

Synechococcus PCC7002의 세포 및 틸라코이드 막의 Polyvinylalcohol 고정화에 의한 광합성 특성

윤 지 은 · 전 현 식 · *이 혜 주 · *엄 경 일 · *선우 양 일 · *박 인 호 · 이 진 범
동의대학교 자연과학대학 생물학과
*동아대학교 자연과학대학 생물공학과

Photosynthetic Characteristics of Intact Cells and Thylakoid Membranes of *Synechococcus* PCC7002 with Polyvinylalcohol-Immobilization

Chi Eun Yoon, Hyun Sik Chun, *Hae Joo Lee, *Kyungil Um,
*Yangil Sunwoo, *In Ho Park and Chin Bum Lee

Department of Biology, Donggeui University

*Department of Biology, Dong-A University

ABSTRACT

Highly stable O₂-evolving cells and thylakoid membranes have been obtained from the cyanobacterium, *Synechococcus* PCC7002, by immobilization with polyvinylalcohol(PVA). The absorption peak showed the blue-shift of about 3 nm after immobilization of intact cells and thylakoid membranes as well as isolation of thylakoid membranes. Photosynthetic electron transport activities, especially PS II activity showed greater stability in the PVA-immobilized cells and thylakoid membranes when stored at 4°C than in those at 25°C. When the cells were treated at higher temperature, the level of F_o and F_v increased. After immobilization, however, F_o showed no change. This suggests that the immobilization can protect against the damages of PS II complex, especially a water-splitting system, by heat treatment.

Key words : immobilization, cyanobacterium, *Synechococcus* PCC7002, oxygen evolution, photosynthesis, polyvinylalcohol, fluorescence.

Abbreviations : PS, photosystem ; PBQ, phenyl-p-benzoquinone ; Chl, chlorophyll ; PVA, polyvinyl-alcohol ; F_o, initial fluorescence ; F_v, variable fluorescence ; F_m, maximum fluorescence ; DCPIP, 2, 6-dichlorophenolindophenol ; Asco, ascorbic acid ; HEPES, N-2-hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid ; Tricine, N-tris [hydroxymethyl]-methylglycine ; MES, 2-[N-morpholino] ethanesulfonic acid ; MV, methylviologen.

서 론

광합성을 이용하여 인간에게 유용하며 산업적으로 가치가 있는 여러 물질을 생산(지질, 아미노산, 단백질)할 수 있으며, 특히 광합성의 기본과정인 물의

광분할기능을 이용하여 수소가스와 같은 무공해 대체에너지의 개발이 가능하다. 일반적으로 분리염록체(틸라코이드) 막은 물의 광분할과 수소생성을 수행할 수 있으나(1-3), 생물촉매(biocatalyst)로서 안정성이 크게 문제가 되고 있으며, 광계 2복합체는

특히 환경에 더욱 민감한 것으로 알려져 있다.

최근 생물촉매로서 효소, 세포 내 소기관 및 세포 등의 고정화는 지속성 유지의 수단으로서 매우 중요한 방법으로 인식되고 있다(4). 생물촉매 고정화의 장점으로는 생성물과 생물촉매와의 물리적 분리 및 생물촉매의 재사용이 가능하고, 반응기의 지속적인 흐름에 의한 사용과 반응기 내의 높은 세포 밀도를 유지할 수 있으며, 안정성, 생산력 및 대사양상과 같은 생물촉매의 특성의 변형을 가져올 수 있음을 들 수 있다(5).

남조는 고등식물과 매우 유사하게 틸라코이드 막에 두 개의 광계를 가지고 광합성에 의해 산소발생을 하는 원핵생물로서(6), photoautotrophic 조건하에서 매우 신속하게 자란다(7, 8). 남조의 틸라코이드 막은 광합성의 초기과정의 구조적 기능적 연구뿐만 아니라 광합성의 분자생물학 연구에 최근 많이 이용되고 있다. 그러나 남조로부터 분리한 틸라코이드 막은 매우 불안정하여 수시간 내에 산소발생능을 상실한다(6, 9, 10). 최근 저자들은 polyvinyl-alcohol(PVA)을 이용하여 고정화한 시금치 엽록체에서, 특히 광계 2가 PVA에 의한 고정화에 의해 매우 안정하고, 활성이 오랫동안 지속되어짐을 알 수 있었다(11).

