

自然科學

研究論集

第 25 輯 · 第 1 號

2006

目 次

<연구논문>

- SUBGROUPS OF REFINEMENT PERMUTATIONS IN S_{10} Dong-Wan Park
- ON THE FIXED POINTS OF REGULAR STOCHASTIC MATRIX
IN CONNECTION WITH THE INVARIANTS Koon-Chan Kim
- Some Bounds on Steinhaus Graphs Dae-Keun Lim
- 지방중소도시의 상업시설 실태에 관한 통계적 고찰
- 경산시를 사례로 - 송규문
- 고주파 스퍼터링에 의한 TiO_2 박막에서 상전이 현상 김태우 · 김경찬
- 초음파 세척기와 다목적 세정액을 이용한 세척 후의
콘택트렌즈 표면분석 윤선광 · 이창섭
- 토양에서 불용성 인산염 용해균의 분리 金收貞 · 金現洙
- Chromobacterium violaceum* YK 391의 세포내 Cytosine Deaminase
활성에 미치는 Cytosine Analogues의 영향 김효정 · 김현수 · 서영은 · 유대식
- Monascus purpureus*의 Cytosine Deaminase 활성 김효정 · 김대현 · 김정 · 서영은 · 유대식
- 유산균 *Lb. reuteri*, *Lb. suebicus*, *Lb. vaccinostercus*, *Lb. vaginalis*의
생리 · 생화학적 특성에 대한 연구 권오식
- Poor-Medium Tends to Increase the Stability of Newly Transconjugated
Plasmid of *Pseudomonas* sp. KM12TC Kyung-Pyo Yoon
- 동치미에서 분리한 *Leuconostoc citreum* 균주의
당 발효능에 대한 비교 연구 마지현 · 권오식 · 이삼빈

<부 록>

2005학년도 자연과학연구소 소속교수의 논문투고 업적

啓明大學校 自然科學研究所

ISSN 1738-6152

自然科學

研究論集

第 25 輯 · 第 1 號 2006

啓明大學校 自然科學研究所

목 차

〈연구 논문〉

- SUBGROUPS OF REFINEMENT PERMUTATIONS IN S_{10} Dongwan Park … (1)
- ON THE FIXED POINTS OF REGULAR STOCHASTIC MATRIX
IN CONNECTION WITH THE INVARIANTS Koonchan Kim … (13)
- Some Bounds on Steinhaus Graphs Daekeun Lim … (21)
- 지방중소도시의 상업시설 실태에 관한 통계적 고찰
- 경산시를 사례로 - 송규문 … (27)
- 고주파 스퍼터링에 의한 TiO_2 박막에서 상전이 현상 김태우 · 김경찬 … (37)
- 초음파 세척기와 다목적 세정액을 이용한 세척 후의
콘택트렌즈 표면분석 윤선팽 · 이창섭 … (43)
- 토양에서 불용성 인산염 용해균의 분리 金收貞 · 金現洙 … (53)
- Chromobacterium violaceum* YK 391의 세포내 Cytosine Deaminase
활성에 미치는 Cytosine Analogues의 영향 김효정 · 김현수 · 서영은 · 유대식 … (61)
- Monascus purpureus*의 Cytosine Deaminase 활성 김효정 · 김대현 · 김정 · 서영은 · 유대식 … (75)
- 유산균 *Lb. reuteri*, *Lb. suebicus*, *Lb. vaccinostercus*, *Lb. vaginalis*의
생리 · 생화학적 특성에 대한 연구 권오식 … (81)
- Poor-Medium Tends to Increase the Stability of Newly Transconjugated
Plasmid of *Pseudomonas* sp. KM12TC Yoon, Kyung Pyo … (89)
- 동치미에서 분리한 *Leuconostoc citreum* 균주의
당 발효능에 대한 비교 연구 마지현 · 권오식 · 이삼빈 … (95)

CONTENTS

⟨Research Articles⟩

- SUBGROUPS OF REFINEMENT PERMUTATIONS IN S_{10} Dongwan Park ... (1)
- ON THE FIXED POINTS OF REGULAR STOCHASTIC MATRIX
IN CONNECTION WITH THE INVARIANTS Koonchan Kim ... (13)
- Some Bounds on Steinhaus Graphs Daekeun Lim ... (21)
- A Statistical Study on the Actual Conditions of Commercial Facilities
of Local Small and Medium Cities - as A Case of Gyeongsan City -
..... Gyu Moon Song ... (27)
- Phenomena of Phase Transformation in TiO_2 Thin Film by RF Sputtering
..... Tae Woo Kim and Kyung Chan Kim ... (37)
- Surface Analysis of Contact Lens after Cleaned with Ultrasonic Cleaner
and Multi-purpose Solution Sun Kwang Yun and Chang-Seop Lee ... (43)
- Isolation of Phosphate Solubilizing Strains from soil
..... Soo-Jung Kim and Hyun-Soo Kim ... (53)
- Effect of Cytosine Analogues on Cytosine Deaminase Activity
from Intracellular *Chromobacterium violaceum* YK 391
..... Hyo Jung Kim, Hyun Soo Kim, Young Eun Seo and Tae Shick Yu ... (61)
- Cytosine Deaminase from *Monascus purpureus*
..... Hyo Jung Kim, Tae Hyun Kim, Jung Kim, Young Eun Seo and Tae Shick Yu ... (75)
- A Study on Physio-biochemical Characteristics of the Lactic Acid Bacteria
Lb. reuteri, *Lb. suebicus*, *Lb. vaccinostercus* and *Lb. vaginalis*
..... Oh-Sik Kwon ... (81)
- Poor-Medium Tends to Increase the Stability of Newly Transconjugated
Plasmid of *Pseudomonas* sp. KM12TC Yoon, Kyung Pyo ... (89)
- A Comparative Study of *Leuconostoc citreum* Strain Isolated
from Dongchimi for Carbohydrate Fermentation
..... Ji-Hyun Ma, Oh-Sik Kwon and Sam-Pin Lee ... (95)

SUBGROUPS OF REFINEMENT PERMUTATIONS IN S_{10}

DONGWAN PARK

1. Introduction

A. Hopenwasser and J. Peters([2]) showed the exponent set $E(\mu)$ gives a complete characterization of those permutations for which A_μ is a refinement algebra. Here are a few results of Hopenwasser and Peters, which we utilize in the next sections.

LEMMA 1.1([2]). *Let μ be a permutation in S_b with order d . Suppose $E(\mu) = \{0\}$. Then d divides a power of b .*

THEOREM 1.2([2]). *Let $\mu \in S_b$ and let A_μ be the limit algebra of the stationary system of nest embeddings associated with μ . A_μ is (isomorphic to) a refinement algebra if and only if $E(\mu) = \{0\}$.*

For a given permutation μ , to determine whether A_μ is a refinement algebra, it is an interesting approach to examine the permutation μ itself without a series of tedious computations of the exponent set $E(\mu)$.

In the current paper, our interest goes to the subgroups generated by the refinement permutations in the symmetric group S_{10} . There are many abelian refinement subgroups of S_{10} each of which is a product of a finite number of cyclic groups \mathbb{Z}_2 and \mathbb{Z}_4 . And a refinement subgroup of S_{10} is not necessarily abelian, there is a refinement subgroup which is isomorphic to the dihedral group D_4 .

2. Previous results on refinement permutations

Let μ be a permutation in S_b . By R_μ , we denote the set of the members of $[b] = \{0, 1, 2, \dots, b-1\}$ which are not fixed by μ . That is, $R_\mu = \{x \in [b] \mid x - \mu(x) \neq 0\}$.

LEMMA 2.1 [3]. Let $\mu \in S_b$ and $\sigma \in S_c$ be the permutations of order d such that $R_\mu = R_\sigma$, $\mu(x) = \sigma(x)$ for $x \in R_\mu$. Then $\phi_d(b) = \phi_d(c)$ implies $E(\mu) = E(\sigma)$.

With Lemma 2.1, in a practical computation of $E(\mu)$ for a permutation μ of order d in S_b , we may take b as small as possible, provided that $\mu \in S_b$ and the number $\phi_d(b)$ remains unchanged.

If A_μ is a refinement algebra, Lemma 2.1 can be much enhanced:

LEMMA 2.2. Let $\mu \in S_b$ and $\sigma \in S_c$ be permutations of order d dividing both a power of b and a power of c , $R_\mu = R_\sigma$, $\mu(x) = \sigma(x)$ for $x \in R_\mu$. Assume both b and c have the same supernatural number. Then $E(\mu) = \{0\}$ if and only if $E(\sigma) = \{0\}$.

Proof. By Power([14]), a refinement algebra in S_b is isomorphic to a refinement algebra in S_c if and only if both b and c have the same supernatural number. Thus if this refinement algebra is arising from permutation, then its exponent set must be $\{0\}$. \square

LEMMA 2.3 [3]. Let μ be a permutation of order d in S_b , where d divides a power of b . If $\phi_d(x - \mu(x)) = 0$ for all $x \in R_\mu$, then $E(\mu) = \{0\}$.

If x is a fixed point of μ , then it is always true that $\phi_d(x - \mu(x)) = 0$. So, the condition $\phi_d(x - \mu(x)) = 0$ holds for all $x \in R_\mu$ if and only if it holds for all $x \in [b]$. We will mention R_μ instead of $[b]$ to emphasize the permutation μ itself. Also note that, for a cycle μ , $\phi_d(x - \mu(x)) = 0$ for all $x \in R_\mu$ if and only if $\phi_d(x - y) = 0$ for any two elements x and y of R_μ .

The converse of Lemma 2.3 need not be true:

Let $\mu = (0\ 2\ 4\ 6)(1\ 3\ 5\ 7)$ be a permutation in S_8 , then $E(\mu) = \{0\}$. But $\phi_4(x - \mu(x)) \neq 0$ for any $x \in R_\mu$. However,

THEOREM 2.4 ([3]). Let p be a prime number, and μ be a permutation of order p in S_b , where p divides b . $E(\mu) = \{0\}$ if and only if $\phi_p(x - \mu(x)) = 0$ for all $x \in R_\mu$.

Proof. By Lemma 2.3, it suffices to prove that if $E(\mu) = \{0\}$, then $\phi_p(x - \mu(x)) = 0$ for all $x \in R_\mu$. Suppose that there exists $y_0 \in R_\mu$

such that $\phi_p(y_0 - \mu(y_0)) \neq 0$. Obviously, $E_1(\mu) = [p] \neq \{0\}$. Assume $E_m(\mu) \neq \{0\}$ for some $m \geq 1$. Then there exists a nonzero $t \in E_m(\mu)$. Since p is a prime number and $E_m(\mu) \subseteq [p]$, t is relatively prime to p . Therefore $R_{\mu^t} = R_\mu$, and thus there exists $x_0 \in R_\mu$ such that $\phi_p(x_0 - \mu^t(x_0)) \neq 0$. Indeed, if $\phi_p(x - \mu^t(x)) = 0$ for all $x \in R_{\mu^t}$, then, since t is relatively prime to p , $\phi_p(x - y) = 0$ for all $x, y \in R_{\mu^t}$. Regarding y_0 and $\mu(y_0)$ as elements of R_{μ^t} , we have $\phi_p(y_0 - \mu(y_0)) = 0$ contradictory to the choice of y_0 . Since $\phi_p(x_0 - \mu^t(x_0)) \in E_{m+1}(\mu)$, we have $E_{m+1}(\mu) \neq \{0\}$. Thus, by induction, $E_m(\mu) \neq \{0\}$ for all m . In particular, $E(\mu) \neq \{0\}$. \square

THEOREM 2.5 ([3]). *Let $\pi = \mu\sigma$, where μ and σ are disjoint permutations in S_b . If $A_\pi \cong A_o$, then $A_\mu \cong A_o$ and $A_\sigma \cong A_o$.*

The converse fails: Let $\mu = (0\ 3\ 6)$ and $\sigma = (1\ 5)$ in S_{12} . Then $E(\mu) = E(\sigma) = \{0\}$, by Lemma 2.4. But $E(\mu\sigma) = \{0, 2, 3, 4\}$.

The following lemma shows that a cycle consuming all elements of $[b]$ is not a refinement permutation in S_b .

LEMMA 2.6 ([3]). *If $b \geq 2$ and $\mu \in S_b$ is a cycle of order b , then $E(\mu) = [b]$. In particular, μ is not a refinement permutation.*

Proof. Since the order of μ is b , the $\mu^n(0)$ are distinct for all $n \in [b]$.

$$\begin{aligned} E_1(\mu) &= [b], \\ E_2(\mu) &= \{\phi_b(x - \mu^n(x) + bn) \mid x \in [b], n \in E_1(\mu)\} \\ &\supseteq \{\phi_b(0 - \mu^n(0)) \mid n \in [b]\} \\ &= \{\mu^n(0) \mid n \in [b]\} \\ &= [b]. \end{aligned}$$

Therefore $E(\mu) = [b] \neq \{0\}$. \square

LEMMA 2.7 ([3]). *Let p be a prime number, and σ be a cycle of order p in S_b , where p divides b . Let μ be in $\langle \sigma \rangle$, the cyclic subgroup generated by σ . If $E(\sigma) = \{0\}$, then $E(\mu) = \{0\}$.*

Proof. Let $\mu \in \langle \sigma \rangle$, then $\mu = \sigma^n$ for some $n \in [p]$. If $n = 0$, then μ is the identity permutation, hence obviously $E(\mu) = \{0\}$. For $1 \leq n \leq p-1$, we have $R_\mu = R_{\sigma^n} = R_\sigma$. Indeed, if $\sigma = (a_0\ a_1 \cdots a_{p-1})$, then $\sigma^n =$

$(a_0 \sigma^n(a_0) \sigma^{2n}(a_0) \dots \sigma^{(p-1)n}(a_0))$. Observe that $\sigma^{kn}(a_0) = a_{\phi_p(kn)}$ for $k = 0, 1, \dots, p-1$. Since n is relatively prime to p , $\{\phi_p(kn) \mid 0 \leq k \leq p-1\} = [p]$, thus we have $R_{\sigma^n} = \{a_0, a_1, \dots, a_{p-1}\}$. Since $E(\sigma) = \{0\}$ and σ is a cycle, Lemma 2.3 shows that $\phi_p(x-y) = 0$ for all $x, y \in R_\sigma$. Therefore, by Lemma 2.3 again, $E(\mu) = \{0\}$. \square

THEOREM 2.8 ([3]). *If p is a prime number, $\mu \in S_p$ and A_μ is a refinement algebra, then μ is the identity permutation.*

Proof. Let $\mu \in S_p$ and let d be the order of μ . Suppose A_μ is a refinement algebra. Then, by Theorem 1.2, $E(\mu) = \{0\}$. Lemma 1.1 shows that d divides a power of p . Note that d is the order of the cyclic subgroup $\langle \mu \rangle$ of S_p . Thus d divides $p!$. Therefore d divides p , that is, $d = 1$ or $d = p$. If $d = p$, then we have

$$\begin{aligned} E_2(\mu) &= \{\phi_p(x - \mu^n(x) + pn) \mid x \in [p], n \in E_1(\mu) = [p]\} \\ &= \{\phi_p(x - \mu^n(x)) \mid x, n \in [p]\} \\ &\supseteq \{\phi_p(0 - \mu^n(0)) \mid n \in [p]\} \\ &= [p] \\ &= E_1(\mu). \end{aligned}$$

This implies $E(\mu) = E_1(\mu) = [p] \neq \{0\}$, which is a contradiction. Therefore $d = 1$, and μ is the identity permutation. \square

In other word, the only refinement permutation in S_p is the identity permutation. Our next problem is to figure out which permutations in S_b are refinement ones for arbitrary positive integer b .

3. The subset $r(S_b)$ of refinement permutations

For a positive integer b , with $r(S_b)$ we denote *the set of all the refinement permutations in S_b* .

Here arises a question: For what values of positive integer b , $r(S_b)$ is a subgroup of S_b ?

Theorem 2.8 gives an affirmative answer to the question when the integer b is a prime number. It will be a nice starting point if we do the problem in S_{pq} or in S_{p^n} where p and q are prime numbers.

Before we proceed with the refinement permutations in S_{pq} , we consider the refinement permutations of order a power of a prime number p in S_b for an arbitrary positive integer b .

LEMMA 3.1 ([9]). *For a positive integer n , let μ be a permutation of order p^n in S_b , and let there exist an element x of R_μ such that $\phi_p(x - \mu(x)) \neq 0$. If $t \in [p^n] \setminus p\mathbb{Z}$, then there exist $s \in [p^n] \setminus p\mathbb{Z}$ and $x_0 \in R_\mu$ such that $\phi_{p^n}(x_0 - \mu^t(x_0)) = s$.*

Proof. Suppose to the contrary that $\phi_{p^n}(x - \mu^t(x)) = 0$ for every $x \in R_\mu$. Then, for $j = 1, 2, 3, \dots$, $\phi_{p^n}(x - \mu^{jt}(x)) = \phi_{p^n}(x - \mu^t(x) + \mu^t(x) - \mu^{2t}(x) + \dots + \mu^{(j-1)t}(x) - \mu^{jt}(x)) = 0$. Since p^n and t are relatively prime, for any fixed x , $\{\mu^{jt}(x) \mid j = 0, 1, 2, \dots\}$ exhausts all elements of R_μ . Thus $\phi_{p^n}(x - y) = 0$ for any pair of elements x and y of R_μ . In particular, $\phi_{p^n}(x - \mu(x)) = 0$ for every $x \in R_\mu$, hence $\phi_p(x - \mu(x)) = 0$ for every $x \in R_\mu$, which is a contradiction. Therefore there exists $x_0 \in R_\mu$ such that $\phi_{p^n}(x_0 - \mu^t(x_0)) \neq 0$.

Let $s = \phi_{p^n}(x_0 - \mu^t(x_0))$. It remains to show that x_0 can be chosen so that $\phi_p(s) \neq 0$. Suppose that $\phi_p(s) = \phi_p(\phi_{p^n}(x - \mu^t(x))) = 0$ for every $x \in R_\mu$. Then $\phi_{p^n}(\phi_p(x - \mu^t(x))) = 0$. Thus $\phi_p(x - \mu^t(x))$ is a multiple of p^n which is less than p . That is, $\phi_p(x - \mu^t(x)) = 0$ for every $x \in R_\mu$. Since t is relatively prime to p , we have $\phi_p(x - y) = 0$ for any pair of elements x and y of R_μ . Hence $\phi_p(x - \mu(x)) = 0$ for every $x \in R_\mu$, which is another contradiction. \square

THEOREM 3.2 ([9]). *Let μ be a permutation of order p^n in S_b , where p is a prime number dividing b . If $E(\mu) = \{0\}$, then $\phi_p(x - \mu(x)) = 0$ for every $x \in R_\mu$.*

Proof. Assume p^n divides b . Suppose that $\phi_p(x_0 - \mu(x_0)) \neq 0$ for some $x_0 \in R_\mu$, that is, $\phi_p(x_0 - \mu(x_0)) \in \{1, 2, \dots, p-1\}$. Then $\phi_{p^n}(x_0 - \mu(x_0)) \in [p^n] \setminus p\mathbb{Z}$. Let $t = \phi_{p^n}(x_0 - \mu(x_0))$. By Lemma 3.1, there exist $x_1 \in R_\mu$ and $s \in [p^n] \setminus p\mathbb{Z}$ such that $\phi_{p^n}(x_1 - \mu^t(x_1)) = s$. This means that if $0 \neq t \in E_k(\mu)$ for some $k \geq 1$, then $0 \neq s \in E_{k+1}(\mu)$. Since $s \in [p^n] \setminus p\mathbb{Z}$, Lemma 3.1 applies repeatedly. Thus $E_k(\mu) \neq \{0\}$ implies $E_{k+1}(\mu) \neq \{0\}$ for every $k \geq 1$. It follows that $E(\mu) \neq \{0\}$. \square

LEMMA 3.3 ([10]). *Let p be a prime number. If μ is a refinement permutation in S_{p^2} , then either μ is the identity permutation or the order of μ is p .*

Proof. Since μ is a refinement permutation, by Lemma 1.1, the order $o(\mu)$ of μ divides a power of p^2 , hence $o(\mu)$ divides a power of p . That is, $o(\mu)$ itself is a power of p . By Theorem 3.2, it holds that $\phi_p(x - \mu(x)) = 0$, for every $x \in R_\mu$, hence for every $x \in [p^2]$. Thus we have either $o(\mu) = 1$ or $o(\mu) = p$ in order that $R_\mu \subset [p^2]$. \square

In S_{p^2} with p a prime number, by Lemma 3.3, the refinement permutations are of order p except the identity permutation. Since p is a prime number, a permutaion of order p is a product of disjoint cycles of order p . Therefore if we find out all the refinement p -cycles in S_{p^2} , then we would have all the refinement permutations in S_{p^2} .

EXAMPLE 3.4 ([10]). If p is a prime number, then, by Theorem 2.8, $r(S_p)$ consists only of the identity permutation. Clearly, $r(S_p)$ is the trivial subgroup of the symmetric group S_p . \square

In Example 3.4, $r(S_p)$ happens to be a subgroup of S_p . But, in general, $r(S_b)$ need not to be a subgroup of S_b .

EXAMPLE 3.5 ([10]). In S_6 , a refinement permutation is of order 2 or 3 by Lemma 1.1. With Theorem 2.4, we can easily find that the cycles $\mu = (0\ 2)$ and $\sigma = (0\ 4)$ are refinement permutations. But the product of these refinement permutations $\tau = \mu\sigma = (0\ 4\ 2)$ is not a refinement permutation, for $\phi_3(0 - \tau(0)) = \phi_3(0 - 2) \neq 0$. In fact, there are no refinement permutations of order 3 in S_6 . Since $r(S_6)$ is not closed under the composition of permutations, it is not a subgroup of S_6 . \square

THEOREM 3.6 ([10]). $r(S_4)$ is a subgroup of S_4 which is isomorphic to the Klein Four group, say, $r(S_4) \cong \mathbb{Z}_2 \times \mathbb{Z}_2$.

Proof. Since 2 is a prime number and $4 = 2^2$, by Lemma 3.3, if μ is a refinement permutation in S_4 , then either μ is the identity permutation or the order of μ is 2. By Theorem 2.4, μ is a refinement 2-cycle in S_4 if and only if $\phi_2(x - \mu(x)) = 0$ for all $x \in R_\mu$, hence for all $x \in [4] = \{0, 1, 2, 3\}$. There are precisely 2 possibilities: $(0\ 2)$ and $(1\ 3)$. Thus there are 4 refinement permutations in S_4 in all, say, $() =$ the identity permutation, $(0\ 2)$, $(1\ 3)$, and $(0\ 2)(1\ 3)$. So we have

$$r(S_4) = \{(), (0\ 2), (1\ 3), (0\ 2)(1\ 3)\}.$$

It is obvious that $r(S_4)$ is closed under the composition of permutations, and that each permutation in $r(S_4)$ is idempotent. Therefore $r(S_4)$ is a subgroup of S_4 , and we have

$$r(S_4) = \langle (0\ 2) \rangle \times \langle (1\ 3) \rangle \cong \mathbb{Z}_2 \times \mathbb{Z}_2,$$

as desired. \square

We have proved that $r(S_4)$ is a subgroup of S_4 . But there is no way for us to expect that the same theorems hold for S_b for arbitrary base b .

EXAMPLE 3.7 ([10]). Let $p = 5$ and consider the group S_{25} . As the previous discussions, a member of $r(S_{25})$ is a product of refinement 5-cycles. Now let $\mu = (0\ 10\ 15\ 20\ 5)$ and $\nu = (0\ 10\ 20\ 15\ 5)$. By Theorem 2.4, μ and ν are refinement cycles. The composition of these 5-cycles is $\sigma = \mu\nu = (0\ 15)(5\ 10)$. The order of σ is 2 which does not divide 5, so σ does not belong to $r(S_{25})$. Thus $r(S_{25})$ is not a subgroup of S_{25} . \square

By a *refinement subgroup* of S_b , we mean a subgroup of S_b consisting of refinement permutations. For $b = pq$ with $p = 2$ and $q = 3$, every refinement subgroup of S_b is abelian.

THEOREM 3.8 ([8]). A nontrivial refinement subgroup G of S_6 is isomorphic to a direct product of k copies of the cyclic group of order 2, say

$$G \cong \prod_{j=1}^k G_j$$

where each G_j is isomorphic to the cyclic group \mathbb{Z}_2 and $1 \leq k \leq 2$.

4. Refinement subgroups of S_{10}

In this section, we investigate the refinement subgroups of S_{10} . Though $r(S_{10})$ is too big to be a subgroup of S_{10} and a refinement subgroup of S_{10} is not necessarily abelian, there are many refinement subgroups of S_{10} each of which is a finite product of cyclic groups of order 2 or 4.

LEMMA 4.1. *If μ is a refinement permutation in S_{10} , then μ is the identity permutation or a permutation of order 2 or a permutation of order 4.*

Proof. Assume that μ is not the identity permutation and that μ is a cycle. Since $10 = 2 \cdot 5$, the order of μ , $o(\mu)$, divides a power of 2 or a power of 5, by Lemma 1.1. But a 5-cycle in S_{10} can not be a refinement permutation by Theorem 2.4. Thus $o(\mu)$ divides only a power of 2. Let $o(\mu)$ be 8 or greater. Then for μ to be refinement it requires eight or more distinct elements of $[10]$ all of which are congruent modulo 2. We can choose only five such elements from $[10]$, say, $\{0, 2, 4, 6, 8\}$ or $\{1, 3, 5, 7, 9\}$. Therefore $o(\mu)$ is 2 or 4. \square

LEMMA 4.2. *$r(S_{10})$ is not a subgroup of S_{10} .*

Proof. Let μ and ν be refinement 2-cycles in $r(S_{10})$ such that $\mu = (a_0 \ a_1)$, $\nu = (a_0 \ a_2)$ with three distinct elements a_0, a_1, a_2 . Then $\mu\nu = (a_0 \ a_2 \ a_1)$ is a 3-cycle, hence it is not a refinement permutation in S_{10} by Lemma 4.1. That is, $r(S_{10})$ is not closed under the multiplication of permutations. \square

Since a refinement permutation of order 2 or 4 in S_{10} is a product of finite number of disjoint refinement cycles of order 2 or 4, we examine the multiplication of refinement cycles of order 2 or 4 in S_{10} .

LEMMA 4.3. *If G is a refinement subgroup of S_{10} and if μ and ν are refinement 2-cycles in G , then either $R_\mu \cap R_\nu = \emptyset$ or $\mu = \nu$.*

Proof. Note that for 2-cycles μ and ν , $\mu = \nu$ if and only if $R_\mu = R_\nu$. Assume that $R_\mu \neq R_\nu$. Suppose $R_\mu \cap R_\nu \neq \emptyset$ and let $a_0 \in R_\mu \cap R_\nu$. Since both μ and ν are 2-cycles, we have $R_\mu = \{a_0, a_1\}$ and $R_\nu = \{a_0, a_2\}$ with $a_1 \neq a_2$. Then $\mu\nu = (a_0 \ a_2 \ a_1)$ is a nonrefinement 3-cycle as in the proof of Lemma 4.2. This is impossible because G is a group and $\mu\nu \in G$. Thus we have $R_\mu \cap R_\nu = \emptyset$. \square

LEMMA 4.4. *If μ and ν are refinement 4-cycles in S_{10} , and if $R_\mu = R_\nu$, then $\mu = \nu$ or $\mu = \nu^3$ (equivalently, $\mu^3 = \nu$), that is, $\langle \mu \rangle = \langle \nu \rangle$.*

Proof. Let $R_\mu = R_\nu = \{a_0, a_1, a_2, a_3\}$ and $\mu = (a_0, a_1, a_2, a_3)$. Since μ is a refinement cycle, we have either (i) $\phi_2(\mu(a_i) - a_i) = 0$ and $\phi_4(\mu(a_i) - a_i) \neq 0$, for each $i = 0, 1, 2, 3$, or (ii) $\phi_4(\mu(a_i) - a_i) = 0$, for each $i = 0, 1, 2, 3$. The 4-cycles with the essential range $\{a_0, a_1, a_2, a_3\}$

are $\mu = (a_0 \ a_1 \ a_2 \ a_3)$, $(a_0 \ a_1 \ a_3 \ a_2)$, $(a_0 \ a_2 \ a_1 \ a_3)$, $(a_0 \ a_2 \ a_3 \ a_1)$, $(a_0 \ a_3 \ a_1 \ a_2)$ and $\mu^3 = (a_0 \ a_3 \ a_2 \ a_1)$. Out of these six cycles, μ and μ^3 are refinement cycles, while other four cycles are nonrefinement because they mix up the conditions (i) and (ii). Hence we have $\nu = \mu$ or $\nu = \mu^3$. That is, $\nu \in \langle \mu \rangle = \{\iota, \mu, \mu^2, \mu^3\}$, where ι is the identity permutation and $\mu^2 = (a_0 \ a_2)(a_1 \ a_3)$. \square

LEMMA 4.5. *If G is a refinement subgroup of S_{10} and if μ and ν are refinement 4-cycles in G , then either $R_\mu \cap R_\nu = \emptyset$ or $\langle \mu \rangle = \langle \nu \rangle$.*

Proof. Assume that $R_\mu \cap R_\nu \neq \emptyset$. Then, since μ and ν are refinement cycles, both R_μ and R_ν consist of elements which are all congruent modulo 2. Suppose $R_\mu \neq R_\nu$. Since there are only five such elements in [10], we have $R_\mu \cap R_\nu = \{b_1, b_2, b_3\}$, a set of three distinct elements. If $\mu = (a_1, b_1, b_2, b_3)$, then we have either $\nu = (a_2, b_1, b_2, b_3)$ or $\nu = (a_2, b_3, b_2, b_1)$, where $a_1 \neq a_2$. Other four possible choices of ν result in the failure to be refinement. If $\nu = (a_2, b_1, b_2, b_3)$, then $\mu\nu = (a_1, b_2, a_2, b_1, b_3)$, which is a nonrefinement 5-cycle. If $\nu = (a_2, b_3, b_2, b_1)$, then $\mu\nu = (a_1, a_2, b_3)$, which is a nonrefinement 3-cycle. Therefore we have $R_\mu = R_\nu$, which implies $\langle \mu \rangle = \langle \nu \rangle$, by Lemma 4.4. \square

LEMMA 4.6. *Let μ be a refinement 4-cycle and ν be a refinement 2-cycle in S_{10} . If $\mu\nu$ is a refinement permutation in S_{10} , then either $R_\mu \cap R_\nu = \emptyset$ or $R_\nu \subset R_\mu$.*

Proof. Suppose $R_\mu \cap R_\nu \neq \emptyset$ and that $R_\nu \not\subset R_\mu$. Then there are distinct elements a_0 and b of [10] such that $R_\mu \cap R_\nu = \{a_0\}$ and $\nu = (a_0 \ b)$. Choosing three more element a_1 , a_2 and a_3 which are distinct from $\{a_0, b\}$, we may write $\mu = (a_0 \ a_1 \ a_2 \ a_3)$. Then we have $\mu\nu = (a_0 \ b \ a_1 \ a_2 \ a_3)$, a 5-cycle in S_{10} , which is impossible since $\mu\nu$ is assumed to be refinement. \square

Note that, in the proof of Lemma 4.6 all element a_0 , a_1 , a_2 , a_3 and b are congruent modulo 2 since μ and ν are refinement cycles. Hence the set $\{a_0, a_1, a_2, a_3, b\}$ is equal to either $\{0, 2, 4, 6, 8\}$ or $\{1, 3, 5, 7, 9\}$. In Lemma 4.6, the condition $R_\nu \subset R_\mu$ does not imply that $\mu\nu$ is a refinement permutation. Moreover, even if $\mu\nu$ is a refinement permutation, the multiplication is not necessarily commutative.

EXAMPLE 4.7. Let $\mu = (0\ 2\ 4\ 6)$ and $\nu = (0\ 2)$ be cycles in S_{10} . Note that both μ and ν are refinement cycles. We have $R_\nu \subset R_\mu$ and that $\mu\nu = (2\ 4\ 6)$, $\nu\mu = (0\ 4\ 6)$. The 3-cycles in S_{10} are nonrefinement. If we choose $\nu = (0\ 4)$, then $R_\nu \subset R_\mu$ and that $\mu\nu = (0\ 2)(4\ 6)$, $\nu\mu = (0\ 6)(2\ 4)$. Both $\mu\nu$ and $\nu\mu$ are refinement permutations, but they are not equal. \square

THEOREM 4.8. There exists a refinement subgroup of S_{10} which is isomorphic to the dihedral group D_4 .

Proof. Let $\mu = (a_0\ a_1\ a_2\ a_3)$ be a 4-cycle in S_{10} such that $\phi_2(\mu(a_i) - a_i) = 0$ and $\phi_4(\mu(a_i) - a_i) \neq 0$, for each $i = 0, 1, 2, 3$. If we put $\nu = (a_0\ a_2)$, then $\phi_4(\nu(a_i) - a_i) = 0$, for each $i = 0, 1, 2, 3$. Thus we have $E(\mu) = \{0\}$ and $E(\nu) = \{0\}$, hence both μ and ν are refinement cycles. Moreover, $\mu^2 = (a_0\ a_2)(a_1\ a_3)$, $\mu^3 = (a_0\ a_3\ a_2\ a_1)$, $\mu\nu = (a_0\ a_1)(a_2\ a_3)$, $\mu^2\nu = (a_1\ a_3)$, and $\mu^3\nu = (a_0\ a_3)(a_1\ a_2) = \nu\mu$ are all refinement permutations in S_{10} . Therefore the set $G = \{\iota, \mu, \mu^2, \mu^3, \nu, \mu\nu, \mu^2\nu, \mu^3\nu\}$ forms a refinement subgroup of S_{10} . Since the group representation of G is $\{\mu, \nu | \nu\mu = \mu^3\nu\}$, G is (isomorphic to) the dihedral group D_4 . \square

COROLLARY 4.9. A refinement subgroup of S_{10} is not necessarily abelian.

Proof. The dihedral group D_4 is nonabelian. \square

THEOREM 4.9. A nontrivial abelian refinement subgroup G of S_{10} is isomorphic to a direct product of the cyclic groups of order 2 and the cyclic groups of order 4, say

$$G \cong \prod_{j=1}^k G_j$$

where each G_j is isomorphic to one of the cyclic groups \mathbb{Z}_2 and \mathbb{Z}_4 .

Proof. By the Lemma 4.1, all elements of G except the identity permutation is of order 2 or 4. So the fundamental theorem of finitely generated abelian groups shows G is isomorphic to a direct product of copies of the cyclic group of order 2. The largest value of k for \mathbb{Z}_2 is 4 and for \mathbb{Z}_4 is 2 since there can be so many distinct generators, that is, disjoint refinement cycles simultaneously in S_{10} . \square

References

1. A. Hopenwasser, S. C. Power, *Classification of Limits of Triangular Matrix Algebras*, Proc. Edinburgh Math. Soc. **36** (1992), 107-121.
2. _____, J. R. Peters, *Full Nest Algebras*, Illinois J. of Math. **38** (1994), 501-520.
3. D. Park, *Limit algebras of stationary systems*, Dissertation, Univ. of Alabama (1995).
4. _____, *Refinement algebras arisen from stationary systems*, Youngnam Math. J. **2** (1995), 115-130.
5. _____, *Exponent tables and limit algebras of stationary systems*, Korean J. Math. Sci. **3** (1996), 179-188.
6. _____, *Permutations of prime square order with trivial exponent sets*, Korean J. Math. Sci. **5** (1998), 229-237.
7. _____, *Refinement Permutations in S_{2p}* , Proc. Math. Sci., INS, Keimyung Univ. **20** (2000), 9-22.
8. _____, *Subgroups of refinement permutations in S_6* , Proc. Math. Sci., INS, Keimyung Univ. **24** no.1 (2005), 7-15.
9. _____, Y. S. Jo, *Refinement Permutations of Prime Power Order*, Comm. Korean Math. Soc. **15** (2000), No. 1, 59-69.
10. _____, Y. S. Jo, *Refinement Permutations in S_4 and S_9* , Proc. Math. Sci., INS, Keimyung Univ. **22** (2002), 59-68.
11. _____, Y. S. Jo, *Refinement Permutations in S_{p^2}* , Proc. Math. Sci., INS, Keimyung Univ. **22** (2002), 69-80.
12. _____, D. K. Kim, K. S. Park, *Cycles of order 8 with trivial exponent sets*, Proc. Math. Sci., INS, Keimyung Univ. **18** (1998), 13-25.
13. _____, K. S. Park, *Refinement Permutations in S_{pq}* , Proc. Math. Sci., INS, Keimyung Univ. **21** (2001), 23-33.
14. S. C. Power, *Limit Algebras: An Introduction to Subalgebras of C^* -algebras*, Pitman Research Notes, Longman, 1992.

Department of Mathematics
 Keimyung University
 Daegu 704-701, Korea

ON THE FIXED POINTS OF REGULAR STOCHASTIC MATRIX IN CONNECTION WITH THE INVARIANTS

KOONCHAN KIM

ABSTRACT. This paper seeks the possibility of using regular stochastic matrices in the study of graph invariant. We construct regular stochastic matrices $S(G)$ and $S(G')$ corresponding to the adjacency matrices $A(G)$ and $A(G')$ of the two given graphs G and G' and induce a graph invariant, a necessary condition for the existence of isomorphism between G and G' . More specifically, if G and G' are isomorphic, then the fixed points z and z' of $S(G)$ and $S(G')$ respectively are the same except the location of the elements. The fixed point graph invariant has a characteristic that if the two sets of the elements of z and z' are the same and distinct, then an isomorphism between the two graphs can be easily identified.

1 Introduction

A *graph invariant* is a property of graphs such that every two isomorphic graphs have the same value with respect to this property. It is a necessary condition for the existence of an isomorphism between two graphs. In other words, if two given graphs G and G' have different value with respect to this graph invariant, then G and G' are not isomorphic. Hence, graph invariants are commonly used to distinguish nonisomorphic graphs rather than finding an isomorphism between two graphs.

Graphs have many different kinds of graph invariants. For example, the same degree sequence, the same girth, the same genus, the same chromatic number, the same determinant, the same eigenvalues, etc. These known invariants are well categorized in [6]. Detailed discussion on graph spectra can be seen in [1,2] and a recent result on a graph invariant based on probability propagation matrix is given in [4]. However, most of these known graph invariants are not strong enough at distinguishing similar but nonisomorphic graphs[3] and even if they have distinct values, most of them are of no use in identifying an isomorphism between two graphs.

2000 Mathematics Subject Classification: 05C50, 05C60.

Key words and phrases: Graph invariant, Regular stochastic matrix for graph, Fixed point.

For example, even if two graphs $G = (V, E)$ and $G' = (V', E')$ have the same sets of eigenvalues and they are distinct, an isomorphism $\theta : V \rightarrow V'$ between the two graphs can not be easily identified.

The purpose of this paper is to investigate the possibility of utilizing the regular stochastic matrices in order to develop a more practical and effective graph invariant. We illustrate how the regular stochastic matrices $S(G)$ and $S(G')$ can be constructed from the adjacency matrices $A(G)$ and $A(G')$ and how the fixed points z and z' of the regular stochastic matrices can be obtained. We also discuss the characteristic and usefulness of this graph invariant, e.g., in vertex classification.

2 Preliminary

A permutation matrix P is a $(0, 1)$ -matrix such that it has exactly one 1 in each row and column. If P is a permutation matrix, then $P^{-1} = P^T$ and P^{-1} is also a permutation matrix. If A is a matrix and x is a vector, then pre-multiplying a permutation matrix P on A and on x , PA and Px , interchanges the rows of A and x , respectively and post-multiplying P on A , AP , interchanges the columns of A .

A simple graph is a graph with no loops or multi-edges, a general graph is a graph that can have multi-edges and loops, and a digraph is a graph in which every edge is directed. Two simple graphs $G = (V, E)$ and $G' = (V', E')$ are isomorphic provided that there is a bijection $\theta : V \rightarrow V'$ such that $\{u, v\} \in E$ if and only if $\{\theta(u), \theta(v)\} \in E'$. That is, vertices u and v in V are adjacent if and only if the corresponding vertices $\theta(u)$ and $\theta(v)$ in V' are adjacent. Similar definitions can be given for general and digraphs.

A row vector $u = (u_1, u_2, \dots, u_n)$ is called a *probability vector* if its components are non-negative and their sum is 1. A square matrix S is called a *stochastic matrix* if each of its rows is a probability vector. A stochastic matrix S is said to be *regular* if all the entries of some power S^m are positive. Let S be a regular stochastic matrix. Then a non-zero row vector $z = (z_1, z_2, \dots, z_n)$ is called a *fixed point* of S if

$$zS = z$$

Then the following results(see e.g., [7]) hold for regular stochastic matrices.

Theorem 1 Suppose S is a regular stochastic matrix. Then,

1. S has a unique fixed probability vector z , and the components of z are all positive;
2. the sequence S, S^2, S^3, \dots of powers of S approaches the matrix Z whose rows are each the fixed point z ;
3. if p is any probability vector, then the sequence of vectors pS, pS^2, pS^3, \dots approaches the fixed point z .

3 Construction of regular stochastic matrices for graphs

Let G and G' be any two graphs with n vertices and let $A(G)$ and $A(G')$ be the adjacency matrices respectively. Then the *regular stochastic matrices* $S(G)$ and $S(G')$ for the graphs G and G' can be constructed from $A(G)$ and $A(G')$. Let E be the $n \times n$ matrix whose elements are all $\epsilon > 0$.

$$E = \begin{pmatrix} \epsilon & \cdots & \epsilon \\ \vdots & \ddots & \vdots \\ \epsilon & \cdots & \epsilon \end{pmatrix}.$$

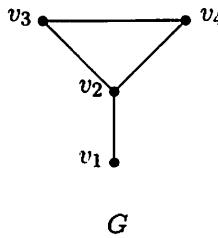
Let D and D' be the diagonal matrix whose (i, i) th diagonal element is the reciprocal of the sum of the i th row of $A(G) + E$ and $A(G') + E$ respectively:

$$D = \begin{pmatrix} \frac{1}{s_1} & 0 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \frac{1}{s_2} & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & \ddots & & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & & \frac{1}{s_n} \end{pmatrix} \quad D' = \begin{pmatrix} \frac{1}{s'_1} & 0 & 0 & \cdots & 0 \\ 0 & \frac{1}{s'_2} & 0 & \cdots & 0 \\ \vdots & \ddots & \ddots & & \vdots \\ 0 & 0 & \cdots & & \frac{1}{s'_n} \end{pmatrix},$$

where $s_i = \sum_{j=1}^n (a_{ij} + \epsilon)$ and $s'_i = \sum_{j=1}^n (a'_{ij} + \epsilon)$, for $i = 1, 2, \dots, n$. Then, $S(G) = D * (A(G) + E)$ and $S(G') = D' * (A(G') + E)$ become regular stochastic matrices for the graphs G and G' .

For example, consider the graph given in Figure 1.

Figure 1.



G

Then the adjacency matrix for G and its regular stochastic matrix (with $\epsilon = 0.1$) are given by

$$A(G) = \begin{pmatrix} 0 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 1 \\ 0 & 1 & 0 & 1 \\ 0 & 1 & 1 & 0 \end{pmatrix} \quad S(G) = \begin{pmatrix} 0.1/1.4 & 1.1/1.4 & 0.1/1.4 & 0.1/1.4 \\ 1.1/3.4 & 0.1/3.4 & 1.1/3.4 & 1.1/3.4 \\ 0.1/2.4 & 1.1/2.4 & 0.1/2.4 & 1.1/2.4 \\ 0.1/2.4 & 1.1/2.4 & 1.1/2.4 & 0.1/2.4 \end{pmatrix}.$$

4 Fixed point graph invariant

Let G and G' be any two graphs(simple, general, digraphs) with their adjacency matrices $A(G)$ and $A(G')$, respectively. Then it is well known and intuitively accepted that G and G' are isomorphic if and only if there exists a permutation matrix P such that $A(G) = P^{-1}A(G')P$. However, a rigorous proof for the following theorem is recently shown in [6].

Theorem 2 (Merris) *Two simple graphs G and G' are isomorphic if and only if there exists a permutation matrix P such that*

$$A(G) = P^{-1}A(G')P.$$

On the regular stochastic matrices for graphs, we have the following results:

Lemma 3 *If two graphs G and G' are isomorphic, then there exists a permutation matrix P such that*

$$S(G) = P^{-1}S(G')P. \quad (1)$$

Proof: Suppose that G and G' are isomorphic. Then by Theorem 2, there exists a permutation matrix P such that $A(G) = P^{-1}A(G')P$. Since $E = P^{-1}EP$,

$$\begin{aligned} A(G) + E &= P^{-1}A(G')P + P^{-1}EP \\ &= P^{-1}(A(G') + E)P. \end{aligned}$$

Also, D and D' are the diagonal matrix whose (i,i) th diagonal element is the reciprocal of the sum of the i th row of $A(G) + E$ and $A(G') + E$ implies that $D = P^{-1}D'P$. Hence,

$$\begin{aligned} D(A(G) + E) &= (P^{-1}D'P)(P^{-1}(A(G') + E)P) \\ &= P^{-1}(D'A(G') + E)P. \end{aligned}$$

That is, if G and G' are isomorphic, then $S(G) = P^{-1}S(G')P$. ■

If two graphs G and G' are isomorphic, then by raising k th power on both side of (1) and using the fact that $P^{-1}P = I$, we have

$$S^k(G) = P^{-1}S^k(G')P, \quad (2)$$

for all positive integer $k = 1, 2, \dots$

The following is a necessary condition for the existence of an isomorphism between two graphs; a graph invariant.

Proposition 4 *If the two graphs G and G' are isomorphic, then the fixed points z and z' of the regular stochastic matrices $S(G)$ and $S(G')$ are the same except the location of the elements.*

Proof: Since $S(G)$ and $S(G')$ are regular stochastic matrices, we let $Z = \lim_{k \rightarrow \infty} S^k(G)$ and $Z' = \lim_{k \rightarrow \infty} S^k(G')$ and let z and z' be the unique fixed points of $S(G)$ and $S(G')$ that are given in each row of Z and Z' , respectively. Then by taking limit as $k \rightarrow \infty$ on both side of (2), we obtain $Z = P^{-1}Z'P$. This implies that z and z' must be the same except the location of the elements. ■

Upon computing the fixed point graph invariant, one of the following three cases occurs:

1. z and z' are different.
2. z and z' are same except the location of the elements and all the elements are distinct.
3. z and z' are the same except the location of the elements but elements in z and z' are not distinct.

In the first case, G and G' are not isomorphic. In the second case, an isomorphism θ can be easily identified and obtained by taking one-to-one correspondence between the distinct elements in z and z' . For the last case, the existence of an isomorphism is highly likely but identification of an isomorphism is not apparent.

To obtain the fixed points z and z' , set

$$\begin{aligned} z_1 + z_2 + \cdots + z_n &= 1 \\ zS(G) - z &= 0 \end{aligned}$$

and

$$\begin{aligned} z'_1 + z'_2 + \cdots + z'_n &= 1 \\ z'S(G') - z' &= 0 \end{aligned}$$

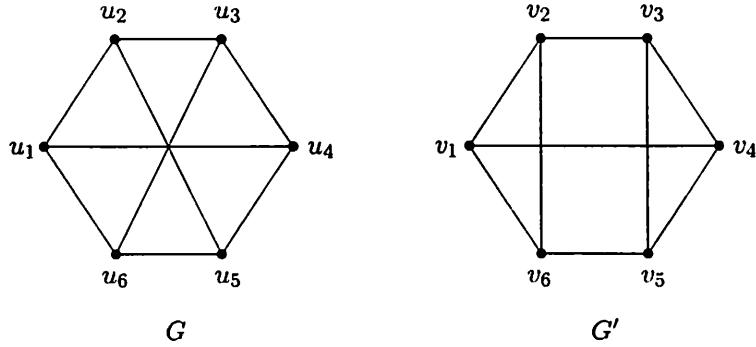
and solve, say, the first n equations from each $n+1$ sets of equations given above.

For the fixed point graph invariant proposed in this paper, the identification of an isomorphism between two graphs, when the invariant values are same and distinct, is simple and easy. This is due to the fact that the location of the elements of z and z' are directly related with the rows of $S(G)$ and $S(G')$ (since $zS(G) = z$, the elements of z are multiplied to the rows of $S(G)$) and this is directly related with the rows of $A(G)$ and $A(G')$ and again this, in turn, is directly related with the labeling of the vertices of G and G' .

5 Numerical illustrations

We first consider the commonly used classical graphs given in Figure 2.

Figure 2. Two nonisomorphic graphs



Then $S(G)$ and $S(G')$ with $\epsilon = 0.1$ are given by

$$S(G) = \begin{pmatrix} 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 \\ 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 \\ 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 \\ 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 \\ 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 \\ 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 \end{pmatrix}$$

$$S(G') = \begin{pmatrix} 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 \\ 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 \\ 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 \\ 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 \\ 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 \\ 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 & 0.3056 & 0.0278 \end{pmatrix}.$$

The two unique fixed points of $S(G)$ and $S(G')$ are given by

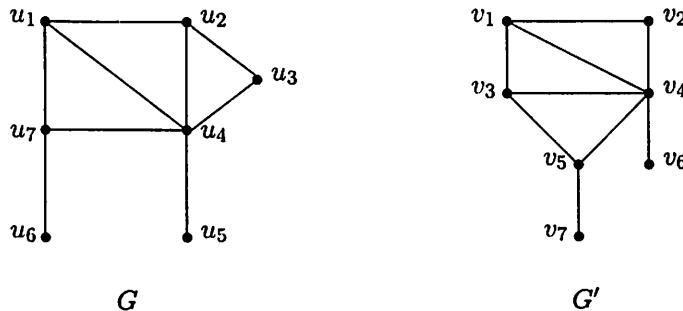
$$z = \{0.2316, 0.2211, 0.2316, 0.2211, 0.2211\}$$

$$z' = \{0.2147, 0.2254, 0.2192, 0.2192, 0.2254\}.$$

Since $z \neq z'$, the two graphs G and G' are not isomorphic.

Consider the two graphs shown in Figure 3.

