

상명대학교 생명공학과 학술지

The CELL

November 2018 Vol.13,14

SangMyung University Department of Biotechnology



상명대학교 생명공학과 학술지

The CELL

November 2018 Vol. 13,14

생명공학과 학술동아리 AMT

Sangmyung University
Department of Biotechnology

Vol. 13, 14

The Cell

생명공학과 학술지

SANGMYUNG UNIVERSITY
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

발 간 사

장영준, 박예진, 임지수, 이동언, 박민선
생명공학과 학술동아리 AMP 임원진 일동

봄에 뿌린 씨앗이 결실을 맺는 가을이 왔습니다. 강한 비와 바람에도 열매를 맺듯, 다사다난 했던 1년이 지나고 AMP의 한해 결실을 모두에게 알려드리게 되어 매우 기쁩니다. 생명과학과에서 생명공학과로 개편된 후 처음으로 집필하게 된 학술지인 만큼 감회가 새로우며 남다른 포부를 가지고 집필에 임하였습니다. 특히 이번에는 2017년과 2018년, 2년의 모든 결과를 모아 편찬하게 된 만큼, 열심히 해온 동아리원의 활동이 잘 전달되게 최선을 다해 편집하여 'The Cell Vol. 13, 14'를 출간하게 되었습니다.

이번 호에는 2018 한국생물공학회 추계학술대회에 발표한 논문인 초본계 식물로부터 항산화 물질을 효과적으로 추출하기 위한 반응조건의 탐색과 *Galactomyces reessii*의 최적 생장조건과 바이오산업 분야로의 응용가능성에 대한 연구가 실렸으며, 스터디 상생 플러스 지원과제로 선정된 탄닌 추출물과 녹조 저감에 대한 고찰이라는 연구가 실렸습니다. 또한, Busulfan 투여 생쥐에서 생식기관에 대한 vitamin E의 영향을 탐구하여 항암제로부터 정상세포의 손상을 최소화할 수 있는 새로운 물질을 발견해 탁월한 성과를 거둔 연구도 있습니다. 더하여, DNA barcoding 기술을 통한 생물 종을 판별하는 방법에 대한 실험과 강산성 환경에서 형질전환 생물의 성장률을 확인하는 실험, 계면활성제가 미세조류의 생장에 미치는 영향에 관한 실험도 진행하였습니다.

먼저 이러한 연구들을 진행하는 데 있어, 학생들을 위해 기회의 장을 마련해주시고 아낌없는 도움을 주신 교수님들께 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 또한 소중한 시간을 할애하여 선배의 마음으로 진심 어린 조언과 실험지도를 맡아주신 조교님들께도 감사드립니다. 올해는 변화한 시대 환경에 맞춰 기존과는 다른 새로운 시도들을 많이 해 보았습니다. 한 번도 가보지 않았던 길을 가기에 어려움도 있었지만, 모든 동아리원이 적극적으로 참여하고, 한명 한명이 최선의 노력을 다했기에 역대 최고의 성과를 이뤄내지 않았나 생각합니다. 이 자리를 빌어 무척이나 더웠던 올여름에 마다하지 않고 연구에 성실히 참여해준 모든 동아리원에게 고마움을 전하며, 조원들을 이끌어주신 조장님들께도 감사의 말씀을 전합니다.

이러한 경험들을 바탕으로 흠이 단단해지는 계기가 돼서 우리 부원들이 자신의 나무를 키워가는데 좋은 밑거름이 되었으면 합니다. 마지막으로 2년의 결과물이 모여 나온 이 학술지가 생명공학과로서의 도약을 알리는 시작점이 되기를 기원합니다.

축 사

생명공학과 학과장

교수 김 창 배

현재 융복합과 빅데이터로 대표되는 4차 산업혁명 시대로서 생명과학과 생명공학은 이러한 시대의 중심에서 정보과학, 나노과학 뿐만 아니라 인문사회과학, 예술분야와도 대화하고 협력하고 있습니다. 이러한 상황에서 생명과학과 생명공학의 학문적 위상과 역할은 증강되고, 여러분이 졸업 후 진출할 산학연의 취업 및 진학의 기회가 더욱 확대되리라고 확신합니다.

올 한 해 동안 학생들이 열의를 갖고 참여하여 이룩한 학과 학술동아리인 A.M.P의 활동 성과를 정리한 학술지 “The CELL” 제 13, 14호의 발간을 진심으로 축하합니다. 생명과학과 생명공학의 소중한 미래가 담긴 학술지 발행을 위하여 성의를 다한 편집위원들과 여러 학생들에게 박수를 보내며 고마운 마음을 전합니다.

이번 학술지 발간을 통하여 학과에 대한 소속감과 생명과학과와 생명공학과의 선후배간의 돈독한 관계가 이어지는 기회가 되기를 바랍니다. 매년 새롭고 참신한 주제로 학술지의 출판이 계속되길 기원합니다.

감사합니다.

격려사

생명공학과 학술동아리 AMP

지도교수 유 하 영

올해 초 AMP 지도교수를 맡게 되어 학생들과 청학동에 모여 인사를 나눈 게 엇그제 같은데 벌써 제10회 학술제를 앞두고 있고, 제 13, 14 “The Cell” 발간을 코앞에 두고 있는 지금 시간이 정말 빠르게 흘러가는 것을 새삼 느끼고 있습니다. 특히, 올해 AMP 활동인원이 35명이 라고 했을 땐 정말... ‘학술동아리로서 운영이 될 수 있을까?’ ‘실험은 어떻게 하지?’ 등등 많은 고민을 했던 게 기억납니다. 욕심 많은 지도교수를 만난 불쌍한 임원진들에게 팀별 연구 수행, 높은 목표설정, 공모전 참가 독려 등 많은 업무를 제시했는데 성실하게 그리고 정말 열심히 활동한 모든 학생들에게 고마움을 느낍니다. 그리고 바쁘신 와중에 학생들을 위해 흔쾌히 연구실을 개방해 주신 학과 교수님들께 진심으로 감사드립니다. 또한 후배들을 위해 많은 업무에도 불구하고 도움을 준 모든 대학원생들 정말 고생하셨습니다.

이번 AMP 학술활동은 학생들이 관심 있는 4대 주제 (의생명공학, 분자유전학, 생물정보학, 환경/미생물/해양)를 선정한 후 6개 팀을 구성하여 학과 교수님의 연구실에 각각 배정하였으며, 학술제에서 완성도 높은 연구결과를 보여드리기 위해 열심히 노력하였습니다. 특히, 기록적인 폭염에도 불구하고 여름 방학동안 자발적으로 실험하고 있는 학생들의 모습은 정말 인상 깊었습니다. 덕분에 교내 공모전인 스터디상생플러스에 2팀이나 지원할 수 있었으며, 우수한 연구 결과물을 바탕으로 한국생물공학회 2018 추계 국제학술대회 학생포스터발표 부문에 2팀이 참가할 수 있었습니다. 석·박사 대학원생들이 주로 참여하는 발표회에서 기죽지 않고 발표하는 모습들이 정말 대견했고, 학생우수논문발표상을 수여 받아왔을 땐 제가 수상했을 때보다 더 기뻐합니다. 이렇게 한 해 동안 타이트한 일정을 소화하며 노력한 결과 모든 팀들이 기대 이상의 우수한 연구결과를 만들었는데, 우리 학생들이 정말 자랑스럽고 개인적으로 매우 보람을 느끼고 있습니다.

생명에 대한 기초부터 응용까지 우리 학과에는 다양한 연구 주제와 소재들이 준비되어 있습니다. 연구에 관심 있는 학생은 주저하지 말고 담당 교수님을 찾아뵙기 바라며, 혼자가 외롭다면 학술동아리 AMP를 통해 그룹스터디 및 연구 활동을 경험해보길 권장합니다. 특히, 고학년 AMP 멤버들이 지속적으로 관심을 갖고 참여해준다면 우리 학술동아리가 더욱 발전하리라 믿습니다. 앞으로도 매년 “The CELL” 학술지를 발간할 수 있도록 모든 구성원들이 관심을 갖고 응원해주시기 바랍니다. 이번 학술제의 성공적인 개최를 기원하며, 학술지 발간을 위해 1년 동안 고생한 임원진, 팀장 그리고 팀원들에게 다시 한 번 고마운 마음을 전합니다.

목 차

학술 동아리 AMP 소개	1
학과 소개	2
교수님 소개	3

2017 생명공학과 AMP

실험 보고

계면활성제가 미세조류의 생장에 미치는 영향	6
강산성 환경에서의 형질전환 생물의 성장을 평가	14

학술 조사

방사선(Radiation) - 오염과 이용	20
호르몬과 질병	26

견학 보고

극지연구소	32
테라젠이텍스	35

2018 생명공학과 AMP

연구 보고

초본계 식물로부터 항산화물질을 효과적으로 추출하기 위한 반응조건의 탐색 ...	40
탄닌 추출물과 녹조 저감에 대한 고찰	58
DNA barcoding 기술을 통한 생물 종 판별	80
<i>Galactomyces reessii</i> 의 최적 생장조건과 바이오산업 분야로의 응용가능성 연구	86
Busulfan 투여 생쥐에서 생식기관에 대한 vitamin E의 영향	112

단체 활동

첫모임	126
회식	127
Membership Training	128

조별 활동

2018 한국생물공학회 추계 국제 학술대회	130
논문 공부 및 학술 활동	132
스터디상생플러스	135
소풍	137

후 기

활동 후기	142
-------------	-----

학술동아리 AMP 소개

학생들의 자치적인 학술 활동 및 서로간의 교류가 부족하였기에 02학번 홍승우 학생을 필두로 하여 많은 학생들의 노력으로 학술·친목 동아리 AMP(Animal Microorganism Plant)는 2007년 6월에 창설되었습니다. 이후 2018년인 현재 AMP는 창설 12년을 맞이하게 되었습니다. 창설 이후 AMP는 2007년 스터디 활동을 시작하였으며 2008년에는 실험 활동을 시작하였습니다. 그 후 이어진 전통과 함께 2009년부터 학술제를 개최하여 이번 2018년에는 제 10회 학술제를 개최하였습니다. 2018년 현 AMP는 동아리의 창설 목적을 잊지 않고 학술적 기능과 더불어 학우 간의 친목을 유지하는 목적도 함께 달성하기 위해 노력하고 있습니다. 현 AMP의 활동은 5개의 조로 진행되며 5인의 임원진, 각 조의 조장, 부원들을 포함하여 35명의 부원들이 활동하고 있습니다. AMP에서는 생명공학과의 학우들이 본인의 진로를 정하고, 그를 향해 나아가는 과정에서 학문적 지식 습득은 물론이고 미래에 있을 각자의 자리에서 실무능력을 발휘할 수 있도록 실질적 능력 함양에 주력하고 있습니다. 또한 대학에 입학하고 사회로 나아가기 위한 준비 과정에서 각자의 뼈와 살이 되고 되돌아보았을 때 의미 있고 보람찬 단체활동의 경험을 만들어 가기 위해 노력하고 있습니다.

단체를 조직하여 활동함에 있어 끝이 아닌 시작이라는 말이 먼저 떠오르는 것은 뜻이 맞는 사람들과 함께하는 활동이기 때문입니다. 학술적 지식 탐구와 친목을 통한 뜻깊은 학교생활을 목표로 하여 마음이 맞는 사람들이 모인 동아리가 AMP입니다. 우리는 AMP가 학생간의 소통을 가능하게 하고 학생과 학문의 매개체가 되어 그 사이를 이어주는 다리가 될 수 있기를 바라며 학문탐구와 친목도모의 목표를 위해 노력할 것입니다. 이러한 우리의 노력 하에 AMP는 앞으로도 이어질 것이며 그 끝이 없을 것입니다.



학과 소개

생명공학은 21세기 인류의 난제인 식량, 에너지, 질병, 환경 문제를 해결하는 핵심 학문 분야로 주목 받고 있습니다. 이러한 추세에 발맞추어 생명공학과에서는 의료 및 헬스관련 바이오신기술 개발, 생명정보분석, 유전공학, 유전체-단백체 분석 및 조작, 해양생명공학, 분자생태환경평가기술 개발, 생명자원활용기술 개발 등 생명공학분야 전반에 걸친 다양한 분야의 연구와 교육을 수행하고 있습니다. 또한 21세기 첨단산업기술사회로의 진입을 위한 국가 신성장 동력의 주역으로 자리 잡은 생명공학 전반에 걸친 심오한 이론과 실험방법론을 교수·연구하는 동시에, 지도자적인 인격과 식견 및 미래에 대한 폭넓은 시야를 갖춘 국가와 인류사회에 기여할 수 있는 유능한 인재를 육성함을 목표로 하고 있습니다. 이러한 목표를 이루기 위해 생명공학과는 미래지향적인 수요자 중심의 맞춤형 교육을 실시하여, 졸업 후 생명공학 분야의 각종 바이오 산업체 및 국가연구기관에서 활약할 전문인력의 양성을 목표로 하며 학생들의 취업기회를 높이기 위하여 생명공학 관련 기업들에서 요구되는 실용적 지식과 실험실습 교육을 강화하고 있습니다.

학과 연혁

년도	내용
1980년 10월 02일	상명대학교 과학교육과 신설 인가 입학정원 100명 (생물교육, 수학교육, 화학교육 전공)
1982년 12월 29일	생물학과 남관으로 이전
1984년 11월 27일	대학원 석사과정 신설
1986년 11월 06일	상명여자대학교로 교명 변경 및 종합학교로 승격
1987년 03월 01일	자연과학부에서 자연과학대학으로 승격
1987년 11월 09일	대학원 생물학과 박사과정 신설
1989년 11월 06일	교육대학원 과학교육과 (생물전공) 신설 인가
1992년 06월 25일	자연과학연구소 신설
1996년 03월 01일	학부제 실시 (화학응용 생명과학부 생명과학 전공)
2000년 03월 01일	화학응용 생명과학부에서 자연과학부로 전환
2005년 03월 05일	생명화학시스템학부 생명과학 전공으로 명칭 변경
2010년 03월 01일	융복합특성화대학 생명과학과로 변경
2013년 03월 01일	자연과학대학 생명과학과로 변경
2017년 03월 01일	미래융합공학대학 생명화학공학부 생명공학과로 변경
2018년 03월 02일	융합공과대학 생명화학공학부 생명공학과로 변경

교수님 소개

	학위 및 학력 이학박사 / 서울대학교 / 발생생리학 연구분야 -동물발생생물학 / 신경생물학 / 종양생물학 -성체줄기세포의 분화기작과 세포치료법 연구 -내분비계 장애물질(환경호르몬)의 생식계, 신경계, 면역계에 미치는 영향 조사
이성호 교수님	
	학위 및 학력 이학박사 / 서울대학교 / 동물계통분류학 연구분야 -해양무척추동물의 분류 -한국 자생동물의 분자계통 및 진화 -야생생물의 비교유전체학 및 생물정보학 -절지동물 중심의 진화발생연구
김창배 교수님	
	학위 및 학력 이학박사 / Univ. of Maryland / 식물유전학 연구분야 -식물스트레스 생리학 :다양한 환경스트레스 하에서 식물의 반응기작 규명 -식물유전공학 :환경스트레스에 내성을 갖는 형질전환 식물의 유전공학적 생산 -X-ray crystallography: 유용단백질의 3차원 구조 규명 -신약개발: 생물물리학적 기법을 통한 식물병원균 방제
안예진 교수님	

 이영미 교수님	학위 및 학력 이학박사 / 한양대학교 / 환경분자유전학 연구분야 -환경오염물질에 대한 수서 생물의 영향 및 작용기전 연구 -생태 위해성 평가를 위한 분자생체지표 발굴 및 적용 -환경요인에 따른 해양생물의 생태적 변화 및 특성 연구 -해양 생물의 유용 유전자의 분자·생화학적 특성 연구
 기장서 교수님	학위 및 학력 이학박사 / 한양대학교 / 환경생태 및 계통학 연구분야 -조류(하등식물)의 독특한 게놈구조, 성장 조절 유전자 규명 -환경게노믹스(Environmental Genomics) :생물의 분자 적응 기작 -해양 적조, 담수 녹조 생물의 대량 증식과 유전자 조절 메커니즘 연구 -미세조류 핵, 엽록체 유전체 구축, DNA taxonomy -동·식물 미토콘드리아 전체 게놈 구조 해독
 유하영 교수님	학위 및 학력 공학박사 / 고려대학교 / 생물공정공학 연구분야 -바이오에너지 및 바이오소재 생산공정 개발 -미생물 유래 신규물질, 효소발굴 및 특성 분석 -항생물질 전구체 생산 및 생물전환 기술 개발 -생물전환공정의 설계, 공정모사 및 경제성 평가

실험 보고

계면활성제가 미세조류의 생장에 미치는 영향

강산성 환경에서의 형질전환 생물의 성장률 평가

INTRODUCTION(연구배경 및 목적)



Figure 1. Chlorella vulgaris(좌), 클로렐라를 이용한 건강식품(우)

<Chlorella vulgaris>

- ❖ 직경 2~10um의 구형의 세포를 갖는 **단세포 녹조류**
- ❖ 생태계의 1차 생산자
- ❖ 필수 아미노산과 각종 비타민, 미네랄 등을 포함한 영양소와 칼륨, 마그네슘, 아연 등이 풍부한 알칼리성 식품으로 이용가능하다.
- ✓ **미세조류(microalgae)를 이용한 미래식량의 확보, 영양원과 단백질원의 확보가능성이 제시되기 때문에 조류의 성장조건에 대한 연구가 필요하다.**

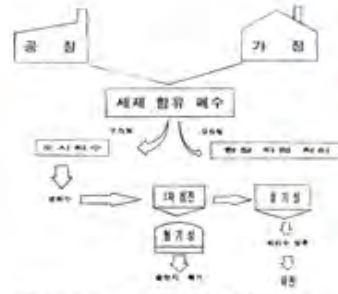


Figure 2. 계면활성제의 환경유출 모식도

<음이온 계면활성제>

- ❖ 계면활성제 중 가장 강한 세정력을 보이는 음이온 계면활성제
- ❖ 유화제, 보습제, 폼 클렌징, 비누, 세제 등에 널리 이용된다.
- ✓ **합성 계면활성제(SDS)는 자주 사용되는 만큼 인체 및 환경요소들에 대한 독성평가가 잘 진행되어 있다. 최근 자주 사용되기 시작한 천연 계면활성제(Proteol-APL)는 인체 또는 환경적인 부분에 대한 연구가 미흡하다.**

<연구배경>

- ✓ 천연 계면활성제가 환경요소에 미치는 영향을 알아보기 위해 미세조류(microalgae)에 대한 환경독성평가를 진행하고자 한다.

Research Activities(연구활동)

Materials & Method



1. *Chlorella vulgaris* 를 SDS, Proteol-APL을 100mg/L, 500mg/L 농도로 준비한 배지에 접종한다.
2. 20°C에서 항온배양하며 0h, 24h, 48h, 72h, 5d, 8d, 12d, 15d, 19d마다 성장량을 측정한다.(h: hour(시간), d:day(일수))
3. Hemocytometer에 1μl씩 분주하고 커버글라스를 덮어 현미경으로 확인하고 counting한다.
4. Counting결과를 이용하여 성장률 그래프를 작성한다.

Results & Discussion

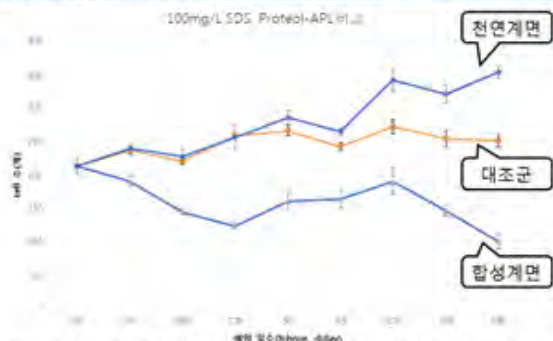


Figure 4. 저농도의 합성계면활성제와 천연계면활성제의 활성비교

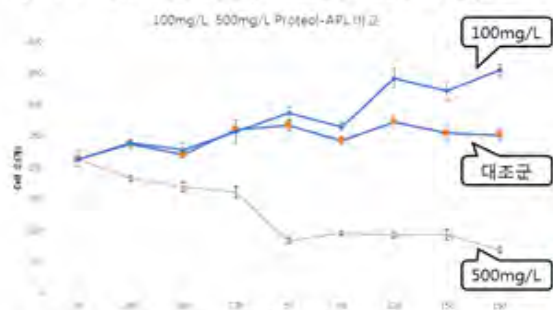


Figure 5. 저농도와 고농도 천연계면활성비교

<합성계면활성제(SDS)의 활성>

- ✓ *C. vulgaris* 의 세포벽은 "TLS"라고 하는 비(非)가수분해성 거대 분자로 구성된 얇은 삼층 외벽이 있다. TLS란 조류가 성장함에 있어서 각종 외부 환경자극으로부터 저항성을 갖도록 도와주는 기능을 수행하는 세포벽 성분이다.
- ✓ TLS가 없는 *C. vulgaris*는 상대적으로 세제성분에 대한 낮은 저항성을 보인 것으로 생각된다. [Figure 4]에 나타난 합성계면활성제에서의 조류세포 수 감소가 나타난 것이 이 주장을 뒷받침한다.

<천연계면활성제(Proteol-APL)의 활성>

- ✓ 천연계면활성제(Proteol-APL)의 세포는 SDS와 반대로 증가했다(Figure 4).
- ✓ 천연계면활성제가 식물로부터 추출한 아미노산의 형태이기 때문일 것으로 추정된다.
- ✓ 아미노산은 세포내에서 단백질의 구성물질이다. 따라서 저농도의 천연계면은 세포생장을 촉진했을 가능성이 있다. 그러나 고농도의 천연계면은 영양원의 양이 독성대(Toxic zone)에 포함되기 때문에 세포 수가 감소한 것으로 판단된다.

<Conclusion>

합성계면활성제는 환경요소의 성장저해를 유발할 수 있기 때문에 적정 농도 내에서 천연계면활성제의 사용을 권장한다.

Acknowledgement

본 실험을 진행하는데 도움을 주신 생명공학과 해양생명공학 연구실 기장서 교수님과 김한솔 조교님께 감사의 뜻을 전합니다.

계면활성제가 미세조류의 생장에 미치는 영향

14 윤혜원 15 이재운 16 류혜인, 문민호, 윤경섭, 전미현, 탁지혜, 표진우
17 박상임, 박시영, 박창현, 백승민, 이다영, 이동연, 장유진, 황병강

Introduction

●연구활동의 의의

최근 합성 계면활성제의 사용량 증가로 인해 계면활성제가 환경으로 노출될 확률이 점차 높아지고 있다. 계면활성제에는 양이온, 음이온, 비이온 등 다양한 계열이 현재 사용되고 있는데, 그 중 음이온 계면활성제가 강한 세정력으로 인해 유화제, 보습제, 폼클렌징, 비누, 세제 등에 널리 이용되고 있다. 따라서 이들을 주로 이용하는 가정 혹은 이를 생산하는 산업체의 생산기관으로부터 주로 계면활성제가 환경으로 유출된다고 할 수 있다. 조사에 따르면 생활하수는 1,627만 3,000톤으로 가정·상업지역·공공시설 등에서 배출되고 있다고 하며, 산업폐수는 주로 제품 제조·수리·세척 등에 사용된 것으로 제조업 시설에서 배출되고 있으며 하루 406만 8,000톤이 발생된다고 한다. 뛰어난 세정력에 비례하여 피부에 독성을 보이거나, 체내 잔류할 가능성이 높기 때문에 근래에는 대안으로서 천연 계면활성제를 사용하는 추세다. 천연 계면활성제는 천연소재로부터 계면활성을 보이는 성분을 추출한 것으로 합성세제보다 환경에 배출된 후 빨리 생분해가 되기 때문에 환경오염 측면에 있어서 유익하다고 알려져 있다. 합성 계면활성제의 경우, 많이 사용되는 만큼 인체 및 환경에 대한 독성평가가 잘 진행되어 있다. 그러나 비교적 최근에 사용되기 시작한 천연 계면활성제의 경우 인체 및 환경적인 부분에 대한 연구가 미흡한 상황이다. 따라서 본 연구를 통해 천연 계면활성제가 환경요소에 어떠한 영향을 미치는지 알아보기 위해 생태계의 1차 생산자 중 하나인 조류(藻類)에 대한 환경독성평가를 진행하고, 이를 합성 계면활성제와 비교함으로써 천연계면활성제의 활성을 확인하고자 한다.

●계면활성제의 환경유출 경로

계면활성제는 주로 폐수 또는 하수 등의 경로를 따라 하천으로 유출되는 것으로 알려져 있다. 경로는 크게 두 가지로 분류되어 점오염원과 비점오염원으로 나뉜다. 점오염원은 생활하수, 산업폐수, 축산폐수처럼 오염물질이 특정 지점에서 발생하는 것을 점오염원이라고 하고, 비(非)점오염원은 도시 노면배수나 농경지 배수와 같이 불특정 배출 경로를 통해 오염물질을 발생시키는 장소 또는 지역을 가리킨다. 즉, 모든 오염물질을 포함한 채 배출되는 빗물이 실제로 주된 비점오염원이라고 할 수 있다. 이들은 날짜나 계절에 따라 배출량의 차이가 크고 예측과 정량화가 어려우며, 인위적 조절이 어려운 기상조건·지질·지형 등에 영향을 많이 받는 특성으로 인해 제도적 기준이 마련되어 있지 않다.

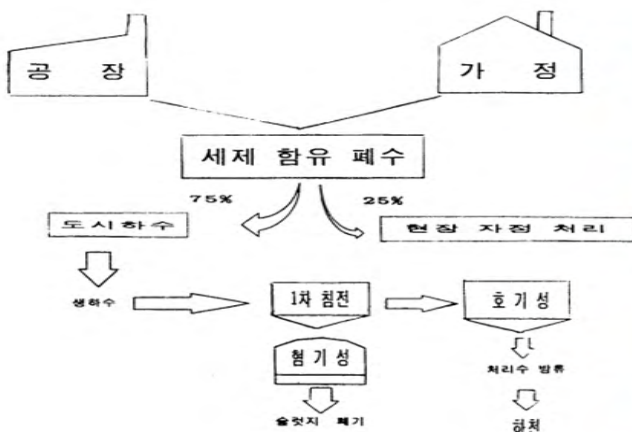


Figure 1. 계면활성제의 환경유출 경로 모식도(좌) 및 오염물질 배출원(우)

●계면활성제의 환경적 영향

합성계면활성제인 SDS(Sodium dodecyl sulfate)는 SLS(Sodium lauryl sulfate)라고도 불리며 현재 각종 계면활성을 보이는 제품에 가장 많이 사용되고 있는 성분이다. 현재 발표된 연구를 기반으로 SDS는 인간과 동물에게 유해한 영향을 끼친다는 것이 밝혀졌다. 영향을 받는 정도는 물질의 농도와 노출된 기간에 따라 상이하다. 그 영향은 또한 급성독성과 만성독성으로 나뉘고, 나타나는 현상도 다른 것으로 밝혀졌다. SDS는 세포에 미치는 연구에 의하면 국소적으로 SLS가 표피의 살아있는 세포층에 쉽게 침투한다는 사실이 밝혀졌다. 이를 통해 SLS로 인한 거친 피부를 유발할 수 있음을 추론할 수 있다. SDS의 경구투여에 따라 나타난 토끼의 피부자극 연구에서는 1200mg/kg-개체의 농도에서 모든 피부 및 눈에서 강한 자극성 반응이 나타났다고 한다. 즉 사람의 경우 피부에 직접 노출되는 것이 아닌 식수 등 물 및 음식을 섭취하는 과정을 통해 SDS를 섭취하게 되더라도 모든 피부 및 눈에 영향을 끼칠 수 있음을 알 수 있다. 미생물의 경우 그람 음성 박테리아에 SDS의 독성 효과 보고에 의하면 세포질에 SDS의 축적량 증가는 세포에 독성이 될 수 있는 단백질의 misfolding 증가에 영향을 주었다고 하며 *Saccharomyces cerevisiae*의 경우 유전자의 발현에 영향을 주어 세포질, 미토콘드리아, 핵, 퍼옥시좀 및 원형질막 형성에 영향을 주었다고 보고된 바 있다.

●Chlorella vulgaris의 특징

*Chlorella vulgaris*는 직경 2~10um의 구형으로 각 세포는 현미경으로 관찰 가능하며 무성생식으로 증식하고 한 번에 4개의 낭세포로 분열하여 증식한다. 단세포 녹조류에 해당하는 진핵생물이다. 이들은 성장은 일반적으로 영양소의 고갈에 의해 제한되는 경우가 많다. 일반적으로 광(光)감소, pH 변화, 탄소 제한, 광합성 산소 축적 등이 클로렐라의 성장을 제한하는 것으로 알려져 있다. SDS는 서론에서 언급한 바와 같이 많은 선행 연구를 통해 조류의 생장에 영향을 줄 수 있는 인위적인 요소로 밝혀졌다. 그 기준은 세포의 50%가 cell death하는 EC50에 기준하여 설정되며 그 자세한 내용은 아래 [표 1]과 같다.

Table 1. Chlorella vulgaris의 계면활성제 성분에 대한 EC50

Species	Fatty acid soap	EC50 (mg/l)	Test duration	Reference
<i>Selenastrum capricornutum</i>	C ₁₈₋₁₈ soap	10-50	72 h	Yamane <i>et al.</i> 1984
<i>Microcystis aeruginosa</i>		20-50	72 h	
<i>Nitzschia fonticula</i>		10-20	72 h	
Algae	Ca soap	10-50	Not indicated	Schöberl <i>et al.</i> 1988
<i>Microcystis aeruginosa</i>	Soap	18-32	96 h	Canton and Slooff 1982
<i>Chlorella vulgaris</i>		180-320	96 h	
<i>Scenedesmus subspicatus</i>	Na-laurate	53	72 h	BKH Consulting Engineers 1994
	Na-oleate	58	72 h	
	Na-palmoil soap	140	72 h	
	Na-tallow acid	190	72 h	
	Na-behenate	230	72 h	

다양한 온도(10 - 35°C, 5°C씩 차이), 광세기(100~800 μEm-2s-1) 및 pH (3, 4, 5, 6, 7, 7.5, 9)의 조건에 대한 선행실험을 통해 25~30°C 조건에서 같은 양의 *C. vulgaris*가 증식하는데 걸리는 시간이 약 5.2 - 5.5배 빨랐고, *C. vulgaris*의 광합성 색소인 Chlorophyll a의 양이 5~5.5배 더 높았다고 한다. 또한 단위 면적당 cell volume이 14% 이상 높았고, 가장 빠른 성장률을 보인 pH는 7 - 7.5였다고 한다. 사실을 통해 *C. vulgaris*의 최적 배양온도는 25~30°C이고, 배양기간은 15일 이내가 적당함을 알 수 있다.

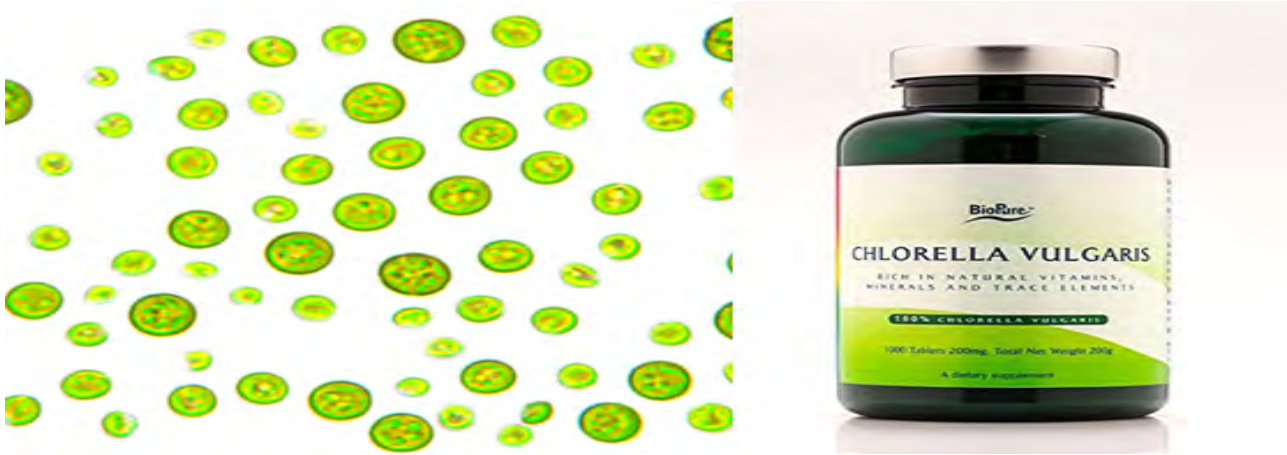


Figure 2. *Chlorella vulgaris* 의 개체(좌), 식품화 된 상품(우)

최근에는 이와 같은 성장조건을 갖는 클로렐라를 이용한 건강식품 개발이 진행 중이라고 한다. 이는 미래 식량의 확보, 영양원과 단백질원의 확보라는 범인류적 이익을 위한 연구로 추측된다. 클로렐라는 필수 아미노산과 각종 비타민, 미네랄 등을 포함한 영양소를 함유하고 있음과 동시에 칼륨, 마그네슘, 아연 등이 풍부한 대표적인 알칼리성 식품으로서 취급할 수 있다. 1960년대 초반부터 진행되고, 연구된 보고들에 의거하여 생각해 볼 때, 클로렐라는 동물체의 성장과 유산균 등 미생물의 성장촉진에 유용하며 병원급식을 포함한 대량급식 전반에 활용할 경우 높은 영양학적 유용성을 얻을 수 있다. 실제로 일본의 한 연구에서는 면역 억제된 쥐에게 클로렐라 추출물을 투여함으로써 박테리아, 대장균 등의 감염에 대한 면역 증강효과로 혈액 내 백혈구 숫자가 대조군에 비해 두 배 이상 빠르게 회복된다는 것을 보고한 바 있으며 일반인 86명에게 클로렐라를 지속적으로 직접 섭취하도록 한 결과, 클로렐라 섭취가 면역력 강화의 지표 물질인 사이토카인(cytokine)의 양을 2.5배 넘게 증가시켜 면역력 강화에 효과가 있음을 확인한 충북대학교 의과대학에 연구 결과 등 관련 연구를 통해 면역학적, 영양학적으로 효과가 있음을 알 수 있다.

●천연계면활성제 Proteol APL

Proteol APL(Soium cocoyl apple amino acids)는 합성계면활성제 SDS와 마찬가지로 음이온계 계면활성제이다. Proteol APL은 일본에서는 quasi-drugs 제품으로 허가를 받았으며 유럽, 미국, 캐나다, 오스트리아, 일본에서 화장품 원료로서 사용을 허가 받아 친환경 화장품 제품 생산에 많이 사용된다. 이들은 최종적으로 사과에서 얻은 필수 아미노산을 acylation 반응시켜 lipoaminated Surfactant을 얻는다. 제조사에서 밝힌 성분분석 결과에 따르면 Proteol APL은 다른 계면활성제와 달리 피부 단백질을 변성 시키지 않으며, 피부 각질 방어체계에도 영향을 미치지 않는다고 한다. 환경에 노출될 경우 미생물에 의해 완전히 무해한 물질로 분해되는 친환경적인 물질이라고 한다. 이와 같은 장점으로 인해 현재 많은 국가, 가정에서는 위 성분을 세제, 비누, 샴푸 및 화장품 등에 사용하고 있다.

Materials

:*Chlorella vulgaris*, (배지), Erlenmeyer flask, micropipette, incubator, microscope, proteol-APL(Sodium Cocoyl Apple Amino acids, Seppic), 1.5ml e-tube, hemocytometer, cell counter, cover glass

Method

-생장을 측정-

1. *Chlorella vulgaris*를 Control(0mg/ℓ), SDS 100mg/ℓ 와 500mg/ℓ, proteol-APL 100mg/ℓ 와 500mg/ℓ 의 농도로 준비한 배지에 접종한다.
2. 접종 0h의 Cell counting을 위해 micropipette을 이용하여 1ml씩 e-tube에 분주한다.
3. cover glass를 덮은 hemocytometer에 e-tube에 분주한 배지를 10μl씩 분주한다.(hemocytometer에 존재하는 2개의 counting area 모두 분주한다.)
4. 컴퓨터와 연결된 현미경을 이용하여 hemocytometer의 counting area의 사진을 찍고, counter를 이용하여 cell counting한다.
5. 0h, 24h(1 day), 48h(2 day), 72h(3 day)를 통해 급성독성을 확인하고, 5 day, 8 day, 12 day, 15 day, 19 day를 통해 만성독성을 확인한다.
6. 0h - 19 day까지 측정한 cell counting 결과를 기반으로 standard curve를 작성한다.

-DNA추출-

1. 2ml e-tube에 배양한 조류를 분주한다.
2. 액체질소에 e-tube를 살짝 담가 급속냉동한 뒤, heat-block을 이용해 약 60°C에서 해동한다. 이 과정을 약 3~5번 반복한다.
3. DNA extraction buffer를 첨가하고 30분간 반응시킨다.
4. 용액을 14,000xg에서 5분간 원심분리한다.
5. 상층액을 조심스럽게 새 e-tube에 옮기고, RNase를 첨가한다.
6. 동량의 Chloroform:Isoamylalcohol(24 : 1)을 첨가하고 vortexing한다.
7. 14,000xg에서 1분간 원심분리하고 상층액을 취한다.
8. Isopropanol을 첨가해 DNA를 침전시킨다.
9. 14,000xg에서 원심분리하여 펠렛을 얻고, 펠렛을 제외한 용액은 버린다.
10. 에탄올을 첨가해 펠렛을 washing한다. 이 과정을 2번 반복하고 건조한다.
11. TE buffer를 사용해 펠렛을 녹여 DNA추출용액을 얻는다.

Result & Discussion

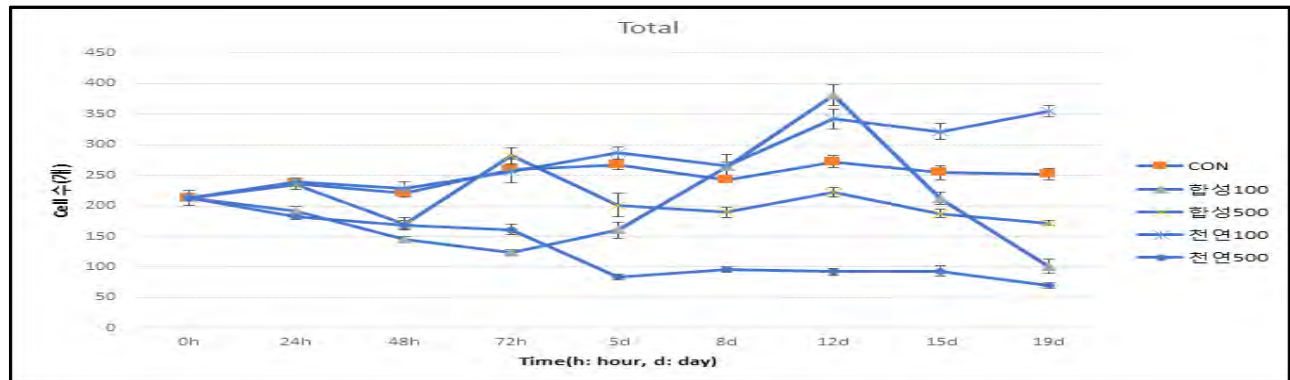


Figure 3. Control, 합성계면활성제(SDS), 천연계면활성제 (proteol-APL)의 cell counting 결과

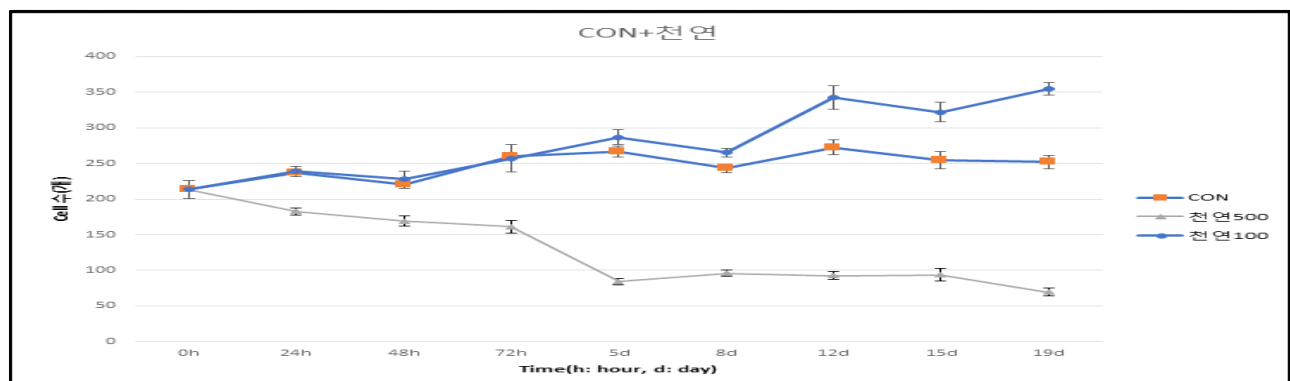


Figure 4. Control, 천연계면활성제(proteol-APL)의 cell counting 결과

본 실험은 세제, 비누, 샴푸 등에 사용되는 계면활성제(surfactant)가 1차 생산자에 해당하는 해양생물인 조류가 성장하는데 영향을 줄 수 있는지 확인하기 위해 진행되었다. 따라서 합성계면활성제 중 가장 강한 활성을 보이는 음이온계 계면활성제인 SDS(sodium dodecyl surfactant)과 최근 DIY제품에 대한 관심이 상승함에 따라 자주 사용되는 추세인 식물유래 천연계면활성제에 대한 영향을 비교하였다. 본 연구에서 사용한 *Chlorella vulgaris*의 세포벽은 TLS라고 하는 비(非)가수분해성 거대 분자로 구성된 얇은 삼층 외벽이 없다. TLS란 조류가 성장함에 있어서 각종 외부 환경자극으로부터 저항성을 갖도록 도와주는 기능을 수행하는 세포벽 성분이다. 이들은 선행연구를 통해 *Chlorella* sp.에 속하는 조류들에게 고농축 세제를 견딜 수 있는 저항능력을 부여할 수 있음이 확인된 바 있다. 따라서 TLS가 없는 *C. vulgaris*는 세제성분에 대한 저항성이 상대적으로 적을 수 있음을 생각해볼 수 있다. 실험결과(Figure 3)에 나타난 것과 같이 합성계면활성제를 사용한 실험군의 세포수는 일정한 수준을 유지하는 대조군에 비해 72h까지의 측정값이 감소하는 경향을 보이고 있음을 확인할 수 있다.

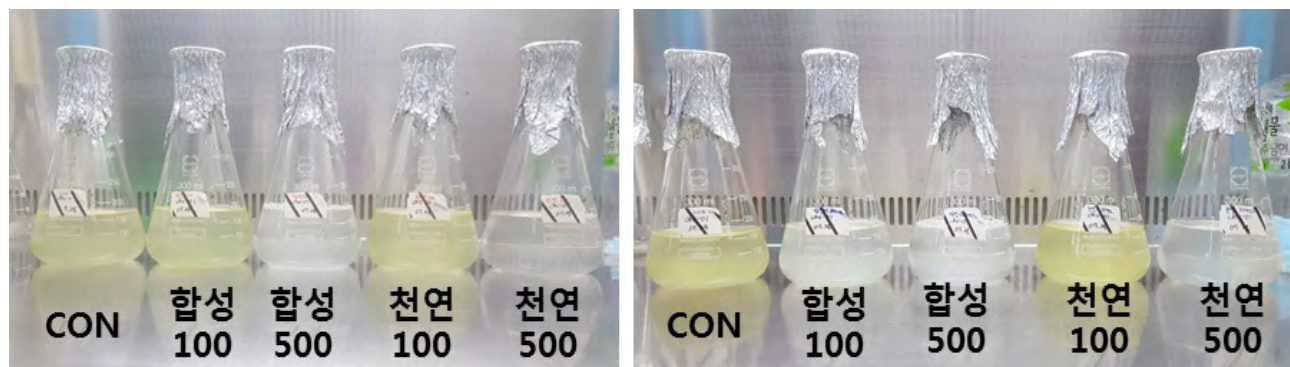


Figure 5. 실험 초기(48h) 및 실험 후기(15 day) 조류 배지 사진

합성계면활성제인 SDS는 단백질을 변성하는 기능과 지질의 마이셀 구조를 파괴할 수 있는 능력을 포함하고 있다. 따라서 SDS로 인해 세포벽 및 세포막의 단백질이 변성되었고, 세포막의 인지질이 형성하고 있는 이중층구조를 파괴하는 활성을 나타냈을 것으로 판단된다. 식물세포의 경우 동물세포에 비해 원형질막에 불포화지방산을 비교적 더 많이 포함하고 있기 때문에 세포벽이 무너짐과 함께 세포막의 형태가 무너지기 시작했을 것으로 생각된다. 천연계면활성제 100mg/ℓ의 농도의 실험군은 특이적으로 세포수가 증가하였다.(Figure 4) 이것은 천연계면활성제가 식물로부터 추출한 아미노산의 변형된 화학물질이기 때문일 것으로 추정된다. 아미노산은 단백질을 구성하는 단위이기 때문에 세포내에서 각종 단백질계열 물질을 합성하는데 이용하게 된다. 사용한 Proteol-APL은 사과로부터 추출한 필수 아미노산을 변형시킨 것이기 때문에 배지 내에서 조류의 성장에 필요한 하나의 영양분으로 작용했을 가능성이 있으며, 이에 따라 세포수가 증가했을 것으로 추정된다. 반면, 천연계면활성제 500mg/ℓ의 농도의 실험군은 100mg/ℓ의 실험군과 달리 세포수가 감소한 것을 확인할 수 있다.(Figure 4) 이것은 영양소비의 적정량의 문제로 생각된다. [Figure 6]은 식물세포 내에 존재하는 영양분의 양에 따라 식물세포에 성장에 영향을 줄 수 있는 범위를 모식적으로 결핍대(Deficiency zone), 적정대(Adequate zone), 독성대(Toxic zone)로 나누어 표기해 놓은 것이다. 세포내에서 영양분의 결핍이 발생할 경우 세포를 구성하는 탄수화물, 단백질, 지질 등의 생체 고분자들의 합성 혹은 활성에 영향을 줄 수 있기 때문에 성장저해, 생리현상 저해와 같은 치명적인 결과를 초래할 수 있지만 반대로 과량이 존재할 경우, 성장률이 급격하게 증가하는 등의 이점이 일부 나타남과 동시에 다른 영양원소의 흡수를 저해하는 등의 현상을 유발하여 부작용이 함께 나타날 가능성이 있다. 단백질을 구성하는 기본적인 C(탄소), H(수소), O(산소), N(질소)중 질소의 경우, 결핍과 과다에 대한 현상이 뚜렷한 원소다.

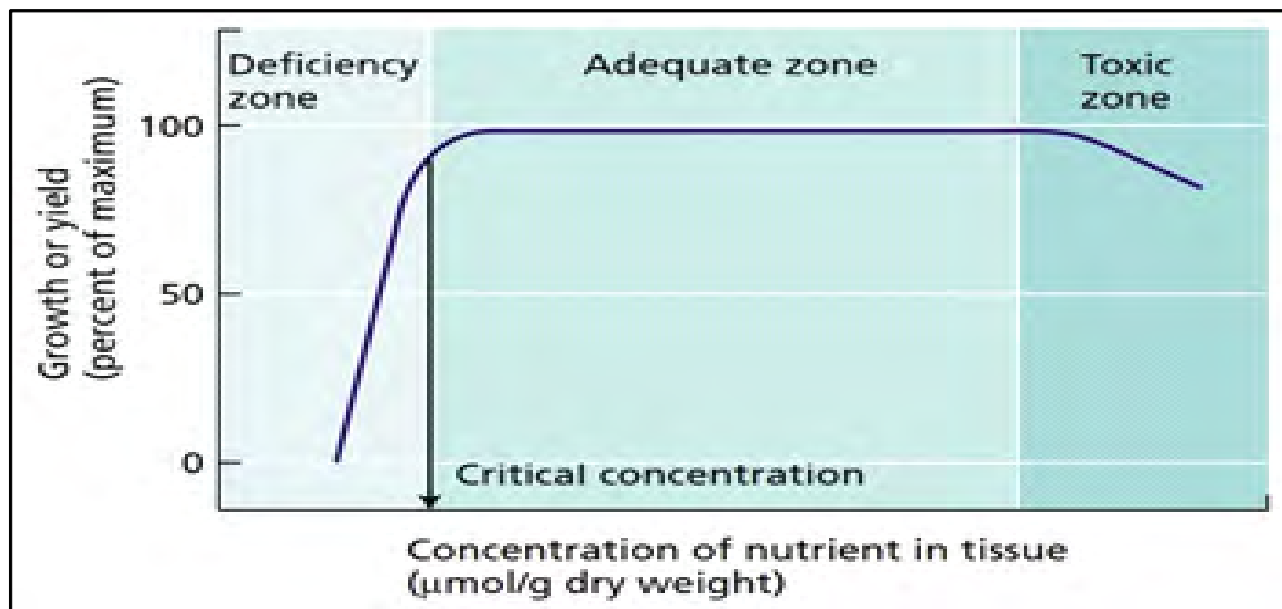


Figure 6. Nutrient concentration in plant tissue(Ördög Vince, Molnár Zoltán, “Plant Physiology”, 2011)

질소가 과다존재하게 되는 경우, 식물세포에 있어서 칼슘을 포함한 여러 무기원소의 흡수를 저해할 수 있다. 이에 기반하여 볼 때, 사용한 천연계면활성제의 성분인 필수아미노산이 100mg/ℓ의 농도에서는 적정대에 포함되었기 때문에 세포수가 증가한 것으로 판단된다. 500mg/ℓ의 농도는 독성대에 포함된 농도이기 때문에 세포성장에 저해가 발생했을 것으로 보인다.

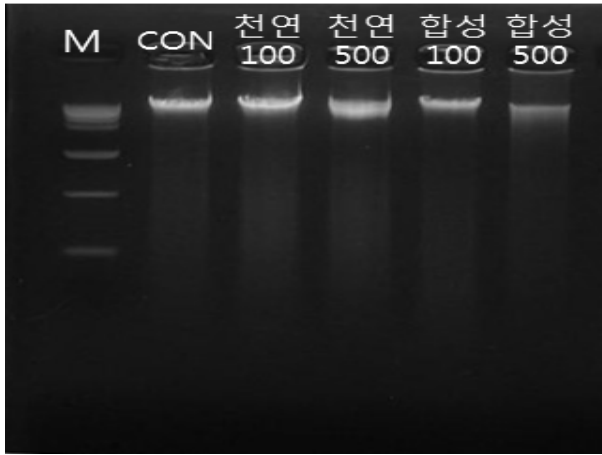


Figure 7. *Chlorella vulgaris* DNA extraction results

Conclusion

조류의 성장에 있어서 환경에 노출되었을 때, 쉽게 분해되지 않는 SDS와 같은 합성계면활성제의 활성은 세포의 구조를 무너뜨리고, 조류의 성장을 저해할 수 있다. 반면 쉽게 친환경적 요소로 분해되는 천연계면활성제의 경우, 일정 농도 이하로 감소할 경우 세포의 성장을 촉진할 수 있으며 이는 식물유래 필수아미노산의 성분으로 구성되어 있기 때문이다.

References

1. 식품저널, “면역력을 키우자...‘클로렐라’에 소비자 시선 집중”, 『FoodNews』, 2015.07.01.
2. 위성욱, “수계 microcosm을 이용한 계면 활성제 및 산업 폐수 등의 독성평가에 관한 연구”, 전남대학교 생물학과 대학원 박사학위 논문, 1999
3. 임공례, “계면활성제와 환경안정성”, 『국립공업시험원』
4. 최희정 • 이승목, “온도, 광세기 및 pH에 따른 *Chlorella Vulgaris* 증식률”, 『대한환경공학회지』, 제33권(7호), 2011, pp.511-515
5. 한국수자원공사, “수질 오염경로”, 『한국수자원공사』
6. Cara AM Bondi and others, “Human and Environmental Toxicity of Sodium Lauryl Sulfate (SLS): Evidence for Safe Use in Household Cleaning Products”, 『Environ Health Insights』, 2015, pp.27-32
7. J.G. Jones, “Advances in Microbial Ecology”, 『Springer Science & Business Media』, 2013, p.108
8. Mizutani T and others, “Sodium Lauryl Sulfate Stimulates the Generation of Reactive Oxygen Species through Interactions with Cell Membranes.”, 『J Oleo Sci』, 2016, pp.993-1001
9. Ördög Vince, Molnár Zoltán, “Plant Physiology”, 『Debreceni Egyetem』, 2011
10. Sanjay Kumar and others, “Toxicological effects of sodium dodecyl sulfate”, 『Journal of Chemical and Pharmaceutical Research(JOCPR)』, 2014, pp.1488-1492.
11. Torben Madsen and others, “Environmental and Health Assessment of Substances in Household Detergents and Cosmetic Detergent Products”, 『Danish Environmental Protection Agency』, 2001.

INTRODUCTION(연구배경 및 목적)

<연구배경>

- 최근, 산업계에서의 **BT(Biotechnology)기술**이 발달함에 따라 미생물은 주류 및 발효식품을 생산하는 것부터 현재의 미생물을 이용한 고부가가치의 상품의 생산 등 이르는 4차 산업에서의 중요한 소재로 이용되고 있다.



Figure 1. 자주 이용되는 E.coli(대장균; 좌), Saccaromyces cerevisiae(효모; 우)

- 미생물은 성장하는 과정에서 "최적의 환경"이 존재한다.
- ✓ **pH**라는 요소는 산(acid)의 상대적인 정도를 의미하는데, 이는 미생물에 성장에 필요한 **효소(단백질)의 활성**에 영향을 끼친다. 적정 pH가 아닌 주변 환경은 미생물이 성장함에 있어서 하나의 "**스트레스(Stress)**"로 작용할 수 있기 때문에 pH에 저항성을 갖도록 미생물을 개발할 필요성이 제시된다.

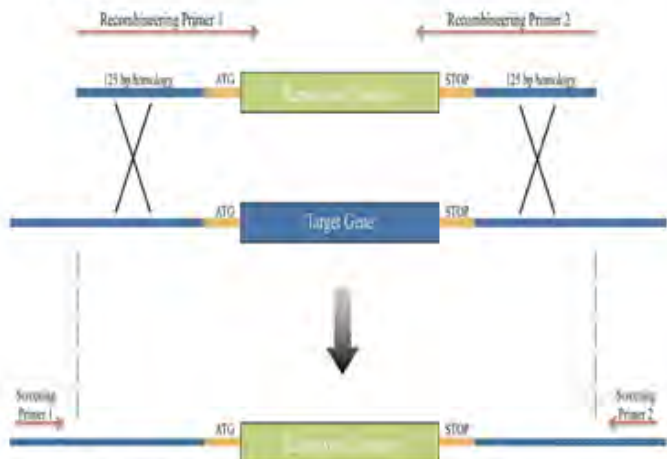


Figure 2. 최신 유전자 재조합 기술인 Recombineering 과정 모식도

- 미생물의 유전자를 **재조합**함으로써 인간이 필요로 하는 물질 생산, 혹은 주변 환경스트레스에 대한 저항성을 갖는 미생물 개발이 가능하다.
- 재조합 기술은 "벡터(Vector)"라고 불리는 운반체를 이용해 유전자를 미생물의 유전자에 삽입하며, 이 때, 외래유전자가 삽입된 미생물을 "**형질전환 미생물**"이라고 부른다. 이들을 이용해 의료제품인 인슐린을 포함한 다양한 유용물질의 생산이 가능하다.

<연구목적>

- ✓ 본 연구활동을 통해 외부 스트레스에 반응하여 생물이 생존할 수 있도록 하는 **Heat Shock Protein 17.7**(이하 Hsp17.7)의 발현이 강산성 환경에서 이루어지는지에 대해 평가하고자 효모(*Saccaromyces cerevisiae*)의 DNA에 Hsp17.7 유전자를 삽입하여 성장률을 확인하였다.

Research Activities

Materials & Method



1. 재조합 Yeast, 야생형, 대조군으로 군주를 준비한다.
2. 각각 YPD배지에 접종하고 225rpm, 30°C 조건에서 진탕배양한다.
3. 1시간 간격으로 배지 1ml를 큐벳을 이용하여 분광광도계로 흡광도를 측정한다.
4. 측정된 O.D.를 토대로 성장률 그래프를 작성한다.

Results & Discussion

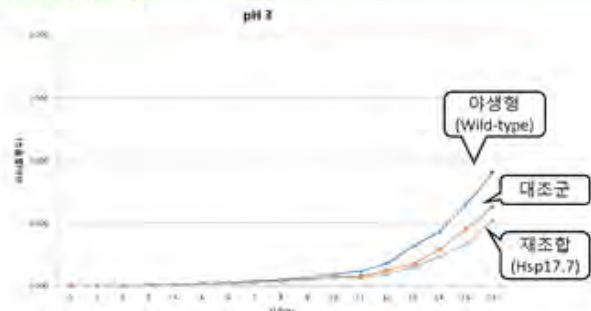


Figure 3. pH 3에서의 형질전환 효모 성장을 측정 결과

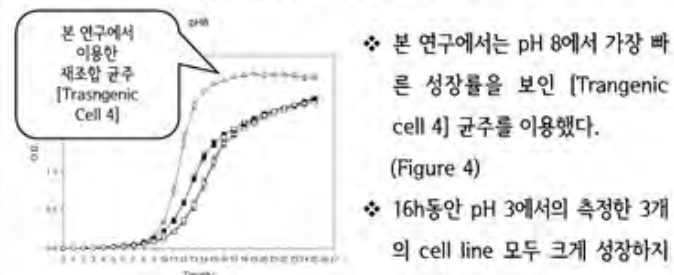


Figure 4. pH 8에서의 형질전환 효모 성장률

- ✓ 본 연구에서는 pH 8에서 가장 빠른 성장률을 보인 [Transgenic cell 4] 군주를 이용했다. (Figure 4)
- ✓ 16h동안 pH 3에서의 측정된 3개의 cell line 모두 크게 성장하지 못했다. (Figure 3)
- ✓ [Transgenic Cell 4]는 자료를 제시하지는 못하였으나 pH 4에서도 pH 8과 마찬가지로 높은 성장률을 보였다. 따라서 본 군주의 성장환경의 한계를 확인하기 위해 pH 3에서의 성장을 측정을 진행했다.
- ✓ pH 3에서도 Hsp17.7의 발현을 통해 높은 성장률을 보일 것으로 예상했으나 야생형보다 느린 성장률을 보였다. 하지만 사용한 3 종류의 cell line 모두 유의할 정도의 성장을 보이지는 못했다.
- ✓ 재조합 군주는 Hsp17.7의 발현이 이루어지지 않아 pH4, 8과 달리 느린 성장률을 보인 것으로 생각되고, 야생형은 수소이온(H+)을 이용하는 막단백질의 활성을 통해 일부 성장한 것으로 보인다.

<Conclusion>

연구에 사용된 효모는 pH 3에서는 pH 8과 달리 쉽게 성장하지 못한다. 명확한 비교를 위해 pH 5~6의 산성환경에서 추가연구가 필요하다.

<Acknowledgement>

본 실험을 진행하는데 도움을 주신 생명공학과 분자생명공학 연구실 안예진 교수님과 김민혜 조교님께 감사의 뜻을 전합니다

강산성 환경에서의 형질전환 생물의 성장을 평가

12 유제원 15 이재운 16 김현지, 문민호, 박종석, 조하영, 표진우
17 김병태, 김유민, 박예진, 이병호, 이재희, 장영준, 최성우, 함진호

Introduction

●미생물의 가치

미생물을 지구상에서 가장 오랜 기간 동안 존재해온 생명체로써 현재, 인류보다 많은 개체수가 존재하고 있다. 세균의 경우 다른 생명체의 피부, 구강, 장(腸)과 같은 다양한 환경에 존재하는 것으로 알려져 있으며 최근의 산업계에서의 BT(Biotechnology)기술이 발달함에 따라 미생물은 4차 산업에서 잠재적으로 생명공학의 중요한 소재로 이용되고 있다.

●미생물의 실험실에서의 이용

먼 과거부터 미생물은 우리의 삶을 풍요롭게 해주는 존재로써 흔하게 이용되어 왔다. 주류 및 발효식품을 생산하는 것부터 현재의 미생물을 이용한 의약품 등의 고부가가치의 상품의 생산하기에 이르고 있는 것이 대표적이다. 현대의 산업현장에서 이용하는 미생물은 대부분 형질전환(transgenesis)된 미생물들이다. 형질전환이란 재조합 DNA 기술을 이용하여 genome에 인간 인슐린을 코딩하는 등의 특수한 목적성을 갖는 DNA조각을 삽입하여 만들어진 새로운 genome을 의미한다. 가장 많이 활용되고 있는 형질전환 기법은 플라스미드 벡터를 이용하는 것이다. 이는 표적 DNA조각을 발현시키고자 하는 플라스미드 벡터에 재조합하고, 새로운 세균에 삽입하여 발현시켜 특수한 목적성 물질을 얻는 방식이다.

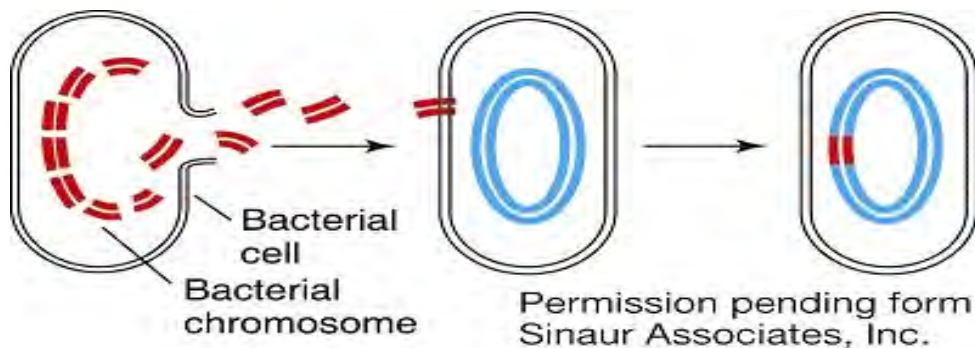


Figure 2. vector transformation 모식도

하지만 벡터를 이용한 형질전환은 표적 DNA의 길이가 일정길이 이상 길어지면 삽입에 난항을 겪는 단점이 있다. 최근에는 기존의 단점을 보완하기 위한 연구를 통해 다양한 재조합방법들이 밝혀졌으며, 현재는 생물의 염색체 수준에서 특정 유전자 서열을 추가 또는 제거, 변형하는 등 인위적인 조작을 가하는 등의 recombineering 기술에 도달하였다. recombineering 기술이 개발됨에 따라 가능해진 염색체 수준의 유전자는 보다 강력한 환경스트레스 저항성을 갖는 박테리아의 개발이 훨씬 용이하게 되었다고 볼 수 있다.

