

국내 연안산 질소고정 단세포 남세균 종주의 광생물학적 수소생산력

박종우*, 명금옥*, 이원호*[†]

*군산대학교 해양학과

Photobiological Hydrogen Production by Korean N₂-fixing Unicellular Cyanobacterial Strains

JONGWOO PARK*, GEUMOG MYUNG*, WONHO YIH*[†]

*Department of Oceanography, Kunsan National Univ., San 68, Miryong-dong,
Kunsan 573-701, Korea

ABSTRACT

Photobiological hydrogen production by nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria has long been considered to be an environmentally sound and very promising method for the future supply of renewable clean energy. We tried to find out the optimum cell concentration for H₂ production in each of the two new Korean nitrogen-fixing unicellular cyanobacterial strains to compare with *Synechococcus* sp. strain Miami BG043511. The two Korean strains, *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-031 and KNU CB MAL-058, were isolated from Korean west coasts. Cell concentrations up to 17 billion cells ml⁻¹ were applied to the tests. High cell concentration over 15 billion cells ml⁻¹ resulted in drastically reduced H₂ production in all the three strains. The two domestic strains, however, produced 2-3 time more hydrogen than *Synechococcus* sp. Miami BG043511 at cell concentrations of 5-10 billion cells ml⁻¹. At lower cell concentrations than 2 billion cells ml⁻¹, MAL-031 exhibited highest H₂ production followed by Miami BG043511, with far less production in MAL-058. Present result suggests that *Cyanothece* sp. MAL-CB031 might be one of the ideal nitrogen-fixing unicellular cyanobacterial strains for the photobiological hydrogen production.

KEY WORDS : Photobiological hydrogen production(광생물학적 수소생산), Unicellular marine cyanobacteria (단세포 해양 남세균), Strain specificity(종주 특이성), N₂-fixation(질소고정), *Synechococcus* sp. Miami BG043511

1. 서 론

태양에너지를 전환하여 수소에너지를 생산하는

방법 가운데 해양미생물을 이용한 수소생산 연구⁷⁾는 미래 가능성이 큰 분야이다⁴⁾. 이 중 해양 남세균을 이용한 광생물학적 수소생산 연구는 녹색기술을 응용한 청정에너지 생산을 지향하고 있으며, 1970 년대에 본격적으로 시작된 분야이다¹²⁾. 우리나라에

[†]Corresponding author : ywonho@kunsan.ac.kr

[접수일 : 2010.2.19 수정일 : 2010.4.7 게재확정일 : 2010.4.20]

서는 남세균 종주를 이용한 수소생산 연구가 1990 년대에 시작 되었으나⁵⁾ 생산성이 높은 종주를 확보 하고 이 종주를 이용하여 최적 수소생산 조건을 탐색하는 등의 기반 구축이 절실한 단계에 있다¹⁻³⁾.

본 연구진은 국내 연안산 남세균 종주를 확보하여, 다양한 배양환경 조건에서 최적 수소생산 능력을 연구하고 있다^{1,2,15)}. 본 연구는 최적 수소생산 능력 비교실험의 하나로서 수소생산능이 우수한 종주인 미국의 *Synechococcus* sp. Miami BG043511 과 국내종주들의 최적 수소생산을 나타내는 적정 세포 농도를 확인하기 위하여 수행되었다³⁾.

실험에 적용한 세포농도 범위에서 실험종주들은 저농도에서 고농도로 갈수록 단위 수소생산량이 높게 나타났으나, 적용한 최고 농도에서는 self shading 효과로 인해 급격히 낮아지는 특성을 나타내었다. 세포 구간별 최대 수소생산능의 확인 및 각 종주별 최대 수소생산력을 나타내는 세포농도를 논의하고, 특정농도에서 3종주간의 수소생산력을 비교하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 실험종주

Fig. 1의 *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-031과 미동정 남세균 KNU CB MAL-058은 각각 2006년 6월 및 2006년 10월, 서해안의 가로림만에서 채수하여 단세포 분리⁸⁾ 통해 종주 배양에 성공하여 계대배양 관리중인 국내 종주이다. *Synechococcus* sp. Miami BG043511은 1981년 카리브해의 Bahama Island에서 Maiami 대학교의 Akira Mitsui 교수 연구팀이 분리한 종주이다^{10,12)}.

