

## 수산가공공장 폐액의 등전점 침전처리에 의한 유용성분 재회수 이용

### 1. 고등어 육 고기풀 제조시 발생하는 폐액의 처리장치 개발

서재수 · \*조순영 · \*\*손광태 · \*\*조호성 · \*\*이응호

고신대학 식품영양학과  
강릉대학교 식품과학과  
부산수산대학교 식품공학과

## Recovery and Utilization of Proteins and Lipids from Washing Wastewater in Marine Manufacture by Isoelectric Point Precipitation Method

### 1. The Coagulation Treatment for Washing Wastewater of Minced Mackerel Meat

Jae-Soo Suh, \*Soon-Yeong Cho, \*\*Kwang-Tae Son, \*\*Ho-Sung Cho and \*\*Eung-Ho Lee

Department of Food and Nutrition, Kosin University, Pusan 606-701, Korea

\*Department of Food Science, Kangnung National University, Kangnung 210-702, Korea

\*\*Department of Food Science and Technology, National Fisheries University of Pusan, Pusan 608-737, Korea

#### ABSTRACT

A lot of water soluble proteins and lipids are released from minced mackerel meat and lost into the washing waste during the leaching process of Kamaboko or surimi manufacture. The removed proteins and lipids are not only an edible things but also a big burden for treating the wastewater. In order to recover the proteins from the effluent and to use as food stuff, the "pH-shifting" treatment, a modified isoelectric point precipitation method, was tried. This method is based on a myogen-aggregation phenomenon, which occurs when a solution of sarcoplasmic proteins is acidified or alkalinized beyond the critical pH zone of 2~3 or 12~13 respectively and then neutralized. The maximum amount of precipitation was obtained by shifting the pH of the wastewater from original pH to isoelectric point (pH 4) or alkali pH 12 and then changing to neutral pH. The precipitates were easily collected by filtration or centrifuging at 10,000rpm. The oils which were only floating in the washing wastewater are easily recovered by separating with oil separator after pouring. The recovered proteins were slightly denaturated during this pH shifting precipitation process, while the composition of amino acids was good balance as a food.

#### 서론

날로 심각해져 가는 하천오염의 주범으로 여러 요

인이 생각되어지나, 지역에 따라서는 수산가공공장  
에서 나오는 폐기물이나 폐액도 상당한 비중으로 원  
인 제공을 하고 있다. 특히 냉동어육 고기풀과 수산

연제품제조시 필수적으로 해야 되는 수세공정중에 다량의 엑스성분과 수용성단백질(筋形質단백질) 및 일부 지방성분이 수세폐액과 함께 유실되어 자원이 용의 면뿐만 아니라 폐수처리의 면에서 심각한 문제점으로 대두되고 있다. 또한, 조미실 오징어 가공품, 황태(동결건조명태), fish block 등의 제조시의 수세폐액도 문제이다. 그런데, 아직 수산가공공장 폐액 특성에 맞춘 폐수처리장치가 개발되지 못해 실제 수산가공공장에선 기존 활성오니에 의한 생물학적 처리를 근간으로 하는 일반 폐수처리 장치를 그대로 도용해 쓰고 있어 그 효과나 유용성에 상당한 문제점을 안고 있다. 본 생물학적 처리방법은 폭기시설을 위해 넓은 면적의 반응조를 필요로 하는 단점이 있으나 화학적 처리법은 보통 상대적으로 작은 면적으로도 충분히 처리해 낼 수 있다. 그래서, 보통의 수산가공공장 폐액내에 거의 대부분을 차지하는 용출수용성단백질의 효율적인 회수가 수산가공공장 폐액처리의 관건이라 생각되는데 이를 위해 이미 각종 응집제를 이용하는 방법(1-3)이나 전기분해처리법(4, 5) 등 화학적 처리법이 시도되거나 실제 행해지고 있다. 그러나 사용하는 응집제에 식품위생상의 문제가 있어 회수단백질을 유효하게 이용하지 못한 채 비료화 내지는 폐기하고 있는 실정이며, 사용 고분자응집제 등이 고가라 운영상의 문제점도 심각하다.

