

Chlorella 의 物質代謝에 미치는 微養元素의 缺乏效果(第 1 報)

—生長·呼吸 및 光合成能에 관하여—

李永祿·陳 平·沈雄燮

(高麗大學校·理工大·生物學科)

Effect of micronutritional-element deficiencies on the metabolism of *Chlorella* cells. (I)

—On the growth rate, respiration and photosynthesis—

Lee, Yung-Nok, Chin Pyung and Sim, Woong-Seop

(Department of Biology, Korea University)

Abstract

Chlorella ellipsoidea cells were cultured in an iron, copper, zinc, manganese, molybdenum or boron-free medium. Physiological activities such as growth rate, reproduction, endogenous and glucose respiration, photosynthetic activity and biosynthesis of chlorophyll of the micro-element deficient cells were measured.

In generally, growth rate, respiratory and photosynthetic activities, and biosynthesis of chlorophyll of the micro-element deficient cells decreased more or less, compared with those of the normal cells.

The growth of the algal cells in an iron-free medium were retarded severely with the chlorosis, and the photosynthetic activity of the cells decreased remarkably even though the low content of chlorophyll in the cells owing to the iron-deficiency is considered. Therefore, it is deduced that iron takes part in the photosynthetic process itself, possibly by its participation in the photo phosphorylation coupled with electron transport.

Respiratory activity of boron-deficient cells showed the most severe decrease whereas those of the molybdenum-deficient cells showed very slight decrease in spite of severe growth retardation.

緒 論

藻類의 無機營養에 관한 研究는 오래전부터 많은 學者들의 研究對象이 되어왔고 특히 綠藻類의 生長에 重金屬元素나 모리브덴 및 보론이 不可缺하다는 것은 널리 알려져 있으나(Wiessner, 1962; Hutner and Provasoli 1964, Epstein, 1965) 細胞의 物質代謝 과정에 있어서의 微養元素 各개의 特異한 作用에 대해서는 아직도 解明하여야 할 餘地를 많이 남기고 있다.

本研究에서는 細胞의 體物質 生合成 과정에 있어

서의 이들 微養元素 各개의 特異한 作用을 究明코자 우선 微養元素缺乏細胞의 生長, 增殖, 呼吸能 및 葉綠素 含量과 光合成能 등 여러가지 生理的 活性을 測定 比較하였다.

材料 및 方法

Chlorella ellipsoidea 를 M 4 N 培地(Tamiya et al, 1953)에서 正常的으로 培養한 후 Fe, Mn, Zn, Cu, Mo 및 B 등 微養元素의 하나가 각각 缺乏된 培地에 接種하였다. 培地는 一級試藥과 ion 交換樹脂를 통과한 純水를 使用하여 만들었다. 培養期間中 一

定한 溫度와 照明을 維持하였고 계속적으로 約 3%의 炭酸가스를 포함하는 空氣의 氣泡을 보내어 通氣하으로써 細胞의 沈澱을 방지하였다.

接種後 六日間の 培養으로 細胞의 生長率은 對照區에 비해 모든 微養元素 缺乏區에서 약간 減少되었으나 黃白化現象과 더불어 가장 심한 生長障害를 나타내었던 Fe 缺乏區에 있어서도 細胞의 容量은 接種時의 約 11 培로 增加하였다. 따라서 微養元素 缺乏培地에서 6日間 生育한 이들 細胞를 각각 해당 微養元素 缺乏細胞로 간주하였다.

生長, 增殖 및 葉綠素 含量의 測定: 微養元素 缺乏細胞를 각각 해당 缺乏培地에 接種하여 第2代 繼代培養을 하였다. 接種時와 培養의 中間期에 一定量의 細胞를 收穫하여 細胞의 生長, 增殖 및 葉綠素 含量 등을 測定하였다. 細胞의 生長은 packed cell volume 으로 測定하였고 增殖은 細胞數를 count 하여 算出하였다. 葉綠素의 含量은 通常의 方法대로 675 mμ에서의 Optical density로 推定하였다.

檢査測定: 微養元素 缺乏細胞의 發育과정에 있어서의 呼吸能과 光合成能을 比較코져 第2代 繼代培養으로 5日間 培養한 細胞를 收穫하여 呼吸能과 光合成能을 각각 manometric method로 測定하였다.