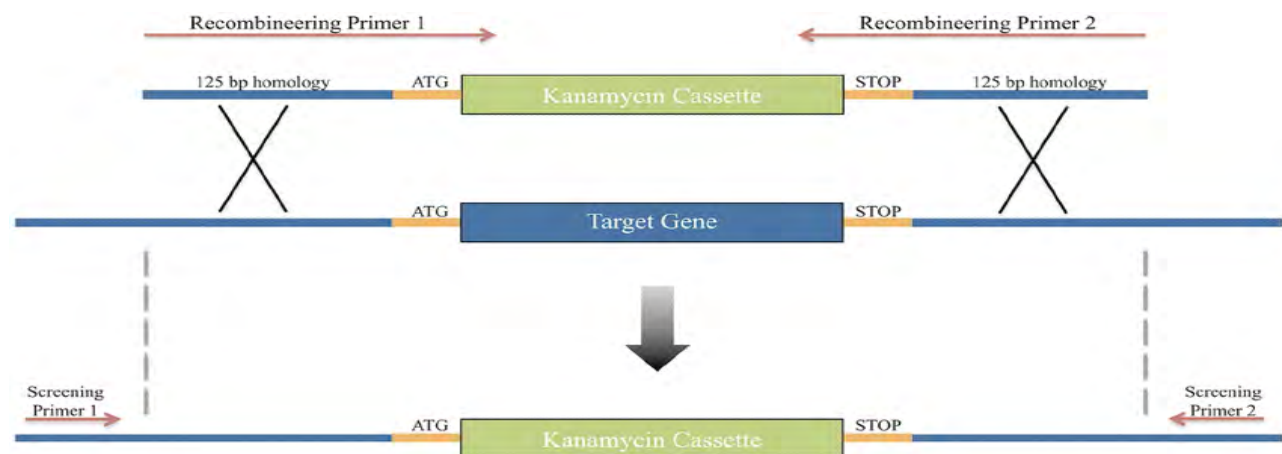


Figure 3. Recombineering 모식도

●환경스트레스과 미생물

환경스트레스란 비생물학적인 환경요소로부터 유래되어 생물의 성장, 대사 등에 영향을 주는 요소를 의미한다. 때문에 환경스트레스가 일정 수준 이상으로 증가하게 되면 서식지역을 크게 바꾸지 못하는 미생물, 식물 등은 그 영향을 크게 받을 수밖에 없다. 하지만 산업기술이 발전함에 따라 발생하는 각종 오염물질로 인해 수질, 토양, 대기오염은 더욱 가속화되고 있다. 특히 “우리나라 토양은 화강암에서 유래되어 규산 함량이 높고, 양이온 함량이 적어 척박하며 강우량이 증발량보다 많아 토양성분의 유실이 발생하고 이로 인하여 토양이 산성을 띄게 된다(환경부, 2009)”고 최근 환경부에서 밝힌 바 있다. 산성 환경의 경우, “pH제어 없이 진행된 선행실험에서 발효 부산물인의 축적에 따라 주변 환경이 빠른 속도로 pH 4.5 이하로 감소하고 미생물의 성장과 에탄올 생산이 중단되는 것을 확인하였다.(박소정 외, 2011)”라는 부분에서 알 수 있듯이 미생물산업의 하위공정의 배양탱크 내에서도 pH변화로 인한 생산량의 감소를 초래할 수 있음을 알 수 있다. 미생물은 성장함에 있어서 온도, 영양분, 산소, 수분활성, pH 등에 의해 영향을 받을 수 있다. 그 이유는 세포내부의 거대분자(enzymes)들의 활성에 있어서 최적의 환경이 존재하기 때문이다. 즉 효소를 비롯한 단백질이 pH, 온도와 같은 강한 스트레스를 받을 경우, 변성되어 서로 응집되는 결과를 초래할 수 있으며 이는 세포의 손상 및 cell death를 야기할 수 있다는 것이다. 따라서 생체에서는 이러한 스트레스로부터 세포를 보호하기 위해 다양한 Heat Shock Protein(이하 HSPs)가 발현되어 변성된 단백질과 결합하고, 3차 구조의 회복과 같은 보수기전을 통해 분자 차폐론성 활성을 보인다.

●효모(*Saccharomyces cerevisiae*)

효모(*Saccharomyces cerevisiae*)는 인간을 포함한 고등 진핵 생물의 기본 세포 과정과 유사하기 때문에 post-translation 과정의 진행이 가능하고, 세포 밖으로 단백질을 분비할 수 있는 특징을 가졌다. 또한 다양한 종류의 연구에서 광범위하게 진핵 생물 모델로서 이용하고 있다. 상업적인 관점에서 볼 때, 효모는 음식이나 연료로 사용할 수 있는 에탄올 생산에 중요한 유기체입니다. 동시에 다른 높은 진핵 생물로 실험 결과를 확장할 수 있기 때문에 현재 다양한 환경조건에서 효모의 대사과정을 연구 중에 있다. 현재 가장 많이 이용되고 있는 대사에 관한 연구로는 특정 스트레스 조건에 대한 반응이 주를 이루고 있다. 예를 들어, 산화 스트레스는 노화, 세포사멸, 암 또는 면역 반응과 관련이 있는 것으로 추정된다. 효모 세포는 스트레스를 받았을 때, 자신을 보호하기 위해 일반적인 유전자를 발현시킨다. 이 현상을 “환경 스트레스 반응”이라고 하며, 이 반응에 약 900개의 유전자가 활성화되거나 억제된다. 일반 생리적인 반응 뿐 아니라, 이들 유전자의 발현은 스트레스로 작용하는 환경조건의 종류에 따라 다양하게 적용될 수 있다. 그에 따라 효모의 환경 스트레스 반응은 에탄올, 삼투압 및 산화 스트레스, 극한의 pH(강산성, 강염기성) 및 열충격 등 다양한 스트레스 조건 등이 이에 해당한다. 따라서 본 연구 활동에서는 recombineering 기술을 이용하여 형질전환된 미생물 중, 기존의 원형생물인 *E. coli*가 아닌 진핵생물인 Yeast(*Saccharomyces cerevisiae*)를 사용한다. 이들이 보이는 강산성 pH 환경에서의 성장을 변화양상을 확인해보고자 한다.

Material

:Transgenic Yeast(Cell 4), YPD media, spectrophotometer, incubator, micropipette, cuvette,

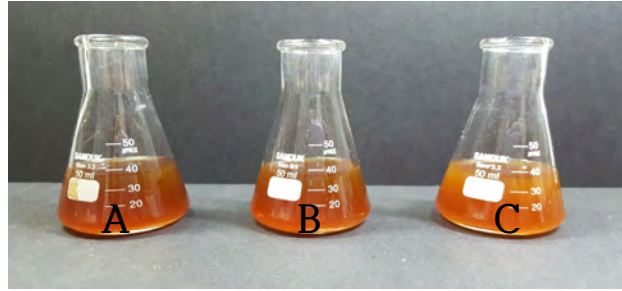
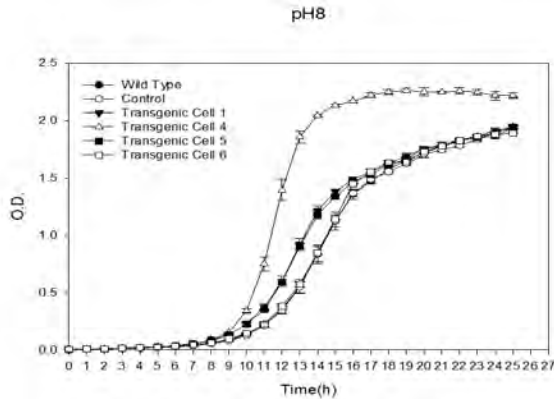


Figure 4. Transgenic Yeast(Cell 4)의 개발당시 pH 8에서의 배양결과, pH 8에서의 Cell 4를 포함한 Yeast 성장을 비교(좌), pH 8에서의 Wild-type(A), Control(B), Cell 4(C)배양 결과(우), Cell 4(C)의 배지 색이 다른 실험군에 비해 옅다.

Methods

-생장률 측정-

1. 각각의 Yeast cell line을 100 μ l씩 각각 준비한 YPD media 20ml에 접종하고, 130rpm, 30 $^{\circ}$ C에서 16 - 20h overnight culture한다.
2. 새로 YPD media 40ml을 배양용기에 담고, 1번의 overnight culture한 cell line을 각각 40 μ l씩 넣어준다
3. 0h의 O.D.(흡광도)측정을 위해 cuvette에 1ml씩 분주하고 600nm파장에서 O.D.를 측정한다.
4. 접종된 균주를 30 $^{\circ}$ C, 225rpm으로 설정한 shaking incubator에서 배양한다.
5. 접종시점을 0h으로 하고, 1h간격으로 incubator에서 꺼내어 cuvette에 1ml씩 분주한 다음, O.D.를 측정한다.
6. 0h - 16h까지 O.D.를 측정하고, 측정한 O.D.를 기반으로 해당 균주의 생장률 standard curve를 작성한다.

-YPD media-

1. D.W.를 800ml 준비한다.
2. YPD시약 40g를 개량하고, bottle에 처음 준비한 D.W.를 일부 넣은 뒤, 개량한 YPD 시약을 넣는다.
3. 남은 D.W.를 모두 넣고 121 $^{\circ}$ C, 15min autoclave한다.

Result & Discussion

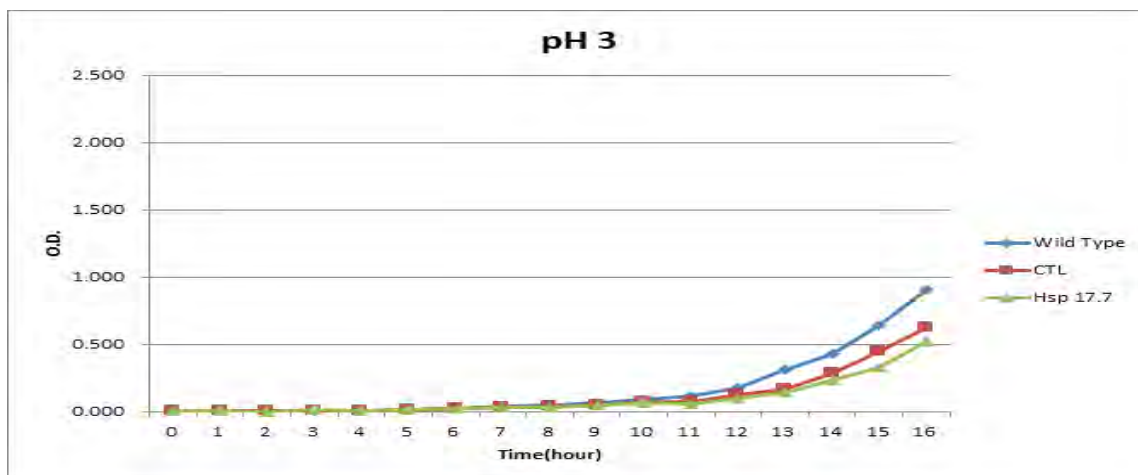


Figure 5. Transgenic Cell 4 strain growth results at pH 3

본 연구는 생명공학산업에 있어서 사용되는 미생물 중 환경스트레스 저항성을 갖는 미생물을 개발하는데 목적이 있다. 환경스트레스 요소 중 미생물 배양기 및 환경 내에서의 pH변화에 대해 저항성을 평가하기 위해 Heat Shock Protein 17.7(이하 Hsp17.7)유전자를 recombineering기술을 이용해 유전체에 삽입한 형질전환 효모를 이용하여 pH 3의 강산성 환경의 저항성을 평가하였다. 16h동안 pH 3에서의 형질전환 Yeast의 cell growth를 측정한 결과 3개의 cell line 모두 크게 성장하지 못하는 것으로 나타났다. 3개의 cell line의 성장속도 비교해 보자면 wild-type이 가장 빠르게 성장하였고, Control, Hsp17.7 유전자를 이용해 형질전환한 실험군의 순서로 상이한 성장속도를 보였다. 3개의 cell line 모두 대수기에 막 진입하려는 경향을 보인 것으로 미루어 볼 때, pH 3은 본 실험의 균주의 성장에 큰 스트레스로써 작용하였음을 알 수 있다. 형질전환된 균주의 경우, 약염기성 환경인 pH 8(Figure 4)과 pH 4에서 강한 생존력을 보인 [cell 4] 균주를 이용하였다. 따라서 일반적인 wild-type과 비교했을 때, pH에 의한 스트레스에 의한 Hsp17.7의 발현을 통하여 빠른 속도로 성장할 것으로 예상하였으나 pH 3에서는 가장 느린 성장속도를 보였기 때문에 이를 통해 강산성 환경에서는 Hsp17.7의 발현이 억제되었거나 혹은 Hsp17.7의 활성이 억제되었을 것으로 추정된다. 이때 생각해 볼 점은 선행연구를 통해 pH 4, pH 8에서의 강한 생존력을 보인 [Cell 4]가 pH 3에서 wild-type 보다 느린 성장률을 보인 것이다. 선행연구에 따르면 산성 스트레스가 주어진 환경에서 수소이온(H^+)의 효모의 원형질막에 존재하는 H^+ -ATPase, ABC-수송체 및 항산화효소의 기능에 영향을 줄 수 있다고 한다. 때문에 wild-type 효모는 수송 단백질 Pdr12와 전사인자 War1, 그리고 아직 명확하게 정의되지는 않았으나 산에 대한 세포 반응을 보이는 Ena1p 등의 유전자의 발현이 강산성 환경에서도 세포의 성장을 유도할 수 있었던 것으로 보인다.

Conclusion

본 실험은 형질전환시킨 Yeast균주의 배양가능 pH범주를 확인하기 위한 연구의 한 단계로서 진행되었다. 실험의 결과를 통해 pH 3에서는 균주에 삽입한 Hsp17.7의 활성이 크게 나타나지 못하는 것으로 보여지며, wild-type은 개체 내 수소이온(H^+)의 농도에 영향을 받는 막 단백질 및 항산화효소 등의 유전자 발현을 통해 강산성환경에 대응한 것으로 추정된다. 따라서 Hsp17.7 이외의 sHsp 유전자의 이용 또는 다른 균주의 이용을 포함한 추가실험을 통해 강산성환경에서의 Hsp 발현을 확인해볼 필요성을 제기하는 바이다.

References

1. 박경제 외 6인, “스트레스 하의 자연세균의 활성 및 생존의 발광표현형을 이용한 탐지”, 『미생물학회지』, 제34권(3호), 1988
2. 박소정 외 3인, “Clostridium Ljungdahlii 성장 및 에탄올 생산에 pH가 미치는 영향”, 『한국공업화학회지』, 제22권(5호), 2011, pp.562-565
3. 미래한국, “미생물의 스트레스 반응”, 『미래한국』, 2002.10.11.
4. 이엠생명과학연구원, “미생물의 발효공정과 대사산물”, 『이엠생명과학연구원』, 2013.09.05.
5. Arbat OB, “Acid stress in yeast *Saccharomyces cerevisiae*”, 『Ukr Biokhim Zh』, 2008
6. Gadgil M and others, “Transcriptional response of Escherichia coli to temperature shift”, 『Biotechnol Prog』, Vol.21(3), 2005
7. Michael J. Waites and others, 『Industrial Microbiology-An Introduction』, “Life Science Publishin co.”, pp.34 - 37
8. Michael Madigan and others, 『Brock Biology of Microorganisms, 13th edition』, “PEARSON education, Inc.”, p.169
9. Rashed Noor and others, “Influence of Temperature on Escherichia coli Growth in Different Culture Media”, 『JOURNAL OF PURE AND APPLIED MICROBIOLOGY』, Vol.7(2), 2013
10. Rogelio Lopes Brandão and others, “Investigating Acid Stress Response in Different Saccharomyces Strains”, 『Journal of Mycology』, 2014.
11. William J. Thieman • Michael Pallandino, 『Introduction to Biotechnology 2nd edition』, “PEARSON education Inc.”, 2012, p.124
12. Wikipedia, “Heat Shock Protein”, 『wikipedia』

학술 조사

방사선(Radiation) - 오염과 이용

호르몬과 질병

방사선의 정의

❖ **방사선**은 현재 지구상에서 가장 위험한 물질이다. 하지만 전기생산의 부산물(원자력발전소), 의학적 검사(X-ray), 과학계 연구도구로서 중요한 위치에 있기 때문에 방사선에 대해 이해할 필요가 있다.



- ❖ 방사선은 **방사능을 가진 원자에서 발생하는 빛 또는 물질**이다.
- ❖ 몸을 구성하는 분자와 공명
 - ▶ 세포 파괴
 - ▶ 유전자 파괴 / 변형
- ❖ 방사선은 반드시 원자력발전 등의 수단을 통해서만 나타나는 것이 아닌 자연상에 존재하는 방사성 원소들의 핵붕괴현상에 의해서도 나타난다

방사선의 오염현황

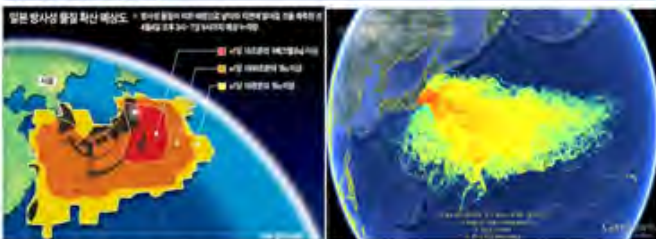


사진 1. 일본을 중심으로 방사선 오염현황 지도

방사선은 현재 지구상에서 가장 위험하고, 빠르게 해결되어야 하는 오염원으로 인식되고 있다.

- ✓ 과거 **체르노빌** 원자력 발전소 사고
- ✓ 일본 **후쿠시마** 원자력발전소 오염수 방출
- ✓ 한국 노후 원자력발전소 폐쇄

일본 원자력 발전소 오염수 배출 사건

일본의 오염수 배출 사건의 경우, 오염수에 형성된 **삼중수소**를 제거하지 못하였으므로 오염수를 방출하겠다고 발표한 것이었다. 고농도의 삼중수소에 노출될 경우 **세포 사멸, 유전적 손상, 생식기능 저해** 등을 일으키는 것으로 알려져 있기 때문에 세계적으로 문제시 되었다.

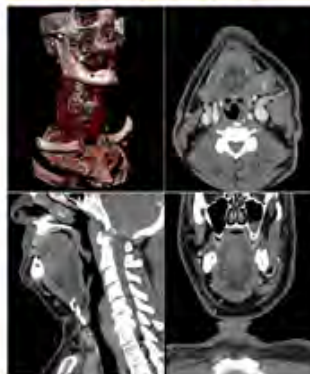
방사선의 이용



사진 2. 방사능세기에 따른 방사선 이용

❖ 방사능의 세기를 적절하게 조절함에 따라 과학적 연구 혹은 치료와 같이 인간에게 유익한 도구로서도 사용이 가능하다.

의학계열의 이용: X-ray & CT



<X-ray>

❖ 파장이 정의되어 있지 않으나, 보통 10~100 m의 수백 배에서 수백만분의 1의 파장의 빛

<종류>

1. 전자가 원자나 원자핵에서 받는 힘에 의한 엑스선(연속 엑스선)
2. 전자를 잃었을 때, 그 공백을 메우기 위해 전자가 이동할 때 발생하는 엑스선(특성 엑스선)

사진 3. CT촬영 예시

<CT(computed tomography)>

- ❖ X선 발생장치가 있는 원형의 큰 기계에 들어가서 촬영하는 것
 - 인체를 가로로 자른 횡단면상을 촬영을 통한 정밀검사
 - 하나의 회전축 주위에서 촬영한 엑스선 영상을 합쳐 3D영상을 얻을 수 있음

농업계열의 이용: 방사선육종



BEFORE & AFTER

표 1. GMO와 방사선육종의 비교

	GMO(유전자조작생물)	방사선육종
형질 발현	다른 생물의 형질발현	자연에 없는 형질발현
형질 개량	1개(단일형질)	1~2개 이상(복수형질)
적용대상	제한적(특정 생물)	다양한 생물 적용가능 ·생물사, 종자, 조직, 화분 etc.
소요시간	시간, 비용 high	시간, 비용 low

방사선(Radiation) - 오염과 이용

14 윤혜원 15 이재운 17 김유민 박창현 이다영 최성우

● 방사능 오염현황

이 시대를 살아가는 사람들에게 있어서 방사능이란 크게 낯설지 않은 개념으로 다가왔다. 우리가 직면한 방사능오염 문제의 경우 과거 체르노빌 원자력 발전소 사고를 시작으로 최근 원자력발전소의 노후문제, 일본 대지진으로 인한 원자력 발전소 문제까지 다양한 사건사고로 다가왔다. 일본의 경우 지난 2011년 동일본대지진 당시 폭발사고를 일으켜 원자로 폐쇄 절차에 들어간 후쿠시마(福島) 제1원자력발전소의 오염수를 바다로 내보내겠다고 밝혀 논란이 일어난 바 있다. 이들은 오염수에 형성된 삼중수소를 제거하지 못하였으므로 오염수를 방출한다고 밝혔으나 삼중수소의 인체 유해성에 대한 연구가 아직 충분하지 않기 때문에 주변국은 물론, 세계 각국 및 각종 환경단체를 통해 크게 문제시 되고 있다.

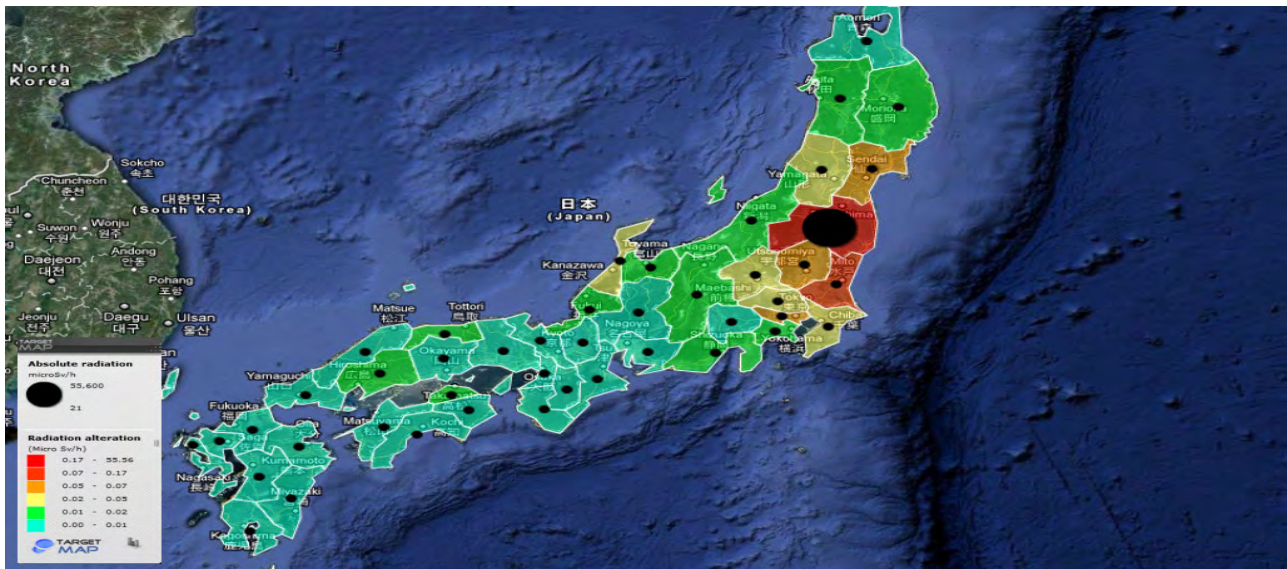


Figure 1. 일본의 방사능 오염현황

현재까지 영국, 캐나다, 미국 등에서 삼중수소를 생산하는 원전에 종사했던 사람들에게 대해 역학 연구가 진행되었으나 암 발생이나 사망률 증가 등의 증거는 아직 확인되지 않았다는 연보고가 있었지만 고농도의 삼중수소에 노출될 경우 세포 사멸, 유전적 손상, 생식기능 저해 등을 일으키는 것으로 알려져 있다.



Figure 2. 방사능 오염물질의 이동 모식도

●방사능 악영향 사례

방사능에 오염된 지역의 야생생물은 방사능에 그대로 노출됨에 따라 외적으로 피폭됨과 동시에 그들이 먹는 먹이의 섭취를 통한 내부피폭도 심각한 상황임을 의미한다. 이에 따라 일본의 니시하라의 류큐스 대학의 생물학자인 조지 오타키의 연구팀은 현장연구와 실험실 연구를 통해서 어떻게 이러한 방사능이 일본 대부분 지역에 서식하고 있는 청띠신선나비에 영향을 주는가에 대한 연구를 수행했다. 이전 실험에서 오타키의 연구그룹은 사고가 일어난 후 몇 달 안에 발전소 근처에서 수집된 수천 베크렐의 방사선에 노출된 팥이밥을 나비 애벌레에게 먹였다. 그 결과, 방사능에 노출된 애벌레는 낮은 생존율과 이상하게 작은 앞날개와 같은 물리적인 기형 발생률이 높음을 보여주었다. 이러한 결과는 정상적인 나비가 서식하는 것으로 예측되는 지역보다 오염된 지역에서는 서식하는 나비의 숫자가 적다는 다른 연구팀이 조사한 현장연구결과를 통해서 확인되었다.



Figure 3. 방사능 피폭에 의한 나비의 변화

일본 뿐 아니라 북한에서도 방사능에 의한 영향이 나타났다고 주장되었다. 북한이 2006년부터 2013년까지 1~3차 핵실험을 하는 동안 핵시설 인근에 살던 주민이 방사성 물질 피폭 증상을 앓고 있다는 것이다. 작년 통일비전 연구회가 핵실험장 부근에서 거주하다 탈북한 탈북주민을 조사한 결과, 일부 주민으로부터 방사능 과다 피폭과 유사한 증세가 나타났다고 한다. 분석결과 핵실험 이후 4~7년 이상 거주한 탈북자들 13명 중 일부는 귀신병이라는 원인 모를 증세에 시달린 것으로 나타났다. 전문가들은 많은 학자들을 통해 확인한 결과 러시아 체르노빌이나 일본 후쿠시마 원전사고 당시 주민들과 유사한 증세라는 것을 밝혀냈다. 생물학, 환경학자들은 핵실험 이후 주변 30km 내외의 토양과 지하, 지표수가 오염돼 이곳에서 생산된 채소와 식수를 장기간 복용할 경우 상당히 높은 수치의 방사성 물질에 직간접적으로 노출될 수 있다고 지적했다.

●방사능의 이용

하지만 방사능이 반드시 악영향만을 주는 것은 아니다. 방사능의 노출량을 적절하게 조절함에 따라 과학적 연구 혹은 치료와 같이 인간에게 유익한 도구로써도 사용이 가능하다.

1. X-ray

가장 대표적인 이용으로 X-ray가 있다. X-ray는 뢰트겐선이라고도 불린다. 빌헬름 뢰트겐이 1895년에 발견되었으나 발견 당시 X-ray의 정체를 이해하지 못했기 때문에 대수에서 미지의 것을 X라 하여 이름 붙여졌다. 엑스선의 파장의 한계는 분명하게 정의되어 있지 않으나, 보통 10⁻⁸~10⁻¹⁰ m의 수백 배에서 수백 만분의 1의 파장의 빛을 엑스선이라 부르고 있다. 엑스선은 엑스선의 발생 방법에 따라 2가지 종류가 있다. 하나는 제동 복사에 따라 만들어지는 연속 엑스선으로서 전자가 원자나 원자핵에서 받는 쿨롱 힘에 의해 갑자기 진로가 바뀔 때에 발생하는 엑스선이다. 다른 하나는 특성 엑스선으로서 원자 속의 깊은 에너지 준위에 있는 전자가 제외되었을 때, 그 공백을 메우려고 바깥쪽 궤도에서 전자가 이동할 때 발생하는 엑스선이다.

-X ray의 이용:CT-

CT(computed tomography)는 X선 발생장치가 있는 원형의 큰 기계에 들어가서 촬영하는 것으로, 단순 X선 촬영과 달리 인체를 가로로 자른 횡단면상을 얻을 수 있어 정밀검사를 시행해야 할 필요가 있을 때 기본이 되는 의료 검사법이다. 디지털 지오메트리 처리는 하나의 회전축 주위에서 촬영한 일련의 2차원 엑스선 영상으로부터의 물체 내부의 3차원 영상을 만드는 데 쓰인다. 엑스선 전산화 단층촬영에서는 1차원으로 배열된 X선 방출장치와 1차원으로 배열된 X선 검출장치가 검사대상을 마주보며 회전한다. 검사 대상 조직은 X선 방출장치로부터 X선을 받아 일부를 흡수하고 나머지를 투과하는데, 투과된 X선이 반대쪽에 위치한 X선 검출장치에 도달·기록된다. 장치는 180도를 회전하면서 각각의 방향마다 1차원의 X선 흡수도 분포를 기록한다. 이후 컴퓨터로서 여기서 얻어진 2차원 (1차원 공간과 회전 각도) 영상 이미지를 역 라돈변환을 통해 2차원의 인체 영상으로 재구성하고, 환자를 이동하면서 얻어진 일련의 2차원 영상을 쌓아 3차원의 입체 영상을 얻는다.

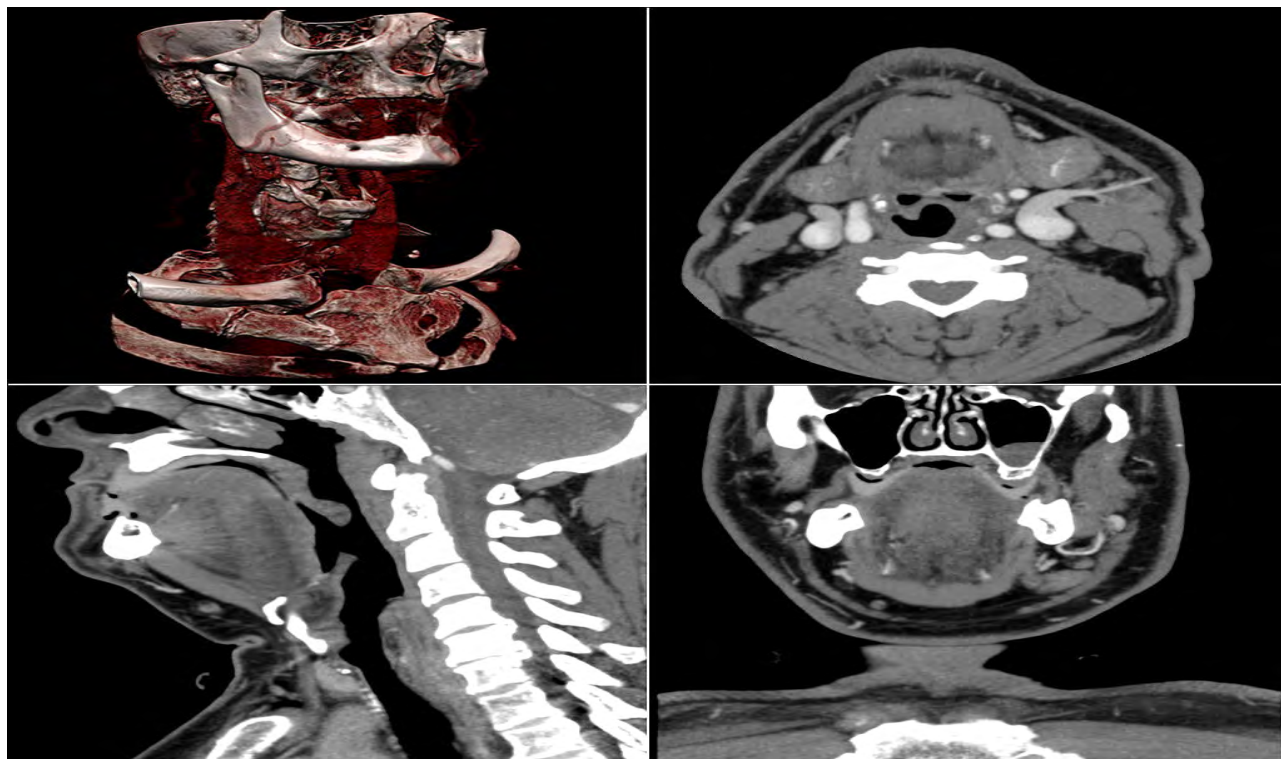


Figure 4. CT로 촬영한 인체사진

컴퓨터 단층촬영(CT)은 X선 발생장치가 있는 원형의 큰 기계에 들어가서 촬영하며 단순 X선 촬영과 달리 인체를 가로로 자른 횡단면상을 획득한다. CT는 단순 X선 촬영에 비해 구조물이 겹쳐지는 것이 적어 구조물 및 병변을 좀더 명확히 볼 수 있는 장점이 있다. 대부분의 장기 및 질환에서 병변이 의심되고 정밀 검사를 시행해야 할 필요가 있을 때 기본이 되는 검사법이다. 단면상을 얻는다는 점에서 MRI와 CT는 공통점이 있지만, CT는 X선을 이용하여 영상을 얻고, MRI는 자기장 내에서 고주파를 전사하여 영상을 획득한다는 차이점이 있다. 또한 CT는 MRI에 비하여 검사비가 싸고, 검사 시간이 짧은 장점이 있다. 반면 MRI는 CT에 비하여 연조직의 표현력 및 대조도가 높아 근육, 인대, 뇌실질 병변 등의 진단에 있어서 기본이 된다. 이전에는 MRI가 횡단면상뿐만 아니라 원하는 단면상의 영상을 자유롭게 획득할 수 있다는 것이 CT에 비하여 장점으로 꼽아졌으나, 최근 들어 다중채널 CT(MDCT, multi-detector CT)가 보급되면서 촬영 후 영상을 재구성하여 MRI처럼 원하는 단면상 및 입체적인 삼차원(3D) 영상도 자유로이 얻을 수 있게 되었다. 컴퓨터 단층촬영(CT)의 경우는 촬영 기법에 따라 2~10mSv 정도 피폭되며 약 8개월에서 3년간 일상에서 노출되는 정도의 방사선량이다. 검사를 받음으로 인한 방사선 노출의 위험과 검사를 시행함으로써 얻게 되는 이득을 따져 보았을 때, 큰 해를 유발하지 않는 정도의 양이다.

2. 방사선 품종개량

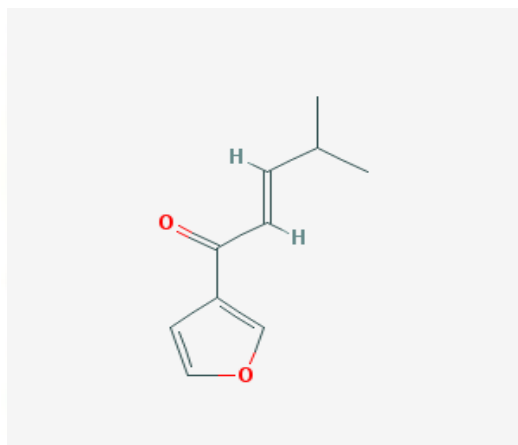
방사선품종 또는 방사선육종이라고 불리는 기술은 농작물이나 가축에게 방사선을 쬌어주었을 때 일어나는 돌연변이를 이용하여 품종을 개량하거나 신품종을 만들어내어 증식시키는 일을 말한다. 목적으로 하는 변이형태는 방사선 돌연변이를 일으킨 다음 세대에서 유용한 돌연변이를 골라내어 얻는 방법을 활용하고 있다. 돌연변이를 유발하는 에너지원으로 X선, 감마선과 같은 방사선 등을 이용한다. 주요 식물의 유전자 염기서열이 밝혀짐에 따라 유전자의 기능을 밝히는 기능유전체(functional genomics) 연구 소재용의 돌연변이 유전자원의 수요가 급속도로 증가하고 있기 때문에 방사선육종 기술을 이용한 대량의 유용 변이체를 창출할 필요성이 있다. 방사선육종은 방사선의 작용에 의해 식물 자체가 가지고 있는 유전자의 기능을 변화시켜 기존에 없던 새로운 형질을 발현시킨 것이다. 이에 반해, GMO는 다른 생물의 유전자를 생명공학적인 방법을 통해 주입함으로써 다른 생물의 형질이 발현된 것이라는 점에서 서로 차이를 보여준다.. 방사선육종 기술의 장점은 1-2개 형질(유전자)의 개량에 유리하여, 기존 유망 품종의 단점 형질을 개량하는데 뛰어나다는 것이다. 이와 같은 특성은 1-2개의 외부 유전자를 주입하는 유전자변형(GMO) 육종기술과 유사한 육종 효과를 낼 수 있는 것으로 현재 기대되고 있다. 뿐만 아니라 다양한 변식방법, life cycle을 갖는 식물에도 적용이 가능하고, 종자, 조직배양체, 화분, 식물체 등 다양한 식물재료에도 적용이 가능하다. 교잡 및 유전자변형 육종기술 등과 비교해 보았을 때 육종에 소요되는 시간과 경비가 적게 드는 점도 방사선 육종의 장점이라고 할 수 있다. 하지만 단점이라고 한다면 역시 돌연변이체의 낮은 회수율일 것이다. 기존의 형질전환 기법을 이용한 품종개량에 비해 방사선에 의한 품종개량은 예상결과와 실제 회수율에 있어서 큰 차이를 보이므로 이 부분은 아직 개선이 필요하다.



Figure 5. 방사선육종을 통해 개발한 오렌지(오른쪽)



Figure 6. 방사선육종을 통해 개발한 보라색 깻잎(왼쪽)



최근에는 방사선 육종기술을 무궁화, 깻잎 등에 응용한 원예, 의학에서의 연구결과가 있다. 무궁화는 원예와 접목되는 결과로써 우리가 흔히 예상하는 무언가 발전된 변이가 아니다. 보통의 무궁화 나무는 3~4년만 돼도 키가 4m로 자라는데 비해 돌연변이 무궁화는 10년을 자라도 50~60cm밖에 되지 않도록 계량한 것이다. 깻잎의 경우 약용물질의 생산에 주목한 결과로써 방사선 육종을 통해 관절염 증상을 보이는 동물에 투여할 경우 부종의 크기가 크게 감소하는 활성을 보이는 ‘이소에고마케톤(isoegomaketone)’의 함량이 기존의 재래종 차조기와 비교했을 때 10배이상 늘어난 ‘안티스페릴’이라는 신품종을 개발하였다고 한다.

References

1. 고상민, “하태경 "북핵실험장 인근 주민들 방사능 피폭 증상"”, 『연합뉴스』, 2017.10.09.
2. 구예지, “후쿠시마 원전 사고 피해 아직도...’반경 100km 이내 높은 농도의 방사성 물질 검출’”, 『MBN 뉴스』, 2017.10.03.
3. 권예슬, “日 후쿠시마 인근 새로운 세슘오염 지역 발견”, 『동아사이언스』, 2017.10.04.
4. 김민수, “보라색 깻잎에 방사선 쬐어 관절염 효능 물질 얻었다”, 『ChosunBiz』, 2017.02.07.
5. 김유아, “방사능에 오염된 재활용 고철 매년 증가해”, 『파이낸셜뉴스』, 2017.10.09.
6. 김윤진, “방사선 기술로 만든 '착한 돌연변이 무궁화'”, 『매일경제』, 2017.08.14.
7. 방사선육종연구센터, “방사선육종”, 『방사선육종연구센터』
8. 심창섭 • 홍지연, “심창섭,홍지연 ,한국 환경정책 평가 연구원, 방사능 재해에 따른 환경 및 인체 영향 분석”, 『한국환경정책 • 평가연구원』, 2011
9. 한영혜, “‘방사능 오염 우려’ 일본산, 국내산으로 둔갑된 사례 3배 증가...가장 많은 건 갈치”, 『중앙일보』, 2017.09.21.
10. 허핑턴포스트, “도쿄전력 "후쿠시마 원전 오염수 바다 방출 방침"”, 『허핑턴포스트』, 2017.07.14.
11. Dennis Normile, “Fukushima radiation still poisoning insects”, 『Sciencemag』, 2017.09.22.
12. Jordan Almond, “Dictionary of Word Origins: A History of the Words, Expressions, and Cliches We Use”, 『Secaucus』, 1997, p.262

호르몬이란?

호르몬이란 우리 몸의 한 부분에서 분비되어 혈액을 타고 표적기관으로 이동하는 일종의 화학물질로, 표적기관에 도착한 후 세포 외부 혹은 내부에 위치하는 수용체와 결합하여 작용한다.

이번 조사에서는 다양한 호르몬 중 뼈, 얼굴의 성장 및 단백질 합성을 촉진시키는 성장호르몬과 탄수화물, 무기질의 대사에 관여하는 부신피질호르몬에 관련된 질병에 대해 알아보려 한다.

말단 비대증

◆ 원인

말단 비대증은 성장이 끝난 후에 뇌하수체에서 성장 호르몬을 분비하는 중량이 생겨서 얼굴과 손발이 커지는 질환이다. 뇌하수체는 뇌의 아래쪽 바닥 부위에 둥그렇게 튀어나온 샘 조직으로, 성장호르몬을 비롯해 6가지 중요한 호르몬을 분비한다. 성장판이 닫히기 전에 성장호르몬 분비가 증가하면 거인 증으로 나타나고, 성장판이 닫힌 후에 분비가 증가되면 말단비대증으로 나타난다.

◆ 증상

대표적인 증상은 얼굴 모양과 손발의 변화이며, 그 외 대사 이상과 종괴로 인한 압박증상이다. 이마와 턱이 튀어나오고, 코와 입술이 커지며, 치아 간격이 벌어지고, 손과 발이 굵어지게 된다. 또한 대사 이상으로 당뇨병, 고혈압 등이 동반되기도 한다. 평균 발생 연령은 40세 정도이며, 남성과 여성 모두 동일하게 발생한다.

◆ 치료방법

주된 치료는 수술적 치료이며, 그 외에 방사선 치료, 약물 치료 등이 있다.



Figure 1. 말단 비대증 증상 전과 후



Figure 2. 치료 방법

쿠싱병

◆ 원인

쿠싱병은 부신에서 필요 이상 많은 양의 당질코르티코이드가 과다분비되는 희귀질환이다. 당질코르티코이드가 과다생산되는 경우는 세 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째, 뇌하수체에 부신피질자극호르몬을 분비하는 중량이 생기게 되면, 뇌하수체 전엽에서 부신피질 자극 호르몬을 과잉분비하고 이는 부신피질에 작용하여 당질코르티코이드가 과잉분비된다. 두 번째, 부신에 중량이 생길 때이다. 이 때에는 중량에서 당질코르티코이드를 과다생산하여 발병한다. 세 번째, 다른 기관에서 생긴 중량에서 부신피질 자극호르몬을 과다생산하여 발병하는 경우이다.

◆ 증상

비만, 당뇨병, 근력저하, 고혈압 등의 증상이 나타난다. 또한 피부선조와 근력저하의 증상도 나타날 수 있다. 피부선조는 피부의 표면에 갈라지는 듯이 나타나는 주름을 말한다.



Figure 3. 쿠싱병 증상



Figure 4. 쿠싱병 발병 전과 후

선천성 부신 증식증

◆ 원인

선천성 부신 증식증은 부신피질호르몬의 생산에 필요한 효소를 조절하는 유전자에 돌연변이가 생겨 부신피질호르몬을 분비하는 부신의 기능이 손상되어 나타난다. 혈액 내 당질코르티코이드의 일종인 코르티솔과 무기질코르티코이드의 일종인 알도스테론 양이 감소되면 뇌하수체에서 생성되는 부신피질자극호르몬의 분비가 증가하게 되고, 이것은 남성호르몬인 안드로겐의 생산을 자극한다.

◆ 증상

이 질환으로 인해 여성들은 외부 성기의 음핵이 비정상적으로 커져서 남성의 성기와 비슷한 모습을 보인다. 남성의 경우, 안드로겐이 계속해서 많이 분비되어 조루증, 빠른 신체 성장, 조기 사춘기 등이 나타난다.

◆ 치료방법

필요한 경우, 조기에 수술하여 외부 생식기계를 바로잡아 줄 수 있다. 여성들의 월경 이상을 치료하기 위해 코르티코스테로이드가 처방되며 이 경우 정상 임신도 가능하다. 남성의 경우 안드로겐 억제제를 사용하여 치료가 가능하다.



Figure 5. 선천성 부신 증식증 증상

[참고문헌]

정운석(1990). "말단비대증의 여후", 대한내분비학회, 제 5권, 제 2호, pp. 101~107.
Lee JY·Oh BH(1992). "Hormone profile in patients with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency", Korean J Obstet Gynecol, vol. 35, no. 4, pp. 498-508.
ko JM·Choi JH·Kim GH·Yoo HW(2005). "Genotype of Steroid 21-Hydroxylase Gene and Clinical Characteristics in Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia 21-Hydroxylase Deficiency", J Korean Soc Pediatr Endocrinol, vol. 10, no. 1, pp. 57-63.
대한신경내분비연구회
서울대학교병원 의학정보, "쿠싱병", <http://www.skhu.org>.
NAVER 국가건강정보포털 의학정보, "말단비대증",
<http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=2119810&ref=y&cid=51004&categoryId=51004>.

호르몬과 질병

16 김경혜 임은주 전민정 조하영 17 박시영 백승민 이재희 임지수

[호르몬이란?]

호르몬이란 우리 몸의 한 부분에서 분비되어 혈액을 타고 표적기관으로 이동하는 일종의 화학물질이다. 표적기관에 도착한 후 세포 외부 혹은 내부에 위치하는 수용체와 결합하여 작용한다. 호르몬은 구성요소에 따라 펩타이드 호르몬과 스테로이드 호르몬으로 분류할 수 있다.

[쿠싱병]

1. 쿠싱병의 개념

부신에서 분비되는 스테로이드 호르몬으로는 코르티코이드와 코르티코스테로이드가 있다. 그 중 코르티코이드는 부신피질에서 분비되는 스테로이드 호르몬으로, 작용양상에 따라 당질 코르티코이드와 무기질코르티코이드로 분류할 수 있다. 쿠싱병은 부신에서 필요 이상 많은 양의 당질코르티코이드가 과다분비되는 희귀질환이다. 이 질병은 높은 사망률을 기록하고 있는데, 이는 심혈관계 합병증 및 다양한 대사질환이 그 원인으로 알려지고 있다.

2. 원인

부신에서 당질코르티코이드를 과하게 생산할 경우에 이 질병이 발병하는데, 과다생산하는 경우는 세 가지로 나눌 수 있다. 첫 번째, 뇌하수체에 부신피질자극호르몬을 분비하는 종양이 생기게 되면, 뇌하수체 전엽에서 부신피질 자극 호르몬을 과잉분비하고 이는 부신피질에 작용하여 당질코르티코이드가 과잉분비된다. 두 번째는 부신에 종양이 생길 때이다. 이 때에는 종양에서 당질코르티코이드를 과다생산하여 발병한다. 세 번째는 다른 기관에서 생긴 종양에서 부신피질 자극호르몬을 과다생산하여 발병하는 경우이다. 부신피질 자극호르몬이 증가하여 양측 부신에 작용하면 양쪽 부신은 비대해지며 기능이 항진되어 부신에서 합성하는 호르몬인 남성호르몬과 함께 당질코르티코이드를 과다생산한다.

3. 증상

당질코르티코이드가 과잉분비될 경우, 비만, 당뇨병, 근력저하, 고혈압 등의 증상이 나타난다. 이 호르몬은 혈당을 높이도록 작용하여 인슐린과 길항하는 작용이 있기 때문에, 내당능의 저하가 나타나 당뇨병을 일으키는 것이다. 또한 피부선조와 근력저하의 증상도 나타날 수 있는데, 당질코르티코이드에는 단백질 이화를 촉진하는 작용이 있어, 근육의 단백질이 분해되기에 근력이 저하되는 것이다. 피부선조는 피부의 표면에 갈라지는 듯이 나타나는 주름을 말한다. 부신피질자극호르몬이 과잉분비될 경우에는 피부에 색소침착이 일어난다.

4. 치료방법

부신에 생긴 종양이 원인일 경우, 복강경 수술에 의한 종양적출 수술이 행해진다. 하지만 뇌하수체에 생긴 종양이 원인이라면 종양을 적출하는 수술 이외에도 방사선 치료를 받아야한다. 종양의 크기가 1cm 미만인 미세선종의 경우에는 경접형동 접근에 의해 미세선종 절제술을 실시한다. 수술이 불가피한 경우, 약물치료를 병행한다. 뇌하수체에 남은 종양에서 분비되는 부신피질 자극호르몬을 억제하는 약물이 사용되는데, 이 약물을 복용하면 파시레오타이드라는 물질이 분비된다. 이 물질은 시상하부에서 분비되어 뇌하수체의 부신피질 자극호르몬을 억제하는 소마토스타틴 유도체이다.

[선천성 부신 증식증]

1. 원인

선천성 부신 증식증은 비정상적으로 커진 부신에서 안드로겐이 지나치게 많이 생성되어서 발생되는데 이로 인해 성적 발달이 비정상적으로 나타난다. 75%의 환자는 코르티솔과 알도스테론이 감소하여 부신 위기가 나타나서 탈수와 쇼크 상태에 빠지게 된다. 그러므로 이 질환에 대한 조기 진단과 치료가 이뤄지지 않으면 생명이 위험할 수 있다. 이 질환으로 인해 여성들은 외부성기의 음핵이 비정상적으로 커져서 남성의 성기와 비슷한 모습을 보인다. 남자의 경우 안드로겐이 계속해서 많이 분비되므로 조로증(조기 노화의 특징을 보임), 빠른 신체 성장, 조기 사춘기 등이 나타난다. 선천성 부신 증식증은 부신피질호르몬의 생산에 필요한 효소를 조절하는 유전자에 돌연변이가 생겨 부신피질호르몬을 분비하는 부신의 기능이 손상되어 나타난다. 혈액 내 당질코르티코이드의 일종인 코르티솔과 무기질코르티코이드의 일종인 알도스테론 양이 감소되면 뇌하수체에서 생성되는 부신피질 자극호르몬의 분비가 증가하게 되고, 이것은 남성호르몬인 안드로겐의 생산을 자극한다. 선천성 부신 증식증은 상염색체 열성형질로 유전된다. 이 질환의 몇몇 형태에서 질환을 일으키는 유전자는 다음과 같다.

- ① 21-수산화효소 결핍을 일으키는 유전자는 6번 염색체의 단완(짧은 팔)에 위치하고 있음.
- ② 11-베타 수산화효소 결핍을 일으키는 유전자는 8번 염색체의 장완(긴 팔)에 위치하고 있음.
- ③ 3-베타-히드록시스테로이드 탈수소효소 결핍을 일으키는 유전자는 1번 염색체의 단완에 위치하고 있음.
- ④ 지질성 부신 과형성증의 원인이 되는 유전자는 15번 염색체에 위치하고 있음.

2. 치료 방법

선천성 부신 증식증의 치료는 필요한 경우 조기에 수술하여 외부 생식기계를 바로잡아 줄 수 있다. 경구용 코르티코스테로이드제제 치료로 내분비 기능의 장애를 조절할 수 있고, 일생동안 지속적으로 약물을 복용해야 한다. 여성들의 월경 이상을 치료하기 위해 코르티코스테로이드가 처방되며, 이 경우 정상 임신도 가능하다. 남성의 경우 안드로겐 억제제를 사용하여 치료가 가능하다.

[갑상선 관련 질병]

- 갑상선의 개념

갑상선의 사전적 정의는 목 앞 중앙에 있는 나비 모양으로 되어 있는 내분비기관이다. 이는 후두와 기관 앞에 붙어있으며 양 옆에 각각 한 개씩의 엽이 존재한다고 한다. 갑상선이 분비하는 호르몬 중 하나인 갑상샘 호르몬은 체온 유지와 신체 대사의 균형을 유지하는 데에 중요한 역할을 담당한다. 분비되는 또 다른 호르몬인 칼시토닌은 뼈와 신장에 작용하여 혈중 칼슘 수치를 낮추어주는 역할을 수행한다.

- 갑상샘호르몬이 합성되는 원리

간뇌의 시상하부는 갑상샘 자극 호르몬 분비 호르몬을 통해 뇌하수체에서 갑상샘 자극 호르몬을 방출하도록 요청한다. 뇌하수체가 갑상샘 자극 호르몬을 분비하면 갑상샘에서 갑상샘 호르몬의 합성 및 분비가 촉진된다. 섭취하여 체내에 들어온 아이오딘이 능동 수송에 의해 갑상샘 세포 안에 들어가 세포에 있는 단백질인 갑상샘 글로블린과 결합하여 갑상샘 호르몬으로 합성된다. 요오드가 3분자 결합한 것을 T3, 4분자 결합한 것을 T4라 부른다. 분비되는 갑상샘 호르몬 중 90 % 이상이 T4이다. 혈중으로 분비된 갑상샘 호르몬은 혈중 단백질과 결합하는데 대부분은 티로신결합 글로블린과 결합하며 일부는 알부민과 결합한다. 호르몬이 필요량보다 많으면 호르몬의 분비가 억제되어 일정수준을 유지하는데, 이러한 조절방식을 음성피드백이라고 한다. 갑상샘 호르몬인 티록신은 음성피드백에 의해 조절된다.

<갑상선 종양>

1. 원인

갑상선에서 일어나는 갑상선 종양은 갑상선 결절이라고 불리며 이에 대한 정의는 다음과 같다. 갑상선 세포의 과증식으로 혹을 만드는 경우이며 이는 나이가 증가함에 따라 발생률이 증가한다. 보통 여성이 갑상선 결절에 걸릴 확률이 남성보다 3~4배 정도 크다고 알려졌다. 갑상선 결절은 양성 결절과 악성 결절로 나뉘는데 이는 발병 원인에 따라 분류된다. 양성 결절에는 총 네 가지 종류가 있다. 대표적으로 과증식성 결절은 아이오딘 결핍에 따른 티록신의 분비 조절 과정에서 일어나는 음성 피드백이 원인이다. 그리고 갑상선 세포에서 만들어 내는 콜로이드라는 액체 성분이 축적되어 생기는 콜로이드 결절, 림프구성 갑상선염이 결절 형태로 성장하여 생기는 염증성 결절, 마지막으로 기존의 결절이 괴사 및 병성을 일으켜 발생하는 낭성 결절이 있다. 악성 결절은 갑상선암으로도 알려졌으며 이는 여러 유전자 변이가 병인으로 밝혀져 있다.

2. 치료방법

갑상선 종양은 호르몬 측정을 하는 혈액 검사, 갑상선 스캔, 갑상선 초음파, 그리고 미세 침 흡인 세포 검사로 검사가 가능하다. 양성 갑상선 결절의 경우는 정기적으로 초음파로 추적 관찰을 한다. 악성인 경우 수술이 필요하며, 증상이 일어나지 않는 악성이 아닌 경우에도 미용을 목적으로 수술이 가능하다. 이와 같은 수술 후에는 호르몬 억제 요법, 방사성 동위원소 치료 등의 항암 치료가 이루어진다.

<크레틴병>

1. 원인

선천성 갑상선 기능저하증이라고 알려진 크레틴병은 선천적이라는 점에서부터 갑상선 종양과 차이가 있다. 일반적으로 환자의 90%가 갑상선 형성 부전에 의해 이 질환을 겪는다. 이는 태아 시기에 갑상선이 형성되는 과정에서 발생하며 대부분 유전성이 아닌 산발성으로 발생한다. 나머지 10%는 갑상선 호르몬 합성 장애 때문에 발생하며 이는 상염색체 열성 유전이 원인이다. 이 질환의 증상은 과다 수면, 수유에 대한 무관심, 낮은 울음소리, 장기간 황달, 저체온, 넓고 낮은 코 등이다. 영아기 이후에는 작은 키와 짧은 목과 사지, 그리고 상체가 하체보다 큰 비율로 나타날 수 있다. 이에 더불어 갑상선 호르몬은 뇌신경계 발달에도 필수적이기 때문에 이 호르몬이 부족한 경우 지능 저하와 운동 장애 등과 같은 신경학적 증상 또한 수반될 수 있다고 한다.

2. 치료 방법

크레틴병은 신생아 선별 검사, 갑상선 호르몬 검사, 갑상선 스캔 등으로 확인 할 수 있다. 치료법으로는 갑상선 호르몬 결핍을 교정하기 위해 갑상선 호르몬 보충 요법을 평생 지속하는 방법이 있다. 이를 예방하기 위해 산모가 갑상선 호르몬 합성에 필요한 아이오딘이 결핍되지 않게 아이오딘 섭취할 수 있다.

<갑상선 기능 항진증>

1. 원인

갑상선 기능 항진증은 갑상선에서 분비되는 호르몬(T3 및 T4)이 어떠한 원인에 의해서 과다하게 분비되어 갑상선 증독증을 일으키는 상태를 말한다. 또한 갑상선 기능 항진증이 심하여 사망에 이르게 될 경우 이를 갑상선 기능 항진증의 발작 또는 급성발작이라고 한다. 갑상선 기능 항진증을 일으키는 가장 주요한 원인은 그레이브스 병이다. 이 외에도 뇌하수체 선종이 있는 경우 이 종양에서 갑상선 자극 호르몬이 과다 분비되어 생길 수 있으며, 인공모성선 자극 호르몬을 분비하는 종양에 의해서도 발생할 수 있다. 갑상선 호르몬제를 과량 복용할 경우에도 갑상선 기능 항진증의 증상이 나타난다.

2. 치료방법

체중이 감소할 수 있다. 더위를 참지 못하고 맥박이 빨라지며(빈맥), 두근거림, 손 떨림이 나타나거나 대변 횟수가 증가할 수 있다. 피로감, 불안감 및 초조함이 나타날 수 있고, 가슴이 아프다고 느끼거나 숨이 차다고 느낄 수 있다. 근력 약화로 인한 근육 마비가 올 수 있다. 눈이 튀어나오거나 안구 건조증 및 각막염, 복시 등의 증상이 나타난다. 갑상선 호르몬의 생산을 억제하는 치료를 하게 된다. 흔히 항갑상선제를 사용한 약물치료를 시행하는데, 항갑상선제 복용을 중단할 경우 재발률이 높은 것이 단점이다. 항갑상선제

는 대부분 부작용이 없는 안전한 약물이지만 드물게 무과립구증, 혈관염 및 간기능 장애를 동반할 수 있다. 약물 치료 외에 갑상선을 절제하는 수술 요법이나 동위원소(방사성요오드 치료)를 이용하여 갑상선을 파괴하는 방사성 동위원소 치료가 사용된다. 그러나 방사성 동위원소 치료의 경우 향후 갑상선 기능 저하증이 발생할 수 있으며 임신이나 수유 시에는 절대로 받을 수 없다.

[말단 비대증]

1. 말단비대증의 개념과 발병원인

말단 비대증은 성장이 끝난 후에 뇌하수체에서 성장 호르몬을 분비하는 종양이 생겨서 얼굴과 손발이 커지는 질환이다. 뇌하수체는 뇌의 아래쪽 바닥 부위에 동그랗게 튀어나온 샘 조직으로, 뇌하수체는 성장호르몬을 비롯해 6가지 중요한 성장호르몬을 비롯한 6가지 중요한 호르몬을 분비하는 매우 중요한 장기이다. 성장판이 닫히기 전인 사춘기 전에 성장호르몬 분비가 증가되면 거인증으로 나타나고, 성장판이 닫힌 후에 분비가 증가되면 말단비대증으로 증상이 나타나게 된다.

2. 증상

성장판이 닫힌 후 성장호르몬의 지속적인 과분비로 발생된 말단비대증의 경우 대표적인 증상은 얼굴 모양과 손발의 변화이며, 그 외 대사 이상과 종괴로 인한 압박증상이다. 이마와 턱이 튀어나오고, 코와 입술이 커지며, 치아 간격이 벌어지고, 손과 발이 굵어지게 된다. 또한 손, 발이 저린 증상이 나타나게 되며, 대사 이상으로 당뇨병, 고혈압 등이 동반되기도 하고, 두통, 시야 결손 등이 압박증상으로 나타나게 된다. 또한 이러한 증상은 서서히 변화하기 때문에 본인은 물론 주위의 가족이나 친지들도 인지하기 힘든 경우가 대부분으로 5~10년 내 진단이 이루어지지 않는 경우가 많다. 평균 발생 연령은 40세 정도이며, 남자와 여자에서 동일하게 발생한다.

3. 치료 방법

(1) 수술적 치료

수술적 치료가 최상의 방법으로, 과거에는 머리를 열고 들어가는 수술로 수술의 후유증이 많았으나, 현재는 기술이 많이 발전하여 경접형골동 선종제거술을 실시하는데 이는 코를 통하여 수술 현미경과 내시경 장비를 이용하여 뇌하수체 선종을 제거하는 수술로 수술의 후유증과 부작용을 현저히 줄이게 되었다.

(2) 방사선 치료

방사선치료는 뇌하수체 종양이 너무 커서 완전히 제거되지 못하는 경우 남은 종양에 대해 방사선을 쬔여 종양을 태우는 방법이다. 이러한 방사선 치료는 대개 1년 이후부터 성장호르몬의 감소가 나타나기 시작하여 늦게는 10년에 걸쳐 효과가 나타나기도 한다. 그러므로 방사선치료 효과가 완전히 나타나기까지는 약물 요법의 도움이 필요한 경우가 대부분이다.

(3) 약물 치료

약물치료는 대부분 보조적인 치료로 이용되고 있다. 즉 방사선 조사 시행 후 이의 효과가 나타나기 전까지 약물치료를 하거나, 다른 동반 질환으로 수술을 바로 할 수 없을 때 일차적으로 임시적으로 사용할 수 있다.

References

1. 정윤석(1990), “말단비대증의 예후”, 대한내분비학회, 제 5권, 제 2호, pp. 101~107.
2. Lee JY·Oh BH(1992), “Hormone profile in patients with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency”. Korean J Obstet Gynecol, vol. 35, no. 4, pp. 498-508.
3. ko JM·Choi JH·Kim GH·Yoo HW(2005), “Genotype of Steroid 21-Hydroxylase Gene and Clinical Characteristics in Patients with Congenital Adrenal Hyperplasia 21-Hydroxylase Deficiency”, J Korean Soc Pediatr Endocrinol, vol. 10, no. 1, pp. 57-63.
4. 대한신경내분비연구회 서울대학교병원 의학정보, “쿠싱병”, <http://www.snuh.org>
5. NAVER 국가건강정보포털 의학정보, “말단비대증” <http://terms.naver.com/entry.nhn?docId=21198>

견학 보고

극지연구소

테라젠이텍스

극지연구소 견학

12 유제원 14 윤혜원 15 이재운

16 김경혜, 류혜인, 문민호, 박종석, 전민정, 조하영, 표진우

17 김병태, 박민선, 박예진, 이예빈, 임지수, 함진호

2017년 7월 24일, 이영미 교수님의 인솔하에 송도에 위치한 한국해양과학기술원-극지연구소를 견학하였다. 1986년 한국해양연구소의 극지연구실에서 시작한 극지연구소는 지구의 양극 지역에 위치한 북극과 남극을 중심으로 빙권을 비롯한 생태계 등의 환경시스템 등을 연구하는 시설이다. 다양한 연구부서가 현재 설립되어 있으며 그 중 이번 견학을 통해 '극지생명과학연구부'를 견학하였다. 이 부서는 극지 생물의 다양성과 진화 연구, 극지 생물의 환경적응 기작과 극지 생물 고유의 생명현상 연구, 극지 생태계 연구, 업무 등의 기초 연구뿐만 아니라, 유용 극지 생물 자원 발굴과 극지 유래 신규 생물 소재 개발, 극지 생물자원은행 구축과 같은 광범위한 연구를 수행하고 있다.

