

低溫 環境이 Canola 原形質膜의 Fatty Acid 構成에 미치는 影響

권성환* · Plank, D. W.* · 전희** · 김재철***
*미네소타주립대 **원예연구소 ***전북대학교 원예학과

Effect of Low Temperature upon the Fatty Acid Composition Plasma Membrane of Canola

Kwon, S.W.* · Plank, D.W.* · Chun, H.** and Kim, J.C.***
*University of Minnesota.
**National Horticultural Research Institute.
***Dept. of Hort., Chonbuk Nat'l Univ.

Abstract

Using a PEG-dextran two phase partition method, plasma and intracellular membrane separated from microsomal membrane of canola (*Brassica napus*) leaves have been fractionated by centrifugation. K^+ -ATPase specific activity in the plasma membrane (U_2 phase) of plants grown at 25°C and 10°C were 6.6 and 4.6 times, respectively that of the microsomal membrane. Plasma membrane had a lower cytochrome-c-oxidase specific activity than the microsomal membrane or intracellular membrane, while intracellular membrane (L_2 phase) had a high cytochrome-c-oxidase but little K^+ -ATPase specific activity.

The plasma membrane of canola grown at 10°C had higher 18:3 to 18:2 (linolenic to linoleic acid) ratio (29.2%) and higher degree of unsaturation than that grown at 25°C. The double bond index of plasma membrane from canola grown at 10°C increased by 8.9% relative to canola grown at 25°C. Similar, intracellular membrane increased by 19.7% at 10°C. Canola grown at 10°C was lower in chlorophyll contents (17.3%) than that grown at 25°C.

These changes in fatty acid unsaturation were attributable largely to change in C18 fatty acid, with major changes occurring in linolenic acid (18:3) which might have a physiological role of membrane to adaptation on low temperature.

키 워 드 : 카놀라, 2상분리, 원형질막, 세포내막, 미세막, 지방산, 이중결합지수
Key words : canola, two phase partition, plasma membrane, intracellular membrane, microsomal membrane, fatty acid, double bond index.

서 언

유류를 생산하는 canola는 환경의 변화에

따라서 맛과 향이 달라지며 사용할수 있는 기간도 다르기 때문에 양질의 canola를 생산하기 위해서는 적절한 환경이 조성되는 시설재

배가 요구된다. 광 및 저온 등의 환경적인 변화에 따라서 가장 먼저 일어나는 물리적 반응은 세포막의 지질구조의 변화이다^{4, 6, 19, 24}). 특히 원형질막은 외부의 환경과 세포질 내에서 일어나는 수많은 대사를 연결하는 기관으로써, 양분의 이동, 이온의 흡수, 광의 감지 및 호르몬의 수용체 등, 식물의 생장에 중요한 역할을 담당하고 있다^{6, 7, 14, 18}).

식물의 세포막을 구성하는 지질은 동물과는 달리 세포막에 당이 많이 함유된 head group을 가지고 있으며, 부적절한 환경 하에서는 desaturase에 의해서 환경에 적응할 수 있는 형태로 변화된다^{15, 16, 20}). 식물이 저온에 적응해 나가기 위해서는 세포막에 있는 포화 지방산들이 약간의 불포화 지방산으로 전환되며, 적절한 온도 이상에서 살아 갈 때는 세포막에 있는 불포화 지방산들이 감소되는 것으로 알려져 있다^{5, 7, 8, 16, 24}). Waner와 Mounts²¹)는 높은 함량의 리놀렌산을 얻기 위해 canola의 개화시기와 포트 육묘하는 동안 온도를 낮춰 재배함으로써 향기와 맛이 좋은 유류를 생산할 수 있다고 하였다. 외부 환경에 가장 먼저 자극을 받는 세포막은 세포벽 내부에 존재하기 때문에, 순수 분리가 어렵고, 특히 sucrose gradient 원심분리법을 이용하면 세포막이 변화되며, percoll을 이용하면 원형질막의 순도가 낮아지는 문제점이 있다^{9, 17, 22}).

Sucrose gradient 원심분리는 여러가지 조직의 크기와 밀도에 따라 분리할 수 있는데^{12, 17}), 이러한 방법을 통해서 Hodges등^{11, 12})에 의해 식물의 원형질막을 처음 분리하였다.

