

自然科學

## 研究論集

第 26 輯 · 第 1 號

2007

## 目 次

## &lt;연구논문&gt;

- A Formal Proof for the Linear Independence of General Functions ..... Koonchan Kim
- A Stopping Rule for the Number of Generating Trees in a Random Forest ..... Cheol-Yong Park
- 가시광 영역에서 RF 스퍼터링에 의한  $TiO_2$  박막의 광촉매 특성 ..... 우충하 · 김경찬
- 트라이에톡시실레인으로 담지된 이산화티타늄 광촉매 화합물의 합성과 가시광선 영역에서 광분해 특성 ..... 이명진 · 박영태
- 교육용 자기공명영상(MRI)을 이용한 임상검사의 고찰 ..... 조무성 · 배재영
- 2,5-Diaminobenzamide계열의 화합물 합성과 항암효과 평가 ..... 이세희 · 백철수 · 이진호
- 생선의 신선도 측정을 위한  $TiO_2/SnO_2$ 계 후막 반도체 가스 센서의 특성 ..... 전재목 · 정지영 · 윤선광 · 이창섭
- 비대칭 유기합성의 메카니즘 확인을 위한 새로운 비대칭 리간드의 합성과 이용 ..... 염재국 · 이진호
- 소수성 표면에서  $\beta$ -casein 흡착에 대한 QCM 연구Ⅱ : pH와 음이온의 영향 ..... 박수경 · 이명희 · 정진갑
- 한국미기록종, 미녀갈거미(거미목: 갈거미과)의 기재 ..... 서보근
- 토양으로부터 무기계르마늄 용해균의 분리 및 특성 ..... 김민희 · 고희선 · 김현수
- 발효된 야채에서 분리한 락토바실러스 균주의 당발효 특성에 대한 연구 ..... 권오식 · 마지현
- Study on the Effects of 0.1X LB on the Survival and Stability of Newly Transconjugated Plasmid for Bioremediation in *Pseudomonas* sp. KM12TC in the Presence of Mercury Ion ..... Kyung Pyo Yoon
- 복분자 과실 색소 추출조건의 최적화 ..... 정용진

ISSN 1738-6152

自然科學

# 研究論集

第 26 輯 · 第 1 號      2007

啓明大學校 自然科學研究所

## 목 차

### 〈연구 논문〉

- A Formal Proof for the Linear Independence of General Functions ..... Koonchan Kim ... ( 1 )
- A Stopping Rule for the Number of Generating Trees in a Random Forest ..... Cheol-Yong Park ... ( 7 )
- 가시광 영역에서 RF 스펙터링에 의한 TiO<sub>2</sub> 박막의 광촉매 특성 ..... 우충하 · 김경찬 ... ( 11 )
- 트라이에톡시실레인으로 담지된 이산화티타늄 광촉매 화합물의 합성과  
가시광선 영역에서 광분해 특성 ..... 이명진 · 박영태 ... ( 17 )
- 교육용 자기공명영상(MRI)을 이용한 임상검사의 고찰 ..... 조무성 · 배재영 ... ( 25 )
- 2,5-Diaminobenzamide계열의 화합물 합성과 항암효과 평가 ..... 이세희 · 백철수 · 이진호 ... ( 33 )
- 생선의 신선도 측정을 위한 TiO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub>계 후막 반도체 가스 센서의 특성 ..... 전재목 · 정지영 · 윤선팽 · 이창섭 ... ( 41 )
- 비대칭 유기합성의 메카니즘 확인을 위한 새로운 비대칭 리간드의 합성과 이용 ..... 염재국 · 이진호 ... ( 49 )
- 소수성 표면에서  $\beta$ -casein 흡착에 대한 QCM 연구Ⅱ: pH와 음이온의 영향 ..... 박수경 · 이명희 · 정진갑 ... ( 57 )
- 한국미기록종, 미녀갈거미(거미목: 갈거미과)의 기재 ..... 서보근 ... ( 63 )
- 토양으로부터 무기게르마늄 용해균의 분리 및 특성 ..... 김민희 · 고희선 · 김현수 ... ( 67 )
- 발효된 야채에서 분리한 락토바실러스 균주의 당발효 특성에 대한 연구 ..... 권오식 · 마지현 ... ( 73 )
- Study on the Effects of 0.1X LB on the Survival and Stability of Newly  
Transconjugated Plasmid for Bioremediation in *Pseudomonas* sp.  
KM12TC in the Presence of Mercury Ion ..... Kyung Pyo Yoon ... ( 79 )
- 복분자 과실 색소 추출조건의 최적화 ..... 정용진 ... ( 85 )

## CONTENTS

### 〈Research Articles〉

- A Formal Proof for the Linear Independence of General Functions ..... Koonchan Kim ... ( 1 )
- A Stopping Rule for the Number of Generating Trees in a Random Forest ..... Cheol-Yong Park ... ( 7 )
- Photocatalytic Properties of TiO<sub>2</sub> Thin Film by RF Sputtering  
in the Visible Light Region ..... Chung-Ha Woo · Kyung-Chan Kim ... ( 11 )
- Synthesis and Photodegradation Properties of TiO<sub>2</sub> Photocatalysts Immobilized  
by Triethoxysilane under Visible Light ..... Myung-Jin Lee · YoungTae Park ... ( 17 )
- The Study of Clinical Examination by Using Instructional  
Magnetic Resonance Imaging(MRI) ..... Moo-Seoung Cho · Jae-Young Bae ... ( 25 )
- Synthesis and Evaluation of Anti-cancer Effects of 2,5-Diaminobenzamide  
Derivatives ..... Sei-Hee Lee · Chul-Soo Paik · Jin-Ho Lee ... ( 33 )
- Characteristics of the TiO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub> Thick Film Semiconductor Gas Sensor for Fish  
Freshness ..... Jae-Mok Jun · Ji-Young Jung · Sun-Kwang Yun · Chang-Seop Lee ... ( 41 )
- Synthesis and Application of New Unsymmetrical Ligand for Identifying  
the Mechanism of Asymmetric Organic Synthesis ..... Jae-Kook Uhm · Jin-Ho Lee ... ( 49 )
- QCM Study of  $\beta$ -casein Adsorption on the Hydrophobic Surface II:  
Effect of pH and Anions ..... Su-Kyung Park · Myunghee Lee · Chinkap Chung ... ( 57 )
- Tetragnatha shinanoensis* Okuma and Chikuni, 1978, a Tetragnathid Spider New  
to Korea (Araneae: Tetragnathidae) ..... Bo-Keun Seo ... ( 63 )
- Isolation and Characterization of Strains Solubilizing Inorganic Germanium  
from Soil ..... Min-Hee Kim · Hee-Sun Ko · Hyun-Soo Kim ... ( 67 )
- A Study of *Lactobacillus* Species Isolated from Fermented Vegetables  
for Carbohydrate Utilization ..... Oh-Sik Kwon · Ji-Hyun Ma ... ( 73 )
- Study on the Effects of 0.1X LB on the Survival and Stability of Transconjugated  
Plasmid for Bioremediation in *Pseudomonas* sp. KM12TC in the Presence  
of Mercury Ion ..... Kyung Pyo Yoon ... ( 79 )
- Optimized Conditions for Extracting Fruit Pigment of *Rubus coreanum*  
..... Yong-Jin Jeong ... ( 85 )

# A FORMAL PROOF FOR THE LINEAR INDEPENDENCE OF GENERAL FUNCTIONS

KOONCHAN KIM

**ABSTRACT.** The linear independence of functions is of paramount importance in a variety of areas. This article presents a formal proof for the necessary and sufficient condition for the linear independence of  $n$  general functions  $f_1, f_2, \dots, f_n$ , similar approach to the one given by Wronskian. However, this proof is based on  $n$  distinct points, and the differentiability and continuity of the functions are not required.

## 1 Introduction

A set of functions  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  is said to be *linearly dependent* on an interval  $I \subseteq \mathbb{R}$  if there exists scalars  $c_1, c_2, \dots, c_n$  not all zero such that  $c_1f_1(x) + c_2f_2(x) + \dots + c_nf_n(x) = 0$  for all  $x$  in  $I$ . If  $c_1f_1(x) + c_2f_2(x) + \dots + c_nf_n(x) = 0$  for all  $x$  in  $I$  implies  $c_1 = c_2 = \dots = c_n = 0$ , then the set of functions is called *linearly independent*.

Wronskian provided a sufficient condition for the linear independence of  $n$  functions on an interval (see [3], for example), which can be stated as follows. Let  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  be  $n$  functions defined on an interval  $I$  with at least  $n - 1$  times differentiable. If the determinant

$$W(f_1, f_2, \dots, f_n) = \begin{vmatrix} f_1 & f_2 & \cdots & f_n \\ f'_1 & f'_2 & \cdots & f'_n \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ f_1^{(n-1)} & f_2^{(n-1)} & \cdots & f_n^{(n-1)} \end{vmatrix}$$

is not zero for at least one point in the interval  $I$ , then the functions  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  are linearly independent on the interval  $I$ .

---

2000 Mathematics Subject Classification: 15A03.

Key words and phrases: General functions, linear independence.

Wronskian's criterion is invaluable used in defining the fundamental set of solutions for the homogeneous linear  $n$ th-order differential equations. However, in the case with general functions, if at least one of the functions is not differentiable, then the Wronskian criterion can not be used. Also, as is known, the converse of the Wronskian criterion is not always true. The two functions  $f_1(x) = x^2$  and  $f_2(x) = x|x|$  are linearly independent on  $\mathbb{R}$ , but  $W(f_1, f_2) = 0$  for all  $x \in \mathbb{R}$ .

In this article we provide a necessary and sufficient condition for the linear independence of any  $n$  functions. To see if the given  $n$  functions  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  are linearly independent or not, one way(a usual approach) is to set  $\sum_{i=1}^n c_i f_i(x) = 0$  for  $n$  different points  $x'_i$ s and determine the values of the coefficients  $c'_i$ s. This article provides a more systematic and formal proof for the linear independence of  $n$  general functions based on these  $n$  points. Recently, the linear independence of intertwining operators is discussed in [2].

To begin with, we first give a notation that is used throughout this article. Given a set of  $n$  functions  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  and a set of  $n$  points  $x_1, x_2, \dots, x_n$ , we define

$$D(f_1, f_2, \dots, f_n)_{\{x_1, x_2, \dots, x_n\}} = \begin{vmatrix} f_1(x_1) & f_2(x_1) & \cdots & f_n(x_1) \\ f_1(x_2) & f_2(x_2) & \cdots & f_n(x_2) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ f_1(x_n) & f_2(x_n) & \cdots & f_n(x_n) \end{vmatrix}. \quad (1)$$

Let us recall the following terminology from linear algebra(see [1], for example). If  $A$  is an  $n \times n$  matrix, then the minor of entry  $a_{ij}$  is denoted by  $M_{ij}$ , the determinant of the submatrix that remains after the  $i$ th row and  $j$ th column are deleted from  $A$ . The cofactor of entry  $a_{ij}$  is denoted by  $C_{ij} = (-1)^{i+j} M_{ij}$ . Hence, for the matrix  $A$ , the cofactor expansion along the  $i$ th row is

$$\det(A) = a_{i1}C_{i1} + a_{i2}C_{i2} + \cdots + a_{in}C_{in} \quad (2)$$

## 2 Main result

**Lemma 1** *Let  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  be  $n$  functions defined on an interval  $I \subseteq \mathbb{R}$ , none of which is identically zero on  $I$ . Then the functions  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  are linearly independent on  $I$  if there exists a set of  $n$  points  $x_1, x_2, \dots, x_n$  in  $I$  such that  $D(f_1, f_2, \dots, f_n)_{\{x_1, x_2, \dots, x_n\}} \neq 0$ .*

**Proof.** Assume there exist  $n$  points  $x_1, x_2, \dots, x_n$  in  $I$  such that

$$D(f_1, f_2, \dots, f_n)_{\{x_1, x_2, \dots, x_n\}} \neq 0.$$

Suppose  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  are linearly dependent. Then there exist scalars  $c_1, c_2, \dots, c_n$  not all zero such that  $\sum_{i=1}^n c_i f_i(x) = 0$  for all  $x$  in  $I$ . In particular, then

$$\sum_{i=1}^n c_i f_i(x_j) = 0, \quad j = 1, 2, \dots, n$$

because  $x_1, x_2, \dots, x_n$  are in  $I$ . Since  $c_1, c_2, \dots, c_n$  are not all zero, this implies that we must have  $D(f_1, f_2, \dots, f_n)_{\{x_1, x_2, \dots, x_n\}} = 0$ . This contradicts to the fact that  $D(f_1, f_2, \dots, f_n)_{\{x_1, x_2, \dots, x_n\}} \neq 0$ , and hence  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  must be linearly independent. ■

**Lemma 2** *Let  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  be  $n$  functions defined on an interval  $I$ , none of which is identically zero. If  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  are linearly independent on  $I$ , then there exist a set of  $n$  points  $x_1, x_2, \dots, x_n$  in  $I$  such that*

$$D(f_1, f_2, \dots, f_n)_{\{x_1, x_2, \dots, x_n\}} \neq 0.$$

**Proof.** We use mathematical induction on  $n$ . For  $n = 2$ , we assume  $f_1(x), f_2(x)$  are linearly independent on  $I$ . Suppose to the contrary that no set of two points exists in  $I$ . That is, for any set of two points  $x_1, x_2$  in  $I$ ,  $D(f_1, f_2)_{\{x_1, x_2\}} = 0$ . Since each function is not identically zero on  $I$ , there exists a point  $x_o$  in  $I$  such that  $f_1(x_o) \neq 0$ . Then, by the assumption,  $D(f_1, f_2)_{\{x_o, x\}} = 0$  for all  $x$  in  $I$ . This implies  $f_1(x_o)f_2(x) - f_2(x_o)f_1(x) = 0$  for all  $x$  in  $I$ . Letting  $c_1 = -f_2(x_o)$  and  $c_2 = f_1(x_o)$  gives  $\sum_{i=1}^2 c_i f_i(x) = 0$  for all  $x$  in  $I$ , with  $c_1, c_2$  not all zero. This contradicts to the fact that  $f_1(x), f_2(x)$  are linearly independent. Hence there must exists at least two points  $x_1, x_2 \in I$  such that  $D(f_1, f_2)_{\{x_1, x_2\}} \neq 0$ .

For  $n = k$ , we assume the statement that if  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_k(x)$  are linearly independent on  $I$ , then there exist a set of  $k$  points  $x_1, x_2, \dots, x_k$  in  $I$  such that  $D(f_1, f_2, \dots, f_k)_{\{x_1, x_2, \dots, x_k\}} \neq 0$ . Now for  $n = k + 1$ , we assume that  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_k(x), f_{k+1}(x)$  are linearly independent and suppose that there do not exist  $k + 1$  points in  $I$  such that  $D(f_1, f_2, \dots, f_{k+1})_{\{x_1, x_2, \dots, x_{k+1}\}} \neq 0$ . That is, for any set of  $k + 1$  points  $x_1, x_2, \dots, x_{k+1}$  in  $I$ ,  $D(f_1, f_2, \dots, f_{k+1})_{\{x_1, x_2, \dots, x_{k+1}\}} = 0$ . Since any nonempty subset of linearly independent set is linearly independent,  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_k(x)$  are linearly independent and hence by the  $n = k$  statement there exist  $k$  points  $x_1^o, x_2^o, \dots, x_k^o$  in  $I$  such that  $D(f_1, f_2, \dots, f_k)_{\{x_1^o, x_2^o, \dots, x_k^o\}} \neq 0$ . Let  $x$  be any point in  $I$  and consider the  $k + 1$  points  $x_1^o, x_2^o, \dots, x_k^o, x$ . By the assumption of the  $n = k + 1$

statement,  $D(f_1, f_2, \dots, f_{k+1})_{\{x_1^o, x_2^o, \dots, x_k^o, x\}} = 0$  for all  $x \in I$ . That is,

$$\begin{vmatrix} f_1(x_1^o) & f_2(x_1^o) & \cdots & f_k(x_1^o) & f_{k+1}(x_1^o) \\ f_1(x_2^o) & f_2(x_2^o) & \cdots & f_k(x_2^o) & f_{k+1}(x_2^o) \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots & \vdots \\ f_1(x_k^o) & f_2(x_k^o) & \cdots & f_k(x_k^o) & f_{k+1}(x_k^o) \\ f_1(x) & f_2(x) & \cdots & f_k(x) & f_{k+1}(x) \end{vmatrix} = 0$$

for all  $x \in I$ . Taking the cofactor expansion along the last row of the above determinant, we have from (2)

$$\sum_{i=1}^{k+1} C_{k+1,i} f_i(x) = 0$$

for all  $x \in I$ , where  $C_{k+1,k+1} = D(f_1, f_2, \dots, f_k)_{\{x_1^o, x_2^o, \dots, x_k^o\}} \neq 0$ . By letting  $c_1 = C_{k+1,1}, c_2 = C_{k+1,2}, \dots, c_{k+1} = C_{k+1,k+1}$ , we see that  $\sum_{i=1}^{k+1} c_i f_i(x) = 0$  for all  $x \in I$ , which is a contradiction to the linearly independence of the functions  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_{k+1}(x)$  since  $c_{k+1} \neq 0$ . Hence, there must exists  $k+1$  points  $x_1, x_2, \dots, x_{k+1}$  in  $I$  such that  $D(f_1, f_2, \dots, f_{k+1})_{\{x_1, x_2, \dots, x_{k+1}\}} \neq 0$ , and this completes the proof. ■

By combining the above two lemmas, we have the following necessary and sufficient condition for the linear independence of  $n$  general functions.

**Proposition 3** *Let  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  be functions defined on an interval  $I \subseteq \mathbb{R}$ , none of which is identically zero. Then  $f_1(x), f_2(x), \dots, f_n(x)$  are linearly independent on  $I$  if and only if there exist a set of  $n$  points  $x_1, x_2, \dots, x_n$  in  $I$  such that  $D(f_1, f_2, \dots, f_n)_{\{x_1, x_2, \dots, x_n\}} \neq 0$ .*

### 3 Examples

For example, the three functions  $f_1(x) = 1, f_2(x) = \sin x, f_3(x) = e^x$  are linearly independent on  $\mathbb{R}$  since at least three points  $x_1 = 0, x_2 = \pi, x_3 = \pi/2$  exist in  $\mathbb{R}$  such that (1) becomes

$$D(f_1, f_2, f_3)_{\{0, \pi, \pi/2\}} = \begin{vmatrix} 1 & 0 & 1 \\ 1 & 0 & e^\pi \\ 1 & 1 & e^{\pi/2} \end{vmatrix} = 1 - e^\pi \neq 0.$$

The functions in Proposition 3 need not be continuous or differentiable. Hence, if we let

$$f(x) = |x|, \quad g(x) = \begin{cases} 1, & x \text{ rational} \\ -1, & x \text{ irrational,} \end{cases}$$

then

$$D(f, g)_{\{1, \pi\}} = \begin{vmatrix} 1 & 1 \\ \pi & -1 \end{vmatrix} = -1 - \pi \neq 0.$$

That is, the two functions  $f(x), g(x)$  are linearly independent on  $\mathfrak{R}$ .

Finally, the two functions  $f_1(x) = x^2$  and  $f_2(x) = x|x|$  are linearly independent on  $\mathfrak{R}$  because

$$D(f_1, f_2)_{\{-1, 1\}} = \begin{vmatrix} 1 & -1 \\ 1 & 1 \end{vmatrix} = 2 \neq 0.$$

## 4 Extension and conclusion

If the definition of linear independence of  $n$  functions is extended to the set of multivariable real-valued functions, then one can obtain the following results. For the proof of multivariable real-valued functions, just replace  $x$  by the vector  $\bar{x}$  in the proofs of the Lemma 1 and 2.

**Corollary 4** *Let  $f_1(\bar{x}), f_2(\bar{x}), \dots, f_n(\bar{x})$  be multivariable real-valued functions defined on a subset  $S \subseteq \mathfrak{R}^m$ , none of which is identically zero. Then  $f_1(\bar{x}), f_2(\bar{x}), \dots, f_n(\bar{x})$  are linearly independent on  $S$  if and only if there exist  $n$  points  $\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_n$  in  $S$  such that  $D(f_1, f_2, \dots, f_n)_{\{\bar{x}_1, \bar{x}_2, \dots, \bar{x}_n\}} \neq 0$ .*

For example, the three functions

$$f_1(x, y, z) = x^2 z |y|, \quad f_2(x, y, z) = e^{xyz}, \quad f_3(x, y, z) = x + y + z$$

are linearly independent in  $\mathfrak{R}^3$  since if we let  $\bar{x}_1 = (0, 0, 0), \bar{x}_2 = (1, 1, 1), \bar{x}_3 = (1, 0, 1)$ , then

$$D(f_1, f_2, f_3)_{\{\bar{x}_1, \bar{x}_2, \bar{x}_3\}} = \begin{vmatrix} 0 & 1 & 0 \\ 1 & e & 3 \\ 0 & 1 & 2 \end{vmatrix} = -2 \neq 0.$$

The  $n$ -points approach is a normal technique for determining the specific values of the coefficients  $c_i$ 's. In this article, we provided a formal proof for the  $n$ -points approach for the linear independence of  $n$  general functions. While Wronskian criterion can be used for the  $n - 1$  times differentiable functions, this approach can be usefully used for any functions including the multivariable real-valued (and complex-valued) functions.

## References

- [1] H. Anton, *Elementary Linear Algebra*, John Wiley & Sons, 1981.

- [2] D. Ban, *Linear Independence of Intertwining Operators*, Journal of Algebra, Vol. 271, No. 2, 2004.
- [3] D. G. Zill, *A First Course in Differential Equations*, 5th ed., PWS Publishing Company Boston, 1993.
- [4] D. Zwillinger, *Handbook of Differential Equations*, 2nd ed., Academic Press, Inc., 1992.

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

# A Stopping Rule for the Number of Generating Trees in a Random Forest

Cheolyong Park

*Department of Statistics Keimyung University*

---

**Abstract.** A stopping rule is proposed for the number of generating trees in a random forest which is used in classifying a new case. This rule utilizes a hypothesis test for testing if the probabilities of the two most popular classes are equal. This rule can be used for every case in a training data based on out-of-bag votes.

---

## 1. Introduction

Recently there has been a lot of research in ensemble methods. Bagging, boosting, and random forest are among the well-known ensemble methods. In bagging (Breiman, 1996), each tree is independently constructed using a bootstrap sample of the data set. In boosting, successive trees give extra weight to points incorrectly predicted by earlier predictors and a weighted vote is taken for prediction in the end (see Shapire et al (1998) for details).

Breiman (2001) proposed random forests, which add an additional layer of randomness to bagging. In addition to constructing each tree using a different bootstrap sample of the data, each node is split using the best among a subset of input variables randomly chosen at that node. This somewhat counterintuitive strategy turns out to perform quite well (see Hamza and Larocque (2005) among others), and is robust against overfitting (Breiman, 2001).

In this article, we propose a stopping rule for the number generating trees in a random forest. The idea of this rule is for classifying a new case but this idea can be extended to classifying each case in the data set. This rule employs a simple hypothesis test for testing

if the probabilities of the two classes being compared are the same. If this hypothesis is rejected, we can believe with high probability that the number of trees generated so far is big enough to ensure that generating more trees will not change the classification results.

This article will be organized as follows. In Section 2, we summarize the random forests algorithm and present a stopping rule with a sketch of proofs. In Section 3, we provide some concluding remarks.

## 2. Random Forests Algorithm and Main Results

Let  $(x_1, y_1), \dots, (x_m, y_m)$  be a training sample of  $m$  cases where  $x_i$ 's are input variables of  $p$ -vectors and  $y_i$ 's are target variables of  $r$  classes. We wish to construct a random forest to use in classifying a new case  $x$ . The random forests algorithm for generating  $n$  trees can be summarized as follows:

**Step 1.** Draw  $n$  bootstrap samples from the original data.

**Step 2.** For each of the bootstrap samples, grow an un-pruned classification tree, with

the following modification. At each node, rather than choosing the best split among all input variables, randomly sample  $K(K < p)$  of the input variables and choose the best split among the chosen  $K$  variables.

**Step 3.** Predict the new case  $x$  by aggregating the predictions of the trees.

Let  $M_n$  be the votes for the most popular class and let  $N_n$  be the votes for the second most popular class. Then

$$Z_n = \frac{(M_n - N_n)}{\sqrt{M_n + N_n}} \quad (1)$$

can be used a guideline whether we need to generate more trees or not. If  $Z_n \gg 0$ , we can safely say that more trees will not change the classification results. Therefore we can employ an informal rule that stops generating more trees when  $Z_n$  is sufficiently large, say, when it exceeds  $c$ . (Formal discussions on this matter can be found in Alam (1991), Ramsey and Alam (1979), and Bhandari and Ali (1994) among others.) A justification of this rule will be given later.

For each case in the training data, we can calculate so called OOB (out-of bag) votes for  $r$  classes as follows:

**Step 1.** At each bootstrap iteration, predict the case not in the bootstrap sample (so called OOB data) using the tree grown with the bootstrap sample. (It is known that each case will be OOB approximately  $n/e$  times.)

**Step 2.** Aggregate the OOB predictions for each case to get the OOB votes for

the classes.

For each training case  $(x_i, y_i)$ , let  $M_n(i)$  be the OOB votes for the correct class  $y_i$  and let  $N_n(i)$  be the OOB votes for the most popular wrong class. If we let

$$Z_n(i) = \frac{(M_n(i) - N_n(i))}{\sqrt{M_n(i) + N_n(i)}}, \quad (2)$$

then, by the same arguments as before, we can safely say that more trees will not change the classification results if  $|Z_n(i)|$  is sufficiently large, say, when  $|Z_n(i)| > c$ .

Here we define  $M_n(i)$  and  $N_n(i)$  a little differently from the earlier  $M_n$  and  $N_n$ . When we know the correct class  $y_i$ , it makes sense to use this in the definitions because we do not care much if the classification procedure cannot pick the correct class.

Here we give some mathematical justification of the stopping rules in (1) and (2). Let  $(X_1, \dots, X_r)$  be a multinomial random vector with sample size  $n^*$  and class probabilities  $p_1, \dots, p_r$ . Note that  $n^* = n$  for the rule in (1) and that  $n^* \approx n/e$  for the rule in (2). Consider two fixed classes  $j$  and  $k$ . It is well known that

$$(X_j, X_k) \sim MN(n^*, (p_j, p_k)) \quad (3)$$

from which it follows that

$$E(X_j - X_k) = n^*(p_j - p_k)$$

and

$$\text{Var}(X_j - X_k) = n^* p_j(1-p_j) + n^* p_k(1-p_k) + 2n^* p_j p_k$$

By the central limit theorem, the trinomial distribution in (3) converges to a normal distribution as  $n^* \rightarrow \infty$ , so that

$$X_j - X_k \approx N(n^*(p_j - p_k), n^*[p_j(1-p_j) + p_k(1-p_k) + 2p_jp_k])$$

for large values of  $n^*$ . Hence, when  $p_j = p_k = p$  and  $n^*$  is large,

$$\frac{(X_j - X_k)}{\sqrt{2n^* p}} \approx N(0,1)$$

and

$$\frac{(X_j - X_k)}{\sqrt{X_j + X_k}} \approx N(0,1) \quad (4)$$

since

$$\hat{p} = (X_j + X_k)/(2n^*)$$

when  $p_j = p_k = p$ .

Thus the statistic in (4) can be used as an approximate test of the hypothesis that  $p_j = p_k$ . In other words, we will reject the hypothesis if we observe large values of

$$\left| \frac{X_j - X_k}{\sqrt{X_j + X_k}} \right|.$$

The choice of critical values will not be strictly based on the standard normal approximation because the rules in (1) and (2) are not comparing two fixed classes. This issue will be discussed a little more in Section 3.

### 3. Concluding Remarks

In this article, we developed a stopping rule for the number of generating trees in a random forest. The basic idea of this rule is for classifying a new case but it can be extended to classifying each case in a training data. This rule employs a simple hypothesis

test for testing if the probabilities of the two classes being compared are the same. If this hypothesis is rejected, we can believe with high probability that the number of trees generated so far is big enough to ensure that generating more trees will not change the classification results.

The rules in (1) and (2) say that we stop generating more trees if we can reject the hypothesis of equal probabilities for the two classes being compared. The procedures in (1) and (2) must be regarded as merely informal. The test statistic in (4) is valid for comparing two fixed class  $j$  and  $k$ , but in (1) we are comparing two random classes, and in (2) we are comparing a fixed class with a random class. This raises the standard issues of multiple comparisons which become especially important when the number of classes is large.

An ideal situation will be that all (or all but a few) cases satisfy  $|Z_n(i)| > c$  but this ideal situation will not occur quite often in real data sets. Therefore we might need some additional stopping rules for the number of generating trees in case where some case has only a slight difference in the probabilities of the two classes being compared. Developing stopping rules for the number of generating trees in this case could be a further research topic.

### References

- [1] Alam, K. (1971). On selecting the most probable category. *Technometrics* 13, 843-850.
- [2] Bhandari, S.K., and Ali, M.M. (1994). An asymptotically minimax procedure for selecting the  $t$ -best multinomial cells. *Journal of Statistical Planning and Inference* 38, 65-74.
- [3] Breiman, L. (1996). Bagging predictors.

- Machine Learning* 24, 123-140.
- [4] Breiman, L. (2001). Random forests. *Machine Learning* 45, 5-32.
- [5] Hamza, M., and Larocque, D. (2005). An empirical comparison of ensemble methods based on classification trees. *Journal of Statistical Computation and Simulation* 75, 629-643.
- [6] Ramey, J.T., and Alam, K. (1979). A sequential procedure for selecting the most probable multinomial event. *Biometrika* 55, 171-173.
- [7] Shapire, R., Freund, Y., Bartlett, P., and Lee, W. (1998). Boosting the margin: a new explanation for the effectiveness of voting methods. *Annals of Statistics* 26, 1651-1686.

## 가시광 영역에서 RF 스퍼터링에 의한 $TiO_2$ 박막의 광촉매 특성

우충하 · 김경찬

계명대학교 자연과학대학 디지털물리학과

### Photocatalytic properties of $TiO_2$ thin film by RF sputtering in the visible light region

Chung-Ha Woo · Kyung-Chan Kim

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

**요약.**  $TiO_2$  박막의 광분해 효율을 알아보기 위하여 UV-Vis 분광광도계와 Congo red 분해 장치를 이용하여 실험하였다. UV-Vis 흡광도에서  $TiO_2$  박막의 결정구조가 아나타제와 루타일 및  $Ti_2O_3$ 가 혼재되어 있을 때 흡수대역이 장파장 쪽으로 이동하고 있는 것을 알 수 있었고,  $O_2$ 와  $N_2$ 의 비율이 2:5일 때 가시광 영역에서 가장 좋은 광분해 효율을 나타내었다.

**Abstract.** To investigate the photodecomposition efficiency of  $TiO_2$  thin films, we have been experimented using UV-Vis spectrophotometer and decomposition device for Congo red dye. Absorption band of thin film having mixed stucture of anatase, rutile and  $Ti_2O_3$  was shifted to longer wavelength and thin film was deposited under  $O_2/N_2$  ratio = 2:5 at which the most efficiency of photodecomposition was shown under the visible light.

## I. 서 론

광촉매 연구는 1972년 동경대학의 Fujishima 와 Honda는 Pt를 음극으로  $TiO_2$ 를 양극으로 한 다음, 제논 램프(Xenon Lamp)를 비추면 물이 분해돼 수소와 산소가 생성되는 현상을 최초로 발견했다.<sup>[1]</sup> 이 성과는 1972년 영국의 세계적 과학 잡지 'Nature'에 발표되고 곧 전 세계의 과학자로부터 주목을 받았다. 각국의 많은 과학자는  $TiO_2$ 의 광촉매 작용에 주목하기 시작했고, 이에 관한 많은 연구가 시작되었다.

$TiO_2$  광촉매는 아나타제(3.2 eV)와 루타일(3.0 eV)로 자외선(300~380 nm)에 의해 광분해가 일어난다. 그러나 최근에는 가시광에 감응하는 광촉매를 만들기 위하여  $TiO_2$ 에 N과 같은 전형원소<sup>[2]</sup>나 Au, Fe<sup>[3,4]</sup>과 같은 전이금속을 도핑하여 반응시키기도 한다.

이와 같은 전형원소나 전이금속은  $TiO_2$ 에 도

핑되어  $TiO_2$ 의 전도대(conduction band)와 가전자대(valence band)사이에 새로운 에너지 준위를 형성하여 가시광과 같은 장파장의 조사하에서 광활성을 가지게 하는 것으로 밴드갭 에너지를 줄여 주는 역할을 한다고 알려져 있다.

본 연구에서는 가시광에서의 광분해 효율을 높이기 위해서  $TiO_2$  타겟으로 하여 Ar-N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> 기체 분위기에서 RF 스퍼터링에 의해  $TiO_2$  박막을 제조하여,  $TiO_2$ 의 박막에 전형원소 N이 도핑되도록 하였다.  $TiO_2$  박막의 가시광 영역에서의 광촉매 특성과 광분해 효율을 알아보기 위하여 UV-Vis 분광광도계와 Congo red 분해 장치를 이용하여 실험하였다.

## II. 실 험

### 1. 실험장치

본 연구에서는  $TiO_2$ (99.99%) 세라믹 타겟을

이용하여 Ar-N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> 기체 분위기에서 RF 마그네트론 스퍼터링에 의해 TiO<sub>2</sub> 박막을 증착하였다. 실험에 사용된 스퍼터링 장치의 개략도를 그림 1에 나타내었다. 진공조 내부의 상단에 2 개의 타겟이 장착되어 다층(multilayer)의 증착 및 동시에 두 종류의 물질을 증착할 수 있게 설계되어 있으며 타겟 어셈블리(assembly)는 영구 자석을 사용한 마그네트론 형태이고 전처리 스퍼터링을 가능하게 하는 셔터가 장착되어 있고 타겟과 기판사이의 거리를 3 cm ~ 10 cm까지 변화시킬 수 있는 장치이다. 최대 600 W의 RF 전력과 기판 지지대 밑에 히터를 설치하여 기판을 가열할 수 있는 장치이다. 로터리 펌프(650 l/min) 및 유 확산 펌프(570 l/sec)를 이용한 기본 압력은  $\sim \times 10^{-6}$  torr이며, 유입 기체의 유량은 3 개의 MFC(mass flow controller)를 이용하여 조절할 수 있도록 되어 있다.

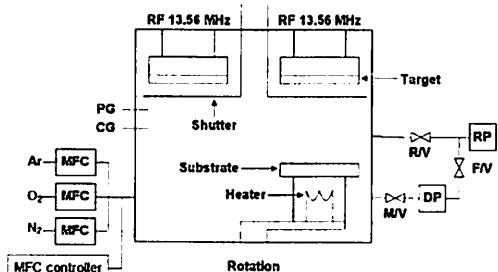


Fig. 1. Schematic diagram of RF sputtering devices.

## 2. TiO<sub>2</sub> 박막 제조

본 실험의 박막 제작에서 타겟은 99.99%인 TiO<sub>2</sub>와 99.95%인 TiN 세라믹 타겟을 사용하였으며, 타겟의 크기와 형태는 직경 2 inch, 두께 1/4 inch, 라운드형이다. 기판으로는 700°C 이상의 고온에서도 잘 견디는 quartz를 사용하였다. 기판 표면 상태에 따라 성장된 물성이 많은 영향을 받기 때문에 기판의 세척은 매우 중요하다. 먼저 아세톤, 메탄올 및 초순수를 사용하여 차례로 초음파 세척과정을 거친 후, N<sub>2</sub> 가스로 건조 후 진공조에 장착하였다.

스퍼터링을 위한 기체로는 99.999%의 Ar, 99.99%의 O<sub>2</sub>, 99.99%의 N<sub>2</sub>를 사용하였다. 스퍼터링을 하기 전 로터리 펌프와 유확산 펌프를

이용하여  $\sim \times 10^{-6}$  torr까지 충분히 배기한 후, MFC(mass flow controller)를 이용하여 Ar 기체와 O<sub>2</sub> 기체 그리고 N<sub>2</sub> 기체를 정해진 비율로 진공조에 유입한다. 대기 중에 노출되어 타겟 표면에 형성된 오염 물질을 제거하기 위해 셔터로 가려준 다음, 10 분 동안 전처리 스퍼터링을 행하였다.

타겟과 기판사이의 거리는 4.5 cm로 고정시켜 실험을 행하였다. RF 전력은 200 ~ 250 W, 기판온도는 RT(room temperature)로 하여 스퍼터링을 행한다. 박막 증착 후 제작된 시료들의 결정화가 잘 이루어지게 하기 위하여 700°C에서 열처리를 행하였다. 열처리 조건은 1 분에 10°C 씩 상온까지 냉각시킨다.

## 3. 박막의 광촉매 특성 평가

**박막의 미세구조 측정:** 박막의 두께와 표면형태는 FE-SEM(field emission scanning electron microscope, Hitachi, S-570)을 이용하여 표면과 단면의 미세구조를 관찰하였다.

**흡광도 측정:** 광학특성(transmittance and absorbance)은 UV-Vis 분광광도계(UV-vis spectrophotometer, HP 8453E)를 이용하여 기저선(증착하지 않은 quartz)을 설정 후, quartz 기판에 증착된 박막을 200 ~ 600 nm의 파장대에서 흡광도를 측정하였다.

**Congo red 분해 실험:** TiO<sub>2</sub> 박막의 광촉매 활성을 고찰하기 위해 반응기는 직경이 13 cm이고 유효 용적이 1 l인 실린더형 용기를 사용하였고, 그림 2에 나타내었다.

반응기의 상단에 자외선 램프를 설치하였고 램프의 발열로 인한 반응조의 온도상승을 억제하기 위해 반응조 외부에 순환식 냉각장치를 설치하여 반응용액의 온도를 28 ~ 32°C로 유지한 상태에서 광반응을 하였다. 실험에 사용한 광원은 중심파장 360 nm인 Oriel사의 자외선 램프(500 W, Hg(Xe) arc lamp)를 사용하였고, 가시광원에서 실험을 하기 위하여 색 필터(dichroic filter)를 이용하여 빛을 420 nm ~ 630 nm의 파장을 통과시켜 실험하였다. 램프는 반응 용기로

부터 25 cm 거리에서 조사할 수 있도록 설치한 후 광량계로 빛이 안정화 되는 것을 확인한 후 가시광선 영역에서 분해 실험을 하였다.

$\text{TiO}_2$  박막은 2.5 cm × 2.5 cm 정방(square)형태의 quartz를 사용하였고 오염물질로는 Congo red 20 ppm을 사용하였으며 오염물질의 양은 200 ml를 사용하여 분해 실험을 하였다.

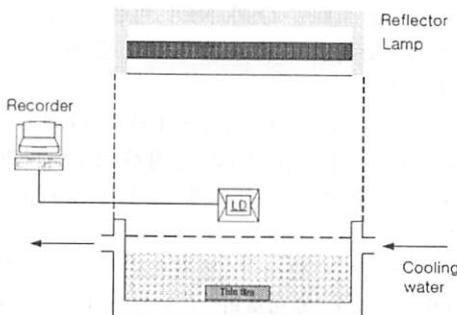


Fig. 2. Schematic diagram of Congo red decomposition device.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. FE-SEM에 의한 박막의 미세구조 특성

그림 3에 FE-SEM(Hitachi, S-570)을 이용하여  $\text{TiO}_2$  박막의 미세구조를 나타내었다.  $\text{TiO}_2$  타겟으로 Ar은 14 sccm으로 고정한 다음 O<sub>2</sub> 가스와 N<sub>2</sub> 가스를 여러 가지 비율로 증착한  $\text{TiO}_2$  박막의 XRD 분석결과이다. 이때의 증착조건은 Ar 기체를 14 sccm으로 고정한 후, O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>의 비율을 각각 2:5, 2:9, 2:15로 하였으며, 작업압력을  $2.0 \times 10^{-2}$  torr ~  $9.0 \times 10^{-2}$  torr로 하였다. 증착시간은 모두 1 시간 30 분이다. 열처리 온도는 모두 700°C로 하였으며, 열처리 시간은 5 시간이다. 열처리는 흡착한 원자(혹은 분자)들을 재배열함으로써 결정화시키는 역할을 한다.

그림에서 O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>의 비율이 각각 2:5, 2:9, 2:15일 때 박막의 두께는 각각 75 nm, 67 nm, 59 nm로 나타났고  $\text{TiO}_2$  입자의 크기도 역시 대략 50 nm로 나타났다. 이것으로 보아  $\text{TiO}_2$  박막의 두께는 대체로 작업압력이 높을수록 낮게 증착되었고  $\text{TiO}_2$  입자의 크기는 모두 50 nm 정도의 크기를 나타낸다고 볼 수 있다.

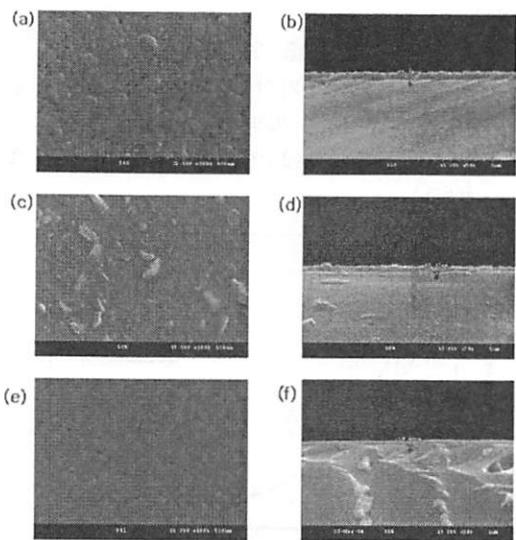


Fig. 3. Surface and cross-sectional SEM images of  $\text{TiO}_2$  films deposited different gas ratio.

(a)(b) O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>=2:1, (c)(d) O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>=2:9,  
(e)(f) O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>=2:15

#### 2. 흡광도 분석

그림 4와 그림 5는 UV-Vis 분광광도계(HP 8453E)를 이용한 흡광도 분석결과이다. 이때의 증착조건은 Ar=100%, Ar=14 sccm으로 고정한 후, O<sub>2</sub>:N<sub>2</sub>의 비율은 각각 0:1, 2:0, 4:0, 2:5, 2:9, 2:15이고 작업 압력은  $2.0 \times 10^{-2}$  torr ~  $9.0 \times 10^{-2}$  torr이고 증착시간은 모두 1 시간 30 분이다. 그리고 열처리 온도는 모두 700°C이고 열처리 시간은 5 시간이다.

그림 4에서 Ar=100%로 증착한  $\text{TiO}_2$ 인 경우 자외선 영역에서 흡수를 보였고 O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>의 비율이 각각 4:0, 0:1, 2:0의 순으로 가시광 영역으로의 흡수이동을 보였다. 이는 박막의 색깔이 Ar=100%로 증착한  $\text{TiO}_2$ 인 경우에는 투명한 갈색에서 O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>의 비율이 각각 4:0, 0:1, 2:0의 순으로의 진한 갈색으로 갈수록 가시광 영역으로의 흡수이동을 보였다. 박막의 색깔이 진한 갈색을 따면서 UV-Vis 흡광도에 영향을 받은 것으로 생각된다.

그림 5에서는 O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>의 비율이 각각 2:15, 2:9, 2:5의 순으로 가시광 영역으로의 흡수이동을

보였다. 이 역시 마찬가지로 박막의 색깔이 O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>의 비율이 각각 2:15, 2:9, 2:5의 순으로의 진한 갈색으로 갈수록 가시광 영역으로 흡수이동이 되는 것으로 보아 박막이 진한 갈색으로 되면서 UV-Vis 흡광도에 영향을 다소 미친 것으로 생각된다.

