

한국 연안산 질소고정 단세포 남세균 종주의 최적 성장 및 수소생산 온도

박종우¹ · 김형섭² · 이원호^{1†}

¹군산대학교 해양학과, ²군산대학교 해양생물공학과

Optimal Temperature for H₂ Production and Population Growth of the N₂-fixing Unicellular Cyanobacterial Strains from Korean Coasts

JONGWOO PARK¹, HYUNGSEOP KIM², WONHO YIH^{1†}

¹Department of Oceanography, Kunsan National University, San 68, Miryong-dong, Kunsan, 573-882, Republic of Korea

²Department of Marine Biotechnology, Kunsan National University, San 68, Miryong-dong,

Kunsan, 573-882, Republic of 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. Using six Korean nitrogen-fixing unicellular cyanobacterial strains and the *Synechococcus* sp. strain Miami BG043511 we performed cultivation experiments to find out the strain-specific optimal temperature for population growth and H₂ production. Under 20°C the population growth of all the tested strains was significantly retarded in contrasts to the faster and higher growth under 25, 30 or 35°C. The highest growth rates in all the 7 strains were measured under 30°C while the maximal biomass yields were under 30°C (strains CB-MAL 026, 054, and 055) or 35°C (strains 002, 031, 058, and Miami BG043511). The difference between the maximal biomass yields at 30°C and 35°C was not greater than 10%. The quantity of photobiologically produced H₂ was only slight larger under 35°C than that under 20°C. Our result may suggest a two-step process of H₂ production which includes rapid and sizable production of biomass at 30°C and the following high H₂ production at 20°C by the test strains of marine nitrogen-fixing unicellular cyanobacteria.

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, *Cyanothece* sp. KNU CB-MAL031

1. 서 론

광생물학적 수소생산능을 가진 남세균의 최적 성장 조건을 탐색하여 효율적으로 생물량을 확보하게 하는

것은 궁극적으로 수소생산 효율을 제고하기 위한 근본적 방안이 될 수 있다. 남세균은 일차적으로 광합성을 통해 유기물의 형태로 에너지를 확보하고, 이차적으로 이를 활용하여, 수소생산 조건에서 hydrogenase 혹은 nitrogenase 효소를 이용하여 수소를 생산하는 매커니즘을 가진다. 이러한 매커니즘을 고려한 수소생산 효율을 높이는 방법으로 적정 CO₂ 농도 주입⁽⁶⁾, 광도

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

[접수일 : 2012.11.28 수정일 : 2013.2.22 계재확정일 : 2013.2.28]

Copyright © 2013 KHNES

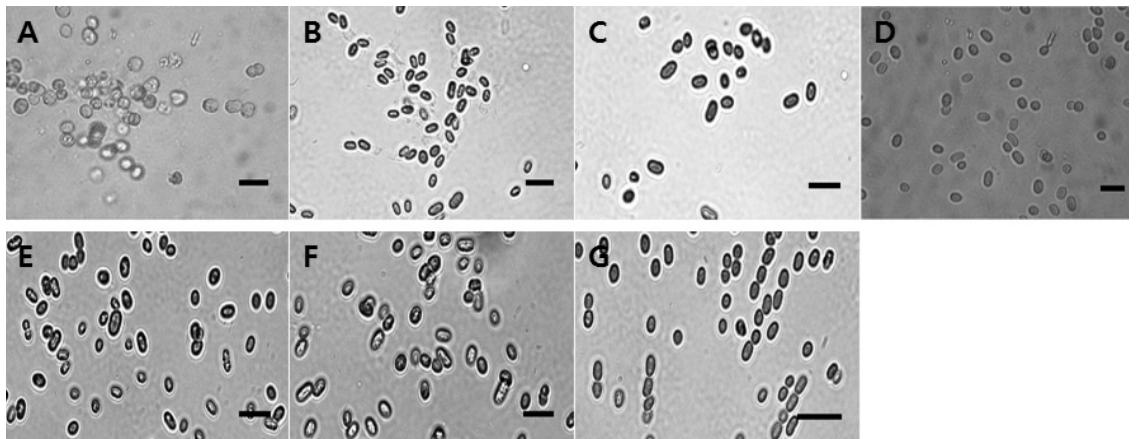


Fig. 1 Seven unicellular cyanobacterial strains used for the H_2 producing experiments. A: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-002, B: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-026, C: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-031, D: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-054, E: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-055, F: *Cyanothece* sp. KNU CB MAL-058, G: *Synechococcus* sp. strain Miami BG043511. scale bar = 10 μm