光合成能의 測定은 飽和光線(約 20,000 lux.)으로 細胞를 계속 照射하고 reaction Chamber에는 bicarbonate-carbonate mixture(pH range 6.3~7.3 at 25°C)에 細胞를 懸濁하여 25°C에서 測定하였다. 光線下에서 30分間 계속 則定한 다음에는 다시 暗處에서 呼吸으로 消費한 酸素의 量을 測定하여 이로부터 光合成으로 放出된 酸素量을 求하여 QO_2 로 算出하였다. 呼吸能의 則定은 전과 같은 方法(陳, 李 1965)으로 행하였다.

實驗 結果

微養元素 缺乏細胞의 生長과 增殖: 微養元素 缺乏培地에서의 第1代 培養에서 6日후에 나타낸 *Chlorella* 細胞의 生長差를 표 1에 표시하고 이들 缺乏細胞가 第2代 繼代培養에서 나타낸 生長差를 Fig 1에 표시한다. 표 1에서 보는 바와 같이 第1代 培素에서는 Fe 缺乏區를 除外하고는 對照區에 비해 다소 生長의 遲延되기는 하였으나 현저한 差異를 나타내지는 않았다. 다만 Fe-缺乏區에서 만은 第1代 배양에서 부터 심한 黃白化現象과 더불어 生長의 抑制가 현저하였다.

그러나 Fig. 1에서 보는 바와 같이 第2代 繼代

Table 1. Packed volume of *Chlorella* cells in the microelement deficient medium. (1st subculture) (ml/Liter medium)

medium	Inoculation	6 days later	increase (-fold)
normal	0.225	4.00	17.7
-Fe	0.225	2.60	11.2
-Mo	0.225	3.24	14.4
-Mn	0.225	3.25	14.0
-Zn	0.225	3.45	15.3
-B	0.225	3.30	14.6
-Cu	0.225	3.75	16.6

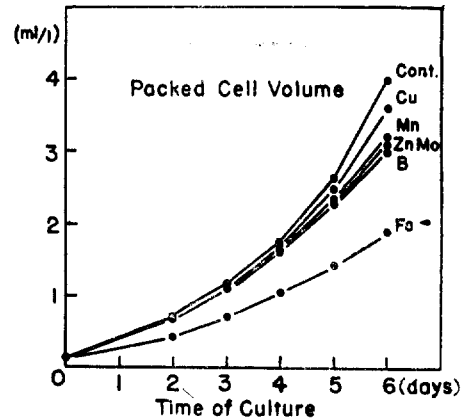


Fig. 1 Effect of micronutritional-element deficiency on the growth rate of *Chlorella* cells. The cells were precultured in each micro-element deficient medium for 6 days before the inoculation.

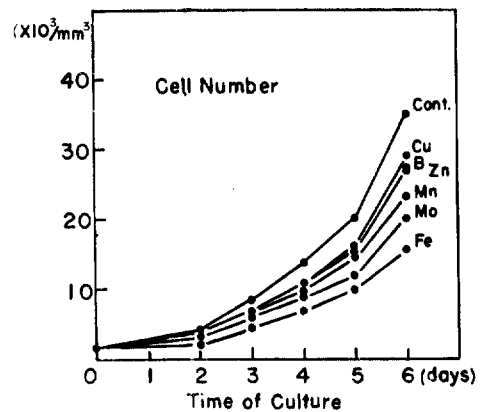


Fig. 2 Effect of micronutritional-element deficiency on the reproductive rate of *Chlorella* cells. The cells were precultured in each micro-element deficient medium for 6 days before the inoculation.

培養에서는 微養元素의 缺乏에 起因하는 이러한 生長差가 다소 顕著하여졌다. Fe-缺乏培地에서 若干 細胞가 가장 甚한 生長障害를 입었고 그 다음이 Mo-缺乏區로 Mn, Zn, B 등의 缺乏區와 서로 비슷한 影響을 입었고 Cu-缺乏區에서는 生長障害가 가장 輕微한 편이 있으나 實驗한 모든 微養元素가 *Chlorella*의 生長에 必要하며 그 缺乏으로 生長이 지연된다는 것을 알 수가 있다.

