

## 뽕잎 추출물의 구강미생물에 대한 항균효과

최정이<sup>†</sup> · 정미애<sup>1</sup> · 정상희<sup>2</sup>

<sup>†</sup>혜전대학 치위생과

<sup>1</sup>동우대학 치위생과

<sup>2</sup>강릉영동대학 치위생과

## Antimicrobial Effect of Mulberry Leaves Extracts Against Oral Microorganism

Jeong-Lee Choi<sup>†</sup>, Mi-Ae Jung<sup>1</sup> and Sang-Hee Jung<sup>2</sup>

<sup>†</sup>Department of Dental Hygiene, Hyejeon College, Chungnam, 350-702, Korea

<sup>1</sup>Department of Dental Hygiene, Dong-u College, Sokcho city, 217-711, Korea

<sup>2</sup>Department of Dental Hygiene, Kangnung Yeongdong College, Kangnung city, 210-842, Korea

**ABSTRACT** In the current research for natural product with antimicrobial effects, various extracts of Mulberry Leaves against microorganisms were evaluated in terms of the minimum inhibitory concentrations(MIC). In general, *Candida albicans* was more antimicrobial activity than the other microorganisms such as *Streptococcus mutans*, *Staphylococcus epidermis*, and *Staphylococcus aureus*. The maximum activity was exhibited by ethanol extract of the leaves of Mulberry Leaves against *Candida albicans* (MIC, 1600 µg/ml). These results suggest that ethanol and water extracts of Mulberry Leaves have a potential antimicrobial activity.

**Key words** Mulberry leaves, Minimum inhibitory concentration(MIC)

### 서 론

뽕나무(mulberry)는 뽕나무과(Moraceae)에 속하는 식물로 열대지방에서부터 온대지방에 걸쳐 130여종의 품종이 세계적으로 존재한다. 우리나라에서는 산상계(*Morus bombysis* Kodiz), 백상계(*Morus alba* L.), 노상계(*Morus Lhou* Koidz)가 재배되고 있다<sup>1)</sup>. 뽕잎은 항고혈압<sup>2)</sup>, 항당뇨<sup>3)</sup>, 콜레스테롤저하<sup>4)</sup>, 발암억제<sup>5)</sup> 및 체지방 축적 억제<sup>6)</sup> 등 성인병에 효능이 있다고 보고 되었고, flavones, steroid, triterpenes, amino acids, vitamins 과 다량의 미네랄 성분이 존재하는 것으로 보고 되고 있다<sup>7,8)</sup>. 뽕잎에는 다른 식물에 비해 뽕잎에 함유된 각종 생리활성 성분은 크게 휘발성 성분과 비휘발성 성분으로 나눌 수 있는데 휘발성 성분으로는 guaiacol, eugenol, methyl salicylate, benzaldehyde 및 phenyl acetaldehyde 등이 보고 되었으며 비휘발성 성분은 플라보노이드가 주류를 이루어 그 함량이 매우 높고 종류 또한 다양하다. 즉 rutin, quercetin, isoquercitrin, astragaln, quercetin 3, 7-diglucoside 및 quercetin 3-triglucoside가 존재한다. 이러한 플라보노이드 화합물의 생리활성은 천연에 존재하는 다른 물질에 비하여 작용이 매우 다양하여 이노작용, 항모세혈관 투과작용, 항알레르기 작용 및 간보호작용, 항세균작용<sup>9)</sup> 등

