

Coprostanol as Biomarker of Fecal Pollution in Archaeological Soil

김민희*, 서민석*, 정용재*, 김정규**, 임수길**

*국립문화재연구소, **고려대학교

Coprostanol as Biomarker of Fecal Pollution in Archaeological Soil

Min Hee Kim*, Min Seok Seo*, Yong Jae Jeong*,
Jeong Kyu Kim** and Soo Gil Leem**

*Conservation Science Division, National Research Institute of Cultural Heritage

**Korea University, Seoul, Korea

1. 서 론

동물의 배설행위는 과거에서부터 현재까지 변하지 않는 생명체의 본능 행위이다. 이런 동물들의 배설물은 농작물을 위한 퇴비로 이롭게 쓰여 지기도 하지만, 환경오염 물질로 취급되어지기도 한다. 따라서 환경오염의 평가를 위해 최근 도시하수로 인한 하천이나 해양의 오염평가물질로 분변성 물질의 생화학적 지표인자(Biomarker)인 coprostanol이 이용되어지고 있다(Writer *et al.*, 1995; Leeming *et al.*, 1996; Elhmmali, 1998; Leeming *et al.*, 2000). Coprostanol은 동물이 배출하는 분변성 sterols 중 하나로써 포유류의 장내에서 cholesterol로부터 생성되는 물질이다. 이 물질은 인간으로부터 배출되는 분변 sterols 중 약 50~80%(약 3,400 μ g/g dry weight)을 차지하며, 이 함량은 다른 육상동물보다 약 5배 이상 많은 양이다(Brown *et al.*, 1984; Writer *et al.*, 1995; Leeming *et al.*, 1996). 특히 자연환경에서 생성되지 않는 물질로써, 낮은 용해도 및 소수성으로 쉽게 용해되지 않으며, 생물학적으로 분해되기 어렵다. 또한 유기물에 쉽게 흡착하여 오랜 시간 안정적으로 환경에 존재하게 되므로 분변성 오염원을 추적하기 위해 적당한 생화학적 지표인자로서 적용되어지고 있다(최 등, 2004; Nishimura *et al.*, 1977; Writer *et al.*, 1995). 이런 특징에 따라 환경오염을

진단하는데 이용되어지고 있는 분변성 생화학적 지표인자인 coprostanol을 고고학적인 측면에서 적용하게 되면 출토되어지는 주거지 유적의 과거 사용용도를 규명 할 수 있으며, 과거 인간의 생활 패턴을 다양하게 확인할 수 있다. 따라서 생화학적 지표인자를 이용한 고대토양의 분변성 오염원에 대한 연구는 과거사의 흔적을 현대 과학기술로 밝혀내는 중요한 분야임과 동시에 고고학적 해석의 새로운 시도인 것이다.

본 연구는 국립부여문화재연구소에서 발굴중인 익산 왕궁리 유적지의 수혈유구토양을 대상으로 토양의 이화학적 및 지화학적 분석을 통해 대상 유적지 토양의 토양생성 메카니즘과 생성과정에서 관계된 고대토양의 특수성을 파악하고, 국내 처음으로 분변성 생화학적 지표인자를 이용하여 과거 인간 행위와 유적지와와의 관계를 과학적으로 증명하고자 한다.

2. 재료 및 방법

1. 시료채취

왕궁리 유적지의 대형수혈유구 단면의 토양을 토색 및 입자형태에 따라 토양 표면으로부터 깊이예 따라 A(240~250cm), B(275~285cm), C(321~331cm), D(345~355cm), E(355~365cm) 총 5지점에서 채취하였으며, 밀폐된 시료용기에 단단히 눌러 포장하고, 최적의 상태유지를 위해 -30℃이하에서 동결 보관하였다

2. 토색

토색측정은 각 층위의 토양시료를 자연 상태로 채취하여 읍지에서 munsell soil color charts에 의거 조사하였다.