-극지생물 다양성 및 진화연구-

극지생물 다양성 및 진화연구는 극지 서식 생물들을 동정 하고 메타게놈 분석으로 미생물의 군집을 분석하며, 극지환경에 적응하여 살아가고 있는 미생물의 다양성을 연구하는 것으로, 극지 생물의 진화과정을 이하는 기초가 된다. 예를 들어, 남극의 인근지역에 분포하는 지의류의 계통분석을 통해 극지생물의 지리적 이동, 종 분화 같은 진화과정을 이해할 수 있다. 이와 유사한 영역으로 유전체 연구부서가 있다. 이곳에서 발표된 극지 생물 유전체 연구 사례로 남극 요각류의 게놈 분석이 있다. 남극 고유 생물인 요각류 *Tigriopus kingsejongensis*의 게놈 분석을 통해 이 종이 1만 2772개의 유전자를 지니고 있고, 이 중 74개가 자연환경에 적응하기 위해 변화된 것이라는 사실을 밝혀냈다.

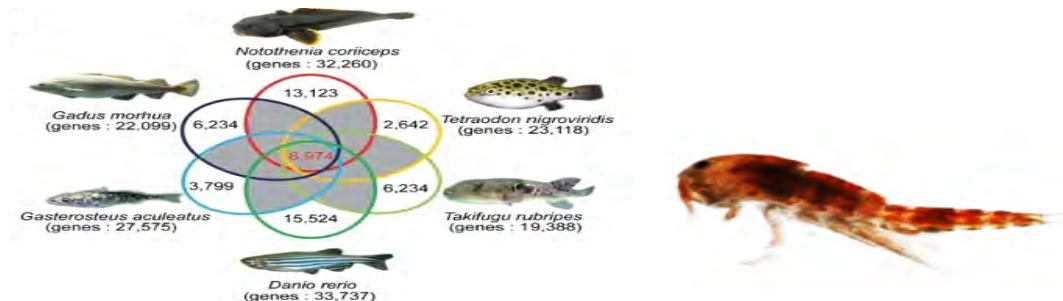


Fig. 1. 극지연구소의 남극 고등생물 유전체 연구와 *Tigriopus kingsejongensis*

-극지 생태계 연구-

극지의 생물은 환경스트레스에 대한 반응이 매우 민감하고 뚜렷하여 기후변화나 오염의 지표가 되는 생물군으로써 연구되고 있다. 대표적으로 인위적 환경변화를 비롯한 주요 생물 분포와 생물량 변동에 대한 장기 관측, 생물 지시자 및 스트레스 마커의 개발은 미래 생태계 변화 예측모델로의 활용되고 있다. 일례로 남극에 서식하는 해양저서무척추동물은 고유종의 비율이 매우 높고 상당한 종다양성을 지니고 있기 때문에 세종기지에서 남극연안 해양생태계를 정기적으로 관측하며 생태계 보존과 변화예측을 위해 연구하고 있다. 생태계의 변화를 연구하기 위해 극지연구소에서는 위성관측부서를 함께 구비하고 있었다. 위성관측 부서에서는 극지 환경을 연구하기 위함도 있지만 짧은 시간 동안 소규모의 인원으로 이루어진 생태계 조사가 한정적이고, 사람이 접근할 수 없는 지역이 존재한다는 점을 극복하기 위해 드론, 항공기, 그리고 인공위성과 같은 무인기의 활용하여 극지 생태계를 관측하고 있었다. 이와 같은 플랫폼에 다양한 기술을 융합하여 원격 탐사를 진행하게 되면 기상 조건의 영향을 상대적으로 덜 받게 되어 시기별로 자료를 축적 가능하다.

-극지생물의 생체물질 확보와 개발-

극한의 환경에 적응한 생물체에서 확보한 대사물질은 일반적인 환경에 서식하는 생물체에서 생산되는 천연화합물보다 뛰어나거나 새로운 생리활성 효과를 갖는다. 따라서 극지생물에게서 얻을 수 있는 저온활성 효소, 항산화, 항당뇨, 항동결, 항노화 물질 등 다양한 유용 생물소재를 이용하여 기존에 보고된 천연생리 활성물질보다 뛰어난 천연물을 지속해서 탐색하고 개발하는 과정이 이루어지고 있었다.

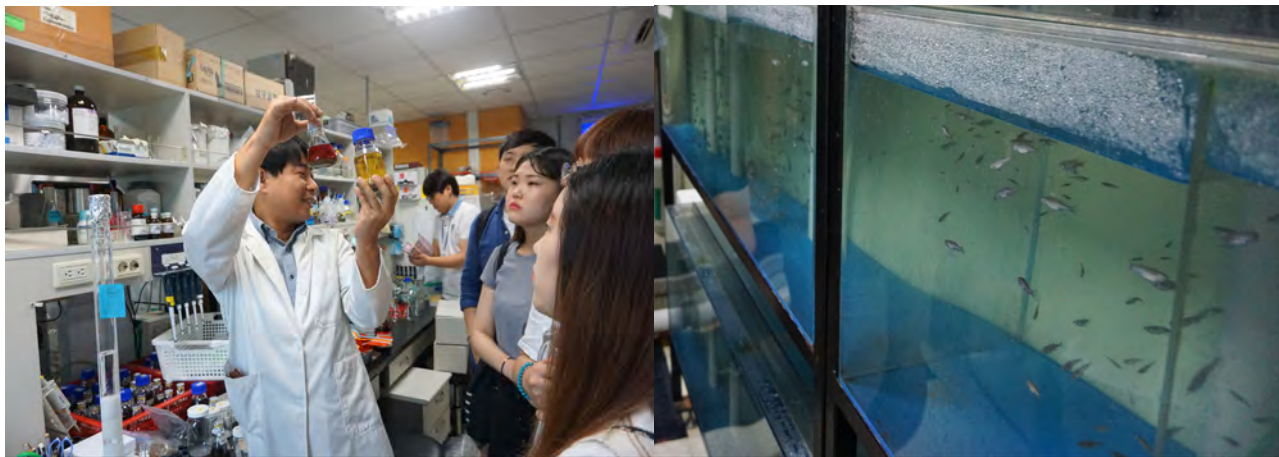


Fig. 2. 천연물연구부서장님의 연구성과 설명과 사육중인 극지 고등생물

-극지생물 자원은행 구축-

극지연구소에서는 지구온난화 등으로 인해 사라져 가고 있는 극지생물의 보호 및 재현을 위해 표본실과 극지생물자원은행을 구축하고 있다. 이곳에서는 아직까지도 미개척 영역이라고 볼 수 있는 극지생물들의 표본을 약품처리 및 박제를 통해 보관 중에 있으며 그 대상은 지의류 등의 박테리아부터 무척추동물 및 조(鳥)류에 이르기까지 매우 다양하다. 특히, 보관중인 지의류 표본을 통해 극지라고 하는 저온 건조한 환경, 강한 자외선이 내리쬐는 환경에서 서식하는 생물들이 보이는 독특한 적응기작을 보유하고 있음을 알 수 있었다. 뿐만 아니라 대사과정에서도 독특한 생체물질을 만들어 내기 때문에 연구소 곳곳에서 그것들과 관련된 유전체 등을 연구하고 있음을 알 수 있었다. 보관중인 조(鳥)류 표본들을 통해서는 이들이 남극의 상위포식자에 해당하며 환경에 민감하게 반응하기 때문에 남극환경 변화의 지표로써 연구할 수 있다는 사실을 배울 수 있었다. 극지 생물 특유의 독특한 생리기작은 유전자와 대사산물을 산업적으로 이용하고자 하는 BT산업에서도 매우 중요한 연구대상이다. 난배양성 미생물 배양법, 식물과 지의류의 조직배양, 메타게놈 라이브러리 제작을 통하여 극지생물 및 유전자원을 확보하고 다양한 장기보존법을 이용하여 자원을 보존하고 있다.



Fig. 3. 표본실에 보관된 조(鳥)류 표본과 미생물은행 견학

이외에도 생명과학과 직접적으로 연관되어 있지는 않지만 극지연구소에서 현재 운용중에 있는 빙하코어 보관실, 상황모니터실 등도 견학해볼 수 있었다. 상황모니터실의 경우 우리나라가 세계 최초로 극지 종합 상황실을 구축하고 운영하고 있는 곳이었다. 이곳을 통해 극지의 과학기지와 실시간으로 연결해 사고예방과 비상상황에 대응할 수 있다고 한다. 이곳을 통해 남극세종과학기지, 북극다산과학기지, 쇄빙연구선 아라온호, 남극장보고 과학기지 등의 주요 인프라를 구축하고 있으며 남극 장보고 과학기지가 운영됨에 따라 다양해진 극지 인프라에 뒤따르는 위험요소가 따라서 증가하고 있다. 때문에 위험요소를 사전 대응하고자 종합상황실을 구축하고 실시간 모니터링을 실시하고 있다고 한다. 빙하코어보관실의 경우, 극지에서 채취한 빙하코어를 보관하고 있는 곳이었다. 채취한 빙하 코어 시료속에는 수많은 초저온 서식 미생물 및 미세조류들이 존재한다. 연구자들의 설명에 의하면 빙하코어의 이산화탄소를 이용한 탄소연대측정으로 해당 시대의 환경을 연구할 수 있으며 코어 속에 갇혀있는 돌말류 등의 미세조류를 연구하여 다양한 물질에 대한 연구가 가능하다고 한다.



Fig. 6.7. 실시간모니터실과 빙하코어보관실 견학 사진

이번 극지연구소의 견학을 통하여 향후 생명과학계열에서의 극지연구와 관련한 연구에 대한 필요성에 대해 생각해 볼 수 있었다. 뿐만 아니라 다양한 과학계열의 연구에 있어서 유동적으로 상호 연관되어 연구가 진행되고 있음을 알 수 있었다. 연구현장을 견학함을 통하여 전공강의시간에 쉽게 접하기 힘든 실질적인 부분들에 대해서도 많은 점을 경험해 볼 수 있었던 견학이었다고 생각한다.



Fig. 8. 극지연구소(KOPRI)견학 단체사진

테라젠이텍스

12 유제원 13 박건원 15 김수진, 이재운 16 문민호, 임은주, 조하영, 표진우
17 김동민, 박민선, 박예진, 이예빈, 이재희, 임지수, 정하영, 홍윤기

2017년 9월 1일, 이영미 교수님의 인솔하에 광고 테크노벨리 차세대융합 기술연구원 내에 위치한 테라젠이텍스-바이오연구소를 견학하였다. 테라젠이텍스는 제약과 바이오로 구분되며 차후 거대한 시너지효과를 창출할 수 있는 역동적 구조를 이루고 있다. 제약 연구소는 개량신약과 신제형 약물을 개발하며 바이오 연구소는 개인 유전체 분석 연구를 모태로 맞춤형 신약 준비를 하고 있다. 이를 위하여 테라젠이텍스는 메드팩토, 리드팜, 테라젠 헬스케어 등의 여러 기업과 그룹계열사를 이루고 있다.

-테라젠이텍스-

테라젠이텍스는 최첨단 게놈해독기술, 최신 생명정보분석기술을 이용한 진단과 신약개발을 추진하는 유전체분석 전문기업이며 세계에서 5번째로 인간 게놈지도를 규명한 업계 최고의 유전자 분석기술을 보유한 기업이다. 2013년 6월에는 세계 최초로 한국인 위암 유전자를 규명하였으며, 2014년 1월에는 세계 최초로 밉크고래게놈지도를 완성하여 네이처 제네틱스 표지를 장식하는 등 기술력을 인정받았다. 테라젠에서 개발한 기술을 통해 전장유전체, 전사체, 후성유전체 등을 해독하는 연구용역 서비스를 제공하고 있으며, 질병의 민감성, 신체적 특성, 약물에 대한 반응 등 개인맞춤유전정보서비스“헬로진”을 제공하고 있다. 국제적으로는 2011년 필리핀 UNIMEX사와의 개인유전체 분석서비스(헬로진) 계약으로 해외 시장에 첫 걸음을 시작하였고, 중국 베이징에 개인 유전체 분석서비스 진출을 위한 합작법인 ‘북경 태래건 이과기 유한공사’를 설립하였다. 테라젠이텍스는 이러한 게놈 분석기술을 기반으로 맞춤의학을 실현하고, 이를 통해 인류복지와 건강을 추구하는 글로벌 선도기업이 되기 위해 끊임없이 노력하고 있는 기업이다.



Figure 1. 테라젠이텍스 기업 전경(좌) 및 기업설명(우)

테라젠이텍스에 견학을 할 당시, 앞서 언급한 테라젠이텍스가 그룹계열사로서 보유하고 있는 자회사에 대한 설명도 함께 들을 수 있었다. 그들은 각각 테라젠이텍스에서 현재 연구중에 있는 분야와 연관지어 다양한 의약학적 서비스를 제공하기 위한 연구를 진행중이었다.

-메드팩토-

메드팩토(MedPacto)는 테라젠(TheragenEtex Inc.)의 자회사 중 하나로써 항암제를 개발하는 기업이다. 이들은 종양학 치료법과 항암제 개발에 주력하여 현재까지의 개발 과정 중인 두 개의 작은 분자를 소개했다. 하나는 TEW-717이라고 불리는 TGF- β 에 의한 신호를 차단하기 위한 ALK-5의 억제제이다. TGF- β 는 성장인자 중 하나인데, 이는 배아가 발달하는 동안 발생하는 세포와 세포 간의 상호 작용을 중재하는 기능을 한다. TGF- β 는 정상세포가 암세포로 변이되는 것을 억제하지만 암세포에 대해서는 종양의 성장과 암

세포의 전이를 돕는 이중적인 기능을 보인다. 이러한 “TGF- β 를 20년간 연구하여 새로운 기전의 후보물질 을 개발한 결과, 글로벌 기술 이전이 눈앞으로 다가왔다”라고 김성진 대표이사가 발표한 것과 같이 현재 미국의 임상2상까지 승인을 받은 것으로 알려졌으며, 전임상 단계에 보유하고 있는 3개의 생산라인을 내년까지 임상1상에 진입시키는 것이 목표라고 한다. 다른 하나는 TEW-0201이라고 불리고, 세포 밖에서 세포 핵으로 화학 신호를 전송하는데 도움을 주는 단백질의 합성을 돕도록 유도하여 세포분열을 조절하거나 암세포형성을 저해하도록 유도하는 기능을 한다. 이들이 개발하고 있는 의약품은 현재 판매 유통되고 있는 vemurafenib보다 우수한 효능을 보이며 안전성 또한 더 높은 것으로 알려졌다. 이는 대장암, 갑상선 암, 폐암, 자궁암 등 여러 암의 치료제로 발전할 가능성이 있다. 더불어 메드팩토는 혈관형성 단백질 또한 개발 중에 있으며 이를 이용하여 당뇨병에 의해 생긴 궤양이나 신경 장애를 치료하기 위한 발판을 마련 중 이라고 하였다.

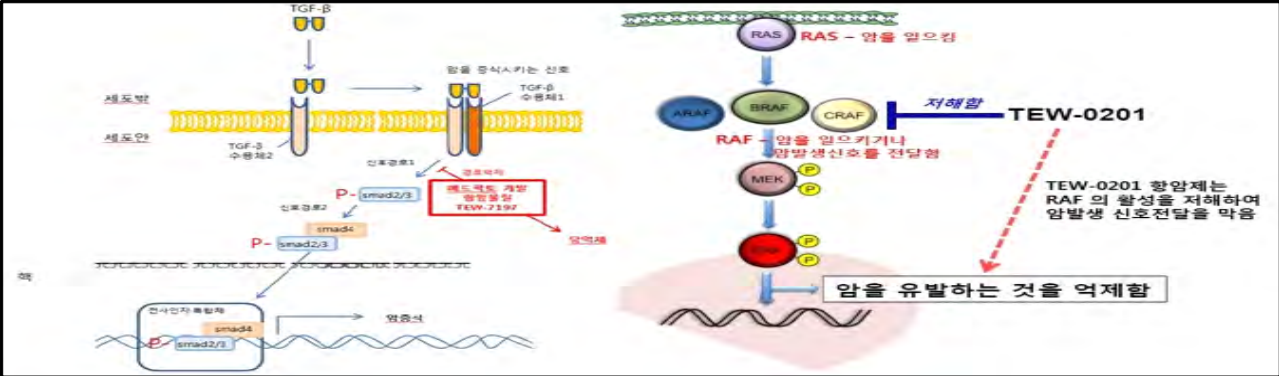


Figure 2. 메드팩토의 의약품 활성화경로 모식도

-지놈케어-

지놈케어는 개인의 유전정보를 활용한 분석 서비스를 제공하고 있으며 이를 위해 NGS(Next Generation Sequencing)기술을 이용하고 있다고 한다. NGS로 인해 인해 염기서열 분석 시간에 있어서 비약적인 발전을 이루었고, 적용 가능한 영역 또한 단순한 염기서열 분석에서 질병의 진단 및 예측, 약물 유전체, 유전자 치료,식품 등 다양한 분야로 확장되고 있다고 한다. 지놈케어는 세계적 수준의 유전체 분석 능력과 바이오인포매틱스(Bio-informatics) 기술을 융합하여 예비 부모들을 대상으로 다양한 유전 정보를 제공하고 있으며 대표적인 서비스가 제노맘이다.



Figure 3. 지놈케어의 대표적 서비스인 제노맘과 제노브로의 상표

제노맘은 점차 결혼 시기가 늦어지는 현상, 각종 환경오염, 스트레스 등으로 인해 기형아 출산의 비율이 증가하고 있고 있음에 따라 만들어진 의료서비스로 제노맘은 기형아를 출산 전에 확인하는 기술이다. 기존의 기형아 검사는 태아의 염색체 이상을 찾을 수 있는 민감도가 상대적으로 낮았다. 하지만 최근에는 제노맘에서 제공하는 바와 같이 NGS 기술을 이용하여 빠르게 유전체를 검사할 수 있게 됨에 따라 임신부의 산전검사 부담을 경감시킬 수 있는 방향으로 선별검사기술이 발전하고 있다고 한다. 제노브로의 경우, 제노브로는 국내 최초 NGS 기반의 PGS 검사(착상 전 검사)로 정상인 배아를 선별해주는 검사이다. 제노브로를 진행하면 가장 좋은 배아를 선별 하여 이식할 수 있기 때문에 착상 및 임신 성공률이 증가함은 물론 이고, 염색체 이상이 있는 배아를 배제함에 따라 유산율도 감소시킬 수 있다고 한다.

이처럼 현재 NGS(차세대 염기서열 분석기술)를 기반으로 다양한 의료서비스를 제공하고 있는 기업에을 견학함으로써 지금까지 염기서열분석기술을 생물의 종을 판단하거나 유전체에 영향을 줄 수 있는 화학약물의 영향력 확인과 같은 학문적인 방법으로만 이용하다가 실제로 사회에 존재하는 서비스에 어떤 방식으로 적용되는지에 대해 배울 수 있었다. 비록 많은 연구실을 구체적으로 견학하지는 못하였으나 사회로의 진출을 준비하는 과정에 있어서 큰 도움이 되었다고 생각한다.



Figure 4. 테라젠이텍스 연구실 전경



Figure 5. 견학 단체사진

연구 보고

초본계 식물로부터 향산화물질을 효과적으로 추출하기
위한 반응조건의 탐색

탄닌 추출물과 녹조 저감에 대한 고찰

DNA barcoding 기술을 통한 생물 종 판별

*Galactomyces reessii*의 최적 생장조건과 바이오산업
분야로의 응용가능성 연구

Busulfan 투여 생쥐에서 생식기관에 대한 vitamin E의 영향

Investigation of Reaction Conditions for Effective Extraction of Antioxidant from Herbaceous Biomass

Byeong Gang Hwang, Eo Jin Sol Kim, Young Been Kim, Jun Woo Heo, Yoon Ki Hong, Jin Ho Ham, Kang Hyun Lee and Hah Young Yoo

Department of Biotechnology, Sangmyung University, 20, Hongjimun 2-Gil, Jongno-Gu, Seoul 03016, Republic of Korea

Abstract

Herbaceous wild grasses such as *Houttuynia cordata* and *Artemisia campestris* have been known for their pharmacological effects such as analgesic, anti-inflammatory, anti-cancer, and hemostatic effects and are being used in various fields such as foods, pharmaceuticals and cosmetics. In this study, the reaction conditions were investigated to effectively extract antioxidant from three types of plant resources (*Houttuynia cordata*, *Artemisia campestris* and cacao nips). Each sample was extracted at four different reaction temperatures (25, 50, 75, and 100°C) for 1 hour using different concentrations of ethanol (0, 25, 50, 75, and 100%), and total phenol content and DPPH radical scavenging activity were analyzed and evaluated to determine the optimal conditions for extraction. As a result, the total phenol content of *H. cordata*, *A. campestris* and cacao nips was maximized under the extraction conditions of 100°C and 50% ethanol, and the content was found to be 3.002 mg/ml, 4.917 mg/ml and 4.852 mg/ml, respectively. It is known that IC_{50} , which shows DPPH radical scavenging activity, has a higher antioxidant efficacy as the lower the value. The results shows that the lowest IC_{50} of *H. cordata*, *A. campestris* and cacao nips was achieved about 0.734 mg/ml (100°C, 75% ethanol), 0.901 mg/ml (50°C, 75% ethanol), and 0.819 mg/ml respectively. Therefore, the bioresources used in this experiment showed excellent antioxidant efficacy and are belie

Introduction



Scientific name	<i>Houttuynia cordata</i>
Kingdom	Plantae
Phylum	Angiospermae
Class	Dicotyledons
Order	Piperiales
Distribution area	Korea, Japan, China, Himalayas, Java
Size	20~50 cm



Scientific name	<i>Artemisia campestris</i>
Kingdom	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Order	Asterales
Distribution area	Eurasia, North America
Size	150cm



Scientific name	<i>Theobroma cacao</i>
Kingdom	Plantae
Phylum	Magnoliophyta
Class	Magnoliopsida
Order	Malvales
Distribution area	Latin America
Size	4-8m

Results and Discussion

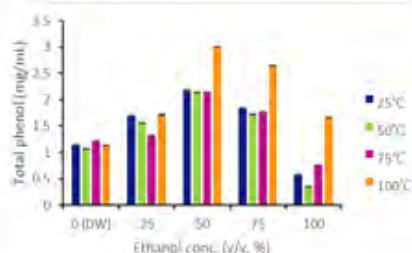


Fig. 1. Total phenol of *Houttuynia cordata* extract according to extraction temperature and ethanol concentration

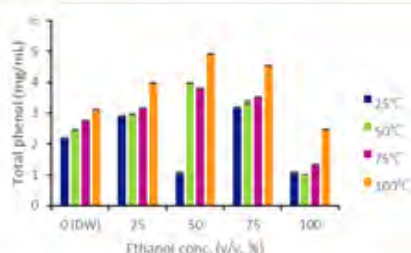


Fig. 2. Total phenol of *Artemisia campestris* extract according to extraction temperature and ethanol concentration

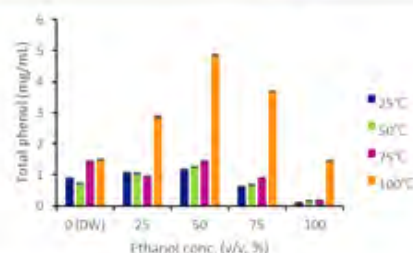


Fig. 3. Total phenol of cacao nips extract according to extraction temperature and ethanol concentration

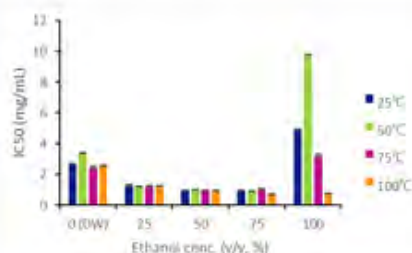


Fig. 4. IC_{50} of *Houttuynia cordata* extract according to extraction temperature and ethanol concentration

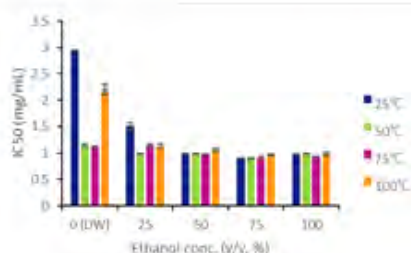


Fig. 5. IC_{50} of *Artemisia campestris* extract according to extraction temperature and ethanol concentration

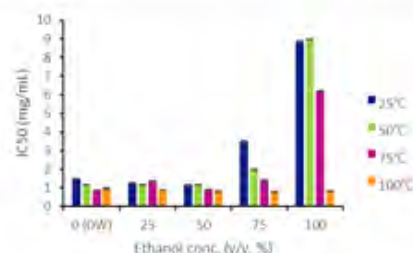


Fig. 6. IC_{50} of cacao nips extract according to extraction temperature and ethanol concentration

Table 1. Optimum conditions for antioxidant extraction from *Houttuynia cordata*

	Ethanol concentration(%)	temperature(°C)
Phenol	50~75	100
IC_{50}	25~75	25~100
Determined condition	50~75	100

Table 2. Optimum conditions for antioxidant extraction from *Artemisia campestris*

	Ethanol concentration(%)	temperature(°C)
Phenol	50~75	100
IC_{50}	50~100	25~100
Determined condition	50~75	100

Table 3. Optimum conditions for antioxidant extraction from cacao nips

	Ethanol concentration(%)	temperature(°C)
Phenol	50	100
IC_{50}	0~50	25~100
Determined condition	50	100

References

1. Y.J. Lee, D.J. Shin, Y.S. Chang and J.J. Shin, Antioxidative Effect of Some Edible Plant Solvent Extracts with Various Synergists (1996) Song Shin Technology Development Institute, 683-688
2. H. R. Jeong, J. H. Kwak, J. H. Kim, G. S. Choi, C. H. Jeong, H. J. Heo, Antioxidant and Neuronal Cell Protective Effects of an Extract of *Houttuynia cordata* Thunb (a Culinary Herb)(2010), *Korean J. Food Preserv.* 17(5), 720
3. J. Kim, B. S. Ryu, J. H. Shin, and H. S. Kim, In vitro and ex vivo supplementation of *Houttuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice(2005), *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 34, 167

학부생 연구 논문

초본계 식물로부터 항산화물질을 효과적으로
추출하기 위한 반응조건의 탐색

Investigation of Reaction Conditions for
Effective Extraction of Antioxidant from
Herbaceous Biomass

2018. 11.

상명대학교 융합공과대학
생명화학공학부 생명공학과
황병강, 홍윤기, 김어진솔, 김영빈, 허준우, 함진호
연구지도자: 이강현¹⁾, 유하영²⁾

1) 상명대학교 일반대학원 생물학과 미생물공학연구실

2) 상명대학교 융합공과대학 생명화학공학부 생명공학과 미생물공학연구실 교수

Abstract

Herbaceous wild grasses such as *Houttuynia cordata* and *Artemisia campestris* have been known for their pharmacological effects such as analgesic, anti-inflammatory, anti-cancer, and hemostatic effects and are being used in various fields such as foods, pharmaceuticals and cosmetics. In this study, the reaction conditions were investigated to effectively extract antioxidant from three types of plant resources (*Houttuynia cordata*, *Artemisia campestris* and cacao nips). Each sample was extracted at four different reaction temperatures (25, 50, 75, and 100°C) for 1 hour using different concentrations of ethanol (0, 25, 50, 75, and 100%), and total phenol content and DPPH radical scavenging activity were analyzed and evaluated to determine the optimal conditions for extraction. As a result, the total phenol content of *H. cordata*, *A. campestris* and cacao nips was maximized under the extraction conditions of 100°C and 50% ethanol, and the content was found to be 3.002 mg/ml, 4.917 mg/ml and 4.852 mg/ml, respectively. It is known that IC_{50} , which shows DPPH radical scavenging activity, has a higher antioxidant efficacy as the lower the value. The results shows that the lowest IC_{50} of *H. cordata*, *A. campestris* and cacao nips was achieved about 0.734 mg/ml (100°C, 75% ethanol), 0.901 mg/ml (50°C, 75% ethanol), and 0.819 mg/ml respectively. Therefore, the bioresources used in this experiment showed excellent antioxidant efficacy and are believed to be applicable as functional materials for cosmetics in near future.

Key Words : *Houttuynia cordata*, *Artemisia campestris*, cacao nips, total phenol content, DPPH radical scavenging activity

국문 초록

예로부터 어성초, 인진쑥과 같은 초본계 야생초들은 진통, 항염, 항암, 지혈작용 등의 약리작용이 알려져 있어 식품, 제약, 화장품 등 다양한 분야에 활용되고 있다. 이번 연구에서는 세 종류 (어성초, 인진쑥, 카카오닙스)의 식물 자원들로부터 항산화 물질을 효과적으로 추출하기 위한 반응 조건을 조사하였다. 각 시료들의 추출은 각각 다른 농도의 에탄올(0, 25, 50, 75, 100%)을 이용하여 4가지의 반응온도 (25, 50, 75, 100°C)에서 1시간 동안 반응하였고, 총 페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능을 분석 및 평가하여 최적 추출 조건을 결정하였다. 그 결과 총 페놀 함량은 어성초, 인진쑥, 카카오닙스 모두 100°C, 50% 에탄올 조건에서 최대로 추출되었고 그 함량은 각각 3.002mg/ml, 4.917mg/ml, 4.852mg/ml 로 조사되었다. DPPH 라디칼 소거능을 나타내는 IC₅₀은 그 수치가 낮을수록 항산화 효과가 높은 것으로 알려져 있다. 실험결과 어성초, 인진쑥, 카카오닙스의 가장 낮은 IC₅₀값은 각각 0.734mg/ml (100°C, 75% 에탄올), 0.901mg/ml (50°C, 75% 에탄올), 0.819mg/ml (100°C, 75% 에탄올)로 분석되었다. 따라서 이번 실험에 사용한 식물 자원들은 우수한 항산화 효능을 나타냈기에 향후 기능성 화장품의 소재로 응용이 가능할 것으로 생각된다.

키워드 : 어성초, 인진쑥, 카카오닙스, 총 페놀 함량, DPPH 라디칼 소거능

목차

I. 서론	45
II. 실험 방법	46
2.1. 실험 재료 및 추출물의 제조	46
2.2. 실험 방법	46
2.2.1. 총 페놀 함량 측정	46
2.2.2. DPPH 라디칼 소거능	46
III. 실험 결과	47
3.1. 어성초 총 페놀 함량 검사, DPPH 라디칼 소거능 검사	47
3.2. 인진쑥 총 페놀 함량 검사, DPPH 라디칼 소거능 검사	50
3.3. 카카오닙스 총 페놀 함량 검사, DPPH 라디칼 소거능 검사	52
IV. 결론	56
참고문헌	57

I. 서론

피부는 인체를 보호하는 제일 외각의 조직으로, 체내의 근육들과 피부를 감싸고 여러 가지 생명활동이 일어나는 중요한 기관이다. 피부는 자외선이나 미생물, 공해와 같은 외부자극으로부터 신체 내부를 보호하는 데 있어 중요한 역할을 하게 된다. 피부는 자체적으로 보호기능을 가지기는 하지만, 지속적인 스트레스 및 외부로부터의 자극에 반복하여 노출될 경우 1차적으로 가장 손상 받기 쉬운 부분이기도 하다[1]. 외부 스트레스 요인 중 대표적인 것이 바로 활성산소종(Reactive oxygen species, ROS)이다. 활성산소종(ROS)에는 라디칼종, 비라디칼종, 그리고 ROS가 생체 내 분자들과의 반응으로 생성되는 Peroxyl radical ($\text{ROO}\cdot$), Alkoxy radical($\text{RO}\cdot$) 등이 있다. 이런 ROS는 피부항산화제의 파괴, 지질 과산화의 개시, 단백질의 산화 등 피부 노화를 가속시킨다[2,3]. 이러한 피부 손상을 막기 위해 피부에는 Superoxide dismutase(SOD), Catalase 및 Glutathione peroxidase(GSHPx)와 같은 효소적 항산화제와 비타민C, E와 같은 비효소적 항산화제로 이루어진 피부 항산화 방어계가 있다. 그러나 자외선이 너무 많게 되면 방어계가 압도당할 수 있고 이로 인하여 ROS가 피부의 항산화 방어시스템을 붕괴시킨다. 따라서 피부 노화를 억제하기 위해서는 피부에서 생성되는 과잉의 활성산소 생성 억제 및 생성된 활성산소의 효율적인 제거를 위한 적절한 항산화제의 개발과 보충이 필요하다[4].

어성초(*Houttuynia cordata*)는 삼백초과(Saururaceae)에 속하는 다년생 초본으로, 우리나라를 비롯하여 중국, 일본, 베트남 등에 자생하며 특유의 생선 비린내가 난다고 하여 이름이 붙여졌다[8]. 전통약용 식물로서 광범위한 분야에서 효능을 나타내고 있는 어성초는 항산화, 항균, 항알러지, 면역력 증진 등의 효과가 보고된 바 있다[8-13].

쑥(*Artemisia princeps* Pampanini)은 국화과(Compositae)의 쑥속(*Artemisia*)에 속하는 번식력이 강한 다년생 초본으로 한국이나 중국, 일본 등 아시아지역과 유럽지역 등에서 널리 분포되어 있으며, 국내에서는 약 300여 종이 자생하는 것으로 알려져 있다. 쑥의 잎과 열매 등은 식용 및 약용으로 이용되어 왔으며 민간요법에서는 쑥의 전초를 말려 진정, 경련, 마비 및 전신강직 등의 치료와 복통, 토혈, 만성간염, 식욕부진 및 만성 위장염 등의 한방약재로 사용하여 왔다[2,8]. 현재 국내에서 인진쑥, 약쑥, 참쑥, 산쑥 등을 소재로 하여 다양한 연구가 이루어지고 있는데, 이 중 인진쑥(*Artemisia capillaris* Thunberg)은 항산화, 항암, 체내 지질대사 촉진 및 간독성 저하효과 등이 보고되어있다[7].

카카오닙스(Cacaonips)는 발효시키지 않거나 약간만 발효시킨 카카오 콩을 산성, 알칼리성, 알콜 등을 포함하는 뜨거운 물 혹은 수증기에 의해 가열시켜서 얻어진다. 이때 함유된 효소들은 불활성화 되거나 부착된 미생물은 멸균된다. 카카오닙스는 미용효과, 노화방지, 성인병 예방 등의 효과를 가지는 폴리페놀(Polyphenol)과 플라보노이드(Flavonoid) 성분을 다량으로 포함하고 있다. 그 외에도 페닐에틸아민(Phenethylamine), 식이섬유, 미네랄 등을 포함한다[5-6].

본 연구에서는 초본계 식물로부터 항산화물질을 효과적으로 추출하기 위해서 여러 반응 조건을 탐색하였다. 어성초, 인진쑥, 카카오닙스 세 종류 시료들의 가장 효과적인 항산화물질 추출 조건을 결정하기 위해 각각 다른 농도의 ethanol과 4 가지의 반응온도 (25, 50, 75, 100°C)에서 1시간 동안 반응하였고, 분리된 상등액의 페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거능을 분석 및 평가하여 최적 추출 조건을 결정하였다.

II. 실험 방법

2.1. 실험 재료 및 추출물의 제조

초본계 바이오배스로 어성초(*Houttuynia cordata*), 인진쑥(*Artemisia campestris*), 카카오닙스(Cacao nibs)를 준비하였다. 먼저 어성초와 인진쑥은 온라인을 통해 건조과정을 거친 분말가루를 직접 구입하여 재료로 사용하였다. 카카오닙스는 대형마트에서 씨앗을 직접 구매하여 분쇄기계를 이용하여 분말로 만들어 재료로 사용하였다.

각각의 시료들을 용질과 용매의 비율을 1:10으로 맞춰준다. 우선 어성초의 분말가루를 1 g 씩 15 ml Screw capped tube에 넣는다. 그 다음으로 용매를 0, 25, 50, 75, 100% Ethanol 농도에 맞게 조절하여 10 ml 씩 넣어준다. 그리고 25, 50, 75, 100°C에 따라 1 시간 동안 반응시켜서 시료로 사용하였다. 위와 같은 방법으로 인진쑥, 카카오닙스도 실험에 사용할 시료를 추출하였다. 총 페놀 함량측정과 DPPH 라디칼 소거능에 쓰일 시료를 만들기 위해 추출한 시료들을 D.W를 이용하여 희석배수를 x(5,10)배 정도의 희석한 시료도 만들었다. 대조군(control)으로 사용하는 시료 vitamin C는 500 배 희석하였다.

2.2. 실험 방법

2.2.1. 총 페놀 함량 측정

Folin-Denis 방법에 따라 e-tube에 시료 추출물 10 μ l D.W 790 μ l 그리고 Folin-ciocalteu 50 μ l을 차례대로 넣어준 다음 약 37°C에서 1 시간 동안 반응 시킨 후 765 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 페놀 함량은 표준물질인 Galic acid를 이용한 Standard curve를 통해서 계산하였다.

2.2.2. DPPH 라디칼 소거능

DPPH 라디칼 소거능은 1,1-diphenyl-2-picrylhy-drazyl(DPPH)에 의한 전자를 공여해주는 효과로 측정하였다. E-tube에 시료 추출물을 500 μ l 과 DPPH 500 μ l을 순서대로 넣어준 다음 상온에서 약 30 초간 Plate shaker를 통해 혼합시켜준다. 이후 37°C에서 1시간 동안 반응 시킨 후 분광광도계 517 nm 파장에서 흡광도를 측정하였다. DPPH 라디칼 소거능의 Free radical은 (1-시료의 흡광도/대조구의 흡광도) $\times$ 100으로 나타내었다.

III. 실험 결과

3.1. 어성초 총 페놀 함량 검사, DPPH 라디칼 소거능 검사

25°C에서 추출 했을 때 총 페놀 함량은 0% ethanol (DW)에서 1.14 mg/ml, 25% ethanol에서 1.69 mg/ml, 50% ethanol에서 2.18 mg/ml, 75% ethanol에서 1.84 mg/ml, 100% ethanol에서 0.59 mg/ml 만큼 추출되었다. IC₅₀값은 0% ethanol(DW)에서 2.69 mg/ml, 25% ethanol에서 1.30 mg/ml, 50% ethanol에서 0.98 mg/ml, 75% ethanol에서 0.94 mg/ml, 100% ethanol에서 4.97 mg/ml만큼 추출되었다.

총 페놀 함량은 50% ethanol 농도에서 2.18 mg/ml로 가장 높았고 IC₅₀의 경우 0.94 mg/ml으로 75% ethanol 농도에서 가장 낮았다.

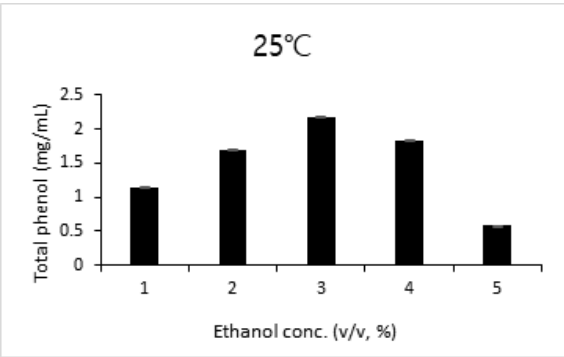


Fig. 1. Total phenol of *Houttuynia cordata* extracted at 25°C

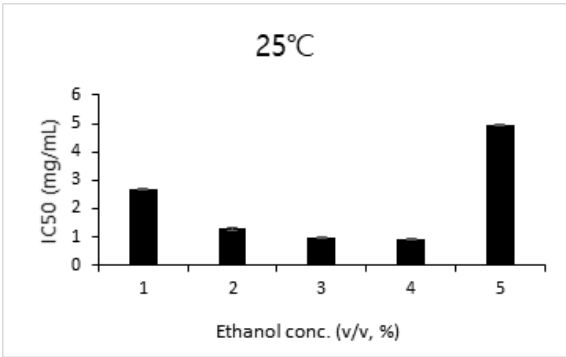


Fig. 2. IC₅₀ of *Houttuynia cordata* extracted at 25°C

Table 1. Total phenol and IC₅₀ of *Houttuynia cordata* extracted at 25°C

Ethanol con. (v/v, %)	Total phenol (mg/mL)		IC ₅₀ (mg/mL)	
	AVE	STDEV	AVE	STDEV
0 (DW)	1.141	0.002	2.694	0.010
25	1.693	0.004	1.300	0.052
50	2.180	0.012	0.980	0.005
75	1.840	0.005	0.941	0.009
100	0.586	0.000	4.971	0.003

50°C에서 추출 했을 때 총 페놀 함량은 0% ethanol (DW)에서 1.08 mg/ml, 25% ethanol에서 1.56 mg/ml, 50% ethanol에서 2.14 mg/ml, 75% ethanol에서 1.73 mg/ml, 100% ethanol에서 0.37 mg/ml 만큼 추출되었다. IC₅₀값은 0% ethanol(DW)에서 3.39 mg/ml, 25% ethanol에서 1.23 mg/ml, 50% ethanol에서 1.03 mg/ml, 75% ethanol에서 0.91 mg/ml, 100% ethanol에서 9.81 mg/ml 만큼 추출되었다.

총 페놀 함량은 50% ethanol 농도에서 2.14 mg/ml로 가장 높았고 IC₅₀의 경우 0.91 mg/ml으로 75% ethanol 농도에서 가장 낮았다.

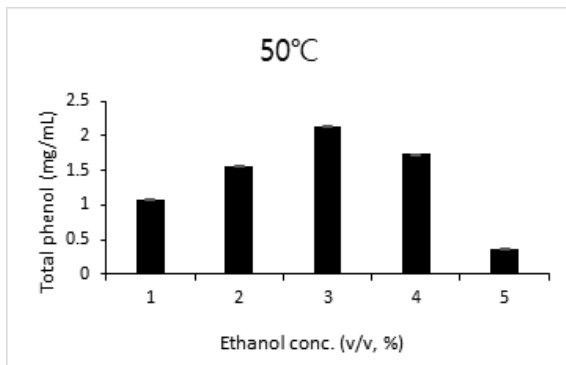


Fig. 3. Total phenol of *Houttuynia cordata* extracted at 50°C

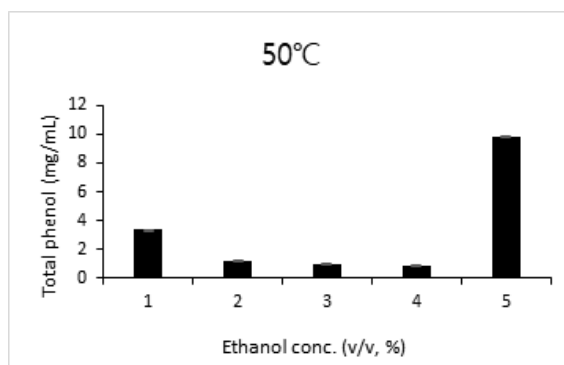


Fig. 4. IC₅₀ of *Houttuynia cordata* extracted at 50°C

Table 2. Total phenol and IC₅₀ of *Houttuynia cordata* extracted at 50°C

Ethanol con. (v/v, %)	Total phenol (mg/mL)		IC ₅₀ (mg/mL)	
	AVE	STDEV	AVE	STDEV
0 (DW)	1.077	0.002	3.394	0.008
25	1.564	0.001	1.229	0.006
50	2.138	0.001	1.026	0.001
75	1.734	0.001	0.914	0.007
100	0.365	0.002	9.805	0.018

75°C에서 추출했을 때 총 페놀 함량은 0% ethanol에서 1.23 mg/ml, 25% ethanol에서 1.33 mg/ml, 50% ethanol에서 2.14 mg/ml, 75% ethanol에서 1.78 mg/ml, 100% ethanol에서 0.76 mg/ml 만큼 추출되었다. IC₅₀값은 0% ethanol(DW)에서 2.45 mg/ml, 25% ethanol에서 1.24 mg/ml, 50% ethanol에서 0.97 mg/ml, 75% ethanol에서 1.02 mg/ml, 100% ethanol에서 3.21 mg/ml 만큼 추출되었다.

총 페놀 함량은 50% ethanol 농도에서 2.14 mg/ml로 가장 높았고 IC₅₀의 경우 0.97 mg/ml으로 50% ethanol 농도에서 가장 낮았다.

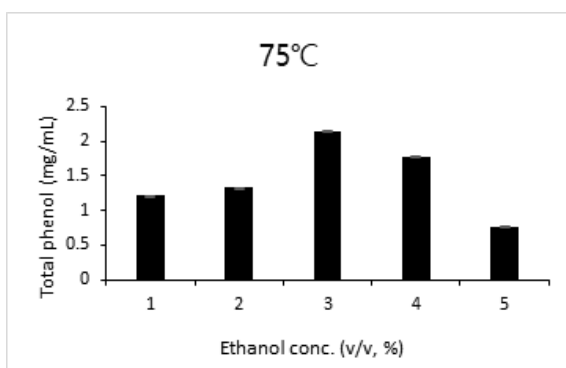


Fig. 5. Total phenol of *Houttuynia cordata* extracted at 75°C

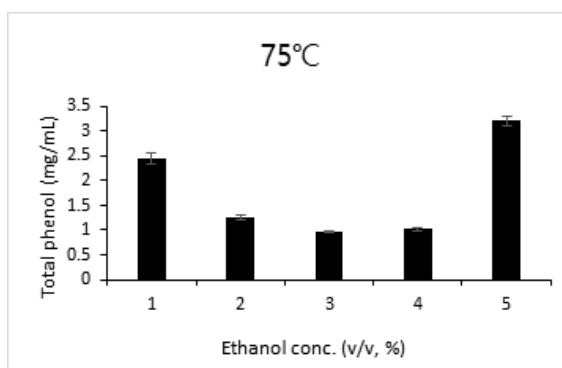


Fig. 6. IC₅₀ of *Houttuynia cordata* extracted at 75°C

Table 3. Total phenol and IC₅₀ of *Houttuynia cordata* extracted at 75°C

Ethanol con. (v/v, %)	Total phenol (mg/mL)		IC ₅₀ (mg/mL)	
	AVE	STDEV	AVE	STDEV
0 (DW)	1.215	0.004	2.451	0.121
25	1.330	0.003	1.242	0.049
50	2.138	0.002	0.972	0.017
75	1.775	0.002	1.020	0.032
100	0.756	0.004	3.209	0.094

100°C에서 추출했을 때 총 페놀 함량은 0% ethanol에서 1.13 mg/ml, 25% ethanol에서 1.71 mg/ml, 50% ethanol에서 3.00 mg/ml, 75% ethanol에서 2.65 mg/ml, 100% ethanol에서 1.67 mg/ml 만큼 추출되었다. IC₅₀값은 0% ethanol(DW)에서 2.59 mg/ml, 25% ethanol에서 1.29 mg/ml, 50% ethanol에서 0.96 mg/ml, 75% ethanol에서 0.73 mg/ml, 100% ethanol에서 0.79 mg/ml 만큼 추출되었다.

총 페놀 함량은 50% ethanol 농도에서 3.00 mg/ml로 가장 높았고 IC₅₀의 경우 0.73 mg/ml으로 75% ethanol 농도(DW)에서 가장 낮았다.

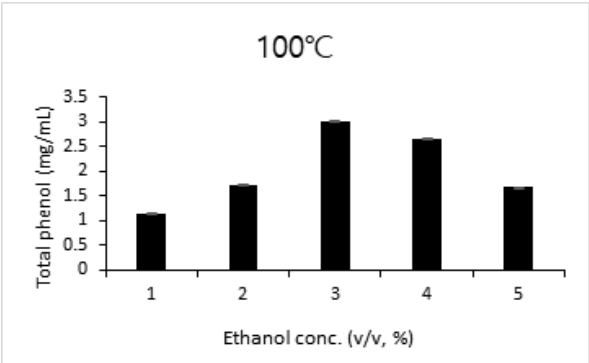


Fig. 7. Total phenol of *Houttuynia cordata* extracted at 100°C

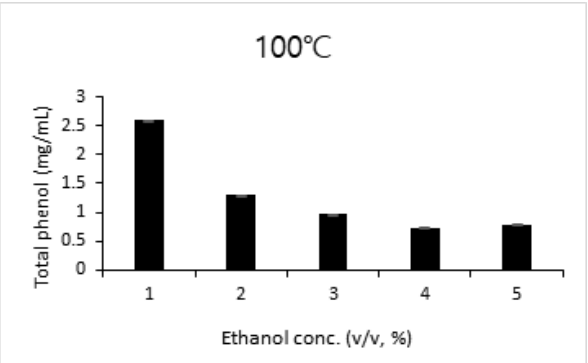


Fig. 8. IC₅₀ of *Houttuynia cordata* extracted at 100°C

Table 4. Total phenol and IC₅₀ of *Houttuynia cordata* extracted at 100°C

Ethanol con. (v/v, %)	Total phenol (mg/mL)		IC ₅₀ (mg/mL)	
	AVE	STDEV	AVE	STDEV
0 (DW)	1.132	0.002	2.595	0.001
25	1.711	0.015	1.297	0.004
50	3.002	0.010	0.967	0.003
75	2.653	0.001	0.733	0.002
100	1.670	0.002	0.791	0.001

총 페놀 함량은 모두 0% ethanol(DW)에서 50% ethanol까지 증가하고 50% ethanol부터 100% ethanol까지 감소한다. 모든 실험군을 통틀어서 100°C, 50% ethanol에서 3.00 mg/ml로 가장 큰 추출량을 보인다.

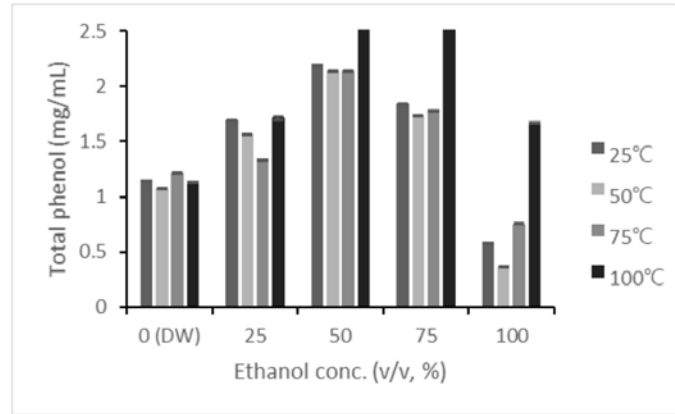


Fig. 9. Total phenol of *Houttuynia cordata* extract according to extraction temperature and ethanol concentration

모든 추출 조건을 고려하여 IC₅₀값을 비교했을 때 100°C, 75% ethanol에서 0.73 mg/ml로 가장 낮은 값을 가진다. 대조군으로 설정했던 vitamin C의 IC₅₀값은 2.04 mg/ml 이었고, 이보다 낮은 수치가 나온 추출 조건은 25°C에서 25%, 50%, 75% ethanol, 50°C에서 25%, 50%, 75% ethanol, 75°C에서 25%, 50%, 75% ethanol, 100°C에서 25%, 75%, 100% ethanol 이다.

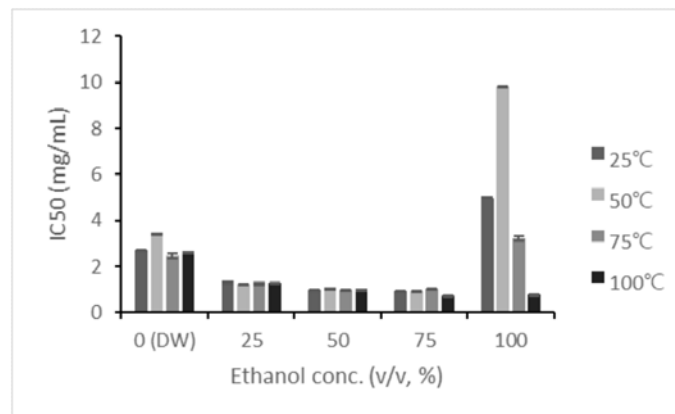


Fig. 10. IC₅₀ of *Houttuynia cordata* extract according to extraction temperature and ethanol concentration

3.2. 인진쑥의 총 페놀 함량 검사, DPPH 라디칼 소거능 검사

인진쑥의 총 페놀함량을 측정한 결과 Fig. 11과 같이 50% ethanol과 100°C에서 페놀함량이 가장 높은 4.98 mg/ml로 조사되었다. 반면에 50% ethanol과 25°C 조건에서 1.06 mg/ml; 100% ethanol과 25°C 및 50°C 조건에서 각각 1.101 mg/ml, 1.013 mg/ml 로 가장 낮은 총 페놀함량이 검출되었다. 총 페놀함량 가장 높은 값과 가장 작은 값의 차이를 비교해보면 약 4.91 배 정도 차이를 확인할 수 있다. 인진쑥의 총 페놀함량은 대부분 같은 ethanol 조건에서 온도에 따라 낮은 온도에서 총 페놀함량 값이 감소했다가 온도가 점차 올라갈수록 총 페놀함량 값이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 반면에 50% ethanol 조건에서는 50°C에서 총 페놀함량이 75°C 보다 0.17 mg/ml 더 높은 것을 확인할 수 있다. 따라서 반응온도가 시료의 추출에 민감하게 영향을 준 것으로 판단된다. 마찬가지로 100% ethanol과 25°C 온도조건에서 총 페놀함량이 50°C보다 0.09 mg/ml 더 높은 것을 확인할 수 있었다.

인진쑥의 DPPH 라디칼 소거능을 측정한 결과 Fig. 12와 같이 50%, 75%, 100% ethanol 농도에 서는 모든 온도에서 IC₅₀값이 비슷했으며 약 1.2 mg/ml 이하로 검출되었다. 또한 0% ethanol과 50°C, 75°C 온도조건 그리고 25% ethanol과 25°C, 50°C, 100°C 온도 조건에서도 IC₅₀값이 약 1.2 mg/ml 이하로 낮게 조사되었다. 이중에서 가장 낮은 IC₅₀값은 75% ethanol과 50°C에서 0.90 mg/ml로 측정되었다. 반면에 0% ethanol과 25°C는 IC₅₀값이 2.94 mg/ml로 가장 높게 측정되었 다. IC₅₀값이 가장 높은 값과 가장 작은 값의 차이를 비교해보면 약 3.22 배 정도 차이를 확인할 수 있다. IC₅₀값은 0% ethanol, 즉 물을 이용하였을 때 25°C 와 100°C 반응 온도조건에서 매우 높은 수치를 나타내었는데, 이는 항산화물질 함량이 가장 낮게 추출 되었거나 반응조건에 의해 항산화물 질이 파괴된 것으로 추측할 수 있다.

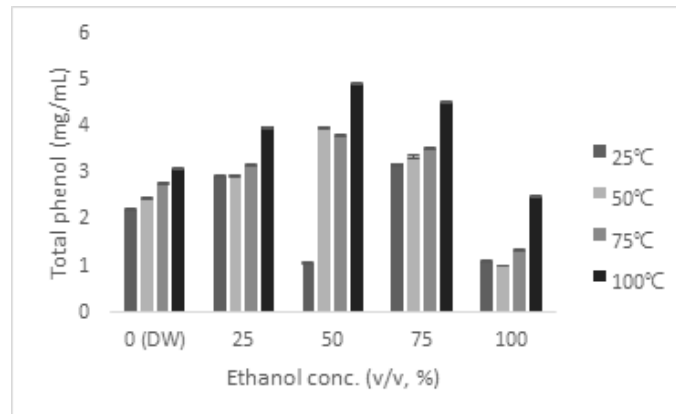


Fig. 11. Total phenol of *Artemisia campestris* extract according to extraction temperature and ethanol concentration

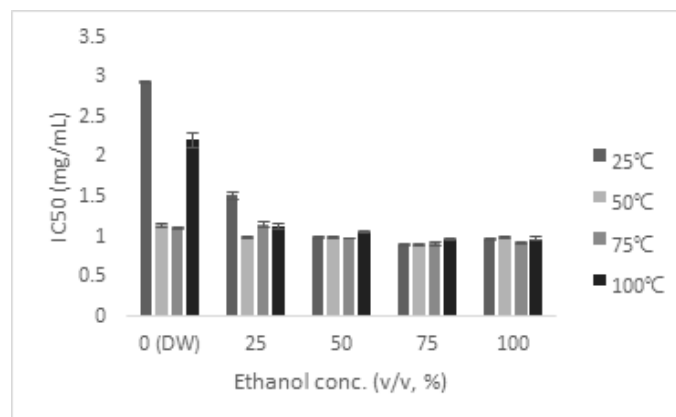


Fig. 12. IC₅₀ of *Artemisia campestris* extract according to extraction temperature and ethanol concentration

인진쑥의 항산화 성분을 추출하기 위한 최적조건을 찾기 위해서는 Fig. 11과 Fig. 12를 통해 비교 분석하여 총 페놀함량이 높고 DPPH 라디칼 소거능인 IC₅₀값이 낮은 조건을 만족하는 반응 변수를 설정하면 된다. 따라서 ethanol 농도 50% 또는 75%; 반응온도 100°C에서 위 조건을 만족하는 것 을 확인할 수 있으며 최적조건이라고 결론내릴 수 있다. 최적 조건인 50% ethanol과 100°C에서 추 출된 성분을 HPLC를 통해 분석한 결과 Galic acid가 가장 높은 함량을 차지함과 동시에 페놀화합 물들이 미량 존재한다고 밝혀졌다.

3.3. 카카오닙스 총 페놀 함량 검사, DPPH 라디칼 소거능 검사

25°C에서 추출 했을 때 총 페놀 함량은 0% ethanol에서 0.91 mg/ml, 25% ethanol에서 1.09 mg/ml, 50% ethanol에서 1.19 mg/ml, 75% ethanol에서 0.63 mg/ml, 100% ethanol에서 0.11 mg/ml 만큼 추출되었다. IC₅₀값은 0% ethanol에서 1.51 mg/ml, 25% ethanol에서 1.28 mg/ml, 50% ethanol에서 1.178 mg/ml, 75% ethanol에서 3.51 mg/ml, 100% ethanol에서 8.85 mg/ml만큼 추출되었다.

총 페놀 함량은 50% ethanol 농도에서 1.189 mg/ml로 가장 높았고 IC₅₀의 경우 1.18 mg/ml로 50% ethanol 농도에서 가장 낮았다.

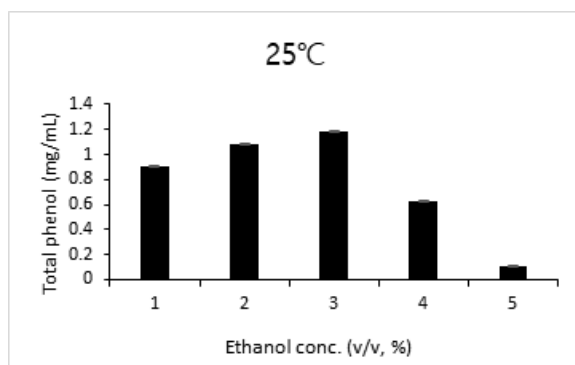


Fig. 13. Total phenol of Cacaonips extracted at 25°C

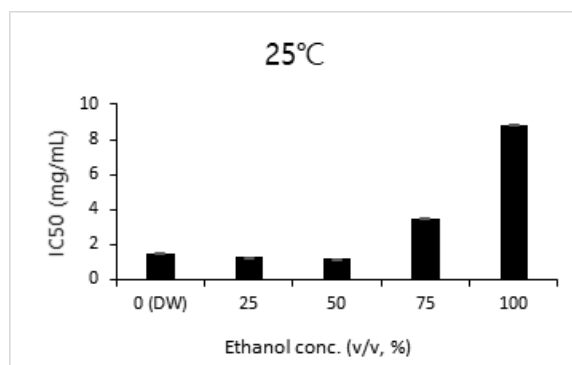


Fig. 14. IC₅₀ of Cacao nips extracted at 25°C

Table 5. Total phenol and IC₅₀ of Cacao nips extracted at 25°C

Ethanol con. (v/v, %)	Total phenol (mg/mL)		IC ₅₀ (mg/mL)	
	AVE	STDEV	AVE	STDEV
0 (DW)	0.908	0.007	1.513	0.002
25	1.085	0.008	1.278	0.018
50	1.188	0.002	1.177	0.006
75	0.628	0.002	3.513	0.009
100	0.109	0.002	8.852	0.009

50°C에서 추출 했을 때 총 페놀 함량은 0% ethanol에서 0.73 mg/ml, 25% ethanol에서 1.04 mg/ml, 50% ethanol에서 1.26 mg/ml, 75% ethanol에서 0.69 mg/ml, 100% ethanol에서 0.16 mg/ml만큼 추출되었다. IC₅₀값은 0% ethanol에서 1.18 mg/ml, 25% ethanol에서 1.19 mg/ml, 50% ethanol에서 1.18 mg/ml, 75% ethanol에서 2.02 mg/ml, 100% ethanol에서 8.98 mg/ml 만큼 추출되었다.

총 페놀 함량은 50% ethanol 농도에서 1.26 mg/ml로 가장 높았고 IC₅₀의 경우 1.18 mg/ml로 0%, 50% ethanol 농도에서 가장 낮았다.

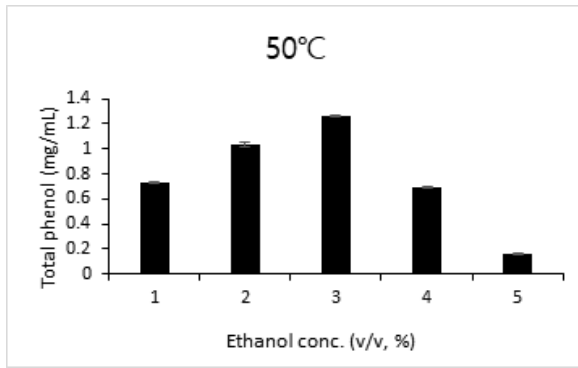


Fig. 15. Total phenol of Cacaonips extracted at 50°C

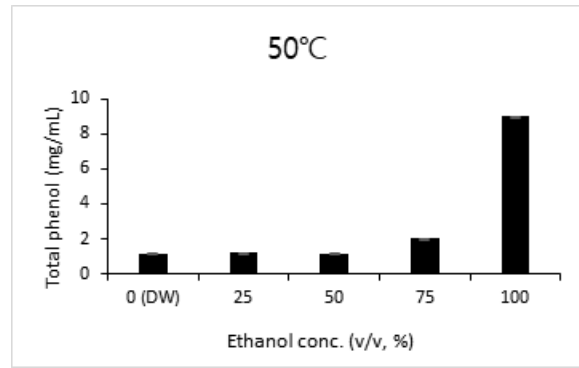


Fig. 16. IC₅₀ of Cacaonips extracted at 50°C

Table 6. Total phenol and IC₅₀ of Cacao nips extracted at 50°C

Ethanol con. (v/v, %)	Total phenol (mg/mL)		IC ₅₀ (mg/mL)	
	AVE	STDEV	AVE	STDEV
0 (DW)	0.729	0.003	1.177	0.003
25	1.039	0.018	1.191	0.002
50	1.264	0.004	1.177	0.016
75	0.692	0.002	2.020	0.002
100	0.157	0.002	8.977	0.009

75°C에서 추출했을 때 총 페놀 함량은 0% ethanol에서 1.44 mg/ml, 25% ethanol에서 0.96 mg/ml, 50% ethanol에서 1.45 mg/ml, 75% ethanol에서 0.89 mg/ml, 100% ethanol에서 0.20 mg/ml 만큼 추출되었다. IC₅₀값은 0% ethanol에서 0.90 mg/ml, 25% ethanol에서 1.38 mg/ml, 50% ethanol에서 0.91 mg/ml, 75% ethanol에서 1.43 mg/ml, 100% ethanol에서 6.22 mg/ml 만큼 추출되었다.