그러나 이러한 방법은 다른 세포막으로 부터 오염되기 쉽고, 고농도의 sucrose에 의해서 세포막이 파괴되기 때문에 dextrane-PEG에 의한 2상 분리가 1981년 처음 시도되었다²²). 2상분리법은 세포막 표면의 이온에 따라 분리하는 방법으로써 sucrose gradient 법보다 원형질막의 순도가 높을뿐 아니라 세포막 자체의 변화가 적기 때문에 보다 좋은 방법으로 판명되었다^{22, 23}). Widell²³)에 의하면 원형질막을 분리하기 위해서는 dextrane-PEG의 정확한 농도가 요구되는데 5°C에서 6.2-6.5%가

적정 농도라고 하였다.

Briskin등⁴)은 원형질막은 능동적 이동과 관련되어 있기 때문에 일가 이온에 의해 ATPase 활성을 나타내며, 미토콘드리아 막은 cytochrome-c-oxidase에 활성이 있는 것으로 보고 하였다^{9, 12, 13, 17}).

본 실험에서는 온도에 따른 세포막의 지질 구조에 변화를 조사하기 위해서 10°C에서 자란 canola와 25°C에서 자란 canola를 원형질막과 세포내막을 각각 분리한 후, 가스 크로마토그래피로 16:0, 16:1, 16:2, 18:0, 18:1, 18:2 및 18:3을 전개시켜 조사하였다.

재료 및 방법

1. 식물 재료

Canola 종자를 증류수에 1시간 동안 침적한 후 포트에 파종하여, 25±2°C의 성장상에 발아시킨 다음, 25±2°C의 온실과 10±2°C의 온실에 옮겨 4주간 생장시켜 실험 재료로 사용하였으며, 관수는 1/4배의 Hoagland 용액으로 매일 실시하였다.

2. 미세막 분리

40g의 엽조직을 160ml의 25mM Tris-MES, pH7.5에 0.33M sucrose, 3mM EDTA, 2.5mM DTT와 1mM PMSF의 용액에 마쇄한 후, 4장의 mesh에 여과하여 10,000×g로 15분간 원심분리 하였다. 상등액을 모아서 4°C에서 100,000×g로 1시간 동안 원심분리하여 미세막을 얻었다. 원심분리는 Beckman ultracentrifuge를 사용하였으며 swing bucket(SW-28)을 이용하였다. 침전된 미세막을 일정량의 0.33M sucrose, Tris-HCl, pH7.2 & 1mM MgSO₄, 2.5mM DTT과 1mM PMSF에 용해시킨 후 2상 분리에 시료로 사용하였다^{4, 11, 17}).

3. 원형질막 분리

Buffer에 용해된 미세막을 Hodges와 Mills¹³)

의 방법을 약간 변형하여 Table 1에서와 같이 혼합한 후 원심분리하였으며, 각 층은 6.3% (w/w) PEG-dextrane system을 사용하여 Fig. 1에서와 같이 분리하였다^{11, 12, 13}. 최종적으로

로 각층의 세포막을 모아서 homogenize buffer에 10배 희석한 후, 다시 원심분리하여 침전된 조직을 시료로 사용하였다.

Table 1. Phase mixture and phase system used in plasma membrane purification.

| Step | Phase mix | Phase system |
|---------------------------------------|-----------|--------------|
| 20% (w/w) Dextrane T-500 | 8.93g | 93.00g |
| 40% (w/w) PEG-3350 | 4.46g | 46.50g |
| Sucrose | 2.44g | 33.89g |
| 0.2 M Tris-HCl, pH7.6 | 0.54ml | 7.50ml |
| 2M NaCl | 0.03ml | 0.45ml |
| Add H ₂ O to final weight: | 21.60g | 300.00g |
| Microsomal membrane | 7.20g | - |

4. 단백질 및 엽록소 함량 측정

단백질량은 Bradford 방법을 이용하여 정량하였으며, 표준으로는 BSA를 사용하여 700nm에서 측정하였다³. 엽록소는 엽조직을 80% 에칠 알콜에서 마쇄한 후 여과하여 665nm에서 Sochanowicz와 Kaniuga¹⁹) 방법으로 조사하였다.

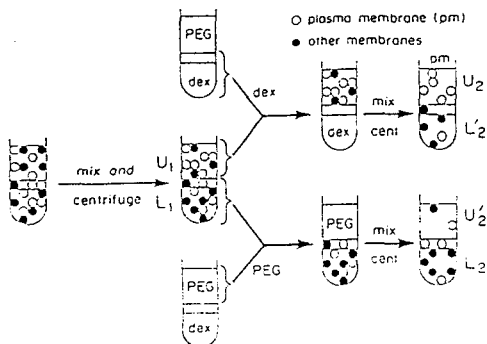


Fig. 1. Schematic diagram of the aqueous polymer partition method in a dextran-PEG (from Hodges and Mills¹³, 1986). U, upper phase; L, lower phase.

