

리기다소나무 잎 에탄올 추출물의 항균 및 생리특성

오병태 · 최성길 · 조성환[†]
경상대학교 식품공학과 · 농업생명과학연구원

Antimicrobial & Physiological Characteristics of Ethanol Extract from *Pinus rigida* Miller Leaves

Byung-Tae Oh, Sung-Gil Choi and Sung-Hwan Cho[†]

Department of Food Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Sciences, Gyeongsan National University, Jinju 660-701, Korea

Abstract

Pinus rigida Miller leaf extract (PRLE) showed antimicrobial activity remarkably against food pathogenic and spoilage bacteria at concentrations of 100~250 µg/mL. Alcohol-soluble PRLE had higher antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* and *E-coli* than any other-soluble PRLE such as butanol, ethyl acetate, ether and water. As PRLE concentration increased, alcohol-soluble PRLE increased the remarkable inhibitory zone of microbial growth on the microbial media. PRLE showed good stability against temperature and pH in the range of 40~150°C and 4~11, respectively. This may indicate that PRLE can be a potential anti-microbial agent for industrial application. In addition, SEM of *Listeria monocytogenes* suggested that its antimicrobial components would perturb the functions of microbial cell membranes synergistically. In the feeding experiment, the formaldehyde content in the serum of formalin-fed and PRLE-treated rats decreased remarkably due to the lysis of formaldehyde and the rate of hemoglobin biosynthesis was recovered to the original state within a short breeding time.

Key words : leaf extract, alcohol-soluble, stability, SEM, lysis of formaldehyde, hemoglobin, biosynthesis

서 론

소나무, 잣나무, 편백나무, 서양측백나무 등과 같은 침엽수에서 추출한 essential oil 성분은 광범위한 범위의 미생물에 대해 강력한 항균력을 나타내었고(1-4), 살충효과(5,6) 및 DPPH 소거능(4)이 검증되었다고 보고된 바 있다. 또한, 이들 essential oil 성분은 혈중 cholesterol 농도를 저하시키고, 흡입시 진정효과를 나타내는 생리특성(7)을 보이는 것으로 나타났다. 정유성분으로 검출되는 terpene 화합물은 분자크기에 따라 monoterpenes, sesquiterpenes, diterpenes 등으로 나눌 수 있으며, 이 화합물에는 alcohol, aldehyde, ketone, ether, 유기산 및 oxide 등의 활성기가 함유되어 있는 것으로 알려져 있다(8). 아울러, 침엽수의 하나인 측백나무

잎의 성분으로는 phenolic compound로 benzoic acid, salicylic acid, p-hydroxy benzoic acid, vanillic acid, coumaric acid, photocatechic acid, gallic acid, ferulic acid, hydroquinone, caffeic acid 등이 있고 heterocyclic compounds로 kojic acid, 2-furan carboxylic acid이며 fatty acid로는 malonic acid, maleic acid, fumaric acid가 확인 되었으며(9). α-pinene 등 30여종의 monoterpenoids 성분이 GC-MS 분석 결과 검출되기도 하였다(10). 또한, 침엽수는 인체 호흡대사에 유리한 효과를 유도할 수 있는 물질을 보유하고 있다는 연구결과(4)들을 토대로, 우리나라 여러 지역에 널리 자생하고 있는 침엽수인 리기다소나무 잎으로부터 정유성분을 추출하고, 분리한 추출물질(*Pinus rigida* Miller Leaf Extract : 이하 PRLE라 칭함)의 항균작용 및 기초 호흡 생리작용을 탐색하여, 리기다소나무 잎 추출물의 다양한 응용성을 확인할 목적으로 기초실험을 실시하였다.

*Corresponding author. E-mail : sunghcho@gsnu.ac.kr,
Phone : 82-55-751-5478, Fax : 82-55-753-4630

재료 및 방법

리기다소나무 잎 추출물의 조제

본 실험에 사용한 시료는 경남 하동군 악양면에 자생하고 있는 리기다소나무 잎을 채취하여 사용하였다. PRLE는 다음과 같은 방법으로 조제하였다. 즉, 채취한 리기다소나무 잎을 물로 세척한 후, 50°C에서 7일간 열풍건조시켜 약 2 cm 정도로 절단한 후, 리기다소나무 잎 200g에 각각 종류 수와 각종 용매(butanol, ethyl acetate, ether, water, ethanol) 1 L씩을 환류냉각관이 부착된 branched round-bottom flask에 넣고 heating mantle에서 6시간 동안 충분히 가열·추출하였다. 추출액은 거름종이로 여과하였으며 감압농축기로 농축시켰다. 농축된 시료는 4°C이하에서 보관하면서 일정량을 채취하여 각각의 용매로 희석시킨 용액을 분석시료로 실험에 사용하였다.

