

보안과제[ ] 일반과제[ ○ ] (제출용)

2021M1A5A1075524
------------------

(4 세부) 2021M1A5A1075524

(총괄) NRF-2021M1A5A1065407 /

(위탁) NRF- 2022M1A5A1034723 / 2022M1A5A1034884

(1단계) (KOPRI) (BSPN21014 / PN22014)

## 해양극지기초원천기술개발사업 (Brain Research Program)

(총괄) 북극권 육상-대기 환경변화 예측 및 대응 기술개발  
(Circum-Arctic Environmental Changes: Monitoring, Assessment,  
Projection, and Adaptation Strategy Development)(CA-MAP)

(4세부) 환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해  
효소 개발  
(Development of microbial enzymes degrading recalcitrant materials  
from the Arctic Circle)

극지연구소

2023. 10.

한국해양과학기술원부설  
극지연구소

과학기술정보통신부



## 제 출 문

극지연구소장 귀하

이 보고서를 “북극권 육상-대기 환경변화 예측 및 대응 기술개발” (과기부 해양극지기초원천기술개발사업 총괄과제)의 4세부과제 “환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발” 단계보고서(연구기간: 2021.04.27.~2022.12.31)로 제출합니다.

2023년 10월 25일

주관연구기관명 : 한국해양과학기술원부설  
극지연구소

주관(총괄)연구책임자 : 이방용( '21.04~ '22.12)

세부과제-4 연구기관명 : 극지연구소

세부과제-4 연구책임자 : 김한우( '21.04~ '22.12)

연구원 : 김기태, 김덕규, 도학원, 신승철,  
이민주, 이준혁, 한세종  
(이상 극지연구소)

1위탁연구기관명 : 숙명여자대학교

위탁연구책임자 : 김두현( '21.04~ '21.12)

연구원 : 유완기

(이상 숙명여자대학교, 퇴직자 포함)

1위탁연구기관명 : 경북대학교

위탁연구책임자 : 김상우( '22.01~ '22.12)

(이상 경북대학교)

2위탁연구기관명 : 서울대학교

위탁연구책임자 : 김효진( '22.01~ '22.12)

(이상 서울대학교)

(이상 성명 가나다순)

(본 보고서는 정부(과학기술정보통신부/한국연구재단)로부터 지원받은 해양·극지기초원천기술개발사업의 일환으로 수행한 연구활동의 1단계(2021.04.27.~2022.12.31.) 보고서로서, 연구개발과제 수행에 참여한 1세부과제와 위탁과제의 연구내용을 담고 있다 (근거 : “한국연구재단 지원사업 관련 법규집” 제12조5항, vol.2021.01.01).

다만, 국가연구개발 혁신법에서 제시한 단계보고서의 양식으로 정부에 기제출한 보고서와는 달리 한국해양과학기술원부설 극지연구소의 연구결과보고서의 제출 양식에 맞추어 부분 수정된 것임을 밝혀 둔다. 아울러 개인정보보호법 등에 저촉될 수 있는 개인 인적사항 및 연락처 등은 표시하지 않았다.



## 단계보고서 (협약용, 세부과제용)

							양식A101-2
① 부처사업명(대)	거대과학연구개발사업			④ 보안등급(보안, 일반)	일반		
② 사업명(중)	해양극지기초원천기술개발사업			⑤ 과제성격(기초, 응용, 개발)	기초		
③ 세부사업명(소)	해양극지기초원천기술개발사업						
⑥ 총괄과제명	북극권 육상-대기 환경변화 예측 및 대응 기술개발						
⑦ 세부과제명	국 문	한북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발					
	영 문	Development of microbial enzymes degrading recalcitrant materials from the Arctic Circle					
⑧ 주관연구기관명	한국해양과학기술원 부설 극지연구소			⑨ 사업자 등록번호	134-82-06870		
⑩ 위탁과제기관명	경북대학교, 서울대학교						
⑪ 주관연구책임자	성 명	김한우		국가연구자번호			
	전 공	단백질 공학		직급(직위)			
	소속부서	저온신소재연구단		전자우편			
	전 화			휴대전화			
⑫ 연구개발비 현황(단위: 천원)							
년 도	정부 출연금 (A)	기업체부담금			정부외출연금 (B)	합계 G=(A+B+E)	상대국 부담금 (F)
		현금 (C)	현물 (D)	소계 E=(C+D)			
1차년도	380,000					380,000	
2차년도	500,000					500,000	
3차년도							
4차년도							
5차년도							
합계	880,000					880,000	
⑬ 총연구기간	2021. 04. 27 - 2024. 12. 31 (45개월)						
⑭ 다년도연구기간	2023. 01. 01 - 2024. 12. 31 (24개월)						
⑮ 당해연도연구기간	2023. 01. 01 - 2023. 12. 31 (12개월)						
⑯ 참여기업 수	중소기업		중견기업		대기업	계	
⑰ 국제공동연구	국가명		상대국 연구기관수		상대국 연구개발비		상대국연구책임자수
⑱ 실무담당자	성 명	임민호	휴대전화			전자우편	
<p>관련 법령 및 규정과 모든 지시 사항을 준수하면서 이 국가연구개발사업을 성실히 수행하고자 아래와 같이 연구개발계획서(연구개발제안서)를 제출합니다. 아울러 이 연구개발계획서(연구개발제안서)에 기재된 내용이 사실임을 확인하며, 만약 사실이 아닌 경우 선정 취소, 협약 해약 등의 불이익도 감수하겠습니다.</p> <p style="text-align: center;">주관연구책임자 : 김한우 (직인생략) 주관연구기관장 : 강성호 (직인생략)</p> <p style="text-align: center;"><b>과 학 기 술 정 보 통 신 부 장 관 귀 하</b></p>							

○ 공동연구개발기관 등 현황 (해당 시 작성)

공동연구개발기관 등 (해당 시 작성)	기관명	책임자	직위	휴대전화	전자우편	비고	
						역할	기관유형
공동연구개발기관							
위탁연구개발기관	경북대	김상우	연구교수			난분해 유기물 질 분 해 활 성 검 증 (2차년 도부터 참여)	대학교
	서울대	김효진	부교수			극지미 생물 기반 난분해 성 물 질 분 해 유 전자 교정 연구 플랫폼 의 개 발 (2차년 도부터 참여)	대학교
연구개발기관 외 기관							

## 〈 요약 문 〉

양식A201

연구개발 목표 (500자 내외)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 환북극권 미생물로부터 생물정화와 바이오 화학산업에 활용성이 우수한 난분해 유기 물질을 분해하는 새로운 효소를 발굴</li> <li>○ 발굴된 효소와 기능성 단백질의 분자구조 기반의 활성기작 규명</li> </ul>			
연구개발 내용 (1000자 내외)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 환북극권 유래의 환경미생물 유전체 확보와 기능성 탐색을 위한 유전체 라이브러리 제작</li> <li>○ 환경미생물 유전체로부터 저온성 효소 단백질 발굴</li> <li>○ 효소 활성기반 대량 탐색을 통한 난분해 유기 물질인 리그닌, 오일류, 미세플라스틱을 가수분해할 수 있는 효소 확보</li> <li>○ 재조합 효소 단백질의 생산 및 정제 조건 확보</li> <li>○ 고기능성 가수분해 효소의 생화학적 특성 및 반응 생산물 분석</li> <li>○ 난분해 유기 물질 가수분해 효소의 단백질 삼차 구조 분석을 통한 분자 구조 수준에서 활성기작 이해</li> <li>○ 효소 단백질의 단백질 개량 기술 등을 적용하여 산업적 활용성 확대</li> </ul>			
활용계획 및 기대효과 (500자 내외) (응용분야 및 활용범위 포함)	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 환북극권 미생물 자원을 활용함으로써 고부가가치의 미래 미생물자원을 발굴하고 데이터베이스 구축을 통한 미래 생명산업의 기반인 극지 고유의 생물자원을 확충</li> <li>○ 발굴된 효소의 생축매기작 분석결과를 이용하여 바이오 의약, 화학, 에너지, 환경정화기술 등의 다양한 산업군에서 활용성을 확대</li> <li>○ 극지 미생물 유전체 자원의 라이브러리 확보와 기능성 탐색을 통하여 새로운 생리활성 물질 탐색 활용</li> </ul>			
국문핵심어 (8개)	환북극권	난분해 유기 물질	효소	생물정화
	미세플라스틱	동토층	단백질	미생물
영문핵심어 (8개)	Arctic Circle	recalcitrant material	enzyme	bioremediation
	microplastic	permafrost	protein	microorganism

### ○ 단계별 연구개발 목표와 내용

연구개발 목표 및 내용	1단계	목표	환북극권 동토 유래 난분해 유기 물질 분해 효소 발굴
		내용	난분해 유기 물질 분해 효소 확보 및 생물리화학적 특성 분석
	2단계	목표	효소와 기능성 단백질의 활성기작 규명
		내용	발굴된 효소의 단백질 구조분석 기술을 통한 활성기작 이해

○ 단계별 연구비

(단위:천원)

단계	년 도	정부출연금 (A)	기업체부담금			정부외출연금 (B)	합계 G=(A+B+E)	상대국 부담금 (F)
			현금 (C)	현물 (D)	소계 E=(C+D)			
1단계	1차년도	380,000					380,000	
	2차년도	500,000					500,000	
	3차년도							
	4차년도							
	5차년도							
	합계		880,000					880,000
2단계	1차년도	500,000					500,000	
	2차년도	500,000					500,000	
	3차년도							
	4차년도							
	5차년도							
	합계		1,000,000					1,000,000

극지연구소

〈 연구 분야 〉

양식A103

코드구분	중심분야		관련분야1		관련분야2		관련분야3		관련분야4	
	코드	비중	코드	비중	코드	비중	코드	비중	코드	비중
국가과학기술표준분류	ND1104	40 %	LA0601	20 %	LA0606	20 %	LA0804	20 %		%
국가과학기술표준분류 (적용분야)	Y05	100 %		%		%		%		%
과학기술분야분류	G20905	70 %	G21101	30 %		%		%		%
6T 기술분류	020314	70 %	020114	30 %		%		%		%
NTRM 분류	B020216	60 %	B030316	40 %		%		%		%
원천기술개발분야	0412	100 %		%		%		%		%

〈 보안 등급의 분류 및 결정사유 〉

양식A102

보안 등급 분류 (선택)	보안	일반
	N	Y
결정 사유	연구책임자 의견	연구기관 자체 검토결과
	보안과제 해당없음	보안과제 해당없음



## 〈 목 차 〉

제 1 장. 연구개발과제의 개요 (총괄) .....	1
제 2 장. 연구개발과제의 목표 및 수행 내용 (세부-위탁과제 포함) .....	13
1. 연구개발과제의 목표 .....	15
2. 평가항목별 성과 .....	17
제 3 장. 연구개발과제의 수행 결과 목표 달성 정도(세부-위탁과제 포함) .....	23
1. 추진내용 및 연구개발결과 .....	25
2. 대표적 연구성과 및 목표 달성 정도 .....	47
제 4 장. 연구개발성과 및 관련 분야에 대한 기여 정도 .....	57
제 5 장. 연구개발 결과 활용 방안 및 계획 .....	61
1. 연구개발 결과의 활용 방안 .....	63
2. 연구개발 결과의 기대효과 .....	64



제 1 장  
연구개발과제의 개요 (총괄)





## ■ (극지의 중요성과 국가 기여도)

### ■ 중요성 (민간 투자가 어려운 국가차원에서의 고유 영역)

[극지는 '기후변화의 바로미터'로서 지구 온난화에 의한 미래 기후환경 변화 영향과 원인에 대한 해답을 찾을 수 있는 최적의 연구 공간]

- ※ 극지연구는 영역적 특성상 접근이 매우 어려워 시작단계에 있으며, 우주개발과 함께 미래 산업에 매우 중요한 정보를 제공할 수 있는 대상임
- ※ 극지는 지구온난화에 민감하게 반응하는 기후시스템으로 구성되어, 과거와 현재 진행 중인 기후변화영향에 대한 연구에 최적화된 "Super Site"로 알려짐(지구 환경 변화 감지와 예측의 최적지인 극지에서 현재 진행되고 있는 기후변화는 우리나라를 비롯한 전지구 기후에 직접적인 영향을 미침)
- ※ 특히, 북극의 급격한 기후환경변화에 따라 실생활 영향이 확대(한파, 폭서 및 슈퍼태풍 등)되고 있어, 과학연구 자료획득 및 지속적인 환경 모니터링을 위한 현장 조사가 매우 중요한 요인임
- ※ 국내의 극지에 대한 기술수준은 선진국대비 약 70% 수준(인프라, 연구비 규모, 연구인력 등 종합 평균, 약 7.2년 격차보임)이므로, 격차 해소와 국제적 과학기술 역량 제고 필요
- ※ 과학기술적, 정치·사회적 중요성
  - 기후변화, 이상기상 현상 등의 글로벌 이슈 해결위한 환경변화 관측 및 DB 축적과 분석 필요
    - 급변하는 극지 기후환경변화에 대한 정밀한 관측과 자체 분석 및 미래 대응 필수
  - 국제 극지과학 거버넌스 내 영향력 확보 및 국가 위상강화 필요
    - 지속적 과학활동과 세계 수준의 연구 성과 창출 및 국제적 의무 수행 필요
  - 북극 현안 대응능력 제고, 국제사회 기여 및 극지과학 역량 강화를 위한 지속적 극지 연구활동 수행
    - 선진국으로서의 대외 국가위상 및 국민 삶의 질 향상과 자긍심 제고

### ■ 기여도 (글로벌 이슈 대응 국가경쟁력 확보)

- 극지 유·무형의 자원과 정보 선점으로 대한민국의 전략적 영향력 확대에 기여
  - 미래 국익 창출 강화를 위해 극지 탐사와 연구를 통한 유·무형 자원 정보 선점 필요
- 글로벌 이슈 해결 동참을 통한 국제사회에서의 '책임완수형 신뢰가능한 파트너'로서의 위상 확보에 기여
  - 대한민국을 넘어선 세계 속 선진국가로서의 글로벌 이슈 해결 동참 역량 강화에 기여
- 극지 환경변화 연구를 통한 국가와 국민의 안정성 확보에 기여
  - 한반도 이상기상(슈퍼폭염, 한파, 가뭄, 홍수 등) 예측 역량 강화로 국가 발전과 국민의 안전 및 삶의 질적 향상 보호와 국민 자긍심 제고

- (국내외 환경/거버넌스 변화) 근래 들어 북극에서의 급속한 기후환경변화 (해빙(海氷) 감소, 동토층 해동(解凍), 생태계 변화 등)가 북극권 자체는 물론 대한민국을 비롯한 지구상 곳곳에도 커다란 영향을 미치고 있음. 이러

- 한 심각한 현상 파악과 대응 문제는 국제사회의 커다란 이슈로 대두되었고, 지속적 모니터링, 정보 공유 확대 및 긴밀한 국제공조체제 강화가 요청되고 있음.

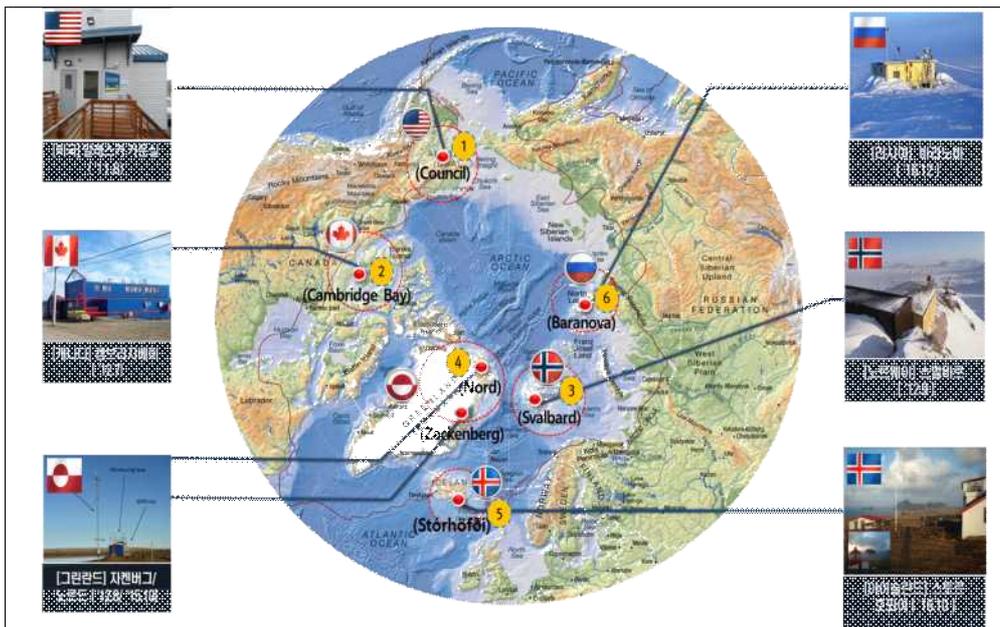
**(주요이슈)**

- 극지환경변화의 물리적 현상과 요인의 급속한 변화 진행
- ※ 극지는 기후시스템(기권/지권/수권/빙권/생물권)을 모두 갖춘 소지구적 영역으로서, 인간 활동의 증가와 더불어 지구온난화에 따른 변화가 가장 극심하고, 전 지구에 미치는 파급효과가 가중되고 있으나, 아직 현장 모니터링과 과학적 자료 및 연구 미흡
- ※ IPCC(기후변화에 관한 정부간 협의체) 6차 보고서( '21.08)와 해양과 빙권 특별보고서(' 19)에서 1.5℃ 기온상승이 기존의 2030~2052년에서 약 10년이 빨라진 2021~2040년에 돌파될 것으로 예측하고 있으며, 특히 영구동토층의 급격한 해동(解凍)과 가파른 온도 상승(0.3℃/10년)으로 대규모 온실가스 방출에 의한 지구온난화의 가속화 경고
- 급격한 동토층의 해동에 의한 생태계의 환경변화가 가속화되면서 전 지구적 규모의 치명적 파급효과 초래
- ※ 북극의 급격한 기후환경변화에 따른 특이현상(슈퍼폭염 및 태풍, 한파, 산불, 홍수, 가뭄 등) 빈도와 강도 증폭으로 지구 생태계와 인간 삶에 악영향 확대
- 선진 각국에서 외교, 환경, 과학, 영유권 분쟁 등 민감한 문제에 선제적 대응을 위한 북극정책 기능 강화
- ※ 북극이사회 국가 및 오피서버 국가들의 자국 이익을 위한 북극정책 수립 및 발표
- 급격한 북극 기후변화 글로벌 이슈 대응을 위한 국제적인 공조체제 강조
- ※ 광범위한 북극지역에서의 급속한 기후변화 조사/분석/평가 등을 위한 국제적 협력 강조

- **(목적)** 이에, 본 과제에서는, 북극권에서의 급변한 환경변화의 중요성 등을 인식하고, 동토지역에서의 육상-대기-연안 영역을 대상으로 기후환경변화에 대한 관찰/관측 및 환경인자 확보와 DB 구축, 각 인자에 대한 분석을 통해 과거부터 현재까지의 변화양상을 파악하고, 나아가 관측자료/위성자료 및 모델링의 기법을 사용하여 미래를 예측하는데 목적이 있음. 또한 북극이사회 오피서버국가로서의 의무 과학활동 수행 및 이를 통한 국가위상 제고 및 오피서버 국가의 자격 유지 등 정치·사회·외교적 업무를 수행함과 동시에 정밀한 과학정보 자료를 우리나라 정책수립에 제공하는데 있음.