총 페놀 함량은 50% ethanol 농도에서 1.44 mg/ml로 가장 높았고 IC₅₀의 경우 0.90 mg/ml로 0% ethanol 농도에서 가장 낮았다.

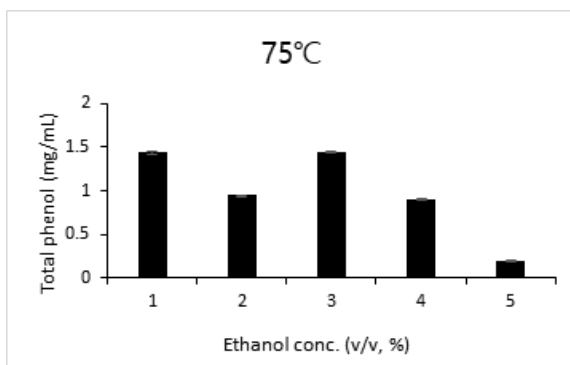


Fig. 17. Total phenol of Cacaonips extracted at 75°C

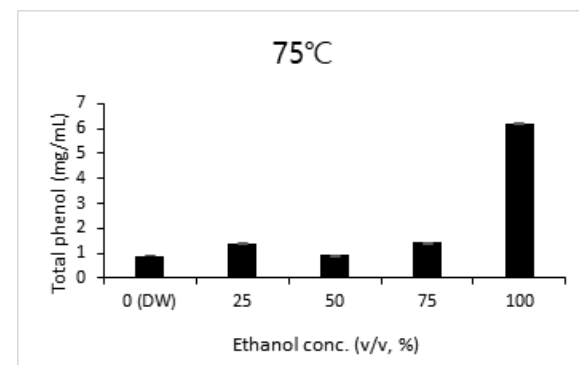


Fig. 18. IC₅₀ of Cacaonips extracted at 75°C

Table 7. Total phenol and IC₅₀ of Cacao nips extracted at 75°C

Ethanol con. (v/v, %)	Total phenol (mg/mL)		IC ₅₀ (mg/mL)	
	AVE	STDEV	AVE	STDEV
0 (DW)	1.439	0.014	0.897	0.001
25	0.954	0.001	1.378	0.004
50	1.44	0.008	0.914	0.005
75	0.894	0.007	1.427	0.013
100	0.201	0.001	6.215	0.007

100°C에서 추출했을 때 총 페놀 함량은 0% ethanol에서 1.50 mg/ml, 25% ethanol에서 2.87 mg/ml, 50% ethanol에서 4.85 mg/ml, 75% ethanol에서 3.69 mg/ml, 100% ethanol에서 1.46 mg/ml 만큼 추출되었다. IC₅₀값은 0% ethanol에서 0.97 mg/ml, 25% ethanol에서 0.88 mg/ml, 50% ethanol에서 0.85 mg/ml, 75% ethanol에서 0.83 mg/ml, 100% ethanol에서 0.84 mg/ml 만큼 추출되었다.

총 페놀 함량은 50% ethanol 농도에서 4.85 mg/ml로 가장 높았고 IC₅₀의 경우 0.83 mg/ml로 75% ethanol 농도에서 가장 낮았다.

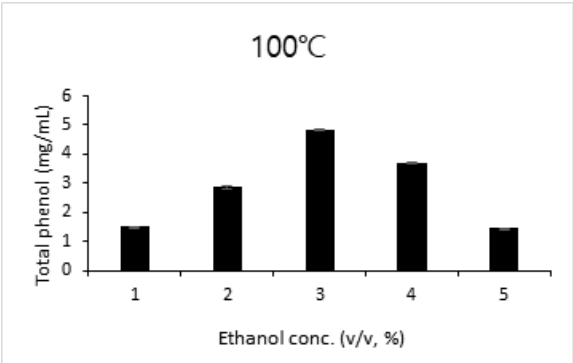


Fig. 19. Total phenol of Cacaonips extracted at 100°C

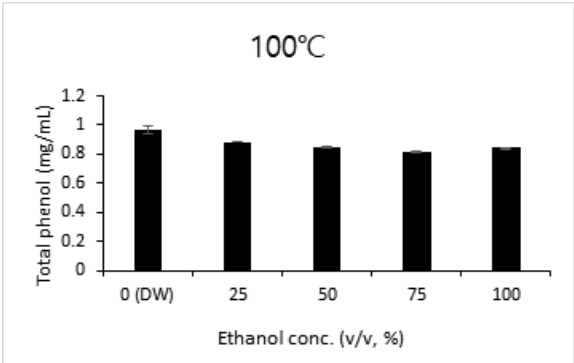


Fig. 20. IC₅₀ of Cacaonips extracted at 100°C

Table 8. Total phenol and IC₅₀ of Cacao nips extracted at 100°C

Ethanol con. (v/v, %)	Total phenol (mg/mL)		IC ₅₀ (mg/mL)	
	AVE	STDEV	AVE	STDEV
0 (DW)	1.498	0.004	0.966	0.025
25	2.865	0.044	0.882	0.001
50	4.852	0.031	0.850	0.003
75	3.685	0.019	0.819	0.001
100	1.464	0.001	0.843	0.001

총 페놀 함량을 비교했을 때, 각각의 온도마다 50% ethanol에서 가장 높은 추출량을 가진다. 카카오닙스의 경우 총 페놀 함량이 4.85 mg/ml로 가장 많이 추출된 추출 조건은 100°C, 50% ethanol이었다.

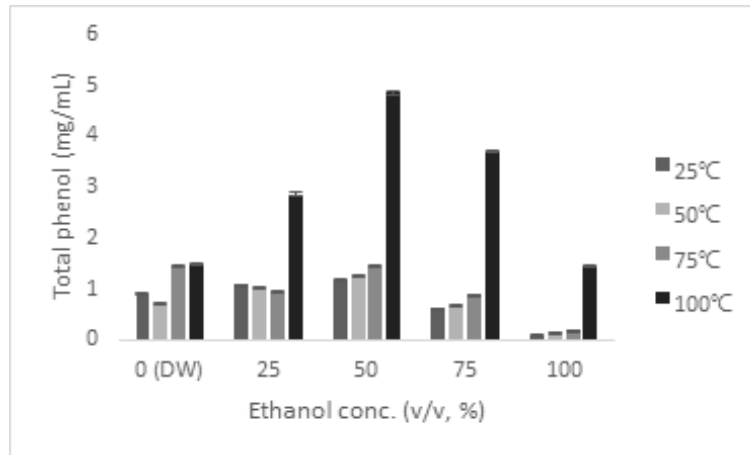


Fig. 21. Total phenol of cacao nips extract according to extraction temperature and ethanol concentration

모든 추출 조건을 고려하여 IC_{50} 을 비교했을 때, 가장 낮은 IC_{50} 값을 가지는 추출조건은 0.82 mg/ml가 나온 100°C, 75% ethanol이다. 대조군인 vitamin C와 비교했을 때 vitamin C 보다 낮은 IC_{50} 값이 나온 추출 조건은 25°C에서 0%, 25%, 50%이고 50°C에서 0%, 25%, 50%, 75%이고 75°C에서 0%, 25%, 50%, 75%이고 100°C에서 모든 조건이다.

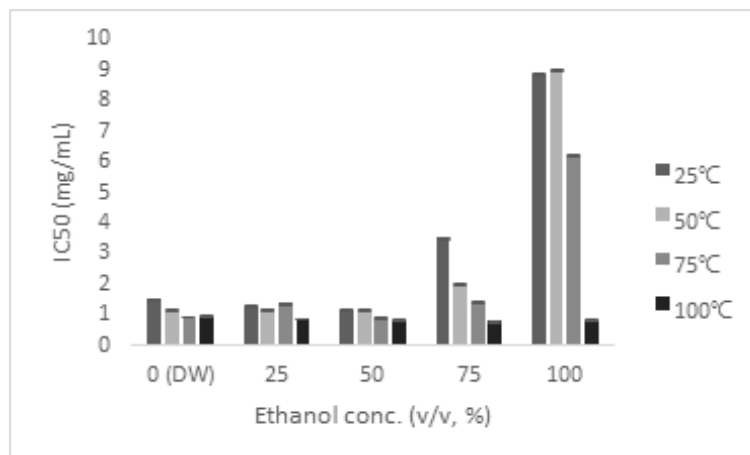


Fig. 22. IC_{50} of cacao nips extract according to extraction temperature and ethanol concentration

IV. 결론

어성초, 카카오닙스, 인진쑥의 성장 조건 등 실험 외적 요인에 의해 쉽게 변할 수 있는 위의 실험 결과는 어성초, 카카오닙스, 인진쑥의 항산화 효능이 얼마나 좋은 지를 확인하는 것이 아니라 어떠한 실험 조건에서 가장 항산화 효능이 좋은지를 확인시켜주는 지표임을 보여준다. 따라서 우리가 정한 최적의 추출 조건은 다음과 같다. 어성초의 경우 50~75% ethanol, 100°C에서, 인진쑥의 경우 50~75% ethanol, 100°C에서, 카카오닙스의 경우 50% ethanol, 100°C에서 최적의 추출 조건을 가진다.

Table 9. Optimum conditions for antioxidant extraction from *Houttuynia cordata*

	Ethanol concentration(%)	Temperature(°C)
Phenol	50~75	100
IC ₅₀	25~75	25~100
Determined condition	50~75	100

Table 10. Optimum conditions for antioxidant extraction from *Artemisia campestris*

	Ethanol concentration(%)	Temperature(°C)
Phenol	50~75	100
IC ₅₀	50~100	25~100
Determined condition	50~75	100

Table 11. Optimum conditions for antioxidant extraction from *Cacaonips*

	Ethanol concentration(%)	Temperature(°C)
Phenol	50	100
IC ₅₀	0~50	25~100
Determined condition	50	100

HPLC 분석결과 어성초에는 vitamin B6, 인진쑥에는 gallic acid, 카카오 닙스에는 vitamin B6이 함유되어 있다는 결과를 얻었다. 어성초와 카카오닙스에는 vitamin B계열과 인진쑥에는 gallic acid등의 페놀화합물이 있다. 이번 실험에 사용한 식물 자원들은 우수한 항산화 효능을 나타내는 페놀화합물을 함유하고 있어 향후 기능성 식품이나 화장품의 소재로 응용이 가능할 것으로 생각된다.

참고문헌

- [1] H. J. Kim, J. Y. Bae, H. N. Jang and S. N. Park, Comparative Study on the Antimicrobial Activity of Glycyrrhiza uralensis and Glycyrrhiza glabra Extracts with Various Countries of Origin as Natural Antiseptics. *Korean J. Microbiol, Biotechnol*, 41(3), 358 (2013).
- [2] S. N. Park, Skin Aging and Antioxidants, *J. Soc. Cosmet. Scientists Korea*, 23(1), 75 (1997).
- [3] S. N. Park, Protective effect of isoflavone, genistein from soybean on singlet oxygen induced photohemolysis of human erythrocytes, *Korean J. Food Sci. Technol.*, 35(3) (2003)
- [4] M. D. Yun, 어성초 추출물의 생리활성 및 성분분석과 나노에멀전을 이용한 안정성 연구, 서울과학기술대학교 일반대학원 정밀화학과, (2018)
- [5] Kazuji Yanamoto, Hideo Sasai, Akira Inoue, Method Of Procuving White Cacao Nibs And Food Using White Cacao Nibs (1995)
- [6] Jensen, J., A. Churchill, The Chemistry Flavouring and Manufacture of Chocolate Confectionery and Cocoa, 40 Gloucester Place, Portman Square, London, pages 158 and 159, (1931)
- [28] Lee, S. D., Park, H. S., Kim, D. W. and Bang, B. H, Bioactive con-stituents and utilities of Artemisia sp. as medical herb and food stuff, *Korean J. Food Nutr*, 13, 490-505 (2000)
- [7] Jin, Y. X., Yoo, Y. S., Han, E. K., Kang, I. J. and Chung, C. K, Artemisia capillaris and Paecilomyces japonica stimulate lipid metabolism and reduce hepatotoxicity induced carbon tetrachloride in rats, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 37, 548-554 (2008)
- [8] D. Bown, "The Royal Horticultural Society Encyclopedia of Herbs & their Uses". Dorling Kindersley, London, 1995.
- [9] H. R. Jeong, J. H. Kwak, J. H. Kim, G. N. Choi, C. H. Jeong, H. J. Heo, Antioxidant and Neuronal Cell Protective Effects of an Extract of Houltuynia cordata Thunb (a Culinary Herb), *Korean J. Food Preserv.* 17(5), 720 (2010)
- [10] K. Y. Kim, D. O. Chung, H. J. Chung, Chemical Composition and Antimicrobial Activities of Houltuynia cordata Thumb, *Korea J. Food Sci. Technol* 29(3) 400 (1997)
- [11] G. S. Kim, D. H. Kim, J. J. Lim, J. J. Lee, D. Y. Han, W. M. Lee, W. C. Jung, W. G. Min, C. G. Won, M. H. Rhee, H. J. Lee, S. Kim, Biological and Antibacterial Activities of the Natural Herb *Houltuynia cordata* Water Extract against the Intracellular Bacterial Pathogen *Salmonella* within the RAW 264.7 Macrophage, *Biol , Pharm, Bull*, 31(11), 2012 (2008)
- [12] J. H. Song, M. J. Kim, H. D. Kwon, and I. H. Park, Antimicrobial activity of fractional extracts from *Houltuynia cordata* root, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 32, 1053 (2003).
- [13] J. Kim, H. S. Ryu, J. H. Shin, and H. S. Kim, In vitro and ex vivo supplementation of *Houltuynia cordata* extract and immunomodulating effect in mice, *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.*, 34, 167 (2005)

학부생 연구 논문

탄닌 추출물과 녹조 저감에 대한 고찰

A Study on the Tannin Extraction and the Reduction of Green Algae

2018. 11

상명대학교

생명화학공학부 생명공학과

박민선, 유시훈, 이예빈, 이정호, 임지수

연구지도자: 김한솔³⁾, 기장서⁴⁾

3) 상명대학교 일반대학원 생물학과 해양생명공학실험실

4) 상명대학교 융합공과대학 생명화학공학부 생명공학과 해양생명공학실험실 교수

국문 초록

4대강 산업 추진 및 다량의 오염물질 배출로 인해 악화되고 있는 녹조 현상을 해결하기 위해 최근 다양한 해결 방안이 제시되고 있으나 실제 적용이 어렵다. 그러나 현재 수중 환경에 2차 오염을 일으키지 않는 친환경적이며 경제적으로 실현 가능한 해결책은 제시되지 않고 있으며 다양한 연구가 진행 중이다. 따라서 본 실험은 녹조 현상을 해결하고 수중 환경을 보호하는데 도움이 되고자 사과 과피에서 추출한 탄닌을 이용하였다. 이는 생물학적으로 유래된 천연 물질이며 음식물 쓰레기로 버려지는 사과 과피를 이용하므로 앞서 말한 조건들에 부합하는 혁신적인 녹조 현상의 해결책이 될 수 있음을 입증하고자 한다. 실험 대상으로는 녹조 현상의 우점종 중 하나인 독소를 방출하는 *Microcystis aeruginosa*를 채택하였다. 이에 사과 과피에서 추출한 탄닌을 처리한 후 현미경으로 관찰하고 pH, 클로로필, 광합성 효율 등을 측정하는 과정으로 이루어졌다. 또한 홍제천에서 채수한 환경샘플들에도 같은 과정을 반복하였다. 그 결과, 사과 탄닌의 효과와 현장 적용 가능성을 확인할 수 있었다. 결과적으로 탄닌을 처리하였을 때 조류들이 뭉쳐 가라앉은 모습이 관찰되었으며 두 샘플 모두 탄닌의 처리량이 증가할수록 클로로필 a의 농도와 광합성 효율이 현저히 감소하는 경향을 보였다. 이는 사과 과피에서 추출한 탄닌이 살조 효과를 가진 천연 물질로서 녹조 현상을 해결할 수 있는 획기적인 방안이 될 수 있음을 명시한다. 다만 HPLC를 통해 사과 과피 추출물의 페놀 함량을 파악하고 더 다양한 지표를 이용해 조류의 생장 여부를 확인하는 과정이 추가적으로 요구된다. 또한 실험 결과를 현장에 직접 적용하기 위해 환경에 따라 적정 처리량을 측정하는 실험 역시 필요할 것이다.

목차

I. 서론	62
1.1 연구 동기 및 배경	62
1.2 연구 목표	63
II. 실험 방법	63
2.1 조류 및 환경샘플 배양	63
2.2 사과 탄닌 추출	64
2.3 탄닌 처리	64
2.4 pH 측정	64
2.5 클로로필 측정	64
2.6 광합성 효율 측정	64
III. 결과 및 고찰	65
3.1 연구 결과	65
3.1.1 홍제천 환경샘플 배양 및 관찰 결과	65
3.1.2 홍제천 환경샘플 단일 배양 결과	66
3.1.3 탄닌 추출 결과	66
3.1.4 탄닌 처리 결과	67
3.1.5 pH 측정 결과	68
3.1.6 클로로필 측정 결과	69
3.1.7 광합성 효율 측정 결과	71
3.2 결과 해석	72
IV. 결론 및 제언	77
V. 첨부 자료	79

I. 서론

1.1 연구 동기 및 배경

지난 몇 년간 우리나라의 여러 강, 호수에서 폐수 등의 오염물질로 인해 부영양화 되어 녹조 현상이 점점 악화되어왔다. 이처럼 부영양화된 호수나 유속이 느린 하천에서 부유성의 조류가 대량으로 증식하여 수질을 오염시켜 호수 또는 하천의 색을 녹색으로 변화시키는 현상을 녹조 현상이라 한다. 지구온난화에 의해 악화된 녹조현상은 2008년부터 2013년까지 총 5년간 진행된 4대강 산업 이후 더욱 악화되었다. 대표적으로 경북권과 경남권에서 주요 수자원으로 이용되어 왔던 낙동강에서는 조류가 매년 크게 발생하여 많은 피해가 발생하고 있다. 낙동강의 부영양화와 수질환경요인을 분석한 한 연구에서는 낙동강이 이미 OECD 부영양화 기준으로 과영양 단계에 도달하였으며 생물량 또한 높은 상태를 유지하고 있다고 주장하였다. [2] 이러한 현상은 수계 pH 상승, 용존산소량 감소와 같은 결과를 불러일으켜 그 심각성을 각인 시킨다. 뿐만 아니라 녹조 현상은 태양광을 가려 부유성을 가지지 않는 미세 조류의 생존을 어렵게 하기도 하며 [7] 독소를 방출하여 생물 다양성을 감소시키는 등의 다양한 피해를 야기시키고 있다. [24] 이 때문에 발생하는 경제적 손실 또한 막대하다. 미국에서의 조사에 따르면 매년 어업에서 발생하는 경제적 손실은 약 1,800만 달러, 공중보건 악화로 발생하는 경제적 손실은 약 2,000만 달러, 측정 및 관리로 발생하는 경제적 손실은 약 200만 달러라고 한다. [26] 특히 한국의 녹조 우점종에 속하는 *M. aeruginosa*는 microcystin이라는 독소를 생성한다. 환상 펩타이드에 속하는 이 독성 화합물은 간에 매우 치명적이기 때문에 식수에서의 함량을 1 μ g/L으로 규정한다. [18] 정제 과정을 거친 식수에 함유 되어있는 microcystin으로 인해 질병이 발생할 확률은 매우 희박하지만 강 및 우물의 물을 사용해온 중국의 특정 지역에서 간암 발병율이 현저히 높았던 바가 있다. [10]

이러한 유해 남조류의 다량 증식에 의한 피해를 막기 위해 물리학적, 화학적, 생물학적 방법 등의 다양한 방면에서 제어 기술들이 개발되어 사용되고 있으나 실질적으로 현장에서 적용 가능한 기술은 화학물질을 살포하는 방법뿐이다. [22] 대표적으로 황산구리(CuSO_4), 살조제와 같은 화학 물질들이 유해 조류(HABs)를 제어하는데 사용되지만, 이러한 물질들은 화학적 안정성과 잔류성에 의해 수중 환경에 2차 오염을 야기할 수 있다. 따라서 지역의 모든 조류의 발생을 무조건적으로 차단하거나, 비선택적으로 제거 또는 사멸시키는 기술보다 환경을 보호할 수 있는 기술 개발이 필연적으로 요구된다. 앞으로는 환경 친화적인 성질과 더불어 경제적인 면을 동시에 갖는 물질을 탐색하여 특정 조류 종의 성장 정도를 차별적으로 제어할 수 있는 기술의 개발이 더욱 필요하다. 최근 연구 동향은 녹조를 유발하는 *cyanobacteria*의 성장을 억제하는 것으로 알려진 polyphenols, fatty acids, L-lysine 과 같이 생물학적으로 유래된 물질(BDS)에 주목하고 있다. BDS의 가장 큰 장점은 비표적 수생 생물과 인간에게는 독성이 낮거나 없으며, 천연 물질에서 비롯된 물질로서 대부분이 수생환경에서 생화학적으로 쉽게 분해된다는 것이다. [17] 따라서 제어효율을 높이고, 조류의 사체로 인한 2차 오염을 방지하는 기술을 개발을 하기 위해서는 생분해가 가능한 천연물로부터 살조 활성 물질을 추출해내는 것이 우선적이다. 가능한 조류발생 초기에 효능을 높이는 화합물 조합을 혼합처리 함으로써 환경에 투입되는 화합물의 절대량을 감소시키는 것이 이상적이다. 최근 저독성 생화학 물질과 천연물질을 이용하여 미세조류를 제어하는 연구가 활발히 진행되고 있음에도 불구하고, 현재까지 탐색된 종류가 제한적이며 일부는 활성이 약하거나 작용 가능한 범위가 좁고 생산가격이 비싸다는 문제점이 있다. 결론적으로 위와 같은 한계를 극복하기 위한 연구가 지속적으로 필요한 상황이다. [23]

1.2 연구 목표

본 연구는 앞서 설명한 녹조 현상에 대응하는 해결책으로 탄닌을 채택하여 그 효과를 입증하고자 한다. 탄닌은 껍질이나 씨에 포함되어 있는 식물성 폴리페놀류로 수용성 탄닌과 불용성 탄닌 두 종류로 크게 나뉘어진다. [20] 수용성 탄닌에 속하는 탄닌산은 10개의 갈산 분자가 에스테르 결합을 하여 내부는 소수성을, 외부는 친수성을 나타내는 독특한 구조를 갖는다. [21] 이 또한 타감물질 중 한 종류로, 생태계 내에서 어떠한 식물로부터 방출되어 다른 생물체의 생장에 영향을 미친다. 페놀류 화합물인 경우가 많으며, 수용성 및 휘발성을 갖는 2차 대사물질이라고도 할 수 있다. [4] 그렇기 때문에 탄닌을 이용하여 녹조를 유발하는 미세조류의 생장을 억제하려는 여러 연구들이 과거부터 이어져왔다. 실제로 1964년 진행된 연구에 따르면 Carob(*Ceratonia siliqua*) pod 추출물과 탄닌산은 셀룰로오스를 가수 분해할 수 있는 일부 박테리아에 강한 항균 작용을 보인다고 한다. 또한 탄닌의 경우, *Cellvibrio fulvus*, *Clostridium cellulosolvens*, *Sporocystophaga myxococcoides*, *Bacillus subtilis*의 생장을 억제하는 최저저지농도(MIC)가 Carob(*Ceratonia siliqua*) pod 추출물, 갈산, 카테콜 등에 비해 상대적으로 낮아 그 효율이 입증되었다. [19] 최근 연구에 따르면, 밤껍질에서 추출한 탄닌으로 액체조류제거제를 개발하거나 [15] 탄닌산이 포함된 카페인에서 *M. aeruginosa*의 성장제어 효과를 발견 [13] 하는 등 성과를 얻었다고 한다.

탄닌은 포도, 사과, 감 등 다양한 과일의 과피나 곡물 등에서 추출할 수 있다. 본 실험에서 사과 과피 탄닌을 선정한 이유는 다음과 같다. 현재 과일류 중 재배면적이 가장 높은 과일인 사과는 생산량과 소비량 또한 높은 수치를 보이고 있는 것을 확인할 수 있다. [3] 보통 과피를 제거하고 섭취하기 때문에 과피 또한 다량으로 발생하게 되고, 이는 음식물쓰레기로 배출되어 2차 환경오염을 일으킬 수 있다. 가정이나 농어촌 등에서 발생하는 음식물쓰레기 역시 현재 해결해야 할 난제로 대두되고 있다. 음식물쓰레기는 유통·가공 과정 중 손질 및 가공 과정에서 발생하거나 유통과정에서 손상, 가정에서 조리과정 중 발생한 잔여 식재료, 보관 중 변질된 식재료, 먹고 남은 음식물 등 가정과 공장, 농어촌 등에서 다양한 경우에서 발생한다. [11] 이들은 악취와 토양오염, 수질오염을 유발할 수 있으며 동시에 하천이나 해수 등으로 유입되어 부영양화를 초래할 수 있다. 이러한 음식물쓰레기의 양을 절감하기 위해 쓰레기 종량제 등 여러 방법이 제시되고 있고, 퇴비 제조 또한 한 가지 방법이다. 다만, 과피 등을 바로 퇴비로 이용하기엔 문제가 있다. 과피에는 앞서 언급했던 탄닌이란 타감물질이 다량 함유되어 있어 바로 퇴비로 이용할 경우 농작물의 생장에 문제가 발생할 수 있다. 때문에 과피로부터 탄닌을 제거하는 가공과정이 필요하다.

따라서 접근성이 용이한 사과 과피를 이용하여 탄닌을 추출하고, 사과 과피에서 추출된 탄닌을 녹조를 유발하는 유독성 남조류 *M. aeruginosa*와 상명대학교 앞에 있는 홍제천에서 채수한 샘플 내에 존재하는 조류에 처리하여 해당 조류에 대한 성장 억제 및 살조 효과를 증명하고자 한다.

II. 실험 방법

2.1 조류 및 환경샘플 배양

실험에 사용된 남세균은 *Microcystis aeruginosa*(NIES-298)을 이용하고, 배양 시 BG11 배지를 이용한다. 홍제천에서 채수한 환경샘플의 경우, BG11 stock, KHPO₄, NaNO₃, P.I.V.를 넣어주고 incubator에 보관하여 배양한다.

2.2 사과 탄닌 추출

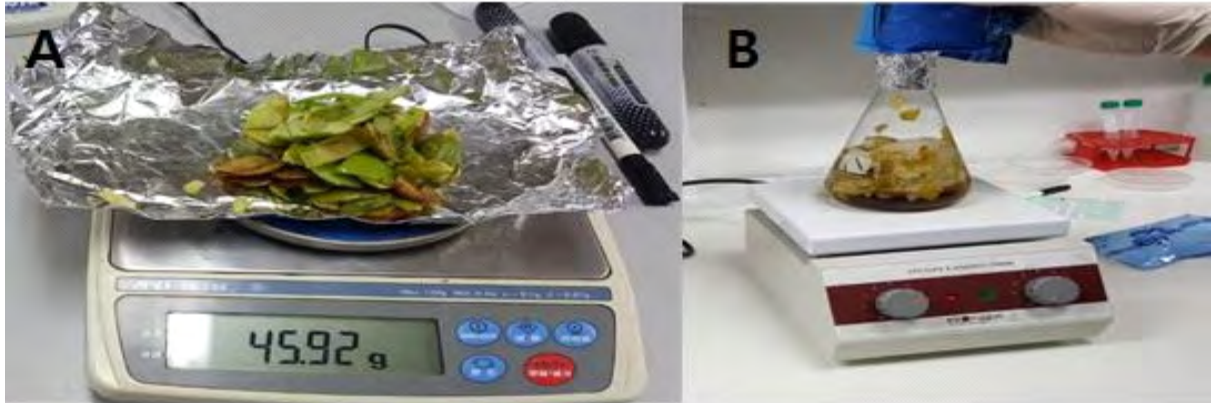


Figure 1. Extraction process of apple tannin acids using an agitator.

A: Weight measuring of pericarp before tannin extraction. B: Heating extraction using alcohol solvent.

플라스크에 사과 과피 100g 가량을 잘게 잘라 넣고, 100% EtOH를 넣어주고 교반기에서 30분동안 가열한다. 이 때, 플라스크 입구에 호일로 U자형 혹은 ㄱ자형 관을 만들어 아이스팩 등을 이용해 냉각시키면서 EtOH가 증발하며 탄닌이 소실되지 않도록 해준다. 가열 후 Conical tube에 옮겨 냉장 보관한다.

2.3 샘플에 탄닌 처리

*M. aeruginosa*의 경우, 클린 벤치에서 glass tube에 30ml씩 분주한 후 각기 250/500/750/1000uL의 탄닌을 첨가해준다. 환경샘플도 앞의 실험과 동일하게 진행한다. 탄닌이 분리되지 않도록 잘 흔들어준 후 incubator에 넣고 72h 동안 보관한다.

2.4 pH 측정

pH용지를 적절한 길이로 잘라 종이에 나열해 붙인다. 샘플들을 6uL씩 분주하여 일정한 간격으로 나열한 pH용지에 떨어뜨린다. 어느 정도 물기가 마른 뒤 pH용지의 색 변화를 관찰하고 pH 정도를 유추해본다.

2.5 클로로필 측정

샘플에 90% 아세톤을 처리한 후 24h 뒤에 분광 광도계를 이용하여 에서의 흡광도를 측정한다. 측정 후 도출된 흡광도를 아래의 식에 대입하여 클로로필의 농도를 계산한다. *M. aeruginosa*와 홍제천 시료 모두 각각 3배수씩 진행한다(positive control, negative control, Apple tannin extract 100uL, 200uL, 300uL, 400uL, 500uL). (박세근 et al., 2015)

2.6 광합성 효율 측정

*M. aeruginosa*와 홍제천 시료 모두 각각 3배수씩 진행한다(positive control, negative control, Apple tannin extract 100uL, 200uL, 300uL, 400uL, 500uL). 각 샘플을 2mL씩 바이알 병에 분주한 후, 샘플을 호일로 감싸 인큐베이터에 20분간 암반응을 진행시킨다. 각 샘플을 일정 시간 간격을 유지하며, Handy PEA를 이용해 광합성 효율을 측정한다.

III. 결과 및 고찰

3.1 연구 결과

3.1.1 홍제천 환경샘플 배양 및 관찰 결과



Figure 2. Environmental samples inoculated with BG11. A, B: 2018/7/5, Cloudy. Incubated for 5 days after the inoculation of BG11 to water collected from the upper reaches of Hongjecheon. C, D: 2018/7/6, Fine. Incubated for 4 days after the inoculation of BG11 to water collected from the upper reaches of Hongjecheon.



Figure 3. Environmental samples inoculated with BG11. E, F: 2018/7/10, Cloudy and humid. Picture taken right after the inoculation of BG11. G, H: 2018/7/12, Cloudy and rainy. Incubated for 13 days after the inoculation of BG11 to water collected from the upper reaches of Hongjecheon.



Figure 4. Micro algae observed in environmental sample A. (X400)

여러 부유물과 함께 다양한 규조류, 남조류, 녹조류 및 이끼가 관찰된다. BG11 접종 후 초기에는 규조류와 일부 녹조류, 남조류가 우세하였으나 배양 4일 이후부터 남조류가 우세하게 관찰되었다. 위 표시는 녹조를 일으킬 것으로 추측되는 조류 중 하나다.

3.1.2 홍제천 환경샘플 단일 배양 결과

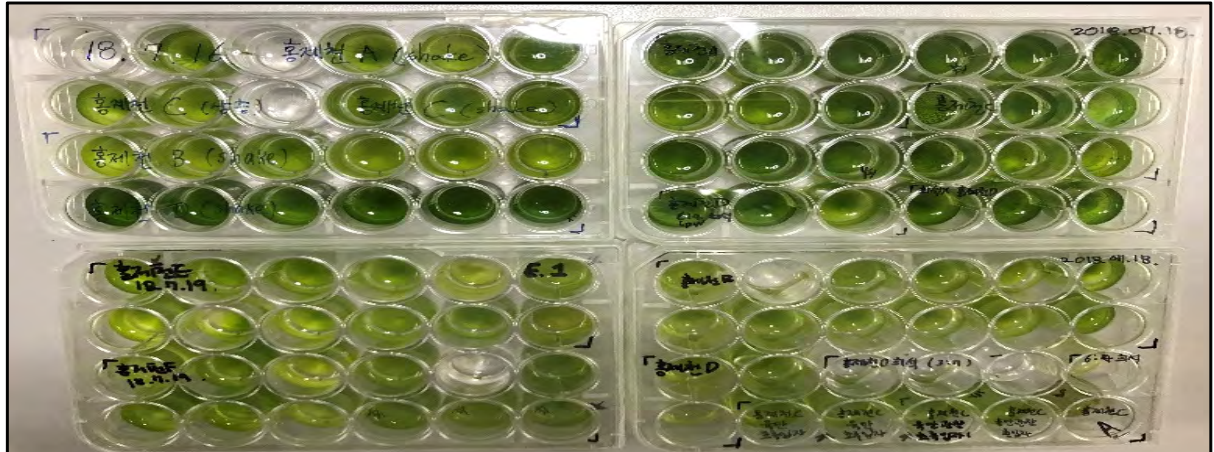


Figure 5. Single-species culture from the environmental samples.

홍제천 환경샘플에 영양분을 첨가(부영양화)하여 12h:12h, 20°C에서 배양한다. 배양액을 단계 희석한 뒤, 현미경을 이용해 단일 세포를 분리해낸다. 단일세포를 24 well plate에 옮긴 후 300μL의 BG11 배지를 첨가하여 배양한다. 단일종을 얻을 때까지 이를 반복한다.

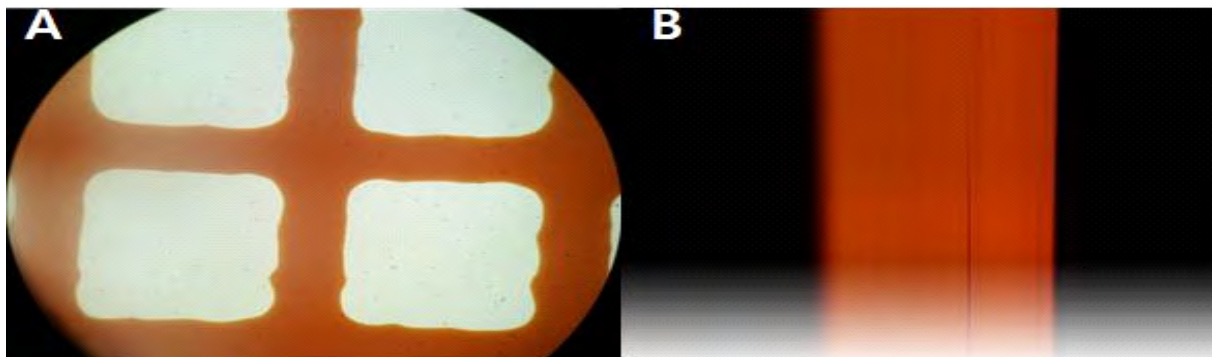


Figure 6. Algae from single-species culture. A(X100), B(X400)

초기 단일 배양을 진행중, 2~3종의 혼합배양이 확인된다. 지속적으로 희석 후 단일 조류 분리를 진행 중이다.

3.1.3 탄닌 추출 결과

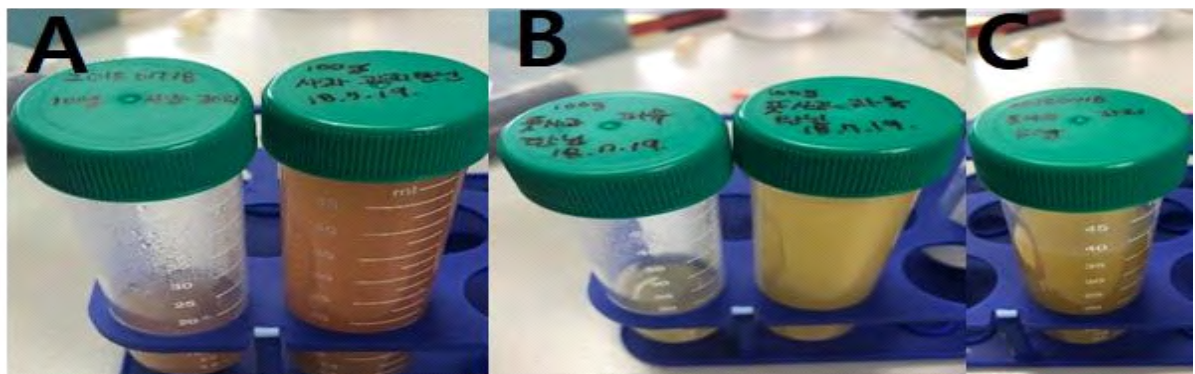


Figure 7. Apple tannin extract extracted after 2-30 minutes of heating.

A: Red apple pericarp 100g, B: Green apple flesh 100g, C: Green apple pericarp 50g.

다양한 농도와 부위로부터 얻은 사과 추출물이다. 붉은 사과 또는 풋사과에 따라 추출물의 색상이 다르다. 붉은 사과 추출물의 경우 주황빛, 풋사과 추출물의 경우 노랑빛을 띤다. 냉장보관 중에는 층의 분리가 발생한다.

3.1.4 탄닌 처리 결과

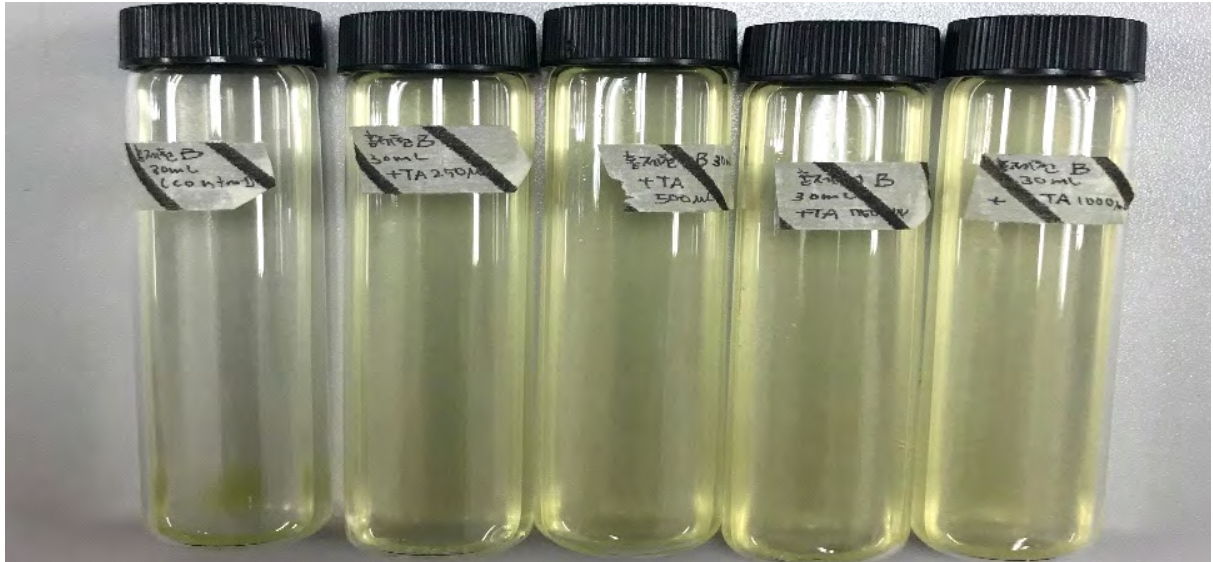


Figure 8. Treatment of tannin from red apple pericarp in environmental sample B of Hongjecheon.

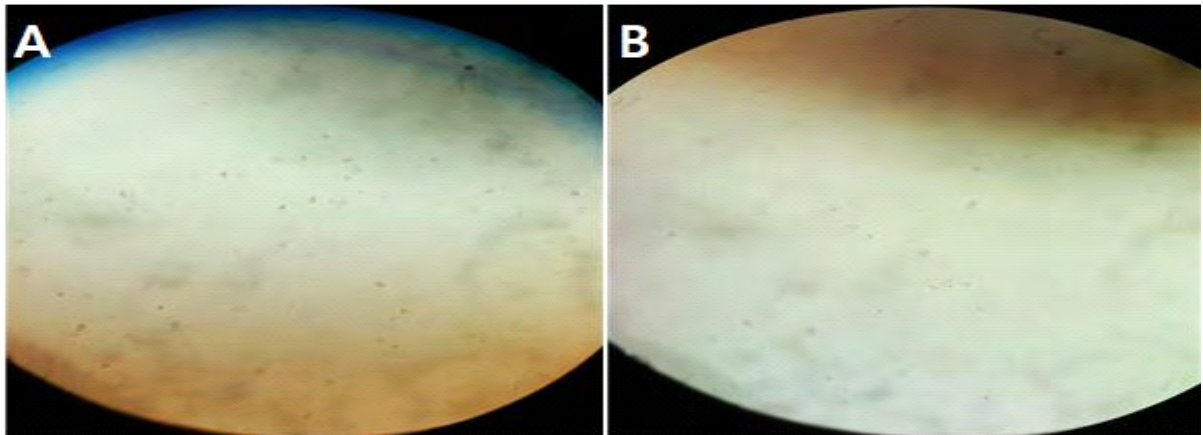


Figure 9. Changes of *Microcystis aeruginosa*(NIES-298) by the treatment of apple tannin acid. A: Control, B: Environmental sample A treated by the upper layer of green apple flesh tannin 1mL. (X400), B(X400)

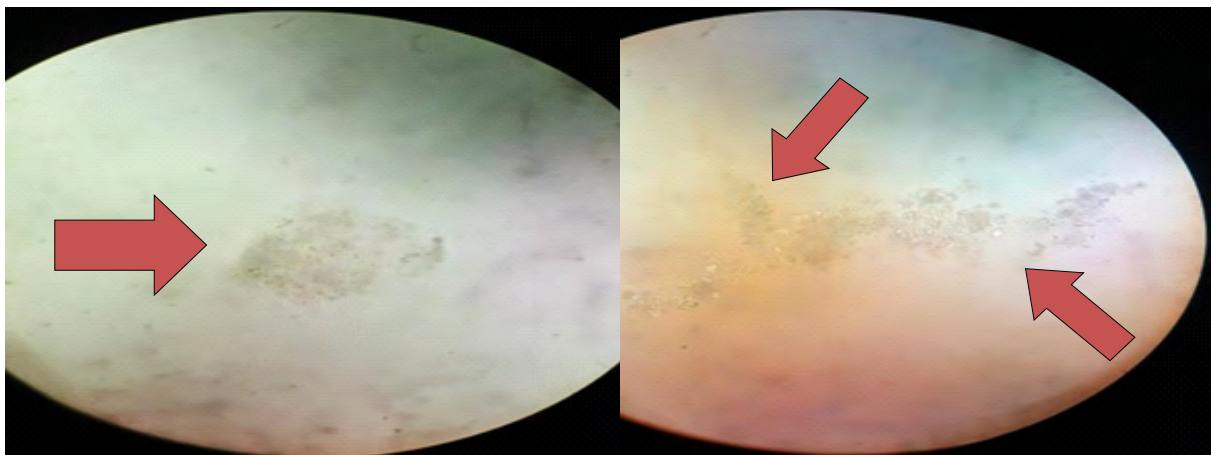


Figure 10. Changes of *Microcystis aeruginosa*(NIES-298) by the treatment of apple tannin acid. A: Treated by the upper layer of green apple flesh tannin 1mL. B: Treated by the upper layer of green apple pericarp tannin 1mL A(X400), B(X400)

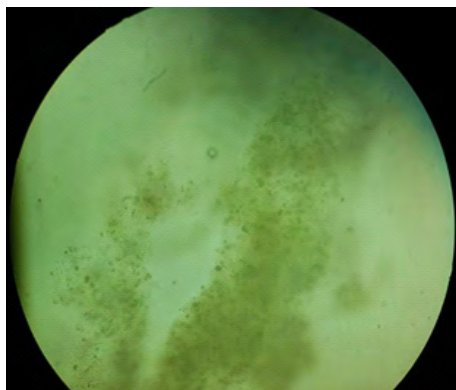


Figure 11. *Microcystis aeruginosa* (NIES-298) treated by the upper layer of green apple pericarp tannin 1mL.

Figure 9.A. (Control)과 비교했을 때, Figure 10.A.와 Figure 10.B에서 *M. aeruginosa*가 뭉쳐 덩어리를 형성한 것이 확인된다. Figure 9.B.의 꽃사과 과육 탄닌 추출물에서는 큰 변화가 확인되지 않는다. Figure 11에서 마찬가지로 확인된다.

3.1.5 pH 측정 결과

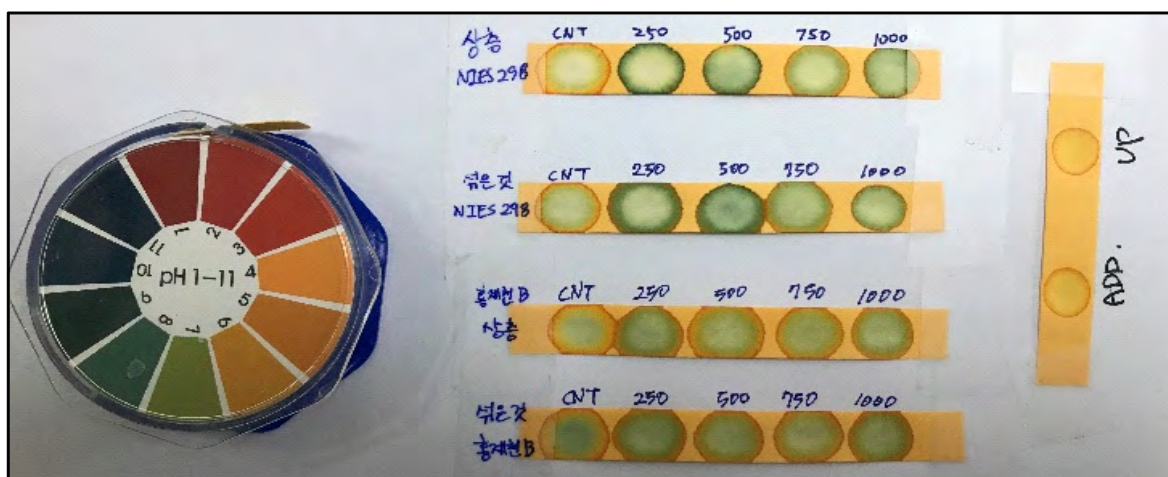


Figure 12. pH results of each micro algae after tannin treatment (72h). Control included 250~1000uL.

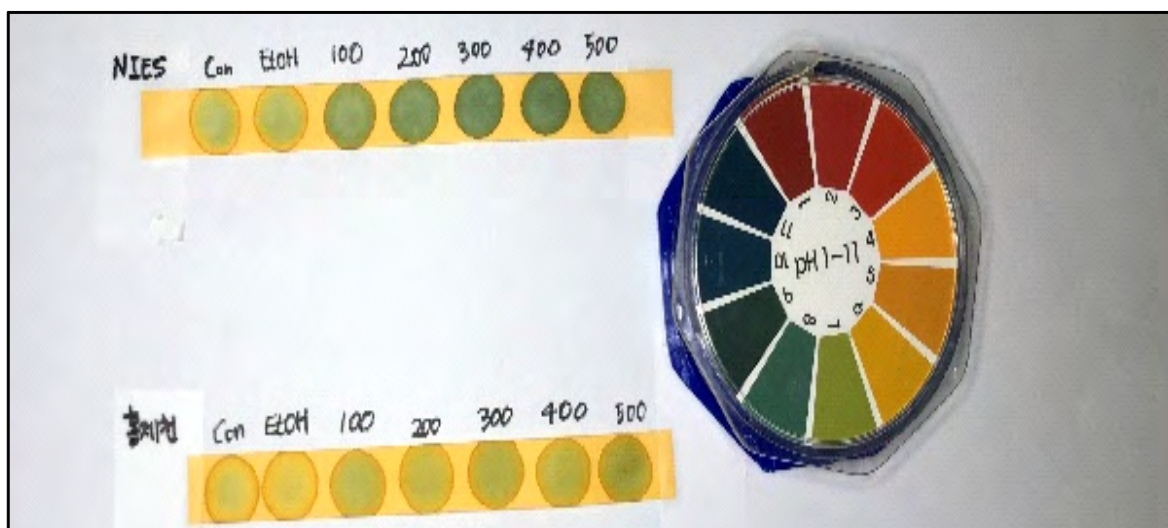


Figure 13. pH results of each micro algae after tannin treatment. Control included 100~500 uL.

3.1.6 클로로필 측정 결과

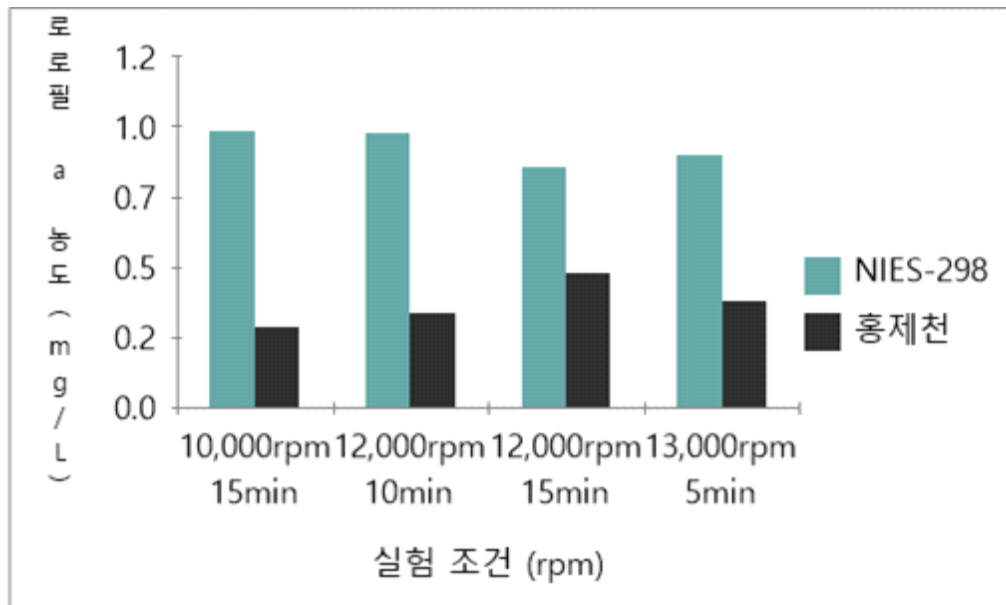


Figure 14. Graph of Chlorophyll a concentration difference by the time of centrifugation and rpm.

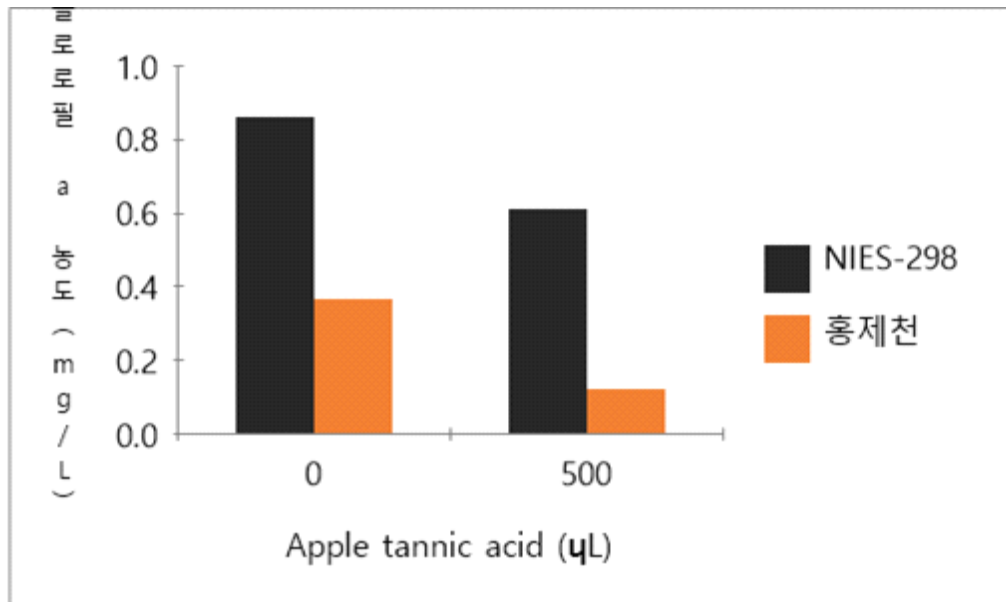


Figure 15. Graph of Chlorophyll a concentration difference by the treatment status of apple tannic acid.

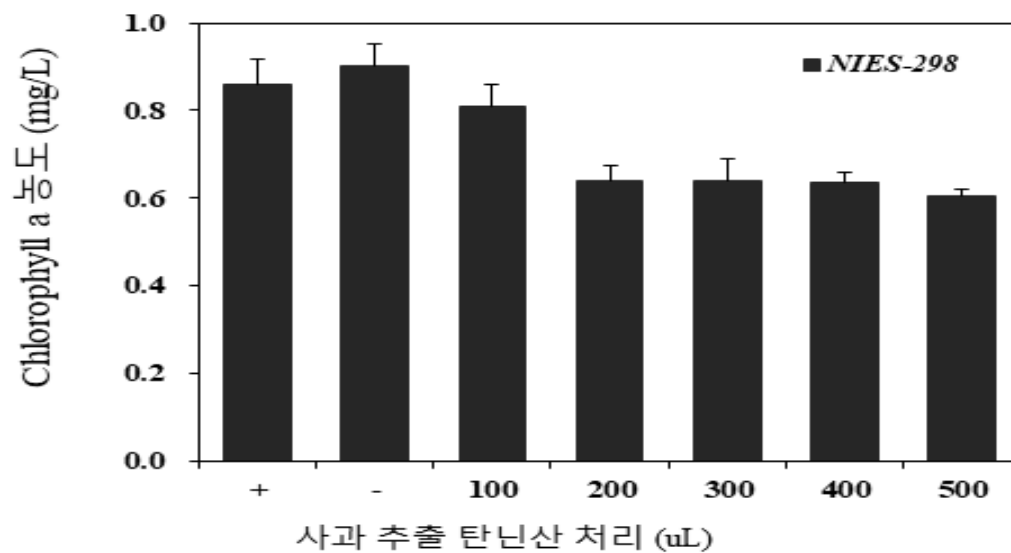


Figure 16. Graph of Chlorophyll a concentration difference by the amount of tannin treatment. (*M. aeruginosa*)

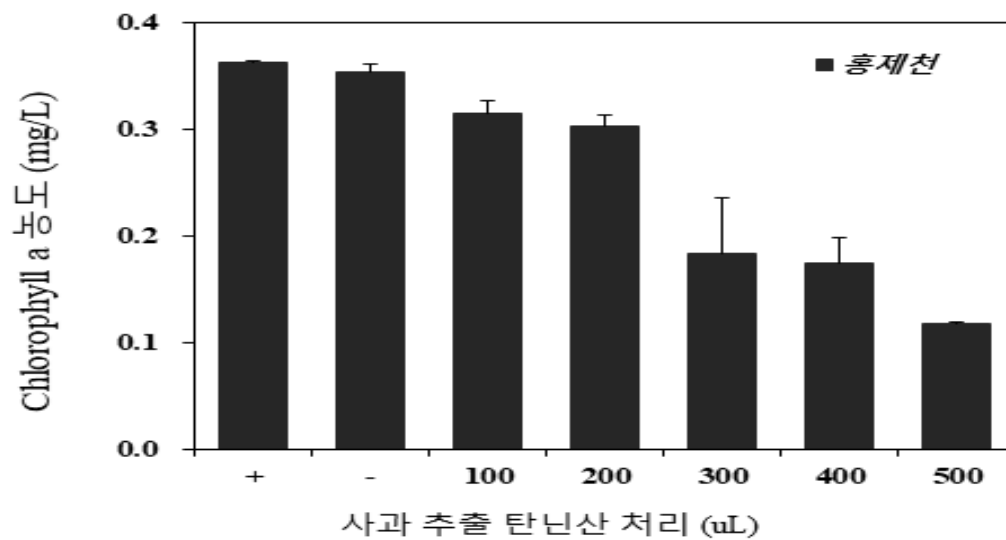


Figure 17. Graph of Chlorophyll a concentration difference by the amount of tannin treatment. (Environmental sample B)

3.1.7 광합성 효율 측정 결과

Table 1. Fv/Fm values of *M. aeruginosa* and environmental sample B after the treatment of Apple Tannic Acid(ATA).

처리 조류 \ 그룹(μL)	Control	CNT	TA 100	TA 200	TA 300	TA 400	TA 500
<i>Microcystis aeruginosa</i>	0.492	0.467	0.327	0.312	0.281	0.256	0.269
	0.493	0.462	0.351	0.301	0.262	0.268	0.258
	0.479	0.469	0.347	0.333	0.266	0.253	0.261
홍제천B (환경 샘플)	0.263	0.208	0.187	0.081	0.071	0.054	0.04
	0.253	0.203	0.187	0.079	0.074	0.053	0.04
	0.256	0.202	0.182	0.082	0.069	0.054	0.04

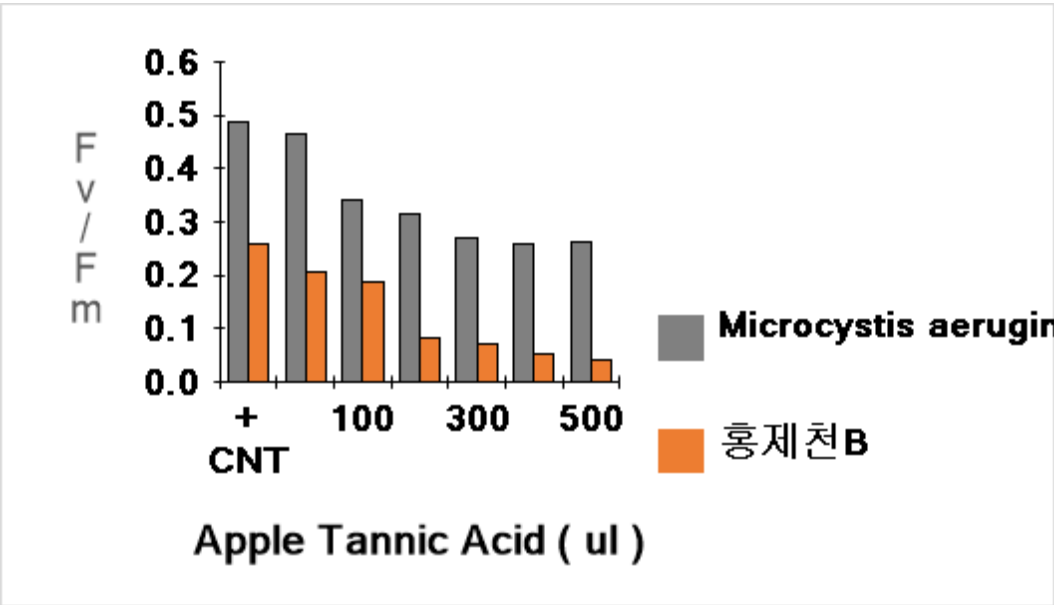


Figure 18. Fv/Fm values according to the amounts of Apple Tannic Acid(ATA).

*Microcystis aeruginosa*와 홍제천B 모두의 경우에서, 광합성 효율을 나타내는 Fv/Fm 값은 처리한 TA의 양이 많을수록 낮게 측정되었다. 여러 그룹들 중 Control 그룹의 Fv/Fm 값이 가장 높게 측정되었으며, 그 값은 *M. aeruginosa*와 홍제천B에서 각각 0.488, 0.257로 나타났다. 100% EtOH 500uL를 처리한 CNT(Negative Control) 그룹의 Fv/Fm 값(*M. aeruginosa*: 0.466, 홍제천B: 0.204)은 Control 그룹과 TA처리 그룹들의 중간에서 나타났다. TA를 처리한 *M. aeruginosa* 그룹들의 값은 ATA 100-500uL(100uL 간격으로 처리)에서 순서대로 0.342, 0.315, 0.270, 0.259, 0.263이며, 홍제천B의 경우 각각 0.185, 0.081, 0.071, 0.054, 0.04이다. ATA 400uL를 처리했을 때 보다 500uL를 처리했을 때 더 낮은 Fv/Fm 값을 나타낸 홍제천B와 달리, *M. aeruginosa*에서는 400uL를 처리한 그룹이 오히려 더 낮은 값을 보였다. ATA 500uL를 처리하였을 때, *M. aeruginosa*의 경우에는 46% 가량 저해 효과가 나타났고, 홍제천B의 경우 84% 가량 광합성 효율이 저해되었다.

3.2 결과 해석

한국의 녹조 우점종에 속하는 *Microcystis aeruginosa*와 홍제천 내에 서식하는 남조류들에 대해 탄닌이 미치는 정도를 비교 분석하기 위하여 홍제천에 서식하는 남조류의 종이 무엇인지 파악하는 것이 가장 우선적인 단계이다. 이를 위해 본 실험은 총 네 차례 홍제천에서 채수를 실행하였다. Fig 1-4는 각기 다른 기후와 다른 장소에서 채수된 홍제천의 물에 배지 처리를 한 환경 샘플들이다. 이는 어떠한 환경에서 조류가 가장 많이 수집되는지를 파악하기 위함이다. 또한 환경샘플 A, C, G, H는 스타킹으로, 환경샘플 E는 미세먼지 마스크로 여과하는 과정 또한 거쳤다. 이는 배양 과정에서 거대 증식한 이끼, 돌말류와 같은 불순물을 제거하기 위함이다. 미세먼지 마스크의 경우 스타킹보다 많이 비교적 더 촘촘하게 구성 되어있을 것이라 예상했지만 여과 정도는 결과적으로 유사했다. 반면 환경샘플 B, D, F에서는 필터로 여과를 한 다른 샘플들에 대한 대조군으로 사용되었다. 전체적으로 채수 당시의 기후와 장소보다 인큐베이터에서 배양된 정도에 따라 큰 차이를 나타낼 수 있다. 인큐베이터 과정을 거치지 않은 환경샘플 E와 F의 경우, 아주 미세하게 녹색을 띠고 있다. 반면 4-5일간 배양된 환경샘플 A, B, C, D와 13일간 배양된 환경샘플 G, H는 확연하게 녹색을 띠고 있다. 국내 하천 및 호소에서 규조류, 녹조류, 남조류 등이 대부분 관찰된다는 점과 남조류나 녹조류의 이상증식에 의해 물빛이 녹색으로 변한다는 점에 의해 녹색을 띠는 홍제천 내에 녹조류가 서식하고 있다고 판단할 수 있다. [4] 결론적으로 인큐베이터 내에서의 배양 기간과 이끼, 돌말류, 조류 등의 성장 정도가 비례함을 알 수 있다.

