

# Chlorella蛋白質의 N<sup>15</sup> 標識

黃 鎬 觀

全北大學校 文理科大學 化學科

## N<sup>15</sup> labelling of Chlorella Protein

Ho-Kwan HWANG

Department of Chemistry, College of liberal arts and Sciences,  
Cheon Puk National University

Ordinary biological methods of evaluating protein quality are subjected to various sources of error, such as preliminary feeding, body weight of the animals, length of feeding period, endogenous nitrogen metabolism, etc. (1). Wide variations in the reported data may be partly due to this fact.

The author postulated that by applying labelled protein these shortcomings may be avoided and that a balance study using nitrogen-15 would give most reliable data, uninfluenced by other factors which are unavoidable in ordinary balance studies using unlabelled nitrogen (2). However, the most important prerequisite for testing this assumption is to obtain labelled protein.

As it has been known long since that chlorella contains a large amount of protein and can be easily cultured in quantity (3,4), it was thought that labelled protein might be obtained by adding N<sup>15</sup> into the culture media.

In this study it has been tried to find out, therefore, whether it is possible to obtain labelled protein by incorporating KN<sup>15</sup> O<sub>3</sub> into the culture fluid and at what stage of growth the incorporation of the label into chlorella occurs.

### 序 言

從來의 生物學的 蛋白質評價의 諸方法에는 豫備飼育 体重 內因性 窒素代謝等 諸 誤差要因때문에 研究者에 따라 그 報告値에 큰差가 있다<sup>1)</sup>. 이와같은 欠陷은 蛋白質을 同位元素로 標識하여 그 標識된 蛋白質을 追跡 함으로써 一掃할 수 있을 것으로 생각된다. 따라서 著者는 從來의 Nitrogen balance method<sup>2)</sup>에 準하여 N<sup>15</sup>로 標識된 蛋白質의 N<sup>15</sup> balance study로서 더 正確한 結果를 얻을 수 있을 것으로 생각하여 우선 N<sup>15</sup>로 標識된 蛋白質을 얻고자 하였다.

*Chlorella ellipsoidea*는 손쉽게 培養할 수 있고 또 많은 蛋白質을 包含하고 있으므로<sup>3,4)</sup> 著者는 本實驗에서 培養液內에 N<sup>15</sup>를 添加함으로써 培養液內의 N<sup>15</sup>으로부터

N<sup>15</sup>으로 標識된 chlorella protein을 얻을 수 있는 지의 與否 그리고 이 chlorella의 成長過程과 N<sup>15</sup>의 蛋白質에의 incorporation과의 關係를 檢討하였다.

### 實驗方法

實驗에 使用한 chlorella는 *chl. ellipsoidea*이며 同調培養法<sup>5)</sup>에 依하여 純粹培養한 것이다. 길이 1m 幅 20cm의 容器內에 30cm 間隙으로 세워진 plastic tube를 通하여 5% CO<sub>2</sub>-95%air를 200ml/min로 培養液內에 吹入 攪拌하였으며 光源으로는 白色螢光燈을 使用하여 9000 Lux로 調節하고 溫度는 21°C pH는 6.0으로 維持하였다.

基本培養液의 組成은 Table 1과 같다.

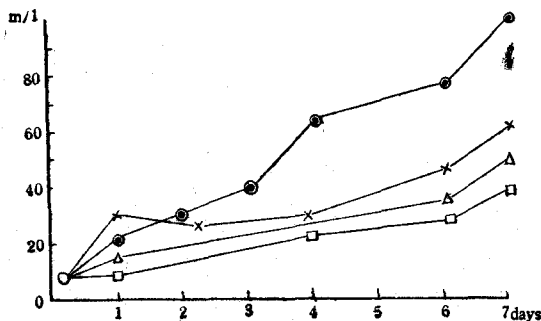
**Table 1. Basic composition of culture fluid of *Chlorella ellipsoidea*, per liter**

