

## Agaricus bisporus의 Lipoxygenase와 Hydroperoxide Lyase를 이용한 천연 (-)-1-Octen-3-ol 생산 공정의 최적화

김경주 · 김용휘<sup>†</sup>

세종대학교 공과대학 식품공학과

### Optimization for Effective Bioproduction of Natural (-)-1-Octen-3-ol by Lipoxygenase and Hydroperoxide Lyase from *Agaricus bisporus*

Kyoungju Kim and Yonghwi Kim<sup>†</sup>

Dept. of Food Science & Technology, Sejong University, Seoul 143-747, Korea

#### Abstract

One of the most important volatile aroma compounds responsible for mushroom flavor is 1-octen-3-ol. To meet the demand for natural mushroom flavor, a study was needed for the production of natural chiral specific (-)-1-octen-3-ol that has higher flavor intensity than synthetic chiral mixtures of (+), and (-)-1-octen-3-ol. The biosynthesis of (-)-1-octen-3-ol was achieved by an aerobic oxidation using lipoxygenase (LOX) and hydroperoxide lyase (HPOL) isolated from commercially available mushrooms in Korean market. Safflower oil from Uiseong, Gyeongsangbuk-do, that contains >75% of linoleic acid, was hydrolyzed using lipase. The recovered linoleic acid was biotransformed to stereo-specific 10-hydroperoxy linoleic acid by LOX. 10-hydroperoxy linoleic acid was further cleaved to (-)-1-octen-3-ol by HPOL. A commercial bioprocess for the production of (-)-1-octen-3-ol was developed using a 5-liter jar fermenter with fruiting bodies of *Agaricus bisporus* harvested from Buyeo, Chungcheongnam-do. The maximum production of (-)-1-octen-3-ol was achieved at 4°C, pH 6.5 and 800 rpm yielding 748 mg/kg of mushroom.

**Key words:** *Agaricus bisporus*, biotransformation, hydroperoxide lyase (HPOL), lipoxygenase (LOX), 1-octen-3-ol

#### 서 론

버섯은 오래 전부터 독특하고 은은한 향기 때문에 음식재료 또는 음식의 향미료로서 많이 이용되고 있다(1). 버섯향은 다양한 성분을 포함한 복합향으로 아미노산, 뉴클레오티드와 같은 비휘발성 물질과 1-octen-3-ol, 2-octen-1-ol, 1-octen-3-one을 포함하는 방향 C-8 화합물질에 기인한다(2-4). 방향물질 중에서 버섯향에 가장 중요한 물질은 1-octen-3-ol이다. 1-octen-3-ol은 버섯을 수확한 후 버섯의 자실체가 물리적으로 손상을 입거나 부서지면서 자실체 내에 존재하는 불포화 지방산인 linoleic acid(9,12-cis,cis-octadecadienoic acid)가 버섯의 자실체에 존재하는 lipoxygenase(LOX)와 hydroperoxide lyase(HPOL)의 작용에 의해 분해되어 생성된다(5,6). 1-octen-3-ol은 *Agaricus* 종의 버섯류 등에 의해 생산되는데 버섯 내 그 생산량은 극히 미소하다(1).

버섯 조합향을 생산하기 위하여 유기합성을 통해 1-octen-3-ol을 생산하였으나, 유기합성 공정은 환경오염을 초래할 수 있으며, 유기합성에 의해서 생산되는 화합물질은 광활성

이성질체((+)/(-)-1-octen-3-ol, 5:5)를 포함하고 있어 향의 강도가 선택적 광활성을 지닌 천연 물질((-)-1-octen-3-ol)보다도 낮다. 선택적 광활성을 지닌 이성질체를 분리하기 위하여 분별 증류법이 이용되고 있으나 경제적인 이유로 그 이용이 제한되고 있다. 선택적 광활성의 (-)-1-octen-3-ol을 생산하기 위하여 버섯의 용매 추출법과 수증기 증류법이 이용되었으나, 처리과정 중에서 높은 열에 의한 향의 상실 및 다른 방향물질을 함유하여 향의 질이 떨어지며, 버섯의 연간 생산량 변동과 함께 버섯 농가의 지리적 제한으로 상대적으로 가격이 비싼 버섯을 이용한 천연 (-)-1-octen-3-ol을 상업적으로 생산하기에는 한계를 지니고 있다. 최근 소비자의 천연 식품에 대한 요구의 증가로 국내 향신료의 중요한 부분을 차지하고 있는 천연 버섯향의 대량 생산이 요구되어 버섯의 1-octen-3-ol의 생산성을 향상시키기 위해 조직 배양의 기술이 개발되었으나 상업적 생산성에 이르지 못했다.