Figure 3. Two isomorphic graphs



With $\epsilon = 0.1$, we obtain

$$S(G) = \begin{pmatrix} 0.0270 & 0.2973 & 0.0270 & 0.2973 & 0.0270 & 0.0270 & 0.2973 \\ 0.2973 & 0.0270 & 0.2973 & 0.2973 & 0.0270 & 0.0270 & 0.0270 \\ 0.0370 & 0.4074 & 0.0370 & 0.4074 & 0.0370 & 0.0370 & 0.0370 \\ 0.1930 & 0.1930 & 0.1930 & 0.0175 & 0.1930 & 0.0175 & 0.1930 \\ 0.0588 & 0.0588 & 0.0588 & 0.6471 & 0.0588 & 0.0588 & 0.0588 \\ 0.0588 & 0.0588 & 0.0588 & 0.0588 & 0.0588 & 0.0588 & 0.6471 \\ 0.2973 & 0.0270 & 0.0270 & 0.2973 & 0.0270 & 0.2973 & 0.0270 \end{pmatrix}$$

$$S(G') = \begin{pmatrix} 0.0270 & 0.2973 & 0.2973 & 0.2973 & 0.0270 & 0.0270 & 0.0270 \\ 0.4074 & 0.0370 & 0.0370 & 0.4074 & 0.0370 & 0.0370 & 0.0370 \\ 0.2973 & 0.0270 & 0.0270 & 0.2973 & 0.2973 & 0.0270 & 0.0270 \\ 0.1930 & 0.1930 & 0.1930 & 0.0175 & 0.1930 & 0.1930 & 0.0175 \\ 0.0270 & 0.0270 & 0.2973 & 0.2973 & 0.0270 & 0.0270 & 0.2973 \\ 0.0588 & 0.0588 & 0.0588 & 0.6471 & 0.0588 & 0.0588 & 0.0588 \\ 0.0588 & 0.0588 & 0.0588 & 0.0588 & 0.6471 & 0.0588 & 0.0588 \end{pmatrix}.$$

Hence,

$$\begin{aligned} z &= \{0.1616, 0.1616, 0.1179, 0.2489, 0.0742, 0.0742, 0.1616\} \\ z' &= \{0.1616, 0.1179, 0.1616, 0.2489, 0.1616, 0.0742, 0.0742\}. \end{aligned}$$

By comparing, we see that the two sets z and z' are the same, and the vertex set $\{u_1, u_2, u_7\}$ has been mapped to the vertex set $\{v_1, v_3, v_5\}$, $\{u_3\}$ to $\{v_2\}$, $\{u_4\}$ to $\{v_4\}$, and $\{u_5, u_6\}$ to $\{v_6, v_7\}$. This implies that the technique can be usefully used in vertex classification approaches.

6 Conclusions

This paper studied the graph invariant based on the regular stochastic matrices as a first attempt. We illustrated how the regular stochastic matrices $S(G)$ and $S(G')$ can be constructed from the adjacency matrices $A(G)$ and $A(G')$ and how the fixed points z and z' of the regular stochastic matrices can be obtained. The study indeed showed that the fixed points can be effective tool for the development of graph invariants and can possibly be applied in vertex classification.

Two graphs G and G' are isomorphic implies that $A(G) = P^{-1}A(G')P$ and this implies that the two matrices $A(G)$ and $A(G')$ are similar. Hence, the determinant and the eigenvalues of them must be the same. However, even if these values are distinct, an isomorphism between the two graphs is not easily determined. The graph invariant discussed in this paper has a characteristic that if the values are the same and distinct, then an isomorphism can be easily obtained. The technique can be applied to the general and digraphs which is the subject of the subsequent paper.

References

- [1] D. Cvetkovic, M. Doob, and H. Sachs, *Spectra of Graphs-Theory and Application*, Deutscher Verlag der Wissenschaften-Academic Press, Berlin-New York, 1980.
- [2] D. Cvetkovic, *A study of eigenspaces of graphs*, Linear Algebra and Its Applications 182 (1993) 45-66.
- [3] P. Fletcher, H. Hoyle, and C.W. Patty, *Foundations of Discrete Mathematics*, PWS-KENT Publishing Company, 1991.
- [4] G.H. King and W.G. Tzeng, *New graph invariant for graph isomorphism: probability propagation matrix*, Journal of Information Science and Engineering 15(3), 1999, 337-352.
- [5] R. Merris, *Graph Theory*, John Wiley & Sons, Inc., 2001.
- [6] K.H. Rosen, J.G. Michaels, J.L. Gross, J.W. Grossman, and D.R. Shier, *Handbook of Discrete and Combinatorial Mathematics*, CRC Press, 2000.
- [7] S. Lipschutz, *Schaum's Outline Series, Finite Mathematics*, McGRAW-Hill Book Company, 1966.

Department of Mathematics
 Keimyung University
 Daegu, 704-701, Korea
 kmkim@kmu.ac.kr

Some bounds on Steinhaus graphs

Daekeun Lim

Abstract

In this paper, we give the number of Steinhaus graphs with $\gamma(G) = 1$, and an upper bound for domination number for all nontrivial Steinhaus graphs.

1. Introduction

A set $S \subseteq V(G)$ of a graph G is a *dominating set* if every vertex not in S is adjacent to a vertex in S . The *domination number* of G , denoted by $\gamma(G)$, is the minimum cardinality of a dominating set. A dominating set of G of cardinality $\gamma(G)$ is called a γ -set. We denote that for each vertex v in G , *open neighborhood*, $N(v)$, the set of vertices adjacent to v . The concept of domination in graphs, with variations, is now well studied in graph theory. The first three theorems about dominating set were given by Ore in his book, *Theory of Graphs*, as follows(see [7]):

Theorem 1. 1 *A dominating set S is a minimal dominating set if and only if for each vertex $u \in S$, one of the following two conditions holds:*

(a) *u is an isolate of S .*

(b) *there exists a vertex $v \in V - S$ for which $N(v) \cap S = \{u\}$.*

Theorem 1. 2 *Every connected graph G of order $n \geq 2$ has a dominating set S whose complement $V - S$ is also a dominating set.*

Theorem 1. 3 *If G is a graph with no isolated vertices, then the complement $V - S$ of every minimal dominating set S is a dominating set.*

1991 AMS Subject Classification: 05C05.

Key words and phrases: Steinhaus graph; domination number; generating string; doubly symmetric; partner

A *Steinhaus graph* G is a labeled graph G of order n whose adjacency matrix $A(G) = (a_{i,j})$ satisfy the Steinhaus property : $a_{i,j} = a_{i-1,j-1} + a_{i-1,j} \pmod{2}$ for each $1 \leq i < j \leq n$. It is easy to see that a Steinhaus graph G is completely determined by the first row of the adjacency matrix $A(G)$. The triangle $(a_{i,j})_{2 \leq i < j \leq n}$ in $A(G)$ is called the *Steinhaus triangle* of G and the first row $(a_{1,j})$ for $j = 1, 2, \dots, n$ in the adjacency matrix $A(G)$ is called the *generating string* of G . So, G is generated by the first row (which is the generating string) in the Steinhaus triangle. It is obvious that there are exactly 2^{n-1} Steinhaus graphs of order n . The vertices of a Steinhaus graph are usually labelled by their corresponding row numbers. In Figure 1, the Steinhaus graph generated by 00110110 is pictured. For given a Steinhaus graph G with generating string $T = a_{1,1}a_{1,2}\dots a_{1,n}$, the *partner* of G , $P(G)$, is the Steinhaus graph with the generating string $a_{n,n}a_{n-1,n}\dots a_{1,n}$. Note that G is isomorphic to its partner $P(G)$. A Steinhaus graph G is *doubly symmetric* if G and its partner $P(G)$ are same (for example, see figure 1).

Steinhaus in [10] asked if there were Steinhaus triangles containing the same number of zeros and ones and Harborth [7] answered this affirmatively by showing that for each n , $n \equiv 0, 1 \pmod{4}$, there are at least four strings of length $n - 1$ that generate such triangles.

	1	2	3	4	5	6	7	8
1	0	0	1	1	0	1	1	0
2	0	0	1	0	1	1	0	1
3	1	1	0	1	1	0	1	1
4	1	0	1	0	0	1	1	0
5	0	1	1	0	0	1	0	1
6	1	1	0	1	1	0	1	1
7	1	0	1	1	0	1	0	0
8	0	1	1	0	1	1	0	0

Figure 1 Steinhaus graph with the generating string 00110110

In this paper, $\lfloor x \rfloor$ is the floor of x and $\lceil x \rceil$ is the ceiling of x . We denote $\log_2(x)$ by $lg(x)$.

2. A lower bound for number of Steinhaus graphs with $\gamma(G) = 1$

An obvious upper bound on the domination number is the number of vertices in the graph. Since at least one vertex is needed to dominate a graph, we have $1 \leq \gamma(G) \leq n$

for every graph of order n . A graph obtains $\gamma(G) = 1$ if and only if $\Delta(G) = n - 1$, and it achieves the upper bound if and only if the graph is $G = \bar{K}_n$, G is the set of isolated vertices. Note that each isolated vertex must be in every dominating set. We want to show that the number of Steinhaus graphs with $\gamma(G) = 1$ is at most n .

Theorem 2. 1 *The number of Steinhaus graphs with $\gamma(G) = 1$ is n .*

Proof. For each $1 \leq i \leq n$, we want to construct a general generating string such that the degree of vertex i is $n - 1$. Now, we want to construct an adjacency matrix (a_{ij}) which gives the vertex i of degree $n - 1$. Let k be the vertex which is not adjacent to i . Define

$$a_{i,j} = \begin{cases} 0 & \text{if } j = i, k; \\ a_{j,i} & \text{otherwise.} \end{cases}$$

This matrix generated by the string a_{ij} gives the vertex i of degree $n - 1$.

Let $i < j$ be vertices whose degree is $n - 1$. Then the string $a_{i,i} \cdots a_{i,n}$ is $00 \cdots 0$. Thus the string $a_{j,j} \cdots a_{j,n}$ is also $00 \cdots 0$. So, $\deg(j) \leq n - j - 1 < n - 1$. This gives a contradiction. \square

3. A upper bound for domination number for Steinhaus graphs

For graphs without isolated vertices, the upper bound n is much improved in a classical result that is direct consequence of Ore's Theorem ([7]).

Theorem 3. 1 *If a graph G has no isolated vertices, then $\gamma(G) \leq n/2$.*

Ore's Theorem applies to graphs having minimum degree $\delta(G) \geq 1$. Restricted their attention to graphs G having $\delta(G) \geq 2$, MaCuaig and Shepherd ([7]) made other improvement on the upper bound. Also, they characterized the extremal graphs that obtain this upper bound.

Theorem 3. 2 *If G is a connected graph with $\delta(G) \geq 2$ and G is not a special graph, then $\gamma(G) \leq 2n/5$.*

Reed([7]) again improved the upper bound by increasing the minimum degree requirement.

Theorem 3. 3 *If G is a connected graph with $\delta(G) \geq 3$, then $\gamma(G) \leq 3n/8$.*

An obvious conjecture seems to be for any graph G with $\delta(G) \geq k$, $\gamma(G) \leq kn/(3k - 1)$. However, for $\delta(G) \geq 7$, Caro and Roditty gave the better bound. The question remains open for graphs G having $4 \leq \delta(G) \leq 6$.

Now returning our attention to Steinhaus graphs, we give an upper bound of domination numbers. Let G be a Steinhaus graph with n vertieces and a pendent vertex k i.e. the degree of k is 1. So, $\delta(G) = 1$. Let i be a vertex that is adjacent to k .

Lemma 3. 4 *If $k = 1$ or n , then $\gamma(G) \leq n/3$.*

Proof. Assume that $k = 1$.

Case 1 $i = 2$.

In this case, G is the path of length n , P_n . So, $\gamma(G)$ is $n/3$.

Case 2 $i = 3$.

In this case, G is a wounded ladder graph. So $\gamma(G) \leq n/4$.

Case 3 $i \geq 4$.

Choose m such that $2^m \leq i < 2^{m+1}$. Choose l such that $l2^m \leq n(l + 1) < 2^{m+1}$. Then, i is adjacent to the vertices $1, 2, \dots, i - 1$ by Steinhaus property. On the other hand, for each $1 \leq j \leq l$, the vertex $j2^m$ is adjacent to vertices $i + (j - 1)2^m + r$, where $r = 1, 2, \dots, 2^m$. Therefore, $\{i, 2^m, \dots, (l + 1)2^m\}$ is a dominating set of G . So, $\gamma(G) \leq l + 2$. Since $4 \leq 2^m$, $\gamma(G) \leq n/3$.

Hence the proof of Theorem is completed by combining three cases for $k = 1$.

For $k = n$, use its partner of G , $P(G)$ by using $\gamma(G) = \gamma(P(G))$. \square

Lemma 3. 5 *If $2 \leq k \leq n - 1$, then $\gamma(G) \leq 2$.*

Proof. Consider the following two cases.

Case 1 $i < k$.

If $i = 1$, then the generating string is clearly $011 \dots 1$ by Steinhaus property, the graph G is the star graph, $K_{1,n-1}$. So, the set $\{1\}$ is a dominating set of G . In this case, $\gamma(G) = 1$. Assume that $2 \leq i$. By Steinhaus property, the string $a_{i,i+1}a_{i,i+2} \dots a_{i,n}$ is $11 \dots 1$. Therefore, the vertex i is adjacent to the vertices $i + 1, i + 2, \dots, n$.

On the other hand, since $a_{k,1}a_{k,2} \dots a_{k,i-1}$ is $00 \dots 0$ and $a_{i,k+1} = 1$, the string $a_{k,1}a_{k,2} \dots a_{k,i}$ is $11 \dots 1$. So vertex $k + 1$ is adjacent to the vertices $1, 2, \dots, i$. Thus $\{i, k + 1\}$ is a dominating set of G . So, $\gamma(G) \leq 2$.

Case 2 $k < i$.

If $i = n$, then the generating string is clearly $00 \cdots 01$ by Steinhaus property, the graph G is the star graph, $K_{1,n-1}$. So, $\{1\}$ is a dominating set of G . In this case, $\gamma(G) = 1$. Assume that $i < n$. By Steinhaus property, the string $a_{k-1,i+1}a_{k-1,i+2} \cdots a_{k-1,n}$ is $11 \cdots 1$. Therefore, the vertex $k - 1$ is adjacent to the vertices $i + 1, i + 2, \dots, n$.

On the other hand, since $a_{i-1,1}a_{i-1,2} \cdots a_{i-1,k}$ is $00 \cdots 0$ and $a_{k-1,i} = 1$, the string $a_{i,1}a_{i,2} \cdots a_{i,k-1}$ is $11 \cdots 1$. So vertex i is adjacent to the vertices $1, 2, \dots, k - 1$. Thus $\{k - 1, i\}$ is a dominating set of G . So, $\gamma(G) \leq 2$.

Hence the proof of Lemma is completed by combining two cases. \square

By combining above Lemmas, we have the following upper bound.

Theorem 3. 6 If G with n vertices is a nontrivial Steinhaus graph with a pendent vertex, then, $\gamma(G) \leq n/3$.

Note that the path P_n achieves the bound.

References

- [1] B. Bollobas, *Graph Theory*, Springer-Verlag, New York, 1979.
- [2] C. K. Bailey and W. M. Dymacek, *Regular Steinhaus graphs*, Congr. Numer. **66** (1988), 45-47.
- [3] W. M. Dymacek, *Bipartite Steinhaus graphs*, Discrete Mathematics, **59** (1986) 9-22.
- [4] W. M. Dymacek and T. Whaley *Generating strings for bipartite Steinhaus graphs*, Discrete Mathematics, **141** (1995), no 1-3, 95-107.
- [5] W. M. Dymacek, M. Koerlin and T. Whaley *A survey of Steinhaus graphs*, Proceedings of the Eihgth Quadrennial Intrnational Conference on Graph Theory, Combinatorics, Algorithm and Applications, 313-323, Vol. 1, 1998.
- [6] G. J. Chang, B. DasGupta, W. M. Dymacek, M. Furer, M. Koerlin, Y. Lee and T. Whaley *Characterizations of bipartite Steinhaus graphs*, Discrete Mathematics **199** (1999) 11-25.

- [7] H. Harborth, *Solution of Steinhaus's problem with plus and minus signs*, J. Combinatorial Theory **12 (A)** (1972), 253-259.
- [8] T. W. Haynes, S. T. Hedetniemi, P. J. Slater (Eds), *Domination in Graphs: Advanced Topics*, Marcel Dekker, New York, 1998.
- [9] T. W. Haynes, S. T. Hedetniemi, P. J. Slater, *Fundamentals of Domination in Graphs*, Marcel Dekker, New York, 1998.
- [10] D. J. Kim, D. K. Lim, *2-connected and 2-edge-connected Steinhaus graphs*, Discrete Math. **256** (2002), No. 2-3, 257-265.
- [11] D. J. Kim, D. K. Lim, *Steinhaus Graphs with Minimum Degree Two*, Kyungpook Mathematical Journal, Vol. **43**, No. 4 (2003), 567-577.
- [12] H. Steinhaus, *One Hundred Problems in Elementary Mathematics*, Dover, New York, 1979.
- [13] W. M. Dymacek, *Connectivity in Steinhaus graphs*, in preparation.

Department of Mathematics
Keimyung University
Daegu 704-701 Korea
e-mail : limd@kmu.ac.kr

지방중소도시의 상업시설 실태에 관한 통계적 고찰 - 경산시를 사례로 -

송규문

계명대학교 자연과학대학 통계학과

A Statistical Study on the Actual Conditions of Commercial Facilities of Local Small and Medium Cities - as A Case of Gyeongsan City -

Gyu Moon Song

Department of Statistics, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

요약. 중소도시인 경산시의 상업시설 이용실태를 조사하여 중소도시의 지역적 여건을 파악하고 이용객들의 특성을 분석하여 경산시 상업시설의 활성화방안을 제시하고자 한다.

Abstract. The purpose of this study is to present a plan which can vitalize the commercial facilities of Gyeongsan City by investigating the actual conditions of commercial facilities of Gyeongsan, a small and medium city, grasping a local given condition of small and medium cities and analysing the characteristics of users.

I. 서 론

경산시는 경상북도의 남부 중앙지역에 위치하고 있으며, 서쪽으로는 대구광역시, 남쪽으로는 청도군, 동북쪽으로는 영천시 등과 인접하여 왔다. 대구분지의 동쪽 끝에 자리잡은 경산시는 경부선·대구선 철도와 경부고속도로 그리고, 국도4호(산업도로)·25호선이 지나가는 교통이 요충지이다.

따라서, 포항, 경주, 울산, 부산 등 남동쪽 지역에서 대구로 진입하는 관문의 역할을 하는 곳이다. 또한 경산시는 대구광역시와 연접하여 있는 관계로 대구의 일상생활권내의 속해있는 대도시 근교 주변지역으로서의 성격을 강하게 지니고 있다. 이러한 위치적 특성으로 말미암아 경산시는 근교농업지역, 근교학원 도시지역, 근교주거 및 공업지역 등의 다양한 기능을 수행하고 있는 도농복합적인 대도시 근교 주변지역이라 할 수 있다(5).

하지만 상업시설로는 정기시장 5개소, 대형할인점 1개소, 백화점 및 쇼핑센터는 전무한 형편이고

대구와 일상생활권내에 있는 관계로 지역민들의 대구에서의 소비지출이 증가하고 있는 추세이다.

이처럼 교통, 교육, 문화시설의 차이로 인하여 중소도시의 상권 및 상업지역은 인접한 대도시에 비하여 점점 침체되고 있다. 그러나 여러 지방 중소도시에서는 향후 도시계획수립에 있어서 이러한 현실을 고려하지 않은 체 도시발전의 가능성과 전망만을 전제로 한 상업지역에 대한 공간수요를 설정하고 있다. 이러한 원인으로 인해 몇몇 중소도시에서는 상업지역이 과대책정되고 있는 것이 현실이다(1).

본 연구는 어떻게 해야 지역내소비자들이 지역내의 상업시설을 많이 이용할 수 있는가에 대해서 대구시와 인접한 경산시를 사례지역으로 설정하여 중소도시에서의 상업시설 이용실태를 조사하여 중소도시의 지역적 여건을 파악하고 이용객들의 특성을 분석하여 경산시 상업시설의 활성화방안을 제시하고자 하는데 목적이 있다. 2절에서는 이론적 배경에 대하여 기술하고, 3절에서는 연구방법에 대하여 4절에서는 그 결과에

대하여 기술하고 5절에서 결론을 맺는다.

II. 이론적 배경

중소도시의 상업시설은 급변하는 유통환경에 적응하지 못하고 아직도 현상유지에만 급급하고 있는 실정이어서 유통현대화과정에서 계속 낙후되어가고 있다. 상업시설에 대한 환경개선사업을 통해 상인을 보호하고 시민들에게 다양한 쇼핑 공간을 제공하는 일거양득의 효과를 거두어야한다. 대도시의 상설할인매장 등의 저가 할인점들의 등장으로 중소도시의 상업시설은 급변하는 유통환경 속에서 생존하기위한 정략방안을 강구하여야한다.

지방중소도시에서의 적정상업시설의 용도별 규모를 산정하고, 국토계획법에서 정하고 있는 상업 지역의 적정규모를 연구하고 도시계획에 있어서의 지방중소도시 상업지역의 적정계획 등에 관한 연구가 이루어지고 있다. 외국 유통업체들의 국내진출과 국내 대기업의 유통산업의 진출이 활발해지고, 전자상거래가 활성화되면서 새로운 소매업태가 성장하고 있다. 도시공간구조 입장에서 보면 지하철 노선의 개설과 역세권 개발이 개발되면서 도심이나 부심이 아닌 주거지에 인접한 지역중심 상가의 입지가 강화되는 단계에 있다(1).

상업시설의 이용형태에 대한 이론은 소비자들의 행동이론과 상업시설의 특징 그리고 각 상업 시설의 이용에 영향을 미치는 저항 및 촉진요인에 관한 이론들이다. 이 모든 것을 포함하는 것이 상권이론이다. 장동훈 등(2003)은 상업시설 이용관리는 지속적인 부동산 관리와 관련이 깊으며 소비자의 상업시설 이용행태에 관한 내용은 부동산업 분야에서 매우 중요한 의사결정의 자료라고 하였다. 상업시설의 이용행태는 상권분석 중에서 상권의 확정이나 상권내의 잠재 매출액의 추정, 소비자의 행동, 입지이론과 밀접한 관련이 있다. 상권분석의 과정에서 상업시설의 이용권, 즉 상권은 소비자의 생활권과 연계되어 있어 상권을 확정할 때 수학적이거나 통계적인 모형에 의해 소비자의 미시적인 요인을 함께 반영하여 확정하는 것이 타당함을 재확인했다.

김한수·임준홍(1996)은 상업시설은 도심공간

의 도시의 이미를 창출하는 대표적인 공간이며, 도시 내에서 생활하는 도시민이나 방문객에게 가장 큰 이미지를 줄 수 있는 공간이므로 업종 분포와 이용자의 행태에 대한 시·공간적 변화를 중심으로 분석하였다.

III. 연구방법

3.1 연구모형

본 연구는 소비실태를 조사하기 위하여 인구 통계학적 변수들이 상업시설의 이용에 대하여 영향을 미치는지를 밝히고 이를 통하여 상업시설에 대한 실태를 파악하여 활성화방안을 제시하고자 한다.

인구통계학적 변수

성별, 연령, 교육수준, 거주지, 소득, 직업, 결혼유무	⇒	상업시설 이용실태
---------------------------------------	---	--------------

[그림 1] 연구모형

3.2 가설 및 분석방법

인구통계학적 변수에 의해 상업시설이용에 차이가 있는지를 검정하고자 한다.

첫째, 인구통계변수에 대하여 빈도분석을 실시한다.
둘째, 상업시설 이용실태에 대하여 파레토 그레프로 비교한다.

셋째, 상업시설에 대하여 인구특성에 의해 차이가 나타나는지 χ^2 검정과 분산분석을 실시한다.

넷째, 평균소비지출액에 대하여 다변량 분산분석을 실시한다.

3.3 설문지 구성

본 연구에서 사용된 설문지는 인구통계변수와 경산시의 상업시설 관련사항과 대구시의 상업시설 관련사항을 측정하는 문항으로 구성되어있다. 설문문항이 많이 누락되거나 동일한 숫자로 반복 응답하고 있는 불성실한 답변을 한 132부를 제외하고 유효한 397부로 통계분석을 하였다.

<표 1> 응답자의 인구통계적 특성

변수	항목	명(비율)	변수	항목	명(비율)
성별	남	228 (57.4%)	평균 소득	100만원 미만	100 (25.2%)
	여	169 (42.6%)		100~200만원	159 (40.1%)
연령	20대	133 (33.5%)		200~300만원	96 (24.2%)
	30대	101 (25.4%)		300만원 이상	42 (10.6%)
교육 수준	40대	104 (26.2%)	직업	생산직	64 (16.1%)
	50대이상	59 (14.9%)		사무직	57 (14.4%)
	고졸	154 (38.9%)		서비스업	87 (21.9%)
거주지	전문대졸	80 (20.2%)		자영업	89 (22.4%)
	대학	162 (40.8%)		전문직	57 (14.4%)
거주지	경산권	309 (77.8%)		기타	43 (10.8%)
	하양권	60 (15.1%)	결혼 유무	기혼	220 (55.7%)
	진량·자인권	28 (7.1%)		미혼	175 (44.3%)

IV. 실증분석

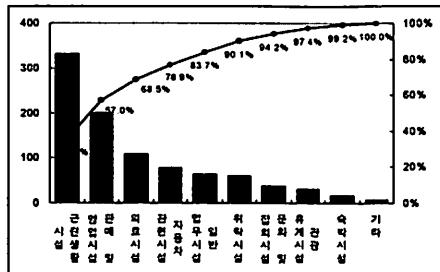
4.1 표본의 특성

<표 1>에 본 연구에 이용된 응답자의 인구통계적 특성을 요약해서 나타내었다. 성별은 남성이 57.4%, 여성이 42.6%이며, 연령별로는 20대가 33.5%, 30대가 25.4%, 40대가 26.2%, 50대 이상 14.9%로 나타났다. 교육수준은 대졸이 40.8%로 가

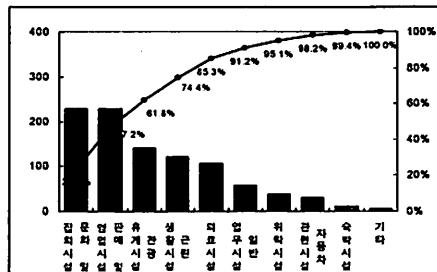
장 높게 나타났으며, 고졸이 38.9%, 전문대졸이 20.2%로 나타났다. 거주지별로 살펴보면 경산권이 77.8%, 하양권이 15.1%, 진량·자인권이 7.1%로 나타났다. 월평균소득은 100만원 미만이 25.2%, 100~200만원이 40.1%, 200~300만원이 24.2%, 300만원 이상이 10.6%로 조사되었다. 직업분포를 살펴보면 자영업이 22.4%로 가장 높게 나타났으며, 서비스업이 21.9%, 생산직이 16.1%, 사무직과

<표 2> 경산시와 대구광역시에서 주이용 상업시설(복수응답)

항목	경산시		대구시	
	빈도	비율(%)	빈도	비율(%)
근린생활시설	331	35.6	121	12.6
문화 및 문화시설	38	4.1	228	23.7
판매 및 영업시설	199	21.4	227	23.6
의료시설	107	11.5	105	10.9
일반 업무시설	63	6.8	57	5.9
숙박시설	17	1.8	11	1.1
위탁시설	60	6.5	38	3.9
자동차 관련시설	78	8.4	30	3.1
관광휴게시설	30	3.2	140	14.5
기타	7	0.8	6	0.6
합계	930	100	963	100



[그림 2] 경산시에서 주이용 파레토그래프



[그림 3] 대구시에서 주이용 파레토그래프

전문적이 14.4%, 기타 10.8% 순으로 나타났다.

4.2 상업시설 이용실태

4.2.1 경산시와 대구광역시에서 주이용 상업시설

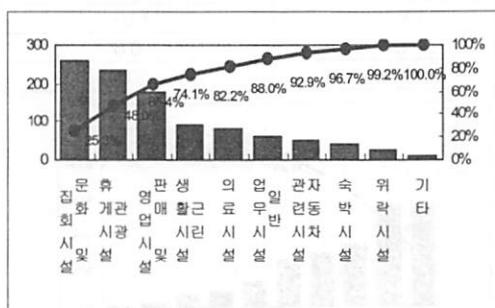
경산시에서 주이용 상업시설로는 근린생활시설, 판매 및 영업시설, 의료시설이 68.5%를 차지하였으며, 대구시에서의 주이용 상업시설은 문화 및 집회시설, 판매 및 영업시설, 관광휴게시설이 61.8%를 차지하여 경산시에는 품격 있는 문화창조를 위한 문화시설과 편리하고 편리한 휴게시설 등이 부족한 것으로 나타났다(표 2)。

4.2.2 경산시 필요 상업시설

경산시에 필요한 상업시설로는 문화 및 집회시설, 관광휴게시설, 판매 및 영업시설이 65.4%를 차지하여 <표 2>의 결과와 같이 문화자원 활용 관광·휴양 산업 육성을 활성화하여야 하는 것으로 나타났다.

<표 3> 경산시 필요 상업시설(복수응답)

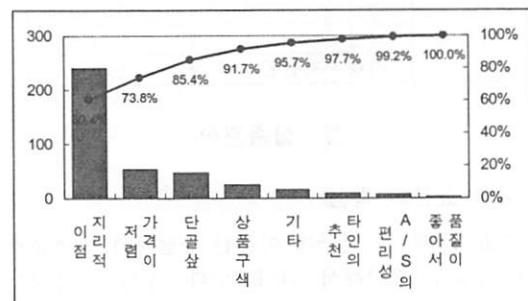
항목	빈도	비율(%)
근린생활시설	89	8.7
문화 및 집회시설	260	25.3
판매 및 영업시설	179	17.4
의료시설	83	8.1
일반 업무시설	60	5.8
숙박시설	39	3.8
위락시설	26	2.5
자동차 관련시설	50	4.9
관광휴게시설	233	22.7
기타	8	0.8
합계	1027	100



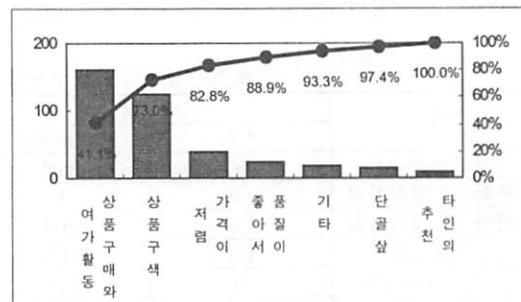
[그림 4] 경산시 필요 상업시설에 대한 파레토 그램

4.2.3 상업시설 이용 이유

경산시의 상업시설을 이용하는 주된 이유에 대해서는 지리적 이점과 가격이 저렴해서가 73.8%를 차지하였고, 대구시의 상업시설을 이용하는 주된 이유에 대해서는 상품구매와 여가활동과 상품구색이 73.0%를 차지하여 경산시의 상업시설에 대한 여건이 대구시에 비해 경쟁력이 낮은 것으로 나타나고 있다[그림 5] [그림 6].



[그림 5] 경산시의 상업시설을 이용하는 주된 이유



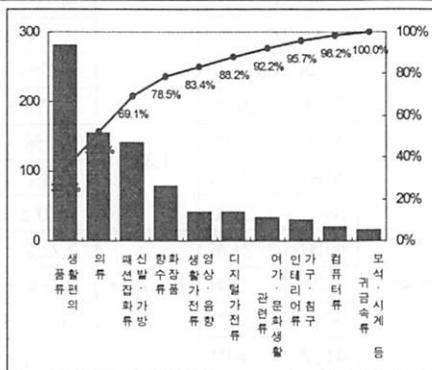
[그림 6] 대구시의 상업시설을 이용하는 주된 이유

4.2.4 주로 쇼핑하는 품목

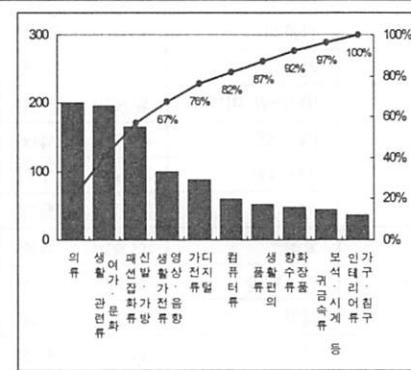
경산시 지역에서는 생활편의 품류, 의류, 신발, 가방, 패션잡화가 69.1%로 나타났다. 대구시 지역에서는 주로 쇼핑하는 품목으로 의류, 여가·문화생활, 신발, 가방 패션잡화류, 영상, 음향, 생활가전류가 67%를 차지하는 것으로 나타났다. 대구시에 경우 여가·문화시설이 많이 입점해 있고, 쇼핑과 여가문화를 동시에 추구하고자 하는 경산시민들의 소비행태를 위한 다양한 여건을 갖추고 있기 때문인 것으로 분석되고 있다[그림 7] [그림 8].

<표 4> 경산시와 대구광역시에서 주로 쇼핑하는 품목(복수응답)

항목	경산시		대구시	
	빈도	비율(%)	빈도	비율(%)
컴퓨터류	21	2.5	59	6.0
디지털가전류	40	4.8	87	8.9
영상, 음향, 활가전류	41	4.9	99	10.1
의류	155	18.6	201	20.4
신발, 가방, 선착화류	140	16.8	165	16.8
보석, 시계 등 금속류	15	1.8	43	4.4
화장품, 향수류	78	9.4	47	4.8
가구, 침구, 테리어류	29	3.5	35	3.6
여가, 문화생활 편류	33	4.0	196	19.9
생활편의품류	281	33.7	51	5.2
합계	833	100	983	100



[그림 7] 경산시에서 주로 쇼핑하는 품목



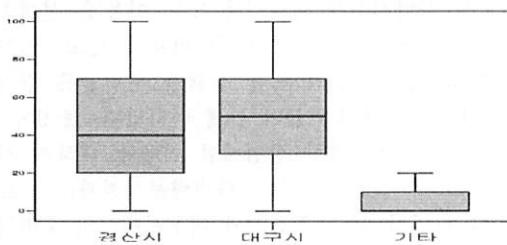
[그림 8] 대구시에서 주로 쇼핑하는 품목

4.3 상업시설에 대한 평균소비지출 비율

상업시설에 대한 소비지출비율을 살펴보면 경산시에서는 평균적으로 43.64%, 대구시에서 49.86%를 소비하는 것으로 대구시에서의 소비지출이 높게 나타났다.

<표 5> 지역별 평균소비지출비율

지역	$\bar{X} \pm S$
경산시	43.64% \pm 26.41
대구시	49.86% \pm 25.94
기타	6.50% \pm 12.59



[그림 9] 지역별 평균소비지출 비율에 대한 상자그림

상업시설에 대한 소비지출비율을 인구통계적 특성에 따라 비교하면 <표 6>과 같다.

첫째, 성별로 보면 남자는 대구시에서의 소비지출비율이 높고 여자는 경산시에서의 소비지출이 높은 것으로 나타났다.

둘째, 연령별로는 40대 이상이 경산에서 소비지출이 대구시보다 높게 나타나고, 30대 이하는 대구에서 소비지출이 더 높게 나타나고 있다.

셋째, 교육수준에서는 학력이 높을수록 대구시에서 소비지출이 높고, 학력이 낮을수록 경산시에서 소비지출이 높은 것으로 나타났다.

넷째, 거주지별로 살펴보면 대구와 가까운 경산시에 거주하는 사람들은 대구시에서 소비지출이 높게 나타났고, 전량·자인권에 거주하는 사람들은 경산에서 소비지출이 높게 나타났다.

다섯째, 결혼여부에 대해서는 기혼인 사람은 경산에서, 미혼인 사람은 대구시에서 소비지출이 높은 것으로 나타났다.

<표 6> 인구 통계적 특성별 경산시 및 대구시 상업시설에서 평균 소비지출액의 비율

변수	항목	경산시	F	대구시	F	기타	F
성별	남	41.61% ± 25.62	3.205	52.44% ± 25.16	5.355*	5.96% ± 11.10	0.993
	여	46.40% ± 27.28		46.37% ± 26.64		7.23% ± 14.38	
연령	20대	34.46% ± 23.20	14.733**	58.58% ± 23.85	13.388**	6.96% ± 12.92	0.308
	30대	40.08% ± 25.93		53.04% ± 25.61		6.88% ± 12.53	
	40대	53.32% ± 25.46		41.18% ± 23.82		5.50% ± 11.28	
	50대	53.53% ± 27.31		39.91% ± 27.14		6.55% ± 14.30	
직업	생산직	43.36% ± 25.43	2.102	49.84% ±	1.292	6.80% ± 11.07	1.009
	사무직	40.18% ± 22.90		53.21% ±		6.61% ± 12.33	
	서비스업	44.89% ± 25.76		47.36% ±		7.76% ± 16.40	
	자영업	48.62% ± 29.78		46.93% ±		4.45% ± 8.70	
	전문직	35.44% ± 24.32		56.19% ±		8.37% ± 15.08	
	기타	46.60% ± 26.92		48.28% ±		5.12% ± 8.76	
소득	100만원 미만	42.82% ± 27.93	1.150	50.11% ± 27.72	1.334	7.07% ± 15.34	0.769
	100~200	43.00% ± 24.66		49.79% ± 25.07		7.21% ± 12.86	
	200~300	47.50% ± 27.77		46.85% ± 25.84		5.65% ± 10.44	
	300~400	39.17% ± 25.78		56.43% ± 24.70		4.40% ± 8.21	
교육수준	고졸	52.22% ± 26.88	13.804**	40.56% ± 25.76	17.578**	7.22% ± 14.88	1.464
	전문대졸	38.94% ± 24.06		53.31% ± 23.38		7.75% ± 13.78	
	대학졸	38.07% ± 25.06		56.70% ± 24.72		5.23% ± 9.15	
결혼여부	기혼	48.85% ± 26.89	20.873**	44.77% ± 26.04	20.449**	6.37% ± 12.98	0.062
	미혼	36.93% ± 24.27		56.38% ± 24.41		6.69% ± 12.15	
거주지	경산권	42.92% ± 25.77	1.636	51.38% ± 25.17	3.538*	5.72% ± 10.88	2.637
	하양권	43.30% ± 28.03		47.53% ± 27.37		9.17% ± 17.42	
	진량·자인권	52.32% ± 29.17		38.39% ± 28.84		9.29% ± 16.76	

*p<0.05 **p<0.01

4.4 지하철 연장운행시 상업시설 이용에 대한 차이 검정

지하철 연장운행시 상업시설 이용에 대하여 분석해본 결과 대구시 상업시설을 이용한다는 비율은 57.7%이고, 경산시의 상업시설을 이용한다는 비율은 23.4%로 나타나 대도시에서의 상업시설 이용을 원하는 것으로 나타났다<표 7>.

<표 7> 지하철 연장운행시 상업시설 이용에 대한 비율

항목	빈도(%)
대구시 상업시설 적극적 이용	92(23.2%)
대구시 상업시설 이용	137(34.5%)
상업시설 선택에 영향이 없음	75(18.9%)
경산시 상업시설 이용	54(13.6%)
경산시 상업시설 적극적 이용	39(9.8%)

지하철 연장운행시 상업시설 이용에 대하여 인구통계적 특성별로 살펴보면 <표 8>과 같다. 모든 변수에서 대구시 상업시설 적극적 이용 또는 대구시 상업시설 이용할 것이라는 비율이 높게 나타났다.

지하철 연장운행시 상업시설 이용에 대하여는 '대구시 상업시설을 적극이용 또는 이용'을 선택한 사람은 대구시에서의 소비지출비율이 높고 '경산시 상업시설 적극 이용'을 선택한 사람들은 경산시에서의 소비지출비율이 높게 나타났다<표 9>.

지하철 연장운행시 상업시설 이용에 대하여 지역별 소비지출액에 대한 다변량분석결과는 <표 10>에 나타나 있다. 경산시와 대구시에서의 소비지출에 대하여 평균차이가 있다는 것을 알 수 있다.

<표 8> 인구통계적 특성별 상업시설 이용에 대한 χ^2 검정(빈도/행%)

변수	항목	대구시 상업시설 적극적 이용	대구시 상업시설 이용	상업시설 선택에 영향이 없음	경산시 상업시설 이용	경산시 상업시설 적극적 이용	χ^2	p-value
성별	남	58(25.4%)	76(33.3%)	42(18.4%)	32(14.0%)	20(8.8%)	2.14	0.710
	여	34(20.1%)	61(36.1%)	33(19.5%)	22(13.0%)	19(11.2%)		
직업	생산직	18(28.1%)	16(25.0%)	13(20.3%)	14(21.9%)	3(4.7%)	27.665	0.118
	사무직	12(21.1%)	27(47.4%)	6(10.5%)	9(15.8%)	3(5.3%)		
	서비스업	18(20.7%)	24(27.6%)	24(27.6%)	8(9.2%)	13(14.9%)		
	자영업	23(25.8%)	29(32.6%)	15(16.9%)	11(12.4%)	11(12.4%)		
	전문직	9(15.8%)	24(42.1%)	10(17.5%)	8(14.0%)	6(10.5%)		
	기타	12(27.9%)	17(39.5%)	7(16.3%)	4(9.3%)	3(7.0%)		
소득	100만원 미만	24(24.0%)	28(28.0%)	22(22.0%)	14(14.0%)	12(12.0%)	11.239	0.509
	100~200	34(21.4%)	59(37.1%)	24(15.1%)	22(13.8%)	20(12.6%)		
	200~300	25(26.0%)	34(35.4%)	22(22.9%)	12(12.5%)	3(3.1%)		
	300만원 이상	9(21.4%)	16(38.1%)	7(16.7%)	6(14.3%)	4(9.5%)		
연령	20대	34(25.6%)	47(35.3%)	22(16.5%)	16(12.0%)	14(10.5%)	4.968	0.959
	30대	24(23.8%)	38(37.6%)	16(15.8%)	13(12.9%)	10(9.9%)		
	40대	20(19.2%)	34(32.4%)	24(23.1%)	17(16.3%)	9(8.7%)		
	50대이상	14(23.7%)	18(30.5%)	13(22.0%)	8(13.6%)	6(10.2%)		
교육 수준	고졸	34(22.1%)	48(31.2%)	27(17.5%)	25(16.2%)	20(13.0%)	5.710	0.680
	전문대졸	21(26.3%)	27(33.8%)	16(20.0%)	10(12.5%)	6(7.5%)		
	대학졸	36(22.2%)	62(38.3%)	32(19.8%)	19(11.7%)	13(8.0%)		
결혼 여부	기혼	52(23.6%)	73(33.2%)	44(20.0%)	30(13.6%)	21(9.5%)	0.522	0.971
	미혼	40(22.9%)	63(36.0%)	31(17.7%)	24(13.7%)	17(9.7%)		
거주 지	경산권	72(23.3%)	112(36.2%)	49(15.9%)	43(13.9%)	33(10.7%)	13.094	0.109
	하양권	13(21.7%)	16(26.7%)	16(26.7%)	10(16.7%)	5(8.3%)		
	진량·자인권	7(25.0%)	9(32.1%)	10(35.7%)	1(3.6%)	1(3.6%)		

<표 9> 지하철 연장운행시 상업시설 이용에 대하여 지역별 평균소비지출액

항목	경산시	대구시	기타
대구시 상업시설 적극이용	36.89±24.84	57.84±25.21	5.27±11.20
대구시 상업시설 이용	43.65±24.72	50.04±23.61	6.31±12.15
상업시설 선택에 영향이 없음	49.60±29.07	42.71±27.83	7.69±14.21
경산시 상업시설 이용	43.98±26.05	49.44±25.69	6.57±12.01
경산시 상업시설 적극이용	47.68±28.57	44.66±28.07	7.66±14.95
합계	43.64±26.41	49.86±25.94	6.50±12.59

<표 10> 다변량분석 결과

종속변수	제 III 유형 제곱합	자유도	평균제곱	F	유의 확률
경산시	7482.074	4	1870.518	2.729*	.029
대구시	10733.832	4	2683.458	4.114**	.003
기타	301.584	4	75.396	.473	.756

*p<0.05 **p<0.01

4.5 경산시의 상업시설과 대구시의 상업시설 비교

경산시의 상업시설을 대구시의 상업시설과 비교했을 때 어느 정도 경쟁력이 있느냐는 문항에 대해서는 ‘거의 없다’와 ‘없는 편이다’라는 비율이 54.8%이고, ‘조금 있다’와 ‘아주 많이 있다’라는 비율은 13.4%로 나타나 경산시가 대구시에 비하여 지역산업구조경쟁력을 갖추지 못한 것으로 나타났다<표 11>.

경산시의 상업시설을 대구시의 상업시설의 경쟁력에 대하여 인구통계적 특성별로 살펴보면 <표 12>와 같다. 모든 변수에서 ‘경쟁력이 없다’

라는 비율이 ‘경쟁력이 있다’라는 비율보다 훨씬 높게 나타나 지역 상권과 유통서비스업 활성화에 힘써야 할 것으로 보인다.

<표 11> 경산시와 대구시 상업시설의 경쟁력에 대한 비율

경산시의 상업시설을 대구시의 상업시설과 비교했을 때 어느 정도 경쟁력	빈도(%)
거의 없다	64(16.2%)
없는 편이다	153(38.6%)
보통이다	126(31.8%)
조금 있다	46(11.6%)
아주 많이 있다	7(1.8%)

<표 12> 인구통계적 특성별 경쟁력에 대한 χ^2 검정(빈도/행%)

변수	항목	거의 없다	없는 편이다	보통이다	조금 있다	아주 많이 있다	χ^2	p-value
성별	남	42(18.4%)	94(41.2%)	65(28.5%)	24(10.5%)	3(1.3%)	5.652	0.227
	여	22(13.1%)	59(35.1%)	61(36.3%)	22(13.1%)	4(2.4%)		
직업	생산직	12(19.0%)	24(38.1%)	18(28.6%)	8(12.7%)	1(1.6%)	22.582	0.310
	사무직	5(8.8%)	26(45.6%)	20(35.1%)	6(10.5%)	0(0.0%)		
	서비스업	13(14.9%)	32(36.8%)	24(27.6%)	15(17.2%)	3(3.4%)		
	자영업	19(21.3%)	25(28.1%)	37(41.6%)	6(6.7%)	2(2.2%)		
	전문직	7(12.3%)	29(50.9%)	15(26.3%)	5(8.8%)	1(1.8%)		
	기타	8(18.6%)	17(39.5%)	12(27.9%)	6(14.0%)	0(0.0%)		
소득	100만원 미만	18(18.0%)	37(37.00%)	31(31.0%)	10(10.0%)	4(4.0%)	14.592	.264
	100~200	28(17.7%)	61(38.6%)	484(30.4%)	20(12.7%)	1(0.6%)		
	200~300	11(11.5%)	35(36.5%)	38(39.6%)	12(12.5%)	0(0.0%)		
	300만원 이상	7(16.7%)	20(47.6%)	9(21.4%)	4(9.5%)	2(4.8%)		
연령	20대	29(21.8%)	56(42.1%)	32(24.1%)	13(9.8%)	3(2.3%)	14.610	0.263
	30대	15(14.9%)	40(39.6%)	36(35.6%)	8(7.9%)	2(2.0%)		
	40대	11(10.6%)	36(34.6%)	38(36.5%)	17(16.3%)	2(1.9%)		
	50대이상	9(15.5%)	21(36.2%)	20(35.4%)	8(13.8%)	0(0.0%)		
교육 수준	고졸	29(19.0%)	44(28.8%)	59(38.6%)	19(12.4%)	2(1.3%)	16.709*	0.033
	전문대학	15(18.8%)	33(41.3%)	26(32.5%)	5(6.3%)	1(1.3%)		
	대학졸	20(12.3%)	75(46.3%)	41(25.3%)	22(13.6%)	4(2.5%)		
결혼 여부	기혼	35(16.0%)	77(35.2%)	77(35.2%)	27(12.3%)	3(1.4%)	4.381	0.357
	미혼	29(16.6%)	76(43.4%)	48(27.4%)	18(10.3%)	4(2.3%)		
거주지	경산권	56(18.1%)	121(39.2%)	90(29.1%)	37(12.0%)	5(1.6%)	7.754	0.458
	하양권	6(10.0%)	23(38.3%)	24(40.4%)	6(10.01%)	1(1.7%)		
	진량·자인권	2(7.4%)	9(33.3%)	12(44.4%)	3(11.1%)	1(3.7%)		

*p<0.05 **p<0.01

경산시의 상업시설과 대구시의 상업시설의 경쟁력에 대하여는 '경쟁력이 거의 없다 또는 없는 편이다'를 선택한 사람은 대구시에서의 소비지출 비율이 높고 '경쟁력이 있다'라는 항목을 선택한 사람은 경산시에서의 소비지출비율이 높게 나타났다 <표 13>.

경산시의 상업시설과 대구시의 상업시설의 경쟁력에 대하여 소비지출액에 대한 다변량분석 결과는 <표 14>에 나타나 있다. 경산시와 대구시에서의 소비지출에 대하여 평균차이가 있다는 것을 알 수 있다.

<표 13> 경산시의 상업시설과 대구시의 상업시설의 소비지출 비율

항목	경산시	대구시	기타
거의 없다	41.00±27.47	54.12±26.14	4.87±9.414
없는 편이다	37.33±23.42	55.11±23.61	7.56±13.39
보통이다	49.52±27.56	42.71±25.84	5.40±12.26
조금 있다	51.44±26.15	40.89±24.32	7.67±12.95
아주 많이 있다	50±30.55	47.14±27.52	2.86±4.88
합계	43.65±26.44	49.99±25.85	6.36±12.32

<표 14> 다변량분석 결과

종속 변수	제 III 유형 제곱합	자유도	평균 제 곱	F	유의 화률
경산시	13917.546	4	3479.387	5.189**	.000
대구시	11929.340	4	2982.335	4.628**	.001
기타	639.437	4	159.859	1.054	.379

*p<0.05 **p<0.01

경산시의 각종 상업시설을 대구시의 상업시설과 비교하였을 때 어느 정도 경쟁력이 있다고 생각하는 항목과 하철 노선이 경산방면까지 연

장 운행된다면 어느 지역의 상업시설을 더 많이 이용하겠는가에 대한 교차분석결과는 <표 15>와 같다. 분석결과 $\chi^2=29.734$, p-value=0.019로 경쟁력과 상업시설 이용실태는 관련이 있는 것으로 나타났다. '경쟁력이 거의 없다'고 생각하는 사람은 대구시 상업시설 적극이용하고 '경쟁력이 없는 편이다'라고 생각하는 사람은 대구시 상업시설을 이용하고 '경쟁력이 보통'이라고 생각하는 사람은 상업시설 선택에 영향이 없음 그래도 '경쟁력이 조금이라도 있다'고 생각하는 사람은 경산시 상업시설 이용하는 것으로 나타났다.

V. 결 론

본 연구는 대구시와 인접한 경산시의 상업시설 이용실태를 조사하여 중소도시의 지역적 여건을 파악하고, 지역민 특성을 분석하여 경산시 상업시설의 활성화방안을 제시하고자 하는 것이다. 본 연구를 통하여 다음과 같은 사실을 알 수 있었다.

첫째, 경산시에 필요한 상업시설로는 문화 및 집회시설, 관광휴게시설, 판매 및 영업시설 등으로 문화창조를 위한 문화시설, 쾌적하고 편리한 관광·휴양 산업육성 활성화, 근린상가를 확충하여야 하는 것으로 나타났다.