물에 용해된 단백질의 용해도를 낮춰 응집침전시키는 간단한 대량처리법으로서 각 단백질의 등전점 pH 부근에서 용해도가 극도로 낮아진다는 원리를 이용한 등전점 침전법이라는 것이 있다. 본 단백질 침전방법은 단지 염가의 수산화나트륨과 염산만 있으면 된다는 장점은 있으나 다만 용해도만 떨어뜨릴 뿐 다시 응집시켜 침전하게 하기 위해 반나절 정도 더 저온실에 방치하고 나서 원심분리해야 하는 등 장시간의 시간이 소요되는 최대 단점이 있다(6). 이의 해결책으로서 西岡와 志水(7, 8)가 어류의 근형질단백질(일명 수용성단백질)액 pH를 일단 4 이하의 산성 또는 11 이상의 알칼리성으로 하고 나서 중화하는 pH이동처리법에 의해 근형질의 대부분이 응집한다는 사실을 보고한 바 있다.

따라서, 본 연구에서는 수산가공공장폐액의 특성을 살린 운전비가 적게 들면서 그 처리에 의한 유용성분회수 및 이용까지 도모할 수 있는 폐수처리장치 개발을 시도하고자 한다. 어류 수용성단백질이 등전점영역에서 용해도가 떨어진다는 현상과 西岡와 志水(7, 8)가 보고한 pH이동법에 의한 수용성단백질 응집침전법을 조합하여, 우선 수산가공공장폐액내

주 유용성분인 단백질을 최대한 변성억제시키면서 회수해 내고 그와 동시에 고도불포화지방산으로 구성된 폐액내 잔존어유도 동시 회수하는 조건을 확립하고, 본 장치로 회수된 단백질의 이용 가능성 타진을 위해 기초적인 성분분석도 행하였다.

## 재료 및 방법

### 시료어

본 실험에 사용된 고등어, *Scomber japonicus*(체장 35~38cm, 체중 448~525g)는 1991년 10월에 부산공동어시장에서 선도 양호한 것으로 구입하여 시료어로 하였다.

### 수산 지질 및 수용성단백질 재회수를 위한 시험폐액 조제

원료어의 두부와 내장을 제거하고 혈액과 협잡물을 제거하기 위하여 가볍게 수세한 후 채육기(roll 식,  $\Phi 4.5\text{mm}$ )로 채육하였다. 채육된 육에 대하여 수돗물 또는 약알칼리수(식염 0.15% + 중탄산나트륨 0.2%)를 약 5배량 가한 후 저온하(5~10°C)에서 가끔씩 교반해 주면서 30분 또는 1시간 동안 침지하였다. 본 실험에서는 수용성단백질과 지질이 특히 많이 유출되는 제1차 수세침지액의 상층에 떠 있는 부유지방을 회수하여 시료유로 하였고, 또한 그 유리지방수가 끝난 침지액을 세경 이상의 가아제로 여과시켜 나오는 여액을 잔존수용성단백질의 회수시험시료로 하였다.

### 수용성단백질의 회수방법

기본적으로 폐액내 pH를 등전점 부근으로 이동시킴으로써 용해도 저하를 유발시켜 수용성단백질을 응집시킨 후 원심분리 또는 여과분리하여 회수하였다. 즉, 그 pH조정법으로서 다음의 세 방법을 시도해 보았다.

① 단순한 등전점으로의 pH조정법(7) : 시료폐액 중의 단백질의 등전점인 4.5~5.5 부근으로 3N 또는 0.1N의 HCl용액으로써 조정된 뒤 원심분리하여 회수한다.

② 산이동법(8) : 시료에 3N 또는 0.1N HCl용액을 가해 그 pH를 2~4의 일정값(1차조정 pH)으로 조정한다. 다음에 이것에 3N 또는 0.1N NaOH용액을 가해 pH를 5~9의 일정값(2차조정 pH값)으로 조정한다.

③ 알칼리이동법(8) : 시료에 3N 또는 0.1N

NaOH용액을 가해 그 pH를 10~12의 일정값(1차 조정 pH)으로 조정한다. 다음에 이것에 3N 또는 0.1N HCl용액을 가해 pH를 5~9의 일정값(2차 조정 pH값)으로 조정한다.

