

보안과제(), 일반과제(O) / 공개(O), 비공개()

BSPE99622-11776-3

비광합성 해양·극한 미생물의 탄소 대사과정 규명 및 활용 최종보고서

2019. 02.

주관연구기관 / 한국해양과학기술원

한국해양과학기술원

제 출 문

한국해양과학기술원장 귀하

본 보고서를 “비광합성 해양·극한 미생물의 탄소 대사과정 규명 및 활용” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2019. 02. 28

총괄연구책임자 : 이 정 현

참 여 연 구 원 : 강성균, 권개경, 이현숙, 김윤재, 임형순, 임재규, 이종민, 이성목, 박기정, 염승식, 김원덕, 안영준, 이경원, 이성혁, 이진우, 정해창, 노유림, 김민지, 도미숙, 이규비, 양지인, 김재영, 권수재, 박미정, 오지혜, 양성현, 양정안, 정창숙, 김정희, 유주현, 채철기, 하성희, 나혜윤, 한재호, 김미숙, 김연아, 남지영, Teddy Namirimu, Mohammad Nazrul Islam, AQIL AZIZI

보고서 초록

과제고유 번호	PE99514	해당단계 연구기간	2017.01.01.~2018.12.31	단계 구분	1단계
연구사업명	중사업명	주요사업 고유임무형			
	세부사업명	바다자원 찾기			
연구과제명	대과제명	미래해양생물자원 개발			
	세부과제명	비광합성 해양·극한 미생물의 탄소 대사과정 규명 및 활용			
연구책임자	이정현	해당단계 참여연구원수	총 : 41 명 내부: 10 명 외부: 31 명	해당단계 연구비	정부: 3,254,000 천원 기업: 천원 계 : 3,254,000 천원
		총연구기간 참여연구원수	총 : 41 명 내부: 10 명 외부: 31 명	총 연구비	정부: 3,254,000 천원 기업: 천원 계 : 3,254,000 천원
연구기관명 및 소속부서명	한국해양과학기술원		참여기업명		
국제공동연구					
위탁연구					
요약				보고서 면수	116

1. 연구 목표

○ 비광합성 해양·극한 미생물의 탄소고정 및 대사과정 규명 및 활용 기술 개발

- 다양한 해양·극한 환경으로부터 비광합성 미생물·유전자원을 확보하고 다양한 오믹스 분석을 통해 탄소대사 과정 이해
- 보유한 탄소대사경로를 기반으로 게놈 편집(genome editing), 대사경로 재설계 등을 통한 유용물질 생산 균주 제작 및 성능평가
- C1가스/해양바이오매스 기질을 이용한 미생물 고농도 배양기술 개발

2. 연구 결과

(1) 비광합성 해양·극한 미생물·유전자원 확보 및 분석

- 대양 및 연안환경으로부터 24종 41주의 신규 미생물자원 확보
- 확보 균주 중 6균주의 CO, CO₂ 대사능 비교를 통해 집중 연구 대상으로 *Moorella thermoacetica*와 *Acetobacterium* sp. HAWD4 선정
- 비광합성 자가영양미생물 표준균주 4종 확보

- *Moorella thermoacetica* CLWD1를 보고된 12주의 *Moorella thermoacetica*와 비교유전체 분석을 수행함으로써 2,3-BDO 대사경로 관련 유전자와 활성이 있음을 확인
- 2단공정을 고려하여 유기산 이용에 특화된 *Alcanivorax gematiniphagus*의 유전체 정보를 분석하여 바이오플라스틱 (Polyhydroxybutyrate) 생산경로를 확인함

(2) 해양·극한 미생물 탄소대사 재설계 및 성능평가

- *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *Thermosulfidibacter takaii* ABI70S6 유래 rTCA 대사 경로 클로닝; Isocitrate dehydrogenase 유전자 도입 NA1 돌연변이 균주 제작
- *Carboxydotherrnus hydrogenofomans* 유래 WLP 대사경로 클로닝
- Acetogen에 활용 가능한 벡터 확보, 검증을 통하여 pCB102, pAMβ1, pIP404 등이 유용함을 확인
- 당화효소군 및 알콜대사 관련 유전자 도입 재조합 균주 3주 제작
- 단백질 전자전달 기술을 이용하여 세계최초로 일산화탄소를 포름산으로 전환하는 합성 효소, 일산화탄소:포름산 산화환원효소 (carbon monoxide:formate oxidoreductase, CFOR) 개발

(3) 해양·극한 미생물 생물반응기 배양기술

- 일산화탄소:포름산 산화환원효소 (carbon monoxide:formate oxidoreductase, CFOR)를 도입한 재조합 균주를 이용하여 CO 가스로부터 400 mmol/L/day의 포름산 생산성 달성
- 하동 발전으로부터 전달받은 개미산, 개미산염이 6시간 이내에 90% 수준으로 수소로 전환됨을 확인

3. 활용 계획

- 당초 계획과 달리 2+3년의 2단계 계획 중 1단계에서 종료됨에 따라 후속과제에서 확보된 균주, 구축 시설, 기술 등을 활용하여 지속적으로 자가영양미생물 확보 및 특성 분석, 대사경로 편집기술과 대량배양기술의 고도화를 통해 C1가스 전환기술 고도화를 목표로 연구개발을 수행

색인어 (각 5개 이상)	한 글	비광합성, 해양극한, 탄소대사, 게놈 편집, C1가스(CO, CO ₂)
	영 어	non-photosynthetic, marine and extreme, Carbon metabolism, genome editing, C1 gas (CO, CO ₂)

요 약 문

I 제 목

비광합성 해양·극한 미생물의 탄소 대사과정 규명 및 활용

II 연구개발의 목적 및 필요성

1. 연구개발 목표

- 비광합성 해양·극한 미생물의 탄소고정 및 대사과정 규명 및 활용 기술 개발
 - 다양한 해양·극한 환경으로부터 비광합성 미생물·유전자원을 확보하고 다양한 오믹스 분석을 통해 탄소대사 과정 이해
 - 보유한 탄소대사경로를 기반으로 게놈 편집(genome editing), 대사경로 재설계 등을 통한 유용물질 생산 균주 제작 및 성능평가
 - C1가스/해양바이오매스 기질을 이용한 미생물 고농도 배양기술 개발

2. 연구개발 필요성

- 해양극한미생물의 탄소대사연구 및 탄소활용기술 필요
 - 탄소대사에 관련된 원천 자원 및 기술을 확보함으로써 파리협정 이후 新기후체제 대응 및 전 지구적 기후변화 대응노력에 참여
 - 기존 화학적 방법 및 광합성 미세조류를 이용한 탄소전환 기술에서 탈피하여 풍부한 해양자원을 대상으로 원천 자원 및 기술 확보
- 원천자원으로서 탄소대사에 적합한 비광합성 해양·극한 미생물·유전자원을 확보
 - 비광합성 해양·극한 미생물의 다양한 탄소 고정화 대사경로를 발굴하고, 이를 이용하여 산업적 유용산물을 생산할 수 있는 탄소 저감 및 전환을 위한 해양유래 원천 기술의 개발 필요
 - 탄소전환에 유용한 균주의 발굴을 위해서는 다양한 탄소고정 균주를 대상으로 하는 생화학적, 유전학적 정보 확보가 요구 됨
 - 선행과제인 ‘차세대 해양생물 유전체 해독 및 활용 연구’를 발전시켜 해양·극한 미생물의 탄소대사 과정의 규명 및 재설계 기술 개발을 통해 탄소전환에 특화된 균주 개발

III

연구개발의 내용 및 범위

1. 비광합성 해양·극한 미생물·유전자원 확보 및 분석

○ 신규 해양미생물자원 확보

- 다양한 해양환경으로부터 농후 배양 을 통해 비광합성 해양·극한 미생물 3종 분리

○ 집중 연구 대상 균주 선정

- 확보된 미생물 2종에 대한 특성분석 및 비교 분석
- 유전체 해독 2건 및 탄소대사 경로 규명 1건

2. 해양·극한 미생물 탄소대사 재설계 및 성능평가

○ C1가스 이용 해양·극한 미생물의 탄소대사 재설계 균주 개발

- 탄소전환 기작 규명
- 대사공학적 기법 이용 개량균주 제작
- C1가스 이용 유기산 생산능 분석

○ 탄소 고정화 획득 해양·극한 미생물 균주 개발

- 탄소고정화 대사경로 도입 NA1 균주의 탄소 고정화능 분석

○ 유전자 조작툴 박스 구축

- 유전자 조작기술 구현

3. 해양·극한 미생물 생물반응기 배양기술

○ 해양극한미생물 고농도 배양기술 확립

- C1 가스 이용 해양극한미생물의 가스발효 생물반응기 운전: 세포농도 (OD_{600}) > 0.2

○ C1가스 이용 유기산 전환균주의 생물반응기 배양조건 최적화

- CO 전환-개미산 생산성 개선; 100 mmol/L

○ 개미산활용 미생물 프로세스 개발 및 최적화

- 개미산활용 수소생산 발효공정 최적화

1. 비광합성 해양·극한 미생물·유전자원 확보 및 분석

○ 신규 해양미생물자원 확보

- 대양 및 연안환경으로부터 24종 41주의 신규 미생물자원 확보
- 확보 균주 중 6균주의 CO, CO₂ 대사능 비교를 통해 집중 연구 대상으로 *Moorella thermoacetica*와 *Acetobacterium* sp. HAWD4 선정
- 비광합성 자가영양미생물 표준균주로서 *Moorella thermoacetica* DSM 521, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *Carboxydotherrmus hydrogenofomans* Z-2901, *Aquifex pyrophilus* DSM 6858, *Thermosulfidibacter takaii* ABI70S6를 분양 혹은 분리자로부터의 양여를 통해 확보함

○ 확보한 해양미생물의 특성분석

- *Moorella thermoacetica* CLWD1를 보고된 12주의 *Moorella thermoacetica*와 비교유전체 분석을 수행함으로써 2,3-BDO 대사경로 관련 유전자가 있음을 확인
- *Moorella thermoacetica*의 경우, 기존에 보고된 three enzyme pathway가 아닌, two enzyme pathway(ALS/BDH)에 의해서 2,3-BDO가 생산될 수 있음을 확인
- 2단공정을 고려하여 유기산 이용에 특화된 *Alcanivorax gematiniphagus*의 유전체 정보를 분석하여 바이오플라스틱 (Polyhydroxybutyrate) 생산경로를 확인함

2. 해양·극한 미생물 탄소대사 재설계 및 성능평가

○ 탄소 고정화 획득 해양·극한 미생물 균주 개발

- *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 유래 rTCA 대사경로 클로닝; Isocitrate dehydrogenase 유전자 도입 NA1 돌연변이 균주 제작
- *Carboxydotherrmus hydrogenofomans* 유래 WLP 대사경로 클로닝
- *Thermosulfidibacter takaii* ABI70S6 유래의 rTCA cycle을 통째로 *Thermococcus onnurineus* NA1에 넣기 위한 벡터 준비
- Acetogen에 활용 가능한 벡터 확보, 검증을 통하여 pCB102, pAMβ1, pIP404 등이 유용함을 확인
- 당화효소균 및 알콜대사 관련 유전자 도입 재조합 균주 3주 제작

○ C1가스 이용 해양·극한 미생물의 탄소대사 재설계 균주 개발

- 합성 일산화탄소:포름산 산화·환원효소 분리 및 활성 확인
- CO⇒개미산 생산기작 규명
- 융합 단백질 도입 재조합 개량 균주 11주 추가 제작
- 단백질 전자전달 기술을 이용하여 세계최초로 일산화탄소를 포름산으로 전환하는 합성효소, 일산화탄소:포름산 산화환원효소 (carbon monoxide:formate oxidoreductase, CFOR) 개발

3. 해양·극한 미생물 생물반응기 배양기술

- 일산화탄소:포름산 산화환원효소 (carbon monoxide:formate oxidoreductase, CFOR)를 도입한 재조합 균주, 씨모코커스 온누리누스 BCF12 (*Thermococcus onnurineus* BCF12) 균주를 개발하고 이를 이용하여 CO 가스를 포름산으로 전환; 포름산 생산성 400 mmol/L/day 달성
- 하동 발전으로부터 전달받은 개미산, 개미산염이 6시간 이내에 90% 수준으로 수소로 전환됨을 확인

V

연구개발결과의 활용계획

- 신규 비광합성 해양·극한 미생물은 국가 자산으로서 다양한 기초·응용 연구개발에 활용
- 물질대사공학 또는 합성생물학 기술을 이용한 균주 내 유용물질 생산 시스템에 응용할 수 있는 원천균주와 유전자원 제공
- 탄소대사, 탄소고정 기작의 연구 영역 확대
- 원천기술을 이용 탄소전환을 통한 바이오화학소재 생산기술 개발에의 활용
- 발전소 및 제철소에서 생산되는 부생가스에 생물학적 가스발효기술을 활용

SUMMARY & KEYWORDS

I Title of the Project

Elucidation and application of carbon metabolic process in non-photosynthetic marine and extreme microorganisms

II Necessities and Objectives of the Project

1. Objectives of the Project

The aim of the research is as follows; 1) Acquisition and characterization of non-photosynthetic autotrophic microorganisms, 2) Set-up the methods such as genome editing, metabolic engineering, reconstruction of metabolic pathway etc. for utilization of carbon metabolic pathways of the acquired autotrophic microorganisms, and 3) Set-up the high-density cultivation technology for gas fermentation or biomass decomposition

2. Necessities of the Project

- Understanding and/or application of carbon metabolic process of marine & extreme microorganisms is important in the era under Paris Agreement
 - Establish and acquiring basic bioresources, technologies, and facilities for correspond to technologies required for mitigation of Global Weather Change is important for future of human beings
 - Novel resources and technologies that overcome limitations of chemical process or technologies based on photosynthetic organisms possibly comes from marine environments
- Acquisition of non-photosynthetic marine and extreme microorganisms as a basic resources is recommended
 - For production of basic materials and reduce green house gases, development of basic bioresources and technologies based on marine and extreme bioresources is recommended for future society

- For development of novel and powerful strains could transform C1 gases, biochemical and genetical informations from variety of C1 transforming organisms is one of the essential information
- Need to upgrading and utilize knowledges developed by previous research programs

III Scope of the Research

1. Acquisition and characterization of marine and extreme microorganisms

- Acquisition of novel microbial resources
 - Isolate more than 3 novel strains from various marine environments
- Select strains for extensive investigation
 - Analysis of various characteristics of acquired microorganisms
 - Analyze genome information and metabolic process of the selected strains

2. Construction of metabolically engineered strain and estimation of its ability

- Development of metabolically improved strains could transform C1 gas efficiently
 - Study on carbon metabolic process
 - Improvement of strains via metabolic engineering methods
 - Analyzes of ability to produce organic acid from C1 gas
- Construct strains acquired carbon fixing ability
 - Introduction of carbon fixing process into strain NA1 and verification of it
- Set-up the genetic engineering tool box for chemolithotrophic microorganisms
 - Construction of genetic engineering tool sets

3. Development of high-density cultivation technology

- Establishing high-density cultivation Technology
 - Aimed to reach (OD_{600}) > 0.2 via C1 gas fermentation
- Optimization of fermentation technology for organic acids production from C1 gas
 - Upgrade of CO to formic acid production process; reach to 100 mmol/L productivity
- Development and optimization of formate based fermentation technology
 - Optimization of hydrogen production process using formic acids

1. Acquisition and analysis of novel marine and extreme microbial resources

○ Acquisition of novel microorganisms

- Acquired 4a strains affiliated with 24 species from coastal and open oceans
- Two strains, *Moorella thermoacetica* and *Acetobacterium* sp. HAWD4 were selected for further study based on metabolism of CO and CO₂ gases
- Acquiring type strains such as *Moorella thermoacetica* DSM 521, *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6, *Carboxydotherrmus hydrogenofomans* Z-2901, *Aquifex pyrophilus* DSM 6858, and *Thermosulfidibacter takaii* ABI70S6 from culture collection or isolaters as genetic resources

○ Characterization of acquired microorganisms

- Novel 2,3-BDO producing process was mined from *Moorella thermoacetica* CLWD1 via comparative genomic analysis of 13 genome sequenced *Moorella thermoacetica* strains
- The novel pathway is two enzyme pathway(ALS/BDH) rather than well known 3 step process
- Biosynthetic pathway of polyhydroxybutyrate was confirmed from *Alcanivorax gematiniphagus*, that can transform short chain organic acids to high molecular weight lipids compounds

2. Development of strains that has reconstructed carbon metabolism pathway and verification of the strains

○ Development of strains get carbon fixing ability

- Cloning of rTCA cycle gene set from *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 ; Construct mutant NA1 strain that incorporated Isocitrate dehydrogenase gene
- Wood-Ljingdahl pathway of *Carboxydotherrmus hydrogenofomans* was colned
- Preparation of vector plasmid for cloning full rTCA cycle gene cluster from hyperthermophilic and chemolithotrophic strain *Thermosulfidibacter takaii* ABI70S6
- Various vector systems for acetogen manipulation were investigated and pCB102, pAMβ1, and pIP404 were setlected for future application

- Construct 3 recombinant strains that acquired genes concerned in saccharification and alcohol metabolism process

○ Development of recombinant strains that acquired newly rearranged C1 gas metabolic process

- Design and construction of carbon monoxide:formate oxidoreductase (CFOR) fusion protein, purify proteins, and confirm its activity
- Construct total 12 recombinant strains acquired fusion protein genes
- Investigated the process of $\text{CO} \Rightarrow \text{formate}$
- Novel artificially constructed carbon monoxide:formate oxidoreductase (CFOR) was developed via understanding and application of electron transport mechanism at first in the World

3. Mass culture techniques of marine and extreme microorganisms using Bioreactor

- Recombinant *Thermococcus onnurineus* BCF12 strain that acquired carbon monoxide:formate oxidoreductase (CFOR) was cultivated at bioreactor under various conditions and finally reached 400 mmol/L/day productivity of CO via transformation of formate
- Approx. 90% of formate or formic acid salt from Hadong Power plant was transformed to hydrogen within 6 hours of cultivation

V

Plan for Utilization

- Acquired microbial resources could be applied on various researches as a national properties
- Provide strains or genetic resources for development of production processes of biomaterials via metabolic engineering or synthetic biological techniques
- Enlarging boundary of research field against carbon metabolism including carbon fixation
- Applied as basic technology for production of biochemical materials via C1 gas transformation
- Applying for sin gas fermentation that produced from power plant or steel mill companies

KEYWORDS : 비광합성 (non-photosynthetic), 해양극한 (marine and extreme), 탄소대사 (Carbon metabolism), 게놈 편집 (genome editing), C1가스 (CO, CO₂)

- C O N T E N T S -

Chapter 1. Research outline	20
Section 1. The purpose and the need for research	20
1. Research background	20
2. Research necessity	25
Section 2. Research contents and scope	30
1. Research and development final goals	30
2. Research objectives and contents	30
Chapter 2. Domestic and overseas technology development status	33
1. Carbon converting technology by photosynthetic organisms	33
2. Carbon converting technology by non-photosynthetic organisms	34
3. Overseas status	36
4. Domestic status	38
5. Technology development trend of domestic carbon capture & utilization (CCU)	39
Chapter 3. Results	43
Section 1. Securement and analysis of genetic resources from non-photosynthetic marine-extreme microorganisms	43
1. Securement of novel marine microorganisms	43
2. Securement of identified microorganisms	47
3. Characterization of secured microorganisms	48
Section 2. Reconstitute carbon metabolic pathway and evaluating the performance of marine-extreme microorganisms	57
1. Development of the reconstitute carbon metabolic pathway in marine-extreme microorganisms that utilizing C1 gas	57
2. Securement of genetic resources to improve a non-photosynthetic microorganisms	86
3. Development of saccharogenic enzymes and alcohol producing recombinant microorganisms	

4. Development of carbon fixation marine-extreme microorganisms	90
Section 3. Culture technology on bioreactor for Marine-extreme microorganisms	95
1. Establishment of bioreactor culture condition of organic acid conversion bacteria using Cl ₂ gas	95
2. Development and optimization of microbial process using formic acid	100
Chapter 4. The achievement of research goals and external contribution	103
Section 1. The achievement of research goal	103
Section 2. External contribution	105
1. Technical aspects	105
2. Economic and social aspect	107
Chapter 5. Application plan of research development results	108
1. Future research plan	108
2. Application plan	109
Chapter 6. References	110

- 목 차 -

제1장 연구개발 과제의 개요	20
제1절. 연구의 목적 및 필요성	20
1. 연구개발의 배경	20
2. 연구사업의 필요성	25
제2절. 연구의 내용 및 범위	30
1. 연구개발의 최종목표	30
2. 연구개발 목표 및 내용	30
제2장 국내외 기술개발 현황	33
1. 광합성생물의 탄소전환 기술	33
2. 비광합성 미생물의 탄소 전환	34
3. 국외현황	36
4. 국내현황	38
5. 국내의 탄소자원화(CCU) 기술개발 동향	39
제3장 연구개발수행 내용 및 결과	43
제1절. 비광합성 해양·극한 미생물 유전자원 확보 및 분석	43
1. 신규 해양미생물자원확보	43
2. 기 보고 미생물 확보	47
3. 확보 미생물의 특성 분석	48
제2절. 해양·극한 미생물 탄소대사 재설계 및 성능 평가	57
1. C1가스 이용 해양·극한 미생물의 탄소대사 재설계 균주 개발	57
2. 비광합성 미생물 개량을 위한 유전자원 확보	86
3. 당화효소군 및 알코올 생산 재조합 균주 개발	87
4. 탄소 고정화 획득 해양·극한 미생물 균주 개발	90
제3절. 해양·극한 미생물 생물 반응기 배양기술	95
1. C1가스 이용 유기산 전환균주의 생물반응기 배양조건 확립	95
2. 개미산활용 미생물 프로세스 개발 및 최적화	100

제4장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도	103
제1절 연구개발 목표 달성도	103
제2절 대외 기여도	105
1. 기술적 측면	105
2. 경제·사회적 측면	107
제5장 연구개발결과의 활용계획	108
1. 향후 연구 방향	108
2. 성과 활용 계획	109
제6장 참고문헌	110

1. 연구개발의 배경

가. 해양환경·생명자원의 중요성

○ 해양은 생명탄생과 진화의 장소

- 해양생물은 20억년 이상의 진화 역사를 가지고 있는 생명진화지이며 지구상 동식물 80%, 1,200만종의 생물이 해양에 서식하여 지구생물다양성의 대부분을 차지
- 실제 지구상 동물종의 33개의 문 (phylum) 단위 분류군 중 32개가 해양생태계에 존재하나 육상생태계에는 15개의 문만 존재하는 것으로 보고됨 (03년 해양생물센서스 보고서)
- 그럼에도 불구하고 지구상 생명 서식처의 90%를 차지하는 **해양환경 중 99%**는 탐사되지 않은 **새로운 가능성**을 지닌 미지의 영역으로 남아있음

○ 해양, 새로운 생명자원의 보고

- 이와 같이 다양성의 원천이라 할 수 있는 해양생물은 육상생물에 비해 월등히 높은 새로운 유전자, 생체구조 및 대사물질 (의약품)의 보고로 알려짐
- 대양, 심해저, 열수구 및 냉용수 생태계 등에서 발굴 가능한 극한생명체와 특이한 생명현상들은 바이오산업의 원천소재 및 기초원천기술을 제공할 가능성이 큼
- 해양조류는 지구적 규모의 이산화탄소 고정량의 45%를 차지하며, 바이오연료의 원료인 바이오매스의 주요 공급자로 각광 받고 있으며, 해양생물의 태양에너지 전환효율은 미세조류의 경우 최고 10%에 달하는 등 육상생물보다 우수한 것으로 알려짐
- 광합성 미생물 외에도 연안의 갯벌이나 심해 퇴적토, 열수구 주변 환경 등으로부터 C1 가스를 이용하는 비광합성 미생물들이 보고되고 있어 해양환경으로부터 다양한 탄소대사기능을 발굴하고 활용하는 것이 가능

○ 생명과학의 가능성

- 생명과학이 해결해야 할 미래 과제는 식량, 에너지, 원료, 보건 (신약), 환경
- 문제의 해결 실마리는 해양 바이오매스와 유전자원이 될 것이라고 기대되고 있음

- 해양바이오매스는 식량 생산을 위한 농지사용과 경쟁하지 않으면서 막대한 바이오매스를 제공해 줄 수 있는 원천이며 이의 가공을 통해 산업 원료, 연료 등의 공급이 가능
- 해양바이오매스는 탄소중립적인 소재로서 신기후협약에 따른 온실가스 감축 의무와 무관하다는 장점을 지님
- 온실가스 감축과 관련하여 비광합성 미생물은 무궁무진한 가능성을 가지고 있으며 이를 해양환경으로부터 확보하고 활용기술을 개발하는 것은 매우 중요함

나. 산업화의 후유증

○ 지구온난화

- 산업혁명 이후 화석연료 사용의 급격한 증가와 이로 인한 온실가스 배출로 지구 평균 온도의 지속적 상승이 이슈로 대두됨
- 산업화에 따른 화석연료 사용의 증가로 대기 중의 온실가스 농도가 빠르게 증가하면서 지구 지표면 온도가 빠르게 상승하고 있으며, 이에 따른 기후 변화가 심화될 것으로 전망됨
- 2014년 기후변화에 대한 정부간 패널(Intergovernmental Panel on Climate Change, IPCC)의 5차 보고서에 따르면 현재 추세로 온실가스를 배출한다면 금세기말 (2081-2100년)의 지구 평균기온은 3.7 [2.6-4.8]°C 상승할 것으로 예측.
- 지난 133년(1880-2012년)간 지구의 평균기온 0.85°C [0.65-1.06°C] 상승. 해수면 높이는 지난 112년(1901~2010년)간 0.19 [0.17-0.21]m 상승. 전지구 해수면 평균상승률은 (1901~2010년) 1.7[1.5-1.9]mm/yr, (1993~2010년) 3.2[2.8-3.6]mm/yr로 측정
- 북극의 연평균 해양빙(sea-ice) 면적은 1979-2012 년 기간 동안 10 년당 3.5-4.1% 범위의 속도로 감소됨

○ 온실가스

- 산업화 시대 이전부터 인위적 온실가스(GHG) 배출이 주 원인이 되어 이산화탄소, 메탄, 아산화질소의 대기 중 농도가 크게 증가 (그림 1-1c). 1750-2011 년 대기 중 누적 인위적 이산화탄소 배출량은 2040 ±310 GtCO₂. 배출량의 약 40 %는 대기(880 ± 35 GtCO₂)에 남아있고 나머지는 대기에서 제거되어 육지(식물과 토양)와 바다에 저장. 해양은 인위적 이산화탄소 배출량의 30%를 흡수했는데, 이로 인해 해양 산성화가 초

래. 1750-2011 년의 인위적 이산화탄소량 중 절반 가량은 지난 40 년 중 배출된 것으로 계산 (그림 1-1d)

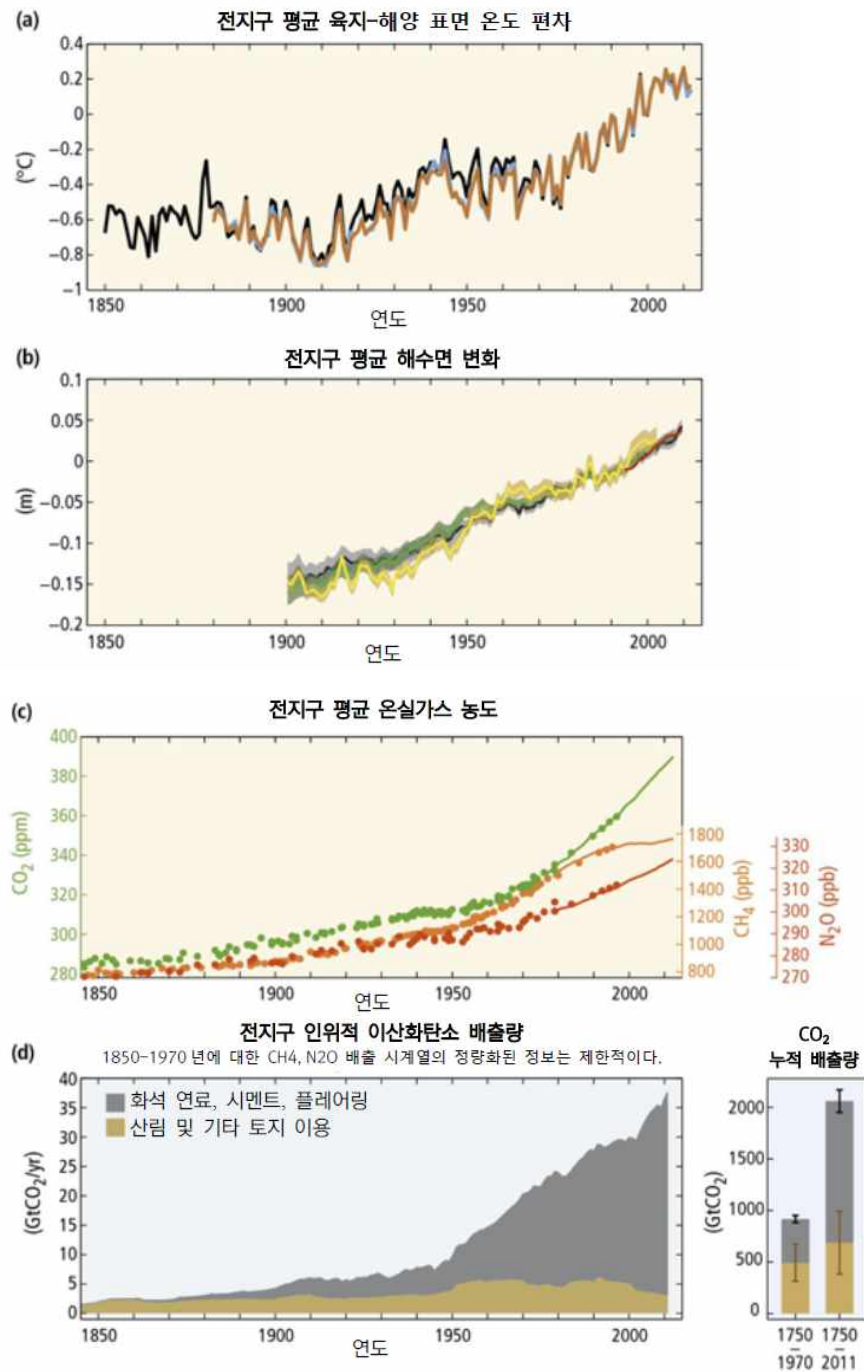


그림 1-1. 전지구 온도, 해수면, 온실가스, 이산화탄소 변화 (IPCC5차 보고서)

- 기후변화 완화 정책이 점차 마련 및 추진되고 있음에도 불구하고, 총 인위적 온실가스 배출량은 2000-2010 년에 절대적으로 크게 증가하였고 1970-2010 년에도 계속해서 증가하였다. 2010 년 인위적 온실가스 배출량은 49(±4.5) GtCO₂-eq/yr 에 달함
- 전세계 경제 성장과 인구 증가는 화석연료의 연소에 의한 이산화탄소 배출의 증가를 가장 큰 동인이다. 전세계 에너지 공급 패턴은 점진적으로 탈탄소화 추세(예. 에너지의 탄소농도 감소)를 띄고 있지만, 석탄 사용이 증가함에 따라 탈탄소화 추세에 걸림들

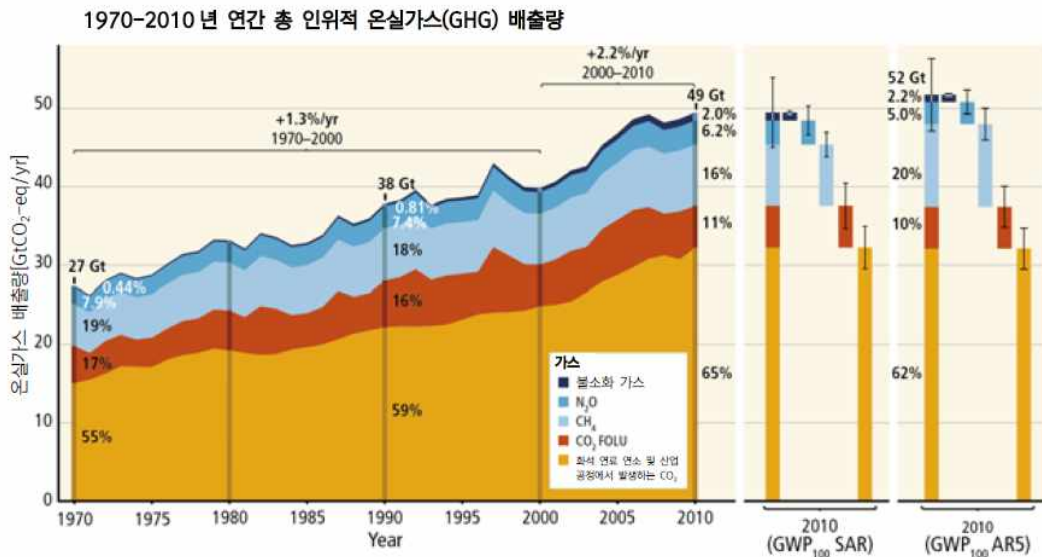


그림 1-2. 1970-2010 최근 온실가스 배출량 (5차 IPCC 보고서)

○ 기후변화 영향

- 지구온난화는 기상재해, 생태계 파괴 등 환경위기뿐 아니라 경제에 대한 위협 요인으로 작용하고 있으며, 가뭄·홍수·폭염 등 기상재해 피해는 향후 더욱 악화될 전망이다
- 온난화의 속도와 규모가 증가하고 해양산성화가 심화되며 기후 시스템에서 여러 변화가 나타남에 따라, 기후변화가 진행됨에 따라 21 세기 중과 후에 많은 종들이 멸종 위기에 처할 것이며, 편평한 경관 지역의 소형 포유류 및 담수성 연체동물 대다수 또한 21 세기 중 예상되는 기후변화의 속도에 맞추어 적응할 수 없을 것이다 (높은 신뢰도). 해양생물은 점차 용존산소 감소, 해양 산성화 속도 및 크기 증가와 함께

(높은 신뢰도) 해양 극한 수온의 심화에 따른 위험에 처할 것이다 (중간 신뢰도). 특히 산호초 및 북극 생태계의 취약성이 높다. 해수면 상승은 연안 시스템에 및 저지대 지역에 대한 위험 요소로 작용하는데, 지구 평균 기온이 안정화된다고 할지라도 해수면 상승은 수세기 동안 지속될 것이다 (높은 신뢰도)

다. 한국 기후변화 대응 및 온실가스 감축 의무

- 우리나라의 경우 온실가스 배출량이 세계 7위 수준으로서 온실가스 감축에 관한 국제적인 압력을 받음. 2015. 6. post-2020 온실가스 감축목표로 2030년 총 국가 배출량 전망치(BAU) 대비 37%를 감축하겠다는 내용의 국가별 기여방안(INDC)를 UN에 제출. 파리 협정의 체결 이후에는 5년마다 정기적으로 이행실적을 점검하고 보다 상향된 감축목표의 제출을 사실상 강제하는 대외적 압박이 점점 강화될 것으로 예측
- 파리협정 55개국 이상이 비준하고, 비준 국가의 온실가스 배출 비중이 전세계 온실가스 배출량의 55% 이상이 되면 발효. 국내에서는 국회의 동의를 얻어 대통령이 비준하면(대한민국헌법 제60조, 제73조), 국내법과 동일한 효력을 가지게 됨 (대한민국헌법 제6조 제1항)

2. 연구사업의 필요성

가. 기후변화대응 국제협약 및 온실가스 감축 의무화

- IPCC에 따르면 추가적인 완화 노력이 이루어지지 않는다면 21 세기 말까지 온난화는 전지구적으로 확산되어 돌이킬 수 없는 심각한 영향을 초래할 것이며 완화 노력이 없는 대부분의 시나리오(2100 년도의 대기 중 농도가 CO₂ 환산 1000ppm 을 초과하는 경우, 즉 1000ppm 이상인 경우)에서는 온난화 수준이 2100 년까지 산업화 이전 수준 대비 4°C를 초과할 가능성이 높음
- 이에 1990년대부터 선진국을 중심으로 온실가스 감축을 위한 국제사회의 노력이 본격적으로 시작됨. 지난 1992년에 온실가스감축을 위한 범세계적인 첫 대응책으로 기후변화협약 (UNFCCC)이 채택되었고 1997년에는 기후변화협약의 실행지침으로써 온실가스감축을 누가, 얼마만큼, 어떻게 줄이느냐에 대한 구체적 방안을 담고 있는 교토의정서가 채택된 바 있음
- 이후 교토의정서체제의 문제점과 제2차 교토의정서 공약기간의 공식종료(2020년)는 새로운 기후체제의 필요성을 부각시킴
- 제20차 기후변화당사국총회(COP20)에서 INDC (INDC: intended nationally determined contributions)작성 지침에 대한 구체화에 합의하였고. 이를 바탕으로 모든 국가가 기후변화 대응노력에 참여한다는 新 기후체제를 규정한 ‘파리협정’이 채택
- 파리협정에서는 2020년 이후부터 기존 교토의정서 체제를 대체할 新기후체제를 규정하고 있다. 무엇보다도 선·개도국 구분 없이 모든 국가가 전지구적인 기후변화 대응노력에 참여하도록 하였다는 점에서 그 의미가 큼. 산업혁명이전 대비 지구평균기온 상승을 2°C보다 상당히 낮은 수준으로 유지하도록 하고, 온도 상승을 1.5°C 이하로 제한하기 위한 노력을 추구
- 국가별기여방안(INDC)은 현행과 같이 각국이 스스로 정하는 방식 채택하며 매 5년마다 상향된 목표 제출. 공통의 차별화된 책임(common but differentiation responsibility) 및 국별 여건(national circumstance)을 고려, 선진국은 절대량 목표방식(예: 90년 대비 40% 감축)을 유지하고 개도국은 경제 전반을 포괄하는 감축목표를 점진적으로 채택
- 또한 각 국가에게 2020년까지 장기 저탄소 개발 전략(long-term low greenhouse gas emission development)을 마련하여 제출 요청. 2023년부터 5년 단위로 파리협정 이행 전반 에 대한 국제사회 차원의 종합이행점검(Global stocktaking)을 실시할 계획임

나. 바이오기술개발 필요성

- IPCC 5차보고서에 따른 온실가스 증가 완화 기술(예, 바이오에너지, CCS 및 BECCS, 원자력, 풍력/태양광)이 부재하거나 그 적용이 제한적인 경우, 완화비용은 어떠한 기술을 고려하느냐에 따라 상당히 증가할 수 있음. 추가적인 완화를 미룰 경우, 중장기 완화 비용은 증가할 것임. 추가적인 완화가 상당 기간 지연되는 경우, 대부분의 모형에서, 21 세기 동안 산업화 이전 수준 대비 2°C 이하로 온난화를 제한할 수 없을 가능성이 높음
- 특히 바이오에너지, CCS 및 이 둘을 결합한 BECCS 등의 기술이 제한될 경우에 많은 모형에서 온난화를 2°C 이하로 제한할 수 없을 가능성이 높음 (높은 신뢰도) (표 1-1). 따라서 바이오기술 개발을 통한 이산화탄소 완화 적용은 필수적인 요소임

