



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

碩士學位論文

해양 산성화에 따른 사육수의 낮은
pH변화가 송어(*Mugil cephalus*)에
미치는 생리적 영향

濟州大學校 産業大學院

海洋生物工學科

朴 鎮 熙

2017 年 2 月

해양 산성화에 따른 사육수의 낮은 pH변화가 송어(*Mugil cephalus*)에 미치는 생리적 영향

指導教授 呂寅圭

朴鎮熙

이 論文을 理學 碩士學位 論文으로 提出함

2017 年 2 月

朴鎮熙의 理學 碩士學位 論文을 認准함

審査委員長 이영돈

委 員 이승현

委 員 여인규



濟州大學校 産業大學院

2017 年 2 月

The effect of ocean acidification on physiological
response of the grey mullet, *Mugil cephalus*

Jin-Hee Park
(Supervised by professor In-Kyu Yeo)

A thesis submitted in partial fulfillment of the
requirement for the degree of Master of Science

2017. 2.

This thesis has been examined and approved.

Department of Marine Life Sciences

GRADUATE SCHOOL
JEJU NATIONAL UNIVERSITY

목 차

목 차	i
List of Tables	iii
List of Figures	iii
Abstract	v
I. 서론	1
II. 재료 및 방법	
1. 실험동물 및 사육조건	3
2. 성장률 및 생존율	5
3. 혈액생화학적 및 삼투압 분석	6
4. 항산화 활성 분석	7
4-1. Superoxide dismuatase (SOD) 활성 분석	7
4-2. Catalase (CAT) 활성 분석	8
4-3. Glutathione (GSH) 활성 분석	9
5. 통계 처리	10
III. 결과	
1. 성장률 및 생존율의 변화	11
2. 혈액생화학적 분석 결과	13
2-1. 혈액 생화학적 변화	13
2-2. 혈장 내 삼투압 변화	20
3. 항산화 활성 변화	21
3-1. Superoxide dismuatase (SOD) 활성의 변화	21
3-2. Catalase (CAT) 활성의 변화	22
3-3. Glutathione (GSH) 활성의 변화	23

IV. 고찰	24
V. 참고 문헌	28
VI. 감사의 글	33

List of Table

Table 1. Effects of low pH on Survival rate (%) and Final weight (g) in grey mullet, <i>M. cephalus</i>	11
---	----

List of Figures

Fig. 1. The constitution of experimental tank used breeding experiment by pH concentration in grey mullet(<i>M. cephalus</i>).	3
Fig. 2. The pictures of experimental tank used breeding experiment by pH concentration in grey mullet(<i>M. cephalus</i>).	4
Fig. 3. Principle of the superoxide dismutase assay kit (Sigma)	7
Fig. 4. Principle of the catalase assay kit (Biovision)	8
Fig. 5. Principle of total glutathione quantification kit (Dojindo)	9
Fig. 6. Effects of low pH on final average weight (g) in grey mullet, <i>M. cephalus</i>	12
Fig. 7. Effects of low pH on survival rate (%) in grey mullet, <i>M. cephalus</i>	12
Fig. 8. Changes of aspartate aminotransferase in grey mullet, <i>M. cephalus</i> exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).	14
Fig. 9. Changes of alanine aminotransferase in grey mullet, <i>M. cephalus</i> exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).	15
Fig. 10. Changes of total protein in grey mullet, <i>M. cephalus</i> exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).	16

- Fig. 11. Changes of triglyceride in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$). 17
- Fig. 12. Changes of glucose in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$). 18
- Fig. 13. Changes of phosphorus in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$). 19
- Fig. 14. Changes of plasma osmolality in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$). 20
- Fig. 15. Changes of superoxide dismutase activity in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$). .. 21
- Fig. 16. Changes of catalase in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$). 22
- Fig. 17. Changes of glutathione activity in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$). 23

Abstract

The ocean acidification from global warming is affects marine life in the ocean. In particular, fish is subject to various physiological changes in the body even after minute changes in the pH of the water, resulting in respiratory and osmotic pressure control disorders. Since the ocean acidification is rapidly progressing as CO₂ emissions continue to increase in recent years, it is very important to understand the effects of ocean acidification on marine life and to cope with it in advance. In this study, we investigated the effect of ocean acidification using *M. cephalus*. *M. cephalus* of about 14.8 ± 3.4 g were used in the experiment and the pH in the water bath was adjusted with 6.0, 6.5 7.0 and 8.0 (natural condition), respectively. Four experimental groups were set up in 25 per experimental groups and were kept for 15 days, food did not supply. After the end of breeding, the survival rate and body weight were measured respectively. By sampling the blood and liver of each experimental fish were performed blood biochemical analysis, osmotic concentration measurement and antioxidant activity analysis. As a result, the decrease of the survival rate and the decrease of the body weight were confirmed as the concentration of the pH decreased. In addition, AST, TP and TG showed a significant difference between the experimental groups as the pH decreased, which is presumed to be caused due to the stress by change of low pH. As a result of the osmotic pressure measurement, it was confirmed that the osmotic pressure value was significantly higher in the pH 6.0 experimental group. In addition, SOD, CAT and GSH measurement results, which are defensive mechanisms to remove active oxygen, SOD showed high values low pH environment condition, but CAT maintained a rather low value, and GSH showed low activity in low pH environment condition. In general,

antioxidant enzymes have been reported to be sensitive to osmotic stress. Therefore, in this study, it is considered that the lowering of pH also causes a change of antioxidant enzyme activity by acting as a stress factor by inducing osmotic pressure control disorder. In conclusion, it is considered that when *M. cephalus* is exposed to acidification of pH, it induces changes in the blood constitution and osmotic pressure control disorder of the body and it induces in reduction of survival rate and inhibition of growth causing physiological stress in the body due to the effect the antioxidant enzyme activity.

I. 서론

최근 산업 발달 및 경제적 성장으로 인해 화석연료의 사용이 증가함에 따라 대기 중에 방출되는 CO₂의 방출량 또한 크게 증가하고 있다(Solomon et al., 2007). 특히 화석연료의 연소에 의해 방출된 대기중의 CO₂는 해양으로 흡수되어 탄산염(carbonate) 및 중탄산염(bicarbonate)을 생성하게 되며 이로 인한 해양의 수소이온농도(pH)의 감소가 해양 산성화(ocean acidification)를 초래한다(Gattuso and Buddemeier, 2000).

일반적으로 자연상태 해수(약 35 psu)의 pH는 7.8 - 8.2의 범위로 일정하게 유지되며, pH가 그 이하로 내려가는 것은 극히 드물었지만, 앞서 언급 하였듯이 CO₂의 방출량 증가로 인한 기후의 변화가 해양의 pH를 산성화시킴에 따라 큰 문제를 야기할 것으로 여겨지고 있다(Knutzen, 1981). 이에 해양 산성화는 전 세계적인 문제로서 대두되고 있으며, 2000년대 초반부터 산성화가 해양 생물에 미치는 영향에 관한 연구가 급격히 증가하고 있다(Gattuso and Hansson, 2011).

수중에 서식하고 있는 해양 생물은 pH가 미미하게 변화하여도 스트레스의 요인으로서 크게 작용하여 다양한 생리학적 영향을 야기하게 된다(Pörtner et al., 2004). 현재까지 해양 산성화가 상어(*Mustelus canis*), 연어(*Oncorhynchus gorboscha*) 및 큰 가시고기(*Gasterosteus aculeatus*)와 같은 어종에서 성장 저하, 감각기능 손상 및 신경 전달물질 기능의 변화로 인한 행동 변화 등 다양한 장애를 유발하고, 물질수송과정에 영향을 미쳐 어류의 호흡 및 산소수송기능의 저하를 가져오는 것으로 보고되고 있다(Dixson et al., 2015; Ou et al., 2015; Lai et al., 2015; Pörtner et al., 2004). 따라서 지속적인 해양 산성화는 해양 생태계의 멸종과 유사한 효과를 나타낼 수 있으므로(Arrigo, 2007), 해양 산성화가 해양 생물에 미치는 영향을 파악하여, 지속적으로 변화하는 지구의 해양 환경에 미리 대처하는 것이 매우 중요할 것으로 여겨진다. 또한 종(species) 또는 개체군(population)간의 회복 능력에 따라 해양산성화가 체내에 미치는 영향은 크게 달라질 수 있기 때문에 어종에 따른 변화 분석 또한 매우 중요하다고 할 수 있다(Pörtner, 1998).

숭어(*Mugil cephalus*)는 해수 및 담수에서 모두 사육이 가능한 어종으로서, 우수한 삼투조절을 가지고 있어 다양한 변화에 적응력이 뛰어난 것으로 알려져 있다. 또한 숭어는 전 세계적으로 분포하는 종으로 환경 변화에 대한 지표 실험동물로 매우 적합한 어종으로 판단되고 있다. 따라서 본 연구에서는 해양 표층의 평균 pH인 8.1 전후를 대조구(pH 8.0)로 설정하여 pH의 저하에 따른 어류의 생리적 변화를 관찰하기 위하여, pH 8.0을 포함한 총 4가지의 pH농도의 수중 환경에서 사육한 숭어(*M. cephalus*)를 이용하여 해양 산성화가 광염어종인 숭어(*M. cephalus*)에 미치는 영향을 검토하였다.

II. 재료 및 방법

1. 실험동물 및 사육조건

본 실험에서는 평균 무게 14.8 ± 3.4 g 인 승어(*M. cephalus*)를 사용하여 진행하였다. 실험에 사용한 수조의 구성은 Fig. 1과 같으며, 여과조와 탱크 일체형으로 수중펌프를 사용한 순환여과를 실시하였다. 사육 시 수온 23.0°C , 염분 35.0 ‰ 및 D.O 7.0 ppm 으로 모든 실험군에서 동일하게 유지 하였으며, pH는 HCl을 해수에 각각 네 가지 조건인 pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0 및 pH 8.0(자연일 반해수)으로 설정하였다. 이에 pH의 농도에 따라 총 4개의 실험군으로 나누어 250L의 수조에서 11L:13D의 광주기로 한 실험군당 25마리씩 사육하였다(Fig. 2). pH조건별 사육은 15일간 진행되었으며, 사육기간 동안 먹이는 공급하지 않았다.

