연구보고서(연차)
NIE-A-2024-11

2024년 신기술 LMO의 위해성 평가 기술 및 가이드라인 개발

Establishment of risk assessment and guideline for LMOs developed through new technologies

NATIONAL
INSTITUTE OF ECOLOGY

연구진

연구책임자	이준우	LMO팀	전임연구원(연구책임자)
연구참여자(내부)	천성준	LMO팀	전임연구원(연구부책임자)
	설민아	LMO팀	연구원(실무자)
	이중로	LMO팀	책임연구원
	최원균	LMO팀	선임연구원
	남경희	LMO팀	선임연구원
	정영준	LMO팀	전임연구원
	이은선	LMO팀	전임연구원
	임혜송	LMO팀	연구원
	윤아미	LMO팀	연구원
	김지훈	LMO팀	연구원
	노동현	LMO팀	연구원

본 연구진은 연구윤리를 준수하였음을 서약합니다.

<목 차>

요약문(Abstract) ····· **1**

Ⅰ. 서론 ····· **3**

1. 유전자변형생물체의 기술 혁신과 안전성 ····· 3
2. 유전자변형미세조류의 활용변화와 전망 ····· 7
3. 환경부 소관 신기술 유전자변형생물체의 규제 ····· 8

Ⅱ. 연구내용 및 방법 ····· **11**

1. 신기술 LMO 사전검토제 대응 환경부 소관 평가 항목 발굴 ····· 11
2. 환경부 위해성평가용 신기술 LMO(식물, 미생물, 미세조류) 개발 ···· 11
   가. 유전자가위 이용 환경정화용 LM 미세조류 형질전환 시스템 구축 ··· 11
   나. 환경정화용 신기술 LM 식물 형질전환 및 우성형질 선별 ····· 12
      1) 야외 목본의 기내 도입 ····· 12
      2) 목본 순화 처리 및 식재 ····· 13
      3) 아그로박테리움 방법 이용 신기술 LM 목본 형질전환 ····· 13
      4) 가이드 RNA 서열 특이적 프라이머 이용 표적 돌연변이 부위 확인 ····· 14
   다. 환경부 소관 LM 미생물 형질전환 및 우성형질 선별 ····· 15
      1) *Pseudomonas putida* 선정 ····· 16
      3) *Pseudomonas putida* 배양조건 ····· 17
      4) *Pseudomonas putida* 형질전환 ····· 18
      5) *Pseudomonas putida* 우성형질 선별 ····· 19
   라. 개선된 온실·한실 환경 내 신기술 LMO 생장 분석 ····· 20
3. 환경부 소관 신기술 LMO 위해성심사 지침(안) 개발 ····· 20
4. 환경정화용 신기술 LM미세조류 위해성평가용 모의생태계 환경 개발 ·· 21
5. 환경부 소관 생산공정이용시설 관련 LMO법 통합고시 개정 추진 ·· 22

Ⅲ. 연구 결과 ····· 23
1. 신기술 LMO 사전검토제 대응 환경부 소관 평가 항목 발굴 ····· 23
가. 신기술 LMO 기술유형별 안전성 분석 ····· 23
나. 국가별 유전자가위 적용 LMO의 환경위해성평가 항목 분석 ···· 27
다. 미국, 유럽연합, 일본의 유전자 편집 기술 규제 항목 비교 및 시사점 ··· 32
라. 유전자변형생물체법(LMO법) 개정 대비 환경부 소관 평가 항목 · 35
2. 환경부 위해성평가용 신기술 LMO(식물, 미생물, 미세조류) 개발 ···· 37
가. 유전자가위 이용 환경정화용 LM 미세조류 형질전환 시스템 구축 ··· 37
나. 신기술 LM 식물 형질전환 및 우성형질 선별 ····· 39
1) 야외 목본의 기내 도입 착수 ····· 39
2) 목본 순화 과정 ····· 44
3) 아그로박테리움 방법 이용 신기술 LM 목본 형질전환 ····· 45
4) 가이드 RNA 서열 특이적 프라이머 이용 표적 돌연변이 부위 확인 ····· 48
다. 환경부 소관 LM 미생물 형질전환 및 우성형질 선별 ····· 49
1) 환경부 소관 LM 미생물(*Pseudomonas putida*) 형질전환 ····· 49
2) 제한효소 서열 이용 도입유전자 삽입 부위 검증 ····· 52
라. 개선된 온실·한실 환경 내 신기술 LMO 생장 분석 ····· 54
3. 환경부 소관 신기술 LMO 위해성심사 지침(안) 개발 ····· 55
가. 환경정화용(환경부 소관) LM 미세조류 상업화 대비 위해성심사 지침(안) 개발 ····· 56
나. LMO법 통합고시 별표 10-1 LMO 위해성심사 사례 및 자료 분석 ··· 69
4. 환경정화용 신기술 LM 미세조류 위해성평가용 모의생태계 환경 개발 ·· 71
가. 국내 담수 환경 데이터 분석으로 수생태계 모의 환경 조성 ····· 71
나. 담수생태계 위해성평가 지표 발굴 ····· 75
5. 환경부 소관 생산공정이용시설 관련 LMO법 통합고시 개정 추진 ·· 79
가. 환경정화용 LM 미세조류 상업화 예정 생산공정이용시설 설치·운영·점검·사후관리 분석 ····· 79
나. 환경부 소관 생산공정이용시설 관련 LMO법 통합고시 개정(안) 마련 ····· 83

Ⅳ. 고찰 및 제언 ····· 87

참고문헌 ····· 90

부 록 ····· 98

<표 목차>

표 1. 유전공학 식물 기반 산업 생산성 ····· 4
표 2. 신기술 LM 포플러 우성형질 검증용 프라이머 정보 ····· 15
표 3. 유전자변형미생물의 산업활용 분야 ····· 15
표 4. *Pseudomonas putida* 배양조건 ····· 17
표 5. 신기술 별 외래유전자 잔존 여부 비교 ····· 25
표 6. 기존 및 최신 유전자가위 기술의 비교 ····· 26
표 7. 미국, 일본, 유럽연합의 신기술 LMO 규제 완화 기준 ····· 30
표 8. 국가별 바이오신기술 종루에 따른 규제 완화 비교 ····· 31
표 9. 미국, 유럽연합, 일본의 신기술 LMO 안전관리 체계 비교 ····· 34
표 10. LM미생물 도입유전자 삽입 부위 검증 방법 ····· 53
표 11. 유전자변형미세조류의 위해성평가·심사 가이드(안) ····· 57
표 12. 개발사의 유전자변형미생물 위해성평가 방법 비교 ····· 70
표 13. 「물환경보전법」에 따른 호소 정기조사 ····· 72
표 14. 대상 수생태계의 이화학적 분석 ····· 74
표 15. '생산공정이용시설의 안전관리등급의 분류 및 허가 또는 신고 대상' ····· 82
표 16. 환경부 생산공정이용시설 관련 LMO법 통합고시 개정(안) 일부 발췌 ····· 83

<그림 목차>

그림 1. 시대별 유전자변형생물체 산업의 기술 및 응용 ····· 3
그림 2. 미국, 유럽연합, 일본의 LMO 규제 기관 및 역할 ····· 6
그림 3. 유전자변형미세조류 산업의 시대별 변화 ····· 8
그림 4. '2024년 신기술 LMO의 위해성평가 기술 및 가이드라인 개발' ····· 10
그림 5. Phytozome 데이터베이스 ····· 11
그림 6. *Pseudomonas putida* 배양 ····· 17
그림 7. 환경정화용 LM미세조류 환경방출 대비 수생태계 위해성평가 지역 ····· 22
그림 8. GOX1의 대사 (출처: Simkin et al., 2019) ····· 38
그림 9. 유전자가위 LM미세조류 형질전환체 확보 ····· 38
그림 10. 대량증식용 야생형 포플러 기내 도입 2주 경과 ····· 39
그림 11. 대량증식용 야생형 포플러 기내 도입 3주 경과 ····· 40
그림 12. 대량증식용 야생형 포플러 기내 도입 5주 경과 ····· 40
그림 13. 대량증식용 포플러의 기내 도입 소독 및 plant culture dish내 배지로 이식. ····· 42
그림 14. Plant culture dish 내 생육. ····· 43
그림 15. 온실 포플러 순화 과정 (A) 포플러 잎 제거 (B) 포플러 새순 형성 ····· 44
그림 16. 포플러의 삽목 과정 ····· 45
그림 17. 신기술 LM포플러 형질전환 ····· 46
그림 18. 신기술 LM포플러 형질전환 후 Callus 유도 ····· 46
그림 19. 신기술 LM포플러 Callus 유도 완료 ····· 47
그림 20. 신기술 LM포플러 발근 유도 ····· 47
그림 21. 신기술 LM포플러 돌연변이 부위 확인 ····· 48
그림 22. 표적유전자 정제 ····· 50
그림 23. *P.putida* 형질전환체 확보 ····· 50
그림 24. 형질전환체 검증용 Colony PCR 결과 ····· 51
그림 25. 형질전환체 도입유전자 증폭 및 염기서열 분석 완료 ····· 51
그림 26. LMO 온실이용 신기술 LM콩 종자 대량 확보 ····· 54
그림 27. LM미세조류 위해성심사 및 평가를 위한 개발사-관계부처 논의 ····· 55
그림 28. 환경정화용 LM미세조류 위해성심사·평가 가이드라인(안) ····· 56

그림 29. 「물환경보전법」 발췌 ····· 71
그림 30. 「물환경보전법」 정기조사 대상 호소 및 하천 ····· 72
그림 31. 금강 담수환경 데이터 분석을 위한 대상 지역 ····· 73
그림 32. 농림축산식품부의 '농어촌 알리미' 수질정보 데이터 ····· 73
그림 33. 대상 수생태계의 동물플랑크톤 형태 분석 ····· 75
그림 34. 대상 수생태계 LM미세조류 접종 후 위해성평가 ····· 77
그림 35. 수계와 계절에 따른 미생물 군집 비교. (a) 시기와 지역에 따른 속 단위 미생물의 군집 구성 비교, (b) ASV 수준에서 NMDS 분석을 통해 나타낸 시료간 유사도. ····· 78
그림 36. 환경정화용 신기술 LM 미세조류 생산공정이용시설 활용 예시 ····· 79
그림 37. 한국바이오안전성정보센터-환경부 통합고시 개정(안) 검토 및 자문 ····· 85
그림 38. 환경부 LMO법 통합고시 개정(안) 전문 ····· 86
그림 39. 환경부 LMO법 통합고시 개정(안) 신구대조문 ····· 86

요약문

본 과제는 유전자변형생물체(Living Modified Organisms, LMOs) 중 신기술 LMO의 위해성평가 및 안전관리 체계를 마련하기 위해 수행했다. 과제는 1) 신기술 LMO의 환경부 소관 평가 항목을 발굴 2) 환경부 소관 신기술 LMO 위해성평가용 모델 시스템 구축 3) 신기술 LM 미세조류의 환경방출에 대한 생물다양성 위해성평가 지표 발굴 4) 환경부 소관 신기술 LMO 위해성평가·심사 지침(안) 및 LMO법 통합고시 개정(안) 개발로 구성되어 수행되었다.

신기술 LMO의 안전성 평가를 위해 각 신기술 유형의 특성을 기반으로 안전성을 분석하고 미국, 유럽연합, 일본의 규제 사례를 참조하여 환경부 소관 위해성 평가 항목을 제안하였다. 국내외 수입 및 개발 대비 신기술 LMO 위해성평가용 모델 시스템을 구축하기 위해 LM 목본, 미생물, 미세조류 형질전환 및 우성형질 선별 시스템을 구축하였고 각각 1개체의 LMO를 확보하였다. 환경부 소관 신기술 LMO의 환경방출 대비 국내 실정에 맞는 위해성 평가 항목을 개발하기 위해 국내 담수 생태계를 기반으로 LM 미세조류를 접종하고 해당 생태계의 생존성과 증식 가능성을 평가하였다. 그리고 환경 유전자를 확보하여 국내 수생태계의 생물다양성 기초자료를 확보하였다. 마지막으로 신기술 LMO의 위해성 평가 및 심사를 거쳐 이용 승인을 받고자 하는 개발자들의 진입 장벽을 낮추고 환경부 신기술 LMO 안전관리 체계를 마련하기 위해, 신기술 LMO의 위해성평가·심사 가이드라인(안)을 개발했고 환경부 생산공정 이용시설 관련 LMO법 통합고시 개정(안)을 마련하였다.

본 과제는 신기술 LMO의 생태계 안전성 확보를 위한 과학적 근거를 제시하며, 신기술 LMO 안전관리에 기여하고자 수행되었다. 이를 통해 생명공학 기술 발전을 대비하는 환경부 신기술 LMO 안전관리 체계 달성에 중요한 기반 자료를 제공하는데 기여하고자 한다.

핵심어: 신기술 LMO, 생산공정이용시설, 위해성평가, 유전자가위, 미세조류, 담수 생태계

Abstract

This project was conducted to establish a risk assessment and risk management system for new technology LMOs among living modified organisms (LMOs). The project consisted of 1) discovering evaluation items for new technology LMOs of the Ministry of Environment, 2) establishing a model system for risk assessment of new technology LMOs of the Ministry of Environment, 3) discovering biodiversity risk assessment indicators for the environmental release of new technology LM microalgae, and 4) establishing draft guidelines for risk assessment and review of new technology LMOs and draft revision of the integrated notice of the LMO Act related to production process utilization facilities under the Ministry of Environment. In order to ensure the safety management of new technology LMOs, we analyzed safety related to the characteristics of each new technology type and proposed risk assessment categories for the Ministry of Environment by referring to regulatory cases in the United States, the European Union, and Japan. In order to respond to domestic and international imports and developments, a model system for risk assessment of new technology LMOs was established, and one LMO was secured for each organisms. We inoculated LM microalgae based on domestic freshwater ecosystems and evaluated the viability and proliferation potential of the corresponding ecosystems to develop risk assessment categories suitable for domestic conditions. Finally, to lower the barriers for developers seeking approval for the use of their LMOs by undergoing risk assessment and review, a guideline (draft) for risk assessment and review was developed, and a revised integrated notice (draft) for the Ministry of Environment's production process utilization facility-related LMO Act was prepared. This project was conducted to develop guidelines for risk assessment of new technology LMOs and to enhance safety management of new technology LMOs. Through this, the goal was to contribute to providing important basic data for establishing the Ministry of Environment's LMO safety management system in preparation for the development of biotechnology.

Keywords: Advanced Technology LMO, Production Process Facility, Risk Assessment, Gene Editing Technology, Microalgae, Freshwater Ecosystem

Ⅰ. 서론

1. 유전자변형생물체의 기술 혁신과 안전성

유전자변형생물체(Living Modified Organisms, LMOs) 기술은 현대 생명과학의 중요한 발전 중 하나로, 지난 수십 년 동안 급속히 발전해왔다. 20세기 후반에 이 기술은 주로 농업 생산성 향상과 병충해 저항성 증대에 초점을 맞춰 시작되었고, 당시 유전자변형 작물은 곡물 수확량을 크게 증가시키며 기아 문제 해결에 기여했을 뿐만 아니라 농업의 경제적 부담을 줄이는 데 중요한 역할을 했다. 그러나 기술은 여기서 멈추지 않고, 의약품 생산, 희귀 질환 치료, 기능성 식품 개발 등 더 넓은 영역으로 확장되었다. 이러한 과정에서 혁신적인 유전자 편집 기술인 CRISPR-Cas9(Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats and CRISPR-associated protein 9)이 등장하면서, 특정 유전자를 제거하거나 교체하는 작업이 더욱 정밀하고 효율적으로 수행될 수 있게 되었다(Lee et al., 2018, Klümper, W., & Qaim, M., 2014, Li et al., 2023). 이 기술은 고전적인 유전자 변형 방법보다 더 빠르게 원하는 결과를 설계할 수 있게 함으로써 생명공학 연구의 패러다임을 재정립하며, 의학, 농업, 생태 보전 및 환경 문제 해결에 이르는 다양한 분야에서 혁신적 가능성을 제시하고 있다(그림 1).

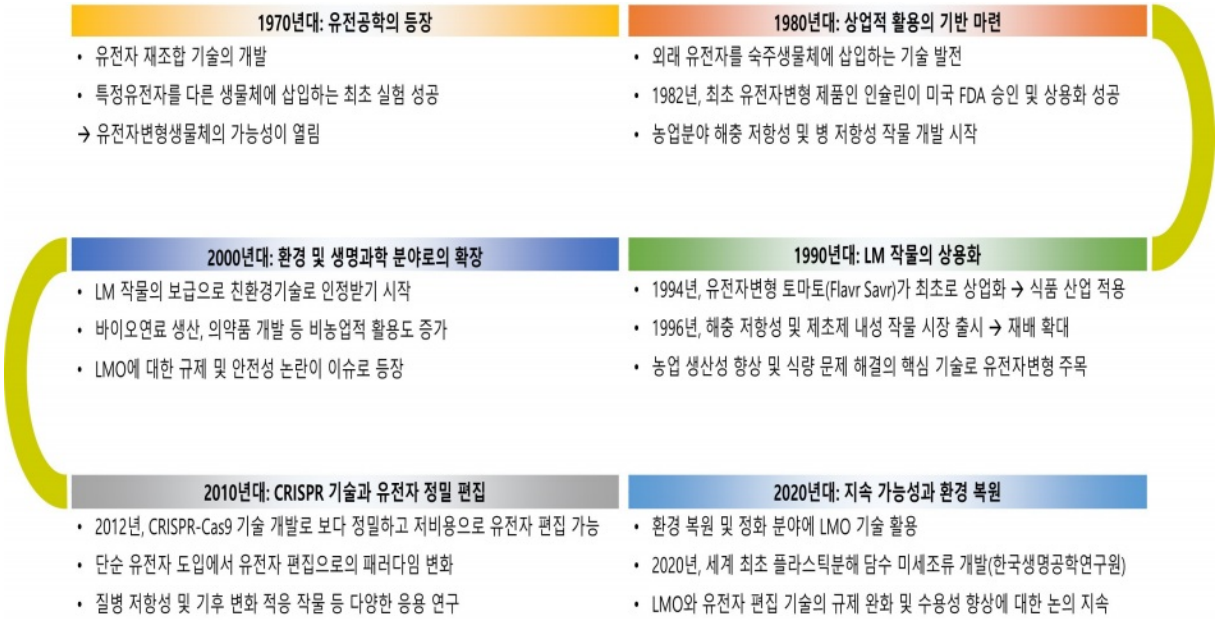


그림 1. 시대별 유전자변형생물체 산업의 기술 및 응용

유전자변형생물체 기술은 기존의 단순한 응용을 넘어, 혁신적인 생명공학적 접근법을 통해 산업 전반에 걸쳐 변화를 일으키고 있다. 예를 들어, 유전자 변형 효모는 고부가가치 의약품 생산에서 단백질 합성 속도와 정확도를 혁신적으로 개선하며, 기존의 생산 공정을 대체하고 있으며 특히, 효모 기반의 백신과 항체 생산은 전통적인 방법보다 빠르고 대규모로 생산이 가능해, 감염병 대응에 획기적인 전환점을 마련하고 있다(Wang, G., Huang, M., & Nielsen, J., 2017.). 또한, 유전자변형 식물은 세포공장으로 설계되어 특정 치료제나 산업용 화합물을 효율적으로 생산할 수 있다. 이러한 식물 기반 생산은 전통적인 생물 반응기보다 자원 소모가 적고 친환경적이라는 장점을 부각시킨다(Eidenberger, L., Kogelmann, B., & Steinkellner, H., 2023.)(표 1). 더욱이, 유전자변형 박테리아는 대사 경로를 혁신적으로 조작하여 바이오연료뿐만 아니라 지속 가능한 바이오플라스틱을 생산하며, 산업 생산 과정의 환경적 영향을 최소화하고 있다(Miao et al., 2021). 이러한 기술적 혁신은 단순한 문제 해결에 그치지 않고, 자원 효율성 증대와 환경 지속 가능성 확보를 통해 미래 생명공학의 발전을 주도할 청사진을 제시하고 있다.

표 1. 유전공학 식물 기반 산업 생산성

산업	대상물질	발현 시스템	생산량 (kg/년)	참고문헌
의약품	BChE	식물세포	25	Corbin et al., 2020
의약품	Griffithsin	일시적 발현	20	Alam et al., 2018
의약품	단일클론 항체	일시적 발현	300	Nandi et al., 2016
의약품	hLF	식물 종자	600	Nandi et al., 2005
의약품	BChE	일시적 발현	25	Tuse et al., 2014
바이오연료	셀룰레이즈		$3x10^6$	
식품 위생	항균 단백질	식물체	500	McNulty et al., 2022
실험용 시약	HRP	일시적 발현	5	Walwyn et al., 2015

이러한 기술적 혁신에도 불구하고 가장 중요한 것은 유전자변형생물체의 잠재적 위험성을 사전에 규명하는 것이다. 상업적 이용과 환경 방출 전에 철저한 안전성 평가를 통해 생태계와 인체 건강에 미칠 영향을 체계적으로 분석하는 과정은 필수적이며, 유전자변형생물체가 생태계에 미치는 영향과

인체 건강에 대한 잠재적 위험을 분석하는 것은 안전성 평가의 핵심이 된다. 유전자 변형이 예상치 못한 생태적 변화를 초래하거나 특정 생물군이 생태적 우위를 점할 가능성은 여전히 과학적 논의의 중심에 있으며, 유전자변형 생물체가 자연 생태계에서 유전자를 전이시켜 야생종이나 토착 생물에 부정적인 영향을 미칠 가능성도 검토되어야 한다. 인체 건강에 대한 영향 역시 알레르기 반응 유발 가능성이나 독성 물질 생성 여부를 철저히 평가해야 한다. 이러한 이유로 유전자변형생물체는 상업화 이전에 다단계의 생물학적 및 생태학적 시험을 거쳐야 하며, 장기적인 환경적 영향을 지속적으로 모니터링하는 것이 중요하다. 그에 따라, 현재 연구자들은 보다 정교한 분석 기법을 활용하여 불확실성을 줄이고, 안전성을 확보하기 위해 다양한 모델을 적용하고 있다.

주요 국가들은 유전자변형생물체의 안전성을 관리하기 위해 포괄적이고 엄격한 규제 체계를 운영하고 있고 그 예시로, 환경보호청(Environmental Protection Agency, EPA), 식품의약국(Food and Drug Administration, FDA), 농무부(United States Department of Agriculture, USDA) 등 여러 연방 기관이 협력하여 유전자변형생물체의 환경적 및 건강적 영향을 분석하고 관리한다. 대표적으로, '연방 식품·의약품·화장품법(Federal Food, Drug, and Cosmetic Act)'과 '연방 살충제, 살균제, 살서제법(Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act)' 외에도, 연방 규정집(Code of Federal Regulations, CFR)에서 관련 법률과 규정이 명시되어 있다. CFR은 유전자변형생물체와 관련된 세부 규제와 절차를 구체적으로 규정하며, 각 기관은 이를 기반으로 안전성 평가를 수행하고 필요 시 상업적 사용을 제한하거나 조건부 승인을 부여한다. 유럽연합(European Union, EU)은 '유전자변형생물체 규정(Regulation (EC) No 1829/2003)'과 '환경적 위험 평가 지침(Directive 2001/18/EC)'을 기반으로 엄격한 규제를 운영한다. 2024년에는 유전자 가위 기술에 대한 규제 완화안을 발표하며, 기후 변화 대응과 지속 가능성 증대를 위해 새로운 유전자 교정 작물을 허용하는 방향으로 나아가는 과도기 상태에 있다. 여전히 환경적·윤리적 우려가 존재하며, 유럽 각국의 과학적 검토와 시민의 의견을 반영해 신중하게 결정된다. 일본은 '카르타헤나 법(Cartagena Act)'을 통해 유전자변형생물체의 환경과 생태계에 미칠 영향을 평가하며, 후생노동성, 농림수산성, 환경성 등 여러 정부 기관이 협력하여 유전자변형생물체의 수입, 실험, 상업화 등을 심사한다 (그림 2). 2019년에는 유전자 교정 작물에 대해 외래 유전자가 남아있지

않을 경우 규제 대상에서 제외하는 완화 정책을 도입했으며, 이를 통해 최초의 유전자 교정 토마토가 상업화되었다. 이와 같은 변화는 유전자 가위 기술의 잠재적 이점을 반영한 것이지만, 안전성과 윤리성에 대한 논의는 여전히 진행 중이며, 글로벌 협력과 과학적 데이터 공유는 이러한 규제 체계가 일관되게 적용될 수 있도록 돕는 핵심적인 요소이다.

그림 2. 미국, 유럽연합, 일본의 LMO 규제 기관 및 역할

유전자변형생물체 기술의 혁신과 안전성 관리 간의 조화를 이루는 것은 필수적이다. 기술이 계속 발전하는 만큼, 균형을 유지하기 위해서는 과학적 근거에 기반한 신중한 규제와 투명한 정보 공개가 필요하다. 연구자들은 유전자변형생물체의 긍정적인 효과와 잠재적 위험을 모두 고려하며, 공정한 데이터 제공과 대중과의 소통을 통해 사회적 신뢰를 쌓아야 한다. 국제적 협력 역시 매우 중요하다. 각국이 독립적으로 규제를 시행할 뿐만 아니라, 글로벌 기준을 설정하고 협력함으로써 안전성을 강화할 필요가 있다. 이를 통해 기술 발전이 사회적 수용성과 생태적 안전성을 동시에 충족할 수 있을 것이다. 궁극적으로, 유전자변형 기술이 인류와 환경에 혜택을 제공하면서도 책임 있게 활용될 수 있도록, 이해관계자들의 협력이 필수적이다. 미래 생명공학의 발전을 위해서는 이러한 접근이 반드시 요구된다.

2. 유전자변형미세조류의 활용변화와 전망

유전자변형미세조류는 초기 단계에서 바이오디젤 생산을 위한 대체 에너지원으로 크게 주목받았으며, 높은 지질 함량과 빠른 성장 속도로 인해 석유 기반 연료를 대체할 수 있는 잠재력을 가지고 있었다. 이를 통해 이산화탄소 배출을 줄이는 환경적 이점도 제공할 수 있었음에 따라 연구자 및 개발자들은 미세조류 기반 바이오디젤 기술의 상업적 가능성을 탐색하기 위해 대규모 연구 프로젝트를 진행하고 있다. ExxonMobil은 캘리포니아에 위치한 Synthetic Genomics와 협력하여 *Nannochloropsis* 종의 유전자를 변형해 지질 합성을 40% 이상 증가시키는 데 성공했다(Ajjawi et al., 2017). 이러한 연구들은 미세조류 기반 바이오디젤의 상용화 가능성을 제시했지만, 여전히 높은 생산 비용과 기술적 장벽이 상업화의 주요 과제로 남아 있다.

유전자변형미세조류의 응용은 단순한 바이오디젤 생산을 넘어 고부가가치 화합물 생산으로 빠르게 확대되고 있다. 미세조류 화합물에는 오메가-3 지방산, 항산화제, 기능성 단백질 등이 포함되며, 이러한 물질들은 건강 보조제, 의약품, 화장품 산업에서 큰 수요를 보이고 있다. 이러한 고부가가치 산물의 생산은 단순한 연료 공급을 넘어 다양한 산업에서 경제적 이익을 창출하고 있으며, 미세조류 기술의 응용 범위를 넓히고 있다.

최근 유전자변형미세조류는 탄소중립 목표 달성을 위한 주요 기술로 부상하고 있다. 탄소중립은 배출된 이산화탄소의 양을 흡수량과 맞추어 실질적인 '제로(0)' 상태를 만드는 것을 의미하며, 이는 기후 변화에 대응하기 위한 국제적 목표다(IPCC, 2021). 유럽연합(EU)은 2050년까지 탄소중립을 달성하기 위해 '유럽 그린 딜(European Green Deal)'을 발표하고, 미세조류 기반 탄소 포집 및 활용(Carbon Capture and Utilization, CCU) 기술에 많은 투자를 하고 있다.

탄소 포집 미세조류 산업은 글로벌 에너지 전환과 환경 보호에 중요한 역할을 하고 있다. 그러나 여전히 미세조류 산업은 해결해야 할 도전 과제를 안고 있다. 미세조류 배양에 필요한 에너지 소비를 줄이기 위한 혁신적 기술 개발, 대규모 시설의 경제적 타당성 확보, 그리고 지속 가능한 배양 방법이 요구된다. 더 나아가, 미세조류 산업의 도전 과제보다 선행되어야 할 것은 유전자변형미세조류가 인간과 환경에 위해성이 없다는 것을 연구자 및 개발사들은 증명해야 할 것이며, 국가는 유전자변형미세조류에 대한 위해성심사 및 평가를 포함한 안전관리 체계가 필요하다.

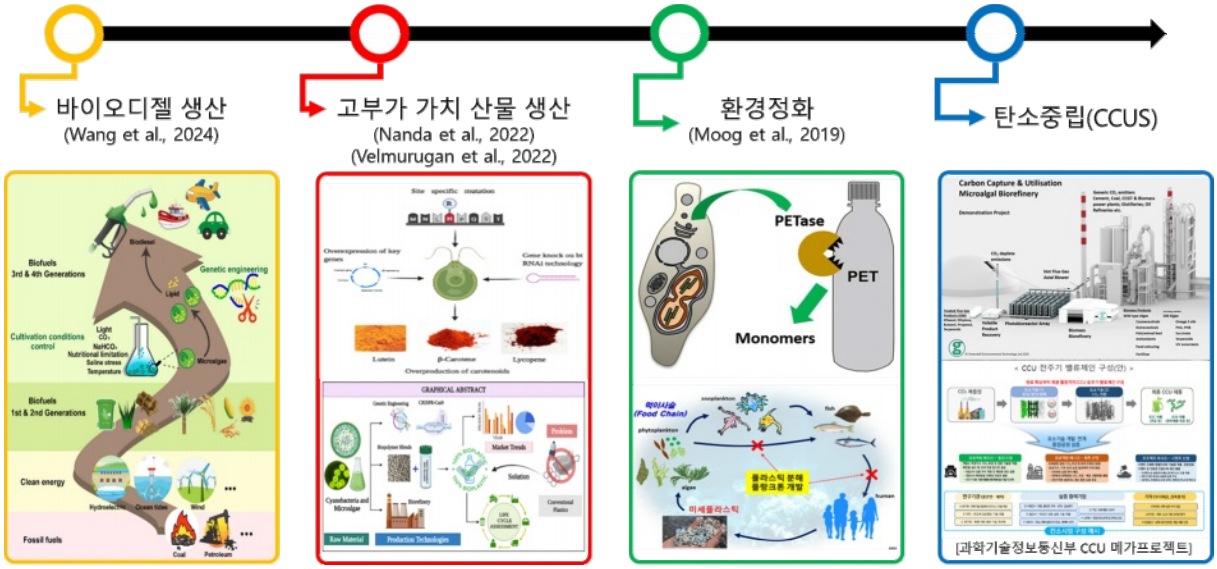


그림 3. 유전자변형미세조류 산업의 시대별 변화

3. 환경부 소관 신기술 유전자변형생물체의 규제

유전자변형생물체(Living Modified Organisms, LMOs)는 생태계와 인체 건강에 미치는 잠재적 영향을 고려하여 엄격한 규제를 받고 있다. 유엔 생물다양성협약(CBD) 산하의 '카르타헤나 생명안전 의정서'는 유전자변형 생물체의 환경적 영향 평가를 위한 국제적 규제 틀을 제공한다. 이 의정서는 유전자변형생물체의 국경 간 이동을 규제하며, 사전 인지 동의(Advanced Informed Agreement, AIA) 절차를 통해 수입국이 환경 및 생물다양성에 미칠 영향을 평가할 수 있도록 한다(CBD, 2000). 이 원칙은 각국의 규제 시스템에 기반이 되어, 환경정화 목적으로 개발된 유전자변형생물체도 엄격한 검토를 거쳐야 한다.

미국은 유전자변형생물체의 환경 방출을 철저히 규제하기 위해 여러 연방 기관이 협력한다. 환경보호청(Environmental Protection Agency, EPA)은 유전자변형생물체가 생태계에 미칠 잠재적 위험을 평가하고, 승인 절차를 통해 특정 실험적 방출이나 상업적 사용을 관리한다. 미국 식품의약국(Food and Drug Administration, FDA)과 농무부(United States Department of Agriculture, USDA)도 각각 인체 건강 및 농업 생태계에 미칠 영향을 평가하며, 협력하여 종합적인 규제 체계를 운영하고 있다.

유럽연합(EU)은 환경 방출용 유전자변형생물체에 대해 세계에서 가장 엄격한 규제를 적용한다. '유전자변형생물체 지침(Directive 2001/18/EC)'과 '규정(Regulation (EC) No 1829/2003)'에 따라, 환경 방출 전에 광범위한

위험 평가가 필요하다. 유럽식품안전청(European Food Safety Authority, EFSA)은 생태계에 미칠 장기적인 영향을 분석하며, 유전자변형생물체의 환경 방출이 승인되기 위해서는 독립적인 과학적 검토를 통과해야 한다. 예를 들어, 유전자 변형 미세조류를 이용해 오염된 수역을 정화할 경우, 오염 물질의 분해 속도와 생태적 영향, 그리고 유전적 확산 가능성이 모두 평가된다. 이 외에도, EU는 예방 원칙에 따라 환경과 인체 건강에 잠재적 위험이 있는 경우 상업적 사용을 제한할 수 있다.