표 1-1. 기술 개발 및 적용에 따른 온도 증가 완화 가능성 예측

기술의 제한적 사용에 따른 완화 비용 증가율 ^a					2030년까지 추가 완화 정책의 지연에 따른 비용 증가율	
[각 기술의 제한적 사용에 따른 총 완화 비용 증가율 (2015년-2100년), %]					[현재 대비 완화 비용 증가율, %]	
2100년 이산화탄소 농도 시나리오 (CO ₂ 환산 ppm)	CCS 비사용	원자력 폐기	태양력/풍력 제한	바이오에너지 제한	중기 비용 (2030-2050)	장기 비용 (2050-2100)
450 430-480	138% (29-297%)	7% (4-18%)	6% (2-29%)	64% (44-78%)	44% (2-78%)	37% (16-82%)
500 (480-530)	사용 불가능	사용 불가능	사용 불가능	사용 불가능		
550 (530-580)	39% (18-78%)	13% (2-23%)	8% (5-15%)	18% (4-66%)	15% (3-32%)	16% (5-24%)
580-650	사용 불가능	사용 불가능	사용 불가능	사용 불가능		
범례 - 이산화탄소 농도 목표 달성 모델 현황(달성한 모델의 수를 의미)						
■ : 모든 모형이 목표 농도 달성 ■ : 모형 중 80-100%가 목표 농도 달성			■ : 모형 중 50-80%가 목표 농도 달성 ■ : 모형 중 50% 이하가 목표 농도 달성			

*특정 기술의 적용성 제한 또는 비용 효과적인 시나리오 대비 추가적인 완화 지연으로 인한 전세계 완화 비용 증가 (괄호표시). 한 각 시나리오의 표본 크기는 꺾쇠괄호에 표시. 각 셀의 색상은 성공적으로 목표한 농도 수준에 도달할 수 있도록 한 체계적인 모형 비교 연습에 따른 모형의 일부분을 나타냄

다. CCS에서 CCU기술개발로의 전환

- 이산화탄소 배출 저감 기술로서 이산화탄소 저배출 산업구조로의 전환 등의 장기적 플랜 뿐 아니라, 경제성을 담보한 이산화탄소 회수 및 활용 기술 확보가 매우 시급함

- 미국, 일본, EU 등의 선진국에서는 이미 온실가스 감축을 위한 신기술을 국가전략기술로 선정하고 향후 로드맵을 수립하여 중앙 및 주 정부차원의 다양한 기초원천 및 응용과제 수행 중임. 파리협약을 이행하기 위한 국가별 이산화탄소 등 온실가스 감축 기술의 상용화를 가속화하기 위한 인센티브 제공 및 국제적 프로그램을 추진 중임
- CO₂를 포집해 쓰레기와 같이 지하에 매립하는 CCS(이산화탄소 포집 및 저장, Carbon Capture and Storage)가 온난화에서 지구와 인류를 구할 수 있는 궁극적인 대안으로 제시되었으나, 최근 들어 CO₂를 단순히 버려지는 물질이 아닌 하나의 유용한 자원으로 바라보기 시작
- CCS 기술의 문제점으로 1) 현실적으로 접근 가능한 저장 장소가 제한적이며, 2) 비교적 접근 가능한 지역에 저장능력이 충분한 안정적 저장 공간이 존재한다 하더라도 정치적 이슈가 여전히 걸림돌로 작용할 가능성이 높다는 점이 걸림돌로 작용
- ‘이산화탄소 처리=비용 부담’이라는 기존의 인식을 깨고 이산화탄소를 고부가가치의 원료나 친환경적인 연료로 전환하는 CCU(이산화탄소 포집 및 재활용, Carbon Capture and Utilization)기술이 환경 문제 해결과 수익 창출의 두 마리 토끼를 잡을 수 있는 대안 중 하나로 주목
- 화학적 CCU 기술에 비해 에너지 및 자원사용량을 줄일 수 있고, CO₂ 재활용 공정이 비교적 친환경적이며 안전한 생물학적 CCU 기술 개발이 이루어져야 함
- CO₂를 생물학적으로 고정하거나 인공광합성 과정을 통해 고부가가치의 산업 부산물로 전환하는 분야는 CCU 가운데 가장 주목 받는 분야 중 하나

라. 친환경 바이오경제 체제 요구

- 생물자원경쟁
 - 생물다양성협약과 ABS (Access and Benefit Sharing) 협약에 따라 비싼 기술료와 자원 이용 부담료라는 대가를 치를 수밖에 없으며 국가간 분쟁의 소지도 있을것으로 예상
 - 각국의 생물자원 확보 및 관리와 이를 활용한 연구가 주류를 이루고 있으며, 경제적 효과가 기대되는 미생물 및 관련기술의 경우 연구용 이외 산업용으로는 엄격히 규제가 되고 있는 실정이며 이를 위반할 경우, 많은 경제적 사회적 책임이 뒤따름
- 바이오기술의 성장 가속화 - 원천소재 및 원천기술 중요성 증대
 - 21 세기에 접어들어 세계적으로 생물자원 확보 및 특허 경쟁이 치열해지고 있으며, 산업 paradigm이 대량생산에서 신지식기반 지속가능 저탄소 녹색성장으로 변화

- 인간게놈프로젝트이후, 생명현상과 생명공학기술에 이해가 급속도로 발달하였고. 또한 최근에는 생명공학기술과 정보기술 나노기술과 같은 다른 첨단기술과 융합되면서 생명공학산업의 시장규모가 확대되고 있다 (세계시장 연평균 성장률 11%)
- 미국, 일본, EU 등은 해양생명현상 및 기능에 대한 신지식을 바탕으로 대체에너지, 친환경오손처리, 이산화탄소고정 등 에너지, 환경 문제 해결 연구가 진행 중
- 미래의 바이오산업은 신규바이오자원의 확보와 첨단 생명공학적 omics분석을 통해 이루어질 것으로 예측됨
- 미국, 일본, EU, 캐나다 등의 선진국과 브라질, 중국 등 제3세계 국가들도 우수한 바이오자원 확보와 유전체 연구를 국가적으로 지원하고 있으며 기반/핵심기술로 인식
- 인간 게놈 프로젝트 이후, 생명현상이해 와 생명공학기술은 급속도로 발전하고 있고, 해양바이오분야도 시장규모가 확대기대

마. 합성생물학 기술의 발전

- 오믹스 연구와 대량의 생물학 정보 분석 computing기술은 생명공학기술에 획기적인 변화 가져옴. 최근에 이를 활용한 합성생물학(synthetic biology)은 다양한 생명공학분야에 적용
- 미국 J. Craig Venter Institute(JCVI)는 오믹스 연구를 기반으로 합성 생물학(synthetic biology)을 이용하여 바이오에너지 및 바이오산업소재 생산을 위한 모델생물을 개발. JCVI는 화학적 인공합성을 통하여 1.08 Mb(mega base) 사이즈의 미코플라스마 마이코이데스(Mycoplasma mycoides) 유전체를 합성하는데 성공하였으며, 합성된 유전체는 세포내에서 완벽하게 작동됨을 확인
- 일본 가오 주식회사에서는 미생물 유전체정보의 이용에 관한 경제산업성의 프로젝트에 참여하여, 3개 대학과 공동으로 단백질 생산에 특화된 숙주미생물세포 창제기술을 개발, 최소 유전체구조를 가지는 물질생산 공장(MGF, minimum genome factory)의 개발 연구를 진행

바. 이산화탄소의 자원화 원천기술의 필요성

- 우리나라는 에너지 수입의존도 96.6% (2007년), 세계 4위 원유수입국 (860만 배럴), 에너지수입액 960억불로 전체 수입액의 36% 차지하고 있으며 신재생 에너지 보급율 2.24% (2006년)임

- 기후변화협약에 대응하기 위해 한국은 국가적인 차원에서 2030년 총 국가 배출량 전망치(BAU) 대비 37%를 감축하겠다는 내용의 국가별 기여방안(INDC)을 UN에 제출한 상태 따라서 이산화탄소 저감 관련 원천기술 개발 필요.
- 이산화탄소 배출 저감 기술로서 이산화탄소 저배출 산업구조로의 전환 등의 장기적 플랜 뿐 아니라, 경제성을 담보한 이산화탄소 회수 및 활용 기술 확보가 매우 시급함
- 국내의 기존 이산화탄소 배출 저감 기술은 대량배출원으로부터 이산화탄소를 포집 및 회수한 후 이를 대수층, 지층, 심해 및 폐유전에 저장하는 CCS (Carbon Capture & Storage) 기술을 중심으로 이루어지고 있으나, 이산화탄소를 땅 속이나 해저에 가두는 탄소포집은 핵폐기물 처분장처럼 심각한 위험이 존재하고 현 수준에서는 경제성과 안전성이 떨어지며 저장 공간, 기간이 제한적이므로 근본적 대책이 아니라는 평가
- 또한 CCU의 기술도 mineralization 등의 일부기술에 제한적으로 시도되고 있어 다양한 이산화탄소 활용 원천기술의 필요성이 부각되고 있음
- 여러 한계를 지닌 단순한 저장으로서의 CCS가 아닌 이산화탄소를 이용하여 고부가가치 물질을 직접 생산하는 근본적인 대책으로서의 CCU (Carbon Capture & Utilization) 기술로의 전환이 부각되고 있음

사. 해양 바이오경제시대

- 그동안 육상생물자원 중심으로 많은 연구가 진행되어 왔고, 일부 상업화가 이루어질 정도로 기술이 성숙되고 있으나, 해양의 생물다양성을 바탕으로 해양생물의 독특한 생명현상과 이를 바탕으로 원천기술 개발을 위한 다양한 프로그램이 가동 중에 있음
- 특히 해양수산부는 2004년부터 해양바이오 프로그램을 바탕으로 해양생물자원, 유전체, 신약, 신소재, 바이오에너지개발 분야의 R&D를 통해 집중적인 해양생명공학기술 개발에 투자하고 있음
- 해양과학기술원에서는 해양생명공학연구센터를 중심으로, 다양한 해양환경으로부터 한생물자원을 확보하여 ‘해양극한자원뱅크’를 운영하고, 다양한 유용한 해양극한생물 자원의 유전체연구를 통해 극한생명현상을 이해하고, 이를 바탕으로 유용한 바이오신소재 발굴, 바이오수소, 에너지연구에 노력해옴
- 확보된 해양생물 자원의 유용한 가치를 확보하고, 전세계적으로 진행되고 있는 오믹스활용연구를 통해 bioindustry산업의 원천,응용기술을 개발하여 국가의 국격을 높이고, 미래산업 창출이 가능할 것으로 기대됨

제2절 연구의 내용 및 범위

1. 연구개발의 최종목표

- 비광합성¹⁾ 해양·극한 미생물의 탄소대사²⁾ 과정 규명 및 활용 기술 개발
 - 다양한 해양·극한 환경으로부터 신규 비광합성 미생물·유전자원을 확보하고 오믹스 분석을 통해 탄소대사 과정 이해
 - 보유한 탄소대사경로를 기반으로 게놈 편집(genome editing), 대사경로 재설계 등을 통한 유용물질 생산 균주 제작 및 성능평가
 - 가스 또는 해양바이오매스 기질을 이용한 미생물 고농도 배양기술 개발

- 정성적 목표
 - 비광합성 해양·극한 미생물·유전자원 확보 및 분석
 - ; 신규 미생물 10종 이상 확보, 유전체 해독 10건, 탄소대사 규명 2건
 - 해양·극한 미생물 탄소대사 재설계 및 성능평가
 - ; 재설계 균주 10주, 유용 균주 5주 제시
 - 해양·극한 미생물 생물반응기 배양기술
 - ; 세포농도 (OD₆₀₀) > 2.0

- 정량적 목표
 - SCI(E)급 논문 30편, 국내특허 출원/등록 5건/3건, 국제특허 출원/등록 2건/1건

2. 연구개발 목표 및 내용

가. 비광합성 해양·극한 미생물·유전자원 확보 및 분석

국내외 해양환경 유래 다양한 비광합성 특이 탄소대사 미생물 및 유전자원을 확보하고 특성을 분석

-
- 1) 비광합성 미생물(non-photosynthetic chemotroph): 화학무기영양(chemolithotrophs)과 화학유기영양(chemoorganotrophs)을 포함하며, 에너지원으로 환경내의 전자공여체(유기물 혹은 무기물)를 산화하여 얻고 탄소원은 무기탄소(inorganic carbon)를 이용하는 미생물을 의미함. 비광합성 미생물은 자가영양(autotroph) 혹은 종속영양 생물로 나뉘며 (Hyper)thermophilic archaea, Clostridium, Ralstonia 등을 주 연구 대상으로 하였다.
 - 2) 탄소대사: 본 연구에서의 탄소대사는 C1가스(CO, CO₂), 해양바이오매스(다당류) 등의 탄소원을 이용하여 미생물 내에서 일어나는 모든 생리학적 탄소대사과정을 의미함.

- 해양·극한 환경 유래 신규 비광합성 미생물·유전자원 확보
- 미생물 특성분석, 유전체 해독 및 탄소대사 경로 분석

나. 해양·극한미생물 탄소대사 재설계 및 성능평가

기존연구 및 새롭게 확보된 유전자원, 유전자 조작 툴 박스, 핵심 연구결과를 기반으로 탄소대사(C1가스, 해조류)를 이해하고 게놈편집(genome editing)을 통하여 탄소대사 재설계 균주 개발

- C1가스 이용 해양·극한미생물을 이용한 탄소대사 재설계 균주 개발
 - 탄소대사 관련 유전자들을 재조합하여 C1 가스=>유기산으로 전환 가능한 시스템을 구축하고 유기산 생산이 가능한 탄소대사 재설계 균주 개발
- 해조류 이용 해양·극한미생물을 이용한 탄소대사 재설계 균주 개발
 - 해조류 다당류 분해 유전자군 및 알콜 생산 관련 유전자들을 도입하여 해조류=>알콜 생산이 가능한 탄소대사 재설계 균주 개발
- 탄소 대사능 보유 해양·극한 미생물 균주 개발
 - 초고온 고세균의 생물학적 탄소 고정화에 이용하기 위해 고온성 박테리아 유래 탄소 고정 대사경로를 탐색 및 선정하고 초고온성 고세균 균주에 도입하여 탄소 고정화능을 획득한 탄소대사 재설계 균주 개발

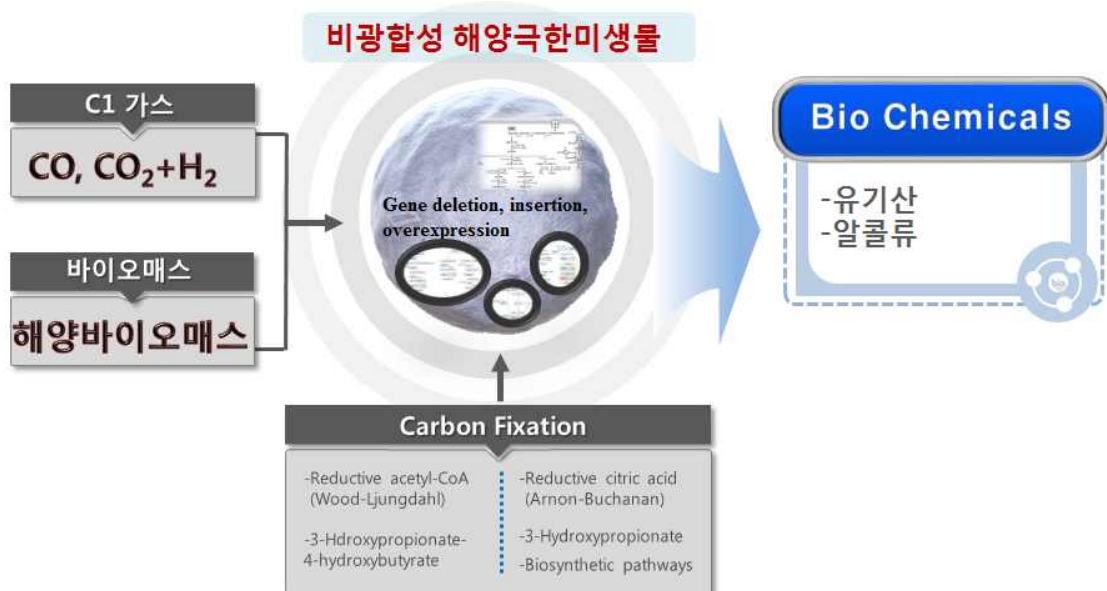


그림 1-3. 연구개발의 모식도

다. 해양극한 미생물 고농도 배양기술

기존연구에서 확보한 가스발효기술을 바탕으로 가스 및 해양바이오매스 기질을 이용한 고농도 세포배양기술을 개발

- 가스발효에 적합한 생물반응 시스템 개발
- 해양바이오매스 활용 해양극한미생물의 고농도 발효공정 개발

라. 핵심기술

- 혐기성 배양 기술: 혐기성균주 성장에 필요한 산소제거, 배지제조, 가스 주입 기술 등을 포함
- 오믹스 분석 기술: 유전체, 메타게노믹스, 전사체, 대사체, 생물정보 분석기술
- 대사공학 및 게놈 편집 기술: 유전자 수준이 아닌 유전체(게놈) 수준에서의 편집(editing)을 통하여 대사과정을 재설계하는 것을 의미함
- 생물반응기 기술: 비광합성 해양극한 미생물의 경우, 세포농도 (OD600) > 2.0 이상을 고농도 세포배양 기술로 정의함
- 가스발효 기술: 미생물을 이용하여 일산화탄소, 이산화탄소, 메탄, 합성가스과 같은 탄소원 역할을 하는 가스기질을 이용하는 생물반응기를 운전하여 이들 가스를 유용한 산물로 전환 가능

1. 광합성생물의 탄소전환 기술

가. 육상식물

- (1) 조림, 재식림, 작물재배 및 목축 등 혼농임업을 통한 탄소 격리(sequestration) 중에서 목초 지나 농작물 재배 (3 Gt carbon/year)보다 나무 재배 (550 Gt carbon/year)가 탄소 sink에 효과적이다.
- (2) 바이오연료를 생산하는 농작물을 생산하기 위해 대단위로 토양을 사용하는 것은 토양을 식량 생산에 사용할 것이냐 에너지 생산에 사용할 것이냐의 경쟁 관계를 유발할 수 있다.
- (3) 주성분이 녹말과 목질섬유소인 육상식물의 바이오매스를 이용하여 바이오에탄올, 바이오부탄올 등 액체연료와 바이오가스를 생산하기 위한 과정은 단단한 목질을 고온 고압에서 산을 이용해서 1차 분해하는 과정, 중화 과정, 목질의 당화 과정, 발효 과정 등의 복잡한 여러 단계를 거쳐야 하며 부차적으로 발생하는 리그닌 성분의 활용 기술, 폐기물 처리 등 비용이 많이 드는 공정이 요구된다. 보다 효과적인 목질계 바이오매스의 활용을 목표로 하여 셀룰로오스를 분해하여 저비용으로 바이오에탄올을 생산할 수 있는 세포주의 개발이 이루어지기도 하였다 (Olson et al., 2012).

나. 미세조류

- (1) 주로 담수 또는 해양에서 서식하는 미세조류는 육상식물 (평균 0.5%)에 비해 높은 광합성 효율 (3-8%) 가지는 것으로 밝혀졌다.
- (2) 미세조류는 부생가스 (이산화탄소 함유율 6-13%)를 이용하는 것이 가능하므로 CO₂ 공급 비용이 감소하여 경제성을 높일 수 있다.
- (3) 이와 같은 장점들에 착안하여 이산화탄소 고정 효율 및 바이오매스 생산성이 높은 균주 개발 연구가 진행되었다 (Cheng et al., 2013).
- (4) 사례로 부생가스의 독성 성분에 의한 저해를 극복한 균주 개발로 67% 이산화탄소 포집이 가능하다는 결과가 보고된 바 있다 (Li et al., 2011).
- (5) 또한 미세조류는 세포내 지질 (1-80%/건조중량), 탄수화물, 단백질 함량이 높아 제3세대 바이오연료 공급 원료로 인식되고 있다.

- (6) 바이오디젤, 바이오에탄올, 바이오부탄올 등 생산하고자 하는 바이오연료에 따라 지질, 탄수화물 함량이 높은 미세조류개발이 가능하며 산물에 대해 다양한 발효미생물을 이용하여 바이오연료를 생산할 수 있다.
- (7) 미세조류 세포벽을 산-열 처리후 포도당 및 유기산 대사를 통한 혐기적 광발효과정으로 바이오수소를 생산하는 것도 가능하다. 미세조류의 혐기소화를 통해 바이오가스를 생산할 경우 효율이 높아진다. 그러나 아직까지 상업적 스케일에선 실용성이 낮다는 한계를 지닌다.
- (8) 미세조류 바이오매스와 바이오알콜 대사 또는 지질 추출 과정 후 남은 부산물을 혐기소화하여 60% 이상 바이오메탄 생산이 가능하다는 보고도 있다 (Chen et al., 2013).
- (9) 미세조류를 이용한 CO2 저감기술의 한계와 기술의 현재 상황은 다음과 같다.
 - (가) 미세조류 1톤의 이산화탄소 흡수 능력은 1.8톤에 달하나, 전체 가치사슬상의 이산화탄소 배출량 감안시 바이오매스 1톤당 이산화탄소 순감축량은 0.5톤 수준으로 추산
 - (나) 광합성을 위한 대단위의 필요 부지면적이 요구됨
 - (다) 이산화탄소 순감축 효과를 향상시키기 위해 생산능력이 높은 미세 조류 균주 개발이 필요하나 유전자 도입이 어려움
 - (라) Cyanobacteria는 배지성분이 단순하고 다양한 유용 산물 생산을 위한 유전자 조작이 가능하여 연구가 집중되고 있음
 - (마) 미국 Algenol Biotech사는 *Synechocystis* 종을 유전자조작하여 에탄올을 생산함

2. 비광합성 미생물의 탄소 전환

가. 비광합성 미생물에 의한 탄소 전환기술은 미국 등 해외 선진국에서는 활발히 연구개발 중이나 (대표적으로 미국 에너지성의 ARPA-E program) 국내에서는 학교를 중심으로 소수의 연구그룹에 의해 제한적으로 연구가 이루어지고 있다.

나. 비광합성 탄소 고정 미생물의 장점

- (1) 탄소 고정을 위한 에너지원으로 광원을 사용하지 않아 생물학적 반응기의 활용이 용이하고 작은 부지를 활용하여 반응기를 설치하는 것이 가능함

(2) 유전자 조작 기술의 확보 및 적용이 미세조류에 비해 용이하며 대사조작이 가능함

(3) 비광합성(non-photosynthetic) 미생물을 이용한 가스발효 (gas fermentation) 기술은 세계적으로도 개발초기단계여서 기술의 성장 가능성이 큼

다. 성장과 숙신산 생산에 CO₂가 필요한 미생물인 *Actinobacillus succinogenes*를 이용하여 다양한 바이오매스 가수분해물 또는 농업 폐기물을 이용하여 숙신산을 생산하는 기술이 보고되었다 (Yu et al., 2013; Li et al., 2011).

라. *Ralstonia eutropha* (유전정보를 이용한 재분류 결과로 공식 학명은 *Cupriavidus necator*로 변경됨)를 이용하여 수소와 이산화탄소로부터 바이오플라스틱 polyhydroxyalkanoate (PHA), 디젤급의 메틸케톤 등을 생산하였다는 보고들이 있다 (Yu et al., 2013; Müller et al., 2013). 또한 광전기 장치를 개발하여 이소부탄올, 메틸부탄올 생산에 활용한 사례도 보고되었으며 (Li et al., 2012), 미생물-전기촉매작용 통합 시스템으로 생성된 수소를 이용하여 polyhydroxybutyrate, 부탄올, 파네센 (farnescene), 긴사슬 알켄 등의 생산에 대해서도 보고되었다 (Hawkins et al., 2013).

마. 대표적인 혐기성 발효미생물인 *Clostridium* 종을 이용하여 CO₂로부터 아세트산, 메탄올 등을 생산할 수 있으며, 유전자 조작된 *Clostridium* 종 (*C. ljungdahlii*)을 이용하여 합성가스로부터 부탄올을 생산할 수 있다는 보고도 있다 (Ampelli et al., 2015). 독일 Evonik 케미칼회사는 아세트산 생성균을 이용하여 산업 폐가스로부터 아세톤을 생산하고 있다.

바. 극한 환경에서 성장하는 고세균을 이용한 탄소 전환 연구로는 메탄 생성균에 의한 메탄 생산, 호염성균에 의한 PHA (polyhydroxyalkanoate) 생산 등의 사례가 있다.

사. 수소-산화 세균들이 이산화탄소 고정시 수소를 필요로 하는 것에 반해, 다른 전자공여체 (sulfide, thiosulfate, nitrite)를 이용하는 미생물군집 연구도 수행되고 있다 (Hu et al., 2009).

아. 광합성 뿐만 아니라 비광합성 경로를 통한 탄소 고정화가 해양 환경에서 일어나는 것 또한 잘 알려져 있다 (Hügler and Sievert, 2011).

자. 탄소를 전환한 바이오원료 또는 케미칼 생산 연구에 있어서 생물종의 장점 및 단점을 정리해 보면 아래 표와 같다.

표 2-1. 생물학적 탄소전환을 산업규모의 케미칼 생산에 적용시 장단점

생물종		장점	단점
광합성	조류	<ul style="list-style-type: none"> • 수생환경에 널리 분포 • 세포내 높은 지질 함량 • 고부가 부산물 생산 	<ul style="list-style-type: none"> • 빛, 물, 다량의 인 필요 • 조류 유래 바이오디젤은 저온 유동성 낮고 산화도 높음
	남세균	<ul style="list-style-type: none"> • 조류나 식물에 비해 성장과 광합성률 높음 • 다양한 연료 (수소, 에탄올, 디젤, 메탄 등) 생산 가능 	<ul style="list-style-type: none"> • 온도, pH, 빛 강도에 생산성 영향 받음
비광합성	Proteobacteria	<ul style="list-style-type: none"> • 호기성 미생물이어서 배양 용이 • 다양한 탄소원 이용 가능 • 유전자 조작 가능 	<ul style="list-style-type: none"> • 가스 발효 미개발
	Clostridia	<ul style="list-style-type: none"> • 다양한 탄소원 이용 • 유용 대사산물 생산하는 합성경로 보유 • 대사물질과 기질의 독성에 강함 • 유전자 조작 가능 	<ul style="list-style-type: none"> • 고비용 혐기 발효 • 가스 발효 미개발
	고세균 (Archaea)	<ul style="list-style-type: none"> • 메탄 (메탄 생성균), 바이오플라스틱 PHA (호염성균) 생산 • 열안정한 탄산 탈수 효소 생산 가능 	<ul style="list-style-type: none"> • 가스 발효 미개발 • 성장 조건 파악 어려움 • 대부분 종의 유전자 조작 도구 미흡

3. 국외 현황

가. 일본 RITE (지구환경산업기술연구소)는 1990-1999년 생물학적 고정화 연구에 약 1,000억 원을 집중 투자하였으며, 그 결과물로 탄소를 고정하는 우량 미세조류의 확보, 숲보다 10배의 광합성 용량을 갖는 광생물 반응기 개발 등과 소규모의 생물학적 고정화 system을 실증화하였다.

나. 일본 CRIEPI (전력중앙연구소)는 원추형 나선 관상 광생물 반응기를 제작하고 여기에 태양광을 조사함으로써 *Chlorella* sp.의 최대 광합성량이 33.2 g dry weight/m²/d에 도달하는 성과를 얻었다.

다. 미국 DOE에서는 non-photosynthetic microorganisms을 플랫폼으로 다양한 C1 compound (CO₂, HCO₃⁻, HCOOH) 및 다양한 energy source를 이용하여 바이오연료를 생산하는 연구를 진행하고 있다.

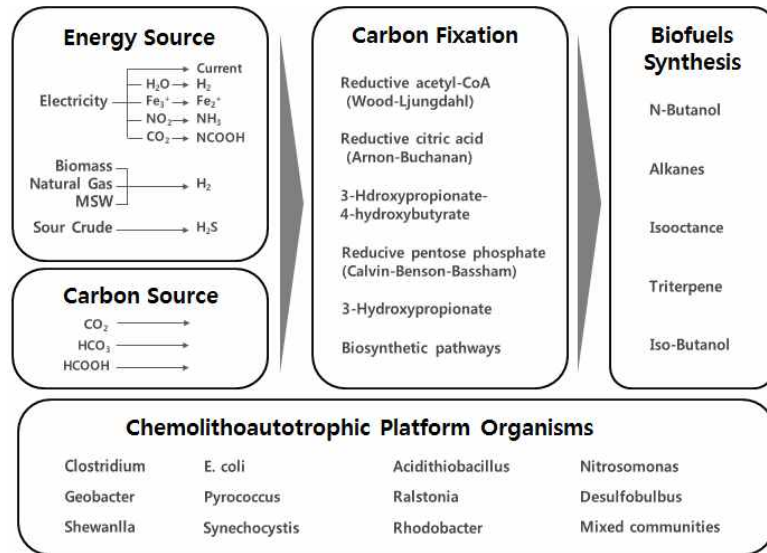


그림 2-1. 미국 DOE에서 추진하는 Electrofuels Program

- 라. 미국 NREL (National Renewable Energy Laboratory)는 1978-1996년 미세조류의 유전자 분석, 유전체 연구, 유전자 조작 등 생명 공학 기술을 이용한 균주 개량을 중점적으로 시도하였고 고지질 함량의 미세조류를 이용하여 CO_2 로부터 Bio-diesel을 생산하는 기술을 개발하였다.
- 마. 미국 Cyanotech Inc.는 미세 조류 배양 시설의 난방 목적으로 설치한 보일러에서 배출되는 연소 가스를 cyanobacteria의 일종인 *Spirulina* 배양 원료로 사용하는 폐쇄 시스템을 실증규모로 운전하여 보일러에서 배출되는 연소가스 처리비용을 \$0로 낮출 수 있다고 보고하였다.
- 바. 독일 Wolfsburg는 총길이 500 km, 총 부피 $700 m^3$ 의 규모로 온실 내에 유리로 제조된 산업용의 관형 광생물 반응기를 설치하여 연간 *Chlorella* 생산량 130-150 ton dry weight를 달성하였다.
- 사. 노르웨이의 Skulberg사는 2000년부터 자연 수계로부터 cyanobacteria의 분리·확보, cyanobacteria로부터 생리활성 물질 탐색 등의 연구를 지속적으로 수행하여 최근 30종 이상의 신규 항생물질을 보고하였다. 부차적인 고부가가치 산물의 생산은 경제성 확보에 매우 중요하다.
- 아. 미국을 중심으로 한 선진국들은 CO_2 의 생물학적 자원화에 관한 성공적인 기초연구를 활용하여 2000년대 중반이후 벤처기업의 창업이 활발하게 진행되고 있다.

4. 국내 현황

가. 新기후체제 출범(파리협정)에 따라 ‘9대 국가전략 프로젝트’에 탄소자원화 분야를 선정하고 미래부에서는 탄소자원화(CCU) 발전전략 마련하고 국가과학기술자문회의에 보고하였다 (‘16.04).

- (1) 중점 추진 전략 3대분야로 1)탄소자원화 전주기 기술개발, 2)탄소자원화 시범단지 구축, 3)탄소자원화 생태계 조성을 선정
- (2) 탄소자원화 전주기 기술개발 내용으로 1)부생가스(CO, CH₄) 전환, 2)이산화탄소 광물화, 3)이산화탄소 전환 등의 원천·상용화 기술을 포함.



그림 2-2. 신산업 창출을 위한 9대 국가전략 프로젝트

나. 미래부에서는 ‘신기후체제 대응을 위한 탄소자원화 (CCU) 발전전략’ 을 수립하였다 (국가과학기술자문회의에 보고, ‘16.04.).

- (1) 중점 추진 전략 3대분야로 1)탄소자원화 전주기 기술개발, 2)탄소자원화 시범단지 구축, 3)탄소자원화 생태계 조성을 선정
- (2) 탄소자원화 전주기 기술개발 내용으로 1)부생가스(CO, CH₄) 전환, 2)이산화탄소 광물화, 3)이산화탄소 전환 등의 원천·상용화 기술을 포함

다. 정부는 2000년대 초반에는 단위과제 형태로 시작하여 2010년대 본격적으로 CCS 사업을 추진하고 있다.

- (1) 미래창조과학부는 기후변화 대응기술 개발사업을 추진하여 40여개 산학연이 참여하는 Korea CCS 2020 사업단(한국에너지기술연구원, 2011-2020년, 1,727억원) 출범
 - 탄소 대량 배출원에 적용 가능한 CCS 원천기술 개발을 중심으로 탄소 포집, 저장, 전환 기술의 통합적 기술개발을 추진

5. 국내의 탄소자원화(CCU) 기술개발 동향

가. 정부는 2000년대 초반에는 단위과제 형태로 시작하여 2010년대 본격적으로 CCS 사업을 추진하고 있다.

- (1) 미래창조과학부는 기후변화 대응기술 개발사업을 추진하여 40여개 산학연이 참여하는 Korea CCS 2020 사업단(한국에너지기술연구원, 2011-2020년, 1,727억원) 출범
 - 탄소 대량 배출원에 적용 가능한 CCS 원천기술 개발을 중심으로 탄소 포집, 저장, 전환 기술의 통합적 기술개발을 추진.

나. 부생가스 전환 기술개발

- (1) 미래창조과학부는 C1 가스 리파이너리 사업 (서강대, 2015-2024, 1,415억원) 추진
 - C1 가스(CO, CH₄)를 원료물질로 화학적·생물학적 방법을 통하여 수송용 알코올, 올레핀/BTX, 폴리머 등의 다양한 화학소재 기술 개발 연구를 진행.

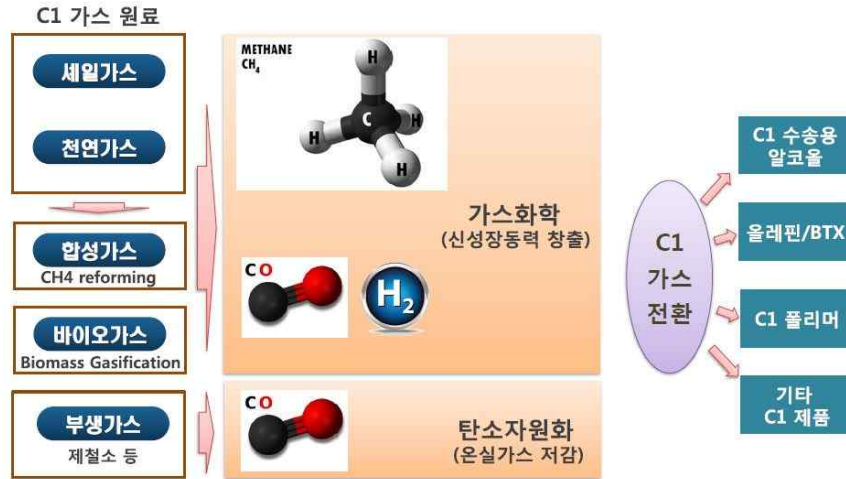


그림 2-3. C1 가스 리파이너리 사업단 기술개발 분야

(2) 해양수산부는 해양생명공학기술개발사업으로 추진되는 부생가스 이용 바이오수소생산 기술 개발 과제(2009-2017년) 추진

- 한국해양과학기술원은 당진 제철소에 1톤 규모의 생물반응기를 설치하고 부생가스를 직접적으로 이용하여 바이오수소 실증생산 연구를 진행('16.05.).



그림 2-4. 당진 제철소 내 바이오수소 실증플랜트

다. 이산화탄소 전환 기술개발

(1) 생물학적 이산화탄소 전환 기술개발

- (가) 미래창조과학부는 기후변화대응기술사업으로 광합성 미세조류 기반 또는 효소 기반의 이산화탄소 전환 기술개발을 추진 중에 있음(표 2).
- (나) 바이오에너지 개발 사업의 일환으로 해양수산부에서 지원하는 ‘해양바이오에너지 개발 연구단(인하대, 2009-2018년, 490억원)’, 미래창조과학부 글로벌프로티어사업으로 추진하는 ‘차세대바이오매스 연구단(KAIST, 2010-2018년, 1,065억원)’ 역시 미세조류 기반의 바이오연료, 바이오화합소재 개발 연구를 추진 중에 있음.
- (다) 또한, 화력발전소에서는 발전소에서 발생하는 이산화탄소와 온배수로 미세조류 고속, 대량배양을 통하여 이산화탄소 저감과 더불어 고부가 유용물질을 생산하는 연구를 진행.
- (라) 농촌진흥청에서는 고순도의 이산화탄소를 이용하여 농작물 재배 생산성의 수율을 높이는 연구를 진행.

표 2-2. 기후변화대응기술개발로 추진 중인 국내과제 현황

사업명	과제명	기관	과제책임자	연구비(백만)	연구목표
기후변화대응기술개발	생물학적 이산화탄소 고속전환 유기 자원화 기술	고려대	심상준	530	광합성 연구와 미세조류 배양을 최적화하고 유용물질의 생산성을 극대화할 수 있는 저비용 단세포 맞춤형 미세유체 배양기술을 개발
기후변화대응기술개발	분자생물학적 개량을 통한 고효율 이산화탄소 고정 미세조류 개발	한양대	진연선	250	발굴된 이산화탄소의 고속전환 능력을 보유하고 Biomass의 증감에 관련된 유전자를 유전자 편집을 통해 표적 지향적 돌연변이 미세조류를 확보
기후변화대응기술개발	혁신적 CO ₂ reductase 개발 및 이를 이용한 전기화학적BT-NT 융합개미산제조시스템개발	광운대	김용환	500	BT-NT 기술의 융복합을 통하여 전기를 환원력으로, 이산화탄소를 탄소원으로 활용하여 효과적인 이산화탄소 환원효소의 촉매작용을 통하여 개미산을 효율적으로 생산하는 기술을 개발

기후변화대 응기술개발	바이오리파이너리 를 위한 미생물 시스템대사공학 원천기술 개발	한국과학 기술원	이상엽	1550	바이오리파이너리 구축에 있어 핵심 전략 기술인 미생물 시스템 대사공학 플랫폼기술을 개발
기후변화대 응기술개발	단백질 공학을 통한 고효율 이소프렌 생합성 효소의 개발	경상대	이곤호	130	바이오이소프렌을 고농도로 생산하기 위해서 이소프렌 생합성 경로 효소들 을 효소기질 상호작용에 대하여 X-선 삼차원 구조 분석 및 무작위 돌연변이 를 통하여 개량하여 고효율의 효소를 개발
기후변화대 응기술개발	대사재설계를 통한 바이오이소프렌 고생산 세포공장 개발	경상대	김선원	160	바이오이소프렌을 고농도로 생산하는 미생물 세포공장을 대사재설계를 통해 서 개발하는 것을 목표
기후변화대 응기술개발	발효최적화를 통한 바이오이소프렌 대량생산 배양공정 개발	한국 생명공학 연구원	최의성	216	이소프렌 고생산 균주들의 발효공정 최적화를 통해서 세계 최고수준의 이 소프렌 생산기술을 완성하는 것을 목 표

제3장

연구개발수행 내용 및 결과

제1절

비광합성 해양·극한 미생물·유전자원 확보 및 분석

1. 신규 해양미생물자원 확보

가. 다양한 환경으로부터 비광합성 탄소대사 미생물의 분리

대부도, 영흥도, 오이도 등 연안 갯벌과 피지, 인도양 열수구 등의 다양한 해양환경으로부터 CO, CO₂를 head space gas로 하거나 Clostridium용 배지, 해초, cellulose 등의 고분자 유기물 제공하여 미생물을 농후배양하고 단일 미생물을 분리하였다. 농후배양은 중온, 고온, 초고온으로 실시하였다. 단일 균주 분리 후 보존 완료된 균주는 아래와 같다 (표 3-1).

