

한국산 수소생산 남세균 종주들의 세포주기 동조화

박종우*, 안세희*, 김형섭**, 이원호[†]

*군산대학교 해양학과 **전라북도 수산 기술연구소

Synchronization of Cell Cycle in Korean Hydrogen Producing Cyanobacterial Strains

JONGWOO PARK*, SEHEE AHN*, HYUNGSEOP KIM*, WONHO YIH[†]

*Department of Oceanography, Kunsan National University,
San 68, Miryong-dong, Kunsan, 573-882, Republic of Korea

**Research Institute of Fisheries Technology, Kunsan, 573-701, Republic of Korea

ABSTRACT

Under a daily photoperiod of 14h light and 10h dark synchronization of cell cycle in Korean Cyanobacteria spp. strains and *Synechococcus* sp. strain Miami BG043511 was analyzed as to be applicable to enhanced hydrogen production. For all strains peaks of double cell were observed during the light period of a daily cycle. Peaks of maximal cell size measured by a coulter counter appeared at the peak of double cells observed under light microscope reconfirming the synchronization of daily cell cycle. The cell cycle synchronization became weakened within two days when treated with continuous illumination. Rapid detection of the peak time of double cell percentage by coulter counters may contribute to quasi-realtime feedback control for efficient production of photobiological hydrogen by unicellular cyanobacterial strains.

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

1. 서 론

배양체 내 각 세포의 생활 주기시점을 일치화 시키는 것을 동조화 배양이라고 한다^{1,6)}. 수소생산 주기 또는 광합성 주기 등으로 전체 세포의 일일주기를 인위적으로 일치시키는 동조화 시스템을 구축할

경우 수소생산 효율을 제고할 수 있다^{7,8,12)}. 동조화 비율이 높아지면, 같은 시간대에 대부분의 세포가 일제히 수소생성을 할 수 있어 고효율의 수소생산이 이루어질 수 있다. 즉 수소발생 시기와 산소발생 시기의 시간적 격리를 통해 수소생산 효율을 높이는 여러 응용적인 연구가 가능하다^{2,3)}. 또한 동조화 전·후의 색소체 변화 및 세포 내·외부 상태의 변화를 규명하게 되면 수소생산 시 사용할 수 있는 세포 내

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

[접수일 : 2011.9.29 수정일 : 2011.10.20 게재확정일 : 2011.10.21]

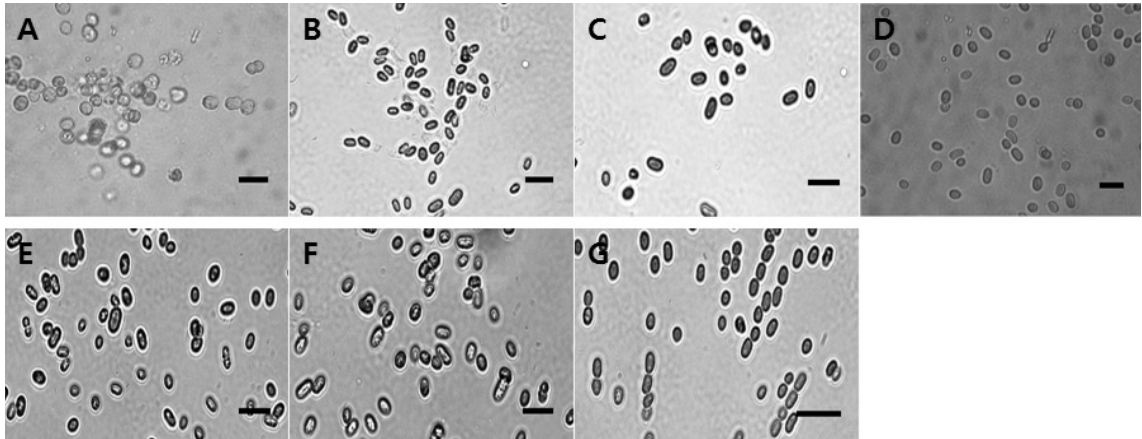


Fig. 1 Seven unicellular cyanobacterial strains used for the synchronization experiments. A: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-002, B: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-026, C: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-031, D: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-054, E: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-055, F: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-058, G: *Synechococcus* sp. strain Miami BG043511. scale bar = 10 μm

유기물질의 표준화가 가능할 것으로 판단된다^{1,4,12)}. 특히 수소생산 재연성의 측면에서 볼 때에는 세포주기 단계 별로 측정이 가능하게 되어, 수소생산의 세부과정을 규명하기 위한 연구가 가능해진다.