본 연구는 천연의 (-)-1-octen-3-ol을 생산하기 위하여 고함량의 linoleic acid를 함유하고 있는 국내산 홍화유와 함께 국내에서 생산되고 있는 다양한 버섯의 LOX와 HPOL를

<sup>†</sup>Corresponding author. E-mail: kimyh@sejong.ac.kr  
Phone: 82-2-3408-3228, Fax: 82-2-3408-3319

이용하여 생물전환법으로 선택적인 광활성을 지닌 천연 (-)-1-octen-3-ol의 생물공정을 개발하는데 목적을 두고 있다. 개발된 생물공정의 생산성은 fermenter에서 검토하였다.

## 재료 및 방법

### 재료 및 시약

일반 홍화유는 시장에서 구입하고, 고함량의 linoleic acid를 함유하고 있는 홍화유는 경북 의성의 경북 의성 홍화식품에서 주문 생산하여 사용하였다. 홍화유의 가수분해를 위한 lipase(Amano-MY)는 Amano사(Japan)에서 구입하였다. Linoleic acid(95%)는 ICN Chemical Co.에서 구입하였다. 실험에 이용한 느타리 버섯(*Pleurotus ostreatus*, 경기 양주), 새송이 버섯(*Pleurotus eryngii*, 강원 원주), 팽이버섯(*Flammulina velutipes*, 충북 제천)은 가락동 농산물 시장에서 구입하였으며, 양송이버섯(*Agaricus bisporus*)은 충남 부여의 석성 버섯농장에서 공급 받았다. 버섯의 신선도를 유지하기 위하여 매 실험에 필요한 양송이 버섯은 석성 버섯 농장에서 전날 수확되어 공급되었다. 반응물의 추출은 ethyl acetate(대정)를 사용하였다. 지방산의 methylation은 boron trifluoride methanol complex(Lancaster, England)를 이용하였다.

### 지방산의 가수분해 및 methylation

홍화유의 linoleic acid의 함량을 측정하기 위하여 홍화유(20%)와 lipase-MY(1.0%, 홍화유 기준)를 0.2 M의 인산용액(pH 6.5)에 용해시켜 37°C에서 4시간 반응시켜 가수분해시킨 후, 65°C에서 30분간 가열하여 효소 반응을 중지하였다. 가수분해된 지방산은 50% 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)으로 산성화(pH 4.0)시킨 후 ethyl acetate로 추출하여 rotary evaporator(Tokyo Rikakikai, Japan)로 농축하였다. 분리된 지방산은 boron trifluoride methanol complex(Lancaster, England)와 혼합하여 100°C에서 5분간 가열하여 methyl ester로 변환시켰다. 홍화유내 linoleic acid의 함량은 gas chromatography(Donam, Model DS 6200, Korea)로 확인하였다.

### 홍화유 기질의 준비

고함량의 linoleic acid를 함유하고 있는 의성 홍화유를 가수분해하기 위하여 5-liter jar fermenter에 홍화유(20%)와 lipase-MY(1%, 홍화유 기준)를 0.2 M의 phosphate buffer에 용해시켜 37°C에서 800 rpm으로 회전시키면서 16~18시간 동안 25% NaOH를 이용하여 pH를 6.5로 유지한 상태에서 가수분해시켰다. 가수분해된 홍화유는 65°C로 가열하여 효소 반응을 정지시킨 후, 지방산을 함유하고 있는 상등액을 회수하여 기질로 이용하였다. 가수분해된 홍화유 상등액의 linoleic acid의 함량은 methylation후 gas chromatography(GC) 분석을 이용하여 정량하였다.