표 3-1. 탄소대사 연구 목적으로 분리한 균주 리스트

Strain	Sample site	동정 정보		비고
		표준균주	유사도	
HAWD1	인천 북성포	<i>Clostridium aestuari</i>	96.7%	Acetogen 배지
HAWD2	안산 갈대습지공원	<i>Clostridium soprophaeroides</i>	90.8%	Acetogen 배지
HAWD3	제부도 퇴적토	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i>	96.6%	Acetogen 배지
HAWD4	영흥도 퇴적토	<i>Acetobacterium fimetarium</i>	96.6%	Acetogen 배지
HAWD5	순천만 퇴적토	<i>Terrisporobacter mayombe</i>	99.5%	Acetogen 배지
MCWD3	울릉분지 퇴적토	<i>Sporosalibacterium faouarense</i>	92.8%	CO ₂ 농후배양
MCWD4	통영 퇴적토	<i>Brassicibacter mesophilus</i>	94.7%	고온성
MCWD5	무안군 염전	<i>Robinsoniella peoriensis</i>	94.8%	고분자물질
MCWD6	무안군 염전	<i>Clostridium methylpentosum</i>	90.8%	CO ₂ 농후배양
CLWD1	통영 해조류	<i>Moorella thermoacetica</i>	99.7%	고온성
CLWD3	안산 갈대습지공원	<i>Clostridium acetobutylicum</i>	96.7%	Acetogen 배지
SH24	시화호 퇴적물	<i>Clostridium lungdahlii</i>	99.6%	CO 농후배양
T18-2	대부도	<i>Moorella thermoacetica</i>	99.8%	고온성
AWRP45-1	안산 갈대습지공원	<i>Prevotella heparinolytica</i>	88.0%	CO 농후배양
Oi401-1	오이도 퇴적물	<i>Clostridium neopropionicum</i>	97.5%	CO 농후배양
YH40-2	영흥도 퇴적물	<i>Anaerovorax odorimutans</i>	93.4%	CO 농후배양
PA55-2	음성 퇴적물	<i>Moorella humiferrea</i>	98.1%	고온성

분리 균주 중 영흥도 갯벌로부터 CO 50% 조건에서 성장하는 중온성 미생물 YH40-2은 분자동정 결과 Clostridium 계열의 *Emergencia timonensis*와 94% 유사도를 보였다. (그림 3-1)

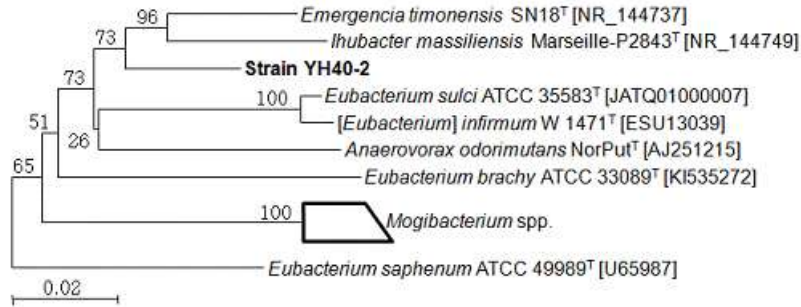


그림 3-1. 신규 확보균주 YH40-2의 16S rRNA 유전자 염기서열에 근거한 계통학적 위치

분리균주 중 오이도 갯벌로부터 CO 50% 조건에서 성장하는 중온성 미생물 Oi401-1 균주는 분자동정 결과 Clostridium 계열의 *Clostridium neopropionicum*과 98% 유사도를 보였다. (그림 3-2)

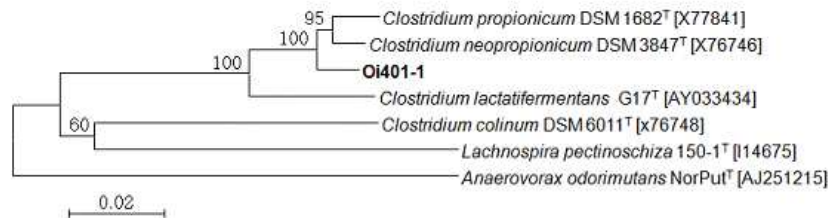


그림 3-2. 신규 확보균주 Oi401-1의 16S rRNA 유전자 염기서열에 근거한 계통학적 위치

나. 화학독립영양(혐기) 또는 고온성(혐기) 미생물자원 확보

지속적인 독립영양미생물 확보를 목적으로 하여 acetogen (AM), methanogen (MMJ) (with SO₄, sulfate, or nitrate), Artificial Sea Water (ASW)-YT, Iron Reducer (IRRMB) medium 등 총 7가지의 autotrophic 또는 heterotrophic 배지를 사용하여 대양 심해 (인도양 및 태평양), 국내 연안(안산, 인천, 서천) 등의 퇴적토 또는 암석시료를 확보하였다. 대양 심해 시료로부터 30도, 55도, 80도 autotrophic 조건에서 1,068 ea, 국내연안 시료로부터 30도 autotrophic 조건에서 24 ea를 농후배양 및 계대배양을 수행하였다. 이 중 대양 및 연안시료의 30도, autotrophic 또는 heterotrophic 조건에서 6주를 확보하고 16S rRNA 유전자를 이용한 분자동

정을 수행하였다. 55도 조건에서 3주를 추가 확보하였다. 분리가 완료된 균주는 모두 박테리아였으며, 분리 진행 중인 균주 중 1주가 아키아임을 확인하였다 (그림 3-3).



그림 3-3. Bacterial or archaeal primers를 이용한 PCR 분석

분리균주 중 연안에서 확보된 3개의 균주는 표준균주와 93-96% 상동성을 나타내는 신종으로 추정되며 독립영양조건에서 분리되어 독립영양 여부를 확인하였다. 대양에서 분리된 IOR2 균주는 *Desulfovibrio*와 97% 상동성을 보였다 (표 3-2).

표 3-2. 분리 균주의 분자동정 결과

시료	균주번호	최근연종		배지 종류	비고
		종명	유사도(%)		
18-09	IOR2	<i>Desulfovibrio senegalensis</i>	96.4	ASW-YT	중온성
18-08	IOR5	<i>Paraclostridium sordellii</i>	98.7	ASW-YT	중온성
18-09	IOR7	<i>Tepidibacter mesophilus</i>	98.6	ASW-YT	중온성
3-a	SL6	<i>Aminipila butyrica</i>	96.1	CO2/H2	중온성
4-a	SL7	<i>Clostridium putrefaciens</i>	92.7	CO2/H2	중온성
4-a	SL9	<i>Clostridium putrefaciens</i>	92.9	CO2/H2	중온성
18-09	IOT3	<i>Caloranaerobacter azorensis</i>	99.4	ASW-YT	고온성
18-10	IOT10	<i>Camnicella sporogenes</i>	98.9	IRBIM	고온성
18-10	N6	<i>Clostridium oceanicum</i>	98.7	ASW-YT	고온성

분리균주에 대하여 계통분석학적 분석을 수행하였다 (그림 3-4).

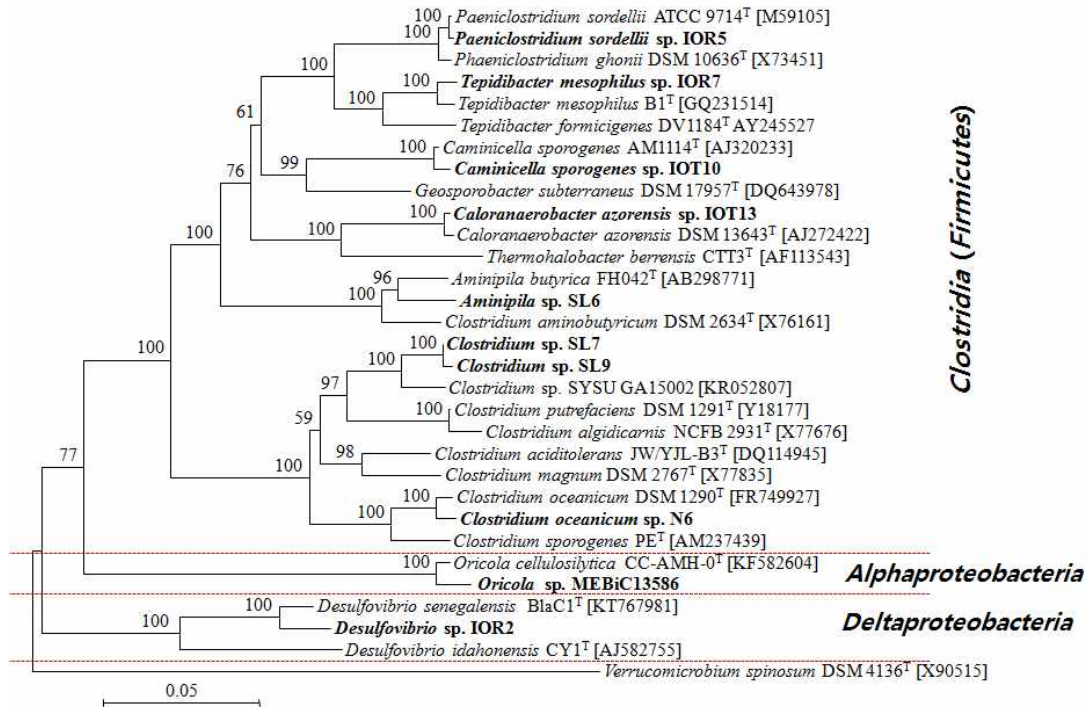


그림 3-4. 확보된 균주의 계통분류학적 분석

고분자 화합물 분해 미생물자원 확보를 목적으로 하여 키틴 또는 셀룰로스를 포함하는 배지를 사용하여 국내연안(안산, 인천, 서천) 등의 퇴적토 시료를 접종하였다. 55도 조건에서 8 ea를 농후배양 및 계대배양을 수행하여 15주 미생물 자원을 확보하였으나 대부분 기존 보고된 미생물들과 높은 상동성을 보였으며 1주가 고분자 유기물을 분해하는 것으로 알려진 *Oricola cellulosilytica* 와 98% 수준의 상동성을 보였다 (그림 3-4).

다. 보유 균주 중 CO, CO₂ 이용 능력 비교를 통한 집중 연구 대상 선정

분리·보유 중인 탄소고정 미생물의 특성 분석을 통해 집중 연구 대상 균주를 선정하고자 하였다. CO 또는 CO₂ 이용이 확인되거나 가능성이 높은 것으로 평가된 균주는 아래 표와 같으며 이 중 성장 특성과 생산 산물을 고려하여 CLWD1과 HAWD4를 추가 연구대상으로 제안하였다.

표 3-3. CO 또는 CO2 이용균주 특성 분석

균주번호	분자동정 (표준균주와의 유사도)		이용 가능 기질		비고
	종명	유사도	CO	CO2	
HAWD4	<i>Acetobacterium fimetarium</i>	96.6%	+	W	중온성
HAWD5	<i>Terrisporobacter mayombi</i>	99.5%		+	중온성
CLWD1	<i>Moorella thermoacetica</i>	99.2%	+	+	고온성, Acetogen
T18-2	<i>Moorella thermoautotropica</i>	99.8%	+	+	고온성, Acetogen
PA55-2	<i>Moorella humiferrea</i>	98.1%	?	?	고온성, 느린 성장, Acetogen
SH24	<i>Clostridium lungdahlii</i>	99.6%	+	+	중온성

라. 확보 미생물의 동정

확보된 미생물 중 *Acetobacterium* 속에 속하는 HAWD4 균주의 동정 진행하였다. 생화학 적 특성과 지방산 조성 등 여러 특성들이 신종에 부합되며 보완실험 진행하였다.

중온성, 중속영양세균들에 대해 지속적으로 동정 진행하였으며, 광양만 갯벌에서 분리된 MEBiC09124를 *Oleigrimonas citrea*로 보고하였고, 영광군 염전에서 분리된 MEBiC09412 를 신종 미생물 *Marinirhabdus citrea*로 제안하였다.

2. 기 보고 미생물 확보

가. *Moorella thermoacetica* DSM 521

확보한 *Moorella thermoacetica* 균주의 비교유전체 분석을 통하여 2,3-BDO 가능성을 확인하 기 위한 대조군으로서 표준균주인 DSM 521를 DSMZ로부터 분양받아 autotrophic(CO2/H2) 조건에서 배양하였다.

나. *Thermosulfidibacter takaii*

초고온 고세균 NA1에 rTCA(reductive TCA) 유전자군을 도입하고자 초고온 박테리아인 *Thermosulfidibacter takaii* 균주 및 genomic DNA를 DSMZ로부터 분양 받았다. 2세부 연구주 제와 연계하여 추가 연구를 진행하였다.

다. *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

표준균주 *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6 및 DNA를 DSMZ로부터 분양받았다. TK-6 균 주는 최초의 호기성 수소산화 미생물로 보고되었으며 Sanger method와 NGS 방법 각각으로

유전체 해독이 진행되었다. TK-6 균주의 유전체 크기는 1.74 Mbps, G+C 44.0 mol%, CDS 1,899개로 보고되었으며 reverse TCA cycle을 보유하였다. DNA를 활용한 연구가 되었으며, 자체 배양에는 어려움을 겪었다.

라. *Aquifex pyrophilus* DSM 6858

표준균주 *Aquifex pyrophilus* DSM 6858을 DSMZ로부터 분양받았다. DSM 6858 균주는 유전체 해독이 수행되지 않았으나 같은 속에 속하는 *A. aeolicus*의 경우 약 1.6 Mbps의 유전체 크기를 가지며 reverse TCA cycle을 보유하는 것으로 보고되었으며 이산화탄소 고정능이 보고되었다. 질산염을 제공하는 혐기조건으로 배양시 낮은 cell density를 보임으로써 보다 많은 생체량을 얻기 위해 시도하였다.

3. 확보 미생물의 특성 분석

가. *Moorella thermoacetica* 균주들의 계통분석, 유기산 생성 및 유전체 해독

확보된 *Moorella thermoacetica* 균주 3주 중 표준균주와 99.7% 유사도를 보이는 CLWD1 (그림 3-5)의 배양 및 유전체 해독을 진행하였다.

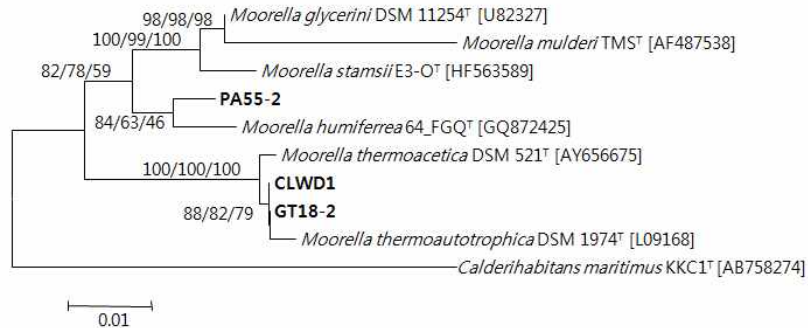


그림 3-5. 기 확보균주 GT18-2의 16S rRNA 유전자 염기서열에 근거한 계통학적 위치

PacBio system을 이용해 유전체 해독을 실시한 결과 *Moorella thermoacetica* CLWD1 균주는 2,867,731 bps의 유전체 크기를 가지며 총 2,863개의 유전자를 보유한 것으로 확인되었으며 이는 표준균주보다 약 230,000 bps 정도 큰 크기에 해당하였다 (그림 3-6). 표준균주 유전체와 ANI 분석을 실시하였을 때 98.5로 나타남으로써 신종으로 분류될 수는 없었다.

KEGG metabolic pathway를 기준으로 탄소고정과 관련된 대사과정을 분석해 보면 rTCA cycle은 불완전한 반면 Wood-Ljungdhal pathway는 완전하게 보유하고 있음을 확인하였다 (그림 3-7).

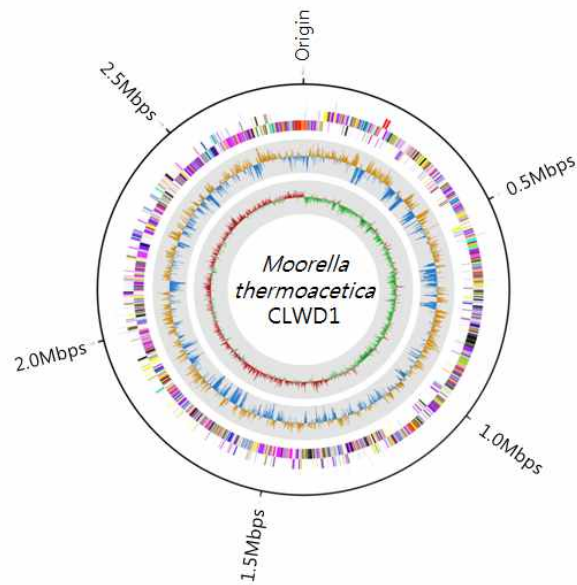
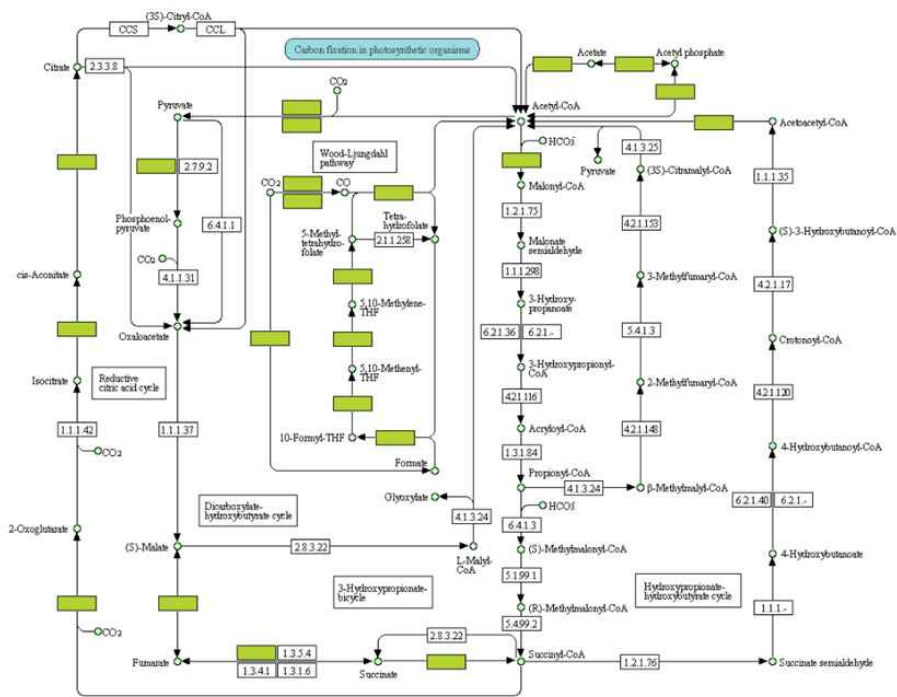


그림 3-6. *Moorella thermoacetica* CLWD1 균주의 유전체 지도



00720 11/17/14
© Kanehisa Laboratories

그림 3-7. *Moorella thermoacetica* CLWD1의 탄소고정 대사과정. 연두색은 대사경로 중 보유하고 있는 유전자를 의미함.

HPLC를 이용하여 *M. thermoacetica* 균주의 유기산 생성 여부를 CO조건과 CO₂ 조건에서 확인하였다. 분석 결과 균주는 CO₂ 조건에서 13.2 mM, CO 조건에서 12.6 mM의 acetate를 생산함으로써 두 조건 모두에서 비교적 높은 농도의 유기산을 생성함을 확인하였다. (그림 3-8).

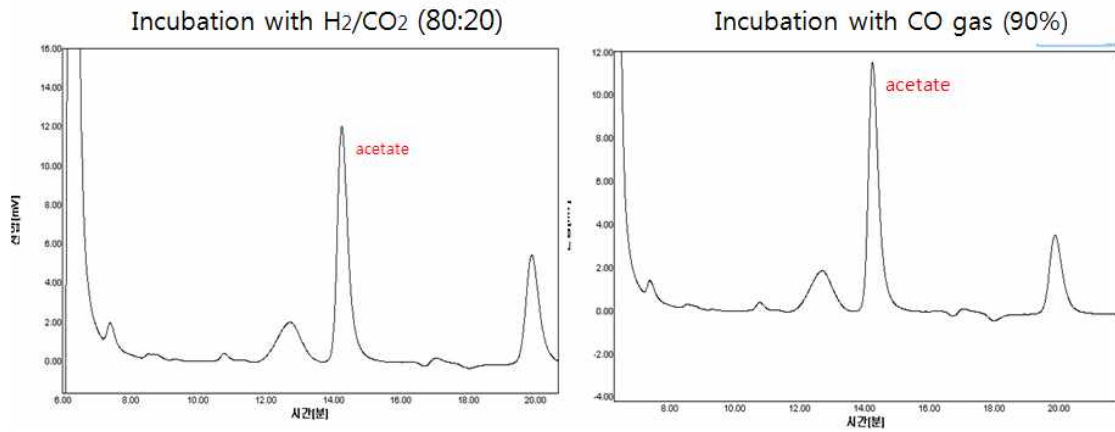


그림 3-8. *M. thermoacetica* 균주의 기질조건별 acetate 생산 분석

나. *Moorella thermoacetica* CLWD1의 비교유전체 분석 및 2,3-BDO 생산가능성

기 확보한 *Moorella thermoacetica* CLWD1의 유전체 정보를 보고된 12주의 *M. thermoacetica* 와 비교 분석하였다.

ANI 분석결과, 기 보고된 표준 균주들과 93-98%의 상동성을 나타내었다. 하지만, DSM 21394 균주의 경우, 계통분석이 잘못된 것으로 생각되며, 이를 제외하면 98% 이상의 상동성을 보일 정도로 균주간 유사도가 높은 것으로 분석되었다 (표 3-4).

표 3-4. *Moorella thermoacetica* 균주들 사이의 ANI 분석 결과

		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	DSM 103132	---	98.74	93.26	98.64	98.76	98.76	98.74	97.72	98.80	98.52	98.63	97.81	98.38	98.77
2	DSM 12797	98.70	---	93.09	98.73	98.68	98.68	98.66	98.26	98.71	98.62	98.44	97.63	98.13	98.68
3	DSM 21394	93.19	92.99	---	93.14	92.87	92.88	92.87	91.60	93.14	93.07	92.96	91.49	92.95	92.88
4	Y72	98.64	98.70	93.14	---	98.62	98.62	98.66	97.98	98.70	98.60	98.57	97.97	98.28	98.62
5	DSM 6867	98.86	98.85	93.12	98.71	---	99.99	99.94	98.30	98.94	98.60	98.99	98.46	98.37	99.99
6	MTA3	98.92	98.86	93.09	98.72	99.99	---	99.95	98.20	98.99	98.63	99.06	98.40	98.34	99.99
7	DSM 521	98.90	98.86	93.02	98.78	99.95	99.95	---	98.21	99.02	98.75	99.02	98.45	98.32	99.96
8	CLDW1	98.65	98.76	93.08	98.67	98.44	98.43	98.40	---	98.66	98.62	98.42	97.59	98.08	98.44
9	DSM 7417	98.77	98.79	93.05	98.78	98.86	98.86	98.87	98.33	---	98.65	98.45	98.22	98.24	98.87
10	DSM 11768	98.42	98.48	92.97	98.48	98.35	98.35	98.42	97.80	98.44	---	98.22	97.43	98.03	98.34
11	DSM 12993	98.69	98.50	93.10	98.61	98.95	98.96	98.96	98.00	98.57	98.44	---	98.05	98.66	98.96
12	T18-2	98.71	98.50	93.20	98.70	98.87	98.87	98.84	97.77	98.75	98.60	98.62	---	98.26	98.87
13	DSM 103284	98.50	98.30	93.01	98.43	98.28	98.28	98.25	97.62	98.34	98.24	98.67	97.49	---	98.28
14	DSM 2955	98.87	98.84	93.08	98.69	99.98	99.99	99.94	98.23	98.95	98.62	98.99	98.45	98.34	---

유전체 기반 계통분석을 통하여 CLWD1 균주의 경우 DSM 12797 균주와 가장 가까이 위치하였으며, GT18-2 균주의 경우 DSM7417 균주와 가장 가까이 위치하였다 (그림 3-9).

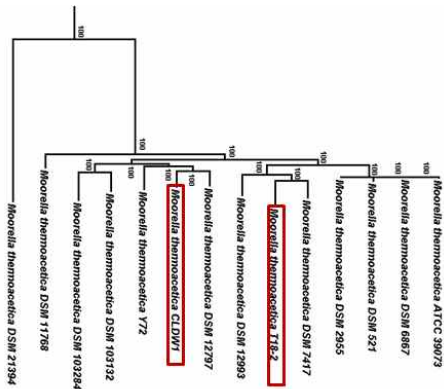


그림 3-9. CLWD1 및 GT18-2의 유전체 기반 계통분석

비교 유전체 분석 결과로 CLWD1 균주에 특이적인 대사경로를 확인하였다. CLWD1 균주에 다른 균주에는 존재하지 않는 특이적인 methanofuran 생합성 관련 유전자들이 있음을 확인하였다. Methanofuran을 활용하여 CO₂를 formate로 전환할 수 있을 것으로 추정되었다 (그림 3-10).

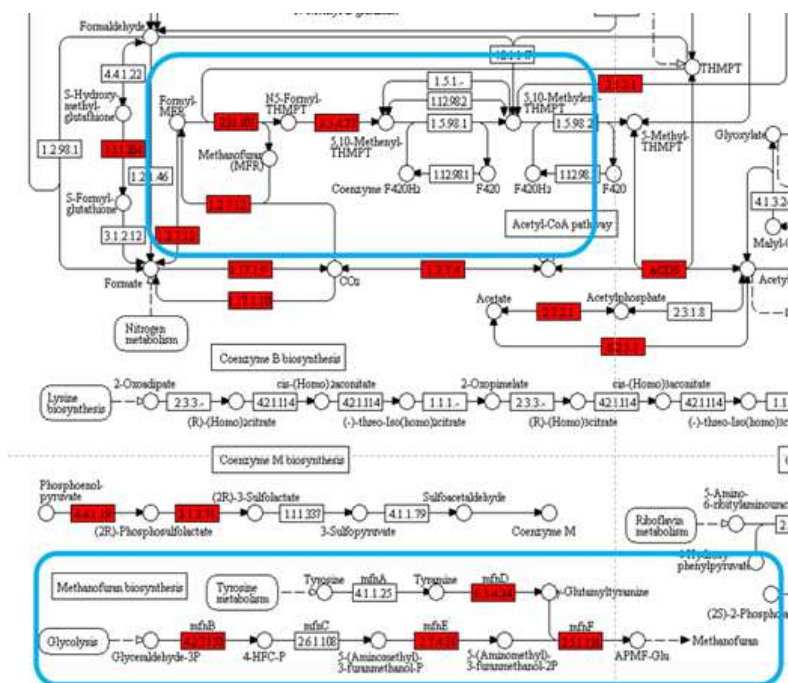


그림 3-10. CLWD1 균주의 methanofuran 생합성 관련 경로 및 유전자들

또한 CLWD1 균주에 2,3-BDO 생합성 관련 유전자들이 있음을 확인하였다. Pyruvate로부터 2,3-BDO를 생산하기 위해서는 3개의 유전자가 필요하였다. ALS (pyruvate->acetolactate), ALDC (acetolactate->acetoin), AR (acetoin->2,3-BDO) 등 3가지 효소가 필요하지만, CLWD1에는 ALS/AR만 확인되었다. ALDC가 매개하는 decarboxylation 반응(acetolactate->acetoin)은 열에 의해서 자연적으로 일어날 것으로 예측하였다 (그림 3-11).

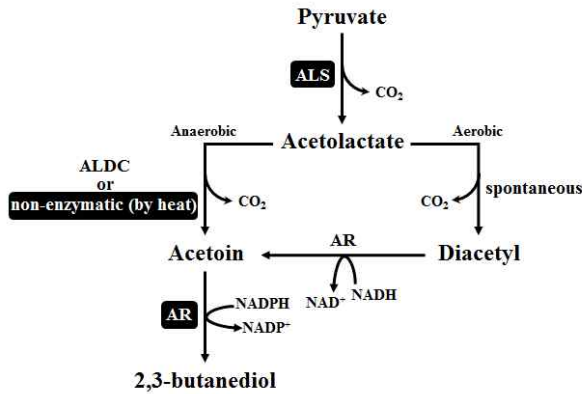


그림 3-11. CLWD1 균주의 예측되는 2,3-BDO 생합성 관련 경로 및 유전자들

이상의 결과를 바탕으로 하여 CLWD1 균주의 2,3-BDO 생산 여부를 확인하였다. 최적온도보다 높은 온도인 60도 이상에서 배양할 경우 CLWD1 균주가 heterotrophic 조건에서 약 1-6 mM 수준으로 2,3-BDO를 생산함을 확인하였다 (그림 3-12).

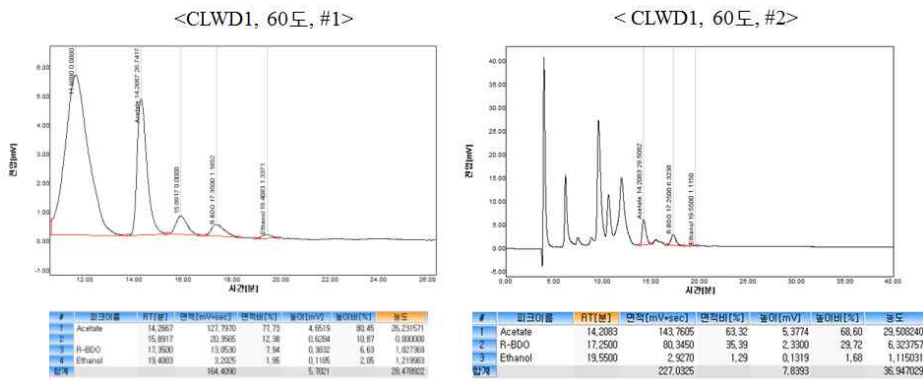


그림 3-12. CLWD1 균주의 heterotrophic 조건에서 2,3-BDO 생산성

이상과 같은 현상이 표준균주에서도 발생하는지 확인하기 위하여 동일조건으로 표준균주를 배양하였을 때 표준균주인 DSM 521 균주에서도 1 mM 수준으로 2,3-BDO가 생산됨을 확인하였다 (그림 3-13). 결과를 바탕으로 재추적한 결과 표준균주의 Genome 정보로부터 3 copy

의 alsS 유전자를 확인하였다. 반면 bdh 유전자는 확인하지 못하였지만, 표준균주에서는 다른 유전자가 bdh 활성을 나타내어 2,3-BDO를 생산하였을 것으로 예측되었다 (그림 3-14).

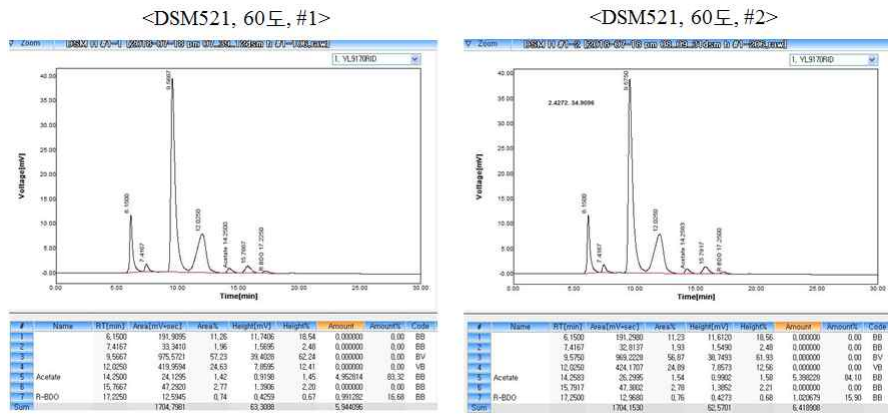


그림 3-13. DSM521 균주의 heterotrophic 조건에서 2,3-BDO 생산성

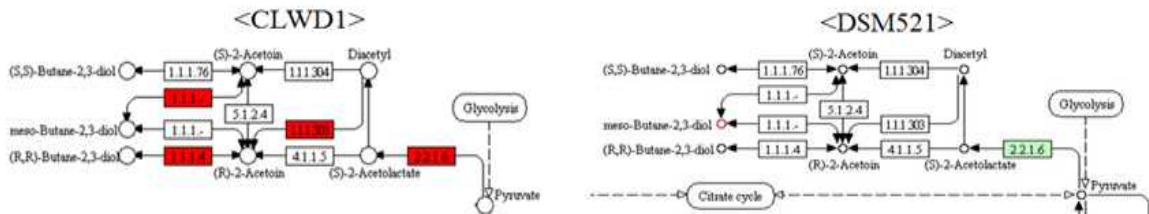


그림 3-14. CLWD1과 DSM521 균주의 2,3-BDO 생합성 경로 비교

Heterotrophic 조건에 더하여 CLWD1 균주가 CO₂, CO, MeOH, formate 등 다양한 C1 compounds를 활용한 autotrophic 조건에서도 2,3-BDO를 생산 할 수 있는지를 테스트한 결과 CO₂/MeOH 조건에서 미량의 2,3-BDO가 생산됨을 확인하였다 (그림 3-15).

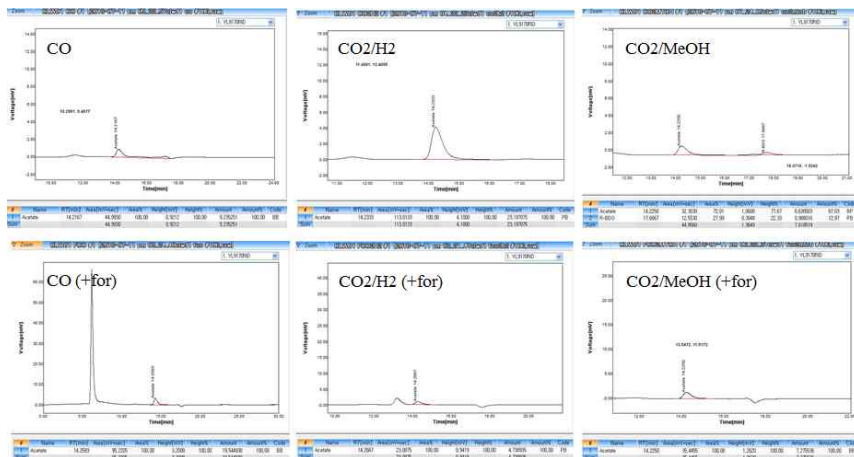


그림 3-15. 다양한 C1 compounds에서 CLWD1의 2,3-BDO 생산성 테스트

CLWD1 균주의 염에 대한 내성을 테스트한 결과 growth retardation은 있었지만, 성장을 확인하였으며, 계대배양 후 lag phase가 짧아졌음을 확인했다 (그림 3-16).

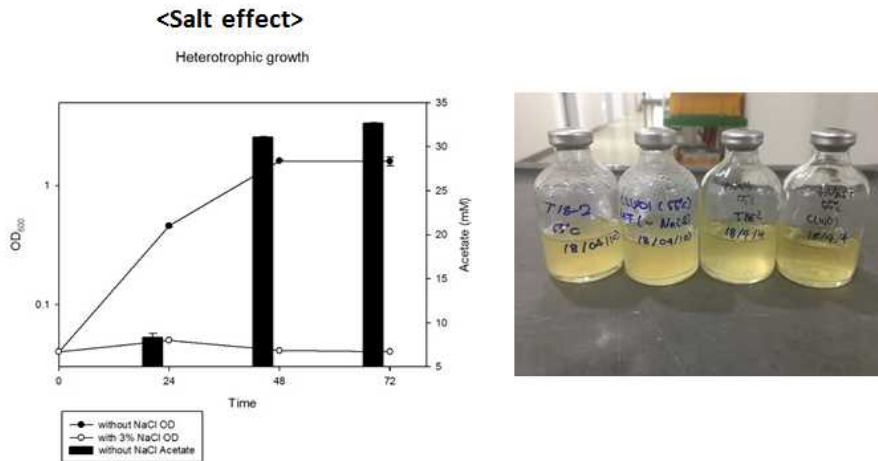


그림 3-16. CLWD1 균주의 내염 테스트

다. *Alcanivorax gelatiniphagus*의 유전체 정보 분석 및 hybrid system에의 활용을 위한 예비연구

MEBiC08158 균주는 아세트산을 기질로 하여 성장하며 전자현미경 사진을 통해서도 저밀도의 덩어리가 확인되어 저장물질을 합성하는 것으로 추정되었다. 이에 아세트산을 활용한 고부가가치 산물 생산 측면에서 유전체 정보 분석을 실시하였다. Illumina system으로 확보한 MEBiC08158 균주의 draft genome 정보 분석을 수행하였다. 균주의 유전체는 50 contigs로 해독되었으며 4.2 MB 사이즈, 3850 CDS가 예측됨. 유전체정보로부터 polyhydroxybutyrate (PHB) 합성 경로가 예측되었다 (그림 3-17).

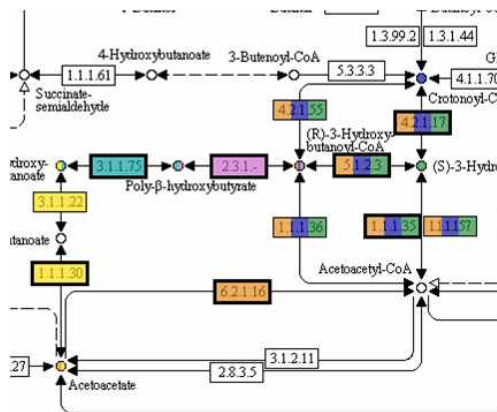


그림 3-17. MEBiC08158 균주의 PHB 합성 경로 예측

아세트산을 이용하여 성장하며 고분자 지질을 합성하는 *Alcanivorax*속 균주의 특성을 이용하여 autotrophs와 heterotrophs의 hybrid system에서 아세트산을 이용하여 고분자 물질을 합성하는 heterotroph 플랫폼 균주로서의 가능성을 확인하기 위한 테스트를 진행하였다. *Acetobacterium woodii*, *Moorella thermoacetica*, *Clostridium autoethnogenum* 등의 autotrophs들의 culture broth를 확보하였다. 관련 실험은 과제의 재편에 따라 후속 과제에서 진행하기로 하였다.