아시아에서도 환경정화용 유전자변형생물체에 대한 규제는 점점 더 강화되고 있다. 일본은 '카르타헤나법(Cartagena Act)'을 통해 유전자변형생물체의 수입, 실험, 환경 방출을 엄격히 규제하며, 후생노동성, 농림수산성, 환경성 등이 협력하여 유전자변형생물체가 생태계에 미치는 영향과 유전적 안정성을 평가한다. 최근, 일본은 유전자변형 미세조류를 이용한 해양 정화 프로젝트를 검토했으며, 이에 대한 환경 안전성 평가가 철저히 이루어졌다. 중국은 생물안전법을 통해 유전자변형생물체의 관리 및 환경 방출 규제를 시행하고 있으며, 특히 환경 오염 정화 목적으로 개발된 생물체에 대해 상업적 이용을 엄격히 제한하고 있다. 중국 농업부와 생태환경부는 합동으로 생태계에 미칠 영향을 분석하고, 실증 연구를 통한 안전성 검증을 요구한다.

유전자변형생물체 기술은 농업, 의약, 에너지 생산, 그리고 환경 정화에 이르기까지 현대 생명공학의 핵심 분야로 자리 잡고 있으며, 급격한 기술 혁신을 통해 다양한 산업에 변화를 가져오고 있다. 특히, 유전자변형미세조류는 탄소중립 목표 실현과 오염 정화에 필수적인 역할을 하며, 지속 가능한 미래를 위한 중요한 해결책으로 주목받고 있다. 그러나 이러한 기술이 환경과 인체 건강에 미칠 잠재적 위험성에 대한 철저한 규제와 안전성 검토가 동반되어야 한다. 세계 각국은 과학적 근거에 기반한 규제를 통해 유전자변형생물체의 안전성을 보장하려고 노력하고 있으며, 기술 발전과 규제 간의 균형을 맞추기 위해 협력하고 있다. 새로운 기술의 포괄적인 용어로 본 과제의 '신기술'로 표현하였으며, 바이오 산업의 새로운 기술뿐만 아니라 국내 LMO 관련 새로운 정책 역시 본 과제가 다루어야 할 중요 내용이다. 따라서, 본 과제에서는 신기술 LMO의 등장에 따른 안전성 확보와 안전관리 체계 구축을 목표로, 신기술 LM 미세조류에 대한 환경부의 유전자변형생물체 위해성심사·평가 지침(안)을 수립하고, 관련 법 개정(안)을 개발함으로써 환경부 소관 신기술 LMO 안전관리 체계의 기틀을 마련하고자 한다(그림 4).

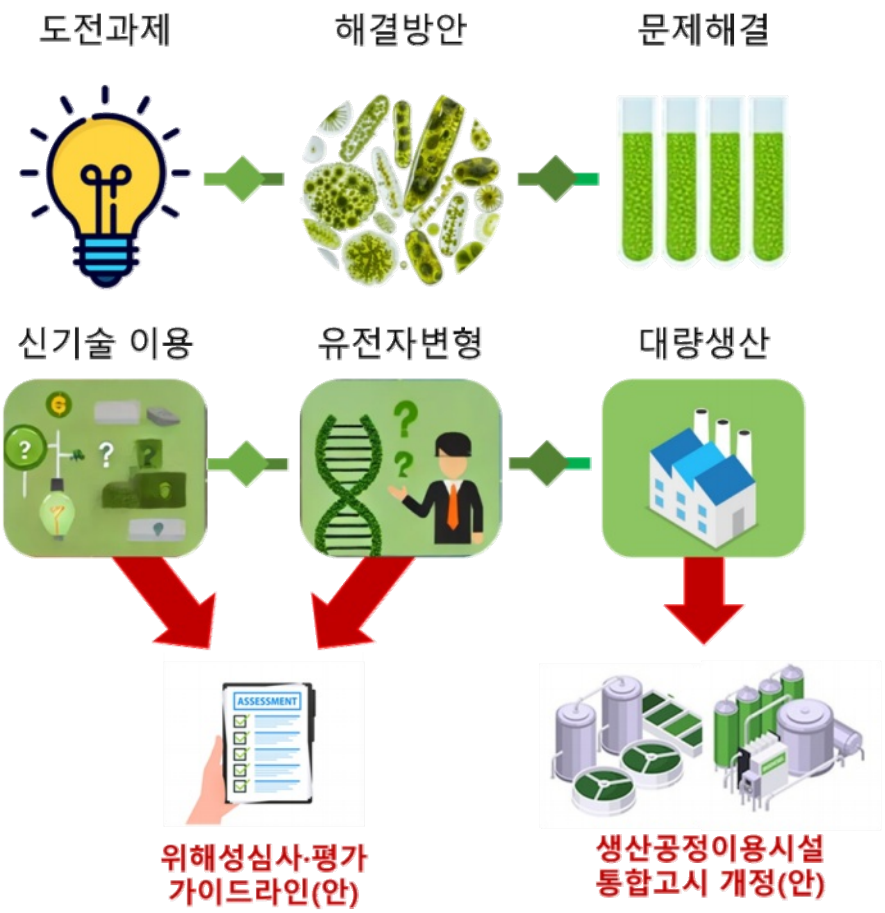


그림 4. ‘2024년 신기술 LMO의 위해성평가 기술 및 가이드라인 개발’

Ⅱ. 연구내용 및 방법

1. 신기술 LMO 사전검토제 대응 환경부 소관 평가 항목 발굴

신기술 LMO 사전검토제 대응 환경부 소관 평가 항목을 발굴하기 위하여 비교법적 관점에서 국가별 신기술 LMO에 대한 규제 및 정책 등을 분석하였으며, 국내 신기술 LMO에 대한 개정(안) 변화 추이를 확인하였다. 추후, 부처별 신기술 LMO에 대해 논의될 사항을 정리하였다.

2. 환경부 위해성평가용 신기술 LMO(식물, 미생물, 미세조류) 개발

가. 유전자가위 이용 환경정화용 LM 미세조류 형질전환 시스템 구축

유전자가위 미세조류를 개발하기 위하여 적절한 유전자을 웹데이터베이스 기반으로 탐색하였다. 사용한 웹데이터베이스는 Phytozome과 NCBI로 특히, Phytozome은 식물 및 미세조류의 유전체 정보를 통합적으로 제공하는 데이터베이스로 미국 에너지부(Department of Energy, DOE)의 합성생물학 연구소(Joint Genome Institute, JGI)가 주도로 관리하고 있다. Phytozome은 쌀, 옥수수, 대두, 애기장대, 콩, 미세조류까지 다양한 광합성 유기체의 유전체 데이터를 확보하고 있고 특정 유전자를 검색하거나 유전자 유사성을 확인할 수 있다. 더욱이, 유전체 연구 결과를 지속적으로 반영하여 데이터가 갱신되는 특징을 가지고 있다(그림 5).

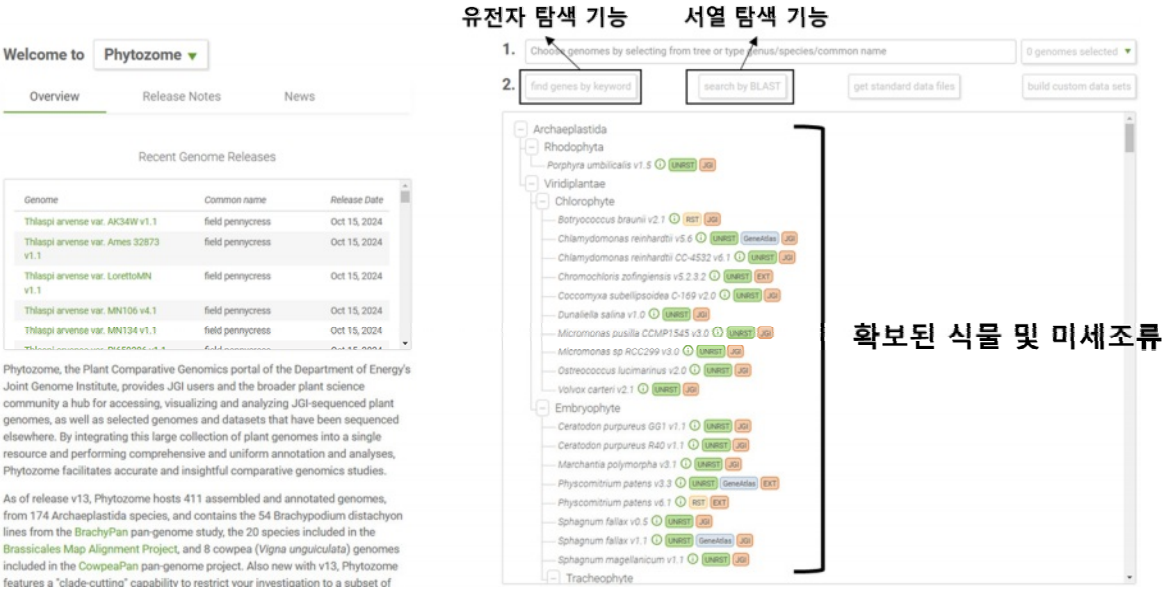


그림 5. Phytozome 데이터베이스(https://phytozome-next.jgi.doe.gov/)

본 과제에서는 유전자가위 이용 LM 미세조류를 개발하기 위해 ribonucleoprotein(RNP) 기술을 적용하였다. RNP 기술은 기존 알려진 유전자가위 기술인 CRISPR-Cas 시스템에서 Cas 단백질의 한 종류인 Cpf1 단백질과 가이드RNA를 결합한 복합체를 이용하여 유전자를 편집한다. RNP기술이 기존 CRISPR-Cas9 기술과 다른 점은 세포 내 일시적으로 작용하며, DNA 플라스미드 방식과 달리 지속적으로 발현되지 않아 오프타겟 효과를 줄일 수 있다. 이러한 특징 때문에 RNP 기술은 최근 연구자들 사이에서 정확하고 안전한 유전자 편집 기술로 주목받고 있다. 특히, RNP 기반 접근법은 환경적 안전성과 효율성 측면에서 우수하여, 유전자가위 기술을 활용한 LM 미세조류 개발 가능성을 크게 확대하고 있다. 유전자가위 기술이 적용된 LM 미세조류의 개발 및 수입 가능성이 증가함에 따라, 환경부는 이에 선제적으로 대응하고자 유전자가위 기술이 적용된 LM 미세조류를 기반으로 위해성평가 지침(안)을 마련하고, 향후 유전자가위 LMO의 관리와 평가 기준을 정립하는 데 중요한 자료로 활용하기 위하여 RNP 기술이 도입된 LM 미세조류 모델 시스템을 구축하고 있다.

나. 환경정화용 신기술 LM 식물 형질전환 및 우성형질 선별

1) 야외 목본의 기내 도입

야생형 포플러 개체를 다량 확보하기 위해 야외에 식재된 포플러 절편체를 시험관 내로 도입하였다. 야외 식물의 기내 도입은 새로운 잎과 줄기가 발아하기 전인 봄철에 가장 효율적이다. 봄이 지나면 식물과 병원체 간 접촉 기회가 증가하여 기내 도입 시 오염 발생률이 높아지기 때문이다. 특히, 그루터기나 줄기 밑부분에서 발생한 새 줄기는 활력이 뛰어나 기내 도입에 유리하다. 2월 중순, 야외 포플러 성숙목에서 액아를 포함한 어린 가지를 잘라냈다. 이를 식물영양제 Hyponex 3 ml이 포함된 물에 꽂아 신초 발아와 발근 여부를 관찰하였다. 영양제는 3일 간격으로 교체하였고, 2주 후 액아에서 신초가 발아하고 뿌리가 유도되었다. 벌레나 곰팡이가 보이지 않는 개체는 70% 에탄올과 2% 락스 희석액으로 소독한 뒤, PPM(Plant Preservative Mixture) 1 ml/L을 포함한 발근 유도 배지에 치상하였다. 이후 생장실로 옮겨 생육 과정을 관찰하였다.

2) 목본 순화 처리 및 식재

야생형 포플러에 목표 유전자를 형질전환한 후, 신초가 발아하고 6주 이내에 뿌리가 유도되면 순화 과정을 거쳐 흙에 옮겨 심어야 한다. 순화 과정을 통해 식물체가 정상적으로 생육하면 비로소 완전한 형질전환체를 확보할 수 있다. 이를 위해 본 연구에서는 순화 과정에 필요한 온도, 습도 및 빛 등의 조건을 확립하기 위해 시험관 내 환경에서 온실로 적응시키는 실험을 수행하였다. 먼저, 생장실 내에서 Test tube에서 재배된 개체를 Incu Tissue plate(square type: 72mm x 72mm x 100mm)로 옮겨 신장이 약 30cm에 이를 때까지 키웠다. 이후, 온실로 옮겨 뿌리에 붙은 MS 배지를 물로 씻어낸 후 흙에 식재하였다. 식재 후 충분한 수분 공급을 위해 아크릴 뚜껑을 덮고 1주일 동안 배양한 뒤, 뚜껑을 제거하고 계속 배양하였다. (24 ~ 25℃, 16시간 광주기/8시간 암주기)

3) 아그로박테리움 방법 이용 신기술 LM 목본 형질전환

전년도 연구에 이어, 유전자가위 기술을 이용하여 변형한 표적 유전자를 아그로박테리움 방법으로 환경정화용 LM 목본 형질전환을 수행하였다. 기 형질전환 방법에서 초순 확보, 배지 조성 등을 보완하여 실험을 진행하였다. 실험 방법은 다음과 같다.

① **야생형(wild-type) 준비:** 6주된 WT 40개 test tube를 준비한다.

② **아그로박테리움 배양:** 표적 유전자가 형질전환된 아그로박테리움을 5 mL LB배지에 접종하여 28℃의 shaking incubator에서 2일간 배양한 후, 배양액 100 μL를 50 mL LB배지에 접종하여 28℃에서 1일간 추가 배양한다.

③ **균 현탁액 준비:** 배양된 균주를 50 mL Falcon tube로 옮기고 4℃에서 3000 rpm으로 15분간 원심분리한 뒤 상등액을 제거하고 0.85% NaCl 5 mL로 pellet을 현탁한다. 이후 0.85% NaCl을 20 mL로 조정하고 10 mg/mL 아세트실리건(3′,5′-Dimethoxy-4′-hydroxyacetophenone) 20 μL를 첨가한다.

④ **형질전환 준비:** 각 개체의 초두를 잘라내어 계대를 진행하고, 줄기에서 잎을 제거한 뒤 0.85% NaCl 20 mL이 담긴 Falcon tube에 보관해 건조를 방지한다.

⑤ **절편 준비 및 아그로박테리움 형질전환:** 줄기를 메스를 이용하여 형성층 손상이 없도록 절간(마디 사이)을 0.7 ~ 1cm 정도로 예리하게 잘라서 아그로박테리움 현탁액에 10 ~ 15분간 반응시킨 후 2 ~ 3분에 한 번씩 현탁해준다. 아그로박테리움 현탁액 1개당 약 40개 절간을 접종시킨다.

⑥ **조직 세척 및 준비:** 형질전환 후 균 현탁액을 제거하고, 절편을 1/2 MS 배지로 3 ~ 4회 세척한다. 멸균된 종이에 올려 물기를 제거한 뒤 박테리아가 완전히 흡착되도록 한다.

⑦ **Callus 유도:** 항생제가 포함되지 않은 callus 유도 배지에 조직 단면을 치상하고 랩과 호일로 밀봉하여 암배양을 2일간 진행한다. 이후, 항생제가 포함된 callus 유도 배지에 3×4 배열로 조직을 배치하여 4주간 명배양하고 2주마다 배지를 교체해준다.

⑧ **Shoot 유도:** 지름 0.8 ~ 1 cm 크기로 유도된 callus를 shoot 유도 배지에 치상하여 신초를 생장시킨다. 작은 callus는 계속 callus 배지에서 성장시킨다. 신초 유도 배양은 2주마다 배지를 교체하며 최대 13주까지 진행한다.

⑨ **Root 유도:** 신초 줄기가 2 cm 이상 자라면 root 유도 배지로 옮겨 뿌리 생장을 관찰한다. 6주 이내에 뿌리가 유도되지 않으면 폐기한다.

⑩ **형질전환 확인 및 순화:** 뿌리가 유도된 식물체의 잎을 이용해 gDNA를 추출하고 PCR 및 염기서열 분석을 통해 표적 유전자의 발현 여부를 확인한다. 형질전환이 확인된 식물체는 항생제가 포함되지 않은 root 배지로 옮겨 순화 과정을 거친 후 흙에 식재한다.

4) 가이드 RNA 서열 특이적 프라이머 이용 표적 돌연변이 부위 확인

형질전환 식물체의 표적 유전자 돌연변이 여부를 확인하기 위해 각 개체의 잎에서 gDNA를 추출하였다. 추출된 gDNA를 대상으로 특이적 프라이머를 사용하여 PCR을 수행하였으며, 이후 염기서열 분석을 통해 가이드 RNA 서열 및 표적 돌연변이 부위를 확인하였다.

표 2. 신기술 LM 포플러 우성형질 검증용 프라이머 정보

목표유전자	Primer	증폭 (bp)
PagABCG22-1	FW primer : GGGGAGAGGAAAAGAGTTTG	530bp
	RV primer : TTCACTTCTTCATCAAGGGGT	
Tubulin	FW primer : CTCACAGTCCCGGAGCTGACA	350bp
	RV primer : GCTTCAGTGAACTCCATCTCG	

다. 환경부 소관 LM 미생물 형질전환 및 우성형질 선별

최근 우리나라의 LMO 위해성 심사 승인 현황을 살펴보면, 콩, 면화, 옥수수, 카놀라 등 4개 주요 작물뿐만 아니라 감자, 알팔파, 사탕무 등이 포함되어 있으며, 이 외에도 산업용, 보건용, 환경정화용으로 개발된 LM 미생물도 승인되고 있다. LM 미생물은 유전자 변형을 통해 다양한 용도로 활용될 수 있기 때문에 안전성에 대한 지속적인 평가와 규제가 요구된다. 따라서 본 연구과제에서는 환경정화용 신기술을 이용한 LM 초본과 목본 연구에 이어, 상업화를 대비한 위해성평가용 LM 미생물 개발을 목표로 형질전환 연구를 수행하였다.

표 3. 유전자변형미생물의 산업활용 분야

특성	응용 사례
산업용	- 효소, 항생제, 비타민, 재조합 단백질(예: 인슐린) 생산 - 바이오 연료, 생분해성 플라스틱, 식품 첨가물 등 다양한 화학 제품 생산
환경정화용	- 유전자 변형을 통해 특정 오염 물질을 분해하는 미생물 개발 - 플라스틱 생분해 미생물, 석유 오염 처리 미생물 등
의약용	- 특정 질병 치료제, 백신 생산 - 재조합 인슐린
농업용	- 병원균 방어 및 작물 보호: 특정 병원균 저항성 미생물 개발, 생육 환경 개선 및 농약 사용 감소

1) *Pseudomonas putida* 선정

환경정화용 LM 미생물 형질전환을 위해, 연구 과제 수행에 적합하며 다루기 쉽고 독성이 없는 미생물을 선정하였다. 이에 따라, 한국생명공학연구원 생물자원센터로부터 *Pseudomonas putida* KCTC 1452 균주를 동결건조된 앰플 형태로 분양받았다. 분양 후 즉시 생존 실험을 위해 고체 배지에 접종하여 순수 colony를 확인한 뒤, 액체 배지에 배양하여 20% glycerol stock을 제작하고 -80℃에 보관하였다.

2) *Pseudomonas putida* 일반특성

*Pseudomonas putida*는 그람 음성 γ-프로테오박테리아로, 다양한 생명공학 응용 분야에서 주목받는 흥미로운 미생물이다. 그람 음성 세균으로서 *P. putida*의 세포 형태는 막대 모양(바실러스형)이며, 길이는 약 1.5 ~ 3.0 μm, 폭은 약 0.5 ~ 1.0 μm로 둥근 외형을 가진다. 배양 시 노란빛의 콜로니를 형성하며, 생물막을 생성하고 세포들이 엉겨 표면에 붙어 다층 구조로 고정화된 상태에서 장기간 생존할 수 있다. 생물안전등급 1등급으로 독성이 없으며, 활성 온도 범위는 0 ~ 42℃, 최적 성장 온도는 26℃, 최적 성장 pH는 7이다. 이 균주는 산소가 풍부한 조건에서 적합하게 성장하며, 용존 산소 농도가 낮아도 생존 가능한 통성 혐기성 미생물이다. *P. putida*는 탄소와 에너지원으로 다양한 유기 화합물을 이용하는 토양 및 수계 유기체로, 이화 경로 연구와 생물학적 정화에 중요한 역할을 한다. 현재까지 분석된 *P. putida*의 63개 게놈에서 단백질 수는 3748 ~ 6780개(평균 5197개)로 확인되었으며, GC 함량은 58.7 ~ 64.4%(평균 62.3%)이다. 63개 게놈에서 확인된 핵심 단백체는 1724개의 단백질로 구성되며, 그중 1개 단백질은 다른 슈도모나스 속에는 존재하지 않는 고유 단백질로 확인되었다. 야생형 *P. putida*는 뛰어난 환경 스트레스 저항성과 오염 물질 분해 능력을 갖추어 환경 정화에 효과적으로 활용될 수 있다. 예를 들어, 나프탈렌 오염 토양의 정화를 위한 접종제로 활용되며, 스타이렌을 생분해성 플라스틱(PHA)으로 전환하여 폴리스티렌 재활용에도 기여할 수 있다. 또한, 이 균주는 식물 병원체인 *Pythium phanidermatum*와 *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*에 대항하는 생물학적 방제로서의 잠재력을 지닌 유망한 미생물이다.

3) *Pseudomonas putida* 배양조건

*P. putida*는 호기성 세균으로 약 6.5에서 7.5 사이 중성에 가까운 pH 범위가 최적조건이며, 자세한 배양조건은 다음과 같다.

표 4. *Pseudomonas putida* 배양조건

	고체배지	액체배지
배지 조성	○ Nutrient Agar (NA) ○ Luria-Bertani(LB) Agar ○ Potato Carrot Agar (PCA) ○ King's B(KB) medium	○ NA medium ○ LB medium
최적 온도	25°C ~ 30°C	25°C ~ 30°C
Shaking rpm	-	200 rpm ~ 250 rpm
생장 측정 방법 (Growth)	CFU 측정 (Colony Forming Units)	OD600 측정 (Optical Density at 600 nm)

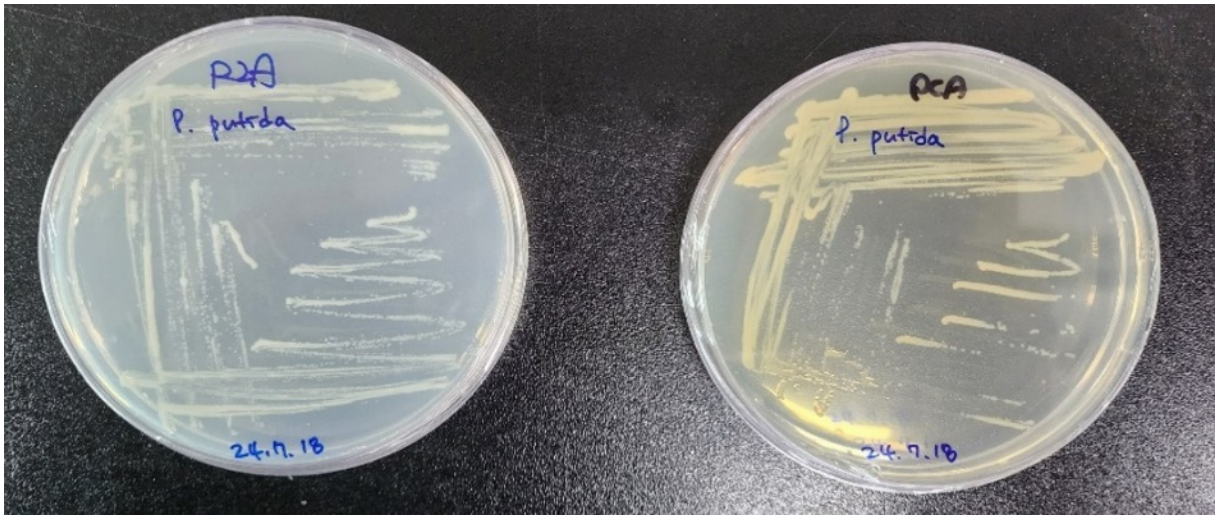


그림 6. *Pseudomonas putida* 배양

4) *Pseudomonas putida* 형질전환

환경정화용 LM 미생물 *Pseudomonas putida*의 형질전환은 전기 천공법(electroporation)을 이용하여 수행되었다. 전기 천공법은 전기 펄스를 통해 세포막에 일시적인 나노미터 크기의 구멍을 형성하여 표적 유전자를 세포 내로 도입하는 기술이다. 본 실험에서는 형질전환 효율을 극대화하기 위해 *P. putida*의 생리적 상태를 조절하고, 적절한 조건에서 전기 천공을 수행하였다. 구체적인 실험 절차는 다음과 같다.

① 균주 및 시약:

○ *P. putida* 균주, 표적 유전자 플라스미드, 멸균된 300 mM sucrose, LB 액체 및 고체 배지를 준비하였다.

○ 기기: 전기 천공기(electroporator), 0.2 cm 전기 천공 큐벳.

② 균주 배양:

○ *P. putida*를 LB 액체 배지에 접종하여 28°C에서 진탕 배양하였다.

○ 배양은 중기 대수 성장기(OD_{600}: 0.26 – 0.38)에 도달할 때까지 진행하였다.

③ 세포 수확 및 세척:

○ 4°C에서 7500 g로 15분 동안 원심분리하여 세포를 수확하였다.

○ 상등액을 제거한 후 세포를 멸균된 300 mM sucrose 30 mL로 현탁하였다.

○ 동일 조건에서 원심분리 및 상등액 제거를 반복한 후, 300 mM sucrose 1.5 mL로 최종 현탁하였다.

○ 300 μL씩 분주하여 균질한 세포 현탁액을 준비하였다.

④ 전기 천공 및 형질전환

○ 전기 천공: 세포 현탁액 300 μL에 표적 유전자 플라스미드를 첨가하고, 얼음에서 10분 동안 안정화한 후, 표적 유전자와 *P. putida*가 혼합된 mixture를 0.2 cm 전기 천공 큐벳에 옮긴다.

○ 전기 펄스 적용: 전기 천공기는 2500 V, 25 μF, 200 Ω의 조건으로 설정하였다. 전기 펄스를 통해 세포막의 투과성을 일시적으로 증가시켜 플라스미드 DNA가 세포 내로 도입되도록 하였다.

○ 회복 과정: 전기 천공 후, 세포 현탁액을 1 mL LB 배지에 즉시 옮겨 담고, 얼음에서 5분간 안정화시켰다. 이후 28°C에서 1.5시간 동안 진탕 배양하여 세포막을 회복시키고 형질전환된 세포를 증식시켰다.

⑤ 도말 및 형질전환 확인

○ 세포 도말: 배양된 세포를 원심분리하여 상등액을 제거한 후 새로운 LB 배지로 재현탁하였다. 50 μL씩 LB 고체 배지에 도말한 후, 28°C에서 over-night 배양하였다.

○ 형질전환 확인: 배양된 colony에서 DNA를 추출하여 colony PCR을 수행하였다. PCR 산물을 염기서열 분석하여 표적 유전자가 성공적으로 도입 및 발현되었는지 확인하였다.

5) *Pseudomonas putida* 우성형질 선별

형질전환 후 획득한 single colony에서 표적 유전자 발현 여부를 확인하기 위해 colony PCR 및 염기서열 분석을 수행하였다. 세부 방법은 다음과 같다.

Colony PCR

① Template 준비

○ 멸균된 20 μL 증류수가 담긴 PCR 튜브에 single colony를 Tip으로 채취하여 현탁한다.

○ 현탁액 1 μL를 PCR 반응의 template로 사용한다.

○ Primer 정보

- Forward primer (FW): CATGAGTGCGTTCTATCCCTCTAT
- Reverse primer (RV): CCACCTTCGGTTAGTTGGGCATCT
- 증폭되는 PCR 산물 크기: 700 bp

② PCR 조건

반응 혼합물 준비 후 다음 조건으로 PCR을 수행한다:

- Initial denaturation: 95°C, 2분
- Denaturation: 95°C, 30초
- Annealing: 58°C, 1분
- Extension: 72°C, 30초 30 cycle 반복
- Final extension: 72°C, 5분

③ 염기서열 분석

○ PCR 산물 확인

○ PCR 반응 후, 700 bp 크기의 PCR 산물을 확인한다.

○ Sequencing 수행: 확인된 PCR 산물을 염기서열 분석에 사용하여 표적 유전자 서열 유무를 확인한다.

라. 개선된 온실·한실 환경 내 신기술 LMO 생장 분석

개선된 온실 환경에서 룸 배양실과 비교하여 기 개발된 신기술 LM 콩 생장 양상과, 종자 수확량 변화를 분석해보고자 하였다. 신기술 LM 콩을 화분에 식재하여 종자를 수확할 때까지 표현형, 소요되는 시간 등을 관찰하였다.

3. 환경부 소관 신기술 LMO 위해성심사 지침(안) 개발

2020년 한국생명공학연구원 세포공장연구센터 연구팀이 흔히 PET병이라 부르는 플라스틱을 분해하는 유전자가 도입된 미세조류를 최초 개발하였다. 연구팀이 선택한 유전자는 PETase라 불리는 플라스틱 분해 유전자로 담수에 서식하는 미세조류에 도입하였다. 그들은 물속의 미세플라스틱에 의한 생물 농축을 해결할 수 있는 방안으로 플라스틱분해 LM 미세조류가 기여할 수 있을 것이라 전했고 이는 국내에서 환경정화용으로 개발된 최초의 미세조류 사례가 되었다. 이 연구진들은 더 나아가 과학기술정보통신부의 '바이오위해평가 원팀 리노베이션 사업'에 해수 미세조류에 플라스틱을 분해하는 PETase를 도입하여 해양 미세플라스틱을 분해하는 내용의 과제로 선정되었고 '바이오위해평가 원팀 리노베이션 사업'의 최종목적인 위해성심사 진입을 목표로 연구를 수행하고 있다. 환경부는 플라스틱분해 LM 미세조류가 환경정화용 위해성심사를 받는 최초의 사례로 보고 이에 대응하기 위해 2024년 본 과제에서 LM 미세조류 위해성심사 지침(안)을 개발하고자 하였다. 위해성심사 지침(안)을 개발하기 위해 국외 LM 미세조류 승인 현황 및 평가서를 참조하였으며, 국내에는 산업통상부 한국바이오안전성정보센터 및 해양수산부 해양생물자원관 바이오실용화실 등 관계부처와 함께 세미나 및 자문을 진행하며 작성하였다.

4. 환경정화용 신기술 LM미세조류 위해성평가용 모의생태계 환경 개발

본 과제는 환경정화용 미세조류의 환경방출시 접근할 수 있는 위해성평가 지표 발굴을 목표로, 다양한 하천 및 저수지에서 미세조류 생태 특성을 조사하고 이를 기반으로 접종 실험을 수행하였다. 이를 위해 동부저수지, 축동저수지, 상류(농지 인근), 중류(농지 및 축산 인근), 하류(마을 및 금강 합류 지점) 등 총 5개 지역을 대상으로 연구를 진행하였다(그림 7). 주요 연구 내용은 자연수계 내 LM미세조류의 하천 내 이동성과 생존성을 평가하며, 접종된 LM미세조류가 생태계에 미치는 영향을 확인하는 것이다. 추가적으로, 각 지역의 미세조류 우점종 및 군집 구조를 분석하기 위한 데이터를 수집하고자 하였다. 먼저, 물환경보전법 제28조 및 시행령 제30조를 준수하여 환경부 호소환경 조사지침을 참고하여 조사 지역을 선정하였으며, 각 조사 지역의 지리적 좌표를 바탕으로 표본 채취 지점을 구체적으로 설정하였다. 이후 식물 및 동물 플랑크톤 네트를 사용하여 각 조사 지역에서 샘플을 채취하고, 현미경 관찰을 통해 생물상을 확인하였다. 취수된 샘플은 LM미세조류 접종 실험에 활용되었으며, 접종 후 우점종 변화와 생존성을 평가하였다. 더불어, 접종된 미세조류가 하천 생태계에 미치는 영향을 분석하기 위해 수질 등 이화학적 분석을 병행하였다. 현미경 관찰과 이화학적 분석을 통합하여 각 지역의 특성을 도출하였으며, 이를 바탕으로 LM 미세조류 접종이 주변환경에 미치는 효과를 평가하고자 하였다. 또한, 채취된 샘플에 대해 16S 및 18S rRNA 유전자를 이용한 주변생물상 분석을 수행 중에 있다.