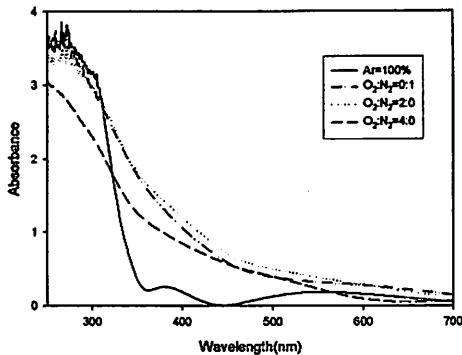


Fig. 4. Optical absorption spectra of TiO<sub>2</sub> films deposited with different gas ratio.

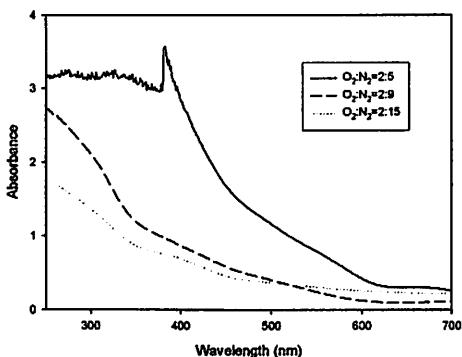


Fig. 5. Optical absorption spectra of TiO<sub>2</sub> films deposited with different gas ratio.

### 3. Congo red 분해 효율

Congo red의 분해반응속도는  $v = kC^2\omega$   $v = -\frac{dC}{dt}$

로 표현할 수 있고, 이 식에서  $v$ 는 반응속도 ( $\text{mg/l} \cdot \text{min}$ )이고,  $k$ 는 Congo red의 분해속도상수( $1/\text{min}$  혹은  $1/\text{hour}$ )이며  $C$ 는 분해시간에 따른 Congo red의 농도( $\text{mg/l}$ )에 해당한다. 위의 두 분해반응속도 식을 이용하여 시간에 따른 분해물질의 농도변화를 반응시간 및 농도에 대해 적분하면  $\ln(C/C_0) = kt$ 라는 1차 반응속도 식

을 얻을 수 있다. 여기서  $C_0$ 는 Congo red의 초기농도( $\text{mg/l}$ )에 해당한다. 그럼 6에서 TiO<sub>2</sub> 측면에 의한 Congo red 광분해 실험은  $\ln(C/C_0)$ 를 분해시간  $t$ 의 함수로 도식화하여 그래프의 기울기로부터 각 측면의 Congo red 분해속도상수를 확인하였다. Congo red 자체만으로 된 용액에 가시광을 조사하여 blank 실험(광분해 실험)을 한 후, Ar=100%, O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>의 비율은 각각 0:1, 2:0, 2:5로 증착한 TiO<sub>2</sub> 박막으로 분해 실험을 진행하였다.

분해 실험 결과 blank, Ar=100%, O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>의 비율은 각각 0:1, 2:0, 2:5로 증착한 TiO<sub>2</sub> 박막의 순으로 가시광에서의 광분해 효율이 좋다고 나타났다.

Y. Chiba 등은 산소의 결핍으로 인해 생겨난 Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub>가 가시광 쪽으로의 흡수경계가 일어나는데 역할을 한다고 보고하였다.<sup>[5]</sup> 따라서 O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>의 비율을 각각 0:1, 2:0, 2:5로 증착한 TiO<sub>2</sub> 박막의 XRD 결과에서 Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub>가 가시광에서 Congo red를 분해하는 데 크게 기여한 것으로 보인다.

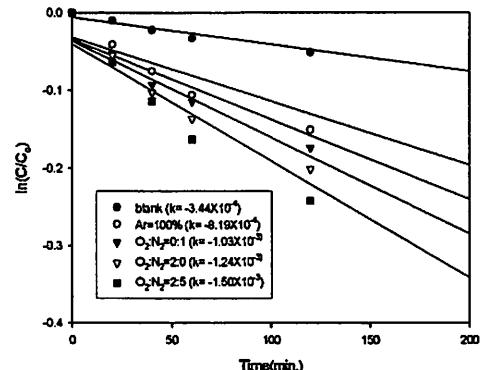


Fig. 6. Kinetics of the photocatalytic degradation of Congo red.

### IV. 결 론

고주파 마그네트론 스퍼터링 장치에서 TiO<sub>2</sub> 세라믹을 타겟으로하여 Ar-N<sub>2</sub>-O<sub>2</sub> 기체 분위기에서 증착한 TiO<sub>2</sub> 박막에서 열처리 온도, Ar=100%, O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>의 여러 가지 비율등의 증착 조건에 따른 박막의 미세구조, UV-Vis 흡광도, Congo red 광분해 효율 등의 특성을 조사하였으

며, 상호 연관성을 통하여 광촉매 특성에 대해 알아보았다.

TiO<sub>2</sub> 박막의 미세구조에서 입자의 크기는 50 nm 내외의 크기를 나타내었으며, 기체의 유량이 많을수록, 즉 작업압력이 높을수록 낮은 중착율을 나타내었다.

UV-Vis 흡광도에서는 TiO<sub>2</sub> 박막의 결정구조가 일반적으로 광촉매에 좋다고 알려진 아나타제 구조만 가지고 있을 때보다 아나타제와 루타일 및 Ti<sub>2</sub>O<sub>3</sub>가 혼재되어 있을 때 가시광 영역인 장파장 영역으로 이동하고 있는 것을 볼 수 있었다. O<sub>2</sub>와 N<sub>2</sub>의 비율이 2:5일 때 가시광 영역 가장 이동이 컸다. 또한 이 조건에서 가시광 영역의 Congo red 분해 실험 결과 가장 좋은 분해율을 보였으므로 광촉매 효율이 가장 좋을 것으로 사료된다.

### 감사의 글

본 연구는 2007년도 산업자원부 한국산업기술재단 지역혁신 인력양성사업 연구비 지원으로 수행되었음.

### 참고문헌

1. A. Fujishima and K. Honda, *Nature*, **37**, 238 (1972).
2. R. Asahi, T. Morikawa, T. Ohwaki, K. Aoki, Y. Taga, *Science*, **269**, 293, (2001).
3. Armelao et al., *American Chem. Society*, **16**, 3331 (2004).
4. 김승민, 가시광원에서 고효율 광촉매를 위한 TiO<sub>2</sub> 제조방법 및 특성조사, 계명대학교, 박사학위논문, 2005, p. 97.
5. Y. Chiba, K. Kashiwagi, H. Kokai, *Vac.*, **74**, 643 (2004).

## 트라이에톡시실레인으로 담지된 이산화티타늄 광촉매 화합물의 합성과 가시광선 영역에서 광분해 특성

이명진 · 박영태\*

계명대학교 자연과학대학 화학과

## Synthesis and Photodegradation Properties of TiO<sub>2</sub> Photocatalysts Immobilized by Triethoxysilane under Visible Light

Myung Jin Lee and Young Tae Park\*

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

**요약.** TiO<sub>2</sub>를 출발물질로 하여 톨루엔 용매 하에서 triethoxysilane 시약과의 탈수소반응을 통하여 triethoxysilane의 H 위치에 TiO<sub>2</sub>를 치환시켜 다양한 물 비료 실리콘에 담지된 TiO<sub>2</sub> 화합물을 합성하였다. 이 화합물은 THF와 클로로포름 같은 일반적인 유기용매에는 거의 용해되지 않았다. 하지만, 혹시 남아있을지 모르는 유기그룹을 제거하기 위해서 클로로포름으로 씻어주었다. X선 형광분광기(XRF)를 통하여 Si/Ti의 비율이 화합물 I은 0.541%이며 화합물 II는 1.415%임을 확인하였다. 순수한 TiO<sub>2</sub>와 합성한 triethoxysilane이 담지된 TiO<sub>2</sub>의 광분해 특성을 확인하기 위하여 congo red 수용액과 methylene blue 수용액을 가시광 영역에서 광분해 실험을 하였다. 그 결과 congo red 수용액에서는 triethoxysilane이 담지된 TiO<sub>2</sub>보다 순수한 TiO<sub>2</sub>가 더 좋은 광촉매 활성을 보였으나 methylene blue 수용액에서는 triethoxysilane이 담지된 TiO<sub>2</sub>가 더 좋은 광촉매 활성을 나타내었다.

**Abstract.** We have synthesized the silicone immobilized TiO<sub>2</sub> compounds by dehydrogenation reaction of triethoxysilane with TiO<sub>2</sub> in toluene as solvent. The synthesized materials are insoluble in usual organic solvents such as THF and CHCl<sub>3</sub>. However we have washed the prepared compounds with CHCl<sub>3</sub> to remove remained organic materials. The ratios of Si/Ti of immobilized TiO<sub>2</sub> photocatalysts I and II were analyzed to be 0.541% and 1.415% by using XRF, respectively. We have also observed Si resonance peak of expected Q-unit by <sup>29</sup>Si CP/MAS solid state NMR. We have investigated photocatalytic activity of the immobilized TiO<sub>2</sub> in the water solution of Congo Red dye and Methylene Blue dye under visible range light. We have observed that the pure TiO<sub>2</sub> has better photocatalytic activity than that of triethoxysilane immobilized TiO<sub>2</sub> in the solution of Congo Red dye, however triethoxysilane immobilized TiO<sub>2</sub> has better photocatalytic activity than that of pure TiO<sub>2</sub> in the solution of Methylene Blue dye.

### I. 서 론

규소(Silicon)는 지구상에서 산소 다음으로 많은 양을 차지하는 원소로 지각을 구성하는 8대 주요 원소 중의 하나이다.<sup>1,2</sup> 주기율표에서 3주기 14족에 속하는 비금속성 원소이며, 1824년 스웨

덴의 Berzelius가 최초로 규소원소를 발견하였고 염소와의 반응을 시켜 최초의 규소 화합물로서 무색 휘발성 액체인 SiCl<sub>4</sub>가 합성되었다.<sup>3</sup> 1857년 독일의 Wöhler는 규소와 탄소를 섞은 후 가열하면서 HCl기체를 통과시켜서 trichlorosilane을 합성하였는데, 오늘날에도 HSiCl<sub>3</sub>를 제조하는데 이

와 비슷한 공정을 사용하고 있다.

1860년경 프랑스의 Friedel과 미국의 Crafts는 tetrachlorosilane에 diethylzinc를 반응시켜 직접 결합된 최초의 유기규소 화합물을 합성하였다.<sup>4</sup> 1899년부터 1944년 까지 규소화학의 연구에 전념한 영국의 Kipping은 유기규소 화합물을 silanol 작용기를 두 개 가지고 있으면 매우 불안정하여 물이 빠지면서 축합하는 것을 발견하는데 Kipping의 생각인 규소와 산소간의 이중결합이라는 것과는 달리 단일결합으로 이루어진 폴리실록산(polysiloxane) 고분자 물질이라는 것이 후에 판명되었다.<sup>5,6</sup>

한편, 최근에 들어서 크게 문제가 되고 있는 것 중의 하나가 새집증후군(Sick House Syndrome)이다. 건축한지 시간이 얼마 지나지 않은 집의 내부에서 배출되는 여러 가지 휘발성 유기화합물로 인한 폐단이 속속 보고되고 있다. 이러한 휘발성 유기화합물로 인한 호흡기질환, 피부병 등 특히 어린이와 노인에게 큰 피해를 주는 사례는 여러 매스미디어를 통하여 접하고 있는 실정이다.

새집증후군의 피해를 줄이고자 여러 사업체나 학계에서 많은 연구를 하고 있는데, 그 중에서도 TiO<sub>2</sub> 광촉매를 이용한 휘발성 유기용매의 분해에 많은 비중을 두고 연구를 하고 있다. 이 광촉매의 원리는 TiO<sub>2</sub>가 용액이나 기상에 분산되어 있을 때 빛을 조사하면 자발적인 산화 환원반응을 일으키는 데, 이 때 조사된 빛은 반응물이 아닌 광촉매에 흡수되는 이러한 과정을 거쳐 일어나는 원리이다.<sup>7</sup> 또한 TiO<sub>2</sub>는 다른 광촉매에 비해 저렴한 비용, 인체의 무해성, 살균, 각종 유기물의 효과적 분해력, 안정성 및 지속적인 내구성 등의 많은 장점을 가지고 있어서 여러 가지 많은 분야에 응용되고 있다.<sup>8,9</sup> 본 연구실에서도 TiO<sub>2</sub> 광촉매에 관한 연구를 하고 있는데, 주력하는 분야는 광촉매를 사용하는 데 있어서 좀 더 효과적인 방법으로 사용할 수 있게 연구하는데 목적이 있다.<sup>10</sup> 즉, 규소화합물을 도입하여 분산능(dispersibility)을 높이는 연구를 하는데 큰 목적이 있다.

본 논문에서는 triethoxysilane을 TiO<sub>2</sub>와 반응하여 실리콘(silicon)이 결합된 TiO<sub>2</sub> 화합물을 합

성하고자 한다.<sup>11-13</sup> 특히, 이렇게 합성한 TiO<sub>2</sub> 화합물은 물성과 구조를 분석하기 위해서 여러 가지 기기분석을 하자 한다. 또한, 순수한 TiO<sub>2</sub>와 합성한 triethoxysilane이 담지된 TiO<sub>2</sub>에 대하여 congo red 수용액과 methylene blue 수용액을 가시광 영역에서 광분해 실험을 수행하여 광분해 특성을 확인하고자 한다.

## II. 실험

### 1. 일반적인 사항

본 실험에서 사용한 triethoxysilane는 미국의 Aldrich사의 시약을 사용하였으며 용매로 사용한 틀루엔 또한 Aldrich사에서 구입하여 사용하였다. 아르곤 기체는 국내에서 생산되는 99.999% 이상의 고순도를 지닌 것을 구입하여 사용하였다. 생성물을 분석하기 위해서 X선 형광분광기(XRF)를 사용하였다. X선 형광분광기(XRF)는 PHILIPS사의 PW2400을 사용하였다. <sup>29</sup>Si CP-MAS NMR 스펙트럼은 Varian unity Inova-600을 사용하여 측정하였다. XRD 스펙트럼은 Philips X'pert APD을 사용하여 측정하였다. 광분해 실험에 사용한 광원은 미국의 Newport사의 Research ARC source를 사용하였고, 가시광선 영역에서 촉매활성을 평가하기 위해 자외선 차단 광 필터를 사용하여 400nm 이하의 파장을 가지는 빛을 차단하였다.

### 2. 용매와 실험장치

실험에 쓰인 용매인 틀루엔은 Na 금속과 benzophenone으로 하루 동안 환류시킨 후 정제하여 사용하였다. 모든 실험 장치는 불꽃 건조하여 사용하였고, 실험의 안정성을 위하여 아르곤 대기하에서 실행하였다.

### 3. Triethoxysilane으로 담지된 TiO<sub>2</sub> 화합물 (I) 및 (II)의 합성

① 250 mL 등근바닥 플라스크에 냉각기를 장치하고 아르곤 대기하에서 불꽃 건조한다. 플라스크에 실험실에서 합성한 TiO<sub>2</sub> (8 g, 100 mmol)과 triethoxysilane (0.26 g, 1.6 mmol) 및

정제한 toluene 28 g을 넣는다. 두 번째는 플라스크에 실험실에서 합성한  $\text{TiO}_2$  (8 g, 100 mmol) 과 triethoxysilane (0.65 g, 4.0 mmol) 및 정제한 툴루엔 28 g을 넣는다. 플라스크를 가열망태기에게 넣고 자석교반 장치를 한다. 냉각기를 15 °C로 유지하면서 가열망태기의 온도를 60 °C로 하여 자석교반을 한다. 약 8시간 정도 교반을 한 후 실험을 종료한다.

② ①에서 합성한 화합물을 회전 증발기로 용액을 제거한 후 진공오븐에서 하루 동안 건조한다. 이 화합물을 클로로포름( $\text{CHCl}_3$ )으로 쟁어 진공오븐에서 다시 건조하여 규소화합물이 담긴  $\text{TiO}_2$ 화합물 (I)과 (II)인 흰색 파우더를 각각 7.38 g 및 7.47 g을 얻었다.

#### 4. 가시광 영역에서 congo red의 광분해 실험

① 50 ppm congo red 용액 200 mL를 실린더형의 반응조에 담은 후에 제조된  $\text{TiO}_2$  분말 0.1 g을 주입한다. 흡착에 의한 영향을 막기 위해 암실에서 약 1시간동안 교반한다.

② 광량이 안정화되는 것을 확인하고, 가시광선 빛을 조사하여 광분해 실험을 한다. Visible lamp에서 발생하는 고온의 열에 의한 분해를 방지하기 위해 순환식 냉각장치를 설치한다.

③ 최초 1시간 동안은 20분 간격으로, 1시간 후부터 4시간까지는 1시간 간격으로 5 ml의 반응액을 채취하여 UV-Vis 분광기로 반응시간에 따른 congo red의 농도를 관측한다. 용액 채취시 membrane filter를 사용하여  $\text{TiO}_2$ 분말을 걸러낸다.

④ 검량선(498 nm)을 그리고 시간에 따른 농도변화를 그래프로 나타낸다.

#### 5. 가시광 영역에서 methylene blue의 광분해 실험

① 15 ppm Methylene Blue 용액 200 mL를

실린더형의 반응조에 담은 후에 제조된  $\text{TiO}_2$  분말 0.1 g를 주입한다. 흡착에 의한 영향을 막기 위해 암실에서 약 1시간 교반한다.

② 광량이 안정화되는 것을 확인하고, 가시광선 빛을 조사하여 광분해 실험을 한다. Visible lamp에서 발생하는 고온의 열에 의한 분해를 방지하기 위해 순환식 냉각장치를 설치한다.

③ 1시간 동안 20분 간격으로 5 ml의 반응액을 채취하여 UV-Vis 분광기로 반응시간에 따른 Methylene Blue의 농도를 관측한다. 용액 채취 시 membrane filter를 사용하여  $\text{TiO}_2$ 분말을 걸러낸다.

④ 검량선(665 nm)을 그리고 시간에 따른 농도변화를 그래프로 나타낸다.

#### 6. 광분해 실험 반응장치도

합성한  $\text{TiO}_2$  광촉매들의 촉매 활성을 평가하기 위해 Figure 1과 같은 반응장치를 구성하여 광분해 실험을 하였다.

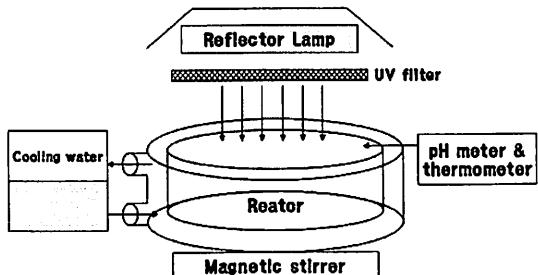
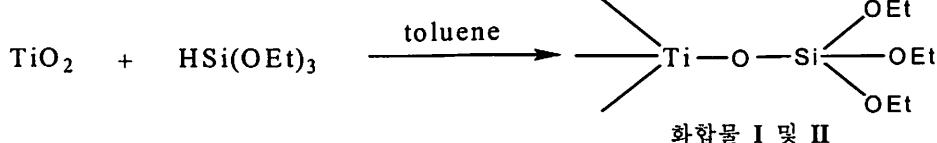


Figure 1. Scheme of the photodegradation reactor

### III. 결과 및 고찰

Triethoxysilane과  $\text{TiO}_2$  간의 탈수소 반응을 수행하여 얻은 화합물 I 및 II에 대한 반응식은 Scheme 1에 나타나 있다.

#### Scheme 1



합성한 화합물 I 과 II의 XRF 자료는 Table 1과 Table 2에 나타나 있다. Figure 2은 합성한 화합물 I 과 화합물 II에 대하여  $2\theta$ 값에 대한 측정된 세기(kcps) 중에서 Si 피크를 나타낸 스펙트럼이다. 여기에서 두 화합물에 담지된 Si/Ti의 비를 알 수 있다. 실험결과 합성된 화합물 I의 Si의 비율은 0.541%였으며 화합물 II의 Si의 비율은 1.415%로 확인되었다.

합성한 화합물 I의 고체 상태에서  $^{29}\text{Si}$  CP/MAS NMR 스펙트럼을 Figure 3에 나타내었다. 이 스펙트럼을 살펴보면, -81 ~ -90 ppm에서 예상되는 Q-단위의 Si 피크를 확인할 수 있다. 이것으로서 규소 원소에 산소가 4개 결합된, 즉,  $\text{TiO}_2$ 가 triethoxysilane과 결합하였음을 알 수

있다. 다시 말해서, triethoxysilane의 규소 원소에는 세 개의 산소가 결합되어 있는 형태였는데  $\text{TiO}_2$ 의 산소가 결합되어서 규소 원소의 주위에 네 개의 산소가 결합되어 있는 형태로 되었다는 것이다.

XRD 스펙트럼은 Figure 4와 5에 나타내었다. Figure 4는 triethoxysilane을 도입하기 전의  $\text{TiO}_2$  자체의 XRD 스펙트럼이고, Figure 5은 triethoxysilane을 도입한 후의 XRD 스펙트럼이다. 실험에 사용한  $\text{TiO}_2$ 는 anatase 타입과 rutile 타입이 섞여있는 상태의  $\text{TiO}_2$ 였는데, triethoxysilane을 도입한  $\text{TiO}_2$  화합물 역시 그 구조에는 변화가 없었다. 이것 역시 실리콘 화합물의 도입이 구조 변화에는 영향을 미치지 않음을 알 수 있었다.

Table 1. XRF data of compound I

**Concentrations of sample DS0623-1**

Compound	Conc. (%)										
1 Al	<<	S	<<	Ca	<<	Rh	<<				
2 Si	0.541	Cl	0.787	Ti	98.672	C19H38ON	F255.68				
3 P	<<	K	<<	Zn	<<						

Table 2. XRF data of compound II

**Concentrations of sample DS0623-2**

Compound	Conc. (%)										
1 Si	1.415	Ca	<<	Rh	<<	C19H38ON	F255.41				
2 Cl	0.794	Ti	97.792	Au	<<						

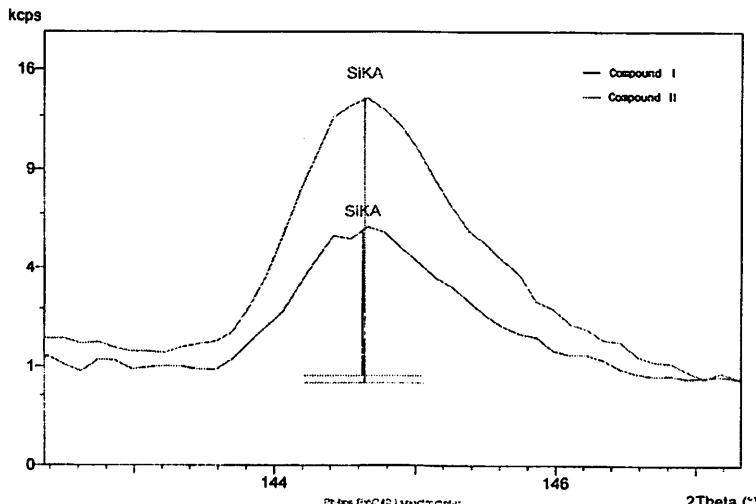


Figure 2. Si peak of compound I and II by XRF.

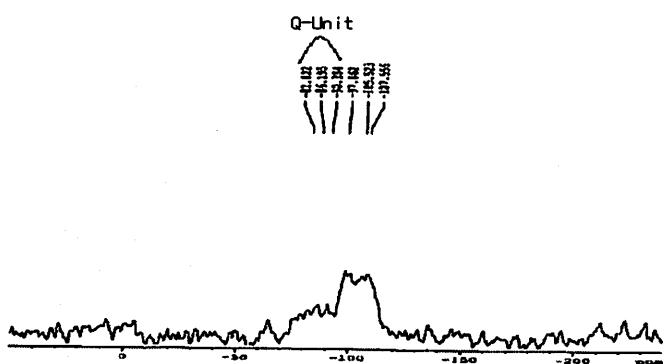


Figure 3.  $^{29}\text{Si}$ -CP/MAS solid state NMR spectrum of compound I.

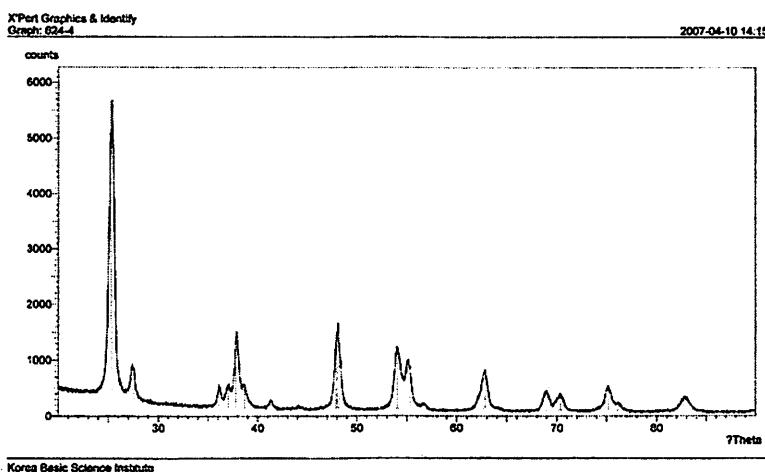


Figure 4. XRD spectrum of  $\text{TiO}_2$ .

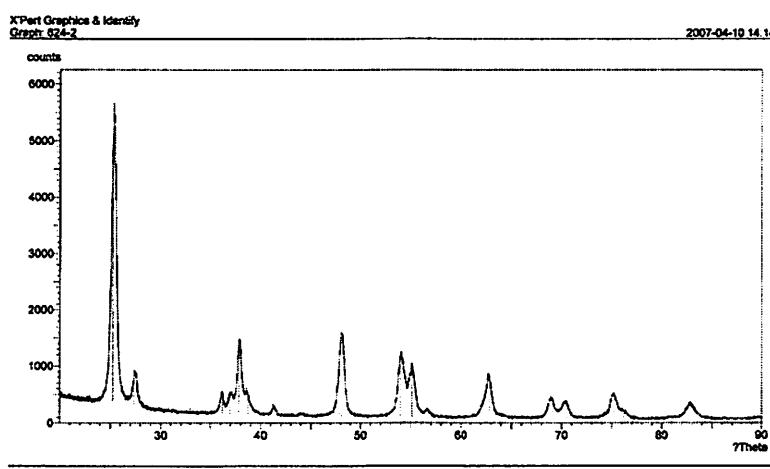


Figure 5. XRD spectrum of compound I.

실험실에서 합성한 순수한  $\text{TiO}_2$ 와 triethoxysilane으로 담지된  $\text{TiO}_2$ 에 대해 광촉매 분해실험을 수행하였다. Figure 6에서는 가시광 영역에서 광촉매 분해 반응에 의한 congo red의 시간에 따른 농도변화를 나타내었고, Figure 7에서는 각 화합물의 속도상수를 계산하기 위해  $\ln(C_0/C)$ 를 반응 시간(t)에 대해 1차 방정식으로 나타낸 것이다. congo red 용액에 대하여 순수한  $\text{TiO}_2$  촉매가 triethoxysilane이 담지된  $\text{TiO}_2$  촉매보다 흡착뿐만 아니라 분해능이 좋다는 것을 알 수 있으며 담지된 규소의 양이 많을수록 분해능이 떨어지는 것을 확인할 수 있었다.

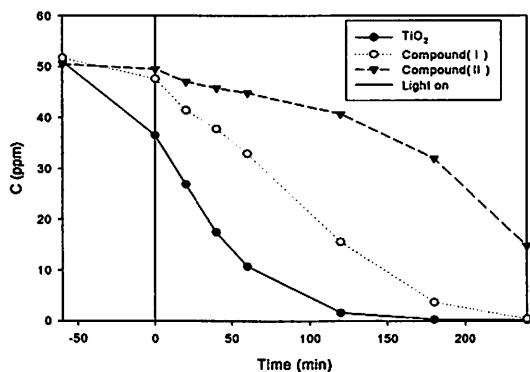


Figure 6. The photocatalytic degradation curves of congo red.

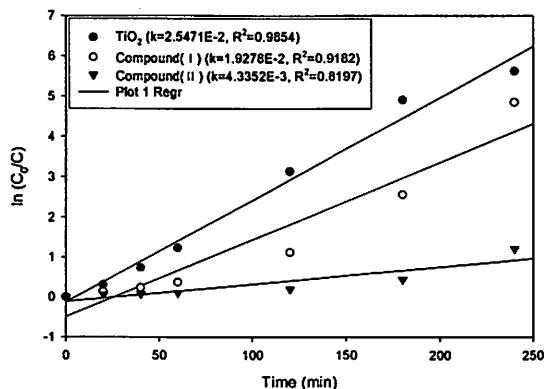


Figure 7. The photocatalytic degradation rates of congo red.

한편, 다른 종류의 유기 염료에 대하여 실험실

에서 합성한 순수한  $\text{TiO}_2$ 와 triethoxysilane 담지된  $\text{TiO}_2$ 의 광분해 특성을 확인하기 위해 methylene blue 수용액을 이용하여 광분해 실험을 수행하였다. Figure 8에서는 가시광 영역에서 광분해 반응에 의한 methylene blue 수용액의 시간에 따른 농도변화를 나타내었고, Figure 9에서는 각 화합물의 속도상수를 계산하기 위해  $\ln(C_0/C)$ 를 반응 시간(t)에 대해 1차 방정식으로 나타낸 것이다.

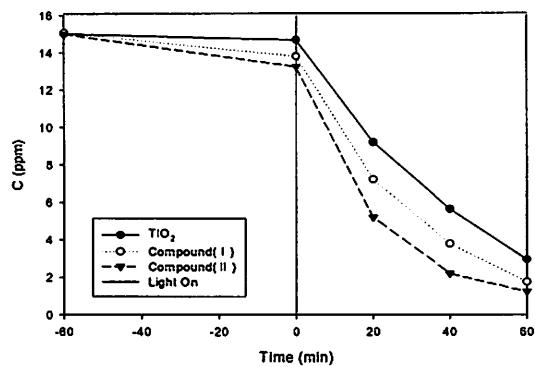


Figure 8. The photocatalytic degradation curves of methylene blue.

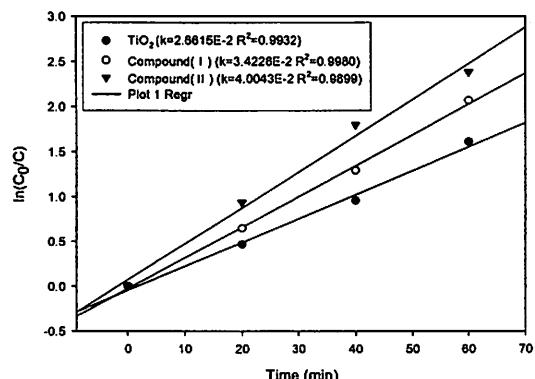


Figure 9. The photocatalytic degradation rates of methylene blue.

congo red 수용액에 대한 광촉매 분해실험 결과와는 달리, methylene blue 수용액의 광촉매 분해실험에서는 triethoxysilane이 담지된  $\text{TiO}_2$ 가 순수한  $\text{TiO}_2$ 보다 흡착은 물론 광분해능이 더 우

수한 것을 확인할 수 있었다. 또한, 담지된 규소의 함량이 많아질수록 1시간 동안의 흡착반응은 물론 광분해속도도 빨라진다는 것을 확인할 수 있었다.

#### N. 결 론

$\text{TiO}_2$ 를 출발물질로 하여 triethoxysilane 시약과의 반응을 통하여 triethoxysilane의 수소가  $\text{TiO}_2$ 의 산소와 치환된  $\text{TiO}_2$  화합물을 합성하였다. 합성된  $\text{TiO}_2$  화합물은 THF 같은 일반적인 유기용매에는 거의 용해되지 않았지만, 혹시 남아있을지 모르는 유기그룹을 제거하기 위해서 클로로포름으로 씻어주었다. X선 형광분광기와  $^{29}\text{Si}$  CP/MAS NMR 스펙트럼을 통하여 합성된 화합물의 성분을 분석하였다. 또한 합성한  $\text{TiO}_2$ 에 대한 XRD 스펙트럼의 분석 결과, 합성된  $\text{TiO}_2$ 는 anatase 타입과 rutile타입이 섞여있는 상태의  $\text{TiO}_2$ 였는데 triethoxysilane을 도입한  $\text{TiO}_2$  화합물 역시 그 구조에는 변화가 없었다. 이렇게 합성한 triethoxysilane이 담지된  $\text{TiO}_2$ 의 광분해 능을 확인하기 위해서 가시광선 영역에서 분해 실험을 수행하였다. 50ppm의 congo red 용액의 분해실험에서는 순수한  $\text{TiO}_2$ 가 1시간 동안의 흡착반응은 물론 광촉매 분해반응도 빨리 일어났으며 담지된 실리콘의 함량이 많아질수록 분해 능이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 하지만 15 ppm의 methylene blue 용액의 분해실험에서는 담지된 규소의 함량이 많아질수록 1시간동안의 흡착반응은 물론 분해속도도 빨라진 것을 확인할 수 있었다. 이 결과로 triethoxysilane 담지된  $\text{TiO}_2$ 는 특정 유기물에 대해 순수한  $\text{TiO}_2$ 보다 좋은 광분해능을 보이는 것으로 생각되며 이 특징을 이용하여 다양한 환경정화제로서의 사용이 기대된다.

#### 참고문헌

1. Rochow, E. G. In *Comprehensive Inorganic Chemistry*; Hailar, J. C., et al., Eds; Pergamon Press: Oxford, 1973; Vol. 1, Chapter 15 Silicon.
2. 정일남, 제3세대 실리콘 화학; 자유아카데미: 서울, 1997.
3. Berzelius, J. J. *Pogg. Ann.* 1824, 1, 169.
4. Friedel, C.; Crafts, J. M. *Ann. Chem. Justus Liebigs.* 1863, 127, 28.
5. Kipping, F. S.; Lloyd, L. *Chem. Ber.* 1899, 15, 174
6. Kipping, F. S.; Abrams, J. *J. Chem. Soc.* 1944, 1, 81
7. 김승민. 가시광원에서  $\text{TiO}_2$  광촉매의 최적 조건. 박사학위논문, 계명대학교, 대구, 2005.
8. Matsunaga, T.; Tomato, R.; Nakajima, T.; Wake, H. *Microbiol. Lett.* 1985, 29, 211.
9. Fujishima, A.; Ohtsuki, J.; Yamashita, T.; Hayakawa, S. *Photomed. Photobiol.* 1986, 8, 45.
10. 하후찬. 광촉매  $\text{TiO}_2$ 를 이용한 Phenol 유도체 분해에 관한 연구. 석사학위논문, 계명대학교, 대구, 2004.
11. Akira, Nakabayashi. *Organosilicon Chemistry V*; WILEY-VCH GmbH & Co. KGaA: Germany, 2003.
12. H. Fukui, *Hyomen* 1994, 32, 131-140.
13. H. Tada, *Lamuir* 1996, 12, 966-971.

## 교육용 자기공명영상(MRI)을 이용한 임상검사의 고찰

조무성 · 배재영  
계명대학교 자연과학대학 화학과

### The Study of Clinical Examination by Using Instructional Magnetic Resonance Imaging(MRI)

Moo-Seoung Cho, Jae Young Bae

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

**요약.** 자기공명영상(MR Imaging; MRI)은 기본적으로 각 펄스계열(pulse sequence)에 따라 다양하게 형성된다. 인체에 대한 MR 임상검사에서는 혼재된 고유한 조직들 간의 물리화학적 변화에 따른 영상의 신호강도와 형태적 변화를 이해하기 위해 펜텀과 인체조직에 대한 영상을 비교 고찰하여 MRI의 임상적 이해와 교육의 기초 자료로 활용하고자 한다.

**주제어:** MR Imaging, pulse sequence, phantom, susceptibility artifact, clinical education

**Abstract.** The Magnetic Resonance Imaging(MRI) was variously formed by according to the each pulse sequence. We can understand the signal intensity, formation change, and artifact formed by physical and chemical changes between mixed tissue (clinical test for human body). It can be possible for clinical understanding of MRI and it can be useful as basic materials of clinical education by comparison with phantom and the image of human tissue.

#### I. 서 론

인체에 무해하고 연부조직에 대한 묘출능이 높은 영상검사 방법 중에는 음파를 이용한 초음파(ultrasound; US) 검사와 MRI 검사 시스템이 있다. MRI는 US에 비해 인체 전신의 대부분을 고해상력의 영상으로 볼 수 있다. 특히 연부조직에 대하여 MRI는 일반적인 다른 방사선 영상검사 방법보다 더 높은 분해능을 나타낸다. 인체의 두부검사 시에 영상진단에 혼히 이용되고 있는 전산화단층촬영(computed tomography; CT) 상에 비해 MRI는 백질과 회백질 사이의 대조도가 우수하며 뼈에 의한 영상결점(artifact)이 나타나지 않는 장점이 있다. 그러나 지방과 물 또는 공기와 생체조직 간의 자화율의 차이에 의한 왜곡(distortion) 현상 등의 영향으로 영상의 변위가 발생할 수 있다.<sup>1-3</sup>

MR 영상은 스픬 에코(spine echo; SE) 또는 경사자기장 에코(field echo; FE) 방법과 연속 펄스의 반복시간(repetition time;  $T_R$ ) 및 에코시간(echo time;  $T_E$ ), 여기 각도(flip angle) 등을 선택하면 각 조직의 세로 이완시간(longitudinal or spin lattice relaxation time;  $T_1$ )과 가로 이완시간(transverse or spin-spin relaxation time;  $T_2$ ) 및 양성자 밀도(proton density; PD,  $\rho$ ) 등에 의해 신호강도의 차이에 기인해 명암이 형성된다.<sup>4-7</sup> MR 영상은 조직에 대한 분해능이 높기 때문에 정상조직과 병소와의 변별력이 우수하며 영상진단은 거의 조직의 특성에 의해 결정된다.<sup>8,9</sup> 조직 고유의  $T_1$ ,  $T_2$  값은 각 조직 내의 자유수 양에 의해 가장 큰 영향이 있는 것으로 알려져 있다.<sup>10,11</sup>

MR 영상에서 조직의  $T_1$  강조영상(Weighted

image; T<sub>1</sub>WI)에서는 조직의 T<sub>1</sub>이 짧으면 영상에서 밝게 보이고 T<sub>1</sub>이 길수록 더 어둡게 보인다. 그리고 T<sub>2</sub> 강조영상(Weighted image; T<sub>2</sub>WI)에서는 그 반대로 조직의 T<sub>2</sub>가 길면 밝게 보이고 조직의 T<sub>2</sub>가 짧을수록 어둡게 표현하여 회색단계로 나타낸다. 또 같은 조직에서도 펄스 계열에 따라 영상의 흑백이 바뀌게 되고 조직의 해부구조와 영상해석의 기초 자료가 제공됨으로써 조직의 이상 유무 판별과 영상진단이 가능하게 된다.

본 연구에서는 인체의 각 조직에 대한 기본적 성분을 함유하고 있는 표본 펜텀(phantom) 실험과 결과를 인용하여 인체의 두개부(두부) 및 혈관부위를 각각 영상화하였다.<sup>12-14</sup> MR의 영상변수(parameter) 중에서 신호강도에 변화를 주는 반복시간(repetition time; T<sub>R</sub>), 에코시간(echo time; T<sub>E</sub>), 반전시간(inversion time; T<sub>I</sub>) 및 여기 펄스의 각도 즉 플립 각(flip angle;  $\alpha$ ) 등을 변화시켜 촬영하였다. 얻어진 영상자료는 영상 내의 관심부위에 대해 시각적 관찰과 명암의 농도를 측정기로써 농도변화를 객관화 하였다. 각 펄스계열 따라 나타난 영상은 펜텀의 영상자료를 참고하여 인체의 두부영상과 함께 비교하였다. 영상의 임상적 비교와 이론적 배경을 근거하여 실험한 결과를 MRI의 다양한 영상변수와 정밀성이 요구되는 임상검사의 전문적인 교육적 기초 자료에 이용하고자 한다.

## II. 실험

### 1. 실험 장치 및 기구

영상화는 자기장세기가 0.5 테슬라(tesla; T)인

초전도자석 MRI 기기(Max Plus System, GE, America)와 두부전용 코일(head coil)을 사용하였다. 또 두부 혈관촬영에는 1.5T 초전도형 자기공명영상 기기(Magnetom Symphony Maestro Class, Siemens, Germany)와 CP Head array coil을 사용하였다. MR 영상의 흑백농도는 PDA-85(Japan, Konica Co., digital type) 측정기를 이용하였다.

### 2. 임상 실험방법

인체에 대한 임상실험은 펜텀의 영상 데이터와 비교하기 쉬운 두부를 선택하여 영상화 하였다. 임상에서는 MR 영상에 대한 진단의 정확성을 높이기 위한 수단으로써 조직 간의 신호강도 차이를 크게 할 목적으로 상자성 약제인 Gd-DTPA (diethylenetriaminepentaacetic acid) 조영제(contrast medium)를 이용하여 영상의 대조도를 증강시킨다.<sup>15</sup> 임상실험은 같은 목적으로 상용화된 조영제인 Magnevist(Schering Co. Germany)를 사용하여 영상화 하였다. 인체의 두부의 영상화는 교육용 펜텀의 영상화에 이용하였던 펄스계열과 같은 방법으로 Table 1에 의해 실험하였고 조영제 사용 부분의 영상화 조건은 Table 2와 같다.

영상의 농도측정은 인체 두부영상에서 펜텀의 영상과 비교되는 관심부분을 지정하고 육안적인 관찰과 함께 농도측정기로써 측정하였다.

또한 인체 두부는 조직과 공기를 항상 동시에 함유하고 있기 때문에 자화율이 영상에 미치는 영향을 알아보기 위하여 FE법으로써 혈관 영상을 보기위한 3D TOF(Time of flite)방식을 이용하여 부비강 주위를 촬영하였다.

Table 1. Pulse sequences and shift factors(0.5T MRI system).

MR Imaging	Flip Angle ( $\alpha$ )	T <sub>R</sub> (msec)	T <sub>I</sub> (msec)	T <sub>E</sub> (msec)	Weighted Image	Image of Figure
SE	-	500	-	25	T <sub>1</sub>	A
	-	2000	-	20	PD	B
	-	2000	-	70	T <sub>2</sub>	C
FE	90°	300	-	14	T <sub>1</sub>	D
	30°	300	-	20	T <sub>2</sub>	E
IR	-	1500	400	25	T <sub>1</sub>	F

Table 2. Shift factors of spin echo method for a human head containing tumor

$T_R$ (msec)	$T_E$ (msec)	Weighted Image	Gd-DTPA	Image of Figure 6
600	20	$T_1$	NO	A
2300	40	PD	NO	B
2300	120	$T_2$	NO	C
600	20	$T_1$	YES	D

### III. 결과 및 고찰

다음은 Table 1에 나타낸 펠스계열과 촬영법에 따라 영상화한 것으로서 영상의 비교검토에 필요한 주요 부분에 대해서 펜톰의 영상 데이터를 참고하여 함께 고찰한 것이다.

