발간등록번호
11-1543000-001241-01

천연고무 생산 작물개발을 위한 천연고무 생합성 핵심유전자 규명 및 응용

(Identification of key rubber biosynthesis genes and its industrial application)

한국생명공학연구원

농림축산식품자료실
0006074

농 림 축 산 식 품 부

편집순서 2

제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “천연고무 생산 작물개발을 위한 천연고무 생합성 핵심유전자 규명 및 응용”의 보고서로 제출합니다.

2016 년 2 월 3 일

주관연구기관명 : 한국생명공학연구원
주관연구책임자 : 유 병 태
세부연구책임자 : 유 병 태
연 구 원 : 최 상 철
연 구 원 : 홍 승 백
연 구 원 : 배 성 우
협동연구기관명 : 디알비동일(주)
협동연구책임자 : 강 신 정

편집순서 3

요 약 문

Ⅰ. 제 목

-천연고무 생산 작물개발을 위한 천연고무 생합성 핵심유전자 규명 및 응용

Ⅱ. 연구성과 목표 대비 실적

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책,활용,홍보		기타(타연구)
										논문		학술발표					
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		SCI	비SCI				정책활용	홍보전시	
최종목표	2									3		3	1	1			
연구기간 내 달성실적	5 (11)*	3 (6)*								1 (2)**	1	12	6	4			
달성율(%)	250									33		400	600	400			

*(개별국 출원 등록 포함) **(투고 중 1편, 투고 예정 1편)

Ⅲ. 연구개발의 목적 및 필요성

1.연구개발의 목적

생명산업소재 천연고무를 생산하는 생합성 회로에서 핵심 조절유전자/단백질을 규명함으로써 고부가가치 유전자원 발굴 GT 원천기술을 확립하고 천연고무를 생산하는 형질전환 식물체 제조의 핵심기술로 개발하고자 한다. 참여기업체 DRB동일(주)와 협력하여 미래 바이오산업기술로 활용하고자 한다.

2. 연구개발의 필요성

석유자원의 고갈에 따른 합성고무 한계뿐만 아니라 최근에 대두되고 있는 저탄소 녹색성장을 위한 방안으로 천연고무 생산 작물개발이 미국과 유럽에서 커다란 이슈가 되고 있다. 개발도상국가들의 경제 성장으로 천연자원의 소비가 늘고 있으며, 자동차 타이어와 다른 고무제품의 수요도 꾸준히 늘어나고 있다. 이에 따라 합성고무는 물론 천연고무 값도 가파르게 치솟고 있어서 다른 물가에도 영향을 미치고 있다. 천연고무 값은 2004년 이후 4배 이상 올랐다 (2008년 기준). 그럼에도 불구하고 천연고무 생산은 *Hevea* 고무나무 한 종에만 의존하고 있으며, 언제든지 병에 의하여 천연고무 생산이 중단되어 전 세계의 경제에 치명적인 타격을 줄 수 있는 위험성이 내재되어 있다.

Ⅳ. 연구개발 내용 및 범위

세부과제: 천연고무 생합성 핵심 유전자/단백질 규명 및 응용 (생명연)

1) Hevea Latex에서 Rubber particles 분리 및 단백질 분리: Latex에서 고무입자를 분리하여 그 막 표면에 붙어 있는 단백질들을 분리하여 분석. 고무입자에서 단백질을 분리한 후 1-D 및 2-D PAGE 분석을 수행함
2) 천연고무 핵심 생합성 효소 후보단백질 분리 (Maldi Toff 분석-내부협력): 천연고무 생합성효소 후보단백질 군을 분리하여 단백질 동정 또는 peptide amino acid 분석
3) 후보유전자 분리 및 재조합단백질 발현 및 활성측정 (KOBIC과 내부협력): Sequence database에서 amino acid sequence 정보를 이용하여 후보 유전자를 분리하고, 재조합 단백질을 만든 후 천연고무 활성을 측정함
4) 재조합 단백질을 이용한 천연고무 생합성효소 규명 (외부기관과 협력)

협동과제: 식물체에서 천연고무의 수확, 추출, 활용 기초기반 구축 (DRB동일-주)
1) 천연고무 대체작물 러시안민들레의 대량재배 기술개발
2) 지하부에서 녹색바이오소재 (천연고무) 소량 및 대량 추출 기술개발
3) 지하부 녹색바이오소재 천연고무의 활용특성 분석 (분자량, 물성 등)
4) 지하부 바이오소재의 산업소재로의 이용기술 개발 (산업소재 재료로의 응용)

Ⅴ. 연구개발결과

1. Latex 채취 및 고무입자 분리

- 천연고무 생합성은 rubber particle 표면에서 일어나는 것으로 추정 되고 있다. 본 연구의 주요 과제는 천연고무 생산에 영향을 주는 유용 유전자들을 분리 동정하는 것이다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 말레이시아 및 캄보디아에서 채취한 latex를 세층으로 구분하였으며 고무입자에 붙어 있는 단백질들을 파악하기 위하여 PAGE gel에서 분리하였다.

2. 고무입자에서 천연고무 생합성 관련 단백질 분리

- Latex에서 rubber particle를 분리한 다음 rubber l particle에 붙어있는 단백질들을 detergent를 사용하여 떼어 내었다. 그 단백질 중에 천연고무 생합성과 관련된 단백질을 분리하기 위하여 여러 가지 다른 column을 사용하였다. Gel chromatography로 단백질 크기별로 분리하고 ion exchange column을 거쳐 몇 개의 단백질만 남을 때까지 고무 생합성 in vitro activity assay에서 activity를 추적하여 좁혀갔다. 몇 개의 단백질을 전기영동으로 분리하여 partial amino acid를 확보하였다. rubber particle 고무입자에 붙어있는 단백질을 degergent를 처리하여 분리하고 추출한 다음 천연고무 생합성 in vitro assay를 통하여 생합성활성을 추적하였다. size fraction chromatography 등 여러 columns을 통과하여 최종 남아있는 단백질들을 MALDI-TOF로 동정하였다.

3. Latex 조직에서 RNA sequecing 및 Transcriptome 분석

○ 다양한 러시아 민들레 조직으로부터의 RNA sequencing
- 러시아 민들레의 잎, 뿌리, 2개의 다른 라텍스 sample로부터 얻은 RNA sample을 사용하여 Illumina sequencing을 수행하였다.

- HiSeq 2000 system을 사용하여 약 14.9 Gbp의 sequence 정보를 얻었다.
- 이러한 raw read들은 assemble된 sequence의 질을 개선하기 위해 양쪽 끝의 low-quality base의 제거 과정을 거쳤다.
- SolexaQA package에 있는 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램을 사용하여 trim과 sort 작업을 수행하였다.
- 최종적으로 전체 read 중, 85%에 해당하는 125,492,878 reads (10,953,646,408 base)가 high-quality read로 분류되었다.

○ *De novo* assembly를 통한 전사체 선별

- de Bruijn graph 알고리즘을 기반으로 하는 Velvet과 Oases를 사용하여 trimmed reads를 전사체로 *de novo* assembly를 수행하였다.
- 다양한 hash length 값 중, *k*-mer=59와 *k*-mer=61을 사용하여 de novo assembly 후, *k*-mer=61을 사용하여 최종적으로 assembly를 수행하였다.

○ 라텍스에서 발현되는 unigene 선발

- 42,203개의 전체 unigene 중, 라텍스에서만 발현되는 unigene을 선발하기 위해 raw read 수가 5개 미만인 unigene을 제외함으로써 37,412개의 unigene을 선발하였다.

○ Annotation 분석

- 37,412개의 라텍스 발현 unigene에 대해 Gene Ontology (GO), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Clusters of orthologous groups for eukaryotic genome (KOG)의 annotation 분석을 수행하였다.

4. 전사체 분석을 통한 고무생합성 관련 유전자군 분리와 발현양상 조사

- 총 39개의 고무생합성 관련 유전자를 동정하였다. MVA 경로 (mevalonate pathway) 13개 유전자, MEP 경로 (2-*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway) 11개 유전자, 하위 경로 (Downstream) 7개 유전자, 고무생합성 관련 (Rubber biosynthesis) 8개 유전자를 각각 동정하였다.

○ 고무생합성 관련 유전자들의 발현양상 조사

- 제작한 primer를 사용하여 39개의 고무생합성 관련 유전자들에 대해 발현양상을 조사하였다.
- CFX96 Real-time PCR detection system (Bio-Rad)을 사용하여 quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)을 수행하였다.
- *TkActin1*을 reference로 사용하여 normalization 후, 결과값을 얻었다.
- qRT-PCR을 통해 발현이 나타나지 않은 5개 유전자는 제외하였다.
- MVA 경로 유전자들의 발현이 MEP 경로 유전자들의 발현보다 대체로 높게 나타났다.
- 고무생합성 유전자들 중, *TkSRPP3*, *TkSRPP5*, *CPT1*의 발현은 매우 높게 나타났다.

5. 고무 생합성 효소 후보 유전자 전체서열 cloning 및 재조합 단백질 생산

- RNA-sequencing database를 바탕으로 확보한 부분 peptide 서열정보를 이용하여 예시와 같이 고무생합성효소 유전자를 확보하였다.

- 단백질 발현 백터를 제작한 후 대장균과 이스트에서 재조합 단백질을 발현 정제하였다.

- Hevea에서 분리한 천연고무 생합성 후보 단백질의 항체를 제작하였다.

6. 고무 생합성 후보 단백질의 in vitro 활성 검정과 특허출원

- *Hevea*에서 latex를 수확한 후 ultracentrifuge하여 rubber particle 층, C-serum 층, 및 bottom fraction으로 구분 그리고 immno-precipiation한 후 Western blot으로 고무생합성 후보 단백질의 발현을 조사하였다.

- 상기한 고무 생합성 재조합 단백질을 가지고 in vitro assay를 수행하였는데 천연고무 생합성 단백질이 막 단백질인 관계로 추출 정제하는 데 많은 어려움을 겪었으며 활성이 보이지 않았다. 이러한 어려움을 극복하기 위하여 antibody(항체)를 제작하여 immuno-precipitation(IP)을 시도하였으며, IP한 단백질로 in vitro assay를 수행하여 후보 단백질이 고무 생합성의 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

- 활성을 검정한 고무 생합성 후보 단백질과 유전자 서열을 특허출원하였다. 곧 이어 PCT 특허출원을 진행할 예정이다.

7. 고무 생합성 유전자 promoter sequence cloning

- 파라고무나무 (*Hevea brasiliensis*)의 잎으로부터 CTAB 용액을 사용하는 분리 방법을 통해 genomic DNA를 추출하였다. 이러한 genomic DNA를 Nanodrop 기기를 사용하여 DNA 농도를 측정 후, 최종농도를 50 ng/μL으로 맞추었다.
- 이전 연구를 통해 밝힌 고무중합효소 후보 유전자인 파라고무나무 Pep16 (HbPep16) 유전자의 DNA sequence를 바탕으로, genomic DNA를 사용하여 inverse PCR을 수행하였다.
- iPCR을 통해 1079 bp의 promoter 영역의 sequence를 얻었으며 이를 sequencing을 통해 확인하였다.
- 고무중합효소 후보 유전자의 promoter에 대한 promoter-GUS 벡터 제작하였다.

8. 유전자 도입 민들레 형질전환체 제조

- 고무중합효소 후보 유전자인 HbPep16에 대한 promoter-GUS 형질전환체 및 latex-specific promoter (SRPP promoter)를 사용한 과발현 형질전환체를 생산하고자 하였다.
- 식물체 절편에서 형성된 캘러스를 사용하여 Agrobacterium tumefaciens과 co- culture를 시킨 후, 적절한 농도의 호르몬과 항생제를 포함하는 선택배지에서 형질전환이 이루어진 캘러스를 선별하였다.
- 이 과정에서 캘러스뿐만 아니라 일부 식물체의 재분화가 유도되었다. 이후 유도된 식물체들을 생장배지에서 완전한 식물체로의 재분화를 위해 생장시키고 있다.

9. 지하부 biomass 생산을 위한 러시안 민들레 대량 재배기술 개발

○ 재배용 뿌리절편 묘 대량 생산

- 뿌리를 수확 후 바로 절단하여 상토에 심는 것보다 3-4일 건조시킨 후 절단하여 심었을 때 싹이 더 잘 나왔다.
- 상토로 채워진 모판에 3-40개의 뿌리 절편을 심어서 식물공장과 육묘장에서 2개월 정도 재배하였다.

○ 하우스내 육묘판에서 유묘 재배

- 상토로 채워진 모판에 우량 묘를 3개씩 이식하여 급수하면서 하우스에서 재배하였다.

○ 하우스내 육묘판에서 고무추출용 러시안 민들레 재배 및 수확.

- 재배 기간별 정기적인 고무함량 분석에 의한 최적 수확 시기 검토하였다.
- 장기간 재배시 복토에 의한 뿌리 생산량 증가 검토하였다.
- 생장이 왕성할 때 1주 간격으로 25% 메탄올을 뿌려서 잔뿌리 생성 촉진하였다.
- 잎이 거의 고사할 시기에 수확하면 작업이 수월하였다.
- 모판재배는 제초작업이 필요 없어 노지재배보다 재배관리가 편리하였다.

○ 하우스내 토양에서 멀칭 재배에 의한 대량 생산

- 뿌리절편으로 만든 묘를 토양에 이식하여 러시안 민들레를 대량 재배하였다.
- 이식된 묘는 1개월 재배하였을 때 뿌리가 토양에 완전히 활착시켰다.
- 토양재배는 멀칭해도 잡초가 무성해 3주에 1회정도 잡초제거 필요하였다.
- 여름철 하우스내 고온 장애 방지를 위해 차광막 설치하였다.

10. 러시안 민들레 고무함량에 미치는 메탄올 영향분석

- 러시안 민들레 고무함량에 미치는 화학물질의 영향을 평가하였다.
- 메탄올 또는 메탄올영양박테리아 처리에 의한 고무함량 증가를 발견하였으며 이의 결과를 바탕으로 특허출원하였다.

- 본 발명은 메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아 처리에 의한 식물체의 고무 함량 증가 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 식물체에 메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아를 처리하여 식물체의 고무 함량을 증가시키는 방법 및 메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아를 유효성분으로 함유하는, 식물체의 고무 함량 증가용 조성물에 관한 것이다.

11. 러시안 민들레에서 천연고무 추출방법 개선

- 기존 soxlet 방법에서의 문제점을 발견하고, 이를 보완하여 효율적인 고무추출 방법을 찾고자 하였다. soxlet 방법은 그라인딩 후의 뿌리를 이용하였을 때 뿌리 양이 많아질수록 고무추출의 효율이 떨어졌으며 결과의 반복성이 떨어지는 결과를 보였다. 이 문제를 해결하고자 우리는 뿌리 가루를 cyclohexane에서 24시간 동안 섞어 준 후 고무가 포함 된 cyclohexane만 분리 할 수 있도록 원심분리기를 이용하여 뿌리가루만 제거하였다. 그 후 아세톤을 이용한 응집작용을 통해 고무를 추출하였다. 이 방법은 샘플 양에 상관없이 비슷한 효율로 고무를 추출 할 수 있었으며 매 실험에서 비슷한 결과를 보였다.
- 그라인딩 된 뿌리 사이즈에 따라 고무추출 효율이 달라 질 것이라 예상하고 뿌리 사이즈를 달리 하여 고무를 추출하였다. 실험방법은 overnight soaking 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 뿌리는 총 3가지 형태로 그라인딩하였고, 가장고운가루만 실험용 그라인더를 이용하였고, 나머지는 주방용 그라인더를 이용하여 그라인딩 하였다. 실험결과 뿌리 사이즈가 작을수록 고무추출 효율이 높아지는 것을 확인 하였다.
- 뿌리와 cyclohexane 비율 및 처리 온도에 따른 고무추출 효율을 분석하였다. 뿌리는 4g을 이용하였고 뿌리 g당 cyclohexane 비율은 각각 1:10, 1:20으로 설정하였다. 24시간동안의 shaking은 각각 25℃, 50℃에서 RPM150으로 섞어주었으며, 용매의 증발을 막기 위해 호일로 감싼 후 실험을 진행하였다. 뿌리와 cyclohexane의 비율에 따른 고무추출 효율을 비교하였을 때 1 : 10의 비율에서는 약 8%의 효율을 보였으며, 1 : 20의 비율에서는 약 6%의

효율로 1 : 10의 비율에서 더 좋은 고무추출효율을 보였다. 반면에 온도는 고무 추출 효율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

12. 러시안 민들레에서 추출한 천연고무의 물리화학적 특성분석

가. 지하바이오 매스 대량 확보 및 천연고무 추출

○ 지하바이오 매스 대량 확보

– 위탁연구기관 하우스 내 토양에서 재배된 러시아 민들레를 수확(여름 1회, 가을 1회)

○ 천연고무 추출

– 방법 1 : Soxhlet extraction으로 천연고무 추출

– 방법 2 : 민들레 뿌리를 미세분쇄 후 Cyclohexane으로 녹이고, Cyclohexane의 2배 아세톤을 첨가하여 고무를 침전시켜 고무 추출물을 얻음

나. 추출 천연고무 물성 특성분석

- Heava 고무나무에서 추출 된 천연고무 대비 러시아 민들레에서 추출 된 천연고무를 KS 배합에 의해 칭량 후 혼련공정을 거쳐 KS M 6518(가황고무 물리 시험방법)따라 시험을 진행하였다.