여기에서는 단세포성 해산 남조류인 *Synechococcus* PCC7002(PCC7002)의 세포 및 분리한 틸라코이드 막을 PVA로 고정화하여 이들의 pH, 온도 및 장기간의 보존에 대한 안정성 여부를 확인한 결과를 논의하고자 한다.

재료 및 방법

성장조건

Synechococcus PCC7002 성장에는 20mM HEPES (pH 7.5)가 첨가된 medium A (12)를 이용하여 34°C에서 1% CO₂를 공급하였다(13). 광원은 백열등을 사용하여 10W m⁻² 광도를 유지시켰다.

틸라코이드 막 분리

틸라코이드 막은 성장 대수기의 1ℓ 배양(10mg Chl 상응) 세포를 5,000×g에서 10분간 원심분리하여 수집한 후 분리하였다. 침전된 세포를 30mM CaCl₂가 포함된 50mM HEPES-NaOH (pH 7.5) 용액 50mℓ로 2회에 걸쳐 재현탁 및 재원침시켰다. 이를 30mℓ의 50mM HEPES-NaOH (pH 7.5), 800mM sorbitol, 1.0M betaine 및 1.0mM amino-

caproic acid 용액에 현탁시켰다. 이 모든 과정은 실온에서 행하였으며, 이후의 과정은 4°C에서 이루어졌다. 현탁 세포의 파괴는 기계적으로 glass bead (<0.1mm in diameter)를 1:1의 비율로 세포와 혼합시켜 bead beater(Biospec Products, Bartlesville, OK, USA)를 이용하여 행하였다. 10,000×g에서 10분간 원심분리하여 파괴되지 않은 세포를 제거한 후, 60,000×g에서 60분간 원침시켜 틸라코이드 막을 얻었다. 이를 800mM sorbitol 및 1.0M betaine이 포함된 50mM HEPES-NaOH(pH 7.5)로 1회 세척한 후 재원심분리하여 같은 용액으로 적당량 희석시켜 사용하였다.

세포 및 틸라코이드 막의 고정화

15% PVA에 동량의 세포 현탁액 및 틸라코이드 막 현탁액을 혼합시켜 slide glass에 고르게 펼친 후 건조시켜, 여러 온도조건에서 보관시켰다.

광합성능의 측정

광합성에 의해 발생하는 산소량은 Clark-type oxygen electrode(YSI 553; Yellow Springs Instrument Co., Yellow Springs, OH, USA)를 이용하여 25°C에서 측정하였다. 기본적인 반응액은 30mM CaCl₂와 600mM sucrose를 포함하는 50mM Tricine-NaOH (pH 7.5)를 사용하였다. 광계 2의 활성은 전자수용체로 0.3mM PBQ를 사용하여 산소발생량으로 측정하였고, 광계 1의 활성은 전자공여체로 DCPIP+ascorbic acid를 전자수용체로 MV를 사용하고, 전 광계의 활성은 전자수용체로 MV를 이용하여 산소소비량으로 측정하였다.

엽록소 형광의 측정

엽록소 형광은 PAM 101 및 102 fluorometer (Walz Co., Germany)을 이용하여 Chun 등(14)의 방법에 따라 행하였다. 광원은 Schott 1500 T (Schott Co., Germany)을 사용하였고, 포화광의 pulse를 위한 shutter는 Unibriz shutter를 이용하여 1.0 sec pulse를 주기적으로 주었다.

엽록소 측정 및 흡수스펙트럼

80% acetone으로 추출된 엽록소의 양은 663nm와 645nm에서 흡광도를 측정하여 계산하였으며(15), 고정하거나 고정하지 않은 세포 및 틸라코이드 막의 흡수스펙트럼은 가시광 영역(400-700nm)에서 Cary 5 spectrophotometer(Varian Techtron

Pty. Ltd., Australia)로 측정하였다.