3. 총 유기물 함량

본 실험의 총 유기물 함량은 작열 감량법(LOI(%); Loss on Ignition(%))을 이용하여 측정하였다. 토양시료를 105~110℃로 건조하여 토양내의 토양수분을 제거한 후 무게가 정확하게 칭량되어진 도가니에 건조된 토양시료를 2g씩 넣어 전기로에서 550℃로 1시간 30분 동안 가열시킨다. 유기물의 함량을 백분율로 나타내었다.

4. pH 측정

토양을 35℃에서 건조시켜 곱게 가루로 만든 후 2mm 체에 친 후 이 건조토양시료 5g을 100ml 비커에 취하고 증류수 25ml를 가한 후 교반시켜 25℃에서 1시간 방치

하였다. 이 후 pH 4.01과 7.01로 보정한 pH측정기(Hanna Model Hi9024C, USA)를 이용하여 토양의 pH를 측정하였다.

5. 미소부 X선 회절분석

토양시료의 광물학적 성분분석은 미소부 X선 회절분석기(Micro-area X-ray diffraction system: MXRD, MXP18VA, MAC Science, Japan)를 이용하여 분석하였다. 건조된 토양시료를 550°C 이상에서 유기물을 제거하고 분말화한 시료를 유리판에 고착한 후 각 토양시료의 광물 결정들을 알아보았다. 이때 Target은 Cu를 이용하였으며, 분석조건은 30kV, 50mA이었고, scanning speed는 4°/min이었다. 측정 후 분석 데이터는 피크 매칭(peak matching)프로그램을 이용하여 각 피크를 동정하였다.

6. X선 형광분석

토양의 지화학적 성분분석은 X선 형광분석기(Energy dispersive X-ray micro fluorescence analyzer; EDXRF, PW2404, Philips Analytical B.V)를 이용하여 분석하였다. 분석을 위해 건조된 시료분말과 Lithium Tetraborate($\text{Li}_2\text{B}_4\text{O}_7$)를 1:10으로 혼합한 후 1200°C에서 30분간 가열하여 glass bead를 제작하였다. 제작된 glass bead는 로듐(Rh) target으로 주원소의 함량을 구하였다.

7. Coprostanol 추출 및 분석

고대토양시료를 40~45°C의 온도로 건조시킨 후 10g를 칭량하여 DCM:MeOH(2:1, v/v) 50ml을 넣어 30분씩 3회 초음파추출 시킨 후 24시간 동안 교반을 하였다. 이 후 원심분리기를 이용하여 3500rpm으로 30분 동안 원심 분리하였다. 위의 과정을 3회 반복하여 토양 내 지질을 충분히 추출시켰다. 추출물은 회전감압농축기를 이용하여 감압 농축 건고시켰으며 5M KOH(in MeOH 90%)를 첨가하여 70°C에서 3시간동안 중탕하여 가수분해하였다. 이 후 5M HCl로 pH 3~4가 되도록 한 후 증류수 10ml를 첨가하여 가수분해를 종결시켰다. 각 시료의 추출물에 chloroform 10ml씩을 넣어 잘 혼합하여 원심분리기를 이용하여 수용액층과 용매층을 분리시켰다. 용매층은 Na_2SO_4 컬럼으로 수분을 제거한 후 N_2 gas로 건고시켰다. 건고되어진 잔류물은 n-hexane 2ml을 넣어 총 지질을 추출하였다(안 등, 2003). 추출되어진 총 지질에서 sterols을 분리정제하기 위해 먼저 3ml 미니컬럼에 크로마토그래피용 실리카겔을 1g을 충전 한 후 n-hexane 6ml을 가하여 활성화시켰다. 이 컬럼에 n-hexane 2ml에 녹여진 추출물을 넣은 후 n-hexane 3ml, n-hexane/DCM(9:1, v/v) 1.5ml, DCM 2ml를 순차적으로 흘려 hydrocarbons, aromatics, ketones를 제거하였다. 이 후 DCM:MeOH(1:1, v/v) 3ml