공기와 물은 국소자기장 불균일과 자화율 차이에 의한 왜곡현상으로서 두 물질 사이에는 자화율 변화가 보고된 바 있으며 인체에서 공기가 항상 존재하는 부위로서는 두부 주위의 부비강이 있다.<sup>2,16</sup> 펜톰의 실험결과에서 나타난 바와 같이 물과 공기부분이 접한 원주형 비커 모양이 삼각형에 가까운 왜곡된 영상으로 나타나서  $T_1$ WI에 비해 SE법과 FE법 공히  $T_2$ WI에서 뚜렷한 왜곡현상을 나타냈다.<sup>14</sup>

뼈의 피질부와 공기는 신호가 없는 것이기 때문에  $T_1$  및  $T_2$ WI 모두 어둡게 나타났으며 이러한 것으로는 혈류, 뇌척수액, 흐름 등과 같은 유체와 철 등이 해당된다.<sup>17,18</sup>

인체의 MRI는 조직에 대한 대조도 분해능이 높기 때문에 백질과 회백질의 구별이나 정상 뇌조직과 병소와의 식별 등 뇌 내의 해부학적 표출에 우수하다는 것이 보고 되어있다.<sup>19</sup>

Fig. 1의 1~3(A~F)은 Table 1에 따라 촬영된 인체 두부영상이다. 여기서 백질, 회백질, 뇌척수액, 지방에 대해 설명한 다음 펜톰 영상 데이터와 함께 비교하고자 한다.

여기서 A는 SE법으로 촬영한  $T_1$ WI이다. 백질과 회백질에 대해서  $T_1$ WI에서는 백질이 회백질보다 높은 신호강도를 나타내어 밝게 보인다. 순수액체에 가까운 뇌척수액은  $T_1$ 이 상당히 길기 때문에 가장 검은 영상으로 나타났다.

인체조직 중에 양성자는 지방 보다 물에서 훨씬 많기 때문에 두 조직의 공명진동수의 차이가

커서 물과 지방이 어긋난 영상(chemical shift artifact)으로 나타나게 되고 물과 지방의 양성자 공명진동수는 약 3~4ppm 차이가 있다.<sup>20</sup>

MR 영상에서 지방조직은 수소원자핵의 영향이 강조된 단일의  $T_1$ 값을 가진 것이라고 가정할 수 있다. 따라서  $T_1$ 이 짧은 지방은 신호가 강하여 가장 밝게 나타났다.

B는 PDWI으로서 거칠게 보여도 백질과 회백질의 구분이 선명하다. 뇌척수액은 백질보다 검게 나타났고 지방은 회백질과 비슷한 밝기로 나타났으나 A의  $T_1$ WI보다 신호강도가 감소되어 검게 나타났다.

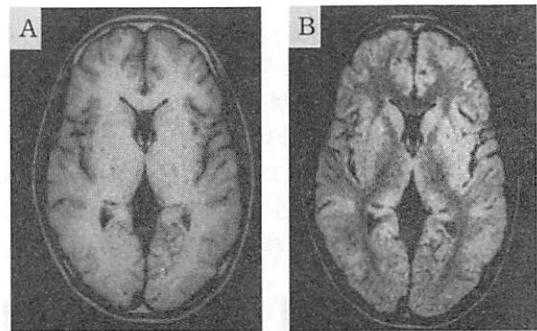


Fig. 1-1.  $T_1$  Weighted (A) and PD (B) Weighted images by SE method;

A:  $T_R = 500$ ,  $T_E = 25$ , B:  $T_R = 2000$ ,  $T_E = 20$ .

C는  $T_2$ WI로서 백질 보다 회백질이 상대적으로 물의 함량이 많으므로 회백질 측에서 신호가 강하게 되어 희고 지방은 검게 나타났으나 펜톰에서와 같은 화학적 이동 현상을 발견하기 어려웠다. 이것은 인체의 해부적 구조가 두개부의 뼈와 외부의 공기로 존재하기 때문으로 생각한다.

D와 E는 SE법에 근사한 영상을 얻기 위해 FE법으로 촬영하여 얻어진 영상이다. D는

$T_1$ WI으로서 백질은 회백질보다 신호강도가 강하여 희게 나타났고 뇌척수액은 가장 검게 나타났다. 지방은  $T_1$ 이 짧기 때문에 희게 나타났다.

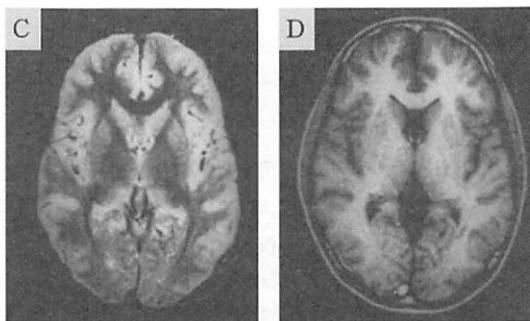


Fig. 1-2.  $T_2$  Weighted image(C) by SE method and  $T_1$  Weighted image(D) by FE method; C:  $T_R = 2000$ ,  $T_E = 70$ , D:  $\alpha = 90^\circ$ ,  $T_R = 300$ ,  $T_E = 14$ .

E는  $T_2$ WI으로 백질이 회백질보다 저 신호강도로 검게 나타났다. 뇌척수액은 가장 희게 나타났으며 지방은 가장 검게 나타났으나 화학적 이동은 구별할 수 없다.

F는 조직의  $T_1$ 을 정확히 측정하여 얻을 수 있는 IR법에 의해 촬영된  $T_1$ WI이며 조직의 구조를 잘 나타낼 수 있는 촬영법이다. 백질은 신호강도가 강하여 희게 나타났고 회백질은 상당히 검게 나타났다. 뇌척수액은  $T_1$ 이 길기 때문에 신호가 약하여 역시 검게 나타났다. 지방은  $T_1$ 이 짧기 때문에 신호 강도가 강하여 가장 희게 나타났다.

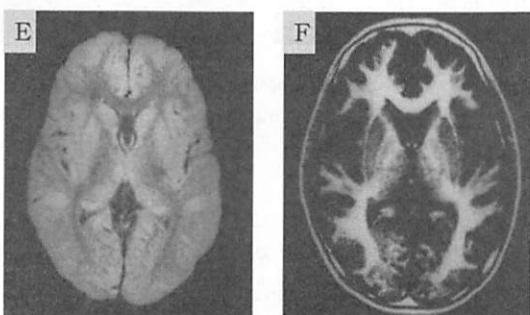


Fig. 1-3.  $T_2$  Weighted image(E) by FE method and  $T_1$  Weighted image(F) by IR method; E:  $\alpha = 30^\circ$ ,  $T_R = 300$ ,  $T_E = 20$ , F:  $T_R = 1500$ ,  $T_I = 400$ ,  $T_E = 25$ .

이상의 영상을 각 연속펄스 별로 비교해 보면 백질은  $T_1$ WI에서  $T_2$ WI보다 밝게 나타났고 회백질은  $T_2$ 가 백질 보다 길기 때문에 신호강도가 강하여  $T_2$ WI에서 더 밝게 나타났다. 이 두 부분은 SE법의  $T_1$ WI보다  $T_2$ WI에서 더 잘 구별되었다. 뇌척수액은  $T_1$ WI에서는  $T_1$ 이 길기 때문에 신호강도가 낮아서 검게 나타났으며  $T_2$ 가 긴 만큼 신호강도가 강하여  $T_2$ WI에서는 희게 나타났다. 지방조직은  $T_1$ 이 짧기 때문에 신호강도가 강하여  $T_1$ WI에서는 희게  $T_2$ WI에서는  $T_2$ 가 짧기 때문에 신호강도가 낮아서 검게 나타났다. 그러나 인체의 두개부에서는 SE법 및 FE법의  $T_2$ WI에서 모두 펜톰의 실험에서와 같이 분명한 화학적 이동 현상에 의한 영상을 발견하기 어려웠다.

Table 3은 같은 조건에 의해 얻어진 펜톰 영상 데이터와 Fig. 1(A-F)의 영상농도를 측정한 값과 비교하여 비슷한 대조도를 보이는 부분을 함께 나타내었고 편의상 인체를 위주로 하여 백질, 회백질, 뇌척수액, 지방 조직의 순으로 나열하였다.<sup>14</sup> 백질은 생두부, 회백질은 삶은 계란(흰자 부위), 뇌척수액은 수돗물, 지방은 식용유와 각각 비교했을 때 비슷한 농도를 유지하여 영상에서 좋은 대조를 형성하고 있다.

Fig. 2(A~D)의 영상은 Table 2의 SE법에 의하여 얻어진 영상이고 펜톰의 조영제 부분과 종양 소견을 가진 환자의 두부를 촬영한 영상으로써 비교하고자 한다.

A는 조영제를 사용하기 전에 촬영한  $T_1$ WI이다. 이 영상은 Fig. 1의 영상 A에 비하여  $T_R$ 이 길고  $T_E$ 가 짧은 조건에서 촬영되었다. 그러므로 같은  $T_1$ WI도  $T_R$ 을 길게 함으로써  $T_1$ 에 의한 대조도가 낮기 때문에 백질과 회백질의 구별은 어렵다고 볼 수 있으며 이 영상의 농도를 Table 4에 나타냈다. A의  $T_1$ WI에서 정상의 백질 및 회백질 부위와 종양부위는 신호강도의 차이가 거의 나타나지 않는다. 이것은 Table 1에서의 SE 법 보다  $T_R$ 이 길어짐에 따라 조직 간의 신호 강도차이가 낮아졌기 때문에 생각된다. 그러나 뇌종양 주변에는 혈관성 부종을 동반하는 것이 많으며 부종 부위는 수분함량이 많기 때문에  $T_1$ WI에서는 신호가 낮아서 약간 검게 나타나고 있다.<sup>21</sup>  $T_2$ WI에서는 종양과 부종부위가 함께 강

Table 3. Comparison of the density values of the image for the phantom and Fig. 1

Pulse sequence components	SE		FE		IR(F)	
	T <sub>1</sub> (A)	PD(B)	T <sub>2</sub> (C)	T <sub>1</sub> (D)		
White matter	0.64	1.12	1.82	0.39	1.64	0.66
Bean curd*	0.83	1.26	2.43	0.52	1.50	0.31
Gray matter	0.84	0.68	0.90	1.11	1.38	2.45
Boiled egg*	1.34	0.87	2.01	1.22	1.32	1.77
Cerebral spinal fluid	1.93	2.25	0.86	2.43	0.77	1.91
Tap water*	1.90	1.22	0.86	2.23	0.49	2.26
Fat	0.25	1.45	2.10	0.43	2.58	0.21
Edible oil*	0.36	0.84	2.12	0.64	1.75	0.18

(\*는 인체 두부영상과 비교하기 위해 펜톰 영상 데이터로부터 인용한 것임)<sup>14</sup>

한 신호를 나타내기 때문에 두 부분의 경계를 구별할 수 없었다.

B와 C의 PD 및 T<sub>2</sub>WI에서는 조영제를 사용하지 않고서도 병소부위를 쉽게 발견할 수 있으나 정확한 범위는 구별할 수 없다.

D는 Gd-DTPA를 사용하여 촬영한 SE의 T<sub>1</sub>WI이다. 이것은 SE법의 T<sub>1</sub>WI과 종양의 Gd-DTPA에 의한 조영효과의 평가 방법으로써 이완속도는 Gd-DTPA의 농도에 비례하는 것으로 발표되었다.<sup>22</sup> Gd-DTPA는 조직의 T<sub>1</sub> 및 T<sub>2</sub>를 단축하는 성질이 있지만 T<sub>1</sub>WI에서 신호가 더 강하게 나타남을 알 수 있다. 또한 이완시간이 긴 조직이 조영제 사용 후 이완시간의 단축 효과가 크다는 것을 알 수 있다.

Table 3의 백질과 생두부, 회백질과 삶은 계

란, 뇌척수액과 수돗물 그리고 지방과 식용유의 비교에서 서로 비슷하게 나타나 있다. 그리고 조영제는 정상조직과 병소조직의 구별을 용이하게 한다.

Table 4의 T<sub>1</sub>\*<sup>\*</sup>, T<sub>2</sub>\*\* 부분은 Fig. 2 영상의 농도를 측정하여 나타낸 것이며 이 중에 T<sub>1</sub>WI의 조영제 사용 전 (T<sub>1</sub>\*<sup>\*</sup>) 및 사용 후(T<sub>2</sub>\*\*<sup>\*</sup>)의 영상을 펜톰의 종류수 및 Gd-DTPA 수용액 (100:1)부분과 비교해 보면 유사하다.<sup>14</sup>

Table 3의 SE법에서 생두부, 삶은 계란 및 생계란은 Table 4의 백질, 회백질 및 부종과의 비교에서 잘 일치하고 있다. 각 영상의 비교에 의하면 MRI의 신호강도 차이에 의한 것만으로써 물질의 종류를 구별하는 것은 어려우나 SE법 또는 FE법의 T<sub>2</sub>WI에 의해 정량적으로 구별할 수

Table 4. Comparison of the density values for T<sub>1</sub> before and after the injection of Gd-DTPA in the patient, PDWI and T<sub>2</sub>WI.

components	T <sub>1</sub> * <sup>*</sup>	T <sub>2</sub> ** <sup>*</sup>	PD	T <sub>2</sub>
White matter in normal tissue	0.86	0.91	1.84	1.75
White matter in tumor portion	0.87	0.25	0.92	0.77
Gray matter in normal tissue	0.92	0.92	1.42	1.33
Gray matter in tumor portion	0.93	0.25	0.92	0.77
Margin	1.02	-	-	-
Edema	0.89	0.92	0.48	0.18

있는 것을 알 수 있다. 따라서 Fig. 2에서 종양과 부종 등과 같이 조직의 종류에 대한 구별은 역시 어려울 것으로 예상된다.

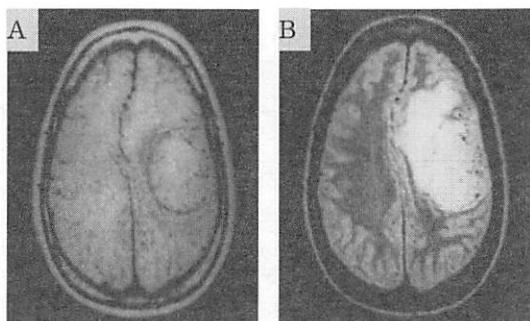


Fig. 2-1. T<sub>1</sub> Weighted(A) and PD(B) Weighted images by SE method before the injection of Gd-DTPA; A: T<sub>R</sub>= 600, T<sub>E</sub>= 20, B: T<sub>R</sub>= 2300, T<sub>E</sub>= 40.

이상과 같이 빠는 각 연속펄스와 T<sub>1</sub> 및 T<sub>2</sub>WI에 관계없이 모두 MRI의 신호강도가 낮아서 쉽게 보였으며 Table 3으로서 T<sub>1</sub>WI와 T<sub>2</sub>WI에서의 차이를 비교할 수 있다. IR법을 이용한 영상은 측정시간이 길뿐만 아니라 영상에 잡음이 많아서 S/N은 나쁘지만 Fig. 1-3에서 뇌의 백질, 회백질 등의 비교에서와 같이 조직의 신호강도를 강조할 수 있는 장점이 있다.

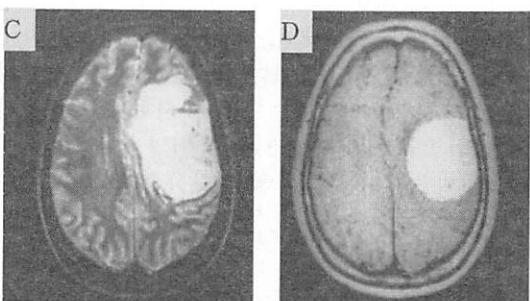


Fig. 2-2. T<sub>2</sub> Weighted image(C) before the injection of Gd-DTPA and T<sub>1</sub> Weighted image(D) after the injection of Gd-DTPA by SE method; C: T<sub>R</sub>= 2300, T<sub>E</sub>= 120, D: T<sub>R</sub>= 600, T<sub>E</sub>= 20

Fig. 3의 A, B는 혈관을 보기위해 FE 방법으

로 촬영한 3D TOF(Time of flite) 영상이다. 이 영상에서 네모 표시 내의 화살표 부분은 환자의 오른쪽 혈관에 해당한다. 이 부분은 부비강 내에 공기가 존재하므로 조직간 자화율의 변화에 의해 왜곡된 현상으로 볼 수 있다. 이것은 SE 방법과 FE 방법으로 써 펜톰을 촬영한 SE T<sub>2</sub>WI와 FE T<sub>2</sub>WI에서 특히 뚜렷하게 나타나 있다. 또한 같은 T<sub>1</sub>WI이라 하더라도 경사자기장을 이용한 영상(FE T<sub>1</sub>WI)이 SE방법을 이용한 영상(SE T<sub>1</sub>WI)에 비해 왜곡의 영향이 분명히 더 크게 나타나는 것은 매우 흥미 있고 좋은 자료로 이용될 수 있을 것이다.

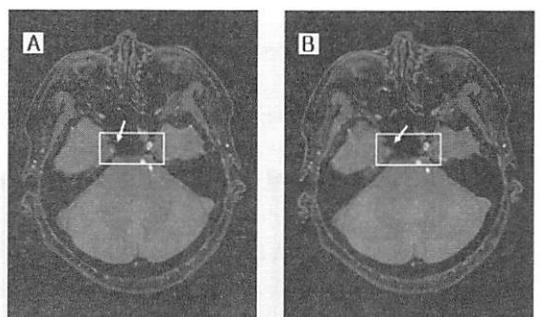


Fig. 3. Right normal vessels which were in the square turned out to be distorted by magnetic susceptibility(White arrow).

#### IV. 결 론

인체에 대한 MR 검사의 기초적 임상연구를 위한 영상화는 임상 MRI의 기본적 검사 및 방법을 이해하는데 유용한 영상을 제시하였다. 여러 가지의 펄스계열 중에 기본이 되는 SE와 FE 및 IR법은 교육용 펜톰을 이용한 기초실험과의 비교 고찰에서 이론에 부합되고 임상교육의 기초 자료로 이용하기에 매우 의미 있는 것으로 나타났다.

SE법, FE법 및 IR법의 T<sub>1</sub> WI를 서로 비교해 보면 인체 두개부의 백질, 회백질, 뇌척수액, 지방조직에 해당하는 영상부분은 펜톰 영상 중에서 생두부, 삶은 계란, 수돗물, 식용유와 유사하게 나타나서 이론과 일치하고 있다. 조영제와 비

교되는 설록차는 망간, 칼륨 등의 상자성효과를 일으키는 금속 성분이 포함되어 있기 때문에 신호증강 효과가 크다고 생각한다. 임상에서 MRI 검사용 조영제로 사용되는 Gd-DTPA는 조직의 T<sub>1</sub>에 대한 단축효과를 잘 나타내어 의미 있는 자료로 활용할 수 있을 것이다. 펜톰의 영상에서 물과 지방의 화학적 이동에 의해 변화되게 나타난 영상의 결점(chemical shift artifact) 부분은 이론과 정확히 일치됨을 보여주었고, 공기와 물의 관계에서는 국소자기장의 불균일과 자화율의 차이에 의해 영상의 왜곡현상이 잘 나타나 있어서 인체의 영상과 좋은 비교자료로 활용될 수 있을 것이다.

인체를 촬영한 영상과 펜톰 내 물질의 특성과 각 연속 펄스계열에 따른 결과를 고찰해 봄으로서 임상 MRI 검사에 적용할 수 있고, 영상의 흑백농도를 수치화한 자료로 제시함으로써 보다 객관성 있는 MRI의 기초적 임상교육을 위한 자료로 이용가치가 높다고 할 수 있다. 또한 구하기 쉽고 값이싼 재료를 이용하여 MRI의 기초적 임상교육용 펜톰을 개발할 수 있다고 생각한다. 음용수로 이용되는 설록차는 망간의 조영증강효과에 의해 소화기 계통의 영상에서 대조도의 증강효과가 있을 것으로 기대한다.

본 연구에서 매우 흥미 있고 관심 있게 주시해야 할 부분은 기초적 교육용 펜톰의 영상 데이터와 인체의 두부 혈관영상에 대한 임상실험의 비교 고찰에서 일치하고 있는 결과 중의 한 가지인 물과 공기, 조직과 공기에 대한 상호간 데이터 해석의 차이는 정확한 진단을 위해 매우 주의해야 할 요소로 작용할 수 있을 것이다. 경우에 따라서 부비강 주변에 있는 혈관은 조직의 특성과 해부학적 구조에 의해 자화율의 차이에 의한 영상의 왜곡현상으로 혈관이 병적으로 좁아진 것처럼 나타날 수도 있어서 오진의 원인이 될 수 있기 때문에 주의가 요구되며 앞으로 이들에 대하여 차후 더 연구 되어야 할 것으로 생각한다.

### 참고문헌

1. Schick, R. M.; Wismer, G. L.; David, K. R. *Magnetic susceptibility effects secondary to out-of-plane air in fast MR scanning, AJNR*, 1988, 9, 439.
2. Katoh, T.; Yamanouchi, Y.; Sawada, S.; Kurokawa, H.; Kitada, N.; Miyaoka, Y.; Tanaka, Y.; et al.; *Evaluation of Cranial MR Images with Field Echo Sequence, JJMR*, 1990 10(4), 220.
3. Konishi, H. *MRI of subacute intracranial hematomas: the difference between spin-echo and gradient-echo images, JJMR*, 1990, 10(5), 357.
4. Hashimoto, Y.; Fujita, A.; Kiri, M.; Shimizu, K. *Magnetic Resonance Imaging Technology II*, 1985, 42, 9.
5. Winkler, M. L.; Ortendahl, D. A.; Mills, T. C.; et al.; *Characteristic of partial flip angle and gradient reversal MR imaging, Radiology*, 1988, 166, 17.
6. Ishii, M.; Sukegawa, K.; Saito, M. *Image contrast and clinical application of gradient echo sequence at 0.2T, JJMR*, 1990, 176.
7. 眞野 勇, 図説 MRI; 秀潤社: 1989; 12.
8. Damadian, R. *Tumor detection by nuclear magnetic resonance*, 1971, 171, 1151.
9. Robert R. Edelman; John R. Hesselink, Clinical Magnetic Resonance Imaging; W. B. Saunders Company: 1990; 12.
10. Robert R. Edelman; John R. Hesselink, Clinical Magnetic Resonance Imaging; W. B. Saunders Company: 1990; 9.
11. 永井輝夫, MRI 診斷學(基礎と臨床); 朝倉書店: 1989; 139.
12. 永井輝夫, MRI 診斷學(基礎と臨床); 朝倉書店: 1989; 116.
13. Robert R. Edelman; John R. Hesselink, Clinical Magnetic Resonance Imaging; W. B. Saunders Company: 1990; 110.
14. 조무성 배재영, 홍대일, 자기 공명 영상(MR Imaging)을 이용한 교육용 Phantom 제작 및 해석, 계명대학교 자연과학연구소, 2007,

- 25(2), 69.
15. Anzai, Y.; Minoshima, S.; Itami, J.; Uno, K.; Arimizu, K.; Kaneko, T.; Morita, F.; Uematsu, S. Usefulness of Gd-DTPA in MR imaging of Head and Neck tumor, *JJMR*, 1990, 10, 28.
  16. Yamada, N.; Nishimura, Y.; Sakuma, T.; Yamada, Y.; Imakida, S.; Naito, H.; Nishimura, T.; Takamiya, M. Assessment of the susceptibility effect with use of the phase images of gradient echo, *JJMR*, 1989, 9(2), 127.
  17. Satoh, K.; Kuhara, S. Basic Aspect for Measuring Blood Flow by MRI, *JJMR*, 1987, 7(3), 24.
  18. Robert R. Edelman; John R. Hesselink, Clinical Magnetic Resonance Imaging; W. B. Saunders Company: 1990; 74.
  19. Ikehira, H. 先進進報, 1986, 30(3), 404.
  20. Yamamoto, D. *Chemical shift Imaging, NMR 醫學*, 1987, 6(4), 221.
  21. Hashimoto, Y.; Fujita, A.; Kiri, M. 島津評價, 1985, 42(1), 9.
  22. Runge, V. M. Magnetic resonance image, Partain, C. L, Price, R. R.; Patton, J. A., et al. Eds; W. B. Saunders Company: Tokyo, 1988; 810.

## 2,5-Diaminobenzamide계열의 화합물 합성과 항암효과 평가

이세희 · 백철수 · 이진호\*

계명대학교 자연과학대학 화학과

## Synthesis and Evaluation of Anti-cancer Effects of 2,5-Diaminobenzamide Derivatives

Sei Hee Lee, Chul Soo Paik, Jinho Lee\*

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

**요약.** 항암제 효과를 보이는 새로운 모핵구조를 발굴하기 위하여 2,5-diaminobenzamide계열의 화합물을 합성하였다. 2,5-Diaminobenzamide 유도체들은 2-fluoro-5-nitrobenzoic acid로부터 4단계에 걸쳐 합성되었다. 합성된 화합물의 암세포 성장 억제능을 두경부암, 폐암, 간암, 신장암, 위암 세포주를 사용하여 평가한 결과 간암과 두경부암의 성장을 효과적으로 저해하는 것으로 나타났다.

**Abstract.** 2,5-Diaminobenzamide derivatives were synthesized in order to find new scaffold having anti-proliferative effect. 2,5-Diaminobenzamide derivatives were obtained in 4 steps from 2-fluoro-5-nitrobenzoic acid. The cell growth inhibitory activities of compounds were evaluated using A549, SNU484, HepG2, Caki, AMC-HN4 cell lines. The result showed that 2,5-diaminobenzamides inhibit the growth of Caki and AMC-HN4 cell lines.

### I. 서 론

암은 역사적으로 인류의 주된 사망원인이었으며, 산업과 기술의 발전에 따라 발생되는 암의 양상이 변화되어 왔다. 특히 수명연장과 생활형태의 변화가 발생되는 암의 종류와 발병률에 가장 많은 영향을 미쳤다. 즉 이번 세기에 들어서 일부 암들의 발병률은 현저하게 줄어들든 반면, 사회의 노령화에 따라 다른 암들의 발병은 늘어나고 있다. 연령이 증가 될수록 암의 발생률은 높아지며, 수명이 길어짐에 따라 개개인이 암에 걸릴 가능성도 증가된다.<sup>1</sup>

매년 1,000만 명의 새로운 환자가 발생하는 암은 세계적으로 가장 파괴적인 질병이다. 암은 파괴적인 질병이지만 많은 정도 예방이 가능한 질병이다. 암으로 인하여 초래되는 고통과 부담은 기초 연구와 치료 방법의 개선으로 줄일 수 있다. 그동안의 많은 연구 결과 암 전체의 약 1/3

정도를 예방할 수 있게 되었다. 즉 금연, 건강식 품 섭취, 발암 물질과의 접촉 차단 등을 통하여 상당수의 암 발생은 예방될 수 있다. 또한 암의 1/3정도는 수술, 방사선 치료, 항암요법 등의 효과적인 치료법을 통하여 치료될 수 있다. 따라서 기초 연구를 통한 암 발생 원인의 규명과 더불어 암을 효과적으로 치료할 수 있는 치료법의 발굴은 암의 예방과 치료 가능성을 높이게 된다.

항암제는 세포독성제, 호르몬제, 그리고 혁신적 신약 등이 사용되고 있으나 최근 항암제 개발 동향은 대부분 표적 지향적인 혁신적 신약에 많은 비중이 놓여있다.<sup>2,3,4</sup> 실제로 최근 몇 년 사이에 개발된 혁신적 신약으로는 Gleevec, Iressa, Avastin, Tarceva, Sutent, Velcade, Erbitux, Herceptin 등이 있으며 이들의 사용으로 인하여 환자가 30~80% 정도 생명연장이 되고 환자의 65%가 입원하지 않고 외래진료로 항암치료를 하고 있다. 혁신적 신약들은 암 환자를 적은 부작

용으로 효과적으로 치료하기 때문에 항암제 시장 점유율이 급속히 증가되고 있다.

혁신적 신약들의 반 정도는 합성을 통해 얻어진 합성신약이다. 합성 신약의 발굴을 위해서는 10년 이상의 연구기간이 소요된다.<sup>4</sup> 즉 표적 발굴에서부터 시작하여 초기 선도물질 발굴, 최적화, 개발후보 발굴, 전임상, 임상 1, 2, 3 상 및 식약청 심사 등의 매우 복잡하고 어려운 과정을 거치게 된다. 이 과정을 거쳐 신약으로 되는 확률은 약 0.01% 정도이다. 이렇게 낮은 성공확률은 화합물의 약효의 부족과 독성에 기인한다고 알려져 있다. 따라서 신약 발굴을 위해서는 생물학적인 평가와 최적의 임상실험도 중요하지만, 약으로 개발될 수 있는 특성 즉 낮은 독성과 높은 약효를 가진 화합물의 발굴이 필수적이다. 또한 약이 되기 위한 약효를 포함한 다양한 특성을 보이는 화합물은 특허로 보호될 수 있는 고유한 구조를 가지고 있어야 한다. 따라서 우수한 항암효과를 보이는 고유한 구조의 화합물을 확보하고 개발하는 것이 신약개발의 중요한 위치를 차지하고 있다.

1990년대에 들어 생리활성 저분자의 발굴은 천연물 추출물이나 조합화학(combinatorial chemistry)를 통해 얻어진 chemical library를 이용하여 특정 분자 표적(molecular target)에 대한 고효율 스크리닝(high throughput screening, HTS)으로 얻어진 hit를 최적화 시키는 과정을 거쳐 얻어지고 있다. 초창기 HTS는 정제된 target 단백질의 활성을 측정하는 cell-free assay가 주를 이루었으나, 최근에는 세포의 기능 변화 혹은 형질 변화를 분석하여 신약 후보 물질을 찾아내는 방법(cell/phenotype-based screening; 세포/형질 기반 스크리닝)의 비중이 점차 증가되고 있다. 세포기반 스크리닝은 별도의 단백질 정제 과정이 필요 없고, 생리 조건과 유사한 환경을 이용한 기능 검색이 가능하며, 세포 독성이나 세포 투과성의 문제 등을 배제할 수 있는 등의 장점을 갖고 있다. 또한 세포기반 스크리닝은 암과 같이 여러 가지 유전자의 변이가 일어난 질병의 치료에 좀 더 효과적일 것으로 추정되고 있는 다양한 표적에 작용하는 약물의 개발에 효과적이다.<sup>5</sup>

본 연구에서는 항암제로 사용될 수 있는 새로운 구조의 발굴을 위하여 2,5-diaminobenzamide 유도체를 합성하고 항암효과를 세포기반 평가법을 이용하여 조사하였다.

## 2. 실험

### 2-1. 시약 및 기기

시약은 Aldrich, Acros, Junsei, 그리고 삼천화학 등의 제품을 그대로 사용하거나 필요한 경우 정제하여 사용하였다. <sup>1</sup>H-NMR 및 <sup>13</sup>C-NMR 스펙트럼은 Bruker AVANCE 400 분광계를 사용하여 얻었다. 피크는 d(doublet), t(triplet), q(quartet), m(multiplet), dt(doublet of triplet) 등으로 표시하였고, 용매로는 CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD 또는 DMSO-d<sub>6</sub>를 사용하였으며 표준물질로는 TMS를 사용하였다. 화합물의 순도는 Knauer HPLC를 사용하여 조사하였다. 화합물의 세포 성장 억제 효능은 Welgene 사의 WelCount™ cell viability assay kit를 구입하여 사용하였다.

### 2-2. 합성 방법

#### 2-(4-Methyl-piperidin-1-yl)-5-nitro-benzoic acid (1a)

2-fluoro-5-nitrobenzoic acid 1g(5.4mmol)을 70ml의 acetonitrile에 녹인 후, 4-methylpiperidine 0.956ml(8.1mmol)을 가하고 12시간 동안 환류시키며 끓여주었다. 용매를 감압증류로 제거한 다음 ethyl acetate를 가하고 5% citric acid 용액으로 씻어주었다. MgSO<sub>4</sub>로 물을 제거한 다음 감압여과하고 ethyl acetate를 감압증류로 제거하여 표제 화합물 1.297g의 90% 수율로 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub>+CD<sub>3</sub>OD 400Hz) : δ 9.07(1H, d, J=2.39), 8.43(1H, dd J=8.82, 2.76), 7.65(1H, d, J=8.83), 3.20(2H, d, J=11.73), 3.03(2H, td, J=11.91, 2.14), 1.96(2H, dd, J=13.38, 1.68), 1.61(1H, m), 1.57(2H, qd, J=11.83, 3.86), 1.08(3H, d, J=6.47)

#### 2-(3,4-Dihydro-1*H*-isoquinolin-2-yl)-5-nitro-benzoic acid (1d)

1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline 0.75ml(5.96mmol)을 1a의 합성법과 같은 방법으로 실험하여 표제

화합물을 정량적으로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3 + \text{CD}_3\text{OD}$  400Hz) :  $\delta$  8.91(1H, d,  $J=2.78$ ), 8.33(1H, dd,  $J=9.07$ , 2.80), 7.34(1H, d,  $J=9.08$ ), 7.23~7.18(3H, m), 7.09(1H, d,  $J=5.93$ ), 4.36(2H, s), 3.54(2H, t,  $J=5.83$ ), 3.10(2H, t,  $J=5.79$ )

**N-Cyclopropyl-2-(4-methyl-piperidin-1-yl)-5-nitro-benzamide (2a)**

**1a** 0.15g(0.56mmol)을 30ml DMF에 녹인 후 cyclopropylamine 0.039ml (0.56mmol), EDC 0.108g (0.56mmol), HOBT 0.153g(1.13mmol)을 넣고 12시간 동안 교반하였다. 용매를 감압증류로 제거한 다음 ethyl acetate를 가하고 물,  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , 5% citric acid 용액으로 각각 3번씩 씻어주었다.  $\text{MgSO}_4$ 로 물을 제거한 다음 ethyl acetate를 감압증류로 제거하고 hexane:ethyl acetate(2:1)을 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물 0.094g의 54%의 수율로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  400Hz) :  $\delta$  8.69(1H, d,  $J=3.04$ ), 8.63(1H, s), 8.14(1H, dd,  $J=8.92$ , 2.83), 7.15(1H, d,  $J=8.96$ ), 3.32(2H, d), 2.26(1H, m), 2.82(2H, td,  $J=12.05$ , 2.05), 1.86(2H, d,  $J=11.42$ ), 1.62(1H, m), 1.32(2H, qd,  $J=12.01$ , 3.08), 1.04(3H, d,  $J=6.52$ ), 0.90(2H, q,  $J=5.62$ ), 0.64(2H, q,  $J=4.18$ )

**N-(3-Dimethylamino-propyl)-2-(4-methyl-piperidin-1-yl)-5-nitro-benzamide (2b)**

**1a** 0.10g(0.37mmol)을 10ml DMF에 녹인 후 3-dimethylaminopropylamine 0.047ml(0.37mmol), EDC 0.073mg(0.38mmol), HOBT 0.082mg(0.61mmol)을 넣고 12시간 동안 교반하였다. 용매를 감압증류로 제거한 다음 ethyl acetate를 가하고 포화용액으로  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ 로 세 번 씻어주었다.  $\text{MgSO}_4$ 로 물을 제거한 다음 ethyl acetate를 감압증류로 제거하고 MeOH:DCM(5:95)을 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물 0.098g을 74%의 수율로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR( $\text{CDCl}_3$  400Hz) :  $\delta$  8.69(1H, d,  $J=2.8$ ), 8.61(1H, s), 8.18(1H, dd,  $J=6.15$ , 2.81), 7.14(1H, d,  $J=8.99$ ), 3.56(2H, q,  $J=6.73$ ), 3.38(2H, d,  $J=12.2$ ), 2.88(2H, dt,  $J=10.3$ , 1.67), 2.42(2H, t,  $J=6.92$ ), 1.85(4H, m), 1.61(1H, m), 1.40(2H, m), 1.03(3H, d,  $J=6.5$ )

**N-(2-Diethylamino-ethyl)-2-(4-methyl-piperidin-1-yl)-5-nitro-benzamide (2c)**

**1a** 0.20g(0.76mmol)과 N,N-diethylethylenediamine 0.11ml(0.78mmol)을 사용하여 **2b**의 합성법과 같은 방법으로 실험하여, MeOH:DCM(7:93)을 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물 0.12g을 43%의 수율로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  400Hz) :  $\delta$  8.73(1H, d,  $J=2.4$ ), 8.42(1H, s), 8.18(1H, dd,  $J=9.2$ , 2.8), 7.15(1H, d,  $J=9.2$ ), 3.57(2H, q,  $J=6$ ), 3.36(2H, d,  $J=12.4$ ), 2.84(2H, t,  $J=10.4$ ), 2.68(2H, t,  $J=6.4$ ), 2.62(4H, q,  $J=7.2$ ), 1.81(2H, d,  $J=11.6$ ), 1.60~1.55(1H, m), 1.40(2H, td,  $J=12.2$ , 3.6), 1.03(9H, t,  $J=7.6$ )

**2-(3,4-Dihydro-1*H*-isoquinolin-2-yl)-*N*-(3-dimethylamino-propyl)-5-nitro-benzamide (2d)**

**1d** 0.14g(0.47mmol)과 3-dimethylaminopropylamine 0.17ml(1.35mmol)을 사용하여 **2b**의 합성법과 같은 방법으로 실험하여, MeOH:DCM(7:93)을 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물 0.12g을 68%의 수율로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  400Hz) :  $\delta$  8.56(1H, d,  $J=2.79$ ), 8.54(1H, t), 8.14(1H, dd,  $J=9.04$ , 2.79), 7.21~7.18(3H, m), 7.13~7.09(2H, m), 4.34(2H, s), 3.53(2H, t,  $J=5.79$ ), 3.47(2H, q,  $J=5.60$ ), 3.03(2H, t,  $J=5.63$ ), 2.29(2H, t,  $J=6.68$ ), 2.10(6H, s), 1.63(2H, p,  $J=6.68$ )

**2-(3,4-Dihydro-1*H*-isoquinolin-2-yl)-*N*-(3-methoxy-propyl)-5-nitro-benzamide (2e)**

**1d** 0.14g(0.47mmol)과 2-methoxypropylamine 0.14ml(1.33mmol)을 사용하여 **2a**의 합성법과 같은 방법으로 실험하여, hexane:ethyl acetate(2:1)을 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물 0.11g을 63%의 수율로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  400Hz) :  $\delta$  8.64(1H, d,  $J=2.78$ ), 8.17(1H, dd,  $J=8.95$ , 2.80), 8.08(1H, t,  $J=5.16$ ), 7.23~7.17(3H, m), 7.14(1H, d,  $J=9.04$ ), 7.10(1H, d,  $J=6.07$ ), 4.34(2H, s), 3.54~3.49(4H, m), 3.36(2H, t,  $J=5.77$ ), 3.17(3H, s), 3.02(2H, t,  $J=5.73$ ), 1.71(2H, p,  $J=6.22$ )

**5-Amino-N-cyclopropyl-2-(4-methyl-piperidin-1-yl)-benzamide (3a)**

2a 0.093g(0.30mmol)을 30ml methanol에 녹인 후 Pd/C 촉매를 넣고 수소공기 하에서 1시간 동안 교반하여 주었다. 셀라이트를 이용한 감압여과로 고체를 제거하고 용매를 감압증류로 제거하여 표제 화합물 0.083g을 99%의 수율로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  400Hz) :  $\delta$  10.9(1H, s), 7.58(1H, d,  $J=2.92$ ), 7.03(1H, d,  $J=8.28$ ), 6.71(1H, dd,  $J=8.43$ , 2.93), 2.99(1H, m), 2.95(2H, d,  $J=12.13$ ), 2.67(2H, td,  $J=11.80$ , 2.22), 1.78(3H, d,  $J=12.78$ ), 1.52(1H, m), 1.24(2H, qd,  $J=12.64$ , 3.58), 1.01(3H, d,  $J=6.31$ ), 0.84(2H, q,  $J=5.44$ ), 0.57(2H, q,  $J=5.02$ )

**5-Amino-N-(3-dimethylamino-propyl)-2-(4-methyl-piperidin-1-yl)-benzamide (3b)**

2b 0.097g(0.27mmol)을 3a의 합성법과 같은 방법으로 실현하여, 표제 화합물 0.98g을 98.8%의 수율로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  400Hz) :  $\delta$  10.8(1H, s), 7.58(1H, d,  $J=2.74$ ), 7.07(1H, d,  $J=7.46$ ), 6.73(1H, dd,  $J=5.50$ , 2.84), 3.50(2H, q,  $J=6.18$ ), 2.99(2H, d,  $J=7.5$ ), 2.72(2H, t,  $J=11.6$ ), 2.39(2H, t,  $J=7.0$ ), 1.84(4H, m), 1.53(1H, m), 1.35(2H, m), 1.01(4H, d,  $J=6.48$ )

**5-Amino-N-(2-diethylamino-ethyl)-2-(4-methyl-piperidin-1-yl)-benzamide (3c)**

2c 0.11g(0.31mmol)을 3a의 합성법과 같은 방법으로 실현하여, 표제 화합물 0.099g의 93.7%의 수율로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  400Hz) :  $\delta$  10.73(1H, s), 7.57(1H, s), 7.05(1H, d,  $J=8.4$ ), 6.71(1H, d,  $J=8$ ), 3.78(2H, s), 3.54(2H, q,  $J=6.4$ ), 2.97(2H, d,  $J=11.2$ ), 2.70~2.58(8H, m), 1.76(2H, d,  $J=12.8$ ), 1.50(1H, m), 1.37(2H, q,  $J=12$ ), 1.01(9H, m)

**5-Amino-2-(3,4-dihydro-1*H*-isoquinolin-2-yl)-N-(3-dimethylamino-propyl)-benzamide (3d)**

2d 0.12g(0.32mmol)을 3a의 합성법과 같은 방법으로 실현하여, 표제 화합물 0.11g을 96%의 수율로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  400Hz) :  $\delta$

10.54(1H, t,  $J=5.28$ ), 7.58(1H, d,  $J=2.69$ ), 7.19~7.12(3H, m), 7.08(1H, d,  $J=8.47$ ), 7.02(1H, d,  $J=7.18$ ), 6.77(1H, dd,  $J=8.37$ , 2.67), 4.00(2H, s), 3.31(2H, q,  $J=6.03$ ), 3.22(2H, t,  $J=5.71$ ), 3.04(2H, t,  $J=5.45$ ), 2.26(2H, t,  $J=7.28$ ), 2.14(6H, s), 1.54(2H, p,  $J=7.42$ )

**5-Amino-2-(3,4-dihydro-1*H*-isoquinolin-2-yl)-N-(3-methoxy-propyl)-benzamide (3e)**

2e 0.12g(0.32mmol)을 3a의 합성법과 같은 방법으로 실현하여, 표제 화합물 0.10g을 99%의 수율로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{CDCl}_3$  400Hz) :  $\delta$  10.55(1H, t), 7.59(1H, d,  $J=2.54$ ), 7.22~7.16(3H, m), 7.06(1H, d,  $J=8.45$ ), 7.01(1H, d,  $J=4.09$ ), 6.75(1H, dd,  $J=8.38$ , 2.74), 3.98(2H, s), 3.34(2H, t,  $J=5.80$ ), 3.21(2H, t,  $J=5.90$ ), 3.13(2H, t,  $J=5.90$ ), 3.07(3H, s), 3.01(2H, t,  $J=6.22$ ), 1.52(2H, p,  $J=6.47$ )