공시균주

본 실험에서 PRLE의 항균력 검색을 위해 사용한 균주들은 일반적으로 곡류가공식품, 낙농가공식품, 육가공식품, 수산가공식품 및 기타 발효식품의 변질에 관여하는 Gram 양성 박테리아, Gram음성 박테리아, Yeast, Mold의 대표적 균주이며, 경상대학교 식품공학과에서 보관중이거나 한국 종균협회에서 분양받아 실험에 사용하였다. 곰팡이 및 효모는 potato dextrose agar, 세균은 brain heart infusion agar (BHIA), tryptic soy agar (TSA) 등의 사면배지에 계대 배양하여 4°C에 보관하면서 사용하였다.

PRLE의 항균력 검사

항균력 시험은 여러 농도의 PRLE로 포화시킨 paper disk를 brain heart infusion agar plate상에 접촉시켜 공시균주의 증식도를 비교하여 생육저해정도를 측정하는 paper disk 확산법(agar diffusion method)(11,12)을 이용하였다. 즉 tryptic soy agar의 사면에 배양된 공시균주 1 백금이를 취하여 10 mL TSB에 접종하고 30°C에서 24 시간 배양한 후, 일정농도로 희석한 후 0.1 mL를 실온에서 하룻밤 건조한 두께가 5~8 mm BHIA 배지 표면에 접종하고 도말봉으로 균일하게 도포한 다음, 멀균된 10 mm filter paper disk(Advantec. Toyo Roshi Kaisha Ltd., Japan)를 각각의 용매로 일정비율로 희석시킨 100, 250, 500 µg/mL 농도의 PRLE로 포화시킨 paper disk를 brain heart infusion agar plate 상에 올려놓고 30°C에서 48 시간동안 배양한 후 disk 주위의 생육저해정도를 측정하는 paper disk 확산법(agar diffusion method)을 이용하였다.

PRLE의 열 및 pH 안정성 조사

PRLE의 열안정성을 측정하기 위하여, 살균·냉각한 potato dextrose agar 또는 tryptic soy agar 표면에, PRLE를

40, 60, 80, 100, 120, 150°C로 각각 30분 동안 열처리한 PRLE 250 µg/mL 농도의 시험용액에 침지한 disk를 올려놓고, paper disk 확산법으로 *Listeria monocytogenes*의 생육저해환을 측정·비교하였다. 또한 pH 안정성은 염산이나 수산화나트륨으로 PRLE의 pH를 4에서 11까지 조정한 후, 일정량을 paper disk상에 접종한 다음, 열안정성과 동일한 방법으로 *Listeria monocytogenes*의 생육저해환을 측정·비교하였다.

PRLE에 의한 미생물 세포의 전자 현미경학적 형태변화 조사

항균력이 뛰어난 PRLE의 처리로 인한 미생물의 세포형태 및 기능성 변화를 알아보기 위해 주사전자현미경(SEM : Scanning electron microscope, DS-130C ISI ABT)을 이용하여 각각 Pyliotis 방법(13)에 준하여 처리전후의 미생물 세포의 형태변화를 관찰하였다. 즉, 공시균주를 PRLE 무처리구인 대조구와 함께, 500 µg/mL 농도의 PRLE가 첨가된 각각의 Fraser base broth에서 36~48시간동안 배양한 다음, 배양액 1 mL를 eppendorf tube에 옮긴 후 5,000 rpm에서 10분간 원심 분리하여 상동액을 제거하고 1 mL의 4% neutral buffered para-formaldehyde(NBP)를 가하여 다시 원심분리한 후 천천히 진탕하면서 2회 세척하였다. 여기에 1 mL의 NBP를 다시 가하여 4°C에서 48시간동안 고정시키고 0.015 mM phosphate buffer solution(PBS, pH 7.2)를 1 mL가하고 진탕하면서 2회 세척한 후 무수 알콜로 진탕하여 탈수하고 임계점 건조기로 건조한 후, 대조구와 함께 미생물세포의 형태변화를 관찰하였다.