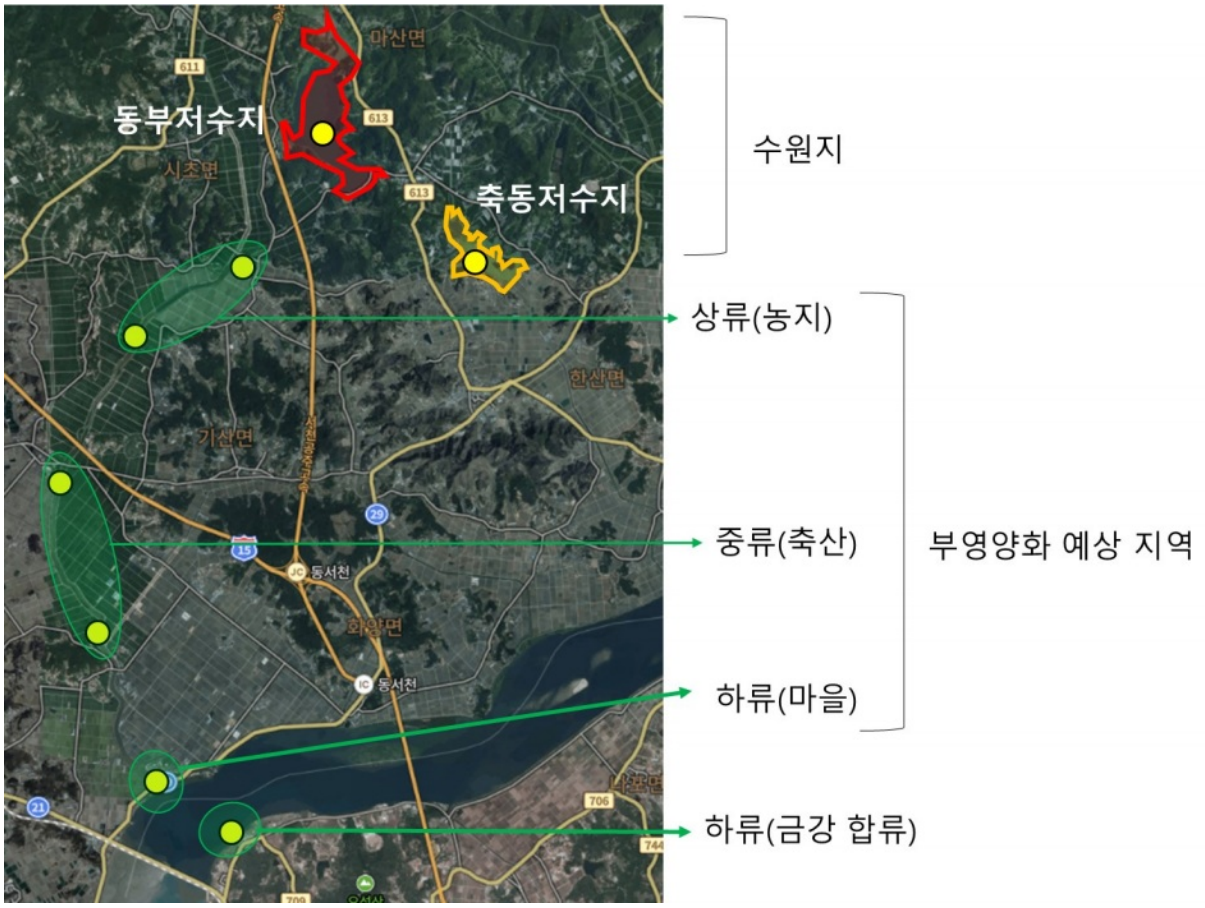


그림 7. 환경정화용 LM미세조류 환경방출 대비 수생태계 위해성평가 지역

5. 환경부 소관 생산공정이용시설 관련 LMO법 통합고시 개정 추진

환경부 소관 생산공정이용시설 관련 LMO법 통합고시 개정(안) 마련을 위해 부처별 LMO법 통합고시의 생산공정이용시설을 비교분석하였다. 비교분석을 통해 환경부 생산공정이용시설의 생물안전등급 설정 및 신고와 허가 기준을 명확하게 하고자 하였으며, 초안을 작성하였다. 작성된 초안을 가지고 한국바이오안전성정보센터에 검토 및 자문을 거쳐 개정(안)을 최종 작성하였다.

Ⅲ. 연구 결과

1. 신기술 LMO 사전검토제 대응 환경부 소관 평가 항목 발굴

가. 신기술 LMO 기술유형별 안전성 분석

신기술 LMO의 안전성을 평가하기 위해서 각 기술 유형의 특성과 이로 인해 발생할 수 있는 잠재적 위험 요소에 대하여 심층적인 이해가 필요하다(표 5). SDN-1(site directed nucleases-1)은 특정 유전자 부위에서 이중 가닥 절단을 유도하여 자연적인 DNA 복구 과정을 통해 돌연변이를 유발하는 기술로 이 과정에서 외래 유전자가 도입되지 않으므로 최종 산물에 외래 유전자가 잔존하지 않으며, 전통적인 육종 방법과 유사한 안전성을 가진다. 이러한 특성 덕분에 SDN-1은 대부분 국가에서 규제 완화 대상으로 간주되고 있지만 표적 외 부위에서 발생할 수 있는 오프타겟 효과는 여전히 면밀히 평가가 필요하며, 이와 관련한 기술적 개선이 이루어져야 한다.

SDN-2(site directed nucleases-2)는 이중 가닥 절단 후 소량의 외부 DNA를 도입하여 특정 염기서열 교체를 유도하며, 도입된 외부 DNA는 최종 산물에 남지 않기 때문에 전통적인 육종과 유사한 안전성을 보장한다. 하지만 표적 외 돌연변이 가능성은 여전히 논란의 대상으로 이러한 비표적 효과를 줄이기 위해 가이드 RNA 설계와 유전체 스크리닝과 같은 후속 기술의 발전이 요구된다. ODM(oligonucleotide directed mutagenesis)은 상보적인 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 표적 부위에서 원하는 돌연변이를 유도한다. 무작위 돌연변이 발생 가능성이 낮아 안전성이 높은 기술로 평가되지만, 원형질체 배양 시스템 구축이 필요한 점에서 적용 대상이 제한적이다.

시스제네시스(Cisgenesis)와 인트라제네시스(Intragenesis)는 동일 종 또는 근연종의 유전자를 도입하거나 동일 종 내에서 유전자 재조합을 통해 형질을 개선하는 기술로 외래 유전자를 포함하지 않아 전통적인 육종과 유사한 안전성을 제공하지만 도입된 유전자의 발현 위치와 수준에 따라 예상치 못한 표현형 변화 가능성이 있으며, 이를 체계적으로 검토가 필요하다. 크리스퍼/Cas9(CRISPR/Cas9)은 특정 염기서열을 인식하여 DNA를 절단하는 효소 시스템으로, 높은 정확성과 효율성을 가진 유전자 편집 기술이지만 비표적 부위에서의 절단 가능성이 보고된 바 있어, 이를 최소화하기 위한 가이드 RNA 설계와 검증이 필수적이다.

탈렌(TALENs, Transcription activator-like effector nucleases)과 징크핑거 뉴클레이즈(ZFNs, Zinc-finger nucleases)는 특정 DNA 서열을 인식하여 절단하는 단백질 기반 유전자 가위 기술로 이 기술은 높은 정밀성을 보장하지만 제작이 복잡하고 비용이 높아 대규모 상용화에는 제한이 따른다. 메가뉴클레이즈(Meganucleases)는 긴 인식 서열을 가진 엔도뉴클레이즈로 특정 DNA 서열을 절단하는 기술로, 비표적 절단 가능성이 낮아 안전성이 높은 기술로 평가된다. 하지만 원하는 표적 서열에 맞는 메가뉴클레이즈를 설계하는 과정에서 기술적 어려움이 있을 수 있다.

RNA 간섭(RNA interference)은 특정 mRNA를 분해하여 유전자 발현을 억제하는 기술로, 식물의 형질 조절에 널리 활용되지만 비표적 mRNA에 대한 영향을 배제할 수 없으므로 주의가 필요하다. 아그로박테리움 매개 유전자 전달(*Agrobacterium*-mediated Transformation)은 외래 유전자를 식물 세포에 삽입하여 형질을 변형하는 기술로, 삽입 위치와 발현 수준을 면밀히 평가해야한다.

프라임 에디팅(Prime Editing)은 가장 최근에 개발된 유전자 편집 기술로, 특정 DNA 서열에서 염기 치환, 삽입, 삭제 등을 수행할 수 있다. 이 기술은 기존 CRISPR/Cas9보다 비표적 돌연변이가 적고 이중 가닥 절단이 필요하지 않아 높은 안전성을 제공하나 이 기술의 대규모 환경 방출이 생태계에 미칠 영향을 평가하기 위한 추가 연구가 필요하다. 특히 프라임 에디팅은 정밀 편집 기술로서 기존의 육종 방식과 비교하여 규제 체계에서 차별화된 위치를 차지할 가능성이 크다(표 6).

표 5. 신기술 별 외래유전자 잔존 여부 비교

기술	외래유전자 잔존 여부	설명
SDN-1	없음	외래 유전자 도입 없이 특정 위치에서 이중 가닥 절단 후 자연 복구(NHEJ)를 활용하여 변이 유도.
SDN-2	없음	외래 유전자 없이 교정 또는 삽입을 위한 짧은 DNA 템플릿을 사용하여 HDR 메커니즘을 통해 변이 유도.
ODM	없음	외래 유전자 없이 짧은 올리고뉴클레오타이드를 사용하여 점 돌연변이를 유도.
Cisgenesis	있음	동일한 종에서 유래한 유전자를 도입하므로 외래 유전자는 아니지만, 삽입된 유전자가 잔존.
Intragenesis	있음	동일한 종 내 유전자를 재조합하여 삽입하므로 외래 유전자는 아니지만, 유전자가 잔존.
TALEN	없음	편집 과정에서 사용된 외래 유전자는 최종 결과물에서 제거 가능하여 잔존하지 않음.
ZFN	없음	편집 과정에서 사용된 외래 유전자는 최종 결과물에서 제거 가능하여 잔존하지 않음.
RNAi	있음	RNA 간섭을 위해 외래 유전자(예: siRNA, shRNA)를 도입하며, 최종 결과물에 잔존.

표 6. 기존 및 최신 유전자가위 기술의 비교

기술	CRISPR	Base Editing	Prime Editing
작동 원리	Cas9 단백질이 특정 DNA 서열을 절단하여 이중 가닥 절단을 유도	Cas9 또는 Cas9 nickase와 탈아미노화 효소를 결합하여 특정 염기 치환을 유도	Cas9 nickase와 reverse transcriptase를 결합하여 DNA에 새로운 서열을 삽입하거나 염기를 교체
수정 방식	이중 가닥 절단 후 비상동성 말단 연결(NHEJ) 또는 상동 재조합(HDR)을 통해 유전자 수정	특정 염기를 직접적으로 변환	안내 RNA와 템플릿 RNA를 통해 유전자 서열을 보다 정밀하게 수정
적용 가능한 변이	삽입, 결실, 치환, 복잡한 재배열	단일 염기 치환	삽입, 삭제, 모든 염기 치환
필요한 구성 요소	○ Cas9 단백질 ○ guideRNA	○ Cas9 nickase ○ guideRNA ○ 탈아미노화효소	○ Cas9 nickase ○ guideRNA ○ Reversetranscriptase ○ 주형 RNA
DNA 손상 정도	이중 가닥 절단으로 인해 상대적으로 높은 DNA 손상	DNA 손상을 최소화	DNA 손상을 최소화
정확성	NHEJ의 낮은 정확성으로 인해 삽입 또는 결실 발생 가능	높은 정확성으로 단일 염기 치환 가능	높은 정확성으로 다양한 유형의 유전자 수정 가능
적용 범위	다양한 유전자 편집 실험 및 치료에 사용 가능	단일 염기 변이가 주요한 질병(예: 유전성 질병)의 치료에 적합	삽입, 삭제, 다중 염기 치환이 필요한 경우에 적합
복잡성	상대적으로 단순함	비교적 낮은 복잡도	높은 복잡도

나. 국가별 유전자가위 적용 LMO의 환경위해성평가 항목 분석

유전자 편집 기술의 발전은 농업 생산성을 높이고 생태계 보존에 기여할 수 있는 혁신적인 도구로 주목받고 있고 이 기술은 전통적인 육종 방식과 비교하여 훨씬 정밀하게 작물의 유전자를 편집할 수 있으며, 이를 통해 가뭄 저항성, 병해충 내성, 품질 개선 등 다양한 농업적 이점을 제공한다. 더욱이, 특정 유전자 기능을 조절하거나 새로운 특성을 부여함으로써 자연생태계 복원이나 환경오염 문제 해결에도 적용 가능성이 높다. 그러나 유전자 편집 기술이 환경에 미칠 잠재적 영향을 평가하고 규제하는 체계는 국가별로 정책적, 기술적, 사회적 차이로 인해 여전히 상이하다. 특히, 유전자 편집 기술을 통해 생성된 LMO가 환경에 방출될 경우, 예상치 못한 생태학적 영향을 초래할 가능성에 대한 우려가 존재하며, 이러한 우려는 기술적 정확성에 대한 신뢰뿐 아니라, 비표적 돌연변이, 생물다양성 영향, 근연종과의 유전자 교환 가능성 등 다양한 요소를 필수적으로 고려해야 한다. 이에 따라 주요 국가들은 과학적 평가 기준을 마련하고 기술적 특성에 맞는 규제 체계를 구축하고 있다(표 7, 8).

미국은 2021년에 도입된 SECURE Rule(Sustainable, Ecological, Consistent, Uniform, Responsible, Efficient)을 통해 유전자 편집 작물의 환경 방출과 생물다양성 영향을 체계적으로 평가하는 규제 체계를 구축하였다. SECURE Rule은 유전자 편집 기술이 기존 LMO와 어떻게 다른지 명확히 정의하고, 최종 산물의 특성과 기술적 과정을 기반으로 평가 항목을 설정하는 데 중점을 두고 있으며, 이 규제는 유전자 편집 작물이 환경에 미칠 잠재적 위험을 최소화하는 동시에 상업적 활용의 목적을 가지고 있다. SECURE Rule은 주요 평가 항목으로 비교 식물의 종 및 아종 정보, 유전자형 및 표현형 특성, 생물다양성 영향, 그리고 근연종과의 교배 가능성을 포함한다. 비교 식물 정보는 변형된 작물과 기존 작물 간의 유전적 및 생물학적 차이를 평가하는 데 사용되며, 유전자형 및 표현형 특성 평가는 표적 돌연변이와 비표적 돌연변이를 중심으로 변형된 작물의 특성을 분석한다. 특히, 비표적 돌연변이는 환경 방출 시 예기치 않은 유전자 변화를 유발할 가능성이 있으므로 이를 체계적으로 평가한다. 또한, 생물다양성 영향은 유전자 편집 작물이 환경에 방출되었을 때 비표적 생물과의 상호작용, 근연종과의 유전자 교환 가능성을 검토한다.

2024년 현재, 미국 농무부(USDA-APHIS)는 SECURE Rule을 지속적으로 업데이트하며, 유전자 편집 기술 특성에 맞춘 규제 완화와 상업화를 동시에

추진하고 있다. 특히, SDN-1 및 일부 SDN-2 기술로 개발된 작물은 외래 유전자가 포함되지 않고 전통적 육종 방식과 유사한 경우 규제 면제를 적용받을 수 있다. 이는 기술 혁신을 장려하면서도 생물다양성 보호를 유지하려는 균형 잡힌 접근법으로 평가된다. 또한, SECURE Rule은 작물의 상업적 승인 전에 장기적인 모니터링 계획을 필수로 요구하며, 이 계획은 환경 방출 후 비표적 생물과의 상호작용, 근연종에 미칠 영향을 지속적으로 평가한다. 미국의 이러한 규제 체계는 생물다양성과 농업적 혁신을 동시에 추구하려는 노력의 일환으로, 다른 국가들에게도 중요한 참고 사례가 되고 있다.

유럽연합은 2023년 7월 발표된 NGT(New Genomic Techniques) 개정안을 통해 유전자 편집 기술 규제를 대대적으로 개편하였다. 기존의 엄격한 GMO 규제에서 벗어나, 유전자 편집 기술의 최종 산물이 자연적 돌연변이와 유사한 경우 규제를 완화하는 방향으로 전환하는 이 개정안은 유전자 편집 기술을 NGT 카테고리 1과 NGT 카테고리 2로 나누어 규제를 차별화하고 있다. NGT 카테고리 1은 자연적 또는 전통 육종에 의해 발생할 수 있는 돌연변이와 유사한 기술을 포함하며, 최종 산물에 외래 유전자가 포함되지 않는 경우 GMO 규제에서 면제된다. 이 범주에는 SDN-1 기술과 일부 SDN-2 기술이 포함된다. NGT 카테고리 2는 외래 유전자가 일시적으로 도입되었지만 최종 산물에 잔존하지 않는 기술을 포함하며, 기존 GMO 규제와 비교하여 일부 완화된 평가 절차가 적용된다. 이는 기술적 혁신과 안전성 보장을 동시에 고려한 접근으로 평가받고 있다.

유럽연합의 새로운 개정안에서는 유전자 편집 기술로 유도된 돌연변이가 기존 자연적 돌연변이와 동등한지를 분석하는 표적 돌연변이 평가를 포함하며, 표적 외 부위에서 발생할 수 있는 예기치 않은 변화를 검토하는 비표적 돌연변이 분석이 요구된다. 또한, 작물이 자연 생태계와 상호작용할 때 비표적 생물에 미칠 영향을 검토하는 생물다양성 영향 분석이 이루어지며, 유전자 편집 작물이 환경에 방출된 이후 장기적인 생태적 영향을 지속적으로 평가할 수 있는 모니터링 체계의 구축을 포함하고 있다.

2024년 현재, 유럽연합은 이러한 새로운 규제를 통해 유전자 편집 기술의 상업적 활용 가능성을 대폭 확장하였다. 특히, NGT 카테고리 1 기술은 규제 완화로 인해 연구 및 상업적 개발 속도가 가속화되고 있으며, 농업 생산성을 높이는 데 중요한 역할을 하고 있지만 카테고리 2 기술은 여전히 외래 유전자 도입과 관련된 위험을 면밀히 평가해야 하므로, 상업화

과정에서 제한이 있을 수 있다. 유럽연합은 유전자 편집 기술이 기존 LMO와 본질적으로 다르다는 점을 인정하며, 기술적 특성과 안전성을 기반으로 한 규제 체계를 마련하였다. 특히, 환경 방출 시 생태계에 미칠 영향을 사전에 평가하고, 유전자 편집 작물이 기존 농업 생태계와 조화롭게 활용될 수 있도록 지속 가능한 접근을 제안하고 있다.

일본은 유전자 편집 기술을 활용한 생물체를 규제하기 위해 카르타헤나 법과 함께 독자적인 규제 체계를 운영하고 있다. 2019년부터 일본 환경성은 유전자 편집 기술로 생성된 생물체에 대해 기존 LMO와 차별화된 접근을 도입하였으며, 특히 외래 유전자가 최종 산물에 잔존하지 않는 경우를 중심으로 규제 완화를 시행하고 있다. 이는 생물다양성을 보호하면서도 유전자 편집 기술의 연구와 상업적 활용을 촉진하기 위한 정책적 조치로 평가된다. 일본은 유전자 편집 생물체의 환경 방출에 대해 명확한 절차를 수립하여 생물다양성 보호와 기술 발전의 조화를 이루기 위해 체계적으로 접근하고 있다. 환경 방출을 승인받기 위해서는 먼저 개발자가 해당 생물체의 유전자 편집 방법, 이를 통해 달성하고자 하는 목적, 그리고 환경에 미칠 잠재적 영향을 종합적으로 분석하고 이러한 분석을 바탕으로 상세한 평가 자료를 작성하여 환경성에 제출하며, 제출된 자료는 환경성의 검토를 거친 후 전문가 위원회로 이관된다.

전문가 위원회는 다양한 생물다양성 관련 분야의 전문가들로 구성되며, 유전자 편집 생물체가 생태계에 미칠 잠재적 영향을 심층적으로 평가한다. 이 과정에서는 해당 생물체가 자연 생태계 내에서 확산될 가능성, 비표적 생물에 미칠 잠재적 영향, 그리고 근연종과의 유전자 교환 가능성 등 다양한 요인이 검토되며, 심사를 통해 환경 방출이 생물다양성에 부정적인 영향을 미칠 가능성이 있다고 판단되면 추가적인 보완 자료를 요청하거나 환경 방출을 제한할 수 있다. 심사 결과는 투명성과 공정성을 확보하기 위해 일반 국민과 관련 단체에 공개되며, 이 과정에서 다양한 의견을 수렴하는 절차가 진행된다. 이러한 공개 의견 수렴은 잠재적 위험 요인을 사전에 파악하고 사회적 신뢰를 확보하는 데 중요한 역할을 한다. 이후, 수집된 의견과 전문가 심사 결과를 종합적으로 검토한 환경성은 최종적으로 환경 방출 승인 여부를 결정한다.

이 모든 절차는 단계별로 명확히 구분되며, 생물다양성 보호를 우선시하는 동시에 유전자 편집 기술의 안전한 활용을 지원하는 데 초점을 맞추고 있다. 특히, 이러한 절차는 생물다양성에 미치는 부정적 영향을

최소화하면서도 연구 및 상업적 활용을 촉진하기 위한 기반을 제공하며, 일본의 생태계 안정성과 지속 가능성을 유지하는 데 중요한 장치로 기능하고 있다. 이를 통해 일본은 유전자 편집 기술이 생태계와 조화롭게 공존할 수 있도록 책임감 있는 규제 체계를 운영하고 있다. 2024년 현재, 일본은 국제적 규제 동향에 발맞추어 평가 항목을 더욱 세분화하고 있으며, 기술의 안전성과 생태적 영향을 정밀하게 분석하는 체계를 강화하고 있으며, 국제 협력을 통해 유전자 편집 기술의 세계 시장에서 경쟁력을 확보하려는 노력을 이어가고 있다.

표 7. 미국, 일본, 유럽연합의 신기술 LMO 규제 완화 기준

국가/지역	규제 완화 기준	주요 내용
미국	외래 유전자 도입 여부	- 외래 유전자가 도입되지 않은 경우 LMO로 간주하지 않음. - FDA, USDA, EPA의 사전 승인 절차를 면제. - SDN-1, SDN-2, ODM 기술에 대해 규제 간소화.
일본	외래 유전자 잔존 여부	- 외래 유전자가 잔존하지 않는 경우 LMO 규제 대상에서 제외. - 환경 방출 시 간단한 신고 절차만 요구. - SDN-1, SDN-2, ODM 기술에 대해 규제 완화 적용.
유럽 연합	외래 유전자 도입 및 환경 영향 평가 여부	- 2023년 개정안에서 외래 유전자가 도입되지 않은 유전자 편집 작물에 대해 LMO 규제를 완화 검토 중. - SDN-1, SDN-2, ODM 기술을 기존 LMO 규제에서 제외 가능성.

표 8. 국가별 바이오신기술 종루에 따른 규제 완화 비교

기술	미국의 규제 완화	일본의 규제 완화	유럽연합의 규제 완화
SDN-1	규제 완화 (LMO로 간주하지 않음)	규제 완화 (LMO로 간주하지 않음)	규제 완화 검토 중 (LMO로 간주하지 않을 가능성)
SDN-2	규제 완화 (LMO로 간주하지 않음)	규제 완화 (LMO로 간주하지 않음)	규제 완화 검토 중 (LMO로 간주하지 않을 가능성)
ODM	규제 완화 (LMO로 간주하지 않음)	규제 완화 (LMO로 간주하지 않음)	규제 완화 검토 중 (LMO로 간주하지 않을 가능성)
Cisgenesis	규제 완화 없음	규제 완화 없음	제한적 규제 완화 가능 (유전자 기원에 따라 다름)
Intragenesis	규제 완화 없음	규제 완화 없음	제한적 규제 완화 가능 (유전자 기원에 따라 다름)
TALEN	규제 완화 (외래 유전자 없을 경우)	규제 완화 (외래 유전자 없을 경우)	규제 완화 검토 중 (LMO로 간주하지 않을 가능성)
ZFN	규제 완화 (외래 유전자 없을 경우)	규제 완화 (외래 유전자 없을 경우)	규제 완화 검토 중 (LMO로 간주하지 않을 가능성)
RNAi	규제 완화 없음	규제 완화 없음	규제 완화 없음

다. 미국, 유럽연합, 일본의 유전자 편집 기술 규제 항목 비교 및 시사점

2024년 현재, 미국, 유럽연합, 일본은 유전자 편집 기술을 적용한 LMO(Living Modified Organisms)의 환경위해성을 평가하기 위해 각각의 정책적, 생태적, 기술적 특성을 반영한 규제 체계를 운영하고 있다. 이 세 국가와 지역은 모두 생물다양성 보호와 기술 혁신 간의 균형을 중시하며, 유전자 편집 기술이 기존 GMO와 본질적으로 다르다는 점을 인정하고 있다. 그러나 규제 체계와 평가 항목에서 차별화된 접근을 보이며, 이는 각국의 정책 우선순위와 생태적 요구를 반영한다.

미국은 2021년에 도입된 SECURE Rule(Sustainable, Ecological, Consistent, Uniform, Responsible, Efficient)을 통해 유전자 편집 기술로 개발된 작물의 환경 방출과 생물다양성 영향을 체계적으로 평가하고 있다. SECURE Rule은 유전자 편집 작물이 기존 GMO와 어떤 점에서 차별화되는지 명확히 규정하며, 평가 항목을 비교 식물 정보, 유전자형 및 표현형 특성, 생물다양성 영향, 근연종과의 교배 가능성으로 구성한다. 특히, SECURE Rule은 장기적인 생태적 변화를 관찰하기 위한 모니터링 계획을 필수적으로 요구하여, 유전자 편집 작물이 환경 방출 이후에도 안전성을 지속적으로 보장할 수 있도록 한다. 이러한 규제 체계는 유전자 편집 기술이 농업 생산성을 높이고 환경적 위험을 최소화할 수 있도록 설계되었다. 또한, 미국은 SDN-1과 일부 SDN-2 기술을 기반으로 개발된 작물에 대해 외래 유전자가 포함되지 않을 경우 규제 면제를 적용함으로써, 기술 혁신과 상업화를 촉진하고 있다. 이는 기술 발전을 지원하는 동시에 생태적 안정성을 확보하려는 미국의 전략을 보여준다.

반면, 유럽연합은 2023년 발표된 NGT(New Genomic Techniques) 개정안을 통해 유전자 편집 기술 규제를 대대적으로 개편하였다. 기존 GMO 규제에서 벗어나, 기술 특성과 최종 산물의 안전성을 기준으로 평가 체계를 세분화하였다. 유럽연합은 유전자 편집 기술을 NGT 카테고리 1과 카테고리 2로 나누어 규제를 차별화하였다. 카테고리 1은 자연적 돌연변이와 유사한 기술을 포함하며 외래 유전자가 잔존하지 않는 경우 규제에서 면제된다. 이와 달리, 카테고리 2는 외래 유전자가 일시적으로 도입되었으나 최종 산물에 남아 있지 않은 기술을 포함하며, 보다 엄격한 평가가 요구된다. 유럽연합은 특히 표적 돌연변이와 비표적 돌연변이를 세밀히 분석하며, 생물다양성 영향과 장기적인 생태적 변화를 모니터링 하는 체계를 강화하였다. 이러한 접근은 유전자 편집 기술의 안정성을

검증하는 동시에, 기술의 상업적 활용 가능성을 확장하려는 유럽연합의 전략을 반영한다.

일본은 2019년부터 카르타헤나법을 기반으로 유전자 편집 기술에 대한 독자적인 규제 체계를 구축하였으며, 외래 유전자가 최종 산물에 포함되지 않을 경우 규제를 완화하였다. 일본은 비표적 생물에 미치는 영향, 근연종과의 교배 가능성, 생물다양성 변화 가능성, 환경 방출 후 장기적인 영향을 주요 평가 항목으로 설정하고 있다. 환경 방출 절차는 기술적 안전성뿐 아니라 사회적 신뢰를 확보하기 위한 과정으로 설계되어 있으며, 심사 결과는 일반 국민과 관련 단체에 공개된다. 이러한 투명한 접근 방식은 일본이 유전자 편집 기술에 대한 대중의 수용성을 높이고 사회적 신뢰를 강화하려는 전략을 보여준다. 일본은 또한 국제 규제 동향을 반영하여 평가 항목을 지속적으로 세분화하고 있으며, 글로벌 시장에서의 경쟁력을 확보하기 위한 국제 협력을 강화하고 있다.

이 세 국가와 지역의 사례는 유전자 편집 기술이 가진 잠재적 위험과 이점을 과학적으로 평가하고, 각국의 정책적 우선순위와 생태적 요구를 반영한 규제 체계를 설계하는 데 있어 중요한 참고가 된다(표 9). 미국은 기술 혁신과 생물다양성 보호 간의 균형을 맞추기 위해 장기적 모니터링 체계를 강화하고 있으며, 유럽연합은 기술의 안전성을 중심으로 규제를 세분화하여 자연 생태계와의 조화를 이루고 있다. 일본은 생물다양성 보호와 사회적 신뢰 구축을 강조하며, 투명성과 국제 협력을 통해 기술 발전을 지원한다. 이러한 사례는 유전자 편집 기술이 환경적 안전성과 기술적 발전을 조화롭게 달성할 수 있도록 설계된 규제 체계의 중요성을 강조하며, 향후 글로벌 규제 체계 발전에 있어 중요한 시사점을 제공한다.

표 9. 미국, 유럽연합, 일본의 신기술 LMO 안전관리 체계 비교

항목	미국 (SECURE Rule)	유럽연합 (NGT 개정안)	일본 (카르타헤나법 기반)
기술 규제	SDN-1 및 일부 SDN-2 기술에 대해 외래 유전자 없음 시 규제 면제	NGT 카테고리 1 (자연적 돌연변이 유사) → 규제 완화 NGT 카테고리 2 (외래 유전자 일시적 도입) → 제한적 규제	외래 유전자가 최종 산물에 잔존하지 않으면 규제 완화
평가 항목	○ 비교 식물 정보 ○ 유전자형 및 표현형 특성 ○ 생물다양성 영향 ○ 근연종과의 교배 가능성	○ 표적 돌연변이 분석 ○ 비표적 돌연변이 검증 ○ 생물다양성 영향 ○ 환경 방출 후 장기 모니터링	○ 비표적 생물에 미치는 영향 ○ 근연종과의 교배 가능성 ○ 생물다양성 변화 가능성 ○ 환경 방출 후 장기 영향 분석
규제 목표	기술 혁신 촉진과 생물다양성 보호 간의 균형 유지	유전자 편집 기술의 안정성 검증과 자연 생태계와의 조화	생물다양성 보호와 사회적 신뢰 구축
사후 관리	필수. 환경 방출 후 생태적 변화를 지속적으로 관찰	필수. 장기적 생태 변화와 비표적 돌연변이 지속적 검토	필요. 생물다양성 변화 및 근연종 교배 가능성을 장기적으로 평가
평가 항목	기술적 안정성과 생태적 위험을 종합적으로 평가	표적/비표적 돌연변이를 구분하고, 생물다양성 영향 분석 항목을 세분화	생물다양성 영향에 중점을 둔 평가 항목 설정
사회적 신뢰	모니터링 계획을 통해 장기적 안전성 보장	기술 안정성 검증으로 규제 완화를 통해 사회적 수용성 강화	심사 과정에서 국민 의견 수렴 및 공개를 통해 투명성 확보

다. 유전자변형생물체법(LMO법) 개정 대비 환경부 소관 평가 항목

유전자변형생물체법(LMO법) 개정을 앞두고, 환경부는 유전자 편집 생물체의 환경 방출에 따른 영향을 체계적으로 평가하기 위한 항목을 구체화해야 한다. 이는 생물다양성 보호와 유전자 편집 기술의 안전한 활용을 보장하기 위한 필수적인 과정이다. 특히, 유전자 편집 생물체가 국내 생태계에 미칠 잠재적 영향을 사전에 예측하고, 이를 통해 규제 체계를 강화하면서도 기술 혁신을 지원할 수 있는 방안을 마련해야 한다. 이를 위해 환경부 소관 평가 항목으로 다음과 같은 주요 요소들이 제안된다.

먼저, 유전자 편집 생물체의 자생종 및 근연종과의 교배 가능성을 평가하는 것이 중요하다. 환경에 방출된 유전자 편집 생물체가 국내 자생종이나 근연종과 교배할 가능성은 생물다양성 변화와 예기치 않은 유전자 이동의 위험을 초래할 수 있다. 따라서 교배 가능성 평가를 통해 방출 지역의 자생종 분포와 근연종의 생태적 특성을 분석하고, 유전자 이동으로 인해 발생할 수 있는 잠재적 영향을 사전에 차단해야 한다.

또한, 비표적 돌연변이와 비표적 유전자 발현 변화에 대한 분석이 필수적이다. 유전자 편집 기술은 높은 정밀성을 자랑하지만, 표적 외 부위에서 예기치 않은 돌연변이나 유전자 발현 변화가 발생할 가능성을 배제할 수 없다. 이러한 비표적 영향은 생물다양성과 생태계 안정성에 부정적인 결과를 초래할 수 있으므로, 기술적 안정성을 확보하기 위한 세밀한 검토가 요구된다.

유전자 편집 생물체의 환경 방출 시 생존력과 확산 가능성을 평가하는 것도 필수적이다. 방출된 생물체가 자연환경에서 얼마나 오래 생존하고 확산할 수 있는지를 분석하는 것은 생태계 균형을 유지하기 위한 중요한 과정이다. 특히, 확산 패턴과 번식력을 평가하여 환경 방출이 자연 생태계에 미치는 영향을 정량화하고, 필요한 관리 조치를 설계하는 데 활용해야 한다.

생물다양성 영향은 환경 방출이 자연 생태계의 비표적 생물에 미치는 영향을 평가하는 핵심 항목이다. 유전자 편집 생물체가 특정 생물군의 감소나 생태적 관계 변화와 같은 예기치 않은 영향을 미칠 수 있으므로, 비표적 생물과의 상호작용과 독성 여부를 검토하는 것이 필수적이다. 이를 통해 방출된 생물체가 기존 생태계와 조화롭게 공존할 수 있는지를 판단하고, 생물다양성 손실을 예방할 수 있다.