결과 및 논의

Fig. 1은 실온에서 PVA로 고정화한 PCC7002 및 이로부터 분리한 틸라코이드 막의 흡수 스펙트럼

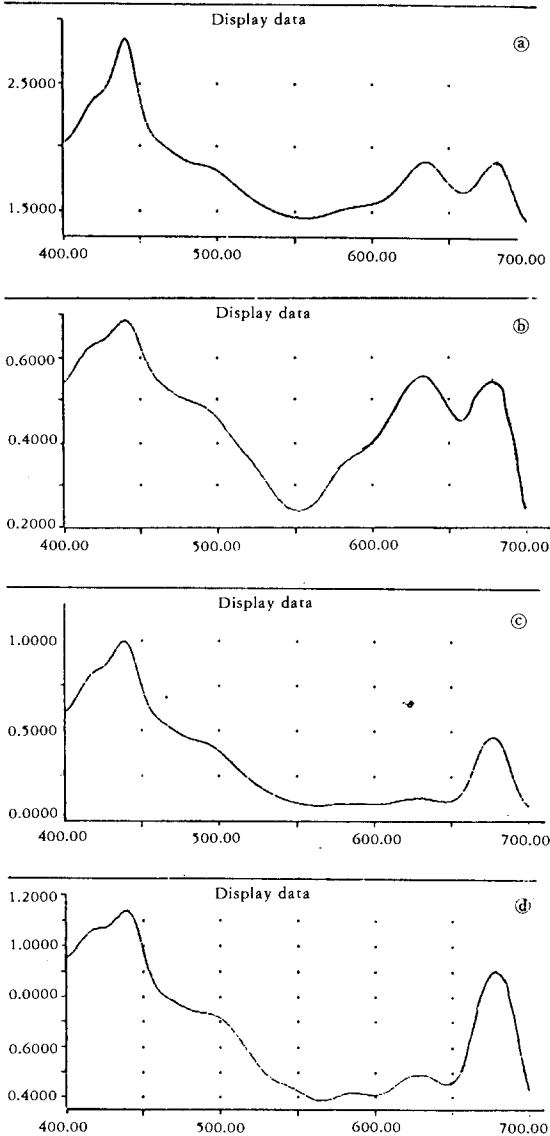


Fig. 1. Absorption spectra of native cells(a), PVA-immobilized cells(b), free thylakoid membranes(c) and PVA-immobilized thylakoid membranes(d) of *Synechococcus* PCC7002. Absorbance is in relative units.

을 보여준다. Chl a에 기인한 흡수곡대는 681nm와 430nm에서 나타났으며, 493nm 근처의 shoulder는 carotenoid의 존재를 보여주었고(10), phycobilins의 peak는 634nm에서 보여준다(Fig. 1a). 고정화한 세포와 틸라코이드 막에서는 3nm 정도의 blue-shift 현상이 일어남을 볼 수 있는데(Fig. 1b and 1c), 이는 아마도 고정화 과정(11)과 틸라코이드 막 분리시 틸라코이드 막에 존재하는 색소들의 구조적 배열에 변화가 있음을 시사한다. 한편 틸라코이드 막의 흡수 스펙트럼에서는 634nm의 흡수곡대가 나타나지 않음을 볼 수 있는데 이는 막 분리시 phycobilins가 쉽게 틸라코이드 막으로부터 떨어져 나갔음을 의미한다.

PVA에 고정화하였을 경우 얼마나 산소발생능의 안정화에 기인하는지를 보기 위하여 4°C와 25°C에 보관하여 14일간 측정하여 보았다. 25°C에 보관하였을 경우 전광계의 활성은 5일 이후 거의 20% 수준으로 떨어졌으며, 광계 2는 지속적으로 감소하여 15일 후 20% 수준을 보였다. 그러나 광계 1은 오히려 활성의 증가를 보여 5일 이후 거의 130%의 활성을 나타냈다(Fig. 2). 이에 반하여 4°C에 보관

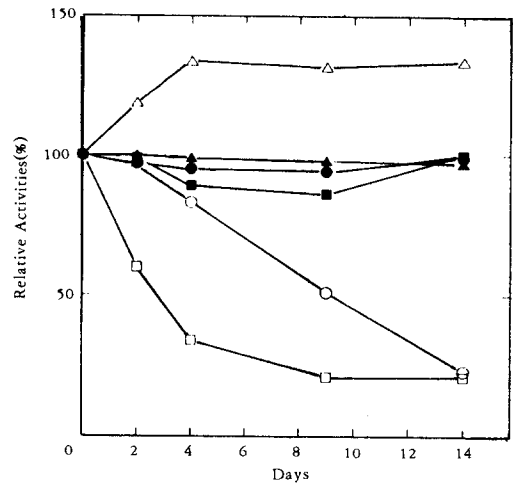


Fig. 2. Photosynthetic electron transport activities of PVA-immobilized *Synechococcus* PCC7002 cells during storage at 4°C (close) and 25°C (open). H₂O/PBQ(○), H₂O/MV(□), Asco+DCPIP/MV(△). Original activity of PS II, PS I and whole chain at 4°C and 25°C are 423, 167, 292 and 344, 221, 446 μ mole O₂ (mg Chl)⁻¹. hr⁻¹ respectively.

