

自然科學

研究論集

第 27 輯 · 第 1 號

2008

目 次

<연구논문>

- An Expansion Algorithm and Its Implementation for Sensitivity Analysis in LP Koonchan Kim
- A Note on Roman Domination in Steinhaus Graphs Daekeum Lim
- EHR 시스템에 사용되는 단위의 분류와 국제표준단위계로 변환 정운상 · 김경찬
- 폴리(옥시플루오렌옥시메틸페닐실레인)의 합성과 특성 정은애 · 박영태
- 한국산 갈래꼭지거미속의 2종 (거미목:수리거미과) 서보근
- 발효한약의 특성분석 강동희 · 고희선 · 김현수
- 총각김치에서 분리한 유산균 *Leuconostoc mesenteroides* 1B12 균주에 대한 연구 권오식
- Isolation of Cellulase-Producing Microorganisms as One of Process Components in The Production of Lignocellulosic Bioethanol Kyung Pyo Yoon
- 적하수오의 약리 및 독성학적 특성 남정민 · 이현영 · 김영희 · 김현지 · 김민정 · 김기석
- 피부적용제로서 미백효과가 우수한 코직산의 피부 안전성 평가 연구 김배환
- 전통 동치미에서 분리한 높은 텍스트란 생성능을 가지는 신균주 *Leuconostoc citreum* S5의 분리 및 특성 손민정 · 권오식 · 이삼빈
- 외식업체 이직비용 산출에 대한 사례 연구 최미경
- 두 다른 질량을 가진 Sunset도형의 적분 계산 김정구

ISSN 1738-6152

自然科學

研究論集

第 27 輯 · 第 1 號 2008

啓明大學校 自然科學研究所

목 차

〈연구 논문〉

- An Expansion Algorithm and Its Implementation
for Sensitivity Analysis in LP Koonchan Kim ... (1)
- A Note on Roman Domination in Steinhaus Graphs Daekeum Lim ... (13)
- EHR 시스템에 사용되는 단위의 분류와 국제표준단위계로 변환
..... 정운상 · 김경찬 ... (19)
- 폴리(옥시플루오렌옥시메틸페닐실레인)의 합성과 특성 정은애 · 박영태 ... (29)
- 한국산 갈래꼭지거미속의 2종 (거미목 : 수리거미과) 서보근 ... (39)
- 발효한약의 특성분석 강동희 · 고희선 · 김현수 ... (45)
- 총각김치에서 분리한 유산균 *Leuconostoc mesenteroides*
IB12 균주에 대한 연구 권오식 ... (55)
- Isolation of Cellulase-Producing Microorganisms as One of Process Components
in The Production of Lignocellulosic Bioethanol Kyung Pyo Yoon ... (65)
- 적하수오의 약리 및 독성학적 특성
..... 남정민 · 이현영 · 김영희 · 김현지 · 김민정 · 김기석 ... (71)
- 피부적용제로서 미백효과가 우수한 코직산의 피부 안전성 평가 연구 김배환 ... (79)
- 전통 동치미에서 분리한 높은 텍스트란 생성능을 가지는 신균주
Leuconostoc citreum S5의 분리 및 특성 손민정 · 권오식 · 이삼빈 ... (89)
- 외식업체 이직비용 산출에 대한 사례 연구 최미경 ... (97)
- 두 다른 질량을 가진 Sunset도형의 적분 계산 김정구 ... (105)

CONTENTS

⟨Research Articles⟩

- An Expansion Algorithm and Its Implementation
for Sensitivity Analysis in LP Koonchan Kim ... (1)
- A Note on Roman Domination in Steinhaus Graphs Daekeum Lim ... (13)
- Classification of Units Used in the EHR System
and Conversion to the SI Units Un Sang Jung and Kyung Chan Kim ... (19)
- Synthesis and Characterization of Poly(oxyfluorenoxymethylphenylsilane)
..... Eun Ae Jung and Young Tae Park ... (29)
- Two Species of the Genus *Cladothela* from Korea (Araneae: Gnaphosidae)
..... Bo Keun Seo ... (39)
- Characterization of Fermented Herbal Medicine
..... Dong Hee Kang, Hee Sun Ko and Hyun Soo Kim ... (45)
- A Study on the *Leuconostoc mesenteroides* 1B12 Strain Isolated
from Chonggak-Kimchi Oh-Sik Kwon ... (55)
- Isolation of Cellulase-Producing Microorganisms as One of Process Components
in The Production of Lignocellulosic Bioethanol Kyung Pyo Yoon ... (65)
- Pharmacological and Toxicological Properties of *Polygonum Multiflorum*
..... Jung-Min Nam · Hyun-Young Lee · Young-Hee Kim
· Hyunji Kim · Min-Jung Kim · Kisok Kim ... (71)
- The Skin Safety Evaluation of a Potent Anti-pigmentation Agent,
Kojic Acid, for the Skin Application Bae-Hwan Kim ... (79)
- Isolation and Characterization of a Novel *Leuconostoc citreum* S5
with High Dextran Producing Capacity from Korean Fermented Vegetable
..... Min-Jung Son · Oh-Sik Kwon · Sam-Pin Lee ... (89)
- A Case Study on Calculating Turnover Cost of a Foodservice Organization
..... Mi-Kyung Choi ... (97)
- Calculation of the Sunset Diagram with Two Different Masses
..... Chungku Kim ... (105)

An Expansion Algorithm and Its Implementation for Sensitivity Analysis in LP

Koonchan Kim

Sensitivity analysis in linear programming focuses on the effects of perturbation in the coefficients of the objective function or the right-hand side terms. This paper describes a technique which enlarges the region as large as possible along a direction, where the cost coefficients and right-hand side terms can be altered without necessarily changing the current optimal basis. The formulated algorithm is implemented on a linear programming problem for illustration and viability.

1 Introduction

Consider the following polytope P defined by the following set of inequalities,

$$\begin{array}{lll} a_{11}x_1 + a_{12}x_2 + \cdots + a_{1n}x_n & \leq & b_1 \\ a_{21}x_1 + a_{22}x_2 + \cdots + a_{2n}x_n & \leq & b_2 \\ \vdots & \vdots & \vdots \\ a_{m1}x_1 + a_{m2}x_2 + \cdots + a_{mn}x_n & \leq & b_m \end{array} \quad (1)$$

which can be written in matrix and vector notations as $\mathbf{Ax} \leq \mathbf{b}$. We assume that at least one interior point \mathbf{y}^* exists in P . One intriguing and useful question would be to find a region R with $\mathbf{y}^* \in R$ such that $R \subseteq P$. An approach would consist of finding a starting region S with $\mathbf{y}^* \in S$ contained in P and expanding S using some technique into R such that $S \subseteq R \subseteq P$.

The starting region S can be obtained, for example, using the concept of Tchebycheff norm. For the application of this concept on the development of the tolerance approach can be seen in [4]. An expansion method on S to compute a larger region R and its application on sensitivity analysis is described in [3].

2000 Mathematics Subject Classification: 90C05, 90C31.

Key words and phrases: Sensitivity analysis; Linear programming.

This paper describes a technique which enlarges the starting region S as large as possible along a direction to obtain a so-called ‘maximal’ region T where the cost coefficients and right-hand side terms can be altered without necessarily changing the current optimal basis \mathbf{B} of a given linear programming.

This paper is organized as follows. Section 2 presents preliminaries concerning the formation of a starting region and an expansion technique. Section 3 describes an algorithm for finding a ‘maximal’ region and demonstrates the proposed technique on an example. An application on sensitivity analysis is provided in Section 4 and concluding remarks are given in Section 5.

2 Preliminaries

2.1 Computation of a Starting Region S

Given a polytope defined by $\mathbf{A}\mathbf{x} \leq \mathbf{b}$ (this polytope is called ‘ x -critical region) with an interior point \mathbf{y}° , find a vector α such that $\mathbf{A}(\mathbf{y}^\circ + \alpha) \leq \mathbf{b}$. Note that this can be written as $\mathbf{A}\alpha \leq \mathbf{b} - \mathbf{A}\mathbf{y}^\circ = \tilde{\mathbf{b}}$, i.e.,

$$\sum_{j=1}^n a_{ij}\alpha_j \leq \tilde{b}_i \quad \text{for } i = 1, \dots, m. \quad (2)$$

Above is called an ‘ α -critical region. Let

$$\alpha_* = \max\{\tilde{\alpha} \geq 0 : \sum_{j=1}^n |a_{ij}| \tilde{\alpha} \leq \tilde{b}_i, i = 1, 2, \dots, m\}.$$

Then $\alpha_* \geq 0$ is the largest value such that so long as $-\alpha_* \leq \alpha_j \leq \alpha_*$, the inequalities in (2) are satisfied.

To compute α_* using the concept of the Tchebycheff norm[5], let

$$\gamma_i = \frac{\tilde{b}_i}{\sum_{j=1}^n |a_{ij}|}$$

for $i = 1, \dots, m$, and set

$$\alpha_* = \min\{\gamma_1, \gamma_2, \dots, \gamma_m\}. \quad (3)$$

Putting $\alpha = (\alpha_*, \alpha_*, \dots, \alpha_*)^T$ gives $\mathbf{A}\alpha \leq \tilde{\mathbf{b}}$, and

$$S = \prod_{j=1}^n [y_j^\circ - \alpha_*, y_j^\circ + \alpha_*] \quad (4)$$

will be the starting region contained in P with $\mathbf{y}^\circ \in S$.

2.2 The Expansion Technique

Suppose that an ℓ th inequality in (2) becomes tight(if more than one, choose arbitrarily) in the following sense:

$$|a_{\ell 1}| \alpha_* + |a_{\ell 2}| \alpha_* + \cdots + |a_{\ell n}| \alpha_* = \tilde{b}_\ell. \quad (5)$$

Then a point $\mathbf{z} = (z_1, z_2, \dots, z_n)$ that belongs to the corresponding boundary of the ℓ th inequality in (2) and which becomes a corner point(or a mid-point of a horizontal or vertical line) of S can be found[3] as:

Conjecture 1 *If α_* and S are obtained by (3) and (4), respectively, and ℓ th inequality in (2) becomes tight in the sense of (5), then a point $\mathbf{z} = (z_1, z_2, \dots, z_n)$ belonging to the boundary of the ℓ th inequality of (2) and which becomes a corner point(or a mid-point of a horizontal or vertical line) of S is given by*

$$z_j = \begin{cases} y_j^\circ + \alpha_* & \text{if } a_{\ell j} > 0 \\ y_j^\circ - \alpha_* & \text{if } a_{\ell j} < 0 \\ y_j^\circ \text{ or } y_j^\circ + \alpha_* \text{ or } y_j^\circ - \alpha_* & \text{if } a_{\ell j} = 0, \end{cases}$$

for $j = 1, 2, \dots, n$.

A new point \mathbf{y}^1 in P can be obtained by considering a direction emanating from the point \mathbf{z} and passing through the point \mathbf{y}° as

$$\mathbf{y}^1 = \mathbf{y}^\circ + (\mathbf{y}^\circ - \mathbf{z}) = \mathbf{z} + 2(\mathbf{y}^\circ - \mathbf{z}).$$

To expand the region S (to get hold of a larger region R that contains S), we repeat the procedure given in section 2.1 by starting at \mathbf{y}^1 to find α_*^1 . Upon executing once, it can be observed that one of the two possible cases occur:

$$\begin{aligned} (I) \quad & \alpha_*^1 < 2\alpha_* \\ (II) \quad & \alpha_*^1 = 2\alpha_*. \end{aligned}$$

If (I) occurs, we terminate the expansion process. If (II) results, then the region S can be expanded into a larger region R . In the whole, above process can be continued as long as (II) satisfied. In the $i(i \geq 1)$ th step, the range of R then becomes

$$R = \prod_{j=1}^n [y_j^i - \alpha_*^i, y_j^i + \alpha_*^i].$$

3 A Technique for Finding a Maximal Region

The expanding process given in the previous section does not find a ‘maximal’ region; the process simply terminates when the criterion (I) is satisfied even if there is a room for further expansion. In this section we provide a technique that can extend in a specified direction as far as possible to obtain a so-called maximal region T that contains S . The underlying idea behind this approach is to follow the same approach used in the previous section, but we extend the region S as large as possible by employing very similar to the ‘bisection method’ for solving a nonlinear equation in the field of numerical analysis.

The essence of the new procedure is as follows. After obtaining the starting region S with given κ , the new procedure seeks larger and larger region by consecutively incrementing κ as $\kappa = \kappa + d$, where d is defined as a step length. If no further extension is possible at a certain stage, then we reduce d in half ($d \leftarrow d/2$). At this point, if a further expansion is possible, then let $d \leftarrow d/2$ and set $\kappa = \kappa + d$. If not, then let $d \leftarrow d/2$ and set $\kappa = \kappa - d$. This repetitive process is terminated when d falls below the specified tolerance ϵ . At the end, one would get a maximal region T larger than the region R obtained by [3].

3.1 The Maximal Expansion Algorithm

The maximal expansion algorithm(MEA) is formulated below.

Algorithm MEA

Given a polytope $P(\mathbf{Ax} \leq \mathbf{b})$, an interior point \mathbf{y}° , a tolerance ϵ , a first step κ , and a step length d

STEP 0: Form $\mathbf{A}\alpha \leq \mathbf{b} - \mathbf{Ay}^\circ = \tilde{\mathbf{b}}$

Compute α_* , S , and \mathbf{z}

STEP 1: $T \leftarrow S$

$\mathbf{y}^N = \mathbf{z} + \kappa(\mathbf{y}^\circ - \mathbf{z})$

Form $\mathbf{A}\alpha \leq \mathbf{b} - \mathbf{Ay}^N = \tilde{\mathbf{b}}$

Compute α_*^N

STEP 2: while $\alpha_*^N > \alpha_*$

$\alpha_* \leftarrow \alpha_*^N$

$\kappa \leftarrow \kappa + d$

$\mathbf{y}^N = \mathbf{z} + \kappa(\mathbf{y}^\circ - \mathbf{z})$

Form $\mathbf{A}\alpha \leq \mathbf{b} - \mathbf{Ay}^N = \tilde{\mathbf{b}}$

Compute α_*^N

end

$d \leftarrow d/2$

```

 $\kappa \leftarrow \kappa - d$ 
STEP 3: while  $d > \epsilon$ 
     $\mathbf{y}^N = \mathbf{z} + \kappa(\mathbf{y}^\circ - \mathbf{z})$ 
    Form  $\mathbf{A}\alpha \leq \mathbf{b} - \mathbf{A}\mathbf{y}^N = \tilde{\mathbf{b}}$ 
    Compute  $\alpha_*^N$ 
    if  $\alpha_*^N > \alpha_*$ 
         $d \leftarrow d/2$ 
         $\kappa \leftarrow \kappa + d$ 
         $\alpha_* \leftarrow \alpha_*^N$ 
    else
         $d \leftarrow d/2$ 
         $\kappa \leftarrow \kappa - d$ 
    end
end
end

```

The convergence to a maximal region when MEA is implemented is formulated as a proposition below. The proof can be easily established since its approach is similar to that of bisection method for solving nonlinear equation (expansion or contraction at each step is always based on half of the previous step length).

Conjecture 2 *The algorithm MEA finds a maximal region along the specified direction $\mathbf{z} + \kappa(\mathbf{y}^\circ - \mathbf{z})$.*

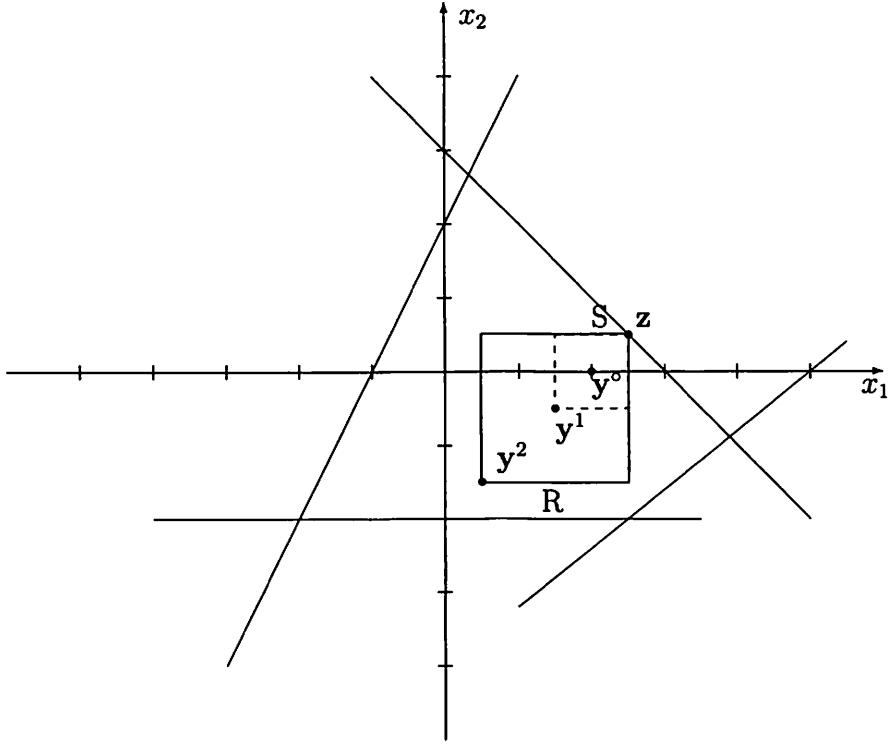
3.2 An Illustration

To illustrate the above algorithm, we consider the same example given in [3]:

$$\begin{aligned}
 \text{Example 1: } -2x_1 + x_2 &\leq 2 \\
 x_1 + x_2 &\leq 3 \\
 4x_1 - 5x_2 &\leq 20 \\
 -x_2 &\leq 2
 \end{aligned}$$

with the same starting point $\mathbf{y}^\circ = (2, 0)$. The expansion technique introduced in [3] gives the result(the starting region S and the expanded region R have been marked) shown in Figure 1.

Figure 1. Region R



Specifically

$$S = [1.5, 2.5] \times [-0.5, 0.5]$$

and

$$R = [0.5, 2.5] \times [-1.5, 0.5].$$

Now, using the algorithm MEA introduced in this paper, we obtain

$$T = [0, 2.5] \times [-2, 0.5].$$

The maximal region is depicted in Figure 2. The coordinate for the last y^N is $(1.25, -0.75)$.

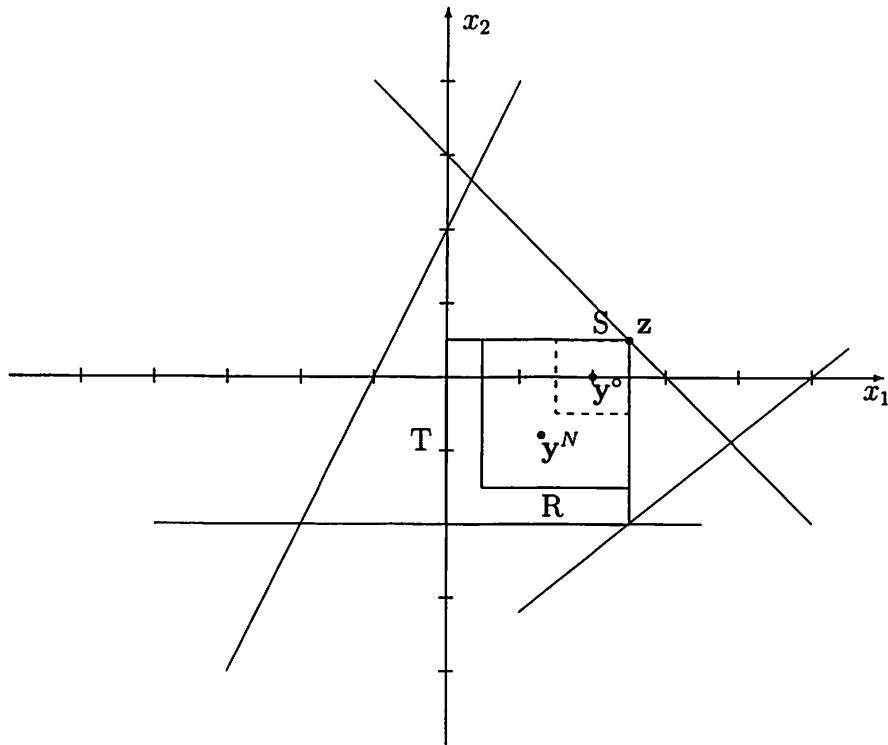
Figure 2. Region T 

Table 1 below shows, in more detail, the calculated \mathbf{y}^N 's at each iteration for the starting point $(0, 1)$ in addition to $(2, 0)$. We set $\epsilon = 0.01$ for the sake of illustration although the algorithm terminates prematurely.

Table 1. Iterative Results

k	\mathbf{y}^N	\mathbf{y}^o
0	$(2, 0)$	$(0, 1)$
1	$(1.50, -0.50)$	$(0.33, 0.67)$
2	$(1.00, -1.00)$	$(0.67, 0.33)$
3	$(1.25, -0.75)$	$(1.00, 0.00)$
4	$(1.13, -0.88)$	$(0.83, 0.17)$
5	$(1.19, -0.81)$	$(0.92, 0.08)$
6	$(1.22, -0.78)$	$(0.88, 0.13)$
7	$(1.23, -0.77)$	$(0.85, 0.15)$
8	$(1.24, -0.76)$	$(0.84, 0.16)$
9	$(1.24, -0.76)$	$(0.84, 0.16)$

Notice that with the starting point $(0, 1)$, the maximal region is given as

$$T = [-0.16, 1.84] \times [-0.84, 1.16].$$

4 Application on the Tolerance Approach

We reconsider the tolerance approach proposed by Wendell[5]. The perturbed problem(on objective function only) of (1) becomes

$$\begin{aligned} & \text{minimize} && \sum_{j=1}^n (c_j + \alpha_j c'_j) x_j \\ & \text{s.t.} && \sum_{j=1}^n a_{ij} x_j = b_i, \quad i = 1, \dots, m \\ & && x_1, \dots, x_n \geq 0. \end{aligned} \tag{6}$$

We denote \mathbf{B} an optimal basis of (1) and IR the index set of the nonbasic variables. Let $\mathbf{y}_j = \mathbf{B}^{-1} \mathbf{a}_j$, as usual. Then, \mathbf{B} remains an optimal basis in (6) if

$$\sum_{i=1}^m (c_{B_i} + \alpha_{B_i} c'_{B_i}) y_{ij} - (c_j + \alpha_j c'_j) \leq 0 \tag{7}$$

for each $j \in IR$, where $c_{B_i}, c'_{B_i}, \alpha_{B_i}$ denote the corresponding basic variable coefficients in the vectors $\mathbf{c}, \mathbf{c}', \alpha$, respectively. The system in (7) is called α -critical region. Note that if $\mathbf{c}' = \mathbf{1}$ (i.e., each $c'_j = 1$), then α becomes an additive parameter and would represent additive variation in the coefficients. A maximum allowable tolerance on the *additive* variation would then be

$$\alpha_*^{add} = \min_{\substack{j \in IR^+}} \frac{c_j - z_j}{\sum_{i=1}^m |y_{ij}| + |\mathbf{1}|}$$

where $IR^+ = \{j \in IR : \sum_{i=1}^m |y_{ij}| + |\mathbf{1}| > 0\}$.

As an illustration, consider the same problem given in [1]:

$$\begin{aligned} & \text{minimize} && -2x_1 + x_2 - x_3 \\ & \text{s.t.} && x_1 + x_2 + x_3 \leq 6 \\ & && -x_1 + 2x_2 \leq 4 \\ & && x_1, x_2, x_3 \geq 0. \end{aligned}$$

For this problem, the optimal simplex tableau is given by

	z	x_1	x_2	x_3	x_4	x_5	RHS
z	1	0	-3	-1	-2	0	-12
x_1	0	1	1	1	1	0	6
x_5	0	0	3	1	1	1	10

The minimum is attained at $\mathbf{x}^* = (6, 0, 0, 0, 10)$. The index set for the basic variable $IB = \{1, 5\}$ and for the nonbasic variable $IR = \{2, 3, 4\}$.

From (7), the α -critical region becomes

$$\begin{array}{lll} \alpha_1 - \alpha_2 & + 3\alpha_5 & \leq 3 \\ \alpha_1 & - \alpha_3 + \alpha_5 & \leq 1 \\ \alpha_1 & - \alpha_4 + \alpha_5 & \leq 2, \end{array} \quad (8)$$

If we consider $\mathbf{c}^o = (-2, 1, -1, 0, 0)$ the original objective function coefficients as an initial interior point, then based on the additive variation a region S that contains \mathbf{c}^o and in which the basis \mathbf{B} is still an optimal is given by

$$S = [-7/3, -5/3] \times [2/3, 4/3] \times [-4/3, -2/3] \times [-1/3, 1/3] \times [-1/3, 1/3].$$

Furthermore, using the expansion technique given in [3], the expanded region R becomes

$$R = [-3, -5/3] \times [0, 4/3] \times [-4/3, 0] \times [-1, 1/3] \times [-1, 1/3].$$

Now, the algorithm MEA with $\epsilon = 0.0001$, a first step $\kappa = 2$, and a step length $d = 1$ gives a maximal region T as

$$T = [-10/3, -5/3] \times [-1/3, 4/3] \times [-4/3, 1/3] \times [-4/3, 1/3] \times [-4/3, 1/3].$$

Note that $S \subset R \subset T$.

The source program(m-file) written in MATLAB adapted to this example of sensitivity analysis is given in Appendix section. The coefficient matrix for the final simplex tableau is denoted by AF and α -critical region given in (8) is designated by A. The variable y_0 corresponds to the initial starting point \mathbf{c}^o .

5 Concluding Remarks

The usual tolerance approach finds a region S in which the objective function coefficients or the right-hand side terms can be changed on a “one-time” basis. The expansion method[3] expands the region a number of times starting from the result(starting region) obtained by the tolerance approach to give a larger region R . The maximum expansion technique introduce in this paper seeks such a region as

large as possible in the sense of ‘maximal’ region T in a given direction. This maximal strategy is particularly advantageous if the initial vectors \mathbf{c}° or \mathbf{b}° are closer to the boundary of the critical region(polytope) and one wants to secure the region as large as possible.

Appendix: M-File for MEA

```

AF = [1 1 1 1 0;0 3 1 1 1];
A = [1 -1 0 0 3;1 0 -1 0 1;1 0 0 -1 1];
y0 = [-2; 1; -1; 0; 0];
z = [0; 0; 0; 0; 0];
IB = [1 5];
IN = [2 3 4];
kappa = 2;
n = length(y0);
d = 1;
eps = 1.0e-4;
bbar = y0(IN)' - y0(IB)'*AF(:,IN);
gamma = bbar./sum(abs(A'));
[alpstar, tight] = min(gamma);
for j = 1:n
    if A(tight,j) >= 0
        z(j) = y0(j)+alpstar;
    end
    if A(tight,j) < 0
        z(j) = y0(j)-alpstar;
    end
end
yN = z + kappa*(y0 - z);
bbar = yN(IN)' - yN(IB)'*AF(:,IN);
gamma = bbar./sum(abs(A'));
[alpstarN, tightN] = min(gamma);
while tightN == tight
    tight = tightN;
    alpstar = alpstarN;
    kappa = kappa + d;
    yN = z + kappa*(y0 - z);
    bbar = yN(IN)' - yN(IB)'*AF(:,IN);
    gamma = bbar./sum(abs(A'));
    [alpstarN, tightN] = min(gamma);
end

```

```

end
d = d/2;
kappa = kappa - d;
while d > eps
    yN = z + kappa*(y0 - z);
    bbar = yN(IN)' - yN(IB)'*AF(:,IN);
    gamma = bbar./sum(abs(A'));
    [alpstarN, tightN] = min(gamma);
    if alpstarN > alpstar & tightN == tight
        d = d/2;
        kappa = kappa + d;
        alpstar = alpstarN;
    else
        d = d/2;
        kappa = kappa - d;
    end
end
fprintf('T = ');
for i = 1:n-1
    fprintf(['%4.2f, %4.2f] X ', yN(i) - alpstar, yN(i) + alpstar);
end
fprintf(['%4.2f, %4.2f]', yN(n) - alpstar, yN(n) + alpstar);

```

References

- [1] Bazaraa, M.S., Jarvis, J.J. and Sherali, H.D., *Linear Programming and Network Flows*, 2nd ed., John Wiley & Sons, (1990).
- [2] Dantzig, G.B., *Linear Programming and Extensions*, Princeton University Press, Princeton, N.J (1963).
- [3] Kim, K., Jo, Y.S. and Kang, Y.Y., "A Geometrical Expansion Technique Approach to Sensitivity Analysis in Linear Programming", *The Korean Operations Research and Management Science Society*, (1996), pp. 35-47.
- [4] Wendell, R.E., "Using Bounds on the Data in Linear Programming: The Tolerance Approach to Sensitivity Analysis", *Mathematical Programming* 29, (1984), pp. 304-322.

- [5] Wendell, R.E., "The Tolerance Approach to Sensitivity Analysis in Linear Programming", *Management Science*, Vol. 31, No. 5, (1985), pp. 564-578.

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

A Note on Roman Domination in Steinhaus Graphs

Daekeun Lim

Abstract

Roman dominating function on a graph $G = (V, E)$ is a function $f : V \rightarrow \{0, 1, 2\}$ satisfying the condition that every vertex u for which $f(u) = 0$ is adjacent to at least one vertex v for which $f(v) = 2$. The weight of a Roman dominating function is the value $f(V) = \sum_{v \in V} f(v)$. The minimum weight of a Roman dominating function on a graph G is called the Roman domination number of G . In this paper, we study properties of this variant of the domination numbers for all nontrivial Steinhaus graphs.

1. Introduction

A set $S \subseteq V(G)$ of a graph G is a *dominating set* if every vertex not in S is adjacent to a vertex in S . The *domination number* of G , denoted by $\gamma(G)$, is the minimum cardinality of a dominating set. A dominating set of G of cardinality $\gamma(G)$ is called a γ -set. We denote that for each vertex v in G , *open neighborhood*, $N(v)$, the set of vertices adjacent to v . The concept of domination in graphs, with variations, is now well studied in graph theory. A *Roman dominating function(RDF)* on a graph $G = (V, E)$ is a function $f : V \rightarrow \{0, 1, 2\}$ satisfying the condition that every vertex u for which $f(u) = 0$ is adjacent to at least one vertex v for which $f(v) = 2$. The weight of a Roman dominating function is the value $f(V) = \sum_{v \in V} f(v)$. The minimum weight of a Roman dominating function on a graph G is called the Roman domination number of G denoted by $\gamma_R(G)$.

Proposition 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:*

1991 AMS Subject Classification: 05C05.

Key words and phrases: Steinhaus graph; domination number; Roman domination; generating string

(a) u is an isolate of S .

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

Proposition 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.

Proposition 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.

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 asked if there were Steinhaus triangles containing the same number of zeros and ones and Harborth [3] 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.

In this paper, $\lfloor x \rfloor$ is the floor of x and $\lceil x \rceil$ is the ceiling of x .

2. Small Roman domination numbers in Steinhaus graphs

In this section, we will give a characterization of Steinhaus graphs with small Roman domination numbers. For this purpose, we introduce some notation and a few propositions from [1].

For a graph $G = (V, E)$, let $f : V \rightarrow \{0, 1, 2\}$, and let (V_0, V_1, V_2) be the ordered partition of V induced by f , where $V_i = \{v \in V | f(v) = i\}$ for $i = 0, 1, 2$. Note that there exists a 1 – 1 correspondence between the functions $f : V \rightarrow \{0, 1, 2\}$ and the ordered partitions (V_0, V_1, V_2) of V . Thus we can write $f = (V_0, V_1, V_2)$.

Therefore, a RDF on graph G can be defined as a function $f = (V_0, V_1, V_2)$ satisfying the condition that $V_2 \succ V_0$, where \succ means that the set V_2 dominates the set V_0 , i.e. $V_0 \subseteq N[V_2]$. The weight of a RDF f is $f(V) = \sum_{v \in V} f(v) = 2|V_2| + |V_1|$. We say that a function $f = (V_0, V_1, V_2)$ is a γ_R -function if it is an RDF and $f(V) = \gamma_R(G)$.

Proposition 2. 1 *For any graphs G , $\gamma(G) \leq \gamma_R(G) \leq 2\gamma(G)$.*

Proposition 2. 2 *Let $f = (V_0, V_1, V_2)$ be any γ_R -function for G . Then*

- (1) $G[V_1]$ has maximum degree 1.
- (2) No edge of G joins V_1 and V_2 .
- (3) V_2 is a γ -set of $G[V_0 \cup V_2]$.

Proposition 2. 3 *If G is a connected graph of order n , then $\gamma_R(G) = \gamma(G) + k$ if and only if there is a vertex $v \in V$ of degree $n - \gamma(G)$.*

Proposition 2. 4 *If G is a connected graph of order n , then $\gamma_R(G) = \gamma(G) + k$ if and only if:*

- (1) G does not have a vertex $v \in V$ of degree $n - \gamma(G)$.
- (2) either G has a vertex of degree $n - \gamma(G) - 1$ or G has two vertices v and w such that $|N[v] \cup N[w]| = n - \gamma(G) + 2$.

An obvious upper bound on the domination number is the number of vertices in the graph. Since at least one vertex is needed to dominate a graph, we have $1 \leq \gamma(G) \leq n$ for every graph of order n . A graph obtains $\gamma(G) = 1$ if and only if $\Delta(G) = n - 1$, and it achieves the upper bound if and only if the graph is $G = \bar{K}_n$, G is the set of isolated vertices. Note that each isolated vertex must be in every dominating set. We want to show that the number of Steinhaus graphs with $\gamma(G) = 1$ is exactly n .

Theorem 2. 5 *The number of Steinhaus graphs with $\gamma(G) = 1$ is n .*

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

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

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

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

Note that $\gamma_R(G) \geq 2$ if $n \geq 3$. From Theorem 2.5, we get to the following Theorem.

Theorem 2. 6 *The number of Steinhaus graphs with $\gamma_R(G) = 2$ is n if $n \geq 3$.*

Proof. Let $f = (V_0, V_1, V_2)$ be any γ_R -function for G . Since $\gamma_R(G) = 2$, either $|V_1| = 2, |V_2| = 0$ or $|V_1| = 0, |V_2| = 1$. Suppose that $|V_1| = 2, |V_2| = 0$. Then $|V_0| = 0$, so $G = \bar{K}_2$. Therefore, it is impossible. Suppose that $|V_1| = 0, |V_2| = 1$. So, V_2 is a γ -set. Therefore, $\gamma(G) = 1$. By Theorem 2.5, The number of Steinhaus graphs with $\gamma_R(G) = 2$ is n if $n \geq 3$. \square

Theorem 2. 7 *Let G be a Steinhaus graph with $n \geq 3$. Then $\gamma_R(G) = 3$ if and only if G either G is \bar{K}_3 or $\Delta(G) = n - 2$.*

Proof. Let $f = (V_0, V_1, V_2)$ be any γ_R -function for G . Since $\gamma_R(G) = 3$, either $|V_1| = 3, |V_2| = 0$ or $|V_1| = 1, |V_2| = 1$. Suppose that $|V_1| = 3, |V_2| = 0$. Then $|V_0| = 0$, so $G = \bar{K}_3$. Suppose that $|V_1| = 1, |V_2| = 1$. So, V_2 is a γ -set of the induced subgraph $G[V_0 \cup V_2]$. Say, $V_2 = \{v\}$. Note that since $|V_0| = n - 2$, the degree of v is at least $n - 2$. Since any vertex in V_1 is not adjacent to v , $\Delta(G) = n - 2$. Conversely, it is enough to assume that $\Delta(G) = n - 2$. Say the degree of v is $n - 2$. Denote that V_0 is the set of all vertices which are adjacent to v , V_1 is the vertex which is not adjacent to v and $V_2 = \{v\}$. Then $f = (V_0, V_1, V_2)$ is an RDF and $f(V) = \gamma_R(G) = 3$. \square

3. Roman Steinhaus graphs

From Theorem 2.1 we know that for any graph G , $\gamma_R(G) \leq 2\gamma(G)$. We will say that a graph G is a *Roman graph* if $\gamma_R(G) = 2\gamma(G)$. In this section, we seek to find some Roman Steinhaus graphs.

Proposition 3. 1 $\gamma(P_n) = \lceil \frac{2n}{3} \rceil$. Therefore, P_n is a Roman graph if $n = 3k, 3k + 2$.

Proposition 3. 2 For $n \geq 3$, $\Delta(G) = n - 1$ if and only if $\gamma(G) = 1$ and $\gamma_R(G) = 2$. Therefore, all any graph G of order n having a vertex of degree $n - 1$ is a Roman graph.

Note that all graphs in Propositions 3. 1 and 3. 2 are Steinhaus graphs. Before we seek to find another Roman Steinhaus graphs, we need the following notation and Proposition. For arbitrary graphs G and H , we define the *Cartesian product* of G and H to be the graph $G \square H$ with the vertices $\{(u, v) | u \in G, v \in H\}$. Two vertices (u_1, v_1) and (u_2, v_2) are adjacent if and only if one of the following is true: $u_1 = u_2$ and v_1 is adjacent to v_2 in H or $v_1 = v_2$ and u_1 is adjacent to u_2 in G . If $G = P_m$ and $H = P_n$ then the Cartesian product $G \square H$ is called $m \times n$ grid graph and is denoted by $G_{m,n}$.

Proposition 3. 3 *For the $2 \times n$ grid graph $G_{2,n}$, $\gamma_R(G_{2,n}) = n + 1$.*

The Steinhaus graph with $2n$ vertices generated by the string $01100\cdots$ are $2 \times n$ grid graph $G_{2,n}$ where $n \geq 2$. Also, the induced subgraph deleted by vertex 1 of Steinhaus graph with $2n + 1$ vertices generated by the string $00100\cdots$ are $2 \times n$ grid graph $G'_{2,n}$ and is denoted by $G'_{2,n}$. Among those Steinhaus graphs, we find Roman graphs. Note that $\gamma(C_n) = \lceil \frac{2n}{3} \rceil$.

Theorem 3. 4 *For the $2 \times n$ grid graph $G_{2,n}$, $G_{2,n}$ is a Roman graph if and only if n is odd.*

Proof. Suppose that the $2 \times n$ grid graph $G_{2,n}$ is a Roman graph. Since $\gamma_R(G_{2,n}) = n + 1$, $n + 1$ is even. So, n is odd. Conversely, assume that n is odd. Then since $\gamma(G_{2,n})$ is $\lceil \frac{n+1}{2} \rceil$, $n + 1 = 2 \times \lceil \frac{n+1}{2} \rceil$. So, $G_{2,n}$ is a Roman graph. \square

Theorem 3. 5 $G'_{2,n}$ is a Roman graph if and only if n is odd.