더불어, 외래 유전자의 잔존 여부를 검토하여 최종 산물이 외래 유전자를 포함하고 있는지를 평가해야 한다. 외래 유전자가 포함되지 않은 유전자

편집 생물체는 자연적 돌연변이와 유사한 특성을 가지며, 이는 규제 완화의 기준이 될 수 있다. 이러한 검토는 최종 산물의 안전성을 평가하는 중요한 척도로 작용한다.

환경 방출 이후의 영향을 지속적으로 관찰할 수 있는 장기적 모니터링 체계도 필수적이다. 환경 방출 후 유전자 편집 생물체가 생태계에서 미치는 영향을 지속적으로 평가하고, 이를 통해 비표적 생물과의 상호작용, 근연종과의 유전자 교환 가능성, 생태적 균형 변화 등을 추적해야 한다. 이러한 모니터링 체계는 부정적 영향을 조기에 탐지하고 적절한 대책을 마련하는 데 기여할 것이다.

마지막으로, 평가 항목은 국내 생태적 특성을 반영해야 한다. 국내 생태계는 특정 지역에 고유한 자생종과 생물 군집이 존재하므로, 해외 규제 사례를 그대로 적용하기보다는 국내 자연환경에 맞는 맞춤형 평가 기준을 수립해야 한다. 이는 한국 생태계의 특수성을 반영하고, 국내에서 발생할 수 있는 잠재적 영향을 보다 효과적으로 관리하기 위한 중요한 과정이다.

결론적으로, 환경부는 유전자변형생물체법(LMO법) 개정을 통해 위의 평가 항목을 바탕으로 체계적이고 구체적인 규제 기준을 마련해야 한다. 이러한 평가 항목은 미국, 유럽연합, 일본 등 주요 국가의 규제 사례를 참고하되, 국내 생태적 특성과 법적 요구를 반영한 맞춤형 체계를 통해 기술 혁신과 생물다양성 보호 간의 균형을 유지할 수 있을 것이다. 이를 통해 유전자 편집 기술의 안전한 활용을 보장하고, 환경 방출로 인한 잠재적 위험을 최소화할 수 있는 기반을 제공할 것이다.

2. 환경부 위해성평가용 신기술 LMO(식물, 미생물, 미세조류) 개발

가. 유전자가위 이용 환경정화용 LM 미세조류 형질전환 시스템 구축

신기술 LM미세조류의 위해성평가 체계를 마련하기 위하여 모델 시스템을 구축하였다. 선정한 유전자는 glycolate oxidase 1(*GOX1*)으로 광호흡 과정에서 핵심적인 역할을 하는 효소를 암호화한다. 이 효소는 글리콜산(glycolate)을 글리옥실산(glyoxylate)으로 산화시키는 반응을 촉매하며, 이는 광합성 과정에서 발생하는 광호흡 부산물을 처리하는 중요한 단계다. *GOX1*은 광합성 시 과도하게 생성된 글리콜산을 제거하여 탄소와 에너지의 손실을 줄이는 데 기여한다. 이 유전자는 미세조류가 스트레스 환경, 특히 고농도의 CO_2 또는 낮은 CO_2 조건에서 적응하고 생존하는 데 필수적이다. 또한, *GOX1* 유전자의 발현 조절은 광합성과 광호흡의 균형을 유지하는 데 중요한 요소로 연구되고 있다. 본 과제는 *GOX1* 유전자를 유전자가위 기술로 편집하면 광호흡 과정이 억제되어 탄소 손실을 최소화하고 광합성 효율을 향상시키는 효과가 나타날 것으로 예측하였다. 이 과정에서 탄소 고정이 보다 효과적으로 이루어져 바이오매스 생산량이 증가하며, 이는 바이오연료 및 고부가가치 물질 생산에서 중요한 장점으로 작용할 것이며 또한, 고농도 CO_2 환경에서 광합성 효율이 증가하여 생산성이 더욱 극대화될 가능성이 있다고 판단했다. *GOX1* 유전자 결실은 이러한 특성을 바탕으로 미세조류 기반의 대규모 탄소 고정 기술에서 주된 전략으로 평가하였으며, 나아가 탄소 중립 LM미세조류 개발 또는 수입 가능성을 높게 예측했다.

가이드 RNA와 Cfp1 단백질이 결합된 RNP(Ribonucleoprotein)를 미세조류에 전기천공법을 사용하여 도입하였고 생성된 콜로니를 계대배양하여 증식하였다. RNP는 벡터를 이용한 유전자가위와 다르게 선별마커가 없으므로 다수의 콜로니를 확보하여 유전자가위 LM미세조류의 후보군을 확보할 필요가 있다. 현재 다수 콜로니를 확보한 후 유전자 결실 여부를 조사하고 있으며, 추후 연구에 그 결과를 반영할 예정이다.

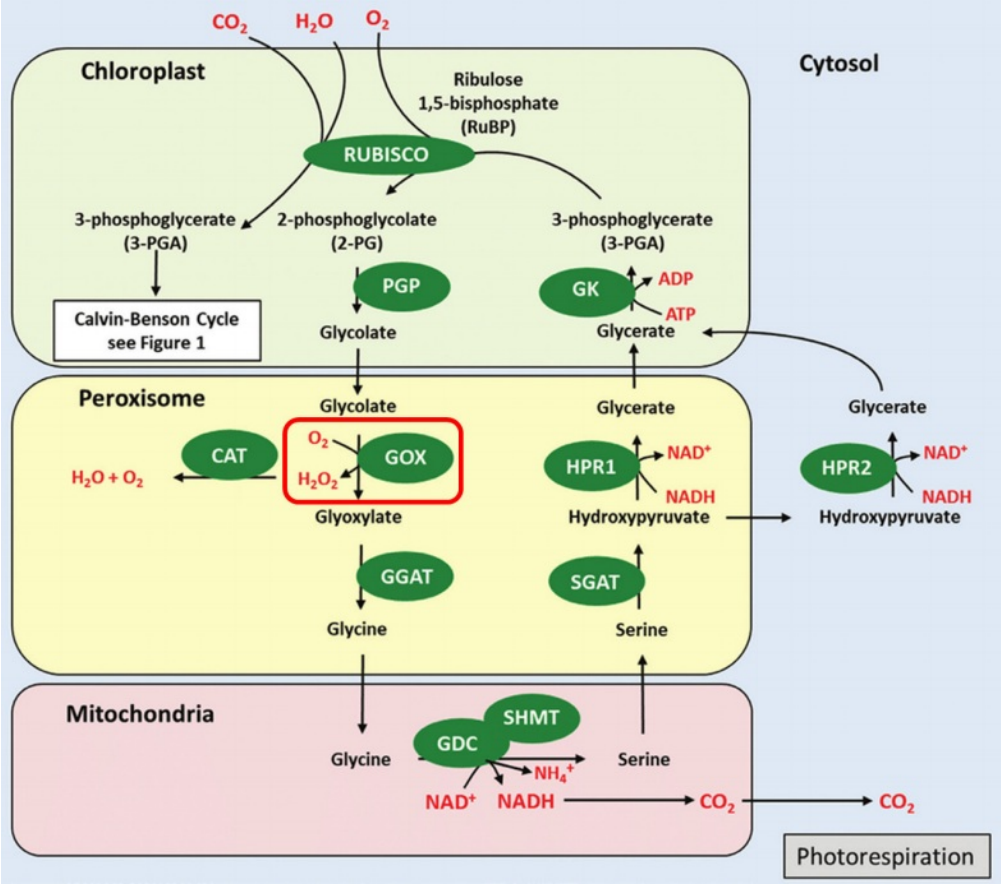


그림 8. *GOX1*의 대사 (출처: Simkin et al., 2019)

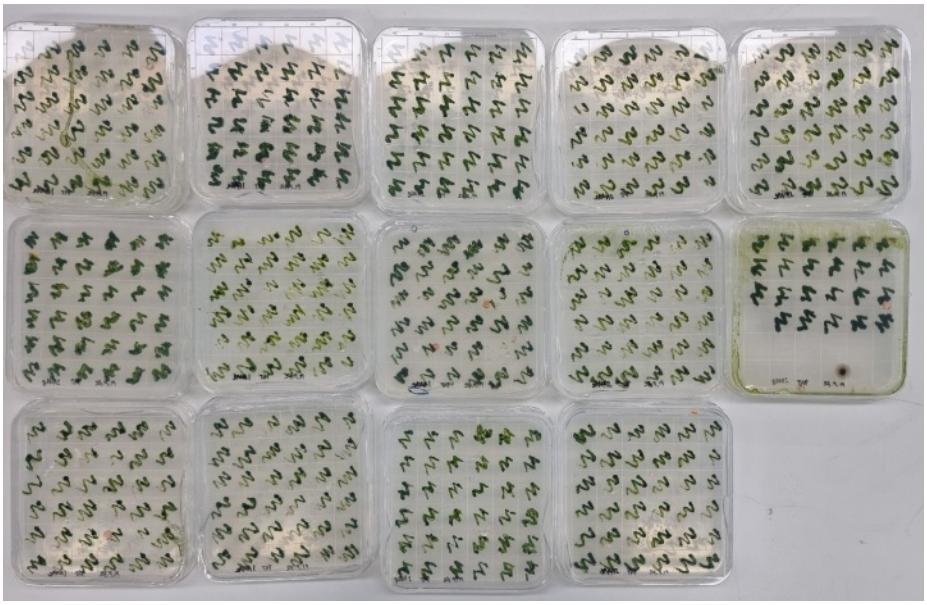


그림 9. 유전자가위 LM미세조류 형질전환체 확보

나. 신기술 LM 식물 형질전환 및 우성형질 선별

1) 야외 목본의 기내 도입 착수

신기술 LM 포플러의 형질전환을 주기적으로 안정적으로 수행하기 위해, 형질전환 전 야생형 포플러 개체를 충분히 확보할 수 있는 효율적인 방법을 모색하였다. 이를 위해 야외에 식재된 포플러 절편체를 시험관 내로 도입하는 방법과 형질전환 시 줄기의 일부를 남겨 계대배양을 진행하는 방안을 제안하였다. 우선, 2월 중순경 야외에서 재배 중인 포플러를 대상으로 기내 도입을 시도하였다. 격리된 포장지 내에서 재배 중인 야생형 포플러의 어린 가지를 채취하였으며, 채취 시 액아를 포함하도록 가지를 예리하게 절단하였다. 이후, 물 3 L와 식물영양제 Hyponex 3 mL를 혼합한 용액에 절편체를 담가 신초 생육 및 발근 여부를 관찰하였다. 혼합 용액은 3일 간격으로 교체하여 적절한 영양 상태를 유지하도록 관리하였다. 그 결과, 약 2주 후 액아로부터 신초가 발아하고 뿌리가 유도되는 것을 확인하였다(그림 10, 11, 12). 이를 통해, 야생형 포플러를 안정적으로 기내로 도입할 수 있는 가능성을 확인하였으며, 형질전환에 필요한 개체를 효율적으로 확보할 수 있는 기초 자료를 마련하였다.

그림 10. 대량증식용 야생형 포플러 기내 도입 2주 경과

그림 11. 대량증식용 야생형 포플러 기내 도입 3주 경과

그림 12. 대량증식용 야생형 포플러 기내 도입 5주 경과

기내 도입 후 6주가 경과한 포플러 절편체를 plant culture dish 내 배지로 이식하기 위해, 벌레나 곰팡이가 없는 잎과 줄기 부위를 선별하여 무균대에서 처리하였다. 우선, 절편체를 증류수로 3 ~ 4회 세척하여 외부 오염원을 제거하였다. 이후, 개체별로 70% 에탄올, 0.5% Triton X-100, 그리고 2% 락스 희석액을 사용해 각기 다른 시간과 횟수로 살균하였으며, 마지막으로 증류수로 여러 차례 세척하여 잔류 화학물질을 제거하였다. 살균 처리 후, 멸균된 필터 페이퍼로 절편체의 표면 물기를 제거한 뒤, 식물 생육에 영향을 미치지 않는 곰팡이 제거제인 PPM(Plant Preservative Mixture) 1 mL/L가 포함된 발근 유도 배지에 치상하였다. 치상된 절편체는 생장실로 옮겨져 생육 과정을 관찰하였으며, 해당 과정은 그림에 요약되어 있다(그림 13, 14). 이 방법은 기내 도입된 절편체의 성공적인 발근 및 생육을 위한 기초 자료를 제공하였다.

소독과 세척 과정 후 곰팡이 억제제를 첨가한 배지에 이식하여 생장 과정을 관찰한 결과, 포플러 잎은 연두색에서 갈색으로 변색되었고, 결국 낙엽이 되어 떨어졌다. 또한, 뿌리 유도가 이루어지지 않아 줄기만 남은 상태가 되었으며, 시간이 지나도 생장이 멈춘 상태를 유지하였다. 기내 도입 실패의 주요 원인은 에탄올과 락스 처리 및 세척 과정에서 어린 포플러 개체가 과도한 물리적, 화학적 손상을 입어 생육이 저해된 것으로 판단된다. 이러한 문제를 해결하기 위해, 다음 기내 도입 과정에서는 어린 가지를 채취한 즉시 소독 및 세척을 진행하고, 표면이 살균된 절편체를 건조한 후, 뿌리 유도 배지가 담긴 시험관에 치상하는 방법을 시도할 계획이다. 이를 통해 손상을 최소화하고 성공적인 기내 도입을 도모하고자 한다.

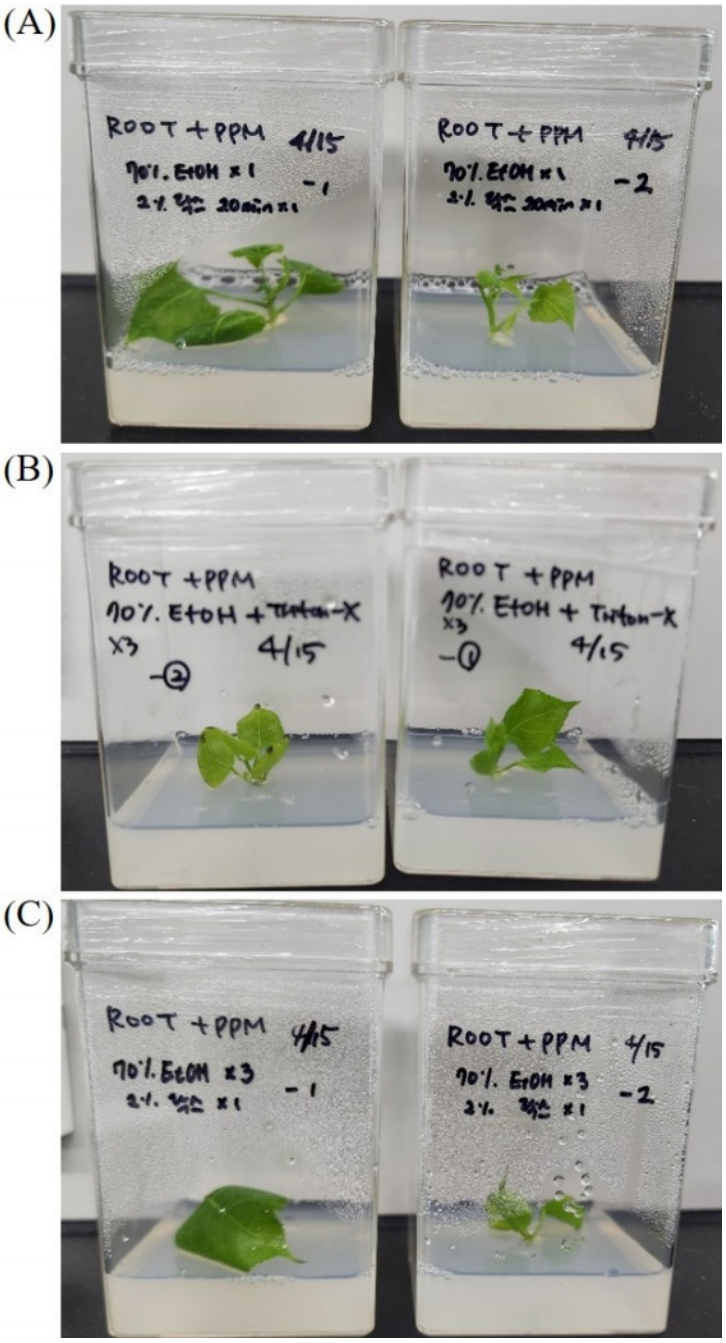


그림 13. 대량증식용 포플러의 기내 도입 소독 및 plant culture dish내 배지로 이식. (A) 70% 에탄올 × 2% 락스, (B) 70% 에탄올 × 0.5% Triton X-100, (C) 70% 에탄올 × 2% 락스

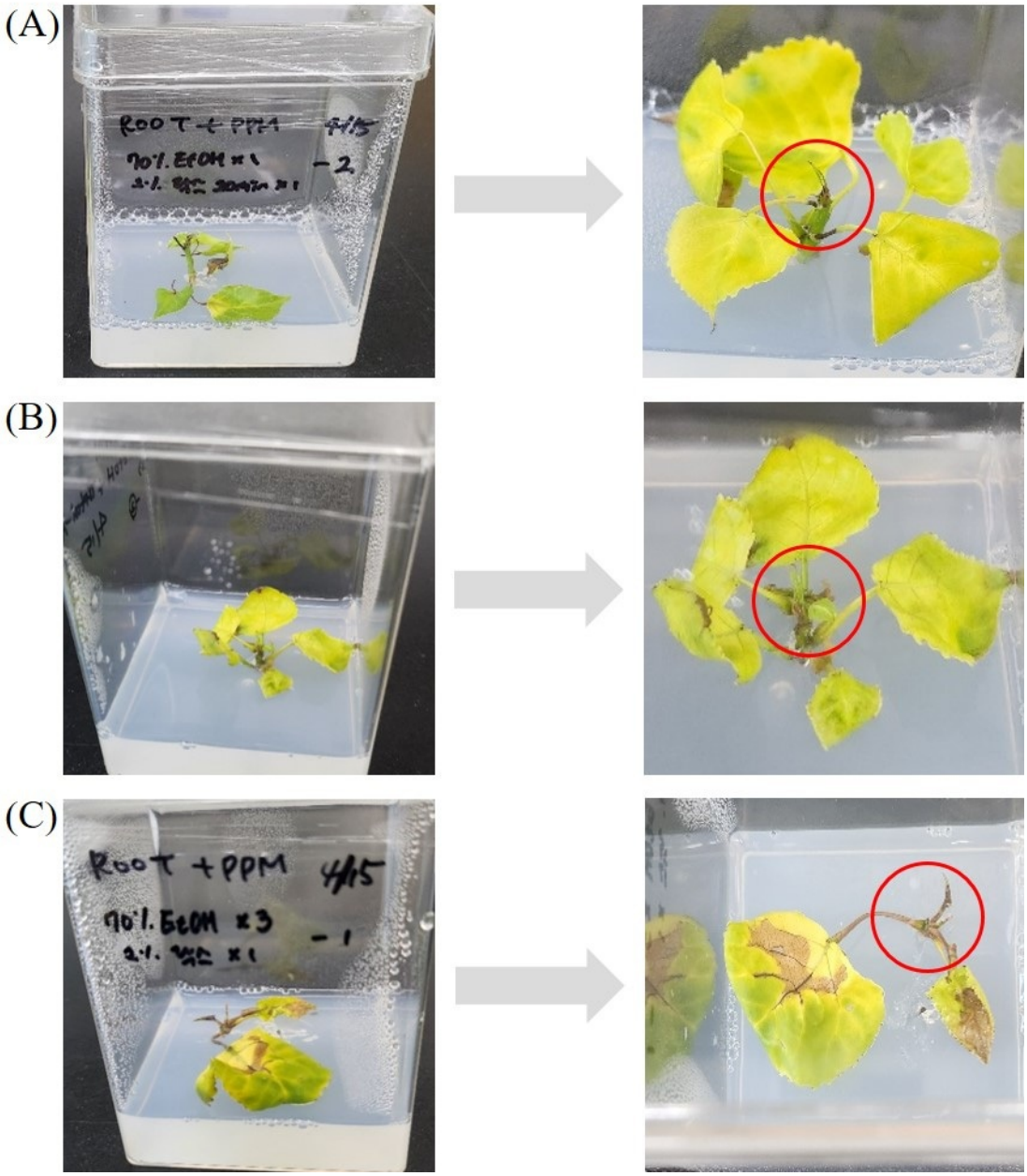


그림 14. Plant culture dish 내 생육.
(A) 70% 에탄올 × 2% 락스 (B) 70% 에탄올 × 0.5% Triton X-100,
(C) 70% 에탄올 × 2% 락스

2) 목본 순화 과정

목본 식물의 순화 과정을 위한 온도, 습도, 빛 등 최적 조건을 확립하기 위해, 시험관 내(test tube)에서 온실, 그리고 온실에서 야외 포장으로 이어지는 적응 실험을 단계적으로 수행하였다(그림 15). 먼저, 생장실 내에서 Test tube에 배양된 목본 식물을 Incu Tissue plate(square type: 72 mm × 72 mm × 100 mm)로 옮겨, 목본의 신장이 약 30 cm에 이를 때까지 증식시켰다. 이후, 온실 환경으로 옮기기 전에 식물의 뿌리에 묻은 MS 배지를 증류수로 세척하고, 잔뿌리를 정돈한 뒤 멸균된 흙에 이식하였다. 온실 환경에서는 충분한 수분 공급을 위해 이식 후 1주일 동안 아크릴 뚜껑으로 덮어 습도를 유지하였다. 식물체가 안정화된 시점에서 뚜껑을 제거하고, 24 ~ 25°C 온도와 16시간 광주기(16 h L / 8 h D) 조건 하에서 지속적으로 배양하였다.

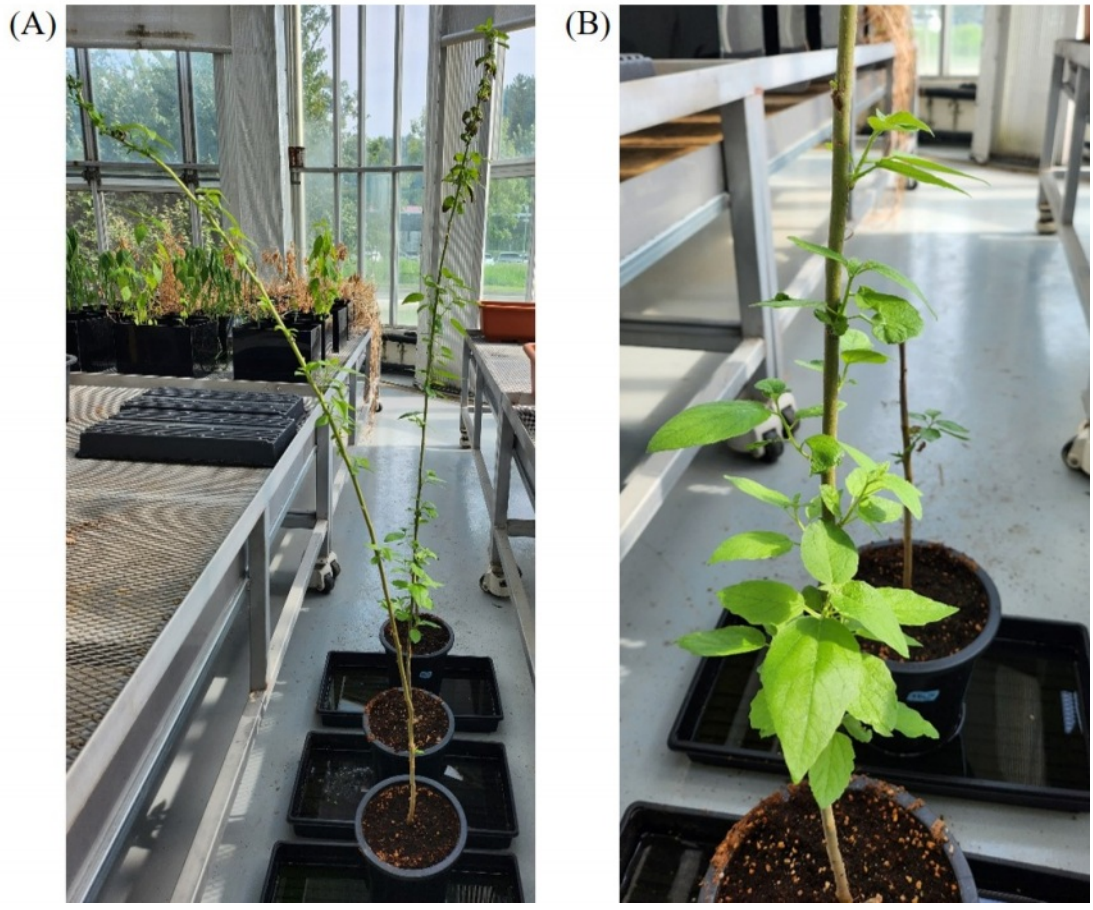


그림 15. 온실 포플러 순화 과정 (A) 포플러 잎 제거 (B) 포플러 새순 형성

이러한 실험 결과, 목본 식물이 시험관 내(test tube) 배양 배지에서 온실로 이식되고 흙으로 순화되는 과정에서 생장실의 온도, 습도, 명암 주기 조건(24 ~ 25℃, 16h L/8h D)보다 여름철 고온(30 ~ 35℃) 및 70% 이상의 다습한 환경에서도 충분히 생존할 수 있음을 확인하였다. 이를 바탕으로 현재 목본의 삽목 과정을 진행 중이다(그림 16). 향후 본 연구는 '환경부 LMO 위해성평가기관 운영' 과제와 협업하여, 온실에서 야외 포장으로의 이동 과정을 포함한 신기술 LM 포플러의 위해성 평가를 수행할 예정이다. 이를 통해 신기술 LM 포플러의 위해성평가를 실제 토양으로 옮겨 수행할 예정이다.

그림 16. 포플러의 삽목 과정

3) 아그로박테리움 방법 이용 신기술 LM 목본 형질전환

기존 형질전환 방법의 한계를 보완하기 위해, 야생형 BH 포플러(*Populus alba* × *Populus glandulosa*)의 초순 확보 및 배지 조성 성분을 개선하였다. 이를 통해 유전자가위 기술로 변형한 표적 유전자를 아그로박테리움 매개법을 이용하여 환경정화용 LM 목본 형질전환을 수행하였다. 우선, 야생형 BH 포플러 40개체를 배양하였고, 초순은 새로운 배양 배지로 옮긴 후 남은 줄기 마디를 절단하여 각 아그로박테리움 현탁액(40개 절간/현탁액 1개)에 감염(접종)시켰다. 이후, 항생제가 포함되지 않은 callus 유도 배지에 10 mg/mL

아세트실리건을 첨가하고, 조직 단면을 치상한 뒤(그림 17) 호일로 배양 접시를 밀폐하여 암배양을 2일간 진행하였다. 2일 후, 감염된 조직을 항생제가 포함된 callus 유도 배지에 3×4 배열로 배치하고, 4 ~ 6주간 명배양을 진행하여 callus 유도를 관찰하였다(그림 18). 이 과정에서 2주마다 배지를 교체하여 조직의 생육을 유지하였다. 실험 결과, 5주가 경과한 시점에서 callus가 유도된 것을 확인할 수 있었다(그림 19).

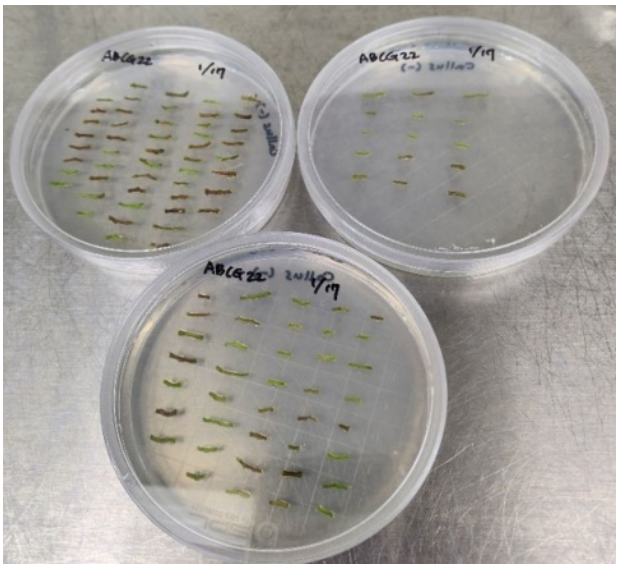


그림 17. 신기술 LM포플러 형질전환

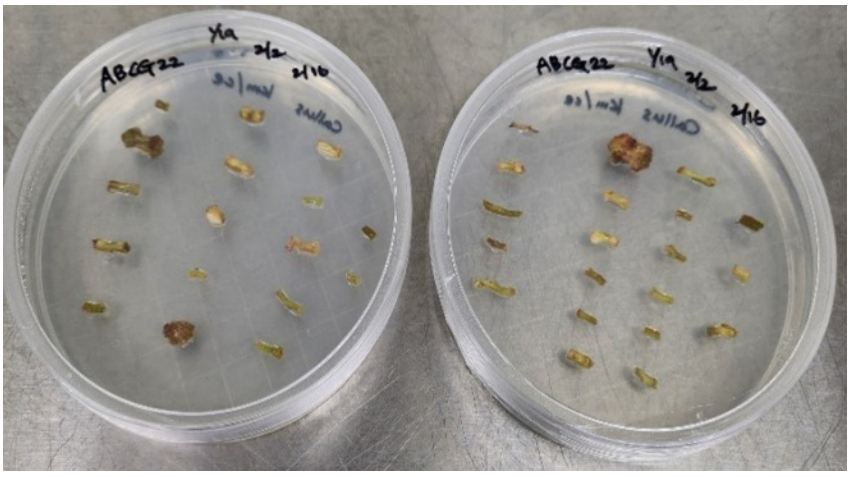


그림 18. 신기술 LM포플러 형질전환 후 Callus 유도

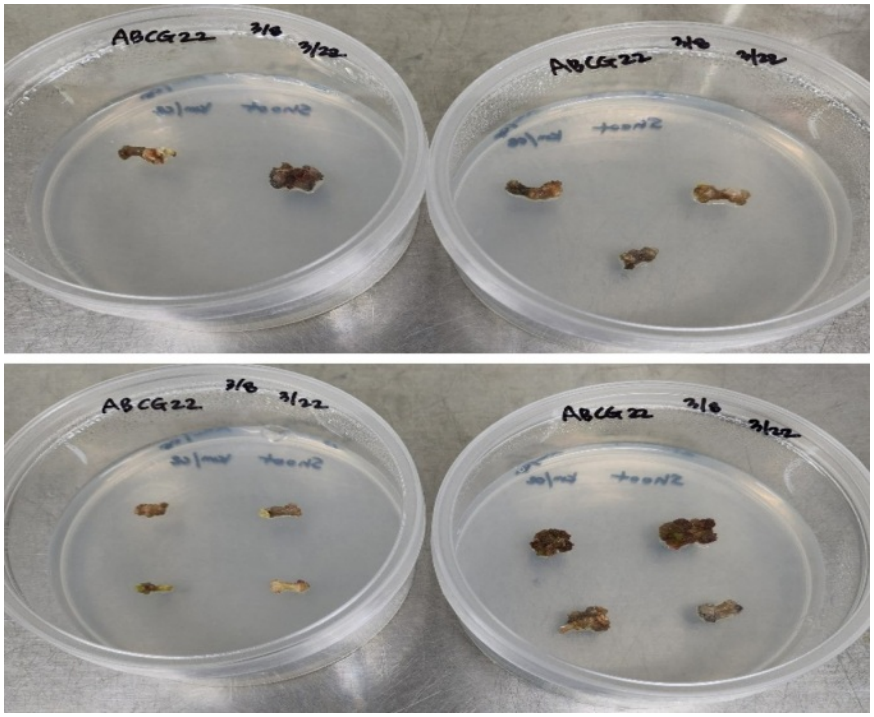


그림 19. 신기술 LM포플러 Callus 유도 완료

형질전환된 조직은 즉시 Shoot(신초) 유도 배지로 옮겨 배양하였으며, 신초가 자라는 모습을 관찰할 수 있었다. 신초의 길이가 약 2 ~ 3cm에 도달하였을 때, 날카로운 메스를 사용하여 callus와 신초 사이의 단면을 정교하게 분리한 후 Root(뿌리) 유도 배지로 옮겨주었다. 배양 후 약 1주일이 경과하자 뿌리가 형성되고 새로운 잎이 자라는 것을 확인하였다(그림 20).

그림 20. 신기술 LM포플러 발근 유도

4) 가이드 RNA 서열 특이적 프라이머 이용 표적 돌연변이 부위 확인

형질전환 식물체의 표적유전자 돌연변이 유무를 확인하기 위해 특이적 프라이머를 사용하여 PCR 실험을 수행하였다(그림 21). 염기서열 분석을 통해 가이드 RNA 서열의 PAM site로부터 LM 포플러의 표적 돌연변이 부위를 확인하였다. 향후, 신기술 LM 포플러 개체들은 deep-sequencing을 통해 비표적부위 발생 유무 및 정확한 돌연변이 효율을 검증하고, 항생제가 포함되지 않은 root 배지로 옮겨 순화 과정을 거쳐 흙으로 옮겨 심어 신기술 LM 포플러의 위해성평가 지침 개발에 활용될 예정이다.