PRLE의 구강투여후 실험동물의 혈청내 formaldehyde 소거능 및 hemoglobin 함량 변화 검사

본 실험에서 사용된 동물은 ICR계 mouse(♂, 20±2 g)를 사용하였다. 실험동물(♂, 4주령)은 (주)샘타코 코리아에서 구입하여 온도(20±2°C), 습도(55±2%) 및 명암(light : 08:00 ~19:00, Lux : 180~250)이 조절되는 동물실험실에서 일주일간 적응시킨 후 실험에 이용하였고, 사료 및 음수는 삼양 사료 제품 및 여과된 수도수를 사용하였다. 실험은 실험동물에 PRLE (1 g/kg, D.W.)과 formalin을 200 mg/mL 농도가 되도록 증류수에 희석하여 경구로 투여한 후, 국립보건원 시험법에 따라 혈청내 formaldehyde 및 hemoglobin 분석을 실시하였다. 실험에 사용된 모든 동물에 대하여 시료 투여 후 4일간 성분분석과 함께 실험동물의 운동성 및 외관 등을 깊게 관찰하였다.

결과 및 고찰

추출용매별 PRLE의 수율

추출용매별 PRLE의 추출수율은 Table 1과 같다. 즉,

리기다소나무 잎의 용매별 추출 수율은 물에서 24.5%로 가장 높았고, ethanol 22.3%, butanol 12.8%, ethyl acetate 6.9%, ether 3.5% 순으로 나타났다.

Table 1. Extraction yields(%) of *Pinus rigida* Miller leaves by the use of several solvents

Solvent	Distilled water	Butanol	Ethyl acetate	Ethanol	Ether
Extraction yields (%)	24.5	12.8	6.9	22.3	3.5

추출용매별 PRLE의 항균력

상기한 용매를 사용하여 추출한 PRLE의 항균력 실험결과는 Table 2와 같다. 즉, 식중독의 원인 균주인 *Staphylococcus aureus* 및 *Escherichia coli*에 대한 추출용매별 항균효과는 ethanol추출물 및 물추출물에서 뚜렷한 생육저해환을 볼 수 있었으며, butanol과 ether추출물에서는 다소 낮은 저해정도를 보였다. Park 등(14)은 20종의 한약재를 다른 용매로 추출시, 추출용매나 시료에 따라 항균력의 차이를 나타낸다고 하였으며, 물보다는 에탄올 추출물의 경우가 광범위한 미생물영역에서 우수한 항균효과가 있다고 발표한 결과와 일치하였다. 따라서 비교적 높은 추출수율과 뚜렷한 항균효과를 보이는 리기다소나무 잎의 ethanol추출물을 항균물질로 선정하여 다음 단계의 실험을 실시하였다.

Table 2. Comparison of the inhibitory zone of microbial growth caused by various kinds of extract from *Pinus rigida* Miller leaves.

Extraction solvent	Inhibitory Zone of Microbial Growth ¹⁾	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>
Butanol	12.3	11.2
Ethanol	17.6	17.0
Ethyl acetate	10.4	10.9
Ether	12.1	12.4
Water	12.8	14.3

¹⁾All results are presented as mean of triplicate.

추출용매 중 가장 강한 항균력을 보인 리기다소나무 잎 ethanol 추출물의 항균력 측정 결과는 Table 3과 같다. 즉, 리기다소나무 잎 ethanol 추출물은 공시 균주에 대해 PRLE는 Gram 양성균, Gram 음성균, 곰팡이 및 효모 등 광범위한 미생물영역에 대하여 항균력을 나타내었고 모든 미생물에 대하여 농도가 증가함에 따라 항균력이 증가하고 있음을 알 수 있었다. 일반적으로 곰팡이나 효모보다 Gram(+)균과 Gram(-)균에 대해 더욱 강력한 항균효과를 나타내었다. 특

히, *Listeria monocytogenes*에서 생육저해환의 크기는 100 µg/mL에서 13 mm, 250 µg /mL에서 15 mm, 500 µg/mL에서 18 mm로 각각 측정되어 강력한 항균력을 나타내었다.

