig. 7과 같이 넓은 pH 領域에서 活性을 나타내는 것은 없다.<sup>21)</sup> 방어나 도미의 筋肉抽出液의 P Mase 活性(合成基質 p-Nitrophenyl 磷酸)의 至適 pH 가 4.5~5.0 인 것 등을 생각하면<sup>22)</sup> 5'-N tase는 生體中에 넓게 存在하며 또한 各種 磷酸 ester 類에 作用하는 P Mase 가 IMP 分解에 一部 關與하고 있으므로 IMP 分解酵素의 pH 活性曲線이 魚種마다 다르고 複雜한 것은 5'-N tase 나 P Mase 의 量的, 質的, 存在樣式이 魚種에 따라 다르기 때문으로 생각되며 Table 3에서, 肉 均質物에서의 IMP 分解活性은 ADP의 添加에 의해 相當히 抑制되고 ADP는 5'-Nucleotidase 의 效果的인 阻害劑라고 생각된다.

Table 3. Effect of ADP on IMP and P-NPP degrading activities of snaked head muscle homogenate.

pH	IMP-degrading activity (Pi, μmol/ml)		P-NPP degrading activity (Pi, μmol/ml)	
	Control	+0.5ml ADP	Control	+0.5ml ADP
5.0	2.1	1.32	1.7	1.8
6.0	4.2	1.13	0.8	0.9
7.5	4.4	0.70	0.3	0.4

## 要 約

12種의 活魚 또는 新鮮魚의 筋肉에 있어서 K值의 增加率 및 IMP 分解酵素의 活性에 關한 實驗結果는 다음과 같다.

1. K값은 붉은살魚보다는 흰살魚의 鮮度判定 指標로서 適當하나 赤身魚라도 血合肉의 含量이 0.5~31%이므로 支障이 없을 것으로 思料된다.
2. K값의 變化速度와 IMP 分解酵素 活性間의 相關係數는 0.77이며 高度의 有意성이 認定된다.
3. 魚肉內에는 IMP 分解酵素 活性의 阻害劑가 內在할 것으로 思料된다.
4. IMP에 對한 pH 活性曲線은 魚種에 따라 다른데, 이것은 5'-N tase 나 P Mase 의 量的, 質的, 存在樣式이 魚種에 따라 다르기 때문이라 생각된다.

## 參考文獻

1. 보사부: 국민영양조사, 48~79 (1984).
2. Jones, N.R. and Murray, J.: *J. Biochem.*, 77, 567~575 (1960).
3. 新井健一·齊藤恒行: *Bull. Fac. Fish. Hakkai-do Univ.*, 13, 193~199 (1963).
4. Bung-Orn, Kassemarn., Sanz, Perez, B., Murray, J. and Jones, N.R.: *J. Food. Sci.*, 28, 28~37 (1963).
5. 小林邦男: *日本水産學會誌*, 32(2), 166~170 (1966).
6. 齊藤恒行: *日本水産學會誌*, 27(5), 461~470



- (1961).
7. Saito, T., Arai, K and Matsuyoshi, M.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 24, 749~750(1959).
  8. 内山均・江平重男: *日本水産學會誌*, 36(9), 977~992(1970).
  9. Kim, J.B., Murata, M and Sakaguchi, M.: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 53(1), 159~164(1987).
  10. 北田善三・佐佐文美智子・谷川薫・直井裕・福田忠明・加藤善規・岡本一郎: *日本食品衛生學會誌*, 24(2), 225~229(1983).
  11. 山本喜男・遠藤金次・門脇蓉子・岸田比出子: *栄養と食糧*, 19, 385~389(1967).
  12. 赤堀四郎: *酵素研究法* 2卷, 朝倉書店, 東京, 44(1956).
  13. 戸田準・澤田辛七・中谷弘實・和田正三・藤田榮一郎: *栄養と食糧*, 18, 210~213(1965).
  14. 内山均・江平重男・小林宏・清水亘: *日本水産學會誌*, 36(2), 177~187(1970).
  15. 日本水産學會: *白身の魚と赤身の魚肉の特性*(恒星社 厚生閣, 東京), *水産學シリーズ*, 13, 78~92(1976).
  16. Ehira, S and Uchiyama, H: *Bull. Japan, Soc Sci. Fish.*, 40(5), 479~487(1979).
  17. Hirota, N: *Bull. Japan. Soc. Sci. Fish.*, 39, 1271~1278(1973).
  18. 戸田準・中谷弘實・石井清文・藤田榮一郎: *栄養と食糧*, 18, 60~62(1962).
  19. 戸田準・中谷弘實・石井清文・藤田榮一郎: *栄養と食糧*, 18, 63~65(1965).
  20. Tarr, H. L. A., Gardner, L. J and Ingram, P.: *J. Food Sci.*, 34, 634~637(1969).
  21. 宏田望: *日本水産學會誌*, 39(12), 1279~1283(1973).
  22. Endo, K., Osaka, N., Nakabe, K and Yamamoto, Y.: *Res. J. Living, Sci. Sci.*, 15, 1~4(1968).