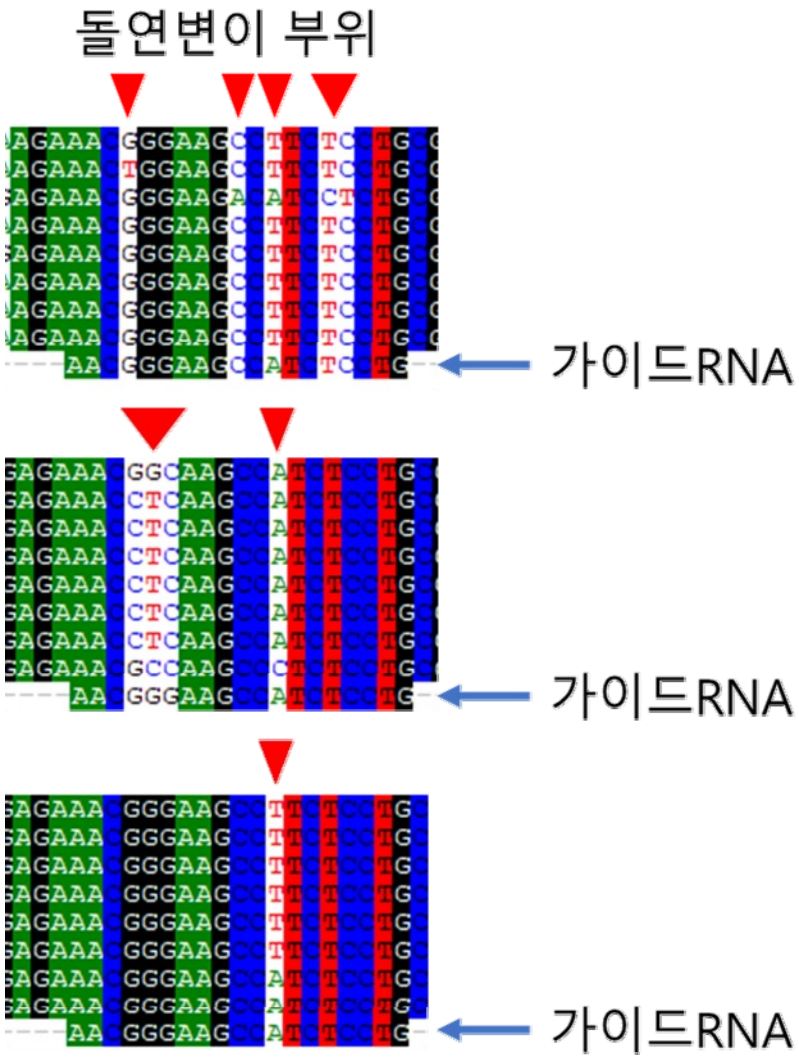


그림 21. 신기술 LM포플러 돌연변이 부위 확인

다. 환경부 소관 LM 미생물 형질전환 및 우성형질 선별

최근 유전자변형기술과 합성생물학의 발전은 환경정화와 기후변화 문제를 해결하기 위한 새로운 가능성을 제시하고 있다. 특히, 유전자변형미생물(Genetically Engineered Microbes, GEMs)을 환경에 방출하여 활용하는 환경방출용 유전자변형미생물(Engineered Microbes for Environmental Release, EMERs)은 환경 복원, 오염물질 제거 및 생물 감지와 같은 다양한 분야에서 중요한 역할을 할 수 있는 기술로 주목받고 있다.

또한, 미국은 박테리아의 유전자 발현이 환경 요인에 의한 조절 기작과 환경정화에 적용하는 연구하기 위해 미국 국립과학재단(National Science Foundation)으로부터 120만 달러의 지원을 했다. 이 지원은 토양 박테리아인 Pseudomonas putida를 대상으로 메틸화(methylation)가 유전자 발현에 미치는 영향을 조사하여, 박테리아를 환경정화 목적으로 활용할 때의 안정성과 예측 가능성을 높이는 것을 목표로 하고 있다.

1) 환경부 소관 LM 미생물(*Pseudomonas putida*) 형질전환

본 과제에서는 '23년 신기술 LM 초본, 목본 형질전환 시스템 구축에 이어 '24년 위해성평가용 LM 미생물 형질전환 시스템 구축을 수행하였다. 먼저, 표적유전자를 정제 한 후 (그림 22), LB 배지에서 28 °C 진탕 배양한 *P. putida*를 전기 천공법(electroporation)으로 형질전환을 수행하였다. 다음날, 형성된 colony들을 Colony PCR을 통해 표적유전자가 증폭되는 것을 확인하였다(그림 23, 24). 이후, 염기서열 분석을 수행하여 *P. putida*내 표적 유전자 서열이 존재하는 것을 검증하였고, 우성형질을 선별하였다 (그림 25).이러한 결과를 통해 환경부 소관 LM 미생물 형질전환 시스템을 구축하였고 추후 위해성평가용 LM 미생물 개발에 적용할 예정이다.

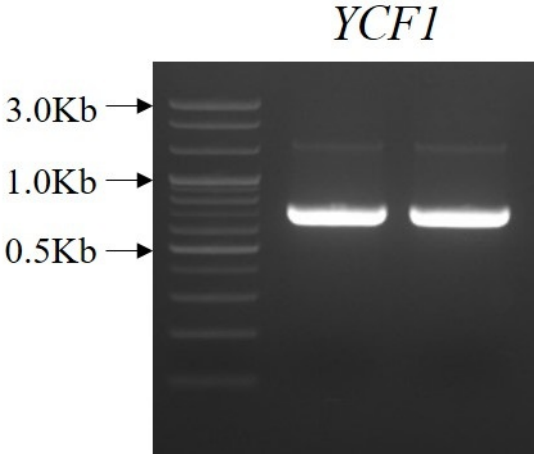


그림 22. 표적유전자 정제

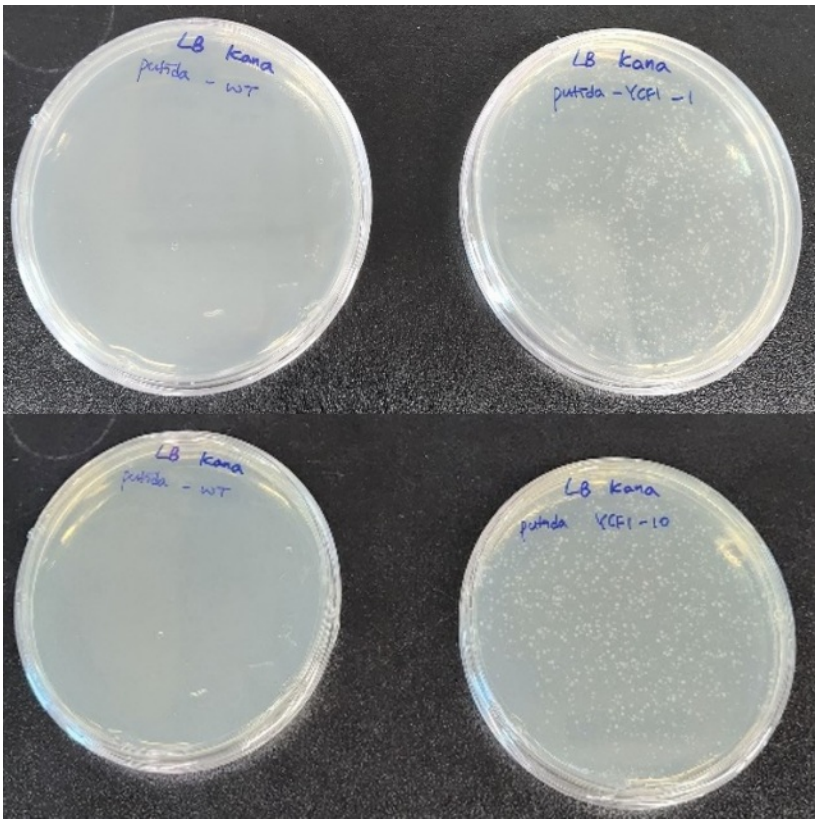


그림 23. *P.putida* 형질전환체 확보

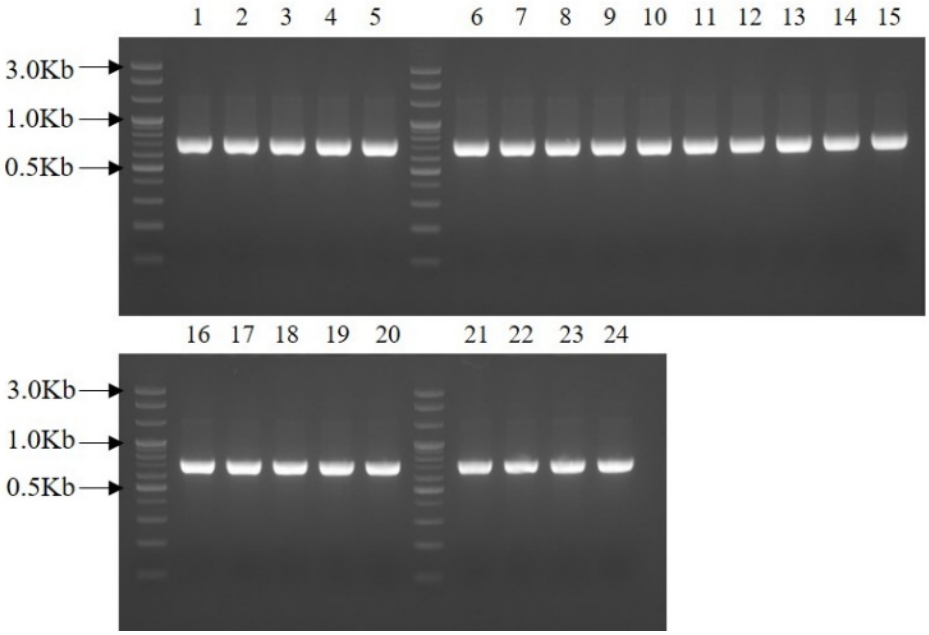


그림 24. 형질전환체 검증용 Colony PCR 결과

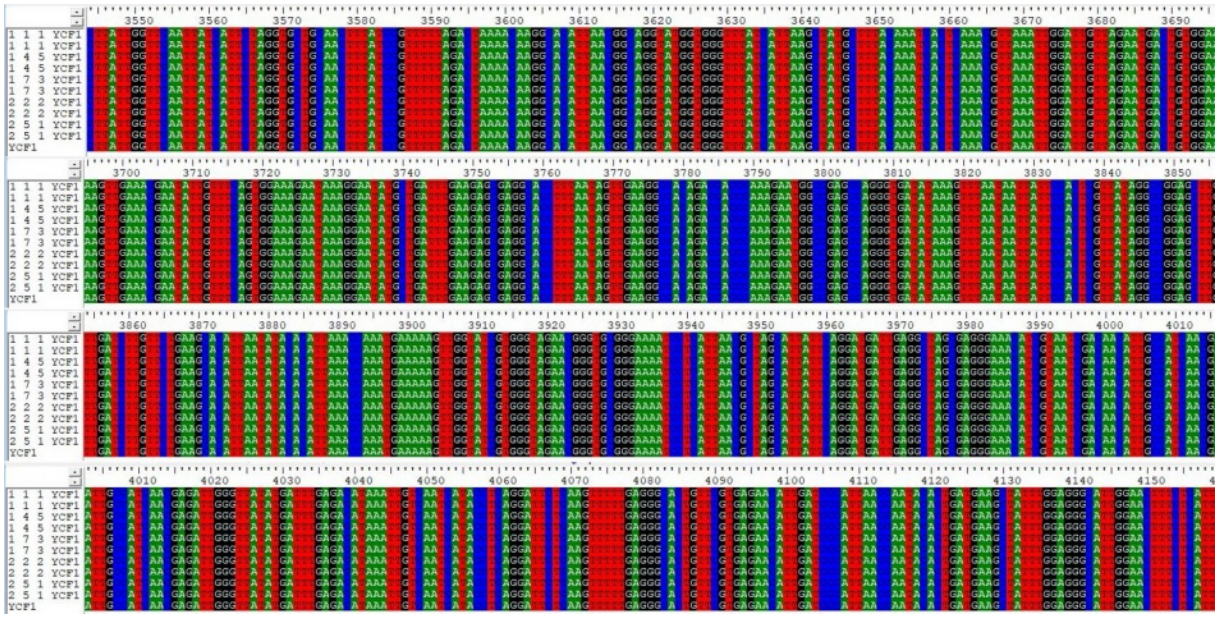


그림 25. 형질전환체 도입유전자 증폭 및 염기서열 분석 완료

2) 제한효소 서열 이용 도입유전자 삽입 부위 검증

미생물에서 도입유전자 삽입 부위를 결정하기 위해 다양한 방법들이 제시된다(표 10). LMO법 통합고시 별표 10-1 유전자변형미생물의 위해성 평가자료에 근거하여 '유전자변형미생물 특성에 관한 자료'에서 도입유전자 및 인접 숙주 게놈 유전자의 외래전사해독프레임 유무와 그 전사, 발현 가능성, 위해염기서열의 존재 유무 등 유전자변형미생물 내 도입유전자에 관한 자료를 작성시 요구되는 사항이다. 본 과제는 제한효소 서열을 활용하여 삽입 부위를 검증하는 Inverse PCR의 접근법을 통해 확인하고자 한다. Inverse PCR은 제한효소로 숙주 DNA를 절단한 뒤에 도입유전자 주변 서열을 증폭시켜 삽입 부위를 확인하는 원리로 실험이 간단하며 빠르게 확인할 수 있다. 그러나 제한효소에 따라 효율이 달라진다는 단점에 의해 적절한 제한효소를 선택하는게 중요하다. 따라서 현재 LM미생물의 도입유전자 삽입 위치를 확인하기 위하여 제한효소의 효율을 검증하고 있는 단계로 추후 결과를 지속적으로 업데이트할 예정이다.

표 10. LM미생물 도입유전자 삽입 부위 검증 방법

방법	원리	적용 상황
Inverse PCR	제한효소로 절단된 DNA를 self-ligation하여 원형화한 후, PCR로 증폭하여 삽입 위치 분석	삽입 부위 주변 서열을 확인하고자 할 때
Southern Blot	제한효소로 소화된 DNA를 막에 전이한 후, 외래 유전자 탐침으로 hydbridization	삽입 유전자의 복제 수와 구조를 확인하고자 할 때
Whole Genome Sequencing (WGS)	게놈 전체를 시퀀싱하여 외래 유전자 삽입 위치와 주변 서열을 분석	삽입 위치를 정확히 파악하거나 여러 삽입이 있을 때
Tn-seq	트랜스포존 기반 삽입 후, 시퀀싱을 통해 삽입 위치를 분석	무작위 삽입 위치를 분석하고자 할 때
PCR-based Screening	삽입 가능성이 높은 게놈 영역에 대해 프라이머를 설계하여 PCR로 증폭 후, 시퀀싱	특정 게놈 영역에 삽입 여부를 확인하고자 할 때
CRISPR-Cas9 기반 타겟 시퀀싱	CRISPR-Cas9로 삽입 가능성이 높은 게놈 영역을 타겟팅하여 시퀀싱	특정 게놈 영역에 외래 유전자가 삽입되었는지 정밀 분석할 때
RNA-seq	발현된 RNA를 시퀀싱하여 삽입된 외래 유전자 발현 여부와 위치를 간접적으로 분석	삽입 유전자가 발현 중인지 확인하며 위치를 추론하고자 할 때

라. 개선된 온실·한실 환경 내 신기술 LMO 생장 분석

2023년 본 과제에서는 유전자가위 등 신기술 이용 LMO에 대한 위해성 평가를 위해 기존 식물재배실(한실·온실) 환경 개선사업을 수행하였다. 신기술 이용 LMO뿐만 아니라 기존 관리되고 있는 LMO의 안전관리 및 연구자들의 안전을 위한 배수 개선, 온도 유지 개선, 화분 비산 및 종자 유출 방지 등 전반적인 개선을 수행했고 성공적으로 마무리했다. 그에 따라, 올해 본 과제에서는 기개발된 유전자가위 CRISPR-Cas9 적용 *FAD2*(고올레산 생산) 발현 LM 콩을 위해성 평가용으로 종자를 다수 확보하기 위해 개선된 온실에서 생육하였다. T3 종자를 멸균된 흙에 하나씩 심은 후 생장 과정을 관찰하였다. 약 4개월 동안 경실종자 없이 100% 발아율로 모든 종자가 싹을 틔워, 꽃이 피고 꼬투리에 열매가 맺혀 많은 종자를 수확할 수 있었다. 이것은 개선된 온실 환경이 식물 생장에 필요한 온도, 습도, 산소, 빛 조건을 충족시킨다는 것을 보여주는 결과이다(그림 26). 콩 생육은 작은 방으로 된 배양실보다 빛을 많이 받을 수 있는 온실과 한실에서 수행하는 것이 적합할 것으로 사료된다.

그림 26. LMO 온실이용 신기술 LM콩 종자 대량 확보

3. 환경부 소관 신기술 LMO 위해성심사 지침(안) 개발

본 과제에서는 '새로운 기술로 개발된 LMO 또는 새로운 규제 또는 정책이 필요한 LMO'의 넓은 범주로 '신기술 LMO'를 다루고 있다. 2020년 한국생명공학연구원에서 개발된 플라스틱 분해 LM미세조류 역시 새로운 정책이 필요한 LMO로 간주된다. 2023년부터 본 과제는 플라스틱 분해 LM미세조류를 위한 법안 및 가이드라인을 준비 중에 있다. 또한 개발사와의 열린 창구를 통해 위해성심사서 작성에 애로사항을 청취하며 정부의 R&D 사업 방향에 맞게 개발사의 위해성심사 진입유도에 많은 노력을 취하고 있다(그림 27).

플라스틱 분해 LM미세조류를 개발한 한국생명공학연구원 세포공장연구센터는 국내 7개부처로 나눠 진행되는 위해성심사에 중요한 '용도'의 방향성을 선정하기 위해 2023년 과학기술정보통신부의 국가안전관리사업본부, 환경부의 국립생태원, 해양수산부의 국립해양생물자원관과 국립수산과학원과 함께 논의를 진행하였고 개발사는 플라스틱 분해 LM미세조류를 '환경정화용'의 용도로 방향성을 정하고 환경정화용 LMO로 위해성심사를 진입하고자 하였다. 본 과제는 2022년부터 환경정화용 LMO 개발을 지속적으로 모니터링 하고 있으며, 플라스틱 분해 LM미세조류의 위해성심사를 염두해두고 준비해왔다.

2024년, 개발사인 한국생명공학연구원 세포공장연구센터에서 환경정화용 LM미세조류의 위해성평가 방법 및 상업화 진입방안에 대한 문의가 들어왔고 LMO팀은 적극적의 개발사의 애로사항을 청취하고 위해성평가 방법 및 심사 작성 시 유의사항을 전달하였다.

개발사-과학기술정보통신부-환경부-해양수산부 논의

개발사-환경부 위해성평가 방법 논의

그림 27. LM미세조류 위해성심사 및 평가를 위한 개발사-관계부처 논의

가. 환경정화용(환경부 소관) LM 미세조류 상업화 대비 위해성심사 지침(안) 개발

개발사의 위해성심사에 가장 큰 애로사항은 '어떻게 작성해야 하고, 무엇을 제출해야 하는지, 심사과정은 어떻게 되는지' 였으며, 본 과제에서 개발사에게 환경정화용 LM미세조류 위해성심사를 위한 지침(안)을 개발하였다(그림 28). 지침(안)의 구성은 환경부의 역할, 환경정화용 LMO의 위해성심사 과정, 위해성심사 가이드라인(안) 크게 3파트로 구분되게 작성되었다. 본 과제의 가이드라인은 추후 지속적으로 내용 추가 등 업데이트될 예정으로, 후술하는 내용은 환경부 입장을 대표하는 것은 아님을 명확히 한다(표 11).

그림 28. 환경정화용 LM미세조류 위해성심사·평가 가이드라인(안)

표 11. 유전자변형미세조류의 위해성평가·심사 가이드(안)

※ 후술하는 지침(안)은 전체 내용 중 일부를 발췌한 것으로 환경부 전체 입장을 대변하는 것을 아님을 알리며, 어느 법적 효력을 가지고 있지 않습니다.

유전자변형미세조류의 위해성평가·심사 가이드(안)

[환경부 소관 유전자변형 미세조류 위해성평가·심사 안내]

1. 개발의 목적 및 용도에 관한 자료

▷ 개요

본 항목은 유전자변형 미세조류의 개발 목적과 그 유용성, 실제 적용 방식을 종합적으로 기술하여야 합니다. 개발된 유전자변형 미세조류가 해결하고자 하는 문제와 이를 통해 기대할 수 있는 과학적, 산업적, 환경적 기여를 명확히 설명하고, 활용 방안과 등록 정보를 체계적으로 제공하는 것을 목표로 작성되어야 합니다.

▷ 주요 검토 사항

가. 개발 목적

○ 유전자변형 미세조류 개발의 주요 목표를 기술

나. 개발의 유용성 및 용도

○ 개발된 유전자변형 미세조류가 가지는 과학적, 산업적, 환경적 유용성을 설명합니다.

다. 사용방법

○ 유전자변형 미세조류의 사용 목적에 따라 일반적인 적용 방식을 기술합니다.

라. 품종등록 정보(유전자은행 등)

○ 해당 유전자변형 미세조류가 등록된 유전자은행 또는 관련 기관의 정보를 기재합니다.

○ 등록번호: 유전자은행 또는 관련 기관에 등록된 경우, 공식 등록번호를 포함하여야 합니다.

○ 기관명: 품종이 등록된 국내외 기관의 명칭을 작성합니다.

○ 등록 상태: 품종 보호 또는 지식재산권 관련 상태를 기술합니다.

2. 숙주생물체에 관한 자료

▷ 개요

본 항목은 유전자변형 미세조류의 숙주 생물체에 대한 정보를 체계적으로 기술하기 위한 것입니다. 숙주 생물체의 분류학적 특성, 자연생태계에서의 분포 현황, 생물학적 특성 및 이용 내력 등을 포함하여 안전성과 관련된 모든 측면을 종합적으로 제공하는 것이 목적입니다. 특히, 숙주 생물체의 병원성, 항생제 저항성, 유해물질 생산 가능성, 그리고 자연 상태에서의 유전자 교환 양식 등은 위해성 평가에 중요한 요소입니다.

▷ 주요 검토 사항

가. 분류학적 특성

- ○ 학명: 생물체의 공식 학명.
- ○ 일반명: 해당 생물체의 일반적으로 알려진 이름.
- ○ 균주은행 등록번호: 숙주 생물체가 균주은행에 등록된 경우, 등록번호를 명시합니다.

나. 자연생태계 분포 현황

- ○ 숙주 생물체가 자연생태계에서 발견되는 지리적 범위 및 서식 환경(예: 토양, 수계, 공기 등)을 기술합니다.

다. 생물학적 특성

- ○ 형태: 생물체의 형태학적 특징(크기, 구조 등).
- ○ 생태특성: 생장 속도, 영양 요구 조건, 생태적 역할 등.
- ○ 생식 및 유전적 특성: 무성생식, 유성생식 여부와 유전적 다양성.

라. 생물학적 위험군 분류 현황

(1) 생물체의 병원성 및 기생성

- ○ 병원성 유무와 기생성 여부를 기술합니다.

(2) 생물체의 전파방식 및 숙주범위

- ○ 감염 경로 및 감염 가능한 숙주의 범위를 설명합니다.

(3) 인체에 대한 감염량 등 병독성

- ○ 인간 감염 시 필요한 최소 감염량 및 병독성 강도.

(4) 질병에 대한 효과적인 예방과 치료조치 유무

- ○ 해당 생물체로 인한 질병 예방 및 치료 가능성 여부.

마. 최적의 생장(배양) 조건 및 환경에서의 안정성

○ 생장에 최적화된 조건(예: 온도, pH, 영양소 요구 사항).

○ 자연환경에서의 생존 가능성과 안정성.

바. 항생제 저항성 확인

○ 특정 항생제에 대한 저항성 유무를 명시하고, 저항성 여부가 확인된 항생제 목록을 포함합니다.

사. 유해물질 생산성

○ 숙주 생물체가 독소 또는 유해물질을 생성하는지 여부를 기술.

아. 병원성 인자 (virulence factors) 포함 유무

○ 병원성 인자를 포함하는지 여부와, 포함될 경우 관련 유전자 또는 물질을 기술합니다.

자. 자연 상태에서의 유전자교환 양식 및 관련 종에 대한 정보

○ 유전자 교환 방식(수평적 유전자 이동, 플라스미드 전이 등)과 관련 종을 기술합니다.

차. 인류에 의한 이용 내력

○ 국내외 이용 상황: 숙주 생물체가 산업, 연구, 의료 등에서 사용된 역사 및 활용 사례를 요약해서 작성합니다.

3. 공여체에 관한 자료

▷ 개요

본 항목은 유전자변형 과정에서 사용된 공여체의 특성과 안전성을 평가하기 위한 자료입니다. 공여체의 분류학적 위치와 자연생태계 분포 현황, 생물학적 특성 등을 바탕으로, 공여체가 유전자변형 미세조류에 제공하는 유전적 기여와 그 잠재적 영향을 분석합니다. 특히, 공여체가 유독물질을 생산하거나 독소 및 알레르기 유발 가능성이 있는지, 항생제 내성 및 병원성 인자를 포함하고 있는지에 대한 정보가 포함되어야 합니다.

▷ 주요 검토 사항

가. 분류학적 위치(학명, 일반명, 품종, 계통명 등)

○ 공여체의 학명 및 일반명, 품종명, 계통명을 명확히 기재합니다.

○ 분류학적 정보: 강(Class), 목(Order, 과(Family), 속(Genus), 종(Species)의 체계에 따라 상세히 기술합니다.

나. 자연생태계에서의 분포 현황

○ 공여체의 발견 및 분리 위치를 명시

○ 서식지의 환경적 조건(예: 담수, 해수, 토양 등)과 지리적 범위를 상세히 설명합니다.

○ 공여체가 특정 지역에 제한적으로 분포하거나 광범위하게 분포하는지 기술합니다.

다. 인류에 의한 이용 내력

○ 공여체가 과거부터 현재까지 인류에 의해 어떻게 이용되었는지 기술합니다.

○ 산업, 연구, 의학, 식품 등의 활용 사례를 포함합니다.

라. 생물학적 특성

○ 공여체의 크기, 형태, 생식 방식(무성생식, 유성생식 여부)을 기술합니다.

○ 생장 속도와 생장 조건 등을 추가적으로 설명합니다.

마. 유독물질의 생산 가능성

○ 공여체가 독소를 생산하는지 여부와 이를 뒷받침하는 문헌 자료를 제시합니다.

○ 병원성 여부와 생물안전분류 등급(Biosafety level, BSL)을 기술합니다.

바. 공여생물체 및 근연종에서의 독소 생산성 및 알레르기 유발성

○ 공여체와 근연종의 독소 생산성 및 알레르기 유발 가능성을 확인합니다.

○ 삽입된 유전물질의 독소 및 알레르겐 상동성을 분석한 결과를 기술합니다.

사. 공여체가 미생물인 경우

(1) 생물학적 위험군 분류 현황

○ 공여체의 위험군(Biosafety Risk Group) 분류 상태를 기술합니다.

(2) 최적의 생장(배양)조건 및 환경에서의 안정성

○ 공여체가 생장할 수 있는 온도, pH, 영양 요구 조건 등을 기술합니다.

○ 환경에서의 생존 및 안정성에 대해 설명합니다.

(3) 자연 상태에서 유전자 교환양식 및 관련 종에 대한 정보

○ 공여체의 유전자 교환 방식(수평적 유전자 이동 여부)과 교환 가능성이 있는 종을 기술합니다.

(4) 항생제 저항성 확인

○ 공여체가 항생제 조건에서 생존 가능한지와 특정 항생제에 대한 내성 유무를 기술합니다.

(5) 병원성 인자 포함 유무

○ Virulence factor 및 항생제 내성과 관련된 데이터를 데이터베이스에서 검토하고 기술합니다.

4. 유전자변형 미세조류 개발에 관한 자료

▷ 개요

본 항목은 환경정화용 유전자변형 미세조류의 개발과 관련된 자료로, 균주 제조 방법 및 제조용 균주의 배양, 보존, 관리 방법에 대해 상세히 기술합니다. 이 자료는 공여체와 숙주의 특성, 유전자 삽입 및 선별 과정, 형질 안정성 평가 등 균주의 개발 과정을 체계적이고 상세히 작성하여야 하며, 제조용 균주의 최적 배양 조건, 장기 보존, 오염 방지 방안 등 관리 체계의 원칙이 포함되어야 합니다.

▷ 주요 검토 사항

가. 균주제조 방법

○ 유전자 전달 방법의 주요 요소(예: 벡터 설계, 형질전환방법 등)를 상세히 기술합니다.

○ 유전자 삽입 이후 변형 균주의 확인 방법과 선별 기준을 설명합니다.

○ 일반적으로 활용되는 확인 방법(분자생물학적, 생리학적 방법 등)을 기준으로 제시합니다.

나. 제조용 균주의 배양, 보존 및 관리 방법 (Master seed / Working seed 포함)

○ 균주가 생장할 수 있는 기본 배양 조건(온도, pH, 영양 요구 등)을 기술합니다.

○ 균주의 대량 배양 시 고려해야 할 일반적인 원칙을 제시합니다.

○ 장기간 보존 후 균주 안정성을 유지하기 위한 관리 방침을 제시합니다.

○ 균주 관리 및 배양 시 오염 방지를 위한 일반적인 원칙을 기술합니다.

5. 유전자재변형특성에 관한 자료

▷ 개요

본 항목은 환경정화용 유전자변형 미세조류의 개발에 사용된 유전자운반체(벡터) 및 도입유전자의 특성과 안전성을 평가하기 위한 자료를 작성하는 것입니다. 유전자운반체의 구성요소와 특성을 상세히 기술하며, 도입유전자의 구조적, 기능적 정보를 포함하여 유전자 삽입과 관련된 모든 사항을 검토합니다.

▷ **주요 검토 사항**

가. 유전자운반체(벡터)에 관한 자료

(1) 명칭 및 유래

○ 벡터의 공식 명칭과 개발 배경 및 유래를 설명합니다.

○ 벡터를 제공한 기관 또는 출처를 명시합니다.

(2) DNA 분자량

○ 벡터의 전체 DNA 분자량에 대해 기술합니다.

○ 일반적인 단위(base pair)로 정확하게 표기합니다.

(3) 운반체 구성요소에 관한 정보

○ 벡터의 각 구성 요소(예: 복제 원점, 프로모터, 선택 마커)의 유래, 기능, 크기 등을 설명합니다.

○ 제한효소 부위 및 각 구성 요소의 염기서열 정보를 상세히 기술합니다.

(4) 제한효소에 의한 절단지도

○ 벡터 내 유전 요소의 위치 및 방향성을 포함한 제한효소 절단 지도를 제시합니다.

○ 제한효소 부위와 삽입 유전자의 상대적 위치를 설명합니다.

(5) 인정 숙주-벡터계 확인

○ 벡터가 숙주와 호환 가능한지, 안정적으로 발현 및 복제 가능한지 확인합니다.

○ LMO법 통합고시 별표 2-2 승인 제외대상 약제내성 유전자의 내용을 참조하여 인정 숙주-벡터계를 확인합니다.

(6) 유해염기배열 등의 유무 확인

○ 벡터 내 유해한 염기 배열(예: 독성 유전자, 병원성 인자)의 존재 여부를 확인하기 위한 데이터베이스 및 분석 도구에 대해 상세히 기술합니다.

(7) 벡터가 다른 생물체로 전달될 가능성 또는 숙주 의존성

○ 벡터의 전파 가능성과 숙주에 의존적인 특성 여부를 설명합니다.

○ 환경 방출 시의 유전자 전달 가능성을 검토합니다.

나. 도입유전자에 관한 정보

(1) 도입유전자의 특성

(가) 도입유전자의 분자량, 기능 및 특성

○ 도입된 유전자의 분자량 및 기본적인 기능과 특성을 설명합니다.

(나) 도입 유전자 구성요소에 관한 정보

<1> 도입유전자: 주요 유전자의 유래, 기능, 염기서열 정보를 간략히 기술합니다.

<2> 조절인자: 프로모터, 종결자 등 조절 요소의 유래와 기능을 설명ㅎㅂ니다.

<3> 선발표지 유전자: 사용된 선발 마커의 종류와 기능을 기술합니다.

<4> 기타 조절인자 및 DNA 기능에 영향을 줄 수 있는 요소: 추가 요소의 역할과 중요성을 설명합니다.

(2) 이용을 위하여 도입유전자 변형 내용

○ 도입유전자에 가해진 변형 내용을 설명하고, 변형의 목적과 효과를 기술합니다.

(3) 위해염기서열의 존재 유무

○ 도입된 유전자 내 유해한 염기 배열(병원성, 독성 유전자 등)의 존재 여부를 확인하고, 이를 설명합니다.

(4) 완성된 벡터 내에서의 도입유전자 염기서열 위치, 방향성 등 완전성 확인

○ 완성된 벡터에서 도입된 유전자의 위치와 방향성을 확인하고, 전체적인 완전성을 기술합니다.

(5) 외래전사해독프레임의 유무와 그 전사 및 발현 가능성

○ 외래 유전자가 전사 및 번역될 가능성에 대한 자료를 제시하고 프레임 시프트 등의 위험성을 자세히 기술합니다.

6. 유전자변형 미세조류 특성에 관한 자료

▷ 개요

본 항목은 유전자변형 미세조류의 도입유전자와 발현산물의 특성을 평가하고, 이를 통해 유전자변형의 안전성과 효율성을 검증하기 위한 자료를 제공합니다. 도입유전자의 구성 요소, 삽입 위치, 복제수 및 안정성을 포함하여 유전자변형 미세조류의 유전적 특성을 상세히 기술하며, 발현산물의 기능적 및 구조적 특성을 종합적으로 검토합니다. 이 자료는 유전자변형 미세조류와 비변형 생물체 간의 특성 비교를 통해 변형에 따른 개선점과 잠재적 위험 요소를 평가하며, 발현산물의 생산, 분리, 정제 과정 및 안전성을 확인하기 위한 기초 자료로 활용됩니다.

