

상명대학교 생명공학과 학술지

The CELL Vol. 15

상명대학교 생명공학과

상명대학교 생명공학과 학술지

**The CELL**

SangMyung University Department of Biotechnology

**Sangmyung University**  
**Department of Biotechnology**

**November 2019 Vol. 15**

Vol. 15

# The CELL

생명공학과 학술지

SANGMYUNG UNIVERSITY  
DEPARTMENT OF BIOTECHNOLOGY

# 발 간 사

생명공학과 학술동아리 AMP

회장 이 정 호

부회장 박 지 영

짧았던 가을이 지나고 어느덧 쌀쌀한 바람이 부는 겨울이 다가오고 있습니다. 여러 계절이 지나 한 해의 마지막을 향해 달려가고 있는 지금, AMP의 지난 1년 동안의 기록을 모두에게 보여드릴 수 있게 되어 기쁩니다. 작년에 이어 올해도 훌륭한 학술지를 집필하기 위해 심혈을 기울였습니다. 올 한해 AMP에서 진행한 활동들이 잘 전달될 수 있도록 최선을 다했으며 마침내 'The Cell Vol. 15'를 출간하게 되었습니다.

먼저 AMP 학생들이 연구를 진행할 수 있도록 기회를 제공해 주시고 이에 따른 아낌없는 지원과 조언을 주신 교수님들께 감사의 말씀을 드리고 싶습니다. 또한 학생들의 실험지도를 맡아 수고해주신 조교님들께도 감사의 말씀을 전합니다. 올해 동아리 내의 많은 개편사항들로 인해 동아리 활동이 쉽지만은 않았습니다. 하지만 '고진감래'라는 말이 있듯, 적극적으로 참여해준 모든 동아리원들의 수고와 노력이 모여 현재의 성과를 이룰 수 있었다고 생각합니다. 무더운 여름, 방학임에도 불구하고 학교에 나와 연구 활동에 성실히 참여해준 동아리원들과, 각 팀을 이끌어준 팀장들에게도 감사의 말을 전합니다.

AMP에서의 활동이 앞으로 나아가는 길에 좋은 밑바탕이 되면 좋겠다는 바람입니다. 지난 1년간의 기록이 발판이 되어 앞으로 생명공학과와 학술지가 계속 이어져 나가기를 기원합니다.

## 축 사

생명과학과/생명공학과 학과장

교수 안 예 진

올 한 해 동안 우리 학과 학생들이 열심히 연구하고 조사한 내용들을 모아 2019학년도 Cell지를 발간하게 됨을 매우 기쁘게 생각합니다. 학술동아리 AMP 구성원들과 지도교수님, 물심양면으로 도움을 준 우리 학과 학생회 여러분, 그리고 지도와 조언을 아끼지 않으신 여러 학과교수님들께 진심 어린 감사의 말씀을 드립니다.

다양한 연구와 조사를 수행하며 즐겁고 보람을 느끼는 순간과 함께 연구가 계획한 만큼 잘 진행되지 않아 어려운 순간들도 많았을 것입니다. 생명과학은 자연과 생명현상에 대한 호기심에서 시작하여 이를 규명하고 인간생활에 이용하고자 하는 끈기 있는 연구를 통하여 발전하여 왔습니다. 실패를 두려워하지 않고 꾸준히 정진하여 결과를 얻는 값진 경험이 되었으리라 믿습니다.

생명과학/생명공학 분야의 미래 비전은 세계적 IT 기업 Microsoft사의 창업주 빌 게이츠씨가 젊은이들에게 건넨 이야기 속에서도 찾을 수 있습니다. “내가 대학교 신입생으로 돌아간다면 인공지능(AI)이나 에너지, 생명과학을 전공했을 것이다. 이 학문들은 아주 큰 영향력을 줄 수 있는 전도유명한 분야이다. (2017)” 생명과학/생명공학은 인간의 생활과 직결된 핵심산업 분야로 4차산업혁명시대를 이끌어 나아갈 주역으로 주목받고 있습니다. 저는 여러분이 대학에서 생명과학/생명공학을 전공하고 있음을 매우 자랑스럽게 생각하시길 바랍니다.

교정이 아름다운 단풍으로 물드는 가을, 우리 학과의 Cell지 발간을 다시 한번 진심으로 축하드립니다. 감사합니다.

## 격 려 사

생명공학과 학술동아리 AMP

지도교수 유 하 영

작년에 이어 2019학년도 AMP 지도교수를 맡게 되어 학생들과 정말 즐거운 연구 활동을 함께 할 수 있던 것 같습니다. 올해에도 많은 학생들이 AMP 학술동아리에 지원하여 30명 넘는 인원이 모이게 되었고, 다양한 실험과 경험을 쌓기 위해 팀 단위로 운영하게 되었습니다. 작년 팀 단위 운영 이후 단점으로 지적된 동아리 결속력 약화, 팀간 과도한 경쟁 등을 개선하기 위해 학기 초 회장을 비롯한 임원진들과 다양한 의견을 나누며 토의했던 일들이 기억에 남습니다. 결론은 다 함께 욕심을 내어 모든 팀들이 교내 공모전 프로그램 참여 및 교외 학술대회 참가를 목표로 두었고, 팀장을 비롯한 모든 학생들이 정말 열심히 활동하여 엄청난 성과를 거두었습니다. 특히 올해에도 학생들을 위해 흔쾌히 연구실을 개방해 주시고 바쁘신 와중에 논문지도까지 해주신 학과 교수님들께 진심으로 감사드립니다. 본인 연구 수행 및 많은 업무에도 불구하고 성실하게 봉사해 주신 모든 대학원 조교 선생님들께 다시 한 번 감사드리며 따로 회식 자리를 마련하겠습니다.

이번 AMP 학술활동은 실험을 진행하는 연구논문 다섯 팀(의생명공학, 생물소재 및 계통분류, 분자생명공학, 해양생명공학, 미생물공학)과 리뷰논문 한 팀으로 총 6팀이 편성되었습니다. 다양한 연구 주제를 바탕으로 모든 팀들이 교내 상생플러스 및 SM-URP 프로그램 지원을 승인 받았으며, 교외 학술대회 참가 및 수상까지 하는 쾌거를 이룩하였습니다. 사실 학기 초 “작년만큼 활동할 수 있을까? 올해는 학술지를 만들 수 있을까?” 등 개인적으로 많은 걱정을 했지만, 임원진과 팀장들이 년, 월 단위 계획을 세우고 목표 달성을 위해 스스로 채찍질하는 모습을 보며 다시 한 번 우리 학생들이 정말 대견스럽고 지도교수로서 많은 보람을 느끼고 있습니다. 2019학년도 AMP가 완성한 15번째 The Cell지 발간을 축하하며 이번 학술제의 성공적인 개최를 기원합니다. 앞으로도 우리학과와 학술동아리가 더욱 발전할 것으로 믿습니다. 모두 1년 동안 정말 고생 많았습니다. 감사합니다.

# 목 차

|                                                                          |     |
|--------------------------------------------------------------------------|-----|
| 학과 학술통아리 AMP 소개 .....                                                    | 1   |
| 학과 소개 .....                                                              | 2   |
| 학과 교수님 소개 .....                                                          | 3   |
| 연구 보고                                                                    |     |
| 고지방 식이가 암컷 흰쥐의 사춘기 개시, 생식주기 그리고 생식기관 발달에 미치는 영향 .....                    | 6   |
| 서울 아카시아 꿀의 화분 염기서열 분석을 통한 종 판별 .....                                     | 28  |
| 형질전환 대장균에서 재조합 ADH의 최적 발현조건 탐색과 산업적 이용 가능성 연구 .....                      | 43  |
| 생활용 살균제 트리클로산이 해양 미세조류 <i>Prorocentrum minimum</i> 의 광합성 및 생리 작용에 미치는 영향 | 75  |
| Inducer를 포함한 배지가 <i>Galactomyces reessii</i> 의 laccase와 향산화 물질생산에 미치는 영향 | 97  |
| 식물 내 스트레스 내성 호르몬 앱시스산의 중요성과 산업적 활용의 잠재력에 대한 연구 .....                     | 121 |
| 활동 소개 및 후기                                                               |     |
| Membership Training .....                                                | 137 |
| CJ 블로썸 캠퍼스(CJ제일제당) 견학 .....                                              | 138 |
| 팀별 활동 소개 .....                                                           | 140 |
| 팀별 활동 내역 .....                                                           | 146 |
| AMP 활동 후기 .....                                                          | 147 |

## 학과 학술통아리 AMP 소개

AMP (Animal Microorganism Plant)는 생명공학과 학술통아리로서 학생들의 자치적인 학술 활동 및 교류를 위해 02학번 홍승우 학생을 필두로 2007년 6월에 창설되었습니다. 초기에는 스터디를 주 활동으로 하였으며, 2008년 이후에는 본격적으로 연구 활동을 시작하였습니다. 한 해의 연구 성과를 공유하기 위해 학술지 The CELL을 발간해오고 있으며, 2019년 현재 AMP 창설 12년을 맞아 Vol. 15를 발간합니다. 특히 2009년부터는 학술제를 개최하여 생명과학과/생명공학과의 학술적 교류의 장을 만들고 있으며 2019년 11월 22일, 제11회 학술제가 개최됩니다.

AMP에서는 매년 동아리의 창설 목적을 잊지 않고 학술 활동과 학생들 간의 친목 활동을 적극적으로 행하고 있습니다. 학생들이 자율적으로 진로를 설계하고 전문 지식을 습득할 수 있도록 돕는 것이 우리 AMP 동아리의 역할입니다.

올해의 AMP는 실험을 진행하는 의생명공학팀, 생물소재 및 계통분류팀, 분자생명공학팀, 해양생명공학팀, 미생물공학팀의 5팀과 논문을 공부하고 리뷰하는 논문리뷰팀의 1팀, 총 6팀으로 편성되었습니다. 자신의 관심 분야에서 실제로 실험을 진행하고 결과를 정리한 뒤 공유하는 과정까지, AMP는 학생들이 생명공학도의 자질을 기를 수 있도록 지지하고 응원합니다. 각 팀별로는 활동을 지도해주는 교수님과 조교님이 계시며 적극적인 지도를 해주셨기에 한 해의 활동을 마무리 지을 수 있었습니다.



A N I M A L  
M I C R O O R G A N I S M  
P L A N T

## 학과 소개

생명공학은 21세기 인류의 난제인 식량, 에너지, 질병, 환경 문제를 해결하는 핵심 학문 분야로 주목받고 있습니다. 이러한 추세에 발맞추어 생명공학과에서는 의료 및 헬스 관련 바이오 신기술 개발, 생명 정보분석, 유전공학, 유전체-단백체 분석 및 조작, 해양생명공학, 분자생태환경평가기술 개발, 생명 자원 활용기술 개발 등 생명공학 분야 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 국가 연구기관에서 활약할 전문인력의 양성을 목표로 하며 학생들의 취업기회를 높이기 위하여 생명공학 관련 기업들에서 요구되는 실용적 지식과 실험 실습 교육을 강화하고 있습니다.

## 학과 연혁

| 년도            | 내용                                                   |
|---------------|------------------------------------------------------|
| 1980년 10월 02일 | 상명대학교 과학교육과 신설 인가<br>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 | 융합특성화대학 생명과학과로 변경                                    |
| 2013년 03월 01일 | 자연과학대학 생명과학과로 변경                                     |
| 2017년 03월 01일 | 미래융합공학대학 생명화학공학부 생명공학과로 변경                           |
| 2018년 03월 02일 | 융합공과대학 생명화학공학부 생명공학과로 변경                             |

## 학과 교수님 소개

|                                                                                     |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
|    | <b>학위 및 학력</b>                    |
|                                                                                     | 이학박사 / 서울대학교 / 발생생리학              |
|                                                                                     | <b>연구분야</b>                       |
|   | <b>학위 및 학력</b>                    |
|                                                                                     | 이학박사 / 서울대학교 / 동물계통분류학            |
|                                                                                     | <b>연구분야</b>                       |
|  | <b>학위 및 학력</b>                    |
|                                                                                     | 이학박사 / Univ. of Maryland / 분자유전공학 |
|                                                                                     | <b>연구분야</b>                       |

이성호 교수님

- 동물발생생물학 / 신경생물학 / 종양생물학
- 성체줄기세포의 분화기작과 세포치료법 연구
- 내분비계 장애물질(환경호르몬)의 생식계, 신경계, 면역계에 미치는 영향 조사

김창배 교수님

- 해양무척추동물의 분류
- 한국 자생동물의 분자계통 및 진화
- 야생생물의 비교유전체학 및 생물정보학
- 절지동물 중심의 진화발생연구

안예진 교수님

- 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

|                                                                                     |                           |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|
|    | <b>학위 및 학력</b>            |
|                                                                                     | 이학박사 / 한양대학교 / 환경분자유전학    |
|                                                                                     | <b>연구분야</b>               |
|   | <b>학위 및 학력</b>            |
|                                                                                     | 이학박사 / 한양대학교 / 분자생태 및 계통학 |
|                                                                                     | <b>연구분야</b>               |
|  | <b>학위 및 학력</b>            |
|                                                                                     | 공학박사 / 고려대학교 / 생물공정공학     |
|                                                                                     | <b>연구분야</b>               |

이영미 교수님

- 환경오염물질에 대한 수서 생물의 영향 및 작용기전 연구
- 생태 위해성 평가를 위한 분자생체지표 발굴 및 적용
- 환경요인에 따른 해양생물의 생태적 변화 및 특성 연구
- 해양생물의 유용 유전자의 분자·생화학적 특성 연구

기장서 교수님

- 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

- 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

# 연구 보고

## [연구 논문]

고지방 식이가 암컷 흰쥐의 사춘기 개시, 생식주기 그리고 생식기관 발달에 미치는 영향

서울 아카시아 꿀의 화분 염기서열 분석을 통한 종 판별

형질전환 대장균에서 재조합 ADH의 최적 발현조건 탐색과 산업적 이용 가능성 연구

생활용 살균제 트리클로산이 해양 미세조류 *Prorocentrum minimum*의 광합성 및 생리 작용에 미치는 영향

Inducer를 포함한 배지가 *Galactomyces reessii*의 laccase와 향산화 물질생산에 미치는 영향

## [리뷰 논문]

식물 내 스트레스 내성 호르몬 앱시스산의 중요성과 산업적 활용의 잠재력에 대한 연구

학부생 연구 논문

고지방 식이가 암컷 흰쥐의 사춘기 개시,  
생식주기 그리고 생식기관 발달에 미치는 영향

Effects of High-Fat Feeding on Puberty  
Initiation, Estrous Cycle and Reproductive  
Organs Development in Female Rats

2019. 11.

상명대학교 자연과학대학  
생명과학과  
박진수

상명대학교 융합공과대학  
생명화학공학부 생명공학과  
김민하, 서유진

지도교수  
이성호

# 고지방 식이가 암컷 흰쥐의 사춘기 개시, 생식주기 그리고 생식기관 발달에 미치는 영향

박진수, 김민하, 서유진, \*이성호

Department of Biotechnology, Sangmyung University, Seoul, Korea, 03016



## Abstract

고지방(High fat, HF) 식이가 포유동물의 생식 생리에 영향을 끼칠 수 있음이 여러 연구에서 보고되었다. 그러나 섭취한 지방과 체내 지방 조직의 암컷 생식계에 대한 역할 이해는 그 중요성에 비해 아직 부족한 편이다. 본 연구는 이유 직후부터 고지방 식이를 제공한 암컷 흰쥐에서 사춘기 전후에 관찰되는 생식계의 변화를 조사하고자 조직학적, 세포학적 관찰을 수행하였다. 사육한 동물들 생후 20일에 분리해 21일부터 대조군(CON, n=5)은 일반 사료, 그리고 실험군(HF, n=5)은 고지방 사료를 공급하였다. 사육기간 중 체중과 질구개방(Vaginal opening, V.O.) 여부를 24시간 주기로 확인하였고, V.O. 이후 회생 전까지 생식주기를 24시간 주기로 확인하였다. 최초 V.O. 이후 2번의 생식주기가 경과한 후 Estrus 단계에 도달한 개체를 희생하고 즉시 난소와 자궁의 무게를 측정하고 후 조직학적 관찰을 위해 4% paraformaldehyde에 고정하였다. 고정 후 파라핀 조직절편을 내어 H&E 염색을 시행한 후 조직학적 차이를 관찰하였다. CON군에 비해 HF군에서 V.O.가 빠르게 관찰되었고( $p<0.05$ ), V.O. 시 체중은 HF군이 더 가벼웠다( $p<0.05$ ). 이후 약 2주간 생식주기는 HF군이 성체와 유사하게 훨씬 더 안정적이고 규칙적인 패턴을 보였다. 생식기관의 무게는 HF군이 더 무거웠으며( $p<0.05$ ), 조직학적으로 HF군에서 더 많은 황체( $p<0.05$ )와 발달된 자궁근층( $p<0.05$ ), 자궁샘( $p<0.001$ )이 관찰되었다. 이러한 결과는 고지방 식이가 사춘기 이전의 흰쥐에 이른 사춘기를 유발시키고 빠른 생식기관의 성숙을 유도한다는 것을 나타낸다. 특히 고지방 식이는 일반적으로 V.O. 직후 단기간 동안에 관찰되는 불안정한 생식주기를 비교적 안정화시켜 주는 것으로 보인다. 고지방 식이의 어떤 요인이 이 같은 안정화를 유도하는지에 대한 후속 연구가 필요하다.

## Introduction

고지방식은 다양한 질병의 원인이다. 생식계에 대한 영향은 특히 아동에게서 빠른 사춘기를 유발함이 잘 알려졌다.



## Materials & Methods



## Results

Table 1. Comparison of V.O. date from female SD rat treated with high fat feeding.

|                 | CON       | HF         |
|-----------------|-----------|------------|
| V.O. date (PND) | 36.2±1.36 | 31.2±0.37* |

Values are expressed as mean±S.E. Significant difference is marked with an asterisk. \*,  $p<0.05$ .

Table 2. Comparison of absolute tissue weights of female SD rat treated with high fat feeding for 2 weeks post V.O.

|                                       | CON         | HF          |
|---------------------------------------|-------------|-------------|
| Initial body weight (g)               | 38.7±4.57   | 38.5±2.61   |
| V.O. body weight (g)                  | 117.7±5.77  | 95.6±4.04   |
| Terminal body weight (g)              | 174.7±9.28  | 182.9±13.65 |
| Weight gain until V.O. weight (g)     | 79.0±5.60   | 57.0±3.17*  |
| Weight gain until terminal weight (g) | 136.0±8.26  | 144.3±13.56 |
| Ovary weight (mg)                     | 28.1±2.70   | 42.0±2.87** |
| Ovary/Body weight                     | 18.5±2.17   | 19.0±2.54   |
| Uterus weight (mg)                    | 316.1±23.52 | 344.9±49.74 |
| Uterus/Body weight                    | 1.6±0.19    | 2.3±0.21*   |

Values are expressed as mean±S.E. Significant differences are marked with an asterisk. \*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .

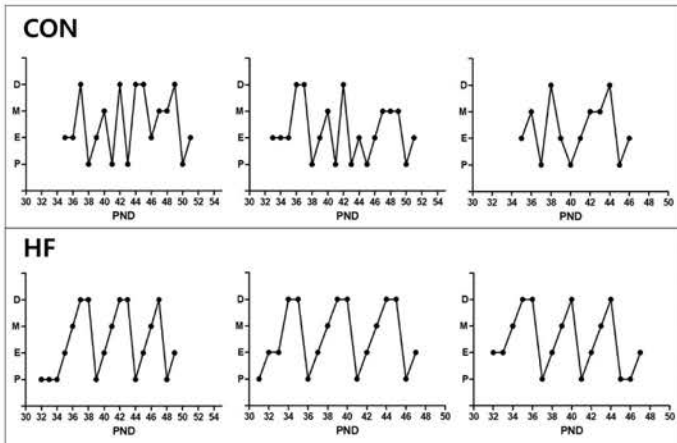


Fig. 1. Estrous cycle of individual rat in the study. Staged estrous cycles of individual rat. Two cohorts of animals were evaluated: (CON) control group, (HF) experimental group, feeding high fat diet. (D, diestrus; M, Metestrus; E, Estrus; P, proestrus)

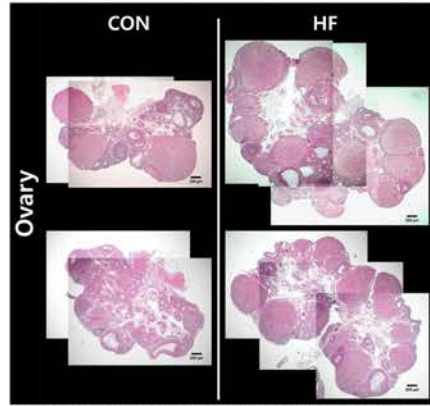


Fig. 2. Histological analyses of the ovary from HF-treated rat. Tissues were applied to the standard paraffin section and H&E staining method. Representative microphotographs. X40 (Scale bar, 200µm)

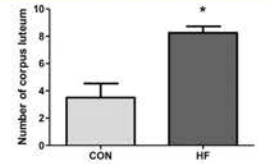


Fig. 3. Number of corpus luteum from HF-treated rat. Values are expressed as mean±S.E. Significant differences are marked with an asterisk. \*,  $p<0.05$ .

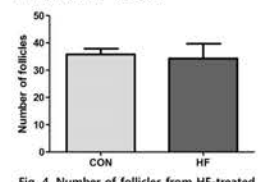


Fig. 4. Number of follicles from HF-treated rat. Values are expressed as mean±S.E.

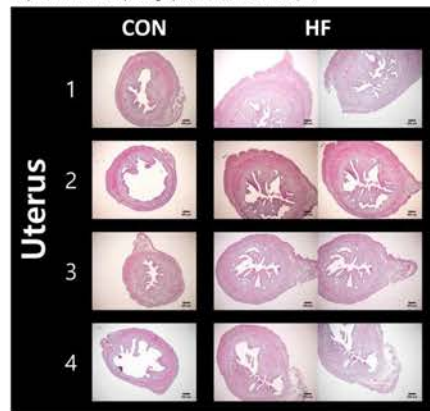


Fig. 5. Histological analyses of the uterus from HF-treated rat. Tissues were applied to the standard paraffin section and H&E staining method. Representative microphotographs. X40 (Scale bar, 200µm)

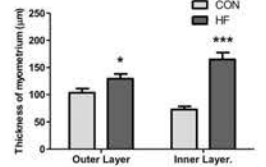


Fig. 6. Thickness of myometrium from HF-treated rat. Values are expressed as mean±S.E. Significant differences are marked with an asterisk. \*,  $p<0.05$ ; \*\*\*,  $p<0.001$ .

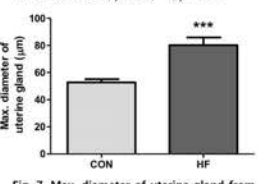


Fig. 7. Max. diameter of uterine gland from HF-treated rat. Values are expressed as mean±S.E. Significant differences are marked with an asterisk. \*\*\*,  $p<0.001$ .

## Conclusion

- 고지방 식이는 초기에 V.O.를 유발한다.
  - 고지방 식이는 더 가벼운 체중 상태에서 V.O.를 유발한다.
  - 고지방 식이는 일반 사료 섭취보다 Estrous stage의 난소 무게를 유의하게 증가시킨다.
  - 고지방 식이는 V.O. 직후 Estrous cycle을 초기에 안정화 시켜준다.
  - 일반 사료 섭취군보다 고지방 식이군의 Estrous stage 난소에서 더 많은 황체가 관찰된다.
  - 고지방 식이군의 자궁에서 자궁근층이 더 두껍고 자궁샘이 발달된 것을 확인할 수 있다.
- 이러한 결과들은 고지방 식이가 빠른 성적 성숙 유도 뿐만 아니라 조직학적으로도 더 높은 수준의 성숙을 유도한다는 것을 보여준다. 특히 Estrous cycle의 경우 고지방 식이가 대조군에 비해 초기에 안정화된 생식주기를 갖게 해주는 것을 확인하였다. 생식력의 최초 획득과 이후 생식주기 안정화 과정에 대한 이해 증진을 위하여 향후 고지방 식이의 생식력 성숙유도 기작에 대한 상세한 후속 연구가 필요하다고 사료된다.

## Acknowledgement

본 연구는 상명대학교 서울캠퍼스 2019-1 학부생 전공심화 연구소모임(SM-URP) 지원으로 이루어졌음.

## Abstract

현재 인류의 영양섭취 양과 질이 지속적으로 개선되면서 과도한 영양섭취에 따른 비만 인구 또한 급증하고 있다. 비만은 성인에서 각종 합병증을 유발하고 삶의 질을 떨어뜨리는 질병이지만 특히 아동비만은 성조숙증을 유발하는 원인 중 하나로 알려져 있다. 현재 여아의 초경 연령은 지속적으로 단축되는 추세를 보이며, 심한 경우 8세 미만에 사춘기 증상을 보이는 성조숙증도 증가하고 있다. 성조숙증은 특정 식품, 질환, 환경 호르몬 등 다양한 요인에 의해 발병될 수 있으며 정확한 인과관계에 대해 많이 규명되지 않았지만 고지방 식이습관도 요인 중 하나로 추정된다. 본 연구는 고지방 식이가 암컷 SD Rat에서 체중, 생식기관, 초기 Estrous cycle 기간에 미치는 영향을 조사하였다.

실험을 위해 생후 20일에 분리해 두 그룹으로 나눈 뒤 21일부터 대조군(CON)은 일반사료만을 공급하였고 실험군(HF)은 고지방 사료만을 공급하였다. 사육 기간 동안 체중과 질구개방(Vaginal opening, V.O.)확인 및 Estrous cycle을 확인하였고 최초 V.O. 이후 2주 뒤 Estrus 단계에서 희생하여 난소와 자궁을 수집하여 무게를 측정하고 H&E염색을 통해 조직학적 차이를 관찰하였다. 실험결과 CON군에 비해 HF군에서 V.O.가 빠르게 관찰되었고 V.O. 시기의 체중은 HF에서 더 가볍게 나타났다. Estrous cycle은 V.O. 직후 약 2주간 HF군이 더 안정적이고 규칙적인 패턴으로 보여주었다. 희생 이후 생식기관의 무게 측정과 조직학적인 관찰에서는 HF군이 같은 Estrus 단계이지만 더 무겁고 발달된 결과를 보여주었다.

고지방 식이는 암컷 SD Rat에서 빠른 사춘기와 생식기관 성숙을 일으키며 V.O. 직후 Estrous cycle이 빠르게 규칙적으로 안정시킬 수 있음을 확인하였다. 하지만 어떤 기작으로 고지방 식이 섭취가 V.O. 직후 초기 Estrous cycle을 안정화시켰는지 불분명하다. 또한 고지방 식이에 의해 대조군보다 빠르게 사춘기를 맞아 생식기관이 발달되었기 때문에 개체의 조기 임신 능력 및 태어난 개체의 초기 발생에 영향이 미칠 가능성에 대한 후속 연구가 필요하다고 사료된다.

# 목 차

|                                                |           |
|------------------------------------------------|-----------|
| <b>I . Introduction</b> .....                  | <b>10</b> |
| 1. 초경 연령의 감소는 지방섭취량의 증가와 관련 있다. ....           | 10        |
| 2. 지방 섭취 증가로 인한 비만은 다양한 질병을 유발할 수 있다. ....     | 10        |
| 3. 고지방 식이는 비만과 독립적으로 생식기능에 위협적이다. ....         | 10        |
| 4. 고지방 식이는 특히 아동에게 성조숙증을 유발 할 수 있다. ....       | 10        |
| 5. 실험계획 .....                                  | 11        |
| <b>II . Materials and Methods</b> .....        | <b>12</b> |
| 1. Animals .....                               | 12        |
| 2. Treatments .....                            | 12        |
| 3. Estrous cycle .....                         | 12        |
| 4. Histological studies .....                  | 13        |
| 5. Statistical analysis .....                  | 13        |
| <b>III . Results</b> .....                     | <b>14</b> |
| 1. 체중에 대한 고지방 사료의 영향 .....                     | 14        |
| 2. 생식기관의 무게에 대한 고지방 사료의 영향 .....               | 14        |
| 3. V.O.시기 및 Estrous cycle에 대한 고지방 사료의 영향 ..... | 14        |
| 4. 고지방 사료에 의한 생식기관의 조직학적 영향 .....              | 14        |
| 5. Table & Figures .....                       | 15        |
| <b>IV . Discussion</b> .....                   | <b>23</b> |
| 1. 고지방 식이가 체중에 미치는 영향에 대한 고찰 .....             | 23        |
| 2. 고지방 식이가 생식기관 무게와 조직구조에 끼친 영향에 대한 고찰 ....    | 23        |
| 3. 고지방 식이가 생식기관의 빠른 발달에 영향을 준 요인에 대한 고찰 ....   | 23        |
| 4. 고지방 식이가 Estrous cycle에 미치는 영향에 대한 고찰 .....  | 24        |
| <b>References</b> .....                        | <b>25</b> |

# I . Introduction

## 1. 초경 연령의 감소는 지방섭취량의 증가와 관련있다.

전 세계적으로 여아의 초경 연령은 지속적으로 단축되는 추세를 보이고 있다(Boaz et al., 1999). 우리나라에서도 1900년~1990년 출생한 여성에 대한 통계연구에 따르면 초경 평균 연령이 지속적으로 단축되고 있다(박 et al., 2006). 이는 산업사회로 전환되면서 농축산업 기술의 발달과 사회 시스템의 발전 등으로 인류가 만성적인 영양 결핍 상태에서 벗어나 ‘과잉’ 상태에 접어든 것과 밀접한 관련이 있다. 영양섭취 과잉에는 생식능력에 영향을 줄 수 있는 지방 섭취 증가가 크게 기여하였으며, 따라서 비만 인구도 증가하였다.

## 2. 지방 섭취 증가로 인한 비만은 다양한 질병을 유발할 수 있다.

지방 섭취와 비만과의 관계는 고지방 사료를 먹인 흰쥐 실험을 통해 고지방 식이가 체중과 체중 대비 지방량을 증가시켜 비만을 유발한다는 것이 밝혀졌는데(Stephen et al., 2003), 이때 지방의 종류와 상관없이 지방 섭취는 체지방량을 증가시킬 수 있다(Bourgeois et al., 1983). 최근 지방에 치중된 영양섭취로 발병하는 비만은 체중과 체지방량을 늘릴 뿐 아니라, 다른 각종 합병증을 유발하여 삶의 질을 떨어뜨릴 수 있는 일종의 ‘역병’으로 여겨진다(Bray, 2004). 그렇기 때문에 비만으로 인한 여러 생리적인 문제를 극복하기 위한 여러 연구가 보고되고 있다(Xu et al., 2018).

## 3. 고지방 식이는 비만과 독립적으로 생식기능에 위협적이다.

비만의 원인이 되는 과도한 지방 섭취는 생식능력에도 영향을 줄 수 있음이 여러 연구를 통해 보고되고 있다. 마우스를 사용한 실험에서 고지방 사료를 장기간 섭취하면 난소의 난포수와 염증성 사이토카인 수준 및 대식세포의 침윤이 증가한 것이 보고되었으며(Malgorzata et al., 2016), 고지방 사료를 9주간 섭취한 마우스를 이용해 IVF를 시도한 결과 고지방 식이가 난모 세포의 질과 양에 영향을 미쳐 수정율을 떨어뜨림이 보고되었다(Maryam et al., 2015). 이처럼 지방을 많이 섭취하면 생식기능에 악영향을 줄 가능성이 있다(Mona et al., 2016; Natalie et al., 2017). 고지방 식이로 인한 생식기능 이상 문제를 완화시키기 위한 연구들은 고지방 식이습관이 비만과는 독립적으로 생식기능에 위협적인 요소임을 시사한다(Zhang et al., 2019).

## 4. 고지방 식이는 특히 아동에게 성조숙증을 유발 할 수 있다.

생식기능에 영향을 줄 수 있는 고지방 식이는 아직 성적으로 미성숙한 아동에게 더욱 큰 영향을 미친다. Wistar Rat에 고지방 사료를 먹이고 질구개방(V.O.) 시기를 측정한 결과 일반사료를 먹인 대조군보다 빠른 V.O.가 관찰되었다(Boukouvalas et al., 2008). 이를 기반으로 고지방 식이는 여아의 초경시기를 앞당기며 심각한 경우 성조숙증을 유발할 수 있는 원인 중 하나로 추정되고 있다. 성조숙증은 단순히 사춘기를 빠르게 앞당기는 것으로 끝나지 않고 이후에도 많은 영향을 줄 수 있다. 성조숙증으로 인한 빠른 초경은 조기 임신, 조기 성장판 폐쇄, 불안증상이나 우울증 같은 심리장애와 더불어 심혈관 질환과 암과도 연관이 있다고 보고되고 있다(Olga et al., 2010).

동물 실험에서도 미성숙한 생후 23일된 암컷 SD Rat에 8주에서 14주 간 고지방 사료를 섭

취하게 한 결과 혈중 testosterone, LH 수치를 증가시키고 성적으로 보다 빨리 발달하게 만들었으며 Estrous cycle을 불규칙하게 한다는 연구가 있다(Katrina et al., 2017).

## 5. 실험계획

위 연구들을 통해 고지방 식이가 흰쥐에서 V.O.를 앞당겨 사춘기 개시를 앞당기고 성조숙증을 나타낼 수 있다는 것을 알 수 있으나, 성숙의 '질'적인 측면에 해당되는 사춘기 개시 초기의 Estrous cycle의 안정성, 생식기관 발달에서 조직학적인 차이는 조사된 바가 없다. 특히 정상적으로 성숙한 흰쥐에서는 V.O. 시점에서 불규칙한 Estrous cycle을 보일 수 있기 때문에 고지방 식이가 이러한 cycle 길이에 어떠한 영향을 끼칠지는 알려진 바 없다. 본 연구는 3주령의 어린 SD Rat에 고지방 식이로 성조숙증을 유발시키고 체중변화, V.O. 확인, V.O. 직후 초기 Estrous cycle 추적, 생식기관의 무게 및 조직절편을 관찰하고 분석하였다.

## II. Materials & Methods

### 1. Animal

SD Rat을 대한바이오링크에서 구매하여 상명대학교 실험동물 사육장에서 사육한 뒤 교미시킨 자손을 사용하였다. 일정한 온도(20~24°C)와 광주기(12시간 조명, 12시간 소등) 하에서 먹이와 물의 접근이 자유로운 조건에서 사육하였다.

### 2. Treatments

Table 1. Composition of AIN-93G and HFD 45% cal

| Formulation        | AIN-93G |        | HFD 45% cal |       |
|--------------------|---------|--------|-------------|-------|
|                    | g m %   | kcal % | g m%        | kcal% |
| Protein            | 20      | 20     | 24          | 20    |
| Carbohydrate       | 64      | 64     | 41          | 35    |
| Fat                | 7       | 15     | 24          | 45    |
| kcal/kg            | 4,000   |        | 4,776       |       |
| Ingredient         | g       | kcal   | g           | kcal  |
| Casein (from milk) | 200     | 800    | 200         | 800   |
| Corn starch        | 397.486 | 1,590  | 155.036     | 620   |
| Sucrose            | 100     | 400    | 50          | 200   |
| Dextrose           | 132     | 528    | 132         | 528   |
| Cellulose          | 50      | 0      | 50          | 0     |
| Soybean oil        | 70      | 630    | 25          | 225   |
| Lard               | 0       | 0      | 175         | 1575  |
| Mineral mixture    | 35      | 0      | 35          | 0     |
| Vitamin mixture    | 10      | 40     | 10          | 40    |
| TBHQ               | 0.014   | 0      | 0.014       | 0     |
| L-Cystine          | 3       | 12     | 3           | 12    |
| Choline bitartrate | 2.5     | 0      | 2.5         | 0     |
| Total              | 1000    | 4000   | 837.5       | 4000  |

생후 20일부터 두 그룹(n=5)으로 나누어 대조군(CON)은 일반 사료를, 실험군(HF)은 고지방 식이를 위한 고지방 사료를 공급해주었다. 본 실험에서 사용한 일반 사료는 AIN-93G, 고지방 사료는 HFD 45% cal이다. AIN-93G는 총 무게 중 단백질 함량이 20%, 탄수화물이 64%, 지방이 7%이다. HFD 45% cal은 총 무게 중 단백질함량이 24%, 탄수화물이 41%, 지방이 24%이다. 체중은 매일 개체마다 측정하여 기록을 하였다. 또한 동물들 모두 V.O.로부터 2주후 첫 번째 estrus주기에 맞춰 희생하였다. 희생 이후에는 각 개체의 난소, 자궁을 적출하여 무게를 측정한 뒤, 4% Paraformaldehyde(pH 7.2)에 4°C 저온 보관했다.

### 3. Estrous cycle

Estrous cycle을 확인하기 전 생후 25일부터 각 개체의 V.O.를 24시간마다 매일 21시에 확인하였다. V.O.확인 당일부터 Estrous cycle을 확인하기 위해 0.9% NaCl 생리식염수를 이용하여 질 세척을 하여 질내 세포를 수집하였다. 수집한 세포는 즉시 Hematoxylin과 Eosin B로 염색을 한 뒤 슬라이드에 도말하여 광학현미경으로 세포학적인 관찰을 통해 Estrous cycle 단계를 결정하였다.

#### 4. Histological studies

자궁과 난소는 희생을 통해 수집한 뒤 무게를 측정한 직후 4% Paraformaldehyde(pH 7.2)에서 48시간 고정시켰다. 이후 조직의 탈수를 위해 농도별 EtOH(70%>80%>90%>95%>100%) 각 단계에서 1시간 30분씩을 탈수 후, Xylene에 40분씩 총 3번 담가 두어 투명과정을 거쳤다. 이후에 56°C의 paraffin oven에서 paraffin 침투를 30분씩 3번에 걸쳐 진행하였다. Embedding center에서 paraffin 블록을 제작하였으며 이 때 자궁의 경우 자궁 경부에서 나팔관까지 4개의 구간으로 나누어 제작해 여러 부분에서 관찰이 가능하도록 하였다. 블록을 굳히고 section을 할 때 까지 -20°C 냉동 보관을 하였다. 완전히 굳은 paraffin 블록을 Microtome를 이용해 section하여 5 $\mu$ m두께로 절편 낸 뒤 45°C의 water bath에 띄워서 슬라이드 위로 뜬 뒤 완전히 건조 될 수 있도록 37°C의 slide warmer에서 밤새 건조하였다. 조직 절편이 부착된 슬라이드는 염색 전 파라핀 제거를 위해 Xylene에서 5분씩 3번 담가서 조직과 슬라이드의 paraffin을 충분히 녹여주었다. 이후 염색을 위해 단계별 EtOH(100% > 95% > 90% > 80% > 70%)에서 각 5분씩 담가 함수과정을 거쳤다. 염색은 0.6% Haematoxylin에서 20초 염색한 뒤 D.W.로 수세하고 0.1% Eosin B에서 5분간 염색한 뒤 D.W.로 수세하였다. 이후 탈수를 위해 농도별 EtOH (70% > 80% > 90% > 95% > 100%) 각 단계에서 5분간 담가 주고 Xylene에 5분간 3번 담가준 뒤 슬라이드가 마르기 전에 Histological mounting medium을 떨어뜨려 커버 글라스로 덮어서 봉입해 영구프레파라트를 제작하였다. 이후 mounting medium이 마르면 광학현미경을 통해 조직학적 차이를 관찰했다.

#### 5. Statistical analysis

실험 결과의 통계적 분석은 Prism statistical software (Version 5, GraphPad Software Inc, USA)를 사용하여 Mann Whitney test를 이용했다. 여기서 나온 데이터 값들은 mean $\pm$ S.E.형식으로 표현되었다. p-value 0.05 미만을 통계적 유의성이 있다고 판정하였다. 이때 \* 1개에서 3개까지  $p<0.05$ ,  $p<0.01$   $p<0.001$  순서로 정의했다.

### III. Results

#### 1. 고지방 사료에 의한 체중 차이

PND 20에 최초 체중을 측정하였으며 이후 V.O.가 확인된 날 체중과 희생 당일 최종 체중을 측정하였다(Table 2). 최초 체중은 두 그룹 간 큰 차이와 유의성을 보이지 않고 비슷하였다(Table 2; CON vs HF,  $39 \pm 4.6$  vs  $39 \pm 2.6$  g,  $p > 0.05$ ). V.O.시기의 체중은 CON군이 HF군보다 높게 측정되었지만 유의성을 없었다(Table 2; CON vs HF,  $118 \pm 5.8$  vs  $96 \pm 4.0$  g,  $p > 0.05$ ). 최종체중에서는 HF군이 높게 측정되었지만 유의성은 없었다(Table 2; CON vs HF,  $175 \pm 9.3$  vs  $183 \pm 13.7$  g,  $p > 0.05$ ).

체중변화량은 최초 체중 측정 이후 체중을 측정한 두 시기까지의 변화량을 계산하였다(Table 2). 최초 체중에서 V.O.시기까지 체중변화량은 CON군에서 유의하게 더 높았다(Table 2; CON vs HF,  $79 \pm 5.6$  vs  $57 \pm 3.2$  g,  $p < 0.05$ ). 최초 체중에서 최종 체중까지의 체중변화량은 HF군이 약간 더 높았지만 유의성은 없었다(Table 2; CON vs HF,  $136 \pm 8.3$  vs  $144 \pm 13.6$  g,  $p > 0.05$ ).

#### 2. 고지방 사료에 의한 생식기관 무게 차이

생식기관의 무게를 측정한 결과 HF군에서 난소의 무게가 유의하게 더 무거웠다(Table 2; CON vs HF,  $28 \pm 2.7$  vs  $42 \pm 2.9$  g,  $p < 0.01$ ). 난소의 상대 무게에서도 마찬가지로 HF군에서 유의하게 무거웠다(Table 2; CON vs HF,  $16 \pm 1.9$  vs  $23 \pm 2.1 \times 10^{-3}$  %,  $p < 0.05$ ). 자궁은 HF군에서 더 무거웠지만 유의성은 없었다(Table 2; CON vs HF,  $316 \pm 23.5$  vs  $345 \pm 49.7$  g,  $p > 0.05$ ). 자궁의 상대무게에서도 마찬가지로 HF군이 더 무거웠으며 유의성은 없었다.(Table 2; CON vs HF,  $185 \pm 21.7$  vs  $190 \pm 25.4 \times 10^{-3}$  %,  $p > 0.05$ ).

#### 3. 고지방 사료에 의한 V.O.시기 및 Estrous cycle 차이

V.O. 시기(Fig. 2)는 HF군에서 CON군에 비해 평균 5일 정도 유의하게 일찍 발생했다(Table 3; CON vs HF,  $36 \pm 1.4$  vs  $31 \pm 0.4$  g,  $p < 0.05$ ). Estrus 단계와 Estrus 단계 사이의 길이를 CON군과 HF군에서 측정해본 결과 CON군에서 평균 약 0.7일 정도 길게 확인되었지만 유의성은 없었다(Table 3; CON vs HF,  $5 \pm 0.8$  vs  $4 \pm 0.3$  days,  $p > 0.05$ ). V.O. 이후 희생되기 전까지 약 2주 동안 Estrous cycle을 측정한 결과(Figure 3, 4) HF군에서 CON군에 비해 더 규칙적이고 안정적인 cycle이 확인되었다(Figure 1).

#### 4. 고지방 사료에 의한 생식기관의 조직학적 차이

난소의 모든 황체의 개수는 CON군보다 HF군에서 평균 약 5개가 유의하게 더 많이 관찰됐다(Table 4; CON vs HF,  $3 \pm 1.0$  vs  $8 \pm 0.5$  ,  $p < 0.05$ ; Figure 5). 난소의 모든 난포의 개수는 CON군에서 HF군보다 약 2개 정도 많이 관찰되었지만 유의성은 없었다(Table 4; Figure 5). 자궁의 자궁샘 개수를 측정한 결과 HF군에서 평균 약 6개가 더 많이 관찰되었지만 유의성은 없었으며(Table 5; Figure 6), 자궁샘 각각의 최대 직경은 HF군에서 유의하게 약  $28 \mu\text{m}$  더 길게 관찰되었다(Table 5,  $p < 0.001$ ; Figure 6). 자궁근층의 두께는 바깥쪽 자궁근층과 안쪽의 자궁근층이 모두 CON군보다 HF군에서 유의하게 더 두꺼운 것으로 나타났다(Table 5 바깥 층, CON vs HF,  $104 \pm 7.8$  vs  $130 \pm 8.8$ ,  $p < 0.05$ ; 안쪽 층, CON vs HF,  $73 \pm 5.8$  vs

71±1.2,  $p<0.001$ ; Figure 6). 내강 상피세포층은 CON군에서 HF군보다 평균 약 6μm 더 유의하게 두꺼웠다(Table 5,  $p<0.01$ ; Figure 6).

## 5. Tables & Figures

Table 2. 암컷 쥐에서 고지방 식이가 체중과 생식기관에 미친 영향

|                                              | CON      | HF       |
|----------------------------------------------|----------|----------|
| Initial body weight (g)                      | 39±4.6   | 39±2.6   |
| V.O body weight (g)                          | 118±5.8  | 96±4.0   |
| Terminal body weight (g)                     | 175±9.3  | 183±13.7 |
| Weight gain            until V.O. weight (g) | 79±5.6   | 57±3.2*  |
| until terminal weight (g)                    | 136±8.3  | 144±13.6 |
| Ovary weight (mg)                            | 28±2.7   | 42±2.9** |
| Ovary/Body weight                            | 16±1.9   | 23±2.1*  |
| Uterus weight (mg)                           | 316±23.5 | 345±49.7 |
| Uterus/Body weight                           | 185±21.7 | 190±25.4 |

Values are expressed as mean ± S.E. CON (n=5), HF (n=5)

\*significantly different from the control group,  $p <0.05$ .

\*\*significantly different from the control group,  $p < 0.01$ .

Table 3. 암컷 쥐에서 고지방 식이가 V.O. 시기와 Estrous cycle 길이에 미친 영향

|                    | CON    | HF      |
|--------------------|--------|---------|
| V.O. date (PND)    | 36±1.4 | 31±0.4* |
| Cycle length (Day) | 5±0.8  | 4±0.3   |

Values are expressed as mean ± S.E. CON (n=5), HF (n=5)

\*significantly differenfrom the control group,  $p <0.05$ .

Table 4. 암컷 쥐에서 고지방 식이가 난소의 조직학적 변화에 미친 영향

|                         | CON    | HF     |
|-------------------------|--------|--------|
| Number of corpora lutea | 3±1.0  | 8±0.5* |
| Number of follicles     | 36±2.1 | 34±5.4 |

Values are expressed as mean ± S.E. CON (n=5), HF (n=5)

\*significantly different from the control group,  $p < 0.05$ .

Table 5. 암컷 쥐에서 식이가 자궁의 조직학적 변화에 미친 영향

|                                               |             | CON     | HF        |
|-----------------------------------------------|-------------|---------|-----------|
| Number of uterine glands                      |             | 19±4.1  | 24±2.2    |
| Max. diameter of uterine gland (μm)           |             | 53±2.4  | 80±5.6*** |
| Thickness of myometrium (μm)                  | Outer Layer | 104±7.8 | 130±8.8*  |
|                                               | Inner Layer | 73±5.8  | 71±1.2*** |
| Thickness of lumen epithelial cell layer (μm) |             | 24±1.6  | 18±1.5**  |

Values are expressed as mean ± S.E. CON (n=5), HF (n=5)

\*significantly different from the control group,  $p < 0.05$ .

\*\*significantly different from the control group,  $p < 0.01$ .

\*\*\*significantly different from the control group,  $p < 0.001$ .

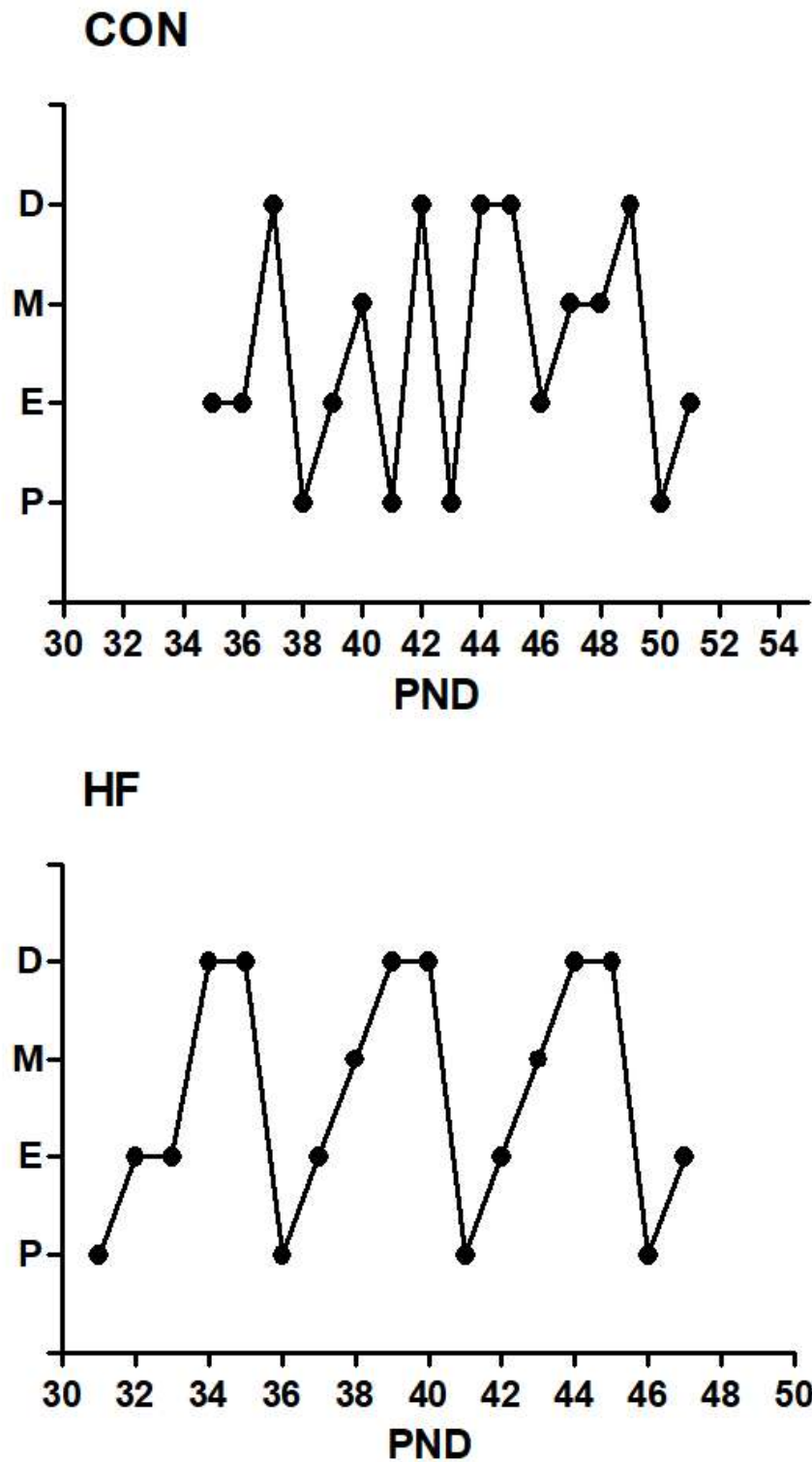


Figure 1. 일반 사료와 고지방 사료를 섭취한 SD Rat에서 V.O. 직후의 estrous cycle. (CON) 일반사료를 섭취한 대조군의 estrous cycle. (HF) 고지방 사료를 섭취한 실험군의 estrous cycle. (D, diestrus; M, Metestrus; E, Estrus; P, proestrus)

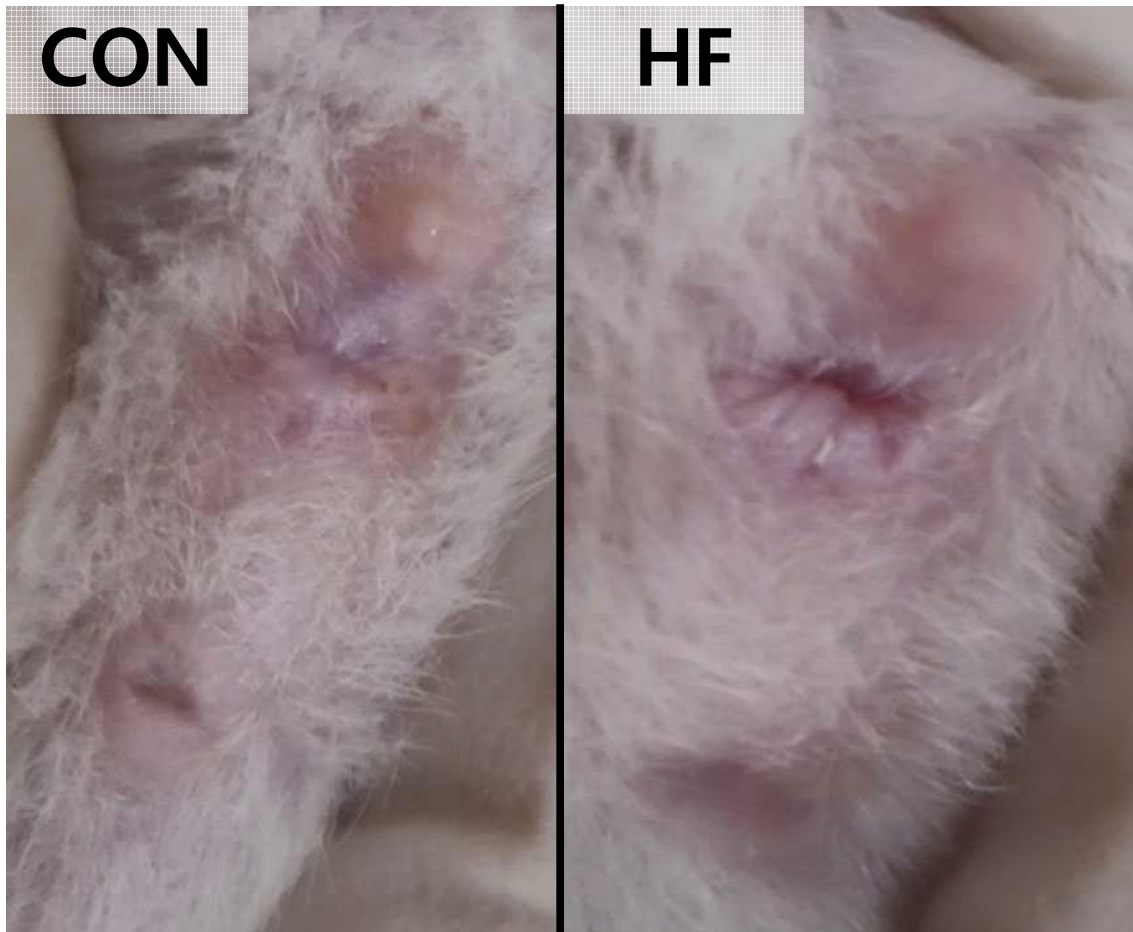


Figure 2. PND 31에 관찰한 질구개방 상태. (CON)일반 사료를 먹인 개체로 아직 질구가 닫혀있는 것을 관찰 할 수 있다. (HF)고지방 사료를 먹인 개체는 질구가 열린 것이 관찰 되었다.

