알긴산염 마이크로캡슐 내부에 동결보존된 사상체 남세균의 특성 연구

박미레, 김지훈, 남승원, 이상득, 윤석민, 권대률, 이창수*
국립낙동강생물자원관 미생물연구실 조류연구팀

Received: December 17, 2019 / Revised: January 14, 2020 / Accepted: January 23, 2020

Characterization of Filamentous Cyanobacteria Encapsulated in Alginate Microcapsules

Mirye Park, Z-Hun Kim, Seung Won Nam, Sang Deuk Lee, Suk Min Yun, Dae Ryul Kwon, and Chang Soo Lee*

Algae Research Team, Microbial Research Department, Nakdonggang National Institute of Biological Resources, Sangju 37242, Republic of Korea

Cyanobacteria are microorganisms which have important roles in the nitrogen cycle due to their ability to fix nitrogen in water and soil ecosystems. They also produce valuable materials that may be used in various industries. However, some species of cyanobacteria may limit the use of water resources by causing harmful algal blooms in water ecosystems. Many culture collection depositories provide cyanobacterial strains for research, but their systematic preservation is not well-developed in Korea. In this study, we developed a method for the cryopreservation of the cyanobacteria *Trichormus variabilis* (syn. *Anabaena variabilis*), using alginate microcapsules. Two approaches were used for the experiments and their outputs were compared. One of the methods involved the cryopreservation of cells using only a cryoprotectant and the other used the cryoprotectant within microcapsules. After cryopreservation for 35 days, cells preserved with both methods were successfully regenerated from the initial 1.0×10^5 cells/ml to a final concentration of 6.7×10^6 cells/ml and 1.1×10^7 cells/ml. Irregular *T. variabilis* shapes were found after 14 days of regeneration. *T. variabilis* internal structures were observed by transmission electron microscopy (TEM), revealing that lipid droplets were reduced after cryopreservation. The expression of the *mreB* gene, known to be related to cell morphology, was downregulated (54.7%) after cryopreservation. Cryopreservation using cryoprotectant alone or with microcapsules is expected to be applicable to other filamentous cyanobacteria in the future.

Keywords: Cyanobacteria, cryopreservation, microcapsule, *Trichormus variabilis*, *mreB*

서론

남세균은 담수수계부터 해양환경에 이르기까지 다양하게 존재하고 지구상에서 최초로 광합성을 수행한 생물 중 하나로 알려져 있다. 많은 남세균 종이 공기중 질소를 수중 혹은 토양에 고정해 박테리아나 바이오매스 연소의 탈질화에 대한 손실을 보상한다고 알려져 있기 때문에 이들은 생태 환경적으로 중요한 위치를 차지하고 있다[1–3]. 또 여러 나라에

서 식품으로 이용했던 것에서 착안하여 남세균은 건강보조 식품, 사료첨가제, 대체연료, 화장품 원료, 제약 등 다양한 산업적 분야에서 유용한 생물 소재로 주목받고 있다[4–7]. 반면에 *Microcystis* sp., *Anabaena* sp., *Oscillatoria* sp., *Nostoc* sp., *Cylindrospermopsis* sp. 같은 남세균 종들은 유해 조류 번성을 발생해 환경문제를 일으키며 microcystin, cylindrospermopsin, anatoxin, saxitoxin과 같은 다양한 독소를 생산하기 때문에 인간이나 동물의 수자원 이용에 제한을 주는 미생물로 알려져 있다[8–10]. 이렇게 남세균은 수환경에서 중요한 생태학적 위치를 차지하고 있고, 동시에 인간 생활에 크게 영향을 미치는 생물이기 때문에 다양한 방면에서 연구가 활발히 수행되고 있다.

*Corresponding author

Tel: +82-54-530-0840, Fax: +82-54-530-0849

E-mail: cslee@nnibr.re.kr

© 2020, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

연구자들은 대체로 생물소재은행(culture collection)을 통해 남세균 자원을 분양받아 연구에 이용한다. 대부분의 미생물 은행 및 조류은행에서는 남세균을 액체 배지를 이용한 계대배양으로 유지하며 관리하고 있다[9, 11–13]. 그러나 주기적인 계대배양법은 시간과 비용, 인력의 소모가 크고 제한적인 배지 성분과 한정된 조건에서 배양하기 때문에 곰팡이나 세균 및 기타 미세조류 종과 오염 가능성이 높다는 단점이 있고, 세대 반복에 따른 돌연변이에 취약하다고 알려져 있다[11, 14]. 이러한 단점을 해결하고 남세균의 안정적인 중·장기 보존을 위해 동결보존제를 이용한 동결보존법이 꾸준히 개발되어 왔다[15]. 그러나 동결보존을 할 때, 세포가 냉각되면서 세포 내 수분이 세포 밖으로 나와 동결이 진행되고, 이 과정에서 세포 외부의 수분이 먼저 얼게 된다. 이때 세포 내부는 원형질 분리(plasmolysis)가 발생하여 세포 및 세포막 손상이 발생한다[12, 16]. 일반적으로 세포 손상을 방지하기 위해서 미리 dimethyl sulfoxide (DMSO)나 methanol, glycerol과 같은 동결보존제를 첨가하여 세포 내로 침투시키고 천천히 온도를 낮추는 방법으로 세포를 유리화(vitrification) 시켜 동결보존 재생률을 높일 수 있다[17, 18]. 그러나 미세조류 혹은 남세균과 같은 광합성을 수행하는 미생물은 세포벽 구조가 복잡하고 액포(vacuoles)나 편모 삽입점(flagella insertion points) 등 특이한 구조를 가지고 있어 동결보존제의 침투가 어렵기 때문에 세균이나 균류에 비하여 동결보존이 어렵다고 알려져 있다[12]. 예를 들어 세포 크기가 크거나 복잡한 구조를 가지고 있고 사상성 혹은 규산질 외피를 갖고 있는 돌말류의 경우, 동결보존이 어렵고 재생과정에서 대부분 사멸하거나 낮은 재생률을 보이는 것으로 알려져 있다[13, 15, 19–21]. 그럼에도 불구하고 동결보존제를 이용한 미세조류 및 남세균의 동결보존법은 1960년대 이후 꾸준히 개선되어 유럽의 자원은행에서는 실제 자원관리에 적용하기 시작했다[11, 12, 22–24].