실제로 400배율의 현미경 아래에서 환경샘플을 관찰한 결과, 일정한 형태의 녹조류가 관찰된다. 다른 불순물들을 최대한으로 제거하고 녹조류로 판단되는 특정 조류만을 증식시키기 위해 단일 배양을 채택하였다. 녹조류가 성장하기에 적절한 영양분을 제공해주고, pH를 적절하게 조절한 다음, 온도와 빛 등 기타 배양 조건을 완성시켜주면 실험실에서의 인공배양이 가능하다. [15] 단일 배양 결과, 가장 짙은 녹색을 나타내는 환경샘플 B와 D에서 녹조류를 포함하여 이끼와 같은 불순물도 비례하게 많이 배양된 것을 확인할 수 있다(Fig 7). 반면 환경샘플 A와 C의 경우, 색이 짙은 정도가 비교적 낮게 나타나며 그 원인은 앞서 설명한 필터를 통한 여과 여부라고 추측한다. 단일배양과 현미경 관찰 결과를 바탕으로 유추한 홍제천에 서식하는 녹조류의 종은 *Scenedesmus acutus*이며, 그 근거는 다음과 같다. 일반적으로 *Scenedesmus acutus*는 4개에서 8개의 가늘고 긴 방추형 형태의 세포로 구성된 군체는 비교적 규칙적인 평면상으로 배열되어 있다. [8] 다음은 *Scenedesmus acutus*의 현미경 사진이다. [27]



Fig 19. *Scenedesmus acutus* (Illustrations of The Japanese Fresh- water Algae, 1977).

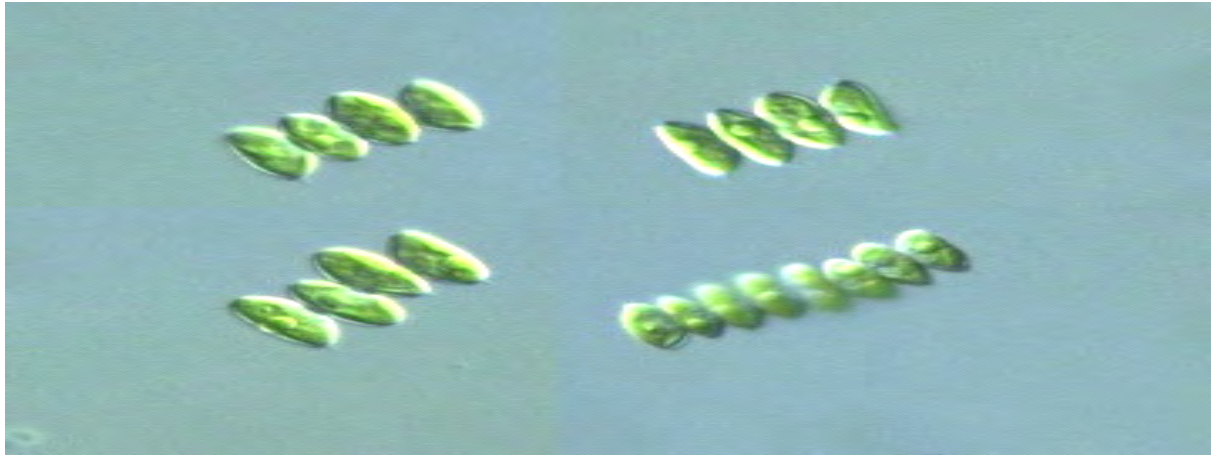


Fig 20. *Scenedesmus acutus* (Illustrations of The Japanese Fresh-water Algae, 1977).

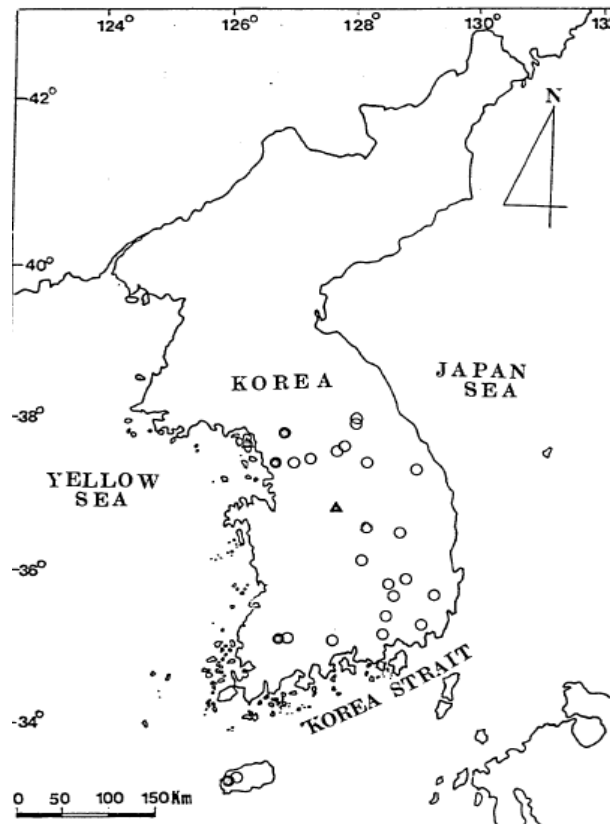


Figure 21. Distribution plot of *Scenedesmus acutus* [8]

400배율의 현미경으로 환경샘플 A를 관찰한 Fig 7과 Fig 8과 비교하면 그 형태가 무척이나 유사하다. 4개의 세포가 교차하면 붙어 있는 형태와 8개의 세포가 일렬로 배열된 형태 모두 본 실험에서 관찰된 바이다.

또한 이 종의 국내 분포를 나타내면 다음과 같다. 전국적으로 하천이 있는 환경에서 흔히 관찰되며, 홍제천이 위치한 서울권에서도 관찰된 바 있다.

*Scenedesmus acutus*로 추측되는 홍제천 환경샘플과 *M. aeruginosa*에 탄닌을 처리하기 위해 탄닌을 총 세 가지 형태로 추출하였다. 첫째로 100g의 붉은 사과 과피에서 추출하였고, 둘째로는 과피가 아닌 청색의 풋사과 과육 100g, 마지막으로 50g의 풋사과 과피에서 추출하였다. 그 결과, 붉은 사과로부터 청색의 풋사과보다 더 진한 갈색의 탄닌을 추출하였다. 과피의 색상이 추출되는 탄닌의 색에 영향을 미치는 요인 중 하나라는 것을 추측할 수 있다. 또한 동량의 과피에서 실험을

했다면 풋사과에서의 탄닌 추출량이 비교적 더 많았을 것이라 예상한다.

동일한 환경샘플에 탄닌의 양을 다르게 해서 처리하는 경우, 탄닌의 양과 색의 진한 정도가 비례하는 것을 확인할 수 있다(Fig 18). *M. aeruginosa*(NIES-298)에 풋사과 탄닌을 다르게 처리하는 경우에 대한 결과와 그에 대한 해석은 Fig 19-23을 참고할 수 있다. 섞여 있지 않은 상태의 탄닌 상층액을 처리하는 경우와 비교적 균일하게 혼합된 상태의 탄닌 혼합액을 처리하는 경우의 차이는 자명하게 나타난다. 혼합액을 사용하는 경우 응집되는 남조류의 정도가 더 효과적이기 때문에 탄닌 추출물에서 실제로 효과를 보이는 탄닌 물질은 가라앉아 있다고 판단할 수 있다. 또한 과육에서 추출한 탄닌과 과피에서 추출한 탄닌을 동일한 대상에 동일한 양을 처리했을 때 과피 탄닌 추출물이 더 많은 응집 반응을 일으키는 것을 확인할 수 있다. *M. aeruginosa*가 응집되는 형태는 불규칙성을 나타내기 때문에 일반화하기는 어렵다고 판단한다. 이와 같은 탄닌의 효과로 응집 및 침강을 통해 조류를 제거할 수 있게 된다. 조류가 응집되면 전기적 중화, 충돌 및 가교작용을 통해 floc을 형성한다. Floc이 침강을 하는 과정에서 수체 내 오염 물질을 제거한다. [9] *M. aeruginosa*는 앞서 응집이 되며 탄닌의 효과를 증명하였다. 응집된 상태의 조류에 대한 평가는 pH 측정과 클로로필 흡광도 측정 결과 분석 등을 통해서 할 수 있다.

사과에서 추출한 탄닌의 살조효과를 확인하기 위해 pH용지를 이용하여 각각 샘플의 pH 변화를 2회의 걸쳐 측정하였다. [6] 해당 샘플들을 6uL씩 뽑아 길게 나열된 pH용지에 일정한 간격으로 떨어뜨린다. 물기가 어느 정도 마르면 pH용지의 색 변화를 관찰하고 어느 정도의 pH인지 기준색과 비교하며 추론한다. 첫번째로 실시한 실험의 경우 사과추출 탄닌의 상층액만 주입한 *M. aeruginosa*과 홍제천B 환경샘플(이하 환경샘플), 상층액과 하층에 가라앉은 침전물을 혼들어 혼합한 탄닌을 주입한 *M. aeruginosa*와 환경샘플을 이용하였다. Control과 탄닌 250/500/750/1000uL씩 첨가한 *M. aeruginosa*와 환경샘플들 모두 대체로 연두색-녹색을 나타냈으며, pH용지의 기준을 통해 대체로 7-8사이의 pH를 가진다고 추론할 수 있다. pH 차이는 Control과 탄닌 250uL 첨가 샘플에서 가장 확연하게 나타났으며 탄닌을 250uL, 500uL 첨가한 샘플들의 색이 가장 진했다.

두번째로 실시한 실험에서는 아무것도 처리하지 않은 Positive Control과 100% EtOH 500uL를 처리한 Negative Control, 탄닌 100uL, 200uL, 300uL, 400uL, 500uL를 처리한 실험군을 이용하였다. 원심분리를 실시한 후의 해당 샘플에서 상층액을 6uL 추출하여 pH용지에 떨어뜨리는 과정을 실시하였다. 실험 결과, 첫번째 실험과 마찬가지로 pH용지가 대체로 pH7-8로 예상되는 녹색으로 변화한 것을 확인하였다. 색은 Positive Control에서 탄닌 500uL 첨가한 샘플로 갈수록 진하게 나타났으며, 샘플 간 확연하게 색이 나타난 *M. aeruginosa*와 달리 환경샘플은 뚜렷한 색 차이가 나타나지 않았다. 이는 *M. aeruginosa*와 달리 환경샘플의 경우 내부에 단일 종이 아닌 여러 종류의 조류와 기타 물질들이 존재할 가능성이 있어 이들이 결과에 영향을 미친 것이라 추측한다. 산성을 나타낼 것이라는 예상과 달리 중성 혹은 염기성에 가깝게 결과가 나타난 이유는 첨가된 탄닌이 가지는 산성보다 탄닌에 의해 죽은 조류가 가지는, 혹은 방출하는 염기성 물질이 더 우세하게 작용하기 때문이라 추측한다.

실험에 사용된 *M. aeruginosa*와 홍제천으로부터 채수 및 배양된 다양한 녹조현상 원인종 집단에게 탄닌을 처리하였을 때 탄닌이 어느 정도의 살조 효과를 가지며 어떠한 영향을 미치는가에 대해 알아보고자 클로로필 a 농도 측정을 실시하였다. 이전 실험에서 조건대로 탄닌 또는 다른 물질이 처리된 대조군, negative-control, 100-500uL ATA 처리 샘플을 사용하였다. 측정을 위한 사전준비 과정 중 측정을 원하는 클로로필 a만을 분리해내기 위해 거치는 원심분리 과정 중 첫 번째 원심분리에서 어느 정도의 시간, rpm에서 클로로필 a가 가장 많이 추출되는가를 알아보기 위해 대조군과 500uL의 탄닌 추출물을 처리한 샘플만을 사용하여 실험한 결과 10,000rpm, 15분, 12,000rpm 10분 원심분리 샘플에서 대체로 농도가 높게 나왔으나 원심분리 시간이 길어짐에 따라 펠렛이 너무 단단하게 부착되어 아세톤 처리 시 클로로필 a가 충분히 다 녹아나오지 않는다는 것이 확인되었다. 이는 샘플마다 녹아나오는 정도에 차이가 있을 수 있다는 것을 의미하며 이후 실험 결과에 악영향

을 미칠 수 있다고 판단하여 적당히 농도가 높으며 펠렛이 충분히 녹아나오는 13,000rpm 5분 원심 분리 샘플을 사용하는 것으로 결정하였다. 본 결과값은 아세톤 처리된 샘플을 663, 645, 630, 750nm의 파장에서 흡광도를 측정한 뒤 공식에 대입하여 구해진 값으로 클로로필 a의 농도를 의미한다.

클로로필 a 농도를 구하기 위해 아래 식을 이용한 것처럼 다른 실험에서도 이 식은 클로로필 a의 농도를 구하기 위한 식으로 이용된 바가 있다.

다음으로는 나머지 샘플(Negative-Control, 100~400uL의 TA를 처리한 샘플)을 위에서 실험한 대조군, 500uL의 TA 처리 샘플과 같이 13,000rpm, 5분간 원심 분리된 샘플들을 사용하여 측정을 실시하였다. TA 처리 후 경과 시간을 동일하게 하기 위해 모든 샘플들은 72시간 경과 시점으로 흡광도 측정을 위한 사전 준비가 진행되었다.

본 실험은 2배수로 진행되었기 때문에 동일한 시료를 둘로 나누어 각각 측정되었고 항목 당 2개의 값을 가진다. 위 그래프는 아래 표의 각 항목마다의 두 Y값(클로로필 a 농도값)의 평균을 기반으로 만들어졌다. 먼저 대조군의 값을 살펴보았을 때 *Microcystis aeruginosa*은 0.858796, 홍제천 샘플은 0.363826으로 대조군끼리의 클로로필 a 농도에 차이가 상당히 있음이 관찰된다. 실험에 사용

$$Y = 11.64X_1 - 2.16X_2 + 0.10X_3$$

$$X_1 = OD663 - OD750$$

$$X_2 = OD645 - OD750$$

$$X_3 = OD630 - OD750$$

$$\text{Chlorophyll-a} (\mu\text{g/l}) = \frac{Y \times \text{시료량 (ml)}}{\text{시료량 (l)}}$$

된 홍제천 샘플은 7월 5일에 채수한 물로부터 만들어졌기 때문에 그동안 배지를 처리하고 배양을 진행했다고는 하나 채수 후 상당한 시간이 경과되어 샘플 내부의 생존해있는 조류 양이 실험 시점에서는 많이 줄었기 때문인 것으로 생각된다. 다음 실험에서는 시간이 많이 지나지 않고 관리가 잘 된 샘플을 재료로 사용해야 할 것이다. 일단 *M. aeruginosa*와 홍제천 샘플 모두에서 유의한 경향성을 확인할 수 있었다. 대조군에 비해 TA를 처리한 샘플들에서는 클로로필 a의 농도가 명확하게 감소되었고 TA의 처리량이 증가함에 따라서 클로로필 a 농도의 감소율 또한 증가했다는 것이다. *M. aeruginosa*에 대해 더욱 들어가 보면 첫 번째로 대조군과 비교하였을 때 Negative-Control 샘플의 클로로필 a 농도가 약간 상승해 있는 것을 확인할 수 있다. 본래라면 에탄올은 조류에게 스트레스로 작용하여 오히려 개체수가 줄음에 따라 클로로필 a 농도 또한 더 낮은 것이 정상이다. 이 결과는 실험 중에 약간의 오류로 인한 것으로 생각된다. 하지만 동시에 에탄올에 의한 개체수 감소, 클로로필 a 농도의 감소는 탄닌 처리 여부에 비해서는 상당히 낮음은 확인할 수 있다. 전반적으로 살펴보면 대조군과 100uL TA 처리, 200uL TA 처리 샘플 사이에서 클로로필 a 농도의 감소 폭이 상당히 컸고 300uL 이상부터는 대체로 클로로필 a 농도의 감소가 더 이상 발생하지 않는 것으로 보인다. 대조군과 TA를 500uL 처리한 샘플과 비교하였을 때 약 30%의 감소율을 보였다. 반면 홍제천 샘플을 살펴보면 *M. aeruginosa*때와는 달리 Negative-Control의 클로로필 a 농도는 대조군에 비해 아주 약간 낮은 정도로 다시 한 번 알콜에 의한 영향은 TA에 비해 훨씬 적다는 것을 확인할 수 있었다. 이것으로 TA 추출물에 의한 개체수 감소는 추출물 내에 포함되어 있는 에탄올에 의한 것이 아니라는 것으로 결론지을 수 있다. 또한 *M. aeruginosa*와는 달리 300uL 이상 처리했을 때 클로로필 a 농도의 감소율이 더더지지 않고 일정하게 감소하는 것을 확인할 수 있다. 대조군과 TA를 500uL 처리한 샘플과 비교하였을 때 감소율은 약 70% 수준으로 *M. aeruginosa*를 대상으로

했을 때에 비해 현저히 높았으며 농도가 일정하게 감소했기 때문에 TA의 처리량을 더 늘리면 그만큼 더 감소할 가능성도 생각해볼 수 있다. 재실험을 진행하였을 때 이와 유사한 결과가 나온다면 추출물 처리량을 더 늘려 실험을 진행해볼 것이다. 본 실험 결과와 일치하는 한 연구에서도 *Desmodesmus armatus*와 *M. aeruginosa*에 폴리페놀성 화합물인 탄닌산과 갈릭산을 처리하여 2일 후 클로로필 a의 농도를 측정해본 결과 M.a에서 클로로필 a의 농도가 감소했다고 한다. [25]

TA 처리량에 따른 *Microcystis aeruginosa*와 홍제천B의 성장 억제 효과(광합성 효율) 정도를 분석하면 다음과 같다. *M. aeruginosa*는 우리나라 관리 대상 남조류 4종 (*Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Oscillatoria*) 중에서 가장 광범위하게 우점종을 차지하고 있는 종이다. [17] 본 실험에서는 살조제로부터의 2차 오염을 줄이고자 하는 노력과 맞물려, 자연 친화적이며 생분해 가능한 Apple Tannic acid(ATA)를 사과피로부터 추출하여 이용하였다. 이와 유사하게 *M. aeruginosa*의 성장제어 및 제거 실험에 썩 추출액을 이용거나 [16], 솔잎 추출액을 사용한 실험이 있다. [17] 실제로 그 효과를 확인한 두 실험에서 알 수 있듯이 자연 추출물으로써 녹조 현상을 해결하고자 하는 노력은 계속되고 있는데, 본 실험에서도 결과적으로 살조 효과를 확인할 수 있었다. *M. aeruginosa*에 ATA를 처리한 결과 광합성 효율이 확연히 저해되었으며, 그 중에서도 ATA 100uL를 처리하였을 때 이용량 대비 효과가 가장 좋다. 100uL의 간격으로 ATA 처리량을 늘리며 그 효과를 확인하였을 때, 같은 양(100uL)임에도 불구하고 처음에 처리한 100uL의 영향이 지속적으로 나타나지 않았다. ATA가 살조제로서 활용된다면 경제적으로 이점이 있으면서도 효과가 잘 나타나는 범위의 ATA 농도를 고려해야 옳을 것으로 판단된다. 특히 *M. aeruginosa*의 경우에는 ATA를 500uL 처리했을 때 46% 가량 광합성 효율이 떨어졌기 때문에 TA의 적정 농도에 대한 지속적인 연구가 필요할 것으로 전망된다. 한편 ATA 400uL와 ATA 500uL 그룹의 성장 억제 효과를 비교했을 때, 400uL에서 약간 더 유의미한 성장 억제의 결과가 나왔다. 매우 유사한 값이지만 그럼에도 ATA 400uL에서 더 높게 측정된 이유는 다음과 같이 추측할 수 있다. 첫째, 확률상의 이유로 유독 ATA 500uL를 처리한 그룹에 조류가 더 적게 들어간 경우를 생각할 수 있으며 둘째로는 과다한 ATA의 양이 오히려 조류의 적응도를 높여 조류가 회복한 경우를 생각할 수 있다. 후자의 경우라면 ATA 양이 400-500uL 사이일 때 최대 효과가 나타남을 예측할 수 있을 것이다.

ATA 500uL를 기준으로 TA는 *M. aeruginosa* 보다 환경 샘플인 홍제천B에서 더 효과적이었다. *M. aeruginosa*의 경우와 달리 홍제천B에서는 처리한 ATA의 양이 많을수록 광합성 효율이 낮아지는 일정한 추세를 보였다. 특히 홍제천B에 TA를 처리하였을 때 상대적으로 침전 효과가 더 발생하였는데, 이러한 응축 효과에 의하여 광합성 효율이 *M. aeruginosa*에 비해 더 저해된 것으로 보인다. 실제로 환경 샘플은 다양한 조류 종들을 포함하기 때문에, TA가 살조제로서 이용 가능한지를 판단할 때 긍정적인 부분으로 작용할 수 있을 것이라 생각된다.

IV. 결론 및 제언

최근 다양한 오염물질로 인한 부영양화와 지구온난화는 심각한 녹조 현상을 일으키고 있다. 특히 *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Microcystis*, *Oscillatoria*는 녹조를 일으킴과 동시에 독소를 생성하기 때문에 심각한 악취, 물고기의 폐사 등의 문제를 일으키고 있다. 이를 해결하기 위해 다양한 해결 방안이 제시되고 있지만 경제적, 환경친화적, 저독성 등의 기준에 모두 부합하는 해결책을 찾기 못한 실정이며 여전히 연구가 진행 중이다. 기본적으로 2차 오염을 일으키지 않고 본연의 역할을 다한 후 생분해 되는 살조 물질을 찾기 위해서는 천연 물질이 해답일 것이며 최근 다양한 천연 물질을 이용한 살조 실험이 진행되고 있다. 이와 같은 배경을 바탕으로 본 실험은 사과 과피에서 추출한 탄닌을 해결책으로 내놓고자 한다. 탄닌의 타감 작용이 확인된 이후로 탄닌을 항균, 살조 등에 이용하는 다양한 실험이 이루어지고 있는데, 특히 사과 과피에서 추출한 탄닌은 살조 효과뿐만 아니라 재활용 효과 역시 가져올 수 있기 때문에 채택하였다. 전세계에서 사과 과피는 음식물 쓰레기로 대량 폐기되고 있으며 심지어 이들은 퇴비로 사용하기 위해 타감 물질, 즉 탄닌을 제거하는 가공과정을 거쳐야 한다. 따라서 경제적으로도, 환경적으로도 사과 과피는 문제인 것이 현실이다. 이번 실험에서는 이와 같은 점을 반영하여 일석이조의 효과를 얻고자 한다. 음식물 쓰레기로 버려지는 사과 과피에서 탄닌을 추출하여 남은 껍질은 퇴비로 사용하고 탄닌은 녹조 현상을 해결하는 데 사용하는 것이 목적이다.

실험은 *Microcystis aeruginosa* 와 홍제천에서 지속적으로 채수한 환경 sample을 사용하여 진행되었다. 특히 홍제천 sample에는 녹조를 일으키는 단일종의 조류만 존재하는 것이 아니라 다양한 생물들이 공존하고 있는데 이는 사과 추출 탄닌의 실현 가능성을 확인하는 과정의 역할을 한다. 탄닌은 사과 과피, 풋사과의 과육과 과피 등에서 추출하여 그 효과를 확인하였는데 사과 과피가 가장 효과적이라는 결과를 바탕으로 이를 조류에 농도별로 처리하여 그 결과를 확인하였다. 탄닌의 영향을 확인하기 위해 먼저 pH를 측정해본 결과, 탄닌을 처리하지 않은 대조군과 탄닌을 100uL에서 500uL까지 처리한 sample들이 평균적으로 7-8의 pH를 가지며 큰 차이를 보이지 않았다. 탄닌은 산이므로 pH가 낮을 것으로 예상했던 것과는 다른 결과이며 그 이유는 첨가된 탄닌이 가지는 산성보다 탄닌에 의해 죽은 조류가 가지는, 혹은 방출하는 염기성 물질이 더 우세하게 작용하기 때문이라고 추측한다. 또한 육안으로 조류들이 뭉쳐 바닥에 가라앉는 모습을 확인하였으며 현미경으로 관찰하였을 때 조류들이 대량으로 뭉쳐있는 동시에 점액질과 같은 특이 물질이 함께 있는 것을 발견하였다. 이에 더해 조류의 성장 여부와 직결되어 있는 클로로필 a의 흡광도 측정을 진행하였다. 750nm, 663nm, 645nm, 630nm의 흡광도에서 얻은 값을 계산식에 대입하였을 때 대조군에 비해 탄닌을 처리한 sample의 클로로필 a의 농도는 명확하게 감소되었고 탄닌의 처리량이 증가함에 따라 클로로필 a 농도의 감소율 또한 증가했다는 것을 확인하였다. 특히 홍제천 sample에서는 탄닌의 처리 농도가 증가함에 따라 클로로필 a의 농도 역시 일정하게 감소하는 것으로 보아 처리 농도를 더 증가시켰을 때 확실한 살조가 가능할 것으로 추정된다. 결과적으로 사과 과피에서 추출한 탄닌의 살조 효과는 분명하며 본 실험의 목표대로 사과 과피 탄닌은 녹조 현상 해결과 음식물 쓰레기의 효율적인 처리를 가능케 하는 해결책이다.

다만 본 실험은 탄닌 처리 후 조류의 성장 여부를 판단하기 위해 PsbA, PasA, rbcL과 같은 광합성 단백질 관련 유전자의 변화를 대조군과 실험군을 상대로 비교 분석하는 등 더 다양한 지표를 사용할 필요가 있다. 현재 클로로필 a의 흡광도 측정, pH 측정, 현미경을 통한 관찰을 통해 조류의 상태를 확인하였지만 진행 중에 있는 광합성 효율 측정과 ROS 및 항산화 단백질의 생성량 비교, 응집도 측정 등의 추가적인 실험을 진행하여 그 효과를 입증하고자 한다. 이와 더불어 HPLC를 통해 사과 과피 추출물의 성분을 분석하여 탄닌 이외에 살조 효과를 극대화시키거나 오히려 방해하는 성분은 존재하지 않는지 확인하는 실험 역시 진행하고자 한다.

V. 첨부 자료

- [1] 강상재, 퇴비의 부숙 과정 중 추출물이 종자 발아력에 미치는 영향, 생물환경조절학회지, 2005, 제14권, pp. 407-414.
- [2] 김미숙, 낙동강 부영양화와 수질환경요인의 통계 적 분석, 한국조류학회지, 2002, pp. 105-115.
- [3] 농사로, “사과”, 농촌진흥청, <http://www.nongsaro.go.kr/portal/ps/psr/psrb/monthmtDtlps?menuId=PS03924&cntntsNo=98818#non> (검색일:2018.08.09.).
- [4] 모상호, 영산강 조류발생 형태 및 제어방안, 2013, 전남대학교 석사학위논문. 박명환, 왕겨 메탄올 추출물을 이용한 독성 남조 *Microcystis aeruginosa*의 생장 억제, Korean J. Limnol 41. .2008, pp. 99-106.
- [5] 박세근, *Microcystis aeruginosa*에 대한 hydrotrope-combined copper의 생장억제 및 독성평가, Korean Journal of Microbiology, 2015, 제51권, pp. 7-13.
- [6] 박혜진, 황토의 *Microcystis* spp. 제거효율 및 생태독성평가, Journal of Korean Society on Water Environment, 2014, 제30권, pp. 261-268.
- [7] 박흥기, 정은영, 이유정, 정종문, 홍용기, 낙동강 하류에 분포하는 남조류 *Microcystis aeruginosa*의 무균분리 및 16S rRNA 유전자 염기서열분석, 생명과학회지, 2002, 제12권, pp. 158-163.
- [8] 안석숙, 韓國産 綠藻 *Scenedesmus*屬 植物의 分類學的 研究 = (A)taxonomic study of the genus *scenedesmus*, 1990, 숙명여자대학교 박사학위논문.
- [9] 안성민, 황토와 응집제, 살조제의 남조류 *Microcystis* 제거 효과 및 위해성 평가 (The Assessment of Blue-green Algae *Microcystis* Elimination Effect and Risk of Loess, Coagulants and Algicides), 2011, 대구대학교 석사학위논문.
- [10] 이재현, 신귀암, 수도물을 통해 노출되는 녹조독소의 인체위해성 평가, 한국환경과학회지, 2017, 제26권, pp. 345-362.
- [11] 전태완, 수도권 지역의 음식물쓰레기 발생 모니터링 결과 비교, 한국폐기물자원순환학회, 2013, pp. 218.
- [12] 전한기, 음식물 퇴비의 연용 시용에 따른 고추의 생육과 수량에 미치는 영향, 2003, 폐기물 자원화, 제11권, pp. 129.
- [13] 최희정, 카페인을 이용한 유해 녹조류 생장 제어, 한국수처리학회지, 2016, 제24권, pp. 111-122.
- [14] 최희정, 쑥 추출액을 이용한 제거 및 성장억제 연구, Journal of Korean Society on Water Environment, 2017, 제33권, pp. 441-448
- [15] 한세진, 녹조류를 이용한 바이오메탄을 생산 및 정제, 2012, 강원대학교 석사학위논문
- [16] Choi, H. J., Removal of *Microcystis aeruginosa* using Pine Needle Extracts, Journal of Korean Society on Water Environment, 2017, Vol. 33, pp. 8-14.
- [17] Choi, H. J., Removal and Regrowth Inhibition of *Microcystis aeruginosa* using *Artemisia asiatica* Extracts, Journal of Korean Society on Water Environment, 2017, Vol. 33, pp. 441-448.
- [18] Daniel Tillett, Elke Dittmann, Marcel Erhard, Hans von Döhren, Thomas Börner, Brett A Neilan, Structural organization of microcystin biosynthesis in *Microcystis aeruginosa* PCC7806: an integrated peptide-polyketide synthetase system, Chemistry & Biology, 2002, pp. 753-764.
- [19] Henis, Y., Tagari, H., Volcani, R., Effect of water extracts of carob pods, tannic acid, and their derivatives on the morphology and growth of microorganisms, J.

- Appl. Microbiol, 1964, Vol. 12, pp. 204-209.
- [20] Hwang E, The effect of supplementart feeding of tannic acid on growth and hematological changes in rats fed high fat diet, J Vet Clin, 2005, Vol. 22, pp. 108-113.
 - [21] Isenburg JC, Karamchandani NV, Simionescu DT, et al., Structural requirements for stabilization of vascular elastin by polyphenolic tannins, Biomaterials, 2006, Vol. 27, pp. 3645-3651.
 - [22] Joo, J.H., Cho, H., Han, M.S., Novel algicidal substance (naphthoquinone group) from bio-derived synthetic materials against harmful cyanobacteria, Microcystis and Dolichospermum: Ecology and Resilient Infrastructure, 2016, Vol. 3, pp. 22-34.
 - [23] Kwak, H.S., Kim, B.G., Kim, J.S., Algicidal characterisrics of cashew nut oil against microalgae and development of its mixtures with synergistic effects, Weed & Turfgrass Science, 2016, Vol. 5, pp. 136-143.
 - [24] Oberholster, P.J., A.M. Botha and J.U. Grobbelaar, Microcystis aeruginosa: source of toxic microcystins in drinking water, African Journal of Biotechnology, 2004, Vol. 3, pp. 159-168.
 - [25] Pauline Laue, Hanno Bährs, Shumon Chakrabarti, Christian E.W. Steinberg, Natural xenobiotics to prevent cyanobacterial and algal growth in freshwater: Contrasting efficacy of tannic acid, gallic acid, and gramine, Chemosphere, 2014, Vol. 104, pp. 212-220.
 - [26] P. Hoagland, D. M. Anderson, Y. Kaoru, and A. W. White, The economic effects of harmful algal blooms in the United States: Estimates, assessment issues, and information needs, Estuaries, 2002, Vol. 25, pp. 819.
 - [27] Protist Images, “Scenedesmus acutus”,http://protist.i.hosei.ac.jp/pdb/images/chlorophyta/scenedesmus/acutus/costulatus_10.html, (검색일:2018.08.23.)



염기서열 분석 및 비교를 통한 해양 생물종 판별

박예진, 박예경, 류성현, 임소연, 정서윤, 최태준, 김창배

Abstract

다양한 생물 종 중에는 그 사이의 형태적 특징이 유사하여 육안만으로 동정하기 힘든 경우가 존재한다. 최근 이러한 점을 악용하여 종을 속여 판매함으로써 금전적 이득을 취한 사례가 다량 보고되고 있다. 본 연구에서는 이러한 오류를 막기 위한 방법 중 하나로 분자생물학적 기법인 DNA barcode에 주목하였다. 그에 기반하여 종명을 확인하지 않은 어류 sample 8개의 DNA 채취, 증폭, 염기서열 분석 과정을 거친 후 각 sample의 종을 동정하였다. 실험에 앞서 해당 sample 8마리 모두 참조기(*Larimichthys polyactis*)일 것이라고 가정한다. 실험 결과 모든 종의 염기 서열이 예상했던 것과 같은 참조기(*Larimichthys polyactis*)로 확인되었다. 더하여 실험에 사용한 sample의 sequence와 기준 sequence사이의 유사도 또한 100%로 일치했다. 이를 통해 해당 생물은 종명을 속이지 않았음을 확인 할 수 있었다. 분석한 sequence와 기존에 알려진 종과의 비교 결과를 통해 종을 속여 판매하는지의 여부를 확인하는 것으로 실험을 마무리한다.

Introduction

전통적으로 시장에서는 형태학적인 특징을 이용하여 어종을 동정하였다. 그러나 식품으로 가공할 시 원 형태를 알아볼 수 없으며 다량어와 같은 대형 어류의 경우 사전에 부위별로 해체되어 유통되므로 기존 방법만으로는 종을 규명하기 어렵다. 이러한 동정 상의 어려움을 악용하여 저가 어종을 시세가 높은 특정 종으로 둔갑시켜 판매하는 행위(intended mislabelling)가 전 세계적으로 증가하는 추세이다. 이러한 범죄를 적발하고 소비자의 혼란을 막기 위해서는 수산자원의 정확한 동정이 필수적이다.

Material & Method

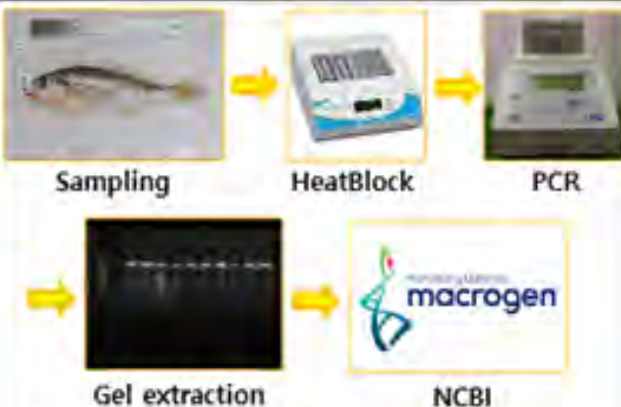


Table 1. Primer Fish 염기서열

Primer	Sequence (5' → 3')
Fish F1	TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC
Fish R1	TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA

Results

실험에 사용된 8개의 어류 sample로부터 추출한 DNA의 sequence를 NCBI BLAST를 통해 등록되어있는 sequence와 대조한 결과에서 확인하고자 했던 참조기(*Larimichthys polyactis*)와 100%의 DNA sequence 일치도를 나타내고 있음을 확인했다. 이를 통해 실험에 사용된 sample들은 생물종의 위장이 이루어지지 않았음을 알 수 있다.

Table 2. sample의 NCBI BLAST값 일치도

11-Fish	12-Fish
13-Fish	14-Fish
15-Fish	16-Fish
17-Fish	18-Fish

Conclusion

NCBI BLAST(<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)의 기존 데이터베이스와 추출된 DNA sequence를 대조한 결과 모든 어류 sample이 확인하고자 했던 종인 참조기(*Larimichthys polyactis*)로 확인되었다. 일치율은 모든 경우에서 최상위 데이터 기준 100%에 달할 정도로 높다. 그러나 샘플의 수가 총 8마리로 적고 수집 장소가 동일하다는 한계점이 있다.

DNA barcoding 기술은 근연종 및 잘 알려지지 않은 생물의 종 구분과 생물 정보 축적 및 사용에 유의미한 영향을 끼칠 수 있으므로 계속 연구되어야 한다.

Sangmyung University
Department of Biotechnology
Academic Club AMP



염기서열 분석 및 비교를 통한 해양 생물종 판별

Based on the sequence analysis and comparison
Discrimination of marine species

지도 교수님 : 김창배 교수님

실험 조교님 : 최태준 조교님

실험 참여자 : 박예진, 박예경, 류성현, 임소연, 정서운

Abstract

지구상에 존재하는 다양한 생물 종은 육안으로 구별이 가능한 종도 있지만 겉모습이 비슷하여 육안만으로는 비교가 불가능한 종도 상당수 존재한다. 이러한 점을 악용하여 생물종을 속임으로써 금전적 이득을 취하는 경우도 존재하며 소비자들은 육안으로 판별이 어렵기 때문에 판매자의 눈속임에 속아 손해를 보는 경우도 다반수이다. 이번 실험을 통해 종명을 확인하지 않은 임의의 어류 sample 8개의 DNA를 수집하고 염기서열 분석을 통해 기존에 알려진 종들과 비교함으로써 실험 sample 8개의 종을 확인해 보고자 한다. 실험에 앞서 8개의 sample은 모두 참조기(*Larimichthys polyactis*)일 것이라고 가정하여 실험을 진행한다. 분석한 sequence와 기존에 알려진 종과의 비교 결과를 통해 종을 속여 판매하는지의 여부를 확인하는 것으로 실험을 마무리한다. 실험 진행 전 가정한 sample의 종명은 참조기(*Larimichthys polyactis*)였으며 실험 결과의 sequence 또한 예상했던 것과 같은 참조기(*Larimichthys polyactis*)로 확인되었다. 실험에 사용한 sample의 sequence와 기준 sequence사이의 유사도 또한 100%로 일치했으며 이를 통해 종명을 속이지 않았음을 확인 할 수 있었다. 실험 종료 후에는 결과를 정리하고 도출된 결과를 바탕으로 실험 과정에서 보완할 부분과 추가적인 실험에서 변화시킬만한 조건들을 기록했으며 sample수 집지역의 한정됨으로 인한 다양성 부족과 sample자체의 개수가 적은 것이 다음 실험에서 보완되어야 할 점으로 생각된다. 추가적으로 실험의 사전단계와 진행과정에서 찾아본 생물종 판별에 대한 기사를 실험 참여자들간 공유하고 의논함으로써 생물종 판별의 필요성과 이에 사용되는 DNA barcoding 기술에 대하여 실험 참여자들의 생각과 의견을 추합하여 DNA barcoding 기술의 중요성과 연구의 필요성을 언급한다.

Introduction

기존의 시중에서는 판매자와 소비자가 형태학적인 특징을 이용하여 어종을 동정하였다. 그러나 어묵, 회 등의 식품으로 가공할 시 원 형태를 알아볼 수 없으며 다랑어와 같은 대형 어류의 경우 사전에 부위별로 해체한 후에 유통되므로 기존 방법만으로는 종을 규명하기 어려운 것이 현실이었다. 이러한 동정 상의 어려움을 악용하여 부당한 이윤 창출을 위해 저가 어종을 시세가 높은 특정 종으로 둔갑시켜 판매하는 행위(intended mislabelling)가 전 세계적으로 증가하는 추세이다. 일례로 캐나다의 경우 밴쿠버, 토론토, 오타와를 비롯한 5개 대도시에서 채취한 382개 샘플 중 168개의 샘플이 CFIA(Canadian Food Inspection Agency)가 제시한 labelling 조건에 미치지 못하는 것으로 드러났다. 이는 전체의 44퍼센트에 달하는 수치이며 intended mislabelling의 대표 사례이다. 또한 과거 국내에서도 식약청 조사 결과 73개의 업소 중 16개의 업소에서 기름 갈치꼬치(*Ruvettus pretiosus*)를 형태적 특징이 유사한 다랑어(*Thunnus spp*)로 속여 판매한 사실이 적발된 바 있다. 이러한 같은 범죄를 적발하고 소비자의 혼란을 막기 위해서는 수산자원의 정확한 동정을 통해 판매자의 불법행위를 제재하고 소비자에게 판매 중인 생물종에 대한 정확한 정보가 제공되어야 한다. 과거부터 현재까지 생물종 동정 과정에 대한 많은 연구가 진행되었으며 최근 등장한 분자생물학적 방법인 DNA barcoding 기술이 생물종 동정의 방법으로 조명 받고 있다. DNA barcoding은 종 분류에 유용한 특정 유전자를 거대 데이터베이스에 참조 표본(reference standard)으로 등록하고 염기서열의 상동성 비교를 통해 종을 동정해내는 기법이다. 동물종 동정 시에는 주로 미토콘드리아 시토크롬옥시다아제 I (CO I) 유전자의 5'말단 600bp 가량 부분을 이용한다. 해당 유전자는 핵 유전체보다 복제개수가 많으며 종 내에서의 변이는 극히 적은 반면 다른 종간의 변이가 극심하므로 생물 종 동정 및 계통수 작성에 널리 사용된다. 이를 이용한 동정이 기존 형태학적 분류 방법과 거의 유사할 정도로 높은 적중률을 보였다는 사실이 선행연구에서 확인되었으며 이후 DNA barcoding에 대한 연구가 활발히 진행되었다. DNA barcoding 기술의 국내 이용 예시로는 파주시에서 수집된 두부 손상 상태의 조류 사체를 DNA barcoding 기술을 사용하여 동정함으로써 43년 만의 왕새매(*Butastur indicus*)의 번식이 진행되고 있음을 확인한 사례가 있다. 왕새매는 맹금류에 속하는 최상위 포식자로서 생태계를 안정시키는데 중요한 역할을 한다. 그러나 현재 맹금류의 개체 수는 산업화와 도시화에 따른 서식지 단절 및 먹이생물의 감소 등으로 줄어들고 있는 추세였으며 이러한 상황에서 DNA barcoding 기술을 통해 폐사한 야생동물의 종을 동정하고 생태계 주요 종의 확인이 가능했다는 점으로 보아 DNA barcoding 기술은 생물 및 생태계 보존의 분야에서도 중요한 역할을 할 것으로 기대된다.

Material & Method

1. sampling

온라인 마켓에서 참조기로 판매 중인 Sample 8마리를 구매하여 실험에 사용하였다. 동정을 위해 sample의 꼬리지느러미와 배지느러미에서 조직을 수집하여 균질화하였다. 70% 알코올로 고정한 후 heat block을 사용해 lysis 과정을 진행하였다.

2. DNA extraction

확보된 시료에서 DNA를 추출하기 위해 AccuPrep® Genomic DNA Extraction kit (Bioneer, Korea)를 사용하였다. 추출된 DNA는 1% TAE agarose gel 상에서 전기영동하여 확인하였다.

3. Polymerase chain reaction (PCR)

COI 유전자를 증폭하기 위해 주형 DNA template 3μl, DW 5μl, Primer Fish F1 1μl, Primer Fish R1 1μl, master mix 10μl를 혼합하여 total volume 20μl로 계산한 후 PCR을 진행하였다. PCR 과정에서 COI 유전자 내의 5'말단 600bp만큼의 부분이 증폭되었으며 PCR에 사용한 primer는 어류 미토콘드리아 COI 증폭의 univesai primer 중 하나인 Primer Fish F1, Primer Fish R1이다. PCR 반응 조건은

94℃에서 5분 동안 pre-denatulation을 진행한 후 94℃에서 30초간 denatulation, 55℃에서 30초간 annealing, 72℃에서 1분간 extension을 진행하고 본 과정을 30cycle 반복하여 진행한다. cycle의 반복이 종료된 후 72℃에서 10분 동안 elongation 하였다. 이후 1% TAE agarose gel 상에서 전기영동하여 증폭 결과를 확인하였다. 전기영동을 통해 얻은 DNA 결과를 국내 전문 기관(Macrogen, Korea)에 의뢰하여 추가 정제 및 DNA Sequencing을 진행하였다. 해당 결과는 NCBI BLAST를 사용하여 비교 및 대조함으로서 실험 sample의 동정을 진행하였다.

Table 1. Fish 염기서열

Primer	Sequence (5'→ 3')	Reference
Fish F1	TCA ACC AAC CAC AAA GAC ATT GGC AC	Ward et al., 2005
Fish R1	TAG ACT TCT GGG TGG CCA AAG AAT CA	Ward et al., 2005

Results

Table 2. 실험 sample의 NCBI BLAST값 및 최상단종과의 일치도

J1-Fish							J2-Fish																																																																																																																											
Alignments Download Search Display Interpretation of results <table><tr><th>Description</th><th>Max score</th><th>Total Query score</th><th>E value</th><th>Ident</th><th>Accession</th></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>101</td><td>101</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>99%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>99%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>99%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>99%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>99%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>99%</td><td>AF041411</td></tr></table>							Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	101	101	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411	Alignments Download Search Display Interpretation of results <table><tr><th>Description</th><th>Max score</th><th>Total Query score</th><th>E value</th><th>Ident</th><th>Accession</th></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr></table>							Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411							
Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession																																																																																																																													
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	101	101	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	99%	AF041411																																																																																																																												
Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession																																																																																																																													
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
일치도		100%					일치도		100%																																																																																																																									
J3-Fish							J4-Fish																																																																																																																											
Alignments Download Search Display Interpretation of results <table><tr><th>Description</th><th>Max score</th><th>Total Query score</th><th>E value</th><th>Ident</th><th>Accession</th></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr></table>							Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Alignments Download Search Display Interpretation of results <table><tr><th>Description</th><th>Max score</th><th>Total Query score</th><th>E value</th><th>Ident</th><th>Accession</th></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr></table>							Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411							
Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession																																																																																																																													
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession																																																																																																																													
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
일치도		100%					일치도		100%																																																																																																																									
J5-Fish							J6-Fish																																																																																																																											
Alignments Download Search Display Interpretation of results <table><tr><th>Description</th><th>Max score</th><th>Total Query score</th><th>E value</th><th>Ident</th><th>Accession</th></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>102</td><td>102</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr></table>							Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411	Alignments Download Search Display Interpretation of results <table><tr><th>Description</th><th>Max score</th><th>Total Query score</th><th>E value</th><th>Ident</th><th>Accession</th></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr></table>							Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411							
Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession																																																																																																																													
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	102	102	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession																																																																																																																													
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
일치도		100%					일치도		100%																																																																																																																									
J7-Fish							J8-Fish																																																																																																																											
Alignments Download Search Display Interpretation of results <table><tr><th>Description</th><th>Max score</th><th>Total Query score</th><th>E value</th><th>Ident</th><th>Accession</th></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>103</td><td>103</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>103</td><td>103</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>103</td><td>103</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>103</td><td>103</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>103</td><td>103</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>103</td><td>103</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>103</td><td>103</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>103</td><td>103</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr></table>							Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411	Alignments Download Search Display Interpretation of results <table><tr><th>Description</th><th>Max score</th><th>Total Query score</th><th>E value</th><th>Ident</th><th>Accession</th></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr><tr><td>Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)</td><td>100</td><td>100</td><td>100%</td><td>0.0</td><td>100%</td><td>AF041411</td></tr></table>							Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411	Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411
Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession																																																																																																																													
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	103	103	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Description	Max score	Total Query score	E value	Ident	Accession																																																																																																																													
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
Lamprologus pulchellus (GenBank: AF041411) (chromosome: whole genome)	100	100	100%	0.0	100%	AF041411																																																																																																																												
일치도		100%					일치도		100%																																																																																																																									

실험에 사용된 8개의 임의 sample로부터 추출한 DNA의 sequence를 NCBI BLAST를 통해 등록되어있는 sequence와 대조한 결과에서 확인하고자 했던 참조기(*Larimichthys polyactis*)와 100%의 DNA sequence 일치도를 나타내고 있음을 확인했다. 이를 통해 실험에 사용된 sample들은 생물종의 위장이 이루어지지 않았음을 알 수 있다.

Discussion & Conclusion

실험에 사용된 8개의 sample은 종명을 확인하지 않은 상태로 사용되었으며 DNA의 추출 과정을 통해 각 sample의 DNA를 확보하여 sequence 분석을 진행한 결과에 따르면 8개의 sample 모두가 확인하고자 했던 종인 참조기(*Larimichthys polyactis*)로 확인되었다. 이를 통해 실험 진행 전 우려했던 생물종의 위장 판매는 이루어지고 있지 않음을 간단하게 확인할 수 있었다. 하지만 실험을 진행함에 있어 8개의 sample만을 사용했기 때문에 sample의 수가 현재 시장 전체의 신뢰도를 확보하기에 부족했다는 점과 8개의 sample을 준비함에 있어 동일한 곳에서 수집함으로써 sample의 다양성이 부족했다는 점이 다음 실험에서 보완되어야 할 부분으로 생각된다. 이에 따라 추후 진행해볼 실험에서는 sample 수집 과정상의 변화가 필요할 것으로 판단하였다. 다음 실험 진행 시에는 sample의 수를 늘려봄으로써 실험 결과의 신뢰도를 확보하고 서로 다른 지역에서 sample을 수집함으로써 sample의 다양성을 증가시키는 것을 통해 이전보다 세밀한 실험을 진행하는 것을 목표로 설정했다.

이번 실험의 기본 원리는 출처가 불분명한 생물종의 DNA를 채취하고 sequence 확인을 통해 생물종을 판별하는 DNA barcoding 기술의 원리를 이용하였다. 실험에 참여한 학생들의 의견은 DNA barcoding 기술 연구가 계속 진행되어 기술의 진보와 발전이 이루어져야 한다는 것으로 통일되었으며 그에 대한 이유는 다음과 같이 정리되었다. 첫째, 현재 시장에서 물건을 소비하는 소비자 개개인은 판매자가 생물종을 속여 비슷한 종으로 판매할 시에 이를 확인할 수 있는 방법이 보편화되어 있지 않다. 따라서 작게는 기업 차원에서, 크게는 국가적 차원에서 DNA barcoding 기술을 통해 소비자에게 제품에 대한 정보를 제공해야 하며 이를 통해 소비자의 알 권리 및 제품에 대한 신뢰도를 충족시켜 주어야 한다. 둘째, 판매자가 생물종을 속여 판매함으로써 얻게 되는 금전적 이득은 시장경제의 기본 원리인 ‘수요에 따른 공급과 이에 대한 보상의 윤리’에서 벗어난 불법적 이득이기 때문에 제재되어야 하며 제재를 위한 기준 마련 과정에서 DNA barcoding 기술이 종의 구분을 가능하게 해줄 수 있을 것이다. 셋째, 단순 시장경제의 차원에서 벗어나 과거 존재했으나 현재 사망하여 종을 확인할 수 없는 생물의 종 구분 및 새롭게 발견된 생물의 종을 정하기 위해 기존에 확인된 다른 종들과의 유연관계 비교 등과 같이 생물 정보와 관련된 전 분야에서 DNA barcoding 기술이 사용될 수 있기 때문이다. 이와 같은 이유로 알 수 없는 생물의 종 구분과 생물 정보 축적 및 사용을 용이하게 해줄 수 있는 DNA barcoding 기술은 계속 연구되어야 한다.

References

강남훈, 식품의 기준 및 규격설정을 위한 규제영향분석 사업 최종보고서, 2010.11.

‘식품의 기준 및 규격설정을 위한 규제영향분석 사업’

<http://www.ndsl.kr/ndsl/search/detail/report/reportSearchResultDetail.do?cn=TRKO201200006744>

박예지, 석사학위논문, 2012.08.

‘미토콘드리아 시토크롬 옥시다제 I 유전자 염기서열에 의한 한국산 해양어류종의 분자동정’

http://www.riss.kr/search/detail/DetailView.do?p_mat_type=be54d9b8bc7cdb09&control_no=cd599a344c53dc49ffe0bdc3ef48d419

진선덕, 한국환경생태학회지, 2014.10.

‘파주시에서 수집한 폐사체 맹금류의 DNA 바코드 연구’

<http://www.ndsl.kr/ndsl/commons/util/ndslOriginalView.do?cn=JAKO201434441683876&dbt=JAKO&koi=KISTI1.1003%2FJNL.JAKO201434441683876>

한국해양생물자원관, 국가해양수산물종목목록집, 2017.12.

‘국가해양수산물종목목록집’

<https://www.mbris.kr/pub/marine/natilist/nationalist.do>

Oceana, online magazine, 2018.08.

‘Oceana Canada Press release’

<https://oceana.ca/en/press-center/press-releases/oceana-canada-report-uncovers-widespread-seafood-fraud-across-country>

A Study on the Optimum Growth Conditions and Application Possibility to Biological Industry of *Galactomyces reessii*

Ha Young Jung, Young Jun Jang, Seong Woo Choi, Byeong Ho Lee, Go Un Park, Yeon Seo Kim, Seo Young Kang, Ji Young Park, In Kyoung Kim, Seong Chan Hong, Kang Hyun Lee, Hah Young Yoo

Department of Biotechnology, Sangmyung University, 20, Hongjimun 2-Gil, Jongno-Gu, Seoul 03016, Republic of Korea

Abstract

Recently, ferment filtrate from *Galactomyces* strains have been attracted in cosmetic industries. Especially, *Galactomyces reessii* is known to produce β -hydroxy- β -methylbutyric acid and redox enzymes. In this study, the cultural medium of *G. reessii* was optimized based on cell growth, and the total phenol and DPPH radical scavenging activity were analyzed from the ferment filtrate. Effect of various carbon source (malt extract, glucose, sucrose, maltose, galactose, xylose, mannose, cellobiose, fructose, and locust bean gum (LBG)) and nitrogen source (peptone, yeast extract, urea, soybean, and ammonium sulfate) on the response (dry cell weight, total phenol concentration, and IC_{50}) was evaluated. As a result, the highest cell growth was achieved by malt extract and sucrose as carbon source, and yeast extract and soybean as nitrogen source. In the optimal medium, the cell growth was improved about 9-fold compared with the control group. The highest content of total phenol was found to be 0.57 g/L at 3% xylose and 1% yeast extract as optimal carbon and nitrogen source. The lowest IC_{50} , an indicator of antioxidant efficacy, was achieved about 376.2 g/L at 3% sucrose and 1% ammonium sulfate. In overall, the ferment filtrate from *G. reessii* shows antioxidant efficacy, thus, it could be applied for cosmetic materials in the future.

Introduction

Fermentation conditions

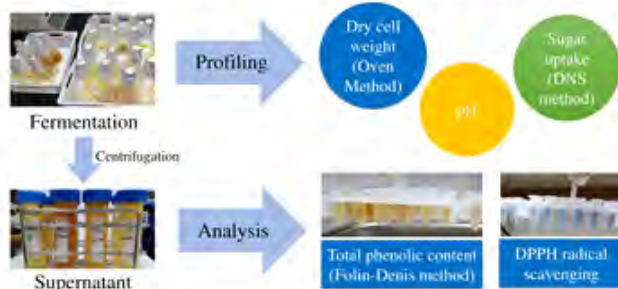
Effect of carbon and nitrogen source
3% carbon and 1% nitrogen with initial pH of 6.5 at 37°C for 7 days, 150 rpm

Effect of temperature
3% sucrose and 1% yeast extract with initial pH of 6.5 at 37°C for 7 days, 150 rpm

Carbon sources: malt extract, glucose, sucrose, maltose, galactose, xylose, mannose, fructose, cellobiose, and locust bean gum (LBG)

Nitrogen sources: peptone, yeast extract, urea, soybean, and ammonium sulfate

Temperature: 25 °C, 30 °C, 37 °C



Results and Discussion

Carbon Source

Nitrogen Source

Temperature

Dry Cell Weight

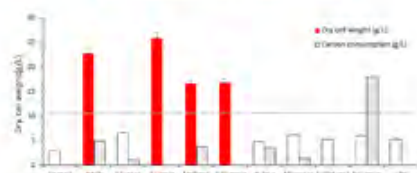


Fig. 1. Effect of different carbon compounds on *G. reessii* growth and carbon consumption

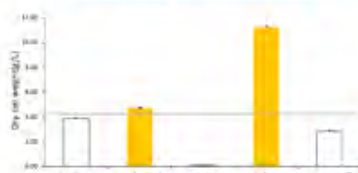


Fig. 2. Effect of different nitrogen compounds on *G. reessii* growth



Fig. 3. Effect of different incubation temperature on *G. reessii* growth

Total Phenolic Content

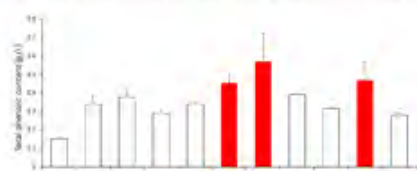


Fig. 4. Total phenolic content by *Galactomyces reessii* growth to carbon source change



Fig. 5. Total phenolic content by *G. reessii* growth to nitrogen source change



Fig. 6. Total phenolic content by *G. reessii* to incubation temperature change

Table: Free radical scavenging activity of antioxidants and Final pH by carbon source and nitrogen source changes

Media Composition		IC ₅₀ (mg/mL)	Final pH
Carbon Source	Nitrogen Source		
Malt extract 4%		484.88 ± 11.15	4.73
Malt extract 3%	Yeast extract 1%	549.98 ± 57.09	4.93
Glucose 3%	Yeast extract 1%	428.80 ± 22.86	4.70
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	561.96 ± 111.96	6.07
Maltose 3%	Yeast extract 1%	428.14 ± 50.73	4.99
Galactose 3%	Yeast extract 1%	585.27 ± 64.60	5.30
Xylose 3%	Yeast extract 1%	1296.35 ± 19.93	4.81
Mannose 3%	Yeast extract 1%	437.79 ± 12.50	5.14
Cellobiose 3%	Yeast extract 1%	442.27 ± 23.17	5.49
Fructose 3%	Yeast extract 1%	465.87 ± 71.23	4.80
LBG 1%	Yeast extract 1%	N.D.	7.9
Sucrose 3%	Peptone 1%	565.28 ± 11.37	4.60
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	570.65 ± 40.45	5.34
Sucrose 3%	Urea 1%	N.D.	9.67
Sucrose 3%	Soybean 1%	N.D.	4.80
Sucrose 3%	Ammonium sulfate 1%	376.18 ± 0	4.16

Galactomyces reessii
(KCCM 50259)



Conclusion

The optimum medium for *G. reessii* is sucrose as carbon source and yeast extract as nitrogen source, and the incubation temperature is 30 °C

- Microbial cell growth was low in the medium without addition of nitrogen source

The most effective carbon source for production of phenolic compound is xylose, and the nitrogen source is yeast extract

- The production of phenolic compound by *G. reessii* is significantly affected by using yeast extract

The relatively low IC_{50} means the higher antioxidant efficacy. The highest antioxidant efficacy was achieved by 3% sucrose and 1% ammonium sulfate. Thus, the optimal medium for antioxidant production is determined as 3% sucrose and 1% ammonium sulfate.

학부생 연구 논문

*Galactomyces reessii*의 최적 생장조건과
바이오산업분야로의 응용가능성 연구

A Study on the Optimum Growth
Conditions and Application Possibility to
Biological Industry of *Galactomyces reessii*

2018. 11.

상명대학교 융합공과대학

생명화학공학부 생명공학과

17 장영준, 정하영, 최성우, 이병호

18 박고운, 김연서, 강서영, 박지영, 김인경, 홍성찬

연구지도자: 이강현⁵⁾, 유하영⁶⁾

5) 상명대학교 일반대학원 생물학과 미생물공학연구실

6) 상명대학교 융합공과대학 생명화학공학부 생명공학과 미생물공학연구실 교수

Abstract

Recently, ferment filtrate from *Galactomyces* strains have been attracted in cosmetic industries. Especially, *Galactomyces reessii* is known to produce β -hydroxy- β -methylbutyric acid and redox enzymes. In this study, the cultural medium of *G. reessii* was optimized based on cell growth, and the total phenol and DPPH radical scavenging activity were analyzed from the ferment filtrate. Effect of various carbon source (malt extract, glucose, sucrose, maltose, galactose, xylose, mannose, cellobiose, fructose, and locust bean gum (LBG)) and nitrogen source (peptone, yeast extract, urea, soybean, and ammonium sulfate) and incubation temperature (25°C, 30°C, 37°C) on the response (dry cell weight, total phenol concentration, IC₅₀, and HPLC) was evaluated. As a result, the highest cell growth was achieved by sucrose and malt extract as carbon source, and yeast extract and peptone as nitrogen source, and 30°C as incubation temperature. In the optimal medium, the cell growth was improved about 9-fold compared with the control group. The highest content of total phenol was found to be 0.57 g/L at 3% xylose and 1% yeast extract as optimal carbon and nitrogen source. The lowest IC₅₀, an indicator of antioxidant efficacy, was achieved about 376.2 g/L at 3% sucrose and 1% ammonium sulfate. In overall, the ferment filtrate from *G. reessii* shows antioxidant efficacy, thus, it could be applied for cosmetic materials in the future.

Key Words : *Galactomyces reessii*, Antioxidant, Optimal medium

국문초록

최근 화장품 업계에서는 기능성 화장품을 제조하기 위해 *Galactomyces* 속 균 주의 발효 여과 물에 큰 관심이 있다. 본 연구에서는 *Galactomyces* 속 균 중 β -hydroxy- β -methylbutyric acid와 산화환원효소를 생산하는 것으로 알려진 *Galactomyces reessii*의 최적화 배지를 찾고, *G. reessii*의 발효 여과액의 항산화 효능을 측정하였다. 다양한 탄소원(malt extract, glucose, sucrose, maltose, galactose, xylose, mannose, cellobiose, fructose, locust bean gum)과 질소원(peptone, yeast extract, urea, soybean, ammonium sulfate), 배양 온도(25°C, 30°C, 37°C)에서 균의 성장 정도를 dry cell weight로 측정하였다. 또한 각 조건에서 배양한 발효 여과액의 총 페놀 함량과 IC₅₀을 구하고 HPLC로 구성성분을 분석함으로써 발효 여과액의 항산화 효과를 검증하였다. *G. reessii*는 탄소원을 sucrose와 malt extract로 사용했을 때 가장 잘 자랐고, 질소원으로는 yeast extract와 peptone을 사용했을 때 가장 잘 자랐으며 30°C의 배양온도에서 가장 높은 성장을 보였다. 최적 배지에서의 세포 성장은 대조군보다 약 9배 향상되었다. 총 페놀 함량은 최적 탄소원인 xylose를 3%로, 최적 질소원인 yeast extract를 1%로 공급했을 때 0.57g/L로 가장 높게 나타났다. 항산화 효능의 지표인 IC₅₀의 최솟값은 sucrose를 3%로, ammonium sulfate를 1%로 공급한 발효 여과액에서 376.2 g/L로 나타났다. 위 결과를 종합했을 때, *G. reessii*의 발효 여과액은 항산화 활성을 가지며, 미래에 화장품의 원료로 활용될 수 있을 것이다.