#### 회수율 측정

수용성단백질의 회수율 측정은 아래와 같이 행하였다.

$$\left[1 - \frac{\text{회수하고 난 후 수세폐액중에 잔존되어 있는 단백질의 함량}}{\text{수세폐액중에 함유되어 있는 단백질의 함량}}\right] \times 100$$

또한, 회수된 지질의 회수율 측정은 아래와 같이 행하였다.

$$\frac{\text{회수지질의 중량(g)}}{\text{채육한 육중 지질의 중량(g)}} \times 100$$

#### 회수된 수용성단백질의 아미노산 조성

시료 50mg을 정평하여 ampoule에 넣고 6N HCl 용액 2ml를 가하여 진공하에서 봉입한 다음 110°C의 sand bath에서 24시간 가수분해하였다. 분해액을 glass filter로 여과하고 감압건조시킨 후 pH 2.2의 구연산완충액으로써 25ml로 하여 구성아미노산 분석시료로 하여(9), 자동아미노산분석계(LKB-4150α)로 정량하였다.

#### 일반성분, pH 및 휘발성 염기질소의 측정

수분은 상압가열건조법, 조단백질은 biuret법(10)과 semimicro kjeldahl법, 조지방은 Soxhlet법, 조회분은 전산화법으로 측정하였으며, pH는 시료 5g을 정칭하여 10배 양의 순수를 가한 후 Waring blender로써 균질화한 다음 pH meter(Fisher model 630)로 측정하였다. 휘발성 염기질소는 Conway unit를 사용하는 미량화산법(11)으로 측정하였다.

### 결과 및 고찰

#### 처리반응조의 제작

Pilot plant 규모로 수산가공공장 폐액(대개 수용성단백질이 주성분임)으로부터 수용성단백질 및 유지를 유효적절하게 회수하는 조건의 결정을 위해 Fig. 1에 나타난 바와 같은 처리반응조를 만들었다. 기본적으로 상층 몇 군데에 표층액을 적시에 뺄 수 있는 개폐식 구멍을 만들고, 최하층에 회수용 구멍을 뚫은 반응조속에 온도조절기능을 갖춘 circulator

를 넣고 동시에 10°C 전후의 저온유지를 위해 침지식 냉각기를 부착한다. pH전극과 pH controller로써 산 또는 알칼리용액을 적절히 반응조에 가하여 원하는 pH로 조절하였다. 아울러 응집침전 반응후액의 표층에 부유되는 유지층을 우선 회수하여 유분리기에 보내 처리하고, 그 표층수 밑쪽액들은 원심분리기 또는 여과장치로 보내어져 응집단백질만 분리, 회수할 수 있도록 하였다. 이때 처리액의 온도는 회수단백질의 변성이나 회수지질의 산화방지를 위해 10~15°C 정도로 조정하면서 행하였다.

#### 수산가공 중 발생하는 수세폐액 내 수용성단백질 최적회수조건

실험실 규모의 냉동고기품 제조과정중에 나오는 폐액에 대해 Fig. 1에 나타난 바와 같은 장치를 이용하여 단순한 등전점침전법(7), 산이동법(8) 및 알칼리이동법(8)을 각각 시도하여 폐액 내 유용한 수용성단백질의 회수조건을 결정하였는데, 그 결과의 일부를 Fig. 2~9에 나타내었다. 그 결과 단순하게 어육수세액내 단백질의 등전점인 5~5.5 부근으로 낮추는 조작만으로는 액이 다른 pH조건보다 혼탁해질 뿐 그냥 장시간 방치해 두어서는 응집침전이 전혀 일어나지 않았고, 원심분리나 여과를 행하여도 결코 침전분리되지 않았다. Nishioka와 Shimizu(8)도 고등어, 전갱이 및 민어 냉동고기품 제조시 나오는 폐액에 대해 단순한 등전점 응집법을 행해 본 결과 단순하게 등전점(대략 5~5.5) 부근으로 폐액 pH를 낮추는 것만으로는 용해도가 5~20% 정도 낮아질 뿐 응집, 침전이 예상한 것처럼 뚜렷하게 나타나지 않았다고 하였다. 그래서 본 실험에서 폐액 내 수용성 단백질을 효과적으로 응집, 침전시켜 회수하기 위해서는 기존의 등전점 침전법과는 다른 방법의 등전점 침전법을 시도해야만 하는데, 西岡와 志水(8)에 의하면 폐액 내의 NaCl농도가 높아짐에 따라 침전 생성영역이 서서히 산성측으로 넓어짐과 동시에 침전량도 급격히 증가된다고 하였다. 이 결과는 잘 알려져 있듯이(12-15)단백질 표면 전하에 대한 음이온의 선택적 흡착, 즉 Cl<sup>-</sup>가 단백질의 양성전하에 결합하기 쉬운데 비해 Na<sup>+</sup>의 단백질 음성전하에 대한 결합은 상대적으로 매우 약해지기 때문이라 생각되어진다. 결과적으로 고등어 냉동고기품 제조 폐액(주로 수용성 단백질로 구성)에 대해 pH를 일단 4 이하의 산성(산이동법) 또는 11 이상의 알칼리성(알칼리이동법)으로 하고 나서 중화하면 그 중화과정 중에 수용성 단백질 표면전하에 대한 음이온의