둘째, 지리적 이점과 가격이 저렴해서 주로 경산시의 상업시설을 이용하는 것으로 나타났고, 대구시의 상업시설을 이용하는 주된 이유에 대해서는 상품구매와 여가활동과 상품구색 등으로 나타나 대구시에 비해 경쟁력이 낮으며 경산시의 상업시설 확충 및 근린상가와 재래시장 활성

<표 15> 경쟁력과 지하철연장에 대한 χ^2 검정 결과

		지하철연장시					χ^2	p-value
		대구시 상업시설 적극이용	대구시 상업시설 이용	상업시설 선택에 영향이 없음	경산시 상업시설 이용	경산시 상업시설 적극이용		
경 쟁 력	거의 없다	25(39.1%)	10(15.6%)	14(21.9%)	7(10.9%)	8(12.5%)	29.734*	0.019
	없는 편이다	36(23.5%)	63(41.2%)	21(13.7%)	20(13.1%)	13(8.5%)		
	보통이다	23(18.3%)	45(35.7%)	28(22.2%)	19(15.1%)	11(8.7%)		
	조금 있다	5(10.9%)	17(37.0%)	9(19.6%)	8(17.4%)	7(15.2%)		
	아주 많이 있다	3(42.9%)	2(28.6%)	2(28.6%)	0(0%)	0(0%)		

*p<0.05 **p<0.01

화를 강구해야 할 것이다.

셋째, 상업시설에 대한 소비지출비율을 살펴보면 경산시에서는 평균적으로 43.64%, 대구시에서 49.86%를 소비하는 것으로 대구시에서의 소비지출이 높게 나타났고, 지하철 연장운행시 대구시 상업시설을 이용은 57.7%이고, 경산시의 상업시설을 이용하다는 비율은 23.4%로 나타나 대도시에서 상업시설이용을 원하는 것으로 나타났다. 경산시의 상업시설을 대구시의 상업시설과 비교했을 때 어느 정도 경쟁력이 있느냐는 문항에 대해서는 '거의 없다'와 '없는 편이다'라는 비율이 54.8%이고, '조금 있다'와 '아주 많이 있다'라는 비율은 13.4%로 나타나 경산시의 지역산업 구조경쟁력을 갖추지 못한 것으로 인식하는 것으로 나타났다.

경쟁력을 갖추지 못한 지역산업구조를 변화시키기 위해서는 근린상가와 재래시장 확충 및 활성화, 물류 및 유통서비스업 활성화, 취약한 지역 내 혁신네트워크를 구축하여 권역별 특성과 개발잠재력을 극대화함으로써 취약한 지역의 삶의 질 향상, 자주경영도시를 이루어야 할 것이다.

참고문헌

1. 계명대학교 산업경영연구소 (2006), 중소도시 상업지역 규모설정 연구, 계명대학교 산업경영연구소.
2. 김한수·임준홍 (1996), 도심 상업시설 분포 및 이용행태에 관한 연구, 대한건축학회논문집 제12권 12호.
3. 이장희·이상철 (2001), 재래시장에 대한 실태 조사 및 활성화 방안 - 청주시 7개 재래시장 을 중심으로-, 산업과 경영 제14권 제1호, 충북대학교.
4. 장동훈·정승영·이옥동 (2003), 상업시설의 이용에 관한 소비자의 행태분석, 부동산학보 제21집.
5. 경산시청 홈페이지(<http://www.gyeongsan.go.kr>)

고주파 스퍼터링에 의한 TiO_2 박막에서 상전이 현상

김태우 · 김경찬*

계명대학교 자연과학대학 디지털물리학과

Phenomena of phase transformation in TiO_2 thin film by RF sputtering

Tae Woo Kim and Kyung Chan Kim*

Department of Digital Physics, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

요약. TiO_2 세라믹을 타겟으로한 고주파 마그네트론 스퍼터링을 이용하여 작업 압력, 기판 온도, 증착 시간 등의 여러 가지 스퍼터링 변수 아래서 TiO_2 박막을 증착하였다. 우수한 효율의 광촉매를 제조하기 위한 박막의 증착 조건과 증착된 기판의 열처리 조건을 찾았다. 이를 여러 조건 아래서 증착된 TiO_2 박막의 물성을 알아보기 위하여 XRD를 이용하여 분석하였다. TiO_2 박막의 결정성은 고주파 전력이 클수록, $O_2/Ar+O_2$ 비는 낮을수록, 기판 온도는 높을수록 그리고 열처리 온도는 높을수록 증가하였다. 같은 조건의 변화에 따라 TiO_2 박막이 비정질 상에서 점차 나타내는 루타일로 상전이 하였다.

Abstract. TiO_2 thin films are deposited by RF magnetron sputtering using TiO_2 ceramic target under various sputtering parameters such as working pressure, substrate temperature and deposition time. We find deposition conditions and post-deposition thermal-annealing conditions of thin films to produce a high efficiency of photocatalyst. XRD is used to investigate physical properties of TiO_2 thin films deposited under these conditions. The crystallinity of TiO_2 films was increased with high RF power, high substrate temperature, low $O_2/Ar+O_2$ ratio and high thermal annealing temperature. TiO_2 films were gradually transformed from amorphous phase to anatase and rutile phase with same changes of these conditions.

I. 서 론

TiO_2 박막을 제조하는 방법에는 졸-겔^[1,2], 진공 증착법^[3], 화학 기상 성장법(Chemical Vapor Deposition)^[4], 스퍼터링^[5,6] 등의 방법이 있다. 현재 다양하고 진보적인 기술을 적용하여 고순도 산화 박막을 생산해 내는 반응성 마그네트론(magnetron) 스퍼터링과 같은 방법은 증착 과정에서 스퍼터링 속도를 높고 쉽게 조절할 수 있고 많은 양, 균일한 박막과 쉽게 조절할 수 있는 이점이 있다. 위의 중요한 이점을 제외하고도, 이 박막의 제작 방법은 증착 과정동안 기판의 온도를 낮게 유지할 수 있어 낮은 용융점을 가

진 기판을 사용할 수 있다. 게다가 스퍼터링 중에는 높은 충진 밀도와 강력한 부착력을 가지고 큰 면적에 균일한 코팅을 하기 위한 가장 주목하는 방법 중의 하나이다.

본 연구에서는 우선적으로, TiO_2 박막을 제작하기 위하여 고주파(RF) 마그네트론 스퍼터링 방법으로 작업압력과 고주파 전력 및 열처리 온도 등의 다양한 조건 아래서 증착된 결정 TiO_2 박막은 높은 광촉매 활동을 가진 증착 박막의 최적 조건을 구한다.

그러나 약한 자외선의 태양 가시광이나 실내의 형광등 빛 아래서는 광촉매의 효율이 낮으므로, 가시광선 영역에서도 광촉매 반응을 하는

TiO_2 가 요구된다. 오늘날 TiO_2 의 가시광선에서의 반응에 대한 다양한 연구가 행해지고 있는데, 본 연구에서는 N_2 를 도핑함으로써 광촉매 효율을 높이는 동시에 가시광선에서도 반응을 하는 TiO_2 박막을 제작한다. 불순물 준위에 질소 분자를 도핑 함으로써 반도체의 금지대를 새롭게 형성하여 띠간격(bandgap)을 좁힌다. 띠간격을 축소하면 낮은 에너지의 가시광선 아래에서도 가전자대에서 전도대로 여기(excite)할 수 있다.

II. 실험

1. 실험장치

TiO_2 세라믹을 타겟으로 한 고주파 마그네트론 스퍼터링을 이용하여 TiO_2 박막을 증착하였다. 실험에 사용된 스퍼터링 장치의 개략도를 그림 1에 나타내었다. 진공조의 상단에 두개의 타겟이 장착되어 다층의 증착 또는 동시에 두 종류의 물질을 증착할 수 있도록 설계되어 있다. 타겟 조립품은 영구 자석을 사용한 마그네트론 형태이다. 타겟과 기판 사이의 거리를 3 cm ~ 12 cm 까지 변화시킬 수 있으며, 600 W의 고주파 출력을 공급할 수 있다. 기판 지지체 뒷면에 열선을 설치하여 기판을 가열할 수 있다. 배기 용량이 650 l/min인 로터리 펌프와 배기용량이 570 l/sec인 유학산 펌프를 이용하여 기저 압력을 대략 10^{-6} Torr로 유지할 수 있다. 유입 기체의 유량은 3개의 MFC(mass flow controller)를 이용하여 조절할 수 있다. 13.56 MHz의 고주파 전력을 Ar 분위기와 Ar/O₂ 분위기에서 반응성 스퍼터링을 할 수 있다.

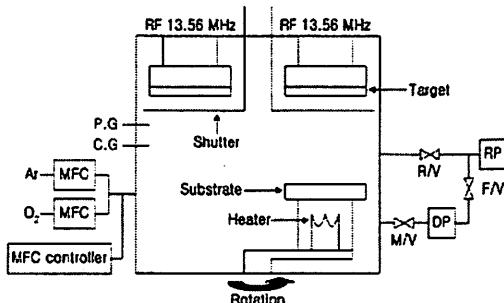


Fig. 1. Diagram of RF magnetron sputtering system.

2. TiO_2 박막 제조

그림 2는 본 실험의 박막 제조 순서이고, 표 1은 TiO_2 박막 형성 조건을 나타낸다. 순도가 99.99%인 TiO_2 세라믹 타겟을 사용하였으며, 크기와 형태는 직경 2 인치 두께 1/4 인치의 디스크형이다. 기판으로는 Corning 유리 1737과 석영(quartz)을 사용하였다. 기판 표면 상태에 따라 성장된 물성이 영향을 크게 받기 때문에 유리와 석영의 세척은 매우 중요하므로, 그림3의 기판 세척 순서를 사용하여 세척하였다. 먼저 아세톤, 메탄올 및 초순수를 사용하여 순서대로 초음파 세척과정을 거친 후, 질소 기체로 건조한 후 진공조에 장착하였다. 스퍼터링을 위한 기체로는 순도 99.999%의 Ar과 순도 99.99%의 O₂ 기체를 사용하였다. 스퍼터링을 하기 전에 로터리 펌프와 유학산 펌프를 이용하여 대략 10^{-6} Torr까지 충분히 배기시킨 후, MFC를 이용하여 Ar와 O₂ 기체를 정해진 비율로 진공조에 유입하고, 원하는 작업 압력이 되도록 압력 조절 밸브를 조절한다. 대기 중에 노출될 때 타겟 표면에 형성된 오염 물질을 제거하기 위해 셔터로 가려준 다음, 10분 동안 전처리 스퍼터링을 행하였다. 타겟과 기판 사이의 거리는 4.5 cm로 고정하여 150에서 250 W 사이의 고주파 출력에서 실험을 하였다.

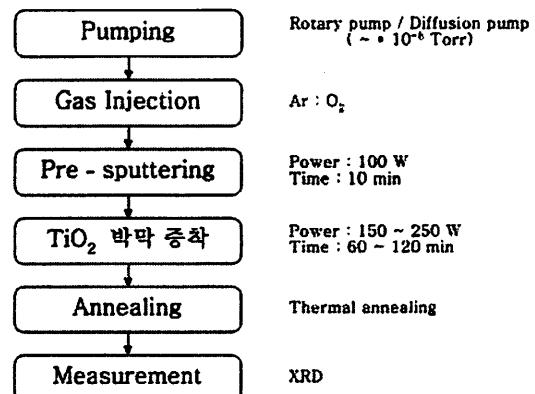


Fig. 2. Flowchart of experimental process.

Table 1. Deposition conditions of TiO₂ thin films by RF magnetron sputtering.

Item	Value
Target	TiO ₂ ceramic (99.99%)
RF power	150 W ~ 250 W
Base pressure	~ $\times 10^{-6}$ Torr
Working pressure	7.0×10^{-3} Torr, 2.0×10^{-2} Torr
Target-sub distance	4.5 cm
Substrate temp	R.T., 400°C, 500°C, 550°C
Annealing temp	700°C, 900°C

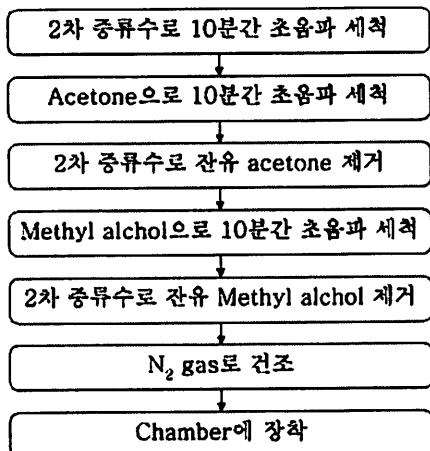


Fig. 3. Flowchart of substrate cleaning process.

3. 측정 및 분석

제작된 TiO₂ 박막 결정구조를 알아보기 위해서 전압 40 kV, 전류 30 mA, 스캔 속도 0.5°/sec, 구간 크기 0.04°의 조건에서 XRD(X'Pert-APD, PHILIPS) 분석을 출발각 15.02°와 종료각 79.98°의 2 theta 각 범위에서 하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 고주파 전력에 따른 TiO₂ 박막의 구조 및 성분 분석

그림 4는 고주파 전력에 따른 TiO₂ 박막의 XRD 분석 결과이다. 이때의 증착 조건은 작업 압력 7.0×10^{-3} Torr이고 증착 후 열처리 온도는

700°C이다. 고주파 전력은 150, 200, 250 W로 다양화 하였다. 실험 장치에 250 W를 초과하는 전력을 장시간 공급할 때에는 고주파 발생 장치 중 고주파 동축 케이블의 과열로 인한 핵선이 발생하였다. 분석 결과에서 고주파 전력이 증가함에 따라 비정질(amorphous), 아나타제(anatase)가 존재되는 상에서 점점 아나타제 상의 강도가 증가하는 점으로 보아 결정성이 증가하는 것을 알 수 있다. 이것은 고주파 전력이 증가함에 따라 기판 표면에 증착되는 TiO₂ 입자들이 더 큰 에너지를 가지게 됨으로써 증착된 박막의 결정성이 더 좋아지는 것으로 생각된다.^[7]

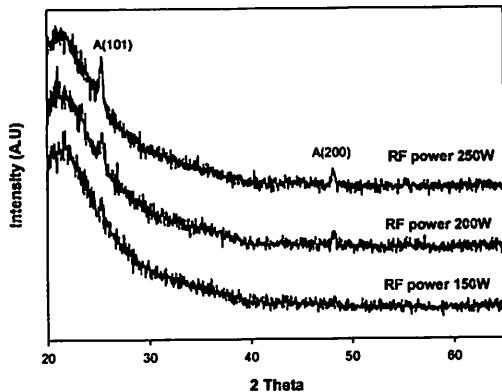


Fig. 4. XRD patterns of TiO₂ films deposited with different power. (working pressure 7 mTorr, annealing temp. 700°C)

2. 기판 온도에 따른 TiO₂ 박막의 구조 및 성분 분석

그림 5는 기판 온도에 따른 TiO₂ 박막의 XRD 분석 결과이다. 증착 조건은 고주파 전력 250 W, 작업 압력 2.0×10^{-2} Torr이고 기판 온도는 실온, 400°C, 500°C, 550°C로 다양화하였다. 실험 장치에서 기판 온도를 550°C를 초과, 장시간 스퍼터링한 경우 진공조 내부의 작업 압력이 불안정한 현상을 나타내었다.

지금까지 연구에 의하면 아나타제 결정의 TiO₂ 박막을 제조하기 위해서는 기판의 온도를 200°C 이상으로 하였을 때 아나타제 결정이 형성된다고 발표되었다.^[8] 본 실험의 분석 결과에서는 상온에서 증착된 박막의 경우에 비정질로

존재하다가 기판 온도가 점차 상승함에 따라 비정질, 아나타제가 혼재되는 상으로 구조가 변화하는 것을 알 수 있다. 이는 기판 위에 증착된 입자들이 높은 기판 온도로 인하여 원자 이동도가 증가하여 에너지적으로 안정한 위치로의 이동이 용이하여 결정성이 기여한 것으로 생각된다. 그러나 피크 강도에서 나타나듯이 본 실험에서 기판 온도에 따른 결정성은 다른 증착 조건에 비해 결정성에 미치는 영향이 작다는 것을 알 수 있다. 이러한 기판 온도의 영향은 기판의 종류, 표면 상태, 박막 물질에 따라 매우 다른 특성을 보인다.

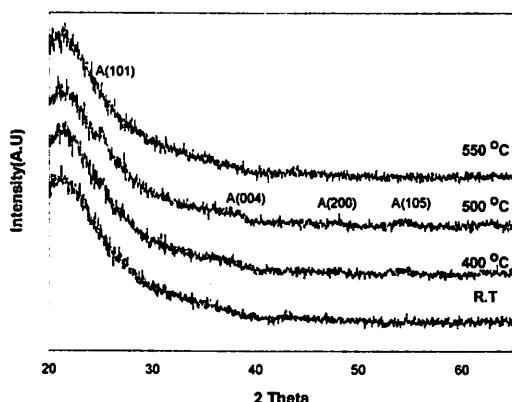


Fig. 5. XRD patterns of TiO₂ films deposited with different substrate temperature. (RF power 250 W, pressure 20 mTorr)

3. O₂/(Ar+O₂) 비율에 따른 TiO₂ 박막의 구조 및 성분 분석

그림 6은 O₂/(Ar+O₂) 비율의 변화에 따른 박막의 결정성을 나타낸 XRD 분석 결과이다. 증착 조건은 고주파 전력 200 W, 작업 압력 2.0×10^{-2} Torr이고 증착 후 열처리 온도는 700°C이다. O₂/(Ar+O₂) 비율이란 진공조 내에 유입되는 기체 유량의 비율의 의미한다. 분석 결과에서 O₂/(Ar+O₂) 비율이 감소하면 오히려 결정성이 증가하는 것을 볼 수 있다.

O₂/(Ar+O₂) 비율이 감소함에 따라 결정성이 증가되는 이유는 아래와 같이 추측한다. 작업 기체에서 O₂ 기체가 감소되므로 O₂ 기체에 의한

반응성 스퍼터링 과정이 감소하게 된다. 그 결과 타겟 표면에서 떨어져 나온 Ti 원자들이 O₂ 기체와 충돌될 확률이 작아지고 그에 따라 Ti 원자의 이동도가 증가되어서 결정성이 증가되는 것으로 생각된다.

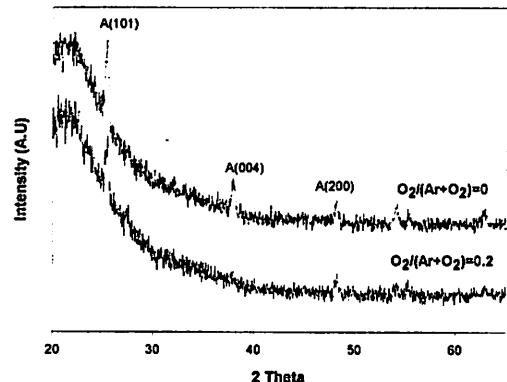


Fig. 6. XRD patterns of TiO₂ films deposited with different O₂/(Ar+O₂). (RF power 200 W, pressure 20 mTorr, annealing temp. 700°C)

4. 열처리 온도에 따른 TiO₂ 박막의 구조 및 성분 분석

그림 7은 열처리 온도에 따른 TiO₂ 박막의 결정성을 나타낸 XRD 분석 결과이다. 이때의 증착 조건은 고주파 전력 250 W, 작업 압력 2.0×10^{-2} Torr이고 열처리 온도는 500°C, 700°C, 90

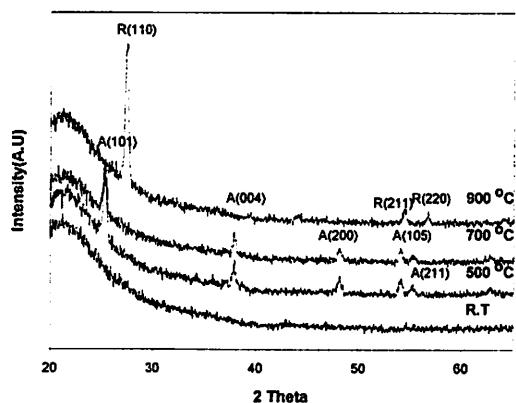


Fig. 7. XRD patterns of TiO₂ films deposited with different annealing temperature. (RF power 250 W, working pressure 20 mTorr)

0°C로 다양화하였다. 열처리는 흡착한 원자(혹은 분자)들을 재배열함으로써 결정화시키는 역할을 한다. 상온에서 증착된 TiO₂ 박막은 비정질로 존재하다가 500°C 이상에서アナタ제상으로의 결정화가 본격적으로 진행되고 900°C 이상에서 루타일(rutile)로의 상전이가 일어남을 알 수 있다.

본 실험에서 열처리 온도가 900°C를 초과하지 않은 이유는 다음과 같다. 분석 결과에서 보듯이 900°C에서 열처리한 경우 루타일로 상전이가 일어남으로써 더 이상의 높은 온도에서의 열처리는 광활성에 유리한アナ타제상을 제작하려는 실험 목적에서 벗어나기 때문이다.

V. 결 론

고주파 마그네트론 스퍼터링 장치에서 TiO₂ 세라믹을 타겟으로하여 증착한 TiO₂ 박막의 고주파 전력, 증착온도, O₂/Ar+O₂ 비 및 증착후 열처리 등의 조건에 따른 상의 변화에 대하여 알아보았다. 증착 조건에서 고주파 전력은 클수록, O₂/(Ar+O₂) 비율은 낮을수록, 기관 온도는 높을수록 그리고 열처리 온도는 높을수록 TiO₂ 박막의 결정성은 증가하였고 비정질,アナ타제, 루타일이 혼재한 상에서 점차アナ타제 또는 루타일로의 상전이를 볼 수 있다.

본 실험을 통하여 고주파 전력 250W, 작업 압력 2×10^{-2} Torr, 기관 온도 400°C, 열처리 온도 700°C에서 제작된 TiO₂ 박막이 광활성 효율이 높은アナ타제 결정형을 나타내었다.

참고문헌

1. T. Yoko, L. Hu, H. Kozuka and S. Sakka, Thin Solid Films 283(1), 188 (1996).
2. T. Watanabe, A. Nakajima, R. Wang, T. Minabe, S. Koizumi, A. Fujishima, K. Hashimoto, Thin Solid Films 351(1), 260 (1999).
3. G. Atanassov, R. Thielsch and D. Popov, Thin Solid Films, 223(2), 288 (1993).
4. D. R. Burgess, P. A. Morris Hotsenpiller, T. J. Anderson and J. L. Hohman, J. Cryst. Growth 166(1-4), 763 (1996).
5. S. Takeda, S. Suzuki, H. Odaka and H. Hosono, Thin Solid Films, 392(2), 338 (2001).
6. P. Zeman and S. Takabayashi, Surf. Coat. Technol. 153(1), 93 (2002).
7. S. B. Amor, G. Baud, J. P. Besse and M. Jacquet, Materials Science and Engineering B, 47(2), 110 (1997).
8. H. Wang, T. Wang and P. Xu, Journal of Materials Science, 9(2), 327 (1998).

초음파 세척기와 다목적 세정액을 이용한 세척 후의 콘택트렌즈 표면분석

윤선광 · 이창섭*

계명대학교 자연과학대학 화학과

Surface analysis of contact lens after cleaned with ultrasonic cleaner and multi-purpose solution

Sun Kwang Yun* and Chang-Seop Lee

Department of Chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, korea

요약. 콘택트렌즈 초음파세척기를 이용하여 다목적 세정액과 생리 식염수에 따른 콘택트렌즈에 흡착된 단백질 및 세균의 세척 및 소독효과를 비교해 보고 효과적인 렌즈관리체계를 제시할 목적으로, 단백질 흡착 및 세척 실험, 단백질 정량실험, 세균제거 기능 실험, 주사전자현미경 관찰을 하였다. 초음파로 세척을 수행한 시간이 길어질수록 단백질의 세척효과와 세균제거기능이 더 우수하였으며, 생리 식염수보다 다목적 세정액을 이용한 세척 효과가 더 우수한 것으로 나타났다. 초음파 세척(250mA, 10분간)을 250회 반복하여 시행한 다음 콘택트렌즈의 손상 유무를 주사전자현미경으로 관찰한 결과 대조군과 비교 시 표면 손상이나 렌즈 재질의 변성 등의 변화는 없었다. 이상의 결과로 콘택트렌즈에 흔히 부착되는 단백질 및 세균을 보다 효과적으로 간편하게 제거하는 데 생리식염수보다 다목적 세정액을 이용한 초음파 세척이 효과적임을 알 수 있었고 초음파 세척 시간이 길수록 세척효과가 증대 되었으며 본 초음파세척기의 경우 콘택트렌즈에 부착된 단백질 및 세균의 세척 및 소독기능이 우수한 것으로 나타났다.

주제어: 초음파세척기, 다목적 세정액, 콘택트렌즈

Abstract. Using Contact lens Ultrasonic Cleaner, the effects were compared in aspect of a cleaning of protein absorbed in the Contact lens. For the purpose of giving some effective lens management system, this study has observed a protein absorption, a cleaning test, a protein fixed quantity test, a germ removal function test and Scanning Electron Microscope(SEM). The longer time cleaning with ultrasonic waves, the better results was obtained from protein cleaning, germ removal. Cleaning effect with MPS(Multi-purpose Solution) was superior to it with SS(saline solution). This study did ultrasonic cleaning process(250mA, 10min.) 250 times, and then observed the damage presence of the contact lens with the SEM. There was no any changes on the damage on surfaces and the metamorphosis etc. compared. It indicates the result above and attach frequently in the contact lens the protein and the germ which it sees effectively to be simple. There is a possibility the ultrasonic cleaning process which uses MPS and SS, which it removes protein and germ with an effective suitability. It gave proof washing and the sterilizer decline good of the protein which attaches in the case of contact lens of the ultrasonic cleaner and the germ.

I. 서 론

소프트 콘택트렌즈는 1508년 레오나르도 다빈치(Leonardo da Vinci)에 의해 콘택트렌즈에 대한 고인이 시작되었으며, 1912년 Karl Zeiss 회사에 의해 공막렌즈가 개발되어 1931년 각막렌즈 개발, 공막렌즈 제조를 위한 하드렌즈(PMMA) 재질이 사용되었다. 1950년대 하드렌즈가 널리 사용되기 시작 되었고, 1966년 Basch & Lomb 회사의 실험에 기초를 둔 spin-cast 소프트렌즈의 개발과 1967년 미국에서 Lathe cut 소프트렌즈의 임상활용의 승인으로 이용이 활성화되었다.¹ 우리나라에서는 1958년 공병우박사가 미국에서 콘택트렌즈 개발에 필요한 기구와 문현을 들여와 1960년에 국산 콘택트렌즈 제작에 성공하여 그 후 많은 발전을 거듭하여 오늘에 이르고 있다.

정보화 시대와 더불어 눈에 대한 혹사와 환경오염 등에 의해 시력이 급속히 저하되어 가면서 시력을 교정하기 위한 방법으로 우리는 안경을 장용하던지, 콘택트렌즈의 착용, 또는 최근에 안과병원에서 많이 시행하는 레이저를 이용한 근시교정술을 시행하고 있다.

안경을 이용한 경우 미용 상의 문제나 장용에 따른 불편함을 호소하게 되고, 근시교정술은 수술비용이 많이 들며 위험성과 후유증이 우려된다. 이러한 단점을 보완하기 위해 젊은 여성층을 중심으로 콘택트렌즈의 착용이 점점 늘어가고 있다. 콘택트렌즈의 착용은 간편하고 안경에 비해 눈에 쉽게 적용하고 부동시를 교정하며 넓은 시야를 확보하고, 수차 감소와 안경 착용에 따른 불편함을 해소하는 등의 장점으로 착용 인구가 꾸준히 증가되어 2005년 통계 자료에 의하면 콘택트렌즈 상용 인구는 350~400만, 콘택트렌즈 겸용 인구는 600~750만에 이르게 되었다.

그러나 콘택트렌즈는 각막과 직접 접촉하기 때문에 각막에 많은 영향을 미치므로 콘택트렌즈의 관리가 매우 중요하다. 이러한 소프트 콘택트렌즈는 착용 중 관리 소홀로 인한 여러 가지 눈의 손상을 일으킬 수 있는데,

이는 단백질이나 환경오염물 등과 같은 유기물이 침착되거나, 칼슘염이나 인산염 등과 같은 무기물의 침착되기도 하며, mucoprotein-lipid complex 침착물이 유기-무기물 등과 결합해 혼합 침착물이 생기기도 한다. 또한 미생물의 오염이나 제조과정상의 기계적 결합, 불순물 소화, 퇴화로 인해 눈이 손상될 수 있다.²

오염된 콘택트렌즈 보존액이나 용기는 종종 세균성 각막염과 관련이 있고 심한 경우 각막 궤양까지 발생할 수 있으며, 증상이 없는 경우에서도 74~82% 정도가 오염된 렌즈 관리 용품을 사용하였다고 보고하여³⁻⁵ 콘택트렌즈의 소독 및 보관요령이 무엇보다 중요하므로 올바른 콘택트렌즈의 관리를 위해 보다 더 효과적인 세척방법을 고려해야 한다.^{6,7} 착용 콘택트렌즈는 여러 가지 합병증, 즉 각막염, 각막궤양, 각막 혼탁이 생기고 심하면 실명까지 초래할 수 있다.^{8,9}

김 등(2002)은 다목적 콘택트렌즈 세정액의 항녹농균의 효과를 비교하는 연구에서 30초간 문지르기, 30분간 담그기, 4시간 담그기, 30초간 문지르고 30분간 담그기를 실시하여 비교분석한 결과 4시간 담그기가 가장 효과적이라고 하였다.¹⁰ 현재 안경사들은 다목적 세정액에 4시간 담구기를 권장하고, 일반적으로 이 방법은 가장 많이 사용하고 있는 방법이다.

렌즈 사용자가 간편하고 효과적으로 렌즈를 세척, 소독하기 위한 방법들이 꾸준히 개발되고 제시되어 왔다. 그중 초음파나 자외선을 이용하는 방법들이 렌즈의 세척 및 살균에 있어 효과가 입증된 이후 이들 방법을 이용한 소독기들이 개발되어 의료용으로 사용되고 있으며 특히 초음파를 이용한 세척방법은 콘택트렌즈나 보관 용기뿐만 아니라 각종 의료용 기구를 세척하는데 이용되고 있다.¹¹

그러면서 생리식염수와 초음파 세척기를 이용한 실험도 하게 되었다.¹² 그러나 보통 일반 식염수에는 방부 성분이 없어 개봉한 후 3, 4일 후면 균이 서식하게 되는데, 오염된 생리식염수를 사용한 렌즈나 이런 식염수를 눈에 직접 넣을

경우 눈병에 걸릴 확률이 매우 높기 때문에 좀 더 장기간 사용해도 안전한 다목적 세정액과 초음파 세척기를 이용한 연구의 필요성이 대두되었다.

따라서, 본 연구에서는 일반 콘택트렌즈 장용자들이나 안경사들이 보다 더 효과적으로 콘택트렌즈를 관리하기 위해 다목적세정액 Solex alpha (포리타치케미칼, 한국)와 생리식염수 뷰티콘 (중외제약, 한국)을 사용해서 최근 콘택트렌즈에 흔히 부착되는 단백질 및 세균을 보다 효과적으로 간편하게 제거할 수 있도록 고안한 초음파 세척기 Lensmedic (SC900E)을 이용하여 소프트콘택트렌즈(Focus^①, Ciba vision Co. USA, 주성분 Vifilcon A, 함수율 55 %)에 부착된 단백질 및 세균의 세척 및 소독기능을 표면분석을 통하여 보다 효과적인 콘택트렌즈 관리체계를 찾고자 하며, 주사전자현미경(JSM-5410LV, JEOL, JAPAN)으로 초음파로 인한 하드콘택트렌즈(Bescon 6, RGP 렌즈, 한국)의 표면 손상 유무 관찰을 통한 콘택트렌즈 초음파세척기 안전성 검사와 콘택트렌즈의 세척효과도 관찰하였다.

II. 실험

1. 단백질의 흡착 및 세척실험

콘택트렌즈에 부착하는 인체 단백질의 표준으로 HSA (human serum albumin, Sigma사, 미국)을 사용하였다. 대조군 및 실험군에서 사용한 콘택트렌즈는 일회용 소프트콘택트렌즈(Focus^①, Ciba vision Co. USA, 주성분 Vifilcon A, 함수율 55%)이었으며 렌즈의 세척에는 생리식염수 뷰티콘 (중외제약, 한국)을 사용하였고, 다목적세정액은 Solex alpha(포리타치케미칼, 한국)를 사용하였다.

콘택트렌즈에 단백질이 흡착된 후 초음파 세척기에 의해 단백질이 얼마나큼 유리되는지를 알아보기 위하여 아래와 같이 6종류의 군(A, B, C, D, E, F군)으로 분류하였다.

A군: 렌즈에 흡착된 단백질 총량을 측정하는 군(생리식염수 이용)

B군: 다목적 세정액에 렌즈를 4시간 보관만 한 대조군

C군: 초음파세척기로 250mA에서 5분간 세척한 군(생리식염수 이용)

D군: 초음파세척기로 250mA에서 10분간 세척한 군(생리식염수 이용)

E군: 초음파세척기로 250mA에서 5분간 세척한 군(다목적 세정액 이용)

F군: 초음파세척기로 250mA에서 10분간 세척한 군(다목적 세정액 이용)

단백질의 흡착은 먼저 human serum albumin (SA)을 멸균 생리식염수에 녹여 단백질 회석액 농도를 10 mg/ml (1%)로 제조하였다. 회석단백질 용액 10ml 를 콘택트렌즈 용기에 옮겨서 새 소프트 콘택트렌즈를 이 용액에 가라앉힌 다음 실온에서 Shaking incubator (Power shaker. VISION scientific Co. Ltd. 한국)로 100rpm의 속도에서 12시간 동안 반응시켜 단백질이 콘택트렌즈에 흡착되도록 하였다.

12시간 경과 후에 콘택트렌즈를 꺼낸 다음 10ml의 멸균 생리식염수 속에서 서서히 좌우로 세척을 3회 실시하였다. 단백질이 흡착된 콘택트렌즈가 준비된 다음 각 군별로 실험을 진행하였다.

A군에서는 단백질이 흡착된 콘택트렌즈를 초음파 세척기로 처리한 다음 생리식염수 속에 떨어져 나온 단백질 양을 측정하여 이 양을 콘택트렌즈에 흡착된 단백질의 총량으로 정하였다.

B군은 대조군으로 생리식염수용액에만 보관한 것이다.

C군과 D군은 단백질이 흡착된 콘택트렌즈를 생리식염수 25 ml가 들어있는 초음파 세척기 용기에 가라앉힌 다음 250mA에서 각각 5분 또는 10분간 씩 세척을 수행한 후에 생리식염수에 유리되어 나온 단백질 양을 측정하였다.

E군과 F군은 단백질이 흡착된 콘택트렌즈를 다목적용액 25 ml가 들어있는 초음파 세척기 용기에 가라앉힌 다음 250mA에서 각각 5분 또는 10분간 씩 세척을 수행한 후에 다목적용액에 유리되어 나온 단백질 양을 측정하였다.

2. 단백질 정량 실험

콘택트렌즈에서 떨어져 나온 유리 단백질의 정량에는 BCA protein assay reagent (pierce)를 이용하였고, 표준용액은 Human Serum Albumin 을 5, 10, 17.5, 25 및 50 ml의 농도로 제조하여 사용하였다. C, D, E, F 군에서 세척되어 나온 단백질 양은 미미하여 농축을 하였다. 농축 방법은 먼저 생리 식염수를 -70°C에서 완전히 얼린 후에 동결 전조기를 이용하여 전조한 다음 중류수 1ml를 녹여서 단백질 정량에 사용하였다.

단백질 정량을 하기 위해서 먼저 각 표준용액과 시험용액을 각각 50ml 씩 취하여 micro centrifuge tube에 넣고 여기에 1.0 ml의 working reagent를 가하여 잘 혼합한 후 circulating water bath (DCI, Haake, Germany)를 이용하여 60°C에서 30분간 반응시켰다.

혼합된 용액을 상온에서 식힌 후에 spectrophotometer (Biospec-1601, Shimadzu, Japan)로 562 nm에서 농도에 따른 흡광도를 측정한 후 표준용액으로 작성된 표준검량선을 이용하여 각 시험용액의 단백질 농도를 측정하였다. 측정된 검량선은 Figure 1과 같다.

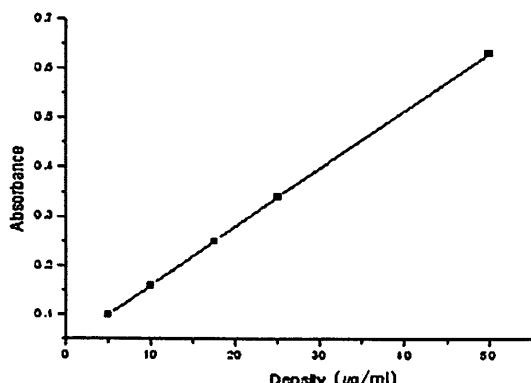


Figure 1. The calibration curve for HSA(562nm)

3. 세균 제거 기능 실험

사용하지 않은 콘택트렌즈의 표면에 세균의 유착을 유도하기 위하여 0.5 Mcfarland Unit(1×10^6 cfu: colony-forming unit)/ml 농도의 녹

농균(ATCC-27853)/녹농균 혼탁액에 렌즈를 24시간동안 배양한 다음, A군~F군으로 나누어 세척 후에 렌즈에 잔존하고 있는 세균의 수를 비교하였다. 각각의 세척된 렌즈를 5ml의 생리식염수가 담긴 용기에 넣은 다음 vortex stirrer에 10분간씩 3회 세척한 다음 각각 1ml씩 채취하여 혈액배지에 도포하고 24시간 후에 혈액배지에 발생된 세균 군주의 수를 측정하였다.

FDA에서 규정한 항균검정에 사용되는 균주 5 가지는 Table 1 과 같으며, 이번 세균제거기능실험에 사용된 균주는 *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC27853)이다.

Table1. FDA-recommended challenge microorganisms

FDA-recommended challenge microorganisms	Microorganisms	Media
<i>Aspergillus fumigatus</i> ATCC9197	fungi	Malt Extract Agar, 24°C
<i>Candida albicans</i> ATCC10231	fungi	YM Broth, 25°C
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC27853	bacteria	Muller Hinton Broth 21g/L, 37°C
<i>Serratia marcescens</i> ATCC27117	bacteria	Nutrient Agar, 26°C
<i>Staphylococcus epidermidis</i> ATCC12228	bacteria	Nutrient Agar, 26°C

4. 주사 전자 현미경 관찰(SEM: Scanning Electron Microscope)

단백질의 흡착 및 세척 실험과 세균 제거 기능 실험에서 초음파 세척 전과 초음파 세척 후 (실험군 E군)의 세척 비교를 주사전자현미경으로 소프트 콘택트렌즈 표면을 관찰 하였고, 초음파세척에 의한 하드 콘택트렌즈의 표면이나 재질의 변화 및 손상을 알아보기 위하여 초음파세척을 하지 않은 대조군의 하드 콘택트렌즈 및 초음파세척기로 250 mA에서 10분간 세척을 250

회(1년 사용 기준) 실시한 하드 콘택트렌즈를 주사 전자 현미경 (JSM-5410LV, JEOL, JAPAN)으로 관찰하였다.

주사 전자 현미경 관찰을 위하여 먼저 콘택트렌즈를 전 고정 및 후 고정한 다음 탈수하고, isoamyl acetate로 치환시켜 24시간이 지나서 임계점 진조기(E-3000 type, Polaron, Watford, England)로 진조시켰다. 이어서 Ion Sputter (JFC-1100 type, JEOL, JAPAN)를 이용하여 5분간 표면에 금을 입힌 후, 15kV 가속 전압을 걸어 주사전자 현미경으로 콘택트렌즈의 표면과 변연부를 관찰하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 콘택트렌즈의 잔존 단백질 흡착율

단백질 흡착 및 세척 실험에서는 콘택트렌즈에 흡착된 총 단백질 양의 평균은 $35.03 \mu\text{g}$ 이었고, 생리식염수에 5분간 보관만 하였던 대조군에 잔존한 단백질 양의 평균은 $15.17 \mu\text{g}$ 으로 43.30%의 흡착율을 보였다. 따라서 초음파 세척을 하지 않고 식염수에만 보관하였을 경우에 평균 $19.86 \mu\text{g}$ 의 단백질이 콘택트렌즈에서 유리되어 나왔다. 초음파로 생리식염수를 이용하여 세척을 시행한 C군과 D군의 경우 5분간 세척을 한 경우에는 콘택트렌즈에 잔존하고 있는 단백질의 양은 평균 $7.09 \mu\text{g}$ 으로 20.24%의 흡착율을 보였고, 10분간 초음파를 작동시킨 경우에는 평균 $3.02 \mu\text{g}$ 으로 8.62%의 흡착율을 보였다.

초음파로 다목적 세정액을 이용하여 세척을 시행한 E군과 F군의 경우 5분간 세척을 하였을 때 콘택트렌즈에 잔존하고 있는 단백질의 양은 평균 $3.01 \mu\text{g}$ 으로 8.59%의 흡착율을 보였고, 10분간 초음파를 작동시킨 경우에는 평균 $1.80 \mu\text{g}$ 으로 5.14%의 흡착율을 보였다.

따라서, 대조군보다 초음파세척을 한 C군의 흡착율이 더 낮으므로 초음파이용이 단백질 제거에 효과적이었으며, 초음파로 세척을 시행한 시간이 길어질수록 단백질의 흡착율은 더 감소됨을 보여 주었고, 생리식염수를

이용한 C, D군 보다 다목적 세정액을 이용한 E, F군에서의 흡착율이 더 낮아지므로 세척 효과가 생리식염수보다 다목적세정액이 더 우수함을 나타내었다.

Table 2. Total quantity of protein which remains in the contact lens(μg)

	Total quantity of protein	Control group	C group	D group	E group	F group
1	33.30	13.20	7.35	3.01	2.73	1.57
2	38.01	19.01	6.58	2.71	3.32	1.82
3	33.32	13.32	7.11	2.75	2.72	1.51
4	32.56	12.32	5.99	3.25	3.11	2.03
5	33.68	17.90	7.30	3.11	2.99	1.75
6	39.19	15.29	8.22	3.31	3.19	2.13
Average	35.03	15.17	7.09	3.02	3.01	1.80

Table 2에서는 콘택트렌즈에 남아있는 단백질의 총량을 각 군당 6회의 실험을 통하여 나타내었고, 각 군당 평균값을 나타내었다. 같은 시간의 초음파세척을 하지 않은 대조군보다 초음파세척을 5분간 한 C군에서의 세척효과가 두 배 이상 차이가 났으므로 초음파가 세척에 효과가 있음을 알 수 있었고, 시간에 따라 콘택트렌즈에 잔존해 렌즈에 흡착된 단백질량을 C와 D군, E와 F군을 비교하면 세척시간이 긴 D와 F군에서의 단백질 흡착량이 적어짐으로 시간이 길수록 단백질 세척효과가 있었다. 생리식염수와 다목적세정액의 단백질 흡착량 C, D군과 E, F군을 비교하면 다목적 세정액을 이용한 E와 F군에서의 단백질 흡착량이 적어짐으로 생리식염수보다는 다목적세정액을 이용한 초음파세척이 효과가 있음을 알 수 있었다.

Table 3에서는 콘택트렌즈에 흡착된 총 단백질 양의 평균은 $35.03 \mu\text{g}$ 이고, 대조군에 잔존한 단백질 양의 평균은 $15.17 \mu\text{g}$ 으로 43.30%의 흡착율로 나타났으며, 단백질 초음파 세척 후 콘택트렌즈에 잔존해 콘택트렌즈에 흡착된 단백질 양의 평균과 흡착율은 C군에서는 잔존한 단백질 양의 평균은 $7.09 \mu\text{g}$ 으로 20.24%의 흡착율로, D군에서는 잔존한

단백질 양의 평균은 $3.02 \mu\text{g}$ 으로 8.62%의 흡착율로, E군에서는 잔존한 단백질 양의 평균은 $3.01 \mu\text{g}$ 으로 8.59%의 흡착율로, F군에서는 잔존한 단백질 양의 평균은 $1.80 \mu\text{g}$ 으로 5.14%의 흡착율로 나타났다.

Table 3. Protein absorption ratio of contact lens

	Total quantity of protein	Control group	C group	D group	E group	F group
Average	35.03	15.17	7.09	3.02	3.01	1.80
absorption ratio %	100	43.30	20.24	8.62	8.59	5.14

따라서, 초음파 세척을 하지 않은 대조군보다는 초음파세척을 한 C군이 두 배 이상의 흡착율 감소효과가 있었으며, 생리식염수를 이용한 C, D군보다 다목적 세정액을 이용한 E, F군에서의 흡착율 감소효과가 더 있었으며, 시간에 따른 C, D군과 E, F군의 흡착율을 비교해보면 초음파세척 시간이 길수록 흡착율 감소효과가 더 있었다.

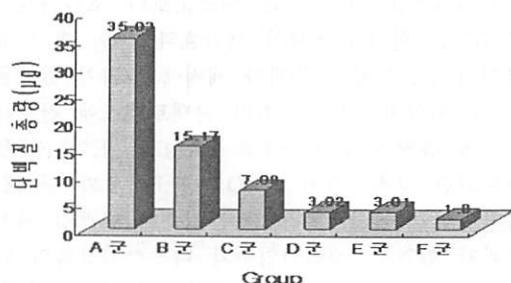


Figure 2. Total quantity of protein which remains in the CL (indicated by bar graph)

Figure 2와 Figure 3에서는 콘택트렌즈에 남아있는 단백질총량의 평균값을 각 군별로 나타내었다. 초음파 세척을 하지 않은 대조군이 가장 많이 콘택트렌즈에 단백질이 잔존하여 흡착량이 높았고, 다목적세정액을 이용해서 초음파 세척을 10분간 한 F군에서 가장 적게 단백질이 잔존하여, 가장 낮은 흡착량으로 나타났다.

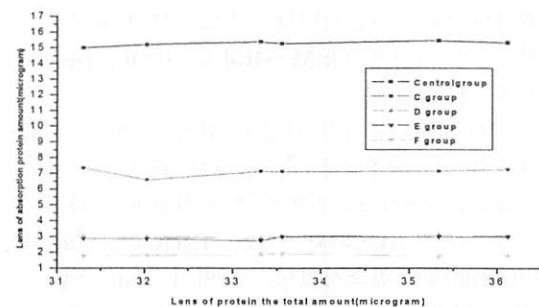
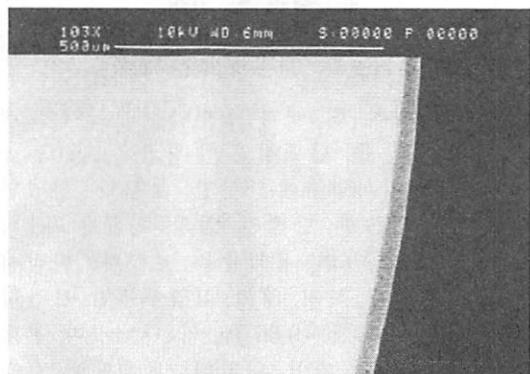


Figure 3. Total quantity of protein which remains in the CL (indicated by line graph)

Before ultrasonic cleaning process of protein



After ultrasonic cleaning process of protein

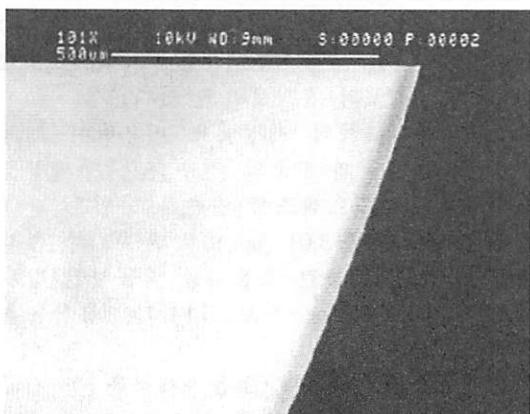


Figure 4. SEM Image of contact lens after ultrasonic cleaning process of protein

Figure 4에서는 단백질 초음파 세척 전과 다목적세정액을 이용하여 초음파세척을 10분간 한 E군의 콘택트렌즈 내면부와 변연부를 주사전자현미경으로 100배의 배율로 관찰한 결과 뚜렷한 구분이 되지 않았으나 세척 후의 콘택트렌즈 표면이 좀 더 깨끗하게 나타났다.

2. 생리식염수와 다목적 세정액을 이용한 초음파의 단백질 제거율

Table 4에서 보는 바와 같이 단백질 흡착 및 세척 실험에서 콘택트렌즈에 흡착된 단백질양의 평균은 $35.03 \mu\text{g}$ 이었고, 생리식염수에 5분간 보관만 하였던 대조군에 제거된 단백질 양의 평균은 $19.86 \mu\text{g}$ 으로 56.70%의 제거율을 보였고, 초음파로 생리식염수를 이용하여 세척을 시행한 C군과 D군의 경우 5분간 세척을 한 경우에는 콘택트렌즈에서 제거된 단백질의 양은 평균 $27.94 \mu\text{g}$ 으로 79.76%의 제거율을 보였고, 10분간 초음파를 작동시킨 경우에는 평균 $32.01 \mu\text{g}$ 으로 91.38%의 제거율을 보였다.

초음파로 다목적 세정액을 이용하여 세척을 시행한 E군과 F군의 경우 5분간 세척을 하였을 때 콘택트렌즈에서 제거된 단백질양의 평균은 $32.02 \mu\text{g}$ 으로 91.41%의 제거율을 보였으며, 10분간 초음파를 작동시킨 경우에는 평균 $33.23 \mu\text{g}$ 으로 94.86%의 제거율을 보였다.

따라서, 초음파로 세척을 시행한 시간이 길어질수록 단백질의 제거율은 더 증대됨을 보여 주었고, 생리식염수를 이용한 C, D군보다 다목적 세정액을 이용한 E, F군에서의 단백질 제거율이 더 우수함을 나타내었다.

Table 4. Protein removal ratio by ultrasonic waves

	Total quantity of protein	Control group	C group	D group	E group	F group
Average	35.03	19.86	27.94	32.01	32.02	33.23
Removal ratio%	100	56.70	79.76	91.38	91.41	94.86

3. 생리식염수와 다목적 세정액에 유리된 단백질

초음파세척에 의해 콘택트렌즈에서 유리된 단백질이 생리식염수와 다목적세정액에 실제로 존재하는지를 알아보기 위하여 생리식염수와 다목적세정액속의 단백질 양을 측정하였다.

Table 5에 나타난 바와 같이 단백질 초음파 세척에 의해 콘택트렌즈에서 유리된 단백질 양은 대조군의 경우 $0.67 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($16.75 \mu\text{g}/25\text{ml}$)이 측정되었고, 생리식염수를 이용하여 초음파 세척을 5분간 한 C군 경우에는 생리식염수에 유리되어 있는 단백질 양이 평균 $0.62 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($15.50 \mu\text{g}/25\text{ml}$)이었고 10분간 초음파세척을 한 D군 경우에는 $0.51 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($12.75 \mu\text{g}/25\text{ml}$)이었다.