■ **(과제 개요)**

- 『극지기초원천기술개발사업』은 수행 주체인 극지연구소를 중심으로, 과기부의 인적·물적 지원과 외교부의 국제외교적 지원을 받아, 북극이사회 국가들과의 연구 협정을 체결하고, 환북극 동토지역에 6개 관측거점 확보와 정밀측정시스템 구축, 환경인자 빅데이터 DB 확보와 특성 분석 및 미래 대응 연구 수행(북극 동토 연구의 table setter 및 pioneer 역할 담당).
- \* 미국, 캐나다, 스발바르, 덴마크(그린란드), 아이슬란드, 러시아 등 6개 북극이사회 국가 동토층에 설치한 연구 사이트 및 정밀측정시스템 등 종합 패키지
- \* 대기-동토(지표/지중)-생태계 등의 종합적 연구대상을 특성화하여 북극권 환경변화에 따른 물질이동 중점 연구 수행)



※ 사업 수행 지원근거

◇ 법적근거

- 제4차 국가과학기술기본계획( '17.12)
  - 미래도전 과학기술 역량 확충/혁신활성화 과학기술생태계 조성/과학기술 행복한 사회 구현 등
- 제2차 북극활동진흥기본계획( '18.07)
  - 북극 거버넌스 확대/북극 현안대응 주도/정책 추진역량 강화 등

◇ 기획근거

- '극한지 기초원천 연구개발 전략 수립연구' ( '17.11, 한국연구재단)
- '글로벌 이슈대응 극지연구개발사업 기획 연구' ( '19.11, 과기부/해수부)

○ 국내·외 정책 및 거버넌스와의 부합성

▶ 국내 정부정책 동향과의 부합성(의무적 지원근거)		▶ 국제 거버넌스와의 연계성			
<p>세력들이 대진할 시효의 최양적 이해를 실현하기 위한 과학기술 기반의 국가 시효 혁신</p> <table border="1"> <tr> <td> <b>과학기술정책</b>                      국가 시효 혁신을 위한 정책인식도 강화                      국가과학기술위원회                      2018.12.15. 1차 회의                      2019.1.15. 2차 회의                      2019.2.15. 3차 회의                 </td> <td> <b>과학기술혁신</b>                      혁신의 국가적 중요성을 높이는 차질없는 추진                      국가과학기술위원회                      2018.12.15. 1차 회의                      2019.1.15. 2차 회의                      2019.2.15. 3차 회의                 </td> <td> <b>과학기술혁신</b>                      혁신의 국가적 중요성을 높이는 차질없는 추진                      국가과학기술위원회                      2018.12.15. 1차 회의                      2019.1.15. 2차 회의                      2019.2.15. 3차 회의                 </td> </tr> </table>	<b>과학기술정책</b> 국가 시효 혁신을 위한 정책인식도 강화 국가과학기술위원회 2018.12.15. 1차 회의 2019.1.15. 2차 회의 2019.2.15. 3차 회의	<b>과학기술혁신</b> 혁신의 국가적 중요성을 높이는 차질없는 추진 국가과학기술위원회 2018.12.15. 1차 회의 2019.1.15. 2차 회의 2019.2.15. 3차 회의	<b>과학기술혁신</b> 혁신의 국가적 중요성을 높이는 차질없는 추진 국가과학기술위원회 2018.12.15. 1차 회의 2019.1.15. 2차 회의 2019.2.15. 3차 회의	<p>과학기술 제5차 과학기술기본계획 (23-27) 공청회 개최 (22.11.07) - 과학기술기본계획(7조) (연내 확정 예정)</p>	<p>❖ 북극기후변화업데이트 2021 (AMAP 보고서) - Arctic Climate Change Update 2021: Key Trends and Impacts</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 지속적 급격히 변화하고 있는 북극변화의 물리적 동인 (drivers)</li> <li>- 북극 극한 현상의 빈도와 강도 증가</li> <li>- 북극 기후변화가 지역 사회에 큰 영향</li> <li>- 북극 생태계의 급격한 변화</li> <li>- 북극의 변화는 전 지구적인 결과 초래</li> <li>- 북극 온난화에 대한 최신 기후 모델 가동</li> </ul>
<b>과학기술정책</b> 국가 시효 혁신을 위한 정책인식도 강화 국가과학기술위원회 2018.12.15. 1차 회의 2019.1.15. 2차 회의 2019.2.15. 3차 회의	<b>과학기술혁신</b> 혁신의 국가적 중요성을 높이는 차질없는 추진 국가과학기술위원회 2018.12.15. 1차 회의 2019.1.15. 2차 회의 2019.2.15. 3차 회의	<b>과학기술혁신</b> 혁신의 국가적 중요성을 높이는 차질없는 추진 국가과학기술위원회 2018.12.15. 1차 회의 2019.1.15. 2차 회의 2019.2.15. 3차 회의			
<p>❖ <b>극지활동진흥법</b> '21.04.13 제정 / 10.14 시행':</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 목적: 극지활동을 육성·지원하여 극지의 지속가능한 발전과 인류 공동문제 해결을 선도하고, 국가경제 발전 및 국민의 재고에 이바지</li> <li>- 진흥: 연구개발, 전문인력 양성, 경제활동 진흥, 기반시설 설치 운영, 정보시스템 구축 등 극지활동 활성화 추진</li> </ul> <p>❖ <b>"2050 북극활동 전략" 발표</b> ('21.11.30 국무회의 의결):</p> <table border="1"> <tr> <td>비전</td> <td>2050 북극 거버넌스 선도국가 도약</td> </tr> <tr> <td>주요 전략</td> <td> <input type="checkbox"/> 북극권 현안 해결 기여    <input type="checkbox"/> 북극 외교 지원 확대  <input type="checkbox"/> 지속가능한 북극 발전 동향    <input type="checkbox"/> 북극 활동 기반 마련                 </td> </tr> </table>	비전	2050 북극 거버넌스 선도국가 도약	주요 전략	<input type="checkbox"/> 북극권 현안 해결 기여 <input type="checkbox"/> 북극 외교 지원 확대 <input type="checkbox"/> 지속가능한 북극 발전 동향 <input type="checkbox"/> 북극 활동 기반 마련	<p>❖ IPCC AR6(21.8): 현재 기후상태/가능한 미래 기후/리스크 평가와 기후정보/미래 기후변화 억제</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- 현재 기후상태 판단 (빠르고 광역적 정확하게...)</li> <li>- 가능한 미래 기후 예측 (근미래(~2040) 1.5°C 온난화 도달)</li> <li>- 리스크 평가와 지역 적응위한 기후정보 (기후영향인자 (Climatic Impact Drivers: CID)(한정연자) 파악과 전망)</li> <li>- 미래 기후변화 억제 (온실기체 등 감축 필요)</li> </ul> <p>※ 6차 보고서에서는 CID 각각의 역할 반영함</p>
비전	2050 북극 거버넌스 선도국가 도약				
주요 전략	<input type="checkbox"/> 북극권 현안 해결 기여 <input type="checkbox"/> 북극 외교 지원 확대 <input type="checkbox"/> 지속가능한 북극 발전 동향 <input type="checkbox"/> 북극 활동 기반 마련				
<p>❖ [사업 기획 및 수행 근거]</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>✓ '극한지 기초원천 연구개발 전략 수립연구' [2017.11. 한국연구재단 수행]</li> <li>✓ '글로벌 이슈대응 극지연구개발사업 기획 연구' [2019.11. 과기부/해수부 공동 수행]</li> </ul>					

○ 과제의 독창성/혁신성/타당성

**국가연구개발사업으로서의 글로벌 이슈 대응을 위한 과학기술적 연구개발과 우수 성과 창출 및 북극이사회 옵서버국가라는 지위에 부합되는 국가위상 제고 연구 수행**

❖ [핵심 연구계획]

- **[독창성]** 세계 최초로 한북극 동토 지역내 동시 6개 관측 거점 확보와 동시 운영, 환경인자 DB 구축 및 leading-edge 연구 수행
- **[혁신성]** 국내 유일무이한 북극권에서의 기관-지권-생물권-빙권 대상 환경변화에 대한 종합 모니터링 수행과 기술개발, 환경변화 특성 규명 등 국내외적 문제해결형 혁신적 과제
- **[목표의 명확성]** 지구온난화에 따른 동토지역 육상-대기 환경변화, 동토층내 미생물 활동 변화와 생태계 파급효과 등 규명, 환경인자 간 상호 정확한 현상해석 및 부존 유용생물자원의 활용방안 연구, 과학·공학 융복합으로 생태계-인간 공존 미래 환경변화 예측과 대응방안 마련 등 명확한 목표 설정

❖ 현장조사 → 데이터 수집(DB 구성) → 특성 분석 → 현상규명 (알고리즘/시나리오 제시) → 사업의 완성도 제고, 국가위상 제고

■ **환경인자(Environmental Factor) (기후영향인자 Climatic Impact-Drivers; CID):** 북극권에서의 급속한 환경변화에 따른 대기-생태-동토의 상태 측정을 위한 필수 요소

❖ **환경인자 확보의 필요성:** 북극권 환경변화 인지 → 정보 수집(환경인자)과 처리 → 환경변화 진단과 특성분석 → 변화의 양/음 되먹임(feedback) 결과 도출과정에서의 기본적이고 필수적임

- 6 -

○ 과제의 추진 체계 구성(2022년 기준)



※ 2단계(1차년도)부터 세부과제-2와 세부과제-5에 각각 대학 위탁연구 1개씩 추가함

○ 세부과제별(위탁과제 포함) 특성과 연계성



〈북극 공간활용을 통한 연구 주제별 역할(본 과제에서 북극공간활용이라는 대전제로 개발한 핵심 연구주제들의 역할)〉



■ 프로세스 종합 개요(과제 구성 및 각 세부과제 수행의 적절성):

북극권에서의 동태-대기-생태-연관 등 영역 대상으로 과거-현재-미래의 시간적 변화까지 4차원적 연구와 생물자원 활용 및 영향 평가라는 체계하에,

- 세부과제1에서 대기환경 종합적 변화 관측 및 분석(대기질, 기후역력, 개년, 자료생산, OPA)이 가능, 선진통신, 개년, 자료전송(원격, 빅데이터 전송) 기술 적용 등 연구 수행
- 세부과제2에서 생태변화 및 미생물 거동-지표에 영향/생태계 등 지표 환경변화 측정 및 특성 분석(생물/생태 개년) 등 연구 수행
- 세부과제3에서 과거 기후환경 변화 (고기후역력, 개년) 복원 및 인위적 기후 환경변화 추적 및 분석 등 연구 수행
- 세부과제4에서 정부 R&D에서 산업화에 기여할 수 있도록, 세부과제 2-3 등 KPDC 자부 활용: 유용 생물자원의 발굴 및 활용기술 개발(생물공학 개년) 등 연구 수행
- 세부과제5에서 세부과제1-3 등 KPDC 북극 권역자료와 모델/위성을 활용한 자료 저장/분석/연상 진단과 미래 예측(추진) 관련 방안 제시 개년

등 연구를 수행하여 상호 연계성과 시너지 효과를 얻을 수 있도록 구성하였음

〈본 과제의 종합 추진 개념 및 세부주제별 연계성(연구 수행 방법)〉

○ 종합 로드맵 ( '21.04~' 24.12)

주제	전기 (45개월)				최종 목표 달성
	2021년 (1단계 1차년)	2022년 (1단계 2차년)	2023년 (2단계 3차년)	2024년 (2단계 4차년)	
1. 북극 동태-대기환경 관련 종합 모니터링 및 상호작용 규명	북극권 육상-대기 기후환경 관련 고도화 및 환경영향 정보 활용성 제고	북극권 육상-대기 기후환경 관련 고도화 및 환경영향 정보 활용성 제고	북극권 육상-대기 기후환경 관련 고도화 및 환경영향 정보 활용성 제고	북극권 육상-대기 기후환경 관련 고도화 및 환경영향 정보 활용성 제고	북극권 육상-대기 기후환경 관련 고도화 및 환경영향 정보 활용성 제고
2. 북극 동태-생태계 변화 관련 연구	북극 동태-생태계 변화 관련 연구				
3. 북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발	북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발	북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발	북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발	북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발	북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발
4. 북극권 동태-생태계 변화 관련 연구	북극권 동태-생태계 변화 관련 연구				
5. 북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발	북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발	북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발	북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발	북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발	북극권 육상-대기 상호작용 규명 및 온실 기체 플럭스 교환 알고리즘 개발

■ 5개 세부과제로 구성: 1단계(21개월) + 2단계(24개월)로 수행/시너지 효과 → 최종목표 달성

본 과제에서는 총괄적으로 북극이사회 8개 국가 중 북극해 연안 6개 국가(미국, 캐나다, 그린란드(덴마크), 노르웨이(스발바르), 아이슬란드, 러시아 등)내 동토 지역에 관측 거점을 확보하고 정상적으로 가동하며, 동토층에서의 대기-생태-식생 등 환경물리학적 특성과 북극권 온실기체 변동 요인인 동토층 유기탄소 및 미생물의 특성을 이해하는 것을 목적으로 하고 있다. 또한 각 관측 거점에서의 동토층에서의 온난화 기체 특성 관측 및 분석, 전자통신학적 자료 전송 시스템 구축과 적용 등 연구를 수행하였다. 이에 대한 수행 내용과 결과 등에 대해서, 앞에 제시한 전체 로드맵에 의거하여, 각 세부과제별(위탁과제 포함)로 각각 기술하되, 본 보고서에서는 4세부과제만 기술하였다.

한편, 본 과제의 특성상 접근하기 어렵고 북극권 국가들만의 주권행사 지역에서의 환경변화 연구 수행이라는 특수성을 최대한 감안하기 위하여, 과학적/정책적/국제적 접근 방향을 설정하고 충분한 사전종합분석-국제협력 추진-거점확보 및 시스템 구축-확보된 거점에서의 지속적인 모니터링-양질의 자료 확보와 모델링을 통한 예측 등의 연구 흐름성을 유지 발전시키면서 계획된 연구의 성공적 달성을 위해 주력하였다.

## 나. 과제 구성

본 과제의 총괄은 2단계 1차년도( '21.04~ '21.12)와 2차년도( '22.01~ '22.12)의 기간 동안 대기분야, 생태분야, 환경분야, 지질/지구물리분야, ICT 공학분야, 미생물분야, 수치모델링분야 등 다학제적으로 구성되어 있으며, 4세부과제에서는 북극권 동토층의 대기-동토-지질-공학적인 현상을 입체적으로 연구하는 전략으로 이루어져 있다. 본 과제에서의 참여연구원은 우리나라와 국외의 해당분야 전문가 그룹과의 연계로 상승효과를 도모하고자 추진하였다.

### ◆ 주요 내용(총괄)

- 북극권 6개 관측 거점에서의 토양미생물특성, 이산화탄소 플럭스, 토양물리특성, 메탄 플럭스, 블랙카본 농도, 토양코어, 에어로졸, 기상, 식생(생태)지수, 냉각가스, 토양미생물 유전체 등 환경인자 확보 : 자료의 QC/QA를 통한 안정적 DB 등재 완료-대외 활용도 확산
- 북극권에서 기후환경변화가 동토 생태계에 미치는 영향과 생태계의 반응 파악
- 유용 효소관련 연구분야 및 산업의 성장 가속화: 생산균주 탐색, 유전자 해석기술, 단백질 공학방법에 의한 효소 개량기술, 효소 고정화, 보존, 안정화 기술, 제재화 기술 등
- 기후변화(지구 온난화)에 의한 미생물의 분해대사활성은 증가할 것이며, 더불어 부식질의 분해률과 분해산물 역시 증가하리라 예상됨에 따라, 영구동토층 해동에 따른 탄소 방출량 변화가 주변 생태계에 미치는 영향을 예측하고자 하는 연구 진행
- 북극 지역에서의 이러한 대기 역학 및 대기 물리 과정과 육상의 생지화학 과정의 상호작용을 보다 잘 수치 모사할 수 있는 모형 개발
- 다양한 대기 환경 모델링 기술 중에서 중요한 육상생태계 모델링, 대기경계층 모델링, 가변격자 모델링 기술에 대한 관측 자료 기반의 검증을 수행하고 전 지구시스템 모델의 북극 기후 모델링 특성 파악

◆ **목표의 도전성과 혁신성(총괄)**

- 세계 최초로 북극이사회 국가(미국, 캐나다, 노르웨이, 덴마크(그린란드), 러시아, 아이슬란드 등)와의 양자, 다자협력 체결을 통한 6개 관측 거점 확보 및 정밀측정시스템 개발·운영
  - ※ 현재까지 1개 국가가 북극권 국가내에 다각적인 환경변화 관측 거점을 확보하고 국제공동 연구를 수행하는 국가는 우리나라 이외에 전무함
- 가혹한 북극 기후환경에서의 내한성 입체형 무인정밀측단시스템 설치와 ICT 융복합 자료획득 및 전송시스템 개발(대기-토양-생물/생태계 등 종합적 환경변화 특성 관찰)
  - 북극지역에서의 내한성 종합적, 입체적 관찰 시스템은 본 과제에서 수행하는 것이 독보적이며 혁신적인 것으로 국제사회에서 인정받고 있음(“CAPEC”은 본 과제가 국제사회에서 인정받아 명명된 북극연구 프로그램 명칭임)
- 기존 연구와의 차별적 수월성을 획득할 수 있는 최신의 분석기술을 활용하는 도전적 목표 설정
  - 최신 분석 기술(열분해-기체크로마토그래피-질량분석기 다각적 활용)을 이용하여 대용량의 유기물 특성 데이터 분석
  - 유기물의 특성과 식생 및 다양한 토양 환경인자와의 상관관계가 규명을 목표로 설정
- 동토층 연구에 유용한 자료 획득 및 분석을 통한 연구 성과 도출을 목표로 설정
  - 기후변화에 취약한 고위도 북극 유기물의 특성을 분석한 자료와 결과 매우 희소
  - 접근성 및 기술적 한계로 인해 그간 연구 수행이 어려웠던 북극권 영구동토층에서 코어 시료 확보 및 물리화학/생물학적 특성 규명

