

自然科學

研究論集

第 26 輯 · 第 2 號

2008

目 次

〈연구논문〉

- Standard Forms of Parabolic Cylinders Kwang Sung Park
- Upper Bound on Domination Number of Steinhaus Graphs Daekeun Lim
- 새로운 C_2 -순대칭 리간드, (S)-(-)-Binaphthalene-bis-N,N'-
(2,2'-Diphenylphosphinobenzene)-2,2'-Formamide의
합성과 이용 엄재국
- 플라본 계열의 싸이클린 의존 키나아제 저해제 이진호 · 엄재국
- 폴리(옥시비스페닐옥시테트라메틸다이실록세인)의
합성 및 특성 정인경 · 박영태
- 고추 잎으로부터 신초의 다 유기와 이의 내염성 노광수
- 수리거미과 (거미목)의 2종 서보근
- Comparison of the Plastid Inclusion Bodies in *Sedum* Examined
by the Transmission Electron Microscopy (TEM) and
High Voltage Electron Microscopy (HVEM) InSun Kim
- 김치에서 분리한 *Leuconostoc* 균주의 당 발효특성에 대한 연구 권오식
- 주요 식품에서 발견되는 *Leuconostoc* 종의 대사 특성에 대한 연구 권오식 · 김선지 · 진준엽
- Thermochemical Pretreatment of Hardwoods as One
of Process Components in the Production of
Lignocellulosic Bioethanol Kyung Pyo Yoon
- 초등학교 주변의 부정불량식품에 관한 조사연구 김종규

啓明大學校 自然科學研究所

ISSN 1738-6152

自然科學

研究論集

第 26 輯 · 第 2 號 2008

啓明大學校 自然科學研究所

목 차

〈연구 논문〉

Standard Forms of Parabolic Cylinders

..... Kwang Sung Park ... (1)

Upper Bound on Domination Number of Steinhaus Graphs

..... Daekeun Lim ... (9)

새로운 C₂-손대칭 리간드, (S)-(-)-Binaphthalene-bis-N,N'-

(2,2'-Diphenylphosphinobenzene)-2,2'-Formamide 의 합성과 이용

..... 염재국 ... (15)

플라본 계열의 싸이클린 의존 키나아제 저해제 이진호 · 염재국 ... (23)

폴리(옥시비스페닐옥시테트라메틸다이실록세인)의 합성 및 특성

..... 정인경 · 박영태 ... (31)

고추 잎으로부터 신초의 다 유기와 이의 내염성 노광수 ... (45)

수리거미과 (거미목)의 2종 서보근 ... (51)

Comparison of the Plastid Inclusion Bodies in *Sedum* Examined

by the Transmission Electron Microscopy (TEM) and High Voltage

Electron Microscopy (HVEM) InSun Kim ... (55)

김치에서 분리한 *Leuconostoc* 균주의 당 발효특성에 대한 연구

..... 권오식 ... (63)

주요 식품에서 발견되는 *Leuconostoc* 종의 대사 특성에 대한 연구

..... 권오식 · 김선지 · 진준엽 ... (73)

Thermochemical Pretreatment of Hardwoods as One of Process

Components in the Production of Lignocellulosic Bioethanol

..... Kyung Pyo Yoon ... (83)

초등학교 주변의 부정불량식품에 관한 조사연구 김종규 ... (87)

CONTENTS

⟨Research Articles⟩

STANDARD FORMS OF PARABOLIC CYLINDERS

KWANG SUNG PARK

ABSTRACT. In this paper, we study on transformations to principal axis of quadratic surfaces. We focus on finding a simple way of standard forms of parabolic cylinders.

1. Introduction

We are going to study a simple way of finding standard forms of parabolic cylinders. The formulas of transformations to principal axis of quadratic curves are well-known. Those are easy and simple. The cases of quadratic surfaces are similar except one surface, the parabolic cylinder.

A *quadratic surface* is the level surface $F^{-1}(0)$ of F , where $F(x, y, z)$ is a quadratic function of x, y, z .

Let $F(x, y, z)$ be the quadratic function

$$ax^2 + by^2 + cz^2 + 2fyz + 2gzx + 2hxy + 2lx + 2my + 2nz + d$$

The following matrix and determinants will be used frequently in this paper.

$$A = \begin{pmatrix} a & h & g \\ h & b & f \\ g & f & c \end{pmatrix}, \quad \Delta = \begin{vmatrix} a & h & g \\ h & b & f \\ g & f & c \end{vmatrix}$$

Key words and phrases. principal axis, diametral plane, quadratic surface, parabolic cylinder.

$$\delta = \begin{vmatrix} a & h & g & l \\ h & b & f & m \\ g & f & c & n \\ l & m & n & d \end{vmatrix}$$

If we denote t_1, t_2, t_3 the eigenvalues of A , then $\Delta = t_1 t_2 t_3$ and one of the eigenvalues is nonzero. We may assume that $t_1 \neq 0$.

2. Preliminaries

Let $M = F^{-1}(0)$ be a quadratic surface. A point P is called a *center* of M if it is a point symmetry of M . Note that if the origin is a center, then x, y, z terms should be disappeared by the symmetry. A center of M is a solution of the following system of equations

$$ax + hy + gx + l = 0$$

$$hx + by + fz + m = 0$$

$$gx + fy + cz + n = 0$$

Thus M has a unique center if and only if $\Delta \neq 0$.

A plane Π is called a *principal diametral plane* of M if it is a plane symmetry of M . Note that if the xy -plane is a principal diametral plane, then yz, zx, z terms should be disappeared by the symmetry. The principal diametral planes of M can be obtained by the following formula :

$$t(\lambda x + \mu y + \nu z) + l\lambda + m\mu + n\nu = 0,$$

where t is a nonzero eigenvalue of A and (λ, μ, ν) is an eigenvector corresponding to t .

The standard forms of quadratic surfaces are the one with the origin as a center, if exists, and coordinate planes as principal diametral planes. To obtain the standard form of M , we need the following process.

- (i) Find eigenvalues of A .
- (ii) Find corresponding eigenvectors.

(iii) Find principal diametral planes which are vertical to these eigenvectors.

(iv) Rotate coordinate axes so that these principal diametral planes are parallel to coordinate planes.

(v) If M has a center P , translate the origin to P . If there is no center, translate the origin to a point of M case by case.

In fact, we can obtain standard forms of quadratic surfaces as follows :

(I) $\Delta \neq 0$

In this case, the eigenvalues t_1, t_2, t_3 are nonzero. And the standard form of M is of the form

$$t_1x^2 + t_2y^2 + t_3z^2 + \frac{\delta}{t_1t_2t_3} = 0$$

Let (x_0, y_0, z_0) be the unique center of M . Then we have

$$f(x_0, y_0, z_0) = \frac{\delta}{t_1t_2t_3}$$

The quadratic surface of this standard form is one of an empty set, a point, an ellipsoid, a hyperboloid and a cone.

(II) $\Delta = 0$

In this case, some eigenvalues are 0. We may assume $t_3 = 0$.

(i) If M has a center (x_0, y_0, z_0) , then its standard form is of the form

$$t_1x^2 + t_2y^2 + f(x_0, y_0, z_0) = 0$$

The quadratic surface of this standard form is one of an empty set, an elliptic cylinder, a hyperbolic cylinder, a straight line, a plane and two planes.

(ii) If M has no center and $\delta \neq 0$, then $t_2 \neq 0$ and its standard form is of the form

$$t_1x^2 + t_2y^2 = 2\sqrt{-\frac{\delta}{t_1t_2}}z$$

The quadratic surface of this standard form is the paraboloid.

(iii) If M has no center and $\delta = 0$, then $t_2 = 0$ and its standard form is of the form

$$t_1x^2 + 2\alpha z = 0$$

The quadratic surface of this standard form is the parabolic cylinder. But the coefficient α is not known at this moment.

3. Results and Examples

In section 2, we found standard forms of all quadratic surfaces except parabolic cylinder. Now we are going to find the standard form of parabolic cylinder. Let M be a parabolic cylinder. Consider the principal diametral plane Π given by

$$t_1(\lambda x + \mu y + \nu z) + l\lambda + m\mu + n\nu = 0$$

and two parallel parabolas

$$f(x, y, 0) = 0, f(x, y, 1) = 0.$$

Note that

$$\Pi \cap (F(x, y, 0) = 0), \Pi \cap (F(x, y, 1) = 0)$$

give two points P_0, P_1 . The line passing through these points is parallel to generating lines of M .

EXAMPLE 1. Let

$$F(x, y, z) = x^2 + y^2 + z^2 + 2yz - 2zx - 2xy - 4x - 2y + 10z + 1.$$

Then

$$A = \begin{pmatrix} 1 & -1 & -1 \\ -1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 \end{pmatrix}, \quad \Delta = \begin{vmatrix} 1 & -1 & -1 \\ -1 & 1 & 1 \\ -1 & 1 & 1 \end{vmatrix} = 0$$

$$\delta = \begin{vmatrix} 1 & -1 & -1 & -2 \\ -1 & 1 & 1 & -1 \\ -1 & 1 & 1 & 5 \\ -2 & -1 & 5 & 1 \end{vmatrix} = 0.$$

Since the system of equations for centers has no solutions, The quadratic surface $F(x, y, z) = 0$ is a parabolic cylinder. The eigenvalues of A is $t_1 = 3, t_2 = t_3 = 0$, and an eigenvector corresponding to 3 is $(-1, 1, 1)$. Thus the principal diametral plane is

$$3(-x + y + z) + 6 = 0$$

$$\implies -x + y + z + 2 = 0$$

Note that

$$f(x, y, 0) = x^2 + y^2 - 2xy - 4x - 2y + 1,$$

$$f(x, y, 1) = x^2 + y^2 - 2xy - 6x + 12$$

Then $P_0 = (\frac{3}{2}, -\frac{1}{2}, 0), P_1 = (\frac{7}{2}, \frac{1}{2}, 1)$. Thus the direction of generating line of this parabolic cylinder is $(2, 1, 1)$.

Note that the direction of generating line and eigenvectors corresponding to t_1 are orthogonal. Now we choose three orthonormal vectors containing the normalizations of these two vectors

$$(u_1, v_1, w_1), (u_2, v_2, w_2), (u_3, v_3, w_3)$$

Then we rotate coordinate axes which is given by the matrix

$$A = \begin{pmatrix} u_1 & u_2 & u_3 \\ v_1 & v_2 & v_3 \\ w_1 & w_2 & w_3 \end{pmatrix}$$

That is, replace x, y, z in $F(x, y, z) = 0$ by

$$u_1x + v_1y + w_1z$$

$$u_2x + v_2y + w_2z$$

$$u_3x + v_3y + w_3z$$

Then the resulting equation gives the standard form of M by a proper translation.

EXAMPLE 2. Let

$$F(x, y, z) = x^2 + y^2 + z^2 + 2yz - 2zx - 2xy - 4x - 2y + 10z + 1$$

We choose orthonormal vectors

$$\left(\frac{2}{\sqrt{6}}, \frac{1}{\sqrt{6}}, \frac{1}{\sqrt{6}}\right), \left(-\frac{1}{\sqrt{3}}, \frac{1}{\sqrt{3}}, \frac{1}{\sqrt{3}}\right), \left(0, \frac{1}{\sqrt{2}}, -\frac{1}{\sqrt{2}}\right)$$

And we replace x, y, z in $F(x, y, z) = 0$ by

$$\frac{x}{\sqrt{6}} - \frac{y}{\sqrt{3}}, \quad \frac{x}{\sqrt{6}} + \frac{y}{\sqrt{3}} + \frac{z}{\sqrt{3}}, \quad \frac{x}{\sqrt{6}} + \frac{y}{\sqrt{3}} - \frac{z}{\sqrt{3}}$$

Then we have

$$3y^2 - 6\sqrt{2}z + 4\sqrt{3}y + 1 = 0$$

By translating coordinate axes, we have the following standard form of $F^{-1}(0)$.

$$y^2 = 2\sqrt{2}z$$

EXAMPLE 3. Let

$$F(x, y, z) = x^2 + 4y^2 + z^2 - 4yz - 2zx + 4xy - 2x + 4y - 6z + 3$$

Then

$$A = \begin{pmatrix} 1 & 2 & -1 \\ 2 & 4 & -2 \\ -1 & -2 & 1 \end{pmatrix}, \quad \Delta = \begin{vmatrix} 1 & 2 & -1 \\ 2 & 4 & -2 \\ -1 & -2 & 1 \end{vmatrix} = 0$$

$$\delta = \begin{vmatrix} 1 & 2 & -1 & -1 \\ 2 & 4 & -2 & 2 \\ -1 & -2 & 1 & -3 \\ -1 & 2 & -3 & 3 \end{vmatrix} = 0.$$

Since the system of equations for centers has no solutions, the quadratic surface $F(x, y, z) = 0$ is a parabolic cylinder. The eigenvalues

of A is $t_1 = 6, t_2 = t_3 = 0$, and an eigenvector corresponding to 6 is $(-1, -2, 1)$. Thus the principal diametral plane is

$$-x - 2y + z = 0$$

Note that

$$f(x, y, 0) = x^2 + 4y^2 + 4xy - 2x + 4y + 3,$$

$$f(x, y, 1) = x^2 + 4y^2 + 4xy - 4x - 2$$

Then $P_0 = (\frac{3}{4}, -\frac{3}{8}, 0), P_1 = (-\frac{1}{4}, \frac{5}{8}, 1)$. Thus the direction of generating line of this parabolic cylinder is $(-1, 1, 1)$.

We choose orthonormal vectors

$$\left(-\frac{1}{\sqrt{3}}, \frac{1}{\sqrt{3}}, \frac{1}{\sqrt{3}}\right), \left(-\frac{1}{\sqrt{6}}, -\frac{2}{\sqrt{6}}, \frac{1}{\sqrt{6}}\right), \left(\frac{1}{\sqrt{2}}, 0, \frac{1}{\sqrt{2}}\right)$$

And we replace x, y, z in $F(x, y, z) = 0$ by

$$-\frac{x}{\sqrt{3}} - \frac{y}{\sqrt{6}} + \frac{z}{\sqrt{2}}, \quad \frac{x}{\sqrt{3}} - \frac{2y}{\sqrt{3}}, \quad \frac{x}{\sqrt{3}} + \frac{y}{\sqrt{6}}, \frac{z}{\sqrt{2}}$$

Then we have the following

$$6y^2 - 4\sqrt{2}z - 2\sqrt{6}y + 3 = 0$$

By translating coordinate axes, we have the following standard form of $F^{-1}(0)$.

$$3y^2 = \sqrt{6}z$$

References

- [1] R. Fenn, *Geometry*. Springer, London, 2000.
- [2] J. Smart, *Modern Geometry*. Brooks-Cole Publishing Company, Boston, 1997.
- [3] I. Vaisman, *Analytic Geometry*. World Scientific, London, 1997.

Department of Mathematics
Keimyung University
Taegu, Korea 704-701

Upper bound on domination number of Steinhaus graphs

Daekeun Lim

Abstract

In this paper, we give the upper bound for domination numbers of 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

3. A upper bound for domination number for Steinhaus graphs

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 $G = \overline{K}_n$,

G is the set of isolated vertices. Note that each isolated vertex must be in every dominating set.

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 of nontrivial Steinhaus graphs complemented Steinhaus graphs. Let G be a Steinhaus graph with n vertices and $a_{11}a_{12}a_{13}\cdots a_{1n}$ be the generating string of G .

Theorem 3. 4 *For any nontrivial Steinhaus graph G , $\gamma(G) \leq \lceil \frac{n}{3} \rceil$.*

Proof. Use induction on n . For $n \leq 6$, we can show that $\gamma(G) \leq \lceil \frac{n}{3} \rceil$. Assume that $n \geq 7$. Consider the induced subgraph $G - \{1, 2, 3\}$. If the subgraph is the trivial graph, it is clear that $\gamma(G) \leq \lceil \frac{n}{3} \rceil$. Assume that the subgraph is nontrivial. Then by induction hypothesis, the subgraph has a dominating set S such that $|S| \leq \lceil \frac{n-3}{3} \rceil$.

Case 1 $a_{11}a_{12}a_{13} = 000$.

In this case, choose that the smallest vertex i such that $a_{1i} = 1$. Then $S \cup \{i\}$ is a dominating set for G such that the size of $S \cup \{i\}$ is atmost $\lceil \frac{n}{3} \rceil$.

Case 2 $a_{11}a_{12}a_{13} = 001$.

In this case, $S \cup \{3\}$ is a dominating set for G such that the size of $S \cup \{3\}$ is atmost $\lceil \frac{n}{3} \rceil$.

Case 3 $a_{11}a_{12}a_{13} = 010$.

In this case, $S \cup \{2\}$ is a dominating set for G such that the size of $S \cup \{2\}$ is atmost $\lceil \frac{n}{3} \rceil$.

Case 4 $a_{11}a_{12}a_{13} = 011$.

In this case, $S \cup \{1\}$ is a dominating set for G such that the size of $S \cup \{1\}$ is atmost $\lceil \frac{n}{3} \rceil$.

Hence the proof of Theorem is completed by combining four cases. \square

Note that the path P_n achieves the bound. Next, we give an upper bound for domination numbers of the complement Steinhaus graphs. For $n \leq 6$, the tight upper bound for domination numbers of the complement Steinhaus graphs is given by as follows:

$$\begin{cases} 2 & \text{if } n = 2, 3, 4; \\ 3 & \text{if } n = 5, 6. \end{cases}$$

In particular, if $n = 6$, $\gamma(G) = 3$ if and only if $G = K_2 \cup C_4$, where $K_2 = \{i, i+3\}$, $i = 1, 2, 3$.

Theorem 3. 5 For any complemented Steinhaus graph \overline{G} , $\gamma(\overline{G}) \leq \lfloor \frac{n+4}{3} \rfloor$ where $n \geq 2$.

Proof. Use induction on n . For $2 \leq n \leq 6$, we know that $\gamma(\overline{G}) \leq \lfloor \frac{n+4}{3} \rfloor$. Assume that $n = 7$. If the subgraph $\overline{G} - \{7\}$ has the domination number two, then $\gamma(\overline{G}) = 3$ by adding 7 to the minimal domination set of $\overline{G} - \{7\}$. If $\overline{G} - \{7\}$ has domination number three, then the vertex 7 cannot be isolated by Steinhaus property. So, it is clear that $\gamma(\overline{G}) = 3$.

Assume that $n \geq 8$. Consider the subgraph $\overline{G}[\{1, 2, \dots, 6\}]$. If $\overline{G}[\{1, 2, \dots, 6\}]$ has domination number two, then $\gamma(\overline{G}) \leq \lfloor \frac{n+4}{3} \rfloor$ because by induction hypothesis, domination number of the subgraph $\overline{G} - \{1, 2, \dots, 6\}$ is at most $\lfloor \frac{(n-6)+4}{3} \rfloor$, so $\gamma(\overline{G}) \leq 2 + \lfloor \frac{(n-6)+4}{3} \rfloor = \lfloor \frac{n+4}{3} \rfloor$.

Assume that $\overline{G}[\{1, 2, \dots, 6\}]$ has domination number three. So, the subgraph is $K_2 \cup C_4$, where $K_2 = \{i, i+3\}$, $i = 1, 2, 3$. If domination number of the subgraph $\overline{G} - \{1, 2, \dots, 6\}$ is at most $\lfloor \frac{(n-6)+4}{3} \rfloor - 1$, then $\gamma(\overline{G}) \leq 3 + \lfloor \frac{(n-6)+4}{3} \rfloor - 1 = \lfloor \frac{n+4}{3} \rfloor$. So, we assume that domination number of the subgraph $\overline{G} - \{1, 2, \dots, 6\}$ is $\lfloor \frac{(n-6)+4}{3} \rfloor$. Let $S = \{v_1, v_2, \dots, v_{\lfloor \frac{(n-6)+4}{3} \rfloor}\}$ where $1 \leq i < j \leq \lfloor \frac{(n-6)+4}{3} \rfloor$ if and only if $v_i < v_j$. If there is a vertex in S which is adjacent to a vertex k in C_4 , then the subgraph $K_2 \cup C_4 - \{k\}$ has a domination number two. Let the dominating set be $\{i, j\}$. So,

set $T = S \cup \{i, j\}$ is a dominating set of \bar{G} . So, $\gamma(\bar{G}) \leq \lfloor \frac{n+4}{3} \rfloor$. Next, assume that none of vertices in S is adjacent to a vertex k in C_4 . If $v_1 = 7$, then $\gamma(\bar{G}) \leq \lfloor \frac{n+4}{3} \rfloor$. Otherwise, there are two vertices v_i in S such that $v_{i+1} - v_i \leq 2$. Observe that there are two consecutive vertices $j, j + 1$ in C_4 .

Case 1 $v_{i+1} - v_i = 1$.

In this case, $a_{j, v_i} = a_{j, v_{i+1}} = a_{j+1, v_{i+1}} = 0$, which gives a contradiction by Steinhaus property.

Case 2 $v_{i+1} - v_i = 2$.

In this case, there is a vertex k in C_4 such that difference of k and j is two. Say $k < j$. Then $a_{k, v_j} = a_{k, v_{j+1}} = a_{j+1, v_{i+1}} = 0$, which gives a contradiction by Steinhaus property.

By combining two cases, the proof is completed. \square

Conjecture 3. 6 For any complemented Steinhaus graph \bar{G} , $\gamma(\bar{G}) \leq \lceil \frac{n+1}{3} \rceil$ where n is large enough.

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 Eighth Quadrennial International 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

새로운 C₂-손대칭 리간드, (S)-(-)-Binaphthalene-bis-N,N'-(2,2'-diphenylphosphinobenzene)-2,2'-formamide 의 합성과 이용

엄재국
계명대학교 자연과학대학 화학과

Synthesis and Application of new C₂-Chiral Ligand, (S)-(-)-Binaphthalene-bis-N,N'-(2,2'-diphenylphosphinobenzene)-2,2'-formamide

Jae-kook Uhm

Department of Chemistry, Collage of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

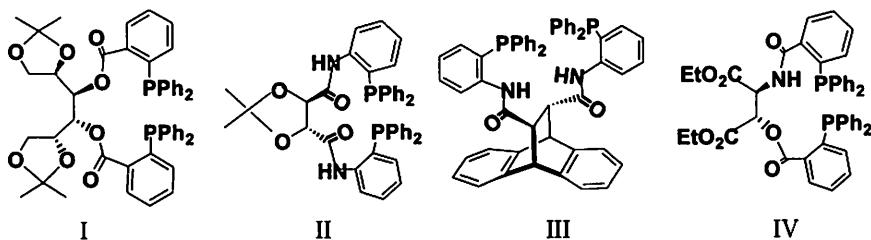
요 약. 복잡하고 덩치가 큰 치환체를 갖는 C₂-손 대칭형 리간드를 새로이 합성하기 위하여, (S)-binaphthalene-2,2'-dicarboxylic acid를 출발물질로부터 몇 단계의 반응을 거쳐서, 새로운 리간드 화합물 2, (S)-(-)-Binaphthalene-bis-N,N'-(2,2'-diphenylphosphinobenzene)-2,2'-formamide 를 생성하였다. 수율은 65% 무색 결정이었고 m.p는 101 °C였으며, [α]_D=-46.4° (c=1.05, CH₂Cl₂)였다. 이 화합물이 비대칭형 리간드로써 작용하는 메카니즘을 확인하기 위하여, 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno[4,3-d]-(3aS, 6aR)-oxazolidin-2-one의 생성에 Pd 화합물과 같이 작용시켰다. 리간드와 팔라듐 금속을 2:1의 비율로 작용시켰더니 측정된 ee 량은 30%였고, 생성물의 수율은 81%였다. 이미 연구하였던 많은 종류의 C₂-손 대칭형 리간드와같이 이 화합물도 유사한 착물 중간체를 생성하지만, ee 량의 결정에 크게 영향을 미치지 않은 것으로 예상이 되었다.

Abstract. The new unsymmetrical ligand, 2, (S)-(-)-binaphthalene-bis-N,N'-(2,2'-diphenylphosphinobenzene)-2,2'-formamide with the polarization of [α]_D=-46.4° (c=1.05, CH₂Cl₂) and m.p of 101 °C was obtained in 65% yields from a few steps by using (S)-binaphthalene-2,2'-dicarboxylic acid for the starting material. In other side, this new compound, 2 was used to investigate the mechanism of asymmetric synthesis as a C₂-asymmetrical ligand for Pd-catalyst to produce 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno[4,3-d]-(3aS, 6aR)-oxazolidin-2-one. This ligand which was reacted in ratio of 2 times to palladium metal showed the amount of only 30% enantiomeric excess(ee) and 81% yield. This ee amount is very low as the case of general C₂-chiral ligands used in our lab. It seemed that this compound as an asymmetrical ligand would had a similar Pd-complex intermediate to other C₂-chiral ligand.

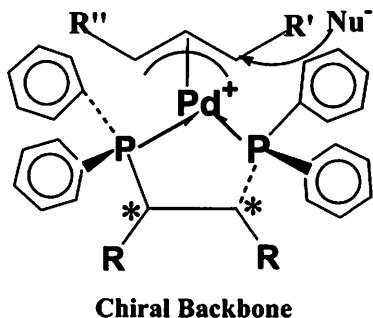
I. 서 론

본 연구실에서는 덩치가 큰 C₂-손대칭 리간드를 여러 종류 합성하여 팔라듐 착물과 작용시켜 측매로 활용하므로, 우선적인 비대칭유기합성

(chiral organic synthesis)을 위한 많은 연구가 수행되어 왔다.¹⁻⁷ Trost 등은 여러 종류의 비대칭 유기화합물을 합성하였고 상세한 메카니즘 규명을 위한 연구를 수행하고 있다.⁸⁻⁹ 그는 이러한 C₂-손대칭 리간드가 팔라듐 금속과 배위결합

Scheme 1. C_2 -Asymmetric and Unsymmetric Ligands

을 하므로, 상당히 큰 부피의 중간체 착물을 형성하고 넓은 입체적인 공간을 차지하므로 이때 빈 공간을 통해서 친핵체가 한 가지 방향으로만 도입되는 것으로 예상하여 높은 ee (high enantiomeric excess)상태의 생성물을 얻을 수 있다고 하였다.¹⁰ 다음 scheme 1에 본 연구실에서 이미 사용하였던 C_2 -손대칭 포스핀류 리간드를 나타내었으며, scheme 2에 Trost가 주장한 높은 ee 생성물을 얻기 위한 이론적인 뒷받침을 할 수 있는 근거를 제시하였다.¹¹⁻¹³



Scheme 2. Complex Intermediate for Asymmetric Synthesis

Scheme 1에 나타낸 몇 종의 C_2 -손 대칭형 리간드는 팔라듐 화합물과 결합이 되었을 때 scheme 2 와 같은 중간체를 생성시킬 것이다. 카이랄 골격 (chiral backbone)이 D-mannitol, dimethyl-L-tartrate, 그리고 anthracene을 출발 물질로 하여 C_2 -손 대칭형 리간드를 생성하였고 (I-III), diethyl tartarate를 골격(IV)으로 하는 비대칭형 리간드를 생성하였다.¹⁴

본 연구실에서는 scheme 1과 유사한 몇 종의 ligand를 새로이 합성하여 1(R),4(S)-

dihydroxycyclopent-2-ene과 p-toluenesulfonyl isocyanate를 반응시켰고 π -allylpalladiumchloride dimer 착물과 같이 반응시켰다. 생성물인 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno [4,3-d]-(3aS, 6aR)-oxazolidin-2-one이 거울상 이성질체를 포함하는 내용에 대한 일련의 연구를 하여왔다.

본 연구에서는 카이랄 골격으로 (S)-binaphthalene-2,2'-dicarboxylic acid를 출발물질로 이용하였으며, 연결부분(linker)도 -CO-NH- 또는 -COO-로써 이미 많이 이용되었던 -NH-CO-와는 반대 경우이다. 이러한 골격과 연결부분에 2-diphenylphosphinoaniline과 결합시켜 덩치가 큰 C_2 -손 대칭리간드(C_2 -chiral ligand)를 새로이 합성하고자 한다. 여기에 팔라듐 화합물과 반응시켜 촉매로 이용하므로, 얻어지는 생성물 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno-[4,3-d]- (3aS, 6aR)-oxazolidin-2-one의 입체이성질체에 대한 관계를 조사하여 그 반응 메카니즘을 밝히고, 비대칭 유기합성을 위한 리간드의 활용에 대해서도 조사하는 것이 본 연구의 목적이다.

II. 실 험

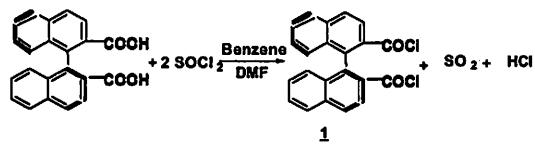
시약 및 기기.

본 연구에 사용된 시약은 Aldrich, Merck사, 그리고 Strem사 제품이었다. 여러 종류의 용매도 Aldrich, Merck사 그리고 국산제품이었으며, potassium, sodium, CaH₂등을 작용시키고 계속 환류시키면서 아르곤 가스를 불어주면서 증류된 것을 사용하였다. 생성물 분리를 위하여 사용한 chromatography용 충진체는 silica gel 60(독일 Merck사 제품)이었다. 생성물을 확인하기 위해

사용한 기기들중 NMR은 ¹H-과 ¹³C- 그리고 ³¹P-을 측정하기 위하여 Bruker Digital Avance DRX 400, Varian XL-300, Varian Gemini 200 등의 몇 가지 종류를 동시에 이용하였다. Mass Spectra는 Kratos MS 9 KFA spectrometer를 사용하였다. 원소분석은 Carlo Erba Elemental Analyzer CHNS-O EA1108로부터 결정되었으며, 각 화합물의 용점(m.p)은 Thomas-Hoover 용점 측정기로 측정하였다. 또 선광성을 조사하기 위한 편광계는 JASCO DIP-360(50 mm cell) 을 사용하였다. 각 화합물의 주요 작용기를 확인하기 위하여 IR은 Nicolet 205 spectrometer를 이용하여 각각의 spectra를 얻었다.

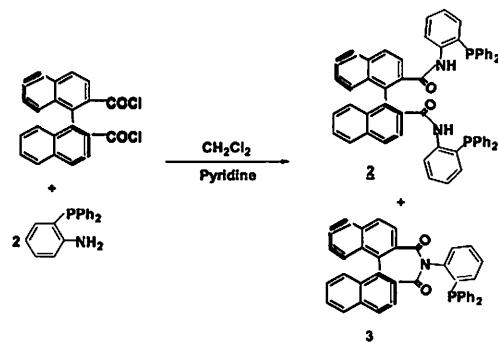
(S)-(-)-Binaphthalene-bis-N,N'-(2,2'-diphenylphosphino- benzene)-2,2'-formamide, 2의 합성

(S)-(-)-Binaphthalene-2,2'-dicarboxylic acid²⁰ 0.34 g(1 mmol)을 10mL 벤젠에 녹이고 실온에서 질소를 불어주면서 두 방울의 무수 DMF를 가하고 0.5 mL(6.8 mmol) SOCl₂를 작용시켰다. 반응혼합물은 소량의 질소를 불어주면서 환류시켰다. 150 분 후에 0.5 mL의 SOCl₂를 더 가해주고 계속해서 150 분 동안 환류하면서 반응시켰다. 반응물질을 냉각시킨 후에 모든 휘발성 성분을 제거하면 노란색 결정질 1의 화합물이 얻어지며, 이 화합물은 다음 반응에 직접 사용하였다.



50 mL Schlenk tube에 2-diphenylphosphinoaniline 0.277 g(1.0 mmol)을 넣고 3 mL pyridine과 3 mL methylene chloride를 같이 가하고, 실온에서 질소기류 하에 1의 화합물, (S)-(-)-binaphthalene-2,2'-dicarbonyl chloride 0.190 g(0.5 mmol)을 2 mL methylene chloride 녹여서 dropping funnel에 넣은 후에 천천히 방울방울로 떨어뜨리면서 반응시켰다. 모두 가한 후에 반응혼합물을 4시간

동안 환류시켰다. 실온까지 냉각시킨 후에 반응용액을 100 mL methylene chloride로 희석시키고 계속해서 50 mL NaHSO₄ 포화수용액으로 씻어주고, 또 50 mL NaHCO₃ 포화수용액, 그리고 물 50 mL와 소금물 50 mL로 씻어준 후에 무수 MgSO₄로 전조시키고 용매 methylene chloride는 증발시켜 제거시킨다. 생성물은 실리카겔 판크로마토그래피(25% ethylacetate/hexane 용매)로 분리하였더니 처음 분리되는 성분은 부산물 imide, 3이었으며, 두 번째 분리되는 물질은 목표로 하는 생성물, 2로 확인되었다.



생성물 2 : m.p = 101 °C(무색 유리질); 수율: 0.28 g (65%)

Rf = 0.16 (30% ethylacetate/hexane); [α]_D = -46.4° (c=1.05, CH₂Cl₂)

IR(neat film, from CDCl₃ solution): 3223, 2056, 1667, 1575, 1515, 1435, 1300, 909, 733, 697 cm⁻¹

¹H-NMR(CDCl₃, 300MHz): δ= 6.94(m, 2H), 6.83(m, 2H), 7.09-7.43(m, 32H), 7.86(m, 4H), 9.19(m, 2H)

¹³C-NMR(CDCl₃, 75MHz): δ= 123.18, 123.50, 125.08, 126.49, 127.06(d, J_{P,C}=6.1 Hz) 127.88, 128.13, 128.26, 128.49(d, J_{P,C}=6.1 Hz), 128.76, 129.79, 132.26, 133.56(d, J_{P,C}=19.7 Hz), 133.35(d, J_{P,C}=19.8 Hz), 133.93, 134.02, 134.59, 135.57, 140.98(d, J_{P,C}=21.3 Hz), 168.18.

³¹P-NMR(CDCl₃, 161MHz) : δ = -20.09(s)

Elemental Analysis : C₅₈H₄₂N₂O₂P₂(FW 860.92952)

calculated C% 80.92 H% 4.92 N% 3.25
found C% 80.69 H% 5.16 N% 3.26

부산물 3 : m.p = 179 °C(무색 침상결정질); 수
율: 0.08 g (27%)

R_f = 0.31 (30% ethylacetate/hexane); $[\alpha]_D$ =
 -225.6° ($c=1.05$, CH_2Cl_2)

IR(neat film, from CDCl_3 solution) : 3057, 1710,
1674, 1435, 1345, 1301, 1266, 1235, 1142,
909, 821, 757, 733, 697 cm^{-1}

$^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 , 300MHz) : δ =7.11–7.54(m, 21H),
7.85–8.05(m, 5H)

$^{13}\text{C-NMR}$ (CDCl_3 , 75MHz) : δ = 125.47, 126.43,
126.71, 127.60(d, $J_{\text{P,C}}=14.1$ Hz), 128.12
128.20, 128.28, 128.41, 128.49, 128.54,
128.90, 129.06 129.11, 129.17, 129.62, 130.67,
130.75, 131.23, 131.53, 133.51(d, $J_{\text{P,C}}=19.3$ Hz), 133.57(d, $J_{\text{P,C}}=19.9$ Hz), 134.12, 134.22,
134.59, 135.66, 136.03(d, $J_{\text{P,C}}=11.4$ Hz),
136.19(d, $J_{\text{P,C}}=12.5$ Hz), 137.42(d, $J_{\text{P,C}}=13.2$ Hz), 144.62(d, $J_{\text{P,C}}=28.4$ Hz), 171.35.

$^{31}\text{P-NMR}$ (CDCl_3 , 161MHz) : δ = -16.2(s)

Elemental Analysis : $\text{C}_{40}\text{H}_{26}\text{NO}_2\text{P}$ (FW 583.62466)
calculated C% 82.32 H% 4.49 N% 2.40
found C% 82.44 H% 4.76 N% 2.57

화합물 2를 리간드로 이용한 1-(*p*-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno(4,3-d)-(3a*S*,6a*R*)-oxazolidin-2-one의 생성

새로운 리간드 화합물 2, (S)-(-)-binaphthalene-bis-N,N'-(2,2'-diphenylphosphinobenzene)-2,2'-formamide를 이용하여, 출발물질인 cyclopentoxazolidin-2-one에 π -allyl-palladiumchloride dimer 화합물과 같이 작용시켜 거울상이성질체의 생성으로 ee 량을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.¹⁶

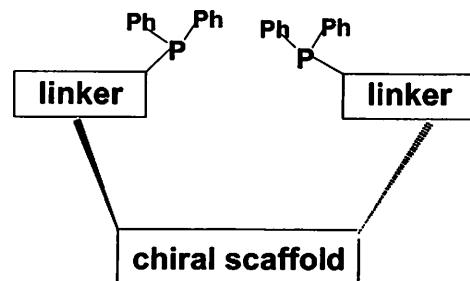
50ml Schlenk tube⁹ 1(R),4(S)-dihydroxycyclopent-2-ene 0.6g(6 mmol)과 무수 THF 5ml를 가한 후에 *p*-toluenesulfonyl isocyanate 1.89 ml(12.3 mmol)를 방울로 가하면서 반응시켰다. 다른 50ml Schlenk tube를 Ar가스로 채운 후에 화합물 2

0.516 g(0.6 mmol)과 π -allyl-palladiumchloride dimer 착물 55 mg(0.15 mmol)을 넣은 후에 감압하였다가 Ar가스를 불어넣고, 무수 THF 5ml를 용매로 작용시켰다. 이 용액을 1시간 동안 교반하면 반응물은 밝은 오렌지색으로 바뀌게 되고 0°C로 냉각시킨 후에, 상기의 biscarbamate 용액을 방울로 떨어뜨려 반응시켰다. 완전히 가하고, 0°C에서 3시간 동안 교반 시키면 반응이 일어난다. 용매를 제거하고 남는 찌꺼기는 실리카겔판 크로마토그래피(20% ethylacetate-hexane 용매)에 의해서 생성물을 분리하였으며, 이 화합물을 확인하기 위한 분석결과는 문헌치와 일치하였다. 수율은 2.7 g (81%)였다. $[\alpha]_D$ = -42.4 °(c = 3.13 methylene chloride 용매)였으며, ee 량은 30%이었다.