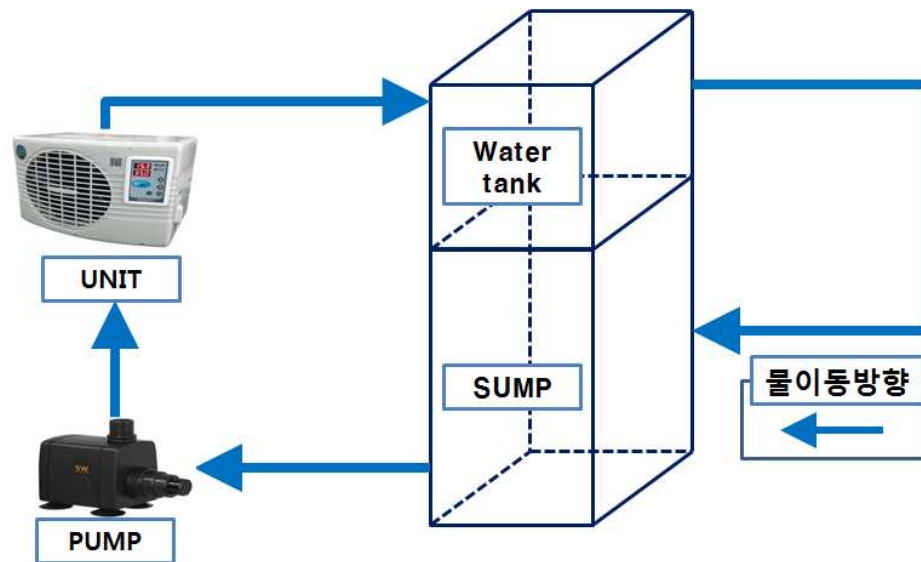


Fig. 1. The constitution of experimental tank used breeding experiment by pH concentration in grey mullet (*M. cephalus*).

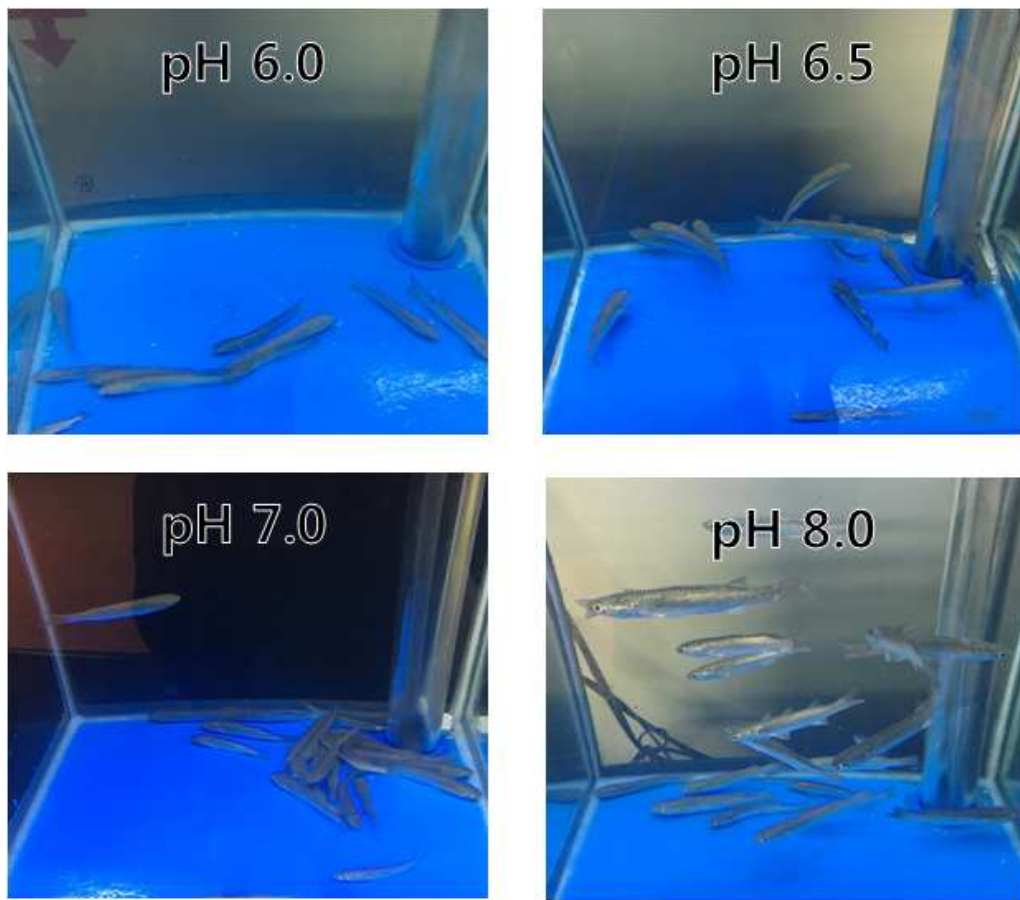


Fig. 2. The pictures of experimental tank used breeding experiment by pH concentration in grey mullet (*M. cephalus*).

2. 성장률 및 생존율

pH의 변화가 어체의 성장에 미치는 영향을 조사하기 위하여 실험 개시 시와 실험 종료 시에 각 실험어의 체중을 측정하였다. 측정 시에는 전자저울(sartorius BP3100S)을 이용하여 실시하였다. 또한 pH 조건에 따른 각 실험어들의 생존율은 $\text{Survival rate (\%SR)} = (\text{final amount of fish}/\text{initial amount of fish}) \times 100$ 의 식에 따라 각각 계산하였다.

3. 혈액생화학적 및 삼투압 분석

15일간의 사육 후, 각 수조의 실험어를 2-phenoxyethanol로 마취한 뒤 실험어의 미부정맥에서 1 ml 주사기를 이용하여 혈액을 채취 하였다. 채취한 혈액은 2500 rpm에서 10 min동안 원심분리하여 상층액을 분리한 뒤 새 tube로 옮겨주었으며, 분석 전까지 -50℃에서 보관하였다.

혈액성상은 생화학분석기(VET TEST 8008)를 이용하여 Aspartate Aminotransferase (AST), Alanine aminotransferase (ALT), Total protein (TP), Triglyceride (TG), Glucose (GLU) 및 Phosphorus (PHOS) 를 측정하였으며, 혈액 내 삼투압 측정은 삼투압 측정기(Vapor Pressure Osmometer 5600)를 이용하여 분석을 실시하였다.

4. 항산화 활성 분석

4-1. Superoxide dismutase (SOD) 활성 분석

항산화 활성 분석을 위해 실험종료 후 각 실험군의 간(liver)을 샘플링 하였다. 각 샘플은 채취 직후 -50°C 에 보관하였으며, 이후 항산화 활성 분석에 사용하였다. Superoxide dismutase (SOD) 활성 분석은 시중에 판매 되는 상용 kit (Sigma)를 이용하였으며 분석 방법은 다음과 같다.

먼저 각 실험군의 간 조직 0.1 g을 정량하여 kit (Fig. 3)에 포함되어 있는 buffer solution으로 균질화 하였다. 이후 10,000 g에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액을 샘플로 하여 제조사의 방법에 따라 처리하였으며, 다기능 마이크로 플레이트리더를 이용하여 440 nm 파장에서 SOD 활성을 측정하였다.

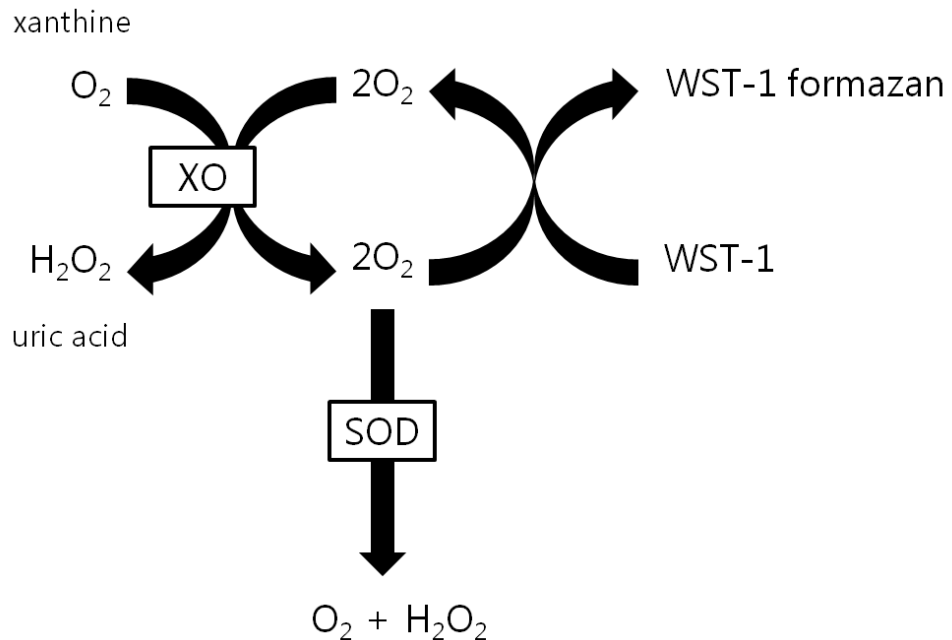


Fig. 3. Principle of the superoxide dismutase assay kit

4-2. Catalase (CAT) 활성 분석

Catalase (CAT) 활성 분석 또한 각 실험군의 간(liver)를 이용하여 실시하였다. 채취한 샘플은 0.1 g씩 정량하여 BioVision사의 kit(Fig. 4)에 포함되어있는 Assay buffer 0.2 ml로 균질화 하였다. 이후 10,000 g 에서 15분간 원심분리하여 얻은 상층액을 이용하여 분석을 실시하였다. 분석은 제조사의 방법에 따라 진행하였으며, 다기능 마이크로 플레이트리더를 이용하여 570 nm 파장에서 CAT 활성을 측정하였다.

