

<https://doi.org/10.15433/ksmb.2019.11.2.052>

ISSN 2383-5400 (Online)

유전자변형 미세조류의 생태 유출 모니터링 및 위해성평가 연구

Monitoring and Environmental Risk Assessment of Genetically Modified Microalgae

조기철¹, 전한철¹, 황현주², 홍지원³, 이대성⁴, 한종원^{4,*}

Kichul Cho¹, Hancheol Jeon¹, Hyun-Ju Hwang², Ji Won Hong³, Dae-Sung Lee⁴, Jong Won Han^{4,*}

¹전임연구원, 국립해양생물자원관 유전자원연구실, 충남 서천군 장항읍 장산로 101번길 75, 33662, 대한민국

²선임연구원, 국립해양생물자원관 유전자원연구실, 충남 서천군 장항읍 장산로 101번길 75, 33662, 대한민국

³전임연구원, 국립해양생물자원관 분류연구실, 충남 서천군 장항읍 장산로 101번길 75, 33662, 대한민국

⁴책임연구원, 국립해양생물자원관 유전자원연구실, 충남 서천군 장항읍 장산로 101번길 75, 33662, 대한민국

^{1,2,4}Department of Genetic Resources Research, National Marine Biodiversity Institute of Korea, 101-75, Jangsan-ro, Janghang-eup, 33662 Seochun-gun, Chungchungnam-do, Republic of Korea

³Department of Taxonomy and Systematics, National Marine Biodiversity Institute of Korea, 101-75, Jangsan-ro, Janghang-eup, 33662 Seochun-gun, Chungchungnam-do, Republic of Korea

(Received 20 November 2019, Revised 26 November 2019, Accepted 28 November 2019)

Abstract Over the past few decades, microalgae-based biotechnology conjugated with innovative CRISPR/Cas9-mediated genetic engineering has been attracted much attention for the cost-effective and eco-friendly value-added compounds production. However, the discharge of reproducible living modified organism (LMO) into environmental condition potentially causes serious problem in aquatic environment, and thus it is essential to assess potential environmental risk for human health. Accordingly, in this study, we monitored discharged genetically modified microalgae (GMM) near the research complex which is located in Daejeon, South Korea. After testing samples obtained from 6 points of near streams, several green-colored microalgal colonies were detected under hygromycin-containing agar plate. By identification of selection marker genes, the GMM was not detected from all the samples. For the lab-scale environmental risk assessment of GMM, acute toxicity test using rotifer *Brachionus calyciflorus* was performed by feeding GMM. After feeding, there was no significant difference in mortality between WT and transformant *Chlamydomonas reinhardtii*. According to further analysis of horizontal transfer of green fluorescence protein (GFP)-coding gene after 24 h of incubation in synthetic freshwater, we concluded that the GFP-expressed gene not transferred into predator. However, further risk assessments and construction of standard methods including prolonged toxicity test are required for the accurate ecological risk assessment.

Keywords : Environmental risk assessment, GMO, LMO, Horizontal gene transfer, Monitoring, Microalgae

서론

미세조류는 줄기, 잎, 뿌리가 명확히 구분되지 않는 엽상체 식물로 분류되며 대기 중 이산화탄소를 유기탄소로 전환시켜 탄소원을 전달해주는 먹이사

슬의 제 1차 생산자로서 생태계의 중요한 역할을 담당한다. 미세조류는 육상식물에 비해 상대적으로 빠른 성장과 광생물 배양기(Photo-bioreactor) 및 옥외 배양시스템으로의 적용을 통한 바이오매스의 대량 생산, 배양 환경 조건 변화를 통한 카로테노이드 등

* Corresponding author
Phone: +82-41-950-0760 Fax: +82-41-950-0760
E-mail: jwhan@mabik.re.kr

This is an open-access journal distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

의 고부가 물질 생산 최적화와 더불어 대기 중 이산화탄소 감축효과 등 다양한 장점을 가지고 있기 때문에 최근 산업 및 연구적으로 많은 관심을 받고 있다 [1,2]. 실제 미세조류는 식품첨가물, 양식어종의 먹이생물 등 식품 및 수산업에서 활발히 활용되어 왔으며 향후 바이오연료, 오폐수 처리, 의약품, 농업 및 화장품 등 다양한 산업에도 적용이 가능할 것이라 예측되고 있다 [2-6]. 스페인 바르셀로나에 위치한 MONZON BIOTECH 회사에서는 현재 양식용 먹이생물, 애완동물을 위한 건강기능사료, 화장품 첨가제 등을 해양 미세조류 *Nannochloropsis* sp.와 *Dunaliella salina*를 활용하여 산업적으로 적용하였으며 (<https://mznbiotech.com>), 국내에서는 PHYCOIL BIOTECH에서 미세조류에서 추출한 Docosahexanoic acid (DHA)를 건강기능식품으로 생산중이다 (<http://www.phycoilbiotech.com>). 또한, (주) 대상에서는 *Chlorella*를 건강기능 식품으로 판매하고 있다 (<https://www.daesang.com>). 이렇듯, 미세조류에 대한 산업적인 가치가 점차적으로 부각되며 이를 활용한 고부가물질의 생산최적화를 위한 배양 공학적 연구와, 더 나아가 유전공학기술을 접목한 연구들도 지속적으로 확대되고 있다. 특히, CRISPR/Cas9을 활용한 혁신적인 유전자 편집 기술의 개발과 형질전환의 모델 균주인 *Chlamydomonas reinhardtii*를 활용한 지속적인 미세조류 유전공학 연구결과의 축적은 미세조류를 기반으로 한 다양한 고부가물질의 생산 가능성을 확대시키고 있으며, 국내에서도 한양대학교, 한국생명공학연구원 및 카이스트를 중심으로 다양한 연구들이 이뤄지고 있다 [7-9]. 일례로, 한국생명공학연구원에서는 최근 유전공학기술을 활용한 미세조류의 자가 포식(Autophagy) 생물 대사과정 조절을 통한 지질 및 카로테노이드 생산 최적화 연구가 활발하게 진행 중에 있다 [10,11]. 실제 이러한 유전공학기술들을 활용하여 Hamilton et al. [12]은 긴 사슬(long chain)의 오메가3 지방산 생산을 미세조류 *Phaeodactylum tricorutum*에 최적화 하였으며, León et al. [13]은 *C. reinhardtii*를 활용하여 생물활성물질인 ketocarotenoid의 합성을 증가시켰다는 보고가 있다.