1900년대에는 동결보존제의 독성이 세포내에 침투되어 영향을 미치는 것을 피하고 유리화를 용이하게 하기 위해 마이크로캡슐을 이용한 세포 포집법(encapsulation)이 개발되었다[7, 25]. 세포 포집법이란 알긴산염과 염화칼슘의 중합반응을 이용하여 동결보존하고자 하는 세포를 마이크로캡슐에 가두어 동결하는 방법이다. 처음에는 식물의 생식질(germplasm)을 보존하기 위해 개발되어 20여종의 식물세포에서 보존 효과를 확인하였고, 1990년대에는 미세조류 세포의 동결보존에도 적용되기 시작했다[7, 25–27]. 그러나 유럽과 미국에서 수행된 남세균 및 미세조류의 동결보존 연구에 비해 우리나라에서는 국내에서 분리된 남세균에 대한 동결보존 연구가 거의 이루어지지 않고 있다. 특히 단세포성 남세균에 비하여 사상성 남세균을 대상으로 한 동결보존연구가 부족한 실정이다[28].

따라서 본 연구에서는 한국의 담수수계에서 분리한 사상성 남세균인 *T. variabilis*를 일반적인 동결보존법과 마이크로캡슐을 이용한 동결보존법으로 각기 나누어 실험하여 그 효과를 비교하였다. 또 동결보존 후 재배양 시 나타나는 형태적 유전적 차이를 관찰하기 위해 광학 및 투과전자현미경(TEM)을 이용하여 세포 및 세포 내부의 형태 변화를 관찰하고 세포벽 분화와 관련된 유전자의 발현도를 비교하였다.

재료 및 방법

남세균 준비 및 배양

*Trichormus variabilis*는 낙동강생물자원관의 담수생물자원은행에서 *Trichormus variabilis* FBCC 010004 배양주를 분양받아 실험에 이용하였다(<https://fbcc.nnibr.re.kr/fbcc>). *T. variabilis*의 배양은 광주기(L:D) 12시간: 12시간, 온도 20°C, 습도 35%, 광도 20 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 조건에서 BG11 액체배지를 이용하여 500 ml culture flask에 200 rpm의 교반 속도로 배양한 후 이용하였다. 배양된 세포는 주기적인 계대배양을 통해 유지하였고, 혈구계수기(hemocytometer, Sigma-Aldrich, USA)를 이용하여 관측하고 농도를 측정하였다(Nikon eclipse Ni, Nikon, Japan). 계대배양 한 지 20일 이내의 *T. variabilis* 세포를 동결보존실험에 사용하였다.

남세균의 동결보존

동결보존제는 BG11배지에 희석한 20% DMSO 용액을 만들어 121°C에서 15분간 멸균 후, 무균배양대에서 cryovial에 1 ml씩 분주하였다. 1.0×10^7 cells/ml의 *T. variabilis* 배양액 1 ml를 동결보존제에 첨가하여 동결보존제의 최종 농도를 10%로 맞추었다. 마이크로캡슐을 이용한 동결보존을 위하여, *T. variabilis* 세포를 원심분리 하여 상등액은 버리고 3.0×10^6 세포를 모은 후 1 ml의 2.5% 알긴산염(sodium alginate)과 혼합해 마이크로피펫을 이용하여 2.5%의 염화칼슘(calcium chloride) 용액에 30 $\mu\text{l}/\text{drop}$ 으로 떨어뜨렸다. 생성된 한 개의 bead에는 1.0×10^5 세포가 포집되었다. 상온에서 10분간 기다린 후 체를 이용하여 bead만 모아 10%의 DMSO에 넣었다. 이 후 선행연구를 통해 밝혀진 최적의 동결조건으로 자동동결장치(Planer Limited Middlesex, UK)를 이용해 분당 1°C씩 -40°C까지 온도를 내렸다가 10분간 유지하고 다시 분당 1°C씩 -70°C까지 재 냉각 하는 2단계 동결보존법으로 동결하였다[11, 12, 29]. 4일간 -70°C에 보관 후 다음 실험에 사용하였다(Fig. 1).

재배양 및 재생률 분석

동결보존된 시료를 재배양 한 후 혈구계수기를 이용하여 살아있는 세포수를 세는 방법으로 실험하였다. 동결보존된

Fig. 1. Schematic representation of *Trichormus variabilis* cryopreservation procedure. Cell count with hemocytometer and cell harvest, then mix with 10% DMSO as cryoprotectant or produce Ca-alginate bead and mix same cryoprotectant. After 2 step cryopreservation and for 4 days later viability test was started with 96 well plate.

