

## 감마선에 대한 고구마 Peroxidase 형질전환 담배식물체의 반응

윤병욱 · 이행순 · 권석윤 · 김재성<sup>1</sup> · 박상수\*

생명공학연구소 식물세포공학연구실, <sup>1</sup>한국원자력연구소 동위원소 · 방사선응용연구팀

### Responses of Transgenic Tobacco Plants Expressing Sweet Potato Peroxidases to Gamma Radiation

YUN, Byung-Wook · LEE, Haeng-Soon · KWON, Suk-Yoon · KIM Jae-Seung<sup>1</sup> · KWAK Sang-Soo\*

Plant Cell Biotechnology Laboratory, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,

P.O. Box 115, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea

<sup>1</sup>RI · Radiation Application Research Team, Korea Atomic Energy Research Institute,

P.O. Box 105, Yusong, Taejeon, 305-600, Korea

**ABSTRACT** Transgenic tobacco plants expressing either a sweet potato anionic peroxidase (POD) (*swpa1*) or neutral POD (*swpn1*) were irradiated by gamma radiation, and the gamma radiation-induced biochemical changes in antioxidant enzymes and plant growth inhibition were investigated at 30 days after treatment. Gamma radiation significantly inhibited the growth of all plants regardless of transgenic or nontransformed plants, showing a dose-dependent inhibition. In high dosage of 50 and 70 Gy, plant heights were severely retarded and new leaves does not emerged. No significant changes in antioxidant enzymes such as POD, superoxide dismutase and catalase were observed in all plants regardless of irradiation dosages ranging from 10 to 50 Gy. These results suggest that sweet potato PODs may be not involved in the protection against the oxidative stress induced by gamma radiation.

**Key words:** Antioxidant enzyme, catalase, growth inhibition, *Ipomoea batatas*, *Nicotiana tabacum*, superoxide dismutase

## 서 론

식물은 각종 환경스트레스에 노출되면 생체내 산소 (O<sub>2</sub>)는 유해한 활성산소종 (reactive oxygen species, ROS)으로 변환되어 산화적인 스트레스 (oxidative stress)를 유발하여 식물이 질병에 감염되기 쉽거나, 노화가 촉진되며 심할 경우는 고사하게 된다 (Alscher and Hess 1993; Asada 1999). 생체는 ROS의 피해로부터 자신을 보호하기 위하여 superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD), catalase (CAT) 등의 다양한 종류의 항산화효소와 ascorbate,  $\alpha$ -tocopherol, glu-

tathione 등의 저분자 항산화물질을 생산한다 (Alscher and Hess 1993).

산화적인 스트레스를 유발할 수 있는 스트레스원은 생물학적 스트레스, 미생물학적 스트레스 등 매우 다양하다. 지금까지 오존, 산성비, 자외선, 화학물질 등이 식물 또는 식물세포에 생장과 항산화기구에 미치는 영향에 대한 연구는 비교적 많다. 또한 감마선을 포함한 방사선이 생체에 ROS를 과다하게 생성하여 방사선장해를 유발하여 인체에 치명적인 피해를 주고 있음은 잘 알려져 있다 (Kergonou et al. 1987; Hall 1988; Dubner et al. 1995). 방사선은 식물종자의 발아율 증가, 돌연변이체 유도, 식품멸균 등 다양한 용도로 식물분야에 이용되고 있으나, 방사선이 식물의 항산화기구에 미치는 영향에 대한 연구는 매우 미흡하다 (Sah et al. 1996).

한편, 식물배양세포는 높은 배양스트레스 특히 산화적인 스

\*Corresponding author. Tel 042-860-4432

E-mail sskwak@mail.kribb.re.kr

트레스 조건에서 배양되기 때문에 항산화기구의 해석과 항산화물질의 탐색연구에 좋은 소재가 될 수 있다. 저자들은 배양 세포가 지닌 배양특성에 착안하여 100여 종의 배양세포주를 대상으로 항산화활성을 조사하여, POD 고생산 세포주로 고구마 배양세포주를, SOD 고생산세포주로 카사바와 토마토 배양세포주를 선발하여 효소의 생산, 유전자 탐색 및 항산화기구 연구에 이용하고 있다 (Kim et al. 1994; You et al. 1996, 1997; Huh et al. 1997; Kim et al. 1999; Lee et al. 1999a).