하지만, 이러한 미세조류의 유전공학 기술의 발달과 더불어 형질전환 미세조류의 환경 위해성에 대한 이슈들이 지속적으로 제기되어 왔다 [14-17]. 최근

미국 Environmental Protection Agency (EPA)의 허가를 받고 진행한 Szyjka et al. [17]의 유전자 변형 미세조류 *Acutodesmus dimorphus*의 연구에서 지방산 조성과 green fluorescence protein (GFP)을 발현시킨 미세조류를 옥외에서 성공적으로 배양하였으며, 환경 노출 시 지역 호소의 생태계 구성에 큰 영향을 주지 않는 것을 확인한 바 있지만, 여전히 생태계 구성을 변화시킬 수 있는 잠재적인 환경 위해성은 제대로 평가되지 못하고 있다. 특히, 유전공학기술에 의해 형질 전환된 미세조류는 예상치 못한 대사물질을 생성할 수 있으며, 수생태계 먹이사슬에서 잠재적인 독성을 야기할 수 있다. 하지만, 잠재적인 독성에 대한 생태계 영향평가 연구는 거의 이뤄지지 않았다.

그리고 유전자변형생물체로부터 수해양생태계의 생물로의 수평적 (Horizontal gene transfer, HGT), 수직적 유전자 전달 가능성에 대한 우려가 제기되고 있다. 유전자전달은 인위적으로 만들어진 유전자의 확산을 초래하고 수해양생태계의 다양성을 훼손할 잠재적 가능성이 있다. 따라서 유전자변형 미세조류의 생태유출을 방지하기 위한 노력과 모니터링이 필요한 실정이지만 현재 시행된 유전자 변형 미세조류 (Genetically modified microalgae, GMM)의 모니터링 및 독성에 대한 연구는 거의 진행된 바가 없다. 따라서 이번 연구에서는 국내에서 미세조류 형질전환 연구가 활발히 진행되고 있는 대전 연구 단지를 중심으로 유출된 형질전환 미세조류의 유무를 모니터링 하였고, 이전 연구에서 GFP를 성공적으로 발현시킨 모델 미세조류 *Chlamydomonas reinhardtii* CC-621의 형질 전환체를 활용하여 실험실 수준에서 GMM의 잠재적인 환경 위해성을 평가하였다.

재료 및 방법

조사지역 및 시료채취

유전자변형 미세조류의 모니터링을 위해 미세조류 형질전환 연구가 활발하게 진행되고 있는 한국생명공학연구원과 KAIST가 위치해 있는 대전광역시 유성구의 연구단지 인근의 갑천과 탄동천을 중심으로 조사를 진행하였고, 조사기간은 미세조류의 성장 온도 조건이 유지되는 2017년 7월 및 8월에 걸쳐 총 2회 실시되었다. 조사는 Fig. 1A,B

에 표시된 것처럼 갑천 원류에서 3개 지역 (a. 36°26'54.7"N 127°23'25.7"E, b. 36°23'17.3"N 127°24'39.9"E, c. 36°22'02.8"N 127°22'09.5"E), 탄동천 지류에서 3개 지역 (a. 36°23'16.1"N 127°21'25.0"E, b. 36°22'36.3"N 127°21'41.5"E, c. 36°22'32.2"N 127°21'57.1"E)

을 선정하여 멸균된 채수기를 활용하여 진행되었으며, 채집된 샘플은 분석 전까지 1 L 눈금실린더에 방치하여 24시간 어두운 곳에 보관하였다 (Fig. 1A, B). 이후 침전된 샘플을 회수하여 분석에 활용하였다.

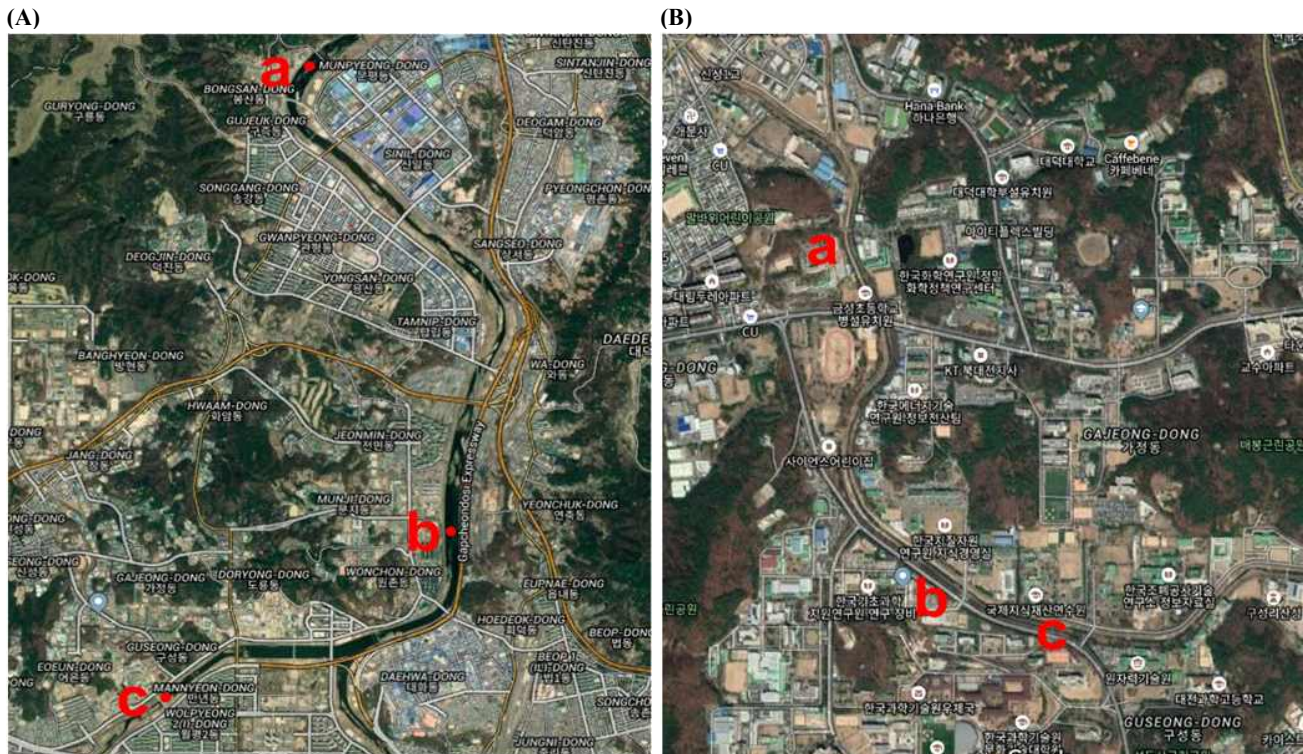


Figure 1. Sampling points (near Daejeon research complex, Korea) for the monitoring of genetically modified microalgae. (A) is Gap-Cheon and (B) is Tandong-Cheon.

