

Chlorella 의 比成長率에 미치는 有效磷酸量과 그 理論的 分析

李 周 植 · 張 楠 基 · 李 泰 雨

(서울대학교 師範大學 生物科)

Theoretical analysis on the correlation between the amount of available phosphorus and the growth rate of *Chlorella ellipsoidea*.

Lee, Zoo Shik. Chang, Nam Kee. and, Rhee, Tai Woo.

(Department of Biology, College of Education, Seoul National University.)

Abstract.

Theoretical analysis reported in this paper is on the varieties of the growth rate of *Chlorella ellipsoidea* due to the amount of available phosphorus for the purpose of the continual mass culture.

Available phosphorus in the culture media of the *Chlorella* was also estimated at a limiting factor as this experiment.

The equation between the concentration of *Chlorella* n and growth period t is

$$\frac{dn}{dt} = Kn,$$

and the functional relation between the Specific growth rate K and steady state period T is the following :

$$K = \frac{2.303}{T} \cdot \log \frac{n}{n_0} \quad (n_0 = \text{initial concentration}).$$

結 論

Chlorella 의 大量培養을 目的으로 한 合理的이고 理論的인 研究를 爲해 有效磷酸量의 培地濃度에 따른 *Chlorella ellipsoidea* 의 Specific growth rate 의 變化를 測定하고 그 結果로써 連續의 大量培養의 基礎 理論을 展開하였다.

材料 및 方法

本實驗에서 使用한 菌株는 韓國에서 分離한 *Chlorella ellipsoidea*(Y 511)로 液體培養基內에서 培養한 *Chlorella* 의 一定量을 實驗群의 培養基에 移植 25°C±1°C 에서 2300 lux 의 光을 고르게 받도록 電光을 利用하였다.

培地의 調成은 phosphorus 의 濃度에 따른 成長率의 變化 觀察이 容易하며 他無機養料의 影響을 可能한 限 避하기 爲하여 1 당 KNO₃ 0.25g, MgSO₄ · 7H₂O 0.5g, KH₂PO₄ 0.25g FeSO₄ · H₂O 0.0028g.

의 量을 含有한 培地(中村)를 基準으로 하고 phosphorus 의 增減에 따른 K 의 減量은 KCl 로 補充하였다.

그리고 一定 間隙을 두고 培地를 진탕하여 成長을 促進시켰다.

培養液中の phosphorus 의 量은 Dickman & Bray (1940)의 方法으로 檢定하였으며 *Chlorella* 의 濃度는 Clinical electrophotometer 를 使用하여 Logarithmic scale 로 決定하였고 *Chlorella* Cell 의 Count 는 Thoma Zeiss 의 血球計算器를 使用하여 算定하였다.

結果 및 考察

1) 有效磷酸量에 의한 *Chlorella* 의 成長率의 變化 培養基 中에 含有되어 있는 有效磷酸의 濃度를 tap water 에 0.05, 0.15, 0.25, 0.35gm./l. 로 變化시켰을 때의 *Chlorella ellipsoidea* (Y511)의 成長曲線은 Fig. 1 과 같다. 勿論 本實驗에 使用한 tap water 는 微量의 磷酸을 含有하고 있으나 *Chlorella*

의 成長에 必要한 充分한 量이 못될 뿐만 아니라 大量培養을 目的으로 하기 때문에 이를 比較區로 設定한 것이다.

Fig. 1의 結果로 比較區와 0.05gm/l의 有効磷酸 量을 含有하는 培養基에서 *Chlorella*가 자라는 成長率과 比較하면 0.05gm/l區가 成長이 빠르며 그 차는 統計學的으로 有意하였다.

0.15, 0.25, 0.35gm/l의 有効磷酸을 含有하고 있는 培養基에서는 그 成長速度의 差異가 顯著하여 統計學의 分析으로도 대단히 有意하였다(Fig. 1).

그러므로 有効磷酸量은 *Chlorella*의 成長에 영향 을 주어 成長率의 變化를 가져 왔다는 것을 알 수 있다.

同一한 環境條件 아래서 時間에 따른 *Chlorella*의 成長率의 變化는 Fig. 1에서 보는 것과 같이 24 時間, 48時間이 經過하면 成長率은 急增하나 72時間, 96時間 등으로 時間이 경과하면 할수록 점차 성장율은 완만하여져서 Steady state에 到達하게 된다.

이와 같이 他 無機養料의 含有濃도가 一定한 條件 下에서 有効磷酸의 濃도는 *Chlorella*의 growth 率에 영향을 주는 limiting factor로 볼 수 있으 므로 *Chlorella*의 成長率에 미치는 重要한 要素임을 立證하는 것이다.