및 세포농도 조절¹⁾, 온도조절¹⁰⁾ 등 의 연구가 시도되고 있다. 일반적으로, 남세균은 일정 범위 내에서는 온도의 상승에 따라 성장이 크게 촉진되어 개체군이 빠르게 증가하지만, 한계를 초과하는 온도에서 개체군이 급격히 쇠퇴하는 경향을 보인다. 따라서, 광생물학적 수소생산능력을 가진 종주들의 최적성장 온도를 규명하여 효율적인 배양체 생산 체계를 확립할 필요가 있다. 수학한 배양체 생물량을 이용한 수소생산 단계에서는 별도의 최적 온도 규명하고, 생물량 확보 단계와 수소생산 단계에 각각 특이적인 온도를 구별함으로써, 수소생산 효율을 더욱 높일 수 있다.

본 연구는 최적 수소생산 능력 비교실험 및 최적 수소생산 조건 탐색 연구의 일부이다. 수소생산능이 우수한 6개의 한국연안 산 남세균 종주와 대서양군 *Synechococcus* sp. 종주 Miami BG043511⁹⁾의 개체군 성장과 광생물학적 수소 생산 각각을 위한 두 가지의 최적 온도를 탐색하였다.

2. 실험 재료 및 방법

2.1 실험종주

실험에 사용된 한국 연안산 종주들은(Fig. 1) 모두

Cyanothece 속의 남세균이다. 이들이 채집된 연도와 장소는 2005년 천수만(KNU CB MAL-002), 2006년 고흥(KNU CB MAL-026), 2006년 가로림만(KNU CB MAL-031, 055 및 058), 2006년 부안(KNU CB MAL-054) 및 2006년 가로림만(KNU CB MAL-002) 등이다. 현장에서 생시료를 채취하여 단세포 분리한 후, 지속적인 계대배양으로 항온·항광 시스템에서 관리 중이다⁵⁾. 비교 종주로 이용한 *Synechococcus* sp. Miami BG043511은 1981년 카리브해의 Bahama 해역에서 Miami 대학교의 Akira Mitsui 교수 연구팀이 분리하였다⁸⁾.

2.2 실험방법

2.2.1 온도 별 성장반응 실험

염분 30 psu의 f/2+BGER 배양액(Table 1)을 사용하여 24일 동안 회분식 배양(batch culture) 실험을 실시하였다. 종주별로 각각 1000 cells mL^{-1} 이 되도록 초기에 접종하고, 100 $\mu E m^{-2} s^{-1}$ 의 연속 광 조건에서 20, 25, 30, 35°C의 4개 온도 구간을 적용하였다. 각 실험구에서 24시간 단위로 5mL 씩 2개의 분할시료(subsample)를 취하고 Lugol's solution으로 고정하였다. 고정시료 내 생물량의 분석은 광학현미경 하에

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

Reagents	Final concentration in medium (mol L ⁻¹)
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}

서 Sedgwick-Rafter 계수판과 혈구 계수판을 이용하여 수행되었다. 작성한 각 온도 별 성장곡선에서 연속 3일간의 지수성장 구간을 대표하는 성장 속도를 평균 일일 최대 성장률로 삼았다.

2.2.2 온도 별 수소생산 능 측정

광생물학적 수소생산 실험을 실시하기 위하여, 실험종주를 1) 연속광에서 배양하여 고농도의 배양체를 생산한 다음, 2) 이를 원심분리하여 얻은 pellet을 목표 농도로 희석한 실험 배양체를 질소고정 조건에서 동조화시키고, 3) 5일간의 질소고정과 동조화를 거친 배양체로 부터 pellet을 생산하여, 4) 고농도의 세포 혼탁액을 만든 후, 이를 이용하여 수소생산 측정 실험을 실시하였다.