유전자변형 미세조류 판별

미세조류의 형질전환 연구는 모델 미세조류인 *Chlamydomonas reinhardtii*가 널리 활용되고 있으며, 미세조류의 형질 전환체를 선별하기 위해 Hygromycin 항생제가 선택표지인자로서 일반적으로 활용되고 있다. 따라서 채집된 시료들에 함유된 유전자변형 미세조류를 식별하기 위해, *C. reinhardtii* 배양 시 사용되는 TAP 배양배지(1.5% Agar)를 활용하여 Hygromycin을 포함시킨 한천 배지와 포함시키지 않은 한천 배지를 각각 만들어 Bi-petridish (SPL Life science, Cat. No. 10092)에 균한 이후 50 µL의 샘플을 각각 도말 하였다. 이후 25°C,

150 µmole m⁻² s⁻¹ 광도의 형광등 아래에서 Continuous light 조건에서 배양하였다. 그리고 Hygromycin 배지에서 검출된 미세조류 집락의 형질 전환 여부를 검증하기 위해 Table 1과 같이 항존 유전자(house keeping gene)인 *rbcl*과 Hygromycin 내성 유전자인 *Hyg*를 검출하기 위한 primer를 제작하였고, PCR과 전기영동을 통해 검증하였다. PCR 조건은 95°C에서 5분간 초기 반응(initial-activation) 이후, 95°C에서 30초간 denaturation, 59°C에서 annealing 및 72°C에서 1분간 extension으로 30 cycle 반응을 진행하였다. 이후 전기영동을 통해 PCR 밴드를 확인하였다.

Table 1. Design of primers for house keeping (*rbcL*) and selection marker (*Hygro*)-coding genes

Primer	Sequence (5' to 3')	Gene
<i>rbcL</i> _F	TATGCCAGTTGCTTCAGGCG	<i>Rubisco</i> large subunit
<i>rbcL</i> _R	AGAGCTACACGGTTAGCTGC	
<i>C_Hyg_F</i>	ATGATTCTACGCGAGCCTG	<i>Hygromycin</i> resistance B
<i>C_Hyg_R</i>	GAAGTCGTGCAGGAAGGTGA	

형질전환 미세조류의 윤충류 급성 독성 평가

실험실 수준에서 GMM의 독성여부와 수평적 유전자 전달 여부를 확인하기 위해, 이전 연구에서 *subtilisin* (*Alcalsase*)을 활용하여 형질전환을 수행 하였던 *C. reinhardtii* CC-621 GFP 발현 형질 전환체를

실험군으로 사용하였다 [18]. 미세조류의 상위포식자인 윤충류는 표준 시험생물로 활용되고 있는 *Brachionus calyciflorus*를 활용하였고 ROTOXKIT F (MicroBioTests Inc. Gent, Belgium) cyst를 96 mg/L의 NaHCO₃, 60 mg/L의 CaSO₄, 60 mg/L의 MgSO₄ 및 4 mg/L의 KCl을 녹여 만든 합성 담수 (Synthetic freshwater, SFW)에 16시간 동안 배양하여 부화시켰으며 Fig. 2.에 나타낸 것처럼 각 well당 5개체를 분주하여 형질 전환체 미세조류와 야생형 미세조류를 조류 대 발생 초과농도(4.0-6.0 × 10⁶ cells/mL)로 처리하여 24시간 동안 섭식시킨 후 윤충류의 치사율을 확인하였다. 또한 용매 대조군(Solvent control)에 의한 독성 영향을 확인하기 위해 윤충류를 미세조류가 없는 SFW에서 배양하며 치사율을 관찰하였다.

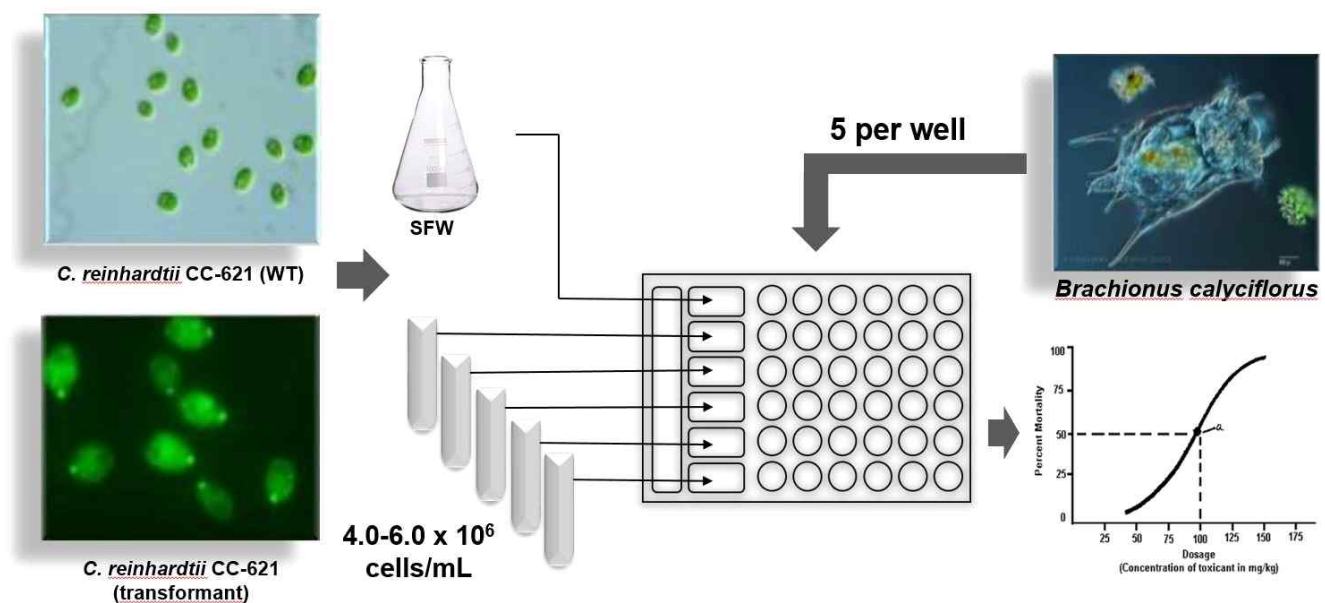


Figure 2. Schematic of experimental procedure for genetically modified microalgal toxicity test using rotifer *Brachionus calyciflorus*.