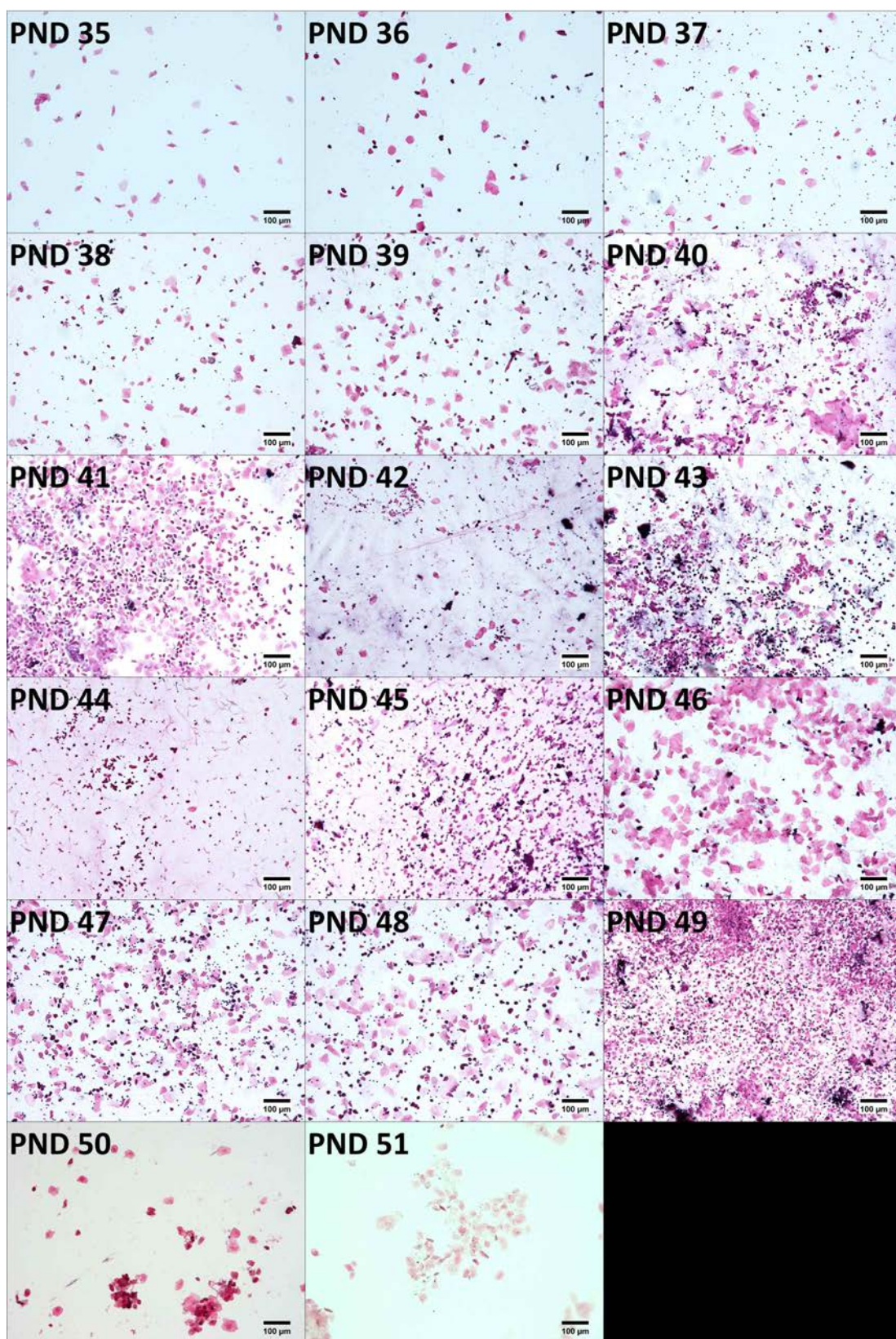


Figure 3. 일반 사료를 섭취한 CON군에서의 estrous cycle 세포. 각 PND의 cycle 단계는 Fig 1과 같다. (100x, Scale bar 100µm)

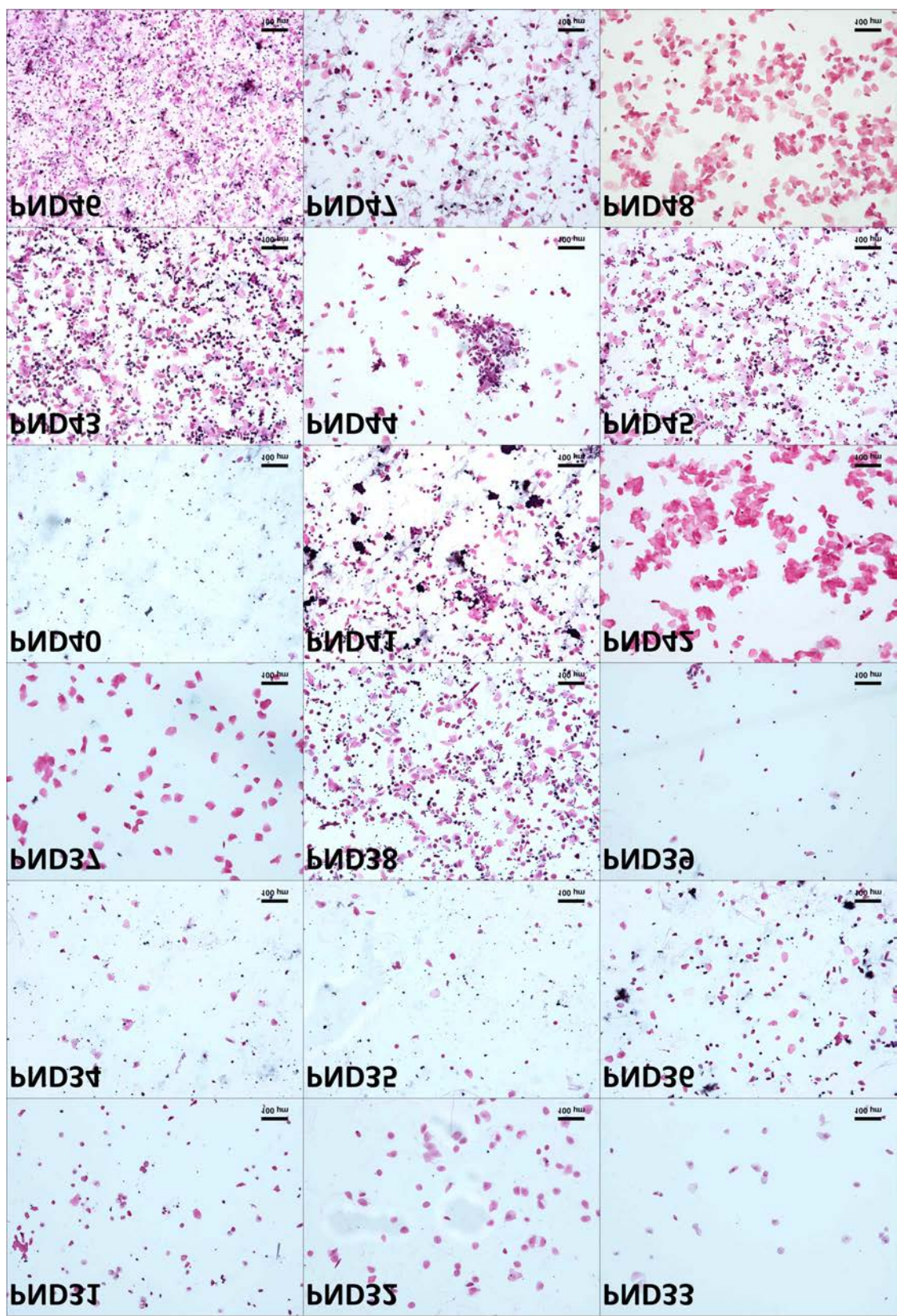


Figure 4. 고지방 사료를 섭취한 실험군에서의 estrous cycle 세포. 각 PND의 cycle 단계는 Fig 1과 같다. (100x, Scale bar 100µm)

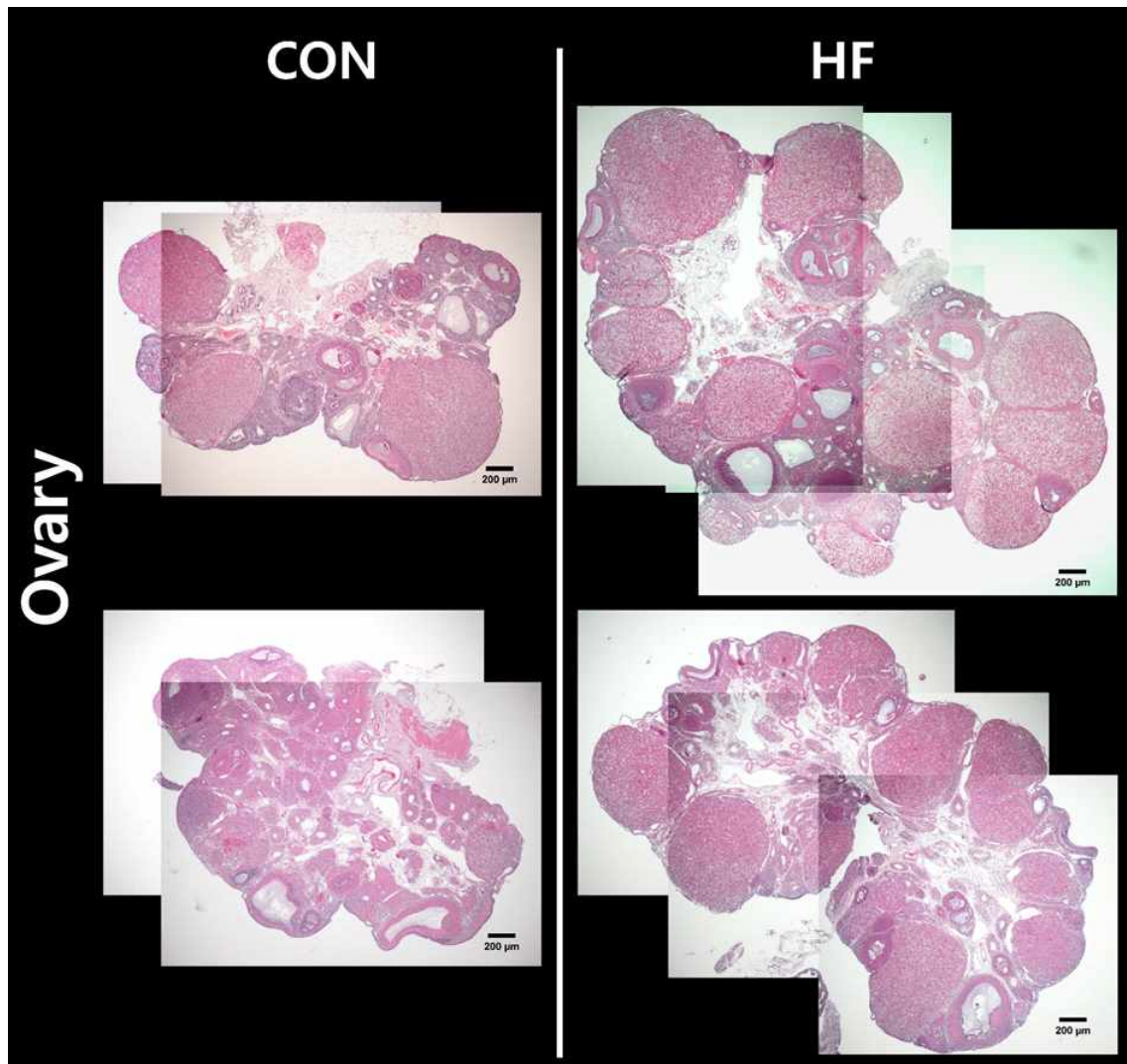


Figure 5. 고지방 사료에 의한 난소에서의 조직학적 차이. 전체적인 조직구조를 확인하기 위해 여러 장을 찍은 뒤 겹쳐서 보았다.(40x, Scale bar 200μm)

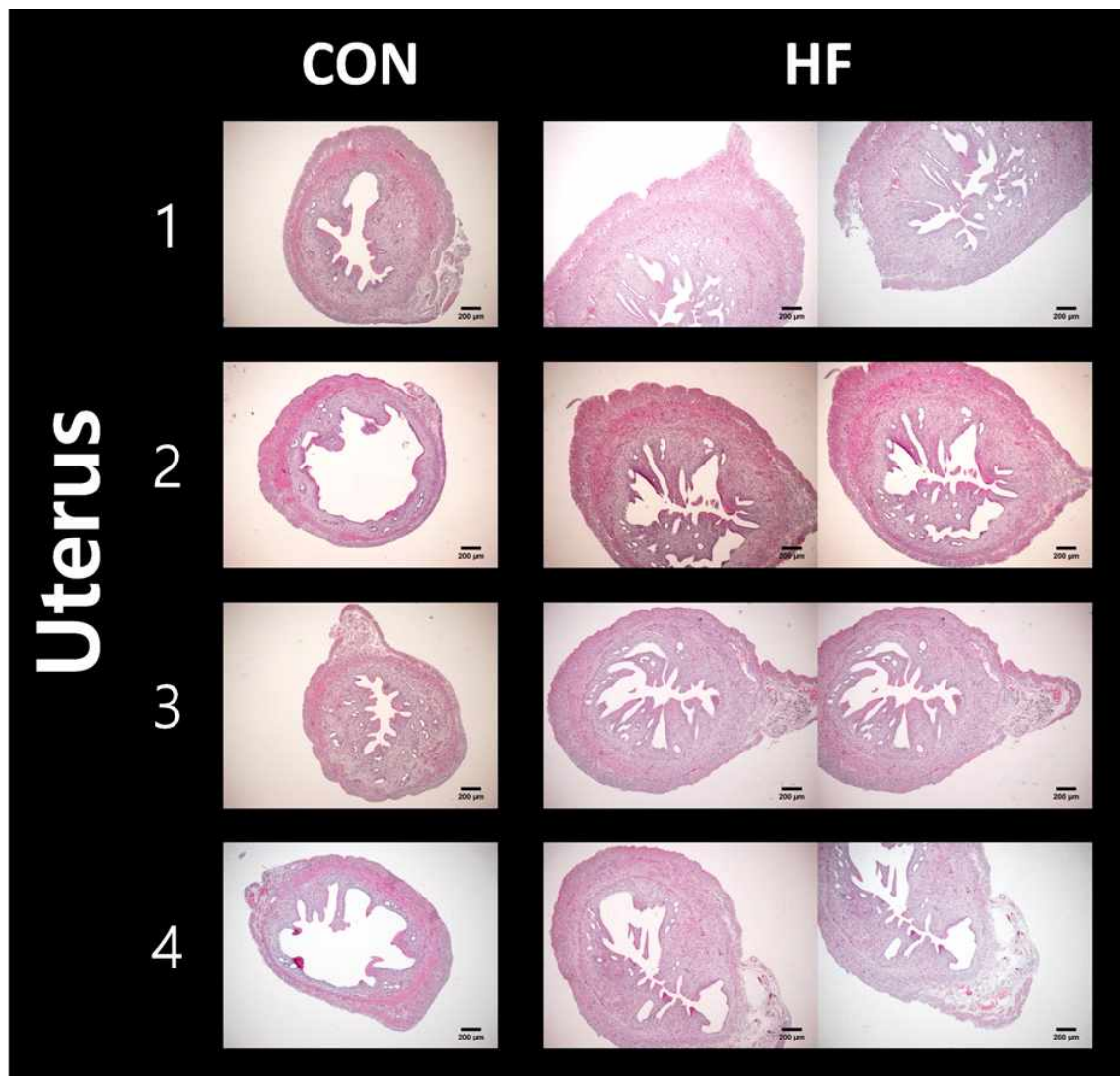


Figure 6. 고지방 사료에 의한 자궁에서의 조직학적 차이. 긴 관 형태의 자궁 구조 특성상 위치에 따라 조직의 형태가 다르게 관찰될 수 있어 자궁경부에서 나팔관까지 1~4의 구간으로 나누어 관찰하였다.(40x, Scale bar 200μm)

## IV. Discussion

고지방 식이는 체중과 체지방량을 증가시켜 비만을 유발한다(Stephen et al., 2003). 고지방 식이와 비만은 여러 질병을 유발할 수 있는 것으로 알려져 있으며, 호르몬 신호와 특히 아동에서는 사춘기 개시에 영향을 줄 수 있는 것으로 알려져 있다(Chen et al., 2017; Qing et al., 2001). 현재 여아의 초경 연령이 지속적으로 낮아지고 있고 임신 또한 보다 어린 나이에 가능해지고 있다(Paul et al., 2008). 하지만 이른 나이에 임신을 하게 되면 학업과 취업에 영향을 미치게 되고 경제적 기반이 갖춰지지 않은 상태에서의 원치 않는 임신으로 빈곤해질 가능성이 높다. 임신 가능 연령의 지속적인 감소로 사회적 약자 증가 가능성은 지속적으로 높아지고 이는 결국 사회비용 증가로 사회적으로 많은 문제를 일으킬 수 있다. 따라서 고지방 식이에 따른 사춘기 개시와 생식능력 변화에 대한 연구는 순수과학적인 의미 외에도 여러 응용적인 측면에서도 중요한 의미를 가지고 있다. 본 연구에서는 빠른 성 성숙의 원인 중 하나로 알려진 고지방 식이를 어린 SD Rat 암컷에 이용하여 빠른 사춘기 유도하고 체중변화 및 생식기관의 무게, Estrous cycle, 생식기관의 조직학적 관찰을 통해 알아보았다.

### 1. 고지방 식이가 체중에 미치는 영향에 대한 고찰

CON군과 비교하여 HF군에서 V.O. 시기의 체중과 최초 체중에서 V.O.시기까지의 체중변화가 유의하게 적었다(Table 2). V.O.까지 걸린 기간도 CON군에 비교하여 HF군에서 유의하게 짧게 관찰되었다(Table 3). V.O.까지의 적은 체중 및 체중변화량과 기간은 V.O.에 영향을 미치는 요인이 V.O.시기의 절대적인 체중이 아닌 고지방 식이에서 비롯된 것으로 추측할 수 있다.

### 2. 고지방 식이가 생식기관 무게와 조직구조에 끼친 영향에 대한 고찰

난소와 자궁의 절대 무게와 상대무게는 모두 HF군에서 무겁게 관찰되었다(Table 2). 조직학적인 관찰에서도 HF군에서 난소와 자궁이 더 많이 성숙한 것이 관찰되었다. CON군에 비해 HF군에서 난소의 경우 황체가 더 많이 관찰되었고, 자궁은 자궁샘의 개수가 더 많고, 안쪽과 바깥쪽의 자궁근층 두께가 유의하게 더 두꺼웠다(Table 4, 5; Figure 5, 6). 이러한 HF군의 생식기관 발달은 HF군에서 V.O.가 먼저 일어난 뒤 생식기관이 CON군에 비해 성숙할 기간이 더 있었기 때문으로 추측된다. 결국 앞당겨진 V.O.로 인하여 생식기관이 더 발달되었다고 할 수 있다. 본 실험에서는 고지방 식이가 V.O.의 조기 발생에 영향을 주었다고 추측한다.

### 3. 고지방 식이가 생식기관의 빠른 발달에 영향을 준 요인에 대한 고찰

고지방 식이는 체내의 지방량을 증가시킨다(Stephen et al., 2003). 뿐만 아니라 지방세포에서 분비되는 렙틴을 더 많이 분비시킨다(Jade et al., 2017; Mona et al., 2016). 렙틴은 지방세포로부터 분비되는 단백질로 시상하부에 작용하여 식욕과 체내대사 조절에 길항적으로 작용하는 호르몬이다. 하지만 여러 연구에 의해 렙틴이 에너지 조절 역할 뿐만 아니라 시상하부-뇌하수체 생식선에서 복잡하고 다양한 통해 생리학적으로 여러 중요한 역할을 해낸다는 것이 밝혀졌다(David et al., 2010; José et al., 2011). 원숭이를 사용한 실험에서는 뇌하수체에서 방출되는 생식선 자극호르몬인 LH와 FSH의 분비를 증가시킬 수 있는 것으로도 보고되었다(Patricia et al., 1998). 렙틴에 의해 분비된 생식선 자극호르몬은 성호르몬의 자극을 촉진하

여 사춘기를 유도 할 수 있다. 또한 자궁과 난소는 렙틴에 대한 수용체 mRNA를 가지고 있으며, 특히 난소에 매우 많이 있는 것으로 보고되었다(Leon et al., 2001). 본 연구 결과와 같은 HF군의 생식기관 발달은 지방에서의 렙틴의 과다 분비와 생식기관에서의 렙틴 수용체 자극으로 CON보다 빨리 사춘기가 개시되었기 때문으로 추측된다.

#### 4. 고지방 식이가 Estrous cycle에 미치는 영향에 대한 고찰

이전의 연구에서는 고지방 식이가 Estrous cycle을 불안정하게 만든다고 보고되었다; 7-9주령의 SD Rat을 이용한 연구에서 고지방 식이 실험군이 대조군에 비해 Estrous cycle이 불규칙하게 측정되었다는 보고가 있다(Hussain et al., 2016). 생후 23된 SD Rat을 이용한 실험에서도 고지방 식이 실험군이 Estrous cycle이 더 불규칙하게 관찰되었다(Katrina et al., 2017).

이러한 결과들은 이미 성체가 된 동물에 고지방 사료를 주거나 V.O. 이후 8주 내지 14주까지 비교적 장기간 관찰한 결과를 보여준 것이다. 하지만 본 실험에서는 아직 성적으로 미성숙한 3주령 때부터 고지방 사료를 섭취시켰으며 V.O. 이후 2주간의 단기간 동안의 Estrous cycle만을 관찰하였다. 그 결과 V.O. 이후 희생 직전까지 초기 약 2주 동안 HF군에서 CON군보다 더 안정적이고 규칙적인 cycle을 보여주었다(Figure 1).

정상적인 식이를 한 경우 사춘기 개시 직후에는 Estrous cycle이 불안정하게 시작하고 점차 안정성을 찾아간다. 하지만 사춘기 개시 이전부터의 고지방 식이는 빠른 V.O.를 가져옴과 동시에 안정적인 cycle을 가져왔다. 어린 시기부터의 고지방 식이와 빠른 V.O. 발생 그리고 그 이후에도 지속된 고지방 섭취까지 일련의 과정에 cycle 안정화 요인이 있을 것으로 추측된다.

프랑스인을 대상으로 한 통계 연구에 따르면 초경의 나이가 어릴수록 규칙적인 월경을 시작하기까지 걸린 기간이 짧은 그룹에 더 많이 분포하는 경향을 보였다(Françoise et al., 2002). 그렇기 때문에 빠른 V.O. 자체에 요인이 있을 수도 있다.

하지만 빠르게 cycle이 안정화되는 요인으로 고지방식이에 의해 과분비된 렙틴이 작용하였을 수도 있다. 렙틴의 과분비로 대조군과 같은 시기 대비하여 많은 생식선 자극호르몬이 방출되고 오히려 초반의 Estrous cycle을 대조군 대비 안정적으로 조절 할 수 있게 도와주었을 수도 있다.

본 실험에서는 여러 결과가 렙틴과 연관이 있을 것이라고 추측되지만 고지방 식이 - 렙틴 - V.O. 직후 Estrous cycle 안정 간의 상세한 분자적 메커니즘은 아직 규명되고 있지 않다. 그러므로 이를 위해 고지방 식이를 한 암컷 쥐에서 어떤 요인이 V.O. 직후의 Estrous cycle을 안정시켰는지 후속 연구가 필요하다.

결론적으로 고지방 식이는 암컷 흰쥐에서 사춘기를 빠르게 앞당기고 생식기관을 빠르게 발달시킨다. 특히 V.O.직후 초기에는 정상적인 식이를 한 그룹의 Estrous cycle과 달리 안정적이고 규칙적인 모습을 보여줬다. 본 실험에서 이러한 결과가 나타난 정확한 메커니즘을 확인 할 수는 없었지만 규칙적이지 않은 Estrous cycle 초기에 비교적 안정성을 부여하는 요인이 고지방 식이에 있다는 것을 시사한다.

# References

- Barash IA, Cheung CC, Weigle DS, Ren H, Kabigting EB, Kuijper JL, Clifton DK, Steiner RA. (1996) Leptin is a metabolic signal to the reproductive system *Endocrinology*. 137:3144 - 3147
- Boukouvelas G, Antoniou K, Papalexi E, Kitraki E. (2008) Post weaning high fat feeding affects rats' behavior and hypothalamic pituitary adrenal axis at the onset of puberty in a sexually dimorphic manner. *Neuroscience* 153: 373-382
- Bourgeois F, Alexiu A, Lemonnier D. (1983) Dietary-induced obesity: effect of dietary fats on adipose tissue cellularity in mice *Br J Nutr*. 49:17 - 26
- Chang Chen, Yunting Zhang, Wanqi Sun, Yao Chen, Yanrui Jiang, Yuanjin Song, Qinmin Lin, Lixia Zhu, Qi Zhu, Xiumin Wang, Shijian Liu, and Fan Jiang (2017) Investigating the relationship between precocious puberty and obesity: a cross-sectional study in Shanghai, China *BMJ Open*. 11:e014004
- Clavel-Chapelon F. (2002) Evolution of age at menarche and at onset of regular cycling in a large cohort of French women. *Hum Reprod* 17: 228-232
- David Garcia Galiano, Susan J. Allen, and Carol F. Elias (2014) Role of the Adipocyte-derived Hormone Leptin in Reproductive Control *Horm Mol Biol Clin Investig*. 19:141 - 149
- Differences in Relationship to Adiposity, Insulin Sensitivity, and Energy Expenditure *J Clin Endocrinol Metab*. 82:1293 - 1300
- Finn PD, Cunningham MJ, Pau KY, Spies HG, Clifton DK, Steiner RA. (1998) The Stimulatory Effect of Leptin on the Neuroendocrine Reproductive Axis of the Monkey. *Endocrinology* 139: 4652-4672
- George A. Bray (2004) Medical consequences of obesity *J Clin Endocrinol Metab*. 89:2583 - 2589
- Hohos NM, Skaznik-Wikiel ME. (2017) High-Fat Diet and Female Fertility. *Endocrinology* 158: 2407-2419
- Hussain MA, Abogresha NM, Hassan R, Tamany DA, Lotfy M (2016) Effect of feeding a high-fat diet independently of caloric intake on reproductive function

- in diet-induced obese female rats *Arch Med Sci.* 12:906 - 914
- José Donato Jr., Roberta M. Cravo, Renata Frazão, and Carol F. Elias (2011) Hypothalamic Sites of Leptin Action Linking Metabolism and Reproduction *Neuroendocrinology.* 93:9 - 18
- Leon J. Spicer (2001) Leptin: a possible metabolic signal affecting reproduction *Domest Anim Endocrinol.* 21:251 - 270
- Merih Berberoğlu (2009) Precocious Puberty and Normal Variant Puberty: Definition, etiology, diagnosis and current management *J Clin Res Pediatr Endocrinol.* 1:164 - 174
- Olga Karapanou, Anastasios Papadimitriou. (2010) Determinants of menarche. *Reprod Biol Endocrinol* 10.1186/1477-7827-8-115
- Stephen C. Woods, Randy J. Seeley, Paul A. Rushing, David D'Alessio and Patrick Tso (2003) A Controlled High-Fat Diet Induces an Obese Syndrome in Rats *J Nutr.* 133:1081 - 1087
- Paul B. Kaplowitz (2008) Link Between Body Fat and the Timing of Puberty *Pediatrics.* 3:S208-17
- Qing He, Johan Karlberg (2001) BMI in Childhood and Its Association with Height Gain, Timing of Puberty, and Final Height *Pediatr Res.* 49:244 - 251
- Seul Koo, Younjin Ahn, Joong-Yeon Lim, Juhee Cho, and Hyun-Young Park. (2017) Obesity associates with vasomotor symptoms in postmenopause but with physical symptoms in perimenopause: a cross-sectional study. *BMC Womens Health* 10.1186/s12905-017-0487-7
- Skaznik-Wikiel ME, Swindle DC, Allshouse AA, Polotsky AJ, McManaman JL. (2016) High-Fat Diet Causes Subfertility and Compromised Ovarian Function Independent of Obesity in Mice. *Biol Reprod* 94: 108
- Sohrabi M, Roushandeh AM, Alizadeh Z, Vahidinia A, Vahabian M, Hosseini M. (2015) Effect of a high fat diet on ovary morphology, in vitro development, in vitro fertilisation rate and oocyte quality in mice. *Singapore Med J* 56: 573-579
- Venancio JC, Margatho LO, Rorato R, Rosales RRC, Debarba LK, Coletti R, Antunes-Rodrigues J, Elias CF, Elias LLK. (2017) Short-Term High-Fat Diet Increases Leptin Activation of CART Neurons and Advances Puberty in Female Mice. *Endocrinology* 158: 3929-3942

- Volk KM, Pogrebna VV, Roberts JA, Zachry JE, Blythe SN1, Toporikova N. (2017) High-Fat, High-Sugar Diet Disrupts the Preovulatory Hormone Surge and Induces Cystic Ovaries in Cycling Female Rats. *J Endocr Soc.* 1: 1488-1505
- Zhang F, Su H, Song M, Zheng J, Liu F, Yuan C, Fu Q, Chen S, Zhu X, Wang L, Gao P, Shu G, Jiang Q, Wang S. (2019) Calcium Supplementation Alleviates High-Fat Diet-Induced Estrous Cycle Irregularity and Subfertility Associated with Concomitantly Enhanced Thermogenesis of Brown Adipose Tissue and Browning of White Adipose Tissue. *J Agr Food Chem.* 67: 7073-7081
- Boaz N. T. *Essentials of biological anthropology* Prentice Hall, New Jersey (1999)
- 박미정, 이인숙, 신은경, 정효지, 조성일. (2006) 한국 청소년의 성성숙 시기 및 장기간의 초경연령 추세분석 *Korean Journal of Pediatrics* pp.601-616

학부생 연구 보고서

서울 아카시아 꿀의 화분 염기서열 분석을  
통한 종 판별

Species identification of acacia honey in  
Seoul based on the sequence analysis

2019. 11.

상명대학교 융합공과대학  
생명화학공학부 생명공학과  
지도 교수님. 김창배 교수님

실험 조교님. 김정일, 최태준, 안형은

실험 참여자. 임소연, 안효빈, 박윤진, 서한은별, 양지원

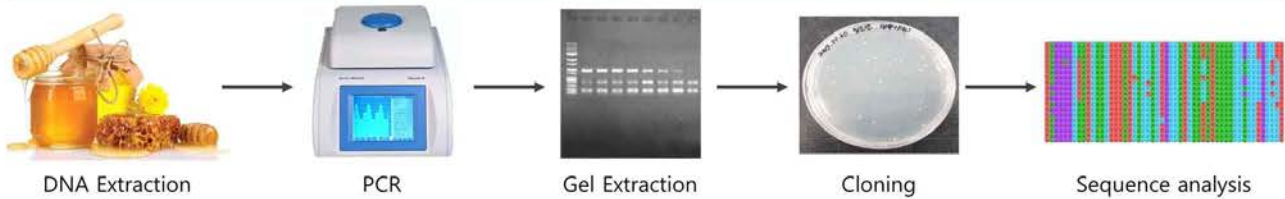
임소연<sup>1</sup>, 안효빈<sup>1</sup>, 박윤진<sup>1</sup>, 서한은별<sup>1</sup>, 양지원<sup>1</sup>, 김정일<sup>2</sup>, 최태준<sup>2</sup>, 안형은<sup>2</sup>, 김창배<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>상명대학교 생명공학과, <sup>2</sup>상명대학교 대학원 생명과학과

## Introduction

현재 꿀의 등급은 수분, 과당/포도당비, HMF(신선도), 색도, 향미 등과 같은 화학적 지표로 나뉘고 있고 생물학적 지표는 배제되어 있기 때문에 채밀된 꿀에 포함된 생물 종을 판단할 수 없는 상황이다. 이러한 문제들을 해결하기 위해선 생물학적 분석을 통한 지표 확립이 필요한데, 최근 이에 사용되고 있는 분석 방법이 DNA Metabarcoding이다. 모든 생명체는 고유의 염기서열을 가지고 있어서 이를 일종의 유전자 신분증(ID)으로 사용할 수 있는데, 이것은 다른 종과의 차이를 보이기 때문에 종 판별에 이용할 수 있다. 이때 사용되는 유전자 영역을 DNA Barcode라고 하고 DNA Metabarcoding은 DNA Barcode를 이용하여 혼합 시료 내 종을 동정할 수 있는 기술이다. DNA Metabarcoding은 식물과 동물 모두 동정이 가능한데, 식물 동정 시에는 MatK (Maturase K)와 rbcL (rubisco Large) 유전자를 주로 사용한다. 따라서 본 연구에서는 시중에서 흔히 접하는 서울 아카시아 꿀의 화분 DNA를 추출하고, 이를 MatK 유전자로 증폭해 Cloning하여 Sequence 분석을 통해 생물학적 요소를 파악하고 종을 판별하여 식품안전에 위한 생물학적 지표 확립에 도움을 주고자 한다.

## Materials & Methods



## Results & Discussion

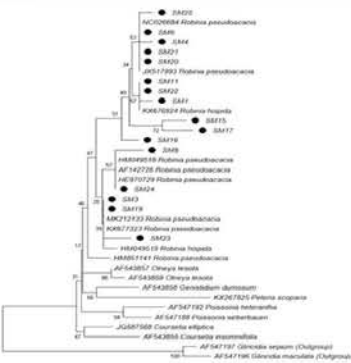


Fig. 1. *Robinia* 속으로 추정되는 sample의 계통수 분석 결과 (SM1, 3, 4, 6, 8, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25)



Fig. 2. *Sorbus* 속으로 추정되는 sample의 계통수 분석 결과 (SM2)

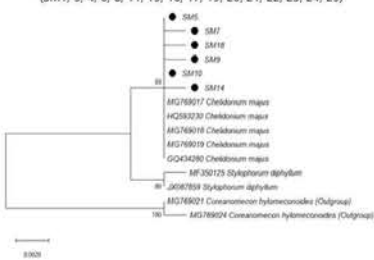


Fig. 3. *Chelidonium majus*로 추정되는 sample의 계통수 분석 결과 (SM5, 7, 9, 10, 14, 18, 19)



Fig. 4. *Rosa* 속으로 추정되는 sample의 계통수 분석 결과 (SM12, 13)

Table 1. 서울 아카시아꿀의 종 판별 결과

| Sample number | Species name             | 서식지            | 개화시기 |
|---------------|--------------------------|----------------|------|
| SM1           | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM2           | <i>Sorbus</i> sp.        | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM3           | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM4           | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM5           | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM6           | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM7           | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM8           | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM9           | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM10          | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM11          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM12          | <i>Rosa</i> sp.          | 전국 분포          | 5~7월 |
| SM13          | <i>Rosa</i> sp.          | 전국 분포          | 5~7월 |
| SM14          | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM15          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM16          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM17          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM18          | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM19          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM20          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM21          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM22          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM23          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM24          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM25          | <i>Robinia</i> sp.       | 전국 식재, 북아메리카원산 | 5~6월 |

실험에 사용한 서울 아카시아 꿀에 포함된 식물 종의 64%가 *Robinia* 속 (아카시아나무)으로 이루어져 있다는 것을 확인하였다. 하지만 나머지 다른 식물 종들이 아카시아(아카시) 나무의 개화 시기와 비슷하다는 것과 나머지 식물 종이 36%라는 큰 비율을 차지하고 있다는 것으로 보아 실험에 사용한 꿀을 아카시아 꿀이라고 단정 짓기는 이르다고 판단하였다. 또한 본 연구는 오직 25개의 sample만을 sequencing을 진행하였기 때문에 서울 아카시아 꿀의 종 판별의 신뢰도를 확보하기엔 부족하다. 이에 따라 추후 진행할 실험에서는 sample의 수를 늘려 반복적으로 실험함으로써 실험 결과의 신뢰도를 높일 것이며 더 나아가 본 실험에서 사용한 MatK 이외에도 rbcL과 같은 DNA Metabarcoding에 사용하는 다른 증폭 유전자들을 사용하여 이전 실험보다 종 판별의 정확성을 높이는 것을 목표로 삼았다

## Conclusion

현재 가장 꿀과 천연 꿀을 구별하는데 사용하는 방법에는 탄소 동위원소비 검사와 같은 화학적 방법들 뿐이며 생물학적 분석 방법은 이용되고 있지 않다. 생물학적 분석을 이용해서 꿀에 포함된 성분과 식물 종들을 파악하여 꿀에 대한 생물학적 지표를 확립한다면 좀 더 체계적이고 정확한 분류가 가능해질 것이다. 따라서 본 실험에서는 혼합 시료 내에서도 여러 종을 동정해 낼 수 있는 DNA Metabarcoding을 이용하였다. 시중에서 판매되는 서울 아카시아 꿀의 화분 DNA를 추출하여 PCR과 Cloning 과정을 통해 총 25개 sample의 sequence를 얻었다. 그중 sequencing을 통해 25개 sample의 종 판별을 진행하였다. 그 결과 25개 sample 중 *Robinia* 속이 16개, *Chelidonium majus* 6개, *Rosa* 속 2개, *Sorbus* 속 1개로 나타났고 이를 비율로 나타내면 64%를 *Robinia* 속이 차지하였고 *Chelidonium majus*가 24%, *Rosa* 속이 8%, *Sorbus* 속이 4%를 차지했다. 이러한 본 연구의 결과는 식품안전에 위해서 꿀 등급판정을 위한 생물학적 지표 활용의 필요성을 제시한다. 그리고 나아가 NGS와 같은 방식을 이용해 더 많은 종류의 꿀을 Sequencing하여 빅데이터를 구축하면 표준화된 생물학적 지표를 세우는 데 도움이 될 수 있을 것이라 기대한다.

## Abstract

현재 꿀의 등급은 수분, 향미, 탄소 동위원소비 등과 같은 화학적 지표를 사용하여 3가지의 등급으로 나누어지고 있고, 생물학적 지표를 고려하고 있지 않다. 따라서 꿀에 어떠한 식물 종이 포함되어 있는지 알 수 없다. 최근 이러한 사실을 악용하여 소비자의 식품안전을 위협하고 원산지를 속여 경제적 이득을 취하는 일이 빈번하게 발생하고 있다. 따라서 본 연구는 생물학적 지표 확립에 도움을 주고자 꿀에 어떠한 식물 종이 포함되었는지를 확인하기 위해 DNA Meta barcoding에 주목하였다. 식물의 종 판별에 주로 사용되는 MatK 유전자를 사용하였다. 서울 아카시아꿀을 대상으로 DNA extraction, PCR, cloning, DNA sequence 분석 과정을 거친 후 각 sample의 종을 확인하였다. 실험 결과 서울 아카시아 꿀에 포함된 식물 종의 64%(16개)가 *Robinia* 속 (아까시나무)이며 36%가 다른 식물 종으로 이루어져 있다는 것을 확인하였다. 하지만 이 결과는 오직 25개의 sample만을 sequencing을 진행하였기 때문에 서울 아카시아 꿀의 종 판별의 신뢰도를 확보하기엔 부족하다. 따라서 더 많은 sample을 이용한 추가적인 실험이 필요하다. 따라서 위 결과에 더불어 NGS와 같은 방식을 이용해 더 많은 종류의 꿀을 Sequencing하여 빅데이터를 구축하면 꿀이 등급을 생물학적으로 판정할 수 있는 기준을 제공하고, 도시양봉과 같은 사회적 기업의 질을 제고할 수 있는 과학적 증거를 제시할 수 있을 것으로 기대된다.

## Introduction

꿀은 꽃의 종류에 따라 밤꿀, 아카시아꿀, 잡화꿀이 있는데 각각 맛, 향기, 색이 다르다. 밤꿀은 색이 짙은 갈색을 띠고 맛과 향이 강하여 쓴맛이 나서 음식보다는 약용으로 더 많이 이용되고 아카시아꿀은 색이 투명하고 맑으며 맛이 부드럽고 은은해 우리나라 사람들이 가장 많이 찾는 꿀이다. 현재 우리나라에서는 2013년 12월부터 이러한 꿀 종류의 특성을 이용하여 소비자가 꿀의 품질 차이를 알고 구매할 수 있도록 ‘꿀 등급제 시범사업’을 시행하고 있다. 꿀 등급판정 항목으로는 꿀의 수분, 과당:포도당비, HMF(신선도), 색도, 향미 등이 있고 이를 종합적으로 평가하여 “1+ (premium) 등급”, “1(special) 등급”, “2(standard)등급” 3단계 등급으로 나뉜다. 그러나 이러한 평가 방식은 아카시아나 밤꿀 등이 다른 꿀과 섞였는지의 여부나 천연 꿀에 설탕이 얼마나 섞였는지를 통한 꿀의 진위 여부를 화학적 지표로만 나타낼 수 있고 생물학적 지표는 배제되어 채밀된 꿀에 포함된 생물 종을 판단할 수 없다. 이런 꿀 등급판정 방식의 한계점이 악용된다면 소비자의 안전을 위협하는 일들이 발생할 수 있다. 실제로 지난 2012년에는 어느 꿀 판매업자는 사양 벌꿀에 물엿 등을 50% 상당 혼합한 후 카라멜 색소와 밀가루를 넣어 국내산 벌꿀 100%인 ‘아카시아꿀’ 및 ‘잡화꿀’인 것처럼 속여 팔아 문제가 되었고 2014년에는 강한 독성으로 인해 국내에서 정식 허가되지 않은 네팔산 야생 꿀이 유입되어 부작용을 호소하는 소비자들이 늘어난 적도 있다.

이러한 문제들을 방지하고 꿀의 관리체계를 확립하기 위해서는 생물학적 분석을 통한 지표 확립이 필요한데, 최근 이에 사용되고 있는 분석 방법이 DNA Metabarcoding이다. 모든 생명체는 고유의 염기서열을 가지고 있어서 이를 일종의 유전자 신분증(ID)으로 사용할 수 있는데, 이것은 다른 종과의 차이를 보이기 때문에 종 판별에 이용할 수 있다. 이때 사용되는 유전자 영역을 DNA Barcode라고 하고 DNA Metabarcoding은 DNA Barcode를 이용하여 혼합 시료 내 종을 동정할 수 있는 기술이다. DNA Metabarcoding은 식물과 동물 모두 동정이 가능한데, 식물 동정 시에는 MatK (Maturase K)와 rbcL (rubisco Large) 유전자를 주로 사용한다.

따라서 본 연구에서는 시중에서 흔히 접하는 서울 아카시아 꿀의 화분 DNA를 추출하고, 이를 MatK 유전자로 증폭해 Cloning하여 Sequence 분석을 통해 생물학적 요소를 파악하고 종을 판별하여 식품안전을 위한 생물학적 지표 확립에 도움을 주고자 한다.

## Material & Method

### 1. DNA extraction

시중에서 판매되는 서울 강동구에서 도시양봉을 통해 채밀한 아카시아 꿀을 구매하여 연구에 사용하였다. 꿀의 점성을 제거하기 위해 아카시아꿀 25ml와 D.W 25ml를 혼합하여(총 50ml conical tube 3개) 2min동안 Vortexing한 후 60°C 30min간 Incubation 해준다. 그 다음 Centrifuge 8000rpm에서 20min후 상층액을 제거하고 D.W 20ml을 넣어준 후 다시 Centrifuge 8000rpm에서 20min동안 해준다. 이렇게 확보한 시료에서 DNA를 추출하기 위해 Bioneer MagListo™ 5M Plant Genomic DNA Extraction Kit를 사용하였다.



Fig. 1. 서울 강동구에서 도시 양봉으로 채밀한 서울 아카시아 꿀의 사진

## 2. PCR

MatK 유전자를 증폭하기 위해 2X TOPsimple™ DyeMIX-nTaq 10μl, Template DNA 5 μl, MatK Primer(1쌍) 2μl, D.W 3μl를 혼합하여 total volume 20μl로 계산한 후 PCR을 진행하였다. PCR 과정에서 MatK 유전자 내의 3'말단 800bp만큼의 부분이 증폭되었으며 사용한 Primer는 MatK-xf:MatK-MALP이다.

Table 1. MatK 염기서열

| primer    | 서열                          | 방향      | Reference                  |
|-----------|-----------------------------|---------|----------------------------|
| MatK-xf   | TAA TTT ACG ATC AAT TCA TTC | Forward | Ford et al., 2009          |
| MatK-MALP | ACA AGA AAG TCG AAG TAT     | Reverse | Dunning & Savolainen, 2010 |

Table 2. PCR cycle 조건

| 단계        | 온도    | 시간     | cycle 수  |
|-----------|-------|--------|----------|
| Denature  | 95°C  | 2 min  | 1 cycle  |
| Denature  | 95°C  | 30 sec | 35 cycle |
| Annealing | Grad. | 1 min  |          |
| Extention | 72°C  | 1 min  |          |
| Extention | 72°C  | 5 min  | 1 cycle  |
| Store     | 4°C   |        |          |

## 3. Gel Extraction

PCR product를 합쳐 그중 5μl를 1% agarose gel에서 30분 전기영동 하여, 800bp의 band를 Gel Extraction 진행하였다. Gel Extraction은 AccuPrep® PCR:Gel DNA Purification Kit에 따라 3 volumes의 FB Buffer를 PCR product에 넣고 1 volume의 isopropanol을 추가하였다. 그 다음 혼합물을 binding column에 넣고 14,000rpm에 1분간 centrifuge한 후 2 ml collection tube가 있는 binding column에 옮긴다. W2 Buffer 500

μl를 넣어준 후 다시 14,000 rpm에서 1분간 centrifuge한 후 이 과정을 반복한다. 그 후 14,000 rpm에서 1분간 centrifuge해주어 washing buffer를 제거하고 새로운 1.5 ml micro centrifuge tube가 있는 binding column에 옮긴다. EA Buffer 30 μl를 binding column에 넣고 1분간 elution이 되도록 기다린 후 14,000rpm에 1분간 centrifuge하여 purified fragment DNA를 얻는다.

#### 4. Cloning

Gel extraction에서 얻은 DNA를 Insert로 클로닝 진행하였다. TOPcloner™ PCR Cloning Kit를 사용하여 pTOP TA V2 Vector 1μl, 6×TOP cloner buffer 1μl, PCR product 1μl, D.W 3μl을 혼합해 ligation mix를 만든다. ligation mix 4μl를 DH5α competent E. coli에 넣어준 후 Ampicillin이 포함된 LB배지와 Ampicillin과 Kanamycin이 둘 다 포함된 LB배지에 도말하여 하루동안 배양한다. 배양 후, Plasmid Miniprep S&V kit를 사용해서 plasmid DNA를 추출하여 제한효소 EcoRI을 1시간 처리 후 1% TAE agarose gel 상에서 전기영동을 진행하였다. 전기영동을 통해 얻은 결과는 국내 전문기관((Bionics, Seoul, Korea)에 의뢰하여 Sequence analysis를 진행하였다. 해당 결과는 NCBI BLAST를 이용하여 다른 sequence들과 비교함으로써 실험에 사용한 서울 아카시아 꿀의 종 판별을 진행하였다.

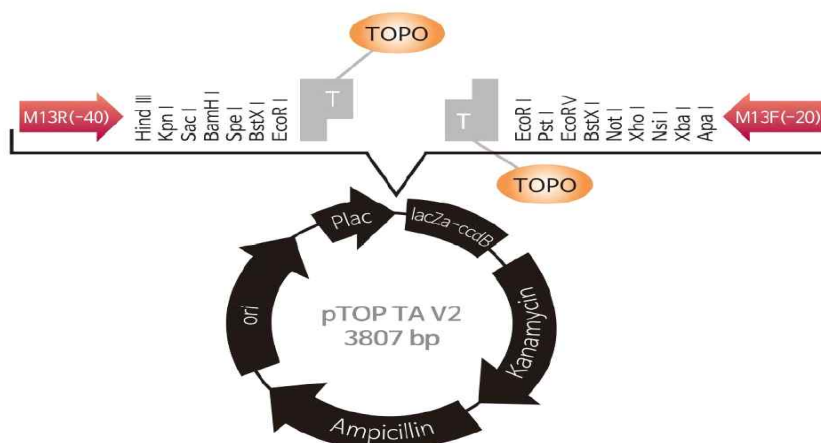


Fig. 2. Map of pTOP TA V2 Vector

#### 5. 서열 분석 및 계통분석

Sequencing을 통해 얻은 서열은 Geneious 9.1.8을 통해 quality를 확인하고, 양쪽의 EcoRI 서열을 제거하였다. 그리고 NCBI BLAST를 이용하여 Genbank의 서열들과 비교, 분석하여 종을 판별하였다.

BLAST 결과, 98% 이상의 유사도를 보이는 서열과 유연관계 비교를 위해 염기서열을 MEGA X program을 사용하여 Kimura-2-Parameter distance model에 의한 유전 거리를 계산하고 Neighbor-joining method를 이용하여 계통수를 작성하였다.

## Results

### 1. DNA Extraction 결과

총 75ml의 서울 아카시아 꿀로부터 DNA를 추출하여 4개의 DNA sample의 순도와 농도를 측정한 후, PCR에 이용하였다.

Table 3. DNA Extraction 결과

| sample | A260/230 | A260/280 | Conc. (ng/ul) |
|--------|----------|----------|---------------|
| SB 1   | 0.947    | 1.781    | 21.25         |
| SB 2   | 0.980    | 1.499    | 29.49         |
| SB 3   | 0.831    | 1.830    | 21.59         |
| SB 4   | 1.149    | 1.215    | 56.76         |

### 2. PCR 전기영동 결과

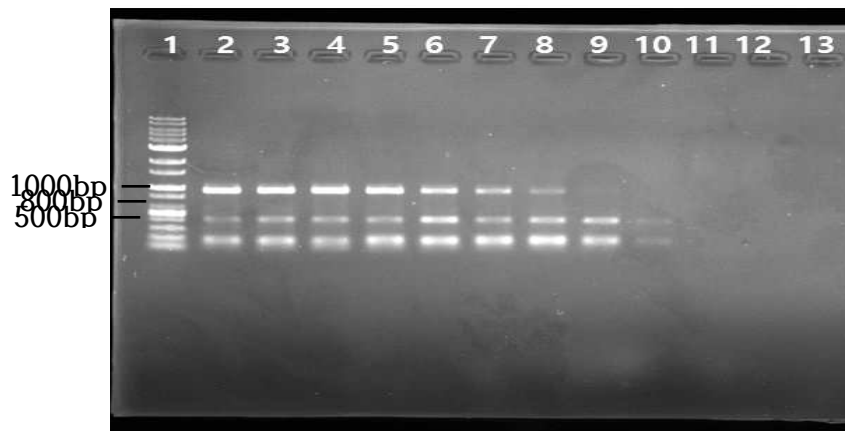


Fig. 3. 1% agarose gel에서 전기영동 결과 사진

1. Marker; 2. MatK 40.0; 3. MatK 41.0; 4. MatK 42.0; 5. MatK 44.0; 6. MatK 46.4; 7. MatK 48.8; 8. MatK 51.2; 9. MatK 53.6; 10. MatK 56.0; 11. MatK 58.0; 12. MatK 59.0; 13. MatK 60.0

추출한 DNA에 포함된 식물 종마다 유전자가 증폭되는 최적 온도가 다르기 때문에 40°C~60°C로 온도를 다양하게 하여 PCR을 진행한 결과이다. 그 결과, 2번부터 8번까지 MatK의 target size인 800bp에서 밴드가 관찰되었다.

## 2. Cloning 및 cloning 제한 효소처리 결과

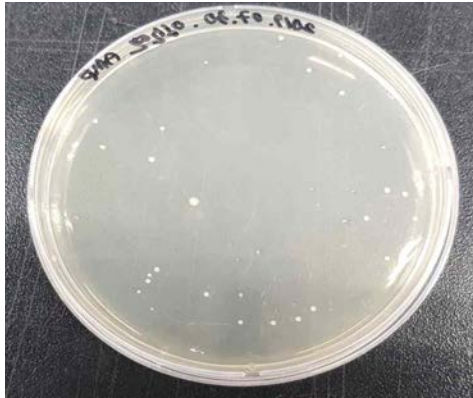


Fig. 4. Ampicillin이 포함된 LB배지 24시간 배양 후 사진

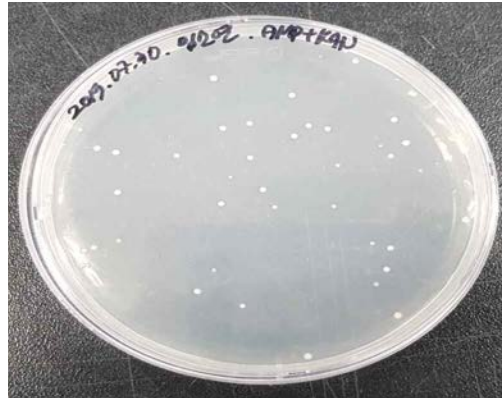


Fig. 5. Ampicillin과 Kanamycin 둘 다 포함된 LB배지 24시간 배양 후 사진

Fig. 4와 Fig. 5 결과에서 *E.coli*가 모두 잘 배양된 것을 확인하였다. 배양된 colony 중 크기가 큰 colony들을 pipette으로 따내어 plasmid를 추출하여 제한효소를 처리한 후, plasmid를 추출하여 1% Agarose gel에서 전기영동을 진행하였다.

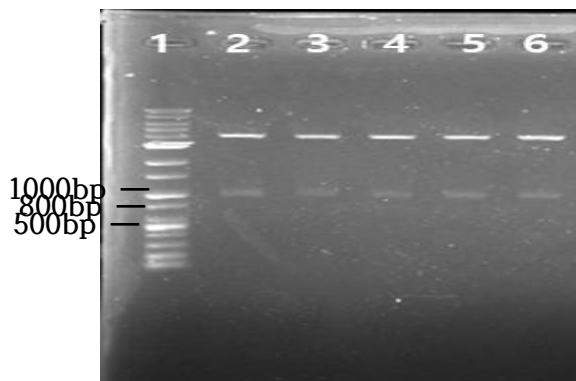


Fig. 6. cloning 제한효소 처리결과(1)

1. Marker; 2. SM1; 3. SM2; 4. SM3; 5. SM4; 6. SM5

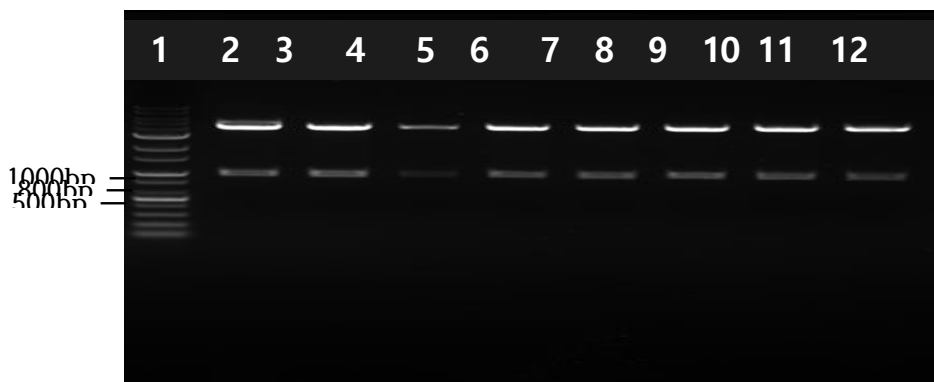


Fig. 7. cloning 제한효소 처리결과(2)

1. Marker; 2. SM6; 3. SM7; 4. SM8; 5. SM9; 6. SM10; 7. SM11;
8. SM12; 9. SM13

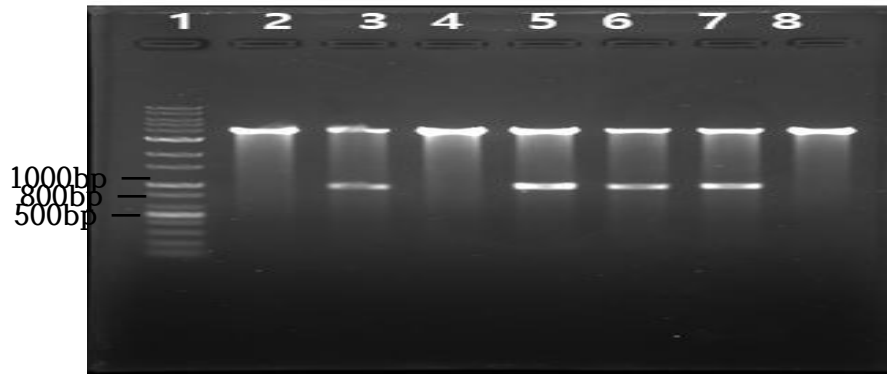


Fig. 8. cloning 제한효소 처리결과(3)

1. Marker; 2. SM14; 3. SM15; 4. SM16; 5. SM17; 6. SM18; 7. SM19; 8. SM20

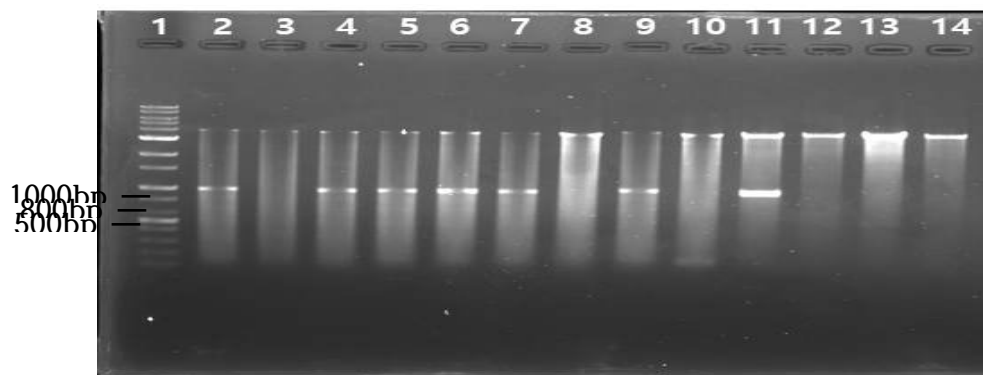


Fig. 9. cloning 제한효소 처리결과(4)

1. Marker; 2. SM21; 3. SM22; 4. SM23; 5. SM 24; 6. SM25; 7. SM26; 8.
- SM 27; 9. SM28; 10. SM29; 11. SM30; 12. SM31; 13. SM32; 14. SM33

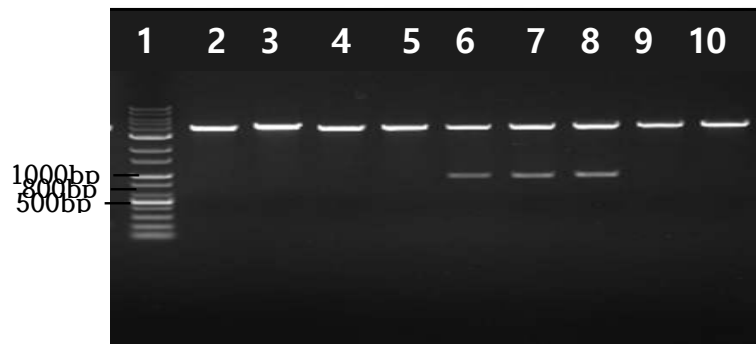


Fig. 10. cloning 제한효소 처리결과(5)

1. Marker; 2. SM34; 3. SM35; 4. SM36; 5. SM37; 6. SM38; 7. SM39;
8. SM40; 9. SM41; 10. SM42

Fig. 6 ~ Fig. 10에서 사용한 Marker는 Fig. 3에서 사용한 것과 동일하다.

Plasmid DNA에 제한효소를 처리했기 때문에 insert DNA가 삽입됐을 시 vector와 insert DNA band, 총 2개의 band가 나타나야 한다. 총 25개의 sample에서 약 3000bp vector의 band와 800bp의 insert DNA band가 관찰되었다. Fig. 6 ~ Fig. 10에서 얻은 25개의 sample을 이용해 Sequence analysis를 진행하였다.

### 3. Sequence analysis

서울 아카시아 꿀로부터 얻은 25개의 염기서열을 NCBI BLAST와 계통수 작성을 통해 분석하였다. 총 25개의 서열을 BLAST를 통해 NCBI GenBank 내 다른 염기서열들과 비교한 결과 정확한 다양한 종들과 98%이상의 일치도를 보여 정확한 종 판별에 한계가 있었다.

총 16개의 sample (SM1, 3, 4, 6, 8, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25)의 BLAST 결과, *Robinia* 속 뿐만 아니라 *Genisitidium*, *Peteria*, *Olney*, *Poissonia*, *Coursetia* 속과도 98% 이상의 일치도를 보였다. 계통분석 결과 시료 모두 *Robinia* 속인 것으로 나타났다(Fig. 11). SM2의 BLAST 결과, *Sorbus* 속, *Micromeles folgneri*, *Aria alnifolia*와 99.8%의 유사도를 보였다. *Micromeles folgneri*, *Aria alnifolia*는 각각 *Sorbus folgneri*, *Sorbus alnifolia*의 동종 이명인 것을 확인했다. 따라서 SM2는 *Sorbus* 속의 종으로 판단된다(Fig. 12). 총 7개 sample (SM5, 7, 9, 10, 14, 18, 19)의 BLAST 결과 *Chelidonium majus* 뿐 아니라 *Stylophorum* 속과 98%이상의 일치도를 보였으나, 계통분석 결과 *Chelidonium majus* 와 같은 분기군을 이루었다(Fig. 13). SM12, 13의 BLAST 결과 *Rosa* 속의 다양한 종들과 일치도 99%이상의 일치도를 보였다(Fig. 14). 계통분석 결과에서 *Chelidonium majus*를 제외한 나머지 sample들은 종까지 판별이 불가능하였고, 속 수준으로 Table 3을 분류하였고 이를 종합한 각 시료의 종판별 결과를 Table 3에 나타내었다. 그리고 *Rosa*, *Sorbus*, *Robinia*, *Chelidonium majus*의 비율만을 Fig. 15로 나타냈다. 그 결과, *Robinia* 속이 64%로 가장 높은 비율을 차지했고 그 다음으로 *Chelidonium majus*가 24%, *Rosa* 속이 8%, *Sorbus* 속이 4% 순으로 높은 비율을 차지했다.