*T. variabilis*를 초저온냉동고에서 꺼내어 37℃ 수조에서 5분간 해동시킨 후 원심분리 하여 상등액을 버리고 BG11 배지를 20 ml 첨가하여 96 well plate에 well 당 200 µl씩 분주하고 재배양 하였다. 마이크로캡슐의 경우 한 well당 배지 200 µl에 bead 1개씩 넣고 20℃, 20 µmol/m²/s, 광주기 (L:D) 12시간: 12시간, 습도 35% 조건 하에서 재배양 하였다. 재배양 한 지 35일이 되었을 때 마이크로캡슐 및 각 well에 있는 *T. variabilis* 세포의 수를 혈구계수기로 측정하였다. 마이크로캡슐의 경우 homogenizer (Bio-vortexer homogenizer EF16425A, Daigger Scientific Inc., USA)를 이용하여 캡슐을 파쇄한 후 세포의 수를 측정하였다.

현미경 분석

*T. variabilis*는 동결보존 전, 동결보존 직후, 재생 14일, 재생 35일에 광학현미경(Nikon eclipse Ni, Nikon, Japan)으로 형태를 관찰하였고 10 × 4, 10 × 10, 10 × 20, 10 × 40배의 배율로 광학현미경 화상 자료를 확보하였다.

투과전자현미경 전처리는 *T. variabilis* 동결보존 전 bead, 동결보존 후 bead, 동결보존 후 14일간 배양한 bead의 동결보존제를 버리고 bead만 micro-centrifuge tube에 모아 2% glutaraldehyde 1 ml을 넣고 4℃에 한 시간 고정시킨 후 상등액을 버렸다. 배양 배지를 이용해 3회 이상 세척하고 1% osmium tetroxide 1 ml 넣고 4℃에 한 시간 고정 후 상등액을 버리고 증류수로 3회 세척했다. 이 후 에탄올 농도별(50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 100%)로 처리하여 탈수시키고 1 ml의 propylene oxide를 세번 반복 처리하였다. 마지막으로 propylene oxide에 희석된 레진(resin)을 50%, 75%, 100% 순으로 처리하고 치환이 완료되면 70℃에서 레진을 굳혀주었다. 레진 블록은 PT-X ultramicrotome (RMC Products;

Boeckeler Instruments, Tucson, USA)으로 얇게 절편으로 자른 후 JEM-1010 transmission electron microscope (JEOL, Japan)으로 분석하였다[30, 31].

Quantitative PCR

*T. variabilis*의 RNA는 Qiagen RNeasy mini kit (74104, Qiagen, Germany)를 이용하여 추출하였고 M-MuLV Reverse Transcriptase (NEB M0253, New England Biolabs Ltd., USA)를 사용하여 제공된 실험방법에 기술된 대로 cDNA를 합성하였다(<https://international.neb.com/protocols/2016/04/26/first-strand-cdna-synthesis-standard-protocol-neb-m0253>). Random primer mix, buffer, dNTP, reverse transcriptase를 넣고 25℃에서 5분간, 42℃에서 한 시간 반응 후 반응 중지지를 위해 65℃에서 20분간 처리하였다(First Strand cDNA Synthesis Quick Protocol). 그 후 Labopass™ SYBR Green Q Master (Cosmogentech, Korea)를 이용해 internal control 16s rRNA primer (F-AGCCACACTGGGACTGAGACA, R-TCGCCCATTGCGGAAA)로 pre-denature 94℃에서 3분간, amplification 94℃에서 10초간, 56℃에서 30초간 40회의 증폭 과정을 반복하였다[32]. *MreB* 유전자의 경우 선행연구에서 이용된 primer (Q7- AAATGTGATTGCCCTGCGA, Q8-TGCCTTCATTGACCCTCTGAA)를 이용하여 16s rRNA와 같은 온도, 시간 조건으로 quantitative PCR을 수행하였다 (CFX connect real-time PCR, Bio-Rad, USA) [33].

PCR 과정에서 목표 유전자가 특이적으로 증폭되었는지 확인하기 위하여 melting curve 분석을 수행하였다. 40회의 증폭반응 후에 65℃에서 95℃까지 온도를 올리며 유전자 이중 가닥의 녹는 점을 확인하였다. DNase digestion 후 잔여

DNA의 여부를 확인하기 위하여, DNA template가 들어가지 않은 조건(no template control, NTC)과 역전사 효소가 없는 조건(no reverse transcription control, NRTC)을 negative control로 사용하였다[34]. Ct 값은 Bio-Rad CFX manager software 제품의 기본설정을 이용하였고 relative expression의 경우 16s rRNA를 internal control로 사용하고, *mreB*를 목표 유전자로 설정하여 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 방법으로 발현량을 산출하였다[35].

결 과

T. variabilis 재생률

*T. variabilis*를 대상으로 동결보존제만 이용한 방법과 마이크로캡슐을 이용한 방법으로 동결보존 했을 때 재생효율을 비교하였다. 마이크로캡슐에 포집된 *T. variabilis*와 포집되지 않은 세포를 10%의 DMSO에 4일간 동결보존 했다가 해동하여 96 well plate에 BG11과 함께 옮겨 담고 세포 재생을 확인하였다. 초기 농도는 1.0×10^5 cells/well로 시작하였고 35일간 배양 후 혈구계수기를 이용하여 세포수를 측정하였다(Fig. 1). 한 개의 마이크로캡슐 안에는 최소 4.5×10^6 cells/well에서 최대 1.0×10^7 cells/well까지 평균 $6.7 \times 10^6 \pm 2.2 \times 10^6$ cells/well이 관찰되었고 동결보존제를 이용해 세포만 동결보존한 경우 최소 9.3×10^6 cells/well에서 최대 1.4×10^7 cells/well까지 평균 $1.1 \times 10^7 \pm 1.6 \times 10^6$ cells/well이 관찰되었다(Fig. 2). 4일간의 동결보존 후 35일 동안 배양한 실험에서 마이크로캡슐 포집방법보다 *T. variabilis* 세포만 동결보존제에 넣어 보존하는 방법이 약 2배가량 세포 농도가 높았다. 두 경우 모두 초기 세포수인 1.0×10^5 cells/well 보다는 35일간 배양 후 마이크로캡슐 방법이 67

Fig. 2. Viability comparison of encapsulation and non-encapsulation methods after 4 days of cryopreservation at -70°C . *T. variabilis* cells were counted with hemocytometer after 35 days of regrowth.