특히 고구마 배양세포는 POD의 대량생산에 적합한 세포일 뿐 아니라 환경스트레스 관점에서 POD 동위효소 (isoenzyme)의 생리적인 기능을 규명하기에 매우 좋은 세포주임이 확인되고 있다 (Kwak et al. 1995, 1996; Huh et al. 1997; Kim et al. 1999; Yun et al. 1999). 고구마 배양세포에서 분리한 POD cDNA (산성 POD인 swpa1, swpa2, swpa3와 중성 POD인 swpn1)들은 배양세포에서 강하게 발현되며, 고구마 식물체 앞에는 발현되지 않지만, 상처 (wounding), 저온, 오존를 처리하면 유전자간에 발현의 정도는 차이가 있지만 대부분의 경우 강하게 발현되었다 (Huh et al. 1997; Kim et al. 1999). Swpa1과 swpn1을 각각 도입한 형질전환 담배 식물체의 잎절편과 식물체에 methyl viologen (MV)를 처리한 결과, swpa1를 도입한 식물체에서 내성을 나타내었지만, swpn1 식물체에는 비형질전환식물과 마찬가지로 피해를 나타내었다 (Kwak and Yun, 1998; Yun et al. 1999).

본 연구에서는 방사선이 식물 POD에 미치는 생리적인 역할을 규명하기 위하여 고구마 배양세포에서 분리한 POD 유전자 (swpa1과 swpn1)를 발현하는 형질전환 식물체에 감마선을 처리하여 항산화효소 활성의 변화와 식물의 생장에 미치는 영향을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 식물재료

본 실험에 사용한 POD 형질전환 담배식물체는 Huh 등 (1998)이 고구마 배양세포에서 분리한 산성의 POD cDNA (swpa1) 또는 중성의 POD cDNA (swpn1)를 *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404를 매개로 담배 (*Nicotiana tabacum* cv. Bel W3)에 도입한 식물체로부터 채종한 종자를 발아시켜 얻은 T1세대의 것이다. Swpa1을 발현하는 담배 식물체 (이하 swpa1 식물체라 함)와 swpn1 식물체의 종자를 kanamycin 150 mg/L을 함유한 MS (Murashige and Skoog, 1962) 기본 배지에서, 비형질전환 식물체 (nontransformed plant, NT 식물체)는 MS 기본배지에서 발아시킨 후, 16시간 광과 8시간 암주기의 25°C 조건에서 약 2주간 배양하였다. 배양 후 생장이 양호한 유식물체를 선발하여 화분으로 옮겨 온

실에서 6주간 생장시킨 후 감마선처리에 사용하였다.

### 감마선 처리

방사선에 대한 POD 형질전환식물체 및 NT 식물체의 반응 특성을 조사하기 위하여 한국원자력연구소가 보유하고 있는 코발트 60 ( $^{60}\text{Co}$ )의 감마선시설을 이용하였다. 감마선의 처리는 방사선 발생중심지로부터 거리별로 식물체를 배치하여 3시간 동안 방사선을 조사하였을 때 0, 10, 30, 50, 70 Gy의 세기가 되도록 하였다.

### 조효소액의 추출

담배 식물체 잎 생중량 0.5 g을 0.05 M 인산 완충액 (pH 7.0) 0.5 mL과 함께 얼음위의 막자사발에서 마쇄한 후 14,000 rpm로 10분간 원심분리하여 얻은 상등액을 조효소액으로 사용하였다. 단백질정량은 BSA를 표준단백질로 사용한 Bradford (1976)의 방법에 따라 측정하였다.