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.25g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.50g
FeSO <sub>4</sub> solution, 0.5%	1.0ml
Arno's A <sup>5</sup> solution*	1.0ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> or KNO <sub>3</sub>	variable amount
* H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> 2.850g/l	
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1.810g/l
ZnCl <sub>2</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.220g/l
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.078g/l
3(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> O <sub>7</sub> MoBO <sub>3</sub>	0.111g/l

培養液에다 *chl. ellipsoidea*를 接種한 後 一定時間 經過後에 培養液에서 試料를 採取하여 cell number와 packed cell volume를 測定하였으며 chlorella protein은 高森<sup>6,7)</sup>에 準하여 chlorella를 120×g, 10분간 遠沈 分離하여 培体の 10倍容量의 70% methanol에 1時間 浸漬시킨 後 遠沈 分離하고 다시 70% methanol로 反覆浸漬하여 煮沸한 다음 減壓乾燥시켜 N 및 N<sup>15</sup>의 定量 試料로 하였다. *chl. ellipsoidea*의 cell number는 Thoma's hemocytometer로 顯微鏡下에서 計測하였고 그 packed cell volum은 마개있는 遠沈管에 넣어서 1500×g로 5분간 遠沈하여 測定하였다. N의 分析은 micro Kjeldahlometry에 依하였고, N<sup>15</sup>는 mass spectrometry에 따라 그 excess%를 求하고 total nitrogen에다 이 값을 곱하고 또 1/1000을 곱하여 얻었다.

**結 果**

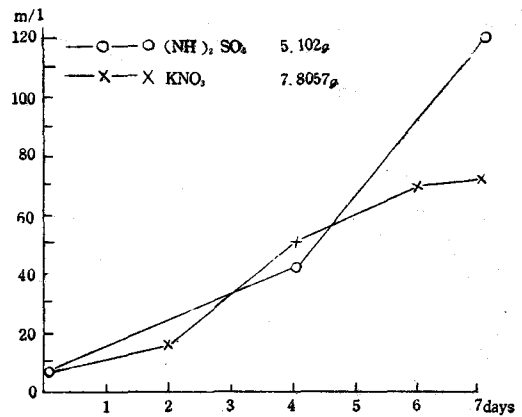
먼저 培養液中的 窒素量이 chlorella蛋白質에 미치는 影響은 Fig. 1에서 보는 바와 같이 培養時間에 따라



**Fig. 1. Uptake of nitrogen into the chlorella, Circles=6.01g/l, crosses=4.01g/l, triangles=3.04g/l, and squares=2.09g/l of (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> were added to the culture fluid.**

Chlorella 窒素가 增加하였을 뿐만 아니라 培養液中的 窒素濃度에 比例하여 chlorella 窒素含量이 많아짐을 볼 수 있었다. 그러나 이와같이 培養液에 添加한 窒素에 對한 chlorella 体内에 uptake된 窒素의 比率을 最終日인 70만에 觀察한 結果 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>量이 2.09g/l 및 3.04g/l 일때는 各各 16.5% 및 19.4%로 增加하나 4.01g/l와 6.01g/l 일때에는 各各 15.5% 및 14.1%로 오히려 줄어드는 것을 볼 수 있었다.

使用한 N<sup>15</sup>의 source가 KN<sup>15</sup>O<sub>3</sub>이었으므로 KNO<sub>3</sub>를 培養液中的 Nitrogen source로 供給하여 그 影響을 보 고져 窒素量이 같은 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>와 KNO<sub>3</sub>를 各各 培養液內에 넣어 chlorella体内에 들어가는 窒素量을 比較 하여 보았으며 그 結果는 Fig. 2와 같다.



**Fig. 2. Incorporation of nitrogen into chlorella protein from KNO<sub>3</sub> as exogenous nitrogen source. The same amounts of nitrogen (1.082 g/l) were added either as (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (circles) and as KNO<sub>3</sub> (crosses).**

添加後 第4日까지는 兩群間에 別差異가 없으나 第7日에는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>群에서는 123mg/l인데 反하여 KNO<sub>3</sub>는 74mg/l으로서 差異가 나며 後者가 nitrogen source로 前者보다 못하였다. 그러나 兩者 모두 chlorella 窒素의 source로 利用되고 있음을 알 수 있었다.