배, 일반 동결보존법이 110배 이상 세포수가 크게 늘어났다.

현미경을 통한 *T. variabilis* 형태 관찰

T. variabilis 세포는 동결보존 전과 후에 광학현미경, 투과전자현미경(TEM)을 통하여 세포의 변형 여부를 비교하였다. 마이크로캡슐의 경우 육안으로도 동결보존 전과 동결보존 후 14일간 재생 시 *T. variabilis*의 농도가 증가하여 캡슐의 색이 확연히 녹색으로 변하는 것을 확인하였다(Figs. 3A and 3C). 광학현미경을 통해 관찰한 캡슐 내 세포도 동결보존 전의 경우 사상성이 실처럼 잘 나타나지만 동결보존 후에는 세포의 모양이 커지고 원래의 구형이 아닌 부정형으로 나타났다(Figs. 3B, 3D). 이때 세포의 형태가 변하면서 사상성이 많이 끊어진 것을 관찰하였다(Fig. 3D). 35일간의 배양 후에는 배양 14일차 보다 더 큰 군집 모양의 세포와 완전히 재생된 사상성의 *T. variabilis*를 관찰할 수 있었고 군집 형태의 세포를 확대하면 외곽의 원래 세포막과 함께 수많은 세포가 모여있는 것을 관찰하였다(Figs. 3E and 3F).

투과전자현미경(TEM)을 이용하여 마이크로캡슐을 이용한 동결보존 전과 후 세포의 구조적인 차이를 관찰해 보았다. 동결보존 전 세포 내부는 주름 구조를 보이는 틸라코이드막과(thylakoid membrane) 내부의 검은색 지질체(lipid body), 회색의 카복시솜(carboxysome)과 틸라코이드막에 둘러 쌓인 하얀 공간의 lacunae가 관찰된다. 세포소기관은 원형의 형태로 보여주고 있으며 이러한 소기관 사이에 세포질(cytoplasm)로 채워져 있음을 확인하였다(Figs. 4A and 4B). 동결보존 직후에는 세포질이 감소하여 세포가 수축되면서 표면에 깊은 주름이 생기는 검은 줄이 나타나거나 lacunae와 lipid body의 크기가 줄어든 것으로 확인된다(Figs. 4D–4F). 또한 동결보존 직후 세포의 외부에 균질한 polysaccharide layer가 발견되고 있다(Fig. 4D). 전체적으로 동결보존 전에는 thylakoid가 원형을 이루고 있으며 cytoplasm이 세포 내에 충전되어 있지만, 동결보존 직후나 재배양 14일 후에는 thylakoid가 겹겹이 쌓여 있거나 뭉쳐져 있고 cytoplasm이 줄어들어 있는 것을 확인하였다(Figs. 4B–4F).

세포 형태 관련 *mreB* 유전자 발현도

*T. variabilis*의 동결보존 재생 14일 후 세포의 형태가 커지고 부정형적으로 변하는 것을 관찰하였다. 형태관련 유전자 발현과의 연관성을 확인하기 위하여, 남세균의 세포 형태와 연관된 *mreB* 유전자의 발현도를 quantitative PCR을 통해 확인해 보았다. Melting peak를 확인해 보면 16s rRNA와 *mreB* 유전자 모두 $84\text{--}85^\circ\text{C}$ 사이에서 peak를 보였다. 동결보존 전과 후 모든 샘플이 서로 같은 온도에서 peak를 보였기 때문에 다른 유전자의 증폭이나 다른 종의 오염이 없었다. 또한 동결보존 전과 후에 melting peak가 같은 온도

Fig. 3. Light microscopic images of encapsulated *T. variabilis*. Before cryopreservation of Ca-alginate bead (A) and expended cell (B), re-cultivation after 14 days of Ca-alginate bead (C) and expended cell (D), re-cultivation after 35 days of Ca-alginate bead cell (E) and expended cell (F).

즉 동일선상에서 나타나는 것은 증폭된 염기서열이 같음을 의미하고 따라서 동결보존 전후 염기서열 변화없이 *mreB* 유전자가 제대로 증폭되었음을 의미한다.

세포 내에서 항상 발현하는 16s rRNA를 내부 통제 유전자(internal control)로 기준했을 때 동결보존 전 Ct 값이 24.87 ± 0.230 , 동결보존 후 24.74 ± 0.040 으로 동결보존 전후 크게 차이가 없었다. 그러나 *mreB* 유전자의 경우 동결보존 전 Ct 값이 12.54 ± 0.112 , 동결보존 후 11.55 ± 0.135 로 약 1정도 유의한 차이가 났다. 이 값을 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 수식에 대입한 후 동결보존 전을 1로 fold change했을 때 동결보존 직후 *mreB* 유전자의 발현도가 0.547로 동결보존 전에 비하여 54.7%로 줄어 든 것을 확인하였다(Fig. 5).