본 연구는 최적 수소생산 능력 비교실험의 하나로써 수소생산능이 우수한 남세균 종주인 대서양산 *Synechococcus* sp. strain Miami BG043511 과 수소생산능을 가진 국내산 우수 종주들의 동조화에 따라 나타나는 종주들의 일일 세포주기 변화 상태를 규명하고자 하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1 실험종주

Fig. 1의 *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-002, 026, 031, 054, 055, 058의 국내산 남세균 6종주는 각각 2005년 천수만, 2006년 고흥, 2006년 가로림만, 2006년 부안, 2006년 가로림만, 2006년 가로림만에서 채수하여 단세포 분리를 통해 종주 배양에 성공하여 계대배양 관리중인 국내 종주이다⁵⁾. *Synechococcus* sp. Miami BG043511은 1981년 카리브해의 Bahama 해역에서 Miami 대학교의 Akira Mitsui 교수 연구팀이 분리한 종주이다⁹⁾.

2.2 실험방법

2.2.1 연속 광 배양

염분 30psu의 f/2+BGER 배양액(Table 1)에 종주를 접종 후, 광원에 대한 각 세포의 노출도를 동일한 수준으로 유지하기 위해 멸균 필터한 공기를 배양액

Table 1 Molar 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
BGER trace	Biotin	2 × 10 ⁻⁹
	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 of cyanobacterial cultures

에 연속 공급하였다. $100\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 연속 광, 20°C 의 온도에 세 종주 모두 고농도 세포 농도가 될 수 있도록 배양하였다.

2.2.2 동조화 배양

6종주의 국내산 남세균과 대서양산 남세균 *Synechococcus* sp. strain Miami BG043511 종주를 일반 배양한 후, 고농도로 성장한 실험 배양체를 원심분리하여 pellet으로 수확하였다. Pellet을 염분 30psu의 질소원인 NaNO_3 를 배제한 f/2+BGER-N 배양액에 재부유시켜 각각 약 10mL의 농축 배양체를 준비하였다. 준비된 재부유 배양체의 세포농도를 결정하기 위해 농축 배양체의 0.1mL을 채취하여 f/2+BGER-N 배양액으로 100배 희석한 후 hemocytometer에 넣어 광학 현미경 하에서 세포를 계수하였다. 다음으로 30psu의 f/2+BGER-N 배양액 200ml이 담긴 250ml 투명 실험용기 2개에 초기농도 $5 \times 10^5 \text{cells mL}^{-1}$ 로 농축 배양체를 접종하였으며, 광원에 대한 각 세포의 노출도를 동일한 수준으로 유지하고 self-shading effect 등을 억제하기 위하여, 멸균 솜으로 여과한 공기를 배양액에 연속 공급하고, 용기입구는 알루미늄 호일을 사용해 밀봉하였다(Fig. 2). 배양 5일간 20°C 서 $100\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 의 14 : 10 L/D cycle의 광 조건을 적용하였다.

2.2.3 동조화 비율 측정

동조화 배양 5일 동안 4시간 단위로 subsample하였다. 이후에는 동조화가 악화되는 과정을 확인하기 위해, 연속 광 조건에서 3일 동안 더 배양하여 8시간 단위로 subsample하였다.

Subsample한 시료들은 Lugol's solution 용액으로 고정하여 hemocytometer에 넣어 광학현미경(Olympus model CH2) 하에서 계수하였고, 광학 현미경 하 직접 계수와 병행하여 coulter counter(Beckman model Z2)기기를 이용하여 동일 시료의 세포크기 변화를 측정·비교하였다. Coulter-counter로 측정한 데이터의 분석을 위해, 각 시료에서 검출된 전체 세포를 세포크기 순서대로 나열한 후 상위 55%, 70%, 85%에 해당하는 세포크기의 시간대 별 변화양상을 확인하였다. 세 가지 크기등급 각각에 해당하는 세포 크기의 일중 변화 곡선에서 peak를 나타낸 시간대와 현미경 관찰에서 확인된 double cell의 peak time을 비교하였다.