Proof. Note that $G'_{2,n} - \{1\}$ is $G_{2,n}$. \square

References

- [1] E.J. Cockayne, P.M. Dreyer Jr. and S.M. Hedetniemi, *On Roman domination in graphs*, Discrete Math. 278(2004), pp.11-22.
- [2] W. M. Dymacek and T. Whaley, *Generating strings for bipartite Steinhaus graphs*, Discrete Mathematics, 141 (1995), no 1-3, 95-107.
- [3] H. Harborth, *Solution of Steinhaus's problem with plus and minus signs*, J. Combinatorial Theory 12 (A) (1972), 253-259.
- [4] T.W. Haynes, S.T. Hedetniemi, and P.J. Slater, *Fundamentals of Domination in Graphs*, Marcel Dekker, New York(1998).
- [5] C.S. ReVelle and K.E. Rosing, *Defends imperium romanum:a classical problems in military Strategy*, Amer. Math. Monthly 107(2000)(7) pp.585-594.
- [6] I. Stewart, *Defend the Roman Empire!*, Sci. Amer. 281 (1999) (6) pp.136-139.

- [7] H. Xing, X. Chen, and X.G. Chen, *A note on Roman domination in graphs*, Discrete Math. 306(2006), pp.3338-3340.

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

EHR 시스템에 사용되는 단위의 분류와 국제표준단위계로 변환

정운상 · 김경찬*

계명대학교 자연과학대학 디지털물리학과

Classification of Units Used in the EHR System and Conversion to the SI Units

Un Sang Jung and Kyung Chan Kim*

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

요약. HR 시스템에서 표준화와 통합이 부족하기 때문에 환자에 대한 의료 데이터를 상호 교환하는 것이 쉽지 않다. 특히 EHR 시스템에 사용되는 단위에서 이런 현상이 더욱 심하다. 본 논문에서는 EHR 시스템에서 사용되는 검사 정보를 SI 단위를 기준으로 하여 서로 다른 EHR 시스템 사이에 공유할 수 있도록 하는 단위 변환 알고리즘을 작성하였다. 작성된 알고리즘을 이용하여 각 변환 과정을 확인하였다. 또한 알고리즘을 사용하여 단위 변환이 이루어지므로 모든 프로그래밍 언어에서 사용 가능하다.

Abstract. Because there is no standardization and integration to Electronic Health Record (EHR) system, it is difficult that exchange the medical treatment data about a patient between hospitals. Specially, these phenomena become more serious in case of units those are used for the EHR system. In this paper, We designed and made algorithms of conversion of the units in the EHR system to the SI units, which enables to share examination information between EHR systems. Each conversion processes of units in the EHR system have been verified using the SI conversion algorithms. And these algorithms of the unit conversion can be also implemented to all kinds of programming languages.

I. 서 론

의료정보 시스템은 전자의무기록(electronic medical record, EMR)을 필수적인 요소로 하고 있으며, 그 적용 범위에 따라 최근에는 전자건강기록(electronic health record, EHR)이라는 이름으로 통용되고 있다.^{[1][2]} 의료정보 시스템에서 EMR 시스템이 EHR 시스템으로 그 적용 범위가 확장되어 가면서 병원간의 정보 공유의 중요성이 대두되고 있다. EHR 시스템 사이의 정보 공유에서 중요한 것은 각기 분산

관리되고 있는 EHR 시스템 내의 의료 정보를 서로 다른 용용 프로그램들이 공유할 수 있게 하는 것이다.

의무 기록의 작성에는 전문적인 의학 용어 및 일상생활에서 사용되는 모든 용어가 필요하다. 하지만 전문 분야 혹은 개개인에 따라서 사용하는 용어의 의미가 다를 수 있기 때문에 서로 의사소통이 가능하기 위해서는 용어의 의미에 대한 표준화가 필요하다. 특히 이기종 간에 표준화된 용어 및 자료 교환의 표준이 절대적으로 필요하다. 그러나 의료기관마다

각종 검사 수치 등의 단위가 상이하여 상호간의 공유 과정에서 서로 다른 단위 사이에 환산이 필요하므로 의료 데이터 표준화에 걸림돌이 되고 있는 실정이다.

단위 사용의 혼용으로 인한 문제는 1986년 철린저호 폭발사고나 1999년 화성 탐사선 폭발사고만 봐도 그 중요성을 알 수 있다.^[3] 따라서 본 연구에서는 국내 의료기관에서 사용되고 있는 의무기록 데이터의 단위들 중 각종 검사에 사용되는 단위를 국제단위계의 분류 기준에 따라 분류하고, 상이한 단위를 서로 변환할 수 있도록 환산 기준을 작성하여, 각 의료기관 혹은 의료 종사자와 환자가 사용하는 각기 다른 의학 용어 및 검사 수치 등에서 단위를 SI 국제단위를 중심으로 상호변환이 가능하게 한다.

II. 이론적 배경

1. 국제단위계(The International System of Units)

각 의료기관에서 사용하는 검사 정보를 공유하는 과정에서 검사 정보 단위에 관해 국제 단위를 중심으로 하는 변환 과정을 거치도록 하였다. 따라서 국제단위계인 SI 단위에 대한 이해가 필요하다.

과학과 기술은 측정과 비교에 바탕을 두고 있다. 따라서 관측 대상을 측정하고 비교할 수 있는 규칙이 필요하다. 서로 다른 물리량은 매우 많지만 이들이 모두 독립적인 것은 아니다. 그러므로 기본이 되는 몇 개의 물리량에 대해 국제 협약에 따라 정의하고, 기본 물리량으로 다른 물리량들을 정의하면 된다.^[4] 1948년 국제 도량형 총회는 국제 도량형 위원회에 미터 협약에 가입한 모든 나라가 채택하기에 적합한 실용 측정 단위계를 확립하기 위한 권고 사항들을 마련할 것을 지시하였다. 우리나라에

서는 1999년에 국가 표준 기본법을 제정하여 측정 단위를 SI 단위인 기본 단위, 유도 단위 및 접두어로 구분하여 정의하고 SI 단위만을 사용하도록 규정하였으며,^[5] 계량에 관한 법률에서 모든 계량 단위를 기본, 유도, 보조, 및 특수 단위로 구분하여 정의하고 법정 계량 단위로 규정하였다.^[6]

2. EHR 시스템(Electronic Health Record System)

의료정보시스템(HIS)은 원무 관리, 일반 관리, 처방 전달(OCS), 검사 및 진료 지원 관리, 경영 정보 관리, 영상저장전달(PACS), EMR 등 병원 관리 전반에 걸친 의료정보시스템을 총칭하는 것이다. 그 중 EMR은 단순하게 의무기록의 전자화라는 정의에서 개인의 생애에 걸친 건강 상태와 의학적 문제가 전자화된 형태로 유지되는 정보의 총체라는 EHR 개념까지 정의될 수 있다.

EMR 시스템의 도입으로 인한 몇 가지 이점을 살펴보면 컴퓨터가 있는 곳이면 의사와 간호사가 언제 어디서든 환자의 기록을 보고 기록할 수 있어 접근성이 좋다. 따라서 의무 기록을 찾는 시간을 단축시키고 여러 사용자가 동시에 조회하고 입력할 수 있는 장점이 있다. 또한 기록의 정확성을 제공한다. 글씨체를 판독하지 못해 생기는 의사소통의 오류가 사라지고 환자 기록을 전산망을 통해 공유함으로써 의사소통의 효율성을 증진시킬 수 있다.^[7]

EMR이 EHR로 그 적용 범위가 확장되면서 2003년에 Institute of Medicine(IOM)에서는 다음과 같은 EHR의 구체적인 가이드라인을 제시하기도 하였다.

첫째, 전자화된 개인의 평생 건강 정보 또는 진료 정보이어야 한다.

둘째, 허가된 사용자는 개인이나 집단에 대한 정보에 바로 접근 가능 하여야 한다.

셋째, 환자 진료의 효율성, 안전성 및 질을 향상시킬 수 있는 지식과 의사 결정 지원을 제공하여야 한다.

이는 모두 환자에 대한 최적의 건강과 질병에 대한 효율적 치료와 관리를 보장하고자 하는 목표에서 나왔다. 이런 이상을 실현하기 위해 환자의 건강 기록은 환자의 상태에 대한 기록만이 아닌 개인의 식생활 습관까지 포함하는 건강과 상관없이 보이는 기록까지 포함하고자 할 것이고 이로 인해 이기종간의 정보 공유 및 상호 운용을 확대하는 것이 필요하다.

3. 의료기관에서 사용하는 단위의 추출

의료기관의 EHR 시스템에서 사용되는 단위들은 주로 검사와 약물 관련 테이블에서 볼 수 있었으며 본 연구에서는 의료기관의 검사 정보에서 사용되는 단위들을 변환하는 것을 목표로 하여 검사 정보 테이블에서 사용되고 있는 단위를 추출하였다.

추출 방법은 본 연구의 데이터로 사용된 경

북 소재 800 병상급 K병원의 임상병리 검사 정보에서 불필요하거나 개인 정보를 제외한 코드의 일부, 검사명, 검사 그룹, 검체 번호, 검체 이름, 단위, 검사 결과, 참고치의 최대, 참고치의 최소, 의뢰 검사 정보로 이루어진 데이터 약 270만 건을 추출하였다.

표 1은 SQL(structured query language)에서 원하는 데이터를 검색하는 SELECT 명령에 적절한 함수 및 연산자를 이용하여 추출한 단위의 종류이다. 추출된 데이터에서 SI 접두어인 마이크로는 u로 저장되어 있었다. 이는 데이터베이스에 저장된 데이터를 검색하는 과정 등에서 특수문자의 처리가 어려우므로 소문자 u로 대체하여 사용하는 것을 알 수 있었다.

표 1의 여러 단위들은 대부분이 접두어의 변환만으로 정보의 공유나 활용이 가능한 것으로 보였다. 하지만 각 검사실의 검사 장비 및 검사 방법의 표준화가 되어 있지 않아 의료기관의 검사 정보에서 사용되는 단위들은 동일한 검사인 경우에도 사용하는 검사 장비나 검사 방법에 따라 서로 다른 단위들로 결과들이

표 1. SQL 명령을 사용하여 추출한 단위의 종류.

UNIT	UNIT	UNIT	UNIT	UNIT	UNIT
%	U/mL	mEq/day	mmol/L	sec	umol/L
*100 ³ /uL	U/ml	mIU/mL	mm ³	uIU/mL	× 1000 ⁴ /uL
/ml	cc	mOsm/kg	ng/dL	ug/L	× 10 ³ /uL
GPL unit	fL	mU/mL	ng/mL	ug/dL	형
HPF	fL	mg/L	ng/mL/hr	ug/day	
INR	g/dL	mg/dL	ng/ml	ug/dl	
IU/L	g/day	mg/day	nmol/L	ug/mL	
IU/mL	g/dL	mg/dL	pg	ug/min	
Index	gm/dL	min	pg/mL	ug/ml	
S/N	index	mm/hr	pg/ml	ul	
U/L	mEq/L	mmHg	pint	umoL/L	

*SQL 명령: SELECT distinct unit FROM LABINFO

*HPF: High Power Field

*INR: Internatinal Normalized Ratio

나오게 된다. 이로 인해 각 의료기관들은 mol과 g의 혼용이나 U와 IU의 혼용 및 접두어가 서로 다르게 쓰이는 등 동일한 단위가 서로 다르게 표현된다. 따라서 검사 정보의 공유와 활용을 위해 접두어의 변환만으로는 검사 정보의 공유와 활용에서의 단위변환이 어려움을 알 수 있었다.

4. 의료기관에서 사용하는 단위와 SI 단위의 비교

검사에 사용된 의료기관의 전체 검사 종류는 476종이었으며, 그 중 단위가 존재하는 검사가 230종이었고 검사 종류에 상관없이 단위만을 중복 없이 검색한 결과 59종의 단위를 사용하고 있었다. 추출된 단위에는 단위 변환이 필요하지 않는 단위, 변환이 필요한 단위 그리고 값에 대한 십진 배수의 표현이 포함되어 있는 단위 등이 존재하였다. 의료기관별로 다르게 사용하는 경우가 있을 수 있으나 단위 변환이 필요하지 않는 단위는 대상 의료기관에서 이미 SI 단위로 사용하고 있어 검사 정보의 전송 과정에는 변환을 하지 않아도 되는 단위들과 SI 단위에 정의된 기본 단위나 유도 단위로 표현되지 못하는 단위들이 있었다. 십진 배수의 표현이 포함되어 있는 단위는 값에 대한 십진 배수의 표현이 사용 단위에 저장되어 있는 경우로 각 의료기관의 정보 공유나 활용에 또 다시 저장된 단위들을 단위와 십진 배수를 분리해 내는 과정이 필요하게 된다.

변환이 필요하지 않는 단위로 이미 SI 단위로 사용되고 있는 단위는 물질량의 단위인 mol, 국제 효소의 단위인 U 등이 있으며 SI 단위에 정의된 기본 단위나 유도 단위로 표현되지 못하는 단위는 뇌화학 검사 중에서 RBC(red blood cell) count나 WBC(white blood cell) count처럼 현미경을 통해서 본 격자내의 적혈구나 백혈구의 개수를 알아보는 것으로 사용

되고 있는 단위가 검사 조건을 나타내는 HPF (high power field)로 쓰여지고 있었다.

U나 IU는 효소, 호르몬, 단백질 등의 활성 물질의 활성을 국제적으로 통일해 지칭할 때 사용하는 단위로 대부분의 효소에서 실제 농도를 알 수 없을 때 효소의 양을 그 활성으로 표시하는 것이다. 이는 특정조건 하에서 1분간 1마이크로 몰의 기질을 생성물로 바꾸는 활성을 말한다. 또한 1999년에 채택된 SI 유도 단위의 측매 활성도 캐탈(kat)로도 표현된다.

본 연구에서 추출된 476종의 검사 항목 중 단위가 존재하는 230종을 항목별로 분류한 결과 단위 변환이 필요한 항목이 150종, 변환이 필요하지 않은 항목이 62종, 검사 정보가 명확하지 않아 제외된 항목이 18종이었다.

표 2는 의료기관에서 사용되는 관용 단위 81종을 변환 인자 및 SI 단위와 비교하여 보여준다. 단, 분자량과 관련한 단위는 SI 단위로 변환하였을 때 구성 물질에 따라 변환 기준이 각각 다르므로, 표 2에 있는 변환 인자는 특정한 물질에 대한 변환 인자이며, 특정 시약 또는 물질은 모두 나타내지 않았다.

III. 단위 변환 알고리즘 설계

단위 변환을 위해서는 각각의 단위에 대해 분리를 하고 국제 단위계로의 변환 알고리즘을 사용하여야 한다. 그러나 보다 빠르고 효율적인 SI 변환 프로그램 구현을 위해 본 연구는 세 가지 변환 알고리즘을 이용하였다. 첫째, Institute for Algorithmic Medicine에서 진행하고 있는 The Medical Algorithms Project의 Ch. 40의 데이터와 각종 문헌자료를 바탕으로 의료 기관의 검사 항목과 Table Mapping하여 변환한다. 둘째, 변환 인자를 이용하는 단위 변환 알고리즘을 사용하여 변환 한다. 셋째, 알려진 물질량 변환 알고리즘을

표 2. 의료 기관에서 사용되는 관용 단위와 SI 단위로의 매칭.

Conventional Units	Factor for Conversion	SI Units	Conventional Units	Factor for Conversion	SI Units
%	0.01	mol/mol	cubic microns	1	fL
/ L	106	/L	days	1	d
g/mg creatinine	669	mol/mol creatinine	ea	-	-
g N/dL	0.714	mol N/L	fl	1	fL
g NH3/dL	0.5872	mol NH3/L	fmol/mg protein	1	nmol/kg protein
g/24h	2.76	nmol/d	g/24h	8.84	mmol/d
g/d	4.42	mol/d	g/5h	6.66	mmol/5h
g/dL	10	g/L	g/day	1	g/d
g/g feces	1.5	nmol/g feces	g/dL	10	g/L
g/mg creatinine	1.1362	nmol/mmol creatinine	g/dL	0.155	mmol/L
g/L	3.04	nmol/L	hrs	1	h
g/mg creatinine	738	mol/mol creatinine	King Armstrong units/dL	7.1	U/L
g/mL	2.6	mol/L	l	1	L
g/mL	0.0125	mmol/L	MBq	27	Ci
IU/mL	6.945	pmol/L	mEq/24h	1	mmol/d
Babson units per L at 37°C	1	U/L at 37°C	mEq/h	1	mmol/h
Bessey-Lowry-Brock units per L at 37°C	16.67	U/L at 37°C(nkat/L)	mg/g creatinine	0.617	mmol/mol creatinine
beats/min	1	beats/min	mg/24h	2.76	mol/d
BOX	-	-	mg/d	1	mg/d
cap	-	-	mg/dL	172.95	mol/L
cc	1	mL	mg/g creatinine	344	mol/mol creatinine
centipoise	1	centipoise	mg/kg/24h	8.84	mol/kg.d
cm	0.01	m	mg/L	4.58	mol/L
copies/ml	1	copies/mL	mg/mL	1	g/L
pg/mL	0.0059	nmol/L	mIU/mL	1	IU/L
reticulocytes/ L	10 ⁶	/L	ml	1	mL
Somogyi units/h	0.185	U/h	ml/Day	1	mL/d
U/day	1	U/d	ml/dl	0.1	mg/ml
U/dL	10	U/L	ml/min	1	mL/min
U/L	0.017	Kat/L	mL/min/1.73 m ²	0.0096	mL/sec·m ²
U/mL	1	kU/L	mmHg	0.133	kPa
g/day	1	g/d	mm/hr	1	mm/h
g/dl	0.1	mg/L	mmol/D	1	mmol/d
g/l	1	g/L	mmol/l	1	mmol/L
IU/ml	1	IU/mL	mU/mL	1	IU/L
mol/l	1	mol/L	nEq/L	1	nmol/L
units	1	U	ng/dL	10	ng/L
units/mL at 25°C	0.0167	U/L at 25°C	ng/mL	1	g/L
units/mL at 30°C	0.482	U/L at 30°C	ng/mL/h	1	g/L·h
yrs	1	y	nmol/min/mL	1	U/L
pg/cell	0.06206	fmol/cell			

사용하여 변환한다.

1. 매핑 테이블을 이용한 단위 변환

매핑 테이블을 이용한 단위 변환 방법은 The Medical Algorithms Project의 Ch.40 SI & Conventional Units에서 SI 단위에서 관용 단위로 혹은 SI 단위에서 관용 단위로의 변환에 변환 인자를 이용하여 단위 변환을 하게 된다. The Medical Algorithms Project의 자료와 참고문헌들의 자료를 활용하여 상호 변환 인자들과 SI 단위 그리고 관용 단위들을 테이블로 생성하고 의료 기관에서 사용하는 검사 정보에서 검사 항목에 따라 매핑 참조테이블을 생성한다.^[8-10]

생성된 매핑 참조테이블은 단위 변환 어셈블리에서 매핑 테이블을 이용한 단위 변환 방법이 지정되면 해당하는 SQL 명령을 이용하여 해당하는 변환 인자를 불러와 SI 단위나 관용 단위로의 변환이 이루어지도록 하였다. 단위 변환 전후의 접두어의 차이는 필요할 때마다 접두어 변환 알고리즘을 불러와 변환 인

자들을 계산하여 변환되도록 하였다. 다음 표 3은 해당 의료 기관의 검사 항목에 따른 매핑 참조테이블 중 일부를 보여준다.

2. 측정 단위 변환

단위 변환은 변환하고자 하는 단위를 목표하는 단위로 변환하는 것이다. 단위는 가장 간단하게 단위를 나타내는 기호와 값으로 이루어지게 된다. 단위는 단위와 단위사이의 곱 혹은 나눔의 관계로 이루어지는 좀 더 복잡한 형태로 표현되는 경우도 있다. 또한 간단한 단위와 복잡한 단위들이 복합적으로 표현되는 것들도 있다. 이러한 단위들은 다른 단위로 변환될 때 목표하는 단위로 값이 변환되도록 하는 변환 인자를 지닌다. 이러한 변환 인자들은 접두어, 단위의 차원 그리고 복잡한 단위들 간의 곱 혹은 나눔에 의해 결정된다.

단위와 단위 사이의 변환에 필요한 변환 인자를 알면 해당 단위의 값으로 변환되어지게 되는데 단위들 사이의 관계를 이용하여 전체 변환 인자를 계산하여 곱해주면 해당 단위로

표 3. 의료 기관의 검사 항목에 따른 매핑 참조 테이블.

ONAME	MACHNAME	METHOD	MOLECULE
Number of sperm	Sperm count	MappingTable	
Al(Aluminium)		MolecularMethod	Al,1
Cu(Copper)		MolecularMethod	Cu,1
Ammonia		MolecularMethod	N,1,H,3
PLT	Platelet Count	MappingTable	
PO2	Oxygen partial pressure PO2	MappingTable	
PSA		PrefixMethod	
PT(%)	Hematocrit	MappingTable	
PTH-Intact	Parathyroid hormone (PTH)	MappingTable	
Phospholipid		PrefixMethod	
Phosphorus(s)		PrefixMethod	
Poly-Diff	Hematocrit	MappingTable	
Pro-BNP		PrefixMethod	
Prolactin	Prolactin	MappingTable	
Protein C	Protein C	MappingTable	
Protein S	Protein S	MappingTable	
Protein(24hr's urine)	Protein, total	MappingTable	

값을 변환할 수 있다.

측정된 단위를 주어진 단위로부터 목표하는 단위로의 변환은 식 (1)에 의해 의료 기관의 단위를 SI단위로 변환하는 변환 인자를 구할 수 있다. 따라서 변환하고자 하는 단위의 값과 변환될 단위의 값 사이에는 식 (2)의 관계가 성립되고 각 변환 인자들 사이의 관계는 식 (3)에 의해 계산되어 전체 변환 인자를 계산할 수 있다. 이를 이용해 단위 변환이 이루어지게 된다. 여기에서 q_s 와 q_d 는 변환하고자 하는 단위의 값과 변환될 단위의 값이고 q_{SI} 는 SI 단위에서의 값을 나타낸다. f_s 나 f_d 는 해당하는 단위가 SI 단위로 변환되는 변환 인자이다.^[11]

$$q_s \cdot f_s = q_{SI} = q_d \cdot f_d \quad (1)$$

$$q_d = q_s \cdot \frac{f_s}{f_d} \quad (2)$$

$$f = \frac{f_s}{f_d} = \frac{\text{factor}(unit_s)}{\text{factor}(unit_d)} \quad (3)$$

3. 물질량의 변환

물질량의 단위들은 화학원소나 화합물의 양을 표시하는데 사용된다. 이 단위는 상대적 질량인 원자량이나 분자량과 관계가 있다. 따라서 물질량의 변환은 물질의 원자량이나 분자량에 따라 결과가 달라진다. 이러한 물질량과 관계된 단위의 변환은 mol과 g사이의 관계에 의해 식 (4)와 식 (5)로 변환 인자를 표현할 수 있다. 각 의료 기관 간의 단위 변환에 적용하는 것은 물질량의 변환 이전, 이후에 단위 변환 알고리즘을 적용하여 변환 인자를 구하고 물질량의 변환의 변환 인자와 계산하여 전체 변환 인자를 구하게 된다.

$$SI\text{ factor} = \frac{1}{\text{원자량 또는 분자량}} (\text{mol}) \quad (4)$$

$$NonSI\text{ factor} = \text{원자량 또는 분자량} (g) \quad (5)$$

IV. 결과 및 고찰

본 연구에서 구현된 SI 단위를 중심으로 하는 단위 변환 알고리즘은 알려진 모든 임상 병리 검사를 포함하는 것은 아니다. 실제 병원에서 사용하고 있는 EHR 시스템에서 임상병리 검사 정보 테이블을 환자 정보를 제외하고 SQL 문을 이용하여 백업 받아 가상의 EHR 시스템의 검사 정보 테이블을 구성하고 사용되고 있는 검사 항목과 단위들을 추출한 후 추출된 단위와 검사 항목에 맞도록 단위 변환 알고리즘을 구현하였다. 그리고 의료정보의 공유에 주로 사용하는 XML(extensible markup language) 파일을 의료 기관과 동일한 형태로 추출하여 각각의 단위 변환 과정을 시행하고 해당 의료 기관에서 사용 중인 XSL(extensible stylesheet language) 스타일시트를 이용하여 변환 과정의 결과들을 확인하였다. 그림 1과 그림 2는 XSL 스타일시트를 입힌 각각의 단위 변환 방법에 대한 결과이다.

그림 1는 매핑 테이블을 이용한 단위 변환 방법의 결과로 위에서부터 해당 의료 기관에서 관용적인 단위로 쓰고 있는 검사 정보의 XML화면, SI 단위로 변환된 검사 정보의 XML 화면, 임의의 공유 혹은 전송할 의료 기관에서 사용하는 관용 단위의 검사 정보의 XML화면을 확인에 필요한 부분만 추출하여 동시에 보여준 것이다.

그림 2는 알려진 물질량을 이용한 단위 변환 방법의 결과로 해당 검사에서 확인하고자 하는 물질의 양을 이용하여 SI 단위로 변환하고 이를 다시 관용적으로 쓰이는 단위로 변환됨을 보여준다.

본 연구를 진행하는 과정에서 몇 가지 문제

검사코드	검사명칭	검사결과	단위	H/L	하한치	상한치	검체코드/명
YLC08	A/G ratio	0.7			0	0	B6
YLC09	Total Bilirubin	2.2	mg/dl	H	2	1.2	B6
YLC12	AST(GOT)	27.0	U/L		8	38	B6
YLC13	ALT(GPT)	10.0	U/L		4	43	B6
검사코드	검사명칭	검사결과	단위	H/L	하한치	상한치	검체코드/명
YLC08	A/G ratio	0.7			0	0	B6
YLC09	Total Bilirubin	37.62	umol/L	H	3.42	20.52	B6
YLC12	AST(GOT)	0.459	uKat/L		0.136	0.646	B6
YLC13	ALT(GPT)	0.17	uKat/L		0.068	0.7310001	B6
검사코드	검사명칭	검사결과	단위	H/L	하한치	상한치	검체코드/명
YLC08	A/G ratio	0.7			0	0	B6
YLC09	Total Bilirubin	2.2	mg/dL	H	0.2	1.2	B6
YLC12	AST(GOT)	27.0	U/L		8	38	B6
YLC13	ALT(GPT)	10.0	U/L		4	43	B6

그림 1. 매핑 테이블을 이용한 단위 변환 방법의 결과.

검사코드	검사명칭	검사결과	단위	H/L	하한치	상한치	검체코드/명
YLC08	Cu(Copper)-구리	74	ug/dL		70	140	B6
YLC09	Al(Aluminium)	3.3	ug/L		0	5.41	B6
YLC12	Ammonia	27.0	ug/dL		25	80	B6
검사코드	검사명칭	검사결과	단위	H/L	하한치	상한치	검체코드/명
YLC08	Cu(Copper)-구리	11.64505	umol/L		11.01559	22.03118	B6
YLC09	Al(Aluminium)	0.1223058	umol/L		0	0.2005074	B6
YLC12	Ammonia	15.85383	umol/L		14.67947	46.9743	B6
검사코드	검사명칭	검사결과	단위	H/L	하한치	상한치	검체코드/명
YLC08	Cu(Copper)-구리	740	ug/L		700	1400	B6
YLC09	Al(Aluminium)	3.3	ug/L		0	5.41	B6
YLC12	Ammonia	270	ug/L		250	800	B6

그림 2. 물질량의 변환을 이용한 단위 변환 방법의 결과.

점들이 발견되었다. 단위를 추출하는 과정에서 의료기관에서 사용되는 단위가 SI 단위에 정의되지 않은 단위들이 사용되는 경우가 상당수 발견되었고, SI 단위인 경우에도 영문의 대소문자 구분이 혼용되어 사용되거나 불필요한 곳 및 적절하지 않은 곳에 사용되는 경우가 있었다. 심지어 단위가 존재하는 검사임에도 기

재되지 않은 채 사용되는 경우도 일부 발견되었다. 또한 검사 항목에 따른 단위들에서 사용자가 검사 정보 테이블에 기록하도록 되어 있어 사용자의 개별적 특성 및 전문성에 의해 동일 항목에서도 서로 다른 단위로 작성될 수 있었다.

본 연구에서는 SI 단위에서 정의되지 않은 단위들의 경우 의료 기관의 특성상 동일하게 사용

되는 단위로 보고 그대로 두었으며 대소문자의 경우 사용 중인 단위들에서 문제가 되는 경우가 존재하지 않아 프로그램 상에서 대문자로 변환하여 처리하였다. 불필요한 곳이나 적절하지 못한 곳에 사용되는 경우는 적절히 수정하거나 그대로 두었다. 단위가 존재하는 검사인데도 불구하고 단위가 존재하지 않은 경우는 찾아 기재하였다.

V. 결 론

본 논문에서는 국내 의료 기관의 전자 의무 기록에서 사용되고 있는 각종 임상 병리 검사 정보에서 단위와 결과들을 추출하여 검사 정보의 공유 및 활용을 위해 SI 단위계를 중심으로 하는 단위 변환 프로그램을 구현하였다. 구현에는 .NET 기반의 언어에서 사용 가능한 어셈블리로 각 기능을 구현하였으며 이를 검증하기 위한 SI 변환 프로그램을 작성하였다.

SI 변환 프로그램은 검사 정보의 공유 및 활용에 필요한 과정들을 하나씩 볼 수 있도록 하였으며 그 결과 각 알고리즘에 의해 적절히 단위 변환이 이루어짐을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업(RTI04-01-01) 지원으로 수행되었음

참고문헌

1. 대한의료정보학회, *보건의료정보학*, (현문사, 서울, 2003), Chap. 10.
2. Institute of Medicine, *환자안전: 새로운 의료표준*, 대한의료정보학회 편, (원기획, 서울, 2006), pp. 353-367.
3. 문화일보. <http://www.munhwa.com/news/view.html?no=2006060201031024306002> (accessed May. 2007)
4. D. Halliday, R. Resnick, *Fundamentals of Physics*, 7th ed. (Wiley, 2005), Chap. 1.
5. 국가 표준 기본법, 법률 제6315호, (1999).
6. 계량에 관한 법률, 법률 제6193호, (2000).
7. E. Y. Choi, Y. S. Chang, H. J. Chin, E. J. Chung, N. S. Byeun, D. H. Yoo, S. N. Bae, K. S. Ha, *The Korean Society Of Medical Informatics*, 12(1), 45, (2005).
8. J. B. Henry, *Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods*, 19th ed, (W. B. Saunders, 1996).
9. E. Braunwald, D. Kasper, A. Fauch, S. Hauser, D. Longo and J. Jameson, *Harrison's Principles of Internal Medicine*, 16 ed, (MIP, 2006).
10. The Medical Algorithms Project. <http://www.medal.org> (accessed February. 2007).
11. Gordon. S, Novak. Jr, *IEEE Transactions on Software Engineering*, 21(8), 651, (1995).

폴리(옥시플루오렌옥시메틸페닐실레인)의 합성과 특성

정은애 · 박영태*

계명대학교 자연과학대학 화학과

Synthesis and Characterization of Poly(oxyfluorenoxymethylphenylsilane)

Eun Ae Jung and Young Tae Park*

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

요 약. Bichloromethylphenylsilane(I)을 diethylamine과 반응시켜 두 개의 chlorine 작용기를 diethylamine 작용기로 모두 치환시킴으로써 bis(diethylamino)methylphenylsilane(II) 유기규소 화합물을 합성하였다. 생성된 화합물을 단위체로 하여 2,7-dihydroxy-9H-fluorene-9-one과 용융 공중합 반응을 진행하여 새로운 형태의 유기 규소 고분자인 poly(oxyfluorenoxymethylphenylsilane)(III)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 관찰할 수 있었으며, UV-VIS 흡수 스펙트럼에서는 258 nm에서 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 스펙트럼은 검출파장 270 nm에서 260 nm의 최대 흡수 띠가 나타났으며, 형광방출 스펙트럼에서는 420 nm에서 최대 방출 띠가 나타났다. 또한, 합성한 고분자는 질소 대기 하에서 500 °C까지 가열할 때 처음 무게의 93%가 존재함으로서 열에 대단히 안정하였다.

Abstract. Bis(diethylamino)methylphenylsilane(II) was synthesized by the substitution reaction of bichloromethylphenylsilane(I) with diethylamine. A new silicon-containing polymeric material of poly(oxyfluorenoxymethylphenylsilane)(III) was prepared by the melt copolymerization of bis(diethylamino)methylphenylsilane(II) with 2,7-dihydroxy-9H-fluorene-9-one. The obtained polymer is soluble in usual organic solvents such as THF and CHCl₃, and the average molecular weight is turned out to be M_w of 12388 with polydispersity M_w/M_n of 1.04. The prepared material was fully characterized by ¹H-NMR, ¹³C-NMR, and ²⁹Si-NMR along with IR spectroscopies. The electronic properties of the fluorescent polymer spectra show that excitation band is observed at 270 nm and emission band at 420 nm in THF. About 93% of the initial polymer weight remained at 500 °C in nitrogen atmosphere.

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, 원자반지름이 1.64 Å, 293K에서 밀도가 2.33 g/cm³, 녹는점 1410 °C, 끓는점 2355 °C인 물질로 알려

져 있다.¹

1824년 스웨덴의 Berzelius가 최초로 무정형 고체의 규소를 발견하였으며 HCl과의 반응을 통하여 최초의 규소 화합물인 무색 휘발성 액체 SiCl_4 을 합성하였고 1857년 독일의 Wöhler는 규소와 탄소를 섞은 후 가열하면서 HCl기체를 통과시켜서 trichlorosilane을 합성하였는데 오늘날에도 HSiCl_3 을 제조하는데 이와 비슷한 공정을 사용하고 있다.¹² 1860년경 프랑스의 Friedel과 미국의 Crafts는 tetrachlorosilane에 diethylamine을 반응시켜 직접 결합된 최초의 유기규소 화합물인 $(\text{C}_2\text{H}_5)_4\text{Si}$ 을 합성하였다.

1945년 미국의 Rochow는 금속 규소원소와 유기 할로겐화합물을 Cu 촉매 하에서 한 단계 반응으로 methylchlorosilane을 대량으로 생산할 수 있는 직접합성법을 발견하였으며, 가수분해를 통하여 주 사슬의 기본골격이 규소와 산소로 이루어진 폴리실록산 소위 silicone을 만들 수 있게 되었다.^{3,4}

1978년에 Yajima에 의해 실리콘 카바이드 (SiC)세라믹의 원료로 사용되는 polysilane을 열처리하는 과정에서 반응의 중간체로서 먼저 폴리카보실란(polycarbosilane)으로 변한다는 소위 Yajima Process가 보고되면서 폴리카보실란류의 유기규소 고분자물질에 관한 연구가 활기를 띠게 되었다.^{5,6} 하나의 예를 들면, 1987년 캐나다 Chen그룹과 미국의 Weber그룹은 유기규소 고리화합물에 대한 음이온 개환 중합 반응을 발견하였으며 지금까지 개환 중합 반응의 메카니즘과 이들의 응용에 관해 많은 연구가 진행되고 있다.^{7,8}

2003년에 발표된 West의 논문에서는 폴리(메틸하이드로실록산)을 여러 종류의 형광성 알코올과 각기 다른 촉매 하에서 탈수소 반응을 진행하여 형광성 폴리실록산을 합성하였다.⁹

오늘날 규소화학 공업에서는 이러한 유기염

화실란의 대량생산이 가능해짐으로써 최근에는 규소원소가 포함된 많은 종류의 새로운 무기고분자 물질에 대한 연구와 신소재로서의 활용이 크게 확산되어 가고 있는 실정이다.^{2,10-14} 규소원소가 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.^{2-4,10}

본 연구에서는 새로운 유기 규소 화합물인 bis(diethylamino)methylphenylsilane (II)을 합성하고, 2,7-dihydroxy-9H-fluorene-9-one과의 용융공중합 반응을 진행하여 methylphenylsilane을 포함하는 새로운 유기 규소 고분자인 poly(oxyfluorenloxy)methylphenylsilane(III)을 합성하고자 한다.

합성하는 각각의 화합물에 대하여 다양한 분광기기로 구조분석을 하여 구조를 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 dichloromethylphenylsilane(I)을 구입하여 정제하지 않고 그대로 사용하였으며, diethylamine은 KOH를 적당량 넣고 환류 시킨 후에 증류하여 사용하였다. 용

때로서 hexane은 아르곤 대기 하에서 sodium 과 benzophenone을 적당량 넣고 환류 시킨 후에 증류하여 사용하였다.

본 실험에서 사용한 기기는 다음과 같다. UV-Vis 스펙트럼은 HP-8453E를 사용하였고, IR 스펙트럼은 Bruker IFS 48 분광광도계를 사용하여 얻었으며, ¹H-NMR은 Bruker AVANCE 400 분광계를 사용하였고 용매로는 CDCl₃ 또는 THF-d₈를 사용하였다. ¹³C-NMR 스펙트럼은 Bruker AVANCE 400 분광계 또는 Varian UnityINOVA 600 분광계를 사용하여 용액상태 또는 고체상태에서 얻었고, ²⁹Si-NMR 스펙트럼은 Varian UnityINOVA 500 또는 Varian UnityINOVA 600 분광계를 사용하여 용액상태 또는 고체상태에서 얻었다. 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 굴절률 검출기로 구성하였으며 Breeze 소프트웨어 시스템을 사용하였다. GPC 용매는 THF를 사용하였으며 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 500 °C까지 10 °C/min씩 온도를 올려주면서 질소 대기 하에서 측정하였다(질소 flow rate: 20 cm³/min).