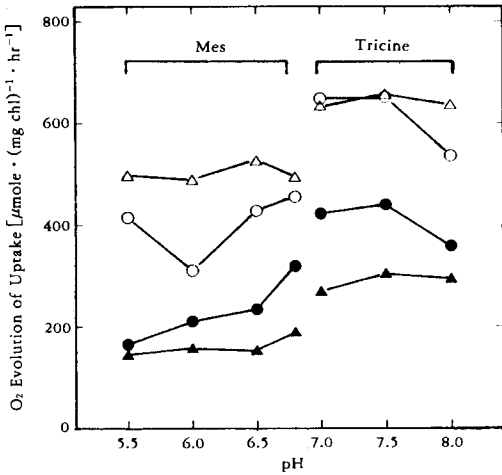


Fig. 3. Effect of pH on PS II (open) and PS I (close) electron transport activities of PVA-immobilized *Synechococcus* PCC7002 cells at 4°C (Δ) and 25°C (○) on various pH of reaction mixture.

한 경우에는 전광계, 광계 1 및 광계 2 모두 활성이 떨어지지 않고 계속 유지하는 것으로 나타났다(Fig. 2). 이와 같은 결과는 PVA에 의한 고정화는 PCC7002 세포의 활성 유지에 크게 기여하고, 특히 저온에서의 보관 (4°C)이 산소발생능을 오랜기간 지속시킬 수 있음을 나타낸다.

Fig. 3은 PVA에 고정화한 1일 후 세포의 pH에 따른 광계 1과 광계 2의 활성을 보여준다. pH 7.5에서 모두 최대치를 나타냈으나, 4°C의 경우가 25°C의 경우에 비해 전반적으로 측정된 pH 범위에서 활성의 변화가 적은 반면, 25°C의 경우 pH 7.0 이상에서 급격한 활성의 증가를 보이고 pH 8.0에서 뚜렷한 감소를 보였다. 또한 광계 2는 전반적으로 4°C가 활성이 높은 반면 광계 1은 25°C가 높게 나타났다(Fig. 3).

Fig. 4는 PVA에 고정하여 1일간 4°C 및 25°C에 보관한 세포의 pH에 따른 CO₂ 의존성 산소발생능을 보여준다. Fig. 3과 마찬가지로 모두 공히 pH 7.5에서 최대치를 보였고 4°C에 보관한 경우 25°C 보다 활성이 높게 나타났다. Fig. 3과 4에서 pH에 따른 고정화에 의한 변화는 볼 수 없으나, Fig. 2와 마찬가지로 저온 보관이 보다 산소발생능의 안정성에 기여하는 것으로 여겨진다.

Table 1은 PVA에 고정한 틸라코이드 막의 산소

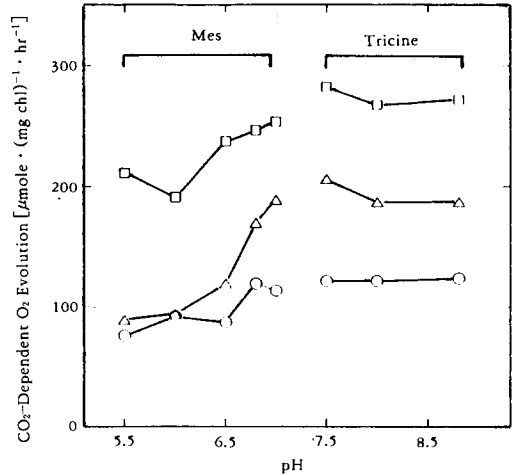


Fig. 4. Effect of pH on CO₂-dependent O₂ evolution of native cells (□) and PVA-immobilized cells of *Synechococcus* PCC7002 at 4°C (Δ) and 25°C (○).