의 특성이 알려져 있으며 또한 quercetin 3-O-(6"-O-acetyl)-β-D-glucoside와 kaempferol 3-O-(6"-O-acetyl)-β-D-glucoside는 충치 제거에 관여하는 것으로 보고되었으나 어느 구강미생물에 작용하는가는 밝혀지지 않았다. 특이한 플라보노이드 골격인 kuwanon G는 혈압강하 작용이 매우 뛰어난 것으로 보고 되었다<sup>10)</sup>. 뽕잎의 methanol 추출물은 항산화 활성이 강한<sup>11)</sup> 것으로 보고 되었으며 따라서 본 연구는 뽕잎의 추출물을 대상으로 DSC(시차주사열량)분석, FT-IR(적외선 분광)분석, UV(자외선분광)분석 실험을 통하여 열적 거동 및 용매의 종류에 따른 특성 분석을 실시하였으며, 차로 음용했을 때와 같이 물로 추출한 것과 에탄올(C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH)로 추출하여 얻은 뽕잎 추출물에 의한 구강 내 미생물의 항균효과에 관한 보고는 미비하여 구강 내 미생물에 대한 항균력을 조사하였다.

### 재료 및 방법

#### 1. 실험재료

충청북도 잠사균이 시험장에서 뽕잎을 구입하여 동결 건조한 다음 plastic bottle에 밀봉하여 4°C냉장고에 보관하면서 실험에 사용하였다.

#### 2. 실험방법

##### 1) 추출방법

뽕잎성분을 이용하기 위하여 건조한 뽕잎을 C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 및 증

<sup>†</sup>Corresponding author

H.P: 016-730-1897

Fax: 041-630-5176

E-mail: biobrain@hyjeon.ac.kr

류수에 냉침 시켜 추출을 실시하였다.

## 2) 추출물 특성 분석

추출 농축액을 0.4  $\mu\text{m}$  여과지로 여과하여 35°C에서 감압 증류하여 용매를 제거하고 추출물을 대상으로 DSC(Differential Scanning Calorimetry, TA Instruments DSC2910 Co., USA), IR(Infrared Spectrometer, JASCO IR 5300 Co., JAPAN), UV(Ultraviolet Spectrophotometer, JASCO V-550 Co., JAPAN) 등을 이용하여 열적 거동 및 용매의 종류에 따른 특성 분석을 실시하였다. 용매를 이용하여 추출한 성분의 관능기의 변화 스펙트럼을 확인하기 위하여 FT-IR(Fourier transform Infrared Spectrometer, JASCO FT-IR 5300 Co., JAPAN)를 주사범위 400~4000  $\text{cm}^{-1}$ 에서 측정하였으며, UV(Ultraviolet Spectrophotometer, JASCO V-550 Co., JAPAN)를 이용하여 분석하였다. 뽕잎에 대한 시차주사열량분석은 DSC(Differential Scanning Calorimeter, TA Instruments DSC2910 Co., USA)로 승온 속도를 10°C/min로 하여 300°C까지 측정하였다.

## 3) 사용균주 및 배지

실험에 사용된 균주는 *Streptococcus mutans* JC-2, *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213와 *Candida albicans* KCTC 1940를 사용하였다. 세균배양에 사용된 배지는 *S. mutans*, *S. epidermidis*와 *S. aureus*는 BHI(brain heart infusion, Difco, USA)를 사용하였고, *C. albicans*는 SB(sabouround, Bacto-peptone 10 g Bacto-dextrose 40 g in DW 1L)를 사용하였다.

## 4) 항균력 측정

항균효과를 파악하기 위하여 최소억제농도(minimum inhibitory concentration, MIC)를 측정하였다. 액체배지 희석법<sup>12-14)</sup>을 이용하였으며, 96-microwell plate(Nunc, Denmark)에 각 추출물의 농도를 최고 3,200  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 에서 최저농도 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 까지 2배씩 연속적으로 희석하였다. 각 균주는 단일 콜로니를 액체배지에 접종하고, 37°C배양기에서 18시간동안 배양한 균주를  $10^5$  cells/ml 접종하여 37°C 배양기에서 24시간 배양 한 후, ELISA (Spectra Max 250, Molecula Devecas, USA)에 의한 흡수과장 630 nm에서 흡광도를 측정하여 배지의 탁도를 확인 하였고, 순수 배양액의 흡광도 값과 같은 결과를 얻은 것을 MIC로 결정하였으며, MIC의 수치가 낮은 것을 항균효과가 높은 것으로 판정하였다.