**5-Benzoylamino-N-cyclopropyl-2-(4-methyl-piperidin-1-yl)-benzamide (4a)**

3a 0.045g(0.16mmol)을 DCM에 녹인 후 pyridine 0.013ml(0.16mmol)을 넣고 10분간 교반해주었다. chloroacetyl chloride 0.013ml(0.16mmol)를 가하고 4시간 동안 교반해주었다. 용매는 감압증류로 제거한 다음 ethyl acetate를 가하고 5% citric acid 용액으로 씻어주었다.  $\text{MgSO}_4$ 로 물을 제거한 다음 감압여과하고 ethyl acetate를 감압증류로 제거하고 hexane:ethyl acetate(1:2)를 이용한 결착 크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 정량적으로 얻었다.  $^1\text{H}$  NMR ( $\text{DMSO}$  400Hz) :  $\delta$  9.93(1H, s), 9.47(1H, d,  $J=4.30$ ), 7.52(1H, d,  $J=2.68$ ), 7.30(1H, dd,  $J=8.69$ , 2.70), 6.81(1H, d,  $J=8.72$ ), 3.78(2H, s), 2.51(2H, d,  $J=11.52$ ), 2.45(1H, m), 1.30(2H, d,  $J=11.35$ ), 1.50(1H, m), 0.78(2H, qd,  $J=3.49$ ), 0.51(3H, d,  $J=6.50$ ), 0.32(2H, q,  $J=5.03$ ), 0.07(2H, q,  $J=6.14$ ).  $^{13}\text{C}$  NMR ( $\text{CDCl}_3+\text{DMSO}$  100Hz) :  $\delta$  167.4, 165.1, 148.6, 135.2, 128.0, 123.8, 122.4, 122.2, 54.3, 43.6, 35.2, 32.1, 30.3, 29.9, 22.8, 22.2, 6.6

**5-(2-Chloro-acetylamino)-N-(3-dimethylamino-propyl)-2-(4-methyl-piperidin-1-yl)-benzamide (4b)**

**3b** 0.089g(0.27mmol)을 10ml DCM에 녹인 후 pyridine 0.025ml(0.31mmol)을 넣고 10분간 교반해 주었다. chloroacetyl chloride 0.022ml(0.28mmol)를 가하고 4시간 동안 교반해 주었다. 용매는 감압증류로 제거한 다음 MeOH:DCM(7:93)을 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 0.081g을 73.6%의 수율로 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (DMSO 400Hz): δ 10.41(1H, t, J=5.32), 8.86(1H, s), 8.15(1H, dd, J=5.99, 2.72), 7.98(1H, d, J=2.72), 4.21(2H, s), 3.53(2H, q, J=7.0), 3.08(2H, d, J=11.8), 2.77(2H, dt, J=9.83, 1.9), 2.42(2H, t, J=7.14), 1.85(4H, m), 1.59(1H, m), 1.38(2H, m), 1.03(3H, d, J=6.44). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> 100Hz) : δ 166.1, 165.0, 147.8, 135.0, 134.2, 133.6, 129.4, 128.6, 127.3, 126.7, 126.6, 124.3, 123.1, 122.3, 57.3, 56.9, 51.1, 45.5, 43.6, 38.2, 29.9, 27.4

**5-(2-Chloro-acetylamino)-N-(2-diethylamino-ethyl)-2-(4-methyl-piperidin-1-yl)-benzamide (4c)**

**3c** 0.05g(0.15mmol)과 chloroacetyl chloride 0.013ml(0.16mmol)을 **4b**의 합성법과 동일한 방법으로 실험하여, MeOH:DCM(7:93)을 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 0.046g을 75.1%의 수율로 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> 400Hz) : δ 10.25(1H, s), 9.00(1H, s), 8.11(1H, dd, J=8.6, 2.8), 7.97(1H, d, J=2.8), 7.23(1H, d, J=8.8), 4.20(2H, s), 3.59(2H, q, J=6), 3.07(2H, d, J=11.6), 2.75~2.62(8H, m), 1.80(2H, d, J=11.6), 1.54~1.50(1H, m), 1.40(2H, qd, J=12, 3.6), 1.06~1.03(9H, m). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> 100Hz) : δ 166.5, 164.8, 149.3, 134.2, 128.4, 123.1, 122.0, 54.6, 52.0, 47.2, 43.5, 37.7, 35.1, 30.6, 22.2, 11.4

**5-Amino-2-(3,4-dihydro-1*H*-isoquinolin-2-yl)-N-(3-dimethylamino-propyl)-benzamide (4d)**

**3d** 0.11g(0.31mmol)과 chloroacethyl chloride 0.025ml(0.31mmol)을 **4b**의 합성법과 같은 방법으로 실험하여, MeOH:DCM(7:93)을 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물 0.069g

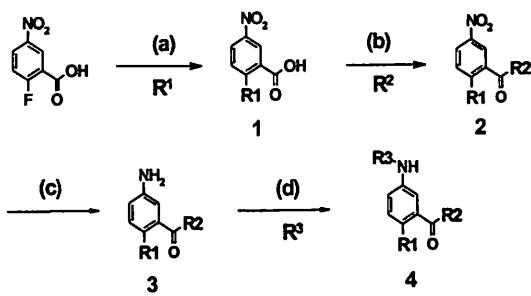
을 51%의 수율로 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> 400Hz) : δ 10.11(1H, t, J=5.16), 9.36(1H, s), 8.15(1H, d, J=8.68), 8.08(1H, d, J=2.52), 7.25(1H, d, J=8.60), 7.19~7.15(3H, m), 7.05(1H, d, J=7.16), 4.24(2H, s), 4.07(2H, s), 3.32(6H, t, J=4.40), 3.05(2H, s), 2.12(2H, t, J=7.23), 2.03(6H, s), 1.44(2H, p, J=7.15). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> 100Hz) : δ 166.1, 165.0, 147.8, 135.0, 134.2, 133.6, 129.4, 128.6, 127.3, 126.7, 126.6, 124.3, 123.1, 122.3, 57.3, 56.9, 51.1, 45.5, 43.6, 38.2, 29.9, 27.4

**5-(2-Chloro-acetylamino)-2-(3,4-dihydro-1*H*-isoquinolin-2-yl)-N-(3-methoxy-propyl)-benzamide (4e)**

**3e** 0.10g(0.29mmol)과 chloroacethyl chloride 0.024ml(0.30mmol)을 **4a**의 합성법과 같은 방법으로 실험하여, hexane:ethyl acetate(1:1)을 이용한 컬럼크로마토그래피로 정제하여 표제 화합물을 0.030g을 24%의 수율로 얻었다. <sup>1</sup>H NMR (CDCl<sub>3</sub> 400Hz) : δ 10.01(1H, t, J=4.92), 8.90(1H, s), 8.20(1H, dd, J=8.72, 2.72), 8.02(1H, d, J=2.68), 7.27(1H, d, J=8.92), 7.22~7.16(3H, m), 7.06(1H, d, J=6.84), 4.21(2H, s), 4.10(2H, s), 3.41(2H, q, J=6.73), 3.34(2H, t, J=5.81), 3.18(2H, t, J=6.11), 3.11(3H, s), 3.06(2H, t, J=5.58), 1.55(2H, p, J=6.47). <sup>13</sup>C NMR (CDCl<sub>3</sub> 100Hz) : δ 166.1, 164.8, 148.0, 134.6, 134.2, 133.7, 129.4, 128.8, 127.3, 126.7, 126.6, 124.3, 123.3, 122.3, 70.6, 58.9, 56.8, 51.2, 43.4, 37.3, 29.7, 29.6

### 3. 결과 및 고찰

2,5-Diaminobenzamide 유도체는 반응도식 1과 같이 합성하였다. 2-fluoro-5-nitrobenzoic acid의 fluorine을 amine기로 치환시킨 후, amide결합으로 acid기에 R2를 도입하였다. 5번 위치의 nitro 기를 palladium 촉매를 사용하여 환원시킨 다음 amine기와 acid chloride를 반응시켜 R3를 도입하였다.



반응도식 1. 2,5-Diaminobenzamide의 합성 방법: (1) CH<sub>3</sub>CN, reflux; (2) EDC, HOBT, DMF; (3) Pd/H<sub>2</sub>, MeOH; (4) i) R3 = R4COCl, pyridine, DCM, ii) R3 = R5COOH, EDC, HOBT, DMF

합성된 화합물들은 A549(폐암), SNU484(위암), HepG2(간암), Caki(신장암), AMC-HN4(두경부암)의 5가지 암세포주에 대하여 XTT assay를 이용하여 암세포 성장 억제능을 측정하였다(표 1).<sup>6</sup>

화합물 4a는 Caki와 AMC-HN4 암세포주에 대

하여 성장 억제능을 나타내었다. 수용액에 대한 용해도를 증가시키기 위하여 R2를 amine기를 포함한 치환체로 변경하였을 때, N,N-diethylamino ethyl을 도입한 4c는 Caki 암세포주에 대한 성장 억제능을 그대로 유지하는 반면, 3-(N,N-dimethylamino)propyl을 도입한 4b의 경우는 현저히 감소된 암세포 성장 억제능을 보였다. R1을 4-methyl piperidine에서 1,2,3,4-tetrahydroisoquinoline로 변형시켜 화합물의 소수성을 증가시켜도 암세포 성장 억제능은 증가되지 않았다(4b, 4d). 그러나 3-methoxypropyl로 치환시켰을 때 암세포 성장 억제능이 다시 증가되었다(4e). R2 치환체가 소수성인 경우에는 R1의 크기나 R2의 구조 변화가 암세포 성장 억제능에 영향을 주지 않는 것으로 나타났다(4a, 4e). 2,5-Diaminobenzamide 유도체들이 암세포 성장을 억제하는 작용기전은 아직 조사되지 못하였으나, R3의 chloro acetyl은 반응성이 큰 치환체로 효소나 단백질과 반응하여 비가역성 저해제로 작용할 가능성이 있다.<sup>7,8</sup>

표 1. 합성된 화합물의 구조와 암세포 성장 억제능.



	R1	R2	R3	purity (%)	% inhibition at 10uM					
					A549	SNU 484	Hep G2	Caki	AMC-HN4	HU-fib
4a				98.6	58	ND	58	90	88	0
4b				91.7	10	30	20	0	14	ND
4c				97.4	38	23	75	91	70	ND
4d				99.8	0	23	17	0	12	ND
4e				96.6	26	24	70	88	79	ND

\*ND : 실험하지 않음

#### 4. 결 론

5개의 2,5-diaminobenzamide 계열의 화합물을 합성하여  $^1\text{H-NMR}$  및  $^{13}\text{C-NMR}$  스펙트럼으로 합성된 화합물의 구조를 확인하였다. 합성된 화합물은 HPLC를 이용하여 순도를 측정한 결과 모두 90%이상의 순도를 나타내었다. 4a 화합물은 10uM 농도에서 Caki 와 AMC-HN4 암세포 주에 대하여 88%이상의 성장 억제능을 보였고, 4c와 4e 화합물은 HepG2, Caki 및 AMC-HN4 암세포주에 대하여 성장 억제능을 나타내었다. 새로이 합성된 2,5-diaminobenzamide 유도체들이 특정 암세포주에 선택적으로 억제 효능을 보이고, 또한 치환체에 대한 의존성을 보이는 결과는 이 구조가 항암제로 개발될 가능성을 제시하고 있다.

#### 감사의 글

본 연구는 2007년도 1학기 계명대학교 대학원 학생 학술연구 장학금에 의해 연구되었습니다. 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

- Rosemary C. Bonney, 2001, "Scrip's Guide to Cancer Therapies: A biotech revolution?", PJB publication, Richmond
- Henk J. Broxterman; Nafissa H. Georgopapadakou, *Drug Resistance Update*, 2004, 79-87
- David G. Lloyd; Georgia Golfis; Andrew J. S. Knox; Darren Fayne; Mary J. Meegan; Tudor I. Oprea; *Drug Discovery Today*, 2006, 11, 149-159
- Barbara M. Bolten; Tracy DeGregorio, *Nature Reviews*, 2002, 335-336
- Grant R. Zimmermann; Joseph Lehár; Curtis T. Keith, *Drug Discovery Today*, 2007, 12, 34-42
- XTT 실험은 assay kit 판매처의 protocol을 따라 수행하였다. XTT : 2,3-Bis(2-methoxy -4-nitro-5-sulfophenyl)-2h-tetrazolium-5-carboxamide inner salt.
- Philip L. Whitney; George Folsch; Per O. Nyman; Bo G. Malmstrom, *The Journal of Biological Chemistry*, 1967, 25, 4200-4211
- Robert D. Elliott; R. Wallace Brockman; John A. Montgomery, *Journal of Medicinal Chemistry*, 1986, 29, 1052-1056

## 생선의 신선도 측정을 위한 $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ 계 후막 반도체 가스 센서의 특성

전재복 · 정지영 · 윤선광 · 이창섭  
계명대학교 화학과

## Characteristics of the $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ Thick Film Semiconductor Gas Sensor for Fish Freshness

Jae-Mok Jun, Ji-Young Jung, Sun-Kwang Yun, Chang-Seop Lee  
*Department of Chemistry, Keimyung University,*

**요약.** 부패한 어류에서 발생되는 휘발성염기질소가스 중에 trimethylamine를 선택적으로 측정할 수 있는 가스센서를 제작하여 그 특성을 조사하였다. 주 물질인  $\text{SnO}_2$  원료분말은 습식화학법인 침전법으로 제조하였으며, 금속산화물인  $\text{TiO}_2$ 와 전이금속인 Pd, Ru, Rh, Pt와 In을 첨가하여 센서물질로 제조하였다. 지지체는 감지막 전극과 히터가 내장된  $8.08\text{mm} \times 10\text{mm} \times 0.68\text{mm}$ 의  $\text{Al}_2\text{O}_3$ 기판으로 구성하였으며 전극부분에 스크린 프린트법으로 후막을 형성하였다. 이렇게 제작된 후막형 가스 센서를 지름 100mm인 1.5리터 용량의 용기에 높이 40mm 위치에 고정 시킨 후 가스를 주입하여 감도를 측정하였다. 가스의 농도는 100~1000ppm 범위의 trimethylamine, dimethylamine 및 ammonia gas를 사용하였고, 100°C ~ 400°C의 온도범위에서 감도를 측정하였다. 가스 검출 특징은 금속의 종류와 양에 따라 결정되었다. 감도는 250°C에서 1wt% Pd/ $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ 일 때 가장 우수하였고, 다른 가스에 대한 선택성도 1wt% Pd/ $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ 일 때 가장 우수한 것으로 나타났다.

주제어: 가스센서,  $\text{SnO}_2$ , Trimethylamine, 생선의 신선도

**Abstract.** This study investigates the use of  $\text{TiO}_2$ , Pd, Pt, In, Ru, and Rh that greatly improves the sensitivity to trimethylamine gas. The Metal- $\text{SnO}_2$  thick films were prepared by screen-printing method onto  $\text{Al}_2\text{O}_3$  substrates with platinum electrode. The sensing characteristics were investigated by measuring the electrical resistance of each sensor in a test box as a function of gas concentration. This was then used to detect trimethylamine, dimethylamine and ammonia vapors within a concentration range of 100~1000 ppm. The gas sensing properties of Metal- $\text{SnO}_2$  mixed thick films depended on the content and variety of Metal. It was found that sensitivity and selectivity of the sensing materials with 1wt% Pd and 10wt%  $\text{TiO}_2$  to TMA gas at 250°C showed the best result.

Keywords: Gas sensor,  $\text{SnO}_2$ , trimethylamine, fish freshness

### I. 서 론

최근 현대 사회는 ISO 9000의 시행으로 식생활에서 식품 안전 문제에 대한 관심도가 높아지

고 있으며, 식품의 안정성을 과학적인 수치로 판별할 수 있는 시스템이 요구되고 있다. 특히 어류의 신선도는 식품산업에서 원료의 품질 및 가공 기능성의 판정, 위생적인 안전성 측면에서 정확히 판별

하여야 한다. 어류는 생선의 종류, 근육 상태, 저장 상태 등의 여러 가지 요인에 따라 부폐의 차이가 많아서 과과없이 신선도를 신속히 감지할 수 있어야 한다. 기존의 측정 방법으로는 관능검사, 비중, pH 검사, 암모니아 시험, 단백질전반응, 휘발성염기질소량 측정, trimethylamine의 정량과 어류의 ATP 분해 시 나타나는 화학적 변화를 측정하는 방법이 사용되고 있다. 이 방법들은 어류의 형태나 냄새, 색의 변화를 바탕으로 신선도를 판단하므로 정확성이 떨어지고, 전문 기관에서 연구원에 의해 첨단 장비로만 분석할 수 있기 때문에 시간과 지식이 요구되며, 어류의 형태가 과과되고 측정시간이 길어서 실용성이 떨어지게 된다. 따라서 어류의 신선도를 현장에서 실시간으로 분석하는 방법으로서 어류에서 발생하는 부폐성 가스를 감지하는 방법이 있다. 어류는 신선도가 떨어지면서 trimethylamine, dimethylamine, ammonia 등의 휘발성 염기질소 가스가 방출되며, 특히 trimethylamine 가스는 생선의 신선도가 떨어질수록 발생량이 급격히 증가한다. 이때, 반도체 가스센서를 이용하면 생선에서 방출되는 trimethylamine 가스를 간접적으로 측정할 수 있는데, 이는 가스 흡착에 따른 저항의 변화에 따라 센서물질의 전도도가 변화하는 성질을 이용하는 것이다. 이러한 반도체형 가스센서의 재료로는 SnO<sub>2</sub>, ZnO, TiO<sub>2</sub> 등이 널리 사용되고 있다.

본 연구에서는 SnO<sub>2</sub>를 주 물질로 하고, 순수한 SnO<sub>2</sub>에 전기적 특성의 안정화를 위해 금속 산화물인 TiO<sub>2</sub>를 첨가하고, 선택성과 감도를 증대시키기 위해 촉매금속인 Pd, Pt, In, Ru, Rh 등을 일정 무게비로 첨가하여 만들어진 센서물질을 스크린 법으로 후막을 형성하여 가스센서를 제작하였다. 이 가스센서로 동작온도와 가스 농도에 따른 감도와 선택성을 조사하였다.

## 실험

### 시약 및 재료

본 논문에서에서는 사염화주석(SnCl<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O)을 사용하여 습식화학법으로 침전시켜 주물질이 되는 SnO<sub>2</sub>를 제조하였다.

또한, 센서 물질의 전기적 특성의 안정화를 위하여 TiO<sub>2</sub>를 다양한 조성비율로 탈이온수에 혼합한 후 자기교반기로 교반하면서 주 물질인

SnO<sub>2</sub>에 첨가하였다.

가스센서의 기본적인 조건인 감도와 선택성을 향상시키기 위하여 촉매금속을 합침법으로 첨가하였으며, 그 방법을 Figure 1에 나타내었다. 합침법의 경우 전이금속인 Pd와 Pt, Ru, Rh, In을 1~3wt% 무게비가 되도록 칭량한 후 비이커에 넣고 염산 1mL를 첨가하여 전이금속을 완전히 녹인 후 중류수를 첨가하여 균일 용액을 제조하였다. SnO<sub>2</sub> 분말이나 TiO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub> 분말을 첨가하여 전이금속을 합침시킨 후 자기교반기로 교반하면서 서서히 가열하여 전이금속이 담지된 SnO<sub>2</sub> 분말이나 TiO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub> 분말을 제조하였다. 얇은 물질을 110°C에서 12시간 건조하고 600°C에서 2시간 소성시킨 후 분말을 분쇄하여 센서물질을 얻었다.

Catalyst metal + HCl-1mL @25°C, 30min stirring

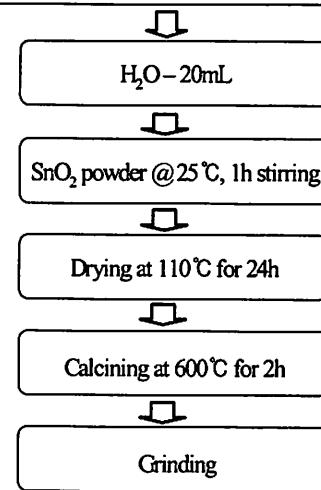


Fig. 1. Preparation of metal/TiO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub> powder.

이렇게 제조된 센서물질들의 성분과 조성비를 Table 1에 나타내었다.

### 후막 센서의 제작

후막형의 경우 제작 과정을 크게 두 부분으로 나눌 수 있다. 감지막 센서물질인 감지후막을 스크린 법으로 인쇄하는 과정과 감지막의 전극 및 히터를 형성하는 과정이다.

감지막 전극 및 히터가 내장된 기판은 시장에

Table 1. Weight ratio of sensor material and dopants.

A material	Metal oxide	Metal catalyst				
		Pd	Pt	In	Ru	Rh
SnO <sub>2</sub>	TiO <sub>2</sub>					
100	0	0	0	0	0	0
99	1	0	0	0	0	0
95	5	0	0	0	0	0
90	10	0	0	0	0	0
99	0	1	0	0	0	0
99	0	0	1	0	0	0
99	0	0	0	1	0	0
89	10	1	0	0	0	0
89	10	0	1	0	0	0
89	10	0	0	1	0	0
89	10	0	0	0	1	0
89	10	0	0	0	0	1
88	10	2	0	0	0	0
87	10	3	0	0	0	0
88	10	0	0	0	2	0
87	10	0	0	0	3	0
88	10	1	0	0	1	0
88	10	1	0	0	0	1

출시된 제품을 사용하였다. 알루미나 기판 ( $13\text{mm} \times 8\text{mm} \times 0.67\text{mm}$ )의 앞면은 전극 부분으로서 Pt를 0.5mm 간격으로 세 쌍을 형성하였고, 뒷면에는 히터를 형성하는 부분으로서 Ni-Cr으로 구성하였다. Figure 2에 후막 센서의 구성도를 나타내었다.

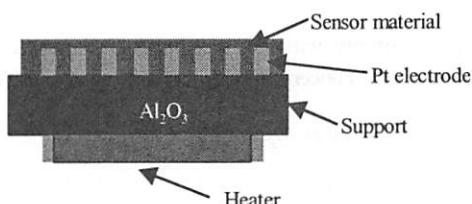


Fig. 2. Structure of the gas sensor.

각각의 센서 물질에 대한 후막은 분말 무게의 10wt%가 되도록 바인더인 Ethylene glycol과 30wt%의 증류수를 첨가하여 적당한 점도를 가진 paste를 전극부분이 형성된 알루미나 기판 위에 스크린 프린팅하여 구성하였다. 형성된 후막

소자는 상온에서 24시간 건조하고 대류 건조기에서 5°C/10min로 승온하여 110°C에서 12시간 건조 후 600°C에서 1시간 동안 열처리하였다.

이렇게 제작된 가스센서를 250mm×200mm×200mm인 10L 용기에서 높이 50mm 위치에 고정 시킨 후 소자 내부에 있는 전자를 없애기 위해 측정온도와 동일한 온도에서 12시간 동안 안정화 처리를 하였으며, 용기 내에 감지 가스를 주입하고, 팬을 동작시킨 후 평형농도에도 달될 때 일렉트로미터로 저항변화를 측정하였다. 센서의 감도는 공기 중에서의 가스저항에 대한 가스의 유입에 따라 변화된 저항의 비를 의미하며, 다음 식으로 정의하였다.

$$S = Ra/Rg$$

여기에서  $Ra$ 는 가스 주입 전의 저항이며,  $Rg$ 는 가스 주입 후 저항이다. 일반적으로 본 논문에서 사용한 물질과 같은 같은 n형 반도체 센서로 환원성 가스를 감지하게 되면 저항이 감소하게 되므로  $S$  값이 클수록 센서의 감도가 우수한 것을 의미한다.

Figure 3에 본 실험에서 사용한 가스 측정 장치도를 나타내었다.

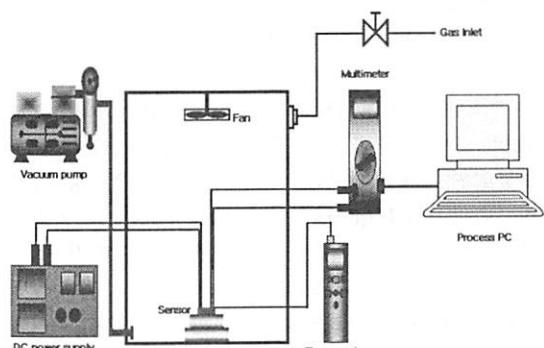


Fig. 3. Experimental apparatus used for gas-sensing experiments.

## 결과 및 고찰

### 센서 물질의 특성 분석

본 연구에서는 주 물질인 SnO<sub>2</sub> 분말 및 혼합

분말의 혼합비를 달리하여 가스감지용 센서 물질을 제조하였으며, 침전 시 용액의 pH를 9.5로 고정하여 주 물질인  $\text{SnO}_2$ 를 얻었다. 습식화학법으로 제조된 주 물질과 혼합물 상태인 센서 물질의 결정화 상태 및 상 확인을 위해 XRD로 분석한 결과를 Figure 4에 나타내었다. Figure 4에서 알 수 있듯이  $\text{TiO}_2$ 의 첨가 양이 많아질수록  $\text{TiO}_2$ 의 결정화 정도가 높아지는 것을 알 수 있으며, 루타일 구조로 상변화가 나타나는 것을 알 수 있었다.

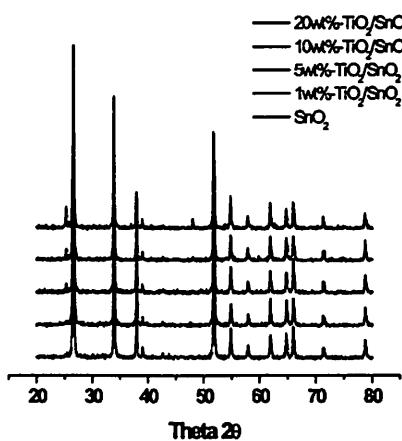


Fig. 4. XRD patterns of  $\text{SnO}_2$  mixed with the various ratios of  $\text{TiO}_2$  calcined at 600°C.

제조한 센서물질들의 입자에 대한 분석결과를 Table 2에 나타내었다. Table 2에서 알 수 있듯이 주물질인  $\text{SnO}_2$  입자의 평균 크기는 132.2nm이며, 비표면적이  $7.16\text{m}^2/\text{g}$ 로 나타났고,  $\text{TiO}_2$ 의 첨가량이 증가할수록 입자크기가 작아지면서 비표면적이 증가하는 것으로 나타났다. 결과적으로 주물질인  $\text{SnO}_2$ 에  $\text{TiO}_2$ 가 10wt% 첨가된 경우가 입자 크기는

80.3nm이고, 비표면적은  $8.38\text{m}^2/\text{g}$ 로 측정되었다.

#### $\text{TiO}_2$ 가 첨가된 $\text{SnO}_2$ 의 가스 감지 특성

가스 감지물질로서 상용화되기 위해서는 높은 감도를 유지하면서 동시에 장기안정성이 우수하여야 한다. 또한 초기 및 장기 안정성은 회로를 구성하는데 필요한 조건이다. 안정성 향상을 위해  $\text{TiO}_2$ 를 다양한 무게비로 첨가한 후 가스 감응 특성을 조사한 결과를 Figure 5에 나타내었다. Figure 5에 나타난 바와 같이  $\text{SnO}_2$ 는 가스의 농도에 따라 감도가 큰 차이가 없는 것으로 나타났고, 1wt%  $\text{TiO}_2$ 와 5wt%  $\text{TiO}_2$ 를  $\text{SnO}_2$ 에 첨가했을 때는 감도가 나타났지만, 두 센서물질의 감도 차이는 근소하였다. 그러나 10wt%  $\text{TiO}_2$ 를  $\text{SnO}_2$ 에 첨가했을 때는 가스 농도에 따라 감도의 차이가 많이 나는 것을 알 수 있었다.

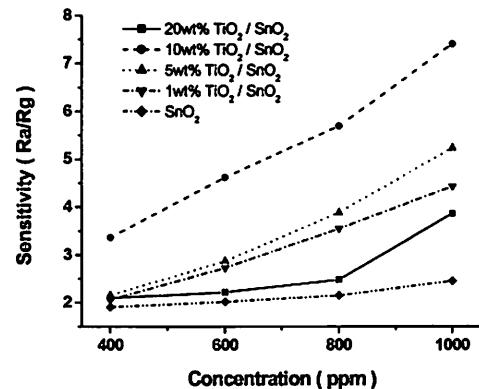


Fig. 5. Sensitivity with the amount of  $\text{TiO}_2$  to the various concentrations of TMA gas at 250°C.

#### 센서물질에 대한 온도효과

Figure 6는  $\text{SnO}_2$ 에 첨가된 금속 산화물의 양

Table 2. Crystallite size, d-spacing and surface area of  $\text{SnO}_2$  added with  $\text{TiO}_2$

Sample	$\text{SnO}_2$	1wt%- $\text{TiO}_2$ / $\text{SnO}_2$	5wt%- $\text{TiO}_2$ / $\text{SnO}_2$	10wt%- $\text{TiO}_2$ / $\text{SnO}_2$
D-spacing(Å)	2.9140	2.9192	2.9189	2.9208
Crystallite size (nm)	132.2	110.2	100.2	80.3
Surface area( $\text{m}^2/\text{g}$ )	7.16	8.03	8.01	8.38

과 촉매금속의 종류에 따라 온도를 변화시켰을 때 센서의 감도 변화를 나타낸 것이다.  $\text{SnO}_2$ 는 모든 농도에 대하여 250 °C에서 감도가 좋게 나타난 반면에,  $\text{SnO}_2$ 에 1 wt%  $\text{TiO}_2$ 를 첨가하면 200 °C로 감지온도가 낮아졌다. 그러나  $\text{SnO}_2$ 에 10 wt%  $\text{TiO}_2$ 를 첨가하거나 1 wt% Pt과 10 wt%  $\text{TiO}_2$ 를 첨가하였을 경우 감도가 가장 좋은 것으로 나타났다. 이것은 금속 산화물의 양과 촉매금속의 종류에 따라 활성화 에너지가 적당한 온도에서 빠르게 변화하기 때문이다.

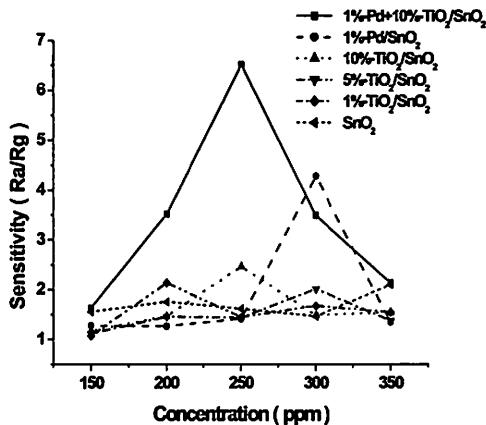


Fig. 6. Sensitivity of the gas sensor to trimethylamine gas with the temperature (gas concentration : 100 ppm).

#### 센서물질에 대한 촉매 효과

가스센서의 기본요건인 안정화에 직접적인 영향은 미치지 않으나 Trimethylamine gas에 대한 감도와 선택성을 높이기 위하여 전이금속을 센서물질에 첨가하였다.  $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ 에 전이금속을 혼합하게 되었을 때 전자 수수가 원활하게 됨으로써 증가된 양의 흡착종들은 흡·탈착현상에 관여하게 되어 전기전도도의 변화를 증가시키는 것으로 보고되어 있다<sup>26</sup>. 이러한 촉매작용의 효과를 높이기 위해서는 가스에 대한 촉매의 접촉면적을 크게 함으로써 감도와 선택성 및 동작온도에 영향을 주는 것으로 보고되었다<sup>26</sup>.

Figure 7에는 전이 금속의 종류에 따른 측정

가스의 감도를 나타내었다. 금속산화물이 10wt%- $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ 인 시스템을 기본 센서 물질로 하여 여러 가지 촉매금속을 첨가하였다. 그림에서 알 수 있듯이 In이나 Pt는 오히려 첨가 전보다 감도가 떨어지는 것으로 나타났으나 Pd를 첨가했을 때, 감도가 다른 전이 금속 및 10wt%- $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ 일 경우보다 더 좋은 것을 알 수 있었다.

이로써 1%-Pd+10wt%- $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ 의 센서물질이 환원성 가스인 TMA gas를 다른 센서물질에 비해 빠른 속도로 산화시키면서, 좋은 선택성을 보인다는 것을 알 수 있었다.

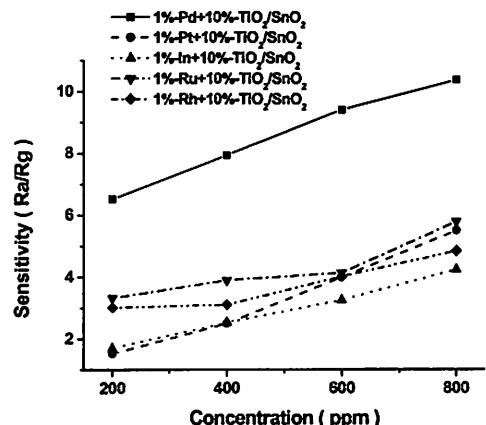


Fig. 7. Sensitivity with catalyst /10wt% $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$  to the various concentrations of TMA gas at 250°C.

Figure 8에는 전이 금속의 종류에 따라 측정 가스의 감도를 나타내었다. 금속산화물이 10wt%- $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ 인 시스템을 기본 센서 물질로 하여 여러 가지 촉매금속을 첨가하였다. 그림에서 알 수 있듯이 In이나 Pt는 오히려 첨가 전보다 감도가 떨어지는 것으로 나타났으나 Pd를 첨가했을 때, 감도가 다른 전이 금속 및 10wt%- $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ 일 경우보다 더 좋은 것을 알 수 있었다.

이로써 1%-Pd+10wt%- $\text{TiO}_2/\text{SnO}_2$ 의 센서물질이 환원성 가스인 TMA gas를 다른 센서물질에 비해 빠른 속도로 산화시키면서, 좋은 선택성을 보인다는 것을 알 수 있었다.

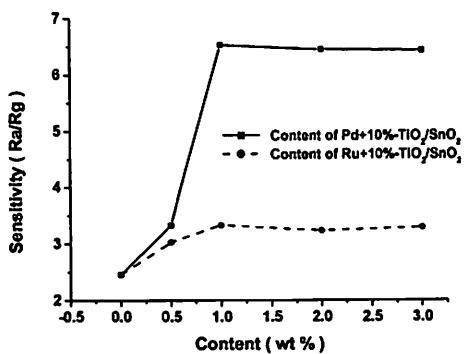


Fig. 8. Sensitivity with the contents of Pd and Ru catalysts to the 200ppm of TMA gas at 250°C.

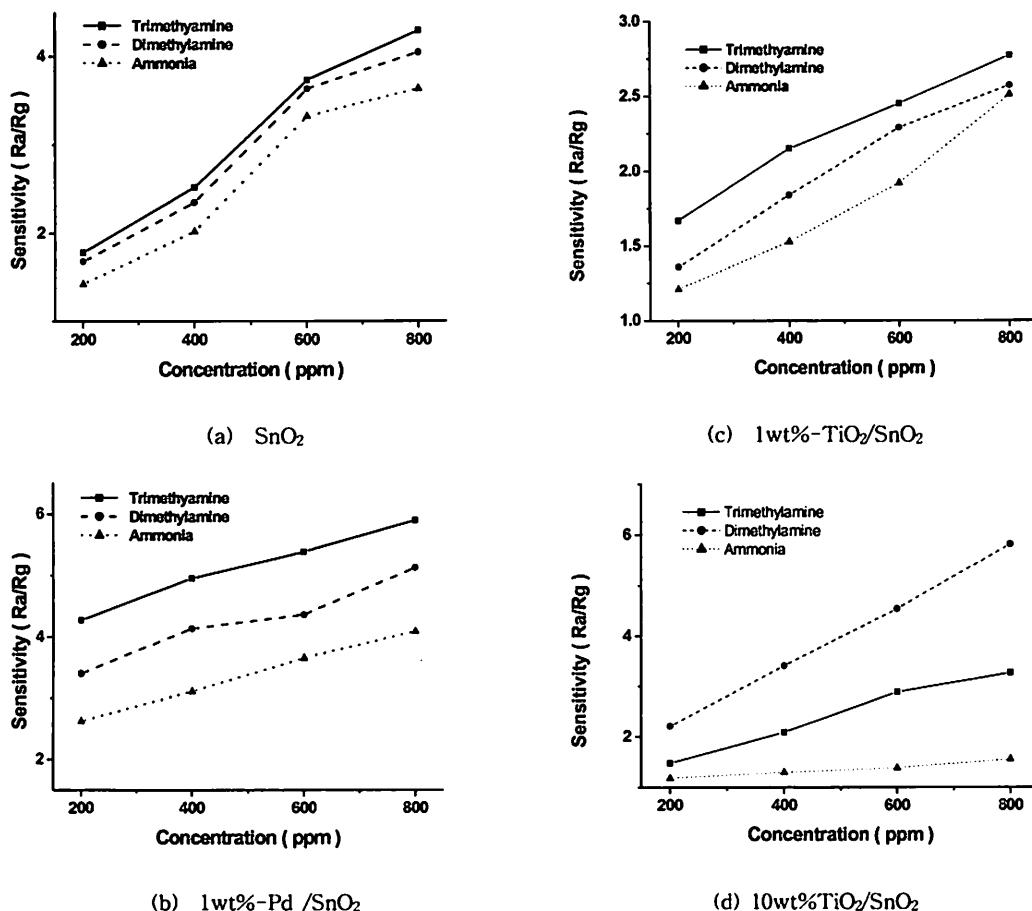


Fig. 9. Sensitivity of the various sensor materials to the different gases at 250°C.

### 센서물질에 따른 TMA 가스의 선택성

Figure 9에는 SnO<sub>2</sub>에 TiO<sub>2</sub>를 첨가하는 양과 촉매의 종류에 따라 Trimethylamine gas, Dimethylamine gas, Ammonia gas에 대한 센서물질의 감도를 250°C에서 농도에 따라 나타낸 것이다. 센서 물질의 온도가 250°C 일 때 Trimethylamine gas의 감도가 가장 좋았기 때문에 Trimethylamine gas와 감도를 비교하기 위하여 다른 가스도 250°C 일 때 측정하였다. Figure 9에서 알 수 있듯이 1wt%TiO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub>의 경우 차이가 0.5 미만으로 나타나고 10wt%TiO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub>는 1wt%TiO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub>보다 감도의 차이가 2 이상 나타나지만, 촉매를 첨가하였을 경우보다 가스에 대한 선택성이 좋지 않은 것을 알 수 있었다. Figure 10

에는 센서물질을 1wt%Pd/10wt% $TiO_2/SnO_2$ 로 구성하였을 경우 가스의 종류에 따른 선택성을 나타내었다. 그림에서 볼 수 있듯이 Trimethylamine에 대하여 다른 종류의 가스에 의한 감도 차이가 6 이상으로 나타나 가장 선택성이 좋은 것을 알 수가 있었다. 이는 1wt%Pd/10wt% $TiO_2/SnO_2$ 일 경우가 Dimethylamine gas나 Ammonia gas보다 Trimethylamine gas를 잘 분해시키고 반응을 활성화시켜 선택성을 향상시키는 것으로 생각된다.

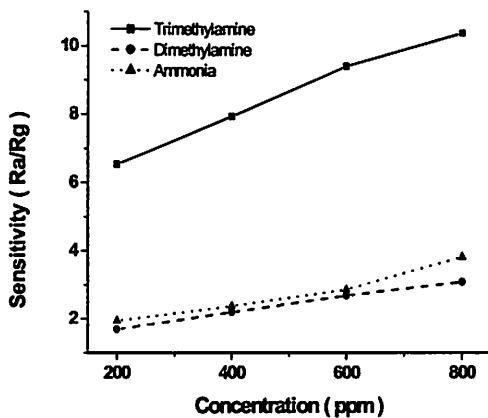


Fig. 10. Sensitivity of the sensor material 1wt%Pd/10wt% $TiO_2/SnO_2$  to the different gases at 250°C.

## 결 론

본 논문에서는 TMA 가스에 대한 감도와 선택성 향상을 위하여  $TiO_2$ 와 여러 종류의 전이금속을 첨가한  $SnO_2$ 계 후막센서를 제작하여 그 특성을 연구하였다. 후막의 물성에 커다란 영향을 미치는 금속산화물의 양, 전이금속의 종류와 양, 두께, 작동온도 등 다양한 변수들에 대하여 측정한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. TMA 가스에 대한 감도는 주물질  $SnO_2$ 에  $TiO_2$ 의 첨가량을 증가시킬수록 증가하였으며 10wt% 첨가했을 때 가장 우수하였다.
2. 전이금속의 종류와 양에 따라 감도가 다르게 나타났으며 Pd를 1wt% 첨가했을 때 가장 감도가 우수하였다.

3. 센서 물질의 두께는 얇을수록 감도가 우수하였으며 센서 물질에 따라 다소 차이는 있으나 작동온도는 250°C일 때 가장 감도가 우수하였다.
4. 1wt%Pd/10wt% $TiO_2/SnO_2$ 로 구성된 센서물질이 TMA 가스에 대한 감도와 Dimethylamine 및 Ammonia 가스에 대한 선택성이 가장 우수하였다.

## 인용문헌

1. Taguchi, N. Jap. Patent, 45-38200, 1962.
2. Nitta, M.; Kanefusa, S.; Haradome, M. *J. Electrochem. Soc.* 1978, 125, 1676~1679.
3. Nagatani, Y.; Matsuoka, M. *Jap. J. Appl. Phys.* 1982, 22, 233.
4. Oyabu, T. *J. Appl. Phys.* 1982, 53, 7125.
5. McAleer, J. F.; Moseley, P. T.; Norris, J. O. W.; Williams, D. E. *J. Chem. Soc. Faraday Trans. I*, 1987, 83, 1323~1346.
6. Jones, E. *Solid State Gas Sensor*, Adam Hilger, 1987, 17~24.
7. Ogino, K. et al. *Yazaki Report*, 1988, 13.
8. Levy, M. et al. *J. Physique. Coll.* 1991, 6(41), 329~339.
9. Saji, K. et al. *Proc. Int. Meet. on Chemical Sensors*, Fukuoka, Japan, 1983, 171.
10. Tones, T. A.; Firth, J. G.; Mann, B. *Sensors and Actuators*, 1985, 8, 281~306.
11. Fisher, G. *Ceramic Bulletin*, 1986, 65(4), 23.
12. 김영해, “가스 센서와 그 응용”, 기전 연구사, 1992.
13. Kwon, T. Ha.; Park, S. H.; Ryu, J. Y.; Choi, H. H. *Sensors and Actuators B*, 1998, 46, 75~79.
14. Arshak, K.; Gaidan, I. *Sensors and Actuators B*, 2005, 111~112.
15. Wach, M. S.; Jain, G. H.; Patil, D. R.; Patil, S. A.; Patil, L. A. *Sensors and Actuators B*, 2006, 115, 128~133.
16. Guo, P.; Pan, H. *Sensors and Actuators B*, 2006, 114, 762~767.
17. Seiyama, T.; Kato, A.; Fujiishi, K.; Nagatani, M. *Anal. Chem.*, 1962, 34, 1502~1504.

18. 홍병호; 임병국, “센서일렉트로닉스”, 서울: 大光書林, 1995, 1502~1504.
19. 김보연 “센서를 활용하자”. 한진 도서 출판사, 2001.
20. 박보선; 홍광준; 김호기; 박진성 *센서학회지*, 2002, 11(3), 155~162.
21. 박성현; 최우창; 김성우; 류지열; 최혁환; 이명교; 권태하 *센서학회지*, 2000, 9(1), 36~42.
22. 민봉기 *박사학위논문*, 영남대학교도서관, 2003.
23. Matsushima,S.; Teraoka, Y.; Miura, N; Yamazoe, N. *Jpn J. Applied Physics*, 1988, 27(10), 1978~1802.
24. Min, B. K.; Oh, S. D. *Kor J Ceram*, 1999, 5(2), 125~130.
25. Lim, C. H.; Oh, S. J. *Sensors and Actuators B*, 1996, 30, 223~231 .
26. 유도준; 준 타마키; 노리오 미우라; 노보루 야마조에; 박순자 *한국재료학회지*, 1996, 6(7), 716~722.