有効磷酸이 *Chlorella*의 成長에 limiting factor 로 作用하는 生化學的 生理的인 原因은 Winterman (1955), Nihei(1957), Miyachi(1961), Correll (1962, 1964, 1965)과 Lee & Chin(1964, 1966) 等 여러 學者에 依하여 밝혀진 *Chlorella* 細胞의 磷酸代 謝에 있어서 無機磷의 Poly 磷酸으로의 轉換과 RNA-

polyphosphate complex의 物理化學的 性狀 및 存 在를 理解하고 最近 Lee & Chin(1966)에 依하여 보고된 바와 같이 polyphosphate의 phosphate는 RNA-polyphosphate complex로 轉換도 하며 한편 直接間接으로 DNA 및 Protein의 合成에 利用되기 때문이라고 思料된다.

또한 이 事實은 Chang(1967)에 依하여 報告된 바 와 같이 *Chlorella*의 成長에 必要한 無機養料中 가장 그 영향이 큰 것은 磷酸이라는 것과 一致되는 結果이다.

2) *Chlorella*의 Specific growth rate.

Chlorella ellipsoidea (Y511) 菌株의 growth 率 有効磷酸量에 依하여 變化하는 바와 같이 *Chlorella*의 成長率은 여러가지 環境要因의 影響을 받 아 變化한다는 것을 알 수 있다(Chang 1967). 따 라서 一般적으로 初期의 *Chlorella*의 濃도를 *n*이라 하고 *dt* 時間동안에 增加하는 *Chlorella*의 濃도를 *dn*이라고 할때 *Chlorella*의 growth rate는

$$\frac{dn}{dt} = Kn$$

이라고 表示할 수 있다. 上記 式에서 *dt*가 無限小 量에 가까와 지면 다음과 같이 바뀌어 쓸 수가 있다.

$$\frac{dn}{n} = Kn \dots \dots \dots (1)$$

(1)式에서 *K*는 *Chlorella*의 成長率을 表示하는 常數로써 比成長率(Specific growth rate)이다.

만일 *Chlorella*의 濃도가 *n*₁에서 *n*₂로 增加하였을 때 이에 必要한 時間을 *t*₁에서 *t*₂로 變化하였다고 가정하면 소요된 時間 *T*는 *t*₂-*t*₁=*T*로 쉽게 求할 수 있다.

이제 (1)式을 定積分하면

$$\int_{n_1}^{n_2} \frac{dn}{n} = K \int_{t_1}^{t_2} dt$$

$$\ln[n]_{n_1}^{n_2} = K[t]_{t_1}^{t_2}$$

$$\ln n_2 - \ln n_1 = K(t_2 - t_1)$$

$$\ln \frac{n_2}{n_1} = KT$$

上記式을 指數函數로 바꾸어 쓰면

$$n = n_{0e}^{KT} \dots \dots \dots (3)$$

(3) 式은 一般적으로 *Chlorella*의 成長曲線을 나타내는 式이다.

(3) 式에서 Specific growth rate를 求하면

$$K = \frac{1}{T} \cdot \ln \frac{n_0}{n}$$

上記式을 常用對數式으로 變形시키면

$$K = \frac{2.303}{T} \log \frac{n_0}{n} \dots \dots \dots (4)$$

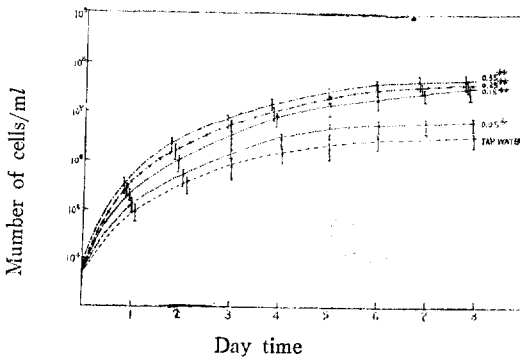


Fig 1. Growth under the different available phosphorus concentration of *Chlorella ellipsoidea*

* Significant at 5% level
** Significant at 1% level

다시 n 을 最初의 濃度로 하고 x 를 T 時間동안의 增加濃度라고 하면 (1)式은 다음과 같이 變形할 수 있다.

$$\frac{d(n+x)}{dt} = K(n+x)$$

따라서

$$K = \frac{2.303}{T} \log \frac{n+x}{n} \dots\dots\dots(5)$$

그러므로 (5)式에 依하여 Specific growth rate K 를 計算할 수 있다.

有效磷酸濃度에 依한 *Chlorella ellipsoidea*의 Specific growth rate 變化를 時間에 따라 測定한 結果는 table 1과 같으며 時間이 經過할수록 K 는 減少하여 차츰 零에 無限히 가까와져 Steady state에 到達한다는 것을 알 수 있다.

Table 1. Specific growth rate varieties between amounts of available phosphorus and *Chlorella* concentration.