### 항산화효소 활성측정

SOD 활성은 McCord와 Fridovich (1969)의 방법에 따라 xanthine, xanthine oxidase (XOD)와 cytochrome c를 이용하여 측정하였다. 효소측정을 위한 반응액 [10 mM xanthine 2.5 mL, 10 mM cytochrome c 0.5 mL, 0.1 mM EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액 (pH 7.8) 47 mL의 혼합액]은 매번 조제하여 사용하였다. 반응액중 cytochrome c의 농도를 일정하게 유지하기 위하여 반응액을 만든 후 sodium dithionite로 매회 보정하였다. 상기 반응액 1 mL과 효소액 (10  $\mu\text{L}$  전후)을 큐벳에 넣은 후  $10^{-4}$  M EDTA를 포함한 0.05 M 인산완충액 (pH 7.8)으로 25배 희석한 XOD 10  $\mu\text{L}$ 를 첨가하여 효소반응을 시작하였다. 효소활성의 1 단위 (unit)는 25°C에서 2분간 반응하여 550 nm에서 흡광도변화를 조사하여 XOD 활성이 50% 억제된 것으로 정의하였다.

POD 활성은 pyrogallol를 기질로 사용한 Sigma사의 방법에 따라 측정하였다. 배양세포 조효소액 100  $\mu\text{L}$ 를 3 mL cuvette에 넣고 0.1 M 인산완충액 (pH 6.0) 0.32 mL, 0.147 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  0.16 mL, 5% pyrogallol 용액 0.32 mL과 증류수 2.1 mL을 함께 섞은 후, 420 nm에서 20초간 상온에서 흡광도 변화를 측정하여 구하였다. UV 측정시 반응액의 흡광도가 0.4~0.7이 되도록 조효소액을 희석하여 효소활성을 측정하였다. POD 활성은 다음의 식으로부터 구하였다. POD 활성 (unit/g 건물중) =  $[(\Delta A_{420}/20 \text{ sec}) \times (\text{희석배율})]/(12^* \times \text{g 시료/mL 반응액})$ . 여기서  $12^*$ 는 420 nm에서의 흡광계수이다.

CAT 활성은 기질인  $\text{H}_2\text{O}_2$ 의 감소량을 측정하는 방법 (Aebi, 1984)을 사용하였다. 효소측정을 위한 반응용액은 0.053 M  $\text{H}_2\text{O}_2$  1 mL, 효소액 0.1 mL, 0.05 M 인산완충액 (pH

7.0) 1.9 mL의 혼합액으로 하여, 효소활성은 cuvette내에서 효소에 의한 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 분해를 240 nm의 흡광도 감소를 1분간 측정하여 다음의 식으로 계산하였다. CAT 활성 (unit/g 건물중) =  $(\Delta A_{240}/\text{min} \times \text{희석배율}) / (2 \times 43.6^*)$ . 여기서 43.6\*은 240 nm에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 흡광계수이다.

## 결과 및 고찰

### 감마선 처리에 의한 형질전환 식물체의 항산화효소 활성

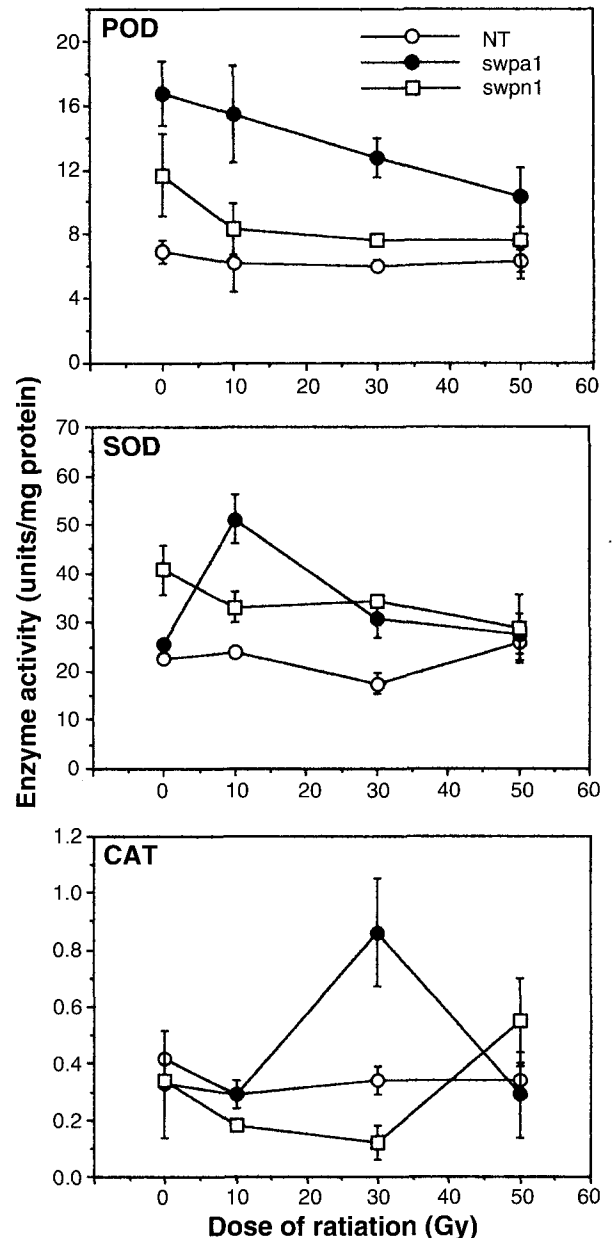
감마선을 처리한 swpa1 형질전환식물체 (이하 swpa1 식물체로 약함)와 swpn1 형질전환식물체 (swpn1 식물체) 및의 POD 활성은 비형질전환식물체 (NT 식물체) (6.8 units/mg protein)에 비하여 각각 약 2.5배와 1.7배가 높았다 (Figure 1).