국내산 종주인 *Cyanothece* sp. KNU CB-MAL058를 이용한 추가 실험에서는 14: 10 L/D cycle을 적용하여 5일간 배양하고 광주기 14시간 중 후반부 10시간동안 매 시간 1회 씩 10회, 암주기 10시간 중에는 중간과 종료시점에 subsample하였다.

3. 결과 및 토의

실험에 사용된 모든 종주들은 NaNO_3 등의 질소원을 배제한 배양액에서 정상적인 성장을 나타내었으며, 일중 광합성 시기와 세포분열 시기가 뚜렷하게 구분되어, 이들이 질소고정능을 가진 것으로 판단하였다.

동조화되는 과정은 광학 현미경 하에서 세포분열 상태인 double cell의(Fig. 3) 출현양상과 단세포 형태인 unicell 출현양상을 계수한 후 비교하여 동조화 비율을 측정하였다.

실험대상 모든 종주 중 CB054를 제외한 나머지 종주들은 14:10 LD cycle 적용 시간동안 일주기 중 명주기 10시간대에 double cell이 집중 출현하는 경향을 보였다(Fig. 4). CB054는 명주기 6시간대에 double

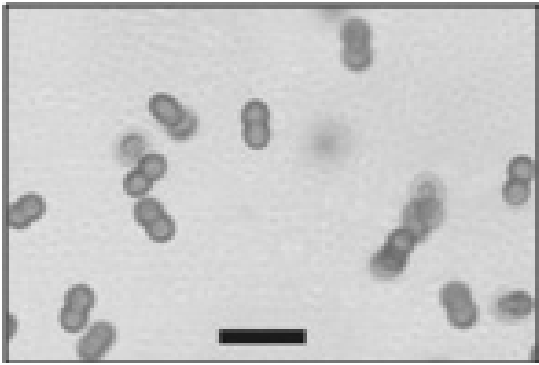


Fig. 3 A photomicrograph of CB-MAL031 shows the predominantly dividing cells during the synchronized cell cycle (size bar = 20 μm)

cell이 집중되는 현상을 보였으며, 모든 종주들은 24시간 주기로 double cell의 집중이 규칙적으로 나타나는 결과를 확인할 수 있었다(Fig. 4).

Double cell의 출현비율은 종주간의 차이가 있었으나 0.11~87.85% 범위 내에 분포하였다(Table 2). 또한 14:10 LD cycle을 5일 적용한 후 연속 광 환경에서 3일간 배양했을 시, double cell의 출현양상은 CB026, CB031 종주를 제외한 모든 종주들은 처음 24시간동안에는 동조화 현상이 약해지나 이 후에는 double cell 비율이 다시 높아지는 경향을 보였다(Fig. 4). 이와는 달리 동조화된 CB031에 연속 광 처