2.2 실험방법

일반배양 : 30psu의 f/2+BGER 배양액에 종주를 접종 후 필터한 공기를 배양액에 연속 공급하였다. $100\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 연속 광, 20°C의 온도에 세 종주 모두 고농도 세포 농도가 될 수 있도록 배양하였다. f/2+BGER 배지는 식물플랑크톤이 성장하는데 필요한 영양염을 멸균해수에 정량 주입하여 만든 영양배

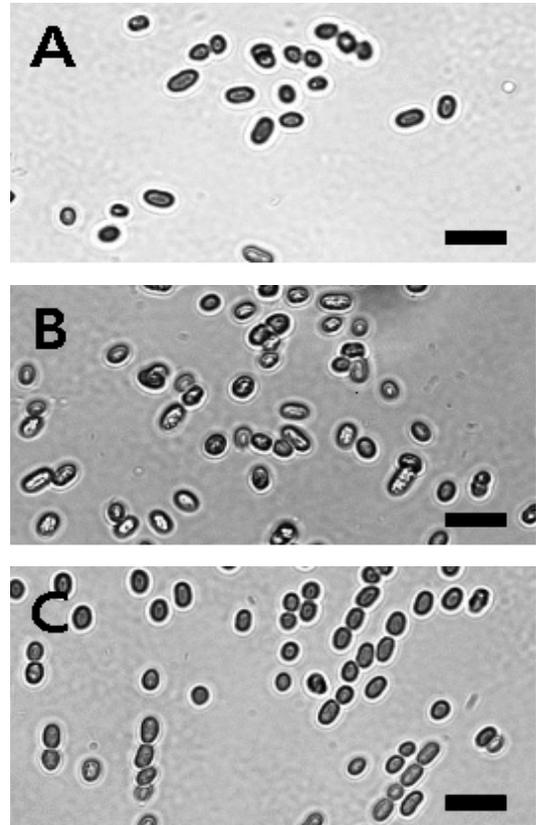


Fig. 1 Experimental strains. A : *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-031, B : unidentified cyanobacterium KNU CB MAL-058, C : *Synechococcus* sp. Miami BG043511. scale bar = 10 μm .

지이며, 화학적 조성은 Table 1과 같다. 동조화 배양에는 질소계 이온인 NaNO_3 를 첨가하지 않은 f/2+BGER-N 배양액을 사용하였다⁸⁾.

동조화 배양 : 일반배양 후, 세포 동조화를 통해 수소생산 효율을 높이고자 광조건 및 영양염 농도(N 성분 제외)를 조절하여 실험배양을 실시하였다^{9,13)}. 세포동조화는 세포의 주기시점을 일치화시키는 것이며, 일반배양을 통해 고농도로 성장한 배양체를 원심 분리하여 pellet을 획득하였다. 농축된 배양체를 30psu의 f/2+BGER-N 배양액에 접종하여, 3일간 $100\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 20°C 온도와 낮과 밤의 분리 상태를 만들어 주기 위해 14:10 light/dark cycle을 적용한 조건에서 배양하여 Fig. 2와 같이 세포 동조화 시스템을 구축하였다.