2.2.2.1 연속 광 배양

염분 30psu의 f/2+BGER 배양액(Table 1) 500mL에 종주배양체 20mL를 접종 후, 광원에 대한 각 세포의 평균 노출도를 동일한 수준으로 유지하기 위해, 멀균 공기를 배양액에 연속 주입하였다. 100μE m⁻² s⁻¹의 연

속 광, 20°C의 일정한 온도 조건에서 2주간 회분식 배양을 실시하였다.

2.2.2.2 동조화 배양

한국 연안산 남세균 종주 6개와 대서양산 남세균 *Synechococcus* sp. Miami BG043511 종주를 연속광에서 일반 배양한 후, 고농도로 성장한 실험 배양체를 원심분리하여 pellet으로 수확하였다. Pellet을 염분 30psu의 f/2+BGER-N(질소원인 NaNO₃를 첨가하지 않음; Table 1) 배양액에 재 부유시켜 각각 약 10mL의 농축 배양체를 준비하였다. 준비된 농축 배양체의 세포농도를 결정하기 위해 농축 배양체의 0.1mL을 채취하여 f/2+BGER-N 배양액으로 100배 희석한 후 혈구 계수판에 넣어 광학 현미경 하에서 세포를 계수하였다. 다음으로 30psu의 f/2+BGER-N 배양액 200mL이 담긴 250mL 투명 실험용기 2개에 농축 배양체를 접종하여, 초기농도가 5×10^5 cells mL⁻¹이 되도록 하였다. 광원에 대한 각 세포의 평균 노출도를 동일한 수준으로 유지하여 자체 음영효과(self-shading effect)를 배제하기 위하여, 멀균 솜으로 여과한 공기를 배양액에 연속 주입하였다. 온도 20°C에서 100μE m⁻² s⁻¹로 14:10 L:D cycle의 광주기를 적용하여, 5일간 동조화 배양을 실시하였다.

2.2.2.3 실험조건 및 수소생산 측정

고농도 세포현탁액(cell suspension)을 희석하여 목표 농도의 배양체를 준비하였다. 질소 고정 조건에서 동조화 전처리를 마친 배양체를 원심분리하여 얻은 pellet을 재 희석하여 초고농도의 수소생산 용 실험 배양체를 준비하였다. 접종 초기의 세포농도는 본 연구진의 기존 수소생산 연구를 통해 확인된 각 종주 별 최적 세포농도를 적용하였다(CB002, CB026, CB031, CB054, CB055 : 6억 cells mL⁻¹, CB058 : 8억 cells mL⁻¹, BG043511 : 12억 cells mL⁻¹²⁾). 각 배양체를 25mL의 Fern-Bach flask에 3mL 씩 넣고 고무마개로 밀봉한 후, 수소생산량 측정을 위해 고무마개를 통해 주사바늘로 플라스크의 head space와 주사기를 연결하였다. 수소생산을 위해 flask 내 기체를 고순도 질

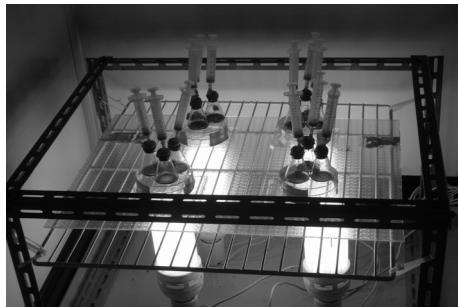


Fig. 2 Figure showing experimental condition for photobiological H₂ production

소가스로 100% 치환하고, 광도 350μE m⁻² s⁻¹의 연속 광 환경에서 온도 10, 20, 35°C를 적용하여(Fig. 2) 배양하였다. 실험 시작 후 0, 12, 24, 36, 48, 72시간 등의 6개 개스시료 채취점에서 gas chromatograph(SRI-8610C)를 이용하여 수소생산 누적량을 측정하였다.