2. Bis(diethylamino)methylphenylsilane

1000 mL 삼구 플라스크에 냉각기와 적하깔때기를 설치하고, 자석젓개를 넣고 아르곤 기체 대기 하에서 불꽃 건조시켜 용기 내부의 습기

를 제거한다. 여기에 아르곤 기체를 계속 훌러주면서 hexane(150 mL)과 diethylamine 33.4 g(0.46 mol)을 넣는다. 그리고 적하 깔때기에는 dichloromethylphenylsilane 19.1 g(0.10 mol)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)methylphenylsilane (I) 14.4 g(수득률, 55%)을 얻었다. bp: 98 °C/1.1 mmHg, ¹H-NMR(400 MHz, CDCl₃): δ 0.39(s, 3H), 1.06(t, J=7Hz, 12H), 2.96(q, J=7Hz, 8H), 7.40~7.66(m, 5H); ¹³C-NMR(100 MHz, CDCl₃): δ -2.20, 15.0, 39.2, 127.4, 128.6, 134.5, 139.6; ²⁹Si-NMR(99 MHz, CDCl₃): δ -30.74 ; IR (KBr disk): ν 3067, 2963, 2863(ν_{C-H}), 1342, 1253, 1203(ν_{Si-C}), 1173, 1107, 1057(ν_{C-N}), 928(ν_{Si-N}), 787, 722 cm⁻¹; MS: m/z (relative intensity) 264(M⁺, 3), 249(M⁺-CH₃, 2), 235(2), 219(2), 192(M⁺-NEt₂, 4), 178(2), 164(3), 150(6), 131(2), 120(M⁺-2(NEt₂), 3), 105(6), 95(3), 72(8), 58(16), 44(Si-CH₄⁺, 100), 28(77).

3. Poly(oxyfluorenoxymethylphenylsilane) (III)의 합성

50 mL 둥근바닥플라스크에 냉각기를 설치하고 불꽃 건조시켜 용기 내부의 습기를 모두 제거한다. 여기에 아르곤 기체를 훌러주면서 bis(diethylamino)methylphenylsilane 39.67 mg (150 mmol)과 2,7-dihydroxy-9H-fluorene-9-one 32.1 mg(150 mmol)을 넣는다. 반응 혼합물이 들어 있는 플라스크의 온도를 130 °C로 가열망태기를 이용하여 가열하면서 12시간 동안 반응시키고, 다시 200 °C로 3시간 반응시킨 후, 최종적으로 260 °C에서 20시간 동안 반응시킨

다. 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 100°C로 3일 동안 건조시켜 거무스름한 고체인 순수한 생성물 poly(oxyfluorenoxy-methylphenylsilane)(II) 35mg(수득률, 72%)을 얻었다. $^1\text{H-NMR}$ (400 MHz, THF- d_8): δ 0.10 (s, 3H), 7.10~7.38(m, 11H); $^{13}\text{C-NMR}$ (150MHz, CP-MAS): δ 0.13, 128.21, 133.73, 153.08; $^{29}\text{Si-NMR}$ (119MHz, CP-MAS): δ -33.57; IR: ν 3062, 2965, 1712, 1587, 1432, 1259, 1124, 1015($\nu_{\text{Si-O}}$), 769, 724, 692; UV-Vis(THF): λ_{max} , nm(ϵ): 258 ($4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) ; 들뜬 상태(excitation) 스펙트럼과 형광방출(emission) 스펙트럼 그리고 질소 대기 하에서의 TGA 열중량 분석 자료는 결과 및 고찰에 서술하였다.

III. 결과 및 고찰

Dichloromethylphenylsilane(I)을 diethylamine과 반응시켜 두 개의 chlorine 작용기를 diethylamine 작용기로 모두 치환시킴으로써 수득률 55%의 bis(diethylamino)methylphenylsilane(II) 유기규소 화합물을 합성하였다(Scheme 1).

합성된 화합물 II의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 Figure 1에 나타내었다. 합성한 화합물 II의 $^1\text{H-NMR}$ 스펙트럼을 살펴보면, CH_3 의 수소피크가 0.25 ppm에서 단일선으로, CH_2CH_3 의 CH_3 수소피크가 0.93 ppm에서 삼중선으로 CH_2 의 수소피크가 2.82 ppm에서 사중선으로 관찰되었으며, 그리고 C_6H_5 의 수소피크는 7.25~7.51 사이에서 다중선으로 관찰되었다. 각 피크의 면적 비율은 3: 12: 8: 5로 나타났으며 예상되는 화합물 II와 일치하였다.

Scheme 1

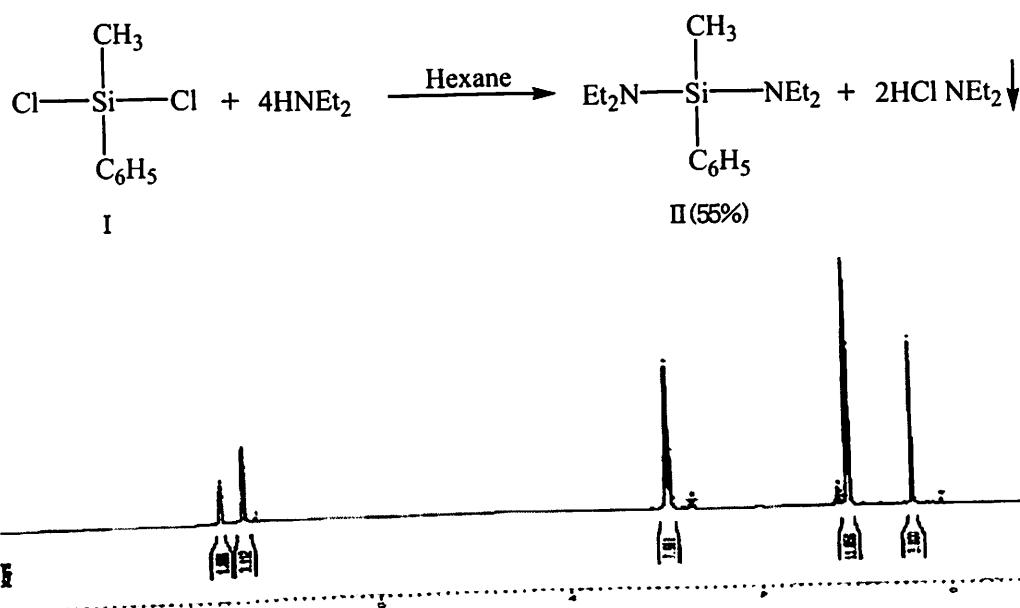


Figure 1 $^1\text{H-NMR}$ Spectrum of compound II.

합성된 화합물 II의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 Figure 2에 나타내었다. 합성된 화합물 II의 ^{13}C -NMR 스펙트럼은, CH_3 에 의한 탄소피크가 -2.25 ppm에서, CH_2CH_3 의 CH_3 에 의한 탄소피크가 14.93 ppm에서 CH_2 에 의한 탄소피크가 38.88 ppm에서 각각 관찰되었고 페닐기에 의한 피크는 120~140 사이에서 나타났다.

또한, 화합물 II의 ^{29}Si -NMR 스펙트럼에서는 규소 피크가 -30.74 ppm에서 관찰되었다 (Figure 3).

화합물 II의 적외선 흡수 스펙트럼은 Figure 4에 나타내었다. 스펙트럼을 살펴보면, 방향족 C-H의 신축 진동에 의한 흡수띠가 3067 cm^{-1}

에서 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며, 지방족 C-H의 신축 진동은 2963 cm^{-1} 에서 각각 나타남을 알 수 있었다. 또한 C-N의 신축진동에 의한 흡수띠가 1057 cm^{-1} 에서 나타나는 것을 볼 수 있다. 그리고 이 실험에서 합성한 화합물에서 가장 큰 특징인 Si-N 신축진동에 의한 흡수띠가 928 cm^{-1} 에서 나타나고 있음을 확인할 수 있었다.

Figure 5에 나타낸 질량 분석 스펙트럼에서는 분자 토막 이온(M^+)에 해당하는 m/z 값이 264에서 나타났으며, $\text{M}^+ - \text{CH}_3$ 에 해당하는 토막 이온은 249, $\text{M}^+ - \text{NEt}_2$ 에 해당하는 토막 이온은 192 그리고 $\text{M}^+ - (\text{NEt}_2)_2$ 에 해당하는 토막

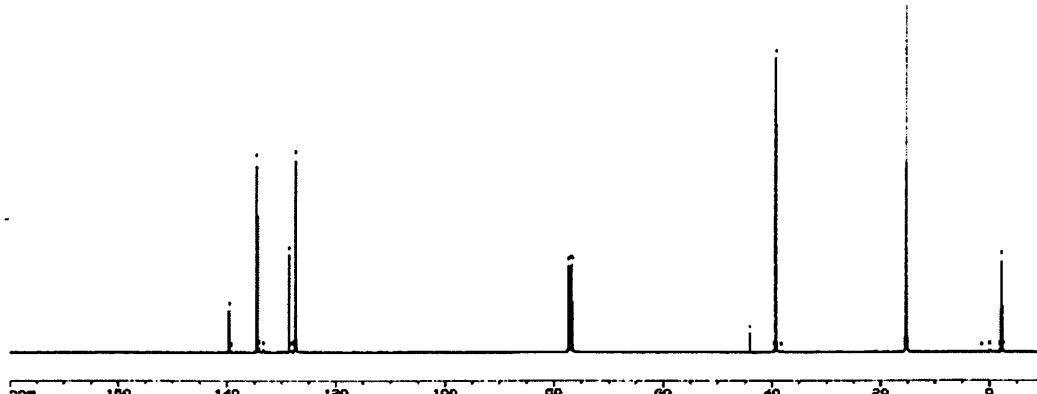


Figure 2 ^{13}C NMR Spectrum of compound II.

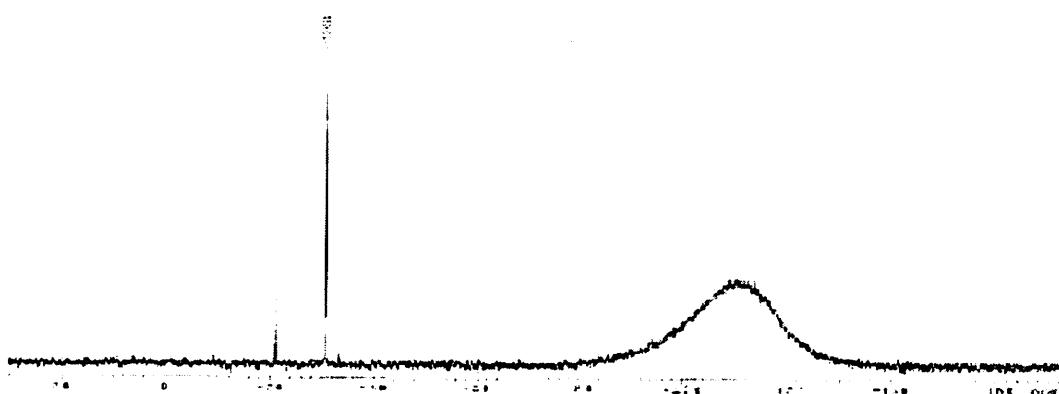


Figure 3. ^{29}Si -NMR spectrum of compound II.

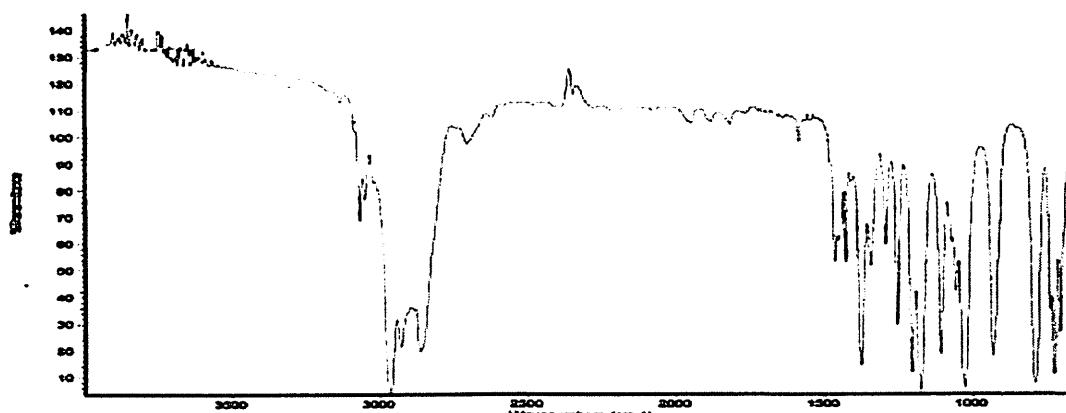


Figure 4. IR spectrum of compound II.

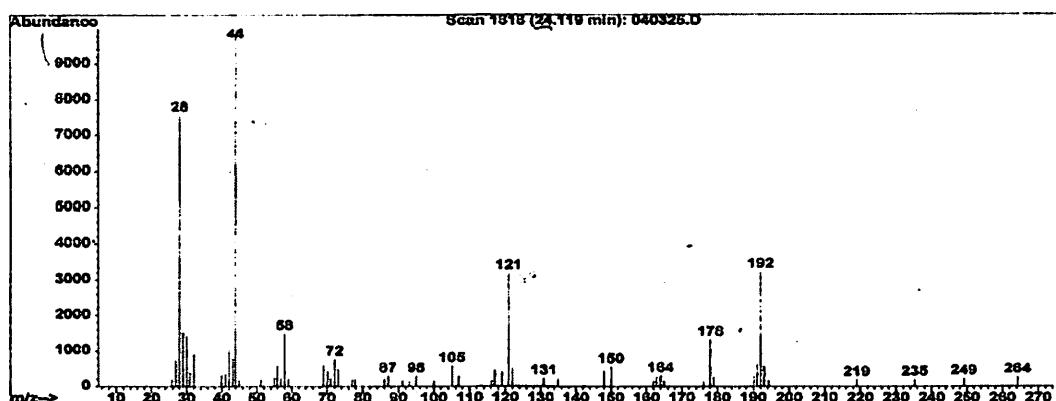


Figure 5. MS spectrum of compound II.

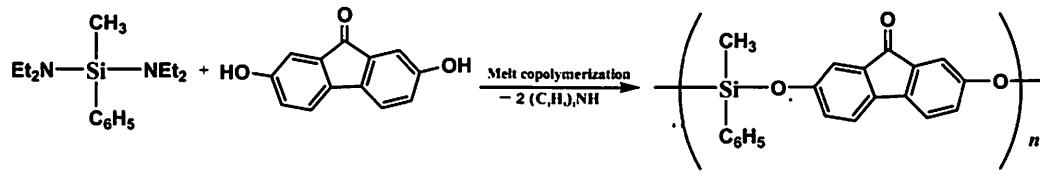
이온은 120에서 각각 관찰되었다.

두 개의 diethylamine 작용기를 지닌 유기규소 화합물 bis(diethylamino)methylphenylsilane (II)을 2,7-dihydroxy-9H-fluorene-9-one 사용하여 용융 공중합반응을 진행하여 새로운 형태의 유기 규소 고분자 poly(oxyfluorenoxymethyl-

phenylsilane)(III)을 72%의 수득률로 합성하였다. 이들의 합성과정을 Scheme 2에 나타내었다.

합성된 화합물 III의 ¹H-NMR 스펙트럼을 Figure 6에 나타내었다. 합성한 화합물 III의 ¹H-NMR 스펙트럼을 살펴보면, CH₃의 수소피크가 0.10ppm에서 확인할 수 있었고, phenyl

Scheme 2



II

III(72%)

기와 fluorene의 수소피크가 7.10~7.38 ppm에서 다중선으로 각각 관찰되었다.

합성된 화합물 III을 고체 상태에서 CP-

MAS NMR을 측정하였으며 Figure 7에 나타내었다. 화합물 III의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 살펴보면, CH_3 에 의한 탄소피크가 0.13 ppm에서,

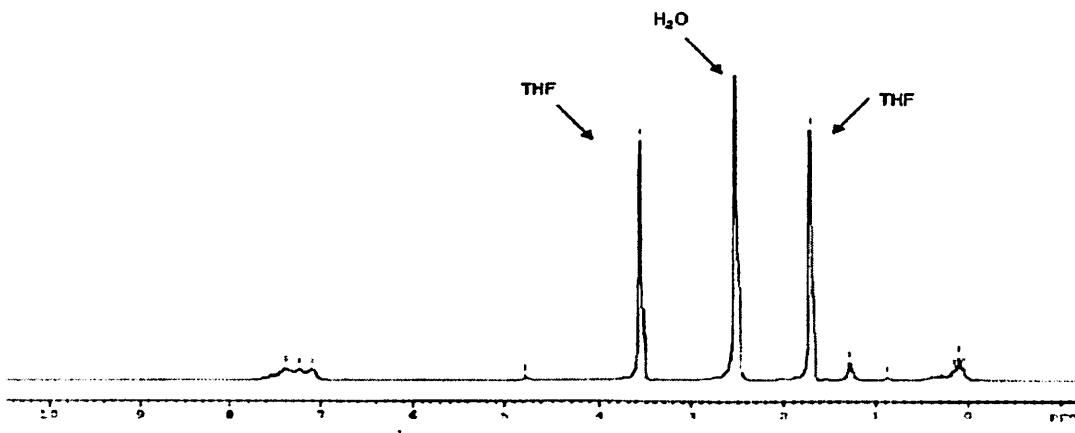


Figure 6. ^1H -NMR spectrum of compound III.

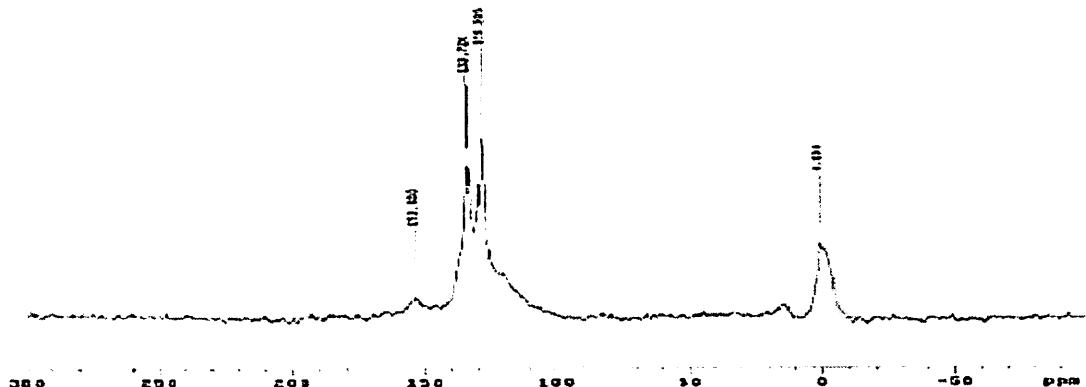


Figure 7. ^{13}C CP-MAS NMR spectrum of compound III.

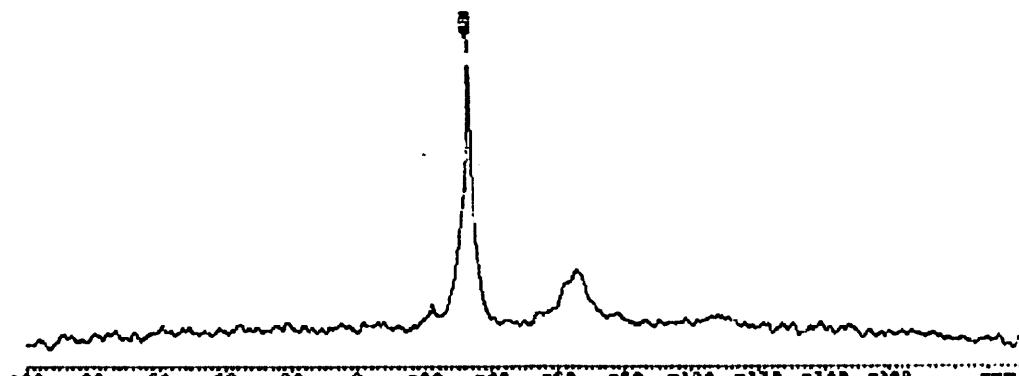


Figure 8. ^{29}Si CP-MAS NMR spectrum of compound III.

C_6H_4 에 의한 탄소피크가 120.21~150ppm 사이에서 broad하게 나타났다.

합성된 화합물 III의 ^{29}Si -NMR 스펙트럼에서는 규소의 주 피크가 -33.57ppm에서 관찰되었다 (Figure 8).

그리고 화합물 III의 적외선 흡수 스펙트럼을 Figure 9에 나타내었다. 화합물 III의 적외선 흡수 스펙트럼을 살펴보면, 방향족 C-H의 신축 진동에 의한 흡수띠는 3062 cm^{-1} 에서 나타나는 것을 관찰할 수 있었으며, 지방족 C-H의 신축진동에 의한 흡수띠가 2965 cm^{-1} 에서 각각 나타남을 확인 할 수 있다. 그리고 이 실험에서 합성한 화합물에서 가장 큰 특징인 Si-O 신축운동에 의한 흡수띠는 1015 cm^{-1} 에서 나타나고 있음을 확인 할 수 있었다.

그리고 합성한 고분자 물질 III의 분자량을

알아보기 위하여 겔 투과 크로마토그래피(GPC) 측정을 하였다. Polystyrene을 표준물질로 하여 THF(HPLC용, Aldrich)에 녹여 측정한 결과 M_w 는 12388로 그리고 M_w/M_n 는 1.04로 나타났다.

합성한 화합물 III의 UV-Vis 스펙트럼은 THF 용매 하에 258 nm 의 파장에서 몰흡광계수(ϵ)가 $4.3 \times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 인 최대 흡수띠를 보여주고 있다 (Figure 10).

합성한 고분자 물질 III의 경우 액체상태의 들뜬상태(excitation) 스펙트럼은 검출파장이 420 nm 에서 260 nm 의 최대 흡수띠가 나타났다. 한편, 형광방출(emission) 스펙트럼은 들뜸 파장이 270 nm 일 때 420 nm 에서 최대 방출띠가 관찰되었다(Figure 11).

합성한 고분자 물질 III의 열적 안정성을 알

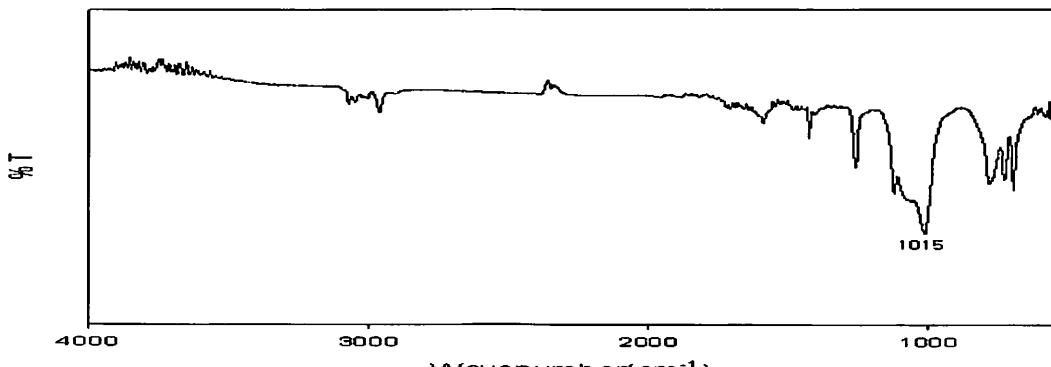


Figure 9. IR spectrum of compound III.

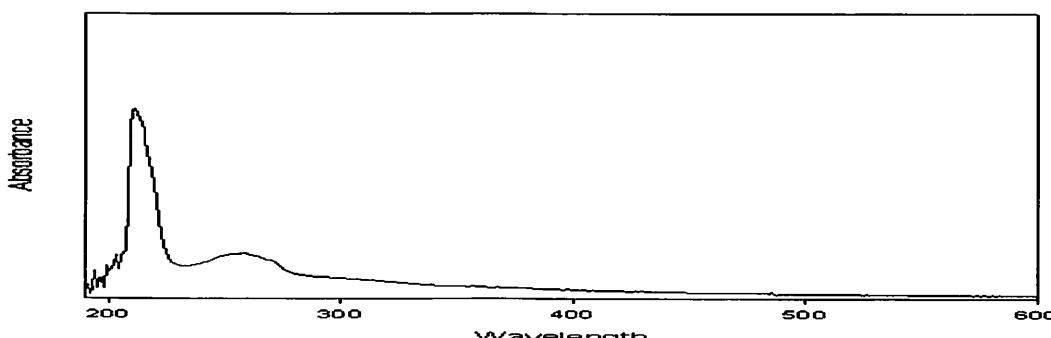


Figure 10. UV-Vis spectrum of compound III.

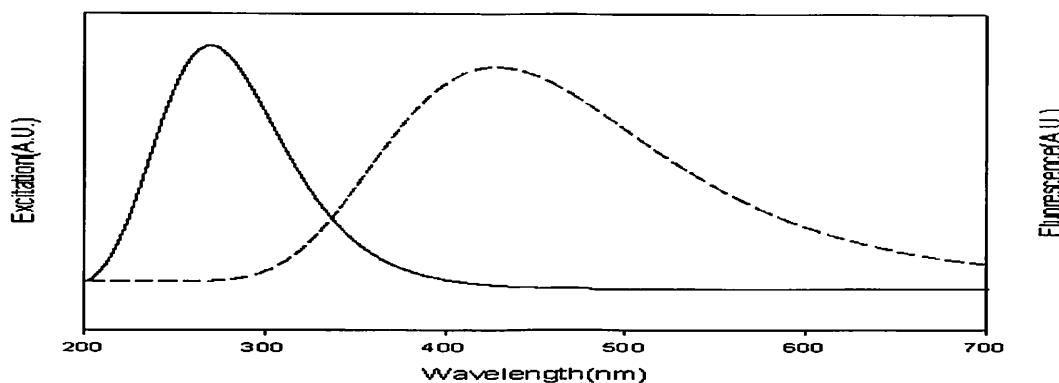


Figure 11. Excitation and emission spectra of compound III.

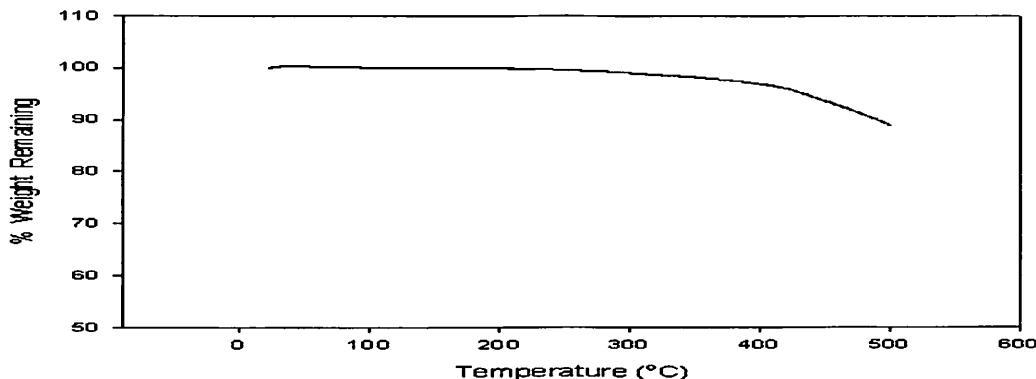


Figure 12. TGA thermogram of polymer III in nitrogen.

아보기 위하여 질소 대기압 하에서 열중량 분석을 하였다. 합성한 고분자 물질 III의 열중량 분석도를 Figure 12에 나타내었다. 고분자 물질 III의 TGA 열중량 분석도를 살펴보면, 온도를 실온에서부터 시작하여 10 °C씩 증가시킴에 따라 200°C까지 무게의 변화 없이 안정하였으며 이 후 500°C까지 처음 무게의 단지 7%만 감소하였다 (Figure 12).

IV. 결 론

Dichloromethylphenylsilane(I)을 diethylamine과 반응시켜 두 개의 chlorine 작용기를 diethylamine 작용기로 모두 치환시킴으로써 유기규소 화합

물 bis(diethylamino)methylphenylsilane(II)을 합성하였다. 생성된 화합물을 단위체로 하여 2,7-dihydroxy-9H-fluorene-9-one과 용융공중합반응을 진행하여 새로운 형태의 유기 규소 고분자인 poly(oxyfluorenoxymethylphenylsilane)(III)을 합성하였다.

얻어진 고분자 물질은 THF 또는 CHCl₃ 등의 일반적인 유기용매에 용해되었으며, 분자량을 측정한 결과 M_w는 12388 및 M_w/M_n는 1.04로 각각 나타났다. ¹H-NMR, ¹³C-NMR, ²⁹Si-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 고분자의 둘뜬 상태 스펙트럼은 검출 파장 420nm에서 260 nm의 최대 흡수띠가 나타났으며, 형광방출 스펙트럼에서는 둘뜸 파장이 270nm일 때 420 nm에서 최대 방출띠가 나타났다. 또한, 합성한 고분자는 공기 대기 하에서 200 °C까지는 무게가 감소하지 않고 안정하였으며 500°C까지 가열할 때에 단지 7%의 무게 감소를 나타내었다.

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

감사의 글

본 연구는 2008년도 1학기 계명대학교 대학원 학생 학술연구 장학금에 의해 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Rochow, E. G. In *Comprehensive Inorganic Chemistry*; Hailar, J. C. et al., Eds.; Pergamon Press: Oxford, 1973; Vol. 1.
- Rochow, E. G. *Silicon and Silicones*; Springer-Verlag: Berlin, 1987.
- Rochow, E. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, 67, 963.
- Hurd, D. T.; Rochow, E. G. *J. Am. Chem. Soc.*, 1945, 67, 1057.
- Baque, E.; Pillot, J. P.; Birot, M.; Dunogues, J. *Macromolecules* 1988, 21, 30.
- Boury, B.; Carpenter, L.; Corriu, R. J. P. *Angew. Chem. Int. Ed.* 1990, 29, 785.
- Harvath, R. F.; Chan, T. H. *J. Org. Chem.* 1987, 52, 4489.
- Zhang, X.; Zhou, Q.; Weber, W. P.; Horvath, R. F.; Chan, T. H.; Manuel, G. *Macromolecules* 1988, 21, 1563.
- Toulokhonova, I.; Bjerke-Kroll, B.; West, R. *J. Org. Chem.* 2003, 686, 101.
- Noll, W. *Chemistry & Technology of Silicon*; Academic press: New York, 1968.
- 김홍재 번역, 규소수지: 플라스틱 재료강좌 9 대광서림: 서울, 1989.
- Hench, L. L.; Ulrich, D. R. *Science of Ceramic Chemical Processing*; John Wiley & Sons, Inc. 1986.
- Zeigler, J. M.; Fearon, F. W. G. Eds., *Silicon Based Polymer Science: A Comprehensive Resource*, ACS Series 224; American Chemical Society: Washington, DC, 1990.
- Mark, J.; Allock, H. R.; West, R. *Inorganic Polymers*; Prentice-Hall Interaction: New Jersey, 1992.
- Pretsch, E.; Bilmann, P.; Affolter, C. *Structure Determination of Organic Compounds Tables of Spectral Data*; Springer-Verlag: Berlin, 2000.
- Yajima, S.; Hesegawa, Y.; Hayashi, J.; Imura, M. *J. Mater. Sci.* 1978, 13, 2569.
- Imai, Y. *J. Polym. Sci., Part A : Polym. Chem.* 1990, 28, 2997
- 정일남, 제 3세대 실리콘 화학; 자유아카데미; 서울, 1997
- Liu, X.; Xu, J. *Macromolecules*, 2006, 39,

Two Species of the Genus *Cladothela* from Korea (Araneae: Gnaphosidae)

Bo Keun Seo*

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

한국산 갈래꼭지거미속의 2종 (거미목 : 수리거미과)

서보근

제명대학교 자연과학대학 생물학과

요약. 갈래꼭지거미속 (수리거미과)에 속하는 2종, 작은갈래꼭지거미 (신칭) (*Cladothela parva*) 와 고리갈래꼭지거미 (신칭) (*Cladothela unciinsignita*)을 한국미기록종으로 보고한다.

Abstract. Two spider species of the genus *Cladothela* (Gnaphosidae), *Cladothela parva* Kamura, 1991 and *Cladothela unciinsignita* (Bösenberg and Strand, 1906), are reported with illustrations as new records to the Korean spider fauna.

Introduction

The genus *Cladothela* was erected by Kishida designating *C. boninensis* as the type in 1928 (Kamura, 1991; Paik, 1992). Since that time, three remarkable generic characters, which are a large spine on retrolateral side of male palpal femur, trochanter of legs without ventral notch and cheliceral retromargin without tooth, have been added by Kamura (1991).

The members of this genus are only nine species and have been reported from China, Japan and Korea (Palearctic region) (Platnick, 2008), and two species, *C. oculinotata* (Bösenberg & Strand, 1906) and *C. tortiembola* Paik, 1992, were recorded from Korea (Paik, 1992). In this paper, the author described two species of *Cladothela*,

C. parva Kamura, 1991 and *C. unciinsignita* (Bösenberg and Strand, 1906), from Isl. Ulleung, Gyeongsangbuk-do as new records to the korean spider fauna. The materials examined are deposited in the collection of Department of Biology, Keimyung University.

Description

Family Gnaphosidae Pocock, 1898

Genus *Cladothela* Kishida, 1928

Cladothela parva Kamura, 1991 (Figs. 1-4)

Cladothela parva Kamura, 1991, p. 57, figs. 37-43; Zhang, Song and Zhu, 2002, p. 17, figs. 1-5; Zhang, Yin and Bao, 2004, p. 83, figs. 9-16; Song, Zhu and Zhang, 2004, p. 42, figs. 21A-F.

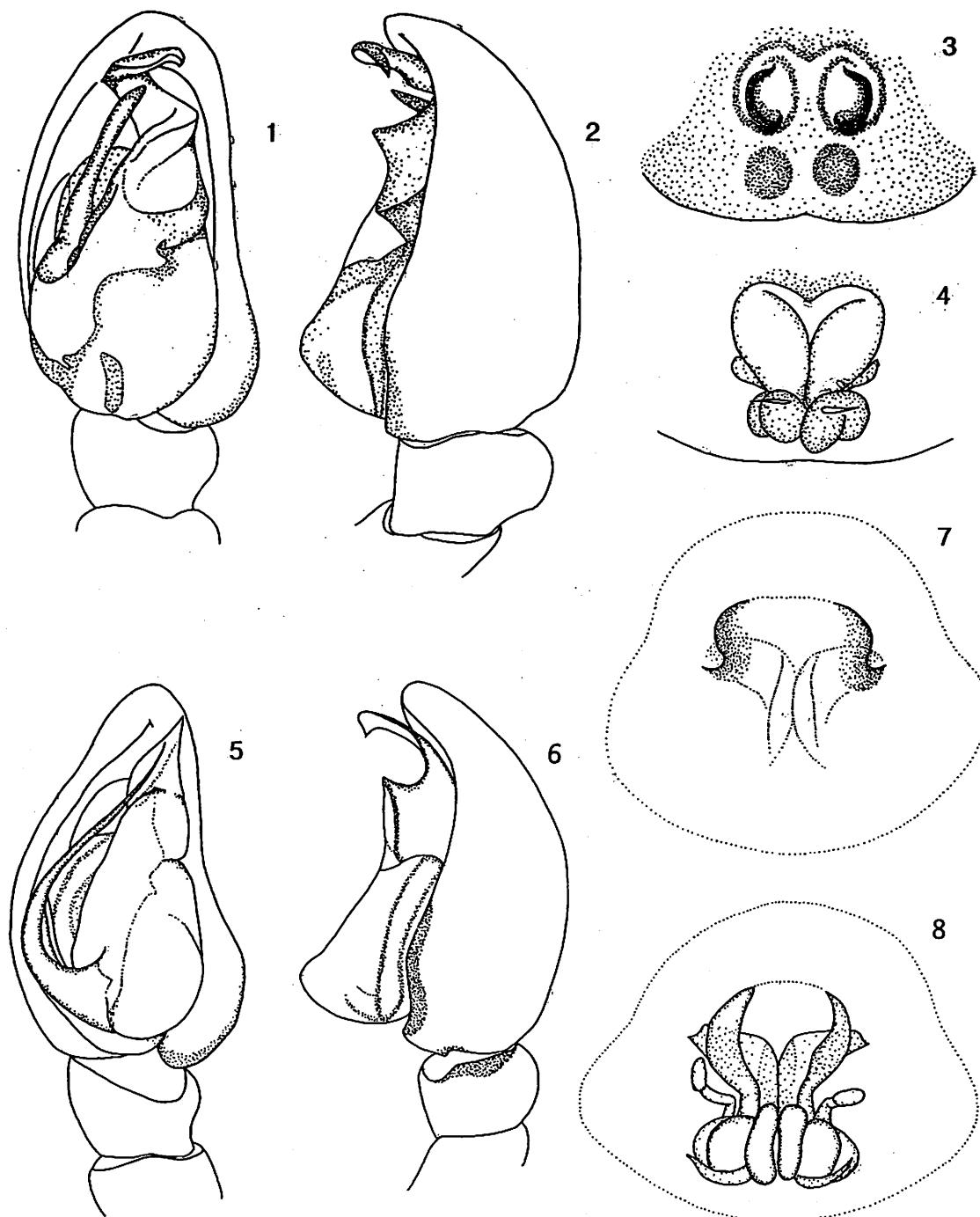
Material examined. 1♂, 1♀, Taeha-dong

(Ulleung-gun), 12 Nov. 2005 (C. W. Lee).

Description. Male: Carapace oval and reddish brown; black reticulated striae radiate from a short line-shaped median furrow; the index 77. Cephalic width index 52. Clypeus height the same to diameter of anterior median eyes. In dorsal view anterior eye row recurved slightly and posterior eye row procurved slightly. Eye row index 87. Eye area index 53. Eye ratio, anterior lateral eye = posterior median eye > anterior median eye > posterior lateral eye (5 : 4.5 : 4). Anterior median eyes separated by one third of their diameter, nearly contiguous from the laterals. Posterior median eyes contiguous each other and separated by 0.4 times of their diameter from the laterals. Anterior and posterior lateral eyes separated by 0.4 times of diameter of anterior lateral eyes. Median ocular quadrangle, height > posterior side > anterior side (12 : 11 : 9.5). Chelicerae with two small promarginal teeth. Sternum and labium reddish brown; the index 76 and 80, respectively. Legs yellowish brown; ventrodistal parts of metatarsi III and IV with black long hairs instead of preening comb. Leg formula 4123. Leg formular index 100 : 91 : 81 : 119. Leg I/c 2.41. Fem. I/c 0.71. Tib I/c 0.52. Met I/c 0.39. Met. I/tar. I 1.04. Met. IV/tar. IV 1.62. Fem. I l/d 2.75. Tib. I l/d 3.20. Pat. I+tib. I/c 0.94. Leg spination pattern: femora: I and II d1-1, p0-0-1; III d1-1-0, p0-1-1, r0-1-1; IV d1-1-0, r0-0-1; tibiae: III d1-0, p1-1-1,

r1-1-1, v2(1)-2-2; IV d2-2, p1-1, r1-1, v2-2-2; metatarsi: I v2(1)-1, II v2-2; III d1-0, p1-1-1, r1-1-1, v2-0; IV d1-0-1, p1-2-2, r1-2-2, v1-1. Abdomen dark brown with two pairs of elongate sigilla; the index 66. Palpal organ with long embolus on prolateral part of bulb; conductor large, sclerotized and twisted (Figs. 1-2).