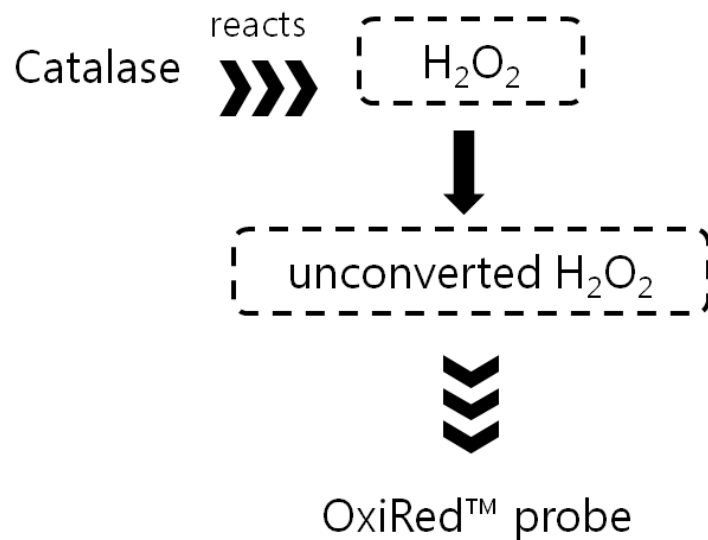


Fig. 4. Principle of the catalase assay kit (Biovision).

4-3. Glutathione (GSH) 활성 분석

Glutathione (GSH) 활성 또한 각 실험어의 간(liver)조직을 이용하여 분석을 실시하였다. 분석을 위해 실험어의 간 조직 0.1 g을 각각 정량한 뒤, 5% 5-Sulfosalicylic Acid (SSA) 0.5 ml을 첨가하여 균질화 하였다. 이후 8000 g 에서 10분간 원심분리하여 얻은 상층액으로 GSH활성 분석을 실시하였다. 분석은 Dojindo에서 시판되는 kit (Fig. 5)를 이용하여 진행하였으며, 다기능 마이크로 플레이트리더를 이용하여 415 nm 파장에서 GSH 활성을 측정하였다.

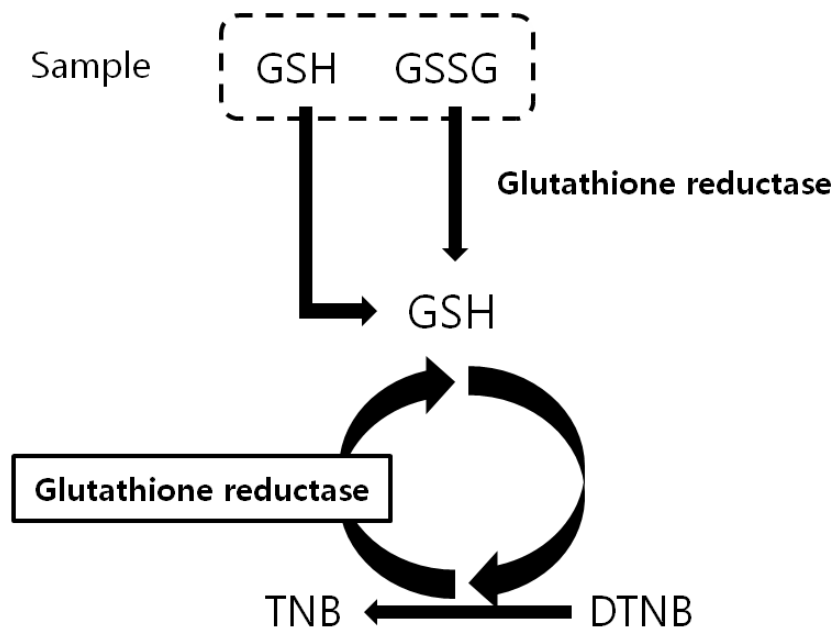


Fig. 5. Principle of total glutathione quantification kit (Dojindo).

5. 통계 처리

본 실험의 모든 결과는 SPSS version 21 (SPSS Inc., USA)을 활용하여 One-way ANOVA-test 로 통계 분석을 실시하였다. 데이터 값의 유의차는 Duncan's multiple test 사후분석을 실시하여 측정하였으며, $P < 0.05$ 에서 유의성을 판단하였다.

III. 결과

1. 성장률 및 생존율의 변화

각기 다른 농도의 pH 환경에서 숭어(*M. cephalus*)를 15일간 사육 후 어체 무게 및 생존율의 변화를 확인하였다. 그 결과, 15일간의 사육 실험 종료 후 초기 무게 14.8 ± 3.4 g의 실험어는 pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0 및 pH 8.0 의 농도 증가에 따라 14.54 ± 4.22 g, 14.52 ± 4.10 g, 14.74 ± 4.12 g 및 15.08 ± 3.99 g 으로 나타났으며 각 실험구간의 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 1, Fig. 6, $P>0.05$). 반면에 생존율은 pH가 저하할수록 생존율이 낮아지는 것이 관찰되었다(Table 1, Fig. 7).

Table 1. Effects of low pH on survival rate (%) and experimental fish weight (g) in grey mullet, *M. cephalus*

pH concentration	Survival (%)	Start weight (g)	Final weight (g)
pH 6.0	48	14.8 ± 3.4	14.54 ± 4.22
pH 6.5	64	14.8 ± 3.4	14.52 ± 4.10
pH 7.0	80	14.8 ± 3.4	14.74 ± 4.12
pH 8.0	100	14.8 ± 3.4	15.08 ± 3.99

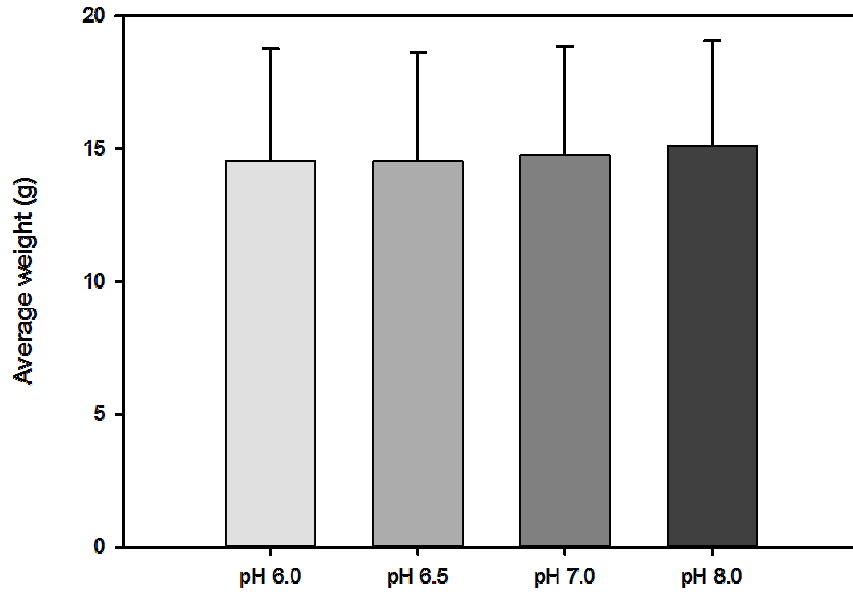


Fig. 6. Effects of low pH on final average weight (g) in grey mullet, *M. cephalus*.

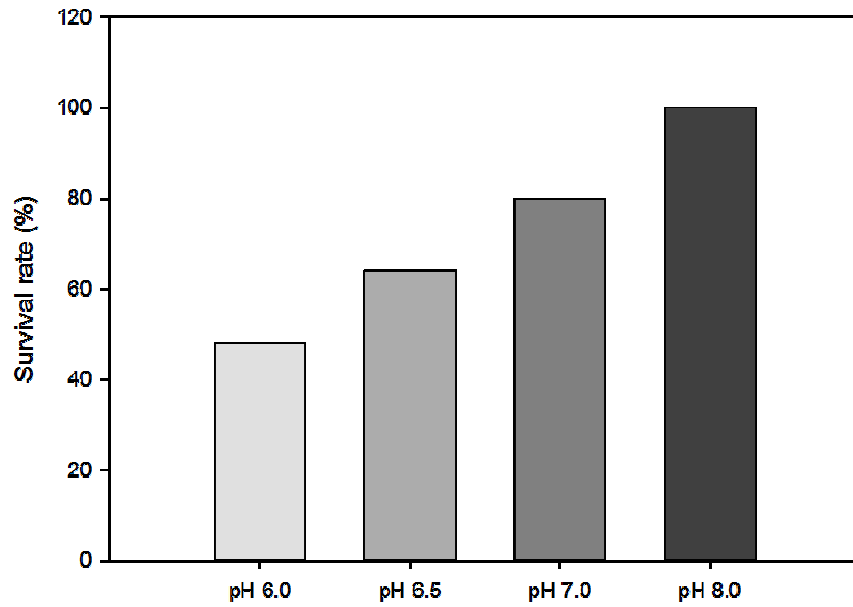


Fig. 7. Effects of low pH on survival rate (%) in grey mullet, *M. cephalus*.

2. 혈액생화학적 분석 결과

2-1. 혈액 생화학적 변화

일반적으로 Aspartate amino transferase (AST)와 Alanine amino transferase (ALT)는 간세포 손상이나 장애를 암시하는 효소로서 본 연구에서 AST를 측정한 결과 pH의 농도가 저하할수록 그 수치가 유의적으로 감소하는 것으로 확인되었다($P < 0.05$). 특히 pH 6.0의 AST 값은 30.67 ± 8.76 U/L로 나타나 일반적인 자연해수 pH에서 사육한 pH 8.0 실험군의 90.80 ± 58.71 U/L에 비해 유의적으로 낮은 경향을 나타냈다(Fig. 8, $P < 0.05$).