라. *Acetobacterium* sp. HAWD4 균주의 전체 정보 분석 및 특성분석

*Acetobacterium*속 균주들과 높은 유사도를 보이는 HAWD4 균주에 대하여 Illumina system으로 draft genome 분석을 수행하였다. 101 contigs로부터 3.46 MB 사이즈, 3,193 CDS가 예측되었다. HAWD4 균주는 기 보고된 *Acetobacterium*속 균주들과 16S rRNA 유전자 상동성이 97% 이하이며, 계통분류학적 위치로 보아 신속으로 예측되었다 (그림 3-18).

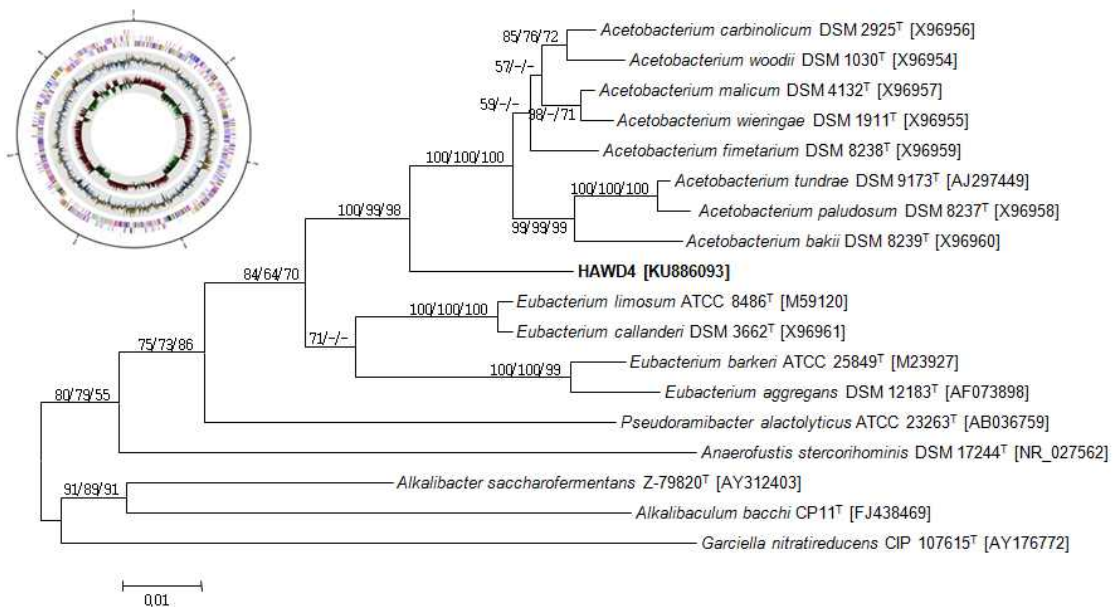


그림 3-18. HAWD4 유전체 지도 및 계통분류학적 위치와 유전체 지도

HAWD4 균주는 CO₂ 고정화 경로로 WLP를 가지고 있으나 관련된 *fdh* 유전자가 확인되지 않았으며, Glycerol를 대사할 수 있을 것으로 예측되었다 (그림 3-19).

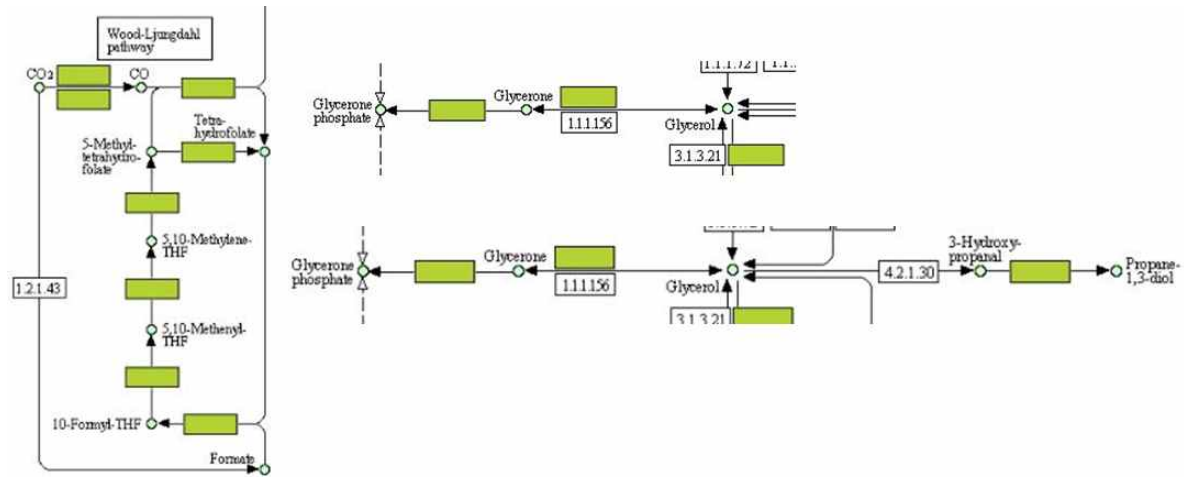


그림 3-19. HAWD4 균주의 WLP 회로 분석 및 glycerol 대사경로 예측

HAWD4 균주는 *Acetobacterium woodii*와는 달리 lactate, propanol, 1,2-propanediol, 및 acetoin 대사에 관여하는 유전자를 보유함을 확인하였다. 따라서 HAWD4 균주는 해당하는 대사산물을 생산할 것으로 예측되었다 (그림 3-20).

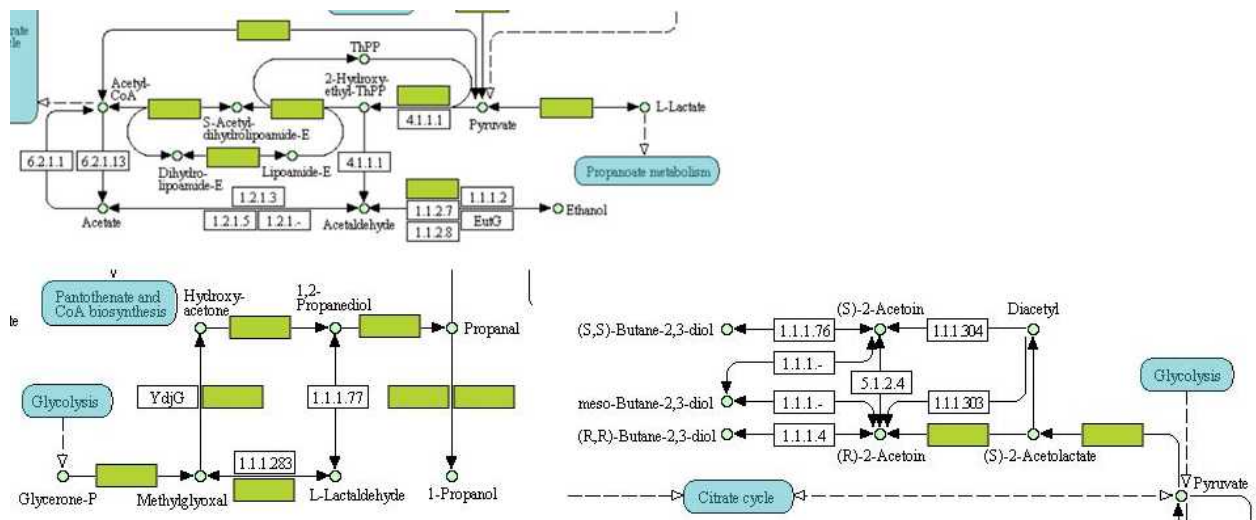


그림 3-20. Lactate, propanol, 1,2-propanediol, 및 acetoin 대사경로 예측

이상과 같은 결과를 기반으로 Autotrophic condition(CO₂/H₂ or CO)에서 HAWD4 균주의 성장 및 대사산물 분석을 진행하였으나 균주의 재생과 성장에 문제가 발생하여 분석을 유보하였다.

제2절 해양극한 미생물 탄소대사 재설계 및 성능평가

1. C1가스 이용 해양·극한 미생물의 탄소대사 재설계 균주 개발

가. 대사공학기반 CO를 유기산인 개미산으로 전환 가능한 신규 대사경로 설계 및 융합단백질 도입 NA1 재조합 균주 제작

(1) 전자전달 융합단백질 발현을 위한 유전자 클로닝

Thermococcus onnurineus NA1 균주 유래 formate dehydrogenase3 (Fdh3)와 CO dehydrogenase (CODH)의 electron transfer 기능을 하는 단백질인 small subunit들을 flexible linker로 연결하여, 새로운 Fdh3-CODH complex 단백질이 NA1 균주에서 발현되도록 클로닝을 실시하였다. 이를 위해 이전에 제작한 거대 유전자 삽입용 cloning vector인 pNA1comFosC1096에 fdh3 small subunit (TON_0541)-codh small subunit (TON_1017)의 fusion construction을 실시하였다. Formate transporter를 포함한 fdh3 cluster 뒤에 linker를 삽입하고, 해당 linker 뒤에 CODH cluster의 small subunit (TON_1017) ~ maturation subunit (TON_1020) 부분을 cloning 하는 방법으로 전체 cloning을 design하였다 (그림 3-21).

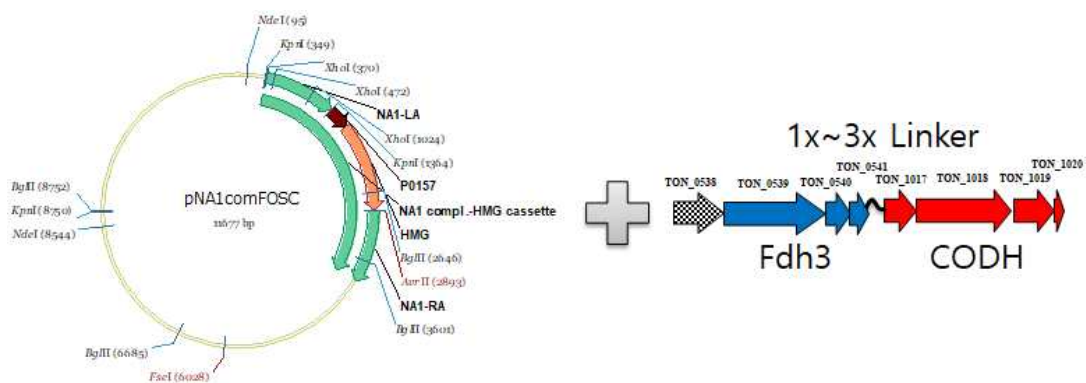


그림 3-21. CODH-Fdh 융합단백질 제작을 위한 클로닝 모식도

Linker는 protein fusion에 일반적으로 사용되는 ‘GGGGS’ flexible linker를 사용하였으며, 길이에 따라 protein fusion 성공 가능성이 다르게 나타날 수 있어 ‘GGGGS’ linker를 1개 사용한 1x linker와 2개를 사용한 2x liker, 3개를 사용한 3x linker를 각각 제작하였다. 각 linker의 서열은 NA1 균주의 codon usage에 맞추어 제작하였다 (표 3-5).

표 3-5. Flexible linker, 'GGGGS'의 염기서열

Fusion linker	Sequence
1x GGGGS	GGC GGC GGA GGC AGC
2x GGGGS	GGC GGC GGA GGC AGC gga gga ggc gga agc
3x GGGGS	gga gga ggc gga agc GGC GGC GGA GGC AGC gga gga ggc gga agc

이전 실험에서 제작한 PCR primer를 사용하여 *fdh3* gene cluster (TON_0538~TON_0541) 와 *codh* gene cluster (TON_1017~TON_1020) 부분을 PCR 증폭의 타겟으로 하였으며, fusion linker의 개수를 1개, 2개로 제작하였다 (그림 3-22).

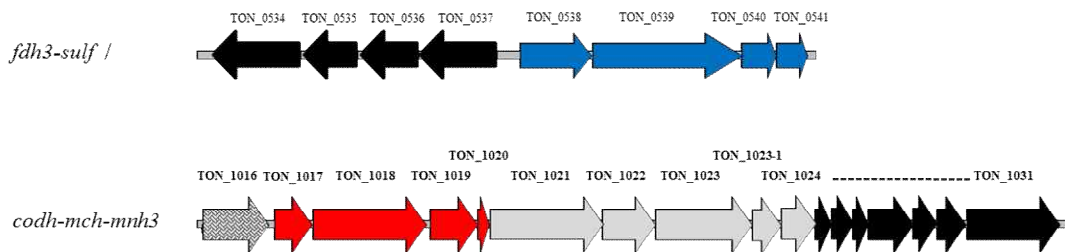


그림 3-22. *fdh3* 및 *codh* 유전자군 모식도.

PCR 결과 각 linker 개수에 해당하는 PCR product를 확보할 수 있었다 (그림 3-23).

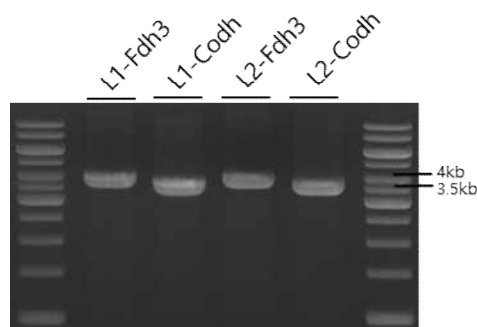


그림 3-23. PCR 방법으로 증폭된 *fdh3* 와 *codh* 유전자군의 DNA 단편

선행연구를 통해 개발한 pNA1comFosC1096 Fosmid vector를 AvrII 제한효소로 처리 하여 DNA 단편으로 만든 후 Gibson assembly 방법을 이용하여 Fdh3-CODH fusion protein construction을 진행하였다 (그림 3-24).

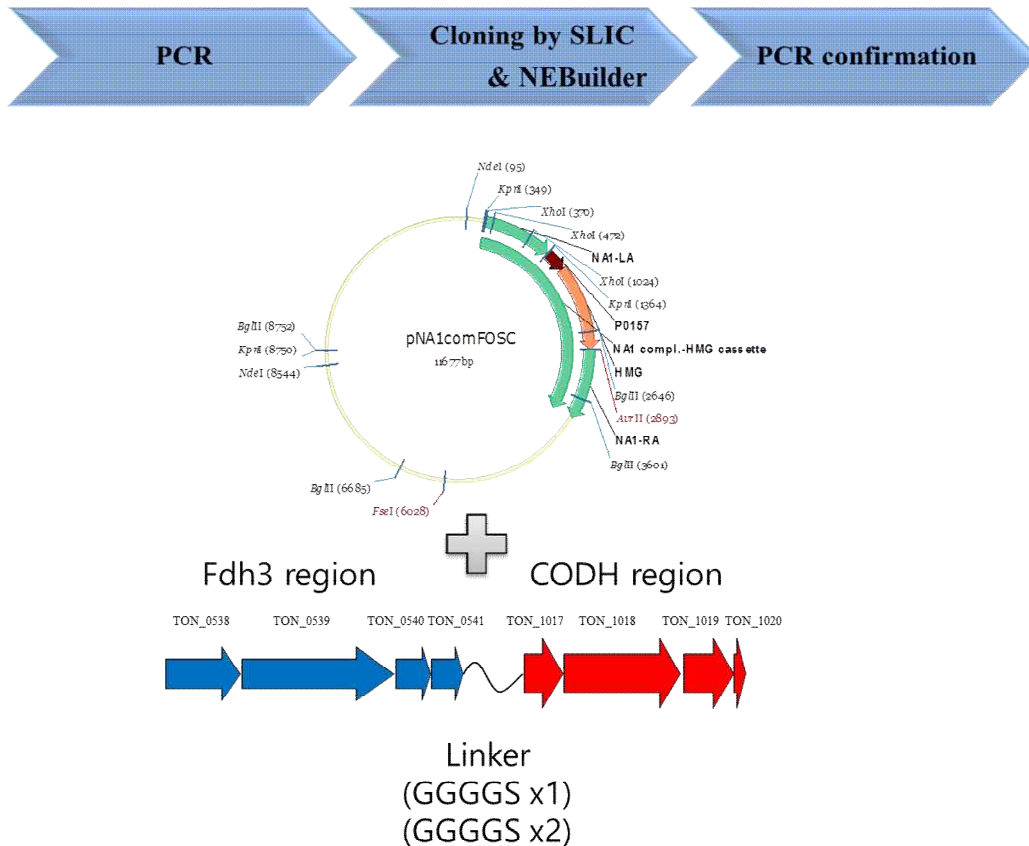


그림 3-24. 클로닝 모식도

Gibson assembly에 의한 gene cloning 후 해당 유전자를 E. coli DH5a host strain에 형질전환 하였으며, Cloning이 제대로 된 균주를 확인하기 위해 PCR 방법을 사용하여 fdh3 와 codh 유전자를 증폭하여 전기영동 실시하였다. PCR 결과 1 x linker에서는 #4, #5, #6 clone이 성공적으로 클로닝 된 것으로 확인되었으며, 2 x linker에서는 #5, #8, #9, #10 clone이 성공적으로 클로닝 된 것으로 확인되었다 (그림 3-25).

fdh3-codh fusion 의 1X, 2X, 3X-GGGGS Linker를 확인하기 위해 염기서열 분석 실시하였다. PCR로 클로닝이 확인된 균주들 중 한 균주씩을 선별하여 fosmid를 prep. 한 후 이를 template DNA로 하여 해당 linker 부분의 염기서열을 분석하였다. 분석결과 목표로 하였던 1X, 2X, 3X-GGGGS Linker를 확인하였다 (그림 3-26). 결론적으로 1x, 2x, 3x'GGGGS'linker 가 삽입된 Fdh3-CODH fusion cloning에 성공하였다.

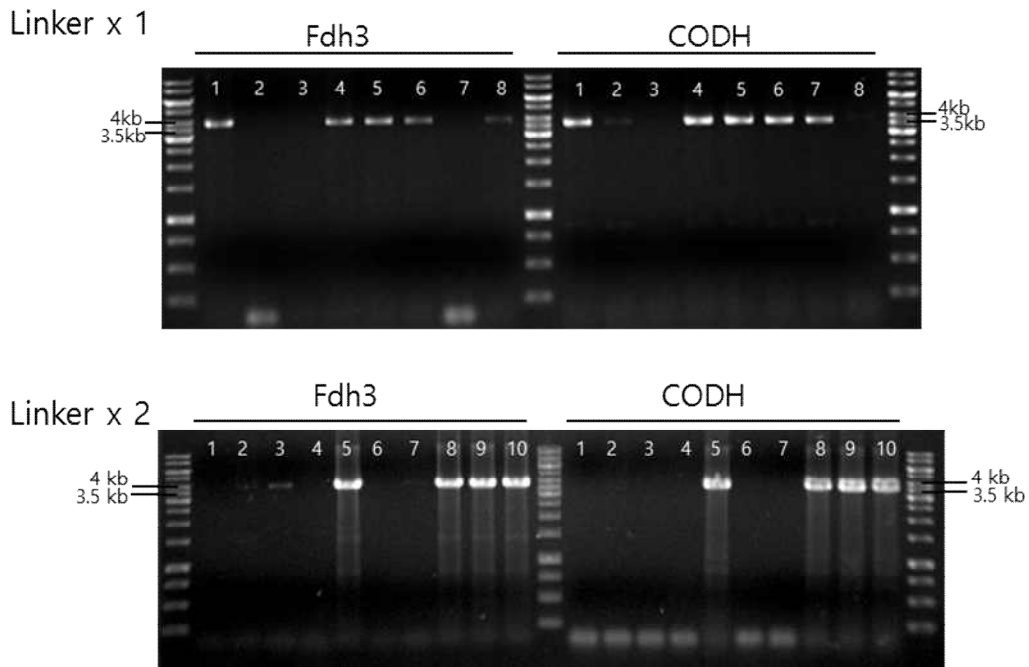


그림 3-25. 클로닝 확인을 위한 PCR 결과

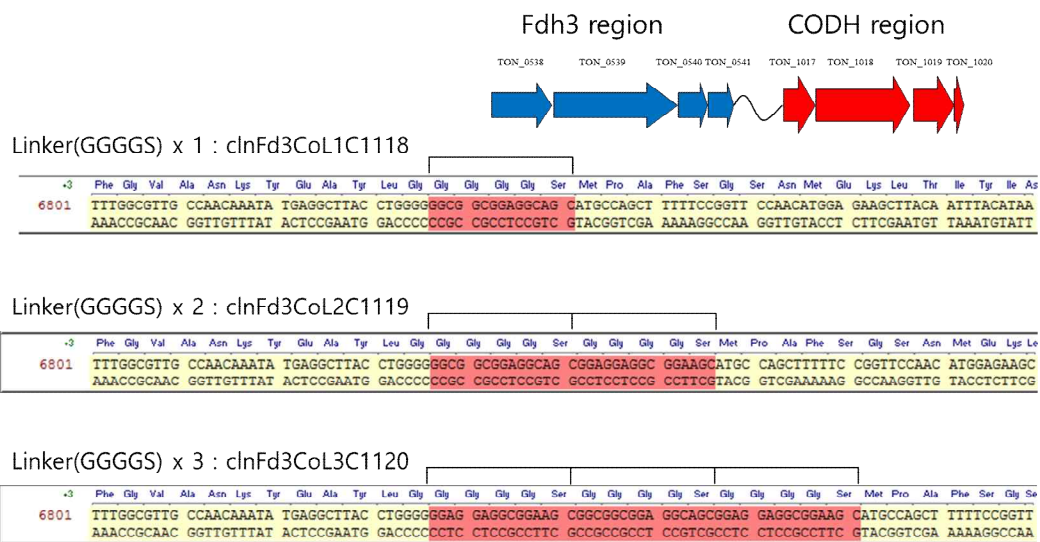


그림 3-26. 선택클론의 염기서열 분석을 통한 1X, 2X, 3X-‘GGGGS’ Linker의 확인.

(2) CODH-Fdh 1x linker fusion 클론을 도입한 형질전환 T. onnurineus NA1 균주 제작
 fdh3-codh fusion 유전자가 cloning된 약 20 kb 크기의 fosmid를 포함하고 있는
 clnFd3CoL1C1118 (1x linker), clnFd3CoL2C1119 (2x linker), clnFd3CoL3C1120 (3x linker)

fosmid의 NA1 균주에 대한 transformation 수행하였다. NA1 균주에 대한 transformation을 위해 고농도의 DNA가 필요하기 때문에, 500 ml에 해당하는 E. coli clone을 배양하여 fosmid prep.을 매뉴얼 방법으로 실시하였다. Fosmid의 prep. 결과 약 1.5 ug/ul에 해당하는 고농도의 DNA 50 ul를 확보하여, 총 75 ug의 DNA를 확보하였다 (그림 3-27).

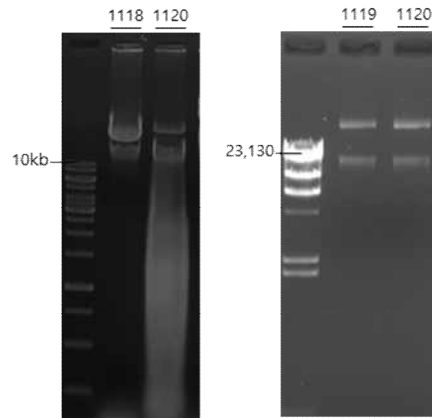


그림 3-27. fosmid prep. 결과

fosmid prep.을 통하여 확보한 clnFd3CoL1C1118 fosmid를 초고온성 고세균인 NA1균주에 형질전환하였다. NA1 wild-type 균주의 경우 Fdh3-CODH fusion complex에 의해 생성된 fomrate가 formate dehydrogenase인 Fdh2 와 Fdh3에 의해 소모될 수 있어 이들 유전자들이 삭제된 $\Delta fdh2$ - $\Delta fdh3$ 균주를 대상으로 형질전환을 실시하였다. 형질전환은 heat transformation 방법을 사용하여 진행하였다 (그림 3-28).

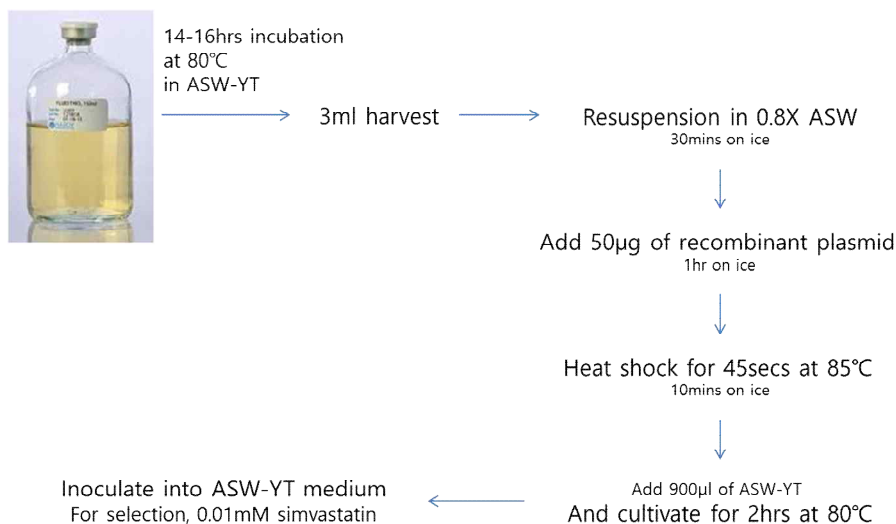


그림 3-28. 초고온성 고세균 NA1의 형질전환 모식도

Transformation을 진행한 NA1 균주를 selection marker인 10 uM Simvastatin이 첨가된 ASW-YTS medium에 배양하였으며, 2회에 걸쳐 동일한 배양액에서 균주 계대배양 진행하였다. 그 결과 selection marker인 10 uM Simvastatin이 첨가된 2차 계대에서 배양된 균주를 확보하였다. 이들 배양액 내에 *clnFd3CoL1C1118* fosmid가 성공적으로 도입된 균주가 있는지 PCR 방법으로 *fdh3* 와 HMG cassette 유전자를 확인하였다 (그림 3-29).

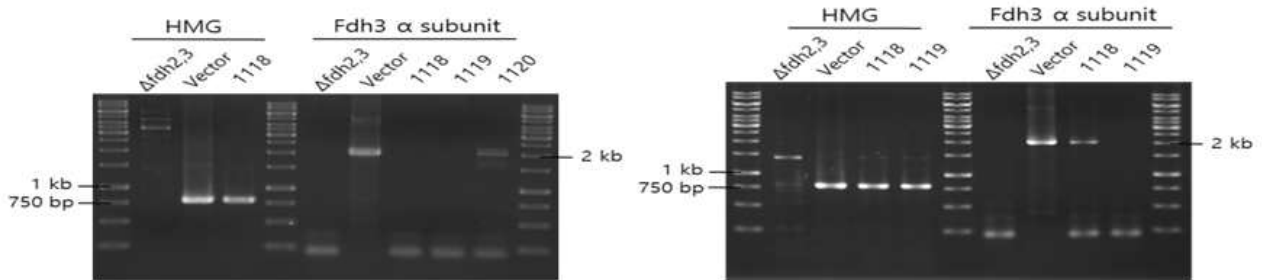


그림 3-29. PCR 방법을 사용한 fosmid 도입여부 확인

clnFd3CoL1C1118 fosmid가 계능상에 도입된 재조합 NA1 균주를 확보하기 위해 목표유전자의 Double crossover event가 생긴 재조합 NA1 균주의 선별실험을 진행하였다. 이를 위해, 10 uM Simvastatin이 첨가된 배양액에서 2차 계대한 균주를 대상으로 고체 배지에 도달하여 콜로니 10개를 분리하여 배양액에서 배양하였다. 배양된 균주에서 DNA를 확보하여 PCR 방법으로 타겟 유전자의 유무를 확인하였다. PCR 결과 *clnFd3CoL1C1118* fosmid가 계능상에 도입된 재조합 NA1 균주를 확인하였다 (그림 3-30).

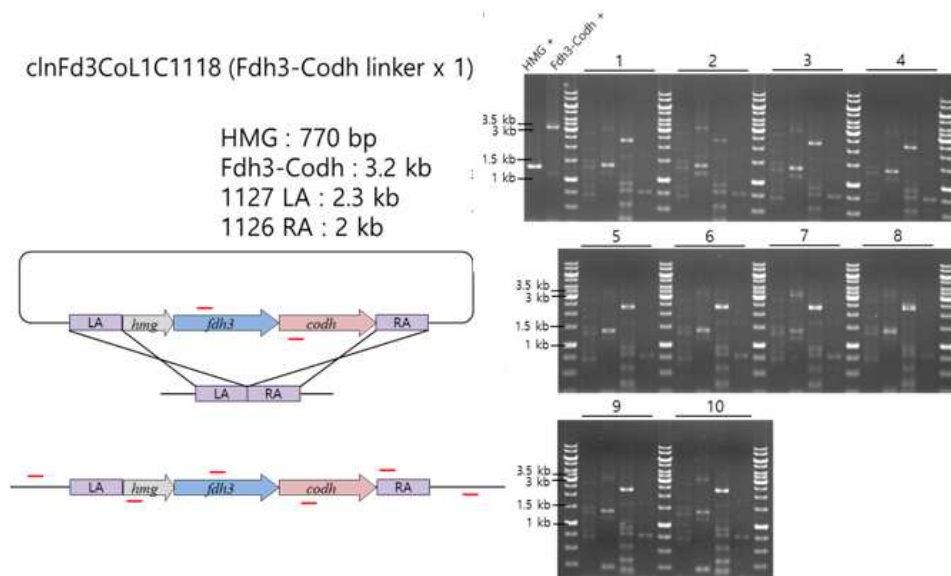


그림 3-30. *clnFd3CoL1C1118* fosmid가 도입된 재조합 NA1 균주의 PCR 확인

(3) CODH-Fdh 1x 및 2x linker fusion 클론을 도입한 형질전환 *T. onnurineus* NA1 균주 제작

1x Linker인 *clnFd3CoL1C1118* fosmid 이외에 2x Linker인 *clnFd3CoL2C1119* 및 3x Linker인 *clnFd3CoL3C1120*이 도입된 NA1 재조합 균주 클로닝을 실시하였다. fosmid prep.을 통하여 확보한 *clnFd3CoL2C1119*와 *clnFd3CoL3C1120* fosmid를 각각 NA1 Δ fdh2- Δ fdh3 돌연변이 균주에 heat transformation 방법을 사용하여 형질전환 진행하였다. Transformation을 진행한 NA1 균주를 selection marker인 10 uM Simvastatin이 첨가된 ASW-YTS medium에 배양하였으며, 2회에 걸쳐 동일한 배양액에서 균주 계대배양 실시하였다. 그 결과 selection marker인 10 uM Simvastatin이 첨가된 2차 계대에서 배양된 균주를 확보하였다. 이들 배양액 내에 해당 fosmid가 성공적으로 도입된 균주가 있는지 PCR 방법으로 *fdh3* 와 HMG cassette 유전자를 확인하였다.

*clnFd3CoL2C1119*와 *clnFd3CoL3C1120* fosmid가 계놈상에 도입된 재조합 NA1 균주를 확보하기 위해 목표유전자의 Double crossover event가 생긴 재조합 NA1 균주의 선별실험을 진행하였다. 이를 위해, 10 uM Simvastatin이 첨가된 배양액에서 2차 계대한 균주를 대상으로 고체 배지에 도말하여 콜로니 10개를 분리하여 배양액에서 배양하였다. 배양된 균주에서 DNA를 확보하여 PCR 방법으로 타겟 유전자의 유무를 확인하였다. PCR 결과 *clnFd3CoL2C1119*와 *clnFd3CoL3C1120* fosmid가 계놈상에 도입된 재조합 NA1 균주를 확인하였다 (그림 3-31). 이들 중 *clnFd3CoL2C1119*는 2-2번 균주를, 그리고 *clnFd3CoL3C1120*은 3-5번 균주를 최종 클로닝 균주로 선택하였다.

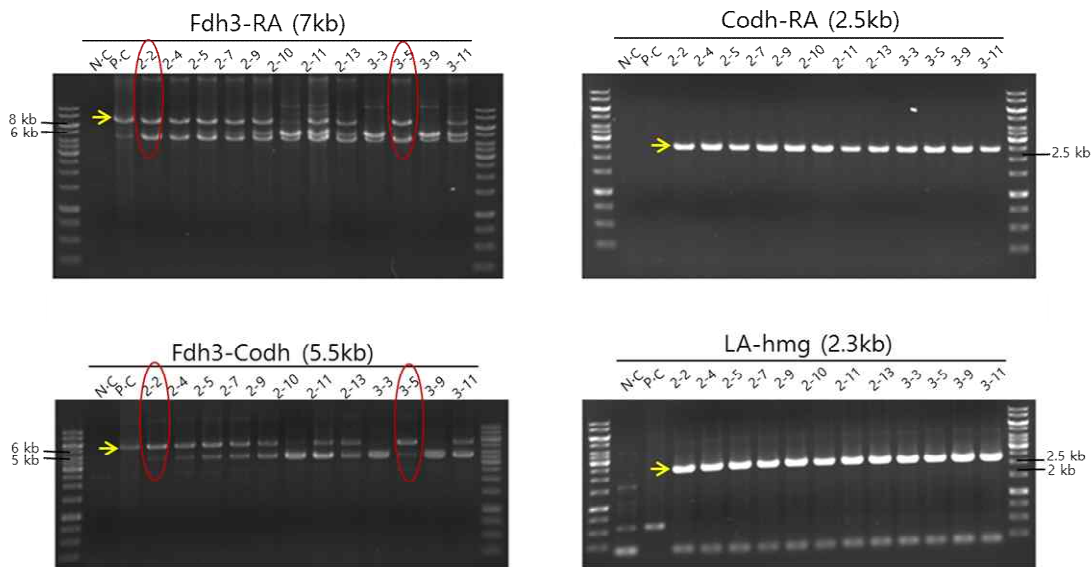


그림 3-31. *clnFd3CoL2C1119*와 *clnFd3CoL3C1120* fosmid가 도입된 재조합 NA1 균주의 PCR 확인

(4) *T. onnurineus* NA1- Δ fdh1,2,3를 host strain으로 하는 CODH-Fdh3 fusion 형질전환균주 제작

T. onnurineus NA1 균주는 계놈상에 3 종류의 formate dehydrogenase 유전자군인 fdh1 (TON_0281~TON_0266), fdh2 (TON_1563~TON_1580), fdh3 (TON_0538~TON_0541) 유전자군을 포함하고 있으며 (그림 3-32), 앞서 제작한 CODH-Fdh3 fusion을 포함하고 있는 *T. onnurineus* NA1- Δ fdh2,3 형질전환 균주는 fdh1 유전자군이 계놈상에 남아있고, fdh2 유전자군과 fdh3 유전자군의 핵심 유전자인 Fdh3 large subunit 유전자, TON_0539가 삭제된 *T. onnurineus* NA1 (Δ fdh2-mfh2-mnh2 Δ TON_0539) 균주를 host 균주로 하여 제작하였다.

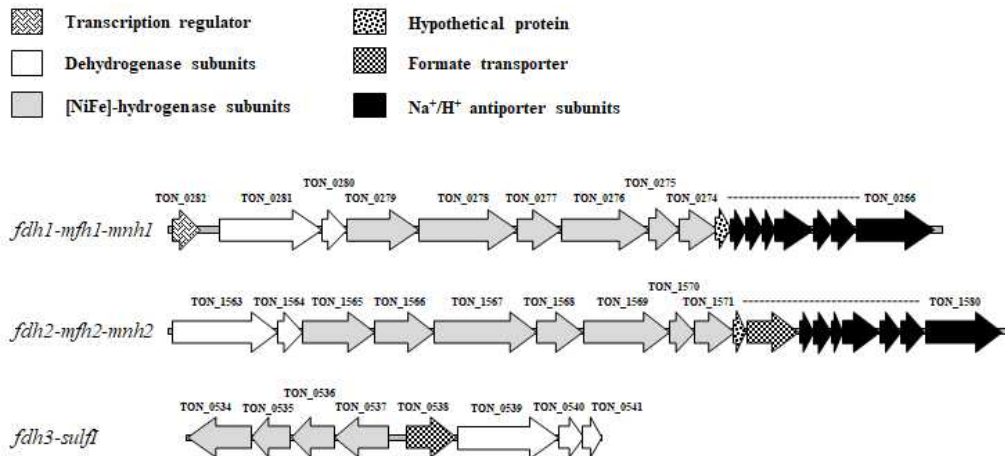


그림 3-32. *T. onnurineus* NA1 균주에 존재하는 formate dehydrogenase 유전자군 모식도

따라서 해당 재조합 NA1 균주의 경우 계놈상에 남아있는 endogenous Fdh1에 의해 CO 가스로부터 전환된 formate가 소모될 가능성이 있어 fdh1 유전자군이 추가로 삭제된 *T. onnurineus* NA1- Δ fdh1,2,3 (Δ fdh1-mfh1-mnh1 Δ fdh2-mfh2-mnh2 Δ TON_0539) 균주를 host 균주로 사용하여 codh-fdh3 유전자가 linker로 연결된 epiFd3CoL1C1118, epiFd3CoL2C1119, epiFd3CoL3C1120 plasmid를 formate의 소모가 없도록 새롭게 형질전환하였다. NA1 균주에 대한 transformation을 위해 고농도의 DNA가 대량으로 필요하기 때문에, *E. coli* 클론인 epiFd3CoL1C1118, epiFd3CoL2C 1119, epiFd3CoL3C1120을 500 ml 씩 배양하여 fosmid extraction을 실시하였다 (그림 3-33).

Transformation 대상 균주인 NA1 Δ fdh1,2,3 strain을 pyruvate 첨가 배지인 MM1-pyruvate (5 g/L)에서 배양한 후, 50 μ g의 DNA를 첨가하여 NA1 균주에 transformation을 진행하였다. Transformation 후, Selection marker로서 10 μ M simvastatin이 첨가된 MM1-pyruvate 배지에서 NA1 균주를 이틀간 80°C에서 배양한 결과 cell의 성장을 확인할 수 있었고, plasmid에 의한 형질전환을 예상하여 2회 추가로 10 μ M simvastatin이 포함된 배지에 계대하여 균주를 농후배양하였다.

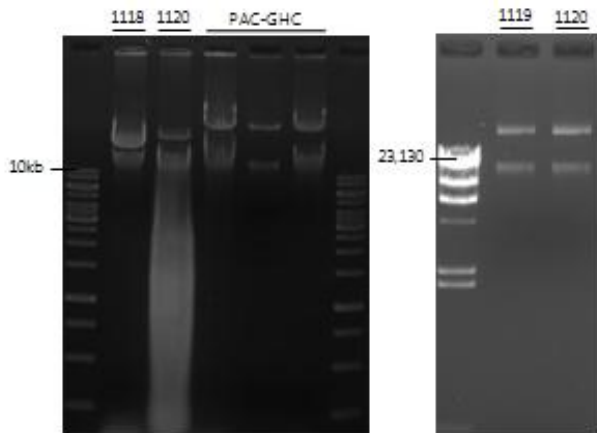


그림 3-33. epiFd3CoL1C1118,
 epiFd3CoL2C1119,
 epiFd3CoL3C1120의 fosmid extraction
 확인

2회 계대한 세포 배양액을 3ml 확보하여 실제 형질전환을 확인하기 위하여 PCR 방법을 사용 Insert DNA인 Fdh3 α subunit과 HMG cassette를 PCR로 증폭한 결과, [그림 2-14] 와 같이 epiFd3CoL1C1118, epiFd3CoL3C1120의 transformant에서 해당 유전자의 증폭을 확인하였고, epiFd3CoL2C1119에서는 확인되지 않아, transformation을 다시 진행하여 transformant를 확보하였다.