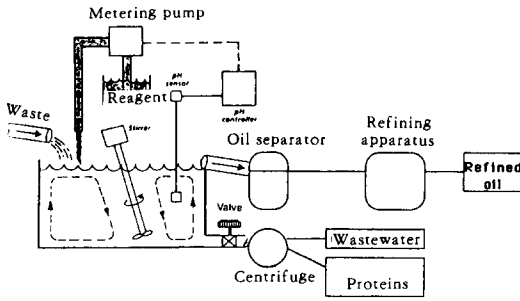


Fig. 1. Process diagram for recovery of the bioactive compounds from marine manufacture wastewater by an isoelectric point precipitation or pH shifting method.

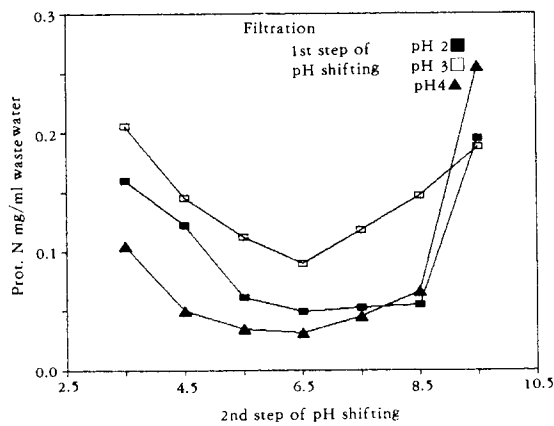
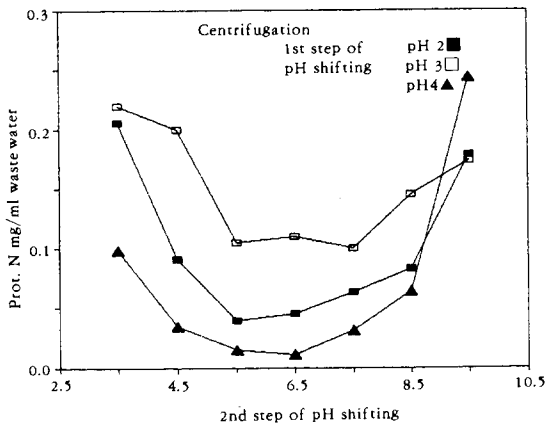


Fig. 2. Protein contents in the wastewater of 0.5hr water-soaking and washing for minced mackerel meat treated at various acidic pH-shifting conditions.