Female: Carapace index 76. Cephalic width index 58. Clypeus height 0.6 times of the diameter of anterior median eyes. Eye row index 89. Eye area index 49. Eye ratio, posterior median eye = anterior lateral eye > anterior median eye = posterior lateral eye (6 : 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 one fourth of their diameter from the laterals. Anterior and posterior lateral eyes separated by one third of diameter of anterior lateral eyes. Median ocular quadrangle, height > posterior side > anterior side (14 : 12 : 11). Posterior median eyes oval. Chelicerae with three small promarginal teeth and without retromarginal tooth. Sternum and labium index 76 and 83, respectively. Legs; black long hairs ventrodistally on metatarsi III and IV. Leg formula 4123. Leg formular index 100 : 89 : 80 : 119. Leg I/c 2.41. Fem. I/c 0.72. Tib I/c 0.50. Met I/c 0.40. Met. I/tar. I 1.16. Met. IV/tar. IV 1.67. Fem. I l/d 2.89. Tib. I l/d 1.70. Pat. I+tib. I/c 0.93. Leg spination



Figs. 1-8. *Cladothela parva* Kamura, 1991(1-4) and *Cladothela unciinsignita* (Bösenberg and Strand, 1906).
 (5-8) : 1. left palp of male, ventral view; 2. ditto, retrolateral view; 3. epigynum, ventral view; 4. ditto, dorsal view; 5. left palp of male, ventral view; 6. ditto, retrolateral view; 7. epigynum, ventral view; 8. ditto, dorsal view.

pattern same as the male except the following: tibiae: III p2-1-1; IV d1-1-0, p2-1-1, r2-1-1; metatarsi II v2-1; III p1-2-1, r1-2-1; IV d0, v2-2-1. Abdominal index 59. Palp without a large hook on femur. Anterior epigynal ducts wide (Figs. 3-4).

Measurements (mm). Male/female: Body length 4.66/6.51; carapace length 2.17/2.52, width 1.68/1.93; cephalic width 0.88/1.12; sternum length 1.30/1.47, width 0.98/1.12; labium length 0.35/0.42, width 0.28/0.35; anterior eye row 0.41/0.49; posterior eye row 0.47/0.55; abdomen length 2.45/3.92, width 1.61/2.31.

Leg I 5.22/6.07 (1.54/1.82, 0.91/1.09, 1.12/1.26, 0.84/1.02, 0.81/0.88), II 4.77/5.40 (1.40/1.61, 0.84/0.98, 0.95/1.09, 0.84/0.95, 0.74/0.77), III 4.25/4.84 (1.19/1.40, 0.67/0.74, 0.77/1.84, 0.88/1.05, 0.74/0.81), IV 6.20/7.22 (1.68/1.93, 0.91/1.09, 1.23/1.40, 1.47/1.75, 0.91/1.05). Palp 2.10/2.36 (0.84/0.81, 0.35/0.46, 0.14/0.35, 0.77/0.74).

Distribution. China, Japan, Korea.

Cladothela unciinsignita (Bösenberg and Strand, 1906) (Figs. 5-8)

Drassodes unci-insignitus Bösenberg and Strand, 1906, p. 120, pl. 16, fig. 500 ; *D. unciinsignitus* Yaginuma, 1986, p. 190, fig. 105.5.

Prosthesima x-notata Bösenberg and Strand, 1906, p. 122, pl. 16, fig. 489.

Zelotes x-notatus : Yaginuma, 1986, p. 192, fig. 106.6.

Drassyllus x-notatus : Platnick, 1989, p. 471.

Cladothela unciinsignita : Kamura, 1991, p. 55, fig. 33-36.

Material examined. 1♂, 1♀, Jeo-dong (Ulleung-gun), 7 Aug. 2007 (B. K. Choi).

Description. Male: Carapace oval and reddish brown with black striae radiating from a short line median furrow; the index 74. Cephalic width index 60. Clypeus height 1.2 times to diameter of anterior median eyes. In dorsal view anterior eye row straight and posterior eye row procurved. Eye row index 93. Eye area index 55. Eye ratio, posterior median eye > anterior lateral eye > posterior lateral eye = anterior median eye (14 : 13 : 12). Anterior median eyes separated by about 0.4 times of their diameter, nearly contiguous from the laterals. Posterior median eyes nearly contiguous each other and separated by 0.36 times of their diameter from the laterals. Anterior and posterior lateral eyes separated by about radius of anterior lateral eyes. Median ocular quadrangle, height > posterior side = anterior side (34 : 29). Chelicerae with two minute promarginal teeth. Sternum and labium reddish brown; the index 77 and 80, respectively. Legs brown; ventrodistal parts of metatarsi III and IV with black long hairs. Leg formula 4123. Leg formular index 100 : 95 : 83 : 125. Leg I/c 2.07. Fem. I/c 0.62. Tib I/c 0.43. Met I/c 0.34. Met. I/tar. I 1.11. Met. IV/tar. IV 1.68. Fem. I I/d 2.71. Tib. I I/d 2.89. Pat. I+tib. I/c 0.79. Leg spination pattern: all

femora: d1-1; tibiae: III d(1)-0, p1-1-1, r0-1-0, v1-2-2; IV d1-1-0, p1-1-1-1, r1-1-1, v2-2-2; metatarsi: III d0-1-0, p1-1-1, r1-1-1, v2-0; IV d0-2-0, p1-1-2, r1-1-1, v2-2. Abdomen dark gray; the index 60. Palpal organ with long, curved embolus tapering apically; conductor twisted and flatten distally (Figs. 5-6).

Female: Carapace index 82. Cephalic width index 56. Clypeus height 0.7 times of the diameter of anterior median eyes. Eye row index 95. Eye area index 53. Eye ratio, anterior median eye > posterior median eye = anterior lateral eye > posterior lateral eye (15 : 14 : 12). Anterior median eyes separated by 0.47 times of their diameter. Posterior median eyes close each other and separated by 0.36 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 > anterior side > posterior side (37 : 31 : 30). Chelicerae with two small promarginal teeth. Sternum and labium index 83 and 95, respectively. Leg formula 4123. Leg formular index 100 : 93 : 81 : 119. Leg I/c 2.24. Fem. I/c 0.68. Tib I/c 0.48. Met I/c 0.36. Met. I/tar. I 1.20. Met. IV/tar. IV 1.72. Fem. I l/d 2.81. Tib. I l/d 2.91. Pat. I+tib. I/c 0.89. Leg spination pattern same as the male except the following: tibiae: IV r1-1-1-1; metatarsi IV d2-2-2, p0-1-1, r1-1-0, v0-2-2-1. Abdominal index 63. Epigynum with a pair of orifices, genitalia

with a pair of coiled spermathecae dorsally (Figs. 7-8).

Measurements (mm). Male/female: Body length 6.80/8.70; carapace length 3.05/3.30, width 2.25/2.70; cephalic width 1.35/1.50; sternum length 1.75/1.80, width 1.35/1.50; labium length 0.52/0.53, width 0.42/0.51; anterior eye row 0.69/0.75; posterior eye row 0.74/0.79; abdomen length 3.50/4.80, width 2.10/3.00.

Leg I 6.30/7.40 (1.90/2.25, 1.10/1.35, 1.30/1.60, 1.05/1.20, 0.95/1.00), II 5.98/6.85 (1.73/2.00, 1.05/1.25, 1.25/1.40, 1.00/1.15, 0.95/1.05), III 5.20/6.00 (1.45/1.70, 0.85/1.00, 0.95/1.10, 1.15/1.25, 0.80/0.95), IV 7.88/8.80 (2.10/2.40, 1.10/1.30, 1.60/1.70, 1.93/2.15, 1.15/1.25). Palp 2.40/2.85 (0.85/1.00, 0.45/0.60, 0.20/0.45, 0.90/0.80).

Distribution. Japan, Korea.

References

- Boesenbergs, W. and E. Strand, 1906. Japanische Spinnen. Abh. Senck. naturf. Ges. 30: 93-422.
- Kamura, T., 1991. A revision of the genus *Cladothela* (Araneae: Gnaphosidae) from Japan. Acta Arachol., 40: 47-60.
- Paik, K. Y., 1992. Korean spiders of the genus *Cladothela* Kishida, 1928 (Araneae: Gnaphosidae). Korean Arachnol., 8: 33-45.
- Platnick, N. I., 1989. Advances in Spider Taxonomy 1981-1987: A Supplement to Brignoli's A Catalogue of the Araneae described between 1940 and 1981. Manchester Univ. Press.
- Platnick, N. I. 2008. The world spider

- catalog, version 9.0. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>
6. Song, D. X., M. S. Zhu and F. Zhang, 2004. Fauna Sinica: Invertebrata Vol. 39: Arachnida: Araneae: Gnaphosidae. Science Press, Beijing.
 7. Yaginuma, T., 1986. Spiders of Japan in color (new ed.). Hoikusha Publ. Co., Osaka.
 8. Zhang, F., D. X. Song and M. S. Zhu, 2002. Two species of the genus *Cladothela* from China (Araneae: Gnaphosidae). *Acta Zootaxon. Sin.*, 27: 241-245.
 9. Zhang, Y. J., C. M. Yin and Y. H. Bao, 2004. One new and one newly recorded species of the genus *Cladothela* from China (Araneae, Gnaphosidae). *Acta Zootaxon. Sin.*, 29: 83-86.

발효한약의 특성분석

姜東希·高僖鮮·金現洙
啓明大學校 自然科學大學 微生物學科

Characterization of Fermented Herbal Medicine

Dong Hee Kang, Hee Sun Ko and Hyun Soo Kim

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

요 약. 한약의 발효로부터 기능성 물질의 생산가능성을 검토하기위하여 4종류의 유용균주를 발효에 사용하였다. 효소생산을 검토하기 위해서 아토피치료용으로 조제한 한약에 Black sugar의 첨가 및 미첨가, 또는 propolis를 첨가하여 사용하였으며, 공시균으로는 전배양한 *Sacch. cerevisiae*, *Lb. acidophilus*, *B. subtilis* sub. *subtilis*와 *Bacillus* sp. 6-1을 사용하였다. 발효된 한약에서 α -amylase, glucoamylase, cellulase와 fibrinolytic enzyme은 생산이 되지 않았으나 protease 생산은 미발효 한약 보다 다소 우수하였다. 또한 *Sacch. cerevisiae*와 *Bacillus* sp. 6-1로 배양한 한약에 *B. subtilis* sub. *subtilis* 전배양액을 접종하여 혼합배양(coculture)한 결과 배양 7일째에 protease 활성이 가장 높았다. 혼합배양한 한약의 Ethyl ether 추출물은 시험균인 *Bacillus subtilis*와 *E. coli*에 대한 저지원이 21 mm 이상으로 높은 항균활성을 보였다.

Abstract. The purpose of this study was to investigate the production of functional materials from fermented herbal medicine. The herbal medicine with black sugar and propolis was fermented using 4 strains of *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus subtilis* sub. *subtilis*, *Bacillus* sp. 6-1 and *Lactobacillus acidophilus* for 5days. Protease production of the fermented herbal medicine was higher than that of original herbal medicine. The fermented herbal medicine with *Saccharomyces cerevisiae* and *Bacillus* sp. 6-1 was cocultured with *Bacillus subtilis* sub. *subtilis* for 7days. The protease activity of the cocultured herbal medicine was the highest in 7days. The ethyl ether extracts of this cocultivation strongly inhibited the growth of *Bacillus subtilis* and *E. coli*, which represented the clear zone size of above 21 mm from paper-disc agar diffusion method.

I. 서 론

최근 생활수준의 향상으로 동·서양 모두 건강에 대한 관심이 높아졌으며 고령화 사회로의 진입, 식습관에서 기인하는 만성 질환의 증가, 식품의 유효성분에 의한 건강 증진 효과 및 질병예방의 효과 등이

연구로 증명되면서 식품에 대한 소비자의 요구수준이 높아지고 있다. 따라서 소비자는 과거 식품의 고유기능으로 평가되던 영양에 관한 1차 기능과 기호에 관한 2차 기능에 만족하지 않고 식품의 3차 기능인 생체방어·생체리듬에 대한 관심이 증대되면서(1), 밤, 당근 및 쌀 등과 같은 식물성 소재를 이용하거나, 홍화, 홍삼 및 동충하

초등의 약용식물을 이용한 다양한 기능성 제품이 출시 또는 연구되고 있다(2, 3).

식물추출물 발효식품은 건강식품에 속하는 제품유형으로 식품공전 상에 등재되어 있으며, 일반적으로 여러 가지 식물성 원료에 당을 첨가하거나 유산균 등의 미생물을 첨가하여 발효시킨다. 현대인들이 많이 접하게 되는 가공식품은 제조과정에서 효소들이 파괴되기 쉽고, 식품첨가물이나 화학성분들도 효소기능을 약화시키게 되므로 현대인의 식생활은 효소가 많이 부족해지기 쉽다. 식물체에는 여러 가지의 효소가 함유되어 있으며 식물추출액을 발효시키면 많은 효소들이 활성화되어 여러 가지 생화학반응을 일으킴으로써 식물체의 영양성분이 소화, 흡수되기 쉬운 형태로 변환될 수 있으며, 효소작용으로 생성된 성분들에 의해 새로운 생리조절기능을 발현할 수 있다. 또한 효소자체를 섭취함으로써 체내에서 신진 대사 기능을 촉진하게 된다(4).

식물에는 다양한 항균물질이 존재하는 것으로 알려져 있는데 식물에 들어 있는 항균 물질은 alkaloid류, flavonoid류, terpenoid류, phenolic compound류, quinone류 및 volatile oil 등의 2차 대사산물이거나 그 유도체들이다(5). 그러나 이러한 천연항균 물질의 항균효과가 합성된 항생제에 비해 효과가 뛰어나지 않기 때문에 아직까지 실용화되는 경우는 많지 않은 실정이다. 국내에서 천연물로부터 항균성 물질의 개발에 관한 연구는 주로 의약품과 천연보존제의 용도로서 단백질, 유기산, 지방산,

향신료, 생약추출성분 등을 대상으로 주로 이루어져 왔다. 한약재의 항균횤과는 동양 여러 나라에서 이용되는 상용 한약 400여 종을 처방빈도가 높은 순으로 하여 연구(6)되기도 했으며, 최근에는 이들 중 항균성이 있는 한약재에 관한 연구가 활발하게 진행되고 있다(7, 8, 9, 10, 11).

본 연구는 전통한약재의 기능성 물질 생산의 일환으로 한약의 발효를 통하여 소화흡수의 개선 등 한약의 애호점 해결 및 생물전환에 의한 우수한 기능성 물질의 생산 가능성을 검토하고자 하였다. 열수추출한 한약(아토피 치료용)에 당과 propolis를 첨가한 후 항균활성을 확인하였으며, *Saccharomyces cerevisiae*, *Bacillus* sp.와 *Lactobacillus acidophilus*를 배양시켜 α -amylase, glucoamylase, cellulase와 protease 생산을 검토하였다. 또한 *Sacch cerevisiae*와 *Bacillus* sp. 6-1이 함유된 한약에 *Bacillus subtilis* sub. *subtilis*를 배양시켜 protease 생산을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 사용배지 및 균주

본 실험에 사용한 한약은 한약재를 열수추출 후 black sugar와 propolis를 각각 첨가하여 사용하였다. 한약 발효를 위해 본 실험실 보유균주인 *Saccharomyces cerevisiae*와 *Lactobacillus acidophilus*, 청국장에서 분리한 *Bacillus subtilis* sub. *subtilis*와 *Bacillus* sp. 6-1을 각각 YM 배지(yeast extract 3 g, malt extract 3g, dextrose 10 g, peptone 5 g/l, pH 7.6),

lactobacilli MRS 배지(proteose peptone No.3 10 g, beef extract 10 g, yeast extract 5 g, dextrose 20 g, polysorbate 80 1 g, ammonium citrate 2 g, maganessium sulfate 0.1 g, manganesse sulfate 0.05 g, dipotassium phosphate 2 g, sodium acetate 5 g/l, pH 6.5), Nutrient 배지(beef extract 3 g, peptone 5 g/l, pH 6.8)에 전배양한 후 사용하였다.

2. 효소 생산을 위한 배양 조건

2.1 Black sugar와 propolis가 첨가된 한약
본 실험에 사용한 한약은 아토피 치료용으로 조제한 한약을 사용하였으며, black sugar 첨가 및 미첨가, propolis 첨가의 한약 110 ml에 전배양한 공시균 *Sacch cerevisiae*, *Lb. acidophilus*, *B. subtilis* sub. *subtilis* 와 *Bacillus* sp. 6-1을 각각 8×10^7 CFU/ml, 6×10^7 CFU/ml, 6×10^7 CFU/ml와 7×10^7 CFU/ml되게 조정하여 1ml씩 접종하였다. *Sacch cerevisiae*는 27°C, *B. subtilis* sub. *subtilis*와 *Bacillus* sp. 6-1은 37°C, 180rpm에서 진탕 배양하였고, *Lb. acidophilus*는 37°C에서 정치 배양하였다.

2.2 한약의 혼합배양(Coculture)

B. subtilis sub. *subtilis* 전배양은 300 ml Nutrient 배지에 100 µl 접종한 후 37 °C, 180rpm으로 14시간동안 배양하였다. 본배양은 *Sacch cerevisiae*와 *Bacillus* sp. 6-1로 전배양한 발효한약에 *B. subtilis* sub. *subtilis* 전배양액(6.0×10^7 CFU/ml)을 1% 첨가하여 37°C, 180 rpm에서 배양하였으며, 7일간 sampling을 하였다.

3. 조효소액 조제

각 배양액은 3,000rpm에서 10분간 원심 분리하여 상등액을 80% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 로 침전 시킨 후 0.1 M potassium phosphate buffer로 투석하여 조효소액으로 사용하였다.

4. 효소 생산 검토

4.1 α -Amylase 생산

α -Amylase 활성은 40 mM acetate buffer(pH 5.0)에 용해시킨 1% soluble starch 2 ml를 40°C에서 5분간 예열하고, 조효소액 0.1 ml를 취하고, 40°C에서 30분간 반응시킨 반응액 0.1 ml를 취하여 0.00025 N 요오드 용액 10 ml에 첨가하여 효소반응을 정지시켰다. 이 반응액을 UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 670 nm에서 흡광도를 측정한 후, Wohlgemuth value에 준한 아래의 식에서 효소의 활성도(unit)를 산출하였다(12).

$$U(\text{units/g}) = \frac{12.75 \times (T_{30\text{min}} - T_{0\text{min}})}{30\text{min}}$$

4.2 Glucoamylase 생산

측정은 50 mM phosphate buffer(pH 7.0)에 용해시킨 1% soluble starch solution 0.25 ml에 조효소액 0.25 ml을 넣고 37°C에서 5분간 반응시킨 후 DNS(Dinitrosalicylic acid) 방법(13)에 의해 glucose를 표준물질로 하여 550 nm에서 흡광도를 측정, 비색 정량 하였으며, 효소단위는 1분에 1 µmole의 glucose에 상당하는 환원당을 유리하는 효소량을 1 unit로 하였다.

4.3 Cellulase 생산

조효소액 1 ml와 종류수로 용해시킨 2%

CMC(Carboxymethyl cellulose sodium) 1 ml를 혼합하여 40°C에서 40분간 반응시킨 후 100°C에서 10분간 가열하여 반응을 정지시켰다. CMC 가수분해로 생성된 환원당은 DNS(Dinitrosalicylic acid) 방법(13)에 따라 550 nm에서 흡광도를 측정, 비색정량 하였으며, 40분간 1 μ mole의 환원당을 생성하는 효소량을 1 unit로 표시하였다.

4.4 Protease 활성

Protease 생산은 Nomoto와 Lee에 의한 casein법(14)을 변형하여 확인하였다. 조효소액 0.2 ml와 0.6% casein이 함유된 50 mM phosphate buffer(pH 7.0) 1 ml를 혼합한 후 65°C에서 30분간 반응을 시킨 다음 15% TCA 용액 0.4 ml을 첨가한 후 실온에서 15분간 방치하여 반응을 중지하였다. 반응액을 12,000 rpm으로 5분간 원심분리 하여 상동액을 filter paper (ϕ 70 mm, Whatman Co.)를 사용하여 여과한다음 여과액 0.5 ml, Na₂CO₃ 2.5 ml와 folin 0.5 ml를 가하여 38°C에서 30분간 발색시켰다. 발색 후 UV-Vis spectrophotometer를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다. Protease의 1 unit는 1분간 tyrosine 1 μ g을 생성하는 효소량으로 하였다.

Tyrosine 표준곡선을 작성하기 위하여 농도별로 희석한 tyrosine 0.5 ml, Na₂CO₃ 2.5 ml와 folin 0.5 ml를 가하여 38°C에서 30분간 발색시킨 후 UV-Vis spectrophotometer

를 사용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였다.

4.5 Fibrinolytic enzyme 생산 검토

Fibrinolytic enzyme 생산은 Astrup와 Mllertz(15)의 fibrin plate assay를 변형하여 확인하였다. Fibrin plate를 만들기 위해 fibrinogen (Sigma Co.) 50 mg/ml과 thrombin (Sigma Co.) 100 NIH U/ml을 20 mM tris-HCl buffer (pH 8.0)에 녹여 사용하였다. Gel 상태로 만들기 위해 20 mM Tris-NaCl (0.15 M) buffer에 agar 0.75% (w/v)를 넣어 고압증기멸균 (121°C, 15min) 후 50°C ~ 60°C가 유지되도록 하였다. Plate에 thrombin 16 μ l와 agar가 포함된 20 mM tris-NaCl buffer 10 ml에 20 mM tris-HCl buffer로 녹인 fibrinogen 5 ml를 혼합한 후 plate에 분주하여 실온에서 10분간 방치 후 assay plate를 만들었다. 조효소액은 균배양액을 원심 분리한 후 얻은 상등액을 사용하였다. 조효소액 20 μ l를 paper disc (ϕ 6 mm, Whatman Co.)에 분주하여 fibrin plate에 얹고 37°C에서 18시간 반응시켜 clear zone의 생성 유무를 확인하였다. 변이처리 균주와 미처리 균주가 생산하는 혈전 용해 효소의 활성을 비교하기 위하여 clear zone의 직경을 비교하였다.

5. 발효한약의 항균력 검토

Black sugar 첨가 및 미첨가 한약과 propolis 첨가 한약 110 ml에 ethyl acetate를 1:2로 첨가하여 추출하고 그 여액을

ethyl ether로 추출한 후 Na_2SO_4 로 수분을 제거하여 filter paper로 여과하고 evaporator로 농축하였다.

항균성 물질의 확인은 agar diffusion법을 사용하였다. 농축액을 20 μl 씩 paper disc(ϕ 6mm, Advantec Co.)에 분주하여 건조한 후 *E. coli*와 *B. subtilis*가 함유된 평판 배지 위에 얹고 37°C, 12시간 배양하여 생성된 inhibitory zone의 유무 및 크기로서 판단하였다.

III. 결과 및 고찰

1. Black sugar와 propolis가 첨가된 발효한약

1.1 효소 생산 검토

발효한약으로부터 제조한 조효소액(0.1 ml)의 효소생산을 검토하기 위하여 먼저 α -amylase, glucoamylase, cellulase 및 Fibrinolytic enzyme 생산을 검토하였다.

한약에 균주를 접종하지 않은 것과 접종한 것을 비교한 결과 차이가 없었으며(결과 미개재), 한약을 발효 시 α -amylase, glucoamylase, cellulase와 fibrinolytic enzyme는 생산이 되지 않는 것으로 추정된다. 반면 protease 생산을 검토한 결과 Table 1에서 보는 바와 같이 미접종시에 비해 한약에 *Lactobacillus acidophilus*, *B. subtilis* sub. *subtilis*와 *Bacillus* sp. 6-1을 접종 후 배양하였을 때 첨가된 당의 종류에 관계없이 효소생산이 다소 우수하였다. 그러나 *Sacch cerevisiae*의 경우 효소생산이 미흡하였다(결과 미개재).

2. 혼합배양(Coculture)

2.1 생육확인

*Sacch cerevisiae*와 *Bacillus* sp. 6-1로 각각 전배양한 한약을 각각 *B. subtilis* sub. *subtilis*로 발효(혼합배양)시켜 현미경으로

Table 1. Protease production of the fermented herbal medicine

	Test samples	Incubation time(days)		
		1	3	5
A	control	0.112*	0.139	0.109
	<i>B. subtilis</i> sub. <i>subtilis</i>	0.124	0.229	0.110
	<i>Bacillus</i> sp. 6-1	0.185	0.150	0.077
B	<i>Lb. acidophilus</i>	0.199	0.166	0.064
	control	0.119	0.102	0.032
	<i>B. subtilis</i> sub. <i>subtilis</i>	0.104	0.232	0.219
C	<i>Bacillus</i> sp. 6-1	0.141	0.145	0.120
	<i>Lb. acidophilus</i>	0.177	0.125	0.093
	control	0.097	0.131	0.073
	<i>B. subtilis</i> sub. <i>subtilis</i>	0.200	0.144	0.169
	<i>Bacillus</i> sp. 6-1	0.235	0.221	0.133
	<i>Lb. acidophilus</i>	0.150	0.216	0.082

*; ABS

A; Black sugar free, B; Black sugar addition, C; Propolis addition
control; Non-inoculation

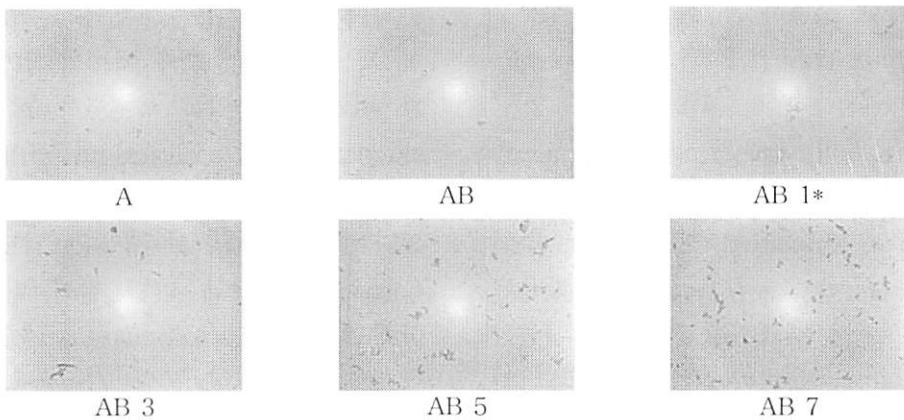


Fig. 1. A microscopic examination of the fermented herbal medicine
A; Contain of *Sacch cerevisiae*; B; Inoculation of *B. subtilis* sub. *subtilis*
*: Incubation time(days)

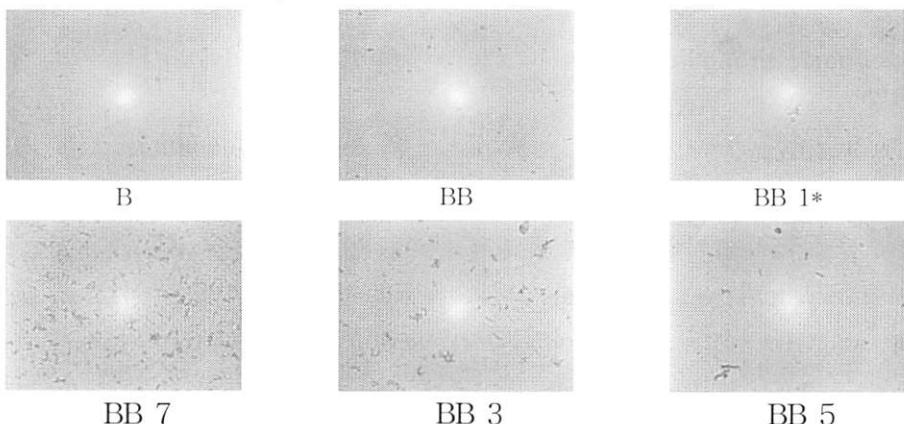


Fig. 2. A microscopic examination of the fermented herbal medicine
B; Contain of *Bacillus* sp. 6-1, BB; Inoculation of *B. subtilis* sub. *subtilis*
*: Incubation time(days)

확인한 결과 Fig. 1과 Fig. 2에서 보는 바와 같이 발효될수록 균수가 증가하는 것으로 나타났다.

2.2 혼합배양에 따른 Protease 활성 검토

Protease 활성측정을 위한 Tyrosine 표준곡선은 Fig. 3에서 보는 바와 같다.

B. subtilis sub. *subtilis* 혼합배양에 의한 Protease 생산을 검토한 결과 Table 2에서 보는 바와 같이 *Sacch cerevisiae*로 전배

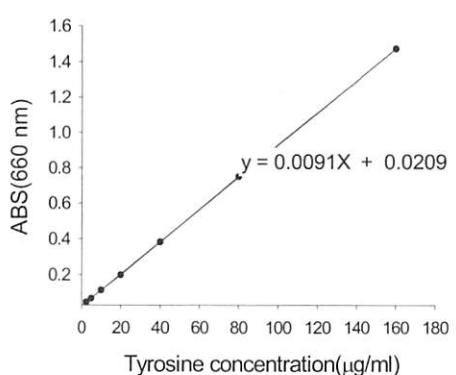


Fig. 3. Tyrosine standard curve

Table 2. Protease activity of the cocultured herbal medicine

Test samples	Incubation time(days)	-*	0	1	3	5	7
		Protease activity(U)					
A		0.630	0.588	0.638	0.704	0.726	0.896
B		0.726	0.734	0.91	1.172	1.15	1.694

*-; Non-inoculation of *B. subtilis* sub. *subtilis*A; The herbal medicine containing *Sacch. cerevisiae*, B; The herbal medicine containing *Bacillus* sp. 6-1

양한 한약보다 *Bacillus* sp. 6-1로 전배양한 한약이 배양일수에 따라 더 높은 protease 활성을 보였으며 배양일수에 따라 protease 활성이 증가하여 배양 7일째 가장 높았다.

3. 혼합배양한 발효한약의 항균활성

공시균인 *B. subtilis* sub. *subtilis*와 *Bacillus* sp. 6-1를 사용하여 black sugar 첨가 및 미첨가 한약과 propolis 첨가 한약을 발효 시킨 후 ethyl acetate와 ethyl ether로 추출하여 농축한 결과는 Table 3에서 보는

바와 같다. 추출물의 항균활성은 Table 4에서 보인 바와 같이 black sugar가 첨가되지 않은 한약의 ethyl acetate 추출물(0.213 g/ml)보다 ethyl ether 추출물(0.065 g/ml)이 더 높은 항균활성을 보였다. Black sugar와 propolis가 첨가된 한약의 ethyl ether 추출물은 ethyl acetate 추출물보다 농도가 높으며, 항균활성이 높았다. Black sugar 첨가 및 미첨가 한약과 propolis 첨가 한약의 항균활성은 ethyl acetate로 추출한 것과 ethyl ether로 추출한 것을 비

Table 3. Concentration of condensed herbal medicine

Solvent	A	B	C
	Concentration(g/ml)		
Ethyl acetate	0.213	0.004	0.116
Ethyl ether	0.065	0.009	0.46

A; Black sugar free, B; Black sugar addition, C; Propolis addition

Table 4. Antibacterial activity of the fermented herbal medicine

Test strains	Solvent	A	B	C
		Inhibitory zone(φ mm)		
<i>B. subtilis</i>	EA	+*	+	+
	EE	++	+++	+++
<i>E. coli</i>	EA	+	+	+
	EE	+++	+++	+++

A; Black sugar free, B; Black sugar addition, C; Propolis addition, EA; Ethyl acetate, EE; Ethyl ether
*+; 5~10 mm, ++; 11~20 mm, +++; above 21 mm, -; Non-inhibition

교하였을 때 ethyl ether로 추출한 것이 더 높았다.

참고문헌

- Jong Hyun Han, You Jin Song and Sung Hye Park. Development of drink from composition with medicinal plants and evaluation of its physiological function in aorta relaxation. *J. Korean Oriental Physiology & Pathology*: 18(4): 1078-1082. (2004).
- Park SY, Ko YT, Lee JY, Mok CK, Park JH, Ji GE. Fermentation of carrot juice by *bifidobacterium*. *J. Korea Food Sci. Technol.* 39: 571-575. (1997).
- Cha SK, Hong SS, Ji GE, Mok CK, Park JH. Isolation of macrophage-activation *bifidobacterium* for the manufacture of fermented rice products. *J. Korean Appl. Microbiol. Biotechnol.* 27: 509-514. (1999).
- Na-Mi Kim, Jong-Won Lee, Jae-Ho Do and Jae-Won Yang. Effects of the fermentation periods on the qualities and functionalities of the fermentation broth of wild vegetables. *J. Korean Food Sci. Technol.* 35(2): 272-279. (2003).
- Kang JM, Cha IH, Lee YK, Ryu HS. Identification of volatile essential oil, and flavor characterization and antimicrobial effect of fractions from *Houttuynia cordata* thunb. *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 26: 209-213. (1997).
- 정시련. 상용 한약의 항균효과. *대한약사회지*. 4(2): 77-80. (1993).
- 이성규. 가축질병 균주에 대한 소목의 항균활성. *J. Korean Microbiol. Biotechnol.* 31(3): 242-249. (2003).
- Il Choi, Jae-Yong Cho and Sang-Cheol Lim. Antimicrobial activity of medicinal herbs against *Staphylococcus aureus*. *J. Korean Plant Res.* 19(4): 491-496. (2006).
- Chang, Hyung Soo, Choi, Il. *Escherichia coli*에 대한 한약재의 항균활성. *J. Korean Community Living Science* 18(2): 293-300. (2007).
- 권오근, 손진창, 김상철, 정신교, 박승우. 목단피 추출물의 항균 및 항산화 작용. *한국식품유통학회지*. 5: 281-285. (1998).
- 조성환, 김영록. 황금추출물의 항균특성. *한국식품영양과학회지*. 30(5): 964-968. (2001).
- 이상훈, 정혁준, 여수환, 김현수, 유대식. 신종 누룩사상균, *Aspergillus coreanus* NR 15-1의 α -Amylase의 효소학적 특성. *J. Korean Biotechnol. Bioeng.* 19(4): 301-307. (2004).
- Bernfeld, P. Amylase, α and β , method in Enzymology, 1: 149-158. (1955).
- Oh, Sung-Hoon and Pyong-Su O. Screening of *Bacillus* sp. No. M-71

with High Alkaline Protease Productivity and Some Properties of the Enzyme. *J. Korean Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19(1): 1-7. (1991).

15. Astrup, T. and S. Millertz., The fibrin plate method for estimating fibrinolytic activity. *Arch Biochem Biophys.* 40: 346-351. (1952).

총각김치에서 분리한 유산균 *Leuconostoc mesenteroides* 1B12 균주에 대한 연구

권오식

계명대학교 자연과학대학 미생물학과

A Study on the *Leuconostoc mesenteroides* 1B12 Strain Isolated from Chonggak-Kimchi

Oh-Sik Kwon

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

요약. 총각김치에 분리한 유산균 1B12의 5탄당 발효능은 공시균인 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505와 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 일치하였다. 또한 분리균주의 6탄당 발효패턴은 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 동일함을 확인할 수 있었다. 이러한 경향은 당발효 시험을 위하여 사용된 이당류, 삼당류 및 복합당에서도 같은 결과를 보여 주었다. 특이적으로 테스트한 아종이 같은 공시균인 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505는 분리균과 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 6탄당인 galactose, 이당류인 cellobiose, lactose 그리고 복합당인 amygdalin, esculin 등에서 발효능의 현격한 차이를 보여주었다. 그러나 유전학적 기법인 random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석법으로 유전체 수준에서 동정한 결과, 이들은 모두 *Leuc. mesenteroides* 아종임에도 불구하고 의미있는 차이를 보여주었다. 특히 P152 실험 결과, 각 균만이 가지는 고유의 RAPD DNA 밴드가 나타났다. 따라서 총각김치에서 분리한 유산균인 1B12 균주는 당발효 특성상 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 동일하지만 유전체적 특성이 다른 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*로 확인되었다.

Abstract. Pentose fermentation ability of the lactic acid bacteria 1B12 isolated from chonggak-kimchi was identical to *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505 and *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722 of type strains. Hexose fermentation pattern of the isolate was exactly same as *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722. Fermentation results from disaccharide, trisaccharide and complex carbohydrates revealed very much identical tendency. Unexpectedly, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505 showed quite different fermentation patterns with the isolate 1B12 and *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722 in galactose, cellobiose, lactose, amygdalin and esculin. However, from a genetical method applied, all three strains of *Leuc. mesenteroides* showed very typical RAPD-PCR band patterns that implied significant discrepancy among them. Especially, the results of P152 revealed very typical RAPD DNA bands that originated from every *Leuc. mesenteroides*. Therefore, it was confirmed that the isolate 1B12 was identical to *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722 in fermentation characteristics but different from it in genomic nature.

I. 서 론

*Leuconostoc*은 인간에게 매우 유용한 프로바이오틱균(probiotics; 7, 8, 9)으로 특히 동식물의 표면에서도 쉽게 발견되며(2, 3, 4) *Lactobacillus* 및 *Pediococcus*와 계통발생학적인 관계가 있는 유산균으로 당발효에 있어 많은 특성을 함께 공유한다(14, 16). *Leuconostoc*은 그람 양성균으로 포자를 생성하고 운동성이 없으며(1, 13) 또한 이 균은 최적생육을 위하여 매우 복잡한 영양조건을 요구하며 채소, 낙농 유제품, 고기 등의 다양한 발효 음식물에서 발견되고 있다(13, 14, 15). 잘 알려져 있는 *Leuconostoc*은 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*, *Leuc. mesenteroides* subsp. *dextramicum*, *Leuc. lactis* 및 *Leuc. paramesenteroides*로 특히 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*는 exopoly-saccharides를 생산하기 때문에 설탕제분에 있어서 주요한 오염물질이다(12). *Leuc. lactis*는 우유에서 우점종으로 존재하는 leuconostocs 균으로 유제품을 발효시킨다(13).