○ 재료

- 본 연구에 사용된 배합 조성표는 Table 1에 나타내었다. Heave 고무나무에서 추출된 천연고무 Grade는 SPR#20를 사용하였으며, 카본블랙은 N330(HAF)을 사용하였다.
- 황 가류를 위하여 촉진제로서는 CBS(N-Cyclohexyl-2benzothiazole sulfenamide)와 황(Sulfur)을 사용하였다. 산화아연, 스테아린산, 오일은 동일하게 적용하였다.

○ 칭량 및 소련/혼련 작업, 시편제조

- 소련(mastication)은 기계적인 전단력으로 고무 분자쇄를 절단 또는 쇄상 분자의 상호 얽힘을 풀어 분자량을 저하 시키는 작업으로서, 천연고무는 분자량이 크고 일정하지 않으므로 3분 이상 충분히 진행하였다.
- 혼련공정은 배합제를 원료고무 중에 균일하게 분산시키는 작업으로서 Brabender OHG社 시험용 Internal Mix를 이용하여 배합제의 첨가순서 및 시간을 동일하게 적용하여 시험을 진행하였다.
- 혼련특성은 일반적으로 소요전력과 혼련시간과의 관계로부터 얻을 수 있다. 고무나무에서 추출된 천연고무와 민들레에서 추출된 천연고무를 동일한 믹싱 시간에서 작업시 시험용 Mix의 Torque와 온도 값이 유사함을 확인 할 수 있었다.

○ 물성시험

- 미가황고무 시험

: ASTM D1646에 따라 무늬점도 시험결과 Heava 고무나무 무늬점도는 50, 민들레 추출분 천연고무의 무늬점도는 49로 가공성이 유사한 수준임 확인되었다.

: 가황곡선을 이용한 가황상태 분석 결과, 최대 토크값은 유사한 수준이며 스코치 특성은 민들레 추출분 천연고무의 스코치 거동이 빨라지는 것으로 확인 되었다.

- 가황고무 시험

: KS M 6518 (가황고무 물리 시험방법)에 따라 가황고무 물성 시험 결과 경도는 추출분

천연고무의 경도가 3(Shore A) 높음

: 인장강도(kg/cm^2), 신장율(%), 내마모성을 종합적으로 비교하면 고무나무 추출분 천연고무 대비 민들레 추출분 천연고무의 가황고무 물성은 90% 수준으로 확인된다. 물성 시험결과는 Figure6에 나타내었다.

- Dynamic Mechanical

: 고무의 기계적 물성은 높은 온도에서 약해지기 때문에 열 발생이 적은 Polymer 사용이 바람직하다. GABO사 EPLEXOR 150N 점탄성 시험기를 이용하여 Properties 시험결과 민들레 추출분 천연고무가 고무나무 추출분 천연고무 대비 발열 특이 10% 이상 저하됨을 확인 할 수 있었다. 민들레 추출분 천연고무의 동특성능 향상을 위해서는 가교제 함량 증량 외 방법으로 가교제 변경이 필요해 보인다.

Ⅵ. 연구성과 및 성과활용계획

1. 연구성과: 특허 출원 5건 (개별국 출원 포함 11건) 및 등록 3건 (개별국 등록 포함 6건)

2. 연구성과 실용화.산업화 계획

- 연구성과물을 국내 고무회사인 디알비동일(주)에서 인수하기로 하였으며 이를 위하여 양 기관간 MOU를 체결하였다. 이를 위하여 원천기술을 공동개발하였으며 또한 유용 유전자 도입 형질전환체를 제조할 것이며 러시안민들레 유래 천연고무의 품질평가 및 재배기술 관련 연구를 실용화를 위하여 지속적인 연구를 수행할 것이다. 2018년 이내에 실용화 작업을 착수할 수 있을 것으로 예상된다.

3. 기술확산/지식재산권 확보 계획

- 유용성이 매우 높은 천연고무 유전자에 대한 특허권을 확보하였으므로 이러한 유전자를 품종개발에 활용할 계획이다.
- 천연고무를 민들레에서 생산하여 수입의존도를 줄이고 현 천연고무 작물 *Hevea*의 allergy 유발 결점을 보완하는 고부가가치 무-알레르기 천연고무의 생산에 활용할 계획이다.
- 민들레 천연고무의 특성분석을 통하여 확립된 기초정보 및 기반기술이 민들레에서 생산한 천연고무의 실용화 공정기술 개발에 초석으로 활용될 것이다.
- 고무 생합성 핵심 유전자 규명은 천연고무 대체작물 개발에 선두우위를 점하게 하며 특허실시권을 수출할 수 있을 것으로 예상된다.

4. 추가연구, 타 연구에 활용 계획

- 향후 제조한 GM민들레의 품종화를 위하여 야외재배인증을 위한 LMO 안전성평가를 수행할 것이다.

편집순서 4

SUMMARY
(영문요약문)

I. Title of the Study

Identification of key rubber biosynthesis genes and its industrial application

II. Objectives and Significance of the Study

>The objective of this project was to identify rubber biosynthesis genes from TKS.

III. The Scope of the Study

1. Latex collection and isolation of rubber particle
2. Isolation of Functional genes related to rubber biosynthesis
3. RNA sequencing and transcription analysis in latex
4. Identification of rubber biosynthesis pathway genes
5. Cloning of rubber biosynthesis genes
6. In vitro assay of rubber biosynthesis
7. Cloning of promoter of rubber biosynthesis gene
8. Transformation of dandelion
9. Techniques for cultivation of Russian dandelion
10. Effect of abiotic stresses or hormones on rubber content
11. Improvement of rubber extraction methods
12. Characterization of physical chemical properties of TKS rubber

IV. Results and Application

1. Latex collection and isolation of rubber particle

☐ Latex was collected from Cambodia and rubber particles was isolated.

2. Isolation of Functional genes related to rubber biosynthesis

☐ Isolation of functional genes related to natural rubber biosynthesis

3. RNA sequencing and transcription analysis in latex

☐ Latex RNA of TKS was sequenced and used for transcriptome analysis

4. Identification of rubber biosynthesis pathway genes

☐ Rubber biosynthesis pathway genes were isolated from RNA sequencing database.

5. Cloning of rubber biosynthesis genes

☐ Seperation of rubber particles and In vitro assay of rubber biosynthesis

☐ Functional genes related to improvement of abiotic and biotic stress resistances

6. In vitro assay of rubber biosynthesis genes

□ Rubber biosynthesis-related genes were expressed in vivo and assayed in vitro

7. Cloning of promoter of rubber biosynthesis gene

□ The promoter region of rubber biosynthesis gene was cloned.

8. Transformation of dandelion

□ Generation of transformant dandelion plants that contain functional genes related to natural rubber biosynthesis

□ Generation of transformant dandelion plants that contain functional genes related to increase rubber content and improved growth rate.

9. Techniques for cultivation of Russian dandelion

□ Import of Russian dandelion, cultivation, harvest, extraction of natural rubber, and analysis of natural rubber properties.

□ Comparison of natural rubber properties with native dandelion plants

10. Effect of abiotic stresses or hormones on rubber content

□ The effects of abiotic stresses such as drought or hormones were evaluated.

11. Improvement of rubber extraction methods

□ The rubber extraction methods were examined for further improvement.

12. Characterization of physical chemical properties of TKS rubber

□ Rubber extracted from TKS was examined for its physical/chemical properties in compared to Hevea rubber.

V. Application of outcomes

- The technology we develop will be applied to production of natural rubber with improved quality without allergy problem and to reduce our dependency on import of natural rubber from other countries.
- We will file patent application for valuable functioanl genes related to rubber production and biosynthesis and utilize them to molecular breeding.
- By collaborating with industrial partner, we aim to put our outcomes into real practice so that our GM dandelion is cultivated and harvested for natural rubber production. The GM dandelion plants will be transferred to Dongil Rubber Belt Co. who has contracted with us by MOU.

편집순서 5

CONTENTS
(영 문 목 차)

Chapter 1. Introduction and objectives.....14
Chapter 2. Current Status of Technique Development 20
Section 1. Developmental status in Korea 20
Section 2. Direction for industrial application 20
Section 3. 3P analysis and future plan 21
Chapter 3. Research Contents and Results 22
Section 1. Approach methods 22
Section 2. Research contents and mothods 23
Section 3. Russian dandelion: Import, cultivation 24
Section 4. Isolation of Functional genes related to rubber biosynthesis.....25
Section 5. RNA sequencing and transcription analysis in latex 25
Section 6. Identification of rubber biosynthesis pathway genes 30
Section 7. Cloning of rubber biosynthesis genes.....32
Section 8. In vitro assay of rubber biosynthesis.....33
Section 9. Cloning of promoter of rubber biosynthesis gene.....34
Section 10. Transformation of dandelion.....34
Section 11. Techniques for cultivation of Russian dandelion 36
Section 12. Effect of abiotic stresses or hormones on rubber content.....39
Section 13. Improvement of rubber extraction methods 40
Section 14. Characterization of physical chemical properties of TKS rubber.....41
Chapter 4. Achievement and Contribution 46
Chapter 5. Outcomes and future use 47
Section 1. Utilization and Plan 47
Section 2. Plan for technique propagation.....47
Section 3. Additional research and application to other reas 47
Chapter 6. Information obtained 48
Chapter 7. Facility and Equipments 49
Chapter 8. Achievements for lab safety.....50
Chapter 8. References 51
<Attachment> Patents, Papers and Market report

편집순서 6

목 차

제 1 장 연구개발 과제의 개요 및 성과목표 14
제 2 장 국내외 기술개발 현황 20
제 1 절 천연고무 생산 및 시장현황 20
제 2 절 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과 20
제 3 절 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 향후 계획 21
제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과 22
제 1 절 이론적 실험적 접근 방법 22
제 2 절 연구범위에 따른 연구수행 내용 및 방법 23
제 3 절 Latex 채취 및 고무입자 분리.....24
제 4 절 고무입자에서 천연고무 생합성 관련 단백질 분리.....25
제 5 절 Latex 조직에서 RNA sequencing 및 Transcriptome 분석.....25
제 6 절 전사체분석을 통한 고무생합성 관련 유전자군 분리와 발현양상 조사.....30
제 7 절 고무 생합성효소 후보 유전자 전체서열 Cloning, 재조합 단백질 생산 ...32
제 8 절 고무 생합성 후보 단백질의 활성 검정과 특허출원 33
제 9 절 고무 생합성 유전자 promoter sequence cloning 34
제 10 절 유전자 도입 민들레 형질전환체 제조 34
제 11 절 지하부 biomass 생산을 위한 러시안 민들레 재배기술 개발 36
제 12 절 러시안 민들레 고무함량에 미치는 메탄올 영향분석 39
제 13 절 러시안 민들레에서 천연고무 추출방법 개선 40
제 14 절 러시안 민들레에서 추출한 천연고무의 물리 화학적 특성분석 41
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도 46
제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획 47
제 1 절 연구성과 실용화.산업화 계획 47
제 2 절 기술확산/지식재산권 확보 계획 47
제 3 절 추가연구, 타 연구에 활용 계획 47
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보 48
제 **7** 장 연구시설·장비현황 49
제 8 장 연구실 안전관리 이행실적 50
제 9 장 참고문헌 51

<첨부> 특허, 논문 및 시장분석 보고서

제 1 장 연구개발 과제의 개요 및 성과목표

1. 연구개발의 최종목표 및 주요내용

식물 유용자원물질 천연고무를 생산하는 민들레 산업작물을 발굴 개발하여 농가소득 작물로 활용하고 또한 천연고무 수입 의존도를 낮출 뿐만 아니라 합성고무 원료인 석유사용을 줄여 국가 저탄소 녹색성장을 이룩하고자 한다. 본 연구는 기 구축된 민들레 형질전환 기술을 바탕으로 추진하는 개발 중간단계로서 민들레의 천연고무 생산성 향상 및 질적 향상을 위하여 천연고무 생합성 유용유전자 발굴 등이 주요 연구내용이다.

2. 천연고무 생산작물 개발의 필요성

석유자원의 고갈에 따른 합성고무 한계뿐만 아니라 최근에 대두되고 있는 저탄소 녹색성장을 위한 방안으로 천연고무 생산 작물개발이 미국과 유럽에서 커다란 이슈가 되고 있다. 개발도상국가들의 경제 성장으로 천연자원의 소비가 늘고 있으며, 자동차 타이어와 다른 고무제품의 수요도 꾸준히 늘어나고 있다. 이에 따라 합성고무는 물론 천연고무 값도 가파르게 치솟고 있어서 다른 물가에도 영향을 미치고 있다. 천연고무 값은 2004년 이후 4배 이상 올랐다 (2008년 기준). 그럼에도 불구하고 천연고무 생산은 *Hevea* 고무나무 한 종에만 의존하고 있으며, 언제든지 병에 의하여 천연고무 생산이 중단되어 전 세계의 경제에 치명적인 타격을 줄 수 있는 위험성이 내재되어 있다.

우리나라는 연간 400,000톤 이상의 천연고무를 쓰고 있는데 전량을 수입하고 있다. 따라서 직접투자 등 천연고무를 안전하게 확보할 방법을 강구하고 석유 기반의 합성 고무에 대한 의존성을 줄여야 한다. 고무나무 대체 작물을 개발하기 위해서는 한국산 민들레의 육종과 형질전환 등으로 우리 토양과 기후 조건에 맞으며 생산량이 우수하고 병충해에 강한 작물을 찾아내어 종자를 개량해야 한다. 그리고 유전공학 등의 상대적으로 발달된 생물공학 기술을 이용하여 고무나무를 대체할 수 있는 새로운 품종의 작물을 개발하려는 노력을 추진해 나가야 할 것이다. 천연고무 대체 작물은 농민들에게도 고부가가치 품종으로 재배될 수 있을 것이다.

3. 천연고무 생산 민들레 산업작물로의 개발 적합성

민들레가 천연고무 함량이 높고 단위면적당 생산량이 많아 미국과 유럽 및 러시아에서 천연고무 생산 대체작물로서 개발되어 오고 있다. 미국 천연고무 연구팀은 러시아민들레 뿌리에서 10 ~ 20%의 천연고무 성분을 추출하였다고 발표하였다. 뿐만 아니라 몇 년에 걸쳐 재배하여야 하는 *Hevea* 목본에 비하여 재배기간이 짧다. 우리나라에서는 민들레가 건강에 유익하다는 인터넷, 방송 매체의 보도에 따른 소비자들의 관심이 고조되어 가고 있다. 자연적으로 자라고 있는 야생민들레를 무작위 채취하여 건강식품으로 활용하고 있어 야생 민들레의 급격한 감소를 야기 시키고 있다. 우리나라 일부 지역에서 민들레의 대량 재배단지를 조성하여 농가소득화를 기하고 있으나 좀 더 민들레 활용범위를 첨단기술로 다변화시켜 농가 고부가가치 경제작물로의 개발이 필요하다.