3. 결과 및 토의

3.1 온도 별 성장반응

모든 실험 종주는 20°C에서 다른 온도구간에 비해 약 일주일 늦게 지수성장을 나타내었다(Fig. 3). 또한 20°C의 최대 생물량은 배양 후 15일~20일이 경과되어 뒤늦게 나타났으며, 그 값은 한국 연안산 6종주의 경우 1.6×10^6 ~ 2.43×10^6 cells mL⁻¹, 대서양산 Miami BG043511에서는 2.48×10^6 cells mL⁻¹ 이였다. 모든 종주는 30°C에서 가장 빠른 지수성장을 보였는데, 배양 3일~4일 만에 지수성장이 시작되어 5, 6일 만에 각 종주별로 20°C에서 기록한 최대 생물량을 초과하였다. 25°C와 35°C에서는 배양 3일~7일 사이에 지수적 성장이 나타났으며, 일반적인 성장패턴은 25, 30 및 35°C에서 서로 비슷하였다(Fig. 3). 종주 별 최대 생물량은 35°C(CB002, CB031, CB058 및 Miami BG043511) 또는 30°C(CB026, CB054 및 CB055)에서 나타났다(Table 2). 최대생물량 도달 시간은 모든 종주에서 30°C에서 35°C에 비해 짧았는데, 최장 3일이 단축되었다. 최대생물량 차이는 최대 0.6×10^6 cells

Table 2 Optimal temperature for photosynthetic growth of the 7 H₂ producing strains

Strain	Max. cell concentration & temperature (10^6 cells mL ⁻¹ , °C)	Exponential growth period (d) & Max. growth rates (day, μ max d ⁻¹)
CB002	4.12, 35	3~6, 1.82
CB026	4.12, 30	3~6, 1.82
CB031	4.8, 35	3~6, 2.08
CB054	4.12, 30	3~6, 1.79
CB055	4.0, 30	3~6, 1.79
CB058	4.0, 35	3~6, 1.7
BG043511	4.48, 35	3~6, 1.78

mL⁻¹의 미미한 수준으로, 시험 종주에 따라 최대생물량을 기록한 온도가 서로 상이하였다. 이런 점을 고려할 때, 30°C가 본 실험종주의 개체군 성장을 위한 최적 온도라고 판단된다. 또한 30°C와 35°C에서 3일째부터 나타난 지수성장 기간의 평균 일일 최대 성장률은 1.78~2.08 범위로 나타났다. 이는 수소생산 남세균 종 *Cyanothece* 속의 *Cyanothece* sp. ATCC51142 종주의 성장률이 0.9~1.0 d⁻¹로 보고된 이전의 결과¹⁴⁾와 비교해 볼 때 현저히 높은 값이다. 적용한 초고온도인 40°C에서 종주들의 성장반응을 확인하기 위해, 국내 연안산 종주 CB031과 대서양산 종주 Miami BG043511을 이용하여 성장실험을 진행하였다(Fig. 4). 40°C에서는 두 종주 모두 개체군의 불규칙한 변동을 보였다. 평균 생물량도 100~1300 cells mL⁻¹ 범위의 매우 수준에 머물러 있어 40°C의 고온에서는 이 두 종주의 정상적인 성장이 불가능함을 확인할 수 있었다. 이는 남세균의 성장과 수소생산이 적합한 온도 범위가 20~37°C라는 이전 보고와 40°C에서 광합성을 감소하는 기존 연구 결과들^{4,13)}과 일치하며, 실험에 사용된 종주 역시 40°C의 고온에서는 성장에 심각한 저해를 받음이 확인되었다(Fig. 4).