### 버섯을 이용한 생물전환

버섯을 이용한 생물전환반응 scheme은 다음과 같다. LOX와 HPOL의 효소의 활성을 지닌 버섯을 선별하기 위하여 시장에서 구입한 버섯과 석성 버섯 조합에서 공급된 신선한 버섯은 불순물을 제거한 깨끗한 상태에서 4°C에서 Waring blender(Waring, USA)를 이용하여 분쇄하였다. 1-liter의 blender jar에 250 g의 버섯을 125 mL의 각각의 0.2 M 초산완충액(pH 5.0), 인산완충액(pH 6.5) 또는 borate 완충액(pH 9.0)과 125 g의 얼음, 가수분해된 홍화유 5 mL와 함께 분쇄기에 넣고 분쇄시키면서 15분간 4°C에서 반응시켰다. 반응 온도를 4°C로 유지하기 위하여 추가적으로 얼음을 첨가한 후, 가수분해된 홍화유 5 mL를 더 첨가하고 15분 더 반응시켰다. 생물전환 반응 후 50% 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 이용하여 반응액의 pH를 4.0으로 낮춘 후, 원심분리(5,000 rpm×10 min, 4°C)하여 상등액을 회수한 후, GC를 이용하여 1-octen-3-ol의 양을 정량하였다.

### 5-liter fermenter를 생물전환 공정

5 liter jar fermenter(Biotron, Korea)에 500 mL의 인산용액(pH 6.5)과 500 mL의 증류수, 가수분해된 홍화유 20 mL를 첨가한 후, grinder(Hanil, Korea)를 이용해 1 kg의 버섯을 5분간 분쇄하여 첨가하였다. 전체 working volume은 2 liter로 하여, 분쇄된 버섯을 첨가한 후 공기(2.0 v/v/m)를 주입하면서 15분간 반응시키고 추가적으로 가수분해된 홍화유 20 mL를 첨가하여 15분 더 반응시켰다. 반응시간 동안 25% NaOH를 이용하여 pH를 6.5로 유지하였다. 최적 생물전환 공정을 개발하기 위하여 생물전환 공정은 4°C~20°C로, 500~1,000 rpm에서 각각 30분간 반응시킨 후 최적 조건을 결정하였다. 전체 반응액을 50% 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)을 이용하여 pH를 4.0로 낮춘 후, 원심분리(5,000 rpm×10 min, 4°C)하여 상등액을 회수한 후, GC를 이용하여 1-octen-3-ol의 양을 정량하였다.

### 1-octen-3-ol의 추출 및 분석

버섯의 균질액을 원심분리하여 얻어진 상등액을 50% 황산(H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)으로 pH를 4.0으로 떨어뜨린 후, ethyl acetate(1:1, v/v)로 추출하였다. 유기 용매층은 무수황산나트륨(Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>)으로 수분을 제거한 후 농축시켰다. 농축된 시료는 ethyl acetate로 희석시켜 gas chromatography로 분석하였다. GC 분석을 위하여 Rtx-1 capillary column(60 m, crossband 100% dimethyl polysiloxanecolumn, Phenomenex, USA)과 helium carrier gas를 사용하였으며, column의 온도는 100°C에서 200°C까지 5°C/min으로 높였으며, FID detector와 injector의 온도는 각각 320°C로 하였다(7). 생물전환을 이용한 1-octen-3-ol의 생산은 GC-MS(Supelco, Supelcowas<sup>TM</sup>-10, USA)를 이용하여 확인하였다. GC/MS 분석을 위하여 fused silica capillary column(30 m×0.25 mm×0.25 μm)과 helium carrier gas를 사용하였으며, column의 온도는 70°C에서

240°C까지 3°C/min으로 높였으며, FID detector와 injector의 온도는 각각 250°C로 하였다.