한편 細胞의 增殖率도 微養元素의 缺乏으로 顕著히 低下하였는데 Fig. 2에서 보는 바와 같이 增殖率의 低下는 대체로 細胞의 生長障害와 비슷한 傾向을 나타내었다. 卽 生長障害가 가장 甚한 Fe-缺乏區에서부터 Mo, Mn의 順으로 細胞의 增殖도 影響을 입었다. 그리고 배양기간 중 測定한 細胞의 平均 直徑은 一般의으로 各 微養元素 缺乏細胞에서 다소 減少되는 傾向을 나타내었다.

細胞의 呼吸 및 光合成能에 미친 微養元素의 缺乏效果: 微養元素의 缺乏에 起因하는 *Chlorella* 細胞의 生長障害가 細胞의 어떠한 生理的 活性의 低下로 招來되었는가를 밝히고자 微元素 缺乏細胞의 光合成能과 呼吸能을 測定하여 그 結果를 Fig.3과 Fig. 4에 각각 표시하였다.

Chlorella 細胞의 光合成能은 Fe-缺乏細胞에서 가장 낮고 正常細胞의 光合成能의 約 6~7%에 不 過하였다. 그 다음이 Cu-, Mn-, Zn-缺乏細胞의 順인데 이들 缺乏細胞의 光合成能도 正常細胞의 그 것에 비해 顕著히 減少하였다. 그러나 Mo-缺乏細胞에 있어서는 그 生長率의 低下와는 달리 光合成能의 低下는 그다지 顕著하지 않았다.

Chlorella 細胞의 呼吸能은 Fig 4에서 보는 바와

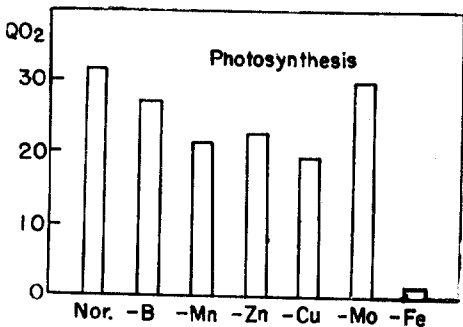


Fig. 3 Comparison of photosynthetic activities of the micronutritional-element deficient *Chlorella* cells, which were grown in the micro-element deficient medium for 11 days through second subculture.

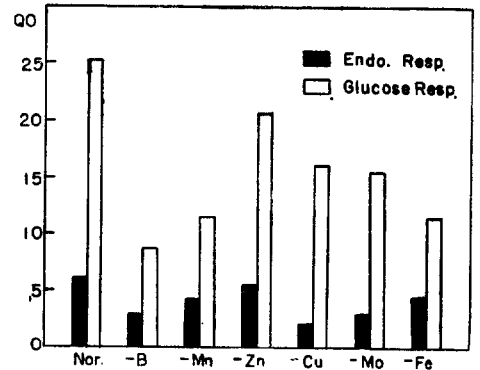


Fig. 4 Endogenous and glucose respiration of the micronutritional-element deficient *Chlorella* cells, grown in the micro-element deficient medium for which were 11 days through second subculture.

같이 微養元素의 缺乏으로 相當한 장애를 입었다. 一般的으로 glucose respiration에 미친 微養元素의 缺乏效果가 endogenous respiration에 미친 效果보다도 더 顯著하였다. glucose respiration이 가장 顯著히 抑制된 것은 B-缺乏細胞이고 그 다음이 Mn-, Fe-, Mo-, Cu-, Zn-의 順으로 實驗한 모든 缺乏細胞에서 呼吸能은 抑制되었다.

微養元素 缺乏細胞의 光合成能의 顯著한 低下가 *Chlorella* 細胞의 葉綠素 含量의 減少에 直接的인 原因이 있는 것인가의 與否를 밝히고자 微養元素

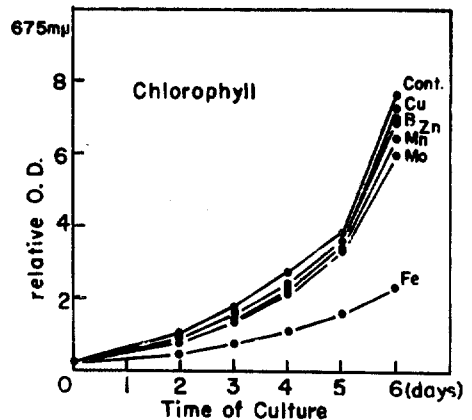


Fig. 5 Effect of micronutritional-element deficiency on the biosynthetic activity of chlorophyll in *Chlorella* cells. The cells were precultured in each micro-element deficient medium for 6 days before the inoculation.