◆ **달성 과정의 적절성(총괄)**

- (북극이사회 국가와의 국제협력 수행) 관측 거점의 성공적인 확보를 위해 긴밀한 국제협력 (MoU, LoA 등 6개 국가와의 협정 체결) 체제 구축
  - 북극은 남극과 달리, 북극해를 둘러싼 북극권 국가의 영유권이 주장되고 있어, 원활한 연구수행을 위해서는 과학적·외교적 국제협력이 필수적임
- (국제협력 강화) 국제북극연구활동(AMAP, ICARP III)에서 제시한 연구 주제 설정(참고 자료 별첨) 및 세계기상기구 GAW(Global Atmosphere Watch) 프로그램 중심으로 국제공동연구 수행
  - 공동연구 기관 : 미국 알래스카페어뱅크스대학/국제북극연구센터(UAF/IARC), 노르웨이 극지연구소(NPI), 캐나다 극지지식청(POLAR Canada), 그린란드(덴마크) Aarhus 대학, 아이슬란드 대학교(UoI), 러시아 북극남극연구소(AARI) ▶ 국제공동연구 수행을 통해 본 과제의 역량 강화 및 국제적인 선도 연구프로그램으로 육성
- (거점 확보 및 안정화) 환북극권 동토 지역 내에 환경변화 관측 거점 확보 및 안정적

자료 생산과 전송 체제 구축

- 미국 알래스카 놉 소재 UAF-NWC 한-미 북극공동연구실 기반(2015.7.29. 개소) Council 툰드라 동토지역에서의 에너지플럭스/토양/생태변화/ICT 기반 전송 등 연구 기반 확장
  - 한-노르웨이 제플린관측소 동토대기 구름응결핵 연속관측 DB 기반 구축
  - 각 관측 거점에서의 원활한 자료 수집 및 획득을 위한 GPS/USN기반/cyber-infrastructure 기술 개발과 현장 적용
  - 메탄/이산화탄소 플럭스, 에어로졸, 북극대기 황성분 (DMS), 블랙카본 등 자료생산 및 DB 구축
- (외부 환경 변화 극복) 북극권 국가의 연구 동향이나 정책 변화 반영에 따른 공동연구의 방향성 조정
- 북극권 이사회 국가(미국, 캐나다, 노르웨이, 그린란드(덴마크), 러시아, 아이슬란드 등)들의 북극권 환경변화에 대한 연구 동향과 정책 분석, 본 과제 수행진행 방향에 접목
- (기타 연구과정상 타 기관 모범사례) 정부 정책(북극연구의 활성화 등 ‘북극활동진흥 기본계획’, 국가과학기술기본계획 등)에 대한 자발적, 선제적 업무 수행
- 국제협력의 다변화 또는 양자협력을 통해 정부 정책의 자발적, 효과적 이행
- (북극권 환경변화에 대한 의무적 역할과 책임 이행)
- 북극이사회 옵서버 국가(‘13.5)로서의 정부 정책(‘북극정책 기본계획’ 등)에 대한 자발적, 선제적 업무 수행
  - 극한지 동토 지역에서의 글로벌 이슈 관련 과학적 관심사항에 대한 leading-edge 연구 및 이를 통한 우리나라와 지구적 과급효과 진단과 환경변화 등과 관련된 국제사회에서의 역할 이행
  - 비북극권 국가로서, 환경변화가 극심한 북극권 동토지역 내에서 진행되는 온난화 과정과 생태계 변화 등에 대한 인자를 확보함으로써, 북극권 환경변화에 대한 대응전략 수립 기초자료로 활용함은 물론 우리나라 국가 위상 강화에 기여함



제 2 장  
연구개발과제의 목표 및 수행 내용  
(4세부과제-위탁과제 포함)





# 1. 연구개발과제의 목표

## □ 연구개발 목표

<b>최종목표</b>	환북극권 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발
<b>세부목표</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 환북극권 동토 유래 미생물 유전체로부터 난분해 유기 분해 효소 발굴</li> <li>2. 분해 효소 단백질의 생촉매 활성 특성 분석</li> <li>3. 효소 단백질의 구조와 기능 간의 관계 규명</li> </ol>
<b>연차별목표</b>	<ol style="list-style-type: none"> <li>1. 1단계             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 1차년도 (1단계 1차년도): 환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구</li> <li>○ 2차년도 (1단계 2차년도): 난분해 유기 물질 분해 활성 효소의 유전자 확보와 특성 연구</li> </ul> </li> <li>2. 1단계 최종 성과목표             <ul style="list-style-type: none"> <li>○ 효소와 기능성 단백질 5종 이상 확보</li> <li>○ SCI(E)급 논문 2편 이상 출판</li> <li>○ 특허출원 2건 이상.</li> </ul> </li> </ol>

## 연구개발과제의 추진체계

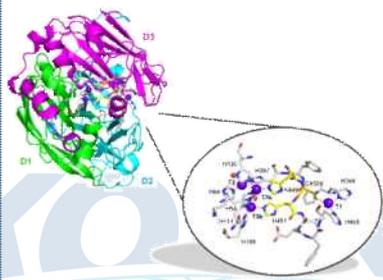
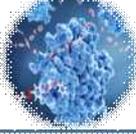
### 환북극권 동토 유래 환경 미생물로부터 난분해성 물질 분해 효소 개발



위탁과제1 (경북대): 미세플라스틱 분해를 위한 극지미생물 유래 저온성 플라스틱 분해효소 발굴

위탁과제2 (서울대): 유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발

## 유용 생물자원(연구 내용)

연구의 필요성	연구 내용	연구 활용성
 <p>환북극권 동토극한 환경</p>	<p>- 난분해 유기 물질 : 유류, 리그닌, 미세 플라스틱, 항생제, 방향족 화합물 ...</p> <p>- 분해 효소 발굴 : lipase, laccase, PETase, lactam hydrogenase, deoxygenase ...</p> 	<p style="color: red;"><b>연구개발 효소의 활용분야</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• 생물정화 시스템 활용</li> <li>• 바이오 연료</li> <li>• 화장품 산업</li> <li>• 바이오 센서</li> <li>• 식품 산업</li> <li>• 펄프 산업</li> <li>• 유기 합성 물질 생산</li> <li>• 의약품 생산 및 개발</li> </ul> 
 <p>미생물 다양성 극한 미생물</p>		
 <p>생명자원 다양성 유전자 유용성</p>		
 <p>신규 효소 단백질 산업적 활용성</p>		

## 세부과제-4 : 유용 생물자원(연차별 정량성과 창출)

평가항목	가중치 (%)	관련 세부목표	연차	연차별 목표 (조건/환경)
<p><b>[정량성과]</b></p> <p>환북극권 미생물 생명자원으로부터 난분해 물질 분해 효소 유전자 탐색 및 효소의 생축매 반응 특성 연구</p>	60	<p>난분해 유기 분해 효소 발굴 및 효소 단백질의 생축매 활성 특성 분석</p>	1차년도 (1단계)	○ 활성 효소 유전자 분석 (SCI급 논문 1편 이상)
			2차년도 (1단계)	○ 발굴 효소의 생화학적 특성 연구 (SCI급 논문 1편 이상, 특허출원 2건 이상)
			3차년도 (2단계)	○ 효소 단백질 구조 정보 확보 (PDB 등록) ○ 발굴된 효소 및 기능성 단백질의 연구 (SCI급 논문 1편 ; 상위 20% 이내)
			4차년도 (2단계)	○ 단백질 구조 기반의 기능성 연구 (SCI급 논문 1편 ; 상위 20% 이내, 특허등록 1건 이상)
			최종	○ 환북극권 환경 미생물 유래 유용 효소 개발 연구 (SCI급 논문 4편; 상위 20% 논문 2편 포함), 특허출원 2건/등록 1건 이상

※ 나머지 가중치 40%는 계획서의 정성적인 항목(단백질 탐색, 구조분석, 활성기작 규명, 효소 발굴 및 개발 등)에 배정함

## 2. 평가항목별 성과 (1단계)(2021.04.27.~2022.12.31.)

### □ 세부과제-4

평가항목	가중치 (%)	관련 세부목표	연차	연차별 목표 (조건/환경)	실적요약	관련증빙
(정량) 환북극권 미생물 유전체 라이브러리 제작을 통한 생명자원 확보 및 유전자 기능성 탐색	40	1. 환북극권 토래생유체로부터 난분해효소발굴	1차년도 (1단계 1차년도)	환북극권 동토 환경시료 유래의 미생물과 극지연구소 미생물 유전체 라이브러리 확보 ( $5 \times 10^4$ fosmid clone 이상) 기능성 효소 발굴을 위한 활성 기반 탐색 기술 확립	1. PAMC에서 북극 유래 미생물의 유전체 라이브러리 ( Fosmid library) 3건 획득 ( $8.7 \times 10^4$ fosmid clone) 2. 구축된 미생물 유전체 라이브러리 (Fosmid library) 로부터 56종의 lipase/esterase 활성 클론 및 16종의 laccase 활성 클론 확보	1.라이브러리제작 결과 보고서 2.lipase/laccase 효소 활성 검증 사진
			2차년도 (1단계 2차년도)	신규 또는 기존의 환경시료 전처리를 통한 미생물 유전체 라이브러리 확보 ( $2 \times 10^4$ fosmid clone 이상) 미생물 유전체로부터 난분해 유기 물질(리그닌, 오일류, 플라스틱 등) 분해 효소 유전자 발굴 (2종 이상, GenBank 또는 KPDC 등록)	3. 북극해 코어시료 상층부에서 51,333 fosmid clone 확보  -환경 미생물 유전체 라이브러리를 이용하여 lipase, laccase 등 총 20종의 fosmid done sequence를 KPDC 등록	3.라이브러리 제작 결과 보고서  - KPDC 등록 리스트 (보고서 P.18-19)
(정량) 효소활성 기반 탐색을 통한 극지유래 난분해 물질 분해 효소 유전자의 발현 생산 및 효소의 생촉매 반응 특성 연구	20	2. 분해효소백질의 촉활 특성 분석	1차년도 (1단계 1차년도)	효소와 기능성 유전자의 발현 벡터 및 숙주 선정 효소 단백질의 특성 연구 논문 1편 이상 (SCI급)	4. 북극 토양미생물 (Paenibacillus sp. R4) 유래 novel putative sugar isomerase 효소의 구조분석	4.출판 논문 1건
			2차년도 (1단계 2차년도)	난분해 유기 물질 분해 효소의 정제 단백질 확보, 발굴된 효소의 기질 특이성 및 효소학적, 생화학적 특성 분석 논문 1편 이상	5. 난분해 유기물질 분해 효소 esterase 4종의 생화학적 분석 및 단백질 구조 분석 완료 6. 극지 저온성 효소 단백질의 활성성 관련	5. 출판 논문 4건 6. 특허출원 2건

				(SCI급) 효소 단백질의 특허출원 2 건 이상	특허 2건 출원	
(정성) 발굴된 효소와 기능성 단백질의 3차 구조분석과 활 성기작 규명	20	3. 효 소 단 백 질 의 구 조 와 기 능 의 관 계 규 명	1차년도 (1단계 1차년 도)	효소와 기능성 단백질의 구조분석을 위한 단백질 결정 조건 탐색 및 최적화	7.저온성 미생물 ( <i>Flavobacterium psychrodimae</i> ) 유래 dienelactone hydrolase 효소의 2.25Å 해상도의 삼차구조 해석	7. diene lactone hydrolase 효소의 삼차구조 PDB 일부 캡처 그림 파일
			2차년도 (1단계 2차년 도)	발굴된 효소 단백질의 X-ray 회절 실험을 통한 분자 구조 해석	-저온성 단백질 (ScEst, LgEstI, 등) 5종의 X-ray 회절 기반의 분자 구조 해석 완료	-관련 증빙 5, 출판 논문 참조
(정성) 난분해 물질 분해 효 소 및 기능성 단백질의 활성 특성을 이용한 응용 및 활용 성 확대 연구	20	3. 효 소 단 백 질 의 구 조 와 기 능 의 관 계 규 명	1차년도 (1단계 1차년 도)	다양한 기질에 대한 효소 의 활성 데이터 확보. 목적 효소군에 대한 활성 측정 방법 확립	8.북극 토양 미생물 ( <i>Paenibacillus</i> sp. R4) 유래의 신규 esterase PsEst3 효소의 다양한 합성기질에 대한 활성 데이터 확보	8. PsEst3 효소의 활성 데이터 그림 파일
			2차년도 (1단계 2차년 도)	효소 활성 기반의 유용 기 능성 단백질 탐색 기술 확 보. 미생물 유전체에서 발굴된 기능성 단백질을 발현하는 형질전환체의 세포내 생리 적 특성 분석 연구	-기질 배지를 이용한 lipase(2종), 항생제 내성 유전자(7종), - 플라스틱 분해 효소(4종) 발굴 및 2차 검정 완료 - 미생물 균주( <i>P. xylanexedens</i> )의 난분해성 물질에 따른 생장 분석 및 물질 이용 분석 정보 확보	- 메타지놈 라이브러리들 이용한 기능성 탐색 결과물 사진 (보고서, P17) - 경부대 위탁보고서 주요 내용 P9 - 난분해성 물질에 대한 발효 특성 분석 그래프 및

						사진 데이터 (보고서 P18, 서울대 위탁 보고서 주요 내용, P12-14)
합계	100					



□ 위탁과제-1(경북대 : 미세플라스틱 분해를 위한 극지미생물 유래 저온성 플라스틱 분해효소 발굴)

평가항목	가중치 (%)	관련 세부목표	연차	연차별 목표 (조건/환경)	실적요약	관련증빙
(정량) 극지 미생물내 잠재적 플라스틱 분해 효소의 탐색, 정제 및 특성 분석	70	1,2	2차년도 (1단계 2차년도)	유전자재조합 기술을 이용한 E.coli 대량 정제 시스템의 확보	- 9종 신규 극지 미생물 유래 효소 탐색 - 9종 신규 효소의 대량 정제 시스템 확보	- 실험결과 1 - 논문 1 - 논문 2
(정성) 고정화 및 돌연변이를 통한 효소 안정성 및 기능 개선	30	1,2	2차년도 (1단계 2차년도)	High-throughput 시스템을 통해 플라스틱 분해 및 다기능 저온 효소의 발굴	4종 신규 효소 플라스틱 분해 활성 확인	- 실험결과 2
합계	100					

□ 위탁과제-2(서울대 : 유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발)

평가항목	가중치 (%)	관련 세부목표	연차	연차별 목표 (조건/환경)	실적요약	관련증빙
(정성) 난분해성 물질 분해를 위한 <i>P. xylanexedens</i> 의 유전자 교정 플랫폼 구축	70	1,2	2차년도 (1단계 2차년도)	(달성률 100%) <i>P. xylanexedens</i> 의 유전자 교정을 위한 Cas9과 sgRNA, repair template 등 시스템 확보	<i>P. xylanexedens</i> 의 유전자 교정에 사용 가능한 플라스미드 1건 제작	1. 플라스미드 지도 (map) (p. 15 참조)
(정량) <i>P. xylanexedens</i> 의 야생 균주와 유전자 교정 균주의 특성 분석	30	1,2	2차년도 (1단계 2차년도)	(달성률 100%) <i>P. xylanexedens</i> 야생 균주의 난분해성 물질에 대한 발효 특성 분석	균주의 난분해성 물질에 대한 발효 특성 분석 그래프 및 사진 데이터	2. 발효특성 분석 그래프 및 사진 파일 1건 이상 확보 (p. 12-13 참조)
합계	100					

### 1-3. 연구개발 목표 및 주요내용 변경사항

구분	변경 전	변경 후	변경 사유 및 조치사항	협약변경 승인일
연구목표 및 주요내용	-	<ul style="list-style-type: none"> <li>Tycho 장비 구매 (3천만원 이상 연구장비 구매)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>효소 활성 검증을 위한 정밀 분석을 위한 장비의 조기 도입</li> </ul>	2021.10.14. 심의결과 통보
	1단계 2차년도부터 위탁연구1(숙명여대)에 대한 연구추진 내용으로서 “미세플라스틱 분해 효소 탐색효소의 생화학적 특성분석 효소 응용 기술 “ 대한 내용으로 공동연구를 계획함. (선정시 연구계획서에 기 언급함).	<ul style="list-style-type: none"> <li>(위탁연구1, 숙명여대): 미세플라스틱 분해를 위한 극지미생물 유래 저온성 플라스틱 분해효소 발굴</li> <li>(위탁연구2, 서울대):유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발</li> </ul> <p>※ 당초 계획한 1개의 위탁연구(숙명여대)에서, 1개를 더 추가(서울대)하여 변경코자 함 .</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>전체적인 연구목표 및 내용에 있어서 주요 변경사항은 없음.</li> <li>당해연도(1단계 2차년도)부터는 연구개발계획서의 위탁연구1(숙명여대) 과 신규 위탁연구과제 1개를 추가하여 공동연구를 진행하여, 보다 강화된 목표 달성을 모색함.</li> </ul>	2021.12.14. 연차 협약
	<ul style="list-style-type: none"> <li>2개 위탁연구</li> <li>제1위탁과제 -숙명여대(과제번호: 2022M1A5A1034723)</li> <li>제2위탁과제 -서울대(과제번호: 2022M1A5A1034884)</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>2개 위탁연구</li> <li>제1위탁과제를 경북대학교로 이관하여 과업수행</li> <li>제2위탁과제(서울대)는 변경사항 없음</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>위탁연구과제의 책임자(숙명여대 김두현 교수)의 연구수행 중 갑작스런 작고(作故)로, 위탁연구과제(위탁1)의 중단이 불가피함</li> <li>연구목표 달성을 위해 제1위탁과제를 경북대학교로 이관하여 수행함</li> <li>기존 위탁연구기관(숙명여대)에서 주도적으로 참여한 참여 연구원을 변경기관(경북대)에서 참여시킴으로서 원활한 과업수행을 가능하게 함</li> </ul>	2022.09.15. 심의결과 통보



제 3 장  
연구개발과제의 수행 결과 및 목표 달성 정도  
(4세부과제-위탁과제 포함)





## 1. 추진내용 및 연구개발결과

년도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 방법
1차년도 (1단계 1차년도)	환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>난분해 유기 물질 분해 효소와 새로운 기능성 단백질 탐색을 위하여 유전체 라이브러리 제작 및 유전체 분석</li> <li>미생물 유전체 라이브러리 제작과 클론 확보</li> <li>효소 활성과 기능성 기반의 효소 단백질 탐색 및 유전자 확보</li> <li>다양한 기질에 대한 효소의 활성 데이터 확보</li> </ul>
2차년도 (1단계 2차년도)	난분해 유기 물질 분해 활성 효소의 유전자 확보와 특성 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>환북극권 동토 환경시료 확보와 환경미생물 유전체 라이브러리 추가 제작</li> <li>발굴된 효소 단백질의 효소학적, 생화학적 특성 분석</li> <li>발굴된 효소 단백질의 X-ray 회절 실험을 통한 분자구조 해석</li> <li>미생물 유전체에서 발굴된 기능성 단백질을 발현하는 형질전환체의 세포내 생리적 특성 분석 연구</li> </ul>

### 1차년도: 환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구

#### ○ 난분해 유기 물질 분해 효소와 새로운 기능성 단백질 탐색을 위하여 유전체 라이브러리 제작 및 유전체 분석

- Polar and Alpine Microbial Collection (PAMC)에서 ice와 soil로 분류되는 균주를 선정하여, Pacbio Sequel II를 이용하여 genome sequencing 진행

Table 1. The results from the sequence analysis by Pacbio Sequel II

Cell Name	Polymerase Read Bases	Polymerase Reads	Polymerase Read N50	Average Read Length
icesoil	138,492,356,009	6,891,829	31,580	20,095

#### ○ 미생물 유전체 라이브러리 제작과 클론 확보

- PAMC의 glycerol stock을 ice, soil과 sediment 분류군에 포함하는 clone을 pooling함
- pCC1FOS fosmid vector을 이용하여 fosmid library 제작하고 제작된 fosmid library의 insert의 평균 size 확인

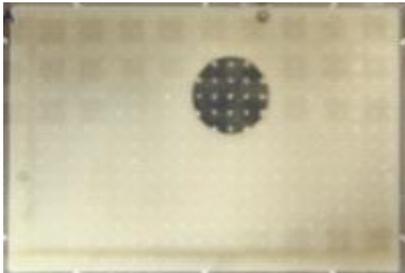
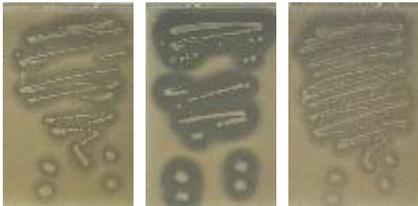
Table 1. The results of fosmid library construction (Fosmid clone number and Insert size)

	평균 insert size	Fosmid clone
Ice	32	23,000
Soil	26	54,000
Sediment	30	10,000

○ 효소 활성과 기능성 기반의 효소 단백질 탐색 및 유전자 확보

- 확보된 fosmid library를 이용하여 다양한 효소 및 기능성 단백질 screening을 위해 기질이 포함된 specific media plate 제작
- Lipase/esterase 활성을 갖는 fosmid 클론 screening 결과
- ▷ Lipase 및 esterase의 활성 클론을 screening 하기 위해 Tributyrin 기질이 포함된 agar plate에 384 well plate로 제작된 fosmid library를 배양하여 각 clone의 활성을 확인하고 screening 함. 그 결과, 총 75 plate (28,800 클론)에서 총 53종의 활성 클론을 선별하였음.