발생능에 대한 안정성을 보여준다. 고정화하지 않은 틸라코이드 막은 25°C 보관할 경우 10시간에서 거의 50% 이상 활성을 상실하며, 1.0M의 glycinebetaine을 처리하여도 24시간 이후에는 20% 정도 활성이 감소하였다(결과 미발표). 그러나 고정화한 틸라코이드 막은 25°C에 보관할 경우 산소발생능의 상실이 지연되어 6일 이후 20% 정도 감소하였으며, 4°C에 보관한 경우에는 6일 후에도 전혀 활성의 감소를 보이지 않았다. 이는 막의 고정화가 산소발생능의 안정에 기인하고, 저온 역시 세포수준(Fig. 1)과 유사하게 작용함을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 시금치의 엽록체 수준에서 PVA에 고정한 결과와 일치한다(11).

Fig. 5는 PVA에 고정화한 세포와 틸라코이드 막을 4°C와 25°C에 1일간 보관한 후, 측정 온도에 20분간 처리하여 H₂O→PBQ에 의한 산소발생능을 측정하여 열에 대한 안정성을 본 결과이다. 25°C에 보관하였을 때 대략 30-35°C에서 최대 활성을 보이거나 전반적으로 열에 대해 안정한 반면, 4°C 보관한 경우 온도 증가에 따라 지속적인 활성의 감소를 나타내었다. 25°C에 비해 4°C에서 나타난 활성의 감소는 아마도 급격한 온도의 차에 기인한 것으로 여겨진다.

암처에 적용된 PCC7002의 열처리에 따른 엽록소형광양상을 알아보기 위하여, 측정 온도에서 20분간

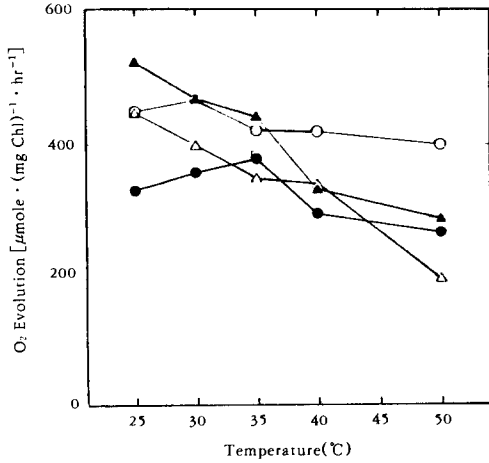


Fig. 5. Photosynthetic oxygen-evolving thermostability of PVA-immobilized cells (open) and isolated thylakoid membranes (close) of *Synechococcus* PCC7002 at 4°C (△) and 25°C (○).

처리한 후, 형광유도곡선을 보았다(Fig. 6). 광화학 반응을 수행할 수 없는 약한 빛(m. b)의 처리에 의한 형광상승은 Fo를 나타낸다. 일시적인 포화광(s. l)의 처리는 Fm을 보여주며, 시간에 따른 형광유도곡선은 Fv의 변화를 나타낸다. 온도의 증가에 따라 Fo의 상승이 뚜렷이 나타났으며, Fv도 역시 상승하였다. 이와 같은 결과는 아마도 열처리에 의해 물분해기구나 광계 2 반응중심의 활성화가 손상을 받았음을 의미하며, 광계 2의 환원정도를 나타내는 qQ가 온도가 높아질수록 감소되는 양상을 보임에 따라 산소발생능의 저하를 나타내는 결과이다(16).

Fig. 7은 암처에 적응된 PCC7002 세포와 분리 티라코이드 막의 고정화와 열처리에 대한 엽록소 형광양상을 나타낸다. 고정화한 세포의 경우 열처리에 따른 Fo의 상승은 나타나지 않았으며, 열처리 시간에 따라 Fv의 감소를 보였다(Fig. 7d, e, and f). 이에 따라 Fv/Fm 비율의 감소를 보이는데, 이는 열처리에 따라 물분해기구의 손상보다는 광화학 활성능의 감소로 여겨진다. 한편 분리 티라코이드 막의 고정화 역시 열처리에 따른 Fo의 상승은 나타나지 않았으며, 열처리에 따른 Fv의 감소도 세포수준과 마찬가지로 양상을 보였다(Fig. 7b and c). 이와 같은 결과는 PVA에 의한 고정화는 물분해기구의 열에 의한 손상을 보호해 줄 수 있음을 시사한다.

