

DU-도전학기 참가신청서

성명		학번	
단과대학		학과(전공)	
휴대전화 번호		이메일	
보호자 성명		보호자 연락처	
도전학기 지도교수			
도전학기 과제명	(한글) 토양 내 초산균의 분리와 검증 (영문) Independent Research: Isolation and verification of <i>Acetobacter</i> from soil		
도전 기간	2018-겨울학기	도전 영역	☐ 일반선택영역 ☒ 전공영역
도전학기 과제 내용 요약	특정한 물질을 합성하는 미생물의 특성을 탐구한 뒤 토양으로부터 분리해 낸 미생물 가운데 필요한 개체만을 선별하고 계대 배양하는 동시에 이를 검증한다. 본 도전학기 과제의 수행을 통해 미생물 배양의 기초를 다지고 직접 실험을 설계함으로 생물학 연구자로서 필요한 능력을 키울 수 있다.		
대학 재학 중 주요 교내외 활동	기관명	활동기간	활동내용
	대구대신문사	2015.03.~2015.12.	대구대신문사 수습 및 취재부 정기자
	대구대학교 식물계통학 실험실	2015.03.~2016.2.	식물 시료 제작 및 데이터베이스 입력 보조 연구원
	대구대학교 유전공학 실험실	2018.03.~	외국인 연구원 활동 보조
2017-1 교내외 장학금 수혜내역	구분(교내/교외)	장학금명	장학금액(원)
상기와 같이 도전학기에 지원합니다. 2018 년 10 월 8 일 신청인 :			

[별첨2]

DU-도전학기 계획서

성 명			학 번	
단과대학			학과(전공)	
도전학기 과제명	(한글) 토양 내 초산균의 분리와 검증 (영문) Independent Research: Isolation and verification of <i>Acetobacter</i> from soil			
신청학점 및 교과구분	전 공: 3 학점 일반선택: 0 학점	예상 소요 예산		
		소속 학과장		
학과장 의견	위 학생은 2학년 학생임에도 불구하고 '생명현상' 연구에 관심이 많은 학생입니다. 따라서 본인 스스로 실험을 통해 생명현상을 경험하고 체득하고자 하는 열망이 가득하므로 본 도전학기 기획을 통해 이 학생의 전공에 대한 이해가 깊어져 훌륭한 인재로 성장하길 바라는 마음으로 추천합니다.			

1. 도전의 배경

이공계 대학생이 대학원에 진학하여 곧바로 적응하고 우수한 연구 인력으로 성장하기 위해서는 학부 때 독자적인 연구 경험을 가질 필요가 있어 본인은 현재 교내 유전공학 실험실에서 다양한 시료(sample)에서 미생물을 분리하고 배양하는 방법을 익히고 있다. 따라서 본 도전을 통해 실험실에서 배운 미생물의 표본 채집과 배양 등 관련 지식 및 기술을 이해하고, 이를 이용해 직접 독립 연구를 수행할 기회를 가질 수 있다. 이 도전은 정규 교과목인 미생물학 및 미생물학 실험과는 달리 단순한 지식과 기초적 기술만을 전달하는 것이 아니라 학생이 교수의 일방적 지시에서 벗어나 스스로 특정 미생물을 분리함으로 관련된 기존 연구를 선별, 학습하고 스스로 실험을 설계, 진행할 수 있게끔 돕는다.

또한, 수행한 연구 내용을 논문 게재나 학술 대회 참여 등의 방법으로 발표하며 연구가 단순히 실험만으로 그치지 않음을 이해하게 한다. 이는 학자로서 필수적이나 학부 과정에서 접하기 힘든 연구 방법론을 익히는 데에 크게 기여할 것이며, 연구 경력을 만듦으로 학생의 진로에 도움이 될 것이다.

즉, 본 도전을 통해 미생물학을 이해하는 데에 그치지 않고 본인 스스로 독립적인 연구를 수행할 역량을 키우는 한편, 생물학 연구 방법론을 알고 그동안 학습한 내용을 실제 현장에서 활용할 수 있을 것이다. 이는 학부생으로서 찾아보기 힘든 기회로, 본 도전을 이수하여 무사히 완수한 학생은 곧바로 산업 현장 또는 학계에서 대학원생에 준하는 연구자로서 활동할 능력을 검증받을 수 있을 것이다.

2. 도전 및 도전 과제의 목표

본 도전의 목적 및 목표는 학생 스스로가 문제 발견, 해결 방법 탐색, 실험의 진행 및 결과 발표 등의 연구 과정을 이해하는 데에 있다. 미생물학은 해당 목표를 달성하기 위한 주제에 불과하며, 본 도전의 목적을 달성하기 위해 미생물학의 기초를 다지며 생물학 실험을 스스로 설계하고 수행할 것이다. 본 도전 과제의 수행을 통해 과제 수행에 필요한 미생물 연구 방법 및 연구 대상 미생물의 조사, 실험의 설계와 연구 결과 공유 등을 스스로 진행함으로써 과학적 연구 방법을 익히고 독립된 연구자로서의 자질도 키울 수 있다.