다목적 세정액을 이용하여 초음파 세척을 5분간 한 E군 경우에는 다목적 세정액에 유리되어 있는 단백질 양이 평균 $0.53 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($13.25 \mu\text{g}/25\text{ml}$)이었고 10분간 초음파세척을 한 F군 경우에는 $0.45 \mu\text{g}/\text{ml}$ ($11.25 \mu\text{g}/25\text{ml}$)의 결과를 나타내었다.

따라서, 초음파 세척에 의해 유리된 단백질의 대부분이 생리식염수와 다목적 세정액에 유리되어 잔존함을 알 수 있었다.

Table 5. The quantity of protein which separated from the contact lens

	Quantity of protein($\mu\text{g}/\text{ml}$)
Control group	$0.67(16.75 \mu\text{g}/25\text{ml})$
C group	$0.62(15.50 \mu\text{g}/25\text{ml})$
D group	$0.51(12.75 \mu\text{g}/25\text{ml})$
E group	$0.53(13.25 \mu\text{g}/25\text{ml})$
F group	$0.45(11.25 \mu\text{g}/25\text{ml})$

4. 생리식염수와 다목적 세정액을 이용한 초음파의 세균 제거율

세균제거 기능 실험에서는 초음파 세척을 시행하지 않은 대조군의 경우에는 렌즈에 존재하

는 세균의 수(cfu)가 9.49×10^5 cfu/ml로 5.1%의 세균제거 감소율을 보인 반면 생리 식염수를 이용하여 초음파세척을 5분간 한 C군의 경우에는 6.00×10^4 cfu/ml로 94%의 세균제거 감소율을 보였고 10분간 초음파 세척한 D군의 경우에는 5.00×10^3 cfu/ml로 99.5%의 세균제거 감소율을 보였으며 다목적 세정액을 이용하여 초음파세척을 5분간 한 E군의 경우에는 8.00×10^3 cfu/ml로 99.2%의 세균제거 감소율을 보였으며 10분간 세척한 F군의 경우에는 0 cfu/ml로 100%의 세균제거 감소율을 나타냄을 Table 6.에서 알 수 있었다.

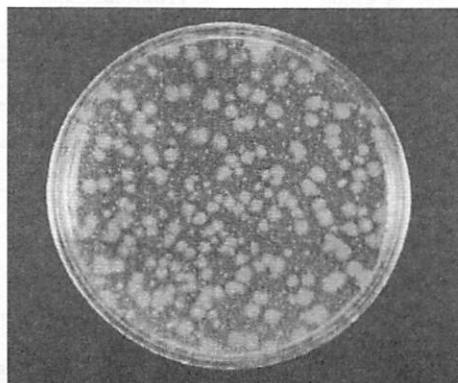
따라서, 초음파 세척에 의해서 렌즈에 붙어 있던 세균의 많은 수가 초음파 세척에 의해 탈락되어 제거됨을 알 수 있었고, 생리 식염수를 이용한 C, D군 보다 다목적 세정액을 이용한 E, F군에서의 세균 제거 효과가 더 우수함을 나타내었다.

Table 6. Germ removal ratio of ultrasonic waves by saline solution and multi-purpose Contact Lens solution

	Germ figure (cfu/ml)	% Germ removal ratio*
Control group	9.49×10^5	5.1
C group	6.00×10^4	94.0
D group	5.00×10^3	99.5
E group	8.00×10^3	99.2
F group	0	100.0

* A group germ figure 1×10^6 Standard

Pseudomonas before ultrasonic cleaning



Pseudomonas after ultrasonic cleaning -10minute

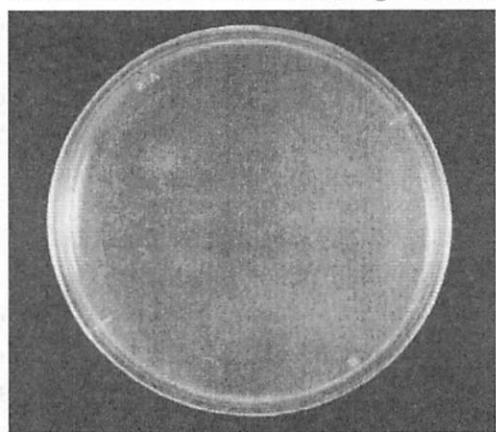
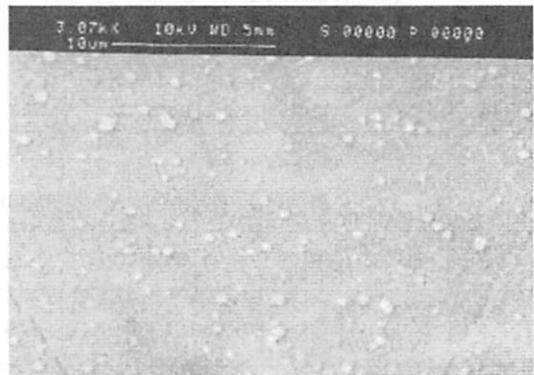


Figure 5. Comparison of contact lens after stipendiary Pseudomonas removal by ultrasonic cleaning process

Figure 5에서는 혈액한천배지에서 초음파로 녹농균 세척전과 다목적세정액을 이용해서 10분간 초음파 세척을 한 후의 결과 사진이다. 10분간의 초음파 세척 후에는 녹농균이 깨끗이 제거되어 녹농균이 발견되지 않았다.

Figure 6에서는 초음파로 녹농균 세척전과 다목적세정액을 이용해서 10분간 초음파 세척을 한 후 주사전자현미경사진으로 3000배율로 보았을 때 관찰한 것이며, 10분간의 초음파 세척 후에는 녹농균이 깨끗이 제거되어 녹농균이 발견되지 않았다.

Before ultrasonic cleaning



After ultrasonic cleaning

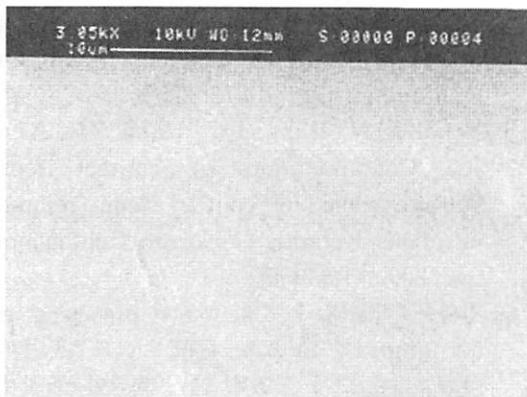


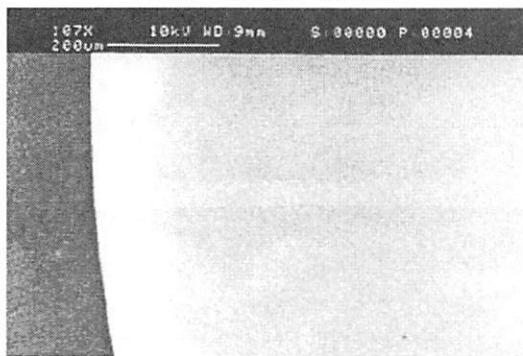
Figure 6. SEM Image of contact lens after Pseudomonas removal of ultrasonic cleaning process

5. 하드콘택트렌즈 표면의 주사전자현미경 관찰결과

초음파 세척(250mA, 10분간)을 250회(1년 사용기준) 반복하여 시행한 다음 콘택트렌즈의 손상 유무를 주사전자현미경으로 100배의 배율로 관찰한 결과 대조군과 비교 시 표면 손상이나 렌즈 재질 변성 등의 변화는 없었다. 따라서 동일한 렌즈를 초음파세척기로 250회 반복 세척하여도 하드 콘택트렌즈 자체에는 문제가 발생하지 않음을 Figure 7에서 알 수 있었다.

따라서, 본 실험에 사용한 콘택트렌즈 초음파세척기에서는 초음파로 인한 콘택트렌즈에 손상을 주지 않아 안전성에서 우수함을 알 수 있었다.

Before ultrasonic cleaning



After ultrasonic cleaning

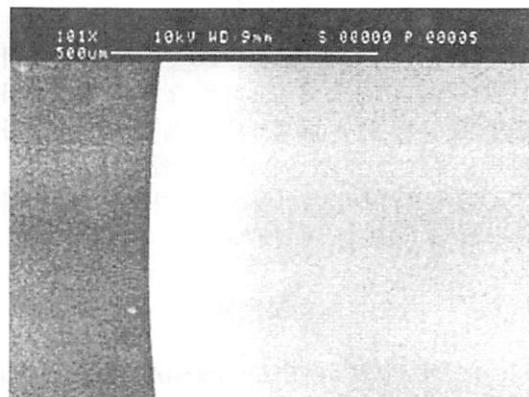


Figure 7. SEM Image of the inside surface and the edge of hard CL before and after ultrasonic cleaning process

주사전자현미경으로 100배의 배율로 보았을 때 초음파세척을 250회 실시한 하드 콘택트 렌즈의 내표면과 변연부를 관찰한 결과 정상렌즈와 같이 표면이나 재질의 형태학적 변화를 보이지 않았다.

IV. 결 론

콘택트렌즈 초음파세척기를 이용하여 다목적 세정액과 생리식염수에 따른 콘택트렌즈에 흡착된 단백질 및 세균의 세척 및 소독효과를 표면분석을 통해 비교해 보고 단백질 흡착 및 세척 실험, 단백질 정량실험, 세균제거 기능 실험, 주사전자현미경 관찰을 하였으며 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 콘택트렌즈에 흔히 부착되는 단백질을 보다 효과적으로 간편하게 제거하는 데 초음파 사용이 효과적임을 알 수 있었으며, 생리식염수를 이용한 초음파 5분 세척은 79.76%이고, 다목적세정액을 이용한 초음파 5분 세척은 91.41%의 단백질 제거율로서 다목적세정액이 효과적이었다.

2. 콘택트렌즈를 장용 했을 때 생길 수 있는 각막염의 원인균의 하나인 녹농균 제거기능실험에서 초음파세척이 우수했으며, 다목적세정액을 사용한 초음파 5분 세척은 99.2%였고, 생리식염수를 사용한 초음파 5분 세척은 94%로

다목적세정액이 보다 우수했다.

3. 초음파 세척으로 인한 콘택트렌즈 손상유무를 관찰하기 위해 하드콘택트렌즈를 사용하여 1년간 사용한 정도의 250회를 초음파 세척해서 표면 관찰한 결과 콘택트렌즈 재질의 변성이나 형태학적 변형이 없음을 알 수 있었다.
4. 초음파 세척 시간에 따라 단백질 제거 및 세균의 수 감소는 비례하였다.

참고문헌

1. 윤민화, 박현주, 이기영, *pseudomonas aeruginosa*에 대한 soft contact lens 다목적 용액의 항균효과, *한국안광학회지*, 9(2): 353-359 (2004)
2. 박미경, 차홍원, 연성콘택트렌즈에서 발육한 미생물8종, *대한안과학회지*, 2(11): 96-102 (1991)
Peter A. Simmons, PhD, FFAO, William H. RidderIII, OD, PhD, FFAO, Timothy B.Edrington OD, MS, FFAO, Sharon Ho, OD, and Kuen-Chine Lau, OD, Passive Protein Removal by Two Multipurpose Lens Solutions: Comparison of Effects on In Vitro Deposited and Patient-Worn Hydrogel Contact Lenses, *ICLC* 26:33-8(1999).
3. Gray TB, Cursons RT, Sherwan JF, Rose PR. Acanthamoeba, bacterial, and fungal contamination of contact lens storage cases. *Br J Ophthalmol* 1995;79:601-5.
4. Cho YA, Lee KH, Jung HR. Bacterial contamination of the wetting solution in cases of soft contact lens. *J Korean Ophthalmol Soc* 1987;28:259-1.
5. Tchah HW, Hahn TW, Hahn YH, Kim JC. Contamination of contact lens storage case in contact lens related infectious Keratitis. *J Korean Ophthalmol Soc* 2000;41:349-55.
6. 김덕훈, 박용태, 유해병, 배양된 *pseudomonas aeruginosa*의 소프트 콘택트렌즈 표면부착에 대한 미세 구조적 연구, *한국안광학회지*, 5(2): 11-14(2000)
7. 김재민, 콘택트렌즈 관리용액이 배양 생쥐 썸유모세포에 미치는 세포독성에 관한 연구, *한국안광학회지*, 1(2): 13-18(1996)
8. Stamler JF. The complication of contact lens wear. *Current option ophthalmology* 1998;9:66-71
9. Dong EY, Kim EC, The Korean Contact Lens Study Society
10. 박현주, 박동화, 김재민, 이기영, Soft Contact Lens 다목적 용액의 단백질 제거 효능에 관한 연구, *대한시과학회지*, 3(2): 143-149(2001).
11. Bartolomei A, Alcaraz L, Bottone E. Clinical evaluation of purilens, an ultraviolet light contact lens care system. *CALO J.* 1994; 20:23-26.
12. 오세환의 Cleaning Effects of Ultrasonic Contact Lens Cleaner

토양에서 불용성 인산염 용해균의 분리

金收貞 · 金現洙

啓明大學校 自然科學大學 微生物學科

Isolation of Phosphate Solubilizing Strains from soil

Soo-Jung Kim and Hyun-Soo Kim

Department of Microbiology, College of Natural Science, Keimyung University, Taegu 704-701,
Korea

요약. 본 연구는 토양으로부터 불용성 인산염을 용해하는 균주를 탐색하기 위해 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 등을 사용하여 두균주 L-1, BR-1을 분리하였다. 또한 탄소원과 질소원으로 최대 생육 조건을 검토한 결과, L-1은 glucose와 peptone에서 가장 우수하였고 BR-1은 glucose와 yeast extract에서 가장 우수하였다. 인산염 용해균을 이용하여 포장 시험한 결과, 배추 밭에 L-1과 BR-1 배양액을 분주하였을 때 인산염 용해능이 가장 우수하였다.

Abstract. Strain L-1 and BR-1 that solubilized insoluble phosphate were isolated from soil. The maximum growth conditions were investigated about carbon and nitrogen sources. Strain L-1 showed the excellent growth in the culture broth with glucose and peptone addition. Strain BR-1 revealed the excellent growth under the addition of glucose and yeast extract. In the result of garden plants experiment using two strains, the cabbage field showed the high phosphate solubilizing activity when L-1 and BR-1 culture broth sprayed.

I. 서 론

인산은 식물체가 필요로 하는 영양원으로서 핵산, 인지질 등의 중요 구성성분이며, 식물과 박테리아 성장에 필요한 에너지 대사에서도 중요한 역할을 하고 있다(1). 실제로 토양 중 인산의 농도는 약 0.05 mg/L에 불과하나 식물이나 미생물이 이용할 수 있는 인산의 양은 0.1%로 알려져 있다(2, 3).

우리 농업은 단위 면적당 작물의 수확량을 극대화하기 위하여 다량의 화학비료와 유기물을 사용하여 화학적, 생물학적 반응을 거쳐 비료성분의 불용화나 유실현상이 일어나게 된다. 특히 인산은 산성토양에서 철, 알루미늄 이온과 그리고 알칼리성 토양에서는 칼슘이온과 쉽게 결합하여 식물체가 이용 할 수 없는 불용성 인산의

형태로 전환됨으로써 토양의 지력 저하와 하천과 바다의 부영양화를 가져오는 주원인이 되고 있다(4-6). 염류가 과도하게 집적된 토양은 농작물의 영양분 흡수와 생육을 억제함으로 인해 각종 질병에 대한 감염 위험을 높인다(7).

인산 가용화 균을 이용한 환경친화형 미생물비료의 개발노력은 부단히 이루어져 왔다. 이미 1950년대에 러시아와 동유럽에서는 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물(phosphobacteria)을 분리하여 토양에 처리한 결과, 농작물의 인산 흡수율을 증대시킬 수 있었으며, 평균 10%의 수량증가를 보았다(8). 1980년대에는 *Penicillium bilaji* 등의 특정 사상균이 인산의 흡수를 증대시키는 것으로 밝혀졌다(9). 불용성 인산을 가용화시킬 수 있는 미생물(phosphate-solubilizing microorganism, PSM)을 토양에 접종함으로써 고정된 토양 인산

의 가용화를 촉진시킬 수 있고, 이에 따라 농작물의 생산성을 높일 수 있다(10). 이미 보고되어진 인산 가용화 균으로는 *Bacillus megaterium*(8), *B. polymyxa*(11), *Pseudomonas striata*(12), *Penicillium simplicissimum*(13), *P. aurantiogriseum*(14), *Aspergillus awamori*(15), *A. aculeatus*(16), *A. niger*(13) 등이 있다.

국내에서도 환경농업의 중요성이 인식되면서 여러 대학 및 연구소에서 미생물제제에 대한 연구를 시작하고 있으나 균주 선발 및 배양특성 조사, 포장시험 등에 관한 폭넓은 연구의 부족으로 아직 실험실 수준의 초보적인 단계에 머무르고 있다(17, 18). 앞으로 환경보전을 위한 여러 규제강화로 화학비료에 대한 제약이 심화될 것으로 예상되며 인 자원의 재활용측면에서 불용성 인산염을 효율적으로 분해하여 농작물이 필요로 하는 인산 비료성분을 충분히 공급해 줄 수 있는 생물비료의 개발은 중요한 과제가 될 것이다.

따라서 본 연구는 칼슘비료 및 인산비료의 과다사용으로 인한 작물생장저해를 해결하기 위해 칼슘, 인산염의 용해능이 있는 균주를 사용하여 균주의 기질특이성, 생육조건을 검토하여 포장시험을 하였다.

II. 실험재료 및 방법

1. 사용 균주 및 배양 조건

부추 밭, 대나무뿌리, 유럽, 대구 근교 등 각각의 토양으로부터 균주를 분리하여 인산염 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, AlPO_4 , $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$, K_2HPO_4 , $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 를 각각 0.5% 첨가한 흑설탕배지(black sugar 1%, agar 20 g/l)와 $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 를 0.5% 첨가한 PDA배지(Difco Co.)에 분리 균을 접종하였다. 분리 균주의 배양은 28°C, 2~3일간 배양하여 불용성 인산염을 용해시키는 균주를 선별하였으며 생육배지에 배양하여 공시균으로 사용하였다(19).

2. 염화제일주석 환원법에 의한 인의 정량

용액 중의 인의 농도를 측정하기 위하여 염화제일주석 환원법으로 standard curve를 제작하

였다.

표준원액(0.1 mg-P/ml)을 조제하기 위하여 KH_2PO_4 를 110°C에서 3시간 건조하여 desiccator에서 방냉 시킨 후 중류수에 용해시켜 인이 0.1 mg/ml가 되게 만들었다.

발색시약인 ammonium molybdate용액은 중류수 150 ml에 ammonium molybdate[$(\text{NA}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$] 8.27 g 첨가하고, 중류수 50 ml에 antimony potassium tartrate hemihydrate ($\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_7\text{SBK} \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$)을 첨가하여, 이 두 용액을 16% H_2SO_4 를 가하면서 혼합 후, ammonium amidosulfate($\text{NH}_4\text{OSO}_2\text{NH}_2$) 10 g을 녹였으며 이 혼합액에 중류수를 가하여 총 부피가 1 l가 되게 하였다.

인산염내의 인을 정량하기 위한 tin(II) chloride dihydrate용액을 조제하기 위하여 tin(II) chloride dihydrate 2 g을 HCl 10 ml에 첨가하여 녹인 후, 중류수를 가하여 총 부피가 100 ml가 되게 하였다

인 표준용액을 농도 별로 ammonium molybdate 용액 0.5 ml와 tin(II) chooride dihydrate용액 0.025 ml를 혼합시켜 중류수를 가하여 총 부피가 5 ml되게 한 후, 20~30°C에서 10분간 방치한 다음 690 nm에서 흡광도를 측정하여 표준용액에 의한 standard curve를 작성하였다(18).

3. 불용성 인산염 용해능 검토

분리 균주를 액체 배양시켜 배양액 1 ml에 중류수 3 ml를 넣어 시험액으로 만들었다. 시험액에 ammonium molybdate 용액 0.5 ml와 tin(II) chloride dihydrate 용액 0.025 ml를 혼합시켜 중류수를 가하여 총 부피가 5 ml가 되게 한 후, 20~30°C, 10분간 방치하여 690 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4. 분리 균주의 최대 생육 조건(탄소원과 질소원) 검토

불용성 인산염 용해균의 최대 생육 조건을 검토하기 위하여 흑설탕배지에 탄소원(glucose, fructose, lactose, soluble starch, maltose, saccharose)을 달리하여 각 1%첨가 배양하여 탄소원의 최대 생육 조건을 검토한 후 질소원(yeast extract, malt extract, peptone, soytone,

NaNO_3)을 달리하여 각 1%첨가 배양하여 생균 수를 측정하였다.

5. 열무와 배추를 대상으로 불용성 인산염 용해균을 이용한 포장시험

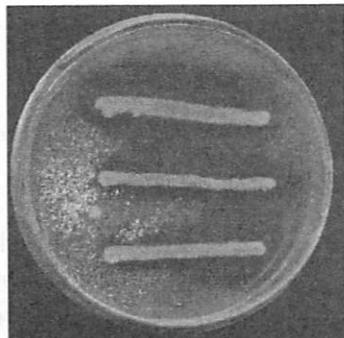
열무와 배추를 시험 작물로 하여 농가 포장에서 실험하였으며 인산염 용해 분리균주 L-1과 BR-1을 액체 배양 후 혼합하여 분무형식으로 수행하였다.

열무와 배추의 잎을 건조시킨 후 파쇄하여 0.5 g에 멸균수 10 ml를 가하여 여과 한 후 14,000 rpm, 15분간 원심분리하여 상등액 1 ml에 증류수 3 ml를 넣어 각각의 시험액으로 사용하였다. 또한 열무가 생육한 토양을 채취하여 잔존 인산염을 확인하기 위하여 일정 비율로 희석한 후 상등액을 시험액으로 사용하였다. 각 시험액을 대상으로 염화제일주석 환원법으로 인을 정량하였다.

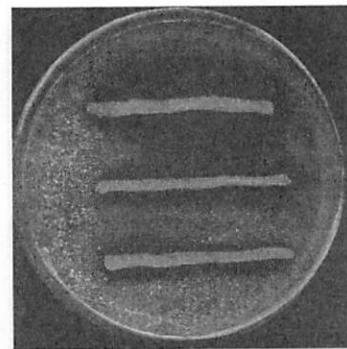
III. 결과 및 고찰

1. 불용성 인산염 용해균 분리

$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.5% 첨가된 PDA배지에서 배양한 L-1, BR-1과 $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ 0.5% 첨가된 흑설탕배지에서 배양한 BR-1, L-1, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 를 0.5% 첨가된 흑설탕배지에서 배양한 BR-1, L-1, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.5% 첨가된 흑설탕배지에서 배양한 L-1 균이 인산염을 용해하여 clear zone을 형성하였다(Fig. 1). Clear zone의 면적이 클수록 인산염 용해 활성이 높은 것으로 사료된다.



L-1

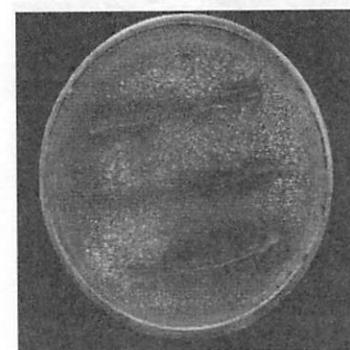


BR-1

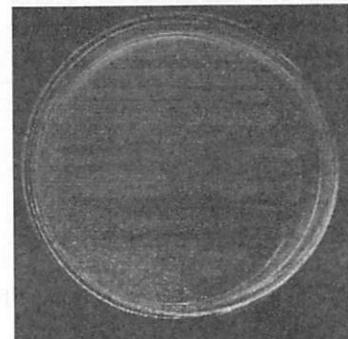
Fig. 1. Isolation of phosphate solubilizing strains from soil on PDA medium contain of $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$

L-1; Isolated from leek soil

BR-1; Isolated from bamboo root soil



A



B

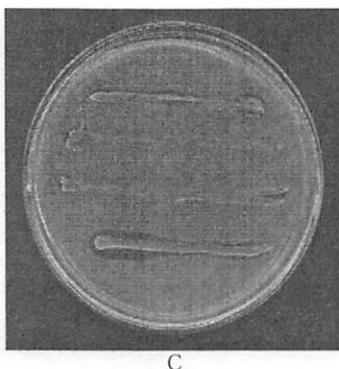


Fig. 2. Isolation of phosphate solubilizing L-1 strain from soil on black sugar medium

- A; Black sugar medium containing $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- B; Black sugar medium containing $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- C; Black sugar medium containing $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$

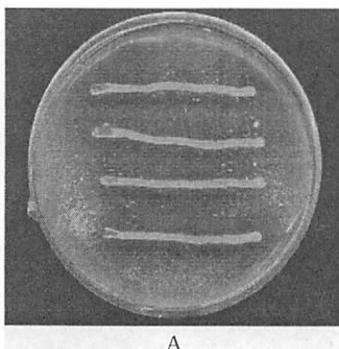


Fig. 3. Isolation of phosphate solubilizing BR-1 train from soil on black sugar medium

- A; Black sugar medium containing $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- B; Black sugar medium containing $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

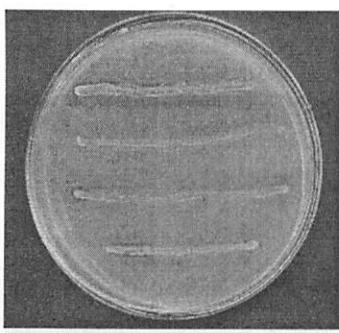


Fig. 3. Isolation of phosphate solubilizing BR-1 train from soil on black sugar medium

- A; Black sugar medium containing $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
- B; Black sugar medium containing $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

2. 인 표준용액의 염화제일주석 환원법에 의한 standard curve 작성

Table 1, Figure 4에서 보는바와 같이 인 표준용액의 농도별로 염화제일주석 환원법에 의한 standard curve를 작성하였다.

Table 1. ABS value of phosphate concentration

Phosphate concentration (ppm)	ABS
0	0
5	0.242
10	0.305
15	0.368
20	0.43
25	0.431
30	0.57
35	0.608
40	0.673
45	0.667
50	0.73

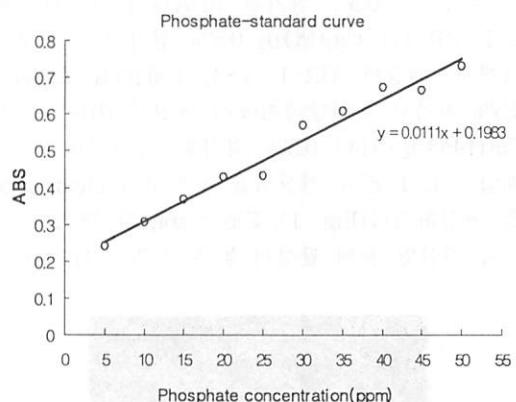


Fig. 4. Standard curve of Phosphate

3. 불용성 인산염 용해능 검토

분리균주 배양액의 흡광도를 측정하여 용해된 인산염의 농도(ppm)를 산출한 결과 Table 2에서 보는바와 같이 흑설탕 배지에 $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 를 첨가하여 배양한 분리균주 L-1이 인산염의 용해능이 가장 우수한 것으로 나타났다.

Table 2. Medium type of phosphate solubilizing activity

Medium	Salts	Strains	O.D	ppm	Total($\mu\text{g}/\text{ml}$)
PDA	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	L-1 ¹⁾	0.369	15.378	768.9
		BR-1 ²⁾	0.322	11.144	557.2
Black sugar	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	L-1	0.442	21.955	1097.75
		BR-1	0.669	42.405	2120.25
Black sugar	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	L-1	0.844	58.171	2908.55
		BR-1	1.066	78.171	3908.55
	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	L-1	2.227	181.865	9093.25

¹⁾; Isolated from leek soil²⁾; Isolated from bamboo root soil

4. 분리균주의 최대 생육 조건 검토

분리균주의 최대 생육 조건을 검토하기 위하여 배지의 탄소원과 질소원을 달리하여 검토하였다. 흑설탕배지에 탄소원(glucose, fructose, lactose, soluble starch, maltose, saccharose)을 달리하여 각 1%첨가 배양한 후 생균수를 측정하였다. Table 3에서 보는바와 같이 분리균주 L-1에서는 glucose, BR-1에서는 glucose와 soluble starch에서 가장 생균수가 높았다.

Table 3. Effect of varies carbon sources on strains

C sources	Strains	L-1	BR-1
Control		7°	1
Glucose		10	8
Fructose		6	1
Lactose		1	4
Soluble starch		1	8
Maltose		1	4
Sucrose		4	5

*: $1 \times 10^4/\text{ml}$

최대 생육 탄소원을 검토한 후 질소원(yeast extract, malt extract, peptone, soytone, NaNO_3)을 달리하여 각 1%첨가 배양한 후 생균수를 측정하였다.

정하였다. Table 4에서 보는바와 같이 L-1은 peptone, BR-1은 yeast extract에서 생균수가 가장 높았다.

분리균주 L-1은 탄소원 glucose, 질소원 peptone에서 가장 생균수가 많았고 BR-1은 탄소원 glucose, 질소원 yeast extract에서 가장 생균수가 많았으므로 이를 최대 생육 조건으로 확립하였다.

Table 4. Effect of varies nitrogen sources on strains

N sources	Strains	L-1	BR-1
Control		10°	9
Malt extract		15	22
Yeast extract		12	99
Peptone		21	39
Soytone		2	9
NaNO_3		5	9

*: $1 \times 10^5/\text{ml}$

5. 열무와 배추를 대상으로 불용성 인산염 용해균을 이용한 포장시험

열무와 배추를 시험작물로 하여 농가 포장에서 실험하였으며 인산염 용해 분리균주 L-1과 BR-1을 액체 배양한 후 혼합하여 분무형식으로 수행하였다. 열무 잎의 시험액을 염화제일주석

Table 5. Activity of phosphate solubilizing on the young radish field

Treatments	Young radish		Soil of young radish	
	control	treatment	control	treatment
Phosphate concentration(ppm)	113	114	0	12

Table 6. Activity of phosphate solubilizing on the cabbage field

Treatments	Primary		Secondary		Tertiary	
	control	treatment	control	treatment	control	treatment
Phosphate concentration(ppm)	2	2	2	10	3	5

환원법으로 인을 정량한 결과 Table 5에서 보는 바와 같이 분리균주 배양액을 분무한 열무 잎에 잔존하는 인의 양은 분리균주 배양액을 분무하지 않은 것과 차이가 나지 않으며 열무가 생육한 토양에 잔존하는 인의 양은 분리균주 배양액을 분무한 토양에 용해된 인산염이 12 ppm 더 많이 존재하였다.

또한 배추는 3회에 걸쳐 분리균주 배양액을 분무하여 배추 잎을 채취하였으며 배추 잎의 시험액은 염화제일주석 환원법에 따라 인을 정량하였다. Table 6에서 보는 바와 같이 분리균주 배양액의 분무 2회시 가장 높은 인산염 용해 활성을 보였다.

참고문헌

1. Alexander, M. In *introduction to soil microbiology*. Wiley, New York. (1977)
2. Vassilev, N., M.T. Baca, M. Vassilev, I. Franco and R. Azcon. Rock phosphate solubilization by *Aspergillus niger* grown on sugarbeet waste medium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 546-549. (1995)
3. Scheffer, F. and Schachtschabel, P. In *Lehrbuch der Bodenkunde*. Ferdinand Enke Verlag, Stuttgart. (1992)
4. Paul, E.A. and Clark, F.E. In *Soil microbiology and biochemistry*. Academic Press, New York, USA. (1992)
5. Whitelaw, M.A., Harden, T.J., Helyar, K.R. Phosphate solubilization in solution culture by the soil fungus *Penicillium radicum*. *Soil Biol. Biochem.* 31, 655-665. (1999)
6. Low, H.A. and D.M. Webley. A study of soil bacteria dissolving certain phosphate fertilizers and related compounds. *J. Appl. Bacteriol.* 22, 227-233. (1959)
7. Van Elas, J.D., Trevors, J.T., Wellington, E.M.H *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, Inc., New York. (1997)
8. Dubey, S.K. and S.D. Billore. Phosphate solubilizing microorganism(PSM) as inoculant and their role in augmenting crop productivity in India. *Crop Res. Hisar.* 5, 11-17 (1992)
9. Kucey, R.M.N. Effect of *Penicillium bilaji* on the solubility and uptake of P and micronutrients from soil by wheat. *Can. J. Soil Sci.* 68, 261-270. (1988)
10. Illmer, P. and F. Schinner. Solubilization of inorganic phosphates by microorganisms isolated from forest soils. *Soil Biol. Biochem* 24, 389-395. (1992)
11. Tiwari, V.N., Pathak, A.N., Lehri, L.K. Rock phosphate superphosphate in wheat in relation with phosphate solubilizing organism and organic waste. *Ind. J. Agr. Res.* 27, 137-145. (1983)
12. Agaimani, C., Mudagiriyappa, A., Sreenivasa, M.N. Response of groundnut to phosphate

- solubilizing microorganisms. *Groundnut News.* 6, 5. (1994)
13. Sayer, J.A., Raggett, S.L., Gadd, G.M. Solubilization of insoluble for solubilizing ability and metal tolerance. *Mycological Res.* 99, 987-993. (1995)
14. Illmer, P. and F. Schinner. Solubilization of inorganic calcium phosphate: solubilization mechanisms. *Soil Biol. Biochem.* 27, 257-263. (1995)
15. Varsha, N., Jungu, T., Patel, H.H. Solubilization of natural rock phosphates and pure insoluble inorganic phosphate by *Aperillus awamori*. *Ind. J. Exp. biol.* 31, 747-749. (1993)
16. Varsha, N., Jungu, T., Patel, H.H. Mineral phosphate solubilization by *Asperillus aculeatus*. *Ind. J. Exp. biol.* 33, 91-93. (1995)
17. Kim, H.O., Uo, Z.K., Lee, S.C., Kucey, R.M.N. Mycorrhizae distribution and rock phosphate dissolution by soil fungi in the citrus fields in Jeju-do. *Cheju Natl. Univ. J.* 17, 45-50. (1984)
18. Suh, J.S., Lee, S.K., Kim, K.s., Seong, K.Y. Solubilization of insoluble phosphate by *Pseudomonas putida*, *Penicillium* sp. and *Aspergillus niger* isolated from Korean soils. *J. Kor. Soc. Sci. Fert.* 28, 278-286. (1995)
19. Kang, S.C. and Choi, M.C. Isolation and cultural characteristics of a phosphate-solubilizing fungus, *Penicillium* sp. P113. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 13, 497-501 (1998)

Chromobacterium violaceum YK 391의 세포내 Cytosine Deaminase 활성에 미치는 Cytosine Analogues의 영향

김효정 · 김현수 · 서영은 · 유대식

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

Effect of Cytosine Analogues on Cytosine Deaminase Activity from Intracellular *Chromobacterium violaceum* YK 391

Kim, Hyo Jung, Hyun Soo Kim, Young Eun Seo, and Tae Shick Yu

Department of Microbiology, Keimyung University, 701-704 Taegu, Korea

요약. 본 연구는 *Chromobacterium violaceum* YK 391의 세포내 cytosine deaminase 활성에 미치는 cytosine analogue의 영향에 대하여 조사하였다. Cytosine deaminase는 기질이 cytosine일 때 6-azacytosine, 2-thiocytosine, 2-thiouracil에 의하여 저해되었으며, 2-thiocytosine과 2-thiouracil의 저해 계수는 $2.5 \times 10^{-3} M$ 과 $2.65 \times 10^{-3} M$ 이었다. Cytosine deaminase는 기질이 5-fluorocytosine일 때 2-thiocytosine과 2-thiouracil에 의하여 저해되었으며, 2-thiocytosine과 2-thiouracil의 저해 계수는 $2 \times 10^{-3} M$ 과 $0.875 \times 10^{-3} M$ 이었다.

Abstract. In this study investigated the effect of cytosine deaminase activity from intracellular *Chromobacterium violaceum* YK 391 by cytosine analogues. When was substrate cytosine, the cytosine deaminase was inhibited by 6-azacytosine, 2-thiocytosine and 2-thiouracil. The Ki value of 2-thiocytosine and 2-thiouracil were $2.5 \times 10^{-3} M$ and $2.65 \times 10^{-3} M$. When was substrate 5-fluorocytosine, the enzyme was inhibited by 2-thiocytosine and 2-thiouracil. The Ki value of 2-thiocytosine and 2-thiouracil were $2 \times 10^{-3} M$ and $0.875 \times 10^{-3} M$.

I. 서 론

Cytosine deaminase(cytosine aminohydrolase, EC 3.5.4.1)는 핵산의 pyrimidine 염기 중의 하나인 cytosine의 4번 탄소에 위치한 아미노기를 가수분해하여 uracil과 암모니아로 전환시키는 가수분해 효소이다. 이 효소는 1923년에 처음 발견된 이래 세균, 효모, 곰팡이 등 여러 종류의 미생물에서 대부분 세포내 효소로 발견되었다.

세포내 cytosine deaminase(CODase)에 관한 연구로서, Kream와 Chargaff(1952)는 CODase의 효소학적 특성을 연구하였으며, Kaltwasser와 Kramer(1968)는 cytosine을 함유한 배지에서 CODase 활성이 증가된다고 하였다.

CODase는 cytosine의 유도체 중의 하나인 5-fluorocytosine(5-FC)에 대해서 탈 아미노화 반응을 촉매하여 5-fluorouracil(5-FU)을 형성시킨다. 이와 같은 탈 아미노화 반응은 두 가지 측면에서 임상학적인 의의를 포함하고 있다.

첫째는 항진균제로서의 5-FC의 역할이다. 5-FC는 uracil의 fluoro화 된 유도체인 5-FU와는 달리 진균의 성장을 억제하지 못하나 진균류가 소유하고 있는 CODase의 작용에 의해 5-FU로 변환되어 진균감염에 대한 화학요법 효과가 나타난다고 보고하였다.

둘째는 항종양물질로서의 역할이다. 1957년 Duschinsky 등이 5-FC가 항종양 효과가 없다고 보고한 이래로 1970년 이르러서는 Giege와 Weil

이 진균에 함유되어 있는 CODase에 의하여 5-FC가 5-FU로 탈 아미노화됨으로써 진균감염에 대한 화학요법에 효과가 있다고 보고하였다. 그 후, *Escherichia coli*로부터 정제한 CODase (Katsuragi, et al., 1986)와 5-FC를 병행 투여하는 국소화학요법으로 cerebellar deficient folia (CDF) 쥐 glioma로부터 유도된 EA-285 glioma 세포의 증식을 저해하고(Sakai, et. al., 1985) 더 옥이, Fisher계 쥐의 뇌종양 내에서 뇌종양 괴사고를 확인함으로 특이에 의해 enzyme capsule의 이용과 더불어 drug-delivery system에 대한 연구가 활발히 이루어졌고 1994년에는 Wallace 등에 의해 CODase를 항체와 결합시키는 새로운 항종양요법이 시도되었고 1998년에는 Kim 등이 *in vitro*상에서 인간 만성적인 끌수성의 빈혈을 유발하는 백혈병 세포계인 K-562 및 인간 대장암 세포계인 SUN-C4에 대하여 CODase와 5-FC를 병행 투여함으로써 증식 저하를 나타낸다는 연구 결과를 보고 하였다. 최근에는 CODase를 이용해서 암유전자 치료를 위한 suicide gene으로써 사용하는 연구가 활발하게 진행되고 있다.

이상과 같이 CODase는 pyrimidine nucleotide 대사계에서 중요한 역할을 담당하는 key enzyme 일 뿐만 아니라 항진균제이며 인체에 무해한 5-FC와 CODase를 병행 투여함으로써 탁월한 제암효과를 나타내어 임상학적 측면에서도 이용 가능성이 높은 효소이다. 그러나 CODase는 포유동물에서는 생성되지 않고 단지 미생물에서만 극 미량 생산되고 열에 대해서도 불안정하기 때문에 학술적·임상학적 연구에 직접 이용하기 어려운 점이 있으므로 저장성이 높은 CODase의 계발이 절실히 요구된다. 그러므로 CODase를 세포외로 분비할 뿐만 아니라 세포내에서도 매우 높은 활성을 나타내는 *Chromobacterium violaceum* YK 391(Yu와 Kim, 1997)을 공시균으로 사용하였다.

Chromobacterium violaceum YK 391에 대한 효소학적 성질 등이 규정되어 있을 뿐, 본 효소의 활성저해 기작에 관한 연구는 전무하며, 단지 Cihak 등(1965)은 *Escherichia coli*의 CODase의 저해는 5-azacytosine에 의해, Krem 등의 빼효모 CODase의 저해는 isocytosine과 2-mercaptop-6-

aminopyrimidine에 의해 각각 저해되었다는 것과 1997년 *Aspergillus fumigatus* IFO 5840이 생산하는 CODase은 6-azacytosine과 2-thiocytosine에 의해 저해되었다는 보고가 있었다. 따라서 본 연구에서는 *Chromobacterium violaceum* YK 391이 생산하는 CODase를 저해하는 cytosine analogue의 영향과 본 효소의 활성저해 기작에 관하여 연구하였다.

II. 재료 및 방법

공시균주 및 균주 보존

본 실험에 사용한 균주는 Yu와 Kim(1997)에 의해 세포외 CODase를 분비하는 *Chromobacterium violaceum* YK 391를 공시균주로 사용하였다. 이 균주를 대상으로 세포내 CODase에 관한 연구를 수행하였다. 그리고 미생물의 보존은 증식용 배지에서 배양한 균체를 20% glycerol 용액에 혼탁하여 deep freezer(-70°C)에 넣어 보관하였다.

배지 조성 및 배양 조건

기존에 사용했던 효소생산 배지(Peptone 10.0, Meat extract 1.0, Yeast extract 1.0, Soluble starch 7.5, K₂HPO₄ 0.5, NaCl 0.1g/l)보다 효소 활성이 2배 이상 높게 나타난 증식용 배지(Peptone 2.0, Meat extract 1.0, Yeast extract 1.0, Dextrose 10.0g/l, pH 7.0) 20ml를 100ml 삼각 플라스크에 넣고 공시균주를 1백금이 접종한 후 30°C, 150rpm에서 1일간 전탕 배양하여 이를 전 배양액으로 사용하였다. 본 배양은 증식용 배지 100ml를 250ml 삼각 플라스크에 넣은 후, 전 배양액 1ml를 첨가하여 30°C, 150rpm에서 2일간 전탕배양 시켰다. 전탕 배양한 후, 8,000rpm에서 원심분리하여 균체를 회수하였다.

조효소학의 조제

공시균주가 생산하는 세포내 CODase를 얻기 위하여 2일간 전탕 배양한 공시균주의 균체를 8,000rpm에서 원심분리하여 집균하고 중류수로 3회 세척한 다음, 0.2M Tris-HCl완충액(pH 7.5)으로 1회 세척하였다. 세척한 균체를 다시 0.2M Tris-HCl완충액(pH 7.5)에 혼탁하고 10°C이하에서

120Hz로 1분 간격으로 초음파 파쇄기를 사용하여 현미경에서 완전히 세포가 파쇄 될 때까지 행하였으며 파쇄시간은 균체 농도에 따라 조정하였다. 현미경상으로 완전히 파쇄된 것을 확인한 후, 12,000rpm에서 20분간 원심분리하여 균체 찌꺼기를 제거하고 그 상층액을 조효소액으로 사용하였다.

효소활성도 측정

Cytosine deaminase의 활성도는 Sakai 등의 방법(1975a)에 준하여 분광광도계를 사용하여 산성조건에서 290nm의 기질인 cytosine과 생성물인 uracil이 나타내는 흡광도의 감소로 활성을 측정하였다. CODase의 효소 반응은 5mM cytosine용액 0.2mℓ와 적당히 회석한 조효소액 0.2mℓ 및 0.2M Tris-HCl완충액(pH 7.5) 0.6mℓ를 전체용량이 1.0mℓ되게 하여 37°C에서 30분간 효소 반응시킨 후, 0.1N HCl 4.0 mℓ를 첨가하여 효소 반응을 정지시켰다. 효소 반응 후, 침전물이 생기면 원심분리하여 침전물을 제거하고 활성을 측정하였다. 효소활성의 단위는 30분 동안에 1 μmole의 cytosine을 탈 아미노화하여 uracil로 전환시키는 효소량을 1unit로 정의 하였다.

효소의 정제

조효소액의 100mℓ에 황산암모늄을 20%로 포화시켜 1시간 정치한 후, 4°C에서 12,000rpm로 10분간 원심분리 하여 비활성 단백질인 침전물을 제거하고 상등액에 황산암모늄을 40%로 포화시켜 하룻밤 정치시켰다. 그 후 황산암모늄이 포화된 효소액을 위의 조건에서 원심분리 하여 얻어진 침전물을 소량의 0.2M Tris-HCl완충액(pH 7.5)에 용해시키고 효소액의 20배 양의 동일한 완충액으로 3회 반복하면서 4°C에서 10시간 투석시켰다. 그리고 투석된 효소액 중의 불용성 물질은 위의 조건에서 원심분리하여 제거하여 사용했다.

효소의 특성

본 효소의 특성을 검토하기 위해 pH 안정성, 열 안정성, 반응 최적 pH, 반응 최적 온도 등을 조사하였다. 효소의 pH 안정성을 검토하기 위하여 효소액 일정량을 pH 3.0에서 pH 12.0까지 조

정된 각각의 완충액에 24시간 4°C에서 투석시킨 후, 효소 활성을 측정하였다. 본 효소의 열 안정성은 효소액을 25°C에서 80°C까지의 각 온도에서 10분간 열처리한 후, 급히 냉각시켜 37°C에서 잔존효소활성을 측정하였다. 본 효소의 반응 최적 pH를 검토하기 위하여 기질을 pH 별 완충액에 각각 녹여 효소 활성을 측정하였고 반응 최적 온도는 15°C에서 75°C까지 각 온도에서 효소활성을 측정하였다.

Cytosine analogue의 영향

본 효소의 활성에 미치는 cytosine analogue의 저해 유무를 검토하기 위하여 5mM의 cytosine과 5-fluorocytosine을 각각 기질로 하여 cytosine analogue의 최종 농도를 1mM 되게 첨가하고 혼합하여 효소 반응시켜 잔존효소활성을 측정하여 효소 활성에 미치는 cytosine analogue의 영향에 대하여 검토했다.

결과 및 고찰

세포내 cytosine deaminase의 효소학적 특성 pH 안정성

효소의 안정성에 미치는 pH의 영향을 검토하기 위하여 pH 3.0에서 pH 12.0까지의 각 완충액

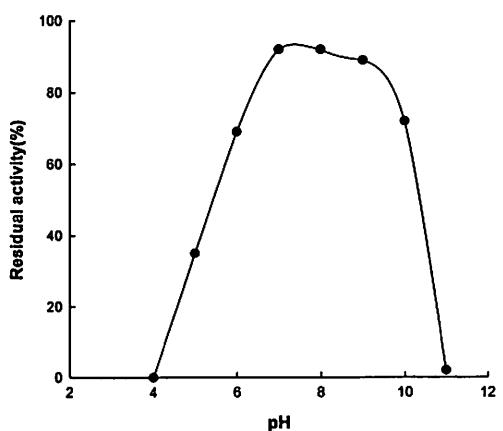


Figure 1. pH stability of the cytosine deaminase. Enzyme solutions were dialyzed in 0.2M buffers of pH 3.0 to 12.0 at 4°C for 24 hours. The residual activity was assayed under standard conditions.

에 24시간 4°C에서 투석시킨 후, 그 잔존 효소 활성을 측정했다. 사용한 완충액은 pH 3.0 glycine-HCl 완충액, pH 4.0에서 pH 5.0까지는 acetate 완충액, pH 6.0는 citrate-phosphate 완충액, pH 7.0에서 pH 8.0까지는 Tris-HCl 완충액, pH 9.0에서 pH 12.0까지는 glycine-NaOH 완충액을 각각 사용하였다. Fig. 1에 나타난 바와 같이, pH 7.0에서 pH 9.0 사이에서 본 효소는 안정하였다.

본 효소의 pH 안정성은 *C. violaceum* YK 391의 세포내 CODase(Kim, et al., 1998)의 pH 안정성 범위인 pH 7.0에서 7.5 사이, *Asp. fumigatus* 세포내 CODase(Yu, et al., 1991)의 pH 5.5에서 8.0사이, *E. coli*의 세포내 CODase(Katsuragi, et al., 1986)의 pH 9.0에서 10.0 사이에서 안전한 효소와 상이한 반면 *S. marcescens*(Yu, et al., 1976a)와 *P. aureofaciens* 세포내 CODase(Yu, et al., 1976b)의 pH 안정성 범위인 pH 7.0에서 9.0사이와는 유사한 경향을 나타내었다.

열 안정성

본 효소의 열 안정성을 검토하기 위하여 효소 액을 25°C에서 80°C까지 각 온도에서 10분간 열 처리한 후, 급 냉각시켜 37°C에서 잔존 효소 활

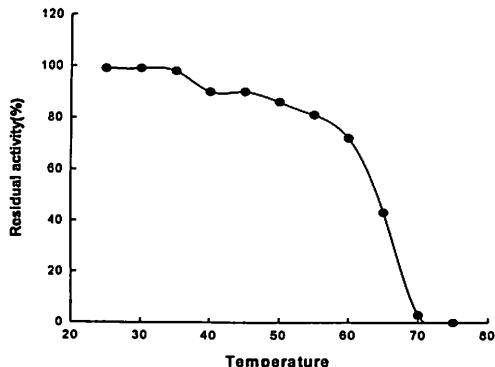


Figure 2. Temperature stability of the cytosine deaminase.

Enzyme solutions were kept in 0.2M Tris-HCl buffer(pH 7.5) and incubated at the indicated temperature ranging from 25°C to 80°C for 10min. The residual activities were assayed under standard reaction conditions.

성을 측정했다. Fig. 2에 보는 바와 같이, 25°C와 35°C에서는 100% 잔존 효소 활성을 나타내었고, 50°C에서는 86%의 잔존 효소 활성을 나타내었다. 또한 65°C에서는 43%의 잔존 효소 활성을 나타내었으며 75°C에서는 완전히 실활 되었다. *C. violaceum* YK 391의 세포내 CODase(Kim, et al., 1998)는 70°C에서 10분간 열처리를 한 경우에는 약 19%의 잔존 활성을 나타내었으나 90°C에서는 완전히 실활 되었다. *Asp. fumigatus* 세포내 CODase(Yu, et al., 1991)는 45°C에서 15%의 잔존 효소 활성을 나타내는 반면에 *S. marcescens*(Yu, et al., 1976a)와 *P. aureofaciens* 세포내 CODase(Yu, et al., 1976b)는 60°C, 70°C까지는 안정하며, *E. coli*의 세포내 CODase (Katsuragi, et al., 1986) 50°C까지는 안정하였다.