缺乏細胞의 葉綠素의 形成能을 第2代 繼代培養 과정을 통하여 測定한 結果를 Fig. 5에 표시하였다. 微養元素 缺乏細胞들의 葉綠素의 生合成은 Fig 5에서 보는 바와 같이 正常細胞의 그것에 비해 상당히 抑制되었다. 그 정도는 Fe-缺乏細胞에서 가장甚하고 그 다음이 Mo-, Mn-缺乏細胞의 順으로 대체로 細胞의 生長에 미친 効果와 비슷한 傾向을 나타내었다. 이는 微養元素의 缺乏에 起因된 *Chlorella* 細胞의 發育遲延은 細胞의 葉綠素 形成能의 低下에 直接的인 原因이 있다는 것을 나타내는 것이다. 그러나 葉綠素 形成이 가장 抑制된 Fe-缺乏細胞의 경우에 있어서도 光合成能의 抑制는 細胞의 葉綠素含量의 減少를 考慮한 것보다도 더 甚한 것이었다.

考 察

實驗한 微養元素 Fe, Cu, Mo, Mn, Zn, B 등은 *Chlorella* 細胞의 正常的發育을 위해 不可缺少하다. 이들 微養元素가 缺乏된 細胞에서 나타난 一般的 現象은 程度의 差는 있으나 모두 生長障害, 呼吸 및 光合成能의 低下를 초래하였다.

*Chlorella pyrenoidosa*의 光合成實驗에서 Emerson (1939, 1929)은 Mn, Zn, Cu, Mo, B 등과 같은 微養元素는 모두 細胞의 光合成에 影響을 미치며 Fe-缺乏細胞의 光合成能의 減少는 葉綠素 含量의 減少에만 그 原因이 있는 것이라는 結論을 내린 바 있다. 그러나 Pirson et al (1952)은 *Ankistrodesmus*의 Fe-缺乏에 由來하는 光合成能의 減少는 黃白化現象과 平行하기는 하나 所謂 "recovery technique"를 적용하여 Fe-缺乏細胞에 Fe를 加했을 때 곧 光合成의 回復이 수반되지 않는 것을 보고 Fe-缺乏細胞의 葉綠素 含量의 減少는 오히려 間接的인 結果이고 Fe의 缺乏으로 葉綠體內의 蛋白質의 合成이 減少되는 것이 아닌가하고 推理한 바 있다.

本研究에서 測定한 Fe-缺乏細胞의 光合成의 減少

는 細胞의 葉綠素 含量의 減少를 考慮한 것보다도 더 甚한 것으로 나타났다. 即 培養과정을 통한 細胞數나 葉綠素 含量의 變化는 細胞의 生長과 대체로 비슷한 傾向을 나타내었으나 Fe-缺乏細胞의 光合成能은 보다 顯著하게 抑制되었다. 그러나 葉綠素의 測定에 Opal glass method (Shibata, 1959)를 쓰지 않았기 때문에 葉綠素 이외에도 細胞內에 存在한 다른 物質이 같은 波長의 光線에 吸收된 것도 있었으리라 生覺된다. 여하튼 이는 Fe-缺乏細胞에 있어서는 葉綠素의 生合成 뿐만 아니라 光合成 자체도 抑制됨을 나타내는 것이다.

Granick(1951)는 *Chlorella*의 葉綠素 生合成 과정에서 Fe는 Mg의 protoporphyrin으로의 轉換에 役割한다고 하고, Chance and Sagar(1957)는 Cytochrome이 *Chlamydomonas*의 光合成에 役割을 한다고 하였는데 cytochrome은 Fe-porphyrin이므로 결국 Fe는 葉綠素의 形成 뿐만 아니라 그 機能에도 뚜렷한 作用을 하는 것으로 生覺된다. Fe는 cytochrome 이외에도 catalase, peroxidase, cytochrome oxidase 등과 같은 呼吸酵素의 구성분이 되므로 Fe-缺乏細胞의 호흡능이 低下된 점에도 수궁이 간다.