Table 2. The representative of fosmid clone with lipase activity

Plate ID	Well no.			Tributyrin 분해 활성 clone	단일 클론 검증
PIC-3	A16	F14	K1		

- 북극 토양 미생물 (Paenibacillus sp. R4) 유래 novel putative sugar isomerase 효소 (PbSI) 의 구조분석

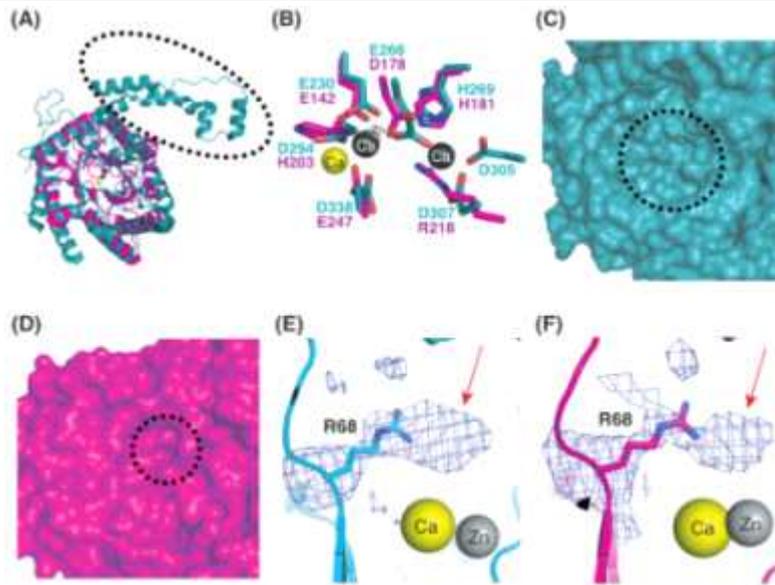


Fig. 1. Structural comparison of cold-active enzyme PsSI and PbXI.

- ▷ PbSI 효소는 PbXI 효소에 비해 보다 넓고 열려있는 기질 결합 부위를 가짐. 전자밀도맵 분석을 통해 PbSI 의 Arg68 잔기 근처에 아직 규명되지 않은 기질이 결합할 가능성이 있음.

○ 다양한 기질에 대한 효소의 활성 데이터 확보.

저온성 esterase PsEst3의 구조 분석 및 생화학적 특성 분석

- ▷ PsEst3의 단백질 구조 분석에 의해 기질 결합 부위를 예측하고 관련 아미노산 잔기의 돌연변이형 제작
- ▷ 기질 결합과 관련된 아미노산 잔기 S128의 활성화에 대한 역할을 규명하기 위하여 야생형과 돌연변이형의 효소 활성을 분석하였으며, PsEst3 유사 esterase family에서의 특성을 규명함.
- ▷ 기질의 ester chain 길이에 따라 효소의 반응을 분석하여 효소 활성의 특성을 규명하였음.
- ▷ 사용된 기질은 p-Nitrophenyl ester 기반의 합성기질과 fluorescein 기반의 C8과 C12 기질로서 기질 결합 부위의 구조정보와 활성 데이터를 활용하여 활성기작을 분석하였음.

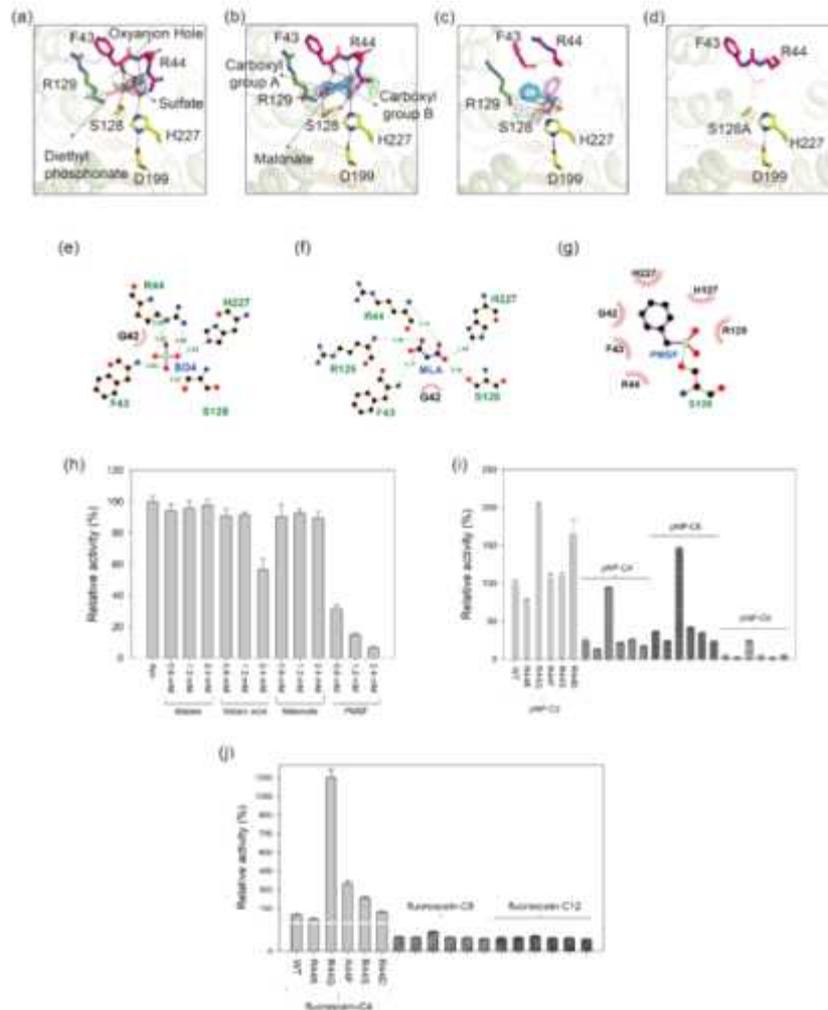


Fig. 2. the enzyme activity comparison for various substrate and ligand binding patterns of the cold-active enzyme PsEst3.

## 2차년도: 난분해 물질 분해 활성 효소의 유전자 확보와 특성 연구

### ○ 환북극권 동토 환경시료 확보와 환경미생물 유전체 라이브러리 추가 제작

– 북극해 코어 환경시료 및 PAMC균주(Lichen/water 유래)로부터 환경미생물 유전체 fosmid library 제작

▷ 북극해 코어시료의 상층부 (~5cm)와 중층부 (30~35cm) 토양으로부터 환경유전체 DNA를 추출하였으나, 중층부의 시료에서는 라이브러리 구축을 위한 최소한의 DNA량을 확보하기 어려웠으며, 상층부에서 31  $\mu$ g DNA를 확보하였음.

▷ DNA 추출은 MPBIO사의 FastDNA Spin kit for soil 제품을 사용하였으며, 1개 column 당 약 200 mg 의 토양시료를 사용하여 10 g의 시료로부터 토양 DNA를 추출함. 확보된 환경 유전체를 이용하여 pCC1FOS vector를 이용하여 라이브러리를 구축함. 전체 library titer는 51,333 clones를 확보(using 384 format plate)

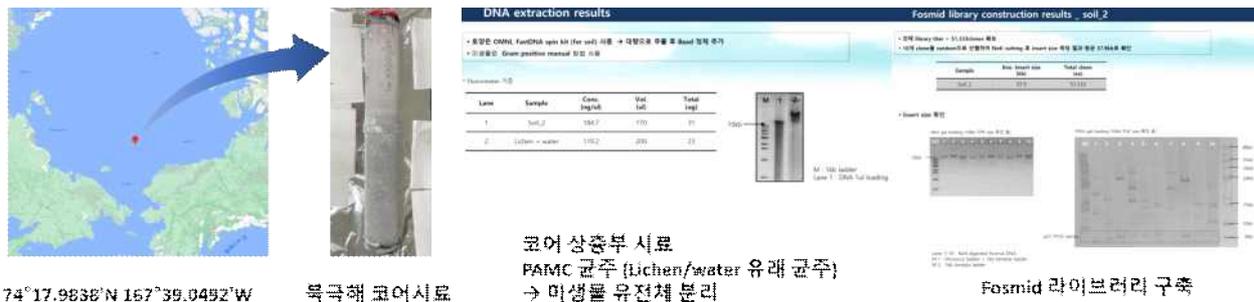


Fig.3. Construction of fosmid library using environmental sample of the Arctic ocean and PAMC strains

### ○ 발굴된 효소 단백질의 효소학적, 생화학적 특성 분석

- *Psychrobacter* sp. PAMC 21119에서 유래한 OTCs(Ps\_cOTC, Ps\_aOTC)의 생화학적, 구조적 특성 분석
  - ▷ Arginine deiminase (ADI) 합성경로와 arginine 생합성은 미생물이 환경 변화에 적응하는데 필요한 물질을 만들어 내는 것으로 알려져 있음. 특히, ADI 시스템은 pH가 낮아지면 유전자 오페론 전사량을 증가시켜 암모니아를 생산하고 pH가 낮은 환경에 대응하는 시스템임.
  - ▷ ADI 합성경로와 arginine 생합성에서 촉매작용을 일으키는 중요한 단백질이 Ornithine carbamoyltransferases (OTC)로 알려져 있으며 이 단백질은 catalytic OTC (cOTC)와 anabolic OTC (aOTC) 두 단백질이 존재하며 서로 다른 방향의 촉매작용을 촉진함.

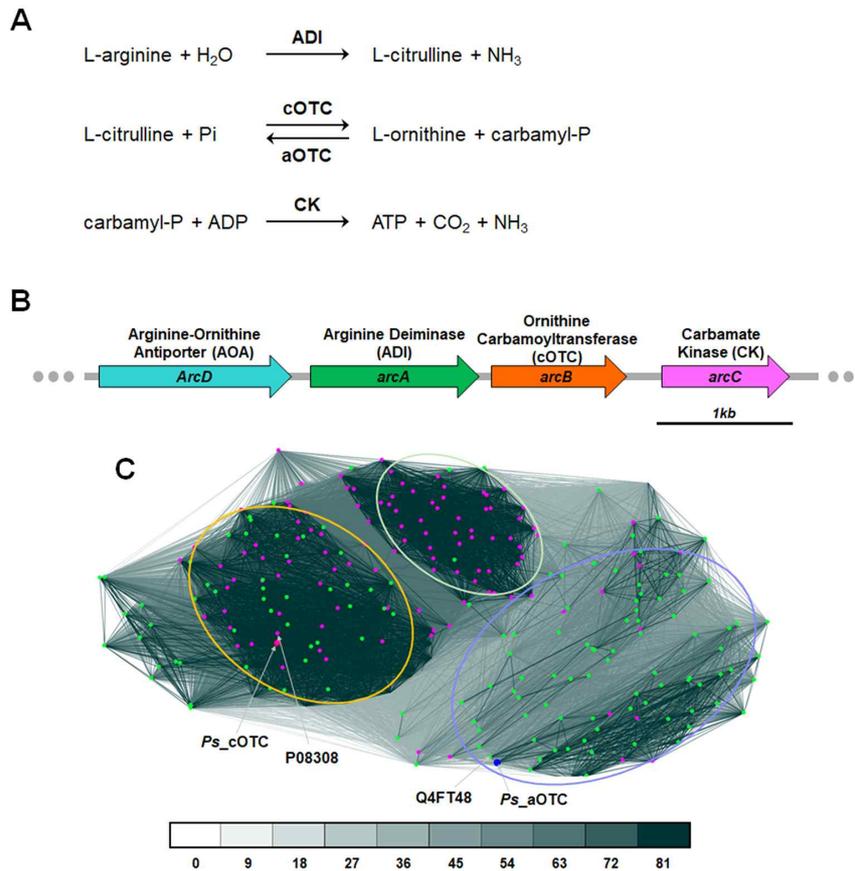


Fig. 4. The catabolic OTC (cOTC) and anabolic OTC (aOTC) from *Psychrobacter* sp. PAMC 21119. (A) Schematic representation of the ADI pathway and the reaction catalyzed by the OTCs. (B) Schematic representation of gene organization within the ADI system of the PAMC 21119 strain. (C) Clustering analysis of OTCs searched using ProtBLAST/PSI-BLAST from the PDB and Uniprot\_sport databases. The three clusters are indicated with light green, purple-blue, and orange circles. The genes annotated with *arcB* or *argF* are indicated with green and purple dots. *Ps\_cOTC* and *Ps\_aOTC* are indicated with red and blue dots. Darker and shorter connecting lines indicate higher sequence similarity. Connections with P-values higher than  $1e^{-x}$  are drawn in the corresponding color ( $x =$  number below).

### ○ 효소 활성 기반의 유용 기능성 단백질 탐색 기술 개발.

– 환경 유전체 라이브러리를 이용한 활성 기반의 기능성 유전자 탐색

- ▷ 북극해 코어시료와 PAMC 균주(Lichen/water 유래)의 추출된 DNA를 사용하여 구축된 환경유전체 라이브러리를 이용하여 기능성 단백질을 발현하는 유전자를 탐색하였으며, 효소활성 관련 기질 혹은 항생제를 포함한 배지에서 활성을 관찰하였음.

## Functional Screening using Metagenome Library

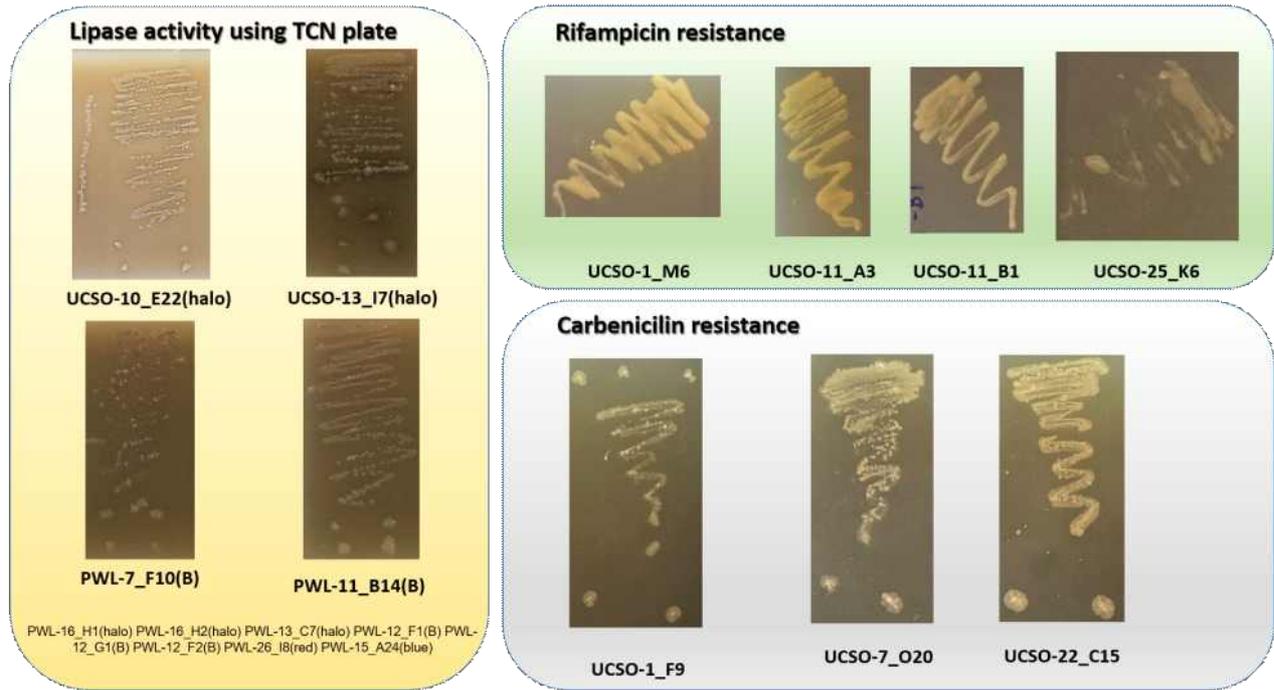


Fig.5. The fosmid clones selected from functional screening using metagenome library.

### ○ 미생물 유전체에서 발굴된 기능성 단백질을 발현하는 형질전환체의 세포내 생리적 특성 분석 연구

– *P. xylanexedens*의 난분해성 물질에 따른 성장 분석

- ▷ *P. xylanexedens*을 난분해성 물질인 cellulose와 xylan에서 정치배양(20 °C)으로 30일간 관찰한 결과 비슷하게 xylan에서 glucose와 거의 유사한 속도로 자라는 것이 확인되었고 이에 비해 cellulose에서는 자라지만 그 속도가 미미했음. 이 실험은 혐기조건(anaerobic condition)에서도 진행되었는데 이 조건의 경우도 xylan과 glucose 배지에서 자라는 속도가 비슷했는데 매우 느리게 자라는 것으로 확인 됨. 이에 비해 cellulose는 거의 이용하지 못하는 것으로 확인 됨.