ALT의 경우 pH 6.0에서 11.00 ± 1.41 U/L, pH 6.5에서 11.25 ± 2.82 U/L, pH 7.0에서 13.22 ± 5.33 U/L 및 pH 8.0에서 13.33 ± 2.87 U/L로 나타나 각 실험군간 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 9, $P > 0.05$).

Total protein(TP) 또한 간 조직의 손상여부 지표로서 사용되어지며, 분석 결과 pH 6.0에서 1.20 ± 0.40 g/dl, pH 6.5에서 1.74 ± 0.67 g/dl, pH 7.0에서 2.09 ± 0.81 g/dl 및 pH 8.0에서 1.93 ± 0.86 g/dl로 나타나 AST 결과와 마찬가지로 pH농도가 감소함에 따라 수치가 감소하는 경향을 나타내었다($P < 0.05$).

Triglyceride(TG)는 pH 6.0에서 14.20 ± 10.89 mg/dl, pH 6.5에서 28.29 ± 13.71 mg/dl, pH 7.0에서 32.13 ± 13.34 mg/dl 및 pH 8.0에서 26.68 ± 15.50 mg/dl로 나타나 pH 6.0 실험군에서 대조군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 11, $P < 0.05$).

Glucose의 분석 결과는, pH 6.0에서 21.00 ± 4.00 mg/dl, pH 6.5에서 22.38 ± 5.32 mg/dl, pH 7.0에서 24.00 ± 6.67 mg/dl 및 pH 8.0에서 22.89 ± 7.39 로 나타나 각 실험구간 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 12, $P > 0.05$).

또한 phosphorus는 pH 6.0에서 11.88 ± 1.95 mg/dl, pH 6.5에서

13.40 ± 1.32 mg/dl, pH 7.0에서 14.28 ± 2.13 mg/dl 및 pH 8.0에서 11.99 ± 2.93 mg/dl로 나타났으며, 각 실험구간 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Fig. 13, $P>0.05$).

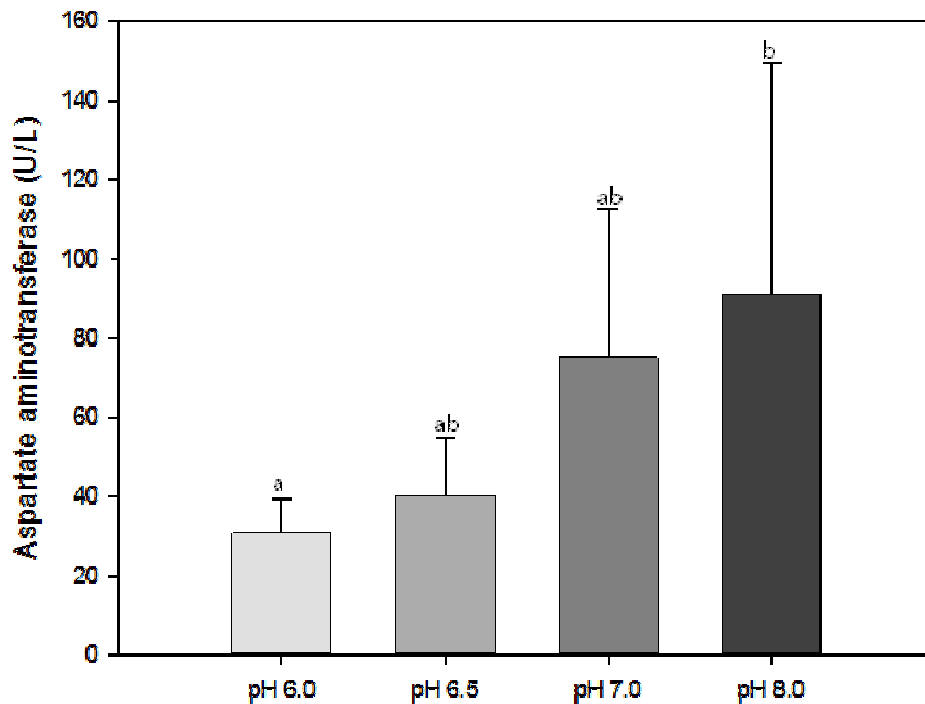


Fig. 8. Changes of aspartate aminotransferase in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean ± SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P<0.05$).

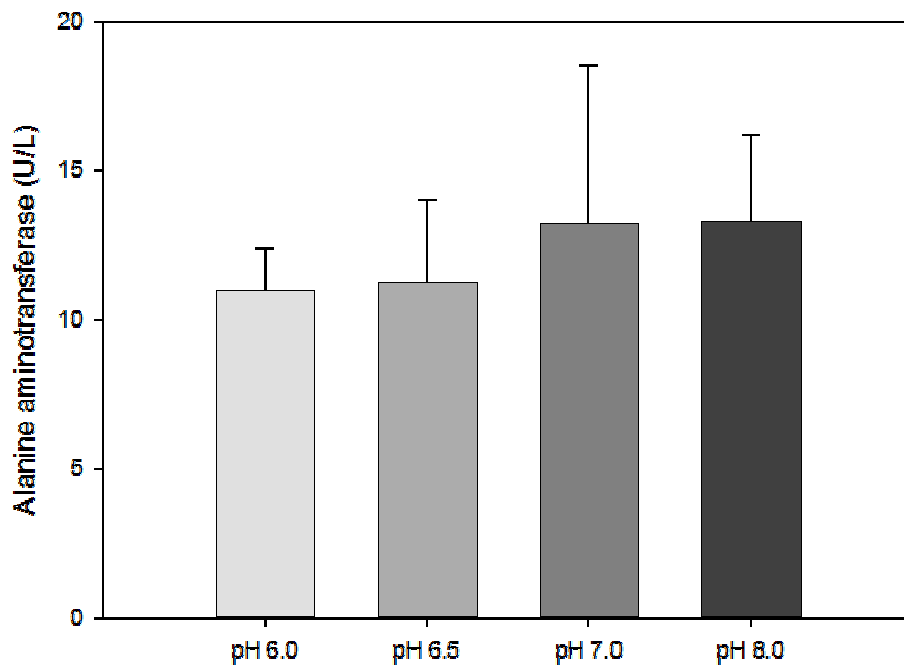


Fig. 9. Changes of alanine aminotransferase in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

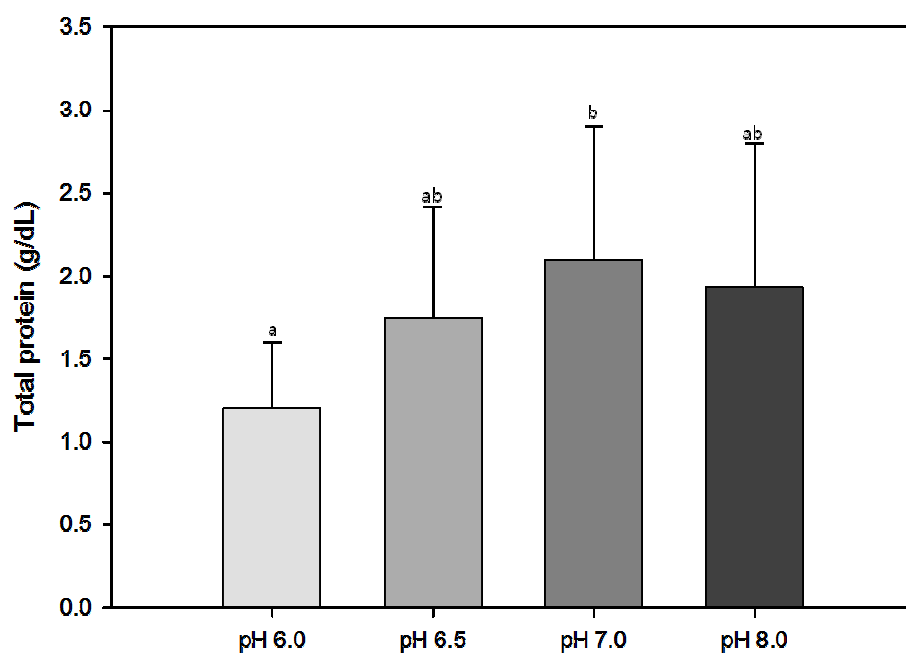


Fig. 10. Changes of total protein in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

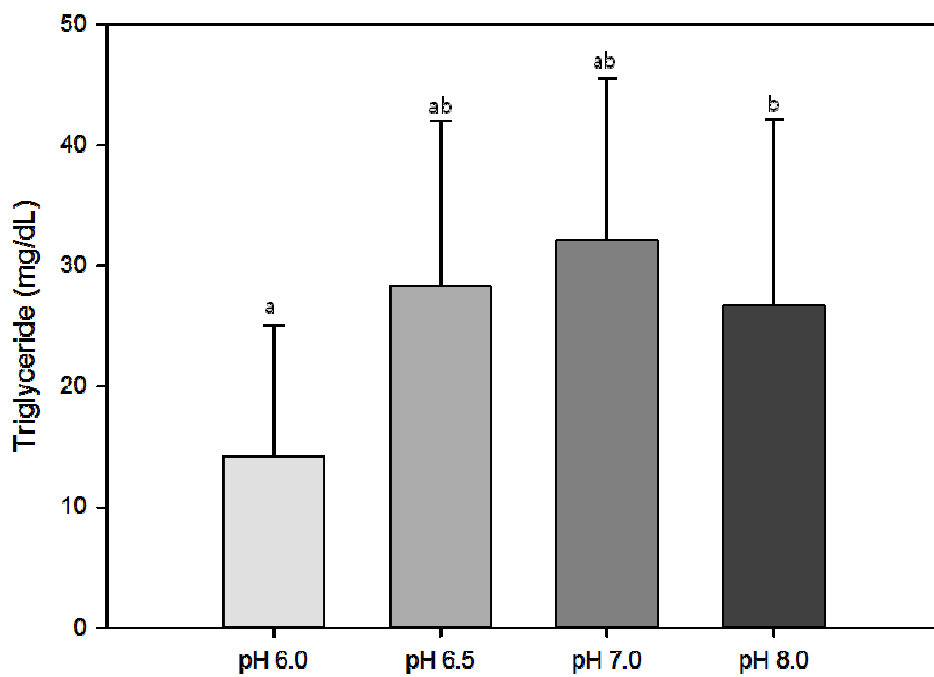


Fig. 11. Changes of triglyceride in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