## 비대칭 유기합성의 메카니즘 확인을 위한 새로운 비대칭 리간드의 합성과 이용

엄재국 · 이진호  
계명대학교 자연과학대학 화학과

### Synthesis and Application of New Unsymmetrical Ligand for Identifying the Mechanism of Asymmetric Organic Synthesis

Uhm, Jae-kook · Lee, Jinho

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

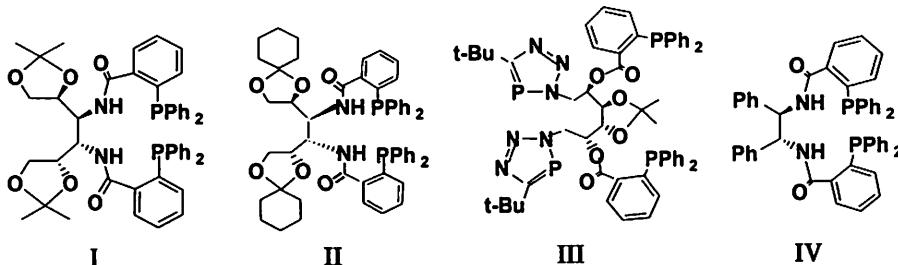
**요약.** 복잡하고 덩치가 큰 치환체를 갖는 비대칭형 리간드를 새로이 합성하기 위하여, diethyl-L-tartrate를 출발물질로부터 몇 단계의 반응을 거쳐서, 새로운 리간드 화합물 4, 2-diphenylphosphinobenzoylamido-3-diphenylphosphinobenzoate-1,4-diethylbutanodiate를 생성하였다. 수율은 56% 무색 결정이었고 m.p는 83 °C였으며,  $[\alpha]_D=+16.95^\circ$ (c=2.4, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)였다. 이 화합물이 비대칭형 리간드로써 작용하는 메카니즘을 확인하기 위하여, 1-(p-tolylsulfonyl) cyclopent-5-eno[4,3-d]-(3aS,6aR)-oxazolidin-2-one을 생성시키기 위해 Pd 화합물을 촉매로 같이 작용시켰다. 리간드와 팔라듐 금속을 4:1의 비율로 작용시켰더니 측정된 ee 량은 54%였고, 생성물의 수율은 81%였다. C<sub>2</sub>-손 대칭형 리간드와는 다르게 비대칭형 리간드인 경우에도 유사한 착물을 중간체를 생성하므로, 따라서 ee 량의 결정에 크게 영향을 미치지 않을 것으로 예상이 된다.

**Abstract.** The new unsymmetrical ligand, 4, 2-diphenylphosphinobenzoyl-amido-3-diphenylphosphinobenzoate-1,4-diethylbutanodiate with the polarization of  $[\alpha]_D=+16.95^\circ$ (c=2.4 in CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) and m.p of 83 °C was obtained in 56% yields from a few steps by using diethyl-L-tartrate for the starting material. In other side, this new compound, 4 was used to investigate the mechanism of asymmetric synthesis as a unsymmetrical ligand for Pd-catalyst to produce 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno[4,3-d]-(3aS,6aR)-oxazolidin-2-one. This ligand which was reacted in ratio of 4 times to palladium metal showed the amount of only 54% enantiomeric excess(ee) and 81% yield. This ee amount is not so high as the case of general C<sub>2</sub>-chiral ligands used in our lab. It seemed that this compound as a unsymmetrical ligand would had a similar Pd-complex intermediate to other C<sub>2</sub>-chiral ligand.

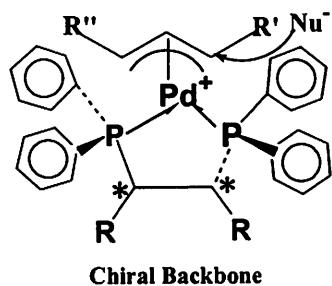
### I. 서 론

덩치가 큰 C<sub>2</sub>-손대칭 리간드를 여러 종류 합성하여 팔라듐 금속 화합물과 작용시켜 촉매로 활용하므로 비대칭 유기합성(chiral organic synthesis)을 위한 많은 연구가 수행되어 왔다.<sup>1-7</sup> Trost 등은 상기 연구에 대한 이론적인 규명은 물론 여

러 종류의 비대칭 유기화합물을 합성하였다.<sup>8-9</sup> 그는 이러한 C<sub>2</sub>-손대칭 리간드가 팔라듐 금속과 배위결합을 하므로, 상당히 큰 부피의 착물을 형성하고 넓은 입체적인 공간을 차지하므로 이때 빈 공간을 통해서 친핵체가 한 가지 방향으로만 도입되는 것으로 예상하여 높은 ee (high enantiomeric excess)상태의 생성물을 얻을 수 있다고 하였

Scheme 1.  $C_2$ -Chiral Phosphine Ligands

다.<sup>10</sup> 다음 scheme 1에 본 연구실에서 이미 사용하였던  $C_2$ -손대칭 포스핀류의 리간드를 나타내었으며, scheme 2에 Trost가 주장한 높은 ee 생성물을 얻기 위한 이론적인 뒷받침을 할 수 있는 근거를 제시하였다.<sup>11-13</sup>



Scheme 2. Complex Intermediate for Asymmetric Synthesis

Scheme 1에 나타낸 몇 종의  $C_2$ -손 대칭형 리간드는 팔라듐 화합물과 결합이 되었을 때 scheme 2와 같은 중간체를 생성시킬 것이다. 카이랄 골격 (chiral backbone)이 D-mannitol을 출발물질로 하였거나(I~III), dibenzyl을 골격(IV)으로 하는  $C_2$ -손 대칭형 리간드를 생성하였다.<sup>14</sup>

본 연구실에서는 scheme 2의 ligand와 유사한 몇 종의 ligand를 새로이 합성하여 1(R),4(S)-dihydroxycyclopent-2-ene과 p-toluenesulfonyl isocyanate를 반응물로 작용시켰고 tris (dibenzylideneacetone)dipalladium(0)-chloroform 착물과 같이 반응시켰다. 생성물인 1-(p-tolylsulfonyl) cyclopent-5-eno[4,3-d]-(3aS,6aR)-oxazolidin-2-one이 거울상 이성질체를 포함하는 내용에 대한 일련의 연구를 하여왔다.

본 연구에서는 카이랄 골격으로 diethyl tartrate를 출발물질로 이용하여 덩치가 큰 비대칭리간드 (unsymmetric ligand)를 새로이 합성하고자 한다. 여기에 팔라듐 화합물과 반응시켜 촉매로 이용하므로, 얻어지는 생성물 1-(p-tolylsulfonyl) cyclopent-5-eno-[4,3-d]-(3aS, 6aR)-oxazolidin-2-one의 입체이성질체에 대한 관계를 조사하여 그 반응 메카니즘을 밝히고, 비대칭 유기합성을 위한 리간드의 활용에 대해서도 조사하는 것이 본 연구의 목적이다.

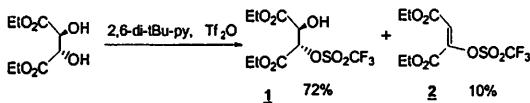
## II. 실험

### 시약 및 기기.

본 연구에 사용된 시약은 Aldrich, Merck사, 그리고 Strem사 제품이었다. 여러 종류의 용매도 Aldrich, Merck사 그리고 국산제품이었으며, potassium, sodium, CaH<sub>2</sub>등을 작용시키고 계속 환류시키면서 아르곤 가스를 불어주면서 중류된 것을 사용하였다. 생성물 분리를 위하여 사용한 chromatography-용 충진제는 silica gel 60(독일 Merck사 제품)이었다. 생성물을 확인하기 위해 사용한 기기들중 NMR은 <sup>1</sup>H-과 <sup>13</sup>C- 그리고 <sup>31</sup>P-을 측정하기 위하여 Bruker Digital Avance DRX 400, Varian XL-300, Varian Gemini 200 등의 몇 가지 종류를 동시에 이용하였다. Mass Spectra는 Kratos MS 9 KFA spectrometer를 사용하였다. 원소분석은 Carlo Erba Elemental Analyzer CHNS-O EA1108로부터 결정되었으며, 각 화합물의 용점(m.p)은 Thomas-Hoover 용점 측정기로 측정하였다. 또 선광성을 조사하

기 위한 편광계는 JASCO DIP-360(50 mm cell)을 사용하였다. 각 화합물의 주요 작용기를 확인하기 위하여 IR은 Nicolet 205 spectrometer를 이용하여 각각의 spectra를 얻었다.

#### Diethyl tartrate-monotriflate(1)의 생성



100ml Schlenk tube에 diethyl-L-tartrate 0.855 mL(5 mmol)과 30ml methylene chloride를 넣어서 녹인 후에 -78 °C로 냉각한 후에, triflic anhydride 0.84mL(5 mmol)를 주사기로 천천히 가한다. 5분 후에 계속해서 2,6-di-tert-butylpyridine 1.235 mL(5.5 mmol)를 가한다. 반응혼합물은 2 시간 동안 실온 까지 온도를 높인 후, 실온에서 계속해서 24시간 더 반응을 시킨다. 생성물은 실리카겔 판 크로마토그라피(30% ethylacetate/hexane)에 의해서 분리하였더니, 먼저 분리되는 부분이 화합물, 2로 확인되었고 무색 기름모양이며 465 mg(1.45 mmol, 48 %)의 수율로 얻어졌다.

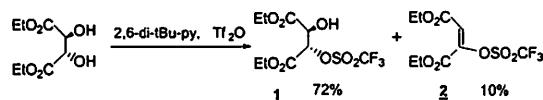
Monotriflate 1 : Rf = 0.5 (30% ethylacetate/hexane);  $[\alpha]_D = +32.1^\circ$  ( $c=1.11, \text{CH}_2\text{Cl}_2$ )

IR(neat film, from  $\text{CDCl}_3$  solution) : 3500, 2990, 1777, 1746, 1423, 1268, 1246, 1212, 1143, 1031, 926, 881  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) : δ 1.35(t,  $J=7.2$  Hz, 6H), 3.45(d,br,  $J=5.76$  Hz), 4.24(q,  $J=7.2$  Hz, 2H), 4.02–4.12(m, 4H), 4.37(q,  $J=7.2$  Hz, 2H), 4.84(dd,  $J=5.85, 1.51$  Hz, 1H), 5.46(d,  $J=1.97$  Hz, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) : δ 13.75, 13.82, 63.46, 63.49, 70.7, 76.4, 118.3(q,  $J_{\text{C,F}}=319.4$  Hz), 164.2, 169.1

#### Diethyl tartrate-vinyltriflate(2)의 생성 및 분리



100ml Schlenk tube에 diethyl-L-tartrate 0.513 mL(3 mmol)과 20ml methylene chloride를 넣어서 녹인 후에 -78 °C로 냉각한 후에, triflic anhydride 0.978mL(5.82 mmol)를 주사기로 천천히 가한다. 5분 후에 계속해서 2,6-di-tert-butylpyridine 4.041 mL(18 mmol)를 가한다. 반응혼합물은 2 시간 동안 실온까지 온도를 높인 후, 실온에서 계속해서 1시간 더 반응을 시킨다. 생성물은 실리카겔 판 크로마토그라피(30% ethylacetate/hexane)에 의해서 분리하였더니, 먼저 분리되는 부분이 화합물, 2로 확인되었고 무색 기름모양이며 465 mg(1.45 mmol, 48 %)의 수율로 얻어졌다. 다음으로 분리되는 성분이 화합물, 1이며 수율은 200 mg(0.59 mmol, 20%)이었다. 상기의 실험에 의해 화합물, 1을 우세하게 얻을 수 있었다.

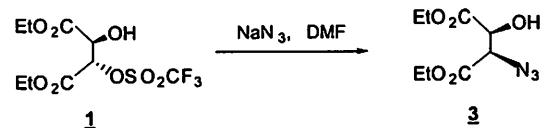
Vinyltriflate 2 : Rf = 0.73 (30% ethylacetate /hexane)

IR(neat film, from  $\text{CDCl}_3$  solution) : 2989, 1747(sh), 1732, 1669, 1434, 1275, 1212, 1140, 1080, 1030, 932, 859  $\text{cm}^{-1}$

$^1\text{H-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 300MHz) : δ 1.35(t,  $J=7.15$  Hz, 3H), 1.37(t,  $J=5.5$  Hz, 3H), 4.31(q,  $J=7.15$  Hz, 2H), 4.38(q,  $J=5.5$  Hz, 2H), 6.89(s, 1H)

$^{13}\text{C-NMR}$ ( $\text{CDCl}_3$ , 75MHz) : δ 13.65, 13.68, 62.24, 63.59, 118.3(q,  $J_{\text{C,F}}=320.8$  Hz), 120.8, 143, 159.27, 161.5

#### Diethyl tartrate-azidoalcohol(3)의 생성



100ml Schlenk tube에 diethyl-L-tartrate monotroiflate, 1 1.225 g(3.62 mmol)과 10mL dimethylformamide를 가하여 녹인 후에 실온에서 다시 sodiumazide 2.35 g(36 mmol)를 혼합한다. 반응혼합물은 12 시간 동안 교반시켜준다. 반응물은 70 mL methylene chloride로 끓힌 후 50 mL 물로 네 차례 씻어주고  $\text{MgSO}_4$ 로 수분을

제거시킨다. 용매는 evaporator로 제거하면 생성물, 3이 무색 기름상태로 얻어진다. 수율은 0.704 g (84%)였다.

Azide 3 : Rf = 0.43 (30% ethylacetate/hexane);

$$[\alpha]_D = +5.7^\circ \text{ (c=0.96, CH}_2\text{Cl}_2)$$

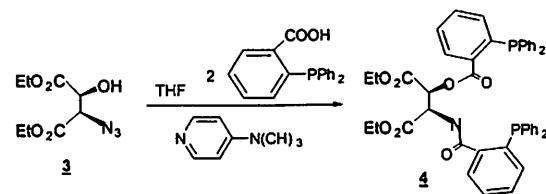
IR(neat film, from CDCl<sub>3</sub> solution) : 3486, 2988, 2119, 1747, 1374, 1208, 1112, 1030, 862 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 300MHz) : δ 1.31(t, J=6.2 Hz, 6H), 3.43(s, br, 1H), 4.22 - 4.38(m, 4H), 4.65(s, br, 1H)

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 75MHz) : δ 13.98(2CH<sub>3</sub>), 62.34, 62.60, 64.36, 72.0, 166.90, 170.74

MS(70eV) : cal. M<sup>+</sup>-CO<sub>2</sub>Et 158.056566, found 158.056594

### 2-Diphenylphosphinobenzoylamido-3-Diphenylphosphino-benzoate-1,4-diethylbutanoate(4)의 합성



50mL Schlenk tube에 200 mg(0.865 mmol)의 azide 화합물(3)과 362 mg(1.384 mmol) triphenylphosphane을 넣고 3 mL THF를 용매로, 또 0.036 mL(2 mmol)의 물(N<sub>2</sub> 분해용)을 가한다. 반응용액은 실온에서 18 시간 교반시킨다. 모든 휘발성 성분을 증발시킨 후 (약 2 시간 동안 vacuum pump를 이용), 증발 잔유물은 10 mL methylene chloride에 녹이고 574 mg(1.82 mmol) 2-diphenylphosphinobenzoic acid과 5.28 mg(0.0432 mmol) 4-N,N-dimethylaminopyridine을 가하여 작용시킨 후 392.6 mg(1.90 mmol)의 dicyclohexylcarbodiimide를 넣는다. 실온에서 하루 동안 반응시키면 황색 백묵 모양으로 생성물이 얻어졌으며, 용매를 분리한 후에 20% ethylacetate/hexane을 용매로 실리카겔 관 크로마토그래피에 의해서

생성물을 정제하였다. 수율은 380 mg(56%) 무색 결정이었고, m.p는 83°C였다. Rf=0.27 (30% ethylacetate-hexane), [α]<sub>D</sub>=16.95 °(c=2.4, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>) IR(neat film from CDCl<sub>3</sub> solution) : 3360, 3055,

2983, 1760, 1756, 1747, 1673, 1668, 1586, 1550, 1505, 1435, 1373, 1278, 1242, 1211, 1109, 1028, 911, 744, 733, 697 cm<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>H-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 400MHz) : δ 1.24(t, J=4.06, 6H), 4.20(m, 4H), 5.47(dd, J=8.56, 2.79 Hz, 1H), 6.98(m, 2H), 7.07-7.41(m, 25H), 7.65(m, 1H), 8.12(m, 1H)

<sup>13</sup>C-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 100MHz) : δ 13.91, 52.95, 61.80, 62.11, 72.95, 127.78, 127.84, 128.25, 128.34, 128.47, 128.53, 128.59, 130.41, 131.10, 132.28, 133.42, 133.45, 133.56, 133.69, 133.72, 133.84, 134.19, 134.44, 136.97, 137.12, 137.25, 137.31, 137.39, 139.75, 140.06, 140.4, 165.01, 166.11, 167.8, 168.19

<sup>31</sup>P-NMR(CDCl<sub>3</sub>, 161.9MHz) : δ -5.41(s), -9.37(s)

Elemental Analysis : C<sub>46</sub>H<sub>41</sub>NO<sub>7</sub>P<sub>2</sub> (Mw= 781.77992)

calculated (%)	C	70.67	H	5.29	N	1.79
found (%)	C	70.88	H	5.17	N	1.81

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

새로운 리간드 화합물 4, 2-diphenylphosphinobenzoylamido-3-diphenylphosphinobenzoate-1,4-diethylbutanoate를 이용하여, 출발물질인 cyclopentoxazolidin-2-one에 팔라듐 화합물과 같이 작용시켜 거울상이성질체의 생성으로 ee 률을 확인하기 위하여 다음과 같은 실험을 수행하였다.<sup>16</sup>

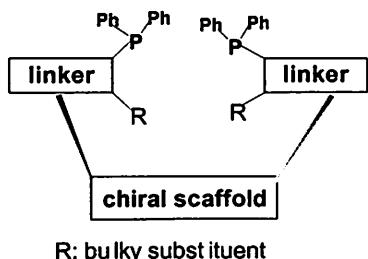
50ml Schlenk tube에 1(R),4(S)-dihydroxycyclopent-2-ene 0.6g(6 mmol)과 무수 THF 5mL를 가한 후에 p-toluenesulfonyl isocyanate 1.89 mL(12.3 mmol)를 방울로 가하면서 반응시켰다. 다른 50mL Schlenk tube를 Ar가스로 채운 후에 화합물 4 0.63g(0.6 mmol)과 tris-(dibenzylideneacetone)dipalladium (0)-chloroform 착물 156 mg(0.15

mmol)을 넣은 후에 감압하였다가 Ar가스를 불어넣고, 무수 THF 5mL를 용매로 작용시켰다. 이 용액을 1시간 동안 교반하면 반응물은 밝은 오렌지색으로 바뀌게 되고 0°C로 냉각시킨 후에, 상기의 biscarbamate 용액을 방울로 떨어뜨려 반응시켰다. 완전히 가하고, 0°C에서 3시간 동안 교반 시키면 반응이 일어난다. 용매를 제거하고 남는 찌꺼기는 실리카겔 관 크로마토그래피(20% ethylacetate-hexane 용매)에 의해서 생성물을 분리하였으며, 이 화합물을 확인하기 위한 분석 결과는 문헌치와 일치하였다. 수율은 1.35 g (81%)였다.  $[\alpha]_D = -76.3^\circ$  (c = 2.68 methylene chloride 용매)였으며, ee 량은 54%이었다.

### III. 결과 및 고찰

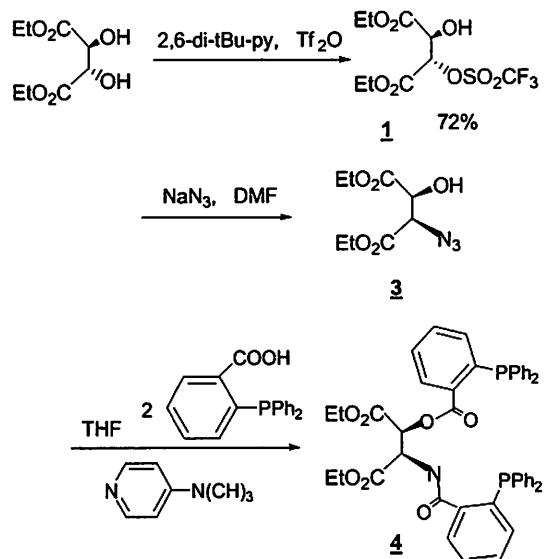
#### 복잡한 비대칭형 리간드, 4의 합성

본 연구실에서는 다년간 새로운 비대칭형 리간드의 합성과 이들 리간드들이 촉매로써 사용될 때, 바람직한 높은 ee 화합물을 생성하는지에 초점을 맞추어 많은 연구를 수행하였고 실제로 사용 가능성이 높은 몇 종류의 리간드를 생성하기도 하였다. 그렇지만 아직도 이러한 연구에 대한 확실한 반응 메카니즘이 결정되지 않은 상태이다.<sup>8-9,10-14</sup> 따라서 본 연구에서는 비대칭형 리간드의 작용을 좀 더 구체적으로 밝히기 위하여 Scheme 3과 4와 같은 틀에서 연결 부분(linker)의 산소와 질소에 비교적 둉치가 큰 치환체를 결합시키므로 Trost 이론과 비교를 하고자 한다. 새로운 복잡한 비대칭형의 리간드를 생성하기 위해서는 ethyltartrate를 출발물질로 하여 몇 단계의 반응을 거쳐 합성하였다. 다음 Scheme 5에



Scheme 3. Framework of C<sub>2</sub>-Chiral Ligand

ethyltartrate를 출발물질로 하여 비대칭리간드를 합성하는 전과정(total synthesis)을 나타내었다. 이 화합물을 생성하기 위하여 본 연구실에서 이미 수행하였던 연구와 유사한 과정과 반응을 거치게 된다.<sup>17,18</sup>

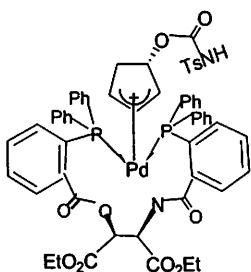


Scheme 4. Total Synthesis of unsymmetrical Ligand 4

#### 생성을 4를 리간드로 이용한

#### 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno(4,3-d)-(3aS, 6aR)-oxazolidin-2-one의 생성

본 연구실에서 이미 합성했던 여러 종류의 C<sub>2</sub>-손대칭형 리간드를 이용하여 1(R),4(S)-dihydroxycyclopent-2-ene를 출발물질로 하여 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno-[4,3-d]-(3aS, 6aR)-oxazolidin-2-one을 생성하였으며 ee 량을 조사하였다.<sup>19</sup> 본 연구에서도 같은 조건에서 유사한 내용의 실험을 수행하였다. 이미 조사된 결과와 비교하므로, 새로운 리간드의 작용과 메카니즘에 대한 확인으로 본 연구의 목적에 부합되는지를 알아보고자 한다. 본 연구의 가능한 반응 메카니즘은 다음 Scheme 5와 같이 나타낼 수 있다고 생각된다.



Scheme 5. Expected Pd Complex Intermediate of Ligand 4

리간드 4와 형성되는 예상되는 착물 중간체를 보면 친핵체(-OCON<sup>-</sup>Ts)가 allyl형의 탄소를 공격하는 방향은 이미 조사된 결과와도 어긋나지 않게 거의 일정할 것으로 예상된다.<sup>8-9</sup> 이전 연구에서 III와 같은 C<sub>2</sub>-손대칭 리간드 내에 상당히 부피가 큰 tert-butyl-triazaphosphol이 공간을 차지하는 경우와 본 연구에서 친핵체 공격 방향이 다를 것으로 생각하였다.<sup>11-13</sup> 그렇지만 본 연구의 결과에 의한 생성물, 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno-[4,3-d]-(3aS,6aR)-oxazolidin-2-one이 81%의 수율과 54%의 ee 량으로 얻어졌다. 따라서 얻어진 ee 량이 같은 조건에서 III의 경우와 비교하였을 때 약간 우세하였으며, 이것은 이러한 비대칭 리간드가 C<sub>2</sub>-손대칭의 경우와 비슷한 팔라듐 착물 중간체(scheme 5)를 거쳐가는 것으로 예상할 수 있다.

#### IV. 결 론

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

첫째 본 연구에서는 새로운 비대칭형 리간드 화합물을 합성하였다. 새로운 리간드를 합성하기 위하여 diethyl-L-tartrate를 출발물질로 이용하여 triflicanhydride를 반응시켜 diethyl tartrate-monotriflate(1)를 72%의 수율로 얻었다. 다음은 여기에 sodiumazide를 반응시켜 diethyl tartrate-azidoalcohol(3)를 84%의 수율로 생성하였다. 계속해

서 2-diphenylphosphinobenzoic acid를 작용시켜 새로운 비대칭형 화합물, 2-diphenylphosphinobenzoyl-amido-3-diphenylphosphinobenzoate-1,4-diethylbutanodiate(4)를 56%의 수율로 얻었다. m.p는 83°C이었고, [α]<sub>D</sub>=16.95 °(c=2.4, CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>)이었다.

둘째 이 리간드는 연결부분에 덩치가 큰 치환체를 결합시키므로, 촉매의 작용에 의한 팔라듐 착물 중간체에 친핵체가 어떻게 공격하는지를 조사하였다. 이 연구의 결과는 친핵체가 공격하는 방법은 이미 연구하였던 방법과 같이, 입체장애에 많은 영향을 받는다는 결론을 얻었다.

셋째 본 연구실에서 많이 연구했던 C<sub>2</sub>-손 대칭 리간드와는 다른 비대칭 리간드를 사용하여 생성되는 화합물의 입체구조에 의한 ee 량을 조사하였다. 본 연구에서 새로이 합성된 비대칭 리간드와 1(R),4(S)-dihydroxycyclopent-2-ene과 p-toluenesulfonyl isocyanate 와 그리고 tris (dibenzylideneacetone) dipalladium(0)-chloroform 착물을 반응시켰으며, 생성되는 1-(p-tolylsulfonyl)cyclopent-5-eno[4,3-d]-(3aS,6aR)-oxazolidin-2-one이 거울상 이성질 관계로 얻어졌다. 이때 리간드와 팔라듐 금속을 4:1의 비율로 작용시켰더니 측정된 ee 량은 54%였고, 생성물의 수율은 81%였다. 선광성의 특성으로 [α]<sub>D</sub> = -76.3 °(c = 2.68 methylene chloride 용매)이었다. 이 반응에서 리간드를 과량으로 작용하였을 때는 일반적인 C<sub>2</sub>-리간드와 팔라듐 금속과 거쳐가는 착물 중간체가 유사한 것으로 예상할 수 있다. 따라서 친핵체 공격이 한 가지 방향으로만 특징 지워져 ee 량 비슷하다고 본다. 이전 연구에서 더욱 복잡하고 덩치가 큰 치환체를 갖는 C<sub>2</sub>-손 대칭 리간드를 과량으로 사용할 경우, 팔라듐 금속과 이중 착물 중간체를 형성하여 친핵체 공격을 차단한다고 생각되어 얻어지는 화합물의 입체특이성에 대한 ee 량은 낮아 질 수 있다는 결론을 얻었다.

#### 인용문헌

1. a) Henry, P. M.; 'Palladium Catalyzed Oxidation of Hydrocarbons'; Reidel Reidel Dordrecht, 1980 b) Heck, R. F.: In 'Palladium

- Reagents in Organic Synthesis*; Academic Press, New York, 1985 c) Maitlis, P. M.; 'The Organic Chemistry of Palladium', Academic Press, New York, 1971 d) Achavarren, A. M.; Tueting, D. R; Stille, J. K. *J. Am. Chem. Soc.*, 1988, 110, 4039
2. a) Hayashi, T.; Yamamoto, A.; Hagihara, T.; Ito, Y., *Tetrahedron Lett.* 1986, 27, 191 b) Hayashi, T.; Yamamoto, A.; Ito, Y.; Nishioka, E.; Miura, H.; Yanagi, K., *J. Am. Chem. Soc.*, 1989, 111, 6301
  3. a) Leutenegger, U.; Umbricht, G.; Fahrni, C.; Matt, P.V.; Pfaltz, A., *Tetrahedron*, 1992, 48, 2143 b) Matt, P.v.; Pfaltz, A., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1993, 32, 566 c) Sprinz, J.; Helmchen, G., *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 1769 d) Peter, von Matt; Lloyd-Jones, Guy. C.; Minidis, A. B. E.; Pfaltz, A.; Macko, L.; Neuburger, M.; Zehnder, m.; Ruegger, H.; Pregosin, P. S., *Helv. Chim. Acta*, 1995, 78, 265
  4. a) Noyori, R.; Kitamura, M. in *Modern Synthetic Methods*, R. Scheffold, Ed., Springer, 1989. b) Brunner, H. *Topics in Stereochemistry*, 1988, 18, 129
  5. a) Finn, M.G.; Sharpless, K.B. in *Asymmetric Synthesis*, J.D. Morrison, Ed. Academic Press, 1985, Vol.5, 247 b) Trost, B. M., 'Comprehensive Organic Synthesis' Pergamon Press, Oxford, 1991
  6. Sharpless, K.B.; et al., *J. Org. Chem.* 1992, 57, 2768
  7. Uozumi, Y.; Lee, S.Y.; Hayashi, T. *Tetrahedron Lett.* 1993, 34, 7185
  8. Trost, B. M.; Van Vranken, D. L.; Bingel, C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1992, 114, 9327
  9. Trost, B. M.; Van Vranken, D. L. *J. Am. Chem. Soc.*, 1993, 115, 444
  10. a) Trost, B. M. *Tetrahedron*, 1977, 33, 2615 b) Trost, B. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1989, 28, 1173 c) Trost, B. M. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1995, 34, 259 d) Trost, B. M.; Strege, P. E.; Weber, L.; Fullerton, T. J.; Dietsche, T. *J. J. Am. Chem. Soc.*, 1978, 100, 3407
  11. a) Trost, B. M.; Breit, V.; Organ, M. G., *Tetrahedron Lett.*, 1994, 32, 5817 b) Uhm, J. K.; An, H. W.; Kim, H. R. *J Inst. Nat. Sci.*, (Keimyung Univ.), 1995, 14, 47
  12. a) Trost, B. M.; Bunt, R. C. *J. Am. Chem. Soc.*, 1994, 116, 4089 b) Hegedus, L.S., *Angew. Chem. Int. Ed. Eng.*, 1988, 27, 1113
  13. Trost, B. M.; Breit, B.; Peukert, S.; Zambrano, J.; Ziller, J.W., *Angew. Chem., Int. Ed. Eng.*, 1995, 34, 2386
  14. Uhm, J. K.; Lee, J. H., *J. Inst. Nat. Sci.* (Keimyung University) 2002, 21, 13
  15. Regitz, M.; Scherer, O. J. 'Multiple Bonds and Low Coordination in Phosphorus Chemistry', Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 1990
  16. a) Uhm, J. K. *J. Inst. Nat. Sci.(Keimyung University)* 2001, 20, 13 b) Uhm, J. K.; Kim, J. J. *J. Inst. Nat. Sci.(Keimyung University)* 2000, 19, 19 c) Uhm, J.K. *J. Inst. Nat. Sci.(Keimyung University)* 1999, 18, 17
  17. Canelli, G.; Manescalchi, F.; Martelli, G.; Panunzio, M.; Plessi, L., *Tetrahedron Lett.*, 1985, 28, 3369
  18. Sugiyama, T.; Sugawara, H.; Watanabe, M.; Yamashita, K., *Agri. Biol. Chem.*, 1984, 48, 1841
  19. a) Uhm, J. K.; Yu, T. S. *J. Inst. Nat. Sci.(Keimyung University)* 1999, 19, 27 b) Uhm, J. K.; Trost, B. M. *J Inst. Nat. Sci.*, (Keimyung Univ.) 1996, 15, 5

## 소수성 표면에서 $\beta$ -casein 흡착에 대한 QCM 연구 II: pH와 음이온의 영향

박수경 · 이명희 · 정진갑  
계명대학교 자연과학대학 화학과

## QCM Study of $\beta$ -casein Adsorption on the Hydrophobic Surface II: Effect of pH and Anions

Su-Kyung Park · Myunghee Lee · and Chinkap Chung  
Department of Chemistry, Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

**요약.** 소수성 표면에서  $\beta$ -카세인 흡착 특성을 QCM을 이용하여 연구하였다. 수정 결정에 입혀진 금 표면의 1-옥타데칸ти올 자기조립단분자막은 흡착을 위한 소수성 표면으로 이용되었다.  $\beta$ -카세인의 흡착 특성은 용액의 조건을 달리하여 관찰하였다. 대부분의 경우  $\beta$ -카세인이 단분자막을 형성되는 것이 관찰되었다. 염의 영향으로 미셀 형성이 억제되는 것을 확인하였다. 용액의 pH는 흡착 속도에 관여하며, 흡착량에는 무관함을 알 수 있었다. 또한 용액 내 함유된 양이온과는 달리, 음이온의 영향은 그 종류와 관계없이 크지 않음을 알 수 있었다.

**주제어.** 흡착,  $\beta$ -카세인, 수정 결정 미세저울, 음이온, pH

**Abstract.** QCM has been used to characterize the adsorption of  $\beta$ -casein on a hydrophobic surface. Self assembled monolayer of 1-octadecanethiol on a gold coated quartz crystal has been served as a hydrophobic surface. The adsorption characteristics of  $\beta$ -casein has been studied in different solution conditions. The monolayer formation of the  $\beta$ -casein has been observed in most of the cases. Added salt suppressed the micelle formation. The pH of the solution affected the adsorption speed, but not the adsorption quantity. The anions in the solution did not affect the adsorption characteristics quite contrary to the cations.

### I. 서 론

최근 단백질 흡착과 흡착막에 관한 연구가 많이 행해지고 있으며 이를 위해서는 단백질 콜로이드 또는 응집의 형성과 안정성에 영향을 주는 물리적 화학적 요인들을 이해하는 것이 필수적이다.<sup>1</sup>

단백질 흡착 현상은 다양한 연구 장비를 사용함으로써 흡착된 물질의 양과 구조변화에 대한 정보를 얻을 수 있다. 본 논문에서는 흡착된 단백질의 양을 측정하기 위해 QCM(quartz crystal microbalance)를 사용하였다. QCM의 기본 원리

는 압전효과이며, 높은 민감도와 빠른 응답 때문에, QCM 방법은 표면 현상과 관련된 활발한 변화를 연구하는데 적합하다.<sup>2</sup>

단백질 흡착과 관련하여 많이 연구되는 물질로 카세인을 들 수 있으며, 그 중에서도  $\beta$ -카세인의 연구가 가장 활발하게 진행되고 있다. 이는  $\beta$ -카세인이 표면 활성이 매우 강한 단백질이며, 단백질의 흡착은 표면 활성 분자와 관련되어 있기 때문이다.  $\beta$ -카세인의 표면 활성은  $\beta$ -카세인이 지닌 양쪽성에 기인한다. 즉, 구조상  $\beta$ -카세인은 친수성기와 소수성기를 한 분자 내에 지니고 있다.

$\beta$ -카세인의 흡착은 첨가되는 이온의 종류와 농도뿐만 아니라 표면 상태에 따라서 그 흡착 정도가 달라진다. 각 표면에서의 두드러지는 차이점은 흡착 속도와 최종 흡착량이 일정해지는 범위이다. 친수성 표면에서의 흡착은 초기에는 소수성 표면에서와 비슷한 경향을 보이다가 시간이 경과함에 따라 흡착 속도는 점차 느려진다. 많은 경우 소수성 표면에서는 흡착 후 1시간 이내에 흡착량이 일정해지는 반면에 친수성 표면에서는 흡착 후 2시간이 지나도 흡착량이 일정해지지 않는다. 이는 흡착 과정 동안 흡착막 내에서 단백질 분자의 재배열이 일어나는 것을 암시한다. 단백질은 소수성 표면에서 더 균일하고 빠른 흡착이 이루어지기 때문에 금속 표면에 단백질을 균일하게 흡착시키기 위해 친수성인 금속 표면을 소수성으로 변형하는 것이 필수적이다. 따라서  $\beta$ -카세인 흡착 연구는 주로 유기 고분자와 같은 소수성 고체 표면을 사용하여 연구되었다.<sup>3</sup>

소수성 표면으로의 변형을 위해 금속 표면에 말단기가 소수성인 유기 화합물을 단분자층이나 다분자층으로 표면에 박막으로 입혀 만들 수 있다. 이들 유기 박막에 관한 연구는 광통신 등에 이용될 수 있는 비선형 광학 물질, 분자 단위에서의 제어가 가능한 미세 전자 소자(micro electronic device)의 재료 등 소위 첨단 과학 분야뿐만 아니라 금속 부식을 방지하기 위한 보호피막, 화학 수식 전극(chemically modified electrode), 접착 현상, 윤활 작용, 인공 심장 등의 인공 장기의 생체 내 거부 반응 이해 등 아주 넓은 영역에서 행해지고 있다.<sup>4-8</sup>

우리는 이전 논문에서 금 표면에 형성된 알칸티올의 SAM(self assembled monolayer)에서  $\beta$ -카세인 흡착에 관여하는 이온세기와 양이온의 영향을 QCM을 이용하여 논의하였다.<sup>9</sup> 이 논문에서는  $\beta$ -카세인 흡착에 관여하는 용액의 pH와 음이온의 영향을 QCM을 이용하여 연구하였다.

## II. 실험

### 1. 시약

$\beta$ -카세인은 Sigma사에서 구입하여 사용 전

-15°C 이하의 온도에 보관하였다.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SH}$  (98.0%)는 Aldrich사에서 구입하여 재결정법으로 정제하여 사용하였다.

Trizma 완충용액은 Trizma base(min. 99.9%)와 Trizma hydrochloride(min. 99%)를 Aldrich 사에서 구입하여 제조하였고, 물은 1차 중류된 것을 Millipore Filtration System으로 탈염하여 사용하였다. 그 외의 시약은 특별한 언급이 없는 한, 특급시약을 더 이상의 정제 없이 그대로 사용하였다.

### 2. 기기

Fig. 1에 나타낸 QCM 기기는 전극, EQCM 장비(model CHI440, CH Instrument), 주문 제작한 cell로 구성된다.

QCM 측정이 온도에 매우 민감하여 QCM cell과 기준 진동자는 직접 주문 제작한 항온 cage 안에 두었다.

AT-cut 수정 결정(고유진동수; 8MHz, 특정 진동수의 변화;  $\Delta m / df = 1.38 \text{ ng/Hz}$ , 수정 결정에 입혀진 금 표면적;  $0.2 \text{ cm}^2$ )에 입혀진 금 전극을 사용하였다. QCM 신호의 안정성을 증가시키고, 흡착 과정에서 용액의 교반의 영향을 피하기 위해 테플론 재질의 QCM cell의 옆면에 전극을 배치하였다. 결정 표면에 흡착되거나 탈착된 질량은 결정의 고유진동수의 변화로 나타난다. 흡착량과 진동수 관계는 Sauerbrey 식( $\Delta F = -2F_0^2 \Delta m / A(p_q \cdot \mu_q)^{1/2}$ )으로 나타난다.<sup>10</sup>

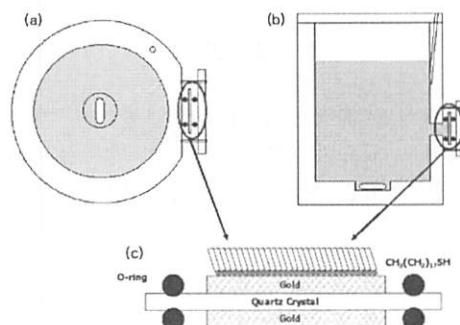


Fig. 1 A scheme of the QCM cell; (a) the top side, (b) the front side, (c) the expanded diagram of the Quartz Crystal section.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. SAM의 형성

Fig. 2는  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SH}$ 의 단분자막 형성을 보여준다. QCM cell에 에탄을 49mL를 채우고 magnetic stirrer로 교반하였다.

초기 실험에서 magnetic stirrer를 사용하여 용액을 교반하여도 진동수의 변화에는 영향을 주지 않음을 확인하였고, 실험 전 과정에서 magnetic stirrer를 사용하였다. 안정한 상태임을 확인 후 10mM의  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SH}$  용액 1mL를 주사기로 주입하였다. 안정화에 필요한 시간은 평균 4시간이며, 이때 잡음(noise)에 의한 진동수 변화는 약  $\pm 0.5\text{Hz}$ 이다.

측정된 진동수의 변화는 약 14Hz이며 이는 19.3ng에 해당된다.  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SH}$ 의 몰 분자량 286.57g/mol를 고려하면  $6.7 \times 10^{11}\text{mole}$  즉,  $4 \times 10^{13}$  개의 분자가 SAM을 형성하고 있다. 일반적으로 알려진 SAM을 형성하는 분자의 밀도 ( $1 \times 10^{13}\text{ molecules/cm}^2$ )로부터  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SH}$ 이 단분자막을 형성함을 확인 할 수 있다.<sup>11</sup>

SAM 형성 과정에서 에탄을 자체에 의해 나타나는 진동수의 변화는 0.33Hz으로 noise에 의한 영향과 크게 구분되지 않기 때문에 용매로 사용된 에탄올의 영향은 고려하지 않았다.

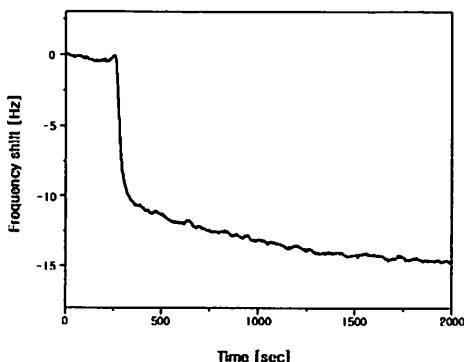


Fig. 2 QCM result showing the formation of  $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SH}$  SAM on the gold surface.

#### 2. 염(salt)의 영향

Fig. 3은  $\beta$ -카세인 흡착에 대한 염의 영향을

보여준다. Fig. 3(a)는 염을 첨가하지 않은 경우이며, Fig. 3(b)는 염을 첨가한 경우를 나타낸 것이다. 이 때 첨가한 염은 0.6M NaCl, 단백질 농도는 0.1mg/mL, 그리고 용액의 pH는 7이다. Fig. 3(a)에서 염을 첨가하지 않은 경우, 시간 경과에 따라 감소하던 진동수가 일정 시간 이후 다시 증가하는 “overshoot” 현상을 볼 수 있다. “overshoot” 현상은 명확하지는 않지만 구조상 안정한 미셀 형성에 의한 것으로 생각되며, 이전 논문에서 단백질의 임계 미셀 농도(0.5mg/mL) 이상에서는 “overshoot” 현상이 사라지는 것을 확인하였다.<sup>9</sup>

Fig. 3(b) 염을 첨가한 경우, “overshoot” 현상이 사라짐을 볼 수 있다. 이는 임계 미셀 농도 이하에서도 염의 첨가로 “overshoot” 현상이 없앨 수 있음을 의미한다. 첨가한 염의 영향으로  $\beta$ -카세인이 용액 내에서 미셀을 형성하지 않고, 단위체로 존재하여 그 결과 단분자막 형태로 흡착됨을 확인 할 수 있다.