키워드 : *Galactomyces reessii*, Antioxidant, Optimal medium

목차

I. 서론	91
1.1 연구동기 및 필요성	91
1.2 연구목표	92
1.3 이론적 배경	92
II. 실험 방법	92
2.1 Fermentation conditions for <i>Galactomyces reessii</i>	92
2.1.1 균주 접종 및 스타터 배양 (종균배양)	92
2.1.2 최적 탄소원 조사	92
2.1.3 최적 질소원 조사	93
2.1.4 최적 생장 온도 조사	93
2.2 Fermentation profiling of <i>Galactomyces reessii</i>	93
2.2.1 Dry cell weight 측정	93
2.2.2 배양 후 배지 내 pH 측정	93
2.2.3 DNS를 통한 배지 내 당 함량 측정	93
2.3 항산화 효능 분석법	94
2.3.1 총 페놀 함량(Total phenolic content) 측정	94
2.3.2 DPPH radical 소거능 측정	95
2.3.3 HPLC 분석	95
III. 연구결과 및 고찰	96
3.1 연구결과	96
3.3.1 배지 조성에 따른 <i>Galactomyces reessii</i> 의 건세포중량	96
3.3.2 <i>Galactomyces reessii</i> 발효 여과액의 총 페놀함량	98
3.3.3. <i>Galacotmyces reessii</i> 발효 여과액의 항산화 활성 측정	100
3.3.4. HPLC를 통한 <i>Galactomyces reessii</i> 발효 여과액의 성분 분석	101
3.2 고찰	104
3.2.1 <i>Galactomyces reessii</i> 의 최적배지	104
3.2.2 총 페놀 함량 분석	105
3.2.3 IC ₅₀ 분석	105
3.2.4 항산화효과 분석	106
3.2.5 HPLC 분석	106
IV. 결론 및 제언	107
4.1 결론	107
4.2 Further Works	108
4.3 활용방안	109
참고문헌	109

I. 서론

1.1 연구동기 및 필요성

예로부터 사람들은 자신을 치장하고 꾸미는 데 관심이 많았다. 그 근거로 삼국유사에 쓰인 기록 중 신라의 화랑들이 화장했다는 기록과 고려와 조선 시대 역시 청동거울과 연지를 사용하여 화장했다는 기록이 있다[1,2]. 과거에는 연꽃이나 백합 등 자연물에서 색을 얻어 치장했었지만, 근대에 이르러 자연물보다 효과가 좋고 가격도 저렴한 인공합성물이 생산되면서 자연스럽게 소비자들의 관심은 자연물보다 미적인 효과를 극대화할 수 있는 인공합성물이 함유된 화장품으로 옮겨갔다.

그러나 화장품에 함유된 중금속, 화학물질에 의한 피해가 대두되면서 현대의 소비자들은 미적인 효과뿐만 아니라 화장품에 함유된 성분이 유해한지, 부작용은 없는지를 확인하고 제품을 구매하기 시작했다. 이러한 현대 소비자들의 요구에 맞춰 화장품 제조업체들은 인공적인 화학물질 대신 자연물에서 추출한 자연주의적인 화장품들을 적극적으로 개발하고 있다. 또한, 소비자들은 화장품을 통해 외적인 아름다움을 충족하는데 그치지 않고 주름 개선, 미백, 피부 건조개선 등 피부의 근본적인 문제를 해결하고자 하였다. 이렇게 특정 기능이 강화된 화장품을 기능성 화장품이라 하는데, 국내 기능성 화장품 시장은 2012년 2조 1,487억에서 2017년 4조 8,558억으로 5년 사이에 무려 126%나 성장하는 추세를 보이는 등 급격히 성장하고 있는 것을 보아 전망 역시 밝다고 할 수 있다[3].

특히 식품의약품안전처의 자료에 따르면, 국내 화장품 생산실적은 2012년 7조 1,227억에서 2017년 13조 5155억으로 5년 동안 89.8% 증가하는 등 폭발적으로 성장하고 있으며[3], 2017년 기준 전년 대비 국내 화장품 생산실적은 총 3.6% 증가로 성장률은 약간 감소하였지만, 남성 화장품 생산실적은 4.12% 증가한 것으로 보아 현대 사회에서는 남녀를 가리지 않고 화장품에 대한 관심도와 소비가 증가하고 있다는 것을 알 수 있다. 게다가 국내외 경기 불안과 소비심리가 위축되고 있음에도 불구하고, 화장품의 1인당 구매금액을 의미하는 객단가가 지속해서 증가하는 추세를 보인다[4,5]. 또한, 다른 산업과 달리 화장품 산업은 소득이 감소하더라도 이에 대한 지출은 줄지 않는 비대칭적 소득탄력성을 가지고 있어[6] 미래 발전 가능성이 큰 분야라 할 수 있다. 더하여 화장품 산업은 2017년 기준 전체 생산량 대비 수출액이 41.3%(5조 5874억 원)나 차지하는 등 내수산업에서도 탈피해 효자 수출상품으로 자리 잡고 있다[3].

따라서 소비자들이 요구하는 천연물질과 자연주의적 성분이 함유된 기능성 화장품을 개발한다면 그 산업은 고부가가치를 창출해 국내외적으로 많은 이윤을 얻을 수 있을 것으로 생각한다. 통계청의 자료에 따르면 2018년 현재 65세 이상 인구는 전체인구의 14.3%에 불과하지만 2028년에는 전체인구의 22.9%, 2038년에는 전체인구의 31.7%, 30년 후인 2048년에는 전체인구의 38.1%가 65세 이상 인구가 될 것으로 예측한다[7]. 노인 인구가 급격히 증가할 것으로 예측됨에 따라 우리 연구진은 다양한 종류의 기능성 화장품 중 항산화 물질이 함유된 노화 방지 화장품이 미래에 지속해서 가장 많은 수익을 낼 수 있으리라 판단하였다.

최근 수많은 화장품 제조업체들 역시 천연물질이 함유된 노화 방지 화장품을 제조하고는 있으나, 화장품을 제조할 때 사용하는 천연원료 대부분을 수입에 의존하고 있으며[6] 그 천연원료 역시 대부분 식물추출물이나 동물의 부산물을 기반으로 하고 있다. 또한, 새로운 원료를 개발하려는 연구 대신 기존 원료의 안전성 확보에 관한 연구가 주로 이루어지고 있기 때문에[6], 현재 대부분의 기능성 화장품들은 식품의약품안전처에 고시된 원료들을 배합하여 만드는 데 그치고 있다. 이러한 상황이 지속될 경우 국내에서 개발된 기능성 화장품이 글로벌 회사가 제조하는 상품과의 차별성을 갖지 못하게 되어 시장 경쟁력이 점점 약화될 것이다.

따라서 본 연구에서는 노화 방지에 효과가 있다고 알려진 항산화 물질을 식물추출물이나 동물의 부산물이 아닌 미생물 발효를 통해 생산하여 기능성 화장품의 원료가 되는 천연성분의 물질을 개발하고자 한다. 기존의 한방화장품 연구에서 *Galactomyces* 속의 균주들이 만들어내는 발효 여과액에 피부 내 보습인자와 유사한 물질이 발견되었다는 사실이 밝혀졌다[8]. 따라서 *Galactomyces* 속의 균주 중 그동안 연구가 이루어지지 않으면서, 자연에서 쉽게 발견되는 토양미생물인 *Galactomyces reessii*의 발효 여과액이 바이오 화장품 및 식품 등의 바이오산업에서 활용 가능한지를 알아보고자 한다.

1.2 연구목표

*G. reessii*는 연구가 거의 이루어지지 않은 미생물이다. 따라서 일부 연구에서 이 균주가 생산하는 물질에 대한 기초 자료는 보고된 적이 있었으나, 기본적인 미생물 배양조건 또는 대량생산 조건에 대한 정보는 알려진 바가 없었다. 미생물이 인류에 유용한 물질을 많이 만들어낸다고 하더라도 균주를 대량 생산할 수 없다면 그 효과는 반감되기 때문에 본 연구에서는 일차적으로 *G. reessii*가 최적으로 성장할 수 있는 배지 조건을 연구해보고자 한다. 우선 *G. reessii*가 성장하는 배지의 탄소원과 질소원을 각기 달리하여 배양시킨 후 최적 탄소원과 질소원을 선정하고, 이 최적 배지 조건에서 배양온도를 달리하였을 때 배양온도가 미생물 성장에 미치는 영향을 조사하여 *G. reessii*의 산업적 대량생산의 기반을 마련하고자 한다.

또한 *G. reessii*로부터 생산되는 항산화 물질들의 함량을 분석하기 위해 총 페놀 함량측정법, DPPH radical 소거능 측정법, HPLC 분석을 이용하여 확인하고자 한다. 이를 통해 *G. reessii*가 산업적으로 어떠한 가치를 가졌는지, 특히 화장품 분야에서 활용될 수 있는 잠재적 가치를 평가하고자 한다.

1.3 이론적 배경

*G. reessii*는 말레이시아 야자수 조림지에서 발견된 토양미생물이다[9]. *G. reessii*는 탄소원은 glucose와 galactose, 질소원은 peptone을 영양소로 삼을 때 가장 잘 자라는 것으로 알려져 있다[10]. 이러한 *G. reessii*는 여러 분야에서 산업적 가치의 가능성을 보여주고 있다. 첫째로 *G. reessii*가 만들어내는 효소인 laccase로 미생물 연료전지를 제작하여 전기를 만들어 낼 수 있다[11]. 둘째로 *G. reessii*는 강도 높은 운동을 할 때 근육의 손실을 보충해주고 지방의 제거를 돕는 등의 기능을 하는 β -methylbutyric acid(MBA)를 류신의 산화 과정을 통해 더 좋은 효율을 가지는 β -Hydroxy- β -methylbutyric acid(HMB)로 전환할 수 있다[12]. 셋째로 *G. reessii*는 laccase와 manganese peroxidase를 포함하는 세포외효소에 기반한 POME(Palm Oil Mill Effluent)의 페놀 제거에 효능이 있어 비용 면에서 효율적인 폐수 처리 시스템 개발에 활용될 수 있다[13].

II. 실험 방법

2.1 Fermentation condition for *Galactomyces reessii*

2.1.1 균주 접종 및 스타터 배양(종균배양)

연구에 사용한 *Galactomyces reessii*는 한국 미생물 보존센터(KCCM)에서 2018.05.02.에 분양받은 것으로 균주 번호는 KCCM 50259이며 분양받은 *G. reessii*는 Indonesia의 Hibiscus cannabinus에서 분리 동정 되었다. 동결된 균주는 malt extract 4%, agar 1.5%를 증류수에 녹인 후 2M의 NaOH를 이용하여 pH를 6.5로 맞춘 평판배지에 도말하여 21°C에서 7일간 배양하였다. 그 후 pH는 6.5, malt extract의 농도를 4%로 한 액체배지에서 3일씩 3번 배양하여 균의 활성도를 높였다. 마지막으로 pH는 6.5, malt extract의 농도는 4%, agar 1.5%로 된 사면배지에서 균을 배양하였다.

2.1.2 최적 탄소원 조사

탄소원의 종류에 따라 *G. reessii*의 성장 정도를 액체배지를 이용하여 알아본다. 실험에 사용한 탄소원은 malt extract, glucose, sucrose, maltose, galactose, xylose, mannose, cellobiose, fructose, Locust bean gum(LBG)으로 총 10종류이다. 각 실험균은 탄소원의 농도를 3%로, 질소원인 yeast extract의 농도를 1%로 한 액체배지에서 배양시켰다. 액체배지의 초기 pH는 6.5로 하여 실험을 진행했고, 분주한 균의 농도는 배지의 8%로 하였다. 균은 7일간 150rpm으로 37°C에서 배양하였다. 다만, 탄소원을 LBG로 한 처리구에서는 증류수에 대한 LBG의 용해도를 고려하여 LBG

의 농도를 1%로 하였다. 대조군의 배지 조성은 malt extract 4%로 설정하였으며, 대조군 배지의 pH는 6.5, 균의 농도는 배지의 8%로 하여 37°C에서 150rpm으로 7일간 배양하였다.

2.1.3 최적 질소원 조사

질소원의 종류에 따른 *G. reessii*의 성장 정도를 알아보고자 한다. 실험에 사용한 질소원은 peptone, yeast extract, urea, soybean, ammonium sulfate로 총 5종류이다. 각 실험군은 최적 탄소원 조사 실험 결과 나온 최적 탄소원(sucrose)의 농도를 3%로, 각각의 질소원의 농도를 1%로 공급한 액체배지에 균의 농도를 배지의 8%로 하여 균을 배양하였다. 액체배지의 초기 pH는 6.5로 맞추어 실험을 진행하였고, 균은 37°C에서 150rpm으로 4일간 배양하였다.

2.1.4 최적 성장 온도 조사

배양온도에 따른 *G. reessii*의 성장 정도를 알아보고자 한다. 각 균들은 최적 탄소원 조사 실험 결과에서 나온 최적 탄소원(sucrose)의 농도를 3%로, 최적 질소원 조사 실험결과에서 나온 최적 질소원(yeast extract)의 농도를 1%로 한 액체배지에서 배양온도를 25°C, 30°C, 37°C로 달리하여 배양하였다. 분주한 균의 농도는 배지의 8%로 하였고, 액체배지의 초기 pH는 6.5로 하였다. 각 실험군은 150rpm으로 4일간 배양하였다.

2.2 Fermentation profiling of *Galactomyces reessii*

2.2.1 Dry Cell Weight 측정

Dry weight는 growth kinetics, yield factor, metabolic quotients의 한도를 정해 biomass의 최대한도를 계산함으로써 일반 생리학적 연구 및 미생물 공정의 효율을 높이기 위한 기준이 되는 근본적인 값이다[14]. 세포의 건조중량을 측정하는 방법은 여러 방법이 보고되었지만[15] 본 연구에서는 전통적으로 사용되어왔던 oven method를 이용해[14] *G. reessii*의 건조중량을 측정하였다. 탄소원과 질소원, 온도를 달리하여 배양시킨 *G. reessii*를 미리 질량을 측정한 falcon tube(W_1)에 옮겨 4°C에서 3000rpm으로 40분간 원심분리를 한 후 *G. reessii*와 상층 액을 분리하였다. 균이 담긴 falcon tube를 dry oven에서 60°C로 48시간 건조하였고, 건조된 균과 falcon tube의 질량(W_2)을 측정하였다. 무게는 chemical balance로 소수점 5번째 자리까지 측정하였다. 또한 *G. reessii*의 건 세포 중량(dry cell weight)은 건조된 균과 falcon tube의 합산 질량(W_2)에서 미리 측정한 falcon tube 질량(W_1)의 차로 구하였다.

$$\text{Dry Cell Weight} = W_2 - W_1$$

2.2.2 배양 후 배지 내 pH 측정

균이 산업 환경에서 일정하게 배양될 수 있게 만들어 주기 위해서는 일정한 pH를 유지해 주어야 한다. 따라서 탄소원과 질소원, 온도를 달리한 처리구들을 배양시킨 후 Dry cell weight를 측정하기 위해 분리한 상층 액에서 배양 후 배지의 pH를 측정하였다.

2.2.3 DNS를 통한 배지 내 당 함량 측정

균이 성장하기 위해서는 영양분인 당을 지속해서 공급해야 한다. 적절한 당의 공급을 통한 균의 효율적 성장을 유도하기 위해서는 균이 성장하면서 소모한 당의 양을 알아야 한다. 따라서 *G. reessii*의 배양 전 배지 용액의 당 함량(C_1)과 *G. reessii*의 배양 후 상층 액의 당 함량(C_2) 차이를 통해 *G. reessii*가 성장하면서 소모한 당의 양을 측정하였다. 당 함량 조사는 최적 탄소원 조사 실험

험군만 하였다. 당 함량을 측정하는 방법 중 본 실험에서는 J. Sumner가 고안하고, G. L. Miller가 개량한 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 방법을 사용하였다. carbonyl group(C=O)을 가지고 있는 당류는 환원성을 가지는데, carbonyl group을 가진 당류는 3,5-dinitrosalicylic acid를 염기성 환경에서 3,5-dinitrosalicylic acid의 aldehyde group을 carboxyl group으로 환원시켜 3-amino-5-nitrosalicylic acid로 만들어[16] 적갈색을 띠게 만든다. 이렇게 변화된 색을 spectrophotometer로 540~575nm에서 흡광도를 조사하면 당의 함량을 비교 분석할 수 있다. 30 ml의 증류수에 1g의 DNS 시약을 첨가한 뒤 염기성 환경을 조성하기 위해 2M의 NaOH를 20ml 첨가하였다. 또한 용존산소에 의한 색 변색을 방지하기 위해 Rochell salt(Potassium sodium tartrate)를 30g 첨가한 후 증류수를 첨가하여 총 시약의 volume이 100ml가 되게 하였다[17].

*G. reessii*를 배양하기 전 용액과 *G. reessii*를 배양한 후 얻은 상층액을 50배 희석시킨 후 희석한 용액 0.4ml와 제조한 DNS 시약 0.8ml를 혼합하여 60°C에서 3분간 반응시킨 후 냉각한 용액을 spectrophotometer로 540nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정한 흡광도는 glucose로 만든 표준 곡선을 이용하여 당의 함량을 계산하였다.

$$y = 1.9288x - 0.0113, R^2 = 0.9999$$

y = 흡광도
x = 당 함량

또한 당 소모량은 위 식을 통해 구한 배양 후 상층액(C₂)에서의 당 함량과 배양 전 용액의 당 함량(C₁)의 차이를 통해 구하였다.

$$\text{Carbon consumption} = C_2 - C_1$$

2.3 항산화 효능 분석법

2.3.1 총 페놀 함량(Total phenolic content) 측정

총 페놀함량을 측정하는 방법에는 Folin-Denis 방법, Prussian blue assay, Lowenthal 방법 등 여러 가지가 있으나[18] 본 연구에서는 Folin-Denis 방법과 Vernon(1999)의 spectrophotometer method를 일부 변형하여 페놀성 화합물의 총량을 측정하였다. 페놀성 물질들은 염기성 조건에서 Folin-Ciocalteu(F-C)시약의 phosphomolybdic/phosphotungstic acid 복합체를 환원시켜(전자를 공여하여) 청자색의 환원물질을 생성하는데[18], Folin-Denis 방법은 이 F-C 시약을 이용하여 색 변화의 정도를 측정하는 것이다. Vernon(1999)의 방법은 색 변화를 spectrophotometer로 765nm에서 측정하는 것이다. 총 페놀함량은 다음과 같은 방법으로 실험하였다. *G. reessii*를 배양하고 분리한 상층 액 10μl에 증류수 790μl, Folin-Ciocalten 50μl를 넣고 30°C에서 8분간 반응시킨다. Blank에는 시료 대신 증류수를 첨가하여 반응을 진행하였다. 이후 sodium carbonate solution을 150μl 넣고 24°C에서 1시간 동안 반응시킨 후 UV-VIS spectrophotometer로 OD₇₆₅를 측정하였다. 측정 결과는 gallic acid로 만든 아래 표준 곡선을 이용하여 총 페놀함량으로 변환하였다.

$$y = 0.9635x - 0.0272, R^2 = 0.9995$$

y = 흡광도
x = 총 페놀 화합물들의 함량

2.3.2 DPPH radical 소거능 측정

항산화 능력은 인체 내에서 free radical의 활성을 막아 노화를 방지할 수 있게 하는 능력을 의미한다[19]. 항산화 능력을 측정하기 위하여 가장 대표적이고 상업적으로 유용한 방법인 DPPH• (1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl) 소거능법을 사용하였다. 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl는 상온에서 안정한 유기 질소 radical의 일종으로[20,21] 두 번째 질소에 짝을 짓지 않은 하나의 전자를 가지고 있으며 보라색을 띤다. DPPH•의 두 번째 질소에 수소가 결합해 환원이 일어나면 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazine(DPPH)이 되면 노란색을 띠게 되며[22] 색이 열리는 정도에 따라 항산화 능력이 크다고 판단한다. DPPH•는 515~528nm에서 가장 빛을 잘 흡수하는 반면 DPPH는 515~528nm 부근에서 빛을 잘 흡수하지 못하므로[22] 본 실험에서는 Blois의 방법에 기반하여 517nm에서 흡광도를 측정하였다. DPPH•(1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl)소거능 측정을 위한 실험 방법으로는 Blois(1958)과 Williams(1994), Gulcin(2003)의 방법을 기반으로 하여 변형하여 사용하였다. 시료 500μl와 500μl의 0.25mM DPPH용액(용매 methanol)을 24°C에서 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer로 517nm에서 흡광도를 측정하였다. blank에는 methanol 1ml를 넣었고, DPPH control은 시료대신 methanol을 500μl 넣어주었다. 또한 비교를 위해서 1mg/μl의 비타민 C 500μl와 0.25mM DPPH용액 500μl를 24°C에서 30분간 반응시킨 후 spectrophotometer로 517nm에서 흡광도를 측정하였다. Free radical 소거능은 아래 식으로 구했다.

$$\text{DPPH radical 소거능(\%)} = \frac{A_0 - A_1}{A_0} \times 100$$

A_0 = the absorbance of the control reaction

A_1 = the absorbance in the presence of the sample

또한 DPPH radical 50%를 소거하는데 필요한 시료의 농도를 IC₅₀(Inhibitory concentration 50%)이라 하였다.

$$\text{IC}_{50}(\text{mg/ml}) = \frac{\text{시료의 농도}(\text{mg/ml}) \times 50}{\text{시료의 DPPH radical 소거능}(\%)}$$

2.3.3 HPLC 분석

유의미한 총 페놀함량과 DPPH 소거능이 나타난 실험군에 대해서 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)를 통해 성분을 분석하였다. 질소원을 yeast extract로 고정하고 탄소원을 달리한 실험군에서, 탄소원을 xylose, cellobiose, fructose로 공급한 배지에 대해 HPLC를 측정하였다. 또한 탄소원을 sucrose로 고정하고 질소원을 달리한 실험군에서는 질소원을 yeast extract, soybean을 공급한 배지에 대하여 HPLC를 측정하였다. HPLC는 HITACHI사의 장비를 이용하였고 컬럼은 영진바이오크롬사의 INNO Column C18 120Å 5μm 4.6×250mm를 사용하였으며, 용매(이동상)를 50% Acetonitrile로 삼고 DAD 검출기 파장 260nm에서 측정하였다. HPLC의 용매의 flow rate는 1ml/min로 하였고 컬럼의 온도는 50°C, injection volume은 5μl, 분석시간은 30분으로 하였다.

III. 연구 결과 및 고찰

3.1 연구 결과

3.1.1. 배지 조성에 따른 *Galactomyces reessii*의 건세포중량

Galactomyces reessii 배양 배지의 조성 중 질소원은 yeast extract 1%로 고정하고, 탄소원을 각기 다르게 하여 배양한 *G. reessii*의 성장 정도와 배양 후 발효 여과액의 Final pH를 나타낸 결과는 Table 1이다. *G. reessii* 배양 배지의 조성 중 탄소원을 sucrose 3%로 고정하고 질소원을 각기 다르게 하여 배양한 *G. reessii*의 성장 정도와 배양 후 발효 여과액의 Final pH를 나타낸 결과는 Table 2이다. *G. reessii* 배양 배지의 조성은 Sucrose 3%와 yeast extract 1%로 고정하고 배양온도를 달리하였을 때 *G. reessii*의 성장 정도와 배양 후 발효 여과액의 Final pH를 나타낸 결과는 Table 3이다.

Table 1. Utilization of different carbon compounds for growth by *Galactomyces reessii* in liquid medium

Media Composition		Incubation Temperature	Dry cell weight (g/L)	Final pH of the filtrate
Carbon Source	Nitrogen Source			
Malt extract 4%	Yeast extract 1%	37°C	2.93 ± 0.19	4.73 ± 0.00
Malt extract 3%		37°C	22.77 ± 0.92	4.93 ± 0.13
Glucose 3%		37°C	6.57 ± 0.07	4.70 ± 0.06
Sucrose 3%		37°C	25.90 ± 0.86	6.07 ± 0.17
Maltose 3%		37°C	16.65 ± 0.52	4.99 ± 0.07
Galactose 3%		37°C	16.84 ± 0.58	5.30 ± 0.16
Xylose 3%		37°C	4.87 ± 0.03	4.81 ± 0.03
Mannose 3%		37°C	6.16 ± 0.04	5.14 ± 0.17
cellobiose 3%		37°C	5.32 ± 0.01	5.49 ± 0.02
Fructose 3%		37°C	6.05 ± 0.02	4.80 ± 0.12
LBG 1%	Yeast extract 1%	37°C	5.28 ± 0.09	7.85 ± 1.37

All analyses were mean of triplicate measurement ± standard error

질소원을 yeast extract로 고정하고, 각기 다른 10종류의 탄소로 만든 배지에서 *G. reessii*를 7일간 150rpm으로 배양시킨 결과 탄소원이 sucrose일 때 25.90g/L로 가장 잘 자랐으며, 그 외에도 탄소원이 malt extract(22.77g/L), galactose(16.84g/L), maltose(16.65g/L)인 배지 순으로 *G. reessii*가 잘 자랐다. 따라서 *G. reessii*의 최적 성장을 이끌어 낼 수 있는 탄소원은 sucrose이다. 또 모든 실험군은 질소원을 첨가하지 않은 대조군보다 질소원을 첨가한 실험군에서 잘 자랐다.

Table 2. Utilization of different nitrogen compounds for growth by *Galactomyces reessii* in liquid medium

Media Composition		Incubation Temperature	Dry cell weight (g/L)	Final pH of the filtrate
Carbon Source	Nitrogen Source			
Sucrose 3%	Peptone 1%	37°C	3.87 ± 0.03	4.60 ± 0.00
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	37°C	4.72 ± 0.01	5.34 ± 0.21
Sucrose 3%	Urea 1%	37°C	0.08 ± 0.00	9.67 ± 0.02
Sucrose 3%	Soybean 1%	37°C	11.28 ± 0.08	4.80 ± 0.20
Sucrose 3%	Ammonium sulfate 1%	37°C	2.86 ± 0.05	4.16 ± 0.09

All analyses were mean of triplicate measurement ± standard error

Table 2는 배지의 탄소원 조성은 Table 1의 결과에서 *G. reessii*의 최적 탄소원으로 선정된 sucrose로 고정하고, 각기 다른 5종류의 질소원으로 만든 배지에 *G. reessii*를 150rpm으로 4일간 배양시킨 결과이다. 실험 결과 질소원이 soybean일 때 11.28g/L로 가장 잘 자랐으며 질소원이 yeast extract인 배지에서 자란 *G. reessii*의 성장량 역시 4.72g/L로 전체 실험군의 평균값인 4.56g/L를 넘었다. 다만 질소원이 soybean인 배지는 soybean의 가루가 균의 dry cell weight에 영향을 주었을 수도 있으므로 *G. reessii*의 최적 성장을 유도할 수 있는 질소원으로는 yeast extract를 선정하였다.

Table 3. Utilization of different incubation temperature for growth by *Galactomyces reessii* in liquid medium

Media Composition		Incubation Temperature	Dry cell weight (g/L)	Final pH of the filtrate
Carbon Source	Nitrogen Source			
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	25°C	4.00 ± 0.00	5.25 ± 0.20
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	30°C	7.11 ± 0.02	5.37 ± 0.25
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	37°C	5.10 ± 0.06	5.64 ± 0.31

All analyses were mean of triplicate measurement ± standard error

Table 3은 Table 1의 실험결과와 Table 2의 실험결과에서 선정된 최적탄소원인 sucrose와 최적 질소원인 yeast extract로 만든 배지에 *G. reessii*를 분주한 후, 25°C, 30°C, 37°C에서 150rpm으로 4일간 배양한 결과이다. 실험결과 30°C에서 *G. reessii*가 가장 잘 자랐으며, Final pH는 각 온도별에서 큰 차이를 보이지는 않았다.

3.1.2 *Galactomyces reessii* 발효 여과액의 총 페놀함량

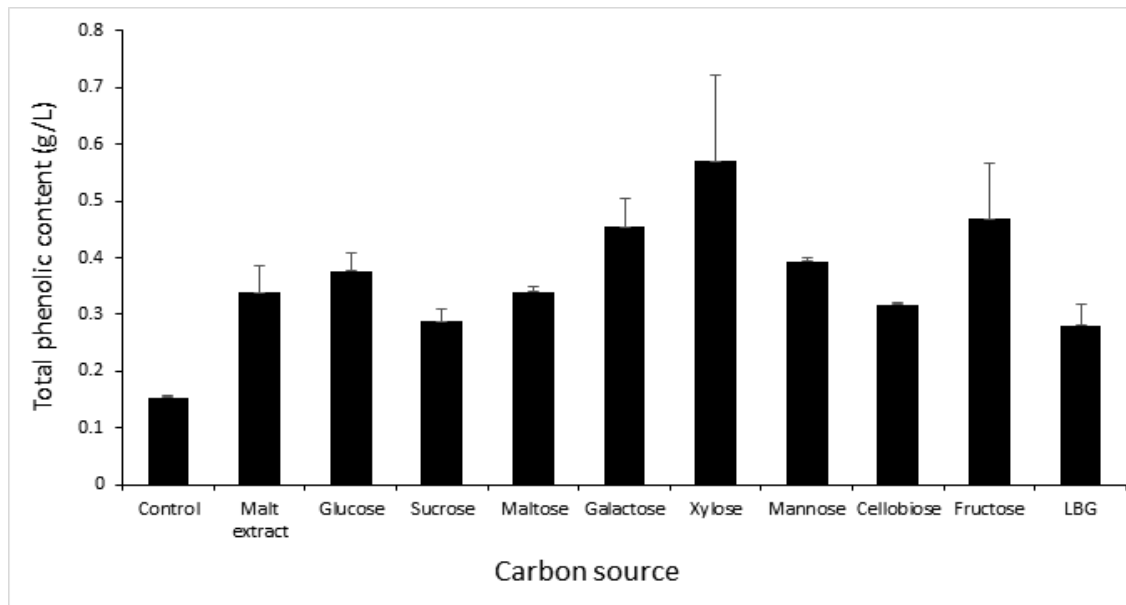


Figure 1. Effect of different carbon compounds on total phenolic content of fermented filtrate of *Galactomyces reessii*

The total phenolic content was higher in all experiment groups than the control group which didn't add nitrogen sources. All analyses were mean of triplicate measurement $\pm$ standard deviation

탄소원을 달리하며 키운 배지에서 생산된 발효 여과액의 총 페놀함량에서는 탄소원이 xylose인 배지에서 총 페놀함량이 0.57g/L로 가장 높게 나왔다. 탄소원이 galactose인 배지와 fructose인 배지의 총 페놀함량도 각각 0.45g/L, 0.47g/L로 높게 나왔다.

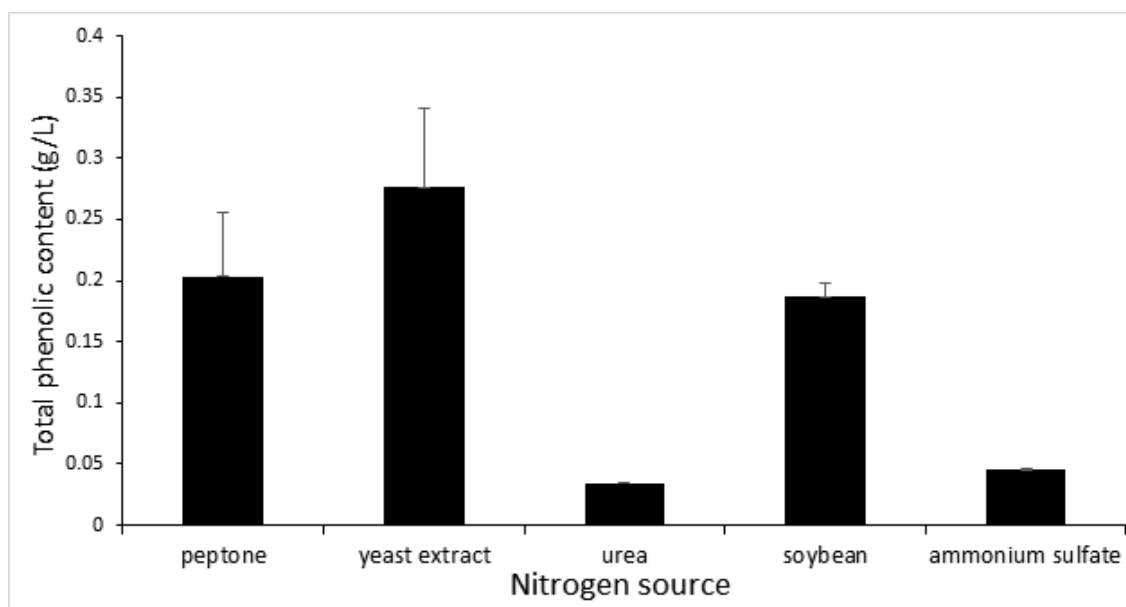


Figure 2. Effect of different nitrogen compounds on total phenolic content of fermented filtrate of *Galactomyces reessii*

All analyses were mean of triplicate measurement $\pm$ standard deviation

탄소원을 sucrose로 고정하고, 질소원을 달리하여 *G. reessii*를 키운 배지에서 생산된 발효 여과액에서는 질소원을 yeast extract로 제공한 배지에서 총 페놀함량이 0.28g/L로 가장 높게 생산되었고, 그 다음으로는 질소원으로 peptone을 제공한 배지에서 총 페놀함량이 0.20g/L로 높게 나왔다. 또한 질소원으로 soybean을 제공한 배지에서 역시 총 페놀함량이 0.18g/L로 높게 나왔다. 반면에 질소원을 urea와 ammonium sulfate로 공급한 배지에서는 총 페놀함량이 0.03g/L와 0.04g/L로 낮게 검출되었다.

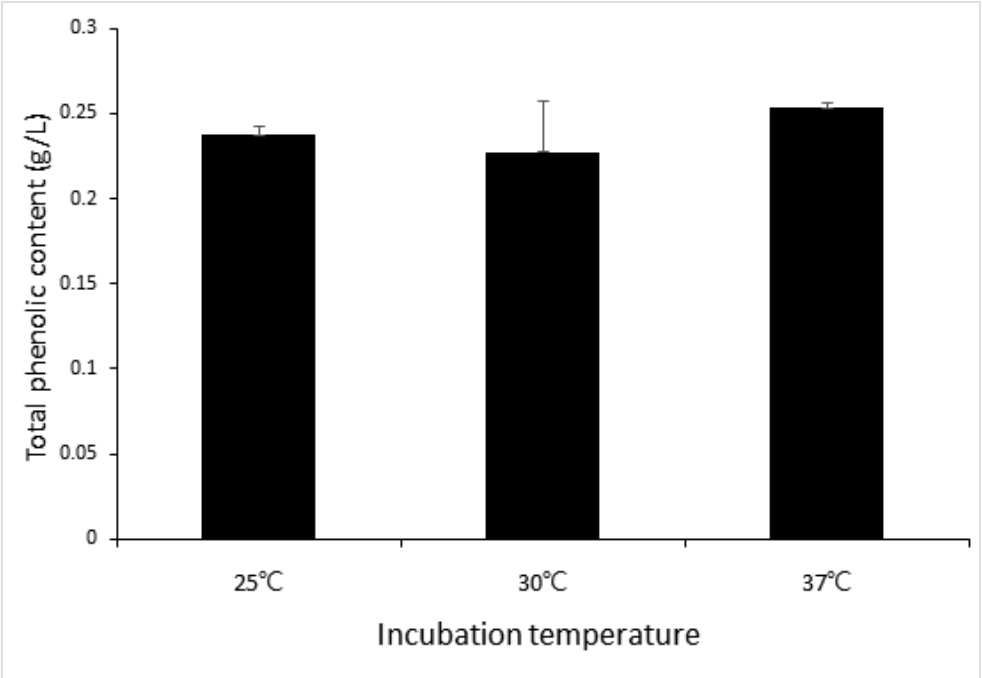


Figure 3. Effect of different incubation temperature on total phenolic content of fermented filtrate of *Galactomyces reessii*

All analyses were mean of triplicate measurement $\pm$ standard deviation

탄소원은 sucrose로 질소원은 yeast extract로 공급한 배지를 각기 다른 배양온도에서 배양시켰을 때, 배양온도에 따른 *G. reessii*의 배양여과액에서 검출된 총 페놀함량은 25°C에서 0.24g/L, 30°C에서는 0.23g/L, 37°C에서는 0.25g/L 수준으로 큰 차이를 보이지 않았다.

3.1.3 *Galactomyces reessii* 발효 여과액의 항산화 활성 측정

Table 4. Free radical scavenging activity of antioxidants by carbon source changes

Compound		Incubation Temperature	IC ₅₀ (mg/mL)
Carbon Source	Nitrogen Source		
Malt extract 4%		37°C	484.88 ± 11.15
Malt extract 3%	Yeast extract 1%	37°C	549.98 ± 57.09
Glucose 3%	Yeast extract 1%	37°C	428.80 ± 22.86
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	37°C	561.96 ± 111.96
Maltose 3%	Yeast extract 1%	37°C	428.14 ± 50.73
Galactose 3%	Yeast extract 1%	37°C	585.27 ± 64.60
Xylose 3%	Yeast extract 1%	37°C	1296.35 ± 19.93
Mannose 3%	Yeast extract 1%	37°C	437.79 ± 12.50
cellobiose 3%	Yeast extract 1%	37°C	442.27 ± 23.17
Fructose 3%	Yeast extract 1%	37°C	465.87 ± 71.23
LBG 1%	Yeast extract 1%	37°C	N.D.

All analyses were mean of triplicate measurement ± standard deviation

N.D. = not detected

DPPH radical이 50% 소거되는데 필요한 발효 여과액의 양을 계산한 IC₅₀은 탄소원을 maltose, glucose로 공급한 배지에서 각각 428.14mg/mL, 428.80mg/mL로 가장 낮게 나왔다. 탄소원을 mannose, cellobiose로 공급한 배지에서의 IC₅₀ 역시 437.79mg/mL, 442.27mg/mL로 낮은 값을 가졌다. 반면, 탄소원을 xylose로 공급한 배지의 발효 여과액에서의 IC₅₀은 1296.35mg/mL로 모든 실험군 중 가장 높은 IC₅₀을 보여주었다.

Table 5. Free radical scavenging activity of antioxidants by nitrogen source changes

Compound		Incubation Temperature	IC ₅₀ (mg/mL)
Carbon Source	Nitrogen Source		
Sucrose 3%	Peptone 1%	37°C	565.28 ± 11.37
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	37°C	570.65 ± 40.45
Sucrose 3%	Urea 1%	37°C	N.D.
Sucrose 3%	Soybean 1%	37°C	N.D.
Sucrose 3%	Ammonium sulfate 1%	37°C	376.18 ± 0

All analyses were mean of triplicate measurement ± standard deviation

N.D. = not detected

질소원을 달리하여 배양시킨 조건에서 질소원을 urea와 soybean으로 제공한 배지는 DPPH radical 소거능이 관찰되지 않았다. 반면, 질소원을 ammonium sulfate로 제공한 배지에서는 모든 실험군을 통틀어 가장 낮은 IC₅₀인 376.18mg/mL을 보여주었다.

Table 6. Free radical scavenging activity of antioxidants by incubation temperature changes

Compound		Incubation Temperature	IC ₅₀ (mg/ml)
Carbon Source	Nitrogen Source		
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	25°C	516.15 ± 88.71
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	30°C	526.17 ± 148.19
Sucrose 3%	Yeast extract 1%	37°C	542.29 ± 40.00

All analyses were mean of triplicate measurement ± standard deviation

탄소원을 sucrose로, 질소원을 yeast extract로 배지에 공급한 뒤 배양온도를 달리하여 배양시킨 *G. reessii*의 배양여과액에서 측정된 IC₅₀은 온도가 낮을수록 낮았다. 그러나 큰 차이를 보이지는 않았다.

3.3.4. HPLC를 통한 *Galactomyces reessii* 발효 여과액의 성분 분석

G. reessii 발효 여과액에 함유된 물질의 분석을 위해 HPLC를 진행하였다. Figure 4부터 Figure 10까지는 표준물질에 대한 HPLC의 결과이며, Figure 11부터 Figure 15까지는 *G. reessii* 발효 여과액에 대한 HPLC 결과이다.

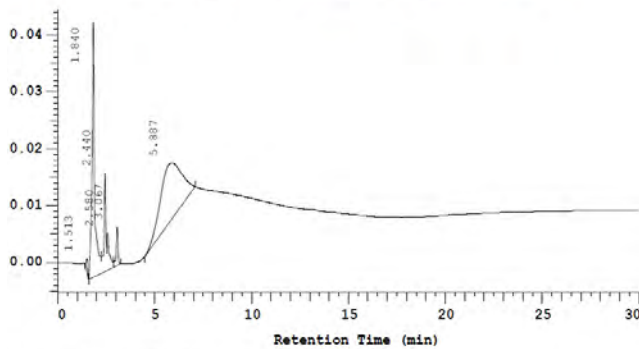


Figure 4. HPLC chromatogram of L-ascorbic acid at 260nm

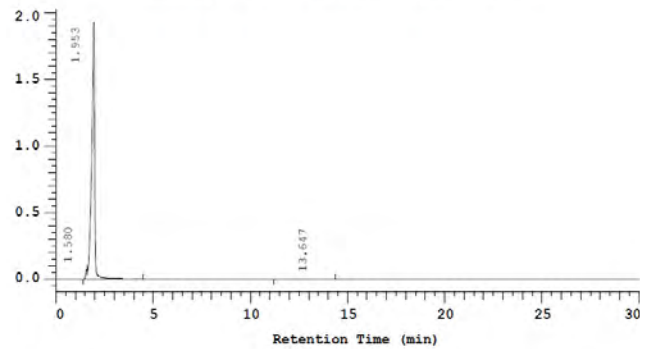


Figure 5. HPLC chromatogram of Gallic acid at 260nm

L-ascorbic acid는 260nm에서 1.840분에서 검출되었고, Gallic acid는 260nm에서 1.953분에서 검출되었다.

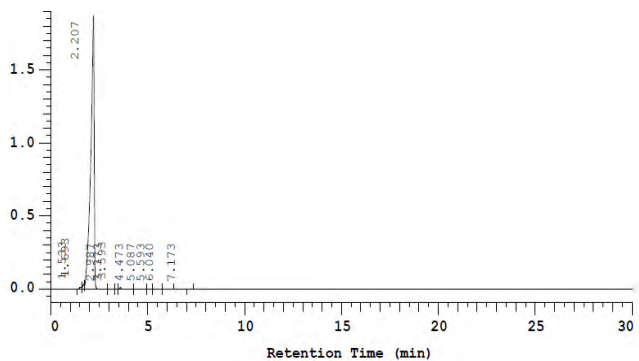


Figure 6. HPLC chromatogram of Vanillic acid at 260nm

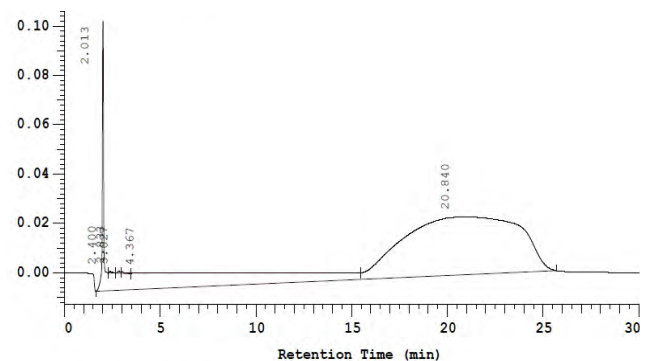


Figure 7. HPLC chromatogram of Vitamin B₁ at 260nm

Vanillic acid는 260nm에서 2.207분에서, Vitamin B₁는 260nm에서 2.013분에서 검출되었다.

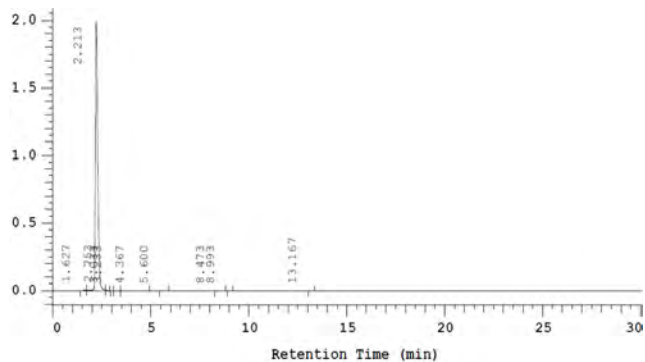


Figure 8. HPLC chromatogram of Vitamin B₁₂ at 260nm

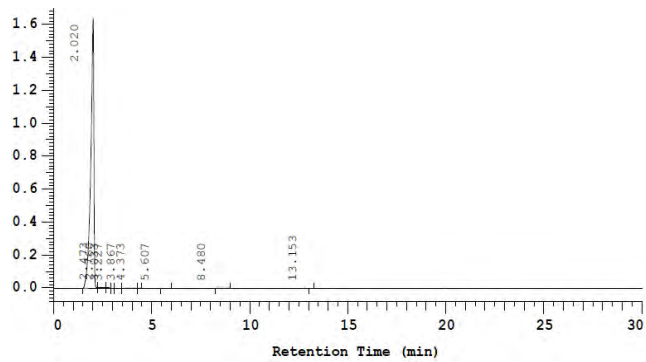


Figure 9. HPLC chromatogram of Vitamin B₃ at 260nm

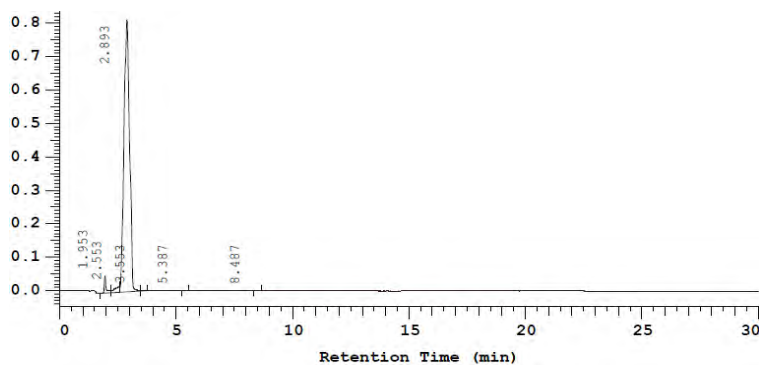


Figure 10. HPLC chromatogram of Vitamin B₆ at 260nm

260nm에서 Vitamin B₁₂는 2.213분, Vitamin B₃는 2.020분, Vitamin B₆는 2.893분에서 각각 검출되었다.

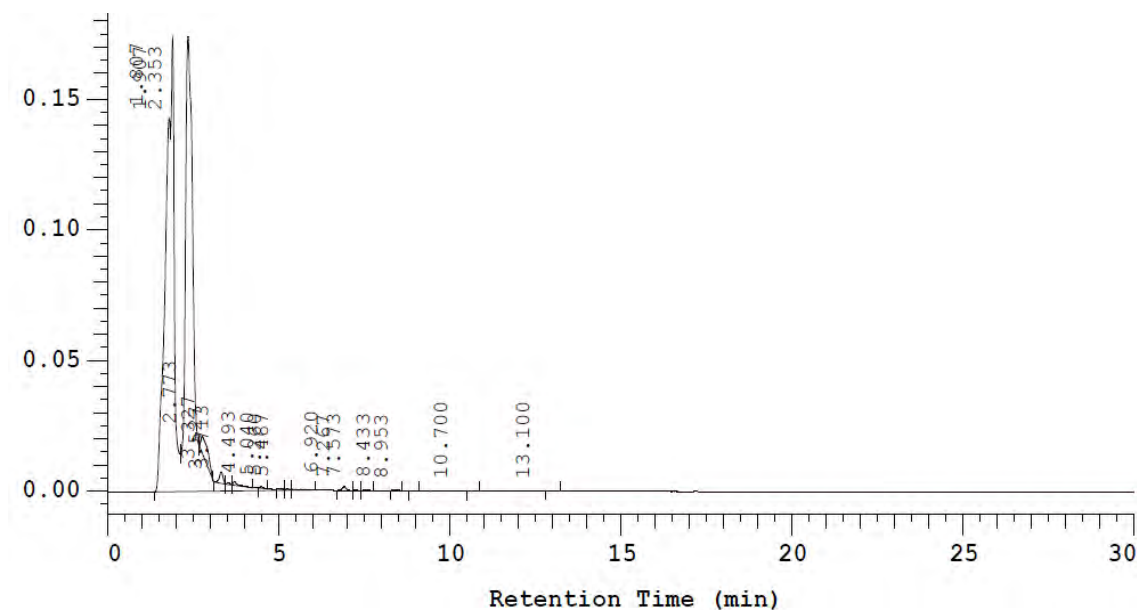


Figure 11. HPLC chromatogram of medium of composition that carbon source is xylose and nitrogen source is yeast extract at 260nm

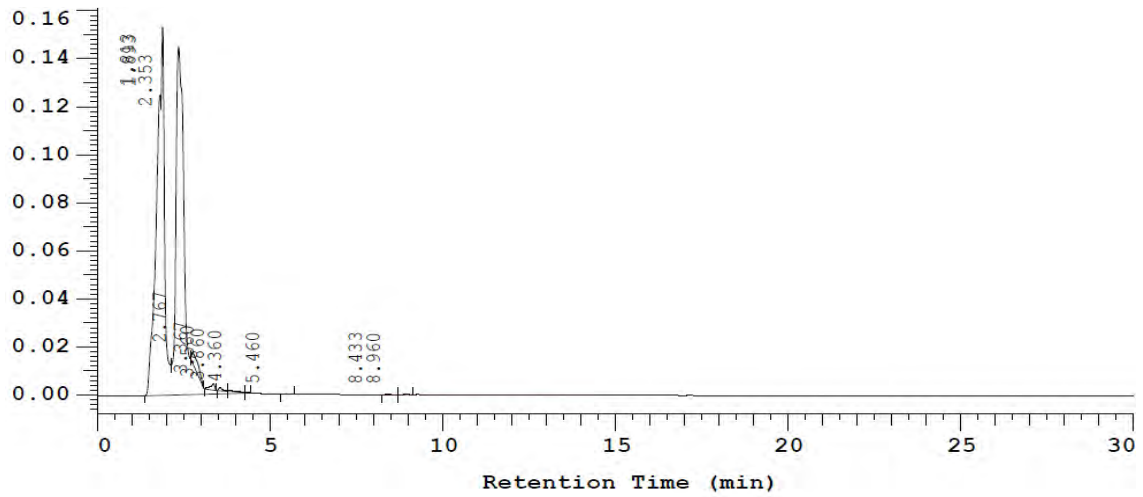


Figure 12. HPLC chromatogram of medium of composition that carbon source is fructose and nitrogen source is yeast extract at 260nm

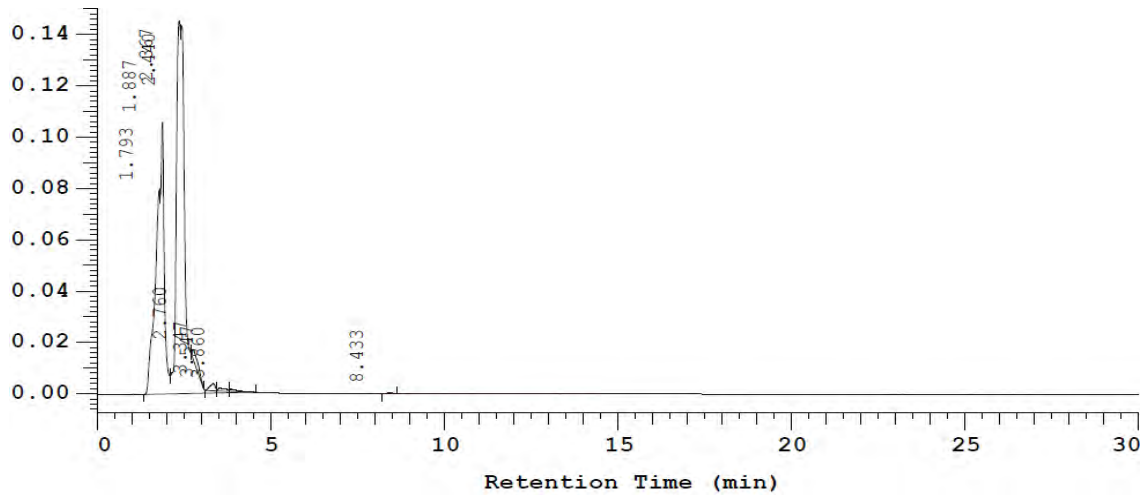


Figure 13. HPLC chromatogram of medium of composition that carbon source is locust bean gum and nitrogen source is yeast extract at 260nm

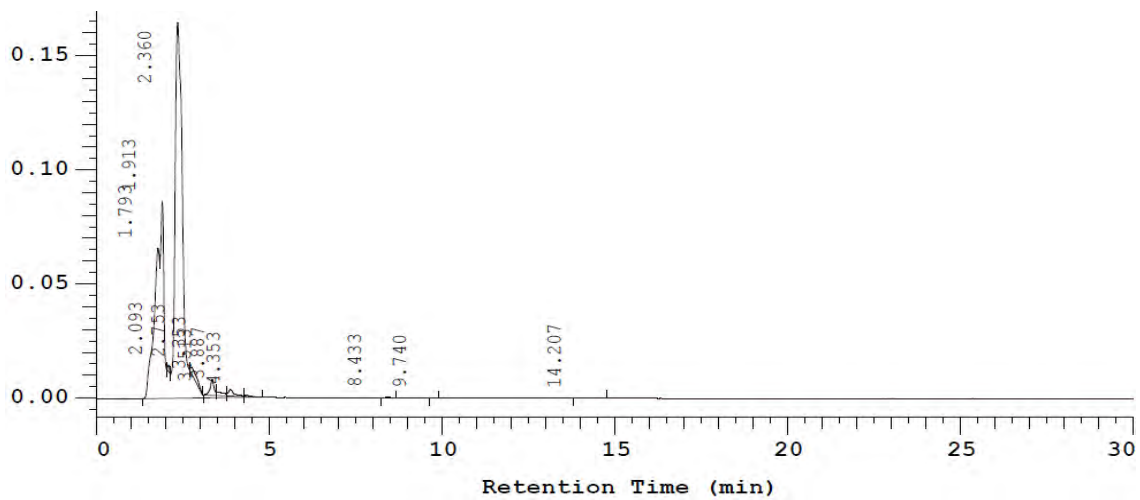


Figure 14. HPLC chromatogram of medium of composition that carbon source is sucrose and nitrogen source is yeast extract at 260nm

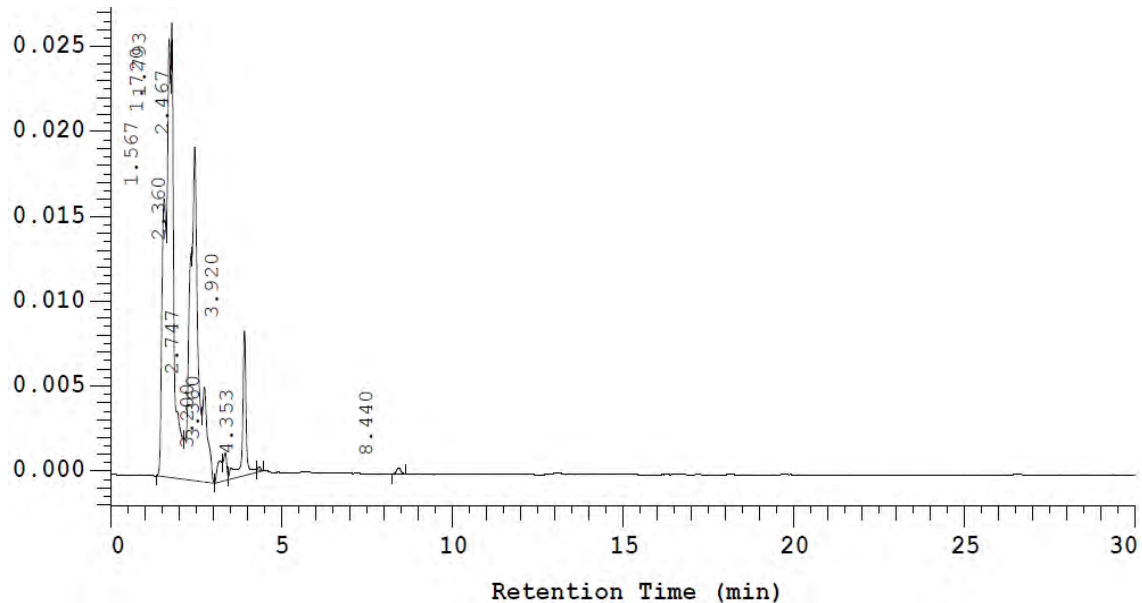


Figure 15. HPLC chromatogram of medium of composition that carbon source is sucrose and nitrogen source is soybean at 260nm

HPLC를 통해 *G. reessii* 발효 여과액에 함유된 성분 분석을 한 결과, 5종류의 배양 여과액에서 L-ascorbic acid와 Gallic acid, Vanillic acid, Vitamin B₆, Vitamin B₁₂가 포함된 것으로 확인되었다. 탄소원을 sucrose, 질소원을 yeast extract로 공급한 배지(Figure 14)의 발효 여과액에서는 Vitamin B₃가 추가로 함유된 것을 확인 할 수 있다.

3.2 고찰

3.2.1 *Galactomyces reessii*의 최적배지

탄소원을 달리한 배지에서 배양한 *G. reessii*의 건 세포 중량을 측정한 결과는 Table 1을 통해 확인할 수 있다. 그 무게는 sucrose에서 25.90g/L로 전체 실험군 중 가장 많이 성장하였다. 이는 malt extract 4%를 넣은 대조군의 무게인 2.93g/L보다 약 9배 정도 월등히 성장한 결과이다. 따라서 *G. reessii*의 최적성장을 위한 탄소원은 sucrose로 판단된다. 그 외에는 malt extract에서의 무게가 22.77g/L, galactose가 16.84g/L 그리고 maltose에서 16.65g/L로 전체 실험군의 평균무게인 10.85g/L보다 높은 성장률을 보였다. 또한 Table 1의 결과에서 질소원을 첨가하지 않은 대조군과 질소원인 yeast extract를 첨가한 모든 실험군에서 *G. reessii*의 성장률이 더 우수한 것으로 보아 균의 우수한 성장을 위해서는 탄소원과 질소원이 함께 존재하는 것이 더 적절하다고 판단된다.

*G. reessii*의 최적 성장을 유도한 탄소원인 sucrose와 5가지의 질소원으로 배양배지를 제작하여 건 세포 중량으로 균의 성장률을 확인한 결과(Table 2), 그 무게는 soybean에서 11.28g/L로 다른 질소원보다 확연히 높은 성장률을 나타내었다. 하지만 soybean은 고분자 상태로 이루어져 있어 배지에 잘 녹지 않아 균의 무게와 soybean의 무게가 함께 측정되었을 가능성이 있기 때문에 soybean에서 균이 가장 잘 자랐다고 판단하기는 어렵다. 따라서 이러한 가능성을 포함하였을 때 균이 가장 잘 자란 배지는 soybean 다음으로 잘 자랐으며 평균 무게인 4.56g/L보다 성장률이 높은 4.72g/L 자란 yeast extract로 판단된다. Yeast extract는 질소원 외에도 다양한 vitamin, mineral 및 성장인자를 함유하고 있기 때문에[23] 질소원을 yeast extract로 첨가한 배지에서 *G. reessii*의 성장률이 가장 우수해진 것으로 판단된다. 또한 urea의 성장률이 0.08g/L로 거의 자라지 않았음을 확인할 수 있는데 이것은 urea가 다섯 가지 질소원 중 유일한 비단백질성 질소원[24]이라는 점에서 기인한 것으로 보인다.

균 배양의 최적 온도를 찾기 위해 최적 탄소원(sucrose)과 최적 질소원(yeast extract) 배지에서 온도를 달리하여 균을 배양하였다. 그 결과, 30°C에서 7.11g/L로 가장 우수한 생장률을 보였고 그 뒤로는 37°C에서 5.1g/L, 25°C에서 4.0g/L의 생장을 확인하였다(Table 3). 최적 배지 실험 결과를 종합해보았을 때 *G. reessii*가 glucose 또는 galactose 그리고 peptone에서 가장 잘 자란다고 알려진 기존의 연구내용[10]과 달리 *G. reessii*의 최적 배지 조성은 sucrose와 yeast extract인 것으로 사료되며 배양온도는 30°C로 판단된다.

3.2.2 총 페놀 함량 분석

온도와 pH, 배양 시간과 같은 균 배양조건을 일정하게 유지한 상태에서 각 탄소원과 질소원의 종류에 따라 *G. reessii*가 생산하는 항산화 물질의 농도를 확인하기 위해 총 페놀함량을 측정하였다. Phenolic compounds는 식물계에 널리 분포된 2차 대사산물의 하나로 항산화, 항균 활성 등의 생리활성 기능을 나타내며 일반적으로 페놀성 화합물이 항산화 활성을 나타내는 물질로 알려져 있다 [25-27]. 그 결과, xylose 배지에서 가장 많은 양의 페놀성 화합물이 측정되었으며 그 뒤로 fructose와 galactose에서 페놀성 화합물의 높은 함량을 보였다(Figure 3). 건조된 세포의 무게와 총 페놀함량이 비슷한 양상을 보이지 않는 것으로 보아 탄소원의 변경에 의한 미생물의 생장과 총 페놀함량은 상관관계가 존재하지 않는 것으로 판단된다. 결과적으로 *G. reessii*로부터 페놀성 화합물을 얻기 위한 탄소원으로는 가장 많은 양의 총 페놀을 함유한 xylose 배지가 적절하다고 판단된다.

질소원의 경우 평균값인 0.15g/L보다 낮은 페놀성 화합물의 함량을 보이는 urea(0.03g/L), ammonium sulfate(0.05g/L)와 높은 함량을 보이는 peptone(0.2g/L), yeast extract(0.28g/L), soybean(0.19g/L)으로 분류된다(Figure 4). 이는 Urea와 ammonium sulfate는 무기 질소원, peptone과 yeast extract, soybean은 유기 질소원[28]으로 두 질소원 간 총 페놀함량에 차이가 나는 것으로 보아 페놀성 화합물 생산을 위해 *G. reessii*를 배양할 때는 유기 질소원을 배지의 영양 원소로 삼는 것이 적합하다고 추정된다. 또한 Table 1에서 malt extract 3%, yeast extract 1% 배지의 총 페놀함량이 malt extract 4% 배지(대조군)의 약 2.2배인 것으로 보아 *G. reessii*의 페놀 생산에는 질소원이 큰 영향을 미친 것으로 판단된다. 결과적으로 페놀생산에 가장 효과적인 질소원은 성장이 가장 우수한 질소원과 마찬가지로 yeast extract로 사료된다.

최적 질소원 탐색 과정에서 총 페놀 함량에 영향을 줄 수 있는 요인은 질소원의 종류와 *G. reessii*의 성장량이다. 질소원의 종류에 따라 미생물의 성장량에 차이가 발생하였고 건 세포 중량을 확실하게 알 수 없는 soybean을 제외했을 때 미생물의 성장량과 총 페놀 함량이 비슷한 양상을 보이는 것으로 보아 총 페놀함량은 미생물의 성장량에 영향을 받은 것으로 판단된다. 최적 탄소원 탐색 과정도 이와 마찬가지로 탄소원의 종류별 *G. reessii*의 성장량과 총 페놀함량이 아무런 상관관계를 가지지 않는 것으로 보아 총 페놀함량은 탄소원의 종류나 그에 따른 발효 여과액에 포함된 다양한 생성물에 영향을 받은 것으로 판단된다.

온도를 달리한 조건에서 총 페놀함량은 25°C에서 0.24g/L, 30°C에서 0.23g/L, 37°C에서 0.25g/L로 실험군 사이에 큰 차이는 보이지 않았다(Figure 5). 따라서 *G. reessii*의 배양온도는 배양과정에서 페놀성 화합물의 생성에 거의 영향을 미치지 않는 것으로 판단되나 결과적으로는 37°C에서 총 페놀함량이 가장 높게 기록되었다.