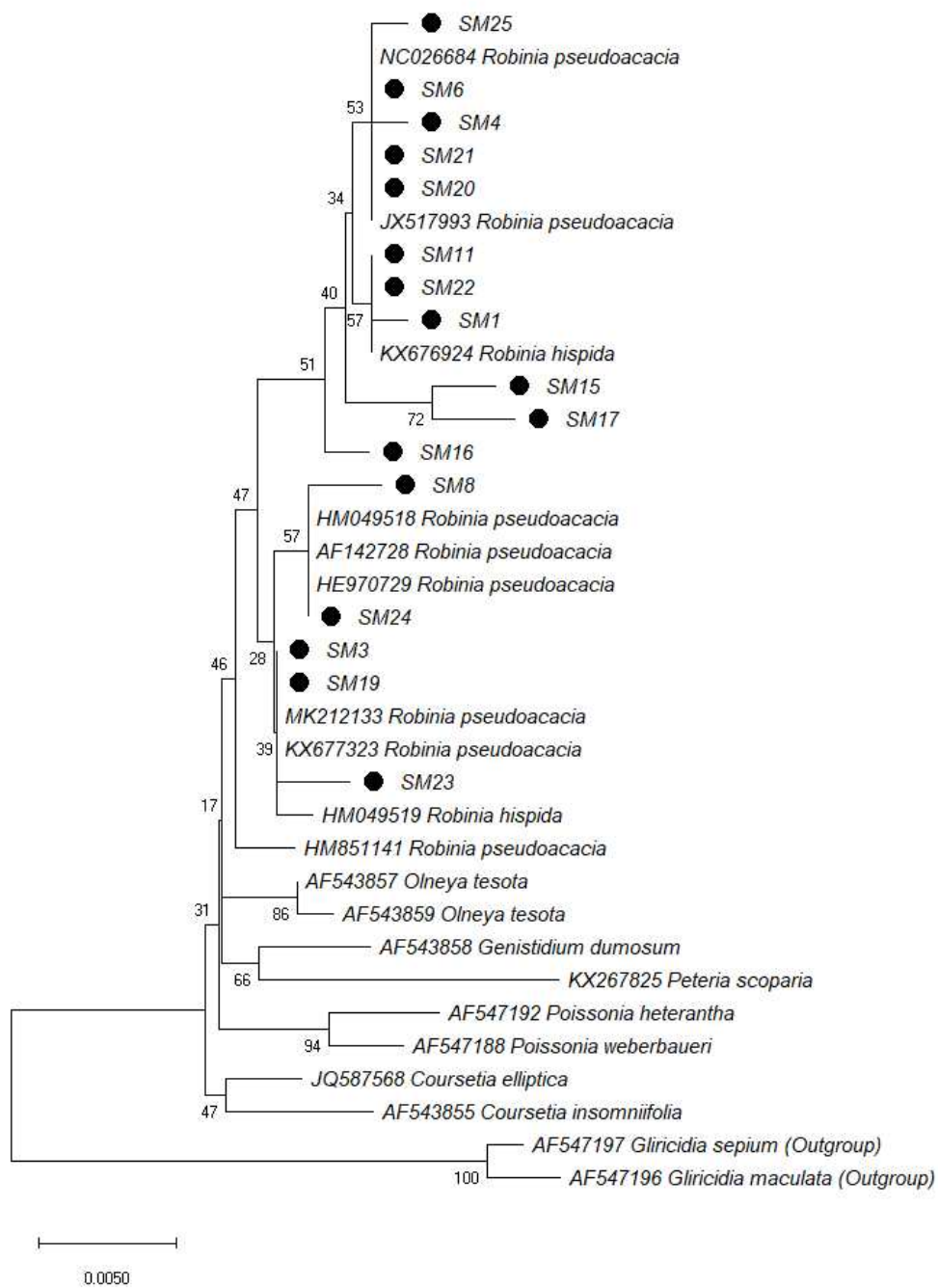


Fig. 11. *Robinia* 속으로 추정되는 sample의 계통수 분석 결과 (SM1, 3, 4, 6, 8, 11, 15, 16, 17, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25)

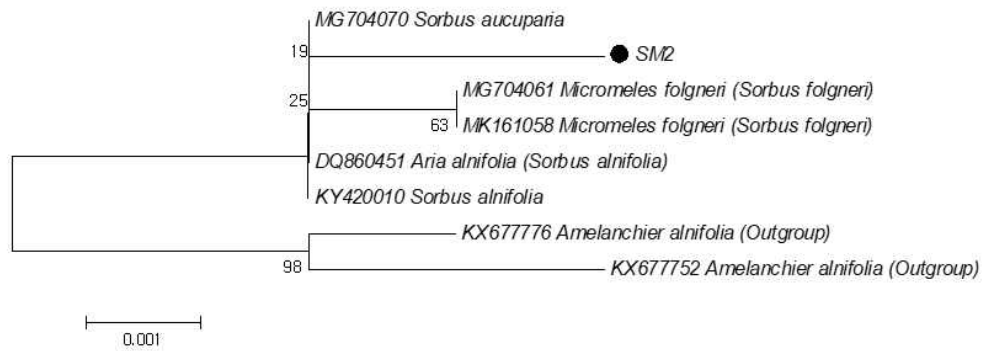


Fig. 12. *Sorbus* 속으로 추정되는 sample의 계통수 분석 결과(SM2)

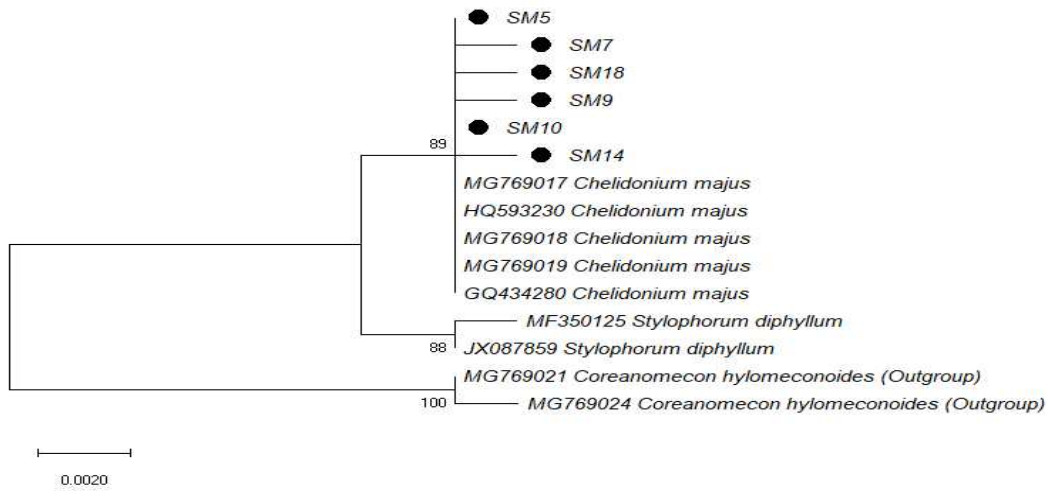


Fig. 13. *Chelidonium majus*로 추정되는 sample의 계통수 분석 결과 (SM5, 7, 9, 10, 14, 18, 19)

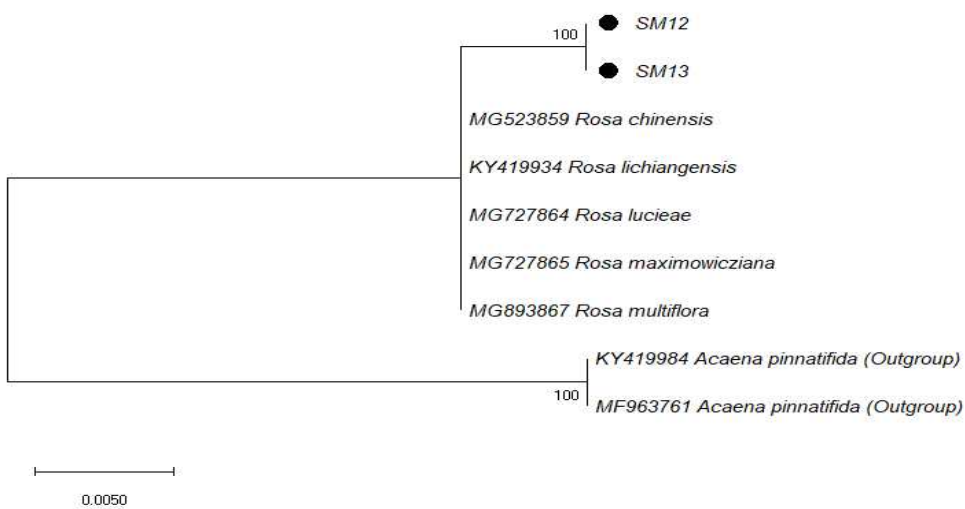


Fig. 14. *Rosa* 속으로 추정되는 sample의 계통수 분석 결과 (SM12, 13)

Table 4. 서울 아카시아꽃의 종 판별 결과

| Sample number | Species name             | 서식지            | 개화시기 |
|---------------|--------------------------|----------------|------|
| SM1           | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM2           | <i>Sorbus sp.</i>        | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM3           | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM4           | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM5           | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM6           | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM7           | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM8           | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM9           | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM10          | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM11          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM12          | <i>Rosa sp.</i>          | 전국 분포          | 5~7월 |
| SM13          | <i>Rosa sp.</i>          | 전국 분포          | 5~7월 |
| SM14          | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM15          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM16          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM17          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM18          | <i>Chelidonium majus</i> | 전국 분포          | 5~6월 |
| SM19          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM20          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM21          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM22          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM23          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM24          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |
| SM25          | <i>Robinia sp.</i>       | 전국 식재; 북아메리카원산 | 5~6월 |

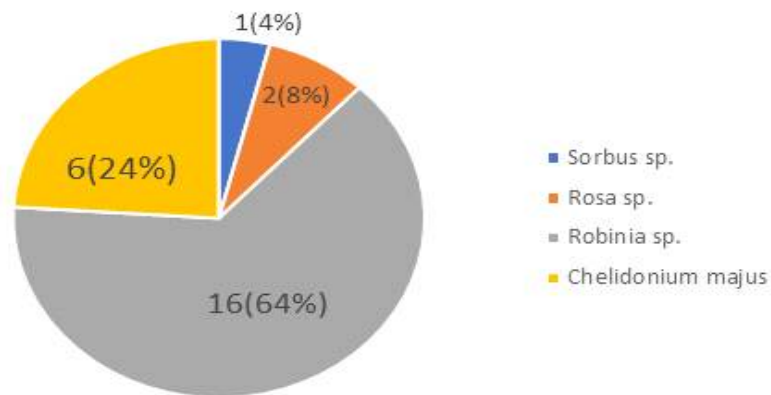


Fig. 15. 서울 아카시아꿀에 포함된 식물의 비율

실험에 사용한 서울 아카시아 꿀에 포함된 식물 종의 64%가 *Robinia* 속 (아카시아나무)으로 이루어져 있다는 것을 확인하였다. 하지만 나머지 다른 식물 종들이 아카시아(아까시) 나무의 개화 시기와 비슷하다는 것과 나머지 식물 종이 36%라는 높은 비율을 차지하고 있다는 것으로 보아 실험에 사용한 꿀을 아카시아 꿀이라고 단정 짓기는 이르다고 판단하였다. 또한 본 연구는 오직 25개의 sample만을 sequencing을 진행하였기 때문에 서울 아카시아 꿀의 종 판별의 신뢰도를 확보하기엔 부족하다. 이에 따라 추후 진행할 실험에서는 sample의 수를 늘려 반복적으로 실험함으로써 실험 결과의 신뢰도를 높일 것이며 더 나아가 본 실험에서 사용한 MatK 이외에도 rbcL과 같은 DNA Metabarcoding에 사용하는 다른 증폭 유전자들을 사용하여 이전 실험보다 종 판별의 정확성을 높이는 것을 목표로 삼았다.

## Conclusion

꿀은 인류가 가장 오래전부터 이용해온 식품이자 천연 감미료이다. 예로부터 꿀은 동서양을 막론하고 식품뿐만 아니라 약용으로도 이용되어왔다. 최근에는 과학기술이 발달하면서 꿀 속에 사람에게 필요한 미네랄과 비타민이 풍부하다는 것과 항산화 성분이 다량 함유되어있는 것이 확인되어 그 가치를 높이 평가받고 있다. 이에 따라 소비자들은 꿀을 구매함에 있어 높은 꿀의 품질과 정확하고 신뢰도 있는 꿀의 종류, 성분 등을 요구하고 있다. 하지만 현재 가짜 꿀과 천연 꿀을 구별하는데 사용하는 방법에는 탄소 동위원소비 검사와 같은 화학적 방법들뿐이며 생물학적 분석 방법은 이용되고 있지 않다. 생물학적 분석을 이용해서 꿀에 포함된 성분과 식물 종들을 파악하여 꿀에 대한 생물학적 지표를 확립한다면 좀 더 체계적이고 정확한 분류가 가능해질 것이다. 따라서 본 연구에서는 이런 생물학적 지표 확립에 도움을 주고자 하며 그 방법으로 혼합 시료 내에서도 여러 종을 동정해 낼 수 있는 DNA Metabarcoding을 이용하였다. 실험은 시중에서 판매되는 서울 아카시아 꿀의 화분 DNA를 추출하여 PCR과 Cloning 과정을 통해 총 25개 sample의 sequence를 얻었다. 그중 sequencing을 통해 25개 sample의 종 판별을 진행하였다. 그 결과 25개 sample 중 *Robinia* 속이 16개, *Chelidonium majus* 6개, *Rosa* 속 2개, *Sorbus* 속 1개로 나타났고 이를 비율로 나타내면 64%를 *Robinia* 속이 차지하였고 *Chelidonium majus*가 24%, *Rosa* 속이 8%, *Sorbus* 속이 4%를 차지했다.

본 연구의 결과는 식품안전을 위해서 꿀 등급판정을 위한 생물학적 지표 활용의 필요성을

제시한다. 그리고 나아가 NGS와 같은 방식을 이용해 더 많은 종류의 꿀을 Sequencing하여 빅데이터를 구축하면 표준화된 생물학적 지표를 세우는 데 도움이 될 수 있을 것이라 기대된다.

## References

- 1) 박인규, 식물 DNA 바코드 데이터 생산 및 연구 동향, 2017-02-14, pp. 3.
- 2) 축산물품질평가원, 기획 - 꿀에도 등급이 있습니다!, 2014. pp. 1-3.
- 3) KBS 뉴스, “네팔산 야생꿀·태국참 등 함부로 먹지 마세요”,  
<https://m.news.naver.com/read.nhn?mode=LSD&mid=sec&sid1=102&oid=056&aid=0010033983> (검색일 2019.09.26)
- 4) 나명옥, 물엿 섞은 ‘가짜 벌꿀·꿀차’ 제조업자 구속, 식품저널 인터넷식품신문 foodnews,  
<http://m.foodnews.co.kr/news/articleView.html?idxno=39951> (검색일 2019.09.26)

학부생 연구 논문

형질전환 대장균에서 재조합 ADH의 최적  
발현조건 탐색과 산업적 이용 가능성 연구

Study on the Optimal Expression  
Condition of Recombinant ADH  
in Transgenic *Escherichia coli* and  
Its Industrial Availability

2019. 11.

상명대학교 융합공과대학  
생명화학공학부 생명공학과  
정하영, 강서영, 김연서, 박지영  
연구지도자: 임은주<sup>1)</sup>, 안예진<sup>2)</sup>

---

1) 상명대학교 일반대학원 생명과학과

2) 상명대학교 융합공과대학 생명화학공학부 생명공학과 분자생명공학실험실 교수

# 형질전환 대장균에서 재조합 ADH의 최적 발현조건 탐색과 산업적 이용 가능성 연구

정하영, 강서영, 김연서, 박지영, 임은주, 안예진

상명대학교 생명공학과 분자생명공학실험실

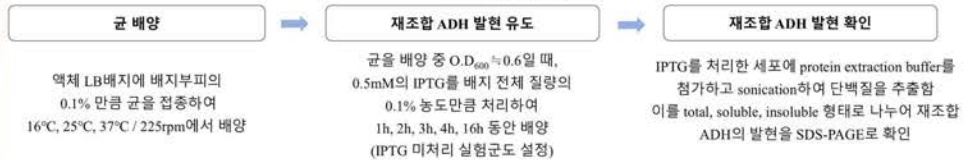
## Abstract

현재 재조합 단백질의 중요성이 많은 분야에서 확인됨에 따라 이는 바이오 의약품, 식품, 농업 등의 다양한 산업에 사용되고 있다. 그중에서도 알코올 분해 효소 ADH(Alcohol dehydrogenase)는 숙취 해소제품뿐만 아니라 건강 기능식품, 기능성 화장품, 의약품 제제 등에도 유용하게 활용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 고부가가치를 지닌 ADH를 재조합 단백질의 형태로 생산하고, 이의 최적 발현조건을 탐색하고자 한다. 더 나아가 분자 샤페론인 DcHSP70을 이용하여 사용 가능한 수용성 재조합 ADH를 생산하고자 한다. 본 연구에서는 Wild type(BL21), pET11a-6His-ADH in BL21, 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70을 사용하였다. 각 실험군을 16°C, 25°C, 37°C에서 배양하고 IPTG를 처리하여 1h, 2h, 3h, 4h, 16h 동안 반응시켰으며, 재조합 ADH의 발현은 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. 실험결과, 16°C에서 16시간 동안 IPTG에 노출한 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70에서, 기준값의 40배에 달하는 가장 많은 양의 재조합 ADH가 발현되었다. 본 연구는 재조합 ADH의 최적 발현조건을 통해 이의 산업적 대량생산을 위한 기반을 마련하였다는 데에 의의가 있으며, 이는 앞으로 다른 재조합 단백질을 생산하기 위한 후속 연구의 바탕이 되어 유용하게 사용될 것으로 예상된다.

## Materials and Methods



Fig. 2. *Escherichia coli* 본 연구에서 재조합 ADH의 발현균주로 사용한 미생물이다. 실험에는 Wild type BL21(DE3)과 플라스미드에 ADH가 삽입된 pET11a-6His-ADH in BL21, ADH와 DcHSP70이 각각 플라스미드와 대장균의 genome에 삽입된 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70이 사용되었다.



## Results and Discussion

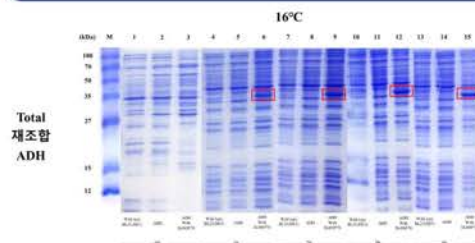


Fig. 3. 16°C에서 배양한 대장균에서 발현된 total 재조합 ADH 재조합 ADH 단백질의 크기는 37kDa로, 각 사진에 표시하였다. 초반에는 다른 실험군에 비해 느린 발현율을 보이나, IPTG 처리 시간에 따라 재조합 ADH의 발현이 증가하는 양상을 보였다.

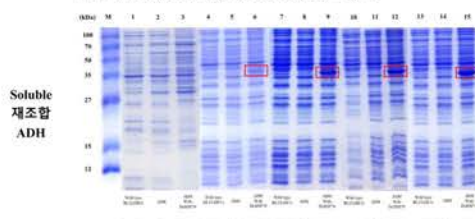


Fig. 6. 16°C에서 배양한 대장균에서 발현된 soluble 재조합 ADH IPTG 처리 시간이 길어질수록 수용성 재조합 ADH의 발현량도 증가하였다. 25°C에서보다 Total 재조합 ADH의 발현량은 적지만, soluble 형태의 재조합 ADH는 많이 생성되었다.

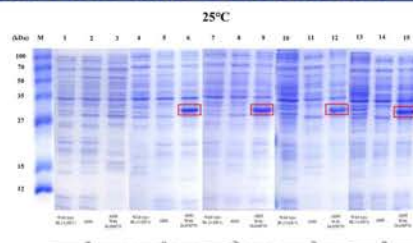


Fig. 4. 25°C에서 배양한 대장균에서 발현된 total 재조합 ADH 모든 배양온도 중 25°C에서 재조합 ADH가 가장 빠르게 발현되었으며, 발현량 또한 많다. 하지만 IPTG를 처리한 시간이 길어질수록 단백질 발현율이 초반보다 감소하는 양상을 보였다.

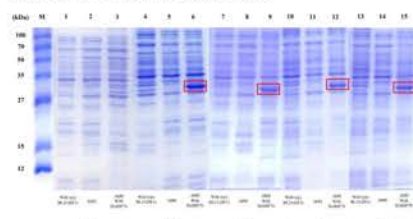


Fig. 7. 25°C에서 배양한 대장균에서 발현된 soluble 재조합 ADH 다른 온도에서의 실험군보다 많은 양의 total 재조합 ADH가 생성된 것에 비해, 대체적으로 적은 양의 수용성 재조합 ADH가 발현되었다.

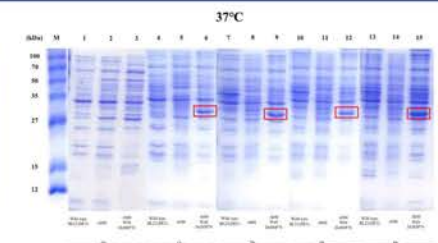


Fig. 5. 37°C에서 배양한 대장균에서 발현된 total 재조합 ADH IPTG 노출 시간이 길어짐에 따라 재조합 ADH의 발현량이 증가하였다. IPTG를 처리하고 3시간까지는 재조합 ADH의 밴드가 눈에 띄지 않으나, 4시간 이후부터 main band로 자리잡았음을 확인할 수 있다.

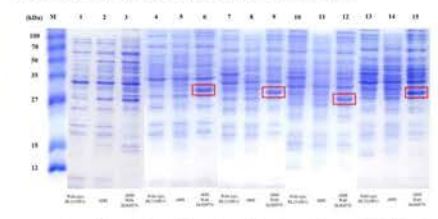


Fig. 8. 37°C에서 배양한 대장균에서 발현된 soluble 재조합 ADH 발현된 재조합 ADH가 대부분 soluble 형태로 생성되었다. 이는 실험군이 대장균의 최적 배양온도에서 배양되어 단백질 발현에 관여하는 다양한 효소와 HSP70이 효과적으로 활성화되어 나타난 결과로 예상된다.

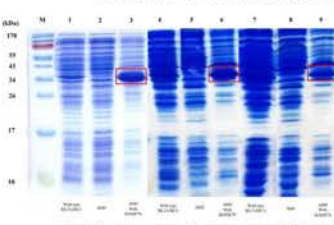


Fig. 9. 16시간 동안 IPTG를 처리하였을 때 배양온도 별 total 재조합 ADH의 발현량 (기준: 37°C에서 4시간 동안 IPTG에 노출시킨 pET11a-6His-ADH in BL21에서 total 재조합 ADH의 발현량) 기준값을 1로 두고 각 실험군의 SDS-PAGE 결과를 수치화하여 나타낸 것으로, 16°C에서 16시간 동안 IPTG를 처리한 실험군에서 재조합 ADH의 우수한 발현을 보였다.

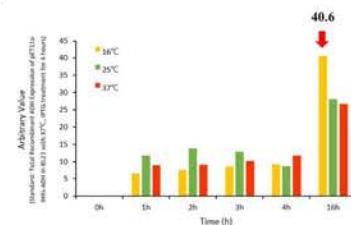


Fig. 10. 각 배양조건에서 total 재조합 ADH의 발현량 (기준: 37°C에서 4시간 동안 IPTG에 노출시킨 pET11a-6His-ADH in BL21에서 total 재조합 ADH의 발현량) 기준값을 1로 두고 각 실험군의 SDS-PAGE 결과를 수치화하여 나타낸 것으로, 16°C에서 16시간 동안 IPTG를 처리한 실험군에서 재조합 ADH의 우수한 발현을 보였다.

## Conclusion

- 본 연구에서는 재조합 단백질의 생산량을 높이기 위해 HSP70을 사용하였음  
→ 분자샤페론인 HSP70은 단백질의 폴딩을 도와 이의 발현율을 높이는 기능을 하기 때문에 모든 실험군 중에서 HSP70으로 형질전환한 실험군에서만 재조합 ADH가 발현되었음
- 실험 결과, 16°C에서 16시간 동안 IPTG를 처리한 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70에서 고온에서 발현율의 약 1.5배에 해당하는 재조합 ADH가 발현되었음  
→ 이는 저온에서 단백질 합성속도가 감소함에 따라 단백질이 올바르게 접힐 수 있는 시간이 증가하였기 때문으로 판단됨
- 본 연구는 재조합 ADH가 많은 산업에서 사용될 수 있는 기반을 마련하였으며, 앞으로 다양한 재조합 단백질 발현을 위한 연구의 바탕이 될 것으로 예상됨

참고문헌

1. Germain L, Rosano and Eduardo A. Ceccarelli, "Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges", *frontiers in MICROBIOLOGY* (review article), Vol. 5, Article 172, 1-17, 2014
2. Chang-Jin Park and Young-Su Seo, "Heat Shock Proteins: A Review of the Molecular Chaperones for Plant Immunity", *The Plant Pathology Journal*, Vol. 31, No. 4, 323-333, 2015
3. Gary Stevens et al., "RedET Recombination: Cloning Without Restriction Enzymes"
4. SIGMA, "Cloning and Expression", pp. 43-44
5. 강현아, 권오석, 오두병, "미생물 산업의 국내외 상품화 경험 및 동향 : 의약품 재조합 단백질 생산", 한국미생물생명공학회지, 2006

## 국문 초록

재조합 단백질은 살아있는 세포에서 재조합 DNA를 발현하여 얻은 단백질로 현재 바이오 의약품, 식품, 농업 등의 다양한 산업에서 사용되고 있으며 많은 자료에서 그 중요성에 관해 언급하였다. 그중에서도 알코올 분해 활성을 가진 ADH는 시력의 유지와 항산화 및 항노화 효능을 가진 레티날의 합성과정에 관여하기 때문에 숙취 해소제품뿐만 아니라 건강 기능식품, 기능성 화장품, 의료용 제제 등에도 유용하게 활용될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 산업적으로 고부가가치를 가지며 그 유용성이 주목받고 있는 ADH를 재조합 단백질의 형태로 생산하고, 이의 최적 발현조건을 탐색하여 산업적 대량생산의 기반을 마련하고자 한다. 또한, 단순히 재조합 ADH의 최적 발현조건을 확립하는 것에서 더 나아가 분자 샤페론인 DcHSP70을 삽입함으로써 산업에 사용 가능한 수용성 재조합 ADH를 생산하고자 한다. 본 연구에서는 대조군으로 Wild type(BL21)을, 실험군으로는 pET11a-6His-ADH in BL21, 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70을 사용하였다. 각 실험군을 16°C, 25°C, 37°C에서 배양하고 O.D<sub>600</sub>≒0.6이 되었을 때 IPTG를 처리하여 1h, 2h, 3h, 4h, 16h 동안 반응시켰으며, 재조합 ADH의 발현은 SDS-PAGE를 통해 확인하였다. 실험결과, 16°C에서 16시간 동안 IPTG에 노출한 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70에서, 기준값의 40배에 달하는 가장 많은 양의 재조합 ADH가 발현되었으며 이는 저온에서 단백질 합성 속도가 감소하여 단백질이 올바르게 접힐 수 있는 시간이 충분하게 제공되어 나온 결과로 예상된다. 본 연구는 재조합 ADH의 최적 발현조건을 통해 이의 산업적 대량생산을 위한 기반을 마련하였다는 데에 의의가 있으며, 이는 앞으로 다른 재조합 단백질을 생산하기 위한 후속 연구의 바탕이 되어 유용하게 사용될 것으로 예상된다.

# 목차

|                                                         |           |
|---------------------------------------------------------|-----------|
| <b>I. 서론</b>                                            | <b>48</b> |
| 1.1 연구 동기 및 필요성                                         | 48        |
| 1.1.1 재조합 단백질 시장 동향                                     | 48        |
| 1.1.2 우리나라의 음주 생활과 숙취                                   | 48        |
| 1.1.3 알코올의 대사과정                                         | 49        |
| 1.1.4 숙취해소제 산업 동향과 기존 숙취 해소제품의 단점                       | 49        |
| 1.1.5 타 산업에서 ADH의 이용 가능성                                | 50        |
| 1.2 연구목표                                                | 50        |
| 1.3 이론적 배경                                              | 50        |
| 1.3.1 재조합 단백질 생산 균주로서 <i>Escherichia coli</i> 의 중요성     | 50        |
| 1.3.2 Heat Shock Protein(HSP)의 기능                       | 51        |
| 1.3.3 상동 재조합 기법과 본 연구에서 사용한 Cell line 소개                | 51        |
| <b>II. 실험 방법</b>                                        | <b>54</b> |
| 2.1 Cell growth curve 작성                                | 54        |
| 2.1.1 균주 접종 및 배양                                        | 54        |
| 2.1.2 균의 성장 측정                                          | 54        |
| 2.2 재조합 ADH 발현 및 추출                                     | 54        |
| 2.2.1 IPTG를 통한 재조합 ADH 단백질 발현 유도 및 cell 추출              | 54        |
| 2.2.2 세포 파쇄 및 단백질 분리(Total, Soluble, Insoluble protein) | 56        |
| 2.3 단백질 정량 및 발현 정도 확인                                   | 56        |
| 2.3.1 단백질 정량                                            | 56        |
| 2.3.2 SDS-PAGE를 이용한 단백질 분리                              | 57        |
| <b>III. 연구 결과 및 고찰</b>                                  | <b>59</b> |
| 3.1 연구 결과                                               | 59        |
| 3.1.1 <i>Escherichia coli</i> 의 Cell growth curve       | 59        |
| 3.1.2 재조합 단백질 발현유도조건에 따른 재조합 ADH의 발현량                   | 60        |
| 3.2 고찰                                                  | 67        |
| 3.2.1 Cell growth curve 분석                              | 67        |
| 3.2.2 재조합 ADH 발현을 위한 최적 배양온도 분석                         | 67        |
| 3.2.3 재조합 ADH 발현을 위한 최적 IPTG 노출 시간 분석                   | 68        |

|                   |    |
|-------------------|----|
| IV. 결론 및 제언 ..... | 70 |
| 4.1 결론 .....      | 70 |
| 4.2 활용방안 .....    | 70 |
| 참고문헌 .....        | 72 |

# I. 서론

## 1.1 연구 동기 및 필요성

### 1.1.1 재조합 단백질 시장 동향

재조합 단백질은 살아있는 세포 내에서 재조합 DNA를 발현하여 얻은 단백질로[1], 생물 체에서 추출하거나 인공적으로 합성한 DNA를 플라스미드나 바이러스 같은 자기 증식성 DNA에 인위적으로 결합하여 세포 내에 도입하는 재조합 기술을 통해 생산된다[2]. 재조합 단백질은 의약품이나 백신과 같이 질병의 치료 및 진단을 위한 도구로 많이 이용되며 [3] 연구의 수단, 기술개발의 도구 및 최종 제품으로도 활용될 수 있다[4]. 이렇게 만들어진 재조합 단백질에는 인슐린, 성장호르몬, 인터페론, Cyclodextrin glucanotransferase, phytase 등이 있다[5, 6].

재조합 단백질은 바이오 의약품에 가장 많이 사용되는데, 바이오 의약품(바이오 시밀러)은 재조합 DNA 기술을 이용하여 미생물·배양조직에서 대량으로 생산한 의약품으로[7] 인슐린과 같은 재조합 단백질 의약품, 항체 의약품, 백신 등을 예로 들 수 있다[8]. 한국 생명공학정책연구센터에서는 글로벌 바이오의약품 시장이 2017년 270.6억 달러에서 2023년에는 442억 달러 규모로 확대되어 연평균 8.6%로 성장할 것이라고 밝혔다(Fig. 1-a)[9]. 이는 재조합 단백질을 활용하는 바이오 의약품 시장의 밝은 전망을 보여주는 자료로, 이를 통해 간접적으로 재조합 단백질 시장의 성장세를 엿볼 수 있다.



Fig. 1. (a) Current Status and Prospects of the Global Bio-Medicine Market, (b) Outlook of Recombinant Protein Market

최근 바이오 의약품뿐만 아니라 식품, 농업을 포함한 기타 산업에서도 재조합 단백질의 이용성이 점차 증가하고 있다[4]. 삼성경제연구소에서는 미래 유망 신사업에 재조합 단백질 산업을 선정하였으며[4], 시장조사기관 Mordor Intelligence에서도 앞으로 재조합 단백질 산업이 성장할 것이라고 발표한 바 있다(Fig. 1-b)[10]. 이는 재조합 단백질이 여러 산업에서 부가가치를 창출해 낼 수 있는 중요성을 지니고 있음을 보여준다.

### 1.1.2 우리나라의 음주 생활과 숙취

농경 생활이 시작되면서부터 곡물을 이용한 곡주를 시작으로 술에 관한 관심은 꾸준히 증가해왔다[11]. 보건복지부의 자료에 따르면, 2008년부터 2017년까지 한국인의 월간

음주율은 점차 증가하는 경향을 보였다[12]. 또한, 식품의약품안전처에서 조사한 ‘우리나라 국민의 17년 주류 소비·섭취 실태’에서는 많은 사람이 고위험 음주를 즐기며 음주 시, 음주자 본인이 생각하는 적정 음주량보다 더 많이 섭취한다고 밝혔다[13]. 이러한 것들로 보아 술은 한국인의 생활에서 적지 않은 부분을 차지하고 있다고 할 수 있다.

한편, 우리나라의 주류 문화가 발달함에 따라 숙취 해소를 위한 관심도 나날이 증가하고 있다. 숙취란 알코올이 포함된 음료를 복용하고 수면에서 깬 후에 육체적 또는 정신적으로 느껴지는 불쾌감이 지속되는 것을 의미한다[14]. 숙취는 알코올음료를 자신의 대사 능력 이상으로 섭취하였을 때 발생하며 주요 증상으로는 두통, 구토, 집중력과 단기 기억력 저하 등이 있다. 이처럼 숙취는 고통을 동반하기 때문에, 숙취 해소를 위한 다양한 연구들이 활발히 진행되고 있다.

### 1.1.3 알코올의 대사과정

체내에 유입된 알코올은 간에서 두 단계에 걸쳐 물과 이산화탄소로 대사된다. 이 과정에서 중간산물로 아세트알데하이드가 생성되는데, 이는 세계보건기구(WHO)에서 규정한 1급 발암물질이자 숙취를 일으키는 주요 원인이다[15]. 아세트알데하이드는 아세트알데하이드탈수소효소(ALDH)에 의해 분해되는데, ALDH에는 아세트알데하이드 처리능력이 좋은 정상형 ALDH와 비교적 활성도가 낮아 결과적으로 높은 체내 아세트알데하이드 농도를 유발하는 비활성형 ALDH가 있다[16]. 한국인을 포함한 동양인의 경우 약 30~50%의 높은 비율로 비활성형 ALDH를 가지기 때문에[17] 혈중알코올농도를 감소시켜 빠르게 숙취를 제거할 수 있는 보조적인 수단이 필수적이라고 할 수 있다.

### 1.1.4 숙취해소제 산업 동향과 기존 숙취 해소제품의 단점

숙취 해소를 위한 대표적인 해결책 중의 하나는 숙취해소제이다. 숙취 해소에 관한 관심도와 비례하여 숙취해소제 시장은 점차 성장해왔다. 시장조사기관 닐슨코리아에서는 국내 숙취해소제 시장 매출 규모는 2015년부터 2017년까지 3년간 약 15% 성장했으며, 2019년에는 그 규모가 3000억 원대에 달할 것이라고 밝혔다[18, 19]. 또한, 숙취 회복도 일종의 능력으로 평가받는 사회적 분위기에 따라 건강기능식품으로써 숙취해소제의 수요가 꾸준히 증가할 것으로 판단되기 때문에, 숙취 해소를 위한 일환으로 숙취해소제를 개발한다면 그 산업은 고부가가치를 창출해 많은 이윤을 가져올 수 있을 것으로 보인다.

시중에 나와 있는 숙취해소제의 원리는 크게 두 가지이다. 첫 번째는 알코올의 체내 흡수를 억제하는 것이다. 숙취해소제에 포함된 ‘글루메이트’ 성분은 알코올과 결합해 알코올의 화학구조를 변화시켜 체내에 알코올이 흡수되는 것을 저해한다[20]. 두 번째는 알코올을 빠르게 분해하여 체내 흡수를 막는 것이다. 숙취해소제에 포함된 일부 물질들은 간 기능의 활성도를 높여 알코올 분해효소인 ADH와 ALDH의 활성을 촉진한다[21]. 결과적으로 ADH와 ALDH에 의해 체내에 잔류하는 알코올 성분을 최소화함으로써 숙취를 예방하는 것이다. 현재 개발된 대부분의 숙취 해소제품은 후자의 원리를 이용한다[22]. 하지만 이 부류의 숙취해소제는 숙취 해소 효과가 미비하며 심한 갈증을 유발한다는 단점이 뒤따른다[23]. 따라서 간 기능 향상을 통해 알코올 분해효소의 기능을 촉진하기보다 알코올 분해효소를 숙취 해소제품의 직접적인 원료로 사용하여 이러한 단점을 극복할 필요가 있다고 생각된다.

한편, 혈중 당류의 부족은 숙취를 유발하므로[24] 시중에 나와 있는 대부분의 숙취해소제에는 다량의 설탕이 함유되어 있다. 하지만 설탕 함유량이 높은 제품은 당뇨병 환자나 대사증후군 환자 및 비만 환자에게 악영향을 끼칠 수 있다. 따라서 충분한 양의 숙취 해소물질이 함유되어 당 함량을 감소시킬 수 있는 숙취해소제 개발의 필요성이 제기된다.

#### 1.1.5 타 산업에서 ADH의 이용 가능성

ADH는 숙취 해소제품뿐만 아니라 다양한 산업에 이용된다. ADH는 비타민 A의 한 형태인 레티놀을 효과적으로 레티날로 전환시킨다[25]. 레티날은 망막 내에서 옵신과 결합하여 로돕신을 구성함으로써 정상적인 시력 유지에 관여한다[26]. 또한, 레티날은 항염증, 항산화 및 항노화의 효능이 있는 것으로 알려져 기능성 화장품의 원료로도 사용된다[27]. 따라서 숙취 해소제품의 원료 물질로 ADH를 생산한다면, 이는 숙취해소제뿐만 아니라 건강 기능식품, 사료 첨가제, 의료용 제제 등 다양한 분야에서 핵심적인 기능을 가진 물질로 활용될 수 있을 것으로 생각된다.

따라서 본 연구에서는 숙취 해소제품의 원료로 알코올 분해효소인 ADH를 대장균을 이용하여 고부가가치를 가진 재조합 단백질의 형태로 생산하고 이와 더불어 ADH가 건강보조제, 의료용 약품 등 여러 방면에서 활용될 수 있는지 알아보려고 한다. 이는 현재까지 개발된 숙취 해소제품의 한계점을 극복하여 다양한 소비자들의 욕구를 충족시킬 수 있으며, 동시에 숙취해소제 산업의 발전에도 크게 기여할 수 있을 것이다.

### 1.2 연구목표

ADH는 알코올 분해효소로서 체내에 독소로 작용하는 알코올을 분해해주어[28] 음주 후 많은 이들의 숙취를 덜어줄 수 있다. 또한, ADH는 눈 건강 유지에 도움을 주는 레티날[29]을 생산하는 과정에 관여하기도 한다[30]. 어떤 효소가 인간에게 유용한 기능을 많이 가졌다고 하더라도 대량생산이 불가능하다면 그 효과를 충분히 누리기 어려울 것이다. 따라서 본 연구에서는 일차적으로 많은 양의 ADH를 생산할 수 있는 조건을 최적화하고자 한다. 우선 대장균에 목표 유전자인 ADH 유전자를 도입하여 균의 배양온도와 IPTG 노출 시간을 달리한 조건에서 균을 배양하고, 재조합 단백질의 발현량을 확인함으로써 ADH의 산업적 대량생산의 기반을 마련하고자 한다.

효소를 대량생산할 수 있는 조건이 모두 갖춰졌다고 하더라도 그 효소가 불용성 단백질로 이루어져 있다면 이 또한 무용지물일 것이다. 따라서 본 연구에서는 단순히 ADH의 대량생산을 위한 조건을 확립하는 것에서 더 나아가 사용 가능한 수용성 재조합 단백질의 발현 최적 조건을 탐색하고자 한다. SDS-PAGE를 이용하여 각각의 조건에서 배양된 균이 생산한 수용성 및 불용성 재조합 단백질의 양을 측정함으로써 재조합 ADH가 숙취 해소제품, 건강 기능식품, 의료용 제제 등 산업적으로 이용될만한 가치를 가졌는지 평가해보고자 한다.

### 1.3 이론적 배경

#### 1.3.1 재조합 단백질 생산 균주로서 *Escherichia coli*의 중요성

클로닝 기술을 통해 생산된 재조합 단백질은 주로 미생물에서 그 생산 수준을 증가시킬 수 있다[3]. 이러한 재조합 단백질의 생산 과정에서 미생물은 특정한 유전자나 DNA 조각

을 선택적으로 증폭시키기 때문에 본래 세포에서보다 많은 양의 유용 단백질을 얻을 수 있다[31]. 재조합 단백질을 생산하는 데 있어서 적절한 발현 숙주를 선택하는 것은 매우 중요하다. 재조합 단백질의 생산에는 동물, 식물, 효모 등 다양한 생물들이 사용되고 있으나, 현재 재조합 단백질 생산에 가장 많이 사용되고 있는 대표적인 산업 미생물은 대장균 (*Escherichia coli*)이다[32].

대장균은 배양 조건이 간단하고 성장 속도가 빨라 산업적 배양 시 유리하며, 유전자 조작이 용이하고 비교적 많은 양의 재조합 단백질을 생산할 수 있어서 가장 많이 선호되는 발현 숙주 중의 하나이다[32, 33]. 그중에서도 B strain에 속하는 BL21은 외부 단백질을 분해하는 효소인 Lon protease와 ompT를 가지고 있지 않아 생산된 재조합 단백질의 안정성을 보장할 수 있다[34]. 또한, BL21에 존재하는 hsdSB 돌연변이는 세포분열 중에 플라스미드가 손실되거나 손상되는 것을 방지해주므로[35] 본 연구에서 사용하고자 하는 BL21은 재조합 단백질 발현에 적합한 미생물이며 대장균을 이용한 재조합 단백질의 생산이 경제적 및 효율적인 측면에서 유리하다고 판단된다.

### 1.3.2 Heat Shock Protein(HSP)의 기능

Heat Shock Protein(HSP)은 세균에서부터 고등 동식물을 포함한 모든 생명체에 존재하며, 생물체 내에서 다양한 기능을 수행하는 분자 샤페론이다[36]. 이는 단백질의 올바른 접힘을 유도함으로써 단백질이 응집되어 기능이 망가지는 것을 방지하고, 거대 단백질의 결합과 해체를 돕는다[36]. HSP는 세포 내에서 10~100kDa의 다양한 크기로 존재하며 크기에 따라 부가적인 기능에 차이가 있다. HSP100은 손상된 폴리펩타이드를 분해하고 HSP60은 자가면역에 관여하며, sHSP는 열에 의한 단백질의 응집을 방지한다[37]. 그중에서도 HSP70은 단백질의 접힘을 돕고 봉입체가 생기는 것을 방지하여 단백질의 수용성을 증가시킬 뿐만 아니라 단백질이 이동하는 동안 이를 보호하여 적절한 위치에 사용될 수 있도록 해준다(Fig. 2)[36]. 특히, HSP70은 생물학적 스트레스 조건에서 생물이 성장하는 데 그 기능이 필수적이라고 알려져 있다[38].

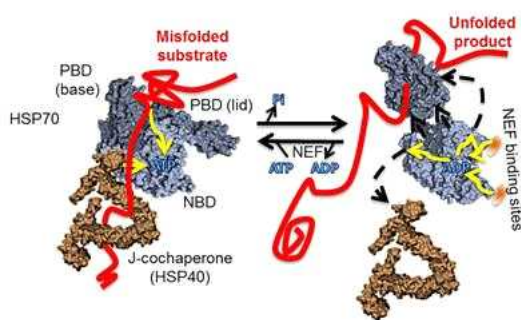
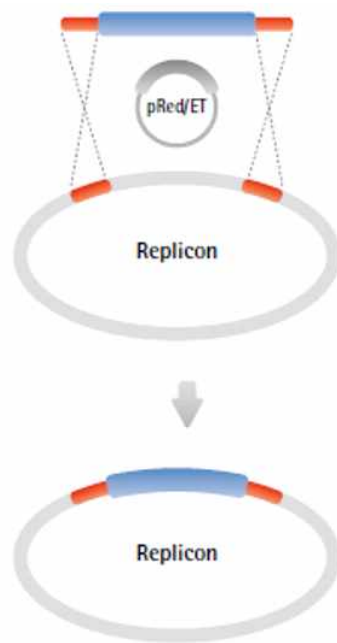


Fig. 2. Structure and Working Mechanism of HSP70

### 1.3.3 상동 재조합 기법과 본 연구에서 사용한 Cell line 소개

Red/ET Recombination은 대장균 내에서 Rac prophage 유래의 truncated RecE-T 또는 coliphage  $\lambda$  Red system 유래의 Red $\alpha\beta\gamma$ 에 의해 선형의 vector 조각과 원형의 DNA 사이에 재조합이 일어나는 상동 재조합 기반의 기술이다(Fig. 3)[39]. 기존의 유전자

조작 기술은 삽입하려는 DNA의 크기 제한이 있어 비교적 작은 크기의 DNA만 삽입할 수 있는 반면에, Red/ET Recombination 기술을 이용하면 restriction sites와 무관한 거대 유전자의 조작이 가능하여 원하는 DNA의 삽입이 쉬워진다[40]. 또한, 이는 기존의 클로닝 방법보다 더 빠르고 돌연변이가 적다는 장점이 있어[40] 분자생물학을 포함한 여러 분야에서 광범위하게 사용되고 있다.



**Fig. 3. Red/ET Homologous Recombination**

본 연구에서는 앞서 말한 Red/ET Recombination 상동 재조합 기법으로 대장균 유전체의 *yddE* pseudogene (NCBI accession no.: NC\_012971.2) 내부에 *Daucus carota*의 HSP70 유전자를 삽입하여 만든 형질전환 대장균 cell line을 사용하였으며, HSP70 유전자를 발현하기 위한 프로모터로는 Lipoprotein(*Lpp*) promoter가 사용되었다(Fig. 4-a, b). *Lpp* promoter은 뒤에 있는 유전자를 상시로 발현하는 특징을 가진다. 또한, *NheI*과 *BamHI* 제한효소로 절단한 pET11a 발현 벡터에 발현하고자 하는 목적 단백질인 재조합 ADH 유전자를 도입하여 이를 형질전환 대장균에 삽입하였다(Fig. 4-c). 최근, 선행연구에서 HSP70을 발현하는 형질전환 대장균 cell line이 일반 BL21보다 빠른 생장률과 높은 총 세포 중량을 보였다는 것이 발표된 바 있으므로, 본 연구에서도 높은 성장률을 기반으로 한 재조합 단백질의 대량생산과 수용성 향상을 위해 HSP70 형질전환 대장균 cell line을 사용하였다.

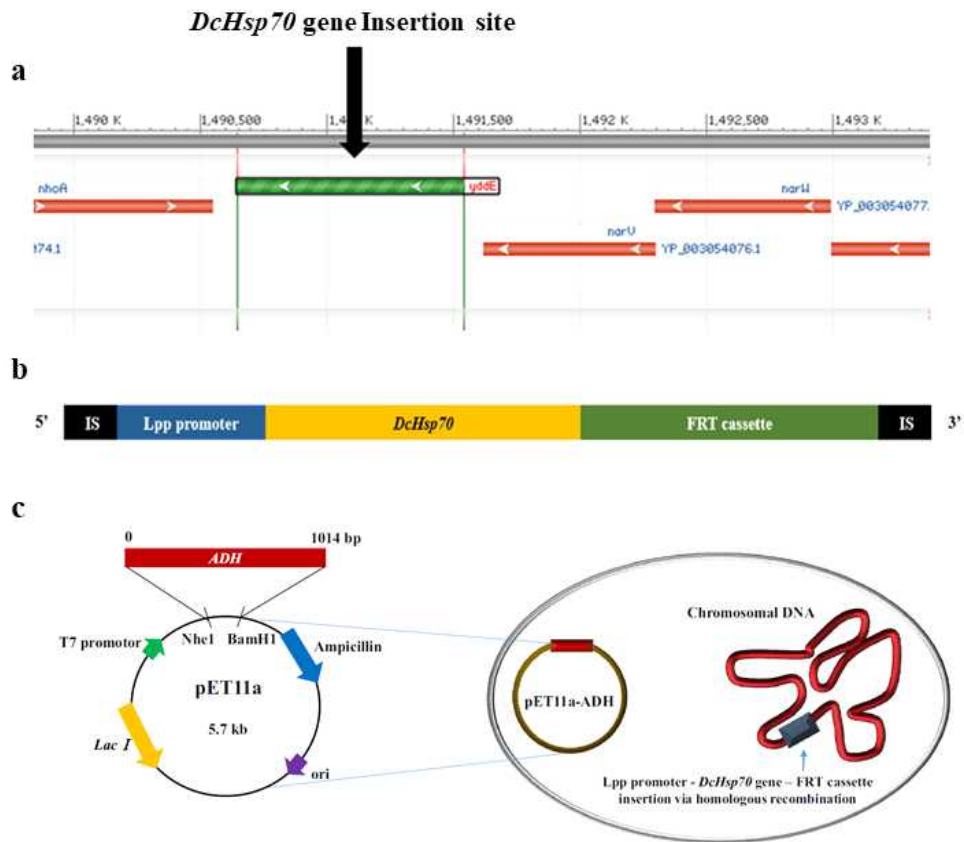


Fig. 4. Transgenic information used in this study (a: Insertion site of *DcHsp70* genes in *E. coli* genome, b: Schematic diagram of the *LPP* promoter-*DcHsp70*-FRT cassette template, c: Transgenic *E. coli* cell lines used in this study)

## II. 실험 방법

### 2.1 Cell growth curve 작성

#### 2.1.1 균주 접종 및 배양

본 연구에 사용한 균주는 Wild type(BL21)과 pET11a-6His-ADH in BL21, 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70으로 총 3가지이다. 모든 균주는 500 $\mu$ l의 균에 80% glycerol 200 $\mu$ l을 첨가하여 -80°C에 동결 보관하면서 실험 전, 액체 Luria-Bertani(LB) 배지 20ml에 100 $\mu$ l의 균을 접종하고 배양온도 37°C, 130rpm의 교반 조건에서 14~16시간 전배양하여 사용하였다.

#### 2.1.2 균의 성장 측정

미생물을 이용한 실험에서 성장곡선은 균의 활성도와 같은 세포의 생리적 상태에 관한 정보를 제공해주기 때문에 세포 성장곡선의 작성은 필수적이라고 할 수 있다. 본 연구에서는 시험 균주의 성장곡선 작성을 위한 미생물의 농도 측정에 탁도 측정법[41]을 사용하였다. 전배양된 각 균주 배양액을 40ml LB 배지가 든 삼각 플라스크에 최종 농도가 0.1%가 되도록 접종하고 shaking incubator(Fig. 5-a)에서 37°C, 225rpm의 조건으로 배양하여 실험에 사용하였다. 균의 성장률은 spectrophotometer(Fig. 5-b)를 이용하여 600nm에서 배양액으로 흡광도를 측정하여 확인하였으며, 1시간마다 총 8번 반복하여 실시하였다.

또한, IPTG를 처리하였을 때의 성장곡선을 작성하였다. O.D<sub>600</sub>≒0.6이 되었을 때, 0.5mM의 IPTG를 첨가하고 위와 같은 방식으로 흡광도를 측정하였다. Blank로는 배양액 대신 LB 배지를 사용하였으며, 모든 과정은 실험결과의 정확성을 위해 총 3번 반복하였다.

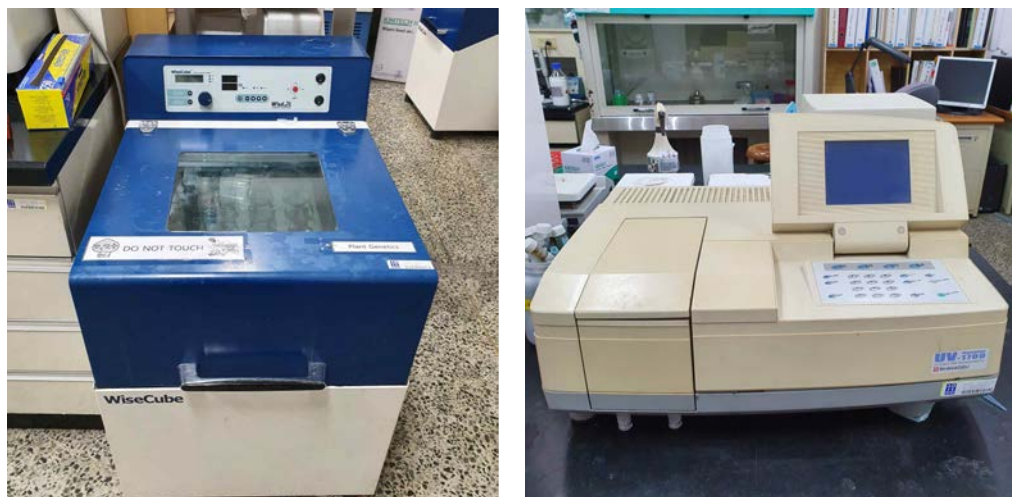


Fig. 5. (a) Shaking Incubator, (b) Spectrophotometer

### 2.2 재조합 ADH 발현 및 추출

#### 2.2.1 IPTG를 통한 재조합 ADH 단백질 발현 유도 및 cell 추출

원하는 시기에 특정 유전자의 발현을 유도하는 데에는 promoter와 직접적 및 간접적인 상호작용이 가능한 유도물질이 사용된다[42]. 이러한 유도물질에는 대표적으로 Isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside(IPTG), Tetracycline, Allolactose 등 여러 가지가 있는데[42], 본 연구에서는 단백질의 발현 정도를 알아보기 위한 물질로 IPTG를 사용하였다. IPTG는 젓당 분해 억제 단백질인 lac repressor와 결합하여 이를 저해함으로써 lac operon 내의 유전자를 발현할 수 있게 한다[42]. IPTG는 allolactose와 분자적으로 유사하지만, lac repressor와 결합한 후에 분해되는 allolactose와는 달리 세포 내에서 분해되지 않고 일정한 농도를 유지해 지속적으로 유전자를 발현할 수 있게 한다[42, 43].

본 실험에서는 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70과 pET11a-6His-ADH in BL21을 실험군으로 설정하였으며, 단백질 발현을 위한 IPTG 처리는 다음과 같은 방식으로 진행하였다. Cell growth curve를 작성할 때와 마찬가지로 균을 배양하고 O.D<sub>600</sub>≒0.6이 되면, 0.5mM의 IPTG를 배지 전체 질량의 0.1% 농도가 되도록 처리하였다. 본 과정은 재조합 ADH의 최적 발현조건을 확인하기 위해서 조건을 달리하여 여러 번 진행하였다. 우선 배양온도에 따른 단백질 발현의 차이를 알아보기 위해 균의 배양온도를 16°C, 25°C, 37°C로 다르게 설정하였다. 또한, IPTG에 노출되는 시간에 따른 차이를 확인하기 위해 IPTG 처리 후 1h, 2h, 3h, 4h, 16h 동안 균을 배양하였으며 IPTG를 처리하지 않은 실험군(0h)도 두었다. 모든 실험군의 배양이 완료되면 4°C, 2500rpm에서 10분간 원심분리하여 상층액은 제거하고 남은 pellet은 -80°C에 동결 보관하였다.

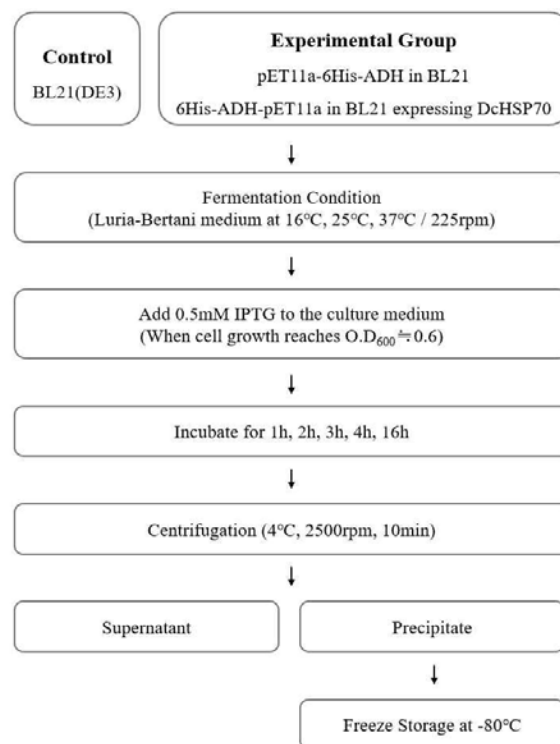


Fig. 6. Schematic diagram of Experiment 2.2.1

### 2.2.2 세포 파쇄 및 단백질 분리(Total, Soluble, Insoluble protein)

동결 보관해두었던 pellet에 *E. coli* protein extraction buffer 3ml를 넣어 pellet을 잘 풀어주었다. Protein extraction buffer는 300mM NaCl 4.5ml와 25mM Tris HCl 375 $\mu$ l, 3mM  $\beta$ -mercaptoethanol 3.75 $\mu$ l를 넣고 total volume이 15ml가 되도록 D.W.를 첨가하여 제조하였다. 그 후 sonicator를 사용하여 세포를 파쇄시켜 단백질을 추출하였다. Sonication 된 시료는 e-tube에 옮겨 담아 4°C, 13,000rpm에서 30분간 원심분리하였고 원심분리 후에 생성된 상층액은 conical tube에 보관하였다. 이 과정에서 생긴 상층액에는 total protein이 포함되어있다. 이 상층액을 e-tube에 한 sample 당 200 $\mu$ l씩 옮겨 담아 4°C, 13,000rpm에서 1시간 동안 원심분리를 진행하였다. 원심분리 후 상층액을 취하여 e-tube에 담아두고, pellet에는 앞서 사용한 것과 동일한 buffer 200 $\mu$ l를 넣어 풀어주었다. 이때 상층액과 pellet에는 각각 soluble protein과 insoluble protein이 포함되어있다.

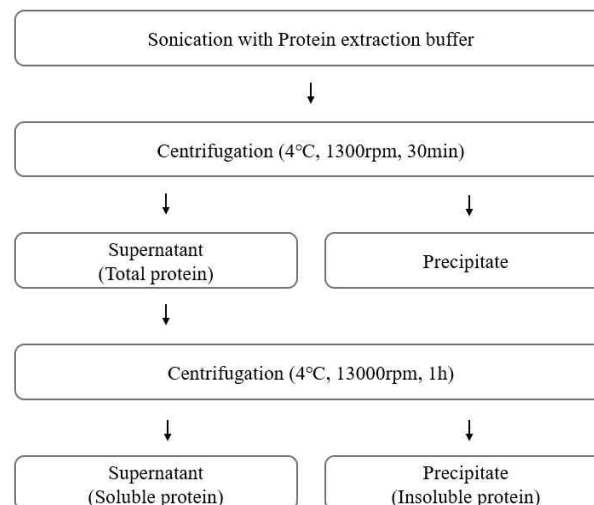


Fig. 7. Schematic diagram of Experiment 2.2.2

## 2.3 단백질 정량 및 발현 정도 확인

### 2.3.1 단백질 정량

생물학 및 생화학적 실험에서 단백질의 농도를 빠르고 정확하게 측정하는 것은 필수적이다. 단백질 정량법에는 biuret 정량법, Lowry 정량법, BCA 정량법 등 여러 가지가 있으나[44] 본 실험에서는 Bradford 정량법을 사용하여 단백질의 발현량을 확인하였다. Bradford 정량법은 Coomassie brilliant blue G-250(CBBG) 염료가 단백질의 양전하를 띤 아미노산 잔기(Arg, Lys, His)와 결합할 때 고유 최대 흡광 파장이 변화하는 것을 이용하는 방법이다[44, 45]. 염료가 비 결합 형태로 존재할 때의 최대 흡수 파장은 650nm(녹색)와 465nm(붉은색)이지만, 아미노산과 결합하면 최대 흡수 파장이 595nm(파란색)로 이동한다[46]. 따라서 595nm에서 흡광도의 증가는 단백질과 결합한 염료의 양을 나타내고, 이는 샘플 내에 존재하는 단백질의 양을 의미한다[46]. 다른 단백질 정량법과는 달리, Bradford 정량법은 염료의 민감도가 높아 단백질과 잘 반응하며 시료에 존재할 수 있

는 다른 화학물질에 의한 간섭에 덜 민감하다[46].

각각의 시료(Total protein, Soluble protein, Insoluble protein) 5 $\mu$ l에 NaCl 95 $\mu$ l와 Bradford 시약 1ml를 넣고 vortexing 하여 상온에서 2분간 반응시킨 후 spectrophotometer로 595nm에서 흡광도를 측정하였다. Blank에는 샘플 대신 D.W.를 1ml 넣어주었다.