를 용리시켜 sterols을 포함하는 alcohol을 분리 추출하였다. 건고되어진 sterols에 BSTFA((N,O-bis(trimethylsilyl)trifluoroacetamide)-1%(v/v)TMCS(trimethylsilylchloride), Pierce Chemical Co.) 100 μ l을 첨가하여 뚜껑을 확실히 닫은 후 60 $^{\circ}$ C에서 15분 동안 증탕하여 TMS(trimethylsilyl) 유도체화 하였다. 이 과정을 마친 후 1ml Hexane을 넣어 GC/MSD분석을 위한 전처리 과정을 마쳤다(Bethell *et al.*, 1994). Coprostanol은 GC/MSD(Gas Chromatography/Mass Selective Detector; Agilent 6890/5973i, USA)를 이용하였으며 선택적 이온은 m/z 257, 355, 370이다(최 등, 2005).

3. 결과 및 고찰

왕궁리 유적지 수혈유구의 토양은 흑색에 가까운 토색과 pH 2~6의 산성토양 특성을 나타냈으며, 총 유기물 함량은 7~22%로 다량의 유기물질이 토양 내에 존재하고 있음을 확인할 수 있었다. 또한 주성분 원소의 함량에서 SiO₂의 함량은 LOI와 상반된 경향을 나타냈다. 이와 같은 결과를 종합적으로 해석해보면 유기물 함량에 따라 풍화가 진행되어 토양의 화학적 변질이 이루어짐으로써 나타나는 토양 특성으로 사료된다(Table 1, 2).

Table 1. Soil color, content of total organic matter and pH of sample soils, Wanggung ri site.

Sample	Soil color	LOI(%)	pH
A(240~250cm)	10YR2/1	22.12	2.86
B(275~285cm)	10YR4/3	7.67	3.67
C(321~331cm)	7.5YR2.5/1	17.91	4.18
D(345~355cm)	10YR2/2	7.30	4.77
E(355~365cm)	10YR3/2	6.69	5.95

왕궁리 유적지 수혈유구 토양의 생성학적 원인은 다량의 유기물이 토양 풍화작용에 큰 영향을 주는 요인으로 작용하였을 것으로 여겨진다. 또한 여기서 측정된 총 유기물 함량은 보통 토양이 함유한 토양 유기물의 함량에 비해 월등히 많은 양으로써 이는 과거 수혈유구 내에 인위적인 유기물의 투여가 있었을 가능성이 큰 것으로 보여진다. 또한 층위별 토양의 광물 조성은 전반적으로 Quartz와 Feldspars가 우세하였으며, 주성분 원소 함량이 SiO₂ 54~66%, Fe+Mg+Mn 5~6.7%의 특성에 따라 본 유적지 토양의 모재는 현무암보다는 산성암인 화강암의 특성을 보여준다(Table 2, Figure 1).

Table 2. Major element composition, Wanggung ri site, values in percentages(unit:%).

	SiO ₂	Al ₂ O ₃	Fe ₂ O ₃	TiO ₂	MnO	CaO	MgO	K ₂ O	Na ₂ O	P ₂ O ₅	LOI	Total
A	54.33	14.32	3.96	0.70	0.05	0.29	1.00	2.10	0.32	0.20	22.71	99.98
B	66.68	14.89	5.14	0.88	0.12	0.39	1.19	2.35	0.36	0.22	7.69	99.92
C	58.07	14.15	4.58	0.81	0.06	0.42	1.10	2.10	0.35	0.51	17.51	99.66
D	66.42	14.38	5.30	0.91	0.08	0.48	1.33	2.42	0.57	0.46	7.48	99.83
E	67.81	14.79	4.71	0.76	0.06	0.36	1.04	2.81	0.42	0.38	6.64	99.78



Figure 1. MXRD patterns of five soil samples from Wanggung ri site.