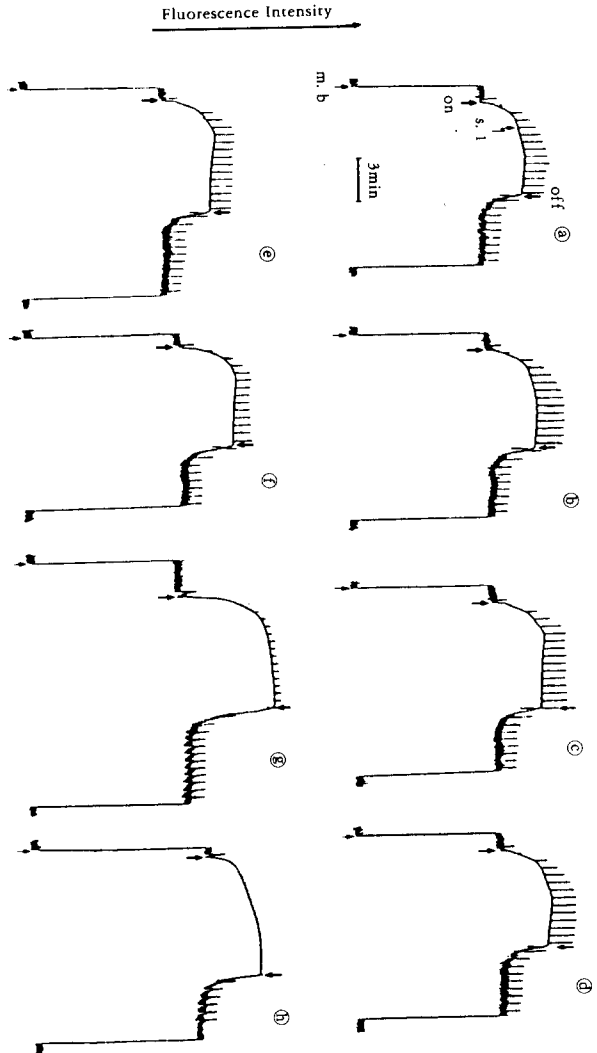


Fig. 6. Fluorescence induction curve of chlorophyll a of *Synechococcus* PCC7002 at various temperatures. a 4°C; b, 15°C; c, 25°C; d, 30°C; e, 35°C; f, 40°C; g, 45°C; h, 50°C. mob, weak measuring beam; on and off, actinic light on and off; s. l, saturating light.

본 실험을 통해 매우 높은 안정성을 갖는 세포 및 티라코이드 막을 PVA에 의한 고정화를 이용하여 단세포성 남조류인 PCC7002로부터 얻을 수 있었다. 상기의 결과는 세 가지 가능한 결론을 보여준다. 첫째로 고정화에 따라 흡수 스펙트럼의 blue-shift 현상을 나타냈는데, 이는 티라코이드 막에 존재하는

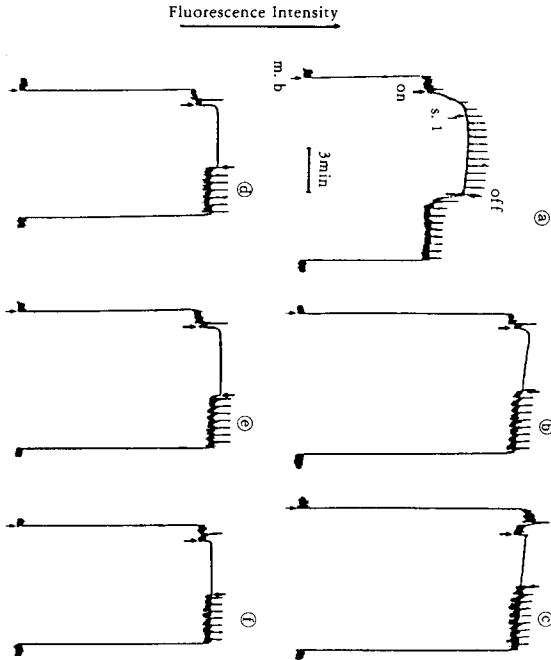


Fig. 7. Chlorophyll fluorescence induction curve of native cells (a), PVA-immobilized thylakoid membranes (b), PVA-immobilized thylakoid membranes after 20 min of heat treatment at 45°C (c), PVA-immobilized cells (d), and PVA-immobilized cells after 20 min (e) and 60 min (f) of heat treatment at 45°C.