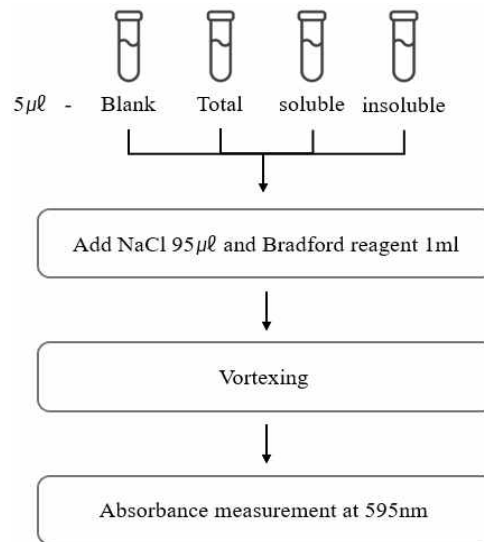


Fig. 8. Schematic diagram of Experiment 2.3.1

측정한 O.D값( $y$ )으로부터 아래의 standard curve 식을 이용하여 샘플에 포함된 단백질의 양( $x$ )을 구하였다. 표준물질은 Bovine Serum Albumin(BSA) 0.5mg/ml를 이용하였다.

$$y = 0.1127x - 0.0932$$

또한, SDS-PAGE에 필요한 샘플의 양( $z$ )은 아래의 식을 이용하여 계산하였다.

$$z = (30 \div x)$$

### 2.3.2 SDS-PAGE를 이용한 단백질 분리

오늘날의 단백질학 연구는 단백질의 발현과 기능 및 조절 작용, 다른 단백질과의 상호작용, 결합 등에 집중하여 분자 생화학적으로 단백질 간의 기능과 상호관계를 규명하는 것에 목표를 둔다[47]. 이러한 것들을 규명하기 위해서는 일차적으로 단백질의 분리 및 동정을 할 수 있어야 하는데, 이를 가능하게 하는 가장 대표적인 방법이 SDS-PAGE(Sodium Dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)이다[47]. SDS-PAGE는 분자유전학 등에 이용되는 단백질 분리 기술로, gel에 첨가되는 SDS에 의해 단백질의 소단위체가 분리되어 단백질의 접힘 구조에 따른 이동속도와 관계없이 분자량의 차이에 따라 단백

질을 분리할 수 있다[48].

본 실험에서는 재조합 ADH의 발현을 확인하기 위해 Laemmli(1970)의 방법으로 SDS-PAGE를 수행하였다. Gel의 조성은 Table 1에 나타내었으며 stacking gel의 농도는 5%, separating gel의 농도는 17%의 acrylamide로 제조하였다. 1.5ml e-tube에 dye 5 $\mu$ l와 일정량의 샘플(z)을 넣고 Protein extraction buffer를 이용하여 총 volume 25 $\mu$ l를 맞춰주었다. 이렇게 만들어진 시료에 85°C에서 5분간 열을 가해준 후, 미리 제조한 acrylamide gel에 marker 25 $\mu$ l와 함께 loading하여 150V에서 2시간 동안 전기영동하였다. 전기영동 한 gel은 Commassie Brilliant Blue(CBB)로 6시간 염색하고 탈색용액은 Destaining buffer(methanol 450ml, D.W. 450ml, acetic acid 150ml)을 이용하여 탈색하였다.

**Table 1. Composition and condition in SDS-PAGE Gel**

| Component                      | Stacking gel              | Running gel              |
|--------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| D.W. (ml)                      | 2.85                      | 1.7                      |
| Acrylamide (ml)                | 0.85                      | 5.7                      |
| Gel buffer (ml)                | 0.5M Tris-HCl buffer 1.25 | 1.5M Tris-HCl buffer 2.5 |
| SDS ( $\mu$ l)                 | 50                        | 100                      |
| Ammonium persulfate ( $\mu$ l) | 25                        | 50                       |
| TEMED <sup>3)</sup> ( $\mu$ l) | 5                         | 5                        |

3) TEMED: N'N'N-Tetramethylethylendiamine

### Ⅲ. 연구 결과 및 고찰

#### 3.1 연구 결과

##### 3.1.1 *Escherichia coli*의 Cell Growth curve

대장균에서 재조합 ADH 단백질을 발현하기에 앞서, 균의 활성도와 세포의 생리적 상태를 안정화하여 재조합 단백질을 효율적으로 생산하고자 균의 성장률을 측정하였다. 모든 실험은 결과의 정확성을 위해 3번 반복하여 진행하였다.

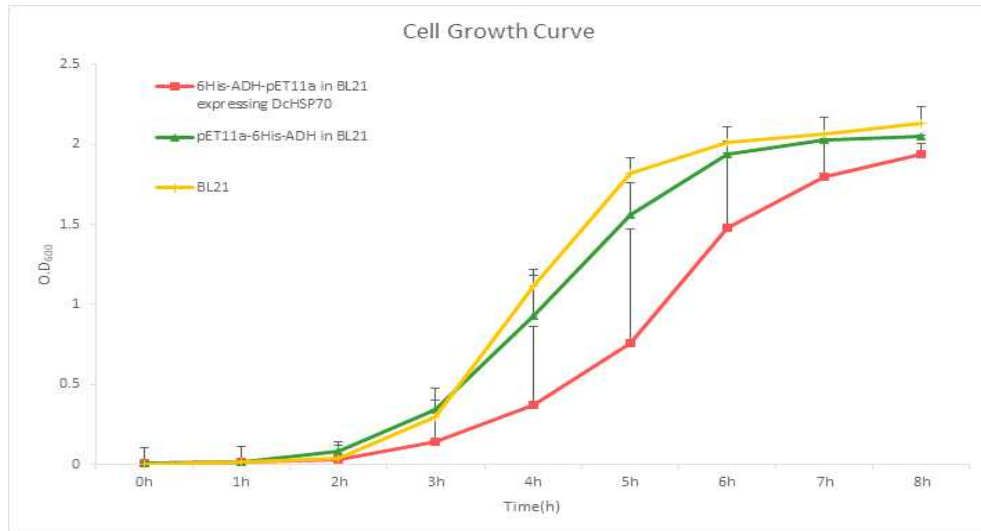


Fig. 9. Cell growth curve following without IPTG treatment in *E. coli* with different transgenic

IPTG를 처리하지 않았을 때의 Wild type(BL21)과 pET11a-6His-ADH in BL21, 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70의 세포 성장곡선이다. 모든 실험군에서 세균의 성장곡선과 비슷한 경향의 성장률이 관찰되었다.

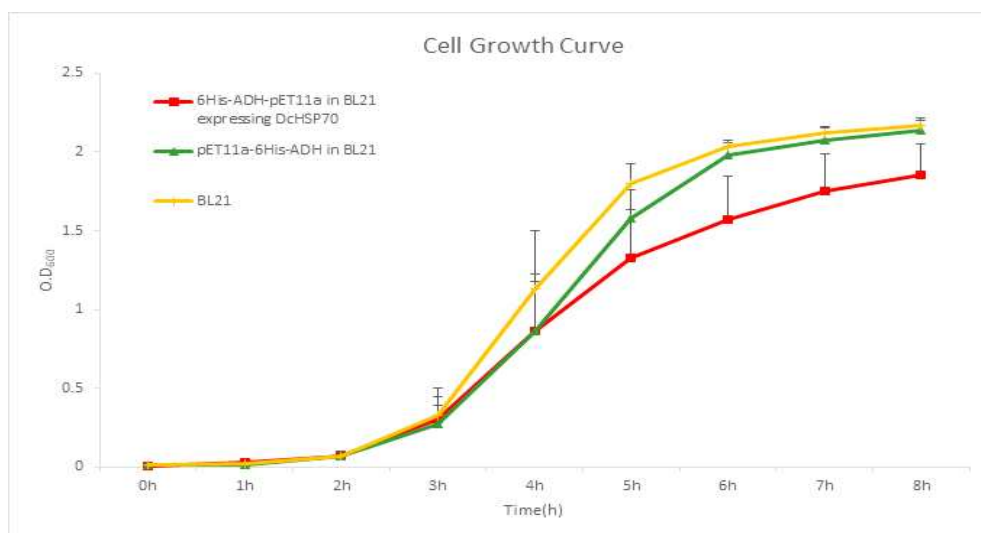


Fig. 10. Cell growth curve following IPTG treatment in *E. coli* with different transgenic

실험군마다  $O.D_{600} \approx 0.6$ 일 때, IPTG를 처리하여 Wild type(BL21)과 pET11a-6His-ADH in BL21, 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70의 성장을 측정하였다. BL21이 가장 잘 자랐으며 그다음은 pET11a-6His-ADH in BL21, 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 순으로 성장하였다.

### 3.1.2 재조합 단백질 발현유도조건에 따른 재조합 ADH의 발현량

배양온도와 IPTG 처리 시간 등 재조합 단백질의 발현유도조건에 따른 재조합 ADH의 발현량을 SDS-PAGE로 확인하였다. 각각의 SDS-PAGE 결과에서 첫 번째 line에는 Marker를 나타내었고, 그 이후의 Line 별 로딩한 sample의 순서는 Table 2에 나타내었다. 발현을 확인하고자 하는 목적 단백질인 재조합 ADH는 각 Figure에 표시하였다.

Table 2. Samples Loaded by Lane of Figure 11~19

| Line | IPTG treatment time | Sample                                     |
|------|---------------------|--------------------------------------------|
| 1    | 0h                  | Wild type(BL21)                            |
| 2    |                     | pET11a-6His-ADH in BL21                    |
| 3    |                     | 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 |
| 4    | 1h                  | Wild type(BL21)                            |
| 5    |                     | pET11a-6His-ADH in BL21                    |
| 6    |                     | 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 |
| 7    | 2h                  | Wild type(BL21)                            |
| 8    |                     | pET11a-6His-ADH in BL21                    |
| 9    |                     | 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 |
| 10   | 3h                  | Wild type(BL21)                            |
| 11   |                     | pET11a-6His-ADH in BL21                    |
| 12   |                     | 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 |
| 13   | 4h                  | Wild type(BL21)                            |
| 14   |                     | pET11a-6His-ADH in BL21                    |
| 15   |                     | 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 |

#### ① 16°C의 배양온도에서 재조합 ADH의 발현량

16°C에서 배양한 대장균을 이용하여 600nm에서 측정한 흡광도가 약 0.6이 되었을 때, 0.5mM의 IPTG를 배지 전체 질량의 0.1%가 되도록 첨가하였다. 각 실험군은 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 동안 IPTG에 노출되었으며, IPTG를 처리하지 않은 실험군도 두었다. 대장균 세포로부터 추출한 단백질은 total, soluble, insoluble protein으로 분리하여 각각 SDS-PAGE를 진행하였다.

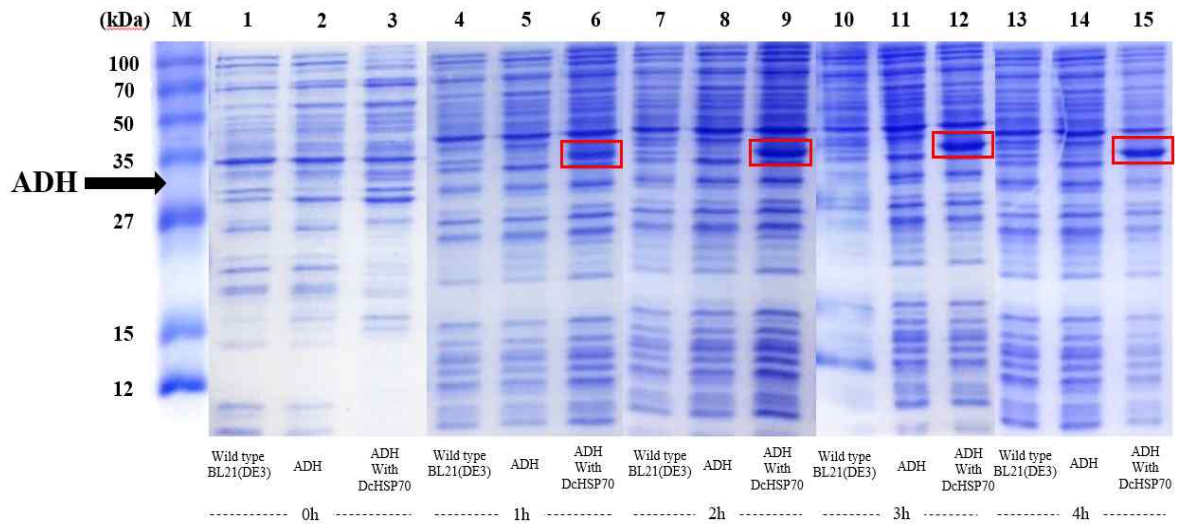


Fig. 11. Total Recombinant ADH expressed when *E. coli* was Incubated at 16°C

16°C의 배양온도에서 IPTG 노출 시간을 달리하였을 때, 재조합 ADH의 발현량을 확인하였다. IPTG를 처리하지 않았을 때는 재조합 ADH의 발현이 나타나지 않았다. 반면, IPTG를 처리하였을 때는 IPTG에 노출된 시간이 길어짐에 따라 재조합 ADH의 발현량도 증가하는 모습을 보였다.

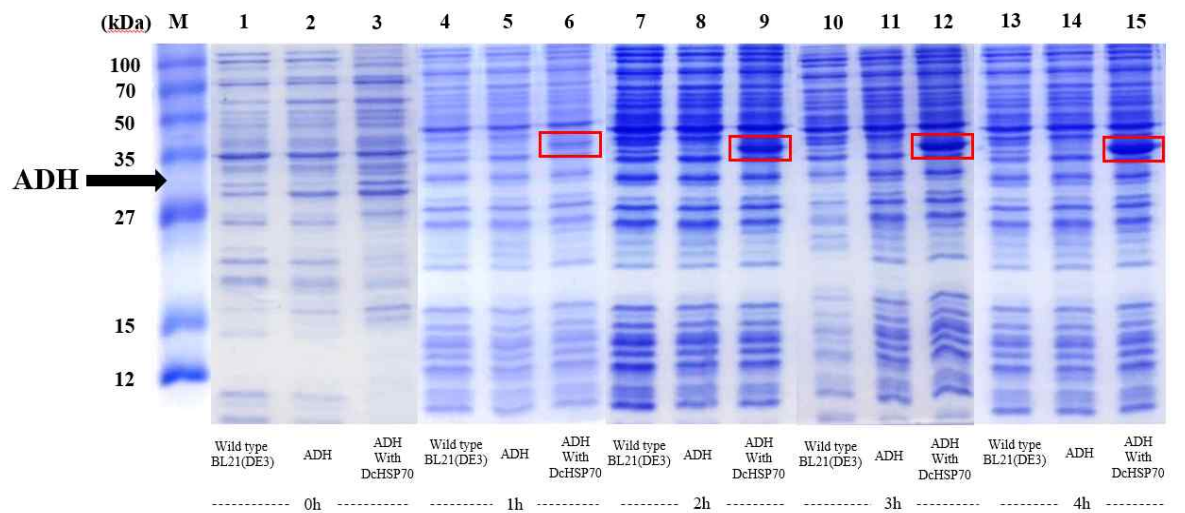


Fig. 12. Soluble Recombinant ADH expressed when *E. coli* was Incubated at 16°C

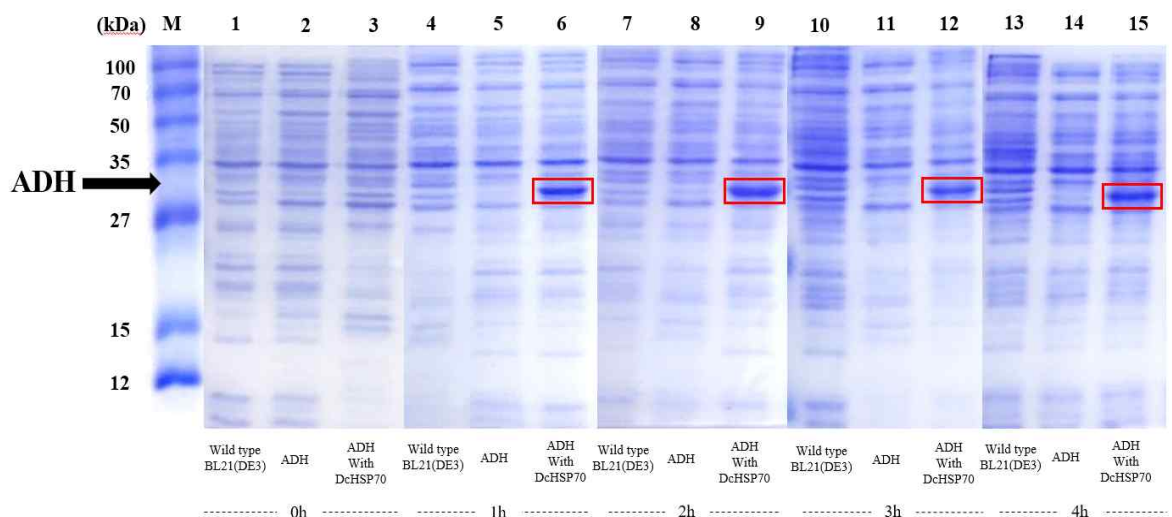
16°C에서 균을 배양하고 IPTG 노출 시간에 차이를 두었을 때, 수용성 재조합 ADH의 발현 정도를 SDS-PAGE로 확인하였다. IPTG 처리 시간이 길어질수록 수용성 재조합 ADH의 발현량도 증가하였다.



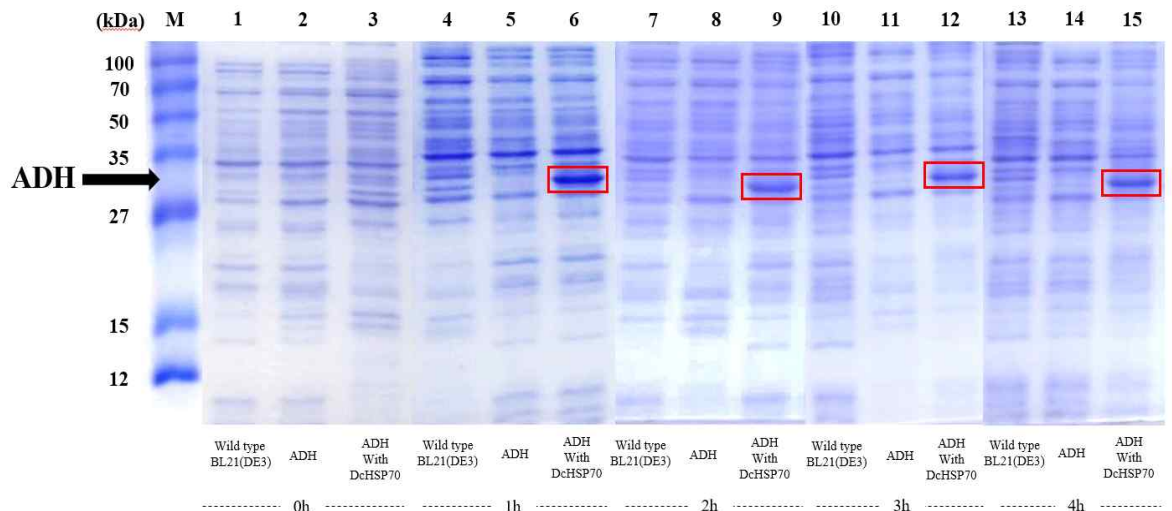
**Fig. 13. Insoluble Recombinant ADH expressed when *E. coli* was Incubated at 16°C**  
 16°C에서 IPTG 노출 시간에 따른 불용성 재조합 ADH의 발현량을 확인하였다. IPTG 처리 3시간 이후부터 불용성 상태의 재조합 ADH가 급격히 증가하였다.

## ② 25°C의 배양온도에서 재조합 ADH의 발현량

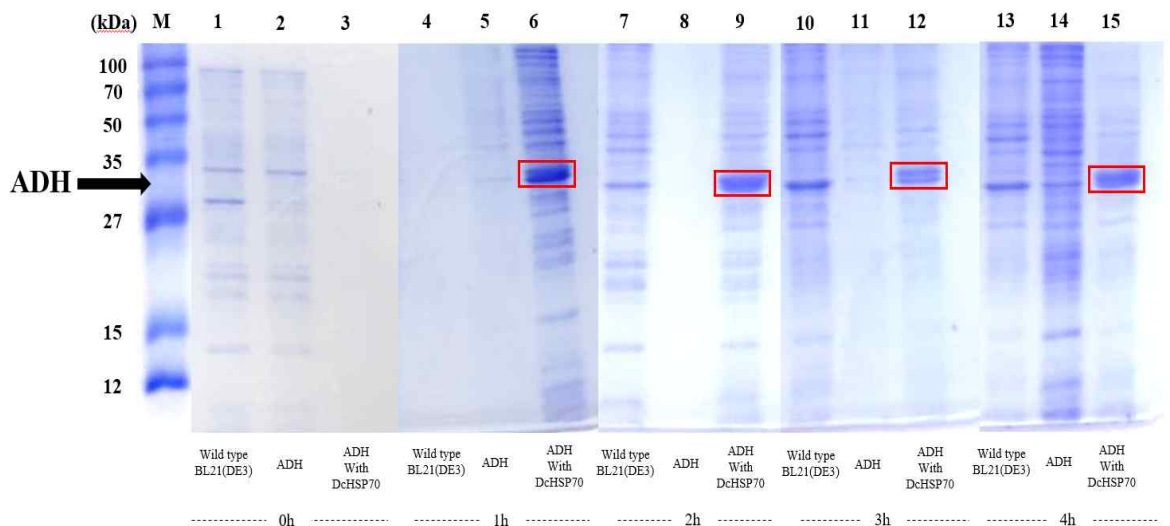
25°C의 배양온도에서 대장균을 배양하고, O.D<sub>600</sub>≒0.6일 때 0.5mM의 IPTG를 배지 전체 질량의 0.1%가 되도록 처리하였다. 실험군에 따라 1시간부터 4시간 동안 IPTG를 처리하였으며, IPTG를 처리하지 않은 실험군도 설정하였다. 각 실험군으로부터 추출한 단백질을 total, soluble, insoluble protein으로 나누어 SDS-PAGE를 진행하였다.



**Fig. 14. Total Recombinant ADH expressed when *E. coli* was Incubated at 25°C**  
 25°C의 배양온도에서 IPTG 처리 시간을 달리하였을 때, 재조합 ADH의 발현량을 SDS-PAGE로 확인하였다. IPTG에 노출되고 나서 1시간 이후부터 재조합 ADH의 발현을 확인할 수 있다.



**Fig. 15. Soluble Recombinant ADH expressed when *E. coli* was Incubated at 25°C**  
 25°C의 배양온도에서 생산된 수용성 재조합 ADH의 발현 정도를 나타내었다. 전체적으로 흐리고 옅은 밴드가 관찰되었다.



**Fig. 16. Insoluble Recombinant ADH expressed when *E. coli* was Incubated at 25°C**  
 25°C에서 배양된 대장균이 생산한 불용성 재조합 ADH 단백질의 발현량을 확인하였다. IPTG 노출 시간과 관계없이 모든 조건의 실험군에서 불용성 재조합 ADH의 밴드가 두껍게 나타났다.

### ③ 37°C의 배양온도에서 재조합 ADH의 발현량

37°C에서 균을 배양하고,  $O.D_{600} \approx 0.6$ 이 되었을 때 0.5mM의 IPTG를 배지 전체 질량의 0.1%가 되도록 첨가하였다. 실험군마다 1시간, 2시간, 3시간, 4시간 동안 IPTG에 노출하였으며, IPTG를 처리하지 않은 실험군도 두었다. 배양한 대장균으로부터 단백질을 추출하였고 이를 total, soluble, insoluble protein으로 나누어 SDS-PAGE를 진행하였다.

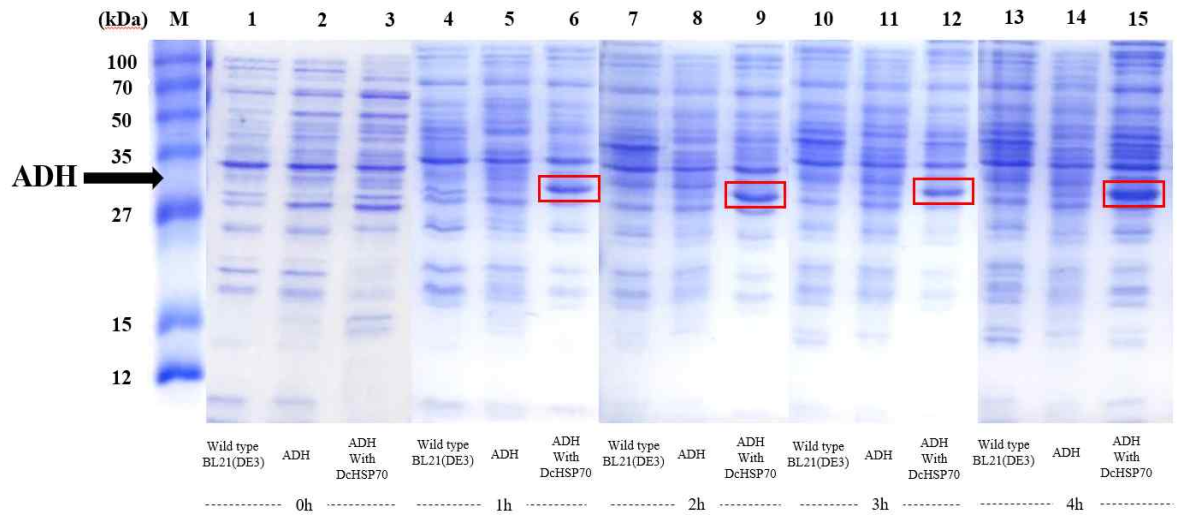


Fig. 17. Total Recombinant ADH expressed when *E. coli* was Incubated at 37°C

37°C의 배양온도에서 IPTG 노출 시간을 0시간에서 4시간까지 달리하였을 때, 재조합 ADH의 발현량을 나타내었다. IPTG에 노출된 시간과 재조합 ADH의 발현량이 비례하여 증가하는 양상을 확인할 수 있다.

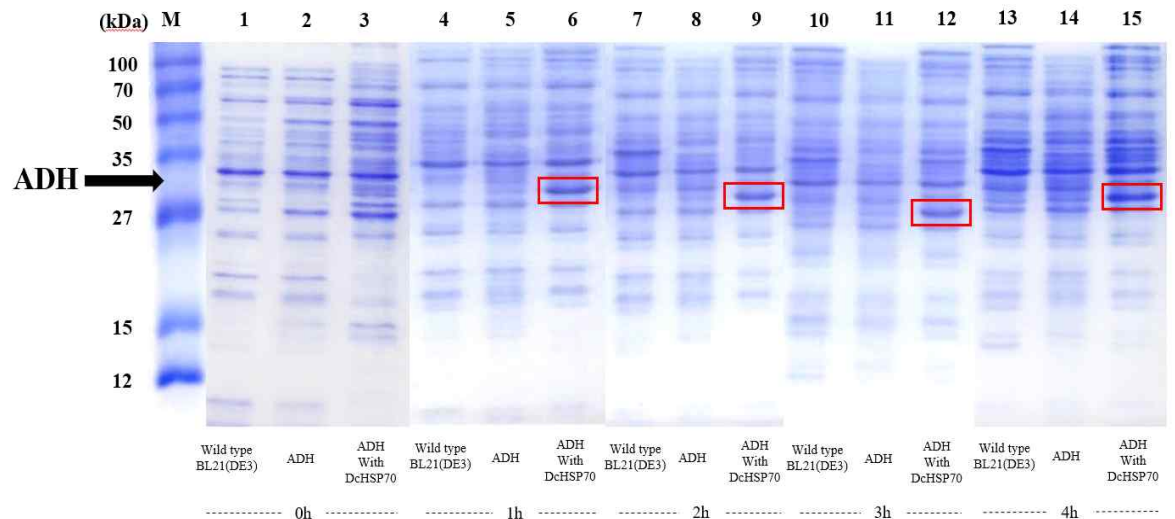
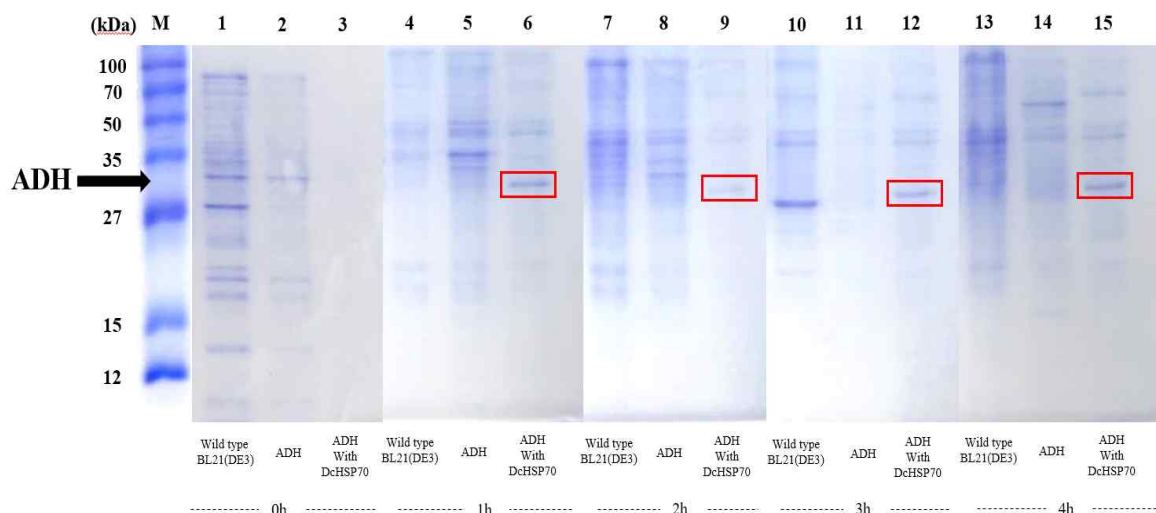


Fig. 18. Soluble Recombinant ADH expressed when *E. coli* was Incubated at 37°C

37°C에서 발현된 재조합 ADH는 대부분 soluble protein의 형태로 발현되었다.



**Fig. 19. Insoluble Recombinant ADH expressed when *E. coli* was Incubated at 37°C**  
 37°C의 배양온도에서 생산된 재조합 ADH에서는 불용성 상태의 단백질이 거의 확인되지 않는다.

④ 16시간 동안 IPTG를 처리하였을 때 재조합 ADH의 발현량  
 16°C, 25°C, 37°C에서 균을 배양하고, O.D<sub>600</sub>≒0.6이 되었을 때 0.5mM의 IPTG를 배지 전체 질량의 0.1%가 되도록 첨가하였다. 그 후, 16시간 동안 추가로 배양하여 SDS-PAGE로 재조합 ADH 단백질의 발현량을 확인하였다. SDS-PAGE 결과에서 첫 번째 line에는 Marker를 나타내었고, 그 이후 sample의 순서는 Table 3에 나타내었다.

**Table 3. Samples Loaded by Lane of Figure 20**

| Line | Culture temperature | Sample                                     |
|------|---------------------|--------------------------------------------|
| 1    | 16°C                | Wild type(BL21)                            |
| 2    |                     | pET11a-6His-ADH in BL21                    |
| 3    |                     | 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 |
| 4    | 25°C                | Wild type(BL21)                            |
| 5    |                     | pET11a-6His-ADH in BL21                    |
| 6    |                     | 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 |
| 7    | 37°C                | Wild type(BL21)                            |
| 8    |                     | pET11a-6His-ADH in BL21                    |
| 9    |                     | 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 |

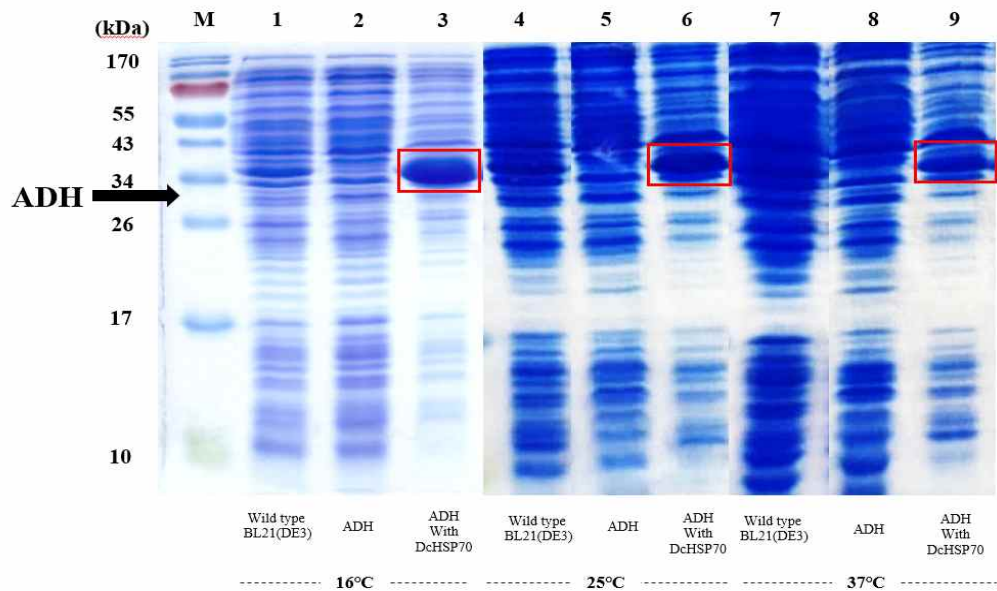


Fig. 20. Total Recombinant ADH expressed when *E. coli* was Incubated for 16 hours at different temperature

IPTG를 처리하고 각 배양온도에서 16시간 동안 배양하였을 때, total 재조합 ADH의 발현 정도를 확인하였다. 16°C에서 가장 많은 양의 재조합 ADH가 발현되었으며, 25°C와 37°C에서 비슷한 정도의 ADH가 발현되었다.

##### ⑤ Total 재조합 ADH 발현량 수치화

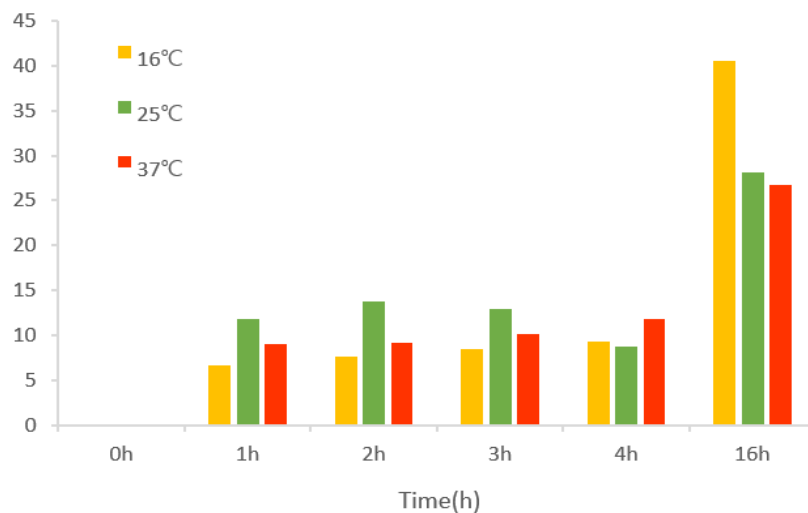


Fig. 21. Expression of Total recombinant ADH at each culture temperature based on pET11a-6His-ADH in BL21 treated with IPTG for 4 hours at 37°C

37°C에서 4시간 동안 IPTG에 노출시킨 pET11a-6His-ADH in BL21을 기준으로 하여, 배양온도와 IPTG 처리 시간에 따른 total 재조합 ADH의 발현량을 수치화하여 나타냈다. 16°C, 16시간의 노출 시간에서 눈에 띄는 재조합 ADH의 발현량이 확인되었다.

## 3.2 고찰

### 3.2.1 Cell growth curve 분석

세포 성장곡선은 균의 활성도 및 안정도 등 세포 상태에 관한 정보를 제공해주기 때문에, 미생물을 이용한 실험에서 일차적으로 진행하는 과정이며 특히 미생물에서 재조합 단백질을 생산할 때에는 효과적인 재조합 단백질의 발현에 필수적이다. 본 연구에서는 세포 성장곡선을 IPTG 처리 여부에 따라 나누어 작성하였다.

모든 실험군에서 세균의 성장곡선과 비슷한 경향의 성장률이 관찰되었으며, IPTG 처리 여부와 관계없이 BL21, pET11a-6His-ADH in BL21, 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 순의 성장률을 확인하였다(Fig. 9, 10). 모든 경우에서 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70이 최저 성장률을 달성하였다. 이는 해당 실험군에 형질전환 시 삽입된 LPP promoter가 상시로 HSP70을 발현한다는 다른 실험군과의 차이점으로 인해, 세포의 대사활동에 변화가 일어나 성장 속도가 느려진 것으로 판단된다. 한편, IPTG를 처리하였을 때 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70의 성장률이 IPTG를 처리하지 않았을 때보다 감소하였다. 이것은 HSP70을 발현하는 실험군에서 IPTG의 처리로 인해 재조합 ADH 단백질까지 생산하게 됨으로써 세포 대사의 부담이 증가하여 성장률이 감소한 것으로 생각된다.

### 3.2.2 재조합 ADH 발현을 위한 최적 배양온도 분석

대장균의 배양온도가 재조합 단백질의 생산에 미치는 영향에 대해 알아보고, 이를 통해 재조합 단백질을 생산하기 위한 최적 배양온도를 탐색하였다. 배양온도에 따른 재조합 ADH의 발현을 SDS-PAGE로 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 11~19에 나타내었다.

#### ① 재조합 ADH가 발현되지 않은 실험군

IPTG를 처리하지 않았을 때는 모든 실험군에서 재조합 ADH가 발현되지 않았다(Fig. 11, 14, 17). IPTG는 유전자 발현 억제 단백질과 결합함으로써 삽입한 유전자의 단백질로의 발현을 유도하는 물질이다[43]. 따라서 이는 IPTG 미처리로 인해 재조합 ADH의 발현이 일어나지 않은 것으로 보인다. 또한, 재조합 ADH의 발현은 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70에서만 확인되었다. 이를 제외한 실험군에서는 재조합 단백질의 발현을 돕는 HSP70이 존재하지 않아 같은 조건에서도 재조합 ADH가 거의 발현되지 않은 것으로 판단된다.

#### ② 16°C의 배양온도에서 재조합 ADH의 발현량 분석

IPTG를 처리한 후 3시간까지, 다른 배양온도에서보다 16°C에서 재조합 ADH의 발현량이 적게 나타났다(Fig. 11). 이는 대장균에서 단백질을 발현할 때 온도 조건이 중요하게 작용한다[49]는 특성과 대장균의 최적 생육온도가 37°C라는 특성이 동시에 작용하여 나온 결과로 예상된다. 한편, 16°C와 25°C의 조건에서 생산된 재조합 ADH를 비교했을 때, 16°C에서 발현된 insoluble 상태의 단백질의 양이 25°C에서보다 대부분 적거나 일부 비슷한 정도였다(Fig. 13, 16). 높은 온도에서는 단백질들이 제대로 접히기도 전에 빠른 속도로 펩타이드 사슬들이 번역되고, 이들이 뭉쳐져 불용성 단백질의 형태가 될 가능성이 상

당히 크다[50]. 하지만, 낮은 온도에서는 전사와 번역 속도가 감소하여 최종적으로 효과적인 단백질의 접힘이 가능하므로[50] 비교적 높은 온도인 25°C에서 더 많은 양의 불용성 재조합 ADH 단백질이 발현된 것으로 보인다.

### ③ 25°C의 배양온도에서 재조합 ADH의 발현량 분석

Total protein의 관점에서 보면 대체로 25°C에서 가장 빠르고 많은 양의 재조합 ADH가 생산되었음을 알 수 있다(Fig. 14). 하지만 이 조건에서 대장균이 생산한 재조합 ADH는 대부분 insoluble protein으로, inclusion body의 형태로 예상된다(Fig. 16). HSP의 발현은 온도, 중금속, 염분농도 등의 환경요인의 영향에 따라 차이를 보이는데, 그중에서도 본 연구에 사용된 HSP70은 환경요인 중 특히 온도에 따라 발현에 차이가 난다[51]. 따라서 25°C의 배양온도는 대장균의 최적 배양온도인 37°C[32]와 큰 차이가 나지 않아 전사와 번역의 속도가 다소 빨라져서 단백질의 발현율은 높아졌으나, soluble protein의 생산에 필수적인 HSP70이 작용하기엔 충분하지 않은 온도였던 것으로 예상된다.

### ④ 37°C의 배양온도에서 재조합 ADH의 발현량 분석

37°C의 배양온도에서는 IPTG를 처리하고 난 이후에 얼마 지나지 않아 재조합 ADH의 발현이 확인되었다(Fig. 17). 또한, 시간이 지남에 따라 재조합 ADH의 발현량이 증가하는 경향을 보였으며 이의 대부분은 soluble protein의 형태이다(Fig. 18). 이는 실험군이 대장균의 최적 배양온도에서 배양됨에 따라, 단백질 발현에 관여하는 다양한 효소와 HSP70 단백질이 효과적으로 활성화되어 나타난 결과로 사료된다.

## 3.2.3 재조합 ADH 발현을 위한 최적 IPTG 노출 시간 분석

대장균 배양에서 IPTG는 목적 단백질의 생합성을 유도하는 기능을 하며[42], 목적 단백질의 발현을 최적화하기 위해서는 유도 시간의 조절이 필수적이다[52]. 따라서 일정한 배양온도에서 IPTG 노출 시간이 재조합 단백질의 생산에 미치는 영향에 대해 알아보고, 이를 통해 재조합 단백질 생산을 위한 최적 IPTG 노출 시간을 분석하였다. IPTG 노출 시간에 따른 재조합 ADH의 발현을 SDS-PAGE로 확인하였으며, 그 결과는 Fig. 11~20에 나타내었다.

### ① IPTG 처리 시간(1h, 2h, 3h, 4h)에 따른 재조합 ADH 발현량

16°C의 배양온도에서는 IPTG에 노출된 시간이 길어짐에 따라 재조합 ADH의 발현이 증가하는 경향을 보이며, 수용성 재조합 ADH의 발현량도 증가한다(Fig. 12). 25°C에서 배양된 대장균은 IPTG에 노출되고 난 후, 가장 빠르게 많은 양의 재조합 ADH를 생산하였으나, 발현되는 재조합 ADH가 거의 불용성의 상태이다(Fig. 16). 37°C의 배양온도에서는 IPTG를 처리하고 나서 점차 재조합 ADH의 발현량이 증가하며, 대부분 수용성 단백질의 형태이다(Fig. 19). 위의 결과를 종합해보면, 16°C와 37°C에서 IPTG 유도 시간이 길어짐에 따라 재조합 ADH 단백질의 생산량이 증가하는 경향을 보이며 37°C의 배양온도에서 4시간 동안 IPTG를 처리한 실험군에서 가장 많은 수용성 ADH가 발현되었다.

## ② IPTG 처리 시간(16h)에 따른 재조합 ADH 발현량

단백질을 생산하는 속도가 느리다는 것은 단백질이 제대로 접힐 수 있는 시간이 생겨 수용성 단백질의 생산이 증가한다는 것을 의미한다. 단백질 합성 속도를 낮출 때는 미생물의 최적 생육온도보다 낮은 배양온도에서 배양하는 것이 일반적이다. 하지만 배양온도를 낮추면 원하는 만큼의 단백질을 얻기 위해 더 긴 시간 동안 배양해야 한다. 선행연구에서 많은 양의 불용성 재조합 단백질이 생산되었을 때, 최적 배양온도보다 약 20°C 낮은 온도에서 오랜 시간 배양하여 성공적인 수용성 재조합 단백질의 발현을 이끌었다는 연구 결과가 발표된 바가 있다[35]. 따라서 본 연구에서도 각 배양온도에서 IPTG 처리 이후 16시간 동안 배양하여 재조합 ADH의 발현량을 확인하였다(Fig. 20). 그 결과, 16°C에서 눈에 띄는 양의 재조합 ADH를 확인할 수 있었다. 37°C에서 4시간 동안 IPTG에 노출시킨 pET11a-6His-ADH in BL21을 기준으로 하여, 다른 실험군들에서 재조합 ADH 발현량을 수치화하여 나타냈다(Fig. 21). 16°C에서 16시간 동안 IPTG를 처리한 실험군에서 재조합 ADH는 기준값보다 약 40배 이상 발현되었으며, 이는 모든 실험군 중에서 가장 큰 값을 가진다.

## IV. 결론 및 제언

### 4.1 결론

본 연구는 *Escherichia coli*에서 재조합 단백질을 생산하기 위한 최적 발현조건을 수립하기 위하여 실험군마다 배양온도와 IPTG 노출 시간을 달리하였고 SDS-PAGE를 통해 목적 단백질인 재조합 ADH의 발현량을 확인하였다. 실험에 사용된 균주는 Wild type(BL21)과 pET11a-6His-ADH in BL21, 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70으로 배양과정에서 발생하는 각종 스트레스에서 세포의 생존을 돕고 그와 동시에 분자 샤페론의 기능을 하여 재조합 단백질의 생산량을 높여주는 열충격단백질인 HSP70[32]을 도입한 균주를 이용하였다.

*E.coli*의 배양온도는 16°C와 25°C, 37°C로 설정하여 균을 배양하였으며, IPTG 노출 시간의 영향은 IPTG를 처리하지 않은 대조군과 비교적 짧은 시간(1시간, 2시간, 3시간, 4시간) 동안 처리한 실험군, 긴 시간(16시간) 동안 처리한 실험군으로 나눠 확인하였다. 그 결과, 37°C의 배양온도에서 4시간 동안 IPTG에 노출시킨 6His-ADH-pET11a in BL21 expressing DcHSP70 실험군에서 가장 많은 양의 수용성 재조합 ADH가 생산되었다. 이는 대장균의 최적 배양온도인 37°C에서 전사와 번역 속도가 충분히 증가하고 단백질의 수용성을 위한 HSP70이 활성화되어 야기된 결과로 예상된다. 하지만 배양시간을 늘려 16시간 동안 IPTG에 노출하였을 때에는, 16°C에서 기준값의 40배에 달하는 많은 양의 재조합 ADH가 발현되었다. 저온에서는 단백질 합성 속도가 감소하여 초반 발현량이 저조하나, 합성시간이 길어짐에 따라 단백질이 접힐 수 있는 시간이 충분히 제공되어 이러한 결과가 나온 것으로 판단된다.

위와 같은 결과를 모두 종합하면, *E.coli*에서 재조합 ADH 단백질을 생산하기 위한 최적 조건은 16°C의 배양온도와 16시간의 IPTG 노출 시간이다. 다만, 비교적 짧은 시간 내에 재조합 단백질을 얻고자 할 때는 37°C의 배양온도에서 4시간 동안 IPTG를 처리하는 것도 하나의 방법으로 생각된다. 재조합 ADH를 산업적으로 이용할 때, 배양시간과 배양온도에 따른 발현량의 차이와 이로 인해 수반되는 경제적 측면을 계산한다면 더 많은 이익을 얻을 수 있을 것으로 보인다. 이러한 결과는 ADH를 모델로 하여 다양한 분야에서 활용되고 있는 재조합 단백질의 효율적인 생산을 위한 산업적 대량생산의 기반을 마련하였다는 데에 의의가 있으며, ADH 이외의 재조합 단백질을 생산하기 위한 후속 연구의 기초적 배경이 되어 유용하게 사용될 것으로 판단된다.

### 4.2 활용방안

대장균을 이용한 단백질의 발현은 이미 많은 실험을 통해서 확인된 바 있다. 이러한 실험의 목적은 대부분 특정 유전자의 기능을 확인하기 위함이었다[53]. 하지만 본 연구는 대장균에서 수용성 재조합 ADH의 최적 발현조건을 찾는 것에 목표를 두었다. 따라서 이는 ADH를 산업적으로 다양하게 활용하기 위해 효율적인 생산 기반을 마련하였다는 데에 의의가 있다.

ADH는 알코올 분해효소로 숙취 해소제품에 이용될 수 있다. 서론에서 언급했다시피 현

대인들에게 숙취 해소제품은 매우 중요한 부분으로 자리 잡았지만, 기존의 숙취 해소제들은 과도한 당 포함, 숙취 해소 효과 미비 등의 여러 가지 문제점을 가진다. 하지만 숙취 해소제의 원료에 있어서 ADH의 사용은 이러한 단점들을 극복하고 더욱 효과적인 숙취 해소제품의 개발을 가능하게 할 것이다.



Fig. 22. Hangover helper Products with ADH

또한, ADH는 레티놀을 레티날로 대사시키는 데 있어서 매우 중요한 역할을 한다[25]. ADH에 의한 대사물질인 레티날은 비타민 A 전구체로 옅신과 결합하여 로돕신을 형성함으로써 시각을 성립하는 데에 필수적인데, 인간은 로돕신을 직접 생산하지 못하기 때문에 로돕신이 부족하면 야맹증에 걸릴 가능성이 현저하게 증가한다[26]. 따라서 본 연구의 결과를 토대로 soluble 상태의 ADH를 대량 생산한다면, 전자기기를 많이 사용하는 현대인들을 위한 건강 보조제 산업 발전에 이바지할 수 있을 것으로 기대된다.

현재 전 세계적인 고령화 추세로 인해 피부 노화 방지를 위한 관심이 높아짐에 따라 화장품 시장은 높은 성장률을 보이며, 특히 주름 개선 기능성 화장품에 대한 수요는 꾸준히 증가할 것으로 예측된다. ADH에 의해 만들어지는 레티날은 항산화 및 항노화의 효능을 가져[27] 주름 개선 기능성 화장품의 원료로 사용될 수 있다. 따라서 ADH의 대량생산을 통해 레티날의 대량생산이 가능해진다면 이는 해당 분야의 핵심소재로 활용되어 화장품 산업의 발달에 기여할 수 있을 것이다.

한편 ADH의 활성은 뿌리의 내수성과 관련되어 농업적인 부분에서도 활용될 수 있다. 일부 식물은 과량의 물 스트레스를 받으면, 혐기성 조건에서 식물 내에 에탄올의 생산량이 증가한다[54]. 하지만 에탄올의 증가는 식물의 성장을 저해하기 때문에, 식물은 뿌리에서 스스로 ADH의 활성을 증가시켜 에탄올을 대사시킨다[54]. 하지만 이는 세포 대사의 변화로 인해 세포의 성장 속도를 느리게 한다[55]. 그러므로 ADH를 식물에서 에탄올 축적을 방지하는 데에 사용한다면, 홍수와 같이 높은 강수량을 동반하는 지역에서 농작물의 성장을 보장할 수 있을 것이다.

앞서 말했듯이 ADH는 숙취 해소제품, 화장품, 건강 보조제, 농업 등 다양한 산업에서 활용될 수 있는 중요한 물질이다. 결국, 재조합 ADH의 최적 발현조건을 수립하는 것은 ADH가 많은 분야의 산업에서 사용될 수 있는 기반을 마련하고, 이를 통해 국가적·사회적 경제성을 증가시킬 것으로 생각된다. 더하여 본 연구에서 사용한 HSP70 외의 다른 유전자를 단백질의 수용성 증가를 위해 사용하거나 본 연구 결과를 다른 재조합 단백질 생산을 위한 자료로 활용한다면, 향후 발현 시스템과 배양 조건 등 환경적 요인들의 최적화를 통한 생산성 증대와 재조합 단백질 발현 연구의 학문적 발전이 가능할 것이다.

## 참고문헌

- [1] 네이버 지식백과, “재조합 DNA”,  
<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=5141633&cid=60266&categoryId=60266>
- [2] 네이버 지식백과, “유전자 재조합 기술”,  
<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=637330&cid=42143&categoryId=42143>
- [3] William J. Thieman. & Michael Palladino, 이진성 역, “최신 생명공학의 이해”, 2판,  
(주)바이오사이언스, pp. 201, 2016
- [4] 강현아, 권오석, 오두병, “미생물 산업의 국내외 상품화 경향 및 동향 : 의약품 재조합 단백질 생산”, 한국미생물생명공학회지, 2006
- [5] 이상기, “재조합 단백질의 생산 및 분리정제 기술”, 유전공학연구소
- [6] 박용철 외, “재조합 대장균을 이용한 외래 단백질 생산기술의 현황과 전망”
- [7] 두산백과, “바이오 의약품”,  
<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1097798&cid=40942&categoryId=32820>
- [8] LG 케미토피아, “[화학개론] 다양한 종류의 바이오 의약품으로 알아보는 바이오산업 현황”, [https://blog.lgchem.com/2016/11/28\\_2\\_bio2/](https://blog.lgchem.com/2016/11/28_2_bio2/)
- [9] 후생신보(윤병기), “글로벌 바이오의약품 시장 2023년 약 500조원 규모 확대”,  
<http://m.whosaeng.com/109315>
- [10] Modor Intelligence, “Recombinant Protein Market - Growth, Trends, and Forecast (2019 - 2024)”,  
<https://www.mordorintelligence.com/industry-reports/recombinant-protein-market>
- [11] 한국콘텐츠진흥원, “전통술의 역사”,  
[http://www.culturecontent.com/content/contentView.do?search\\_div=CP\\_THE&search\\_div\\_id=CP\\_THE005&cp\\_code=cp0522&index\\_id=cp05220004&content\\_id=cp052200040001&search\\_left\\_menu=3](http://www.culturecontent.com/content/contentView.do?search_div=CP_THE&search_div_id=CP_THE005&cp_code=cp0522&index_id=cp05220004&content_id=cp052200040001&search_left_menu=3)
- [12] 보건복지부, “2018년 지역사회건강조사 결과 발표”,  
[http://www.mohw.go.kr/react/al/sal0301vw.jsp?PAR\\_MENU\\_ID=04&MENU\\_ID=0403&CONTENT\\_SEQ=348837](http://www.mohw.go.kr/react/al/sal0301vw.jsp?PAR_MENU_ID=04&MENU_ID=0403&CONTENT_SEQ=348837)
- [13] 식품의약품안전처, “우리나라 20~30대 고위험 음주와 폭탄주 즐겨”,  
[https://www.mfds.go.kr/brd/m\\_99/view.do?seq=39966](https://www.mfds.go.kr/brd/m_99/view.do?seq=39966)
- [14] 네이버 지식백과, “숙취”,  
<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1116098&cid=40942&categoryId=32799>
- [15] 한겨레(이근영), “‘술 깨는 약’은 없다”, 2015.04.05.,  
[http://www.hani.co.kr/arti/science/science\\_general/685533.html](http://www.hani.co.kr/arti/science/science_general/685533.html)
- [16] 울산과학고 화학교육 정보 나눔터, “알코올의 과학”, 116-118, 2010
- [17] 백인호, “한국인 알코올 의존 환자의 제2알데히드탈수소효소 유전자형 빈도”, Korean Neuropsychiatr Assoc, 제37권, 제1호, 149-158, 1997
- [18] 푸드투데이(황인선), “숙취해소음료 효능있나...품질은 비슷 가격은 천차만별”, 2018.12.16.,  
<https://www.foodtoday.or.kr/news/article.html?no=156709>
- [19] 서울경제(우영탁), “‘3,000억 숙취해소시장’ 바이오도 출사표”, 2019.01.31.,

<https://www.sedaily.com/NewsView/1VE927MEB6>

[20] REAL FOODS(김성우), “커피·오이…술 빨리 깨는 ‘비약’”, 2016.07.19.,  
<http://realfoods.co.kr/view.php?ud=20160719000102>

[21] 중앙일보(류장훈), “알코올 분해효소 함유, 숙취 해소효과 높아”, 2014.05.12.,  
<https://news.joins.com/article/14651825>

[22] Su Hee Kang, Eun Kyung Cho and Young Ju Choi, “ $\alpha$ -Glucosidase Inhibitory Effects for Solvent Fractions from Methanol Extracts of *Sargassum fulvellum* and Its Antioxidant and Alcohol-Metabolizing Activities”, *Journal of Life Science*, Vol. 22, No. 10, 1420-1427, 2012

[23] 중앙일보(민기홍), “맹그로브 숲에서 찾은 숙취해소 효소 ‘키스립’…숙취 제거에 탁월”, 2014.05.12., <https://news.joins.com/article/14655347>

[24] 김성철, “숙취해소제의 진실”, 약학정보원, 1-9, 2016

[25] Won Eil Jung, “Alcohol Dehydrogenase III Exacerbates Liver Fibrosis by Enhancing Stellate Cell Activation and Suppressing Natural Killer Cells in Mice”, *Hepatology*, Vol. 60, No. 3, 1044-1053, 2014

[26] 네이버 지식백과, “retinal”,  
<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=3518418&cid=60408&categoryId=58529>

[27] 농촌진흥청, “미생물 이용한 ‘레티놀 대량생산 기술’ 개발”, 2013.03.14.,  
[http://www.rda.go.kr/board/board.do?mode=view&prgId=day\\_farmprmninfoEntry&dataNo=100000508896#script](http://www.rda.go.kr/board/board.do?mode=view&prgId=day_farmprmninfoEntry&dataNo=100000508896#script)

[28] 공광훈 외, “재조합 alcohol dehydrogenase의 발현 및 기능분석”, *SCIENCE & TECHNOLOGY*, 제12권, 제6호, 565-570, 1999

[29] 위키백과, “비타민 A”,  
[https://ko.wikipedia.org/wiki/%EB%B9%84%ED%83%80%EB%AF%BC\\_A](https://ko.wikipedia.org/wiki/%EB%B9%84%ED%83%80%EB%AF%BC_A)

[30] Seung-Hye Hong etc, “Biochemical study of retinoid converting enzymes based on the structure analysis and their application to retinoid production”, Department of Bioscience and biotechnology Graduate School of Konkuk University, 2016

[31] 네이버, “재조합 DNA”,  
<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=5141633&cid=60266&categoryId=60266>

[32] Bilgimol C joseph etc, “An overview of the Parameters for Recombinant Protein Expression in *Escherichia coli*”, *Cell Science & Therapy*, Vol. 6, Issue 5, 2015

[33] Kamna Jhamb & Debendra K. sahu, “Production of soluble recombinant proteins in *Escherichia coli*: Effects of process conditions and chaperone co-expression on cell growth and production of xylanase”, *Bioresource Technology*, Vol. 123, 135-143, 2012

[34] SIGMA, “Cloning and Expression”, pp. 43~44

[35] Germán L. Rosano and Eduardo A. Ceccarelli, “Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges”, *frontiers in MICROBIOLOGY* (review article), Vol. 5, Article 172, 1-17, 2014

[36] Chang-Jin Park and Young-Su Seo, “Heat Shock Proteins: A Review of the

- Molecular Chaperones for Plant Immunity”, The Plant Pathology Journal, Vol. 31, No. 4, 323-333, 2015
- [37] Hyunseok Jee, “Size dependent classification of heat shock proteins: a mini-review”, Journal of Exercise Rehabilitation, Vol. 12, No. 4, 255-259, 2016
- [38] M.P.Mayer and B.Bukau, “Hsp70 chaperones: Cellular functions and molecular mechanism”, Cellular Molecular Life Sciences, Vol. 62, 670-684, 2005
- [39] 윤여준, 천연물 조합생합성을 위한 합성생물학적 도구, 2016
- [40] Gary Stevens etc, “Red/ET Recombination: Cloning Without Restriction Enzymes”, [https://www.genebridges.com/storage/Red\\_ET\\_by\\_Gene\\_Bridges.pdf](https://www.genebridges.com/storage/Red_ET_by_Gene_Bridges.pdf)
- [41] 황수정, 김영만, “자반고등어에서 histamine 분해능을 가진 세균의 분리 동정”, Journal of Life Science, 제15권, 제5호, 743-748, 2005
- [42] 명승현, “IPTG와 젓당을 이용한 유전자 유도 발현 시스템 개발”, 조선대학교, 2018
- [43] Lars H. Hansen etc, “The Effect of the lacY Gene on the Induction of IPTG Inducible Promoters, Studied in *Escherichia coli* and *Pseudomonas fluorescens*”, CURRENT MICROBIOLOGY, Vol. 36, 341-347, 1998
- [44] 왕진호, “「생물학적제제 품질관리시험 매뉴얼」 단백질정량(로리)법”, 식품의약품안전처 식품의약품안전평가원, 2014
- [45] 안태호, “단백질 프로토콜”, 전남대학교 출판부, p. 38, 2012
- [46] MARION M. BRADFORD, “A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding”, ANALYTICAL BIOCHEMISTRY, Vol. 72, 248-254, 1976
- [47] 표재성 외, “Duplex SDS-PAGE를 이용한 단백질 분리향상”, ANALYTICAL SCIENCE & TECHNOLOGY, 제19권, 제6호, 529-534, 2006
- [48] ㈜다인바이오 연구소, “SDS-PAGE”, 다인바이오주식회사
- [49] 김근중 외, “박테리아 기반의 유용 단백질 발현전략 최신동향”, 전남대학교, 2018
- [50] 맹보희, 남동현, 김용환, “B-type natriuretic peptide 분석을 위한 항 BNP sdFv 항체의 대장균 세포질 내에서의 기능적 발현”, KSBB Journal, 제24권, 591-597, 2009
- [51] 김철원, 강한승, “공기노출 및 절식시기 동안 참돔치, *Mytilus coruscus*에서 Hsp70 및 GST 유전자 발현에 대한 연구”, Korean Journal Malacol, 제32권, 제2호, 73-81, 2016
- [52] B.V. Kilikian etc, “Process strategies to improve heterologous protein production in *Escherichia coli* under lactose or IPTG induction”, Process Biochemistry, Vol. 35, 1019-1025, 2000
- [53] 김수중 외, “IPTG의 첨가 시간이 대장균(*Escherichia coli*)에서 순무 모자이크 바이러스 (TuMV)의 외피단백질 발현에 미치는 영향”, 한국식물병리학회지, 제13권, 제4호, 248-254, 1997
- [54] R. M. M. CRAWFORD, “Alcohol Dehydrogenase Activity in Relation to Flooding Tolerance in Roots”, Journal of Experimental Botany, Vol. 18, Issue 3, 458-464, 1967.
- [55] 문석영, “재조합 대장균에서 유도조건 최적화를 통한 Insuline-like Growth factor 1 생산에 관한 연구”, 인하대학교, 2009

학부생 연구 논문

생활용 살균제 트리클로산이 해양 미세조류  
*Prorocentrum minimum*의 광합성 및 생리  
작용에 미치는 영향

Triclosan, A Disinfectant for Life, Effects  
of Microalgae *Prorocentrum minimum* on  
Photosynthesis and Physiology

2019. 11.