3. 도전 과제 내용

본 도전의 주 목적은 생물학적 연구방법론을 이해함이다. 이를 달성하기 위한 도전 내용은 크게 사전 조사, 실험 설계 및 진행, 결과물 발표가 있다.

사전 조사 과정에서 연구 주제와 관련된 참고 문헌과 연구 결과들을 탐색하는 법을 익힌다. 특히, 인터넷을 통해 빠르게 연구 결과를 공유하는 현 시대 과학 연구자 사회의 요구에 맞추어 Web of Science, NCBI PubMed 등 과학 및 생물학 데이터베이스를 이용해 필요한 정보를 검색하는 방법을 배운다. 이는 대학원 과정의 생물정보학과 연계한다.

실험 설계 및 진행 과정에서 알고 있는 지식을 바탕으로 목적을 달성하기 위한 실험을 구상하고 이를 실천하는 법을 익힌다. 이를 통해 연구자로서 필요한 사고 능력과 창의력, 끈기를 얻을 수 있으며, 이는 대학원 과정의 연구방법론 과목과 연계한다. 이에 관해서는 아래에 상술한다.

결과물 발표 과정에서는 연구의 결과를 정리하고 이를 발표하는 법을 익힌다. 실제 연구에서의 결과물 발표 과정에는 실험 설계와 진행 과정 이상의 노력이 필요하다. 발표하고자 하는 학술지 또는 학술행사를 탐색하고 양식에 맞추어 수정, 투고 및 심사를 거치는 과정은 굉장히 복잡하여 연구자가 되려는 학생은 이를 학습할 필요가 있다. 하지만, 학부 과정에서 이러한 절차와 과정을 배울 기회는 거의 없어 겨울 방학 동안의 짧은 도전을 통해 체험할 수 있을 것이다. 이는 대학원 과정의 논문 작성법 및 세미나 과목과 연계한다.

(1)연구 대상 조사

- LB 배지의 특징과 제조 방법
- 트립톤, 이스트 등, 배지 제작에 사용되는 주요 성분의 역할
- Acetobacter*속 미생물의 특징과 배양 방법

(2)실험 준비

요구 기구

Micropipette

-미생물 고체 배지의 제조

예상 요구 재료

Yeast extract, Sodium chloride, Calcium carbonate, Glucose, Agar powder

-흙과 막걸리 등을 이용한 초산균의 배양

Acetic Acid, Sodium hydroxide, Iron(III) chloride

(3)실험 과정

-고체 배지의 제조

LBA

①Tryptone 3g, Yeast extract 1.5g, Sodium chloride 3g, Agar powder 4.5g을 덜어 증류수 300mL에 희석한다.

②혼합액을 잘 섞어 고압 증기 멸균기에 넣고 20분간 멸균한다.

③혼합액을 배양 접시에 붓고 완전히 굳으면 포장하여 보관한다.

GYEC

①Glucose 15g, Yeast extract 3g, Ethanol 9mL, Agar powder 4.5g을 덜어 증류수 300mL에 희석한다.

②혼합액을 잘 섞어 고압 증기 멸균기에 넣고 20분간 멸균한다.

③혼합액을 배양 접시에 붓고 완전히 굳으면 포장하여 보관한다.

-흙과 막걸리 등을 이용한 초산균의 배양

①토양에서 채집한 흙을 계대 희석법으로 나누어 토양 샘플을 만들고 샘플에 서식하는 미생물을 배양한다.

②배양된 실험균들 가운데에 *Acetobacter* 속의 미생물이 포함된 것으로 보이는 샘플을 분리한다.

③고체 GYEC 배지를 제조하여 앞서 분리한 샘플의 배양액을 배양한다.

④배양된 배지에서 *Acetobacter*의 특징을 나타내는 미생물 군집을 선별하고 검증한다. 검증 방법에는 아세트산과 수산화나트륨, 염화철의 발색 반응을 이용하는 방법, 아세트산 특유의 식초 향을 이용하는 방법, 에탄올 또는 설탕을 소모하여 아세트산과 에너지를 만들어 내는 *Acetobacter*의 특징을 활용한 *Acetobacter*의 선별 배지를 이용하는 방법 등이 있다.

(4)실험 정리

매일 촬영한 사진과 작성된 노트, 세균 동정 의뢰 보고서를 바탕으로 지도교수의 지도하에 논문을 작성한다. 적절한 학술지를 탐색하고 나서 완성된 논문을 제출, 게재 또는 학술 행사에서 초록 발표하는 것으로 도전을 마무리한다.