색소들의 구조적 배열에 변화가 있을 수 있음을 시사한다. 둘째로 PCC7002 세포 및 분리 틸라코이드 막의 PVA에 의한 고정화는 산소발생능의 안정화에 기여할 수 있으며, 특히 저온 (4°C)에서의 보관은 오랜기간 활성의 유지에 필수적이었다. 마지막으로 고정화한 세포나 틸라코이드 막은 열에도 매우 안정하여, 열에 의한 광계 2의 물분해기구의 손상에 따른 산소발생능의 상실을 보호해 줄 수 있을 것으로 여겨진다.

적 요

산소발생능에 있어 오랜 기간 안정성을 유지하는 세포와 분리 틸라코이드 막을 단세포성 남조류인 *Synechococcus* PCC7002로부터 PVA로 고정화하여 구할 수 있었다. 분리 틸라코이드 막 및 고정화한 세

포나 틸라코이드 막의 흡수스펙트럼의 굽대가 청색 쪽으로 3nm 정도 전이하였다. PVA에 고정화한 세포나 틸라코이드 막은 4°C에 보관할 경우 광합성에 의한 전자전달 활성, 특히 광계 2의 활성을 오랜기간 보존할 수 있었다. 세포를 고온에 처리하였을 때 F_0 와 F_v 가 증가하였으나 고정화한 후에는 F_0 의 변화가 거의 없었다. 이 결과는 고정화가 열처리에 의한 광계 2 복합체의 손상 특히 물분해기구의 손상에 대해 보호작용을 할 수 있음을 시사한다.

감 사

본 연구는 1991년도 교육부 기초과학육성 특성화 연구비 및 한국과학재단 세포분화연구센터의 연구비 (92-5-5) 지원에 의하여 이루어졌으며 이에 대하여 감사드립니다.

참고문헌

1. P. Cuendet and M. Gratzel (1982), *Photochem, Photobiol.*, **36**, 277.
2. K. K. Rao, L. Rosa and D. O. Hall (1976), *Biochem, Biophys. Res. Commun.*, **68**, 21.
3. P. E. Gisby and D. O. Hall (1980), *Nature*, **287**, 251.
4. I. Chibata, T. Tosa and T. Sato (1987), *Biotechnology*, (J. F. Kennedy ed.). Vol. **7a**, 653, Verlag Chemie, Berlin.
5. M. D. Trevan and A. L. Mak (1988), *Tibtech.*, **6**, 68.
6. J. C. Gingrich, G. E. Gasparich, K. Sauer and D. A. Bryant (1990), *Photosyn. Res.*, **24**, 137.
7. F. Ferino and F. Chauvat (1989). *Gene*, **84**, 257.
8. W. F. J. Vermaas, J. G. K. Williams, A. W. Rutherford, P. Mathis and C. J. Arntzen (1986), *Proc. Natl. Acad. Sci.*, **83**, 9474.
9. C. Astier, S. Styring, B. Maison-Peteri and A.-L. Etienne (1986), *Photobiochem. Photobiophys.*, **11**, 37.
10. R. Burnap, H. Koike, G. Sotiropoulou, L. A. Sherman and Y. Inoue (1989), *Photosyn Res.*, **22**, 123.
11. I. H. Park, S. H. Seo., H. J. Lee., C. B. Lee and Y. Sunwoo (1991), *Kor. J. Bot.*, **34**, 215.

12. Jr. S. E. Stevens, C. O. Patterson and J. Myers (1973), *J. Phycol.*, **9**, 427.
13. T.-A. Ono and N. Murata (1978), *Biochim. Biophys. Acta*, **502**, 477.
14. H. S. Chun, I. H. Park., H. J. Lee., Y. Sunwoo and C. B. Lee (1990), *Kor. J. Bot.*, **33**, 277.
15. D. I. Arnon (1949), *Plant Physiol.*, **24**, 1.
16. C. B. Lee, I. H. Park, H. J. Lee and Y. I. Sunwoo (1991), *Korean Biochem. J.*, **24**, 594.