고찰

T. variabilis 재생률

본 연구에서는 동결보존 대상인 남세균 *T. variabilis*를 일반적인 세포와 마이크로캡슐에 포집하여 동결보존제에 동결보존 한 경우의 효율을 비교하였다. 그 결과 두 가지 방법 모두 초기 농도 1.0×10^5 cells에 비해 동결보존 후 35일간 배양 시 마이크로캡슐 방법은 67배, 일반 동결보존법은 110배 증가한 세포수를 보였다. 따라서 동결보존 후 재생효율이 마이크로캡슐 방법에 비해 일반 동결보존법이 세포 농도 증가에 더 유리하였다(Fig. 2). *T. variabilis*를 0.4 M sucrose 용액에 세 가지 동결보존제(DMSO, ethylene glycol, glycerol)

Fig. 4. Transmission electron microscope images of encapsulated *T. variabilis*. Before cryopreservation of Ca-alginate bead (A, B), after cryopreservation of Ca-alginate bead (C, D), re-cultivation after 14 days of Ca-alginate bead cell (E, F). L = Lipid, C = carboxysome, La = Lacunae, Ty = Thylakoid, P = Polysaccharide layer.

Fig. 5. MreB gene expression level of before and after cryopreservation. Before cryopreservation fold change = 1.

를 혼합하여 일반적으로 동결한 방법과 마이크로캡슐에 포집하여 액체질소에 보존한 선행연구에서도 비슷한 결과를 확인하였다[27]. 이는 세포 재생 시 일반 동결보존법은 공간의 제약이 거의 없는 반면 마이크로캡슐의 경우 초기에는 bead에서만 성장해야 하기 때문에 공간의 제약을 받아 세포 농도 차이가 난 것으로 판단된다. 이를 정확하게 비교하기 위해서는 동일 부피의 액상 배지와 마이크로캡슐을 설계하거나 마이크로캡슐을 동결한 후 분쇄하여 동일 부피의 액상 배지에 재생하여 비교할 필요가 있다.

현재 국내에서 분리된 *Oscillatoria*, *Gitlerinema*와 같은 사상성 남세균과 *Chlorella*, *Chlamydomonas*, *Mychonastes*와 같은 녹조류에 대한 동결보존을 연구하고 있으며 동결보존 후 재배양이 되는 것을 부분적으로 확인하였다. 이번 *T. variabilis*의 연구결과로 마이크로캡슐을 이용한 동결보존법이 다른 사상성 남세균에도 적용이 가능할 것으로 예상되나

다른 종에 대한 적용범위와 동결보존 조건 등은 후속연구를 통하여 추가적으로 확인할 필요가 있다. 또한 동결보존 기간이 길어질수록 재생률이 낮아지고 재생 시간도 오래 걸린다는 여러 선행 연구결과가 있었기 때문에 동결보존된 *T. variabilis*에 대하여 동결보존 기간에 따른 생존률 변화를 지속적으로 추적하는 연구도 필요하다[11, 36].

현미경을 통한 *T. variabilis* 형태 관찰

동결보존 후 재생 시 *T. variabilis*의 형태가 기존에 알려진 연구결과와 다르게 변하는 것을 관찰하였다(Fig. 3D). 일반적으로 동결보존 후 재생에는 형태가 거의 변하지 않거나 대체로 동결보존 직후 탈수작용으로 세포수축이나 엽록체 파괴를 일으킨다고 알려져 있었다[7, 27, 37]. 그러나 본 연구에서는 재생 14일 후에 세포 크기가 커지고 구형이 아닌 부정형의 모양으로 변하였는데 이는 기존 남세균이나 사상성 미세조류의 동결보존에서 알려진 바 없었다. 재생 35일 후에는 커진 세포 내에서 여러 개의 세포로 분화된 모습을 원래 세포막이 일부 파괴된 것과 함께 관찰하였다(Figs. 3D and E). 이는 *T. variabilis*가 대체로 2분법으로 분열하는 것과는 다른 양상이지만 휴면포자와 akinete 형태로 분열할 때 akinete coat를 사상성의 세포형태로 벗기는 경우와 일부 유사했다[38, 39]. 따라서 동결보존 후 재생과정에서 급격한 온도 변화와 물 부족 같은 극한 환경에 살아남기 위해 세포가 저온 스트레스에 반응하고 시간이 지날수록 손상을 회복하여 다시 원래의 모습을 찾는 것으로 추정된다.

*T. variabilis*의 형태 변화는 투과전자현미경(transmission electron microscope, TEM) 사진에서도 세포소기관의 변화로 잘 나타난다. 세포막 합성의 과정에서 문제가 생길 때 세포의 형태가 부정형으로 변화할 수 있다. *Hematococcus* sp.를 대상으로 한 연구에서 지질의 수송 메커니즘이 제대로 작동하지 않은 경우에 세포 내 합성된 지질 운송에 문제가 생기고, heterocyst glycolipid로 구성된 틸라코이드의 합성이 저해되면서 lacunae을 유발할 수 있다고 보고되었다[40]. 또한 지질 합성에 문제가 생기면 세포벽의 성분 변화로 인해 탄력성이 떨어지면서 세포벽이 더 단단해질 수 있다고 보고되었다[41]. 이렇게 지질 합성 경로에 변화가 온 세포는 외형적으로 구형에서 부정형으로 변하고 이로 인하여 동일한 표면적의 세포벽으로 유지하는 세포 내부의 부피는 구형에 비해 축소될 수 있어 결과적으로 부정형으로 변화된 세포는 구형에 비해 cytoplasm의 부피를 줄여 외부 스트레스에 반응할 것으로 예상된다.