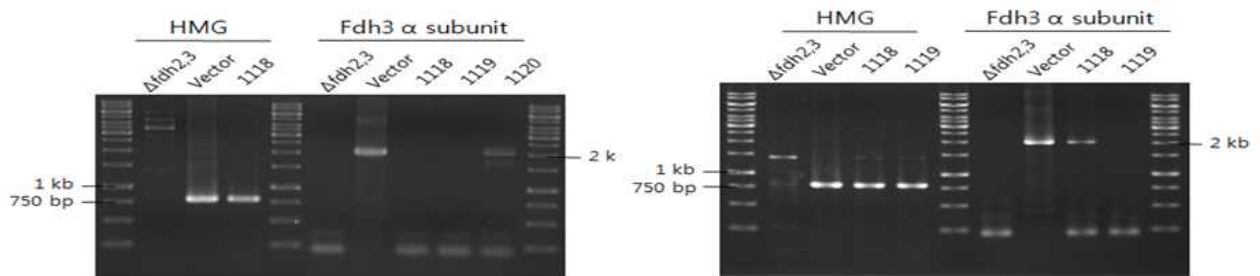
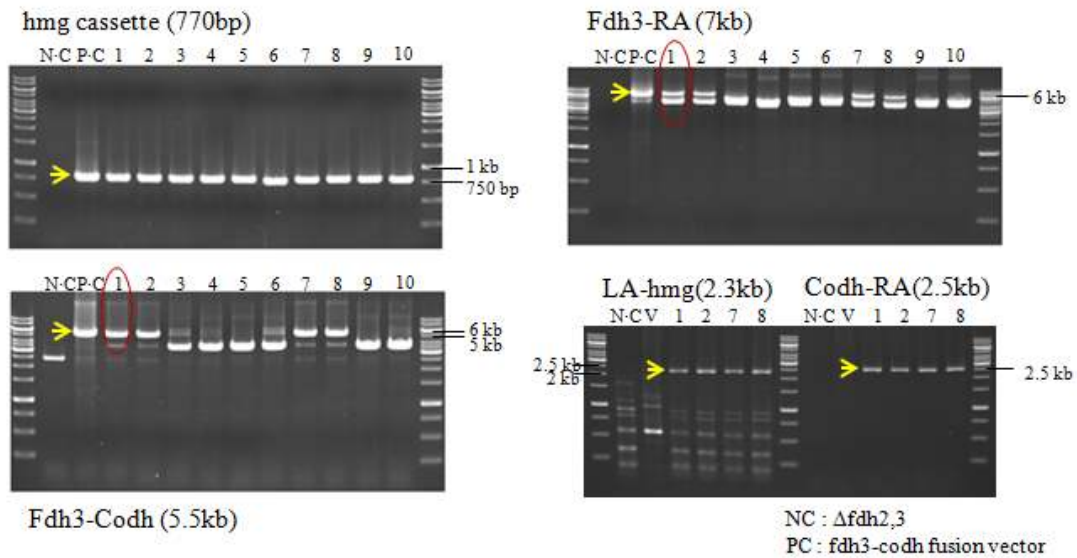


그림 3-34. epiFd3CoL1C1118, epiFd3CoL2C1119, epiFd3CoL3C1120의 NA1 균주로의
 유전자 도입 확인

이렇게 확인된 transformant를 ASW-YT(sulfur) 고체 배지에 도말하여 80°C에서 약 48시간 배양 여기서 배양된 콜로니 중 각 10개-12개를 isolation하여 다시 한 번 10 μ M simvastatin이 첨가된 ASW-YT 배지에 농후배양하였다. 이 isolate들의 유전자형을 각각 확인하기 위하여, 배양액을 3ml씩 확보하여 모두 genomic DNA를 추출한 후 PCR 방법을 사용하여 확인하였다 (그림 3-35) 4종류의 PCR을 통해서 해당 유전자의 증폭을 확인하였고, NA1 mutant를 모두 isolation하여 확보하였다. 이렇게 확보된 균주들은 각각 nadFd3CoL1C1118DF123, nadFd3CoL2C1119Df123, nadFd3CoL3C1120Df123 라고 명명하였다.

epiFd3CoL1C1118 transformation confirmation



epiFd3CoL2C1119, epiFd3CoL3C1120 transformation confirmation

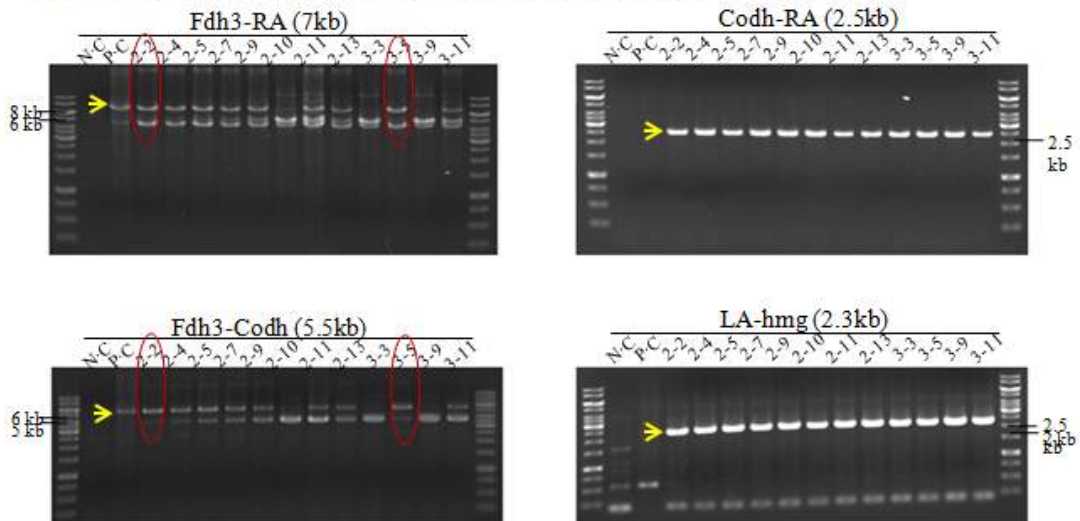


그림 3-35. epiFd3CoL1C1118, epiFd3CoL2C1119, epiFd3CoL3C1120의 NA1 Δ fdh1,2,3 균주로의 transformation 확인

(5) nadFd3NHisCoL1C1128 균주의 Resting cell test에 의한 개미산 생산능 분석

Fdh3 N-term. His-tag 돌연변이 균주인 nadFd3NHisCoL1C1128 균주로부터 CODH-Fdh3 complex 분리 및 in vitro 활성 측정에 성공하여 nadFd3NHisCoL1C1128 균주의 Resting cell assay를 실시하였다. 이를 통하여 균주 상태에서 CO 전환/개미산 생산 특성 분석하였다. Resting cell 분석에 사용할 고농도 cell mass 확보를 위해 Bioreactor를 활용하여 1.5L의 세포 배양을 실시하였다. 4시간 동안 세포배양하여 OD 0.833 까지 배양하였으며, 세포농축을 통

해 최종적으로 OD 60.6, 20 ml을 확보하였다. Resting cell assay는 20 ml serum vial에 세포 농도 OD 0.5 4 ml을 분주한 후, CO 2bar를 head space에 치환하여 실험준비하였다. 실험은 80°C에서 실시하였으며, triplicate 로 측정하여 결과의 신뢰도를 확보하였다.

Resting cell 실험 결과 36hr에서 개미산 14 mM이 생성됨을 확인하였으며, H₂ 152 mM이 생성됨을 확인하였다 (그림 3-36). 개미산:H₂ 생산비가 1:10 이므로 CO의 개미산 전환율은 약 10% 였다. 실험결과로부터 CODH-Fdh3 fusion complex가 도입된 nadFd3NHisCoL1C1128 균주의 CO 전환-개미산 생산능이 resting cell 에서도 확인되었다.

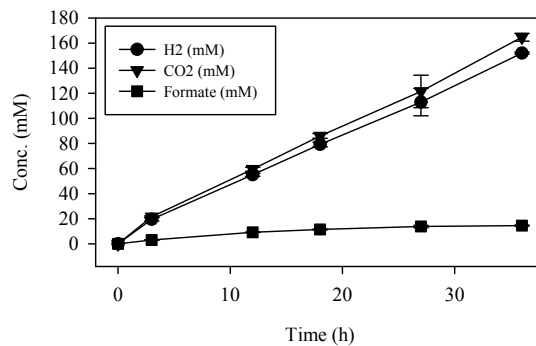


그림 3-36. nadFd3NHisCoL1C1128 균주의 Resting cell 결과

(6) 신규 CODH-Fdh3 fusion complex 구축을 통한 carbon monoxide:formate oxidoreductase (CFOR)의 생합성

기존에 제작한 Fdh3-CODH complex는 Fdh3 cluster의 Fe-S 단백질 subunit TON_0541과 CODH subunit TON_1017이 fusion 되었으나, 전자전달의 효율성을 개선하고자 TON_0540과 TON_1017을 fusion하는 새로운 complex를 구축하였다 (그림 3-37). 또한 CODH-Fdh complex의 단백질 분리 효율을 높이기 위해 앞서 제작한 fdh3 gene cluster (TON_0539-0542) deletion mutant인 NA1 Δ fdh1,2,3C 균주에 신규 Fdh3-CODH complex 유전자를 도입하였다. 이러한 일련의 유전자 조작을 통해 CO 가스를 개미산으로 전환 가능한 새로운 합성 단백질을 제작하고자 하였으며, 이는 자연계에서는 아직 발견되지 않은 신규 단백질로서 이번 연구에서 새롭게 carbon monoxide:formate oxidoreductase (CFOR)로 명명하였다.

TON_0540과 TON_1017을 linker로 직접 연결하기 위하여 앞서 구축되었던 fosFd3NHis-CoL1C1128 재조합 플라스미드를 주형으로 하여 PCR을 진행하였다. 이때, His-tag은 분리가 가능했던 조건인 Fdh3 N-terminus 위치에 그대로 삽입하였으며, GGGGS linker 사용하였다

(그림 3-38). Cloning 후에, 대량의 플라스미드를 확보하여 NA1 $\Delta fdh1,2,3C$ 균주에 transformation 진행하였다. PCR을 통해 유전자형을 확인하였으며, 최종적으로 2번 균주를 신규 CODH-Fdh3 complex가 도입된 “namFd3NHisCoL1C1132” 돌연변이 균주로 확보하였다 (그림 3-39).

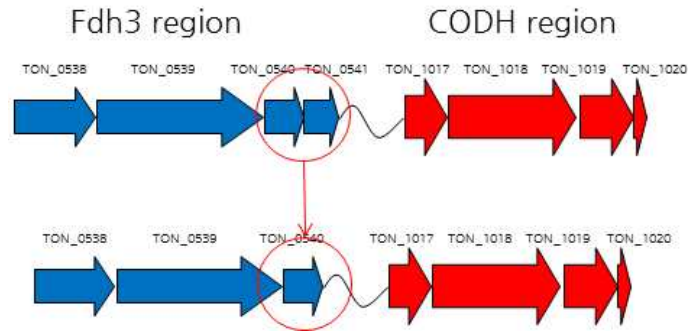


그림 3-37. Fdh3의 small subunit의 변경 내용

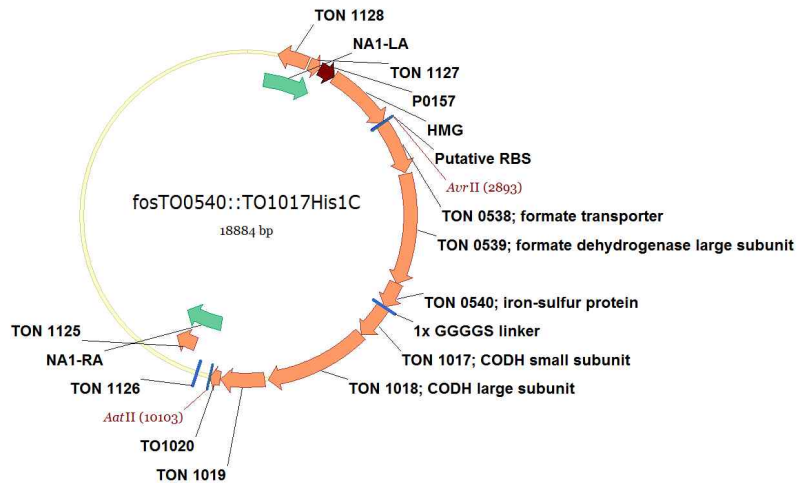


그림 3-38. 신규 CODH-Fdh3 fusion 제작 및 벡터맵 모식도

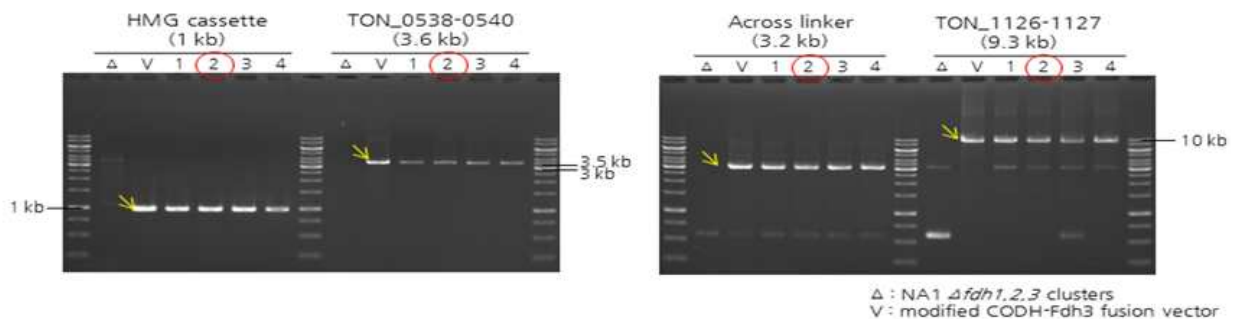


그림 3-39. NA1 $\Delta fdh1,2,3C$ 숙주균주로의 transformation 결과

나. NA1 재조합 균주의 CO 전환, 개미산 생산 확인

(1) *codh-fdh3* 1x linker 균주인 *nadFd3CoL1C1118* 균주의 CO 전환, 개미산 생산 확인

FDH3-CODH fusion 재조합 NA1 균주인 *nadFd3CoL1C1118*, *nadFd3CoL1C1119*, *nadFd3CoL1C1120* 균주의 construction이 확인 되어 *nadFd3CoL1C1118* 균주를 대상으로 CO를 기질로 주었을 때, 개미산 생산능을 보이는지 HPLC로 확인하였다. *nadFd3CoL1C1118* 균주를 MM1-CO 배지에서 2차 계대를 거쳐 배양하였으며, 2차 계대한 배양액 1ml을 샘플 처리하여 HPLC로 formate 유무를 확인하였다. 실험결과 HPLC 상에서 약 3 mM 수준의 formate peak이 관찰되었으며, 15 mM 농도의 K-formate peak과 일치하는 것을 확인하였으나, 유전자 조작 host strain인 NA1 Δ *fdh1-2-3* 균주의 경우 formate와 일치하는 HPLC peak이 나타나지 않았다 (그림 3-40). 따라서 실험결과로부터 FDH3-CODH fusion 재조합 NA1 균주인 *nadFd3CoL1C1118* 균주가 CO 조건에서 formate 생합성이 가능함을 확인하였으며, 이를 통해 *fdh3* small subunit (TON_0541)-*codh* small subunit (TON_1017) fusion construction이 성공적으로 작동함을 확인하였다.

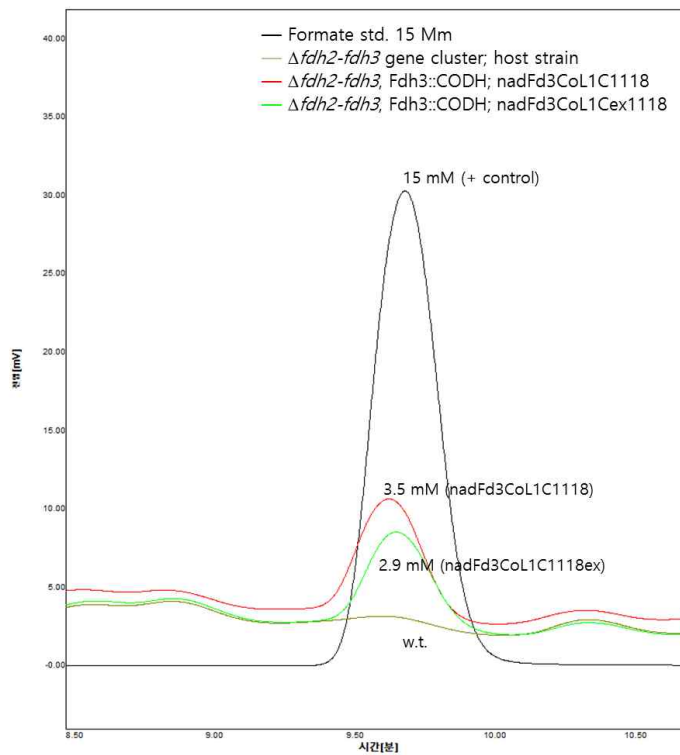


그림 3-40. *nadFd3CoL1C1118* 배양액의 HPLC 결과

clnFd3CoL1C1118 균주의 세포 성장에 따른 formate 생합성 정도와 0.1M bis-Tris (pH 6.5) buffer 유무에 따른 pH의 변화를 확인하기 위해 clnFd3CoL1C1118 균주를 MM1-CO 및 MM1-CO (0.1M bis-Tris) 배지에서 배양하면서 시간별로 세포 성장, pH, formate 농도 변화를 관찰하였다 (그림 3-41). 실험결과 0.1M bis-Tris (pH 6.5) buffer 유무에 따른 세포 성장 속도에는 큰 차이를 보이지 않았으나 buffer가 없는 배양액의 경우 pH가 4.5까지 크게 감소한 반면, buffer를 넣어준 배양액의 경우 pH가 큰 변화 없이 유지되었다. Formate 농도 또한 0.1M bis-Tris (pH 6.5) buffer를 넣어준 배양액에서는 18 mM 농도까지 확인이 되었으나, buffer가 없는 배양액의 경우 1/3 수준인 6 mM 농도의 formate가 관찰. 이와 같은 buffer 유무에 따른 formate 농도의 차이는 pH 영향에 따른 차이일 것으로 여겨진다. 실험 결과로부터 세포 성장에 따른 formate의 증가를 확인할 수 있었으며, 배양액에 0.1M bis-Tris (pH 6.5) buffer를 첨가하는 것이 매우 효과적임을 확인하였다.

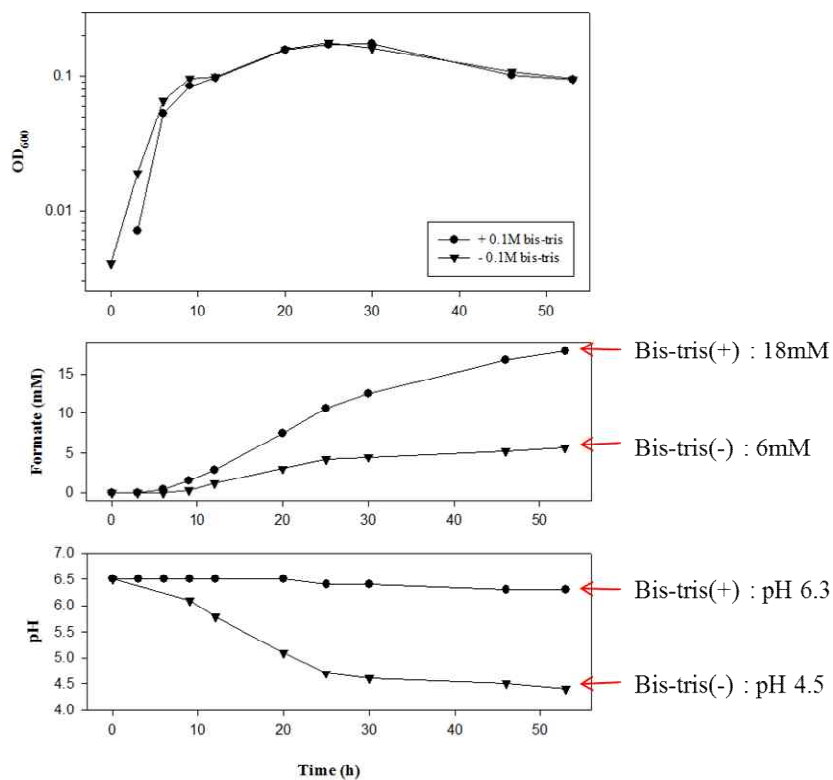


그림 3-41. clnFd3CoL1C1118 균주의 세포 성장에 따른 formate 생합성

(2) *T. onnurineus* NA1- Δ fdh1,2,3 기반 codh-fdh3 fusion 재조합 균주의 CO 전환, 개미산 생산 확인

T. onnurineus NA1- Δ fdh1,2,3(Δ fdh1-mfh1-mnh1 Δ fdh2-mfh2-mnh2 Δ TON_0539) 균주를 host

로 사용하여 제작한 *codh-fdh3* fusion 재조합 균주인 *nadFd3CoL1C1118DF123*, *nadFd3CoL2-C1119 DF123*, *nadFd3CoL3C1120DF123*의 CO 조건에서 세포성장과 이에 따른 formate 생산성을 확인하였다. 비교균으로 host로 활용한 NA1 Δ *fdh1,2,3* 균주와 확보된 세 mutant를 대상으로 진행하였으며, 배지는 MM1 (Yeast extract 4g/L)에 CO를 2bar로 충전하였고, pH를 조절해주기 위하여 biological buffer인 Bis-Tris를 0.1M 농도로 각 균주는 3개의 anaerobic vial에 동일하게 접종하여 triplicate로 샘플링 80°C에서 배양하며 시간별로 OD600nm와 pH, Formate의 생산량을 HPLC로 분석하였다 (그림 3-42).

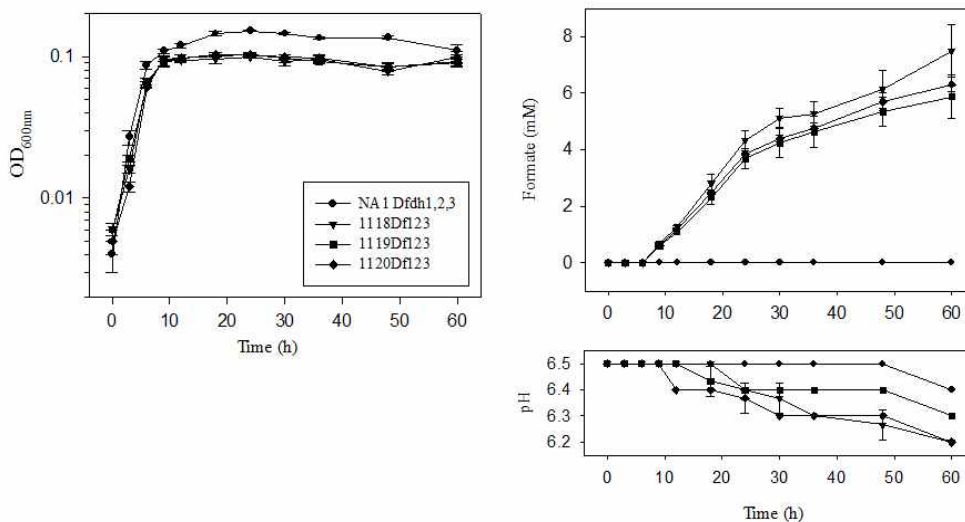


그림 3-42. *nadFd3CoL1C1118DF123*, *nadFd3CoL2C1119 DF123*, *nadFd3CoL3C1120DF123*의 세포성장, formate 생산, pH 변화 관찰

Mutant 세 종은 거의 동일한 세포성장 양상을 보였으며, host strain과 비교하여 약간의 growth retardation이 관찰하였다. Linker의 길이에 따라 formate 생산량에서 약간의 차이가 있었는데, *nadFd3CoL2C1119DF123*, *nadFd3CoL3C1120DF123* 균주는 오차범위 이내로 거의 유사한 생산량을 보였으며, *nadFd3CoL1C1118DF123* 균주가 가장 많은 formate를 생산하였다. 실험 결과로부터, 인위적인 단백질 융합을 통해 CO 가스를 formate로 전환 가능한 초고 온성 고세균을 대사공학적으로 제작하는데 성공하였다.

(3) 신규 *namFd3NHisCoL1C1132* 균주의 CO 전환, 개미산 생산 확인

전자전달 효율을 높이기 위해 Fe-S단백질인 TON_0541을 제거하고, TON_0540과 TON_1017을 fusion하여 제작한 신규 *namFd3NHisCoL1C1132* 균주와 기존에 제작한 *nadFd3CoL1C1118* 균주의 세포 성장 및 개미산 생산성을 비교분석하였다. 각각의 균주는 2 bar CO가 채워진 MM1 배지에서 균주 배양을 실시하였다. 균주 배양에 따른 개미산 생산성을 시간별로

HPLC로 분석하여 비교하였다. 세포성장의 경우 host로 사용한 균주들의 세포성장이 가장 좋았으며, nadFd3CoL1C1118 균주가 host 균주보다 세포성장이 조금 떨어졌고, 신규 namFd3NHisCoL1C1132 균주가 가장 낮은 성장을 보였으나 그 차이가 적었다 (그림 3-43A). 개미산 생산의 경우 host 균주에서는 개미산 생산이 전혀 관찰되지 않았으며, fusion 균주의 경우 48시간 균주배양 후 nadFd3CoL1C1118 균주가 5 mM, namFd3NHisCoL1C1132 균주가 18 mM의 개미산이 확인되었다 (그림 3-43B). 따라서 신규 namFd3NHisCoL1C1132 균주의 개미산 농도가 3.6배 증가하였으며, TON_0540과 TON_1017의 직접적인 fusion을 통해 전자 전달 효율이 높아졌음을 확인하였다.

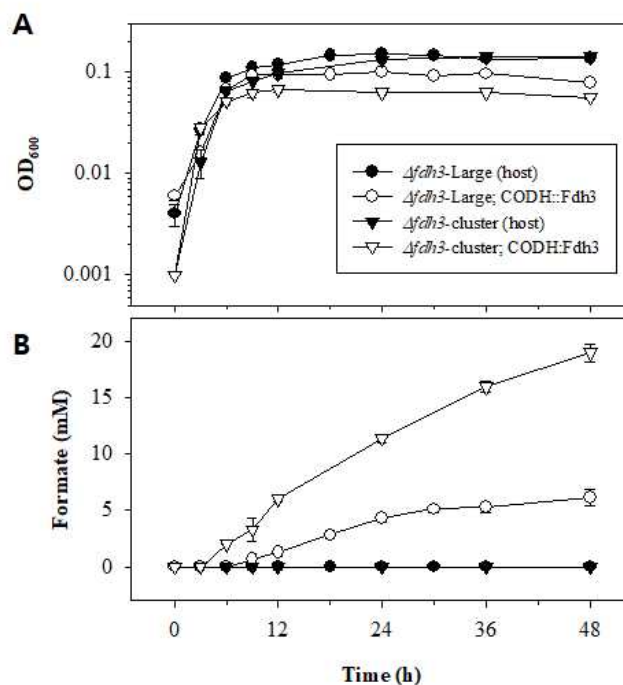


그림 3-43. 신규 재조합 균주의 세포성장 (A) 과 개미산 생산성 (B)

(4) Resting cell 실험을 통한 돌연변이 균주의 CO 전환, 개미산 생산 확인

돌연변이 균주의 개미산 생산이 CODH-Fdh3 fusion complex의 활성화에 의한 것인지를 추가로 확인하기 위해 버퍼기반의 고농도 미생물 현탁액을 사용한 CO 가스의 개미산 전환을 살펴보는 Resting cell 실험을 nadFd3CoL1C1128DF123 균주와 namFd3NHisCoL1C1132 균주로 진행하였다. 실험을 위해 각각의 균주는 생물배양기에서 배양하였으며, 1.5 L MM1 배지에 돌연변이 균주를 접종한 후, 100% CO 가스를 purging하여 균주 배양하였다. nadFd3CoL1C1128DF123 균주의 생물반응기 배양의 경우 초기 OD₆₀₀ 0.04에서 배양을 시작하였으며, Agitation 500 rpm 조건으로 운전하여 균주 OD₆₀₀ 0.8 일 때 배양을 멈추고 cell harvest 실험

시하였다. 수확한 *nadFd3CoL1C1128DF123* 균주는 Yeast extract를 첨가하지 않은 MM1 base에서 2회 wash 하여 잔여 배지 성분을 제거하였으며, 최종적으로 MM1 base (50 mM bis-Tris, pH6.5)에 균주를 현탁하여 OD600 0.5로 제작하여 resting cell 실험에 사용하였다. 20 ml serum vial에 균주 현탁액 4 ml을 분주하여 용기를 밀폐한 후 100% CO 가스를 headspace에 2 bar 압력으로 purging 하고 80°C에서 배양하여 반응을 시작하였다.

실험결과 *nadFd3CoL1C1118DF123* 균주는 CO 가스만 주어진 조건에서 개미산 생산이 가능한 것으로 확인되었으며, 생산성은 36시간 동안 29 mmol/L의 개미산을 생산하였다 (그림 3-44B). 이러한 결과를 통해 *nadFd3CoL1C1118DF123* 균주가 실제로 CO를 개미산으로 전환함을 확인 할 수 있었다. 모든 개미산 생산 돌연변이 균주는 CO 가스를 이용하여 수소생성과 ATP 합성을 하는 CO 가스 특이적인 에너지대사를 하고 있어 CO 가스의 약 90%가 바이오수소로 전환되고 약 10% 정도가 개미산으로 전환되었음을 확인하였다 (그림 3-44A).

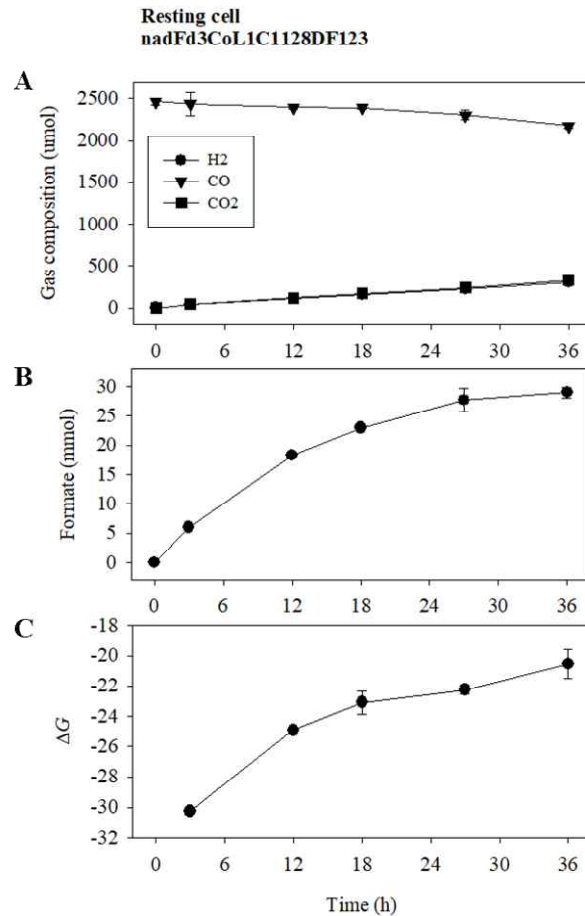


그림 3-44. *nadFd3CoL1C1118DF123* 균주의 Resting cell에 의한 CO가스의 개미산 전환. (A) CO의 소모와 H₂, CO₂의 발생. (B) 개미산 생산. (C) ΔG 에너지의 변화.

namFd3NHISCoL1C1132 균주의 생물반응기 배양조건 및 Resting cell 실험방법은 nadFd3CoL-1C1118DF123 균주에 사용한 방법과 동일하게 진행하였다. 실험결과 resting cell 배양 48 시간 후에 13.5 mM 농도의 개미산이 생성됨을 확인하였다 (그림 3-45A). 각 시간별 가스 조성 분석과 생성된 개미산 농도를 비교하여 CO 가스의 stoichiometry를 분석하였으며, 그 결과 namFd3NHISCoL1C1132 균주 역시 CO 가스 특이적인 에너지대사에 의해 CO 가스의 약 90%가 바이오수소로 전환되고 약 10% 정도가 개미산으로 전환되었음을 확인하였다 (그림 3-45B, 표 3-6).

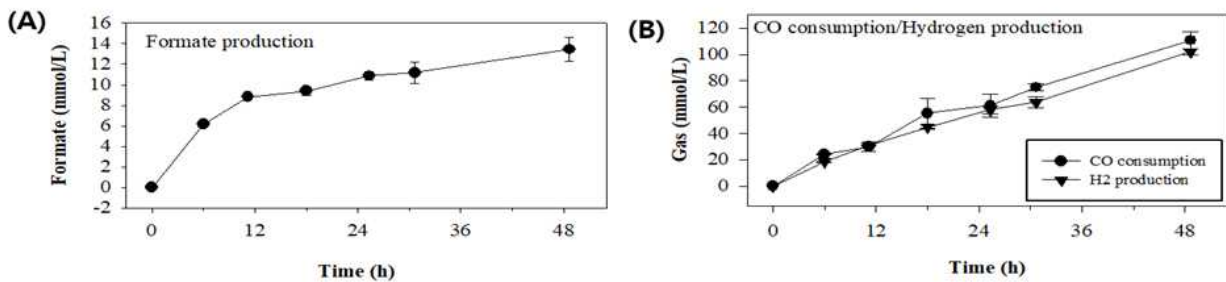


그림 3-45. Resting cell 실험을 통한 CO 가스의 개미산 생전환 성능 분석. *T. onnurineus* BCF12 균주를 CO 조건의 배지에서 배양한 후, 특정 buffer에 OD₆₀₀ 0.5의 cell suspension을 제작. Cell suspension에 CO가스를 공급하여 시간에 따른 개미산 생산성 (A) 과 CO 소모량 및 수소 생산성 확인하였다 (B).

표 3-6. namFd3NHISCoL1C1132 균주 resting cell 실험의 48시간 경과 후 stoichiometry 분석 결과. CO 소모량의 약 10%가 개미산으로 전환되고 약 90%가 바이오수소로 전환되었다.

항목	농도 (mmol/L)
개미산 생산	13.5 (±1.2)
H ₂ 생산	102.0 (±2.2)
CO 소모	110.7 (±6.3)

다. CODH-Fdh3 단백질 complex의 분리

(1) CODH-Fdh3 단백질 complex의 분리를 위한 6 His-tag 클로닝

앞서 확인하였던 In vivo 상에서의 formate 생산 뿐만 아니라 In vitro 에서도 CO를 직접적으로 formate로 전환하는지 확인하고자 CODH-Fdh3 단백질 complex의 분리를 위한 His-tag 클로닝을 실시하였다. 기존에 구축되어 있던 linker 1개로 연결된 Fdh3-CODH fusion 단백질

의 plasmid를 template으로 하여 His-tag을 첨가하도록 설계 His-tag affinity를 이용한 단백질 분리, 정제 과정에서 fusion protein의 온전한 complex를 얻어야만 하므로, Fdh3 large subunit (TON_0539) 또는 CODH large subunit (TON_1018)의 각 N-terminal과 C-terminal에 His-tag을 삽입하는 네종류의 클론을 제작하였다 (그림 3-46).

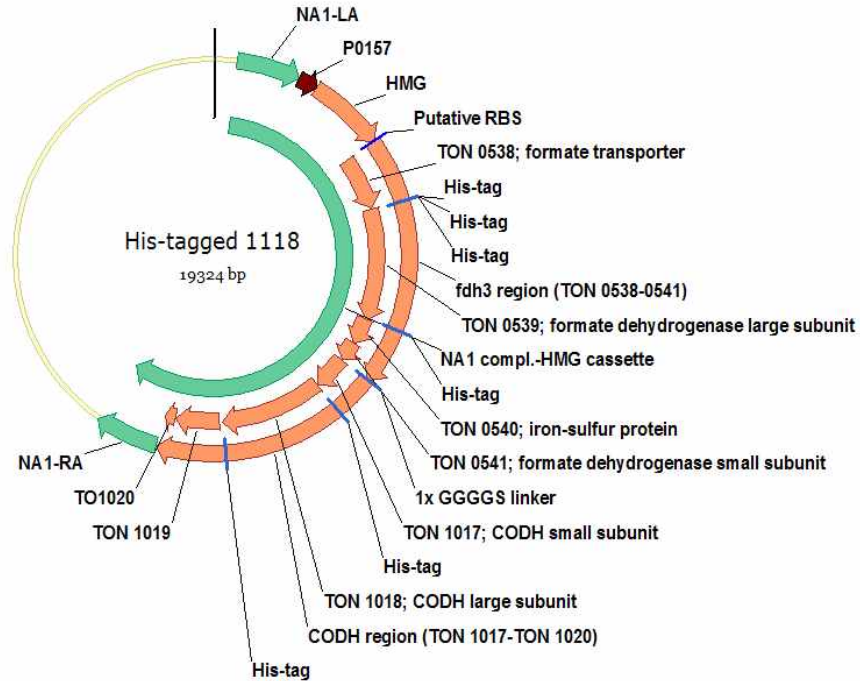


그림 3-46. His-tag Fdh3-CODH fusion protein의 vector map

첨가되는 His-tag sequence를 기준으로 양 옆의 두 insert fragment를 PCR로 증폭시키고, vector를 제한효소 AvrII로 처리하여 준비하였다 (그림 3-47).

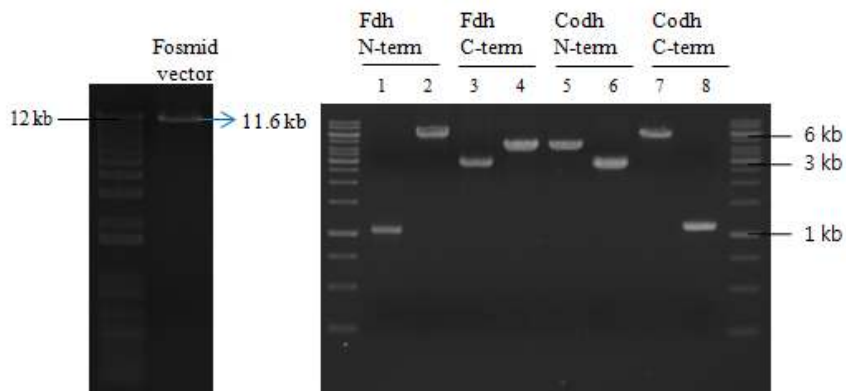


그림 3-47. His-tag 삽입 cloning을 위한 vector와 insert DNA.