미세조류 형질 전환체의 수평적 유전자 이동 확인

미세조류 형질 전환체의 윤충류 섭식에 의한 수평적 유전자 이동 여부를 확인하기 위해 광범위 세균 항생제인 Imipenem (Sigma-Aldrich, USA)을 100 µg/L로 처리하여 SFW에서 16시간 동안 부화시킨 *B. calyciflorus*에 GFP 형질전환 미세조류인 *C. reinhardtii* CC-621를 조류 대 발생 세포농도인 4.0~6.0 × 10⁶ cells/mL로 처리한 이후 2시간 동안 형질 전환체를 윤충류에 섭식 시켰다. 이후 해부

현미경을 활용하여 형질 전환체에 노출시킨 윤충류를 확보하였고, 배양액 환수 후 다시 24시간 SFW에 방치하여 *B. calyciflorus*의 소화관 내용물을 모두 배출 시켰다. 이후 AccuPrep Genomic DNA Extraction Kit (Bioneer, South Korea)를 활용하여 확보된 윤충류 시료의 Genomic DNA를 추출하였고, Wizard DNA Clean-Up System (Promega, USA)을 활용하여 불순물을 제거한 이후 DNA를

정제하였다. 추출된 DNA를 주형으로 PCR을 통해 GFP 유전자 검출을 시도하였으며, 전기영동을 통해 GFP 유전자 밴드를 확인하였다. 또한, 비교 검증을 위해 음성대조군으로 야생형 *C. reinhardtii* CC-621의 genomic DNA를 사용하였다.

통계학적 분석

실험결과에 대한 유의성 검증은 one-way analysis of variance (ANOVA)와 post-hoc t-test 분석을 통해 진행하였으며 Excel 2016 (Microsoft, USA) 프로그램을 활용하였다.

결과 및 고찰

Hygromycin 저항성 미세조류 균집 및 변이 검증

형질전환 미세조류의 환경 노출 모니터링을 위해, 현재 미세조류 연구가 활발히 진행되고 있는 한국생명공학연구원과 KAIST 인근 하천인 갑천과 지류인 탄동천을 중심으로 Fig. 1A와 B에 나온 지점에서 샘플링을 진행하였다. 형질전환 미세조류의 선별표지인자는 Table 2에 보이는 것처럼 Hygromycin, Kanamycin, Zeocin, Norflurazon, G418, Nourseothricin 등 매우 다양하게 존재하지만, 가장 많이 활용되고 있는 형질전환 모델종인 *C. reinhardtii*의 경우 Hygromycin을 표지인자로 널리 사용하고 있다 (Table 2).

Table 2. Transformation method and widely used antibiotics for genetic engineering of various microalgae

	Transformation method	Antibiotics	Reference
<i>Chlamydomonas</i>	Glass beads	Hygromycin	Ladygin and Boutanaev [19]
	Electroporation	Hygromycin	Wittkopp [20]
	Silicon carbide whiskers	Hygromycin	Dunahay [21]
	Bombardment	Hygromycin	EL-Sheekh et al. [22]
	Agrobacterium	Hygromycin	Kumar et al. [23]
<i>Chlorella</i>	Bombardment	Kanamycin	Talebi et al. [24]
	Electroporation	Hygromycin	Chow and Tung [25]
	Protoplast transformation	Zeocin	Liu et al. [26]
<i>Haematococcus</i>	Bombardment	Norflurazon	Steinbrenner and Sandmann [27]
<i>Phaeodactylum</i>	Bombardment	Zeocin	Apt et al. [28]
<i>Navicula</i>	Bombardment	G418	Dunahay et al. [29]
<i>Thalassiosira</i>	Bombardment	Nourseothricin	Poulsen et al. [30]
<i>Amphidinium</i>	Silicon carbide whiskers	Hygromycin	Te and Miller [31]
<i>Symbiodinium</i>	Silicon carbide whiskers	Hygromycin	Te and Miller [31]

따라서 이번 조사에서는 Hygromycin을 처리한 *Chlamydomonas* 배양 배지인 TAP 배지를 활용하여 형질전환 미세조류의 존재 유무를 판별하였다. 그 결과 Fig. 3A 및 C에서 보는 것처럼 문지동 근처에서 채취한 샘플에서 Hygromycin에 내성을 갖는 미세조류 집락이 형성된 것을 관찰할 수 있었다.

하지만 Fig. 3B에서 보이는 것처럼 탄동천에서는 Hygromycin에 내성을 갖는 미세조류는 관찰되지 않았다. 형성된 미세조류 집락의 Hygromycin 저항 유전자의 존재 여부를 판별하기 위해 Table 1에 나타낸 것처럼 항존유전자인 *rbcL* 유전자를 검출하기 위해 *rbcL_F* (5'-TATGCCAGTTGCTTCAGGCG-3')와 *rbcL-R* (5'-AGAGCTACACGGTTAGCTGC-3')를 사용하였고,

Hygromycin resistant 유전자인 *Hyg*를 검출하기 위해 *C_Hyg_F* (5'- ATGATTCCTACGCGAGCCTG-3')와 *C_Hyg_R* (5'-GAAGTCGTGCAGGAAGGTGA-3')를 각각 제작하여 PCR 분석에 사용하였다. PCR 이후 전기영동을 통해 확인한 결과, Fig. 3D에서 보이는 것처럼 Hygromycin 내성유전자를 포함하는 벡터(양성대조군)와 형질 전환체에서는 Hygromycin 내성유전자 밴드가 검출된 반면, Hygromycin에 내성을 갖는 미세조류 균집에서는 모두 Hygromycin 내성유전자가 검출되지 않았다. 따라서 이번 조사지역에서 채취된 샘플에서는 형질전환 미세조류가 존재하지 않는다는 사실을 확인할 수 있었다. 이번 결과를 토대로 현재 조사지역 부근에서 미세조류 *C. reinhardtii*의