최근 연구에 따르면 광합성을 수행하는 미세조류가 동결 조건에서 생존률을 높이는 방법으로 세포 내 수분함량의 감소, 광합성의 발현 저하, 세포벽의 경화, 클로로필 함량의 감소 등이 보고되었다[42, 43]. 세포외 다당류는 줄어든 수분

량 때문에 생기는 건조 환경에 대한 저항성을 세포에게 제공할 것으로 여겨진다. 남세균의 exopolysaccharides (EPS) 층은 복잡한 구조로, 일반적으로 흡습성이 있는 다당류로 구성되는데, 세포의 성장과정에서 수분 보유 특성을 조절할 수 있다고 알려져 있다(Fig. 4D) [44]. 또한 gloeocapsin, fuscocorhodin, fuscocochlorin과 같은 색소의 생성은 건조 내성을 증가시키는 것이 보고되었다[45].

세포 형태 관련 *mreB* 유전자 발현도

동결보존 재생 시 세포 형태 변화와 관련하여 특정 유전자 발현에 변화가 생겨 형태적 변화가 있었을 것으로 보고 세포 형태와 관련된 유전자의 발현도를 비교하였다. 세포 형태에 관여하는 유전자 중 *mreB* 유전자는 세포골격을 형성하는 액틴을 생성하는 유전자로 대부분의 박테리아에서 세포 모양과 분열에 관여하는 유전자이다[46, 47]. 이 *mreB* 유전자가 발현되지 않게 유전자를 조작하거나 세포에 중금속 스트레스를 주면 유전자 발현량이 줄어 *Anabaena*의 세포 모양이 부정형으로 변한다고 알려져 있다[33]. 따라서 본 연구에서는 세포 재생 후 *T. variabilis*의 형태 변화와 관련하여 동결보존 전과 직후에 *mreB* 유전자 발현량을 quantitative PCR을 이용해 확인해 보았고 그 결과 동결보존 직후에 유전자 발현이 0.547로 동결보존 전에 비하여 54.7%로 감소하였다(Fig. 5). 기존에 알려진 *mreB*의 기능과 본 연구에서 확인한 발현량 감소결과로 볼 때, 동결보존 직후에 세포 스트레스로 인해 *mreB* 유전자 발현이 줄어들어 재생 14일에는 세포 형태를 유지하지 못했고, 재생 35일에는 다시 *mreB* 유전자 발현이 정상화 되어 세포분열이 되며 세포 형태가 정상화 되었을 것으로 추측된다(Figs. 3D-F).

결론

해외의 자원은행과 달리 국내 자원은행에서는 남세균이나 조류에 대한 동결보존 연구가 미비하다. 따라서 국내에서 분리한 사상성의 남세균인 *Trichormus variabilis* (sys. *Anabaena variabilis*)에 대하여 일반적인 세포와 동결보존제를 이용한 방법, 마이크로캡슐을 이용한 포집 방법 두 가지 방법을 이용해 동결하고 재생효율을 비교해 보았다. 아울러 재생 시 형태적인 변화를 광학 및 투과전자현미경을 통해 관찰하고 세포의 형태와 관련된 *mreB* 유전자의 발현도도 함께 측정하였다. 그 결과 세포와 동결보존제를 이용한 방법이 초기 1.0×10^5 cells/well 보다 35일간 배양 후 일반 동결보존법은 6.7×10^6 cells/well, 마이크로캡슐을 이용한 동결보존법은 1.4×10^7 cells/well로 세포수가 증가하였다. 따라서 국내에서 분리한 *T. variabilis* FBCC 010004 배양주는 동결보존제를 이용한 일반적인 동결보존법 및 마이크로

캡슐을 이용한 동결보존법을 이용하여 동결보존이 가능했다. 일반적으로 동결보존 후 세포수축의 형태를 보인다고 알려진 바와 달리 재생 14일 후에는 세포가 더 커지고 부정형적인 형태가 되었다. 그러나 35일 후에는 커진 세포가 다시 사상성으로 *T. variabilis*가 분화되는 모습을 보였다. 또 세포 골격에 관련된 *mreB* 유전자의 발현도가 동결보존 전 보다 후에 대략 절반가량 줄어들었다. 또한 부정형 세포변화, 다당류 생산, cytoplasm 축소에 따른 세포 내부의 틸라코이드 배열의 변화, lipid body 함량 변화 등은 저온 스트레스에 의한 지질합성과 같은 생리적 특성변화와 연관이 있으며, 세포벽 경화와 수분량 감소 등과 같은 동결조건에 대응하는 생존전략과 일치하는 것으로 보인다.

요 약

남세균은 수계나 토양 생태계에서 질소 고정 능력으로 인해 질소순환 과정에 중요한 역할을 하는 미생물로 다양한 산업분야에서 활용될 수 있는 유용 물질을 생산할 수 있다. 또한 일부 종은 수생태계에서 유해조류 번성을 일으켜 수자원의 이용을 제한한다. 일반적으로 생물소재은행은 관련 연구를 위해 남세균 배양주를 제공하는 역할을 한다. 하지만 국내 생물소재은행에서는 남세균의 체계적인 보존이 미비한 실정이다. 본 연구에서는 국내에서 분리한 *Trichormus variabilis* (syn. *Anabaena variabilis*)를 대상으로 알긴산 마이크로캡슐을 이용한 동결보존기술을 개발하였다. 동결보존제만 사용하는 일반 동결보존법과 세포를 마이크로캡슐에 포장한 후 동결보존제를 혼합하는 두 가지 방법으로 실험을 수행하였고 각각의 효율을 비교하였다. *T. variabilis* 동결보존 후 35일간 재배양하여 세포수를 비교한 결과 두 가지 동결보존법 모두 재생에 성공하였으며, 초기 농도 1.0×10^5 cells에서 마이크로캡슐 방법은 6.7×10^6 cells로, 일반 동결보존법은 1.1×10^7 cells로 증가되었다. 또한 배양 14일 후 *T. variabilis* 세포의 부정형 형태를 발견하였다. 세포 소기관을 관찰하기 위해 투과전자현미경(TEM) 분석을 하였고 lacunae와 lipid body의 크기가 줄어든 것을 확인하였다. 세포 형태와 관련된 *mreB* 유전자가 동결보존 전에 비해 동결보존 후 발현량이 54.7%로 감소된 것을 확인하였다. 본 연구결과를 통해 향후 사상성 남조류에 대하여 보존제와 마이크로캡슐을 이용한 동결보존이 가능할 것으로 기대된다.