4. 연구성과 목표 및 대비 실적

성과목표	사업화지표									연구기반지표							
	지식재산권		기술이전	사업화					기술인증	학술성과			교육지도	인력양성	정책,활용,홍보		기타(타연구)
										논문		학술발표					
	출원	등록		제품화	기술창업	매출창출	고용창출	투자유치		SCI	비SCI				정책활용	홍보전시	
최종목표	2									3		3	1	1			
연구기간 내 달성실적	5 (11)*	3 (6)*								1 (2)**	1	12	6	4			
달성율(%)	250									33		400	600	400			

*(개별국 출원 등록 포함) **(투고 중 1편, 투고 예정 1편)

5. 연구성과 세부내용

가. 특허 출원

성과물 유형	성과물명	성과물 주담당자	성과적용 년월
산업재산권 출원	메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아 처리에 의한 식물체에서 고무함량을 증가시키는 방법	유병태	2015년09월
산업재산권 출원	메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아 처리에 의한 식물체에서 고무함량을 증가시키는 방법(PCT)	유병태	2015년09월
산업재산권 출원	미생물로부터 리소포스파티딜에탄올아민 18:1의 생산 방법	유병태	2015년06월
산업재산권 출원	천연고무 중합효소 유전자와 프로모터 및 이의 용도	유병태	2015년05월
산업재산권 출원	메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아 처리에 의한 식물체에서 고무 함량을 증가시키는 방법	유병태	2014년09월
산업재산권 출원	GGPS gene inducing fast growth or fast biomass increase of plant and uses thereof (인도)	유병태	2013년05월
산업재산권 출원	Laticiferous tissue-specific SRPP promoter from Hevea brasiliensis and uses thereof (인도)	유병태	2013년05월
산업재산권 출원	GGPS gene inducing fast growth or fast biomass increase of plant and uses thereof (중국)	유병태	2013년04월
산업재산권 출원	Laticiferous tissue-specific SRPP promoter from Hevea brasiliensis and uses thereof (중국)	유병태	2013년04월
산업재산권 출원	GGPS gene inducing fast growth or fast biomass increase of plant and uses thereof (미국)	유병태	2013년04월
산업재산권 출원	Laticiferous tissue-specific SRPP promoter from Hevea brasiliensis and uses thereof (미국)	유병태	2013년04월

나. 특허 등록

성과물 유형	성과물명	성과물 주담당자	성과적용 년월
산업재산권 등록	LATICIFEROUS TISSUE-SPECIFIC SRPP PROMOTER FROM HEVEA BRASILENSIS AND USES THEREOF (중국)	유병태	2015년06월
산업재산권 등록	GGPS gene inducing fast growth or fast biomass increase of plant and uses thereof (중국)	유병태	2015년04월
산업재산권 등록	LATICIFEROUS TISSUE-SPECIFIC SRPP PROMOTER FROM HEVEA BRASILENSIS AND USES THEREOF (미국)	유병태	2014년12월
산업재산권 등록	식물의생장 또는 바이오매스 증가를 촉진시키는 GGPS 유전자 및 이의 용도	유병태	2013년07월
산업재산권 등록	파라고무나무 유래의 라텍스 분비 조직 특이적 SRPP 프로모터 및 이의 용도	유병태	2013년06월
산업재산권 등록	생물적 및 비생물적 스트레스에 대한 증가된 저항성 또는 단축된 개화시기를 나타내는 유전자 도입 식물 및 이를 생산하는 방법	유병태	2013년02월

다. 유전자 등록

성과물 유형	생명자원(생명정보) 명	등록·기탁 번호	등록·기탁기관	성과물 주담당자	성과적용년월
생명자원 등록	Taraxacum brevicorniculatum	KF387616	NCBI genebank	유병태	2013년11월
생명자원 등록	Taraxacum brevicorniculatum	KF387617	NCBI genebank	유병태	2013년11월
생명자원 등록	Taraxacum brevicorniculatum	KF387618	NCBI genebank	유병태	2013년11월
생명자원 등록	Taraxacum brevicorniculatum	KF387619	NCBI genebank	유병태	2013년11월
생명자원 등록	Taraxacum brevicorniculatum	KF387620	NCBI genebank	유병태	2013년11월
생명자원 등록	Taraxacum brevicorniculatum	KF387621	NCBI genebank	유병태	2013년11월
생명자원 등록	Taraxacum brevicorniculatum	KF387622	NCBI genebank	유병태	2013년11월
생명자원 등록	Taraxacum brevicorniculatum	KF387623	NCBI genebank	유병태	2013년11월

생명자원 등록	Taraxacum brevicorniculatum	KF387624	NCBI genebank	유병태	2013년11월
생명자원 등록	Taraxacum brevicorniculatum	KF387625	NCBI genebank	유병태	2013년11월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222409	NCBI genebank	유병태	2014년10월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222410	NCBI genebank	유병태	2014년10월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222411	NCBI genebank	유병태	2014년10월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222412	NCBI genebank	유병태	2014년10월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222413	NCBI genebank	유병태	2014년10월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222414	NCBI genebank	유병태	2014년10월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222415	NCBI genebank	유병태	2014년10월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222416	NCBI genebank	유병태	2014년10월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222417	NCBI genebank	유병태	2014년10월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222418	NCBI genebank	유병태	2014년10월
생명자원 등록	Taraxacum koksaghyz	KM222419	NCBI genebank	유병태	2014년10월

라. 논문

성과물 유형	성과물명	성과물 주담당자	성과적용 년월
논문게재 (SCI)	Heterologous expression of chloroplast-localized geranylgeranyl pyrophosphate synthase confers fast plant growth, early flowering and increased seed yield. Plant Biotech J. 14:29-39	유병태	2015년07월 (on line) 2016년01월 (printed)
논문투고 (SCI)	Transcriptome analysis of latex from *Taraxacum kok-saghyz* provides insights into rubber biosynthesis. PLOS One	유병태	2016년 투고중
논문게재 (SCI)	Identification of rubber polymerase in the latex of *Hevea*, rubber tree.	유병태	2016년 투고예정
논문게재 (비 SCI)	Secretory phospholipase A2 and Phospholipase A1 in plants. *In* Phospholipases in Plant Signaling (Wang X. ed.)	유병태	2014년

마. 학술발표

성과물 유형	발표제목	학회명	성과물 주담당자	성과적용 년월
학술발표 (국내)	Study on rubber biosynthesis and rubber quality and quantity increase in *Taraxacumkok-saghyz*	2015 한국식물학회	유병태	2015년 11월
학술발표 (국내)	RNA-Seq Analysis and De novo Transcriptome assembly of Russian dandelion (*Taraxacum kok-saghyz*)	2015 한국식물학회	유병태	2015년 11월
학술발표 (국내)	Study on rubber biosynthesis and rubber quality and quantity increase in *Taraxacumkok-saghyz*	2015 한국분자세포생물학회	유병태	2015년 09월
학술발표 (국내)	RNA-Seq Analysis and De novo Transcriptome assembly of Russian dandelion (*Taraxacum koksaghyz*)	2015 한국분자세포생물학회	유병태	2015년 09월
학술발표 (국내)	Study on rubber biosynthesis and rubber quality and quantity increase in *Taraxacum kok-saghyz*	2014 한국식물학회	유병태	2014년 11월
학술발표 (국내)	Geranylgeranyl pyrophosphate synthase induces fast plant growth influencing major metabolic fluxes	2014 한국식물학회	유병태	2014년 11월
학술발표 (국내)	Generation of Industrial Rubber Plants Producing Useful Natural Rubber Materials and Development of Techniques for Natural Rubber Production from Rubber Plants	2014 한국식물생명공학회	유병태	2014년 05월
학술발표 (국내)	Characterization of *Hevea* SRPP promoter and utilization of Taraxacum plant species in natural rubber study	2014 한국식물생명공학회	유병태	2014년 05월
학술발표 (국내)	Fast plant growth is induced by chloroplast-localized geranylgeranyl pyrophosphate synthase	2014 한국식물생명공학회	유병태	2014년 05월
학술발표 (국내)	Heterologous expression of chloroplast-localized geranylgeranyl pyrophosphate synthase confers fast plant growth, early flowering, and increased seed yield	2013 식물형질전환연구회/GM작물실용화사업단 공동 심포지엄	유병태	2013년 10월
학술발표 (국내)	Heterologous expression of chloroplast-localized geranylgeranyl pyrophosphate synthase confers fast plant growth, early flowering, and increased seed yield	2013 한국분자세포생물학회	유병태	2013년 10월
학술발표 (국내)	Heterologous expression of chloroplast-localized geranylgeranyl pyrophosphate synthase confers fast plant growth, early flowering, and increased seed yield	2013 한국식물생명공학회	유병태	2013년 06월

바. 인력양성

지원 총인원	지원 대상 (학위별, 취득자)				성별		지역별		
	박사	석사	학사	기타	남	여	수도권	대전	기타지역
4	1	1	-	2 (인턴)	1	3		3	1

사. 산업체 인력 교육지도

년도	프로그램명	프로그램 내용	교육기관	교육 개최회수	총 교육시간	총 교육인원
2013	㈜디알비동일 소속 산업기술 인력 교육 (홍신영, 정지혜)	천연고무 중합효소 규명과 바이오소재 활용을 위한 연구	한국생명 공학연구원	12회	60시간	2명
2014	㈜디알비동일 소속 산업기술 인력 교육 (배성우, 정지혜, 최상철, 홍승백)	천연고무 중합효소 규명과 활용을 위한 연구	한국생명 공학연구원	12회	60시간	4명
2014	㈜마이크로 프랜츠 소속 산업기술인력 교육 (정성희)	최신기기를 활용한 천연고무 분석	한국생명 공학연구원	12회	60시간	1명
2015	㈜디알비동일 소속 산업기술 인력 교육 (배성우, 홍승백)	천연고무 중합효소 규명과 활용을 위한 연구	한국생명 공학연구원	12회	60시간	2명
2015	㈜마이크로 프랜츠 소속 산업기술인력 교육 (정성희)	최신기기를 활용한 바이오소재 분석	한국생명 공학연구원	12회	60시간	1명

제 2 장 국내외 기술개발 현황

제 1 절 천연고무 생산 및 시장현황

1. 국내 제품생산 및 시장 현황

가. 국내에서 민들레 생산 천연고무 사용제품은 전무한 실정이다.

2. 국외 제품생산 및 시장 현황

가. 러시아 민들레(Russian dandelion)는 구소련에서 천연고무 자원을 개발하려는 전략적 계획을 진행하는 도중에 카자흐스탄에서 확인되었으며, 세계 2차대전 당시 구소련에서 민들레 고무를 사용하여 전차 및 트럭의 타이어를 제조하였다.(출처 : Whaley, W.G., and Bowen, J.S. (1947) Russian dandelion (Kok-Saghyz). An emergency source of natural rubber. (Washington D.C.: United States Department of Agriculture).

나. 미국 오하이오 대학에서 러시아 민들레 중 10 ~ 20%의 천연고무 추출성공을 하였으며, 2년내 상용화 예정이다. 브리지 스톤에서 민들레 고무가 고무나무에서 생산된 고무와 비교하여 품질면에서 동일하다고 발표하였다.

제 2 절 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

1. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

가. 천연고무는 40,000가지 이상의 제품에 쓰이는데, 여기에는 400종 이상의 의료 장치, 수술용 장갑, 항공기용 타이어, 자동차 타이어와 셀 수 없는 공업 및 상용 제품에 상용화가 가능하다. 최고치 기준으로 천연고무 수입금액 1조2천억원(수입량 41만톤/년)에 이르는데, 민들레 고무는 5% 정도인 약 585억원(2만톤/년)의 대한 수입대체효과가 예상된다.

2. 산업화를 통한 기대효과

개발된 천연고무 생산 산업작물의 산업화를 통하여 기대되는 경제 파급효과는 아래의 도표와 같이 매우 높다

(단위 : 백만원)

산업화 기준 / 항 목	개발후 5차년도 (2020년)	개발후 10차년도 (2025년)	개발후 15차년도 (2030년)
직접 경제효과 (수입대체)	11,700 (0.1%)	35,100 (3%)	58,500 (5%)
경제적 파급효과	550	17,550	29,250
부가가치 창출액	13,300	400,000	666,700
합 계	15,850	452,650	754,450

제 3 절 3P(특허,논문,제품)분석을 통한 향후 계획

1. 특허분석 측면

가. 기존 특허들은 천연고무 생합성 회로에 관련된 일반 유전자 분리에 치중되어 있으며, 천연고무 생합성 핵심효소인 중합효소가 밝혀져 있지 않기 때문에 본 연구과제에서는 천연고무 생합성 핵심 유전자 분리 동정 방향으로 연구를 추진하였으며 유용 유전자들 특허 등을 국내 및 국외에 출원하였음

나. 기존에는 *Hevea*를 중심으로 천연고무 특성분석 및 실용화 기반기술이 개발되어 왔으나 본 연구과제에서는 대체 고무작물인 민들레에서 추출한 천연고무의 실용화를 위한 특성분석 및 기반기술을 개발하여 특허를 출원하였음

2. 논문분석 측면

가. 기존 논문은 천연고무 생합성에 관련되어 있는 유전자를 분리 동정한 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 천연고무 생합성 유전자를 분리 동정하는 방향으로 연구를 추진하여 “천연고무 생합성 핵심유전자 분리 동정“ 논문 등을 국제 학술지 등에 투고하려고 준비 중

나. 지금까지 대부분의 유전자 분리는 *Hevea*에서 하여 왔으나 본 연구과제에서는 민들레의 latex에서 발현하는 천연고무 생합성 유전자를 분리하여 대량 sequencing 하였음

3. 제품 및 시장분석 측면

가. 지금까지 대부분의 천연고무 자원은 *Hevea*에서 확보하였으나, 언제 어느 때에 질병으로 인하여 생산이 중단되어 전 세계의 경제에 큰 타격을 입힐지를 모르기 때문에, 본 연구과제에서는 천연고무 대체작물 개발 방향으로 연구를 추진하여 천연고무 생산 민들레 신품종 등을 생산하여 국내 및 국외에 공급할 계획임

나. 국내 및 국외시장 분석결과 석유자원에서 만들어 진 합성고무 제품의 생산 및 판매가 주를 이루고 있으나, 현재 석유자원의 고갈과 고유가 시대로 인하여 자원 확보 한계점에 접어들었으므로, 본 연구과제에서는 식물유래 천연고무 생산증대 및 대체 천연고무 작물 개발 방향으로 연구를 추진하여 질적으로 향상된 천연고무를 생산하여 국내뿐만 아니라 국외의 시장에도 진출할 수 있을 것임.

제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

제 1 절 이론적 실험적 접근 방법

1. 관련유전자 선별 및 염기서열 분석

민들레 및 *Hevea* 고무나무의 latex 조직내에서 특이적으로 발현하는 고무 생산성 관련 유전자를 분리하기 위하여 cDNA library screening과 PCR 방법을 이용한다. 본 연구팀에서 확보한 internal amino acid sequence 정보를 이용하여 degenerate primer를 제작하여 PCR에 이용하며 선별된 유전자의 염기서열은 Automatic DNA Sequencer를 이용하여 분석하였다.

2. 재조합 단백질의 발현, 정제 및 역가 측정

민들레와 *Hevea* 고무나무에서 고무생합성에 관련된 것으로 여겨지는 고무중합효소의 재조합 단백질을 발현 분리하기 위하여 E. coli 발현 벡터와 Pichia 발현 벡터를 사용한다. 해당 유전자를 PCR방법으로 확보하여 적당한 제한효소를 이용하여 벡터에 클로닝한 후 E. coli나 Pichia에 transformation하여 단백질을 발현시켰다. 발현된 재조합 단백질은 His-tag, Strep-tag, GST-tag 등을 이용하여 분리 정제한 후 그 효소 역가를 측정하였다.

3. In vitro rubber biosynthesis assay

E. coli 및 yeast로부터 분리한 재조합 단백질의 고무 생합성 여부를 조사하기 위하여 실험관 내에서의 고무 생합성 실험을 시행하였다. 재조합 단백질을 효소원으로 하여 반응용기에 [14C]-IPP와 FPP를 첨가하여 효소반응을 시킨 다음 생합성 된 고무를 benzene으로 추출하거나 0.02 μm filter를 이용하여 여과한 다음 남아있는 ^{14}C의 양을 측정하여 생합성 된 고무의 양을 조사하였다. 아울러 생합성 된 고무의 분자량은 GPC 및 reverse-phase TLC를 이용하여 측정하였다.

4. 전기영동을 통한 고무생합성 단백질의 분리 및 동정

고무입자에 결합하여 있는 단백질을 조사하기 위하여 민들레와 *Hevea* 고무나무의 latex와 washed rubber particle을 detergent buffer (0.1% Triton X-100, 1% SDS)와 혼합하여 상온에서 약 30 분 동안 방치한 후 SDS-12% PAGE를 이용하여 단백질을 분리 동정하였다. 특정 단백질의 펩타이드 서열 규명을 위하여 SDS-PAGE로 분리한 단백질을 PVDF 막으로 옮긴 후 해당 밴드를 잘라내어 펩타이드 서열을 규명한다. 펩타이드 서열 규명은 기초과학지원연구소 서울분소의 Procise Protein Sequencing System (Applied Biosystems)을 이용하여 시행하였다.

5. Latex 조직에서 발현하는 RNA NGS Sequencing : 서울대 NICEM과 생명연 내부 기기를 사용하여 총 10G 이상의 database를 구축하였다.

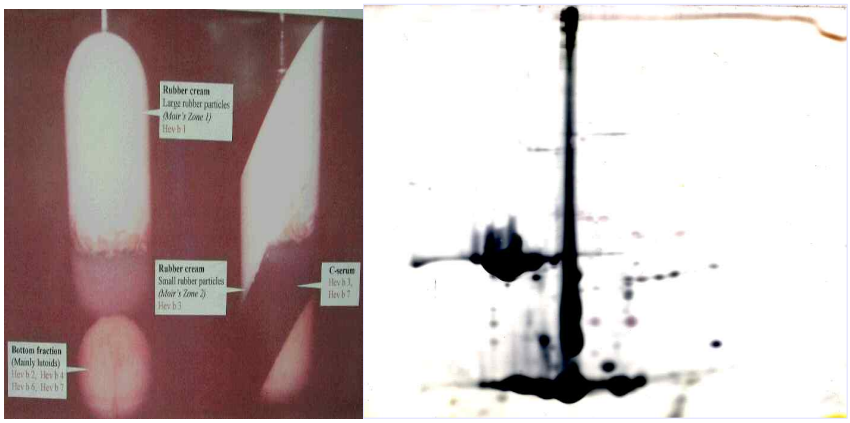
제 2 절 연구범위에 따른 연구수행 내용 및 방법

연 구 범 위	구체적인 내용	연구수행방법 (이론적·실험적 접근방법)
□ Latex에서 고무입자 분리 및 단백질 분석	○Latex 채취 및 고무입자 분리 - 말레이시아 및 캄보디아에서 Latex 채취 - spin으로 고무입자 분리 ○고무입자 단백질 분석	고무나무가 자라는 현지 생육지 말레이시아와 캄보디아를 방문하여 직접 latex를 채취하여 dry ice에 넣어 우송하였다. 고무입자를 latex로부터 분리한 후 고무입자 단백질을 전기영동으로 분리 분석하였다.
□ 천연고무 생합성에 관련된 유용 유전자 분리	○천연고무 생합성 과정에서 중요한 key step의 조절을 위한 천연고무 생합성 관련 유전자 분리 및 동정 ○천연고무 생합성에 관련한 유용 유전자를 선발하기 위하여 latex 조직이 많이 있는 뿌리와 꽃대에서 RNA를 추출하여 EST seq 읽음 (서울대 NICEM / 생명연 유전체 분석팀에 의뢰하여 수백만개를 확보)	*Hevea* 고무나무와 러시안 민들레의 latex 조직내에서 고무중합효소 유전자후보의 DNA sequence를 찾기 위하여 EST seq을 수백만개 이상을 읽었다 (서울대 NICEM과 생명연 유전체분석팀에 의뢰). 이미 확보한 peptide seq 정보를 이용하여 match 되는 DNA를 확보하고 이를 이용하여 full seq를 읽어 내었다.
□ 민들레 생육활성에 관련된 유용 유전자 분리	○천연고무 생산회로에 있는 유전자 중 식물체 생육도 함께 촉진하는 기능이 있는 유전자를 담배/민들레 형질전환체를 이용하여 탐색함 (유용유전자 특허출원을 목표로 함)	척박한 지역에서 재배를 가능하게 하고 민들레 고무생산을 증가시키는 목표를 달성하기 위하여 민들레 생육과 기타 복합내성을 촉진하는 유용유전자를 탐색하였다.