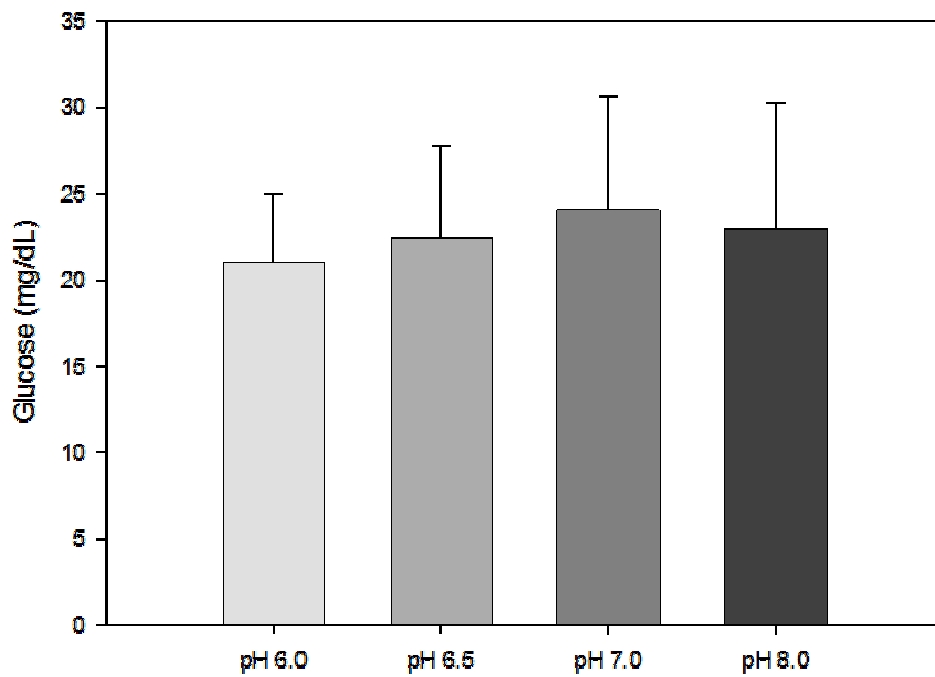


Fig. 12. Changes of glucose in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

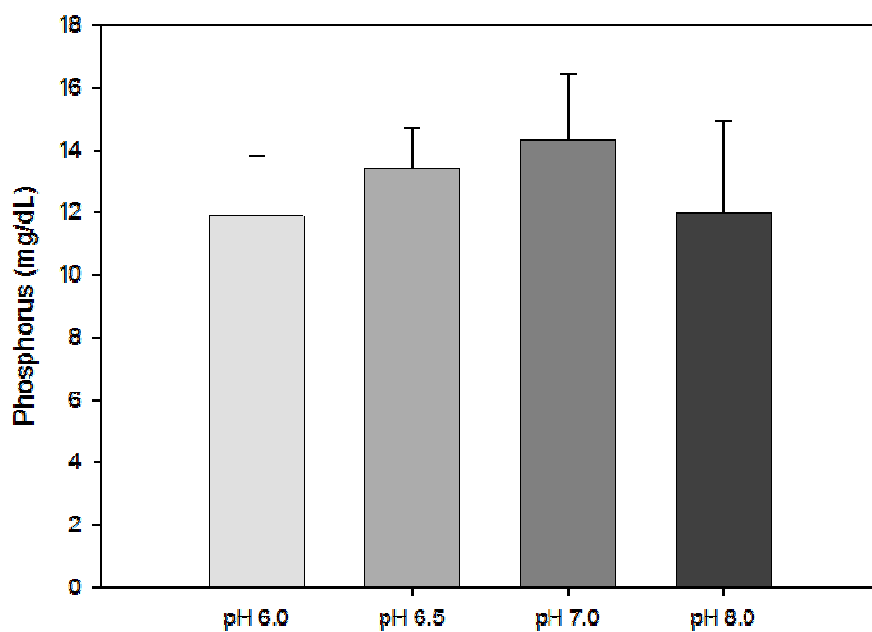


Fig. 13. Changes of phosphorus in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

2-2. 혈장 내 삼투압 변화

삼투압 측정 결과는 Fig. 14에 나타내었으며, pH 6.0 실험군에서 358.88 ± 0.89 mOsm/l 으로 나타나 다른 실험군에 비해 높은 경향을 나타내었다. 일반적으로 해산어류의 혈장 내 삼투압은 280-330 mOsm/l 으로 알려졌으나, pH 6.0, pH 6.5, pH 7.0 및 pH 8.0 실험군에서 316.13 ± 1.85 mOsm/l, 312.90 ± 2.40 mOsm/l 및 309.60 ± 5.26 mOsm/l 으로 각각 나타나 pH 6.0 실험군에서만 정상적인 삼투압 수치에서 상당히 벗어난 것을 확인할 수 있었다(Fig. 14, $P < 0.05$).

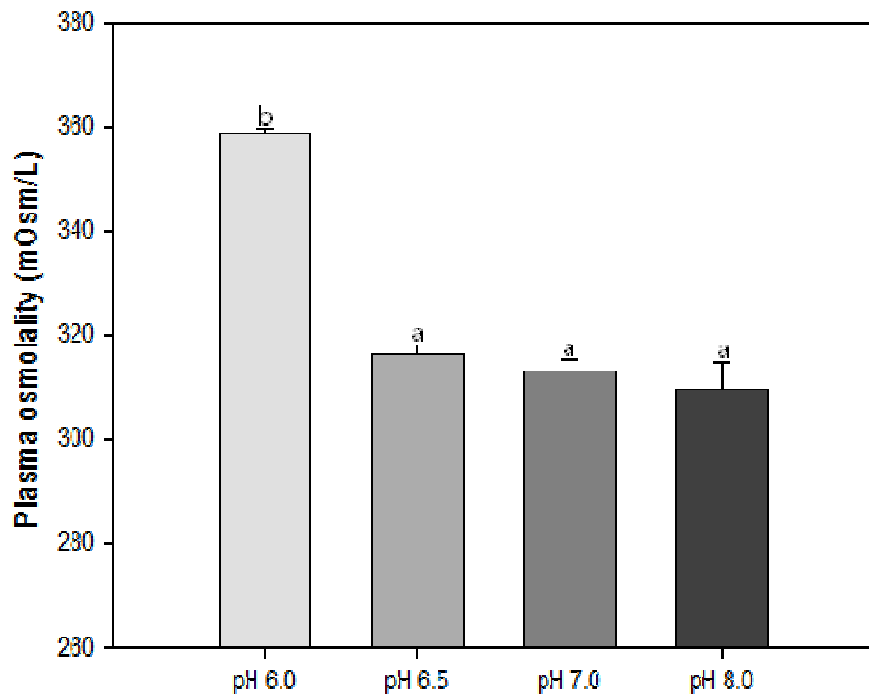


Fig. 14. Changes of plasma osmolality in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

3. 항산화 활성 변화

3-1. Superoxide dismutase (SOD) 활성의 변화

본 연구에서 pH 농도 사육에 따른 어류 간장에서의 SOD 활성은 각 실험구별로 pH 6.0에서 93.64 ± 3.97 U/ml, pH 6.5에서 102.18 ± 0.89 U/ml, pH 7.0에서 97.58 ± 1.54 U/ml 및 pH 8.0에서 91.40 ± 4.20 U/ml 으로 나타나 pH 6.5 및 pH 7.0 실험군에서 SOD 활성이 현저하게 높은 수치를 나타내었다(Fig. 15, $P < 0.05$).

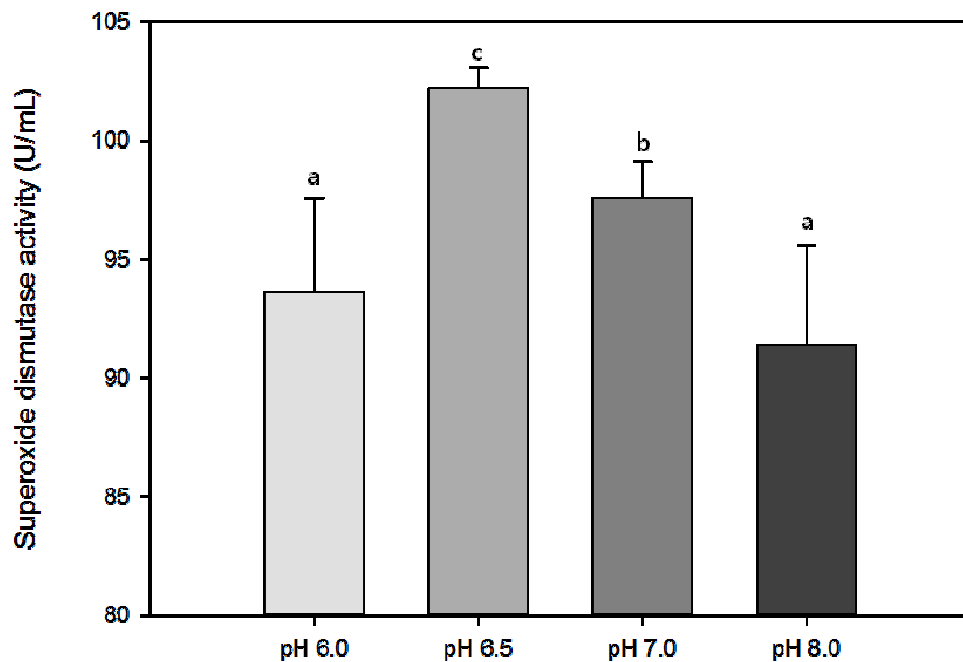


Fig. 15. Changes of superoxide dismutase activity in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

3-2. Catalase (CAT) 활성의 변화

CAT 활성의 경우에는 pH 6.0에서 0.12 ± 0.04 mU/ml, pH 6.5에서 0.08 ± 0.03 mU/ml, pH 7.0에서 0.03 ± 0.03 mU/mL 및 pH 8.0에서 1.08 ± 0.55 mU/ml로 각각 나타나 일반적인 해수의 pH인 pH 8.0을 제외한 나머지 농도 실험군에서 모두 활성이 급격히 낮은 수치를 나타내었다 (Fig. 16, $P < 0.05$).