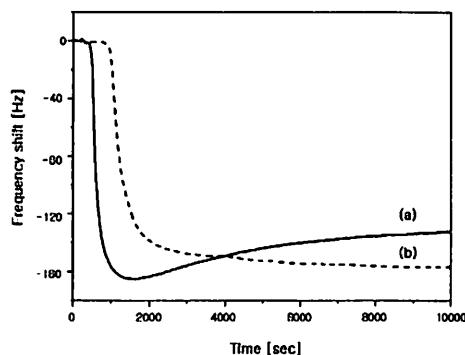


Fig. 3 The effect of salt on the adsorption of  $\beta$ -casein;  $\beta$ -casein concentration 0.1mg/mL, (a) the case of no added salt, (b) the case of added salt.

#### 3. pH의 영향

Fig. 4는 (a) pH 11, (b) pH 6에서  $\beta$ -카세인 흡착 특성을 보여준다. pH 6에서는 단백질 주입 후, 빠른 진동수 변화를 보이며, 약간의 “overshoot” 현상을 나타낸다. 카세인의 등전점은 pH 4.6부근이며, 이 pH에서 카세인은 전하를 띠지 않아 용액 내에서 침전을 형성하게 된다. 등전점보다 높

은 pH에서 카세인은 잘 용해되고, 경우에 따라서 미셀을 형성하기도 한다. 염의 실험에서도 알 수 있듯이, 미셀 형성은 단백질 흡착 속도를 증가시킨다. 용액의 pH 11에서는 일반적인 흡착 곡선을 나타낸다. 일정 시간이 지나면 더 이상의 진동수 변화가 나타나지 않고 140 Hz부근으로 수렴하는 것을 볼 수 있다. 이때 흡착량은 Sauerbrey식에 대입하면 약  $9.66 \text{ mg/m}^2$ 이다. 용액의 pH는 미셀 형성에 관여하여 흡착 속도에만 영향을 줄 뿐 최종 흡착량에는 영향을 주지 않는 것으로 생각된다.

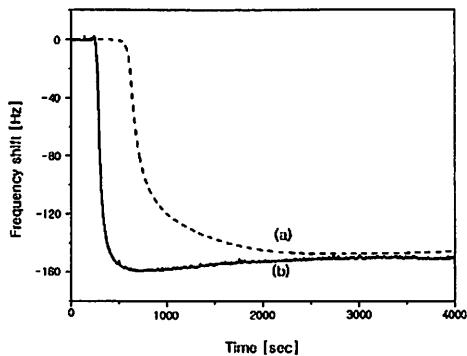


Fig. 4 The effect of pH on the adsorption of  $\beta$ -casein;  $\beta$ -casein concentration  $0.1 \text{ mg/mL}$ , (a) pH 11 buffer, (b) pH 6 buffer.

#### 4. 음이온의 영향

Fig. 5, Fig. 6은 NaCl, NaNO<sub>3</sub> 두 음이온을 이용한  $\beta$ -카세인 흡착 특성을 보여준다. 동일한 실험조건에서 두 음이온을 첨가한 용액에서의 단백질 흡착은 유사한 거동을 나타낸다. 즉, 1) 낮은 이온 농도에서 “overshoot” 현상이 보이며, 이온 농도가 증가함에 따라 “overshoot” 현상이 서서히 사라지는 것을 볼 수 있다. 2) 두 경우 모두 매우 빠른 흡착 속도를 나타낸다. 3) 일정 시간이 지나면 더 이상 진동수 변화가 나타나지 않고 150Hz부근으로 수렴하는 것을 볼 수 있다. 평균 흡착량은 흡착량과 고유 진동수 변화의 관계로부터 측정한다. 알려진 소수성 표면에서  $\beta$ -카세인의 흡착량은 약  $12.0 \text{ mg/m}^2$ 이다. 이 값은 실험에서 측정한 값 약  $10.35 \text{ mg/m}^2$ 과 비슷하다. QCM의 진동수 변화는 전극표면에 흡착된 물질

의 질량을 반영하며, 측정된 질량은 흡착막의 용매 분자를 포함한다. 예상보다 더 크게 나타난 진동수 변화는 흡착막이 단순하고 균일하지 않을 수도 있다는 것을 암시한다. 흡착막의 불균등 함은 단백질 분자의 양쪽성 특성과 용매 영향에 의한 것으로 생각된다.

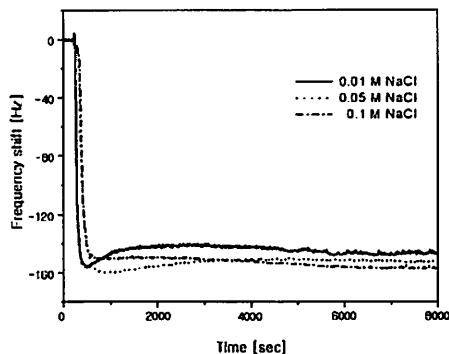


Fig. 5 Adsorption kinetics of  $\beta$ -casein on the hydrophobic surface at different NaCl concentrations;  $\beta$ -casein concentration  $0.1 \text{ mg/mL}$ , pH 7 buffer.

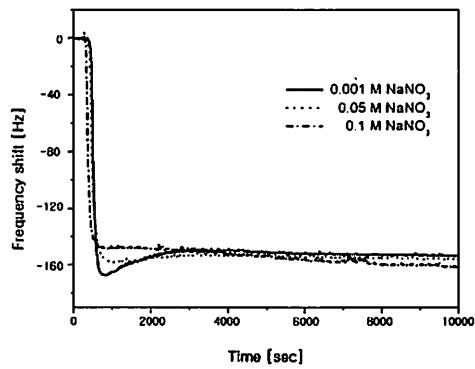


Fig. 6 Adsorption kinetics of  $\beta$ -casein on the hydrophobic surface at different NaNO<sub>3</sub> concentrations;  $\beta$ -casein concentration  $0.1 \text{ mg/mL}$ , pH

#### IV. 결 론

$\beta$ -카세인은 양쪽성 단백질이며, 이러한 정전기적 특성이 흡착에 중요한 영향을 준다. QCM 방법으로 단백질 구조변화로부터 야기된 흡착량 변화를 측정한다. 용매 분자 흡착은 QCM 측정

에 영향을 주지만, 그 변화가 매우 작아 정확한 흡착량 측정이 어렵다.

그러나 QCM 방법은 측정 시간이 매우 짧아 활발한 흡착에서의 속도론 연구가 가능하다. 첨가된 염은 단백질 구조와 특성을 변화시켜 흡착에 영향을 준다. 미셀의 형성은 흡착 속도를 증가시킨다. 용액의 pH는 흡착 속도에만 영향을 줄뿐 최종 흡착량에는 영향을 주지 않는다. 일가음이온의 종류와 농도 변화는 단백질 최종 흡착량과 흡착 속도에 미세한 영향을 주거나, 거의 영향을 미치지 않음을 알 수 있다.

### 참고문헌

- Clasesson, P. M.; Blomberg, E.; Froberg, J. C.; Nylander, T.; Arnebrnt, T. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1995, 57, 162.
- Janshoff, A.; Galla, H.-J.; Steinem, C. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2000, 39, 4004.
- Nylander, T.; Tiberg, F.; Su, T.-J.; Lu, J. R.; Thomas, R. K. *Biomacromolecules* 2001, 2, 278.
- Bain, C. D.; Trouton, E. B.; Tao, Y. T.; Evall, J.; Whitesides, G. M.; Nuzzo, R. G. *J. Am. Chem. Soc.* 1989, 111, 321.
- Porter, M. D.; Bright, T. B.; Allara, D. L.; Chidsey, C. E. D. *J. Am. Chem. Soc.* 1987, 109, 3559.
- Nuzzo, R. G.; Dubois, L. H.; Allara, D. L. *J. Am. Chem. Soc.* 1990, 112, 558.
- Sabatini, E.; Rubinstein, I.; Maoz, R.; Sagiv, J. *J. Electroanal. Chem.* 1987, 219, 365.
- Swalen, J. D.; Allara, D. L.; Andrade, J. B.; Chandross, E. A.; Garoff, S.; Israelachvili, J.; McCarthy, T. J.; Murray, R.; Pease, R. F.; Rabolt, J. F.; Wynne, K. J.; Yu, H. *Langmuir* 1987, 3, 932.
- M. Lee; S. K. Park; C. Chung; H. Kim *Bull. Korean Chem. Soc.* 2004, 25, 1031.
- Crickert, J.; Brecht, A.; Gopel, W. *Biosensors Bioelectronics* 1997, 12, 567.
- N. K. Chaki; K. Vijayamohanan *Biosensors Bioelectronics* 2002, 17, 1.

**Tetragnatha shinanoensis Okuma and Chikuni, 1978,  
a Tetragnathid Spider New to Korea  
(Araneae: Tetragnathidae)**

Bo-Keun Seo

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

한국미기록종, 미녀갈거미(거미목: 갈거미과)의 기재

서보근

계명대학교 자연과학대학 식품가공학과

**요약.** 여러 산지에서 채집된 갈거미과의 1종인 미녀갈거미(신칭)(*Tetragnatha shinanoensis* Okuma & Chikuni, 1978)를 한국미기록종으로 기재한다.

**Abstract.** A tetragnathid species, *Tetragnatha shinanoensis* Okuma & Chikuni, 1978, collected from several mountain districts is described with illustrations as new to Korean spider fauna.

## Introduction

*Tetragnatha* spiders have an elongate to tubular-shaped abdomen. Carapace is slightly elongate and weakly sclerotized. Most *Tetragnatha* species are found near water.

Their orb-web ranges from horizontal to vertical (Levi, 1981).

Eleven species of this genus have been reported in Korean spider fauna (Platnick, 2007): *caudicula*, *extensa*, *lauta*, *lea*, *maxillosa*, *nitens*, *pinicola*, *praedonia squamata*, *vermiformis* and *yesoensis*.

Recently the author identified *Tetragnatha shinanoensis* Okuma & Chikuni, 1978 among the specimens collected from several mountain districts and described new to Korea in the present paper.

The materials examined are deposited in the collection of Department of Biology, Keimyung University.

## Description

Family Tetragnathidae Menge, 1866

Genus *Tetragnatha* Latreille, 1804

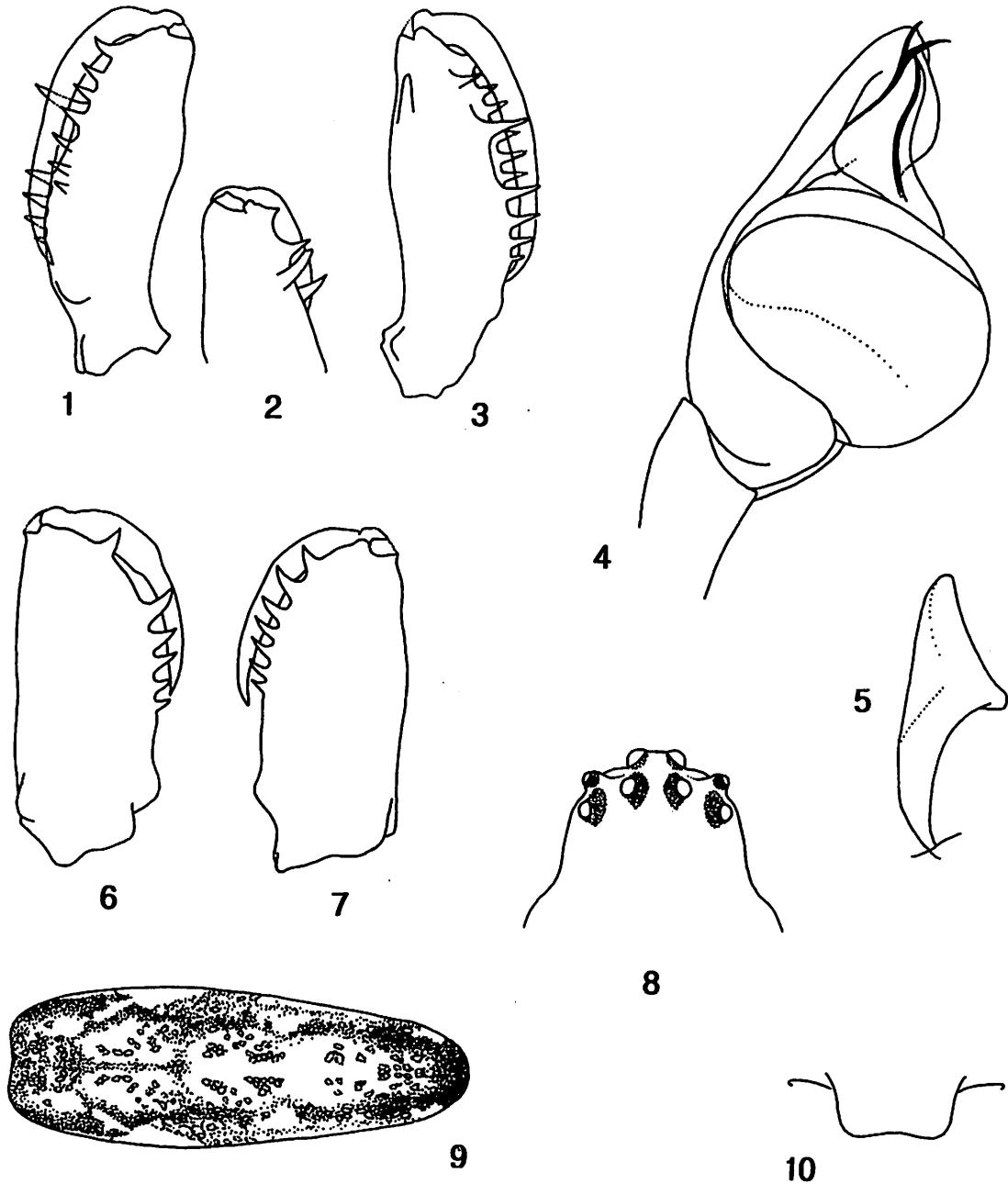
***Tetragnatha shinanoensis* Okuma and Chikuni, 1978 (Figs. 1-10) 미녀갈거미(신칭)**

*Tetragnatha shinanoensis* Okuma and Chikuni, 1978, p.1, figs. 1-13; Yaginuma, 1986, p.133, fig. 71.3; Okuma, 1988, p.176, figs. 7A-J; Chikuni, 1989, p.94, fig. 13.

**Material examined.** 1♂, 1♀, Mt. Sokri (Chungcheongbuk-do), 21 May 2006 (C. W. Lee).

**Description.** Male: Carapace yellowish brown with dark margins, and with a large slight depressed median furrow; cervical groove distinct; index 65. Cephalic width index 60. Clypeus height the same to radius of anterior median eyes.

In dorsal view anterior and posterior eye row recurved. Eye row index 98. Eye area



Figs. 1-10. *Tetragnatha shinanoensis* Okuma and Chikuni, 1978:

- 1. Male, left chelicera, retrolateral view.
- 2. Ditto, dorso-prolateral view of tip.
- 3. Ditto, prolateral view.
- 4. Left palp, prolateral view.
- 5. Ditto, paracymbium.
- 6. Female, left chelicera, prolateral view.
- 7. Ditto, retrolateral view.
- 8. Female, eye area.
- 9. Ditto, abdomen.
- 10. Ditto, epigynal fold.

index 95. Eye ratio, anterior median eye > posterior median eye = posterior lateral eye > anterior lateral eye (8 : 6 : 5). Anterior median eyes separated by 0.75 times of their diameter, and by 1.25 times of their diameter from the laterals. Posterior median eyes separated by 3 times of their radius, and by 1.3 times of their diameter from the laterals. Anterior and posterior lateral eyes separated by 0.8 times of diameter of anterior lateral eyes. Median ocular quadrangle, posterior side > height > anterior side (21 : 20 : 19).

Chelicerae yellowish brown (Figs. 1-3). Sternum with dark margin, index 75 and labium brown, index 133. Legs yellowish brown. Leg formula 1243. Leg formula index 100 : 61 : 28 : 54. Leg I/c 10.44. Fem. I/c 2.79. Tib I/c 3.09. Met I/c 3.31. Met. I/tar. I 4.01. Met. IV/tar. IV 3.80. Fem. I l/d 21.65. Tib. I l/d 34.72. Pat. I+tib. I/c 3.51.

Abdomen elongated; dorsum with a dark brown stripe running on each side and covered with scale pattern; venter light brown; index 37. Palp with a characteristic bifurcate structure at tip of conductor; paracymbium triangle-shaped (Figs. 4-5).

Female: Colour and general appearance the same as male. Carapace index 68. Cephalic width index 68. Clypeus height the same to radius of anterior median eyes. Eye row index 96. Eye area index 91. Eye ratio, anterior median eye > posterior median eye = posterior lateral eye > anterior lateral eye (9 : 7 : 5). Anterior median eyes separated by 0.8 times of their diameter, by 1.4 times of their diameter from the laterals. Posterior median eyes separated by 1.6 times of their diameter, by 1.3 times of their diameter from the laterals. Anterior and posterior lateral eyes separated by 2 times of radius of anterior lateral eyes (Fig. 8). Median ocular quadrangle, posterior side > height > anterior

side (25 : 21.5 : 21).

Chelicerae colored as male (Figs. 6-7). Sternum and labium index 81 and 138 respectively. Leg formula 1243. Leg formula index 100 : 61 : 29 : 57. Leg I/c 10.05. Fem. I/c 2.64. Tib I/c 2.92. Met I/c 3.32. Met. I/tar. I 4.62. Met. IV/tar. IV 3.81. Fem. I l/d 18.74. Tib. I l/d 29.18. Pat. I+tib. I/c 3.38.

Abdominal index 40 (Fig. 9). Epigynal fold wide and slightly protruded posteriorly (Fig. 10).

**Measurements(mm).** Male/female: Body length 5.63/6.51; carapace length 2.02/2.52, width 1.32/1.93; cephalic width 0.79/1.12; sternum length 1.06/1.47, width 0.79/1.12; labium length 0.26/0.42, width 0.35/0.35; anterior eye row 0.74/0.49; posterior eye row 0.76/0.55; abdomen length 3.78/3.92, width 1.41/2.31.

Leg I 21.08/22.12(5.63/5.81, 0.84/1.01, 6.25/6.42, 6.69/7.30, 1.67/1.58), II 12.95/13.42 (3.83/3.96, 0.75/0.88, 3.61/3.74, 3.70/3.70, 1.06/1.14), III 5.98/6.51(2.02/2.20, 0.53/0.62, 1.23/1.41, 1.50/1.58, 0.70/0.70), IV 11.44/12.50(3.70/3.96, 0.57/0.70, 2.95/3.17, 3.34/3.70, 0.88/0.97). Palp 2.42/2.77(0.97/0.97, 0.31/0.35, 0.35/0.48, 0.79/0.97).

**Remarks.** Male of this species may be confused with *T. maxillosa* because they are very similar in general appearance, but strikingly distinguished from the latter by bifurcate tip of conductor of male palp.

**Distribution.** Korea, Japan.

**Records.** 1♂, Mt. Geum (Gyeongsangnam-do, Namhae-gun), 29 May 2005 (J. Y. Park). 2♂, 1♀, Mt. Geryong (Chungcheongnam-do), 16 Jun. 2006 (S. H. Shin). 1♂, 1♀, Mt. Naejang (Jeonlabuk-do), 12 Jun. 2006 (S. Y. Kim). 2♀, Mt. Juwang (Gyeongsangbuk-do), 2 Jun. 2006 (S. H. Shin). 2♂, 1♀, Mt. Sokri (Chungcheongbuk-do), 21 May 2006 (C. W. Lee).

### References

1. Chikuni, Y., 1989. Pictorial Encyclopedia of Spiders in Japan. Kaisei-sha Publ. Co., Tokyo, pp. 1-310.
2. Levi, H. W., 1981. The American orb-weaver genera Dolichognatha and *Tetragnatha* north of Mexico (Araneae: Araneidae, Tetragnathinae). Bull. Mus. comp. Zool. Harv., 149: 271-318.
3. Okuma, C., 1988. A revision of the genus *Tetragnatha* Latreille (Araneae, Tetragnathidae) of Asia, Part I. J. Fac. Agr. Kyushu Univ., 32: 165-181.
4. Okuma, C. and Y. Chikuni., 1978. A new species of the genus *Tetragnatha* (Araneae: Tetragnathidae) from Nagano Pref., Japan. Acta arachn. Tokyo, 28: 1-7.
5. Platnick, N. I., 2007. The world spider catalog, version 7.5. American Museum of Natural History, online at <http://research.amnh.org/entomology/spiders/catalog/index.html>
6. Yaginuma, T., 1986. Spiders of Japan in color (new ed.). Hoikusha Publ. Co., Osaka, pp. 1-305.

## 토양으로부터 무기게르마늄 용해균의 분리 및 특성

김민희 · 고희선 · 김현수  
계명대학교 자연과학대학 미생물학과

## Isolation and Characterization of Strains Solubilizing Inorganic Germanium from Soil

Min-Hee Kim · Hee-Sun Ko · Hyun-Soo Kim  
Department of Microbiology, College of Natural Science,  
Keimyung University, Daegu 704-701, Korea

**요약.** 본 연구는 무기게르마늄을 용해하는 균주를 탐색하기 위해 금산인삼과 수삼의 뿌리주변의 흙으로부터 무기게르마늄 용해균을 분리하였다. 무기게르마늄 용해능이 우수한 두 균주를 선별하여 G2와 G4로 명명하였다. 두 균주의 최대생육배지는 1% black sugar 배지로 결정하였다. 균주 G2와 G4의 배양액을 혼합하여 열무, 배추와 참외에 분무하여 포장시험을 수행하였다. 시험작물을 채취하여 Ge의 함량을 분석한 결과, 대조군보다 유기Ge의 농도가 높은 것으로 보아 가용화Ge이 식물내로 유입되었음을 확인하였다.

**Abstract.** This study was tried to select the strains which dissolve inorganic germanium(Ge). Two strains were isolated from soil near the root of fresh ginseng and gumsan ginseng as inorganic Ge decomposers. These were named by G2 and G4. One percent of black sugar medium was confirmed as the maximum growth medium. The mixture of strain G2 and G4 culture broth was sprayed to the young radish, the cabbage and the melon. Several leaves of these plants were collected to measure the concentration of Ge absorbed into the plants. The results showed that the concentration of Ge in all plants which treated by the mixture was increased significantly compared to untreated ones.

### I. 서 론

게르마늄의 생리활성에 대한 관심이 고조됨에 따라 현대사회에서는 각종 식품이나 생약, 약수 등 Ge 함량에 관한 보고가 많아졌고 인간의 생존에 필수조건 중 하나인 식품은 최근 well-being 시대를 맞이하여 여러 기능성을 가진 무기물이 첨가된 기능성 식품으로 개발되고 있다.

원자번호 32번인 Ge은 회백색의 광물로서 지상에서 대부분 무기상태로 존재하는데 1948년 미국 벨르연구소의 바데인 박사와 교그레 박사가 Ge 원소에 반도체 성질이 존재함을 발견하면서

부터 전자공학의 비약적 발전을 이루게 되었고, 더불어 Ge 원소는 과학적, 의학적 측면에서의 관심사가 증가하면서 반도체원소의 성질을 생체 내에서 작용하게 하는 인체교정 의학분야에서 연구가 시작되었다(1). 무기상태의 Ge은 Transistor의 원료가 될 뿐 생명체가 그 자체를 이용하기는 어렵기 때문에 생리적 효능을 가지고 동식물에 이용되는 유기상태의 Ge 효능은 세포내 산소공급의 증진, 혈액의 정화, 체내증금속의 체외배출 촉진, NK세포와 mactophag의 활성화, 인터페론 분비 유도, cytotoxic T-lympho cyte의 생산 조절 등의 기능을 가진다(2, 3, 4, 5, 6, 7).

현재 효모나 미생물을 이용하여 무기Ge ( $\text{GeO}_2$ )을 유기Ge으로 대량생산하는 실험과 Ge의 분석법이 많이 보고 되어있다(8, 9, 10, 11). 대부분은 유기Ge이 혼산과 단백질에 결합되어 균체 내에 존재하는 Ge축적 효모균체의 생산에 관한 연구이다(12, 13). 그러나 균체 내 축적되어 있는 Ge은 균체를 파쇄해야 하는 어려움이 있고 이용효율이 떨어지는 등 여러 가지 문제점이 제시되고 있다.

따라서 본 실험에서는 Ge의 유기화에 초점을 맞추어 배양액중에 첨가한 무기Ge(*Inorganic Germanium*)을 유기Ge으로 가용화하는 능력을 가진 균주를 분리하여 기능성 미생물 비료로 서의 응용가능성을 확인한 결과를 보고하고자 한다.

## II. 실험재료 및 방법

### 1. 재료 및 실험방법

공시균의 분리를 위한 토양시료는 인삼에 Ge의 함량이 가장 많은 점을 고려하여 수삼과 금산인삼의 뿌리토양 및 풍기지역 인삼재배 토양을 입수하여 사용하였으며, 본 연구에는 선행연구에서 선발된 수삼과 금산인삼의 뿌리 토양을 사용하였다.

무기Ge은 *Inorganic Germanium*( $\text{GeO}_2$ )분말을 구입하여 사용하였고, 균주 분리용 배지는 LB배지(Table 1), 1% 흑설탕배지(black sugar 10 g/L), 혼합배지(LB배지 + 흑설탕배지)를 사용하였다.

Table 1. Composition of LB medium

Peptone	10 g
Yeast extract	5 g
NaCl	5 g / l (pH 7.0)

균주의 분리는 각각의 배지에 1%의 *inorganic Germanium*을 첨가하여 살균한 다음, 채취한 토양시료 1 g을 멸균수 9 ml로 회석하여 각 배지에 회석액을 100  $\mu\text{l}$ 씩 접종하여 37°C, 160 rpm으로 3~7일간 배양하였다. 배양 3일, 5일째에 sampling하여 16,000 rpm에서 10 min 원심분리한 후 상등액을 300  $\mu\text{l}$  추출하여 전조기에서 건조시킨 후 ICP-MS(ELAN 9000, Perkin-Elmer Co.)로 Ge함량을 측정하였다. 대조구로는 토양시

료를 접종하지 않고  $\text{GeO}_2$ 만을 흑설탕배지에 넣은 배양 상등액을 사용하였다.

위 실험을 토대로 순수분리 배지를 흑설탕 배지로 선택하여 무기Ge을 유기Ge으로 용해시키는 균을 순수분리하기 위하여 수삼, 금산인삼 뿌리토양을 회석하고 흑설탕 평판배지에 100  $\mu\text{l}$ 를 도말하여 37°C에서 24~48 hr을 배양하여 순수분리하였다.

### 2. Ge standard curve 제작 방법

Ge의 함량의 측정에 사용한 ICP-MS는 분석의뢰에 시간이 걸리며, 많은 양의 시료를 측정하기에는 부적합하므로 Ge농도를 측정하는 assay법을 이용하였다.

Ge 표준용액은 Aldrich Germanium ICP/DCP standard solution(contains 9,985  $\mu\text{g}/\text{ml}$ =9,985 ppm)을 이용했고 O.D는 10,000 ppm으로 환산(=9,985 ppm O.D값-(O.D×0.002))하였다.

Ge standard curve 측정은 phenylfluorone solution(phenylfluorone solution : 9-phenyl-3-fluorone 32 mg, ethanol 85 ml, 6 N HCl 1 ml /ethanol 100 ml) 2 ml와 cyclohexanol(Fluka Co.) 1 ml를 첨가한 후 측정이 가능하도록 회석한 Ge sample solution 2 ml를 첨가하였다.

이 혼합액을 실온에 30 min 방치 후 잘 섞어 UV spectrophotometer를 이용하여 525 nm에서 측정하였다. 측정가능 Ge solution 농도는 1~5 ppm 이므로 Ge 농도가 높은 것은 측정 범위에 들어가게 회석하여 작성하였다(14, 이하 PF sol'n 방법).

### 3. 분리균주에 따른 무기Ge의 유기화(가용화)능 검토

순수 분리한 각 균주를  $\text{GeO}_2$  0.1 g을 포함한 각각의 흑설탕배지 20 ml에 1백금이 접종한 후, 37°C에서 7일간 160 rpm으로 배양하였다.

공시균의 첨가없이  $\text{GeO}_2$  0.1 g만 첨가한 흑설탕배지를 대조구로 하였으며 배양기간 중에 1, 3, 5, 7일째 배양액을 2 ml 씩 채취하여 불용성인 무기Ge의 미세입자를 침전시키기 위해 3일간 정치한 후 16,000 rpm, 10 min 원심분리하여 상등액을 PF sol'n 방법으로 유기Ge의 함량을 측정하였다.

#### 4. 분리균주의 생육배지 검토

무기Ge의 유기화에 관여하는 두 분리균주 G2와 G4의 최대 생육배지를 결정하기 위하여 1% black sugar, NB(nutrient broth, Difco Co.), YM(yeast extract 0.3%, malt extract 0.3%, peptone 0.5%, glucose 1%, pH 5~6), PDB(potato dextrose broth, Difco Co.) 배지에 한 백금이 접종하여 37°C, 160 rpm, 24 hr 동안 배양하였다. 생육정도는 660nm에서 ABS값으로 결정하였다.

#### 5. 열무와 배추, 참외를 대상으로 유기Ge 생산균을 이용한 포장시험

열무와 배추, 참외를 시험 작물로 하여 농가에서 임대한 하우스에서 포장실험을 하였으며, 선발된 가용화 Ge 생산균주 G2와 G4를 액체 배양 후 혼합하여 분무형식으로 수행하였다. 열무와 배추는 종묘를 이식 후 1~2주일 간격으로 3회 분무하였으며, 매 분무시마다 잎과 토양을 분석시료로 채취하였다. 참외는 임대농가가 참외의 수확 후에 일정기간 실시하였으며 분석시료는 잎과 참외 및 토양을 채취하였고, 시료의 처리는 앞의 실험과 동일한 방법으로 2회 처리하였다.

분석 시료로 채취한 열무와 배추, 참외 및 잎을 건조시킨 후 파쇄하여 0.5 g에 멸균수 10 ml를 가하여 여과 한 후 14,000 rpm, 15 min 원심 분리하여 상등액 1 ml를 PF sol'n 방법으로 유기 Ge 함량을 측정하였다.

### III. 결과 및 고찰

#### 1. 배양액중의 Ge 함량 확인

대조구는 균을 접종하지 않고 GeO<sub>2</sub>를 흑설탕배지에 넣어 10일간 진탕 배양한 결과는 1,853. 888 ppm(μg/ml)이며 ICP측정 결과는 Table 2와 같다.

대조구의 값(1,854 ppm)과 비교하여 유기 Ge의 함량이 높게 나타난 배양액 중에 무기 Ge을 가용화 할 수 있는 균의 존재가 예상되었다. 따라서 Table 2에서의 수삼과 금산인삼 토양 모두 5일 배양한 흑설탕배지에서 높게 나타난 결과로부터 흑설탕배지에서 유기Ge 생산균의 생육정도와 생산이 가장 큰 것으로 추정되었다.

Table 2. ICP value of soluble Ge in various media by soil sample incubation

Medium	Incubation time(days)	
	3	5
SS <sup>a</sup>	L	758*
	B	1,202
	L + B	389
GS <sup>b</sup>	L	934
	B	1,187
	L + B	563

<sup>a</sup> : Fresh ginseng, <sup>b</sup> : Gum-san ginseng,

L : LB medium, B : black sugar

L + B : mixed medium, \* : ppm,

Control : 1,854 ppm(μg/ml) for 10 days incubation in black sugar medium.

#### 2. 생산균의 분리

위의 결과에서 유기Ge 생산균의 존재가 예상됨에 따라 수삼 및 금산인삼의 뿌리 토양을 배양한 배양액 중에서 생육된 균을 순수분리 하기 위하여 배양액을 회석하여 평판 배양하였다. Ge 흡착을 보이는 곰팡이속을 제외한 세균, 효모로 보이는 각 4개 균을 분리하였다. 수삼에서 분리한 균주를 S1, S2, S3, S4 (Fig. 1)로 금산인삼에서 분리된 균주는 G1, G2, G3, G4 (Fig. 2)로 각각 명명하였다.

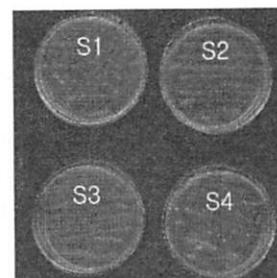


Fig. 1. Four strains isolated from the soil sample attached to fresh ginseng root.

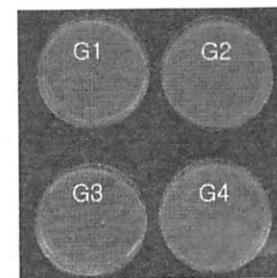


Fig. 2. Four strains isolated from the soil sample attached to gum-san ginseng root.

### 3. Ge standard curve 작성 (정량곡선)

Ge standard curve는 Table 3의 값으로 측정되었고 정량곡선은 Fig. 3으로 나타내었다.

Table 3. Absorbance value of Ge standard solution

ppm	Absorbance(525nm)
0.5	0.396
1.0	0.492
2.0	0.610
2.5	0.667
4.0	0.930
5.0	1.022

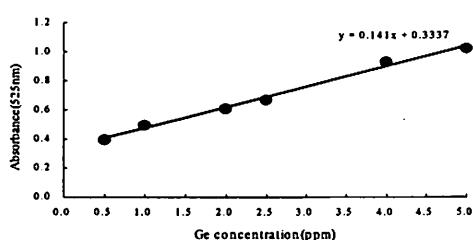


Fig. 3. Standard curve of Ge concentration.

### 4. 유기(가용화)Ge 생산균의 확인

수삼 및 금산인삼에서 분리한 균주 S1, S2, S3, S4와 G1, G2, G3, G4는 0.5% 무기 Ge이 첨가된 흑설탕배지에서 1일, 3일, 5일, 7일간 배양하였다. 배양일수에 따른 배양액중의 Ge의 양(ppm)은 수삼 분리균은 Table 4, Fig. 4, 금산인삼 분리균은 Table 5, Fig. 5와 같았다. 측정시료는 회석하여 흡광도 측정 후 표준곡선에서 유기 Ge의 ppm값을 산정하여 배양액의 Ge 함량으로

Table 4. Ge ppm value with incubation time of the strains isolated from fresh ginseng root

Incubation time(days) \ Strains	S1	S2	S3	S4
1	5911	5198	5331	5420
3	6510	6379	5947	6036
5	5540	5448	5747	5895
7	7429	5705	6075	6889

\* Control(미생물 미첨가구)은 흑설탕배지에 배양시료 구와 동일하게 배지에 무기Ge을 0.5%첨가하여 동일한 조건으로 배양하였고, 원심 상동액의 가용성 Ge 수치는 5,721 ppm이었다.

계산하였다. 대조구로 배양배지(흑설탕배지, Ge 미첨가)자체를 10<sup>3</sup>배 회석한 흡광도는 0.003정도로 영향을 거의 미치지 않는 것으로 보였다.

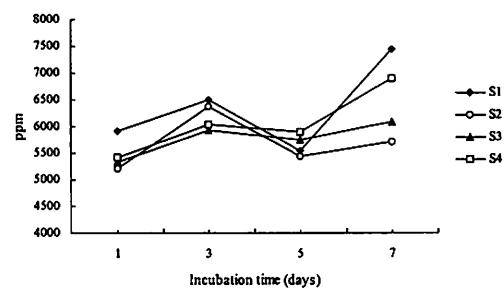


Fig. 4. Ge concentration in culture broth with incubation time of the strains isolated from fresh ginseng root.

Table 5. Ge ppm value with incubation time of the strains isolated from gum-san ginseng

Incubation time(days) \ Strains	G1	G2	G3	G4
1	7770	9660	6522	6202
3	7497	8743	8504	9618
5	7483	6709	6495	6820
7	5441	6202	6205	6049

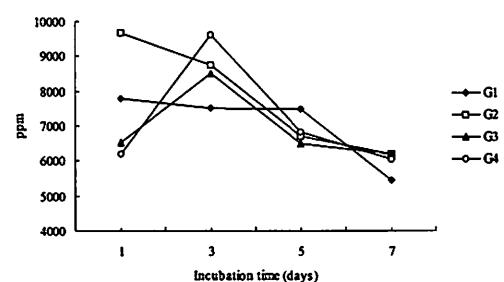


Fig. 5. Ge concentration in culture broth with incubation time of the strains isolated from gum-san ginseng root.

수삼인삼과 금산인삼의 배양지의 뿌리흙에서 분리한 각각의 4개 균주를 무기Ge(GeO<sub>2</sub>)을 첨가한 흑설탕배지에 배양하여 Ge 함량을 확인한 결과 수삼에서 분리한 균의 경우 S1과 S4균이 배양 7일째에서 Ge 함량이 가장 높게 나타났으며 (Table 4, Fig. 4), 금산인삼에서 분리한 균주인 G2는 배양 1일째, G4는 3일째 배양에서 control

에 비해 가장 높은 Ge의 함량을 보이는 것을 확인할 수 있었다 (Table 5, Fig. 5). 이 결과에서 분리균으로는 금산인삼의 뿌리 흙에서 분리한 G2, G4균이 무기Ge을 가용화하는 능력이 우수한 것으로 평가되었다.

### 5. 분리균주의 최대 생육배지 검토

G2, G4 두 균주의 대량생산을 위한 최적배지 조성을 검토한 결과 모두 YM배지에서 최대 균생육을 확인하였으며(Table 6), 균생육도를 검토한 결과는 YM배지가 적합하다고 생각되나 산업화에 가장 적합한 배지로는 가용화능도 우수하며 저가인 black sugar 배지가 양호하다고 평가하였다.

Table 6. Effect of growth of G2 and G4 strain on various media.

Medium	B	NB	YM	PDB
Strains	Absorbance(660nm)			
G2	0.33	0.27	0.58	0.02
G4	0.38	0.60	1.40	0.69

B : 1% Black sugar medium

### 6. 열무, 배추와 참외를 대상으로 포장시험

포장 실험용 시료를 제조하기위하여 공시균은 1% 흑설탕 배지에 0.5% 무기Ge을 첨가하여 3일간 배양한 후 10<sup>2</sup>배 회석하여 3회 처리하였다. 처리 전후의 토양 및 각 포장시험 시료를 채취하여 Ge의 함량을 분석하였다. Table 7에서 보

는 바와 같이 포장 실험 전의 토양속의 Ge의 양은 1 ppm으로 측정되었으며, 3회 처리 후 토양에서 5~7 ppm 정도 검출되었다. 처리 후 시료로 채취한 열무 sample은 측정한 Ge값이 대조구에 비해 2 ppm정도 높게 검출되었으며, 이는 Ge 용해균이 무기Ge을 가용화하고 가용화된 Ge이 열무속으로 흡수된 것으로 추정할 수 있었다.

Table 7. Concentration of Ge on the young radish field

Treatments	Young radish		Soil of young radish	
	Control <sup>1)</sup>	Treatment	Control <sup>2)</sup>	Treatment
Ge concentration (ppm)	2	4	1	6

1) untreated radish

2) untreated soil

배추의 포장실험에서는 1차 처리에서는 대조구에 비해 처리구에서 Ge의 농도가 2 ppm정도 높게 나왔으나 2, 3차 처리군은 Ge의 농도 차이를 보이지 않은 것을 확인하였다(Table 8). 이 결과는 배추의 경우 처음에는 Ge이 흡수되어 증가하다가 시간이 경과 할수록 Ge이 서서히 다시 배출되는 결과라고 사료되며, 처리 작물의 수분 함량 등에 따라 잔존하는 Ge의 양의 차이가 있을 것으로 추정되었다. 따라서 대상작물에 따라 효율적인 처리 시기, 및 처리 횟수 등의 검토가 필요하다고 예상되었다.

Table 8. Concentration of Ge on the cabbage field

Treatments	Primary		Secondary		Tertiary	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
Ge concentration(ppm)	3.5	5.4	1.2	1.3	1.2	1.4

참외의 경우, 앞에서 1차 처리시는 2 ppm정도 높게 검출되었으며, 2차 처리시는 1 ppm 높게나온 것으로 보아 1차 처리시에서 더 높은 Ge의 잔류를 확인할 수 있었고, 열매에서는 2차 처리시 Ge의 농도가 무처리구에 비해 2 ppm정도 높게 검출되었다(Table 9).

Table 9. Concentration of Ge in the melon leaf and melon

plant parts	Ge concentration(ppm)			
	Primary treatment		Secondary treatment	
	Control	Sample	Control	Sample
Melon leaf	5.1	7	7	8
Melon	5.0	6.5	5.5	7.5

이는 Table 7의 결과와 마찬가지로 가용화된 Ge이 시간이 경과함에 따라 서서히 토양에서 잎, 그리고 참외로 이동한 결과로 추정된다. 미처리구인 대조구의 Ge이 높게 검출된 것은 포장시험을 수행한 하우스가 Ge작목반의 하우스를 이용하였으므로 토양중의 가용성 Ge잔류농도가 다른 토양(열무, 배추 하우스: 1 ppm정도. 결과 미기재에 비해 월등히 높은 결과로 추정되었다.