Acknowledgments

This research was supported by the research program of the Nakdonggang National Institute of Biological Resources funded by the Ministry of Environment (NNIBR201902111, NNIBR202001103) and by the Basic Core Technology Development Program for the Oceans

and the Polar Regions of the National Research Foundation funded by the Ministry of Science, ICT & Future Planning (2016M1A5A1027454).

Conflict of Interest

The authors have no financial conflicts of interest to declare.

References

1. Brock TD. 1973. Evolutionary and ecological aspects of the cyanophytes. *Botanical Monographs*. **9**: 487-500.
2. Tamagnini P, Axelsson R, Lindberg P, Oxelfelt F, Wunschiers R, Lindblad P. 2002. Hydrogenases and hydrogen metabolism of cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **66**: 1-20.
3. Fay P. 1992. Oxygen relations of nitrogen fixation in cyanobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **56**: 340-373.
4. Milledge JJ. 2010. Commercial application of microalgae other than as biofuels: a brief review. *Rev. Environ. Sci. Biotechnol.* **10**: 31-41.
5. Mourelle M, Gómez C, Legido J. 2017. The potential use of marine microalgae and cyanobacteria in cosmetics and thalassotherapy. *Cosmetics* **4**: 46.
6. Vijayakumar S, Menakha M. 2015. Pharmaceutical applications of cyanobacteria-A review. *J. Acute Med.* **5**: 15-23.
7. Wang B, Zhang E, Gu Y, Ning S, Wang Q, Zhou J. 2011. Cryopreservation of brown algae gametophytes of undaria pinnatifida by encapsulation-vitrification. *Aquaculture* **317**: 89-93.
8. Hallegraeff GM. 1993. A review of harmful algal blooms and their apparent global increase. *Phycologia* **32**: 79-99.
9. Wood SA, Rhodes LL, Adams SL, Adamson JE, Smith KF, Smith JF, et al. 2008. Maintenance of cyanotoxin production by cryopreserved cyanobacteria in the New Zealand culture collection. *New Zeal J. Mar. Fresh* **42**: 277-283.
10. Bartram J, Chorus I. 1999. Toxic cyanobacteria in water - A guide to their public health consequences, monitoring and management. In: Redman M, Crompton TR, Welch EB, Bau J, Henriques JD, Oliveira Raposo de J, Lobo Ferreira JP, Best G, Niemirycz E, Bogacka T, Lester JN, Birkett JW, Gleeson C, Gray N, Pereira LS, Gowing J, Bardole R, Kay B, Smith LED, Franks T, Howsam P, Carter RC, Helmer R, Hespanhol I, Kimstach V, Meybeck M, Baroudy E, Chapman D, Bartram J, Balance R, Kay B, Howsam PE & FN Spon, pp. 416. London.
11. Rastoll MJ, Ouahid Y, Martín-Gordillo F, Ramos V, Vasconcelos V, Campo FFd. 2013. The development of a cryopreservation method suitable for a large cyanobacteria collection. *J. Appl. Phycol.* **25**: 1483-1493.
12. Day JG, Benson EE, Harding K, Knowles B, Idowu M, Bremner D, et al. 2005. Cryopreservation and conservation of microalgae: the development of a Pan-European scientific and biotechnological resource (the COBRA project). *Cryo Letters* **26**: 231-238.
13. Day JG. 2007. Cryopreservation of microalgae and cyanobacteria. pp. 141-151. *Cryopreservation and Freeze-Drying Proto-*