## 5) 시료의 처리

조제한 시료는 즉시 4°C 냉장고에 저장하였고, 사용직전에 10% DMSO(dimethyl sulfoxide)에 희석하여 실험에 사용하였다.

# 결과 및 고찰

## 1. 뽕잎추출 특성분석

뽕잎성분에 대한 열적인 거동 특성과 뽕잎을 물과 에탄올을 이용하여 추출한 후 추출된 물질의 특성을 파악하기 위하여 DSC 및 분광분석을 실시하여 다음과 같은 몇 가지 결과를 얻었다.

### 1) DSC 분석

뽕잎을 차로 복용하는 경우 최적온도 조건에 대한 분석을 위하여 뽕잎 분말에 대한 열적 거동 분석을 실시하였다. 열적거동을 알 수 있는 시차주사열량 분석 (DSC)은 열분석법의 일종으로 시료와 기준물질의 온도를 계속하여 증가 시키고, 기록계에 나타난 열량은 발열 또는 흡열 반응의 결과로 얻은 열 또는 잃은 열을 상쇄하여 그래프로 나타나게 된다<sup>15)</sup> 이에 시차주사열량계(DSC)를 이용하여 뽕잎의 열적 거동을 분석하여 그 결과를 그림 1에 나타내었다. 그림 1에 의하면 본 연구에서 사용한 뽕잎의 경우 81°C 부근에서 열적 거동을 보이고 있다. 즉 뽕잎이 온도 변화가 발생할 경우 70°C 이전까지는 열적인 안정성을 유지하고 있으나 70°C이상의 온도범위에서는 흡열에 의한 질량의 변화가 발생하고 있음을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 뽕잎 구성 성분중의 일부가 70°C 이상의 온도에서 물리적인 변화가 발생한다고 할 수 있다. 열적 거동의 결과에 의하면 뽕잎을 차로 마실 경우 물의 온도가 81°C 부근에서 뽕잎의 구성 성분이 물속에 용해되어 나오는 것이라 할 수 있다. 따라서 최소한 81°C 이상으로 가온된 물을 사용하여야 뽕잎 성분을 차로 섭취할 수 있을 것으로 판단되어진다.

### 2) 적외선(IR) 분광 분석

뽕잎의 성분을 추출하기 위하여 용매로 물과 에탄올을 사용

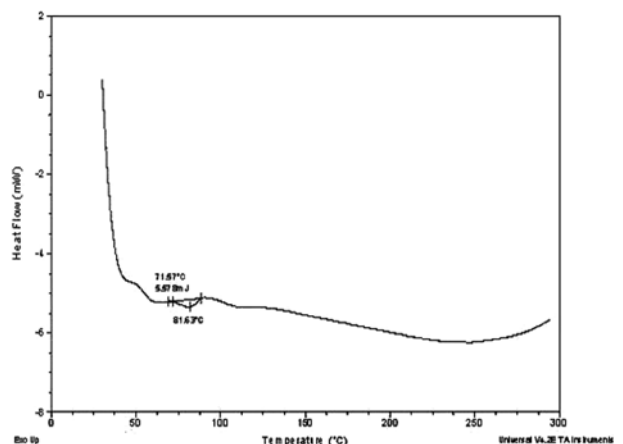


Fig. 1. DSC thermograms of mulberry leaves.

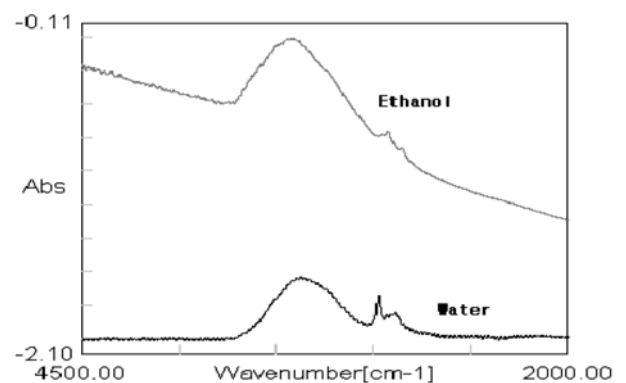


Fig. 2. FR-IR spectra of Mulberry Leaves Extracts.