이상의 결과와 비교하면 본 효소는 실온에서 고온까지 열안정성이 매우 높은 효소이므로 임상적으로 충분히 사용이 가능한 실용성 효소라고 추정되었다.

Table 1. Substrate specificity of the cytosine deaminase.

Substrate(5mM)	Relative activity(%)
Cytosine	100
5-Fluorocytosine	58
Cytidine	0
5-Methylcytosine	7
6-Azacytosine	7
5-Azacytosine	0
Isocytosine	0

The cytosine deaminase activity was assayed under standard reaction conditions in presence of substrates at indicated concentrations and the results were expressed as relative activity to that of cytosine.

반응 최적 pH

효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 기질을 pH별 완충액에 각각 녹여 37°C에서 반응시켜 효소 활성을 측정했다. Fig. 3에 나타난 바와 같이 비교적 중성에서 효소활성이 양호하였으며 pH 7.5에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었다. *C. violaceum* YK 391의 세포내 CODase(Kim, et al., 1998)와 *Sal. typhimurium* (West, et al., 1982)의 세포내 CODase의 반응

최적 pH가 7.5라는 것과 *Asp. fumigatus* 세포내 CODase(Yu, et al., 1991)와 땅효모(Ipata, et al., 1970)의 반응 최적 pH가 7.0이라는 것이 매우 유사하였으나, *S. marcescens*(Sakai, et al., 1975a)와 *P. aureofaciens*(Sakai, et al., 1975b)가 생성하는 세포내 효소의 반응 최적 pH가 각각 10.0과 9.5라는 결과는 상반된 결과를 나타내었다.

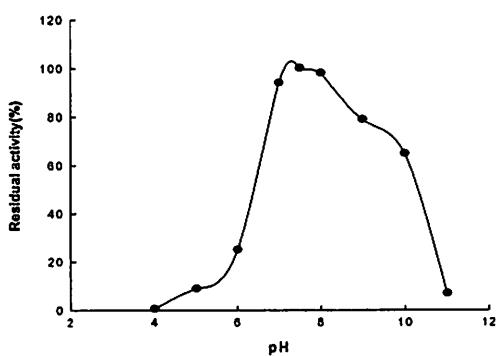


Figure 3. Effect of pH on the cytosine deaminase activity.

The enzyme activity was assayed under standard reaction conditions using glycine-HCl buffer(pH 3.0), acetate buffer(pH 4.0 to pH 5.0), citrate-phosphate buffer(pH 6.0), Tris-HCl buffer(pH 7.0 to pH 8.0), and glycine-NaOH buffer(pH 9.0 to 12.0).

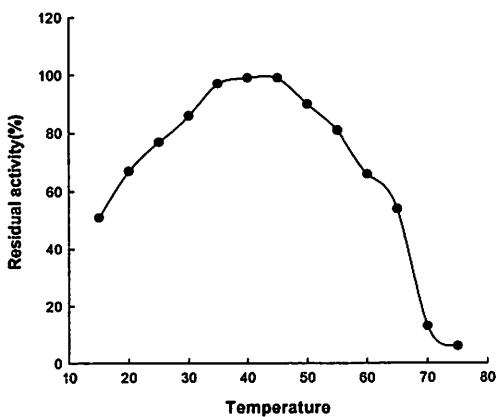


Figure 4. Effect of temperature on the cytosine deaminase activity.

The enzyme activity was assayed under standard reaction conditions and the reaction temperature was varied from 15°C to 75°C.

반응 최적 온도

효소의 활성에 미치는 온도의 영향을 조사하기 위하여 15°C에서 75°C까지 각 온도에서 효소 활성을 측정했다. Fig 5에 나타난 바와 같이 본 효소의 반응 최적 온도는 35°C에서 45°C사이였다. *C. violaceum* YK 391의 세포내 CODase(Kim, et al., 1998)는 28°C에서 32°C사이에서 효소 활성이 양호하였으며 반응 최적 온도는 30°C이고 *S. marcescens*(Yu, et al., 1976a)와 *P. aureofaciens* 세포내 CODase(Yu, et al., 1976b)가 50°C에서 45°C부근에서 반응 최적 온도를 나타내는데 비하여 본 효소는 체온인 37°C에서 반응 최적 온도를 나타내므로 임상학적인 이용성이 유리한 효소로 추정된다.

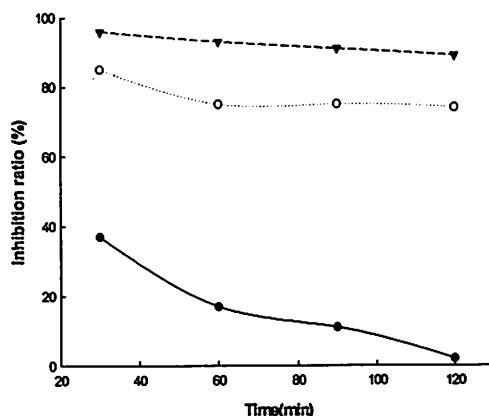


Figure 5. Effect of the inhibitors on the activity of cytosine deaminase on incubation time.

Inhibitor(10mM) was allowed to react with cytosine deaminase for various periods of time at 37°C in 0.2M Tris-HCl buffer(pH 7.5) and 5mM cytosine.

—●—; 6-azacytosine, ⋯○⋯; 2-thiocytosine,
—▼—; 2-thiouracil.

세포내 cytosine deaminase의 반응 속도론적 특성

기질 특이성

본 효소의 기질에 대한 특이성을 검토하기 위하여, 염석과 탈염을 한 효소를 사용하여 cytosine, 5-FC, 5-MC, cytidine 및 cytosine analogue 등에

대한 효소 활성을 측정했다. Table 1에 나타난 바와 같이, 본 효소는 cytosine에 비하여 5-FC와 5-MC, 6-azacytosine에 대해 각각 58%와 7%, 7%정도 저해되었으며, 그러나 cytidine과 5-azacytosine, isocytosine은 저해되지 않았다.

본 효소는 cytosine만을 기질로 사용하는 *S. marcescens*(Yu et al., 1976a)와 cytosine과 5-MC를 기질로 사용하는 *P. aureofaciens*(Yu et al., 1976b)와 달리 cytosine, 5-FC, 5-MC, 6-azacytosine, cytidine를 기질로 이용하는 *C. violaceum* YK 391의 세포내 CODase(Kim et al., 1998)와 같이 폭넓은 기질 특이성을 가지는 경향을 보였다.

기질별 cytosine analogue의 영향

본 효소의 기질인 cytosine과 5-FC일 때 효소 활성에 미치는 cytosine analogue의 영향을 알아보기 위하여, 기질 5mM cytosine 0.2mL, 효소 0.2mL, 10mM cytosine analogue 0.1mL와 0.2M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 0.5mL를 혼합하여 37°C에서 30분간 효소반응을 시켜 효소 활성을 측정하였다.

Table 2. Effect of cytosine analogues on the cytosine deaminase activity using different substrates.

Cytosine analogue (1mM)	Inhibition ratio(%)	
	Cytosine	5-Fluorocytosine
None	0	0
5-Azacytosine	0	4
6-Azacytosine	39	9
6-Azauracil	9	3
2-Thiacytosine	87	57
2-Thiuracil	95	77
Isocytosine	0	0

The cytosine deaminase activity was assayed under standard reaction conditions in the presence of cytosine analogue at indicated concentrations and the results were expressed as relative activity to that of none.

Table 2에 나타난 바와 같이, 기질을 cytosine을 사용하여 효소 활성을 측정했을 때 5-azacytosine, 6-azauracil과 isocytosine은 본 효소 활성에 아

무런 영향을 미치지 못 했으나, 6-azacytosine, 2-thiacytosine, 2-thiouracil에 의하여 39%, 87%, 95%로 본 효소 활성은 강하게 저해되었다.

C. violaceum YK 391의 세포내 CODase(Kim et al., 1998)와는 비슷한 경향을 나타내었으나 2-thiacytosine, 2-thiouracil, 2-mercaptopurine에 의해 저해되는 *Asp. fumigatus* 세포내 CODase(Yu et al., 1991)와는 다른 경향을 나타내었다.

더욱이, 기질을 5-FC를 사용하여 효소 활성을 측정했을 때 본 효소 활성의 저해 양상은 5-azacytosine, 6-azacytosine, 6-azauracil과 isocytosine은 본 효소 활성에 아무런 영향을 미치지 못 했으나, 6-azacytosine, 2-thiacytosine, 2-thiouracil에 의하여 9%, 57%, 77%로 본 효소 활성은 저해되었다.

본 효소는 기질로 cytosine을 사용할 시는 저해제로 작용한 6-azacytosine이 기질로 5-FC를 사용했을 시는 6-azacytosine이 저해제로 작용하지 않는 특성을 나타내어 본 효소 활성의 저해 양상이 기질에 따라 다르게 나타남을 확인할 수 있었다.

기질 cytosine일 때 cytosine analogue의 영향

시간별 저해 물질에 대한 cytosine deaminase의 활성 변화

Cytosine analogue인 6-azacytosine, 2-thiacytosine과 2-thiouracil이 기질로서 cytosine을 사용했을 때 본 효소 활성이 효소 반응시간에 따라 저해되는 양상을 검토하기 위하여 5mM cytosine 0.2mL, 효소 0.2mL와 0.2M Tris-HCl 완충액 (pH 7.5) 0.5mL를 혼합하여 효소 혼합액에 10mM 6-azacytosine, 2-thiacytosine, 2-thiouracil 0.1mL을 각각 첨가하여 37°C에서 30분, 60분, 90분, 120분 반응하여 반응시간별 효소활성을 측정하였다. Fig. 5에 나타난 바와 같이, 본 효소는 6-azacytosine에 의하여 초기 30분간 강하게 효소 활성을 저해하여 120분간 반응에 의한 저해 정도의 약 65%가 초기 30분에 저해되었다. 그리고 비교적 본 효소 활성을 약하게 저해하는 2-thiacytosine과 2-thiouracil 역시 초기 30분에 저해했으며 그 이후의 반응 시간에 따라 서서히 저해됨을 알 수 있었다.

온도별 저해 물질에 대한 cytosine deaminase의 활성 변화

Cytosine analogue인 6-azacytosine, 2-thiocytosine과 2-thiouracil이 본 효소 활성이 효소 반응 온도에 따라 저해되는 양상을 검토하기 위하여 5mM cytosine 0.2ml, 효소 0.2ml와 0.2M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 0.5ml를 혼합하여 효소 혼합액에 10mM 6-azacytosine, 2-thiocytosine, 2-thiouracil 0.1ml을 각각 첨가하여 24°C, 30°C, 37°C, 45°C에서 30분간 반응하여 효소활성을 측정하였다. Fig. 6에 나타난 바와 같이, 본 효소는 반응온도를 37°C에서 저해제인 6-azacytosine, 2-thiocytosine, 2-thiouracil에 의하여 다른 온도보다 약하게 저해되었으나, 본 효소 활성은 온도에 의하여 저해 정도가 다르게 나타나지는 않았다.

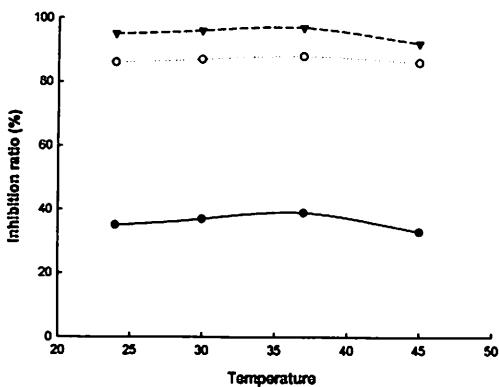


Figure 6. Effect of the inhibitors on the activity of cytosine deaminase on incubation temperature.

Inhibitor(10mM) was allowed to react with cytosine deaminase for various periods of temperature at 37°C in 0.2M Tris-HCl buffer(pH 7.5) and 5mM cytosine.
 —●—; 6-azacytosine, …○…; 2-thiocytosine,
 —▼…; 2-thiouracil.

온도별 저해 물질에 대한 cytosine deaminase의 활성 변화

Cytosine analogue인 6-azacytosine, 2-thiocytosine과 2-thiouracil이 본 효소 활성이 저해제의 농도에 따라 저해되는 양상을 검토하기 위하여 5mM cytosine 0.2ml, 효소 0.2ml와 0.2M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 0.5ml를 혼합하여 효소 혼합액에

6-azacytosine의 농도를 1mM, 2mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM로 하고 2-thiocytosine과 2-thiouracil의 농도를 0.5mM, 1mM, 2mM, 3mM, 5mM, 10mM로 각각 효소 반응액에 첨가하여 효소 활성을 측정하였다. Fig. 7에 나타난 바와 같이, 본 효소 활성은 17.5mM 6-azacytosine, 6mM 2-thiocytosine, 5mM 2-thiouracil에서 50% 저해되었다.

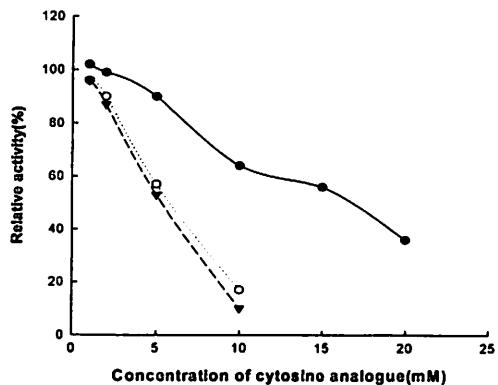


Figure 7. Effect of the inhibitors on the activity of cytosine deaminase on inhibitor concentration.

Cytosine deaminase was allowed to react for various periods of inhibitor concentrate at 37°C in 0.2M Tris-HCl buffer(pH 7.5) and 5mM cytosine.

—●—; 6-azacytosine, …○…; 2-thiocytosine,
 —▼…; 2-thiouracil.

저해 양상

본 효소에 대한 6-azacytosine, 2-thiocytosine, 2-thiouracil의 저해 양상을 검토하기 위하여 cytosine 농도를 1mM에서 5mM까지 조절하고 6-azacytosine, 2-thiocytosine와 2-thiouracil의 농도를 17.5mM, 6mM, 5mM으로 하여 37°C에서 30분간 반응 시켜 효소 활성을 측정하여 Lineweaverburk plots로 나타내었다. Fig. 8은 기질을 cytosine을 사용했을 때 6-azacytosine의 저해형태를 나타낸 것으로 6-azacytosine은 cytosine deaminase에 대하여 저해형태는 X와 Y의 +영역에서 교차하는 형태를 나타내었다.

이는 효소의 저해양상인 non-competitive, competitive, mixed, 및 uncompetitive inhibition의 형태가 아닌 형태를 나타내어 좀 더 연구를 계속하여 규명 할 필요성이 대두되었다. 이러한 형태는 기존에

저해 양상에 나타난 것이 아닌 것으로 본 연구자들이 처음 접하는 저해형태임을 알 수 있었다.

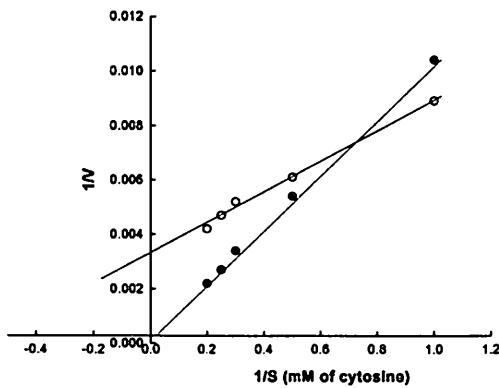


Figure 8. Type of inhibition against cytosine deaminase by 6-azacytosine.

The enzyme activity was assayed the presence or in the absence of 6-azacytosine. the reaction mixture contained 0.1ml of the enzyme solution. Velocity(v) was expressed by the decrease of OD at 290nm for 30min at 37°C and substrate concentration(s) on mM of cytosine.

—○—; 17.5mM 6-azacytosine, —●—; None.

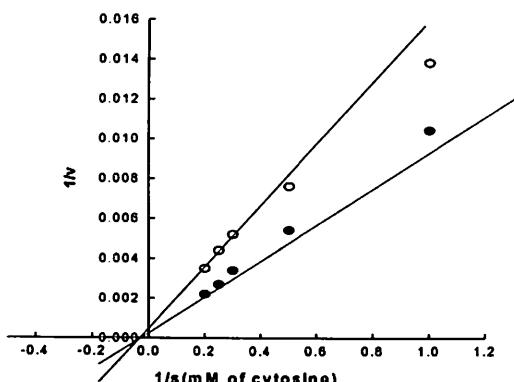


Figure 9. Type of inhibition against cytosine deaminase by 2-thiocytosine.

The enzyme activity was assayed the presence or in the absence of 2-thiocytosine. the reaction mixture contained 0.1ml of the enzyme solution. Velocity(v) was expressed by the decrease of OD at 290nm for 30min at 37°C and substrate concentration(s) on mM of cytosine.

—○—; 6mM 2-thiocytosine, —●—; None.

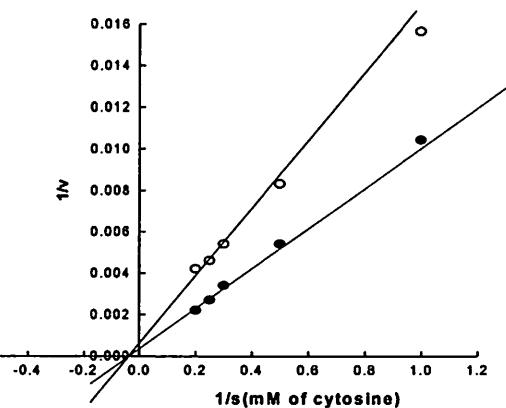


Figure 10. Type of inhibition against cytosine deaminase by 2-thiouracil.

The enzyme activity was assayed the presence or in the absence of 2-thiouracil. the reaction mixture contained 0.1ml of the enzyme solution. Velocity(v) was expressed by the decrease of OD at 290nm for 30min at 37°C and substrate concentration(s) on mM of cytosine.

—○—; 5mM 2-thiouracil, —●—; None.

Fig. 9과 Fig. 10은 기질을 cytosine을 사용했을 때 2-thiocytosine과 2-thiouracil의 저해형태를 나타낸 것으로 cytosine deaminase에 대한 2-thiocytosine과 2-thiouracil의 저해형태는 cytosine에 대한 K_m 값은 변하지 않았으며 V_{max} 를 변화시키는 전형적인 비경쟁적 저해(non-competitive inhibition)임을 나타내었다.

저해 계수

본 저해제들의 저해 계수(K_i)의 값을 조사하기 위하여 2-thiocytosine 농도를 4mM에서 8mM까지, 2-thiouracil 농도를 3mM에서 7mM까지 조절하여 37°C에서 30분간 반응시키고 그 결과를 Dixon법에 의해 plot하여 측정하였다. Fig. 11과 Fig. 12에서 보는 바와 같이, 2-thiocytosine과 2-thiouracil에 대한 K_i 값은 각각 $2.5 \times 10^{-3} M$ 과 $2.65 \times 10^{-3} M$ 이였다.

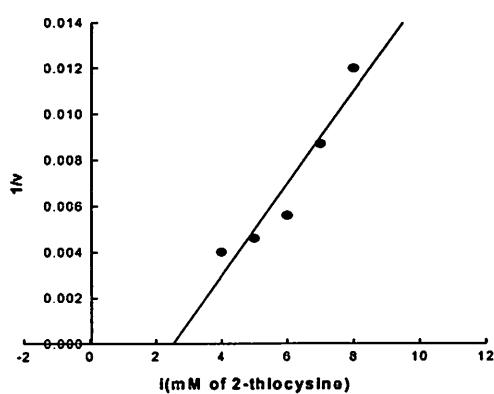


Figure 11. Graphical determination of inhibition constant of 2-thiocytosine.

Reaction condition were the same as those described in the 'Materials and Method' except that the reaction mixture contained 0.2ml of the enzyme solution and varied concentration of 2-thiocytosine. Velocity(v) was expressed in mM of uracil formed in 30min and 2-thiocytosine concentration(i) in mM.

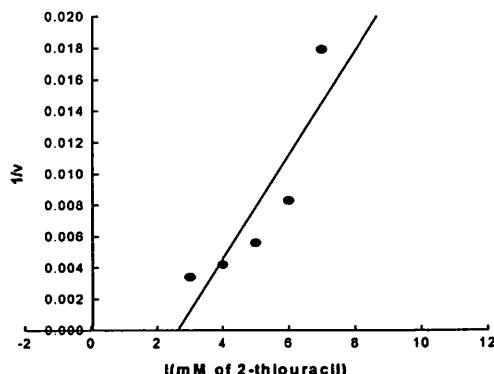


Figure 12. Graphical determination of inhibition constant of 2-thiouracil.

Reaction condition were the same as those described in the 'Materials and Method' except that the reaction mixture contained 0.2ml of the enzyme solution and varied concentration of 2-thiouracil. Velocity(v) was expressed in mM of uracil formed in 30min and 2-thiouracil concentration(i) in mM.

기질 5-FC일 때 cytosine analogue의 영향

시간별 저해 물질에 대한 cytosine deaminase의 활성 변화

Cytosine analogue인 2-thiocytosine과 2-thiouracil이 기질로서 5-fluorocytosine을 사용했을 때 본 효소 활성이 효소 반응시간에 따라 저해되는 양상을 검토하기 위하여 5mM cytosine 0.2ml, 효소 0.2ml와 0.2M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 0.5ml를 혼합하여 효소 혼합액에 10mM 2-thiocytosine과 2-thiouracil 0.1ml을 각각 첨가하여 37°C에서 30분, 60분, 90분, 120분 반응하여 반응시간별 효소활성을 측정하였다. Fig. 13에 나타난 바와 같이, 본 효소는 반응시간 60분에서 2-thiocytosine과 2-thiouracil에 의한 본 효소활성의 저해가 높게 나타났으나, 반응시간에 따라 커다란 차이점은 없었다.

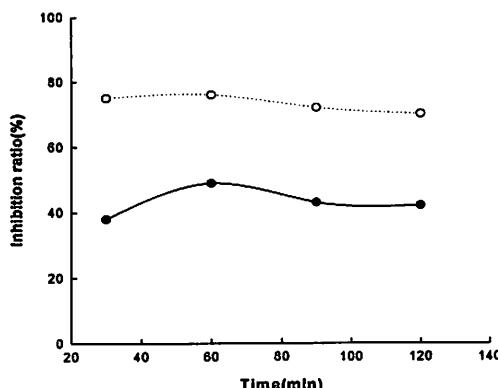


Figure 13. Effect of the inhibitors on the activity of cytosine deaminase on incubation time.

Inhibitor(10mM) was allowed to react with cytosine deaminase for various periods of time at 37°C in 0.2M Tris-HCl buffer(pH 7.5) and 5mM 5-FC.

—●—; 2-thiocytosine, …○…; 2-thiouracil.

온도별 저해 물질에 대한 cytosine deaminase의 활성 변화

Cytosine analogue인 2-thiocytosine과 2-thiouracil이 기질로서 5-fluorocytosine을 사용했을 때 본 효소 활성이 효소 반응 온도에 따라 저해되는 양상을 검토하기 위하여 5mM cytosine 0.2ml, 효

소 0.2㎖와 0.2M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 0.5㎖를 혼합하여 효소 혼합액에 10mM 2-thiocytosine과 2-thiouracil 0.1㎖를 각각 첨가하여 24℃, 30℃, 37℃, 45℃에서 30분간 반응하여 효소활성을 측정하였다. Fig. 14에 나타난 바와 같이, 본 효소는 반응온도를 37℃로 하였을 때 2-thiocytosine과 2-thiouracil에 의하여 다른 온도보다 약하게 저해되었으나, 본 효소 활성은 온도에 의하여 저해 정도가 다르게 나타나지는 않았다.

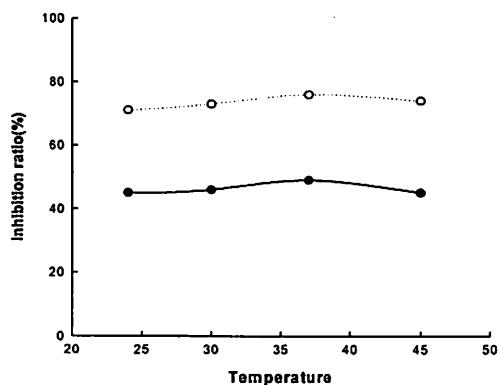


Figure 14. Effect of the inhibitors on the activity of cytosine deaminase on incubation temperature.

Inhibitor(10mM) was allowed to react with cytosine deaminase for various periods of temperature at 37℃ in 0.2M Tris-HCl buffer(pH 7.5) and 5mM 5-FC.

—●—; 2-thiocytosine, …○…; 2-thiouracil.

농도별 저해 물질에 대한 cytosine deaminase의 활성 변화

Cytosine analogue인 2-thiocytosine과 2-thiouracil이 본 효소 활성이 저해제의 농도에 따라 저해되는 양상을 검토하기 위하여 5mM cytosine 0.2㎖, 효소 0.2㎖와 0.2M Tris-HCl 완충액(pH 7.5) 0.5㎖를 혼합하여 효소 혼합액에 2-thiocytosine의 농도를 1mM, 2mM, 5mM, 10mM, 15mM, 20mM로 하고 2-thiouracil의 농도를 0.5mM, 1mM, 2mM, 3mM, 5mM, 10mM로 각각 효소 반응액에 첨가하여 효소 활성을 측정하였다. Fig. 15에 나타난 바와 같이, 본 효소는 10mM 2-thiocytosine과 7mM 2-thiouracil에서 효소 활성이 50%로 저해되었다.

저해 양상

본 효소에 대한 2-thiocytosine과 2-thiouracil의 저해 양상을 검토하기 위하여 5-fluorocytosine 농도를 1mM에서 5mM까지 조절하고 2-thiocytosine과 2-thiouracil의 농도를 10mM, 7mM로 하여 37℃

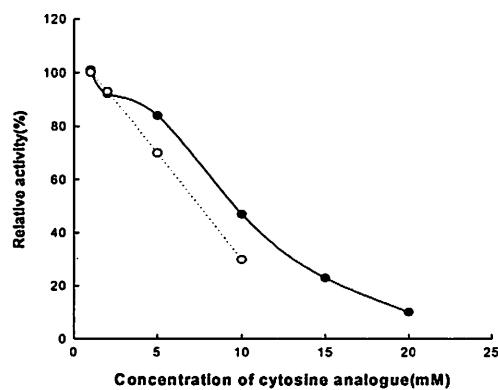


Figure 15. Effect of the inhibitors on the activity of cytosine deaminase on inhibitor concentration.

Cytosine deaminase was allowed to react for various periods of inhibitor concentrate at 37℃ in 0.2M Tris-HCl buffer(pH 7.5) and 5mM 5-FC.

—●—; 2-thiocytosine, —○—; 2-thiouracil.

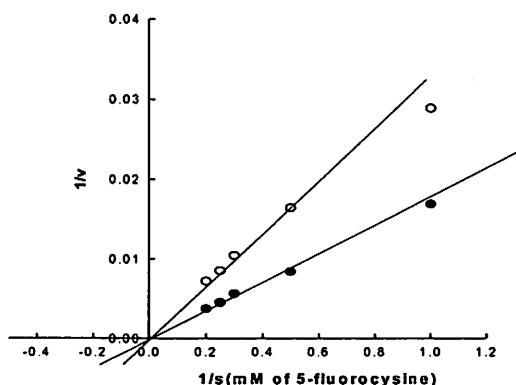


Figure 16. Type of inhibition against cytosine deaminase by 2-thiocytosine.

The enzyme activity was assayed in the presence or in the absence of 2-thiocytosine. The reaction mixture contained 0.1㎖ of the enzyme solution. Velocity(v) was expressed by the decrease of OD at 300nm for 30min at 37℃ and substrate concentration(s) on mM of cytosine.

—○—; 10mM 2-thiocytosine, —●—; None.

에서 30분간 반응 시켜 효소 활성을 측정하여 Lineweaverburk plots로 나타내었다. Fig. 16과 Fig. 17은 본 cytosine deaminase가 기질로서 5-fluorocytosine에 대한 2-thiocytosine과 2-thiouracil의 저해형태를 나타낸 것으로 5-fluorocytosine에 대한 K_m 값은 변하지 않고 V_{max} 값만 변화되는 비경쟁적 저해(non-competitive inhibition)임을 나타내었다.

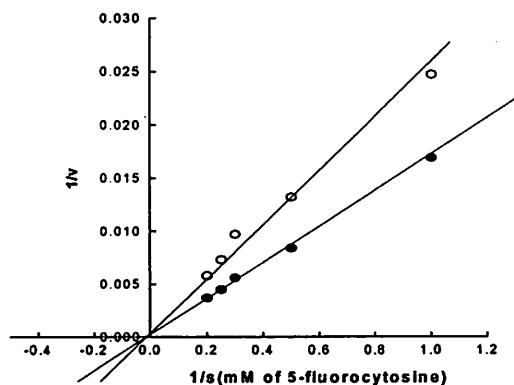


Figure 17. Type of inhibition against cytosine deaminase by 2-thiouracil.

The enzyme activity was assayed in the presence or in the absence of 2-thiouracil. The reaction mixture contained 0.1mL of the enzyme solution. Velocity(v) was expressed by the decrease of OD at 290nm for 30min at 37°C and substrate concentration(s) on mM of cytosine.

—○—; 7mM 2-thiouracil, —●—; None.

저해 계수

본 효소 활성을 저해하는 cytosine analogue인 저해제들의 저해 계수(K_i)의 값을 조사하기 위하여, 2-thiocytosine 농도를 8mM에서 12mM까지, 2-thiouracil 농도를 5mM에서 9mM까지 조절하여 37°C에서 30분간 반응시키고 그 결과를 Dixon 법에 의해 plot하여 측정하였다. Fig. 18과 Fig. 19는 본 cytosine deaminase가 기질로서 5-fluorocytosine에 대한 2-thiocytosine과 2-thiouracil의 저해 정도를 나타내는 저해계수를 나타내는 것으로 2-thiocytosine과 2-thiouracil에 대한 K_i 값은 각각 2×10^{-3} M과 0.875×10^{-3} M이었다.

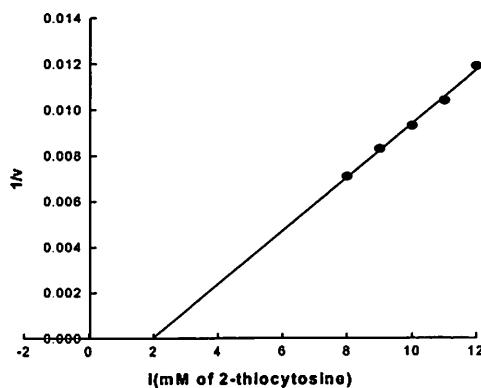


Figure 18. Graphical determination of inhibition constant of 2-thiocytosine.

Reaction condition were the same as those described in the 'Materials and Method' except that the reaction mixture contained 0.2mL of the enzyme solution and varied concentration of 2-thiocytosine. Velocity(v) was expressed in mM of uracil formed in 60min and 2-thiocytosine concentration(i) in mM.

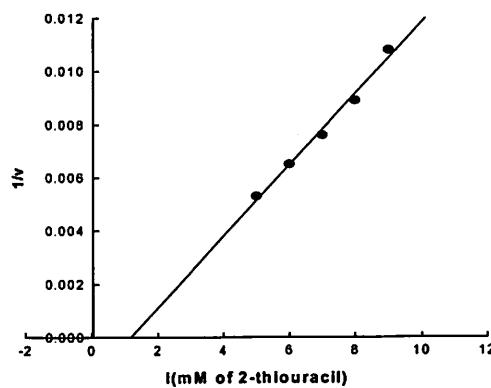


Figure 19. Graphical determination of inhibition constant of 2-thiouracil.

Reaction condition were the same as those described in the 'Materials and Method' except that the reaction mixture contained 0.2mL of the enzyme solution and varied concentration of 2-thiouracil. Velocity(v) was expressed in mM of uracil formed in 60min and 2-thiouracil concentration(i) in mM.

요 약

Cytosine deaminase(cytosine aminohydrolase, EC 3.5.4.1)는 인간이나 고등 동식물에서는 발견되지 않은 효소로서 cytosine과 5-fluorocytosine을 uracil과 5-fluorouracil로 가수분해하는 효소이다. 본 연구에서는 *Chromobacterium violaceum* YK 391이 생산하는 세포내 cytosine deaminase 활성을 미치는 cytosine analogue의 영향에 대하여 검토했다. 본 효소에 대한 특성을 다시 검토한 결과, pH 안정성에서는 pH 7.0부터 pH 9.0 사이에서 안정하였고 열 안정성에서는 25°C부터 35°C에서는 100% 잔존 효소 활성을 나타내었고 50°C에서는 86%의 잔존 효소 활성을 나타내었다. 또한 65°C에서는 43%의 잔존 효소 활성을 나타내었고 75°C에서는 완전히 실활되었다. 본 효소의 반응 최적 pH는 비교적 중성에서 효소 활성이 양호하였으며 pH 7.5에서 가장 높은 효소 활성을 나타내었고 반응 최적 온도는 35°C에서 45°C 사이에서 높은 효소 활성을 나타내었다. 본 효소의 기질 특이성은 cytosine에 비하여 5-FC와 5-MC, 6-azacytosine에 대해 각각 58%, 7%와 7%정도 기질로써 이용하였다. 그러나 cytidine과 5-azacytosine, isocytosine은 기질로써 이용하지 못했다. 기질로 cytosine을 사용했을 때 본 효소의 활성은 6-azacytosine, 2-thiocytosine, 2-thiouracil에 의하여 39%, 87%, 95% 저해되었고 기질을 5-FC를 사용했을 때 본 효소의 활성은 2-thiocytosine과 2-thiouracil에 의하여 57%와 77% 저해되었다. 기질 cytosine일 때 cytosine analogue의 영향을 살펴 본 결과, 본 효소는 반응시간을 30분으로 하고 반응온도를 37°C로 하였을 때 6-azacytosine, 2-thiocytosine, 2-thiouracil에 의하여 가하게 저해되었으며 더욱이, 본 효소의 활성은 17.5mM 6-azacytosine, 6mM 2-thiocytosine, 5mM 2-thiouracil에서 50% 저해되었다. 그리고 본 효소는 2-thiocytosine과 2-thiouracil에 의하여 비경쟁적으로 저해(noncompetitive inhibition)되었으며, 6-azacytosine는 기존에 저해 양상에 나타난 것이 아닌 처음 보는 저해형태임을 알 수 있었다. 2-Thiocytosine과 2-thiouracil에 대

한 K_i 값은 각각 $2.5 \times 10^{-3} M$ 과 $2.65 \times 10^{-3} M$ 이었다. 기질 5-FC일 때 cytosine analogue의 영향을 살펴 본 결과, 본 효소는 반응시간을 60분으로 하고 반응온도를 37°C로 하였을 때 2-thiocytosine, 2-thiouracil로 인해 가하게 저해되었고 10mM 2-thiocytosine과 7mM 2-thiouracil에서 50%로 저해되었다. 저해 양상은 2-thiocytosine과 2-thiouracil은 비경쟁적으로 저해(noncompetitive inhibition)됨을 확인 할 수 있었다. 2-Thiocytosine과 2-thiouracil에 대한 K_i 값은 각각 $2 \times 10^{-3} M$ 과 $0.875 \times 10^{-3} M$ 이었다.

참고문헌

- Andrews, P.(1964) Estimation of the molecular weight of proteins by Sephadex gel filtration. *Biochem. J.* 91, 222-233
- Chakavarty, P. K., P. L. Carl, M. J. Weber, and J. A. Katzenellenbogen.(1983) Plasmin-activated prodrugs for cancer chemotherapy. Synthesis and biological activity of peptidylacivicin and peptidylphenylenediamine mustard. *J. Med. Chem.* 26, 633-638.
- Cihak, A. and F. Sorm.(1965) Inhibition of microbial cytosine deaminase by 5-azacytosine and 5-azauracil. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 2137-2139.
- Cihak, A. and F. Sorm.(1965) Biochemical effects and metabolic transformations of 5-azacytidine in *Escherichia coli*. *Collect. Czech. Chem. Commun.* 30, 2091-2101.
- Cohen, L. A.(1970) In the enzymes, 3rd ed., Academic press, New York, 148-211.
- Diasio, R. B., J. E. Bennett, and C. E. Myers.(1978) Mode of action of 5-fluorocytosine. *Biochem. Pharmacol.* 27, 703-708.
- Dixon, M. and E. C. Webb.(1975) Enzymes (2nd ed.), New York: John Wiley and Sons, p. 309.
- Duschinsky, R., E. Pfeven, and C. Heidelberger. (1957) The synthesis of 4559-4560.
- Giege, R. and J. H. Weil.(1970) Elude des

- t-RNA de levure avant incorpore du 5-fluorouracil provenant de la 5-fluorocytosine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 52, 135-144.
10. Grunberg, E., E. Titsworth, and M. Bennett. (1964) Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Ann. Arbor. Mich* 6, 566-568.
11. Hahn, A. and W. Lintzel. (1923) ber das verhalten von pyrimidin derivaten in den organismen, I. Einfluss von hefe and pyrimidinderivate. *Z. Biol.* 79, 179-184.
12. Ipata, P. L., G. Cercignani, and E. Balestreri. (1970) Partial purification and properties of cytidine deaminase from baker's yeast. *Biochem.* 9, 3390-3395.
13. Kaltwasser, H and J. Kramer.(1968) Verwertung von cytosine und uracil durch *Hydrogenomas* facilis und *Hydrogenomas* H-16. *Archiv fur Microbiologie.* 60, 172-181.
14. Katsuragi, T., T. Sakai, and K. Tonomura. (1986) Affinity chromatography of cytosine deaminase from *Escherichia coli* with immobilized pyrimidine compound. *Agr. Biol. Chem.* 50, 1713-1719.
15. Kim, J. K.(1997) Effect of cytosine analogue on cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus* IFO 5840. *Korean J. Food & Nutr.* 1, 53-59.
16. Kim, J., H. S. Kim, and T. S. Yu.(2004) Purification and properties of intracellular cytosine deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 1182-1189.
17. Kim, T. H., J. Kim, and T. S. Yu.(1998) Revelation of antitumor effect in combination with 5-fluorocytosine and extracellular cytosine deaminase. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 13, 669-674.
18. Koechlin, B. A., F. Rubio, S. Palmer, T. Gabriel, and R. Duschinsky.(1966) The metabolism of 5-fluorocytosine- 214 C and of cytosine- 14 C in the rat and the disposition on 5-fluorocytosine- 214 C in man. *Biochem. Pharmac.* 15, 435-446.
19. Kream, J. and E. Chargaff. (1952) On the cytosine deaminase of yeast. *J. Amer. Chem. Soc.* 74, 5157-5160.
20. Lineweaver, H. and D. Burk. (1934) The determination of enzyme dissociation constants. *J. Amer. Chem. Soc.* 56, 658-666.
21. Sakai, T., T. Katsuragi, K. Tonomura, T. Nishiyama, and Y. Kawamura.(1985) Inplantable encapsulated cytosine deaminase having 5'-fluorocytosine deaminase activity. *J. Biotechnol.* 2, 13-21.
22. Sakai, T., T. S. Yu, H. Tabe, and S. Omata. (1975a) Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agr. Biol. Chem.* 39, 1623-1629.
23. Sakai, T., T. S. Yu, K. Taniguchi, and S. Omata. (1975b) Purification of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agr. Biol. Chem.* 39, 2015-2020.
24. Wallace, P. M., J. F. Macmaster, V. F. Smith, D. E. Kerr, P. D. Senter, and W. L. Cosand.(1994) Intratumoral generation of 5-fluorouracil mediated by an antibody-cytosine deaminase conjugate in combination with 5-fluorocytosine. *Cancer Res.* 54, 2719-2723.
25. Wang, X. P., K. Yazawa, J. Yang, D. Kohn, W. E. Fisher, and F. C. Brumicardi.(2004) Specific gene expression and therapy for pancreatic cancer using the cytosine deaminase gene directed by the rat insulin promoter. *SSAT.* 1, 98-108.
26. West, T. M., S. Shanly, and G. A. O' Donodvan. (1982) Purification and some properties of cytosine deaminase from *Salmonella typhimurium*. *Biochim. Biophys. Acta*, 719, 251-258.
27. Wilma, D. E. V.(1986) Prodrugs in cancer chemotherapy. *Biochem. Soc. Trans.* 14,

- 375-382.
- 28. Yu, T. S. and T. H. Kim.(1997) Isolation and identification of bacterium producing excelluar cytosine deaminase. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 25, 9-14.
 - 29. Yu, T. S., J. Kim, and H. S. Kim. (1998) Chemical modification of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol.* 36, 39-42.
 - 30. Yu, T. S., J. K. Kim, T. Katsuragi, T. Sakai, and K. Tonomura. (1991) Purification and some properties of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Ferment. Bioeng.* 72, 266-269.
 - 31. Yu, T. S., T. Sakai, and S. Omata. (1976a) Kinetic properties of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agr. Biol. Chem.* 40, 543-549.
 - 32. Yu, T. S., T. Sakai, and S. Omata. (1976b) Kinetic properties of cytosine deaminase from *Pseudomonas aureofaciens*. *Agr. Biol. Chem.* 40, 551-557.

*Monascus purpureus*의 Cytosine Deaminase 활성

김효정 · 김대현¹ · 김정² · 서영은 · 유 대식*

계명대학교 미생물학과 · ¹경북과학대학 안경광학과 · ²수원여자대학 치위생과

Cytosine Deaminase from *Monascus purpureus*

Kim, Hyo Jung, Tae Hyun Kim¹, Jung Kim², Young Eun Seo, and Tae Shick Yu*

Department of Microbiology, Keimyung University, 701-704 Taegu, Korea

¹Department of Ophthalmic Optics, Kyungbuk College of Science, Kyungpook 718-850, Korea

²Department of Dental Hygiene, Suwon Woman's College, Suwon 441-748, Korea

요 약. 본 연구는 홍국사상균들로부터 cytosine deaminase(EC 3.5.4.1)를 다량 생산하는 *Monascus purpureus* KM 1001 변이주를 선별했으며, cytosine deaminase는 PDB 배지에서 30°C, 7일간, 150 rpm의 진탕 배양하므로 1.68 unit의 최대 효소활성을 나타내었다. *Monascus purpureus* KM 1001 변이주의 cytosine deaminase 효소활성 최적 조건은 pH 8.0, 45°C, 45분이였다.

Abstract. *Monascus purpureus* KM 1001 mutant plentifully producing a cytosine deaminase (EC 3.5.4.1) was screened from some *Monascus* sp. The cytosine deaminase production was reached maximum level in the PDB at 30°C under shaking(150 rpm) for 7 days .The cytosine deaminase activity was found in a optimum pH of 8.0 and optimum temperature of 45°C for 45 minutes.

서 론

Cytosine deaminase(EC 3.5.4.1)는 핵산의 pyrimidine 염기 중의 하나인 cytosine의 4번 탄소에 위치한 아미노기를 가수분해하여 uracil과 암모니아로 전환시키는 가수분해 효소이다. 이 효소는 1923년에 처음 발견된 후(4, 5), 세균(8, 9), 효모(6), 곰팡이(13, 14, 15) 등 여러 종류의 미생물에서 대부분 세포내 효소로 발견되었다.

Cytosine을 제외한 핵산 염기는 생체 내에서 산화로 완전 분해되든지, nucleoside phosphorylase 혹은 UMP pyrophosphorylase의 촉매에 의하여 nucleotide로 재합성되든지 한다. 그러나 cytosine은 직접 분해 혹은 nucleotide로 재합성될 수 없는 특이한 핵산 염기 성분이다. Cytosine은 반드시 cytosine deaminase의 촉매에 의하여 uracil을 거쳐 분해되든지, nucleotide로 재합성된다. 그

러므로 cytosine의 대사에는 cytosine deaminase의 촉매가 필수적으로 작용해야 한다. 이러한 대사 경로에서 cytosine deaminase는 pyrimidine계 핵산 염기 대사에 중요한 효소이다.

세포내 cytosine deaminase에 관한 연구로서, cytosine deaminase의 효소학적 특성을 연구하였으며(9), cytosine을 함유한 배지에서 cytosine deaminase의 활성이 증가된다는 보고도 있다(10).

Cytosine deaminase는 cytosine의 유도체 중의 하나인 5-fluorocytosine에 대해서 탈 아미노화 반응을 촉매하여 5-fluorouracil을 형성시킨다. 이와 같은 탈 아미노화 반응은 두 가지 측면에서 임상학적인 의의를 포함하고 있다. 첫째는 항진균제로서의 5-fluorocytosine의 역할이다. 5-Fluorocytosine은 uracil의 fluoro화 된 유도체인 5-fluorouracil와는 달리 진균의 성장을 억제하지 못하나 진균류가 생합성하는 cytosine deaminase

의 작용에 의해 5-fluorouracil로 변환되어 진균
감염에 대한 화학요법 효과가 나타난다고 보고
하였다(3).

둘째는 항종양물질로서의 역할이다. 1957년 Duschinsky 등(1)이 5-fluorocytosine가 항종양 효과가 없다고 보고한 이래로 1970년 이르러서는 Giege와 Weil(2)이 진균에 함유되어 있는 cytosine deaminase에 의하여 5-fluorocytosine이 5-fluorouracil로 탈 아미노화됨으로써 DNA 생합성을 억제하여 항종양 효과가 있다고 보고하였다.

이상과 같이 cytosine deaminase는 pyrimidine nucleotide 대사계에서 중요한 역할을 담당하는 key enzyme일 뿐만 아니라, 항진균제이며 인체에 무해한 5-fluorocytosine과 cytosine deaminase를 병행 투여함으로써 탁월한 제암효과를 나타내어 임상학적 측면에서도 이용가능성이 높은 효소이다. 그러나 cytosine deaminase는 포유동물에서는 생성되지 않고 단지 미생물에서만 극히少量 생산되고 열에 대해서도 불안정하기 때문에 학술적·임상학적 연구에 직접 이용하기 어려운 점이 있으므로 저장성이 높은 cytosine deaminase의 계발이 절실히 요구된다.

특히, 진핵 사상미생물에서는 연구된 바가 거의 없으며, 1984년 *Aspergillus fumigatus* 사상균에서 cytosine deaminase의 활성이 확인(15)되었으며, 1991년 이 효소가 최초로 정제(14)되어 1998년에 이 효소의 효소활성부위의 관여하는 아미노산 잔기가 규명(13)되기도 했다. 그러나 *Aspergillus fumigatus*를 제외한 사상균의 효소에 관한 연구는 이루어지지 않고 있다. 때문에 진핵 사상균에 관한 cytosine deaminase의 연구가 요구되고 있다.

본 연구에서는 현재까지 연구되지 않은 *Monascus* sp. 사상균주에 대한 연구를 위하여 *Monascus purpureus* KM 1001 변이주, *Monascus ruber* KCTC 6122, *Monascus purpureus* KCCM 60016, *Monascus pilosus* KCCM 60160의 cytosine deaminase 활성을 검색하고 효소활성이 높은 홍국사상균의 cytosine deaminase의 효소학적 특성을 알아보고자 한다.

재료 및 방법

재료 및 시약

본 실험에 사용된 시약으로 patato dextrose agar (PDA), patato dextrose broth(PDB), yeast malt broth(YM)는 Difco제품을 사용하였다. 그리고 효소활성 측정 실험을 위해 cytosine, Trizma base는 Sigma Co. (USA)제품을 사용하였고 그 이외의 시약은 덕산제품을 사용하였다.

사용균주

사용균주는 본 연구실에서 분리한 *Monascus purpureus* KCCM 60016으로부터 분리한 KM1001 변이주(7)를 사용하였다. 그리고 *Monascus* sp. 중에 다른 종에도 cytosine deaminase가 있는지 확인하기 위해 *Monascus ruber* KCTC 6122, *Monascus purpureus* KCCM 60016, *Monascus pilosus* KCCM 60160을 사용하였다.

기본 배지

사용균주의 배양을 위해서는 PDA 배지를 사용하였고, 효소생성능을 확인하기 위해 PDB 배지와 YM 배지를 사용하여 액체배양의 배지로 사용하였다.

균주배양

사용균주들을 PDA 배지에서 30°C, 7일간 배양한 plate에 0.1 % Tween 80 용액을 가하여 멸균된 유리막대를 이용하여 홍국사상균의 포자를 회수한 후, cotton filter를 이용하여 군사와 포자를 분리하고 멸균수로 3회 세척하여 포자현탁액을 제조하였다. 포자현탁액을 hemocytometer를 이용하여 포자의 수를 계수한 후, 2×10^6 spores/ml 되게 조정하여 사용하였다.

250 ml 삼각플라스크에 PDB 배지와 YM 배지를 각각 100 ml씩 분주하여 121°C, 15분간 멸균한 후, 포자현탁액 100 μ l를 접종하여 30°C, 150 rpm에서 5일, 7일, 10일, 15일간 진탕 배양하였다.

조효소액의 조제

250 ml 삼각플라스크에 배양된 균체와 배양액을 각각 흡인 여과하여 균체를 회수한 후, 회수된 균체는 멸균수로 3회 세척하여 사용했다. 세척 균체에 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH7.5) 100 ml와 균체량 4배정도의 glass bead(Φ1mm)를 넣고 Warning blender로 4분간 처리하여 균체를 파쇄한 후, 수분간 정지하므로 glass bead를 침전시켜 상등액을 모아 8,000 rpm, 4°C, 10분간 원심 분리하여 상등액을 조효소액으로 사용하였다.

효소활성 측정

Cytosine deaminase 활성은 산성조건 하에서 cytosine과 uracil의 흡광도의 차이에 의하여 측정하였다(11). 효소 반응계는 5 mM cytosine 용액 0.2 ml, 조효소액 0.2 ml 및 적당한 양의 0.2 M Tris-HCl 완충액(pH7.5)을 섞은 효소 반응액 1 ml를 37°C, 30분간 반응시킨 후, 0.1 N HCl 4 ml를 첨가하여 반응을 정지시키고 효소 반응 전후에서의 290 nm의 흡광도의 감소를 측정하였다.

결과 및 고찰

배양일수에 의한 효소활성

사용균주 들을 PDB 배지에서 액체배양한 균체로부터 조효소액을 얻어 효소활성을 측정한 결과, *Monascus purpureus* KM 1001 변이주는 PDB 배지에 7일간 배양한 배양액에서 1.68 unit로 가장 높은 cytosine deaminase의 활성을 나타냈고 배양일수가 증가함에 따라 효소활성은 급격히 감소하여 배양 15일째 0.24 units를 나타내어 7일간 배양한 효소활성에 비해 약 85 %로 감소했다. *Monascus purpureus* KCCM 60016와 *Monascus pilosus* KCCM 60160도 PDB 배지에 7일간 배양한 배양액에서 각각 0.76 unit와 0.91 unit로 높은 효소활성을 나타내었다. 그리고 *Monascus pilosus* KCCM 60160과 *Monascus purpureus* KCCM 60016는 시간이 지남에 따라 효소활성이 점차 감소하여 배양 15일로서 효소활성은 거의 소멸했다. *Monascus ruber* KCTC 6122는 다른 3종류의 홍국사상균의 효소활성이

초대값에 도달하는 배양 7일까지 효소활성은 나타내지 않고, 배양 10일에 1.01 units로서 최대값에 도달하고 그 이후는 다른 실험균주와 같이 효소활성이 감소했다(Table 1).