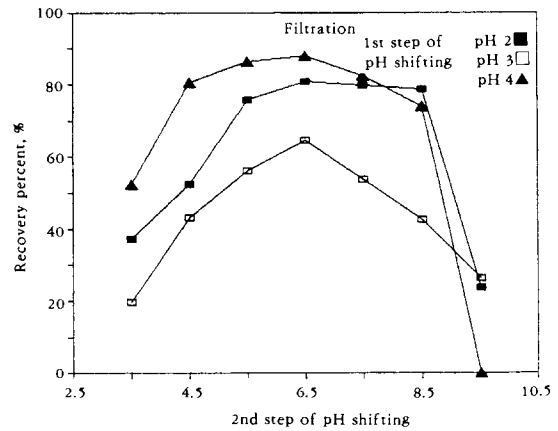
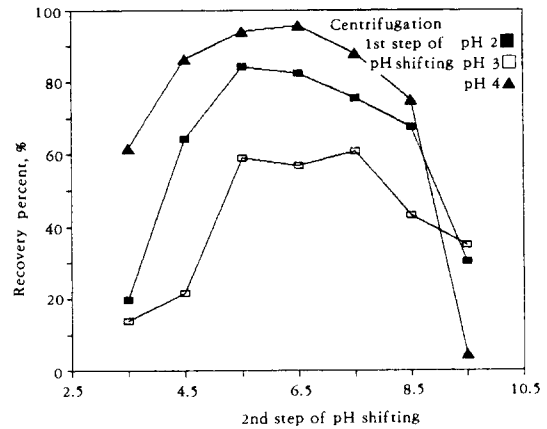


Fig. 3. The percent of proteins recovered from the wastewater of 0.5hr water-soaking and washing for minced mackerel meat at various acidic pH-shifting conditions.

선택적 흡착에 의해 수용성단백질들이 응집되어 불용화됨으로써 회수가능한 단백질체로 만들어지는 것이다. 따라서 본 연구에서도 Fig. 2~9에 나타낸 바와 같이 산이동법과 알칼리이동법으로 폐액 내 수용성 단백질 응집 회수를 꾀했다.

고등어 냉동 고기풀 제조시 수용성 단백질의 물추출시간에 따른 폐액 내 단백질량에는 큰 차이가 없었고(Fig. 2~9), 변형 등전점 응집법인 산이동법 및 알칼리이동법에 의한 처리 후 그 응집 단백질 회수방법으로서 여과법(Toyo No. 2로 10분 정도 소요)과 원심분리법(3,000rpm, 10분간)을 비교해 본 결과도 큰 차이는 없었으며, 산이동법과 알칼리이동법의 폐액 내 단백질 응집효과에도 큰 차이를 찾아볼 수 없었다 (Fig. 2~5). 아울러, Fig. 6~9의 결

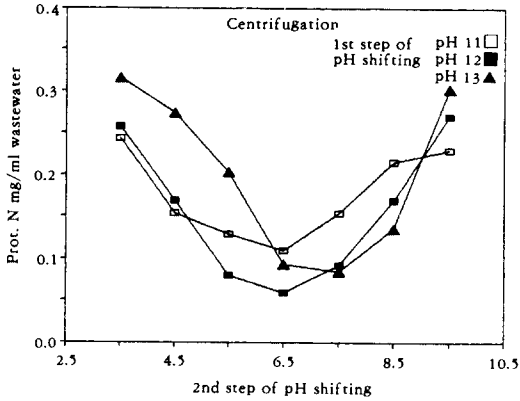


Fig. 4. Protein contents in the wastewater of 1hr water-soaking and washing for minced mackerel meat at various basic pH-shifting conditions.

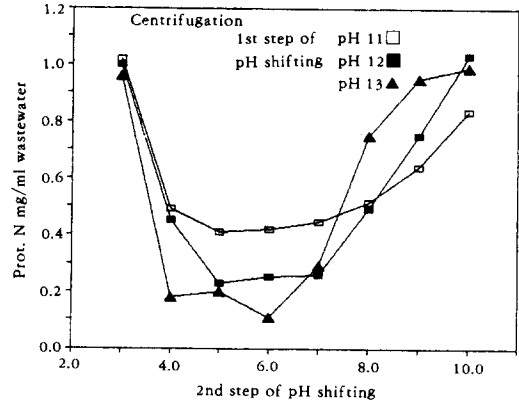


Fig. 6. Protein contents in the wastewater of 0.5hr alkaline water-soaking and washing for minced mackerel meat treated at various basic pH-shifting conditions. The alkaline water was composed of 0.01N NaHCO<sub>3</sub> and 0.01N NaCl solution.