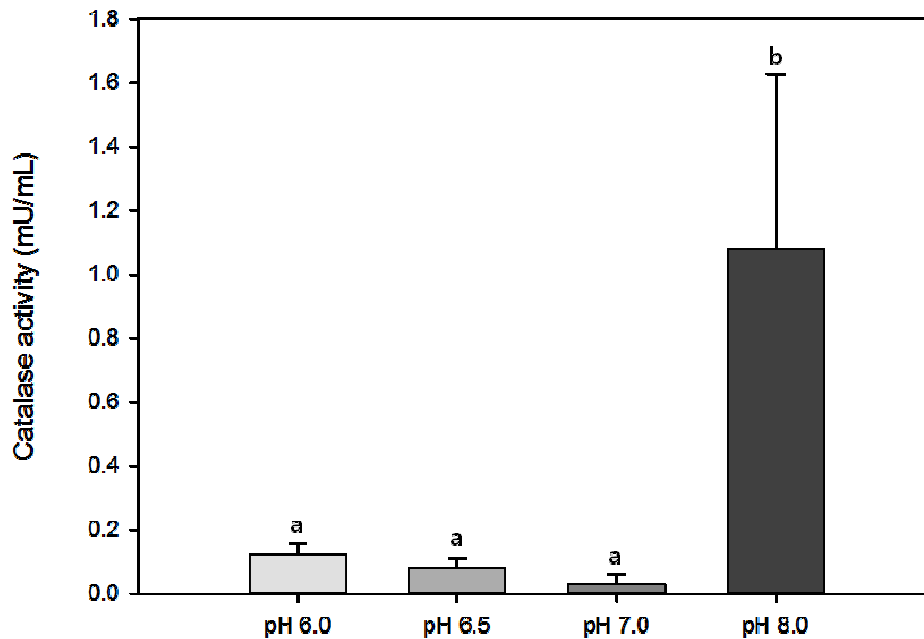


Fig. 16. Changes of catalase in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

3-3. Glutathione (GSH) 활성의 변화

GSH의 활성 변화 결과는 pH 6.0에서 $14.06 \pm 4.06 \mu\text{mol/l}$, pH 6.5에서 $30.94 \pm 5.13 \mu\text{mol/l}$, pH 7.0에서 $50.14 \pm 4.36 \mu\text{mol/l}$ 및 pH 8.0에서 $50.73 \pm 4.00 \mu\text{mol/l}$ 으로 나타나 대조구에 비해 pH 6.0 및 pH 6.5에서 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 17, $P < 0.05$).

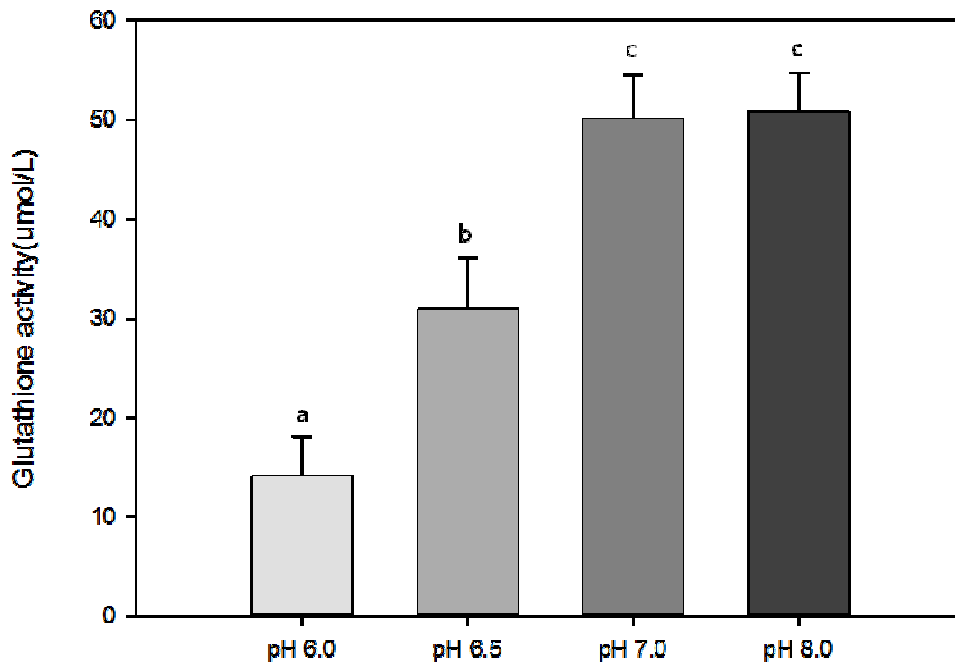


Fig. 17. Changes of glutathione activity in grey mullet, *M. cephalus* exposed to various pH concentrations. Data are expressed as mean \pm SD, different superscript letters (a, b, c) indicate significant difference between the values ($P < 0.05$).

IV. 고찰

본 연구에서는 각기 다른 농도의 pH 환경에서 송어(*M. cephalus*)를 15일간 사육 후 나타나는 생리적 변화를 관찰하였다. 본 연구 결과, 15일의 단기간의 사육이므로 각 실험구간의 유의적인 성장의 차이는 나타나지 않았으나, 사육기간 동안 pH농도가 감소할수록 체중이 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 기존의 연구에서 낮은 pH에 14일간 노출시킨 거미게(*Hyas arameus*) 자어의 성장을 감소 및 발달 저해가 보고된 바 있으며(Walther et al., 2010), 본 연구에서는 송어 자어를 이용한 먹이를 공급하지 않은 상태에서의 사육으로 각 실험구간 유의적인 체중 변화 차이는 나타나지 않았으나, pH농도가 저하할수록 체중이 실험 개시 전 보다 감소하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는 스트레스로 작용하여 대사의 불균형을 야기 할 뿐만 아니라 많은 에너지 소모로 인하여 pH가 저하할수록 체중의 감소가 커진 것으로 추정된다. 생존율 또한 pH가 저하할수록 생존율이 낮아지는 것이 관찰되었다(Table 1). 수중의 pH 감소는 해양에서 서식하는 생물의 신진대사 및 산소수송기능의 저하를 야기하는 것으로 알려져 있다(Bonga, 1997). 또한 pH의 감소가 청보리멸(*Sillago japonica*), 참돔(*Pagrus major*)의 자치어뿐 아니라 유럽바다농어(*Dicentrarchus labrax*)의 폐사를 유도하며, 산-염기 조절에 장애를 가져오는 것으로 보고된 바 있으며(Kikkawa et al., 2003, 2004; Grøttum and Sigholt, 1996), 어류뿐 아니라 일본산 진주조개(*Pinctada fucata*) 및 굴(*Crassostrea virginica*)등의 패류에도 성장률 저하 및 사망률 증가를 유도하는 것으로 보고된 바 있다(Kuwatani and Nishii, 1969; Calabrese and Davis, 1966). 기존의 연구 결과와 동일하게 본 실험에서 사용한 송어(*M. cephalus*)의 생존율 저하 역시 pH의 저하에 따른 신진대사의 저하 및 체내 삼투압 등의 대사 조절 능력의 장애 발생 등으로 인하여 야기된 결과라고 추정된다.

일반적으로 어류의 혈액은 생리상태의 변화를 파악할 수 있는 요인으로 생리활성 평가의 지표로서 사용된다(Chen et al., 2004). 본 연구에서는 네 가지의 pH농도에서 사육한 각 실험어의 혈액성상분석을 측정하여, pH 농도에 따른 변화를 관찰하였다. 일반적으로 Aspartate amino transferase (AST)와

Alanine amino transferase (ALT)는 간세포 손상이나 장애를 암시하는 효소로서, 본 연구에서 AST를 측정한 결과 pH의 농도가 저하할수록 그 수치가 유의적으로 감소하는 것으로 확인되었다($P < 0.05$). 특히 pH 6.0의 AST 값은 30.67 ± 8.76 U/L로 나타나 일반적인 자연해수 pH에서 사육한 pH 8.0 실험군의 90.80 ± 58.71 U/L에 비해 유의적으로 낮은 경향을 나타냈다($P < 0.05$). 일반적으로 어체의 생리상태가 좋지 않을수록 간의 장애가 일어나고 AST·ALT의 활성이 높아지는 것으로 알려졌으나, 간세포의 괴사가 더욱 진행된 경우에는 활성 수치가 오히려 감소되는 것으로 보고되고 있다(Molander et al., 1955). 그러나 ALT의 경우에는 본 실험의 결과 각 실험군간 유의적인 차이는 나타나지 않았다($P > 0.05$). 본 연구의 결과에서 나타난 AST의 급격한 감소는 간 기능의 저하에 따른 결과로 추정되나, 간 내의 효소 활성에 pH 저하에 따른 체내의 이온농도 변화에 따른 삼투압의 변화로 인하여 직·간접적으로 저해 작용이 유발되었을 가능성이 있으므로 이에 대한 추가적인 검토가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 한편, 간 조직의 손상여부 지표로서 사용되는 Total protein (TP) 측정 결과, AST 결과와 마찬가지로 pH농도가 감소함에 따라 수치가 감소하는 경향을 나타내었다($P < 0.05$). TP 또한 간 조직의 손상여부 지표로서 활용되어지며, 일반적으로 환경 스트레스를 받은 어류는 간체장의 손상 및 세뇨관의 재흡수 장애로 인해 혈청 내 TP가 감소하는 경향을 나타내는 것으로 보고되어 있어(Doney et al., 2009), 본 연구의 결과에서도 pH의 저하가 간 기능저하나 세뇨관의 재흡수의 장애를 통한 삼투압 조절 이상으로 TP의 수치가 감소했을 가능성이 있는 것으로 여겨진다. Triglyceride (TG)는 pH 6.0 실험군에서 대조군에 비해 유의적으로 낮은 수치를 나타내었으며, glucose 및 phosphorus는 각 실험군간 유의적인 차이는 나타나지 않았다(Table 1). TG는 수온, 성별, 생식 주기 및 먹이 등에 의해 변화하는 것으로 알려져 있다(Lie et al., 1988). 본 실험에서의 TG 측정 결과 pH 6.0 실험군에서 14.20 ± 10.89 mg/dl로 나타나 다른 실험군에 비해 낮은 경향을 나타내었는데, 이는 낮은 pH의 변화에 의한 스트레스 작용으로 에너지 소모가 유발된 결과로 추정된다($P < 0.05$, Table 1). 일반적으로 환경적인 요인에 의해 스트레스가 야기된 어류는 체내 항상성을 유지하기 위해 많은 에너지가 요구