위 결과는 이 지역이 토양 생성학적 분류에서 성산통의 특성과 일치하는 것으로 확인되었다. 또한 각 층위별 광물학적 조성의 상대적 피크의 강도가 비슷한 패턴을 보임에 따라 모든 층위의 토양은 같은 광물의 특성을 나타낸 것으로 보인다. 즉 모재인 화강암의 풍화에 따른 토양이 과거에 쌓여진 후 교란 없이 동일한 토양화 작용을 받은 것으로 사료된다. 이 토양에 다량의 유기물 중 존재하는 분변성 생화학적 지표인자인 coprostanol을 분석한 결과, 모든 토양시료에서 0.16~1.01 μ g/g의 함량을 나타냈다 (Figure 2, 3).

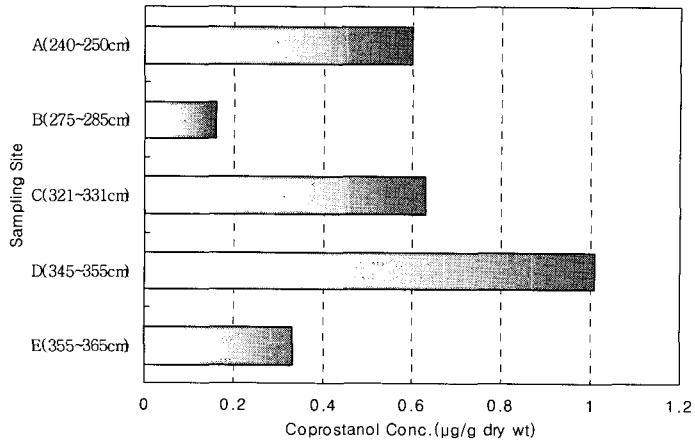
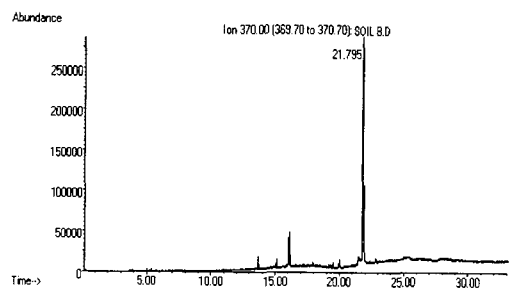
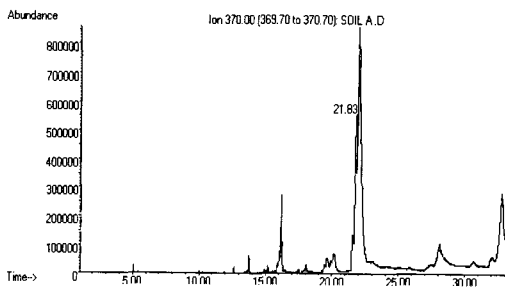


Figure 2. Concentrations of coprostanol from five soil samples collected in the site.

이는 과거 한 시점에 다량의 분변물질이 유구 내 모든 층위에 걸쳐서 매장되어 있는 것을 의미하며, 이와 같은 결과는 왕궁리 유적지의 수혈유구가 과거 화장실의 용도로 사용되었을 가능성이 있음을 제시한다. 또한 coprostanol의 함량과 총 유기물 함량의 상관관계가 없는 것으로 보아 분변 물질과 그 밖의 유기물질이 함께 화장실 내에 투입되었을 것으로 해석되어질 수 있을 것이다. 이와 같은 연구는 생화학 지표인자를 고대 토양의 분석에 적용하여 과학적으로 고고학적인 해석을 시도하였음에 큰 의미가 있을 것이며, 앞으로 출토되는 다양한 고대토양의 과학적인 연구에 있어 필요한 기본적인 자료로 제공되어질 것으로 기대되어진다.