상명대학교 융합공과대학  
생명화학공학부 생명공학과  
참여 학생: 박고운, 박인옥, 이승연,  
김수황, 이혜성, 손혜림, 구병운  
연구지도자: 박현준<sup>1)</sup>, 김한솔<sup>1)</sup>, 기장서<sup>2)</sup>

---

1) 상명대학교 일반대학원 생명과학과

2) 상명대학교 융합공과대학 생명화학공학부 생명공학과 해양생명공학실험실 교수

## Introduction

Triclosan ( $C_{12}H_7Cl_2O_2$ )은 항 균 및 항 진균 활성을 갖는 5-chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy) phenol 계열에 속하며, 국내 뿐만 아니라 전 세계 속 생활용 위생용품에 널리 사용되는 물질이다. 2017년 미국 FDA (Food and drug administration)와 EU (European Union)에서 구강용품에 triclosan 사용을 제한하였으며, 국내 식품의약품안전처도 구강용품에 사용 금지와 화장품 내 배합한도가 0.3%이하가 되도록 규정하고 있다. Triclosan은 구강용품, 세제 등에 들어있어, 생활하수를 통해 수계로 노출되기 쉽다. Triclosan은 수계에 노출 시 광분해가 일어나는데, 광분해시 phenolate형태로 광분해되며, 담수와 해수 모두에서 2,8-Dichlorodibenzo-p-dioxin (DCDD)로 전환된다. DCDD로 전환 시, 기존 10일 이하였던 반감기보다 증가된, 120일대의 반감기를 가져, 환경에 미치는 위해성이 증가될 수 있다. 따라서 본 연구에서는 해양 1차 생산자인 와편모조류 *Prorocentrum minimum*을 통해 triclosan이 해양 환경에 미치는 독성 영향을 확인하였다. 환경 독성 평가를 위해 세포 수와 색소의 변화를 관찰했고, 색소의 감소를 통해 반수치사농도( $EC_{50}$ ) 값을 산출했다. 생리적 변화 관찰을 위해, triclosan 처리 농도 및 시간에 따른 광합성 효율( $F_v/F_m$ )과 상대적 형광의 변화를 관찰했다. 또한, triclosan 스트레스에 대한 상대적 유전자 발현을 비교를 위해, 광합성 관련 유전자(*PmpsbA*, *PmpsaA*, *PmatpB*, *PmrbclL*)와 항산화 단백질 유전자(*PmGST*, *PmKatG*)의 발현을 확인하였다.

## Materials and Methods

### (1) *Prorocentrum minimum*의 배양 및 triclosan 처리

- 연구생물 *P. minimum* (D-127)은 f2 medium에 배양하여, 20 °C 12:12 L:D cycle에서 배양하였다.
- Triclosan (5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol, CAS no. 3380-34-5, Sigma)은 순도 99.8% 이상의 물질을 사용하여, 실험에 따라 다양한 농도(을 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L)의 triclosan 지수기의 *P. minimum*에 처리하였다.

### (2) 세포 수 변화 관찰

- 세포 수는 광학현미경(Axioskop, Carl Zeiss, GmbH, Germany) 이용하여 SR chamber (HMA-s6117, Matsunami Glass, Japan)에 1 mL분주 후 관찰하였다.

### (3) 광합성 변화 및 형광량 관찰

- 광합성률( $F_v/F_m$ )과 형광량 관찰은 2 mL의 샘플을 Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd., England)를 이용하여 진행되었다.

### (4) *Prorocentrum minimum*의 광합성 및 생리 작용 유전자 관찰

- Triclosan이 0, 0.1, 0.5, 1.0 (mg/L)의 농도로 작용하였을 때 발생하는 분자 수준에서의 변화를 관찰하기 위해 TRIzol method로 RNA를 추출하였다. 추출한 RNA는 cDNA로 합성 후, real-time PCR (CFX96 Real time system, BIO-RAD)을 진행하였다. 형광물질로는 SYBR green (Ezzyomics Inc., Korea)을 사용하였으며, reference gene으로 *PmtubA*를 사용하였다.

## Results

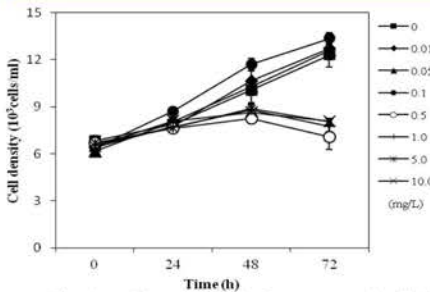


그림 1. 농도 별 triclosan 노출 후 *P. minimum*의 시간별 세포 수 변화 (0-72시간).

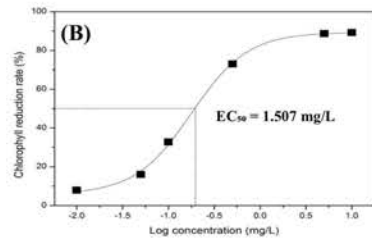
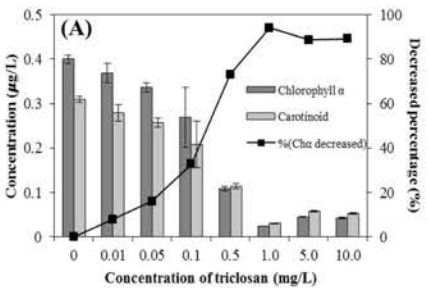


그림 2. Triclosan 노출 후 *P. minimum*의 chlorophyll a와 carotenoid의 변화(A) 그리고 chlorophyll a 변화를 이용한  $EC_{50}$ 값 (B).

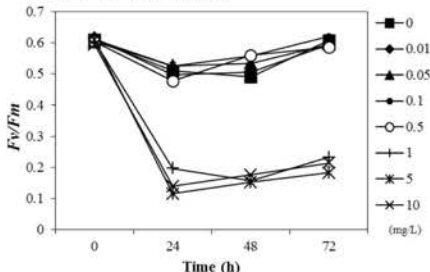


그림 3. Triclosan 노출 후 *P. minimum*의 시간별  $F_v/F_m$  변화 (0-72시간)

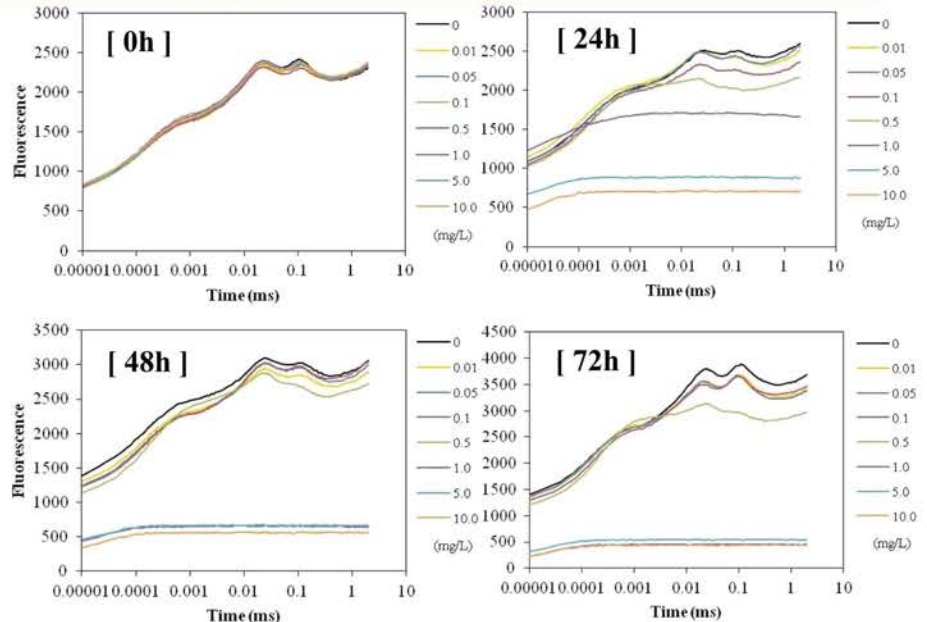


그림 4. Triclosan 노출 후 *P. minimum*의 시간 별 형광 값 변화 (0-72시간)

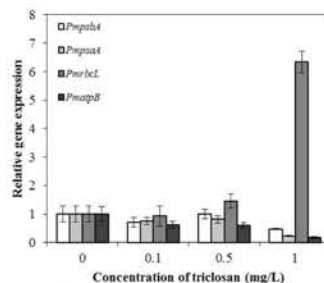


그림 5. Triclosan 노출 후 *P. minimum*의 광합성 관련 유전자 발현 변화 (*PmpsbA*, *PmpsaA*, *PmatpB*, *PmrbclL*)

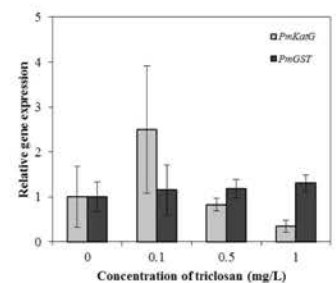


그림 6. Triclosan 노출 후 *P. minimum*의 항산화 단백질 유전자(*PmGST*, *PmKatG*)

## Major findings and conclusion

- Triclosan의 해양 와편모조류에 대한 *Prorocentrum minimum*에 대한 환경 독성 평가 및 광합성 생리작용에서의 영향을 관찰하였다.
- Cell count에서 triclosan 0.5mg/L 이상의 농도에서 노출된 sample의 영향이 관찰되었으며, 이는 상대적 형광값과  $F_v/F_m$ 의 결과와 동일한 양상을 보였다.
- Triclosan의  $EC_{50}$ 은 chlorophyll a와 carotenoid에서 약 1.507 mg/L로 측정되었으며, 72시간 기준 세포 수, 광합성 효율 및 형광 값은 1 mg/L 이상에서 유의한 결과가 관찰되었다.
- *P. minimum*의 유전자 발현을 관찰에서 광합성 관련 유전자(*PmpsbA*, *PmpsaA*, *PmatpB*, *PmrbclL*)와 항산화 단백질 유전자(*PmGST*, *PmKatG*)에서  $EC_{50}$  보다 낮은 농도인 0.1~1.0mg/L에서 유의한 발현 변화가 확인되었다.
- 생활용 triclosan은 수계로 유입되어 광합성 생물에 영향을 줄 수 있다.

## 국문 초록

트리클로산(Triclosan)은 항균물질이자 살균제로 국내 및 유럽에서 생활용 위생용품 등 다방면에 사용되고 있다. 이에 트리클로산은 산업 폐수 및 생활 폐수를 통해 수계로 방출되어, 담수 생태계에 미치는 영향에 대한 다양한 연구가 진행되었다. 하지만 트리클로산이 가지는 수계 노출 이후 물질 성분 변화에 의한 위험성에도 불구하고, 해양 생태계에 미치는 영향에 대해서는 연구는 미미하다. 본 연구는 해양 기초생산자인 와편모조류 *Prorocentrum minimum*을 통해 해양으로 노출된 트리클로산이 어떤 영향을 미치는지 파악하였다. 트리클로산 처리 후, 색소인 chlorophyll *a* 와 carotinoid의 뚜렷한 감소가 관찰되었으며, Chlorophyll *a* 따른 EC<sub>50</sub>값은 약 1.5 mg/L로 관찰되었다. 세포 수의 경우 0.5 mg/L 이상의 농도에서 세포 사멸 없이 세포 분열에 따른 증가량이 감소되어 비슷한 세포 수를 유지하였다. 72시간 기준 1.0 mg/L 이상의 농도에서 자가 형광과 광합성 효율(*Fv/Fm*)이 감소하는 유의미한 결과가 확인되었다. 트리클로산에 노출된 세포에 분자세포학적으로 발생하는 생리적 변화를 확인하기 위해 72시간 노출된 샘플을 이용해 quantitative real-time PCR (qRT-PCR)을 진행하였다. 그 결과, 광합성 관련 유전자 중, *Pmpsba*, *Pmpsaa*는 처리 농도가 증가할수록 유전자 발현율이 증가하다 1.0 mg/L에서 감소하는 양상이 확인되었으며, *PmrbcL*은 지속적으로 증가, *PmatpB*는 약품 노출 즉시 발현량이 감소하는 결과가 확인되었다. 항산화 단백질 관련 유전자인 *PmGST*는 트리클로산 처리 농도가 증가함에 따라 지속적으로 발현량이 증가하였고, *PmKatG*는 노출 즉시 높은 유전자 발현량을 보이고 0.5 mg/L에서 발현량이 급감하는 결과가 관찰되었다. 본 연구 결과, 트리클로산은 해양 와편모조류의 *P. minimum*의 세포 성장 및 광합성 기능에 영향을 주며, 낮은 농도에서도 광합성 복합 단백질 및 산화스트레스 관련 항산화 단백질의 유전자 발현에 유의미한 영향을 미친다는 점이 확인되었다. 이는 다른 해양 생물에게 비표적성 영향을 줄 수 있음을 암시한다. 추가적인 조류 및 생물 실험을 통해 트리클로산이 해양 생물에 미치는 생리적 독성을 확인하여 트리클로산의 해양 생태계 독성 지표연구가 진행되어야 할 것이다.

# 목차

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| <b>I. 서론</b>                  | <b>79</b> |
| 1.1 연구동기 및 필요성                | 79        |
| 1.2 연구 목적                     | 82        |
| 1.3 이론적 배경                    | 82        |
| <b>II. 실험 방법</b>              | <b>83</b> |
| 2.1 조류 배양 및 실험 사용 약품          | 83        |
| 2.2 EC <sub>50</sub> 측정       | 84        |
| 2.3 광합성 효율 측정                 | 84        |
| 2.4 관련 유전자 발현도 측정             | 84        |
| <b>III. 연구결과 및 고찰</b>         | <b>85</b> |
| 3.1 Cell counting             | 85        |
| 3.2 Fluorescence              | 85        |
| 3.3 Fv/Fm                     | 86        |
| 3.4 Chlorophyll a, Carotinoid | 87        |
| 3.5 관련 유전자 발현도 측정             | 88        |
| <b>IV. 결론 및 제언</b>            | <b>90</b> |
| 4.1 활용방안                      | 90        |
| 4.2 결론                        | 91        |
| 4.3 Further Works             | 91        |
| <b>참고문헌</b>                   | <b>93</b> |

## I. 서론

### 1.1 연구동기 및 필요성

트리클로산은 개인위생 용품인 비누, 핸드로션, 치약 등에 쓰이며, 추가적으로 장난감, 매트리스 등 생활용품에 향균 및 살균제로 첨가된다. 생활 속에서 쉽게 접할 수 있는 물질인 만큼, 트리클로산은 인간에 노출되기 쉬우며, 노출량이 클 경우 인체에 유해한 영향을 끼칠 수 있다. 또한 생활 폐수로서 수계에 유입될 확률이 크므로 환경에 영향을 미치기 쉽다. 최근 1회용 생필품의 사용량이 증가함에 따라 수계로 유입되는 트리클로산의 양 또한 증가하고 있다. 이에 FDA와 같은 환경기관들은 트리클로산의 안전성을 검토하고 있으며, 트리클로산의 독성 평가와 관련된 연구들을 활발히 진행하고 있다.

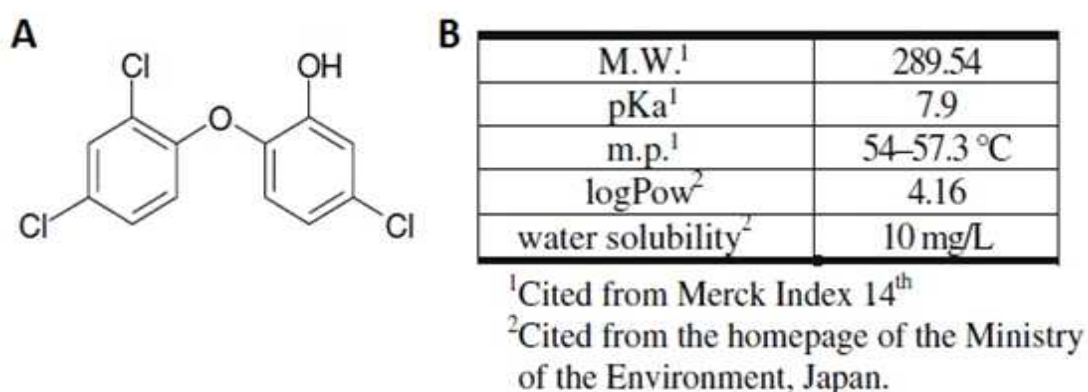


Fig. 1. A : Chemical structure B : physic-chemical properties of triclosan (Iwaki et al., 2008)

트리클로산(Triclosan, C<sub>12</sub>H<sub>7</sub>Cl<sub>3</sub>O<sub>2</sub>)은 포도상 구균에 높은 활성을 보이는 화학물질로써 일반적인 상태에서는 백색의 결정성 분말로 존재한다. 구조식은 ‘Fig. 1’과 같으며, 해당 물질은 pKa 8.1인 chloro phenoxy phenol계열에 속한다. 수계에 노출 시 광분해를 주 작용으로 분해된다는 특이성을 지니며(Lindström et al., 2002; Tixer et al., 2002) Phenolate 형태로 광분해 및 안정화가 이루어짐과 동시에 주변 pH를 증가시킨다(Fig. 1).

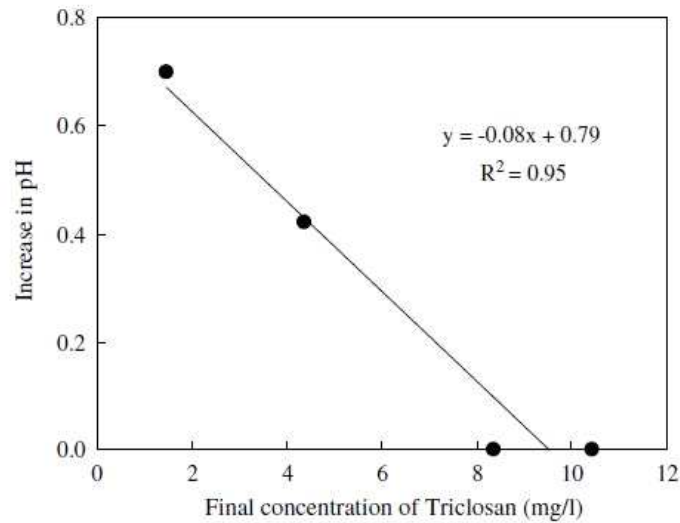


Fig. 2. Relationship between triclosan concentration in the final sampler (freshwater and seawater after 12days) and increase in pH values (Kazushi et al., 2006)

트리클로산은 담수와 해수에 노출 시, 공통적으로 광분해가 발생하며, 반감기는 담수에서 8일, 해수에서 4일로 측정된다. 하지만 수계에 노출되면, 3일 이후 2,8-Dichlorodibenzo-p-dioxin (DCDD)로 전환되며(Fig. 2), DCDD는 트리클로산보다 안정된 분자로, 담수에서 126일, 해수에서 122 일의 반감기를 가진다(Fig. 3, Kazushi et al., 2006). 수계에 노출된 트리클로산의 수명은 pH와 금속 이온 및 유기 물질(염분) 등의 보조 용질에 의해 조절된다(Latch et al., 2005).

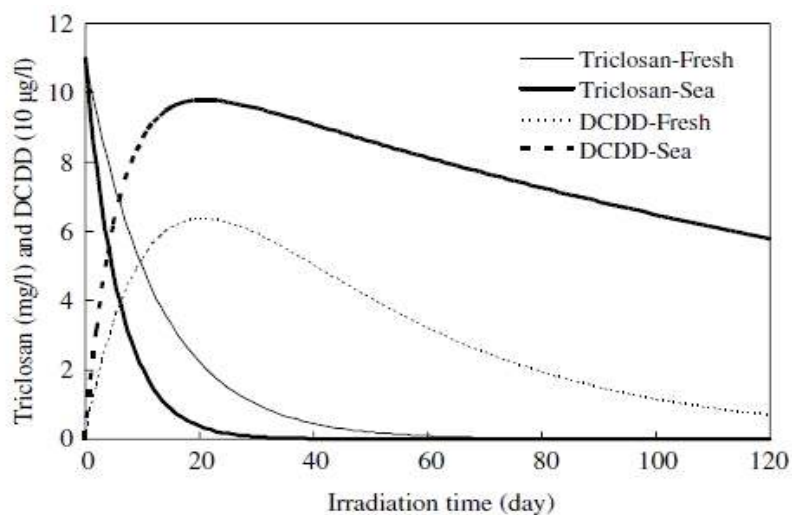


Fig. 3. Prediction of the levels of triclosan, 2,8-DCDD in fresh water and sea water (Kazushi et al., 2006)

최근 연구에 따르면 트리클로산은 광반응 이외에도 수돗물에 함유되어 있는 염소와 반응

하여 클로로폼이나 다이옥신으로 전환될 수 있는 신생오염물질로 밝혀졌다. 높은 농도의 트리클로산에 노출될 경우, 생물의 생체대사과정에서 호르몬을 변형시켜 내분비 장애를 초래하며 이는 발암, 내분비계 장애처럼 더 큰 독성을 유발하는 결과를 초래한다(정희재, 2012). 또한, 전환 과정에서의 유도체인 ‘metyltriclosan’은 생물 분해가 늦어 지속적인 수생생물에 독성을 유발한다고 알려져 있다. 이에 유럽연합(EU)에서는 트리클로산을 유럽화학물질청(ECHA)의 신유해화학물질 관리제도에 의거한 보건 및 환경 위험성 의심 화학물질 평가계획에 현재 조사대상 목록으로 등재하고 있으며, 유럽 소비자 연합 단체(BEUC)는 유럽집행위원회에 화장품에 사용되는 트리클로산에 대한 강력한 규제가 마련되어야한다고 주장하고 있다. 국내에서도 2009년 11월 신규화학물질 이외의 화학물질 유해성 심사결과에 따라 트리클로산 및 이를 함유한 혼합 물질은 피부에 자극성이 있으며, 수생생물에 매우 유독하기에 국립환경과학원의 유해화학물질 관리법 개정고시에 유독물로 추가한 바이다. 연구는 활발히 진행되고 있지만, 트리클로산을 관리하기 위해 표준화된 시험분석 및 평가방법을 확립해야함에도 불구하고 아직까지 트리클로산에 대한 표준화된 분석방법은 마련되지 않은 상태이다.

트리클로산은 보편적으로 다양한 제품에 사용되고 있는 추세이기에, 실제 담수에서 검출된 사례는 국내부터 해외까지 광범위하게 확인되고 있다. 해외의 경우 영국과 그리스의 폐수 처리장에서는 트리클로산이 각각 최대 1.9 ng/L, 23.9 ng/L가 검출되었다(Reiss et al., 2002; Sabaliunas et al., 2003; Stasinakis et al., 2008). 트리클로산은 폐수처리장, 생분해, 광변형, 수작 그리고 침전 작용에 의해 96%가 제거 되지만, 그럼에도 불구하고 폐수 배출물에 잔류하는 트리클로산의 양은 적지 않다. 지표수에서는 2.3 ng/L (Singer et al., 2002; Tixier et al., 2002; Lindstrom et al., 2002), 미국 하천 하류에서는 1.4 ~ 90 ng/L의 트리클로산이 검출되었다(Kolpin et al., 2002). 일본의 tone 운하에서도 트리클로산이 검출되었다는 사례가 있으며 상류보다 하류 부근에서 더욱 높은 농도의 트리클로산이 검출되었다(Iwaki et al., 2008). 가정 폐수 속 트리클로산의 농도는 55~134 ng/L이었지만, 운하에서 검출된 트리클로산의 농도는 11 ng/L ~ 31 ng/L로 감소되어 관찰되었다. 하류 지역 측정 지점에서 하루를 기준으로 시간별로 측정을 진행하였을 때, 최대 120 mg/h의 트리클로산이 검출되었다.

해외뿐만 아니라 한국에서도 트리클로산에 대한 사용량이 높아지고 있으며 그에 따른 수계 노출 가능성 또한 비례하게 증가하고 있다. 화학물질유통량 조사결과, 트리클로산의 국내 유통량은 전량 수입되며, 연간 67.16톤이 수입된다. 국내에서는 영산강, 섬진강 수계 하수처리장 방류수에서 트리클로산이 검출이 확인되었으며, 12 ng/L이 검출되었다(Kim et al., 2007, Vanderford et al., 2006). 국내 팔당과 잠실 수중보 사이의 지류에 위치하는 하수처리장(난지, 서남, 중랑, 탄천)의 유입, 유출수와 국외 하수처리장 유입, 유출수를 비교 분석 검출 결과(Lee et al., 2009)는 다음과 같다.

**Table 1.** Occurrence of EDC/PPCPs in the influent of a WWTP(Lee min ju et al., 2009)

| Chemical            | Domestic   |            | Overseas  |    |                       |                      |
|---------------------|------------|------------|-----------|----|-----------------------|----------------------|
|                     | This study | The others | Japen     | US | Europe                |                      |
| Triclosan<br>(ng/L) | 14         | -          | 200~1,000 | -  | 4,900<br>(170~23,900) | 1,800<br>(390~4,200) |

트리클로산의 국외 대비 국내 수계 노출량은 적다. 이는 하수처리장에서의 처리율이 90% 이상이라, 실질적인 물 환경에서는 검출량이 미미한 것으로 확인된다(Ryu et al., 2018). 하지만 해당 물질은 적은 농도에도 높은 독성을 나타낼 가능성과, DCDD로의 전환(Kazushi et al., 2006)을 미루어 보아, 실질적인 트리클로산 검출량 이외에 더욱 안정화 된 형태의 DCDD가 수계에 존재할 것으로 추정된다. 따라서 트리클로산이 수계로 유입되었을 때, 1차 노출지인 담수이외에 최종 목적지인 해양생태에 미치는 영향을 본 연구를 통해 확인하고자 한다.

## 1.2 연구 목적

트리클로산은 생활용 살균제로써 생활폐수로 수계환경에 노출이 되며, 안정된 구조인 DCDD로의 전환을 통해 잠재적으로 축적되어 해양 생태계에 독성을 나타낼 수 있는 물질이다. 수계에 대한 트리클로산의 영향을 파악하기 위해 조류 중 가장 분포도가 높아 해양 생태계의 환경을 파악하기에 용이한 와편 모조류 중 *Prorocentrum minimum* 을 실험 생물로 선정하였다. 이에 본 실험은 트리클로산을 *Prorocentrum minimum*에 노출시킨 후 나타나는 결과를 통해 트리클로산이 해양 생물에게 영향을 미치는지에 대해 목적을 두고 있다.

## 1.3 이론적 배경

최근 트리클로산[Triclosan, TCS; 5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol]의 사용이 급격히 증가하면서 환경으로 유입되는 양 또한 증가하여 수계에서 트리클로산의 검출이 증가하고 있다. 트리클로산은 enoyl-acyl carrier protein reductase enzyme(ENR)의 활성 부위를 억제함으로써 박테리아 지질 합성을 차단하여(Levy C.W., Roujeinikova A., Sedelnikova S., 1999) 세포막 형성을 억제하는(Villalain et al., 2001) 기작을 통해 세포 증식을 멈춘다(Phan and Marquis, 2006). 트리클로산은 phenolic, diphenyl ether 및 polychlorinated biphenyl(PCB) 하부 구조를 갖는 할로겐화 방향족 탄화수소로 분류된다.(Ahn K.C., Zhao B., Chen J., Cherednichenko G., Sanmarti E., Denison M.S., Lasley B., Pessah I.N., Kültz D., Chang D.P.Y., et al., 2008.) 그 화학 구조는 PCB, 폴리브롬화 디페닐 에테르, 비스페놀 A, 다이옥신과 같은 독성 화합물의 화학적 특성을 갖는다(Allmyr M., Harden F., Toms L.M.L., Mueller J.F., McLachlan M.S., Adolfsson-Erici M., Sandborgh-Englund G., 2007.).

이런 특성을 가진 트리클로산은 미생물 저항성, 피부 자극, 내분비 교란, 알레르기 발생률 증가, 갑상선 호르몬 대사 변화 및 그 부산물로 인한 종양 발생과 같은 건강 문제에 대한 다양한 연구 결과가 밝혀지고 있다. 먼저 인체에 트리클로산이 노출될 경우, 접촉성 피부염 또는 피부 자극을 일으켜 광 알레르기성 피부염이 발생할 수 있고 그로 인해 습진 발진과 같은 증상이 유발될 수 있다(Robertshaw H., Leppard B., 2007). 또 다른 연구에서는 저 체온증과 생쥐의 중추 신경계(CNS)의 전반적인 우울증을 유발하여 갑상선 호르몬의 신진 대사에 부정적인 영향을 미친다고 밝혔다(Miller TL, Lorusso DJ, Walsh ML, Deinzer ML, 1983). 0.03 mg/L-1 농도의 트리클로산 노출은 올챙이 변성 유전자의 발현을 야기하여 조기 변태를 유발했다(Veldhoen N., Skirrow RC, Osachoff H., Wigmore H., Clapson DJ, Gunderson MP, van Aggelen G., 2006). 이와 유사하게 수컷 쥐에서 정자 생산이 감소된 원인이 트리클로산 노출과 관련이 있다고 밝혔다(Kumar et al. 2009). 또한, 생쥐에서 장기간 트리클로산 노출은 간암을 발병시킨다는 점에서 트리클로산의 암 메커니즘

은 인간을 대상으로 독성 관련성을 가지고 있다(Yueh et al., 2014).

수생 생물을 대상으로 트리클로산의 독성에 관한 다양한 연구가 밝혀지고 있다. 일반적으로 박테리아에 대한 MIC(최소 억제 농도)는 10~3,000 µg/L로, 저 농도의 트리클로산이 효모, 곰팡이뿐만 아니라 그람 양성, 그람 음성 박테리아에 영향을 줄 수 있다(Bhargava and Leonard, 1996). 위 독성을 갖는 트리클로산이 수생태계에 노출 되었을 때의 선행연구(Orvos et al., 2002; Ishibashi et al., 2004; Tatarazako et al., 2004; Canesi et al., 2007; DeLorenzo et al., 2008)에 의하면, *Daphnia magna*의 EC<sub>50</sub>값은 390 µg/L, *Ceriodaphnia dubia*는 48시간 기준 240 µg/L의 EC<sub>50</sub>값을 지닌다. 물고기는 96시간을 기준으로 사멸 농도가 260~370 µg/L에서 관찰되었으며 *Lemna gibba*의 성장 저해는 7일 기준 62.5 µg/L보다 높은 농도에서 관찰되었다. *Selenastrum capricornutum*의 EC<sub>50</sub> 및 성장 저해는 4.7 µg/L에서 관찰되었다. 미세조류인 *S. capricornutum*의 트리클로산에 대한 민감도는 박테리아인 *Vibrio fischeri*의 EC<sub>50</sub>값인 150 µg/L보다 30배 높게 측정되었으며 이는 수계에서 트리클로산에 대해 미세조류가 가장 민감하다는 것을 입증하는 결과이다(Tatarazako et al., 2004).

비록 트리클로산이 폐수 처리장에서 대부분 제거되어도 잔류 된 트리클로산은 쉽게 광분해 되어 산화하는 동안 독성 부산물을 형성하게 된다(Yang et al., 2011). 실험에 따르면 상이한 조사 파장을 사용하여 pH>8에서 최대 12 %의 수율로 2,8-DCDD 로의 광 전환을 관찰하였다. 연구자들은 실험실 조건(정수) 하에서 2,8-DCDD 형성 수율을 담수 조건과 비교했다. 실험실과 실제 조건 사이의 비교 결과(in vitro)는 트리클로산이 햇빛에 조사된 수원에서만 2,8-DCDD로 변환 될 수 있음을 확인하였다(Latch et al., 2003). 수계에서 발견되는 트리클로산은 햇빛에 노출되어 광분해 되는 작용 이외에도 염소와 반응하여 다이옥신으로 전환된다. 전환 과정에서 유도체인 metyltriclosan은 생물 분해가 늦어 지속적인 수생생물에 독성을 유발할 뿐만 아니라 약한 에스트로겐 활성화, 다양한 염소화 및 브롬화 유도체를 형성한다(Onodera et al. 1987; Latch et al. 2003; Arizono and Takao 2006; Inaba et al. 2006). 현재 국내 및 해외에서 관심 오염물질로 지정하여 환경 위해성 평가 항목에 포함된 트리클로산은 위와 같은 다양한 독성으로 수계 생태계에 영향을 미친다. 또한, 적은 농도로도 물질 전환을 통한 안정화로 독성 영향을 끼칠 수 있어 지속적인 수계 모니터링이 필요한 상황이다.

## II. 실험방법

### 2.1 조류 배양 및 실험 사용 약품

실험에 사용된 조류는 해양에 서식하는 와편모조류인 *Prorocentrum minimum* (Strain number : D-127)을 사용하였다. 조류 배양에는 F/2 배지를 사용하였으며, 20℃, 12:12 광주기의 배양기에서 배양하였다. 트리클로산(5-Chloro-2-(2,4-dichlorophenoxy)phenol, CAS no. 3380-34-5, Sigma)은 순도 99.8% 이상의 물질을 사용했다. 분말 형태의 트리클로산을 실험에 이용하기 위해, 유기용매인 Dimethyl sulfoxide(DMSO)에 녹여 사용하였으며, 만들어진 stock의 농도는 1 g/mL였다. 실험에 맞는 농도를 사용하기 위해, 10% 단계 희석을 시킨 용액을 단계별로 사용하였다. 실험에 사용된 농도는 0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 (mg/L)이며, DMSO가 실험에 영향을 줄 수도 있기에, 투여량이 100µl를 넘지 않게 했다. *P. minimum* 이 포함된 배지 150ml를 300ml 플라스크에 분주 후 각 농도에 맞게 트리클로산 투여를 진행했다. 트리클로산이 *P. minimum*에게 미치는 단기적 독성을 확

인하기 위해, 0, 24, 48, 72시간마다 생물의 형태적, 생리적 상태를 확인하였다. 24 시간마다 세포 계수와 광합성 효율 측정을 진행하였으며, 마지막 날인 72 시간대에 관련 유전자 발현량, chlorophyll, cell size 확인을 통해 실험 결과를 도출하였다. 실험 초기 시작 세포 농도는  $6.5 \pm 0.075 \times 10^3$  였으며 세포 수 계수 시, SR chamber (HMA-s6117, Matsunami Glass)를 이용하여 cell 110 $\mu$ l를 DW 990 $\mu$ l에 10% 희석한 용액 1ml를 분주하여 계수를 진행했다. 각 실험군 당 3개의 sampling (triplicate)을 진행하고, 0시간에서 100개에 근접한 세포 수 대비 칸 수(16box)를 설정하여 sample당 2회씩 계수를 진행했다. 계수된 16box의 세포 수(a)를  $a/16 \times 1,000$ 을 통해 총 세포수를 계산 하였으며, 6회 계수의 평균값을 도출하여 총 세포 수를 도출해 냈다.

## 2.2 EC<sub>50</sub> 측정

OECD guid line (2011)에 의거하여 물질이 생물에 영향을 주어 생장률이 50% 감소하는 시점에서의 물질 농도를 나타내는 값인 EC<sub>50</sub> (Effective concentration 50%)를 측정하였다. EC<sub>50</sub>를 통해서 트리클로산이 *P. minimum*에 미치는 단기 독성을 확인하였다. 일반적으로 세포가 사멸하는 양상이 관찰될 때, EC<sub>50</sub>값으로 세포 계수를 이용하지만, 트리클로산에 영향을 받은 *P. minimum*은 Control군과 육안으로 큰 차이를 발견하지 못했다. 이에 해당 실험에는 72시간에서의 Chlorophyll값으로 EC<sub>50</sub>를 도출해냈다. Chlorophyll a와 carotenoid 측정을 진행하였으며, DU730 생명과학 UV/Vis 분광광도계(Beckman Coulter)를 이용하였다. Sample 50ml을 농축시킨 후, 90% acetonedmf 이용해 색소를 검출하였다. 각 분광광도에서 샘플 촬영 후, Chlorophyll 계산은 Unesco 1996를 참고하여 진행하였다. 측정된 Chlorophyll은 Origin v8.5 (MicroCal Software Inc.)로 does response curve도출을 통해 EC<sub>50</sub>값을 확인하였다.

## 2.3 광합성 효율 측정

트리클로산이 광합성에 미치는 영향을 확인하기 위해 *P. minimum*을 대상으로 처리 농도 및 시간에 따른 광합성 효율 변화를 측정했다. 일반적으로 조류에게 광합성은 생존에 관여하며, 광합성 저해는 세포의 손상 및 사멸을 유도한다. 광합성 효율을 측정하기 위해 Handy PEA (Hansatech Instruments Ltd.)를 이용하였으며, 3,000 luminous를 1초 노출시켰을 때의 변화를 관찰하였다. 광합성 효율 측정을 위해 전용 유리병에 2ml씩 분주하였고, 각 실험군 당 3개의 샘플을 채집하여 오차 범위를 줄였다. 이후 샘플을 은박지로 감싸 배양기에 20분간 보관하여 암적응을 유도하였다. 첫 번째로 암적응 세포에 순간적인 빛을 가해 세포의 형광 수준을 측정하였다. 형광 매개 변수인 F<sub>0</sub> (암적응된 세포가 반응하는 최소 형광 값), F<sub>M</sub> (암적응된 세포가 반응하는 최대 형광 값)을 이용( $F_v = F_M - F_0$ )하여 F<sub>v</sub>값을 구하고 이를 통해 광계2에서의 광합성 효율을 나타내는  $F_v/F_M$ 을 도출하였다.

## 2.4 관련 유전자 발현도 측정

트리클로산(0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L)이 *P. minimum*에 작용하였을 때, *P. minimum*에서 발생하는 분자 수준에서의 변화를 관찰하기 위해 150ml의 sample을 농축하여 RNA 추출(Trizol solution)을 진행하였다. 추출한 RNA는 cDNA로 합성하여 real-time PCR (CFX96 Real time system, BIO-RAD)을 통해 광합성 관련 유전자(*PmrbcL*, *PmatpB*, *Pmpsba*,

*PmpsA*)와 산화스트레스가 발생했을 때 발현되는 유전자(*PmGST*, *PmKatG*)의 발현 정도를 확인하였다. RT-PCR시, 사용된 형광 물질은 syber green을 사용하였으며, reference gene으로 *PmtubA* 유전자를 사용하였다.

### III. 연구 결과 및 고찰

#### 3.1 Cell counting

실험에 앞서, 초기 세포 수는 오차 범위 내에서 측정되었다. 트리클로산 처리 농도 0, 0.01, 0.05, 0.1 mg/L에서는 유의미한 결과 없이 세포수가 증가하는 양상이 관찰되었다. 트리클로산 농도 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L에서는 48시간까지 정상적인 증가 값보다 낮은 값을 나타내며 세포 수가 증가하였지만, 72시간에 세포 수가 감소하는 양상이 관찰되었다 (Fig. 4). *P. minimum* 세포에 있어서 유의한 영향을 주는 트리클로산 농도는 72시간 기준 0.5~10.0 mg/L로 관찰되었다. 유의미한 영향을 주는 농도에서 확실한 세포 사멸이 이루어지지 않은 것으로 보아, 트리클로산의 단기 독성은 세포를 직접적으로 사멸시키는 물질이 아닌, 세포 성장 및 세대에 영향을 준다는 사실이 확인되었다.

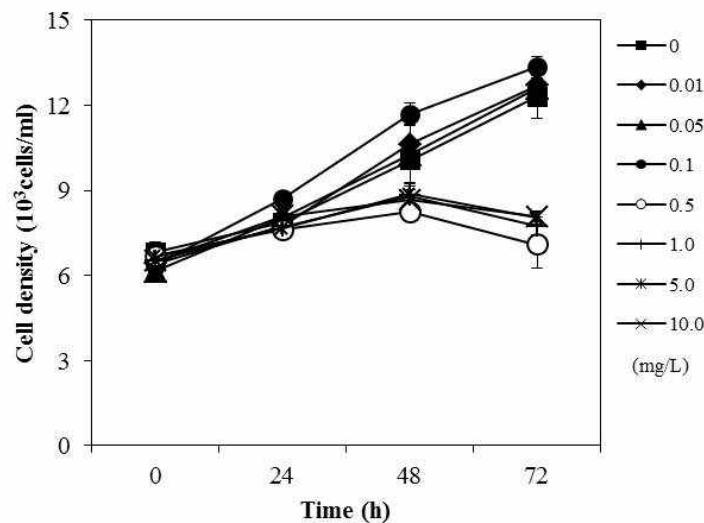


Fig. 4. Triclosan 농도별(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L) *P. minimum* 계수 결과

#### 3.2 Fluorescence

형광은 0~1초까지 log scale로 관찰하였으며, 3,000의 luminous을 주었다. 0시간에서 동일한 양상의 형광 그래프가 형성되어, 초기 sample은 똑같은 상태의 세포로 실험이 시작되었음이 확인되었다. 24시간부터 5.0, 10.0 mg/L 그래프는 정상적인 양상과 다르게 관찰되었으며, 1.0 mg/L 그래프도  $F_0$  값은 유지되었지만 5.0, 10.0 mg/L 그래프와 동일한 형광 그래프를 나타내었다. 48시간에 1~10 mg/L까지의 그래프는 형광을 보이지 않는 결과가 도출되었으며, 72시간에 0.5 mg/L가 영향을 받아 정상적인 그래프의 OJIP 양상과 달라진 결과가 관찰되었다. 해당 결과를 바탕으로 형광에 영향을 주는 트리클로산의 농도는 72시간 기준 0.5~1.0 mg/L 사이에 존재한다는 점을 확인 가능했다.

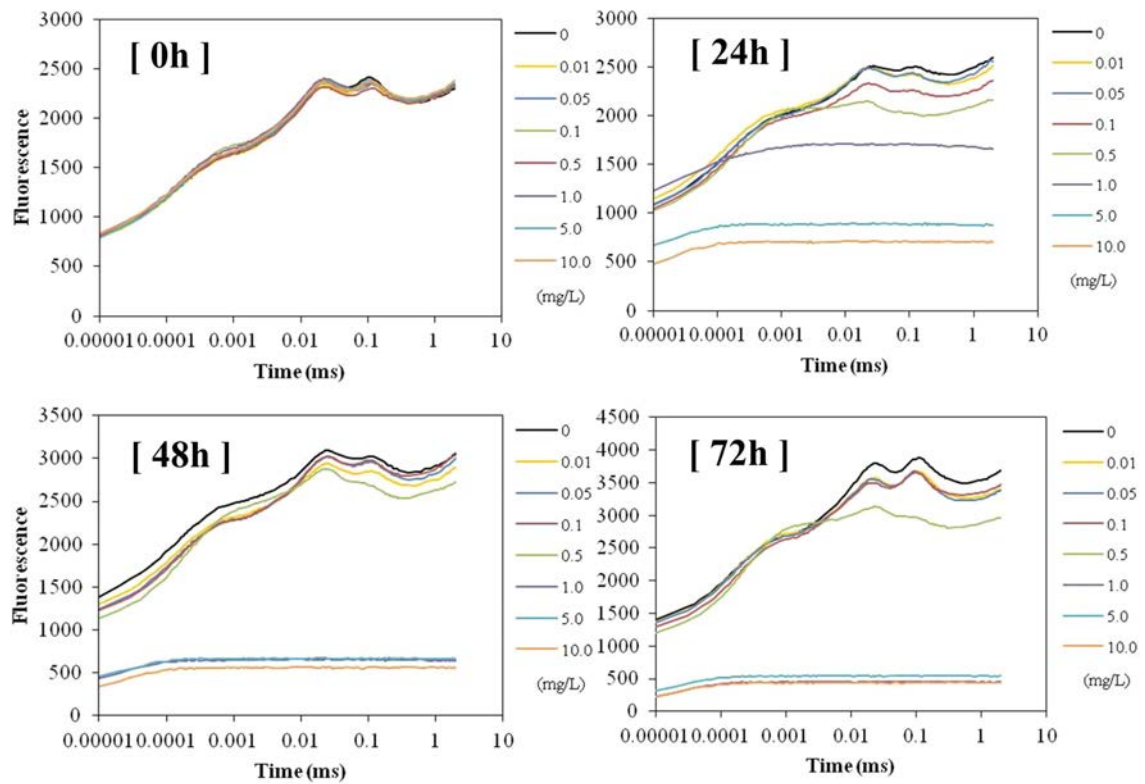


Fig. 5. Triclosan 농도별(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L), 시간대별(0, 24, 48, 72) 형광 값 변화

### 3.3 $F_v/F_m$

24시간부터 1.0, 5.0, 10.0 mg/L의 트리클로산이 투여된 sample에서  $F_v/F_m$ 값이 감소하는 결과가 도출되었다. 형광그래프 기준, 72시간에 영향을 보였던 0.5 mg/L는 영향 농도 미만의 sample들과 동일한 수준의  $F_v/F_m$ 결과가 관찰되었다. 이는 트리클로산이 형광에 영향을 주었지만,  $F_v/F_m$ 에까지는 영향을 주지 않아 광계2는 아직 정상범주의 작동을 한다는 결론을 내릴 수 있다. Fig. 5과 Fig. 6 결과를 통해 트리클로산이 광합성에 영향을 준다는 사실이 확인되었다.

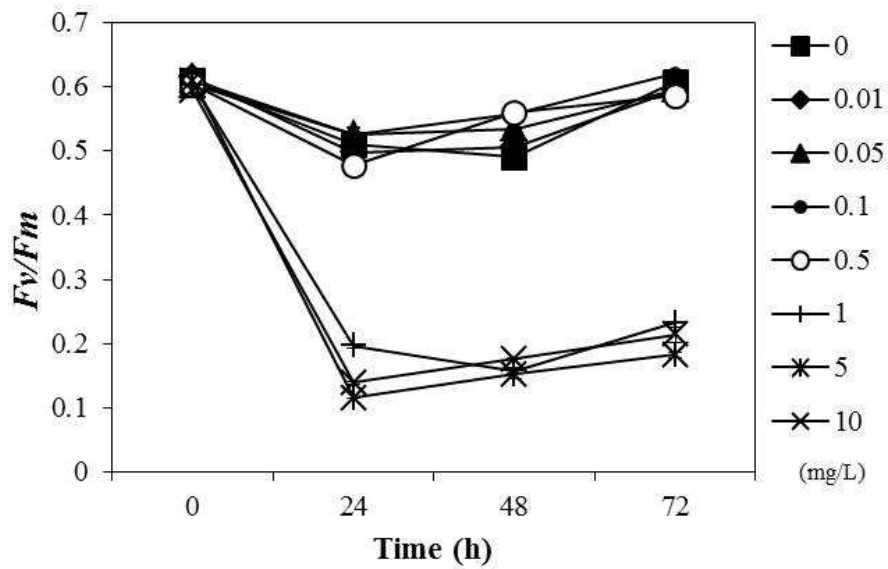


Fig. 6. Triclosan 농도별(0, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L), 시간별(0, 24, 48, 72)  $F_v/F_m$  변화

### 3.4 Chlorophyll a, Carotinoid

72시간째 되는 날에 각 농도별로 chlorophyll a를 확인한 결과(Fig. 7), 0.1~0.5 mg/L구간에서 가장 큰 감소폭이 관찰되었다. 0.5 mg/L에서의 chlorophyll a감소량은 Control대비 약 73%감소하였으며, 0.1 mg/L대비 약 40% 감소하는 결과가 관찰되었다. 외편모조류는 Chlorophyll 관찰 시, chlorophyll a와 carotinoid를 관찰한다. 보통 외부적 자극으로 인해 stress가 발생하여 색소에 영향을 미치게 될 경우, chlorophyll a가 감소하게 되고, 감소한 chlorophyll a를 대체하기 위해 carotinoid가 증가하게 된다. 본 실험에서는 carotinoid 또한 chlorophyll a와 동일한 양상으로 감소되는 결과가 관찰되었다. 마찬가지로 0.1~0.5 mg/L구간의 감소폭이 약 54%로 가장 크게 관찰되었으며 control 대비 0.5 mg/L에서 약 63% 감소하는 결과가 관찰되었다(Fig 7). Chlorophyll 결과를 통해 트리클로산이 세포의 색소에 영향을 주고 최종적으로 광합성에 영향을 미친다는 결과가 확인되었다. Chlorophyll a값을 토대로  $EC_{50}$ 값은 약 1.5 mg/L로 관찰되었다 (Fig 8).

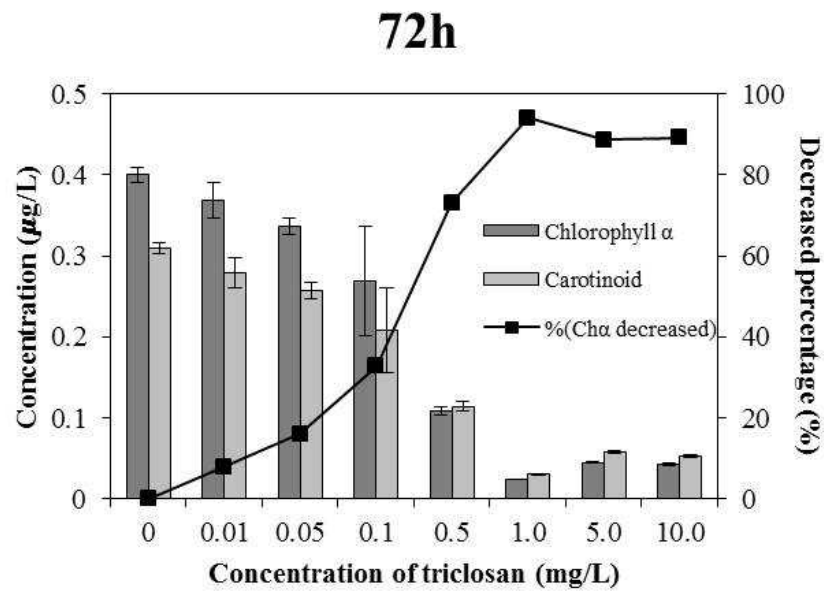


Fig. 7. Chlorophyll  $\alpha$ , carotenoid 양 및 Chlorophyll  $\alpha$  감소율

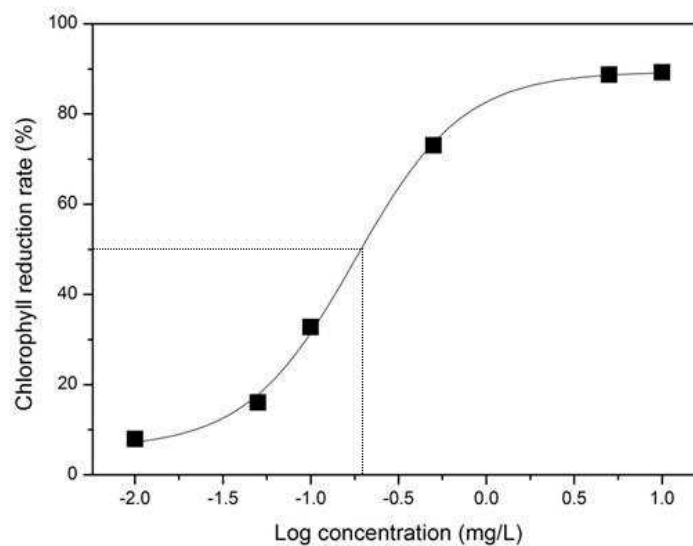


Fig. 8. Chlorophyll  $\alpha$  감소율 기준  $EC_{50}$

### 3.5 관련 유전자 발현도 측정

광합성 관련 유전자(*PmrbcL*, *PmatpB*, *Pmpsba*, *Pmpsaa*)와 산화스트레스 관련 유전자(*PmGST*, *PmKatG*)의 발현도를 확인하였다. 앞선 실험에서  $EC_{50}$  값이 약 1.5 mg/L로 관찰되었기에 이보다 낮은 농도에서 구간을 나누어 트리클로산을 노출시켰다. 0, 0.1 mg/L에서는 유의미한 독성 결과가 나오지 않았지만, 0.5 mg/L를 기점으로 1.0 mg/L은 유의미한 영향이 관찰되어 0, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L 농도 구간으로 실험을 진행했다(Fig 9, Fig 10). 광

합성 관련 유전자인 *Pmpsba*, *Pmpsaa*는 1.0 mg/L에서 발현량이 급 감소하였고, *PmatpB*는 노출농도가 증가 할수록 감소하였다. *PmrbcL*은 노출이후 지속적인 증가량이 관찰되었다. 산화스트레스 관련 항산화 단백질을 생성하는 유전자인 *PmGST*는 1 mg/L까지 지속적으로 증가하는 결과가 관찰되었고, *PmKatG*는 0.1 mg/L에서 높은 발현량을 보이고 이후 농도에서 발현량이 감소하는 양상이 확인되었다. 보통 유전자 발현이 증가하면, 세포가 건강한 상태이기 때문에 그만큼 높은 활성을 띤다고 할 수 있지만, 해당 실험에서는 유해할 것이라 추정되는 물질인 트리클로산을 처리했기 때문에 해석을 달리해야 한다. 유전자량의 증가는 해당 물질의 독성 혹은 방해 기작에 의해 세포가 일반적인 상태를 유지하기 위한 방어기작으로 해석해야 하며, 유전자 발현량이 증가 후, 급감하게 되면 결국 세포는 회복하지 못하고 유전자가 관련하는 기능의 약화가 발생했다고 해석할 수 있다. 광합성 관련 유전자는 각기 다른 양상을 보이지만, 유전자의 증감량을 통해 트리클로산이 광합성의 저해를 일으킨다는 사실을 확인할 수 있다. 항산화 단백질 유전자 또한 증감량을 통해, 트리클로산이 *P. minimum*에 산화스트레스를 유발시킨다는 결과가 확인되었다.

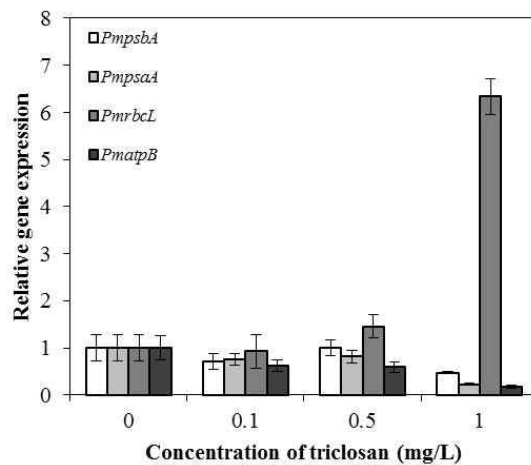


Fig. 9. 광합성 관련 유전자(*PmrbcL*, *PmatpB*, *Pmpsba*, *Pmpsaa*)의 발현도

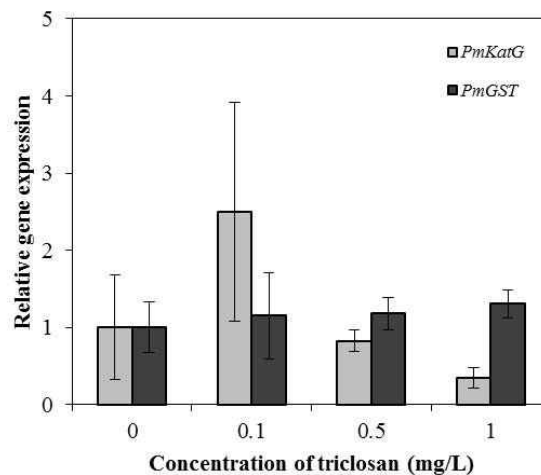


Fig. 10. 항산화 단백질 관련 유전자(*PmKatG*, *PmGST*)

## IV 결론 및 제언

### 4.1 활용방안

본 실험을 통해 트리클로산이 해양 와편모조류인 *P.minimum*의 생장에 영향을 미친다는 결과를 확인할 수 있었다. 트리클로산이 여러 생물에게 독성 영향을 미친다는 연구 결과가 있지만, 트리클로산이 일반 생필품에 살균 성분으로 사용되고 있는 점을 감안하면, 생물에 유해한 영향을 미치지 않는 범주에서는 다채롭게 사용할 수 있을 것이다. 앞서 언급한 트리클로산의 독성 효과 중 하나인 박테리아 지질 합성을 차단(Levy C.W., Roujeinikova A., Sedelnikova S., 1999) 및 세포막 형성을 억제하는(Villalain et al., 2001)기작을 이용한다면 차세대 연료인 bio-fuel 등 생물 배양에 있어 효과적으로 단일 세포만 배양 가능할 것이며, 세포 분열 주기를 조절하는데 사용될 수 있을 것이다. 박테리아, 곰팡이, 효모 등을 억제하는 살균 용도로써의 트리클로산은 이미 활용도가 높기에, 세포증식을 멈추는 독성을 활용해, 여러 분야에 활용할 수 있다. 또한 세포막 형성을 억제하는 기작은 차세대 암세포 치료제로 활용될 가능성이 있다. 암이 유발되었을 때, 암세포를 추적하여 진단하는 치료법들이 개발되었지만 암에 있어서 근본적인 예방과 진단만 있을 뿐, 확실한 치료법은 존재하지 않고 있다. 세포 분열 주기가 손상된 암세포를 다른 세포나 기관에 영향을 주기 전에 제거하는 것이 현재의 차선책이지만, 완치라는 개념이 없어, 암에 걸린 사람들은 언제 다시 재발할지 모르는 두려움에 살고 있다. 만약 트리클로산이 체내에 투입되었을 때, 다른 세포와 기관에 독성영향을 미치지 않는 선에서 순환할 수 있고, 안전하게 체외로 배출될 수 있다면, 차세대 암세포 치료제로 사용될 수 있을 것이다. 현재 트리클로산이 세포분열에 미치는 영향에 대한 연구는 활발히 진행되고 있으며, 쥐를 대상으로 암세포 치료에 관련된 연구 또한 진행되고 있다. 추가적으로 동물에 있어서는 반감기와 생물 독성 정도를 고려해, 양식장에서 따개비, 해파리 등 어업에 영향을 주는 생물의 활동을 억제할 수 있을 것이라고 생각한다. 식물에 있어, 농업에 제한을 주는 생물(곤충, 식물)등의 활동을 억제하고 식물을 보호하는 방향으로 활용할 수 있을 것이다. 해당 실험에서 조류들이 사멸하지는 않았지만, 분열이 일어나지 않은 점을 참고하여 조경, 원예 등 생물의 성장을 멈추어 그 상태로 유지하는 작용으로도 활용 할 수 있을 것이다. 위 두 경우에는 생태계 먹이 연계과정에 하위 단계에 있는 생물들과 적용 생물에 영향을 미치지 않는 선에서 활용이 되어야 한다.