네 종류의 클론 중, CODH C-terminal His-tag 의 cloning을 가장 먼저 성공하여 [그림 2-21] 과 같이 PCR 방법을 통해 his-tag과 insert DNA를 확인하고 (그림 3-48) C5 균주를 선택하였으며, epiFd3CoHisL1C1127 이라고 명명하였다.

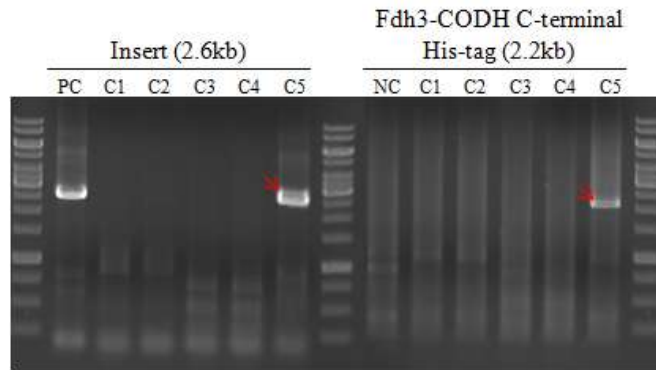


그림 3-48. epiFd3CoHisL1C1127 균주의 PCR 확인

Fdh3 N-terminal His-tag, Fdh3 C-terminal His-tag의 cloning도 차례로 성공하였다. NEB사의 NEBuilder Master mix를 사용하여 cloning을 시도하였으며, 각 8개의 콜로니를 isolation 하여 PCR 방법을 통해 확인하였다 (그림 3-49). 이렇게 분리된 균주는 epiHisFd3CoL1C1128, epiFd3HisCoL1C1129로 명명하였다.

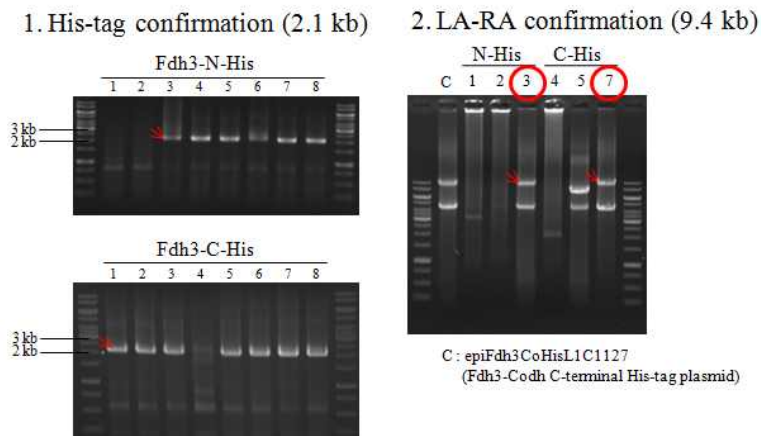


그림 3-49. epiHisFd3CoL1C1128, epiHisFd3CoL1C1129 PCR을 통한 cloning의 확인

(2) His-tag이 포함된 융합단백질 클론들의 NA1 도입

형질전환에 사용할 host strain 균주로 *T. onnurineus* NA1- Δ fdh1,2,3(Δ fdh1-mfh1-mnh1 Δ fdh2-mfh2-mnh2 Δ TON_0539) 균주를 선정하여, pyruvate 첨가 배지인 MM1- pyruvate(5g/L)에서

배양한 후, 50 μ g의 DNA를 형질전환에 사용 클로닝을 통해 완성된 3 가지의 fosmid인 epiFd3CoHisL1C1127, epiHisFd3CoL1C1128, epiFd3HisCoL1C1129 을 NA1에 형질전환하였다.

형질전환 후, Selection marker로서 10 μ M simvastatin이 첨가된 MM1-pyruvate 배지에서 NA1 균주를 이틀간 80°C에서 배양한 결과 세포의 성장을 확인할 수 있었고, plasmid에 의한 형질전환을 예상하여 2회 추가로 10 μ M simvastatin이 포함된 배지에 계대하여 균주를 농후배양 진행하였다. 2회 계대한 세포 배양액을 3ml 확보하여 genomic DNA를 추출 PCR을 통해 확보된 mutant의 유전자형을 확인하여 hmg cassette와 His-tag이 성공적으로 도입되었음을 확인되었다 (그림 3-50).

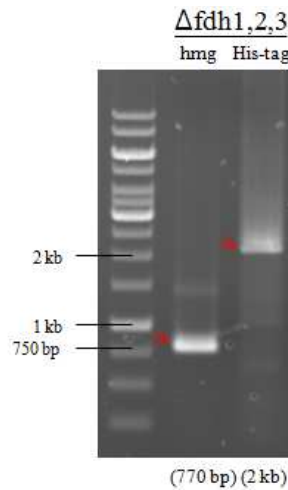


그림 3-50. epiFd3CoHisL1C1127의 NA1 균주로의 도입 PCR 확인결과

이렇게 확인된 transformant를 ASW-YT(sulfur) 고체 배지에 도말하여 80°C에서 약 48시간 배양 여기서 배양된 콜로니 중 24개를 isolation하여 다시 한 번 10 μ M simvastatin이 첨가된 ASW-YT 배지에 농후배양하였다. 이 isolate들의 유전자형을 각각 확인하기 위하여, 배양액을 3ml씩 확보하여 모두 genomic DNA를 추출한 후 PCR 방법을 사용하여 확인 [그림 2-24]와 같이 His-tag, complementary site에서의 homologous recombination, Insert 전체의 PCR을 통해 전체 insert의 삽입을 확인하고 (그림 3-51) 12번 균주를 선택하여 nadFd3CoHisL1C1127이라 명명하였다.

epiHisFd3CoL1C1128 균주도 형질전환 균주를 PCR 확인한 결과 클로닝에 성공하였으며, 돌연변이 균주를 nadFd3NHisCoL1C1128로 명명하였다. epiFd3HisCoL1C1129의 경우 NA1 균주에 형질전환 되지 않아 최종적으로 CODH C-term. His-tag 클로닝 된 NA1 돌연변이 균주 nadFd3CoHisL1C1127 과 Fdh3 N-term. His-tag 클로닝 된 nadFd3NHisCoL1C1128 두 균주를 확보하였으며, CO 조건에서 세포성장 후 세포성장액을 LC로 측정한 결과 formate가 생성됨을 확인 따라서 His-tag 에 의한 formate 생산저해는 없는 것으로 확인하였다 (표 3-7).

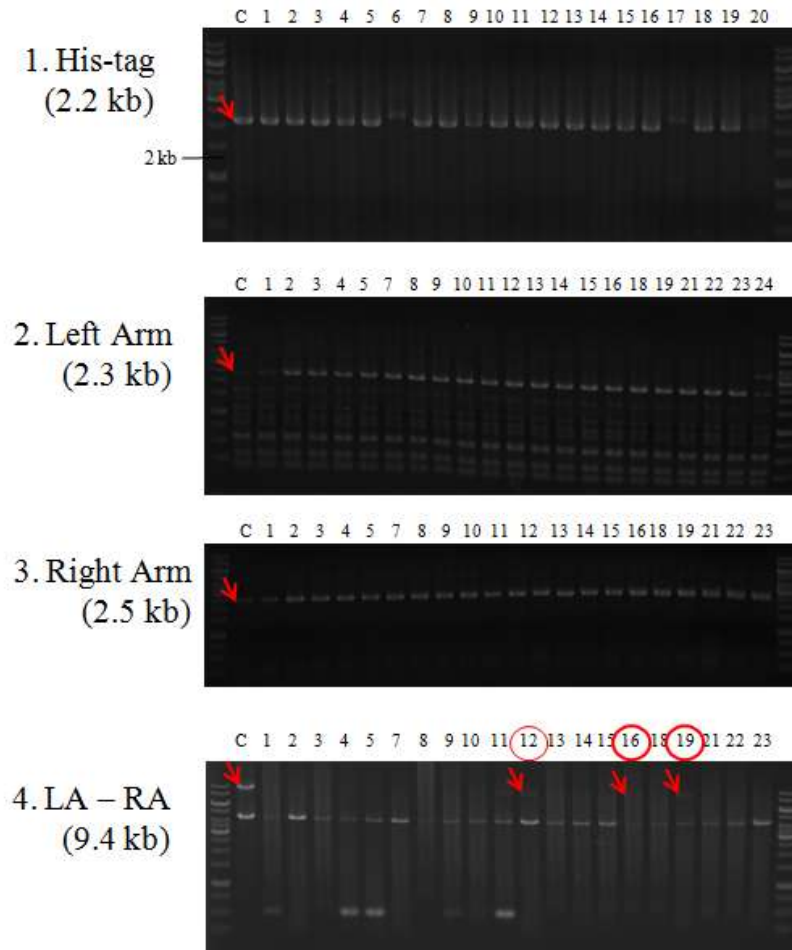


그림 3-51. nadFd3CoHisL1C1127 돌연변이 균주의 PCR 확인 결과

표 3-7. CODH-Fdh3 단백질 complex의 분리를 위한 His-tag 클로닝 결과

His-tag	NA1 재조합 균주	CO 조건에서 formate 생산능
TON1018 (CODHLarge) N-term.	-	-
TON1018 (CODHLarge) C-term.	nadFd3CoHisL1C1127	O
TON0539 (Fdh3 Large) N-term.	nadFd3NHisCoL1C1128	O
TON0539 (Fdh3 Large) C-term.	-	-

(3) CODH C-term. His-tag을 이용한 CODH-Fdh3 fusion protein 분리 및 활성 확인

CO를 formate로 전환하는지 여부를 단백질 수준에서 확인하기 위해 CODH-Fdh3 fusion protein의 CODH C-term. his-tag 균주인 nadFd3CoHisL1C1127 균주로부터 affinity column

purification 방법을 사용하여 해당 fusion protein을 분리를 진행하였다. Fusion protein을 포함하고 있는 돌연변이주, nadFd3CoHisL1C1127 균주를 MMC (bis-Tris pH 6.5) 배지 350 ml로 배양하여 fermenter seed로 사용하였다. 5L fermenter에서 균주 배양을 실시하였으며, CO를 연속 공급 11시간 배양 후 OD 0.9에서 cell harvest 진행하였다. harvest한 균주를 과쇄한 후 Talon affinity column을 사용하여 fusion 단백질 분리를 시도하였다. 단백질 분리 후 각 단백질 fraction을 PAGE 상에서 확인한 결과 His-tag을 포함하고 있는 CODH 외에도 다양한 크기의 protein band 들이 확인 되었으나, 이들 중 CODH-Fdh3 complex에 해당하는 단백질들을 특정할 수 없었다 (그림 3-52).

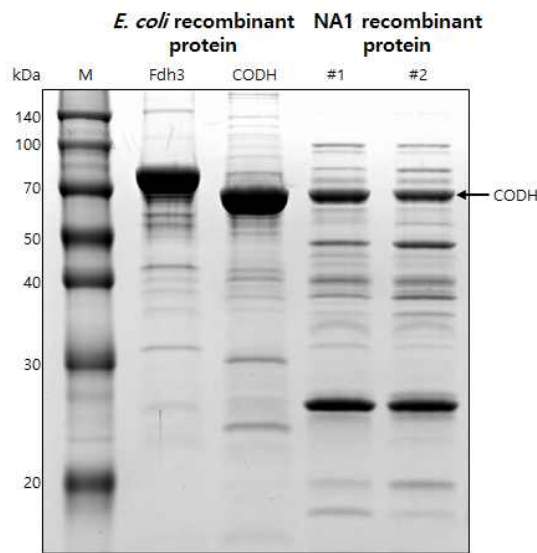


그림 3-52. nadFd3CoHisL1C1127 균주로부터 분리한 단백질의 PAGE 결과

분리한 protein을 대상으로 CODH에 의한 CO oxidation 과 Fdh3에 의한 formate oxidation activity를 methyl viologen 방법으로 확인하였다. CODH activity는 2bar CO를 기질로, Fdh activity는 40 mM sodium formate를 기질로 하였으며, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0) buffer를 사용하여 활성을 측정하였다. Activity 확인 결과 CODH 활성만 확인 되었으며, Fdh 활성은 확인 되지 않았으며, 실험 결과로부터 CODH His-tag으로 fusion protein을 분리한 단백질로부터 목표로 하였던 fusion protein complex를 확인 하지 못하였다 (표 3-8).

표 3-8. CODH his-tag으로 분리한 단백질의 효소활성 결과

배양 조건	CODH 활성	Fdh 활성	Formate 생산능
CO (fermenter)	+	-	-

(4) Fdh3 N-term. His-tag을 이용한 CODH-Fdh3 fusion protein 분리 및 subunit Identification

CODH His-tag으로 fusion protein을 분리한 단백질로부터 formate 생산능을 확인하지 못해 Fdh3 N-term. His-tag 돌연변이 균주인 nadFd3NHisCoL1C1128 균주로부터 CODH-Fdh3 complex 분리를 시도하고 효소 활성을 측정하였다. 균주의 배양 조건 및 His-tag affinity column을 사용한 단백질의 분리는 이전과 동일한 방법으로 진행하였다.

CODH-Fdh3 complex를 구성하는 단백질들의 예상 분자량은 표 3-9와 같으며 분리한 단백질을 PAGE로 확인한 결과 His-tag을 포함하고 있는 Fdh3 large subunit이 major band로 확인되었다. 이 외에도 다양한 protein band 들이 확인되었으나, nadFd3CoHisL1C1127 균주에서 분리한 CODH His-tag 단백질과는 다른 양상을 보였다 (그림 3-53).

표 3-9. CODH-Fdh3 complex를 구성하는 단백질들의 예상 분자량

Enzyme	M. W. (kDa)
TON_1018 (CODH large)	67
TON_1017 (CODH small)::TON_0541 (Fdh3 small)	38
TON_0541 (Fdh3 small)	14
TON_0540 (Fe-S)	18
TON_0539 (Fdh3 large)	76

분리된 단백질 내에 Fdh3 외에 또 하나의 핵심 단백질인 CODH가 존재하는지 확인하기 위해 CODH 항체를 사용하여 Western blot을 그 결과, 분리된 단백질내에 CODH가 존재함을 확인할 수 있었으며, 이는 CODH와 Fdh3가 단백질 Complex를 이루고 있음을 의미하였다 (그림 3-54).

CODH 와 Fdh3 외에, 다른 subunit 들의 확인을 위해 major protein band 들을 대상으로 LC/MS 분석을 실시하여 분리된 단백질들을 규명하였다. 그 결과, 예측되는 CODH-Fdh3 complex를 구성하는 단백질들이 모두 크기에 맞게 확인되어 CODH small subunit (TON_1017)과 Fdh3 small subunit(TON_0541)의 fusion을 통해 CODH-Fdh3 complex가 형성되었음을 최종적으로 확인하였다. 이와 더불어 LC/MS 분석을 통해 분리된 다른 단백질들에서 TON_0542 와 TON_0543이 확인됨에 따라 fdh3 down-stream에 존재하는 이들 유전자들이 fdh3 gene cluster에 속하며, *T. onnurineus* NA1 균주 내에서 endogenous protein complex를 이루는 것을 새롭게 확인하였다 (그림 3-55). 이는 보고되지 않았던 것으로 기존에 알려지지 않은 새로운 기능을 하는 단백질 complex 일 것으로 예상되었다 (그림 3-56).

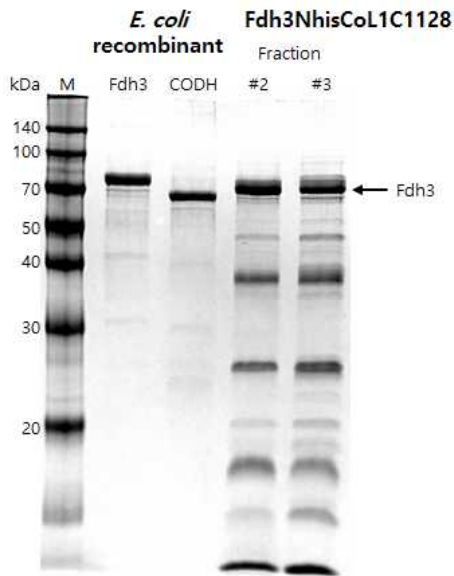


그림 3-53. Fdh3 N-term. His-tag 으로 분리한 단백질 PAGE 결과

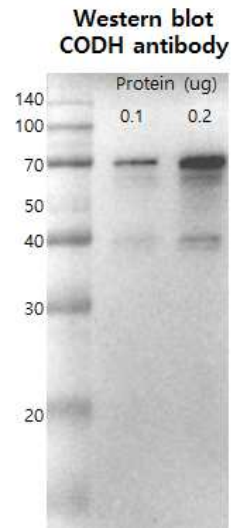


그림 3-54. Fdh3 N-term. His-tag 으로 분리한 단백질의 CODH Western blot 결과

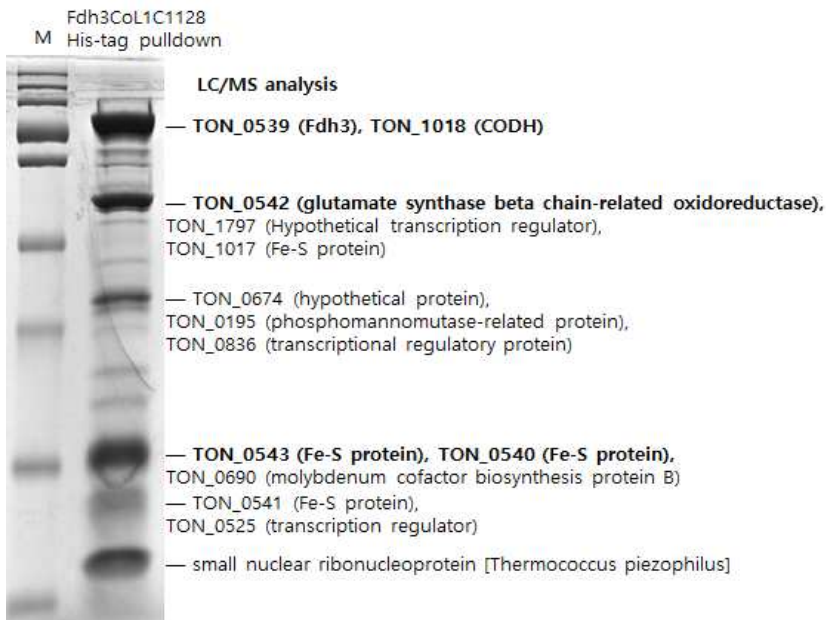


그림 3-55. Fdh3 N-term. His-tag 으로 분리한 단백질의 LC/MS 결과

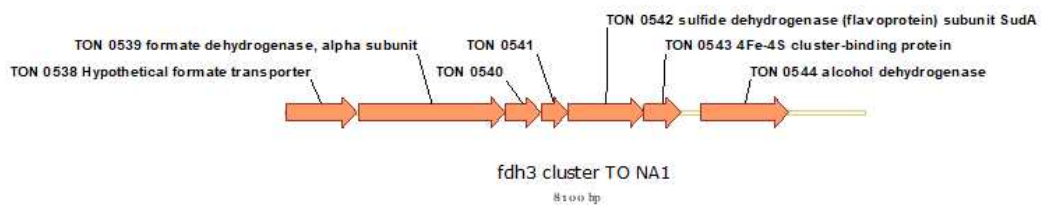


그림 3-56. *fdh3* 유전자군 모식도

(5) CODH-Fdh3 complex의 효소활성 측정 및 CO 전환, 개미산 생산능 확인

분리된 CODH-Fdh3 complex가 CODH 와 Fdh 효소 활성을 가지고 있는지 확인하기 위해 각각 CO 와 formate를 기질로 주고 methyl viologen을 electron acceptor로 사용하여 in vitro 조건에서 효소활성을 측정하였다. 그 결과, CODH-Fdh3 complex에서 CODH 활성이 120.9 (± 11.3) mmol min⁻¹ mg⁻¹, Fdh 활성이 1.8 (± 0.3) mmol min⁻¹ mg⁻¹ 으로 높은 수준의 활성 확인하였다 (그림 3-57).

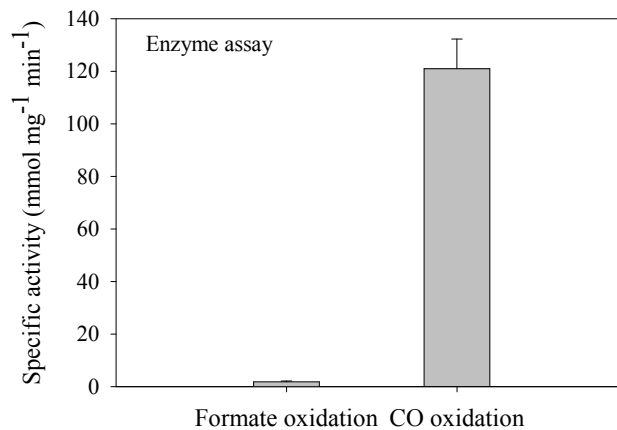


그림 3-57. CODH-Fdh3 complex의 CODH 및 Fdh 효소 활성

CODH와 Fdh 효소활성이 확인된 CODH-Fdh3 complex에 의해 실제로 CO oxidation-formate 생산 반응이 가능한지 확인하기 위해 100 ug/ml 농도의 Fdh3 N-term. His-tag 으로 분리한 단백질에 2 bar 압력의 CO 가스를 head space에 채운 후, 80 °C에서 24시간 incubation 하여 CO 가스에 의한 formate 생산이 가능한지 LC로 확인하였다. 그 결과, 약 4.3 mM 농도의 formate가 분리된 단백질에 의해 생산됨을 in vitro 조건에서도 확인되었다 (그림 3-58).

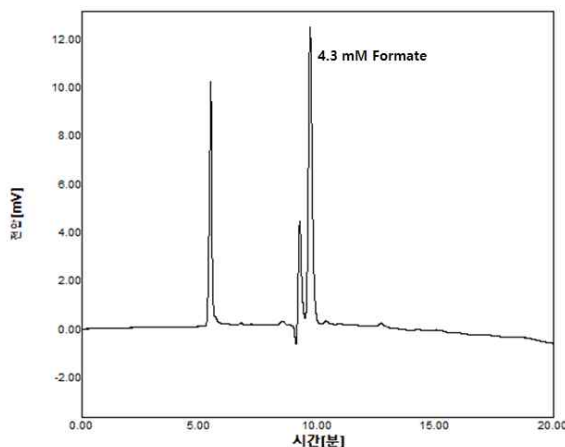


그림 3-58. CODH-Fdh3 complex에 의해 in vitro 조건에서 생성된 formate의 LC 결과

(6) 합성 CO 전환-개미산 생산 단백질, carbon monoxide:formate oxidoreductase (CFOR)의 분리·정제

신규로 제작한 *namFd3NHisCoL1C1132* 균주에서 확인된 CO에 의한 개미산 생산능이 돌연변이균주 내에서 생성된 합성 CFOR에 의한 직접적인 현상인지 확인하기 위해 해당 단백질을 분리·정제하고 *in vitro* 조건하에서 CO 전환-개미산 생산능을 확인하고자 하였다. CFOR 단백질의 분리·정제를 위해 유전자 클로닝 단계에서 *Fdh3* large subunit인 TON_0539의 N-terminal 부분에 His-tag을 부착하였으며, TALON affinity column purification 방법을 사용하여 해당 단백질의 분리를 진행하였다. 신규 합성 단백질인 CFOR을 포함하고 있는 돌연변이주, *namFd3NHisCoL1C1132* 균주를 MMC (bis-Tris pH 6.5) 배지 350 ml로 배양하여 fermenter seed로 사용하였다. 5L fermenter에서 균주 배양을 실시하였으며, CO를 연속 공급하여 9시간 배양 후 OD 0.9에서 cell harvest 하였다. Harvest한 균주를 6000 rpm 에서 30분간 원심분리하여 균주만 따로 회수 하였으며, 확보한 균주를 talon buffer (50 mM Tris-HCl (Ph 8.0), 0.1M KCl, 10% glycerol)에 잘 풀어준 후, sonicator를 사용하여 균주를 균일하게 파쇄한 다음 Talon affinity column을 사용하여 단백질을 분리하였다. 단백질은 최종 300 mM imidazole이 포함된 talon buffer를 사용하여 talon resin으로부터 분리하였으며, Bradford assay 방법으로 단백질 농도를 정량하고, 12% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)로 분리·정제한 단백질을 확인하였다.

분리·정제한 CFOR 단백질을 PAGE 상에서 확인한 결과 His-tag이 부착된 76 kDa TON_0539 (*Fdh3* large subunit)와 이와 단백질 complex를 이룰 것으로 예상되는 67 kDa TON_1018 (*CODH* large subunit)과 38 kDa Fe-S 융합단백질인 TON_1017::TON_0540 단백질 band가 확인되었다 (그림 3-59, 60, 표 3-10).

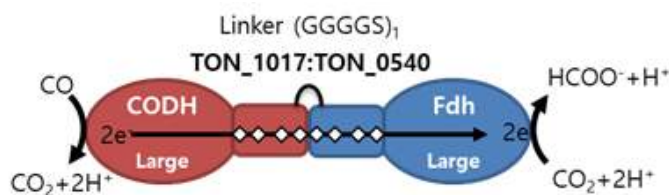


그림 3-59. 합성 CFOR의 예상 모식도

His-tag pulldown을 통해 확인한 각 구성 단백질이 실제로 예상 단백질인 *Fdh3*, *CODH*, Fe-S 융합단백질이 맞는지 확인하기 위해 해당 단백질 밴드들의 LC-MS/MS 분석을 실시하였으며, 예상되는 단백질 (표 3-10)과 일치함을 최종적으로 확인하였다 (그림 3-60). 따라서 *CODH*와 *Fdh3*가 Fe-S 융합단백질을 매개로 하나의 새로운 합성단백질을 형성하고 있음을 확인하였다.

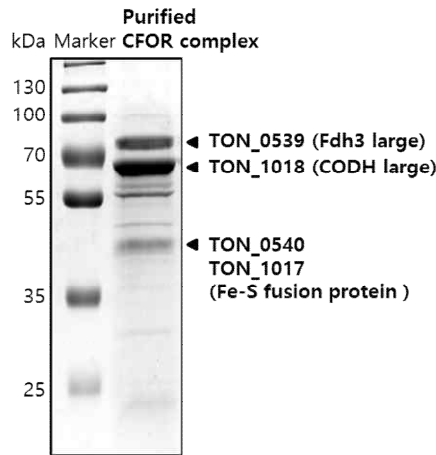


그림 3-60. namFd3NHisCoL1C1132 균주에서 분리한 합성 carbon monoxide:formate oxidoreductase (CFOR) 단백질의 PAGE 결과

표 3-10. 합성 CFOR complex를 구성하는 각 subunit의 예상되는 molecular weight

Enzyme	Molecular weight (kDa)
TON_0539 (Fdh3 large)	76
TON_1018 (CODH large)	67
Fusion of Fe-S proteins	
TON_0541:TON_1017 (BCF09)	38
TON_0540:TON_1017 (BCF12)	

(7) 분리·정제한 합성 CFOR 단백질의 CO 전환-개미산 생산활성 확인

분리한 CFOR 단백질을 대상으로 Fe-S fusion 단백질 간의 전자전달이 실제로 가능한 지를 확인하기 위해 *in vitro* 조건하에서 CO 가스에 의한 개미산 생산능을 확인하였다. 분리·정제한 CFOR 단백질의 CO 전환-개미산 생산활성은 5 종류의 buffer (50 mM Bis-Tris pH 6.5, 150 mM HEPES pH 7.5, 50 mM potassium phosphate pH 7.6, 100 mM Tris pH 8.0, 200 mM Bicine-KOH pH 8.5)에 분리한 CFOR 단백질을 최종 100 ug/ml 농도로 사용하여 25 ml serum vial에 2ml 의 CFOR 혼합액으로 실험하였다. 23 ml head space에 CO-CO₂혼합가스 (CO:CO₂=53.5:46.5,vol./vol.)를 주입 한 후, 80℃ 에서 incubation 하며 반응을 진행하였다.

5시간 동안 반응 시킨 후, 생성된 개미산의 농도를 LC로 측정한 결과 모든 buffer 조건에서

개미산 생산이 관찰 되었으며, 150 mM HEPES (pH 7.5)에서 가장 많은 약 5 mmol/L 의 formate가 확인되었다 (그림 3-61). In vitro 조건에서 CO와 CO₂ gas만으로 개미산 생성이 최종 확인되었으며, 따라서 전자전달 역할을 하는 Fe-S 단백질의 융합을 통해 CODH 효소와 Fdh 효소가 complex를 이루는 새로운 형태의 CFOR 단백질을 제작하였고 기능을 함을 최종적으로 확인하였다.

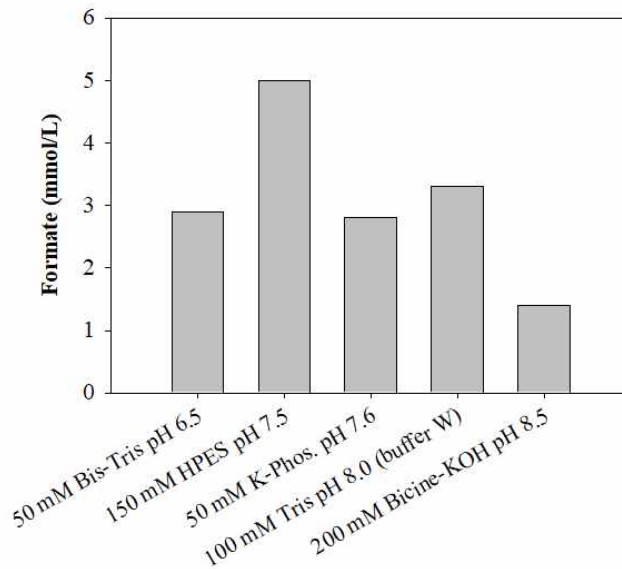


그림 3-61. 합성 CFOR 단백질의 CO 가스-개미산 생전환 효소활성 분석결과

2. 비광합성 미생물 개량을 위한 유전자원 확보

(1) Acetogen 미생물에 적용 가능한 벡터 확보

Acetogen 미생물의 계통 분류에 근거하여 가까운 미생물에서 복제 가능한 벡터 자원들을 문헌 조사를 통해 확인하였다. 이를 기반으로 국내·외 Acetogen 연구 그룹간 교신 및 유료 자원 분양을 통하여 Acetogen 미생물에 적용 가능한 플라스미드 형태의 벡터를 확보하였다 (표 3-11).

표 3-11. 확보된 acetogen 미생물 벡터

Plasmid	Replicon	Source	Rep. Mode
pMTL007	pCB102	<i>Clostridium butyricum</i>	RC
pMTL500E	pAM β 1	<i>Streptococcus faecalis</i>	Theta
pJIR750ai	pIP404	<i>Clostridium perfringens</i>	Theta?
pIKM1	pIM13	<i>Bacillus subtilis</i>	RC

확보한 벡터를 이용하여, acetogen 균주 중 하나인 *Clostridium* sp. AWRP(안산 갈대습지 분리)를 대상으로 형질 전환을 시도하였다. 벡터에 포함된 항생제 내성 유전자에 따라 5 μ g/mL의 Thiamphenicol 또는 20 μ g/mL의 Erythromycin을 첨가하여 colony 형성을 확인하였다 (그림 3-62). 4종의 벡터 중 AWRP 균주에서는 pCB102, pAM β 1, pIP404 계열 복제 원점이 잘 작동하는 것을 확인하였다. 당해연도에 확보한 벡터 자원은 추후 신규 비광합성 미생물에도 적용이 가능할 것으로 보이며, 신규 분리 acetogen 미생물에 적용 계획이다.



그림 3-62. AWRP 미생물에서의 벡터를 이용한 형질 전환

3. 당화효소군 및 알코올 생산 재조합 균주 개발

가. 당화 유전자군 도입된 *Thermococcus onnurineus* NA1 제작 및 특성분석

초고온 고세균 *T. pacificus*로부터 β -linked polysaccharide 대사에 관여하는 당화효소군을 탐색하고 유전자원을 확보하였다. 이를, 초고온 고세균 NA1에 도입하고자 fosmid 벡터에 클로닝을 완료하였다 (그림 3-63).

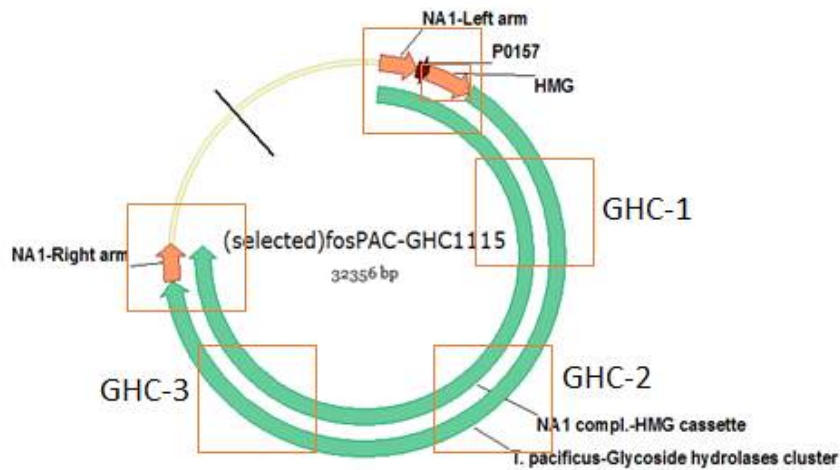


그림 3-63. Fosmid 벡터에 당화효소군을 포함하는 재조합 플라스미드 제작

상기 재조합 플라스미드를 NA1에 도입하고 외래의 당화효소군 유전자들을 homologous recombination에 의하여 genome editing을 수행하였다. PCR 분석방법을 통하여 약 20 kb에 해당하는 당화효소군 유전자들이 NA1 genome에 삽입되었음을 확인하였다 (그림 3-64).

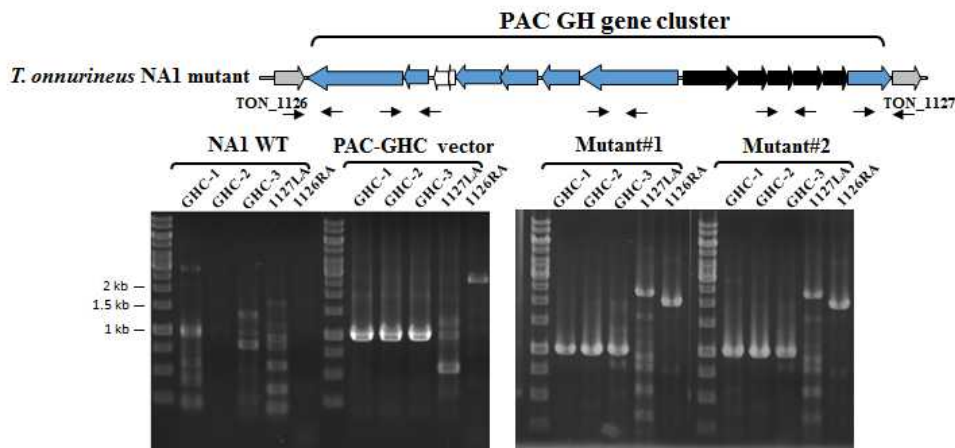


그림 3-64. 돌연변이 NA1 제작 및 PCR 분석

야생형과 당화효소군이 도입된 돌연변이 NA1을 CMC, laminarin, agarose에서 배양한 결과, 야생형은 모든 기질에서 성장을 하지 못하였지만, 돌연변이 균주는 laminarin 기질에서 성장과 더불어 수소생산을 확인하였다 (그림 3-65). CMC 및 agarose 기질에서 성장하지 못한 이유는 기질이용에 있어서 적응기간이 필요한 것으로 판단되었다.

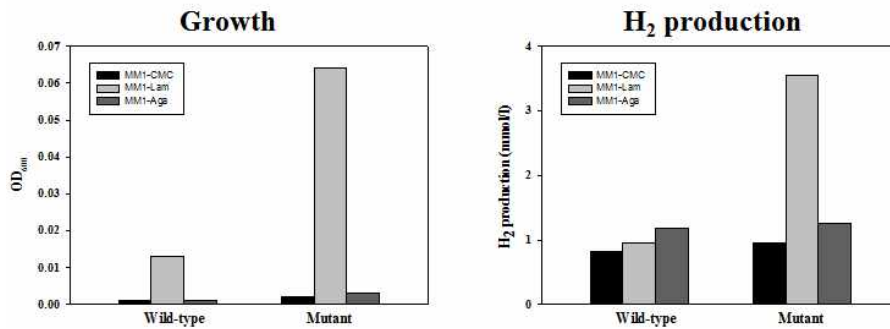


그림 3-65. 야생형과 돌연변이 NA1 균주의 다양한 다당류에서의 성장 및 수소생산능 분석

나. 2,3-BDO 생산관련 유전자가 도입된 *T. onnurineus* NA1 제작 및 특성분석

선행과제인 “해양·극한 유전자 신기능 발굴 및 활용기술개발” 과제에서 2,3-BDO 대사관련 유전자가 도입된 돌연변이 NA1 균주를 제작하고 특성을 분석하였다. alsS 그리고 alsS-adh 유전자가 도입된 돌연변이 NA1(BP001 그리고 BP002) 제작하고 BP001 strain에서 acetoin 생산, BP002 strain에서 meso-2,3-BDO 생산을 확인하였다 (그림 3-66).

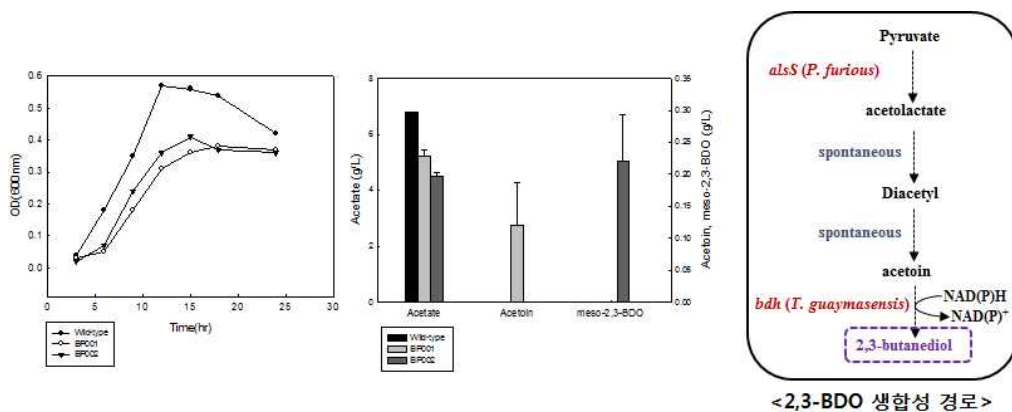


그림 3-66. 야생형과 돌연변이 NA1 균주의 다양한 다당류에서의 성장 및 수소생산능 분석

2,3-BDO 대사관련 유전자가 도입된 돌연변이 NA1(BP002) 균주에 2,3-BDO 생산 개선을 위하여 NAD(P)H regeneration 하고자, 일산화탄소를 첨가하여 약 25% 2,3-BDO 생산이 개선됨

을 확인하였다 (그림 3-67). CO oxidation으로부터 전자는 1)직접적으로 ferredoxin을 매개로 또는 2)수소를 거쳐 uptake hydrogenase에 의해서 NAD(P)+에 전달될 것으로 예측하였다.