본 실험에서 이용된 *Leuc. mesenteroides* 균들은 한국인에게 있어서 매우 중요한 발효식품인 여러 가지 김치 등에서 흔히 발견되고 있는데, 이 균들의 존재 때문에 식품의 보존성 향상, 풍미와 영양 증진 및 건강 효과(2, 3)를 기대할 수 있다. 지금까지 잘 알려진 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(8, 9, 10).

따라서 많은 유산균학자들은 이들의 유용성을 인간에게 이용하기 위하여 새로운 유산균

들을 분리하여 동정하고 있다. 이에 우리는 한국인들에게 아주 필수적인 식품이며 전통 발효 식품인 김치의 숙성 초기와 중기에 많이 발견되며(3, 4) 맛과 향미를 결정하는 중요한 유산균인 *Leuconostoc* 균을 총각김치에서 분리하였다. 또한 분리한 균의 아종(subspecies) 결정을 위하여 대조군으로 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505와 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722 균주와 당 발효능을 비교 조사하였다. 추가로 분리한 *Leuc. mesenteroides* 균의 유전적 속성을 확인하기 위하여 이들로부터 intact한 chromosomal DNA를 추출하여 분자유전학적 기법인 RAPD-PCR법으로 비교분석하여 보았다.

II. 재료 및 방법

공시 균주. 본 실험에서 사용한 공시균주는 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505와 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722로 한국생명공학연구원(KCTC, 대전)에서 분양받았다. 균주는 MRS(Difco) 배지에 계대배양 후 glycerol이 20% 포함된 저장액에 넣어 -80°C deep freezer에 보관하여 사용하였다.

분리 균주. *Leuconostoc* 균을 분리하기 위하여 총각김치를 멸균 증류수를 이용하여 혼탁한 후 이 용액을 10ml 취하여 6% NaCl용액 10ml를 섞어 3% NaCl 용액으로 만들었다. 그리고 이 용액을 10⁻³배로 희석하여 2% 한천이 첨가된 MRS 평판배지에 배양하였으며, 일정한 수의 콜로니가 확인되면 계대배양 후 각 균주들을 4°C 냉장고에 보관하였다. 이 콜로니를 이용하여 세로운 MRS agar 선택 배지에 도말하였으며, 얹어진 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 글리세롤이 포함된 저장 용액에 혼탁하여 액체 질소를 이용하여 급속 동결시킨 후 -80°C deep freezer에 보관하여 사용하였다. 또한 공시균과 분리 균주들은 일 차적으로 MRS 배지(Difco)를 이용하여 배양 하였다. 이들의 생육특성을 결정하기 위하여 균 적정 생육온도(18°C)로 조정한 냉장배양기 (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. 배양액 중 상청액의 수소 이온 농도는 pH meter(Mettler, Model 225)로 측정하여 균 생육의 지표로 이용하였다.

내염성 테스트. *Leuconostoc* 균주들의 내염성을 조사하기 위하여 MRS broth(Difco)에 NaCl을 첨가하여 최종 1%, 2%, 4%, 6% 및 8%의 농도로 제조한 후 배지 10 ml당 공시균 주 20 ul를 접종하였다. 적정 배양 온도에서 3 일간 배양한 후 4°C에서 15분간 원심 분리(3,000 rpm)하고 pH meter로 상청액의 pH를 측정하였다.

당 발효 테스트. 이들 균주들의 당 발효 특성을 조사하기 위하여 glucose가 첨가되지 않는 MRS 배지(2)를 특별히 제조하여 사용하였다. Glucose가 첨가되지 않는 MRS broth에 10% 당 stock solution을 첨가하여 가압멸균하여 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 원심 분리한 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).

***Leuconostoc* Chromosomal DNA 추출.** *Leuconostoc* 균주의 chromosomal DNA를 추출하기 위하여 효소 처리에 의한 DNA 분리 방법인 Luchansky *et al.*(14)의 방법을 이용하였다. 즉, MRS 배지에서 3일간 생육한 균들을 15 ml PP 원심분리관(Corning)에 넣어 원심분리한 후, 상청액을 버리고 얻어진 cell pellet 을 TES buffer(50 mM NaCl, 30 mM Tris, pH 8.0, 5 mM EDTA)로 2번 세척하였다. 세척된 *Leuconostoc* 균의 세포막을 파괴시키기 위하여 이들을 1 ml의 뮤타노라이신 벼페에 혼탁 시킨 후 10 ul의 뮤타노라이신(10,000 unit/mg, Sigma Chemical Co.)을 처리하여 37°C water bath에서 배양하였으며, 25 ul의 라이소자임(400 mg/ml, Sigma Chemical Co.)을 첨가한 후 다시 2시간 배양하고 500 ul의 0.25 M EDTA를 첨가하였다. 이후 200 ul의 25% SDS 용액을 가한 후 65°C heat block에 배양하고 20 ul의 Proteinase K(20 mg/ml)를 첨가하여 15분간 실온에 방치하였다. 이 세균 파쇄액에 동량의 phenol을 첨가하여 잘 섞은 후 2,500 rpm으로 15분간 원심 분리하였으며, 얻어진 상청액은 멸균된 15 ml 원심분리관에 넣고 동량의 phenol:chloroform(1:1) 용액으로 2회 처리하였다. 원심분리 후 얻어진 상청액은 250 mM

의 NaCl 용액으로 만들고 최종 부피의 2배에 해당하는 cold ethanol(100%, Merk)을 첨가해 -20°C 냉동고에서 밤새 장치시켰다. 이를 2번 수세한 후, 얻어진 DNA pellet은 회전 진공건조기(Biotron Model 3180)를 사용하여 30분간 말렸다.

RAPD-PCR. 본 실험에 사용된 random primer는 서로 다른 염기서열을 가진 10-mer 길이의 oligonucleotide(P100: GGGGCTGGCG, P101: GCGGCTGGAG, P125: GCGGTTGAGG, P149: AGCAGCGTGG, P152: CGCACCGCAC)로 바이오나이(대전)에서 주문하여 사용하였다. PCR 반응은 10 mM Tris-HCl(pH 8.4), 50 mM KCl, 3.0 mM MgCl₂, 0.001% gelatin, 각 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP(Sigma Chemical Co.), 200 pmol primer, 200 ng *Leuconostoc* chromosomal DNA 및 1.0 unit *Taq* DNA polymerase(Applied Biosystems) 등을 총 부피가 20 μ l로 만들고 automatic thermocycler(AB GeneAmp 2700)를 이용하여 PCR(polymerase chain reaction)을 시행하였다. PCR 반응조건은 94°C/1분, 40°C/1.5분, 7 2°C/2분이며 반응 횟수는 40 cycles로 하였다. 또한 PCR 반응 후 *Taq* DNA polymerase의 최종 중합반응을 돋기 위하여 72°C에서 7분간 더 배양 하였다.

한천 젤 전기영동법 및 UV 사진 PCR 반응의 결과를 확인하기 위하여 반응액 10 μ l에 2 μ l의 gel loading buffer(blue juice)와 잘 섞은 후 2.0% 한천 젤을 사용하여 전기영동을 실시하였다. DNA 염색을 위해 agarose gel 100 ml에 ethidium bromide(10 mg/ml) 5 μ l을 첨가하였다. 전기영동은 power supply(EC model 105)를 이용하였으며, 80 volts constant로 5~

6시간 진행한 후 UV transilluminator(Vilber Loumat TFX20M)를 이용하여 얻어진 random amplified polymorphic DNA(RAPD) band 모습을 Polaroid film(type 667)으로 촬영하였다. UV 사진에 나타나는 RAPD DNA band의 크기를 확인하기 위하여 DNA marker로 *Hae*III로 제한 처리된 ϕ X174 RFI DNA(0.25 ug)를 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

내염성 테스트. 유산균인 *Leuconostoc* 균은 내염성이 비교적 강한 세균으로 알려져 있기 때문에 본 실험에서는 분리균인 1B12를 포함하는 3종의 *Leuconostoc* 균주의 내염성을 조사하였다. 이를 위하여 액체 배양 배지에 NaCl을 1%~8%의 농도로 첨가하여 이들의 균생육 정도를 비교해 보았다. 그 결과 Fig. 1에서 보는 것처럼 *Leuconostoc* 균들은 모두가 1%~6%의 NaCl이 첨가된 배지에서 잘 생육

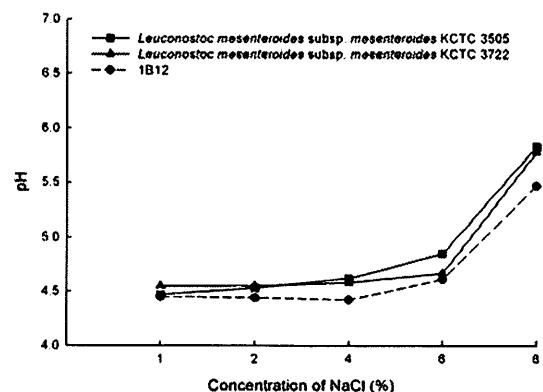


Figure 1. Comparison of the of the three *Leuconostoc* strains growing at different NaCl concentrations (2%, 4%, 6%, and 8%). In this case, the increasing pH values indicate growth inhibition occurred by NaCl. *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(■), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲) and 1B12(●) isolated from Chonggak-kimchi.

하였다(pH 5.0 이하). 하지만 8%의 NaCl이 첨가된 배지에서 배양한 경우 확연히 균생육이 배지의 높은 NaCl 농도로 인하여 균생육이 저해됨을 알 수 있었다. 공시균인 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(■)와 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲)는 생육 최종 pH가 5.8 이상으로 나타난 반면 총각김치에서 분리한 균(1B12, ●)는 최종 pH가 5.5로 훨씬 더 생육이 양호함을 알 수 있었다.

5탄당 발효능. 이들 균주의 5탄당을 발효능을 알아보기 위하여 각각 D-arabinose, L-arabinose, ribose 및 xylose 등을 배지에 첨가하여 균들을 배양하였다. 그 결과 2개의 공시균주를 포함하여 분리균인 1B12는 D-arabinose, L-arabinose, ribose에서 동일한 발효능을 보여주었다(Fig. 2). 즉, 테스트한 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(■), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲)와 1B12(●) 균

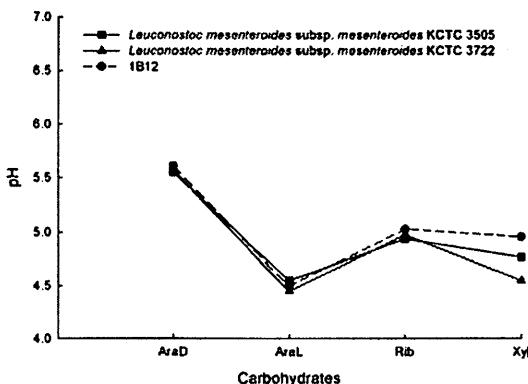


Figure 2. Pentose fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: AraD as (D)-arabinose, AraL as (L)-arabinose, Rib as ribose and Xyl as xylose. *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(■), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲) and 1B12(●) isolated from Chonggak-kimchi.

주는 모두 D-form의 arabinose(AraD)를 이용하지 못하였다(최종산도가 5.5 이상). Xylose의 경우, 각 균이 어느 정도 차이를 보여주었는데 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722가 가장 생육이 우수하였고 분리균주인 1B12가 가장 저조하였다.

6탄당 발효능. 6탄당은 유산균인 *Leuconostoc* 균이 잘 이용하는 glucose(포도당, Glu)와 mannose(Mann)를 포함하고 있으며, 본 실험에서는 이외에 fructose(과당, Fru), galactose(Gal), 및 rhamnose(Rha)를 이용하여 균주간의 당 발효능의 차이를 비교하여 보았다. 그 결과 Fig. 3에서 보는 것처럼, 공시균인 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(■)와 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲)과 분리균인 1B12(●)는 아주 유사한 6탄당 발효 경향을 보여주었다. 따라서 우리는 분리균인 1B12가 공시균과 같은 *Leuc. mesenteroides* subsp.

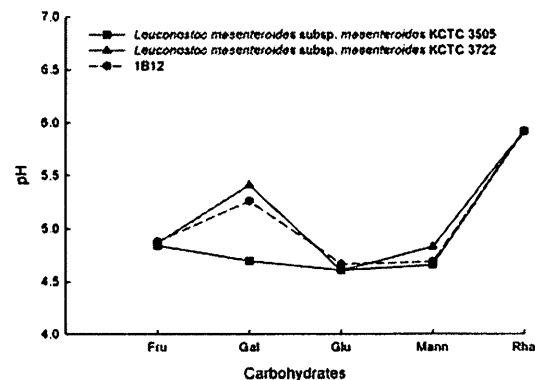


Figure 3. Hexose fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Fru(fructose), Gal(galactose), Glu(glucose), Mann(mannose) and Rha(rhamnose). *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(■), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲) and 1B12(●) isolated from Chonggak-kimchi.

mesenteroides)며 이 중 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲)와 동일한 균임을 알 수 있었다. 왜냐하면 galactose를 잘 발효하지 못하는 경향이 정확히 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 같았기 때문이다. 반면 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505는 galactose를 매우 잘 발효하였다. 또한 이를 균주들은 rhamnose를 전혀 이용하지 못하고 있었다(최종 pH 6.0 이상).

이당류의 발효. 이당류(disaccharides)는 단당류(5탄당 혹은 6탄당) 2개가 *O*-glycoside bond로 결합된 것으로 이들의 결합이 분해되면 이당류를 구성하고 있었던 단당류 두 분자가 생성된다. 이당류 발효 실험(Fig. 4)에서 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲)와 분리균인 1B12(●)는 정확하게 동일한 발효패턴을 나타냈다. 특히 공시균인 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(■)가 모든 이당류를 잘 이용하고 있는 반면 KCTC 3722(▲)와 분리균인 1B12(●)는 cellobiose와 lactose를 유난히 발효하지 못하고 있음이 발견되었다. 유산균에 있어서 이당류인 lactose(glucose + galactose)는 유산균 구별에 중요한 당으로서 만일 lactose를 잘 발효할 경우 이를 동물성 유래 유산균으로 보며 그렇지 않을 경우 식물성 유래 유산균으로 정의하고 있다. 이러한 차이로 말미암아 총각김치에서 분리한 균인 1B12는 식물성 유래 유산균임을 알 수 있었다. 결과적으로 본 조사에서 분리균 1B12는 6탄당 실험에서 나타난 바와 똑같이 공시균인 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*로 KCTC 3722(▲)와 동일한 균임을 두 균이 이당류 발효능에 있어서 정확히 일치하고 있음으로 알 수 있었다.

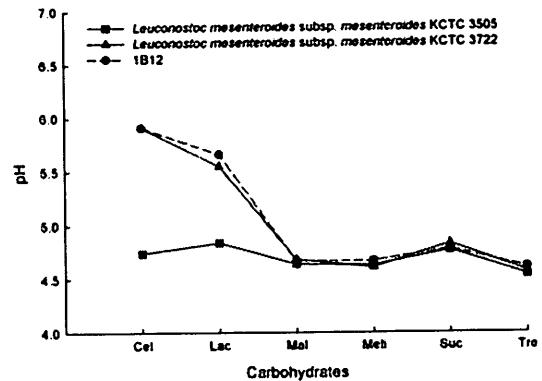


Figure 4. Disaccharide fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Cel (cellobiose), Lac(lactose), Mal(maltose), Meli (melibiose), Suc(sucrose), and Tre(trehalose). *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(■), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲) and 1B12(●) isolated from Chonggak-kimchi.

삼당류의 발효. 3개의 단당류가 결합된 삼당류의 경우를 보면(Fig. 5), 모든 균주는 melezitose(Mele)를 전혀 이용하지 못하는 반면 raffinose(Raf)는 모든 균주들이 잘 발효하였다. 이러한 결과는 유산균 *Leuconostoc*의 중요한 특징으로 사료되었다. 한편 삼당류 발효에 있어서 분리균주인 1B12가 melezitose를 가장 잘 이용한 것으로 판명되었다.

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) 등이었다. 결과를 살펴보면(Fig. 6), 전반적으로 분리 균주인 1B12(●)는 공시균인 *Leuc. mesenteroides* subsp.

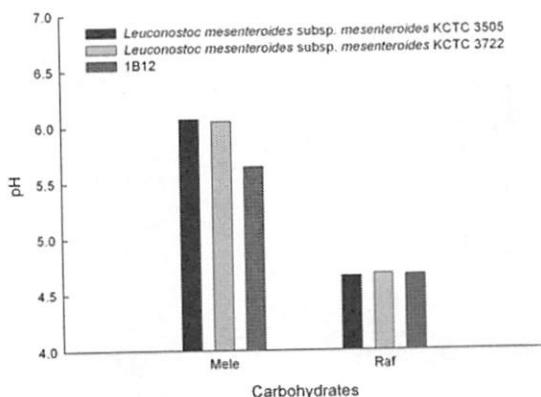


Figure 5. Trisaccharide fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Mele(melezitose) and Raf(raffinose). Tested strains were *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722 and 1B12 isolated from Chonggak-kimchi.

mesenteroides KCTC 3722(▲)과 정확하게 동일한 발효패턴을 보여주었다. 이 결과는 앞서 시험한 당발효 특성(6탄당, 이당류, 삼당류)에서 보여준 것과 똑같이 두 균이 동일한 균임을 알려주는 것이다.

이상의 당발효 특성 비교실험을 통하여 결론적으로 총각김치에서 분리한 1B12(●)는 공시균 주인 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 발효 특성이 정확히 일치하는 균으로 분리한 균이 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* 임을 아종까지 확인할 수 있었다. 또한 동시에 테스트한 공시균으로 아종이 같은 균으로 동정된 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(■)는 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲)와 비교시 6탄당에서 galactose, 이당류에서 cellobiose, lactose 그리고 복합당에서 amygdalin, esculin 등에서 발효능의 현격한 차이를 나타내고 있었다.

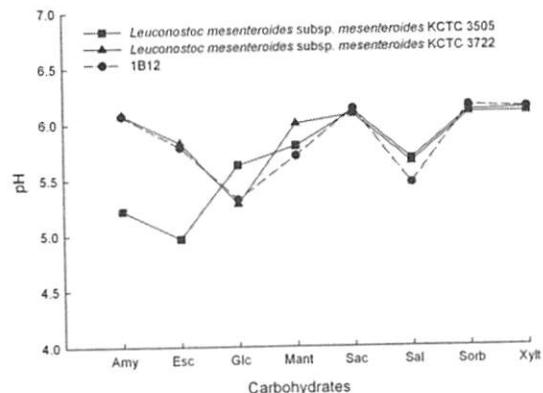


Figure 6. Complex carbohydrates fermentation characteristics of the tested *Leuconostoc* strains. Abbreviations of the carbohydrates: Amy(amygdalin), Esc(esculin), Glc(gluconic acid), Mant(mannitol), Sac(saccharin), Sal(salicin), Sorb(sorbitol), and Xylt(xylitol). *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(■), *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(▲) and 1B12 (●) isolated from Chonggak-kimchi.

RAPD-PCR 분석에 의한 분리균 동정. 테스트한 공시균과 더불어 분리균인 1B12에 대하여 유전학적 동정 기법인 random amplified polymorphic DNA(RAPD) 분석법으로 분자적 차원(유전체 수준)에서의 동정을 시도하여 보았다. 왜냐하면 총각김치에서 분리한 *Leuconostoc*인 1B12가 공시균인 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 알려진 당발효 특성이 정확히 일치하는 균으로 판명된 반면, 같은 아종에 속하는 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505는 오히려 테스트한 여러 가지 당(galactose, cellobiose, lactose, amygdalin, esculin 등)에 있어서 현격한 발효 능 차이를 보여 주고 있었기에 분리균의 보다 더 정확한 동정을 분자적 기법의 도입이 꼭 필요하다고 사료되었다.

이를 위해 5가지 random primers(P100, P101, P125, P149, P152)를 이용하여 PCR을

한 결과는 Fig. 7에서 보는 바와 같다. 먼저 P101을 사용한 RAPD-PCR 결과에서는 나타나는 RAPD DNA band가 대부분 똑같이 나타남으로써 이를 3균종 모두가 같은 균 즉, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*임을 확인할 수 있었다. 그리고 P125의 경우 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505(lane 1)과 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(lane 2)가 똑같은 밴드 패턴을 보여주고 있는 반면 분리균 1B12(lane 3)의 밴드 패턴은 특이적인 DNA(화살표 2위치)가 매우 두껍게 나타나고 있다. 이는 분리 유산균인 1B12의 유전체 조성이 공시균과 차이가 존재하고 있음을 알려주는 것이다. 더욱이 P152 실험 결과는 균 동정을 위하여 테스트한 3가지 *Leuconostoc* 균의 유전적 상이성과 동일성이 잘 나타나고 있다. 즉 동일한 위치에서 나타나는 많은 DNA 밴드(특히 화살표 2위치에서)들이 존재하는 반면 각 균 고유의 DNA 밴드들도 나타났다. 즉, 화살표 1위치의 DNA밴드는 분리균인 1B12(lane 3)에서만 나타나며, 화살표 3위치에서는 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722(lane 2)와 1B12(lane 3)에서만 나타나고 있다. 이러한 결과를 종합해 보면 총각김치에서 분리한 1B12는 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*로서 기존에 분리 동정된 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505나 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와는 다른 *Leuconostoc* 균임을 확인할 수 있었다. 따라서 분리균 1B12가 당발효 특성상 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722와 동일하지만 이 분리균의 유전체적 특성은 또다른 *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides*임을 발견할 수 있었다.

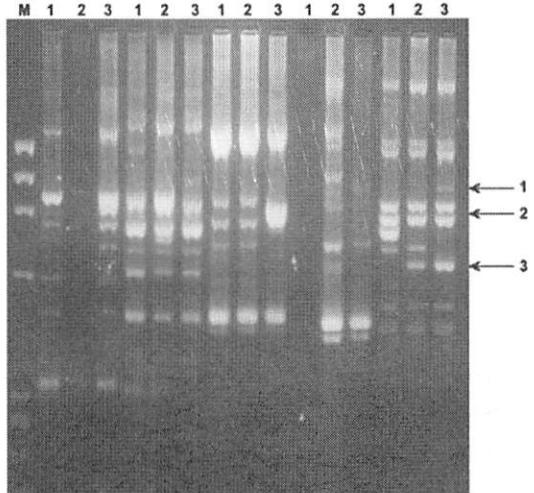


Figure 7. Typical RAPD-PCR patterns of *Leuc. mesenteroides* strains used in this study. Used primers were P100, P101, P125, P149 and P152. Nucleotide sequences of the primers were described in the materials and methods. Lane descriptions: M, marker DNA (ϕ X174 DNA HaeIII digested); 1, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3505; 2, *Leuc. mesenteroides* subsp. *mesenteroides* KCTC 3722; 3, 1B12 isolated from Chonggak-kimchi (experimental).

참고문헌

1. 강국희. 1990. 유산균 식품학. 성균관대학 교 출판부. 서울.
2. 권오식. 2008. 김치에서 분리한 *Leuconostoc* 균주의 당 발효능에 대한 연구. *J. Inst. Nat. Sci.* 26: 63-71.
3. 권오식, 김선지, 진준엽. 2008. 주요 식품에서 발견되는 *Leuconostoc* 종의 대사 특성에 대한 연구. *J. Inst. Nat. Sci.* 26: 73-81.
4. 권오식, 마지현. 2007. 발효된 야채에서 분리한 락토바실러스 균주의 당발효 특성에 대한 연구. *J. Inst. Nat. Sci.* 26: 73-78.
5. 권오식, 이삼빈. 2004. 여러 가지 *Lactobacillus* 균주들의 생리적 및 생화학적 특성 조사

- (1). *J. Inst. Nat. Sci.* 22: 35-42.
6. 백영진, 김종만, 임억규. 1993. 유기산 생산 균 이용현황과 전망. *생물산업*. 6:23-25.
7. 정명준. 1997. 유산균의 산업적 응용. *생물 산업*. 10: 13-21.
8. 정후길. 2001. 프로바이오틱 유산균의 선별 기준 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 효소활성의 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. 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. Scheifer). Springer-Verlag. Germany. pp.1508-1534.
14. Luchansky, J. B., M. C. Tennant and T. R. Klaenhammer. 1991. Molecular cloning and deoxyribonucleic acid polymorphism in *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus grasser*. *J. Dairy Sci.* 74: 3293-3302.
15. Son, M. J., E. K. Jang, O. S. Kwon, J. H. Seo, I. J. Kim, I. S. Lee, S. C. Park and S. P. Lee. 2008. Characterization of dextran produced from *Leuconostoc citreum* S5 strain isolated from Korean fermented vegetable. *Eur. Food Res. Technol.* 226: 697-706.
16. Stackebrandt, E. and M. Teuber. 1988. Molecular taxonomy and phylogenetic position of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 317-324.

Isolation of Cellulase-Producing Microorganisms 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 concept, known as 'cellulosic bioethanol' is seen as the next generation of ethanol production techniques - as it aims to produce higher yields per hectare at lower costs than current techniques consuming grains for sugar or starch since cellulosic bioethanol is derived from plant cell wall materials, cellulose and hemicellulose mainly. As a pretreatment procedure several methods were tested and a novel method was established and named as 'Yoon method'. 'The novel Yoon method' was used to prepare wood chips for the isolation of cellulose-producing microorganisms. Several microorganisms were isolated and among them, ten microorganisms were compared in terms of cellulose activity in liquid cultures. The experimental results suggested that the novel Yoon method was so effective that many isolated microorganisms could facilitate the utilization of the wood chips as a carbon and energy source.

INTRODUCTION

Plant cell walls are made of lignocellulosic materials, whose structure is chiefly represented by cellulose (a linear glucose polymer), hemicellulose (a highly branched heteropolymer), and lignin (a very high molecular weight and cross-linked aromatic macromolecule) [1]. The association between polysaccharide (cellulose and hemicellulose) and non-polysaccharide (lignin) components is mostly responsible for its mechanical and biological resistance. Cellulose, the most abundant polysaccharide on earth, is a highly ordered polymer of cellobiose (D-glucopyranosyl- β -1,4-D-glucopyranose), representing over 50% of the wood mass. Wood cellulose has about 10,000 glycosyl units in the cellulose chain that form fibrils, long bundles of molecules. Cellulosic materials

present crystalline domains separated by less ordered, amorphous, regions that are potential points for chemical and biochemical attacks. Cellulases are able to hydrolyse the cellulose polymer to its monomer, the sugar glucose, that is naturally fermented to ethanol by the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Therefore, this biocatalyst is central for the biomass ethanol technology. Hemicelluloses are the linking material between cellulose and lignin. Wood hemicelluloses are short (degree of polymerisation between 100 to 200), highly branched heteropolymers of the predominant xylose, plus glucose, mannose, galactose and arabinose, as well as different sorts of uronic acids. The C5 and C6 sugars, linked through 1,3, 1,6 and 1,4 glycosidic bonds and often acetylated, acting as a glue between cellulose and lignin. By contrast, lignin is a three-dimensional polyphenolic

network of dimethoxylated, monomethoxylated and on-methoxylated phenylpropanoid units, derived from the corresponding p-hydroxycinnamyl alcohols. Lignin is hydrophobic and highly resistant towards chemical and biological degradation. It acts as cement between the plant cells, forming, together with hemicellulose, an amorphous matrix in which the cellulose fibrils are embedded and protected against biodegradation. Other non-structural components of plant tissues (phenols, tannins, fats, sterols, sugars, starch, proteins, and ashes) usually represent less than 5% of the wood dry weight [2].

In order to achieve biomass hydrolysis, i.e. the depolymerization of the biomass polysaccharides to fermentable sugars, there are several pretreatment steps such as steam explosion, mild acid treatment, strong acid treatment, ammonia treatment, or hydroxide treatment etc. Whichever treatment method is chosen, the pretreatment method must be carried out environmentally friendly and economically feasible technologies [3, 4]. In the simultaneous saccharification and fermentation (SSF) process, biomass hydrolysis (saccharification) can be done simultaneously with the ethanol fermentation, using conventional yeast and bacteria strains or genetically modified organisms. The SSF process has the advantage of avoiding enzyme inhibition by threshold sugar concentrations, allowing higher biomass conversion yields and, by extension, higher ethanol concentrations [5, 6]. Decisions must be affected by the process yields and

productivity parameters as well as the process dependability and cost.

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 maximum 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.

Isolation of Cellulase-producing Microorganisms

Ten soil samples were collected from 'Wooroonooran' rain forest, Australia. The samples were pooled and thoroughly mixed and an enrichment culture was established as follows. 3 g of the mixed sediments was placed in 300 ml of minimal basal salts (MBS) medium (pH 7.0) supplemented with yeast extract, peptone, and soluble starch at a final concentration of 0.5 g/l each. The culture was incubated in a rotary shaker at

150 rpm (28°C). At 1-week intervals, subenrichment cultures were made with 10% inoculum of the previous enrichment culture and transferred into fresh MBS medium supplemented as described above. In addition to establishing a stable consortium by the above methods, cellulase-producing microorganisms were selectively isolated by diluting 100-fold in an 250 ml Erlenmeyer flasks with basal medium (100 ml) containing the following (per liter of deionized water): 2.13 g of Na₂HPO₄, 2.04 g of KH₂PO₄, 1 g of (NH₄)₂SO₄, 0.067 g of CaCl₂ · 2H₂O, 0.248 g of MgCl₂ · 6H₂O, 0.5 mg of FeSO₄ · 7H₂O, 0.4 mg of ZnSO₄ · 7H₂O, 0.002 mg of MnCl₂ · 4H₂O, 0.05 mg of CoCl₂ · 6H₂O, 0.01 mg of NiCl₂ · 6H₂O, 0.015mg of H₃BO₃, and 0.25 mg of EDTA. The pH of the medium was 7.0. Wood-chips prepared by novel Yoon method (unpublished method) was added as the sole carbon and energy source to a final concentration of 10 g/liter. For a solid medium, 15 g of agar (Difco Laboratories, Detroit, Mich.) was added. Fast-growing colonies were obtained on the solid medium after incubation at 28°C for a week. Ten fast-growing microorganisms, designated CM01-10, were selected for further study and characterized in liquid media again for cellulase producing ability.

Estimation of Cellulase-Producing Activities of Isolated Microorganisms

Each cellulase-producing microorganisms selectively isolated by diluting 100-fold in an 250 ml Erlenmeyer flasks with basal medium Wood-chips as described above was

grown in the same media containing a final concentration of 10 g wood chips/liter. After a week at 28°C growth of microorganism and amount of consumed wood chips were compared and the cellulase-producing activities were determined by five scales.

RESULTS AND DISCUSSION

Isolation of Cellulase-producing Microorganisms

The degradation of cellulose and hemicellulose is carried out by microorganisms that can be found either free in nature or as part of the digestive tract of higher animals. This research first focused in finding free-living microorganisms which can degrade cellulose and hemicellulose and utilize them as a carbon and energy source. The microorganisms were selected from soil collected at 'Wooroonaoran' rain forest, Australia. The forest is tens of millions years old and presumably maintains its original status, not interfered by human activities. The soil was mixed and prepared as described in Materials and Methods. From the liquid cultures, small amount of the liquid cultures were transferred on solid cultures containing cellulose as a carbon and energy source and each fast-growing colony was separated individually again in liquid and solid media.

The degradation of cellulose and hemicellulose imposes several intrinsic challenges for the microorganism. The polymer is of high molecular weight, either insoluble or associated

with lignin. Cellulose and hemicellulose is also highly variable in its structure.

Therefore pretreatment steps are very important to aid the microorganisms degrading wood materials. Several different strategies were taken and finally the best efficient pretreatment method was devised and named Yoon method (unpublished data, reserved for patent). When the wood chips were treated with conventional low acid pretreatment method, selected microorganisms were not able to digest wood chips well compared with wood chips prepared by Yoon method (unpublished data). Table 1 shows that fungus did better than bacteria in terms of digesting wood chips. The slow and weak activities were observed when wood chips were pretreated with conventional method (not shown). The novel Yoon method was indeed proved to facilitate digestion of cellulose by microorganisms.

Table 1. comparison of ten microorganisms in terms of relative cellulase activity

name	microorganisms	relative cellulase activity
CM01	fungus	+++++
CM02	fungus	+++++
CM03	fungus	++
CM04	fungus	+++
CM05	fungus	++
CM06	fungus	+
CM07	bacteria	+
CM08	bacteria	++
CM09	bacteria	+++
CM10	bacteria	++

Among ten microorganisms, two were selected and examined the digestion ability in liquid media as described in Materials and Methods. Figure 1 shows that both CM01 and CM02 could digest wood chips very well. They could even form a pit into the leveled wood chips at the bottom of liquid media. The CM01 and CM02 are good candidates for isolation of genes encoding cellulases, hemicellulases and other enzymes participating in hydrolyzing and utilizing the wood materials as a carbon and energy source. The researches concerning the matters are currently going on.

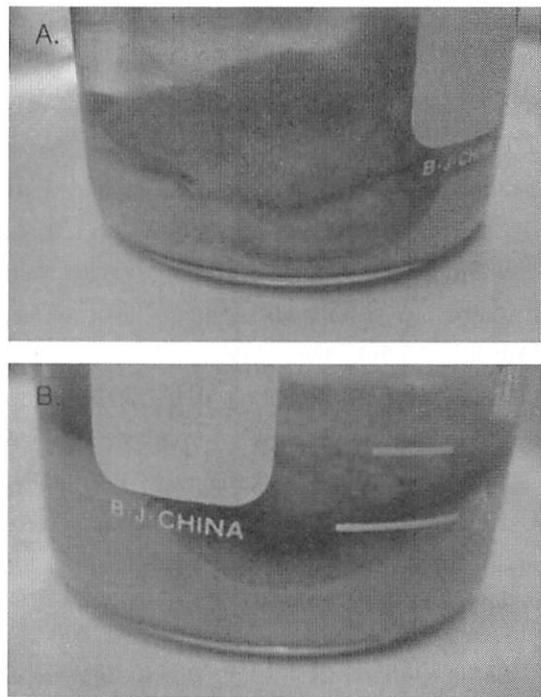


Fig. 1. Growth of CM01 and CM02 in liquid media. Fungus CM01 and CM02 were prepared as described in Materials and Methods. Pictures were taken after 2 weeks of incubation at room temperature. Panels: A, CM01; B, CM02.

REFERENCES

1. T. Eriksson, J. Karlsson and F. Tjerneld, A model explaining declining rate in hydrolysis of lignocellulose substrates with cellobiohydrolase I (cel7A) and endoglucanase I (cel7B) of *Trichoderma reesei*, *Appl Biochem Biotechnol*, 2002, 101: 41-60.
2. H. Palonen, F. Tjerneld, G. Zacchi and M. Tenkanen, Adsorption of *Trichoderma reesei* CBH I and EG II and their catalytic domains on steam pretreated softwood and isolated lignin, *J Biotechnol*, 2004, 107: 65-72.
3. J.M. Fang, P. Fowler, J. Tomkinson and C.A.S. Hill, Preparation and characterisation of methylated hemicelluloses from wheat straw, *Carbohydr Polym*, 2002, 47: 285-293.
4. C. Lequart, J.M. Nuzillard, B. Kurek and P. Debeire, Hydrolysis of wheat bran and straw by an endoxylanase: production and structural characterization of cinnamoyl-oligosaccharides, *Carbohydr Res*, 1999, 319: 102-111.
5. A.P. Nunes and J. Pourquier, Steam explosion pretreatment and enzymatic hydrolysis of eucalyptus wood, *Bioresour Technol* 1996 57: 107-110.
6. H. Durand, M. Clanet and G. Tiraby, Genetic improvement of *Trichoderma reesei* for large scale cellulase production, *Enzyme Microb Technol* 1988 10: 341-346.

적하수오의 약리 및 독성학적 특성

남정민 · 이현영 · 김영희 · 김현지 · 김민정 · 김기석*
계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

Pharmacological and Toxicological Properties of *Polygonum Multiflorum*

Jung-Min Nam · Hyun-Young Lee · Young-Hee Kim · Hyunji Kim · Min-Jung Kim · Kisok Kim*
Department of Public Health, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

요약. 적하수오는 마디풀목 마디풀과에 속하는 덩굴성 다년생 풀로서 뿌리를 사용한다. 국내 한방에서 오랫동안 널리 이용되고 있으며 임상에서 강장제, 강정제, 완화제로 다양하게 사용되고 있는 한약재 중 하나이다. 적하수오는 백하수오와 구별하여 사용하고 있고 백하수오와는 기원과 약효에서 차이가 난다. 적하수오는 뛰어난 항산화 작용, 간 보호 작용, 조혈 작용, 혈중지질 강화 등의 많은 약리학적 효능을 가진다고 보고되고 있는 반면 독성학적 작용 측면에서는 간독성이 보고되어지고 임상 실험에서도 급성 간독성을 유발하였다고 보고되었다. 그러나 이러한 독성에 대한 보고 이외에는 다른 독성학적 작용이 구체적으로 알려지지 않아 향후 체계적인 독성실험에 의한 안전성 평가가 요구되어지는 생약이다.

Abstract. The root of *Polygonum multiflorum* thumb. have been used in oriental medicine as a analeptic, aphrodisiac, and malactic drug. In addition, it has been reported that the root of *Polygonum multiflorum* extracts promote cellular antioxidant activity, increase the activity of C u · Zn-superoxide dismutase, hematinic effect, inhibit the formation of oxidized lipids, and repress lipid peroxidation in the mitochondria. However, *Polygonum multiflorum* also has been known to be associated with liver toxicity and reported to produce the acute hepatotoxicity in clinical trial. Accordingly, this review focused on the pharmacological and toxicological properties of *Polygonum multiflorum* Thunb. to promote the adequate use of this traditional herb medicine.