Pgm/l Time	Tap water	0,05	0,15	0,25	0,35
24 hrs.	2.56531	3,40176	3,76195	4,24926	4,44340
48 "	1,87947	1,25306	1,38663	1,60978	1,61979
72 "	0,40555	1,13169	1,19410	1,19410	1,09876
96 "	0,18239	0,69320	0,83290	0,26231	0,26231

(3) *Chlorella*의 Specific growth rate의 變化.

K 의 變化는 (5)式에 依하여 充分히 理解할 수 있다. *Chlorella*의 濃도가 一定할 때 即 $\log = \frac{n+x}{n}$ 항이 1, 2, 3, 등으로 變化할 경우를 生覺하면 T 의 變化에 依한 K 의 變化 曲線을 나타내는 式은

$$K(1) = \frac{2.303}{T}$$

$$K(2) = \frac{4.606}{T}$$

$$K(3) = \frac{6.906}{T} \dots\dots\dots$$

등으로 表示된다.

上記式에서 알 수 있는 바와 같이 T 에 따른 K 의 變化는 雙曲線이나 growth rate를 表示하는 것으로 3상환의 경우는 해당되지 않으며 다만 1상환의 경우만이 K 의 變化를 나타내는 曲線이다.

그 結果는 Fig. 2와 같다.

다음에 (5)式에서 T 를 1, 2, 3 등으로 一定하게 하고 *Chlorella*의 增加濃度에 依한 K 의 變化는

$$K_1 = 2.303 \log \frac{n+x}{n}$$

$$K_2 = 1.152 \log \frac{n+x}{n}$$

$$K_3 = 0.768 \log \frac{n+x}{n}$$

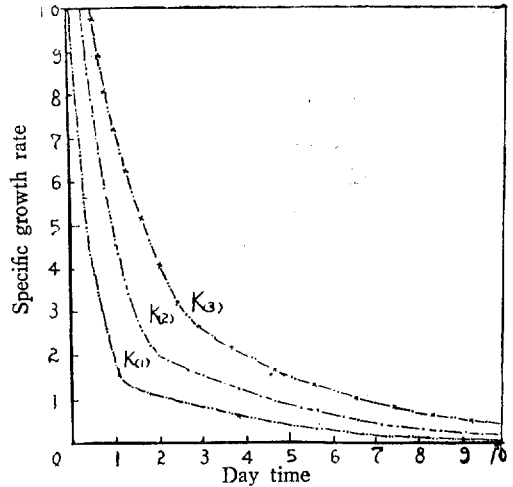


Fig. 2. Relation between the time and the Specific growth rate.

로 表示된다. 다시 初期 *Chlorella*의 濃度 n 을 $10^1, 10^2, 10^3, \dots\dots/ml$ 등으로 接種하였을 때를 고려하면 上記 K_1 은

$$K_1' = 2.303 \log \left(1 + \frac{x}{10}\right)$$

$$K_1'' = 2.303 \log \left(1 + \frac{x}{100}\right)$$

$$K_1''' = 2.303 \log \left(1 + \frac{x}{1000}\right) \dots\dots\dots$$

$$K_2 \text{는 } K_2' = 1.152 \log \left(1 + \frac{x}{10}\right)$$

$$K_2'' = 1.152 \log \left(1 + \frac{x}{100}\right)$$

$$K_2''' = 1.152 \log \left(1 + \frac{x}{1000}\right) \dots\dots\dots$$

$$K_3 \text{는 } K_3' = 0.768 \log \left(1 + \frac{x}{10}\right)$$

$$K_3'' = 0.768 \log \left(1 + \frac{x}{100}\right)$$

$$K_3''' = 0.768 \log \left(1 + \frac{x}{1000}\right) \dots\dots\dots$$

등으로 表示된다. 이들 式이 나타내는 曲線은 Fig. 3과 같으며 이것은 *Chlorella*의 增加濃度에 依한 K 常數의 變化樣狀을 보여 주는 것이다.

Fig. 2, 3에서 알 수 있는 바와 같이 比成長率의 變化는 接種初期에는 時間의 經過에 따라서 대단히 變化가 甚하나 차츰 時間이 경과되면 거의 零에 가까우리 만큼 變化가 완만하여 저서 Steady state에 到達한다는 것을 意味한다. 이것은 Fig. 1의 結果와 잘 부합되는 事實이다.

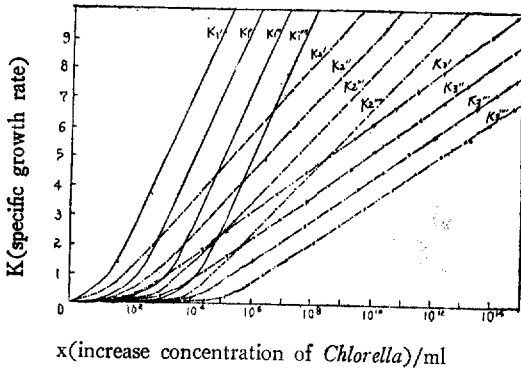


Fig. 3. Relation between the increase concentration of *Chlorella* and Specific growth rate.