다음 1.5% excess의 KNO<sub>3</sub>를 5g/l가 되도록 培養液內에 加하여 chlorella의 成長 pattern과 chlorella內의 窒素 및 N<sup>15</sup>의 吸收를 觀察하였다. Table 2는 이와같은 實驗結果를 綜合한 것이다.

여기에서 L는 光線下 D는 遮光時를 나타내고 sub-number는 時間을 나타낸다. 여기에서 細胞數는 照光時에 32時間만에 約 2倍로 增加하였으며 遮光時에도 亦是 增加하여 39時間만에 2倍以上으로 增加하여 光源의 有無에 相關없이 增加함을 볼 수 있다. 그러나

Table 2. Growth pattern and incorporation of N and N<sup>15</sup> into chlorella

	L <sub>0</sub>	L <sub>4</sub>	L <sub>14</sub>	L <sub>32</sub>	D <sub>15</sub>	D <sub>39</sub>
Cell no. (x10 <sup>9</sup> /l)	9.81	11.06	10.5	18.43	23.33	40.25
Packed cell vol. (%)	0.39	0.45	0.77	1.60	1.55	1.58
Nitrogen (mg/l)	6.74	7.34	12.16	30.62	—	30.16
N <sup>15</sup> % excess	0.0	0.128	0.500	0.516	—	0.580
N <sup>15</sup> (mg/l)	0.0	0.009	0.061	0.158	—	0.175

Lo: immediately after inoculation. L<sub>4</sub>, L<sub>14</sub>, L<sub>32</sub> are values at 4, 14, and 32 hrs. after inoculation under illumination. D<sub>15</sub> and D<sub>39</sub> are 15 and 39 hrs. after switching off the light.

packed cell volume은 Nitrogen量과 比例하여 32時間의 照光期間中에는 約 4倍의 增加를 보이나 一段 遮光하면 packed cell volume의 增加는 거의 停止됨을 볼 수 있다. 即 光線下에서는 窒素의 同化와 蛋白質의 合成이 일어나나 遮光時에는 細胞의 分裂만이 일어나는 것을 暗示하는 것 같다. 한편 N<sup>15</sup>를 보면 光線下에서는 14時間後에 벌써 0.5% excess로서 급격히 增加하고 培養液內의 labelled N<sup>15</sup>에서 새로히 合成되는 것을 볼 수 있으며 그後는 32時間 지나도록 0.516으로 큰 變動이 없으며 그後에는 N<sup>15</sup>總量은 nitrogen量에 比例하여 增加하는 것을 볼 수 있다. 그러나 遮光으로서 39時間 지난後 N<sup>15</sup> excess는 0.58%로 N<sup>15</sup>總量은 0.175mg으로 前者에 比해서 약간만 增加하는 것을 볼 수 있었다

### 考 察

Chlorella의 成長과 培養液內의 窒素와의 關係는 알 려진 바 오래이며<sup>8)</sup> Sadikova<sup>9)</sup> 등은 medium內에 50~300mg/l의 濃度가 最適이라고 하였다. 本研究에서도 N의 量의 增加에 따라 chlorella의 窒素 uptake가 增加하지만 이 uptake率은 培養液中的 窒素含量이 높을 수록 점차로 減少되는 것을 볼 수 있었다. 또한 그 nitrogen source에 따라서도 상당히 差異가 있었다. Tomova<sup>10)</sup> 등은 urea와 NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>가 가장 좋으며 KNO<sub>3</sub>나 KNO<sub>2</sub>는 그것보다 못하다고 한바 있으며 Truklin<sup>11)</sup>도 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 또는 CO(NH<sub>2</sub>)<sub>2</sub>로 부터의 assimilation이 KNO<sub>3</sub>로 부터의 assimilation보다 좋다고 하였다. 그러므로 本研究에서도 ammonium compound가 nitrate compound보다 더 좋은 nitrogen source라는 結果와 符合한다. 다음에 chlorella의 培養에 있어서 그 細胞數는 照光下에서나 暗室에서 有意한 差異없이 增加하였다. 그러나 packed cell volume과 窒素의 uptake는 遮光하면 거의 增加하지 않았으며 따라서 이와같이 光合成이 일어나지 않는 狀態에서는 窒素의 assimilation도 일어나지 못함을 보여주고 있다. 한편 N<sup>15</sup>의 excess %는 光線下에서 14時間後에 0.500으로 거의 最高值에