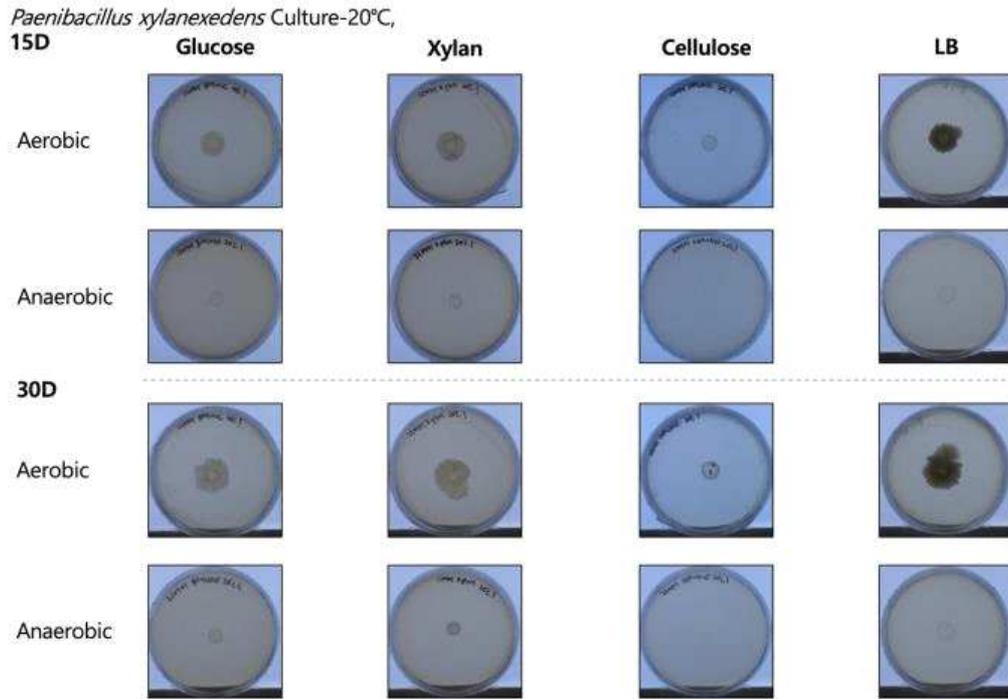


Fig.6. The growth analysis of *P. xylanexedens* according to the recalcitrant materials.

(참고) 극지연구소 KPDC(Korea Polar Data Center) 생물자원 등재 목록 (2022.11. 현재)  
 ※ 세부과제-4(NRF-2021M1A5A1075524 / 극지연구소 과제분류번호-PN21014, 22014)  
 의 한국극지데이터센터(KPDC; Korea Polar Data Center) 등재 목록(1단계 1차년도와  
 2차년도)

순번	PN21014			원시데이터 (등록일)
	데이터 이름1)	메타데이터 ID2)	메타데이터 제목3)	
1	Fosmid clone (PIC13-E19)	KOPRI-KPDC-000 01808	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC13-E19)	등록 (2021-09-30)
2	Fosmid clone (PSO25-J20)	KOPRI-KPDC-000 01807	Fosmid sequence carrying genes related with indigo synthesis (PSO25-J20)	등록 (2021-09-30)
3	Fosmid clone (PSO21-P18)	KOPRI-KPDC-000 01806	Fosmid sequence carrying genes related with indigo synthesis (PSO21-P18)	등록 (2021-09-30)
4	Fosmid clone (PIC17-E19)	KOPRI-KPDC-000 01805	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC17-E19)	등록 (2021-09-30)

순번	PN22014			원시데이터 (등록일)
	데이터 이름1)	메타데이터 ID2)	메타데이터 제목3)	

1	Fosmid clone (PSO23-K9)	KOPRI-KPDC-000 02012	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying amylase gene (PSO23-K9)	등록 (2022-09-23)
2	Fosmid clone (PSO_Lac5C)	KOPRI-KPDC-000 02013	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac5C)	등록 (2022-09-23)
3	Fosmid clone (PSO_Lac6E)	KOPRI-KPDC-000 02014	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac6E)	등록 (2022-09-23)
4	Fosmid clone (PSO_Lac6H)	KOPRI-KPDC-000 02015	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying laccase gene (PSO_Lac6H)	등록 (2022-09-23)
5	Fosmid clone (PIC15-F4)	KOPRI-KPDC-000 02016	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PIC15-F4)	등록 (2022-09-23)
6	Fosmid clone (PWL12-F1)	KOPRI-KPDC-000 02017	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PWL7-F10)	등록 (2022-09-23)
7	Fosmid clone (PWL13-C7)	KOPRI-KPDC-000 02018	Fosmid sequence carrying genes related with lipase gene (PWL13-C7)	등록 (2022-09-23)
8	Fosmid clone (PIC14-H14)	KOPRI-KPDC-000 02019	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC14-H14)	등록 (2022-09-23)
9	Fosmid clone (PSO2-I10)	KOPRI-KPDC-000 02020	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PSO2-I10)	등록 (2022-09-23)
10	Fosmie clone (PIC19-A15)	KOPRI-KPDC-000 02021	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC19-A15)	등록 (2022-09-23)
11	Fosmie clone (PIC14-E21)	KOPRI-KPDC-000 02022	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC14-E21)	등록 (2022-09-23)
12	Fosmie clone (PIC7-O11)	KOPRI-KPDC-000 02023	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC7-O11)	등록 (2022-09-23)
13	Fosmie clone (PIC8-F9)	KOPRI-KPDC-000 02024	Nucleotide sequence of fosmid clone carrying lipase gene (PIC8-F9)	등록 (2022-09-23)
14	Fosmid clone (PSO20-P6)	KOPRI-KPDC-000 02025	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO20-P6)	등록 (2022-09-23)
15	Fosmid clone (PSO2-K8)	KOPRI-KPDC-000 02026	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO2-K8)	등록 (2022-09-23)
16	Fosmid clone (PSO1-A20)	KOPRI-KPDC-000 02027	Fosmid sequence carrying genes related with pigment synthesis (PSO1-A20)	등록 (2022-09-23)

□ 위탁과제-1(경북대 : 미세플라스틱 분해를 위한 극지미생물 유래 저온성 플라스틱 분해효소 발굴)

1) 극지 미생물 내 미세플라스틱 분해 효소 탐색

- 기존 미세플라스틱 분해 효소의 서열을 이용하여 극지 미생물 내 잠재적 미세플라스틱 분해 효소를 탐색

기존에 보고된 *Bacillus licheniformis*로부터 유래한 가수분해효소 (BL28)가 플라스틱 단위체인 bis-hydroxyethyl terephthalate (BHET)를 분해할 수 있다는 결과를 본 연구팀에서 확인함 (미보고된 결과). 따라서, 본 연구팀은 극지 미생물 (*Halocynthiibacter arcticus*, *Exiguobacterium antarcticum*, 및 *Flavobacterium psychrolimnae*)로부터 BL28 유사 서열 효소를 BLAST기법을 통해 탐색함 (그림 1, (좌)). 탐색을 통해 얻은 효소 서열은 대장균 발현 시스템을 이용한 대량 정제를 위해 단백질 발현용 플라스미드 벡터에 삽입함 (그림 1, (우), A).

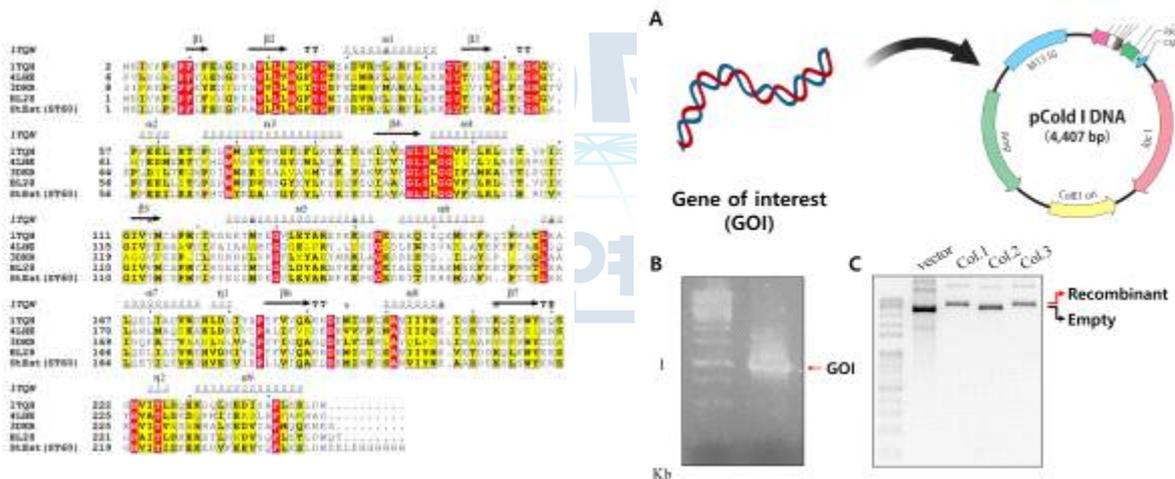


그림 1. (좌) BLAST를 통해 얻은 BL28 유사 서열의 Multiple-sequence alignment. (우) Recombinant pCold vector 제작

타겟 유전자 (Gene of interest)는 극지 연구소로부터 얻은 미생물 genomic DNA로부터 polymerase chain reaction (PCR) 기법을 통해 증폭된 뒤 (그림 1, (우), B), 극지 미생물 유래 단백질 발현 및 정제에 최적화된 pCold 플라스미드 벡터에 NdeI 과 HindIII 제한 효소를 이용하여 삽입됨 (그림 1, (우), C).

- 대장균을 이용한 효소의 대량 정제 조건 확립

극지 유래 미생물 단백질 발현 및 정제를 위해 본 연구팀은 극지 미생물 유래 단백질 발현에 최적화된 pCold 벡터를 이용, 조건을 확립함. pCold 벡터는 대장균을 저온 처리 (Cold-shock)하는 것으로 타겟 단백질의 발현을 유도시키는데, 이는 기존의 Lac operon 방식

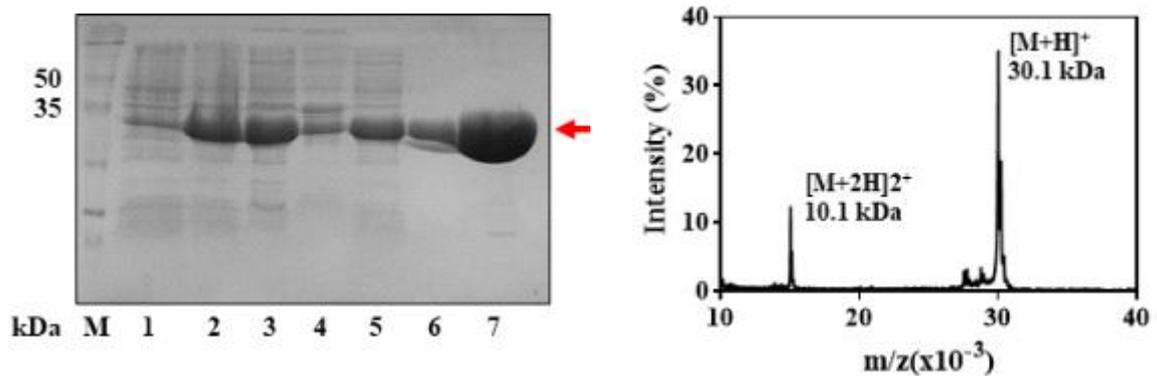


그림 2. (좌) BLAST를 통해 얻은 BL28 유사 서열의 Multiple-sequence alignment. (우) 유사 서열 분석을 통해 얻은 효소의 정제보다 타 단백질에 의한 오염이 적고, 발현 효율이 굉장히 높은 장점이 있음. 600 nm 흡광도 0.7 수준의 대장균 배양액을 15도 저온 처리하여 단백질을 발현시킴. 그림 2, (좌), 2에서 확인할 수 있듯, 저온 처리를 통해 타겟 단백질이 고효율로 발현되는 것을 확인함. 15도에서 16 시간동안 대장균을 배양한 뒤, 초음파를 통해 균을 파쇄, 원심분리를 통해 상등액을 얻은 후, 상등액속의 타겟 단백질을 확인함 (그림 2, (좌), 4). 이후, 고정화 금속 친화 컬럼 (Immobilized metal affinity column) 기법을 통해 타겟 단백질을 고순도로 정제함 (그림 2, (좌), 8). 정제된 효소의 질량 분석을 통해 타겟 단백질임을 최종 확인함 (그림 2, (우)). 유사한 방식을 통해 총 8종의 신규 효소에 대하여 실험실 수준에서의 대량 정제 조건을 확립함.

● 플라스틱 분해 활성 실험 기법 확립

신규 정제된 8종의 효소와 이후 추가 연구를 통해 탐색될 새로운 효소들에 대하여 간편하고 신속한 플라스틱 분해 효소 활성 분석을 위해 스크리닝 기법을 수립할 필요성이 있음. 본 연구팀에서는 효소의 항생제 분해 활성을 분석하기 위해 주로 사용되는 아가로스겔 plate 기법을 응용하였음.



그림 3. BHET plate 실험. 효소에 의한 BHET 분해 후 혼탁 정도의 변화를 통해 BHET 분해를 확

인.

플라스틱의 구성 단위체인 bis-hydroxyethyl terephthalate (BHET)는 효소의 미세 플라스틱 분해 활성을 확인하는 대표적인 기질로, 효소에 의해 분해되어 mono-hydroxyethylterephthalate (MHET)와 terephthalic acid를 생성함. 본 연구팀은 DMSO에 녹인 BHET를 아가로스겔에 함께 굳혀 만든 BHET-아가로스겔을 제작함. BHET 분해 생성물들은 BHET에 비하여 더 높은 소수성 성질을 가지고 있으므로, BHET가 분해되면 plate상에서 혼탁도가 증가된 영역이 생성되고, 이를 통해 BHET의 분해 정도를 쉽게 확인할 수 있을 것으로 예상함. 그후, 적정량의 단백질 용액을 BHET plate에 점적한 후 반응을 진행, 주변의 혼탁 정도의 변화를 관찰함 (그림 3). 본 연구를 통해 BHET 분해 활성을 가진 효소의 스크리닝 기법을 수립하고, BHET 분해 활성을 가진 총 4종의 신규 효소를 발굴함.



● 논문 (국내외 전문 학술지) 게재

번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부 (SCIE/비SCIE)	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Identification, Characterization, and Preliminary X-ray Diffraction Analysis of a Novel Esterase (ScEst) from Staphylococcus chromogenes	Crystals	황지섭, 전상은	12(4): 546	스위스	MDPI	SCIE	2022.04.13	2073-4352	50%
2	Dual functional roles of a novel bifunctional $\beta$ -lactamase/esterase from <i>Lactococcus garvieae</i>	International Journal of Biological Macromolecules	Ly Thi Huong Luu Le, 유완기	206	네덜란드	ELSEVIER	SCIE	2022.02.17	0141-8130	100%

□ 위탁과제-2(서울대 : 유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발)

년도	연구개발 목표	연구개발 내용 및 방법
2차년도 (1단계) (4세부 위탁 과제2)	<i>P. xylanexedens</i> 의 대사공학적인 접근을 위한 CRISPR/Cas9 system 기반 구축	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 극지연구소 미생물 은행 유래의 <i>P. xylanexedens</i>의 전장 유전체를 PacBio 플랫폼을 이용한 시퀀싱 결과를 분석하고 이 극지 미생물 유전체 내의 주요 유전자 정보 분석을 위하여 활용</li> <li>○ CRISPR/Cas9 적용을 위한 주요 유전자 분석</li> <li>○ <i>P. xylanexedens</i>의 난분해성 물질에 따른 성장 분석하기 위해 액체 제한 배지인 M9 minimal medium에 1% xylan (w/v) 혹은 2% glucose (w/v)을 이용하여 100 RPM으로 배양하였으며 배양 온도는 25 °C, 30 °C, 37 °C에서 72시간 배양하였고, 12시간 간격으로 성장을 각각 spectrometry로 측정하였음</li> <li>○ 또한, 난분해성 물질에 따른 성장을 분석하기 위해 glucose, xylan, cellulose를 각각 포함한 M9 minimal agar medium에서 20 °C에서 정지배양으로 30일간 관찰하였고, 15일과 30일은 사진을 찍어서 분석하였음. Rich media인 LB를 사용하여 성장을 비교하였고, anaerobic condition을 만들어서 aerobic 상태와 성장을 비교함</li> <li>○ 온도에 따른 <i>P. xylanexedens</i>의 난분해성 물질 이용 영향을 분석하기 위해 glucose, xylan, cellulose를 포함한 M9 minimal 배지에서 정지배양을 시행하였음. 온도는 4 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C 등으로 설정하여 30일간 관찰</li> <li>○ 유전체를 기반으로 <i>P. xylanexedens</i>의 대사공학을 진행할 수 있는 Cas9과 sgRNA 시스템 확보. Cas9 protein에 <i>Paenibacillus</i>에서 사용 가능한 프로모터를 사용하고, <i>P. xylanexedens</i>에서 사용할 수 있는 프로모터 이용. 대장균에서 플라스미드 증폭을 할 수 있도록 대장균용 ori 및 항생제 마커 장착</li> <li>○ CRISPR/Cas9 시스템 구동을 위한 repair template와 repair 시스템 확보</li> </ul>

1) PacBio 플랫폼을 이용한 *Paenibacillus xylanexedens*의 전장유전체 분석

(1) *P. xylanexedens*의 전장 유전체내의 주요 유전자 시퀀스 분석

- PacBio RSII 플랫폼을 이용하여 유전체를 분석하여 150,147 read의 총 1,334,843,214 bp의 유전체 정보를 확보하게 됨. 평균적인 subread의 길이는 약 9000 bp임.