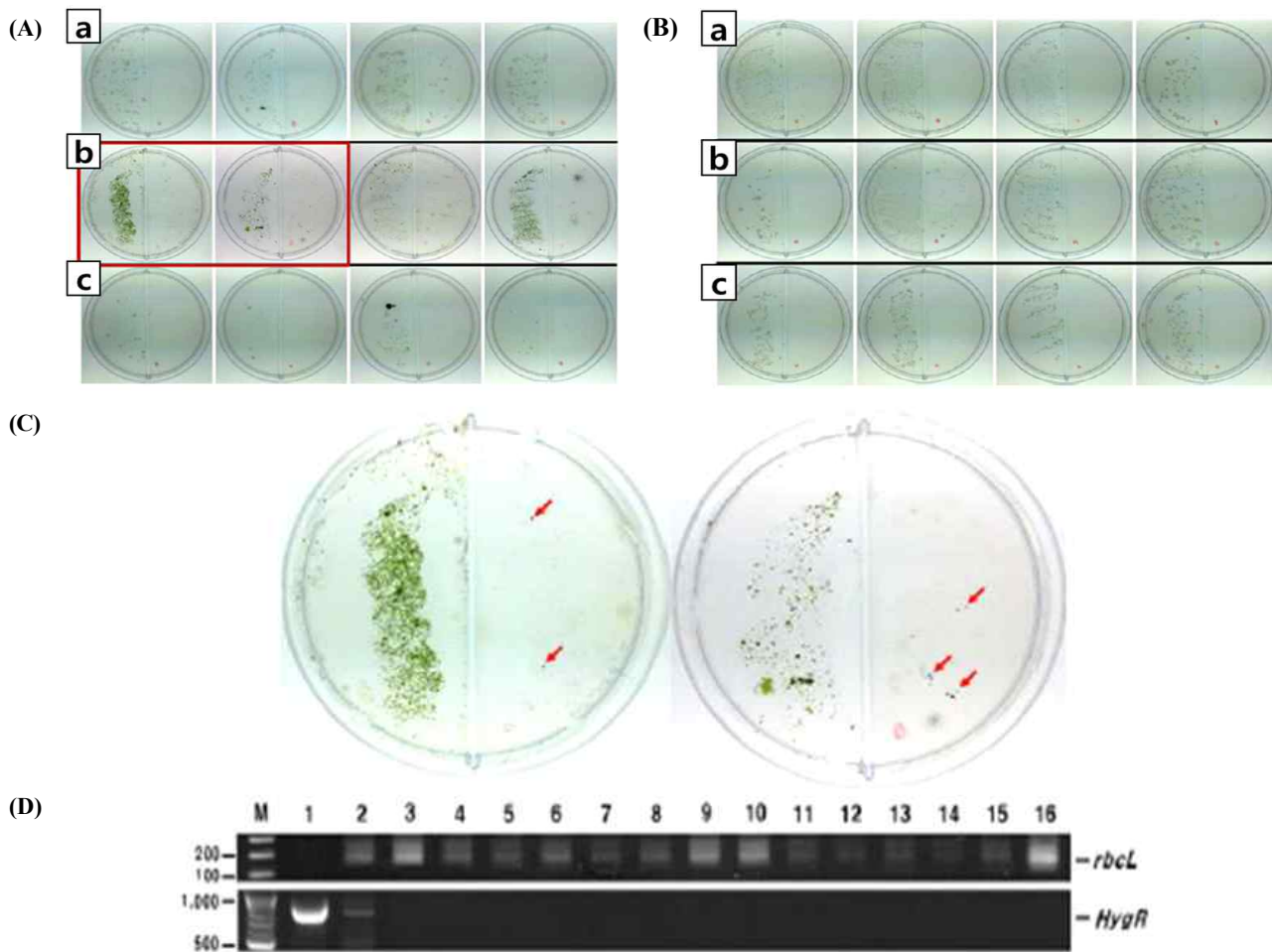


Fig. 3. Microalgal colony formation under hygromycin supplemented or non-supplemented TAP agar medium of obtained samples from (A) Gap-Cheon and (B) Tandong-Cheon. The microalgal colony (C) was obtained and hygromycin-coding gene was estimated by PCR and electrophoresis (D). 1, Vector DNA; 2, genetically modified *Chlamydomonas reinhardtii*; 3-16, Hygromycin-resistant algal colony.

형질 전환체의 노출 관리는 잘 이루어지고 있다는 결론을 내릴 수 있었지만, 형질전환을 시도하고 있는 미세조류의 종류가 상당히 다양하고 사용되는 항생제 등의 선별인자들도 상당히 다양하기 때문에 정확한 모니터링을 위해서는 좀 더 다각화 된 접근이 필요할 것으로 사료된다. 실제 KAIST의 최근 연구에서는 미세조류 *Chlorella*의 광수용 안테나의 유전적 변형을 통한 광합성 효율과 미세조류 바이오매스 생산과 관련된 연구가 진행된 바 있으며 [32], 한국생명공학연구원에서도 *Chlorella*를 활용한 형질전환 연구가 진행되고 있다. 이러한 사실은 미세조류 형질 전환체의 모니터링에 사용되는 최적화 배지를 검출하고자 하는 미세조류의 종류에 따라 선별하거나 보편적으로 검출 될 수 있는 미세조류 배지를 개발하여 다각화 할 필요성이 있다는 사실을 내포하고

있다. 또한, 이번 조사에 사용된 선별 인자인 Hygromycin 이외에도 Kanamycin, Zeocin, Norflurazon, G418, Nourseothricin 등의 선별인자들이 현재 미세조류 형질전환에 다양하게 활용되고 있을 뿐만 아니라 새로운 선별 인자 개발도 진행되고 있기 때문에, 현재 연구가 이뤄지고 있는 다양한 선별인자들을 활용하여 미세조류 형질 전환체를 모니터링 할 수 있는 방법이 강구되어야 할 것으로 사료된다.

미세조류의 환경 유출에 따른 생태계 피해사례는 아직 보고된 바가 없지만 잠재적인 위험 가능성은 여전히 연구가 많이 필요한 상황이다. 실제 미국 환경 보호국 (United States Environmental Protection Agency)에서 허가를 받고 캘리포니아 대학교 샌디에고 캠퍼스에서 진행된 형질전환 미세조류

*Acutodesmus dimorphus*의 옥외배양 실험에서 지방산 합성과 GFP를 발현시킨 미세조류가 15일간 잘 배양되어 산업적으로 활용 가능성을 확인할 수 있었고, 미세조류 형질 전환체의 노출에 의한 생물다양성 등 생태적인 영향은 없다는 사실이 보고된 바 있다 [17]. 하지만 단편적인 연구를 벗어나 장기 노출에 따른 생태변화 모니터링과 독성 영향을 줄 수 있는 인자들을 지속적으로 모니터링 할 필요가 있으며, 효율적인 모니터링 기술이 개발되어야 할 것으로 사료된다. 실제로 Beacham et al. [14]은 이전에 발표한 총설을 통해 GMM의 대량 배양을 위해서 효율적인 환경 위해성 평가방법이 정립되어야 함을 보고한 바 있다. 따라서 이번 연구에서는 새로운 GMM의 위해성 평가방법을 모색하기 위하여 먹이사슬을 통해 상위포식자에 발생할 수 있는 독성을 확인해 보았다.