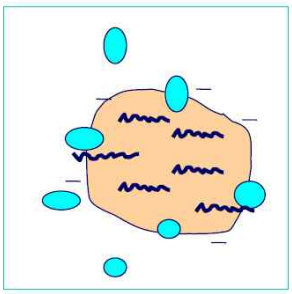
제 3 절 Latex에서 고무입자 분리

- 천연고무의 생합성은 laticifer 조직이란 특수한 기관에서 생성된다. laticifer 조직에는 흰 즙인 latex가 분비되는데 흰 색은 고무입자의 색깔에서 나타나는 현상이다. latex 액을 채취하여 high speed로 spin을 하였을 때 3층으로 구분되어 졌다. 제일 위층은 흰 색을 띄었으며 주로 rubber particle로 되어있었다. rubber particle 안에 천연고무 polymer들이 가득 채워져 있는 것으로 알려져 있다. 그리고 중간 층은 맑은 액체로 serum층으로서 천연고무 생합성에 필요한 효소들이 가득 들어 있다. 그리고 가장 밑층은 세포 소기관들의 잔유물들이 가라앉아 있다. 천연고무 생합성은 rubber particle 표면에서 일어나는 것으로 추정 되고 있다.

본 연구의 주요 과제는 천연고무 생산에 영향을 주는 유용 유전자들을 분리 동정하는 것이다. 이러한 목적을 달성하기 위하여 latex를 받아 세층으로 구분하였으며 rubber particle에 붙어 있는 단백질 들을 파악하기 위하여 2-D PAGE gel에서 분리하였다.



Hevea 고무입자에 부착된 단백질 분리



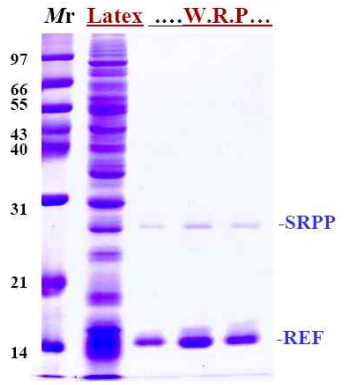


그림 1. 고무나무 latex에서 고무입자분리 및 고무입자 단백질의 2-D 분포.

제 4 절 고무입자에서 천연고무 생합성 관련 단백질 분리

- Latex에서 rubber particle를 분리한 다음 rubber ㅣ particle에 붙어있는 단백질들을 detergent를 사용하여 떼어 내었다. 그 단백질 중에 천연고무 생합성과 관련된 단백질을 분리하기 위하여 여러 가지 다른 column을 사용하였다. Gel chromatography로 단백질 크기별로 분리하고 ion exchange column을 거쳐 몇 개의 단백질만 남을 때까지 고무 생합성 in vitro activity assay에서 activity를 추적하여 좁혀갔다. 몇 개의 단백질을 전기영동으로 분리하여 partial amino acid를 확보하였다.

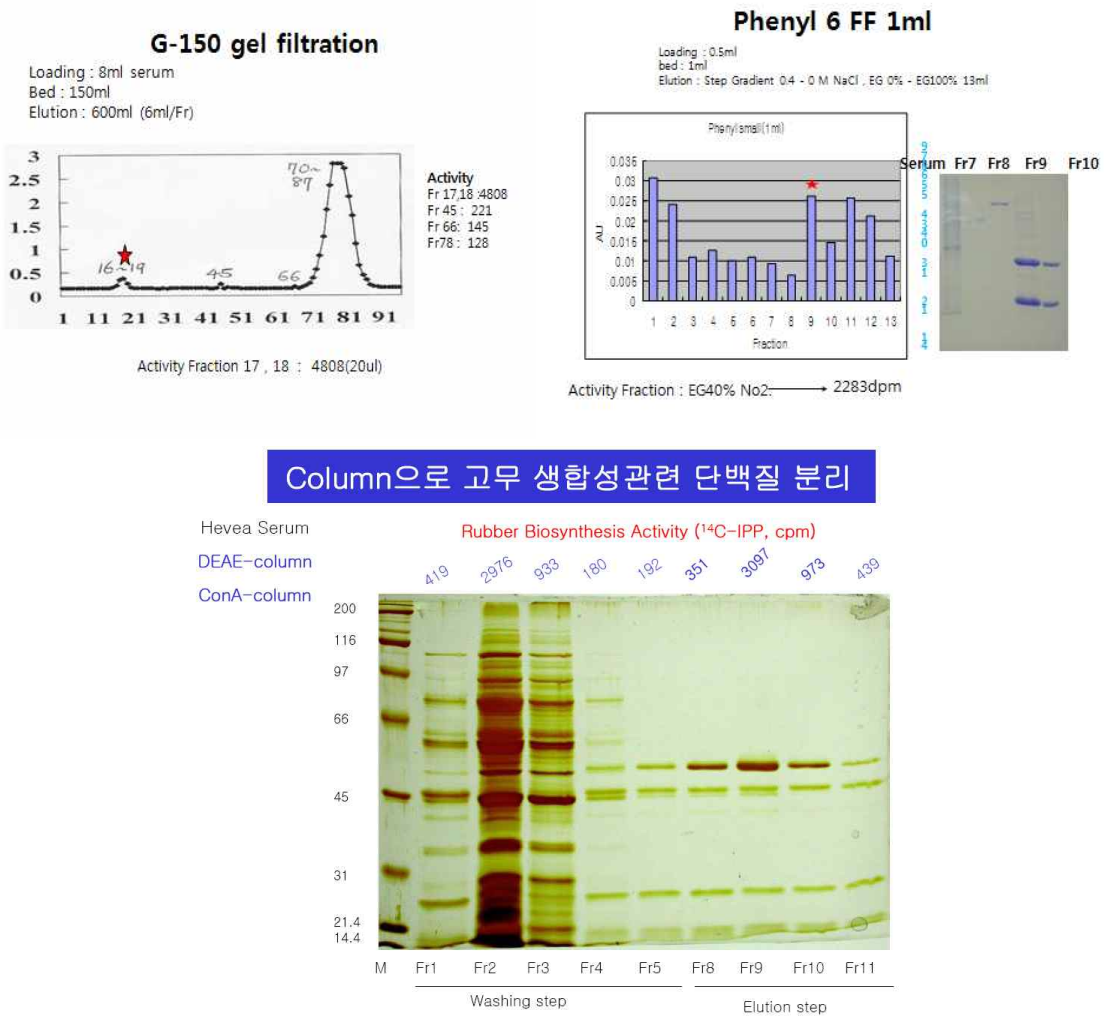


그림 2. 단백질 분리 및 동정

rubber particle에 붙어있는 단백질을 degergent를 처리하여 분리하고 추출한 다음 천연고무 생합성 in vitro assay를 통하여 생합성활성을 추적하였다. size fraction chromatography 등 여러 columns을 통과하여 최종 남아있는 단백질들을 MALDI-TOF로 동정하였다.

제 5 절 Latex 조직에서 RNA sequencing 및 Transcriptome 분석

○ 다양한 러시아 민들레 조직으로부터의 RNA sequencing

- 러시아 민들레의 잎, 뿌리, 2개의 다른 라텍스 sample로부터 얻은 RNA sample을 사용하여 Illumina sequencing을 수행하였다.
- HiSeq 2000 system을 사용하여 약 14.9 Gbp의 sequence 정보를 얻었다.
- 이러한 raw read들은 assemble된 sequence의 질을 개선하기 위해 양쪽 끝의 low-quality base의 제거 과정을 거쳤다.
- SolexaQA package에 있는 DynamicTrim과 LengthSort 프로그램을 사용하여 trim과 sort 작업을 수행하였다.
- 최종적으로 전체 read 중, 85%에 해당하는 125,492,878 reads (10,953,646, 408 base)가 high-quality read로 분류되었다.

표 1. RNA-sequencing 과 *de novo* assembly 결과 요약

Data		
Number of libraries		4
Raw read	Number of reads (n)	147,632,986
	Total length (bp)	14,910,931,586
	Average length (bp)	101
Trimmed read	Number of reads (n)	125,492,878
	Total length (bp)	10,953,646,408
	Average length (bp)	87.29
Total transcripts	Number of transcripts (n)	109,044
	Total length (bp)	132,654,338
Unigenes	Number of transcripts (n)	42,203
	Total length (bp)	38,872,976
	Minimal length (bp)	200
	Maximal length (bp)	13,278
	Average length (bp)	921
	N50 length (bp)	1,412

○ *De novo* assembly를 통한 전사체 선별

- de Bruijn graph 알고리즘을 기반으로 하는 Velvet과 Oases를 사용하여 trimmed reads를 전사체로 *de novo* assembly를 수행하였다.

표 2. 다양한 hash length 에 대한 de novo assembly 의 통계학적 결과 요약

Hash length (*k*-mer)	Number of transcripts	Length (bp) of transcripts				
		Total length	Min	Max	Average	N50
55	89,968	102,312,366	200	15,546	1,137	1,713
57	89,480	100,252,667	200	13,963	1,120	1,680
59	88,458	96,600,499	200	13,278	1,092	1,646
61	87,346	93,002,193	200	13,278	1,064	1,614
63	86,079	89,814,159	200	10,189	1,043	1,584
65	84,799	85,881,260	200	9,305	1,012	1,542
69	80,481	77,051,024	200	9,615	957	1,461
71	77,326	72,281,957	200	11,715	934	1,417
73	73,760	67,129,791	200	11,764	910	1,367
75	70,587	61,996,784	200	11,509	878	1,307
77	66,786	56,882,402	200	9,817	851	1,254
79	62,347	51,120,848	200	8,904	819	1,190
81	58,142	46,180,782	200	8,888	794	1,136
85	48,499	34,999,390	200	9,947	721	980

- 이를 통해 200 bp 이상의 길이를 가지는 109,044개의 전사체를 얻었다.
- 109,044개의 전체 전사체 중, 중복되는 전사체들을 제거함으로써 최종적으로 42,203개의 unigene을 얻었다.

표 3. Assemble 된 전사체의 길이 분포

Length (bp)	Number of transcripts
0−500	17,377
501−1000	10,483
1001−1500	6,243
1501−2000	3,981
2001−2500	2,118
2501−3000	1,038
3001−3500	455
3501−4000	243
4001−4500	128
≥ 4501	137
Total	**42,203**

○ Unigene의 정확성 평가
- 선별된 대표 전사체인 unigene들의 assembly 결과가 정확한지 알아보기 위해 각 유전자 sequence를 Phytozome database와 BLASTx를 사용하여 직접적으로 비교하였다.
- 전체 42,203개의 unigene 중, 24,245개 (57.45%)가 Phytozome에 있는 41개 식물체의 유전자 정보와 유사성을 보였다.

○ 라텍스에서 발현되는 unigene 선발
- 고무생산 작물로서 러시아 민들레가 중요하기 때문에 러시아 민들레의 라텍스에 초점을 맞추었다.
- 42,203개의 전체 unigene 중, 라텍스에서만 발현되는 unigene을 선발하기 위해 raw read 수가 5개 미만인 unigene을 제외함으로써 37,412개의 unigene을 선발하였다.

○ Annotation 분석
- 37,412개의 라텍스 발현 unigene에 대해 Gene Ontology (GO), KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG), Clusters of orthologous groups for eukaryotic genome (KOG)의 annotation 분석을 수행하였다.
- 37,412개 unigene 중, 21,762개는 애기장대 database의 TAIR ID와 annotation이 되었다.
- 이와 함께 42,203개의 전체 unigene에 대해서도 함께 분석하였다.

- GO annotation 분석에서 37,412개의 unigene 중, 17,585개 유전자는 15개의 BP 범주로 류되었고, 16,098개 유전자는 6개의 CC 범주로, 7,818개 유전자는 6개의 MF 범주로 각각 분류되었다.

- BP는 Biological Process, CC는 Cellular Component, MF는 Molecular Function을 나타낸다.

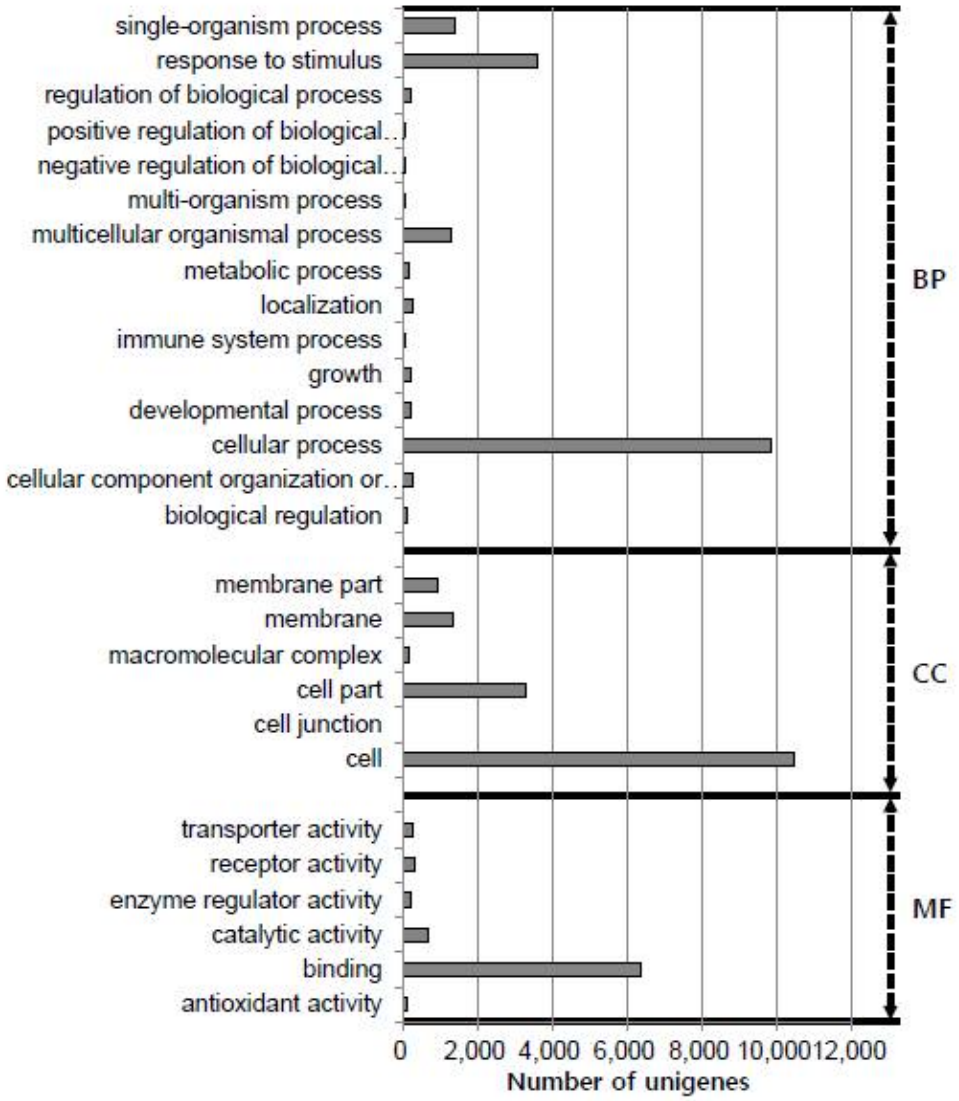


그림 3. 러시아 민들레 라텍스에 대한 GO 분석 결과

- KEGG 분석에서 라텍스발현 unigene 중 3,967개가 106개의 KEGG경로에 맞춰 분류되었다.
- 이 중, 2,737개 unigene은 Metabolism (M) 범주에 포함되었으며, Carbohydrate metabolism (763개 unigene), Amino acid metabolism (472개 unigene), Energy metabolism (314개 unigene)으로 가장 많은 유전자를 포함하는 하위 범주였다.
- 1,047개 unigene은 Genetic Information Processing (GIP) 범주에 속했으며, Cellular Processes (CP), Environmental Information Processing (EIP), Organismal Systems (OS) 범주에 112, 38, 33개의 unigene들이 각각 포함되었다.