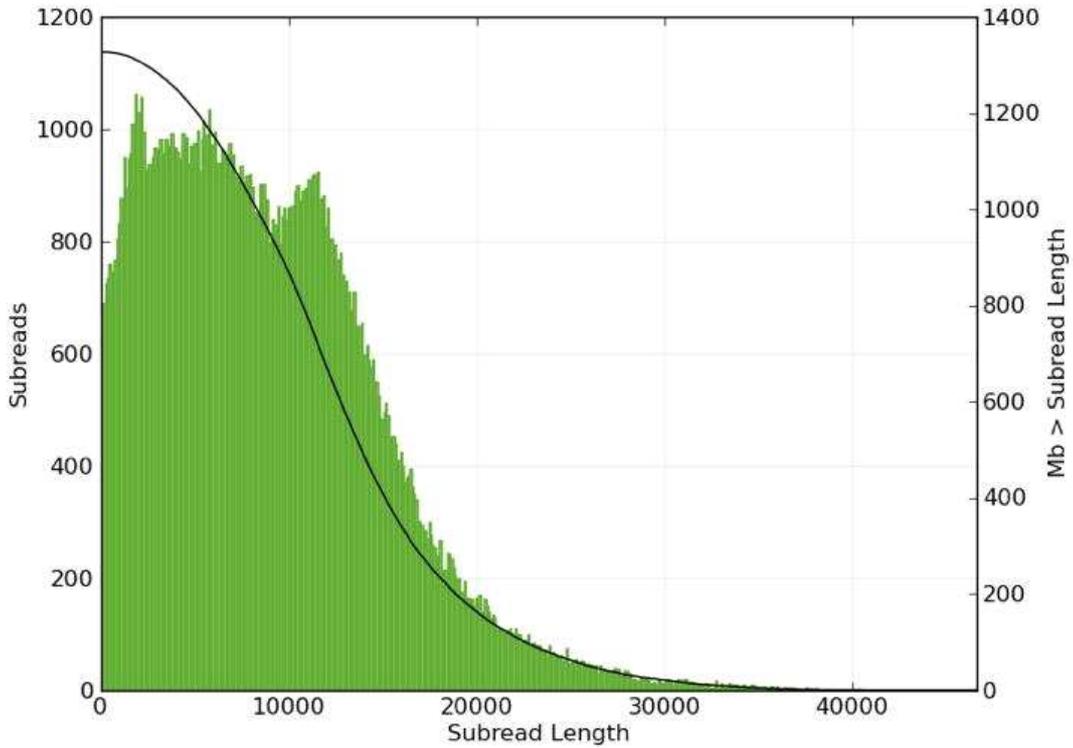


그림 1-1. Filtered subread length distribution

- 유전체 정보에 대한 프로세싱 이후에 유전체를 assembly한 결과 두 개의 circular form의 contig를 확보하게 되었고 분석결과 한 개는 *P. xylanexedens*의 chromosome이고, 다른 하나는 plasmid인 것으로 분석됨.

표 1. 전장유전체 assembly 결과

Contig Name	Length (bp)	GC %	Depth	Circular	Discription
Contig1	7,053,622	46.0	128	Yes	Chromosome
Contig2	44,617	44.1	130	Yes	Plasmid

- 유전체의 assembly에 따르면 chromosome은 GC contents가 46.0%인 약 7Mb로 나타남. Chromosome에는 6098개의 coding sequence가 있었고, tRNA 103개, rRNA가 36개 있는 예측되었음. Plasmid에는 약 44 kb에 이르고, coding sequence는 52개가 있는 것으로 예측되었음.

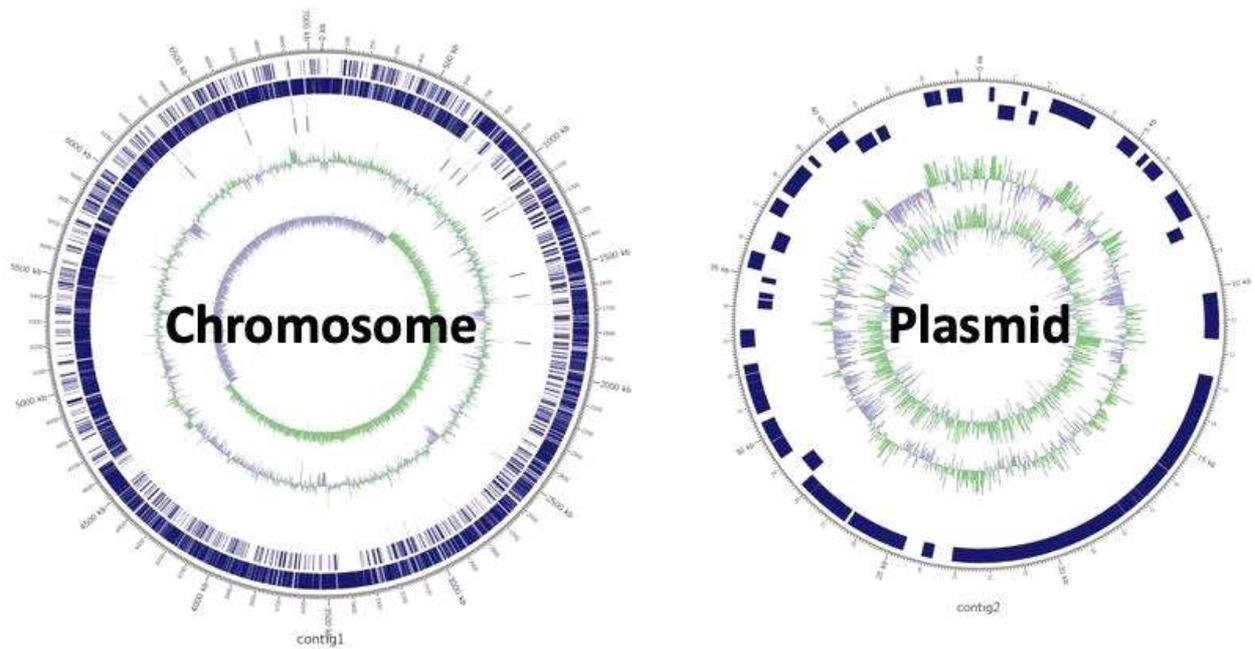


그림 1-2. *P. xylanexedens* 유전체의 circular map

## (2) CRISPR/Cas9 적용을 위한 주요 유전자 분석

- Annotation된 유전체를 분석한 결과 난분해성에 관련된 다양한 유전자가 확인 됨. Lignocellulosic biomass의 주요 구성성분인 xylan과 cellulose의 분해 효소들이 다수 포함 되어 있어 *P. xylanexedens*이 발견된 극지방 대륙붕 표층 퇴적물에 포함된 죽은 식물들을 분해하는 데 사용되는 것으로 추정됨. 이중 11개가 xylanase activity가 있는 것으로 보이고, xylan이 분해되어 생성된 오탄당인 xylose의 세포내 운송과 관련된 단백질은 3개이고, 이외 에도 xylulose kinase와 xylose isomerase 등의 효소도 예측이 되어 xylan을 외부에서 분 해하고 xylose 형태로 세포내로 운반하고 이를 변형하여 pentose phosphate pathway를 통해 c-source로 이용하는 것으로 예측됨.

표 2. *P. xylanexedens* 유전체 내에서 분석된 xylan 분해 관련 유전자들

Contig	Locus_Tag	Start	End	Gene	Function	Species	Identity (BLAST)
1	22703_1_00469	552351	553313	xynB	Endo-1,4-beta-xylanase B	<i>Paenibacillus</i> sp. CF095	99.06
1	22703_1_02143	2417383	2418939	xylG	Xylose import ATP-binding protein XylG	<i>Paenibacillus pinisoli</i>	72.12
1	22703_1_02657	2922944	2925766	xynC	Endo-1,4-beta-xylanase C	<i>Paenibacillus</i> CF095	96.17
1	22703_1_02895	3177240	3178925	xynC_2	Glucuro-xylanase XynC	<i>Paenibacillus</i> sp.	75.8
1	22703_1_03235	3542023	3543087	xynD_1	Bifunctional	<i>Paenibacillus</i> sp.	75.43

					xylanase/deacetylase	FSL R7-269		
1	22703_1_03264	3568202	3570535	xynA_1	Endo-1,4-beta-xylanase A	<i>Paenibacillus</i> sp. FSL R5-0765	99.49	
1	22703_1_03477	3824915	3830119	xynA1_8	Endo-1,4-beta-xylanase A	<i>Paenibacillus</i> sp. GM1FR	93.77	
1	22703_1_03795	4213021	4213656	xynA_2	Endo-1,4-beta-xylanase A	<i>Paenibacillus xylanilyticus</i>	91.94	
1	22703_1_03999	4460784	4463456	xynA_3	Endo-1,4-beta-xylanase A	<i>Paenibacillus</i> sp. CF095	96.18	
1	22703_1_05267	5941940	5943784	xynC_3	Glucuro-xylanase XynC	<i>Paenibacillus</i> sp. AD87	47.07	
1	22703_1_05333	6045036	6045539	xynA1_10	Endo-1,4-beta-xylanase A	<i>Paenibacillus</i> sp. AD87	80.24	
1	22703_1_05358	6070926	6071927	xynB_3	Endo-1,4-beta-xylanase B	<i>Paenibacillus amylolyticus</i>	98.5	
1	22703_1_05384	6091319	6092482	xylH	Xylose transport system permease protein XylH	<i>Paenibacillus</i>	100	
1	22703_1_05385	6092451	6094016	xylG_2	Xylose import ATP-binding protein XylG	<i>Paenibacillus</i> sp. P1XP2	82.65	
1	22703_1_05386	6094038	6095189	chvE	Multiple sugar-binding periplasmic receptor ChvE	<i>Paenibacillus</i> sp. GM1FR	99.74	
1	22703_1_05948	6710424	6711917	xylB_4	Xylulose kinase	<i>Paenibacillus</i> sp. FSL R5-0765	98.79	
1	22703_1_05949	6712642	6713958	xylA_3	Xylose isomerase	<i>Paenibacillus</i>	99.77	
1	22703_1_01665	1858899	1860308	bgIC_1	Aryl-phospho-beta-D-glucosidase BglC	<i>Paenibacillus</i>	100	

- Annotation된 유전체에서 다수의 xylanase가 확인되기 때문에 xylan이라는 난분해성 물질의 이용과 관련하여 이와 관련된 *P. xylanexedens*을 활용하는 것이 매우 유리할 것으로 사료되었음
- 추가적인 분석에 의해서 cellulose 분해와 관련된 효소들도 4개 예측되었는데 cellulase와 endo-와 exoglucanase가 확인됨. Xylanase에 비해 그 숫자가 매우 적기 때문에 상대적으로 cellulose의 이용은 떨어질 수도 있음이 예측됨.

표 3. *P. xylanexedens* 유전체 내에서 분석된 cellulose 분해 관련 유전자들

Contig	Locus_Tag	Start	End	Gene	Function
1	22703_1_00483	568989	570113	celE	Cellulase/esterase CelE
1	22703_1_01838	2064075	2066519	cbhA	Exoglucanase A
1	22703_1_01977	2233214	2236213	eglA	Endoglucanase A
1	22703_1_01685	1882213	1882881	pelA	Pectate lyase A

## 2) *P. xylanexedens*의 난분해성 물질에 대한 발효 특성 분석

### (1) *P. xylanexedens*의 난분해성 물질에 따른 생장 분석

- 유전체의 유전자들을 분석하였을 때 xylan에 대한 이용 가능성이 높기 때문에 이를 실제로 M9 제한배지에서 c-source를 xylan으로 사용하고 이를 glucose의 이용과 비교함.



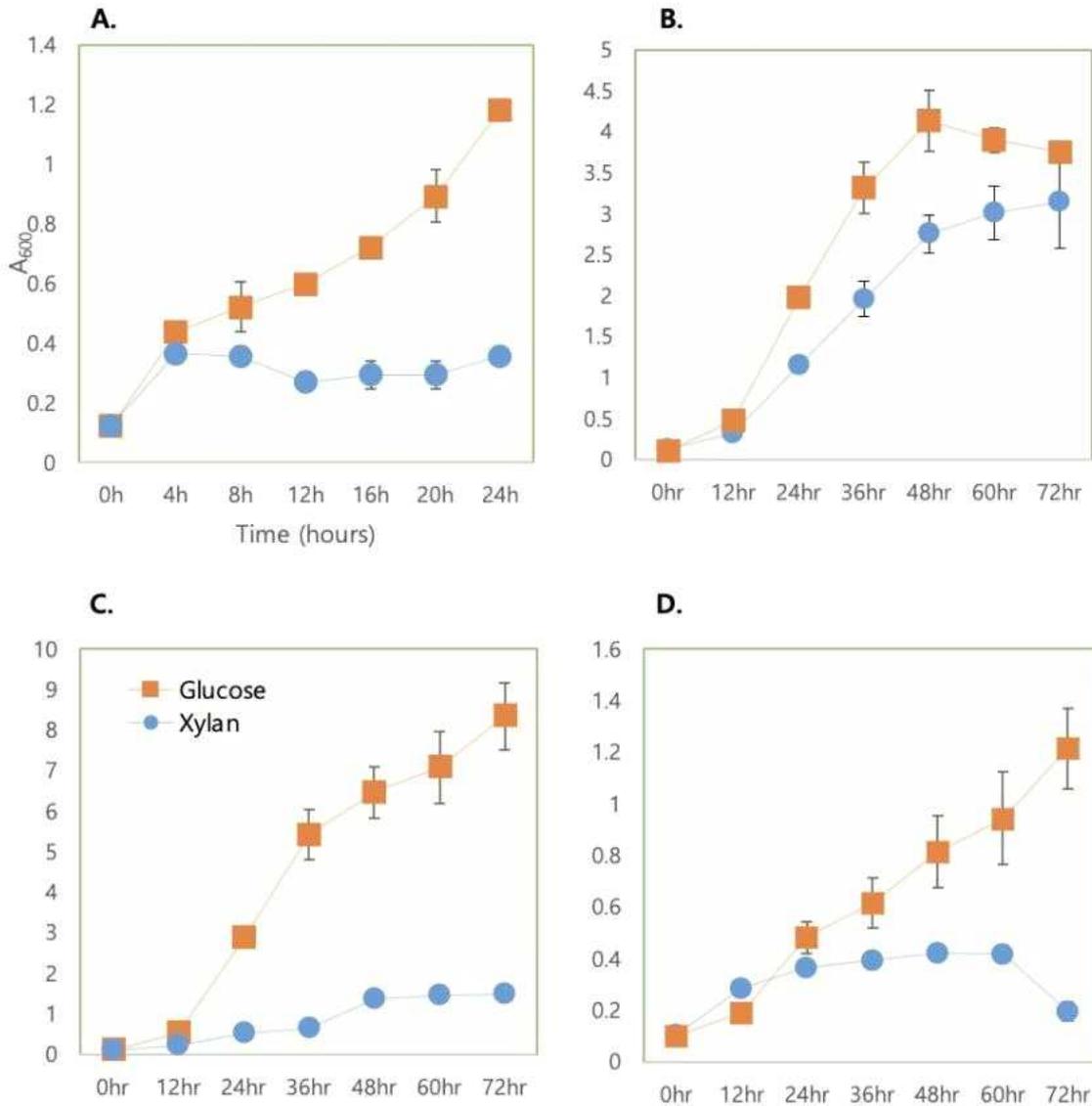


그림 1-3. 대장균과 *P. xylanexedens*의 난분해성 물질에 따른 성장 분석. 대장균의 37 °C에서의 성장(A). *P. xylanexedens*의 25 °C (B), 30 °C (C), 37 °C (D)에서의 성장

○ 대장균의 경우 최적온도 조건에서 glucose에 대한 이용이 매우 뛰어난 것에 비해 xylan은 거의 이용하지 못하는 것으로 확인 됨. 이에 비해 *P. xylanexedens*는 25 °C에서 xylan의 이용이 glucose에 필적하는 결과를 보였으며, 이에 비해 30 °C와 37 °C에서는 glucose의 이용은 정상적이나 xylan의 이용률이 매우 떨어지는 경향을 보였음.

*Paenibacillus xylanexedens* Culture-20°C,  
15D

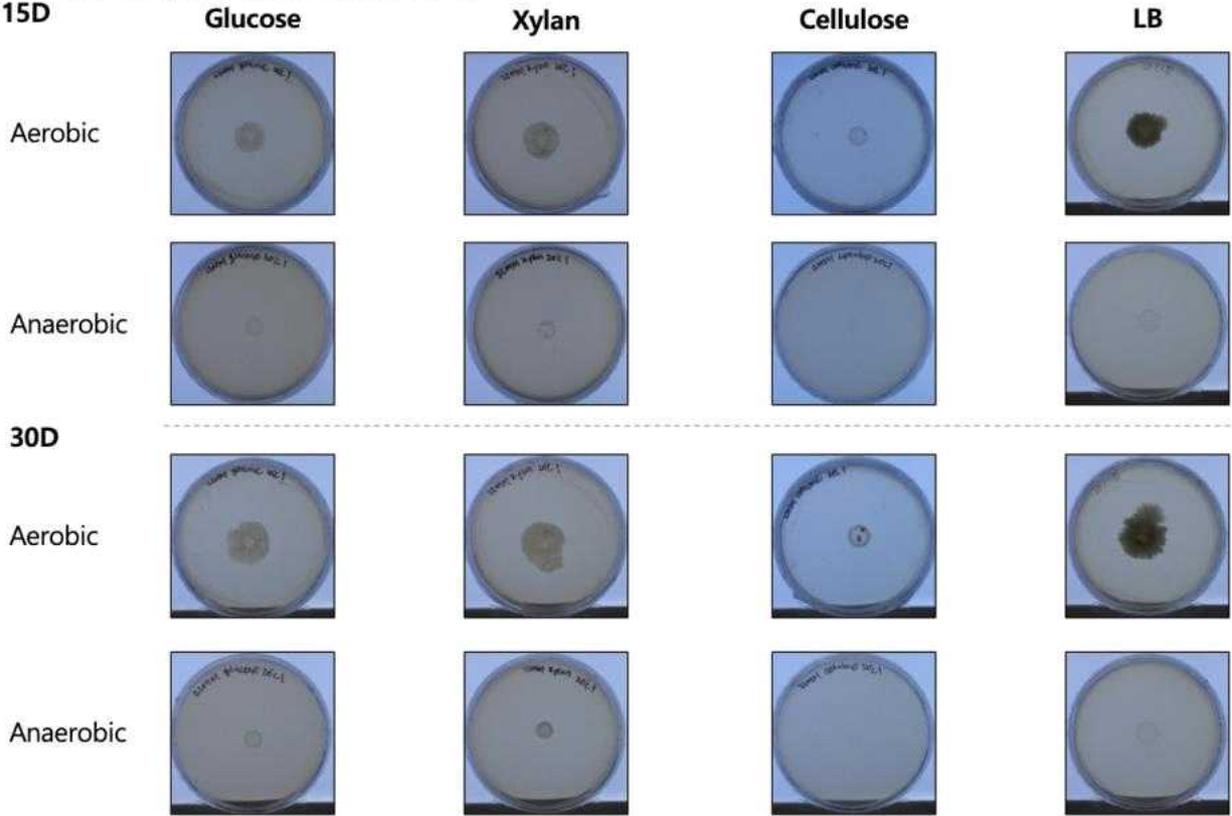


그림 1-4. *P. xylanexedens*의 난분해성 물질에 따른 성장 분석.