III. 결과 및 고찰

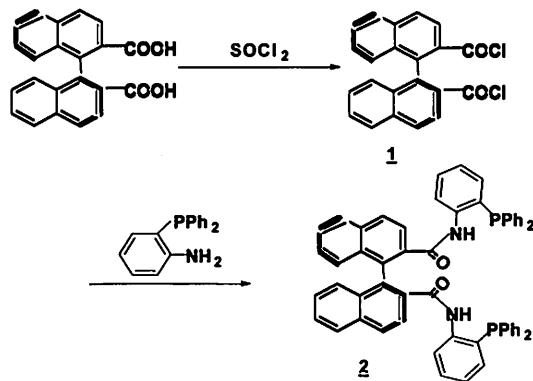
C_2 -손 대칭형 리간드, 2의 합성

본 연구실에서는 다년간 새로운 C_2 -손 대칭형 리간드를 합성하였으며 이들 리간드들이 촉매로 사용될 때, 예상되는 높은 ee 화합물을 생성하는지에 초점을 맞추어 많은 연구를 수행하여왔다. 그렇지만 이러한 연구에 대한 확실한 반응 메커니즘도 아직까지 결정되지 않은 상태이다.^{8-9,10-14} 따라서 본 연구에서는 C_2 -손 대칭형 리간드의 작용을 좀 더 구체적으로 밝히기 위하여 Scheme 3과 4에서 연결 부분(linker)에 산소와 질소의 순서를 바꾸어 주면서 이미 수행하였던 연구결과와 또 Trost 이론과 비교 하고자 한다. 새로운 C_2 -손 대칭형의 리간드를 생성하기 위해서는 (S)-(-)-binaphthalene-2,2'-dicarboxylic



Scheme 3. Framework of C_2 -Chiral Ligand

acid를 출발물질로 하여 몇 단계의 반응을 거쳐 합성하였다. 다음 Scheme 4에 이 리간드를 합성하는 전과정(total synthesis)을 나타내었다. 이 화합물을 생성하기 위하여 본 연구실에서 이미 수행하였던 연구와 유사한 과정과 반응을 거치게 된다.^{17,18}



Scheme 4. Total Synthesis of C₂-asymmetrical Ligand 2

생성물 2를 리간드로 이용한 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno[4,3-d]-(3aS, 6aR)-oxazolidin-2-one의 생성

본 연구실에서 이미 합성했던 여러 종류의 C₂-손대칭형 리간드를 이용하여 1(R),4(S)-dihydroxycyclopent-2-ene를 출발물질로 하여 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno-[4,3-d]-(3aS, 6aR)-oxazolidin-2-one을 생성하였으며 ee 량을 조사하였다.¹⁹ 본 연구에서도 같은 조건에서 유사한 내용의 실험을 수행하였다. 이미 조사된 결과와 비교하므로, 새로운 리간드의 작용과

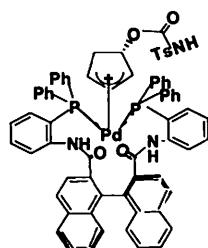
메카니즘에 대한 확인으로 본 연구의 목적에 부합되는지를 알아보고자 한다. 본 연구의 가능한 반응 메카니즘은 다음 Scheme 5와 같이 나타낼 수 있다고 생각된다.

리간드 2와 형성되는 예상되는 착물 중간체를 보면 친핵체(-OCON'Ts)가 allyl형의 탄소를 공격하는 방향은 이미 조사된 결과와도 어긋나지 않게 거의 일정할 것으로 예상된다.⁸⁻⁹ 이전 연구에서 리간드 I, II, III에서와 같이 C₂-손대칭 리간드 내에 측면 연결(linker)이 ester와 -CO-NH-의 경우 ee의 % 향상에 크게 작용되지 않는 것을 볼 수 있었다. 또 리간드 IV의 경우에도 연결부분이 서로 다른 비대칭 리간드의 경우에도 많이 연구되었던 결과가 크게 다르지 않음을 볼 수 있었다. 그 외에도 이전 연구와 같이 리간드 내에 상당히 부피가 큰 tert-butyltriazaphosphol이 공간을 차지하는 경우와 본 연구에서 친핵체 공격 방향이 다를 것으로 생각하였다.¹¹⁻¹³ 그렇지만 본 연구의 결과에 의한 생성물, 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno-[4,3-d]-(3aS, 6aR)-oxazolidin-2-one이 81%의 수율과 30%의 ee 량으로 얻어졌다. 따라서 얻어진 ee 량이 같은 조건에서 III의 경우와 비교하였을 때 대단히 저조하였으며, 이것은 같은 C₂-손대칭 리간드 경우 아직 뚜렷한 효과를 확정지울 수가 없지만 비슷한 팔라듐 착물 중간체(scheme 5)를 거쳐 가는 것으로 예상할 수 있다.

IV. 결 론

본 연구는 이때까지 본 연구실에서 수행해왔던 비대칭 유기합성을 위한 반응메카니즘을 확인하기 위하여, Trost 연구에 초점을 맞추어 다음과 같은 목표를 두고서 연구를 하였다.

첫째 본 연구에서는 새로운 비대칭형 리간드 화합물을 합성하였다. 새로운 리간드를 합성하기 위하여 (S)-(-)-binaphthalene-2,2'-dicarboxylic acid를 출발물질로 이용하였으며 thionyl chloride와 반응시켜 (S)-(-)-binaphthalene-2,2'-dicarbonyl chloride(1)를 95% 이상의 수율로 얻었다. 다음은 여기에 2-diphenylphosphinoaniloin을 반응시켜 예상하는 새로운 C₂-손 대칭형 리간드인,



Scheme 5. Expected Pd Complex Intermediate of Ligand 2

(S)-(-)-binaphthalene-bis-N,N'-(2,2'-diphenylphosphinobenzene)-2,2'-formamide(2)를 65%의 수율로 얻었으며, m.p는 101 °C(무색 유리질)였고, $[\alpha]_D = -46.4^\circ$ ($c=1.05$, CH_2Cl_2)였다.

둘째 본 연구실에서 많이 연구했던 C_2 -손 대칭 리간드와 유사한 다른 종류의 리간드를 사용하여 생성되는 화합물의 입체구조에 의한 ee 량을 조사하였다. 본 연구에서 새로이 합성된 리간드와 1(R),4(S)-dihydroxycyclopent-2-ene과 p-toluenesulfonyl isocyanate와 그리고 π -allyl-palladiumchloride dimer 착물을 반응시켰으며, 생성되는 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-enol[4,3-d]-[3aS, 6aR]-oxazolidin-2-one이 거울상 이성질 관계로 얻어졌다. 이때 리간드와 팔라듐 금속을 2:1의 비율로 작용시켰더니 측정된 ee 량은 30%였고, 생성물의 수율은 81%였다. 선광성의 특성으로 $[\alpha]_D = -42.4^\circ$ ($c = 3.13$ methylene chloride 용매)였다. 이 반응에서 일반적인 C_2 -손 대칭형 리간드와 팔라듐 금속과 거쳐 가는 착물 중간체가 유사한 것으로 예상할 수 있다. 따라서 친핵체 공격이 한 가지 방향으로만 특정 지워졌던 연구결과와 ee량에서 차이가 있다. 따라서 이전 연구에서와 같이 복잡하고 덩치가 큰 치환체를 갖는 C_2 -손 대칭 리간드를 과량으로 사용할 경우, 팔라듐 금속과 이중 착물 중간체를 형성하여 친핵체 공격을 차단한다고 생각되어 얻어지는 화합물의 입체특이성에 대한 ee 량은 낮아질 수 있다는 결론을 내릴 수 있을 것이다.

V. 인용문현

1. a) Henry, P. M.; 'Palladium Catalyzed Oxidation of Hydrocarbons'; Reidel Reidel Dordrecht, 1980 b) Heck, R. F.; In 'Palladium Reagents in Organic Synthesis'; Academic Press, New York, 1985 c) Maitlis, P. M.; 'The Organic Chemistry of Palladium', Academic Press, New York, 1971 d) Achavarren, A. M.; Tueting, D. R; Stille, J. K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 4039
2. a) Hayashi, T.; Yamamoto, A.; Hagihara, T.; Ito, Y., *Tetrahedron Lett.* 1986, 27, 191 b) Hayashi, T.; Yamamoto, A.; Ito, Y.; Nishioka, E.; Miura, H.; Yanagi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 6301
3. a) Leutenegger, U.; Umbrecht, G.; Fahrni, C.; Matt, P.V.; Pfaltz, A., *Tetrahedron*, 1992, 48, 2143 b) Matt, P.v.; Pfaltz, A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 566 c) Sprinz, J.; Helmchen, G., *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 1769 d) Peter, von Matt; Lloyd-Jones, Guy. C.; Minidis, A. B. E.; Pfaltz, A.; Macko, L.; Neuburger, M.; Zehnder, m.; Ruegger, H.; Pregosin, P. S., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 265
4. a) Noyori, R.; Kitamura, M. in *Modern Synthetic Methods*, R. Scheffold, Ed., Springer, 1989. b) Brunner, H. *Topics in Stereochemistry*, 1988, 18, 129
5. a) Finn, M.G.; Sharpless, K.B. in *Asymmetric Synthesis*, J.D. Morrison, Ed. Academic Press, 1985, Vol.5, 247 b) Trost, B. M., 'Comprehensive Organic Synthesis' Pergamon Press, Oxford, 1991
6. Sharpless, K.B.; et al., *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2768
7. Uozumi, Y.; Lee, S.Y.; Hayashi, T. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 7185
8. Trost, B. M.; Van Vranken, D. L.; Bingel, C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 9327
9. Trost, B. M.; Van Vranken, D. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 444
10. a) Trost, B. M. *Tetrahedron*, 1977, 33, 2615 b) Trost, B. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1989, 28, 1173 c) Trost, B. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 259 d) Trost, B. M.; Strege, P. E.; Weber, L.; Fullerton, T. J.; Dietsche, T. J. *J. Am. Chem. Soc.*, 1978, 100, 3407
11. a) Trost, B. M.; Breit, V.; Organ, M. G., *Tetrahedron Lett.*, 1994, 32, 5817 b) Uhm, J. K.; An, H. W.; Kim, H. R. *J Inst. Nat. Sci.*, (Keimyung Univ.), 1995, 14, 47

12. a)Trost, B. M.; Bunt, R. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 4089
b)Hegedus, L.S., *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 1988, 27, 1113
13. Trost, B. M.; Breit, B.; Peukert, S.; Zambrano, J.; Ziller, J.W., *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, 1995, 34, 2386
14. Uhm, J. K.; Lee, J. H., *J. Inst. Nat. Sci.* (Keimyung University) 2007, 26, 49
15. Regitz, M.; Scherer, O. J. 'Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry', Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1990
16. a)Uhm, J. K. *J. Inst. Nat. Sci.(Keimyung University)* 2001, 20, 13 b)Uhm, J. K.; Kim, J. J. *J. Inst. Nat. Sci.(Keimyung University)* 2000, 19, 19 c)Uhm, J.K. *J. Inst. Nat. Sci.(Keimyung University)* 1999, 18, 17
17. Canelli, G.; Manescalchi, F.; Martelli, G.; Panunzio, M.; Plessi, L., *Tetrahedron Lett.*, 1985, 28, 3369
18. Sugiyama, T; Sugawara, H; Watanabe, M; Yamashita, K., *Agri. Biol. Chem.*, 1984, 48, 1841
19. a)Uhm, J. K.; Yu, T. S. *J. Inst. Nat. Sci.* (Keimyung University) 1999, 19, 27
b)Uhm, J. K.; Trost, B. M. *J. Inst. Nat. Sci.*, (Keimyung Univ.) 1996, 15, 5
20. a)Stanley, W. M.; Adams, R., *Rec. Trav. Chim. Pays-Bas*, 1928, 48, 1035
b)Weil, K.; Kuhn, W., *Helv. Chim. Acta* 1944, 27, 1648 c)Barber, H. J.; Gaimster, K., *J. Appl. Chem.* 1952, 2, 565

플라본 계열의 싸이클린 의존 키나아제 저해제

이진호* · 엄재국
계명대학교 자연과학대학 화학과

Flavone derivatives as Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors

Jinho Lee* · Jae-kook Uhm

Department of Chemistry, Collage of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

요약. 플라본 계열의 화합물을 합성하여 싸이클린 의존 키나아제에 대한 저해능을 조사하였다. 3-하이드록시크로멘-4-온 유도체들은 싸이클린 의존 키나아제 2 (CDK2)와 싸이클린 의존 키나아제 4 (CDK4)에 대한 저해능을 보였으며, 8번 위치의 아미노기에 도입된 아마이드 치환체에 따른 저해능의 차이가 조사되었다.

Abstract. Flavone derivatives were synthesized and evaluated inhibitory activities against cyclin-dependent kinases. 3-Hydroxychromen-4-ones inhibited cyclin dependent kinase 2 (CDK2) activity and cyclin dependent kinase 4 (CDK4) activity. The effect of amide substituents linked to 8-amino group on inhibitory activity were investigated.

1. INTRODUCTION

The proliferation of normal cells is regulated by a combination of stimulatory and inhibitory factors that can respond to external signals in a coordinated manner. Various mitogens, growth factors, cytokines, and a host of other agents can perturb the cell cycle machinery eliciting proliferation, differentiation, or apoptosis. Any permanent alteration of the cell cycle-regulatory machinery can lead to a abnormal proliferation, resulting in neoplasia. Such a situation can result following the inactivation of various tumor suppressor proteins, such as Rb and its family members and p53, or by the dominant activation of positive-acting components of the cell cycle machinery, such as the cyclins and cyclin-dependent kinases(CDK) or proto-oncogenes.^{1,2}

The CDK activities are mandatory for cell

cycle progression and are probably the most important positive-acting molecules involved in its regulation. Given their significant role in cell cycle progression, the activity of CDK must be regulated very precisely by multiple machinery. First, they have to associate with cyclins for kinase activity. Since the levels of CDK remain relatively constant through out the cell cycle, it is the relative abundance of the cyclins that to a great extent determines the amount of CDK activity. However, the association with cyclins is not the only major positive determinant of CDK activity, but the specific phosphorylation on a conserved threonine residue is also a major determinant of CDK function. Second, CDK activities are negatively regulated by the class of proteins, Cip/Kip and INK families, known as cyclin-dependent kinase inhibitors (CDKI).^{3,4}

In several human tumor such as pancreatic

cancers, melanoma and breast cancer, CDK activities are not precisely regulated because of the abnormally high expression of cyclins and under or no expression of CDKIs.⁵ The dominant activation of CDKs in tumors renders the researcher to find CDK inhibitor as a anti-cancer drug.⁶ In theory, it will be possible to identify inhibitors of CDK activity which act through a number of different mechanisms, i.e., competition for substrates (ATP and peptide/protein), competition for cyclin binding, mimicking of CDK-inhibitory proteins, or stimulation of specific cyclin destruction. However, the small molecules that competes ATP are the most practical as a drug candidate.^{7,8} Numerous ATP competitive small molecular inhibitors had been published including compounds shown in Figure 1.^{6,9}

Flavonoids are phenylchromone derivatives that are ubiquitous in all plants. It has been shown that they have a variety of biological activities including anticarcinogenic activity.^{10,11}

Flavonoids displayed either inhibition or induction of the enzymes involved in the regulation of the cell proliferation¹²; for example, flavopiridol showed inhibitory activity against multiple kinases and was the first small molecule that went to the clinical trial as a CDK inhibitor.¹³ In an effort to search for CDK inhibitors, flavonol had been found as a hit. In

this article, the synthesis and the biological evaluations of 3-hydroxychromen-4-one derivatives as CDK inhibitor are reported. Variation at 8-position of chromen-4-one was performed via amide linkage.

2. EXPERIMENTAL

2-1. Reagents and Instruments

NMR spectra were recorded on a JEOL GSX-500 Fourier transform spectrometer; chemical shifts are reported in parts per million (δ) and signals are quoted as s (singlet), d (doublet), t (triplet), m (multiplet), br (broad). Mass spectra were obtained with Finnigan LCQ Ion trap Mass Spectrometer (Finnigan, San Jose, CA). All reactions were carried out under an atmosphere of nitrogen unless specified. Dry dichloromethane was obtained by distillation from CaH₂. Dry THF was obtained by distillation from Na and benzophenone.

2-2. Synthesis

(E)-3-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-1-(2-hydroxy-5-methyl-3-nitro-phenyl)-propenone (1). To a 1-(2-hydroxy-5-methyl-3-nitro-phenyl)-ethano ne (1.0 g, 5.1 mmol) in 80% aqueous ethanol were added benzo[1,3]dioxole-5-carbaldehyde (0.92 g, 6.13 mmol) and NaOH (0.61 g, 15.3

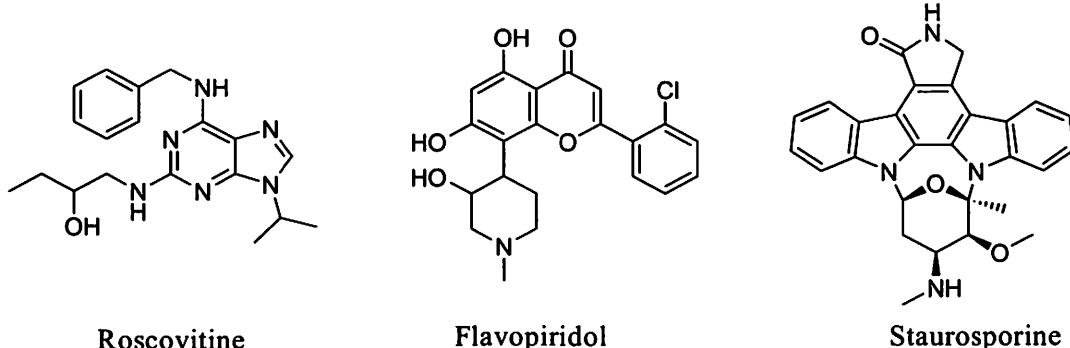


Figure 1. Small molecule inhibitors of cyclin-dependent kinases(CDK) in clinical trial

mmol). After stirring for 3 hours at room temperature, addition of 2M HCl provided yellowish solid. Filtration of solid followed by washing with excess water and MeOH gave the desired product 1.60g in 95 % yield.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 2.41 (3H, s), 6.05 (2H, s), 6.85 (1H, d), 7.18 (2H, m), 7.41 (1H, d), 7.82 (1H, d), 7.92 (1H, s), 8.02 (1H, s); FAB MS (m/e) = 328 [M⁺ +1].

2-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-3-hydroxy-6-methyl-8-nitro-chromen-4-one (2). To a solution of 1 (1.60 g, 4.89 mmole) in methanol (50 ml) were added H₂O₂ (7 ml) and 10% NaOH solution (7 ml). After stirring for 2 hours at room temperature, addition of 2M HCl and dilution with water provided solid. Filtration of solid followed by washing with excess water and MeOH gave the desired product 1.04g in 62 % yield.

¹H NMR (CDCl₃, 500 MHz) δ 2.63 (3H, s), 6.15 (2H, s), 7.16 (1H, d), 7.77 (1H, s), 7.89 (1H, d), 8.27 (1H, d), 8.41 (1H, s), 10.05 (1H, br); FAB MS (m/e) = 342 [M⁺ +1].

8-Amino-2-benzo[1,3]dioxol-5-yl-3-hydroxy-6-methyl-chromen-4-one (3). To a solution of 2 (1.04g, 3.04 mmole) in 50% MeOH/dichloromethane was added catalytic amount of palladium on charcoal. The reaction mixture was stirred 5 hours under H₂ atmosphere. After removal of palladium by filtration with aid of celite, evaporation of solvent provided the desired product 0.83 g in 87% yield.

¹H NMR (CDCl₃+CD₃OD, 500 MHz): δ 2.36 (3H, s), 6.05 (2H, s), 6.89 (1H, s), 6.95(1H, d), 7.31 (1H, d), 7.70 (1H, s), 7.77(1H, d); FAB MS (m/e) = 312 [M⁺ +1].

N-(2-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-8-yl)-3,4-dimethoxy-benzamide (4a). To a solution of 3 (0.020 g, 0.064 mmole) and potassium carbonate (0.027 g, 0.19 mmol) in dichloromethane and water mixture (2 ml, 2ml) was added 3,4-dimethoxybenzoyl chloride (0.026 g, 0.13 mmol) by dropwise. Stirring for 1 hour provided precipitate. Filtration and washing with excess water and diethyl ether provide the desired product as solid 0.024g in 79% yield.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.46 (3H, s), 3.86(3H, s), 3.87 (3H, s), 6.09 (2H, s), 7.04 (1H, d), 7.14 (1H, d), 7.66-7.90 (6H, m), 9.60 (1H, br), 10.26 (1H, s); FAB MS (m/e) = 476 [M⁺ +1].

N-[2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-8-yl]-3,4-dimethoxy-benzamide (5a). To a solution of 4a (0.024g, 0.051mmole) in dichloromethane (2ml) was added excess boron tribromide. The reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature. After addition of methanol, evaporation of solvents in reduced pressure provided solid. The desired product 0.019 g was obtained in 87% yield by washing the solid with dichloromethane.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.44 (3H, s), 6.76 (1H, d), 6.86 (1H, d), 7.45 (3H, m), 7.74 (3H, m), 9.14 (1H, d), 9.28 (1H, d), 9.30 (1H, s), 9.58 (1H, s), 9.67 (1H, s), 9.98 (1H, s); FAB MS (m/e) = 436 [M⁺ +1].

N-(2-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-8-yl)-3,4-dimethoxy-benzamide (4b). To a solution of 3 (0.020 g, 0.064 mmole) and potassium carbonate (0.027 g, 0.19 mmol) in dichloromethane and water mixture (2 ml, 2ml) was added 3,5-dichlorobenzoyl chloride (0.027 g, 0.13 mmol) by dropwise. Stirring for 1 hour provided precipitate. Filtration and washing with excess water and diethyl ether provide the desired

product as solid 0.024g in 77% yield.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.46 (3H, s), 6.09 (2H, s), 7.04 (2H, m), 7.64 (1H, s), 7.75 (1H, s), 7.81 (1H, s), 7.95 (1H, s), 8.05 (2H, s), 9.62 (1H, s), 10.66 (1H, s); FAB MS (m/e) = 484 [M⁺ +1].

N-[2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-8-yl]-3,4-di hydroxy-benzamide (5b). To a solution of 4a (0.024g, 0.050mmole) in dichloromethane (2ml) was added excess boron tribromide. The reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature. After addition of methanol, evaporation of solvent in reduced pressure provided solid. The desired product 0.023 g was obtained in 96% yield by washing the solid with dichloromethane.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.46 (3H, s), 6.81(1H, d), 6.89 (1H, s), 7.48 (1H, d), 7.74 (1H, s), 7.82 (1H, s), 7.94 (1H, s), 8.06 (2H, s), 10.62 (1H, br); FAB MS (m/e) = 472 [M⁺ +1].

N-(2-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-8-yl)-2-thiophen-2-yl-acetamide (4c). To a solution of 3 (0.030 g, 0.096 mmole) and potassium carbonate (0.040 g, 0.29 mmol) in dichloromethane and water mixture (2 ml, 2ml) was added 2-thienylacetyl chloride (0.031 g, 0.19 mmol) by dropwise. Stirring for 1 hour provided precipitate. Filtration and washing with excess water and diethyl ether provide the desired product as solid 0.025g in 59% yield.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.41 (3H, s), 4.03 (2H, s), 6.15 (2H, s), 7.00-7.07 (3H, m), 7.42 (1H, d), 7.70 (1H, s), 7.79 (3H, m), 9.60 (1H, br), 10.14 (1H, s); FAB MS (m/e) = 436 [M⁺ +1].

N-[2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-8-yl]-2-thiophen-2-yl-acetamide (5c). To a solution of

4a (0.025g, 0.057mmole) in dichloromethane (2ml) was added excess boron tribromide. The reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature. After addition of methanol, evaporation of solvents in reduced pressure provided solid. The desired product 0.0014 g was obtained in 4% yield by washing the solid with dichloromethane.

FAB MS (m/e) = 424 [M⁺ +1].

2-Benzo[1,3]dioxol-5-yl-N-(2-benzo[1,3]dioxol-5-yl-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-8-yl)-acetamide (4d). To a solution of 3 (0.030 g, 0.096 mmole) and 3,4-(methylenedioxy)phenylacetic acid (0.040 g, 0.22 mmol) in dimethylformamide were added ethyl dimethylaminopropylcarbodiimide hydrochloride (0.028g, 0.14 mmol), N-hydroxybenzotriazole (0.019 g, 0.14 mmol) and triethylamine (0.019g, 0.19 mmol). After stirring for 5 hour at room temperature, solvent was removed in reduced pressure. To the residue was added ethyl acetate and organic layer was washed with 1M NaOH solution and 1M HCl solution. After dried over magnesium sulfate, removal of solvent in vacuo provide the desired product 0.024g in 52% yield.

¹H NMR (DMSO-d₆): δ 2.38 (3H, s), 3.70 (2H, s), 5.96 (2H, s), 6.11 (2H, s), 6.85-7.00 (6H, m), 7.60-7.70 (2H, m), 7.95-8.00 (2H, m); FAB MS (m/e) = 474 [M⁺ +1].

N-[2-(3,4-Dihydroxy-phenyl)-3-hydroxy-6-methyl-4-oxo-4H-chromen-8-yl]-2-thiophen-2-yl-acetamide (5c). To a solution of 4a (0.024g, 0.051mmole) in dichloromethane (2ml) was added excess boron tribromide. The reaction mixture was stirred for 2 hours at room temperature. After addition of methanol, evaporation of solvents in reduced pressure provided solid. The desired product 0.013 g was obtained in 57% yield by washing the

solid with dichloromethane.

¹H NMR (CD₃OD, 500 MHz): δ 2.44 (3H, s), 3.70(1H, s), 5.48(1H, s), 6.79 (2H, m), 6.91(2H, m), 7.31 (1H, s), 7.75 (1H, s), 7.87(1H, s), 7.90(1H, d); FAB MS (m/e) = 450 [M⁺ +1].

2-3. Assay

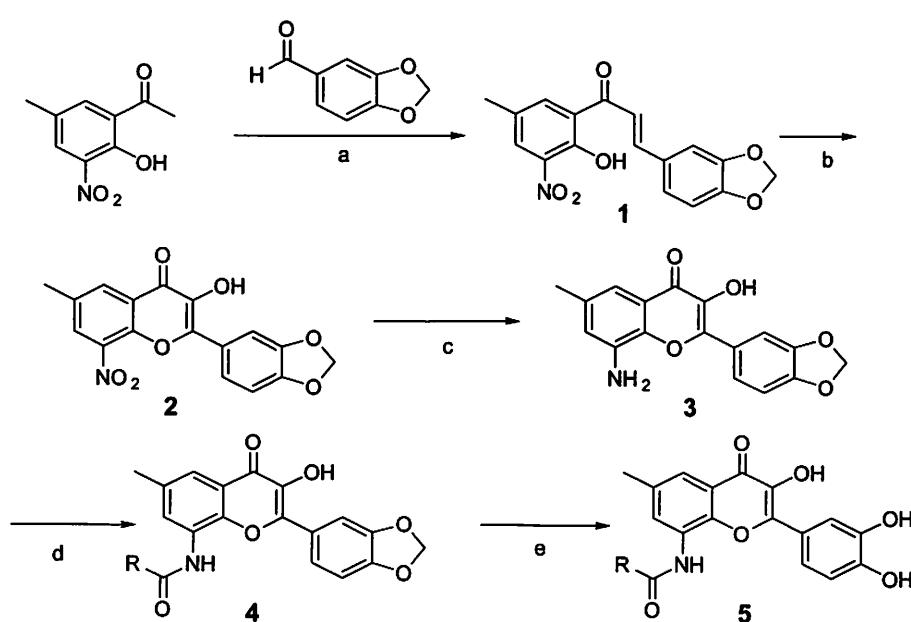
Analytical experiments on inhibitory effects for CDK 2 and CDK 4 proteins were performed in accordance with Carlson's method.¹⁴ CDK2 enzyme was obtained from either extract from the worm cell co-infected with baculovirus which expresses a CDK2 gene and baculovirus which expresses a cyclin A gene, or active enzyme purified therefrom. CDK4 was also obtained from either extract from the worm cell co-infected with baculovirus which expresses a CDK4 gene and baculovirus which expresses a cyclin D1 gene. As substrates, histone H1 or Rb protein was used for CDK2, and Rb

protein for CDK4. The radioactive activities in substrates were determined by reacting compounds diluted with each concentration with a proper quantity of CDK2/cyclin A or CDK4/cyclin D1 and substrate protein, and [γ -³²P labeled] ATP, and then separating the substrates.

Inhibitory abilities of inhibitors according to the present invention for each enzyme activity were expressed as IC₅₀ values, which were determined in accordance with the method as described above.

RESULTS AND DISCUSSION

3-Hydroxychromen-4-ones had been synthesized following the reaction scheme 1. Compound 1 had been obtained from the reaction between 1-(2-hydroxy-5-methyl-3-nitro-phenyl)-ethano ne and benzo[1,3]dioxole-5-carbaldehyde in the



Scheme 1. Synthesis of 3-Hydroxychromen-4-one: a) NaOH, 80% aqueous EtOH, b) 10% NaOH solution, H₂O₂, MeOH, c) H₂, 10% Pd/C, 50% MeOH/dichloromethane. d) RCOCl, K₂CO₃, dichloromethane, e) BBr₃, dichloromethane

presence of sodium hydroxide in 95% yield. Compound 2 has been obtained by treating compound 1 with hydrogen peroxide and sodium hydroxide in 62% yield. Palladium catalyzed reduction of nitro group followed by acylation provided compound 4. Deprotection of compound 4 with excess boron tribromide gave the desired compound 5.

Kinetic study showed that 3-hydroxychromen-4-one derivatives were competitive with ATP (data not shown). According to docking study of 5b, it bound to ATP binding pocket of the CDK2 (Figure 2). 3-Hydroxyl and 4-keto groups made two hydrogen bonds with carbonyl oxygen of Glu 81 and the amide nitrogen of Leu 83, respectively. The chromone ring made many van der Waals contacts with the hinge region of CDK2. The dihydroxyphenyl ring rotated about 30 degrees from the plane of chromone and bound complementarily to the pocket formed by Lys 33, Val 64, Phe 80, and Ala 144. Its 2-hydroxyl group formed third hydrogen bond with the side chain of Asp 145.

3-Hydroxychromen-4-one derivatives showed

inhibitory activity against both CDK2 and CDK4 (Table 1). The inhibitory activities of 3-hydroxychromen-4-one derivatives against CDK2 and CDK4 were about 1 uM range without kinase selectivity.

There were no remarkable dependencies on the structures of amide substituents. This can be explained by the orientation of R. The modeling study showed that the 3,5-dichlorobenzamide substituent was located at the solvent exposure region (Figure 3). As a result, substituent could not make H-bond or van der Waals interaction with CDK2 enzyme and could not contribute to the binding affinity.

CONCLUSION

3-Hydroxychromen-4-one derivatives had been synthesized and their inhibitory activity against CDK2 and CDK4 had been studied. 3-Hydroxychromen-4-ones showed the inhibitory activities against both CDK2 and CDK4 at uM range IC₅₀s. The modeling study showed binding mode of 3-hydroxychromen-4-one at the ATP binding pocket of CDK2.

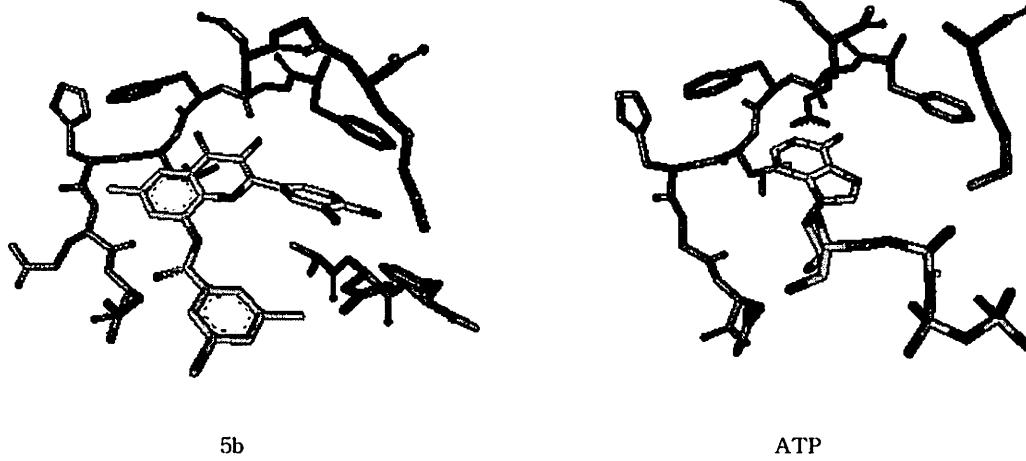
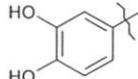
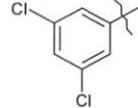
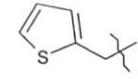
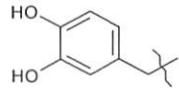


Figure 1. Model of 5b bound to CDK2 and Crystal structure of ATP bound to CDK2

Table 1. Inhibitory activities of flavone derivatives against CDK2 and CDK4.

| ID | R | IC ₅₀ (uM) CDK2 | IC ₅₀ (uM) CDK4 |
|----|--|-------------------------------|-------------------------------|
| 5a |  | 4.00 | 0.80 |
| 5b |  | 1.84 | 1.00 |
| 5c |  | 1.10 | 0.77 |
| 5d |  | 1.10 | 1.70 |

IC₅₀ values are the means of three experiments

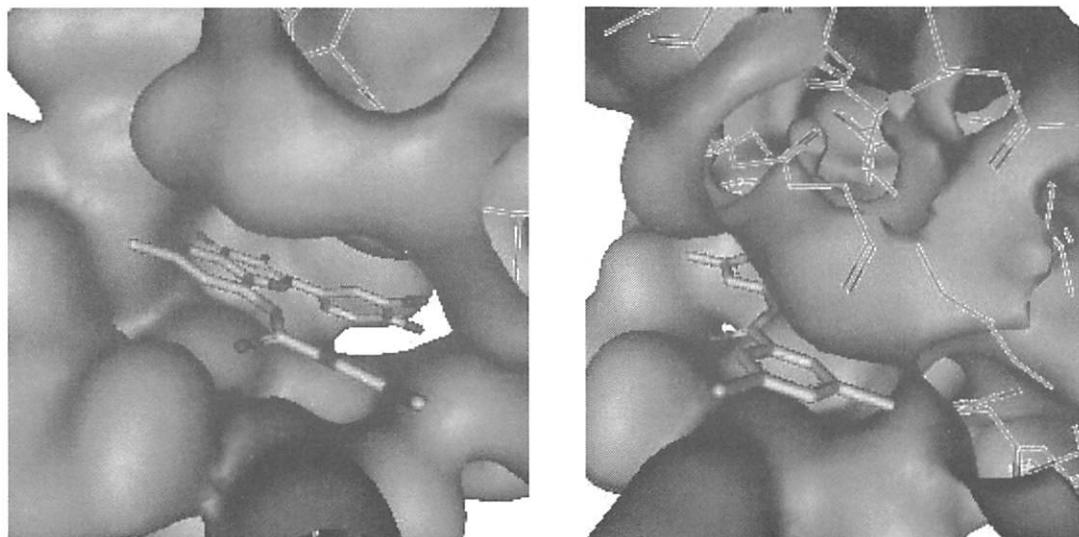


Figure 3. Modeling study of 5b

REFERENCES

- King, R. J. B. *Cancer Biology*, 1996, Longman, Singapore
- Vogt, P. K.; Reed, S. I., ed. "Cyclin Dependent Kinase (CDK) Inhibitors" in *Current Topics in Microbiology and Immunology* 227, 1998, Springer Verlag, Berlin
- Morgan, D. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997, 13, 261-291
- Meijer, L.; Guidet, S.; Philippe, M. ed. *Progress in Cell Cycle Research*, 1997, vol. 3, Plenum Press, New York
- Sellers, W. R.; Kaelin, W. G. Jr. *J. Clin. Oncol.* 1997, 15, 3301-3312
- Sausville, E. A.; Zaharevits, D.; Gussio, R.; Meijer, L.; Mouarn-Leost, M.; Kunick, C.; Schultz, R.; Lahusen, T.; Headlee, D.; Stinson, S.; Arbuck, S. G.; Senderowicz, A. *Pharmacol. Ther.* 1999, 82, 285-292
- Gray, N.; Detivaud, L.; Doerig, C.; Meijer, L. *Curr. Medicinal Chem.* 1999, 6, 859-875
- Toogood, P. L. *Medicinal Res. Rev.* 2001, 21, 487-498
- (a) Lin, R.; Lu, Y.; Wetter, S. K.; Connolly, P. J.; Turchi, I. J.; Murray, W. V.; Emanuel, S. L.; Gruninger, R. H.; Fuentes-Pesquera, A. R.; Adams, M.; Pandey, M.; Moreno-Mazza, S.; Middleton, S. A.; Jolliffe, L.K. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2005, 15, 2221-2224. (b) Bathini, Y.; Singh, I.; Harvey, P. J.; Keller, P. R.; Singh, R.; Micetich, R. G.; Fry, D. W.; Dobrusin, E. M.; Toogood, P. L. *ibid.* 2005, 15, 3881-3885. (c) Shudong Wang, S.; Gavin Wood, G.; Christopher Meades, C.; Gary Griffiths, G.; Carol Midgley, C.; Iain McNa, I.; Campbell McInnes, C.; Sian Anderson, S.; Wayne Jackson, W.; Mokdad Mezna, M.; Rhoda Yuill, R.; Malcolm Walkinshaw, M.; Peter M. Fischer, P. M. *ibid.* 2004, 14, 4237-4240. (d) Byth, K. F.; Culshaw, J. D.; Green, S.; Oakes, S. E.; Thomas, A. P. *ibid.* 2004, 14, 2245-2248
- Middleton, E., Jr.; Kandaswami, C.; Theoharides, T. C. *Pharmacol. Rev.* 2000, 52, 673.
- Ren, W.; Qiao, Z.; Wang, H.; Zhang, L. *Med. Res. Rev.* 2003, 29, 519.
- (a) Lo'pez-La'zaro, M. *Curr. Med. Chem.-Anti-Canc. Agents* 2002, 2, 691; (b) Casagrande, F.; Darbon, J.-M. *Biochem. Pharmacol.* 2001, 61, 1205.
- Sedlacek, H. H.; Czech, J.; Naik, R.; Kaur, G.; Worland, P.; Losiewicz, M.; Parker, B.; Carlson, B.; Smith, A.; Senderowicz, A.; Sausville, E. *Int. J. Oncol.* 1996, 9, 1143
- Carlson, B. A.; Dubay, M. M.; Sausville, E. A.; Brizuela, L.; Worland, P. J. *Cancer Research* 1996, 56, 2973-2978.