5. Marker Enzyme 측정

a) K⁺-dependent ATPase.

전체 1ml 용액 내에 3mM ATP, 3mM MgSO₄ 및 30mM Tris-HCl, 공통적으로 첨가하여 pH를 7.4로 맞춘 후 Brisikin 등⁴)의 방법에 의해서 50mM KCl과 준비된 효소액을 선택적으로 혼합하여 37°C water bath에서 1시간 반응시킨 다음¹²), KCl에 의해 유리된 무기인산을 Ames¹¹) 방법으로 측정하였다.

K⁺에 의해서 유리된 무기인산을 10% ascorbic acid와 0.42% ammonium molybdate를 1N H₂SO₄에 녹여 1:6(v/v)로 혼합한 후, 반응시킨 상기 용액과 7:3으로 혼합하여 실온에서 30분간 반응시킨 다음 700nm에서 측정하였다.

b) Cytochrome-c-oxidase.

Cytochrome c는 화학적으로 sodium dithionite에 의해 환원된다. 전체 용액 3ml 내에 0.1ml 효소액과 0.1ml의 0.3% digitonin, 2.7ml의 50mM phosphate, pH 7.2를 넣고, 마지막으로 cytochrome c를 첨가하여 550nm 흡광도에서 Hodges와 Leonard¹²) 방법으로 조사하

였다.

6. 지방산 분석

원형질막과 다른 세포막에 chloroform:methanol(2:1) 1ml를 첨가한 후 0.2ml의 0.74% KCl를 넣어 원심분리하였다. 이때 아래 층을 Folch¹⁰⁾용액으로 3회 세척하였다. 세척된 phase는 N₂ 가스에 건조시킨 후 chloroform을 넣어 용해시킨 다음, 다시 N₂ 가스에 건조시켰다. 건조된 시료는 10%(w/v) BCl methanol을 첨가하여 끓는 물에 90분간 methyl 에스터화하였다. Methyl 에스터화 된 것을 penten을 이용하여 지질을 추출한 후, 건조시켜 chloroform에 용해한 다음, -80°C에 보관하면서 가스 크로마토그래피에 주입하였다. Packard 가스 크로마토그래피에 10% SP-2330 Supelco column을 부착하여 flame ionization detector를 사용하였다. N₂ 가스를 매개로 하여 입구의 온도는 250°C, detector는 200°C, column은 210°C, 처리시간은 25분으로 하였다⁴⁾. 전체 지방산 중 불포화 지방산을 만들어 2중결합 지수로 표시하였으며 linoleic:linoleic비율을 함께 3반복으로 하여 조사하였다.

결과 및 고찰

1. 원형질막의 분리

Canola 잎의 미세막에서 6.3% dextrane-PEG를 이용하여 원형질막과 세포내막을 분리하였으며, 각각의 marker 효소 활성은 Table 2에 나타나 있다. 원형질막은 다른 세포막(mitochondria, tonoplast 등과 구조가 다르기 때문에 enzyme marker를 이용하여 확인할 수 있다^{4, 13, 22)}. 특히 K⁺ 이온은 ATPase에 의하여 원형질막 내의 세포질에 들어 가기 때문에 원형질막에서 K⁺-ATPase의 활성이 높다. 각 층에 있는 세포막을 채취한 후, buffer에 용해하여 K⁺-ATPase와 cytochrome-c-oxidase

의 활성을 측정한 결과, PEG 층에 있는 원형질막은 ATPase활성이 높은 반면, dextrane 층에 있는 세포내막은 cytochrom-c-oxidase의 활성이 높게 나타났다(Table 2). 미세막의 특이활성도는 10°C에서 자란 것은 0.42, 25°C에서 생장한 것은 0.44로서 25°C에서 자란 canola가 약간 높았다. 상층(U₂)에 있는 원형질막의 K⁺-ATPase의 특이활성도는 10°C와 25°C에서 각각 1.93과 2.91로서 활성은 미세분획에 비하여 4.60배, 6.61배 증가되는 현상을 보였다. U₂'층에서도 U₂층에 비하여 활성은 낮았으나 미세막보다는 높은 경향이였다. 이것은 U₂층에서 더 많은 원형질막이 존재하기 때문으로 사료된다⁴⁾. 그러나 세포내막이 존재하는 하층(L₂)에서는 0.10, 0.13으로서 미세분획보다 K⁺-ATPase 특이활성도가 낮았다.