Mn은 炭水化物 代謝에 關여하는 多數의 酵素를 活性化(Hewitt, 1958)하기 때문에 그 缺乏細胞의 呼吸能이 減少한 것으로 보며 光合成能의 減少는 Hill 反應 자체가 Mn의 缺乏으로 抑制되기(Brown, 1954) 때문인 것으로 生覺된다. 微養元素의 缺乏에 기인하는 光合成能의 低下가 光合成 과정 그 자체가 影響을 입는 것인지 혹은 細胞의 高分子物質의 生合成에 보다 主要한 影響을 미치 細胞의 葉綠素 含量이 減少된 間接的인 結果의 所産인지에 대한 보다 구체적인 解答은 개개의 微養元素 缺乏細胞에 대한 앞으로의 研究成果에서 얻어지게 될 것이다.

摘 要

Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, B 등 微養元素 缺乏細胞의 生長, 增殖, 呼吸能 및 葉綠素의 生成能과 光合成能을 測定 比較하였다.

1. 微養元素 缺乏細胞의 生長과 增殖, 呼吸, 光合成 및 葉綠素의 生合成能은 正常細胞의 그것에 비해 정도의 差는 있으나 모두 減少되었다.
2. Fe-缺乏細胞의 生長은 甚한 黃白化現象과 더불어 현저히 抑制되었는데 Fe-缺乏細胞의 光合成能의 減少는 葉綠素 含量의 減少에 비해서도 더욱 顯著하였다.
3. 生長障害는 葉綠素 形成能의 低下와 비슷한 傾向을 나타내어 Fe-缺乏細胞에서 가장 甚하고 그 다음이 Mo-缺乏區로 Mn, Zn, B 등의 缺乏區와 서로 비슷한 影響을 입었고 Cu-缺乏區에서는 生長障害가 가

장 輕微한 편이었다.

4. 光合成能의 低下는 特히 Fe-缺乏細胞가 顯著하고 그다음이 Cu-, Mn-, Zn-缺乏細胞의 順인데 Mo-缺乏細胞에서는 그 生長率의 低下와는 달리 光合成能의 低下는 輕微하였다.

5. 呼吸能의 低下는 B-缺乏細胞가 가장 顯著하였고 그다음이 Mn-, Fe-, Mo-, Cu-, Zn-缺乏細胞의 順이었다.

REFERENCES

- 1) Brown, T.E. (1954) Comparative studies photosynthesis and the Hill reaction in *Nostoc muscorum* and *Chlorella pyrenoidosa*. Ph. D. Thesis, Ohio State University.
- 2) Chance, B., and Sager, R. (1957) Oxygen and light induced excitations of cytochrome, flavoprotein, and pyridine nucleotide in *Chlamydomonas* mutant. *Plant Physiol.*, 32, 548-561.
- 3) 陳平, 李永祿(1965). *Chlorella*의 有機酸代謝에 關한 研究. 韓國微生物學會誌 3卷 2號 15-21.
- 4) Emerson, R. (1929). The relation between maximum rate of photosynthesis and concentration of chlorophyll. *J. Gen. Physiol.*, 12, 609-622.
- 5) — and Lewis, C.M. (1939) Factors influencing the efficiency of photrosynthesis. *Am. J. Bot.*, 26, 802-822.
- 6) Epstein, E. (1965) "Plant Biotchemistry" 438 (J. Bonner J. E. Varner ed.)
- 7) Granick, S. (1951) Biosynthesis of chlorophyll and related pigments. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 2, 115-144.
- 8) Hewitt, E.J. (1958) The role of mineral elements in the activity of plant enzymesystems. in "Handbuch der Pflanzenphysiologie" (W. Ruhland ed.) 4, 427-481.
- 9) Pirson, A., Tichy, C., und Wilhelmi, G. (1952) Stoffwechesel und Mineralsalzernaehrung einzelliger an Mangelkulturen von *Ankistrodesmus*. *Planta.*, 40, 199-253.
- 10) Shibata, K. (1959) "Method of Biochemical analysis" (David Glick ed.) 7, 80- Interscience Publishers Inc.
- 11) Tamiya, H., Shibata, K., Sasa, T., Iwamura, T., and Morimura, Y (1953), *Carnegie Inst. Wash. Publ. No. 600*, 76, 田宮 博, 渡邊篤 編集, 藻類實驗法 74(1965).
- 12) Wiessner, W. (1962) Inorganic micronutrients. in "Physiology and Biochemistry of Algae" (Lewin, R. A. ed.) 267-286.