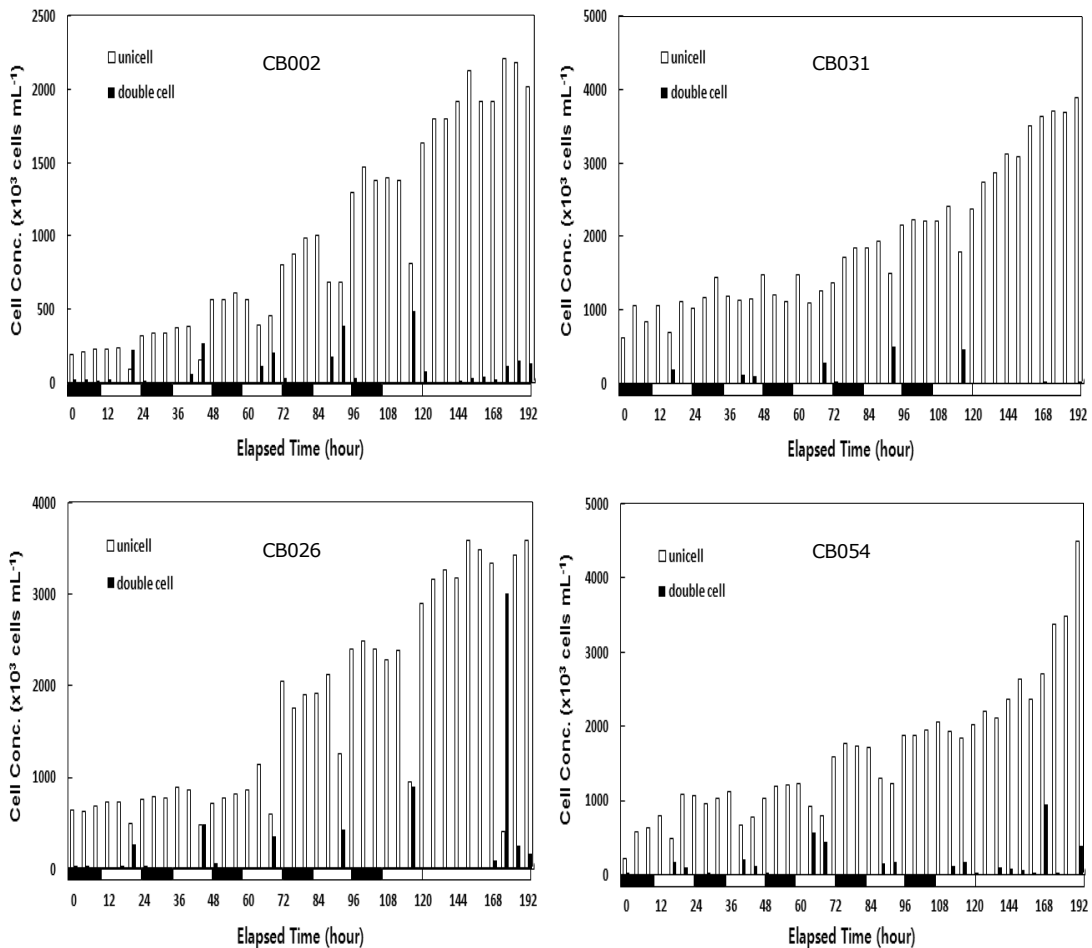


Fig. 4 Concentrations of single and dividing cells during synchronization experiment with CB002, CB026, CB031, CB054, CB055, CB058, and BG043511 (Continued)

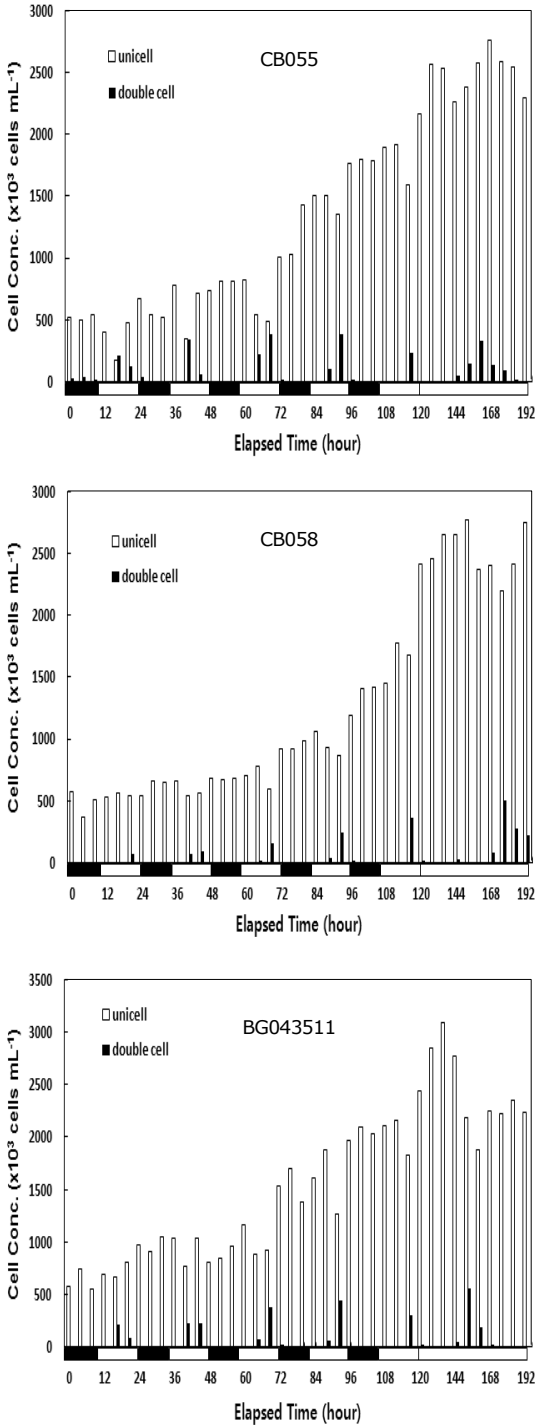


Fig. 4 Concentrations of single and dividing cells during synchronization experiment with CB002, CB026, CB031, CB054, CB055, CB058, and BG043511