I. 서 론

적하수오(赤何首烏; *Polygonum multiflorum*)는 마디풀과(Polygonaceae)에 속하는 하수오(*Polygonum multiflorum* Thunberg)의 덩이뿌리를 지칭하는 것으로, 한약처방 및 민간처방에 다양하게 사용되고 있는 한약재 중 하나이며 우리나라 충남부지방 및 중국각지에서 재배되고 있다(전국한의과대학 본초학 교수공체,

1991). 적하수오는 가을과 겨울에 잎이 질 때 채취하여 양끝을 잘라내고 건조하여 사용하고 (김호철, 2001), 쪘서 말리면 붉은색이 강해진다. 현재 국내에는 재배되는 양이 매우 적어 대부분 중국에서 수입하여 사용하고 있고 굵고 적갈색을 나타내는 것이 우수한 품종으로 알려져 있다(배기현 등, 2004). 임상에서 사용할 때에는 하수오를 적하수오와 백하수오로 구별하여야 하고 중국 일부지역에서는 기원이

* Corresponding author / E-mail: kimkisok@kmu.ac.kr

다른 식물을 약재로 사용하고 있어 약효에도 차이가 크므로 한약재 대부분을 수입에 의존하고 있는 우리나라의 경우 적하수오가 아닌 다른 약재를 사용할 수도 있으므로 적하수오를 정확하게 구별하여 사용해야 한다(신철균, 2004).

이러한 적하수오는 항산화 작용, 항노화 작용, 혈중지질강화, 조혈 작용, 간 기능 보호 작용, 조혈 작용 등 여러 가지 약리학적 작용을 있다고 보고되어지고 있으나(김호철, 2001), 아직까지 적하수오의 약리학적 작용과 독성학적 특성에 대한 명확한 규명이 부족한 실정이다. 따라서 본 논문에서는 적하수오의 주요 성분 및 약리학적 작용뿐만 아니라, 독성학적 관련 문헌을 고찰하였다.

II. 적하수오의 성분

적하수오의 성분은 tannin과 anthraquinone 유도체로 chrysophanol, emodin, rhein, physcion, questine이 있고(배기환, 2004), lecithin과 최근에 polyginumutin B, C가 분리되었다(김호철, 2001). Shun 등(2006)은 high-speed countercurrent chromatography(HSCCC)에 의해 적하수오의 뿌리로부터 9가지 화학적 성분을 분리하였다. Aglycones 같은 낮은 극성의 화학적 성분부터 glycosides 같은 높은 극성의 성분까지 분리되었는데 분리된 9가지 성분은 emodin, chrysophanol, rhein, 6-OH- emodin, emodin-8- β -D-glucoside, polygonimutin B, 2,3,5,4-tetrahydroxystilbene-2- β -D-glucoside, gallic acid와 알려지지 않은 glycoside라고 보고되고 있다.

III. 적하수오의 약리학적 작용

1. 항산화 작용

합성 항산화제 거의 대부분이 인체에 독성을 나타낸다고 보고되고 있어 사용이 제한되

고 있으며 이 중 폐놀계 항산화제인 butyrylated hydroxyanisole(BHA), butyrylated hydroxy toluene(BHT)가 비교적 많이 사용되어지고 있지만 이러한 물질을 50mg/kg/day 용량으로 섭취 했을 때 인체에 독성을 유발한다고 보고되어졌다(Branen, A.L. 1975; Fujimoto, K. 1980). 이에 반해 식물성 성분은 뛰어난 항산화 작용을 나타낸다고 알려져 있어 지금까지 식물에서 기원한 여러 종류의 천연 항산화제가 분리되었으나 토코페롤을 제외하고는 인체에 미치는 독성이 커서 널리 사용되지 않고 있다. 최병욱 등(2001)은 건조된 적하수오를 메탄올로 추출한 후 분리 정제하여 크로마토그래피를 이용해 활성 분획을 얻었고, 이 활성 분획으로부터 HPLC를 이용해 Stilbene glucoside를 얻었다. 분리된 물질의 항산화 활성 조사를 위해 2,2-di(4-t-octylphenyl)-1-picrylhydrazyl (DPPH) radical 소거 활성을 검색하는 Blois 방법(Blois, M.S., 1966)을 이용하여 기존에 알려져 있는 항산화제와 20 μ M 농도에서 비교했을 때 적하수오가 합성 항산화제인 BHT 보다는 높고, Vitamine C인 L-ascorbic acid 보다는 낮은 정도의 활성을 나타냈다고 보고하였다.

임낙철 (2000)은 2,2-azobis(aminodinopropane) hydrochloride(AAPH)에 의해서 산화 유도된 랫드에서 적하수오 약침의 항산화 활성을 평가하기 위한 실험을 수행하여, 급성 산화 실험에서는 AAPH 처치 후 thiobarbituric acid-reactive substances(TBARS)가 30분에서 1시간 30분으로 증가되고 uric acid가 현저히 증가하였고, 만성 산화 실험에서는 적하수오 약침 처치군은 대조군과 비교 시 체중이 현저히 증가한 반면에 조직 중량은 간, 비장에서는 증가하였고 심장, 폐, 신장에서는 감소하였으나 유의성은 없었다고 보고하였다. 또한 glutamic pyruvic transaminase(GPT), 적혈구의 용혈, thiobarbituric

acid(TBA), blood urea nitrogen(BUN)은 현저히 감소하였고 glutamic oxalacetic transaminase (GOT)는 20% 감소하는 것으로 나타나 적하수오 추출물이 항산화 활성을 나타낸다고 보고하였다. 양파, 마늘, β -carotene 그리고 약초인 홍삼, 녹차, 은행잎, 음양과, 적하수오, 진피에 대해 TBA 측정법을 이용하여 인지질의 과산화에 대한 항산화 효과를 알아보기 위한 실험에서, 양파, 마늘, β -carotene은 지질과산화 억제효과가 거의 없었으나 약초에서는 녹차의 물추출물이 가장 강력한 항산화 효과를 나타냈고 홍삼, 은행잎, 음양과, 적하수오, 진피도 항산화 효과를 나타냈다고 보고되었다. 지질과산화의 억제에 효과가 있었던 물질들은 단백질의 산화 예방에도 효과가 있었으나 은행잎, 진피, 적하수오는 높은 농도에서 산화억제성이 떨어졌다고 보고되었다(임종채, 1996).

적하수오 추출물이 세포의 항산화 활성을 향상시키고 Cu · Zn-superoxide dismutase (SOD1) 효과를 증가한다고 보고되었고(Hong, C.Y. 등, 1994), Hwang 등(2006)은 ultraviolet B(UV-B) 광선에 의해 유도된 마우스의 free radical 상해에 대한 적하수오의 보호 효과를 알아보기 위해 UV-B를 마우스의 등쪽 피부(dorsal skin)에 조사 후 즉시 중류수 500 μ M과 1,2,4,8,16% 적하수오 추출물 각각을 피부에 발랐을 때, 종류수를 도포한 군에서는 SOD1 면역반응성, 단백질 함량과 활성이 현저히 감소한 반면에 적하수오 추출물을 도포한 군에서는 용량 의존적으로 증가하였다고 보고하였고 8, 16% 투여 군에서 SOD1 단백질 수준과 활성은 대조군의 80~90% 수준으로 회복 되었다고 보고하였다. 또한 만성 UV-B 조사에 적하수오 추출물의 국소적 처치는 내부 면역반응성, 활성, 단백질 수준을 유지한다고 보고하여 적하수오가 항광노화 효과를 나타낼 것이라고 보고하였다.

2. 뇌 및 신경계에 미치는 영향

Polygonum multiflorum extract(PME)는 Parkinson's disease(PD) 동물 모델과 유사하게 PQMB(paraquat와 maneb)에 의해 유발된 마우스의 행동적 이상을 악화시키는 것과 같은 퇴행성 질환의 치료를 위한 전통적인 한방 처방 약으로 사용되어져 왔다. Li 등(2005)은 C57BL/6 마우스에 PQMB를 일주일에 두 번씩 6주 동안 복강투여 하여 행동이상을 유도하였고, 흑질과 선조체의 도파민성 뉴런이 변성되어 운동감소증(bradykinesia)이 유발되고 중추신경계의 도파민성 신경독성에 의해 유발되는 PD 표현형(phenotype)의 증상이 나타나게 하였다. 흑질과 선조체에 도파민성 변성이 유도된 마우스에 47일 동안 PME, 에탄올을 가용성 PME(PME-I), 에탄올 불용성 PME(PME-II)가 경구 투여 되었을 때 운동감소증과 흑질과 선조체에 도파민성 뉴런의 변성이 현저하게 억제 되었다. 이러한 결과는 PME가 *in vitro*에서 항산화 활성을 가져 oxygen free radical을 감소시키며 PME-I은 PQMB 투여에 의해 유발되는 행동적 이상을 향상시킨다고 보고되었으나 에탄올 불용성 PME-II는 효과가 없어 에탄올 가용성 성분이 PD에 대한 보호적 역할을 한다는 것이 보고되었다.

Amyloid β (A β) protein은 Alzheimer's disease가 진행되는 동안 신경독성을 유발한다고 알려져 있으며 뇌 많은 부위에 노인반(senile plaque)과 신경섬유매듭의 주요 구성성분이라는 것이 제시되었고(Golde, T.E. 등, 1992; Yan, J.J. 등, 2004), 산화적 스트레스가 A β 에 의해 유도된 신경독성의 작용기전과 연관된다고 제시되었다(Behl, C. 등, 1992; Yamada, K. 등, 1999). A β 에 의해 유도된 인지능력이 부족한 마우스에 적하수오가 미치는 효과를 알

아보기 위해 ICR 마우스에 0.5, 1% *Polygonum multiflorum* Thunb. water extract(PWE)를 4주 동안 섭취하게 한 다음 A β 25-35 10 μ g을 단회 intracerebroventricular(i.c.v.) 경로로 투여 하였을 때, PWE 투여군에서 A β 25-35가 투여된 마우스에서 나타난 인지 부족이 개선되었다고 보고되었다. 또한 acetylcholinesterase (AChE) 활성이 A β 25-35 투여 시 증가한 반면에 PWE 섭취에 의해 감소되었으며 lipid peroxide가 미미하게 감소되었으며 뇌 Glutathione peroxidase(GPx) 활성이 증가되어 TBARS 수준은 감소하였지만 catalase와 superoxide dismutase(SOD)활성에는 현저한 효과가 없다고 보고되었다. 이는 GPx가 catalase 또는 SOD보다 lipid peroxidation에 더 민감하다는 결과를 나타내고 있고 항산화 작용기전을 통한 PWE에 의해 A β 에 의한 lipid peroxide의 축적이 감소되어 신경 보호적 역할을 한다고 보고되었다(Um, M.Y. 등, 2006).

Zhang 등(2006)은 학습과 기억 능력에 적하수오의 주요 성분인 2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucoside(TSG)의 보호적 효과를 관찰하기 위해 4, 10, 16 월령 transgenic 마우스에 TSG 120, 240 μ mol/kg/day을 각각 투여하였고 대조군은 같은 연령의 C57BL/6 마우스를 사용하였다. 이러한 결과 학습과 기억 능력은 TSG를 투여한 군에서 현저히 향상되었다고 보고하여 TSG가 AD 치료를 위한 치료제로 사용 가능성을 보고하였다.

3. 순환계에 미치는 영향

적하수오 추출물 치리는 심근 혀혈-재관류 상해에 대해 용량 의존적인 보호 효과를 나타낼 수 있다고 보고되었다(Yim, T.K. 등, 1998). *Polygonum multiflorum*의 stilbeneglycoside (PMS)가 고 콜레스테롤이 유도된 토끼에서

죽상동맥경화증 완화, 거품세포(foam cell)에서 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 protein과 vascular endothelial growth factor (VEGF) protein 수준을 감소하는지 알아보기 위한 연구에서 PMS 섭취군에서는 죽상동맥경화증이 완화되었고 거품세포에서 ICAM-1의 발현과 VEGF의 발현이 감소되었으며 특히, 혈청 triglyceride 수준에 대한 PMS의 감소 효과가 가장 두드러져 고지질의 치료를 위해 적하수오가 활용될 수 있을 것이라고 보고되었다(Yang, P.Y. 등, 2005). 이와 유사하게 백하수오와 적하수오가 고콜레스테롤 섭취로 유도된 죽상동맥경화증에 미치는 효과를 평가하기 위해 4% 콜레스테롤을 섭취, 4% 콜레스테롤과 4% 백하수오, 4% 콜레스테롤과 4% 적하수오를 12주 동안 섭취하게 한 결과, 대조군에 비해 백하수오와 적하수오를 섭취한 군에서 대동맥 내막에서 죽종 생성이 감소되었고 특히, 적하수오 섭취군이 백하수오 섭취군보다 더 효과적이라고 보고되었다. 또한 serum total cholesterol level, serum triglyceride level, serum free fatty acid level, serum total lipid level 등이 대조군에 비해 백하수오 군과 적하수오군 모두에서 유의하게 감소되었고 High-density lipoprotein level은 대조군보다 증가하였지만 유의한 차이는 보이지 않았다고 보고되었다(張憲烈, 1994).

4. 간장에 미치는 영향

적하수오는 한방 치료에서 간 기능 보호에 오랫동안 사용되어져 왔다. 신민교(1985)는 적하수오와 백하수오가 랫드의 간에 미치는 효과를 알아보기 위해 carbon tetrachloride로 간손상이 유도된 랫드에 적하수오와 백하수오 열수 추출물을 구강 투여 하여 간 지방변성, cytochrome oxidase(CYO), adenosine

triphasphatase(ATP), acid phosphatase(ACP), lactate dehydrogenase(LDH), alkaline phosphatase(ALP) 등의 효소 활성을 측정하였다. 이러한 결과, 하수오의 구강 투여 후 지방간이 회복되었고, CYO, ATP, ACP, LDH, ALP 등의 효소 활성이 정상 수준으로 회복되어 carbon tetrachloride로 손상된 간 기능이 회복 된 것을 확인 할 수 있었고 이러한 효과는 백하수오가 적하수오 보다 회복되는 시간이 더 빨랐지만 적하수오도 간 기능 회복에 효과가 상당하다고 보고하였다.

적하수오 에탄올 추출물에서 동정된 catechin과 β -sitosterol은 DPPH free radical 제거 활성에 대한 inhibitory concentration(IC_{50})이 각각 24.6, 11.58 μM 으로 나타났고 특히, β -sitosterol은 Hep G2 세포주의 간세포 보호 활성 시험에서 간세포를 보호 하는 효과를 나타낸다고 확인 되었고 EC_{50} 은 210 μM 이었다고 보고되었다. 또한, 일차배양 랫드 간세포를 이용한 간세포 보호 활성 시험에서 E-2,3,5,4'-tetrahydroxystilbene-2-O- β -D-glucopyranoside와 catechin의 EC_{50} 가 각각 138.53과 79.63 μM 로 나타나 간세포를 보호하는 효과가 있다고 보고되었다(조현, 2001).

5. 항바이러스 작용

Severe acute respiratory syndrome(SARS)는 Corona virus(SARS-Co V)에 의해 발생되는 감염성 질병으로 SARS-Co V spike(S) protein이 속주세포 수용체인 angiotensin-converting enzyme 2(ACE2)에 결합한다고 알려져 있다. SARS에 대한 예방적 효과를 알아보기 위해, 312개 종국 한방 약초를 검색하여 *Nelumbonaceae*, *Labiatae*, *Magnoliaceae*, *Oleaceae*, *Lauraceae*, *Polygonaceae* 등 6개 과(family)가 S protein이 ACE2에 결합하는 것을 60~90% 억제하고

이 중 Polygonaceae의 결합 억제 효과가 가장 높았다고 보고되어졌다. 또한 그 성분 중 emodin이 SARS 예방에 가장 큰 효과가 있다고 나타났다. S protein이 증가할수록 ACE2 결합이 용량 의존적으로 증가하는 반면 emodin 처리 시 SARS-Co V protein이 ACE2에 결합하는 것을 억제하였으며 또한 Vero E6 cell에 S protein-pseudotyped retrovirus의 감염을 억제한다고 보고되어져 emodin이 항 SARS-Co V 성분임이 보고되어 졌다(Ho, T.Y. 등, 2007).

6. 당뇨에 미치는 영향

α -glucosidase는 섭취된 탄수화물을 소화시키는 효소이고 이 효소의 억제는 식후 고혈당증을 억제시킬 수 있다. α -glucosidase 억제제는 식후 포도당의 농도를 낮추기 위해 소화를 지연할 수 있는 경구제제로 알려져 있는데 (Mooradian, A.D. 등, 1999), 여러 식물들도 이러한 역할을 한다고 알려져 있다. Streptozotocin(STZ)-유도된 당뇨 랫드에서 적하수오 추출물의 항고혈당 효과 연구에서 적하수오 추출물은 60분, 90분에서 증가되는 혈장 포도당의 농도를 현저히 억제한다고 보고되어 적하수오 추출물의 만성 섭취가 식후 고혈당증 예방에 도움을 줄 수 있고 당뇨 합병증을 예방 할 수 있다고 보고되었다(Kang, M.J. 등, 2005).

IV. 적하수오의 독성학적 작용

*Polygonum multiflorum*은 탈모와 만성 전립샘염 치료를 위한 제품에서 간 독성이 있다고 보고되어져 왔고, Andres 등(2006)은 머리카락 성장을 돋는 헤어 보조제로 사용되어지고 있는 생약 제품인 Shen-Min이 급성 간염을 일으킨다고 보고하였다. *Polygonum multiflorum*의 주요 성분인 anthraquinone이 Shen-Min 성분에 포함되어 있고 간독성의 잠재적인 원

인물질이라고 보고하였다. 28세의 백인 여성이 Shen-Min을 8주 동안 사용한 후 피로, 권태감, 허약 등 간염증상을 호소하였고, 실험적 연구에서도 혈압이 110/70mmHg, 맥박은 72bpm 이었고 공막과 피부에 황달이 있었고 팔, 다리, 넓적다리에 반구진발진이 일어났다고 보고하였다. Shen-Min 사용이 중단 된 후에는 α -fetoprotein 수준이 412.6ng/ml로 간 기능이 회복됨을 보였고 피로, 허약이 개선되었고 황달, 발진 등은 사용이 중단 된 후 3주에 걸쳐 서서히 개선되었다고 보고하였다.

V. 결 론

적하수오는 오래전부터 강장제, 완화제로 사용되어져 왔고, 항산화 작용이 뛰어나 피부노화 방지 효과도 보고되어졌다. 그리고 Parkinson's disease와 Alzheimer's disease 같은 퇴행성 질병에 대한 보호 효과, 간 보호 효과, 당뇨 예방 효과 등이 보고되어졌고 최근에는 SARS 예방에도 효과가 있다고 보고되어져 기존에 잘 알려진 약리학적 작용 외에도 새로운 약리학적 작용이 계속해서 알려지고 있는 추세이다. 그러나 적하수오를 약용으로 사용 할 때 알맞은 독성학적 기준이 마련되어 있지 않고 체계적인 독성학적 연구가 부족한 실정이다. 특히 한방에서는 추출물 자체를 사용하고 있기 때문에 이러한 적하수오 추출물뿐만 아니라 나아가 각각의 성분들에 대한 독성학적 기준이 마련되어져야 한다. 최근에는 천연물을 사용한 건강보조제품들이 관심을 받고 있어 널리 이용되어지고 있으나 대부분 약리 및 독성학적 고려 없이 무분별하게 사용되어지고 있는 경우가 많다. 따라서 국내에서 적하수오의 효능뿐만 아니라 안전성 평가가 요구되어지고, 이에 따라 적하수오 성분에 관한 독성평가가 이루어져 독성학적 기준이 정립되어야

할 것이다.

참고문헌

1. 김호철. 한약약리학. 집문당. 472-473 (2001).
2. 배기환, 박종희, 김재길, 백완숙, 이형규. 독성시험을 위한 6종 생약 원료물질의 시료 확보. 식품의약품안전청 연구보고서. (2004).
3. 신민교. 환경 간조직에 미치는 적하수오와 백하수오의 효능에 관한 비교 연구. 생약 학회지. 16(2). 81-92 (1985).
4. 신철균. 적하수오와 백하수오의 외부 및 내부형태. 우석대학교. 학위논문. (2004).
5. 임낙철. 적하수오 약침의 AAPH처리된 환경에 대한 항산화작용. 대전대학교 한의학 연구소 논문집. 8(2). 361-374 (2000).
6. 임종체. 홍삼을 비롯한 몇몇 천연물의 항산화능에 관한 연구. 경남대학교. 학위논문. (1996).
7. 張憲烈 白何首烏와 赤何首烏가 高Cholesterol로 誘發된 粥狀動脈硬化에 미치는 影響. 동국대학교 대학원. 학위논문. (1994).
8. 전국한의과대학 본초학 교수공제. 본초학. 영림사. 583-584 (1991).
9. 조현. 천연물로부터 항산화 및 간 보호 물질의 분리 및 구조 결정, 원광대학교 대학원. 학위논문. (2001).
10. 최병욱, 주정훈, 유건식, 이봉호. 적하수오로부터 분리한 stilbene glucoside 항산화제. Research Institute of Industrial Scientific Technology. 5. 217-222 (2001).
11. Andres, C., Juan, C.R., Fernando, S., Gonzalo, C. Acute hepatitis due to Shen-Min A herbal product derived from *polygonum mutwilorum*. J. Clin. Gastroenterol. 40. 629-632 (2006).
12. Behl, C., Davis, J., Cole, G.M., Schubert,

- D. Vitamin E protects nerve cells from amyloid beta protein toxicity. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 186. 944-950 (1992).
13. Blois, M.S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. *J. Invest. Dermatol.* 80. 202 (1966).
14. Branen, A.L. Toxicology and biochemistry of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene. *J. Am Oil Chem.* 52. 59 (1975).
15. But, P.P., Tomlinson, B., Lee, K.L. Hepatitis related to the Chinese medicine Shou-wupian manufactured from *Polygonum multiflorum*. *Vet. Hum. Toxicol.* 38. 280-282 (1996).
16. Fujimoto, K., Kaneda, T. Screening test for antioxygenic compounds from marine algae and fractionation from *Undaria pinnatifida* Jap. Soc. Sci Fish. 46. 1125 (1980).
17. Golde, T.E., Estus, S., Younkin, L.H., Selkoe, D.J., Younkin, S.G. Processing of the amyloid protein precursor to potentially amyloidogenic derivatives. *Science* 255. 728-730 (1992).
18. Ho, T.Y., Wu, S.L., Chen, J.C., Li, C.C., Hsiang, C.Y. Emodin blocks the SARS coronavirus spike protein and angiotensin-converting enzyme 2 interaction. *Antiviral Res.* 72. 92-101 (2007).
19. Hong, C.Y., Lo, Y.C., Tan, F.C., Wei, Y.H., Chen, C.F. *Astragalus membranaceus* and *Polygonum multiflorum* protect rat heart mitochondria against lipid peroxidation. *Am J. Chin. Med.* 22. 63-70 (1994).
20. Hwang, I.K., Yoo, K.Y., Kim, D.W., Jeong, S.J., Won, C.K., Moon, W.K., Kim, Y.S., Kwon, D.Y., Won, M.H., Kim, D.W. An extract of *Polygonum multiflorum* protects against free radical damage induced by ultraviolet B irradiation of the skin. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39. 1181-1188 (2006).
21. Kang, M.J., Kim, J.I., Joo, H.J., Seo, T.J., Kim, H.A., Han, J.H. The inhibitory activity of *Polygonum Multiflorum Thunberg* and its effect on postprandial hyperglycemia in streptozotocin-induced diabetic rats. *Nutri. Sci.* 8(4). 226-230 (2005).
22. Li, X., Matsumoto, K., Murakami, Y., Tezuka, Y., Wu, Y., Kadota, S. Neuroprotective effects of *Polygonum multiflorum* on nigrostriatal dopaminergic degeneration induced by paraquat and maneb in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 82. 345-352 (2005).
23. Mazzanti, Batinelli, Daniele. New case of acute hepatitis following the consumption of Shou Wu Pian, a Chinese herbal product derived from *Polygonum multiflorum*. *Ann. Intern. Med.* 140. W30 (2004).
24. Mooradian, A.D., Thurman, J.E. Drug therapy of postprandial hyperglycemia. *Drugs* 57. 19-29 (1999).
25. Park, G.J., Mann, S.P., Ngu, M.C. Acute hepatitis induced by Shou-Wu-Pian, a herbal product derived from *Polygonum multiflorum*. *J. Gastroenterol. Hepatol.* 16. 115-117 (2001).
26. Shun, Y., Yi, L., Lingyi, K. Preparative isolation and purification of chemical constituents from the root of *Polygonum*

- multiflorum* by high-speed counter-current chromatography. *J. of Chromatogr. A* 1115. 64-71 (2006).
27. Um, M.Y., Choi, W.H., Aan, J.Y., Kim, S.R., Ha, T.Y. Protective effect of *Polygonum multiflorum* Thunb on amyloid-peptide 25-35 induced cognitive deficits in mice. *J. Ethnopharmacol.* 104. 144-148 (2006).
28. Yamada, K., Tanaka, T., Han, D., Senzaki, K., Kameyama, T., Nabeshima, T. Protective effects of idebenone and alpha-tocopherol on betaamyloid-(1-42)-induced learning and memory deficits in rats: implication of oxidative stress in beta-amyloid-induced neurotoxicity in vivo. *Eur. J. Neurosci.* 11. 83-90 (1999).
29. Yan, J.J., Kim, D.H., Moon, Y.S., Jung, J.S., Ahn, E.M., Baek, N.I., Song, D.K. protection against beta-amyloid peptide-induced memory impairment with long-term administration of extract of *Angelica gigas* or decursinol in mice. *Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry.* 28. 25-30 (2004).
30. Yang, P.Y., Almofti, M.R., Lu, L., Kang, H., Zhang, J., Li, T.J., Rui, Y.C., Lian, L.N., Chen, W.S. Reduction of Atherosclerosis in Cholesterol-Fed Rabbits and Decrease of Expressions of Intracellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Endothelial Growth Factor in Foam Cells by a Water-Soluble Fraction of *Polygonum multiflorum*. *J. Pharmacol. Sci.* 99. 294-300 (2005).
31. Yim, T.K., Wu, W.K., Mak, D.H., Ko, K.M. Myocardial protective effect of an anthraquinone-containing extract of *Polygonum multiflorum* ex in vivo. *Planta Medica* 64. 607-611 (1998).
32. Zhang, L., Xing, Y., Ye, C.F., Ai, H.X., Wei, H.F., Li, L. Learning-memory deficit with aging in APP transgenic mice of Alzheimer's disease and intervention by using tetrahydroxystilbene glucoside. *Behav. Brain Res.* 173. 246-254 (2006).

피부적용제로서 미백효과가 우수한 코직산의 피부 안전성 평가 연구

김배환

계명대학교 자연과학대학 공중보건학과

The Skin Safety Evaluation of a Potent Anti-pigmentation Agent, Kojic Acid, for the Skin Application

Bae-Hwan Kim

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

요약. 코직산은 피부에서 멜라닌 색소를 생성하는 타이로신나아제(tyrosinase)의 기능을 억제함으로써 미백에 대한 효능이 기대되기 때문에 최근 기능성 화장품 원료로 개발되어 많이 활용되어지고 있다. 그러나 일부 피부에서의 안전성에 대한 제기 논문도 발표됨에 따라, 본 시험에서는 단회투여독성, 피부1차자극시험, 안점막자극시험, 피부감작성시험, 광독성시험 및 광감작성 실시하여 피부적용 원료로서의 안전성여부를 평가하였다. 시험결과 일부 피부감작성에서 감작성 유발에 대한 가능성이 보였지만, 바로 자극이 완화되고 지금까지 인체에 대한 임상결과에서 커다란 문제가 없었던 점을 감안할 때 기능성화장품 원료로서 사용시 사람 피부에 적용하는데 무난한 물질이라 판단되었다.

Abstract. Kojic acid has been extensively used for topical and systemic treatment nowadays, because it is well known for its anti-pigmentation effect with tyrosinase inhibition activity. Therefore Kojic acid is developed to cosmeceutical agent for cosmetic formulation. However kojic acid is reported to induce the skin problems. In this study, we conducted the several safety tests such as single-dose toxicity, primary skin irritation test, eye irritation test, skin sensitization test, phototoxicity test and photosensitization test, to see if kojic acid is safe in case used for the skin application. Our data obtained hitherto suggest that kojic acid is generally safe if applied to the skin except for showing mild irritation in skin sensitization test.

I. 서 론

멜라닌(melanin)은 인간의 피부나 머리카락에 분포되어 있는 색소이다. 세포내에서 타이로신(tyrosine)은 타이로신네이즈(tyrosinase)에 의해 도파퀴논(Dopiquinone)으로 변형된 후, 자동산화반응과 효소반응 등을 거쳐 멜라닌이 합성된다. 이렇게 생성된 멜라닌은 멜라노좀이라는 주머니를 통해 피부에 분포된다.¹

피부에서 멜라닌은 인간의 방어기능으로 과

잉의 빛을 흡수, 산란하는 기능을 하며 자외선에 의한 악영향을 방어하는 역할을 하지만, 과량 생성되고 국부적으로 발현될 경우 색소침착, 기미 등의 원인이 된다.²

따라서 이러한 색소 침착현상을 막아주기 위해 멜라닌 생성과정에서의 일부 과정을 조절하는 기능성 화장품원료에 대한 관심이 높아지고 있다. 이중 코직산(kojic acid)는 누룩곰팡이 발표액으로부터 얻어지는 성분으로 일본에서 최초로 개발된 원료로 누룩이 발효될

때 생성된다하여 일명 누룩산이라고도 한다. 코직산은 타이로신네이즈의 활성부위에 존재하는 구리이온을 흡착시켜 효소활동을 저해하여 미백에 효과를 보이는 것으로 알려져 있다.³

그렇지만 최근 화장품에서 안정성과 피부암, 피부자극 등의 안전성적인 측면에서의 문제점도 제기되어지고 있다.⁴

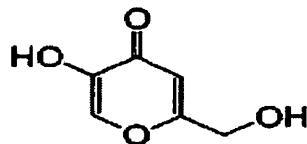


Fig. 1. Structure of kojic acid

2000년대 들어 화장품법이 약사법과 분리되고, 기능성화장품법이 제정되면서, 화장품에서도 주름개선, 미백효과, 자외선 차단 부분에 대해 효능적인 측면을 표시할 수 있게 되었다. 그러나 화장품에 효능이 가미됨에 따라 기능성 신원료의 안전성에 대한 중요성이 더 커지고 있다. 코직산은 기능성화장품법이 발효되기 전부터 기능성 원료로 사용되어 지기 시작되었지만, 국소독성 유발에 대한 우려는 지속적으로 제기되고 있기 때문에, 본 연구에서는 기능성화장품 기준 및 시험방법과 심사에 관한 규정⁵에 의거하여, 설치류 단회투여독성시험, 피부 1차자극시험, 안점막 자극시험, 피부감작성시험, 광독성 및 광감작성시험을 실시하였다.

II. 재료 및 방법

1. 시험물질

본 시험에 사용한 코직산은 Sigma로부터 구입하였으며, PEG400에 적절한 농도로 녹여 각 시험에 사용하였다.

2. 사용동물의 사육조건

본 시험에 사용한 동물(마우스, 토끼 및 기니피)은 Samtako Bio Korea에서 구입하였다. 사육실의 사육조건은 온도 $23 \pm 3^{\circ}\text{C}$, 습도 $50 \pm 10\%$, 환기회수 15회/hr, 조도 150~300 Lux, 명암주기 12시간(08:00~20:00)으로 유지되도록 컨트롤 하였다. 시험 전기간동안 사료(Purina Korea)와 음수는 자유급식 시켰으며, 사료의 오염성적서는 공급처로부터 입수시에 받았고, 음수의 오염성적서는 년 2회씩 정기적으로 경기도 보건환경연구원에 의뢰하여, 시험에 영향을 줄 오염원이 없음을 확인하였다. 모든 실험동물은 시험전 1주간 검염기간을 거쳐 건강한 동물만 실험에 사용하였다.

3. 시험방법

본 시험에 사용된 모든 시험방법은 「의약품 등의 독성시험기기준」⁶, 「기능성화장품등의 심사에 관한 규정」⁷과 CTFA⁸ 및 OECD guideline⁹에 따라 실시하였다.

1) 단회투여독성

예비시험결과 독성이 나타나지 않아 식약청 고시에 명시된 최고농도인 2 g/kg 투여군만 설정하였으며, 암수 각각 5마리의 ICR 마우스(20~25 g)를 5시간 가량 절식시킨 후 10 mL/kg의 volume으로 1회 경구투여 하였다. 투여후, 14일동안 체중변화, 일반증상 및 폐사여부를 관찰하였다. 대조군은 용매(PEG400)만 투여하였다. 시험종료 후 모든 동물은 부검하여 병리 조직학적 이상소견을 관찰하였다.

2) 피부1차자극시험

24시간 전에 제모한 6마리의 New Zealand White rabbit(2.0~2.5 kg)를 이용하여 각 동물의 등 부위를 약 2.5 cm × 2.5 cm 정도의 크

기로 척추를 중심으로 비찰과 피부 2개소와 찰과 피부 2개소로 하여, 좌측 구획은 대조물질(PEG400)을, 우측에는 시험물질 5%(임상예정용량의 5배 수준)를 각각 0.5 ml씩 도포하였다. 시험물질 적용 후 24시간째 및 72시간째에 홍반과 가피형성, 부종형성 등의 자극성 유무를 관찰하여 「의약품등의독성시험기기준」⁶에 따라 판정하였다. 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 일반적으로 많이 이용되는 Draize¹⁰의 P.I.I.(Primary Irritation Index)의 산출 방법에 따랐다.

3) 안점막 자극시험

안검사를 통해 안구 손상 등 각막의 손상이 없는 수컷토끼 (2~2.5 kg) 9마리를 이용하여 좌측 눈은 대조로, 우측 눈에는 시험물질 5% (임상예정용량의 5배 수준)를 각각 0.1 ml씩 점안하였다. 그 중 3마리는 20~30초 후에 미온 생리식염수로 충분히 세안하고, 나머지 6마리는 세안하지 않았다. 시험물질 적용 종료 후 1, 24, 48, 72시간과 4, 7일 후에 적용부위 각막의 혼탁과 그 범위, 홍채의 반응, 결막의 발적, 부종, 배출물의 정도 등의 자극성 유무를 관찰하였다. 안점막 반응의 자극 평가는 「의약품등의독성시험기기준」⁶ 상의 안구병변의 등급을 이용하여 판정하였고, 결과에 대한 자극성의 정도 판정은 일반적으로 많이 사용되는 Draize¹⁰의 안자극 구분표를 따랐다.

4) 피부감작성 시험

코직산에 대한 피부감작성 여부를 군당 암수 10마리씩의 Hartley Albino guinea pig (230~270 g)을 이용하여 GPMT(Guinea Pig Maximization Test)법¹¹에 따라 실시하였다. 감작(induction) 농도는 5%(임상예정용량의 5배 수준)로 설정하였고, 피부1차 자극 시험결과 자극이 관찰되지 않은 1, 0.5%를 야기 농

도를 설정하였다.

1차 감작은 제모된 기니피의 견갑간부에 시료, Freund's complete adjuvant(FCA) 및 FCA와 시료혼합물을 2열로 0.1ml씩 피내주사하였다. 7일후 2차 감작은 동일부위를 제모한 후 10% Sodium Lauryl Sulfate(SLS)를 전처치하고 24시간후에 시험물질을 0.5 ml/site 씩 도포하고 가아제로 덮은 뒤 비자극성 테이프로 고정하여 48시간동안 폐쇄첩포 하였다. 첨포 2주후 감작부위와 다른 등부위를 제모한 후 시험물질을 24시간 동안 폐쇄첩포(challenge)하여 첨포 제거 후 24, 48, 72시간째에 홍반과 가피형성, 부종형성등의 자극성 유무를 관찰하였다. 관찰결과 양성율이 29%이상인 경우 sensitizer로 판정하였다. 양성대조군으로는 DNCB (1-chloro-2,4-dinitrobenzene) 0.1%를 사용하였으며, 음성대조군은 용매인 PEG400을 처치하였다.

5) 광독성시험

코직산에 대한 광독성 여부를 5마리의 Hartley Albino guinea pig (250~300 g)을 이용하여 Lovell 등의 방법¹²에 의해 실시하였다. 시험물질의 사용농도는 임상사용예정량 수준인 1%로 선정하였다. 기니피의 등부위를 제모한 후 양쪽에 2 × 2 cm²의 구획을 3부위씩 총 6부위를 설정하여, 시험물질, 음성대조물질(PEG400) 및 양성대조물질(8-Methoxypsonalen, 8-MOP, 0.1%)를 50 μl씩 균등하게 각각 양쪽부위에 도포 한 후 좌측은 광차단하고 우측은 Ultraviolet A(UVA, 320~400 nm) 15 J/cm²로 광조사하여, 조사 후 24, 48, 72 시간에 피부반응을 관찰하였다. 두께 22.5 mm glass filter를 사용하여 소량의 UVB영역은 차단하였으며, UV 조사영역과 비조사영역의 자극정도 차이 (광독성지수, phototoxic index)를 계산하여, 0.5 이하를 광독성이 없는 물질로 판정하였다.

6) 광감작성시험

코직산에 대한 광감작성 시험을 군당 5마리의 수컷 Hartley Albino guinea pig (240~280 g)을 이용하여 Adjuvant-strip method¹³에 의해 실시하였다. 감작(induction) 농도는 5%(임상예정용량의 5배 수준)로 설정하였고, 야기농도는 감작성시험과 같은 수준인 1, 0.5%로 설정하였다.

제모한 견상갑부위 ($2 \times 2 \text{ cm}^2$)에 FCA를 4군데 코너에 0.1 ml씩 피내주사하고 그 부위 피부를 striping 한 후, 시험물질을 0.5 ml 씩 $2 \times 2 \text{ cm}^2$ 크기의 여과지에 적혀 2시간동안 폐쇄도포 한 다음, 침포제거후 UVA (320~400 nm) 10 J/cm²를 조사하여 감작시켰다. 이런 과정을 주 3회씩 2주에 걸쳐 총 6회 실시하였다. 최종감작일로 부터 10일 후에 다른 등부위를 제모하여 ($6 \times 6 \text{ cm}^2$) 좌우 2개소 위치에 각각 시험물질을 2시간 침포 후, 왼쪽부위만을 차광하여 UVA 10 J/cm²를 조사(challenge)하고, 24, 48, 72시간째에 반응정도를 관찰하였다. 음성대조물질로는 PEG400을, 양성대조물질로는 chlorpromazine (감작량: 1%, 야기량: 0.1%)을 사용하였다. UV조사시 두께가 22.5 mm인 glass filter를 사용하여 소량의 UVB영역은 차단하였으며, UV 조사영역과 비조사영역의 자극정도 차이 (광감작성지수, photoallergic index)를 계산하여 0.5 이하를 광감작성이 없는 물질로 판정하였다.