Swpal 식물체, swpn1 식물체와 NT 식물체에 감마선을 처리한 후, 30일에 처리된 잎의 항산화효소활성을 조사한 결과, 감마선은 처리한 선량범위에서는 항산화효소와 식물체 종류에 따라 약간의 상이한 결과를 나타내었으나, 항산화효소 활성에는 큰 영향을 미치지 않았다. 감마선 처리에 의한 swpa1 식물체의 POD 활성은 조사량에 비례하여 직선적으로 감소하여, 50 Gy 처리에서는 무처리 (0 Gy)의 활성 (16.8 units/mg protein)에 비해 약 60%의 활성만 나타내었다 (Figure 1). swpn1 식물체는 10 Gy에서 POD 활성은 감소된 후, 그 이상의 선량에서는 일정한 값을 유지하였고, NT 식물체는 모든 선량에서 영향을 거의 받지 않았다. 한편 70 Gy에서는 식물체가 지나치게 피해를 입어, 잎으로부터 효소액을 조제할 수 없었다. 이러한 결과는 산화적 스트레스원으로 methyl viologen (MV)이나 오존을 처리하였을 때 나타나는 POD 활성의 증가 (Yun 1998; Yun et al. 1999)와는 대조적인 것으로, 감마선은 MV나 오존 스트레스와는 다른 작용을 가짐을 시사하는 것이다.

SOD 활성은 감마선처리에 의해 swpn1 식물체와 NT 식물체는 거의 영향을 받지 않았으며, 50 Gy 처리에서 거의 같은 활성 (20-35 units/mg protein)을 나타내었다 (Figure 1). Swpa1 식물체에서 SOD 활성은 10 Gy 처리에서 약 2배 증가 하였으나, 30 Gy 이상의 조사선량에서 원래의 값으로 회복하여 50 Gy 처리에서는 swpa1 식물체와 NT 식물체는 거의 같은 활성을 나타내었다. CAT 활성은 감마선처리에 의해 NT 식물체는 거의 영향을 받지 않았으나, swpa1 식물체는 30 Gy에서 약 2.9배 활성이 증가한 후, 50 Gy에서 원래의 활성으로 회복하였다. 이에 비하여 swpn1 식물체는 30 Gy까지는 CAT 활성이 서서히 감소한 후 50 Gy에서는 오히려 무처리에 비하여 활성이 약간 증가하였다.