3.2 온도 별 수소생산

각 종주 별 3개 온도구간의 수소 누적량을 확인해 본 결과, 모든 종주들이 10°C에서는 미미한 수소

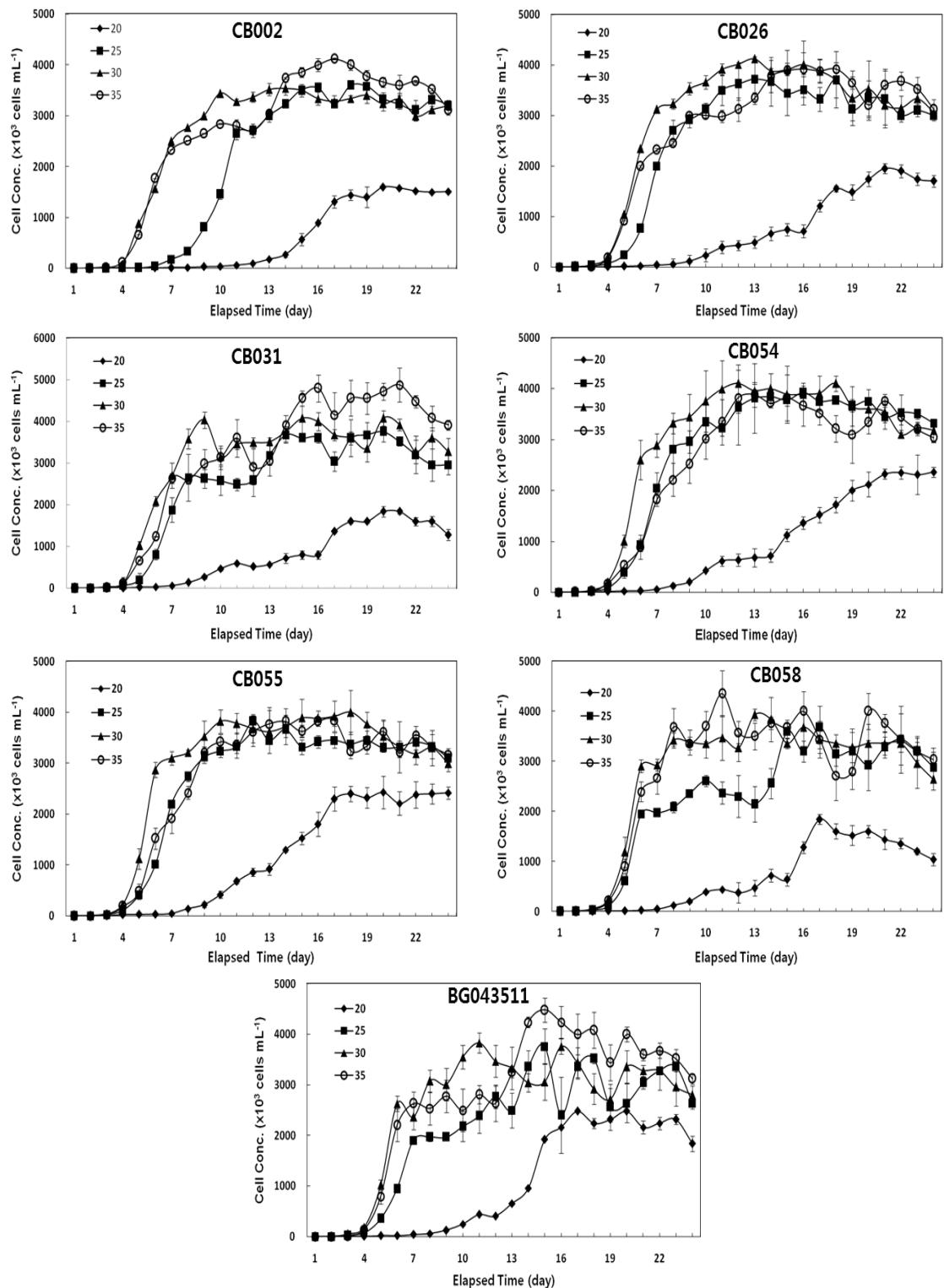


Fig. 3 Population growth of test strains at 4 different temperatures

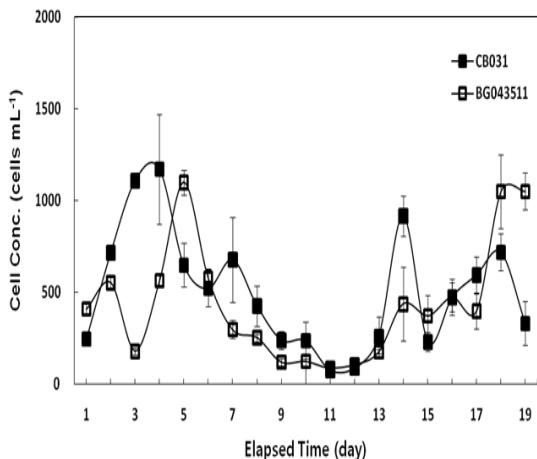


Fig. 4 Population growth of the two H_2 producing strains, CB031 and BG043511 at 40°C