윤충류 급성독성 및 수평적 유전자 이동 여부

미세조류 형질 전환체의 노출로 인한 상위 포식자에 발생할 수 있는 위해성과 수평적 유전자 이동 여부를 평가하기 위해 미세조류를 포식하는 동물플랑크톤의 독성을 실험실 수준에서 평가하였다. 윤충류 *B. calyciflorus*를 활용한 독성 테스트는 그 동안 다양한 화학물질의 독성을 평가하는데 사용되어 왔으며, 광범위한 데이터베이스가 구축되어 있기 때문에 환경에서 잠재적으로 나타날 수 있는 독성을 효율적으로 평가할 수 있다. 최근 연구에서도 *B. calyciflorus*를 활용한 나노플라스틱, 중금속 등의 독성평가가 실험실 수준에서 이뤄진 바 있다 [33-35]. 따라서 이번 연구에서도 윤충류 *B. calyciflorus*를 활용하여 미세조류 형질 전환체의 잠재적인 독성을 확인해 보았다. 미세조류 형질 전환체는 이전 연구에서 GFP를 성공적으로 발현시킨 *C. reinhardtii* CC-621를 사용하였으며, 생태계에 노출 시 수계에 조류 대 발생을 일으킨다는 가정 하에 $4.0\sim 6.0 \times 10^6$ cells/mL의 세포 농도로 미세조류 형질 전환체를 윤충류에 섭식 시켰다. 그 결과 Fig. 4A에 나타난 것처럼 합성 담수에서는 치사율이 관찰되지 않은 반면, *C. reinhardtii* CC-621을 섭식시킨 *B. calyciflorus*에서 약 23.3% 정도의 치사율을 나타내는 것을 확인할 수 있었다. 또한 GFP를 발현하는 *C. reinhardtii* CC-621의 형질 전환체 섭식에 의한 치사율은 야생형 *C. reinhardtii*의

치사율과 큰 차이를 나타내지 않았으며, post-hoc *t*-test 결과에서도 야생형과 큰 유의성을 나타내지 않았다. 이러한 결과를 토대로 미세조류 형질 전환체의 조류 대 발생이 일어났다고 가정했을 때 상위포식자인 동물플랑크톤 *B. calyciflorus*에 야생형 미세조류와 비교해서 큰 독성을 나타내지 않는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 형질 전환체 섭식에 의한 독성은 이미 다양한 생물에서 평가되어 왔다. 일례로, Bhatti et al. [36]의 최근 연구에 따르면, AVP1 유전자를 포함하는 GM 사탕수수 섭식에 의한 마우스 독성 실험에서 야생형과 비교할 때 큰 독성을 나타내지 않는 것을 확인한 바 있으며, 이러한 GMO의 섭식에 의한 독성 평가는 인간의 건강과 직결되므로 다양한 연구가 진행되어왔다 [36-38]. 유전자변형 생물체 섭식에 의한 독성은 아직까지 크게 알려진 것은 없지만, GM 옥수수인 MON863의 마우스 섭식에 의해 변화되는 성비 균형과 무게 및 잠재적인 간 독성이 Séralini et al. [39]에 의해 보고된 바가 있기 때문에, 미세조류의 상위 포식자 독성 연구 또한 지속적이고 장기적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

미세조류 형질 전환체 섭식에 의한 상위포식자로의 수평적 유전자 전달 여부를 확인하기 위해 GFP 발현 미세조류를 섭식 시킨 *B. calyciflorus*를 24시간 이상 합성 담수에 방치하여 소화관을 비운 후 GFP 유전자의 존재 유무를 확인하였다. 그 결과 Fig. 4B에 보이는 것처럼 GFP 발현 미세조류 형질 전환체에서는 GFP 유전자가 뚜렷하게 검출된 반면 (Lane 1), 섭식 이후 바로 분석한 *B. calyciflorus*에서는 상당히 희미한 GFP 유전자 밴드만 나타나는 것을 확인할 수 있었다 (Lane 3). 또한 24시간 이상 소화관을 비운 *B. calyciflorus*와 야생형 *C. reinhardtii*에서는 GFP 유전자 밴드가 검출되지 않았다 (Lane 2, 4). 이러한 결과를 바탕으로 상위 포식자로의 수평적 유전자 이동은 발생하지 않는다는 결론을 도출할 수 있었다. 하지만, 좀 더 장기적인 연구를 통해서 수평적 유전자 이동이 발생하는지 여부를 판단할 필요가 있으며 정확한 평가에 대한 지침이 필요한 상황이다. 유전자의 수평적 이동에 의한 잠재적인 위해성은 그동안 지속적으로 논의되어 왔다 [40,41]. Thomson [41]이 발표한 총설에 설명되어 있듯이 이러한 생물체간의 수평적 유전자 이동은 드물지만 충분히 일어

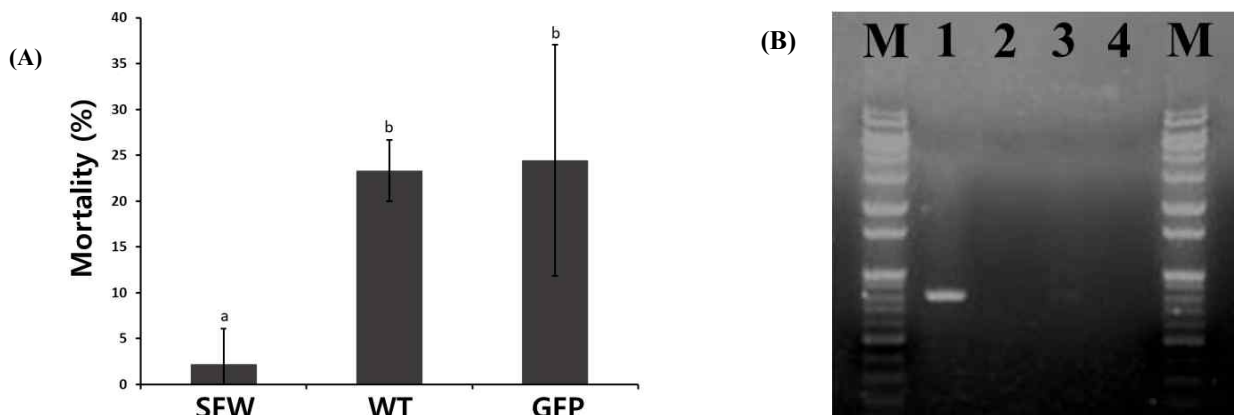


Fig. 4. (A) Effect of feeding wild-type (WT) and green fluorescence protein (GFP)-expressed *Chlamydomonas reinhardtii* CC-621 transformant on the mortality (%) of rotifer *Brachionus calyciflorus* (B) Detection of GFP-coding genes by PCR and electrophoresis after 24 h cultivation of *Brachionus calyciflorus* in synthetic freshwater. SFW, synthetic freshwater; M, 1 kb DNA ladder; Lane 1, GFP transformant; Lane 2, wild-type; Lane 3, *B. calyciflorus* after feeding; Lane 4, incubated *B. calyciflorus* (24 h) after feeding GFP-expressed microalgal transformant. Different letters exhibit significant difference ($P < 0.05$)