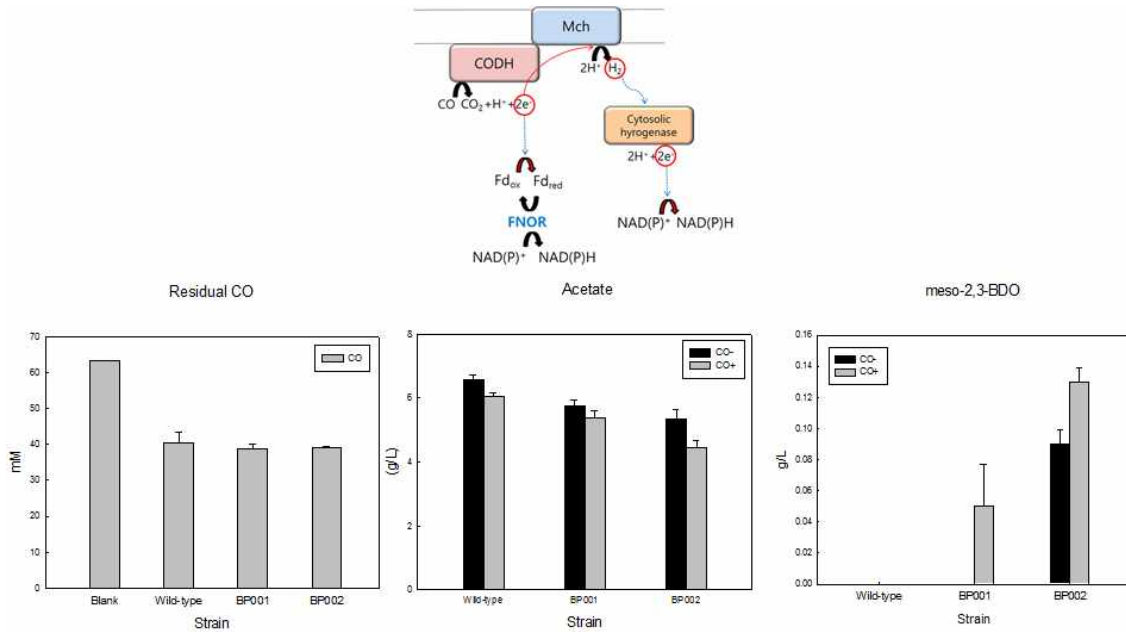


그림 3-67. 돌연변이 NA1 균주의 CO 첨가에 따른 2,3-BDO 생산능 영향 분석

또한, 2,3-BDO 대사관련 유전자가 도입된 돌연변이 NA1(BP002) 균주에 2,3-BDO 생산 개선을 위하여 ACS I(BP003), II(BP004), III(BP005) 유전자가 제거된 돌연변이를 제작하였다. ACS III 유전자가 제거된 BP005 균주에서 2,3-BDO 생산이 개선됨을 확인하였다 (그림 3-68).

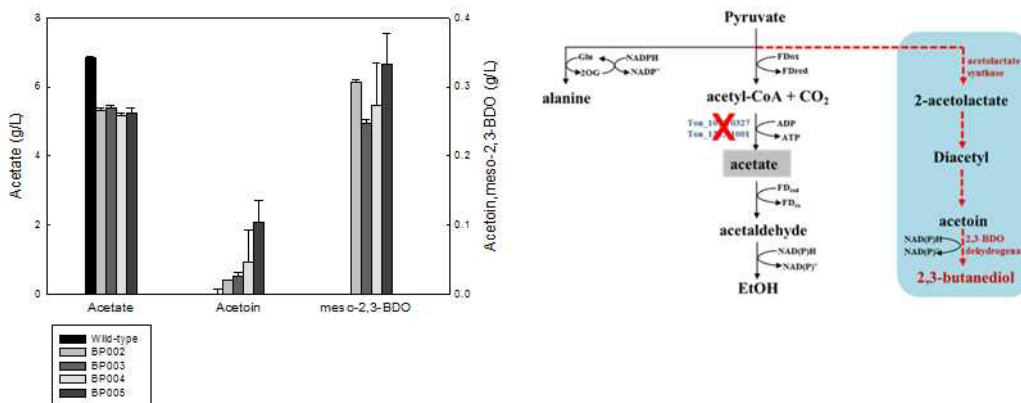


그림 3-68. ACS I, II, III 유전자가 각각 제거된 돌연변이 균주의 2,3-BDO 생산능 분석

다. 해조류(분말)의 강산 이용 전처리 확립

해조류는 홍조류, 녹조류, 갈조류를 각각 한 종씩 선별하여 사용하였으며, 해조류의 당화를 위해서 강산인 H₂SO₄를 이용하였다. 0.2 N H₂SO₄와 0.4 N H₂SO₄ 800 mL에 각각의 해조류 20 g을 넣고 121 °C, 30 min 동안 고압멸균기를 이용하여 열처리를 진행하였다. 2 N NaOH를 이용하여 pH 6 ~ 7 정도로 중화. 중화과정에서 생성되는 salt의 농도를 염도계를 이용하여 측정한 결과 최대 1.68로 해수에 절반 정도로 높은 salt 농도를 확인하였다. 해양 극한미생물을 배양하면서 배지 내에 남아있는 total sugar와 환원당의 변화를 관찰함으로써 해조류 당 성분을 이용할 수 있는지 여부를 확인하였다.

4. 탄소 고정화 획득 해양·극한 미생물 균주 개발

가. Reductive TCA (rTCA) cycle의 *T. onnurineus* NA1 도입

(1) rTCA 이산화탄소 고정 경로의 선정

자연계에 존재하는 CO₂ 고정 경로는 현재까지 총 여섯 경로가 알려져 있으며, 이 여섯 경로는 식물, 광합성 세균 등에서 존재한다 (표 3-12).

표 3-12. 자연계에 존재하는 CO₂ 고정 경로

Pathway	ATP equivalents for synthesis of one pyruvate	Reductants for synthesis of one pyruvate (10[H])	CO ₂ fixing enzymes	Active CO ₂ species
Reductive pentose phosphate cycle (Calvin-Benson-Bassham cycle)	7	5 NADH or NADPH	RubisCO	CO ₂
Reductive citric acid cycle (Amon-Buchanan cycle)	2	2 NADH or NADPH, 1 unknown donor, and 2 ferredoxin	2-Oxoglutarate synthase Isocitrate dehydrogenase Pyruvate synthase PEP carboxylase	CO ₂ CO ₂ CO ₂ HCO ₃ ⁻
Reductive acetyl-CoA pathway (Wood-Ljungdahl pathway)	~ 1	3 ferredoxin and 2 F ₄₂₀ H ₂ (in methanogens)	Acetyl-CoA synthase-CO dehydrogenase Formylmethanofuran dehydrogenase (in methanogens) Pyruvate synthase	CO ₂ CO ₂ HCO ₂
3-Hydroxypropionate bicycle	7	6 NADH or NADPH, but 1 FAD is reduced	Acetyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase	HCO ₃ ⁻
3-Hydroxypropionate-4-hydroxybutyrate cycle	9	6 NADH or NADPH, but 1 FAD is reduced	Acetyl-CoA and propionyl-CoA carboxylase	HCO ₃ ⁻
Dicarboxylate-4-hydroxybutyrate cycle	5	2~3 ferredoxin, 1~2 NADH or NADPH, and 1 unknown donor	Pyruvate synthase PEP carboxylase	CO ₂ HCO ₃ ⁻

지구상에서 가장 많은 CO₂를 고정하는 Reductive pentose phosphate cycle을 포함하여 이 외에도 몇몇 균주들에서 다양한 CO₂ 고정 경로들이 존재한다. *T. onnurineus* NA1은 그 특성이 본래 이산화탄소를 carbon source로 사용하지 못하는 heterotroph이며, 일산화탄소를

energy source로 사용하는 carboxydrotroph이다. 이처럼 CO₂를 고정하지 못하는 균주에 CO₂ 고정 경로를 도입함으로써 CO₂의 방출을 저감하고자 하는 목표로 이 연구를 진행하였다.

심해 열수구 생태계를 살펴보면, 그림 3-69와 같이 고온성 균주들이 보유한 CO₂ 고정 경로들을 알 수 있는데, 그 경로들로는 rTCA(reductive citric acid cycle), WL(Reductive acetyl-CoA pathway)가 주로 존재하며 이 외에 DC/4-HB, 3-HP/4-HB 경로 또한 일부 *Crenarchaeota* 문에서 찾을 수 있다.

Hydrothermal vents					
~4-20°C	Fe ²⁺ -oxidation	Fe ²⁺	O ₂ , NO ₃ ⁻	Zetas, others	CBB
	S-oxidation	S _{red}	O ₂ , NO ₃ ⁻	Gammas, Epsilons, others?	CBB, rTCA
~20-70°C	S-oxidation	S _{red}	O ₂ , NO ₃ ⁻	Gammas, Epsilons, others?	CBB, rTCA
	H ₂ -oxidation	H ₂	O ₂ , NO ₃ ⁻ , S ⁰	Epsilons, Aquificales	rTCA
	Methanogenesis	H ₂	CO ₂	Euryarchaeota	WL
	Sulfate reduction	H ₂	SO ₄ ²⁻	Deltas	WL, (rTCA)
~70-90°C	S-oxidation	S _{red}	O ₂ , NO ₃ ⁻	Aquificales	rTCA
	H ₂ -oxidation	H ₂	O ₂ , NO ₃ ⁻ , S ⁰	Aquificales	rTCA
	Methanogenesis	H ₂	CO ₂	Euryarchaeota	WL
	Sulfate reduction	H ₂	SO ₄ ²⁻	Archaeoglobales	WL
>90°C	H ₂ -oxidation	H ₂	S ⁰ , S ₂ O ₃ ²⁻ , O ₂ , Fe ³⁺	Crenarchaeota	DC/4-HB, 3-HP/4-HB?
	Methanogenesis	H ₂	CO ₂	Euryarchaeota	WL
	Sulfate reduction	H ₂	SO ₄ ²⁻	Archaeoglobales	WL

그림 3-69. 심해 열수구 생태계에서 CO₂ 고정 경로의 분포

Reductive acetyl-CoA pathway와 reductive TCA cycle 두 pathway는 가장 ATP 소비량이 적어 에너지면에서 효율적이며, 초고온의 환경에서도 active한 단백질을 얻을 수 있도록 생육조건이 *T. onnurineus* NA1과 유사한 균주가 존재하는 pathway를 선정하고자 그림 3-63에서 알 수 있듯이 70°C 이상의 고온성~초고온성 균주의 생태적 분포를 보았을 때, reductive acetyl-CoA pathway와 reductive TCA cycle 두 경로가 major하게 분포하고 있는 것을 확인하였다. 이러한 이유로 최종적으로 target CO₂ fixation pathway는 reductive acetyl-CoA pathway와 reductive TCA cycle로 선정하였다.

(2) rTCA 확보를 위한 대상 균주의 선정

T. onnurineus NA1의 최적 성장조건인 80°C에 근접한 온도에서 활성을 유지하는 단백질을

연을 수 있도록 고온성 균주 유래의 reductive TCA cycle 유전자를 NA1에 도입하고자 선정하였다. *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6는 최적 생육 조건이 70-75°C인 고온성 균주로서 NA1의 배양 조건과 부합하는 균주이며, CO₂만을 carbon source로 이용하는 obligate autotrophic organism 이다 (그림 3-70).

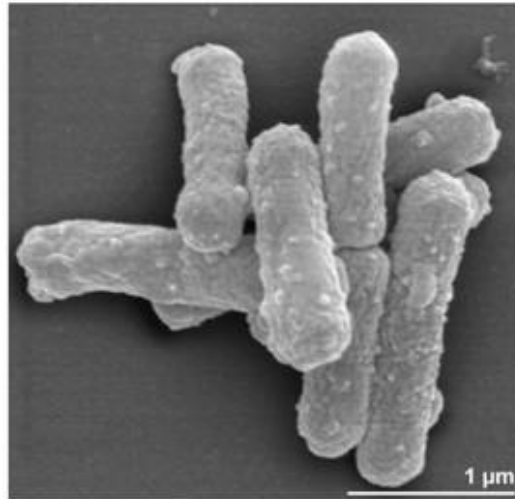


그림 3-70. *Hydrogenobacter thermophilus* TK-6

이렇게 선정된 *H. thermophilus* TK-6가 가지고 있는 reductive TCA cycle에 관여하는 유전자들을 모두 표2와 같이 정리 여기에는 실제 반응에 참여하는 단백질의 유전자 뿐만 아니라, small subunit, maturation 관련 유전자, 그리고 NA1이 가지고 있을 것이라 예측되는 유전자와, reductive TCA cycle 주위의 관련 metabolism까지 포함하였다. 또한, 이 유전자들 중 일부가 NA1 내에서 working하지 않을 경우를 고려하여 *T. onnurineus* NA1과 가까운 *Thermococcales* 목의 균주들 중에서 homology를 갖는 단백질을 함께 mining 하였다 (표 3-13).

나. Wood-Ljungdahl pathway(WLP)의 *T. onnurineus* NA1 도입

(1) Wood-Ljungdahl pathway(WLP) 관련 유전자 분석 및 클로닝

내열성의 WLP 유전자를 탐색하였으며, *Carboxydotherrmus hydrogenoformans* 및 *Moorella thermoacetica*로부터 WLP pathway 관련 유전자를 비교 분석하였다 (그림 3-71). *C. hydrogenoformans*로부터 WLP 대사관련 유전자원(약 25 kb)을 확보하고 1차로 carbonyl branch 관련 유전자들을 fosmid vector 클로닝을 완료하였다 (그림 3-72). 1차로 construct 된 재조합 플라스미드는 초고온 고세균 NA1에 도입을 시도 중에 있으며, 2차로 methyl branch 관련 유전자들을 기 완성된 플라스미드에 클로닝을 진행하였다.

표 3-13. *H. thermophilus* TK-6의 reductive TCA cycle 유전자 list

	Gene number	Annotation	Gene name	Length (kb)	Species	Thermococcales gene
OGOR =2-oxoglutarate synthase	HTH_1094	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase delta subunit	forD	0.7	x	
	HTH_1095	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	forA	1.2	<i>Thermococcus celericrescens</i>	WP_058939906
	HTH_1096	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase beta subunit	forB	0.9	<i>Thermococcus quaymasensis</i>	WP_062373833
	HTH_1097	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase gamma subunit	forG	0.7	<i>Thermococcus zilliqii</i>	WP_010479830
	HTH_1098	2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductase epsilon subunit	forE	0.2	<i>Thermococcus litoralis</i>	WP_004067925
	HTH_1099	hypothetical	forF	0.3	<i>Thermococcus peptonophilus</i>	WP_062390970
Fumarate reductase	HTH_1421	FAD-binding motif (Succinate dehydrogenase subunit A)	FrdA	1.7	<i>Pyrococcus furiosus</i>	WP_011013118
	HTH_0983	[2Fe-2S] cluster (Fumarate reductase subunit B)	FrdB	0.7	<i>Thermococcus sibiricus</i>	WP_015849053
	HTH_1908	[4Fe-4S] cluster (Fumarate reductase subunit C)	FrdC	1.6	x	
	HTH_1512	NAD-binding motif (Fumarate reductase subunit D)	FrdD	1.4	<i>Thermococcus celericrescens</i>	WP_058939317
	HTH_1863	Four [4Fe-4S] clusters (Fumarate reductase subunit E)	FrdE	0.6	<i>Thermococcus barophilus</i>	WP_013467428
ATP-citrate lyase	HTH_0201	Citryl-CoA synthetase small subunit	ccsB	1	<i>Thermococcus barophilus</i>	WP_056933995.1
	HTH_1892	Succinyl-CoA synthetase	sucD	0.9	<i>Thermococcus quaymasensis</i>	WP_062371816.1
Citryl-CoA lyase	HTH_0311	Citryl-CoA lyase	ccl	0.8	<i>Pyrococcus</i> sp. NA2	WP_013749074
Malate dehydrogenase	HTH_0756	malate dehydrogenase	mdh	1	<i>Thermococcus sibiricus</i>	TSIB_1633
Fumarate hydratase	HTH_0757	fumarate hydratase alpha subunit	fumA	0.85	<i>Thermococcus quaymasensis</i>	X802_05410
	HTH_0301	fumarate hydratase beta subunit	fumB	0.6	<i>Thermococcus celericrescens</i>	WP_058939797
Succinyl-CoA synthetase	HTH_1892	Succinyl-CoA synthetase (ADP-forming) alpha subunit	sucD	0.9	x	
	HTH_1893	Succinyl-CoA synthetase (ADP-forming) beta subunit	sucC	1.2	<i>Pyrococcus</i> sp. NA2	WP_013747817.1
Isocitrate dehydrogenase	HTH_0836	isocitrate dehydrogenase	icd	1.3	<i>Pyrococcus</i> sp. NA2	WP_013749073
2-oxoglutarate carboxylase	HTH_1392	2-oxoglutarate carboxylase large subunit	cfiA	2	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	WP_011249941
	HTH_1393	2-oxoglutarate carboxylase small subunit	cfiB	1.4	<i>Thermococcus sibiricus</i>	KUK17932
Aconitase	HTH_0755	Aconitate hydratase/aconitase	acnA	2	<i>Pyrococcus</i> sp. NA2	PNA2_1607
Citryl-coA synthetase	HTH_1737	citryl-CoA synthetase large subunit	ccsA	1.3	<i>Pyrococcus furiosus</i>	WP_014835431
	HTH_0201	citryl-CoA synthetase small subunit	ccsB	1	<i>Thermococcus barophilus</i>	WP_056933995
Pyruvate synthase	HTH_1551	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase gamma subunit	porG	0.7	<i>Thermococcus kodakarensis</i>	WP_011250928
	HTH_1552	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase beta subunit	porB	0.9	<i>Thermococcus barophilus</i>	WP_013467827
	HTH_1553	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase alpha subunit	porA	1.2	<i>Thermococcus barophilus</i>	WP_013467831
	HTH_1554	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase delta subunit	porD	0.6	x	
	HTH_1555	Pyruvate:ferredoxin oxidoreductase epsilon subunit	porE	0.2	<i>Pyrococcus</i> sp. NA2	WP_013748761
PEP synthetase	HTH_1644	Phosphoenolpyruvate synthase	ppsA	2.6	<i>Thermococcus</i> sp. AM4	WP_014121524
PEP carboxylase	HTH_1452	pyruvate carboxylase large subunit	pycA	1.9	<i>Thermococcus barophilus</i>	WP_056933241
	HTH_1598	pyruvate carboxylase small subunit	pycB	1.4	<i>Thermococcus celericrescens</i>	WP_058939252
			Total	35.75		

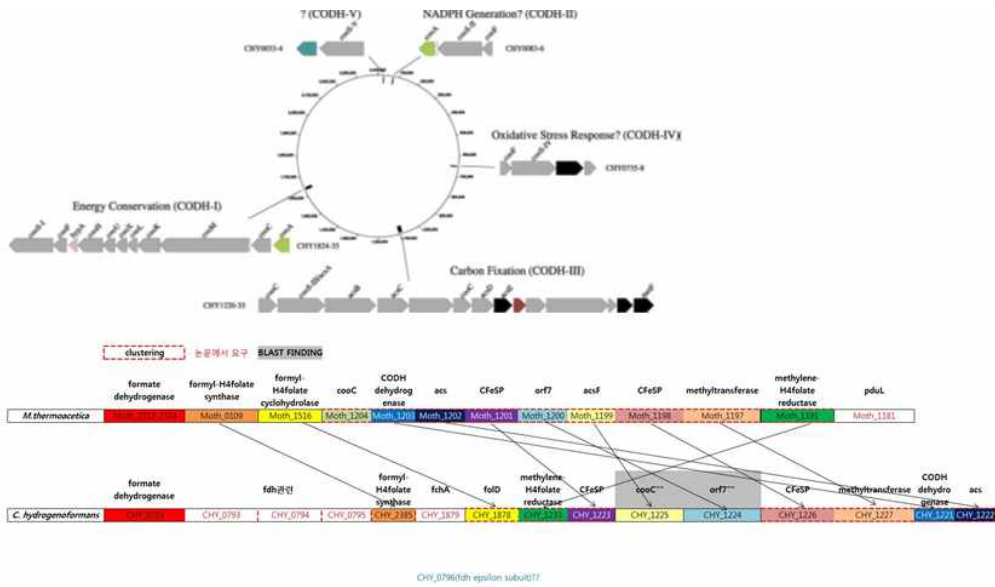


그림 3-71. *Carboxythermus hydrogenoformans* 및 *Moorella thermoacetica*로부터 WLP pathway 관련 유전자를 비교 분석

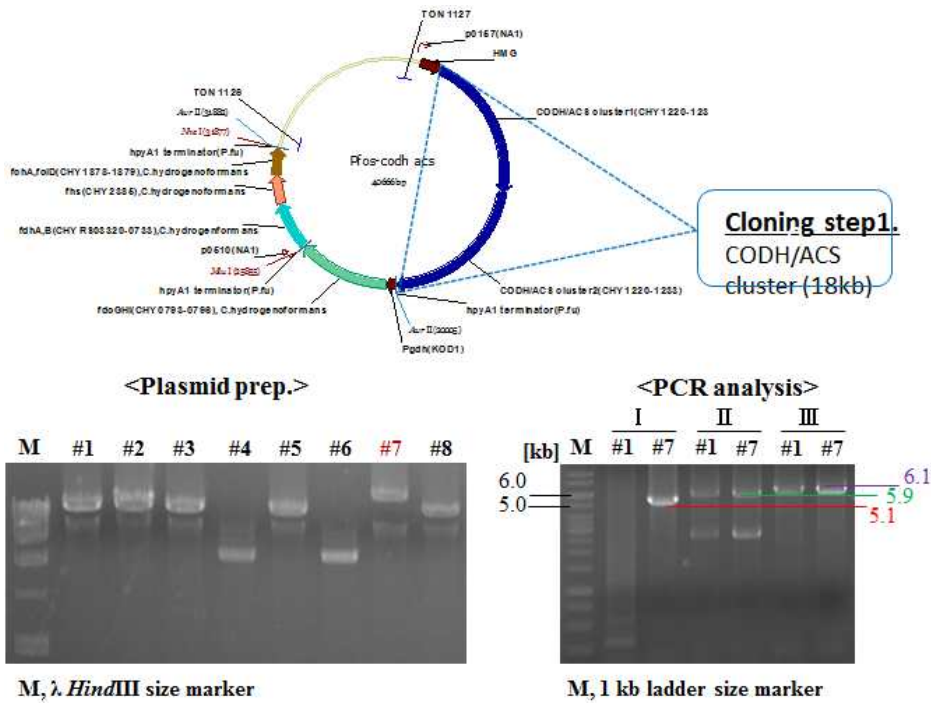


그림 3-72. WLP 유전자들을 포함하는 재조합 플라스미드 및 PCR 분석

1. C1가스 이용 유기산 전환균주의 생물반응기 배양조건 확립

가. CO 전환-개미산 생산 균주의 생물반응기 배양

(1) 1차 CO 가스 발효기 운전

CO전환-포름산생산 재조합 균주인 *T. onnurineus* BCF01를 CO 가스를 공급하는 조건에서 발효기 운전을 실시하였다. 초기 운전 조건은 다음과 같다: initial OD: 0.1, cell culture volume: 1.5L, CO sparging rate: 0.02. CO sparging rate을 0.02~0.08까지 증가시키며, 6시간 동안 가스발효기 상에서 균주 배양하였다. CO 가스발효 결과 개미산이 약 53 mM 농도까지 생산됨을 확인하였으며, 바이오수소의 생산도 확인하였다 (그림 3-73, 표 3-14). CO의 개미산 전환 균주를 최초로 CO 가스를 기질로 하여 발효 하여 개미산의 생산이 발효기 수준에서 가능함을 확인하였다.

1차 반응기 결과

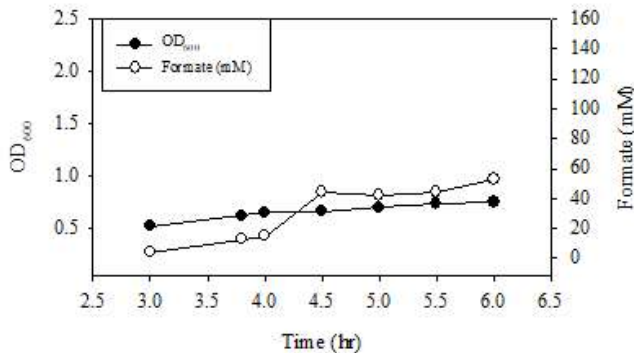


그림 3-73. *T. onnurineus* BCF01 균주의 1차 반응기 결과

표 3-14. CO전환 개미산 생산균주의 CO 가스발효

Time	pH	Agitation	CO rate	H ₂ (GC)	OD600	Formate (mM)	비고
0h	6.30	500	0.02	-			
1h	6.27	500	0.02	1.98			
1h 40m	6.15	500	0.02	5.16			
2h	6.07	500	0.02	7.35			2h 14m 에 rpm 600, CO rate 0.04로 변경, pH 조절시작. 2h 57m 에 CO rate 0.06 으로 변경
3h	6.08	600	0.06	21.73	0.518	3.99	foam 발생
3h 38m	6.08	600	0.06	-	0.62	12.87	
4h	6.08	600	0.06	-	0.65	14.95	4h 15m에 CO rate 0.08로 변경
4h 30m	6.08	600	0.08	-	0.662	44.19	
5h	6.08	600	0.08	-	0.694	42.02	5h 20m에 pH 변화 (pH 6.10→6.08) 시간이 6분대로 측정. pH 변화 X
5h 30m	6.08	600	0.08	-	0.732	44.16	5h 38m에 rpm 800, CO rate 0.12로 변경, 몇 분 후 전수치로 재변경
6h	6.08	600	0.08	-	0.748	52.8	Fermator 종료

(2) 2차 CO 가스 발효기 운전

CO전환-포름산생산 재조합 균주인 *T. onnurineus* BCF09 균주의 CO가스 발효기 2차 운전 실시하였다. 발효기 운전을 통한 개미산 생산의 최적 조건을 확립하기 위해 운전 중 CO sparging 속도를 달리하여 발효기에서 균주 배양 및 개미산 생산성 확인하였다. 초기 운전 조건은 다음과 같다; initial OD: 0.1, cell culture volume: 1.5L, CO sparging rate: 0.02. CO sparging rate을 0.02~0.08 까지 증가시키며, 9시간 동안 가스발효기 상에서 균주 배양하였다.

CO 가스발효 결과 세포 농도가 OD600 2.4 까지 성장하고, 개미산이 약 37 mM 농도까지 생산됨을 확인하였다 (그림 3-74, 표 3-15).

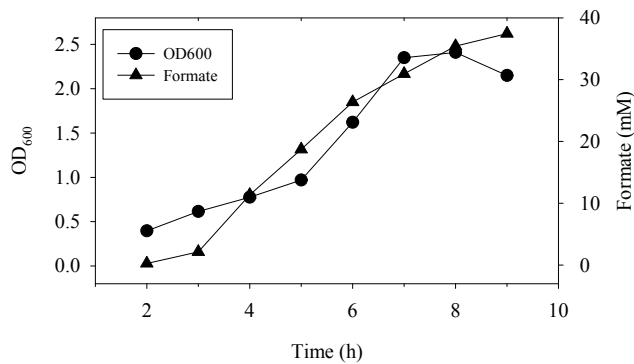


그림 3-74. *T. onnurineus* BCF09 균주의 CO 가스 발효기 2차 운전 실시 결과

표 3-15. CO전환 개미산 생산균주 *T. onnurineus* BCF09 균주의 2차 CO 가스발효

Time	pH	Agitation	CO rate	H ₂ (%)	OD600	Formate (mM)	비고
0h	6.40	500	0.02				
2h	6.30	500	0.02	11.38	0.396	0.27	2h30m, COrate0.02→0.04 2h45m, MaxpH6.30→6.15
3h	6.14	500	0.04	26.01	0.615	2.14	3h 06m, pH ontime 0.2s 설정
4h	6.14	500	0.04	29.40	0.776	11.36	4h23m, COrate0.04→0.06 4h31m, COrate0.06→0.04 4h38m, COrate0.04→0.06 4h42m, COrate0.06→0.04
5h	6.14	500	0.04	29.90	0.970	18.72	5h30m, Agitation500→600, COrate0.04→0.08→0.04 5h50m, Agitation600→700, COrate0.04→0.06
6h	6.14	500	0.06	33.05	1.620	26.37	6h09m, MaxpH6.15→6.5(6h31m, pH6.5도달) 6h13m, pHontime0.2s→0.5s 6h17m, pHontime0.5s→1.0s 6h32m, COrate0.06→0.08 6h34m, COrate0.08→0.06 6h39m, MaxpH6.5→7.0(7h55m, pH7.0도달)
7h	6.75	700	0.06	34.79	2.350	30.93	7h15m, pH6.8 7h55m, pH7.0
8h	6.98	700	0.06	35.07	2.410	35.44	8h23m, OD6002.34, Formate36.87mM 8h36m, COrate0.06→0.08, MaxpH7.0→6.5
9h	7.06	700	0.08	28.17	2.150	37.44	Fermentor 종료

(3) 3차 CO 가스 발효기 운전

CO전환-포름산생산 재조합 균주 *T. onnurineus* BCF12의 CO 가스 발효기 fermenter 운전 실시하였다. 발효기 운전을 통한 개미산 생산의 최적 조건을 확립하기 위해 운전중 CO sparging 속도를 달리하여 발효기에서 균주 배양 및 개미산 생산성 확인하였다. 초기 운전 조건은 다음과 같다; initial OD: 0.1, cell culture volume: 2L. CO sparging rate을 0.1~0.4까지 증가시키며, 9시간 동안 가스발효기 상에서 균주 배양하였다. CO 가스발효 결과 세포 농도가 OD600 1.3 까지 성장하고, 개미산이 약 67 mM 농도까지 생산됨을 확인하였다 (그림 3-75, 표 3-16).

표 3-16. CO전환 개미산 생산균주 *T. onnurineus* BCF12 균주의 CO 가스발효

배양시간 (hr)	pH	RPM	MFC	OD600	Alkali (ml)	Formate (mM)	H ₂	비고
0	6.22	500	0.10		0.0			
1	6.23	500	0.10		0.0		0.260	
1.5	6.23	500	0.10	0.049	0.0			
2	6.23	500	0.10	0.051	0.0		0.483	MFC 0.10→0.15
3	6.24	500	0.15	0.054	0.0		0.626	MFC 0.15→0.10
5	6.19	500	0.10	0.095	0.0	0.82	2.317	MFC 0.10→0.15
6	6.13	500	0.15	0.179	0.0	0.97	6.024	
7	6.10	500	0.15	0.374	19.4	5.41	15.217	MFC 0.15→0.20
7.5	6.10	500	0.20		42.4			MFC 0.20→0.25
7.67	6.08	500	0.25		52.6			MFC 0.25→0.30, Alkali 0.5s→1.0s
7.83	6.10	500	0.30		65.2			
8	6.10	500	0.30	0.628	75.0	24.63		RPM 500→600
8.17	6.10	600	0.30		91.6			
8.33	6.10	600	0.30		100.8			MFC 0.30→0.35
8.5	6.10	600	0.35		106.0			MFC 0.35→0.30
8.67	6.10	600	0.30		113.0			Alkali 1.0s→0.5s
8.83	6.09	600	0.30		121.8			
9	6.08	600	0.30	0.918	133.2	42.57		
9.17	6.08	600	0.30		144.8			Alkali 0.5s→1.0s
9.57	6.10	600	0.30		169.6			
9.67	6.09	600	0.30		175.4			
9.83	6.10	600	0.30		183.4			MFC 0.30→0.35
10	6.10	600	0.35	1.240	191.4	63.45		MFC 0.35→0.40
10.17	6.10	600	0.40		194.0			MFC 0.40→0.35
10.33	6.10	600	0.35		197.6			
10.5	6.10	600	0.35	1.300	204.6	67.47		

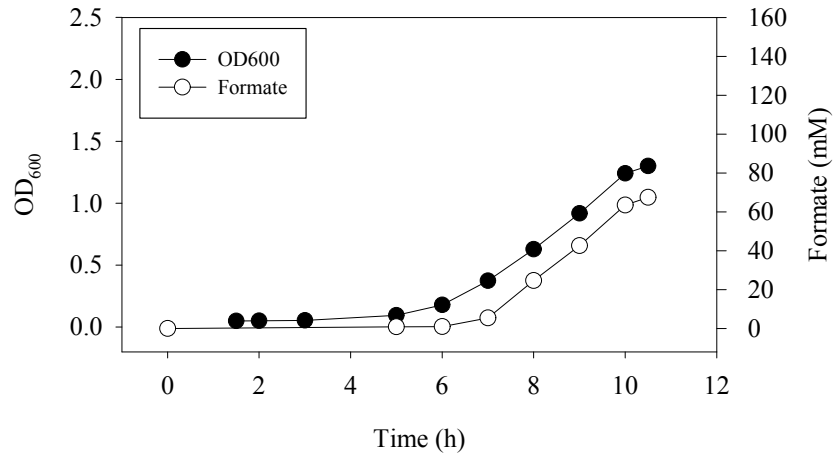


그림 3-75. *T. onnurineus* BCF12 균주의 CO 가스 발효기 운전 결과

(4) 4차 CO 가스 발효기 운전

CO전환-포름산생산 재조합 균주 *T. onnurineus* BCF12의 CO 가스 발효기 fermenter 운전 실시하였다. 발효기 운전을 통한 개미산 생산의 최적 조건을 확립하기 위해 운전 중 CO sparging 속도를 달리하여 발효기에서 균주 배양 및 개미산 생산성 확인하였다. 초기 운전 조건은 다음과 같다; initial OD: 0.06, cell culture volume: 1.5L. CO sparging rate을 0.03~0.08까지 증가시키며, 9시간 동안 가스발효기 상에서 균주 배양하였다. CO 가스발효 결과 세포 농도가 OD600 1.7 까지 성장하고, 개미산이 약 80 mM 농도까지 생산됨을 확인하였다 (그림 3-76, 표 3-17).

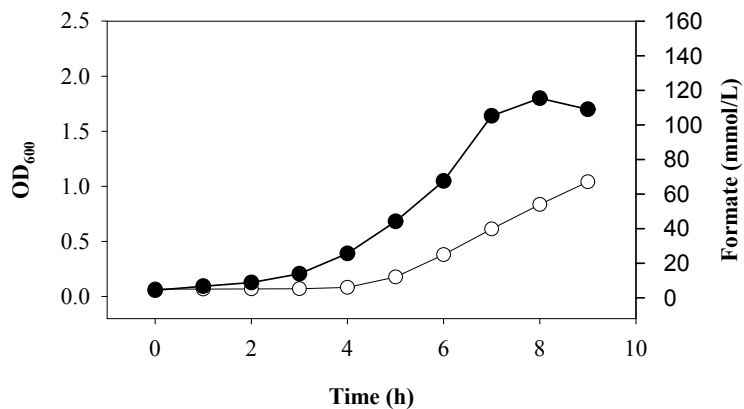


그림 3-76. *T. onnurineus* BCF12 균주의 CO 가스 발효기 운전 결과

표 3-17. CO전환 개미산 생산균주 *T. onnurineus* BCF12 균주의 CO 가스발효

Time	pH	RPM	MFC	압력	OD600	Formate	H ₂	CO	CO ₂	비고
0h	-	500	0.03	0.023	0.057	-	-	-	-	-
1h	-	500	0.03	상승	0.093	5.040	-	-	-	R P M 5 0 0 → 600, MFC 0.03 → 0.04
2h	6.15	600	0.04	0.908	0.127	5.100	3.259	84.153	1.985	R P M 6 0 0 → 700, MFC 0.04 → 0.05
10'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R P M 7 0 0 → 800, MFC 0.05 → 0.06
3h	6.15	700	0.05	0.920	0.206	5.226	4.921	90.589	3.979	
30'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R P M 7 0 0 → 800, MFC 0.05 → 0.06
50'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	R P M 8 0 0 → 900, MFC 0.06 → 0.08
4h	6.15	900	0.08	0.962	0.391	6.026	13.151	80.391	9.415	
50'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	MFC 0.08 → 0.10
5h	6.15	900	0.10	0.915	0.682	11.987	23.230	61.435	19.323	
6h	6.14	900	0.10	0.845	1.048	24.960	29.230	48.435	25.985	
7h	6.16	900	0.10	0.870	1.640	39.778	36.403	41.173	30.910	
8h	6.15	900	0.10	0.965	0.990	54.000				
20'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	압력 0.997 → 0.53으로 조정
30'	-	-	-	-	-	-	-	-	-	압력이 지속적으로 증가함에 따라 계속 조정
9h	6.15	900	0.10	상승	0.92 (1.7)	67.037	35.958	40.363	23.742	R P M 9 0 0 → 700, MFC 0.10 → 0.08
10h	6.15	700	0.08	상승	0.93 (1.4)	74.542				
50'	-	-	-	-	0.72 (1.27)	79.844	-	-	-	Fermentor 종료

(5) 5차 CO 가스 발효기 운전

CO전환-포름산생산 재조합 균주 *T. onnurineus* BCF12의 CO 가스 발효기 fermenter 운전 실시하였다. 발효기 운전을 통한 개미산 생산의 최적 조건을 확립하기 위해 운전 중 CO sparging 속도를 달리하여 발효기에서 균주 배양 및 개미산 생산성 확인하였다. 초기 운전 조건은 다음과 같다; initial OD: 0.2, cell culture volume: 1.5L. CO sparging rate을 0.03~0.12까지 증가시키며, 9시간 동안 가스발효기 상에서 균주 배양하였다. CO 가스발효 결과 세포 농도가 OD600 2.0 까지 성장하고, 개미산이 약 150 mM 농도까지 생산됨을 확인하였다. (그림 3-77, 표 3-18)

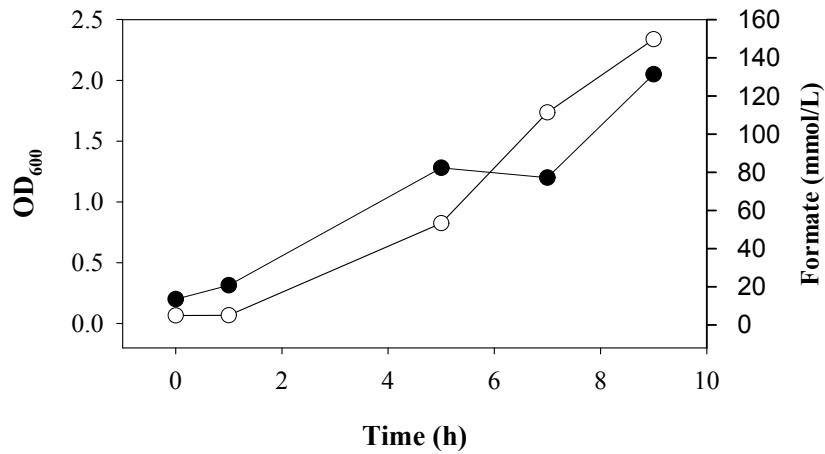


그림 3-77. *T. onnurineus* BCF12 균주의 CO 가스 발효기 운전 결과

표 3-18. CO전환 개미산 생산균주 *T. onnurineus* BCF12 균주의 CO 가스발효

Time (h)	pH	RPM	MFC	OD600	Gage pressure (bar)	Formate
0	6.50	500	0.03	0.200	0.016	4.93
0.5	6.39	600	0.03	-	-	-
1	6.32	600	0.03	0.315	0.820	5.03
1.2	-	800	0.04	-	0.856	-
5	6.10	900	0.08	1.280	0.976	53.32
7	6.10	900	0.12	1.200	0.956	111.29
9	6.10	900	0.12	2.050	-	149.71

2. 개미산활용 미생물 프로세스 개발 및 최적화

가. 남부발전 개미산이용 바이오수소 생산 소규모 회분배양 실험

(1) 개미산

하동발전으로부터 개미산, 개미산염 (K+) 각 1 L 전달받았다 (그림 3-78).