4. 도전 과제 추진 일정

일 시	과제 수행 계획
2018. 12. 3.(월)~ 2018. 12. 4.(화)	관련 문헌 및 자료 조사
2018. 12. 5.(수)	미생물 배지 제작 및 표본 채집
2018. 12. 6.(목)	표본 초대배양
2018. 12. 7.(금)	미생물 선별 및 계대배양
2018. 12. 10.(월)	미생물 장기 보존 샘플 제작
2018. 12. 10.(월)~ 2018.12.14.(금)	미생물 검증 실험 진행 및 자료 정리
2018. 12. 17.(월)	논문 게재처 탐색
2018. 12. 18.(화)~ 2018. 12. 20.(목)	논문 작성 및 투고

미생물 배양 배지에 관한 정보를 습득하고 이해한다. *Acetobacter*의 배양에는 주로 GYC, GYEC, YPG, YGEA 배지 등을 사용하며, 이번 연구에 사용하고자 하는 배지에는 LB 배지와 GYEC 고체 배지가 있다.

실험에 활용되는 미생물의 특징과 배양 방법에 관한 정보를 습득하고 이해한다. 이번 연구에서 확인하고자 하는 종은 *Acetovacter pasteurianus*, *Acetobacter aceti*, *Acetobacter pomorum* 등의 아세트박터속 미생물이다. 해당 미생물들의 형태와 배양 환경, 배양에 사용되는 배지의 구성과 미생물의 검증 방법 등을 탐색한다.

GYEC 배지의 주요 구성성분으로는 Glucose, Yeast, Ethanol, Calcium carbonate가 있다. Glucose와 Yeast는 미생물의 성장에 필요한 양분으로 사용되며, Etanol은 아세트박터가 아세트산을 합성할 때 재료로 사용한다고 알려져 있다. 마지막으로 Calcium carbonate는 본래 특유의 색을 지니고 있다가 아세트산과 반응하면 고체배지가 색을 잃고 투명하게 변하도록 하므로 이를 첨가함으로써 아세트산의 생성을 눈으로 확인할 수 있다.

본 도전에서 선별하고자 하는 아세트박터는 세균, 그 중에서 그람 음성균이므로 진균류의 증식을 억제하기 위해 항진균제인 cycloheximide를 첨가하고 그람 양성균의 배양을 막기 위해 페니실린 또는 아질산나트륨 등을 사용함으로써 아세트박터 배양에 특화된 선별배지를 제작할 수 있다.

연구에 사용할 표본을 채집한다. 교내외의 땅 아래 15cm 내외 지점으로부터 흙을 극미량 채집하여 1.5mL 부피의 소형 튜브에 담고 60시간 배양한다. 이후 초산균의 선별 또는 배양 배지에 옮기고 이를 검증한다. 충분한 시간 배양한 후에 아세트산과 탄산칼슘의 반응으로 형성된 투명한 환의 크기를 측정하여 선별된 아세트박터의 아세트산 생성 능력을 가늠한다. 이외에 염화철과 수산화나트륨을 이용하여 색깔 변화를 유도하는 방법으로 아세트산 생성 능력을 가늠할 수 있다.

도전 1주일 1, 2일차에는 미생물 배양과 관련된 보편적인 지식을 학습한다. 도전 1주일 3, 4일차에는 아세트산을 생산하는 미생물의 특성과 관련 연구들을 학습한다. 도전 1주일 5일차에는 초산균의 선별을 위해 흙 샘플을 채집하여 에탄올을 포함한 막걸리에 60시간 이상 배양한다. 또, 초

산균의 선별에 필요한 미생물 선별배지를 제작하여 냉장 보관한다. 이를 통해 학부 과정에서 배우기 어렵지만, 생물학 연구의 기본이 되는 자료 조사 및 정보 수집 능력을 양성할 수 있다. 도전 2주차에는 채집한 흙 샘플 가운데에 초산 특유의 향이 나는 실험군만을 적정량 덜어내고 희석하여 미리 제작한 선별배지에 도말(spreading)한다. 24시간 이상 배양하여 겔보기에 둥글고 노란 군집을 골라내 다시 도말(streaking)한다. 48시간째에 군집 주변에 투명한 고리가 발견되는 순수한 미생물을 얻어 계대배양한 후 이를 냉동 보관한다. 배양액의 pH 변화, 염화철과 수산화나트륨을 이용한 색의 변화 관찰 등의 방법으로 분리한 미생물의 아세트산 생산 능력을 확인한다. 직접 실험을 설계하고 진행하면서 일반 종합대학에서 배우기 힘든 연구방법론을 단기간에 이수할 수 있다. 또한, 실험의 요령과 기구 사용법만 숙지하는 기존의 미생물학 실험 정규 교과목과는 달리 특정한 균주를 분리, 배양 및 검증까지 스스로 해결한다는 점에서 의의가 있다. 도전 3주차에는 연구 결과를 정리한 후 관련 주제를 다루는 학술지를 탐색한다. 연구를 바탕으로 실제 논문을 작성하고 관련된 생명공학 학술지에 투고 또는 학회 행사에서 발표하는 등 학기 중에 접할 기회가 없는 연구 실무와 절차를 이해할 수 있다.