- cols. Humana Press, Totowa, NJ.
14. Cavalcante SC, Freitas RS, Vidal MSM, Dantas KC, Levi JE, Martins JEC. 2007. Evaluation of phenotypic and genotypic alterations induced by long periods of subculturing of *Cryptococcus neoformans* strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **102**: 41-47.
  15. Romo S, Bécáres E. 1992. Preservation of filamentous cyanobacteria cultures under low temperatures. *J. Microbiol. Methods*. **16**: 85-89.
  16. Benson EE. 2008. Cryopreservation of phytodiversity: a critical appraisal of theory & practice. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* **27**: 141-219.
  17. Harding K, Day JG, Lorenz M, Timmermann H, Friedl T, Bremner DH, et al. 2004. Introducing the concept and application of vitrification for the cryo-conservation of algae-a mini-review. *Nova Hedwigia*. **79**: 207-226.
  18. Day JG. 2004. Cryopreservation: fundamentals, mechanisms of damage on freezing/thawing and application in culture collections. *Nova Hedwigia*. **79**: 191-205.
  19. Brand JJ, Diller KR. 2004. Application and theory of algal cryopreservation. *Nova Hedwigia*. **79**: 175-189.
  20. Day JG, Fleck RA. 2015. Cryo-injury in algae and the implications this has to the conservation of micro-algae. *Microalgae Biotechnol.* **1**: 1-11.
  21. Gwo JC, Chiu JY, Chou CC, Cheng HY. 2005. Cryopreservation of a marine microalga, *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae). *Cryobiology* **50**: 338-343.
  22. Mori F, Erata M, Watanabe MM. 2002. Cryopreservation of cyanobacteria and green algae [Chlorophyceae] in the NIES-collection [Japan]. *Microbiology and Culture Collections (Japan)*. **18**: 45-55.
  23. Holm-Hansen O. 1963. Viability of blue-green and green algae after freezing. *Physiol. plant.* **16**: 530-540.
  24. Morris GJ. 1976. The cryopreservation of *Chlorella* 1. interactions of rate of cooling, protective additive and warming rate. *Arch Microbiol.* **107**: 57-62.
  25. Paulet F, Engelmann F, Glaszmann J-C. 1993. Cryopreservation of apices of in vitro plantlets of sugarcane (*Saccharum* sp. hybrids) using encapsulation/dehydration. *Plant Cell Rep.* **12**: 525-529.
  26. Sakai A, Engelmann F. 2007. Vitrification, encapsulation-vitrification and droplet-vitrification: a review. *Cryoletters* **28**: 151-172.
  27. Kumari N, Gupta MK, Singh RK. 2016. Open encapsulation-vitrification for cryopreservation of algae. *Cryobiology* **73**: 232-239.
  28. Park H-K. 2006. Long-term Preservation of bloom-forming cyanobacteria by cryopreservation. *Algae* **21**: 125-131.
  29. Day JG, DeVille MM. 1995. Cryopreservation of algae. in: Day J.G., Pennington M.W. (eds) *Cryopreservation and Freeze-Drying Protocols*, pp. 141-151, *Methods in Molecular Biology*™, Ed. Humana Press, Totowa, NJ.
  30. Nam SW, Shin W. 2016. Ultrastructure of the flagellar apparatus in cryptomorph *Cryptomonas curvata* (Cryptophyceae) with an emphasis on taxonomic and phylogenetic implications. *Algae* **31**: 117-128.
  31. Popova A, Kemp R. 2007. Effects of surfactants on the ultrastructural organization of the phytoplankton, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Anabaena cylindrica*. *Fund Appl. Limnol.* **169**: 131-136.
  32. Al-Tebrineh J, Mihali TK, Pomati F, Neilan BA. 2010. Detection of saxitoxin-producing cyanobacteria and *Anabaena circinalis* in environmental water blooms by quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**: 7836-7842.
  33. Hu B, Yang G, Zhao W, Zhang Y, Zhao J. 2007. MreB is important for cell shape but not for chromosome segregation of the filamentous cyanobacterium *Anabaena* sp. PCC 7120. *Mol. Microbiol.* **63**: 1640-1652.
  34. Purohit GK, Mahanty A, Mohanty BP, Mohanty S. 2016. Evaluation of housekeeping genes as references for quantitative real-time PCR analysis of gene expression in the murrel *Channa striatus* under high-temperature stress. *Fish Physiol. Biochem.* **42**: 125-135.
  35. Livak KJ, Schmittgen TD. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods*. **25**: 402-408.
  36. Garrido-Cardenas JA, Han X, Alonso DL, Garcia-Maroto F. 2019. Evaluation and optimization of a methodology for the long-term cryogenic storage of *Tetradismus obliquus* at - 80°C. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **103**: 2381-2390.
  37. Lukešová A, Hrouzek P, Harding K, Benson EE, Day JG. 2008. Deployment of the encapsulation/dehydration protocol to cryopreserve diverse microalgae held at the Institute of Soil Biology, Academy of Sciences of the Czech Republic. *Cryoletters* **29**: 21-26.
  38. Sakr S, Jeanjean R, Zhang CC, Arcondeguy T. 2006. Inhibition of cell division suppresses heterocyst development in *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **188**: 1396-1404.
  39. Braune W. 1980. Structural aspects of aknete germination in the cyanobacterium *Anabaena variabilis*. *Arch Microbiol.* **126**: 257-261.
  40. Black K, Buikema WJ, Haselkorn R. 1995. The hglK gene is required for localization of heterocyst-specific glycolipids in the cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. *J. Bacteriol.* **177**: 6440-6448.
  41. Hagen C, Siegmund S, Braune W. 2002. Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *Eur. J. Phycol.* **37**: 217-226.
  42. Chekanov K, Vasilieva S, Solovchenko A, Lobakova E. 2018. Reduction of photosynthetic apparatus plays a key role in survival of the microalga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) at freezing temperatures. *Photosynthetica* **56**: 1268-1277.
  43. Singh SM, Elster J. 2007. Cyanobacteria in antarctic lake environments. *Algae and cyanobacteria in extreme environments*. pp. 303-320. Ed. Springer, Dordrecht.
  44. Potts M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol.*

Mol. Biol. Rev. **58**: 755-805.

45. Bewley JD. 1979. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Annu. Rev. Plant Physiol.* **30**: 195-238.
46. Singh SP, Montgomery BL. 2011. Determining cell shape: adaptive regulation of cyanobacterial cellular differentiation and

morphology. *Trends Microbiol.* **19**: 278-285.

47. Gaballah A, Kloeckner A, Otten C, Sahl HG, Henrichfreise B. 2011. Functional analysis of the cytoskeleton protein MreB from *Chlamydomonas reinhardtii*. *PLoS One* **6**: e25129.