되어지며, 에너지를 필요 이상으로 소모하게 되는데(Schreck, 1982), 본 연구에서도 이와 유사한 결과로 혈중의 TP 및 TG의 감소를 나타냄으로서 pH 저하가 승어에 있어서 큰 스트레스 요인으로 작용하는 것으로 여겨진다.

일반적으로 해산어류의 혈장 내 삼투압은 280-330 mOsm/l 으로 알려졌으나, pH 6.0 실험군에서 358.88 ± 0.89 mOsm/l 으로 나타나 정상적인 삼투압 수치에서 상당히 벗어난 것을 확인할 수 있었다($P > 0.05$). 기존의 해수에서 사육한 은연어(*Onchorhynchus kisutch*)를 이용한 연구에서도 저장성 환경에서 원활한 삼투조절 기능이 저해되어 체내의 삼투압이 증가하게 되는데, 이는 pH의 산성화가 아가미에서의 이온 수송을 저해하여 어류의 식도에서 유입된 이온화 물질이 원활히 제거되지 못하여 체내 삼투압을 증가시키고 이에 따라 대사 항상성 유지를 위해 과도한 에너지의 소모가 발생함에 따라 성장 억제 및 생존율 저하 등을 유발하기 때문으로 보고되어졌다(Young et al., 1989). 본 연구에서도 낮은 pH 농도인 pH 6.0에서 삼투압의 이상 증가 현상이 나타났으며, 이러한 요인으로 생존율 및 혈액 내의 생리 대사 물질 농도의 저하가 유발된 것으로 추정된다.

한편, 각종 물리적, 화학적 및 환경적 요인에 의해 스트레스를 받을 경우 생성되는 활성산소(oxygen free radical)는 여러 가지 질병을 유발하는 원인으로, 활성산소를 제거하기 위한 방어기구로 superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT)와 같은 항산화 효소 및 glutathione (GSH)과 같은 항산화 물질이 존재한다(Dalton et al., 1993). 이러한 항산화 효소는 어류의 종(species) 및 계절에 따라 활성이 변화하는 것으로 알려져 있다(Aksnes et al., 1981; Gabryelak et al., 1983). 항산화 효소인 SOD와 CAT는 체내에서 발생한 superoxide radical (O_2^-)을 H_2O_2 와 $O_2(2O_2^- + 2H^+ \rightarrow H_2O_2 + O_2)$ 로 치환시키고, 이 치환된 H_2O_2 를 CAT가 생체에 무해한 인자인 O_2 와 $H_2O(2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2)$ 로 분해하여 활성산소의 유해성을 저해시킨다(Forman and Fridovich, 1973). 이러한 항산화 효소 활성은 스트레스를 받은 직후부터 효소 활성이 크게 증가한 후, 지속적으로 낮아지는 것으로 보고되어진 바 있다(Parihar et al., 1996, 1997). 기존 연구에 의하면 환경 스트레스를 받은 넙치(*P. olivaceus*)에서 초기 SOD 및 CAT의 활성이 크게 증가하였지만, 어체

내 생리학적 방어기작의 한계에 도달할 경우 항산화 효소 활성이 정상수치보다 오히려 감소하는 것으로 보고되고 있다(Winston and Giulio, 1991). 본 연구의 결과 SOD는 낮은 pH 환경 조건하에서 높은 수치를 나타내었으나 CAT는 오히려 낮은 수치를 유지하였다. CAT는 SOD의 작용에서 활성산소인 O_2^- 를 H^+ 이온과 반응하여 생성된 H_2O_2 를 제거하는 효소로 작용하게 되는데 낮은 pH환경 조건하에서는 체내의 H^+ 이온 농도가 이상적으로 증가하여 삼투조절 능력을 저해함과 동시에 체내 스트레스 작용 요인으로 작용함으로써 H_2O_2 의 과도한 생성으로 인하여 CAT의 고갈 현상이 유발되어 본 실험의 결과에서와 같이 낮은 CAT 농도를 나타낸 것으로 추정된다. 그러나 pH의 저하는 체내의 산소 수송능 저해 또한 유발하는 것으로 알려져 있어(Bonga, 1997), 이러한 산소운반능력의 저해가 항산화 관련 효소의 활성 및 생성에 직접적으로 관여할 가능성이 있으므로 이에 대한 추가적인 검토가 이루어져야 할 것으로 판단된다. 한편, GSH는 대조구에 비해 pH 6.0 및 pH 6.5에서 유의적으로 낮은 수치를 나타내었다(Fig. 4, $P < 0.05$). 이러한 결과는 pH의 저하가 항산화 스트레스 요인으로 작용하여 활성산소가 증가함에 따라 GSH 또한 소모됨으로써 그 효소의 활성이 pH 농도가 낮아질수록 낮은 수치를 나타낸 것으로 판단되어진다. 일반적으로 항산화 효소는 삼투 스트레스(osmotic stress)에 민감하게 반응하는 것으로 보고되고 있으며(Roche and Bogé, 1996), 본 연구에서도 pH의 저하가 체내 삼투압 조절의 장애를 유발함으로써 스트레스 요인으로 작용하여 항산화 효소 활성의 변화를 초래한 것으로 판단되어진다.

이상의 결과들을 종합하여 보면, 송어(*M. cephalus*)가 pH의 산성화에 노출될 경우 체내 혈액성상의 변화와 삼투압 조절 장애를 유발하고, 이를 통한 스트레스 작용으로 항산화 효소인 SOD, CAT 및 GSH 활성에 영향을 미친 것으로 판단되며, 이에 따라 체내의 생리적인 스트레스를 야기함으로써 대사 에너지의 소모를 유발하여 생존율 감소 및 성장 저해 등을 유발시킬 것으로 판단된다.

V. 참고 문헌

Arrigo, K. R. (2007). Carbon cycle: Marine manipulations. *Nature Reports Climate Change*, 100-101.

Aksnes, A., & Njaa, L. R. (1981). Catalase, glutathione peroxidase and superoxide dismutase in different fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry*, 69(4), 893-896.

Bonga, S. W. (1997). The stress response in fish. *Physiological reviews*, 77(3), 591-625.

Calabrese, A., & Davis, H. C. (1966). The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Biological Bulletin*, 131(3), 427-436.

Chen, C. Y., Wooster, G. A., & Bowser, P. R. (2004). Comparative blood chemistry and histopathology of tilapia infected with *Vibrio vulnificus* or *Streptococcus iniae* or exposed to carbon tetrachloride, gentamicin, or copper sulfate. *Aquaculture*, 239(1), 421-443.

Dalton, D. A., Langeberg, L., & Treneman, N. C. (1993). Correlations between the ascorbate-glutathione pathway and effectiveness in legume root nodules. *Physiologia Plantarum*, 87(3), 365-370.

Dixson, D. L., Jennings, A. R., Atema, J., & Munday, P. L. (2015). Odor tracking in sharks is reduced under future ocean acidification conditions. *Global change biology*, 21(4), 1454-1462.

Doney, S. C., Fabry, V. J., Feely, R. A., & Kleypas, J. A. (2009). Ocean acidification: the other CO₂ problem. *Marine Science*, 1.

Forman, H. J., & Fridovich, I. (1973). On the stability of bovine superoxide dismutase The effects of metals. *Journal of Biological Chemistry*, 248(8), 2645-2649.

Gabryelak, T., Piatkowska, M., Leyko, W., & Peres, G. (1983). Seasonal variations in the activities of peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 75(2), 383-385.

Gattuso, J. P., & Buddemeier, R. W. (2000). Ocean biogeochemistry: calcification and CO₂. *Nature*, 407(6802), 311-313.

Gattuso, J. P., & Hansson, L. (Eds.). (2011). *Oceanacidification*. OUP Oxford.

Grøttum, J. A., & Sigholt, T. (1996). Acute toxicity of carbon dioxide on European seabass (*Dicentrarchus labrax*): Mortality and effects on plasma ions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, 115(4), 323-327.

Kikkawa, T., Ishimatsu, A., & Kita, J. (2003). Acute CO₂ tolerance during the early developmental stages of four marine teleosts. *Environmental toxicology*, 18(6), 375-382.

Kikkawa, T., Kita, J., & Ishimatsu, A. (2004). Comparison of the lethal effect of CO₂ and acidification on red sea bream (*Pagrus major*) during the early developmental stages. *Marine Pollution Bulletin*, 48(1), 108-110.

Knutzen, J. (1981). Effects of decreased pH on marine organisms. *Marine Pollution Bulletin*, 12(1), 25-29.

Kroeker, K. J., Kordas, R. L., Crim, R., Hendriks, I. E., Ramajo, L., Singh, G. S., ... & Gattuso, J. P. (2013). Impacts of ocean acidification on marine organisms: quantifying sensitivities and interaction with warming. *Global change biology*, 19(6), 1884-1896.