▷ 주요 검토 사항

가. 유전자변형 미세조류 내 도입유전자에 관한 자료

(1) 도입유전자 구성 요소 확인

○ 도입유전자 구성 요소(코딩 서열, 프로모터, 종결자 등)의 완전성을 검토합니다.

○ 추가, 결실, 삽입, 재조합 등과 같은 유전자 변형 여부를 확인하고 이를 설명합니다.

(2) 도입유전자 도입 위치 및 염기서열

○ 유전자가 삽입된 숙주 게놈의 정확한 위치와 주변 염기서열을 기술합니다.

○ 삽입 부위가 유전적으로 안정적인지 확인합니다.

(3) 도입유전자의 복제수

○ 숙주 게놈 내 도입유전자의 복제수(단일 복제 또는 다중 복제 여부)를 설명합니다.

(4) 도입유전자 및 인접 숙주 게놈 유전자의 외래전사해독프레임 유무와 전사, 발현 가능성

○ 도입유전자와 숙주 유전자 간 전사해독프레임 존재 여부를 확인하고 발현 가능성을 설명합니다.

(5) 위해염기서열의 존재 유무

○ 도입유전자 내 위해염기서열(예: 병원성, 독성 유전자 등)의 존재 여부를 기술합니다.

(6) 도입유전자 검출 및 발현의 확인에 사용된 방법

○ 도입유전자의 존재 및 발현을 확인하기 위해 사용된 검출 방법(예: 일반적인 분자생물학적 분석 방법)을 개괄적으로 설명합니다.

(7) 도입유전자의 계대별 안정성 확인

○ 계대배양을 통한 도입유전자의 안정성 유지 여부를 설명합니다.

나. 유전자변형 미세조류 내 발현산물에 관한 자료

(1) 유전자산물의 기능 및 형질 특성

○ 발현산물(단백질, 비번역 RNA 등)의 기능과 형질 특성을 기술합니다.

(2) 유전자산물의 구조적(물리화학적/생물학적) 평가

(가) 물리화학적 특성

○ 전기영동, 분자량, 크로마토그래피 등을 통한 물리화학적 특성을 설명합니다.

(나) 면역학적 특성

○ 유전자산물의 면역 반응 특성을 설명합니다.

(다) 생물학적 특성

○ 생물학적 활성, 함양 및 순도 등의 평가 내용을 포함합니다.

(3) 유전자산물의 복수 계대 동안의 발현부위, 발현시기, 발현량에 대한 평가

○ 발현산물이 복수 계대 동안 유지되는 발현양상을 평가합니다.

(4) 발현단백질의 아미노산 서열 변이 여부

○ 발현단백질의 서열에서 변이가 발생했는지 여부를 확인합니다.

(5) 발현단백질의 번역 후 구조적 변화 및 신규 융합단백질 생성 유무

○ 번역 후 변형(예: 당화, 아세틸화) 또는 신규 단백질 생성 여부를 기술합니다.

다. 발현산물의 생산, 분리 및 정제에 관한 자료

(1) 제조방법 및 공정의 흐름도

○ 발현산물의 제조 과정 전반을 요약한 공정 흐름도를 제공합니다.

(2) 배양, 분리, 정제 등에 관한 방법 및 검증 자료

○ 발현산물의 배양, 분리, 정제 방법에 대한 일반적인 원칙과 이를 검증한 자료를 기술합니다.

(3) 미생물 무독화 과정

○ 병원성 미생물을 사용한 경우, 무독화 공정 및 관리 방침을 설명합니다.

라. 유전자변형 미세조류와 비변형생물체와의 생존, 증식의 차이

(1) 유전자변형 후의 개선된 특성

○ 유전자 변형으로 인해 개선된 기능이나 특성을 기술합니다.

(2) 항생제 저항성 비교

○ 유전자변형 미세조류와 비변형생물체 간 항생제 저항성을 비교하고 관련 자료를 설명합니다.

(3) 숙주와 유전자변형 미세조류의 생존, 증식 및 불활성화 방법 비교

○ 유전자변형 미세조류와 비변형생물체 간의 생존력, 증식력, 불활성화 방법을 비교하고 그 결과를 기술합니다.

7. 세부 위해 영향 평가 자료

▷ 개요

본 항목은 유전자변형 미세조류가 인체, 생태계 및 환경에 미칠 수 있는 세부적인 위해 영향을 평가하기 위한 자료입니다. 병독성, 알레르기성, 환경위해성을 중심으로 유전자변형 미세조류의 특성과 안전성을 검토하며, 이를 통해 사용 및 방출 시 발생할 수 있는 잠재적 위험 요소를 사전에 분석합니다. 병독성 평가에서는 유전자산물과 대사산물이 독소 또는 병원성 인자와의 구조적 상동성 여부를

확인하고, 노출 경로와 평균 노출량을 산출하며, 독성 데이터를 기반으로 안정성을 검증합니다. 알레르기성 평가는 유전자산물이 기존 알레르겐과의 구조적 유사성, 물리화학적 처리 감수성, 그리고 IgE 항체와의 교차 반응 가능성을 중심으로 이루어집니다. 환경위해성 평가는 유전자변형 미세조류가 토양, 수계, 주변 생물 및 유용 미생물에 미치는 영향을 분석하며, 포자 생성 여부와 유전 물질 교환 가능성 등 환경에서의 안정성을 종합적으로 평가합니다. 이 자료는 유전자변형 미세조류의 안전성을 과학적으로 검토하고, 환경과 생태계에 미치는 영향을 최소화하기 위한 중요한 기반 자료로 활용됩니다.

▷ 주요 검토 사항

가. 병독성 평가 자료

(1) 조사 자료

(가) 구조적 상동성 평가

○ 유전자산물 및 대사산물이 이미 알려진 독소 또는 병원성 인자(virulence factors)와 구조적 상동성을 갖는지 검토합니다.

○ 상동성 검색 시 활용된 데이터베이스와 비교 알고리즘의 신뢰성을 강조합니다.

(나) 평균 노출량 산출

○ 작업자 및 최종 이용자의 노출 경로(흡입, 섭취 등)를 분석하고, 평균 노출량 산출 방법을 설명합니다.

○ 노출 모델링 또는 가정 기반 계산법을 간략히 기술합니다.

(다) 동등성 평가

○ 다른 미생물에서 생산된 발현단백질이 사용될 경우, 유전자변형 미세조류 내 발현 단백질과의 생화학적, 구조적, 기능적, 생물학적 동등성을 평가합니다.

(2) 실험자료

(가) 단회투여 독성 평가

○ 발현산물에 대한 단회투여 독성을 분석하고, 주요 독성 매개 변수(체중 변화, 사료 섭취량, LD50 등)를 기술합니다.

(나) LD50 평가

○ 유전자변형 미세조류, 비변형 미세조류, 안전성이 입증된 균주의 LD50(50% 치사량)을 비교합니다.

(다) 기타 독성 평가

○ 필요 시 발현산물의 추가 독성(예: 면역독성, 신경독성 등)을 분석합니다.

나. 알레르기성 평가 자료

(1) 조사자료

(가) 잠재적 알레르기성 평가

○ 유전자산물의 알레르기 유발 가능성을 기존 데이터 및 구조적 상동성 분석을 통해 평가합니다.

(나) 구조적 상동성 평가

○ 유전자산물 및 대사산물이 알려진 알레르겐과 구조적 상동성을 갖는지 확인합니다.

(다) 동등성 평가

○ 숙주 외 다른 미생물에서 생산된 발현단백질의 동등성을 평가합니다.

(2) 물리화학적 처리에 대한 감수성

○ 유전자산물이 열, pH 변화 등 물리화학적 조건에 얼마나 민감한지를 평가합니다.

(3) 교차반응 평가

○ 공여체 또는 숙주가 알레르기 유발성이 있는 경우, 또는 유전자산물이 알레르겐과 구조적 상동성을 가질 경우, 환자특이적 IgE 항체와의 교차반응을 평가합니다.

다. 환경위해성 평가 자료

(1) 토양 이화학성에 미치는 영향

(가) 토양 pH

○ 유전자변형 미세조류 도입으로 인해 토양 pH 변화 가능성을 평가합니다.

(나) 유기물 용탈

○ 토양 내 유기물 용탈 또는 분해 속도에 미치는 영향을 설명합니다.

(2) 토양 또는 수계에서의 생존능력

○ 유전자변형 미세조류가 자연 환경에서 생존할 가능성과 지속성을 평가합니다.

(3) 포자 생성 여부

○ 유전자변형 미세조류가 포자를 생성하는지 확인하고, 환경적 안정성에 미치는 영향을 논의합니다.

(4) 토양 유용미생물에 미치는 영향

○ 근권 미생물(예: Rhizobium 등)에 대한 유전자변형 미세조류의 영향을 평가합니다.

(5) 주변 생물에 미치는 영향

○ 곤충, 식물, 동물 등 주변 생물에 미치는 잠재적 영향을 평가합니다.

(6) 유전물질 교환 가능성 여부

○ 유전자변형 미세조류가 식물 병원균과 유전 물질을 교환할 가능성을 평가합니다.

8. 해외 인가 및 이용 상황

▷ 개요

본 항목은 유전자변형 미세조류가 해외에서 인가받고 활용된 사례를 파악하고, 각 국가의 인가 및 위해성 평가 체계를 비교·분석하기 위한 자료입니다. 인가를 담당하는 국가별 기관, 위해성 평가 절차, 인가번호, 그리고 관련 자료를 종합적으로 수집하여 유전자변형 미세조류의 안전성과 적합성을 국제적으로 검토합니다.

▷ 주요 검토 사항

가. 국가명

○ 유전자변형 미세조류가 인가된 국가의 명칭을 기재합니다.

나. 기관명

○ 해당 국가에서 유전자변형 미세조류가 인가를 담당하는 기관의 공식 명칭을 작성합니다.

다. 위해성평가기관

○ 유전자변형 미세조류의 위해성 평가를 수행하는 기관의 명칭을 기재합니다.

라. 인가번호

○ 해당 유전자변형 미세조류에 부여된 공식 인가번호를 작성합니다.

마. 인가자료

○ 인가와 관련된 주요 자료를 요약하여 기재합니다. 여기에는 인가 일자, 인가 조건, 사용 목적, 제한 사항 등이 포함될 수 있습니다.

※ 지침(안)은 전체 내용 중 일부를 발췌한 것으로 환경부 전체 입장을 대변하는 것을 아님을 알리며, 어느 법적 효력을 가지고 있지 않습니다.

나. LMO법 통합고시 별표 10-1 LMO 위해성심사 사례 및 자료 분석

현재까지 환경정화용으로 심사를 신청한 식물, 동물, 미생물, 곤충의 사례는 없으며, 환경정화용 LM미세조류가 환경정화용으로 위해성심사를 신청하는 첫 사례가 될 것으로 예측된다. 그에 따라 '가. 환경정화용(환경부 소관) LM 미세조류 상업화 대비 지침(안) 개발'에서 환경정화용 LM미세조류의 위해성심사 가이드라인(안)을 작성하였다.위해성심사 본 파트에서는 LM미생물에 대한 환경위해성평가를 중점적으로 다루고 개발사 등을 포함한 위해성심사서 내 환경위해성평가를 위해 필요한 실험 등 자료를 분석하였다(표 12).

개발사마다 환경위해성평가 방법이 조금씩 상이하게 나타난 것을 확인하였다. 유전자 전이 가능성의 경우, 플라스미드의 전이로 평가하거나 표준환경 미생물을 이용한 전이 가능성 평가, 에어로졸과 같은 환경에 의한 유전자 전이까지 한 가지 항목에도 서로 다른 평가법을 이용하여 위해성평가를 수행하였다. 이러한 차이는 각 평가 방법이 목표로 삼는 환경적 조건이나 실험의 초점에 따라 다르게 나타난 것으로 보인다.

또한, 토양 미생물에 미치는 영향을 평가하는 항목에서도 세부적인 방법의 차이가 존재하였다. 어떤 사례에서는 *Rhizobium*과 같은 근권 미생물의 군집구조를 16S rRNA 시퀀싱으로 분석하였으며, 다른 사례에서는 OTU(Operational Taxonomic Units)를 계산하거나 DGGE(Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)를 이용한 군집 비교를 수행하였다. 이처럼 동일한 항목 내에서도 평가 방법의 차이는 결과 해석에 영향을 미칠 수 있다.

결론적으로, 각 항목의 위해성평가가 공통된 목적을 추구하고 있음에도 불구하고, 세부적인 실험 방법에 차이가 존재한다. 이러한 차이는 각 평가 방법의 강점과 한계를 반영하기도 하지만, 동시에 연구 간 비교 가능성을 저해할 가능성이 있다. 따라서 동일 항목에 대한 평가 방법의 표준화를 마련하는 것이 중요하다. 본 연구에서는 위해성심사・평가 가이드라인뿐만 아니라 이러한 다양한 평가 방법을 분석하고 비교하여, 추후 환경위해성평가를 위한 표준화된 지침을 제시할 계획이다.

표 12. 개발사의 유전자변형미생물 위해성평가 방법 비교

항목	개발사 A	개발사 B	개발사 C	개발사 D
환경 잔존성 평가	토양 및 담수/해수에 접종 후 생존능력 CFU 측정	토양 샘플에 접종한 후 생존율 및 대사활성 측정	수계와 토양 환경 접종 후 생존능력 및 CFU 변화 추적	다양한 pH와 온도 조건에서 생존율 평가, CFU 변화 추적
유전자 전이 가능성	표준 환경 미생물과 접합 시험을 통해 유전자 전달 여부 확인	플라스미드 안정성 및 전이 가능성을 제한효소 분석과 PCR로 평가	수평 유전자 이동성을 위해 주변 환경 미생물과의 접합 실험 수행	토양, 수계, 공기 중 미생물과의 접합 시험을 통해 유전자 전이 여부 분석
병원성 평가	설치류에 경구 투여 후 LD50 값 산출	인체 세포주에서 세포 독성 및 병원성 인자 발현 여부 평가	설치류를 대상으로 장내 독소 및 면역 반응 모니터링	인체 장내 미생물군과의 반응 분석
항생제 내성 확인	최소억제농도(MIC) 시험으로 항생제에 대한 내성 측정	디스크 확산법을 통해 일반적으로 사용되는 항생제 반응 평가	MIC 시험으로 항생제에 대한 저항성 여부 확인	PCR로 내성 유전자 존재 확인 및 MIC 시험 실시
토양 미생물 미치는 영향	근권 미생물 군집 구조 분석	토양 미생물 활성 평가를 위한 효소 활성 분석	미생물 다양성 변화 분석을 위해 OTU 계산	토양 미생물 군집 비교를 위한 DGGE적용
독성 시험	급성 경구 독성 시험으로 확인	아급성 독성 및 주요 장기 조직병리학적 분석	급성 및 아급성 독성 시험 결과 확인	단회 경구 독성 시험과 혈액학/생화학적 분석
알레르기성 평가	단백질의 구조적 유사성 분석 및 IgE 결합능력	면역글로불린결합능력 평가, in vitro 면역세포 반응 시험	단백질 구조 분석 및 알레르겐 데이터베이스와 비교	알레르기성 유발 가능성 평가를 위한 in silico 및 in vitro 시험 병행
수평적 유전자 이동	토양미생물과의 접합 시험, PCR로 유전자 전달 확인	제한효소 지도 분석 및 전체 유전체 서열 비교를 통한 유전자 이동 평가	표준 환경 미생물과 함께 배양 후 플라스미드 전이 여부 확인	야생 미생물 및 표준 환경 미생물과의 접합 결과 PCR 및 Southern blot으로 확인

4. 환경정화용 신기술 LM 미세조류 위해성평가용 모의생태계 환경 개발

가. 국내 담수 환경 데이터 분석으로 수생태계 모의 환경 조성

담수 환경 데이터 분석을 위해 국내 후보 수생태계를 선정했다. 수생태계 선정에 우선적으로 고려사항은 환경방출로 개발된 LM미세조류의 숙주가 해당 수생태계에 서식하고 있는지 였으며, 그 다음으로는 호수로부터 하천을 따라 강으로 유속이 흐르고 하천에 생활권이 존재하는지였다. 「물환경보전법」제3절 호소의 물환경보전, 제28조 정기적 조사·측정 및 분석에 따라 환경부는 정기적으로 조사를 진행하고 있으며, 「물환경보전법」 제28조 및 같은 법 시행령 제30조제1항에 따라 환경부장관이 정기적으로 조사·측정 및 분석하여야 하는 호소 지역을 명시하고 있으며 여기서 생물상도 같이 조사를 하고 있다(표 13, 그림 29, 30). 그에 따라 숙주미세조류의 서식 위치도 확인이 가능하였으며, 최종적으로 서천 동부저수지가 수생태계 영향을 확인하기 위한 최적의 장소로 선정되었다.

물환경보전법

[시행 2024. 1. 30.] [법률 제20172호, 2024. 1. 30., 타법개정]

환경부(총괄-물환경정책과), 044-201-6938
환경부(공공폐수처리시설-수질수생태과), 044-201-7068
환경부(비점오염-물환경정책과), 044-201-7010
환경부(폐수배출시설, 기타수질오염원, 배출 등의 금지-수질수생태과), 044-201-7071
환경부(배출부과금, 배출허용기준, 특정수질유해물질 조사-수질수생태과), 044-201-7075
환경부(폐수처리업, 측정기기-수질수생태과), 044-201-7061
환경부(수생태계 건강성-수질수생태과), 044-201-7072

제1장 총칙

제1조(목적) 이 법은 수질오염으로 인한 국민건강 및 환경상의 위해(危害)를 예방하고 하천 · 호소(湖沼) 등 공공수역의 물환경을 적정하게 관리 · 보전함으로써 국민이 그 혜택을 널리 누릴 수 있도록 함과 동시에 미래의 세대에게 물려줄 수 있도록 함을 목적으로 한다.
<개정 2017. 1. 17., 2021. 4. 13.>
[전문개정 2013. 7. 30.]

제2조(정의) 이 법에서 사용하는 용어의 뜻은 다음과 같다. <개정 2016. 1. 27., 2017. 1. 17., 2018. 10. 16., 2021. 4. 13.>

1. "물환경"이란 사람의 생활과 생물의 생육에 관계되는 물의 질(이하 "수질"이라 한다) 및 공공수역의 모든 생물과 이들을 둘러싸고 있는 비생물적인 것을 포함한 수생태계(水生態系, 이하 "수생태계"라 한다)를 총칭하여 말한다.
1의2. "점오염원"(點汚染源)이란 폐수배출시설, 하수발생시설, 축사 등으로서 관로 · 수로 등을 통하여 일정한 지점으로 수질오염물질을 배출하는 배출원을 말한다.
2. "비점오염원"(非點汚染源)이란 도시, 도로, 농지, 산지, 공사장 등으로서 불특정 장소에서 불특정하게 수질오염물질을 배출하는 배출원을 말한다.
3. "기타수질오염원"이란 점오염원 및 비점오염원으로 관리되지 아니하는 수질오염물질을 배출하는 시설 또는 장소로서 환경부령으로 정하는 것을 말한다.
4. "폐수"란 물에 액체성 또는 고체성의 수질오염물질이 섞여 있어 그대로는 사용할 수 없는 물을 말한다.
4의2. "폐수관로"란 폐수를 사업장에서 제17호의 공공폐수처리시설로 유입시키기 위하여 제48조제1항에 따라 공공폐수처리시설을 설치 · 운영하는 자가 설치 · 관리하는 관로와 그 부속시설을 말한다.
5. "강우유출수"(降雨流出水)란 비점오염원의 수질오염물질이 섞여 유출되는 빗물 또는 눈 녹은 물 등을 말한다.
6. "불투수면"(不透水面)이란 빗물 또는 눈 녹은 물 등이 지하로 스며들 수 없게 하는 아스팔트 · 콘크리트 등으로 포장된 도로, 주차장, 보도 등을 말한다.
7. "수질오염물질"이란 수질오염의 요인이 되는 물질로서 환경부령으로 정하는 것을 말한다.
8. "특정수질유해물질"이란 사람의 건강, 재산이나 동식물의 생육(生育)에 직접 또는 간접으로 위해를 줄 우려가 있는 수질오염물질로서 환경부령으로 정하는 것을 말한다.
9. "공공수역"이란 하천, 호소, 항만, 연안해역, 그 밖에 공공용으로 사용되는 수역과 이에 접속하여 공공용으로 사용되는 환경부령으로 정하는 수로를 말한다.
10. "폐수배출시설"이란 수질오염물질을 배출하는 시설물, 기계, 기구, 그 밖의 물체로서 환경부령으로 정하는 것을 말한다. 다만, 「해양환경관리법」 제2조제16호 및 제17호에 따른 선박 및 해양시설은 제외한다.
11. "폐수무방류배출시설"이란 폐수배출시설에서 발생하는 폐수를 해당 사업장에서 수질오염방지시설을 이용하여 처리하거나 동일 폐수배출시설에 재이용하는 등 공공수역으로 배출하지 아니하는 폐수배출시설을 말한다.

그림 29. 「물환경보전법」 발췌

표 13. 「물환경보전법」에 따른 호소 정기조사

제3절 호소의 물환경 보전 <개정 2017. 1. 17.> 제28조(정기적 조사·측정 및 분석) ① 환경부장관 및 시·도지사는 호소의 물환경 보전을 위하여 대통령령으로 정하는 호소와 그 호소에 유입하는 물의 이용상황, 물환경 현황 및 수생태계 건강성, 수질오염원의 분포상황 및 수질오염물질 발생량 등을 대통령령으로 정하는 바에 따라 정기적으로 조사·측정 및 분석하여야 한다. <개정 2017. 1. 17.> ② 환경부장관 및 시·도지사는 제1항에 따른 조사·측정 및 분석 결과에 따라 물환경 현황 및 수생태계 건강성에 대한 수계별 지도를 제작하고, 변화추이 등을 분석한 결과를 작성하여 그 지도 및 결과를 국민에게 공개하여야 한다. <개정 2017. 1. 17.> [전문개정 2013. 7. 30.] [제목개정 2017. 1. 17.]

【별표】

호소환경조사 대상호소

호소명	위치
낙동강하구언	부산광역시 사하·강서·사상구
회동지	부산광역시 금정구 회동동
가창호	대구광역시 달성군 가창면
대청호	대전광역시, 충북 청원군·옥천군·보은군
사연호	울산광역시 울주군 범서면
대암호	울산광역시 울주군 언양읍
선암제	울산광역시 남구 선암동
회야호	울산광역시 울주군 청량면, 웅촌면
팔당호	경기도 남양주시·광주군·양평군
청평호	경기도 가평군 외서면
남양호	경기도 평택시·화성군 장안면
아산호	경기도 평택시·충남 아산시
고삼지	경기도 안성시 고삼면
이동지	경기도 용인시 이동면
광교지	경기도 수원시 조원동·하광교동
원천지	경기도 수원시 원천동·이의동
서호	경기도 수원시 서둔동·화서동
신갈지	경기도 용인시 기흥읍
의암호	강원도 춘천시 신동면·서면
화진포호	강원도 고성군 현내면
송지호	강원도 고성군 죽왕면
향호	강원도 양양군 현남면
매호	강원도 양양군 현남면
경포호	강원도 강릉시 저동·강문동
영랑호	강원도 속초시 영랑동
청초호	강원도 속초시 교동
소양호	강원도 춘천시·양구군·인제군
화천호(파로호)	강원도 화천군 간동면·화천읍
춘천호	강원도 춘천시 서면·사북면
광동호	강원도 삼척시 하장면
달방호	강원도 동해시 달방동·이로동
강릉지(오봉지)	강원도 강릉시 성산면
옥계지(북동지)	강원도 강릉시 옥계면
충주호	충북 충주시·제천시·단양군
충주조정지	충북 충주시·중원군
괴산호	충북 괴산군 칠성면·청천면
초평지	충북 진천군 초평면
탑정지	충남 논산군 가야곡면
삽교호	충남 아산시 인주면·당진군
예당지	충남 예산군 대흥면·광시면
간월호	충남 서산시 고북면·홍성군
부남호	충남 태안군 남면·서산시
석문호	충남 당진군 석문면
보령호	충남 보령시 웅천읍·미산면
금강하구언	충남 서천군 화양면, 전북 옥구군
송악지	충남 아산시 송악면
대호	충남 당진군 석문면
청천지	충남 보령시 청라면
섬진강호(옥정호)	전북 임실군 강진면·운암면·정읍시 산내면
부안호	전북 부안군 변산면·상서면
용담호	전북 진안군 용담면·안천면·정천면·상전면
대아지	전북 완주군 동상면
경천지	전북 완주군 화산면
주암호(본댐)	전남 순천시·화순군·보성군
상사호 (주암조정지댐)	전남 순천시 주암면·화순군·보성군
영산호	전남 무안군 삼향면·일로읍·영암군 서호면
영암호	전남 영암군 삼호면
금호호	전남 해남군 삼이면
담양호	전남 담양군 금성면·용면
광주호	전남 담양군 고서면·남면
장성호	전남 장성군 장성읍
나주호	전남 나주시 다도면
보성강호	전남 보성군 겸백면
동복호	전남 화순군 동복면·이서면
대동호	전남 함평군 대동면
수어호	전남 광양시 진상면
안계호	경북 경주시 강동면
보문호	경북 경주시 보문동
운문호	경북 청도군 운문면
안동호	경북 안동시 성곡동·임하면·임동면
영천호	경북 영천시 자양면
임하호	경북 안동시 임하·임동·길안면
풍락지	경북 영천시 청통면
용연지	경북 포항시 북구 신광면
기동지	경북 포항시 북구 기계면
오태지	경북 상주시 공검면
경천호	경북 문경시 동로면
덕동호	경북 경주시 덕동
남강호(진양호)	경남 진주시 판문동·대평면·진양군, 사천시 곤명면
주남저수지	경남 창원시 동읍
합천호	경남 합천군 대병면·봉산면
연초호	경남 거제시 연초면
구천호	경남 거제시 신현읍
정양늪	경남 합천군 대양면
박실지(해곰늪)	경남 합천군 용주면
우포늪	경남 창녕군 계성면
번개늪	경남 창녕군 대합면
장척호	경남 창녕군 영산면
하동호	경남 하동군 청암면
질날벌	경남 함안군 법수면

그림 30. 「물환경보전법」 정기조사 대상 호소 및 하천

동부저수지에서 금강까지의 구간을 설정하고, 동부저수지를 수원지로 지정한 뒤 상류, 중류, 하류로 세분화하여 분석하였다. 상류는 농지 지역, 중류는 농지와 축산이 혼합된 형태, 하류는 마을과 금강 합류 지점으로 구분된다(그림 31). 농지와 마을에서는 사람의 활동으로 인한 폐수 발생 가능성이 높으며, 축산 지역에서는 가축에 의한 폐수 발생 가능성이 존재한다. 이러한 폐수는 하천으로 유입되어 조류 대발생의 주요 원인인 부영양화를 초래할 수 있다. 이에 따라, 위치별 취수를 통해 환경정화용 LM 미세조류의 환경 방출 대비 위해성 평가 중 생존성과 우점성을 분석하였다. 시기별 환경 데이터는 농림축산식품부의 ‘농어촌 알리미’와 환경부의 ‘물환경정보 시스템’을 통해 수집하였다(그림 32). 동부저수지의 수온은 계절에 따라 여름철 약 30°C, 겨울철 약 7°C로 변화하며, 본 과제에서 취수한 5월에는 24°C로 측정되었다.

그림 31. 금강 담수환경 데이터 분석을 위한 대상 지역

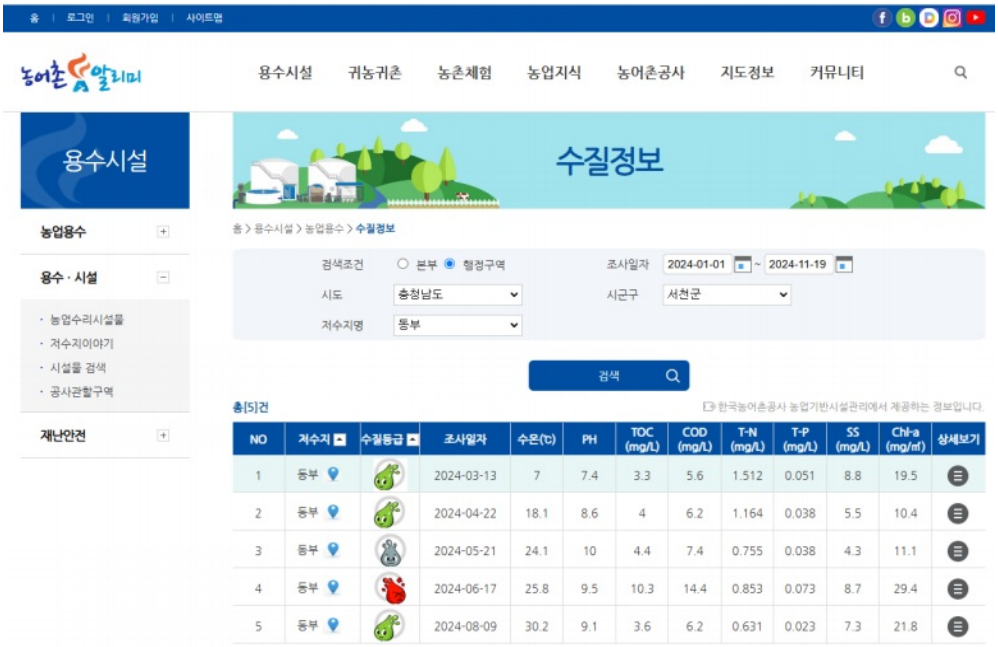


그림 32. 농림축산식품부의 ‘농어촌 알리미’ 수질정보 데이터

선정된 동부저수지부터 금강까지의 이화학적 특성을 분석한 결과(표 14), 1차 취수 시기인 5월에는 수온이 약 20°C 내외였으나, 2차 취수 시기인 6월에는 기온 상승에 따라 수온이 전반적으로 증가한 것으로 나타났다. pH는 1차와 2차를 비교했을 때 하류에서 변화가 두드러졌으며, 용존산소량(DO) 또한 하류 부근에서 감소하는 경향이 확인되었다. 전기전도도는 2차 조사에서 전반적으로 증가하였는데, 이는 용존 이온 농도의 증가를 반영한 결과로 보인다. 총질소(TN)는 6월 조사에서 하류 지역에서 농도가 증가한 반면, 총인(TP)은 오히려 감소하는 경향을 보였다. 이는 6월 동부저수지에서 금강으로 이어지는 구간에 질소와 관련된 오염원이 추가된 반면, 인과 관련된 오염은 줄어든 것으로 해석된다. 종합적으로, 수온 상승과 DO 감소는 계절적 변화의 영향을 받은 것으로 보이며, pH의 하류 변화는 국지적 오염 요인의 발생 가능성을 시사한다. 또한, 총질소와 총인의 상반된 변화 경향은 특정 오염원의 영향을 나타낸다.

표 14. 대상 수생태계의 이화학적 분석

이화학적 특성	1차 취수 (2024.05.30.)				2차 취수 (2024.06.25.)			
	수원지	상류	중류	하류	수원지	상류	중류	하류
수온(℃)	20.6	20.2	20.5	20.1	22.7	22.6	22.8	22.6
pH	7.9	7.5	7.6	7.7	7.9	7.5	7.2	7.3
용존산소량 (DO, mg/L)	11.4	11.2	10.8	12.2	10.5	9.8	9.7	8.7
전기전도도 (μS/cm)	117	118	121	122	155	160	158	161
총질소 (TN, mg/L)	0.75	0.74	0.69	0.71	0.55	0.81	0.82	0.89
총인 (TP, mg/L)	0.031	0.029	0.028	0.031	0.030	0.028	0.021	0.024

나. 담수생태계 위해성평가 지표 발굴

취수 샘플의 현미경 관찰 결과, 4개 지역 모두에서 1차 생산자인 식물성 플랑크톤을 먹이로 삼는 동물성 플랑크톤이 확인되었으며, 하천의 위치에 따라 다양한 동물성 플랑크톤이 관찰되었다(그림 33). 특히, 하류로 갈수록 대형 동물성 플랑크톤이 더 많이 발견되었는데, 이는 하천의 지리적 위치와 유입된 영양염류 및 유기물 농도의 차이가 동물성 플랑크톤의 생태적 분포와 크기에 영향을 미쳤기 때문으로 해석된다. 이러한 결과는 지역별 하천 및 호소 생태계에 서식하는 다양한 생물이 환경정화용 신기술 LM 미세조류 방출 시 위해성 평가에 중요한 지표로 활용될 수 있음을 시사한다. 특히, 동물성 플랑크톤은 담수 생태계의 영양 단계에서 핵심적인 역할을 하며, 환경 변화에 민감하게 반응하는 생물이기 때문에 환경 위해성 평가의 주요 지표로 적합하다. 따라서, 지역별 담수 생태계의 다양한 동물성 플랑크톤 데이터를 기반으로, 환경정화용 신기술 LM 미세조류 방출로 인한 생태계 영향성을 예측하고 평가할 수 있는 표준화된 지표를 발굴할 필요가 있다. 이는 국내 담수 환경에 적합한 모의 생태계 환경 조성 및 위해성 평가 체계를 구축하는 데 기초 자료로 활용될 수 있을 것이다.