폴리(옥시비스페닐옥시테트라메틸다이실록세인)의 합성 및 특성

정인경 · 박영태*
계명대학교 자연과학대학 화학과

Synthesis and Characterization of Poly(oxybisphenyloxytetramethyldisiloxane)s

In Kyung Jung and Young Tae Park*

Department of Chemistry, Collage of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

요약. Bichlorotetramethyldisiloxane(I)을 diethylamine과 반응시켜 두 개의 chlorine 작용기를 diethylamine 작용기로 모두 치환시킴으로써 bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane(II) 유기규소 화합물을 합성하였다. 생성된 화합물을 단위체로 하여 bisphenol A, 4,4'-hexafluorobisphenol A과 각각 용융 공중합반응을 진행하여 새로운 형태의 유기 규소 고분자인 poly(oxybisphenyloxytetramethyldisiloxane)(III) 및 poly(oxyhexafluorobisphenyloxytetramethyldisiloxane)(IV)을 합성하였다. 얻어진 고분자 물질들은 THF 또는 CHCl₃ 등의 일반적인 유기용매에 용해되어 분자량을 측정할 수 있었다. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, 및 ²⁹Si-NMR 스펙트럼에서는 확인하고자 하는 피크를 관찰 할 수 있었으며, UV-VIS 흡수 스펙트럼에서는 299, 310nm와 275, 282nm에서 각각 최대 흡수 띠를 관찰하였으며, 적외선 흡수 스펙트럼에서는 특성적인 신축 진동에 의한 흡수 피크가 나타남으로써 얻고자 하는 고분자 물질이 얻어졌음을 알 수 있었다. 합성한 고분자의 둘뜬 상태 스펙트럼과 형광방출 스펙트럼 그리고 질소 대기 하에서의 TGA 열 중량 분석에 대하여 고찰하였다.

Abstract. Bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane(II) was synthesized by the substitution reaction of dichlorotetramethyldisiloxane(I) with diethylamine. A new silicon-containing polymeric materials of poly(oxybisphenyloxytetramethyldisiloxane)(III) and poly(oxyhexafluorobisphenyloxytetramethyldisiloxane)(IV) were prepared by the melt copolymerization of bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane(II) with bisphenol A and hexafluorobisphenol A, in respect. The obtained polymers are soluble in usual organic solvents such as THF and CHCl₃, and the average molecular weights are turned out to be M_w of 6550 and 5863 with polydispersities M_w/M_n of 1.79 and 2.01 respectively. The prepared materials were fully characterized by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and ²⁹Si-NMR along with IR spectroscopies. The electronic properties of the fluorescent polymers were investigated by absorption, excitation, and emission spectrophotometers along with their thermal properties by TGA.

I. 서 론

규소(Silicon)는 주기율표에서 IVA(또는 14)족에 속하는 비금속원소이며, 지구상에서 산소 다음으로 많이 존재하는 원소이다. 규소원소는 원자번호가 14번이며, 원자량 28.08, 원자반지름

1.64 Å, 293 K에서 밀도가 2.33 g/cm³, 녹는점 1410 °C, 끓는점 2355 °C인 물질로 알려져 있다.¹

1824년 최초의 규소 염화물인 무색 휘발성 액체인 SiCl₄가 합성되었고, 1857년 독일의 Wöhler는 규소와 탄소를 섞은 후 가열하면서 HCl 기체를 그 위에 통과시켜서 trichlorosilane을 합성하였

다.^{1,2} 1945년 미국의 Rochow에 의해 금속 규소원소와 유기 할로겐 화합물을 Cu촉매 하에서 반응시켜 methylchlorosilane 류를 제조하는 소위 직접 합성법(direct synthesis)이 개발되었다.^{3,4} Rochow는 dimethyldichlorosilane의 합성에서 구리가 가장 좋은 촉매임을 발견했고 구리를 촉매로 사용한 반응에서 고체 규소에 methylchloride(MeCl) 기체를 통과시켜 합성하였다.

오늘날 규소화학 공업에서는 이러한 유기염화 실란의 대량생산이 가능해짐으로써 최근에는 규소원소가 포함된 많은 종류의 새로운 무기 고분자 물질에 대한 연구와 신소재로서의 활용이 크게 확산되어 가고 있는 실정이다.^{2,5-9}

1978년에 Yajima에 의해 실리콘 카바이드(SiC)세라믹의 원료로 사용되는 polysilane을 열처리하는 과정에서 반응의 중간체로서 먼저 폴리카보실란(polycarbosilane)으로 변한다는 소위 Yajima Process가¹⁰ 보고되면서 폴리카보실란 류의 유기규소 고분자물질에 관한 연구가 활기를 띠게 되었다.^{11,12} 하나의 예를 들면, 1988년 미국의 Weber는 silacyclopent-3-ene 유도체와 alkylolithium 류의 염기를 이용한 음이온 개환 중합반응(anionic ring opening polymerization)을 통하여 새로운 형태의 폴리카보실란을 합성하기도 하였다.^{13,14}

규소 원소와 산소 원소가 포함된 유기규소 고분자 화합물인 polysiloxane(일명 silicone)은 내열성, 내한성, 내약품성, 발수성, 전기적인 절연성 및 화학적 불활성 등 우수한 장점으로 인해 산업적으로 많이 응용되고 있다.¹⁵

최근에는 여러 가지 유기규소 화합물의 반응을 통하여 합성된 유기규소 고분자물질들이 건축재료, 계면활성제, 세라믹 원료, 반도체 전자재료, 태양 전지, 그리고 실리콘 고무 등 산업의 전 분야에 걸쳐 활용되고 있다.²⁻⁶

본 연구에서는 새로운 유기 규소 화합물인 bis(diethylamino)tetramethylidisiloxane(II)을 합성하고, bisphenol A 및 hexafluorobisphenol A와의 용용공중합 반응을 진행하여 tetramethylidisiloxane 을 포함하는 새로운 유기 규소 고분자 poly(oxybisphenyloxytetramethylidisiloxane)(III) 및 poly(oxyhexafluorobisphenyloxytetramethylidisiloxane)

(IV)을 각각 합성하고자 한다. 합성하는 각각의 화합물에 대하여 다양한 분광기기로 구조분석을 하여 특성을 명확히 결정하고자 한다.

II. 실험

1. 일반적인 사항

본 실험에서 사용한 시약은 Aldrich사의 특급 시약을 정제하여 사용하였으며, 아르곤 기체는 국내에서 생산되는 99.999% 이상 고순도의 것을 구입하여 건조관을 통과시킨 뒤 사용하였고, 용매는 Baker의 특급 제품을 사용하였다.

출발물질로는 Aldrich사의 dichlorotetramethylidisiloxane(I)을 구입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였고, diethylamine은 KOH로 정제하여 사용하였다. 용매로는 hexane을 아르곤 대기 하에서 sodium과 benzophenone을 적당량 넣고 환류시키고 증류하여 사용하였다.

본 실험에서 사용한 기기는 다음과 같다. UV-Vis 스펙트럼은 HP-8453E를 사용하였고, IR 스펙트럼은 Bruker IFS 48 분광광도계를 사용하여 얻었으며, 액체 시료 용기에 2장의 KBr판 사이에 spacer(0.025 cm)를 끼우고 여기에 액체시료를 주입하여 측정하였다. ¹H-NMR 및 ¹³C-NMR 스펙트럼은 Bruker AVANCE 400 분광계를 사용하여 얻었다. ²⁹Si-NMR 스펙트럼은 Varian Inova 400 분광계를 사용하여 얻었다. 용매로는 CDCl₃를 사용하였으며 표준물질로는 TMS를 사용하였다. 질량분석 스펙트럼은 Mass Hewlett Packard 5971A MSD를 사용하여 얻었으며, 70 eV에서 전자살 충격법을 이용하였다. 분자량을 측정하기 위해 사용한 겔 투과 크로마토그래피(GPC)는 Waters 1525 펌프, Waters Styragel HR 3 컬럼, 그리고 40 °C에서의 굽질률 검출기로 구성하였으며 Breeze 소프트웨어 시스템을 사용하였다. GPC 용매는 THF이며 flow rate은 0.3 mL/min이고 표준물질은 polystyrene (M_p= 474, 2950, 9650, 18600)을 사용하였다. 둘째 상태 스펙트럼 및 형광방출 스펙트럼은 Spex Fluorolog 3-11 형광광도계를 사용하여 측정하였다. 열무게 분석은 Shimadzu TGA-60을 이용하여 상온에서 900 °C까지 10 °C/min씩 온도를 올려주면서 질소 대

기 하에서 측정하였다(질소 flow rate: 20 cm³/min).

2.1. Bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane (II)의 합성

1000mL 삼구 플라스크에 냉각기와 적하깔때기를 설치하고, 자석젓개를 넣고 아르곤 기체 대기 하에서 불꽃 전조시켜 용기 내부의 습기를 제거한다. 여기에 아르곤 기체를 계속 훌러 주면서 hexane(150mL)과 diethylamine 33.4g(0.46mol)을 넣는다. 그리고 적하 깔때기에는 dichlorotetramethyldisiloxane 20g(0.10mol)을 넣고 ice bath에서 온도를 떨어뜨린 후 서서히 적하시킨다. 이 혼합물을 하루 동안 교반하면서 반응시키고, 감압 여과하여 반응 동안에 형성된 침전물을 제거하고 액체 상태의 화합물을 분리해낸다. 이것을 단순 증류하여 용매를 제거한 후에 다시 감압증류 하여 무색 액체 상태의 순수한 생성물 bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane (I) 15.7g(수득률, 56%)을 얻었다. bp: 67 °C/4 mmHg, ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 0.05(s, 12H), 0.98(t, J=8 Hz, 12H), 2.82(q, J=8Hz, 8H); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃): δ -0.43, 15.52, 39.41; ²⁹Si-NMR (99 MHz, CDCl₃): δ -13.54; IR (KBr disk): ν 2963, 2930, 2865(v_{C-H}), 1374, 1255, 1206(v_{Si-C}), 1174, 1059(v_{C-N}), 1023(v_{Si-O}), 928(v_{Si-N}), 828, 788 cm⁻¹; MS: m/z (relative intensity) 278(3), 277(7), 276(M⁺, 28), 261(M⁺-CH₃, 5), 206(8), 205(19), 204(M⁺-NET₂, 96), 203(18), 202(40), 192(8), 191 (17), 190(M⁺-NET₂-CH₂, 100), 189(13), 188(67), 176(16), 175(16), 174(88), 160(9), 134(10), 133(68), 123(14), 119(16), 95(6), 58(2).

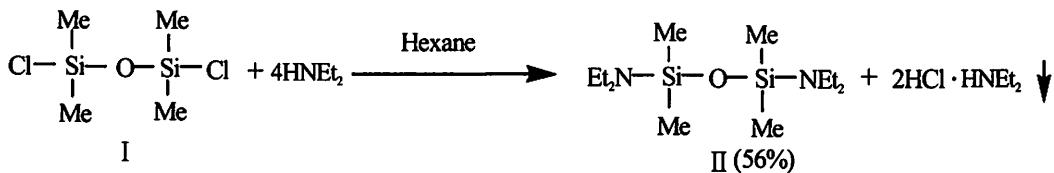
2.2. Poly(oxybisphenyloxytetramethyldisiloxane) (III)의 합성

50 mL 등근바닥플라스크에 냉각기를 설치하고 불꽃 전조시켜 용기 내부의 습기를 모두 제거한다. 여기에 아르곤 기체를 훌러주면서 bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane 2.78 g(10 mmol)과 bisphenol A 2.28 g(10 mmol)을 넣는다. 반응 혼합물이 들어 있는 플라스크의 온도를 130 °C로 가열 망태기를 이용하여 가열하면서 12시간동안 반응시키고, 다

시 200 °C로 10시간 반응시킨 후, 최종적으로 260 °C에서 2시간동안 반응시킨다. 반응이 끝난 후 얻어진 생성물을 소량의 THF로 녹인 후 소량의 methanol로 침전시켜 원심분리를 한다. 상층을 분리해내고 가라앉은 하층을 대기 중에서 하루 동안 건조시킨 후 진공오븐에서 202 °C로 3일 동안 건조시켜 갈색 고체 상태의 순수한 생성물 poly(oxybisphenyloxytetramethyldisiloxane)(III) 2.96 g(수득률, 83%)을 얻었다. ¹H-NMR(400MHz, CDCl₃): δ(ppm) 0.06~0.34(s, 12H), 1.62(s, 6H), 6.73(d, J=8.8Hz, 4H), 7.09(d, J=8.8Hz, 4H); ¹³C-NMR(100MHz, CDCl₃): δ(ppm) 2.0, 31.0, 41.7, 114.7, 127.6, 143.3, 153.2; ²⁹Si-NMR(99MHz, CDCl₃): δ(ppm) -13.21; IR (KBr disk): ν(cm⁻¹) 3059(v_{C-H}), 2960(v_{C-H}), 1503, 1442, 1258(v_{Si-C}), 1034(v_{Si-O}), 802, 507, 492cm⁻¹; UV-Vis(THF): λ_{max} nm(ε): 299(3.8X10³ M⁻¹cm⁻¹), 310(4.3X10³ M⁻¹cm⁻¹); Elem. Anal. Calcd for (C₁₉H₂₆Si₂O₃)_n: C, 63.7; H, 7.3. Found: C, 70.5; H, 6.3; 둘뜬 상태(excitation) 스펙트럼과 형광방출(emission) 스펙트럼 그리고 질소 대기 하에서의 TGA 열중량 분석 자료는 결과 및 고찰에 서술하였다.

2.3. Poly(oxyhexafluorobisphenyloxytetramethyldisiloxane)(IV)의 합성

50 mL 등근바닥플라스크에 냉각기를 설치하고 불꽃 전조시켜 용기 내부의 습기를 모두 제거한다. 여기에 아르곤 기체를 훌러주면서 bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane 2.78 g(10 mmol)과 4,4'-hexafluorobisphenol A 3.36 g(10 mmol)을 넣는다. 반응 혼합물이 들어 있는 플라스크의 온도를 130 °C로 가열 망태기를 이용하여 가열하면서 12시간동안 반응시키고, 다시 200 °C로 10시간 반응시킨 후, 최종적으로 260 °C에서 2시간동안 반응시킨다. 반응이 끝난 후 얻어진 생성물을 소량의 THF로 녹인 후 소량의 methanol로 침전시켜 원심분리를 한다. 상층을 분리해내고 가라앉은 하층을 대기 중에서 하루 동안 건조시킨 후 진공오븐에서 202 °C로 3일 동안 건조시켜 갈색 고체 상태의 순수한 생성물 poly(oxyhexafluorobisphenyloxytetramethyldisiloxane) (IV) 4.09 g(수득률, 88%)을 얻었다. ¹H-NMR



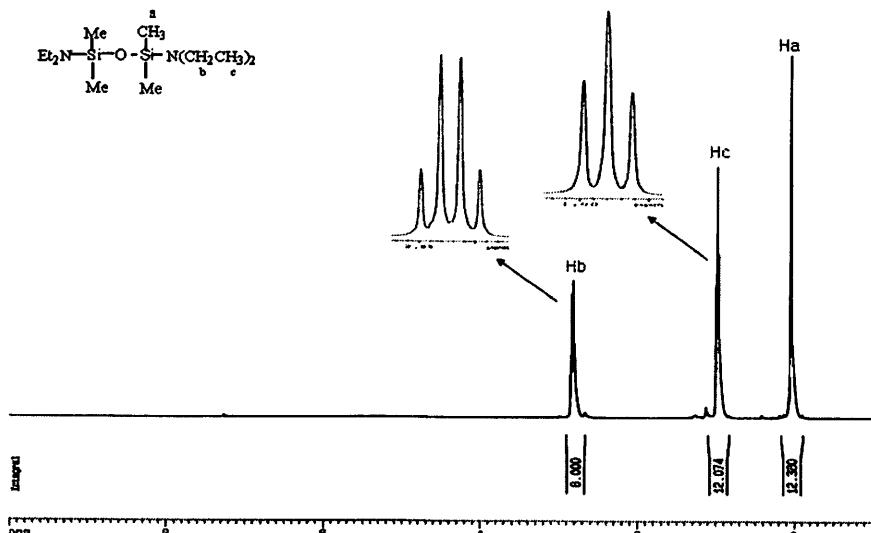
Scheme 1

(400MHz, CDCl_3): δ (ppm) 0.06~0.26(s, 12H), 6.80~6.83(m, 4H), 7.24~7.26(m, 4H); ^{13}C -NMR (100MHz, CDCl_3): δ (ppm) -0.5, 1.0, 29.7, 63.2, 63.5, 63.7, 114.9, 125.6, 131.7, 155.9; ^{29}Si -NMR (99MHz, CDCl_3): δ (ppm) -13.58 IR (KBr disk): ν (cm $^{-1}$) 3049($\nu_{\text{C-H}}$), 2963($\nu_{\text{C-H}}$), 1612, 1513, 1248($\nu_{\text{Si-C}}$), 1207, 1170, 1084($\nu_{\text{C-F}}$), 1027($\nu_{\text{Si-O}}$), 800, 491cm $^{-1}$; UV-Vis(THF): λ_{max} nm(ϵ): 275($5.4 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$), 282($4.8 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$); Elem. Anal. Calcd for $(\text{C}_{19}\text{H}_{20}\text{F}_6\text{Si}_2\text{O}_3)_n$: C, 49.0; H, 4.3. Found: C, 49.5; H, 3.8; 둘다 상태 (excitation) 스펙트럼과 형광방출(emission) 스펙트럼 그리고 질소 대기 하에서의 TGA 열 중량 분석 자료는 결과 및 고찰에 서술하였다.

III. 결과 및 고찰

Dichlorotetramethyldisiloxane(I)을 diethylamine과 반응시켜 두 개의 chlorine 작용기를 diethylamine 작용기로 모두 치환시킴으로써 수득률 56%의 bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane(II) 유기 규소 화합물을 합성하였다(Scheme 1).

합성한 화합물 II의 ^1H -NMR 스펙트럼은 Figure 1에 나타내었다. 합성한 화합물 II의 ^1H -NMR 스펙트럼을 살펴보면, methyl기에 의한 수소피크가 0.05ppm에서 단일 선으로, ethyl의 CH $_3$ 에 의한 수소피크가 0.98ppm에서 삼중선으로, CH $_2$ 에 의한 수소피크가 2.82ppm에서 사중선으로 각각 관찰되었다. 또한 methyl기의 수소와 ethyl기의 수소에 대한 면적 적분비도 약 3:3:2로서 수소 수에 일치함을 보여준다.

Figure 1 ^1H NMR Spectrum of compound II.

합성한 화합물 II의 ^{13}C -NMR의 스펙트럼을 Figure 2에 나타내었다. 화합물 II의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 살펴보면, methyl기에 의한 탄소피크가 -0.43ppm 에서, ethyl기의 CH_3 에 의한 탄소피크가 15.52 , CH_2 에 의한 탄소피크가 39.41ppm 에서 각각 관찰되었다. 또한, 합성한 화합물 II의 ^{29}Si -NMR 스펙트럼을 Figure 3에 나타내었다. 화합물 II의 ^{29}Si -NMR 스펙트럼에서 하나의 규소 피크가 -13.54ppm 에서 관찰되었다.

그리고, 화합물 II의 적외선 흡수 스펙트럼은

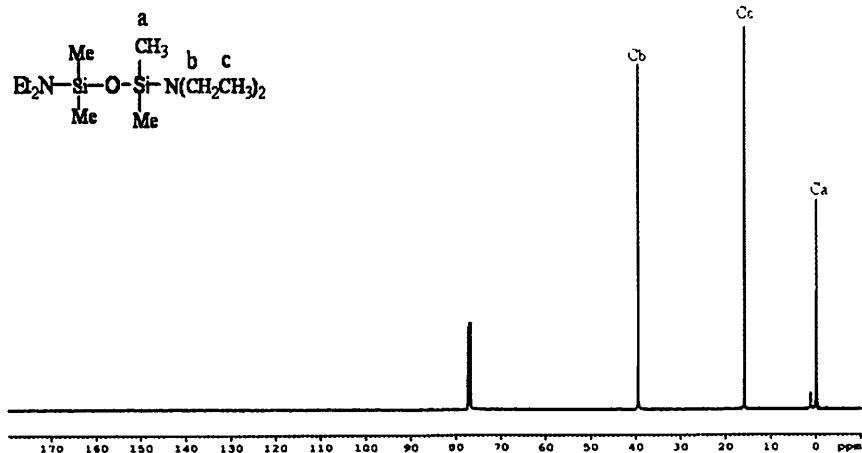


Figure 2 ^{13}C NMR Spectrum of compound II.

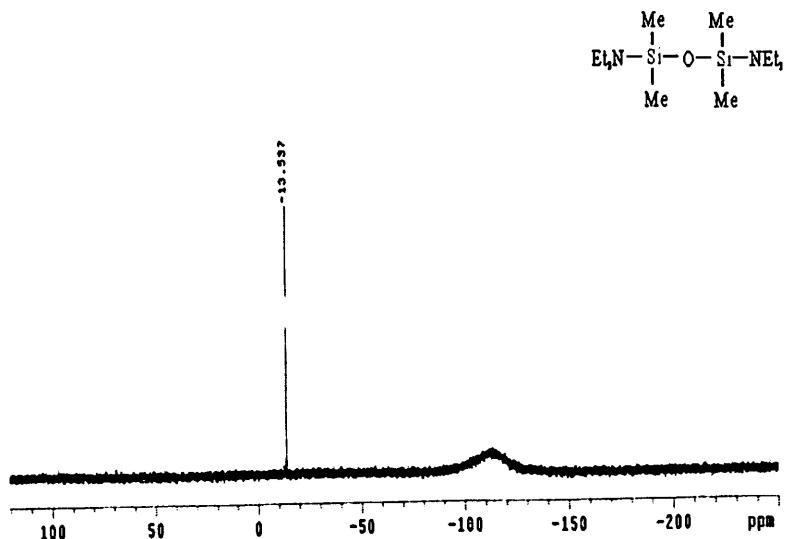


Figure 3. ^{29}Si -NMR spectrum of compound II.

Figure 4에 나타내었다. 스펙트럼을 살펴보면, 화합물 C-H의 신축 진동에 의한 흡수 띠가 2963 , 2930 및 2865cm^{-1} 에서 나타나는 것을 관찰 할 수 있으며, Si-C의 신축진동에 의한 흡수 띠가 1206cm^{-1} 에서, C-N의 신축 진동에 의한 흡수 띠가 1059cm^{-1} 에서, Si-O의 신축 진동에 의한 흡수 띠가 1023cm^{-1} 에서 나타나는 것을 관찰할 수 있었다. 그리고 이 실험에서 합성한 화합물에서 가장 큰 특징인 Si-N 신축 진동에 의한 흡수 띠가 928cm^{-1} 에서 나타나는 것을 관찰할 수 있었다.

Figure 5에 나타난 질량 분석 스펙트럼에서는 분자 이온 피크 (M^+)에 해당하는 m/z 값이 276에서 관찰되었고, $M^+ \text{-CH}_3$ 에 해당하는 값은 261, $M^+ \text{-NEt}_2$ 에 해당하는 값은 204, $M^+ \text{-NEt}_2\text{-CH}_2$ 에 해당하는 값은 190으로 각각 관찰되었다.

두 개의 diethylamine 작용기를 지닌 유기규소

화합물인 bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane (II)을 사용하여 bisphenol A와 용융 공중합반응을 진행하여 새로운 형태의 유기 규소 고분자인 poly(oxybisphenyloxytetramethyldisiloxane)(III)을 83%의 수득률로 합성하였다. 이들의 합성과정을 Scheme 2에 나타내었다.

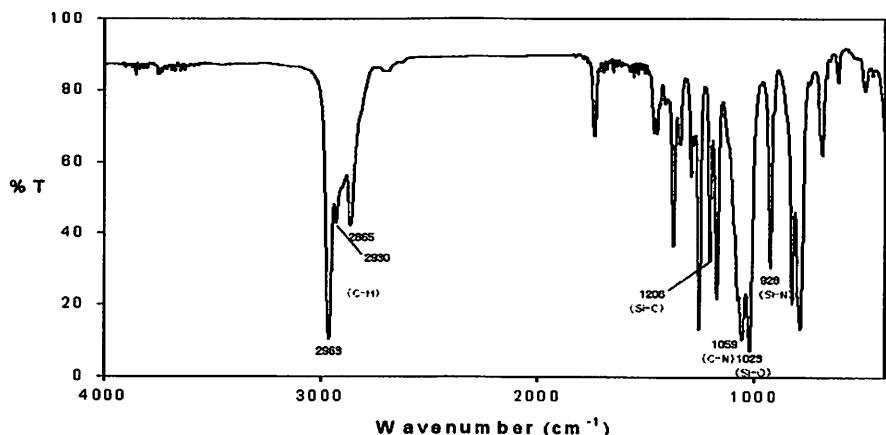


Figure 4. IR spectrum of compound II.

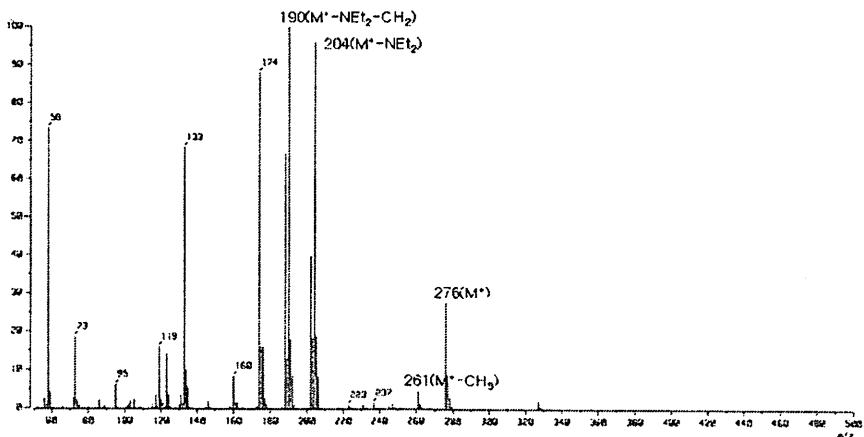
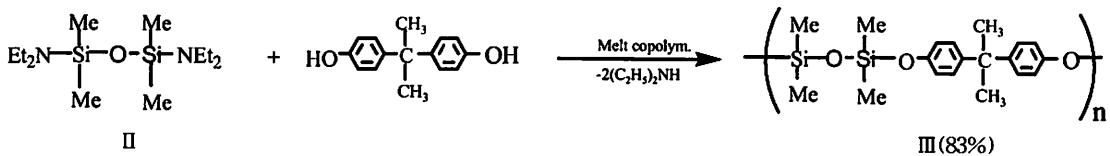


Figure 5. MS spectrum of compound II.



Scheme 2

합성한 화합물 III의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 Figure 6에 나타내었다. 합성한 화합물 III의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 살펴보면, Si에 결합된 CH_3 에 의한 수소피크가 0.06~0.34ppm에서 단일 선으로, C에 결합된 CH_3 에 의한 수소피크가 1.62ppm에서 단일 선으로, C_6H_4 에 의한 수소피크가 6.73 및 7.09 ppm에서 이중선으로 각각 관찰되었다.

합성한 화합물 III의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼은 Figure 7에 나타내었다. 합성한 화합물 III의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 살펴보면, Si에 결합된 CH_3 에 의한 탄소피크가 2.0ppm에서, bisphenyl

기의 CH_3 와 C에 의한 탄소피크가 31.0, 41.7ppm에서 C_6H_4 에 의한 탄소피크가 114.7, 127.6, 143.3 및 153.2ppm에서 각각 관찰되었다.

합성한 화합물 III의 $^{29}\text{Si-NMR}$ 스펙트럼은 Figure 8에 나타내었다. 합성한 화합물 III의 $^{29}\text{Si-NMR}$ 스펙트럼을 살펴보면, -13.21ppm에서 Si에 의한 피크가 관찰되었다.

그리고, 합성한 화합물 III의 적외선 흡수 스펙트럼은 Figure 9에 나타내었다. 합성한 화합물 III의 적외선 흡수 스펙트럼을 살펴보면, 방향족 C-H의 신축 진동에 의한 흡수 띠는 3059cm^{-1} 에서, 지방족 C-H의 신축 진동에 의한 흡수 띠가

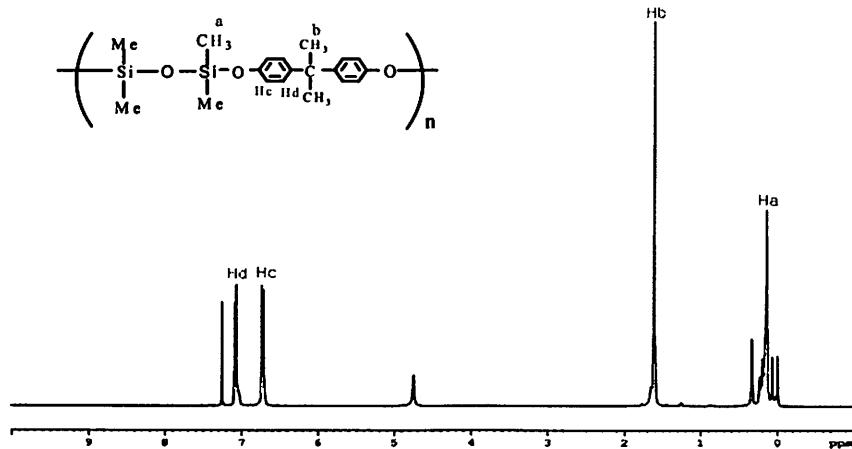


Figure 6. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound III.

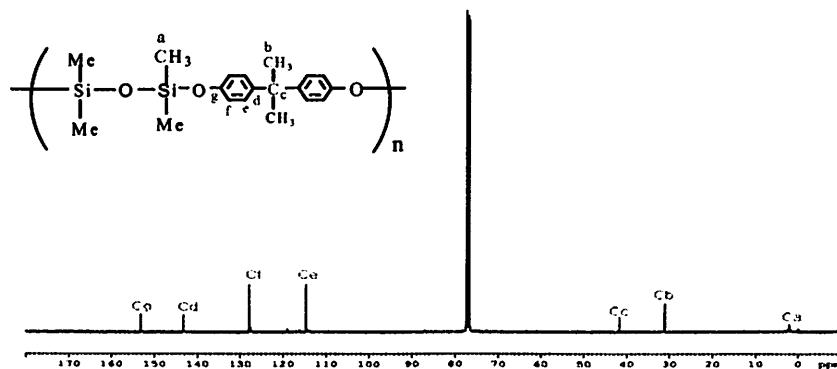


Figure 7. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound III.

2960cm^{-1} 에서 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며, 합성한 화합물에서 가장 큰 특징인 Si-O의 신축 진동에 의한 흡수 띠는 1034cm^{-1} 에서 관찰되었다.

그리고, 합성한 화합물 III의 분자량을 알아보기 위하여 겔 투과 크로마토그래피 측정을 하였다. Polystyrene을 표준물질로 하여 THF(HPLC 용, Aldrich)에 녹여 측정한 결과 M_n 은 6550로, M_w/M_n 은 1.79로 관찰되었다.

합성한 화합물 III의 UV-Vis 흡수, 들뜬상태 (excitation) 그리고 형광방출(emission) 스펙트럼은 Figure 10에 나타내었다. 합성한 화합물 III의 경우 액체상태의 UV-Vis 흡수 스펙트럼은 299,

310nm에서 최대 흡수 띠가 관찰되었고, 들뜬상태(excitation) 스펙트럼은 310nm에서 최대 흡수 띠가 관찰되었다. 그리고 형광방출(emission) 스펙트럼은 들뜸 파장이 310nm일 때 328nm에서 최대 방출 띠가 관찰되었다.

합성한 화합물 III의 열적 안정성을 알아보기 위하여 질소 대기압 하에서 열 중량 분석을 하였다. 합성한 화합물 III의 열 중량 분석도는 Figure 11에 나타내었다. 합성한 화합물 III의 열 중량 분석도를 살펴보면, 온도를 실온에서부터 시작하여 10°C 씩 증가시킴에 따라 300°C 에서 처음으로 무게가 감소하였으며, 400°C 에서 76%감소, 515°C 에서 85%감소하였다. 계속하여 같은 조

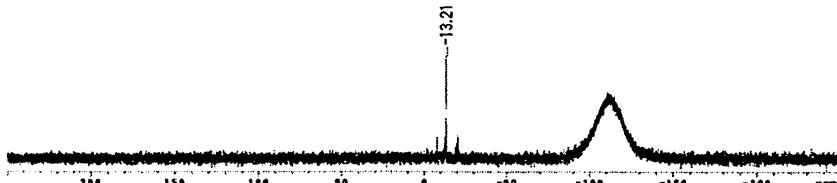


Figure 8. ^{29}Si -NMR spectrum of compound III.

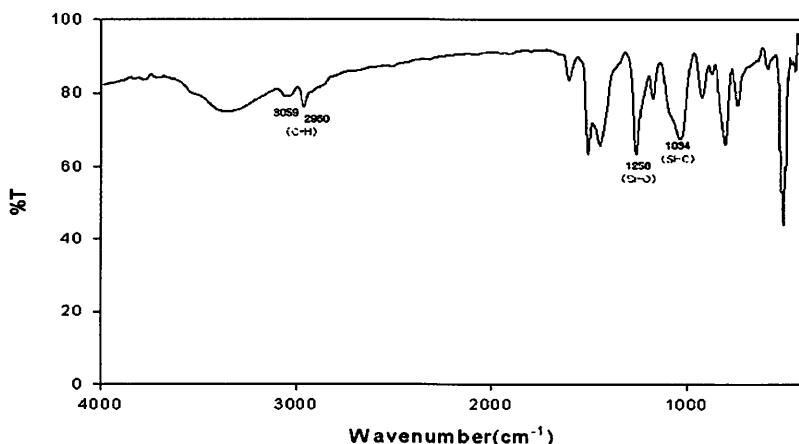


Figure 9. IR spectrum of compound III.

진으로 온도를 900°C까지 올렸을 때 처음 무게의 약 94%가 감소하여, 6%의 탄화율을 나타내는 것으로 관찰되었다.

두 개의 diethylamine 작용기를 지닌 유기규소 화합물인 bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane (**II**)을

사용하여 4,4'-hexafluorobisphenol A와 용융 공중합 반응을 진행하여 새로운 형태의 유기 규소 고분자인 poly(oxyhexafluorobisphenyloxytetramethylsiloxane) (**IV**)을 88%의 수득률로 합성하였다. 이들의 합성 과정을 Scheme 3에 나타내었다.

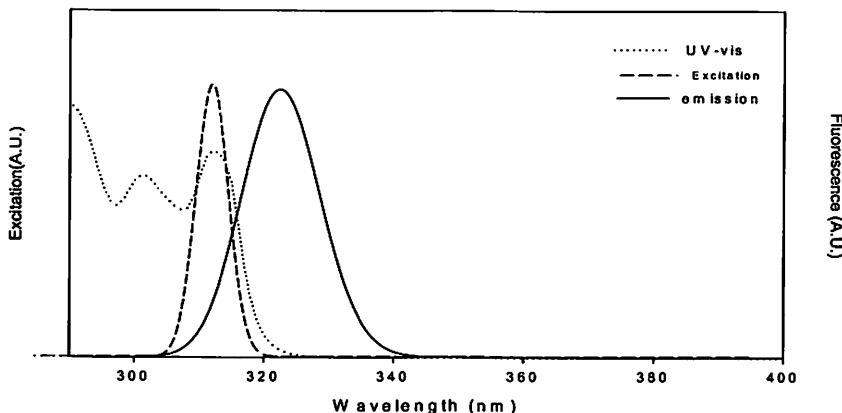


Figure 10. Excitation and emission spectrum of compound **III**.