- *P. xylanexedens*을 난분해성 물질인 cellulose와 xylan에서 정치배양(20 °C)으로 30일간 관찰한 결과 비슷하게 xylan에서 glucose와 거의 유사한 속도로 자라는 것이 확인 되었고 이에 비해 cellulose에서는 자라지만 그 속도가 미미했음. 이 실험은 혐기조건(anaerobic condition)에서도 진행되었는데 이 조건의 경우도 xylan과 glucose 배지에서 자라는 속도가 비슷했는데 매우 느리게 자라는 것으로 확인 됨. 이에 비해 cellulose는 거의 이용하지 못하는 것으로 확인 됨.

## (2) *P. xylanexedens*의 온도에 따른 난분해성 물질 이용 영향 분석

- *P. xylanexedens*의 온도에 따른 난분해성 물질분해 경향을 분석하였는데, glucose의 경우는 4 °C에서는 매우 느리게 자랐고, 15 °C에서는 조금 자라는 속도가 빨라졌으며, 20 °C와 25 °C에서는 어느 정도 빠르게 자랐고, 30 °C에 이르러 가장 잘 자라다가, 37 °C에서 급격하게 자라는 속도가 떨어짐 glucose의 이용은 20 °C ~ 30 °C가 최적 조건인 것으로 판단됨.

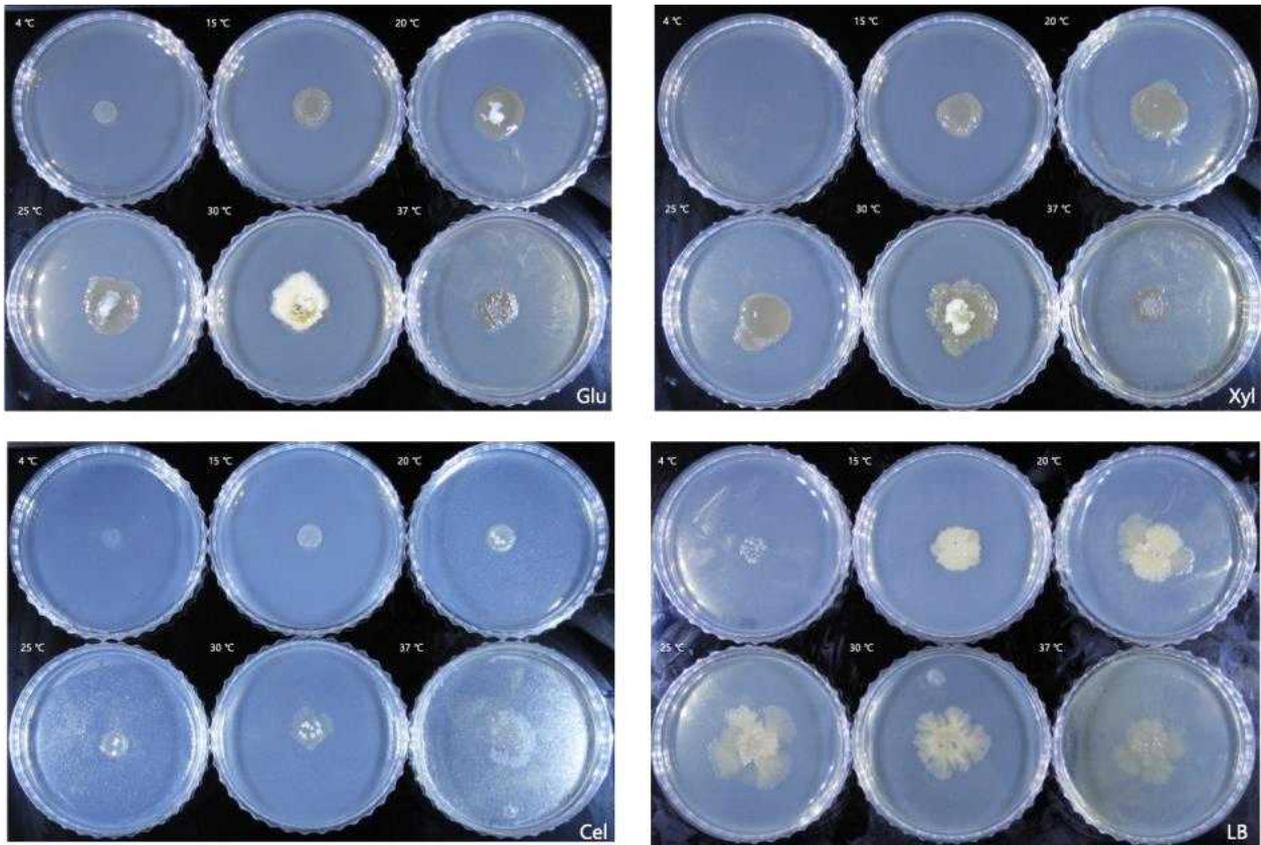


그림 1-5. 온도에 따른 난분해성 물질 이용 분석.

- *P. xylanexedens*의 xylan 이용은 glucose와 유사한 경향을 보였는데, 4 °C에서는 거의 자라지 못하였고, 15 °C에서 어느 정도 자라기 시작하여 glucose와 유사하게 20 °C ~ 30 °C에서 성장속도가 빨라지다가 37 °C에서 급격히 줄어듦. Cellulose의 경우는 조금 이용하기는 하지만 그 양이 미비하고, 다만 특이한 것은 4 °C에서는 xylan 보다 cellulose의 이용이 미약하게나마 좋음.

### 3) *P. xylanexedens*의 CRISPR/Cas9 system 기반 구축

#### (1) *P. xylanexedens*의 대사공학을 위한 Cas9과 sgRNA 시스템 및 repair template 사용을 위한 시스템 확보

- *P. xylanexedens*는 아직까지 CRISPR/Cas9이 구동되는 시스템이 만들어진 적이 없어 이에 대한 제작이 필요하였음. 우선 단백질을 구동할 벡터 시스템 자체가 없기 때문에 이에 대한 제작이 선행되어야 했음. 따라서, 대장균에서 plasmid propagation이 가능하고 보관이 가능하도록 대장균 ori와 selectable marker가 사용가능한 shuttle vector 시스템으로 제작했음. 거기에 *P. xylanexedens*에서 구동 가능한 ori와 항생제 마커, 프로모터를 사용하여 Cas9 단백질이 생성될 수 있도록 제작했음.
- SgRNA의 경우는 in vitro transcription 방법으로 synthesis하는 방법 등을 준비하였고, repair DNA는 overlap PCR을 통해 500bp~1000bp까지 타겟 유전자에 대한 repair DNA template를 제작 가능하도록 하였음. 또한, 유전체 분석결과 recombinase 유전자의 존재를 확인하여 추가적으로 repair를 위한 recombinase를 발현할 필요가 없을 것으로 판단함.

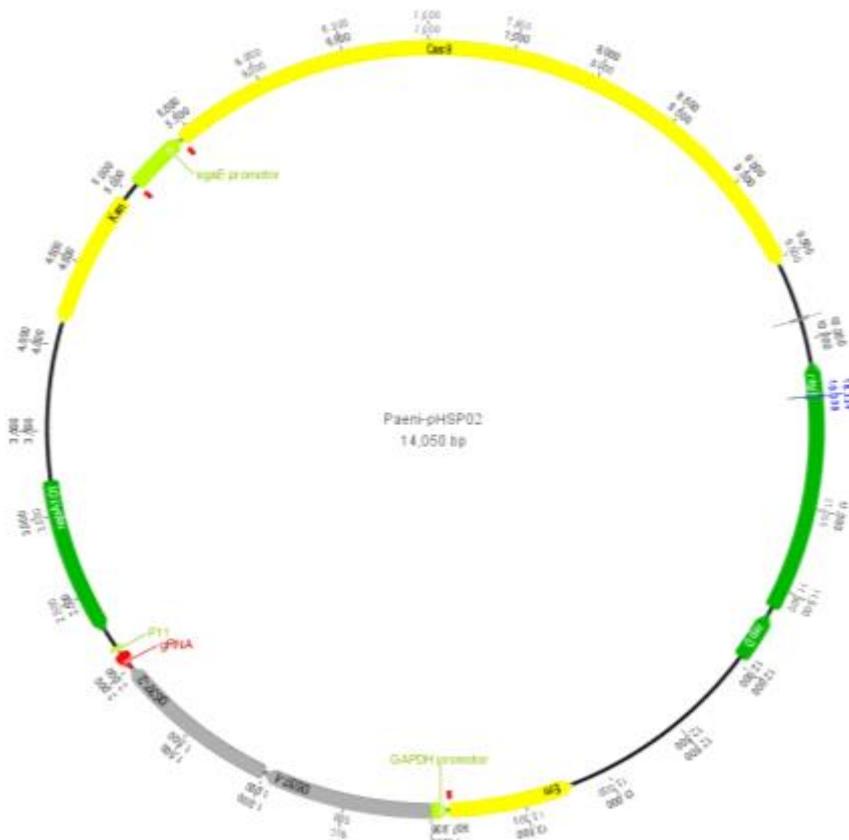


그림 1-6. *P. xylanexedens*의 Cas9 vector system

● 논문 (국내외 전문 학술지) 게재

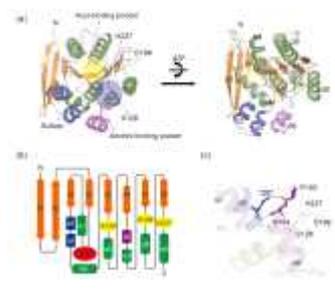
번호	논문명	학술지명	주저자명	호	국명	발행기관	SCIE 여부	게재일	등록번호 (ISSN)	기여율
1	Safety evaluation of mycotoxin citrinin production from <i>Monascus ruber</i> through whole genome sequencing and analytical evaluation	3 Biotech	윤혜리, 구단렬, 한숙, 신승철, 김한우, 김효진	12	독일	Springer International Publishing AG	SCIE	2022/08/08	2190-5738	50

## 2. 대표적 연구성과 및 목표 달성 정도

### 1) 진도관리, 자체평가 결과 등을 반영하여 성과가 우수한 2대 기술을 선정

- (① 신규 저온성 에스테라제 발굴 및 기능성 개선 기술) 알래스카 영구 동토층에 서식하는 호냉성(psychrophilic)미생물인 Paenibacillus sp. R4 균주 유래의 저온에서 활성이 뛰어난 에스터 가수분해효소 PsEst3를 발굴하였으며, 이의 구조적인 특징에 의해 특정 아미노산 잔기에 특정 변이를 유발시켰을 때, 에스터 가수분해효소 활성이 약 2배 정도 증가된 PsEst3 변이체를 제작함.
- (② 극지 효소를 이용한 L-시트룰린(L-citrulline) 또는 L-오르니틴(L-ornithine)을 제조 기술) 극지 저온성 미생물 (Psychrobacter sp. PAMC 21119) 유래 cOTC 와 aOTC 효소의 삼차구조규명 및 생화학적 특성 분석하고, 두 효소를 이용해서 L-시트룰린(L-citrulline) 또는 L-오르니틴(L-ornithine)을 제조할 수 있는 기술을 제공

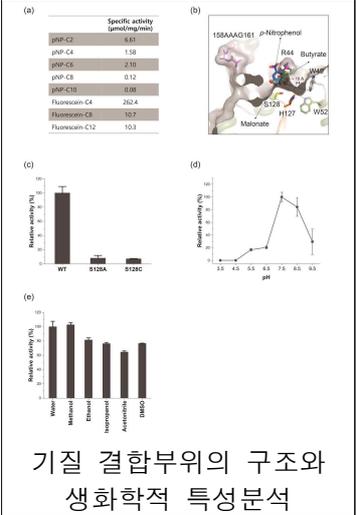
### 2) 성과별 내용

성과 1	신규 저온성 에스테라제 발굴 및 기능성 개선 기술									
① 성과개요										
연구자	극지연구소 김한우/신승철/손종현/최웅/김현									
과제명	극지기초원천기술개발									
기술성숙도 (TRL)	기본원리 파악	기본개념 정립	기능 및 개념검증	연구실환경 테스트	유사 환경 테스트	파일럿 현장 테스트	상용모델 개발	실제 환경 최종 테스트	상용 운영	
		○	○							
성과개요	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 핵심 개발 내용: 알래스카 유래 저온성 미생물 유래의 신규 효소 발굴 및 기능성 개량</li> <li>1) 가수분해효소로 분류되는 에스터 가수분해 효소 (E.C. 3.1.1.1)와 리파아제 (E.C.3.1.1.3)는 지방산 에스테르의 가수분해 및 에스테르 교환반응을 촉진시키는 산업용 효소로 활용이 가능함.</li> <li>2) 저온 환경에서 상대적으로 높은 촉매활성을 보이는 저온성 효소는 에너지 절약 측면이나 저온에서의 촉매 반응이 필요한 정밀화학 등의</li> </ul>						 <p>PsEst3의 단백질 구조</p>			

산업영역에서 잠재성은 상당히 높음.

3) 북극권 토양에서 분리한 저온성 미생물 *Paenibacillus* sp. R4 유래의 신규 에스테라제 PsEst3 의 유전자 분석 결과, 효소활성을 위한 촉매잔기인 serine을 함유하는 특유의 pentapeptide (GHSRA) 서열을 가지고 있는 것이 확인됨.

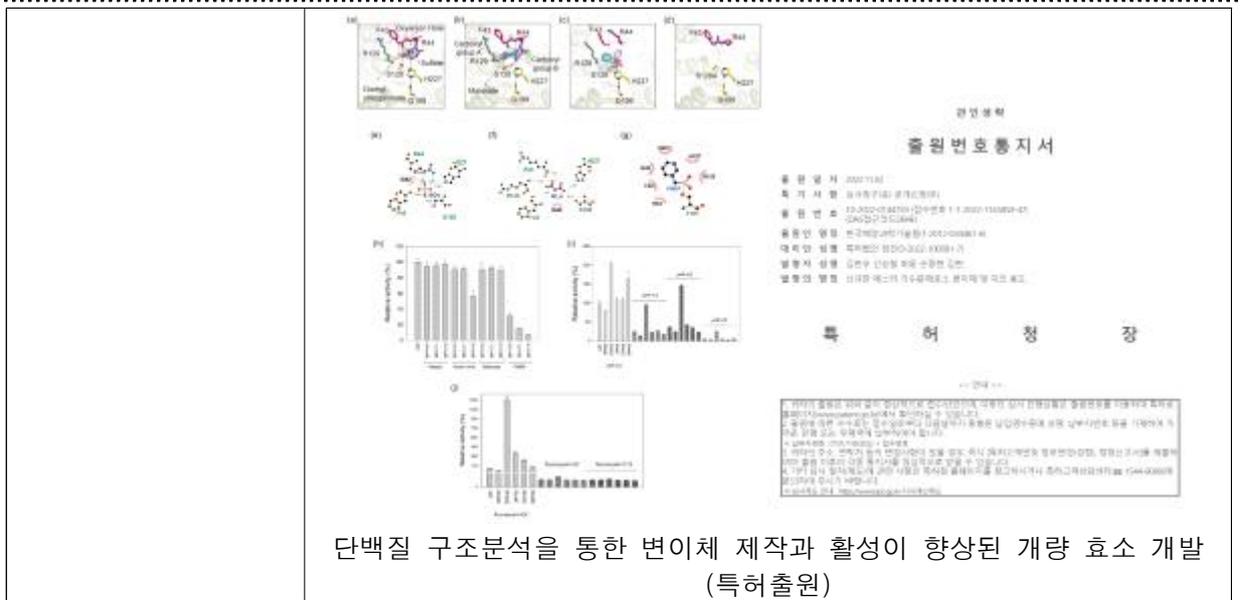
4) 신규 발굴된 PsEst3의 단백질 구조 분석을 통하여 기질 결합부위를 결정하고, 특정 아미노산을 변이시켜 가수분해 활성을 2배 증가시킨 변이체를 제작함으로써 효소의 기능성을 개선시킴.



② 성과내용

- 주요 기능 및 사양

주요 기능/사양	내용
<p>신규 에스테라제/ 저온 환경에서 높은 생촉매 활성</p>	<p>알래스카 유래 저온성 효소 PsEst3의 신규성과 저온 효소활성</p>
<p>변이체 제작을 통한 기능성 개선</p>	



- 혁신성 및 차별성(기존지식/기술 대비)

- PsEst3의 아미노산 서열을 분석한 결과 지금까지 알려진 8개의 lipase/esterase family 중 class V family와 연관이 된 것으로 나타나지만, 초기 진화단계에서 분화되어 새로운 family로 판단됨.(신규성 입증)
- 신규 에스테라제의 효소 활성에 대한 데이터를 구축하고 생화학적 특성을 분석하여, 기존 효소 대비 높은 저온활성과 각종 화학물에 대한 변성내성이 있음을 규명하였음.

- 우수성

- 저온성 효소 PsEst3에 대한 단백질 구조 분석을 통하여, 효소활성 및 기질과의 결합에 관여하는 아미노산의 위치와 역할에 대하여 분자 수준에서 규명함.
- 단백질 구조분석 결과를 기반으로 하여, 발굴된 야생형 효소 단백질의 활성보다 탁월하게 증가된 변이체를 제작함으로써 기능성 향상에 따른 활용성이 높은 개량된 효소를 개발함.