**결과 및 고찰**

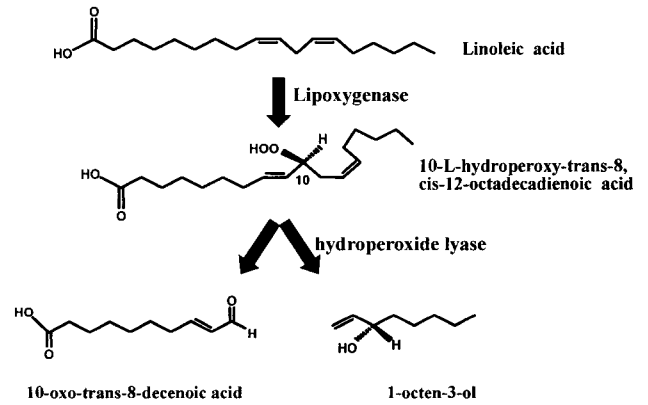
**고 linoleic acid 홍화유의 선정**

1-octen-3-ol을 생산하기 위해서는 불포화 지방산 중 다량의 linoleic acid를 함유하고 있는 홍화유를 선택하여야 한다. 보통 홍화유는 oleic acid를 다량 포함하는 고 oleic acid 홍화유와 linoleic acid를 다량 포함하고 있는 고 linoleic acid 홍화유로 구분된다(8,9). 시중에서 구입한 대부분의 홍화유는 oleic acid를 다량으로 함유하고 있어, 경북 의성 홍화원을 통해 직접 홍화씨를 구매, 주문 생산하여 공급 받았다. 경북 의성 홍화원에서 공급받은 홍화유를 lipase(AMANO, Japan)로 가수분해시킨 후, 추출된 불포화 지방산을 methyl ester화하여 GC 분석과 산가 정량법으로 분석하여 linoleic acid 함량을 분석하였다. 경북 의성 홍화유의 전체 지방산의 분포는 palmitic acid(9~10%), oleic acid(10~15%), linoleic acid(>75%)로 분석되었다(Fig. 1). 많은 양의 홍화유를 가수분해하기 위해서는 최대 20%의 홍화유를 0.2%의 lipase를 첨가한 후 최소한 16~18시간, pH 6.5에서 반응시킬 경우 100% 가수분해되었다.

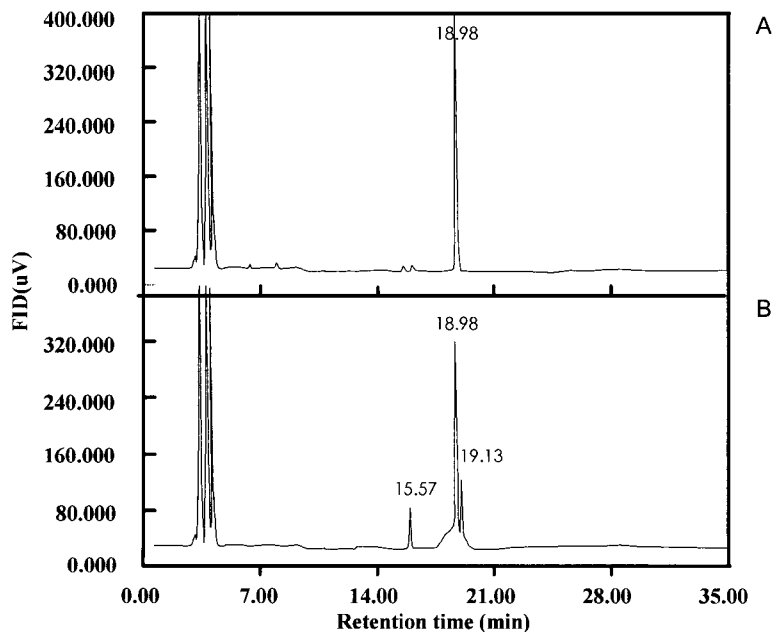
**1-octen-3-ol 생물전환을 위한 버섯균주의 선별**

버섯의 LOX와 HPOL에 의한 1-octen-3-ol의 생성 반응은 Fig. 2에 도식화 되었다. 1-octen-3-ol은 버섯의 LOX 및 HPOL의 작용에 의하여 불포화 지방산인 linoleic acid로부터 생성되는데, LOX 및 HPOL의 양은 버섯의 종류와 버섯