Table 2 Percentage of double cell during synchronization experiment with strains

Strain	Max. double cell (%) & Appeared time (h)
CB002	70.78, 20
CB026	87.85, 176
CB031	25.27, 92
CB054	26.20, 16
CB055	54.87, 16
CB058	21.94, 92
BG043511	29.45, 68

리를 한 경우에는 3일이 경과하는 동안에도 double cell 비율이 회복되지 못하였다. 동조화에 대한 LD cycle 영향이 큰 종주임을 확인 할 수 있었다. CB026의 경우, 연속 광에서 3일째에 회복되어 나타난 double cell의 출현비율이 87.85%의 높은 값으로 나타나, 그 원인을 본 실험 자료만으로는 충분히 설명할 수 없었다.

Coulter counter로 측정된 후 각 시료의 총 세포 개수를 세포크기 별로 나열 정리해 본 결과, 크기 등급 별 세포개수의 분포양상을 확인할 수 있었다. 시간대 별로 변화하는 세포의 크기 양상을 확인 해 보 고자, 각 시료에서 검출된 전체 세포 수를 세포크기 등급 별로 나열한 후 상위 55%, 70%, 85%에 해당하는 크기를 기준으로 세포크기의 변화양상을 확인하였다. 전체 세포농도의 55~85%에 해당하는 세포크기 변화를 확인하여 세포의 생활사 측면에서, 변화하는 세포형태를 통해 동조화 현상을 도출하고자 하였다.

모든 종주들은 20~24시간 단위로 세포크기의 변화양상이 일정하게 나타는 현상을 보였다. 광학 현미경 하의 직접계수 결과와 일치하는 결과로 나타났으며(Fig. 5), 본 실험의 정확도 및 현상 파악을 제고하는데 긍정적으로 사용할 수 있는 결과를 보였다. 모든 종주들의 세포 등급 별 세포개수의 분포 양상은 종주간의 차이는 있었으나, 3.89~5.28 μ m 내에 분포하였다. 또한 모든 종주들은 14:10 LD cycle을 적용하였을 시, 명주기 6~10시간대에 총 세포의