Table 1 Addition to basal seawater for the modified f/2+BGER medium

Reagents		Molarity
f/2 medium	NaNO ₃	8.8×10^{-4}
	NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	3.6×10^{-5}
	Na ₂ EDTA	1.2×10^{-5}
	F-EDTA	1.17×10^{-5}
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8×10^{-5}
	MnCl ₂ ·6H ₂ O	9×10^{-7}
	CoCl ₂ ·6H ₂ O	5×10^{-8}
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	4×10^{-8}
	Vitamin B12	3.7×10^{-10}
	Thiamin HCl	3×10^{-7}
	Biotin	2×10^{-9}
BGER trace	H ₃ BO ₃	1.6×10^{-6}
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	4.6×10^{-5}
	Citric acid	3.1×10^{-5}
	Tris	1×10^{-3}

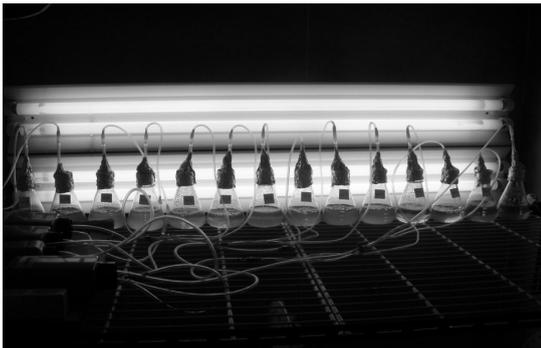


Fig. 2 Experimental setting for synchronization.

2.3 수소생산 측정

동조화 처리한 배양체를 원심 분리하여 pellet을 채 회석하여, 고농도의 실험 배양체를 준비하였으며, hemocytometer를 통해 광학현미경 하에서 초기점종 농도를 계수하였다. 실험 세포농도는 본 연구진의 기존 연구를 통해 수소생산 효율이 높게 나타났던 구간인 $1 \times 10^8 \text{ cells ml}^{-1}$ 이상으로 조절하여, 25ml의 Fern-Bach flask에 배양체를 3ml씩 넣고 고무마개로 밀봉하였다.



Fig. 3 Experimental setting for H₂ photo-production.

수소생산 조건을 만들기 위해 flask 안의 기체를 고순도 질소개스로 완전 치환하였다. 수소생산 실험은 온도 20°C 및 $350 \mu\text{E m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ 의 연속 광 환경에서 Fig. 3과 같은 시스템을 구성하여 수행하였다. 배양 5일 동안 0, 12, 24, 36, 48, 72, 96 시간대에 수소생산 누적량을 gas chromatograph(SRI-8610C)로 측정하였다.

3. 결과 및 토의

Fig. 4의 결과자료를 보면, 세포농도 $1 \sim 4 \times 10^8 \text{ cells ml}^{-1}$ 의 저농도 구간에서 평균 최대 수소생산량은 BG043511 0.46, CB031 0.52 및 CB058 0.28ml H₂/ml suspension으로 3종주의 전체 평균값인 0.42에 비해 BG043511과 CB031에서 높은 편이었다. $5 \sim 10 \times 10^8 \text{ cells ml}^{-1}$ 의 중농도 구간에서 BG043511 0.68, CB031 1.85 및 CB058 1.35ml H₂/ml suspension의 평균 최대 수소생산량을 보여, 총 평균 수소생산량에 비해 CB031과 CB058이 약간 우세한 결과를 보였다. 고농도 세포농도 구간인 $11 \sim 17 \times 10^8 \text{ cells ml}^{-1}$ 에서 평균 수소생산량은 BG043511 1.16, CB031 0.89ml/ml suspension 및 CB058 무검출 등으로, 세포농도별 수소생산 우세구간이 종주 간에 서로 다르게 나타났다.

전체 세포농도 구간에서 각 종주의 ml suspension 당 평균 수소생산량은 BG043511이 0.76, CB031이 1.09, CB058이 0.54ml로 나타났다. 각 종주 별 ml suspension 당 수소생산량을 $1 \times 10^8 \text{ cells ml}^{-1}$ 단위의