이상과 같이 감마선 조사량에 따라 식물의 생장 및 형태에 큰 차이를 나타내는 처리후 30일째의 결과는 처리후 초기에

조사한 항산화효소 활성의 변화와 거의 같은 경향을 나타내었다 (결과 미제시). 또한 감마선은 조사한 항산화효소 isoenzyme의 질적인 변화에는 차이를 나타내지 않았다 (결과 미제시). 감마선이 식물체에 작용하는 정확한 기작은 알려져 있지 않으나, 고에너지를 가지고 있기 때문에 세포내 물분자의 산소-수소결합을 끊어 hydroxyl radical ( $\cdot\text{OH}$ )을 직접 생산하여 식물체에 피해를 주는 것으로 생각된다 (Babbs et al. 1989). Hydroxyl radical은 세포내의 모든 조직을 무차별적으로 공격하여 산화적인 피해를 가져다 주는 가장 독성이



**Figure 1.** Gamma radiation-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of transgenic tobacco plants expressing either a sweet potato anionic POD (*swpa1*) or neutral POD (*swpn1*) and nontransformed (NT) plants at 30 days after radiation. Error bars indicate SE of five replicates.

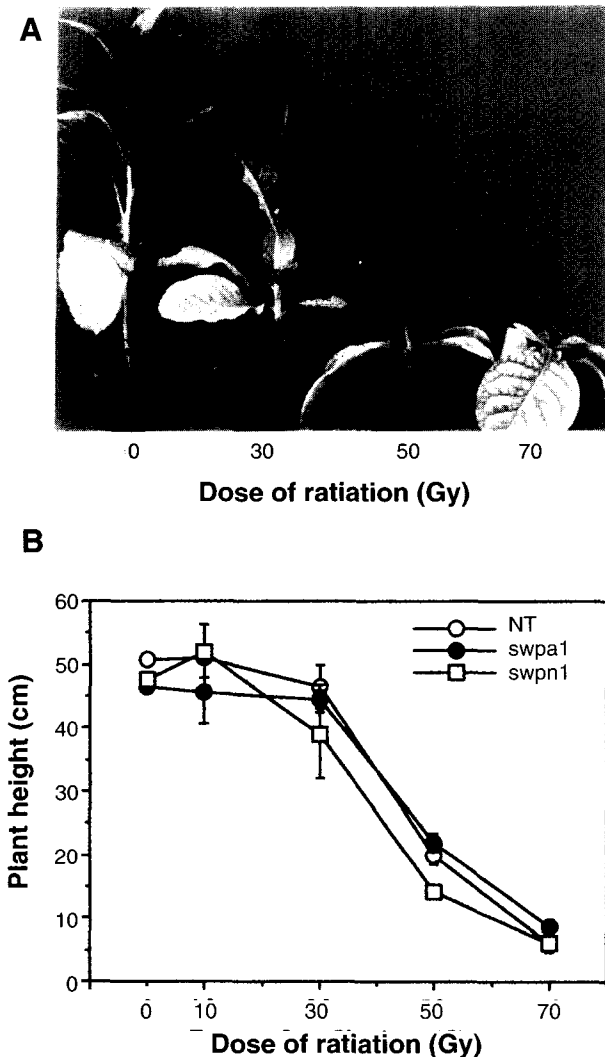
강한 활성산소종이다. POD는 물 분해에 의해 직접적으로 생성되는 hydroxyl radical을 차단하거나 제거할 수 없으며, 감마선 조사선량에 비례하여 POD 활성이 전반적으로 감소하는 것은 조사량이 많을수록 생성되는 hydroxyl radical의 양도 증가하여 높은 선량에서 POD 생성도 억제시키는 것으로 추정된다. SOD와 CAT 활성은 산화적인 스트레스가 극심할 때, 발생한 ROS에 의하여 저해를 받는데, SOD는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의하여, CAT는 superoxide radical에 의하여 각각 저해를 받는다 (Kano et al. 1982; Blum and Fridovich, 1985). 카사바 겐러스에 감마선을 처리한 후 14일에 조사한 항산화효소 활성에서 SOD와 POD 활성은 70 Gy까지 증가하였으며, CAT는 거의 영향을 받지 않아 (Lee et al. 1999b), 감마선에 대한 식물체와 배양세포의 항산화활성에 대한 반응성이 다름이 시사

되었다.