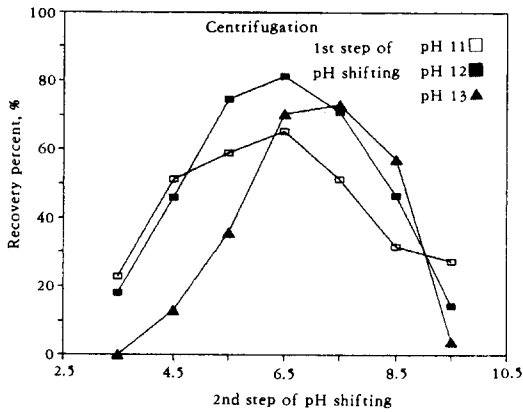


Fig. 5. The percent of proteins recovered from the wastewater of 0.5hr water-soaking and washing for minced mackerel meat at various basic pH-shifting conditions.

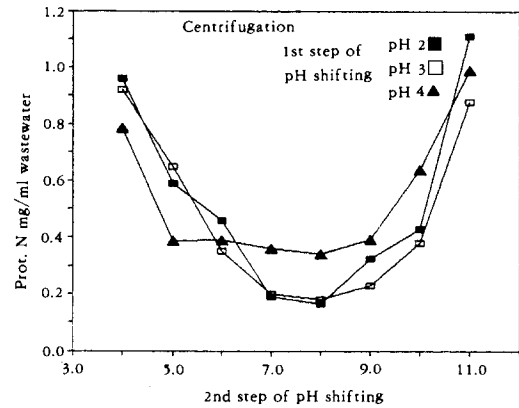


Fig. 7. The percent of proteins recovered from the wastewater of 0.5hr alkaline water-soaking and washing for minced mackerel meat at various basic pH-shifting conditions. The alkaline water was composed of 0.01N NaHCO<sub>3</sub> and 0.01N NaCl solution.

과는 고등어 냉동고기풀 제조시 알칼리 수세법으로 수용성단백질을 추출해낸 경우인데, 이는 약알칼리 수세용액으로 만들기 위해 사용한 0.01N NaHCO<sub>3</sub> 및 0.01N NaCl이 특히 육의 pH가 낮은 적색육에 대해 그 어육내 염용성 단백질과 기타성분(수용성단백질 및 지질)을 서로 잘 분리되도록 한다(16)고 하여 자주 이용되는 수세법의 하나이다. 역시 물 수세법보다 추출 수용성단백질량은 많았으나, 산 또는 알칼리이동법에 의한 응집회수 효과에는 최대 80~90% 회수퍼센트로서 큰 차이가 없었다.

한편, pH 이동을 시키는데 사용되어지는 HCl이나 NaOH의 양을 고려해 볼 때, 폐액 자체 pH가 원래 산성측에 기울어져 있어 알칼리이동법이 산이동법에 비해 약 두 배 양의 시약이 더 소요되기 때문에 경제성이나 응용성면을 고려하여서 산이동법이 유용하다고 판단되어진다. 따라서, 수산가공폐액중 수용성

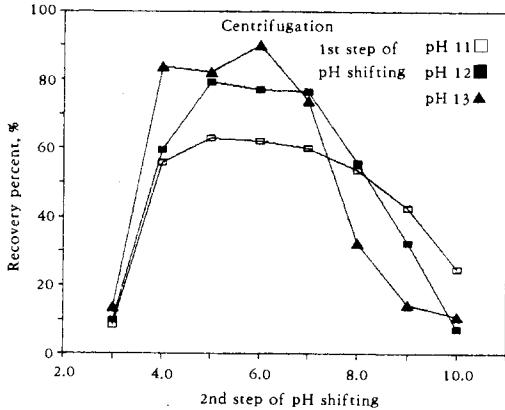


Fig. 8. Protein contents in the wastewater of 0.5hr alkaline water-soaking and washing for minced mackerel meat treated at various acidic pH-shifting conditions. The alkaline water was composed of 0.01N NaHCO<sub>3</sub> and 0.01N NaCl solution.