Table 3. Comparison of the inhibitory zone¹⁾ of microbial growth caused by ethanol extract from *Pinus rigida* Miller leaves

Microorganism	(unit : mm)			
	Concentrate (µg/mL)	0	100	250
<i>Bacillus cereus</i>	10.0	12.2	13.6	14.7
<i>Listeria monocytogenes</i>	10.0	12.8	14.9	18.0
<i>Candida albicans</i>	10.0	10.7	12.1	13.4
<i>Fusarium</i> sp.	10.0	11.4	13.3	13.9

¹⁾All results are presented as mean of triplicate.

항균물질의 열 및 pH 안정성

PRLE가 함유하는 항균물질의 열 및 pH의 안정성을 측정한 결과는 Fig. 1과 같다. 즉, 뚜렷한 항균효과를 나타낸 리기다소나무 잎 ethanol추출물의 *Listeria monocytogenes*에 대한 열안정성 실험결과는 Fig. 1(Left)에서 보는 바와 같이, 넓은 범위의 처리온도(40~150°C)에서 동일한 크기의 생육저해환을 보임으로써 열에 안정한 것으로 나타났다. 또한, PRLE 항균물질의 *Listeria monocytogenes*에 대한 pH 안정성은 Fig. 1(Right)에서 보는 바와 같이, 넓은 pH범위(pH 4~11)에서 동일한 크기의 생육저해환을 나타내어 pH안정성을 보여, PRLE의 항균활성물질은 넓은 pH범위에서 안정하였다. 이상의 결과로 미루어, PRLE의 항균물질은 일반적인 식품가공공정 온도 및 pH범위에서 안정성이 있어 광범위한 영역의 식품원료 및 가공식품에 대한 PRLE처리로 뚜렷한 항균효과 및 저장효과를 기대할 수 있었다.

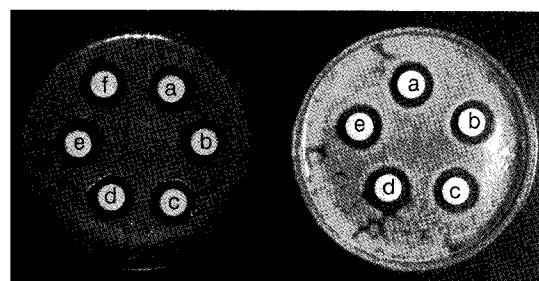


Fig. 1. Thermal(Left) and pH(Right) stability of ethanol-soluble PRLE on the inhibitory growth of *Listeria monocytogenes*, respectively.

(Left) a : 40°C, b : 60°C, c : 80°C, d : 100°C, e : 120°C, f : 150°C.
(Right) a : pH 4.0, b : pH 5.0, c : pH 7.0, d : pH 9.0, e : pH 11.0.

전자현미경을 이용한 미생물 세포조직 및 세포형태변화

PRLE의 미생물세포 생리특성에 미치는 영향을 조사하기 위하여 경상대학교 식품공학과에 보관중인 *Listeria monocytogenes* 균주를 공시균주로 사용하였다. 500 µg/mL의 PRLE용액으로 처리한 균체세포를 처리하지 않은 대조구와 함께 전자현미경검정시료로 조제하여 SEM으로 촬영한 결과는 Fig. 2와 같다. 즉, Fig. 2에서 보는 바와 같이 PRLE용액에 처리한 미생물 균체세포 및 포자는 세포막의 기능이 파괴되어 세포막의 기능이 상실되는 것을 알았고, 또한 세포내용물이 균체외부로 유출되어 균체의 생육이 억제되었으며, 세포막의 삼투조절기능의 상실로 인하여 세포내용이 빈 ghost형태의 사멸균체수가 증가함을 알 수 있었다. 아울러, PRLE처리로 미생물 균체가 세포벽 또는 세포막 파괴로 인하여 세포형태의 변화가 뚜렷하게 발생함이 관찰되었다. 이러한 기작에 의해 결국은 미생물이 사멸하게 되는 것으로 사료된다. 이상의 결과에서 미생물 균체세포에 대한 PRLE의 항균작용이 탁월함을 확인할 수 있었다. 따라서 부패성 및 병원성 균주오염 가능성이 있는 식품을 PRLE로 예방처리함으로써 변파성 미생물균주에 의한 농축수산 식품원료 및 그 가공식품의 변파현상을 억제할 수 있을 것으로 생각된다.