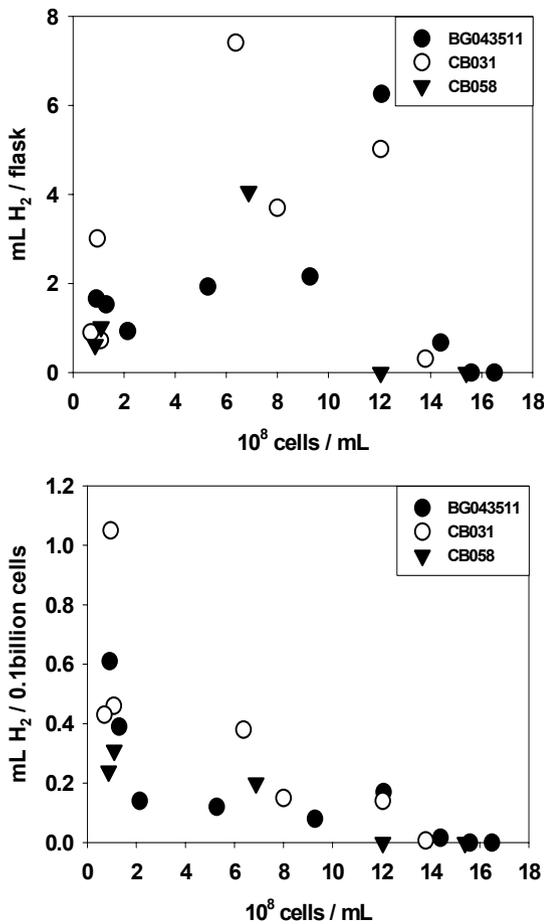


Fig. 4 H₂ production yield at all cell concentrations.

수소생산력으로 환산하였을 때, 세포농도가 낮을수록 수소생산력이 높아지는 결과를 보였다. 또한 BG043511과 CB031 두 종주는 15×10⁸cells ml⁻¹ 이상을 제외한 전체 세포 농도 구간에서 수소생산능이 확인된 반면, CB058종주는 10×10⁸cells ml⁻¹ 이상의 구간에서 수소생산능을 보이지 않았다.

Fig. 4에서 나타난 결과로부터 우수 수소생산 남세균 종주 BG043511은 15×10⁸cells ml⁻¹ 이상 구간을 제외한 전 세포 구간에서 수소생산능을 보였으며 특히 12.1×10⁸cells ml⁻¹에서 최대 수소생산량 2.09ml H₂/ml suspension을 나타냄을 알 수 있다. 전 구간의 수소생산 비율을 확인해 볼 때 약 1~13×10⁸cells ml⁻¹사이에서 수소생산이 가능하며, 특히 세포 당

수소생산 효율을 비교했을 시 1~4×10⁸cells ml⁻¹의 저농도 구간에서 높은 수소생산 효율을 확인할 수 있었다. 전 세포구간에서 최대 수소생산량 비교 시, 이 종주는 7~13×10⁸cells ml⁻¹ 사이가 수소생산 최적의 구간이라 할 수 있겠다.

국내종주 중 CB031 종주는 CB058 종주에 비해 전 세포농도 구간에서 우월한 수소생산능을 보였으며, 특히 6.4×10⁸cells ml⁻¹에서 최대 수소생산량 2.47ml H₂/ml suspension을 나타냈다(Fig. 4). CB031종주는 저농도 구간에서 세포 당 높은 수소생산 효율을 보였으나, 최적의 수소생산 세포농도 구간은 중농도 구간에서 고농도 구간에 이르는 구간, 약 6~13×10⁸cells ml⁻¹ 구간이라고 생각된다. 특히 저농도 구간에서 세포 당 수소생산 효율은 BG043511을 능가하는 값을 보임으로써 저농도 구간에서 세포 당 광에 대한 효율성이 높을 것으로 유추된다. Fig. 4에서, CB058종주는 6.9×10⁸cells ml⁻¹에서 최대 수소생산량 1.35ml H₂/ml suspension을 나타냈으며, 저농도 구간에서 세포 당 수소생산 효율이 BG043511 대비했을 경우 중간 값을 나타냈다. 이 종주는 중농도 구간에서 수소생산능이 우수한 특징을 보였으나, 전체적인 세포농도구간에서의 많은 수소생산 측정결과가 미비하였지만 추가 우수종주가 될 가능성을 남겨 추가 실험이 필요함을 제시하였다.