하였는데 추출에 사용된 용매에 따라 추출된 성분 물질의 차이를 확인하기 위하여 적외선(IR) 분광분석을 실시하였다.

적외선 흡수 스펙트럼은 분자의 구조에 기초한 특유의 진동 스펙트럼이기 때문에, 다른 분자는 반드시 다른 스펙트럼을 주게 되어 다른 분석법에서는 얻을 수 없는 분자의 구조에 관한 중요한 정보를 얻을 수 있다<sup>16)</sup>. 뽕잎을 용매로 추출한 후에 물질의 구성성분에 대한 특성을 나타내는 것을 알아보기 위하여 용매에 따른 적외선 분광 분석을 하여 결과는 그림 2에서 보는 바와 같다. 그림 2에서 살펴보면 2000에서 4500 cm<sup>-1</sup>의 범위에서 에탄올과 물로 추출한 물질의 경우 흡수 피크(peak)의 강도에서는 차이를 보이는 하지만 전체적인 추출물질의 성분에는 큰 차이가 발생하지 않는 것을 알 수가 있다. 즉, 3300 cm<sup>-1</sup>의 범위에서 O-H의 신축진동이 나타나고 있는데 이는 물과 알코올에 들어 있는 -OH기의 특성 때문에 나타나는 결과라 할 수 있다. 또한 약 2950 cm<sup>-1</sup>의 범위에서 알칸족 화합물(C-H)에 의한 신축진동이 나타나고 있는데 에탄올로 추출한 경우 보다 물로 추출한 경우 그 크기가 더욱 크게 나타나고 있다. 이러한 특성으로부터 비교적 물과 알코올을 이용하여 추출한 경우 추출물중에는 C-C 결합을 지니며 대칭구조를 지닌 포화 탄화수소 화합물이나 C-H 신축 형태로 C=O 결합 형태를 지닌 화합물이 존재한다고 할 수 있다.

3) 자외선 (UV) 분광 분석

자외선 분광광도계는 시료가 자외선 영역 및 가시광선 영역의 빛을 흡수하는 정도를, 이용하여 시료를 정성 및 정량 분석하는 기기이며 자외선 및 가시광선 영역에서의, 분자의 광흡수는 분자의 전자구조와 관련 된다<sup>17)</sup>.

용매에 따라 추출되는 성분에 대한 분석을 위하여 UV 분석을 실시하여 그 결과를 그림 3에 나타내었다. 300에서 900cm<sup>-1</sup>의 범위에서 에탄올과 물로 추출한 물질의 경우 물로 추출한 물질의 경우에는 특별한 흡수특성이 보이지 않으나, 에탄올로 추출한 물질의 경우에는 약 420과 670 cm<sup>-1</sup>에서 물과는 다른 특성 피크(peak)를 보이고 있다. 따라서 물과 에탄올을 이용하여 뽕잎 구성 성분을 추출하는 경우 2000에서 4500 cm<sup>-1</sup>의 범위에서는 추출성분에 차이를 보이지 않으나 300에서 900 cm<sup>-1</sup>의 범위에서는 추출된 성분의 차이가 발생하는 것을 확인 하였다. 특히 에탄올로 추출한 경우 650cm<sup>-1</sup>의 범위에서 이중결합을 지니며 대칭형 구조를 지닌 형태의 알켄(C=C) 화합물에 의한 특성 피크(peak)를 보이고 있다. 이러한 특성 분석결

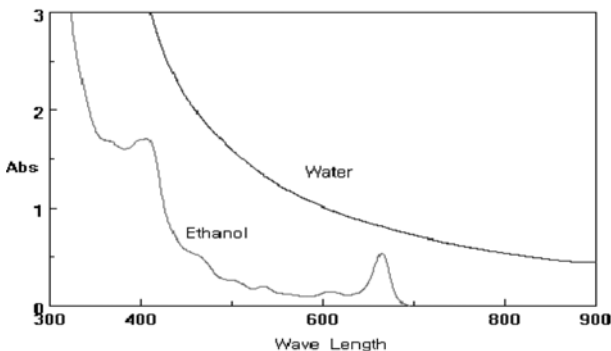


Fig. 3. UV/Vis spectra of Mulberry Leaves Extracts.