4. 통계학적 분석

단회투여독성시험의 경우, 최고용량 1개 군만으로 실험하였기 때문에 probit법에 의한 LD₅₀ 산출은 행하지 않았다. 대조군과 시험군간의 체중변화에 있어서는 student's t-test를 이용하여 유의성 여부를 검사하였다(data not shown).

III. 결 과

1. 단회투여 독성

시험기간동안 시험물질에 기인된 체중변화, 임상증상, 폐사 및 육안적 부검소견의 이상변화가 전혀 관찰되지 않아(data not shown), 코직산의 LD₅₀는 2 g/kg이상으로 생각되었다.

2. 피부1차자극시험

시험기간동안 시험물질에 기인한 체중변화, 임상증상, 폐사 등은 관찰되지 않았으며(data not shown), 시험물질 처치군의 적용부위에서 가벼운 홍반이 관찰되어 피부1차자극지수 (P.I.I.)가 0.21로 산정되었으나(Table 1), 이는 무자극 범위에 속하는 수치였다.

3. 안점막 자극시험

시험기간동안 시험물질에 기인한 체중변화, 임상증상, 폐사 등은 관찰되지 않았으며(data not shown), 시험물질의 적용부위에서 비세안 (non-washing)군의 경우 1시간째에 몇몇 동물에서 결막 혈관의 약한 충혈이 관찰되었으나 점점 약해져서 48시간 이후에는 아무런 증상도 관찰되지 않았다. 세안(washing)군은 1마리에서 1시간째에만 약한 결막 발적이 관찰되었다. 이로써 비세안군 및 세안군의 Acute Ocular Irritation Index (A.O.I.)값은 1시간째의 Mean Ocular Irritation Index (M.O.I.) 값인 1.33 및 0.67로 각각 산출되었으나(Table 2), 모두 무자극 범위에 해당되었다.

4. 피부감작성시험 (GPMT)

시험기간동안 시험물질에 기인한 체중변화, 임상증상, 폐사 등은 관찰되지 않았으며(data not shown), 피부감작성 시험결과 대조물질 처치군의 경우 모든 동물에서 홍반, 가피, 부

Table 1. Results of primary skin irritation test

		Sites treated with test compound (kojic acid)							
Application site		Intact				Abrasion			
Reaction type		Erythema and Eschar formation ¹⁾		Edema formation ²⁾		Erythema and Eschar formation		Edema formation	
Hrs after application		24	72	24	72	24	72	24	72
Animal No.									
M1		0	0	0	0	1	1	0	0
M2		0	0	0	0	0	0	0	0
M3		0	0	0	0	1	0	0	0
M4		1	0	0	0	0	0	0	0
M5		0	0	0	0	0	0	0	0
M6		0	0	0	0	1	0	0	0
Total score		1	0	0	0	3	1	0	0
P.I.I.*		0.21							

		Sites treated with vehicle (PEG400)							
Application site		Intact				Abrasion			
Reaction type		Erythema and Eschar formation		Edema formation		Erythema and Eschar formation		Edema formation	
Hrs after application		24	72	24	72	24	72	24	72
Animal No.									
M1		0	0	0	0	0	0	0	0
M2		0	0	0	0	0	0	0	0
M3		0	0	0	0	0	0	0	0
M4		0	0	0	0	0	0	0	0
M5		0	0	0	0	0	0	0	0
M6		0	0	0	0	0	0	0	0
Total score		0	0	0	0	0	0	0	0
P.I.I.*		0							

Grade of Erythema and Eschar formation¹⁾ 0 (No erytherma), 1 (Very slight erytherma), 2 (Well-defined erythema), 3 (Moderate to severe erythema), 4 (Severe erytehma or eschar formation)

Grade of Edema²⁾ 0 (No edema), 1 (Very slight edema), 2 (slight edema), 3 (Moderate edema), 4 (Severe edema)

* P.I.I.: Primary irritation index, Σ Total Score/(Animal No. \times 4)

Table 2. Results of eye irritation test

Animal No.	Time after treatment(kojic acid)						
	1 hr	24 hrs	48 hrs	72 hrs	4 days	7 days	A.O.I. ^{b)}
Non-washing							
M1	2*	2	0	0	0	0	
M2	0	2	0	0	0	0	
M3	0	0	0	0	0	0	
M4	2	0	0	0	0	0	
M5	2	0	0	0	0	0	
M6	2	2	0	0	0	0	
Average score (M.O.I.) ^{a)}	1.33	1.0	0	0	0	0	1.33
Washing							
M7	0	0	0	0	0	0	
M8	0	0	0	0	0	0	
M9	2	0	0	0	0	0	
Average score (M.O.I.)	0.67	0	0	0	0	0	0.67

* Total score = (Cornea opacity × area of cornea involved × 5) + (Iris lesion × 5) + (Conjunctiva redness + chemosis + exudates) × 2

^{a)} M.O.I. (Mean ocular irritation index): total score/tested animal No. in each observation time

^{b)} A.O.I. (Acute ocular irritation index): maximum among M.O.I.

(0~5, non irritant; 5~15, minimally irritant; 15~30, mildly irritant; 30~60, moderately irritant; 60~80, severely irritant; 80~100, extremely irritant)

종등의 증상이 관찰되지 않았으나 시험물질군의 경우 1% 야기 부위에서 40%의 감작율을 보였고, 0.5% 야기부위에서는 10%의 감작율이 관찰되었다(Table 4). 용매 감작후 실시한 피부 자극 대조부위 수치에서는 1% 처치부위에서 5%의 양성이 관찰되었다. 양성대조군 (DNCB)에서는 모든 동물에서 24, 48, 72시간에 명백한 홍반(양성을: 100%)이 관찰되었다.

5. 광독성시험

시험기간동안 시험물질에 기인한 체중변화, 임상증상, 폐사 등은 관찰되지 않았으며(data not shown), 시험물질인 코직산(1%) 처치군의 경우, UVA 조사 및 비조사 부위에서 자극

이 관찰되어 않아 광독성지수는 0으로 산출되었다(Table 5). 양성대조물질인 0.1% 8-MOP는 광독성 지수가 2.0으로 계산되어, mildly phototoxic한 물질로 평가되었다.

6. 광감작성시험

시험기간동안 시험물질에 기인한 체중변화, 임상증상, 폐사 등은 관찰되지 않았으며(data not shown), 시험물질인 코직산(1%)의 광감작성 시험결과, UVA 조사부위 및 비조사 부위에서 자극이 관찰되어 않아 광감작성지수는 0으로 산출되었다(Table 6). 양성대조물질인 chlorpromazine(0.1%)은 자극지수가 1.8로 계산되어, mildly photoallergen으로 평가되었다.

Table 3. Results of Primary irritation test in guinea pig

Materials	Concentration (%)	24 hrs					72 hrs				
		0	1	2	3	4	0	1	2	3	4
kojic acid	5	5	1	-	-	-	6	-	-	-	-
	1	6	-	-	-	-	6	-	-	-	-

Table 4. Results of guinea pig maximization test

Test Compound	Induction conc.(%)	Challenge conc. (%)	Positive response (%)* by the 1st challenge		
			24 hr	48 hr	72 hr
kojic acid	5	1	30	40	0
		0.5	10	0	0
DNCB (Positive Control)	0.1	0.1	100	100	100
PEG400 (Negative control)	-	kojic acid (1) PEG400	5 0	5 0	0

* Grade I (0~8%), weak sensitizer; Grade II (9~28%), mild sensitizer; Grade III (29~64), moderate sensitizer; Grade IV (65~80%), strong sensitizer; Grade V (81~100%), extreme sensitizer; Estimated allergen showed above 29% of positive response.

Table 5. Evaluation of phototoxic test

Test Compound	No. of animal	Irritation Index ^{a)}		Phototoxic index ^{b)}	Evaluation
		Non-irradiation site	UV-irradiation site		
kojic acid	5	(0 + 0)/5 = 0	(0 + 0)/5 = 0	0	Non-phototoxic
PEG400 (Negative control)	5	(0 + 0)/5 = 0	(0 + 0)/5 = 0	0	Non-phototoxic
8-MOP (Positive control)	5	(0 + 0)/5 = 0	(10 + 0)/5 = 2	2.0	Mildly-phototoxic

^{a)} Irritation Index

= (Max. score of erythema and eschar + Max. score of edema)/No. of animals

^{b)} Phototoxic Index

= Irritation index of UV irradiation site - Irritation index of non irradiation site

(0, non phototoxic; 0.1~0.5, practically non phototoxic; 0.6~1.5, minimally phototoxic; 1.6~3.0, mildly phototoxic; 3.1~5.0, moderately phototoxic; 5.1~6.5, severely phototoxic; 6.6~8.0, extremely phototoxic)

Table 6. Evaluation of photosensitization test

Material	No. of animal	Irritation Index ^{a)}		Photoallergic index ^{b)}	Evaluation
		Non-irradiation site	UV-irradiation site		
kojic acid	5	(0 + 0)/5 = 0	(0 + 0)/5 = 0	0	Non-photoallergen
PEG400 (Negative control)	5	(0 + 0)/5 = 0	(0 + 0)/5 = 0	0	Non-photoallergen
Chlorpromazine (Positive control)	5	(0 + 0)/5 = 0	(9 + 0)/5 = 1.8	1.8	Photoallergen

^{a)} Irritation Index = (Max. score of erythema and eschar + Max. score of edema)/No. of animals

^{b)} Photoallergic Index

= Irritation index of UV irradiation site - Irritation index of non irradiation site
(0, non photoallergic; 0.1~0.5, practically non photoallergic; 0.6~1.5, minimally photoallergic;
1.6~3.0, mildly photoallergic; 3.1~5.0, moderately photoallergic; 5.1~6.5, severly photoallergic;
6.6~8.0, extremely photoallergic)

V. 고 찰

코직산은 멜라닌 색소 억제제로 알려져 기능성화장품 원료로 많이 사용되어지고 있으나, 최근 피부암 등 피부에서의 독성에 대한 의구심이 조금씩 발표되고 있는 실정이다.¹⁻³

그러므로 이번 실험은 기능성 화장품원료로 두루 사용되고 있는 코직산에 대한 피부관련 부작용을 규명하기 위해 실시되었다. 본 시험 결과 코직산은 단회투여독성에서 LD₅₀값이 2 g/kg 이상으로 판찰되었으며, 피부1차자극시험 (P.I.I.=0.21) 및 안점막시험 (Non-washing group A.O.I.=1.33, Washing group A.O.I.= 0.67) 결과도 무자극 범위에 해당되었다. 그러나 피부1차자극시험에서 비록 음성의 범주지만 초기에 약간의 홍반이 관찰되어 피부자극 유발에 대한 약간의 우려감이 관찰되었다.

GPMT에 의한 피부감작성시험 결과에서는 실제 최고 임상사용농도인 1% (양성을 40%) 애기 부위에서 감작성이 유발되었다. 기니픽에 서의 이 결과는 실제로 임상에서의 감작 유발

에 대한 우려감을 보여줄 수 있는 결과로서 매우 조심스럽다 할 수 있다. 그러나 이미 다년간 임상적으로 사용되어지고 있는 농도에서 아직까지 큰 문제 없이 사용되어지고 있다는 점을 미루어 볼 때, 종간 차이에 의해 사람에서는 감작유발이 일어나지 않고 있다고 판단되어진다.

코직산에 대한 UV 흡광여부를 200 ~ 400 nm 사이에서 측정한 결과 흡광 peak가 관찰되어 광독성 시험 및 광감작성 시험도 실시하였다. 시험물질인 코직산(1%)의 광독성 시험 결과, UVA 조사 및 비조사 부위에서 자극이 관찰되지 않아 광독성이 없는 것으로 판단된다. 또한 코직산(1%)의 광감작성 시험결과에서도, UVA 조사부위 및 비조사 부위에서도 자극이 전혀 관찰되지 않아 광감작성 유발능도 없는 것으로 판단된다.

이상의 시험결과 코직산은 임상적 사용농도 수준에서 동물 시험 결과 기니픽을 이용한 감작성시험에서는 약간의 감작성을 유발할 수 있는 위험성이 있는 물질로 사료되며, 그 외

기능성화장품 허가에 필요한 시험들에서는 자국이 없을 것으로 판단된다.

그러나 이미 코직산은 임상적으로 많이 사용되어지고 있기 때문에 사람에서 느껴지는 피부감작성은 동물실험에서와는 달리 그리 심각하지 않을 것으로 사료되지만, 추후 위험성을 감안한 지속적인 추이는 예의주시 해야 할 것으로 판단된다.

참고문헌

1. Kim, J.H., Baek, S.H., Kim, D.H., Choi, T.Y., Yoon, T.J., Hwang, J.S., Kim, M.R., Kwon, H.J., Lee, C.H. (2008) Downregulation of melanin synthesis by haginin A and its application to in vivo lightening model. *J. Invest. Dermatol.* 128(5), 1227-1235
2. Simon, J.D., R zanowska, M. (2008) Perspectives on the structure and function of melanin. *Pigment Cell Melanoma Res.* 21(3):346-7
3. Masse, M.O., Duvallet, V., Borremans, M., Goeyens, L. (2001) Identification and quantitative analysis of kojic acid and arbutine in skin-whitening cosmetics. *Int. J. Cosmet. Sci.* 23(4):219-232.
4. Moto, M., Mori, T., Okamura, M., Kashida, Y., Mitsumori, K. (2006) Absence of liver tumor-initiating activity of kojic acid in mice. *Arch. Toxicol.* 80(5):299-304
5. 「기능성화장품 기준 및 시험방법」 식품의약품 안전청 고시 제2007-44호, 식품의약품안전청, 서울.
6. 「의약품등의독성시험기준」 식품의약품안전청 고시 제2005-60호, 식품의약품안전청, 서울.
7. 「기능성화장품등의심사에관한규정」 식품의약품 안전청 고시 제2008-17호, 식품의약품안전청, 서울.
8. CTFA Safety Testing Guideline: The Cosmetic, Toiletry and Fragrance Association, Inc. Washington, D.C. 20023, 1991
9. Guidelines for the testing of chemical substance (1992), OECD, Paris, France.
10. Draize, J. H. (1959): Appraisal of the Safety of Chemical in Foods, Drugs and Cosmetics, The Staff of the Division of Pharmacology, Food and Drug Education and Welfare, Pub.
11. Magnusson, B. and Kligman, A.M.(1969): The identification of Contact allergens by animal assay. The guinea pig maximization test, *J.Inv.Derm.* 52, 268-276.
12. Lovell, W.W. and Sanders, D.J. (1992): Phototoxicity testing in guinea pig, *Food and chemical toxicology*; 30: 155-160.
13. Gerberick, G.F. and Cindy, A. (1989): Contact photoallergy testing of sunscreens in guinea pigs. *Contact Dermatitis*, 20:251-259.

전통 동치미에서 분리한 높은 덱스트란 생성능을 가지는 신균주 *Leuconostoc citreum* S5의 분리 및 특성

손민정¹ · 권오식³ · 이삼빈^{1,2}

계명대학교 전통미생물자원센터¹ · 계명대학교 식품가공학과² · 계명대학교 미생물학과³

Isolation and Characterization of a Novel *Leuconostoc citreum* S5 with High Dextran Producing Capacity from Korean Fermented Vegetable

Min-Jung Son¹ · Oh-Sik Kwon³ · Sam-Pin Lee^{1,2}

¹Traditional Microorganism Resources Center, Keimyung University, Daegu 704-701 Korea

²Dept. of Food Science and Technology, Keimyung University, Daegu 704-701 Korea

³Dept. of Microbiology, Keimyung University, Daegu 704-701 Korea

요약. 전통 동치미에서 분리한 높은 점액성을 나타내는 균을 분리하여 분석한 결과, *Leuc. citreum*으로 동정되었으며, 이를 *Leuc. citreum* S5로 명명하였다. *Leuc. citreum* S5는 형태적, 생리학적 특성이 *Leuc. citreum* KCTC 3526과 유사하였으며, 두 균주 모두 C16:0 및 C18:1 w9c가 주요 지방산으로 관찰되었다. *Leuc. citreum* S5 균주는 25°C, pH 7에서 가장 높은 점성을 나타내어 균주의 활성을 나타내는 최적 조건으로 나타났고, 설탕을 이용하는 균주로서 탄소원으로 sucrose, 질소원으로 yeast extract를 첨가했을 때 발효물의 점조도가 월등히 높아 이를 이용하는 것으로 나타났다. 또한 *Leuc. citreum* S5 균주는 분자량이 1300 kDa인 낮은 size의 dextran을 많이 생산되었고, *Leuc. citreum* ATCC 3526 균주는 분자량이 2100 kDa인 높은 size의 dextran을 생산하여 두 균주가 생산하는 발효물의 분자량의 크기가 차이가 있는 것으로 나타났다.

Abstract. A novel lactic acid bacterium isolated from traditional fermented vegetable was identified as *Leuconostoc citreum* S5. The strain showed the close similarity to the morphological and physiological properties of *Leuconostoc citreum* KCTC 3526. Both strains contained C16:0, C18:1 and w9c as major fatty acid. In particular, *Leuc. citreum* S5 indicated the optimum production of mucilage at 25°C and initial pH 7. Also, the strain can utilized sucrose as a carbon source and result in the higher production of mucilage in the presence of yeast extract. The molecular weight of mucilage (dextran) produced by *Leuc. citreum* S5 and *Leuc. citreum* ATCC 3526 showed 1300 kDa and 2100 kDa, respectively.

Key words: *Leuconostoc citreum*, dextran, consistency

Introduction

*Leuconostoc*은 동그란 구형의 모양을 하고 있는 유산균으로 *Leuconostoc mesenteroides*라는 종명을 갖는 균이 발효의 주균으로 알려

져 있다(1). *Leuconostoc* 속에 속하는 유산균들의 가장 큰 특징으로는 몸에서 분해가 안 되는 섬유질과 비슷한 비소화성 식이섬유인 dextran을 스스로 만들어 내는 것이다(2, 3). 산업적으로 생산된 dextran은 석유의 차 회수,

종자의 표면처리, 종이나 섬유제품 및 가구의 점도, 경도 부여제 및 고착제, 화장품의 콜로이드 혼탁제(4, 5), 도료나 필름, 분자체, 크로마토그래피용 비드(6), 그리고 식품에도 응용하여 맥주의 향기와 포지성을 주는 침가제와 음료, 시럽, 당과, 젤리 등에 침가하여 결정화를 방지하고 점성을 증가시키는데 사용한다(7). 특히 pseudoplastic한 성질로 식품의 물성에 매우 중요한 역할을 하며, 흡습성과 점착성 그리고 낮은 pH에서도 점도가 높기 때문에 ice cream과 sherbets의 조직을 안정화하는데 뛰어난 효과를 가지고 있다. 특히 의료용으로는 분자량 범위에 따라 혈장대체제 혹은 혈액흐름촉진제 등으로 사용된다(6, 7, 8).

*Leuconostoc*의 dextran 생산은 dextranase에 의해 기질인 sucrose로부터 glucose가 분리되어 중합반응에 의해 고분자의 dextran이 생산된다. Dextran 용액에 대한 흐름의 성질은 Morris 등(9)에 의해 관찰되었고, 중간 농도에서의 dextran의 확산(10,11)과 dextran-enzymatic synthesis media의 유동학적 특성(12)이 연구되었다. Polysaccharide gel들 사이에서 나타나는 흐름성질의 차이는 다당류분자 cross linkage 또는 intermolecule의 수와 성질에 크게 의존하며, 이것은 polysaccharide의 화학적 구조에 의존하고 chain segment junction zone에서 용매계와의 상호관계에 의존하는 특성적인 구조를 가짐이 밝혀졌다. 현재까지의 dextran 생산에 관한 연구는 모두 *Leuc. mesenteroides*에 의한 dextran 생산에 관한 연구보고가 대부분이었고, 한국의 전통식품인 김치에서 분리된 *Leuconostoc citreum*의 dextran 생산에 관한 연구는 미비한 상태이다. 따라서 본 연구에서는 김치에서 *Leuc. citreum* S5 균주를 분리, 동정하여 분리된 균주의 온도, pH 등의 배양조건을 검토하고, 이 균을 이용해 생산된

dextran 발효물의 물리화학적 평가를 통해 식품 및 기능성 소재로서의 활용도를 높이고자 한다.

Material and Methods

재료 및 시약

균주 배양에 사용된 기본배지는 Difco Co. (USA)의 MRS broth를 사용하였다. 그람염색은 Difco Co.(USA)를 사용하였고, 균주 동정에서 당 이용 및 기타 실험은 Sigma Co. (USA) 및 시중에 시판되는 특급품을 구입하여 사용하였으며, 배지 최적 성분에 사용된 탄소원 및 질소원 또한 특급품 이상을 사용하였다.

균주의 분리

전통 동치미를 멸균 종류수에 잘 희석시킨 후, 그 액을 MRS 한천 플레이트에 도말하여 30°C에서 24시간 동안 배양하여 점성을 지니는 균주를 개별 분리하였다. 이 중 plate상에서 점성이 높은 균주를 1차적으로 선별하고, 기본 배지에서 발효하였을 때, 생균수가 높고 산 생성이 우수한 균주를 선택하여 본 실험에 사용하였다. 분리된 균주는 sucrose가 포함된 agar plate에서 30°C, 24시간 계대 배양하여 활성화시킨 후, 한 colony를 따서 멸균된 스타터 배양액 (2% sucrose, 0.5% yeast extract, 0.25% tryptone, 0.25% K₂HPO₄ 함유)에 접종한 후 30°C incubator에서 24시간 정지 배양시켜 사용하였다. 또한 공시균주로는 *Leuconostoc citreum* KCTC 3526균을 한국종균협회에서 구입하여 비교 균주로 사용하였다.

본 배양

균주가 잘 생육하기 위한 제한배지로 20% sucrose(w/v), 0.5% potato powder(w/w), 1.0% skim milk(w/w), 0.5% K₂HPO₄(w/w),

0.02% MgSO₄(w/w), 0.1% CaCO₃(w/w), 0.2% yeast extract(w/w)를 혼합하여 121°C에서 15분간 멸균하여 이를 본 배양 배지로 사용하였다. 여기에 스타터 배양액을 5% 첨가하여, 24시간에서 48시간 동안 30°C incubator에서 배양하였다.

균주의 배양학적, 생리학적 및 생화학적인 특성

균주 배양에 사용된 기본배지는 Difco Co.(USA)의 MRS broth를 사용하였다. 그람염색은 Difco Co.(USA)를 사용하였고, 당 이용 및 기타 실험은 Sigma Co.(USA) 및 API 20E kit를 사용하였다.

균주의 형태학적 특성

균주의 형태 관찰을 위해 MRS broth agar에 24시간 배양한 균체를 60, 70, 80, 90, 95, 100% ethanol로 단계적으로 수분을 제거하여 SEM(scanning electron microscope, Hitachi S-4200, Japan)으로 관찰하였다.

지방산 분석

균주의 세포 지방산 분석을 위해 MRS broth agar에 30°C, 24시간 배양한 균체의 지방산을 Microbial Identification System (MIDI; Microbial ID)의 지침에 의해 추출하여 분석하였다.

pH, 산도 측정

pH는 발효물을 1g씩 달아 증류수를 5 mL 첨가하여 vortex한 후, pH meter (Digital pH meter 420A+, Thermo Orion, Beverly, MA.)를 사용하여 측정하였고, 적정 산도는 pH meter로 pH가 8.3에 도달할 때까지 0.1N-NaOH로 적정한 소비량을 lactic acid 함량(%, v/v)으로 환산하였다.

점조도 측정

생산된 dextran 발효물의 점도는 Rheometer

System(HAAKE RheoStress 1, Germany)에 spindle(Platte PP35 Ti, D=35 mm)을 장착하여 measuring plate P61을 사용하여 측정하였다. 측정온도 20°C에서 전단속도($\dot{\gamma}$)는 1-100s⁻¹의 범위에서 점도측정을 통해서 유동특성을 알아보았고, 점조도지수와 유동지수 값은 Power law model과 Herschel-Bulkley index로 측정하였다.

텍스트란의 분자량 측정

텍스트란의 평균 분자량(M_n)은 Shodex KB 805 column과 RI detector(Waters, model 410)를 이용하여 GPC(gel permeation chromatography)를 이용해 측정하였다. 텍스트란 표준물질은 American polymer standards사의 것을 사용하였고, 이동상으로 0.1M NaNO₃를 분당 1mL의 속도로 흘려주었다.

Result and Discussion

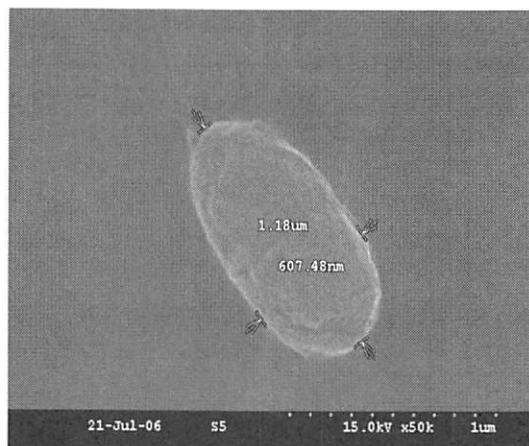
균주의 분리 및 동정

Leuc. citreum S5 균주에 대한 배양학적, 생리학적, 생화학적 특성 및 당 이용성은 Table 1에 나타내었다. 분리된 균주는 L-arabinose, D-fructose, D-galactose, D-glucose, D-mannitol, D-sucrose, salicin 등의 당들은 이용할 수 있는 것으로 나타났으며, adonitol, D-cellobiose, raffinose, L-rhamnose, D-xylose의 이용성은 없는 것으로 나타났다.

분리한 균주의 형태학적 특성은 Fig. 1의 전자현미경사진과 같이 세포 크기는 대략 0.6~0.7×1.18~1.53 μm인 짧은 막대모양의 간균이며, 배양학적 특성으로는 통성혐기성이며, 균체 성장에 미치는 온도영향에서는 15~30°C에서 성장이 양호하였다. MRS 한천 배지에서는 유백색의 균집락을 형성하였고, 높은 점액성을 나타내는 균의 집락을 형성하였으며, 등글고 불록한 외형을 나타내었다.

Table 1. Differential phenotype feature of an isolate *Leuconostoc citreum* S5

Characteristics	Strain <i>Leuc.</i> <i>citreum</i> S5
Gram reaction	+
Growth temperature	15~37°C
Shape	Rod, 0.6~0.7 × 1.18~1.53 μm
Aerobic condition for growth	+
Unaerobic condition for growth	+
Mobility	-
Voges-Proskauer test	-
O/F test	+
Catalase	+
Urease	-
Gelatinase	-
Citrate	-
L-arabinose	+
D-cellobiose	-
D-galactose	+
D-mannitol	+
L-rhamnose	-
D-sucrose	+
Adonitol	-
D-fructose	+
D-glucose	+
Raffinose	-
Salicin	+
D-xylose	-

Fig. 1. Scanning electron micrograph of the strain *Leuc. citreum* S5.

지방산 분석

분리된 균주의 DNA의 GC 함량을 HPLC로 분석한 결과, 공시균주인 *Leuconostoc citreum* KCTC 3526은 GC 함량이 41.98 mol%인 것에 비해 본 발명 균주는 41.45 mol%로서 유사한 GC 함량을 가졌다.

세포벽 지방산 분석을 위해 공시균주인 *Leuconostoc citreum* KCTC 3526을 함께 분석한 결과를 Table 2에 나타내었고, 두 균주 모두 C16:0 및 C18:1 w9c가 주요 지방산으로 관찰되었고, 두 균주는 유사한 분석 결과를 나타내었다.

Table 2. Analysis of cellular fatty acid components between *Leuc. citreum* S5 and *Leuc. citreum* KCTC 3526

세포벽 지방산	<i>Leuconostoc</i> <i>citreum</i> S5	<i>Leuconostoc</i> <i>citreum</i> KCTC 3526
C14:0	6.48	5.61
C16:0	29.43	31.20
C18:1 w9c	22.35	14.26
C18:1 w7c	8.92	6.99
C19:0 cyclo w8c	15.85	20.91

온도의 영향

Leuconostoc citreum S5 균주의 온도에 따른 발효 정도를 알아보기 위해 다양한 온도에서 발효를 행하여 발효물의 점조도를 측정하였고, 공시균주인 *Leuconostoc citreum* 3526 균주와의 차이를 비교해 보았다. 25°C에서 발효하였을 때 가장 높은 점조도 값을 나타내었고, 30°C와 20°C의 발효에서도 발효 시간이 지남에 따라 점조도가 증가하였다. 또한 *Leuconostoc citreum* S5 균주가 공시 균주인 *Leuconostoc*

citreum 3526보다 모든 온도 조건에서 점조도 값이 월등히 높은 것으로 나타났다.

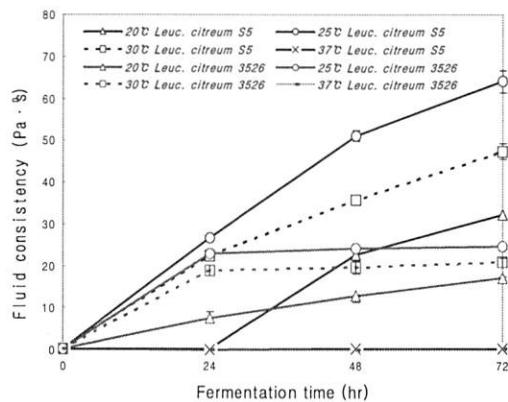


Fig. 2. Comparison of consistency of the culture broth fermented by *Leuc. citreum* S5 and *Leuc. citreum* KCTC 3526 at different culture temperature.

pH의 영향

Leuconostoc citreum S5 균주와 공시균주인 *Leuconostoc citreum* ATCC 3526 균주를 이용하여 발효를 시행해 발효물의 점조도 변화를 알아보았다. 기본 배지의 pH를 5-9로 조절한 후, 발효 48시간 후의 점조도를 비교하였다. pH 조절을 하지 않았을 때 기본 배지의

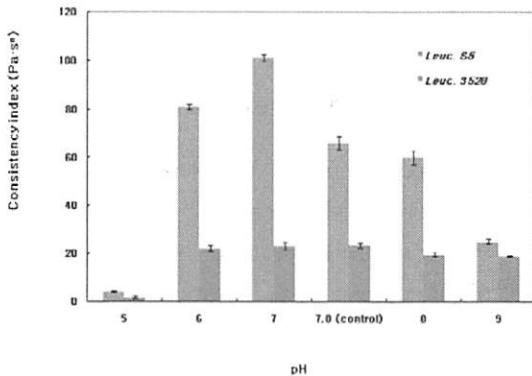


Fig. 3. Comparison of consistency of culture broth fermented by *Leuc. citreum* S5 and *Leuc. citreum* KCTC 3526 with different initial pH.

pH는 7.8을 나타내었다. 발효 후 점조도를 비교한 결과, 전체적으로 *Leuconostoc citreum* S5 균주를 이용하였을 때 점조도가 높게 나타났으며, 특히 *Leuconostoc citreum* S5 균주는 pH 7에서 101.36 Pa·sⁿ의 가장 높은 점조도를 나타내었다. 한편, *Leuconostoc citreum* 3526 균주를 이용하여 발효하였을 때에는 pH 6에서 pH 9까지 모두 비슷한 점조도를 나타내어 두 균주가 활성을 나타내는 pH의 범위가 다른 것을 알 수 있었다.

탄소원의 영향

Leuconostoc citreum S5 균주의 탄소원의 영향을 조사하기 위해 pH 7로 조절한 기본 배지에 다양한 탄소원을 2%(w/v)씩 첨가하여 48시간 발효시킨 후 생산된 텍스트란의 점조도를 조사하였다. 실험에 사용한 탄소원은 glucose, mannose, xylose, saccharose, galactose, fructose, maltose이다. Fig. 4의 결과와 같이 saccharose를 첨가하였을 때, 발효물의 점조도가 높았으나 control보다는 값이 낮아 본 균주 *Leuconostoc citreum* S5는 다른 탄소원의 첨가에 따른 활성은 없는 것으로 나타났다.

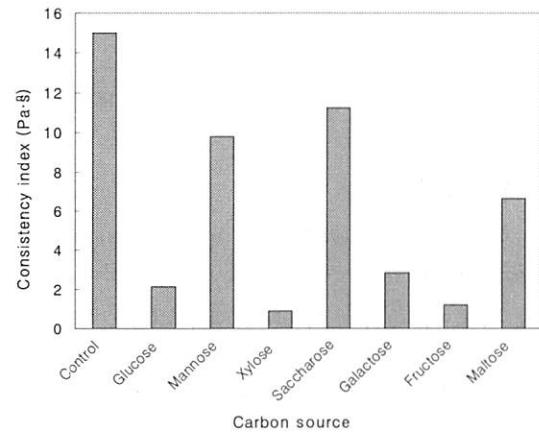


Fig. 4. Effects of carbon sources on the production of dextran.

질소원의 영향

Leuconostoc citreum S5 균주에 대한 질소원의 영향을 조사하기 위해 ammonium nitrate, ammonium sulfate, glycine, potassium nitrate, tryptone, urea, yeast extract를 이용하여 알아보았다. pH 7로 조절한 기본 배지에 위의 질소원들을 각각 1% (w/v)씩 첨가하여 48시간 발효시킨 후 생산된 발효물의 점조도를 조사하였다. 그 결과 yeast extract를 첨가했을 때 발효물의 점조도가 월등히 높은 것을 알 수 있어 본 균주 *Leuconostoc citreum* S5는 질소원으로 yeast extract를 첨가했을 때 활성이 높은 것으로 나타났다.

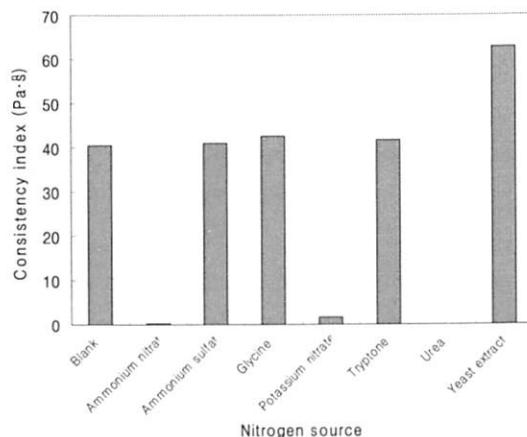


Fig 5. Effects of nitrogen sources on the production of dextran.

분자량 측정

Leuconostoc citreum S5 균주와 *Leuconostoc citreum* ATCC 3526 균주를 이용하여 생산된 발효물의 분자량을 측정해 보았다. 그 결과 두 균주를 이용했을 때, 1,300 KDa과 2,100 KDa의 분자량을 가진 dextran이 생산되는 것을 알 수 있었고, *Leuconostoc citreum* S5 균주를 이용했을 때에는 pH에 상관없이 분자량이 1,300 KDa인 낮은 size의 dextran이 많이

생산되었고, *Leuconostoc citreum* ATCC 3526 균주를 이용했을 때에는 pH 5인 경우를 제외하고, 분자량이 2100 KDa인 높은 size의 dextran이 생산되는 것을 알 수 있었다.

결 론

전통 동치미에서 분리한 높은 점액성을 나타내는 균을 분리하여 *Leuc. citreum*으로 동정하였으며, 이를 *Leuc. citreum* S5로 명명하였다. *Leuc. citreum* S5는 형태적, 생리적 특성이 *Leuc. citreum* KCTC 3526과 유사하였으며, 두 균주 모두 C16:0 및 C18:1 w9c가 주요 지방산으로 관찰되었다. *Leuc. citreum* S5 균주는 25°C, pH 7에서 가장 높은 점성을 나타내어 균주의 활성을 나타내는 최적 조건으로 나타났고, 설탕을 이용하는 균주로서 탄소원으로 saccharose, 질소원으로 yeast extract를 첨가했을 때 발효물의 점조도가 월등히 높아 이를 이용하는 것으로 나타났다. 또한 *Leuc. citreum* S5 균주는 분자량이 1300 KDa인 낮은 size의 dextran을 많이 생산되었고, *Leuc. citreum* ATCC 3526 균주는 분자량이 2100 KDa인 높은 size의 dextran을 생산하여 두 균주가 생산하는 발효물의 분자량의 크기가 차이가 있는 것으로 나타났다.

References

- A. Lopez-Munguia, V. Pelenc, M. Remaud, J. Biton, J. M. Michel, C. Lang, F. Paul, P. Monsan. Production and purification of alternansucrase, a glucosyltransferase from *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B-1355, for the synthesis of oligoalternans. *Enzyme and Microbial Technology*. 1993, 15, 77-85.
- A. Lopez, P. Monsan. Dextran synthesis

- by immobilized dextran sucrase. *Biochimie* 1980, 62, 323-329.
3. P. Monsan, F. Paul, D. Auriol, A. Lopez. Dextran synthesis using immobilized *Leuconostoc mesenteroides* dextransucrase. *Methods in Enzymology*. 1987, 136, 239-254.
 4. Shamala, T. R. Prasad, M. S. Preliminary studies on the production of high and low Viscosity dextran by *Leuconostoc* spp. *Process Biochemistry*. 1995, 30(3), 237-241.
 5. Santos, M. Teixeira, J. Rodrigues, A. Production of dextransucrase, dextran and fructose from sucrose using *Leuconostoc mesenteroides* NRRL B512(f). *Biochem Engin. J.* 2000, 4, 177-188.
 6. Kim, D. Thomas, S. Fogler, H. Effects of pH and trace minerals on long-term starvation of *Leuconostoc mesenteroides*. *Appl. Environ. Microbial.* 2000, 66, 976-981.
 7. J. Mazukiewicz, P. Tomaszik. Viscosity of solutions of dextrans with selected sweeteners. *Eur. Food. Res. Technol.* 2001, 213, 470-473.
 8. H. Kim, H. J. Eom, J. S. Lee, J. S. Han, N. S. Han. Statistical optimization of medium composition for growth of *Leuconostoc citreum* *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2004, 9, 278-284.
 9. Morris, E. R. Curtute, A. N. Ross-Murphy, S. B. Rees, D. A. Concentration and shear rate dependence of viscosity in random coil polysaccharide solutions. *Carbohydr. Polymers*, 1981, 5.
 10. Barry, N. P. Waynem, D. C. Diffusion of dextran at intermediate concentration. *J. Cem. Soc. Faraday Trans I*. 1982, 1208.
 11. Comper, W. D. Preston, B. N. The approach of mutual diffusion coefficient to molecular weight independence in semidilute solution of polydisperse dextran fractions. *J. Phys Chem* 1986, 90, 128.
 12. Tecante, A. Lopez Munguia, A. C. Rheological characterization of dextran enzymatic synthesis media. *J. applied Polymer Science*. 1986, 31, 2337.