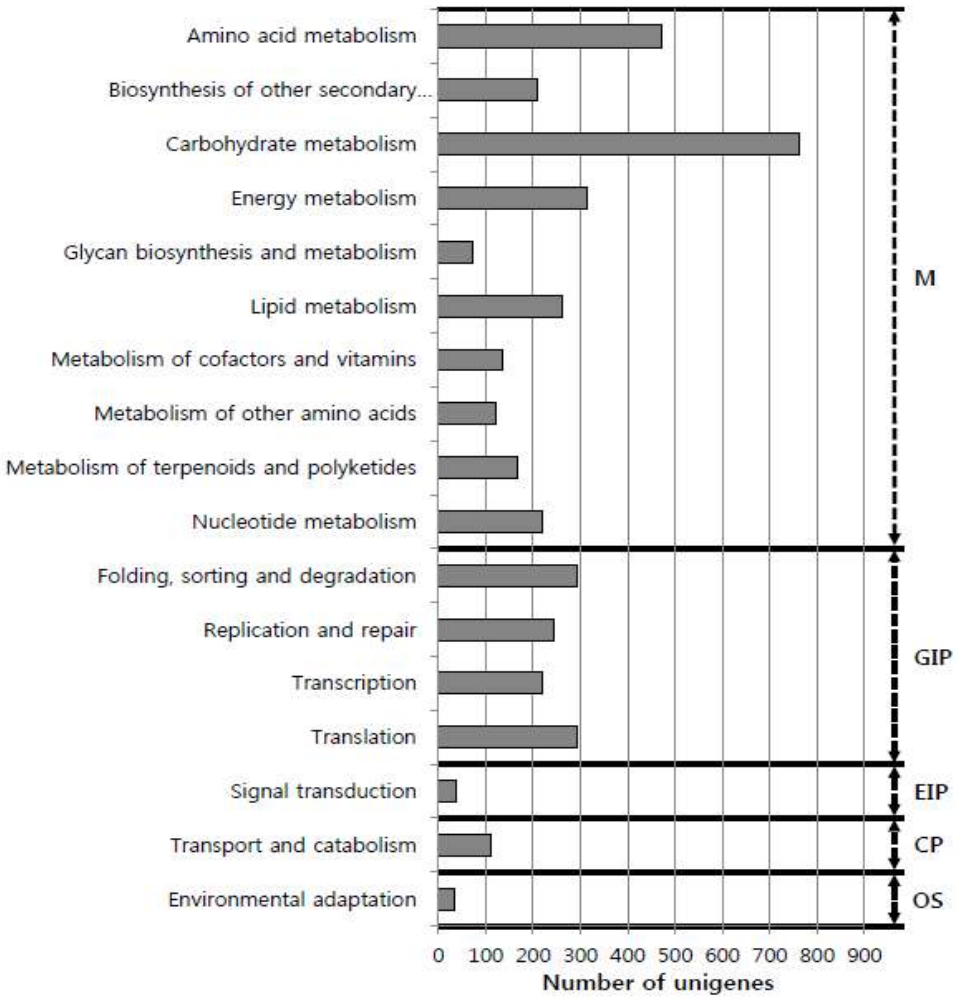


그림 4. 러시아 민들레 라텍스에 대한 KEGG 분석 결과

- KOG 분석에서는 라텍스 발현 unigene 37,412개 중, 20,545개의 unigene이 27개의 범주로 분류되었다.

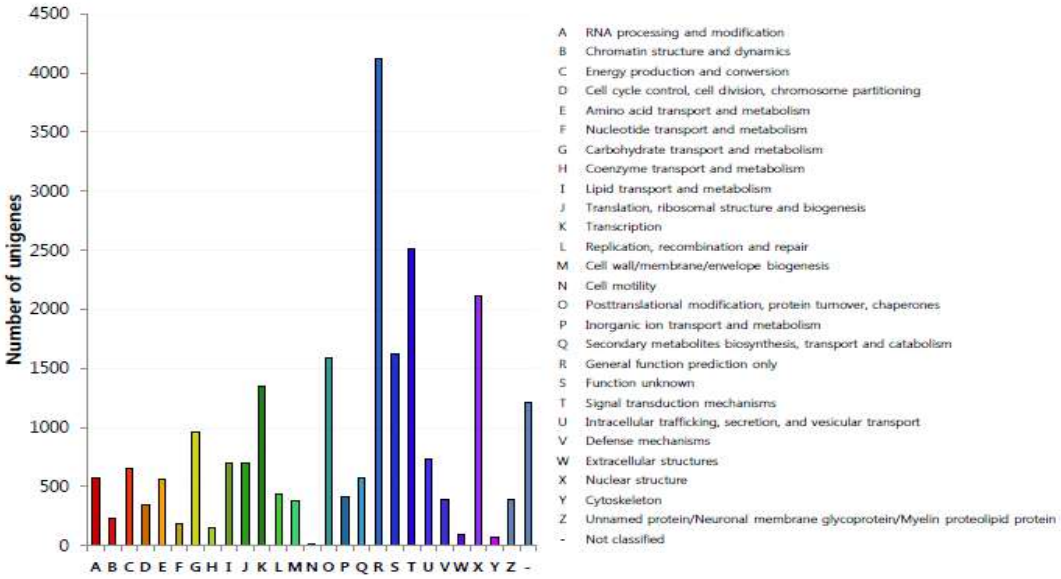


그림 5. 러시아 민들레 라텍스에 대한 KOG 분석 결과

제 6 절 전사체분석을 통한 고무생합성 관련 유전자군 분리와 발현양상 조사

○ 전사체 분석 내용 중 고무생합성 관련 유전자군 분리

- 기존에 NCBI nucleotide database에 등록되어 있는 고무생합성 관련 유전자들 중, *Hevea brasiliensis*, *Taraxacum brevicorniculatum*, *Taraxacum kok-saghyz*, *Catharanthus roseus* 로부터 나온 고무생합성 관련 유전자들을 선발하였다.
- 이 유전자들을 query로 사용하여 러시아 민들레의 라텍스에서 발현되는 고무생합성 관련 유전자를 동정하였다.
- 러시아 민들레 라텍스 transcriptome dataset에 대해 CLC Main Workbench (v7.6.1) 프로그램을 사용하여 아미노산 서열에 대한 BLASTx를 수행하였다.
- 가장 잘 match 되는 고무생합성 관련 유전자를 동정하고 고유한 이름을 부여하였다.
- 총 39개의 고무생합성 관련 유전자를 동정하였다. MVA 경로 (mevalonate pathway) 13개 유전자, MEP 경로 (2-*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway) 11개 유전자, 하위 경로 (Downstream) 7개 유전자, 고무생합성 관련 (Rubber biosynthesis) 8개 유전자를 각각 동정하였다.

표 4. 러시아 민들레 라텍스로부터 동정한 고무생합성 관련 유전자들

Pathway	Gene description	Number of unigenes
MVA	Acetyl-CoA *C*-acetyltransferase (AACT)	3
	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA synthase (HMGS)	1
	3-Hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGR)	5
	Mevalonate kinase (MK)	1
	Phosphomevalonate kinase (PMK)	2
	Mevalonate diphosphate decarboxylase (MPDC)	1
MEP	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase (DXS)	3
	1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR)	1
	2-*C*-methyl-D-erythritol 4-phosphate cytidylyltransferase (MCT)	1
	4-(Cytidine 5'-diphospho)-2-*C*-methyl-D-erythritol kinase (CMK)	1
	2-*C*-methyl-D-erythritol 4-cyclodiphosphate synthase (MDS)	1
	(E)-4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate synthase (HDS)	1
	4-hydroxy-3-methylbut-2-enyl diphosphate reductase (HDR)	3
Downstream	Isopentenyl diphosphate isomerase (IPPI)	2
	Farnesyl diphosphate synthase (FPS)	2
	Geranyl diphosphate synthase (GPS)	1
	Geranylgeranyl diphosphate synthase (GGPS)	2
Rubber biosynthesis	Small rubber particle protein (SRPP)/ Rubber elongation factor (REF)	6
	cis-Prenyl transferase (CPT)	2

○ 라텍스 cDNA 및 primer 제작

- 러시아 민들레로부터 extraction buffer (100 mM Tris-Cl, pH 7.8, 350 mM sorbitol, 10 mM NaCl, 5 mM $MgCl_2$)를 사용하여 라텍스를 얻었다.
- 추출한 라텍스에서 total RNA를 추출하기 위해 Lipid Tissue Plant Kit (Qiagen)을 사용하여 RNA를 추출하였다.
- TOPscript RT DryMIX(Enzynomics)를 사용하여 2μg의 RNA로부터 라텍스cDNA를 합성하였다.
- 고무생합성 유전자 39개와 reference 유전자로 사용할 *TkActin1*에 대한 sequence 정보를 정리 후, 각 유전자에 해당하는 gene specific primer를 design 하였다.

○ 고무생합성 관련 유전자들의 발현양상 조사

- 제작한 primer를 사용하여 39개의 고무생합성 관련 유전자들에 대해 발현양상을 조사하였다.
- CFX96 Real-time PCR detection system (Bio-Rad)을 사용하여 quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR)을 수행하였다.
- *TkActin1*을 reference로 사용하여 normalization 후, 결과값을 얻었다.
- qRT-PCR을 통해 발현이 나타나지 않은 5개 유전자는 제외하였다.
- MVA 경로 유전자들의 발현이 MEP 경로 유전자들의 발현보다 대체로 높게 나타났다.
- 고무생합성 유전자들 중, *TkSRPP3*, *TkSRPP5*, *CPT1*의 발현은 매우 높게 나타났다.

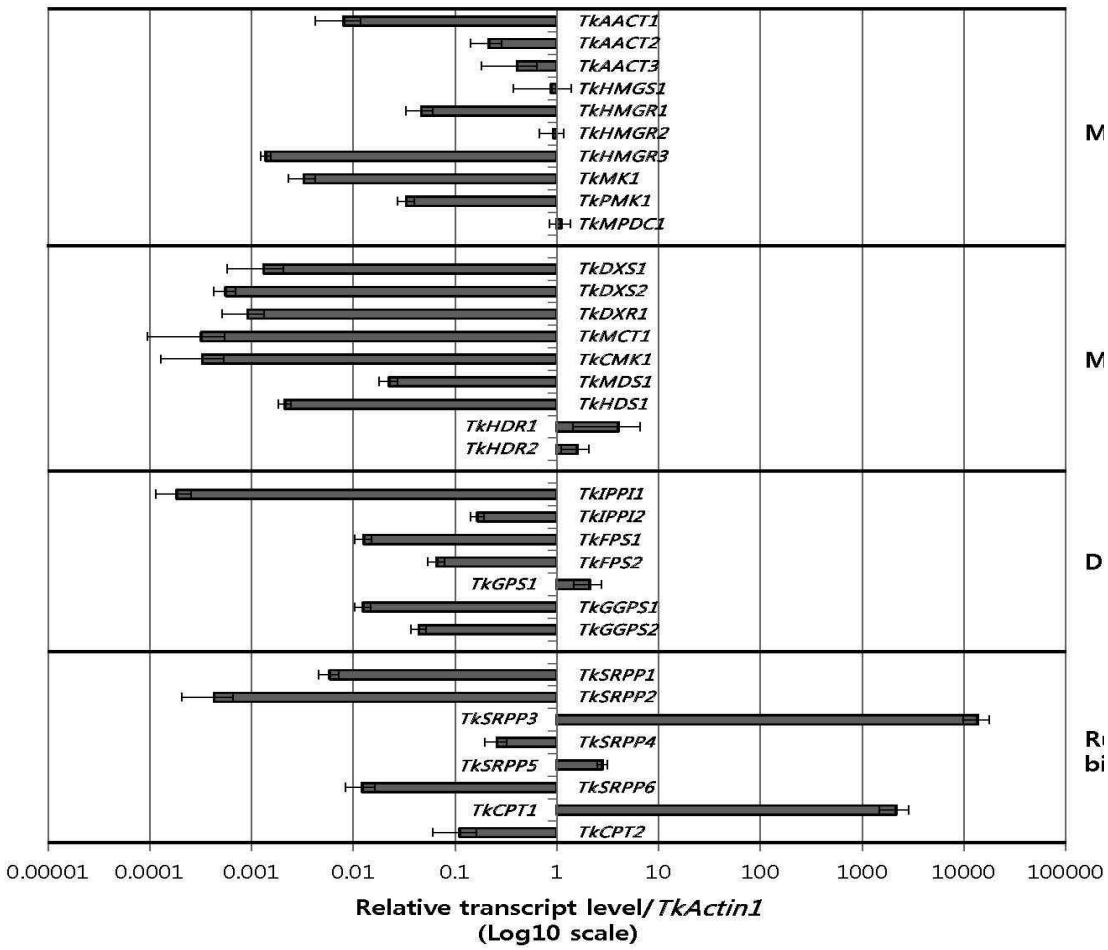


그림 6. 러시아 민들레 라텍스의 고무생합성 관련 유전자들의 발현양상

제 7 절 고무 생합성효소 후보 유전자 전체서열 Cloning 및 재조합 단백질 생산

1. RNA-sequencing database를 바탕으로 확보한 부분 peptide 서열정보를 이용하여 예시와 같이 고무생합성효소 유전자를 확보함.

GTTCAAACATCGGCACGTTTCAATCCTCCAAACGGGACCATGTTGCAATCCTAAATTCGATTCTGTCAGTAGAACCCTGCCTTGTG
GAGGGACGGCCAGTATGGAGCGACATCACGCTGGTCGCTCACGAGTTCATCATAGCCGCCGACAACGACTTTGAGTTGAACGTATT
TATCCCCCGAGAATATGTAAGTTCCGTTCTCGGATCCTGGGCGGGGGATGATCGTGTCGATGGACTTGAACTTCATGACGCTCCAT
CCCACTGTGATGGGCTTTGGCCCGTCGAGGAGCTCGTCGTTGATCTGACCCTCCGTAAACTTAATGCGGCAATACTGTTCGCCACT
GAAAATG---------- 예시 서열이며 중략함 ----------

2. *E. coli* 및 Yeast에서 고무생합성 후보 재조합 단백질 생산:
단백질 발현 백터를 제작한 후 대장균과 이스트에서 재조합 단백질을 아래와 같이 발현 정제함.

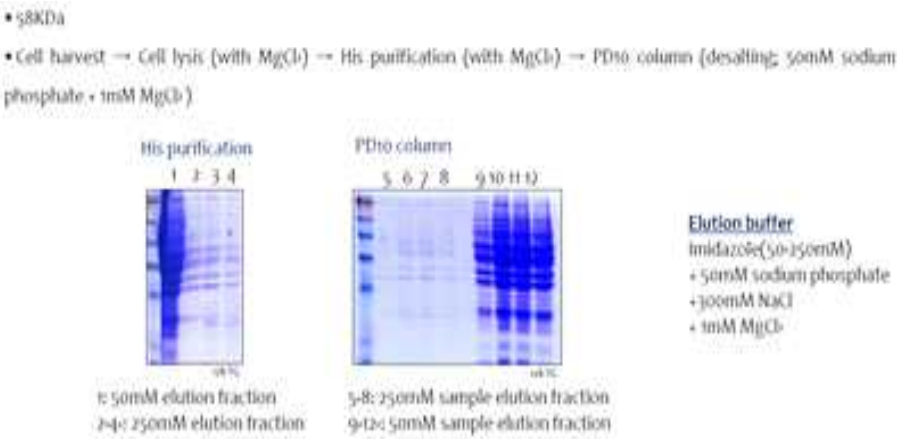


그림 7. 고무 생합성 후보 재조합 단백질의 발현 (Yeast)

3. Hevea에서 분리한 천연고무 생합성 후보 단백질의 항체 제작

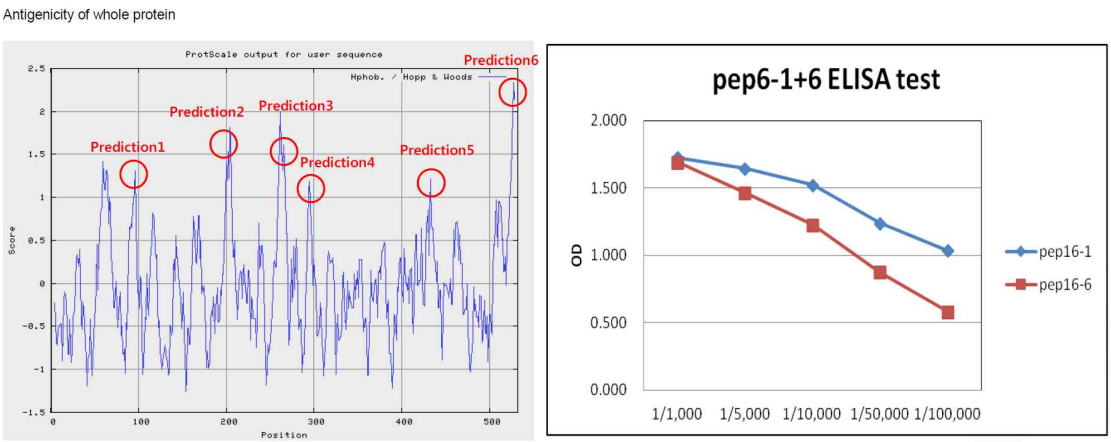


그림 8. 고무 생합성 후보 단백질의 항체 제작

제 8 절 고무 생합성 후보 단백질의 활성검정과 특허 출원

1. 천연고무 생합성 후보 단백질의 Western blot 및 immuno-precipitation

*Hevea*에서 latex를 수확한 후 ultracentrifuge하여 rubber particle 층, C-serum 층, 및 bottom fraction으로 구분 그리고 immno-precipiation한 후 Western blot으로 고무생합성 후보 단백질의 발현을 조사하였다.