Table 1. Effect of incubation times on the cytosine deaminase activity.

	Incubation time (days)			
	5	7	10	15
<i>Monascus purpureus</i> KM 1001	1.3	1.68	0.52	0.24
<i>Monascus purpureus</i> KCCM 60016	—	0.76	0.64	—
<i>Monascus pilosus</i> KCCM 60160	0.24	0.91	0.48	—
<i>Monascus ruber</i> KCTC 6122	—	—	1.01	0.96

배양일수별 pH변화

사용균주들을 PDB 배지에서 5일, 7일, 10일, 15일간 액체배양하여 배양액의 pH를 측정한 결과, 배양시간에 따라 PDB 배지에서는 효소활성이 최대값에 도달하는 배양 7일 이후부터 배지의 pH가 중성화되며 배양 15일의 배지의 pH는 8.3으로 알카리성으로 변했다. 그러나 YM 배지는 배양초기 pH는 4.2에서 15일 배양으로 4.5 정

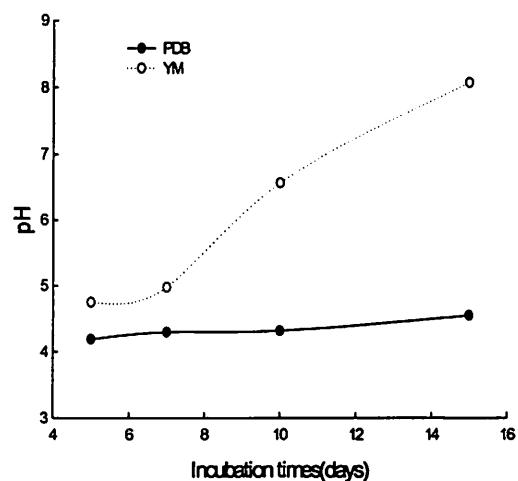


Figure 1. pH change on cultural media of *Monascus purpureus* KM 1001 mutant.

도로 약간 미 산성으로 변하는 정도로 커다란 배지의 pH의 변화는 확인할 수 없었다(Fig. 1).

효소활성에 미치는 pH의 영향

홍국사상균들 중에서 가장 높은 cytosine deaminase의 효소활성을 나타내는 *Monascus purpureus* KM 1001 변이주를 PDB 배지에서 7일간 액체배양하여 얻은 조효소액을 0.2 M Tris-HCl 완충액을 사용하여 pH를 4.0에서 9.0으로 조절하여 효소활성을 측정한 결과, pH 4.0에서는 cytosine deaminase의 효소활성은 나타나지 않으나, pH 4.0 이상으로 pH를 상승시키면 효소활성은 점진적으로 높게 나타났으며 pH 8.0에서 가장 높은 cytosine deaminase의 효소활성을 나타내었다. 그러나 pH를 8.0이상 상승시키면 효소활성은 감소하여 pH 9.0에서는 pH 8.0에서의 효소활성의 65%만 나타내었다(Fig. 2).

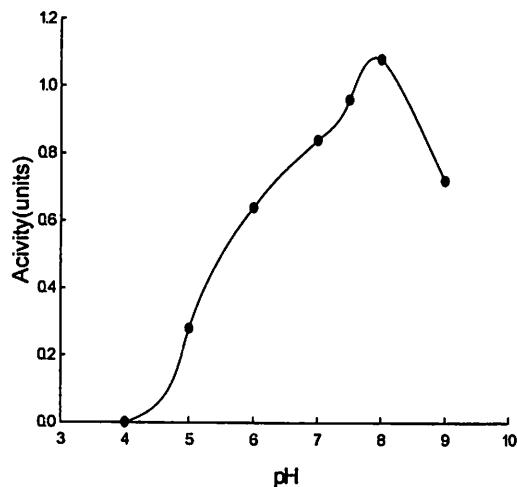


Figure 2. Effect of pH on the cytosine deaminase activity.

*Asp. fumigatus*의 최적 효소 반응 pH는 7.0으로 중성 pH를 나타내었거나(14, 15), 본 실험 균주의 효소활성의 최적 반응 pH는 8.0으로 알카리성을 나타내어 두 균주사이에서 효소 반응 양상의 차이점을 나타내었다.

효소활성에 미치는 온도의 영향

Monascus purpureus KM 1001 변이주를 PDB 배지에서 7일간 액체배양하여 얻은 조효소액을 24°C, 30°C, 37°C, 45°C, 52°C의 각각의 온도에서 효소반응을 시킨 후 효소활성을 측정한 결과, 효소반응 온도 45°C에서 가장 높은 cytosine deaminase의 효소활성을 나타내었다(Fig. 3).

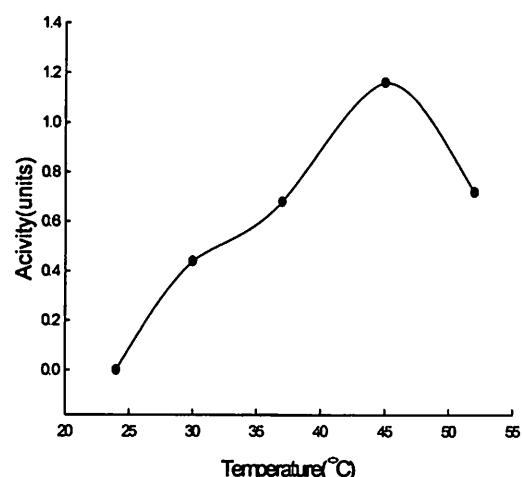


Figure 3. Effect of temperature on the cytosine deaminase activity.

*Asp. fumigatus*의 최적 효소 반응 온도는 35°C를 나타내나(14), 본 실험균주의 효소활성의 최적 반응 온도는 45°C를 나타내어 *Asp. fumigatus*의 효소에 비해 10°C 높은 효소활성의 최적 반응 온도를 나타내어 두 균주사이에서 효소 반응 양상의 차이점을 나타내었다.

효소반응 시간에 따른 효소활성의 변화

Monascus purpureus KM 1001 변이주를 PDB 배지에서 7일간 액체배양하여 얻은 조효소액을 15분, 30분, 45분, 60분으로 각각 효소반응을 시킨 후 효소활성을 측정한 결과, 효소반응 45분에서 가장 높은 cytosine deaminase의 효소활성을 나타내었으며 60분간 효소반응시킴으로 최대반응시간에서의 효소활성의 값보다 약 40% 감소했다(Fig. 4).

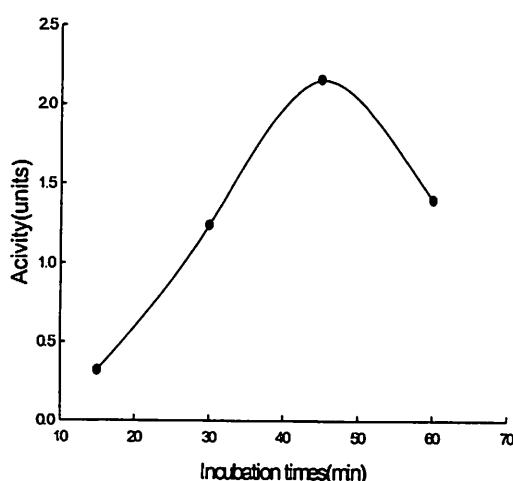


Figure 4. Effect of incubation times on the cytosine deaminase activity.

참고문헌

- Duschinsky, R., E. Pleven, and C. Heidelberger. 1957. The synthesis of 5-fluoro-pyrimidines. *J. Am. Chem. Soc.* **79**, 4559-4560.
- Giege, R. and J. H. Weil. 1970. Elude des t-RNA de levureavant incorpore du 5-fluorouracil provenant de la 5-fluorocytosine. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **52**, 135-144.
- Grunberg, E., E. Titsworth, and M. Bennett. 1964. Chemotherapeutic activity of 5-fluorocytosine. In: Antimicrobial Agents and Chemotherapy. *Ann. Arbor. Mich.* **6**, 566-568.
- Hahn, A. and W. Lintzel. 1923. Ber das verhalten von pyrimidin derivaten in den organismen, I. Einfluss von hefe and pyrimidinderivate. *Z. Biol.* **79**, 179-184.
- Hahn, A. and L. Schafer. 1925. über das verhalten von pyrimidinderivaten in den organismen, *Z. Biol.* **83**, 511-514.
- Ipata, P. L., G. Cercignani, and E. Balestreri. 1970. Partial purification and properties of cytidine deaminase from baker's yeast. *Biochem.* **9**, 3390-3395.
- Jung., H. J. and T. S. Yu. 2004. Production and of cell mass and monacolin K from *Monascus* sp. on rice solid culture. *Kor. J. Microbiol.* **40**, 160-166.
- Kim, J. and T. S. Yu. 2004. Purification and properties of intracellular cytosine deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391. *J. Microbiol. Biotechnol.* **14**, 1182-1189.
- Kream, J. and E. Chargaff. 1952. On the cytosine deaminase of yeast. *J. Amer. Chem. Soc.* **74**, 5157-5160.
- Kaltwasser, H. and J. Kramer. 1968. Verwertung von cytosine und uracil durch *Hydrogenomas facilis* und *Hydrogenomas* H-16. *Archiv. fur Microbiologie.* **60**, 172-181.
- Sakai, T., T. S. Yu, H. Tabe, and S. Omata. 1975. Purification of cytosine deaminase from *Serratia marcescens*. *Agr. Biol. Chem.* **39**, 1623-1629.
- Yu, T. S. and T. H. Kim. 1999. Purification and properties of extracellular cytosine deaminase from *Chromobacterium violaceum* YK 391. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**, 173-178.
- Yu, T. S., J. Kim, and H. S. Kim. 1998. Chemical modification of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Microbiol.* **36**, 39-42.
- Yu, T. S., J. K. Kim, T. Katsuragi, T. Sakai, and T. Kenzo. 1991. Purification and properties of cytosine deaminase from *Aspergillus fumigatus*. *J. Ferment. Bioeng.* **72**, 266-269.
- Yu, T. S., J. K. Kim, T. Sakai, and T. Kenzo. 1986. Cytosine deaminase of fungus. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.* **14**, 169-174.

유산균 *Lb. reuteri*, *Lb. suebicus*, *Lb. vaccinostercus*, *Lb. vaginalis*의 생리·생화학적 특성에 대한 연구

권오식
계명대학교 자연과학대학 미생물학과

A Study on Physio-biochemical Characteristics of the Lactic Acid Bacteria *Lb. reuteri*, *Lb. suebicus*, *Lb. vaccinostercus* and *Lb. vaginalis*

Oh-Sik Kwon
Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

요약. 본 연구에서는 인간의 건강과 관련된 4종의 절대 이상발효 유산균(*Lb. reuteri*, *Lb. suebicus*, *Lb. vaccinostercus*, *Lb. vaginalis*)의 생리·생화학적 특성을 조사하였다. 공시균의 생육 특성을 알아본 바, 배양 후 12시간 만에 가장 많은 균체량(O.D. 0.4 at 650 nm)과 유기산(최종 pH 4.2)을 생성한 *Lb. reuteri* KCTC 3594의 균 생육 특성이 우수하였다. 다른 균들은 일반적인 유산균 증식 패턴을 보이면서 배양 후 약 48시간 만에 생육이 저해되는 것으로 나타났다. 한편 이들 중 6% NaCl이 첨가된 배지에서도 균 생육이 가능한 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608이 내염성이 가장 우수하였다. 발효당인 5탄당의 이용 능력을 보면, *Lb. reuteri* KCTC 3594만이 특이적으로 xylose를 발효하지 못했으며, 6탄당의 경우 공시균들의 발효 양상이 두 개의 그룹으로 나뉘지고 있음을 확인하였다. 이러한 경향은 이탄당, 삼탄당, 복합당에서도 관찰되었다. 즉 인간에게서 분리된 *Lb. reuteri* KCTC 3594와 *Lb. vaginalis* KCTC 3515의 당 이용 능력은 *Lb. suebicus* KCTC 3549와 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608과는 현저한 차이를 보여주고 있었다. 전형적으로 모든 균들은 알콜형 당(mannitol, sorbitol, xylitol) 및 복합당(amygdalin, esculin, salicin)을 전혀 이용하지 못하는 것으로 나타났다(최종 pH 6.5 이상).

Abstract. In this study, 4 strains of obligately heterofermentative *Lactobacillus*(*Lb. reuteri*, *Lb. suebicus*, *Lb. vaccinostercus*, *Lb. vaginalis*) were investigated for their physio-biochemical characteristics. As a result, *Lb. reuteri* KCTC 3594 showed most outstanding growth kinetics that produced abundant cell mass(O.D. 0.4 at 650 nm) and acids(final pH 4.2) within 12 hours after inoculation. Other *Lactobacillus* strains revealed a normal growth pattern and their growth was inhibited by 48 hours after inoculation. On the other hand, *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608 was turned out to be grown in the media containing 6% NaCl where others were unable to grow. For a test using pentoses as fermentable carbohydrates, only the *Lb. reuteri* KCTC 3594 could not ferment xylose at all among the tested strains. In case of hexoses fermentation, it was found that the tested strains were divided into two groups such as lactobacilli isolated from human and from not-human. This kind of tendency was also observed in the tests of disaccharides, trisaccharides and complex sugars. *Lb. reuteri* KCTC 3594 and *Lb. vaginalis* KCTC 3515 isolated from human showed very different abilities of

carbohydrate utilization compared to *Lb. suebicus* KCTC 3549 and *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608 which were isolated from an apple extract and cow dung respectively. In general, all the tested obligately heterofermentative lactobacilli could not utilize alcohol sugars(mannitol, sorbitol, xylitol) and complex carbohydrates(amygdalin, esculin, salicin) that was determined by their final pH 6.5 after 3 days of incubation.

I. 서 론

유산균(lactic acid bacteria)은 여러 가지 당(carbohydrates)을 에너지원으로 사용하여 다량의 유산(젖산)이나 초산과 같은 유기산을 생성하면서(1) 사람이나 동물의 장내에서 해로운 물질인 인돌, 페놀, 아민, 암모니아 등을 생성하지 않고 부패를 방지하지 하는 등 사람 및 동물에게 유익한 Gram 양성 간균이다(11). 이러한 유산균 중 *Lactobacillus*속은 가장 많은 종을 포함하고 있는 것으로 알려져 있는데(9), 이들을 발견할 수 있는 서식처는 자연계에서 매우 다양하다(4, 14). 한편 *Lactobacillus* 균들은 이들의 당 발효 특성에 따라 포도당을 이용하여 85% 이상의 젖산을 만들어내는 정상발효균(homofermenter)과 젖산을 포함하여 CO₂, 에탄올, 초산을 만들어 내는 이상발효균(heterofermenter)으로 나누고 있다(12, 13). 이 *Lactobacillus*균은 장내 유해균 억제작용 및 정장작용, 혈중 콜레스테롤 감소기능, 항암 작용, 면역증강 작용, 유당 불내증 격감작용, 식품영양학적 가치의 증진, 건강보조식품 유산균 식품, 의약품으로써의 유산균 제제, 발효유, 화장품, 건강보조식품, 동물 사료 등 다양한 기능을 가지고 있는 유익한 균이다(5, 6, 7, 10). 따라서 이런 다양한 기능성을 가진 유산균의 분리와 정화한 동정은 보다 나은 인간의 건강을 위하여 꼭 필요함에도 불구하고 이들이 갖고 있는 생리·생화학적 특성과 철저한 혐기성 및 복잡한 영양 조건을 필요로 하기 때문에(2,3) 균주의 배양 및 동정에 있어서 특수한 방법의 적용이 절실하다(4,8).

이에 본 연구에서는 *Lactobacillus* 중에서 인간의 건강과 밀접히 관련된 *Lb. vaginalis*, 요구르트의 스타터로 사용되는 *Lb. reuteri*, 저장한 사과의 표면에서 발견되는 *Lb. suebicus* 및 암소

의 분변에서 분리한 *Lb. vaccinostercus* 등 다양한 서식처에서 발견되는 절대 이상발효를 하는 유산균들을 중심으로 이들의 생리적 및 생화학적 특성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

공시균주. 본 실험에서 사용한 공시균주는 절대 이상발효를 하는 4종의 *Lactobacillus* 균주 (*Lb. reuteri*, *Lb. suebicus*, *Lb. vaccinostercus*, *Lb. vaginalis*)로 이 균들의 출처는 Table 1에 나타난 바와 같다. 이 균들은 모두 한국생명공학 연구원(KRIBB) 유전자원센터 유전자은행(KCTC, 대전)에서 분양 받아 계대배양 후 glycerol이 20% 포함된 저장액에 넣어 -80°C 극저온 냉동고(deep freezer)에 보관하여 사용하였다.

Table 1. Obligate heterofermenting *Lactobacillus* strains used in this study

Species & Strains	Sources
<i>Lb. reuteri</i>	KCTC 3594 adult colon
<i>Lb. suebicus</i>	KCTC 3549 apple extract
<i>Lb. vaccinostercus</i>	KCTC 3608 cow dung
<i>Lb. vaginalis</i>	KCTC 3515 woman vagina

유산균의 산 생성능. 본 실험에서 사용된 절대 이상발효 락토바실러스균들(*Lb. reuteri* KCTC 3594, *Lb. suebicus* KCTC 3549, *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608, *Lb. vaginalis* KCTC 3515)의 산 생성능은 일정 시간 배양 후 원심 분리하여 얻어진 상청액의 pH를 조사하여 결정하였다.

공시균의 생육 특성 조사. 공시 락토바실러스 균들은 일차적으로 MRS 배지(Difco)를 이용하여 배양하였다. 이들의 생육특성을 결정하기 위

하여 균 적정 생육온도로 조정한 배양기에서 12 hr, 24 hr, 36 hr, 48 hr 및 72 hr 배양 후, 각각의 배양액을 20분간 4°C에서 냉장 원심분리기(Union 55R)로 원심분리하였다. 얻어진 균체량은 spectrophotometer(Pharmacia Biochrome 4060)를 이용하여 650 nm에서 흡광도를 측정하여 O.D.로 결정하였으며, 배양액 중 상청액의 수소이온 농도는 pH meter(Mettler, Model 225)로 측정하여 균 생육의 지표로 이용하였다.

내염성 테스트. 공시 유산균들의 내염성을 조사하기 위하여 MRS broth(Difco)에 NaCl을 첨가하여 최종 1%, 2%, 4%, 6% 및 8%의 농도로 제조한 후 배지 10 ml당 공시균주 20 ul를 접종하였다. 적정 배양 온도 30°C에서 배양해야하는 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608을 제외하고 *Lb. reuteri* KCTC 3594, *Lb. suebicus* KCTC 3549, *Lb. vaginalis* KCTC 3515 등은 모두 37°C에서 3일간 배양한 후 4°C에서 15분간 원심분리(3,000 rpm)하여 pH meter를 사용하여 상청액의 산도를 측정하였다.

당 발효 테스트. 공시균들의 당 발효 특성을 조사하기 위하여 glucose가 첨가되지 않는 MRS 배지(Table 2)를 특별히 제조하여 사용하였다. glucose가 첨가되지 않는 MRS broth에 10% 당 stock solution을 첨가하여 autoclave하여 사용하였다. 각각의 10% 당 stock solution이 첨가된 배지 5 ml에 공시균주 20 ul를 접종한 후 3일간 적정 배양 온도에서 배양하였다. 이를 4°C에서 15분간 3,000 rpm으로 원심분리한 후 pH meter를 사용하여 상청액의 pH를 측정하였다. 이 실험 사용된 당의 종류는 모두 25종(Sigma사 제품)으로 다음과 같다: amygdalin(Amy), D-arabinose(AraD), L-arabinose(AraL), cellobiose(Cel), esculin (Esc), fructose(Fru), galactose(Gal), gluconic acid(Glc), glucose(Glu), lactose(Lac), maltose(Mal), mannitol (Mant), mannose(Mann), melezitose (Mele), melibiose (Meli), raffinose(Raf), rhamnose(Rha), ribose (Rib), saccharin(Sac), salicin(Sal), sorbitol(Sorb), sucrose(Suc), trehalose(Tre), xylitol(Xylt), xylose (Xyl).

Table 2. Composition of MRS broth without any carbohydrates (per 1 L)

Ingredients	Weight
Polypeptone	10 g
Beef extract	10 g
Yeast extract	5 g
Ammonium citrate	2 g
Sodium acetate	5 g
Magnesium sulfate	0.1 g
Manganese sulfate	0.05 g
Dipotassium phosphate	2 g
Tween 80 (Polysorbate 80)	1 ml/l

III. 결과 및 고찰

공시균의 생육 특성 조사. 먼저 배양 후 배지에 존재하는 락토바실러스균의 균체량을 시간별로 조사한 결과는 Fig. 1A와 같았다. 4가지의 락토바실러스 균주 중 *Lb. reuteri* KCTC 3594(●)는 다른 균에 비해서 가장 많은 균체량을 생산해 냈는데 이 균은 불과 배양 후 12시간 만에 흡광도(O.D.)를 0.35에서 0.40로 보여주어 가장 빨리 생육하는 균임을 알 수 있었다. 두 번째로 빨리 생육하는 균은 *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼)로 나타났으며, *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■)과 *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆)는 배양 후 36시간에서 48시간 사이에 최대 균체량을 갖는 것으로 판명되었다. 한편 배양액의 산도를 pH meter로 측정한 결과는 Fig. 1B와 같았다. 특히하게도 12시간 배양 후 측정한 상청액의 pH(균들이 만들어 낸 유기산의 정도)의 결과를 보면 *Lb. reuteri* KCTC 3594(●)가 가장 낮았으며(pH 4.5 이하) *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆), *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■), *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼)의 순서로 pH가 낮았다.

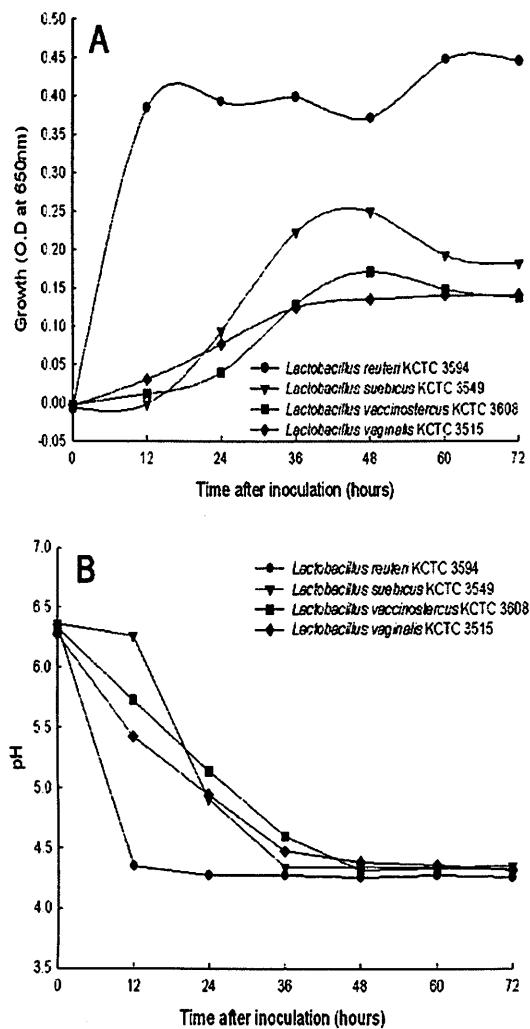


Fig. 1. Growth characteristics of the obligate heterofermenting *Lactobacillus* strains at different time interval(12 hr, 24 hr, 36 hr, 48 hr, 72 hr). A: Bacterial cell growth determined by O.D. B: Bacterial cell growth determined by pH. Tested strains: *Lb. reuteri* KCTC 3594(●), *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼), *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■), *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆).

이는 조사된 균들의 균체량의 증가와 산 생성 능력이 각기 다를 수 있음을 보여주는 것이다. 즉 배양 후 12시간에서 *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆)는 균체량이 증가되지 않는데도 불구하고 배양액의 pH는 5.5 정도로 떨어져 있었는데 이는 적은 수의 균체가 많은 양의 유기산을 생성해 내는

것을 의미하는 것이다. *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■) 역시 배양 후 24시간에서 균체량의 증가는 관찰되지 않는 상황에서 이 균의 배양액 pH가 5.5 이하로 떨어져 있어 *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆)와 같은 경향을 보여주고 있었다. 이들은 균배양이 시작된 후 48시간에 측정한 O.D.(Fig. 1A)와 pH(Fig. 1B)를 살펴보면 측정 수치가 모두 flat한 것으로 봐서, 균 생육이 정지된 것으로 추정되었다. 이는 배양 시간이 경과하면서 배양액의 pH가 너무 낮아졌기 때문에 균생육이 저해된 것으로 사료되었다. 한편 *Lb. reuteri* KCTC 3594(●)는 배양 후 12시간에 최대의 균체량을 보여줌과 동시에 가장 낮은 배양액 산도를 보여주고 있는데 이러한 특성은 왜 *Lb. reuteri*가 유산균 발효유(요구르트)의 스타터로 쓰이게 되는지 알려주는 좋은 생육 특성인 것이다. *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼)는 배양시간이 경과하게 되면 서서히 균체량이 증가하면서 배양액의 산도가 떨어지고 있음을 확인 할 수 있었는데 이러한 상관관계는 일반적인 유산균의 균 생육 특성을 나타내는 것이다. 즉, 균체량이 증가하면서 균의 수적 증가에 따라 배양액의 산도는 균들의 발효 산물인 유기산들이 배양액에 축적되기 때문이다.

내염성 테스트. 유산균들은 내염성이 비교적 강한 세균으로 알려져 있기 때문에 본 실험에서 테스트되는 4종의 절대 이상발효 락토바실러스 균의 또 다른 특성을 조사하기 위하여 액체 배양 배지에 NaCl을 1%~8%의 농도로 첨가하여 이들의 내염성을 비교해 보았다. 전반적으로 테스트된 4종의 절대 이상발효 락토바실러스균들은 1%~2%의 NaCl에서는 큰 차이가 없이 잘 생육할 수 있었다(Fig. 2). 하지만 4% NaCl 농도부터는 salt tolerance에 대한 균 특성이 잘 나타나고 있었으며 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608을 제외하고는 6% NaCl 농도부터 균 생육이 심하게 저해 되었다. 한편 *Lb. suebicus* KCTC 3549는 4% NaCl 농도에서 조차 균 생육이 저해되고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 내염성이 가장 우수한 락토바실러스균은 6% NaCl이 첨가된 배지에서도 균 생육이 가능한 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608이었다.

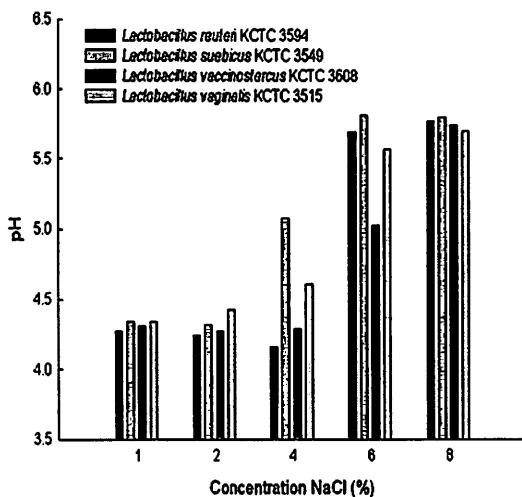


Fig. 2. Comparison of the obligate heterofermenting *Lactobacillus* strains growing at different NaCl concentrations(1%, 2%, 4%, 6%, 8%). In this case, the increasing pH values indicate growth inhibition occurred by addition of NaCl. Tested strains are same as Fig. 1.

5탄당 발효능. 이들 균주가 5탄당(5개의 탄소 원자로 이루어진 당, pentoses)을 발효할 수 있는지 알아보기 위하여 (D)-arabinose, (L)-arabinose, ribose 및 xylose 등을 Table 2에 나타난 배지 조성에 참가하여 균들을 배양하였다. 전반적으로 네 균주들은 유사한 당 발효 패턴을 보여 주었다(Fig. 3). 테스트된 모든 균주는 (L)-arabinose (AraL)를 잘 발효하였으나 (D)-arabinose(AraD)는 전혀 발효하지 못하였다. 또한 이들은 ribose (Rib)가 첨가된 배지에서 균생육이 매우 저조한 것으로 드러났다. 특이적으로 *Lb. reuteri* KCTC 3594(●)만이 xylose를 전혀 발효하지 못하는 것으로 확인되었다.

6탄당 발효능. 가장 대표적인 6탄당(hexoses)은 glucose(포도당, Glu)로 대부분의 유산균이 이를 잘 발효하여 에너지원으로 사용하기 때문에, 본 실험에서는 글루코오스 이외에 fructose (과당, Fru), galactose(Gal), mannose(Mann) 및 rhamnose(Rha)를 이용하여 이들 균주간의 당 발효능의 차이를 비교 조사하여 보았다. Fig 4를 보게 되면, 테스트된 모든 락토바실러스균이

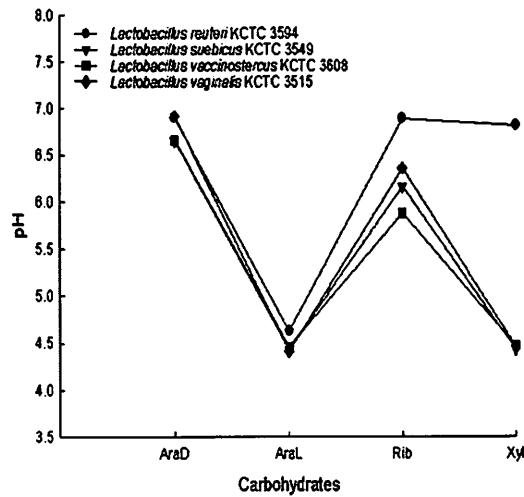


Fig. 3. Pentose fermentation characteristics of the obligate heterofermenting *Lactobacillus* strains. Tested strains: *Lb. reuteri* KCTC 3594(●), *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼), *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■), *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆). Abbreviations of the carbohydrates: AraD as (D)-arabinose, AraL as (L)-arabinose, Rib as ribose and Xyl as xylose.

글루코오스를 첨가했을 때 pH 5.0 이하의 좋은 산 생성능을 보여주고 있어 글루코오스는 좋은 발효원이라고 생각되었다. 하지만 모든 균들은 mannose를 발효하지 못하는 것으로 나타났다. 특이적인 발견은 fructose와 galactose 첨가시 이들의 발효 패턴이 뚜렷한 차이를 보여준 것이었다. 즉 *Lb. reuteri* KCTC 3594(●)와 *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆)는 fructose와 galactose를 이용하여 생육하는 반면 *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼)와 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■)은 전혀 생육하지 못하는 것으로 나타났다. 이는 일차적으로 테스트된 균들의 특성을 보여 주는 것으로 사료된다. 왜냐하면 *Lb. reuteri* KCTC 3594(●)와 *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆)는 Table 1에서 보는 것처럼 이들의 출처가 인간임에 반해 *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼)와 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■)은 비록 종이 다르지만 저장 사과의 표면이나 소의 분변이었기 때문이라고 사료되었다. 한편 테스트된 절대 이상 발효 락토바실러스균 중 오직 *Lb. reuteri* KCTC

3594(●)만이 rhamnose를 발효할 수 있는 것으로 확인되었다.

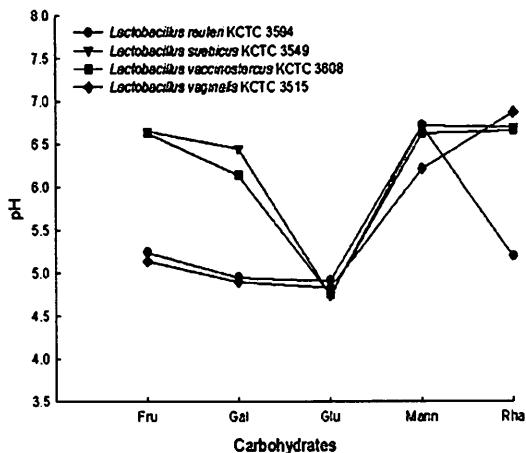


Fig. 4. Hexose fermentation characteristics of the obligate heterofermenting *Lactobacillus* strains. Tested strains: *Lb. reuteri* KCTC 3594(●), *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼), *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■), *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆). Abbreviations of the carbohydrates: Fru(fructose), Gal(galactose), Glu(glucose), Mann(mannose) and Rha (rhamnose).

이당류의 발효. 이당류(disaccharides)라 함은 단당류(6탄당 혹은 5탄당) 2개가 O -glycoside bond로 결합된 것으로 이들의 결합이 분해되면 이당류를 구성하고 있었던 6탄당이 두 분자가 생성된다. 이당류 발효 실험(Fig. 5)에서 사용된 모든 균들은 두 개의 글루코오스가 glucose- β (1 \rightarrow 4)-glucose로 결합된 cellobiose를 전혀 이용하지 못하는 것으로 나타났으나 glucose- α (1 \rightarrow 4)-glucose로 결합된 maltose는 모든 균들이 이용하여 생육하고 있음을 확인하였다. 이들의 차이는 2분자의 glucose가 α -O-glycoside bond를 이루는가(maltose) 아니면 β -O-glycoside bond를 형성하는가(cellobiose)에 기인한다.

한편 이 균들의 나머지 이당류(lactose, melibiose, sucrose, trehalose)에 대한 선호도는 큰 차이를 보여주고 있었다. 먼저, 6탄당에서 언급하였던 발효 패턴이 lactose[galactose- β (1 \rightarrow 4)-glucose]에서도 똑같이 재현되고 있었다. 즉, *Lb. reuteri*

KCTC 3594(●)와 *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆)는 lactose를 이용하여 생육하는 반면 *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼)와 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■)은 전혀 생육하지 못하는 것으로 나타났다. *Lb. reuteri* KCTC 3594(●)와 *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆)는 β -galactosidase가 lactose를 분해하여 구성 성분인 galactose와 glucose를 발효하여 생육하는 것으로 사료된다. 반면 *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼)와 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■)은 lactose를 분해하는 β -galactosidase의 활성이 낮거나 기능을 하고 있지 못하였기 때문에 생육할 수 없었던 것으로 판명되었다.

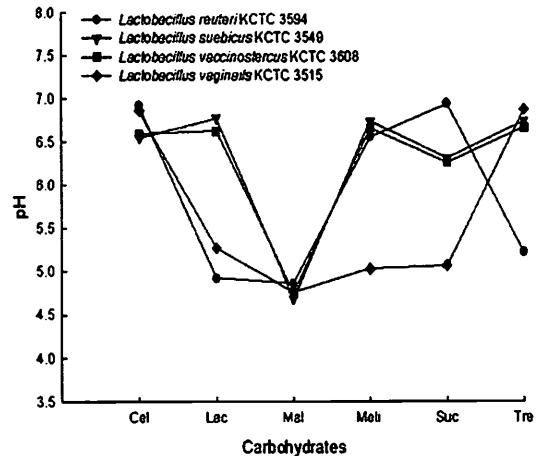


Fig. 5. Disaccharide fermentation characteristics of the obligate heterofermenting *Lactobacillus* strains. Tested strains: *Lb. reuteri* KCTC 3594(●), *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼), *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■), *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆). Abbreviations of the carbohydrates: Cel(cellobiose), Lac(lactose), Mal(maltose), Meli(melibiose), Suc(sucrose), and Tre(trehalose).

또한 Fig. 5에서 보는 것처럼 이들은(*Lb. suebicus* KCTC 3549와 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608) 이당류 발효 패턴이 모두 동일하게 나타났다. 하지만 *Lb. reuteri* KCTC 3594와 *Lb. vaginalis* KCTC 3515의 경우는 나머지 이당류의 이용에 있어서 현저하게 차이가 있었다. *Lb. reuteri* KCTC 3594(●)는 melibiose[galactose- β

(1→6)-glucose]와 sucrose [glucose- α (1→2)-fructose]를 전혀 이용하지 못하고 오직 trehalose [glucose- α (1→1)-glucose]만 잘 이용하였다. 반대로 *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆)는 melibiose와 sucrose를 잘 이용하였으나 다른 균처럼 trehalose는 전혀 이용하지 못하였다. 이로써 본 실험에서 사용된 절대 이상발효 락토바실러스의 종간의 구별은 이러한 이당류의 발효 특성을 비교함으로써 확실해졌다.

삼당류의 발효. 3개의 단당류가 결합된 삼당류의 경우를 보면(Fig. 6), 테스트된 모든 락토바실러스균들은 glucose- β (1→3)-fructose- α (1→2)-glucose로 결합된 melezitose(Mele)를 이용하지 못했다. 하지만 fructose- α (1→6)-galactose- β (1→6)-glucose로 구성된 raffinose(Raf)의 경우에는 역시 두 그룹으로 선호도가 확실히 구별된다. 즉, 인간에서 분리한 *Lb. reuteri* KCTC 3594와 *Lb. vaginalis* KCTC 3515는 raffinose를 이용하여 생육 가능하였으나 그렇지 않은 *Lb. suebicus* KCTC 3549와 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608은 raffinose를 전혀 이용하지 못하였다. 결론적으로 이러한 결과는 테스트된 락토바실러스의 종의 차이에서 도출된 것이지만 본

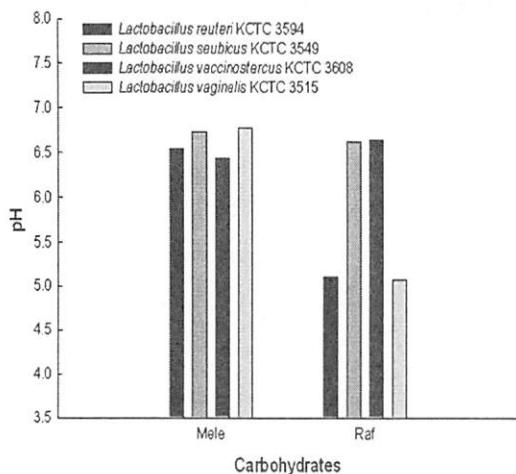


Fig. 6. Trisaccharide fermentation characteristics of the obligate heterofermenting *Lactobacillus* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Mele(melezitose) and Raf(raffinose). Tested strains are as same as Fig. 1.

연구에서 사용된 균들의 분리 출처(서식처, 예를 들면 인간 혹은 사과)에 의하여 당 발효능이 많이 차이나는 것으로도 사료되었다.

복합당 및 변형당의 발효. 이를 균주의 복합당 및 변형당에 대한 이용 가능성을 비교하기 위하여 사용된 당의 종류는 고리형 구조를 갖는 복합당인 amygdalin(Amy), esculin(Esc), saccharin(Sac), salicin(Sal), 글루코오스의 6번째 탄소가 카르복실기로 변형된 gluconic acid(Glc), 그리고 알콜형 당인 mannitol(Mant), sorbitol(Sorb), xylitol(Xylt) 등으로 분류된다. 결과를 살펴보면(Fig. 7), 테스트된 락토바실러스 4균주[*Lb. reuteri* KCTC 3594(●), *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼), *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■), *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆)]들은 전형적으로 모두 알콜형 당(mannitol, sorbitol, xylitol) 및 복합당(amylgdalin, esculin, salicin)을 전혀 이용하지 못하는 것으로 나타났다(최종 pH 6.5 이상). 하지만 gluconic acid의 이용을 살펴보면, *Lb. reuteri* KCTC 3594(●)와 *Lb. vaccinostercus*

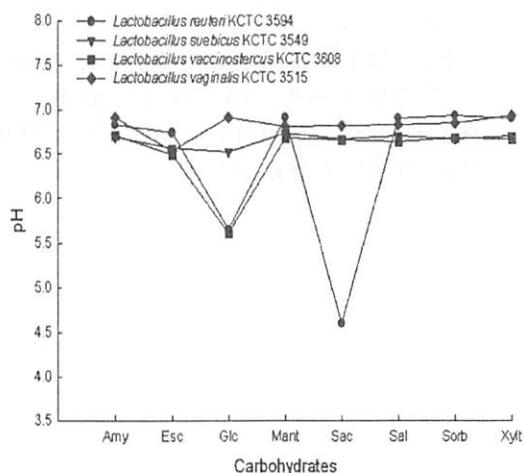


Fig. 7. Complex carbohydrates fermentation characteristics of the obligate heterofermenting *Lactobacillus* strains. Tested strains: *Lb. reuteri* KCTC 3594(●), *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼), *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608(■), *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆). Abbreviations of the carbohydrates: Amy(amygdalin), Esc(esculin), Glc(gluconic acid), Mant(mannitol), Sac(saccharin), Sal(salicin), Sorb(sorbitol), and Xylt(xylitol).

KCTC 3608(■)은 어느 정도 gluconic acid를 이용하여 생육 가능한 반면 *Lb. suebicus* KCTC 3549(▼)와 *Lb. vaginalis* KCTC 3515(◆)는 전혀 불가능하였다. 따라서 gluconic acid는 당 발효능 실험을 통해 여태까지 그 특성이 구별되지 않았던 두 가지 락토바실러스균 *Lb. suebicus* KCTC 3549와 *Lb. vaccinostercus* KCTC 3608을 차별화 시킬 수 있는 유일한 당인 것이다.

참고문헌

1. 강국희. 1990. 유산균 식품학. 성균관대학교 출판부. 서울.
2. 권오식, 이삼빈. 2004. 여러 가지 *Lactobacillus* 균주들의 생리적 및 생화학적 특성 조사(1). *J. Inst. Nat. Sci.* 22: 35-42.
3. 김유진, 윤경표, 권오식. 2005. 유산균 *Lactobacillus plantarum* 아종의 특성에 관한 연구. *J. Inst. Nat. Sci.* 24: 59-65.
4. 백영진, 김종만, 임억규. 1993. 유기산 생산균 이용현황과 전망. 생물산업. 6: 23-25.
5. 정명준. 1997. 유산균의 산업적 응용. 생물산업. 10: 13-21.
6. 정후길. 2001. 프로바이오틱 유산균의 선발기준 및 산업적 응용. 생물산업. 14: 39-48.
7. 차성관. 2000. 프로바이오틱 미생물과 유산균 식품. 미생물과 산업. 26: 13-21.
8. 최신양, 정병문, 김현정, 성승희, 김왕준, 박완수. 2000. 김치 유래 젖산균의 세포외 효소활성의 측정. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 59-61.
9. Choi, I. K., S. H. Jung, B. J. Kim, S. Y. Park, J. Kim, and H. U. Han. 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimch, a fermented cabbage product. *Antonie Van Leeuwenhoek* 84: 247-253.
10. Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 377-381.
11. Kim, T. W., S. G. Min, D. H. Choi, J. S. Jo, and H. Y. Kim. 2000. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 10: 881.
12. Kwon, O. S. 2000. *J. Microbiology*, 38: 137.
13. Pot, B., L. K. Kesters, and K. H. Schleifer. 1994. Bacteriocins of lactic acid bacteria. Blackie and Professional, Glasgow. p. 13.
14. Rasic, J. L., and J. A. Kurman. 1978. Yoghurt. Technical Dairy Publishing House, Copenhagen. p. 17.

Poor-Medium Tends to Increase the Stability of Newly Transconjugated Plasmid of *Pseudomonas* sp. KM12TC

Yoon, Kyung Pyo

Department of Microbiology, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Abstract. The stability of the artificially transconjugated plasmid is crucial for the bioremediation of the co-contaminated sites. In this paper, the effects of rich and poor-medium on the stability of the artificially transconjugated plasmid of *Pseudomonas* sp. KM12TC were studied. Poor medium seemed to have a tendency to stabilize the artificially transconjugated plasmid due to slow plasmid replication. The supplementation of the 0.01X LB did apparently not increase or decrease the stabilities of the plasmids of the *Pseudomonas* sp. KM12TC. The lost rate was even accelerated when the cells were grown in even richer medium (supplemented with 0.5X LB). The preliminary results showed that the cells showed more plasmid-encoded activity. It took about 9 days for two month grown cells in poor-medium to degrade about 95% of phenol at 28°C. But, the same kind of cells grown in rich-medium needed 15-18 days to degrade at the similar efficiency, and the lag was even more pronounced at cells grown in even richer medium.

Key words: *Pseudomonas* sp. KM12TC, Plasmid Stability

INTRODUCTION

Multiple species of heavy metal ions and organic materials are frequently found at cocontamination sites and they could inhibit the bioremediation in combination (1, 2). Therefore bacterial strains with multi-capabilities are needed to bioremediation and such bacterial species could be created by exploiting the ability of many different naturally occurring plasmids in environmental remediation systems (3). Not surprisingly, various heavy metal resistance can be found in many different microorganisms (4-6). These microorganisms can be found from many different environmental and clinical sources (4-6). The genes conferring resistance to inorganic mercury salts, whether encoded by plasmids or by chromosomes, are evolutionary conserved and are found in bacteria isolated from different environmental and clinical sources (3, 4). Such genes might

be selectively got together in a cell to create super bug which can tolerate many toxic heavy metal ions and yet degrade many different organic molecules.

To satisfy the purpose, it is necessary to examine the retention and expression of the 'multi-capa' bacteria, phenol-degrading pKM10 and arsenical resistant pKM20 in the host *Pseudomonas* sp. KM12TC in this experiment. The pKM20 was transconjugated into *P. aeruginosa* TC as published previously (3, 7, 8). The results would help us to understand the fundamental plasmid/host processes that influence plasmid retention, stability, expression, and transfer.

MATERIALS AND METHODS

Bacteria and Growth Conditions

To estimate the effects of LB-supplemented minimal medium and minimal medium without

any supplemented LB on the stability of newly transconjugated plasmid of *Pseudomonas* sp. KM12TC, *Pseudomonas* sp. KM12TC was grown in minimal (OX LB supplemented), poor (0.01X LB supplemented), rich (0.1X LB supplemented), richer medium (0.5X LB supplemented) respectively. *Pseudomonas* sp. KM12TC contains two different kinds of plasmids, pKM10 and pKM20. Plasmid pKM10 presence in a cell was determined using its ability to utilize 1 g/l phenol as sole carbon and energy source. Plasmid pKM20 harbors the ability to grow in 5 mM arsenate. Selective phenol-arsenate agar plates and appropriate slants of plasmid-bearing cultures were maintained and re-streaked as needed.

In each experiment, pure culture of plasmid-carrying strains (Transconjugant *Pseudomonas* sp. KM12TC) were used for starter culture. The cultures were diluted 10⁴-fold in 10 ml of prewarmed appropriate medium after one day growth at 28°C. The cells were grown for specified time in successive batch cultures. After appropriate dilutions of the cultures being plated on nonselective and selective agar plates, at least 100 individual colonies from each diluted sample were replica plated to plates containing appropriate selective or nonselective agar plates. Resistance to the arsenate was correlated with the presence of a plasmid pKM20, whereas the growth at phenol plates was correlated with the presence of pKM10.

Four Selective Media

To identify the plasmid species in the cells, the following four different media were used in this research: (i) Non-selective Luria-Bertani (LB) medium containing 10 g of Bacto Peptone, 5 g of Bacto yeast extract, and 5 g of NaCl in 1 liter of distilled water at pH7.5; (ii) pKM10-selective (phenol degradation-selective)

phenol/basal medium (basal medium supplemented with phenol as the sole carbon and energy source at a concentration of 1 g/l). The basal medium contained the following (per liter of deionized water): 2.13 g of Na₂HPO₄, 2.04 g of KH₂PO₄, 1 g of (NH₄)₂SO₄, 0.067 g of CaCl₂ · 2H₂O, 0.248 g of MgCl₂ · 6H₂O, 0.5 mg of FeSO₄ · 7H₂O, 0.4 mg of ZnSO₄ · 7H₂O, 0.002 mg of MnCl₂ · 4H₂O, 0.05 mg of CoCl₂ · 6H₂O, 0.01 mg of NiCl₂ · 6H₂O, 0.015mg of H₃BO₃, and 0.25 mg of EDTA. The pH of the medium was 7.0.; (iii) pKM20-selective (arsenical resistance-selective) As/LB medium (LB supplemented with 5 mM Na₂HAsO₄ · 7H₂O); (iv) both pKM10 and pKM20-selective (both phenol-degradation and arsenical resistance-selective) phenol · As/basal medium (basal medium supplemented with both phenol and arsenate as specified above). All agar plates were prepared by adding bacto agar (Difco, Detroit, U.S.A.) in an amount of 15 g/l.

Estimation of transconjugated plasmid stability and activity

After diluting accordingly, 100 µl of the diluted *Pseudomonas* sp. KM12TC cells were spread on appropriate agar plates and incubated for two days at 28°C. Then, colonies on the plates were quantified by direct counts. For the measurement of the presence of the specific plasmid, plasmid-harboring (or plasmid-free) cells were identified by replica plating. First, 0.1 ml of appropriately diluted cells was spread on nonselective agar LB plates and incubated as described above. The plates were then replica-plated to selective agar plates containing (i) corresponding plasmid-selective arsenate, or (ii) phenol, or (iii) both. The selective medium of choice for replica-plating was as follows. Phenol-degradation phenotype (pKM10) was quantified by replica-plating on phenol/basal agar plates; arsenical-resistant

phenotype (pKM20) on As/LB agar plates; dual phenotypes (both phenol-degradation and arsenical-resistant phenotypes in a single cell) on phenol·As/basal agar plates. All plates were incubated as described above. Colonies that arose from the selective agar plates were quantified by direct counts.

Phenol-degradation analysis

For the phenol-degradation assay, the culture was grown in 250ml Erlenmeyer flasks on a rotary shaker (150 rpm) at 28°C for the specified time. The modified colorimetric method (9) was used to follow the degradation of phenol. Bacterial culture (1 ml) was added to an Effendorf tube containing 50 µl of 2 N NH₄OH and 25 µl of 2% 4-aminoantipyrine. Then 25 µl of 8% K₃Fe(CN)₆ was added. After mixing, the tube containing the whole mixture was centrifuged to remove cells. A₅₁₀ of the supernatant was measured. Phenol concentrations were calculated by reference to a standard curve.

RESULTS AND DISCUSSION

Activities of the plasmids of *Pseudomonas* sp. KM12TC after growth in the minimal and poor medium.

The plasmid pKM20 was transconjugated into *P. aeruginosa* TC as published previously, and the effect of medium on the stability of the plasmids were examined since plasmid stability tends to be affected by many growth conditions, such as temperature, surrounding selection force, nutrition, growth speed, etc. The retention and expression of the phenol-degrading pKM10 and arsenical resistant pKM20 in the host *Pseudomonas* sp. KM12TC were examined.