한국산 수소생산 남세균 종주들의 세포주기 동조화

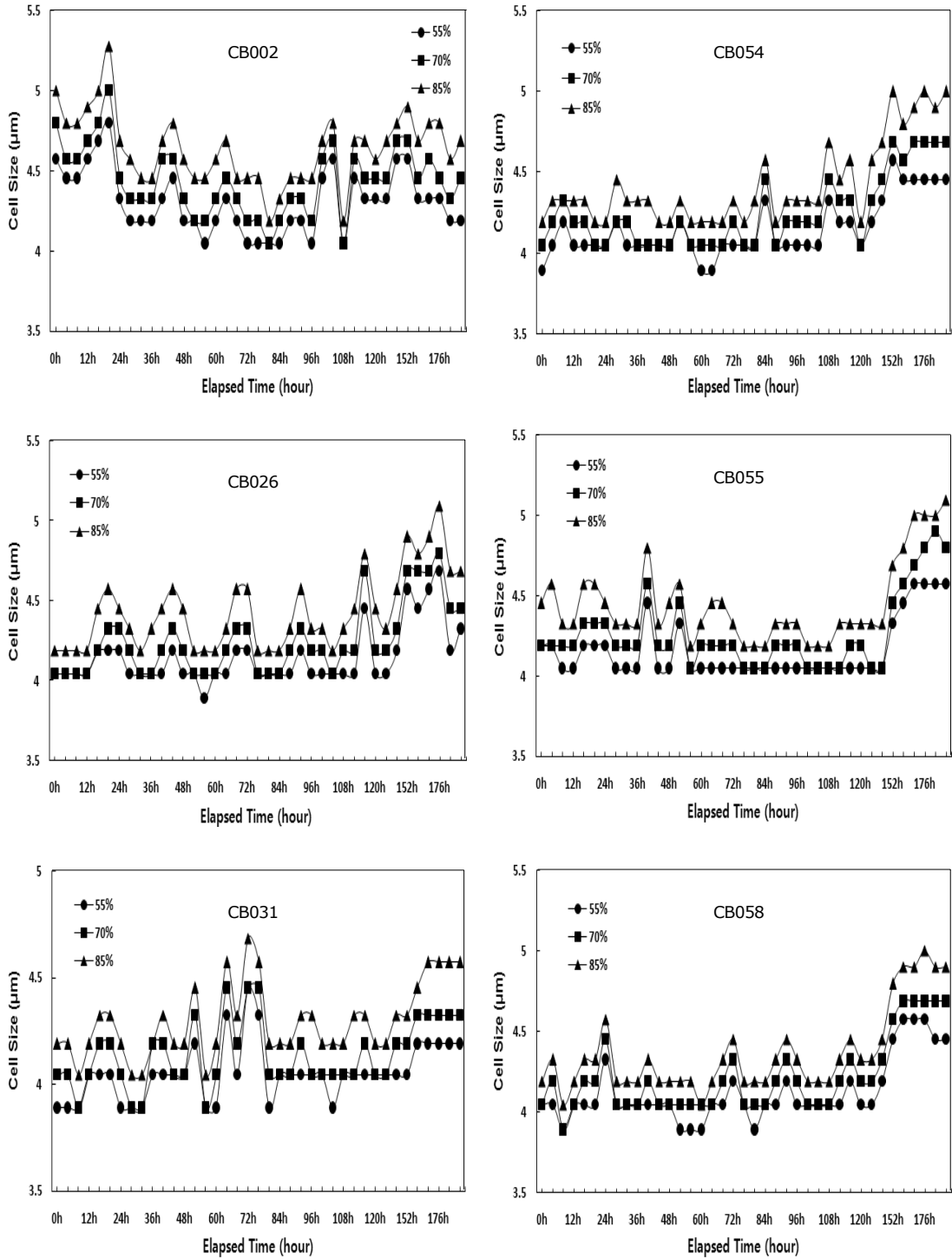


Fig. 5 Fluctuation of the cell sizes corresponding to the upper 55%, 70%, and 85% of size-classes during synchronization experiment with CB002, CB026, CB031, CB054, CB055, CB058, and BG043511 (Continued)

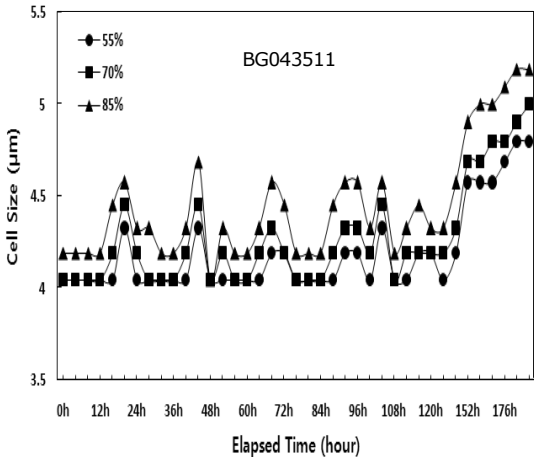


Fig. 5 Fluctuation of the cell sizes corresponding to the upper 55%, 70%, and 85% of size-classes during synchronization experiment with CB002, CB026, CB031, CB054, CB055, CB058, and BG043511

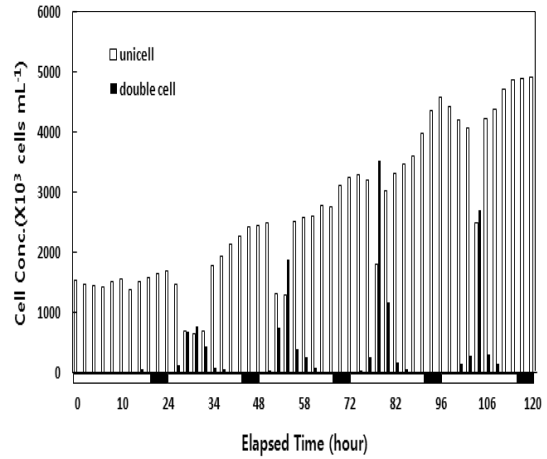


Fig. 6 Synchronization patterns of CB058 at detailed condition

세포크기가 커지고, 이후 세포크기가 작아지는 현상이 20~24시간 단위로 일정하게 변화하는 것을 확인할 수 있었다. 종주 별 세포크기의 일간 변동 폭은 모든 종주에서 비슷한 범위로 나타났으나, CB002와 CB031 종주에서 가장 크게 나타났다.