Fig. 2. Scanning electron micrographs of *Listeria monocytogenes* not-treated(control, top) and treated with 500 µg/mL of PRLE (bottom).

(Magnification: x10,000)

PRLE 투여에 따른 실험동물의 혈청내 Formaldehyde 제거효과 및 Hemoglobin농도의 변화

사육조건이 일정하게 조절되는 동물실험실에서 ICR계 mouse에 PRLE와 formalin을 구강 투여한 후, 일정기간 사육하면서 경시적으로 혈청을 채취하여 혈청 내 fomaldehyde 및 hemoglobin함량을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 즉, 혈청내 fomaldehyde함량은 구강투여후 첫째 날에는 260 µg/mL 이었던 것이 사육기간이 길어질수록 크게 감소하여 4일째에는 29 µg/mL로 나타났다. 아울러, 혈청내 hemoglobin

함량은 구강투여 10시간후, 72 µmoles이었던 것이 사육초기에는 다소 감소하는 것으로 나타났으나, 시간이 경과할수록 김소비율이 작아지다가 40시간이후 오히려 증가하여 회복되는 현상을 보여 주었다. 이 결과로 미루어 보아, PRLE처리로 경과시간이 길어질수록 혈청 내 formaldehyde의 분해가 촉진되어 제거비율이 증진되는 효과를 보였으며, formalin 투여로 인한 생체 내 hemoglobin 생성비율도 짧은 시간 내에 회복됨을 예측할 수 있었다.

Table 4. Changes of formaldehyde and hemoglobin in the serum of rats fed with ethanol-soluble PRLE

Time after feeding (days)	Formaldehyde (µg/mL)	Time after feeding (hr)	Hemoglobin (µmole)
1	260	10	72
2	127	20	60
3	65	30	65
4	29	40	70

고등 식물체가 생산하여 미생물의 생육에 영향을 미치는 물질을 항균성 물질 또는 식물성 살균소(phytoncide)로 부르고 있다. 이들 물질은 균의 침해와는 상관없이 자연 상태에서 획득한 것이 대부분이다. 또한, 많은 침엽수 추출물은 어떠한 형태로든 그 구성성분의 80%가 항균활성을 가지는 것으로 알려져 있는데, 리기다소나무 잎추출물의 항균력도 이 phytoncide의 항균작용과 여러 가지 정유성분의 복합적 작용(특히 폐놀성 화합물)에 의한 결과일 것으로 추정된다. 수목추출물도 유기물의 집합체라는 관점으로 보고 최신 기술을 접목시켜 수목추출성분의 이용을 재검토한다면, 보다 유용한 물질의 개발이 실현될 가능성은 그 어느 때보다도 높을 것이다. 아울러, 생산현장에서 활용되고 있는 대부분의 식품보존료가 화학적 합성품으로 그 안정성이 문제되고 있고, 소비자의 건강 지향적 욕구가 증대됨에 따라 인공 합성 보존제의 기피현상이 두드러지고 있는 이때에, 리기다소나무 잎추출물의 항균성을 이용하여 인체에 해가 없는 식품보존제나 의약품, 기능성화장품, 나아가 생물농약 등으로의 활용을 모색하는 것도 좋은 접근이라 판단된다. 물론, 리기다소나무 잎추출물이 기능성 상품화하기 위해서는 안전성 검사뿐 아니라, 항균활성물질의 분자 구조적 이해와 작용 기작이 선행되어 과학적 근거가 확립될 필요가 필수적인 입장이다.

요 약

리기다소나무 잎추출물의 항균력을 조사한 결과, 100~250 µg/mL 이상의 농도에서 뚜렷한 항균활성을 보였고, 광역의 병원성 및 부패성 미생물들에 대하여 항균활성을