그림 3-78. 하동발전 개미산 (좌), 개미산염(우) 사진

전달된 시약내 포함된 개미산의 농도분석을 위해 LC분석 실시하였다. 분석결과 개미산은 22.89 M, 개미산염은 1.27 M 농도 결정되었다.

(2) 실험 방법

바이오수소 생산 균주 : KIOST 고세균 NA1 개미산최적 우수균주

배양 규모: 1리터 반응기 (그림 3-79)



그림 3-79. 하동발전 개미산이용 KIOST
회분배양 반응기 사진

배양 방법: batch culture (회분배양)

사용한 개미산 기질농도: 200mM 개미산 (8.8 g/L) 및 200mM 개미산염(16.5 g/L) 초기 공급

(3) 실험결과

개미산 함유 반응액에 고세균을 접종 한후에 개미산은 4시간, 개미산 염은 6시간 배양하였다 (그림 3-80). 배양기간 동안 표시된 시점에 샘플을 LC분석 (개미산), GC분석(가스분석), 세포성장 등을 측정하였다. 배양종료 후 초기 사용된 개미산의 90% 정도가 바이오수소로 전환된 것을 확인하였다 (표 3-19). 개미산 염의 경우 개미산의 경우 보다 lag time이 길어 약간 지연됨. 염에 포함된 성분의 효과로 판단되며, 전체적인 반응 속도 등은 큰 차이는 없었다. 특별한 분리단계를 적용하지 않고 생산된 수소의 최종 순도는 51% 정도로 검출되었으며, 나머지는 이산화탄소로 검출되었다.

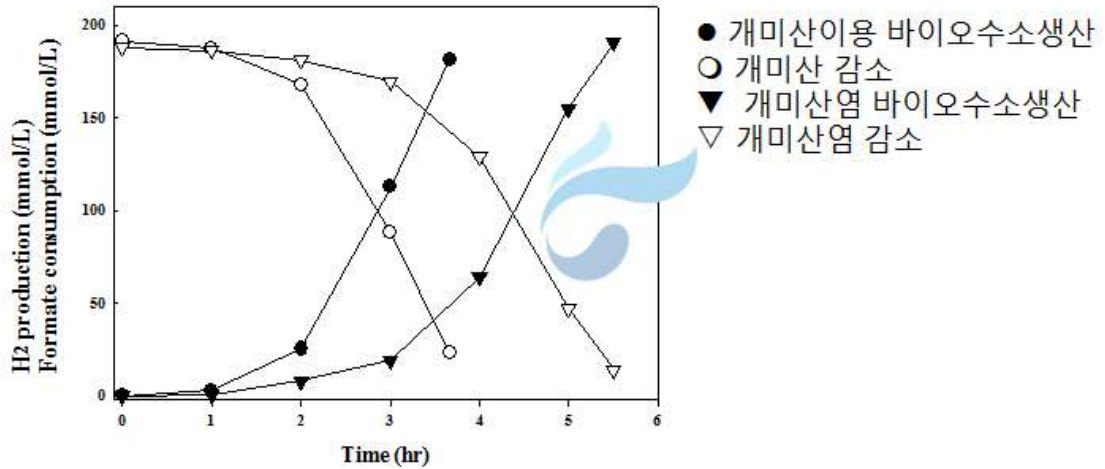


그림 3-80. 고세균 NA1에 의한 개미산이용 바이오수소 생산 회분배양 결과

표 3-19. 회분배양 결과의 바이오수소 생산 정량 분석

초기 개미산 (g/L)	개미산 잔량 (g/L)	수소생산량 (g/L)	개미산 전환효율 (%)	수소 순도
8.8	1.1	0.36	87.9	51%
16.5	1.2	0.38	92.6	50%

(4) 시사점

하동발전에서 제공한 개미산과 개미산염을 이용하여 1L 규모 회분배양 실험결과, 기존 KIOST에서 사용한 SIGMA에서 구입한 순도가 높은 개미산이나 90%정도 순도의 개미산나트륨(중국)의 실험결과에서 제시되었던 생산성, 전환효율과 유사한 결과를 확인하였다. 향후 연속생산 (continuous culture)와 scale up 실험시에도 기존 방법을 적용하여 기존 실험결과와 유사한 결과 산출이 가능할 것으로 예측되었다. KIOST 실험실에 비치된 300L배양기/PSA 실험도 현재의 조건을 적용하여 실험이 가능할 것으로 예측되었다. 경제성 측면에서 중국산 개미산 나트륨의 제공 원가와 비교해 경쟁력 있는 원료물질 공급이 가능하다면 고순도 수소제조 판매시에 경제성분석의 의미가 있을 것으로 판단된다.

제4장 연구개발목표 달성도 및 대외 기여도

제1절 연구개발 목표달성도

총연구기간내 연차별 목표 대비 달성율(%)					
구분	연차별 달성내용				연차별 계획대 비 연구실 적 달성율(B) (%)
	성과목표	연구내용	가중 치 (A)	달성실적	
1년차 (2017)	1.비광합성 해양·극한 미생물·유 전자원 확 보 및 분석	1-1.신규 해양미생물자원 확보 - 다양한 해양환경으로부터 조건별 농후 배양 -> 단일 균주 분리 - 비광합성 해양·극한 미생물 2종 분리	0.5	- 연안환경으로부터 17주 신규 미생물자원 확보 - 확보 균주 중 6균주의 CO, CO ₂ 대사능 비교 - <i>Moorella thermoacetica</i> 에 속 하는 1종 유전체해독 완료	100
		1-2.기존 표준 미생물주 확보 - 표준 균주를 포함하여 보고된 비광합성 해양·극한 미생물 2종 확보		- DSMZ로부터 초고온성 탄 소고정세균 2종을 분양받아 배양 중	
	2.해양·극한 미생물 탄 소대사 재 설계 및 성 능평가	2-1.C1가스 이용 해양·극한 미생물의 탄소대사 재설계 균주 개발 - C1가스 대사경로 분석 및 재설계 - 융합 단백질 도입 재조합 균주 제작	0.5	- CO로부터 HCOO ⁻ 전환 - 융합 단백질 도입 재조합 균주 1주 제작	100
		2-2.해조류 이용 해양·극한 미생물의 탄소대사 재설계 균주 개발 - 해조류=>알콜류 대사경로 분석 및 재설계 - 당화효소균 및 알콜대사 관련 유전자 도입 - 해조류(분말)의 강산 이용 전처리 확립		- 당화효소균 및 알콜대사 관 련 유전자 도입 재조합 균 주 3주 제작	
2-3.탄소고정확획득 해양·극한미생물 균주개발 - 탄소고정화 대사경로 탐색 및 선정	- rTCA 대사경로 선정 - WLP 대사경로 선정				
	계		1.0		100
2년차 (2018)	1.비광합성 해양·극한	1-1. 신규 해양미생물자원 확보 - 다양한 해양환경으로부터 비광합성 해	0.3	- 연안, 대양으로부터 신규미 생물 9종 24주 확보	95

총연구기간내 연차별 목표 대비 달성율(%)

구분	연차별 달성내용			연차별 계획대비 연구실 적달성율(B) (%)	
	성과목표	연구내용	가중 치 (A)		
미생물·유전자원 확보 및 분석		양·극한 미생물 분리 - 확보된 미생물 특성분석		- 확보 미생물과 기보유 미생물의 탄소고정능 분석 중	
		1-2. 기 보고 미생물 확보 - 보고된 비광합성 독립영양미생물 확보		- 초고온성 자가영양 표준균주 2종 확보	
		1-3. 유전체 해독		- 유전체 2건 정보 분석 및 <i>Moorella</i> 속 균주의 비교유전체 해석 완료	
2.해양·극한 미생물 탄소대사 재설계 및 성능평가		2-1.탄소 고정화 획득 해양·극한 미생물 균주 개발 - 탄소 고정화 대사경로 도입 재조합 NA1 제작	0.4	- rTCA 대사경로 클로닝 및 NA1 균주 도입 - WLP 대사경로 클로닝	90
		2-2.C1가스 이용 해양·극한 미생물의 탄소 대사 재설계 균주 개발 - C1가스 이용 유기산 전환 기작 규명 - 대사공학적 기법 이용 개량 균주 제작		- 합성 일산화탄소:포름산 산화·환원효소 분리 및 활성 확인 - CO⇒개미산 생산기작 규명 - 융합 단백질 도입 재조합 개량 균주 11주 추가 제작	
		2-3.유전자 조작틀 박스 구축 - 유전자 조작기술 확립		- acetogen에 활용 가능한 벡터 확보, 검증을 통하여 pCB102, pAMβ1, pIP404 등이 유용함을 확인	
3.해양·극한 미생물 생물반응기 배양기술		3-1.C1가스 이용 유기산 전환균주의 생물반응기 배양조건 확립 - CO 전환-개미산 생산 균주의 생물반응기 배양 - CO 전환-개미산 생산조건 확립	0.3	- CO⇒개미산 생산 균주의 3L 생물반응기 배양 성공 - 150 mmol/L의 개미산 생산성 달성	100
		3-2.개미산활용 미생물 프로세스 개발 및 최적화 - 개미산활용 수소생산능 검증		- 하동 발전으로부터 전달받은 개미산, 개미산염이 6시간 이내에 90% 수준으로 수소로 전환됨을 확인	
계			1.0		94.5

제2절 대외 기여도

1. 기술적 측면

가. 정량적 성과 내역

(1) 논문게재 성과

게재일	논문명	저자			학술지명	Vol. (No.)	국가명	SCI 구분
		주저자	교신저자	공동저자				
17.09.01	optimizing T4 DNA polymerase conditions enhances the efficiency of one-step sequence- and ligation-independent cloning	Islam MN	이정현, 정재연	이경원, 임형순, 이성혁, 정해창	Biotechniques	63, 125-130	영국	SCI
17.07.21	Adaptive evolution of a hyperthermophilic archaeon pinpoints a formate transporter as a critical factor for the growth enhancement on formate	정해창	이현숙, 강성균	이성혁, 이성목, 안영준, 이정현	Scientific Rep	7, 6124-6133	영국	SCI
17.06.30	<i>Oleigrimonas citrea</i> sp. nov., a marine bacterium isolated from tidal flat sediment and emended description of the genus <i>Oleigrimonas</i> Fang et al. 2015 and <i>Oleigrimonas soli</i>	양성현	권개경	서현석, 성치남	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.	67, 1672-1675	영국	SCI
17.06.01	Transcriptomic profiling and its application to H ₂ production of a non-methanogen deficient in the frhAGB-encoding hydrogenase	이성혁	강성균, 이현숙	김민식, 김윤재, 김태완	Appl Microbiol Biotechnol	101, 5081-5088	독일	SCI
17.05.01	Redox regulation of SurR by protein disulfide oxidoreductase in <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	임재규	강성균, 이현숙	정해창	Extremophiles	21, 491-498	독일	SCI
17.01.09	FGF11 induced by hypoxia interacts with HIF-1 α and enhances its stability	이경원	이정현, 정재연	임형순, 신지혜, 이철주	FEBS LETTERS	591, 348-357	영국	SCI
18.02.01	<i>Marinirhabdus citrea</i> sp. nov., a marine bacterium isolated from a seaweed	양성현	권개경	오지혜, 서현석, 이정현	Int. J. Syst. Evol. Microbiol.	68, 547-551	영국	SCI
18.03.31	Investigation of biodegradation pathway of Dibenzofuran by <i>Novosphingobium pentaromativorans</i> US6-1 via Transcriptomic and mass-spectrometry analysis	나혜윤	권개경		한국미생물학회지	54, 46-52	한국	-

18.01.01	Statistical Optimization of Medium for Formate-driven Bio-hydrogen Production by the Hyperthermophilic Archaeon, <i>Thermococcus onnurineus</i>	이성목	강성균	김태완, 이현숙, 이정현	Ocean and Polar Research	39, 269-277	한국	-
18.12.30	Draft sequence of a marine flavobacteria <i>Flagellimonas eckloniae</i> DOKDO 007T	권용민	권개경	Kumar PA, 김상진	한국미생물학회지	54, 460-462	한국	-
19.00.00	Oxygen-mediated growth enhancement of an obligate anaerobic archaeon <i>Thermococcus onnurineus</i> NA1	이성혁	강성균, 이현숙	윤환	J Microbiol	57, 00-00	한국	SCIE

(2) 특허성과

출원된 특허의 경우				
특허명	발명자	출원일	출원번호	출원국가
재순환 루프를 포함하는 회분식 또는 연속식 배양기 및 이를 이용한 배양 방법	이현숙, 이정현, 강성균, 이성목	2017.09.13	10-2017-0117458	대한민국
써모코코스 속 균주를 이용한 메탄으로부터 수소생산방법	이정현, 강성균, 이현숙, 권개경, 이성목	2017.09.13	10-2017-0117457	대한민국
2,3-부탄디올 생산 미생물 고속 스크리닝방법	이정현, 강성균, 이현숙, 임재규	2017.09.07	10-2017-0114811	대한민국
천일염을 이용한 고온성 고세균 배양용 배지 조성물	강성균, 이정현, 이현숙, 이성목	2018.06.18	10-2018-0069482	대한민국
전자전달 체인으로 작동하는 Fe-S 융합단백질 및 이의 용도	이정현, 임재규, 강성균, 임형순, 이종민	2018.11.12	10-2018-0138462	대한민국
Fe-S 융합단백질을 매개로 한 신규한 일산화탄소:포름산 산화·환원효소 및 이의 용도	이정현, 임재규, 이현숙, 강성균	2018.11.12	10-2018-0138467	대한민국
서모코코스 유래 신균주 BCF12 및 이를 이용한 포름산의 생산방법	이정현, 임재규, 이현숙, 강성균	2018.11.12	10-2018-0138475	대한민국
전자전달 체인으로 작동하는 Fe-S 융합단백질 및 이의 용도	이정현, 임재규, 이현숙, 강성균	2018.11.28	PCT/KR2018/014807	PCT

등록된 특허의 경우				
특허명	발명자	등록일	등록번호	등록국가
유기성 폐기물을 유기영양원으로 이용하는 수소 생산 기술(수소 생산용 배지 조성물 및 이를 이용한 수소생산 방법)	강성균, 이현숙, 김태완, 이정현	2018.03.07.	10-1837998	대한민국
미생물을 이용한 수소 대량 생산 방법, 및 수소 대량 생산용 미생물 발효기	강성균, 이정현, 김태완, 이현숙	2018.01.04.	10-1817073	대한민국
퓨린리보뉴클레오사이드모노포스페이트 또는 그 유도체의 베타 락타메이즈 저해제로서의 용도	차선신, 안영준, 김민규, 나정현, 이종석	2018.04.19.	10-1852260	대한민국

나. 정성적 기여

- 새로운 생명자원의 확보를 통하여 과학적 연구의 지평을 넓힘
- CO₂ 고정 경로의 균주내 도입 기술을 확립함으로써 대사경로 조절을 통한 비광합성 자가영양 미생물의 활용 기술을 축적함
- 단백질간의 전자전달 개념을 활용하여 자연에 없던 새로운 개념의 단백질을 설계하고 구현함으로써 전자전달효소들의 재조합을 통한 신규 기능 개발의 단초 제공
- 기존에 존재하지 않던 효소의 설계-제작을 통하여 CO로부터 개미산을 합성하는 균주를 제작할 수 있었으며 생물반응기에서의 생산성도 150 mmol/L에 달해 CO 저장기술 개발에 일조함
- 가스발효 기반의 생물반응기 구축 및 운영기술을 확보함으로써 다양한 가스발효시스템의 활용 및 기술 지원이 가능하여졌음
- 연구개발 과정 중 남태평양 회류지의 심해미생물 다양성 분석 등을 통해 해양미생물의 다양성 정보의 이해 범위를 넓힘
- 미생물 다양성 워크숍, 국제 심해미생물 워크숍 등의 개최를 통해 국내 연구자들간의 네트워크, 세계 유명 해양미생물학자들과의 연구교류 기회를 확대함
- 인력 양성
 - 연구기간 중 석사 3, 박사 1명의 인력 배출
 - 학부 재학 중인 페루 대학생 (Daniella Matuta)에게 2개월간의 인턴 기회를 제공하여 해양미생물학에로의 유전자 도입과 발현기술 교육시킴. 한국 해양과학기술의 국제적 위상 제고에 기여
 - 한양대 학부생 4인, 경성대 학부생 4인, 해양대 학부생 1인의 학기 중 (4인) 또는 방학 중 (5인) 현장실습 프로그램을 지원

2. 경제·사회적 측면

- 새로운 생명자원의 확보를 통하여 장기적으로 균주의 수입과 활용에 따른 기술료 등의 부담을 경감시킬 수 있음
- 현재까지 개발된 기술의 추가 개발을 통해 C1 gas를 활용한 산업 소재 생산이 실용화 될 경우 기업의 탄소세 저감, 산물 생산을 통한 부가가치 상승 등을 통해 투자 이상의 경제적 효과를 거둘 수 있을 것으로 기대됨
- 연구개발 과정을 통해 가스발효장비의 개선에 기여함으로써 장기적인 경제적 효과 유발

1. 향후 연구 방향

2017년 과제 시작 단계에서는 2 + 3년으로 계획되었었다. 그러나 기관 내부의 정책적 필요에 의해 1단계 2년 수행 후 본 과제는 종료하게 되었으며 2019년부터 시작 예정이던 2단계는 “해양바이오 기반 청정 기능성·산업소재 대량생산 기술” 과제로 연결되었다. 이에 후속 과제에서의 진행 계획과 과학기술적 필요성 측면에서 향후 연구 방향에 대해 간략히 정리하였다.

가. 비광합성 해양극한미생물의 지속적 확보 및 특성 이해

- 연구실에 축적된 비광합성 해양·극한미생물 분리·배양기술과 경험을 활용
- 국내 연근해 퇴적물, 생체시료 (어류 등의 장내), 심해 퇴적토, 열수분출공 등으로부터 자가영양미생물의 지속적인 확보 추진
- 확보된 미생물에 대해서는 유전체 해독, 배양 조건, 대사산물 분석 등을 실시함으로써 대사 및 배양 특성을 이해함

나. 해양극한미생물의 탄소대사 재설계 및 활용 기술

- Acetogen을 비롯한 혐기 발효미생물의 유전자 조작기술을 활용하여 유용성이 높은 미생물이 확보될 경우 필요한 유전자의 삽입, 제거 등에 활용
- 지속적으로 유전자 조작 기술, 특히 대규모 유전자 삽입/제거 기술을 지속적으로 구축
- 유전체 정보로부터 대사경로를 확인하고 원하는 산물의 생산을 중심으로 하여 대사경로를 전반적으로 재구성하기 위한 경로 설계, 예측 연구 추진
- 필요에 따라 적응진화 등의 방법론을 적용하여 균주 개량 추진. 그 결과로 변이가 생긴 유전자를 유전체 해독을 통해 확인하고 적용하기 위한 연구 수행

다. 해양극한미생물의 가스전환 대량배양기술

- 가스전환 기술의 고도화를 통해 고농도 배양기술 정착
- 미량성분, 보조기질, 가스 공급 속도, 교반 속도 등 제반 조건의 최적화를 통해 가스전환 기반 고농도 세포배양기술 정착

2. 성과 활용 계획

- 확보된 균주, 가스전환기술, 유전자 조작기술, 배양기 운영기술 등을 가스전환을 통한 유기산 생산기술 개발에 활용
- 기 확보된 미생물은 학술 연구, 응용기술 개발 등의 다양한 목적으로 직접 활용, 수요처에의 공급 등을 통해 다양한 활용 기술 개발에 연결될 수 있음
- 비광합성 해양·극한미생물 배양과 관련된 경험, 시설, 배양기술 등은 다양한 비광합성 해양·극한미생물 균주 확보와 관련된 사업에 활용가능하여 인도양 열수 탐사, 대양 탐사 등의 연구개발 과제 수행에 적극 활용
- 해양·극한미생물의 특성 분석과 관련하여 유전체 해독 및 비교유전체 분석, 배양 특성 이해, 대사산물 분석 등을 위한 다양한 장비와 기술 등을 확보하였으며 이는 새로운 미생물의 특성 이해와 활용기술 개발에 적용할 수 있음
- 선행과제 및 본과제를 통하여 대사과정의 소규모 변형을 위한 재설계, 유전자군의 숙주 세포로의 삽입 및 발현 기술 등을 개발하였으며 이는 향후 보다 큰 규모의 대사경로 재설계 및 유전체 편집 기술로 확대 적용하기 위한 기반이 되어줄 것임
- *Clostridium* 균주 배양을 통하여 고농도 배양에 필요한 다양한 미량원소의 농도, 보조기질의 농도 등의 최적화 연구를 수행하였으며 신규 미생물의 분리, 확보된 미생물의 배지 최적화 등에 축적된 경험과 기술을 적용할 수 있음
- 가스를 기질로 하여 고농도, 대규모로 해양·극한미생물을 배양하기 위해서는 발효장비 운영기술의 확보가 필수적임. 현재 수 백 ml 수준부터 톤단위 배양기가 구축되어있으며 이의 가스기질을 이용한 운영기술도 확보되었음. 구축된 장비와 운영기술, 인력 등은 가스전환 관련 기술개발 과제에 활용될 수 있음
- 온실가스 감축, 자원고갈에 따른 원재료의 공급 등을 위해 가스전환기술의 개발 및 활용은 인류의 생존을 위한 필수 기술이라고 생각되며 본 연구팀은 중장기적으로 자가영양미생물의 확보, 개량, 대량배양기술 개발, 유용 산물 생산 증대기술 개발 등을 통하여 온실가스 감축/재활용 (CCSU)을 통한 산업 원재료 생산기술 개발에 집중할 계획임

제6장 참고문헌

Farrelly D. J., Everard C. D., Fagan C. C., McDonnell K. P., 2013. Carbon sequestration and the role of biological carbon mitigation: a review *Renew. Sustain. Energy. Rev.*, 21:712-727

Olson D. G., McBride J. E., Shaw A. J., Lynd L. R., 2012. Recent progress in consolidated bioprocessing, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 23:396-405

Cheng J., Huang Y., Feng J., Sun J., Zhou J., Cen K., 2013. Mutate *Chlorella* sp. by nuclear irradiation to fix high concentrations of CO₂. *Bioresour. Technol.*, 136:496-501

Li F. F., Yang Z. H., Zeng R., Yang G., Chang X., Yan J. B., Hou Y. L., 2011. Microalgae capture of CO₂ from actual flue gas discharged from a combustion chamber. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 50:6496-6502

Chen C.-Y., Zhao X.-Q., Yen H.-W., Ho S.-H., Cheng C.-L., Lee D.-J., Bai F.-W., Chang J.-S., 2013. Microalgae-based carbohydrates for biofuel production. *Biochem. Eng. J.*, 78:1-10

Yu J., Dow A., Pingali S., 2013. The energy efficiency of carbon dioxide fixation by a hydrogen-oxidizing bacterium. *Int. J. Hydrogen Energy*, 38:8683-8690

Li J., Zheng X. Y., Fang X. J., Liu S. W., Chen K. Q., Jiang M., Wei P., Ouyang P. K., 2011. A complete industrial system for economical succinic acid production by *Actinobacillus succinogenes*. *Bioresour. Technol.*, 102:6147-6152

Müller J., MacEachran D., Burd H., Sathitsuksanoh N., Bi C., 2013. Engineering of *Ralstonia eutropha* H16 for autotrophic and heterotrophic production of methyl ketones. *Appl. Environ. Microbiol.*, 79:4433-4439

Li H., Opgenorth P. H., Wernick D. G., Rogers S., Wu T. Y., 2012. Integrated electromicrobial conversion of CO₂ to higher alcohols. *Science*, 335:1596

Hawkins A. S., McTernan P. M., Lian H., Kelly R. M., Adams M. W., 2013. Biological conversion of carbon dioxide and hydrogen into liquid fuels and industrial chemicals. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 24:376-384

Hu J. J., Wang L., Li Y. L., Fu X. H., Le Y. Q., Xu D. S., Lu B., Yu J. G., 2009. Breeding, optimization and community structure analysis of non-photosynthetic CO₂ assimilation microbial flora. *Huan. Jing. Ke. Xue.*, 30:2438-2444

Ampelli C., Perathoner S., Centi G., 2015. CO₂ utilization: an enabling element to move to a resource- and energy-efficient chemical and fuel production. *Philos. Trans. A. Math. Phys. Eng. Sci.*, 373:20140177

Hügler M., Sievert S. M., 2011. Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic Carbon Fixation in the Ocean. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 3:261-289

Bredwell M. D., Srivastava P., Worden R. M., 1999. Reactor design issues for synthesis-gas fermentations. *Biotechnol. Prog.*, 15:834-844

Fadavi A. and Chisti Y., 2005. Gas-liquid mass transfer in a novel forced circulation loop reactor. *Chem. Eng. J.*, 112:73-80

Fast A. G. and Papoutsakis E. T., 2012. Stoichiometric and energetic analyses of non-photosynthetic CO₂-fixation pathways to support synthetic biology strategies for production of fuels and chemicals. *Curr. Opin. Chem. Eng.*, 1:380-395

Garcia-Ochoa F. and Gomez E., 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: An overview. *Biotechnol. Adv.*, 27:153-176

Jong E. D., Higson A., Walsh P., Wellisch M., 2012. Bio-based chemicals: value added products from biorefineries. IEA Bioenergy Task 42 Biorefinery, 1-33

Lee P.-H., Ni S.-Q., Chang S.-Y., Sung S., Kim S.-H., 2012. Enhancement of carbon monoxide mass transfer using an innovative external hollow fiber membrane (HFM) diffuser for syngas fermentation: Experimental studies and model development. Chem. Eng. J., 184:268-277

Li H. and Liao J. C., 2013. Biological conversion of carbon dioxide to photosynthetic fuels and electrofuels. Energy & Environmental Science, 6:2892-2899

Li S.-Y., Srivastava R., Suib S. L., Parnas R. S., 2011. Performance of batch, fed-batch, and continuous A-B-E fermentation with pH-control. Bioresour. Technol., 102:4241-4250

Yasin M., Jeong Y., Park S., Jeong J., Lee E. Y., Lovitt R. W., Kim B. H., Lee J., Chang I. S., 2015. Microbial synthesis gas utilization and ways to resolve kinetic and mass-transfer limitations. Bioresour. Technol., 177:361-374

Mardanov A. V., Ravin N. V., Svetlitchnyi V. A., Beletsky A. V., Miroshnichenko M. L., Bonch-Osmolovskaya E. A., Skryabin K. G., 2009. Metabolic versatility and indigenous origin of the archaeon *Thermococcus sibiricus*, isolated from a siberian oil reservoir, as revealed by genome analysis. Appl. Environ. Microbiol., 75:4580-4588

Nguyen D. M. N., Lipscomb G. L., Schut G. J., Vaccaro B. J., Basen M., Kelly R. M., Adams M. W. W., 2016. Temperature-dependent acetoin production by *Pyrococcus furiosus* is catalyzed by a biosynthetic acetolactate synthase and its deletion improves ethanol production. Metab. Eng., 34:71-79

Ying X. and Ma K., 2011. Characterization of a zinc-containing alcohol dehydrogenase with stereoselectivity from the hyperthermophilic archaeon *Thermococcus guaymasensis*. J. Bacteriol., 193:3009-3019

- Fukuyama Y., Omae K., Yoneda Y., Yoshida T., Sako Y., 2018. Insight into Energy Conservation via Alternative Carbon Monoxide Metabolism in *Carboxydothemus pertinax* Revealed by Comparative Genome Analysis. *Appl. Environ. Microbiol.*, 84:e00458-18
- Islam M. A., Zengler K., Edwards E. A., Mahadevan R., Stephanopoulos G., 2015. Investigating *Moorella thermoacetica* metabolism with a genome-scale constraint-based metabolic model. *Integr. Biol.*, 7:869-882
- Poehlein A., Bengelsdorf F. R., Esser C., Schiel-Bengelsdorf B., Daniel R., Dürre P., 2015. Complete Genome Sequence of the Type Strain of the Acetogenic Bacterium *Moorella thermoacetica* DSM 521T. *Genome Announc.*, 3:e01159-15
- Agapakis C.M., Silver P. A., 2010. Modular electron transfer circuits for synthetic biology. *Bioeng. Bugs.* 1:413-418
- Atomi H., 2002. Microbial enzymes involved in carbon dioxide fixation. *J. Biosci. Bioeng.* 94:497-505
- Bakkes P. J., Biemann S., Bokel A., Eickholt M., Girhard M., Urlacher V. B., 2015. Design and improvement of artificial redox modules by molecular fusion of flavodoxin and flavodoxin reductase from *Escherichia coli*. *Sci. Rep.* 5:12158
- Berg I. A., 2011. Ecological aspects of the distribution of different autotrophic CO₂ fixation pathways. *Appl. Environ. Microbiol.* 77:1925-1936
- Cao P., Bülow H., Dumas B., Bernhardt R., 2000. Construction and characterization of a catalytic fusion protein system: P-450(11beta)-adrenodoxin reductase-adrenodoxin. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1476:253-264
- Datsenko K. A., Wanner B. L., 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:6640-5
- Hügler M. and Sievert S. M., 2011. Beyond the Calvin Cycle: Autotrophic Carbon Fixation

in the Ocean. *Ann. Rev. Mar. Sci.*, 3:261-289

Lacour T. and Ohkawa H., 1999. Engineering and biochemical characterization of the rat microsomal cytochrome P4501A1 fused to ferredoxin and ferredoxin-NADP⁺ reductase from plant chloroplasts. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1433:87-102

Nangle S. N., Sakimoto K. K., Silver P. A., Nocera D. G., 2017. Biological-inorganic hybrid systems as a generalized platform for chemical production. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 41:107-113

Nunoura T., Chikaraishi Y., Izaki R., Suwa T., Sato T., Harada T., Mori K., Kato Y., Miyazaki M., Shimamura S., Yanagawa K., Shuto A., Ohkouchi N., Fujita N., Takaki Y., Atomi H., Takai K., 2018. A primordial and reversible TCA cycle in a facultatively chemolithoautotrophic thermophile. *Science*, 359:559-563

Nunoura T., Oida H., Miyazaki M., Suzuki Y., 2008. *Thermosulfidibacter takaii* gen. nov., sp. nov., a thermophilic, hydrogen-oxidizing, sulfur-reducing chemolithoautotroph isolated from a deep-sea hydrothermal field in the Southern Okinawa Trough. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 58:659-665

Sibbesen O., De Voss J. J., Montellano P. R., 1996. Putidaredoxin reductase-putidaredoxin-cytochrome p450cam triple fusion protein. Construction of a self-sufficient *Escherichia coli* catalytic system. *J. Biol. Chem.*, 271:22462-9

Wittenberg G., Sheffler W., Darchi D., Baker D., Noy D., 2013. Accelerated electron transport from photosystem I to redox partners by covalently linked ferredoxin. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 15:19608

Woolerton T. W., Sheard S., Reisner E., Pierce E., Ragsdale S. W., Armstrong F.A., 2010. Efficient and Clean Photoreduction of CO₂ to CO by Enzyme-Modified TiO₂ Nanoparticles Using Visible Light. *J. Am. Chem. Soc.*, 132:2132-2133

Wuttke D. S., Bjerrum M. J., Winkler J. R., Gray H. B., 1992. Electron-Tunneling

Pathways in Cytochrome c. *Science*, 256:1007-1009

Yamamoto M., Ikeda T., Arai H., Ishii M., Igarashi Y., 2010. Carboxylation reaction catalyzed by 2-oxoglutarate:ferredoxin oxidoreductases from *Hydrogenobacter thermophilus*. *Extremophiles*, 14:79-85

Harvey B. G., Merriman W. W., Quintana R. L., 2016. Renewable gasoline, solvents, and fuel additives from 2,3-Butanediol. *ChemSusChem*, 9:1814-1819

Hawkins A. B., Lian H., Zeldes B. M., Loder A. J., Lipscomb G. L., Schut G. J., Keller M. W., Adams M. W. W., Kelly R. M., 2015. Bioprocessing analysis of *Pyrococcus furiosus* strains engineered for CO₂-based 3-hydroxypropionate production. *Biotechnol. Bioeng.*, 112:1533-1543

Ji X. J., Huang H., Ouyang P. K., 2011. Microbial 2,3-butanediol production: A state-of-the-art review. *Biotechnol. Adv.* 29:351-364

Lee H. S., Bae S. S., Kim M. S., Kwon K. K., Kang S. G., Lee J. H., 2011. Complete genome sequence of hyperthermophilic *Pyrococcus* sp. strain NA2, isolated from a deep-sea hydrothermal vent area. *J. Bacteriol.* 193:3666-3667

Lee S. H., Kim M.-S., Bae S. S., Choi A. R., Lee J. W., Kim T. W., Lee J.-H., Lee H. S., Kang S. G., 2013. Comparison of CO-dependent H₂ production with strong promoters in *Thermococcus onnurineus* NA1. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98:979-986

Schut G. J., Lipscomb G. L., Nguyen D. M. N., Kelly R. M., Adams M. W. W., 2016. Heterologous production of an energy-conserving carbon monoxide dehydrogenase complex in the hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *Front. Microbiol.* 7:1-9

Thorgersen M. P., Lipscomb G. L., Schut G. J., Kelly R. M., Adams M. W. W., 2014. Deletion of acetyl-CoA synthetases I and II increases production of 3-hydroxypropionate by the metabolically-engineered hyperthermophile *Pyrococcus furiosus*. *Metab. Eng.* 22:83-88

Aklujkar, M., C. Leang, P. M. Shrestha, M. Shrestha, and D. R. Lovley. "Transcriptomic Profiles of *Clostridium Ljungdahlii* During Lithotrophic Growth with Syngas or H₂ and Co₂ Compared to Organotrophic Growth with Fructose." [In eng]. *Sci Rep* 7, no. 1 (Oct 13 2017): 13135.

Diner, B. A., J. Fan, M. C. Scotcher, D. H. Wells, and G. M. Whited. "Synthesis of Heterologous Mevalonic Acid Pathway Enzymes in *Clostridium Ljungdahlii* for the Conversion of Fructose and of Syngas to Mevalonate and Isoprene." [In eng]. *Appl Environ Microbiol* (Oct 20 2017).

Kelly, W. J., G. Henderson, D. M. Pacheco, D. Li, K. Reilly, G. E. Naylor, P. H. Janssen, et al. "The Complete Genome Sequence of *Eubacterium Limosum* Sa11, a Metabolically Versatile Rumen Acetogen." [In English]. *Standards in Genomic Sciences* 11 (Mar 15 2016).

Liew, F., A. M. Henstra, M. Kpke, K. Winzer, S. D. Simpson, and N. P. Minton. "Metabolic Engineering of *Clostridium Autoethanogenum* for Selective Alcohol Production." [In eng]. *Metab Eng* 40 (Mar 2017): 104-14.

Liew, F., A. M. Henstra, K. Winzer, M. Kopke, S. D. Simpson, and N. P. Minton. "Insights into Co₂ Fixation Pathway of *Clostridium Autoethanogenum* by Targeted Mutagenesis." [In eng]. *MBio* 7, no. 3 (May 24 2016).

Marcellin, Esteban, James B. Behrendorff, Shilpa Nagaraju, Sashini DeTissera, Simon Segovia, Robin W. Palfreyman, James Daniell, et al. "Low Carbon Fuels and Commodity Chemicals from Waste Gases – Systematic Approach to Understand Energy Metabolism in a Model Acetogen." *Green Chemistry* 18, no. 10 (2016): 3020-28.

Martin, M. E., H. Richter, S. Saha, and L. T. Angenent. "Traits of Selected *Clostridium* Strains for Syngas Fermentation to Ethanol." *Biotechnol Bioeng* 113, no. 3 (Mar 2016): 531-9.

Molitor, B., K. Kirchner, A. W. Henrich, S. Schmitz, and M. A. Rosenbaum. "Expanding the Molecular Toolkit for the Homoacetogen *Clostridium Ljungdahlii*." [In eng]. *Sci Rep* 6 (Aug 16 2016): 31518.

Nagaraju, S., N. K. Davies, D. J. Walker, M. Kopke, and S. D. Simpson. "Genome Editing of *Clostridium Autoethanogenum* Using Crispr/Cas9." [In eng]. *Biotechnol Biofuels* 9 (2016): 219.

Richter, H., B. Molitor, H. Wei, W. Chen, L. Aristilde, and L. T. Angenent. "Ethanol Production in Syngas-Fermenting *Clostridium Ljungdahlii* Is Controlled by Thermodynamics Rather Than by Enzyme Expression." *Energy & Environmental Science* 9, no. 7 (2016): 2392-99.

Song, Y., J. Shin, Y. Jeong, S. Jin, J. K. Lee, D. R. Kim, S. C. Kim, S. Cho, and B. K. Cho. "Determination of the Genome and Primary Transcriptome of Syngas Fermenting *Eubacterium Limosum* Atcc 8486." [In English]. *Scientific Reports* 7 (Oct 20 2017).

Valgepea, K., R. de Souza Pinto Lemgruber, T. Abdalla, S. Binos, N. Takemori, A. Takemori, Y. Tanaka, et al. "H₂ Drives Metabolic Rearrangements in Gas-Fermenting *Clostridium Autoethanogenum*." *Biotechnol Biofuels* 11 (2018): 55.

Valgepea, K., R. de Souza Pinto Lemgruber, K. Meaghan, R. W. Palfreyman, T. Abdalla, B. D. Heijstra, J. B. Behrendorff, et al. "Maintenance of Atp Homeostasis Triggers Metabolic Shifts in Gas-Fermenting Acetogens." *Cell Syst* 4, no. 5 (May 24 2017): 505-15 e5.

주 의

1. 이 보고서는 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 한국해양과학기술원에서 수행한 주요사업의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안됩니다.