To examine the effect of toxic heavy metal ion on the stability of plasmid in the natural and new host cells, the *Pseudomonas* sp. KM12TC cells from overnight culture were appropriately diluted and grown in minimal or

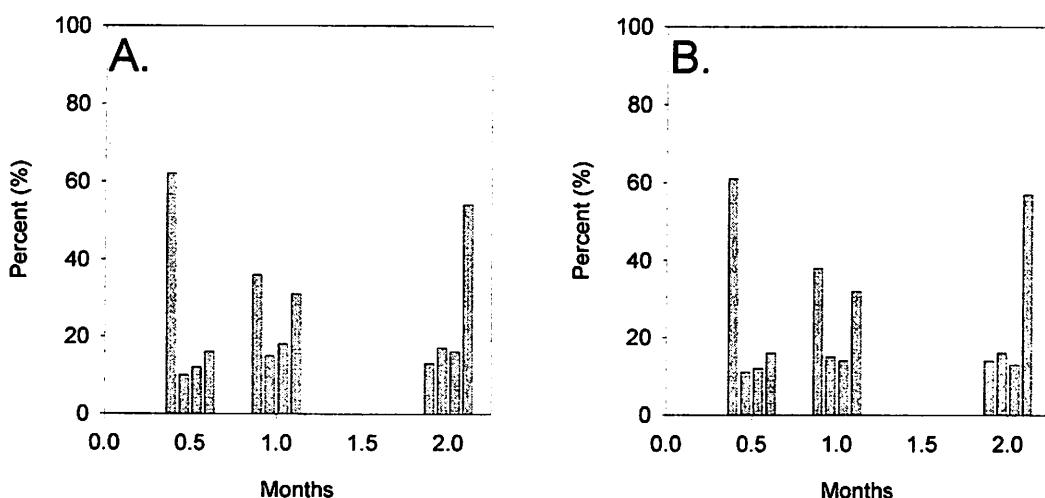


Fig. 1. Activities of the plasmids of *Pseudomonas* sp. KM12TC after growth in the minimal and poor medium. The plasmid activity was expressed as percent survival as described in Materials and Methods. A: minimal medium; B: poor medium (0.01X LB supplemented to the minimal medium). Bars: from left to right, the cells harboring both plasmids, the cells harboring pKM10, the cells harboring pKM20, and The cells harboring none.

poor medium supplemented with 0.01X LB as described in Materials and Methods. Then, as described in Materials and Methods, the cells were spread on appropriate selection agar plates and incubated for two days at 28°C for direct counting. In this experiment, the presence of specific plasmid at different growth conditions after two weeks to two months growth was examined.

When the cells were grown in minimal medium in figure 1A, after two weeks about 38% of cells were losing plasmid(s) and the losing rates was increasing. The plasmidless population reached up to 64% after 4 weeks of growth time and even 87% after 2 months. When the cells were grown in the minimal medium supplemented with 0.01X LB, after two weeks about 39% of cells were losing plasmid(s) and the losing rates was increasing as described before. The plasmidless population reached up to 62% after 4 weeks of growth time and even 86% after 2 months. The lost rate showed the similar tendency to increase. But both data failed to show any significant difference. There seemed to show no significant difference between growth in minimal and poor medium. The supplementation

of the 0.01X LB did apparently not increase or decrease the stabilities of the plasmids of the *Pseudomonas* sp. KM12TCs. The plasmids were seemed to be randomly selected and lost resulting in the clear tendency of increase in the percentage of the plasmid-less *Pseudomonas* sp. KM12TC cells which had harbored the phenol-degrading pKM10 and arsenical resistant pKM20 together before.

Activities of the plasmids of *Pseudomonas* sp. KM12TC after growth in the minimal and rich medium.

Even though the supplementation of the 0.01X LB failed to show any significant differences in the stability of the plasmid of *Pseudomonas* sp. KM12TCs in the previous experiments, when the supplemented amount of LB from 0.01X to 0.1X even to 0.5X LB clearly showed the decreased stabilities of the plasmid of *Pseudomonas* sp. KM12TCs. To examine the effects of rich medium on the stabilities of plasmid of the *Pseudomonas* sp. KM12TC, cells from overnight culture were appropriately diluted and grown in rich (0.1X LB supplemented), or richer medium (0.5X LB supplemented) respectively as described in

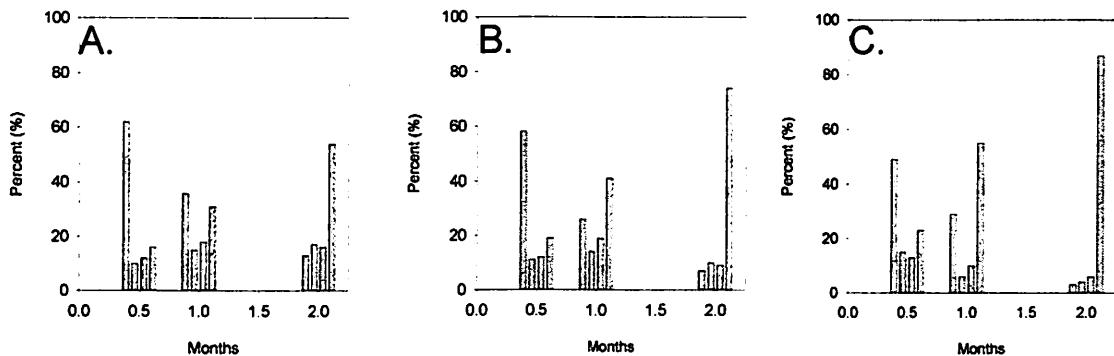


Fig. 2. Activities of the plasmids of *Pseudomonas* sp. KM12TC after growth in the minimal and rich medium. The plasmid activity was expressed as percent survival as described in Materials and Methods. Panel A: minimal medium; B: rich medium (0.1X LB supplemented to the minimal medium) C: richer medium (0.5X LB supplemented to the minimal medium). Bars: from left to right, the cells harboring both plasmids, the cells harboring pKM10, the cells harboring pKM20, and The cells harboring none.

Materials and Methods. Then, the cells were spread on appropriate selection agar plates and incubated for two days at 28°C for direct counting as described in Materials and Methods. In this experiment also, the presence of specific plasmid at different growth conditions after two weeks to two months growth was examined.

When the cells were grown in rich medium (supplemented with 0.1X LB), the rapid decrease in percentage of cells harboring both plasmids from were rapidly decreasing from 58% at second week, to 26% at the first month, even to 7% at the second month were observed probably due to increased growth rate, resulting in the uneven distribution of artificially or natural transconjugated plasmid in figure 2B. The lost rate was even accelerated when the cells were grown in even richer medium (supplemented with 0.5X LB). The percent of plasmidless cells were rapidly increasing from 23% at second week to 87% at the second months. Random selection of the remaining species of plasmid was also observed in this experiment and the unstabilities of plasmids when the cells were grown in rich medium and richer medium at higher rates.

Efficiencies of the phenol degradation of *Pseudomonas* sp. KM12TC after growth for two month in the appropriate media.

Since the stabilities of the plasmid of the *Pseudomonas* sp. KM12TC grown in rich medium for two months decreased severely, the cells were tested for phenol degradation efficiency as described before. *Pseudomonas* sp. KM12TC were grown for two month in the minimal medium (0X LB supplemented), poor medium (0.01X LB supplemented), rich medium (0.1X LB supplemented), or richer medium (0.5X LB supplemented) and used for

phenol degradation efficiency.

For the control experiment, *Pseudomonas* sp. KM12TC directly grown from the fresh stock were showed to degrade 95% of phenol within 2 days as expected. But *Pseudomonas* sp. KM12TC grown for two months in poor to richer medium took longer time to degrade the similar amount of phenol. *Pseudomonas* sp. KM12TC grown in minimal medium for two months took 9 days to degrade 95% of phenol. Similar results were observed when the cells were grown in poor medium (supplemented with 0.01X LB). In fact, there was no significant difference between them. But, when the cells were grown in rich medium or richer medium, the cells took much longer time (15 to 18 days) to degrade similar amount of phenol as compared to 9 days resulting from the loss of active plasmid pKM20 which had been characterized previously. The lag characterized by low degradation efficiency of phenol was observed in case of rich and richer medium, and the lag was more prominent as the amount of supplemental LB

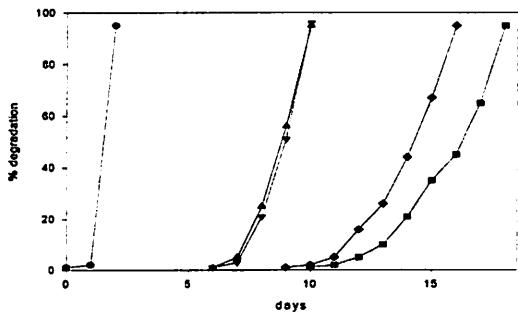


Fig. 3. Efficiencies of the phenol degradation of *Pseudomonas* sp. KM12TC after growth for two month in the appropriate media. The preparation of cells and phenol degradation efficiencies were carried out as described in Materials and Methods. Symbols: ●, control; ▲, minimal medium (0X LB supplemented); ▼, poor medium (0.01X LB supplemented); ◆, rich medium (0.1X LB supplemented); ■, richer medium (0.5X LB supplemented)

was increased (Fig. 3). The cells grown in the minimal and poor medium took longer a significantly shorter period than the cells grown in rich and richer medium. The plasmids seemed to be retained more stably when grown in poor medium.

CONCLUSIONS

When the cells were grown in minimal medium, the plasmidless population reached up to 64% after 4 weeks of growth time and even 87% after 2 months. When the cells were grown in the minimal medium supplemented with 0.01X LB, the plasmidless population reached up to 62% after 4 weeks of growth time and even 86% after 2 months. The supplementation of the 0.01X LB failed to show any significant difference in the stability of the plasmid of *Pseudomonas* sp. KM12TCs. When the cells were grown in rich medium (supplemented with 0.1X LB), the rapid decrease in percentage of cells harboring both plasmids from were rapidly decreased to 26% at the first month, even to 7% at the second month. When the cells were grown in rich medium or richer medium. The lag characterized by low degradation efficiency of phenol was observed in case of rich and richer medium, and the cells took much longer time (15 to 18 days) to degrade similar amount of phenol. For bioremediation work at cocontaminated sites, pKM20 was transconjugated from *Pseudomonas* sp. KM10 into *Pseudomonas* sp. KM20 by transconjugation. The transconjugated cells were expected to have numerous potential benefits, including the ability to be resistant to heavy metals involved in cocontaminated sites. These results suggested that the stability of the plasmid could be increased by growing the transconjugated cells in poor medium.

REFERENCES

1. Kovalick, W. 1995. Remediation technologies for US hazardous waste sites. *Chemistry & Industry*. 13: 500-513.
2. Leighton, I. R., and C. F. Foster. 1998. The effect of heavy metals on a thermophilic methanogenic upflow sludge blanket reactor. *Bioresour. Technol.* 63:131-137.
3. Yoon, K. P. 1998. Isolation and characterization of *Pseudomonas* sp. KM10, a cadmium and mercury-resistant and phenol-degrading bacterium. *J. Microbiol. Biotechnol.* 8: 388-398.
4. Ji, G., and S. Silver. 1995. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol.* 14: 61-75.
5. Hughes, M. N., and Poole, R. K. 1989 *Metals and Microorganism*, pp. 280-285, Chapman and Hall, London.
6. Bruins, M. R., S. Kapil, and F. W. Oehme. 2000. *Pseudomonas pickettii*: A Common Soil and groundwater aerobic bacteria with pathogenic and biodegradation properties. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 47: 105-111.
7. Yoon, K. P. 2002. Plasmid-mediated arsenical and antimicrobial resistance determinants (*ars*) of *Pseudomonas* sp. KM20. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 31-38.
8. Yoon, K. P. 2003. Construction and characterization of multiple heavy metal-resistant phenol-degrading pseudomonads strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 1001-1007.

동치미에서 분리한 *Leuconostoc citreum* 균주의 당 발효능에 대한 비교 연구

마지현 · 권오식 · 이삼빈¹
계명대학교 자연과학대학 미생물학과 · 식품가공학과¹

A Comparative Study of *Leuconostoc citreum* Strain Isolated from Dongchimi for Carbohydrate Fermentation

Ji-Hyun Ma, Oh-Sik Kwon, and Sam-Pin Lee*

Department of Microbiology, *Department of Food Science & Technology,
Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

요 약. 동치미에서 분리한 *Leuconostoc* 균주를 동정함에 있어서 가장 중요한 당 발효능을 조사함과 동시에 대조군으로써 type strain인 *Leuc. citreum* KCTC 3524, *Leuc. citreum* KCTC 3526 및 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505 균주들의 내염성 및 당 발효능을 비교 조사하였다. *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505는 배양 후 최종 pH가 4.5로 내염성이 강한 *Leuconostoc* 종임을 확인할 수 있었다. 하지만 이를 4가지 균주들은 모두 8% NaCl이 첨가된 배지에서는 전혀 생육하지 못하였다. *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505는 *Leuc. citreum* 균주보다 ribose와 xylose를 더 잘 이용할 수 있었다. 이를 4가지 *Leuconostoc* 균주들은 fructose, glucose, mannose는 잘 발효하였으나 rhamnose는 전혀 이용하지 못하고 있었다. 이당류 발효의 경우, *Leuc. citreum* subsp. *dongchimi* 만이 전혀 cellobiose를 발효하지 못하고 있음을 확인하였다. Lactose의 경우 테스트된 *Leuc. citreum* 3균주 모두가 이용하지 못하였지만 오직 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505만이 이용할 수 있었으며, 이와 같은 경향은 melibiose의 경우에서 더 확실하였다. 한편 테스트된 *Leuconostoc* 4균주 모두 알콜형 당을 전혀 이용하지 못하는 것으로 나타났으나 복합당인 amygdalin, esculin 및 salicin은 어느 정도 이용하는 것으로 조사되었다. 이 경우 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505만 salicin을 전혀 이용하지 못하였다.

Abstract. Four strains of *Leuconostoc* including a strain from Dongchimi were tested in order to determine their salt tolerance and ability of carbohydrate fermentation. As a result, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505 showed strong salt tolerance and grew even at the concentration of 6% NaCl although other strains were failed to grow. However, all 4 strains of *Leuconostoc* could not grow at the media containing 8% NaCl. *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505 could utilize ribose and xylose better than three *Leuc. citreum* strains tested for determining pentose fermentation. In the case of hexose fermentation test, all 4 strains of *Leuconostoc* could utilize fructose, glucose, mannose but not the rhamnose at all. From the disaccharides utilization test, only the *Leuc. citreum* strain isolated from Dongchimi failed to utilize cellobiose. All strains of *Leuc. citreum* could not ferment lactose where

the *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505 could utilize it. The tendency was more evident in the case of melibiose. It was turned out that all the strains of *Leuconostoc* including a strain from Dongchimi could not utilize alcohol-derivative carbohydrates. All three strains of *Leuc. citreum* could utilize well amygdalin, esculin and salicin as complex carbohydrates, however only the *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505 could not ferment salicin at all.

I. 서 론

유산균이란 균 생육을 위하여 에너지원으로 당류(carbohydrates)를 사용하여 유기산인 젖산을 다량으로 생산해내는 그람 양성 간균이다(1,2). 자연계에 존재하는 유산균은 그 종류가 매우 다양하며 인간에게 매우 유용한 프로바이오틱(probiotic) 균(6,7)으로 특히 동·식물의 표면에서 쉽게 발견되지만(2,3,10) 유용한 균주만을 신속하게 얻기는 쉽지 않으며 이에 대한 체계적인 분류가 되고 있지 못하다. 왜냐하면 이 균들은 다양한 서식처만큼이나 수많은 종으로 이루어지고 있는데 이들의 형태적 및 기능적 차이로 인해 크게 6개의 그룹으로 분류한다(4,5). 이들은 가장 잘 알려진 *Lactobacillus*속 이외 *Bifidobacterium*속, *Streptococcus*속, *Leuconostoc*속, *Pediococcus*속, 및 *Sporolactobacillus*속 등으로 큰 무리를 이루고 있다. 특히 이 균들은 식품에서 흔히 발견되고 또한 이용되고 있는데 그 이유는 이 균들의 존재 때문에 식품의 보존성 향상, 풍미와 영양 증진 및 건강 효과(4,5)를 위함이라고 할 수 있다. 지금까지 잘 알려진 대표적인 유산균의 유용성(5,6,7)은 장내 유해균의 억제 작용 및 정장 작용, 혈중 콜레스테롤 감소 기능, 면역 증강 작용, 영양학적 가치 증진, 간경화 개선 작용, 항암 작용, 노화억제 작용, 피부 미용 효과, 유당 불내증 격감 작용 등등 인간의 건강과 아주 밀접해 있다.

따라서 많은 유산균학자들은 이들의 유용성을 인간에게 이용하기 위하여 새로운 많은 유산균들을 분리하여 동정하고 있는 실정이다. 이에 우리는 한국인들에게 아주 필수적인 식품인 김치의 숙성 초기와 중기에 많이 발견되며(8,9) 맛과 향미를 결정하는 주요한 유산균의 일종인

*Leuconostoc*균을 분리하기 위하여 동치미의 국물에서 분리한 *Leuconostoc*균(*Leuconostoc* sp.)의 종 결정을 위하여 종 결정에 가장 유효한 당발효능을 조사함과 동시에 대조균으로써 최근 많은 분리와 동정이 보고되는 *Leuconostoc citreum*(10)의 type strain인 *Leuconostoc citreum* KCTC 3524, *Leuconostoc citreum* KCTC 3526 및 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505 균주들의 당 발효능을 비교 조사하였다.

II. 실 험

균주 분리.

동치미 국물을 멸균 종류수를 이용하여 혼탁한 후 MRS agar 배지를 이용하여 평판 배양하였으며, 일정한 수의 콜로니가 확인되면 각 균주들을 4°C 냉장고에 보관하였다. 이 콜로니를 이용하여 새로운 MRS agar 선택 배지에 도말하였으며, 얻어진 콜로니를 다시 MRS agar를 이용하여 30°C 배양기에서 1일간 *Leuconostoc*균을 배양한 다음 균 동정을 위하여 내염성 테스트와 당 발효 실험을 하였다. 얻어진 균들은 글리세롤 20% 저장용액에 혼탁하여 액체 질소를 이용하여 급속 동결시킨 후 -70°C deep freezer에 보관하여 사용하였다.

공시균주.

본 실험에서 사용한 공시균주는 *Leuconostoc citreum* KCTC 3524, *Leuconostoc citreum* KCTC 3526 및 dextran 생산균인 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505로 한국생명공학연구원(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, 대전)에서 분양받아 비

Table 1. Various *Leuconostoc* strains used in this study

Species & Strains		Sources
<i>Leuconostoc citreum</i>	dongchimi	Dongchimi
<i>Leuconostoc citreum</i>	KCTC 3524	ACTC 13146
<i>Leuconostoc citreum</i>	KCTC 3526	honeydew of rye ear
<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i>	KCTC 3505	fermenting olive

교하였다. 특히 본 실험에서는 분리된 *Leuconostoc citreum* 균주와 이미 균주의 통정이 이루어진 *Leuconostoc citreum* 2균주간의 중간의 비교를 위하여 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505와도 함께 조사하였다. 분양 받은 균주들은 계대배양 후 glycerol이 20% 포함된 저장액에 넣어 냉동고에 보관하여 사용하였다. 한편 이 균주들의 출처는 Table 1과 같다.

내염성 테스트.

공시 유산균들의 내염성을 조사하기 위하여 MRS(Difco)를 사용한 액체배지를 제조하였다. 배지의 조성은 MRS 5.58 g에 각각 2 g, 4 g, 6 g, 및 8 g의 NaCl을 첨가하여 100 ml의 2차 중류 수에 녹여 가압 멸균 후 15 ml 원심분리관(Corning)에 분주하여 가압 멸균하여 사용하였다.

당 발효 테스트.

공시균들의 복잡한 당 이용 특성을 조사하기 위하여 포도당이 들어가지 않는 MRS 배지(Table 2)를 제조한 후, 여러 가지 당(10% 용액)을 각각 첨가하여 가압 멸균하여 사용하였다. 이 실험에 사용된 당의 종류는 모두 25종(Sigma사 제품)으로 다음과 같다: amygdalin(Amy), D-arabinose(AraD), L-arabinose(AraL), cellobiose(Cel), esculin(Esc), fructose(Fru), galactose(Gal), gluconic acid(Glc), glucose(Glu), lactose(Lac), maltose(Mal), mannitol(Mant), mannose(Mann), melezitose(Mele), melibiose(Meli), raffinose(Raf), rhamnose(Rha), ribose(Rib), saccharin(Sac), salicin(Sal), sorbitol(Sorb), sucrose(Suc), trehalose(Tre), xylitol(Xylt), xylose(Xyl).

Table 2. Constitution of MRS media without any

carbohydrates	
Ingredients	Weight
Polypeptone	10 g
Beef extract	10 g
Yeast extract	5 g
Ammonium citrate	2 g
Sodium acetate	5 g
Magnesium sulfate	0.1 g
Manganese sulfate	0.05 g
Dipotassium phosphate	2 g
Tween 80	1 ml/l

III. 결과 및 고찰

내염성 테스트.

유산균들은 비교적 내염성이 강한 세균으로 알려져 있기 때문에 본 실험에서 테스트한 김치 등의 발효 식품에서 유래된 4종의 유산균들이 어느 정도의 염분 농도에서 생육 가능 한지를 알아보기 위하여 배양 배지(액체)에 NaCl을 2%에서 8%의 농도로 NaCl을 첨가하여 salt tolerance를 비교해 보았다. 그 결과 테스트된 *Leuconostoc*의 대부분이 2% 및 4%의 NaCl이 첨가된 배지에서는 이들의 최종 생육 pH가 4.5 이하로 잘 자랄 수 있음을 알 수 있었다(Fig. 1). 하지만 6%의 NaCl이 첨가된 배지에서 배양하는 경우, 이들 4 가지 균주들(시험균이 포함된)은 큰 차이를 보여 주고 있었다. 즉, *Leuconostoc citreum* KCTC 3524는 최종 pH가 5.6으로 균 생육이 거의 불가능할 정도로 저해되고 있었으며, *Leuconostoc citreum* KCTC 3526과 동치미에서 분리한 시험 균주(이하 *Leuconostoc citreum* subsp. *dongchimi*)는 비슷하였다. 이는 *Leuconostoc citreum* KCTC 3526과 *Leuconostoc citreum* subsp. *dongchimi*가 유사한 균주임을 시사하는 것으로 사료된다. 한편 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505는 배양 후 최종 pH가 4.5로 가장

내염성이 강한 *Leuconostoc* 종임을 확인할 수 있었다. 하지만 이들 4가지 균주들은 모두 8% NaCl이 첨가된 배지에서는 전혀 생육하지 못함을 알 수 있었다.

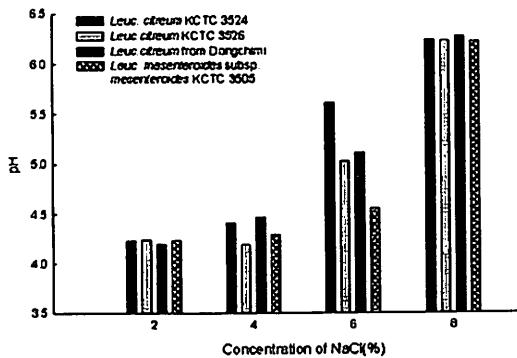


Fig. 1. Comparison of the tested *Leuconostoc* strains growing at different NaCl concentrations (2%, 4%, 6% and 8%). In this case, the increasing pH values indicate growth inhibition occurred by added NaCl.

5탄당 발효.

이들 균주가 5탄당을 발효하는 정도를 알아보기 위하여 D-arabinose, L-arabinose, ribose 및 xylose 등을 Table 2에 나타난 배지 조성에 첨가하여 균들을 배양하였다. 그 결과 네 균주 모두 D-form의 arabinose는 최종 산도가 6.0 이상으로 전혀 이용하지 못하는 것임을 보여주었다(Fig. 2). 하지만 L-form의 arabinose는 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505를 제외하고는 비교적 잘 이용하는 것으로 드러났다. 그러나 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505는 당 발효능의 비교에 있어 세 가지 *Leuconostoc citreum*보다 더 ribose와 xylose를 잘 이용하여 생육할 수 있는 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 이들이 같은 *Leuconostoc* 균이라도 종이 다르기 때문이라고 사료된다. 한편 분리된 *Leuconostoc citreum* subsp. *dongchimi*는 type strain으로 테스트된 다른 *Leuconostoc citreum* 균주들보다 xylose의 이용 능력이 우수한 것으로 판명되었다.

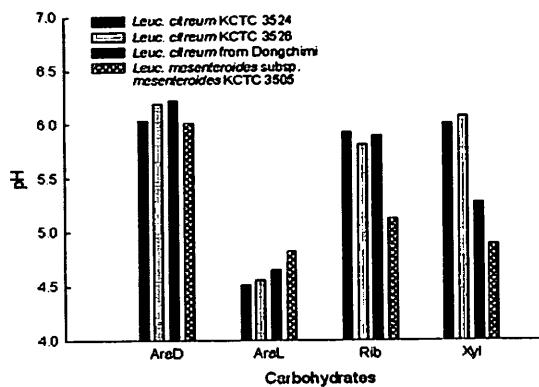


Fig. 2. Pentoses fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: AraD as (D)-arabinose, AraL as (L)-arabinose, Rib as ribose and Xyl as xylose.

6탄당 발효.

6탄당은 대부분의 유산균이 잘 이용하는 glucose(포도당, Glu)을 포함하고 있으며 본 실험에서는 포도당 이외에 fructose(과당, Fru), galactose(Gal), mannose(Mann) 및 rhamnose(Rha)를 이용하여 이를 균주 간의 당 발효능의 차이를 비교 조사하여 보았다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 것처럼, 이들 균주들은 6탄당 발효에 있어서 거의 유사한 패턴을 보여 주었다. 즉 이들 4가지 *Leuconostoc* 균주들은 fructose, glucose, mannose는 잘 이용할 수 있음을 보여 주었으나 (최종 pH가 5.0 이하), 또한 이들 균주들은 rhamnose를 전혀 이용하지 못하고 있었다(최종 pH가 6.0 이상). 이는 *Leuconostoc*에 속하는 유산균의 공통적인 당 발효 특성으로 사료된다. 하지만 galactose의 발효능에 있어서는 Fig. 3에서 보는 것처럼 *Leuconostoc citreum* KCTC 3526은 전혀 이용하지 못하고 있었으며, 오직 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505만이 잘 이용하고 있었다. 이는 *Leuconostoc citreum* subsp. *dongchimi*가 *Leuconostoc citreum* KCTC 3524와도 유사한 성질이 있음을 알려주는 것이 아닌가 하였다. 즉 위 두 가지 실험(5탄당 발효와 6탄당 발효)을 살펴보면 *Leuconostoc citreum* subsp. *dongchimi*는 *Leuconostoc citreum* KCTC 3526이나 *Leuconostoc citreum* KCTC 3524와 다른 균주임을 알 수 있었다.

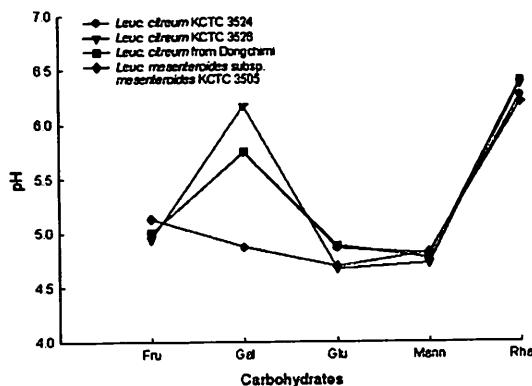


Fig. 3. Hexoses fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Fru(fructose), Gal(galactose), Glu(glucose), Mann(mannose) and Rha(rhamnose).

이당류 발효.

이러한 결과는 6탄당이 2개 결합된 이당류를 이용한 발효 실험(Fig. 4)에서 잘 나타났다. 두 개의 글루코스가 glucose- $\beta(1\rightarrow4)$ -glucose로 결합된 cellobiose의 발효에 있어서 *Leuconostoc citreum* KCTC 3526이나 *Leuconostoc citreum* KCTC 3524는 cellobiose(Cel)를 발효하고 있었으나(최종 pH 5.0 이하), 오직 동치미에서 분리된 *Leuconostoc citreum* subsp. *dongchimi* 만이 전혀 cellobiose를 발효하지 못하고 있음을 확인하였다(최종 pH 6.0 이상). Lactose[galactose- $\beta(1\rightarrow4)$ -glucose]의 경우 테스트된 *Leuconostoc citreum* 3균주 모두가 이용하지 못하였지만 오직 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505만이 이용할 수 있었으며, 이와 같은 경향은 melibiose[galactose- $\beta(1\rightarrow6)$ -glucose]의 경우에서 더 확실하였다. 이런 결과를 보면 *Leuconostoc mesenteroides* 종은 β -O-glucosidic bond를 분해하는 효소가 있는 것이 아닌가 생각된다. 반대로 *Leuconostoc citreum*은 β -O-glucosidic bond를 분해할 수 없는 종으로 판명되었다. 이로써 *Leuconostoc* 종간의 구별은 이러한 이당류의 발효 특성을 비교함으로써 확연히 구별할 수 있었다. 한편 테스트된 4종의 *Leuconostoc* 균주들은 maltose[glucose- $\alpha(1\rightarrow4)$ -glucose], sucrose[glucose- $\alpha(1\rightarrow2)$ -fructose], trehalose[glucose- $\alpha(1\rightarrow$

$1)$ -glucose] 등의 이당류를 잘 이용하고 있었으며, 이들 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505은 모두 α -O-glycosidic bond를 분해하는 효소를 갖고 있는 것으로 사료되었다. 따라서 이러한 결과를 종합해 볼 때 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505는 사용된 모든 종류의 이당류를 잘 발효하는 것으로 보아서 이 균주는 α -O-glycosidic bond를 분해하는 효소와 β -O-glucosidic bond를 분해할 수 있는 효소를 동시에 갖고 있는 것으로 판명된다.

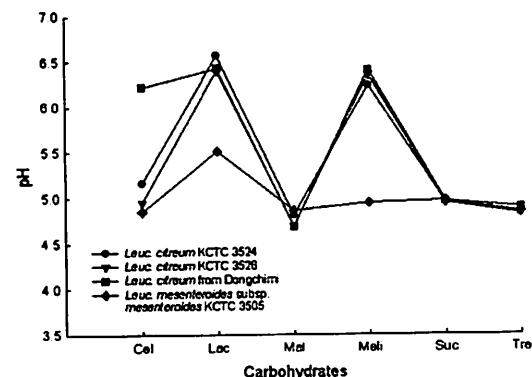


Fig. 4. Disaccharides fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Cel(cellobiose), Lac(lactose), Mal(maltose), Meli(melibiose), Suc(sucrose), and Tre(trehalose).

삼당류 발효.

3개의 단당류가 결합된 삼당류의 이용을 살펴보면(Fig. 5), 모든 균주는 glucose- $\beta(1\rightarrow3)$ -fructose- $\alpha(1\rightarrow2)$ -glucose로 결합된 melezitose(Mele)를 이용하지 못했으며, fructose- $\alpha(1\rightarrow6)$ -galactose- $\beta(1\rightarrow6)$ -glucose로 구성된 raffinose(Raf) 역시 이용하지 못하였다. 단지 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505만 어느 정도 raffinose를 이용할 수 있었다(최종 pH 4.9). 이러한 결과는 역시 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505는 α -O-glycosidic bond를 분해하는 효소와 β -O-glucosidic bond를 분해할 수 있는 효소를 동시에 갖고 있기 때문으로 사료되었다.

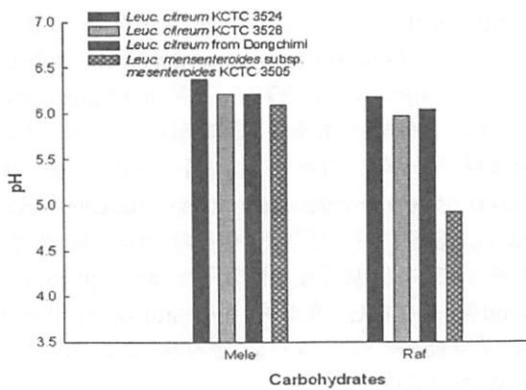


Fig. 5. Trisaccharides fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Mele(melezitose) and Raf(raffinose). t1673611

복합당 및 변형당 발효.

기타 발효능을 비교하기 위하여 사용된 당의 종류는 고리형 구조를 갖는 복합당인 amygdalin (Amy), esculin(Esc), saccharin(Sac), salicin(Sal), 글루코오스의 6번째 탄소가 카르복실기로 변형된 gluconic acid(Glc), 그리고 알콜형 당인 mannitol (Mant), sorbitol(Sorb), xylitol(Xylt) 등으로 분류된다. 전반적으로 살펴보면 테스트된 *Leuconostoc* 4균주(*Leuconostoc citreum* KCTC 3524, *Leuconostoc citreum* KCTC 3526, *Leuconostoc*

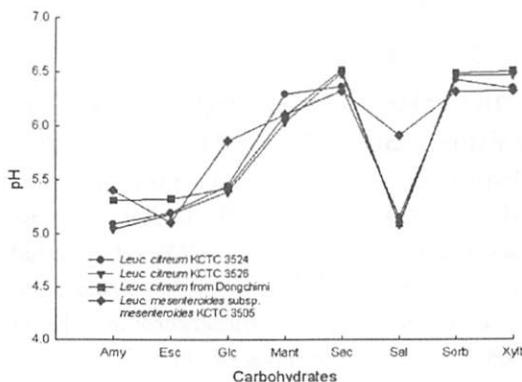


Fig. 6. Complex carbohydrates fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Amy (amygdalin), Esc(esculin), Glc(gluconic acid), Mant(mannitol), Sac(saccharin), Sal(salicin), Sorb(sorbitol), and Xylt(xylitol).

citreum subsp. *dongchimi*, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505) 모두 알콜형 당을 전혀 이용하지 못하는 것으로 나타났으나(최종 pH 6.0 이상) 글루코오스를 포함하는 복합당(amygdalin, esculin, salicin)은 어느 정도 이용하는 것으로 조사되었다(Fig. 6). 이 경우 유독 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505만 폐들이 글루코오스에 결합된 salicin(Sal)을 전혀 이용하지 못함을 확인할 수 있었다.

참고문헌

1. 강국희. 1990. 유산균 식품학. 성균관대학교 출판부. 서울.
2. 권오식, 이삼빈. 2004. 여러 가지 *Lactobacillus* 균주들의 생리적 및 생화학적 특성 조사(1). *J. Inst. Nat. Sci.* 22: 35-42.
3. 김유진, 윤경표, 권오식. 2005. 유산균 *Lactobacillus plantarum* 아종의 특성에 관한 연구. *J. Inst. Nat. Sci.* 24: 59-65.
4. 백영진, 김종만, 임억규. 1993. 유기산 생산균 이용현황과 전망. 생물산업. 6: 23-25.
5. 정명준. 1997. 유산균의 산업적 응용. 생물산업. 10: 13-21.
6. 정후길. 2001. 프로바이오틱 유산균의 선발기준 및 산업적 응용. 생물산업. 14: 39-48.
7. 차성관. 2000. 프로바이오틱 미생물과 유산균 식품. 미생물과 산업. 26: 13-21.
8. 최신양, 정병문, 김현정, 성승희, 김왕준, 박완수. 2000. 김치 유래 젖산균의 세포의 효소활성의 측정. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 59-61.
9. Choi, I. K., S. H. Jung, B. J. Kim, S. Y. Park, J. Kim, and H. U. Han. 2003. Novel *Leuconostoc citreum* starter culture system for the fermentation of kimch, a fermented cabbage product. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 84: 247-253.
10. Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 377-381.

부 록

2005학년도 자연과학연구소
소속교수의 논문투고업적



Available online at www.sciencedirect.com

SCIENCE @ DIRECT®

Chemical Physics Letters 411 (2005) 297–301

CHEMICAL
PHYSICS
LETTERS

www.elsevier.com/locate/cplett

Ground and excited states of Al_2O_2 and its anion

Majher Ibna Mannan Sarker ^a, Chang-Seop Lee ^b, Cheol Ho Choi ^{a,*}

^a Department of Chemistry, College of Natural Sciences, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea

^b Department of Chemistry, Keimyung University, Taegu 704-701, Korea

Received 9 January 2005; in final form 25 May 2005

Available online 5 July 2005

Abstract

CASSCF, MRMP2, MR-CISD, CCSD(T) and CR-CCSD(T) theories were adopted to study the isomers of Al_2O_2 and its anion. CR-CCSD(T) and MR-CISD consistently indicate that the linear isomer **2** is the ground state, which is consistent with matrix isolation experiments. All three peaks at 1.88, 2.37 and 5.1 eV in the photoelectron spectra can be readily assigned as $^2\text{B}_{3u} \rightarrow ^1\text{A}_g$, $^2\text{B}_{3u} \rightarrow ^3\text{B}_{3u}$ and $^2\text{B}_{3u} \rightarrow ^1\text{B}_{3u}$ of isomer **1**, respectively indicating that the electronic states of isomer **1** are in better agreements with the photoelectron detachment spectra. These contradicting results may imply that the major isomer of Al_2O_2 can depend on the experimental conditions.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

As a prototype of alumina, small aluminum oxide particles are of great importance, since they can provide a good testing ground that can allow a better understanding of basic chemical nature for the more complex systems. In spite of the simplicity of these small particles, however, there has been a controversy over the ground state structures of Al_2O_2 in particular. Density functional theories (DFT), MP2 and CCSD(T) theories consistently predicted that the D_{2h} structure (**1**) is the ground state followed by the C_{coh} structure (**2**) [1,2]. While most matrix isolation studies [3–5] prefers **2**, the anion photoelectron spectroscopy study [6] of Al_2O_2^- strongly suggested the rhombic $^1\text{A}_g$ (**1**) as the ground state of the Al_2O_2 . Three peaks at 1.88, 2.37 and 5.1 eV were observed in the photoelectron spectra. They were assigned as the binding energies from the $^2\text{B}_{3u}$ (Al_2O_2^-) ground state to $^1\text{A}_g$, $^3\text{B}_{3u}$ and $^3\text{B}_{3u}$ (Al_2O_2) states of **1** [6]. CCSD(T) results by Archibong and St-Amant [2] further supported the first two peak

assignments. But no theoretical attempt was made to assign the experimental peak at 5.1 eV.

These photoelectron experiment and the theoretical results consistently suggest that the singlet-triplet separation of D_{2h} structure of Al_2O_2 is about 0.49 eV. This indicates that the D_{2h} (**1**) isomer may possess multi-configurational character requiring multi-configurational treatment. Furthermore, more detailed information of the excited states is helpful to better analyze the experimental data.

In this Letter, we adopted CASSCF (complete active space SCF) [7–11] and MRMP2 (multi-reference MP2) [12,13], MR-CISD (multi-reference configuration interaction with single and double excitations) [14], CCSD(T) and CR-CCSD(T) (completely renormalized CCSD(T)) [15] to better understand the chemical nature of the ground and the excited states of Al_2O_2 and its anion.

2. Computational details

The active space for the CASSCF calculations are composed of all 2p electrons and orbitals of O atoms,

* Corresponding author. Fax: +82 53 950 6330.
E-mail address: cchoi@knu.ac.kr (C.H. Choi).

부 록

大韓環境工學會誌 · 논문 · pp. 249 ~ 256. 2006.

톨루엔 분해를 위한 구리-망간 산화물 촉매의 제조방법에 따른 활성 비교

김혜진 · 최성우[†] · 이창섭*

제명대학교 환경과학과 · *제명대학교 화학과

(2005년 11월 2일 접수, 2006년 2월 16일 채택)

Activity Comparison According to Prepared Method of Cu-Mn Oxide Catalyst for Toluene Combustion

Hye-Jin Kim · Sung-Woo Choi[†] · Chang-Seop Lee*

Department of Environment Science, Keimyung University · *Department of chemistry, Keimyung University

ABSTRACT : Catalytic combustion of toluene was investigated on the Cu-Mn oxide catalysts prepared by the impregnation(Imp) and the deposition-precipitation(DP) methods. The mixing of copper and manganese has been found to enhance the activity of catalysts. It is then found that catalytic efficiency of the Cu-Mn oxide catalyst prepared by the DP method on combustion of toluene is much higher than that of the Cu-Mn oxide catalyst prepared by Imp method with the same chemical composition. The catalyst prepared by the deposition-precipitation method observed no change of toluene conversion at time on stream during 10 days and at the addition of water vapor. On the basis of catalyst characterization data, it has been suggested that the catalysts prepared by the DP method showed uniform distribution and smaller particle size on the surface of catalyst and then enhanced reduction capability of catalysts. Therefore, we think that the DP method leads on progressive capacity of catalyst and promotes stability of catalyst. It was also presumed that catalytic conversion of toluene on the Cu-Mn oxide catalyst depends on redox reaction and $Cu_{1.5}Mn_{1.5}O_4$ spinel phase acts as the major active sites of catalyst.

Key Words : Catalyst, Toluene, Copper, Manganese

요약 : 합침법과 침적침전법으로 Cu-Mn 산화물을 제조하여 톨루엔 분해 반응을 조사하였다. 구리와 망간이 혼합됨으로써 촉매활성을 증진 시킬 수 있음을 확인할 수 있었다. 또한 같은 화학적 조성으로 제조된 합침법보다 침적침전법에 의해 제조된 Cu-Mn 산화물 촉매에서 톨루엔 분해 반응 활성이 더 뛰어났다. 침적침전법에 의해 제조된 촉매는 10일간의 장기 분석과 수분 첨가에 의한 톨루엔 분해 효율에 변화가 없었다. 촉매 특성 분석 결과에 기초하여 보면, 침적침전법은 촉매의 표면에 균일한 분산과 작은 크기의 입자를 제공하며 환원 능력을 증진시키는 것으로 판단된다. 따라서 침적침전법은 촉매의 성능을 향상 시키고 촉매의 안정성을 증진시키는 것으로 생각된다. 또한 Cu-Mn 산화물 촉매에서 톨루엔 분해 반응은 산화환원 반응에 의존하며 $Cu_{1.5}Mn_{1.5}O_4$ 스피넬 구조가 주요한 촉매 활성점으로 작용하는 것으로 추측된다.

주제어 : 촉매, 톨루엔, 구리, 망간

1. 서 론

휘발성 유기 화합물(VOC)은 광화학 스모그 생성에 관여하며, 또한 부유입자상물질에도 영향을 미치므로 VOC 삭감문제가 크게 요구되고 있다. VOC발생원 중 이동 발생원의 비율은 10% 정도이며 고정발생원의 비율은 90%를 차지하는 것으로 추정하고 있다. 고정발생원 중에는 용제를 사용하는 시설의 배출이 압도적으로 많아서 70%를 점한다. 업종별로는 도장이 43%, 인쇄 13%, 금유소 8%, 석유화학제품 5%, 트라이크리닝 5%로 도장, 산업에서 발생하는 VOC 삭감 대책이 필요하다.¹⁾ 도장, 인쇄 공정 등에서 배출되는 성분 중

톨루엔의 비율이 60~90%를 차지한다.²⁾ VOC 처리에 효과적인 제거기술로는 활성탄 흡착법, 직접연소법, 촉매연소법, 측열식 연소법, 생물학적 처리법이 있는데 그중 촉매 연소법은 연소로의 온도를 저온으로 설정할 수 있어 연료사용량을 줄일 수 있다는 특징을 갖는다.³⁾ VOC 연소에 주로 사용되는 촉매는 Pt, Pd, Rh 등의 귀금속 촉매^{4,5)}와 Cu, Mn, Ni, Cr 등의 전이금속 산화물 촉매,^{6,7)} perovskite 산화물^{8,9)} 등이 있다. 귀금속 촉매는 활성이 뛰어난 반면 고비용을 초래하므로 최근 들어 전이금속을 이용한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히 알루미나에 합침 시킨 Cu는 활성이 뛰어난 전이금속 촉매로 Kim¹⁰⁾과 Wang¹¹⁾에 의해 보고되었는데 360°C에서 톨루엔 완전 산화가 이루어진 것으로 발표되었다. Mn 또한 활성이 우수한 촉매로 알려져 Alvarez-Galvan¹²⁾에 의해 230°C에서 포름알데히드를 완전 연소하였음이 보고되었다. VOC를 처리하기 위한 대부분의 연구들이 합침법과 침전법으로 촉매

* Corresponding author
E-mail: swchoi@kmu.ac.kr
Tel: 053-580-5245

Fax: 053-580-5385

한국대기환경학회지 제 22 권 제 3 호
J. KOSAE Vol. 22, No. 3 (2006) pp. 373 ~ 381
Journal of Korean Society for Atmospheric Environment

침적침전법에 의해 제조된 Cu-Mn 촉매의 활성 및 특성

Activity and Characteristics of Cu-Mn Oxide Catalyst Prepared by the Deposition-Precipitation Method

김 혜 진 · 최 성 우 · 이 창 섭^{1),*}

계명대학교 환경과학과 · ¹⁾화학과

(2005년 2월 3일 접수, 2006년 4월 20일 채택)

Hye-jin Kim, Sung-woo Choi and Chang-Seop Lee^{1),*}

Department of Environment Science, ¹⁾Department of Chemistry Keimyung University

(Received 3 February 2005, accepted 20 April 2006)

Abstract

The catalytic combustion of toluene was investigated on the Cu-Mn oxide catalysts prepared by the deposition-precipitation method. Experiment of toluene combustion was performed with a fixed bed flow reactor in the temperature range of 100~280°C. Among the catalysts, 1.29Cu/Mn showed the most activity at 260°C. The deposition-precipitation method may be showed the potential to enhance the activity of catalysts. The catalysts were characterized by BET, scanning electron microscopy (SEM), temperature-programmed reduction (TPR), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and X-ray diffraction (XRD) techniques. On the basis of catalyst characterization data, the results showed that the surface of catalysts by deposition-precipitation method had uniform distribution and smaller particle size, which enhanced the reduction capability of catalysts. The XRD results showed that Cu_{1.5}Mn_{1.5}O₄ spinel phase was made by deposition-precipitation method, and increased catalyst activity and redox characteristic. It was assumed that the reduction step of Cu_{1.5}Mn_{1.5}O₄ spinel phase progressed Cu_{1.5}Mn_{1.5}O₄ to CuMnO₂, and Cu₂O to CuMn₂O₄ and Cu.

Key words : Toluene, Catalyst, Combustion, Cu_{1.5}Mn_{1.5}O₄, TPR

1. 서 론

휘발성 유기화합물(VOC)은 페인트를 회색할 때 사용하는 용제, 접착제, 잉크 등에 널리 사용되고 있으며 대기 중에 연간 약 185만톤이 배출되고 있다. VOC는 1960년대부터 광화학 옥시던트의 원인물질

로 알려져 왔는데 최근에는 부유입자상물질(SPM)의 원인물질이라는 사실까지 밝혀지면서 SPM, NOx, SOx와 함께 4대 대기오염물질의 하나로서 VOC배출억제는 대기오염방지행정에 있어 심각한 과제로 남아 있다(편집부, 2004). VOC처리에 효과적인 방법으로는 활성탄 흡착법, 연소처리법, 생물탈취법 등이 있으며 그중 촉매연소법은 연소로의 온도를 낮게 설정할 수 있어 연료 사용량을 줄일 수 있다는 것이 특징이다(편집부, 2004). 촉매 연소법에 주로 이용되

*Corresponding author.
Tel : +82-(0)53-580-5192, E-mail : surfkm@kmu.ac.kr

γ -Al₂O₃에 담지된 Cu-Mn 산화물 촉매의 활성 및 특성김혜진[†] · 최성우 · 이창섭*

계명대학교 환경과학과, *화학과
 704-701 대구시 달서구 신당동 1000
 (2005년 9월 29일 접수, 2006년 3월 27일 채택)

Activity and Characteristics of Cu-Mn Oxide Catalysts Supported on γ -Al₂O₃Hye-jin Kim[†], Sung-Woo Choi and Chang-Seop Lee*

Department of Environmental Science, *Department of Chemistry, Keimyung University,
 1000, Shindang-dong, Dalseo-gu, Daegu 704-701, Korea
 (Received 29 September 2005; accepted 27 March 2006)

요 약

γ -Al₂O₃에 담지한 Cu-Mn 산화물 촉매에서 톨루엔 완전산화 반응은 160~280 °C의 온도 범위에서 고정층 반응기로 조사하였다. BET, SEM, TPR, TPO, XPS 및 XRD를 이용하여 촉매 특성분석을 하였다. 톨루엔의 완전산화 반응은 280 °C 이하에서 이루어졌으며, 적절한 Cu-Mn 담지량은 15.0 wt%Cu-10.0 wt%Mn인 것으로 나타났다. TPR/TPO 및 XPS 분석 결과, 15 Cu-10 Mn 촉매의 산화환원 봉우리가 낮은 온도로 이동하였으며 전합에너지가 높은 값으로 이동하였다. XRD 결과, 고분산된 Mn 산화물과 CuO 보다 Cu_{1.5}Mn_{1.5}O₄의 촉매활성 인자로서의 역할이 더욱 우수한 것으로 추측되며, 촉매의 활성은 촉매의 산화환원 능력과 촉매의 높은 산화 상태에 기인하는 것으로 사료된다.

Abstract – The catalytic oxidation of toluene over γ -Al₂O₃ supported copper-manganese oxide catalysts in the temperature range of 160–280 °C was investigated by employing a fixed bed flow reactor. The catalysts were characterized by BET, scanning electron microscopy (SEM), temperature-programmed reduction(TPR), temperature-programmed oxidation(TPO), X-ray photoelectron spectroscopy (XPS) and X-ray diffraction(XRD) techniques. Catalytic oxidation of toluene was achieved at the below 280 °C, and the optimal content of copper and manganese in the catalyst was found to be 15.0 wt%Cu-10.0 wt%Mn. From the TPR/TPO and XPS results, the redox peak of 15 Cu-10 Mn catalyst shifted to the lower temperature, and the binding energy was shifted to the higher binding energy. Furthermore, It is considered that Cu_{1.5}Mn_{1.5}O₄ is superior to Mn oxides and CuO in the role as active factor of catalysts from the XRD results and also catalytic activities are dependent on the redox ability and high oxidation state of catalysts.