외식업체 이직비용 산출에 대한 사례 연구

최미경

계명대학교 자연과학대학 식품영양학과

A Case Study on Calculating Turnover Cost of a Foodservice Organization

Mi-Kyung Choi

Department of Food Science & Nutrition, Collage of Natural Science,
Keimuing University, Daegu 704-701, Korea

요 약. 본 연구는 이직 시 수반되는 비용 요소를 조사하고 사례연구를 통해 외식업체에 있어 이직 시 발생되는 손실을 금전단위로 환산하여 가시화함으로써 내부마케팅 수립에 있어서의 시사점을 제시하고자 실시 되었다. 문현 조사 결과 이직비용은 크게 퇴직비용, 채용비용, 교육·훈련비용으로 나뉘었으며 세부 항목들과 그 산출 방법을 제시하였다. 사례 연구 대상 업체의 이직비용 산출 결과, 직무 및 직급에 따라 연봉의 13.9%~87.9%로 다양하게 나타났는데, 이직비용의 연봉대비 비율은 근속년수와 연봉에 따라 다소 다른 양상을 보였다.

Abstract. The purposes of this study were to examine turnover cost factors and to calculate turnover cost of a foodservice organization. Separation costs, replacement costs, and training costs were found out as turnover cost factors through literature research. The overall turnover cost for an employee of a selected foodservice organization ranged from 15.5% to 88.8% of the employee's annual salary. The ratio of turnover cost per annual salary were differ with different periods of employment and annual salaries.

I. 서 론

국내 외식산업은 최근 양적 성장을 거듭하면서 업계 내 경쟁이 가속화되고 있다. 그와 함께 외부고객에 대한 서비스 품질 개선, 고객 충성도 제고 등에 대한 노력은 비교적 꾸준히 이루어지고 있는 반면, 내부고객 즉 종사원에 대한 효율적 인적자원관리에는 상대적으로 관심과 투자가 덜 이루어지고 있다. 결과적으로 기대에 못 미치는 근무 조건, 낮은 임금, 사회적 인식 등으로 인해 높은 이직률을 나타내고 있고(1), 외식업계에서는 인력공급의 절대적 부족보다는 이직으로 인한 인력부족이 증가하

고 있다(2). 이러한 이직은 기술 축적을 어렵게 만들고 생산성을 저하시킬 뿐만 아니라, 업체의 경쟁력 약화로 이어지고 있다.

이직(turnover)이라는 용어는 여러가지로 정의될 수 있으나 통상적으로 '조직으로부터 금전적 보상을 받고 있는 개인이 조직내에서 구성원자격을 스스로 종결하는 것으로 조직외부로 이동하는 것'이라는 협의의 이직(3)이 주된 연구 대상이 되어 왔다. 협의의 이직 중에서도 그 성격에 따라 자발적 이직(voluntary turnover), 비자발적 이직(involuntary turnover), 순기능적 이직(functional turnover), 역기능적 이직(dysfunctional turnover), 불가피한 이직

(unavoidable turnover), 통제 가능한 이직 (avoidable turnover) 등으로 분류될 수 있다 (3, 4). 이 중 조직의 기능에 악영향을 줄 수 있으면서 관리를 통해서 감소시킬 수 있는 이직, 즉 자발적, 역기능적, 통제 가능한 이직에 대한 관심이 상대적으로 많았다.

이직에 대한 연구는 비교적 오랜 기간 동안 많은 학자들에 의해 진행되어 왔다. 이직 관련 초기의 연구들은 종사원의 직무성과, 조직몰입, 직무만족 등이 이직의사에 미치는 영향을 살펴보는 것들이 많았으나, 점차 전전한 인적자원관리가 재정적 달성을 위한 관리성이 있음을 보여주는 연구들이 등장하였고(5, 6), 최근 높아지는 인건비 비중과 함께 이직으로 인한 유·무형적 손실들에 대한 중요성을 인지하기 시작하면서 이직비용에 대한 연구가 증가하고 있다(7~13). 특히 Cascio(7)는 이직비용 등 인력의 금전단위 환산의 목적은 비용의 측정뿐 아니라 통제 가능한 비용 요소를 관리함으로써 인적자원으로 인한 비용을 감소하기 위한 방법과 프로그램을 개발하는데 있다고 강조함으로써 이직비용의 측정이 인적자원관리 전반에서 활용될 수 있는 중요한 요소임을 시사하였다. 또한 Slade 등(14)은 여러가지 보상(rewards) 시나리오에 따른 종사원의 예상 잔류 기간을 파악하고, 해당 포트폴리오를 적용할 경우의 비용을 이직 발생시 소요되는 비용과 비교함으로써 인적자원에 대한 투자를 적정화한 마이크로소프트의 사례를 통해서 비용 분석을 통한 내부마케팅 전략 수립의 중요성을 강조하였다.

이직비용 측정 시 일반적으로 종사원의 퇴사부터 인원 충원까지의 절차에 소모되는 직접적인 비용 계산에 중점을 두었다. 이러한 전통적, 또는 보수적인 측정법(conservative estimates)에 의한 연구들에서 나타난 종사원

1인의 이직비용을 \$1,500~\$3,000로 평가되었 다.(7, 15). Hinkin과 Tracy(11)는 이러한 직접적 측정법에서의 항목들 외에 결원으로 인한 비용, 신규채용자의 기술 부족으로 인한 생산성 저하, 동료직원들의 업무 방해 등 생산성 저하 비용(lost-productivity costs)을 추가로 포함시켜 마이애미와 뉴욕 소재 4개 호텔을 대상으로 이직비용을 측정하였다. 그 결과, 1인당 이직비용은 부서 및 직무형태에 따라 평균 \$1,332~\$7,658의 넓은 분포를 나타내었는데, 기술부서에 비해 식음료, front office, housekeeping 부서의 이직률이 높았고, 주된 이직원으로 관리감독의 부실, 열악한 근무환경, 급여 등을 꼽아 적절한 투자와 인적자원 관리를 통해 이직비용을 감소시킬 수 있음을 시사하였다.

국내에서는 호텔 등 인적자원의 비중이 높은 산업을 중심으로 이직과 관련한 연구가 활발히 진행되어 왔으나(1, 16, 17), 이직비용에 대한 구체적인 국내 연구사례는 찾아보기 힘들다. 외국과 우리나라라는 조직문화, 조직시스템, 정서 등 모든 것이 차별화되므로 인적자원 관리에 있어서는 독자적인 국내 연구가 반드시 필요하다.

따라서 본 연구에서는 선행 연구들을 통해 이직비용 측정을 위한 비용 요소를 조사하고 사례연구를 통해 외식업체에 있어 이직 발생 시 수반되는 손실을 금전단위로 환산하여 가시화함으로써 내부마케팅 수립에 있어서의 시사점을 제시하고자 한다.

II. 연구 내용 및 방법

1. 조사 대상 및 기간

이직비용 측정 사례연구를 위해 대구시내 1개 외식업체를 선정하여 인사관리 책임자(업체 대표)를 대상으로 심층면접(in-depth interview)

을 실시하였다. 조사 일자는 2008년 7월 11일이며 문헌조사를 통해 개발된 구조화된 설문지를 토대로 면접을 진행하였다.

2. 연구 내용 및 분석 방법

심층면접에 앞서 이직 및 이직비용 관련 선행 연구들(7, 10~13)을 통해 이직비용 산출 시 기본적으로 규명되어야 할 비용 요소들에 대해 조사하고, 국내 외식업체의 실정을 반영하여 설문지와 산출 방법을 개발하였다.

문헌 조사를 통해 이직 시 수반되는 비용으로 분석된 비용 요소들(퇴사면접, 퇴사관련 행정업무, 퇴직금, 퇴직위로금, 모집·광고비용, 선발관련행정업무, 채용면접, 시험, 교통비, 건강검진, 입사관련 행정업무, 오리엔테이션, 각종 직무관련 교육훈련 등 외식업체 종사원의 이직 및 인원 대체 시 필요한 인력관리 각 과정에서 소요되는 손실)에 대해 금전 단위로 환산하는 수식을 개발하였고, 이를 계산하기 위해 필요한 항목들 즉, 각 단계별 소요되는 실질적인 금전적 비용, 물자, 시간, 인력 등의 비용요

소들을 포함하는 자유응답형(open-ended) 설문지를 개발하였다. 비용 요소들은 크게 퇴직비용, 채용비용, 교육·훈련비용의 카테고리로 묶였고, 사례연구를 통해 조사된 내용을 토대로 이직 시 수반되는 실제 비용이 산출되었다. 산출 시 이용된 급여와 근속년수는 해당업체 내 동일 직무의 동일 직급 평균치를 이용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 이직 비용 요소 조사

문헌 조사를 통해 조사된 직접적 이직 비용 요소를 표 1에 나타내었다. 직접적 이직 비용 요소들로는 크게 퇴사 면접, 퇴사관련 행정업무, 퇴직금 등에 소요되는 퇴직비용, 모집·광고, 선발관련 행정업무, 입사면접, 입사관련 행정업무, 기타 이사·주거비용, 유니폼 등에 소요되는 채용비용, 그리고 마지막으로 오리엔테이션, 배치 후 교육(on-the-job training), 교육 자료 제작 등에 소요되는 교육·훈련비용 등이 있었다.

표 1. 이직 비용 요소

비용 요소		내 용
퇴직 비용	퇴사면접	인사담당자 인건비, 퇴사자 인건비, 관련 소요 물자
	퇴사관련 행정업무	인사담당자 인건비, 관련 소요 물자
	퇴직금	법정 퇴직금, 기타(퇴직위로금 등)
채용 비용	모집·광고	광고제재비용, 모집 관련 전화/인터넷 비용, 인건비
	선발관련 행정업무	담당자 인건비, 관련 소요 물자
	입사면접	면접담당자 인건비, 교통비, Staff 회의, 관련 소요 물자
	입사관련 행정업무	담당자 인건비, 신체검사 비용, 각종 수수료
교육 . 훈련 비용	기타	이사·주거비용 지원, 유니폼 등
	오리엔테이션 (배치 전 교육)	교육담당자 인건비, 피교육자(입사자) 인건비, 강사 초청 비용, 관련 소요 물자
	OJT(On-the-job training) (배치 후 공식 교육)	교육담당자 인건비, 피교육자 인건비
	교육 자료	회사소개 자료, 기타 업무 관련 지침서 등

(Cascio 2000; Graef & Hill 2000; Hinkin & Tracey 2000; Simons & Hinkin 2001, McKinney et al. 2007)

2. 조사대상 업체의 일반적 사항

사례 연구를 위해 선정된 조사대상 업체의 일반적 사항을 표 2에 제시하였다. 대상 업체의 업태는 한식당으로 주류 판매를 포함한 평균 객단 가가 점심 8,000원, 저녁 15,000원이었다. 또한 좌석 수 120석, 대표 제외 종업원 수 11명의 규모를 가지고 있으며 영업년수는 15년이었다. 이직비용 산출에 사용된 종사원 직급별 해당업체 평균 급여 및 평균 근속년수는 표 3에 제시하였다.

표 2. 조사대상 업체의 일반적 사항

항목	내 용
업태	한식당
평균 객단가 (주류 포함)	점심: 8,000원 저녁: 15,000원
좌석 수	120석
종업원 수 (대표 제외)	11명
영업년수	15년

표 3. 직급별 평균 급여(보너스포함) 및 평균 근속 연수

비용 요소	주방 관리자	홀매니저 (점장)	조리사	서버	보조
평균 월급(천원)	2,000	1,800	1,300	1,200	1,100
평균 근속 연수(년)	10	10	3	3	1

표 4. 직급별 이직비용 및 급여대비 비율 (단위: 천원, %)

비용 요소	주방관리자	홀매니저 (점장)	조리사	서버	보조
퇴직비용	20,206	18,206	4,105	3,805	1,305
채용비용	89	89	89	89	89
교육·훈련비용	600	540	495	450	345
기타비용 (격려금, 보건증)	202	102	202	102	102
합계	21,307	18,936	4,891	4,445	1,840
급여대비 비율 (%, 연봉 기준)	87.9	87.7	31.4	30.9	13.9

각 항목별 금액에 있어 백원 이하의 금액은 반올림함.

3. 이직비용 산출

표 4는 대상 업체의 종사원 직무·직급별 이직비용 산출 결과이다. 선행 연구를 통해 조사되었던 비용 요소 중 일부 항목(퇴사관련 행정업무, 선발관련 행정업무, 입사관련 행정업무, 오리엔테이션, 교육자료 등)의 경우 해당업체에 적용하였을 경우 금액적으로 환산할 수 없을 정도의 수치인 관계로 이직비용 산출 시 제외되었다. 대상 업체가 중소규모의 외식업체인 관계로 직무와 직급에 따라 차별화된 퇴직, 채용, 교육·훈련 절차가 이루어지고 있지는 않아 동일한 산출 방법을 적용하였으며, 세부적인 산출 방법과 비용 산출 내역은 표 5에 제시하였다(조리사 기준예).

종사원 1인 이직시 주방관리자의 경우 21,307,000원(연봉대비 87.9%), 홀매니저의 경우 18,936,000원(연봉 대비 87.7%), 조리사의 경우 4,891,000원(연봉 대비 31.4%), 서버의 경우 4,445,000원(연봉 대비 30.9%), 보조의 경우 1,840,000원(연봉대비 13.9%) 가량의 비용이 직접적으로 소요되는 것으로 나타났다. 연봉이 높을수록, 근속연수가 길수록 상대적으로 높은 비용이 소요되는 것으로 나타났고, 퇴직금으로 인한 비용이 차지하는 비율이 높았다. 퇴직금 제외 시 이직비용은 다소 낮게 측정되었는데,

표 5. 이직비용 산출 내역(조리사 기준예)

비용 요소	내용	산출 방법	비용 산출 내역	금액(원)
퇴직면접	인사담당자 인건비 * 인사담당자 급여율 ¹⁾	(인터뷰 준비시간 - 실제 소요시간) * 인사담당자 급여율 ¹⁾	0.5시간*(2,000,000원/330시간)=3,030원	5,000
	.퇴사·자 인건비	인터뷰소요시간 * 퇴사·자 급여율 ¹⁾	0.5시간*(1,300,000원/330시간)=1,970원	
퇴직금 및 기타	법정 퇴직금 ²⁾ 기타(퇴직위로금 등) 환송 행사	평균임금 ³⁾ * 30일분 * 근무일수/365	1,300,000*3=3,900,000원 200,000원	4,100,000
모집·광고	생활정보지 인터넷 구인사이트	매체별 계자비용 * 횟수 매체별 계자비용 * 횟수	40,000원 * 1회 = 40,000원 23,000원 * 1회 = 23,000원	63,000
선발관련 행정업무	전화 면접에 소요되는 인사담당자 인건비	인사담당자 소요시간 * 급여율 ¹⁾	5분*10명*(2,000,000원/330시간)=5,050원	5,050
입사면접 교통비	면접담당자 인건비 * 대상인원	1인 면접 시간 * 면접담당자 급여율 ¹⁾ * 대상인원	20분*3명*(2,000,000원/330시간)=6,060원	21,060
	1인 지급 교통비 * 대상인원	5,000원*3명=15,000원		
보건증	검사 및 발급 비용		1,500원	1,500
OJT(On-the-job training)	교육담당자 인건비 * 피교육자 인건비	교육담당자 소요시간 * 급여율 ¹⁾ 피교육자 소요시간 * 급여율 ¹⁾	15일*11시간*30%*(2,000,000원/330시간) = 300,000원 15일*11시간*30%*(1,300,000원/330시간) = 195,000원	495,000
잔류직원 격려금 주방 관리자에 대한 격려금			200,000원	200,000
				4,890,610

¹⁾ 급여율(pay rate) = (특정기간의 기본급+상여금+수당)/ 해당기간 근무 시간²⁾ 근로기준법 제 4조에 의거, 30일분의 평균임금 : (근속연수 - 잔여월)12 + 잔여월(365)³⁾ 평균임금 = 사유발생 이전 3월간의 임금총액 / 사유발생 이전 3월간의 총 일수(근로기준법 제 19조)

본 연구의 대상 업체의 규모가 비교적 작아 퇴직, 채용, 교육·훈련 상의 절차가 상대적으로 간단하여 직접적 이직 비용이 낮게 나타난 것으로 판단된다.

실제로 미국 전역에서 다양한 규모와 서비스 수준을 가진 98개 호텔을 대상으로 한 연구(12)에서는 이직률과 호텔의 매출간의 관계를 조사하여 이직비용을 계산한 결과, 평균 규모의 호텔(269 rooms)로 가정하였을 경우 1일 숙박 요금(ADR;Average Daily Rate)이 평균 수준(ADR \$77)인 일반 호텔에서 1인이 이직 할 때 약 \$6,350의 이직비용이 소모된 반면, 서비스 품질이 높은 호텔(ADR \$125 Hotel)에서는 1인당 \$27,521의 이직비용이 발생하게 되는 것으로 나타나 업체의 서비스 품질 수준이 높아 질수록 이직시 소모되는 비용도 커지는 것으로 보고한 바 있다. 이러한 양상은 유럽의 호텔을 대상으로 한 연구(15)에서도 나타났다. 이와 같이 직급이나 기술 수준이 높을수록 1인 이직시 소모되는 비용이 적게는 두 배, 많게는 4배 이상 높게 나타났던 점을 고려할 때, 외식산업에 있어서도 기술과 서비스 품질 수준에 따라 이직시 소모되는 비용에 있어 차이가 나타날 것으로 판단되므로 후속 연구를 통해 이러한 차이에 대한 분석도 이루어져야 할 것으로 판단된다.

또한 Hinkin과 Tracy(11)는 이제까지의 연구들은 직접적으로 이직과 관련된 가시적 비용요소들을 중점적으로 다룬 경우가 많았고, 이는 결과적으로 이직으로 인한 비용적 손실을 저평가하는 결과를 낳게 된다고 지적하고 있다. 따라서 향후 연구에서는 이러한 직접적 비용 이외에 부가적으로 발생될 수 있는 비용에 대한 규명과 실질적 측정이 필요한 것으로 사료된다.

IV. 요약 및 결론

본 연구는 외식산업에 있어 이직 발생시 수

반되는 비용을 금전단위로 환산하여 종사원의 자산 가치를 일깨움으로써 효율적인 내부마케팅(internal marketing) 전략 수립을 가능하도록하기 위해 사례조사를 통해 가시적 이직비용 산출에 대한 방법을 탐색하고자 실시되었다.

문헌 조사 결과 이직비용은 크게 퇴직비용, 채용비용, 교육·훈련비용으로 나뉘었으며 세부 항목들과 그 산출 방법을 제시하였다. 사례 연구 대상 업체의 이직비용 산출 결과, 직무 및 직급에 따라 연봉의 15.5%~88.8%로 다양하게 나타났는데, 근속년수와 연봉에 따라 발생되는 이직비용의 연봉대비 비율에 있어 다소 다른 양상을 보였다.

연구 결과에서 제시된 이직비용 요소들은 향후 연구와 업체에서의 이직비용 산출 시 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 판단되며, 이직비용의 산출은 내부마케팅의 비용적 가이드라인을 제시하여 업체의 우수한 인력 유지(retention)에 도움을 주고 나아가서는 업체의 생산성 및 수익성 증가에 도움을 줄 수 있을 것으로 사료된다. 또한 본 연구의 결과는 이직 비용에 대한 연구자들의 인식을 제고함으로써 이직비용과 관련한 다양한 분야에 대한 연구적 노력을 유도하게 될 것으로 판단된다.

향후 연구에서는 다양한 외식업체를 대상으로 한 연구 설계를 통해 외식업체의 규모, 기술, 서비스 품질 수준에 따라 발생 가능한 이직비용의 차이를 규명할 수 있어야 하겠다. 또한 직접적인 이직비용 외에 이직으로 인해 발생 가능한 생산성 저하, 고객 만족도 감소 등의 부가적 손실에 대한 규명과 측정이 이루어져야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

1. 박병렬, 조민호. 2002. 호텔산업 조리인력의 직무만족과 이직의사 영향요인에 관한

- 연구. *외식경영연구*, 5(1):91-110.
2. 김두라. 2000. 외식산업의 경쟁력을 키우자 -주방전문인력이 모자란다. *월간식당*, 8: 159-163.
 3. Mobley WH. 1982. Employee Turnover in Causes Consequences and Control. London: Addison-Wesley Publishing Company.
 4. Abelson MA. 1987. Examination of Avoidable and Unavoidable Turnover. *Journal of Applied Psychology*, 77: 383-385.
 5. Heskett JL, Jones TO, Loveman GW, Sasser Jr. WE, Schlesinger L.A. 1994. Putting the service-profit chain to work. *Havard Business Review*, March-April 1994: 164-170 .
 6. Pfeffer J, Veiga JF. 1999. Putting people first for organizational success. *Academy of Management Executive*, 13(2): 37-48.
 7. Cascio W. 2000. Costing Human Resources: the Financial Impact of Behavior in Organizations. 4th ed., Cincinnati, OH: South-Western College Publishing.
 8. Gray AM, Phillips VL, Normand C. 1996. The Costs of Nursing Turnover: Evidence from the British National Health Service. *Health Policy*, 38: 117-128.
 9. Tziner A, Birati A. 1996. Assessing Employee Turnover Costs: A Revised Approach. *Human Resource Management Review*, 6(2): 113-122.
 10. Graef MI, Hill EL. 2000. Costing Child Protective Services Staff Turnover. *Child Welfare*, 79(5): 517-533.
 11. Hinkin TR, Tracey JB. 2000. The Cost of Turnover:Putting a Price on the Learning Curve. *Cornell Hotel and Restaurant Administration Quarterly*, 41(3): 14-21.
 12. Simons T, Hinkin T. 2001. The Effect of Employee Turnover on Hotel Profits. *Cornell Hotel and Restaurant Administration Quarterly*, 42(4): 65-69.
 13. McKinney WR, Bartlett KR, Mulvaney MA. 2007. Measuring the costs of employee turnover in Illinois Public Park and recreation agencies: an exploratory study. *Journal of Park and Recreation Administration*, 25(1): 50-74.
 14. Slade LA, Davenport TO, Roberts DR, Shah S. 2002. How Microsoft optimized its investment in people after the dot-com era. *Journal of Organizational Excellence*, 22(1): 43-52.
 15. Wasmuth WJ, Davis SW. 1983. Strategies for managing Employee Turnover. *Cornell Hotel and Restaurant Administration Quarterly*, 24(3): 65-75.
 16. 박경문, 김일채. 1997. 호텔종사원의 직무 성과와 이직간의 관계에 관한 연구. *대한 경영학회지*, 15: 363-392.
 17. 양일선, 명미선, 이소정, 이해영. 2004. 직무 유형에 따른 특급호텔 조리·식음료 종사원의 직무만족도가 이직의사 견해에 미치는 영향 분석. *한국조리과학회지*, 220(2): 151-157.

두 다른 질량을 가진 Sunset 도형의 계산

김정구

계명대학교 공과대학 기계자동차공학부

Calculation of the Sunset Diagram with Two Different Masses

Chungku Kim

Faculty of the Mathematical and the Automotive Engineering, Keimyung University, Daegu
704-701, Korea

요 약. 유효 potential을 구하는 과정에서 나타나는 여러 이차 loop order vacuum도형 중 대표적인 서로 다른 두 질량을 가진 sunset도형의 경우에 대하여, momentum의 접근적 전개방법을 적용하여 여러 다양한 질량비의 경우에 대한 계산을 하였다.

Abstract. By means of the asymptotic expansion for the momentum, we have calculated the sunset diagram which is the typical two-loop order vacuum diagram to obtain the effective potential.

I. 서 론

양자장이론^[1]에서 진공의 불안정성과 자발적 대칭붕괴현상을 이해하기 위하여 이용하는 유효 potential^[2]은 여러 vacuum 도형^[3]들을 포함하게 되는데, 이중에서 Sunset도형은 이차 order loop 도형 중 대표적인 것이다. 본 논문에서는 서로 다른 두 질량을 가진 경우에 대한 적분을 momentum전개를 이용하여 계산해보고자 한다.

II. 접근적 전개에 의한 Sunset 도형의 계산

서로 다른 두 질량을 가진 Sunset도형은 다음의 Momentum적분은 다음과 같다.

$$I(M, m) = \int \frac{d^D p d^D k}{(2\pi)^{2D}} \frac{1}{(k^2 + M^2)((p+k)^2 + M^2)(p^2 + m^2)} \quad (1)$$

여기서 $D = 4 - 2\epsilon$ 로 주어진 시공간의 차원이며 M 과 m 은 Sunset도형의 propagator에 나타나는 두 질량이다. 수식(1)을 계산하기 위하여 먼저 momentum k 에 대한 다음의 적분을 생각해 보자.

$$J(p, M) = \int \frac{d^D k}{(2\pi)^D} \frac{1}{(k^2 + M^2)((p+k)^2 + M^2)} \quad (2)$$

$J(p, M)$ 을 구하기 위하여 먼저

$$\frac{1}{(k^2 + x)^m} = \frac{1}{\Gamma(m)} \frac{1}{2\pi i} \int_{-i\infty}^{i\infty} ds \frac{x^s}{(k^2)^{m+s}} \Gamma(-s) \Gamma(m+s) \quad (3)$$

로 주어지는 propagator의 Mellin-Barnes 표현^[4]을 두 번 사용하여

$$J(p, M) = \frac{1}{(2\pi i)^2} \int \frac{d^D k}{(2\pi)^D} \int_{-i\infty}^{i\infty} ds dt \frac{M^{2(s+t)}}{(k^2)^{1+s} ((p+k)^2)^{1+t}} \Gamma(-s) \Gamma(-t) \Gamma(1+s) \Gamma(1+t) \quad (4)$$

를 얻을 수 있다. 이제 위식에서 momentum k 에 대한 다음의 적분을 생각해 보자.

$$K = \int \frac{d^D k}{(2\pi)^D} \frac{1}{(k^2)^{1+s} ((p+k)^2)^{1+t}} \quad (5)$$

먼저 propagator의

$$\frac{1}{A^a B^b} = \frac{\Gamma(a+b)}{\Gamma(a)\Gamma(b)} \int_0^1 d\alpha \frac{\alpha^{a-1} (1-\alpha)^{b-1}}{(\alpha A + (1-\alpha)B)^{a+b}} \quad (6)$$

로 주어지는 Feynman parameter 표현을 이용하면

$$\begin{aligned} K &= \frac{\Gamma(s+t+2)}{\Gamma(s+1)\Gamma(t+1)} \int_0^1 d\alpha \int \frac{d^D k}{(2\pi)^D} \frac{\alpha^t (1-\alpha)^s}{(k^2 + 2\alpha p \cdot k + \alpha p^2)^{s+t+2}} \\ &= \frac{\Gamma(s+t+2)}{\Gamma(s+1)\Gamma(t+1)} \int_0^1 d\alpha \int \frac{d^D k}{(2\pi)^D} \frac{\alpha^t (1-\alpha)^s}{(k^2 + \alpha(1-\alpha)p^2)^{s+t+2}} \end{aligned} \quad (7)$$

를 얻는데 윗 식의 두 번째 줄을 얻기 위하여 $k \rightarrow k - \alpha p$ 의 변수 치환을 하였다. 이제

$$\int \frac{d^D k}{(2\pi)^D} \frac{k^{2r}}{(k^2 + x)^s} = \frac{x^{D/2+r-s} \Gamma(D/2+r) \Gamma(s-r-D/2)}{(4\pi)^{D/2} \Gamma(D/2) \Gamma(s)} \quad (8)$$

로 주어지는 momentum 적분을 이용하면

$$K = \frac{\Gamma(s+t+2-D/2)}{\Gamma(s+1)\Gamma(t+1)} \int_0^1 d\alpha \alpha^{D/2-s-2} (1-\alpha)^{D/2-t-2} p^{2(D/2-s-t-2)} \quad (9)$$

을 얻는다. 남은 α 변수에 대한 적분은 Beta 함수의

$$B(a, b) = \int_0^1 d\alpha \alpha^{a-1} (1-\alpha)^{b-1} = \frac{\Gamma(a)\Gamma(b)}{\Gamma(a+b)} \quad (10)$$

표현을 이용하면 다음과 같이 얻어진다.

$$J(p, M) = \frac{p^{2(D/2-2)}}{(4\pi)^{D/2}(2\pi i)^2} \int_{-i\infty}^{i\infty} ds dt \left(\frac{M^2}{p^2}\right)^{s+t} \Gamma(-s)\Gamma(-t) \\ \times \frac{\Gamma(D/2-1-s)\Gamma(D/2-1-t)\Gamma(2+s+t-D/2)}{\Gamma(D-2-s-t)} \quad (11)$$

여기서 $s+t = -2 + D/2 - q$ 의 변수치환을 하고 Barnes's lemma^[5]를 이용하면

$$J(p, M) = \frac{M^{2(D/2-2)}}{(4\pi)^{D/2}2\pi i} \int_{-i\infty}^{i\infty} dq \left(\frac{p^2}{M^2}\right)^q \frac{\Gamma(-q)\Gamma(1+q)^2\Gamma(2-D/2+q)}{\Gamma(2+2q)} \quad (12)$$

를 얻고 Gamma함수에 대한 doubling 공식 $\Gamma(2z) = 2^{2z-1}\pi^{-1/2}\Gamma(z)\Gamma(z+1/2)$ 을 이용하면

$$J(p, M) = \frac{\pi^{1/2}}{2(4\pi)^{D/2}2\pi i} M^{2(D/2-2)} \int_{-i\infty}^{i\infty} dq \left(\frac{p^2}{4M^2}\right)^q \frac{\Gamma(-q)\Gamma(1+q)\Gamma(2-D/2+q)}{\Gamma(3/2+q)} \quad (13)$$

을 얻게 되고 이 적분은 q적분의 contour가 허수축의 오른쪽 반원인 경우 pole이 $q=n$ 이고 왼쪽 반원인 경우 pole이 $q=-n$ 과 $q=D/2-n$ 임을 이용하여 각각 다음의 두 경우로 얻어지게 되는데 이는 각각 $p^2 < 4M^2$ 인 경우와 $p^2 > 4M^2$ 인 경우의 전개에 해당된다.

$$J(p, M) = \frac{\pi^{1/2}M^{2(D/2-2)}}{2(4\pi)^{D/2}} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\Gamma(2-D/2+n)}{\Gamma(3/2+n)} \left(\frac{p^2}{4M^2}\right)^n \quad (p^2 < 4M^2) \quad (14)$$

$$J(p, M) = \frac{\pi^{1/2}p^{2(D/2-2)}}{4^{D/2-2}2(4\pi)^{D/2}} \left[\sum_{n=0}^{\infty} \frac{\Gamma(1-n-D/2)}{\Gamma(1/2-n)} \left(\frac{4M^2}{p^2}\right)^{n+D/2-1} \right. \\ \left. + 2 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\Gamma(n+2-D/2)\Gamma(D/2-n-1)}{\Gamma(n+1)\Gamma(D/2-n-1/2)} \left(\frac{4M^2}{p^2}\right)^n \right] \quad (p^2 > 4M^2) \quad (15)$$

위의 수식(15)에서 Gamma함수에 음의 정수가 나타나는 경우는

$$\Gamma(z)\Gamma(1-z) = \frac{\pi}{\sin(\pi z)} \quad (16)$$

을 이용하여 다음과 같은 양의 정수에 대한 합으로 바꿀 수 있다.

$$J(p, M) = \frac{\pi^{1/2}p^{2(D/2-2)}}{4^{D/2-2}2(4\pi)^{D/2}} \left[\sum_{n=0}^{\infty} \frac{\Gamma(1/2+n)}{\Gamma(D/2+n)} \left(\frac{4M^2}{p^2}\right)^{n+D/2-1} \right. \\ \left. + 2 \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\Gamma(3/2-D/2+n)}{\Gamma(n+1)} \left(\frac{4M^2}{p^2}\right)^n \right] \quad (p^2 > 4M^2) \quad (17)$$

마지막으로 수식(1)과 수식(2)에서

$$I(M, m) = \int \frac{d^D p}{(2\pi)^D} \frac{J(p, M)}{(p^2 + m^2)} \quad (18)$$

의 관계를 얻을 수 있고 위의 수식(14)와 수식(17)에서 얻은 $J(p, M)$ 의 전개를 이에 대입하고 수식(8)에 주어진 momentum 적분을 이용하면 $I(M, m)$ 을 얻을 수 있는데 이중 수식(18)의 경우는

$$\begin{aligned} I(M, m) &= \frac{\pi^{1/2}}{2(4\pi)^D} [m^{2(1-2\epsilon)} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\Gamma^2(-1+\epsilon)\Gamma(\epsilon)\Gamma(-1/2+n+\epsilon)\Gamma(2-n+2\epsilon)}{\Gamma(2-2\epsilon)\Gamma(-1/2+\epsilon)\Gamma(2-\epsilon)\Gamma(1+n)} (\frac{4M^2}{m^2})^n \\ &+ 2M^{2(1-\epsilon)}m^{-2\epsilon} \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\Gamma(-1+\epsilon)\Gamma(n+1/2)\Gamma(n+\epsilon)\Gamma(1-n-\epsilon)}{\Gamma(n+2-\epsilon)\Gamma(1/2)} (\frac{4M^2}{m^2})^n] \end{aligned} \quad (19)$$

로 주어지는데 이 경우 첫째 줄에서 $n=0$ 인 경우와 두 번째 줄에서 $n=0, 1$ 인 경우에서 $\frac{1}{\epsilon}$ 발산항이 나타나는데 그 결과는 다른 방법^[6]으로 구한 경우와 일치함을 확인할 수 있다. 수식(19)의 마지막 줄에서 $D=4-2\epsilon$ 임을 이용하였다. 수식(14)의 경우는

$$\begin{aligned} I(M, m) &= \frac{\pi^{1/2} m^{2(D/2-1)} M^{2(D/2-2)}}{2(4\pi)^D} \\ &\times \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\Gamma(2-D/2+n)\Gamma(D/2+n)\Gamma(1-n-D/2)}{\Gamma(D/2)\Gamma(3/2+n)} (\frac{m^2}{4M^2})^n \\ &= \frac{\pi^{1/2} m^{2(1-\epsilon)} M^{-2\epsilon}}{2(4\pi)^{4-2\epsilon}} \\ &\times \sum_{n=0}^{\infty} \frac{\Gamma(n+\epsilon)\Gamma(n+2-\epsilon)\Gamma(-1-n+\epsilon)}{\Gamma(2-\epsilon)\Gamma(3/2+n)} (\frac{m^2}{4M^2})^n \end{aligned} \quad (20)$$

을 얻고 이 경우 Gamma함수의 전개를 이용하면 모든 항에서 $\frac{1}{\epsilon}$ 의 발산항이 나타나는 것을 볼 수 있는데 이는 Broadhurst^[6]의 결과와 차이를 보인다.

III. 결과 및 토의

본 논문에서는 접근적 전개를 이용하여 유효 potential을 구하는 단계에서 나타나는 여러 vacuum 도형들 중 이차 loop order 도형 중 대표적인 Sunset도형이 서로 다른 두 질량을 가진 경우에 대한 계산을 하였다. 이중 k momentum 적분을 $\frac{1}{p^2}$ 으로 전개하는 것이 이차항 order에서 정확한 발산항을 나타내는 것을 알 수 있었고 그 결과는 두 질량에 대한 $\frac{M^2}{m^2}$ 의 비에 대한 전개로 주어졌다. 역으로 $\frac{m^2}{M^2}$ 의 비에 대한 전개를 얻기 위하여서는 다른 방법의 접근이 필요하

리라 여겨지고 아울러 본 논문에서 사용한 Feynman도형의 계산방법을 더 높은 차수의 도형에 확장하여 적용하여 보는 것이 필요하리라 생각된다.

참고문헌

1. J. Zinn-Justin, Quantum Field Theory and Critical Phenomena, Oxford Science Publications, Oxford, 1992.
2. M. Sher, Phys. Rep. 89, 273 (1989).
3. R. Jackiw, Phys. Rev. D9, 1686 (1974).
4. K. G. Chetyrkinand F. V. Tkachov, Phys. Lett.B, 144, 419 (1984).
5. W.N.Bailey, Generalized Hypergeometric Series, University Press, Cambridge, (1935).
6. D. J. Broadhurst, Phys. Lett. B164, 356 (1990).

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27輯 第1號

2008年 8月 25日 印刷

〈비매품〉

2008年 8月 30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 達西區 達句伐大路 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**

Vol. 27, No. 1

August, 2008

CONTENTS

⟨Research Articles⟩

- An Expansion Algorithm and Its Implementation
for Sensitivity Analysis in LP Koonchan Kim
- A Note on Roman Domination in Steinhaus Graphs Daekeum Lim
- Classification of Units Used in the EHR System
and Conversion to the SI Units Un Sang Jung and Kyung Chan Kim
- Synthesis and Characterization of Poly (oxyfluorenoxymethylphenylsilane)
..... Eun Ae Jung and Young Tae Park
- Two Species of the Genus *Cladothela* from Korea (Araneae: Gnaphosidae)
..... Bo Keun Seo
- Characterization of Fermented Herbal Medicine
..... Dong Hee Kang, Hee Sun Ko and Hyun Soo Kim
- A Study on the *Leuconostoc mesenteroides* 1B12 Strain Isolated
from Chonggak-Kimchi Oh-Sik Kwon
- Isolation of Cellulase-Producing Microorganisms as One of Process Components
in The Production of Lignocellulosic Bioethanol Kyung Pyo Yoon
- Pharmacological and Toxicological Properties of *Polygonum multiflorum*
..... Jung-Min Nam · Hyun-Young Lee · Young-Hee Kim
· Hyunji Kim · Min-Jung Kim · Kisok Kim
- The Skin Safety Evaluation of a Potent Anti-pigmentation Agent,
Kojic Acid, for the Skin Application Bae-Hwan Kim
- Isolation and Characterization of a Novel *Leuconostoc citreum* S5
with High Dextran Producing Capacity from Korean Fermented Vegetable
..... Min-Jung Son · Oh-Sik Kwon · Sam-Pin Lee
- A Case Study on Calculating Turnover Cost of a
Foodservice Organization Mi-Kyung Choi
- Calculation of the Sunset Diagram with Two Different Masses
..... Chungku Kim