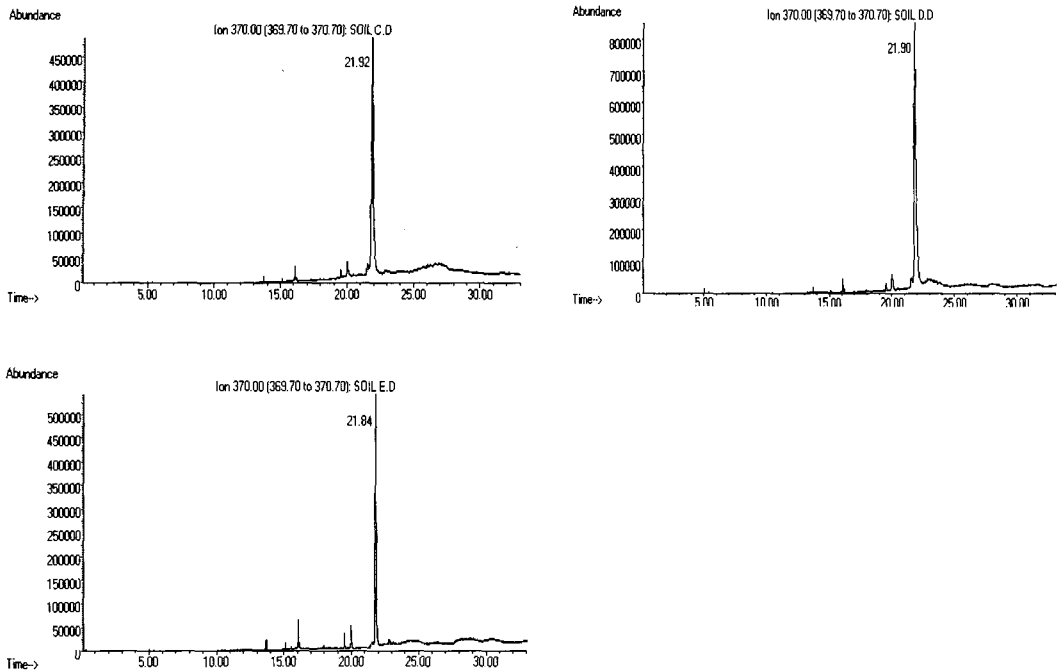


Figure 3. Ion chromatograms(m/z 370) obtained by GC/MSD/SIM analysis of sterols from soil sample.

4. 참고문헌

- 최민규, 최희구, 김상수, 문효방, 박종수. 2004. Fecal sterol을 이용한 진해만 해역에서 도시하수오염 평가. 대한환경공학회 추계학술연구발표회 논문집 546-549
- Bethell, P.H., L.J. Goad, R.P. Evershed and J. Ottaway. 1994. The study of molecular markers of human activity: The use of coprostanol in the soil as an indicator of human fecal material. *Journal of Archaeological Science* 21: 619-632
- Brown, R.C. and T.L. Wade. 1984. Sedimentary coprostanol and hydrocarbon distribution adjacent to a sewage outfall. *Wat. Res.* 18: 621-632
- Elhmmali, M.M.. 1998. Complementary Use of Bile acid and Sterols as Sewage Pollution Indicators. Ph.D Dissertation, University of Bristol 205
- Leeming, R., A. Ball, N. Ashbolt and P. Nichols. 1996. Using fecal sterols from

humans and animals to distinguish fecal pollution in receiving waters. *Wat. Res.* 30: 2893-2900

Leeming, R., R. Coleman. 2000. Bayside Drains fecal Origins Study (Sterol/Bacterial Sampling 1999-2000). CSIRO Marine Research Report No. FPP-02

Nishimura, M. and T. Koyama. 1977. The occurrence of stanols in various living organisms and the behavior of sterols in contemporary sediments. *Geochim. Cosmochim. Acta.* 41: 379-385

Writer, J.H., J.A. Leenheer, L.B. Barber, G.L. Amy and S.C. Chapra. 1995. Sewage contamination in the upper Mississippi river as measured by the fecal sterol, coprostanol. *Wat. Res.* 29: 1427-1436