- 사업/분야별 목표 달성에 대한 기여

구분	당초 계획된 목표	성과의 핵심성
사업 최종목표	환북극권 동토 유래 난분해 유기 물질 분해 효소 발굴	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 알래스카 유래 저온성 미생물에서부터 신규 에스테라제 효소 개발</li> </ul>
분야별 목표	환북극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 동토에서 분리된 미생물 <i>Paenibacillus</i> sp R4의 유전체 정보를 기반으로 신규 에스테라제 효소 PsEst3을 발굴하고 생화학적 특성을 규명</li> <li>• 발굴된 효소의 기능성 개선을 위하여 단백질 구조분석을 통해 변이체를 제작하고, 다양한 기질에 대한 활성을 검정하여 고효율 변이체를 개발함.</li> </ul>

③ 연구성과의 활용 현황 및 계획

- 산업화/산업현장 적용

- 활용 가능한 산업현장으로서의 의약품 산업, 바이오 디젤, 세제 생산, 환경정화 산업 등 광범위한 산업적 응용이 가능함.
- 특허등록을 통한 재산지식권 확보와 해당기술이 요구되는 산업체와의 협력을 통하여 상용화를 추진 계획

구분	기업명	제품/기술명	매출액	상태	주요내용
기술이전	미정				
창업	미정				

#### ④ 파급효과/기대효과

- (학술적/기술적/인프라 측면)

- 신규 에스테라제의 생화학적 활성특성과 단백질 구조 분석정보를 통하여 확보된 기질의 결합 및 활성기작에 대한 학술정보를 제공
- 동토 유래의 저온성 미생물을 활용한 다양한 효소 개발의 가능성과 북극 생명자원을 기술소재로서 활용함으로써 생물소재의 다양성 확보
- 동토 유래 다양한 생명자원을 이용한 국내 생명공학 기술개발을 위하여, 환북극권 관측거점의 인프라 활용에 대한 효과 기대

- (산업경제적 측면)

- 에너지 저감 및 저온에서 에스터 가수분해 반응이 요구되는 식품, 의약, 에너지 등의 다양한 산업분야에서 생촉매 소재로서 활용 가능

- (사회적 측면)

- 생물소재의 다양성을 제공함으로써 생명공학 분야에서의 국가 경쟁력을 향상시킴

#### ⑤ 성과근거자료

구분	SCI 논문			특허출원			특허등록			기술이전
	국내	국외	소계	국내	국외	소계	국내	국외	소계	
사업기간				○						

논문	논문명		학술지명	IF	게재년월
	Structural and biochemical insights into PsEst3, belonging to a new class of esterases, obtained from Paenibacillus sp. R4 strain		IUCrJ	5.588	심사중
특허	출원/등록	특허명	출원/등록번호	출원국	
	출원	신규한 에스터 가수분해효소 변이체 및 이의 용도	10-2022-0144759 (접수번호) 1-1-2022-116585 9-47) (DAS접근코드DB4E)	대한민국	
창업	기술명		기업명	창업일	
	-		-	-	

성과 2	극저온성 미생물 <i>Psychrobacter</i> sp. PAMC 21119 유래 Ps_cOTC 및 Ps_aOTC 효소의 용도: L-시트룰린(L-citrulline) 또는 L-오르니틴(L-ornithine) 제조 기술
------	---

① 성과개요

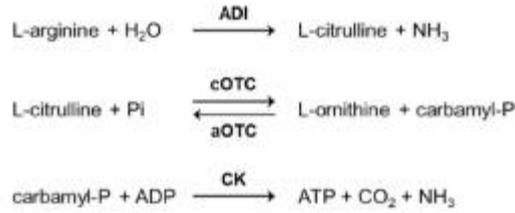
연구자	극지연구소 도학원/황지섭/이민주/이준혁/한세종									
과제명	극지기초원천기술개발									
기술성숙도 (TRL)	기본원리 파악	기본개념 정립	기능 및 개념검증	연구실환경 테스트	유사 환경 테스트	파일럿 현장 테스트	상용모델 개발	실제 환경 최종 테스트	상용 운영	
		O	O							
성과개요	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 극저온성 미생물 (<i>Psychrobacter</i> sp. PAMC 21119) 유래 cOTC 와 aOTC 효소의 삼차구조규명 및 생화학적 특성 분석</li> <li>- 두 효소 (cOTC 와 aOTC) 의 기질 결합 부위 구조적 차이로 인해 기질과 반응물이 서로 다른 반대방향의 화학반응을 촉매한다는 사실 규명</li> </ul>									

② 성과내용

- 주요 기능 및 사양

주요 기능/사양	내용
----------	----

(1) 카타볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제 (catabolic Ornithine carbamoyltransferases, Ps\_cOTC)를 이용하여 L-시트룰린(L-citrulline)으로부터 L-오르니틴(L-ornithine)을 제조하는 방법을 제공



(2) 아나볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제 (anabolic Ornithine carbamoyltransferases, Ps\_aOTC)를 이용하여 L-오르니틴으로부터 L-시트룰린을 제조하는 방법을 제공

본 연구결과로 2.6 Å 과 2.2 Å 분해능에서 극저온성 미생물인 *Psychrobacter* sp. PAMC 21119 유래 Ps\_cOTC 및 Ps\_aOTC의 구조를 해석하고 기질 선호도를 비교하여, L-시트룰린(L-citrulline)으로부터 L-오르니틴(L-ornithine) 제조를 위해서는 Ps\_cOTC를 이용해야 하고, L-오르니틴으로부터 L-시트룰린 제조를 위해서는 Ps\_aOTC를 이용해야 하는 것을 확인

- 혁신성 및 차별성(기존지식/기술 대비)

- 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제 (Ornithine carbamoyltransferases, OTC; EC2.1.3.3)는 아르기닌 디아미나제 (arginine deiminase, ADI) 경로 및 아르기닌 생합성에 관여하는 효소
- 카타볼릭 OTC(catabolic OTC, cOTC) 및 아나볼릭 OTC(anabolic OTC, aOTC) 두 종류의 효소가 존재
- cOTC는 시트룰린(citrulline)의 인산분해(phosphorolysis)를 촉매하여, 오르니틴(ornithine, ORN) 및 카바모일 포스페이트(carbamoyl phosphate, CP)를 생성하고, 이는 ADI 경로를 통해 카바메이트 키나제(carbamate kinase)에 의해 ADP로부터 ATP를 생성하는 역할 수행
- 다양한 종의 OTC에 대한 구조적 및 생화학적 연구가 수십 년 동안 수행되었지만, 두 효소의 단방향 촉매 과정의 구조 기반 메커니즘은 아직까지 명확하지 않음
- 동일한 종에서의 aOTC 및 cOTC에 대한 연구가 부족
- 두 OTC 간의 가장 큰 구조적 차이점은 CP 및 ORN 바인딩 포켓(binding pocket)의 크기 차이임
- Ps\_cOTC 및 Ps\_aOTC를 사용한 생화학적 연구와 구조적 연구 결과는 80s 루프의 독특한 배열이 다른 기질 선호도와 OTC의 활성을 결정 한다는 사실 규명

- 기술적 우수성

- 카타볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(catabolic Ornithine carbamoyltransferases, Ps\_cOTC) 및 아나볼릭 오르니틴 카르바모일트랜스퍼라제(anabolic Ornithine carbamoyltransferases, Ps\_aOTC)의 구조적 및 화학적 특징을 분자수준에서 규명
- 구조적 및 화학적 서로 다른 특징으로 인하여 L-시트룰린(L-citrulline)으로부터 L-오르니틴(L-ornithine)을 제조하기 위해서는 Ps\_cOTC를 이용해야 하고, L-오르니틴으로부터 L-시트룰린을 제조하기 위해서는 Ps\_aOTC를 이용해야 함을 확인

- 사업/분야별 목표 달성에 대한 기여

구분	당초 계획된 목표	성과의 핵심성
사업 최종목표	환복극권 동토 유래 난분해 유기 물질 분해 효소 발굴	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 본 연구에서는 극저온성 미생물 (<i>Psychrobacter</i> sp. PAMC 21119) 유래 cOTC 와 aOTC 효소의 삼차구조규명 및 생화학적 특성 분석을 통해 두 효소 (cOTC 와 aOTC) 의 기질결합 부위 구조적 차이로 인해 기질과 반응물이 서로 다른 반대방향의</li> </ul>

분야별 목표	환복극권 동토 환경 미생물의 유전체 기반의 효소 탐색 연구	<p>화학반응을 촉매한다는 사실을 규명</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>aOTC 는 기질로 이용하는 인산카르바모일과 강한 affinity를 가지는 반면 cOTC 는 인산 카르바모일과 매우 약한 affinity를 가짐</li> <li>두 효소 (cOTC 와 aOTC)의 기능적 차이를 규명한 연구 결과는 향후 해당 효소를 이용한 유용물질 생산에 활용 가능</li> </ul>
-----------	-------------------------------------	---

③ 연구성과의 활용 현황 및 계획

- 산업화/산업현장 적용

- 향후 두 효소 (cOTC 와 aOTC)의 생산방법, 구조정보, 기능적 특성에 대한 추가 연구 및 특허권 확보 이후에 기술 이전을 통한 사업화 추진을 목표로 설정

구분	기업명	제품/기술명	매출액	상태	주요내용
기술 이전	미정				

④ 파급효과/기대효과

- (학술적/기술적/인프라 측면)

- OTC의 구조와 기능 관계를 분자수준에서 이해하기 위해, 두 효소 (Ps\_cOTC 와 Ps\_aOTC)의 결정 구조를 해석
- OTC의 알로스테릭(allosteric) 효과 및 기질 선호도를 이해하기 위해, 트리머에서 Ps\_cOTC 및 Ps\_aOTC의 구조적 차이 규명

- (산업경제적 측면)

- cOTC 와 aOTC 효소의 특성 규명 연구결과는 의약소재 및 건강기능식품 원료 물질인 아르기닌, 시트룰린, 오르니틴의 효소적 대량 생산에 이용 가능

- (사회적 측면)

- 효소 및 생물소재의 국산화를 통해 생명공학 분야에서의 국가 경쟁력 향상

⑤ 성과근거자료

구분	SCI 논문			특허출원			특허등록			기술이전
	국내	국외	소계	국내	국외	소계	국내	국외	소계	
사업 기간		○		○						

논문	논문명		학술지명	IF	게재년월
	Comparative structural insight into the unidirectional catalysis of ornithine carbamoyltransferases from <i>Psychrobacter</i> sp. PAMC 21119		PLoS ONE	3.752	2022년 9월
특허	출원/등록	특허명	출원/등록번호	출원국	
	출원	<i>Psychrobacter</i> sp. PAMC 21119 유래 Ps_cOTC 및 Ps_aOTC 효소 및 이의 용도	10-2022-0145788 (DAS접근코드BC49)	대한민국	
창업	기술명		기업명	창업일	
	-		-	-	

### 3) 목적 달성 정도

1차년도 (1단계 1차년도)														
개발내용	추진 일정												책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
환복극권 미생물 유전체 확보	[Progress bar: 1-10 months completed]												김한우 (극지연구소)	
효소와 기능성 단백질 탐색 및 특성 조사	[Progress bar: 5-10 months completed]												김한우 (극지연구소)	
단백질 발현 생산 정제 시스템 환경 구축	[Progress bar: 3-10 months completed]												김한우 (극지연구소)	
효소 단백질 구조분석을 위한 결정화 조건 조사	[Progress bar: 3-9 months completed]												김한우 (극지연구소)	

당초계획
  실적

2차년도 (1단계 2차년도)														
개발내용	추진 일정												책임자 (소속기관)	비고 (변경사유 등)
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12		
환복극권 미생물 유전체 확보	[Progress bar: 6-10 months completed]												김한우 (극지연구소) 김효진 (서울대)	
발굴 효소 단백질의 생물리학적 특성 분석	[Progress bar: 1-12 months planned]												김한우 (극지연구소)	위탁연구 책임자 변경에 따른 일정

평가																		김상우 (경북대)	변경
효소 단백질의 3차 구조 해석																		김한우 (극지연구소)	
효소활성 탐색기술 확보																		김한우 (극지연구소)	

□ 위탁과제-1(경북대 : 미세플라스틱 분해를 위한 극지미생물 유래 저온성 플라스틱 분해효소 발굴)

2차년도 (1단계 2차년도)																
개발내용	추진 일정												책임자 (소속 기관)	비고 (변경사유 등)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12				
효소의 생화학적 분석, 경제성 증대 전략 모색을 위한 효소 고정화 및 효소의 기능 개선															김상우 (경북대)	

□ 위탁과제-2(서울대 : 유전자 교정 기반 극지미생물 난분해성 폐기물 처리 연구 플랫폼 개발)

1차 년도 (1단계 2차년도)															
추진내용	추진 일정												책임자 (소속기관)		
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12			
<i>P. xylanexedens</i> 의 대사공학적 접근을 위한 CRISPR/Cas9 system 기반 구축															김효진 (서울대학교)



제 4 장  
연구개발과제성과의 관련분야 기여 정도  
(4세부과제-위탁과제 포함)





## 1. 연구개발성과의 관련 분야에 대한 기여정도

- 본 연구과제에서는 극지 미생물에서 난분해성 유기물질을 분해하는 효소를 탐색하고 발굴함으로써 국내에서는 아직 보고된 바가 없는 신규성이 높고 저온에서의 고활성을 가지는 저온성 효소를 중점적으로 개발함. 극지 미생물을 유용 효소의 새로운 유전자 풀로서 제안하고, 관련된 국내 기초 과학 연구 활성화 및 상업적 응용에 대한 상당한 기여가 예상됨.
- 이 연구에서 사용된 유전체 교정기술은 아직까지 미증유의 영역인 극지미생물의 유전자 교정 분야에서 세계적인 선도가 가능하기 때문에 이에 대한 육성을 통해 관련 분야의 기여할 수 있으며 이에 대해 이 연구에서 확보된 정보와 tool들이 활용될 수 있을 것임.
- *P. xylanexedens*는 아직까지 CRISPR/Cas9는 물론 recombinant DNA technology를 위한 시도가 거의 없어서 이에 대한 정보와 tool이 전무한 상태임. 그러므로 이 극지 미생물을 산업적으로 이용하고자 한다면 이 연구에서 개발된 tool과 정보를 참고할 수밖에 없음. 이 연구에서 사용된 CRISPR/Cas9 system을 이용하여 추가적으로 engineered된 *P. xylanexedens*를 개발하는 것이 산업적으로 가능할 것임. 이러한 연구는 국가적으로 육성되고 있는 바이오파운드리 연구에서 극지미생물의 개발에도 응용될 수 있을 것임.
- 이 연구에서 사용된 *P. xylanexedens* 유전체는 공개되었기 때문에 여기에 있는 유전체를 사용가능할 것이고 이는 난배양성 물질 이용을 위한 연구에서 해당 유전자를 이용하여 효소를 분석하는 연구에 추가적으로 사용될 수 있을 것임.
- 이 연구에서 사용된 유전체 교정기술은 아직까지 미증유의 영역인 극지미생물의 유전자 교정 분야에서 세계적인 선도가 가능하기 때문에 이에 대한 육성을 통해 관련 분야의 기여할 수 있으며 이에 대해 이 연구에서 확보된 정보와 tool들이 활용될 수 있을 것임.

## 2. 연구개발성과의 관리 및 활용 계획

- 북극 관측거점 유래의 환경유전체 라이브러리의 제작과 지속적인 관리를 통하여 국내 생명공학 연구자에게 생명자원의 확장성과 활용성을 제공할 계획임.
- 저온에서 생촉매 활성이 요구되는 정밀화학, 의약품 생산 등의 산업분야에서 활용성이 매우 높을 것으로 사료되며, 지식재산권 확보를 통하여 생명공학 산업의 경쟁력을 강화.
- 생분해방식을 이용한 후속 생물전환공정 기술 개발은 기존의 화학공정을 대체할 수 있으므로, 국내 효소 및 글로벌 산업계의 지속가능한 발전을 촉진할 것으로 기대되므로, 산업재산권 출원 및 기술이전을 통하여 본 연구결과의 상용화를 추진
- 극지생명체에서 유용효소 및 친환경 효소 생물공정의 개발은 앞으로 다양한 효소의 학술연구 및 산업적 이용을 촉진하여 고부가가치 창출할 수 있으며, 국내의 극지연구에 새로운 패러다임을 제시하고 새로운 성장 동력을 부여할 것으로 기대
- 본 연구는 바이오파운드리, 화이트바이오 사업과 같은 대형과제를 통해 유전자교정 기반 연구의 난분해성 물질 분해 이용 및 value-added 기능성물질 생산을 위한 다양한 극지미생물로 확장 연구 과제를 도출할 수 있을 것으로 판단됨.



제 5 장  
연구개발 결과의 활용방안 및 계획





## 1. 연구개발 결과의 활용방안

- 확보된 유전체 라이브러리를 이용하여 신규 생리활성 물질 탐색 및 개발에 활용
- 국내 생명공학 기술 개발과 극지 생물자원 소재 개발에 활용
- 환북극권 동토 유래의 환경 미생물 다양성에 기반한 유전체 생명자원을 활용한 공동연구
- 활용가능한 유전체 정보와 유전자원을 국내 연구기관에 제공
- 환북극권 환경 특이적인 미생물의 생리기작을 이용한 국내 생명공학 기술의 소재로서 활용
- 연구소 자체 기술개발을 통하여 기술보호 장벽의 극복과 국내 생물소재산업의 기술자립화 달성
- 한국형 효소 소재와 기술 개발에 의한 해외시장 진출
- 식품, 화장품, 의약, 에너지 등의 다양한 산업에서 생촉매 소재로서 활용
- 생물학적 환경정화 기술 개발을 위한 핵심소재로서 활용
- 특허출원 전략으로 지식재산권 확보하고 기술이전 사업화
- 이 연구에서 제작된 *P. xylanexedens*의 유전체 교정용 플라스미드는 및 관련 기술은 특허출원할 예정이며, 극지연구소와 정보 및 기술에 대한 사항을 공유할 예정임.
- 이 연구는 바이오파운드리, 화이트바이오 사업과 같은 대형과제를 통해 유전자교정 기반 연구의 난분해성 물질 분해 이용 및 value-added 기능성물질 생산을 위한 다양한 극지미생물로 확장 연구 과제를 도출할 수 있을 것으로 판단됨.
- 미세플라스틱의 생분해에 관한 신규 학술자료의 수집과 축적, 그리고 지적재산권의 확보를 통하여, 환경오염의 원인을 제거하고 친환경적인 산업기반 조성
- 생분해에 관한 효소에 대한 연구성과를 통하여 이를 활용하는 BT, IT, NT를 활용한 융합기술의 발전을 도모하고 관련 분야의 연구의 중심그룹으로 성장
- 생분해방식을 이용한 후속 생물전환공정 기술 개발은 기존의 화학공정을 대체할 수 있으므로, 국내 효소 및 글로벌 산업계의 지속가능한 발전을 촉진할 것으로 기대되므로, 산업재산권 출원 및 기술이전을 통하여 본 연구결과의 상용화를 추진
- 극지생명체에서 유용효소 및 친환경 효소 생물공정의 개발은 앞으로 다양한 효소의 학술연구 및 산업적 이용을 촉진하여 고부가가치 창출할 수 있으며, 국내의 극지연구에 새로운 패러다임을 제시하고 새로운 성장동력을 부여할 것으로 기대.

## 2. 연구개발 결과의 기대효과

구분	기대 효과
기술적 측면	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 환북극 동토 환경 미생물 생명자원을 활용하여 국내 생명공학 소재 개발에 대한 국가 경쟁력을 제고</li> <li>○ 효소의 생촉매 활성 탐색에 대한 기술력 진보</li> <li>○ 환경복원에 필요한 생물정화 핵심기술을 개발하여 환경산업에 적용</li> <li>○ 극한 환경 유래의 다양한 효소에 대한 유전자 데이터 대량 확보</li> </ul>
경제적 산업적 측면	<ul style="list-style-type: none"> <li>○ 바이오산업에 유용한 저온 활성 단백질과 유용물질 개발을 통하여 시너지 효과 창출</li> <li>○ 생명공학 분야에서 국가 경쟁력을 향상시킴</li> <li>○ 신규 생명자원 개발과 바이오산업의 기반자원 제공함</li> </ul>



## 주 의

1. 이 보고서는 과학기술정보통신부에서 시행한 해양극지기초원천기술개발사업 “북극권 육상-대기 환경변화 예측 및 대응 기술개발” 총괄과제의 “환북극권 동토 환경 미생물로부터 난분해 유기 물질 분해 효소 개발” 세부과제의 단계보고서이다.
2. 이 연구개발내용을 대외적으로 발표할 때에는 반드시 과학기술정보통신부(한국연구재단)에서 시행한 해양극지기초원천기술개발사업의 결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 안 됩니다.