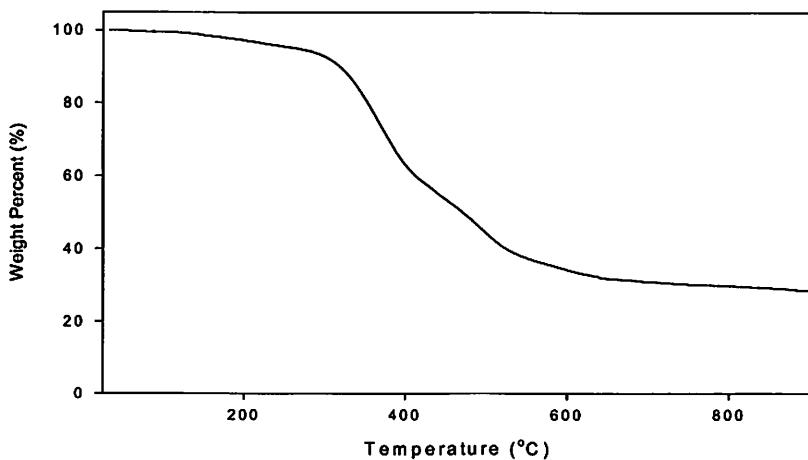
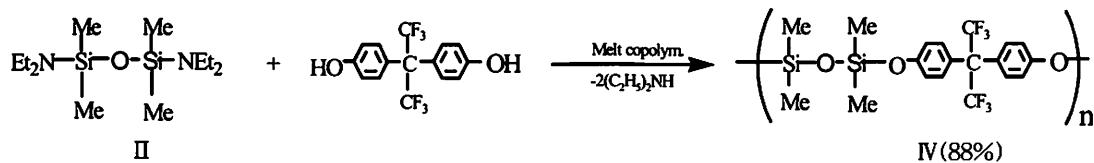


Figure 11. TGA thermogram of polymer **III** in nitrogen.



Scheme 3

합성한 화합물 IV의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼은 Figure 12에 나타내었다. 합성한 화합물 IV의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 살펴보면, CH_3 에 의한 수소피크가 0.06~0.26ppm에서 단일 선으로, C_6H_4 에 의한 수소피크가 6.80~6.83 및 7.24~7.26ppm에서 다중선으로 각각 관찰되었다.

합성한 화합물 IV의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼은 Figure 13에 나타내었다. 합성한 화합물 IV의 $^{13}\text{C-NMR}$ 스펙트럼을 살펴보면, CH_3 에 의한 탄소피크가

-0.5~1.0ppm에서, hexafluorobisphenyl기의 C와 CF_3 에 의한 탄소피크가 29.7, 63.2, 63.5, 및 63.7ppm에서 C_6H_4 에 의한 탄소피크가 114.9, 125.6, 131.7, 및 155.9ppm에서 각각 관찰되었다.

합성한 화합물 IV의 $^{29}\text{Si-NMR}$ 스펙트럼은 Figure 14에 나타내었다. 합성한 화합물 IV의 $^{29}\text{Si-NMR}$ 스펙트럼을 살펴보면, -13.58ppm에서 Si에 의한 피크가 관찰되었다.

그리고, 합성한 화합물 IV의 적외선 흡수 스

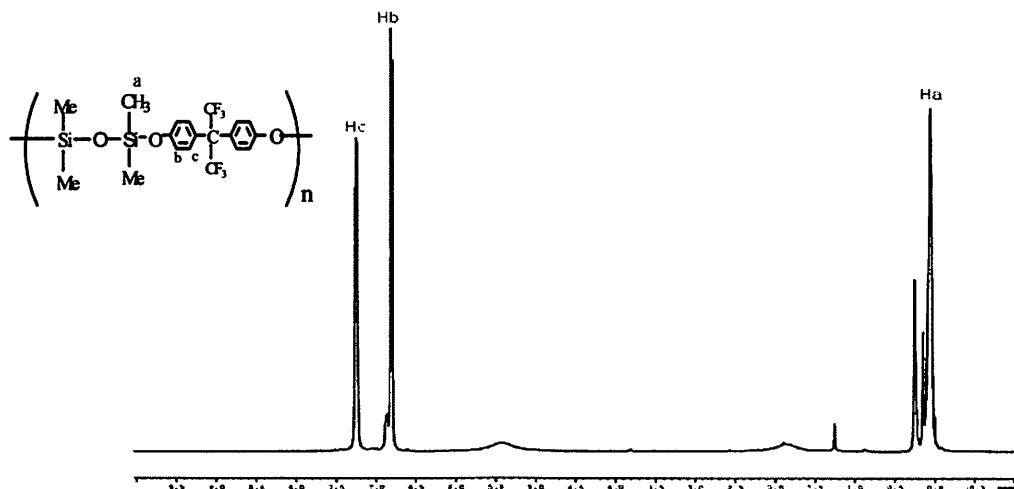


Figure 12. $^1\text{H-NMR}$ spectrum of compound IV.

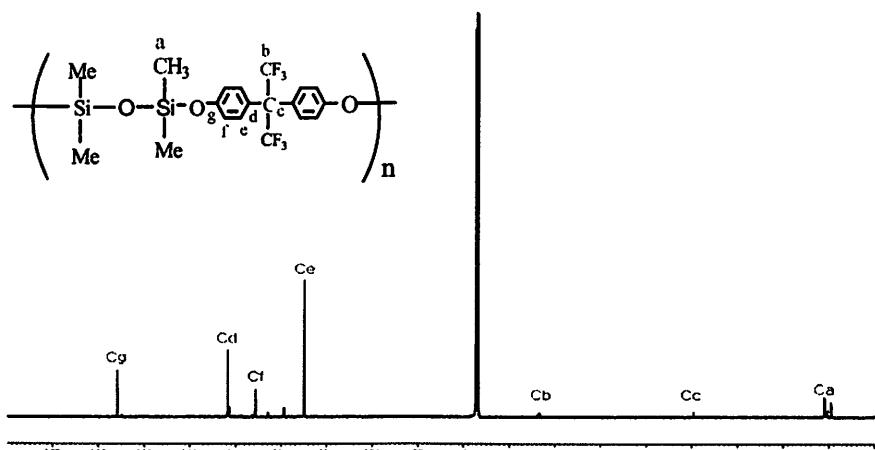


Figure 13. $^{13}\text{C-NMR}$ spectrum of compound IV.

스펙트럼은 Figure 15에 나타내었다. 합성한 화합물 IV의 적외선 흡수 스펙트럼을 살펴보면, 방향족 C-H의 신축 진동에 의한 흡수 띠는 3049cm^{-1} 에서, 지방족 C-H의 신축 진동에 의한 흡수 띠가 2963cm^{-1} 에서 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며, 합성한 화합물에서 가장 큰 특징인 Si-O의 신축 진동에 의한 흡수 띠는 1027cm^{-1} 에서 관찰되었다.

한편, 합성한 화합물 IV의 분자량을 알아보기 위하여 겔 투과 크로마토그래피 측정을 하였다. polystyrene을 표준물질로 하여 THF(HPLC-용, Aldrich)에 녹여 측정한 결과 M_n 는 5863로, M_w/M_n 는 2.01로 관찰되었다.

합성한 화합물 IV의 UV-Vis 흡수, 들뜬상태 (excitation) 그리고 형광방출(emission) 스펙트럼은 Figure 16에 나타내었다. 합성한 화합물 IV

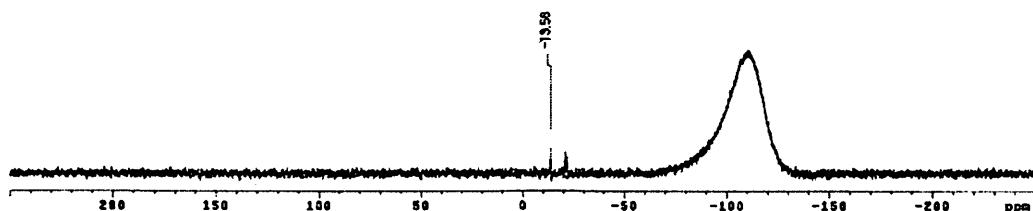


Figure 14. $^{29}\text{Si-NMR}$ spectrum of compound IV.

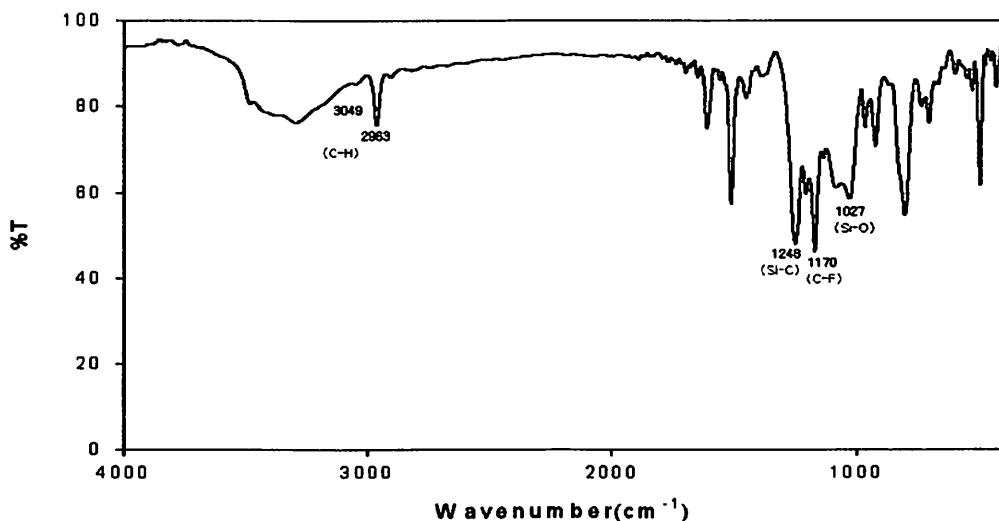


Figure 15. IR spectrum of compound IV.

의 경우 액체상태의 UV-Vis 흡수 스펙트럼은 275, 282nm에서 최대 흡수 띠가 관찰되었고, 들뜬상태(excitation) 스펙트럼은 280nm에서 최대 흡수 띠가 관찰되었다. 그리고 형광방출(emission) 스펙트럼은 들뜸 파장이 280nm일 때 310nm에서 최대 방출 띠가 관찰되었다.

합성한 화합물 IV의 열적 안정성을 알아보기 위하여 질소 대기압 하에서 열 중량 분석을 하였다. 합성한 화합물 IV의 열 중량 분석도는

Figure 17에 나타내었다. 합성한 화합물 IV의 열 중량 분석도를 살펴보면, 온도를 실온에서부터 시작하여 10°C씩 증가시킴에 따라 172°C에서 처음으로 무게가 감소하였으며, 290°C에서 64%감소, 460°C에서 93%감소하였다. 계속하여 같은 조건으로 온도를 900°C까지 올렸을 때 처음 무게의 약 97%가 감소하여, 3%의 탄화율을 나타내는 것으로 관찰되었다.

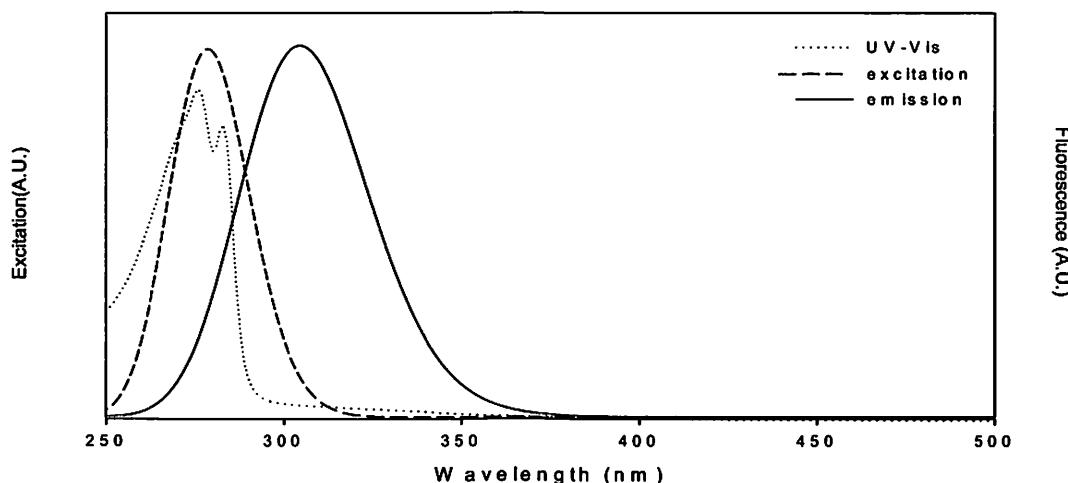


Figure 16. Excitation and emission spectrum of compound IV.

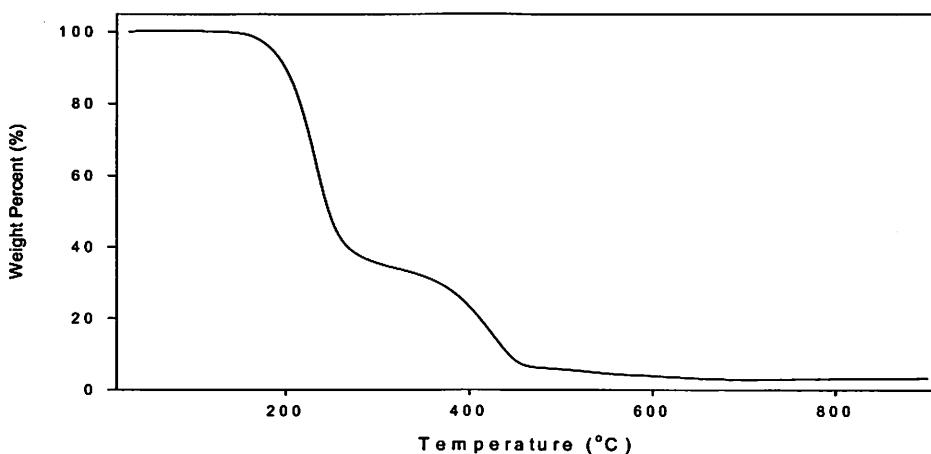


Figure 17. TGA thermogram of polymer IV in nitrogen.

IV. 결 론

Dichlorotetramethyldisiloxane(I)을 diethylamine과 반응시켜 두 개의 chlorine 작용기를 diethylamine 작용기로 모두 치환시킴으로써 유기규소화합물 bis(diethylamino)tetramethyldisiloxane(II)을 합성하였다. 생성된 화합물을 단위체로 하여 bisphenol A, 4,4'-hexafluorobisphenol A와 용융공중합반응을 진행하여 새로운 형태의 유기 규소 고분자 poly(oxybisphenyloxytetramethyldisiloxane) (III) 및 poly(oxyhexafluorobisphenyloxytetramethyldisiloxane)(IV)을 각각 합성하였다.

얻어진 고분자 물질은 THF 또는 CHCl_3 등의 일반적인 유기용매에 용해되었으며, 분자량을 측정한 결과 M_w 는 6550, 5863 및 M_w/M_n 는 1.79, 2.01로 각각 나타났다. $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$, $^{29}\text{Si-NMR}$ 스펙트럼에서는 확인하고자 하는 피크를 각각 모두 관찰할 수 있었으며, 적외선 흡수 스펙트럼에서는 특성적인 Ar-CH, -CH, Si-O 등의 신축 진동에 의한 흡수 피크가 나타남으로써 얻고자 하는 고분자 물질을 확인할 수 있었다. 합성한 고분자(III)의 들뜬 상태 스펙트럼은 검출파장 328nm에서 310 nm의 최대 흡수띠가 나타났으며, 형광방출 스펙트럼에서는 들뜸 파장이 310nm일 때 328 nm에서 최대 방출띠가 나타났다. 또 합성한 고분자(IV)의 들뜬 상태 스펙트럼은 검출파장 310nm에서 280nm의 최대 흡수띠가 나타났으며, 형광방출 스펙트럼에서는 들뜸 파장이 280nm일 때 310 nm에서 최대 방출띠가 나타났다. 또한, 합성한 고분자 III 및 IV는 질소대기 하에서 각각 300 °C, 172°C까지는 무게가 감소하지 않고 안정하였으며 500°C까지 가열할 때에 15%, 7%의 탄화율을 각각 나타내었다.

앞으로도, 더 다양한 유기규소 화합물 유도체의 합성과 이들을 단위체로 사용한 용융 공중합반응을 이용하는 새로운 폴리실록세인의 합성이 필요하리라 생각되며, 이러한 고분자를 이용한 신소재로의 활용도 상당히 기대된다.

V. 참고 문헌

1. Rochow, E. G. In *Comprehensive Inorganic*

Chemistry; Hailar, J. C. et al., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1973; Vol. 1.

2. Rochow, E. G. *Silicon and Silicones*; Springer-Verlag: Berlin, 1987.
3. Rochow, E. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, 67, 963.
4. Hurd, D. T.; Rochow, E. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, 67, 1057.
5. Noll, W. *Chemistry & Technology of Silicon*, Academic press: New York, 1968.
6. 김홍재 번역, 규소수지: 플라스틱 재료강좌 9; 대광서림: 서울, 1989.
7. Hench, L. L.; Ulrich, D. R. *Science of Ceramic Chemical Processing*, John Wiley & Sons, Inc. 1986.
8. Zeigler, J. M.: Fearon, F. W. G. Eds, *Silicon Based Polymer Science: A Comprehensive Resource*, ACS Series 224; American Chemical Society: Washington, DC, 1990
9. Mark, J.: Alcock, H. R.: West, R. *Inorganic Polymers*; Prentice-Hall Interaction: New Jersey, 1992.
10. Yajima, S.; Hesegawa, Y.; Hayashi, J.; Imura, M. *J. Mater. Sci.* 1978, 13, 2569.
11. Bacqe, E.; Pillot, J. P.; Birot, M.; Dunogues, J. *Macromolecules* 1988, 21, 30.
12. Boury, B.; Carpenter, L.; Corriu, R. J. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1990, 29, 785.
13. Harvath, R. F.; Chan, T. H. *J. Org. Chem.*, 1987, 52, 4489.
14. Zhang, X.; Zhou, Q.; Weber, W. P.; Horvath, R. F.; Chan, T. H.; Manuel, G. *Macromolecules* 1988, 21, 1563.
15. Imai, Y. *J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.* 1990, 28, 2997
16. Pretsch, E.; Bühlmann, P.; Affolter, C. *Structure Determination of Organic Compounds Tables of Spectral Data*; Springer-Verlag: Berlin, 2000.

고추 잎으로부터 신초의 다 유기와 이의 내염성

노광수

계명대학교 자연과학대학 생물학과

Multiple Induction of Shoot from Leaves of Hot Pepper and Its NaCl Tolerance

Kwang Soo Roh

Department of Biology, College of Natural Science, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

요약. 고추(*Capsicum annuum* L.) 잎으로부터 신초가 $12 \mu\text{M}$ 의 BA와 $10 \mu\text{M}$ 의 IAA 조합 농도에서 가장 많이 유기되었다. 내염성 신초는 130 mM 이상의 NaCl 농도 범위에서 유기되었으므로 내염성 식물체의 선발 가능성은 보였다. NaCl stress에 의한 soluble protein의 변화를 보기 위하여 40, 80 및 120 mM NaCl 농도에서 선발된 신초로부터 soluble protein을 추출하여 정량한 결과, 단백질량은 80 mM 에서 가장 높았다. SDS-PAGE로서 soluble protein의 pattern을 조사한 결과, NaCl 농도에 따라 특정 band의 강도 차이가 나타났으며, 주 band는 50, 45, 36 및 27 KD 였다. 특히 NaCl 농도가 증가함에 따라 36 KD의 band가 현저하게 증가하는 것으로 보아 이 단백질이 내염성과 관련이 있는 것으로 생각된다.

Abstract. The most pronounced result on the multiple induction of shoots from *Capsicum annuum* L. leaves was obtained at the combination of $12 \mu\text{M}$ BA and $10 \mu\text{M}$ IAA. Also, in order to find the possibility of a selection of NaCl tolerant plant, multiple shoots from leaves was induced at 130 mM NaCl over concentration. The amounts of protein extracted from shoot grown on the concentration of 40, 80, and 120 mM NaCl were estimated to investigate the changes of soluble proteins by salt stress. The highest protein content revealed at 80 mM NaCl. The differentiation of intensity of bands by SDS-PAGE analysis detected at 40, 80, and 120 mM NaCl, and major bands of soluble protein were 50, 45, 36, and 27 KD. In particular, intensity of 36 KD band was increased with increasing concentrations of NaCl, and this band seemed to be related to their salt tolerance.

I. 서 론

세포들은 염 환경 하에서 삼투적응을 하기 위해서 공급된 Na^+ 와 Cl^- 을 축적하게 되는데 이러한 축적이 이온 독성으로 인한 대사 저해를 초래하여 세포의 성장이 저해되므로 염 환경 하에서 식물체가 생존하기 위해서는 낮아진 외부 수분 전위에 의해서 생기는 수분결핍 현상을 극복할 수 있는 능력이 요구된다(Flower et al. 1997).

염에 의한 생육저해 현상을 전 세계 토지의 약 40% 정도를 차지하고 있는 사막 내지는 건조지역에서 주로 나타나는 것으로서, 이들 지역에서는 강우량이 많지 않거나 혹은 계절적으로 제한되어있기 때문에 강우에 의해서 염류가 부분적으로 용탈되기도 하지만 수분의 증발로 인해 토양 내에 염이 축적되기도 한다(Fisher and Turner 1978). 또한 해안지역에서는 관개수가 염을 포함하는 경우가 있으므로 토양의 염류화가

촉진되는 것으로 알려져 있어, 간척지를 경작지로 사용하기 위해서는 장기간의 탈염과정을 거쳐야하는 어려움이 있는 것으로 알려져 있다(Bernstein 1975).

이에 염에 대해 유전적 저항성을 가지는 내염성 작물이 개발된다면 과다한 염에 의해 영향을 받는 지역으로부터 농경지를 확장 지킬 수 있는 방법이 될 수 있으며, 그 외에도 대륙의 해안지역이나 간척지에서 해수관개에 의한 작물 생산을 가능하게 하는 수단이 될 것이다(Epstein et al. 1980).

이를 위한 방법으로 세포배양 기술을 이용하여 유용한 특징을 가지는 내염성 식물체를 선발하려는 연구가 밀(Gorham et al. 1986), 양상추(Shannon et al. 1983), 당근(Ojima and Ohira 1983), 담배(Binzel 1985), 사탕수수(Pua and Thorpe 1986), 유채(Chandler et al. 1988) 등을 대상으로 이루어져 왔으며, 일단 적응한 내염성 세포들은 NaCl이 없는 환경에서도 배양 10대까지 염 저항성이 안정하게 전달되는 것으로 알려져 있다(Bressan et al. 1985).

지금까지 대량증식과 *in vitro* 세포배양을 하기 위하여 leaf explant, stem, root 및 cotyledon (Lineberger 1983; Carswell and Lacy 1984; Grant 1984; Misra and Chaturvedi 1984) 등이 주로 사용되어, 이들로부터 많은 신초가 유기된 것으로 보고되고 있다. 본 연구에서는 일반적으로 분화조건이 까다로운 것으로 알려져 있는 고추 잎으로부터 신초의 유기율을 조사하고, 이 조건에 의하여 내염성 신초를 유기시킴으로서 내염성 식물체의 선발 가능성을 조사하였다.

II. 재료 및 방법

고추 종자의 발아 및 성장

고추(*Capsicum annuum* L.) 종자를 종류수에서 30분간 침윤시키고 10% sodium hypochlorite 용액으로 15분간 살균시킨 후 멸균수로 3회 세척한 다음, MS 배지에 치상하여 30°C 암처에서 2주간 발아시켰으며, 발아된 종자는 16시간의 광주기로 잎이 전개될 때까지 성장시켰다.

Multiple shoot의 유기율 조사

신초의 유기에 필요한 호르몬의 최적 농도를 조사하기 위하여, 잎을 scalpel로 3-4회 상처를 준 후 0-12 μM IAA와 12 μM BA를 각각 혼용 처리한 MS배지에 치상하여 28°C 하의 암처에서 배양하면서 신초의 유기율을 조사하였다.

NaCl에 대한 내염성 조사

발아 3주된 잎을 scalpel로 3-4회 상처를 낸 후 10-140 mM의 NaCl이 첨가된 신초 유기 배지에 치상하여 28°C 하의 암처에서 배양하면서 6주 후에 신초의 유기율을 조사하였다.

Soluble protein의 추출 및 정량

Nason(1955)의 방법에 준하여 soluble protein을 추출하였다. 0, 40, 80 및 120 mM NaCl에서 유기된 신초에 0.1 M potassium phosphate buffer를 첨가하여 마쇄한 후, 4겹의 거즈로 여과하였으며, 여과된 용액을 20,000xg에서 10 분간 원심분리하였다. 얻어진 상동액을 22,000xg에서 재 원심분리하여 soluble protein이 들어 있는 상동액을 수획하였다. Soluble protein의 정량은 Layne(1957)의 방법으로 실행하였다.

Soluble protein의 전기영동

Soluble protein을 2% SDS와 5% mercaptoethanol을 함유하는 0.0625 M Tris-HCl buffer(pH 6.8)에서 1시간 동안 투석시킨 후, 이를 전기영동에 사용하였다. Laemmili(1970)의 방법에 준하여 2.5% stacking gel과 12.5% resolving gel로 구성되는 slab gel을 사용하여 50 V에서 SDS-PAGE를 실시하였다. 전기영동이 끝난 후에는 gel을 상온에서 coomassie brilliant blue 용액으로 2시간 동안 염색시켰으며, 그 후 destaining solution으로 탈색시켰다.

III. 결과 및 고찰

Auxin의 양이 증가할 수록 뿌리의 형성이 촉진되고 cytokinin의 양이 높을수록 신초의 형성이 촉진된다는 George와 Sherrington(1984)의 연구 결과와 같이, 12 μM BA와 0-12 μM IAA

를 혼용 처리한 MS배지에서 잎으로부터 신초를 유기시킨 결과, 10 μM IAA에서 신초가 가장 많이 유기되었다(Fig 1). 유기된 대부분의 신초는 2주부터 증식하기 시작하여 4주에는 잎으로 분화되었다(Fig. 2). 이러한 결과는 *Dendranthema grandiflora*의 경우 5 μM BA와 5 μM NAA (Kaul et al. 1990), *Annona squamosa*의 경우 0.5 mg/L의 kinetin과 BA(Nair et al. 1984), 그리고 *Ipomoea batatas*의 경우 1 mg/L의 NAA 와 0.1 mg/L의 BA(Carswell and Locy 1984) 농도 조합에서 잎으로부터 가장 많은 수의 신초를 유기시켰다는 보고와 비교해 볼 때 식물의 종류에 따라 신초 유기 조건이 다름을 알 수가 있다.

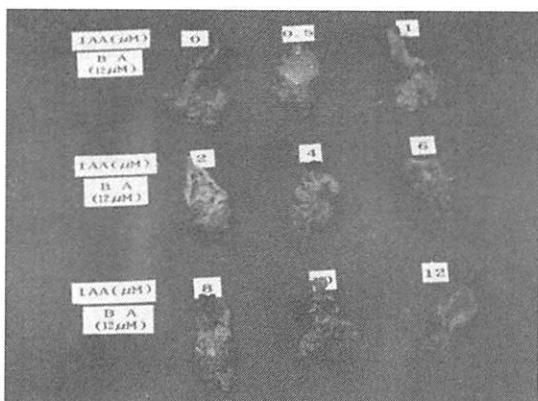


Fig. 1. Effect of IAA concentrations on induction of shoot. Each MS medium contained 12 μM BA.

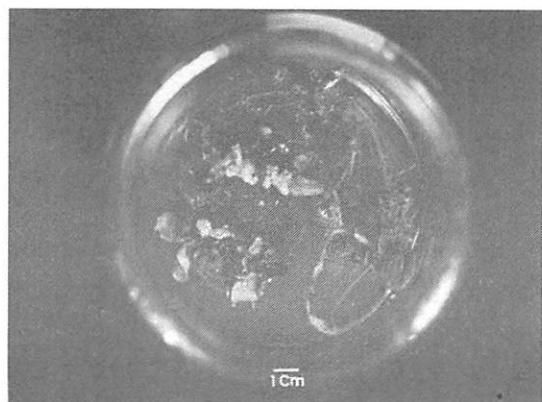


Fig. 2. Proliferation of leaves from shoots on MS medium contained 12 μM BA and 10 μM IAA after 4 weeks..

식물조직 배양 system으로 부터의 분화과정에는 몇 종류의 극성이 존재(Paterson 1983)하는데 그 중의 하나는 식물의 잎이나 잎의 절편으로부터 plantlet가 재생되는 것이며, 이러한 재생의 대부분은 잎의 기부 절단면에서 일어나는 것으로 보고(Douglas 1985)된 바 있는데, 본 실험에서도 잎의 기부에서 신초가 많이 유기되는 극성 분화현상이 관찰되었다.

식물 세포는 염에 의한 수분 결핍으로 인해서 팽압이 감소되거나 상실되므로 초기 생장이 일시적으로 감소 또는 정지되는 경향을 나타내다가(Munns et al. 1982), 삼투환경에 적응하게 되면 다시 팽압을 가지게 되지만 세포의 신장은 여전히 억제되는 것으로 알려져 있다(Michelena and Boyer 1982; Binzel et al. 1985).

내염성 식물체의 선발 가능성을 조사하기 위하여 잎으로부터 내염성을 가지는 신초를 선발하기 위하여 10-150 mM NaCl이 첨가된 신초 유기 배지에서 잎으로부터 유기 된 신초의 증식을 조사한 결과, NaCl 농도가 증가함에 따라 신초의 수는 감소하였는바, 40 mM까지는 신초의 수가 큰 차이가 없었으나 50 mM부터는 현저히

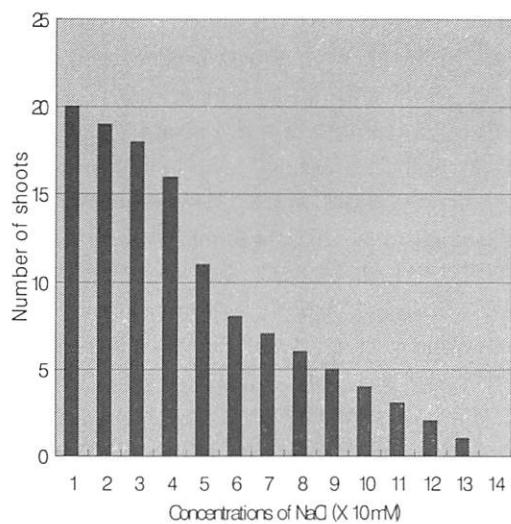


Fig. 3. Effect of NaCl concentrations on induction of shoot from leaves after 6 weeks. MS medium contained 12 μM BA and 10 μM IAA.

감소하기 시작하여 130 mM 까지는 일부 유기가 되었으며 140 mM 이상에서는 완전히 저해되었다(Fig. 3). 따라서 130 mM NaCl이 생육한계인 것으로 생각되며, 이는 염에 의한 수분 결핍에 기인되는 것으로 추측된다(Kriedemann 1986). 좀 더 내염성이 증가된 식물체를 얻기 위해서 130 mM 이하의 농도에서 유기된 신초들을 분화시킨 후 2차 내염성 선발을 시도하는 것이 필요한 것으로 생각된다.

0-120 mM의 NaCl이 첨가된 유기배지에서 선발된 신초로부터 soluble protein을 추출하여 단백질을 정량한 결과 생체 중량당 단백질 양이 80 mM NaCl 농도에서 가장 높았다.(Fig. 4). 이를 바탕으로 염 스트레스에 의한 soluble protein의 변화를 관찰하고자 SDS-PAGE를 실시한 결과, 새로운 band의 출현은 없었으나 band들 사이의 강도가 증감하는 현상을 관찰할 수가 있었는데(Fig. 5), 이러한 결과는 일과 axillary shoot tissue에서는 특이한 polypeptide가 salt stress에 의해서 증감되었다는 Ostrem 등(1987)의 보고와 일치 하였으나, 담배 세포를 고농도의 NaCl에서 배양하였을 때 이에 적응한 세포들은 SDS-PAGE상에서 새로운 또는 양이 증가된 polypeptide band를 가진다는 Singh 등(1985)의 결과와는 다소 차이가 있었다. 그리고 주 band는 50 KD, 45 KD, 36 KD 및 27 KD로 나타났다. 특히 36 KD band의 강도가 현저하게 증가하는 것으로 보아 이 단백질이 내염성과 관련이 있는 것으로 생각된다. NaCl의 농도가 증가함에 따라 특정 band의 강도가 증가한 것은 세포가 염 스트레스에 적응한 결과 유전자의 발현이 변형(Singh et al. 1985)되어 mRNA가 선택적으로 발현되었거나, 또는 NaCl 농도의 증가에 기인한 세포질 RNase의 활성에 의해 translation 수준이 조절(Winicov et al., 1989) 되었기 때문에 NaCl에 의하여 단백질의 양이 증감되는 현상을 보인 것으로 생각된다. 이러한 본 실험의 결과는 담배의 경우 염에 적응한 세포에서 32 KD와 20 KD의 양이 현저하게 많았다는 Ericson과 Alfinito(1984)의 결과, 그리고 43 KD와 26 KD의 polypeptide의 강도가 현저하게 증가하였다는 Singh 등(1985)의 결과와 비교해 볼 때 band 수와 분자량에 있어서 약간의 차이가 있었다.

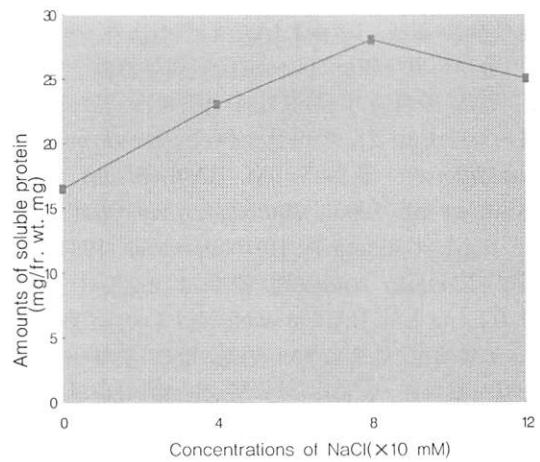


Fig. 4. Effect of NaCl concentrations on soluble protein amounts.

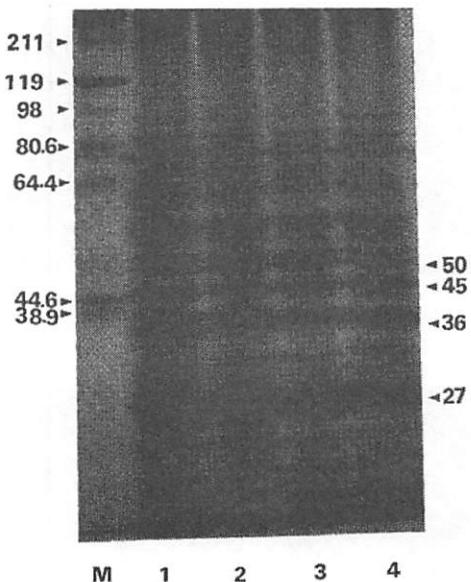


Fig. 5. 12.5% SDS-PAGE pattern of soluble protein isolated from shoots. M: Marker proteins [macroglobulin (211 KD), β -galactosidase (119 KD), fructose-6-phosphate kinase (98 KD), pyruvate kinase (80.6 KD), fumarase (64.4 KD), lactic dehydrogenase (44.6 KD), triosephosphate isomerase (38.9 KD)], Lane 1: 0 mM NaCl, Lane 2: 40 mM NaCl, Lane 3: 80 mM NaCl, Lane 4: 120 mM NaCl.