5. 예상 소요 예산 상세 내역

-실험 재료비

Yeast extract (대정화금 500g) 41300원

Sodium chloride (대정화금 7548-4100) 6900원

Calcium carbonate (대정화금 2505-4405) 5000원

Glucose (대정화금 64220S0601) 4400원

Agar powder (덕산과학) 36450원

Bromothymol Blue (Sigma 114413-5G) 52000원

L-Glutamic acid (Sigma G1251-100G) 37000원

Memantine hydrochloride (Santa Cruz sc-203628) 60000원

(±)-α-Tocopherol (Sigma T3251-5G) 27000원

Micro Quartz Cuvette (대한과학 10mm, 700ul) 225,500원

-실험 기구

Micropipette (Gilson 2ul) 353100원

Micropipette (Gilson 10ul) 353100원

Micropipette (Gilson 100ul) 303600원

Micropipette (대한과학 1ml) 289460원

-분석 의뢰비용

16s rRNA sequencing (Cosmo Genetech 2rxn) 17000원

배송료 별도

예산 신청내역			
항 목		산출근거	금액(₩)
재료비	효모 추출물	Yeast Extract 500g 대정화금 ALL FOR LAB	41,300
	염화나트륨	Sodium chloride 500g 대정화금 ALL FOR LAB	4,400
	탄산칼슘	Calcium carbonate 500g 대정화금 ALL FOR LAB	5,000
	글루코스	Glucose 500g 대정화금 ALL FOR LAB	4,400
	한천	Agar powder 500g 덕산과학	36,450
	지시약	Bromothymol Blue 5g Sigma	52,000
	보충제	L-Glutamic acid 100g Sigma	37,000
	항생제	Memantine hydrochloride 50mg Santa cruz	60,000
	무기염류	(±)-α-Tocopherol 5g Sigma	27,000
소모품 (기구구입)	미생물 농도 확인 장비	Micro Quartz Cuvette 10mm, 700ul Daihan Scientific	225,500
	피펫 (소형)	Micropipette (2ul;10ul) Gilson	706,200
	피펫 (중형)	Micropipette (100ul) Gilson	303,600
	피펫 (대형)	Micropipette (1ml) 대한과학	289,460
실험결과물 업체 의뢰	시료 동정 및 검증	Sample sequencing (2rxn) Cosmo genetechn	17,000
인쇄비	제본	연구노트와 사진이 포함된 보고서 1부, 학회 게재 전 논문 초본 1부	30,000
합 계			1,839,310

6. 도전과 관련하여 제출할 수 있는 결과물

- 조사 문헌 요약 보고서
- 배지 제작 및 미생물 배양 과정에 촬영한 사진
- 일차별 연구 노트 사본
- 출판 논문 또는 포스터

7. 참고문헌

International Journal of Current Microbiology and Applied Science 6(9): 1255-1265

African Journal of Biotechnology 7(16): 2963-2971

Research & Review in Biosciences 8(9): 359-365

[별첨3]

DU-도전학기 서약서

소 속 :

학 번 :

성 명 :

위 본인은 DU-도전학기 과제 수행과 관련하여 아래의 내용에
대하여 서약합니다.

1. 2018년 12월부터 2019년 2월까지 DU-도전학기 활동을 성실히
수행할 것을 약속하며, 과제 수행 중 휴학 또는 자퇴할 경우
지원금 전액을 반환하겠습니다.
2. 교내 프로그램 및 타 국고사업과 동일 또는 유사한 과제로 중
복지원하지 않을 것을 약속하며, 이를 위반할 경우 DU-도전학
기 이수학점 취소 및 지원금 전액을 반환하겠습니다.

2018년 10월 30일

서약자

개인정보 수집 및 활용 동의서

소속 :

학번 :

성명 :

위 본인은 대구대학교 DU-도전학기 참여와 관련한 개인정보를 국고사업 및 각종 평가 실적, 학교 홍보 등의 자료로 활용하는데 동의합니다.

개인정보 수집 및 이용 항목	
성명, 소속, 학번, 연락처, e-mail, 도전과제 및 결과물	☒ 동의함 ☐ 동의하지 않음

*위 목적이외의 다른 용도로는 활용을 하지 않습니다.

2018 년 10 월 4 일

성명