현재 트리클로산의 환경 노출 수준은 전 세계적으로 관심거리이며 그에 따른 수계 노출 규제도 활발히 설정되고 있다. 하지만 트리클로산의 생성물인 DCDD에 대한 규제는 정확히 이루어지지 않고 있다. 대한민국을 제외한 나라에서는 수계에 노출되는 트리클로산의 농도가 현저히 높은 만큼, DCDD의 전환량 또한 많을 것이다. 트리클로산의 반감기가 낮고 광분해 된다는 점을 미루어 보았을 때, 그 자체로 유해성은 갖지만 실질적인 위해성은 갖는다고 볼 수 없다. 하지만 다이옥신 형태인 DCDD로 변환되어 반감기가 증가하게 되고, DCDD의 생물 농축과 더불어 더 큰 수계인 해양으로의 노출은 새로운 독성 영향을 나타낼 수 있다. 이에 선행적으로 DCDD로의 변환 기작을 찾고 그 촉매 작용 물질에 대한 규제도 원활히 진행되어야 할 것이다. 나아가 다이옥신이 높은 독성을 갖는 물질임은 널리 알려져 있지만 DCDD에 대한 정확한 독성 기작은 알려져 있지 않으므로, 확인 연구가 진행되어야 할 것이며 DCDD의 지속적인 환경 검출을 통해, 새로운 독성 지표를 성립해야 할 것이다.

정리하자면, 트리클로산이 생물에 영향을 주는 물질임은 확실하지만, 생물이 영향을 받지 않는 농도 내에서 현재 사용되는 살균 성분등과 같이 이로운 물질로 사용되도록 새로운 방

향을 제시하여 범용성을 높이는 연구가 필요할 것이며, 환경 내 트리클로산 변환 물질인 DCDD에 대해 집중적인 연구가 필요할 것이다.

## 4.2 결론

본 연구는 생활용 살균제의 성분인 트리클로산이 해양 미세조류 *Prorocentrum minimum*에게 어떤 영향을 미치는지 알아보기 위해 *P. minimum*에 트리클로산의 농도를 달리하여 처리하였다. 24시간을 주기로 세포 계수와 광합성 효율 측정을 하였고, 마지막 날인 72시간에 광합성 관련 유전자 발현량, chlorophyll, cell size를 확인하여 다음과 같은 결과를 도출하였다.

트리클로산은 세포 성장을 억제하는 효과를 보였다. Cell counting을 통해 트리클로산 처리농도 중 0.5, 1.0, 5.0, 10.0 mg/L 농도에서 72시간에 세포 수가 감소하였으며, 이 때 0.5mg/L에서 세포의 수가 가장 감소하는 것으로 보아 세포 수에 유의미한 영향을 주는 농도는 0.5~1.0 mg/L로 확인되었다.

트리클로산은 *P. minimum*의 광합성에 영향을 끼친다는 것을 다음과 같은 결과를 통해 알 수 있었다. *P. minimum*의 형광값을 확인한 결과, 형광값에 영향을 주는 트리클로산 농도는 72시간 기준 0.5~1.0 mg/L 사이에 존재 한다는 점을 확인했다. 또한,  $F_v/F_m$  값에서는 0.5 mg/L에서 광계II까지는 영향을 주지 않은 것으로 관찰되어 형광값과 비슷한 양상을 나타내었다. 결론적으로 형광값,  $F_v/F_m$ 값 모두 72시간 기준 0.5 ~ 1.0 mg/L의 농도부터 영향을 받았음이 확인되었다. Chlorophyll 결과는 72시간째 되는 날에 chlorophyll a와 carotinoid 모두 0.1~0.5 mg/L에서 가장 크게 감소하는 결과가 확인되었으며 Control대비 각각 약 73%와 63%가 감소했다. chlorophyll a의  $EC_{50}$  값은 약 1.5 mg/L로 확인되었다. 외부적 자극으로 인해 색소가 영향을 받는 경우 chlorophyll a가 감소하고 이를 대체하기 위해 carotinoid가 증가하게 되는데, 본 실험에서는 두 색소 모두 감소하는 양상을 나타내어 트리클로산이 세포의 색소 감소를 유발해 결과적으로 광합성에 영향을 미친다는 결과를 볼 수 있었다.

추가적으로 광합성 유전자의 발현도를 측정했을 때, 일반 세포와는 다른 유전자 증감량이 관찰되었다. 이를 통해 트리클로산은 광합성 기작에 영향을 끼치며, 산화스트레스를 유발함을 알 수 있다.

이 모든 결과를 종합하였을 때 트리클로산은 *P. minimum*의 광합성과 세포 분열뿐만 아니라 세포 사멸까지도 영향을 끼친다는 점을 확인할 수 있었다. 이러한 결과를 바탕으로 트리클로산 독성에 관한 지표를 이용하여 환경 문제를 해결할 수 있는 연구의 밑바탕이 될 것이라고 판단된다.

## 4.3 Further Works

본 실험을 통해 트리클로산이 *P. minimum*의 광합성과 세포 분열에 문제를 유발한다는 사실이 관찰되었다. 추가적으로 규조류 *Skeletonema costatum*에 트리클로산을 투여했을 경우 산화스트레스가 유발되어 조류를 사멸시킨다고 한다(Zhi lin Zhu et al., 2018). *P. minimum*을 이용해 트리클로산이 산화스트레스를 유발해 사멸의 원인이 되는지 확인할 예정이다. 산화 스트레스가 발생했음을 나타내는 ROS를 DHR123 staining solution을 이용해 확인하고, 산화 스트레스로 인해 생성되는 2차 생성물인 SOD와 MDA를 확인할 예정이다. 이후, 트리클로산이 세포의 성장을 억제한다는 선행 연구 결과를 토대로 cell cycle에 영향

을 미치는 유전자의 발현량을 확인하고, PI staining을 통해 cellometer로 각 cell cycle별 세포 비율을 확인하여 세포 분열 억제에 대한 내용을 확인해 보려고 한다. 또한, 추후 해양 조류 중 다른 종의 조류를 이용하여 트리클로산에 대한 독성 평가를 추가적으로 진행해 볼 예정이다.

트리클로산은 국외에 비해 국내 수계환경에서 검출이 잘 되지 않는 편이다. 하지만, 연구에 따르면 트리클로산은 광화학에서 보다 독성이 강한 화합물 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxins(2,8-DCDD or DCDD)으로 전환됨에 유의해야 한다 (Bedoux et al., 2012). 또한 2,8-DCDD로의 변환의 형성을 시연한 논문에서  $\alpha$ -FeOOH MnO<sub>x</sub> 즉, 망간과 철의 산화물이 2,8-DCDD로의 기작을 용이하게 촉진 한다는 것을 밝혀냈다. 트리클로산에서 2,8-DCDD로의 변환은  $\alpha$ -FeOOH가 45일 만에 약 5.5%의 높은 변환율을 보였고, 이보다 MnO<sub>x</sub>는 16일 만에 약 6.7%의 변환율을 가졌기 때문에 훨씬 빠르게 변환된다(jiafeng et al., 2015). 기존 하수처리 과정에서 나오는 폐수에서의 트리클로산은 제거가 가능하지만 흡착을 통한 처리 과정에 있어 하수와 오수를 처리할 때 나오는 부산물(biosolid)이 완벽히 제거되는 데에는 큰 어려움이 있다. 특히, 트리클로산은 생체 내 축적되는 경향이 있기 때문에 유기체와 이 오염 물질의 빈번한 검출이 국내 수계에서 일어나고 있다. 또한 국내 수계의 마른 토양에서, Mn<sup>2+</sup> Mn<sup>3+</sup>등의 망가니즈 양이온과, 토양 산성화에 영향을 주는 철 성분도 검출되어 2,8-DCDD로의 변환이 유의미한 영향을 끼칠 것으로 보인다.

Fe 및 Mn 산화물에 의한 페놀성 화합물의 산화는 일반적으로 Fe 및 Mn 산화물 사이에 표면 착물(전이 금속의 양이온에 몇 개의 분자 또는 이온이 결합되어 있는 물질)의 형성에 의해 시작된다. 초기 트리클로산에서 수소이온이 빠져 O<sup>-</sup> O<sup>-</sup>기가 형성되는 데, 이후 'smiles rearrangement'가 진행되면서 '오르토'라고 불리는 벤젠에서 Cl의 2개의 고리가 붙어 있는 부분에 O<sup>-</sup> O<sup>-</sup>기가 붙는다. 이후 Cl이온 하나가 빠져나가 라디칼이 존재하는 2,8-DCDD로 변환되는 것이 트리클로산에서 DCDD로의 변환기작이다. 위의 기작으로 인해 트리클로산은 DCDD로 바뀌어 고리폐쇄 현상이 발생함으로, 큰 독성을 지니게 된다(Fig. 11.).

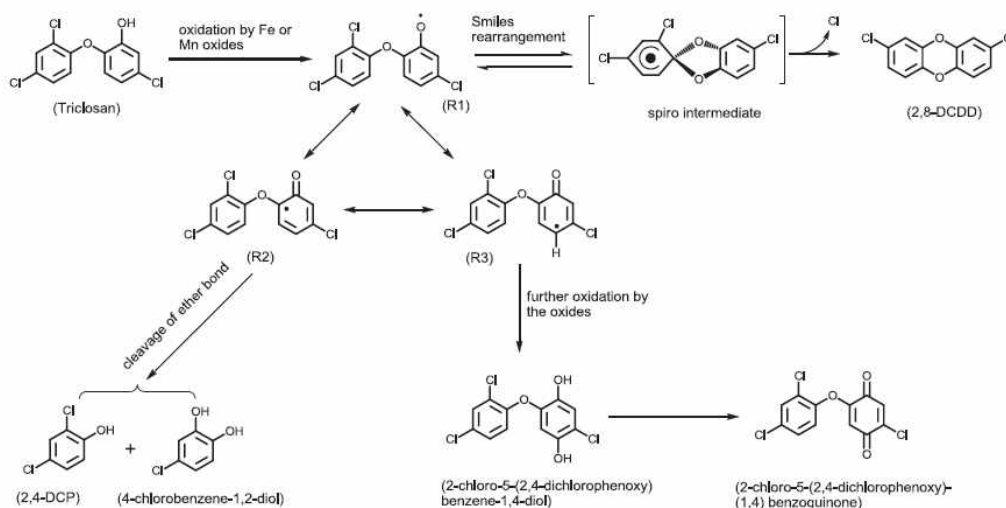


Fig. 11. Possible transformation pathways of TCS by Fe or Mn oxides under near

dry contions.(Jiafeng et al., 2015)

이처럼 DCDD는 매우 큰 독성을 갖고 있어 간독성, 피부독성, 태아독성 및 최기형성, 발암성 등 인체에 심각한 피해를 얻을 수 있기 때문에 매우 유의해야 한다. 따라서 트리클로산이 DCDD로 전환되는 여부를 직접 HPLC 등으로 검출해보고, 검출 결과를 토대로 DCDD가 수계환경에 미칠 수 있는 독성평가를 실시하여 트리클로산의 산물인 DCDD가 환경에 미칠 수 있는 영향을 확인해 볼 것이다.

## 참고문헌

1. Ahn K.C., Zhao B., Chen J., Cherednichenko G., Sanmarti E., Denison M.S., Lasley B., Pessah I.N., Kültz D., Chang D.P.Y., et al. In vitro biologic activities of the antimicrobials triclocarban, its analogs, and triclosan in bioassay screens: Receptor-based bioassay screens. Environ. Health Persp. 2008;116:1203-1210. doi: 10.1289/ehp.11200.
2. Allmyr M., Harden F., Toms L.M.L., Mueller J.F., McLachlan M.S., Adolfsson-Erici M., Sandborgh-Englund G. The influence of age and gender on triclosan concentrations in Australian human blood serum. Sci. Total Environ. 2008;393:162-167. doi: 10.1016/j.scitotenv.2007.12.006.
3. Arizono K, Takao Y., 2006. The Environmental pollution of pharmaceuticals and its ecotoxicological impacts. J Jpn Soc Water Environ 21(7):1338-1349.
4. Bedoux, G., Roig, B., Thomas, O., Dupont, V., Le Bot, B., 2012. Occurrence and toxicity of antimicrobial triclosan and by-products in the environment. Environ. Sci. Pollut. Res. 19, 1044-1065.
5. Bhargava, H.N., Leonard, P.A., 1996. Triclosan: applications and safety. Am. J. Infect. Control. 24, 209-218.
6. Canesi, L., Ciacci, C., Lorusso, L.C., Betti, M., Gallo, G., Pojana, G., Marcomini, A., 2007. Effects of triclosan on *Mytilus galloprovincialis* hemocyte function and digestive gland enzyme activities: possible modes of action on non target organisms. Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 145, 464-472.
7. DeLorenzo, M.E., Fleming, J., 2008. Individual and mixture effects of selected pharmaceuticals and personal care products on the marine phytoplankton species *Dunaliella tertiolecta*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 54, 203-210.
8. Douglas E. Latch, Jennifer L. Packer, William A. Arnold, Kristopher McNeill, Photochemical conversion of triclosan to 2,8-dichlorodibenzop-dioxin in aqueous solution, Journal of Photochemistry and Photobiology A:chemistry 158, 2003, 63-66.
9. Inaba K, Doi T, Isobe N, Yamatoto T., 2006. Formation of bromosubstituted triclosan during chlorination by chlorine in presence of trace levels of bromide. Water Res 40:2931-2937.
10. Ishibashi, H., Matsumaru, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H.,

- Ishibashi, Y., Takao, Y., Arizono, K., 2004. Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquat. Toxicol.* 67, 167–179.
11. Iwaki Nishi, Tsuyoshi Kawakami, Sukeo Onodera, 2008, Monitoring of triclosan in the surface water of the Tone Canal, Japan, *Bulletin of environmental contamination and toxicology* 80(2), 163–166.
  12. Jiafeng Ding, Mian Su, Cuiwei Wu, Kunde Lin, 2015, Transformation of triclosan to 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin by iron and manganese oxides under near dry conditions, *elsevier*, 41–46.
  13. Kazushi Aranami a,b,\* , James W., 2006. Photolytic degradation of triclosan in freshwater and seawater, Readman b a National Institute for Environmental Studies, Onogawa 16-2, Tsukuba, Ibaraki 305-0053, Japan b Plymouth Marine Laboratory, Prospect Place, The Hoe, Plymouth, Devon PL1 3DK, United Kingdom.
  14. Kim Y, Yang J., 2007. Lee D. Regional risk assessment by monitoring and estimation program. Ministry of Environment of Korea.
  15. Kim, S. D., Cho, J., Kim, I. S., Vanderford, B. J., and Snyder, S.A., 2007, "Occurrence and removal of pharmaceuticals and endocrine disruptors in South Korean surface, drinking, and waste waters," *Water Res.*, 41, 1013–1021.
  16. Kolpin, D. W., Furlong, E. T., Meyer, M. T., Thurman, E. M., Zaugg, S. D., Barber, L. B., and Buxton, H. T., 2002, "Pharmaceuticals, Hormones, and Other Organic Wastewater Contaminants in U. S. Streams, 1999–2000: A National Reconnaissance," *Environ. Sci. Technol.*, 36, 1202–1211.
  17. Kumar V., Chakraborty A., Kural M.R., Roy P. Alteration of testicular steroidogenesis and histopathology of reproductive system in male rats treated with triclosan. *Reprod. Toxicol.* 2009;27:177–185. doi: 10.1016/j.reprotox.2008.12.002.
  18. Latch DE, Packer JL, Arnold WA, McNeill K., 2003. Photochemical conversion of triclosan to 2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin in aqueous solution. *J Photochem Photobiol A, Chem* 158:63–66.
  19. Levy, C.W., Roujeinikova, A., Sedelnikova, S., Baker, P.J., Stuitje, A.R., Slabas, A.R., Rice, D.W., Rafferty, J.B., 1999. Molecular basis of triclosan activity. *Nature* 398, 383–384.
  20. Lindström, A., Buerge, I.J., Poiger, T., Bergqvist, P., Müller, M.D., Buser, H., 2002. Occurrence and environmental behavior of the bactericide triclosan and its methyl derivative in surface waters and in wastewater. *Environmental Science and Technology* 36, 2322–2329.
  21. McMurry, L.M., Oethinger, M., Levy, S.B., 1998. Triclosan targets lipid synthesis. *Nature* 394, 531–532.
  22. Min-Ju Lee, Jae-Na Ryu, Je-ill Oh, Hyun-Bae Kim, 2009, Occurrence of

- EDC/PPCPs in Influent and Effluent of a Wastewater Treatment Plant, Journal of Korean Society of Environmental Engineers 31(9), 783–792.
23. Miller T.L., Lorusso D.J., Walsh M.L., Deinzer M.L. The acute toxicity of penta-, hexa-, and heptachlorohydroxydiphenyl ethers in mice. J. Toxicol. Environ. Health. 1983;12:245–253. doi: 10.1080/15287398309530423.
  24. Onodera S, Ogawa M, Suzuki S., 1987. Chemical changes of organic compounds in chlorinated water XIII. J Chromatogr 392:267– 275.
  25. Orvos DR, Versteeg DJ, Inauen J, Gapdeville M, Rothenstein A., 2002. Aquatic toxicology of triclosan. Environ Toxicol Chem 21:1338–1349.
  26. Phan, T.N., Marquis, R.E., 2006. Triclosan inhibition of membrane enzymes and glycolysis of *Streptococcus mutans* in suspensions and biofilms. Can. J. Microbiol. 52, 977–983.
  27. Reiss, R., Mackay, N., Habig, C., Griffin, J., 2002, An ecological risk assessment for triclosan in lotic systems following discharge from wastewater treatment plants in the United States. Environ. Toxicol. Chem. 21, 2483–2492.
  28. Robertshaw H., Leppard B. Contact dermatitis to triclosan in toothpaste, Contact. Dermatitis. 2007;57:383–384. doi: 10.1111/j.0105-1873.2005.00771.x.
  29. Sabaliunas, D., Webb, S.F., Hauk, A., Jacob, M., Eckhoff, W.S., 2003, Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. Water Res. 37, 3145–3154.
  30. Singer, H., Müller, S., Tixier, C., Pillonel, L., 2002, Triclosan: occurrence and fate of a widely used biocide in the aquatic environment: field measurements in wastewater treatment plants, surface waters, and lake sediments. Environmental Science and Technology 36, 4998–5004.
  31. Stasinakis, A. S., Gatidou, G., Mamais, D., Thomaidis, N. S., and Lekkas, T. D., 2008, “Occurrence and fate of endocrine disrupters in Greek sewage treatment plants,” Water Res., 42, 1796~1804.
  32. Tatarazako, N., Ishibashi, H., Teshima, K., Kishi, K., Arizono, K., 2004, Effects of triclosan on various aquatic organisms. Environ. Sci. 11, 133–140.
  33. Tixer, C., Singer, H.P., Canonica, S., Müller, S.R., 2002, Phototransformation of triclosan in surface waters: a relevant elimination process for this widely used biocide – laboratory studies, field measurements, and modeling. Environmental Science and Technology 36, 3482–3489.
  34. Vanderford, B. J., and Snyder, S. A., 2006, “ Analysis of Pharmaceuticals in Water by Isotope Dilution Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry,” Environ. Sci. Technol., 40, 7312~7320.
  35. Veldhoen N., Skirrow R.C., Osachoff H., Wigmore H., Clapson D.J., Gunderson M.P., van Aggelen G., Helbing C.C. The bactericidal agent triclosan modulates thyroid hormone-associated gene expression and disrupts postembryonic anuran development. Aquat. Toxicol. 2006;80:217–227. doi: 10.1016/j.aquatox.2006.08.010.

36. villalain J., Mateo CR., Aranda FJ., Shapiro S., Micol V., "Membranotropic effects of the antibacterial agent Triclosan", Arch Biochem Biophys. 2001 Jun 1;390(1):128-36.
37. Yang B., Ying G.G., Zhao J.L., Zhang L.J., Fang Y.X., Nghiem L.D. Oxidation of triclosan by ferrate: Reaction kinetics, products identification and toxicity evaluation. J. Hazard. Mater. 2011;186:227-235. doi: 10.1016/j.jhazmat.2010.10.106.
38. Yueh M.F., Taniguchi K., Chen S., Evans R.M., Hammock B.D., Karin M., Tukey R.H. The commonly used antimicrobial additive triclosan is a liver tumor promoter. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2014;111:17200-17205. doi: 10.1073/pnas.1419119111.
39. Zhi-lin Zhu, Su-chun Wang, Fei-fei Zhao, Shu-guang Wang, Fei-fei Liu, Guang-zhou Liu., 2018, "Joint toxicity of microplastics with triclosan to marine microalgae *Skeletonema costatum*" Environmental Pollution
40. 류태권, 김정곤, 김경태, 이재우, 김지은, 조재구, 윤준현, 이재안, 김필재, 류지성, 2018, Ivermectin, praziquantel, tamiflu, triclosan의 환경위해성평가, 한국환경보건 학회지 44(2), 196-203.
41. 정희재, 이재인, 권덕준, 엄희정, 최철호, 최기인, 2012, GC/ECD 및 GC/MS를 이용한 트리클로산 정량분석에 관한 기초 연구, 한국세라믹기술원 시험표준센터, 한양대학교

학부생 연구 논문

Inducer를 포함한 배지가 *Galactomyces reessii*의 laccase와 항산화물질 생산에 미치는 영향

Effect of Inducer Contained Medium on Laccase and Antioxidants Production from *Galactomyces reessii*

2019. 11.

상명대학교 융합공과대학  
생명화학공학부 생명공학과  
18 김민우, 박현아

19 김국찬, 이하은, 장신혜, 현지혜  
연구지도자: 이강현<sup>1)</sup>, 유하영<sup>2)</sup>

---

1) 상명대학교 일반대학원 생명과학과

2) 상명대학교 융합공과대학 생명화학공학부 생명공학과 미생물공학연구실 교수

# Effect of Inducer Contained Medium on Laccase and Antioxidants Production from *Galactomyces reessii*

Min Woo Kim, Hyuna Park, Kuk Chan Kim, Ha Eun Lee, Sin Hye Jang, Ji hye Hyun, Kang Hyun Lee and Hah Young Yoo\*

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

## Abstract

Laccase has received attention because of its efficacy in various bioindustries such as food, pulp, nano biotechnology and soil bioremediation. In this study, lignin-containing inducers such as sawdust and rice straw were added to the culture medium for laccase production from *Galactomyces reessii*. In addition, the production of laccase and antioxidants according to the culture conditions were investigated and the most effective production conditions by *G. reessii* were determined. The culture of *G. reessii* (4 day) using sawdust and rice straw was achieved the laccase activity of  $2.95 \pm 0.04$  U/L and  $7.09 \pm 0.34$  U/L, respectively, and the activity was about 9.2 % and 30.1 % higher than the control group. In the culture using sawdust, antioxidants content was measured by DPPH radical scavenging activity, total phenol and flavonoid content, and it was found to be  $329.98 \pm 11.00$  g/L,  $0.54 \pm 0.06$  g/L and  $0.15 \pm 0.08$  g/L, respectively. The antioxidants content of *G. reessii* cultures using rice straw was found to be  $32.17 \pm 2.91$  g/L,  $0.61 \pm 0.06$  g/L and at  $0.19 \pm 0.09$  g/L, respectively, measured by DPPH radical scavenging activity, total phenol and flavonoid content.

## Introduction

### Biomass Selection Criteria

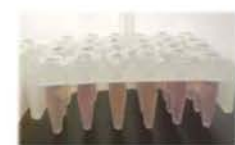
- Low economic value
- High lignin content
- Environmental Pollutant



Culture condition:  
30 °C, 180 rpm



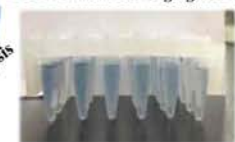
Sampling



DPPH radical scavenging activity



Laccase activity



Total phenol content



DNS

## Results and Discussion

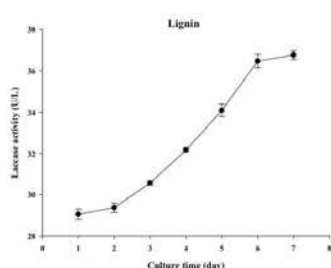


Fig. 1. Laccase production by *G. reessii* using lignin contained medium

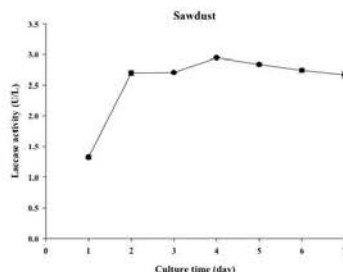


Fig. 2. Laccase production by *G. reessii* using sawdust contained medium

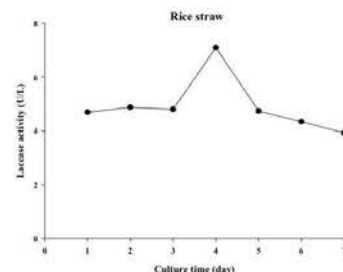


Fig. 3. Laccase production by *G. reessii* using rice straw contained medium

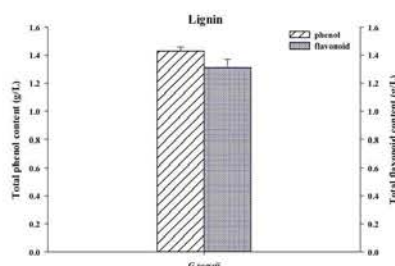


Fig. 4. Polyphenol and flavonoid production by *G. reessii* using lignin contained medium.

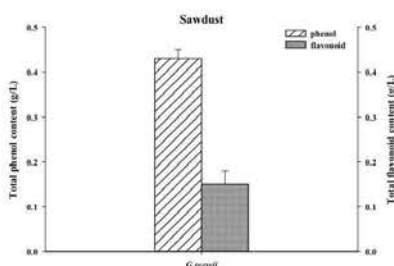


Fig. 5. Polyphenol and flavonoid production by *G. reessii* using sawdust contained medium.

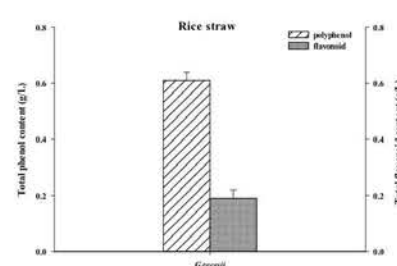


Fig. 6. Polyphenol and flavonoid production by *G. reessii* using rice straw contained medium.

Table 1. DPPH radical scavenging activity of *G. reessii*

| IC <sub>50</sub> (mg/mL) | Culture time (day) |        |        |        |        |        |        |
|--------------------------|--------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                          | 1                  | 2      | 3      | 4      | 5      | 6      | 7      |
| Control                  | 300.23             | 314.46 | 287.23 | 305.99 | 329.01 | 305.28 | 296.76 |
| Lignin                   | 37.09              | 36.17  | 36.59  | 35.59  | 35.61  | 36.40  | 37.28  |
| Sawdust                  | 347.61             | 329.98 | 363.01 | 369.14 | 385.03 | 416.84 | 430.53 |
| Rice straw               | 49.59              | 51.00  | 44.61  | 68.73  | 35.92  | 32.57  | 32.17  |

## Conclusions

- The most effective biomass for production of antioxidants (phenol and flavonoid) was rice straw.
- The IC<sub>50</sub> of *G. reessii* cultures using rice straw was found to be  $32.17 \pm 2.91$  mg/mL, measured by DPPH radical scavenging activity. It showed the most effective radical scavenging activity.
- The most effective biomass for laccase production was rice straw.
- In conclusion, rice straw is a suitable biomass for inducing laccase and antioxidants from *G. reessii*.

## 국문 초록

Laccase는 식품, 펄프, 나노 생명공학, 토양 생물정화 등 다양한 바이오산업에서 요구되는 산화환원반응을 촉매하기에 주목받고 있는 효소다. 본 연구에서는 *Galactomyces reessii*로부터 laccase 생산을 위해 톱밥, 벚짳 등 리그닌이 함유된 inducer를 배양 배지에 첨가하였으며, 배양 조건에 따른 laccase와 항산화 물질의 생산 결과를 바탕으로 *G. reessii*의 가장 효과적인 생산 조건을 결정하였다. 톱밥과 벚짳을 첨가한 배지에서 배양 4일차에 각각  $2.95 \pm 0.04$ 와  $7.09 \pm 0.34$  U/L로 가장 높은 laccase activity를 나타내었으며, 이는 리그닌을 첨가하지 않은 대조군과 비교하였을 때 약 9.2%, 30.1% 만큼 향상된 활성을 보였다. 톱밥을 첨가한 배지에서 항산화 물질 함량을 측정하기 위해 DPPH radical 소거능, 총 페놀 및 flavonoid 함량을 측정하였으며, 각각  $329.98 \pm 11.00$  g/L,  $0.54 \pm 0.06$  g/L,  $0.15 \pm 0.08$  g/L로 가장 높은 활성을 보였다. 벚짳을 첨가한 배지에서의 DPPH radical 소거능, 총페놀 함량, flavonoid함량 측정 결과 각각  $32.17 \pm 2.91$  g/L,  $0.61 \pm 0.06$  g/L로 가장 높은 활성을 나타내었다.

Keywords: *Galactomyces reessii*, laccase, lignin, rice straw, sawdust

## Abstract

Laccase has received attention because of its efficacy in various bioindustries such as food, pulp, nano biotechnology and soil bioremediation. In this study, lignin-containing inducers such as sawdust and rice straw were added to the culture medium for laccase production from *Galactomyces reessii*. In addition, the production of laccase and antioxidants according to the culture conditions were investigated and the most effective production conditions by *G. reessii* were determined. The culture of *G. reessii* (4 day) using sawdust and rice straw was achieved the laccase activity of  $2.95 \pm 0.04$  and  $7.09 \pm 0.34$  U/L, respectively, and the activity was about 9.2% and 30.1% higher than the control group. In the culture using sawdust, antioxidants content was measured by DPPH radical scavenging activity, total phenol and flavonoid content, and it was found to be  $329.98 \pm 11.00$  g/L,  $0.54 \pm 0.06$  g/L and  $0.15 \pm 0.08$  g/L, respectively. The antioxidants content of *G. reessii* cultures using rice straw was found to be  $32.17 \pm 2.91$  g/L,  $0.61 \pm 0.06$  g/L and at  $0.19 \pm 0.09$  g/L, respectively, measured by DPPH radical scavenging activity, total phenol and flavonoid content.

Keywords: *Galactomyces reessii*, laccase, lignin, rice straw, sawdust

# 목차

|                                                          |     |
|----------------------------------------------------------|-----|
| I. 서론 .....                                              | 102 |
| 1.1 연구동기 및 필요성 .....                                     | 102 |
| 1.2 연구 목표 .....                                          | 103 |
| 1.3 이론적 배경 .....                                         | 103 |
| II. 실험 방법 .....                                          | 105 |
| 2.1 균주 접종 및 스타터 배양 .....                                 | 105 |
| 2.2 DNS 환원당 측정법 .....                                    | 105 |
| 2.3 항산화 효능 분석법 .....                                     | 106 |
| 2.3.1 총 페놀 함량 분석 .....                                   | 106 |
| 2.3.2 Flavonoid 함량 분석 .....                              | 106 |
| 2.3.3 DPPH radical 소거능 측정 .....                          | 107 |
| 2.4 Laccase 활성 분석 .....                                  | 108 |
| III. 결과 및 고찰 .....                                       | 109 |
| 3.1 바이오매스 종류에 따른 <i>G. reessii</i> 의 기질 소모 측정 .....      | 109 |
| 3.2 <i>Galactomyces reessii</i> 발효액의 항산화 효능 분석 .....     | 110 |
| 3.3 <i>Galactomyces reessii</i> 발효액의 laccase 활성 분석 ..... | 113 |
| IV. 결론 및 제언 .....                                        | 115 |
| 4.1 결론 .....                                             | 115 |
| 4.2 활용방안 .....                                           | 116 |
| 참고문헌 .....                                               | 118 |

## I. 서론

### 1.1 연구동기와 필요성

전 세계적으로 생활의 편리성이 중요시되면서 사람들은 쓰고 바로 버릴 수 있는 일회용품의 사용량이 크게 늘고 있다. 특히 플라스틱은 값싸고 가벼우며 내구성이 좋기 때문에 페트병, 용기, 포장지, 영수증 등 일상생활에서 필요한 거의 모든 것들이 플라스틱 기반 일회용품으로 대체되고 있다. 2016년 통계청이 발표한 국가별 1인당 연간 플라스틱 소비량 조사를 살펴보면, 우리나라(98.2 kg)는 97.7 kg인 미국을 제치고 국가별 순위에서 1위를 차지했다. 일회용 컵 사용량은 연간 257억 개에 달하며 시간이 지날수록 더욱 많은 양의 일회용품이 소비되고 있다[1].

대부분의 사람들이 알고 있듯이 일회용품은 편리성과 유해성이라는 양면을 가지고 있다. 일회용품에 포함된 화학성분은 환경 및 인체에도 좋지 않은 영향을 주고 있다. 플라스틱은 환경호르몬으로 알려진 비스페놀A(Bisphenol A, BPA)를 함유하고 있다. BPA는 폴리카보네이트나 에폭시수지 같은 플라스틱의 원료로, 각종 플라스틱 용기, CD, 합성수지 원료, 캔 내부 코팅재료, 영수증 등의 제조에 활용된다[2]. 이는 일회용품 제조의 필요물질이지만, 여러 실험 결과 동물 또는 사람에게 유입되었을 때 내분비계 기능 혼란, 방해의 역할을 하는 환경호르몬이다[3]. 음식물을 BPA로 만들어진 물병, 용기, 음식포장지, 캔 등에 보관 후 섭취하면, BPA가 일부 체내로 들어오게 되며 에스트로겐과 비슷한 작용 때문에 내분비계 교란을 일으켜 정자수 감소, 여성화 등의 문제가 발생한다. 또한, BPA는 낮은 농도, 미량으로도 체내 이상을 일으킬 수 있는 매우 위험한 물질로서 미량의 BPA를 주입한 쥐에서 성조숙증, 비뇨체계 이상, 유방암 등의 발생 사례가 보고되었다[4]. 또한 정상적인 세포분열이 저해되어 이수체의 발생률을 높인다는 결과가 발표되었다[5].

이처럼 BPA가 체내에서 유해하게 작용한다는 많은 결과가 보고되었기에 유해성을 인지한 사람들은 이로 인한 피해를 줄이기 위해 비스페놀A Free(BPA Free)라는 BPA가 검출되지 않는 친환경 제품들을 개발하고 있다. BPA free를 위해서는 BPA를 분해할 수 있는 능력을 가진 물질을 사용해야한다. Laccase는 BPA의 분해능이 보고되었으며[6], 이를 이용해 BPA free 제품 개발에 기여하기 위해 본 실험을 계획하였다.

사람들은 오래전부터 자신의 만족을 위해 꾸미고 치장하는 데에 많은 돈과 관심을 투자해 오고 있으며, 그 중에서도 미용 분야는 큰 비중을 차지하고 있다. 주름, 주근깨, 여드름, 기미 등을 가리기 위한 색조화장품은 계속해서 발전하고 있으며 그 시장 또한 규모가 커지고 있다. 지난해 화장품 기업의 매출을 분석해 본 결과, 색조화장품의 매출액은 2017년 대비 35% 상승했다[7]. 하지만 색조화장품 사용 횟수가

증가함에 따라 피부가 오히려 망가져가는 현상이 발생하였고 이를 막기 위해 메이크업의 본 목적인 주름, 기미, 여드름 등 피부를 가리는 것이 아닌 탄력 있고 건강한 피부로 개선하는 기능성 화장품 개발이 시작되었다. 주름과 기미, 잡티 등이 발생하는 것은 피부가 노화되는 것을 의미하고 이를 방지하기 위해 피부 세포가 산화하는 것을 막아야 한다.

*Galactomyces reessii*는 항산화 물질을 생산하는 것으로 알려져 있다[8]. 본 연구에서는 배지에 리그닌을 포함하는 바이오매스를 첨가하였을 때 laccase 뿐만 아니라 항산화물질의 생산량 변화를 조사하고자 한다. 항산화 화장품의 개발이 전문화되었고 기능성 화장품들이 수출산업에 큰 기여를 하는 것으로 보고된 시점에서[9], 본 실험을 통해 피부에 보다 효과적으로 작용하는 항산화 물질이 개발된다면 국내 화장품 산업에 좋은 영향을 줄 것이라 예상된다.

## 1.2 연구 목표

*G. reessii*가 생산하는 물질에 대한 기초 자료는 보고된 적이 있었으나, laccase 생산을 위한 기본적인 미생물 배양 조건 또는 대량 생산 조건에 대한 정보는 알려진 바가 없었다. *G. reessii*로부터 laccase를 대량으로 생산하기 위해 본 연구에서는 일차적으로 laccase가 최적으로 생산될 수 있는 배지 조건을 연구해보고자 한다. *G. reessii*로부터 laccase를 유도하기 위해선 inducer 물질인 리그닌이 필요하다. 때문에 리그닌을 상대적으로 많이 포함하며 주변에서 얻기 쉬운 물질을 바이오매스로 선정하였고, *G. reessii*로부터 laccase를 효율적으로 생산하는데 적합한 조건을 탐색하고자 하였다. 또한 이전 연구에서 *G. reessii*이 항산화 물질을 생산할 수 있다는 선행연구의 자료를 기반으로, 바이오매스를 첨가했을 때의 항산화 물질의 양을 Total phenol content, flavonoid assay, DNS method, DPPH radical 소거능법을 통해 비교하고자 하였다.

## 1.3 이론적 배경

*Galactomyces reessii*는 Dipodascaceae 과에 속하는 효모이다[10]. 본 실험에서의 큰 목표 중 하나는 *G. reessii*로부터 laccase를 생산하는 것인데, laccase는 리그닌을 분해할 수 있는 효소이다[11]. 리그닌이 포함된 물질을 사용하여 *G. reessii*로부터 laccase를 유도해낼 수 있다[12]. laccase는 다양한 분야에서 산업적 가치를 지니고 있다. 먼저 식품산업에서 페놀 유도체를 제거하고 과일주스, 포도주 및 맥주 음료를 안정화 시키는 용도로 사용된다. 또한 laccase를 이용해 바이오센서 및 바이오연료전지를 제작할 수 있다. 그리고 직물, 염색 또는 인쇄 공업에서 염료 탈색, 펄프와 제지 공업에서 목질섬유의 리그닌 분해, 환경정화 · 공업폐수에서 페놀 유도체의 산화 제거, 벤질, 알릴, 프로파길, 지방족 알코올을 알데히드와 케톤으로 산화, 유기합성; 페

놀의 산화반응으로 이량체, 올리고머 등 중합체 형성, 제약 화합물(마취제, 항염증제, 항생제, 진정제)의 합성에 사용 등 laccase를 통해 다양한 부가가치를 창출해낼 수 있다[13]. 또한 *Galactomyces* ferment filtrate(발효 여과액)를 이용해 만든 화장품이 시중에 판매되고 있을 만큼 *Galactomyces* 속 효모가 생산하는 항산화물질의 효능은 뛰어난 것으로 알려져 있다[14]. 본 실험을 통해 바이오매스에 투입에 따른 항산화물질 생산 변화 또한 고찰해보고자 한다.

## II. 실험 방법

### 2.1 균주 접종 및 스타터 배양

본 실험에서 균주를 배양하기 위해 액체 배지를 만들었다. 1% glucose와 1% yeast extract를 증류수에 용해시켰고, 배양 배지의 pH를 6.8로 설정하기 위해 NaOH를 첨가하였다. (+) control과 (-) control의 삼각플라스크에는 50 ml의 액체배지를 분주하였고, 실험군의 삼각플라스크에는 300 ml의 액체배지를 분주하였다. 이후 실험군에는 바이오매스(소나무톱밥, 벚짳)를 첨가하였다. 바이오매스는 믹서기를 이용해 충분히 분쇄한 후 표준 체(standard sieve, 600  $\mu$ m)를 이용해 각 바이오매스를 분획하고, 각 실험군에 해당되는 배지에 2% 용량인 6 g의 소나무 톱밥, 6 g의 벚짳을 첨가하였다. 소나무 톱밥 및 벚짳에는 약 20~30%의 리그닌이 포함되어 있다[15]. 이를 고려하여 (+) control에는 0.3 g의 순수 리그닌을 첨가하였고, (-) control에는 어떠한 물질도 추가적으로 첨가하지 않았다. 그 후 오염균이 통과하지 않도록 배양액을 넣은 용기의 입구를 면전으로 막고 autoclave를 이용하여 배지를 멸균시켰다. 멸균 후 각 처리구에 *G. reessii*를 10% 접종하였으며 면전을 통해 삼각플라스크를 막고, shaking incubator를 이용하여 30°C, 180 rpm으로 균주를 배양하였다. 배양일 수에 따른 총 페놀 함량, DNS 환원당 측정, flavonoid, laccase activity, DPPH radical 소거능을 관찰하기 위해 24시간을 주기로 0일부터 7일까지 *G. reessii*를 sampling하였다.

### 2.2 DNS 환원당 측정법

탄수화물의 단당류와 이당류 중 알데하이드기와 케톤기의 유무에 따라 환원성이 있는 환원당과 환원성이 없는 비환원당으로 나뉘어진다. 환원당은 반응성 있는 알데하이드기, 케톤기를 갖고 금속염 알칼리 용액을 환원시키는 성질이 있는 당의 총칭이다. DNS에 의한 환원당 분석은 환원당에 의하여 3,5-디니트로살리실산(3,5-dinitrosalicylic acid)이 환원되어 생성된 3-아미노-5-니트로살리실산(3-amino-5-nitrosalicylic acid)의 흡광도를 측정하여 당을 정량 분석한다[16]. 생성된 3-아미노-5-니트로살리실산(3-amino-5-nitrosalicylic acid)은 적갈색을 띠며, 적갈색의 농도는 환원당의 농도에 비례한다.

실험 방법 다음과 같다. 먼저 신뢰 가능한 실험 결과 값을 얻기위해, 각 처리구 100  $\mu$ l와 DW 900  $\mu$ l을 섞어 시료를 10 배 희석하였다. DNS 또한 DW를 이용하여 10 배 희석한 후 희석한 시료 400  $\mu$ l과 희석한 DNS 800  $\mu$ l을 분주하여 vortexing 후 항온 수조(water bath) 100°C에서 15 분 동안 반응시켰다. 흡광도를 측정할 때 기준이 될 blank는 DW 400  $\mu$ l와 DNS 800  $\mu$ l를 반응시켰다. 반응이 완료된 모든 시료는 얼음에 식힌 후 분광광도계(spectrophotometer)에서 540 nm으로 흡광도를 측정하였다. 측정된 결과 값을 아래의 glucose로 만든 standard curve에 대입하여 환원당의 함량을 측정하였다.

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

$$y = \text{흡광도 (OD}_{540 \text{ nm}})$$

$$x = \text{환원당 함량}$$

## 2.3 항산화 효능 분석법

### 2.3.1 총 페놀 함량 분석

시료의 Total phenolic content를 측정함으로써 각 시료의 항산화능을 알아볼 수 있다[17]. 본 실험에서 총 폴리페놀 함량을 측정하기 위해 가장 빈번히 사용되고 있는 Folin-Denis법을 변형하여 사용하였으며, standard curve를 작성하기 위해 gallic acid를 표준물질로 이용하였다. 표준곡선을 그린 후 Folin-Ciocalteu 용액을 사용하여 시료의 총 폴리페놀을 측정하였다. Folin-Ciocalteu용액은 sodium molybdate와 sodium tungstate의 혼합을 통하여 phosphotungstomolybdic acid complex를 생성하게 되는데, 이 complex 물질이 알칼리 조건에서 다양한 페놀성 화합물에 의해 환원되어 청자색 환원물을 생성하게 된다[18]. 이를 흡광도로 측정한 후 흡광도 값을 표준 곡선에 대입해 총 페놀함량을 구한다.

실험 방법은 다음과 같다. 먼저 각 시료 10  $\mu$ l과 DW 790  $\mu$ l, Folin-Ciocalteu 용액 50  $\mu$ l을 e-tube에 분주한 후 vortexing을 진행하였다. 이후 항온수조(water bath) 25°C에서 8 분 동안 반응시켰고, 20%  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  150  $\mu$ l을 분주하여 vortexing한 후 다시 25°C에서 1 시간 동안 반응시켰다. 각 용액의 반응을 완료시킨 후 분광광도계 765 nm 파장으로 흡광도를 측정하였다. 측정 결과를 아래의 gallic acid로 만든 표준곡선 식에 대입하여 총 페놀 함량을 구했다.

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

$$y = \text{흡광도 (OD}_{765 \text{ nm}})$$

$$x = \text{총 페놀 함량}$$

### 2.3.2 Flavonoid 함량 분석

Flavonoid는 페놀의 종류 중 하나이다[19]. Flavonoid를 측정하기 위해 aluminium chloride method를 사용하였다[20]. Flavonoid에 알칼리를 작용시키면 hesperidin과 naringin 등의 flavan, 또는 수용성 flavonol 배당체가 황색을 나타낸다[21]. 이때의 흡광도를 측정하여 표준곡선으로부터 시료 중의 총 flavonoid 함량을 산출한다.

실험 방법은 다음과 같다. 각 처리구 50  $\mu$ l과  $\text{NaNO}_2$  50  $\mu$ l을 첨가한 후 항온수조 25°C에서 6 분 동안 반응시켰다. 반응이 충분히 진행되었을 때 10%  $\text{AlCl}_3$  solution 50  $\mu$ l을 첨가한 후 항온수조 25°C에서 5 분 동안 반응시켰다. 그 후 1M의 NaOH

300  $\mu$ l과 반응시키고 1,000  $\mu$ l의 DW를 첨가한 후 항온수조 25°C에서 15 분 동안 반응시켰다. 그 다음 13,000 rpm, 4°C에서 3 분 동안 원심분리 후 분광광도계 파장 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. 측정 결과를 아래의 rutin을 이용해 작성한 표준 곡선에 대입하여 총 flavonoid 함량을 구한다.

$$y = 0.3552x - 0.0255, R^2=0.9962$$

y = 흡광도 (OD<sub>510 nm</sub>)

x = 총 flavonoid 함량

### 2.3.3 DPPH radical 소거능 측정

시중에 *Galactomyces* 속 균주의 발효 여과액을 통해 생산되는 산화 방지 화장품이 존재한다[22]. 본 균주는 항산화능을 가지고 있는 균주로서, DPPH radical scavenging activity을 이용하여 균주의 항산화능을 평가하였다. DPPH는 radical 상태에서 보라색을 띠고, 환원이 되면 노란 색의 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazine (DPPH-H)으로 변환된다. 안정한 라디칼인 DPPH는 산화방지물질로부터 전자 혹은 수소를 제공받으면 non-radical 로 전환된다[23]. 즉 라디칼인 DPPH는 항산화 활성이 있는 물질과 만나면 짙은 보라색이 옅어지면서 노란색을 띠는 특징을 가진다. 색깔이 옅어지는 정도는 추출물이나 화합물의 DPPH radical 소거능이 큰 것을 의미하며, 일반적으로 free radical과의 반응력이 큰 분자일수록 DPPH radical을 효과적으로 소거한다. 라디칼 형태의 DPPH는 515~528 nm에서 가장 빛을 잘 흡수하는 반면 DPPH는 515~528 nm 부근에서 빛을 잘 흡수하지 못하는 것에 기인하여 517 nm에서 흡광도를 측정하였다[24].

본 실험에서는 배지에 첨가하는 바이오매스의 종류에 따라 균주가 생산하는 항산화 효능을 평가하였으며 실험 과정은 다음과 같다. DPPH radical 소거능법을 실행하기에 앞서 신뢰할 수 있을만한 흡광도 값을 얻기 위해 (+) control과 rice straw를 첨가한 시료를 각각 증류수를 이용하여 10 배 희석시켰으며, (-) control과 sawdust가 첨가한 시료는 원액을 이용하였다. 실험을 진행하기 위해서 0.125 mM DPPH 용액 500  $\mu$ l와 각 시료 500  $\mu$ l를 1.5 ml e-tube에 분주한 후 vortexing 하여 시료를 충분히 교반하였고, 25°C의 항온수조에서 각 시료를 30 분 동안 반응시켰다. 반응 후 항온수조에서 e-tube를 꺼내 시료를 cuvette에 분주하였고 분광광도계 파장 517 nm에서 흡광도 값을 측정하였다. Blank의 경우 methanol 1 ml를 이용하였다. 이후 DPPH 자유 라디칼 소거활성을 아래의 식으로 계산하였다.

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

$A_0$  = the absorbance of the control reaction

$A_1$  = the absorbance in the presence of the sample

또한 DPPH radical 소거능의 결과를 도출하기 위해 DPPH radical 50%를 소거하는데 필요한 시료의 농도인 IC<sub>50</sub>(Inhibitory concentration 50%)값을 계산하였다.

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

## 2.4 Laccase 활성 분석

내분비계 장애물질인 BPA는 리그닌 분해 효소인 laccase에 의해 분해될 수 있는데 [25], *Galactomyces reessii*로부터 laccase를 생산할 수 있다[26].

본 연구는 Wolfenden and Wilson 방법을 통해 laccase activity를 측정하였으며, 기질로 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzotiazoline)-6 solphonic acid(ABTS)를 사용하였다. 산화·환원효소 중 하나인 laccase는 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzotiazoline)-6 solphonic acid(ABTS)를 cation of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzotiazoline)-6 solphonic acid(ABTS<sup>•+</sup>)로 산화시킨다. 산화된 ABTS는 420 nm에서 흡광도 값이 증가한다는 특성을 가지고 있다[27].

본 연구에서 각 시료로부터 laccase activity를 측정하였으며 실험 방법은 다음과 같다. 각 처리구 500 µl, 0.01 mM ABTS 500 µl를 e-tube에 분주하여 잘 섞이도록 vortexing을 진행하였다. vortexing 완료 후 항온수조 의 온도를 laccase 활성의 최적 온도인 50°C로 설정하고 e-tube에 담긴 ABTS와 시료를 10 분 동안 반응시켰다. 이후 항온수조에서 e-tube를 꺼내 시료를 cuvette에 분주하고 분광광도계 파장 420 nm에서 흡광도 값을 측정하고 효소가 1 분간 기질 ABTS 1 µmol을 산화시킨 양을 계산하였다. Blank의 경우 500 µl의 증류수와 500 µl의 ABTS 시약을 혼합하여 사용하였다. 각 처리구의 laccase의 활성을 수치화하기 위하여 아래의 식으로 laccase activity(U/L)를 계산하였다.

$$\text{Laccase activity}(U/L) = \frac{\Delta E \times T_v}{\epsilon \times \delta \times V_s}$$

$\Delta E$ : Final absorbance - initial absorbance

$T_v$ : total volume of the reaction

$\epsilon$ : Molar extinction coefficient

$\delta$ : Optical path

$V_s$ : Sample volume

### III. 결과 및 고찰

#### 3.1 바이오매스 종류에 따른 *G. reessii*의 기질 소모 측정

*Galactomyces reessii*가 당을 소모하여 성장하는 양상을 관찰하기 위해 DNS 환원당 측정 실험을 수행하였다. 모든 배양 배지의 탄소원은 glucose로 설정하였으며, 모든 처리구의 초기 glucose 농도는 약 15 g/L이다. Figure 1은 DNS 환원당 측정법을 이용하여 배양일 동안 각 처리구의 배지 내 glucose 농도를 측정한 결과이다. 실험 결과 배양이 진행됨에 따라 모든 처리구의 glucose 농도가 감소되는 것이 관찰된다.

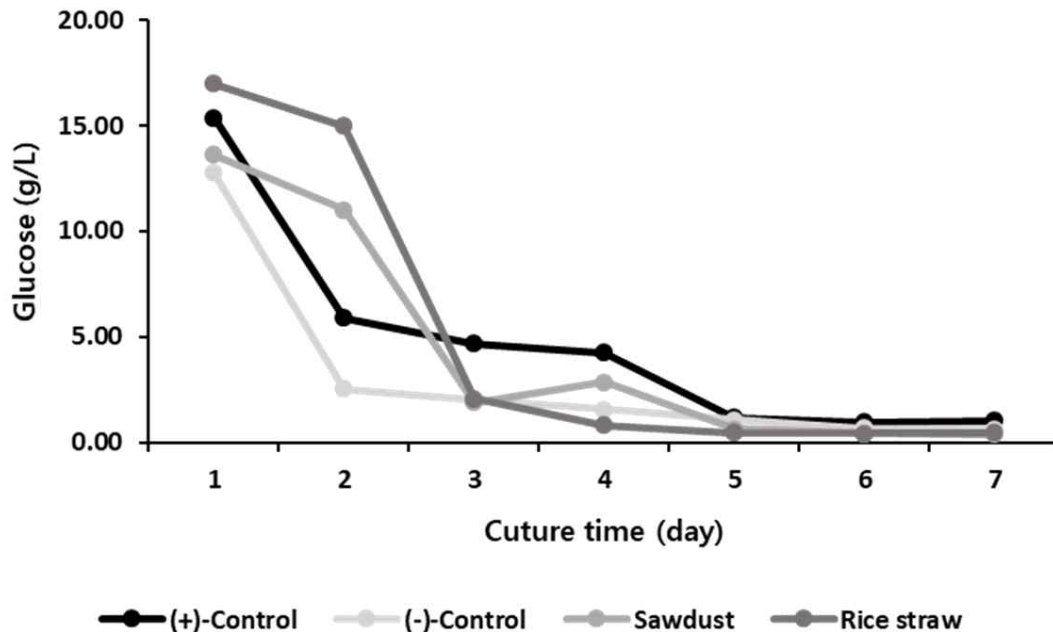


Figure 1. The effect of biomass type on the glucose consumption in fermentation of *Galactomyces reessii*

미생물은 유기탄소원을 에너지원 및 탄소골격으로 이용하여 세포구성성분을 합성하고 성장하며[28], *G. reessii*는 glucose, sucrose, maltose 등의 탄소원을 대사할 수 있다. 즉, 모든 처리구의 glucose의 농도가 감소되는 것은 *G. reessii*가 성장을 위해 glucose를 소모한 것으로 볼 수 있다.

대조군의 경우 배양 1-2일차에 배지 내 glucose의 농도가 급격히 감소하였고 실험군의 경우 배양 2-3일차에 glucose의 농도가 급격히 감소된 것이 관찰된다. 미생물은 배양 초기에 세포분열이 거의 일어나지 않고 새로운 환경에 적응하기 위한 시기

(유도기)가 나타나는데, 이는 영양물질, 탄소원, 삼투압 등 복합적인 요인으로 결정된다[29]. 즉 바이오매스와 같은 물질로 인해 대조군과 실험군이 새로운 환경에 적응하는 시기가 달라짐에 따라 glucose의 농도 감소시기가 다른 것으로 생각된다.

### 3.2 바이오매스 종류에 따른 *G. reessii* 발효액의 항산화 효능 분석

*G. reessii*가 생산하는 항산화 물질의 농도를 확인하기 위해 Total polyphenol content, Total flavonoid content와 DPPH radical 소거능을 측정하였다. Phenolic compounds는 파이토 케미컬의 한 종류로 phenolic hydroxyl 그룹과 단백질, 효소, 2가 금속이온 및 거대분자들 사이의 강력한 결합 성질에 의해 항산화력을 나타낸다[30]. 식물계에 널리 분포된 2차 대사산물 중 하나로 각종 항균, 항암, 항산화작용 뿐만 아니라 혈중 콜레스테롤 저하, 면역기능의 증강, 노화방지 등의 효능이 보고되었으며, 일반적으로 페놀성 화합물은 항산화 활성을 갖는 것으로 알려져 있다[31]. Flavonoid는 식물과 균류의 2차 대사산물 중 하나로 poly phenol계에 속하며, 항산화뿐만 아니라 항균과 항염 등 다양한 생리학적 효능을 나타낸다[32]. 배지에 첨가된 유도물질에 따른 *G. reessii* 발효 여과액의 Total polyphenol content 결과는 Figure 2, Total flavonoid content 결과는 Figure 3, DPPH radical 소거능 결과는 Table 1에 각각 나타내었다.

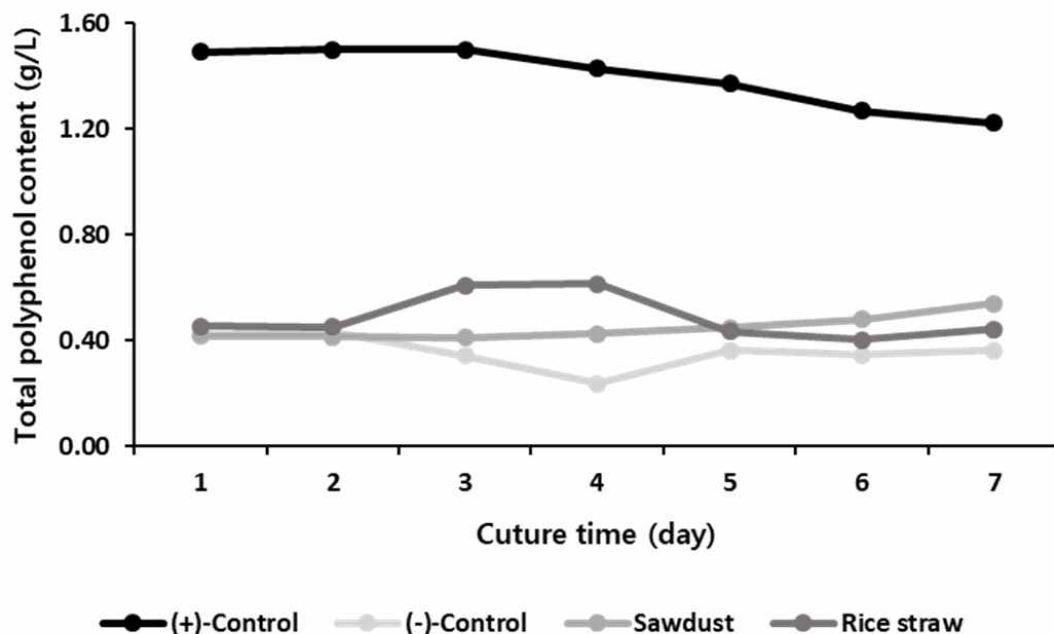


Figure 2. The effect of biomass type on the production of polyphenols in fermentation of *Galactomyces reessii*

Total polyphenol content 실험 결과, 순수한 리그닌이 첨가된 (+) control은 모든 처리구들 중 가장 높은 페놀성 화합물 농도를 나타내었으며, 배양일이 지날수록 총 페놀 함량이 점점 낮아지는 것으로 관찰된다. 이와 반대로 리그닌이 첨가되지 않은 (-) control은 가장 낮은 페놀 함량을 나타내었다. Sawdust를 첨가한 배지의 총 페놀 함량은 0.54 g/L로 배양 7일에서 가장 높게 나타났으며, (+) control 대비 약 44.3%의 활성을 보여주었다. Rice straw를 첨가한 배지의 경우 총 페놀함량이 0.61 g/L로 배양 3일에서 가장 높게 나타났으며, 이는 (+) control 대비 약 40.7%의 활성을 보여준다. 순수한 리그닌이 포함된 (+) control에서 가장 높은 페놀 함량 나타내고, 리그닌이 함유된 바이오매스에서 리그닌이 첨가되지 않은 (-) control 보다 더 높은 페놀을 함유하는 것을 보았을 때, 리그닌은 *G. reessii*의 발효에서 페놀 생산에 긍정적인 영향을 끼친 것으로 보인다. 식물은 성장하면서 경쟁되는 주변 식물의 성장이나 발아를 억제하기 위한 화학물질을 분비하는 타감 작용[33]이 알려져 있으며 이러한 타감 물질은 때때로 주변 미생물의 성장에 부정적인 영향을 주기도 한다[34]. 위의 화학물질로 인해 미생물의 polyphenol 생산이 영향을 받아 실험군에서 생성된 총 페놀 함량이 (+) control에 비해 상대적으로 낮은 것으로 추정된다.