날 가능성을 가지고 있기 때문에 생태적인 영향이나 위해성에 대한 많은 연구가 필요한 상황이다. 또한 항생제 저항성 유전자의 수평적 유전자 이동에 의한 병원체 미생물로의 전이는 잠재적으로 인간에게 심각한 위협이 될 수 있다 [41]. 따라서 본 연구에서는 미세조류 형질 전환체에 의한 포식자로의 수평적 유전자 이동에 대해서만 평가하였지만, 포식자의 소화관을 구성하는 박테리아와 특정 수 생태를 구성하는 다양한 미생물로의 수평적 유전자 이동에 대한 연구도 필요할 것으로 사료된다.

결 론

이번 연구를 통해 GMM 연구가 활발하게 이뤄지고 있는 대전 연구단지 부근의 미세조류 형질 전환체의 노출을 모니터링 하였고 실험실 수준에서 포식자에 나타나는 독성과 수평적 유전자 전달 여부를 평가 하였다. 그 결과 연구단지 부근의 하천에서 미세조류 형질 전환체는 검출되지 않았고, 포식자인 *B. calyciflorus*에 급성 독성과 수평적 유전자 전이 또한 나타나지 않는다는 사실을 확인할 수 있었다. 하지만, 현재 연구되고 있는 미세조류의 종이 상당히 다양할 뿐만 아니라 형질 전환체의 선별 표지인자의 종류 또한 다양하기 때문에 이를 효율적으로 모니터링하기 위한 기술들이 개발되어야 할 것이다. 또한, 미세조류 등 미생물의 환경 노출에 의한 상위 포식자의 독성에 대한 연구는 거의 진행된 바가 없

기 때문에 실험실 수준에서 포식자의 독성을 평가한 본 연구는 향후 미세조류 형질 전환체의 환경 위해성 평가 시 유용한 정보를 제공할 것으로 기대되며, 이러한 정보를 토대로 정확한 평가지침 마련이 이뤄져야 할 것으로 사료된다. 또한 수평적 유전자 전달의 경우 수 생태 또는 포식자의 소화관을 구성하는 다양한 미생물과의 상호작용에 대한 연구도 필요할 것으로 보이며, 특히 인간에게 유해한 병원성 미생물로의 수평적 유전자 전달에 대한 연구를 통해 국가적 차원에서 미세조류 형질 전환체에 대한 정확한 위해성 평가 지침을 마련해야 할 것으로 판단된다.

감사의 글

이 논문은 2019년 국립해양생물자원관 재원으로 지원을 받아 수행된 연구임(2019M00600)

References

1. Pulz, O. and Gross, W. 2004. Valuable products from biotechnology of microalgae. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**(6), 635-648.
2. Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E. and Isambert, A. 2006. Commercial applications of microalgae. *J. Biosci. Bioeng.* **101**(2), 87-96.
3. Abdel-Raouf, N., Al-Homaidan, A. A. and Ibraheem, I. B. M. 2012. Microalgae and wastewater treatment. *Saudi J. Biol. Sci.*