Key words: Toluene, Copper, Manganese, Cu_{1.5}Mn_{1.5}O₄, Catalytic Oxidation

1. 서 론

휘발성 유기화합물(volatile organic compounds, VOC)은 페인트를 회색할 때 사용하는 용제, 접착제, 잉크 등에 널리 사용되는 물질로서 광화학 육시언트(photo chemical oxidants)의 원인 물질로 알려져 왔다. 최근에는 부유 입자상 물질의 원인물질이라는 사실이 밝혀지면서 VOC 배출억제는 점점 강화되는 추세에 있다. VOC 배출은 용제를 중심으로 한 고정 배출원에서의 배출이 72%를 차지하는 것으로 조사되어 배출억제 정책들이 다각도로 추진되고 있다[1]. VOC 제어 방법에는 흡착법, 흡수법, 용축법, 연소법, 촉매 산화법 등이 있는데, 이 중에서 특히 촉매 연소법은 저 농도, 낮은 유량의 가스를 처리하기에 적합한 것으로 알려져 있으며 저온에서 운영될

수 있어, 에너지 효율이 높은 제어 기술로 관심을 끌고 있다[2]. 일반적으로 VOC를 처리하기 위한 촉매로는 귀금속계 촉매와 전이금속계 촉매가 있다. 귀금속계 촉매로는 담지 Pt, Pd 촉매가 있으며 이들 촉매계는 특히 낮은 반응온도에서 높은 촉매활성을 나타낼 뿐만 아니라 배기스에 포함된 황 및 염소계 화합물 등 촉매 파독물질에 대한 내구성이 높기 때문에 상용으로 많이 사용되고 있다 [3, 4]. 그러나 이러한 귀금속계 촉매의 단점은 촉매 제조비용이 많이 들어가 고가인 것을 들 수 있다. 최근에는 저가이면서 촉매 활성이 높은 전이금속계 촉매의 개발 및 그 제조법에 대한 관심이 높아지고 있다. 특히 이들 전이금속 촉매 중에서 복합금속산화물계 촉매에 대한 연구가 활발히 진행되고 있는데, 그 중 Cu와 Mn은 VOC 제거 활성이 뛰어난 금속산화물계 촉매로, 관심의 대상이 되고 있다. Li 등[5]의 reverse microemulsion 법에 의해 제조된 금속 산화물계 촉매의 경우, 220–280 °C 범위에서 98%의 톨루엔 제거 효율

[†]To whom correspondence should be addressed.
 E-mail: hjkim6529@kmu.ac.kr

Oleamide 및 아라미드 칩을 첨가한 NBR 고무재료의 내소음성 및 물성 연구

김 현 뮤[†] · 이 창 섭

계명대학교 자연대 화학과

(2005년 8월 26일 접수, 2006년 2월 22일 수정 및 채택)

A Study on Noise Resistance and Physical Properties of NBR Rubber Materials Containing Oleamide and Aramid Chip

Hyun Muk Kim[†] and Chang-Seop Lee

Department of Chemistry, Keimyung University

1000 Shindang-Dong, Dalseo-Gu, Daegu, 704-701 Korea

(Received August 26, 2005, Revised & Accepted February 22, 2006)

요 약 : 내소음성과 내균열성을 가진 고무재료의 개발을 목적으로 NBR에 oleamide와 아라미드를 첨가하여 함량에 따른 가황특성, 물리적 성질, 내열성, 내유성, 내마모성, 내균열성 및 내소음성을 조사하였다. 가황특성과 Mooney 점도률 측정한 결과, 미가황고무의 가황특성은 oleamide의 양이 증가할수록 torque가 감소하였다. oleamide의 함량이 3 phr까지 증가함에 따라 경도 및 모듈러스 값은 조금씩 감소하였고 신장률은 감소하는 경향을 나타내었으며 인장강도는 거의 변화가 없었다. 내열성 시험(70시간, 120°C) 및 내유성 시험(70시간, 40°C)을 수행한 결과, 인장강도와 신장률이 모두 감소하였으며, TGA/DSC 분석 결과 첨가제에 따른 배합고무재료의 열적 특성은 변화가 없었다. 기본물성, 내마모성, 내소음성 및 내균열성을 종합한 결과, NBR 227001 고무재료에서 내마모성과 내소음성에 대한 oleamide의 최적배합비는 3 phr였으며, 내균열성에 대한 아라미드의 최적배합비는 1 phr로 나타났다.

ABSTRACT : This study are conducted for the purpose of developing rubber material with noise and crack resistance. Cure characteristics, physical properties, thermal resistance, fuel resistance, abrasion resistance, crack resistance and noise resistance of NBR compounds with the various amounts of oleamide and aramid chip were investigated. From the measurements of cure characteristics and Mooney viscosities, cure characteristics of uncured rubber showed that a torque was decreased as the amount of oleamide increased. Hardness, modulus and elongation of rubber specimens tended to be reduced gradually, however, tensile strength remained unchanged as the amount of the oleamide increased. As a testing results of heat resistance for 70 hours at 120°C and oil resistance for 70 hours at 40°C, tensile strength and elongation were all reduced. From the TGA/DSC analysis, there was no such a change observed in thermal characteristics of rubber materials. As a result of testing basic physical properties, abrasion resistance, noise resistance and crack resistance, the optimum ratio of oleamide to NBR was found to be 3 phr, while that of aramid to NBR 227001 was 1 phr.

Keywords : noise resistance, crack resistance, NBR, oleamide, aramid

[†] 대표저자(e-mail : wiseman1236@kmu.ac.kr)

부 록

Elastomer

Vol. 41, No. 2, pp 88~96 (2006)

NR 발포를 사용한 자기 밀폐형 고무 재료의 연구

김 도 현[†] · 김 현 륙 · 이 창 섭 · 안 원 술* · 김 준 형**
계명대학교 화학과, *화학공학과, **화승 R&A(주) 기술연구소
(2005년 11월 14일 접수, 2006년 6월 14일 수정 및 채택)

A Study of Self-Sealing Rubber Material Using Foamed Natural Rubber

Do-Hyun Kim[†], Hyun-Mook Kim, Chang-Seop Lee,
Won-Sool Ahn*, Joon-Hyung Kim**

Department of Chemistry, *Department of Chemical Engineering, Keimyung University
**R&D Center, HS R&A Co., Ltd.

(Received November 14, 2005, Revised & Accepted June 14, 2006)

요약 : 본 연구에서는 연료 누출 시 자기 밀폐성을 갖는 연료 탱크에 사용할 수 있는 고무재료의 개발을 목적으로 발포천연고무에 카본블랙과 가공유를 10~30 phr 범위에서 혼련하여 함량에 따른 발포고무의 가황 특성, 밀도, 팽윤실험 및 표면형상을 조사하였다. 미가황 고무의 가황 특성은 가공유에 의해 t_{50} 과 T_{c0} 이 느려졌으나 카본블랙에 의해서는 뚜렷한 경향이 나타나지 않았다. 발포에 의한 밀도의 차는 가황 전과 비교해 1/5로 밀도가 감소하였다. 발포천연고무의 팽윤실험 측정 결과, 연료 C, 이소옥탄, 톨루엔에서는 2분 이내에 모든 발포고무에서 자기 밀폐작용의 90% 이상이 완료되었다. 전자주사현미경(SEM)으로 표면형상을 관찰한 결과 sodium bicarbonate에 의한 발포는 비균등한 연속 발포 셀로 나타났다.

ABSTRACT : The self-sealing rubber material for a fuel cell which has self-sealing ability, in case of fuel leakage, was studied. Cure characteristics, density, swelling, and surface morphology of foamed natural rubber were investigated with carbon black and with processing oil within the range of 10~30 phr. The rheological properties indicated that the value of t_{50} and the value of T_{c0} were increased with increasing a content of processing oil, while carbon black did not show a similar trend. A difference in density by foaming was decreased to one fifth scale compared to the initial value. According to the swelling test of foamed natural rubber in fuel C, isoocetane and toluene, all the self-sealing action was finished in two minutes. From the SEM image for the surface of rubber compounding, a foaming by sodium bicarbonate was found to be unequal and consecutive foaming cell.

Keywords : NR, foamed rubber, self sealing, swelling, fuel tank.

[†] 대표저자(e-mail : orga-chem@hanmail.net)

한국생물공학회지 제21권 제3호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 21, No. 3, 199-202(2006)

정상 및 암 세포주에서의 5-aminolevulinic acid에 의해 유도된 Protoporphyrin IX의 형광 검출을 위한 In Vitro 연구

김명화 · ¹김현정 · ¹이인선 · ²김경찬 · [†]이창섭
계명대학교 화학과, ¹전통미생물자원개발 및 산업화연구센터, ²디지털물리학과
(점수 : 거제승인 :)

In Vitro Study of Fluorescence Detection for Protoporphyrin IX induced from 5-aminolevulinic acid in Cancerous and Normal Cells

Myung-Hwa Kim, Hyun-Jeong Kim¹, In-Seon Lee¹, Kyung-Chan Kim², and Chang-Seop Lee[†]

Department of Chemistry, ¹The Center for Traditional Microorganism Resources,

²Department of Digital Physics, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Received : Accepted :)

To clarify the usefulness of fluorescent diagnosis for cancer, We investigated the optimal method of administrating 5-aminolevulinic acid (5-ALA) by analyzing fluorescence signal of Protoporphyrin IX (PpIX) in the cultured normal and cancer cells. 5-ALA was injected as a photosensitizer to the cervico-uterine cancer cell line (HeLa) and in normal liver cells (Chang). Chang and HeLa cells were incubated with various concentrations of 5-ALA (0-800 μ g/mL). The accumulation of PpIX induced by 5-ALA was in HeLa and Chang cells. The cell viability was measured by MTT assay. The optimal concentration of ALA that induced maximum levels of PpIX was 50 μ g/mL in HeLa cell cured for 24 hours after 5-ALA injection. Fluorescence of PpIX in HeLa cell was excited at a wavelength ($\lambda=410$ nm) and showed an emission spectrum at 602.3 nm, 659.9 nm which could be related to the PpIX generation induced by the applied 5-ALA. The experimental results showed that fluorescence signal of PpIX was proportional to the concentration of 5-ALA in tumor cells, but measured with low concentration in normal cells.

Key Words : 5-aminolevulinic acid, Protoporphyrin IX, Photosensitizer

서 론

최근에 각광받고 있는 5-aminolevulinic acid (ALA)는 heme의 생합성 경로내의 대사 전구물질로서 조직 내에서 heme의 전구물질인 광민감제 (Photosensitizer) protoporphyrin IX (PpIX)로 전환된다. ALA를 인체에 투여하면 내인성 광민감제인 PpIX를 형성하게 되고, 이는 짧은 시간동안 작용을 한 후 빠르게 대사된다. PpIX가 광민감제로 활성화되면 형광을 내고 세포 특성에 나타내는 특성이 있는데, 최근 이를 이용한 암의 광역학 진단과 치료를 위한 여러 가지 연구가 이루어지고 있다(1-5).

최근 들어 쥐의 대장암 세포 (CT-26) 및 대장암 세포관

mouse에 이식하여 만든 종양에 ALA를 이용한 광역학 치료에 관한 연구(6), nude mouse에 두경부 편평 암세포인 SNU-1041 세포주를 이식하여 종양을 만들고, 마우스의 각 부위별로 ALA 및 ALA-methylester를 투여하고 종양조직과 정상조직에서의 형광을 측정한 비교 연구 등이 보고되었다(7). 또한 Zapata 등은 자궁경부암 세포주인 HeLa와 CaLo 및 정상 자궁상피세포인 NHCE에 ALA를 투여하여 정상세포에 비해 암세포에서 PpIX의 측적이 상승되어 강한 형광성을 나타낸을 확인하였다(8).

이러한 광민감제를 이용한 형광 진단은 외부에서 광민감제를 투여한 후 광수 파장의 광을 비추게 되면 종양조직 내에서 광민감제가 활성화되어 형광이 높게 발현되는데, 이 부위에 형광을 이용한 분광학적 측정을 하는 것은 암을 진단하는 편리한 방법이라 할 수 있다. 특히 5-ALA에 의해 유도된 PpIX의 생성은 정상세포보다 암세포에 특이적으로 측적되어 광수 파장의 광으로 활성화시키면 형광이 높게 반현되어 암 진단의 사용에 용이하다(9).

* Corresponding Author : Department of chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

Tel : +82-53-580-5945, Fax : +82-53-588-3408

E-mail : surflam@kmu.ac.kr



탈알루미늄 및 알칼리/알칼리토금속 양이온을 교환한 Y형 제올라이트의 NO 흡착 특성

김철현 · 이창섭

*안동정보대학 가스산업과, 계명대학교 자연대 화학과

(2005년 8월 10일 접수, 2005년 10월 17일 채택)

Adsorption Characteristics of Nitrogen monoxide over Dealuminated and Alkali/Alkaline-earth Metal Ion Exchanged Y-Zeolites

Cheol Hyun Kim · Chang Seop Lee

*Dept. of Gas Industry, Andong Information Technology, Gyeongbuk 760-833, Korea

Dept. of Chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Received 10 August 2005, Accepted 17 October 2005)

요 약

탈알루미늄 및 알칼리/알칼리토금속 양이온을 교환한 Y형 제올라이트 촉매를 제조하였다. 제조한 촉매 물질의 원소조성 및 구조 변화를 ICP-AES, XRF 및 XRD와 같은 각종 분광학적 방법으로 분석하였으며, NO-TPD 실험을 통한 표면흡착중의 탈착 거동을 조사하였다. 탈알루미늄 처리 후 출발물질인 NaY 보다 촉매물질의 Si/Al 비는 증가하였으며, 탈알루미늄 후 Cs 및 Ba 양이온으로 교환한 Y형 제올라이트의 경우 Si/Al 비가 부가적으로 조금 더 감소하였다. 탈알루미늄 처리한 촉매는 Al 원자의 탈리로 기본 구격의 파괴가 심화되어 framework (tetrahedral) 구조가 감소하고 non-framework (octahedral) 구조가 증가하였다. 이러한 현상은 스팀처리시간이 많아질수록 증가하였으며 양이온을 교환한 후에는 더 크게 나타났다. NO-TPD 실험에서 탈알루미늄 및 양이온은 교환 후 촉매의 활성점을 나타내는 탈착 봉우리들은 저온으로 이동하였으며, 스팀처리시간이 많아질수록 탈착 봉우리가 상대적으로 저온에서 나타났다. 탈알루미늄 및 양이온 교환을 한 Y형 제올라이트는 교환된 양이온과 탈알루미늄으로 인한 non-framework (octahedral) 구조의 생성이 촉매의 활성에 미치는 영향이 더 큰 것으로 나타났다.

Abstract – The dealuminated and alkali/alkaline-earth metal exchanged Y-zeolites were prepared as a catalyst. Elemental compositions and structures of the prepared catalysts were analyzed by the various spectroscopic techniques such as inductively coupled plasma-atomic emission spectroscopy(ICP-AES), X-ray fluorescence(XRF) and X-ray diffraction(XRD), and the desorption behaviors of adsorbed species on the catalyst surfaces were investigated via NO-TPD experiment. Comparing with the composition of the starting material of NaY zeolite, the magnitudes of Si/Al ratio in catalytic materials were increased after dealumination. The Si/Al ratio of catalytic materials after dealumination followed by Cs and Ba cation exchange were additionally decreased. Dealumination to catalysts induced a destruction of basic frame due to a detachment of aluminum, which results in reducing framework structure, while increasing non-framework structure. This phenomenon becomes more serious with increasing time of steam treatment and even more significant for the cation exchanged catalysts. In NO-TPD experiments, the desorption peaks of NO which indicates an activity point of catalysts shifted to the low temperature region after dealumination and cation exchange. The desorption peaks of the NO-TPD profiles taken after steam treatment also shifted to the low temperature region as the steam treatment time increased. In dealuminated and cation exchanged Y-zeolites, the catalytic activities were more influenced by exchanged cation and the formation of non-framework structure.

Key words : Y-Zeolite, NO-TPD, Dealumination, Cation exchange, Si/Al ratio, Framework

*주저자: chkimdaum@hanmail.net

알칼리/알칼리토금속 양이온을 치환한 Y형 및 ZSM-5 제올라이트의 NO 흡착 특성

김철현[†] · 이창섭*

안동정보대학 가스산업과, *계명대학교 자연대 화학과
(2005년 10월 21일 접수, 2005년 11월 14일 채택)

Adsorption Characteristics of Nitrogen Monoxide on Y-type and ZSM-5 Zeolites Exchanged with Alkali/Alkaline-earth Metal Cation

Cheol Hyun Kim[†] and Chang Seop Lee*

Department of Gas Industry, Andong Information Technology, Gyeongbuk 760-833, Korea

*Department of Chemistry, Kyungpook National University, Daegu 704-701, Korea

(Received October 21, 2005; accepted November 14, 2005)

탈알루미늄 및 알칼리/알칼리토금속 양이온으로 치환한 Y형 및 ZSM-5 제올라이트 측면을 제조하였다. 전처리 후 Y형 및 ZSM-5 제올라이트의 Si/Al비는 증가하였고, bulk보다는 표면에서의 Si/Al비가 더 큰 것을 알 수 있었다. 전처리에 의해 제조된 Y형 및 ZSM-5 제올라이트의 꿈각구조 파괴는 주로 탈알루미늄 처리과정에서 Al 이온의 탈리에 의한 것이며, framework이 감소하고 non-framework이 증가하였다. 이러한 현상은 스팀처리 시간이 많아질수록 증가하였고, 양이온으로 치환함에 따라 더욱 심화되었음을 알 수 있었다. NO-TPD 실험결과, 전처리된 Y형 및 ZSM-5 제올라이트는 평화봉우리가 저온으로 이동하였다. 또한 스팀처리 시간이 많은 측면을 질수록 탈착은 도가 더 낮은 온도로 이동하였다. 측면의 광성을 치환된 양이온, Si/Al 함량비 및 탈알루미늄으로 변화된 꿈각구조에서 framework과 non-framework의 비율에 의존하였다.

Dealuminated and alkali/alkaline-earth metal exchanged Y-type and ZSM-5 zeolites were prepared as catalytic materials. Comparing with the composition of starting material, the magnitude of Si/Al ratio was increased after dealumination and cation exchange process. The ratio of Si/Al on surface was appeared to be larger than that in bulk. The destruction of basic frame in catalysts observed was understood to be due to a detachment of aluminum, which results in reducing framework while increasing non-framework. This phenomenon becomes more serious with increasing time of steam treatment and even more significant for the cation exchanged catalysts. The desorption peaks of the NO-TPD profiles taken after dealumination and cation exchanged Y-type and ZSM-5 zeolites shifted to the low temperature region. It was also found that the longer the steam treatment time, the degree of shift toward low temperature region was increased. The catalytic activities are dependent on the nature of cation exchanged, the ratio of Si/Al and the ratio of framework/non-framework by a change in basic frame.

Keywords: Y-zeolite, ZSM-5, dealumination, cation exchange, NO-TPD

1. 서 론

디젤엔진은 공기와 압축한 후 연료를 분사하고, 이 증발된 연료가 압축열에 의해 온도가 올라간 공기와 섞여 자연 발화됨으로써 연소가 일어난다. 엔진의 압축비가 높고 연소가 급격히 일어남으로써 내부의 온도가 높아 질소산화물의 생성이 많고, 가습된 엔진과 달리 공기와 연료가 미리 섞여 있지 않기 때문에 입자상 물질(Particulate Matter, PM)이 많이 배출된다[1]. 디젤 엔진은 작동원리상 분사된 연료분무 주위에서 공간적으로 불균일한 공연비 분포가 생기게 되고 연료가 놓 후한 영역에서는 입자상 물질이 생성되며, 이온 공연비 영역에서는

질소산화물이 증가하는 트레이드오프(trade-off) 관계를 가진다. 즉 연료효율을 좋게 하면 질소산화물의 배출량이 증가하고, 질소산화물의 배출을 감소시키면 PM의 증가와 함께 연료효율이 나빠지는 문제점을 가지고 있다. 따라서 연비 향상을 위해서는 질소산화물의 생성은 불가피한 현상으로 받아들여지고 있기 때문에 디젤자동차의 질소산화물 후처리 기술개발의 연구가 매우 철저한 실정이다.

현재까지 개발된 질소산화물의 후처리기술로는 흡착형 측매(NO_x adsorber)와 De- NO_x 측매가 있다. 흡착형 측매의 경우는 산소가 과다한 영역에서 엔진에서 배출되는 탄화수소를 이용하여 NO_x 를 환원하여 N_2 로 전환하는 방법이며[2-5], 이 경우 연료 중에 함유된 황에 의해 피독되는 문제점을 가지고 있다[2,3]. De- NO_x 측매는 현재 많은 연구가 진행 중이며, 배기ガ스 중의 산소농도가 농후할 경우 작동이 어려

† 주 저자(e-mail: chkimdaum@hanmail.net)

Journal of the Korean Chemical Society
2005, Vol. 49, No. 4
Printed in the Republic of Korea

고온전단분쇄기술을 이용한 재생/신재 EPDM 고무 블렌드물의 특성

박현호* · 이창섭† · 나성택‡

화승 R&A 신공정혁신팀

†계명대학교 자연대 화학과

‡폴리원 기술연구소

(2005. 4. 18 접수)

The Characteristics of Recycled/Virgin EPDM Rubber Blends by High Temperature Shear-crushing Technique

Hyun-Ho Park*, Chang-Seop Lee, and Seong-Toek Na‡

Hwaseung R & A, Ltd, Kyungnam 626-210 Korea

†Department of Chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

‡Polyone R&D Center, Kyunggi, Korea

(Received April 18, 2005)

요 약. 신재 EPDM 고무와 폐 EPDM 고무를 고온 전단분쇄기술로 분말화한 재료를 다양한 혼합비로 블렌드물을 제조하고 재생재료의 함량에 따른 블렌드물의 기왕 특성, 물리적 성질의 변화를 조사하였으며, 이 블렌드물의 내열성, 내부동액성 및 압축영구줄음율을 측정하였다. EPDM 고무 신재에 고온 전단분쇄기술로 제조한 재생 EPDM 재료를 0~50 phr까지 블렌드하여 각종 물성을 측정한 결과, 재생 EPDM 고무의 배합조성이 25~35 phr인 블렌드물이 저가이면서도 분산성, 내열성, 내부동액성 시험에 대한 물성변화율이 가장 작은 배합구성으로 나타났다.

주제어: EPDM, 고온전단분쇄기술, EPDM, Shear Crushing Technique

ABSTRACT. Virgin EPDM and recycled EPDM fine particles that is crushed by high temperature shear-crushing technique from recycled EPDM were blended with the various mixing ratio to rubber blends. The cure characteristics and physical properties of these blended rubber compounding were investigated with the contents of recycled EPDM and physical properties of these blends for heat and antifreeze and compression set were also measured. Recycled EPDM materials prepared by high temperature shear-crushing technique were blended to virgin EPDM with the range of 0~50 phr. The testing results of physical properties indicated that the rubber blends of recycled EPDM with 25~35 phr turned out to be the best compounding showing good dispersibility, heat resistance and anti-freezer resistance and inexpensive in price.

Keywords: EPDM, 고온전단분쇄기술, EPDM, Shear Crushing Technique

서 론

산업의 발전과 더불어 고분자 물질은 우리 주위에
서 가장 많이 사용되는 화학재료 중 하나가 되었다.

그러나 고분자물질을 생산하여 사용한 후 발생되는
폐기물은 또 다른 환경오염 문제를 발생시키므로 고
분자물질의 폐기물 처리는 고분자 신소재를 개발하
는 것만큼 중요한 기술로 인식되고 있다.

고온전단분쇄기술을 이용한 재생/신재 니트릴고무(NBR) 블렌드물의 가황거동 및 물리적 특성

박현호[†] · 김준형 · 이창섭* · 나성택**

화승R&A(주), *계명대학교 자연대 화학과, **풀리원(주)
(2005년 9월 8일 접수, 2005년 10월 20일 채택)

Cure Behaviors and Physical Properties of Recycled/Virgin Nitrile Rubber (NBR) Blends by High Temperature Shear-Crushing Technique

Hyun-Ho Park[†], Joon-Hyung Kim, Chang-Seop Lee*, and Seong-Tae Na**

Hwaseung R & A, Ltd., 147-1 Gyo-Dong Yangsan-Gun, Kyungnam 626-210 Korea

*Department of Chemistry, Kyungpook National University, 1000 Shindang-Dong Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Korea

**Co. PolyOne Sihwa Ind Complex, 673-17 Seonggok-Dong, Danwon-Gu, Ansan city 425-836, Kyunggi-Do

(Received September 8, 2005; accepted October 20, 2005)

니트릴고무(NBR) 신재와 작업현장에서 나온 스크랩을 고온 전단분쇄기술로 분말화한 재료(재생 NBR)를 다양한 혼합비로 블렌드물을 제조하고, 재생재료의 함량에 따른 블렌드물의 가황 거동, 물리적 특성의 변화를 조사하였다. 또한, 열 및 각종 유체에 대한 각 블렌드물의 저항성을 물리적 방법으로 조사하였다. 신재 NBR에 고온 전단분쇄기술로 제조한 재생NBR을 0~50 phr의 함량으로 블렌드하여 가황거동 및 물리적 특성을 측정한 결과, 가황거동은 점도가 증가하고 스코치 시간은 감소하였으며, 내열 및 유체특성은 향상되었다.

Virgin NBR and recycled NBR particles, which were pulverized from NBR scraps by high temperature shear-crushing technique, were blended with different mixing ratio. The effects of the recycled NBR content on the cure characteristics and physical properties of these blends were investigated and resistance properties of these blends to heat and various fluids were also studied. The study of cure characteristics showed that the viscosity increased but the scorch time decreased. The physical properties of rubber blends were improved with the addition of the recycled NBR for heat resistance and various fluid tests.

Keywords: NBR, high temperature Shear-crushing technique, dispersibility, heat resistance, oil resistance, recycled NBR

1. 서 론

1992년 6월 우루파이라운드(UR)로 최초 국제환경협약이 시작되어 GR (Green Round) 협약으로 세계는 환경협약에 의한 규제 시대로 돌입하였다. 이에 따라 세계 각국들이 환경기술 개발을 서두르고 미국, 일본, 독일 등의 선진국들은 제도적으로 재활용 산업을 육성시키고 있다. 이러한 추세에 따라 우리나라 고무산업계에서도 환경기술 개발에 많은 관심을 가지게 되었으며, 페타이어를 비롯한 여러 가지 고무 폐기물에 대한 기술 개발을 서두르고 있는 실정이다. 고무폐기물은 열기소성이 아닌 관계로 열기소성 플라스틱과는 달리 재활용에 어려움이 따른다. 현재 재활용에 관심을 가지는 고무제품은 타이어, 자동차용 고무부품 및 신발고무로 구별된다[1].

특히, 자동차 산업의 급진적인 발전으로 인하여 폐타이어의 발생량이 증가하고 있으며, 아울러 최근 고분자 산업 폐기물의 증가와 환경

규제로 인하여 폐기물 처리에 대한 기술은 고분자 산업분야의 국가 과학기술 수준의 척도로 인식되고 있으며, 또한 소각이나 매립 등의 폐 고무 처리기술은 환경적인 문제와 직결되고 있다. 따라서 폐 고무 재료를 재활용하는 기술의 개발은 재료 활용 측면에서나 환경 문제의 해결에 있어서 필수적인 기술이라 할 수 있다.

폐 고무의 재활용 기술은 크게 열 이용, 원형 이용, 분말가공 이용으로 분류할 수 있으며[2-5], 현재 대량 발생하는 대부분의 고무 폐기물은 소각을 통해 열에너지와 회수(energy recycling)하는 방식으로 처리되고 있다[6]. 그 외에 재활용을 목적으로 진행되어 온 다양한 연구 중 가장 경제적 가치가 있는 방법은 고무의 미세분밀화를 통해 내충격성 충전재로 직접 활용하는 방법과, 분밀화를 통해 증가된 고무 미세분밀의 반응 표면적에 연 또는 초음파를 조사하여 고무분말의 표면을 활성화하여 가교 결합을 분해시키는 연구가 진행되고 있으나, 지금까지 균일하며 재현성 있는 탄광효과가 나타나고 있지 않은 실정이다[7-9].

† 주 저자 (e-mail: htpark@jhsna.com)

부 록

« 연구논문 » Sae Mulli (The Korean Physical Society), Volume 51, Number 5, 2005년 11월, pp. 419~423

Monte Carlo 모델을 이용한 생체조직내 광선추적

도영국 · 김경찬*

제명대학교 디지털물리학과, 대구 704-701

이창섭

제명대학교 화학과, 대구 704-701

박재희

제명대학교 전자공학과, 대구 704-701

(2005년 10월 15일 발음)

생체조직내에서 광자의 이동을 추적할 수 있는 Monte Carlo 모델을 제시하였고 Visual Basic.NET 을 사용하여 프로그램을 작성하였다. 시뮬레이션의 신뢰성을 검증하기 위해서 시뮬레이션 결과를 van de Hulst와 Prahl의 값과 비교하여 잘 일치함을 확인하였다. 인간 폐조직과 같은 다중 조직의 광 학계수를 사용하여 Monte Carlo 시뮬레이션을 함으로써 광자의 거동과 에너지율 및 침투깊이를 구하였다. 광자가 깊이 침투해 들어감에 따라 그리고 광 파장이 짧아짐에 따라 에너지율이 감소하였고, 또한 경계조건이 부정합일 때 에너지율은 증가하였다.

PACS numbers: 78.20.Bh

Keywords: Monte Carlo, 산란, 흡수, 시뮬레이션, 생체조직

I. 서 론

최근에 광은 인체 현상의 진단과 치료 등에 폭넓게 사용되고 있으며, 그 중에서 인체에 발생하는 각종 암 진단과 치료에 많이 사용되고 있다.

암 진단과 치료를 위해 광을 이용하는 방법으로는 DOT (Diffuse optical tomography)와 PDT (Photodynamic therapy)가 있다. DOT는 빛의 확산적인 성질을 이용하여 투과되어 나오는 빛을 측정함으로써 생체조직의 내부 정보를 비침습적으로 얻을 수 있는 방법이다 [1]. PDT는 광민감성 약품과 레이저 광원을 이용한 치료로서 암세포만 선택적으로 치료할 수 있는 방법이다 [2].

이러한 DOT나 PDT방법을 사용하기 위해서는 생체조직의 광학적 특성과 조직내에서의 광자의 움직임을 정확히 이해하여야 한다. 생체조직내 광자의 특성 및 움직임을 이해하기 위해 생체조직내 광자 에너지율 (fluence rate)을 실험으로 측정하거나 계산할 수 있다. 그러나 생체조직은 비균질성 (inhomogeneous)이고 비동방성 (anisotropy)이기 때문에 복잡하고 정밀한 실험을 필요로 한다. 이런 점을 해결하기 위해 생체조직에서 빛의 움직

임을 이해할 수 있는 수치적 모델을 이용해 광자의 에너지율을 계산할 수 있다. 실험으로 측정된 값과 수치적 모델로 계산된 값을 비교한 두 값의 차이가 줄어들수록 우리가 알고자 하는 생체조직이 가지는 광학적 특성 값들로 분석할 수 있으며, 생체조직내에서 이런 광학적 특성 값들의 차이를 바탕으로 생체 내부에서 발생하는 종양이나 암의 위치를 정상적인 주변 생체조직으로부터 식별할 수 있게 해준다 [1,3].

본 연구에서는 이러한 생체조직의 광학적 특성을 나타내는 광학계수들을 사용하여 생체조직내에서 광자의 움직임을 마구잡이 표본 추출 기법인 Monte Carlo 모델을 이용한 시뮬레이션을 구현하였다. Monte Carlo 시뮬레이션의 정확도는 기존에 성공적으로 개발되어 표준으로 사용하는 Monte Carlo 시뮬레이션의 결과와 비교하였다. 또한 광학계수의 변화에 따른 시뮬레이션 결과를 2D 그래픽으로 표현하여 생체조직내 광자의 움직임을 쉽게 이해할 수 있게 하였으며, 각각의 결과들을 비교·분석하였다.

*E-mail: kyung@kmu.ac.kr

한국환경과학회지 제14권(제7호), 669~674, 2005
Journal of the Environmental Sciences

톨루엔 산화에 의한 CuO_x/SnO₂-ZrO₂ 촉매의 특성고찰

김 해진·최 성우·이창섭
계명대학교 환경과학과·계명대학교 화학과
(2005년 1월 21일 접수; 2005년 6월 22일 채택)

The investigation of characteristics of CuO_x/SnO₂-ZrO₂ catalysts for toluene oxidation

Hye-Jin Kim, Sung-Woo Choi and Chang-Soep Lee*

*Department of Environmental Science and Engineering, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

*Department of Chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

(Manuscript received 21 January, 2005; accepted 22 June, 2005)

Catalytic combustion of toluene was investigated on CuO_x/SnO₂-ZrO₂, CuO_x/SnO₂, CuO_x/ZrO₂ catalysts prepared by impregnation. Characteristics of catalysts loaded on binary support and single support were observed by TPR, TPO, XRD, XPS techniques. The results on catalytic combustion showed that binary supports improve the activity of copper in the combustion of toluene. The reason for high catalytic activity on toluene combustion of CuO_x/SnO₂-ZrO₂ catalyst was ascribed to oxidation-reduction activity at low temperatures and stability of oxidation state after reduction.

Key Words : Toluene, Oxidation, Copper, TPR, TPO, XPS

1. 서 론

휘발성 유기 화합물(Volatile organic compounds, VOCs)은 중요한 대기오염 물질로 대기 중에 쉽게 휘발되며 오존의 전구체로서 질소산화물과 함께 광화학 스모그의 주요 원인이 된다¹⁾. 이러한 VOCs의 분해를 위해 여러 가지 기술들이 개발되어 있으며, 그 중 소각법과 촉매산화법이 가장 우수한 것으로 알려져 있다. 소각법은 과도한 열을 필요로 하므로 운전비용이 많이 드는 반면, 촉매산화법은 낮은 온도 범위에서 운전되므로 경제적인 방법이라 할 수 있다. 이러한 VOCs의 촉매산화에 사용되는 촉매로는 palladium, platinum, rhodium 등의 귀금속 촉매와 copper, chromium, manganise 등의 전이금속 촉매가 있다²⁾. 이 중 귀금속 촉매를 이용한 VOCs의 분해 반응은 성공적으로 운영되고 있으며 그 중 일부는 상용화 되어 있다³⁾. 그러나 귀금속 촉매는 고가의 운영비용이 요구되므로 최근 전이금속류에 대

한 연구가 많이 이루어지고 있다⁴⁾. 그 중 CuO/Al₂O₃ 촉매는 Kim⁴⁾과 Wang⁵⁾의 연구를 통해 다른 전이금속류에 비해 활성이 뛰어남이 입증되었으며 최근 들어 다양한 지지체를 이용한 촉매 연구가 많이 이루어지고 있다. Scire⁶⁾는 Cu/Fe₂O₃ 촉매를 사용한 Toluene 반응에 대하여 보고 하였으며, Kikuchi⁷⁾는 honeycomb에 SnO₂, Pd을 차례로 코팅한 촉매가 VOCs에 대하여 뛰어난 산화력을 보여 준다고 보고하였다. Choudhary^{8,9)}의 논문에서는 ZrO₂를 지지체로 하여 전이금속류를 담지 시켜 VOCs의 촉매 산화반응을 조사 하였으며, ZrO₂ 지지체를 변형 시켜 Cu 촉매를 제조¹⁰⁾하여 Toluene의 분해 반응에 관한 연구도 보고되었다. Okumura¹¹⁾는 Toluene 분해 반응에 있어서 지지체의 변화에 따른 촉매의 표면 산화수의 변화를 보고하였다. 이처럼 저가로 저온 영역에서 운영될 수 있는 새로운 촉매 개발을 위하여 혼합 지지체와 새롭게 고안된 지지체의 촉매활성과 표면 특성에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다^{12,13)}.

본 논문에서는 SnO₂, ZrO₂를 지지체로 사용하여 전이금속류 중 촉매활성이 뛰어난 Cu를 담지 시켜 Toluene 분해 반응을 조사하였으며, TPR, TPO, XRD, XPS 분석을 통하여 이성분 지지체의 특성을

Corresponding Author : Sung-Woo Choi, Department of Environmental Science and Engineering, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea
Phone: +82-53-580-5323
E-mail: swchoi@kmu.ac.kr

Oxidative Coupling Polymerization of Diethynylsilane Derivatives and 1,2-Diethynyl-1,1,2,2-tetramethyldisilane

Ji Ho Kim and Young Tae Park*

*Department of Chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea. *E-mail: ytpark@kmu.ac.kr*

Received February 20, 2006

We have carried out the Glaser oxidative coupling polymerizations of diethynylidiphenylsilane, diethynylmethylphenylsilane, diethynylmethyloctylsilane, and 1,2-diethynyl-1,1,2,2-tetramethyldisilane to afford polycarbosilanes containing diethynyl and organosilane groups in the main chain, such as poly(diethynylidiphenylsilane), poly(diethynylmethylphenylsilane), poly(diethynylmethyloctylsilane), and poly(1,2-diethynyl-1,1,2,2-tetramethyldisilane), respectively. These obtained materials are almost insoluble in common organic solvents such as CHCl₃ and THF probably due to the presence of a rigid rod diacetylene group along the polymer main chain. Therefore, the polymers were characterized using several spectroscopic methods in solid state. FTIR spectra of all the polymeric materials show that the characteristic C≡C stretching frequencies appear at 2147–2154 cm⁻¹, in particular. The polymers in the solid state exhibit that the strong maximum excitation peaks appear at 260–283 nm and the strong maximum fluorescence emission bands at 367–412 nm, especially. Thermogravimetric analysis of the materials shows that about 55–68% of the initial polymer weights remain at 400 °C in nitrogen.

Key Words : Polycarbosilanes, Diethynylsilane derivatives, Diethynyltetramethyldisilane, Excitation, Fluorescence

Introduction

Polycarbosilanes bearing π -conjugated groups along the main chain have attracted considerable attention for their potential applications as photonic, electronic, and ceramic materials.¹ For instance, diacetylene-containing polycarbosilanes such as poly(silylene-diethynylene)s were reported to synthesize by polycondensation reactions of the diethynylene dilithium salt with dichlorosilanes.² The prepared materials with low molecular weights of $M_w < 5000$ g/mol exhibit the conductivities ranging from 8×10^{-3} to 3×10^{-3} S cm⁻¹ when they are doped with FeCl₃, and pyrolysis of the polycarbosilane polymers in inert atmosphere results in a β -SiC ceramic material in high yield.^{3,6} Interestingly, the linear copolymers of silylene-siloxane-diacetylene exhibit the elastomeric properties with thermal stabilities up to 330 °C in air.⁷ Some researchers have reported electronic structure of simplified organosilicon polymers containing π -conjugated moieties based on molecular orbital calculation in order to explain their electronic conductivity properties theoretically.^{8,9}

Very recently, ladderlike poly(*p*-phenylenevinylene)s with silicon and carbon bridged π -conjugated framework have been prepared by intramolecular cyclization of mono(*o*-silylphenyl)acetylene, showing that the prepared polymers are intense fluorescent in the visible region and the emission colors vary from blue to green to yellow.¹⁰ End-capped silole dendrimers on a ethenyl-phenyl carbosilane in inner shell exhibit green to greenish-blue fluorescence.¹¹

However, photoelectronic properties such as excitation and fluorescence emission of diethynyl-containing polycarbosilanes have been scarcely reported up to date. Recently, we have reported the synthesis and, in particular, electronic as well as thermal properties of oligomers containing π -

conjugated moiety of C=C-B-C=C and organosilacyclic group along the polymer backbone by polyaddition reactions of 1,1-diethynyl-1-silacyclopent-3-enes with borane derivatives.^{12,13} We reported also the synthesis and photoelectronic as well as thermal properties poly(1,1-diethynyl-1-silacyclopent-3-enes) and 1,1-diethynyl-1-silacyclobutane) by oxidative coupling reactions of diethynyl organosilacyclic monomers.¹⁴ We also have already reported the preparation and excited-state energy dynamics of polycarbosilanes as well as polycarbogermanes containing 1,4-bis(thiophene or phenylene)buta-1,3-diyne in the polymer backbone.^{15,16} With these considerations in mind, we have extended the Glaser oxidative polymerization technique to the preparation and photoelectronic properties of polymeric materials containing diethynyl silanes in the polymer main chains by utilizing functionality of diethynyl-containing silane compounds.

Herein, we now report the Glaser oxidative coupling polymerizations of diethynylidiphenylsilane (2a), diethynylmethylphenylsilane (2b), diethynylmethyloctylsilane (2c), and 1,2-diethynyl-1,1,2,2-tetramethyldisilane (2d) in the presence of cuprous chloride as catalyst and tetramethylethylenediamine/acetone as co-solvent with bubbling oxygen gas through the reaction mixture to give polycarbosilanes containing diacetylene and organosilane groups, such as poly(diethynylidiphenylsilane) (3a), poly(diethynylmethylphenylsilane) (3b), poly(diethynylmethyloctylsilane) (3c), and poly(1,2-diethynyl-1,1,2,2-tetramethyldisilane) (3d), respectively. The obtained materials were characterized by IR and ¹³C and ²⁹Si CP-MAS NMR spectrophotometers in solid state as well as elemental analysis. Furthermore, the synthesized polycarbosilanes can be expected to include a novel π -conjugated moiety of C=C and silane groups along the main chain. In particular, we focus on studying the

Can we obtain the four-particle-irreducible effective action from the fourth Legendre transformation?

Chungku Kim

Department of Physics, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 705-701, Korea
(Received 12 May 2005; published 10 October 2005)

We have investigated the higher loop diagrams of the fourth Legendre transformation which was proposed to obtain the 4PI effective action for the scalar field theory previously. For this purpose, we introduce a method which enables us to obtain the systematic loop expansion of the fourth Legendre transformation from the loop expansion of the second Legendre transformation which gives 2PI effective action. As a result, we have seen that at four-loop order, the 3PR diagrams of the 2PI effective action vanishes completely as expected but at five-loop order, the 4PR diagram of the 2PI effective action does not vanish completely.

DOI: 10.1103/PhysRevD.72.085007

PACS numbers: 11.15.Tk, 11.15.Bt

I. INTRODUCTION

The n -particle irreducible (n -PI) effective action which plays an important role in equilibrium and nonequilibrium quantum field theory is a resummation scheme in terms of self-consistently dressed propagators and n -point vertices. It is expected to describe accurately the collective effects and reduce the gauge dependence of the truncated theory. The early contribution of the 2PI effective action [1] was generalized by Cornwall, Jackiw, and Tomboulis (CJT) [2].

Since the 2PI effective action was obtained from the second Legendre transformation, it was expected that the 4PI effective action can be obtained from the fourth Legendre transformation and recently, the formalism from which one can obtain the 4PI effective action was proposed in [3,4]. The former [3] used the equivalence hierarchy for n -PI effective actions and the latter performed the fourth Legendre transformation [4] by expanding the dressed quantities around the classical solutions. These authors have chosen different relations between the expectation value $\langle \Phi_x \Phi_y \Phi_z \Phi_w \rangle$ and the dressed 3-point and 4-point functions and have applied to the scalar field theory to obtain the three-loop order 4PI effective action. Actually, as can be seen in [5], the three particle reducible (3PR) and the four particle reducible (4PR) diagrams appear at four and five-loop order for the first time, respectively, and hence, in order to check whether it is possible to obtain the 4PI effective action by fourth Legendre transformation or not, we need to investigate the case of the higher loop diagrams. In this paper, we investigate the higher loop diagrams of the 4PI effective action of the scalar field theory proposed previously. In Sec. II, we introduce a method to perform a systematic loop expansion of the fourth Legendre transformation and by using this method, we investigate higher loop diagrams of the fourth Legendre transformation. In Sec. III, we give some discussions and conclusions.

II. THE FOURTH LEGENDRE TRANSFORMATION FOR SCALAR FIELD THEORY

In this section, we introduce a method to perform a systematic loop expansion of the fourth Legendre transformation from the given second Legendre transformation (equivalently, from the 2PI effective action). We will first apply this method to obtain the 2PI effective action from the usual 1PI effective action [6] which is relatively simple and then we will consider the case of the fourth Legendre transformation.

A. 2PI effective action for scalar field theory

The Euclidean classical action for the scalar field theory is given by

$$S[\Phi] = \frac{1}{2} \Phi_x D_{0xy}^{-1} \Phi_y + \frac{g}{3!} \Phi_x^3 + \frac{\lambda}{4!} \Phi_x^4. \quad (1)$$

We use the notation in which the repeated continuous variables are integrated over:

$$J_x \Phi_x = \int d^4x J(x) \Phi(x). \quad (2)$$

Then the generating functional for the connected diagram is given by

$$W[J_1, J_2] = -\hbar \ln \int D\Phi \exp \left[-\frac{1}{\hbar} \left(S[\Phi] + J_{1x} \Phi_x + \frac{1}{2!} J_{2xy} \Phi_x \Phi_y \right) \right], \quad (3)$$

where the external source J_{2xy} is symmetric under the exchange of its indices. By taking the functional derivative of the $W[J_1, J_2]$ with respect to the external sources, we can obtain

$$\frac{\delta W[J_1, J_2]}{\delta J_{1x}} = \langle \Phi_x \rangle = \phi_x. \quad (4)$$



Hydantoin derivatives as non-peptidic inhibitors of Ras farnesyl transferase

Jinho Lee,^{a,*} Jonghyun Kim,^b Jong Sung Koh,^b Hyun-Ho Chung^b and Kyoung-Hee Kim^b

^aDepartment of Chemistry, Keimyung University, 1000 Sindang-Dong, Dalseo-Gu, Daegu 704-701, Republic of Korea

^bLG Life Sciences, Science Town, Taejon 305-380, Republic of Korea

Received 15 September 2005; revised 8 December 2005; accepted 21 December 2005

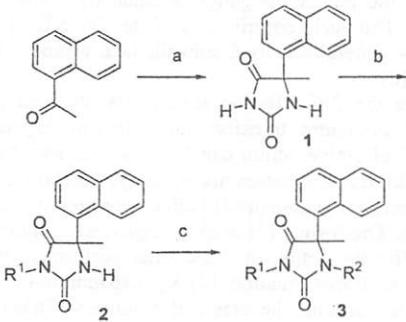
Available online 25 January 2006

Abstract—1,3,5,5-Tetrasubstituted 2,4-imidazolidinedione (hydantoin) derivatives were evaluated as Ftase inhibitors. Potent Ftase inhibitors without thiol or peptide were obtained in three steps.

© 2006 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Ras protein plays an important role in cell growth and differentiation. Oncogenic Ras has been found in 40% of human cancers including 90% of pancreatic and 50% of colon carcinomas.^{1,2} Ras protein needs a series of post-translational modifications including the farnesylation catalyzed by farnesyl transferase (Ftase).³ Inhibitors of Ftase are considered as potential anticancer agents.^{4–6} The observation that Ftase can farnesylate C-terminal tetrapeptide of Ras (CAAX in which C is cysteine, A is aliphatic amino acid, and X is serine or methionine) triggers great efforts to develop peptidomimetic inhibitors. Substitution of aliphatic amino acids, AA of CAAX tetrapeptide, with benzodiazepine⁷ 3-(aminomethyl)benzoic acid (3-AMBA),⁸ piperazine,⁹ and 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline-3-carboxylate (Tic)¹⁰ had been tried. Conformational analysis of potent tetrapeptidic inhibitor CVFM (IC_{50} 25 nM)¹¹ renders us to design hydantoin scaffold.

Hydantoin was synthesized in one step using Sano's condition¹² in 90% yield (Scheme 1). 5-Methyl-5-(1-naphthyl)-2,4-imidazolidinedione (hydantoin 1) was obtained as racemic mixtures from the reaction of 1'-acetonephthalene with potassium cyanide and ammonium carbonate and it was used without chiral resolution. Introduction of the substituent at N-3 position was performed with the corresponding alcohol under the Mitz-



Scheme 1. Reagents: (a) KCN , $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$, 90%; (b) $\text{R}^1\text{-OH}$, DEAD , Ph_3P ; (c) NaH , $\text{R}^2\text{-Br}$.

unobu condition.¹³ Normal alkylation at the N-1 position provided the desired compound 3.

Substitution of naphthalene at C-4 position of hydantoin improved inhibitory activity about one order of magnitude more than that of phenyl substituent (data not shown). However, conformational study showed that naphthalene could accommodate several spatial orientations relative to the hydantoin ring. Introduction of methyl group at C-4 position provided the steric restriction which forced the naphthalene to the desired orientation. Also, it removed the easy epimerizing character of hydantoin structure.

As a first step to remove the peptidic character, imidazole was used at the position of cysteine because it had

Keywords: Hydantoin; 1,3,5,5-Tetrasubstituted 2,4-imidazolidinedione; Farnesyl transferase; Non-peptidic.

* Corresponding author. Tel.: +82 53 580 5183; fax: +82 53 580 5164; e-mail: jinho@kmu.ac.kr

편집		
강	영	욱
김	경	찬
김	인	선
김	태	운
박	천	만
이	인	선
정	진	갑
최	재	성

自然科學研究所
自然科學研究論集 第25輯 第1號

2006年 8月 25日 印刷
2006年 8月 30日 發行 〈비매품〉

發行人 啓明大學校
總長 李鎮雨
編輯人 自然科學研究所
所長 鄭鎮甲

發行處 自然科學研究所
大邱廣域市 達西區 新塘洞 1000番地
電話 (053) 580-5197
(053) 580-5198

印刷 / 圖書出版 泰一社 (053)255-3602

ISSN 1738-6152

**THE JOURNAL OF
THE INSTITUTE
OF NATURAL SCIENCES**

CONTENTS

〈Research Articles〉

SUBGROUPS OF REFINEMENT PERMUTATIONS IN S_{10}	Dong-Wan Park
ON THE FIXED POINTS OF REGULAR STOCHASTIC MATRIX IN CONNECTION WITH THE INVARIANTS	Koon-Chan Kim
Some Bounds on Steinhaus Graphs	Dae-Keun Lim
A Statistical Study on the Actual Conditions of Commercial Facilities of Local Small and Medium Cities - as A Case of Gyeongsan City -	Gyu-Moon Song
Phenomena of Phase Transformation in TiO_2 Thin Film by RF Sputtering	Tae-Woo Kim · Kyung-Chan Kim
Surface Analysis of Contact Lens after Cleaned with Ultrasonic Cleaner and Multi-purpose Solution	Sun-Kwang Yun · Chang-Seop Lee
Isolation of Phosphate Solubilizing Strains from Soil	Soo-Jung Kim · Hyun-Soo Kim
Effect of Cytosine Analogues on Cytosine Deaminase Activity from Intracellular <i>Chromobacterium violaceum</i> YK 391	Hyo-Jung Kim · Hyun-Soo Kim · Young-Eun Seo · Tae-Shick Yu
Cytosine Deaminase from <i>Monascus purpureus</i>	Hyo-Jung Kim · Tae-Hyun Kim · Jung Kim · Young-Eun Seo · Tae-Shick Yu
A Study on Physio-biochemical Characteristics of the Lactic Acid Bacteria <i>Lb. reuteri</i> , <i>Lb. suebicus</i> , <i>Lb. vaccinostercus</i> and <i>Lb. vaginalis</i>	Oh-Sik Kwon
Poor-Medium Tends to Increase the Stability of Newly Transconjugated Plasmid of <i>Pseudomonas</i> sp. KM12TC	Kyung-Pyo Yoon
A Comparative Study of <i>Leuconostoc citreum</i> Strain Isolated from Dongchimi for Carbohydrate Fermentation	Ji-Hyun Ma · Oh-Sik Kwon · Sam-Pin Lee

Published by
KEIMYUNG UNIVERSITY
DAEGU, KOREA