과 에탄올로 뽕잎을 추출한 경우에는 물을 이용하여 추출한 경우와는 달리 이중결합의 구조를 지닌 물질이 추출되어 진다고 할 수 있을 것이다.

2. 뽕잎 추출물의 구강미생물에 대한 항균효과

뽕잎을 물과 유기용매를 사용하여 얻은 뽕잎 추출물을 구강 미생물 중 치아우식원인균인 *S. mutans*<sup>18,19)</sup>, 구강 인두와 피부에 상주균이면서 화농성염증의 원인균인 *S. epidermis*와 *S. aureus*<sup>20,21)</sup>, 구강에 상주하면서 면역력이 저하된 사람에게 기회 감염을 나타내는 원인균인 *C. albicans*<sup>21)</sup>에 대하여 항균 효과를 실험하였다.

뽕잎을 물로 추출하여 얻은 추출물에서 항균효과를 측정할 결과, 물에 의한 추출물에 대하여 *S. mutans* JC-2의 최소억제농도는 3,200 µg/ml 이상으로 항균 활성이 나타나지 않았다. 이에 다른 유기용매를 이용하여 추출하여 *S. mutans*에 대한 항균효과에 대한 연구 검토가 이루어져야 할 것으로 생각된다. 그러나 *S. epidermis* ATCC 12228와 *S. aureus* ATCC 29213의 최소 억제농도는 3,200 µg/ml로 미약한 항균 활성이 나타났으며 진균인 *C. albicans* KCTC 1940에서는 최소억제농도가 1,600 µg/ml로 다른 미생물에 비하여 높게 항진균 활성이 관찰되었다(Table 1).

뽕잎을 에탄올로 추출하여 얻은 추출물에서 항균효과를 측정할 결과 *S. mutans* JC-2, *S. epidermis* ATCC 12228와 *S. aureus* ATCC 29213에 대한 최소억제농도는 3,200 µg/ml 이상으로 항균활성이 나타나지 않았다. 그러나 *C. albicans* KCTC 1940에서는 물에 의한 추출물과 같이 최소억제농도가 1,60 µg/ml로 항진균 활성이 나타났다(Table 2).

결과적으로 뽕잎의 물과 에탄올에 의한 추출물이 구강미생물에 대하여 항진균효과와 미약하게 항세균효과를 관찰 할 수 있었다. 뽕잎 추출물과 분획물의 장내세균에 대한 생장억제효과를 측정하였을 때<sup>22,23)</sup> 뽕잎을 극성에 따라 분획한 후 처리한 장내세균의 억제 활성은 성인의 대표적인 장내세균인 *Bifidobacterium adolescentis*, *Lactobacillus casei* 및 *E. coli*에 대해 생장억제를 보이지 않았으나 뽕잎 핵산 분획물과 물 분획물에서 *Clostridium perfringens*에 대한 약한 생장억제효

Table 1. Minimal inhibitory concentrations(MIC) of the Mulberry leaves

Tested material	MIC <sub>50</sub> (µg/ml)*			
	<i>S. mutans</i> JC-2	<i>S. epidermis</i> ATCC12228	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>C. albicans</i> KCTC1940
WTML	> 3,200	3,200	3,200	1,600

\*Each WTML extract was examined in triplicate experiments. Plant extracts: WTML; Water extract of Mulberry leaves