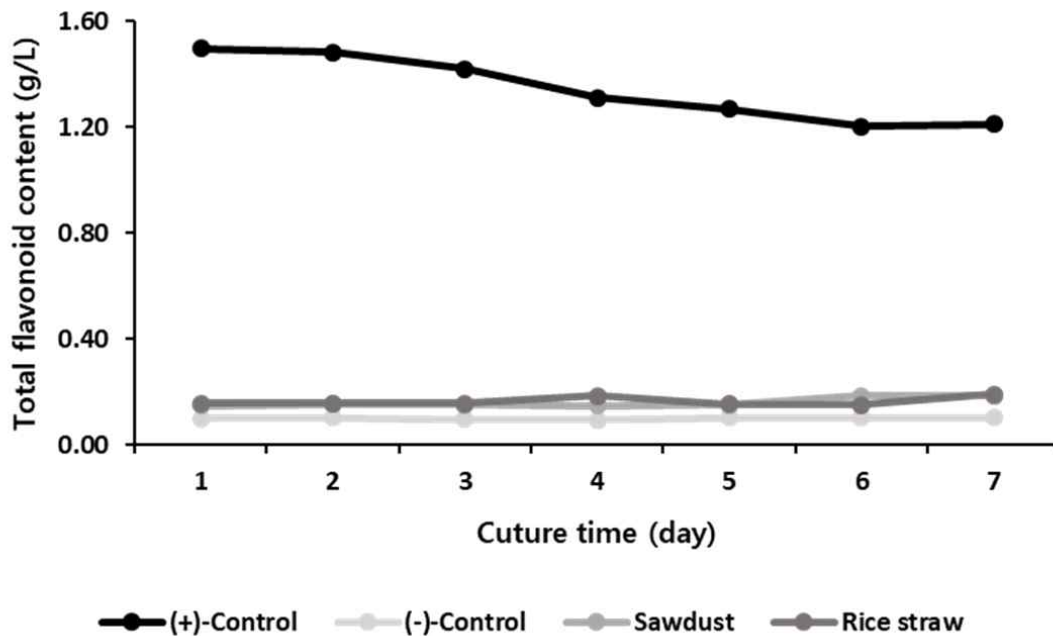


Figure 3. The effect of biomass type on the production of flavonoids in fermentation of *Galactomyces reessii*

Total flavonoid content 실험 결과 (+) control은 다른 3개의 처리구보다 1.00 g/L 이상 더 높은 flavonoid 함량을 나타내었다. Sawdust를 첨가한 배지의 총 flavonoid 함량은 0.19 g/L로 배양 6일에서 가장 높게 나타났으며, 이는 (+) control

대비 약 15.8%의 활성으로 나타났다. Rice straw를 첨가한 배지의 총 flavonoid 함량은 0.19 g/L로 배양 4일과 7일에서 가장 높게 관찰되었으며, 이는 (+) control 대비 약 15.7%에 해당한다. 이는 리그닌 함유량에 따라 flavonoid 생산량의 차이가 발생하는 것으로 추정된다. 실험 전 sawdust와 rice straw에 함유된 리그닌의 양을 계산하여 (+) control에도 비슷한 리그닌 함량인 30%를 넣어 주었음에도 (+) control의 flavonoid 생산량은 sawdust 그리고 rice straw를 첨가한 배지의 flavonoid 함량보다 1.31 g/L의 큰 차이가 나는 것을 관찰할 수 있다. 따라서 flavonoid 생산뿐만 아니라 페놀 생산에서 실험군이 (+) control 보다 낮은 이유는 (1) '실험에 사용된 sawdust와 rice straw의 리그닌 함량이 30% 보다 낮을 것이다'라는 가정과 (2) '사용된 바이오매스의 리그닌은 거대 복합체(리그닌 고분자 중합체)로 존재하므로 미생물이 활용하기에 적합하지 않은 형태이다(전처리와 같은 미생물이 활용하기 적합한 형태의 기질 처리 과정이 필요하다)'라는 가정을 통하여 그 이유를 추정해 볼 수 있다. 하지만 리그닌을 함유하지 않은 (-) control 보다 리그닌이 함유된 바이오매스 실험군에서 flavonoid의 함량이 보다 높게 측정되었기 때문에 리그닌은 페놀 생산과 유사하게 *G. reessii*로부터 flavonoid를 유도하는데 긍정적인 영향을 주었다.

다음으로 각 처리구의 DPPH radical 소거능 실험 결과를 Table 1에 나타내었다. (-) control, sawdust 첨가 배지, rice straw 첨가 배지 모두 (+) control에 비해 높은 IC<sub>50</sub> 값을 나타내었다. *G. reessii* 배양 배지에 sawdust를 첨가하였을 때, IC<sub>50</sub>은 329.98 mg/ml로 배양 2일에서 가장 낮은 값이 도출되었으며, 이는 (+) control의 IC<sub>50</sub> 대비 약 912.30%이다. Rice straw를 첨가한 경우, 32.17 mg/ml로 배양 7일에서 IC<sub>50</sub> 값이 가장 낮았으며, (+) control의 IC<sub>50</sub> 대비 86.29%의 활성을 보여주었다.

**Table 1. Free radical scavenging activity of fermented filtrate from *Galactomyces reessii***

| Culture time<br>Type | IC <sub>50</sub> (mg/mL) |        |        |        |        |        |        |
|----------------------|--------------------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
|                      | 1 day                    | 2 day  | 3 day  | 4 day  | 5 day  | 6 day  | 7 day  |
| (+) Control          | 37.09                    | 36.17  | 36.59  | 35.95  | 35.61  | 36.40  | 37.28  |
| (-) Control          | 300.23                   | 314.46 | 287.23 | 305.99 | 329.01 | 305.28 | 296.76 |
| Sawdust              | 347.61                   | 329.98 | 363.01 | 369.14 | 385.03 | 416.84 | 430.53 |
| Rice straw           | 49.59                    | 51.00  | 44.61  | 68.73  | 35.92  | 32.57  | 32.17  |

1 주일 동안의 배양액 IC<sub>50</sub> 평균값을 도출하였을 때 sawdust는 377.45 mg/ml, (-) control은 305.57 mg/ml, rice straw는 44.94 mg/ml, (+) control은 36.44 mg/ml으로 IC<sub>50</sub> 평균값이 높은 순서대로 나열하였다. 이와 같이 (+) control의 IC<sub>50</sub> 값은 sawdust 보다 약 10.4배, (-) control 보다 약 8.4배, rice straw 보다 약 1.2 배 낮을 것을 확인 할 수 있다.

Table 1의 결과를 보면 편차가 큰 것을 볼 수 있는데 흡광도 측정 과정에서 실험적 오류로 인해 결과 데이터가 불안정한 것으로 추정된다. DPPH radical 소거능 값을 구하기 위해서는 the absorbance of the control reaction과 the absorbance in the presence of the sample이 필요하다. 흡광도 값은 기포나 cuvette의 측정 부분의 오염, 외부 노출 시간 등의 여러 원인에 따라 차이가 발생할 수 있다.

Mussatto 외 (2007)의 rice straw 향산화 효능 연구보고에 따르면 perulic과 p-coumaric acids라는 벚짚의 주요 수용성 페놀산에서 전자를 기증받아 diphenylpicrylhydrazyl이 diphenylpicrylhydrazine으로 전환된다고 한다[35]. 이 과정을 통해 free radical이 전자 혹은 수소를 제공 받아 non-radical이 되어 DPPH radical이 보다 효과적으로 소거되는 것으로 설명할 수 있다. 이 점에서 rice straw는 향산화 효능이 높다고 판단되었고, 본 실험에서 측정한 IC<sub>50</sub> 또한 free radical이 non-radical로 전환되면서 (+) control과 유사하게 향산화 효능이 높은 것으로 추정된다.

하지만 sawdust는 모든 처리구 중 가장 높은 IC<sub>50</sub> 값을 보여주었는데, sawdust의 분자가 free radical과의 반응력이 큰 분자가 아니라는 가능성이 높다. Free radical과의 반응력이 크지 않으면 DPPH는 DPPH-H로 환원되기 어려워 DPPH radical 소거능이 낮아지고 이로 인해 IC<sub>50</sub> 값은 상대적으로 높아지기 때문이다. 따라서 sawdust와 (-) control이 300 mg/ml 이상의 IC<sub>50</sub> 값을 나타내는 것은 향산화 효능이 (+) control 보다 약 8.4 ~ 10.4 배 낮은 것을 알 수 있다.

따라서 *G. reessii*의 배양으로부터 향산화 물질 생산에 가장 효과적인 바이오매스는 rice straw로 결정하였다.

### 3.3 *Galactomyces reessii* 발효액의 laccase 활성 분석

미생물로부터 laccase를 유도하기 위해선 laccase의 inducer인 리그닌이 포함된 물질이 필요하다. 본 실험에서는 리그닌을 포함하는 바이오매스(소나무 톱밥, 벚짚)를 이용해 *G. reessii*로부터 laccase가 효율적으로 생산되는 조건을 탐색하였다. 대조군으로 리그닌을 포함하는 배지인 (+) control과 리그닌을 제외한 배지 (-) control을 설정하였고 동일한 조건 하에서 1 주일 동안 *G. reessii*를 배양하여 생산된 laccase의 활성을 Table 2에 나타내었다.

Table2. The effect of biomass type on the laccase production in fermentation of *Galactomyces reessii*

| Culture<br>time<br>Type | Laccase activity (U/L) |       |       |       |       |       |       |
|-------------------------|------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                         | 1 day                  | 2 day | 3 day | 4 day | 5 day | 6 day | 7 day |
| (+) control             | 29.05                  | 29.37 | 30.57 | 32.17 | 34.09 | 36.48 | 36.77 |
| (-) control             | 1.77                   | 2.05  | 1.56  | 2.13  | 2.32  | 2.10  | 2.08  |
| Sawdust                 | 1.32                   | 2.69  | 2.70  | 2.95  | 2.04  | 2.84  | 3.37  |
| Rice straw              | 4.70                   | 4.87  | 4.80  | 7.09  | 4.74  | 3.94  | 5.92  |

Laccase activity 실험 결과, (-) control, sawdust 첨가 배지, rice straw 첨가 배지 모두 (+) control과 비교하여 낮은 laccase activity (U/L) 값이 나타났다. 바이오매스로써 sawdust를 이용한 경우 배양 7일에서  $3.37 \pm 1.04$  U/L로 가장 높은 활성을 나타내었으며 (+) control의 약 9.17% laccase 활성을 보여주었다. Rice straw를 이용한 경우, laccase activity는 배양 4일에서 가장 높은  $7.09 \pm 0.34$  U/L의 활성을 나타냈으며 (+) control의 약 22% laccase 활성을 보여주었다. 모든 시간에서 sawdust를 바이오매스로 사용했을 때 보다 rice straw를 배지에 활용했을 때 보다 우수한 laccase 활성을 보인다.

실험에서 사용한 sawdust와 rice straw는 리그닌을 포함하는 것으로 알려져 있다 [36]. 하지만 실험 결과 리그닌의 함량과 그 형태가 laccase 생산에 큰 영향을 주는 것으로 추정된다. 순수한 리그닌 형태의 (+) control를 배지에 첨가한 경우 laccase 유도에 적합하였지만, 리그닌을 포함한 바이오매스는 종류에 따라 laccase를 생산하는 능력에서 차이가 발생하였다. 이는 바이오매스에 포함된 리그닌이 미생물 대사에 적합하지 않은 형태인 것을 시사하며, 리그닌 외의 성분을 제거하는 전처리 과정의 필요성이 제기된다.

향후 미생물공학 연구실에서는 리그닌의 형태가 *G. reessii*의 laccase 유도에 미치는 영향을 연구할 예정이다. 이를 위해 보다 다양한 바이오매스를 화학적으로 처리하여 리그닌 함량 및 형태를 다양화 한 후 분석 장비를 활용하여 바이오매스 내 섬유소와 리그닌 함량 비율 조사, 전처리 조건이 리그닌 형태에 미치는 영향 등을 평가할 예정이며, 바이오매스 전처리 공정 최적화를 통한 laccase의 산업적 생산 배지 개발이 최종 목표이다.

## IV. 결론 및 제언

### 4.1 결론

본 연구는 *Galatomyces reessii*에서 laccase의 효과적인 생산 조건을 탐색하기 위하여 리그닌이 함유된 바이오매스를 배양 배지에 첨가하였다. 순수 리그닌을 첨가한 (+) control과 리그닌이 첨가되지 않은 (-) control을 대조군으로 사용하여 실험군과 비교를 통해 7일 동안 배양일에 따른 laccase 및 항산화 물질의 생산에 대해 조사하였다.

DNS 환원당 측정법을 이용해 glucose 농도 변화를 관찰해본 결과 모든 처리구에서 배양이 진행됨에 따라 glucose의 농도가 감소함을 나타내었다. 이는 *G. reessii*가 성장을 위해 glucose를 소모한 것을 알 수 있다. 하지만 배지에 첨가된 물질에 따라 감소하는 양상이 조금 다른 것이 관찰되었는데 (+) control과 (-) control은 1-2일에서, 실험군은 2-3일에서 glucose의 농도가 급격하게 감소하였다. 같은 양의 미생물 발효액을 접종하였고 모두 동일한 조건에서 배양이 진행되었지만 기질 소모 속도와 성장에 차이가 발생하는 이유는 첨가된 바이오매스가 세포 성장 또는 적응 과정에 영향을 주었을 것으로 판단한다.

*G. reessii*가 항산화 물질을 생산할 수 있다는 선행연구의 자료를 바탕으로 본 연구에서는 Total phenolic content 측정법, Flavonoid 분석법, DPPH radical 소거능법을 사용하여 *G. reessii* 발효액의 항산화 효능을 평가하였다. 총 페놀 함량 측정에서는 (+) control이 첨가된 배지에서 가장 높은 페놀성 화합물의 함량이 측정되었고 나머지 (-) control, 톱밥, 볏짚이 첨가된 배지에서는 상대적으로 낮은 양의 페놀 함량이 검출되었다.

Flavonoid 분석 결과 (+) control이 첨가된 배지에서 flavonoid 생산이 가장 우수하였으며, (-) control, 톱밥, 볏짚이 첨가된 배지에서는 flavonoid 생산이 상대적으로 낮은 것을 알 수 있다. 하지만 (-) control 보다 톱밥, 볏짚이 첨가된 배지에서 더 높은 flavonoid가 검출되었기 때문에 리그닌이 flavonoid 생산에 긍정적인 영향을 준 것을 알 수 있다.

1주일 동안 배양액의 IC<sub>50</sub> 평균값을 비교했을 때, 가장 높은 IC<sub>50</sub> 값은 sawdust가 첨가된 배지에서 377.45 mg/ml, (-) control에서 305.57 mg/ml, rice straw에서 44.94 mg/ml, (+) control에서 36.44 mg/ml로 순서로 측정되었다. 실험 결과 배지에 포함된 리그닌이 DPPH radical 소거능에 긍정적인 영향을 미치는 것을 알 수 있다. 하지만 톱밥은 항산화 물질 생산에 큰 영향을 주지 않는 것으로 보이며, 볏짚은 (+) control인 순수한 리그닌과 비슷한 수준의 항산화 물질을 생산하는 것으로 나타났다.

Wolfenden and Wilson 방법을 통해 laccase activity를 측정한 결과 리그닌이 포함된 배지에서 laccase 생산이 효과적임을 알 수 있다. 하지만 리그닌의 함량과 그

형태가 laccase 생산에 큰 영향을 주는 것으로 추정된다. 순수한 리그닌을 배지에 첨가한 경우 laccase 유도에 적합하였지만 리그닌이 포함된 바이오매스는 종류에 따라 laccase 유도에 차이가 발생되었다. 이는 바이오매스에 포함된 리그닌이 미생물 대사에 적합하지 않을 수 있다는 것을 시사하며 여기에 대한 후속 연구가 필요하다.

결과적으로 *G. reessii*로부터 laccase와 항산화 물질을 효과적으로 유도해내기 위한 바이오매스는 rice straw라고 판단된다. 이러한 결과는 *G. reessii*를 이용해 laccase를 대량생산하는데 유용하게 사용될 것이며 BPA free 제품 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 또한 *G. reessii*의 발효를 통해 생산된 항산화 물질은 기능성 화장품 또는 식품 분야에 필요한 기초 원료를 공급함으로써 바이오산업에 기여할 수 있을 것이다.

## 4.2 활용방안

본 연구는 증가하는 플라스틱 소비량과 그를 처리함에 따라 발생하는 BPA를 분해할 수 있는 laccase와 그것을 생산하는 *Galactomyces reessii*의 탐구와 더불어 작년 연구로 분석해 낸 *G. reessii*의 항산화 능력을 실험하는데 목표를 두었다. 본 연구는 *G. reessii*로부터 유도되는 항산화능과 laccase의 유용한 기능을 중점으로 탐구하였다. BPA 분해 능력을 갖춘 laccase와 항산화 능력 분석은 세계적으로 증가하고 있는 플라스틱 처리문제와 바이오산업 분야에서 활용될 수 있는 기반을 마련하고 폐플라스틱 처리의 새로운 시점과 기능성 화장품, 기능성 식품산업의 발전에 가져올 새로운 방안으로 사료된다.

현재 국내에서 폐기되는 폐플라스틱이 방출하는 BPA를 분해하는데 laccase의 대량생산이 해결책이 될 수 있을 것이다. 최근 전 세계 반 이상의 재활용 쓰레기를 수입하던 중국이 이를 중단하면서 국내로 많은 폐플라스틱이 수입되고 있으며, 또한 국내의 1인당 연간 플라스틱 소비량도 세계 1위로 거듭난 만큼 폐기되는 플라스틱의 양도 방대하다[31]. 이때 소각, 매립되는 폐플라스틱에서 독성물질이 방출되는데 그 중 내분비계교란물질로 알려진 BPA가 포함된다. 이 때문에 폐플라스틱의 유해물질을 분해하는 것이 중요하며, laccase의 대량생산을 이용한 BPA의 생물분해를 통해 이와 같은 양상을 바꾸고 유해물질을 사전에 차단할 수 있을 것이다.

뿐만 아니라 기존 수입된 원료를 기반으로 제조되는 화장품 사업의 원료수입량을 줄임으로써 해외 원료 의존도를 낮춰 세계적 기업체와 경쟁할 수 있게 될 것이다. 또한 새로운 항산화 물질 개발을 통해 우리나라가 천연원료에 기반을 둔 기술들을 더 많이 확보하게 될 것이다. 그리고 *G. reessii*를 이용해 국내 기능성 식품과 영양제 산업에 또한 기여가 가능할 것으로 생각되며 차후 국내 기능성 식품 내수시장에 닥쳐올 해외 기업의 위협으로부터 방어할 수 있을 것이다.

또한 본 연구를 활용해 미생물을 이용한 기존산업이 보다 활성화될 것으로 기대된다. 미생물의 발효 여과액만이 가지는 이점(적은 비용으로 생산 가능 등)을 적극적으로 활용하게 된다면 미생물분야의 산업과 새로운 학문적 발전을 도모할 수 있을 것이며,

이 연구를 통해 *G. reessii*의 laccase를 BPA처리 문제, 화장품, 제약, 기능성 식품 등 다양한 분야에서 활용하게 된다면 미생물 활용 분야의 연구가 더욱 활발해질 것이다.

## 참고문헌

- [1] 우은식, CNN“한국, 1인당 플라스틱 소비량 세계최대”, 공감언론  
[http://www.newsis.com/view/?id=NISX20190303\\_0000574876](http://www.newsis.com/view/?id=NISX20190303_0000574876)
- [2] Bisphenol A, Naver Knowledge Encyclopedia,  
<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1172924&cid=40942&categoryId=32314>
- [3] Bisphenol-A(BPA), Naver Knowledge Encyclopedia,  
<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=931874&cid=43667&categoryId=43667>
- [4] Bisphenol A, raising the possibility of developing cancer, OSEN,  
<http://osen.mt.co.kr/article/G1109997184>
- [5] Sung Minjeong. (2007). A study on the chromosomal abnormalities of the mouse fetuses induced by Bisphenol A
- [6] Zahra Asadgol, Hamid Forootanfar, Shahla Rezaei, Amir Hossein Mahvi, and Mohammad Ali Faramarzi. (2014). Removal of phenol and bisphenol-A catalyzed by laccase in aqueous solution
- [7] 장유미, Increased sales of color cosmetics despite the recession..., inews24,  
<http://www.inews24.com/view/1208901>
- [8] Sangmyung University Graduate School of Convergence Technology Biochemistry Engineering Department Biotech. (2018). A Study on the Optimum Growth Conditions and Application Possibility to Biological Industry of *Galactomyces reessii*
- [9] 식품의약품안전처, Korea Food and Drug Administration, 2017, p. 6
- [10] *Galactomyces reessii*, Wikipedia,  
[https://en.wikipedia.org/wiki/Galactomyces\\_reessii](https://en.wikipedia.org/wiki/Galactomyces_reessii)
- [11] Tai-Jeon Kim. (2016). The Study of Enzymes Produced by *Streptomyces halstedii* ssp. *scabies* SA1-27 and *Streptomyces violaceus*inger C1-6 Which Have Good Lignolytic Activity, 대한임상검사학회지 제 38권 제 2호, pp, 87-93
- [12] Chaijak P, Sukkasem C, Lertworapreecha M, Boonsawang P, Wijasika S, Sato C. (2018). Enhancing Electricity Generation Using a Laccase-Based Microbial Fuel Cell with Yeast *Galactomyces reessii* on the Cathode, J Microbiol Biotechnol
- [13] 고온성 laccase에 대한 연구, Protein Engineering,  
<http://biotech.deu.ac.kr/jen/res.htm>
- [14] One Thing, *Galactomyces* Ferment Filtrate, Butylene Glycol

- 1,2-Hexanediol., <https://onething.kr/product/galactomyces-ferment-filtrate/15/>
- [15] You-Na Lee, Seung-Bum Lee, and Jae-Dong Lee. (2011). Characteristics of Lignin Removal in Cellulosic Ethanol Production Process, Appl. Chem. Eng., Vol. 22, No. 1, p. 78
- [16] Marisa Garriga, Melisa Almaraz, Alicia Marchiaro. (2017). Determination of reducing sugars in extracts of *Undaria pinnatifida* (harvey) algae by UV-visible spectrophotometry (DNS method), Actas de Ingeniería Volumen 3, p. 175
- [17] Hae Young, Jang Hee Soo, Park Ki Rok, Kwon Tae Jin, Rhim. (2008). A study on the comparison of antioxidant effects among wild ginseng cultivated wild ginseng, and cultivated ginseng extracts, 대한약침학회지 제11권 제3호, pp.71-72
- [18] Kyung A Park, Yoo-mi Choi, Smee Kang, Mi-Ri Kim, and Jungil Hong. (2015). Effects of Proteins on the Reactivity of Various Phenolic Compounds with the Folin-Ciocalteu Reagent, KOREAN J. FOOD SCI. TECHNOL. Vol. 47, No. 3, p. 299
- [19] Poly phenol, Wikipedia, <https://ko.wikipedia.org/wiki/%ED%8F%B4%EB%A6%AC%ED%8E%98%EB%86%80>
- [20] Luís M. MagalhãesEmail author, M. Inês G. S. Almeida, Luísa Barreiros, Salette Reis, Marcela A. Segundo. (2012). Automatic Aluminum Chloride Method for Routine Estimation of Total Flavonoids in Red Wines and Teas, Food Analytical Methods, Volume 5, p.530
- [21] 공개특허공보 제 10-2014-0120189호(2014. 09. 11) " 생리활성이 향상된 개복숭아 진액 및 그 제조방법"
- [22] SMTECH, 미생물 발효를 이용한 기능성 식물발효추출물 및 발효 화장품 개발, [https://www.smtech.go.kr/front/csg/pr/preSearch01\\_detail.do;jsessionid=eR5plhd9YVvYPtCsD5B0FQglD3ymzlaEcXgHqj3CrQhAOEsIU3FzllCzKW1vTLtc.smwas4\\_servlet\\_engine3?SBJT\\_ID=S2069349&TECL\\_CD=E500200&pageIndex=188](https://www.smtech.go.kr/front/csg/pr/preSearch01_detail.do;jsessionid=eR5plhd9YVvYPtCsD5B0FQglD3ymzlaEcXgHqj3CrQhAOEsIU3FzllCzKW1vTLtc.smwas4_servlet_engine3?SBJT_ID=S2069349&TECL_CD=E500200&pageIndex=188)
- [23] Moon-Hee Choi, Hyun-Jae Shin. (2015). Anti-oxidative and Anti-melogenesis Effects of Buleberry Extract, Kor. J. Aesthet. Cosmetol, Vol. 13 No. 2, p. 262
- [24] Min-Jung Kim and Eunju Park. (2011). Feature Analysis of Different In Vitro Antioxidant Capacity Assays and Their Application to Fruit and Vegetable Samples, J Korean Soc Food Sci Nutr, p. 1054
- [25] Removal of endocrine disrupters by white rot fungi and their degrading enzymes, 환경부, 2008, p. 2
- [26] Chaijak P, Sukkasem C, Lertworapreecha M, Boonsawang P, Wijasika S,

Sato C. (2018). Enhancing Electricity Generation Using a Laccase-Based Microbial Fuel Cell with Yeast *Galactomyces reessii* on the Cathode, *J Microbiol Biotechnol*

[27] Tetsuya Fukuda, Hiroyuki Uchida. (2001). Degradation of Bisphenol A by Purified Laccase from *Trametes villosa*, Vol. 284, p. 704

[28] growth curve, Naver Knowledge Encyclopedia,

<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=1110579&cid=40942&categoryId=32317>

[29] growth curve, 생명과학대사전,

<https://terms.naver.com/entry.nhn?docId=428680&cid=60261&categoryId=60261>

[30] Soon Eun Kwon, Soon Young Ahn, Hae Keun Yun. (2018)

Antioxidant activity and content of phenolic compounds in fruits of mainly cultivated blueberries in Korea, *J Plant Biotechnol*, p. 393

[31] The Extraction of Lignin and Production of Vanillin from Rice Straw, 한국식품영양과학회지 제47권 3호, 2018, pp.243-244

[32] YE Seo, HJ jung, SM Hong. (2007). Optimization of Production of Pigment from *Monascus* sp. in Liquid Culture, *Korean Journal of Microbiology*, p. 60

[33] Influence of Rice Straw Extract on Growth of Barley and Water Foxtail, 한국잡초학회지 제18권 제 1호, 1998, p. 49

[34] 변종영, 식물에서 타감작용의 표적 및 매개체로 작용하는 미생물, 한국과학기술정보연구원, p. 2

[35] S.I. Mussatto, G. Dragone, I.C. Roberto. (2007), Ferulic and p-coumaric acids extraction by alkaline hydrolysis of brewer's spent grain, *Industrial Crops and Products*, Volume 25, pp. 231-237

[36] Woo- young Song, Hee-AE Kwon, Byung-Ro Kim and Soo-Jeong Shin. (2016). Hemicelluloses Comparison between Korean Red Pine and Geumgang Red Pine, *Journal of Korea TAPPI*, Vol. 48, pp. 86-91

[37] '페플라스틱 관리정책의 한계와 시사점', 경기 연구원,

<http://www.gri.re.kr/%EC%9D%B4%EC%8A%88-%EC%A7%84%EB%8B%A8/?brno=13301&prno=6511>

학부생 Review 논문

식물 내 스트레스 내성 호르몬 앱시스산의  
중요성과 산업적 활용의 잠재력에 대한 연구

Study on the Importance of Stress  
Resistant Hormone Absciscic Acid in  
Plants and Its Potential of Industrial  
Application

2019. 11.

상명대학교 융합공과대학  
생명화학공학부 생명공학과

김승희 이정호 송윤석 한승민 김솔빈

지도교수

유하영

## 초록

식물은 외부 환경으로부터 다양한 스트레스에 노출되지만, 운동성이 없기 때문에 이에 대응할 수 있는 저항성을 발달시켜왔다. 가뭄, 고염분, 삼투압 등의 환경에서 식물은 결국 물 부족 스트레스를 받게 되는데, 이때 대표적으로 앱시스산(abscisic acid)이라는 식물 호르몬이 급격히 증가한다. 앱시스산은 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 생성을 유발하는 신호전달 경로를 자극하고 그 결과  $Ca^{2+}$  채널이 활성화된다. 이 과정에서 복잡한 신호전달 과정을 거쳐 기공은 폐쇄되고 식물은 수분 손실을 줄일 수 있게 된다. 앱시스산 신호전달 과정에서는 여러 수용체와 단백질 인산화 효소/탈인산화 효소가 관여한다. 단백질 인산화 효소 SnRK2는 스트레스 환경에서 앱시스산 반응성 전사인자 및 여타 기질들을 인산화시킴으로써 스트레스 저항성 유전자의 발현에 관여한다. 한 연구결과에 따르면 앱시스산 인식 센서라고 할 수 있는 탈인산화효소를 변형시킨 작물은 물이 부족한 환경에서 대조군보다 성장률이 5~10% 향상되었다고 한다. 반면 단백질 탈인산화 효소 PP2C는 비스트레스 환경에서 SnRK2를 탈인산화시킴으로써 앱시스산 신호전달 관련 기질들을 불활성화 시킨다. 앱시스산 수용체 중 PYR/PYL/RCAR은 앱시스산이 있을 때 PP2C와 상호작용할 수 있는데, 이는 PP2C의 불활성을 설명할 수 있는 모델이다. 앱시스산은 스트레스 반응뿐 아니라 잎의 노쇠, 종자의 휴면과 발아, 뿌리 구조 변형 등에도 관여하는 것으로 알려졌다. 이와 같이 식물의 발달뿐만 아니라 스트레스 대응에 중요한 역할을 하는 앱시스산은 생명공학 분야에서 응용 잠재력이 매우 높으며 앱시스산 반응성 유전자들의 발현과 관련된 메커니즘의 명확한 규명을 바탕으로 작물 보호제 및 가뭄 저항성 작물 개발을 기대할 수 있다.

## 서론

식물이 받는 스트레스는 크게 비생물적 스트레스(abiotic stresses)와 생물적 스트레스(biotic stresses)로 나뉜다 (그림 1). 비생물적 스트레스는 생물이 아닌 환경적 요인에 의한 것이기 때문에 환경 스트레스라고도 불리는데, 이러한 비생물적 스트레스에는 오존, 열, 가뭄 등이 해당한다. 식물이 병원균에 노출되면 환경 요인에 의한 비생물적 스트레스 반응이 증가하기도 하는데, 이는 비생물적·생물적 스트레스 반응이 복합적으로 작용한다는 사실을 보여준다[1].

이동성이 없는 식물은 환경 스트레스에 대하여 다양한 방어 기작이 발달 되었는데, 이 과정에서 앱시스산(abscisic acid, ABA), 자스몬산(jasmonic acid), 살리실산(salicylic acid)과 같은 식물 호르몬이 중요한 역할을 한다. 특히 앱시스산은 병원균 방어 경로를 지배적으로 억제하는 스트레스 반응의 전반적인 조절자로 여겨지며, 비생물적·생물적 스트레스에 대한 반응을 미세하게 조율하는 핵심 인자로 보고되었다[2]. 본고에서는 식물의 외부 환경에 대한 스트레스를 저항하는 데 핵심 요소 중 하나인 앱시스산의 발견, 생합성, 수용체 및 신호전달 과정 등 전반적인 이해와 중요성을 조사하였다.

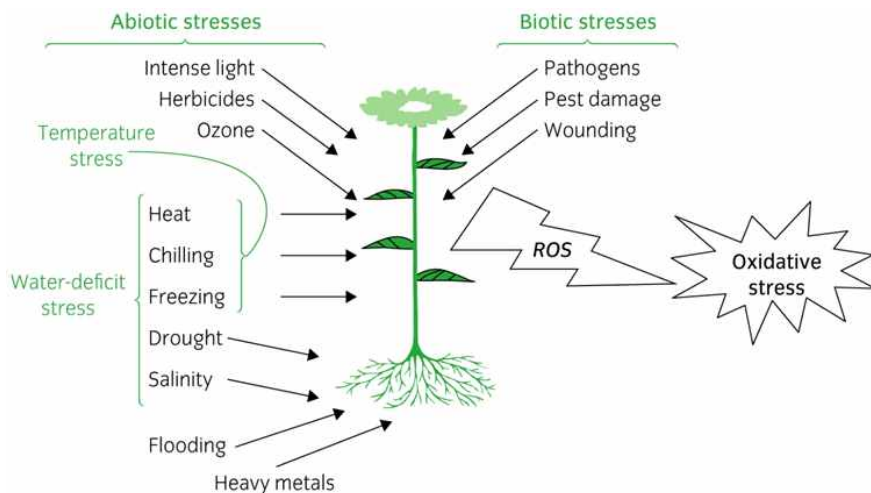


그림 1. 식물이 받는 비생물적 스트레스와 생물적 스트레스.

그림출처: Adrian Slater 외 (2008) [1]

## 앱시스산의 발견

앱시스산은 1960년대에 Addicott 연구팀에 의해 목화로부터 추출한 화합물에서 처음 발견되었는데 abscission(탈리)<sup>1)</sup>을 가속하는 물질 중 두 번째로 분리되었기 때문에 ‘Abscisin II’라고 명명되었다[3,4]. 한편 Eagles와 Wareing은 자작나무의 일종인 *betula pubescens*로부터 추출한 생장 억제 및 휴면(dormancy) 유도 물질을

1) 잎, 꽃, 과일 등의 기관이 그 기부에 이층의 형성으로 인하여 떨어지는 현상을 의미하며, 여기서 이층이란 기관의 기부를 이루는 부분으로 탈락 현상에 관계된다[4].

‘dormin’이라고 명명하였다[5].

이후에 Cornforth 연구팀에 의해 Abscisin II와 dormin이 같은 물질이라는 사실이 밝혀졌고[6], 서로 다른 명칭을 사용하는 것에 대한 혼란이 생겼다. 따라서 Addicott 연구팀은 기존의 명칭에서 크게 벗어나지 않고 화학적 성질을 나타내는 새로운 명칭으로 ‘Absciscic acid’을 제안했다[3].

## 앱시스산 수용체

### -ChlH (Mg-chelatase H subunit)

The magnesium-protoporphyrin IX<sup>2)</sup> chelatase subunit H (Mg-chelatase H subunit; ChlH)는 앱시스산 수용체로 보고된 첫 번째 단백질이다. Mg-chelatase는  $Mg^{2+}$ 를 protoporphyrin에 삽입하는 것을 촉매하는 효소이다. ChlH는 엽록체에 존재하며 종자 발아, 묘목으로의 성장, 기공 개폐에 있어 앱시스산 반응을 매개한다[7]. 스트레스 환경에서 손상된 색소체는, 색소체 단백질을 암호화하는 핵 내 유전자들의 발현을 조절하기 위해 핵으로 역행 신호<sup>3)</sup>를 보내는데, ChlH는 이를 매개하는 데 핵심적인 역할을 하고, 앱시스산에 대한 색소체 수용체로서 앱시스산 신호전달을 매개한다[7,8]. 하지만 보리(*Hordeum vulgare*)에서 ChlH의 상동 단백질은 앱시스산에 실제로 결합하지 않았다는 상충된 보고도 있다[10]. 또한 ABI5, DREB2A와 같은 앱시스산 반응 유전자의 발현을 억제하는 WRKY 그룹 단백질 중, WRKY40을 애기장대에서 돌연변이 시켰는데도 앱시스산 과다 감수성 및 ABI5와 DREB2A의 전사 촉진이 유발되지 않았다[10]. 따라서 ChlH는 앱시스산과 직접 결합하지 않지만 앱시스산 신호전달 경로에 영향을 미치는 것으로 보는 견해도 있다.

### -GTG1과 GTG2 (G-protein-coupled receptor-type G protein 1 & 2)

G-단백질 연결 수용체와 상동성이 있지만 기능적으로 차별성 있는 GTG1 (GPCR-type protein 1), GTG2도 앱시스산 수용체로 작용한다. 앱시스산 신호전달 과정에서 양성조절자라고 할 수 있으며, G-protein  $\alpha$ -subunit (GPA1)과 상호작용한다[7]. GPA1은 GTG-앱시스산 결합 활성을 억제함으로써 앱시스산 신호전달 과정을 음성적으로 조절하는데, 특히 종자 발아 및 발아 후 성장에서 음성적인 조절이 일어난다[9]. 단일 *gtg* 돌연변이 식물체는 야생형과 차이가 없었고, *gtg1/gtg2* 이중 돌연변이는 앱시스산 신호전달 과정에서 유의한 차이를 보였으며 이는 *GTG1* 또는 *GTG2*의 도입으로 완전히 보완되었다[11]. 둘 중 하나만으로 보완되었다는 결과는 둘 사이의 기능적 중복성을 나타낸다.

2) porphyrin은 혈액소 헤모글로빈, 엽록소 클로로필 및 그 관련 물질의 모핵이 되는 화합물이다. 그의 유도체 중에는 protoporphyrin이 있다.

3) 식물세포에서 유전 정보를 저장하는 소기관은 핵, 색소체, 미토콘드리아인데, 핵은 소기관 유전자의 발현, 소기관의 발달 및 기능의 거의 모든 부분을 통제하고 소기관들은 핵으로 신호를 보내 핵 내 유전자 발현을 통제하는데 이를 역행 신호라고 한다[8].

## -PYR/PYL/RCAR (Pyrabactin Resistant/PYR-Like/Regulatory Component of ABA Receptor)

2009년 이후 PYR/PYL/RCAR 수용체가 밝혀져 PP2C, SnRK2, bZIP 타입의 전사 조절인자로 이어지는 앱시스산 경로를 연결시킬 수 있게 되었다[12]. 2009년에 두 연구팀이 각각 세포질에 존재하는 동일한 앱시스산 수용체를 보고하였다. 한 연구팀은 앱시스산과 유사한 발아 억제 특성을 보이는 pyrabactin에 대해 저항성을 나타내는 돌연변이를 선별한 뒤 해당 유전자를 분리하여 PYL로 명명하였으며, 다른 연구팀은 같은 물질을 RCAR이라고 명명하였다[13].

## 앱시스산 신호전달 과정

### -단백질 인산화 효소 SnRK2와 탈인산화 효소 PP2C

식물이 스트레스를 받으면 관련 저항성 유전자가 발현되는데, 그림 2와 같이 앱시스산의 경우 bZIP (basic leucine zipper protein)<sup>4)</sup>과 같은 앱시스산 반응성 전사인자를 활성화하는 경로에 관여한다[14]. 즉, 스트레스 환경에서 앱시스산이 생성되고 그 수용체 및 여타 단백질이 인산화됨으로써 최종적으로 방어 유전자가 발현되는 것이다. 앱시스산 수용체 후보군에는 PYR/PYL/RCAR이 있는데, 이 경로에 관여하는 단백질 인산화 효소와 탈인산화 효소 관련 연구가 활발히 이루어지고 있다.

먼저, 단백질 인산화 효소로 알려진 SnRK2 (Sucrose non-fermenting 1-Related protein kinase 2)는 스트레스 환경에서, 앱시스산 반응성 전사인자 및 여타 기질들을 인산화시킴으로써<sup>5)</sup>, 스트레스 저항성 유전자의 발현에 관여한다. 밑에서 최초로 보고된 PKABA1은 TaABF1의 인산화에 관여하는데[15], TaABF1은 bZIP 전사인자로서 앱시스산 유도 유전자와 앱시스산 억제 유전자 발현을 모두 매개한다[16].

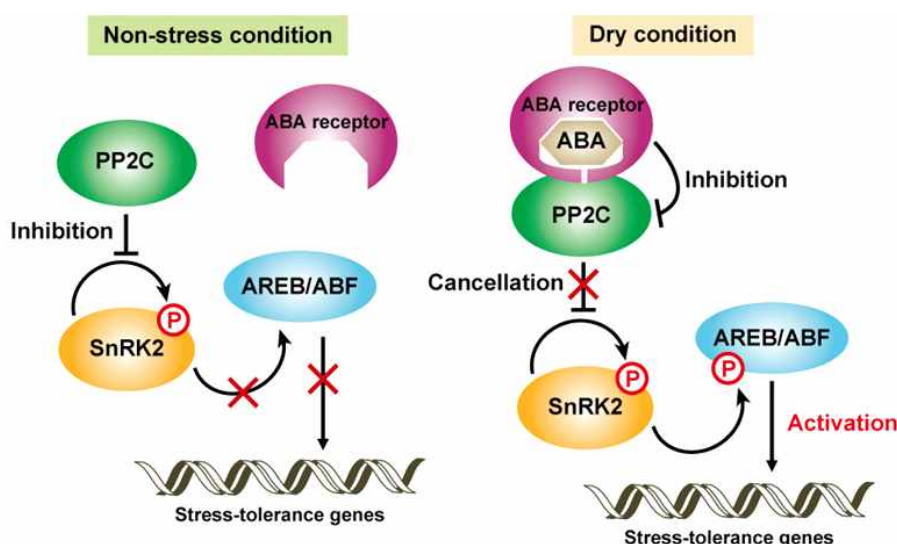


그림 2. 앱시스산의 신호전달 과정.

그림출처: PDBj [14]

4) bZIP은 AREB/ABF (ABRE-binding protein/ABRE-binding factor) family에 속한다.

5) 심지어 스스로 인산화하는 '자가 인산화'도 일어난다.

잠두의 AAPK는 공변세포에서 활성화되어 기공의 개폐를 조절하는 효소로 밝혀졌다 [17]. 애기장대의 경우 10개의 SnRK2가 존재하며, 특히 Subclass III 그룹의 SnRK2는 ABA에 의해 매우 강하게 활성화된다고 한다[18].

다음으로, 단백질 탈인산화 효소로 알려진 PP2C (type 2C protein phosphatase)는 비스트레스 환경에서, SnRK2를 탈인산화시킴으로써 앱시스산 반응성 전사인자 및 여타 기질들을 불활성화시킨다(그림 2). 이는 결과적으로 스트레스 저항성 유전자의 미발현으로 이어진다. 애기장대의 경우 76개의 PP2C가 존재한다고 알려져 있는데 이는 인간(15개)이나 효모(7-9개)에 존재하는 PP2C에 비해 그 수가 현저히 많다. 식물이 이렇게 많은 PP2C를 가진 이유로 이성철(2017) 외 연구에서는 두 가지를 제시하였는데, 첫째는 양성조절자를 활성화하는 것보다 음성조절자를 불활성화시키는 반응이 훨씬 빠르게 일어나기 때문이고, 둘째는 각각의 스트레스를 조절하는 많은 탈인산화 효소가 존재할 수 있기 때문이다[18]. 따라서 외부 환경에 의한 스트레스 저항을 위해 식물 내 단백질 인산화 효소와 탈인산화 효소들의 작용이 중요함은 틀림없다.

#### -앱시스산 수용체와 PP2C, PP2C와 SnRK2 사이의 상호작용

인산화 효소 SnRK2와 탈인산화 효소 PP2C는 앱시스산 신호전달에서 서로 다른 역할을 한다. 단백질의 활성화와 불활성화의 미세한 조절이 신호전달의 핵심이기 때문에 이 둘 간의 상호작용에 관한 연구도 많이 이루어지고 있다.

이전에 언급했듯이 SnRK2는 앱시스산 신호전달 과정에서 앱시스산 반응성 전사인자 및 여타 기질들을 인산화하므로, 양성조절자라고 할 수 있다. 이때 PP2C가 SnRK2를 탈인산화 시키지 않도록 조절해야 하는데, 이 역할을 앱시스산과 그 수용체가 담당한다. PYR/PYL/RCAR 단백질이 *in vitro* 상에서 직접적으로 PP2C 탈인산화 효소와 상호작용을 하고 효소 활성을 억제한다고 알려졌다[18]. 반대로 비스트레스 환경에서는 스트레스 저항성 유전자의 발현이 불필요하므로, PP2C가 SnRK와 상호작용함으로써 앱시스산 신호전달 과정을 음성적으로 조절하게 된다.

#### 앱시스산 생합성 과정

앱시스산은 물 부족, 열, UV 등 다양한 스트레스 반응에 관여한다. 앱시스산의 생합성 경로를 파악하고 조절할 수 있다면 작물의 생산량 증대에 기여할 것이라 사료된다. 앱시스산의 생합성 과정을 그림 3에 나타내었으며, 크게 (1) 색소체에서  $\beta$ -carotene (C40)이 일련의 반응을 거쳐 Xanthoxin (C15)으로 전환되는 과정과 (2) 세포질에서 Xanthoxin (C15)이 앱시스산으로 산화되는 과정으로 구분된다[19].

(1)  $\beta$ -carotene으로부터 전환된 Zeaxanthin은 Violaxanthin으로 에폭시화(epoxidation)되며[20], 이는 Zeaxanthin epoxidase (ZEP)에 의해 촉매 된다[21]. Neoxanthin synthase (NSY)와 isomerase 효소에 의해 Violaxanthin과 Neoxanthin의 *cis*-isomers가 합성되는데, 이들은 9-*cis*-epoxycarotenoidioosyase (NCED) 효소에 의해 Xanthoxin으로 분할되어 세포질로 나온다[22].

(2) Xanthoxin이 short-chain alcohol dehydrogenase/reductase (SDR)에 의해 abscisic aldehyde로 세포질에서 변환된다[23]. 앱시스산 생합성의 마지막 단계로, abscisic aldehyde oxidase (AAO3)에 의해 abscisic aldehyde가 carboxylic-acid로 산화된다[22].

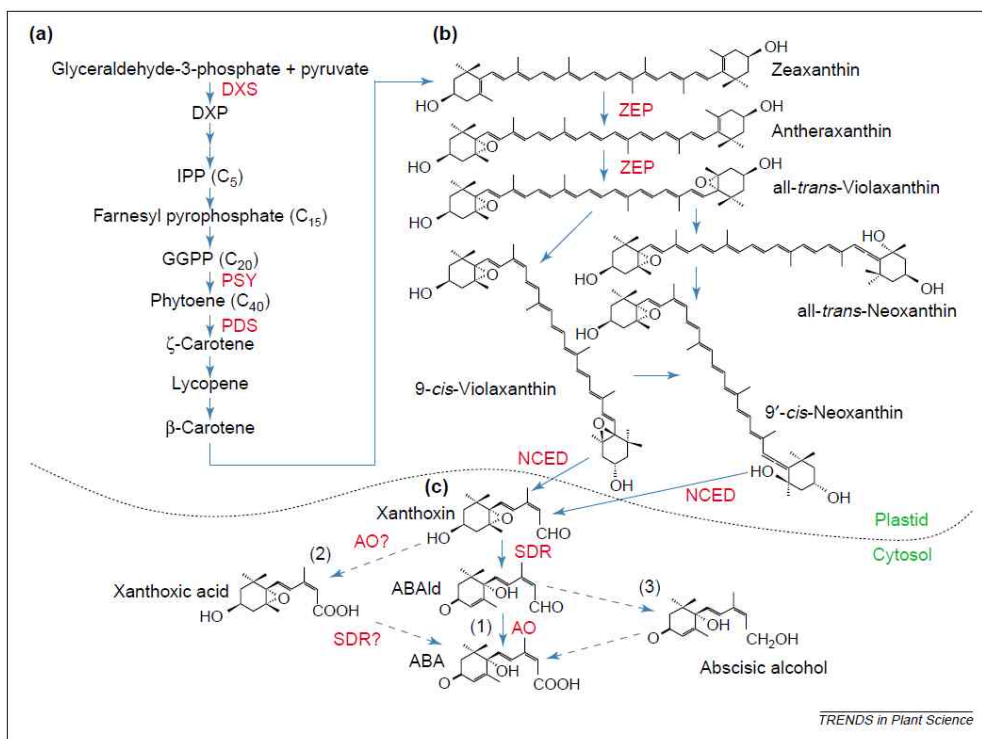


그림 3. 앱시스산 생합성 과정과 관련 효소.

그림출처: Mitsunori Seo & Tomokazu Koshiaba (2002) [19]

## 앱시스산의 역할

앱시스산은 작물 식물에서 환경 스트레스에 대응하는 데 중요한 식물 호르몬이다. 가뭄이나 고온, 고염, 저온과 같은 스트레스 조건에서, 식물체 내의 앱시스산 함량은 증가하고, 식물의 스트레스 저항성 반응이 일어난다[24]. 심지어 앱시스산은 비스트레스 조건에서 식물의 성장과 발달에 관여하기도 한다.

### -잎의 노쇠(Senescence)

식물의 기관 중 하나인 잎은 뚜렷한 발달 단계를 거친다. 어린잎은 초기 잎원기<sup>6)</sup> 이후 영양분이 필요한 기관이 된다[25]. 필요한 영양분을 얻은 잎은 빠른 성장을 이루고 성숙한 크기에 도달하여, 이후 노화 과정을 거치게 된다. 이때, 영양분이 재활용되어 꽃과 씨앗이 자라는 조직으로 운반된다[26]. 잎의 노쇠는 식물 발달의 필수적인 마지막 단계로서, 내생적 및 환경적 요인에 의해 조절된다[23]. 이러한 요인 중 엽시스

6) 발생 초기에 있는 배적 상태의 잎

산은 잎의 노쇠에 유의한 영향을 준다. 한 실험에서는 앱시스산을 처리한 쌀에서 잎의 노화가 촉진된 결과를 보였으며[27], 비슷한 결과가 옥수수에서도 보였다[28]. 잎의 노화는 탄수화물 및 다른 생체 분자를 생산하는 동화작용이 단백질, 핵산, 지질로 분해하여 에너지를 얻는 이화작용으로 전환되면서 발생하며, 이후 세포 자살로 이어져 끝이 난다[25]. 이전까지 앱시스산이 에틸렌의 생합성을 자극하여 노쇠를 유도한다고 알려져 있었다. 하지만 최근 연구에서 에틸렌과는 독립적인 경로의 앱시스산 신호를 통해 잎의 노쇠가 발생한다는 사실을 밝혔다.

#### -종자의 휴면과 발아(Seed Dormancy and Germination)

노쇠는 오래된 잎에서 발생하고 낙엽 현상을 이끄는 반면 휴면은 새싹과 종자에서 발생하며 생명 유지에 도움을 준다[29]. 식물에서 종자의 휴면 및 발아는 식물 수명주기의 핵심 단계이다[23]. 휴면에 관여하는 호르몬에는 지베렐린과 앱시스산이 있는데, 지베렐린은 휴면을 억제하고 발아를 촉진하는 반면[29], 앱시스산은 식물 종자가 물, 햇빛, 온도 등 적절한 환경을 만날 때까지 발아하지 않도록 유도하며, 휴면을 촉진하는 역할을 한다[30]. 앱시스산 대사 및 신호전달과 관련된 많은 유전자는 종자 휴면을 조절하는 데 중요하게 작용한다. 종자 휴면을 촉진하는 데 필요한 앱시스산은 배아에서 생산된다. 모계 조직이나 외부에서 생성된 앱시스산은 종자의 휴면을 직접 유도할 수 없다[31]. 하지만 Kanno 연구팀의 실험에서 모계 조직에서 생성된 앱시스산이 배아로 이동한 것으로 보아 간접적으로 종자 휴면을 유도할 수 있다는 사실을 알 수 있다[32]. 앱시스산 생합성 유전자 중 *NCED*는 반응의 속도를 조절한다[23]. 그중 *NCED6* 및 *NCED9*는 종자 휴면을 유도하는 주요 앱시스산 유전자이다[33]. *NCED6*를 과다 발현시킨 한 실험에서 종자의 앱시스산 함량이 증가하고 성숙한 발아를 억제하는 결과를 보였다[34].

#### -뿌리 구조 변형(Modulation of Root Architecture)

식물은 일련의 유전적 발달 과정을 거친 결과 주어진 환경 변화에 따라 뿌리 성장을 조절한다. 옥신(auxin)은 뿌리 분열 기능을 하는 1차 호르몬이지만, 앱시스산은 뿌리 성장의 주요 조절자로 뿌리 분열조직 및 세포 신장을 조절한다[35]. 물이 충분히 공급되는 조건에서 높은 농도의 앱시스산은 식물의 뿌리 성장을 억제하는 것으로 오랫동안 알려져 왔다. 하지만, 이후 *Medicago truncatula latd* 돌연변이를 통해 앱시스산이 뿌리 분열조직의 유지와 성장에 관여한다는 사실이 알려졌다[36]. 뿌리 성장은 지속적인 세포 분열을 통해 일어난다. 하지만, 평균보다 빠르게 뿌리 성장이 이루어지는 부분은 뿌리 세포가 분화하여 신장한 것이다[35]. 한 실험에서는 수분 스트레스를 받는 옥수수에서 앱시스산이, 신장 될 뿌리의 범위를 넓히고 활성산소종(reactive oxygen species, ROS)의 축적을 줄여 뿌리 신장을 자극한다는 사실을 밝혀냈다[37]. 앱시스산은 내피에 존재하여 주변 토양 환경에 따라 식물이 대처할 수 있게 뿌리의 구조를 신중하게 조절하는 역할을 한다.

### -기공 조절(Stomata Regulation)

식물이 흡수한 물의 90% 이상은 주로 기공이라 불리는 잎 표피 속 작은 구멍을 통해 손실된다[38]. 기공의 공변세포는 광합성에 필요한 이산화탄소 등의 기체 출입, 증산작용을 조절한다. 공변세포는 세포 자율성을 가지며 빛, 이산화탄소, 병원체 감염, 식물 호르몬을 감지하고 신속하게 반응한다[39,40]. 1898년에 Francis Darwin이 상대습도가 감소할 때 기공이 닫히는 것을 관찰하였지만[41], 당시에 이 현상이 일어난 요인에 대해서는 밝혀지지 않았다. 하지만 이후 Bauer 연구팀이 앱시스산이 결핍된 돌연변이체 *aba3-1*을 낮은 상대습도에 두고 관찰하여 공변세포가 앱시스산을 합성하는 데 필요한 유전자를 가지고 있다는 사실을 알아냈다[42]. 앱시스산에 의해 유도된 기공 개폐는 공변세포의 세포막과 액포막에 위치한 이온 채널의 조절과 연관되어 있다[43]. 앱시스산은 복잡한 신호 메커니즘을 거쳐 공변세포의 원형질막 이온 채널에서 음이온과 칼륨의 유출을 유도하며, 그 결과로 공변세포의 압력이 감소되고 기공이 폐쇄된다[44]. 이온 채널에는 slow-acting sustained (S-type)과 rapid transient (R-type)이 있지만, S-type만이 앱시스산이 매개하여 기공 개폐를 조절한다[43]. S-type인 SLAC1 (Slow Anion Channel-Associated 1)은 앱시스산 외에도 이산화탄소, 오존, 빛, 습도변화, 칼슘이온, 과산화수소, 아산화질소에 반응하여 기공을 닫는데 필수적이다[45].

### -비생물적 스트레스 반응(Abiotic Stress Response)

식물은 발달 및 성장 과정 중에 고염, 저온 등 다양한 스트레스를 받는다. 이때 스트레스 저항성 유전자는 방어반응들을 활성화시키기 위해 효소와 조절 단백질 등을 만들어 낸다. 대부분의 환경 스트레스는 물 부족으로 인해 야기된다. 만약 세포 밖의 고염 등의 스트레스로 인해 용질의 농도가 변하거나 저온 스트레스에 의해 얼음이 형성되면 세포로부터 물이 빠져나와 팽압이 감소하고, 세포 내 용질의 농도가 증가한다. 그로 인해 식물이 이용할 수 있는 물이 제한되면 광합성 감소가 일어나며, 더 심각한 경우에는 광합성이 억제된다[46]. 광합성이 저하되면 엽록체는 과도한 들뜬상태에 놓이게 되고[47], 이는 활성산소종의 생성으로 이어져 결국 막과 효소가 손상된다[48]. 대부분의 환경 스트레스는 물 부족으로 인해 야기되지만 각 스트레스에 대한 반응 기작은 서로 상이하며 스트레스로 인한 식물의 반응도 다소 다르다.

### 앱시스산과 물 스트레스(Water Stress)

식물은 다양한 수준의 물 스트레스에 노출된다. 물 스트레스는 주로 물 부족 스트레스에 의해 발생하는데, 가뭄이나 고염분 환경에서도 결국 물 부족 스트레스가 발생한다. 물 부족 스트레스 감지 시에 식물세포 내에서 일어나는 가장 초기 변화 중 하나는 내부 앱시스산의 급격한 증가인데, 실제로 고염분 및 삼투 스트레스 등에 노출 시 영양조직에서 앱시스산 농도가 약 40배 증가하였다고 한다[49]. 내부 앱시스산이 빠르게 생성되면 신호전달을 통해 기공 폐쇄를 포함한 생리적 반응이 일어난다[50].

특히 앱시스산은 활성산소종(Reactive Oxygen Species; ROS)의 생성을 유발하는 신호전달 경로를 자극하는 것으로 알려졌다[50]. ROS 신호전달의 목적 중 하나는 식물의 막에서  $\text{Ca}^{2+}$  채널을 활성화시키는 것인데, 이는 스트레스 및 호르몬 신호, 발달 등 많은 ROS-조절 과정에 있어 중요한 단계일 수 있다[51]. ROS에 의해 세포질의  $\text{Ca}^{2+}$  수준이 증가하면 공변세포로부터 음이온이 방출되고 기공은 폐쇄된다. 즉 공변세포 주변에 앱시스산 농도가 높으면 기공 폐쇄가 발생하고 결과적으로 수분 손실을 줄일 수 있는 것이다[52].

## 앱시스산 활용 방안

농업기술의 개발 사례로 앱시스산을 활용하는 것을 들 수 있다[53]. 앱시스산은 스트레스 호르몬으로서 고온과 가뭄 환경에서 기공을 닫아 수분 손실을 줄여 식물의 생존에 유익한 변화를 유도한다. 하지만 이 물질은 빛에 신속히 불활성화되어 농업에 이용하기 쉽지 않다. 따라서 앱시스산 대신 유사 물질을 작물보호제로 개발하거나, 유전공학적으로 앱시스산 경로를 활성화시키는 방법으로 형질전환된 식물체를 개발하고 있다.

앱시스산 경로를 활성화시키는 방법으로 관련 효소를 변형시키는 연구가 제시되었다. 농촌진흥청과 성균관대학교 구조생물학연구실(이상호 교수팀)이 기후변화 대응 작물 개발의 일환으로 수행한 공동 연구(2012~2017) 결과, 앱시스산을 인식하는 센서의 조절 스위치에 해당하는 부위를 발견하였다[54]. 이 부위에 다양한 변화를 주어 작물의 환경 스트레스 반응 수준을 정밀하게 조절할 수 있음을 밝힌 것이다. 앱시스산을 인식하는 센서는 그 수용체와 탈인산화효소라고 할 수 있는데, 연구팀은 탈인산화효소에 다양한 변형을 준 뒤 변이체의 특성을 분석하였다. 해당 부위를 개선한 애기장대 변이체는 정상 조건에서 대조구 대비 성장률이 5~10% 증대되었고, 앱시스산 농도를 높게 처리한 경우 대조구 대비 생장이 억제되어 민감하게 반응하였다고 한다. 농촌진흥청 유전자공학과 김범기 연구사는 “이 기술로 식물체의 단백질을 설계해 작물의 형질을 개선할 수 있다면 가뭄저항성 등 환경 스트레스 저항성 증진 작물 개발에 기반 기술로 큰 도움이 될 것이다.”라고 평가했다[54]. 이렇듯 앱시스산 신호전달에 관여하는 탈인산화효소 또는 수용체들의 작용 메커니즘을 이해하고, 변형시키는 방법은 스트레스에 강력한 형질전환체를 개발할 수 있도록 한다.