Fig. 4의 저농도 구간에서의 시간에 따른 수소생산 누적율을 확인한 결과에서, BG043511은 실험시작 후 12시간대에 가장 높은 수소 누적율을 보였으며, 이후 차차 감소하는 경향이 나타났다. 국내 연안산 남세균 두 종주는 24시간대에 가장 높은 수소 누적율을 보였다. 이는 광합성을 통해 획득한 유기물의 정도와 빛에 대한 동조화 반응속도가 종에 따라 다른 특성이 나타남을 보여주며, BG043511 종주의 질소고정 효소 반응이 국내산 두 종주에 비해 빠른 시간에 집중됨을 보여주는 결과라 할 수 있겠다. 저농도 구간에서 세포 당 수소생산 효율이 높은 점은 빛에 대한 세포 당 광효율 능력이 1차적으로 유기물의 생성과 획득을 높이는데 관여했음을 알 수 있다. 특히 세포의 self-shading effect와 세포의 크기, 직경, 부피 등이 2차적인 에너지소모를 통해 발

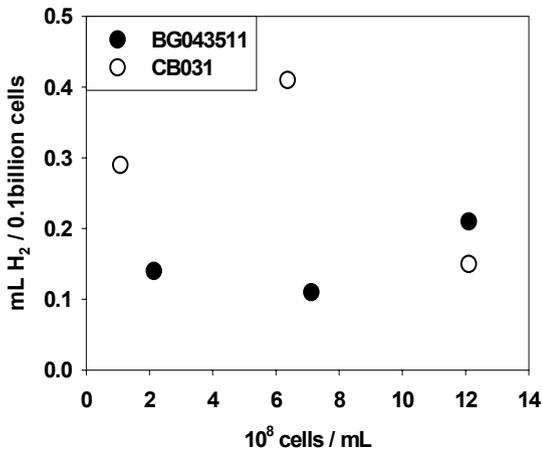


Fig. 5 Maximum H₂ production yield per 0.1 billion cells by BG043511(●) and CB031(○).

생하는 수소생산량에 세포 당 광효율이 얼마나 민감하게 연관이 있는지^{6,11)} 간접적으로 보여주고 있다. 이는 추가적으로 광에 따른 세포성장, 광에 반응하는 엽록체의 활성화 등의 연구와 연계하여¹²⁾ 수소생산 효율이 우수할 수 있는 시·공간적 범위를 정의하는 연구의 필요성을 내포하고 있다¹⁴⁾.

Fig. 5를 보면 국내 남세균 종주 CB031은 최우수 수소생산 남세균 종주인 BG043511에 비해 우수하게 수소생산 효율을 보인 세포농도 구간이 확인되어, 차후 수소생산 연구를 위한 대상종주로서 높은 가능성을 보여주었다. 그리고 위 실험들을 통해 3종주 모두 수소생산이 가능한 세포농도의 상한이 15×10^8 cells ml⁻¹임을 확인하였으며, 각 종주세포의 직경, 면적, 부피의 차이로 인해 최적 수소생산 농도와 세포 당 수소생산 효율성이 다르다는 사실을 알 수 있었다. 즉 수소생산 세포 당 효율은 저농도 구간에서 광에 대한 활성도가 높은 탓에 모든 종주가 높게 나타나 세포농도 조절이 광에 대한 유기물 획득의 유리함을 확인 할 수 있었으며, 세포농도를 조절하여 최대 수소생산량 구간을 종주별로 확인함으로써 세포농도와 광효율의 최적 적합 교차범위를 알 수 있었다³⁾.