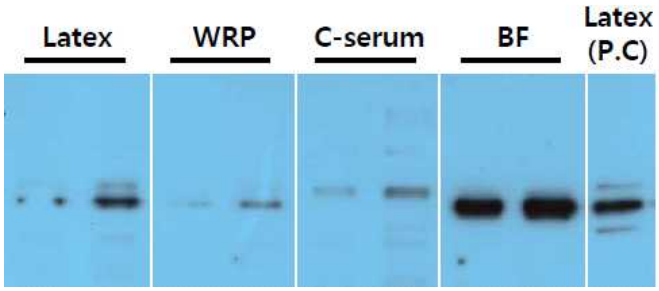


그림 9. 고무 생합성 후보 단백질의 Western blot

2. 천연고무 생합성 후보 단백질의 *In vitro* Assay

상기한 고무 생합성 재조합 단백질을 가지고 in vitro assay를 수행. 천연고무 생합성 단백질이 막 단백질인 관계로 추출 정제하는 데 많은 어려움을 겪고 있다. 이러한 어려움을 극복하기 위하여 antibody(항체)를 제작하여 immuno-precipitation(IP)을 시도하였으며, IP한 단백질로 in vitro assay를 수행하여 후보 단백질이 고무 생합성의 활성을 보이는 것을 확인할 수 있었다.

3. 활성 검정한 고무 생합성 후보 단백질의 특허출원

활성을 검정한 고무 생합성 후보 단백질과 유전자 서열을 특허출원하였다. 곧 이어 PCT 특허출원을 진행할
예정이다.

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2015.05.07
특 기 사 항	심사청구(무) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2015-0063748 (접수번호 1-1-2015-0438703-05)
출원인 명칭	한국생명공학연구원(3-1999-034166-5) 외 1명
대리인 성명	최규환(9-2005-001504-0)
발명자 성명	유병태
발명의 명칭	천연고무 중합효소 유전자와 프로모터 및 이의 용도

특 허 청 장

그림 10.

제 9 절 고무 생합성 유전자 promoter sequence cloning

○ 고무중합효소 후보 유전자의 promoter 분리 목적

- 이전 연구에서 SRPP promoter를 동정하였다. 이 promoter는 러시아 민들레에서 laticifer 조직에 발현됨을 밝혔다. 이와 마찬가지로 형질전환체를 제작할 때 laticifer 조직에 특이적으로 발현될 수 있도록 하는 promoter의 동정을 위해 고무중합효소 후보 유전자의 promoter를 분리하고, 이후 promoter-GUS 형질전환체 제작을 통해 실제로 후보 유전자의 promoter가 SRPP promoter와 마찬가지로 laticifer 조직에 발현되는지 알아본다.

○ 고무중합효소 후보 유전자의 promoter 분리

- 파라고무나무 (*Hevea brasiliensis*)의 잎으로부터 CTAB 용액을 사용하는 분리 방법을 통해 genomic DNA를 추출하였다. 이러한 genomic DNA를 Nanodrop 기기를 사용하여 DNA 농도를 측정 후, 최종농도를 50 ng/μL으로 맞추었다.
- 이전 연구를 통해 밝힌 고무중합효소 후보 유전자인 파라고무나무 Pep16 (HbPep16) 유전자의 DNA sequence를 바탕으로, genomic DNA를 사용하여 inverse PCR을 수행하였다.
- pGA3383을 BamHI, HpaI 제한효소로 절단 후, BamHI으로 절단한 PCR 산물을 라이게이션 하여 pGA3383에 PCR 산물을 삽입하였다.

그림 11. p*HbPep16*-GUS 벡터의 모식도

제 10 절 유전자 도입 민들레 형질전환체 제조

○ 민들레 형질전환체 제작 목표

- 민들레의 형질전환체 개발을 위한 식물체 재분화 조건을 확립하고, 확보된 식물체 재분화 기술을 바탕으로 형질전환의 효율에 커다란 요인으로 알려진 다양한 *Agrobacterium tumefaciens* strain과 형질전환 벡터를 사용하여 형질전환의 효율을 극대화시키며, 이를 바탕으로 천연고무 생합성 관련 유전자가 도입된 민들레 식물체를 생산하고자 한다.

○ 고무 생합성효소 후보 유전자에 대한 형질전환체 제작

- 고무중합효소 후보 유전자인 HbPep16에 대한 promoter-GUS 형질전환체 및 latex-specific promoter (SRPP promoter)를 사용한 과발현 형질전환체를 생산
  - pHbPep16-GUS (pHbPep16-GUS 벡터의 모식도 참조)
  - pSRPP-HbPep16 (pSRPP-HbPep16 벡터의 모식도 참조)

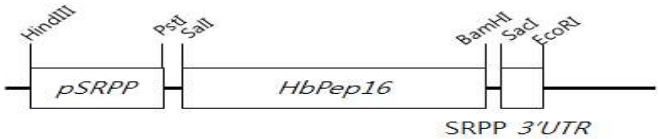


그림 12. pSRPP-HbPep16 벡터의 모식도

- pHbPep16-GUS 및 pSRPP-HbPep16 벡터 도입 서양민들레와 러시아민들레 형질전환체 생산을 위해 NAA, IBA와 BA를 이용하여 재분화를 위한 호르몬 조성 실험과 하이그로마이신을 이용하여 저항성 실험을 진행하였다. 배지는 모두 MS salts을 기본으로 agar는 gelite를 이용한 배지를 사용 하였다. 서양 민들레의 경우 캘러스와 잎 형성 은 NAA 0.2mg/L, BA 2.0mg/L 가 첨가된 배지에서 뿌리형성은 NAA 0.05mg/L 첨가 된 배지 조성에서 재분화 식물체를 얻을 수 있었다. 러시안 민들레의 경우 캘러스 및 잎 형성는 IBA 0.01mg/L, BA 3.0mg/L 포함된 식물체에서 뿌리형성은 NAA가 없는 배지에서 가장 좋은 결과를 보였다. 하이그로마이신의 경우 하이그로마이신 10mg/L가 포함 된 선택배지에서 판별 할 수 있엇다. 이 후 확보된 호르몬 및 항생제 농도를 사용하여 형질전환을 수행하였다.

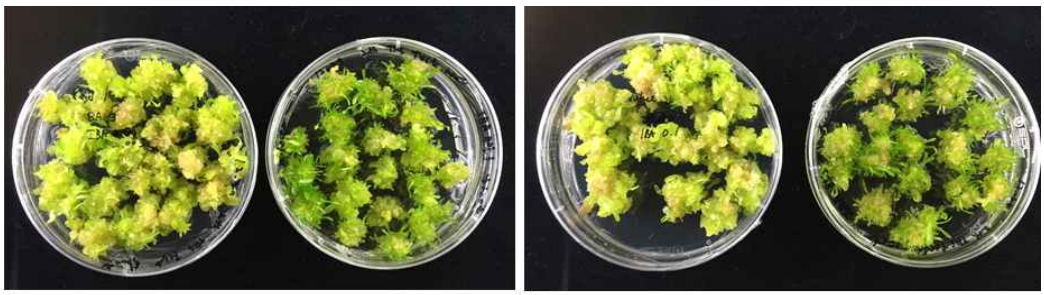


그림 13. 러시안민들레의 캘러스와 뿌리 형성배지 실험

- 식물체 절편에서 형성된 캘러스를 사용하여 Agrobacterium tumefaciens과 co- culture를 시킨 후, 적절한 농도의 호르몬과 항생제를 포함하는 선택배지에서 형질전환이 이루어진 캘러스를 선별하였다.

그림 14. 서양민들레를 이용한 선택배지에서 캘러스

- 이 과정에서 캘러스뿐만 아니라 일부 식물체의 재분화가 유도되었다. 이후 유도된 식물체들을 생장배지에서 완전한 식물체로의 재분화를 위해 생장시키고 있다.

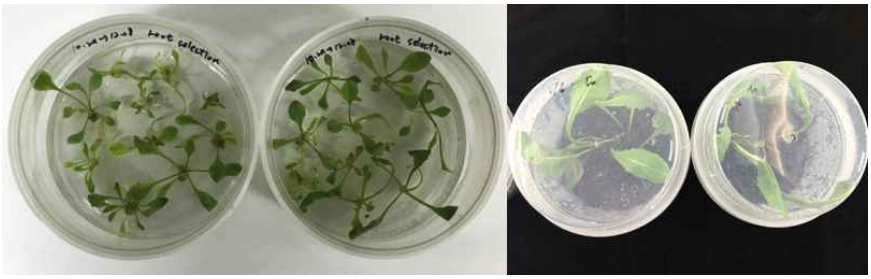


그림15. 형질전환 후 서양민들레의 재분화 실험

제 11 절 지하부 biomass 생산을 위한 러시안 민들레 재배기술 개발

1. 러시안 민들레 우량 묘 생산 기술개발

○ 뿌리조직 절단에 의한 영양번식 방법

- 종자 번식은 연중 증식이 어렵고, 균일한 개체가 나오지 않으므로 균일한 개체를 연중 증식 하는 방법 필요
- 러시안 민들레의 뿌리조직을 2-3cm 정도 길이로 절단하여 뿌리 절편을 심어 완전한 개체로 키우는 방법 개발

○ 겨울철 식물공장에서 뿌리 절편으로부터 싹과 잎이 나오는 최적 조건 검토

- 상토 : 시중에 시판되는 원예용 상토
- 일장 : 광 16시간 / 암 8시간
- 광도 : 강한 형광 빛과 자연광 혼용 조건
- 온도 : 20±2도
- 습도 : 70-80 도

○ 뿌리로부터 민들레 묘 생산 시스템 개발

그림 16. 식물공장에서 뿌리절편에 의한 묘생산 실험

○ 러시안 민들레 재배용 묘 대량 생산 준비

- 고무추출용으로 사용하기 위해서는 대량의 러시안 민들레를 재배해야 함
- 러시안 민들레를 재배하기 위해 대량의 우량 묘가 필요
- 예비실험에 의해 뿌리절편으로부터 싹을 내어 정상적인 식물체로 생장
- 뿌리절편 묘 대량생산을 위한 뿌리절단용 러시안 민들레 준비 (아래 그림 좌측)

○ 재배용 뿌리절편 묘 대량 생산

- 뿌리를 수확 후 바로 절단하여 상토에 심는 것보다 3-4일 건조시킨 후 절단하여 심었을 때 싹이 더 잘 나옴.
- 상토로 채워진 모판에 3-40개의 뿌리 절편을 심어서 식물공장과 육묘장에서 2개월 정도 재배 (아래그림 좌측).

그림 17.

2. 고무추출용 러시안 민들레 모판재배에 의한 대량 재배 시스템 개발

- 상토로 채원진 모판에 3-40개의 뿌리 절편을 심어서 식물공장과 육묘장에서 2개월 정도 재배 (아래그림 좌측).
- 뿌리절편으로 만든 우량 묘를 하우스내 육묘판에 심어 재배(아래그림 우측)하거나 노지 토양에에 멀칭을 하고 재배

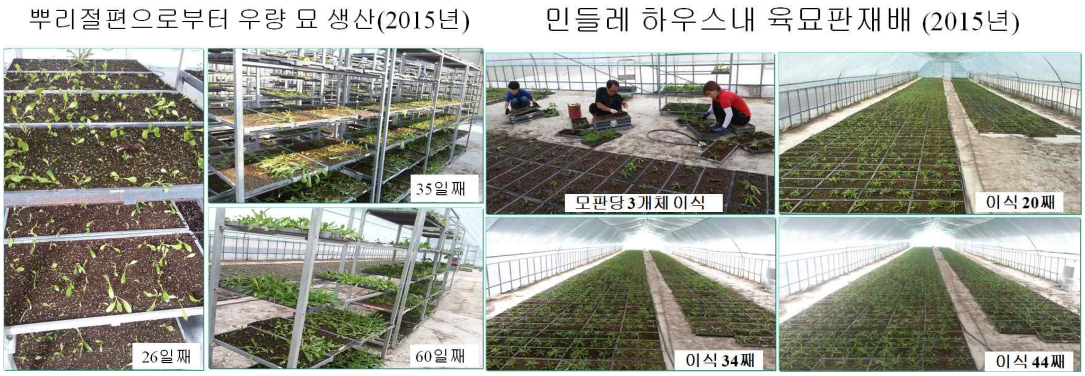


그림 18.

○ 하우스내 육묘판에서 유묘 재배

- 상토로 채워진 모판에 우량 묘를 3개씩 이식하여 급수하면서 하우스에서 재배 (위 그림 우측).
- 이식된 묘는 1개월 재배하였을 때 뿌리가 완전히 활착하였고 잎이 무성히 자람.
- 하우스내 온습도 조절 및 차광망 활용에 의한 광도 조절로 정상적인 생장.
- 여름철 하우스내 고온 장애 방지책 필요

○ 하우스내 육묘판에서 고무추출용 러시안 민들레 재배 및 수확.

- 재배 기간별 정기적인 고무함량 분석에 의한 최적 수확 시기 검토.
- 장기간 재배시 복토에 의한 뿌리 생산량 증가 검토.
- 생장이 왕성할 때 1주 간격으로 25% 메탄올을 뿌려서 잔뿌리 생성 촉진.

육묘판 대량 재배, 복토 및 수확 (2015년)

그림 19.

3. 고무추출용 러시안 민들레 토양재배에 의한 대량 재배 시스템 개발

○ 하우스내 토양에서 멀칭 재배에 의한 대량 생산

– 뿌리절편으로 만든 묘를 토양에 이식하여 러시안 민들레를 대량 재배.

– 이식된 묘는 1개월 재배하였을 때 뿌리가 토양에 완전히 활착

– 토양재배는 멀칭해도 잡초가 무성해 3주에 1회 정도 잡초제거 필요

– 여름철 하우스내 고온 장애 방지를 위해 차광막 설치

– 재배 기간별 정기적인 고무함량 분석에 의한 최적 수확 시기 검토.

– 생장이 왕성할 때 1주 간격으로 25% 메탄올을 뿌려서 잔뿌리 생성 촉진.

– 모판재배보다 재배관리는 어렵지만 뿌리 수확량이 많아 대량 생산에 유리

그림 20.

제 12 절 러시안 민들레 고무함량에 미치는 메탄올 영향분석

○ 비유전자이식 접근 방법을 모색하기 위하여 본 발명자들은 고무함량을 높여주는 호르몬 또는 환경요인을 탐색하는 연구를 수행하였다. 식물체의 바이오매스와 작물 생산성에 대한 식물호르몬, 메탄올 또는 미생물의 사용에 대한 여러 보고가 있었다. 그러나 식물체의 고무함량에 대한 메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아의 영향은 지금까지 보고된 바가 없다. 본 연구자들은 천연고무 대체 작물로 주목받고 있는 TKS 민들레에서 천연고무의 함량에 미치는 메탄올과 메틸로트로픽 박테리아의 영향을 확인코자하였다.

1. 러시안 민들레 고무함량에 미치는 환경/호르몬/화학물질의 영향

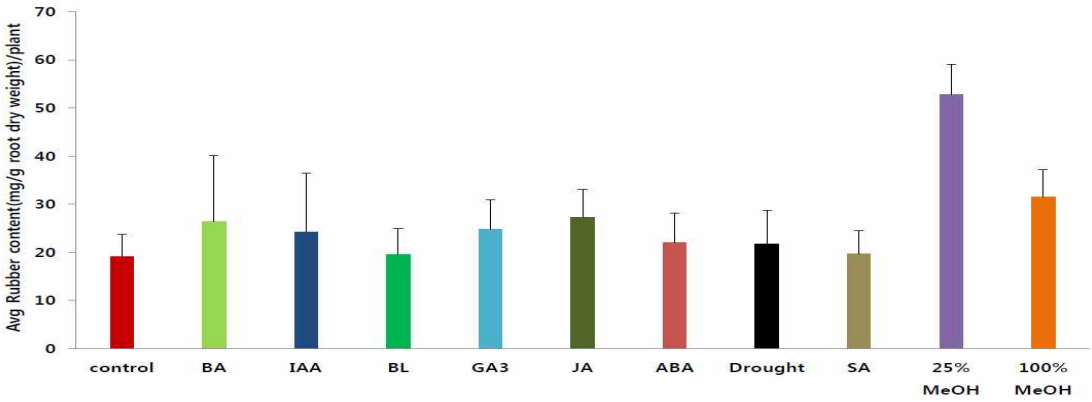


그림 21.

2. 메탄올 또는 메탄올영양박테리아 처리에 의한 고무함량 증가 및 특허출원

○ 본 발명은 메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아 처리에 의한 식물체의 고무 함량 증가 방법에 관한 것으로, 더욱 상세하게는 식물체에 메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아를 처리하여 식물체의 고무 함량을 증가시키는 방법 및 메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아를 유효성분으로 함유하는, 식물체의 고무 함량 증가용 조성물에 관한 것이다.

출 원 번 호 통 지 서

출 원 일 자	2014.09.25
특 기 사 항	심사청구(무) 공개신청(무)
출 원 번 호	10-2014-0128083 (접수번호 1-1-2014-0911262-44)
출원인 명칭	한국생명공학연구원(3-1999-034166-5) 외 1명
대리인 성명	최규환(9-2005-001504-0)
발명자 성명	유병태
발명의 명칭	메탄올 또는 메틸로트로픽 박테리아 처리에 의한 식물체에서 고무 함량을 증가시키는 방법

특 허 청 장

그림 22.