#### 감마선 처리에 의한 형질전환 식물체의 성장억제

감마선은 식물의 성장을 조사선량에 비례하여 현저하게 억제시켰다 (Figure 2). 감마선을 처리하지 않은 식물체의 신장 (plant height)을 100으로 하였을 때, 50 Gy처리에서 swpa1 식물체, NT 식물체, swpn1 식물체의 생장은 각각 47.3%, 39.4%, 29.9%였다. 처리후 30일에 70 Gy처리에서 NT 식물체는 새로운 잎이 나타나지 않았으나 (Figure 2A), swpa1 식물체와 swpn1 식물체에서 나타나기 시작하였으며 (결과 미제시), 식물의 신장은 swpa1 식물체와 swpn1 식물체에서 각각 18.7%와 12.6%였다. 이상의 결과는 swpa1 식물체와 swpn1 식물체가 NT 식물체에 비하여 감마선에 대한 내성이 약간 있음이 시사되었다. 이러한 내성은 swpa1 식물체가 MV에 대한 내성을 갖는 것과 같이 POD와 SOD의 전체 활성이 높아져가 아니라 도입한 POD의 생리적인 기능에 의한 것으로 생각된다.

한편 보리종자에 감마선을 조사한 실험에서 선량에 비례하여 식물체의 신장생장이 억제되었으며, POD의 활성은 1.3 ~ 2.0배 증가하였으나, isoenzyme의 수적변화는 없었다고 하였다 (Sah et al. 1996). 이것은 식물체에 직접 감마선을 처리한 것이 아니고 종자에 처리하여 발아시킨 후의 영향을 본 것으로 본 실험과는 직접적으로 비교하기는 어려운 점이 있다. 종자는 식물체보다 환경스트레스에 보다 강한 내성을 가질 것으로 생각되며, 발아하면서 감마선의 영향에 적응할 수 있는 항산화능력을 가질 것으로 판단된다. Arabidopsis에 강한 감마선량 (1-3 KGy)을 조사하였을 때는 수일내에 생장이 정지되고 방어기작으로 지상부의 anthocyanin의 축적과 trichome이 새로이 형성된다는 보고가 있다 (Nagata et al. 1997). 감마선에 대한 식물세포의 방어기작에 대해 보다 심도 있는 연구가 이루어지면, 방사선보호물질의 생산, 방사선 내성 및 감수성 식물의 개발 등에 이용될 수 있을 것이다.



**Figure 2.** Gamma radiation-induced plant growth inhibition. A, Plant growth inhibition of nontransformed control plants at 30 days after radiation; B, Dose-dependent growth inhibition of transgenic tobacco plants expressing either a sweet potato anionic POD (*swpa1*) or neutral POD (*swpn1*) and nontransformed (NT) plants at 30 days after radiation. Error bars indicate SE of five replicates.

#### 적 요

고구마 산성 peroxidase (POD) (*swpa1*) 또는 중성 POD (*swpn1*)을 도입한 형질전환 담배에 다양한 선량의 감마선을 조사한 후 30일에 항산화효소 활성과 식물생장에 미치는 영향을 조사하였다. 감마선은 조사선량에 비례하여 형질전환 식물체와 정상식물에 관계없이 모든 식물체의 성장을 크게 억제시켰다. 50-70 Gy 처리에서 식물체의 신장이 크게 억제되었고 새로운 잎이 발생되지 못하였다. 10-50 Gy의 조사선량에서는 POD, superoxide dismutase, catalase 활성에 큰 변화를 주지 않았다. 이러한 결과는 고구마 POD는 감마선 조사에 의해 유도되는 산화적인 스트레스에 대한 보호효과에 관

여하지 않음이 시사된다.

사사 - 본 연구는 과학기술부 원자력연구개발사업(NA1030)의 연구결과이다.