- 19(3), 257-275.
4. Hemaiswarya, S., Raja, R., Kumar, R. R., Ganesan, V. and Anbazhagan, C. 2011. Microalgae: a sustainable feed source for aquaculture. *World J. Microb. Biotechnol.* **27(8)**, 1737-1746.
 5. Metting, B. 1990. Microalgae applications in agriculture. *Dev. Ind. Microbiol.* **31**, 265-270.
 6. Wijffels, R. H., Kruse, O. and Hellingwerf, K. J. 2013. Potential of industrial biotechnology with cyanobacteria and eukaryotic microalgae. *Curr. Opin. Biotech.* **24(3)**, 405-413.
 7. Baek, K., Kim, D. H., Jeong, J., Sim, S. J., Melis, A., Kim, J. S., Jin, E. and Bae, S. 2016. DNA-free two-gene knockout in *Chlamydomonas reinhardtii* via CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Sci. Rep.* **6**, 30620.
 8. Baek, K., Yu, J., Jeong, J., Sim, S. J., Bae, S. and Jin, E. 2018. Photoautotrophic production of macular pigment in a *Chlamydomonas reinhardtii* strain generated by using DNA-free CRISPR-Cas9 RNP-mediated mutagenesis. *Biotechnol. Bioeng.* **115(3)**, 719-728.
 9. Shin, S. E., Lim, J. M., Koh, H. G., Kim, E. K., Kang, N. K., Jeon, S., Kwon, S., Shin, W. S., Lee, B., Hwangbo, K. and Kim, J. 2016. CRISPR/Cas9-induced knockout and knock-in mutations in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* **6**, 27810.
 10. Tran, Q. G., Cho, K., Park, S. B., Kim, U., Lee, Y. J. and Kim, H. S. 2019a. Impairment of starch biosynthesis results in elevated oxidative stress and autophagy activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* **9(1)**, 1-9.
 11. Tran, Q. G., Cho, K., Kim, U., Yun, J. H., Cho, D. H., Heo, J., Park, S. B., Kim, J. W., Lee, Y. J., Ramanan, R. and Kim, H. S. 2019b. Enhancement of β -carotene production by regulating the autophagy-carotenoid biosynthesis seesaw in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Bioresour. Technol.* **292**, 121937.
 12. Hamilton, M. L., Haslam, R. P., Napier, J. A. and Sayanova, O. 2014. Metabolic engineering of *Phaeodactylum tricorutum* for the enhanced accumulation of omega-3 long chain polyunsaturated fatty acids. *Metab. Eng.* **22**, 3-9.
 13. León, R., Couso, I. and Fernández, E. 2007. Metabolic engineering of ketocarotenoids biosynthesis in the unicellular microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biotechnol.* **130(2)**, 143-152.
 14. Beacham, T. A., Sweet, J. B. and Allen, M. J. 2017. Large scale cultivation of genetically modified microalgae: A new era for environmental risk assessment. *Algal Res.* **25**, 90-100.
 15. Glass, D. J. 2015. Government regulation of the uses of genetically modified algae and other microorganisms in biofuel and bio-based chemical production. In *Algal Biorefineries*. Springer, Cham, pp 23-60
 16. Kumar, S. 2015. GM algae for biofuel production: biosafety and risk assessment. *Collect. Biosaf. Rev.* **9**, 52-75.
 17. Szyjka, S. J., Mandal, S., Schoepp, N. G., Tyler, B. M., Yohn, C. B., Poon, Y. S., Villareal, S., Burkart, M. D., Shurin, J. B. and Mayfield, S. P. 2017. Evaluation of phenotype stability and ecological risk of a genetically engineered alga in open pond production. *Algal Res.* **24**, 378-386.
 18. Hwang, H. J., Kim, Y. T., Kang, N. S. and Han, J. W. 2018. A Simple Method for Removal of the *Chlamydomonas reinhardtii* Cell Wall Using a Commercially Available Subtilisin (Alcalase). *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **28(4)**, 169-178.
 19. Ladygin, V. G. and Boutanaev, A. M. 2002. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* CW-15 with the hygromycin phosphotransferase gene as a selectable marker. *Russian. J. Genet.* **38(9)**, 1009-1014.
 20. Wittkopp, T. M. 2018. Nuclear Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by Electroporation. *Bio-protocol.* **8(9)**.
 21. Dunahay, T. G. 1993. Transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* with silicon carbide whiskers. *Biotechniques*, **15(3)**, 452-5.
 22. EL-Sheekh, M. M., Almutairi, A. W. and Touliabah, H. E. 2019. Construction of a novel vector for the nuclear transformation of the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its stable expression. *J. Taibah University Sci.* **13(1)**, 529-535.
 23. Kumar, S. V., Misquitta, R. W., Reddy, V. S., Rao, B. J. and Rajam, M. V. 2004. Genetic transformation of the green alga—*Chlamydomonas reinhardtii* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Sci.* **166(3)**, 731-738.
 24. Talebi, A. F., Tohidfar, M., Tabatabaei, M., Bagheri, A., Mohsenpor, M. and Mohtashami, S. K. 2013. Genetic manipulation, a feasible tool to enhance unique characteristic of *Chlorella vulgaris* as a feedstock for biodiesel production. *Mol. Biol. Rep.* **40(7)**, 4421-4428.
 25. Chow, K. C. and Tung, W. L. 1999. Electrotransformation of *Chlorella vulgaris*. *Plant Cell. Rep.* **18(9)**, 778-780.
 26. Liu, L., Wang, Y., Zhang, Y., Chen, X., Zhang, P. and Ma, S. 2013. Development of a new method for genetic transformation of the green alga *Chlorella ellipsoidea*. *Mol. Biotechnol.* **54(2)**, 211-219.
 27. Steinbrenner, J. and Sandmann, G. 2006. Transformation of the green alga *Haematococcus pluvialis* with a phytoene desaturase for accelerated astaxanthin biosynthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **72(12)**, 7477-7484.
 28. Apt, K. E., Grossman, A. R. and Kroth-Pancic, P. G. 1996. Stable nuclear transformation of the diatom *Phaeodactylum tricorutum*. *Mol. Gen. Genet.* **252(5)**, 572-579.
 29. Dunahay, T. G., Jarvis, E. E. and Roessler, P. G. 1995. Genetic transformation of the diatoms *Cyclotella cryptica* and *Navicula saprophila*. *J. Phycol.* **31(6)**, 1004-1012.
 30. Poulsen, N., Chesley, P. M. and Kröger, N. 2006. Molecular genetic manipulation of the diatom *Thalassiosira pseudonana* (bacillariophyceae) 1. *J. Phycol.* **42(5)**, 1059-1065.
 31. Te, M. R. and Miller, D. J. 1998. Genetic transformation of dinoflagellates (*Amphidinium* and *Symbiodinium*): expression of GUS in microalgae using heterologous promoter constructs. *Plant J.* **13(3)**, 427-435.
 32. Shin, W. S. 2018. Genetic modulation of light-harvesting

- complex in chlorella to improve photosynthetic efficiency and biomass productivity, Ph. D. Thesis in Korea Advanced Science and Technology (KAIST), Korea
33. Jeong, C. B., Lee, Y. H., Park, J. C., Kang, H. M., Hagiwara, A. and Lee, J. S. 2019. Effects of metal-polluted seawater on life parameters and the induction of oxidative stress in the marine rotifer *Brachionus koreanus*. *Comp. Biochem. Physiol. C*. **225**, 108576.
 34. Romero-Freire, A., Joonas, E., Muna, M., Cossu-Leguille, C., Vignati, D. A. L. and Giamberini, L. 2019. Assessment of the toxic effects of mixtures of three lanthanides (Ce, Gd, Lu) to aquatic biota. *Sci. Total Environ*. **661**, 276-284.
 35. Saavedra, J., Stoll, S. and Slaveykova, V. I. 2019. Influence of nanoplastic surface charge on eco-corona formation, aggregation and toxicity to freshwater zooplankton. *Environ. Pollut.* **252**, 715-722.
 36. Bhatti, F., Asad, S., Khan, Q. M., Mobeen, A., Iqbal, M. J. and Asif, M. 2019. Risk assessment of genetically modified sugarcane expressing AVPI gene. *Food Chem. Toxicol.* **130**, 267-275.
 37. Bertoni, G. and Marsan, P. A. 2005. Safety risks for animals fed genetic modified (GM) plants. *Vetres. Commun.* **29(2)**, 13-18.
 38. Domingo, J.L. 2007. Toxicity studies of genetically modified plants: a review of the published literature. *Crit. Rev. Food. Sci.* **47(8)**, 721-733.
 39. Séralini, G. E., Cellier, D. and de Vendomois, J. S. 2007. New analysis of a rat feeding study with a genetically modified maize reveals signs of hepatorenal toxicity. *Arch. Environ. Con. Tox.* **52(4)**, 596-602.
 40. Gasson, M. J. 2000. Gene transfer from genetically modified food. *Curr. Opin. Biotech.* **11(5)**, 505-508.
 41. Thomson, J. A. 2001. Horizontal transfer of DNA from GM crops to bacteria and to mammalian cells. *J. Food Sci.* **66(2)**, 188-193.