참고문헌

1. Bernstein, L. 1975. Effect of salinity and sodicity on plant growth. *Ann. Rev. Plant Pathol.* 13: 295-312.
2. Binzel, M. L., P. M. Hasegawa, A. K. Handa and R. A. Bressan 1985. Adaptation of tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79: 118-125.
3. Bressan, R. A., N. K. Singh A. K. Handa, A. Kononowicz and P. M. Hasegawa. 1985. Stable and unstable tolerance to NaCl in cultured tobacco cells. pp 775-769. In: M., Freeling, (ed), *Plant Genetics*. Alan R. Liss, New York.
4. Carswell, G. K. and R. D. Locy. 1984. Root and shoot initiation by leaf, stem, and storage root explants of sweet potato. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3: 229-236.
5. Chandler, S. F., K. Y. Paek, E. C. Pua, E. Ragolsky, B. B. Mandal and T. A. Thorpe. 1988. The effectiveness of selection for salinity tolerance using *in vitro* shoot cultures. *Bot. Gaz.* 149: 166-172.
6. Douglas, G. C. 1985. Formation of adventitious buds in stem internodes of populus hybrid TT32 cultured *in vitro*. Effects of sucrose, Zeatin, IAA and ABA. *J. Plant Physiol.* 121: 225-231.
7. Epstein, E. and J. D. Norlyn, D. W. Rush, R. W. Kingsbury, D. B. Kelley and A. F. Cunningham Wrona. 1980. Saline culture of crops: A genetic approach. *Science* 210: 399-404.
8. Ericson, M. C. and S. H. Alfinito. 1984. Proteins produced during salt stress in tobacco cell culture. *Plant Physiol.* 74: 506-509.
9. Fisher, R. A. and N. C. Turner. 1978. Plant productivity in the arid and semiarid zones. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 29: 277-317.
10. Flowers, T. J., P. F. Troke and A. R. Teo. 1977. The mechanism of salt tolerance in halophytes. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 89-121.
11. George, E. F and P. D. Sherrington. 1984. Plant propagation by tissue culture, In: *Handbook and Directory of Commercial Laboratories* (Exegenetics Ltd., Eversley, Basingstoke, Hants, RG27 OQY).
12. Gorham, J., B. P. Forster, E. Budrewicz, R. G. Wyn Jones, T. E. Miller and C. N. Law. 1986. Salt tolerance in the Triticeae: Solute accumulation and distribution in and amphidiploid derived from *Triticum, aestivum* cv. Chineses spring and *Thinopyrum bessarabicum*. *J. Exp. Bot.* 37: 1435-1449.
13. Grant, J. E. 1984. Plant regeneration from cotyledonary tissue of *Glycine canescens*, a perennial wild relative of soybean. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3: 169-173.
14. Kaul, V., R. M. Miller, J. F. Hutchinson and D. Richards. 1990. Shoot regeneration from stem and leaf explants of *Dendranthema grandiflora* Tzvelev (Syn. *Chrysanthemum morifolium* Ramat.). *Plant Cell Tissue Organ Culture* 21: 21-30.
15. Kriedemann, P. E. 1986. Stomatal and photosynthetic limitations to leaf growth. *Aust. J. Plant Physiol.* 13: 15-31.
16. Laemmili, U.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature* 227: 680-685.
17. Layne, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring protein. IV. Protein estimation by ultraviolet absorption. *Methods in Enzymol.* 3: 447-454.
18. Lineberger, R. D. 1983. Shoot proliferation, rooting, and transplant survival of tissue cultured '*Hally Jolivette*' cherry. *Hort.*

- Science* 18: 182-185.
19. Michelena, V. A. and J. S. Boyer. 1982. Complete turgor maintenance at low water potentials in the elongating region of maize leaves. *Plant Physiol.* 69: 1145-1149.
 20. Misra, P. and H. C. Chaturvedi. 1984. Micropropagation of *Rosmatinus officinalis* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3: 163-168.
 21. Munns, R., H. Greenway, R. Delane and J. Gibbs. 1982. Ion concentration and carbohydrate status of the elongating leaf tissue of *Hordeum vulgare* growing at high external NaCl. II. Cause of the growth reduction. *J. Exp. Bot.* 33: 574-583.
 22. Nair, S., P. K. Gupta, M. V. Shirgurkar and A. F. Mascarenhas. 1984. In vitro organogenesis from leaf explants of *Annona squamosa* L. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 3: 29-40.
 23. Nason, A. 1955. Extraction of soluble enzymes from higher plants. *Methods in Enzymol.* 1: 62-63.
 24. Ojima, K. and K. Ohira. 1983. Characterization of aluminum and manganese tolerant cell lines selected from carrot cell cultures. *Plant Cell Physiol.* 24: 789-797.
 25. Ostrem, J. A., S. W. Olson, J. M. Schmit and H. J. Bohnert. 1987. Salt stress increases the level of translatable mRNA for phosphoenolpyruvate carboxylase in *Mesembryanthemum crystallinum*. *Plant Physiol.* 84: 1270-1275.
 26. Paterson, K. 1983. Polarity of regeneration in excised leaves of *Crassula argentea*. A role of auxin. *Can. J. Bot.* 61: 1058-1063.
 27. Pua, E. C. and T. A. Thorpe. 1986. Differential response of nonselected callus cultures of *Beta vulgaris* L. to salt stress. *J. Plant Physiol.* 81: 621-629.
 28. Shannon, M. C., J. D. McCreight and J. H. Draper. 1983. Screen and tests for salt tolerance in lettuce. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 108: 225-230.
 29. Singh, N. K., A. K. Handa, P. M. Hasegawa and R. A. Bressan. 1985. Protein associated with adaptation of cultured tobacco cells to NaCl. *Plant Physiol.* 79: 126-137.
 30. Winocov, I., J. H. Waterborg, R. E. Harrington and T. T. McCoy. 1989. Messenger RNA induction in cellular salt tolerance of alfalfa (*Medicago saliva*). *Plant Cell Rep.* 8: 6-11.

Two species of the family Gnaphosidae (Araneae) from Korea

Bo Keun Seo

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

수리거미과 (거미목)의 2종

서보근

계명대학교 자연과학대학 생물학과

요약. 수리거미과의 2종을 그림과 함께 보고한다. 쌍방울염라거미, *Zelotes exiguus* (Müller and Schenkel, 1895)의 수컷의 기재는 우리나라에서 처음이며, 절두참매거미, *Drassyllus truncatus* Paik, 1992, 암컷의 기재는 수컷에 의해 신종으로 보고된 이 후 처음이다.

Abstract. Two species of the family Gnaphosidae are reported with illustrations. The description of male of *Zelotes exiguus* (Müller & Schenkel, 1895) is new to Korea, and The description of female of *Drassyllus truncatus* Paik, 1992 is new to science.

Introduction

Gnaphosid spiders are elongate and either flattened or somewhat cylindrical. They live in plant litter, in crevices on tree trunks, and among stones. Total length is about 1.7 mm. In the present paper the author describes two gnaphosid spiders, *Zelotes exiguus* (Mu ller and Schenkel, 1895) and *Drassyllus truncatus* Paik, 1992. *Z. exiguus* is one of the smallest gnaphosid spiders and a rare species in the occurrence frequency. The description of male of *Z. exiguus* is new to Korea. The description of female of *D. truncatus* is new to science since Paik had described the males as new species in 1992.

Terms and abbreviations used are as follow: c, carapace length; d, p, r, and v in spination, dorsal, prolateral, retrolateral and ventral; Fem.

I, length of femur I; Index, (width/length) x 100; Leg I, length of leg I; Met. I, length of metatarsus I; Pat. I, length of patella I; Tib. I, length of tibia I. The materials examined are deposited in the collection of Department of Biology, Keimyung University.

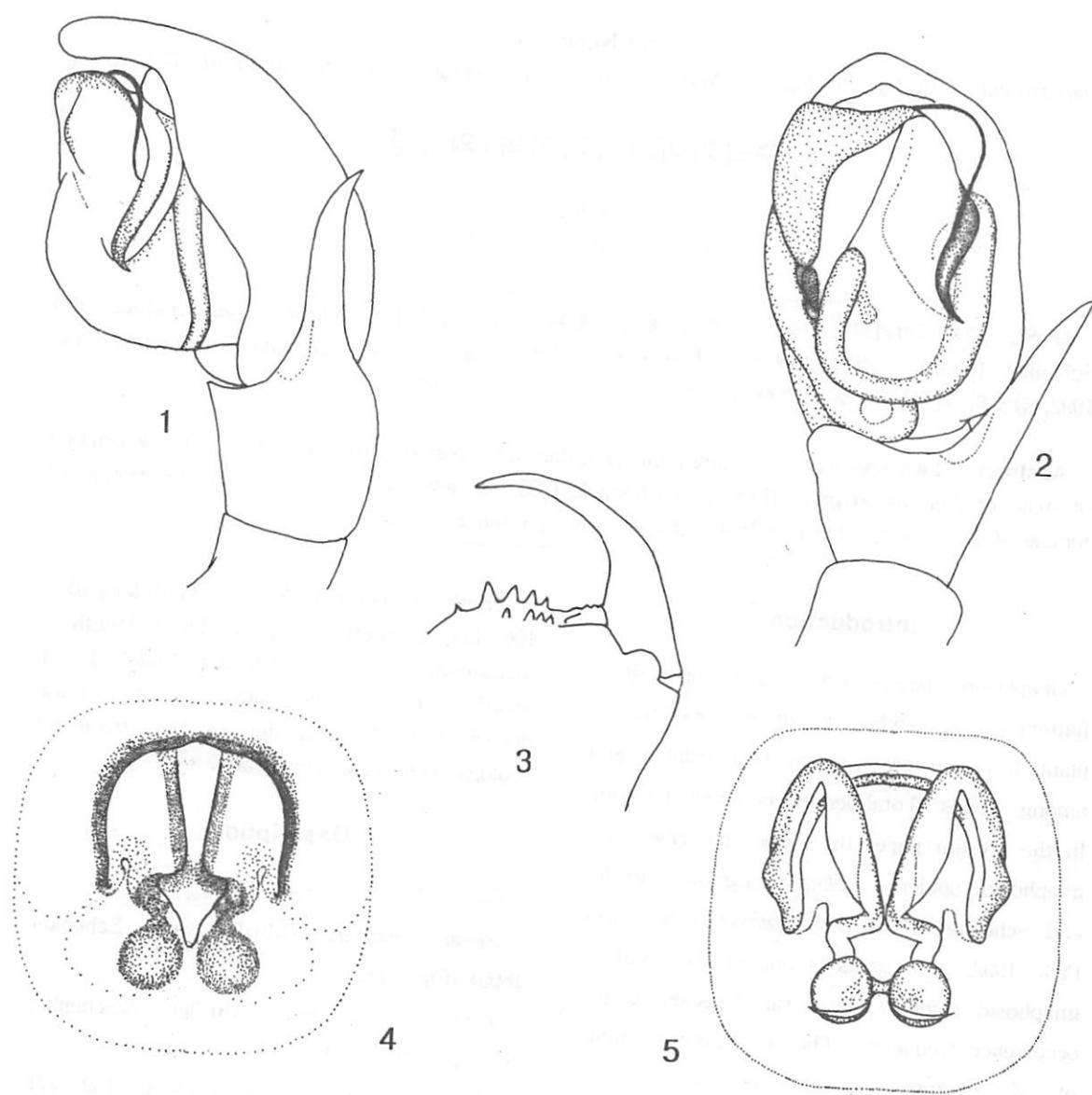
Description

Genus *Zelotes* Gistel, 1848

Zelotes exiguus (Mu ller and Schenkel, 1895) (Figs. 1-2)

Prosthesima exigua Mu ller & Schenkel, 1895, p. 770, pl. 14, fig. 7

Zelotes exiguus Simon, 1914, p. 159, 171, 218, figs. 309-310, 351; Miller & Buchar, 1977, p. 161, pl. I, figs. 10-17; Heimer & Nentwig, 1991, p. 440, fig. 1162; Paik, 1992b, p. 149, figs. 17-25; Song, Zhu & Zhang, 2004: 261, f. 152A-D.



Figs. 1-5. Male of *Zelotes exiguus* (Müller and Schenkel, 1895) (1-2) and female of *Drassyllus truncatus* Paik, 1992 (3-5): 1. left palp, retrolateral view; 2. ditto, ventral view; 3. left chelicera, inner view; 4. epigynum, ventral view; 5. internal genitalia, dorsal view.

Measurements(mm)

Male: Body length 2.29; carapace length 1.04, width 0.76; cephalic width 0.41; sternum length 0.67, width 0.51; labium length 0.14, width 0.16; anterior eye row 0.20; posterior eye row 0.23; abdomen length 1.15, width 0.69.

Leg I 2.69(0.78, 0.46, 0.56, 0.48, 0.41), II 2.23(0.62, 0.39, 0.43, 0.41, 0.38), III 1.96(0.53, 0.29, 0.35, 0.41, 0.38), IV 3.01(0.82, 0.41, 0.62, 0.70, 0.46). Palp 0.91(0.37, 0.15, 0.09, 0.30).

Description

Male: Carapace dark with black radiating reticulated striae; the index 73. Cephalic width index 54. Clypeus height 2.5 times of radius of anterior median eyes. In dorsal view anterior eye row recurved and posterior eye row straight. Eye row index 87. Eye area black, elevated; the index 56. Eye ratio, anterior lateral eye = posterior median eye > posterior lateral eye > anterior median eye (3:2.5:2). Anterior median eyes separated by 2.5 times of their radius, contiguous from the laterals. Posterior median eyes separated by their radius, a third of their diameter from the laterals. Anterior and posterior lateral eyes separated by two thirds of diameter of anterior lateral eyes. Median ocular quadrangle, height = posterior side > anterior side (8:6.5).

Chelicerae with three promarginal and one retromarginal tooth. Sternum dark yellow and labium yellowish brown; the index 76 and 117 respectively. Legs dark yellow except yellowish tarsi; ventrodistal parts of metatarsi III and IV with preening combs. Leg formula 4123. Leg formula index 100:83:73:112. Leg I/c 2.59.

Fem. I/c 0.75. Tib I/c 0.54. Met I/c 0.46. Met. I/tar. I 1.17. Met. IV/tar. IV 1.52. Fem. I l/d 2.79. Tib. I l/d 3.29. Pat. I+tib. I/c 0.98. Leg spination pattern: femora: I d1-1; 0-1; III d1-1, p1-1, r0-1; IV d1-1; tibiae: I v2-2; II v1-1; III d0-1-0, p1-1, r1-2-2, v0-1-1; IV d0-2-0, p1-1, r1-1, v2-2-2; metatarsi: I v2-2; II v1-2; III d0-2-2, p0-1-1, r0-1-1, v0-pc; IV d2-2-2, p0-1-1, r0-1-1, v2-1-pc.

Abdomen dark, chitinized anteriorly; the index 60. Palp with triangular terminal apophysis, long slender embolus ,and big and strong tibial apophysis (Figs. 1-2).

Specimens examined: 2♂, Mt. Naejang (Jeonlabuk-do), 5 May 2006 (S. W. Paik).

Distribution: Palearctic region.

Genus *Drassyllus* Chamberlin, 1922

Drassyllus truncatus Paik, 1992 (Figs. 3-5)

Drassyllus truncatus Paik, 1992a, p. 69, figs. 7-14; Namkung, 2003,p. 471, figs. 37.9a-b.

Measurements(mm)

Female: Body length 5.72; carapace length 2.66, width 2.14; cephalic width 1.19; sternum length 1.54, width 1.26; labium length 0.42, width 0.35; anterior eye row 0.48; posterior eye row 0.55; abdomen length 3.47, width 2.24.

Leg I 7.96(2.17, 1.30, 1.72, 1.51, 1.26), II 6.80(1.89, 1.12, 1.37, 1.33, 1.09), III 5.92(1.68, 0.91, 1.09, 1.33, 0.91), IV 9.04(2.31, 1.30, 1.86, 2.31, 1.26). Palp 2.87(0.98, 0.49, 0.49, 0.91).

Description

Female: Carapace dark brown, with black striae radiating from a short line-shaped median furrow; the index 80. Cephalic width

index 56. Clypeus height 0.9 times of diameter of anterior median eyes. In dorsal view anterior eye row recurved slightly and posterior eye row straight. Eye row index 87. Eye area slightly elevated, the index 46. Eye ratio, anterior lateral eye > posterior lateral eye = posterior median eye > anterior median eye (6.5:5.5:5). Anterior median eyes separated by 0.4 times of their diameter, nearly contiguous from the laterals. Posterior median eyes contiguous each other and separated by about 0.3 times of their diameter from the laterals. Anterior and posterior lateral eyes separated by about 0.4 times of diameter of anterior lateral eyes. Median ocular quadrangle, height > posterior side > anterior side (14.5:12.5:10).

Chelicerae with five promarginal and four retromarginal teeth (Fig. 3). Sternum and labium dark brown; the index 82 and 83 respectively. Femora, patella, and tibiae dark brown, metatarsi and tarsi reddish brown. Leg formula 4123. Leg formula index 100:85:74:114. Leg I/c 2.99. Fem. I/c 0.82. Tib I/c 0.65. Met I/c 0.57. Met. I/tar. I 1.20. Met. IV/tar. IV 1.83. Fem. I l/d 3.24. Tib. I l/d 4.41. Pat. I+tib. I/c 1.14. Leg spination pattern: femora: I and II d1-1, p0-0-1; III d1-1, p0-1-1, r0-1-1; IV d1-1, p0-0-1, r0-0-1; tibiae: I v1-1-1-0; II v1-2-0; III d0-2-0, p0-0-1, r1-1, v0-1-2; IV d0-2-0, p1-0-1, r1-0-1, v2-2-2; metatarsi: I v2-2(1); II v2-2; III d0-2-2, p1-1-1, r1-1-1, v2-0-0; IV d0-2-2, p1-1-1, r1-1-0, v2-2-0.

Abdomen black; dorsum with two pairs of sigilla anteriorly; the index 65. Epigynum

with long anterior epigynal margin and a pair of round spermatheca (Figs. 4-5).

Specimens examined: 1♀, Mt. Naejang (Jeonlabuk-do), 17 Aug. 2005 (S. Y. Kim).

Remarks: Male palp of *D. truncatus* is very similar to that of *D. sanmenensis*, but female of *D. truncatus* is easily distinguished from *D. sanmenensis* by long anterior epigynal margin.

Distribution: Korea.

References

- Heimer, S. and W. Nentwig, 1991. Spinnen Mitteleuropas: Ein Bestimmungsbuch. Verlag Paul Parey, Berlin, pp. 1-543.
- Mller, F. and J. Buchar, 1977. Neue Spinnenarten aus der Gattung *Zelotes* Distel [sic] und *Haplodrassus* Chamberlin (Araneae, Gnaphosidae). Acta Univ. Carol. (Biol.), 1974:157-171.
- Namkung, J., 2003. The Spiders of Korea, 2nd. ed. Kyo-Hak Publ. Co., Seoul, pp. 1-648.
- Paik, K. Y., 1992a. Korean spiders of the genus *Drassyllus* (Araneae: Gnaphosidae) II. Korean Arachnol., 8: 67-78.
- Paik, K. Y., 1992b. The second reports of the genus *Zelotes* (Araneae: Gnaphosidae) from Korea. Korean Arachnol., 7: 145-158.
- Song, D. X., M. S. Zhu and F. Zhang, 2004. Fauna Sinica: Invertebrata Vol. 39: Arachnida: Araneae: Gnaphosidae. Science Press, Beijing, pp. 1-362.

Comparison of the plastid inclusion bodies in *Sedum* examined by the transmission electron microscopy (TEM) and high voltage electron microscopy (HVEM)

InSun Kim*

Biology Department, College of Natural Sciences, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

요약. 본 연구는 광합성 유형에 따라 특수하게 발달하는 *Sedum rotundifolium* 엽육조직 내 색소체에 생장단계상 일시적으로 분화하는 결정체 구성요소들의 특성을 투과전자현미경(TEM)과 고압전자현미경(HVEM)으로 분석한 결과를 비교하였다. 색소체 기질에 텔라코이드에 인접하여 형성되는 결정체들은 어떤 막으로도 둘러싸이지 않는 구조로 수 마이크론에 이르는 커다란 결정체 내에는 $\leq 20\text{ nm}$ 격자거리로 이루어진 많은 미세소관성 요소들이 발달하였다. $60\text{--}90\text{ nm}$ 의 얇은 초박절편 연구로 수합된 평면적 TEM data와는 달리 $1.0\text{ }\mu\text{m}$ 에 이르는 두꺼운 후박절편을 이용한 HVEM에 의한 tilting 및 tomography 기법을 거친 data에서는 결정체 구성요소의 입체적 3-D image 재구축이 가능하였다.

Abstract. In this study, plastid inclusion bodies of *Sedum rotundifolium* examined by transmission electron microscopy (TEM) and high voltage electron microscopy (HVEM) were compared. The plastid inclusion bodies, which are non membrane bounded, can grow up to several microns in size within the stroma during early development. They consist numerous tubular elements $\leq 20\text{ nm}$ in diameter. When thin sections of $60\text{--}90\text{ nm}$ thickness were examined by TEM, they exhibited either a crystalline or paralleled pattern depending on the sectioning angle. However, when thick sections up to $1.0\text{ }\mu\text{m}$ in thickness were viewed and tilted with HVEM, both crystalline and paralleled patterns were found to be well demonstrated within the same plane. Unlike with the 2-D TEM images, it was possible to obtain tilted data and image processing by tomography, and 3-D reconstruction of the plastid inclusion bodies with the use of HVEM.

Key words: High voltage electron microscopy, Image data comparison, Plastid inclusions, *Sedum rotundifolium*, Transmission electron microscopy

I. 서 론

세포구조에 대한 연구는 여러 종류의 현미경을 통해 이루어지고 있으나, 세포내 소기관의 구조연구에는 광학현미경 해상도의 한계로 인하여 투과전자현미경(Transmission Electron Microscopy, TEM)이 이용되고 있다. 그러나 기존의 투과전자현미경은 100 nm 이하의 매우 얇은 시료만이 관

찰 가능하므로, 대개 연구하고자 하는 시료의 심도방향 내 구조적 정보는 상당 부분 소실된다. 따라서 TEM을 이용하여 얻은 세포 수준에서의 2차원적 구조정보에 대한 해석에 있어서는 오류를 범할 가능성이 잠재하고 있다. 이러한 단점을 해결하기 위하여 세포구조를 새로이 연구할 목적으로 1980년대 중반 새로운 공초점현미경 등이 개발되기는 하였으나(1) 두꺼운 시료를 이용하는 경우 여전히 심도방향 내 구조정보 및 해상력에 제한을 받게 된다. 기존의 TEM에 의해 얻은 2차원 결과 영상을 이용한 구조연구의 단점을 극

* Ph: (053) 580-5305; FAX: (053) 580-5305;
E-mail: botany@kmu.ac.kr

복하기 위하여 고압전자현미경(High Voltage Electron Microscopy, HVEM)을 이용한 3차원 구조연구 방안이 여러 방면으로 모색되어 왔다.

최근 HVEM을 이용한 세포의 3차원적 구조 연구는 혁신적인 발전을 이루고 있다. HVEM을 이용한 세포내 소기관들에 대한 구조연구에 있어 3차원 입체구조의 구현(3-D reconstruction)은 특히, 세포수준에서의 생체시료 연구에 있어 매우 중요한 위치를 차지한다. 1 MV 이상의 높은 전압을 이용하여 수 마이크론에 이르는 시료까지도 관찰 가능한 고압전자현미경(HVEM)의 세포생물학 분야에서의 이용은 세포에 대한 세포 단층사진을 이용한 세포의 3차원적 구조결정을 가능하게 하여 2차원적 구조분석으로부터 기인하는 단편적이고 부정확한 결과 해석의 문제를 어느 정도 극복하게 하고 있다. 이러한 발전은 초고압에너지(1.3 MV) 빔에 의한 투과성 및 해상도 증대에 기인하는데, 이를 통해 두꺼운 생체시료의 분석, 냉동된 세포, 세균, 바이러스 관찰, 생물 및 재료 분야에서의 기대분자 등의 관찰이 가능해진다(2, 3). 그리고 이러한 결과를 분석해낼 수 있는 IMOD, SEMPER 등의 프로그램들이 개발됨으로써(4, 5, 6) 세포구조에 대한 연구에서 혁신적인 발전을 이룰 수 있게 되었다.

색소체는 매우 역동적이어서 분열하고 분화 발달하여 특수한 신진대사와 구조를 갖는 여러 형태로 변화한다(7, 8). 광합성 엽육조직의 염록체는 전색소체로부터 발달하는데, 전색소체는 미분화된 조직 세포 내에서 형성되는 염록체 전구체(precursor)라 할 수 있다. 전색소체의 전관상체(prolamellar body)는 빛을 받으면 곧 염록체로 전환되어 명반응이 일어나는 텀라코이드와 그라나의 관상 내막구조로 발달한다. 내막으로 둘러싸인 색소체 내 액체성 구획은 기질로서 DNA, 리보솜 및 각종 효소가 포함되어 있으며, 광합성의 암반응인 캘비회로가 일어나는 중심부이다(8, 9). 특히 CAM 대사를 수행하는 일부 종에서는 생장단계상 또는 일주기성(diurnal fluctuation) 현상으로 색소체 기질에 결정상의 구조체를 형성하는데 이들에 대한 연구는 자세히 이루어지지 않고 있다. 그러나 구조적으로 변하는 CAM 엽육조직 내 색소체 기질상의 결정

구조체의 변이현상을 밝히려는 노력은 시도된 바 있다(10, 11, 12, 13).

이들 결정 구조체는 단백질성 전구물질로 된 구조로서 일부 종이 제한된 조건에 적용하여 CAM 대사를 수행할 때 필요한 효소를 저장하여 공급해주는 부위라고 추정되고 있다(10, 11). 여러 다육질성 CAM 식물의 엽육조직 색소체에 이러한 결정구조체들이 보고 되어 있지만(12, 13), 이들에 대한 구조적 특성과 기능에 대하여는 아직까지 자세히 연구되어 있지 않다. 이들 *S. rotundifolium* 색소체내 결정체는 다양한 section angle에 따라 구성요소들이 crystalline lattice 또는 paralleled arrangement를 나타내어 이들에 대한 3-D 입체적 분석은 결정체의 구조적 특성 연구에 필수적인 분야이다. 본 연구에서는 *Sedum rotundifolium* 색소체 내 결정구조를 TEM 및 HVEM으로 연구한 결과를 비교분석하였다.

II. 재료 및 방법

*Sedum rotundifolium*의 어린 단계(ca. 10~15 mm) 다육질성 잎 중앙 부위에서 약 4 mm의 엽육조직을 채취하여 먼저 2~3% glutaraldehyde에 의한 실온에서의 3시간 전고정(prefixation)과 4°C에서의 2% osmium tetroxide에 의한 2~6시간 후고정(postfixation) 처리하였다. 각 고정단계 후에는 0.1 M phosphate buffer 용액으로 3회 세척하였다. 세척된 시료는 점진적인 30~100%의 아세톤 탈수과정(dehydration)을 거치고, 제조된 low-viscosity resin mixture로 치환(substitution) 및 포매(resin mixture embedding) 되어 60°C 건조기 내에서 72시간 중합경화(polymerization) 되었다. 이러한 단계를 거쳐 만들어진 resin block들은 Reichert Ultracut S ultramicrotome 상에서 diamond knife를 이용하여 각각 TEM 연구용 초박절편(60~90 nm)으로 제작되었다. 이를 절편은 100-mesh grid 위에 올려져 uranyl acetate(실온, 30 min)와 lead citrate(실온, 30 min)로 이중 염색되었고 기초과학지원연구원 대구센터 소재 Hitachi H-7000 TEM으로 연구되었다. TEM photomicroscopy는 75 kV에서 실시되었고, 이후 Artix Scan 4500t Microtek,

Mitsubishi CP9500DW digital printer 등을 거쳐 분석되었다.

HVEM 연구를 위해 연속적으로 제작된 0.25-1.0 μm 의 후박절편은 formvar coating(0.5% formvar in chloroform) 피막을 입힌 후 carbon coating된 single-slot 그리드 위에 올려져 재차 carbon coating 처리되었다. 이와 같이 2회 carbon coating 하여 HVEM 연구 시 1 MV 이상의 초고압 전류로부터 그리드 위 절편이 안정될 수 있도록 하였다. 또한, 두꺼운 조직을 관찰할 경우 후박절편 내 contrast가 약하게 나타나므로 그리드 위 절편들은 TEM 시료 염색의 통상적인 경우보다 높은 농도나 시간으로 uranyl acetate(6%, 1~2 hr) 염색한 후 lead citrate(실온, 60 min)로 이중 염색되었다. 고압전자현미경은 일본 오카자키 국립생리학 연구소 내 National Institute of Physiological Sciences (NIPS) 소재 H-1250 M HVEM을 사용하였다. 연속적으로 section 된 후박절편(serial section)에 의한 2-D image와 해당 절편으로부터 2° 또는 5° 간격으로 -60°~+60° tilting image 결과를 수집하였고, 디지털화한 image의 3차원 영상 재구현(3-D reconstruction)에 필수적인 IMOD 프로그램을 적용하여 색소체 내 결정구조체를 입체적으로 나타내었다.

III. 결과 및 고찰

CAM 대사를 수행하는 다육질성 *Sedum rotundifolium* 광합성 염육조직 색소체에는 생장 단계상 또는 일주기성 현상으로 기질에 결정상의 구조체가 형성된다(11). 이를 결정구조를 이

루는 초미세구조를 TEM 및 HVEM을 이용하여 연구한 결정체의 구조적 특징은 다음과 같다. 색소체 기질에 틸라코이드에 인접하여 형성되는 결정체들은 어떤 막으로도 둘러싸이지 않는 구조로 수 마이크론에 이르는 구조로 발달하였다. TEM으로 연구된 초박절편 및 HVEM으로 연구된 연속 후박절편의 결정체 내에는 $\leq 20 \text{ nm}$ 격자거리로 구성된 많은 미세소관성 요소들이 관찰되었다. 광학현미경 및 저배율의 TEM을 이용한 색소체 구조연구에서는 이들의 분포 및 위치 등은 확인할 수 있다(Fig. 1), 그러나 TEM의 고배율 관찰에서도(Fig. 2) 이들 결정체들이 접하고 있는 색소체 내 여러 막성계 및 기질 등과의 공간적 정보(spational relation)에 대해서는 전혀 알아낼 수 없는 상황이다. CAM 대사를 수행하는 *Sedum* 식물체는 염육조직이 발달함에 따라 일시적 단계에서 색소체 기질에 특이한 형태의 결정상의 구조체를 발달시킨다(10, 11). 이들에 대한 구조연구의 diffractogram을 통해 결정구조가 hexagonal arrangement를 이루고 있음을 밝혀진 바 있고(11), 약 0.5~1.0 μm 두께로 thick section 된 색소체 내 결정구조들이 HVEM으로 조사되면 tilting 및 angle에 따라 상이한 image들로 나타난다(Figs. 3-5). 연속절편(serial section)에 의한 2-D image와 절편으로부터 일정한 각도 ($\pm 2^\circ$ 또는 $\pm 5^\circ$)로 -60°~+60°에 이르는 tilting image 결과를 수집한 후, 디지털화한 image의 3차원 image 재구현 기법을 응용하여 색소체 내 결정구조체를 입체적으로 나타낼 수 있다(Fig. 6). 또한, 이들을 일정한 각도로 tilting하여 관찰하면 결정구조에 인접한 막성계 및 기질과 접하는 소기관들과의 공간적 상관관계(spatial relation) 등

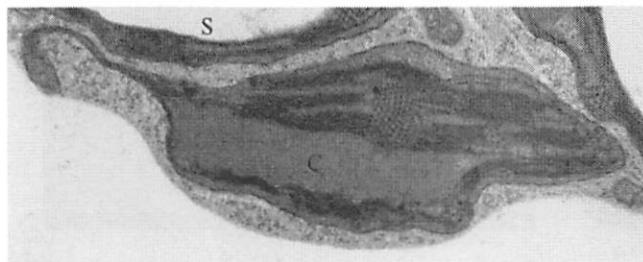


Fig. 1. Peculiar shaped plastid with paralleled inclusion body (C). S, starch grain. TEM. Bar = 1.0 μm .

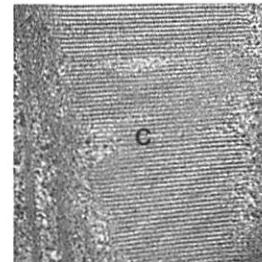


Fig. 2. Closeup of the paralleled inclusion body (C) in Fig. 1. TEM. Bar = 0.5 μm .

을 밝혀낼 수 있게 된다(Fig. 7). 미세조관성 구성요소들의 평행 또는 결정격자들은 다시 6개의 소단위구조(substructure)가 육방정계(hexagonal pattern)를 이루는 정교한 구조로 엽육조직이 발달하면 전판상체 및 녹말입자와 함께 색소체 기질에서 사라져 전혀 관찰되지 않는 것으로 보고되어 있다(12). 엽육세포 색소체에 발달하는 결정체들은 식물이 수행하는 광합성 유형에 따라 각기 다른 구성요소로 형성되어 *Sedum*의 경우와 같이 생장단계별 또는 일주기성으로 분화 발달하는 특성을 보임을 알 수 있었다.

세포의 구조적 기능을 밝혀 생명현상을 규명하는 데에는 얇은 시료 절편의 영상을 얻는 기존의 TEM 연구법이 오래 전부터 이용되어 왔다. 이와 같은 방법으로 얻은 세포 및 세포내 소

기관에 대한 2차원적 구조를 생체구조물을 입체적으로 가시화 할 수 있는 방법 중의 하나는 연속적으로 제작(serial section)된 미세절편을 이용한 재구축 방법이다. 전자현미경에서는 초점심도가 깊기 때문에 절편의 어떠한 평면도 대물렌즈의 초점거리 가운데 들어가고 절편 두께 안에 포함된 구조정보는 전부 겹쳐 2차원적으로 기록되어 버린다. 따라서 구조요소 상호의 3차원적 관계는 stereo 관찰에 의해 명확해진다. 세포 구조를 연구하는 경우 절편이 두꺼울수록 얻어지는 입체적 정보는 많으나 절편이 두꺼워지면 전자선 통과가 어려워지고 구조가 불명확하게 되는 문제가 발생한다. 그러므로 구조의 복잡한 정도에 따라 절편의 두께를 선택할 필요가 있고 목적으로 하는 구조체를 선택적으로 염색하는

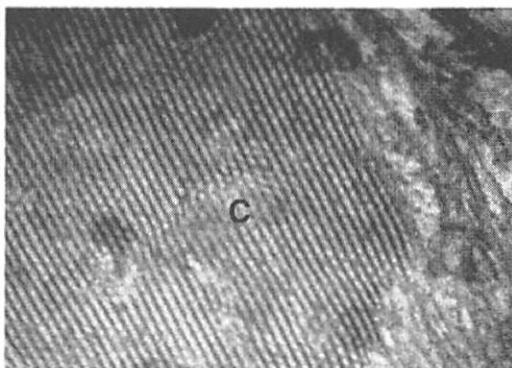


Fig. 3. Part of a plastid inclusion showing a crystalline pattern. 0.25 μm thick section. HVEM. Bar = 0.3 μm .

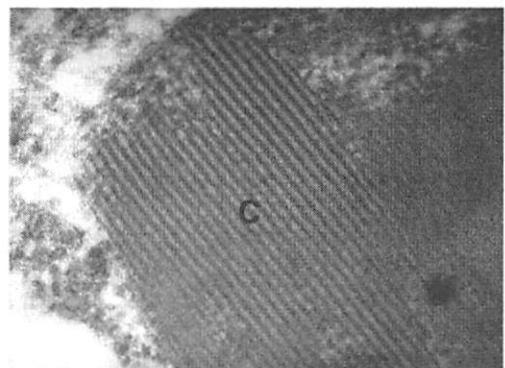


Fig. 4. Plastid inclusion body (C). 0.5 μm thick section. HVEM. Bar = 0.2 μm .

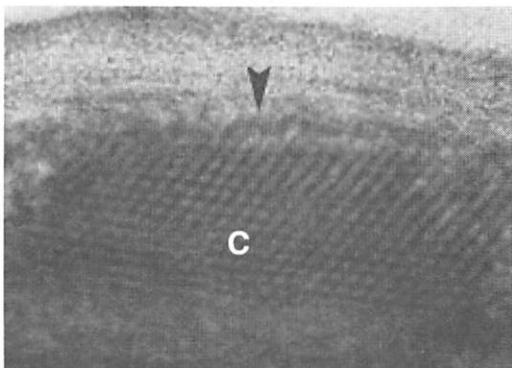


Fig. 5. Plastid inclusion body (C) exhibiting both crystalline and paralleled elements. 1.0 μm thick section. HVEM. Bar = 0.15 μm .

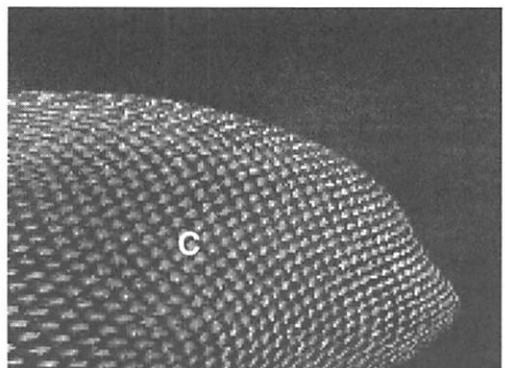


Fig. 6. 3-D reconstruction of a plastid inclusion body (C).

방법이 시행될 수 있다(1).

색소체와 같이 막으로 둘러싸인 영역 또는 구조를 연구하고자 할 때 tomogram을 이용하는 것이 가능하다. 즉 tomogram의 첫 번째 사진에서 구조가 trace되어 다음에 오는 사진에 중합되는데 이때 이전의 절편부근 표면만을 입력시키게 된다. 이것을 계속 연결함에 따라 관찰되는 표면의 경사가 표시되고 해당 구조물은 마치 지형도와 같은 양상으로 재구성된다. 3-D 입체 구조를 구축하는 방법으로서는 computerized axial tomography(CAT)로 불리는 TEM tomography

가 가장 널리 이용되고 있다. 세포구조의 입체적 3-D 분석에는 먼저 2차원 TEM 영상의 처리, 분석과정을 거침으로서 입체구조의 image를 얻는다. Stereo view를 통한 3차구조의 재구현을 위해서 ±로 일정한 두 각도에서(예, ± 5°) 기울어진 HVEM 영상을 획득한다. 또한 HVEM으로부터 얻어진 연속절편 영상으로부터 윤곽선을 추출해내어 3차구조를 modeling 한다. 이러한 image 처리 방법을 도입 실행하기 위해서 “SPIDER and WEB”이나 “IMOD” 등의 프로그램을 이용하여야 한다(4, 5, 6).