제 13 절 러시안 민들레에서 천연고무 추출기술 개발

○ 기존 soxlet 방법에서의 문제점을 발견하고, 이를 보완하여 효율적인 고무추출 방법을 찾고자 하였다. soxlet 방법은 그라인딩 후의 뿌리를 이용하였을 때 뿌리 양이 많아질수록 고무 추출의 효율이 떨어졌으며 결과의 반복성이 떨어지는 결과를 보였다. 이 문제를 해결하고자 우리는 뿌리 가루를 cyclohexane에서 24시간동안 섞어 준 후 고무가 포함 된 cyclohexane만 분리할 수 있도록 원심분리기를 이용하여 뿌리가루만 제거하였다. 그 후 아세톤을 이용한 응집작용을 통해 고무를 추출하였다. 이 방법은 샘플 양에 상관없이 비슷한 효율로 고무를 추출 할 수 있었으며 매 실험에서 비슷한 결과를 보였다.

표 5. 고무추출 방법에 따른 추출 효율 비교

Overnight soaking method			
sample(g)	rubber(%/g)		
	1번 sample	2번 sample	3번 sample
5g	4.8	4.4	5.4
2g	4.5	5.0	5.0
1g	4.0	4.0	5.0
Soxlet			
sample(g)	rubber(%/g)		
	1번 sample	2번 sample	3번 sample
5g	3.2	3.2	3.4
2g	5.0	5.0	4.5
1g	8.0	6.0	5.0

○ 그라인딩 된 뿌리 사이즈에 따라 고무추출 효율이 달라 질 것이라 예상하고 뿌리 사이즈를 달리 하여 고무를 추출하였다. 실험방법은 overnight soaking 방법을 이용하여 실험을 진행하였다. 뿌리는 총 3가지 형태로 그라인딩하였고, 가장고운가루만 실험용 그라인더를 이용하였고, 나머지는 주방용 그라인더를 이용하여 그라인딩 하였다. 실험결과 뿌리 사이즈가 작을수록 고무추출 효율이 높아지는 것을 확인 하였다.

그림 23. 실험용 그라인더를 이용한 러시안 민들레 뿌리 가루

표 6. 그라인딩 된 뿌리 사이즈에 따른 고무추출 효율

Sample type	powder	semi fine powder	fine powder
Rubber (5/g)	5.0	7.5	9.5

○ 뿌리와 cyclohexane 비율 및 처리 온도에 따른 고무추출 효율을 분석하였다. 뿌리는 4g을 이용하였고 뿌리 g당 cyclohexane 비율은 각각 1:10, 1:20으로 설정하였다. 24시간동안의 shaking은 각각 25℃, 50℃에서 RPM150으로 섞어주었으며, 용매의 증발을 막기 위해 호일로 감싼 후 실험을 진행하였다. 뿌리와 cyclohexane의 비율에 따른 고무추출 효율을 비교하였을 때 1 : 10의 비율에서는 약 8%의 효율을 보였으며, 1 : 20의 비율에서는 약 6%의 효율로 1 : 10의 비율에서 더 좋은 고무추출효율을 보였다. 반면에 온도는 고무 추출 효율에 큰 영향을 미치지 않는 것으로 나타났다.

표 7. 용매의 비율과 처리 온도에 따른 고무추출 효율

RT		50℃	
sample:cyclohexane	Rubber(g)/root(4g)	sample:cyclohexane	Rubber(g)/root(4g)
1:10 -1	0.31	1:10 -1	0.31
1:10 -2	0.31	1:10 -2	0.32
1:20 -1	0.26	1:20 -1	0.24
1:20 -2	0.22	1:20 -2	0.21

제 14 절 러시안 민들레에서 추출한 천연고무의 물리 화학적 특성분석

1. 지하 바이오매스 대량 확보 및 천연고무 추출

○ 지하 바이오매스 대량 확보

– 위탁연구기관 하우스 내 토양에서 재배된 러시아 민들레를 수확(여름 1회, 가을 1회)

그림 24. 러시아민들레 대량 확보

○ 천연고무 추출

- 방법 1 : Soxhlet extraction으로 천연고무 추출
- 방법 2 : 민들레 뿌리를 미세분쇄 후 Cyclohexane으로 녹이고, Cyclohexane의 2배 아세톤을 첨가하여 고무를 침전시켜 고무 추출물을 얻음

Soxhlet extraction　　민들레 뿌리 미세 분쇄를 통한 추출

그림 25. 천연고무 추출

2. 추출 천연고무 물성 특성분석

Heava 고무나무에서 추출 된 천연고무 대비 러시아 민들레에서 추출 된 천연고무를 KS 배합에 의해 칭량 후 혼련공정을 거쳐 KS M 6518(가황고무 물리 시험방법)따라 시험을 진행하였다.

○ 재료

본 연구에 사용된 배합 조성표는 Table 1에 나타내었다. Heave 고무나무에서 추출된 천연고무 Grade는 SPR#20를 사용하였으며, 카본블랙은 N330(HAF)을 사용하였다.

황 가류를 위하여 촉진제로서는 CBS(N-Cyclohexyl-2benzothiazole sulfenamide)와 황(Sulfur)을 사용하였다. 산화아연, 스테아린산, 오일은 동일하게 적용하였다.

표 8.

NO	재료명/배합번호	천연고무 SPR #20	민들레에서 천연고무 추출분
1	SPR 20	100.0	
2	민들레 내 천연고무 추출분		100.0
3			
4	Stearic Acid	3.0	3.0
5	ZnO	5.0	5.0
6	A-2	4.0	4.0
7	C/B HAF	50.0	50.0
8			
9	Acc.CZ	1.00	1.00
10	S	3.00	3.00
합　계		166.0	166.0

○ 칭량 및 소련/혼련 작업, 시편제조

소련(mastication)은 기계적인 전단력으로 고무 분자쇄를 절단 또는 쇄상 분자의 상호 얽힘을 풀어 분자량을 저하 시키는 작업으로서, 천연고무는 분자량이 크고 일정하지 않으므로 3분 이상 충분히 진행하였다.

혼련공정은 배합제를 원료고무중에 균일하게 분산시키는 작업으로서 Brabender OHG社 시험용 Internal Mix를 이용하여 배합제의 첨가순서 및 시간을 동일하게 적용하여 시험을 진행하였다.

혼련특성은 일반적으로 소요전력과 혼련시간과의 관계로부터 얻을 수 있다. 고무나무에서 추출된 천연고무와 민들레에서 추출된 천연고무를 동일한 믹싱 시간에서 작업시 시험용 Mix의 Torque와 온도 값이 유사함을 확인 할 수 있었다.

○ 물성시험

– 미가황고무 시험

: ASTM D1646에 따라 무늬점도 시험결과 Heava 고무나무 무늬점도는 50, 민들레 추출분 천연고무의 무늬점도는 49로 가공성이 유사한 수준임 확인

: 가황곡선을 이용한 가황상태 분석 결과, 최대 토크값은 유사한 수준이며 스코치 특성은 민들레 추출분 천연고무의 스코치 거동이 빨라지는 것으로 확인 됨

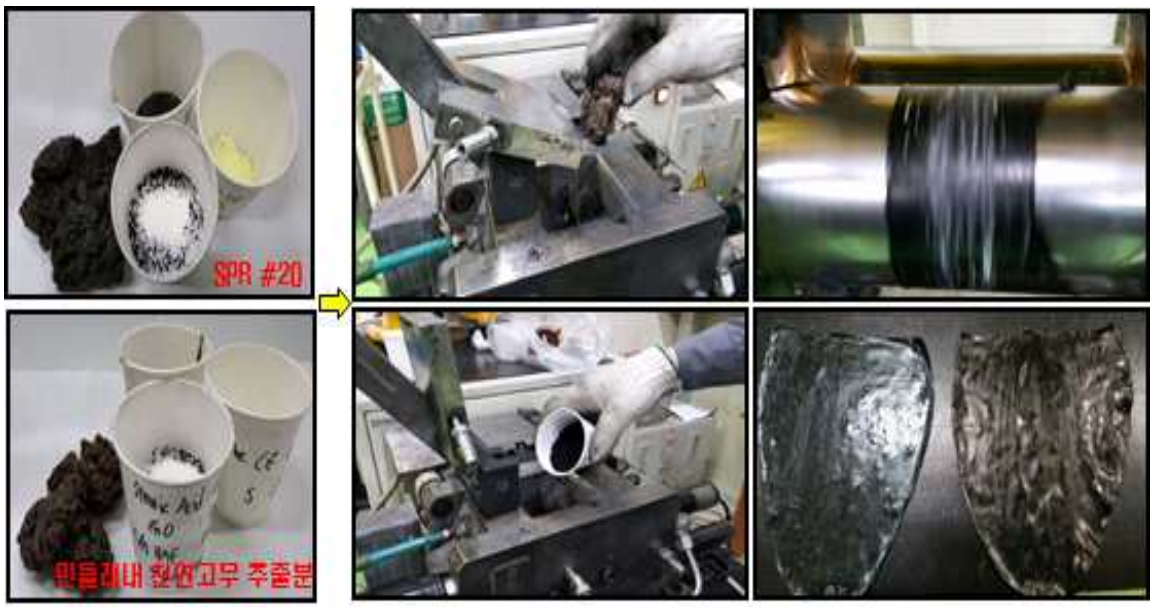


그림 26. 천연고무 소련 및 혼련 Process flow

→스코치 특성이 다른 원인으로는 고무 가공 & 추출방법 및 저장 시기의 차이로 추정 됨

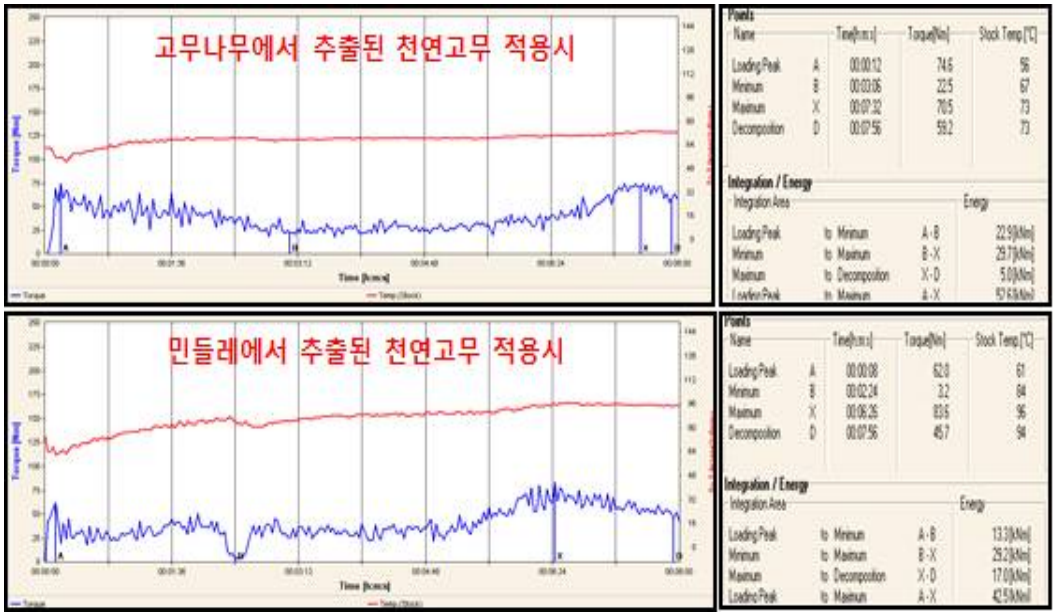


그림 27. 혼련 작업시 Mixer Torque 및 Temperature

– 가황고무 시험

: KS M 6518 (가황고무 물리 시험방법)에 따라 가황고무 물성 시험 결과 경도는 추출분 천연고무의 경도가 3(Shore A) 높음

: 인장강도(kg/cm^2), 신장율(%), 내마모성을 종합적으로 비교하면 고무나무 추출분 천연고무 대비 민들레 추출분 천연고무의 가황고무 물성은 90% 수준으로 확인된다. 물성 시험 결과는 Figure6에 나타내었다.

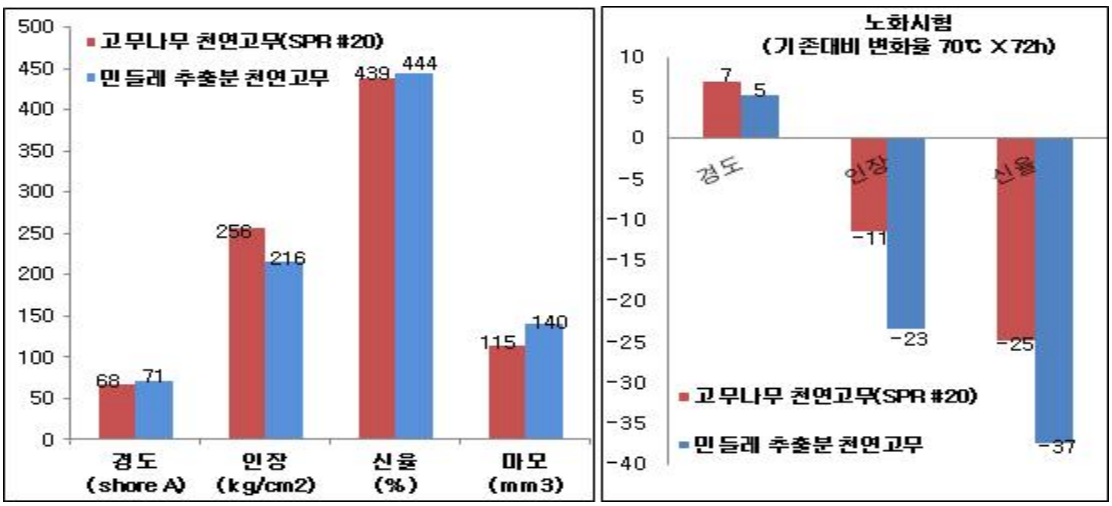
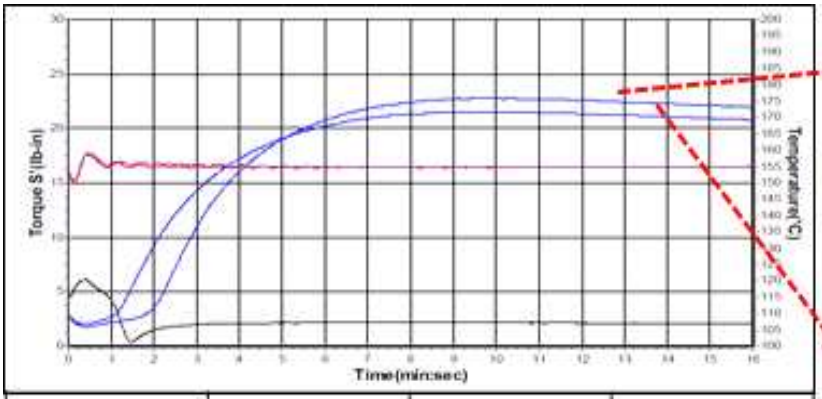


그림 28. 추출 천연고무의 Cure-meter 비교

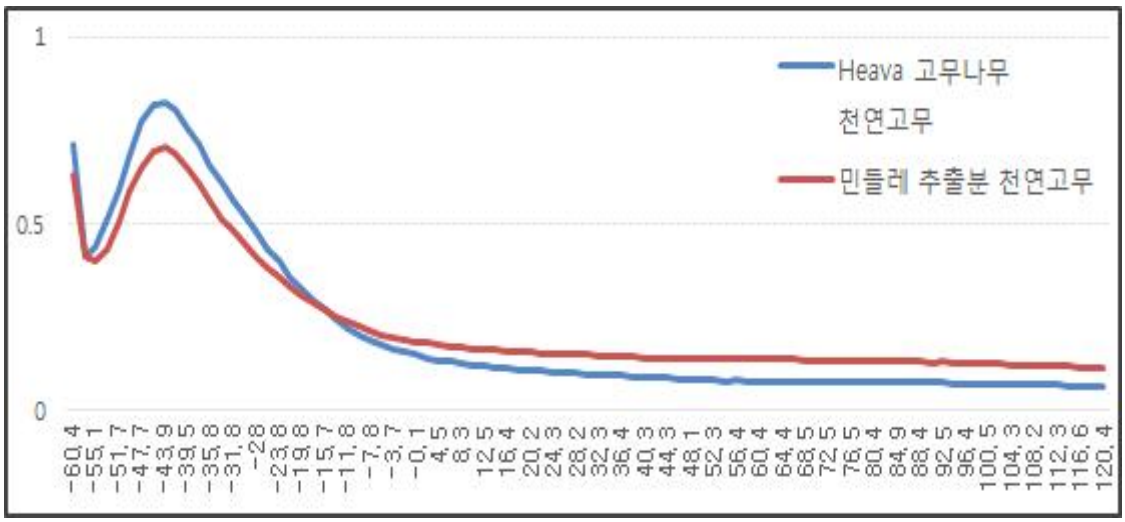


		Heava 고무나무	민들레 추출분
Rheometer (155℃×16분)	t_{10}(min:sec)	2:03	1:17
	t_{90}(min:sec)	5:55	5:19
	ML(lb·In)	1.78	2.08
	MH(lb·In)	22.76	21.52

그림 29. 추출 천연고무의 가황고무 물성 비교

- Dynamic Mechanical Properties

고무의 기계적 물성은 높은 온도에서 약해지기 때문에 열 발생이 적은 Polymer 사용이 바람직하다. GABO사 EPLEXOR 150N 점탄성 시험기를 이용하여 Dynamic Mechanical Properties 시험결과 민들레 추출분 천연고무가 고무나무 추출분 천연고무 대비 발열 특성이 10% 이상 저하 됨을 확인 할 수 있었다. 민들레 추출분 천연고무의 동특성능 향상을 위해서는 가교제 함량 증량 외 방법으로 가교제 변경이 필요해 보인다.