### 참고문헌

- Man Ki Park, Jeong Hill Park, Sang Beom Han, Il Ho Park, Analysis of organic germanium, Ge-132, *J. Kor. Soc. Anal. Sci.*, Vol. 8, No 3, 371-374, (1995)
- Seok-Hwan Kim, Tae-Hyn Jo and Jong-won Choi, Effect of Ge-132 on the Hepatic Bromobenzene Metabolizing Enzyme System in Rats, *J. Korean Soc Nutr.* 22 (6), 702-708, (1993)
- Eun-Jeong Kim, Kyeoung-Im Lee and Kun-Young Park. The Growth Inhibition against Gastic Cancer Cell in Germanium or Soybean Sprouts Cultured with Germanium, *Kor. J. Soc. Food Cookery Sci.* Vol. 20, No. 3, 287-291, (2004)
- Eun-Jeong Kim, Kyeoung-Im Lee and Kun-Young Park. Quantity Analysis of Nutrients in Soybean Sprouts Cultured with Germanium. *J. Kor. Soc. Food Sci. Nutr.* 31(6), 1150-1154, (2002)
- Seong-Tae Lee, Young-Han Lee, Hong-Jae Lee, Ju-Sik Cho and Jong-Soo Heo. Germanium contents of Soil and Crops in Gyeongnam Province. *Kor. J. Envi. Agr.* Vol. 24, No. 1, 34-39, (2005)
- Eun-Jeong Kim, Kyeoung-Im Lee and Kun-Young Park. Antimutagenicity of Soybean Sprouts cultured with Germanium. *J. Kor. Soc. Food. Sci. Nutr.* 33(6), 930-935, (2004)
- Gung Pyo Lee, Hee-Seung Park, Jae Hee Won and Kuen Woo Park. Effect of Geo2 Concentration on Hydroponically-Grown Lettuce(*Lactuca sativa*). *J. Kor. Soc. Hort. Sci.* 46(2), 113-118, (2005)
- Won-Jong Song, Sang-Chul Lee and Tae-Kwang Oh. Preparation of Organic Germanium by Yeast Cell, *Kor. J. Appl. Microbial. Biotech.* Vol. 23, No. 1, 87-90, (1995)
- Hyung Seon Shin, Man-Sik Choi and Kang-Jin Kim. Determination of Trace Amount of Germanium in Rocks and Sediments by Hydride Vapor Generation -ICP-AES. *J. Kor. Chem. Soc.* Vol 41, No 8, 399-405, (1997)
- Sung Hee Lee, san Kwang Lee, Hyun Joo Lee, Yong Sub Yi and Eun Woo Park. Study on Identification and Purification of Germanium-fortified Yeast. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 49(1), 55-59, (2006)
- Sung-Hee Lee, Sook-Nyung Rho and Tsang-Uk Sohn. Efficacy Study of Activation on Macrophage in Germanium -fortified Yeast. *J. Kor. Soc. Appl. Biol. Chem.* 48(3), 246-251, (2005)
- 한성수, 임요섭, 정재훈, 유기Ge 수용액으로 재배된 콩나물의 생육특성과 Ge 흡수량, *J. Agr. Chem. Biotech.* Vol. 39, No. 1, 39-43, (1996)
- So Young Park, Seong Soo Joo, Tae Joon Won, Jin Woong Chung, Sung Hee Lee and Sun Woo Oh. A Modified Process for Producing High Quantities of bio-Germanium in Yeast and a Study of Its Oral Toxicity. *Food Sci. Biotech.* Vol. 16, No. 1, 78-82, (2007)
- Bong-Gum Cho. Research on the Conversion of GeO<sub>2</sub> to Organic Germanium by Microorganism. *J. Inst. Nat. Sci. Kon-Kuk University*, Vol 13, 71-80, (1998)

## 발효된 야채에서 분리한 락토바실러스 균주의 당발효 특성에 대한 연구

권오식\* · 마지현\*\*

\*계명대학교 자연과학대학 미생물학과 · \*\*한국환경정책평가연구원 국토환경연구실

### A Study of *Lactobacillus* Species Isolated from Fermented Vegetables for Carbohydrate Utilization

Oh-Sik Kwon · Ji-Hyun Ma

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

Department of National Land, Korea Environment Institute, Seoul 122-706, Korea

**요약.** 발효된 야채에서 분리한 통성 이상발효균들의 생육특성, 내염성 및 당 발효 특성을 액체배양을 통하여 조사하였다. 그 결과 김치에서 분리된 *Lb. plantarum* KCTC 3108이 12시간 만에 pH가 4.1로 나타나 생육이 매우 빠른 반면 *Lb. homohiochii* KFRI 234는 pH 4.8로 생육이 매우 저조함을 알 수 있었다. 이들의 내염성을 조사해 본 결과 *Lb. plantarum* KCTC 1048은 6% NaCl 농도에서 생육에 매우 저해를 받는 것으로 나타났으며 대부분 테스트된 균주들은 8% NaCl에서 생육이 저해되는 것을 확인할 수 있었다. 한편 테스트한 균들의 5탄당의 이용에 있어 *Lb. homohiochii* KFRI 234가 가장 우수하였으며 *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167은 실험에 이용된 5탄당을 전혀 이용하지 못함을 발견하였다(pH 6.5 이상). 6탄당의 경우, *Lb. homohiochii* KFRI 234는 대부분의 6탄당을 이용하지 못한 반면 나머지 균들은 유사한 당발효 패턴을 보여 주었다. 이당류 발효에 있어서 *Lb. plantarum* KCTC 3108만이 melezitose를 잘 발효하여 것이 매우 특징적이었다. 김치에서 분리한 이 균주는 3당류 첨가시 균 생육도 매우 우수하여 많은 당을 골고루 잘 이용하고 있음을 알 수 있었다. 복합당의 발효에 있어서, *Lb. homohiochii* KFRI 234의 경우 gluconic acid 이외에는 전혀 이용하지 못하여 생육 pH 6.0 이상으로 나타났다. 한편 *Lb. plantarum* KCTC 1048, *Lb. plantarum* KCTC 3108은 비교적 많은 수의 복합당을 이용하는 것으로 나타났다. *Lb. graminis* KCCM 40697은 *Lb. homohiochii* KFRI 234와 함께 sorbitol을 이용하지 못하였다.

**Abstract.** Facultatively heterofermentative *Lactobacillus* strains isolated from fermented vegetables were investigated in order to determine their growth kinetics, salt tolerance and carbohydrate fermentation characteristics. As a result, *Lb. plantarum* KCTC 3108 from kimchi showed strong acid tolerance (pH 4.1) but *Lb. homohiochii* KFRI 234 showed poor growth kinetics (pH 4.8). From the results of salt tolerance, *Lb. plantarum* KCTC 1048 was inhibited at 6% NaCl while other strains were inhibited at 8% NaCl. It was observed that only the *Lb. homohiochii* KFRI 234 fermented all pentose sugars but *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167 could not ferment the sugars at all (pH 6.5). On the other hand, for hexose fermentation, the *Lb. homohiochii* KFRI 234 could not ferment all sugars however other strains utilize the sugars very well except rhamnose. It was also noticed that only the *Lb. plantarum* KCTC 3108 was able to ferment melezitose among tested disaccharides while other strains could not ferment at all.

This strain from kimchi utilized many sugars included trisaccharides. In case of complex sugar fermentation, *Lb. homohiochii* KFRI 234 could not ferment the sugars except gluconic acid but *Lb. plantarum* KCTC 1048 and *Lb. plantarum* KCTC 3108 fermented many complex sugars. *Lb. graminis* KCCM 40697 and *Lb. homohiochii* KFRI 234 could not ferment sorbitol at all.

## I. 서 론

유산균은 일반적으로 많은 수의 당을 발효하여 에너지를 획득하고 이로부터 50% 이상의 젖산을 생성하는 세균의 총칭이다(1, 2). 이들은 그람 양성균 중 비포자 형성균에 속하며 구형 혹은 막대기형으로 catalase가 없으며 오직 복합 배지에서만 자랄 수 있는 화학 영양균이다(10, 11). 발효 당은 에너지원으로 사용되어지는데, 6 탄당(e.g., glucose)은 주로 젖산을 포함하여 기타 아세트산, 에탄올, CO<sub>2</sub> 그리고 숙신산으로 분해된다. 유산균은 주로 발효된 야채, 과일, 음료와 같은 음식물과 우유, 치즈와 같은 유제품, 사람이나 동물의 장내 등에서 발견된다(13). 이러한 유산균은 *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Sporolactobacillus* 등의 종류로 구분된다(1).

*Lactobacillus*속으로 분류되는 균들은 종래의 2군인 정상발효균과 이상발효균으로 구분하였던 것을 1989년 *Bergey's Manual* 제 8판에서부터 obligately homofermentative lactobacilli(절대정상발효균, group-I)와 facultatively heterofermentative lactobacilli(통성이상발효균, group-II) 그리고 obligately heterofermentative lactobacilli(절대 이상발효균, group-III)의 3군으로 분류하고 있다(13). 이들은 인간에게 중요한 식품의 생산에 밀접한 관련이 있는데, 그 이유는 인간의 건강과 관련된 다양하고 유익한 작용을 하기 때문이다.

예를 들면 장내 유해균 억제 작용, 정장 작용, 혈중 콜레스테롤 감소 기능 및 많은 프로바이오틱 기능을 담당하고 있다(6, 7, 8, 9, 1). 즉 많은 수의 유제품에 존재하는 *Lactobacillus* 균주들은 인간의 장내에서 활동하게 되면서 인간의 건강에 상호작용한다는 것을 의미한다(5). 이에 우리는 발효야채에서 발견되는 대표적인 통성이상

발효균인 *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis*, *Lb. graminis*, *Lb. homohiochii* 및 2가지의 *Lb. plantarum* 균주를 이용하여 이들의 당발효 특성(5탄당, 6탄당, 이당류, 삼당류, 복합당)을 조사하여 각기 다른 발효된 야채에서 분리된 이 락토바실러스균들의 생리·생화학적 특성을 알아보고 이들이 인간에게 어떠한 유용성을 제공할 수 있는지를 검토해 보았다.

## II. 실 험

**공시균주:** 본 실험에서 사용한 공시균주는 통성이상발효를 하는 5가지의 *lactobacilli* 균주들로 *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis*, *Lb. graminis*, *Lb. homohiochii* 및 2가지의 *Lb. plantarum*이다. 이들은 한국과학기술원 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행(KCTC, 대전), 한국미생물보존센터(KCCM, 서울) 및 한국식품개발연구원(KFRI, 성남)에서 분양을 받아 계대배양 후 glycerol이 20% 포함된 저장액에 넣어 -70°C 냉동고에 보관하여 사용하였으며, 실험에 사용하기 전 계대배양을 실시하였다. 한편 이 균주들의 출처는 Table 1과 같다.

Table 1. Five *Lactobacillus* strains originated from fermented vegetables

Species and Strains		Sources
<i>Lb. coryniformis</i> subsp. <i>coryniformis</i>	KCTC 3167	Silage
<i>Lb. graminis</i>	KCCM 40697	Grass silage
<i>Lb. homohiochii</i>	KFRI 234	Kimchi
<i>Lb. plantarum</i>	KCTC 1048	ATCC 8014
<i>Lb. plantarum</i>	KCTC 3108	Pickled cabbage

**균 생육 곡선:** 공시균주의 생육 특성은 일정 시간 배양 후, pH를 측정하여 산 생성능으로 조사하였다. 가압멸균된 lactobacilli MRS broth (Difco) 10ml에 공시균주 20 $\mu$ l를 접종하였다. 각 공시균주의 생육 적정온도에 따라 배양하면서 12시간, 24시간, 36시간, 48시간, 72시간마다 배양액을 취하여 3,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심 분리한 후 pH meter(Mettler, Model 225)를 이용하여 상층액의 pH를 측정하였다.

**내염성 테스트:** 공시균주의 내염성을 조사하기 위하여, MRS broth에 NaCl을 첨가하여 2%, 4%, 6% 그리고 8%의 농도로 제조한 후 10 ml당 공시균주 20  $\mu$ l씩 접종하였다. 각각의 농도 별로 공시균주를 접종 후 3일간 배양하여 3,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리 후 상층액의 pH를 측정하였다.

**당 발효 특성 조사:** 공시균들의 복잡한 당 이용 특성을 조사하기 위하여, glucose가 포함되지 않은 MRS broth를 제조하였다(5). Glucose가 첨가되지 않은 MRS broth에 10% 당 용액을 각각 첨가하여 가압 멸균하여 사용하였다. 각각의 10% 당 용액이 첨가된 배지 5 ml에 공시균주 20  $\mu$ l를 접종하였다. 각각의 공시균주의 배양온도에 따라 3일간 배양하여 3,000 rpm, 4°C에서 15분간 원심분리한 후 pH meter로 상층액의 pH를 측정하였다. 실험에 사용된 당은 Table 2와 같이 25종(Sigma)이며 3문자 또는 4문자로 줄여 표시하였다.

Table 2. Twenty-five carbohydrates used for fermentation characteristics

Carbohydrates	Abbreviation	Carbohydrates	Abbreviation
Amygdalin	Amy	Melezitose	Mele
D-arabinose	AraD	Melibiose	Meli
L-arabinose	AraL	Raffinose	Raf
Cellobiose	Cel	Rhamnose	Rha
Esculin	Esc	Ribose	Rib
Fructose	Fru	Saccharin	Sac
Galactose	Gal	Salicin	Sal
Gluconic acid	Glc	Sorbitol	Sor
Glucose	Glu	Sucrose	Suc
Lactose	Lac	Trehalose	Tre
Maltose	Mal	Xylitol	Xylt
Mannitol	Mant	Xylose	Xyl
Mannose	Mann		

### III. 결과 및 고찰

**생육 곡선 조사:** 통성이상발효 유산균 가운데 발효된 야채에서 분리된 공시균주 *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167, *Lb. graminis* KCCM 40697, *Lb. homohiochii* KFRI 234, *Lb. plantarum* KCTC 1048, *Lb. plantarum* KCTC 3108의 생육 특성을 알아보기 위하여, 산 생성능을 기준으로 조사하였다(Fig. 1). 1). MRS broth에 종균을 접종하고 12시간마다 샘플링하여 pH를 측정하였다. 발효된 야채에서 분리된 공시균주 중 *Lb. plantarum* KCTC 3108 이 12시간 만에 pH가 4.1로 나타나 생육이 매우 빠른 것을 확인할 수 있었다. *Lb. plantarum* KCTC 1048, KCTC 3108과 *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167의 pH가 4.0 이 하로 생육이 좋은 반면에, *Lb. homohiochii* KFRI 234는 pH 4.8로 생육이 저해되었고, *Lb. graminis* KCCM 40679는 pH 4.4를 나타내어 비교적 생육이 저조한 것으로 나타났다. 이 그룹의 전반적인 특징은 24시간에서 생육이 저해되어 나타났다.

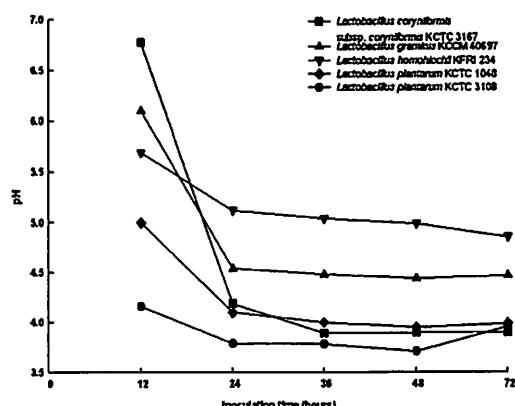


Fig. 1. Comparison of growth characteristics among facultative heterofermentative *Lactobacillus* strains from fermented vegetables.

**내염성 테스트:** 농도에 따른 균의 내염성을 측정하기 위해 2%, 4%, 6%, 8%의 NaCl이 첨가된 MRS broth에 균을 접종하여 3일간 배양 후

pH를 측정하므로 내염성을 판정했다(Fig. 2). 2% NaCl이 함유된 배지에서 *Lb. homohiochii* KFRI 234를 제외하고는 pH가 4.0 이하로 내염성을 나타내었다. *Lb. homohiochii* KFRI 234는 김치에서 분리한 균으로 8% NaCl 배지에서 pH 5.2로 나타났는데, 다른 균들은 pH 6.2 이상으로 완전히 저해되어 자라지 못했으나 *Lb. homohiochii* KFRI 234는 다른 균들에 비해 내염성을 지니고 있는 것으로 판단되었다. *Lb. plantarum* KCTC 3108은 6% NaCl 배지에서 pH 3.6으로 내염성을 띠며 잘 생육하였다. *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167은 4% NaCl 배지에서 내염성을 나타내었지만, 6%에서는 pH 6.3으로 완전히 생육이 저해되어 나타났다. *Lb. plantarum* KCTC 1048도 역시 6% NaCl에서 생육에 매우 저해를 받는 것으로 나타났다. 대부분 테스트된 균주들은 8% NaCl에서 생육이 저해되는 것을 확인 할 수 있었다.

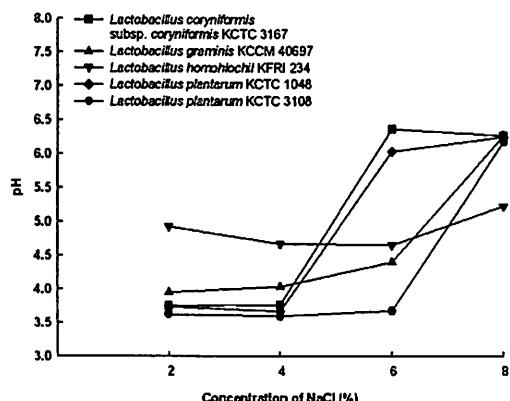


Fig. 2. Comparison of facultative heterofermentative *Lactobacillus* strains from fermented vegetables growing at different NaCl concentration.

**5탄당 발효:** 가장 눈에 띄는 것은 *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167은 pH 6.5 이상으로 나타나 실험에 이용된 5탄당을 이용하지 못함을 알 수 있었다(Fig. 3). 이 균주들은 arabinose D form당을 전혀 이용하지 못하는 것으로 나타났으며, *Lb. gariminis* KCCM 40697은 대체적으로 5탄당의 이용에 있어서 pH

5.5 이상으로 나타나 발효가 저조한 것으로 나타났다. *Lb. homohiochii* KFRI 234는 arabinose D form만 제외하고 arabinose L form과 ribose 그리고 xylose는 pH 4.5 이하로 발효하는 것을 알 수 있었다. *Lb. plantarum* KCTC 1048은 대체적으로 오탄당의 발효에 있어서 저조하였으나 ribose는 pH 4.8로 발효 이용하는 것으로 나타났다. *Lb. plantarum* KCTC 3108은 arabinose L form과 ribose를 발효 이용하였으나, arabinose D form과 xylose의 이용은 저조한 것으로 나타났다.

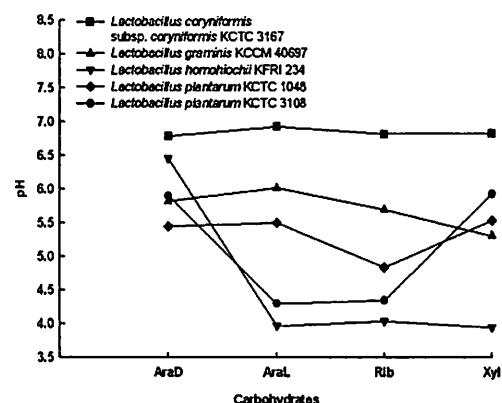


Fig. 3. Pentose fermentative characteristics of the facultative heterofermentative *Lactobacillus* strains from fermented vegetables.

**6탄당 발효:** 6탄당의 이용에 있어서 실험되어진 발효된 야채 *Lactobacillus* 종에서 당 발효 이용 능력에 있어서 뚜렷한 구별됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 4). *Lb. homohiochii* KFRI 234를 제외하고 다른 모든 종들은 fructose, galactose, glucose, mannose를 모두 잘 발효하였다. 특이적으로 rhamnose는 *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167과 *Lb. plantarum* KCTC 1048은 pH 5.0으로 생육이 저조하게 나타났으며, *Lb. plantarum* KCTC 3108은 pH 5.7로 생육에 저해를 받아 발효하지 못하는 것으로 나타났다. 또한 *Lb. graminis* KCCM 40697과 *Lb. homohiochii* KFRI 234는 pH 6.0 이상으로 전혀 발효하지 못하는 것으로 나타났다. 이로써 *Lb. plantarum* 종과 *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167은 rhamnose를 이용하

는 것으로 보이나 발효가 왕성하게 일어나지는 않는 것으로 생각된다.

*Lb. homohiochii* KFRI 234는 5탄당은 잘 이용하였으나 6탄당은 fructose만을 발효하는 것으로 나타났다. 그러므로 이 균은 5탄당만을 특이적으로 잘 이용하였으며, 6탄당은 전혀 이용하지 못하는 것을 확인하였다.

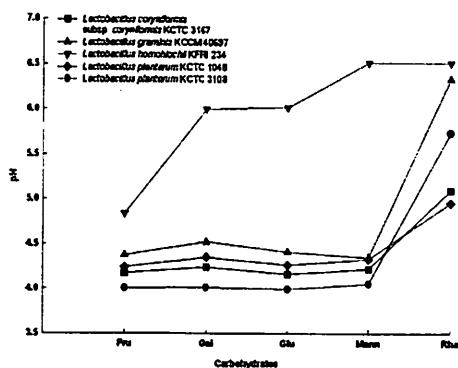


Fig. 4. Hexose fermentative characteristics of the facultative heterofermentative *Lactobacillus* strains from fermented vegetables.

**이당류 발효:** 양배추에서 분리된 *Lb. plantarum* KCTC 3108은 pH 4.0 이하를 나타내어 실험된 모든 이당류를 이용하여 아주 잘 생육하였다 (Fig. 5). *Lb. homohiochii* KFRI 234는 cellobiose, lactose, melibiose, trehalose는 이용하지 못하였으나, 오직 maltose만 이용하여 생육이 가능한 것으로 나타났다. *Lb. graminis* KCCM 40697의 경우 pH 4.4로 cellobiose, sucrose, trehalose를 잘 이용하였으나, maltose, melibiose는 전혀 이용하지 못하였고 lactose와 sucrose는 발효능력에 있어서 pH 5.0으로 저조한 것으로 나타났다. *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167과 *Lb. homohiochii* KFRI 234는 이당류의 발효에 있어서 비슷한 패턴을 나타나는 것을 확인할 수 있다. *Lb. plantarum* KCTC 3108은 pH 4.5 이하로 테스트 되어진 이당류 모두를 잘 이용하는 것으로 나타났다. 각 균은 이당류를 분해해서 glucose, galactose 그리고 fructose를 이용하여 종식하는데 있어서 차이를 보여주고 있다. 각각의 이당류를 분해하는 메카니즘이 다르다는

것은 분해하는 효소가 각각 다르다는 것으로 사료되었다. 이러한 차이는 각 종을 구별할 수 있는 지표로 볼 수 있었다.

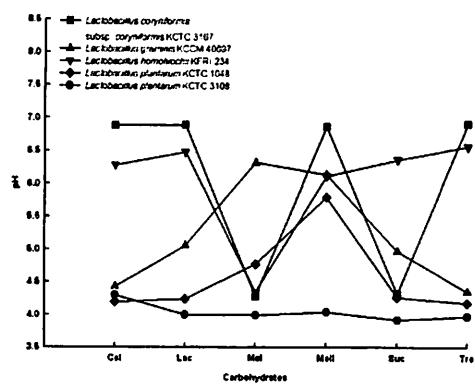


Fig. 5. Disaccharides fermentative characteristics of the facultative heterofermentative *Lactobacillus* strains from fermented vegetables.

**삼당류 발효:** 삼당류 발효에 있어서 김치에서 분리한 *Lb. plantarum* 종만이 melezitose를 발효 이용 가능하여 최종 생육 pH가 4.0 내외인 것으로 나타났다 (Fig. 6). Raffinose 이용에 있어서는 오직 *Lb. plantarum* KCTC 3108만이 최종 pH가 4.0으로 나타나 특별히 주목되었다.

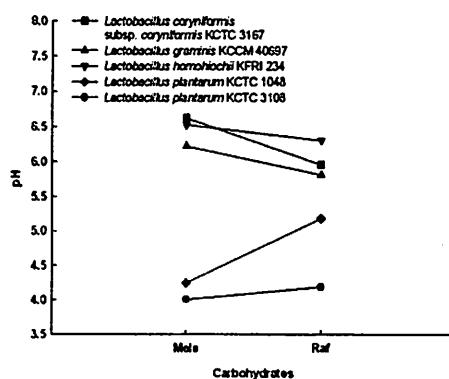


Fig. 6. Trisaccharide fermentative characteristics of the facultative heterofermentative *Lactobacillus* strains from fermented vegetables.

**복합 및 변형당류 발효:** *Lb. homohiochii* KFRI 234의 경우 gluconic acid 이외에는 전혀

이용하지 못하여 생육 pH 6.0 이상으로 나타났다 (Fig. 7). *Lb. coryniformis* subsp. *coryniformis* KCTC 3167은 pH 6.5 이상으로 gluconic acid만 이용하지 못하였다. *Lb. graminis* KCCM 40697은 amygdalin, esculin을 이용가능 한 것으로 나타났으며, *Lb. plantarum* KCTC 1048, *Lb. plantarum* KCTC 3108은 비교적 많은 수의 복합당을 이용하는 것으로 나타났다.

*Lb. plantarum* KCTC 1048, *Lb. plantarum* KCTC 3108은 amygdalin, esculin, mannitol, salicin, sorbitol은 잘 이용하였으나, saccharin, xylitol은 전혀 이용하지 못하는 것으로 나타났다. 알코올 복합당인 xylitol만 이용하지 못했다는 것은 xylitol 껌이 만들어진 이유이다. *Lb. graminis* KCCM 40697은 *Lb. homohiochii* KFRI 234와 함께 sorbitol을 이용하지 못하였다.

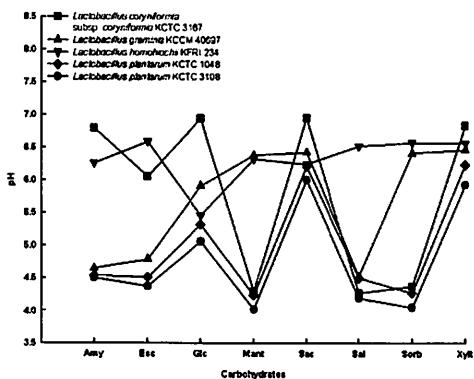


Fig. 7. Complex carbohydrates fermentation characteristics of the facultative heterofermentative *Lactobacillus* strains from fermented vegetables.

### 참고문헌

- 강국희. 1990. 유산균 식품학, 성균관대학교 출판부, 서울. p. 78.
- 강국희, 김동운, 차송일. 1988. *Kor. J. Appl. Microbiol. Bioeng.*, 16: 463.
- 권오식, 이삼빈. 2003. 계명대 기초과학 연구논집, 22: 35.
- 마지현, 권오식. 2007. 계명대 자연과학 연구논집, 25: 93.
- 마지현, 권오식, 윤경표, 이삼빈. 2005. 계명대 자연과학 연구논집, 24: 81.
- 백영진, 김종민, 임역규. 1993. 생물산업, 6: 23.
- 정명준. 1997. 생물산업. 10: 13-21.
- 정후길. 2001. 생물산업. 14: 39-48.
- 차성관. 2000. 미생물과 산업, 26: 13.
- Hammes, W. P., N. Weiss, and W. P. Holzapfel. 1991. The genera *Lactobacillus* and *Carnobacterium*. In: *The Prokaryotes. A Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications*. Eds. A. Balows, H. G. Trüper, M. Dworkin, W. Harder and K. H. Schleifer. Springer. New York. p. 1535.
- Hammes, W. P., and R. F. Vogel. 1995. The genus *Lactobacillus*. In: *The genera of lactic acid bacteria*. Eds. B. J. B. Wood and W. H. Holzapfel. Blackie Academic & Professional. London. p. 19.
- Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell. 1985. *Appl. Environ. Microbiol.*, 49: 377.
- Pot, B., W. Ludwig, K. Kersters, and K. H. Schleifer. 1994. Taxonomy of lactic acid bacteria. In: *Bacteriocins of lactic acid bacteria: microbiology, genetics and applications*. Eds. L. De Vuyst and E. J. Vandamme. Chapman and Hall. London. p. 13.

## Study on the Effects of 0.1X LB on the Survival and Stability of Newly Transconjugated Plasmid for Bioremediation in *Pseudomonas* sp. KM12TC in the Presence of Mercury Ion

Kyung Pyo Yoon\*

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

**Abstract.** When complex organic media such as 0.1X LB was added to the growth media containing subtoxic and toxic amount of mercury ion, the toxic effects of the mercury ion was reduced significantly, resulting in the increased stabilization of artificially transconjugated plasmids of *Pseudomonas* sp. KM12TC. The preliminary results showed that in the presence of 3  $\mu\text{M}$  mercury ion the stability of artificially transconjugated plasmids was not affected significantly. But in the presence of 10  $\mu\text{M}$  mercury ion *Pseudomonas* sp. KM12TC failed to grow. 0.1X LB could reduce the toxic effect of 10  $\mu\text{M}$  mercury ion significantly. When the stability of artificially transconjugated or naturally occurring plasmids after long term growth in toxic heavy metals was examined, one of the two plasmids was disposed randomly. The plasmids were selected and lost randomly and destabilized randomly also. When phenol degradation efficiencies were examined, the cells grown in 10  $\mu\text{M}$  mercury ion could not degrade phenol at all, whereas 6~7 days were needed to degrade about 95% of phenol when the cells were grown in 10  $\mu\text{M}$  mercury ion supplemented with 0.1X LB medium.

**Keywords :** *Pseudomonas* sp. KM12TC, Plasmid Stability.

### INTRODUCTION

Genes necessary for the resistance to toxic heavy metals are found in many different kinds of bacterial genera and species. Recombining such various genes becomes an interesting strategy to treat cocontaminated sites. Cocontaminated sites could require extra efforts for bioremediation process due to the nature of cocontaminants such as various toxic heavy metal ions and multiple toxic xenobiotics (1, 2).

Developing an efficient, reliable 'multi-capable' bacteria needs an extensive study on the

stability of foreign genes in the same cell. Once stabilized in cells, such cells might be used in many cocontaminated sites for bioremediation. Conjugations would be one of many methods to construct new bacteria strains with multi-capabilities since plasmid often contains many heavy metal genes and genes necessary for aromatic metabolism (3). Desirable environmental remediation systems could be made through the study of specific plasmid/host interactions.

*Pseudomonas* sp. KM12TC could have a number of important applications in the field of bioremediation and could be mingled into

\* corresponding author

Phone : 82-53-580-5540, Fax : 82-53-580-5540  
E-mail: kpy@kmu.ac.kr

indigenous bacterial populations and carry out highly effective remediation process in contaminated field such as various heavy metals and organic contaminants (4-6). In order to increase the plasmid stability in toxic mercury ion, 0.1X LB were added into the growth medium of the transconjugated bacteria. The effects of the addition of 0.1X LB on the stability of the plasmid in the presence of mercury ion was measured in this experiment.

## MATERIALS AND METHODS

### Bacteria and Plasmid System

*Pseudomonas* sp. KM12TC has both pKM10 and pKM20. Plasmid pKM10 presence in a cell was determined using its ability to utilize 1 g/l phenol as sole carbon and energy source. Plasmid pKM20 presence in a cell was determined using its ability to grow in 5 mM arsenate. Selective phenol-arsenate agar plates and appropriate slants of plasmid-bearing cultures were maintained and re-streaked as needed. In order to grow the cells, single colonies of transconjugant *Pseudomonas* sp. KM12TC had been purified by two successive platings, and these purified colonies were used for starter culture. After one day growth at 28°C, the cultures were diluted 10<sup>4</sup>-fold in 10 ml of prewarmed appropriate medium. The cells were grown in the 0, 3, or 10 µM HgCl<sub>2</sub> for up to four weeks in successive batch cultures. After appropriate dilutions of the cultures being plated on nonselective and selective agar plates, at least 100 individual colonies from each diluted sample were replica plated to plates containing appropriate selective or nonselective agar plates. Resistance to the arsenate was correlated with the presence of a plasmid pKM20, whereas the growth at phenol plates was correlated with the presence of

pKM10.

### Mercury resistance analysis

The overnight cultures in LB were diluted 100-fold in 5 ml phenol · As/basal medium supplemented with 0, 3, or 10 µM HgCl<sub>2</sub> for the mercury resistance test. The diluted cultures were incubated in a rotary shaker (150 rpm) at 28°C for up to 12 hr. 0.1X LB medium was added as needed. Turbidity (A<sub>600</sub>) was measured using a UV-vis spectrophotometer (Biochrome 4060, Pharmacia Biotech, USA).

### Selective and Non-selective Media

Four different media were used in this research: (i) Non-selective Luria-Bertani (LB) medium containing 10 g of Bacto Peptone, 5 g of Bacto yeast extract, and 5 g of NaCl in 1 liter of distilled water at pH7.5; (ii) pKM10-selective (phenol degradation-selective) phenol/basal medium (basal medium supplemented with phenol as the sole carbon and energy source at a concentration of 1 g/l).

The basal medium contained the following (per liter of deionized water): 2.13 g of Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 2.04 g of KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.067 g of CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.248 g of MgCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.5 mg of FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.4 mg of ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.002 mg of MnCl<sub>2</sub> · 4H<sub>2</sub>O, 0.05 mg of CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.01 mg of NiCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O, 0.015mg of H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>, and 0.25 mg of EDTA. The pH of the medium was 7.0.; (iii) pKM20-selective (arsenical resistance-selective) As/LB medium (LB supplemented with 5 mM Na<sub>2</sub>AsO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O); (iv) both pKM10 and pKM20-selective (both phenol -degradation and arsenical resistance -selective) phenol · As/basal medium (basal medium supplemented with both phenol and arsenate as specified above). All agar plates were prepared by adding bacto agar (Difco, Detroit, U.S.A.) in an amount of 15 g/l.

### Estimation of plasmid stability and activity

*Pseudomonas* sp. KM12TC were grown and prepared as described above. 0.1 ml of the appropriately diluted cells were spread on appropriate agar plates and incubated for two days at 28°C. Then, colonies on the plates were quantified by direct counts. For the measurement of the presence of the specific plasmid, plasmid-harboring (or plasmid-free) cells were identified by replica plating. First, 0.1 ml of appropriately diluted cells was spread on nonselective agar LB plates and incubated as described above. The plates were then replica-plated to selective agar plates containing (i) corresponding plasmid-selective arsenate, or (ii) phenol, or (iii) both. The selective medium of choice for replica-plating was as follows. Phenol-degradation phenotype (pKM10) was quantified by replica-plating on phenol/basal agar plates; arsenical-resistant phenotype (pKM20) on As/LB agar plates; dual phenotypes (both phenol-degradation and arsenical-resistant phenotypes in a single cell) on phenol·As/basal agar plates. All plates were incubated as described above. Colonies were directly counted and evaluated.

### Phenol-degradation efficiencies

For the phenol-degradation assay, the culture was grown in 250ml Erlenmeyer flasks on a rotary shaker (150 rpm) at 28°C for the specified time. The modified colorimetric method (9) was used to follow the degradation of phenol. Bacterial culture (1 ml) was added to an Effendorf tube containing 50 µl of 2 N NH<sub>4</sub>OH and 25 µl of 2% 4-aminoantipyrine. Then 25 µl of 8% K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> was added. After mixing, the tube containing the whole mixture was centrifuged to remove cells. A<sub>510</sub> of the supernatant was measured. In this way,

standard curve was obtained and the curve was used to determine phenol concentrations.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Effects of the addition of 0.1X LB on growth of *Pseudomonas* sp. KM12TC in mercury ion

To study effects of the addition of rich media (0.1X LB) on the maintenance of either pKM10 or pKM20 in transconjugant *Pseudomonas* sp. KM12TC (7, 8) grown in 3 µM or 10 µM mercury ion, the overnight cultures in LB were diluted 100-fold in 5 ml phenol·As/basal medium supplemented with 0, 3, 10, or 15 µM HgCl<sub>2</sub> for the mercury resistance test. The growth of *Pseudomonas* sp. KM12TC was followed up to 12 hours as shown in Figs. 1. Figure 1 shows that when

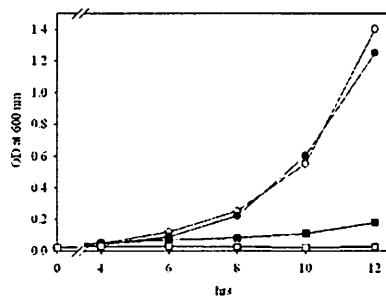


Fig. 1. Effect of 0.1X LB on the growth of *Pseudomonas* sp. KM12TC in mercury ions. Overnight cultures of *Pseudomonas* sp. KM10 were diluted in 5 ml phenol·As/basal medium supplemented with 0, 3, 10 µM or 10 µM HgCl<sub>2</sub> supplemented with 0.1X LB for the mercury resistance test and growth was followed by using a spectrophotometer. The bacterial cultures were grown as described in Materials and Methods. Symbols: ○, growth of *Pseudomonas* sp. KM12TC in the absence of HgCl<sub>2</sub>; ●, in 3 µM of HgCl<sub>2</sub>; □, in 10 µM of HgCl<sub>2</sub>; ■, in 10 µM of HgCl<sub>2</sub> supplemented with 0.1X LB.

the cells were grown in phenol · As/basal medium as described in Materials and Methods, the cells could grow in subtoxic amount of mercury (3  $\mu\text{M}$ ) as expected but failed to grow in toxic amount of mercury (10  $\mu\text{M}$ ). High concentration of mercury greatly impaired the growth of *Pseudomonas* sp. KM12TC. When 0.1X LB was added to the phenol · As/basal medium, the cells could begin to grow significantly as shown in Fig. 1. The addition of 0.1X LB to the phenol · As/basal medium exerted some positive effects to the survival of the cells in spite of toxicity of 10  $\mu\text{M}$  mercury ion.

#### Effects of on the stability of each plasmid grown in subtoxic amount of mercury ions

Plasmid survival could be affected by many growth conditions. In order to examine any preference in plasmid survival in harsh conditions such as toxic heavy metal ions, the stability of artificially transconjugated or naturally occurring plasmids after long term growth in toxic heavy metals was examined as described in Materials and Methods. To examine the effect of toxic heavy metal ion on the stability of plasmids, the *Pseudomonas* sp. KM12TC cells from overnight culture were appropriately diluted and grown in 0 or 3  $\mu\text{M}$  mercury chloride as described in Materials and Methods. Then, the cells were spread on appropriate selection agar plates and incubated for two days at 28°C for direct counting as described in Materials and Methods. In this experiment, the presence of specific plasmid at different growth conditions after one to three weeks growth were examined.

Figure 2A and 2B shows that the survival percents in the absence or presence of 3  $\mu\text{M}$  mercury ion after the specified periods of

growth varied insignificantly. When cells were grown in the absence of mercury the survival percent of both plasmids was about 94% after a week of growth (Fig. 2A). When the cells were grown for three weeks the survival percent was decreased up to 81% (Fig. 2A). When the cells were grown in 3  $\mu\text{M}$  mercury ion for a week, the survival percent of both plasmid was about 92% and after three weeks, the survival rate was about 78%. There was no significant difference in the percents between the growth in the absence or presence of subtoxic amount of mercury. Subtoxic amount of mercury failed to show any destabilization effect on the stability of plasmids.

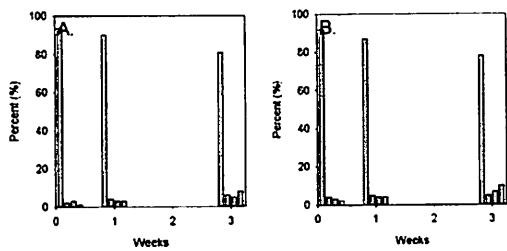


Fig. 2. Estimation of plasmid activities of *Pseudomonas* sp. KM12TC after growth in the absence and presence of subtoxic amount of mercury ion. The plasmid activity was expressed as percent survival as described in Materials and Methods. A: in the absence of mercury, B: in the 3  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ ; Symbols: from left to right, the cells harboring both plasmids, the cells harboring pKM10, the cells harboring pKM20, and The cells harboring none.

#### Effects of the addition of 0.1X LB on the stability of each plasmid grown in toxic amount of mercury ions

Toxic heavy metal ion could reduce the stability of plasmids because toxic heavy metal ion might be a factor which can influence the stability. The effect of the addition of 0.1X LB on the stability of plasmids were examined by estimating the

retention and expression of the phenol-degrading pKM10 and arsenical resistant pKM20 in the host *Pseudomonas* sp. KM12TC.

The *Pseudomonas* sp. KM12TC cells from overnight culture were appropriately diluted and grown in 10  $\mu\text{M}$  mercury chloride or in 10  $\mu\text{M}$  mercury chloride supplemented with 0.1X LB medium as described in Materials and Methods. Then, the cells were spread on appropriate selection solid agar plates and incubated for two days at 28°C for direct counting as described in Materials and Methods. In this experiment, the presence of specific plasmid at different growth conditions up to four weeks growth was examined. The direct cell plating was performed to examine changes in total stability of plasmid of either phenol degradation or heavy metal-resistance to quantify the effects of the addition of 0.1X LB on the stability of the each plasmid.

When cells were grown at 10  $\mu\text{M}$  mercury chloride, the survival percent of both plasmids was about 24% after a week of growth (Fig. 3A). But after growth of a week, the number of cells growing was so small that it was not possible to gather some significant data. Therefore no more data was shown in Fig 3A. But when 0.1X LB (final concentration) was added to the growth media, the plasmid survival percent was increased up to 34% after one week of growth (Fig. 3B). When the cells were grown for four weeks, the survival percent of both plasmid was about 10%. The cells harboring either pKM10 or pKM20 were 19–23% after a week growth and 5–4% after four weeks of growth. The survival percent was increased when 0.1X LB was added. The addition of 0.1X LB could compensate the destabilization effect of toxic heavy metal ion on the stability of plasmids.

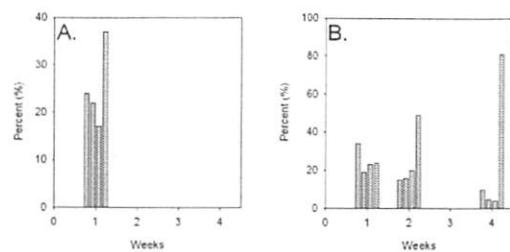


Fig. 3. Effects of the addition of 0.1X LB on the plasmid activities of *Pseudomonas* sp. KM12TC. The plasmid activity was expressed as percent survival as described in Materials and Methods. A: in the 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ ; B: 0.1X LB added to the 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ ; Symbols: from left to right, the cells harboring both plasmids, the cells harboring pKM10, the cells harboring pKM20, and The cells harboring none.

#### Effects of the addition of rich medium on the phenol degradation efficiencies

Toxic heavy metals could affect metabolic activities of microorganisms in different concentrations. In this experiment, the efficiencies of phenol degradation at different concentration of mercury ions after one months of growth in 0, 3, or 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  supplemented with 0.1X LB were examined. *Pseudomonas* sp. KM12TC grown for a month and tested for phenol degradation efficiency as described before.

The figure 4 shows that the phenol degradation efficiency of *Pseudomonas* sp. KM12TC in phenol · As/basal medium at 28°C after specified growth time. *Pseudomonas* sp. KM12TC grown for a month in the absence of mercury or in the presence of subtoxic amount of mercury took no longer than two days to degrade about 95% of phenol. *Pseudomonas* sp. KM12TC grown in 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  failed to degrade any significant amount of phenol (data not shown). But *Pseudomonas* sp. KM12TC grown in 10  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  supplemented with 0.1X LB took about seven

days to degrade approximately 95% of phenol probably due to the loss of plasmid pKM20 during the growth period. These results corresponded with previous results which showed that a little higher plasmid survival percentages in case of the addition of 0.1X LB in growth medium.

These results suggested that in order to prevent the higher loss of plasmid activity in the presence of toxic heavy metal ions in continuous liquid cultures, the addition of rich media might be necessary to reduce the loss of plasmids, resulting in the stable maintenance of newly introduced genetic elements for successful remediation of contaminated areas by many different kinds of toxicants.

## REFERENCES

- Bruins, M. R., S. Kapil, and F. W. Oehme. 2000. *Pseudomonas pickettii*: A Common Soil and groundwater aerobic bacteria with pathogenic and biodegradation properties. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 47: 105-111.
- Groudeva, V. I., S. N. Groudev, and A. S. Doycheva. 2001. Bioremediation of waters contaminated with crude oil and toxic heavy metals. *Int. J. Mineral Processing.* 62: 293-299.
- Kovalick, W. 1995. Remediation technologies for US hazardous waste sites. *Chemistry & Industry.* 13: 500-513.
- Ji, G., and S. Silver. 1995. Bacterial resistance mechanism for heavy metals of environmental concern. *J. Ind. Microbiol.* 14: 61-75.
- Weis, J. S., and P. Weis. 1992. Construction materials in estuaries: reduction in the epibiotic community on chromated copper arsenate (CCA) treated wood. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 83: 45-53.
- Folsom, B. R. and P. J. Chapman. 1991. Performance characterization of a model bioreactor for the biodegradation of tri chloroethylene by *Pseudomonas cepacia* G4. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 1602 -1608.
- Leighton, I. R., and C. F. Foster. 1998. The effect of heavy metals on a thermophilic methanogenic upflow sludge blanket reactor. *Bioresour. Technol.* 63: 131-137.
- Yoon, K. P. 2002. Plasmid-mediated arsenical and antimonial resistance determinants (ars) of *Pseudomonas* sp. KM20. *J. Microbiol. Biotechnol.* 12: 31-38.
- Yoon, K. P. 2003. Construction and characterization of multiple heavy metal -resistant phenol-degrading pseudomonads strains. *J. Microbiol. Biotechnol.* 13, 1001-1007.