의 신선도에 따라 활성이 다르다. 양송이 버섯(충남 부여), 느타리 버섯(경기 양주), 새송이 버섯(강원 원주), 팽이버섯(충북 제천)의 균질액과 가수분해된 홍화유와 반응시켜 얻어진 1-octen-3-ol을 분석한 결과, 양송이 버섯을 이용할 경우 상대적으로 가장 많은 1-octen-3-ol이 생합성됨을 알 수 있었다(Table 1). 1-octen-3-ol의 생합성은 GC-MS로 확인하였다(Fig. 3). 신선도가 떨어진 버섯의 균질액에서는 LOX 및 HPOL의 활성이 나타나지 않아 1-octen-3-ol이 생성되지 않았다. 또한 버섯의 균질액을 상온에서 분쇄하거나, 저온에서 분쇄된 균질액을 상온에 방치할 경우 빠른 시간 내에 LOX 및 HPOL의 활성을 잃어버려 1-octen-3-ol의 생산성이 현저하게 떨어졌다(자료 미제시). 이러한 결과는 양송이



**Fig. 2.** Bioconversion of linoleic acid into 1-octen-3-ol by lipoxigenase (LOX) and hydroperoxide lyase (HPL) from mushrooms.

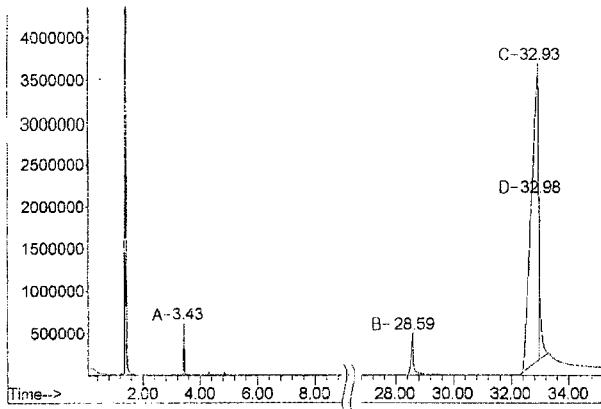


**Fig. 1.** Gas chromatography analysis. (A) Methyl linoleate, (B) Methylation of hydrolyzed safflower oil; methyl palmeate (10%), methyl linoleate (75%), methyl oleate (15%).

**Table 1. Comparison of 1-octen-3-ol production by different species of mushrooms**

Species	1-octen-3-ol
<i>Agaricus bisporus</i>	+++
<i>Pleurotus ostreatus</i>	++
<i>Pleurotus eryngii</i>	+
<i>Flammulina velutipes</i>	+

All steps of extraction and homogenization were performed at 4°C. The reaction products were extracted with ethyl acetate. 1-octen-3-ol was quantitated by using gas chromatography.



**Fig. 3. GC/MS analysis.**

A: 1-octen-3-ol, B: Palmitic acid, C: Linoleic acid, D: Oleic acid.

버섯의 LOX 및 HPOL이 구조적으로 불안정하여 급격하게 불활성화 되었다는 보고와 일치한다(10-12). 이러한 결과를 토대로 1-octen-3-ol의 상업형 생물공정 개발은 부영 석성 버섯 농가로부터 공급되는 버섯을 이용하였다.