생산능을 보였다. 10°C에서 CB054는 수소 누적량이 검출한계 이하였으며, 다른 종주들은 0.45~8.24 μ mole $H_2/10^8$ cells 범위의 낮은 수소 누적량을 나타냈다. 따라서 상대적 저온인 10°C에서는 종주 세포의 대사율이 저하되어, 수소생산능이 현저히 감소하는 것으로 판단된다. 20°C에서는 모든 종주들이 12.52~56.46 μ mole $H_2/10^8$ cells 범위의 수소 누적량을 보였으며, 모든 종주에서 최대 수소 누적량을 기록한 35°C에서는 14.97~60.54 μ mole $H_2/10^8$ cells 범위의 수소 누적량을 나타냈다. 시간대 별 수소 누적량을 살펴보면, 20°C와 35°C 조건에서 모든 시험종주들은 처음 48시간동안 수소 누적량의 증가를 나타내다가 이후 점차적으로 증가율이 감소하는 경향을 보였다 (Fig. 5). 이는 48시간 이후 uptake hydrogenase의 활동성 증가⁴⁾와 세포 내 글리코겐의 소진³⁾으로 인한 현상 등으로 예측할 수 있다. 모든 시험 종주들은 20°C와 35°C에서 서로 유사한 수준의 수소 누적량을 보였다. 수소 누적량 측정치 역시 두 온도 구간에서 큰 차이가 없었으므로(Fig. 6, Table 3), 경제성을 고려한다면, 20°C가 본 실험종주의 실용적인 최적 수소생산 온도라 생각된다.

결론적으로, 종주들의 개체군 성장을 위한 최적온도는 30°C인 반면 수소생산 조건에서 확인된 최적의

Table 3 Maximal H_2 production under 20°C and 35°C by the experimental strains.

Strain	Max. H_2 production (μ mole $H_2/10^8$ cells)	
	20°C	35°C
CB002	27.5	34.0
CB026	54.9	60.5
CB031	56.5	60.2
CB054	41.5	42.2
CB055	27.6	31.9
CB058	37.4	41.1
BG043511	22.9	28.6

수소생산 온도는 20°C인 것으로 확인되었다. 그러므로 실험종주를 이용한 광생물학적 수소 생산의 효율을 극대화하기 위해, 각각 차등적 온도를 적용한 2 단계 과정(two-step process)이 요구된다 하겠다. 즉, 1) 배양 온도 30°C에서 제 일 단계로 개체군의 최적 성장을 유도하여 생물량을 확보한 다음, 2) 수학한 배양체를 수소생산 조건에서 배양하되 최적 수소생산 온도인 20°C를 적용하는 제 이 단계 등이 그것이다.

또한 세포 생육기간과 수소생산기간에서 온도로 인한 세포 내 글리코겐의 변화양상을 정확히 규명한다면, 본 연구를 활용하는데 더욱 의미가 있을 것으로 사료된다. 본 연구진이 세포 내 글리코겐 변화를 확인한 결과에서¹²⁾, 광합성 시기에는 세포 내 글리코겐의 크기가 크고 분포 면적도 높게 나타나며, 세포 분열 시 광합성으로 확보한 많은 양의 글리코겐이 사용되어 세포당 함량이 감소하는 경향을 확인한 바 있다. 그리고 수소생산 후 세포 내 글리코겐의 양과 분포 범위가 감소하는 사실을 확인하였다¹²⁾. 이는 세포생육시기와 수소생산 시기에 글리코겐이 중요하게 활용되고 있음을 의미하며¹¹⁾, 수소생산 지속기간의 결정을 위해 중요한 요소임을 시사한다. 본 연구 결과와 연관하여 추후 응용연구로서, 온도 차에 의한 글리코겐의 변화양상을 심층적으로 파악하는 것이 중요할 것으로 판단된다.