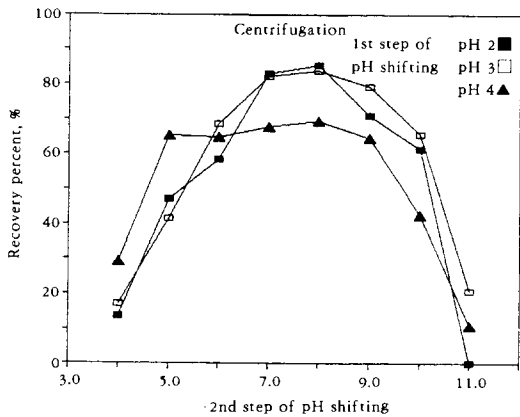


Fig. 9. The percent of proteins recovered from the wastewater of 0.5hr alkaline water-soaking and washing for minced mackerel meat at various acidic pH-shifting conditions.

단백질의 등전점 응집에 의한 회수조건으로서는 물 수세액에 대해 1차조정 pH를 2.5~3.0으로 하고나서 즉시 조정 pH를 6.5~7.5로 조정하는 것이 적당하다고 판단되어진다.

일반성분, 회수율, 휘발성 염기질소 및 pH 본 실험에서 사용된 원료고등어 및 상기에서 기술

Table 1. Proximate composition, pH and volatile basic nitrogen(VBN) contents of the raw mackerel and the recovered water soluble protein fraction in washing wastewater.

(unit : %)		
Component	Raw mackerel	Recovered protein fraction
Moisture	70.2	80.6
Crude protein	19.5(65.4)	14.4(74.2)
Crude lipid	8.1(27.2)	0.5(2.6)
Crude ash	1.2(4.0)	1.5(7.7)
pH	6.53	7.35
VBN(mg/100g)	17.3	9.5

\*( ) : dry basis

Table 2. Amino acid contents of the raw mackerel and the recovered water soluble protein fraction in washing wastewater.

(unit : mg/100g)		
Amino acid	Raw mackerel	Recovered protein
Asp	1.75	1.35
Glu	2.55	1.80
Ser+His	0.70	0.55
Gly	0.95	0.60
Thr	0.90	0.50
Arg	0.80	0.55
Ala	1.00	0.75
Tyr	0.40	0.35
Met	0.40	0.20
Val	0.80	0.20
Phe	0.70	0.50
Ieu	0.75	0.55
Leu	1.40	1.05
Lys	1.65	1.15
Total	14.5(49.5)	10.10(52.1)
	<68.0>	<53.4>

( ) : dry basis

< > : moisture and lipid free basis

한 바와 같은 최적처리 조건에서 회수한 수용성단백질의 일반성분, pH 그리고 휘발성 염기질소량(VBN; volatile basic nitrogen)을 Table 1에 나타내었다. 회수한 수용성단백질의 수분함량은 80.6%였고, 단백질 함량은 14.4%였다. 또한 일부 제거되지 않은 미량의 지질이 함유되어 있었다.

회수된 수용성단백질의 선도상태는 VBN값이 9.58mg/100g인 것으로 미루어 보아 수세과정에서 일부의 휘발성 염기질소 성분이 제거되어 양호한 것으로 생각되었다. 최적 산이동법에 의한 단백질 회수 후 최종 pH값은 7.35로 나타났다.

#### 회수단백질의 구성아미노산 조성

원료어 및 회수 수용성단백질 부분의 아미노산 조성을 비교·검토해 보았는데 Table 2에 나타난 바와 같이 함량에 있어서는 약간 차이가 있으나, 조성비에 있어서는 비슷한 경향을 나타내었다. 주요구성 아미노산은 원료어 및 회수 수용성단백질 부분 모두 glutamic acid, aspartic acid, lysine 및 leucine 등이었다. 우리나라처럼 쌀을 주식으로 하는 나라에서는 쌀의 제한아미노산인 lysine이 많이 함유되어 있는 회수한 수용성단백질을 이용하여 재회수 섭취한다는 것은 영양학적으로도 의의가 있는 일이라고 할 수 있다. 특히, 전구성아미노산에 대한 필수아미노산이 차지하는 비율은 회수 수용성단백질의 경우 42%로 상당히 높아, 영양학적으로 의의가 있을 뿐 아니라 사료화나 어묵 등 단백질 가공제품의 제조 주(부)원료로서의 이용에 큰 도움을 줄 수 있을 것이라 생각되어졌다.