*Agaricus bisporus*(양송이 버섯)를 이용한 생물전환 반응 생물전환에 이용되는 버섯은 LOX와 HPOL의 활성을 최대 유지하기 위하여 석성 버섯 농가의 협조로 실험 전 날 수확되어 바로 배송된 후 당일 실험에 이용하였다. 생물전환에 미치는 pH의 영향을 연구하기 위하여 신선한 상태로 공급된 250 g의 양송이버섯을 1-liter Waring blend jar에 첨가한 후, 5 mL의 가수분해된 홍화유를 125 mL의 각각의 초산 완충액(0.2 M, pH 5.0), 인산완충액(0.2 M, pH 6.5) 혹은 borate 완충액(0.2 M, pH 9.0)과 혼합하여 15분간 최대 속도로 버섯을 분쇄하며 반응을 진행시킨 후 1-octen-3-ol의 생산량을 비교하였다. 양송이 버섯에서 추출된 LOX와 HPOL의 최적 pH 범위는 5.5에서 7.0 사이로 pH 6.5에서 가장 많은 활성을 보였다(자료 미제시). 이러한 결과는 Chen과 Wu(13)의 결과와 일치한다. 또한 LOX와 HPOL의 활성은 양송이 버섯의 자실체의 갓을 이용하였을 경우 가장 높았으며, 양송이 버섯의 자실체 자루 부분을 이용할 경우 1-octen-3-ol의 생산량이 미비하였다(자료 미제시). 이러한 결과는 양송이 버섯이 수확 후 자실체의 조직이 손상되거나 분쇄될 경우 버섯 특유의 향을 형성하는 보고와 일치한다(5).

**Table 2. Effects of temperature and agitation speed on the production of 1-octen-3-ol**

Samples	Temperature <sup>1)</sup> (°C)	Agitation speed <sup>2)</sup> (rpm)	1-octen-3-ol <sup>3)</sup> (mg/kg mushroom)
1	4	800	748
2	10	800	558
3	20	800	144
4	4	500	645
5	4	800	724
6	4	1,000	701

<sup>1)</sup>After 1 kg of *Agaricus bisporus* were cut into small pieces, they were transferred to the fermenter with phosphate buffer (0.2 M, pH 6.5), deionized water, and hydrolyzed safflower oil and the stirrer and air flow (2.0 v/v/m) started immediately.

<sup>2)</sup>The experimental condition was the same at 4°C. The stirred speed changed from 500 rpm to 800 rpm.

<sup>3)</sup>1-octen-3-ol was quantitated by using gas chromatography.

#### (-)-1-octen-3-ol을 합성하기 위한 최적화 조건

(-)-1-octen-3-ol을 대량생산하기 위한 상업형 생물공정을 개발하기 위하여 다량의 버섯을 5-liter jar fermenter를 이용하여 개발하였다. 5-liter jar fermenter에 500 mL의 인산 완충액과 500 mL의 증류수, 가수분해된 홍화유 20 mL를 첨가한 후 신선하게 공급된 양송이 버섯을 분쇄기를 이용하여 분쇄하여 첨가하고 양송이 버섯의 LOX의 활성을 높이기 위하여 공기(2.0 v/v/m)를 주입하였다. 반응 중 pH는 25% NaOH를 이용하여 6.5로 유지하였다. 생물전환공정 중 온도와 교반속도가 1-octen-3-ol에 미치는 영향은 Table 2에 요약되었다. 1-octen-3-ol의 생물전환반응은 4°C에서 가장 많은 생산량을 보였으며 교반속도는 큰 차이를 보이지 않았지만 800 rpm에서 가장 높게 나타났다. 최적 생물전환반응 조건에서 748 mg/버섯 kg이 생합성되었다.

양송이버섯의 LOX와 HPOL를 이용한 상업용 생물전환공정의 개발은 유기합성의 한계점인 선택적 광활성 물질의 생산이 가능하며, 환경친화적 생산공정으로 환경을 보호할 수 있으며, 생물전환 방법으로 생산되는 천연 (-)-1-octen-3-ol은 화학적 합성에 의해 만들어지는 (±)-1-octen-3-ol와 비교하여 약 2배 정도의 향기 강도가 높기 때문에 고부가의 천연 버섯향의 조합원료로 사용될 수 있다(14).