3.2.3 IC₅₀ 분석

10가지 탄소원과 5가지 질소원에 대한 항산화 활성을 알아보기 위해 DPPH radical 소거능법을 이용하였고 그 값을 IC₅₀으로 나타내었다. DPPH assay는 식품 추출물이나 단일 화합물의 산화 방지 활성을 측정하는 방법으로 산화 방지물질과 만나면 매우 빠르게 환원되고 2,2-diphenyl-1-picryl hydrazine으로 비가역적으로 전환되어 짙은 보라색이 없어지는데 없어지는 정도가 클수록 추출

물의 DPPH radical 소거능이 큰 것을 의미한다[29]. 따라서 DPPH radical을 소거하는 능력에 따라 항산화 활성효과가 있다고 말할 수 있다[30,31]. 탄소원에서는 maltose의 IC₅₀이 428.14g/L로 항산화 활성이 가장 큰 탄소원이었으며 그다음은 glucose, mannose, cellobiose 순으로 나타났다(Table 4). 질소원에서는 ammonium sulfate의 IC₅₀이 376.18mg/mL로 가장 항산화 능이 뛰어났으며 그 다음으로 peptone과 yeast extract 순으로 나타났다(Table 5). 결론적으로 *G. reessii*의 항산화 효능의 지표인 IC₅₀은 탄소원과 질소원을 통틀어 ammonium sulfate에서 가장 효과적인 것으로 나타났다. *G. reessii*의 배양조건별 IC₅₀ 중 가장 우수한 값을 가지는 ammonium sulfate의 IC₅₀이 미생물 발효 화장품에 많이 쓰이는 유용 미생물 중 하나인 *Lactobacillus plantarum*[32]의 IC₅₀(353.11mg/mL)[33] 값과 큰 차이를 보이지 않는 것으로 보아 *G. reessii*가 항산화 능을 목적으로 한 화장품의 원료로 쓰일 만한 가치가 있다고 판단된다. 다만 *L. plantarum*과 *G. reessii*의 DPPH radical 소거능 측정 과정에서 시료와 시약을 반응시킬 때 빛의 존재여부가 달랐기 때문에 실험을 같게 다시 진행한다면 IC₅₀에 약간의 차이가 생길 가능성이 있다. 빛의 영향을 차단했을 때, 그 값의 차이는 빛에 더 많이 노출될수록 항산화 작용이 향상한다[34]는 선행연구에 빗대어보면 *G. reessii*의 항산화 능이 더 낮게 평가될 것으로 예상되며 이 점은 추후에 추가적인 실험을 진행하여 면밀하게 규명할 필요가 있다. 배양 온도를 달리하였을 때 IC₅₀은 25°C, 30°C, 37°C에서 각각 516mg/mL, 526.16mg/mL, 542mg/mL이다(Table 6). *G. reessii*를 배양하는 온도가 낮아질수록 IC₅₀이 감소하는 양상을 확인할 수 있다. 따라서 *G. reessii*를 낮은 온도에서 배양할수록 발효 여과액의 항산화 효능은 증가하며 25°C에서 항산화 활성이 가장 높다는 결론을 얻을 수 있다.

3.2.4 항산화효과 분석

총 페놀 함량 분석 결과에서 페놀성 화합물을 가장 효율적으로 얻을 수 있는 배지 조성 성분으로 탄소원은 xylose, 질소원은 yeast extract로 판단했으며, 배지 조성 성분에 의한 항산화 활성을 알아보기 위해 시행된 DPPH radical 소거능을 통해 도출된 IC₅₀ 측정 결과에서 가장 큰 항산화 효과를 보인 배지 조성으로 탄소원은 maltose, 질소원은 ammonium sulfate로 판단하였다. 앞서 DPPH radical 소거능법에 의한 IC₅₀은 명확한 화학적 검증을 통해 직관적으로 항산화 효과를 나타내는 측정방법으로 입증된 바 있다[30,31]. 반면에 총 페놀 함량은 항산화 활성을 나타내는 페놀성 화합물뿐만 아니라[25-27] 일부 세포에는 독성을 가져 항산화 활성을 나타내지 않는 페놀성 화합물[35]까지 포함한 값이기 때문에 정확한 항산화 효능을 나타내는 직접적인 측정 방안으로 활용이 어렵다고 생각된다. 따라서 본 연구에서는 총 페놀함량과 IC₅₀을 복합적으로 해석하여 항산화 효과가 뛰어난 배지를 탐색하려 한다. 총 페놀에는 독성을 가진 페놀류도 포함되어 있지만, 전체적으로는 항산화 기능을 가진다. 페놀이 항산화 활성을 가진 물질이며 IC₅₀이 항산화 효과의 정도를 보여주는 수치이기 때문에 페놀성 화합물의 양이 적고 IC₅₀도 작은 값을 가지는 배지가 항산화 효과에서 가장 우수한 배지라고 판단된다. 이 점을 바탕으로 모든 배지의 총 페놀함량과 IC₅₀을 비교해보았을 때 항산화능이 가장 좋은 배지는 sucrose와 ammonium sulfate가 함께 쓰인 배지로 사료된다.

3.2.5 HPLC 분석

*G. reessii*의 발효 여과액에 포함된 물질을 검출하기 위해 진행한 HPLC 결과는 Figure 11, Figure 12, Figure 13, Figure 14 Figure 15에 나타내었다. *G. reessii*의 발효 여과액에서 하이드록시벤조산(hydroxybenzoic acid) 계열의 Gallic acid, Vanillic acid와 수용성 비타민 계열의 L-ascorbic acid, Vitamin B₁, Vitamin B₃, Vitamin B₆ Vitamin B₁₂가 검출되었다. 이러한 물질들은 이전에 진행되었던 연구에서 항산화 물질로서의 역할이 검증된 바[36-42]가 있지만, 성분분석을 진행한 5가지의 배지별 발효 여과액 중 일부가 IC₅₀ 측정을 통해 항산화 기능을 가지지 않았다는 것이 검증되었으므로 HPLC 결과 *G. reessii*의 발효 여과액에 포함된 것으로 예상되는 물질들이 *G. reessii*의 항산화 기능을 야기하는 물질이라고 판단하기는 어렵다고 생각된다.

IV. 결론 및 제언

4.1 결론

본 연구는 *Galactomyces reessii*의 최적 생장을 유도하는 조건을 확인하기 위하여 10가지 탄소원과 5가지 질소원을 달리 공급하며 *G. reessii*를 배양하였고, *G. reessii*의 배양 온도를 25°C, 30°C, 37°C로 달리하며 배양한 후 건세포중량을 측정하였다. 그 결과 *G. reessii*의 최적 생장 배지를 위한 조건은 3%의 sucrose와 1%의 yeast extract를 공급하고 30°C에서 배양하는 것으로 확인되었다. 또한, 4%의 malt extract만 공급한 배지 대비 3%의 malt extract와 1%의 yeast extract를 공급한 배지에서 *G. reessii*의 생장률이 약 9배 증가한 것으로 보아 *G. reessii*의 생장에는 질소원이 중요하다는 것을 확인할 수 있었다.

*G. reessii*의 바이오 산업 분야의 응용 가능성을 확인하기 위하여 본 연구에서는 *G. reessii*의 발효여과액에 대하여 총 페놀 함량과 DPPH radical 소거능을 측정하였다. 질소원을 yeast extract, 탄소원을 xylose, galactose, fructose, sucrose로 공급한 배지에서 생산된 발효 여과액에서 많은 양의 페놀성 화합물이 검출되었다. 특히 질소원을 공급하지 않고 malt extract만 공급한 배지에서 생산된 발효 여과액 대비, malt extract와 yeast extract를 같이 공급한 배지에서 생산된 발효 여과액에서의 총 페놀 함량이 2.2배 많은 것으로 보아 yeast extract는 *G. reessii*가 페놀성 화합물을 생산해내는 데 도움을 주는 것으로 판단된다. 반면에 온도 조건은 *G. reessii*가 페놀성 화합물을 생산하는 데 큰 영향을 미치지 않는 것으로 확인되었다.

탄소원을 sucrose로 고정하고 질소원을 달리하여 *G. reessii*를 배양한 실험에서, *G. reessii*의 생장량과 발효 여과액의 총 페놀 함량 결과는 비례했다. 하지만, 질소원을 yeast extract로 고정하고 탄소원을 달리하여 *G. reessii*를 배양한 실험에서, *G. reessii*의 생장량과 발효 여과액의 총 페놀 함량 결과는 비례하지 않았다. 이를 통해 질소의 공급 형태는 총 페놀 함량에 영향을 미치지 않지만, 탄소의 공급 형태는 총 페놀 함량에 영향을 미친다는 것을 알 수 있었다. 다만, 이는 명확하게 결론을 내릴 순 없으므로 추가적인 분석이 필요하다고 사료된다.

DPPH radical의 50%를 소거하는데 필요한 발효 여과액의 양을 나타내는 IC₅₀을 계산한 결과 3%의 sucrose와 1%의 ammonium sulfate를 공급한 배지의 발효여과액이 376.18mg/mL로 가장 낮은 IC₅₀을 가졌다. 이 결과는 미생물 발효 화장품에 많이 쓰이는 *Lactobacillus plantarum*의 IC₅₀과 큰 차이를 보이지 않기 때문에 *G. reessii*가 항산화 기능을 위한 새로운 원료로서 가치가 있다고 판단된다.

위의 결과를 통해 다양한 바이오 분야 중 *G. reessii*의 발효여과액이 항산화 기능에 탁월한 역할을 함을 알게 되었기 때문에 항산화 효능에 대해 중점적으로 분석을 진행하였다. 발효 여과액의 IC₅₀이 낮음에도 불구하고, 페놀함량도 적어 발효 여과액에 함유된 물질 중 일부가 월등한 항산화 능력을 갖춘 것으로 추론되는 *G. reessii*의 배양 배지 조성은 3% sucrose와 1% ammonium sulfate이다.

HPLC를 통해 *G. reessii* 발효 여과액의 성분 분석을 한 결과, *G. reessii*의 발효 여과액에는 L-ascorbic acid와 Gallic acid, Vanillic acid, Vitamin B₆, Vitamin B₁₂, Vitamin B₃, Vitamin B₁이 포함되어 있다고 예상된다.

위와 같은 결과를 모두 종합하였을 때, *G. reessii*의 최적 생장을 위한 조건은 sucrose와 yeast extract이며 배양온도는 30°C이며, 항산화 기능을 가진 물질을 최대 생산하기 위해 *G. reessii*를 배양해야 하는 조건은 sucrose와 ammonium sulfate이다. 이러한 결과는 *G. reessii*의 효율적 생산을 위한 산업적 대량배양의 기반을 마련하였다는데 의의가 있으며, *G. reessii*를 이용하는 후속 연구의 기초적 배경이 되어 유용하게 사용될 것으로 판단된다.

4.2 Further Works

*G. reessii*의 최적 생장을 유도하는 질소원을 탐색하는 과정에서 질소원을 urea로 제공한 배지에서 *G. reessii*의 생장률이 다른 질소원을 제공한 실험군에 비해 현저히 낮다는 사실을 확인하였다. 이는 공급한 5가지의 질소원 중에서 urea가 유일한 비단백질성 질소원이라는 점에서 기인한 것으로 예상된다. 하지만 이로 인해 *G. reessii*가 비단백질성 질소원을 영양소로 삼을 때 잘 자라지 않는다고 판단하기에는 실험에 사용된 질소원의 종류가 적을 뿐만 아니라 다른 요인 때문에 이와 같은 결과가 나왔을 가능성이 있어 불가하다. 따라서 질소원의 종류를 늘리거나 다른 질소원과 urea의 차이점을 이용한 다른 추가적인 실험을 진행할 필요가 있다고 판단되며, 이를 바탕으로 어떤 특징을 가진 질소원이 *G. reessii*의 생장을 촉진하는지 추가적인 연구가 이루어질 필요가 있다.

최적 생장을 유도하는 탄소원 탐색 과정에서 당 소모량을 측정하기 위해 DNS method를 이용하여 *G. reessii* 배양 전과 배양 후의 배지에서 당의 함량을 분석하였다. DNS method는 당이 환원되는 정도를 바탕으로 당 소모량을 측정하기 때문에 환원되는 당류에서만 사용할 수 있으며, *G. reessii*의 부산물 중 환원성을 띠는 물질이 있다면, 흡광도에 영향을 미쳐 DNS 법을 통한 정확한 당 소모량 측정이 불가능해진다. 실제로, 본 실험에서 탄소원을 galactose, cellobiose, LBG로 공급한 배지에서 당 소모량이 음수(당이 오히려 증가의 의미)가 나오는 등 당 소모량이 제대로 측정되지 않았다. 따라서 다른 방법으로 당 소모량에 대해 정밀한 연구를 하게 된다면, 산업적으로 *G. reessii*를 대량생산할 때 필요한 당의 양을 알 수 있게 될 것이며, galactose, cellobiose, LBG를 제공한 배지에서 생산된 발효 여과액에 함유된 환원성 물질에 대한 추가적인 연구도 필요할 것으로 생각된다.

미생물 대량배양에서 배지의 pH 조절은 미생물의 생산에 영향을 미치므로 매우 중요한 요소 중의 하나이다. 또한 최적 pH를 맞추는데 드는 비용은 경제성을 평가하는 데 중요하게 고려해야 할 요소이다. 따라서 *G. reessii*의 배양 후 발효 여과액에서의 pH를 측정하였는데, 몇몇 배지에서 독특한 현상이 관찰되었다. 탄소원을 LBG로 공급하고 다른 조건은 같게 하여 배양한 배지의 발효 여과액에서 어떠한 이유 때문인지는 모르지만, 최종 pH가 6.48과 9.22로 다르게 나왔었는데, 이때 균의 생장량이 각각 0.352g/ml, 0.175g/ml로 2배 정도 차이가 났었다. 또한 그 외에도 pH가 높은 특정한 배지에서 균의 생장이 감소하는 현상이 관찰되었는데 이는 경제성평가에 있어 매우 중요한 요소이므로 추가 연구에서 배지의 pH가 *G. reessii*의 생장에 영향을 얼마나 미치는지 확인할 필요가 있다.

유기 질소원인 peptone, yeast extract, soybean을 공급한 배지에서 생산된 *G. reessii*의 발효 여과액에서는 *G. reessii*의 생장률이 많았을 뿐만 아니라 높은 농도로 페놀성 화합물이 검출되었지만, 무기 질소원인 urea와 ammonium sulfate를 공급한 배지에서 생산된 *G. reessii*의 발효 여과액에서는 *G. reessii*의 낮은 생장률과 함께 낮은 농도로 페놀성 화합물이 검출되었다. 이를 통해 질소원의 특징이 *G. reessii*의 성장에 영향을 끼친다는 사실을 생각해볼 수 있긴 하나, 현재 결과만으로는 그 원인을 명확히 판단하기 어려우므로 추가 연구가 필요할 것으로 판단된다.

HPLC는 다양한 물질 검출을 위해 사용하는 크로마토그래피 방법으로 다양한 유용물질 검출에는 대략적인 예측을 가능하게 해 주나, 정확한 물질의 판단은 어렵다. 따라서 예상되는 물질을 검증할 수 있는 다양한 시약을 처리하는 등의 다른 분석방법을 통해 *G. reessii*의 발효 여과액에 포함된 물질에 대해 자세히 분석할 필요가 있다. 또한 본 연구에서 HPLC 결과 *G. reessii*의 발효 여과액에 포함된 것으로 예상되는 물질들이 *G. reessii*가 항산화기능을 갖게 하는 물질이라고 판단하기는 어렵기 때문에 보다 더 자세한 분석방법을 통해 *G. reessii*의 항산화기능을 야기하는 물질을 탐색해볼 필요가 있다.

4.3 활용방안

본 연구는 바이오산업 분야에 적용할 수 있는 신 원료를 개발하는 것과 더불어 *Galactomyces reessii*의 최적 생장 조건을 찾아 *G. reessii*의 효율적인 생산 기반을 마련하는 것에도 목표를 두었다. 특히 본 연구는 여러 유용한 기능 중 항산화 능력에 대하여 중점적으로 분석을 하였는데, *G. reessii*의 최적 생장 조건 모색과 항산화 효과 분석은 *G. reessii*가 바이오산업 분야에서 활용될 수 있는 기반을 마련하고 기능성 화장품과 약품의 소재로 활용할 수 있는 원천 기술을 확보하여 국가적, 사회적 경제성을 증가시키는 산업의 발전을 가져올 것으로 사료된다. 본 연구를 통해 *G. reessii*의 발효 여과액은 항산화 효과를 나타내는 신 원료로써 활용될 수 있다는 점이 확인되었기 때문에, 기존 식물추출물 기반의 화장품 산업에서 탈피하여 신 원료를 기반으로 한 상품을 제조함으로써 세계적 업체와의 경쟁에서 우위를 차지할 수 있게 될 것이다. 또한, 우리나라는 화장품 산업에서 제품을 만들 때 사용하는 원료들을 대부분 수입에 의존하고 있는데, 본 연구에서 개발한 원료를 제품제작에 사용하게 된다면 원료수입량을 줄임으로써 해외원료 의존도를 낮춰 국가적, 사회적으로 이득이 될 것이다. 더하여, 이러한 원료들을 더 개발하게 된다면 우리나라는 천연성 원료에 기반을 둔 기술들을 더 많이 확보할 수 있게 될 것이고, 이는 4차 산업혁명 시대의 새로운 기업을 발전시켜 취업자를 증가시킬 뿐 아니라 국가경쟁력 확보로 이어질 것이다.

본 연구는 제약 및 화장품 산업에서 널리 사용되는 식물추출물이나 동물 부산물이 아닌 미생물의 발효 여과액의 효능에 대해 중점적으로 연구하였는데, 이는 기존산업을 다른 방향에서 접근하는 것으로 미생물의 발효 여과액만이 가지는 특징(적은 비용으로 생산 가능 등)을 탐구하게 된다면 미생물 분야의 새로운 학문적 발전을 도모할 수 있을 것이다. 또한, 이 연구를 통해 미생물을 화장품, 제약, 전기생산 등의 새로운 분야에서 활용하게 된다면 이 분야의 연구가 활발해질 것이며, 그 결과가 분야의 연구인력 역시 늘어날 것으로 생각된다.

참고문헌

- [1] Makeup in the Three Kingdoms of Korea Period, Naver Knowledge Encyclopedia, <https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=776018&%20&cid=42939&categoryId=42939>
- [2] Makeup of the Goryeo Dynasty, Naver Knowledge Encyclopedia, <https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1189962&%20&cid=40942&categoryId=32160>
- [3] 식품의약품안전처 2017 화장품 생산실적, Korea Food and Drug Administration, 2017, page 6
- [4] Men's cosmetics trend, dongA.com, news.donga.com/3/all/20180313/89085964/1
- [5] Men's cosmetics market trend, NEWSIS, http://www.newsis.com/view/?id=NISX20170314_0014762703&cID=10408&pID=13000
- [6] Development of cosmetics using Oriental extracts with antioxidant activity. Culture Pink R&D, Industrial R & D capacity enhancement project final report, page 11
- [7] KOSIS:National statistical portal, http://kosis.kr/statisticsList/statisticsListIndex.do?menuId=M_01_01&vwcd=MT_ZTITLE&parmTabId=M_01_01#SelectStatsBoxDiv
- [8] H. Kenji, N. Akiko, D. Akira, T. Hiromi, and I. Kyoko, Effects of galactomyces ferment filtrate on epidermal barrier marker caspase-14 in human skin cells, Journal of the American Academy of Dermatology, 2010, Volume 62, page AM54.
- [9] S. A. Shahomla, Ascomycetous Fungal Diversity from Tropical Forest and Oil palm Plantation in Malaysia, Major in Biomaterial Science and Technology Department of Environmental Science and Ecological Engineering Graduate School Korea University, 2014, page 36-42.
- [10] T. Sakai and S. Yoshitake, Purification and Some Properties of a Protopectin solubilizing

- Enzyme from *Galactomyces reessii* Strain L†, Agricultural and Biological Chemistry, 2014, Volume 48, page 1941-1984.
- [11] P. Chaijak, C. Sukkasem, M. Lertworapreecha, P. Boonsawang, S. Wijasika, and C. Sato, Enhancing electricity generation using laccase-based microbial fuel cell with yeast *Galactomyces reessii* on cathode, J Microbiol Biotechnology, 2018, Volume 28-8.
- [12] A. Dhar, K. Dhar and JPN Rosazza, Purification and characterization of a *Galactomyces reessii* hydratase that converts 3-methylcrotonic acid to 3-hydroxy-3 -methyl butyric acid, Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002, Volume 28, page 81-87.
- [13] P. Chaijak, M. Lertworapreecha, C. Sukkasem, Phenol Removal from Palm Oil Mill Effluent Using *Galactomyces reessii* Termite-Associated Yeast, Environ. Stud, 2017, Volume 27, page 39-44.
- [14] E. Li and R. Mira de Orduna, A rapid method for the determination of microbial biomass by dry weight using a moisture analyser with an infrared heating source and an analytical balance, The Society for Applied Microbiology, 2010, Volume 50, Page 283-288.
- [15] K. Kiviharju, K. Salonen, U. Moilanen and T. Eerikäinen, Biomass measurement online: the performance of in situ measurements and software sensors, J Ind Microbiol Biotechnol, 2008, Volume 35, Page 657-665.
- [16] J. B. Sumner, DINITROSALICYLIC ACID : A REAGENT FOR THE ESTIMATION OF SUGAR IN NORMAL AND DIABETIC URINE., Journal of Biological Chemistry, 1921, Volume 47, Page 5-.
- [17] G. L. Miller, Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar, ANALYTICAL CHEMISTRY, 1959, Volume 31, Page 426-428.
- [18] J. G. Hong, H. J. Kim, and J. Y. Kim, Factors Affecting Reactivity of Various Phenolic Compounds with the Folin-Ciocalteu Reagent, Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition, Volume 40, Page 205-213.
- [19] G. H. Park, S. H. Lee, H. Y. Kim, H. S. Jeong, E. Y. Kim, Y. W. Yun, S. Y. Nam and B. J. Lee, Comparison in Antioxidant Effects of Four Citrus Fruits, Journal of Food Hygiene and Safety, 2001, Volume 26, Page 355-360.
- [20] E. J. Garcia, T. L. C. Oldoni, S. M. de Alencar, A. Reis, A. D. Loguercio, and R. H. M. Grande, Antioxidant Activity by DPPH Assay of Potential Solutions to be Applied on Bleached Teeth, Brazilian Dental Journal, 2012, Volume 23, Page 22-27.
- [21] D. Huang, B. Ou and R. L. Prior, The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays, AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY, 2005, 1958, Volume 53, Page 1841-1856.
- [22] A. Karadag, B. Ozcelik and S. Saner, Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities, Springer science, 2009, Volume 2, Page 41-60.
- [23] ㈜비전 바이오캡, <http://www.bision.co.kr/page.php?Main=3&sub=1&tab=5>
- [24] non-protein nitro- gen compound (NPN), Naver Knowledge Encyclopedia, <https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=145347&cid=50317&categoryId=50317>
- [25] Durkee A.B., Thivierge P.A., Ferulic acid and other phenolics in oat seeds. J. Food Sci. 42, 1977, page 551-558.
- [26] Kozłowska H., Rotkiewicz D.A., Zadernowski R., Sosulski F.W., Phenolic acids in rapeseed and mustard. J. Am. Oil Chem. Soc. 60, 1983, page 1119-1131.
- [27][재인용] M. H. Kim, E. J. Jeong, and Y. S. Kim, Studies on the Antioxidative Activities and Active Components of the Extracts from *Pleurotus Ostreatus*, Journal of Food Hygiene and Safety, 2016, Volume 31, page 119-125.
- [28] Y. T. Rho, Effects of Carbon and Nitrogen Sources on Immunosuppressant Mycophenolic

Acid Fermentation by *Penicillium brevi-compactum*, The Korean Journal of Microbiology, 2011, Volume 47, page 249-254.

[29] J. Y. Kum, Y. O. Hwang, Eun-soon Lee, K. A. Lee, I. Y. Kim, J. H. Kim and Y. Z. Chae, Polyphenol Contents and Anti-oxidant Capacity of Methanol Extract of Cereals and Legumes, 2012, Report of S.I.H.E, Volume 48, Page 3-12.

[30] Molyneux P, The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity, J. Sci. Technol, 2004, 211-219.

[31] [재인용] J. W. Kim, J. S. Moon and T. B. Choe, Comparison of Antioxidant Activity of Kenaf Extract and its Flavonoids, Kor. J. Aesthet. Cosmetol., 2014, Volume 12, Page 203-210.

[32] H. N Oh, Studies on the Antioxidant Effects of EM (Effective Microorganism s), Theses of marin science Inha univ., 2012.

[33] L. S. Mi, Resistance to Reactive Oxygen Species and Antioxidant Activities o f Some Strains of Lactic Acid Bacteria from the Mustard Leaf Kimchi, The Korean Journal of Microbiology, 2010, Volume 46, Page 375-382.

[34] E. Karimi, H. Z. E. Jaafar, A. Ghasemzadeh and M. H. Ibrahim, Light intensity effects on production and antioxidant activity of flavonoids and phenolic compounds in leaves, stems and roots of three varieties of *Labisia pumila* Benth, Australian Journal of Crop Science, 2013, Volume 7, Page 1016-1023.

[35] J. Golanski, M. Lukasiak, M. Redzynia, J. Dastych and C. Watala, A new approach for the assessment of the toxicity of polyphenol-rich compounds with the use of high content screening analysis, PLOS One, 2017, Volume 12, Page e0180022.

[36] Yilmaz Y, and Toledo R. T, Major flavonoids in grape seeds and skins: antioxidant capacity of catechin, epicatechin, and gallic acid, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2004, Volume 52, Page 255-260.

[37] Chou T. H., Ding H. Y., Hung W. J., Liang C. H., Antioxidative characteristics and inhibition of alpha-melanocyte-stimulating hormone-stimulated melanogenesis of vanillin and vanillic acid from *Origanum vulgare*, Experimental Dermatology, 2010, Volume 19, Page 742-750.

[38] L. Barros, M. JoãoFerreira, B. Queirós, I. C.F.R.Ferreira, P. Baptista, Total phenols, ascorbic acid, β -carotene and lycopene in Portuguese wild edible mushrooms and their antioxidant activities, *Food Chemistry*, 2007, Volume 103, Page 413-419.

[39] Anna Gliszczynska-Świgło, Antioxidant activity of water soluble vitamins in the TEAC (trolox equivalent antioxidant capacity) and the FRAP (ferric reducing antioxidant power) assays, *Food Chemistry*, 2006, Volume 96, Page 131-136.

[40] J. P. Kamat, and T. P. A. Devasagayam, Nicotinamide (vitamin B3) as an effective antioxidant against oxidative damage in rat brain mitochondria, *Redox Report*, 1999, Volume 4, Page 179-184.

[41] C. S. Birch, N. E. Brasch, A. McCaddon, J. H. Williams, A novel role for vitamin B(12): Cobalamins are intracellular antioxidants in vitro, *Free Radical Biology & Medicine*, 2009, Volume 47, Page 184-188.

[42] P, Škorña, J, Rimarc̃ík, P, Poliak, V. Lukeš, E. Klein, Thermodynamic study of vitamin B6 antioxidant potential, *Computational and Theoretical Chemistry*, 2015,

Effects of Vitamin E on Reproductive System in Busulfan-treated Mice.

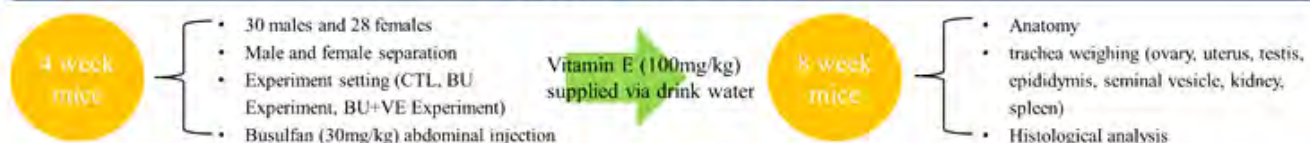
Ye Eun Lee, Dong Eon Lee, Jae Hee Lee, Hae Jin Kim, Seung Won Choi, Hee-Su Kim, Sung-Ho Lee

Department of Biotechnology, Sangmyung University, 20, Hongjinmun 2-Gil, Jongno-Gu, Seoul, Republic of Korea, 03016

Abstract

According to statistics released by the Korea National Statistical Office (KNSO) in 2017, the leading cause of mortality in Korea is malignancy, or cancer, death. An anticancer agent is typically used for treatment of cancer. However, cancer cells as well as normal cells are also attacked by cancer drugs, and many efforts have been made to find a substance to prevent such side effects. This study emphasizes the use of antioxidant Vitamin E as an anticancer substance, focusing on mitigating attack on normal cells of Busulfan. For this experiment, we divided into 3 groups (CTL; control group, BU; treated with Busulfan, BU+VE; treated with Busulfan and supplied Vitamin E via drinking water). The 4 weeks old mice of experimental groups were intraperitoneally injected with Busulfan (30mg/kg) and BU+VE groups were supplied Vitamin E (100mg/kg) for 4 weeks. Finally, 8 weeks old mice were sacrificed and weights of organ were measured. Histological changes of tissues were observed by using hematoxylin/eosin staining. As a result, the weights of testis in BU and BU+VE group were significantly lighter than those in CTL group (103.7±2.5 mg vs 44.7±1.9 mg, vs 59.7±5.1, $p<0.001$), however, those in BU+VE group were higher than those in BU group ($p<0.01$). The ovarian weights of BU+VE group were significantly increased than those of BU group (12.7±1.1 vs 8.8±1.1, $p<0.05$). The Effect of Busulfan was expected to be lower in female mice. The present study suggests that using antioxidants such as Vitamin E in combination with anticancer drugs will reduce the side effects of anticancer drugs and help in more effective treatment.

Materials and Methods



Results

Table 1. The initial and final weights of CTL, BU, BU+VE groups in mice and the weight of each organ.

Male	CTL	BU	BU+VE
Initial B.W. (g)	22.4±0.7	22.6±0.4	22.3±0.5
Terminal B.W. (g)	30.5±0.4	30.2±0.4	30.0±0.3
Gain in B.W. (g)	8.13±0.7	7.57±0.6	7.70±0.6
Testis (mg)	103.7±2.5	44.7±1.9***	59.7±5.1***##
Epididymis (mg)	38.4±1.1	32.2±1.1***	34.7±2.5
S.V. (mg)	78.4±8.0	71.4±2.4	70.9±4.7
Kidney (mg)	200.7±5.0	209.8±4.9	230.4±4.7***##
Spleen (mg)	114.3±3.9	109.5±3.1	115.6±3.4
Female	CTL	BU	BU+VE
Initial B.W. (g)	19.8±0.3	18.8±0.3	19.0±0.4
Terminal B.W. (g)	24.6±0.3	22.8±0.3**	24.6±0.6#
Gain in B.W. (g)	4.8±0.2	4.0±0.6	5.6±0.5
Ovary (mg)	11.0±0.9	8.8±1.1	12.7±1.1#
Uterus (mg)	117.4±11.8	106.9±12.7	114.7±18.1
Kidney (mg)	125.5±2.4	122.3±2.5	139.1±3.8***##
Spleen (mg)	112.7±8.2	105.9±4.5	109.5±6.2

Values are expressed as mean±S.E. Significant differences with CTL group are marked with an asterisk (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$). Significant differences with BU group between BU+VE group are marked with an shop (#, $p<0.05$; ##, $p<0.01$; ###, $p<0.001$).

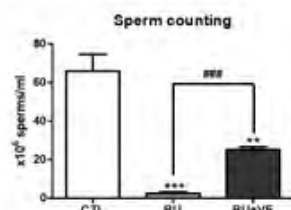


Fig. 1. Sperm counting of male mice. Values are expressed as mean±S.E. Significant differences with CTL group are marked with an asterisk (*, $p<0.05$; **, $p<0.01$; ***, $p<0.001$). Significant differences with BU group between BU+VE group are marked with an shop (#, $p<0.05$; ##, $p<0.01$; ###, $p<0.001$).

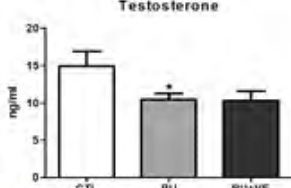


Fig. 2. Serum testosterone levels in male mice. Values are expressed as mean±S.E. Significant differences are marked with an asterisk (*, $p<0.05$).

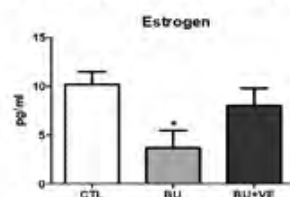


Fig. 3. Serum estrogen levels in female mice. Values are expressed as mean±S.E. Significant differences are marked with an asterisk (*, $p<0.05$).



Fig. 4. Male mouse internal organ pictures. From left to right testis(X200), epididymis(X200), kidney(X200), spleen(X100). From top to bottom CTL, BU, BU+VE.

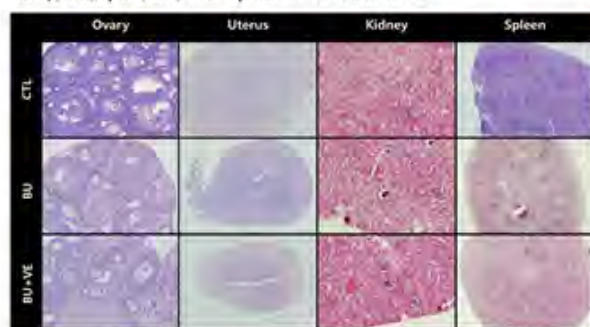


Fig. 5. Female mouse internal organ pictures. From left to right ovary(X200), uterus(X100), kidney(X200), spleen(X50). From top to bottom CTL, BU, BU+VE.

Conclusion

- 1) Testis weight of experimental groups decreased compared to CTL group. However, testis weight was significantly higher in the BU + VE group than in the BU group.
- 2) In the epididymis, in the histological analysis, the BU group showed apoptotic cell death in the seminiferous tubule the BU + VE group maintained the cells in the CTL group.
- 3) In females, the ovarian and uterine weight of the BU group were decreased compared to the control group but not significant. However, the ovarian weight of BU + VE group was significantly higher than that of BU group.
- 4) Busulfan-induced apoptosis is more common in males than in females, and therefore, cell re-generation by vitamin E is also stronger. This suggests that vitamin E, an antioxidant, may alleviate side effects caused by busulfan-induced apoptosis.

학부생 연구 논문

Busulfan 투여 생쥐에서 생식기관에 대한
vitamin E의 영향

Effect of Vitamin E on Reproductive
System in Busulfan-treated mice.

2018. 11.

상명대학교 융합공과대학
생명화학공학부 생명공학과
이예은, 이동언, 이재희, 김해진, 최승원
연구지도자 : 김희수⁷⁾, 이성호⁸⁾

7) 상명대학교 일반대학원 생물학과 의생명공학연구실

8) 상명대학교 융합공과대학 생명화학공학부 생명공학과 의생명공학연구실

국문 초록

2017년 한국 통계청 사망원인통계에 따르면 대한민국의 사망률의 원인 중 1위는 악성 종양, 즉 암에 의한 사망이다. 암에 대한 치료를 위해 대표적으로 사용되는 것이 항암제이다. 이 물질의 목표 원리는 암 세포만 공격하는 선택 독성이다. 하지만 빠르게 분열, 증식하는 세포를 공격하는 성질 때문에 우리 몸의 다른 정상적인 세포도 공격을 받는다. 이와 같은 부작용을 막기 위한 물질을 발견하기 위한 노력들이 이루어지고 있다. 이번 연구의 목적은 알킬화제 항암물질인 busulfan의 정상 세포에 대한 공격을 완화시키는 것에 중점을 두었고, 그에 대한 물질로 항산화제인 vitamin E를 사용한다는 것에 의의를 둔다. 이 실험에서는 1개의 대조군과 2개의 실험군 (busulfan을 주사한 생쥐, busulfan을 주사하고 vitamin E를 섭취한 생쥐)을 암수 분리하여 총 6개의 그룹으로 나누었다. 4주차에 생쥐의 초기무게를 측정하고, busulfan을 복강 주사하여 다시 4주간 사육한다. 그리고 4주 동안 vitamin E를 투여하는 그룹은 음용수에 vitamin E를 녹여 투여한다. 최종적으로, 생쥐를 희생한 뒤 각 조직의 무게를 측정하고 H&E staining을 통해 조직학적 분석을 실시하였다. 그 결과 busulfan과 vitamin E를 같이 투여한 실험군이 busulfan만 투여한 실험군보다 생식기관의 무게들이 상대적으로 높게 나타났고, 정자 수를 관찰했을 때 busulfan과 vitamin E를 같이 투여한 실험군이 busulfan만 투여한 실험군보다 현저히 많았다. 요약하자면 성장기의 수컷 생쥐의 생식선 상피 세포가 busulfan에 의해 파괴되었고, vitamin E가 이러한 부작용을 완화시켜준다는 결과가 나왔다. 하지만 busulfan의 암컷 생쥐에 대한 작용은 수컷 생쥐에 비해 비교적으로 낮았다. 항암제와 함께 vitamin E와 같은 항산화제 물질을 이용한다면, 항암제에 대한 부작용을 줄이고 보다 효과적인 치료에 도움을 줄 것이라고 생각한다. 기존 항암제의 세포 독성 성질을 완화시켜주고 항암제의 목표 원리인 선택 독성을 더 잘 지니게 될 것이라 전망한다.

목차

I. 서론	116
1.1 연구동기 및 필요성	116
1.2 연구 목적	116
1.3 선행 연구 고찰	116
II. 실험 재료 및 방법	117
2.1 실험동물	117
2.2 Busulfan 주사 및 vitamin E 투여	117
2.3 실험동물 희생	117
2.4 조직학적 분석	117
2.4.1 탈수	117
2.4.2 포매	117
2.4.3 Section	117
2.4.4 염색	118
2.4.5 관찰	118
2.5 통계방법	118
III. 결과 및 고찰	118
3.1 연구 결과	118
3.1.1 무게 측정	118
3.1.2 현미경 관찰	120
3.2 고찰	122
IV. 결론 및 제언	123
4.1 결론	123
참고문헌	124

I. 서론

1.1 연구 동기 및 필요성

항암화학요법의 시대는 1940년대에 나이트로젠 머스타드와 엽산 길항제를 처음 사용하면서 시작되었다. 항암제는 악성종양의 치료를 위하여 사용되는 화학요법제의 총칭으로 주로 핵산의 합성을 억제하거나 항암활성을 나타내는 약제이다. 이들은 암세포에만 선택적으로 작용하지 않고 정상세포, 특히 세포분열이 활발한 조직세포에도 손상을 입히기 때문에 여러 가지 부작용을 동반한다. 실제로 만성 골수성 백혈병을 가진 61세의 남자에게 항암제인 busulfan 치료로 인한 발열, 복통 및 담즙 정체성 형태의 간 효소가 나타나는 부작용이 나타난 사례가 있다[4]. 알킬화제에 속하는 항암제들은 반응성이 대단히 높은 물질로 세포에 작용시키면 대부분 DNA의 구아닌과 반응하여 DNA 구조를 변형시키고 사슬절단을 일으켜 항암효과 및 세포독성효과를 나타낸다. 1세대 화학항암제와 2세대 표적항암제가 발생시키는 내성과 부작용으로 인해 3세대 면역항암제가 등장한 후 독성과 내성으로 나타나는 문제들과 부작용을 현저히 줄였으나 그럼에도 불구하고 이들 부작용을 줄여주는 방안이나 항산화물질에 대한 연구는 부족한 실황이다.

1.2 연구 목적

항암제를 생쥐에 투여할 경우, 암컷과 수컷의 생식기 능력의 저하를 야기하는 부작용을 가진다. 한 연구 결과에 따르면 busulfan이 투여된 생쥐의 정소세포가 busulfan에 의하여 인위적인 사멸과정을 증가시킴으로써 정소의 무게가 감소했다[3]. 항암제와 함께 항산화 물질이 투여된 수컷 생쥐의 경우, 항암제만 투여된 수컷 생쥐에 비해 빠르게 정소의 기능을 회복한다. 본 실험에서는 항산화 물질인 vitamin E가 항암제인 busulfan의 투여로 기능이 저하된 정소가 회복하는 데에 어떤 영향을 주는 지에 대해 알아보고자 한다. Busulfan이 동물에게 미치는 부작용에 대한 연구는 많이 진행되었으나 busulfan이 생식기관에 미치는 부작용에 대한 항산화 물질의 투여로 얻을 수 있는 효과에 대한 연구는 부족하다고 판단하여 본 연구를 진행한다.

1.3 선행연구 고찰

Busulfan은 위장관에서 쉽게 흡수되어 2-3시간의 반감기 동안 빠르게 피 속에서 사라지는 화학치료제이자 세포정지제이다[2]. Busulfan은 골수 이식이 필요한 환자들을 위해 기본적으로 사용되는 유용한 약물이며 만성 골수성 백혈병에 안전하고 효과적인 치료가 된다[10]. 생체 조건 내에서 포유류의 정자형성은 정소줄기세포에 의존한 길고 복잡한 과정인데, busulfan은 정원세포의 분화 과정이 아닌 확산에 영향을 미치는 것으로 밝혀졌다[9]. 실제로 한 연구에서는 busulfan이 주입된 생쥐에게서 정원 줄기세포의 활성이 13배 감소한 것을 확인했다[7]. Busulfan이 사람의 정자 수치를 되돌릴 수 없을 정도로 저하시키기 때문에 남성의 생식력에 영향을 주는 것으로 알려져 있는데 이를 완화시켜 줄 수 있는 물질들이 몇 가지 있다. Busulfan이 주입되어 정자 생성 및 운동성이 파괴된 생쥐에게 간 성장 인자인 LGF를 복강 내에 투여함으로써 이를 부분적으로 회복시킨 연구 결과가 있다[14]. 본 실험을 통해 항산화 물질인 vitamin E의 투여를 통해 busulfan이 초래할 수 있는 부작용이 어떤 변화를 갖게 되는지에 대해 알아보고자 한다.

II. 실험 재료 및 방법

2.1 실험동물

본 연구에 사용한 실험동물은 생후 4주차 된 생쥐로 암컷은 총 25마리, 수컷은 총 30마리를 이용하였다. 실험은 대조군(CTL)과 2개의 실험군 busulfan(BU 실험군), busulfan + vitamin E(BU+VE 실험군) 총 3개의 그룹으로 나누었고, CTL 그룹은 암컷 8마리, 수컷 9마리, BU 실험군은 암컷 9마리, 수컷 11마리, BU+VE 실험군은 암컷 8마리, 수컷 10마리와 같이 생쥐를 분배하였고 그룹별로 암컷과 수컷의 초기무게 평균을 구하고 평균무게의 $\pm 10\%$ 이상 차이가 나는 개체들은 실험에서 제외를 한 이후에 실험을 진행하였다.

2.2 Busulfan 주사 및 Vitamin E 투여

실험 4주차에 암수 분리한 생쥐의 무게를 측정하여 30mg/kg의 농도로 busulfan을 복강 주사한 다음 4주간 사육한다. 사육 기간 동안 vitamin E를 투여하는 그룹은 음용수에 vitamin E를 녹여서 체내에 흡수되도록 하였다.

2.3 실험동물 희생

실험 8주차에는 4주간의 생쥐 최종 무게 변화를 측정하고 단두로 희생을 한 후 혈액 샘플을 채취하였다. 암컷은 난소와 자궁, 수컷은 정소, 부정소, 저정낭을 적출하고 비생식기관으로는 비장과 신장을 적출하여 무게를 측정한 후 조직학적 분석을 위해 4%의 paraformaldehyde로 고정시킨다.

2.4 조직학적 분석

실험종료 후 얻은 조직은 탈수, 포매, Section, 염색, 관찰의 5단계 과정을 통해 조직학적 분석을 진행하였다.

2.4.1 탈수

고정시킨 조직들의 내부 수분을 없애기 위해 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 농도의 에탄올을 1시간 30분 간격으로 점차 높은 농도의 에탄올을 갈아주며 Shaker에 올려 Sample들이 에탄올에 더 많이 닿을 수 있도록 흔들어 준다.

2.4.2 포매

에탄올을 통해 수분을 없앤 기관들을 카세트에 담아 xylene 안에 담아주는데 이때 신장과 비장같이 크기가 큰 기관들은 카세트 높이에 맞춰서 잘라 넣어주고 30분 간격으로 다른 Xylene에 옮겨주며 1시간 30분 동안 진행한다. 이후 카세트를 30분 간격으로 진공건조기 속의 3개의 파라핀에 옮겨 넣어주며 1시간 30분간 진행한다. 마지막으로 Embedding center를 이용하여 파라핀 block을 만들어 준다.

2.4.3 Section

포매 과정에서 만들어 둔 block을 microtome을 이용하여 조직 절편을 만들고 slide warmer를 이용하여 물기를 말리고 조직을 slide에 부착시킨다.

2.4.4 염색

제조한 slide를 carrier에 담아서 Xylene에 5분 간격으로 3번 옮겨 넣어주고 에탄올에 100%, 95%, 90%, 80%, 70% 순으로 3분 간격으로 넣어 함수과정을 끝내면 Hematoxylin으로 5분정도 염색 한 다음 Carrier채로 씻어준다. 이후 Eosin으로 5분정도 염색을 하고 이때도 Carrier채로 씻어 준 다음 에탄올에 70%, 80%, 90%, 95%, 100% 순으로 3분 간격으로 넣어 탈수과정을 진행하고 다시 Xylene에 1일간 넣어준다.

2.4.5 관찰

Slide가 담긴 Xylene통을 가져와 Mountin 용액을 이용하여 Cover glass를 덮어 Slide를 계속 보존하게 만들어 준다. Cover glass가 고정이 잘 되도록 Slide를 어느 정도 말려준 다음 현미경 프로그램을 이용하여 40배율부터 고배율로 사진을 찍고 컴퓨터에 저장을 한다. 저장된 사진들을 이용하여 비교 및 관찰을 한다.

2.5 통계 방법

결과 통계 방법은 t-test를 사용하여 유의성을 검사하였으며 신뢰수준은 95%로 설정하였다.

III. 결과 및 고찰

3.1 연구 결과

3.1.1 무게 측정

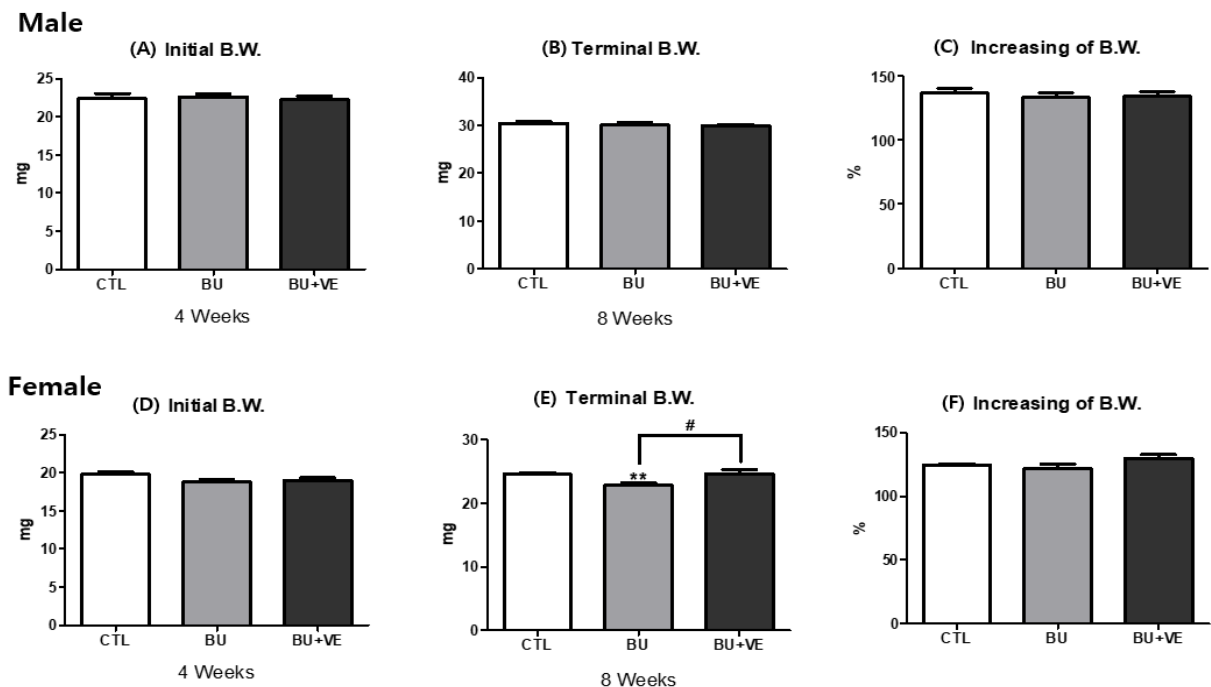


Fig. 1. Mouse B.W. graph (A) 4weeks male B.W. (B) 8weeks male B.W. (C) Male B.W. degree of change. (D) 4weeks female B.W. (E) 8weeks female B.W. (F) Female B.W. degree of change. The asterisk (*) is shown as * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$ and *** when $p < 0.001$ compared with the control group. The shop mark (#) is indicated as # when $p < 0.05$, ## when $p < 0.01$ and ### when $p < 0.001$ compared between BU group and BU+VE group.

Male

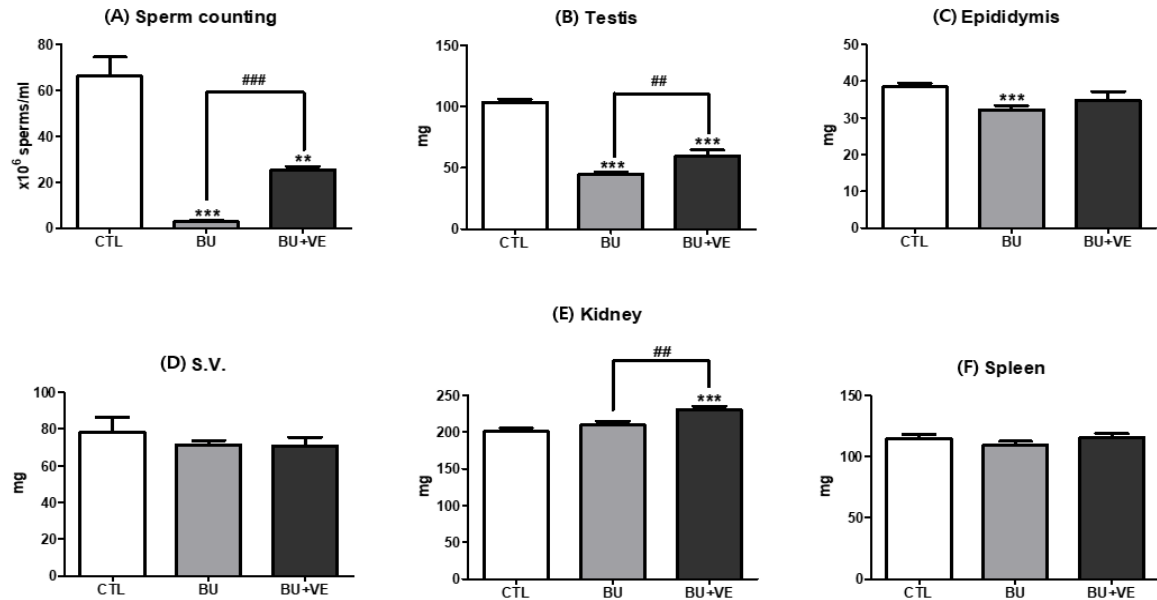


Fig. 2. Male mouse internal organ weight graph (A) Sperm counting. (B) Testis weight. (C) Epididymis weight. (D) S.V. weight (E) Kidney weight. (F) Spleen weight. The asterisk (*) is shown as * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$ and *** when $p < 0.001$ compared with the control group. The shop mark (#) is indicated as # when $p < 0.05$, ## when $p < 0.01$ and ### when $p < 0.001$ compared between BU group and BU+VE group.

Fig. 1.은 각각 대조군과 BU 실험군, BU+VE 실험군의 무게를 4주차, 8주차에 측정한 무게와 그 사이의 체중증가율을 그래프로 나타낸 것이다. 수컷 생쥐 체중의 경우 대조군과 실험군들 사이에서 유의성은 발견되지 않았다. 암컷 생쥐의 경우 8주차에 BU 실험군은 대조군에 비해 무게가 확연하게 감소한 것을 확인할 수 있다. 또한, busulfan만 투여한 BU 실험군보다 busulfan과 vitamin E를 투여한 BU+VE 실험군의 생쥐들이 무게가 더 많이 나가고 최종 몸무게가 대조군만큼 회복되는 것을 확인할 수 있다.

Fig. 2.는 수컷 생쥐의 생식기관과 비생식기관의 무게를 그래프로 나타낸 것이다. 정자 수를 확인해 본 결과(A)에서 두 실험군 모두 대조군에 비해 정자수가 적다. BU+VE 실험군의 정자 수가 BU 실험군의 정자 수에 비해 비교적 높은 수치를 기록하고 있다. 정소(B)는 대조군과 BU 실험군, BU+VE 실험군 사이에 확실한 무게의 변화가 있다. 정자 수(A)와 마찬가지로 BU 실험군과 BU+VE 실험군의 무게는 대조군과 비교했을 때 그 무게가 현저히 낮게 측정됐다. 실험군들 사이에서는 BU+VE 실험군이 BU 실험군에 비해 비교적 무게가 높은 것으로 나타났다. 부정소(C)에서는 BU 실험군의 무게가 대조군에 비해 낮은 무게로 높은 유의성(***; $p < 0.001$)을 보였지만, BU+VE 실험군은 정소(B)에서와는 다르게 대조군과 큰 차이를 보이지 않는다. 저정낭(D)과 비장(F)의 무게는 대조군과 두 실험군 사이에 큰 차이를 보이지 않는다. 신장(E)의 경우, BU 실험군과 대조군에 비해 BU+VE 실험군의 무게가 높게 측정된 것을 확인할 수 있다.

Female

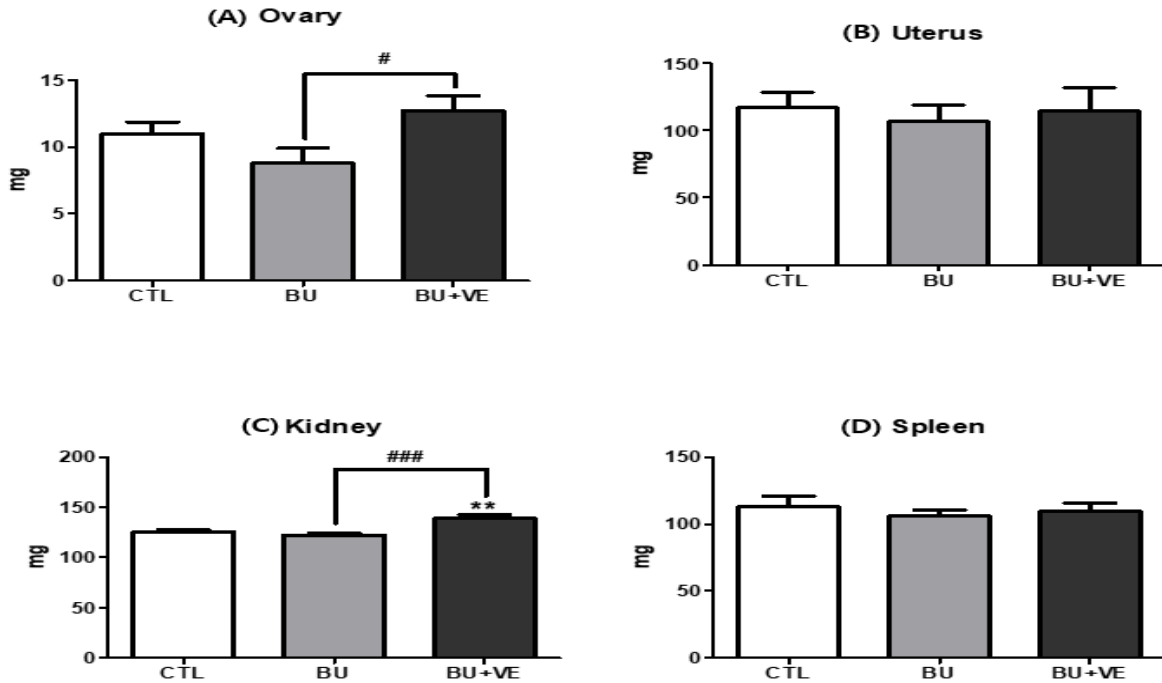


Fig. 3. Female mouse internal organ weight graph (A) Ovary weight. (B) Uterus weight. (C) Kidney. (D) Spleen weight. The asterisk (*) is shown as * when $p < 0.05$, ** when $p < 0.01$ and *** when $p < 0.001$ compared with the control group. The shop mark (#) is indicated as # when $p < 0.05$, ## when $p < 0.01$ and ### when $p < 0.001$ compared between BU group and BU+VE group.

Fig. 3. 은 암컷 생쥐의 장기 무게를 측정한 그래프이다. 난소(A)는 대조군과 BU 실험군 사이에서 유의성은 발견되지 않고, BU 실험군에 비해 BU+VE 실험군의 난소 무게가 많이 나가는 것을 볼 수 있다. 자궁(B)에서는 대조군과 실험군들 사이에서의 큰 차이는 없다. 신장(C)은 대조군과 BU 실험군 사이에 차이는 미미하지만, 실험군들 사이에서는 BU+VE 실험군이 BU 실험군에 비해 무게가 더 높게 측정됐으며 또한 대조군에 비해 BU+VE 실험군의 신장의 무게가 더 높게 측정되었다. 비장(D)의 무게는 대조군과 실험군들 사이에 큰 차이를 보이지 않는다.

3.1.2 현미경 관찰

장기의 무게를 측정한 그래프에서 대조군과 실험군들 사이에 극명한 차이를 보였던 정소는 현미경 상에서도 많은 차이를 보인다(Fig. 4). 대조군의 정상 생쥐의 경우 생식세포를 만들어 내는 세정관이 각각 그 형태를 갖추고 있으며, 조직 내부에 결함이 없고 조직 내부가 완전히 채워져 있는 것을 확인할 수 있다. 반면, BU 실험군의 정소의 단면을 보면 세정관이 원형을 이루지 못하고 대부분의 조직이 깨져 있어 내부에 빈틈이 많은 것을 육안으로 확인할 수 있다. 그에 반해 BU+VE 실험군의 정소에서는 세정관이 그 형태를 비교적 잘 유지하고 있으며, 조직 내부에 약간의 빈 공간을 형성하고 있어 손상이 된 것을 알 수 있지만, BU 실험군과 비교해 봤을 때 비교적 손상된 조직이 적음을 알 수 있다. 장기의 무게를 측정한 그래프(Fig. 2) 상에서도 대조군과 실험군들 사이에 차이가 적었던 부정소와 신장, 비장은 현미경 상의 장기 단면 사진에서도 큰 차이를 보이지 않는다.

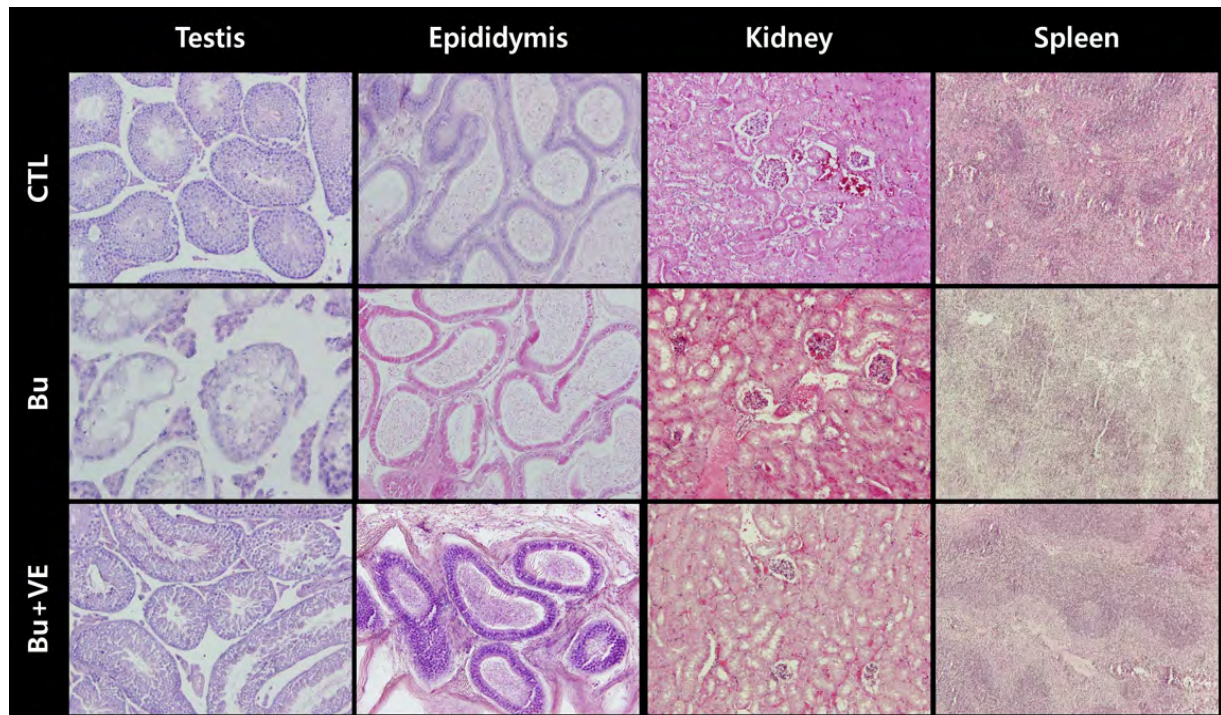


Fig. 4. Male mouse internal organ pictures. From left to right Testis, Epididymis, S.V., Kidney, Spleen. From top to bottom CTL, BU, BU+VE (x1000).

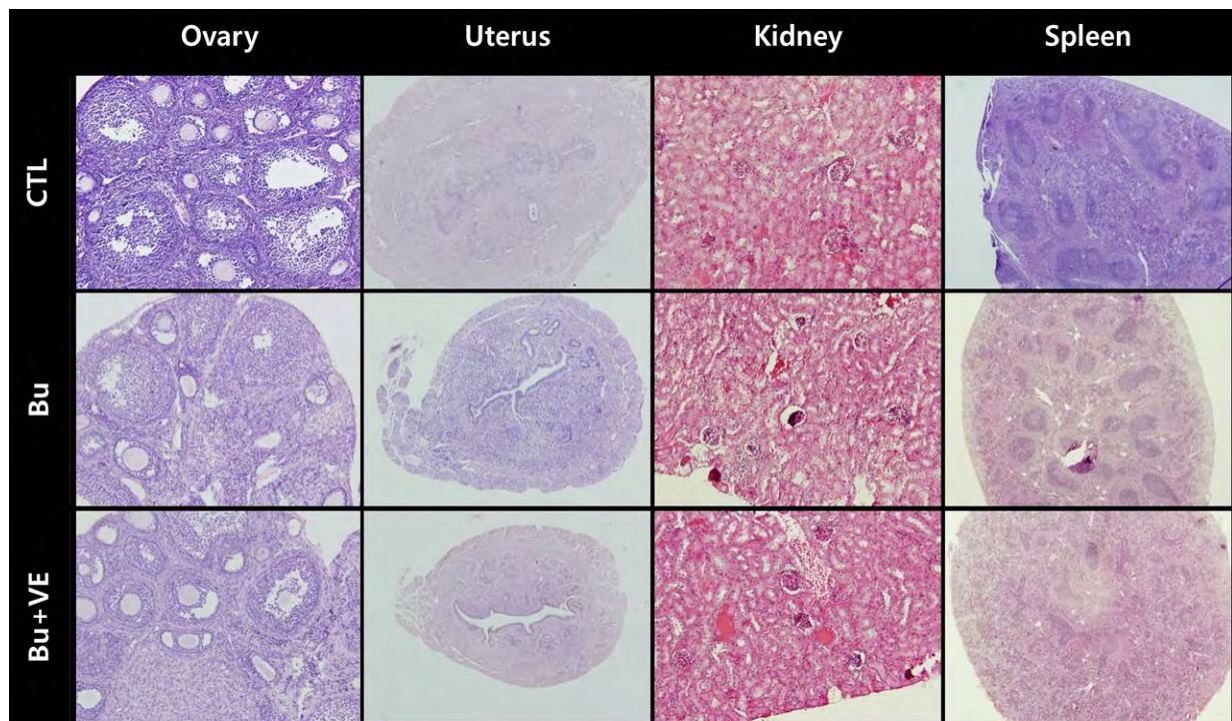


Fig. 5. Female mouse internal organ pictures. From left to right Uterus, Ovary, Kidney, Spleen. From top to bottom CTL, BU, BU+VE (x1000).