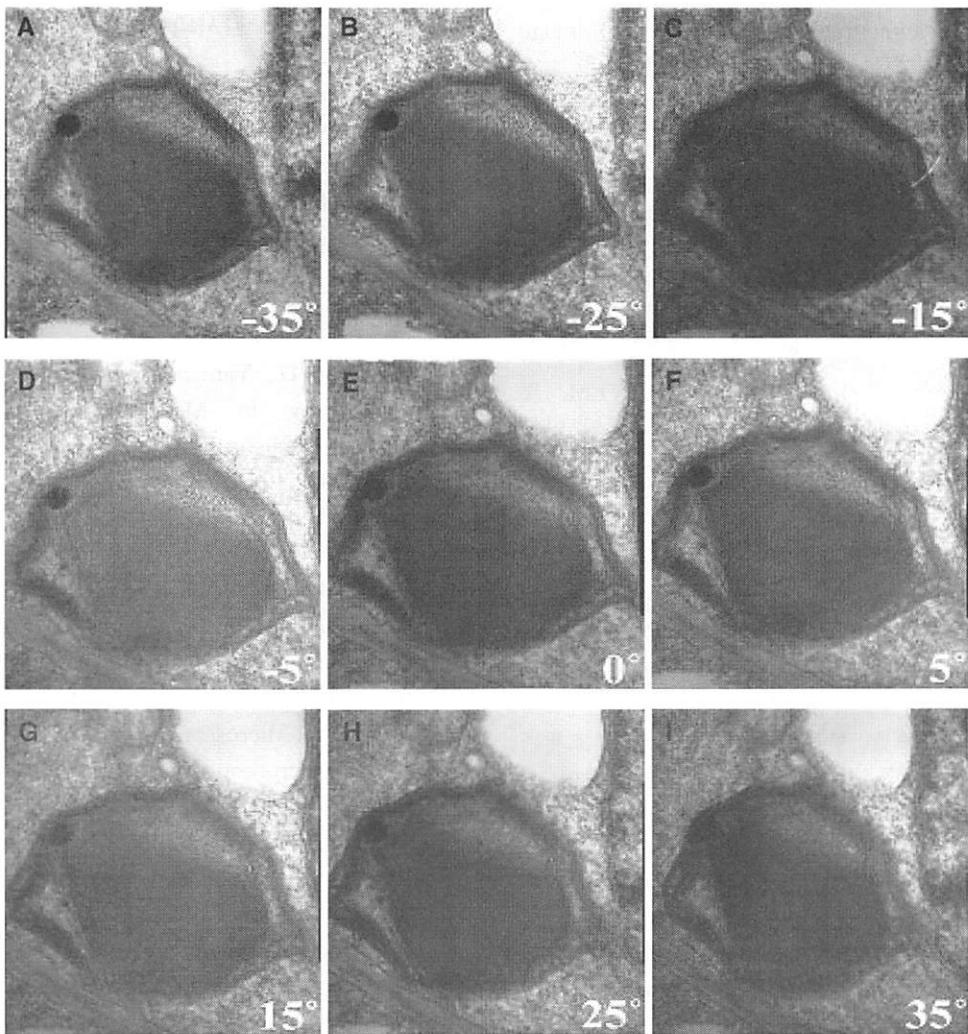


Fig. 7. Tilted images of the plastid inclusion body (C) at 10°intervals. 1.0 μm thick section. HVEM. Bar = 1.2 μm .

다육질성 CAM 수행 *Sedum* 속의 엽육조직에서 나타나는 결정구조체가 CAM 대사를 수행하는 과정에서 어떻게 변화하는지, 또한 전색소체의 전관상체와는 어떻게 다른지 세포의 초미세 구조적 측면의 연구가 이루어지지 않고 있다. 그러나 색소체와 그 결정체의 3차원 구조의 분석은 CAM 과정 중의 결정체 변화를 명료하게 제시하여 줄 것이며, 또한 이러한 연구를 통하여 색소체와 틸라코이드 막성계와의 구조적 상호 연계성 등도 밝힐 수 있을 것으로 사료된다. 이러한 연구는 색소체 연구에 있어 이제까지 접근되지 않았던 새로운 연구방향이라고 할 수 있다. HVEM 및 tomography 등을 통한 3-D image 구현으로 다양한 생물시료를 통해 세포내 소기관의 초미세 3차원적인 구조분석이 가능해지고 있다. 이러한 분야는 생명공학, 의학, 약학 및 공학 등의 많은 분야에서 활용되고 있다(3, 14). 세포 구조연구 분야 또한 HVEM 영상을 이용하여 보다 많은 생물학적 정보를 얻어낼 수 있으나 국내에서는 그 활용과 연구가 국외의 상황에 훨씬 미치지 못하고 있다. 생물시료 내 초미세구조의 3-D 분석결과는 생명현상을 다루는 여러 영역에 영향을 주기 때문에 이후 HVEM 및 tomography 등의 기법을 응용한 후속적인 연구가 활발하게 이루어져야 할 것이다.

IV. 결 론

광합성에서 매우 중요한 대사과정을 수행하는 색소체는 역동적인 세포내소기관으로 CAM 회로를 수행하는 다육질성 *Sedum* 종에서는 생장 단계상 또는 일주기성 현상으로 색소체 기질에 결정상의 구조를 형성한다. 이들 결정구조체는 단백질성 전구물질로 된 구조로서 일부 종이 제한된 조건에 적용하여 CAM 대사를 수행할 때 필요한 효소를 저장하여 공급해 주는 부위라고 추정되고 있다. 본 연구는 수행하는 대사과정 및 세포유형에 따라 다양하게 나타나는 색소체 내 초미세구조를 HVEM 및 tomography 기법과 특별 프로그램을 이용한 이미지 처리과정으로 분석하여 TEM에 의한 구조정보와 비교하였다. 색소체 틸라코이드에 인접하여 형성되는 결정체들

은 어떤 막으로도 둘러싸이지 않는 구조이며, 수マイ크론에 이르는 커다란 결정체 내에는 ≤ 20 nm 격자거리로 이루어진 많은 미세소관성 요소들이 발달하였다. 60-90 nm의 얇은 초박절편을 연구하여 수합된 TEM에 의한 평면적 정보와는 달리 0.25~1.0 μm 에 이르는 두꺼운 후박절편을 이용한 HVEM에서는 높은 해상력의 세포학적 정보를 수집할 수 있었다. HVEM에 의한 tilting 및 tomography 기법으로 image 처리과정을 거친 data에서는 결정체 구성요소의 입체적 3-D image 재구축이 가능하였다.

감사의 글

The author thanks to Dr. Tatsuo Arii of NIPS at Okazaki National Institutes of Natural Sciences, Japan for providing the facilities, including the H-1250 M HVEM, and for technical assistance during this study.

참고문헌

1. Gupta P. D., Yamamoto H. 2000. Electron Microscopy in Medicine and Biology. Science Publishers, Enfield.
2. Randy C. 1997. A simplified approach to image processing: Three-dimensional electron microscopy of macromolecular assemblies. Academic Press.
3. Mannella CA, Hsieh CE, Marko M. 1999. Electron microscopic tomography of whole, frozen-hydrated rat-liver mitochondria at 400 kV. Microscopy and Microanalysis (Proc. Microscopy and Microanalysis 99), Ed. G. Bailey, et al., Springer, New York.
4. Kremer JR, Mastronarde DN, McIntosh JR. 1996. Computer visualization of three-dimensional image data using IMOD. J Struct Biol 116: 71-76.
5. Saxton WO. 1996. Semper: Distortion compensation, selective averaging, 3-D reconstruction, and transfer function

- correction in a highly programmable system. *J Struct Biol* 116: 230-236.
6. Frank J, Radermacher M, Penczek P, Zhub J, Lic Y, Ladjadja M, Leith A. 1996. SPIDER and WEB: Processing and visualization of images in 3D electron microscopy and related fields. *J Struct Biol* 116: 190-199.
7. Bowyer JR, Leegood RC. 1997. Photosynthesis. In: *Plant Biochemistry*. Dey PM, Harborne JB (eds). Academic Press. San Diego. pp. 49-110.
8. Newcomb W. 1997. Plastid structure and development. In: *Plant Metabolism*. Dennis DT, Turpin DH, Lefebvre DD, Layzell DB (eds). Longman. Harlow. pp. 255-259.
9. McDonald M. S. 2003. *Photobiology of Higher Plants*. John Wiley & Sons Ltd., San Francisco, pp. 33-73.
10. Kim IS. 1997. Chloroplast microtubules in young leaves of *Sedum rotundifolium*. *J Plant Biol* 40: 115-119.
11. Santos I, Salema R. 1981. Chloroplast microtubules in some CAM-plants. *Bol Soc Brot Ser* 53: 1115-1122.
12. Kim IS. 2006. Changes in the plastid ultrastructure during *Sedum rotundifolium* leaf development. *J Plant Biol* 49: 376-383.
13. Santos I, Salema R. 1983. Stereological study of the variation of the chloroplast tubules and volume in the CAM plant *Sedum telephium*. *Z Pflanzenphysiol Bd* 113: 29-37.
14. Frank J, Wagenknecht T, McEwen BF, Marko M, Hsieh CE, Mannella CA. 2002. Three-dimensional imaging of biological complexity. *J Struct Biol* 138: 85-91.

김치에서 분리한 *Leuconostoc* 균주의 당 발효특성에 대한 연구

권오식

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

A Study on Carbohydrate Fermentation Characteristics of the *Leuconostoc* Strains Isolated from Kimchi

Oh-Sik Kwon

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

요약. 균생육 특성을 조사하여 여러 가지 김치에서 분리한 균들은 네 가지 그룹으로 나눌 수 있었으며 이들 중 JA2-3은 2%, 4%의 NaCl이 첨가된 배지에서 배양했을 때도 pH가 4.15로 다른 균들에 비해 강한 내산성을 보여주었다. 5탄당의 이용 능력을 살펴보면 JB1-2와 JB2-3은 공시균주 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 발효 패턴이 유사한 것으로 판명되었다. 또한 분리균주 JC2-3을 제외하고는 xylose를 잘 이용하였다. 특이적으로 분리균주들의 6탄당 발효 패턴은 공시균주 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 동일함을 확인할 수 있었다. 테스트된 8개의 균주(공시균주 포함)들은 maltose, meilibiose, sucrose, trehalose 등의 이당류를 잘 이용하고 있었다. 이 실험에서도 JB1-2는 공시균주와 모든 발효 패턴이 같음을 알 수 있었다(cellobiose 제외). 특징적으로 JB2-3만이 sucrose를 잘 발효하고 있었다(최종 pH 4.67). 삼당류의 이용에 있어서, 모든 균주는 melezitose를 전혀 이용하지 못하는 것으로 판명되었고, 반면 raffinose는 모든 균주들이 잘 발효하였다. 특히 JB1-2의 raffinose의 이용 능력은 공시균주의 그것과도 같았다(pH 4.81). 이상의 당발효 실험과 복합당 발효 결과로부터 우리는 분리한 균주가 *Leuconostoc*에 속하는 5가지 종임을 확인할 수 있었으며 이 중 당 발효 특성이 공시균주와 가장 유사한 JB1-2는 사용한 25가지의 당 중에서 오직 5탄당인 xylose와 복합당인 amygdalin에서만 차이를 보여주었다.

Abstract. Four groups of *Leuconostoc* sp. was determined in various kimchi by a growth kinetics study and a salt tolerance test. Among isolated strains, only the JA2-3 from cabbage kimchi showed strong acid resistance(pH 4.15) in media of 4%~6% NaCl added. For a test using pentoses as fermentable carbohydrates, the JB1-2 and JB2-3 showed similar fermentable characteristics with *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722. Only the JC2-3 could not ferment xylose among tested strains. The pattern of hexoses fermentation was very identical to the *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(type strain). All the 8 strains could ferment very well disaccharides such as maltose, meilibiose, sucrose and trehalose. Especially the JB1-2 showed exactly same pattern of fermentation with the type strain in disaccharide fermentation except cellobiose. However the JB2-3 fermented sucrose very well. In the tests of trisaccharides fermentation, all tested strains could not utilize melezitose but fermented raffinose very well. The JB1-2 showed same raffinose fermentation characteristics like type strain(pH 4.81). From the above results, we could identify 5 species in

the isolated *Leuconostoc* from various kimchi. It was also noticed that fermentable ability of the JB1-2 was very closely related with the type strain, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722.

I. 서 론

유산균이란 균 생육을 위하여 에너지원으로 당류(carbohydrates)를 사용하여 유기산인 젖산이나 초산을 다량으로 생산해내는 그람 양성 간균이다 (1,2). 자연계에 존재하는 유산균은 그 종류가 매우 다양하며 인간에게 매우 유용한 프로바이오틱균(probiotics; 6,7)으로 특히 동·식물의 표면에서도 쉽게 발견되지만(2,3,10) 유리한 균주만을 신속하게 얻기는 쉽지 않으며 이에 대한 체계적인 분류가 어렵다. 왜냐하면 이 균들은 다양한 서식처만큼이나 수많은 종으로 이루어지고 있는데 이들의 형태적 및 기능적 차이로 인해 크게 6개의 그룹으로 분류한다(4,5). 이들은 *Leuconostoc*속, 이외 *Lactobacillus*속, *Bifidobacterium*속, *Streptococcus*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 있다. 이에 우리는 한국인들에게 아주 필수적인 식품이며 전통적인 발효 식품으로 소금에 절인 배추김치의 숙성 초기와 중기에 많이 발견되며(8,9) 맛과 향미를 결정하는 중요한 유산균의 일종인 *Leuconostoc*균을 분리하기 위하여 배추김치, 물김치 및 총각김치 등에서 균 분리를 시도하였다. 또한 분리한 균의 종 결정을 위하여 종 결정에 대조군으로 사용되는 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722

균주의 당 발효능과 비교 조사하였다.

II. 재료 및 방법

공시 균주. 본 실험에서 사용한 공시균주는 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722로 한국생명공학연구원(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, 대전)에서 분양받았다. 균주는 MRS(Difco) 배지에 계대배양 후 glycerol이 20% 포함된 저장액에 넣어 -80°C 극저온 냉동고(deep freezer)에 보관하여 사용하였다.

분리 균주. 본 실험은 배추김치(JA), 열무 물김치(JB), 총각김치(JC)를 멸균 종류수를 이용하여 혼탁한 후 이 액을 10ml 취하여 6% NaCl용액 10ml를 섞어 3% NaCl 용액으로 만들었다. 그리고 10³으로 희석하여 2% Agar가 첨가된 MRS 평판배지에 배양하였으며, 일정한 수의 콜로니가 확인되면 계대배양 후 각 균주들을 4°C 냉장고에 보관하였다. 이 콜로니를 이용하여 새로운 MRS agar 선택 배지에 도말하였으며, 얻어진 콜로니를 다시 MRS Broth를 이용하여 30°C 배양기에서 3일간 *Leuconostoc*균을 배양한 다음 균 동정을 위하여 균 생육 특성조사와 내염성 테스트, 당 발효 실험을 하였다. 얻어진 균들은 글리세를 20% 저장용액에 혼탁하여 액체질소를 이용하여 급속 동결시킨 후 -70°C deep freezer에 보관하여 사용하였다.

생육 특성 조사. 공시균과 분리 균주들은 일차적으로 MRS 배지(Difco)를 이용하여 배양하였다. 이들의 생육특성을 결정하기 위하여 균 적정 생육온도(18°C)로 조정한 배양기(Sanyo MIR-153)에서 12 hr, 24 hr, 36 hr, 48 hr 및 72 hr 배양 후, 각각의 배양액을 20분간 4°C에서 냉장 원심분리기(Union Model 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 온도에서 3일간 배양한 후 4°C에서 15분간 원심분리(3,000 rpm)하여 pH meter를 사용하여 상청액의 pH를 측정하였다.

당 발효 테스트. 공시균들의 당 발효 특성을 조사하기 위하여 glucose가 첨가되지 않는 MRS 배지(Table 1)를 특별히 제조하여 사용하였다. Glucose가 첨가되지 않는 MRS broth에 10% 당 stock solution을 첨가하여 autoclave하여 발효능을 조사하였다. 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).

III. 결과 및 고찰

생육 특성 조사. 먼저 공시균주인 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722를 제외한 모든 균들은 배양 시작 후 12시간까지는 활성화가 되지 않다가 배양 후 12시간에서 36시간 사이에 급격히 증식하는 비슷한 양상을 보여주고 있다(Fig. 1A & Fig. 1B). 즉 공시균주인 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 비교되고 있는 Fig. 1A를 보면 분리균들이 전형적인 *Leuconostoc*의 생육 양상을 보여 주고 있음을 알 수 있었다. 생육 72 시간 후 분리균주의 최종 배양액 pH가 4.5 정도였으며 이는 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(■)와 같았다. 따라서 균 생육특성 조사를 통하여(Fig. 1A) 이 2개의 균(JA2-3, JA2-4)이 같은 균이라 생각된다. 그 외에 비슷한 양상을 보이고 있는 5개의 균은 테스트된 공시 균주와 비교할 때 *Leuconostoc carnosum* KCTC 3525, *Leuconostoc lactis* KCTC 3528, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530에 준한다고 생각되었다. 결과적으로 우리는 분리한 균들을 ①JA1-1 ②JA2-3, JA2-4 ③JB2-3,

Table 1. 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 |

JC1-1 ④JB1-2, JC2-3 이렇게 4 그룹으로 나눌 수 있었다. 특징적으로 JA2-3은 배양 후 48시간과 72시간에 pH가 4.5 밑으로 내려감으로 (Fig. 1A, ▼) 분리된 균 중에서 내산성이 가장 높음(pH 4.37)을 알 수 있었다.

내염성 테스트. 유산균들은 내염성이 비교적 강한 세균으로 알려져 있기 때문에 본 실험에서 테스트되는 7종의 김치 유래 *Leuconostoc* sp. 균주의 또 다른 특성을 조사하기 위하여 액체 배양 배지에 NaCl을 1%~8%의 농도로 첨가하여 이들의 내염성을 비교해 보았다. 분리한 7개의 *Leuconostoc*균들 모두가 2%~6%의 NaCl이 첨가된 배지에서 배양하는 경우 균 생육이 잘되는 패턴을 보여주고 있다(Fig. 2A & Fig. 2B). 하지만 8%의 NaCl이 첨가된 배지에서 배양하는 경우는 pH 5.5를 기준으로 두 그룹으로 나눌 수 있는데, JB2-3(▲)과 JC1-1(▼)의 경우 pH가 5.5로 생육이 가능하지만 그 외에 균은 pH가 5.5 이상으로 생육이 불가능하였다(Fig. 2B). 또한 Fig. 2A에서 살펴보면 JA2-3(▼)은 2%, 4%의 NaCl이 첨가된 배지에서 배양했을 때 pH가 4.15로 다른 균들에 비해 잘 생육하여 강한 내염성을 보여주었다. 결론적으로 내염성 테스트 통하여 모든 분리 균주들이 6%의 NaCl이 첨가된 배지에서도 배양이

잘 되었기 때문에 균주의 별다른 특성을 발견하지 못하였다. 그러나 JA2-3과 JA2-4(Fig. 2A)는 분리 출처(배추김치)가 같고 다른 균주보다 더 낮은 pH에서도 생육하는 것으로 보아 두 균이 유사한 균주일 것이라 사료되었다.

5탄당 발효능. 이들 균주가 5탄당을 발효하는 정도를 알아보기 위하여 D-arabinose, L-arabinose, ribose 및 xylose 등을 배지조성에 첨가하여 균들을 배양하였다. 그 결과 공시균주를 포함하여 8 균주 모두 D-form의 arabinose(AraD)는 최종 산도가 5.5 이상으로 이용하지 못하였다(Fig. 3A & Fig. 3B). 하지만 L-form의 arabinose(AraL)는 비교적 잘 이용하였는데 이러한 경향은 공시균주(■)와 같았다. 한편 생육특성 조사시 가장 낮은 pH를 보여준 분리균주 JA2-3(▼)만 유난히 ribose를 잘 이용한 것으로 나타났다. 공시균주가 잘 이용하는 것으로 나타난 xylose(Fig. 3A)를 특정 분리 균주들(배추김치 분리균)은 이용하지 못하였다고 판단되었다(JC2-3). 특징적으로 Fig. 3B에서 보는 것처럼, JB1-2(■)와 JB2-3(▲)은 Fig. 3A에 나타낸 공시균주 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(■)와 발효 패턴이 매우 유사한 경향을 보여주었다.

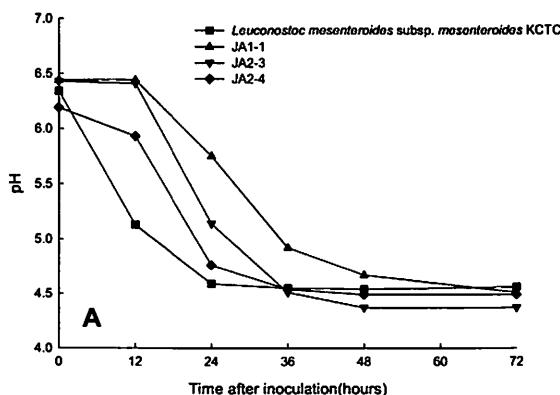


Figure 1A

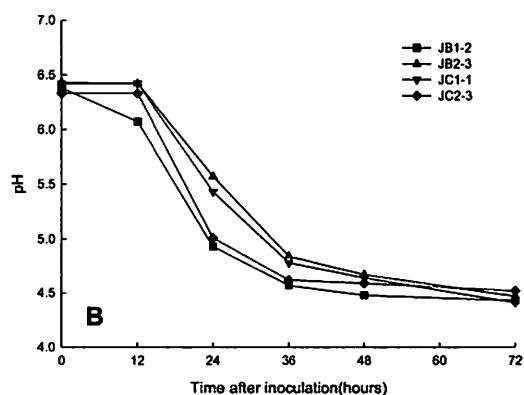


Figure 1B

Fig. 1. Growth characteristics among facultative heterofermentative *Leuconostoc* stains from various kimchi products determined by pH. A: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(■) and JA1-1(▲), JA2-3(▼), JA2-4(◆) isolated from cabbage kimchi. B: JB1-2(■), JB2-3(▲) isolated from Mul-kimchi and JC1-1(▼), JC2-3(◆) isolated from Chonggak-kimchi.

6탄당 발효능. 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 균주간의 당 발효능의 차이를 비교

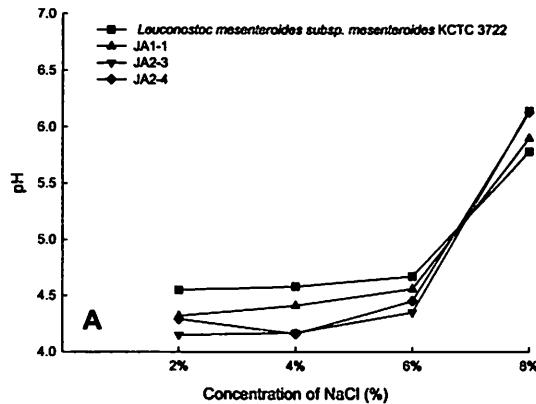


Figure 2A

하여 보았다. 그 결과 Fig. 4A와 Fig. 4B에서 보는 것처럼 분리한 모든 균주의 6탄당 발효페인은 공시균주인 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(■)와 유사한 패턴을 보여주었다. 공시균주를 포함한 7개의 균

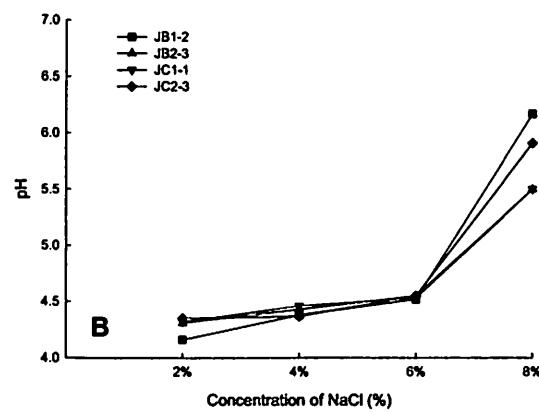


Figure 2B

Fig. 2. Comparison of the 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. A: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(■) and JA1-1(▲), JA2-3(▼), JA2-4(◆) isolated from cabbage kimchi. B: JB1-2(■), JB2-3(▲) isolated from Mul-kimchi and JC1-1(▼), JC2-3(◆) isolated from Chonggak-kimchi.

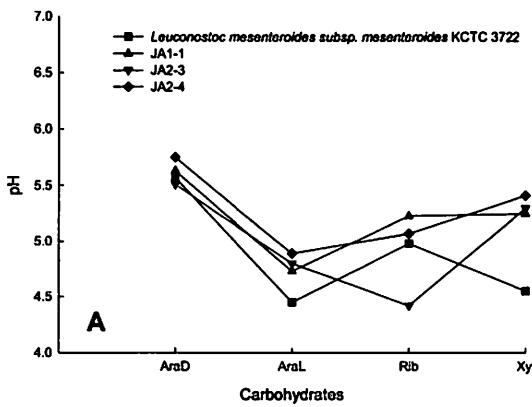


Figure 3A

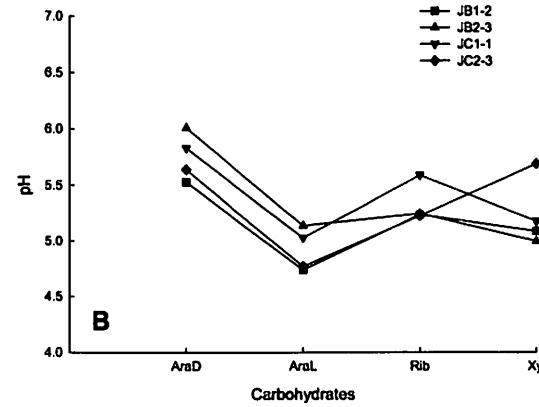


Figure 3B

Fig. 3. Pentose 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. A: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(■) and JA1-1(▲), JA2-3(▼), JA2-4(◆) isolated from cabbage kimchi. B: JB1-2(■), JB2-3(▲) isolated from Mul-kimchi and JC1-1(▼), JC2-3(◆) isolated from Chonggak-kimchi.

주들은 fructose, glucose, mannose는 잘 이용하였으며(pH가 5.0 이하), 또한 이를 균주들은 rhamnose를 전혀 이용하지 못하고 있었다(최종 pH 6.0 이상). 이러한 6탄당 발효 패턴은 공시균주 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 동일함을 확인할 수 있었다. Fig. 4B에서 보는 것처럼 6탄당 발효에 있어서 JB1-2(■)와 JB2-3(▲)은 역시 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(Fig. 4A)와 가장 근접한 결과를 보여주었다. 하지만 galactose의 발효능은 JA2-3과 JA2-4, JB1-2는 우수하였으나 그 외에 균은 이용하지 못하였다. 따라서 6탄당 발효 결과를 보면 JB1-2는 다른 종류의 *Leuconostoc* 종으로 보이며, JA2-3과 JA2-4도 다른 균주임을 알 수 있었다.

이당류의 발효. 이당류(disaccharides)라 함은 단당류(5탄당 혹은 6탄당) 2개가 O-glycoside bond로 결합된 것으로 이들의 결합이 분해되면 이당류를 구성하고 있던 단당류 두 분자가 생성된다. 이당류 발효 실험(Fig. 5A & Fig. 5B)에서 모든 균들의 전반적인 이당류 발효 패턴은 역시 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides*

KCTC 3722(■)와 같았다. 하지만 cellobiose(Cel)의 발효에 있어서 분리한 균주들은 대부분 잘 발효하였으나 오직 공시균주만이 cellobiose를 발효하지 못하는 것이 특징적이었다. 또한 lactose의 경우 테스트된 공시균주와 분리균주 7개가 모두 다 잘 이용하지 못하였다. 한편 테스트된 균주들은 maltose, meilibiose, sucrose, trehalose 등의 이당류를 잘 이용하고 있었다. 마지막으로 분리 균주인 JB1-2(Fig. 5B, ■)는 공시 균주 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 마찬가지로 cellobiose 발효를 제외한 모든 발효 패턴이 같음을 알 수 있었다. 특징적인 분리 균주인 JB2-3(Fig. 5B, ▲)만이 발효 후 배양액의 최종 pH가 4.67로 sucrose(Suc)를 잘 발효하고 있음이 주목되었다.

삼당류의 발효. 3개의 단당류가 결합된 삼당류의 경우를 보면(Fig. 6A & Fig. 6B), 모든 균주는 melezitose(Mele)를 전혀 이용하지 못하는 것으로 판명되었고, 반면 raffinose(Raf)는 모든 균주들이 이용하였다. 삼당류 발효에 있어서 분리균주 중 JB1-2(Fig. 6B)가 가장 우수한 삼당류 발효 능력(pH 4.81)을 보여주었는데 이 수치는 Fig. 6A의 공시균주인 *Leuconostoc mesenteroides*

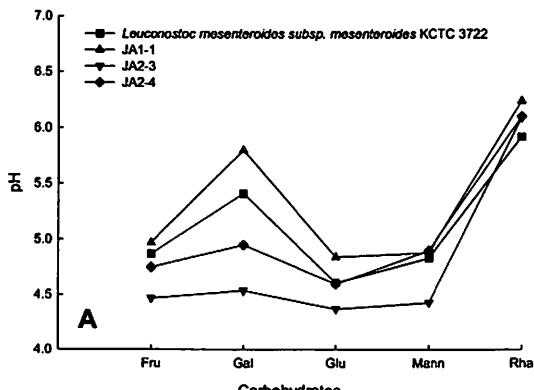


Figure 4A

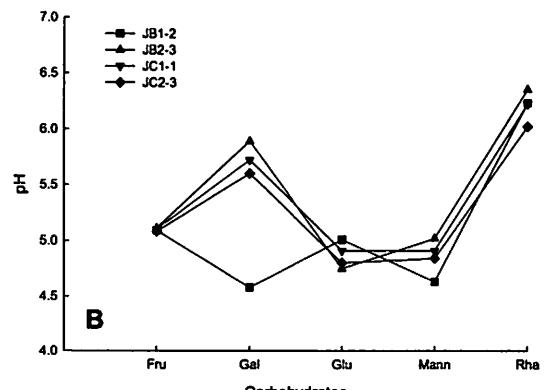


Figure 4B

Fig. 4. Hexose fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Fru (fructose), Gal (galactose), Glu (glucose), Mann (mannose) and Rha (rhamnose). A: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(■) and JA1-1(▲), JA2-3(▼), JA2-4(◆) isolated from cabbage kimchi. B: JB1-2(■), JB2-3(▲) isolated from Mul-kimchi and JC1-1(▼), JC2-3(◆) isolated from Chonggak-kimchi.

subsp. *mesenteroides* KCTC 3722의 raffinose의 발효 능력과 같았다.

복합당 및 변형당의 발효. 이들 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. 7A & Fig. 7B), 전반적으로 분리 균주들은 모두 최종 pH가 6.0 이상으로 알콜형 당을 전혀

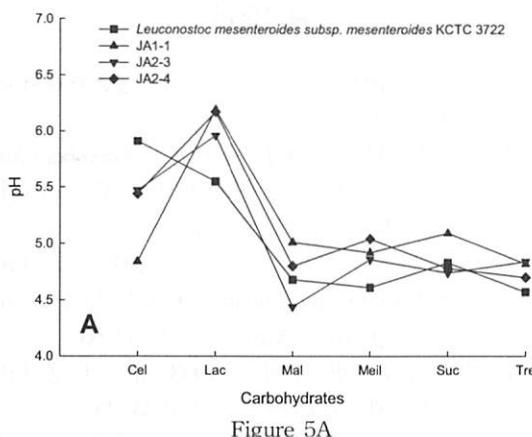


Figure 5A

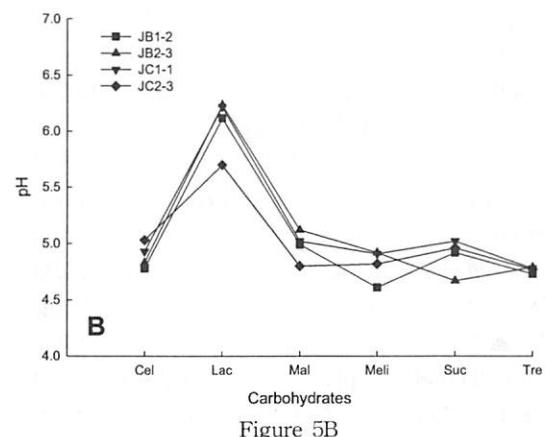


Figure 5B

Fig. 5. Disaccharide fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Cel (cellobiose), Lac (lactose), Mal (maltose), Meil (melibiose), Suc (sucrose), and Tre (trehalose). A: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(■) and JA1-1(▲), JA2-3(▼), JA2-4(◆) isolated from cabbage kimchi. B: JB1-2(■), JB2-3(▲) isolated from Mul-kimchi and JC1-1(▼), JC2-3(◆) isolated from Chonggak-kimchi.

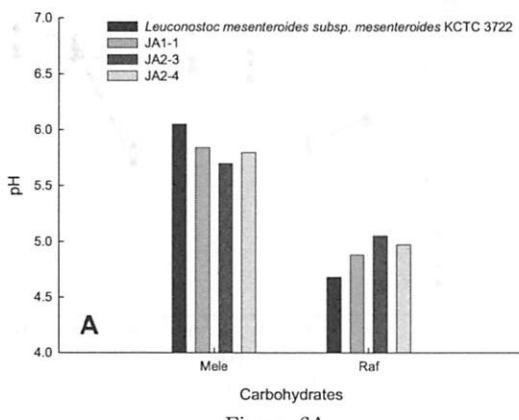


Figure 6A

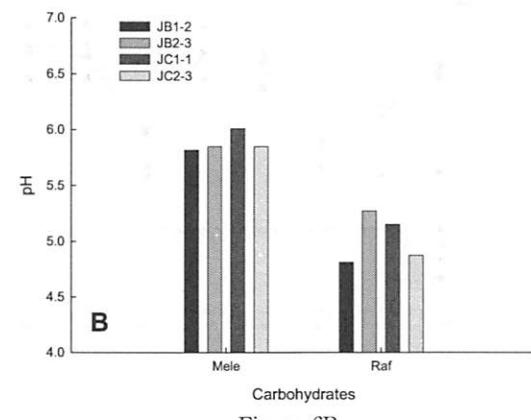


Figure 6B

Fig. 6. Trisaccharide fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Mele (melezitose) and Raf (raffinose). A: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(■) and JA1-1(▲), JA2-3(▼), JA2-4(◆) isolated from cabbage kimchi. B: JB1-2(■), JB2-3(▲) isolated from Mul-kimchi and JC1-1(▼), JC2-3(◆) isolated from Chonggak-kimchi.

이용하지 못하는 것으로 나타났는데(Fig. 7A & Fig. 7B), 이는 공시균주(Fig. 7A, ■)도 마찬가지이었다.

한편 배추김치에서 분리한 JA1-1(Fig. 7A, ▲), 물김치에서 분리한 JB1-2(Fig. 7B, ■), 총각김치에서 분리한 JC2-3(Fig. 7B, ◆)은 복합당인 amygdalin을 어느 정도 이용하는 것으로 나타나는 반면(pH 5.5 이하), 공시균주(Fig. 7A, ■)는 전혀 이용하지 못하는 것으로 나타났다(pH 6.0 이상). 이러한 특성은 공시균주 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722가 물김치에서 분리한 JB1-2와 차이를 보여주는 중요한 결과라고 생각된다. 하지만 공시균주 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722는 사용한 모든 복합당 및 변형당의 발효에 있어서 JB1-2와 복합당 패턴 역시 모두 같았다. 한편 그 중 JA1-1(Fig. 7A, ▲)은 유일하게 esculin을 이용하는 것으로 조사되었다(최종 pH 5.22). 이것으로 보아 JA1-1은 분리한 균 중 유별나게 다른 균임이 판명되었다. 또한 JC2-3(Fig. 7B, ◆)만 유독 salicin을 발효하지 못했는데 이는 다른 모든 분리균주와 공시균주가 잘 이용할 수 있는 당이었다. 따라서 이러한 복합당 발효능 결과로부터 우

리가 분리한 균주가 여러 가지 종임을(적어도 4 종류 이상) 알 수 있었으며 특히 JB1-2는 공시균주 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 분리균주 JB1-2는 사용한 25가지의 당 중에서 오직 5탄당 xylose와 복합당 amygdalin에서만 차이를 보여주었다.

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.

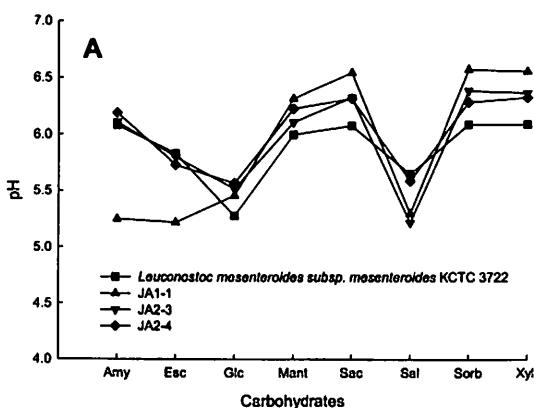


Figure 7A

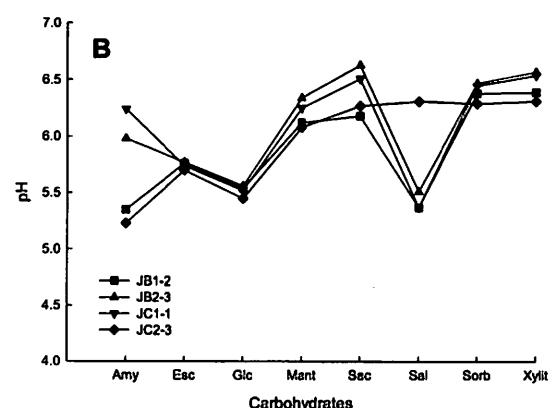


Figure 7B

Fig. 7. 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). A: *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(■) and JA1-1(▲), JA2-3(▼), JA2-4(◆) isolated from cabbage kimchi. B: JB1-2(■), JB2-3(▲) isolated from Mul-kimchi and JC1-1(▼), JC2-3(◆) isolated from Chonggak-kimchi.