특히 위에서 언급한 Fig. 6의 저농도 구간에서 실측된 수소생산량의 시간적 변동을 살펴보면, ml

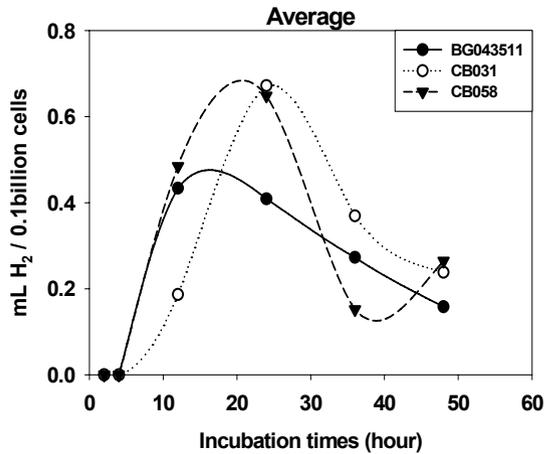
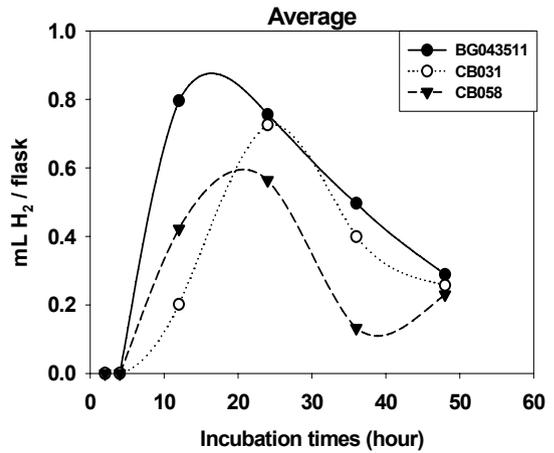


Fig. 6 H₂ production yield at low cell concentration per hours (=cell density is 10^8 cells ml⁻¹).

suspension 당 평균 수소생산 값은 BG043511이 측정 12시간대에 가장 높게 나타났으나, 1×10^8 cells ml⁻¹ 단위 당 평균 수소생산 값은 CB031과 CB058에서 24시간대 가장 높은 값이 나타났다. 이는 국내산 종주 CB031과 CB058이 각각 BG043511 대비 140, 135%의 해당하는 수소생산량을 보인 결과로 저농도 구간에서 국내산 종주들은 특히 세포단위당 수소생산이 높은 구간으로 확인되었다.

종주별 ml suspension 당 수소생산량은 저농도 구간에서는 CB031종주가 BG043511종주보다 높은 반면, CB058종주는 세 종주 가운데 가장 낮게 Table 2와 같이 나타났다. 특히 중농도 구간에서 CB031과

Table 2 Average H₂ production (ml H₂/ml suspension (ml H₂/0.1billion cells))

Cont./Strains	BG043511	CB031	CB058
Low	0.46 (0.38)	0.52 (0.65)	0.28 (0.28)
Mid	0.68 (0.10)	1.85 (0.27)	1.35 (0.20)
High	1.16 (0.09)	0.89 (0.07)	0 (0)

CB058종주는 BG043511종주에 비해 각각 3배, 2배 이상의 수소생산력을 보였다. 고농도 구간에서 BG043511은 국내 두 종주 보다 수소생산량이 높았으나, 다른 농도구간에 대비 세포 당 수소생산량은 낮은 값으로 나타났다.

4. 결 론

이상의 연구결과로부터 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 1) CB031은 전체 실험농도 구간에서 수소를 생산하였고, BG043511 수준의 수소생산능을 보였다.
- 2) 세 실험종주의 최적 수소생산능을 위한 세포농도 범위가 동일하지 않음이 확인되었으며, 이는 각 종주의 세포 직경, 면적, 부피, self-shading effect 등이 서로 다르기 때문이라 판단된다.
- 3) 각 종주의 최적 수소생산은 (1) 저농도에서 self-shading effect가 완화되며 단위세포 당 생산력이 높아지는 효과와 (2)고농도에서 단위세포 당 생산력의 저하에도 불구하고 flask당 수소누적량이 증가하는 두 가지의 서로 배타적인 현상의 교차점에서 나타난다고 할 수 있다.
- 4) 15억 cells ml⁻¹ 이상의 배양체에서는 누적 수소생산량이 측정가능 수준 이하로 확인되었다.