실험 종주 7개를 대표하는 종주로서 CB058을 선택하여, 명주기 동안 double cell 비율을 10회 관찰하는, 정밀 동조화 실험을 추가적으로 수행하였다 (Fig. 6). 실험 결과 double cell 비율의 증가는 명주기에만 나타났으며, double cell 비율의 최고점은 명주기 8시간으로, 매 24시간 간격으로 반복되었다. 4일 연속하여 명주기 8시간에 나타난 double cell 비율의 최고치는 각각 54.8, 59.57, 66.22 및 52.12%를 기록하였다.

국내산 수소생산 남세균 6종주와 대서양산 남세균 1종주에 대해 동조화 비율을 측정 본 실험 결과는 예상보다 낮게 나타났다. 김(2008)과 Park 등(2009)은 CB031에서 83%, Mitsui와 Kumazawa(1988)는 BG043511에서 85%의 동조화 수준을 보고한 바 있다^{1,10,11)}. 다만 CB058에 대한 추가 실험에서는 66% 이상의 동조화 비율이 재연되었다.

이상의 결과를 종합해 보면, 본 연구결과는 수소

생산을 위한 남세균 배양체의 세포주기 동조화 연구에서 coulter counter가 중요한 장비임을 입증하였다. 즉, double cell의 비율을 결정하기 위하여 시간과 노력이 많이 요구되는 현미경 검경 작업 대신, 신속한 계측 장치인 coulter counter를 활용하여 평균 세포크기의 시간적 변동을 추적하고 이로부터 세포주기 동조화 비율을 결정할 수 있음을 제시하였다.

4. 결 론

이상의 연구결과로부터 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 1) 국내산 남세균 6개의 실험종주들은 질소고정능을 가지고 있어(Fig. 4) 세포주기 동조화가 가능하다.
- 2) 모든 종주들은 동조화 조건 적용 3일 안에 70% 이상의 세포주기 동조화가 가능하며, 동조화 조건 적용 전 세포상태의 균일화가 동조화 가능 효율을 높이는데 크게 작용한다.
- 3) 모든 종주가 명주기 시간에 분열하였으며, 분열상태의 세포 출현 양 만큼 총 세포가 일정량 증가하는 현상이 뚜렷하게 나타났다.
- 4) 동조화 최대 시점은 광주기 시작 후 6~14시간

범위에 분포하였다.

- 5) 수소생산을 위한 남세균 배양체의 세포주기 동조화 비율을 결정하기 위한 방법으로 현미경 검경법에 비해, coulter counter에 의한 평균 세포크기의 변동성 분석이 보다 효율적이라 할 수 있다.

후 기

본 연구는 국토해양부 해양생명공학 기술개발사업의 “해양독성생물자원 기탁등록보존기관”(과제번호 D10806911H320000110)지원비로 수행되었으며, 저자들은 해당 지원기관에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- 1) 김재만 : “한국 연안산 질소고정 남세균 종주들의 세포주기 동조화와 광생물학적 수소생산능력”, 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) S. Golden, M. Ishiura, C. Johnson, T. Kondo : “Cyanobacterial circadian rhythms”, Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology. 48, 1997, pp. 327-354.
- 5) R. Guillard : “Methods for microflagellates and nanoplankton”, In, Handbook of phycological methods, 1973, pp. 69-85.
- 6) H. Iwazaki, T. Kondo : “The current state and problems of circadian clock studies in cyanobacteria”, Plant cell Physiology, 41(9), 2000. 99. 1013-1020.
- 7) Y. Luo, S. Kumazawa, L. Brand : “Effect of exogenous substrates on hydrogen photoproduction by a mirine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. MiamiBG043511”, Biohydrogen. 1998, pp. 219-225.
- 8) A. Mitsui, S. Cao, A. Takahashi, T. Arai : “Growth synchrony and cellular parameters of the unicellular nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. strain Miami BG 043511 under continuous illumination”, Physiologia Plantarum 69, 1987, pp. 1-8.
- 9) A. Mitsui, S. Kumazawa : “Hydrogen production by marine photosynthetic organisms as a potential energy resource”, Biological solar energy conversion, 1977, pp. 23-51.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) S. Suda, A. Mitsui : “Alternative and cyclic appearance of H₂ and O₂ photoproduction activities under non-growing H₂ production conditions in an aerobic nitrogen-fixing cyanobacterium *Synechococcus* sp.”, Current Microbiology, 30, 1995, pp. 1-6.