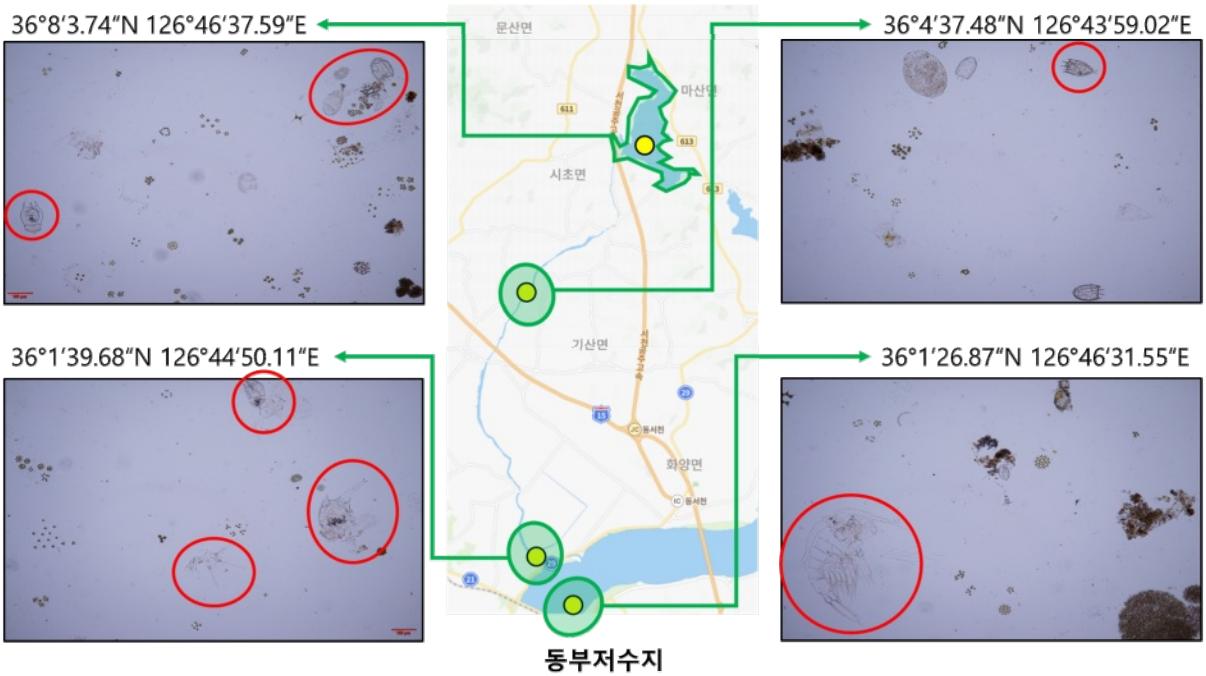


그림 33. 대상 수생태계의 동물플랑크톤 형태 분석

각 지역(수원지, 상류, 하류, 금강)에서 채취한 물에 LM 미세조류(야생형 및 Mutant)를 접종하여 14일간 배양하며 세포 수 변화를 측정하였다(그림 34). 본 실험은 LM 미세조류가 환경에 방출되었을 때 지역별 담수 생태계에서의 생존성과 증식 가능성을 평가하고, 이를 기반으로 위해성 평가 지표를 마련하기 위한 목적으로 수행되었다. 실험 결과, 지역별 담수 환경의 특성에 따라 LM 미세조류의 생존성과 증식 경향에 뚜렷한 차이가 나타났다. 수원지에서는 Mutant가 WT에 비해 비교적 안정적인 세포 수를 유지하였으나, 배양 기간이 길어질수록 두 그룹 모두 세포 수가 감소하였다. 상류에서도 비슷한 경향이 나타났으며, Mutant는 WT보다 완만한 감소세를 보였으나 장기 배양 시 세포 수가 줄어드는 양상은 동일했다. 하류와 금강에서는 초기에는 두 그룹 모두 세포 수가 증가하였으나, 배양 7일 이후 급격히 감소하는 경향이 관찰되었다. 특히 금강에서는 두 그룹 모두 세포 수가 큰 폭으로 감소하며 생존이 어려운 환경이 형성되었음을 시사했다. 이 실험 결과는 LM 미세조류의 생존성과 증식이 지역별 담수 환경의 물리화학적 특성(예: 영양염류 농도, pH, 온도 등)에 따라 크게 달라질 수 있음을 보여준다.

추가적으로 환경 DNA (environmental DNA, eDNA)를 추출하여 세균 군집을 비교하였다(그림 35). 봄과 여름 계절에 걸쳐 다양한 수질 환경에서 수집된 미생물 시료를 바탕으로 세 개의 그룹(동부저수지 및 금강의 봄 시료 그룹, 덕용저수지의 봄 시료 그룹, 그리고 동부저수지의 여름 시료 그룹)을 비교 분석하였다. 미생물 군집 구성의 다양성과 우점 종의 차이를 살펴보았다. 춘계 동부저수지 및 금강 그룹에서는 *Pseudomonas* 속이 평균 37.6±13.8%로 가장 높은 우점도를 보였으며, 특히 금강의 Geum02 시료에서는 59.19%로 가장 높게 나타났다. 이 외에도 *Massilia*와 *Flavobacterium*속이 상대적으로 높은 분포를 보였다. 춘계 덕용저수지에서 *Pseudomonas*속은 여전히 높은 우점도를 보였다(평균 44.5±18.2%). 하계 동부저수지에서는 *Pseudomonas* 속이 여전히 높은 우점율을 보였지만, 춘계에 비해 다소 감소하였다 (평균 31.9±4.9%). 'hgcI clade'의 우점도는 큰 변화 없이 유지되며 *Acinetobacter*의 우점도는 증가하여 하계에 8.16%를 차지했다. 이러한 결과는 계절 변화가 일부 미생물의 우점도에 영향을 줄 수 있음을 시사한다. *Rhodococcus*는 춘계에 비해 하계에 크게 증가하였다(춘계: 0.002±0.005% 하계: 3.5±1.0%). 비계량형 다차원 척도법(NMDS)를 이용하여 군집간 차이를 비교했을 때, 춘계인 그룹 1과 그룹 2는 가까운 거리에 위치하여, 그룹 3에 비해 상대적

으로 비슷한 군집 구조를 보였다. 그룹 3은 그룹 1, 2와는 떨어져 독자적인 그룹을 형성하였다. 해당 결과는 조사 지역보다는 계절에 따른 미생물 군집의 변동성이 크다는 것을 나타낸다.

본 결과는 LM미세조류가 환경방출이 되었을 때, 위해성평가를 위한 미생물 선정을 위한 목적으로 수행되었다. 계절의 변화에 따라 나타나는 미생물의 군집이 상이하다는 점에서 주목해볼만 점이며 추후에 시기를 세분화하여 미생물 군집에 대한 라이브러리를 구축할 것이다.

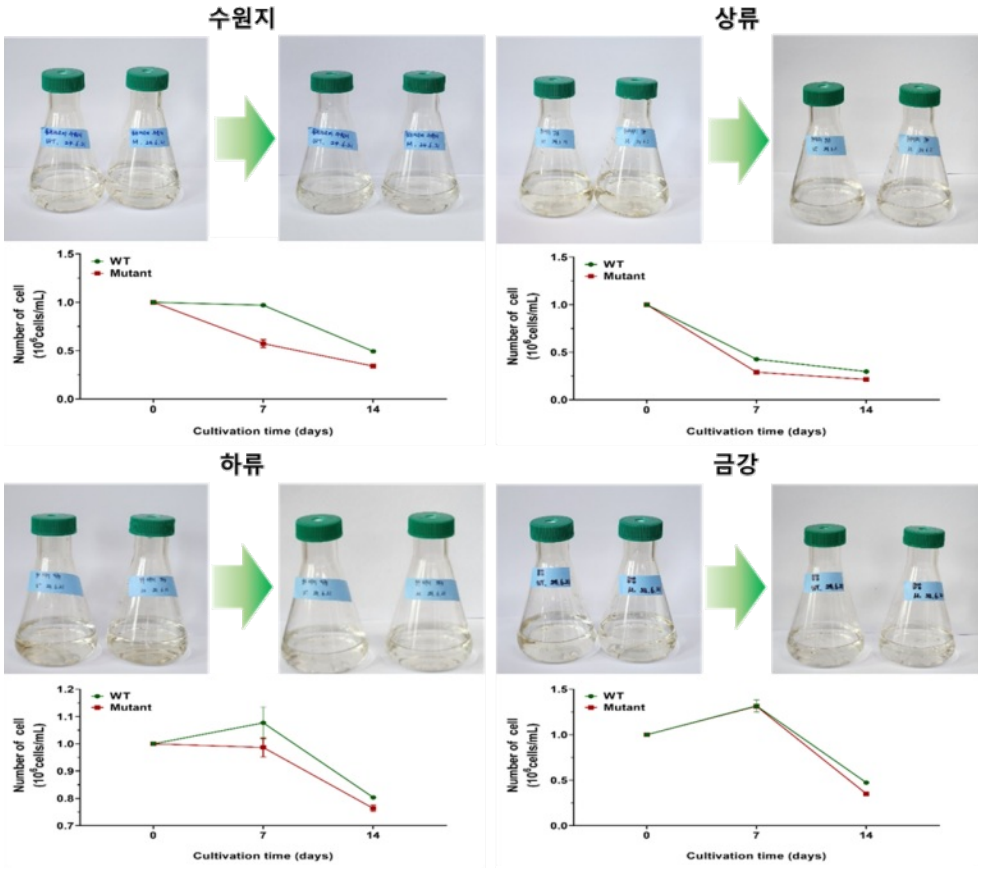


그림 34. 대상 수생태계 LM미세조류 접종 후 위해성평가

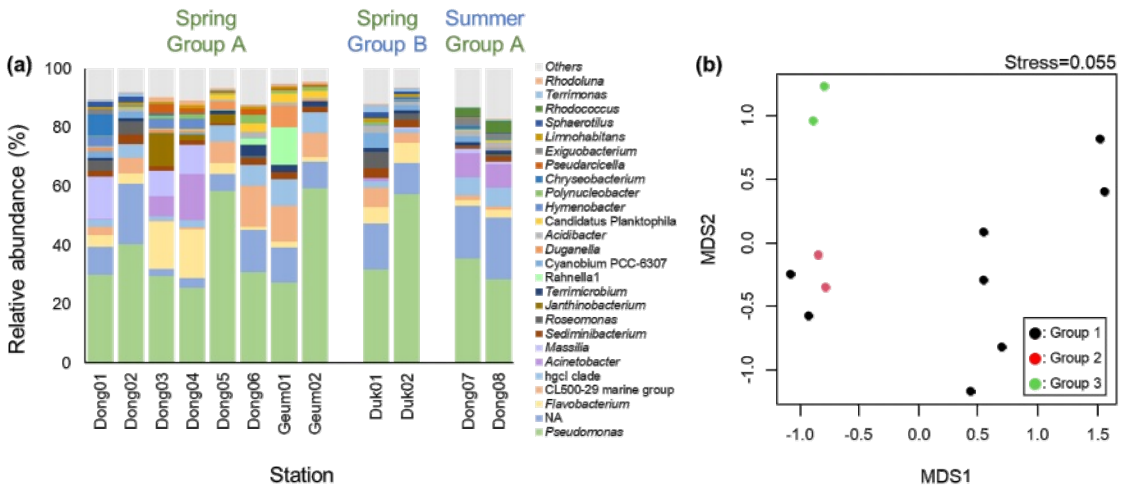


그림 35. 수계와 계절에 따른 미생물 군집 비교.
(a) 시기와 지역에 따른 속 단위 미생물의 군집 구성 비교,
(b) ASV 수준에서 NMDS 분석을 통해 나타낸 시료간 유사도.

최종적으로 본 항목의 결과들은 LM 미세조류가 방출되었을 때 각 지역 생태계에 미칠 영향을 사전에 예측하고 평가해야 할 필요성을 강조한다. 특히, 지역별 수질 특성에 따라 LM 미세조류가 특정 환경에서 과도하게 증식하거나 생태계 내 우점종이 될 가능성이 있으므로, 이를 예방하기 위해 표준화된 위해성 평가 체계를 마련하는 것이 필수적이다. 또한, 본 실험에서 관찰된 세포 수 변화는 LM 미세조류가 자연 환경에 방출되었을 때 발생할 수 있는 잠재적 영향을 간접적으로 시사하며, 이를 기반으로 적절한 환경 모니터링 및 관리 방안을 마련이 필요하다. 향후, 본 과제에서는 지속적인 데이터 축적과 더불어 국내 담수 생태계에 적합한 평가 체계의 고도화를 통해 환경정화용 신기술 LM 미세조류의 안전관리 및 위해성평가 지표 개발을 진행할 예정이다.

5. 환경부 소관 생산공정이용시설 관련 LMO법 통합고시 개정 추진

본 장은 '4. 환경정화용 신기술 LM 미세조류 위해성평가용 모의생태계 환경 개발'과 다른 성격으로 환경정화용 신기술 LM미세조류가 환경방출을 하지 않고 생산공정이용시설을 통해 오염원을 제거하는 목적으로 위해성 심사를 요청할 것을 염두하여 진행하였다. 생산공정이용시설의 법적 정의는 『유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 통합고시』 제1-2조(용어의 정의)에 명시되어 있으며, 내용은 "생산공정이용"이라 함은 생산공정 중에 유전자변형생물체가 대기, 물, 토양 등과 같은 외부 환경으로 확산되지 못하도록 시설, 설비 또는 그 밖의 구조물 내에서 유전자변형생물체를 이용하는 것을 말한다.라고 되어있다. 그에 따라, 환경정화용 신기술 LMO에 따라 달리 접근할 수 있겠지만, 후술할 환경정화용 신기술 LM미세조류의 서식지는 수계이므로 물속 오염원을 제거하기 위해 직접적으로 환경에 방출될수 있을뿐만 아니라, 오염된 물을 이용하여 LM미세조류가 배양되고 있는 배양기를 통해 여과되어 오염원이 제거되고 정화된 물을 자연으로 방출하는 공정도 가능하다(그림 36). 이 공정은 개발사에서도 위해성심사시 하나의 접근으로 염두해두고 있음을 밝혔다. 그에 따라 본 과제는 개발사의 원활한 심사 진입과 환경부의 고시 개정을 통해 안전관리 고도화 및 체계를 마련하고자 수행하였다.

그림 36. 환경정화용 신기술 LM 미세조류 생산공정이용시설 활용 예시

가. 환경정화용 LM 미세조류 상업화 예정 생산공정이용시설 설치·운영·점검·사후관리 분석

환경부 생산공정이용시설 LMO법 통합고시를 개정하기 위해 먼저 부처별 생산공정이용시설 LMO법을 분석했다. '생산공정이용시설 등의 설치·운영 허가, 신고 및 폐쇄신고'에서 농림축산식품부-농림축산업용 LMO, 산업

통산자원부-산업용 LMO 및 보건복지부-보건의료용 LMO는 ‘허가 또는 신고의 기준’이 공통적으로 있으며, 해양수산부-해양·수산용 LMO와 식품의약안전처-식품용 또는 의료기기용 LMO는 ‘생산공정이용시설 설치·운영 신고’가 공통적으로 있다. 『유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 법률』 제22조의3(생산공정이용시설의 설치·운영)에 따라 생산공정이용시설의 안전관리 등급별로 관계 중앙행정기관의 장에게 허가를 받거나 신고하여야 한다. 시행령 별표 2에는 ‘생산공정이용시설의 안전관리등급의 분류 및 허가 또는 신고 대상’에 신고와 허가로 구분된다. 환경부는 ‘생산공정이용시설의 안전관리등급의 분류 및 허가 또는 신고 대상’에 대해 안전관리등급을 어떻게 설정할 것인지에 대해 우선적으로 결정해야한다. 초안에는 환경방출을 염두해두고 해양수산부와 식품의약안전처와 같은 ‘1등급 또는 2등급’의 신고 기준을 마련하는 것으로 방향성을 정했지만 환경정화용 LMO의 생산공정이용시설을 염두해두고 허가가 필요한 ‘3등급 또는 4등급’까지 다루기로 방향성을 선정하였다. 대신 엄격한 관리 및 감독의 기준을 마련하여 ‘환경정화용’의 용도 특성 및 환경보호 및 생물다양성 보전을 위한 예방적 접근으로 다가가는 것으로 설정하였다.

“생산공정이용시설 설치 및 운영기준”은 『유전자변형생물체의 국가간 이동 등에 관한 통합고시』 별표 4-3에 마련되어 있으며, 이 기준은 안전관리등급별로 설치 및 운영기준에 대한 준수사항이 나열되어 있다(표 15). 설치기준에서 안전관리등급 1부터 4까지 공통적인 “필수”는 ‘작업구역위치 및 접근’의 4항목(생산공정이용 작업구역: 일반 구역과 구분, 작업구역의 주 출입구 잠금장치 및 보안시스템 설치, 주 출입구에 생물안전표지판 설치, 작업구역과 시험·검사구역의 구분)이 있고 ‘장비’의 2항목(유전자변형생물체의 외부 누출 방지 설계, 닫힘 상태에서 멸균 조작이 가능한 배양장치 설치, 배양장치 등 밀폐시스템의 배기가스관에 헤파필터 동등 이상의 제균용 필터 또는 장치부착), ‘기타 설비’에 ‘작업구역 내 기계, 설비, 기구·용기 등을 충분히 세척 가능한 설비 또는 시설 설치’가 있다.

운영기준에는 ‘작업구역출입’의 2항목(출입문은 항상 닫아 두며 승인받은 자만 출입, 출입대장 비치 및 기록)과 ‘작업구역 내 활동’은 작업 종료 후 또는 작업구역 퇴실 시 , 노출 가능 신체부위의 세척 및 필요한 경우 소독함, 작업구역 내 음식섭취, 식품 보존, 흡연, 화장 행위 금지, 식물, 동물, 옷 등 작업과 관련 없는 물품 등의 반입 금지, 배양장치에 접종, 시료 채취 및 이동 시 오염 발생 주의, 생산공정에 이용되는 밀폐시스템 및 밀폐장비의 제균용

필터 등은 교환 및 정기검사 전에 멸균, 곤충 및 설치류에 대한 관리 방안 마련 및 정기적 운영의 6항목이 있다. ‘생물안전확보’는 5항목(유전자변형생물체는 비변형생물체 및 다른 시료 등과 구분하여 보관하고 보관물의 세부목록에 대한 기록 관리 및 유지, 유전자변형생물체 보관 장소: “생물재해(Biohazard)” 표시 부착, 작업이 진행 중인 밀폐시스템(예. 배양용기, 발효조 등)에 각 등급에 맞는 표시 부착, 시설 설치·운영 관련 기록 관리 및 유지, 생산공정이용 중 발생한 사건/사고 등에 대한 기록 작성, 보고 및 보관), 그리고 ‘폐기물’은 모든 항목인 작업에 관련된 유전자변형생물체에서 유래하거나 오염된 모든 폐기물 및 폐수는 작업 종료 후 및 폐기 전 불활성화, 처리 전 폐기물: 규정된 용기 및 지정 장소에 보관, 폐기물 처리에 대한 자체 규정 마련 3항목이 “필수”로 지정되어 있다. 환경부 생산공정이용시설 설치·운영 기준도 3등급 및 4등급을 취급하게 되면 설치기준 및 운영기준에 “필수”사항을 철저히 점검하여야 한다. 특히나 LMO의 생산공정이용시설 사용 중 설치 및 운영기준에 준수사항와 같이 배관, 배기, 폐수, 작업자 등 외부유출에 대한 가능성을 항상 염두해야할 필요성이 있다.

환경정화용 LMO 생산공정이용시설의 사후관리는 시설 운영 중 또는 종료 후 발생할 수 있는 잠재적 위험을 최소화하고, 시설의 안전성과 환경적 지속 가능성을 보장하기 위해 수행된다. 이를 위해 환경 모니터링을 통해 LMO가 시설 외부로 유출되거나 예기치 않게 환경에 노출될 가능성을 감시하며, 주변 토양, 물, 공기 등에 대한 정기적인 샘플링과 분석을 통해 유전자 변형체의 확산 가능성과 환경에 미치는 영향을 지속적으로 평가한다. 또한 시설 내 장비와 공정이 정상적으로 작동하는지 확인하며, 유출 방지 시스템, 폐기물 관리 시스템, 생물학적 안전 장치 등이 적절히 작동하는지 점검하여 시설의 안전성을 유지한다. 생산과 관리 과정에서 발생한 모든 데이터를 체계적으로 기록하고, 문제 발생 시 즉각 보고 체계를 통해 관계 당국에 상황을 알림으로써 투명성을 유지하고 법적 요구사항을 충족시킨다. 더불어, 시설에서 배출되거나 유출된 LMO의 위치를 추적하고 필요 시 이를 회수하여 폐기 과정에서 환경 및 생태계에 부정적인 영향을 미치지 않도록 관리한다. 시설 운영이 종료된 후에도 부지와 관련 자원의 안정성을 확보하기 위해 잔류 유출물이나 유전자 변형체의 잔존 여부를 확인 및 처리하며, 장기적인 사후 감시를 통해 안전성을 확보한다. 이를 뒷받침하기 위해 시설 운영자와 관리자를 대상으로 정기적인 안전 교육과 훈련을 실시하여 비상 상황에 대비한 대처 능력을 강화하고 환경 보호 의식을 고취한다. 마지막으로,

시설 운영 과정에서 새롭게 발생할 수 있는 위험 요인을 지속적으로 평가하고, 위험이 발견될 경우 즉각적으로 대응 계획을 수립해 실행한다. 이러한 사후관리는 환경으로의 유출이나 사고를 방지하고, 시설 운영의 지속 가능성과 생태계 안전성을 보장하기 위한 중요한 조치로 간주된다.

표 15. '생산공정이용시설의 안전관리등급의 분류 및 허가 또는 신고 대상'

생산공정이용시설의 안전관리등급의 분류 및 허가 또는 신고 대상

(제23조의8제1항 관련)

등급	대상	허가 또는 신고여부
1등급	법 제7조의2에 따른 위해성심사를 통하여 건강한 사람에게는 질병을 일으키지 않고 환경에 대한 위해를 일으키지 않는다고 확인된 유전자변형생물체를 이용하는 생산공정이용시설	신고
2등급	법 제7조의2에 따른 위해성심사를 통하여 사람에게 질병을 일으키지만 효과적인 치료 및 예방조치가 가능하고 확산의 위험이 낮아 환경에 방출되더라도 위해가 경미하다고 확인된 유전자변형생물체를 이용하는 생산공정이용시설	신고
3등급	법 제7조의2에 따른 위해성심사를 통하여 사람에게 심각한 질병을 일으키지만 전염성이 낮고 치료가 가능하며 환경에 방출되었을 경우 위해성이 있으나 치유가 가능하다고 확인된 유전자변형생물체를 이용하는 생산공정이용시설	허가
4등급	법 제7조의2에 따른 위해성심사를 통하여 사람에게 치료가 어렵고 전염성이 높은 치명적인 질병을 일으키며 환경에 방출되었을 경우 위해가 막대하고 치유가 곤란하다고 확인된 유전자변형생물체를 이용하는 생산공정이용시설	허가
비고: 등급별 세부기준은 관계 중앙행정기관의 장이 협의하여 공동으로 정하여 고시한다.		

나. 환경부 소관 생산공정이용시설 관련 LMO법 통합고시 개정(안) 마련

앞서 부처별 생산공정이용시설 설치·운영·점검·사후관리 비교분석을 통해 환경부 소관 생산공정이용시설 관련 LMO법 통합고시 초안을 작성했다(표 16).

표 16. 환경부 생산공정이용시설 관련 LMO법 통합고시 개정(안) 일부 발췌

※ 초안은 전체 내용 중 일부를 발췌한 것으로 환경부 전체 입장을 대변하는 것을 아님을 알리며, 어느 법적 효력을 가지고 있지 않습니다.

□ 생산공정이용시설 설치·운영신고

① 법 제22조의3제1항 및 영 제23조의8제2항에 따라 생산공정 중에 환경정화용 유전자변형미생물을 이용하는 시설을 설치·운영하고자 하는 자는 영 별표 2에 따른 생산공정이용시설의 안전관리등급 1등급 및 2등급인 경우 규칙 별지 제34호서식의 "생산공정이용시설 설치·운영 신고서"와 첨부서류를 갖추어 환경부장관에게 신고하여야 한다.

② 제1항에 따라 생산공정이용시설의 설치 · 운영 신고서의 첨부서류는 다음 각 호와 같다.

1. 생산공정이용시설의 설계도서 또는 그 사본
2. 생산공정이용시설의 범위와 그 소유 또는 사용에 관한 권리를 증명하는 서류
3. 위해방지시설의 기본설계도서 또는 그 사본

③ 제1항에 따라 신고서를 접수한 환경부장관은 생산공정이용시설 설치·운영 신고서와 첨부서류를 검토하여 결격사유가 없는 경우 규칙 별지 제35호서식의 "생산공정이용시설 설치·운영 신고확인서"를 발급할 수 있다.

□ 생산공정이용시설 설치 · 운영신고사항의 변경신고

① 법 제22조의3제3항에 따라 변경신고를 하려는 자는 규칙 별지 제36호서식의 "생산공정이용시설 설치 · 운영 신고사항 변경신고서"와 첨부서류를 갖추어 환경부장관에게 제출하여야 한다.

② 제1항의 신고를 접수한 환경부장관은 생산공정이용시설설치 · 운영 신고사항 변경신고서와 첨부서류를 검토하여 결격사유가 없는 경우 변경된 내용을 반영하여 규칙 별지 제35호서식의 "생산공정이용시설 설치 · 운영 신고확인서"를 재발급하여야 한다.

□ 생산공정이용시설의 폐쇄신고

① 법 제22조의3제4항 및 제6항에 따라 폐쇄신고를 하려는 자는 규칙 별지 제37호서식의 “생산공정이용시설 폐쇄신고서”를 환경부장관에게 제출하여야 한다.

② 제1항의 신고를 접수한 환경부장관은 필요 시 규칙 별지 제38호서식의 “생산공정이용시설 폐쇄신고확인서”를 발급할 수 있다.

□ 유전자변형미생물의 이용승인

① 법 제22조의4제1항에 따라 환경정화용 유전자변형미생물의 이용승인을 받으려는 자는 규칙 별지 제39호서식의 “유전자변형미생물 이용승인신청서”와 다음 각 호에 관한 서류를 첨부하여 환경부장관에게 제출하여야 한다.

1. 유전자변형미생물의 취급·보관 등에 관한 안전관리방안
2. 안전관리에 필요한 전문인력·설비의 현황

② 제1항에 따라 신청서를 받은 환경부장관은 「전자정부법」 제36조제1항에 따른 행정정보의 공동이용을 통하여 신청인의 법인 등기사항증명서(법인인 경우로 한정한다)를 확인하여야 한다.

③ 환경부장관은 제1항에 따른 이용승인신청서를 접수한 날부터 10일 이내에 이용승인 여부를 결정하고, 규칙 별지 제40호서식의 “유전자변형미생물 이용승인서”를 신청인에게 통지하여야 한다.

④ 환경부장관은 제3항에 따른 이용승인 등을 결정하기 위하여 필요한 경우에는 신청인에게 기간을 정하여 필요한 자료를 제출하게 할 수 있다.

□ 유전자변형미생물 이용승인 사항의 변경승인

① 법 제22조의4제2항에 따라 승인을 받은 사항을 변경하려는 자는 규칙 별지 제41호서식의 “유전자변형미생물 이용승인사항 변경승인신청서”에 다음 각 호에 관한 서류를 첨부하여 환경부장관에게 제출해야 한다.

1. 이용승인서
2. 유전자변형미생물 이용사항의 변경에 관한 서류

② 환경부장관은 제1항에 따른 변경승인신청서를 접수한 날부터 10일 이내에 변경승인 여부를 결정하고, 규칙 별지 제40호서식의 “유전자변형미생물 변경이용승인서”를 신청인에게 통지하여야 한다.

③ 환경부장관은 제2항에 따른 변경승인 등을 결정하기 위하여 필요한 경우에는 신청인에게 기간을 정하여 필요한 자료를 제출하게 할 수 있다.

④ 법 제22조의4제2항 및 영 제23조의14제4항에 따라 변경신고를 하려는 자는 규칙 별지 제41호서식의 “유전자변형미생물 이용승인사항 변경신고서”에 제1항 각 호에 관한 서류를 첨부하여 환경부장관에게 제출하여야 한다.

⑤ 제4항의 신고를 접수한 환경부장관은 필요 시 규칙 별지 제40호서식의 “유전자변형미생물 이용승인사항 변경신고확인서”를 발급할 수 있다.

작성된 초안을 한국바이오안전성정보센터(Korea Biosafety Clearing House, KBCH)에 자문을 구하여 법률 구조 및 세부 사항을 논의하고 수정하는 절차를 거쳤다(그림 37). 자문을 통해 환경부 LMO법 통합고시 생산공정이용시설 관련 신설 및 통합고시의 중복 및 최신화 작업을 거쳐 개정(안)을 마련했으며, 개정(안)에 따른 별지 및 별표 서류 역시 준비하였다. 본 개정(안)은 추후 의견 수렴 및 수정을 통해 내년 환경부에 제안할 예정이다(그림 38, 39).

그림 37. 한국바이오안전성정보센터-환경부 통합고시 개정(안) 검토 및 자문

그림 38. 환경부 LMO법 통합고시 개정(안) 전문

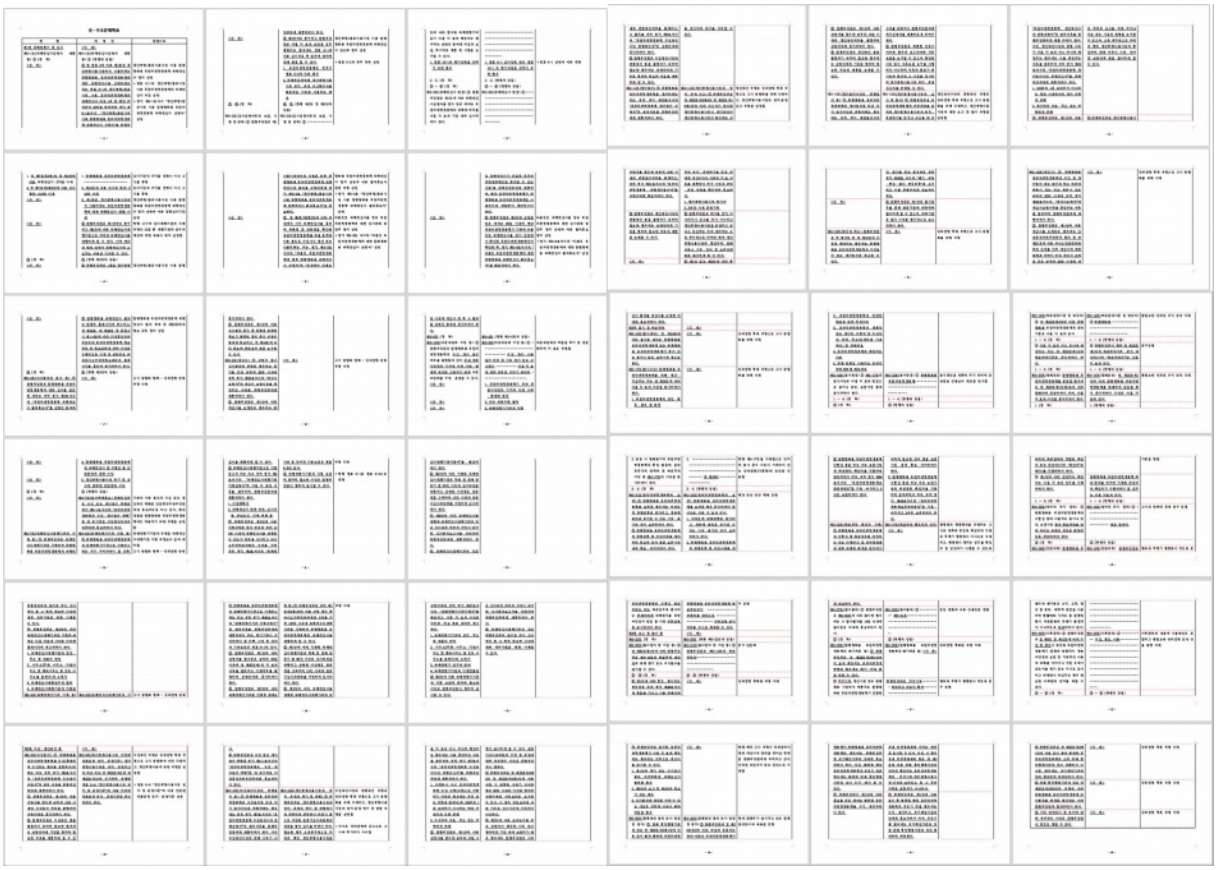


그림 39. 환경부 LMO법 통합고시 개정(안) 신구대조문

Ⅳ. 고찰 및 제언

본 과제는 유전자변형을 위한 새로운 기술로 개발된 LMO 및 그에 따른 환경부의 새로운 규제 및 정책을 다루고 있으며 이를 통칭하여 '신기술 LMO'라 부르고 있다. 유전자를 정밀하게 편집할 수 있는 기술의 등장 이후, 현재는 이 기술의 발전 방향 및 속도에 맞는 규제와 정책이 국제적으로 필요하다. 특히, 환경정화와 환경방출은 자연생태계와 밀접한 영향을 주고받을 가능성이 높기 때문에 더욱 엄격한 규제와 정책이 요구된다. 그에 따라, 여기서는 신기술 LMO의 국제적 규제나 정책을 비교분석하여 국내 실정에 맞는 환경부의 규제와 정책을 제안하였을 뿐만 아니라 국내 개발사의 위해성심사 진입에 애로사항을 청취하며 국가 정책을 위하여 위해성평가・심사에 필요한 가이드라인 및 LMO법 통합고시 개정과 같은 정책적 방향도 제시하였다.