* 분석 온도범위 : -40℃ ~ 120℃, Means. frequency : 10Hz
* Stat. Load = 2%, 90N(Max.force), Dyn. Load = 0.1%, 60N(Max.force)

그림 30. 추출 천연고무의 Dynamic Mechanical Properties 비교

제 4 장 목표달성도 및 관련분야에서의 기여도

1. 목표달성도

세부연구내용	달성도(%)	연구범위
□ Hevea Latex 채취 및 고무입자 분리	100	○캄보디아에서 재배하는 고무나무 줄기에 상처를 내고 흘러나오는 latex를 수집하여 Latex에서 고무 입자를 분리하였다
□ 고무입자 천연고무 생합성 관련 단백질 분리 및 활성 측정	100	○Rubber particles(고무입자)에 붙어있는 단백질을 분리한 후 천연고무 합성 활성 정도를 측정하였다.
□ Latex RNA sequencing 및 Transcriptome 분석	100	○Latex에서 발현하는 RNA를 NGS sequencing 하여 전사체 분석을 실시하였다.
□ 전사체 분석을 통한 고무생합성 관련 유전자군 분리 및 발현양상	100	○전사체분석을 통하여 고무 생합성 관련 유전자들을 모두 분리하여 NCBI에 등록하였다.
□ 고무 생합성 후보 유전자 전체 서열 cloning 및 재조합 단백질 생산	100	○고무 생합성 후보 유전자 전체 서열을 RNA seq data에서 찾아내어 cloning하고 E. coli와 Yeast에서 재조합 단백질을 발현시켰다.
□ 고무 생합성 후보 단백질의 활성 검정과 특허출원	100	○고무 생합성 후보 단백질을 고무입자에서 immuno- precipitation하여 고무 생합성 활성을 검정한 후 특허 출원을 하였다.
□ 고무 생합성 유전자 promoter sequence cloning	100	○고무 생합성 유전자 프로모터 sequence를 cloning 하였다.
□ 유전자 도입 민들레 형질전환체 제조	90	○민들레 종류에 여러가지 유용 유전자를 도입하여 형질전환체 제조하였다.
□ 지하부 biomass 생산을 위한 러시안 민들레 재배개술 개발	100	○러시안민들레 대량재배 기술개발을 위탁과제와 협력 수행하였다.
□ 러시안 민들레에서 추출한 천연고무의 물리화학적 특성 분석	100	○러시안 민들레에서 추출한 고무의 물리 화학적 특성 분석을 실시하였다.

2. 관련분야에 대한 기여도

본 과제의 성공적인 수행은 현재 천연고무 국내 수입량 연간 1.2조원 (08년)에 대한 일부의 수입대체 효과를 가져 올 것으로 기대된다. 뿐만아니라 천연고무 생산 민들레를 국내 재배생산을 함으로서 농가 소득증대에 기여할 수 있을 것이다. 고갈되어 가고 있는 석유자원을 보존함과 동시에 이에서 만드는 합성고무를 줄임으로서 전 세계적으로 주안점을 두고 있는 이산화탄소 배출 억제효과를 가져와 저탄소 녹색성장을 이룩할 수 있을 것이다.

제 5 장 연구개발 성과 및 성과활용 계획

제 1 절 연구성과 실용화.산업화 계획

연구성과물을 국내 고무회사인 디알비동일(주)에서 인수하기로 하였으며 이를 위하여 양 기관간 MOU를 체결하였다. 이를 위하여 원천기술을 공동개발하였으며 또한 유용 유전자 도입 형질전환체를 제조할 것이며 러시안민들레 유래 천연고무의 품질평가 및 재배기술 관련 연구를 실용화를 위하여 지속적인 연구를 수행할 것이다. 2018년 안에 실용화 작업을 착수할 수 있을 것으로 예상된다.

제 2 절 기술확산/지식재산권 확보 계획

1. 유용성이 매우 높은 천연고무 유전자들에 대한 특허권을 확보하였으므로 이러한 유전자들을 품종개발에 활용할 계획이다.
2. 천연고무를 민들레에서 생산하여 수입의존도를 줄이고 현 천연고무 작물 *Hevea*의 allergy 유발 결점을 보완하는 고부가가치 무-알레르기 천연고무의 생산에 활용할 계획이다.
3. 민들레 천연고무의 특성분석을 통하여 확립된 기초정보 및 기반기술이 민들레에서 생산한 천연고무의 실용화 공정기술 개발에 초석으로 활용될 것이다.
4. 고무 생합성 핵심 유전자 규명은 천연고무 대체작물 개발에 선두우위를 점하게 하며 특허 실시권을 수출할 수 있을 것으로 예상된다.

제 3 절 추가연구, 타 연구에 활용 계획

1. 향후 GM민들레의 품종화를 위하여 야외재배인증을 위한 LMO 안전성평가를 수행할 것이다.
2. 개발된 고무 중합효소의 단백질 효소 연구 와 유전자 기능의 추가 연구를 통해 고무 중합 합성에 관여하는 증거확보를 위한 연구를 수행할 것이다.
3. 고무 생합성의 관련 효소 유전자, Pep16 이외의 유전자를 발굴하는 연구를 수행할 것이다.
4. 개발된 유전자에 의해 고무 합성의 증가가 확인 되면 해당 유전자를 고무나무나 러시아 민들레에 형질전환 하는 연구를 수행할 것이다.

제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술정보

1. 전 세계의 최대 천연고무 생산지인 동남아시아에서 고무나무들이 균에 감염되어 고무생산이 갑자기 중단될 우려가 있어 주요 소비국가인 서구라파 및 일본 중국 한국 등은 고무나무 대신 러시아 민들레와 같은 다른 자원으로부터의 고무를 생산하는 연구를 진행하고 있다.

2. 브리지스톤 코퍼레이션과 굿이어타이어는 고품질의 천연고무를 생산하는 상업적으로 이용가능한 재생 자원이자 파라 고무나무를 대체하는 자원으로 과율레(Guayule)을 개발하기 위한 광범위한 연구 프로젝트에 대한 계획을 발표하였다.

4. DuPont사도 수년간 천연고무 생합성 유전자를 규명하고자 대규모 투자를 하였으나 결국은 실패하고 그만 두었다. 한편 DuPont는 발효를 통해 고분자 물질을 생산할 수 있는 미생물을 개발하여 폴리하이드록시알카노에이트 (PHA)라는 폴리에스터가 플라스틱에서 고무에 이르는 여러 성질을 가진 고분자를 생산하는 연구를 수행하여 상업용 생산을 추진하고 있다.

5. EU 연합은 덴마크 독일 등 EU 고무연구 연합팀에 고무 대체작물 개발에 연 100억씩 5년간 지원하였다.

제 7 장　연구시설·장비현황

1. 식물항온생장실 : 연구동 옥상
2. 식물온실 개조 : 온실동 온도조절 환풍기 설치
3. 천연고무 분자량 측정기 구비 : HPLC-GPC system 구비
4. 식물재배 비닐하우스 설치 : 전남 순창 마이크로프랜츠(주)

제 8 장 연구실 안전관리 이행실적

연구실 안전관리에 필요한 안전마스크 응급처치구 장갑 안면보호대 등을 구입 비치하였다.

제 9 장 참고문헌

Bae T.W, Park H.R., Kwak Y.S., Lee H.Y. and Ryu S.B. (2005) Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of a medicinal plant *Taraxacum platycarpum.* Plant Cell Tissue Organ Cult. 80:51-57

Bernardo M. T. da Costa, Jay D. Keasling, and Katrina Cornish (2005) Regulation of Rubber Biosynthetic Rate and Molecular Weight in Hevea brasiliensis by Metal Cofactor. Biomacromolecules 6: 279-289

van beilen J.B and Poirier Y. (2007) Establishment of new crops for the production of natural rubber.Trends Biotechnol.25(11):522-529

Hayashi Y. (2009) Production of natural rubber from para rubber tree. Plant Biotechnol. 26:67-70

Sando T, Hayashi T, Takeda T, Akiyama Y, Nakazawa Y, Fukusaki E, Kobayashi A. 2009. Histochemical study of detailed laticifer structure and rubber biosynthesis-related protein localization in Hevea brasiliensis using spectral confocal laser scanning microscopy. Planta 230:215-225

Wahler, D., Gronover, C.S., Richter, C., Foucu, F., Twyman, R.M., Moerschbacher, B.M., Fischer, R., Muth, J., Prufer, D., 2009. Polyphenoloxidase silencing affects latex coagulation in Taraxacumspecies. Plant physiol. 151:334-346.

Beck, G., Coman, D., Herren, E., Ruiz-Sola, M.A., Rodriguez-Concepcion, M., Gruissem, W. and Vranova, E. (2013) Characterization of the GGPP synthase gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Plant molecular biology* **82**, 393-416.

Regnault, T., Daviere, J.M., Heintz, D., Lange, T. and Achard, P. (2014) The gibberellin biosynthetic genes AtKAO1 and AtKAO2 have overlapping roles throughout Arabidopsis development. *The Plant journal : for cell and molecular biology* **80**, 462-474.

〈 특허, 논문 및 시장분석 〉

1. 본 연구와 관련된 기술의 국내외 수준 비교

기술명	관련기술 최고보유국	현재 기술수준		기술개발 목표수준	비고
		우리나라 관련기술수준	연구사업단 보유기술수준		
(기술 1) - 세부기술1-1 MeOH 처리로 천연고무 함량 증가 - 세부기술1-2 - 세부기술1-3	미국	90	90	현재 기술의 실용화 /상용화 목표	
(기술 2) - 세부기술2-1 Latex-specific promoter 발굴 - 세부기술2-2 - 세부기술2-3	한국	100	100	현재 기술의 실용화 /상용화 목표	
(기술 3) - 세부기술3-1 고무 생합성 유전자 / 단백질 - 세부기술3-2 - 세부기술3-3	한국	100	100	현재 기술의 실용화 /상용화 목표	

1) 기술명은 본 연구사업단과 관련(기보유기술 또는 향후 개발예정기술)된 기술을 기재
2) 현재 기술수준은 세계최고수준을 100%으로 할 때 우리나라 및 신청한 연구사업단의 기술수준 표시
3) 기술개발 목표수준은 연구사업단 종료시의 기술수준을 세계최고수준(100%) 대비 목표로 제시
4) 부가설명이 필요한 경우 비고란에 작성

2. 특허조사분석

가. 특허조사분석 범위

대상국가	*국내, 국외(미국, 일본, 유럽)*
특허DB	*특허정보원(www.kipris.or.k), 국제특허청(www.wipo.int), 미국특허청(www.uspto.gov)등*
검색기간	*19880101 ~20141231*
검색범위	((rubber) and (synthesis or biosynthesis or polymerization)) and (gene or promoter)

※ 특허조사·분석시 활용하였던 특허정보이용과 관련된 내용을 기재

나. 특허 조사·분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

기술명		(기술 1)	(기술 2)	(기술 3)
Keyword		((고무 or rubber) and (합성 or 생성 or 생합성 or 중합 or synthesis or biosynthesis or polymerization)) and (유전자 or 프로모터 or gene or promoter)	((rubber) and (synthesis or biosynthesis or polymerization)) and (gene or promoter)	
검색건수		111	574	
유효특허건수		11	84	
핵심특허 및 관련성	특허명	파라고무나무 유래의 라텍스 분비 조직 특이적 SRPP 프로모터 및 이의 용도	A DNA FRAGMENT ENCODING A RUBBER POLYMERASE AND ITS RELATED PRODUCTS	
	보유국	한국	미국	
	등록년도	2011	1990	
	관련성(%)	50	80	
	유사점	Latex-specific promoter	고무중합효소로 동정함	
	차이점		고무중합효소가 아닌 것으로 판명됨	
핵심특허 및 관련성	특허명			
	보유국			
	등록년도			
	관련성(%)			
	유사점			
	차이점			
핵심특허 및 관련성	특허명			
	보유국			
	등록년도			
	관련성(%)			
	유사점			
	차이점			

1) 기술명은 본 연구사업단과 관련(기보유기술 또는 향후 개발예정기술)된 기술을 기재
2) keyword는 검색어를 의미하며, 검색건수는 keyword에 의한 총검색건수를, 유효특허건수는 검색한 특허 중 연구사업단 관련기술과 관련성이 높은 특허를 의미
3) 기존특허는 검색된 특허중 연구사업단 관련기술과의 관련성이 높고 인용도가 높은 상위 3개 특허를 기준으로 작성

3. 논문분석

가. 논문분석 범위

대상국가	*한국,미국, 일본, 유럽*
논문 DB	*국회도서관(www.nanet.go.kr), Pubmed(www.pubmed.gov)등 논문DB*
검색기간	*(예시)19880101 ~ 20071231*
검색범위	(rubber OR biomass OR yield) AND (increase OR effect) AND (methanol OR meoh)

나. 논문분석에 따른 본 연구과제와의 관련성

기술명		*(기술 1)*	*(기술 2)*	*(기술 3)*
Keyword		rubber production	cis-prenyltransferase	
검색건수		285		
유효논문건수		124		
핵심논문 및 관련성	논문명	Effect of time and Foliar Sparying by Methanol on Growth and Yield of Cowpea (*Vigna unguiculata*)	Laticifer-specific cis-prenyltransferase silencing affects the rubber, triterpene, and inulin content of Taraxacum brevicorniculatum	
	학술지명	Middle-East Journal of Scientific Research	Plant Physiology	
	저 자	MJ Paskiabi	Post J et al	
	게재년도	2011	2012	
	관련성(%)	90%	80%	
	유사점	메탄올처리에 의한 biomass증가	고무중합효소 후보 중의 하나임	
	차이점	민들레가 아닌 동부로 연구, 고무함량은 연구하지 않음.	고무를 만드는 중합효소 증거가 거의 없음	
핵심논문 및 관련성	논문명			
	학술지명			
	저 자			
	게재년도			
	관련성(%)			
	유사점			
	차이점			
핵심논문 및 관련성	논문명			
	학술지명			
	저 자			
	게재년도			
	관련성(%)			
	유사점			
	차이점			

4. 제품 및 시장 분석

가. 생산 및 시장현황

1) 국내 제품생산 및 시장 현황

○ 국내에서 러시안 민들레 생산 천연고무 재배관련 제품은 전무한 실정이다.

2) 국외 제품생산 및 시장 현황

○ 러시안 민들레와 같이 특용작물에 대한 기능성 향상 제품은 실례가 매우 적다.

그러므로 시장을 개척하면 매우 클 것으로 예상된다.

나. 연구사업단 보유(활용)기술의 산업화 계획 및 기대효과

1) 산업화·제품화 계획(제품의 특징, 대상 등)

○ 고효율 고무생산 GM 작물 개발에 활용

○ in vitro 바이오고무 생산 기술개발에 활용

2) 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

산업화 기준 / 항 목	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	1,700 (1%)	5,100 (3%)	8,500 (5%)	8,500 (5%)	8,500 (5%)	22,300
경제적 파급효과	850	7,550	9,250	9,250	9,250	11,150
부가가치 창출액	,300	30,000	66,700	66,700	66,700	533,400
합계	2,350	42,650	74,450	74,450	74,450	666,850

※ 직접 경제효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 제품의 매출액 추정치
※ 경제적 파급효과 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통한 농가소득효과, 비용절감효과 등 추정치
※ 부가가치 창출액 : 본 연구과제 개발기술의 산업화를 통해 기대되는 수출효과, 브랜드가치 등 추정치

5. 3P(특허,논문,제품)분석결과 및 연구사업단 사업내에서의 활용

가. 특허분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

○ 기존 특허는 고무 추출공정 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 유용유전자 확보 방향으로 연구를 추진하여 고무중합효소 특허 등을 국내 및 국외에 출원할 계획임

나. 논문분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

○ 기존 논문은 부차적인 유전자 기능 분야에 치중되어 있으므로, 본 연구과제에서는 고무중합효소 활성 기작 방향으로 연구를 추진하여 고무중합효소 규명 논문 등을 주요 학술지 등에 게재할 계획임

다. 제품·시장분석 및 향후 활용(연계 및 추가연구 등)

○ 국내 및 국외시장 분석결과 합성고무 제품 등의 생산 및 판매가 이루어지고 있으나, 현재 석유자원의 고갈로 한계점에 접어들었으므로, 본 연구과제에서는 천연고무 생산기술개발 방향으로 연구를 추진하여 천연고무 제품 등을 생산하여 국내 및 국외에 판매할 계획임

편집순서 8

주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 '생명산업기술개발사업'의 연구 보고서입니다.

2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 '생명산업기술개발사업'의 연구결과임을 밝혀야 합니다.

3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.