나타내었다. 특히, 리기다소나무 알코올 추출물에서는 100 µg/mL의 낮은 처리농도에서도 뚜렷한 항균력을 나타내었다. 또한 추출물의 농도가 증가함에 따라 미생물의 생육저해환의 직경도 커졌으며, 알코올추출물에서 좀 더 뚜렷한 항균력을 관찰할 수 있었다. 또한, 리기다소나무 잎추출물은 넓은 범위의 열 및 pH에서 안정성을 나타냈다. 따라서 리기다소나무 잎추출물의 항균물질은 항균활성이 높고, 항균 spectrum이 광범위 할뿐 아니라, 넓은 범위의 온도 및 pH에 안정하여 이상적인 천연 항균제로서의 개발가능성을 제시하였다. 아울러, 리기다소나무 잎추출물의 주요 항균작용기작은 미생물 세포막의 perturbation기능에 기인한 것으로 사료되었다. 또한, formalin 투여후 PRLE처리로 혈청내 formaldehyde의 분해가 촉진되어 세뇨비율이 증진되는 효과를 보였으며, formalin투여로 인한 생체내 hemoglobin 생성비율도 짧은 시간내에 회복됨을 예측할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 농림부 농림기술개발사업의 지원에 의해 이루어진 연구결과의 일부로, 연구비지원에 감사드립니다. 아울러, 본 연구의 항균실험 분석에 도움을 준 문성현, 김소라, 박소영, 이혜정, 임현주에게도 감사를 보냅니다.

참고문헌

- Caccioni, D.R.L., Guzzardi, M., Biondi, D.M., Renda, A., and Ruberto, G. (1998) Relationship between volatile components of citrus fruit essential oils and antimicrobial action on *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. International J. of Food Microbiol., 43, 73-79
- Cimanga, K., Kambu, K., Tona, L., Apers, S., Bruyne, T., Hermans, N., Totte, J., Pieters, L., and Vlietinck, A.J. (2002) Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. Journal of Ethnopharmacol., 79, 213-220
- Hassanzadeh, M.K., Rahimizadeh, M., Bazzaz, B.S.F., Emami, S.A., and Asilli, J. (2001) Chemical and antimicrobial studies of *Platycladus orientalis* essential oils. Pharmaceut. Biol. 39, 388-390
- Seo, W.T., Yang, J.K., Kang, B.K., Park, J.S., Hong, W.C., Kang, Y.M., Jung, H.Y., Kim, Y.D., Kang, S.M., Kim, S.W. and Choi, M.S. (2003) Extraction and biological activities of essential oil from *Thuja occidentalis* leaves. Korean J. Medicinal Crop Sci., 11, 364-370
- Baricevic, D., Milevoj L., and Borstnik, J. (2001) Insecticidal effect of oregano (*Origanum vulgare* L. ssp. hirtum Letswaart) on bean weevil(*Acanthoscelides obtectus* Say). International Journal of Horticultural Science, 7, 84-88
- Chantreine, J.M., Laurent, D., Ballivian, C., Saavedra, G., Ibanez, R., and Vilaseca, L.A. (1998) Insecticidal activity of essential oils on *Aedes aegypti* larvae. Phytotherapy Research, 12, 350-354
- Na, K.J., Kang, H.Y., Oh, J.H., Choi, I.G., Yun, Y.W., and Jeung, E.B. (1988) The sedative effect of stress by essential oils purified from softwoods. Korean J. of Lab. Anim. Sci., 14, 93-96
- Dudai, N., Larkov, O., Ravid, U., Putievsky, E., and Lewinsohn, E. (2001) Developmental control of monoterpenes content and composition in *Micromeria fruticosa* (L.) Druce. Ann. Bot., 88, 349-354
- Kwak, S.H. (1994) Allelopathic effect in the plant growth of ground layer in *Chamaecyparis obtusa* and *Thuja orientalis* plantation. Won Kwang Univ. ph. D. Thesis.
- Jo, G.G. and Kim, J.H. (2004) Systematics of *Thuja* Based in leaf monoterpenoids. Korean J. Ecology., 27, 161-164.
- Davidson, P.M. and Parish, M.E. (1989) Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. Food Technology, 43, 148-155
- Piddock, L.J.V. (1990) Techniques used for the determination of antimicrobial resistance and sensitivity in bacteria. J. Appl. Bacteriol., 68, 307-310.
- Pyliotis, N.A., Withecross, M.J. and Jacobsen, J.V. (1979) Localization of gebberlic acid-induced acid phosphorylase activity in the endoplasmic reticulum of barley aleurone cells with the electron microscope. Planta, 147, 134-142
- Park, U.Y., Chang, D.S., and Cho, H.R. (1992) Screening of antimicrobial activity for medicinal herb extracts. J. Korean Soc. Food Nutr., 21, 91-96

(접수 2006년 4월 27일, 채택 2006년 9월 22일)