1. 신기술 LMO의 안전성 평가를 위해 기술 유형별 특성과 잠재적 위험요소를 분석한 결과, 각 기술의 특성에 맞는 세분화된 평가 체계가 필요하며 SDN-1, SDN-2, 시스제네시스(Cisgenesis), RNA 간섭(RNAi) 등 다양한 기술은 전통적인 GMO와 달리 외래 유전자의 도입 여부, 비표적 돌연변이 발생 가능성 등에서 차별화된 특성을 가지고 있다. 이를 기반으로 신기술 LMO의 위해성 평가 항목은 기존 GMO 규제와 동일하게 적용되기보다는 각 기술 유형의 특성을 반영하여 맞춤형 평가 지침이 필요하다. 특히, 비표적 돌연변이와 생물다양성 영향에 대한 정밀한 평가가 요구되며, 이를 위해 가이드 RNA 설계 및 유전체 스크리닝 기술의 발전이 필수적이다. 미국, 유럽연합, 일본 등 주요 국가의 규제 사례를 비교 분석한 결과, 각국은 자국 생태적 특성과 기술 혁신 간 균형을 유지하려는 방향성을 가지고 있으며 미국의 SECURE Rule은 SDN-1 기술의 비외래 유전자 도입 특성을 인정하여 규제를 완화하였으며, 유럽연합의 NGT(New Genomic Techniques) 개정안은 기술의 안전성을 중심으로 규제를 세분화하고 있다. 이러한 사례는 국내에서도 신기술 LMO의 특성을 고려한 규제 체계가 필요하다는 점을 시사함과 동시에 이를 통해 신기술 LMO에 대한 엄격한 안전관리 및 평가 체계가 필요함을 시사한다.
2. 위해성평가용 신기술 LMO 모델 시스템 구축을 위해 목본, 미생물, 미세조류 등의 형질전환 및 우성 형질 선별 시스템을 개발하였고 각각 1

개체의 LMO를 확보하였다. 이를 통해 국내 생태계에 적합한 실험적 환경에서 신기술 LMO의 안전성을 검증할 수 있는 기틀이 마련되었다. 특히, 미세조류와 같은 미생물의 경우, 환경 내에서의 확산 가능성과 우점 형질 발현 여부를 평가하는 것이 중요하며, 본 연구에서 수행된 형질전환 실험은 향후 표준화된 위해성 평가 체계 마련에 기여될 것이다.

3. 본 연구에서 다루고 있는 신기술 LM 미세조류는 '환경정화용'으로 환경부 주관 위해성심사에 진입하는 최초 사례가 될 것으로 예상된다. 개발사는 위해성심사 절차에 처음으로 진입하는 만큼, 환경부 주관 심사의 진행 과정, 요구 서류 및 문서, 그리고 위해성 평가 방법 등에 많은 어려움을 겪고 있다. 이에 본 과제는 개발사에게 위해성심사의 단계별 절차와 평가 시 유의사항을 안내하였다. 또한, 개발사의 위해성심사 진입을 지원하기 위해 '환경정화용 LM미세조류의 위해성평가・심사 가이드라인(안)'을 완성하였다. 이 가이드라인(안)은 향후 수정 및 검토를 거쳐 최종 가이드라인으로 발간될 예정이다. 본 과제에서 개발한 가이드라인(안)은 개발사뿐만 아니라 환경부와 관련 연구기관 및 각 부처에서도 환경정화용 LMO 위해성 협의심사와 평가 과정에서 유용한 참고자료로 활용될 수 있도록 설계되었다. 이를 통해 환경부 위해성심사 과정의 일관성을 확보하고, 개발사가 직면한 행정적 및 기술적 어려움을 완화하는 데 기여될 것으로 예상된다. 더 나아가, 이 가이드라인(안)은 국내외 규제 동향과 최신 과학적 기준을 반영하여 환경정화용 LMO의 위해성평가 방법을 지속적으로 보완할 예정이다.

4. 국내 담수 생태계를 기반으로 모의생태계를 조성하고, 지역별 물리화학적 특성과 생물학적 특성을 분석한 결과, LM 미세조류의 생존성과 증식 가능성은 환경적 요인에 따라 크게 달라짐을 확인하였다. 특히, 동부저수지와 금강을 기반으로 수행된 실험에서는 계절적 변화와 지역별 특성이 LM 미세조류의 성장과 확산에 미치는 영향을 명확히 보여주었다. 예를 들어, 하류 지역에서는 높은 영양염류 농도가 조류의 증식을 촉진하는 반면, 금강과 같은 개방된 수계에서는 생존률이 낮아지는 경향을 보였습니다. 이러한 연구 결과는 LM 미세조류가 환경에 방출되었을 때 생태계에 미칠 잠재적 영향을 사전에 예측하고, 이에 대한 관리 방안을 마련하는 데 중요한 시사점을 제공한다. 특히, LM 미세조류가 특정 환경에서 우점종으로 자리 잡거나 과도한 증식을 일

으킬 가능성을 방지하기 위해 표준화된 위해성 평가 지침이 필요하다. 추후 다양한 수계를 선정하여 지역적 특성을 반영한 데이터 축적을 진행할 예정이며, 이를 기반으로 환경방출 LM 미세조류의 안전관리 체계를 강화할 것이다.

5. 본 연구에서는 환경정화용 LM 미세조류의 생산공정이용시설 활용을 위해 환경부 소관 LMO법 통합고시 개정(안)을 마련하고, 이를 기반으로 생산공정이용시설의 설치·운영·사후관리에 대한 기준 및 현황을 분석하였다. 환경정화용 LM 미세조류는 환경정화 과정에서 직접적인 환경 방출 가능성뿐만 아니라, 생산공정이용시설을 통해 오염원을 제거하는 방식으로 활용될 수 있기 때문에 시설 내 설치와 운영에 대한 철저한 기준을 수립하고, 사후관리 체계를 강화하여 잠재적 위험을 최소화하는 것이 중요하다. 특히, 본 연구에서 제안한 통합고시 개정(안)은 시설 설치 및 운영 기준을 3등급 및 4등급과 같은 고위험군까지 확장하여 엄격한 관리 및 감독 체계를 도입하고자 하였다. 생산공정이용시설의 운영 기준은 시설 규모와 용도에 따라 세분화되고, 폐기물 및 폐수 처리 방식에 대한 구체적인 기술 요구사항을 포함하도록 보완이 필요하다. 본 통합고시 개정(안)은 환경정화용 LM 미세조류에 대한 환경부의 자연생태계 보호 및 생물다양성 보전을 위한 법적·행정적 기반을 마련할 수 있을 것으로 기대된다.

참고문헌

국립생태원. (2021). 신기술 LMO의 위해성평가 기술 및 가이드라인 개발. 국립생태원, 서천. NIE-법정연구-2021-11.

국립생태원. (2022). 신기술 LMO의 위해성평가 기술 및 가이드라인 개발. 국립생태원, 서천. NIE-법정연구-2022-11.

국립생태원. (2023). 신기술 LMO의 위해성평가 기술 및 가이드라인 개발. 국립생태원, 서천. NIE-법정연구-2023-11.

충남대학교 산학협력단. (2023) 2022년 충청남도 호소환경(생태)조사 연구용역 최종보고서

한국바이오안전성정보센터. (2020). 미국 SECURE 규제 발표 : 생명공학규제를 현대화하기 위한 'Sustainable, Ecological, Consistent, Uniform, Responsible, Efficient(SECURE) Rule' 초안 발표

한국바이오안전성정보센터. (2024). KBCH 동향보고서

한국바이오안전성정보센터. (2024). EU 신유전체기술(NGT)에 관한 규범 현황과 시사점

Ajjawi, I., Verruto, J., Aqui, M., Soriaga, L. B., Coppersmith, J., Kwok, K., ... & Moellering, E. R. (2017). Lipid production in *Nannochloropsis gaditana* is doubled by decreasing expression of a single transcriptional regulator. Nature Biotechnology, 35(7), 647-652.

Alam, A., Jiang, L., Kittleson, G. A., Steadman, K. D., Nandi, S., Fuqua, J. L., ... & McDonald, K. A. (2018). Technoeconomic modeling of plant-based griffithsin manufacturing. Frontiers in Bioengineering and Biotechnology, 6, 102.

Anzalone, A. V., Koblan, L. W., & Liu, D. R. (2020). Genome editing with CRISPR–Cas nucleases, base editors, transposases and prime editors. Nature Biotechnology, 38(7), 824-844.

Baek, K., Kim, D. H., Jeong, J., Sim, S. J., Melis, A., Kim, J. S., ... & Bae, S. (2016). DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. Scientific Reports, 6(1), 30620.

Corbin, J. M., McNulty, M. J., Macharoen, K., McDonald, K. A., & Nandi, S. (2020). Technoeconomic analysis of semicontinuous bioreactor

production of biopharmaceuticals in transgenic rice cell suspension cultures. Biotechnology and Bioengineering, 117(10), 3053-3065.

Davis, R., Duane, G., Kenny, S. T., Cerrone, F., Guzik, M. W., Babu, R. P., ... & O'Connor, K. E. (2015). High cell density cultivation of *Pseudomonas putida* KT2440 using glucose without the need for oxygen enriched air supply. Biotechnology and Bioengineering, 112(4), 725-733.

De Brabander, P., Uitterhaegen, E., Delmulle, T., De Winter, K., & Soetaert, W. (2023). Challenges and progress towards industrial recombinant protein production in yeasts: a review. Biotechnology Advances, 64, 108121.

Dhokane, D., Kancharla, N., Savarimuthu, A., Bhadra, B., Bandyopadhyay, A., & Dasgupta, S. (2023). Genome editing in *Chlamydomonas reinhardtii* using Cas9-gRNA ribonucleoprotein complex: A step-by-step guide. In Plant Genome Engineering: Methods and Protocols (pp. 207-217). New York, NY: Springer US.

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). (2010). Guidance on the environmental risk assessment of genetically modified plants. EFSA Journal, 8(11), 1879.

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (GMO). (2012). Scientific opinion addressing the safety assessment of plants developed using Zinc Finger Nuclease 3 and other Site‐Directed Nucleases with similar function. EFSA Journal, 10(10), 2943.

EFSA Panel on Genetically Modified Organisms (EFSA GMO Panel), Naegeli, H., Bresson, J. L., Dalmay, T., Dewhurst, I. C., Epstein, M. M., ... & Rostoks, N. (2020). Applicability of the EFSA Opinion on site‐directed nucleases type 3 for the safety assessment of plants developed using site‐directed nucleases type 1 and 2 and oligonucleotide‐directed mutagenesis. EFSA Journal, 18(11), e06299.

Eidenberger, L., Kogelmann, B., & Steinkellner, H. (2023). Plant-based biopharmaceutical engineering. Nature Reviews Bioengineering, 1(6), 426-439.

Ezura, H. (2022). The world's first CRISPR tomato launched to a Japanese market: The social-economic impact of its implementation on crop genome editing. Plant and Cell Physiology, 63(6), 731-733.

Francescon, S. (2001). The new directive 2001/18/EC on the deliberate release of genetically modified organisms into the environment: Changes and perspectives. Rev. Eur. Comp. & Int'l Envtl. L., 10, 309.

Holkenbrink, C., Dam, M. I., Kildegaard, K. R., Beder, J., Dahlin, J., Doménech Belda, D., & Borodina, I. (2018). EasyCloneYALI: CRISPR/Cas9-based synthetic toolbox for engineering of the yeast *Yarrowia lipolytica*. Biotechnology Journal, 13(9), 1700543.

Horwitz, A. A., Walter, J. M., Schubert, M. G., Kung, S. H., Hawkins, K., Platt, D. M., ... & Newman, J. D. (2015). Efficient multiplexed integration of synergistic alleles and metabolic pathways in yeasts via CRISPR-Cas. Cell Systems, 1(1), 88-96.

Iwasaki, K., Uchiyama, H., Yagi, O., Kurabayashi, T., Ishizuka, K., & Takamura, Y. (1994). Transformation of *Pseudomonas putida* by electroporation. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 58(5), 851-854.

Jacobsen, C. (2015). Fish oils: composition and health effects. In Encyclopedia of Food and Health (pp. 686-692). Elsevier.

Kawall, K., Cotter, J., & Then, C. (2020). Broadening the GMO risk assessment in the EU for genome editing technologies in agriculture. Environmental Sciences Europe, 32(1), 106.

Klümper, W., & Qaim, M. (2014). A meta-analysis of the impacts of genetically modified crops. PloS One, 9(11), e111629.

Kuromori, T., Sugimoto, E., Ohiraki, H., Shinozaki, K. Y., & Shinozaki, K. (2017). Functional relationship of AtABCG21 and AtABCG22 in stomatal regulation. Scientific Reports, 7, 12501.

Kuromori, T., Sugimoto, E., & Shinozaki, K. (2011). *Arabidopsis* mutants of AtABCG22, an ABC transporter gene, increase water transpiration and drought susceptibility. The Plant Journal, 67, 885-894.

Lee, J. W., Lee, M. W., Nam, K. H., Chun, S. J., Oh, H. M., Jin, E., & Lee, H. G. (2024). Enhancement of ketocarotenoid production via heterologous expression of orange protein from *Ipomoea batatas* in indigenous microalga Ettlia sp. Algal Research, 84, 103767.

Lee, J. W., Lee, M. W., Jin, C. Z., Oh, H. M., Jin, E., & Lee, H. G. (2022).

Inhibition of monogalactosyldiacylglycerol synthesis by down-regulation of MGD1 leads to membrane lipid remodeling and enhanced triacylglycerol biosynthesis in *Chlamydomonas reinhardtii*. Biotechnology for Biofuels and Bioproducts, 15(1), 88.

Lee, J. W., Lee, M. W., Ha, J. S., Kim, D. S., Jin, E., Lee, H. G., & Oh, H. M. (2020). Development of a species-specific transformation system using the novel endogenous promoter calreticulin from oleaginous microalgae *Ettlia* sp. Scientific Reports, 10(1), 13947.

Lee, S. W. (2018). Strengthening the competitiveness of agricultural biotechnology through practical application of gene editing technology. Journal of Plant Biotechnology, 45(3), 155-170.

Li, M., Lang, X., Moran Cabrera, M., De Keyser, S., Sun, X., Da Silva, N., & Wheeldon, I. (2021). CRISPR-mediated multigene integration enables Shikimate pathway refactoring for enhanced 2-phenylethanol biosynthesis in Kluyveromyces marxianus. Biotechnology for Biofuels, 14, 1-15.

Li, T., Yang, Y., Qi, H., Cui, W., Zhang, L., Fu, X., ... & Yu, T. (2023). CRISPR/Cas9 therapeutics: progress and prospects. Signal Transduction and Targeted Therapy, 8(1), 36.

Liang, Y., Jiao, S., Wang, M., Yu, H., & Shen, Z. (2020). A CRISPR/Cas9-based genome editing system for *Rhodococcus ruber* TH. Metabolic Engineering, 57, 13-22.

Lian, J., Schultz, C., Cao, M., HamediRad, M., & Zhao, H. (2019). Multi-functional genome-wide CRISPR system for high throughput genotype–phenotype mapping. Nature Communications, 10(1), 5794.

Lu, L., Shen, X., Sun, X., Yan, Y., Wang, J., & Yuan, Q. (2022). CRISPR-based metabolic engineering in non-model microorganisms. Current Opinion in Biotechnology, 75, 102698.

Lv, X., Li, Y., Xiu, X., Liao, C., Xu, Y., Liu, Y., ... & Liu, L. (2023). CRISPR genetic toolkits of classical food microorganisms: Current state and future prospects. Biotechnology Advances, 108261.

Lv, Y., Gu, Y., Xu, J., Zhou, J., & Xu, P. (2020). Coupling metabolic

addiction with negative autoregulation to improve strain stability and pathway yield. Metabolic Engineering, 61, 79-88.

McNulty, M. J., Nandi, S., & McDonald, K. A. (2022). Technoeconomic modeling and simulation for plant-based manufacturing of recombinant proteins. In Recombinant Proteins in Plants: Methods and Protocols (pp. 159-189). New York, NY: Springer US.

Miao, C., Meng, D., Liu, Y., Wang, F., Chen, L., Huang, Z., ... & Li, Q. (2021). Biosynthesis of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in metabolically recombinant *Escherichia coli*. International Journal of Biological Macromolecules, 193, 956-964.

Misra, V., Mall, A. K., Pandey, H., Srivastava, S., & Sharma, A. (2023). Advancements and prospects of CRISPR/Cas9 technologies for abiotic and biotic stresses in sugar beet.

Nandi, S., Kwong, A. T., Holtz, B. R., Erwin, R. L., Marcel, S., & McDonald, K. A. (2016). Techno-economic analysis of a transient plant-based platform for monoclonal antibody production. mAbs, 8(8), 1456–1466.

Nekrasov, V., Wang, C., Win, J., Lanz, C., Weigel, D., & Kamoun, S. (2017). Rapid generation of a transgene-free powdery mildew resistant tomato by genome deletion. Scientific Reports, 7(1), 482.

Nishitani, C., Hirai, N., Komori, S., Wada, M., Okada, K., Osakabe, K., ... & Osakabe, Y. (2016). Efficient genome editing in apple using a CRISPR/Cas9 system. Scientific Reports, 6(1), 31481.

Niu, T. C., Lin, G. M., Xie, L. R., Wang, Z. Q., Xing, W. Y., Zhang, J. Y., & Zhang, C. C. (2018). Expanding the potential of CRISPR-Cpf1-based genome editing technology in the cyanobacterium Anabaena PCC 7120. ACS Synthetic Biology, 8(1), 170-180.

Nonaka, S., Arai, C., Takayama, M., Matsukura, C., & Ezura, H. (2017). Efficient increase of ɣ-aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. Scientific Reports, 7(1), 7057.

Novarina, D., Koutsoumpa, A., & Milias-Argeitis, A. (2022). A user-friendly and streamlined protocol for CRISPR/Cas9 genome editing in budding yeast. Cellpress, Star Protocols.

Oh, J. H., & van Pijkeren, J. P. (2014). CRISPR–Cas9-assisted recombineering in *Lactobacillus reuteri*. Nucleic Acids Research, 42(17), e131-e131.

Ortigosa, A., Gimenez-Ibanez, S., Leonhardt, N., & Solano, R. (2019). Design of a bacterial speck resistant tomato by CRISPR/Cas9-mediated editing of Sl JAZ 2. Plant Biotechnology Journal, 17(3), 665-673.

Osakabe, Y., Watanabe, T., Sugano, S. S., Ueta, R., Ishihara, R., Shinozaki, K., & Osakabe, K. (2013). Optimization of CRISPR/Cas9 genome editing to modify abiotic stress responses in plants. Scientific Reports, 6, 26685.

Park, S. M., Park, H. H., Lim, W. K., & Shin, H. J. (2003). A new variant activator involved in the degradation of phenolic compounds from a strain of *Pseudomonas putida*. Journal of Biotechnology, 103(3), 227-236.

Price, M. A., Cruz, R., Bryson, J., Escalettes, F., & Rosser, S. J. (2020). Expanding and understanding the CRISPR toolbox for Bacillus subtilis with MAD7 and dMAD7. Biotechnology and Bioengineering, 117(6), 1805-1816.

Qin, Q., Ling, C., Zhao, Y., Yang, T., Yin, J., Guo, Y., & Chen, G. Q. (2018). CRISPR/Cas9 editing genome of extremophile Halomonas spp. Metabolic Engineering, 47, 219-229.

Rostoks, N. (2021). Implications of the EFSA scientific opinion on site-directed nucleases 1 and 2 for risk assessment of genome-edited plants in the EU. Agronomy, 11(3), 572.

Ryan, O. W., Skerker, J. M., Maurer, M. J., Li, X., Tsai, J. C., Poddar, S., ... & Cate, J. H. (2014). Selection of chromosomal DNA libraries using a multiplex CRISPR system. Elife, 3, e03703.

Santillán Martínez, M. I., Bracuto, V., Koseoglou, E., Appiano, M., Jacobsen, E., Visser, R. G., ... & Bai, Y. (2020). CRISPR/Cas9-targeted mutagenesis of the tomato susceptibility gene PMR4 for resistance against powdery mildew. BMC Plant Biology, 20(1), 1-13.

Schmidt, S. M., Belisle, M., & Frommer, W. B. (2020). The evolving landscape around genome editing in agriculture: Many countries have exempted or moved to exempt forms of genome editing from GMO regulation of crop plants. EMBO Reports, 21(6), e50680.

Schwartz, C., Shabbir-Hussain, M., Frogue, K., Blenner, M., & Wheeldon, I. (2017). Standardized markerless gene integration for pathway engineering in *Yarrowia lipolytica*. ACS Synthetic Biology, 6(3), 402-409.

Seol, M. A., Kim, S. S., Lee, E. S., Nam, K. H., Chun, S. J., & Lee, J. W. (2024). Yeast cadmium factor 1-enhanced oxidative stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Journal of Plant Biotechnology, 51(1), 337-343.

Simkin, A. J., López-Calcagno, P. E., & Raines, C. A. (2019). Feeding the world: improving photosynthetic efficiency for sustainable crop production. Journal of Experimental Botany, 70(4), 1119-1140.

Song, W. Y., Sohn, E. J., Martinoia, E., Lee, Y. J., Yang, Y. Y., Jasinski, M., Forestier, C., Hwang, I. H., & Lee, Y. S. (2003). Engineering tolerance and accumulation of lead and cadmium in transgenic plants. Nature Biotechnology, 21, 914-919.

Song, X., Huang, H., Xiong, Z., Ai, L., & Yang, S. (2017). CRISPR-Cas9D10A nickase-assisted genome editing in *Lactobacillus casei*. Applied and Environmental Microbiology, 83(22), e01259-17.

Sulis, D. B., Jiang, X., Yang, C., Marques, B. M., Matthews, M. L., Miller, Z., ... & Wang, J. P. (2023). Multiplex CRISPR editing of wood for sustainable fiber production. Science, 381(6654), 216-221.

Tusé, D., Tu, T., & McDonald, K. A. (2014). Manufacturing economics of plant-made biologics: case studies in therapeutic and industrial enzymes. BioMed Research International, 2014(1), 256135.

The University of Queensland. (2020). Risk Assessment and Risk Management Plan for DIR 169.

Vasudevan, S. N., Pooja, S. K., Raju, T. J., & Damini, C. S. (2023). Cisgenics and intragenics: boon or bane for crop improvement. Frontiers in Plant Science, 14, 1275145.

Walwyn, D. R., Huddy, S. M., & Rybicki, E. P. (2015). Techno-economic analysis of horseradish peroxidase production using a transient expression system in Nicotiana benthamiana. Applied Biochemistry and Biotechnology, 175, 841-854.

Wang, B., Hu, Q., Zhang, Y., Shi, R., Chai, X., Liu, Z., ... & Wen, T. (2018).

A RecET-assisted CRISPR–Cas9 genome editing in *Corynebacterium glutamicum*. Microbial Cell Factories, 17, 1-16.

Wang, G., Huang, M., & Nielsen, J. (2017). Exploring the potential of Saccharomyces cerevisiae for biopharmaceutical protein production. Current Opinion in Biotechnology, 48, 77-84.

Wang, Z., Qin, Q., Zheng, Y., Li, F., Zhao, Y., & Chen, G. Q. (2021). Engineering the permeability of *Halomonas bluephagenesis* enhanced its chassis properties. Metabolic Engineering, 67, 53-66.

Wasels, F., Jean-Marie, J., Collas, F., López-Contreras, A. M., & Ferreira, N. L. (2017). A two-plasmid inducible CRISPR/Cas9 genome editing tool for *Clostridium acetobutylicum*. Journal of Microbiological Methods, 140, 5-11.

부 록

1. 연구결과 활용

가. 논문 발표

1) Algal Research. 2024.103767

Algal Research 84 (2024) 103767

Contents lists available at ScienceDirect

Algal Research

journal homepage: www.elsevier.com/locate/algal

Enhancement of ketocarotenoid production via heterologous expression of orange protein from *Ipomoea batatas* in indigenous microalga *Ettlia* sp.

Jun-Woo Lee [a], Min-Woo Lee [b], Kyong-Hee Nam [a], Seong-Jun Chun [a], Hee-Mock Oh [b], EonSeon Jin [c], Hyung-Gwan Lee [b,*]

[a] LMO Team, National Institute of Ecology (NIE), Seocheon, 33657, Republic of Korea
[b] Cell Factory Research Center, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology (KRIBB), Daejeon 34141, Republic of Korea
[c] Department of Life Science and Research Institute for Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 04763, Republic of Korea

ARTICLE INFO

Keywords:
Ettlia sp. YC001
Orange protein
Astaxanthin
Heterologous expression
β-carotene
Ipomoea batatas

ABSTRACT

Astaxanthin, one of the most powerful natural antioxidants, is used in high-value industries such as those of cosmetics, nutraceuticals, and food products derived from microalgae. In this study, *Ettlia* sp. mutants were generated by expressing two types of heterologous orange proteins, IbOr and IbOr-R96H, in which the 96th arginine of IbOr was substituted with histidine derived from *Ipomoea batatas* to enhance astaxanthin production. The *Ett-IbOr-R96H* mutant showed a 2.4-fold increase in β-carotene content compared to the wildtype (4.59 mg g^{-1}DCW), reaching 10.82 mg g^{-1} under high-light conditions via two-phase cultivation. Under the stress treatment combination of high-light intensity and nitrogen deprivation, total carotenoid content increased to 17.24 mg L^{-1} and 21.94 mg L^{-1} in *Ett-IbOr* and *Ett-IbOr-R96H*, respectively. The astaxanthin and canthaxanthin contents in *Ett-IbOr-R96H* was 4.89 mg L^{-1} and 0.47 mg L^{-1}, respectively, which were 1.8- and 1.5-fold higher, respectively, than those in *Ett-IbOr*. Additionally, photosynthetic efficiency (Fv/Fm) recovered in *Ett-IbOr-R96H* under dual-stress conditions compared to the wildtype while reactive oxygen species levels decreased throughout the cultivation period. Our findings suggest that the heterologous *IbOr* expression in *Ettlia* sp. may be an effective approach for enhancing the production of ketocarotenoids and improving stress resistance for industrial applications.

2) Journal of Plant Biotechnology. 2024.51(1), 337-343.

J Plant Biotechnol (2024) 51:337-343
DOI:https://doi.org/10.5010/JPB.2024.51.033.337

ISSN 1229-2818 (Print)
ISSN 2384-1397 (Online)

Research Article

Yeast cadmium factor 1-enhanced oxidative stress tolerance in *Arabidopsis thaliana*

Min-A Seol • Seon Suk Kim • Eun Seon Lee • Kyong-Hee Nam • Seong-Jun Chun • Jun-Woo Lee

Received: 30 September 2024 / Revised: 1 November 2024 / Accepted: 6 November 2024 / Published: 13 November 2024
ⓒ Korean Society for Plant Biotechnology

Abstract Yeast cadmium factor 1 (*YCF1*) is an ATP-binding cassette transporter family protein that is heterologously expressed in *Arabidopsis thaliana*. *YCF1* enhances tolerance to abiotic stresses, particularly Cd and oxidative stress, by acting as a reactive oxygen species (ROS) scavenger and also regulating key transcription factors, including *WRKY13* and *WRKY25*. In the present study, Arabidopsis transformants expressing *YCF1* were generated via *Agrobacterium*-mediated transformation, resulting in two distinct phenotypes: *YCF1_Wt*, which exhibits a wild-type-like appearance, and *YCF1_Dw*, displaying dwarf stature and expressing higher levels of *YCF1* than *YCF1_Wt*. Comparative analysis revealed that *YCF1_Dw* possessed significantly enhanced ROS scavenging activity, as indicated by elevated expression of antioxidant enzymes, such as superoxide dismutase (*SOD1*), catalase (*CAT*), and ascorbate peroxidase1 (*APX1*). Consequently, greater stress tolerance was observed in the *YCF1_Dw* transformant relative to *YCF1_Wt*. The study also revealed differential expression of *WRKY13* and *WRKY25* under stress conditions, with *WRKY13* and *WRKY25* upregulated in response to Cd and oxidative stress, respectively, suggesting a stress-specific regulatory mechanism facilitated by *YCF1*. Moreover, the *YCF1_Dw* phenotype offers practical advantages for phytoremediation applications, as its smaller size lends itself to easier management in controlled environments. These findings highlight the potential of *YCF1* to enhance plant stress tolerance, which could in turn significantly impact agricultural and environmental biotechnology.

Introduction

The yeast cadmium factor 1 (*YCF1*) from *Saccharomyces cerevisiae* is a common enzyme that detoxifies heavy metals, including Cd, As, and Sb (Preveral et al. 2006). Previous studies have investigated the detoxification of heavy metals through *YCF1* heterologous expression in higher plants. In *Arabidopsis thaliana*, *YCF1* overexpression enhanced Pb and Cd tolerance and increased their accumulation (Song et al. 2003). Similarly, in *Brassica juncea*, *YCF1* overexpression enhanced the tolerance to Cd and Pb stress (Bhuiyan et al. 2011). Transgenic *Populus alba* × *Populus. tremula* var. *glandulosa* overexpressing *YCF1* exhibited increased Cd content compared with that in non-transgenic plants (Shim et al. 2013).

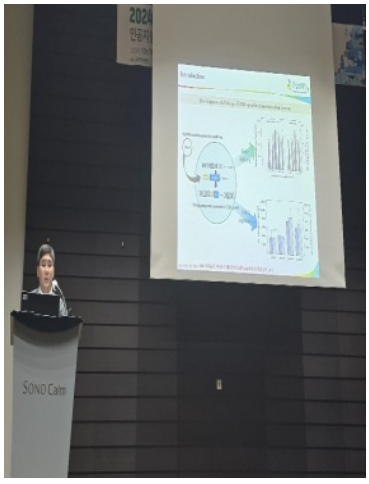
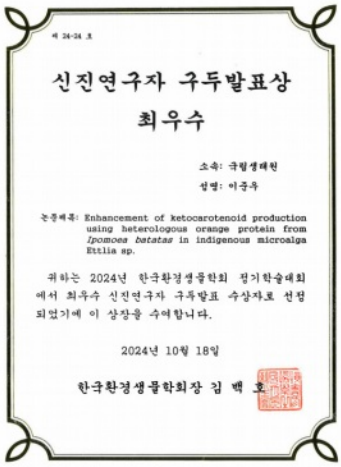
Various signaling pathways involved in plant defense regulate resistance to abiotic stresses, such as heavy metals. Among these, the effective scavenging of reactive oxygen species (ROS) that accumulate owing to abiotic stress is one of the mechanisms for increasing stress resistance. Exposure of plant cells to environmental or abiotic stresses leads to ROS accumulation, triggering cellular responses to external stimuli (Nadarajah 2020). Excessive ROS can cause cellular toxicity, senescence, and cell death. Plants maintain ROS homeostasis by reducing ROS accumulation via the activation of antioxidant enzymes such as catalase (*CAT*), superoxide dismutase (*SOD*), glutathione peroxidase (*GPX*), and ascorbate peroxidase (*APX*) (Hasanuzzaman et al. 2020; Zandi and Schnug 2022).

나. 기술개발 연구결과 특허출원 1건

- *YCF1* 유전자 과발현을 통한 환경 스트레스 내성이 증대된 식물체의 제조방법
  - 10-2024-0177707(접수번호 1-1-2024-1339698-43)(24.12.03.)

다. 학술 실적:

1) 2024 한국환경생물학회 정기학술대회 신진연구자 구두발표상 최우수 수상

<table>
<tr>
<td>  </td>
<td colspan="2">
</td>
<td> 
신진연구자 구두발표상
최우수
소속: 국립생태원
성명: 이준우
논문제목: Enhancement of ketocarotenoid production using heterologous orange protein from Ipomoea batatas in indigenous microalga Ettlia sp.
귀하는 2024년 한국환경생물학회 정기학술대회에서 최우수 신진연구자 구두발표 수상자로 선정되었기에 이 상장을 수여합니다.
2024년 10월 18일
한국환경생물학회장 김 백 호</td>
</tr>
<tr>
<td>신진연구자 발표</td>
<td colspan="2">신진연구자 구두발표상 최우수 수상</td>
</tr>
</table>

라. 정책활용

- 제4차 환경부 LMO 안전관리 계획('23 ~ '27)
- 2024년 환경부 LMO 안전관리 세부시행계획 수립·이행
- 2025년 환경부 LMO 안전관리 세부시행계획에 반영 예정

마. 컨텐츠 개발(유튜브):

- 국립생태원 유튜브 LMO 안전관리 및 과제 소개 (https://youtu.be/-YNAk4XXXbE?si=j5WBVMA2rcZ3w-G_)

[너 이거 알아?] 있어요? 아니, 없어요! 다리가 없는 도마뱀? 너 누군데?
조회수 2.6천회 • 3개월 전

[너 이거 알아?] 성 전환이 흔한 일? 약 500종의 물고기의 놀라운 생존전략
조회수 923회 • 3개월 전

[국립생태원 v-log] 오늘도 난 배운다★ 끊임없는 성장캐 LMO팀 이준우 연구원의 하루
조회수 711회 • 3개월 전

[국립생태원 v-log] 쉴 틈이 없다! 멸종위기 거북이, 앵무새, 도마뱀과 함께 하는 열정맨의 ...
조회수 1.5천회 • 3개월 전