Zhang 연구팀(2010)은 WRKY40 등과 같은 특정 WRKY 그룹 단백질이 ABI5, DREB2A와 같은 앱시스산 반응성 유전자의 발현을 억제하는 반응을 제시하였다[10]. 반면 애기장대의 WRKY40 돌연변이체에서는 상충된 결과가 보고되었기 때문에 명확히 알기 어려운 부분이 있다. 하지만 특정 종에서 WRKY 그룹 단백질이 앱시스산 신호전달 과정을 억제한다면, 이 메커니즘을 이해하고 억제하려는 노력이 필요하다. WRKY의 원하지 않는 영향을 약화시키기 위해 전사 후, 그리고 번역 단계의 변형들을 파악하고 이를 억제한다면, 농작물의 저항성을 증진시키는 기술로 활용할 수 있을 것으로 보인다.

실제로 2005년~2015년까지 환경 스트레스에 대한 농작물의 저항성을 증진시키는 농업기술의 특허출원은 총 340건으로, 작물보호제와 형질전환된 식물체(종자 포함) 관련 출원이 각각 32건 및 308건으로 조사되어 작물보호제보다 형질전환된 식물체의 출원이 훨씬 우세하다[54]. 따라서 형질전환 식물체를 개발할 수 있도록 앱시스산 신호 전달 과정을 규명하는 연구가 지속적으로 이루어져야 하며, 이로써 해당 경로를 활성화시킬 수 있는 방법이 제시될 것으로 기대된다.

## 결론

앱시스산 수용체로 ChlH, GTG1과 GTG2, PYR/PYL/RCAR을 다루었다. 그중 PYR/PYL/RCAR은 PP2C와 상호작용함으로써 앱시스산 신호전달 경로를 활성화시키는 것으로 나타났다. 앱시스산과 결합한 수용체가 PP2C와 상호작용하기 때문에 SnRK2의 불활성화가 이루어지지 않는 것이다. 식물이 건조한 환경에 놓였을 때는 SnRK2에 의해 bZIP과 같은 AREB/ABF 전사인자가 활성화되어 스트레스 저항성 유전자가 전사된다. 앱시스산 반응성 유전자들의 발현과 관련된 메커니즘을 규명하고 응용한다면, 작물 보호제 및 가뭄 저항성 작물 개발에 기여할 수 있을 것으로 기대할 수 있다. 실제로도 앱시스산을 인식하는 수용체와 탈인산화효소 중 탈인산화효소의 변이체에서 성장률이 5~10% 증대되었기 때문에 이는 후에 작물 재배량 증가를 목표로 하는 개발에 쓰일 것으로 예상된다. 또한 탈인산화효소뿐 아니라 앱시스산 반응성 유전자의 발현을 억제하는 다른 단백질들의 역할을 규명하고 앱시스산 존재 시의 활동 메커니즘을 이해한다면 이를 제어할 수 있을 것이라 기대된다.

앱시스산은 잎의 노쇠, 종자의 휴면과 발아, 뿌리 구조 변형, 기공 조절, 비생물적 스트레스 반응 등 다양한 방면에서 작용하는 식물 호르몬이다. 앱시스산 수용체는 엽록체, 세포막, 핵 등 여러 장소에 존재하고 WRKY, PKABA1, TaABF1 등의 효소들과 복합적으로 얽혀있다. 따라서 앞으로도 앱시스산에 대한 역할 및 여러 효소와의 연관성 연구는 지속되어야 한다.

## 참고 문헌

- [1] Slater, A., Scott, N. W., Fowler, M. R. (2008) *Plant Biotechnology*. Oxford: Oxford University Press.
- [2] 정수영 (2015) 식물의 생물학적, 비생물학적 스트레스들의 상호작용: 유전자부터 들판까지. BRIC View 2015-R12 1-14.
- [3] Addicott, F. T., Lyon J. L., Ohkuma, K., Thiessen, W. E., Carns, H. R., Smith, O. E., Cornforth, J. W., Milborrow, B. V., Ryback, G., Wareing, P. F. (1968) Absciscic acid: a new name for abscisin II (dormin). *Science* 159: 1493.
- [4] 농촌진흥청, 디지털 농업용어사전, “탈리”
- [5] Stanley Douglas Strausz (1970) A Study of the Physiology of Dormancy in the Genus *Pyrus*. Unpublished doctoral dissertation. Oregon State University.
- [6] Cornforth, J. W., Milborrow, B. V., Ryback, G., Rothwell, K., Wain, R. L. (1966). Identification of the yellow lupin growth inhibitor as (+)-abscisin II ((+)-dormin). *Nature* 211: 742-743.
- [7] Wu, F. Q., Xin, Q., Cao, Z., Liu, Z. Q., Du, S. Y., Mei, C., Zhao, C. X., Wang, X. F., Shang, Y., Jiang, T., Zhang, X. F., Yan, L., Zhao, R., Cui, Z. N., Liu, R., Sun, H. L., Yang, X. L., Su, Z., Zhang, D. P. (2009) The Magnesium-Chelatase H subunit Binds Absciscic Acid and Functions in Absciscic Acid Signaling: New Evidence in Arabidopsis. *Plant Physiology* 150: 1940-1954.
- [8] Nott, A., Jung, H. S., Koussevitzky, S., Chory, J. (2006) Plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Annual Review of Plant Biology* 57: 739-759.
- [9] Wang, X. F., Zhang, D. P. (2008) Absciscic Acid Receptors: Multiple Signal-perception Sites. *Annals of Botany* 101: 311-317.
- [10] Lee, J. H. (2014) ABA Signal Transduction Pathway in Plants: ABA Transport, Perception, Signaling and Post-Translational Modification. *Journal of Life Science* 24: 196-208.
- [11] Pandey, S., Nelson, D. C., Assmann, S. M. (2009) Two Novel GPCR-Type G Proteins Are Absciscic Acid Receptors in Arabidopsis. *Cell* 136: 136-148.
- [12] Lim, C. W., Baek, W., Han, S. W., Lee, S. C. (2013) Arabidopsis PYL8 Plays an Important Role for ABA Signaling and Drought Stress Responses. *The Plant Pathology Journal* 29: 471-476.
- [13] Kim, N. H., Kim, B. G. (2014) Signaling Components of ABA-dependent Transcriptional Regulation. *Korean Journal of Breeding Science* 46: 1-9.
- [14] Protein Data Bank Japan. <[http://ipr.pdbj.org/eprts/index\\_en.cgi?PDB%3A3jrs%2C3jrq](http://ipr.pdbj.org/eprts/index_en.cgi?PDB%3A3jrs%2C3jrq)>.
- [15] Anderberg, R. J., Walker-Simmons, M. K. (1992) Isolation of a wheat cDNA clone for an absciscic acid-inducible transcript with homology to protein kinases. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 10183-10187.
- [16] Smith, A. E., Yang, X., Lutian, J., Chelimo, D., Lopez, J., Uwase, G., Johnson, R. R. (2019) Transcriptional regulatory activity of the cereal grain bZip protein TaABF1 can be either stimulated or inhibited by phosphorylation. *Seed Science Research* 29: 21-28.
- [17] Li, J., Wang, X. Q., Watson, M. B., Assmann, S. M. (2000) Regulation of absciscic

acid-induced stomatal closure and anion channels by guard cell AAPK kinase. *Science* 287: 300-303.

[18] 이성철 (2017) 앱시스산(ABA) 신호전달 과정을 통한 식물의 방어반응, *Journal of Agricultural, Life and Environmental Sciences*, 29: 18-34.

[19] Seo. M., Koshiba, T. (2002) Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science* 7: 41-48.

[20] Xiong, L., Zhu, J. K. (2003) Regulation of Absciscic Acid Biosynthesis. *Plant Physiol* 133: 29-36.

[21] Marin, E., Nussaume, L., Quesada, A., Gonneau, M., Sotta, B., Hugueney, P., Frey, A., Marion-Poll, A. (1996) Molecular identification of zeaxanthin epoxidase of *Nicotiana plumbaginifolia*, a gene involved in abscisic acid biosynthesis and corresponding to the ABA locus of *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J* 15: 2331-2342.

[22] Vishwakarma, K., Upadhyay, N., Kumar, N., Yadav, G., Singh, J., Mishra, R. K., Kumar, V., Verma, R., Upadhyay, R. G., Pandey, M., Sharma, S. (2017) Absciscic Acid Signaling and Abiotic Stress Tolerance in Plants: A Review on Current Knowledge and Future Prospects. *Front Plant Sci* 8: 161

[23] Saroj, K. S., Kambham, R. R., Jiaxu L. (2016) Absciscic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Front Plant Sci* 7: 571.

[24] Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T., Xu, H. E. (2014) Absciscic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacol Sin* 35: 567-84.

[25] van der Graaff, E., Schwacke, R., Schneider, A., Desimone, M., Flugge, U. I., Kunze, R. (2006) Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence. *Plant Physiol* 141:776-792.

[26] Himelblau, E., Amasino R. M. (2001) Nutrients mobilized from leaves of *Arabidopsis thaliana* during leaf senescence. *Journal of Plant Physiology* 158: 1317-1323.

[27] Ray, S., Mondal, W. A., and Choudhuri, M. A. (1983) Regulation of leaf senescence, grain-filling and yield of rice by kinetin and abscisic acid. *Physiologia Plantarum* 59: 343-346.

[28] He, P., Jin, J. (1999) Relationships among hormone changes, transmembrane  $\text{Ca}^{2+}$  flux and lipid peroxidation during leaf senescence in spring maize. *Acta Botanica Sinica* 41: 1221-1225.

[29] Zhao, Y., Gao, J., Kim, G. I., Chen, K., Bressan R. A., Zhu, J. K. (2017) Control of Plant Water Use by ABA Induction of Senescence and Dormancy: An Overlooked Lesson from Evolution. *Plant and Cell Physiology* 58: 1319-1327.

[30] 박현렬, 농수축산신문 (2015. 10. 01.), 식물발아 관여 호르몬 수송 매커니즘 규명.

[31] Nambara, E., Marion-Poll, A. (2003) ABA action and interactions in seeds. *Trends in Plant Science* 8: 213-217.

[32] Kanno, Y., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nambara, E., Abrams, S. R., Kamiya, Y., Seo, M. (2010) Comprehensive hormone profiling in developing *Arabidopsis* seeds: Examination of the site of ABA biosynthesis, ABA transport and hormone interactions. *Plant Cell Physiology* 51: 1988-2001.

[33] Skubacz, A., Daszkowska-Golec, A. (2017) Seed Dormancy: The Complex Process Regulated by Absciscic Acid, Gibberellins, and Other Phytohormones that Makes Seed Germination Work.

*Phytohormones*. intechopen.

- [34] Martínez-Andújar, C., Ordiz, M. I., Huang, Z., Nonogaki, M., Beachy, R. N., Nonogaki, H.. (2011) Induction of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arabidopsis thaliana* seeds enhances seed dormancy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 17225-17229.
- [35] Harris, J. M. (2015) Absciscic Acid: Hidden Architect of Root System Structure. *Plants* 4: 548-572.
- [36] Liang, Y., Mitchell, D. M., Harris, J. M., (2007) Absciscic acid rescues the root meristem defects of the *Medicago truncatula* latd mutant. *Dev Biology* 304: 297-307.
- [37] Sharp, R. E., Wu, Y. J., Voetberg, G. S., Saab, I. N., Lenoble, M. E. (1994) Confirmation that abscisic-acid accumulation is required for maize primary root elongation at low water potentials. *Journal of Experimental Botany* 45: 1743-1751.
- [38] Pei, Z. M., Ghassemian, M., Kwak, C. M., McCourt, P., Schroeder, J. I. (1998) Role of farnesyltransferase in ABA regulation of guard cell anion channels and plant water loss. *Science* 282: 287-290.
- [39] Kollist, H., Nuhkat, M., Roelfsema, M. R. (2014) Closing gaps: linking elements that control stomatal movement. *New Phytologist* 203: 44-62.
- [40] Murata, Y., Mori, I. C., Munemasa, S. (2015) Diverse stomatal signaling and the signal integration mechanism. *Annual Review of Plant Biology* 66: 369-392.
- [41] Darwin, F. (1898) Observations on stomata. *Philos. Philosophical Transactions of the Royal Society of London* 190: 531-621.
- [42] Bauer, H., Ache, P., Lautner, S., Fromm, J., Hartung, W., Al-Rasheid, K. A., Sonnewald, S., Sonnewald, U., Kneitz, S., Lachmann, N., Mendel, R. R., Bittner, F., Hetherington, A. M., Hedrich, R. (2013) The Stomatal Response to Reduced Relative Humidity Requires Guard Cell-Autonomous ABA Synthesis. *Current Biology* 23: 53-57.
- [43] Joshi-Saha, A., Valon, C., Leung, J. (2011) A brand new START: abscisic acid perception and transduction in the guard cell. *Science Signaling* 4: re4.
- [44] Munemasa, S., Hauser, F., Park, J., Waadt, R., Brandt, B., Schroeder, J. I. (2015) Schroederb, Mechanisms of abscisic acid-mediated control of stomatal aperture. *Current Opinion in Plant Biology* 28: 154-162.
- [45] Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y. F., Nishimura, N., Chan, W. Y., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J. I., Kangasjärvi, J. (2008) SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* 452: 487-491.
- [46] Lichtenthaler, H. K. (1996) Vegetation Stress: an Introduction to the Stress Concept in Plants. *Journal of Plant Physiology* 148: 4-14.
- [47] Smirnoff, N. (1993) The role of active oxygen in the response of plants to water deficit and desiccation. *New Phytologist* 125: 27-58.
- [48] Allen, R. D. (1995) Dissection of Oxidative Stress Tolerance Using Transgenic Plants. *Plant Physiology* 107: 1049-1054.
- [49] Lee, J. H. (2018) Understanding of Drought Stress Signaling Network in Plants. *Journal of Life Science* 28: 376-387.

- [50] Osakabe, Y., Osakabe, K., Shinozaki, K., Tran, L. P. (2014) Response of plants to water stress. *Frontiers in Plant Science* 5: 86.
- [51] Mori, I. C., Schroeder, J. I. (2004) Reactive Oxygen Species Activation of Plant  $\text{Ca}^{2+}$  Channels. A Signaling Mechanism in Polar Growth, Hormone Transduction, Stress Signaling, and Hypothetically Mechanotransduction. *Plant Physiology* 135: 702-708.
- [52] Lisar, S. Y., Motafakkerazad, R., Hossain, M. M., Rahman, I. M. (2012) Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. *Water Stress*. intechopen.
- [53] 특허심사3국 응용소재심사과 (2016. 10. 26), 스트레스로부터 농작물을 보호하라!.
- [54] 농촌진흥청 유전자공학과 (2017. 10. 12.), 벼 가뭄저항성 반응 조절 스위치 규명.

# 활동 소개 및 후기

## Membership Training

### CJ 블로썸 캠퍼스(CJ제일제당) 견학

#### 팀별 활동 소개

의생명공학팀  
생물소재 및 계통분류팀  
분자생명공학팀  
해양생명공학팀  
미생물공학팀  
논문리뷰팀

#### 팀별 활동 실적

#### AMP 활동 후기

## Membership Training

2019학년도 3월, AMP 동아리의 첫 모임과 회식이 있었고 3월 말에는 MT를 다녀왔습니다. AMP 동아리원들과 함께 하는 첫 MT였습니다. 선발대와 후발대로 나눠 MT 준비를 하는 과정에서 설렘이 가득 찼습니다. 숙소로 도착해서는 식사 준비부터 고기 굽고 마무리 정리까지 서로 도와가며 맛있는 저녁 시간을 마쳤으며 그 후 레크레이션을 통해 다양한 게임을 진행하기도 하였습니다. 서로 협력하여 점수를 얻으면서 팀 간의 경쟁심을 불러일으켜 게임에 대한 열정에 불을 지폈고, 그러면서 선배와 후배 간의 벽도 허물 수 있었습니다. 또한, 레크레이션 이후 활동들도 더욱 AMP 동아리원 간의 사이를 가깝게 만들어준 계기가 되었습니다. 선배와 후배들이 학교생활과 동아리에 관해서 얘기를 나누기도 하였으며 학업 및 여러 이야기들로 밤을 지새웠습니다. 신입생이라는 이름으로 모든 것들이 설레기도 하고 낯설기도 한 1학년 친구들과, 꼭 작년 자신들의 모습을 보는 것만 같은 선배들. 설레는 마음으로 밤을 지새웠습니다. 그렇게 AMP 동아리의 큰 행사 중 하나인 MT가 마무리되었습니다. AMP 동아리라는 이름으로 모여 함께 준비하고 즐기면서 서로를 이해하고 돈독해지는 계기가 되었던 것 같습니다. 이때의 추억이 이후 활동을 함에 있어 큰 시너지 효과를 주었다고 생각하고, 공동체 생활에 적응하는 하나의 계기가 되었다고 생각합니다.



## CJ 블로썸 캠퍼스(CJ제일제당) 견학

2019년 9월 30일, CJ제일제당의 브랜드를 오감으로 체험할 수 있는 ‘CJ 블로썸 캠퍼스 투어’에 다녀왔습니다. 셔틀버스에 탑승한 순간부터 가이드 분의 친절な 설명이 이어졌고 저희는 투어 시간 내내 CJ제일제당을 속속들이 이해하는 아주 유익한 시간을 보내고 왔습니다.

CJ 블로썸 캠퍼스 투어는 **히스토리 씨어터**, **햇반 뮤지엄**, **테크놀로지 홀**, 그리고 **카페테리아** 및 **식사로** 매우 알차게 구성되어 있었습니다. **히스토리 씨어터**에서는 CJ제일제당의 역사와 브랜드, 끊임없는 노력의 발자취를 찾아볼 수 있었는데, 여러 체험형 콘텐츠를 구비해 놓았기 때문에 절로 호기심이 생겼습니다. 그렇기에 적극적인 관람이 가능했던 것 같습니다. **햇반 뮤지엄**에는 쌀/밥의 이야기와 햇반에 대해 직접 체험할 수 있는 공간이 마련되어 있었습니다. 특히 햇반이 만들어지는 데 이용되는 기술과 공정 라인을 직접 눈으로 볼 수 있었는데, 이번 견학에서 가장 인상 깊은 체험 라인이었습니다. 특히 가이드 분은 햇반의 멸균 시스템과 쉽게 상하지 않는 이유를 강조하며 건강에 안 좋을 것이라는 일부 사람들의 편견이 사실이 아니라는 말을 전했습니다. 투어에 참여한 부원들 대부분이 이러한 설명을 들으며 식품의 공정 과정과 기술에 더욱 집중하며 관람하였습니다. 또한 햇반 뮤지엄에서는 벼의 여러 품종에 대한 소개와 설명을 들으며 그것들을 개량하고 선정하는 CJ의 섬세함을 엿볼 수 있었습니다. **테크놀로지 홀**에는 CJ 블로썸 캠퍼스에서 생산되는 가정 간편식들이 브랜드 라인별로 전시되어 있습니다. 식품산업에서 간편식의 입지에 대해 충분히 인지할 수 있는 장소였으며, 이를 연구하는 연구원의 노력 하나하나가 맺은 결실의 장소라는 생각에 감탄하였습니다.

투어는 CJ제일제당의 가정 간편식을 식사하는 것으로 마무리되었습니다. 투어 참가자가 지루해하지 않는 구성을 갖춘 CJ 블로썸 캠퍼스에 대해 부원들은 모두 만족스러움을 한껏 표현하였습니다. 그만큼 알찬 투어를 할 수 있었기 때문에 뜻깊은 견학이 아니었나 싶습니다.



| CJ Blossom 캠퍼스(CJ제일제당) 견학 후기 |                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 이름                           | 내용                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 김승희                          | 인스턴트 식품이라고 하면 건강에 안좋은 음식, 신뢰할 수 없는 음식이라는 인식이 있었습니다. 그래서 저는 인스턴트 식품을 기피했습니다. 하지만 기업탐방을 통해 인스턴트 음식에 대한 인식이 바뀌었습니다. 한 제품을 만들기 위해 이렇게 많은 사람들의 노력이 필요하고 생각했던 것보다 과학적 원리가 많이 이용되고 있었기 때문입니다. 밥이 지어지는 과정을 기계로 구현해내는 모습을 직접 보니 인스턴트 음식에 대한 편견도 사라졌고 오히려 신뢰할 수 있음을 느꼈습니다. 기업탐방을 통해 많은 것을 보고 느꼈기에 유익한 활동이었다고 생각했습니다. |
| 박현아                          | 9월 30일 월요일 공강을 맞아 CJ Blossom 캠퍼스 견학을 하였습니다. CJ 식품 중 햇반 공정 과정과 공정 원리를 보고 CJ의 역사, 햇반을 포함한 CJ의 다양한 제품을 보았습니다. 평소에 식품산업 공정에 관심이 많았는데 평소에 많이 접해볼 수 있었던 햇반의 공정을 볼 수 있어서 너무 좋았고, 견학을 통해 산업 공정과 식품에 더욱 관심을 갖게 되었습니다. 좋았던 만큼 이러한 기업견학의 기회가 더 많아졌으면 좋겠습니다.                                                           |
| 손혜림                          | 기업견학을 가게 되어서 몰랐던 정보에 대하여 잘 알 수 있어서 좋았습니다. 햇반을 자주 사 먹지 않았었는데 그 이유는 신뢰가 없었기 때문입니다. 하지만 기업견학을 통해 만들어지는 과정, 사용되는 물품의 종류에 대해 알고 나니 안심해도 되겠다는 생각이 들게 되었습니다. 실제 우리가 먹는 가공식품들이 어떤 과정을 통해 만들어지는지 기업 탐방을 통해 알게 되었고 기업이 돌아가는 방식도 알게 되어 좋았습니다.                                                                         |
| 김수향                          | 자취생에게 필수 아이템인 햇반이 만들어지는 과정을 직접 보니까 공장 단위에서 중간과정에 결함이 생길 시에 얼마나 큰 타격이 생길지 몸소 느낄 수 있었습니다. 인스턴트 식품이라 맛과 품질이 약간은 떨어질 것이라는 제 생각을 바꿔주었습니다. 맛과 품질, 안전까지 상당한 수준에서 이루어졌음을 확인할 수 있었습니다.                                                                                                                              |
| 한승민                          | CJ Blossom Campus를 다녀오고 나서 가장 인상적인 것은 햇반의 생산과정이었습니다. 제 생각보다 햇반의 생산과정이 더욱 청결하고 체계적이어서 다음부터 햇반을 먹을 때 안심하고 먹을 수 있겠다고 생각했습니다. 그리고 생산공정을 위한 공학적 설계와 지식이 필요하다는 것을 느꼈고 학과 공부를 더욱 열심히 해야겠다고 생각했습니다.                                                                                                                |
| 이정호                          | 투어가 전반적으로 참가자 중심의 구성을 갖추고 있었다고 생각합니다. 기업의 비결이라고 할 수 있는 공정 과정을 보기에 앞서 CJ제일제당의 역사, 주요 제품의 옛 광고 등을 접했기 때문에 친근한 느낌을 받았습니다. 햇반의 생산 현장은 매우 깨끗했고, 대부분이 자동화되어 있었기 때문에 놀라울 따름이었습니다. 식품 분야로의 진로 설계를 고려하게 될 만큼 인상적이었습니다.                                                                                              |
| 송윤석                          | 저는 갓 성인이 된 대학교 1학년입니다. 아직은 미래의 취직 일자리에 대해 잘 모르는 상태였습니다. 그러나 CJ 기업으로 견학을 가서 공장이 돌아가는 방식과 그 공정 과정에 쓰이는 원리들을 두 눈으로 확인해 보니 제가 미래에 어떤 일을 하게 될지 와 닿았습니다. 그리고 CJ의 초창기 성장 방식은 플랫폼으로 성장하고 이윤을 내는 요즘 기업의 성장 방식과는 다르게 뭔가 드라마 같은 느낌이 나서 더욱 여러 기업에 대해 알아보고 싶어졌습니다. 이를 계기로 좀 더 사회, 기업체에 대해 잘 알게 될 것 같습니다.                |

## 팀별 활동 소개

-의생명공학팀-

박진수, 김민하, 서유진

High fat 식이가 사춘기 암컷 흰쥐의 생식기능에 미치는 영향에 대해 한 학기 동안 연구하면서 이전에 접하지 못했던 많은 공부와 경험을 할 수 있었습니다. 실험은 설치류인 SD Rat을 일반 식이와 고지방 식이 두 그룹으로 식이를 통제하여 사육하고, 질구개방이 일어난 뒤 같은 생식주기에 희생하여 생식기관에 어떤 차이점이 존재하는지 확인하였습니다. 실험 설계 및 진행을 위해 의생명공학실험실의 이성호 교수님께서 지도 교수님으로서 많은 도움을 주셨으며 SM-URP 비교과 프로그램을 신청하여 지원금을 받아 진행하였습니다.

처음에는 계획대로만 하면 어렵지 않을 것이라 생각하였습니다. 하지만 실험 동물을 사육하고 질도말을 위해 쥐를 잘 움직이지 않게 적당한 방법으로 보정하는 것부터 조직관찰을 위해 염색약을 직접 녹여 만들고 조직 고정을 위한 최적의 시간을 찾아내어 조직을 얇은 절편으로 만들고 염색을 위한 시간조절 등등의 여러 시행착오가 있었습니다. 이 과정에서 미세한 조건의 변화와 기술의 차이들이 결과에 영향을 줄 수 있다는 것을 배웠습니다. 학부생으로서 아직 지식도 실력도 부족하였지만, 위와 같은 실험과정에서 사용한 실험 기기, 시약의 사용법 등 많은 것을 하나하나 공부하면서 실험을 진행하기 위해 노력하였습니다. 이 과정에서 서로 협력하며 만족할 만한 결과를 낼 수 있었고, 무언가 막힐 때마다 교수님께서 조언해주시고 설명해 주셔서 무사히 실험을 마칠 수 있었습니다.

실험 이후 결과를 정리하면서도 논문 형태의 보고서를 작성하기 위해 평소 수업으로는 배우지 못한 논문 찾는 방법도 알게 되었습니다. 실험과 보고서 작성이 모두 끝난 뒤에는 제 38회 발생명물학회 정기학술대회를 8월 31일에 참가했습니다. 처음 가본 학술대회에서 다른 연구원분들의 연구에 대한 발표를 보면서 이해하기 어려운 내용이 많았는데 여기서 이 전공에 대해서 모르는 것과 배울 지식이 매우 방대하다는 걸 느꼈습니다. 발표 내용 뿐 아니라 그 내용을 발표하시는 분들을 보면서도 느끼는 바가 많았습니다. 연구원분들은 당연한 것이겠지만 모두 자신의 분야에 대한 이해도가 매우 높았으며, 어떤 질문을 받아도 그에 대한 대답을 대중 앞에서 자신감 있게 하였습니다. 연구원분들의 지식과 경험, 그리고 무엇보다 많은 시간을 들이고 노력해 오셨다는 것이 느껴졌습니다. 학회에 참가하면서 생명공학을 전공하는 학생으로서 미래에 대한 생각이나 전공분야에 대한 색다른 경험을 할 수 있었습니다.

이런 좋은 경험은 여러 사람들의 도움이 있었기에 가능했다고 생각합니다. 먼저 좋은 기회와 많은 도움을 주신 교수님께 감사드립니다. 그리고 저희의 프로젝트를 선정해 준 SM-URP 담당자분들, 같이 실험을 진행하며 고생한 학우들에게 너무 고맙고 마지막으로 실험을 위해 희생된 생명들에게 미안하고 감사합니다. 나중에도 기회가 된다면 다시 이런 활동을 할 수 있었으면 좋겠습니다.



## 팀별 활동 소개

-생물소재 및 계통분류팀-

임소연, 안효빈, 박윤진, 서한은별, 양지원

저희 조는 생물소재 및 계통분류에 관심이 있는 동아리 부원들의 지원을 통해 구성되었습니다. 3, 4월엔 조원 간 친해지는 시간을 가졌고, 5월 초부터 연구주제를 선정하기 위해 정기적으로 회의를 진행하였습니다. 하지만 대부분 AMP를 처음 들어온 학생들의 비율이 높고 다들 경험이 부족했기 때문에 주제를 정하는 일은 쉽지 않았습니다. 그래서 김창배 교수님과 실험실 조교님께 도움을 요청해 ‘꿀’을 실험 대상으로 선정하게 되었고, 7월부터 매주 2~3번씩 실험을 진행하게 되었습니다. 실험 과정에서 조교님들의 이론적 설명과 도움 덕분에 1학년 학생들은 전공 실험 수업에선 해보지 못했던 실험이나 실험 장비들을 접해보고 2학년 학생들은 실험을 반복하면서 전보다는 실험 장비를 다루는 데 익숙해져 다들 좋은 경험이 되었습니다. 여름 방학기간 동안의 실험이 끝난 후, 2학기에 ‘스터디 상생플러스’라는 대회를 접하게 되었습니다. ‘스터디 상생플러스’는 공통의 관심사를 가진 학생들이 자율적으로 팀을 구성하고 창의적 프로젝트 주제 설정, 지도교수나 기업멘토의 피드백을 받아 프로젝트를 수행하는 프로그램입니다. 프로그램의 취지가 저희 조의 목적과 잘 부합된다고 생각하여 ‘서울 아카시아 꿀의 화분 염기서열 분석을 통한 종 판별’이라는 주제로 참가하게 되었습니다. 이 활동을 통해 매주 1회씩 정기적인 모임을 가지면서 저희가 방학에 했던 실험의 필요성, 목적 등을 다시 한번 생각하게 되었고 실험을 진행하면서 부족했던 점과 보고서 작성에 더 필요한 내용을 얘기해보면서 방학 기간 실험의 내용을 심화해보는 시간도 가져 학술제를 준비하는 데에도 도움이 되었습니다. 실험이나 대회 준비 동안 예상치 못한 실험 결과나 바쁜 일정, 보고서 작성의 어려움 등이 있었지만 교수님의 조언, 격려와 조교님들의 적극적인 도움을 통해 조원들이 같이 어려움을 해결할 수 있었고 조원들 모두 열심히 참여하여 이번년도 AMP 활동을 끝까지 잘 마무리 지을 수 있었던 것 같습니다. 또한 아직 스터디 상생플러스 활동은 끝나지 않았지만, 이 역시 좋은 결과를 얻기 위해 마지막까지 노력할 것입니다.



## 팀별 활동 소개

-분자생명공학팀-

정하영, 박지영, 김연서, 강서영

저희 분자생명공학팀은 안예진 교수님과 임은주 조교님의 지도 아래에 분자생명공학 실험실에서 1년 동안 AMP 활동을 하게 되었습니다. 저희 팀은 HSP70으로 형질전환 된 대장균에서 재조합 ADH 단백질을 효율적으로 생산하기 위하여 최적 발현 조건을 수립하는 연구를 진행하였습니다. 생각했던 것만큼 실험 결과가 잘 나오지는 않았지만, 몇 번의 실험 끝에 의미 있는 결과를 얻을 수 있었습니다. AMP를 통해 학부생 수준에서는 하기 어려운 실험을 하고, 이를 통해 관련된 이론적 지식들을 습득할 수 있었습니다. 또한, 교수님과 논의하기 전, 학생들이 끼리 실험 결과를 분석하여 논문 작성을 함으로써 유의미한 결과 탐색, 논문을 쓰는 법이나 연관된 논문 찾는 법 등에 대해 조금이나마 배울 수 있었던 것 같아 굉장히 좋은 경험을 했다고 생각합니다. 방학 때 실험을 해야 해서 학교를 나오느라 힘들었던 기억이 있지만, 대학 생활을 하면서 한 번쯤 해보면 미래에 많은 도움이 될 만한 동아리 활동이었다고 생각합니다. 또한, 1년에 걸쳐 오랜 기간 동안 동아리 활동을 진행하면서 조금은 어려운 사이라고 느껴졌던 선후배 간 사이가 한층 더 가까워지고 단합력도 느낄 수 있었습니다. 다만 인제 와서 보니 학술적인 모임 외에 친목을 목적으로 하는 만남을 거의 가지지 못한 것이 아쉬움으로 남는 것 같습니다. 올해가 가기 전 다들 시간이 된다면, 친목을 위해 한 번 만났으면 하는 바람이 있습니다.

저희는 저희의 연구주제를 바탕으로 교내 교수학습개발센터에서 시행하는 스터디 상생플러스와 상명 학술상에 참가하였습니다. 단순히 실험만 하고 끝나는 것이 아니라 교내 대회에 지원하여 저희가 한 실험의 전반적인 내용과 그에 관한 여러 가지 것들에 대해 한 번 더 상기시키고 자세하게 알 수 있는 기회가 되었다고 생각합니다.

마지막으로 바쁘신 와중에도 시간을 내어 실험을 도와주시고 저희가 AMP 활동을 잘 마무리할 수 있게 지원해주신 안예진 교수님과 임은주 조교님께 감사의 말씀을 전합니다.



## 팀별 활동 소개

### -해양생명공학팀-

박고운, 박인옥, 이승연, 김수황, 이해성, 손혜림, 구병운

저희 팀은 '생활용 살균제 트리클로산이 해양 미세조류 *Prorocentrum minimum*의 광합성 및 생리 작용에 미치는 영향 (Triclosan, a disinfectant for life, effects of microalgae *Prorocentrum minimum* on photosynthesis and physiology)'을 주제로 1학기 때 SM-URP에 참가하였습니다. URP는 전공 심화 연구부문과 창의·융복합 부문 중 하나를 선택하여 학부생이 팀 기반으로 국내외 학술지에 투고할 학술 논문 작성 및 학술대회 발표를 지원하는 프로그램입니다. 해양생명공학에 관심이 있는 저희로서 이 분야에 대해 알리고 해당 분야에 대해 단순히 아는 것에서 벗어나 심화연구도 할 수 있는 좋은 기회인 것 같아서 참가하게 되었습니다. 꾸준히 만나면서 자료를 조사하고 또 공부함으로써, 이에 관련된 지식을 함양시킬 수 있었고 실험도 함께 진행하여 실험적 능력도 키울 수 있었습니다. 기존 학교 실험 수업에서는 실험방법과 재료 등 이미 짜여 있는 프로토콜을 기준으로 실험을 진행하였지만, 이번 학술대회를 통해 저희가 실험에 관한 것들을 직접 설계하였습니다. 실험결과에 대한 토의를 통해 처음 설정한 가설에 대해 입증해보면서 실험결과 도출의 중요성에 대해 알게 되었습니다. SM-URP를 통해 저희가 한 실험과 내용에 대해 다시 한번 더 상기시킬 수 있었던 기회였다고 생각합니다. 또한, 저희 팀은 교수님의 추천으로 '2019 한국해양생명과학회 제5회 정기학술대회 및 정기총회'에 참가하게 되었습니다. 학술대회에서 전시된 포스터들을 보면서 여러 연구실에서의 결과물들을 확인할 수 있었고, 다양한 해양 분야의 연구에 대해 알아볼 수 있는 계기가 되었습니다. 직접 실험을 설계하고 논문을 작성하며 포스터를 제작하는 과정을 통해 대학원이라는 목표를 가진 학부생 팀으로서 좋은 기회였고 흥미 있는 분야를 탐색할 수 있는 의미 있는 시간이었습니다.



## 팀별 활동 소개

### -미생물공학팀-

김민우, 박현아, 김국찬, 이하은, 장신혜, 현지혜

올해 2019년 AMP 미생물공학팀에서 'Inducer를 포함한 배지가 *Galactomyces reessii*의 laccase와 항산화물질 생산에 미치는 영향'에 대한 연구를 진행하였습니다. 항산화능을 평가하기 위해 총 페놀 함량, Flavonoid, DPPH radical 소거능을 측정하였으며, laccase activity assay를 통해 균주가 생산하는 laccase의 양상을 관찰하였습니다. 주도적으로 진행한 첫 실험이어서 실험을 설계하는 과정에서 많은 어려움을 겪었지만, 교수님 및 조교님의 면담을 통해 어려움을 잘 극복해 나갈 수 있었습니다. 교수님과 조교님의 조언을 통해 실험에 관한 문제해결 능력뿐만 아니라, 연구에 대한 가치관도 배울 수 있었습니다.

본 연구를 통해 *G. reessii*이 가지는 잠재적인 특성을 파악하고 연구에서 얻은 결과를 통해 교내 프로그램인 전공심화 연구소모임(SM-URP)과 세종대학교 컨벤션센터에서 개최된 2019년 한국미생물학회연합 정기학술대회에 참여하였습니다. 교내대회와 학술대회에서 다양한 연구활동 포스터, 연구동향 등을 보고 한 분야의 전문가인 생명공학도의 꿈을 키울 수 있었습니다. 또한 AMP 동아리 활동을 통해 '연구'라는 것에 깊이 이해하고 생각할 수 있었습니다. 단순히 실험능력 향상을 위해 실험을 진행한 것이 아닌 이 실험을 통해 사회적으로 어떤 공헌을 할 수 있는지, 본 실험으로부터 어떤 이점을 도출해 낼 수 있는지 등을 생각하며 실험을 진행할 수 있었습니다. 어려운 연구를 풀어나가는 과정에서 팀원들과 합심하여 협동심을 기를 수 있었고, 실무 능력을 기를 수 있었습니다. 주도적으로 이끌어간 첫 실험이라 많은 부족함과 실수도 있었지만, 교수님과 조교님의 지도하에 팀원들과 포기하지 않고 끝까지 연구를 진행한 점에 있어 매우 뿌듯하고 값진 경험이었습니다.



## 팀별 활동 소개

### -논문리뷰팀-

김승희, 이정호, 송운석, 한승민, 김솔빈

저희 논문리뷰팀은 관심 있는 주제에 대해 여러 논문을 공부해보고, 이를 리뷰하기 위해 편성되었습니다. ‘식물의 스트레스 호르몬’이라는 큰 주제로 시작하여 세부 주제를 고민한 것이 었그제 같은데, 벌써 활동을 마치는 시기에 달했네요. 학기 중, 방학 가릴 것 없이 모여 활동한 것이 결코 만만치는 않았습니 다. 하지만 각자 정한 논문을 공부해온 뒤 내용을 공유하고 토의하는 과정 속에서, 고민하고 깨닫는 즐거움을 얻을 수 있었기 때문에 무사히 활동을 이어 나갈 수 있었던 것 같습니다.

‘앱시스산’이라는 식물 호르몬은, 식물이 물 스트레스(Water Stress)를 받을 때 급격히 증가하는 호르몬으로 스트레스 반응성 유전자의 발현을 위한 신호전달 과정에 관여합니다. 물 부족 환경에서는 기공을 닫아 수분 손실을 줄여야 하는데, 이 과정에도 앱시스산이 관여를 합니다. 저희 팀은 이렇듯 여러 방면에서 중요한 역할을 하는 앱시스산에 큰 호기심을 가졌고, 2학기가 되어서는 ‘스터디상플러스’라는 교내 비교과 프로그램을 통해 더욱 적극적으로 활동을 이어나갔습니다. 지금 생각해보면 비교과 프로그램에 참여한 것이 꾸준한 활동 참여의 동기 부여가 된 것 같습니다.

저희 팀을 제외하고는 모두 실험을 진행하였기 때문에 ‘논문리뷰팀’은 저희에게 나름대로 새로운 도전이었다고 생각합니다. 모두에게는 기초 지식을 쌓는 기회가 되었고, 1학년에게는 논문 학습법과 보고서 작성법을 익히는 경험이 되었으며, 2학년에게는 논문리뷰팀 팀장과 스터디상플러스 팀장으로서의 책임감을 가지고 팀원을 이끄는 값진 경험이 되었습니다. 끝으로 저희 팀의 크고 작은 일들에 신경 써주시고, 늘 지지해주신 유하영 교수님과, AMP 활동에 큰 힘이 되어 주신 교수님, 조교님들께 감사의 말씀을 전합니다.



## 팀별 활동 내역

### 의생명공학팀

2019-1학기 교내 SM-URP 프로그램 참여  
제38회 한국발생생물학회 우수포스터상 수상

### 생물소재 및 계통분류팀

2019-2학기 교내 스터디 상생플러스 프로그램 참여

### 분자생명공학팀

2019-2학기 교내 스터디 상생플러스 프로그램 참여  
제46회 상명 학술상 논문 부문 출품

### 해양생명공학팀

2019-1학기 교내 SM-URP 프로그램 참여  
한국해양생명과학회 제5회 정기 학술대회 및 정기 총회 참가

### 미생물공학팀

2019-2학기 교내 SM-URP 프로그램 참여  
2019 한국미생물학회연합 정기학술대회 참가

### 논문리뷰팀

2019-2학기 교내 스터디 상생플러스 프로그램 참여

## AMP 활동 후기

| 이름  | 내용                                                                                                                                                                                                                                                                                                |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 박진수 | 올해 AMP를 할 계획이 없었지만 실험실에 있는 입장으로 실험을 돕는 김에 명단에 이름을 올리고 AMP를 참여하게 되었다. 결과적으로 다른 팀과 달리 소수의 인원이어서 실험실 입장에서도 실험을 진행하는데 쾌적하였고 함께하기 수월했으며 개인적으로는 혼자서는 힘들었을 실험들을 여럿이서 같이 하게 되어 좋았고 더 열심히 할 수 있었다고 생각한다.                                                                                                   |
| 정하영 | 작년에 이어서 올해도 AMP 활동을 하게 되었습니다. 동아리 활동이 마냥 재밌지만은 않고 힘든 적도 많았지만, 지금 생각해보니 모두 미래에 많은 도움이 될 것 같아요! 짧지만 실험실 생활도 경험해볼 수 있었고 관심 있는 분야에 대해 많은 공부를 하게 된 것 같아 좋았습니다. 모두 모두 수고하셨습니다!                                                                                                                          |
| 강서영 | AMP 동아리 활동의 가장 큰 장점은 실험수업시간에는 프로토콜을 따라 실험을 진행하지만 AMP에서는 직접 연구 주제를 교수님과 이야기를 나누어 정하고, 실험 설계까지 한다는 점에서 연구자로서의 자립심을 키울 수 있다는 점이라 생각합니다. 햇수로 2년간 동아리 활동을 하면서 학사과정 이상의 실험내용과 실험기술을 배웠습니다. 이 덕분에 실험기술이 능숙해져 손이 빨라진 것을 느끼고 실험을 이해하는 수준도 훨씬 높아졌다고 느꼈습니다. 올해에도 AMP가 존재할 수 있게 해준 2019년도 AMP 임원진 분들 감사합니다.~) |
| 김민우 | AMP 미생물 조에서 해당 균주로부터 효소와 향산화능을 유도하는 실험을 진행하였습니다. 실험을 진행하기에 앞서 어떤 균주로 어떤 실험을 할지에 대해서 많은 고민이 있었지만 여러 논문을 찾아보고 팀원들과 함께 실험을 진행해 나가는 과정에서 실험 설계 능력과 실험 수행 능력이 향상됨을 느꼈습니다. 또한 혼자 하기에는 버거운 실험을 교수님, 조교님, 팀원들과 함께 진행해 가면서 협동심과 서로 간의 이해관계를 넓히는 계기가 되었습니다. 기회가 된다면 AMP 동아리에서 좀 더 심화 되고 다양한 실험을 경험해보고 싶습니다. |
| 김승희 | 리뷰논문 조에 들어가면서 저희 조의 주제인 ABA에 대해 알게 되어 유익했습니다. 또한 학교 생활 중 논문을 접하고 읽을 기회가 별로 없는데 리뷰논문 조에 들어가게 되면서 논문을 읽는 방법, 논문 찾는 방법 등 많은 것을 배울 수 있었습니다. 더욱이 생명공학으로서 생명공학에 대한 기본적인 지식, 공학적 활용 등을 알아가면서 생명과학에 대한 관심이 커져 갔으며 진로와 흥미를 알아볼 수 있었습니다. 앞으로도 동아리 활동을 열심히 하고 동아리 활동을 하면서 배운 점들을 활용할 수 있도록 노력할 것입니다.         |
| 김연서 | 학교 커리큘럼에서 배울 수 있는 것보다 좀 더 심도 깊은 내용의 실험을 할 수 있어서 동아리활동 내내 매우 유익한 시간을 보냈던 것 같다. 게다가 이러한 활동을 조원들과 함께 하면서 조별 내의 돈독한 우정을 쌓을 수 있어 좋았고, 앞으로도 이러한 시간이 다시 오지 않을 거 같아 2019년도 AMP 활동이 그리울 것 같다.                                                                                                              |
| 박고운 | 이번 연도 '해양생명공학팀'의 조장을 맡으면서 한 팀을 잘 이끌어 나갈 수 있을까 정말 걱정이 많았는데 교수님과 조교님의 지도 아래 팀원들과 함께 성실하게 참여하면서 좋은 결과로까지 잘 마무리된 것 같아 뿌듯하다. 또한, 해양이라는 분야에 대해 처음 접해본 만큼 낯설기도 했지만 이번 동아리를 통해 지식의 범위를 해양분야로까지 넓혀나간 것 같아 좋았고 실험의 기초부터 차근차근 배워나가면서 실험적 능력까지 키워나갈 수 있어서 뜻깊었다.                                               |
| 박인옥 | 이번 한 해는 AMP라는 학술동아리를 통해 실험 수업시간에 배우는 실험기구와 실험 방법들보다 더 심층적으로 배웠던 시간이었다. 인문계열 분야는 잘 모르지만 생명공학 같이 실험이 필수적인 과목들은 학부 시기에 실험 수업만으로는 학업이 충분치 않다고 생각하기 때문에 대학을 다니는 동안에 AMP 활동은 무엇보다도 나에게 득이 되는 활동이었다.                                                                                                     |

| 이름  | 내용                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |
|-----|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 박지영 | 작년에 이어서 올해에도 AMP 동아리 활동에 참여하게 되었다. 작년과 달리 부회장이라는 직책을 맡게 되어서 부담이 되었지만 많은 분들의 도움을 받으며 즐겁게 활동했던 것 같다. 방학 동안 진행하였던 실험은 너무 보람찼었고, 완성되어가는 논문을 보면서 뿌듯함을 느낄 수 있었다. 다사다난한 해였지만 너무 즐거웠던 동아리 활동이었던 것 같다.                                                                                                                                                                                         |
| 박현아 | 작년 방학엔 아무런 활동을 하지 않고 시간을 낭비하면서 보냈습니다. 하지만 올해 처음으로 AMP에 들어와 방학 동안 실험을 하면서 작년보다 알차게 방학을 보내게 되어 너무 뿌듯했습니다. 혼자 잘하기보다 조원 모두가 함께 최선을 다해야 결과가 잘 나올 수 있었기에 더욱 뜻깊은 활동이었습니다.                                                                                                                                                                                                                    |
| 안효빈 | 자신이 흥미 있는 분야에서 교수님과 조교님의 정확한 피드백을 바탕으로 실험을 진행할 수 있어 좋았습니다. 쉽게 사용할 수 없는 실험기구의 사용 방법을 알고 실험결과를 해석할 수 있는 능력 등을 배울 수 있는 유익한 활동이었습니다.                                                                                                                                                                                                                                                      |
| 이승연 | 이번 연구는 '트리클로산'이라는 처음 접한 주제로 진행되었는데, 생소하였던 분야에서의 지식을 습득할 수 있어서 좋았다. 또한 실험을 진행하기에 앞서 실험의 기초를 연습하는 과정을 거치면서 밑바탕을 깔 수 있었고, 그로 인해 기본적인 실험 능력을 다질 수 있어서 의미가 깊었다. 팀원 모두 성실하게 참여해주어서 고마웠다.                                                                                                                                                                                                    |
| 이정호 | 관심 있는 생명과학·공학 분야의 논문을 직접 찾아 깊이 있게 공부하며 생명공학자가 되기 위한 '탐구'의 자세를 갖추 수 있었습니다. 식물의 스트레스 호르몬 중 앱시스산(Absciscic acid)이 작동하는 기작을 공부하였는데, 그와 동시에 G-protein, G-protein coupled receptor, protein kinase와 같이 앱시스산 신호 전달 과정에만 국한되지 않는 생명과학적 지식을 익힐 수 있었습니다. 올 한 해 논문리뷰팀의 팀장을 맡아 활동하였는데, 팀원들의 마음까지 헤아리지는 못한 부족한 팀장이 아니었나 하는 생각이 듭니다. 영어 논문을 해석하고 공부하며, 이해한 내용을 보고서로 작성한 우리 논문리뷰팀 모두에게 감사한 마음을 전합니다. |
| 임소연 | 이번 AMP 활동에서는 조원이었던 작년과 다르게 조장이 되어 생물 신소재 분야에서 실험을 진행하였습니다. 처음엔 조장으로서 팀원들을 이끌어야 한다는 부담감이 있었지만, 팀원들 모두 적극적으로 실험에 임하고 잘 따라주어 원활한 진행이 이루어져 좋았습니다. 실험 외에도 MT, 현장학습, 축제 등 동아리 부원들과 친해질 수 있는 활동이 많아 재미있었고 모든 조들이 열심히 참여해 좋은 결과를 얻은 것 같아 의미 있는 동아리 활동이었습니다.                                                                                                                                   |
| 구병운 | AMP 활동을 하기 전까지는 저는 연구실에서는 어떤 방식으로 연구를 진행하는지 알지 못했습니다. 하지만 AMP 활동을 통해 직접 교수님의 연구실에서 연구도 해보고 선배들과 동기들과 함께 논문도 써보면서 경험을 쌓고 진로에 대해 생각해 볼 수 있었던 좋은 기회였습니다.                                                                                                                                                                                                                                 |
| 김국찬 | 교과서, 전공 책에서 봤던 지식을 활용 해볼 수 있다는 것을 실험을 통해 경험하면서, 실험에 대한 중요성을 다시금 상기할 수 있었던 계기였습니다. 이전에 다뤄보지 못한 실험기기들을 다루고, 효소와 미생물을 다루면서 실험에 대한 지식 또한 얻을 수 있었습니다. 실험 기간동안 팀원들과 협동하면서 협동심의 중요성이 실험에서도 적용된다는 것에 마음가짐을 바로잡는 기회가 되었던 시간이었습니다.                                                                                                                                                              |
| 김솔빈 | AMP 리뷰논문조를 통해 논문 조사, 정리 방법과 출처를 다는 방법 등에 대해 실질적으로 배울 수 있었다. ABA 호르몬에 대한 보고서를 쓰면서 이 호르몬의 역할과 발현방법 등 자세한 내용을 공부할 수 있었다. 실험을 하기 전에 미리 경험을 쌓을 수 있었고 더 공부하여 내년엔 더 발전된 상태로 실험도 진행해보고 싶다.                                                                                                                                                                                                    |

| 이름   | 내용                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
|------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 김민하  | 저희 조는 환경호르몬이 동물의 몸에 어떠한 영향을 미치는지 조사하기 위한 실험을 했습니다. 처음 듣는 용어와 처음 써보는 도구들 때문에 처음에는 어려움이 있었지만, 점차 익숙해지면서 오히려 일반 실험수업에서는 할 수 없는 경험을 했습니다. 실험이 끝나고 이성호 교수님과 함께 한국발생생물학회에 가서 기업 부스와 다른 학생들 그리고 전문가들의 발표를 보면서 아직 배울 것이 많다고 느꼈습니다. 거의 모든 내용을 이해하지 못했지만, 발표자들의 열정과 듣는 사람들의 열정을 보고 각자 서로 맡은 분야에서 노력하는 모습을 볼 수 있었습니다. 이 모든 것이 좋은 경험이었던 것 같습니다.                                                                                                                                                                 |
| 김수황  | 여름방학 그 더운 날에 언덕을 올라야 하는 일이 보람되게 느껴질 정도로 실험하는 것이 재밌었습니다. 실험실의 분위기도 좋았고 다른 조교님들, 선배님들과 같이 실험하는 것이 너무 재밌었습니다. 생명공학과인 만큼 실험을 진행하는 능력, 기구를 다루는 능력이 중요하다고 생각했는데 AMP를 통해 많은 부분들이 도움이 되었습니다. 또한 어떠한 실험을 진행하기에 앞서 선행연구의 중요성과 실험을 진행할 때 알아야 할 원리가 얼마나 중요한지 알게 되었습니다. 실험에 필요한 공부와 그 생물체에 대한 특성, 화학물질, 등을 알아가는 것이 흥미로웠고, 실제 2학기에 실험 수업을 듣는 데에 있어 큰 도움이 되었습니다. 무엇보다도 좋은 선배들을 만날 수 있어 후배들에게 꼭 추천해주고 싶고, 조교님 선배님들께서 말해주신 한마디 한마디 새겨들으면 정말 좋은 말씀이 많았습니다. 방학에 집에 오랜 시간 있는 것보다 조금 힘들더라도 학교에 나와 실험을 진행하는 것이 매우 뜻깊었습니다. |
| 서유진  | 이번 한 해 동안, 동아리 AMP에 들어 정말 다양한 활동들을 할 수 있어서 좋았습니다! 여러 특색 있는 조 중에서 원하는 조 하나를 골라 실험 수업 때는 해보지 못한 실험들에 참여했던, 1학년에게는 다소 인상 깊은 경험들을 많이 했습니다. 동아리 선배, 동기들과 유대감 있는 시간을 많이 가지게 되어 즐거웠고, 내년에도 하게 되었으면 좋겠습니다. :D                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 서한은별 | 실험기구를 능숙하게 다루지 못했던 1학기 때에 비하면 확실히 능숙하게 다룰 수 있게 되었다는 점에서 가장 의미 있었던 것 같다. 또한 실험은 방학 때 진행했는데, 그냥 2달간의 방학을 허비할 뻔 했지만 AMP 활동을 통해 그 누구보다도 방학이란 시간을 알뜰히 쓸 수 있었다고 생각한다. 실험만 하는 것에서 그치지 않고 직접 논문도 작성해보는 활동도 했기 때문에 생명공학도로서의 자질을 조금이나마 더 향상시킬 수 있었던 것 같다.                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 손혜림  | AMP라는 동아리 활동을 통해 실험 시간에 부분적으로 경험했던 실험들을 전체 과정 모두 경험해볼 수 있어서 너무 좋은 경험이 되었습니다. 방학 때 나날이 학교에 나오는 것이 쉬운 일은 아니었지만 그만큼 많은 것을 배울 수 있었던 기회라 생각했습니다. 생소한 실험 기구를 다뤄볼 수 있었고 각 실험실에서 다루는 분야를 직접적으로 경험해 볼 수 있으며 상세히 알 수 있어서 좋았습니다!                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 송윤석  | 저는 동아리 AMP의 논문 리뷰 조에서 활동을 하면서 영어 논문을 접하게 되었습니다. 처음에는 영어 논문이라는 것이 낯설기도 하고 말도 어려워서 어떻게 공부해야 할지 막막했습니다. 그러나 차근차근 하나씩 공부해가며 지식을 쌓으니 그 이전보다 논문을 읽기가 편해졌고 요령을 터득하게 되었습니다. 이 경험은 미래에 공부를 할 때 큰 도움이 될 것 같습니다.                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| 양지원  | 대학에 들어와서 설명회를 통해 AMP라는 동아리를 알게 되었습니다. 도움이 정말 많이 될 것 같다는 생각으로 지원을 하였고 동아리 활동을 시작했습니다. 동아리에서 관심 분야에 맞게 팀을 짜서 각 팀끼리 실험을 하고 결과를 내어 마무리까지 할 수 있다는 게 좋았습니다. 교수님과 조교님들과 함께 실험 방법을 배우고 진행하면서 실험에 대한 자세라든지 도구 사용 방법, 그리고 이 분야에 대한 지식까지도 넓힐 수 있었습니다. 사실 학부생의 입장에서는 실험이라는 것이 수업이 아니고서는 경험해보기 쉽지 않기 때문에 생명공학이라든가 전공을 가진 저에게는 너무나도 의미 있는 동아리 활동이었습니다.                                                                                                                                                            |

| 이름  | 내용                                                                                                                                                                                                                                                                                             |
|-----|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 박윤진 | AMP라는 학술동아리를 하면서 실험 지식도 많이 쌓고 이론 지식도 많이 쌓을 수 있는 기회가 되었던 것 같다. 학기 중에는 시간이 없어서 방학 때도 나와야 한다는 것이 많이 힘들었지만 더 집중적으로 공부할 수 있는 기회가 된 것 같아 보람이 있었다.                                                                                                                                                    |
| 이하은 | 본 AMP 동아리 활동을 통해, 한 학기 동안 실험에 참여하게 되었는데, 개인적으로 실험에 대한 자세와 지식을 많이 발전시킬 수 있는 계기가 되었습니다. 단순히 '탐구'라는 목표 외에도 그 탐구를 어떻게 잘 수행하고, 또 그것을 어떻게 잘 표현하여 전달하고, 어떤 식으로 응용되어 사용할 수 있는지에 대한 고민들에 대해 깊게 생각해보는 경험을 가질 수 있었습니다. 무엇보다 매우 서툰 실력을 갖고 있었음에도 이것이 가능했던 것은 선배들과 조교님, 교수님들의 도움을 받을 수 있는 환경이었기 때문이라고 생각합니다. |
| 이혜성 | 그동안 AMP 학술동아리 활동에 참여해 오면서 단순히 주어진 실험을 진행하는 것이 아닌 실험에 대해 미리 탐구하고, 설계하고 실험을 수행해 나아가는 과정이 새로웠습니다. 비록 방학에 학교에 나오는 것이 힘들었지만, 그만큼 배워가는 것이 많았습니다. 특히 사용 방법이 궁금했던 다양한 실험기구의 사용법을 공부하고, 사용해보는 것이 특별하고 뜻깊은 경험이 되었습니다.                                                                                    |
| 장신혜 | AMP활동을 통해 1학년이라 아직은 익숙지 않은 실험실 규칙이나 실험도구 사용법, 주의사항 등 많은 것을 배울 수 있었습니다. 또한, 실험의 틀을 세우는 것부터 실험을 마치고 보고서를 작성하는 것까지 모든 과정을 조원들과 함께하면서 실험에서는 이끌어주는 사람과 함께하는 사람이 있다는 것이 얼마나 힘이 되는지도 알아가는 계기가 되었습니다. 짧다면 짧고, 길다면 긴 시간을 AMP와 함께 하면서 생명공학에 대해 깊게 생각해보고 실험에 대한 흥미나 즐거움, 중요성을 찾아갈 수 있어 행복했습니다.            |
| 한승민 | AMP 리뷰논문 활동을 통해서 논문 보는 방법과 생명과학 분야에서 쓰이는 전문적인 용어에 대해서 공부를 하게 되었고 학년이 올라가면서 전공에 대해 깊이 있게 공부할 때 amp 활동이 도움이 될 거라 생각된다.                                                                                                                                                                           |
| 현지혜 | 처음에는 실험에 관심이 많아 AMP에 지원하게 되었는데, 실험뿐만 아니라 논문을 작성하면서 글에 대해서도 많은 것을 배웠습니다. 복잡한 실험도 있었지만 그만큼 실험 장비 사용법, 실험 방법 등 여러 가지를 배울 수 있어 알찬 동아리 활동을 할 수 있었다고 생각합니다.                                                                                                                                          |

## **The CELL Vol. 15**

### **2019학년도 생명공학과 학술지**

---

**학과장**    안예진   교수

**발행인**    유하영   교수

**발행일**    2019년 11월 22일

**발행처**    상명대학교 융합공과대학  
              생명공학과 학술동아리 AMP

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