Table 2. Minimal inhibitory concentrations(MIC) of the Mulberry leaves

Tested material	MIC <sub>50</sub> (µg/ml)*			
	<i>S. mutans</i> JC-2	<i>S. epidermis</i> ATCC12228	<i>S. aureus</i> ATCC29213	<i>C. albicans</i> KCTC1940
WTML	> 3,200	> 3,200	> 3,200	1,600

\*Each WTML extract was examined in triplicate experiments. Plant extracts: WTML; Water extract of Mulberry leaves

과가 보고 되었다. 이는 녹차의 추출물과 인삼추출물<sup>18),19)</sup>이 *Clostridium perfringens*에 대하여 억제효과를 보인 것과 일치하였다. 빵잎은 *in vivo* 실험에서 N-nitroso화합물, aromatic steroid같은 유해산물의 생성을 막고 장내균총을 변화시키는 것으로 알려 졌다<sup>23)</sup>. 향후 빵잎 추출물에 대한 항균 및 항진균물질을 분리 및 분석하여 구강미생물의 억제효과를 나타내는 활성물질을 확인하는 연구들이 수행되어져야 할 것이다.

## 요 약

본 연구에서는 빵잎을 물과 에탄올로 추출하여 얻은 빵잎 추출물을 이용하여 특성을 분석하고 구강미생물에 대한 항균 및 항진균효과를 검색하여 다음과 같은 실험결과를 얻었다.

빵잎을 차로 마실 경우 물의 온도가 81°C 부근에서 빵잎의 구성 성분이 물속에 용해되어 나오는 것으로 나타났다. 추출에 사용된 용매에 따라 추출된 성분 물질의 차이를 확인하기 위하여 적외선(IR) 분광분석을 실시하여 2000에서 4500 cm<sup>-1</sup>의 범위에서 에탄올과 물로 추출한 물질의 경우 흡수 피크(peak)의 강도에서는 차이를 보이지는 하지만 전체적인 추출물질의 성분에는 큰 차이가 발생하지 않는 것을 알 수 있었다. 용매에 따른 추출물질의 양은 물로 추출한 경우에 비하여 에탄올로 추출한 경우가 좀 더 많은 양의 물질이 추출되어진다는 것을 IR 특성을 통하여 확인할 수 있었다.

빵잎의 물과 에탄올에 의한 추출물에서는 *S. mutans* JC-2에 대한 항균활성이 나타나지 않았으나 *S. epidermis* ATCC 12228 와 *S. aureus* ATCC 29213에서 최소억제농도가 3,200 µg/ml로 미약하게 항균효과가 나타났다. 또한, *C. albicans* KCTC 1940은 1,600 µg/ml로 항진균효과를 관찰할 수 있었다. 이와 같이 빵잎 추출물은 구강미생물에 대하여 미약하지만 항균활성을 가지고 있음을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