#### 요 약

1-octen-3-ol은 버섯향의 성분 중 가장 중요한 방향 물질이다. 소비자의 천연 버섯향에 대한 선호도가 상승함에 따라 유기합성으로 만들어지는 광활성 이성질체를 포함하고 있는 (±)-1-octen-3-ol과 다르게 더 강한 향의 강도를 갖는 천연 광활성의 (-)-1-octen-3-ol 생산에 대한 연구가 필요하다. (-)-1-octen-3-ol은 호기성 상태에서 시장에서 구입한 버섯으로 추출된 lipoxygenase(LOX)와 hydroperoxide Lyase(HPOL)을 이용하여 생합성되었다. 75%이상의 linoleic

acid를 포함하고 있는 경복 의성에서 생산된 홍화유는 lipase를 이용하여 가수분해하였다. 가수분해된 linoleic acid는 LOX에 의하여 광활성을 지닌 10-hydroperoxy linoleic acid로 생물전환되었다. 10-hydroxyperoxide은 HPOL에 의해 (-)-1-octen-3-ol로 분해되었다. (-)-1-octen-3-ol을 상업적으로 생산하기 위하여 5-liter jar fermenter와 충남 부여에서 수확된 *Agaricus bisporus* 자실체를 이용하여 개발되었다. (-)-1-octen-3-ol은 4°C, pH 6.5, 800 rpm에서 최대 748 mg의 (-)-1-octen-3-ol(버섯 kg 당)이 생물전환되었다.

### 감사의 글

본 연구는 세종대학교 산학연 공동기술개발 컨소시엄사업의 연구비와 인하대학교 초정밀생물분리기술연구센터의 ERC 연구비를 지원 받아 연구되었다.

### 문헌

- Mau JL, Beelman RB, Ziegler GR. 1992. 1-octen-3-ol in the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *J Food Sci* 57: 704-706.
- Fisher KH, Grosch W. 1987. Volatile compound of importance in the aroma of mushrooms (*Psalliota bispora*). *Lebensm Wiss Technol* 20: 233-237.
- Mau JL, Beelman RB, Ziegler GR. 1993. Factor affecting 1-octen-3-ol in mushroom at harvest and during postharvest storage. *J Food Sci* 58: 331-335.
- Dijkstra FY, Wiken TO. 1976. Studies on mushroom flavors. I. Organoleptic significance of the constituents of the cultivated mushroom, *Agaricus bisporus*. *Z Lebensm Unters Forsch* 160: 255-262.
- Wurzenberger M, Grosch W. 1982. The enzymic oxidative breakdown of linoleic acid in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Z Lebensm Unters Forsch* 175: 186-190.
- Loch-Bonazzi CL, Wolff E. 1994. Characterization of flavor properties of the cultivated mushroom (*Agaricus bisporus*) and the influence of drying process. *Lebensm Wiss Technol* 24: 386-389.
- Belinky PA, Masaphy S, Levanon D, Hadar Y, Dosoretz CG. 1994. Effect of medium composition on 1-octen-3-ol formation in submerged cultures of *Pleurotus pulimonarius*. *Appl Microbiol Biotechnol* 40: 629-633.
- Pandey B. 1986. A comparative fatty acid profile of seeds rich in oleic acid and linoleic acid with corresponding calli. *J Am Oil Chem Soc* 63: 541-547.
- Noh WS, Park JS. 1992. Lipid composition of Korean safflower seeds. *J Korean Agric Chem Soc* 35: 110-114.
- Champavier Y, Pommier MT, Arpin N, Voiland A, Pellon G. 2000. 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid (ODA): Production, biological activities, and comparison with other hormone-like substances in *Agaricus bisporus*. *Enzyme Micro Technol* 37: 177-182.
- Morawicki RO, Beelman RB, Peterson D, Ziegler G. 2005. Biosynthesis of 1-octen-3-ol and 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid using a crude homogenate of *Agaricus bisporus* optimization of the reaction: kinetic factors. *Process Biochem* 40: 131-137.
- Wurzenberger M, Grosch W. 1984b. Origin of the oxygen in the products of the enzymatic cleavage reaction of linoleic acid to 1-octen-3-ol and 10-oxo-*trans*-8-decenoic acid in mushrooms (*Psalliota bispora*). *Biochim Biophys Acta* 794: 18-24.
- Chen CC, Wu CM. 1983. Studies in the formation and manufacturing of mushroom volatile oil. *Res Rep* No. 323, FIRDI, Taiwan.
- Cronin DA, Ward MK. 1971. The characterization of some mushroom volatiles. *J Sci Food Agr* 22: 477-479.

(2005년 3월 22일 접수; 2005년 4월 19일 채택)