국내에서 질소고정 남세균을 이용한 수소생산 연구가 미미함을 생각할 때, 위의 결과들을 바탕으로 국내 연안산 남세균 종주들을 이용한 수소생산 연구의 가능성을 확인하는 동시에 향후의 고효율 수소생산 연구를 위한 기초자료로서 큰 의미를 부여했다고 할 수 있다.

후 기

본 연구는 국토해양부('09 해양생명공학사업 해양생명자원 기탁등록기관 지원비) 및 군산대학교 ('09 해양 개발연구소 학술활동지원비) 등의 지원으로 수행되었으며, 저자들은 해당 지원 기관에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) 김재만 : “한국 연안산 질소고정 남세균 종주들의 세포주기 동조화와 생물학적 수소생산능”, 군산대학교 대학원, 석사학위논문, 2008, p. 52.
- 2) 박종우 : “한국 연안산 남세균 종주들의 광생물학적 수소생산능력”, 군산대학교 대학원, 석사학위논문, 2007, p. 53.
- 3) 박종우, 이원호 : “국내 연안산 질소고정 남세균 종주의 세포농도별 광생물학적 수소생산력”, 2009 한국수소 및 신에너지학회 추계 학술대회 논문집, 2009, pp. 80-83.
- 4) 박종우, 김재만, 이원호 : “단세포성 해양남세균 종주를 이용한 광생물학적 수소생산 기술”, The Sea, Vol. 14, 2009, pp. 63-68.
- 5) 한기연 : “한국 연안산 해양 단세포 남세균의 기체 대사 연구”, 군산대학교 대학원, 석사학위논문, 1998, p. 66.
- 6) Y. Asamo, N. Nakamura : “Biohydrogen production with light-harvesting function of grana from spirulina and colloidal platinum”, Hydrogen Energy, 31, 2006, pp. 39-42.
- 7) H. Gaffron, J. Rubin : “Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae”, J. Gen. Physiol., 26, 1942, pp. 219-240.
- 8) R. Guillard : “Methods for microflagellates and nanoplankton”, In, Handbook of phycological methods, 1973, pp. 69-85.
- 9) S. Kumazawa, A. Mitsui : “Efficient hydrogen photoproduction by synchronously grown cells

- of a marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Miami BG043511, under high cell density conditions”, *Biotechnology and Bioengineering*, 44, 1994, pp. 854-858.
- 10) Y. Luo, S. Kumazawa, L. Brand : “Effect of exogenous substrates on hydrogen photoproduction by a marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MiamiBG043511”, *Biohydrogen*. 1998, pp. 219-225.
- 11) P. Meunier, M. Colon-Lopez, L. Sherman : “Photosystem II cyclic heterogeneity and photoactivation in the diazotrophic, unicellular cyanobacterium *Cyanothece* species ATCC 51142”, *Plant Physiol.*, 116, 1998, pp. 1551-1562.
- 12) A. Mitsui, S. Kumazawa : “Hydrogen production by marine photosynthetic organisms as a potential energy resource”, *Biological solar energy conversion*, 1977, pp. 23-51.
- 13) A. Mitsui, S. Kumazawa : “Nitrogen fixation by synchronously grown unicellular aerobic nitrogen-fixing cyanobacteria”, In: *Methods in enzymology*, edited by Packer, L. and A. N. Glazer, Academic Press, Vol. 167, 1988, pp. 484-490.
- 14) J. Miyake, M. Miyake, Y. Asada : “Biotechnological hydrogen production : research for efficient light energy conversion”, *Journal of Biotechnology*, 70, 1999, pp. 89-101.
- 15) J. Park, J. Kim, N. Ha, W. Yih : “Synchronization of cell cycle in a cultured marine unicellular N₂-fixing cyanobacterium, *Cyanothece* sp. KNU CB-MAL031”, *The Yellow Sea*, 10, 2009, pp. 19-23.