- Kim MH: Mulberry culture science. Hyangmoon Publishing Co, Seoul, pp.67, 1970.
- Cho SK, Shin HS: The effect of Sanbepkie extract on the restriction of blood pressure. J Pharmacology 21: 17-26, 1977.
- Kimura M, Chen F, Nakashima N, Kimura I, Asano N, Koya S: Antihyperglycemic effect of N-containing sugar derived from mulberry leaves in streptozocin-induced diabetic mice. J Traditional Medicine 12: 214, 1995.
- Kim SY, Lee WC, Kim HB, Kim AJ, Kim SK: Antihyperlipidemia effects of methanol extracts from mulberry leaves in cholesterol-induced hyperlipidemia rats. J Korean Soc Food Sci Nutr 27(6): 1217-1222, 1998.
- Lee SJ, Shin EJ, Son KH, Chang HW, Kang SS, Kim HP: Anti-inflammatory activity of the major constituents of *Lonicera japonica*. Arch Pharm Rev 18: 133-135, 1995.
- Kondo Y: Trace constituent of mulberry leaves. Nippon Sanshigaku Zasshi 26: 349, 1957.
- Katai K: Trace components in mulberry leaves. J Chem Soc Jpn 18: 379-383, 1942.
- Lee HS, Kim SY, Jeon HJ, Lee SD, Moon JY, Kim AJ, Lee WC, Ryu KS: Growth Inhibitory effect of *Clostridium perfringens* for catechins separated from mulberry leaves. Kor K of Seric Sci 42: 6-9, 2000.
- 농촌진흥청 잠사곤충연구소: 양잠산물의 생리활성 물질 이용 실태와 개발 전망 심포지움, 1995.
- Hamada S, Koga T, Ooshima T: Virulence factors of *Streptococcus mutans* and dental caries prevention. J Dent Res 63: 407-411, 1984.
- Lew, Id: The antioxidant activity of mulberry leaves. J Industrial Science and Technology 12: 1-7, 2004.
- Cho H, Weon RS, Yang EY, and Kim JS: Antimicrobial effect of the extract of *Sopora flavescens* Ait(1). J Pharm Soc Korea 43: 419-422, 1999.
- Kim KY, Chung DO and Chung HJ: Chemical composition and antimicrobial activities of *Houttuynia cordata* Thumb. Korean J Food Sci Technol 29(3): 400-406, 1997.
- Chung BS, Kim HS and Kim SK: Susceptibility tests of *Candida* species isolated from vagina. J Korean Soc Microbiol 24(5): 523-526, 1989.
- 심주섭, 조원오, 정근우: Oxidation Stability of PAO Oils Determined by Differential Scanning Calorimetry. J KSTLE 12(1): 36-41, 1996.
- 제금련: 근적외선 분광분석을 이용한 생약의 조직평가법 개발. 동덕여자대학교 대학원 박사학위논문, 2002.
- 김철현, 구할분: 유기용매 첨가에 따른 Polypyrrrol-Glucose Oxidase 효소전극의 효소고 정화 향상. 자외선분광분석. 전기전자재료학회지 15(7): 615-620, 2002.
- De Stoppelaar JD, Konig KG, Plasschaert AJM, van der Hoeven JJ: Decrease in cariogenicity *Streptococcus mutans*. Arch Oral 53: 1355-1360, 1974.
- Losche WJ: Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. Microbial Rev 50: 353-380, 1986.
- 김영권, 한만덕: 구강미생물학. 고문사, pp.183-184, 1998.
- 민경희, 김치경, 조민기: 대학미생물학. 탐구당, pp.382-383, 1990.
- 이희삼, 전호정, 이상덕, 문재유, 김애정, 류강선: 식이 빵잎이 흰쥐의 장내균총 구성에 미치는 영향. Korean J Food Sci Technol 33(2): 252-255, 2001.
- 이상덕: 빵잎이 흰쥐의 장관기능과 장내세균에 미치는 영향. 서울대학교 대학원 박사학위논문, 2000.
- Ahn YJ, Kim M, Yamamoto T, Mistuka T: Selective Growth Response of Human Intestinal Bacteria to Analiance plants extracts. Microbial Ecology in Health and Disease 3: 223-229, 1990.
- Ahn YJ, Kamamura T, Yamamoto T, Fuisawa T, Mitsuoka T: Effect of green tea extract on growth of intestinal bacteria. Microbial Ecology in Health and Disease 3: 335-338, 1990.
- 조영제, 천성숙, 권효정, 김정환, 이경환, 안봉전, 추재원: 빵잎(*Morus alba* L.)의 물과 80% Ethanol 추출물의 Angiotensin Converting Enzyme과 Xanthine Oxidase에 대한 활성억제효과 탐색. 한국응용생명화학학회지 49(2): 114-124, 2006.
- 임명자: 빵잎차의 생리활성 및 이화학적 특성. 진주산업대학교 산업대학원 석사학위논문, 2005.
- 김미원: 빵잎 추출물의 유지에 대한 항산화 효과와 항산화 성분의 분리 동정에 관한 연구. 성신여자대학교 대학원 박사학위논문, 2002.

(Received December 1, 2006; Accepted December 13, 2006)