#### 요 약

냉동고기풀 또는 수산연제품 등의 수산가공품 제조시 수세공정에 의해 폐액 중으로 많은 수용성 단백질과 지질성분이 유출되고 있는데, 이로 인하여 폐수의 BOD 및 COD값이 상승되어 해양의 오염과 연안의 적조현상을 일으키는 원인이 되고 있다. 따라서, 본 연구에서는 해양오염 방지 및 미이용 자원의 개발이라는 두 측면에서 수세폐액 중에 함유되어 있는 수용성 단백질을 등전점 pH이동침전법에 의해 최적으로 회수하는 조건을 규명하였고, 아울러 그 회수단백질의 이용가능성 타진을 위해 기초적인 성분 분석도 행하였다.

① 수세폐액 중의 수용성 단백질을 회수하기 위한 방법으로서 여러 가지 등전점 응집법 중 산이동법이 효율적이었다. 즉 수세폐액을 먼저 pH 2.5~3.0으로 낮춘 후 pH 6.5~7.5로 재조절하여 원심분리한 것이 높은 단백질 회수율을 나타내었다. 한편, 폐액 내 잔존지방은 산이동 처리후 대부분 부유하여서 그 상층수를 따라 부어내어 유탁분리로 쉽게 수거가능하므로 본 처리 장치로써 잔존단백질과 지방을 동시

회수할 수가 있다.

② 최적처리조건에서 회수한 단백질부분의 수분과 단백질 함량은 80.6 및 14.4%였다. 한편, 회수단백질부분의 VBN함량은 9.6mg/100g로서 선도가 양호하였으며, 구성아미노산 중 lysine 등 필수아미노산이 여전히 많은 비율로 존재해 있어 영양학적으로도 손색이 없었다.

이상의 결과로 미루어 보아 냉동고기풀이나 어묵의 제조공정 중에 나오는 수세폐액으로부터 수용성 단백질 및 유지를 등전침전법의 한 변형인 산이동법으로 간단히 재회수할 수 있음을 알 수 있었다. 그래서 이들 성분의 재회수로 수산가공공장폐액에 의한 하천의 오염을 근본적으로 막을 수 있음은 물론이고 수산가공폐기물의 완전 식량화의 가능성도 찾아볼 수 있게 되었다고 판단되어진다.

#### 감 사

본 연구는 한국과학재단의 1991년 특정기초연구 과제 연구비 지원 (과제번호: 91-0700-14-03-3)으로 수행된 연구결과의 일부로서, 이에 깊이 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. 石川 静宏, 三宅義章, 江頭辰昭(1970), 뉴어푸드인더스트리, 12, 10~17.
2. 今村薰, 土田洋司, 荒木幹雄(1973), 食品工業, 16, 64~49.
3. 林一將(1974), 食品と科學, 16, 116~120.
4. 木竹茂天, 福井公一, 寺岡一明, 吉田壽德(1977), 日水誌, 43, 975~981.
5. 渡邊尙彦, 長谷川浩, 高井陸雄, 龜井明美(1978), 日水誌, 44, 1381~1387.
6. 山下仁平(1976), 生化學實驗講座1-タンパク質の化學 第1章. 分離精製(日本生化學會編), pp. 73~74, 東京化學同人.
7. 西岡不二男, 志水寛(1979), 日水誌, 45, 1557~1561.
8. 西岡不二男, 志水寛(1983), 日水誌, 49, 795~800.
9. 小原哲二郎, 鈴木降雄, 岩尾裕之(1969), 食品分析ハンドブック, pp. 79~80, 建帛社, 東京.
10. 梅本滋(1966), Bull. of the Japanese Soc. of Scientific Fisheries, 32, 427~435.

11. 日本厚生省編(1960), 食品衛生指針-エ. 揮發性鹽基窒素. pp. 30~32.
12. F. Foster(1960), in "The Plasma Proteins" (ed. by Frank W. Putnam), Vol. 1, Academic Press, New York and London, pp. 188~194.
13. W. Carr(1952), *Arch. Biochem. Biophys.*, **40**, 286~294.
14. W. Carr(1953), *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 424~431.
15. B. N. Ghosh and E. Mihalyi(1952), *Arch. Biochem. Biophys.*, **41**, 107~117.
16. 이동호, 오후규, 조권옥(1982), 냉동공조공학 1, 26~34.