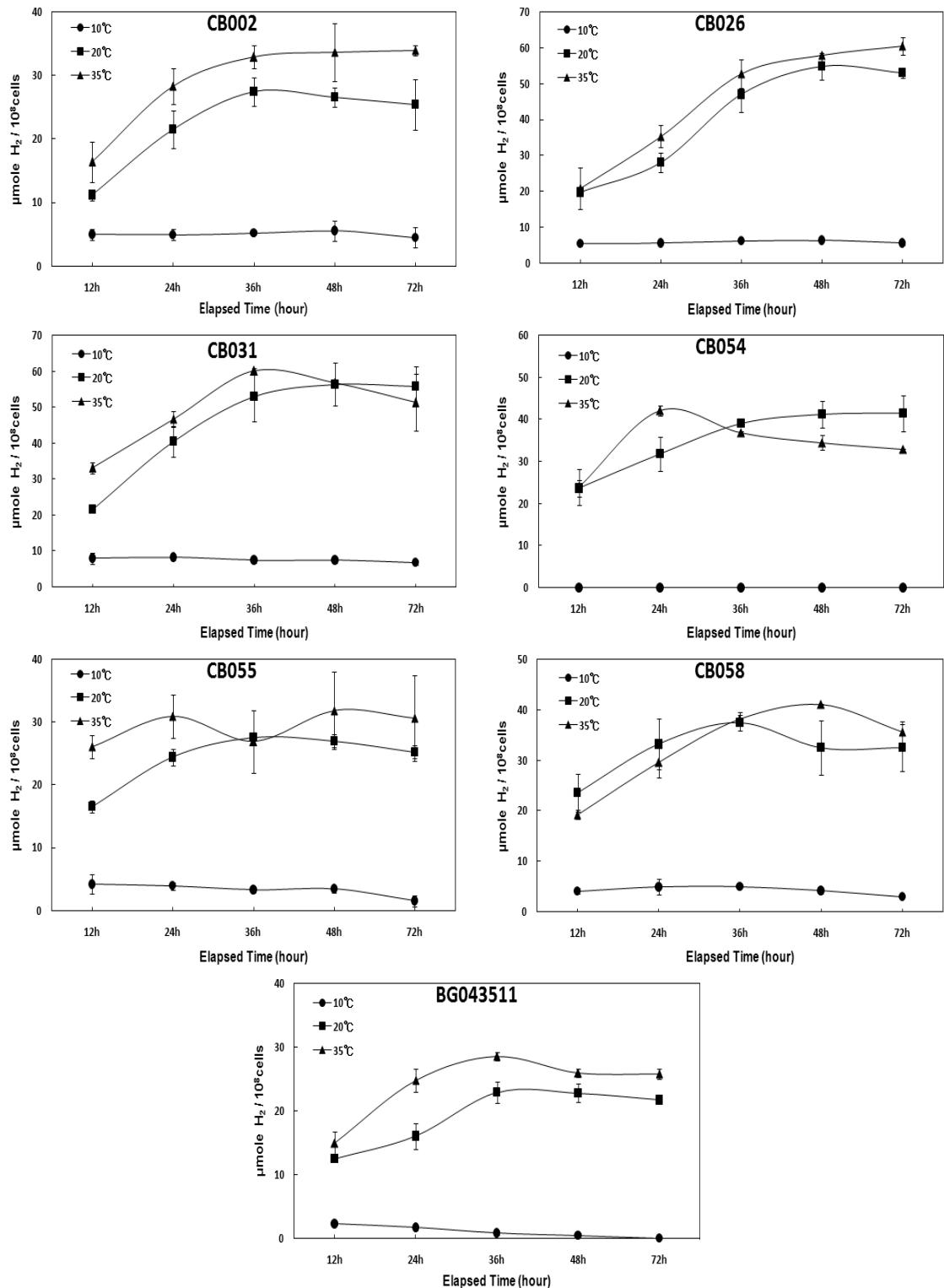


Fig. 5 H_2 production of test strains at 3 different temperatures

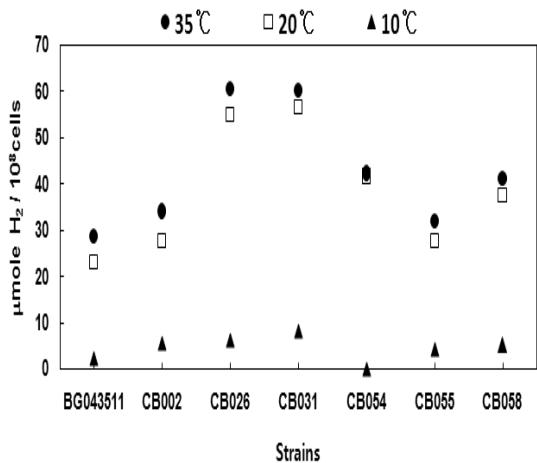


Fig. 6 Maximum H_2 production of strains at 3 different temperature

4. 결 론

- 1) 모든 종주들의 최적 성장온도는 30°C이며, 20°C의 조건보다 지수성장이 약 7일 빠르고, 최대 생물량은 2배 높았다.
- 2) 모든 종주들은 최적온도 30°C 적용 시, 평균 최대 일일 성장률이 1.78~2.08로 20°C에서 보다 크게 향상되었다.
- 3) 모든 종주들의 실용적 최적 수소생산 온도는 20°C이며, 10°C에서는 생산량이 극히 미미하였다.
- 4) 따라서 실험대상 수소생산 남세균 종주 전체의 생물량 확보를 위한 최적 온도는 30°C이며, 수소 생산을 위한 경제적이고 적정한 온도는 20°C라고 판단된다.
- 5) 실험대상 수소생산 남세균 종주를 이용한 수소생산의 효율을 제고하려면, 생물량 확보 단계(30°C) 및 수소생산 단계(20°C) 등으로 구성된 서로 적용 온도가 다른 2단계 과정을 구성할 필요가 있다.

참 고 문 헌

- 산대학교 대학원, 박사학위논문, 2011, 194 pp.
2. 박종우, 이원호, “국내 연안산 질소고정 남세균 종주의 세포동도별 광생물학적 수소생산력”, 2009 한국수소 및 신에너지학회 추계학술대회 논문집, 2009, pp. 80-83.
 3. G. Ananyev, N. Skizim, G. Dismukes, “Enhancing biological hydrogen production from cyanobacteria by removal of excreted products”, Journal of biotechnology 162, 2012, pp. 97-104.
 4. D. Dutta, D. De, S. Chaudhuri, S. K. Bhattacharya, “Hydrogen production by cyanobacteria”, Microbial cell factories, 2005, pp. 4-36.
 5. R. Guillard, “Methods for microflagellates and nanoplankton”, In, Handbook of phycological methods, 1973, pp. 69-85.
 6. S. Kumazawa, “Photoproduction of hydrogen by the marine heterocystous cyanobacterium *Anabaena* species TU37-1 under a nitrogen atmosphere”, Marine biotechnology 5, 2003, pp. 222-226.
 7. A. Mitsui, S. Cao, A. Takahashi, T. Arai, “Growth synchrony and cellular parameters of the unicellular nitrogen-fixing marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Miami BG043511 under continuous illumination”, Physiologia planarum 69, 1987, pp. 1-8.