암컷 생쥐의 경우, 각각의 장기 무게를 측정하여 나타난 그래프(Fig. 3.)에서 기관마다 대조군과 두 실험군 사이에서 큰 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과는 현미경 상에서 관찰한 각 기관의 단면 사진(Fig. 5.) 에서도 마찬가지인데, 비교적 난소에서 차이를 나타내고 있다. 대조군의 난소와 비교했을 때 두 실험군 모두 조직 가운데에 균열이 일어나 있는 것을 육안으로 확인 가능하다. 이 외에 다른 장기 조직에서는 육안으로 확인 가능한 큰 차이는 찾아보기 힘든 것으로 보인다.

3.2 고찰

본 연구에서는 성장기의 수컷 생쥐의 생식세포가 busulfan에 의해 파괴되었고, vitamin E가 이러한 장애를 치료할 수 있음을 보여 주었다. 수컷 생쥐에 대한 busulfan의 파괴적인 작용은 Fig. 4.에서 볼 수 있다. 암컷 생쥐는 수컷 생쥐에 비해 busulfan의 작용을 덜 받는 것으로 보인다(Fig. 5.).

Busulfan은 백혈병 치료에 효과적인 약물이지만 골수억제, 피부반응, 구토, 설사 등의 부작용을 야기하기도 한다. 또한, 생식 세포를 파괴하여 정자 형성에 장애를 주지만 손상의 회복은 어렵다[6]. Busulfan과 같은 화학 요법 후 그에 따른 부작용을 개선하기 위해서 많은 연구들이 있었다. 대부분의 연구가 호르몬과 관련되어 있으며, 그 중 많은 연구에서 melatonin의 정자 형성 복구 작용에 대해 입증되었다[5, 8]. Melatonin은 정소 및 전립선의 무게를 보존하고, 정자 수를 증가시키며, 성호르몬 수치를 조절한다. 또한, 자유라디칼 제거제 특성을 가진 것으로 추정되며, 세포 증식을 유도하여 세포 사멸을 감소시키는 것으로 보인다[1]. 이러한 결과는 melatonin의 항산화 효과에 의한 것으로 유추되기도 한다[8]. Vitamin E 또한 자유라디칼 반응의 전파를 막는 사슬 파괴 항산화제로 산화성 스트레스로부터 세포를 보호하는 역할을 한다. Vitamin E를 투여한 실험군의 정소는 그 무게(Fig. 2.)가 대조군에 비해 현저히 낮았지만, busulfan을 투여한 실험군과 비교했을 때 $p < 0.01$ 의 높은 유의성을 보였다. 현미경을 통해 관찰한 정소의 조직 세포(Fig. 4.)에서 원형조직들이 대부분 파괴되어 그 형태를 구분하기 어려운 BU 실험군에 비해 BU+VE 실험군은 대조군에 비해 원형조직이 손상된 상태이지만 비교적 조직들이 제 형태를 갖추고 있는 모습이다. 정자 수의 경우 BU 실험군은 대조군과 매우 높은 유의성(***)을 보이고, BU+VE 실험군은 대조군과 비교적 낮은 유의성(**)을 보인다. BU+VE 실험군은 BU 실험군과 비교하여 $p < 0.001$ 로 높은 유의성(###)을 보인다(Fig. 2.) 이러한 결과는 melatonin과 같이 vitamin E의 항산화 작용이 세포 증식을 유도하여 세포 사멸을 감소시켜 나타난 것으로 추측된다.

Vitamin E는 생체막에서 일어나는 지질과산화를 방지함으로써 기관들을 보호한다. 이번 연구의 결과 중, 신장의 무게에서 대조군과 BU+VE 실험군 사이에 암컷은 $p < 0.01$, 수컷은 $p < 0.0001$ 로 높은 유의성을 보이고 있다(Fig. 2, 3.). 암수 공통적으로 vitamin E를 투여한 실험군의 신장 무게가 대조군과 BU 실험군에 비해 높게 측정되었다. Vitamin E는 신장에서 지질과산화의 부산물인 malondialdehyde의 형성을 억제하며 이를 통해 세포 생존 능력 유지에 결정적 역할을 하는 Na^+ , K^+ -ATPase 활성의 손실을 방지한다[12]. Rat의 신장에서는 철 매개 과산화를 방지해 세포 사멸을 억제하기도 한다[13]. 대조군과 BU+VE 실험군 사이에서 신장 무게에 높은 유의성을 보이는 것은 vitamin E의 작용으로 세포 생존을 유지하게 됨으로써 그에 따른 무게 변화가 비교적 적어 나타난 것으로 보인다. 신장 무게 변화와 유사하게 암컷 생쥐에서 난소의 무게는 대조군과 BU+VE 실험군 사이에 높은 유의성을 보인다. 이러한 결과는 vitamin E가 생쥐의 난소에서 지질과산화를 방지하고 항산화제를 보호함으로써 나타난 것으로 보인다[11].

IV. 결론

4.1 결론

본 실험은 미성숙한 암수 생쥐에게 busulfan을 투여한 후 8주차에 희생하여 체중의 변화와 생식 기관, 비생식기관의 무게 차이를 확인하였으며 조직학적 분석을 통해 기관 내 세부조직의 차이도 확인하였다. Busulfan은 항암제의 일종으로 분열중인 세포를 특이적으로 사멸시킨다. 이러한 작용 때문에 암세포뿐만 아니라 다른 세포의 사멸을 유도시켜 다른 장기에서 부작용이 나타나기도 한다. 이전 연구결과에서는 성체 수컷 생쥐에게 Busulfan을 투여하면 정소 무게가 감소하고 조직학적인 분석 결과 정자형성에 참여하는 정소의 세정관 내 생식세포들이 busulfan에 의해 10일 이내로 사멸된다는 것을 확인하였다[15]. 하지만 미성숙한 생쥐에게 투여하거나 또는 암컷에게 투여한 연구는 많이 진행되지 않았다. 따라서 이런 연구 결과들을 바탕으로 미성숙한 암수 생쥐에게 busulfan을 투여하여 4주 후 어떤 변화가 있는지 확인하였다. 먼저 체중의 변화를 살펴보면 수컷의 경우 무게의 유의성이 나타나지 않았다. 암컷의 경우 BU 실험군의 희생 시 최종 무게가 대조군에 비해 감소한 것으로 나타났다. BU+VE 실험군의 최종 무게는 대조군과 비슷하고 BU 실험군에 비해 증가한 것으로 보아 busulfan에 의한 무게 감소를 vitamin E가 회복시킨 것으로 보인다. 희생 시 수컷의 부정소 내 정자수를 계수한 결과를 보면 우선 BU 실험군의 정자수가 확연히 줄어든 것을 확인할 수 있다. BU+VE의 경우 대조군보다는 감소하였지만 BU 실험군에 비해서는 증가한 것을 보아 vitamin E의 작용이 긍정적임을 확인할 수 있다. 수컷의 장기무게를 보면 실험군의 경우 정소의 무게가 대조군의 비해 모두 감소한 것을 확인할 수 있다. 하지만 BU+VE 실험군의 정소무게가 BU 실험군의 무게보다 유의성 있게 증가한 것으로 보아 vitamin E가 busulfan에 의한 세포 사멸을 방지 해주었을 것이라 추측할 수 있다. 부정소의 경우에도 BU 실험군은 대조군에 비해 무게가 감소하였지만 BU+VE의 무게는 대조군과 유의성이 없는 것을 확인할 수 있다. 또한 조직학적인 분석 결과에서도 BU 실험군의 세정관 내 세포사멸이 관찰되고 BU+VE 실험군은 대조군만큼 세포가 유지되고 있는 것이 관찰된다. 결과적으로 수컷의 경우 vitamin E의 작용이 busulfan에 의한 생식기관의 세포사멸을 방지한다고 추측할 수 있다. 암컷의 경우에는 대조군과 비교하였을 때 BU 실험군의 난소와 자궁 무게가 감소하지만 유의성이 없는 것으로 나타났다. 하지만 BU 실험군의 난소 무게보다 BU+VE 실험군의 난소 무게가 유의성 있게 증가한 것으로 보아 busulfan에 의한 부작용을 vitamin E가 완화할 수 있다는 것을 암시한다. 결과적으로 암컷보다는 수컷에 busulfan에 의한 세포사멸이 더 많이 일어나며 그에 따라 vitamin E에 의한 세포사멸 방지 작용도 더 강하게 작용하고 있음을 알 수 있다. 따라서 busulfan에 의한 세포사멸로 인해 나타나는 부작용들을 항산화제의 일종인 vitamin E가 완화시킬 수 있다는 점을 시사한다.

참고문헌

- [1] Hemadi M, Zargar M, Sobhani A, Sobhani A. Assessment of morphological and functional changes in neonate vitrified testis grafts after host treatment with melatonin. *Folia Morphol* (Warsz). 2011;70(2):95-102.
- [2] Sayed Hadi Anjamrooz et al. Assessment of Morphological and Functional Changes in the Mouse Testis and Epididymal Sperms Following Busulfan Treatment, *Iranian Biomedical Journal* 11, 2007
- [3] Apoptosis of germ cells induced by busulfan treatment is mediated by c-kit, but not by the fas/fasL or p53 pathways, *Ok Dowon*, 2004
- [4] Morris, L E et al. Busulfan-induced hepatitis, *Morris, The American journal of gastroenterology* v.83 no.6, 1988
- [5] Fahimeh Mohamad Ghasemi, Masoumeh Faghani, Sina Khajehjahromi, Mohamadhadi Bahadori, Ebrahim Nasiri, Masoud Hemadi. Effect of Melatonin on Proliferative Activity and Apoptosis in Spermatogenic Cells in Mouse under Chemotherapy. *Journal of Reproduction & Contraception*. 2010 Jun.;21(2):79-94.
- [6] Udagawa K, Ogawa T, Watanabe T, Yumura Y, Takeda M, Hosaka M. GnRH analog, leuporelin acetate, promotes regeneration of rat spermatogenesis after severe chemical damage. *Int J Urol*. 2001;8(11):615-22.
- [7] Falciatori Ilaria et al. Identification and enrichment of spermatogonial stem cells displaying side-population phenotype in immature mouse testis, *The FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* v.18 no.2, 2004
- [8] Mehri Mirhoseini, Ghasem Saki, Masoud Hemadi, Ali Khodadadi, Javad Mohammadi Asl. Melatonin and Testicular Damage in Busulfan Treated Mice. *Iran Red Crescent Med J*. 2014 February; 16(2): e14463.
- [9] Sang Chul Han et al. Metallothionein Expression in Mouse Testis after Busulfan Treatment, *한국수정란이식학회 제 4회 발생공학 국제심포지움 및 학술대회*, 2004
- [10] Busulfan, Buggia, I et al., *The Annals of pharmacotherapy* v.28 no.9, 1994
- [11] Mandava V.RaoSunita L.ChawlaSeema R.Sharma. Protective role of vitamin E on nickel and/or chromium induced oxidative stress in the mouse ovary. *Food and Chemical Toxicology* 2009 Vol.47 No.6 pp.1368-1371.
- [12] Thomas CE1, Reed DJ. Radical-induced inactivation of kidney Na⁺,K⁺-ATPase: sensitivity to membrane lipid peroxidation and the protective effect of vitamin E. *Arch Biochem Biophys*. 1990 Aug 15;281(1):96-105.
- [13] Daxian Zhang, Shigeru Okada, Yingyan Yu, et al. Vitamin E inhibits apoptosis, DNA modification, and cancer incidence induced by iron-mediated peroxidation in Wistar rat kidney. *Cancer Res* 1997;57:2410-2414.
- [14] Lee, Kyung Hoon et al. Vitrified canine testicular cells allow the formation of spermatogonial stem cells and seminiferous tubules following their xenotransplantation into nude mice, *Scientific reports* v.6, 2016
- [15] P J O'Shaughnessy et al. Effect of germ cell depletion on levels of specific mRNA transcripts in mouse Sertoli cells and Leydig cells, *Reproduction* Vol. 135, 2008, 839-850.

단체 활동

AMP 동아리 첫모임

AMP 동아리 회식

AMP 동아리 Membership Training

AMP 동아리 첫모임

생명공학과 AMP 신입생 여러분 환영합니다! 라는 말과 함께 2018년 AMP가 시작되었습니다. 첫 만남은 재밌는 일이 일어날 것 같은 느낌과 설렘이 가득한 자리 같습니다. 첫 모임에서는 AMP의 일원으로서 향후 계획을 수립하며 전망을 얘기해보려는 자리를 가졌습니다. AMP의 목적 및 활동과 연구 주제 조 편성 등을 중점으로 하여 첫 모임을 진행해보았습니다. 그 결과 생명공학과에 대한 전반적인 이해와 실험을 통한 학습을 계획할 수 있었으며 이러한 결과는 학술제와 학술지를 할 수 있게 된 원동력이 될 수 있던 것 같습니다. 조 편성을 하기에 앞서 5명의 임원과 각 조의 조장을 선출하여 조장을 필두로 생명공학의 여러 가지 분야와 하고 싶은 실험에 대한 뜻이 맞는 사람들이 모여 조가 편성되었습니다. 또한, 각 조의 특성을 살린 실험을 진행하고자 하는 기반도 다질 수 있었습니다. 학술은 물론 친목 동아리만큼 단체 활동들을 통해 친목과 소속감 협동심을 느끼고자 하는 방법도 생각해 보았습니다. 모든 것이 낯설고 새로울 신입생들에게 작은 도움이 되고자 학교생활에 관련된 여러 가지 이야기를 해주며 친해지고 노력하였으며 또한 단체 회식과 같은 친목활동에 관한 이야기도 나왔습니다. 단체 회식과 조별 간의 작은 친목활동들 그리고 회식과 같은 단체 활동으로 소풍과 MT에 관한 이야기들로 들뜨는 자리를 가졌습니다. 첫 모임으로 2018 AMP가 시작된 것을 느낄 수 있던 것 같습니다. 생명공학과로 개편된 후 AMP는 새로운 도약을 준비하고 있습니다, 이 첫 모임을 통해 저희 AMP 일원들 모두 하고 싶은 주제의 실험 계획의 기초를 수행함으로써 생명공학과에 관한 관심과 지식을 함양시키므로 미래 생명공학도로서의 도약을 시작할 수 있는 모임이었던 것만큼 뜻깊은 시간이었던 것 같습니다.



AMP 동아리 회식

회식을 하므로 AMP의 친목을 높일 수 있던 것 같습니다. 사람들과 일을 함께 하기 위해선 일을 하는 사람들 간의 팀워크가 크게 작용하여 친밀감 형성이 중요하다 생각하였습니다. 그러므로 회식을 진행하여 친밀감을 높이고자 하였습니다. 전체 회식으로는 2번 정도의 만남을 가졌습니다. 인원들이 최대한 가능할 수 있는 시간을 찾아야 했고 그러므로 시간을 정하는 과정과 횟수에 대한 어려움을 겪었습니다. 그 결과 첫 모임 때와 2018년 1학기의 종강을 기념하여 단체 회식을 진행하게 되었습니다. 또한, 조별에서 자체적으로 회식하며 팀 내 분위기를 형성할 수 있던 것 같습니다. 분자유전학조와 의생명공학B조에서는 활동을 기념하는 과정에서나 아니면 학회와 상생과 같은 활동에서 성취한 것에 대한 기쁨을 나누면서 회식을 진행하였습니다. 회식을 통해 분위기를 좀 더 완화된 분위기를 만들어 어색함을 줄여 친밀한 관계를 형성할 수 있었습니다. 또한 회식은 조뿐만이 아닌 조들 연합 간으로 하며 AMP의 교류를 활성화할 수 있게 된 계기가 되었습니다. 공동체 의식의 함양과 또한 이를 바탕으로 일을 진행함에 박차를 가할 수 있던 것 같습니다. 모든 일을 진행하기 위해 일의 순서에 얽매이기보다 서로 간의 이해가 같이하고자 하는 일의 능률을 높일 수 있을 것입니다. 그러므로 함께 밥을 먹으며 자연스러운 대화를 통해 생긴 친밀감은 서로의 이해를 가능하게 해주었고 이러한 활동이 저희가 함께 진행해 나가는 실험을 무사히 마칠 수 있는 에너지가 되었습니다.



AMP 동아리 Membership Training

3월의 어느 날 MT를 다녀왔습니다. 처음 AMP의 이름으로 모인 자리는 아니었지만 처음 만나는 것 같은 설렘이 가득한 자리였습니다. 대성리로 오는 과정에서 길을 잃기도 하는 기억에 남은 일화도 많음과 함께 MT가 처음인 신입생들의 활기를 보며 덩달아 즐거워지는 듯한 느낌이 드는 하루였습니다. MT에 가서 다양한 먹거리와 게임을 진행하며 즐겁게 보낼 수 있던 것 같았습니다. MT에서 게임을 할 때 팀을 이루어 게임을 진행하는 과정에서 서로 고민하고 의지하며 점수를 얻는 과정에서 협동심을 기를 수 있던 것 같았습니다. 서로 웃고 즐기는 과정 중 선배와 후배라는 사이라는 벽이 조금씩 허물어지는걸 느낄 수 있었습니다. 또한, 게임 외 활동들도 서로와 가까워질 수 있던 계기가 된 것 같았습니다. 선배와 학교생활을 얘기하기도 동아리에 관해서 얘기하기도 학업에 관해 얘기하기도 하는 대화와 함께 밤이 깊어지는 하루였습니다. 신입생이라는 이름으로 모든 것이 낯설었던 하루가 지나가고 아침이 밝았습니다. MT를 통해 같이 모여 시간을 보내면서 서로를 더 잘 이해하게 되었으며 공동체 의식을 함양시킬 수 있던 것 같습니다. 또한, 동기간 선후배 간의 정을 더 끈끈이 할 수 있던 것 같습니다. 더 나아가 이런 친목활동을 통하여 같이 일을 하는 사람들의 팀워크를 형성하여 좋은 결과를 낼 수 있는 밑바탕이 될 수 있을 것이라 생각합니다.



조별 활동

2018 한국생물공학회 추계국제학술대회

분자유전학조

의생명공학 B조

논문 공부 및 학술 활동

분자유전학조

의생명공학조

스터디상생플러스

분자유전학조

미생물조

소풍

롯데월드

어린이대공원 동물원

서울숲곤충식물원

코엑스 아쿠아리움

2018 한국생물공학회 추계국제학술대회

분자유전학조 : 정하영, 장영준, 최성우, 이병호, 강서영,
김연서, 김인경, 박고운, 박지영, 홍성찬

저희는 교수님의 도움을 받아 10월 12일에 '한국생물공학회'에 참석하게 되었습니다. 처음엔 교수님의 학회에 가보자는 말씀에 단순히 가서 이런저런 구경도 하고 좋은 경험이 될 것 같아 가겠다고 하였습니다. 하지만 학회를 준비하는 기간이 길어지고 학회가 점점 다가옴에 따라 저희는 이왕 가는 거 더 열심히 준비해서 잘하고 오자는 마음으로 마음가짐이 바뀌었습니다. 학회에 가니 생명공학에 관련된 다양한 기업체들이 각자의 부스에서 본인의 회사가 어떤 일을 하고 어떤 기술을 가졌는지에 대해 설명해주었고 여러 교수님과 강사님들이 강의하고 계셨습니다. 강의시간에 교수님들을 통해서 말로만 듣다가 실제로 그 분야에서 일하고 계신 분들께 직접 얘기를 들으니 더욱 신기했고 우리도 미래에 저런 위치에 있었으면 좋겠다는 생각을 가졌습니다. 각 부스 설명이 끝나고 포스터 발표 시간이 되어 저희도 심사위원께 저희의 연구에 대해 간략히 설명해 드리고 각자 관심 있는 연구 분야의 포스터를 찾아다니며 설명을 들었습니다. 저희가 학교에서 이론적으로만 배운 것들에 대해 실제로 실험을 하여 원하는 결과를 얻거나 정말 생각지도 못한 방법과 주제로 실험을 한 팀들이 많았습니다. 그걸 보며 다시 한 번 우리도 열심히 미래를 준비해야겠다는 생각을 하였고 전공에 관련된 공부뿐만 아니라 영어공부도 꼭 해야겠다는 생각을 하였습니다. 이렇게 학회가 마치고 저희는 생각지도 못한 큰 상을 받게 되었습니다. 학회를 준비할 때만 해도 너무 힘들었는데 그동안 저희가 한 노력이 빛을 보는 것 같아 굉장히 뿌듯했고 학부생 때 해보지 못할 경험들을 할 기회를 주신 교수님께 감사한 마음이 들었습니다. 한국생물공학회 말고도 다른 여러 학회가 많이 있는 것으로 알고 있는데 기회가 된다면 미생물이 아닌 다른 주제의 연구를 통해 다른 학회에도 참가해보고 싶다는 생각이 들 만큼 너무나도 좋은 경험이었습니다.



2018 한국생물공학회 추계국제학술대회

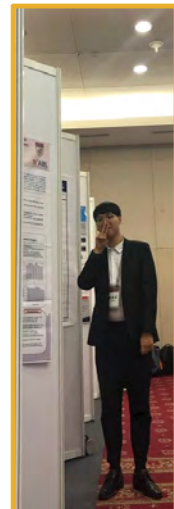
의생명공학 B조 : 홍윤기, 항병강, 함진호, 김어진솔, 김영빈, 허준우

2018년 10월 12일 세종대학교 컨벤션홀에서 열린 2018 한국생물공학회 추계국제학술대회 및 산학연협력심포지엄에 조원 총 6명, 홍윤기, 항병강, 함진호, 김어진솔, 김영빈, 허준우가 참석하였다. 우리 조는 ‘초본계 식물로부터 항산화 물질을 효과적으로 추출하기 위한 반응조건의 탐색’이라는 주제로 학술회에 참가하였다.

이번 학회를 준비하기 위해 여름방학 동안 총 5번의 회의와 4번의 실험을 진행했다. 실험은 어성초, 인진쑥, 카카오닙스를 소재로 진행되었고 각 시료의 추출은 각각 다른 농도의 에탄올(0, 25, 50, 75, 100%)을 이용하여 4가지의 반응온도 (25, 50, 75, 100°C)에서 1시간 동안 반응하였고, 총 페놀 함량과 DPPH 라디칼 소거 능력을 분석 및 평가하여 최적 추출 조건을 결정하였다.

그 결과 총 페놀 함량은 어성초, 인진쑥, 카카오닙스 모두 100°C, 50% 에탄올 조건에서 최대로 추출되었고 그 함량은 각각 3.002mg/ml, 4.917mg/ml, 4.852mg/ml 로 조사되었다. DPPH 라디칼 소거 능력을 나타내는 IC50은 그 수치가 낮을수록 항산화 효과가 높은 것으로 알려졌다. 실험결과 어성초, 인진쑥, 카카오닙스의 가장 낮은 IC50값은 각각 0.734mg/ml (100°C, 75% 에탄올), 0.901mg/ml (50°C, 75% 에탄올), 0.819mg/ml (100°C, 75% 에탄올)로 분석되었다.

주도적으로 진행해본 첫 실험이기도 하고 첫 학술회여서 긴장감 때문에 잘 준비하지 못한 것 같아서 전체적으로 아쉬웠다. 좀 더 잘할 수 있었을 것 같고 더 깊이 있는 실험을 준비할 수 있었던 점을 다음번에 보완해보고 싶다. 전체적으로 어려웠던 실험은 아니어서 실험 중 필요한 농도를 임의로 계산하는 법, 필요한 실험법 등 실험을 준비하는 과정을 배울 수 있었다.



논문 공부 및 실험에 관한 자료조사, 실험 계획 수립, 논문 및 포스터 작성

분자유전학조 : 정하영, 장영준, 최성우, 이병호, 강서영,
김연서, 김인경, 박고운, 박지영, 홍성찬

저희는 4월 12일, 5월 10일, 5월 30일, 6월 11일, 7월 18일, 8월 16일, 8월 22일, 9월 27일 총 8번에 걸쳐 학술적인 모임을 했습니다. 가장 먼저 저희가 연구하고 싶은 실험을 정하기 위해 각자의 관심사에 맞는 여러 논문을 찾아와 그 논문에 관한 이야기를 나누고 교수님을 찾아가 자문하는 등의 과정을 거쳐 모두가 맘에 들어 하는 실험 주제를 정하였습니다. 아직 논문을 많이 접해보지도 못하였고 영어로 된 논문을 읽고 공부하는데 굉장한 어려움을 겪었지만 그런 과정에서 논문을 읽는 법이나 원하는 논문을 쉽게 찾는 법 등 앞으로의 대학 생활에 도움이 될 만한 정보들을 많이 얻을 수 있어 좋았습니다. 또한, 실험주제를 정하는 것으로 끝나는 게 아니라 인터넷과 논문, 전공 서적들을 통해 저희가 연구하고 싶은 주제의 실험을 어떤 식으로 설계해야 하는지에 대해 조사하였습니다. 교수님의 도움을 받아 실험설계를 마쳤지만 이러한 과정에서 아직 접해보지 못한 실험기구, 다양한 실험원리들에 대해 스스로 공부해볼 수 있어 다들 자신에게 뿌듯함을 느끼는 기회가 되었습니다. 저희는 *Galactomyces reessii*의 최적생장 조건과 바이오산업 분야로의 응용 가능성을 목적으로 연구를 진행하였습니다. 방학 때 실험을 하게 되어 그 당시에는 정말 힘들었지만, 만족할 만한 실험 결과가 나오고 실험 도중에 발생하는 예기치 못한 문제들을 해결해가며 미래의 나에게 도움이 되는 경험을 해보는 것 같아 좋았습니다. 실험이 끝나고 함께 모여 실험 결과를 분석해보고 더 의미 있는 결과를 얻기 위해 관련 논문을 조사하며 각자 역할을 나누어 논문을 쓰고 포스터를 만들면서 학부생 때는 해보지 못하는 일들을 하는 우리의 모습을 보며 미래에 한 발짝 더 다가간 것 같은 느낌을 받았고 그 때문에 더 열심히 할 수 있었던 것 같습니다.



의생명공학A조 학술활동

의생명공학A조 : 이예은, 이재희, 이동언, 최승원, 김해진

저희 조는 의생명공학에 대한 관심이 많은 사람이 많은 조로 구성되어 동아리 활동을 했습니다. 처음 저희가 조를 배정받고 활동을 했던 것은 동아리 소풍이었습니다. 저희 조는 어린이 대공원으로 가서 조성된 환경에 대해서 알아보고 친숙해지는 시간을 가졌으며, 저희 조원들의 단합력을 높이는 시간을 가졌었습니다. 본격적인 학술적 활동은 무더운 6월 여름부터 진행했습니다. 6월 초 회의를 통해 의생명공학의 어떤 소재를 중점적으로 다룰 것인가에 관해 얘기했고, 회의를 통해 항산화제의 역할에 대해 알아보고 실험해보자는 결론을 바탕으로 연구를 진행했습니다. 회의를 진행할 때 항산화제에 대한 여러 논문 중 각자 골라서 고른 논문에 관해 공부해보는 시간을 갖고 추후에 발표까지 해보는 시간을 가졌습니다. 발표할 때 서로 새롭게 알아온 내용을 가르쳐주고 소개해주며 부족한 지식에 대해서도 능동적으로 알려주는 시간을 가지며 실험에 임할 소양을 갖췄습니다. 방학 기간 중 실험 일정을 잡아 실험을 진행하였는데, 항산화제인 vitamin E를 항암제인 Busulfan을 투여한 생쥐의 성 성숙에 미치는 영향에 대한 실험을 진행했다. 실험이 진행된 후 결과가 나오고 논문을 쓰기 시작하였는데, 참여하지 않는 조원 없이 전부 다 스스로 역할을 분담하여 논문 작성 활동에 참여하였고 싫은 내색 없이 논문을 완성하게 되었다. 논문 작성을 완료하기 전 조 회식을 해 서로의 의기를 투합하고 몰랐던 사실에 대해서 정보를 공유하고, 조원들의 공통된 경험을 통해 다시 한 번 친목을 도모하였습니다.



분자유전학조 분자유전학실험 연구노트

지도교수님 : 안예진 교수님

지도조교님 : 장보민 조교님

장영준, 최성우, 박고운, 김연서, 정하영, 강서영, 홍성찬, 김인경, 박지영

■ 연구목적 박테리아의 유전형질을 플라스미드를 이용하여 형질전환시키고 형질전환 된 박테리아를 선택하는 과정을 이해한다.

■ 실험원리

외부로부터 주어진 DNA를 받아들여 생물체의 유전적인 성질이 변하는 것을 형질전환 (Transformation)이라한다. 대장균을 포함해서 대부분 박테리아는 일반적인 조건에서 제한된 양의 DNA만을 도입한다. 대장균을 포함해서 대부분의 박테리아는 일반적인 조건에서 제한된 양의 DNA만을 도입한다. 효과적으로 형질전환하기 위하여 DNA 도입능력을 강화하는 물리적이거나 화학적인 처리를 거쳐야만 한다.

■ 연구방법

본 연구에서는 클로닝 과정을 통해 재조합 plasmid를 *E. coli*에 삽입하여 인슐린을 얻는 실험을 진행하였다. 클로닝 과정은 6단계로 이루어진다. 먼저 insert DNA를 제조한다. 이 과정은 insert DNA가 플라스미드에 삽입될 수 있도록 제한효소로 절단하는 작업이다. 증폭시킬 pre-insert DNA를 PCR을 통해 증폭시키고 검증, 정제한 후 제한효소를 처리하여 insert DNA로 만든다. 다음은 vector의 역할을 하는 Plasmid를 절단한다. 절단된 Plasmid의 self ligation을 차단하고 정제한다. 절단된 Plasmid에 insert DNA를 삽입한다. 이 과정에서는 제조한 Plasmid와 insert DNA의 농도와 부피를 계산한 후에 vector와 insert DNA를 연결한다. *E. coli*를 competent cell로 만들어 재조합 plasmid를 삽입하고 37°C에서 15~16시간 배양한다. 배양 후, 증폭된 재조합 plasmid 검증과 재조합 plasmid를 얻어낸다. 재조합 plasmid에 존재하는 -gal과 인슐린 A or B 단백질 사슬을 합성하는 유전자는 인슐린 융합 단백질을 생성한다. 이 재조합 plasmid가 들어있는 *E. coli*의 추출물에서 인슐린을 구성하는 단백질을 추출하여 인슐린으로 제조한다.

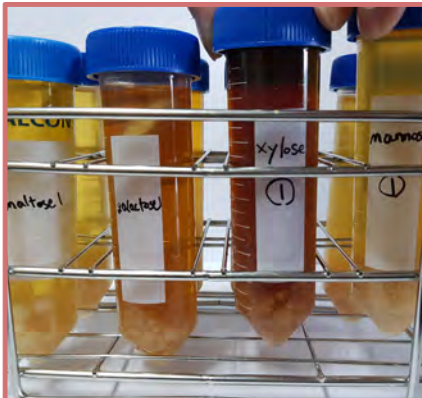
■ 실험 후 느낀 점

우리 조는 분자유전학 부분에 관심이 많은 학생이 모여 있는 조이다. 특히 분자유전학의 기초가 되는 클로닝을 가장 해보고 싶은 1순위 실험으로 정하여 실험을 진행한 것이기 때문에 본 실험에서는 아직은 이론으로만 배웠던 흥미로운 실험을 실제로 진행하는 과정을 가졌고 이 때문에 전공지식뿐만 아니라 실제 실험 기법을 배울 수 있어 큰 도움이 되었다. 하고 싶은 실험이 있어도 학기 중의 실험수업에서는 다루지 않거나 고학년 수업에서 미리 실험하고 싶어도 거의 할 수 없었으나, AMP를 통한 활동 때문에 원하는 실험을 해볼 수 있었고 실험을 설계하여 교수님과 논의해 볼 수 있어 많은 것을 배울 수 있었다. 또한 수업시간에 진행되는 실험 수업은 제한된 시간 내에 실험을 진행하기 때문에 실험 과정이 생략되거나 부분적으로 진행되는 점이 있으나, 이 실험은 방학에 진행되었기 때문에 실험을 처음부터 진행할 수 있었고 일주일의 시간 동안 진행되어 실험 과정과 원리를 정확히 이해해 가면서 적극 실험에 참여할 수 있었다. 따라서 수업에 묶인 실험이 아니라 원하는 실험을 직접 해보고 배울 수 있어서 학업에 많은 도움이 되었고 방학 기간에 의미 있는 활동을 했다고 느꼈다. 실험을 진행하는 동안 이론적인 부분에서 안예진 교수님의 좋은 설명이 있었기에 어려운 부분에서도 정확하게 이해할 수 있었으며 실험에서는 장보민 조교님의 설명과 도움으로 실험에서 좋은 결과를 얻을 수 있었다. 또한, 자율적으로 모르는 부분이 있으면 서로 토의하거나 생각해 보는 시간을 가질 수 있었다. 본 활동을 통해 형질전환을 통한 클로닝을 집중적으로 배우고 실험해 보는 시간을 가질 수 있었다. 클로닝은 유전 공학에서 가장 많이 사용되는 보편적인 방법인 만큼 생명공학을 연구하는 사람이라면 가장 기본적인 실험 방법의 하나일 것이다. 이는 앞으로 우리가 나아갈 방향으로서의 기초적인 연구가 되는 첫걸음이 될 것으로 생각한다.

스터디 상생 플러스

분자유전학조 : 정하영, 장영준, 최성우, 이병호, 강서영,
김연서, 김인경, 박고운, 박지영, 홍성찬

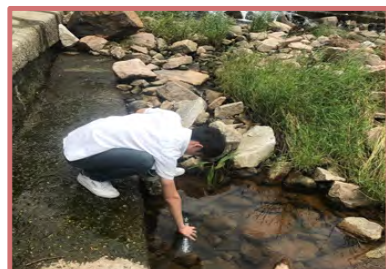
저희는 저희가 연구한 'Enhancement of Antioxidant from *Galactomyces reessii* by Medium Optimization for Cosmetic Application'을 주제로 교내 교수학습개발센터에서 시행하는 2018학년도 2학기 스터디 상생플러스에 참가하였습니다. 스터디 상생플러스란 공통의 관심사를 가진 학생들이 팀을 구성하여 프로젝트 주제를 설정하고 지도교수님과 기업 멘토의 피드백을 받아 프로젝트를 완수할 수 있도록 지원하는 프로그램으로 관심분야가 같다는 공통점을 가지고 모인 저희 조와 잘 맞고 저희의 연구내용을 타과 학생들에게까지 알릴 좋은 기회라고 생각하여 참가하게 되었습니다. 우선 서류를 제출한다고 무조건 할 수 있는 것이 아니었기 때문에 상생플러스에 붙기 위해 수업이 끝난 후에도 남아서 관련 서류를 성심성의껏 쓰기 위해 노력하였습니다. 그렇게 노력한 결과, 저희는 스터디상생플러스에 선정되었고 지금까지도 그 활동을 이어가고 있습니다. 상생플러스를 통해 저희가 한 실험의 전반적인 내용과 그에 관한 여러 가지 것들에 대해 다시 한 번 상기시키고 더 자세하게 알 기회가 되었다고 생각합니다. 또한, 학교 프로그램 중 하나인 'corn'을 사용하여 저희가 매 회 하는 실험과 연구 상황에 대해 조원들과 공유하고 그에 관해 토론하고 이야기할 수 있는 공간이 마련되어 있기 때문에 상생플러스를 진행하는 데 있어 더 용이하였습니다. 저희는 지도교수님을 통해 기업 멘토로 지난 11월 5일에 고려대학교 생명공학과 교수님을 만나 뵙고 생명공학에 대한 전반적인 내용과 최근에 연구되고 있는 내용들, 미래에 어떤 일을 하는 곳으로 취업할 수 있는지에 대한 강의를 들었습니다. 아직은 모두 저학년들이라 생명공학보다는 생명과학에 대해 배우고 있다는 느낌을 받고 있었는데 고려대 교수님의 강의를 통해 우리가 고학년 때 학습할 전공지식에 대한 전반적인 내용과 단순히 알고 있던 연구직이나 영업직뿐만 아니라 다양한 경로로 다양한 분야에 취업할 수 있다는 사실을 깨닫는 좋은 시간이었던 것 같습니다. 아직 상생플러스가 끝나진 않았지만 저희는 끝나는 시점까지 최선을 다해 좋은 결과를 얻어 서로에게 유익한 기회로 기억에 남을 수 있도록 열심히 할 것입니다.



스터디 상생 플러스

미생물조 : 임지수, 박민선, 이예빈, 유시훈, 이정호

상명대학교에서 진행된 2018 하계방학 스터디상생플러스 프로그램에 해양 미생물조 전원이 물꽃이라는 팀명으로 ‘탄닌 추출물을 통한 녹조 저감 효과’ 연구 진행을 위해 참여하였습니다. 처음에는 실험주제를 정하는 것부터 실험을 진행하고 결과를 해석하여 논문으로 작성하기까지 모든 것을 학부생인 저희가 진행해야 한다는 것이 막막하기도 하고 어렵게만 느껴졌습니다. 특히 실험에 기초가 되는 지식을 얻고 실험 방법을 참고하기 위해서 많은 논문을 읽고 해석하는 과정이 필요했는데, 평소 주어진 교과서 내용을 교수님께 배워 익히는 것에 익숙해져 있다 보니 영어 논문을 해석하여 논문 내용을 이해하는 것에 많은 어려움을 겪었습니다. 하지만 실험의 주제를 정하기 위해 논문을 읽어 조원들끼리 토론을 진행하고, 실험을 진행하는 와중에도 관련된 논문을 각자 읽어와 발표를 진행하여 부족했던 부분을 채워나갈 수 있었습니다. 또한, 기록적인 폭염 속에서도 홍제천의 물을 채수하여 조류를 배양하고, 사과의 껍질을 깎아 탄닌을 추출하고, 직접 배양한 조류에게 추출한 탄닌을 처리하여 결과를 얻어내고 분석하기까지 모든 과정이 쉽지 않았습니다. 배양한 조류의 상태가 좋지 않아 일부를 버려야 했고, 실험 중 실수로 다시 실험을 진행하기도 하였습니다. 그러나 조원들 모두가 여름 방학 동안 실험에 적극 참여하면서 어떤 일이든 서로 미루지 않으며 함께 노력한 덕분에 원하던 녹조 저감 효과를 얻어낼 수 있었습니다. 이 모든 과정에는 바쁘신 와중에도 꾸준히 도와주신 교수님, 조교님께서 계셨고, 결과적으로 스터디상생플러스 프로그램에서 우수상이라는 값진 결과를 얻어낼 수 있었습니다. 상을 받았다는 자체만으로도 뿌듯함을 느낄 수 있었지만, 실험에 사용되는 다양한 기구들을 유연하게 다루는 방법, 논문을 읽는 요령 등 전공 수업만으로는 배울 수 없었던 세세한 부분들을 배우고 체험할 수 있는 기회를 통해 성장해가는 저희를 확인할 수 있어 더욱 뿌듯했습니다. 현재 조원 모두가 함께 2학기에 추가적인 실험을 진행하기 위해 계획 중이고, 2018, 2학기 스터디상생플러스와 그 외 공모전에서 좋은 결과를 얻기 위해 노력하고 있습니다.



롯데월드 소풍

분자유전학조 : 정하영, 장영준, 최성우, 강서영,
김연서, 김인경, 박고운, 박지영

저희는 5월 17일에 조별견학으로 롯데월드에 방문하였습니다. 다들 중간고사가 끝나고 휴가분한 상태로 갔던 탓인지 더욱 재밌게 놀 수 있었던 것 같습니다. 도심 속에 이런 거대한 놀이동산을 지어놨다는 것에 감탄하며 오랜만에 온 놀이공원에 신이 나서 부푼 기대감을 안고 입장하던 때가 기억이 납니다. 보통 동기들끼리 놀러 가는 경우가 많은데 선후배가 같이 놀러 간 적은 모두 처음이라 색다르고 놀이기구를 기다리는 긴 시간이나 밥을 먹는 동안 서로 많은 이야기를 하다 보니 전보다 확실하게 친해지는 계기가 되었던 것 같아 내년에도 학술적인 활동뿐만 아니라 친목을 위한 활동도 많이 했으면 좋겠다는 느낌을 받았습니다. 친목을 목적으로 한 회식을 하면 회식을 하는 잠깐의 시간 동안만 친해졌다가 나중에 만나면 다시 어색해지는 경우가 많다고 느꼈었는데 오랜 시간 동안 같이 있던 탓인지 그에 비해 서로에 대해 더 많이 알 수 있어서 좋았습니다. 또한, 다 같이 옷을 맞춰 입었기 때문인지 조금은 어려운 사이라고 생각했던 선후배 사이가 한층 더 가까워지고 단합력도 느낄 수 있었습니다. 저희 조는 1학년에 남자가 없어 초반에 2학년 남자 선배들과 1학년들이 친해지는데 어려움을 겪었는데 학기 초에 친목을 위한 견학을 다녀와서인지 지금은 서로 낯을 가려 어색했던 모습은 없어지고 다들 친하게 잘 지내고 있습니다. 이 시점을 기준으로 조원들 사이에 끈끈함이 생기고 친밀도가 올라가니 서로 배려하며 앞으로 할 조별활동에 대한 기대감도 자연스레 높아졌습니다. 지금 돌이켜보면 1년 동안 한 번 밖에 견학을 가지 못했던 것이 너무 아쉽고 다음에 기회가 된다면 올해가 끝나기 전에 다 같이 또 놀러 갔으면 하는 바람이 있습니다.



어린이대공원 동물원 소풍

의생명공학A조, 의생명공학B조 : 이예은, 이재희, 김해진, 최승원
홍윤기, 황병강, 김어진솔, 김영빈, 허준우

1학년 학생들이 학교에 적응해가고 2학년 학생들이 전공수업에 지쳐갈 때쯤 의생공A조의 학생들과 의생공B조의 학생들은 ‘어린이대공원 동물원’으로 견학을 다녀왔습니다. 바쁜 학교 생활 중에서 오랜만에 느껴보는 여유에 모든 조원이 들뜬 마음으로 견학에 임하였습니다. ‘생명공학과’라는 학과 이름에 부응하듯 한 학생은 전공 책에서 사진으로 실려있던 동물들을 보며 동물의 진화적 특징을 설명하여 주위 조원들에게 큰 웃음을 주기도 하였습니다. 바쁘게 살아오던 일상에서 느끼게 된 꿀맛 같은 여유에 동심을 찾은 것 같다고 생각하기도 했으며 작고 귀여운 동물 등을 보며 자연치유를 하는 학생들도 있었습니다. 견학을 진행한 후 학교에 돌아와 조원들 간의 의견공유 시간에 기억에 남는 동물이 무엇인지 물어보자 코끼리의 실제 크기에 놀라 코끼리가 가장 기억에 남는다는 의견과 아시아에서 보기 힘든 사막여우가 가장 기억에 남는다는 의견, 대나무에 올라타 있던 판다가 귀여워서 기억에 남는다는 의견 등 다양한 의견이 있었습니다. 견학을 통해 조원들의 의견이 모두 다른 것을 보며 같은 장소에서 공통된 것을 보더라도 개개인에 따라 기억하는 것과 느끼는 것이 천차만별이라는 것을 실제로 확인할 수 있었습니다. 치유의 목적으로 진행한 ‘어린이대공원 동물원’ 견학은 통해 동아리 부원들 간의 친목 도모는 물론이고 의견의 다양성을 직접 볼 수 있었던 좋은 기회가 되었습니다.



서울숲곤충식물원 소풍

미생물조, 생물신소재조 : 박예진, 김병태, 김유민, 박예경, 류성현,
임소연, 정서윤, 임지수, 박민선, 유시훈, 이예빈, 이정호

바람이 선선하게 불던 여름날 생물 신소재 조의 학생 7명과 미생물조의 학생 5명은 서울시 성수동에 있는 ‘서울숲 곤충식물원’으로 견학을 다녀왔습니다. 사슴의 서식지를 유사하게 재현하여 조성된 ‘꽃사슴 언덕’에 입장하여 사슴 먹이 주기 활동을 체험해 보았으며 온실 형태로 조성된 ‘곤충식물원’을 방문하여 기온별로 서식하는 식물들과 식물 근처에 서식하는 곤충들을 직접 만나 보았습니다. 곤충을 주로 모아둔 1층 전시실과 식물을 기르고 있는 2층 전시실을 지나면서 각 식물의 서식조건과 곤충들의 특징을 정리해둔 안내판을 읽어보며 비슷한 환경에 서식하더라도 특징 및 생존 방식에는 많은 차이가 존재함을 알 수 있었습니다. 관람을 마친 후에는 근처 식당으로 이동하여 식사를 함께했고 자신에게 기억남은 내용 등을 공유하였으며, 추후 AMP의 견학이 아니더라도 함께 재방문하자고 의견을 모았습니다. 단순히 견학의 목적으로 방문한 ‘서울숲 곤충식물원’이었지만 그 끝에서는 동아리 부원들의 친목 도모와 흥미 유발의 두 마리 토끼를 모두 잡을 수 있었습니다.



코엑스 아쿠아리움 소풍

분자유전학조 : 정하영, 장영준, 최성우, 김연서, 김인경,
박고운, 박지영, 이동연, 김주석, 이병호, 홍성찬

무더위가 극성이었던 더운 여름, 분자유전학의 주제를 중심으로 만들어진 분자유전학 A조와 분자유전학 B조는 더위를 피하고 시원한 견학을 위해 ‘코엑스 아쿠아리움’을 방문하였습니다. 견학을 진행하면서 국내에서 서식하는 어류 종과 국외에서 서식하는 어류종 중에는 일치하는 종이 상당수 존재한다는 것에 많은 부원이 놀랐습니다. 국내와 국외에서 서식하는 종의 구분 기준이 서식 환경의 차이라는 것은 알고 있었지만, 단순히 환경적 차이뿐만 아니라 주변에 존재하는 다른 종에 의해 구분되기도 한다는 것은 새롭게 인지하게 된 사실이었습니다. 물속으로 연결된 해저 통로를 지나가며 아쿠아리움의 환경조성에 놀라움을 느끼기도 하였지만, 한편으로는 어느 곳에서나 인간들의 눈을 의식해야 하는 물고기의 입장은 상당한 스트레스를 받지 않느냐는 의문이 들기도 하였습니다. ‘코엑스 아쿠아리움’ 견학을 다녀온 후 생태 환경을 아무리 유사하게 조성한다고 하더라도 생물로서는 인위적으로 조성된 환경이기에 스트레스를 받을 것이며 이에 대한 적절한 관리가 중요함을 느끼게 되었습니다.



후 기

활동 후기

이름	내용
17 김병태	대학에 입학하고 1학년이 되어 가입한 AMP동아리에 2학년이 되어서도 계속 참여하게 되었습니다. 분야별 실험을 진행하고 정리해 봄으로서 학문적 탐구가 가능했고 다양한 친목 활동을 통해 보람찬 2학년 생활을 보낸 것 같아 매우 뿌듯합니다. 고등학교 편집부 이후 오랜만에 참여하게 된 학술지 편집 과정에서 ‘독단적 행동이 단체에게 주는 피해’에 대해 다시 한 번 생각해 보게 되어 2018년 AMP는 저의 대학생활 중 보다 오래 기억될 것 같습니다.
17 김유민	동아리 활동을 하면서 진로에 대해 좀 더 현실적으로 접근 할 수 있는 시간이었고, 많은 것을 생각할 수 있는 기회기 되었다. 이런 경험이 앞으로 진로에 대해 계획하면서 많은 도움이 되리라 기대가 되던 활동이었다.
17 박민선	본인이 관심 있는 분야에 대한 실험을 계획하여 진행하고 논문까지 완성했다는 사실이 굉장히 뿌듯하다. 실험 수업을 수강하면 항상 정해진 프로토콜에 따라 조교님의 지시 하에 간단한 실험만을 진행하는 것이 아쉬웠다. 하지만 AMP 활동을 통해 실험의 주제를 정하는 것부터 논문을 완성하기까지 모두 직접 해보는 경험을 함으로써 생명공학 연구원이라는 내 꿈에 한걸음 더 다가간 느낌이다.
17 박예경	조별 실험을 통해 자칫 소홀해질 수 있는 기본적인 실험의 과정과 의의를 다시금 확인할 수 있었습니다. 도와주신 김창배 교수님, 최태준 조교님, 안형은 조교님, 임원진들과 조원 모두에게 감사의 말씀 드리고 싶습니다. 또 2018년 AMP의 대표 기획 중 하나였던 학술지 편집에 참가하게 되어 영광입니다. 작업 함께 하신 17학번 박예진, 김병태 조원님 정말 고생하셨습니다.
17 박예진	이번 AMP활동을 하면서 내적 성장을 이루어 보람칩니다. 실험을 하며 생명공학도로서의 미래를 꿈꿔볼 수 있었으며 진로에 대해 심도 있게 고민할 수 있었습니다. 편집을 담당하며 부족한 점이 많았지만 이렇게 학술지가 무사히 발간될 수 있어 기쁩니다. 또한 협동과 소통의 중요성을 깨닫게 된 계기가 되었습니다. 일을 하기 위해선 저의 의지와 능력뿐만이 아닌 주위 사람의 협력도 그만큼 중요한 것을 알아 주위를 살펴 볼 수 있는 넓은 시야를 갖게 되었습니다. 실험을 하며 김창배 교수님과 최태준 조교님 그리고 안형은 조교님께 감사말씀을 전하고 싶습니다. 다음에 또 기회가 된다면 AMP임원으로서 다시 뵙기를 희망합니다.
17 유시훈	각 조를 분야별로 나눔으로써 평소 실험 수업에서 하기 어려운 장기적이고 더욱 심화적인 실험을 할 수 있어 좋았으나 그만큼 각 조가 완전히 분리되어 같은 동아리라는 느낌이 다소 적었던 것 같아 아쉽기도 했다.
17 이동언	처음에 AMP를 다시 하겠다고 말하고, 임원으로 활동하겠다고 말했을 때 어떻게 꾸려나가고 어떻게 이끌어 나갈 수 있을지 많은 생각과 고민으로 지내고 있었던 시간이 있었다. 하지만 분명히 나 혼자 할 수 없었던 일이 임원들의 도움과 생명공학과 2학년의 도움과 생명공학과 1학년의 협조로 내가 생각했던 것보다 정말 잘 진행된 것 같아 뿌듯하다.
17 이병호	거의 1년 동안 AMP라는 실험 동아리에서 활동했는데, 친목뿐만 아니라 학부생에게는 거의 기회가 없는 논문 작성까지 할 수 있었다. 연구를 통해 학회와 교내행사 등에도 참석할 수 있어 좋은 기회를 얻을 수 있는 동아리라고 생각한다.
17 이예은	AMP를 통해서 학부생의 신분으로 해 볼 수 없었던 실험들을 진행할 수 있어서 값진 경험을 할 수 있었던 것 같습니다. 부족한 조장이지만 믿고 따라준 조원들이 있어서 사고 없이 실험도 진행하고, 부족하지만 논문도 작성하고 좋은 성과를 이룰 수 있었던 것 같아서 너무 감사히 생각하고 있습니다. 의생공 A조가 실험을 진행할 수 있도록 도움을 주신 이성호 교수님과 김희수 조교님께 감사 인사를 드리고 싶습니다.
17 이예빈	2018년 한 해 동안 AMP에 참여하면서, 이전보다 더 많은 실질적인 활동을 경험하였다. 관심사가 같은 조원들끼리 모여 주체적으로 탐구할 주제에 대해 논의함으로써 보다 심층적으로 해당 분야에 대한 지식을 이해할 수 있었다. 또한, 더 나아가 그에 대한 실험을 직접 설계하고 실행하면서 전공과 관련된 실험 지식을 직접 습득하고 탐구하는 자세와 협동심을 가질 수 있었다.

이름	내용
17 이재희	혼자서는 하기 어려운 실험들을 AMP를 통해서 조원들과 함께 할 수 있어서 좋았습니다. 리뷰 논문이긴 하지만 논문에도 도전해 볼 수 있어서 제 스스로에게도 발전의 시간이 되었고, 친목 도모를 위한 활동을 통해서도 많은 후배 및 동기들과 소통할 수 있어서 값진 시간이었습니다. 몇 달 동안 고생한 조원 모두와, 실험을 도와주신 조교님께도 감사의 말씀 전하고 싶습니다.
17 임지수	AMP 활동을 통해 실제 실험 수행 과정에서 겪은 여러 시행착오 및 오류에 대한 발생 원인을 분석함으로써 문제를 바라보는 시각을 넓힐 수 있었다. 또한, 같은 분야에 관심을 갖고 있는 학우들과 함께 주제에 대해 고민하고 해결해가는 경험을 통해 더욱 폭넓은 배움을 체험할 수 있었으며 임원으로 활동하면서 동아리를 운영하고 이끄는 일에도 자부심과 뿌듯함을 느낄 수 있었다.
17 장영준	우연히 회장을 맡아 어떤 활동을 해야 할지 고민이 많았는데, 1년간 가치 있는 활동을 통해 다 같이 친해지고, 학문적 성장을 이룬 것 같아 뿌듯합니다. 동아리 활동을 기획하고 조원들을 이끈 임원, 조장님들 정말 고생 많으셨고, 학회 발표까지 잘한 우리 분자유전학조 너무 사랑합니다.
17 정하영	1년간 AMP를 통해 학부생이 쉽게 접할 수 없는 실험과 실험기계에 대해 배우고 논문을 써보는 등 가치 있는 시간을 보낸 것 같아 뿌듯합니다. 직접 실험계획도 세워보고 논문을 쓰기 위해 관련논문들을 직접 찾아보고 분석했던 과정들이 공부가 된 것 같아 아주 좋았던 것 같습니다. 특히 1학년 친구들이 하기 어려웠을 텐데도 잘 따라와 줘서 즐거운 동아리 활동을 할 수 있었던 것 같습니다. 분자유전학조 최고!
17 최성우	동아리 활동을 통해서 학부 수업시간에서 주로 시행되는 실험 수업보다 더욱 유익한 실험을 진행함으로써 더욱 많은 지식을 얻을 수 있었다. 또한 직접 논문을 써봄으로 인해 논문 작성 작업이 매우 힘든 작업이라는 것을 몸소 느낄 수 있었다. 결과적으로 많은 것을 배울 수 있었고 이번학기 군대를 가지 않은 것이 다행이라고 생각했다.
17 홍윤기	한 해 동안을 뒤돌아보면 뜻 깊었던 활동이 참 많았다. 방학에 학교에 나와 실험도 하고 학회에 나가 값진 경험도 쌓고 또 후배, 동기들과 친분도 쌓을 수 있었다. AMP와 함께 원하는 것을 모두 얻었던 한해였다.
17 황병강	이번년도 AMP활동을 하면서 조 활동으로 인해 체계적으로 원하는 분야에 대해서 이론과 실습을 할 수 있는 환경이 주어져서 매우 좋았다. 또한 학부생이 해보기 힘든 실험을 경험하며 통해 내 자신이 한 단계 더 발전하고 앞으로의 자기개발방향을 잡을 수 있는 계기가 되었다.
18 강서영	AMP 분자유전학조에서 활동을 하면서 분자유전학과 관련된 형질전환 실험을 진행하고 이에 따라 관심학문에 대한 이해를 높일 수 있었던 점이 좋았습니다. 그리고 분자유전학에서 자주 이용되는 미생물과 관련된 실험을 직접 설계하고 진행했던 것이 가장 기억에 남고 뜻 깊었습니다. 그리고 이 실험과정과 결과를 이용해 논문을 직접 써봄으로써 논문작성방법을 익힐 수 있었고, 이것이 나중에 많은 도움을 줄 수 있을 것이라 생각되었습니다.
18 김어진 솔	AMP에 들어가 실험을 하며 실험할 때 쓰이는 여러 도구들을 익히고, 이론들을 배우는 시간이 유익했으며 실험 결과를 통해 논문을 쓰는 방법을 배우고 써보는 활동을 할 수 있었던 것이 좋았습니다. 게다가 이러한 활동들이 기반이 되어 학회에 나갈 수 있는 기회를 갖게 된 것이 여태 해왔던 일들의 보상을 받는 거 같아 뿌듯했습니다. 1학년 때하기엔 벅찬 일이었지만, 좋은 선배들, 친구들과 함께 조별활동을 하면서 협업하여 여태 해왔던 모든 일들이 큰 성과를 낸 거 같아 동아리 활동이 더욱 뜻 깊었습니다.
18 김영빈	AMP를 처음에 들어오려 했던 목적은 솔직하게 말해서 선배님들과의 친분을 쌓고 공부도 도움을 받기 위해서였습니다. 그런데 이번에 학술제 활동을 하기 위해 방학 때 일주일에 두 세 번씩 나가서 실험도 하고 포스터도 만들어보면서 친분은 물론 고등학교에서는 해볼 수 없었던 심화적인 활동들을 한 것 같아 뿌듯하고 뜻 깊습니다.

이름	내용
18 김인경	아직 배우지 않은 이론을 접하고 처음 보는 실험기구를 사용해서 실험을 하는 부분에서 낯설고 어려운 부분이 있었지만 배워가는 과정이 재미있었고 일반생물학 실험2에 도움이 되어서 의미 있었던 것 같다. 또한 논문 쓰는 방법을 배워서 도움이 되었다.
18 김해진	동아리 활동을 하면서 직접 실험을 설계하고 진행하는 활동은 매우 가치 있는 경험이었습니다. 처음에는 어색하고 미숙했지만 다 같이 힘을 합쳐 실험을 성공시키고 이를 하나의 논문으로 완성시킨 과정은 정말 좋은 활동이었습니다. 다 같이 간 MT와 소풍도 정말 재미있었고 남은 시간도 좋게 마무리 했으면 좋겠습니다.
18 류성현	방학동안 AMP동아리에서 종을 동정하기 위한 DNA 염기서열을 알아볼 수 있는 실험을 하였다. 이 실험으로 2학년 때 전공수업에서 배울 수 있는 염기서열을 보는 법과 1학기 일반생물학실험에서 배웠던 지식을 다시 한 번 복습하여 다시금 지식을 익힐 수 있는 시간을 얻었습니다. 연습과 복습을 할 수 있는 유익한 시간이었습니다.
18 박고운	이번 실험동아리를 통해 관심분야를 바탕으로 실험을 계획하고 논문을 쓰면서 관련된 이론 및 여러 가지 실험방법, 논문을 쓰는 방법에 대해 알게 되었고, 특히 아직 잘 알려지지 않은 미생물인 <i>G. reessii</i> 분야의 발전가능성을 발견했다는 것이 뜻깊었다.
18 박지영	지금까지 동아리 활동을 하며 여러 가지 실험에 참여할 수 있어서 유익한 시간을 보낸 것 같다. 실험뿐만 아니라 실험을 하기 위해서 계획도 세워보고, 실험에 관한 논문 등을 쓰며 도움이 되는 시간을 보낸 것 같다. 또한 많은 친교활동을 통해 선배나 동기들과 더욱 친해질 수 있는 계기가 되었다.
18 이정호	여러 가지 제약이 있는 실험 수업과 달리 관심 분야의 실험을 자유롭게 진행할 수 있어 좋았습니다. 수업 때 배웠던 지식을 활용하고, 새롭게 알게 된 내용을 노트에 기록하며 많은 보람을 느꼈습니다. 실수도 몇 번 했지만 배우는 과정에 있다는 생각으로 더 정신을 차렸던 것 같습니다. 논문 공부, 실험 진행, 보고서 작성 등 다양한 경험을 하며 AMP의 매력을 느낄 수 있었습니다.
18 임소연	이번 활동에서 초기 sample의 DNA extraction과 전기영동 과정에서 결과가 한 번에 나오지 않았지만, 실험 조성을 변경하면서 계속해서 실험을 진행해 좋은 결과가 나와 만족스러웠다. 또한 방학 때 학교에 나오는 것이 힘들기는 하였지만, 실험 기구의 사용, 방법 등 많은 것을 배워 유익하였다.
18 정서윤	학교 수업에서는 꼼꼼하게 실험과정 하나하나를 배우고 원리를 익히긴 어렵지만 소수로 진행하며 과정 하나하나를 세세하게 배울 수 있었던 점이 좋았다. 염기서열이 계속 나오지 않았을 때는 같은 실험을 반복해야 해서 많이 답답하고 힘들었지만 결국 염기서열을 얻게 되었을 때는 왠지 모를 뿌듯함을 느꼈다. 방학 실험을 한다는 소식을 처음 접했을 때는 '학교 나오는 것이 너무 힘들지 않을까'라는 걱정만 앞섰다. 하지만 실험을 참여해보니 학교 나오는 것에 대한 힘들보다는 좋았던 점이 많았던 것 같다.
18 최승원	아는 것도 경험한 것도 많이 없는 시기에 AMP 활동은 다양한 경험과 많은 지식을 쌓게 해주었고 다른 사람에겐 시간이 아까워 보일 수 있지만 나는 누구와도 견줄 수 있는 아니 비교할 수 없는 값진 시간이었다고 생각한다. 팀장이 잘 이끌어주기도 했고 갖은 노력들이 있었기 때문에 우리 팀원들 간의 단합도 좋을 수 있었고 원활하게 활동할 수 있었던 것 같아 감사한 마음이 다분하다.
18 허준우	학술동아리인 만큼 방학 때마다 나와 실험도하고 친분을 쌓으며 즐겁고 뜻 깊은 시간을 보낼 수 있었습니다. 또한 학회를 목적으로 고등학교와 수준이 다른 실험을 하며 제 전공에 대한 지식을 함양시킬 수 있었습니다. 그리고 학회에서 우리가 준비한 포스터를 발표하고, 다른 실험들에 대한 결과를 들으며 우리 실험에서 부족한 점을 생각하고 반성하는 시간을 가지며 한층 더 발전하는 계기가 되었습니다.
18 홍성찬	지금까지 AMP 동아리 활동을 하면서 여러모로 많은 도움이 되었습니다. 실험을 진행하면서 제가 아직 배우지 못한 여러 이론들을 듣고 새로운 실험 기구들을 많이 보고 사용법을 들을 수 있었던 것이 앞으로의 실험에서 더 잘 이해할 수 있게 하는 발판이 될 것 같습니다.



Animal
Microorganism
Plant
Lecture



The CELL Vol. 13, 14

2018년 생명공학과 학술지

학과장 김창배 교수

발행인 유하영 교수

발행일 2018년 11월 9일

발행처 상명대학교 융합공과대학
생명공학과 학술동아리 AMP

주소 서울특별시 종로구 홍지문 2길 20 상명대학교 생명공학과 T. 02)2287-5142