Cytochrom-c-oxidase 특이활성도는 미세분획 중 25°C에서 생장한 것은 1.29, 10°C에서 1.10, 원형질막에서는 25°C와 10°C에서 각각 0.98, 0.73으로 미세분획에 비하여 감소되었다. 그러나 세포내막에서는 특이활성도가 1.35와 1.21으로서 증가되는 현상을 보였다. 원형질막이 세포내막에 비하여 K⁺-ATPase가 높고 cytochrom-c-oxidase가 낮은 현상은 Hodges와 Leonard¹¹⁾의 결과와 유사한 경향이였다.

2. 지방산 분석

지방의 합성은 색소체와 소포체에서 일어나며, 세포막의 지방산의 변화는 엽록체막 내의 광전자 이동 등 생리적으로 중요한 역할을 하고 있다^{2, 6, 7, 20)}. 엽록소의 함량은 10°C에서 자란 canola가 73.8 mg/cm²로서 25°C에서 자란 것보다 17.3%가 감소되었다(Table 3).

기후 조건에 따라서 지방산의 구성이 변화되는데 이러한 원인은 부적절한 환경에 적응하기 위하여 선행적으로 요구되는 것으로 알려져 있으며^{5, 7, 8, 16, 20, 24)}, 고유의 불포화 지방산들은 저온에 견디기 위해서 기능적으로 중요한 역할을 하고 있다^{6, 7, 16, 24)}. Canola의 미세

Table 2. Protein and marker enzyme activities of microsomal plasma and intracellular membranes from canola leaf cell membrane obtained by two phase partitioning.

| Fraction | Total Protein | | K ⁻ -ATPase | | | Cytochrome C oxidase | | | | |
|---|---------------|------|------------------------|------|------|----------------------|-------|------|-------|------|
| | 10°C | 25°C | 10°C | S. P | 25°C | S. P | 10°C | S. P | 25°C | S. P |
| | (mg) | | (Unit) | | | (Unit) | | | | |
| Microsomal Fraction | 18.6 | 17.2 | 7.85 | 0.42 | 7.58 | 0.44 | 20.46 | 1.10 | 22.19 | 1.29 |
| Plasma Membrane(U ₂) | 1.5 | 1.2 | 2.94 | 1.93 | 3.49 | 2.91 | 1.10 | 0.73 | 1.18 | 0.98 |
| Plasma Membrane(U ₂ ') | 1.2 | 0.8 | 1.96 | 1.63 | 1.50 | 1.88 | 0.72 | 0.60 | 0.72 | 0.90 |
| Intracellular Membrane(L ₂) | 11.2 | 10.3 | 1.10 | 0.10 | 1.35 | 0.13 | 13.55 | 1.21 | 13.91 | 1.35 |

막의 지방산은 Fig. 2에서 보는 바와 같이 주로 16:0, 16:1, 16:2, 18:0, 18:1, 18:2 및 18:3으로 구성되어 있었다. Oleic(18:1)과 linolenic(18:3)은 10°C에서 성장한 canola가 25°C에서 성장한 것에 비하여 원형질막과 세포내막에서 모두 높게 나타났으며, 특히 linolenic(18:3)이 많은 변화를 보였다. 또한 18:3/18:2로도 10°C에서 자란 canola가 25°C에서 자란 것에 비하여 29.2% 더 높게 나타났다. Browse와 Slacks⁵⁾에 의하면 safflower가 32°C

에서 자란 것보다 13°C에서 자란 것이 불포화 지방산 증가되는 현상을 보였으며, 이때 증가된 것은 주로 linolenic이었다. 또한 리롤렌산은 고온에서 성장 할 때는 그 함량에 적지만 저온에서 성장시 환경에 적응하기 위해 세포막 내에 고율의 18:3을 함유하게 된다고 하였다. 본 실험에서도 10°C에서 성장한 것의 리롤렌산이 25°C에 비하여 원형질막(U₂ phase)은 21.7%, 세포내막(L₂ phase)에서는 32.3%가 더 증가되는 현상을 보였다(Fig. 2).