## 복분자 과실 색소 추출조건의 최적화

정용진

계명대학교 자연과학대학 식품가공학과

## Optimized Conditions for Extracting Fruit Pigment of *Rubus coreanum*

Yong-Jin Jeong

Department of Food Science and Technology, Keimyung University,  
Daegu 702-701, Korea

**요약.** 복분자 과실 부산물의 색소를 활용하기 위하여 최적 추출조건을 설정하였다. 복분자의 색소는 에탄올 농도 80%에서 수율이 가장 높았으며, 에탄올 함량이 높을수록 총 페놀함량은 증가하여 60% 농도에서는 감소하는 경향이었다. 색소농도는 0.1% HCl을 첨가한 물 추출액과 40% 에탄올 추출액이 가장 높았고, 색소함량은 복분자 함량이 높을수록 증가하였다. 추출횟수별 색소 함량은 0.1% citric acid를 첨가한 40% 에탄올이 가장 높은 함량을 나타내었으며, 색소함량의 회수율은 물 추출은 약 50~70%, 40% 에탄올 추출은 약 80%로 높았다. 이상의 결과 복분자 추출용매는 물보다 40% 에탄올이 색소 및 총 페놀 함량, 추출율이 높았다.

**Abstract.** Optimized conditions were set to extract fruit pigment of *Rubus coreanum*. Extraction yield of fruit pigment for *Rubus coreanum* was higher when ethanol was controlled at 80%. The amount of phenol increased with the amount of ethanol but decreased when ethanol was controlled at 60%. The density of pigment was higher in water-based extracts containing 0.1% HCl and in ethanol-based extracts(40%). The amount of pigment increased with the amount of *Rubus coreanum*. The amount of pigment by time of extraction was higher in ethanol-based extracts(40%) containing 0.1% citric acid. Extraction ratio was 50% to 70% in water-based extracts and about 80% in ethanol-based extracts(40%). Thus, the amount of pigment, phenol concentration and extraction ratio were higher when ethanol(40%) was used as solvent for extracting essence of *Rubus coreanum*.

### I. 서 론

옛부터 복분자(*Rubus coreanum*)는 맛이 달고 독이 없으며 이뇨작용을 원활하게 하며 별다른 시비 및 농약의 사용 없이 재배 가능한 무공해 식품으로 식품학적 의의가 매우 크다. 또한, 복분자 열매에는 탄수화물, 유기산, 비타민, 안토시아닌계 색소 성분, 페놀성 물질 및 생리활성 물질 등 다양한 기능성 물질이 함유되어 있어

(1-6), 최근 복분자에 대한 관심이 고조되면서 복분자를 활용한 주스, 분말차, 술 등 여러 가지 가공식품이 개발되고 있으며 이러한 가공 공정 중 복분자씨와 복분자 과피에서 약 20~25% 정도의 부산물이 발생되고 있다. 특히, 식품의 색은 종류에 따라 제각기 독특한 빛깔을 나타내고 있어 식품의 관능적인 품질을 결정하는 중요한 품질인자로 매우 중요하다. 일반적으로 식품의 색은 그 선도나 가공조건 및 저장환경에 따라

변화하여 품질의 저하가 일어나므로 이를 방지하기 위하여 식품을 가공 할 때 인위적인 식용색소를 첨가하는 방법이 널리 사용되고 있다. 그러나 최근 인공합성색소의 인체에 대한 안정성 문제가 제기되면서 새로운 천연식용색소의 개발에 대한 관심이 높아지고 있다(7-10).

Anthocyanin은 수용성 색소로서 포도, 나무딸기, 적양배추, 꽃양배추 등과 유색미, 곡류, 자색감자, 자색고구마와 같은 뿌리 또는 줄기의 저장기관 및 꽂이나 열매 등에 존재하고, pH에 따라 주황에서부터 적색, 분홍색, 보라색 및 청색의 다양한 수용성 색소로서 자연계에 약 300여종의 anthocyanin이 존재하는 것으로 알려져 있으며(11-13), 적·자색의 천연색소로서 최고의 이용가치가 있다고 주목을 받고 있다. Anthocyanin 색소들은 비타민, 미네랄, 섬유소, 효소 등 유효성분들이 다양 함유되어 소비자들의 선호도가 증가하고 있는 파일 주스에 광범위하게 분포되어 있기 때문에 파일주스의 품질평가지표로 이용되고 있으며 이에 관한 연구가 이미 국외에서 활발히 진행 중이다.

또한 최근 anti-inflammatory activities, redox potentials, anticonvulsant activity, antioxidant activity 등의 생물학적 활성을 가졌음이 밝혀지면서 색소원 뿐만 아니라 기능성 물질로서 관심이 높아지고 있다.

따라서 본 연구에서는 복분자의 주스 착즙 후 부산물(박)을 활용하여 색소의 추출 및 농축조건을 조사하여 천연 식용 색소로 활용하고자 한다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 재료

본 실험에 사용한 재료는 2005년 전라북도 정읍시에서 수확하여 냉동 저장한 복분자 딸기를 구입하여 주스를 착즙하고 남은 박을 사용하였다.

### 2. 색소추출조건 설정

용매에 의한 색소 추출 : 천연색소로서 활용하기 위해서 용매는 물과 에탄올을 사용하였으며 용매의 농도는 0, 10, 20, 30, 40, 60, 80 및 95%이었다(12). 이때 추출조건은 복분자 박함량

10%에 각각의 용매를 첨가하여 30°C, 12시간 동안 shaking한 후 여과하여 여액을 분석하였다.

산 첨가에 의한 색소 추출 : 안토시아닌계 색소의 추출 효과를 높이기 위해 pH가 낮을수록 선명한 적색을 나타내는 색소의 특성을 이용하여 HCl, ascorbic acid와 유기산(acetic acid, citric acid, lactic acid, tartaric acid, phosphoric acid) 등을 물과 40% 에탄올에 각각 0.1% 첨가한 후 복분자 박을 추출하였다(14).

복분자 비율에 따른 추출 : 위의 결과를 바탕으로 효율성이 좋은 용매를 사용하여 복분자 비율에 대한 색소 추출특성을 조사하였다. 이때 추출조건은 복분자 함량 5, 10, 15 및 20%로 설정하였으며 추출온도 30°C에서 12시간 동안 shaking하여 추출하였다.

추출횟수에 따른 색소 : 용매에 복분자 박 10%를 첨가하여 30°C, 12시간 동안 추출·여과한 후 남아 있는 색소는 다시 새로운 용매를 사용하여 3회 반복 추출·여과하여 여액을 분석하였다.

### 3. 가용성 고형분 함량, pH, 당도 및 총산 측정

각 조건에서 얻어진 추출물의 가용성 고형분 함량은 식품공전(13)에 준하여 3회 반복 측정하여 시료에 대한 건물량(%)으로 나타내었다.

pH는 pH meter(Metrohm 691, Swiss)로 측정하였으며 당도는 굴절당도계(NI Atago Co., Japan)를 사용하여 측정하였다. 총산은 0.1N NaOH 용액으로 중화적정하여 초산함량으로 환산하였다.

### 4. 총 페놀 함량 측정

각 추출물의 페놀성 물질 함량은 Amerine과 Ough의 방법(15)에 의해 비색 정량하였다.

즉, 추출물을 100배 회석한 검액 5mL Folin-ciocalteu 시약 5mL를 가하여 혼합하고 3분 후 10% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 5mL를 넣어 진탕하고 1시간 실온에서 방치하여 700nm에서 흡광도를 측정하였다.

### 5. 색소농도 및 Hunter's color value 및 색소의 희수율 측정

색소농도는 추출물을 UV-spectrophotometer (Shimadzu UV-1601PC, Japan)을 이용하여 520 nm에서 3회 측정하여 평균으로 나타내었으며, Hunter's color value는 UV-spectrophotometer (Shimadzu UV-1601PC, Japan)를 이용하여 L (lightness), a (redness), b (yellowness) 값을 측정하였다. 복분자 박의 추출횟수별 색소의 희수율은 다음 식에 의해 계산하였다(16). 복분자 박의 전체 색소량은 복분자 박으로부터 추출된 색소를 모두 합한 값으로 나타냈다.

$$\text{색소 희수율} (\%) = \frac{\text{매회 추출된 색소량}}{\text{복분자 박의 전체 색소량}} \times 100$$

### 6. 일반세균수 및 대장균군 측정

총균수는 멸균수로 10배수 연속 희석한 다음 plate count agar(Difco, USA)를 사용하여 100  $\mu\text{l}$  분주한 후 37°C, 48시간 이상 배양한 후 생성된 미생물의 집락을 개수로 하여 1 mL 당 colony forming unit (CFU)를 개수하였다. 대장균군은 desoxycholate lactose agar(Difco, USA)를 이용하여 측정하였다. 검액 1 mL를 petri dish에 넣고 배지를 주입한 후 균질화하여 응고시키고 중증배지를 부어 재 응고시킨 것을 30°C에서 24시간 이상 배양하여 적색의 집락을 개수하였다.

## III. 결과 및 고찰

### 1. 용매에 대한 색소 추출특성

복분자 부산물을 이용한 색소 추출에서 먼저 에탄올 농도에 따른 색소 추출특성은 80% 에탄올에서 색소농도 9.51로 가장 높았으며, 물 추출물의 색소 농도는 2.57로 가장 낮은 경향을 보였다(Table 1). 에탄올 농도에 대한 색소농도는 에탄올 함량이 높을수록 증가하였으나 95% 에탄올에서는 7.69로 색소농도가 떨어지는 것으로 나타났다. Kim 등(16)이 보고한 자색고구마의 추

출특성에서는 에탄올보다 물에서 추출효과가 높았다고 나타나 본 실험과 상이한 결과를 보였다. 또한 anthocyanin계 색소에 유효성분이 많은 것으로 밝혀져 각 추출물에 대한 총 페놀 함량을 분석하였다. 에탄올 함량이 높을수록 총 페놀함량은 증가하다가 60% 에탄올에서부터 감소하는 경향이었으며 205.4 mg%인 40% 에탄올 추출액의 함량이 가장 높은 것으로 나타났다.

Table 1. Extraction pigment concentration and total phenols by ethanol concentration in *Rubus coreanum* peel

Ethanol conc. (%)	Pigment conc. (nm)	Total phenols (mg%)
0	2.57	78.74
10	3.07	96.98
20	4.10	125.3
30	5.11	155.8
40	7.53	205.4
60	8.39	195.8
80	9.51	190.7
95	7.69	133.6

### 2. 산 첨가에 따른 색소 추출특성

부산물로 발생하는 복분자 박의 추출조건을 확립하기 위해 0.1%의 산을 첨가하여 그 특성을 살펴보았다. 색소농도는 0.1% HCl을 첨가한 물 추출액과 40% 에탄올 추출액의 경우 각각 34.36과 36.12로 가장 높았고 물 추출액에서는 무첨가구가, 40% 에탄올 추출액에서는 0.1% ascorbic acid를 첨가한 경우 3.01과 10.60으로 가장 낮았다. 이상의 결과는 유 등(17)이 보고한 포도부산물인 과피 추출할 때 0.1% HCl이 가장 높게 추출되었다는 결과와 유사한 경향으로 나타났다 (Table 2). 총 페놀 함량의 경우 물 추출액은 0.1% HCl에서 165.32 mg%, 40% 에탄올은 0.1% ascorbic acid에서 294.00 mg%로 높게 나타났고 물 추출액의 모든 첨가구보다 40% 에탄올 추출액에서 총 페놀 함량이 높게 나타났다. 각 추출액에 대한 Hunter's color value는 Table 3에서 보는 바와 같이 산을 첨가한 물 추출액은 색소농도가 높을수록 밝기, 적색도 및 황색도 모두가 낮아지는 경향으로 Kim 등(18)의 연구한 유색

미, 검정콩, 검정 찰옥수수의 안토시아닌 색소추출의 결과와 유사하였으나 40% 에탄올 추출액의 경우는 상반되는 경향을 나타내었다.

Table 2. Extraction pigment concentration and total phenols by acids species in *Rubus coreanum* peel

	Acids	Pigment conc. (nm)	Total phenols (mg%)
Water	Control	3.01	79.74
	Ascorbic	3.25	141.46
	Acetic	3.33	67.80
	Citric	4.40	73.30
	Lactic	4.42	68.46
	Phosphoric	13.46	96.44
Ethanol 40%	Hydrochloric	34.36	165.32
	Control	11.32	255.08
	Ascorbic	10.60	294.00
	Acetic	11.42	203.80
	Citric	16.53	199.70
	Lactic	16.65	189.32
	Phosphoric	23.23	180.70
	Hydrochloric	36.12	213.6

Table 3. Hunter's color value for acid species of extraction solution from *Rubus coreanum*

	Acids	Hunter's color value		
		L	a	b
Water	Control	27.93	56.87	18.94
	Ascorbic	29.75	59.11	19.84
	Acetic	30.03	59.38	20.50
	Citric	28.64	59.06	19.74
	Lactic	28.61	59.21	19.84
	Phosphoric	21.05	53.27	14.68
Ethanol 40%	Hydrochloric	15.53	42.45	10.81
	Control	18.12	47.32	12.57
	Ascorbic	19.89	50.64	13.02
	Acetic	20.17	51.36	13.97
	Citric	18.52	48.40	12.90
	Lactic	18.03	47.27	12.56
	Phosphoric	20.60	53.21	14.36
	Hydrochloric	20.20	52.85	14.09

### 3. 복분자 비율에 따른 색소 추출특성

물과 40% 에탄올에 각각 0.1% citric acid를 첨가하여 복분자 부산물의 함량별 이화학적 품질 특성을 비교하였다. 색소함량은 무첨가구와 산 첨가구에서 모두 박 함량이 높아질수록 증가하는 경향을 보였으나 시료 g당 색소 함량에서는 복분자 박 함량이 많을수록 감소하는 경향으로 나타났다 (Table 4).

Table 4. Characteristics of quality for solvent and ratio of *Rubus coreanum* peel

	Peel content (%)	Pigment content (nm)	Pigment content (g)	Total phenols (mg%)	Total phenols/g (mg%)
Water	5	1.33	0.266	47.44	9.49
	10	2.34	0.234	71.04	7.10
	20	2.65	0.132	78.70	3.93
	30	2.93	0.098	80.96	2.70
	0.1%	5	1.86	48.64	9.73
	citric acid	10	2.77	65.58	6.56
Ethanol 40%	20	3.37	0.168	78.48	3.92
	30	4.24	0.141	96.52	3.22
	5	2.42	0.484	108.38	21.67
	10	6.68	0.668	169.86	16.99
	20	14.54	0.727	308.00	15.40
	30	18.10	0.603	358.00	11.93
	5	6.36	1.272	113.32	22.66
	10	11.28	1.128	186.02	18.60
	20	19.64	0.982	298.40	14.92
	30	26.83	0.894	386.20	12.87

이는 단순 추출액의 색소함량은 용매에 대한 박 함량의 비율이 높을수록 박에 함유된 색소가 많게 나타났으나 실질적으로 시료 g에 대한 색소함량에서는 박의 함량이 많을수록 시료에 함유된 색소가 1차 추출로 모두 추출되지 않았으나 g당 박 함량이 높을수록 색소 함량이 낮게 나타났다. 또한 총 페놀 함량도 색소함량과 유사한 경향으로 나타났다.

### 4. 추출횟수에 대한 색소 추출특성

복분자 부산물을 이용한 최적 색소추출조건에서 추출횟수별 각 품질특성은 Table 5와 6에 나

타내었다. 추출횟수별 색소 함량의 경우 무첨가구와 0.1% citric acid를 첨가한 40% 에탄올이 물 추출액보다 높게 나타났으며 특히 0.1% citric acid를 첨가한 40% 에탄올에서 13.42로 가장 낮은 물 추출액보다 약 4배 이상 높은 함량으로 나타났다. 색소함량에 대한 회수율을 살펴보면 물 추출인 경우 1회 추출에서 50~70% 이상 회수된 것에 비해 40% 에탄올 추출에서는 80% 이상으로 회수율이 높았고, 0.1% citric acid를 첨가한 물 추출액을 제외한 다른 구간에서는 2회 추출로 90% 이상의 높은 회수율을 보였다. 총 페놀 함량은 색소 함량에 비해 물 추출액과 40% 에탄올 추출액의 함량 회수율의 차이

가 적었으며 물과 40% 에탄올의 경우 무첨가구와 0.1% citric acid 첨가구 간의 함량의 차이도 적게 나타났다. 또한 총 페놀성 화합물의 회수율에서 물 추출액의 경우 1회 추출에서 60% 이상 나타났으나 2회, 3회 추출까지 많은 함량이 추출되었으며, 40% 에탄올은 2회 추출로 90% 이상의 회수율을 얻을 수 있었다. 가용성 고형분 함량은 0.37~0.76g으로 모든 구간에서 미량으로 측정되었다. 이상의 결과로 물보다 40% 에탄올로 추출하였을 경우 복분자 부산물(박)에 함유되어 있는 색소 및 총 페놀 함량 등의 추출율이 높아 품질이 우수한 색소원을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

Table 5. Characteristics of quality by extraction frequency for solvent

		Pigment content (nm)				Pigment recovery rate (%)			
		Extraction frequency							
		1st	2nd	3rd	Total	1st	2nd	3rd	Total
Water	Control	2.34	0.59	0.27	3.20	73.13	18.44	8.43	100
	0.1% citric acid	2.77	1.46	0.85	5.08	54.53	28.74	16.73	100
Ethanol 40%	Control	6.68	0.58	0.25	7.51	88.95	7.72	3.33	100
	0.1% citric acid	11.28	1.51	0.63	13.42	84.05	11.25	4.70	100

Table 6. Total phenols and soluble solids by extraction frequency for solvent

		Extraction frequency									
		Total phenols (mg%)				Total phenols recovery rate (%)				Soluble solid contents (%)	
		1st	2nd	3rd	Total	1st	2nd	3rd	Total	1st	2nd
Water	Control	71.04	25.34	14.78	111.16	63.91	22.80	13.29	100	0.326	0.050
	0.1% citric acid	65.58	25.22	13.32	104.12	62.99	24.22	12.79	100	0.406	0.142
Ethanol 40%	Control	169.86	31.00	17.76	218.62	77.70	14.18	8.12	100	0.290	0.144
	0.1% citric acid	186.02	29.78	13.37	229.17	81.17	13.00	5.83	100	0.628	0.132

## 참고문헌

1. Lee JW, Do JH. 2000. Determination of total phenolic compounds from the fruit of *Rubus coreanum* and antioxidative activity. *J. Korean Soc Food Sci Nutr.*, 29, 943-947.
2. Lee YA, Lee MW. 1995. Tannins from *Rubus coreanum*. *Korean J. Pharmacogn.*, 6, 27-30.
3. Lee MW. 1995. Phenolic compounds from the leaves of *Rubus coreanum*. *Yakhak. Hoeji*, 39, 200-204.
4. Bae GH. 2000. In the medical plants of Korea. Kyohak Publishing Co., Ltd., Seoul.
5. Bang GC. 1996. Tannins from the fruits of *Rubus coreanum* MS. Tesis, Chungang University, Ansan.
6. Park YS, Chang HG. 2003. Lactic acid fermentation and biological activities of *Rubus coreanus*. *J. Kor. Soc. Agric. Chem. Biotechnol.*, 46, 367-375.
7. Francis FJ. 1989. Food colorants: anthocyanins. *Crit. Rev. Food Sci. & Nutr.*, 28, 273-314.
8. Labell F. 1993. Grapes provide brilliant red color. *Food Processing.*, 54, 88-89.
9. Makakis P. 1974. anthocyanins and their stability in foods. *Crit. Rev. Food Technol.*, 4, 437-445.
10. Jackman RL, Yada RY, Tung MA, Speers RA. 1987. Anthocyanins as food colorants. A review. *J. Food Biochem.*, 11, 201-208.
11. Henry BS. 1996. Natural food colorants. pp. 39-78. In : *Natural Food Colorants*, 2nd ed. Hendry, G.A.F. and Houghton, J.D. (ed.). Houghton Blacki A&P, Great Britain.
12. Lee JW, Lee HH, Rhim JW. 2001. Extraction characteristics of red flower cabbage pigment. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 33, 149-152.
13. KMHW (1997) Korean food standard code. The Korean ministry of health and welfare. p. 507-510.
14. Rhim JW, Lee JW, Jo JS, Yeo KM. 2001. Pilot plant scale extraction and concentration of purple-fleshed sweet potato anthocyanin pigment. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 33, 808-811.
15. Amerine, MA, Ough, CS. 1980 Methods for analysis of musts and wine. Wiley & Sons, New York. p. 176-180.
16. Kim SJ, Rhim JW, Lee LS, Lee JS. 1996. Extraction and characteristics of purple sweet potato pigment. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 28, 345-351.
17. Yoo MA, Chung HK, Kang MH. 2004. Optimal extract methods of antioxidant compounds from coat of grape dreg. *Kor. J. Food Sci. Technol.*, 36, 134-140.
18. 김선립, 황종진, 송진, 송정춘, 정국현. 2000. 유색미, 검정콩, 검정 찰옥수수의 안토시아닌 색소의 추출, 정제 및 정량. *한육지*, 32, 146-152.

부 록

2006학년도 자연과학연구소  
소속교수의 논문투고업적

## Effective action for the scalar field theory with higher vertices

Chungku Kim

Department of Physics, College of Natural Science, Kyungpook National University, Daegu 705-701, Korea  
(Received 8 June 2006; published 25 September 2006)

We derive a new kind of recursion relation to obtain the one-particle-irreducible Feynman diagrams for the effective action. By using this method, we have obtained the graphical representation of the four-loop effective action in the case of the general bosonic field theory which has vertices higher than the four-point vertex.

DOI: 10.1103/PhysRevD.74.067702

PACS numbers: 11.15.Bt, 12.38.Bx

## I. INTRODUCTION

In quantum field theory, the effective action plays an important role in studies of the vacuum instability, the dynamical symmetry breaking, and the dynamics of composite particles [1]. It is well known that the effective action of the given particle physics model can be obtained from the 1PI vacuum diagrams with the generalized propagator and the vertices which depend on the classical field [2]. There exist various packages such as FEYNARTS [3] and QGRAF [4] to determine the Green functions of the given particle physics model. Recently, a systematic approach to obtain the recursive generation of the connected and the 1PI Feynman diagrams of the multicomponent  $\phi^4$ -theory, QED and the scalar QED was proposed by using the functional integral identity  $\int D\Phi \frac{\delta}{\delta\Phi} F[\Phi] = 0$  [5–11]. Moreover the recursive generation of the two-particle-irreducible (2PI) effective action have been analyzed [12] and the four-particle- irreducible (4PI) effective action was obtained by using the result of the 2PI effective action [13]. In this paper, we propose a new kind of recursion relation to obtain the 1PI Feynman diagrams for the effective action. In Sec. II, we derive the recursion relation for the effective action and apply this method to the general bosonic field theory which have vertices higher than the four-point vertex and obtain the graphical representation of the four-loop effective action. In Sec. III, we give some discussions and conclusions.

## II. A NEW RECURRENCE RELATION FOR THE FEYNMAN DIAGRAMS OF THE EFFECTIVE ACTION

In this section, we will first derive a recursion relation for the Feynman diagrams of the effective action for the action given by

$$S[\Phi] = \int \left\{ \frac{1}{2} \Phi_A \Delta_{AB}^{-1} \Phi_B + S^{int}[\Phi] \right\}, \quad (1)$$

where the interaction  $S^{int}[\Phi]$  contains the higher vertices which appear in lattice regularization [14] as well as the cubic and the quartic interactions. In this paper, we use a notation where the capital letters contain both the space-time variables and the internal indices and the repeated

capital letters mean both the integration over continuous variables and the sum over internal indices. For example, if the capital letter  $A$  contains a space-time variable  $x$  and the internal index  $i$ ,

$$J_A \Phi_A = \sum_i \int d^4x J_i(x) \Phi_i(x). \quad (2)$$

The generating functional for the Green functional  $W[J]$  is given by the functional integral

$$\exp \left\{ -\frac{1}{\hbar} W[J] \right\} = \int D\Phi \exp \left\{ -\frac{1}{\hbar} (S(\Phi) - J_A \Phi_A) \right\}. \quad (3)$$

Here  $\hbar$  is an expansion parameter and we will put  $\hbar = 1$  at final stage. The effective action  $\Gamma[\phi]$  is defined by the Legendre transformation of the Green functional  $W[J]$  as

$$\Gamma[\phi] = W[J] - J_A \phi_A, \quad (4)$$

where

$$\phi_A = \frac{\delta W[J]}{\delta J_A}. \quad (5)$$

By using (4) and (5), we can obtain the relation

$$\frac{\delta \Gamma[\phi]}{\delta \phi_A} = -J_A \quad (6)$$

and from (3) and (4), we can write

$$\exp \left\{ -\frac{1}{\hbar} \Gamma[\phi] \right\} = \int D\Phi \exp \left\{ -\frac{1}{\hbar} (S(\Phi) - J_A (\Phi_A - \phi_A)) \right\}. \quad (7)$$

By expanding the effective action  $\Gamma[\phi]$  around  $\hbar$  as

$$\Gamma = \sum_{l=0} \hbar^l \Gamma^{(l)}[\phi], \quad (8)$$

we can obtain the loopwise expansion of  $\Gamma[\phi]$  [15]. Now let us change the variable of the functional integral  $\Phi \rightarrow \Phi + \phi$  and expand  $S(\Phi + \phi)$  as

$$S[\Phi + \phi] = S[\phi] + \sum_{N=1} \frac{1}{N!} S_{A_1 \dots A_N}[\phi] \Phi_{A_1} \dots \Phi_{A_N}, \quad (9)$$

where

## BRIEF REPORTS

$$S_{A_1 \dots A_N}[\phi] = \frac{\delta^N S[\phi]}{\delta \phi_{A_1} \dots \delta \phi_{A_N}}. \quad (10)$$

Actually the vertex  $S_{A_1 \dots A_N}$  corresponds to one point in space-time. By substituting (9) into (7), we can obtain the first two terms of the effective action as

$$\Gamma^{(0)}[\phi] = S[\phi], \quad \Gamma^{(1)}[\phi] = \frac{1}{2} \text{Tr} \ln D^{-1}, \quad (11)$$

where

$$D_{AB}^{-1} = S_{AB}[\phi] = \Delta_{AB}^{-1} + \frac{\delta^2 S^{int}[\phi]}{\delta \phi_A \delta \phi_B}. \quad (12)$$

The higher order effective action  $\Gamma[\phi]$  is given by the 1PI vacuum diagrams with the propagator  $D_{AB}^{-1}$  and the vertices  $S_{A_1 \dots A_N}[\phi]$  [2].

Now consider the functional identity

$$\frac{\delta J_A}{\delta \phi_C} \frac{\delta \phi_C}{\delta J_B} = \delta_{AB}. \quad (13)$$

From (6), we can obtain

$$\frac{\delta J_A}{\delta \phi_C} = -\frac{\delta^2 \Gamma[\phi]}{\delta \phi_A \delta \phi_C}, \quad (14)$$

and from (3), (5), and (7) we obtain

$$\begin{aligned} \frac{\delta \phi_C}{\delta J_B} &= \frac{\delta^2 W[J]}{\delta J_C \delta J_B} \\ &= \frac{1}{\hbar} \left( \phi_C \phi_B - \frac{\int D\Phi \Phi_C \Phi_B \exp[-\frac{1}{\hbar}(S(\Phi) - J_A \Phi_A)]}{\int D\Phi \exp[-\frac{1}{\hbar}(S(\Phi) - J_A \Phi_A)]} \right) \\ &= \frac{2}{\hbar} \left( \frac{\delta \Gamma^{(0)}[\phi]}{\delta \Delta_{AC}^{-1}} - \frac{\delta \Gamma[\phi]}{\delta \Delta_{AC}^{-1}} \right) = -\frac{2}{\hbar} \frac{\delta}{\delta D_{AC}^{-1}} \sum_{l=1}^n \hbar^l \Gamma^{(l)}. \end{aligned} \quad (15)$$

We have used the fact that  $\Gamma^{(n)}$  depends on  $\Delta^{-1}$  only through the  $D_{AB}^{-1}$  [see (11) and (12)] when  $n \geq 1$  to obtain the last line of the above equation. By using the identity

$$\frac{\delta}{\delta D_{AC}^{-1}} = \frac{\delta D_{PQ}}{\delta D_{AC}^{-1}} \frac{\delta}{\delta D_{PQ}} = -D_{AP} D_{CQ} \frac{\delta}{\delta D_{PQ}}, \quad (16)$$

and by substituting (14) and (15) into (13), we obtain

$$2 \frac{\delta}{\delta D_{AB}} \sum_{l=1}^n \hbar^l \Gamma^{(l)} = -\hbar D_{AM}^{-1} \left[ \frac{\delta^2 \Gamma[\phi]}{\delta \phi_M \delta \phi_N} \right]^{-1} D_{NB}^{-1}. \quad (17)$$

By using (11), we can see that the order  $\hbar$  term of (17) is already satisfied. As usual, let us define the proper self-energy  $\Pi$  and the full propagator  $G$  as

$$\Pi_{AC} = \sum_{l=1}^n \hbar^l \frac{\delta^2 \Gamma^{(l)}[\phi]}{\delta \phi_A \delta \phi_C} = \sum_{l=1}^n \hbar^l \Pi_{AC}^{(l)}, \quad (18)$$

PHYSICAL REVIEW D 74, 067702 (2006)

and

$$G_{AB}^{-1} = \frac{\delta^2 \Gamma[\phi]}{\delta \phi_A \delta \phi_B} = D_{AB}^{-1} + \Pi_{AB} \quad (19)$$

so that

$$G = D + D \sum_{l=1}^n (-\Pi D)^l. \quad (20)$$

By substituting (18) and (20) into (17) and by multiplying  $D_{AB}$ , we obtain the recursion relation for the effective action as

$$2 \frac{\delta \Gamma^{(n)}}{\delta D_{AB}} D_{AB} = -\text{Tr} \left[ \sum_{l=1}^n (-\Pi D)^l \right]^{(n-1)} \quad (n \geq 2), \quad (21)$$

where the notation  $[...]^{(n)}$  means the order  $\hbar^n$  term of the quantity inside of the bracket. Equation (21) is the central result of this paper and by using this equation, we can obtain the  $n$ th order effective action from the lower order self-energies. Note that the result of the operation  $\frac{\delta \Gamma^{(n)}}{\delta D_{AB}} D_{AB}$  is equal to multiplying each diagram in  $\Gamma^{(n)}$  by the number of its propagators.

Now, let us apply the recursion relation (21) to the general bosonic field theory which have vertices higher than the four-point vertex. In case of the two-loop effective action  $\Gamma^{(2)}$ , (21) becomes

$$2 \frac{\delta \Gamma^{(2)}}{\delta D_{AB}} D_{AB} = \Pi_{AB}^{(1)} D_{BA} = \frac{\delta^2 \Gamma^{(1)}[\phi]}{\delta \phi_A \delta \phi_B} D_{BA}. \quad (22)$$

The derivative with respect to  $\phi$  can act either to the propagator  $D_{AB}$  which contains the term  $S_{AB}[\phi]$  or to the vertex  $S_{A_1 \dots A_N}[\phi]$  as

$$\frac{\delta D_{AB}}{\delta \phi_C} = - \left( D \frac{\delta D^{-1}}{\delta \phi_C} D \right)_{AB} = -D_{AP} S_{CPQ} D_{QB}, \quad (23)$$

and

$$\frac{\delta S_{A_1 \dots A_N}[\phi]}{\delta \phi_C} = S_{A_1 \dots A_N C}[\phi]. \quad (24)$$

In the graphical representation, a line represents the propagator  $D$ , and a  $n$ -point vertex has the factor  $S_{A_1 \dots A_n}$ . Also a box with a capital letter represents the vertex which has indices that are not contracted with the propagators attached to it so that

$$\begin{array}{c} \text{A..B} \\ \boxed{P \quad Q \quad R} \end{array} = S_{A..BP'Q'R'} D_{PP'} D_{QQ'} .. D_{RR'}, \quad (25)$$

## BRIEF REPORTS

For example, (23) can be expressed as

$$\frac{\delta}{\delta \phi_c} [ \text{--- } ]_{AB} = - [ \text{--- } \square \text{--- } ]_{AB}. \quad (26)$$

Then we can obtain from (11) and (18)

$$\begin{aligned} \Pi_{AB}^{(1)} &= \frac{\delta^2 \Gamma^{(1)}[\phi]}{\delta \phi_A \delta \phi_B} = \frac{1}{2} \frac{\delta}{\delta \phi_A} \text{Tr} \left[ D \frac{\delta D^{-1}}{\delta \phi_B} \right] \\ &= \frac{1}{2} [-D_{PQ} S_{AQR} D_{RS} S_{BSP} + D_{PQ} S_{ABPQ}] \quad (27) \\ &= \frac{1}{2} [-A \text{--- } B + AB \text{--- } ]. \end{aligned}$$

By using (22), we can obtain

## PHYSICAL REVIEW D 74, 067702 (2006)

$$\begin{aligned} \Gamma^{(2)}[\phi] &= -\frac{1}{12} S_{AQR} S_{BSP} D_{AB} D_{PQ} D_{RS} + \frac{1}{8} S_{ABPQ} D_{AB} D_{PQ} \\ &= -\frac{1}{12} \bigcirc \text{--- } + \frac{1}{8} \bigcirc \text{--- }. \end{aligned} \quad (28)$$

In case of three-loop effective action  $\Gamma^{(3)}$ , (21) becomes

$$2 \frac{\delta \Gamma^{(3)}}{\delta D_{AB}} D_{AB} = (\Pi_{AB}^{(2)} - \Pi_{AP}^{(1)} D_{PQ} \Pi_{QB}^{(1)}) D_{BA}. \quad (29)$$

$\Pi^{(2)}$  can be obtained from  $\Gamma^{(2)}[\phi]$  by operating  $\frac{\delta^2}{\delta \phi_A \delta \phi_B}$ . The graphical representation of this operation to the diagrams of  $\Gamma^{(2)}[\phi]$  is given by

$$\begin{aligned} \Pi_{AB}^{(2)} &= \frac{\delta^2}{\delta \phi_A \delta \phi_B} \left[ -\frac{1}{12} \bigcirc \text{--- } + \frac{1}{8} \bigcirc \text{--- } \right] = \frac{\delta}{\delta \phi_B} \left[ -\frac{1}{6} A \text{--- } \bigcirc + \frac{1}{4} \text{--- } \bigcirc \text{--- } + \frac{1}{8} \bigcirc \text{--- } \text{--- } - \frac{1}{4} A \text{--- } \bigcirc \text{--- } \right] \\ &= -\frac{1}{6} AB \text{--- } \bigcirc - \frac{1}{6} A \text{--- } \text{--- } B + \frac{1}{2} (B \text{--- } \bigcirc \text{--- } + A \text{--- } \bigcirc \text{--- } ) + \frac{1}{4} \text{--- } \bigcirc - \frac{1}{2} \text{--- } \bigcirc \text{--- } - \frac{1}{2} \text{--- } \bigcirc \text{--- } \\ &\quad + \frac{1}{8} \bigcirc \text{--- } \text{--- } AB - \frac{1}{4} (B \text{--- } \bigcirc \text{--- } A + A \text{--- } \bigcirc \text{--- } B) - \frac{1}{4} \bigcirc \text{--- } \text{--- } AB + \frac{1}{4} A \text{--- } \bigcirc \text{--- } \text{--- } B + \frac{1}{2} \text{--- } \bigcirc \text{--- } \text{--- } B. \end{aligned} \quad (30)$$

By substituting  $\Pi^{(1)}$  and  $\Pi^{(2)}$  given in into (29), we obtain

$$\begin{aligned} \Gamma^{(3)}[\phi] &= -\frac{1}{16} \bigcirc \text{--- } \bigcirc \text{--- } - \frac{1}{48} \bigcirc \text{--- } + \frac{1}{8} \bigcirc \text{--- } \text{--- } + \frac{1}{8} \bigcirc \text{--- } \text{--- } \text{--- } \\ &\quad - \frac{1}{16} \bigcirc \text{--- } - \frac{1}{24} \bigcirc \text{--- } - \frac{1}{12} \bigcirc \text{--- } + \frac{1}{48} \text{--- } \text{--- } \text{--- } \text{--- }. \end{aligned} \quad (31)$$

In the case of the four-loop effective action  $\Gamma^{(4)}$ , (21) becomes

$$\begin{aligned} 2 \frac{\delta \Gamma^{(4)}}{\delta D_{AB}} D_{AB} &= (\Pi_{AB}^{(3)} - 2 \Pi_{AP}^{(2)} D_{PQ} \Pi_{QB}^{(1)} \\ &\quad + \Pi_{AP}^{(1)} D_{PQ} \Pi_{QR}^{(1)} D_{RS} \Pi_{SB}^{(1)}) D_{BA}. \end{aligned} \quad (32)$$

It is straightforward to obtain  $\Gamma^{(4)}$  by following the same steps as before. The result is

$$\Gamma^{(4)} = \Gamma_{1PI}^{(4A)} + \Gamma_{2PI}^{(4B)} + \Delta \Gamma^{(4)}, \quad (33)$$

where  $\Gamma_{1PI}^{(4A)}[\phi]$  is the Feynman diagrams of the four-loop 1PI effective action obtained from the three and four-point vertex and  $\Gamma_{2PI}^{(4B)}[\phi]$  is the Feynman diagrams of the four-loop 2PI effective action obtained from the higher vertices.  $\Gamma_{1PI}^{(4A)}[\phi]$  and  $\Gamma_{2PI}^{(4B)}[\phi]$  have been reported previously [10,12] and we have obtained a result which agrees with the previous results exactly.  $\Delta \Gamma^{(4)}$ , which is the Feynman diagrams of the four-loop 1PI effective action obtained from the higher vertices that were not reported previously,

and is given by

$$\begin{aligned} \Delta \Gamma^{(4)} &= -\frac{1}{24} \bigcirc \text{--- } \bigcirc \text{--- } + \frac{1}{24} \bigcirc \text{--- } \bigcirc \text{--- } - \frac{1}{8} \bigcirc \text{--- } \\ &\quad + \frac{1}{12} \bigcirc \text{--- } \bigcirc \text{--- } + \frac{1}{24} \bigcirc \text{--- } \bigcirc \text{--- } + \frac{1}{32} \bigcirc \text{--- } \text{--- } \\ &\quad - \frac{1}{32} \bigcirc \text{--- } \bigcirc \text{--- }. \end{aligned} \quad (34)$$

## III. DISCUSSIONS AND CONCLUSIONS

In this paper, we have derived a new kind of recursion relation to obtain the effective action. We have applied this method to the general bosonic field theory which has vertices higher than the four-point vertex and have obtained the graphical representation of the four-loop effective action. The 1PI diagrams of the  $\phi^4$ -theory with only three and four-point vertices agreed with previous results and we have given the results for the 1PI diagrams with the higher vertices. The extension of the method we have used in this paper to obtain the recursive generation of the 1PI effective action to the case of the 2PI and 4PI effective action is in progress.

## ACKNOWLEDGMENTS

This research was supported in part by the Institute of Natural Science.

## BRIEF REPORTS

- [1] For a review and references, see M. Sher, Phys. Rep. **179**, 273 (1989).
- [2] R. Jackiw, Phys. Rev. D **9**, 1686 (1974).
- [3] J. Kublbeck, M. Bohm, and A. Denner, Comput. Phys. Commun. **60**, 165 (1990); T. Hahn, Comput. Phys. Commun. **140**, 418 (2001).
- [4] P. Nogueira, J. Comput. Phys. **105**, 279 (1993); <ftp://gtae2.ist.utl.pt/pub/qgraf/>.
- [5] H. Kleinert and A. Pelster, Phys. Rev. D **61**, 085017 (2000).
- [6] B. Kastening, Phys. Rev. E **61**, 3501 (2000).
- [7] H. Kleinert, A. Pelster, B. Kastening, and M. Bachmann, Phys. Rev. E **62**, 1537 (2000).
- [8] A. Pelster, H. Kleinert, and M. Bachmann, Ann. Phys. (N.Y.) **297**, 363 (2002).

PHYSICAL REVIEW D **74**, 067702 (2006)

- [9] H. Kleinert, A. Pelster, and B. Van den Bossche, Physica A (Amsterdam) **312**, 141 (2002).
- [10] A. Pelster and H. Kleinert, Physica A (Amsterdam) **323**, 370 (2003).
- [11] A. Pelster and K. Glaum, Physica A (Amsterdam) **335**, 455 (2004).
- [12] K. Kajantie, M. Laine, and Y. Schroder, Phys. Rev. D **65**, 045008 (2002).
- [13] C. K. Kim, Phys. Rev. D **72**, 085007 (2005); J. Berges, Phys. Rev. D **70**, 105010 (2004); M. E. Carrington, Eur. Phys. J. C **35**, 383 (2004).
- [14] K. Farakos, K. Kajantie, Rummukainen, and Y. Schröder, Nucl. Phys. **B442**, 317 (1995).
- [15] S. Coleman and E. Weinberg, Phys. Rev. D **7**, 1888 (1973).

편집

김경찬  
김군찬  
김인선  
박천만  
윤경표  
이삼빈  
정진갑

自然科學研究所  
自然科學研究論集 第26輯 第1號

2007年 8月 25日 印刷

〈비매품〉

2007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 新塘洞 1000番地

電話 (053) 580-5197

(053) 580-5198

印刷 / 圖書出版 泰一社 (053)255-3602

ISSN 1738-6152

**THE JOURNAL OF  
THE INSTITUTE  
OF NATURAL SCIENCES**

Vol. 26, No. 1 August, 2007

## **CONTENTS**

## 〈Research Articles〉

- A Formal Proof for the Linear Independence of General Functions ..... Koonchan Kim

A Stopping Rule for the Number of Generating Trees in a Random Forest ..... Cheol-Yong Park

Photocatalytic Properties of TiO<sub>2</sub> Thin Film by RF Sputtering  
in the Visible Light Region ..... Chung-Ha Woo · Kyung-Chan Kim

Synthesis and Photodegradation Properties of TiO<sub>2</sub> Photocatalysts  
Immobilized by Triethoxysilane under Visible Light ..... Myung-Jin Lee · YoungTae Park

The Study of Clinical Examination by Using Instructional  
Magnetic Resonance Imaging(MRI) ..... Moo-Seoung Cho · Jae-Young Bae

Synthesis and evaluation of anti-cancer effects of 2,5-Diaminobenzamide Derivatives ..... Sei-Hee Lee · Chul-Soo Paik · Jin-Ho Lee

Characteristics of the TiO<sub>2</sub>/SnO<sub>2</sub> Thick Film Semiconductor Gas  
Sensor for Fish Freshness ..... Jae-Mok Jun · Ji-Young Jung · Sun-Kwang Yun · Chang-Seop Lee

Synthesis and Application of New Unsymmetrical Ligand for  
Identifying the Mechanism of Asymmetric Organic Synthesis ..... Jae-Kook Uhm · Jin-Ho Lee

QCM Study of  $\beta$ -casein Adsorption on the Hydrophobic Surface II  
: Effect of pH and Anions ..... Su-Kyung Park · Myunghee Lee · Chinkap Chung

*Tetragnatha shinanoensis* Okuma and Chikuni, 1978,  
a Tetragnathid Spider New to Korea (Araneae: Tetragnathidae) ..... Bo-Keun Seo

Isolation and Characterization of Strains Solubilizing Inorganic  
Germanium from Soil ..... Min-Hee Kim · Hee-Sun Ko · Hyun-Soo Kim

A Study of *Lactobacillus* Species Isolated from Fermented  
Vegetables for Carbohydrate Utilization ..... Oh-Sik Kwon · Ji-Hyun Ma

Study on the Effects of 0.1X LB on the Survival and Stability of  
Newly Transconjugated Plasmid for Bioremediation in *Pseudomonas* sp.  
KM12TC in the Presence of Mercury Ion ..... Kyung Pyo Yoon

Optimized Conditions for Extracting Fruit Pigment of Rubus coreanum ..... Yong-Jin Jeong

Published by  
**KEIMYUNG UNIVERSITY**  
DAEGU, KOREA