 8. A. Mitsui, S. Kumazawa, “Hydrogen production by marine photosynthetic organisms as a potential energy resource”, Biological solar energy conversion, 1977, pp. 23-51.
 9. A. Mitsui, S. Kumazawa, “Efficient hydrogen photoproduction by synchronously grown cells of a marine cyanobacterium, *Synechococcus* sp. Mimai BG043511, under high cell density conditions”, Biotechnology and bioengineering 44, 1994, pp. 854-858.
 10. A. Mitsui, S. Suda, N. Hanagata, “Cell cycle events at different temperatures in aerobic nitrogen-fixing marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. Miami BG043511”, Marine biotechnology 1, 1993, pp. 89-91.
 11. Y. Nemoto, P. Blackwelder, A. Mitsui, “Ultrastructural changes during synchronous growth of aerobic

- nitrogen-fixing marine unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain Miami BG043511”, Marine biotechnology 1, 1994, pp. 177-183.
12. J. Park, S. Nam, H. Kim, W. Yih, “Enhanced photobiological H₂ production by the addition of carbon monoxide and hydrogen cyanide in two unicellular N₂ fixing cyanobacterial strains isolated from Korean coasts”, International journal of hydrogen energy, 심사 중.
13. R. Robarts, T. Zohary, “Temperature effects on photosynthetic capacity, respiration, and growth rates of bloom-forming cyanobacteria”, New Zealand Journal of marine and freshwater research 21, 1987, pp. 391-399.
14. B. Wu, B. Zhang, X. Feng, J. R. Rubens, R. Huang, L. M. Hicks, H. B. Pakrasi, Y. J. Tang, “Alternative isoleucine synthesis pathway in cyanobacterial species”, Microbiology 156, pp. 596-602. unicellular cyanobacterium *Synechococcus* sp. strain Miami BG043511”, Marine biotechnology 1, 1994, pp. 177-183.