7. 차성관. 2000. 프로바이오틱 미생물과 유산균 식품. *미생물과 산업.* 26: 13-21.
8. 최신양, 정병문, 김현정, 성승희, 김왕준, 박완수, 2000. 김치 유래 젖산균의 세포외 효소 활성의 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* stater 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.

주요 식품에서 발견되는 *Leuconostoc* 종의 대사 특성에 대한 연구

권오식 · 김선지 · 진준엽*

계명대학교 자연과학대학 미생물학과, 계명대학교 의과대학 생리만성질환연구센터*

A Study on Metabolic Characteristics of the *Leuconostoc* Species from Human Diet

Oh-Sik Kwon · Sun-Ji Kim · Jun-Yup Jin*

Department of Microbiology, Physiology and Chronic Disease Research Center*

Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

요약. 식품에서 분리되는 유산균 *Leuconostoc* 종의 대사 특성을 조사하였다. 균생육 특성 조사를 통하여 산생성이 우수한 종은 *Leuc. citreum*과 *Leuc. mesenteroides*이었으며 6% NaCl에서도 생육 가능한 *Leuc. mesenteroides*종은 내염성도 탁월하였다. 5탄당 발효시 *Leuc. citreum*과 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*은 아종간에 동일한 발효 패턴을 보여주었다. *Leuc. lactis* KCTC 3528과 *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530은 전혀 5탄당을 발효하지 못하였다. 5탄당 발효 경향이 같았던 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(pH 4.70)와 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(pH 5.41)는 6탄당 발효시 오직 갈락토오스에서만 차이를 보여주고 있었다. 이러한 결과는 갈락토오스를 포함하는 이당류인 락토오스의 발효에서도 동일하게 나타났다. 슈크로오스는 모든 *Leuconostoc* 종들이 잘 이용하는 것으로 나타났으며 사용한 모든 이당류를 잘 발효한 종은 *Leuc. gelidum*과 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505뿐이었다. 고리형 구조를 갖는 당인 amygdalin은 *Leuc. mesenteroides*의 아종을 구별하는 중요한 당임을 알 수 있었다. *Leuconostoc* 균주들은 알콜형 당인 mannitol, sorbitol 및 xylitol 등을 전혀 이용하지 못하였으며, 우유에서 분리된 *Leuc. lactis* KCTC 3528는 복합당과 변형당을 전혀 발효하지 못하고 있음이 주목되었다.

Abstract. In this study, metabolic characteristics of the *Leuconostoc* species from human diet were determined. Among the tested species, *Leuc. citreum* and *Leuc. mesenteroides* showed strong acid resistance. The species *Leuc. mesenteroides* also showed better salt tolerance than others, which grew in the media contained 6% NaCl. *Leuc. citreum* and *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* showed identical fermentable patterns with pentoses between subspecies. *Leuc. lactis* KCTC 3528과 *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530 did not ferment tested pentoses at all. *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505 and *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722 showed identical patterns of pentoses and hexoses fermentation but differed only in galactose such as final pH 4.70 and 5.41 respectively. This tendency repeatedly appeared in fermentation of the disaccharide lactose that was constituted of galactose and glucose. All the leuconostocs could ferment sucrose, and *Leuc. gelidum* and *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505 were able to utilize all the disaccharides tested. The heterocyclic sugar amygdalin was the key carbohydrate to determine the nature of tested subspecies of *Leuc. mesenteroides*. All the tested leuconostocs could not ferment mannitol, sorbitol

and xylitol. It was also noticed that *Leuc. lactis* KCTC 3528 isolated from milk could not ferment tested complexed sugars and sugar derivertives at all.

I. 서 론

유산균 *Leuconostoc*속은 Gram 양성 혐기성 간균(1)으로 계통발생학적으로 *Lactobacillus*속과 *Pediococcus*속의 균들과 밀접한 관계가 있으며 다른 발효성의 유산균과 함께 많은 특성들을 함께 공유한다(16). 또한 *Leuconostoc*속 균들은 복잡한 영양조건을 필요로 하기 때문에 여러 가지 식물성 식품, 낙농 유제품, 고기와 다양한 발효 음식 등에서 발견된다(14). 예를 들면 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*는 exopolysaccharides를 생산하는데 이는 설탕제분에 있어서 주요한 오염물질이다(12). 하지만 이 균은 우리 나라 고유의 발효식품인 김치의 맛을 결정하는 주요한 균이기도 하다(2). 한편 *Leuc. lactis*는 우유에서 우점종의 *leuconostocs*로서 우유의 발효에 관련되어 있으며 기타 *Leuc. carnosum*, *Leuc. gelidum*과 *Leuc. citreum*은 다양한 육가공품으로부터 분리되었다.

*Leuconostoc*속으로 분류되는 균들은 *Lactobacillus*의 그것에 비하여 종의 수도 적고 비교적 덜 연구되어져 왔다. 하지만 이들 역시 여러 가지 당류(carbohydrates)를 발효하여 유기 산인 젖산이나 초산을 다양으로 생산해내는 유산균으로(6, 12, 14) 사람의 음식물과 기호품(예: 와인)과 관련되어 있기 때문에 인간에게 매우 유용한 프로바이오틱균(probiotics)으로 인식되고 있다.

시작했다(7, 8, 9). 따라서 많은 유산균학자들은 최근에 *leuconostocs*의 실제적 중요성을 더 많이 깨닫게 되었고 특히 김치, 우유, 버터, 치즈, 고기와 같은 발효음식의 본질과 음식의 맛에 대한 사람들의 변화가 다양해지면서 지금까지 알려진 몇몇 *Leuconostoc*속의 균들의 상업성에 주목하고 있다.

이에 우리는 한국인들에게 아주 필수적인 식품이자 전통적인 발효 식품인 김치의 숙성 초기와 중기에 많이 발견되며(3, 4, 5) 여러 가지 김치의 맛과 향미를 결정하는 중요한 유산균의 일종인 *Leuconostoc*균을 분리하기 위하여(2) 선행적으로 알려진 8종의 *Leuconostoc*균을 이용하여 이들의 생육 특성, 내염성 그리고 여러 가지 당발효 특성 등의 대사 특성을 조사하여 비교하였으며 추후 연구될 이들 *Leuconostoc* 종간 혹은 아종간의 유전적 특이성을 확인하기 위하여 intact한 chromosomal DNA를 얻기 위한 추출 방법에 대하여 연구하였다.

II. 재료 및 방법

균주의 배양 및 사용배지. 본 실험에서 사용한 공식균주(Table 1)는 *Leuconostoc* 속에 속하는 종과 아종이 상이한 8종으로 *Leuconostoc carnosum*, *Leuconostoc citreum*(2 아종), *Leuconostoc gelidum*, *Leuconostoc lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*(3

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

| Species and Strains | Sources |
|--|--|
| <i>Leuconostoc carnosum</i> | KCTC 3525 Vacuum-packaged meats |
| <i>Leuconostoc citreum</i> | KCTC 3524 Produces dextran from sucrose |
| <i>Leuconostoc citreum</i> | KCTC 3526 Produces dextran from sucrose |
| <i>Leuconostoc gelidum</i> | KCTC 3527 Vacuum-packaged meats |
| <i>Leuconostoc lactis</i> | KCTC 3528 Milk |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i> | KCTC 3530 ATCC 19255 |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> | KCTC 3505 Fermentating olives |
| <i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>mesenteroides</i> | KCTC 3722 Silage |

아종)로 이 중 균 분리 출처가 다른 *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 2종 등이 포함되어 있다. 이들은 모두 한국생명공학연구원(Korean Collection for Type Cultures, KCTC, 대전)에서 분양받았다. 균주는 MRS(Difco) 배지에 계대배양 후 glycerol이 20% 포함된 저장액에 넣어 -80°C 저온 냉동고(Sanyo, MDF-U72V)에 보관하였으며 실험에 사용하기 전 계대배양을 실시하였다. 사용하였다.

균생육 특성 조사. 8종의 공시균주의 생육특성을 결정하기 위하여 *Leuc. carnosum* KCTC 3525(30°C), *Leuc. citreum* KCTC 3524(26°C), *Leuc. citreum* KCTC 3526(30°C), *Leuc. gelidum* KCTC 3527(25°C), *Leuc. lactis* KCTC 3528(26°C), *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530(30°C), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(30°C), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(25°C)의 균 적정 생육온도를 조정한 냉장배양기(Sanyo MIR-153)에서 배양하였다. 또한 시간별 샘플링을 위하여 12 hr, 24 hr, 36 hr, 48 hr 및 72 hr 배양한 후, 각각의 배양액을 20분간 4°C에서 냉장 원심분리기(Union Model 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 유산균들(*Leuconostoc carnosum* KCTC 3525, *Leuconostoc citreum* KCTC 3524, *Leuconostoc citreum* KCTC 3526, *Leuconostoc gelidum* KCTC 3527, *Leuconostoc lactis* KCTC 3528, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505, *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722)의 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 µl를 접종하였

다. 상기한 적정 배양 온도에서 3일간 배양한 후 4°C에서 15분간 원심분리(3,000 rpm)하여 pH meter를 사용하여 상청액의 pH를 측정하였다.

당 발효 테스트. 공시균들의 당 발효 특성을 조사하기 위하여 glucose가 첨가되지 않는 MRS 배지(2)를 제조하여 사용하였다. Glucose가 첨가되지 않는 MRS broth에 10% 당 stock solution을 첨가하여 autoclave하여 발효능을 조사하였다. 각각의 10% 당 stock solution이 첨가된 배지 5 ml에 공시균주 20 µl를 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, D-arabinose, L-arabinose, cellobiose, esculin, fructose, galactose, gluconic acid, glucose, lactose, maltose, mannitol, mannose, melezitose, melibiose, raffinose, rhamnose, ribose, saccharin, salicin, sorbitol, sucrose, trehalose, xylitol, xylose.

***Leuconostoc* chromosomal DNA 추출.** 공시균주의 chromosomal DNA의 추출하기 위하여 효소 처리에 의한 DNA 분리 방법인 Luchansky et al (5)의 방법과 종래의 손쉬운 방법인 초음파 세포분쇄방법을 비교하였다. 즉, MRS 배지에서 3일간 생육한 균들을 15 ml PP 원심분리관(Corning)에 넣어 원심분리한 후, 상청액을 버리고 얻어진 cell pellet을 TES buffer(50 mM NaCl, 30 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA)로 2번 세척하였다. 세척된 *Leuconostoc* 균의 세포막을 파괴시키기 위하여 이를 1 mL의 뮤타노라이신 버퍼에 혼탁시킨 후 10 µl의 뮤타노라이신(10,000 unit/mg, Sigma Chemical Co.)을 처리하여 37°C water bath에서 배양하였으며, 25 µl의 라이소자임(400 mg/ml, Sigma Chemical Co.)을 첨가한 후 다시 2시간 배양하고 500 µl의 0.25 M EDTA를 첨가하였다. 이후 200 µl의 25% SDS 용액을 가한 후 65°C heat block에 배양하고 20 µl의 Proteinase K(20 mg/ml)를 첨가하여 15분간 실온에 방치하였다. 이 세균 파쇄액에 동량의 phenol을 첨가하여 잘 섞은 후 2,500 xg로 15분간 원심 분리하였

으며, 얻어진 상청액은 멸균된 15 ml 원심분리관에 넣고 동량의 phenol:chloroform (1:1) 용액으로 2회 처리하였다. 원심분리 후 얻어진 상청액은 250 mM의 NaCl 용액으로 만들고 최종 부피의 2 배에 해당하는 cold ethanol(100%, Merk)을 첨가해 -20°C 냉동고에서 밤새 장치시켰다. 2번의 wash과정 후, 얻어진 DNA pellet은 회전 전공전 조기(Biotron Model 3180)를 사용하여 30분간 말렸다.

III. 결과 및 고찰

생육 특성 조사. *Leuconostoc* 종간의 대사 특성을 비교하기 위하여 본 실험에서 사용한 *Leuconostoc* 종(species)은 이들의 분리 출처는 다르지만(Table 1) 5종(*Leuc. carnosum*, *Leuc. citreum*, *Leuc. gelidum*, *Leuc. lactis*, *Leuc. mesenteroides*)으로 구분된다. 먼저 이들의 균생육 특성을 조사한 결과는 Fig. 1A와 Fig. 1B에 나타나 있다. *Leuc. lactis* KCTC 3528(Fig. 1B, ■)을 제외한 모든 공시균은 배양 후 24시간 내에 급격히 생육하고 있었으며, 특징적으로 같은 종에 속하는 *Leuc. citreum* KCTC 3524(▲)와 *Leuc. citreum* KCTC 3526(▼)은 배양 후 최종 pH가 똑같이 4.37로 낮았다(Fig. 1A). 하지만 이러한 결과는 Fig 1B에서 보여주는 것처럼 3개의 아종을 테스트한 *Leuc. mesenteroides* 종에서는

유독 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(▼)만이 최종 pH가 4.37로 나타났다. 이들은 산생성이 탁월하며 따라서 내산성이 높은 *Leuconostoc* 종임을 확인할 수 있었다.

내염성 테스트. 테스트되는 *Leuconostoc* 종들의 또 다른 특성을 조사하기 위하여 액체 배양 배지에 NaCl을 1%~8%의 농도로 첨가하여 이들의 내염성을 비교해 보았다. 그 결과 Fig. 2A & Fig. 2B에서 보는 것처럼 모든 균들은 1%~4%의 NaCl 농도에서는 생육이 가능하였지만 8%의 NaCl 농도에서 모두가 생육 불가능하였음을 알 수 있었다. 그러나 6%의 NaCl 농도에서 Fig. 2B에서 보이는 것같이 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(▼), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(●)가 생육이 좋았다(최종 pH 4.86). 이에 반해 같은 종인 *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530(▲)은 6% 농도에서 생육이 전혀 불가능하였다. 따라서 같은 종(*Leuc. mesenteroides*)이라도 아종(subspecies)에 따라 내염성이 차이가 날 수 있음을 확인할 수 있었다.

5탄당 발효능. 이들 균주가 5탄당을 발효하는 능력을 알아보았다. 그 결과 8개 균주 모두 D-form의 arabinose(AraD)는 최종산도가 5.5 이상으로 이용하지 못하였다(Fig. 3A & Fig. 3B). 하지만 L-form의 arabinose(AraL)는 각 종마다 그

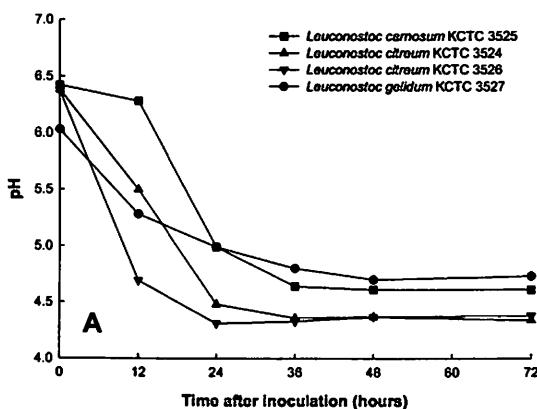


Figure 1A

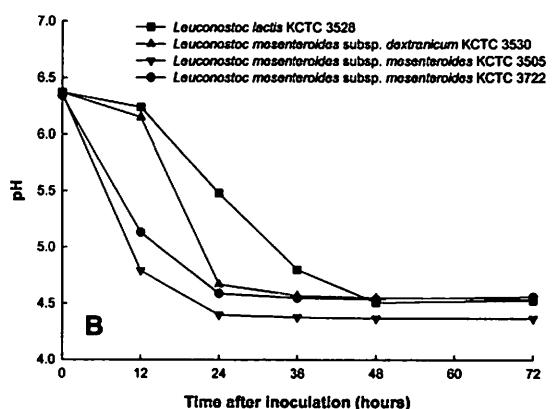


Figure 1B

Fig. 1. Comparison of the growth kinetics among *Leuconostoc* species determined by pH.

능력이 다르게 나타났다. 이 실험에서 보면 두 그룹이 같은 발효능력을 보여주고 있다. 즉 Fig. 3A에서 *Leuc. citreum* KCTC 3524(▲)와 *Leuc. citreum* KCTC 3526(▼)이 같은 발효능을 보이고 있으며, Fig. 3B에서 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(▼)와 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(●)가 동일한 발효 패턴을 보여주고 있다. 이는 같은 종일 경우 같은 발효능을 갖으며 혹은 같은 아종일 경우 같은 발효능을 나타낸다고 보여 진다. 이는 동일한 대사 특성을 갖는 것이

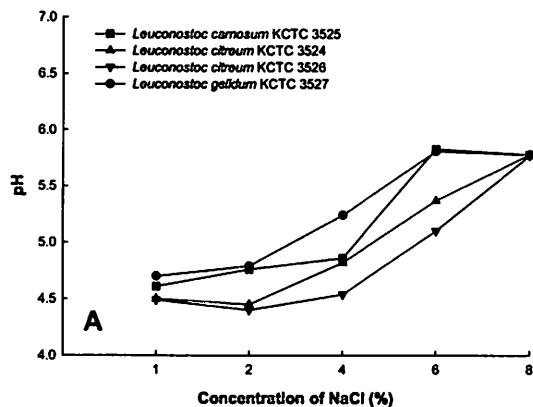


Figure 2A

기도 하다. 하지만 Fig. 3B에서 보는 것처럼, *Leuc. lactis* KCTC 3528(■)과 *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530(▲)은 5탄당을 한 종류도 발효하지 못하는 것으로 나타났다. 특이적으로 5탄당 발효능 조사를 통해 *Leuc. gelidum* KCTC 3527(Fig. 3A, ●)이 리보오스를 잘 발효하고 있음(최종 pH 4.62)이 주목되었다.

6탄당 발효능. 6탄당은 대부분의 유산균이 잘 이용하는 glucose(포도당)을 포함하고 있으며 본 실험

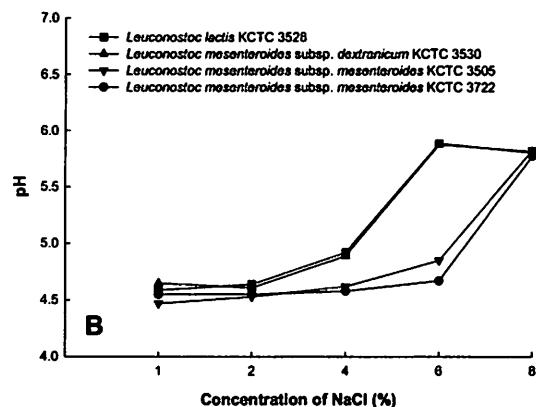


Figure 2B

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

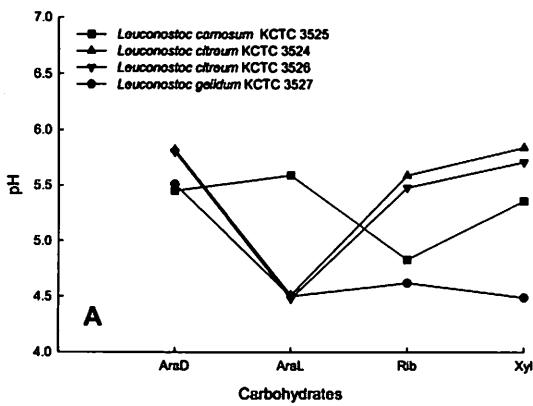


Figure 3A

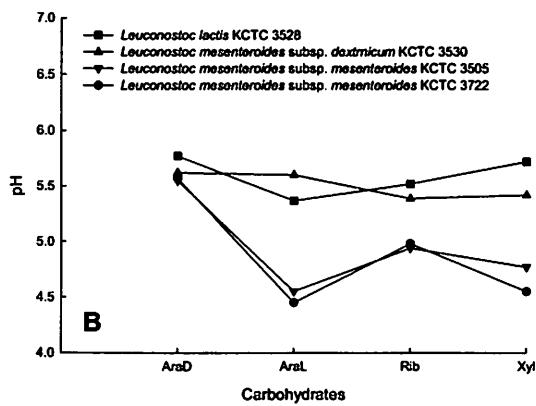


Figure 3B

Fig. 3. Pentose fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* species. Abbreviations of the carbohydrates: AraD as (D)-arabinose, AraL as (L)-arabinose, Rib as ribose and Xyl as xylose.

에서는 포도당 이외에 *Leuconostoc*에 있어서 우선성이 있는 fructose(파당) 및 galactose, mannose, rhamnose를 이용하여 균주간의 당 발효능의 차이를 비교하여 보았다. 그 결과 Fig. 4A와 Fig. 4B에서 보는 것처럼 이들은 글루코오스와 프럭토오스 및 만노오스를 잘 발효하였다. 반면 람노오스는 전혀 발효하지 못하였다. 따라서 이들 종간의 6탄당 대사 능력을 구분하기 위해서는 갈락토오스의 이용 능력 차이를 주목하여야 할 것이다. 즉 5탄당 발효 경향이 같았던 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(▼, pH 4.70)과 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(●, pH 5.41)는 오직 갈락토오스에서만 차이를 보여주고 있었다(Fig. 4B). 이러한 결과는 이들에게 있어서 갈락토오스 대사 특성이 차이가 있음을 보여 주는 것이라 사료된다. 따라서 이들은 다음의 이당류 발효 시험에 있어서 갈락토오스를 포함하는 락토오스의 발효에 있어서 차이를 보여 주어야 할 것이다.

이당류의 발효. 이당류(disaccharides)는 단당류(5탄당 혹은 6탄당) 2개가 O-glycoside bond로 결합된 것으로 이들의 결합이 분해되면 이당류를 구성하고 있었던 단당류 두 분자(예: 락토오스 → 글루코오스+갈락토오스)가 생성된다. *Leuconostoc* 종의 이당류 발효시험 결과(Fig. 5A & Fig. 5B)

를 보면 앞서 살펴본 5탄당 및 6탄당의 발효와는 달리 휠션 복잡함을 알 수 있었다.

물론 이당류 발효시험에서도 상기한 두 종류의 *Leuconostoc* 종들 즉, *Leuc. citreum* KCTC 3524(▲)와 *Leuc. citreum* KCTC 3526(▼, Fig. 5A)은 테스트된 여러 종의 이당류의 발효에 있어서 거의 똑같은 발효패턴을 보여주고 있으며 이러한 경향은 역시 Fig. 5B에서 나타나는 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(▼)와 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(●)에서도 관찰될 수 있었다. 하지만 6탄당 발효시험에서 주지된 것처럼 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(▼)와 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(●)의 이당류 발효 능력 결과는 역시 이들의 락토오스에서만 큰 차이를 보여주고 있음을 발견하였다. 즉 이들의 락토오스 발효능력을 자세히 살펴보면 배양 3일 후 최종 pH가 각각 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(▼)의 경우 4.84이었으며 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(●)의 경우 5.41로 나타났다. 이러한 결과는 *Leuc. mesenteroides*의 두 아종의 락토오스 대사 능력의 차이를 보여주고 있음을 반증하는 것이다. 이는 주로 두 아종의 갈락토오스 대사의 차이에 기인하는 것으로 사료된다. 한편

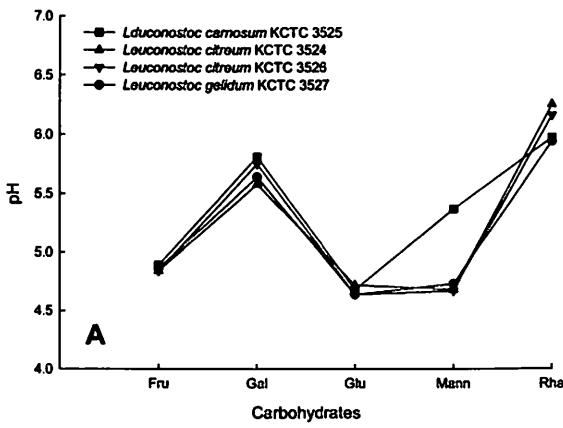


Figure 4A

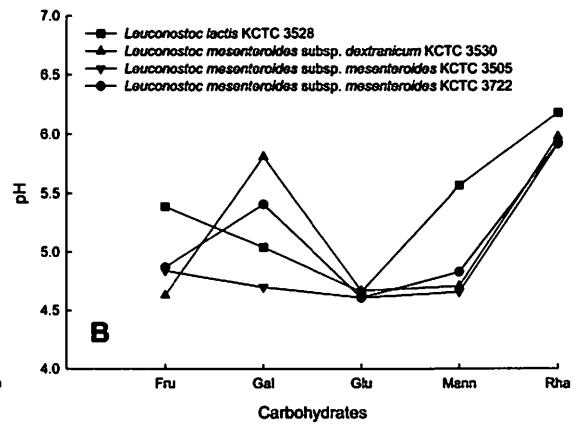


Figure 4B

Fig. 4. Hexose fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* species. Abbreviations of the carbohydrates: Fru (fructose), Gal (galactose), Glu (glucose), Mann (mannose) and Rha (rhamnose).

다른 아종인 *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530(▲)의 경우 락토오스 발효에 있어 최종 pH가 5.81로 락토오스를 거의 발효를 하지 못하고 있음을 확인할 수 있었다. 한편 모든 종들은 슈크로오스를 잘 발효하고 있음과 트레할로오스도 *Leuc. lactis* KCTC 3528 (■, Fig. 5B)만 제외하고는 모든 균들이 잘 이용하고 있음을 확인할 수 있었다. 따라서 이 당류 발효능의 차이는 각각의 *Leuconostoc* 종간의 구

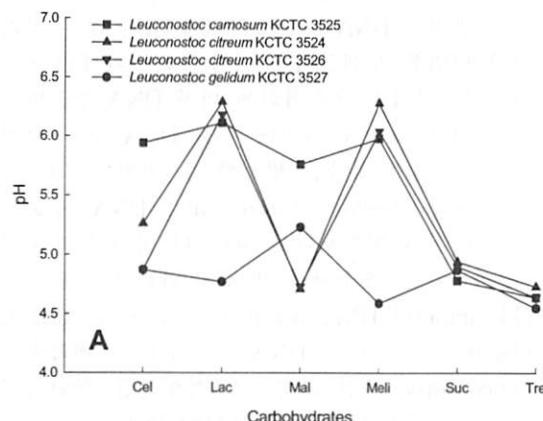


Figure 5A

별에 매우 중요한 지표라고 사료되었다.

삼당류의 발효. 3개의 단당류가 결합된 삼당류 발효의 경우를 보면(Fig. 6A & Fig. 6B), 모든 *Leuconostoc* 종들은 melezitose를 전혀 이용하지 못하는 것으로 판명되었고, 반면 raffinose를 발효할 수 있는 균종은 가공육에서 분리된 *Leuc. gelidum*(Fig. 6A)과 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*(Fig. 6B)뿐이었다.

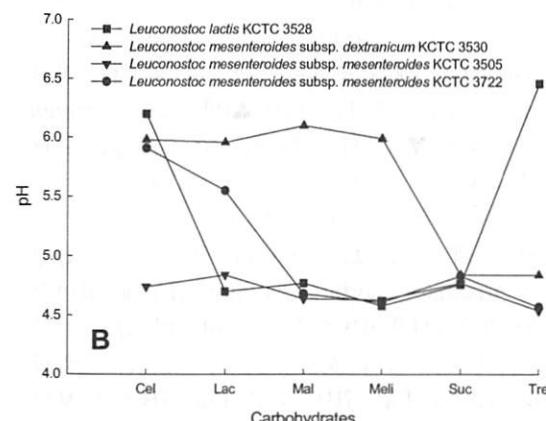


Figure 5B

Fig. 5. Disaccharide fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* species. Abbreviations of the carbohydrates: Cel (cellobiose), Lac (lactose), Mal (maltose), Meil (melibiose), Suc (sucrose), and Tre (trehalose).

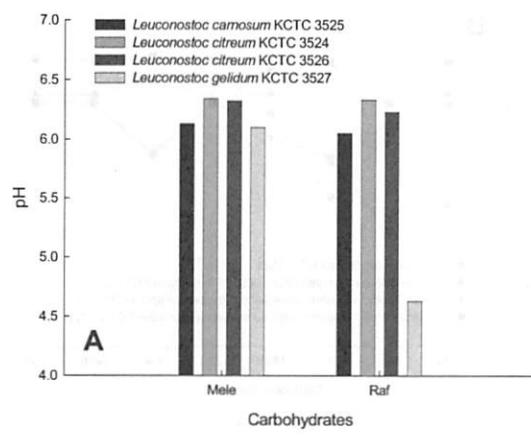


Figure 6A

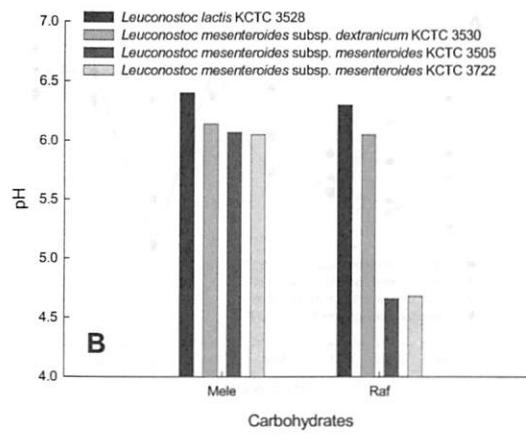


Figure 6B

Fig. 6. Trisaccharide fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* species. Abbreviations of the carbohydrates: Mele (melezitose) and Raf (raffinose).

복합당 및 변형당의 발효. 이들 균종의 복합당 및 변형당에 대한 대사 능력을 비교해보면 이 역시 일정한 패턴이 나타나고 있음을 볼 수 있었다. 먼저 Fig. 7A의 *Leuc. citreum* KCTC 3524(▲)와 *Leuc. citreum* KCTC 3526(▼)를 살펴보면 역시 발효 경향이 동일함을 알 수 있었으며 Fig. 7B의 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(▼), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(●)도 그러하였다. 특징적으로 이들의 구별은 오직 고리형 구조를 갖는 복합당인 amygdalin의 이용에서만 각각의 차이를 알 수 있었다. 따라서 이들 아종의 구별에는 amygdalin이 매우 중요함을 알 수 있었다. 한편 *Leuc. citreum* KCTC 3524(▲)와 *Leuc. citreum* KCTC 3526(▼)은 다른 *Leuconostoc* 종과는 달리 역시 고리형 구조를 갖는 복합당인 salicin을 잘 발효하고 있음을 알 수 있었다.

한편 테스트된 *Leuconostoc* 균주들은 알콜형 당인 mannitol, sorbitol, xylitol 경우에 있어서 모두 최종 pH가 6.0 이상으로 이들이 알콜형 당을 전혀 이용하지 못하는 것을 알 수 있었다 (Fig. 7A & Fig. 7B). 또한 Fig. 7B에서 보면 *Leuc. lactis* KCTC 3528(■)는 전혀 모든 복합당과 변형당을 발효하지 못하고 있음이 주목되었다. 결과적으로 이러한 복합당의 대사능력 차

이는 *Leuconostoc* 각 종들의 체계적 분류나 새로운 *Leuconostoc*의 분리에 있어서 역시 중요한 자료를 제공하고 있다고 사료되었다.

Leuconostoc chromosomal DNA 추출. 당 발효 등의 대사 특성을 조사하여 *Leuconostoc*의 종간의 차이는 확연히 구별될 수 있었지만 좀 더 구체적인 차이(상이성과 유사성)는 이들의 유전체 수준에서도 확인할 수 있기 때문에 테스트된 *Leuconostoc* 균의 chromosomal DNA 추출을 시도하였다. 특히 *Leuconostoc*은 그만 양성 간균인 관계로 DNA를 추출하기가 쉽지 않아 여러 가지 방법을 모색하여 보았다. 그 결과 Fig. 8에서 보는 것처럼 효소처리에 의한 DNA 추출방법과 간편한 초음파 처리에 의한 DNA 추출 방법에 큰 차이가 있음을 발견할 수 있었다. 결과적으로 *Leuconostoc* chromosomal DNA 추출은 초음파 처리 방법보다는 보다 더 복잡하고 조건이 까다로운 효소처리 방법에 의해서만 필요로 하는 intact한 DNA(화살표 1)를 얻을 수 있었다. 이렇게 준비된 DNA는 추후 계속되는 *Leuconostoc* 종간의 유전적 특이성을 확인하거나 분자생물학적 방법인 RAPD-PCR(5)을 통해 유전적 차이를 결정하는데 도움이 될 것이다.

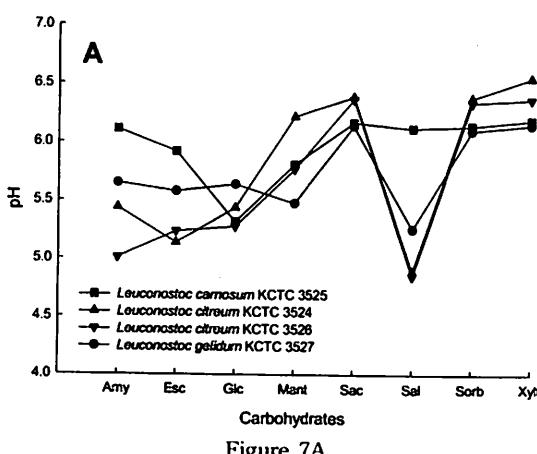


Figure 7A

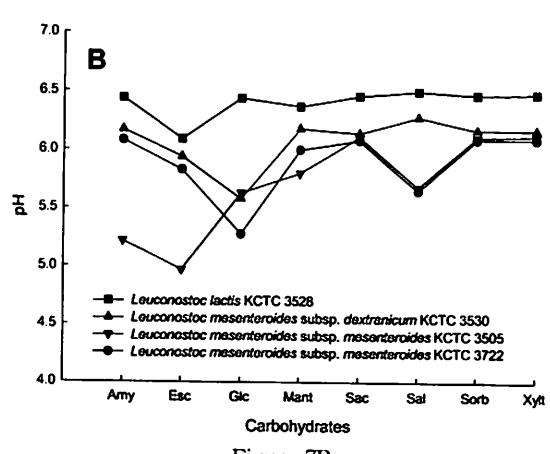


Figure 7B

Fig. 7. Complex carbohydrates fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* species. Abbreviations of the carbohydrates: Amy (amygdalin), Esc (esculin), Glc (gluconic acid), Mant (mannitol), Sac (saccharin), Sal (salicin), Sorb (sorbitol), and Xylt (xylitol).

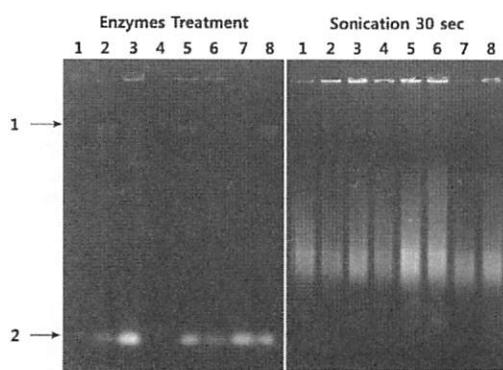


Fig. 8. Comparison of two *Leuconostoc* chromosomal DNA extraction methods. Left: enzymatic method. Right: sonication method. Lane description. *Leuc. carnosum* KCTC 3525(1), *Leuc. citreum* KCTC 3524(2), *Leuc. citreum* KCTC 3526(3), *Leuc. gelidum* KCTC 3527(4), *Leuc. lactis* KCTC 3528(5), *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextranicum* KCTC 3530(6), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(7), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(8).

참고문헌

1. 강국희. 1990. 유산균 식품학. 성균관대학교 출판부. 서울.
2. 권오식. 2007. 김치에서 분리한 *Leuconostoc* 균주의 당 발효능에 대한 연구. *J. Inst. Nat. Sci.* 26: 63-71. (in press)
3. 권오식, 마지현. 2007. 발효된 야채에서 분리한 락토바실러스 균주의 당발효 특성에 대한 연구. *J. Inst. Nat. Sci.* 26: 73-78.
4. 권오식, 이삼빈. 2004. 여러 가지 *Lactobacillus* 균주들의 생리적 및 생화학적 특성 조사(1). *J. Inst. Nat. Sci.* 22: 35-42.
5. 김유진, 윤경표, 권오식. 2005. 유산균 *Lactobacillus plantarum* 아종의 특성에 관한 연구. *J. Inst. Nat. Sci.* 24: 59-65.
6. 백영진, 김종만, 임익규. 1993. 유기산 생산균 이용현황과 전망. *생물산업*. 6:23-25.
7. 정명준. 1997. 유산균의 산업적 응용. *생물산업*. 10: 13-21.
8. 정후길. 2001. 프로바이오틱 유산균의 선발기준 및 산업적 응용. *생물산업*. 14: 39-48.
9. 차성관. 2000. 프로바이오틱 미생물과 유산균 식품. *미생물과 산업*. 26: 13-21.
10. 최신양, 정병문, 김현정, 성승희, 김왕준, 박완수, 2000. 김치 유래 젖산균의 세포외 효소 활성의 측정. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28: 59-61.
11. Choi, I. K., S. H. Jung, B. J. Kim, S. Y. Park, J. Kim, and H. U. Han. 2003. Novel *Leuconostoc citreum* stater culture system for the fermentation of Kimch, a fermented cabbage product. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 84: 247-253.
12. Dellaglio, F., L. M. T. Dicks and S. Torriani. 1991. The genus *Leuconostoc*. In: The genera of lactic acid bacteria (Eds. B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel). Blackie Academic & Professional. London. pp. 235-278.
13. Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 377-381.
14. Holzapfel, W. H. and U. Schillinger. 1992. The Genus *Leuconostoc*. In: The Prokaryotes, Vol. 2 (Eds, A. Balows, H. G. Truper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Scheifele). Springer-Verlag. Germany. pp. 1508-1534.
15. Luchansky, J. B., M. C. Tennant and T. R. Klaenhammer. 1991. Molecular cloning and deoxyribonucleic acid polymorphism in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus grasserii*. *J. Dairy Sci.* 74: 3293-3302.
16. Stackebrandt, E. and M. Teuber. 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 317-324.