Kuwatani, Y., & Nishii, T. (1969). Effects of pH of culture water on the growth of the Japanese pearl oyster. *Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries*, 35, 242-250.

Lai, F., Jutfelt, F., & Nilsson, G. E. (2015). Altered neurotransmitter function in CO₂-exposed stickleback (*Gasterosteus aculeatus*): a temperate model species for ocean acidification research. *Conservation Physiology*, 3(1), cov018.

Lie, Ø., Waagbø, R., & Sandnes, K. (1988). Growth and chemical composition of adult Atlantic salmon (*Salmo salar*) fed dry and silage-based diets. *Aquaculture*, 69(3), 343-353.

Molander, D. W., Wroblewski, F., & LaDue, J. S. (1955). Serum glutamic oxalacetic transaminase as an index of hepatocellular integrity. *The Journal of laboratory and clinical medicine*, 46(6), 831.

Ou, M., Hamilton, T. J., Eom, J., Lyall, E. M., Gallup, J., Jiang, A., ... & Brauner, C. J. (2015). Responses of pink salmon to CO₂-induced aquatic acidification. *Nature Climate Change*, 5(10), 950-955.

Parihar, M. S., Dubey, A. K., Javeri, T., & Prakash, P. (1996). Changes in lipid peroxidation, superoxide dismutase activity, ascorbic acid and phospholipid content in liver of freshwater catfish *Heteropneustes fossilis* exposed to elevated temperature. *Journal of thermal biology*, 21(5), 323-330.

Parihar, M. S., Javeri, T., Hemnani, T., Dubey, A. K., & Prakash, P. (1997). Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defenses in gills of the freshwater catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short-term elevated temperature. *Journal of Thermal Biology*, 22(2), 151-156.

Pörtner, H. O., Reipschläger, A., & Heisler, N. (1998). Acid-base regulation, metabolism and energetics in *Sipunculus nudus* as a function of ambient carbon dioxide level. *Journal of Experimental Biology*, 201(1), 43-55.

Pörtner, H. O., Langenbuch, M., & Reipschläger, A. (2004). Biological impact of elevated ocean CO₂ concentrations: lessons from animal physiology and earth history. *Journal of Oceanography*, 60(4), 705-718.

Roche, H., & Bogé, G. (1996). Fish blood parameters as a potential tool for identification of stress caused by environmental factors and chemical intoxication. *Marine Environmental Research*, 41(1), 27-43.

Schreck, C. B. (1982). Stress and rearing of salmonids. *Aquaculture*, 28(1-2), 241-249.

Shikata, T., Kheyali, D., & S. Shimeno. (1993). Effect of Feeding Rates

on Hepatopancreatic Enzymes and Body Composition in Common Carp. *Nissuishi*, 59(5), 835-839.

Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M. & Miller, H.L., (2007). "Climate Change 2007: The Physical Science Basis - Contribution of Working Group I to the Fourth Assessment Report of the Intergovernmental Panel on Climate Change", Cambridge University Press, Cambridge.

Walther, K., Anger, K., & Pörtner, H. O. (2010). Effects of ocean acidification and warming on the larval development of the spider crab *Hyas araneus* from different latitudes (54 vs. 79 N). *Marine Ecology Progress Series*, 417, 159-170.

Winston, G. W., & Di Giulio, R. T. (1991). Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms. *Aquatic toxicology*, 19(2), 137-161.

Young, G., Björnsson, B. T., Prunet, P., Lin, R. J., & Bern, H. A. (1989). Smoltification and seawater adaptation in coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*): plasma prolactin, growth hormone, thyroid hormones, and cortisol. *General and Comparative Endocrinology*, 74(3), 335-345.

VI. 감사의 글

“시작은 반이다”라는 말이 있듯이 어느새 2년 반이라는 짧고도 긴 시간이 지나갔습니다. 마음만은 항상 공부를 해야지 하면서 미루어 왔던 석사 과정을 제주도에 내려와 이제야 마치게 되었습니다. 그 동안 회사생활을 바쁘게 지내다 보니 늘 마음 한 구석에 공부를 더 해야 하는 마음만 가지고 있었습니다. 고향이 대천해수욕장이다 보니 어려서부터 바다의 해양생물에 대해 경험과 공부를 하였으나, 생물에 대한 공부를 더 하고 싶은 마음의 결정은 쉽지 않았지만 주위 직원들이 대학원에 입학하여 학업에 열중하는 것을 지켜보게 되었고, 나도 한번 해보자 굳은 마음을 먹게 되었으며, 나에게 맞는 대학원이 어디 없을까? 찾던 중 사면이 바다인 제주도에는 제주대학교 해양대학이 있었고, 훌륭한 여인규 지도교수님이 계셨기에 가능하지 않았나 생각 합니다. 처음 어떻게, 무엇부터 시작을 해야 할지 참 난감하였고, 석사 과정이 순탄하지만은 않았습니다. 하지만 그때마다 옆에서 격려 해 주시고 나아가야 할 방향을 가르쳐 주셨기에 어려웠지만 이 석사 과정을 마칠 수 있게 되어 정말 감사하다는 말씀 이 자리에서 올립니다. 앞으로 더 넓은 안목과 해양생물에 대한 이해와 중요성을 다시 깨닫게 되었으며 후배들에게도 학업에 대해 열정을 가지라고 늘 얘기하겠습니다. 그리고 바쁘신 중에도 이 논문에 대한 발표 심사를 위해 노력해 주시고 가르쳐 주신 이영돈 교수님과 이승현 교수님께도 깊은 감사의 말씀을 드리며, 가르침의 말씀은 마음 깊이 간직하여 새로운 연구 활동을 하더라도 큰 보탬이 될 것이라 생각 합니다. 또 이번 연구에 대해 가르침을 주고 석사 논문을 위해 같이 노력해 준 해양동물생리학 실험실에 박사 과정인 문혜나 선생님 처음부터 하나하나 꼼꼼히 도와주고 자세히 지도해 주어 이 자리까지 온 것 같습니다. 정말 고맙고 감사합니다. 해양대학 조교이자 우리 실험실에 언니인 남궁진 선생님 조언해 주고 실험에 도움을 주어 고맙고 곧 일본 북해도로 박사과정 공부를 하러 가시는데 가서 꼭 목표 이루시길 바랍니다. 그리고 영국, 노르웨이에서 공부만 하고 돌아와 제주대 해양동물생리학 실험실에서 박사과정을 이어나가는 김기혁 선생님 많은 도움을 주어 고맙고 격려 해주어 감사드리며, 꼭 박사과정 성취하시길 기원 합니다. 실험실의 살림꾼 누구보다 듬직한 대학원생 박천만 학생 하나부터 열까지 잘 챙겨주었고

큰 덩치와는 다르게 꼼꼼한 부분이 있어 믿음직스러웠다. 논문 심사 프레젠테이션 하는 날에도 아침 일찍 학교에 도착해 연습해 보라면서 들어 주던 천만이 운동 계속 잘 하고 소주도 가끔 하자 정말 고마웠다. 그리고 학부생으로서 대학생 활의 즐거운 추억을 실험실에서 만들고 있고 곧 군대 간다고 준비하는 막내 최진성, 실험실에 분위기 메이커 노윤혜 학생 실험실이 자기 집인 것처럼 밤늦게까지 공부하며 같이 있어주어 심심하지 않게 재미있었고 고마웠다. 지금까지 나 이 많은 후배를 가르쳐 주시고 지도해준 선배님들과 후배님들 이렇게 하나 되어 도와 주셨기에 가능했던 일이라 생각 됩니다. 또 저의 석사과정을 위해서 늘 격려해 주시고 위로 해주신 우리 회사 장동준 본부장님 늘 역량강화를 위해 직원들 편에 계셔 주셔서 가능했던 일이라 생각합니다. 실험을 도와준 우리 회사 후배 백두성, 박근현도 밤새가며 힘들고 어려웠지만 함께 해주어 좋은 추억도 있었고 재미있었던 것 같다. 항상 긍정적인 생각으로 도와주고 말 한마디 한마디가 이제 와서 생각하니 너무 고맙고 힘이 생겼던 것 같다. 회사 후배이면서 대학원 동기 홍성원은 이것저것 도움이 될 만한 것이라면 무엇이든 물어와 보여주고 등록금 입금 하셨죠 하면서 챙겨주었던 것, 졸업 시험은 잘 봐야 한다면서 코팅하여 책상 밑에 깔아 준 것 아직도 가지고 있다 고마웠다. 우리 아쿠아플라넷 제주 아쿠아팀 직원들 잘 되시나요 하면서 도와주고 격려해 주어 힘이 되었습니다. 그리고 무엇보다 우리 마눌님 나이 먹어 대학원에 입학하겠다고 했을 때 말없이 허락을 해준 우리 와이프 채 순 여사님! 아들들 학원비 내기도 쉽지만은 않았을 텐데 고마웠어요. 아들 중훈, 중석에게도 부끄럽지 않은 아빠, 노력하는 모습의 아빠를 보이기 위해 본보기로 공부 했다라고 이제는 말하고 싶다. 너희들은 더 늦기 전에 하고 싶은 공부가 있다면 열심히 하기를 바란다. 마지막으로 우리 어머니 대학원 다닌다고 했을 때 마음 한 부분에 늘 걸렸던 일이라고 하셔서 학교 다닐 때 더 공부 못시켜 미안하다고 하셨을 때 마음이 쩍 했지만 열심히 하라는 어머니 말씀에 더욱 해야겠다는 마음을 갖게 되었습니다. 이번 인연으로 맺어진 여인규 교수님과 해양동물생리학 실험실의 모든 학부생, 대학원생, 박사과정 선생님들 다시 한 번 도와주고 챙겨주어 고맙습니다. 마음만 먹어도 시작한 것이나 마찬가지로 다 라고 했을 때 무엇이든 시작해보세요 그럼 받은 시작한 것입니다. 감사합니다.