Table 3. Effect of temperature on chlorophyll content, 18:3 to 18:2 ratio and double bond index of canola grown at 10°C and 25°C in greenhouse.

| | Temperature | |
|----------------------------------|-----------------------|-----------|
| | 10°C | 25°C |
| Chlorophyll(mg/cm ²) | 73.8±1.9 ^a | 89.2±2.1 |
| Total double bond index | | |
| • Plasma membrane | 159.9±8.4 | 146.8±6.5 |
| • Intracellular membrane | 173.1±9.2 | 144.5±8.8 |
| 18:3/18:2 ratio | | |
| • Plasma membrane | 2.92±0.15 | 2.26±0.20 |
| • Intracellular membrane | 4.03±0.34 | 2.30±0.17 |

^aMeans and standard errors of means.

2중결합지수는 불포화 지방산의 전체 무게로 추정할수 있는데¹⁹⁾, Table 3에서 보는 바와 같이 원형질막(U₂ phase)의 2중결합지수는 10°C에서 159.9, 25°C에서 146.8로서 저온에서 자란 것이 8.9% 더 증가 되었으며, 세포내막에서도 19.7% 증가되는 현상을 보였다. 이와 같이 원형질막이 세포내막에 비하여 불포화 지방산으로 전환되는 비율이 적은 것은 저온에 적용할 수 있는 어떤 구조 또는 인자를 가지고 있는 것으로 사료된다.

또한 저온에서 세포막 내의 불포화 지방산들이 증가된 것은 palmitic 및 steric 등의 포화 지방산을 유연성을 가진 불포화 지방산으로 변화하기 때문으로 추정된다.

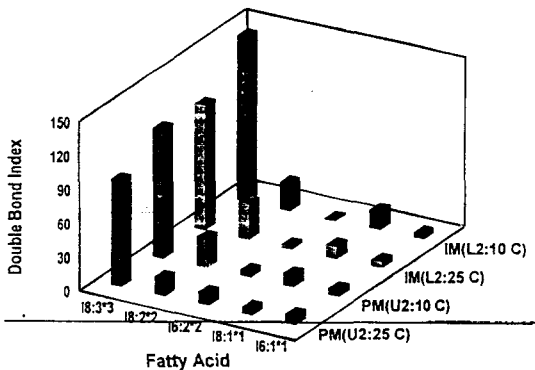


Fig. 2. Double bond index (DBI) of fatty acids of canola grown at 25°C and 10°C. (PM, plasma membrane; IM, intracellular membrane)

적 요

Canola(*Brassica napus*) 엽에서 추출한 미세막으로 부터 PEG-dextran 2상분획법을 이용하여 세포막과 세포내막을 분리하였다. U₂ 상에 있는 원형질막의 K⁻-ATPase의 특이활성도가 미세막에 비하여 25°C에서 자란

canola는 6.6배, 10°C에서 4.6배 각각 증가되었다. 원형질막(U₂)은 미세막이나 세포내막(L₂) 보다 cytochrome-c-oxidase 활성이 적게 나타난 반면, 세포내막에서는 K⁻-ATPase의 특이활성도가 가장 적게 나타났다.

10°C에서 성장한 canola의 18:3/18:2 률은 25°C보다 29.2% 더 높게 나타났다. 원형질막의 2중결합지수는 10°C에서 성장한 canola가 25°C에서 성장한 것보다 8.9% 더 증가되었으며 세포내막에서도 같은 경향으로써 10°C에서 19.7% 더 증가되는 현상을 보였다. 또한 엽록소 함량은 10°C에서 성장한 것이 25°C에 비하여 17.3% 낮았다.

Canola가 저온에서 성장시 주로 C₁₈ 지방산들이 변화되어, 세포막 내에 불포화 지방산이 많았으며, 그중에서도 리놀렌산(18:3)이 크게 변화되는 현상을 보였다. 이러한 변화는 생리적으로 canola의 세포막이 저온에 살아가기 위한 하나의 수단으로 추정된다.

인용문헌

1. Ames, B. N. 1987. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. *Methods in Enzymology*. 8:115-118.
2. Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts polyphenol oxidase in Beta Vulgaris. *Plant Physiology*. 24:1-15.
3. Bollag, D. M. and S. J. Edelstein. 1991. *Protein Methods*. Wiley-Liss, Inc. 50-55.
4. Briskin, D. P., R. T. Leonard, and T. K. Hodges. 1987. Isolation of the plasma membrane: Membrane markers and general principles. *Methods in Enzymology*. 148:542-568.
5. Browse, J. and C. R. Slack. 1983. The