도달하고 그 後에는 큰 變動이 없었던 것은 N<sup>15</sup>가 nitrogen과 같이 蛋白質內로 assimilation되어 가는 것을 보여 주고 있다. 遮光下에서도 아깝이 若干 上昇한 것은 光合成이 일어나지 않는 狀態에서도 培養液中的 nitrogen과 chlorella체內의 nitrogen間의 交換이 일어나고 또한 influx와 outflux가 平衡狀態에 있기때문인 것으로 생각된다.

### 結 論

1. 培養液으로부터 *Chlorella ellipsoidea*체內에 窒素의 uptake는 培養液中的 N-content에 比例하여 增加하나 吸收率은 3g/l (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 가장 높았으며 더 증가시키면 오히려 吸收率이 低下하는 傾向이었다.

2. Nitrogen source로서는 (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>가 KNO<sub>3</sub>보다 좋았다.

3. 成長時間과 N-uptake와 關係는 照光下에서 packed cell volume과 더불어 增加하였으나 暗室內에서는 N-incorporation과 packed cell volume은 일어나지 않았다. 細胞分裂는 어느 條件下에서나 계속 일어났다.

N<sup>15</sup>는 KN<sup>15</sup>O<sub>3</sub>로 부터 nitrogen과 같이 chlorella protein內로 들어가며 N<sup>15</sup>-labelled chlorella protein을 손쉽게 얻을 수 있었다.

### 參考文獻

1. Evaluation of protein quality. Report of an international conference, committee on protein malnutrition, food and nutrition board, National academy of Sciences, National Res. Council. Publ. 1100, p 23, 1963.
2. 東京大學 農學部 農藝化學教室編 實驗農藝化學(上) 1960.
3. Takechi, Y: Mass cultivation of chlorella and present state of its application. Hakkō Kyokaizhi 23, 370-374, 1965.
4. 神立誠: クロレラ蛋白質の營養價 J. Jap. Soc.

- Food and Nutri. 16, 318-322, 1963.
5. Tamiya, H. E. Hose, K, Shibata, A. Mituza, T. Iwamura, T. Nihei, and T. SaSa. Kinetics of growth of chlorella, with special to its dependence on quantity of available light and on temperature.
  6. 高森乙松：クロレラとその飼料價値(3)畜産の研究 20, 921-924, 1966.
  7. Nier, A. O. C., . Preparation and measurement of isotopic tracers. Ed. by Wilson, Nier and Remann, Edwards ann Arbor, p. 11, 1946
  8. Tamiya, H: Mass culture of algae. Ann. Rev. plant physiol. 8, 309-304, 1957.
  9. Sadikova, G. I., I. I. Gitelzon, I. A. Tershoo. Nitrogen in the nutrient medium as a factor for controlling chlorella biosynthesis. AKad. Navk. SSSR, Sib. Otd. Inst. Fiz. 113-26, 1967
  10. Tomova, N. G., Z. G. Eust. gneeva, V. L. Kretovich. The assimilation of nitrite and urea nitrogen by *chlorella pyrenoidosa*. Chem. Abs. 69, 33712 m, 1968.
  11. Trukhin, N. V. Effect of different nitrogen compounds on growth and chemical composition of *chlorella pyrenoidosa*. Chem. Abst. 68, 93824p, 1968.