## 인용문헌

- Asada K** (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **50**: 601-639
- Aebi H** (1984) Catalase *in vitro*. *Methods Enzymol* **105**:121-126
- Alscher RG, Hess JL** (1993) Antioxidants in higher plants. CRC Press, Boca Raton, FL
- Babbs CF, Pham JA, Coolbaugh, RC** (1989) Lethal hydroxyl radical production in paraquat-treated plants. *Plant Physiol* **90**:1267-1270
- Bradford MM** (1976) A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**:248-254
- Blum J, Fridovich I** (1985) Inactivation of glutathione peroxidase by superoxide radical. *Arch Biochem Biophys* **240**:500-508
- Dubner D, Giscone P, Jaitovich I, Perez M** (1995) Free radicals production and estimation of oxidative stress related to gamma irradiation. *Biol Trace Elem Res* **47**:265-270
- Hall EJ** (1988) The physics and chemistry of radiation absorption. In: *Radiobiology for Radiologist*. Lippincott, Philadelphia pp 1-16
- Huh GH, Lee SJ, Bae YS, Liu JR, Kwak SS** (1997) Molecular cloning and characterization of cDNAs for anionic and neutral peroxidases from suspension cultured-cells of sweet potato and their differential expression in response to stress. *Mol Gen Genet* **255**:382-391
- Huh GH, Yun BW, Lee HS, Jo JK, Kwak SS** (1998) Overproduction of sweet potato peroxidase in transgenic tobacco plants. *Phytochemistry* **47**:695-700
- Kano Y, Fridovich I** (1982) Superoxide radical inhibits catalase. *J Biol Chem* **257**: 5751-5754
- Kergonou J, Bernard P, Braquet M, Rocquet G** (1987) Effect of whole body gamma irradiation on lipid peroxidation in rat tissue. *Biochim* **63**:555-559
- Kim KY, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Hur Y, Kwak SS** (1999) Molecular characterization of cDNAs for two anionic peroxidases from suspension cultures of sweet potato. *Mol Gen Genet* **261**:941-947
- Kim SK, Kwak SS, Jung KH, Min SR, Park IH, Liu JR** (1994) Selection of plant cell lines for high yields of peroxidase. *Korean Biochem J* **27**:132-137
- Kwak SS, Kim SK, Lee MS, Jung KH, Park IH, Liu JR** (1995) Acidic peroxidase from suspension-cultures of sweet potato. *Phytochemistry* **39**:981-984
- Kwak SS, Kim SK, Park IH, Liu JR** (1996) Enhancement of peroxidase activity by stress-related chemicals in sweet potato. *Phytochemistry* **43**:565-568
- Kwak SS, Yun BW** (1998) Molecular breeding of environmental stress tolerant plant with using peroxidases of sweet potato. *Chem Regul Plants* **33**:127-130
- Lee HS, Kim KY, You SH, Kwon SY, Kwak SS** (1999a) Molecular characterization and expression of a cDNA encoding copper/zinc superoxide dismutase from cultured cells of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Mol Gen Genet* (in press)
- Lee HS, You SH, Kwon SY, Kim JS, Kwak SS** (1999b) Gamma radiation-induced changes of antioxidant enzymes in callus cultures of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Kor J Plant Tiss Cult* **26**:53-58
- McCord JM, Fridovich I** (1969) Superoxide dismutase. An enzymatic function for erythrocyte (Hemocuprein). *J Biol Chem* **244**:6049-6055
- Murashige T, Skoog F** (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant* **15**:473-497
- Nagata T, Shibata Y, Komatsu S, Todoriki S, Hayashi T, Nakajima N, Mori M, Kanegae H, Kikuchi, S** (1997) Analysis of the responses induced by massive dosage of gamma irradiation in Arabidopsis. *Plant Biotechnology Symposium in Singapore Abstract No.* 650
- Sah NK, Pramanik S, Raychaudhuri SS** (1996) Peroxidase changes in barley induced by ionizing and thermal radiation. *Int J Radiat Biol* **69**:107-111
- You SH, Kim SW, Kim SH, Liu JR, Kwak SS** (1996) Selection and isozyme analysis of plant cell lines for high yields of superoxide dismutase. *Kor J Plant Tiss Cult* **23**:103-106
- You SH, Huh GH, Kwon SY, Lee HS, Ban JW, Kwak SS** (1997) Superoxide dismutase activity in suspension cultured cells of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Kor J Plant Tiss Cult* **24**:57-61
- Yun BW** (1998) Characterization of transgenic tobacco plants overexpressing sweet potato peroxidases in terms of environmental stresses. Ph.D. thesis, Kyungpook Nat'l Univ
- Yun BW, Huh GH, Lee HS, Kwon SY, Jo JK, Kim JS, Cho KW, Kwak SS** (1999) Differential resistance to methyl viologen in transgenic tobacco plants that express sweet potato peroxidases. *J Plant Physiol* (in press)

(접수일자 1999년 8월 28일)