- effect of temperature and oxygen on the rates of fatty acid synthesis and oleate desaturation in safflower(*Carthamus tinctorius*) seed. *Biochemica et Biophysica Acta*. 753:145-152.
6. Diepenbrock. 1981. Effect of light, temperature and nitrogen treatments upon the fatty acid composition of galactolipids of young and older leaves from winter rape plants. *Physiology Plant*. 52:1-6.
 7. Dipenbrock and P. Stamp. 1982. The fatty acid composition in leaves of maize (*Zea may L.*) seedling in relation to genotype and temperature changes. *Angew Botanik*. 56:25-33.
 8. Evans, D. E., J. P. Sang, X. Cominoz, N. E. Rothine, and R. B. Knox. 1990. A study of phospholipids and galactolipids in pollen of two lines of *Brassica napus L.*(Rapeseed) with different ratios of linoleic to linolenic acid. *Plant Physiology*. 92:418-424.
 9. Faraday, C. D. and R. M. Spanwick. 1992. Maize root plasma membranes isolated by aqueous polymer two phase partitioning: Assessment of residual tonoplast ATPase and pyrophosphate activities. *Journal of Experimental Botany*. 43(257):1583-1590
 10. Folch, J. M., M. Lees and G. H. S. Stanley. 1957. A simple method for the isolation of total lipid from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*. 26:497-501.
 11. Hodges, T. K., R. T. Leonard, C. E. Bracker and T. W. Keenan. 1974. Purification of an ion stimulated adenosine triphosphatase from plant roots: association with plasma membranes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 69:3307-3311.
 12. Hodges, T. K. and R. T. Leonard. 1974. Purification of plasma membrane bound adenosine triphosphatase from plant roots. *Methods in Enzymology*. 32:392-406.
 13. Hodges, T. K. and D. Mills. 1986. Isolation of the plasma membrane. *Methods in Enzymology*. 118:41-54.
 14. Linnemeyer, P. A., E. V. Volkenburgh and R. E. Cleland. 1990. Characterization and effect of light on the plasma membrane H^+ -ATPase of bean leaves. *Plant Physiology*. 94:1671-1676.
 15. Markhart III, A. H., M. M. Peet, N. Sionit and P. J. Kramer. 1982. Low temperature acclimation of root fatty acid composition, leaf water potential, gas exchange and growth of soybean seedling. *Plant, Cell and Environment*. 3:435-445.
 16. Matsuo, T., S. Ide, and M. Shitida. 1992. Correlation between chilling sensitivity of plant tissues and fatty acid composition of phosphatidylglycerols. *Phytochemistry*. 31(7):2289-2293.
 17. Pierce, W. S. and D. L. Hendrix. 1979. Utilization of enzyme markers to determine the location of plasma membrane from *Pisum epicotyls* on sucrose gradient. *Planta*. 146:161-169.
 18. Ray, P. M. 1977. Auxin-binding sites of maize coleoptiles are localized on membranes of endoplasmic reticulum. *Plant Physiology*. 59:594-599.
 19. Sochanowicz, B. and Z. Kaniuga. 1979. Photosynthetic apparatus in chilling-sensitive plant. *Planta*. 144:153-159.
 20. Somerville, C., and J. Browse. 1991. Plant lipids: Metabolism mutants

- and membranes Science. 252:80-87.
21. Warner, K. and T. L. Mounts. 1993. Frying stability of soybean and canola oil with modified fatty acid compositions. Journal of American Oil Chemists, Society. 70(10):983-988.
22. Widell, S. and C. Larsson. 1981. Separation of presumptive plasma membranes from mitochondria by partition in an aqueous polymer two phase system. Physiol. Plant. 51:368-374.
23. Widell, S. 1987. Purification of plasma-lemma with aqueous polymer two phase partition. Physiol. Plantarum. 69:727-730.
24. Yaniv, Z., R. A. Levy and D. Palenitch. 1989. Effect of temperature on the fatty acid composition and yield of evening primrose (*Oenothera lamarkiana*) seeds. Journal of Experimental Botany. 40 (214):609-613.

학 회 광 고

한국생물생산시설환경학회에서는 본 학회의 취지에 찬동하는 개인 및 단체(구독, 찬조)회원을 아래와 같이 접수하고 있사오니 많은 참여를 바랍니다.

- 아 래 -

1. 회원가입접수 : 수시접수
2. 회원가입방법 : 학회지에 삽입된 입회원서에 기재
3. 회비(입회비) : 정회원 10,000원(준회원은 제외)
(년회비) : 정회원 20,000원, 준회원 10,000원
구독회원 40,000원, 종신회원 200,000원
찬조회원 1구좌 이상 「1구좌 150,000원」
4. 접 수 처 : 본 학회 사무국