Thermochemical pretreatment of hardwoods as one of process components in the production of lignocellulosic bioethanol

Kyung Pyo Yoon*

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

Abstract. The interests of the production of bioethanol from renewable lignocellulosic materials has been growing in recent decades, not to mention the recent news about of oil price reaching 100 dollars. For the successful commercialization of bioethanol, every efforts should be carried out to reduce the production cost of bioethanol. As one of ongoing research efforts, the examination of thermochemical technology for the pretreatment of cheap and readily available hardwoods was attempted. Current research and development activities mainly focus on the conversion of lignocellulosics biomass. This technology is not available on a commercial scale yet. The dramatic breakthrough in the technologies are not subject of this report. Some preliminary results were introduced.

Key Words: thermochemical pretreatment bioethanol

INTRODUCTION

Many efforts are underway to devise biomass conversion technologies for the commercial production of bioethanol as renewable source of energy. Fermentation is the major technology for the production of ethanol worldwide and produced up to 90% of total world ethanol production (1-3). Worldwide, most bioethanol is produced from sugar cane (Brazil), molasses and corn (USA), but other starchy materials such as wheat, barley and rye are also suitable. Crops that contain starch have to be converted to sugars first. In Europe, the main crops for the production of bioethanol are starch crops (such as common wheat) and sugar beet.

Fermentation of sugars to ethanol is a commercially mature technology on a large

scale. The fermentation technology has been around for thousands years, and optimized well. These costs are largely determined by biomass feedstock prices, which can account for 55 - 80% of the final price of ethanol (4). Brazil and USA are producing most of world bioethanol, and the worldwide demands for the bioethanol are greatly increasing. These facts are inevitably increasing the price of corn, sugar cane, and other important crops necessary for human consumption.

Starch-containing grains go through the conversion process such as milling or grinding of the grain so as to release its starch. Then this material is diluted in water and cooked to dissolve all the water-soluble starches. The starch is converted to sugars simultaneously. This can be done by enzymes or acid hydrolysis. In the case of acid hydrolysis, dilute mineral acid is added to the grain slurry prior to cooking. The short carbohydrates resulting from these processing steps can be

* corresponding author
Phone: 82-53-580-5540; Fax: 82-53-580-5540
E-mail: kpy@kmu.ac.kr

fermented by microorganisms such as the yeast. During fermentation, ethanol is produced, which is diluted with water. Through a series of distillation and dehydration steps, the ethanol concentration can be increased. Thus, fermentation process converts sugar to ethanol (5).

Other plant materials can be excellent source of sugars. In practice, the choice of raw material depends on what grows best in the country under the prevailing conditions of climate, as well as on the sugar content and ease availabilities of the various plants. A new and promising technology has the potential to make ethanol fuels much more practical. This method for producing ethanol not from corn kernels, but from the plant's stalk, roots and leaves, is known as cellulosic material. So-called cellulosic ethanol has been around for years, but breaking down the cellulose to make it fermentable was proven to be inefficient, and expensive. recently progress in the technologies and high oil price makes the process more competitive. But, many people still agree that many new improvements in current technologies are necessary to significantly reduce the current production costs.

The conversion process of lignocellulosic biomass to ethanol only differs from the process described above with respect to the break down, or hydrolysis, of the raw material to fermentable sugar. This hydrolysis process is more difficult than the hydrolysis of starch, not to mention the cost needed for the hydrolysis. In this paper some attempts were made to devise low-cost hydrolysis of lignocellulosic biomass, wood chips.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Wood chips

Thin fragments (flake form; average thickness,

0.2mm; average length, 5mm) of wood chips which is by products of sawmill were acquired from neighboring furniture factories. half gram of the wood chips were used for each experiment. Sulfuric acid and other chemicals were first grade chemicals.

Steam Explosion

Two methods were applied to steam explode wood chips. One is that preweighted wood chips were submersed in water and heated in pressured steam cooker. Two minutes after the pressure reached at maximun level, the steam pressure was released suddenly. This sudden drop in pressure caused the wood chips to expand, resulting in the increase of surface area. The other methods was using autoclave which has been used normally for sterilization normally.

Acid Hydrolysis of Wood Chips

Sulfuric acids were diluted to yield from 0.1N to 0.3N by 0.1N increment and 20ml of diluted sulfuric acid were added in 0.5 gram of dried wood chips in 50ml Corning plastic tube. The mixtures were incubated at 20, or 90°C in water bath with shaking at 100rpm. After three days of incubation, the remains of wood chips were filtered and dried for two days at 90°C. The weights of each pretreated samples were examined.

RESULTS AND DISCUSSION

Composition of lignocellulosic biomass

Figure 1 generalize the pretreatment step and components of lignocellulosic biomass. Lignocellulosic biomass contains carbohydrate polymers called cellulose (40-60% of dry weight) and hemicellulose (20-40% of dry weight) that can be converted to sugars.

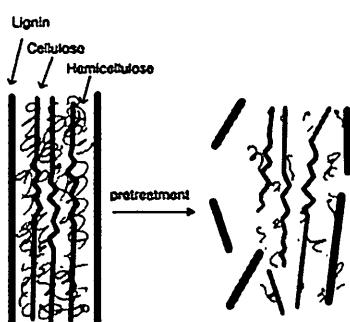


Fig. 1. The pretreatment step and components of lignocellulosic biomass

Cellulose is composed of glucose molecules bonded together in long chains that form a crystalline structure. Hemicellulose consists of a mixture of polymers made up from xylose, mannose, galactose, or arabinose. Both materials are not soluble in water. The remaining fraction, a complex aromatic polymer called lignin (10–25% of dry weight) cannot be fermented because it is resistant to biological degradation. This material can be utilized as a general source of fuel.

Pretreatment of lignocellulosic biomass

Saccharification of lignocellulosic biomass by thermochemical pretreatment in prior to enzymatic hydrolysis still remains illusive. Therefore any cost reduction process could greatly improve the economics of producing bioethanol. Although there has been efforts to develop improved thermochemical pretreatments in more economical way, no dramatic breakthrough have been reported during last several years (6).

The pretreatment step utilize steam and diluted sulfuric acid to expand the lignocellulose pore structure and increase its susceptibility to subsequent enzymatic digestion. Thus, pretreatment step effectively hydrolyze and solubilize the relatively more labile sugars and increase porosity of lignocellulosic biomass, resulting in the improved enzymatic digestibility. Figure 1A shows that when treated with 0.1N sulfuric acids at 20°C only 5% of lignocellulosic part was dissolved after 1 day. The dissolved portion was slightly increased after 3 days. When 0.3N sulfuric acid was used, the remaining

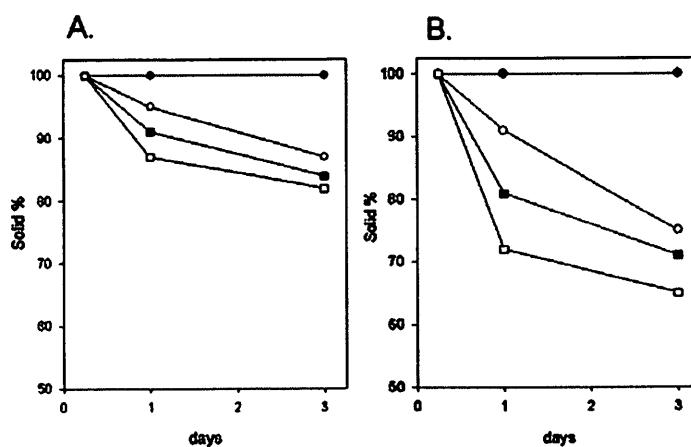


Fig. 2. Estimation of solid material after pretreatments with sulfuric acid. Wood chips were prepared as described in Materials and Methods. After treatments, the remains were filtered and dried and weighted. A: Pretreatment at 20°C; B: Pretreatment at 90°C; Symbols: ○, in the absence of sulfuric acid; ●, in 0.1N sulfuric acid; □, in 0.2N sulfuric acid; ■, in 0.3N sulfuric acid.

solid portion was decreased down to 87% after 1 day and 82% after 3 days. Higher sulfuric acids seemed to increase hydrolysis efficiency. Figure 1B shows that when treated with 0.1N sulfuric acids at 90°C 9% of lignocellulosic part was dissolved after 1 day. The dissolved portion was greatly increased up to 25% after 3 days. When treated with 0.3N sulfuric acids at 90°C, lignocellulosic solid material dissolved relatively fast and after 3 days 65% remained as undissolved. Higher concentration and higher incubation temperature seemed to have an effect of facilitating hydrolysis of lignocellulosic materials.

For complete hydrolysis of the remaining cellulose, saccharification using cellulase was needed of course. But before using cellulase in certain manner, it is important to evaluate the cost-effectiveness of the hydrothermal pretreatment since the pretreatment process, one of the most expensive processes, has a great potential for improvement through research. In other words, just higher concentration of sulfuric acid and higher incubation temperature could not be employed for a commercial purpose due to inevitable expenses necessary for purchasing more sulfuric acid and energy source.

One of the hot topics today in the field of renewable energy is the potential of lignocellulosic bioethanol, i.e. using lignocellulosic rich feedstocks such as trees (7). This means a far greater source of biomass can be used for bioethanol production in more areas of the world than bioethanol from sugar or starch in feedstock crops. Current research and development activities mainly focus on the conversion of lignocellulosic biomass. This technology is not available on a commercial scale yet. Scaling up still proves difficult and commercially unattractive at this moment due to the added processing and more costly

enzymes involved in production. However, it is regarded as far more favorable transport fuels than corn, wheat or sugar beet bioethanol. Therefore, it is absolutely necessary for this research to continue until cost-effective methods are finally devised.

REFERENCES

1. A. Singh and O. Ward, Bioethanol Technology: Developments and Perspectives. *Advances in Applied Microbiology*, 2002. 51: p. 5380.
2. C. Wyman, Alternative fuels from biomass and impact on carbon dioxide accumulation. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 1994. 45/46: p. 897915.
3. J. Goldemburg and et al, Ethanol For A Sustainable Energy Future. *Science*, 2007. 315: p. 808810.
4. J. Hill, et al., Environmental, economic, and energetic costs and benefits of biodiesel and ethanol biofuels. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006. 103(30): p. 1120611210.
5. D. Pimentel and T.W. Patzek, Ethanol Production Using Corn, Switchgrass, and wood: Biodiesel Production Using Soybean and Sunflower. *Natural Resources Research*, 2005. 14(1): p. 6576.
6. A. Demirbas, Progress and recent trends in biofuels. *Progress in Energy and combustion Science*, 2007. 33: p. 118.
7. J.D. Boyd and J. Desmond, BioEnergy Action Plan for California, C.E. Commision, Editor. 2006.

초등학교 주변의 부정불량식품에 관한 조사연구

김종규

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

A Survey on the Misbranded and Adulterated Foods Sold around Elementary Schools

Jong-Gyu Kim

Department of Public Health, College of Natural Sciences, Keimyung University,
Daegu 704-701, Korea

요약. 본 연구는 초등학교 주변에서 판매되는 식품의 유형과 허가여부 등을 조사하여 부정불량 식품의 유통 정도를 알아보고자 수행되었다. 1개 광역시 8개구/군에서 초등학교 48개교를 선정하고 각 학교 인근의 문구점을 대상으로 판매되고 있는 식품류를 조사하였다. 수거된 제품은 총 71종류였으며, 스낵과자류(26종)>사탕류(25종)>젤리류(6종)>껌류(4종)>초콜릿(3종)>기타초콜릿가공품(3종)>캐러멜류(3종)>조미건어포류(1종)의 순으로 나타났다. 그 중 허가된 제품은 43.7%이었으며 원산지 미표시 제품이 16~41%에 달하였다. 이들 식품의 보관 및 진열 환경은 대부분 비위생적이고 실온에 보관된 상태였다. 이로부터 조사대상 중 일부 식품은 부정불량식품임을 추측할 수 있다.

Abstract. This study was performed to inspect misbranding and adulterants in food items commonly consumed by elementary school children. The survey was carried out on 48 stationery stores around elementary schools selected from eight different localities of a city in Korea. A total of 71 types of foods were collected: snacks 26; candies 25; jelly 6; gums 4; chocolate 3; other chocolate products 3; caramel 3; dried and seasoned fish products 1. Only 43.7% of the collected samples had their brand name, and 16~41% did not have their origin. Most of the food items were stored in unsanitary condition. No temperature control for the foods was not found. These results indicate that many of the food samples collected from the stores were found to be misbranded or adulterated. Education and advice are necessary to the school children so that they could detect misbranding and adulterants in commonly sold food items at the stores. There should be monitoring, rigid enforcement of regulations, and punishment for misbranded and adulterated foods.

서 론

좋은 영양상태는 식품을 옳게 충분히 섭취할 때 이루어지는데, 특히 학령기(6세~12세) 아동들은 성장기에 있어 영양소가 풍부하고 안전한 식품을 섭취해야 한다. 그런데 이들 어린이는 아직 인지능력이 충분하지 않으며 자신의 건강과

음식물 섭취에 관한 일반적인 지식이 완전히 정립되지 못하였다. 또한 건강의 중요성도 잘 인식하고 있지 못하므로 식품 선택에 있어 올바른 판단을 내리기가 어려우며, 기호성에 치중하는 경향으로 인하여 건강을 해칠 우려가 크다. 특히 학교주변에서 판매되고 있는 각종 비정상적인 음식물에 그대로 노출되어 있다. 이러한 학교 주

번 문구점 등에서 판매되는 식품의 대부분이 성장에 필요한 영양소는 부족하고 열량이 많은 식품(empty calorie foods)의 일종으로 비만을 비롯하여 각종 영양 불균형의 한 원인으로 지적되고 있다. 또 학령기 아동에 있어서 이와 같은 식품의 섭취는 성인 질환 발생과 유관하다는 것이 이미 여러 연구에서 밝혀졌다.¹⁻³⁾

여기서 영양적으로 불균형적인 식품뿐만 아니라 흔히 법적인 사항을 위반하는 부정식품, 또는 법적 사항과 더불어 일정수준에 미달하는 불량식품이 출현하고 있다. 특히 부정식품은 인체에 유해한 물질 또는 비규격화된 물질을 식품에 혼입하여 판매하는 경우를 말하는데 편의상 위화식품(adulterated food)과 위칭식품(misbranded food)으로 분류한다. 특히 초등학교 부근에서 판매되고 있는 식품류는 부정불량식품인 것이 많다고 추측되고 있다. 최근에는 초등학교 주변 문구점에서 판매되는 식품 중 일부가 위험성을 가진다는 사실이 실제로 밝혀지고 있기도 하다. 사회적으로 불량 식자재 파동 등으로 인하여 전반적으로 식품의 위생안전상태에 관해서 관심이 증가되고 사회적 이슈가 되기는 하였으나, 부정불량식품이나 부정불량식자재 등에 대해서는 실제로 자속적인 조사연구나 현황파악조차 미흡한 편이다. 과거 30여 년 전이나 지금이나 우리의 일상생활에서 쉽게 부정불량식품을 접할 수 있다.⁴⁻⁸⁾ 본 연구는 부정불량식품에 대한 연구의 일환으로, 우선적으로 초등학교 주변 문구점 등에서 판매되고 있는 식품류에 대하여 조사함으로써 부정불량식품의 유통 실태를 파악하고 그 근절과 계몽을 위한 기초 자료를 제공하고자 한다.

연구 방법

1. 조사 대상 및 기간

1개시 광역시 8개 구/군의 초등학교 중에서 각 구/군당 임의로 6개 학교씩 총 48개교를 선정하였다. 각 초등학교 인근의 300m 미만 거리에 있는 문구점을 대상으로 판매되고 있는 식품류를 조사하였다. 특히 초등학생들이 자주 이용하는 식품을 중심으로 가격이 100~500원인 제품을 수집하였다. 시료의 수집은 7월 1일부터 8

월 28일까지 수행하였다.

2. 자료의 정리 및 분석

수집된 시료에 대해 식품 유형, 원산지(제조국), 허가여부 등을 조사 및 분류하였다. 이에 대하여 빈도분석을 수행하였다.

결과 및 고찰

1. 식품 유형

초등학교 주변 문구점에서 수집된 식품은 크게 8종류로 구분되었으며 총 71종이었다. 그中最 많은 것은 스낵과자류(26종)였으며, 다음으로 사탕류 25종, 젤리류 6종, 껌류 4종, 초콜릿 3종, 기타초콜릿가공품(초콜릿 제외) 3종, 캐러멜류 3종, 그리고 조미건어포류 1종이었다(Table 1). 수집된 식품 중에서 스낵과자류(36.6%)와 사탕류(35.2%)가 비교적 높은 비율을 차지하여 어린이들이 많이 선호하는 것으로 보인다.

Table 1. Food types collected from stationery stores around elementary schools

| Food types | Number | Percent |
|----------------------------------|--------|---------|
| Snacks | 26 | 36.6 |
| Candies | 25 | 35.2 |
| Jelly | 6 | 8.5 |
| Gums | 4 | 5.6 |
| Chocolate products (chocolate) | 3 | 4.2 |
| Chocolate products (others) | 3 | 4.2 |
| Caramels | 3 | 4.2 |
| Dried and seasoned fish products | 1 | 1.4 |
| Total | 71 | 100 |

2. 원산지 및 제조국

수집된 식품을 스낵과자류, 사탕류, 초콜릿류(초콜릿, 기타초콜릿가공품), 기타 식품류(껌류, 젤리류, 캐러멜류 및 조미건어포류)로 분류하여 원산지 또는 제조 국가를 알아보았다.

스낵과자류의 제조 국가를 보면 한국산이 46%로 가장 높은 비율을 차지하였으며 그 다음으로는 중국산 19%, 인도네시아산 8%로 나타났

다. 말레이시아와 필리핀산은 각각 4%로 나타났다. 스낵과자류의 원산지 미표시 제품은 19%였다(Figure 1).

사탕류의 제조 국가를 보면 한국산이 44%로 스낵과자류와 비슷하게 높게 나타났다. 다음으로 중국산이 24%로 나타났고, 나머지는 인도네시아산, 남아프리카산, 멕시코산, 파키스탄산 등 네 나

라로 각각 4%의 동일한 비율을 나타내었다. 사탕류의 원산지 미표시 제품은 16%였다(Figure 2).

초콜릿을 비롯한 초콜릿가공품의 제조 국가를 보면 한국산 32%였으며, 중국산, 그리스산, 아르헨티나산이 각각 17%로 동일한 비율을 나타내었다. 초콜릿가공품의 원산지 미표시 제품은 17%였다(Figure 3).

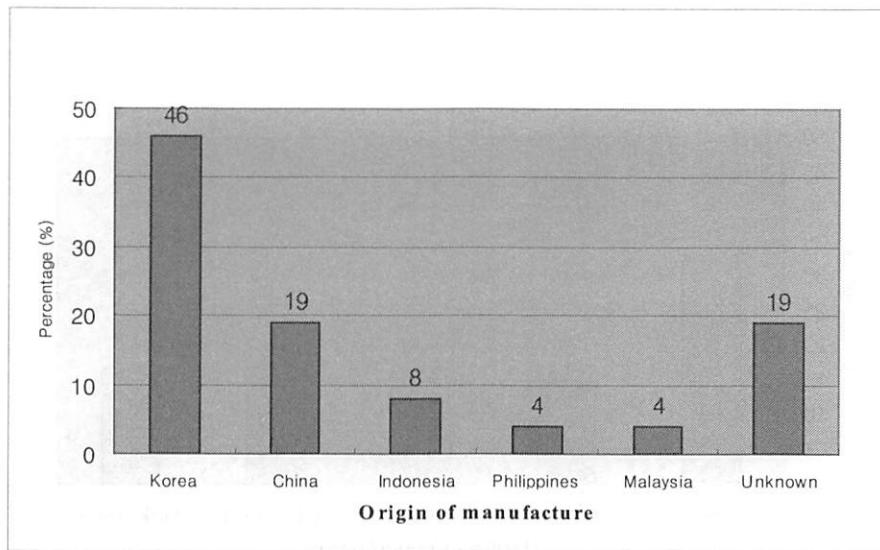


Figure 1. Origin of snacks

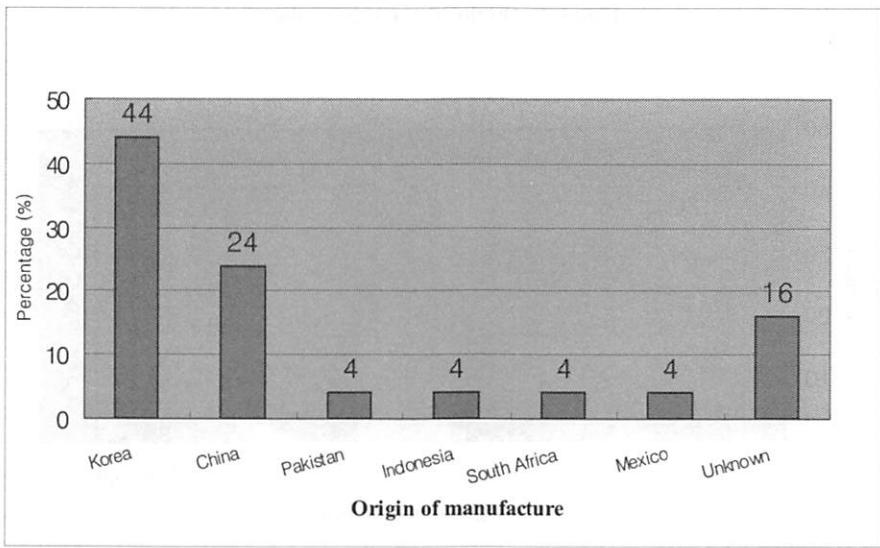


Figure 2. Origin of candies

기타식품류(껌류, 젤리류, 캐러멜류 및 조미간어포류)에서는 한국산 25%, 중국산 17%, 인도네시아산 17%였으며, 원산지 미표시 제품이 41%로 가장 높은 비율을 차지하였다(Figure. 4). 이들은 식품 자체의 크기가 작고 날개로 포장된 것이 많았으며, 그리하여 식품 표시사항이 빠진 것이 많아서 원산지 미표시도 높게 나타난 것으로 보인다.

3. 허가여부

식품 유형별로 허가여부를 조사하였다. 전체적으로는 71개 제품 중 31개 제품만이 허가된 것으로 나타났다. 식품별로는 스낵과자류 제품 26개 중에서 허가를 받은 식품은 13개로 12개는 한국산이었다. 사탕류 제품 25개 중에서 허가를 받은 식품은 9개였다. 초콜릿가공품 6개 중에서 단 1개만이 허가를 받았다. 기타식품류 제품 14

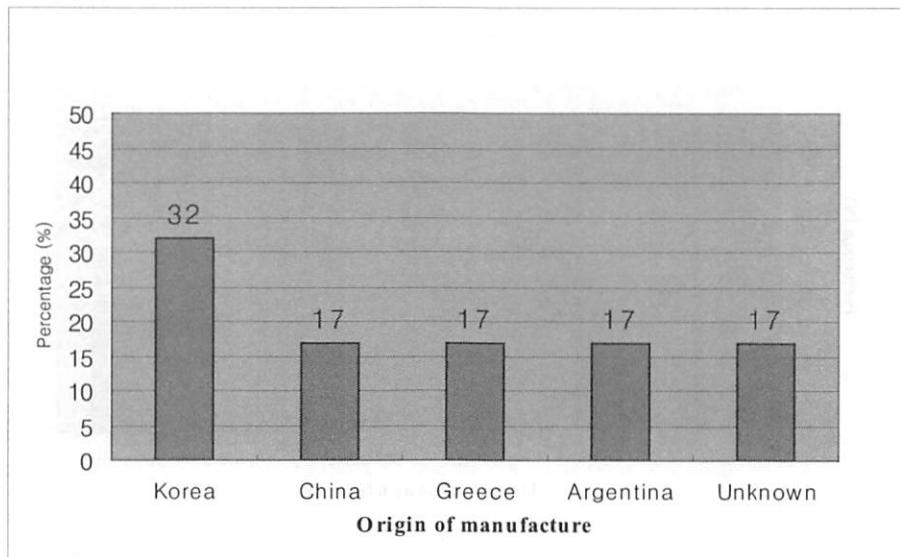


Figure 3. Origin of coconut products

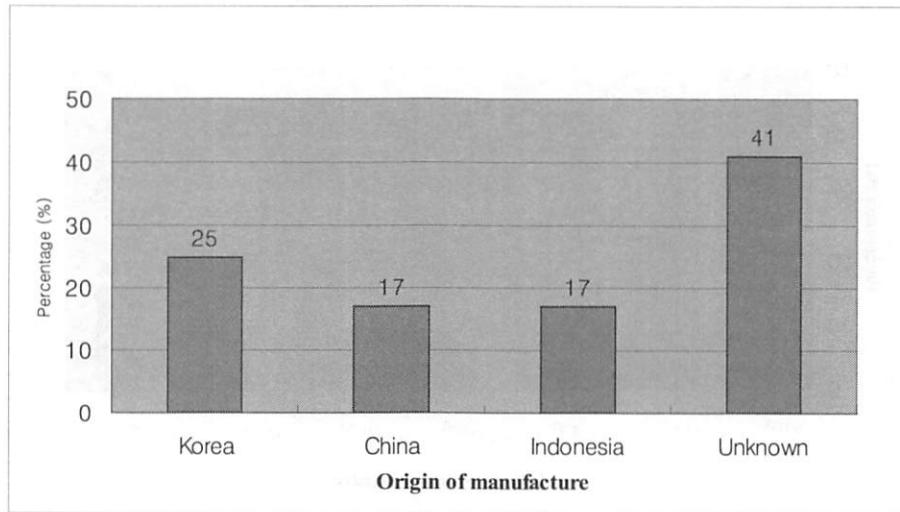


Figure 4. Origin of others

개 중 허가를 받은 것은 8개였다. 한편 허가받은 제품은 대부분 한국산이었고 수입산 제품의 대부분은 허가번호가 표시되지 않은 제품이었다. 그러나 한국산도 허가받지 못한 제품이 있었다.

한편 허가여부를 비율로 보면 전체적으로는 허가제품이 43.7%에 불과하였다. 식품별로 스낵과자류는 50%, 사탕류는 36%, 초콜릿류는 17%, 기타식품류(껌류, 젤리류, 캐러멜류 및 조미건어포류)는 57%가 허가를 받은 것으로 나타났다 (Figure 5). 여기서 기타식품류가 허가 비율이 높은 것은 각각의 수집 품목수가 다른 식품유형에 비해 적었기 때문이라 생각된다.

즉 스낵과자류 50%, 사탕류 64%, 초콜릿류 83%, 기타식품류 43%가 허가 받지 않은 것으로 드러났다. 전체적으로는 허가받지 않은 식품이 56.3%에 달하였다. 허가된 제품이라 할지라도 유효기간 등이 표기된 경우는 드물었다.

이로부터 조사대상 초등학교 주변 문구점에서 판매되는 일부 식품은 부정불량식품일 가능성이 크다고 할 수 있겠다. 부정불량식품의 실태를 조사하여 보고한 연구 자료가 미흡하므로 본 연구의 결과를 비교하기는 어렵다. 그러나 부정불량식품에 대해서는 사회적 관심으로 신문 등의 기사에 비교적 자주 나타난 바 있다. 실제로 '성분,

제조일이 불분명하며 값이 싸다보니 내용물이 영망이고 단속은 사각지대'라는 기사, '초등학교 앞 문구점 등에서 파는 어린이 먹을거리 가운데 상당수가 불량식품인 것으로 드러났다'라는 기사 등이 있다. 특히 본 연구의 조사대상지역에서 '43%가 위법임이 적발되었다'라는 기사도 있었다.^{9, 10)} 이에 비하여 본 조사에서는 약 56%가 허가받지 않은 제품으로 무허가식품이 더 증가되어 있다. 이로부터 수입산 무허가제품이 더 증가하였을 것으로 의심되며, 이에 대한 실태 조사와 감시도 시급하다.

4. 보관 및 진열상태

조사대상 문구점에서 파는 식품의 진열상태는 열악하여 직사광선이 내리쬐는 곳에 그대로 진열되어 있었다. 뿐만 아니라, 언제부터 진열되었는지도 모를 정도로 뿌옇게 먼지가 쌓인 것도 있었다. 도로가에 있는 문구점에서는 날개로 판매되는 식품임에도 불구하고, 개별 포장이 되어 있지 않고 뜯어진 봉지가 든 박스채로 방치해 두어 지나가는 사람이나 차량의 배기가스에 의해 오염될 염려도 있었다.

또 사탕류나 초콜릿류와 같이 녹기 쉬운 제품을 냉장보관 하지 않고 실온에 그대로 두어 포

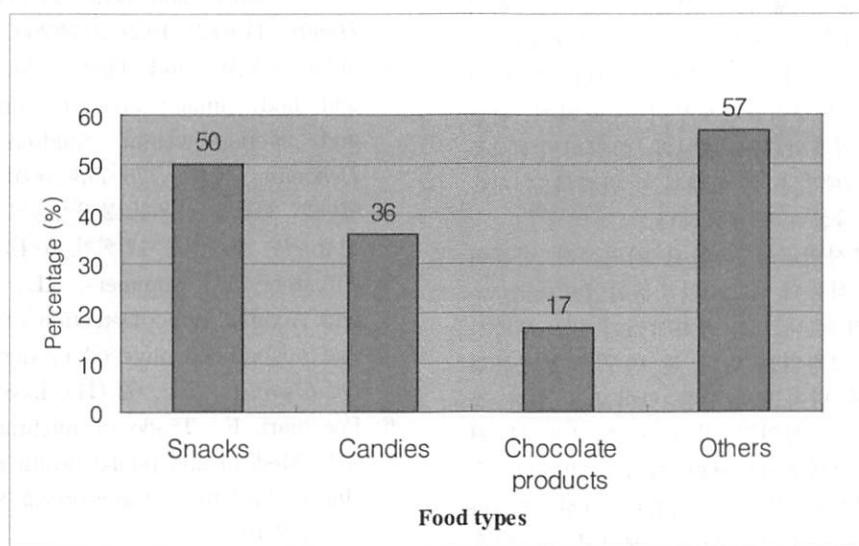


Figure 5. Foods which have their brand name

장 안의 제품이 녹아서 새어나오고 있었으나 그대로 판매되고 있었다. 표시가 유사하고 내용물이 같은 제품인데도 제품명만 살짝 바꾸어서 다른 제품인 것처럼 만든 것도 있었다. 또한 허가된 식품이지만 유통기한이 경과되었음에도 불구하고 판매되는 식품도 있어, 판매자가 식품안전 관리에 대한 기본적 개념이 없음을 여실히 나타내었다.

성인(주부)에 대한 조사에서 대상자 모두 불량식품을 판별하는 능력이 있다고 응답하였으나, 실제로 그들이 구득한 식품 중 1개 제품만이 양호한 식품이었다는 보고가 있다.¹¹⁾ 성인에 비하여 학동들은 부정불량식품에 대한 판단이나 지식이 더욱 미흡하다. 본 연구를 토대로 학교에서 부정불량식품에 대하여 대처하고 식품안전 의식을 강화할 수 있는 교육을 수시 및 정기적으로 실시해야 할 것으로 보인다. 또 학부모를 비롯한 어른들이 어린이 기호식품에 대하여 더 관심을 가지고 지도할 필요가 있다.

식품의약품안전청에서는 식품제조·가공업소, 도시락제조업소, 집단급식소 등에 대하여 부정불량식품 단속 및 적발 등을 시행하고 있고, 또 시·군·구로 연결되는 부정불량식품신고전화(1399)가 운영되면서 무허가(신고)식품 등의 제조·가공·운반 및 소분·판매하는 행위 등에 대하여 행정처분 등을 행하고 있다.¹²⁾ 그렇기는 하지만 부정불량식품의 판매단속을 더 강화하고 처벌의 강도를 높여야 할 것으로 보인다. 특히 어린이들을 부정불량식품으로부터 보호하기 위한 조치는 매우 미흡하다고 보인다. 어린이기호식품 제조업소와 판매업소에 대해서는 면밀하고 지속적인 감시가 절실하게 필요하다.

한편 본 조사연구는 국한된 지역에서 이루어졌고 조사한 식품의 수도 일부분이었으므로, 우리나라 전체의 실태로 일반화시키기에는 부족한 편이다. 비록 그렇기는 하나 본 연구는 부정불량식품이 건강에 미치는 영향을 알아보기 위한 장기간 실험이나 임상연구 전에 꼭 있어야 할 전단계 과정인 실태조사로서의 의미를 갖는다. 이를 토대로 앞으로 부정불량식품에 관한 조사나 연구에 기본적인 틀과 방향이 제시될 수 있을 것으로 본다.

결 론

일부 지역 초등학교(48개 학교) 주변 문구점에서 수집된 총 71개 제품 중 원산지 표시 제품은 59~84%에 그쳤으며, 허가된 제품은 43.7%(31종)에 불과하였다. 또 이들 문구점에서는 대부분 식품의 진열 환경이 비위생적이고 실온에 보관된 상태였으며 냉동·냉장 등의 보관이 소홀하였다. 이 결과를 통해 조사대상 학교주변 문구점에서 판매되는 일부 식품은 부정불량식품일 것으로 생각된다. 초등학생에 대한 식품위생안전 교육이 강화되어야 하며 부정불량식품 판매에 대한 지속적인 감시, 강력한 단속과 처벌 등 법적 제재가 강화되어야 할 것이다.

참고문헌

1. Kobayashi Masako and Kobayashi Maiko: The relationship between obesity and seasonal variation in body weight among elementary school children in Tokyo. *Economics and Human Biology*, 4(2), 253-261 (2006).
2. Sturm R. and Datar A.: Body mass index in elementary school children, metropolitan area foodprices and foodoutlet density. *Public Health*, 119(12), 1059-1068(2005).
3. Jillon S.V.W. and Thelen, M. H.: Eating and body image concerns among obese and average-weight children. *Addictive Behaviors*, 25(5), 775-778(2000).
4. 이미순: 형광을 이용한 불량식품의 감별-식품의 발광 패턴. *한국식품과학회지*, 10(1): 16-26(1978).
5. Firestone, D., Summers, J.L., Reina, R.J., and Adams, W.S.: Detection of adulterated and misbranded olive oil products. *J. Amer. Oil Chemists' Soc.*, 62 (11), 1558-1562(1985).
6. Pocchiari, F.: Trade of misbranded frozen fish: Medical and public health implications. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanita*, 13(4), 767-772(1977).
7. 이준혁: 불량식품 근절위해 민, 기, 관 나서야,

- 한국논단, 1994-12, 234-235(1994).
8. 박경진, 천석조, 박기환, 홍종해, 김정원: 식
증독 경험 및 식품안전에 대한 인식조사. 한
국보건산업진흥원(2003).
9. 서울신문: 부정불량식품관련기사, 2004.4.12
(2004).
10. 문화일보: 부정불량식품관련기사, 2004.4.7
(2004).
11. Beniwal, A. and Khetarpaul, N.: Knowledge
of consumers regarding the nature and extent
of adulteration of Indian foods. *Nutrition
and Health*, 13(3), 153-160(1999).
12. <http://kfda.go.kr>

편집

| | |
|-----|---|
| 김 경 | 찬 |
| 김 군 | 찬 |
| 김 인 | 선 |
| 박 천 | 만 |
| 윤 경 | 표 |
| 이 삼 | 빈 |
| 정 진 | 갑 |

自然科學研究所
自然科學研究論集 第26輯 第2號

2008年 2月 20日 印刷

〈비매품〉

2008年 2月 25日 發行

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 金仁仙

發行處 自然科學研究所

大邱廣域市 遠西區 遠句伐大路 2800番地
電話 (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〉

- Standard Forms of Parabolic Cylinders Kwang Sung Park

Upper Bound on Domination Number of Steinhaus Graphs Daekeun Lim

Synthesis and Application of New C₂-Chiral Ligand, (S)-(-)-Binaphthalene-bis-N,N'-(2,2'-Diphenylphosphinobenzene)-2,2'-Formamide Jae-kook Uhm

Flavone Derivatives as Cyclin-Dependent Kinase Inhibitors Jinho Lee · Jae-kook Uhm

Synthesis and Characterization of Poly(oxybisphenyloxytetramethyldisiloxane)s In Kyung Jung · Young Tae Park

Multiple Induction of Shoot from Leaves of Hot Pepper and Its NaCl Tolerance Kwang Soo Roh

Two Species of the Family Gnaphosidae (Araneae) from Korea Bo Keun Seo

Comparison of the Plastid Inclusion Bodies in *Sedum* Examined by the Transmission Electron Microscopy (TEM) and High Voltage Electron Microscopy (HVEM) InSun Kim

A Study on Carbohydrate Fermentation Characteristics of the *Leuconostoc* Strains Isolated from Kimchi Oh-Sik Kwon

A Study on Metabolic Characteristics of the *Leuconostoc* Species from Human Diet Oh-Sik Kwon · Sun-Ji Kim · Jun-Yup Jin

Thermochemical Pretreatment of Hardwoods as One of Process Components in the Production of Lignocellulosic Bioethanol Kyung Pyo Yoon

A Survey on the Misbranded and Adulterated Foods Sold around Elementary Schools Jong-Gyu Kim

Published by
KEIMYUNG UNIVERSITY
DAEGU, KOREA