그리고 K 는 T 가 일정할때 증가하는 *Chlorella*의 농도가 $10^2 \sim 10^4$ /ml 범위까지는 그 변화율은 완만하여 점차 변하나 그 이상이 되면 직선으로 나타나서 그 변화율은 T 의 값에 따라 일정하게 된다.

또한 초기 *Chlorella* 농도의 변화에는 서로 평행한 직선으로 그 변화율은 동일하다. 이 사실은 초기 *Chlorella*의 농도는 *Chlorella*의 성장에 그리 큰 영향을 주지 않는다는 것을 알 수 있다.

실제로 Fig. 4에서 보는 바와 같이 *Chlorella*의 초기 농도를 0.5×10^2 , 7.5×10^2 , 2.5×10^3 , 7.5×10^3 , 2.5×10^4 /ml 등으로區別하여 농도가 6.5×10^5 /ml로 증가하는데 필요한 시간은 193, 180, 154, 96, 44, hours 이나 변화樣狀으로 推定할때 어느 시간에到達하면 *Chlorella*의 농도는 Steady state에 이르게 된다.

따라서 *Chlorella*의 초기 농도차는 培養初期에는 큰 영향을 받으나 限界濃도에到達하는데 다만 시간의 差異만이 있을 뿐 초기 농도에는 영향을 받지 않는다.

이것은 理論式(5)와 正確히 부합한다는 것을 立證하여 주는 것으로 思料된다.

$$\begin{aligned}
 T10^1 &= \frac{2.303}{K} \log \frac{10n_0}{n_0} = \frac{2.303}{K} \log 10 = \frac{2.303}{K} \\
 T10^2 &= \frac{2.303}{K} \log \frac{10n_0}{n_0} = \frac{2.303}{K} \cdot 2 \cdot \log 10 = \frac{4.606}{K} \\
 T10^3 &= \frac{2.303}{K} \log \frac{10n_0}{n_0} = \frac{2.303}{K} \cdot 3 \cdot \log 10 = \frac{6.909}{K} \\
 T10^4 &= \frac{2.303}{K} \log \frac{10n_0}{n_0} = \frac{2.303}{K} \cdot 4 \cdot \log 10 = \frac{9.212}{K} \\
 T10^5 &= \frac{2.303}{K} \log \frac{10n_0}{n_0} = \frac{2.303}{K} \cdot 5 \cdot \log 10 = \frac{11.515}{K} \\
 &\vdots \\
 T10^m &= \frac{2.303}{K} \log \frac{10^m n_0}{n_0} = \frac{2.303}{K} \cdot m \cdot \log 10 = \frac{2.303 \times m}{K}
 \end{aligned}$$

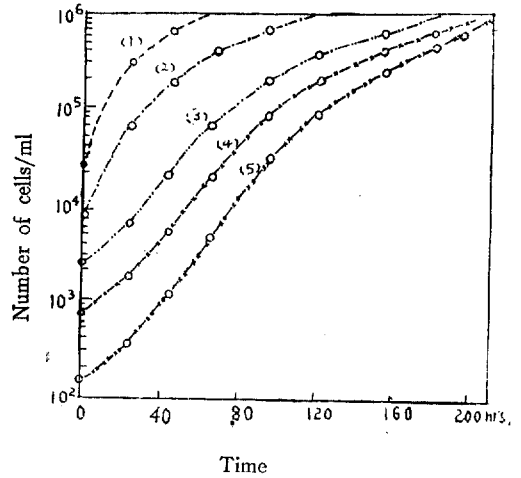


Fig. 4. Effect of the initial amounts of *Chlorella ellipsoidea* in the media on the growth per ml of inoculated *Chlorella* suspension:

- (1) 2.5×10^4 /ml; (2) 7.5×10^3 /ml; (3) 2.5×10^3 /ml; (4) 7.5×10^2 /ml; (5) 0.5×10^2 /ml.

(4) *Chlorella*의 成長限界濃度

*Chlorella*의 成長은 接種後 時間이 經過하면 Steady state에 到達한다. 이때의 *Chlorella*의 농도를 成長限界濃度라고 할 수 있다.

*Chlorella*의 成長限界濃度を 알게 되면 그 濃도에 到達하는데 必要한 時間 T 를 計算할 수 있다.

(4)式에서 T 를 求하면

$$T = \frac{2.303}{K} \log \frac{n}{n_0} \dots \dots \dots (6)$$

即 (6)式에서 n 濃도에 到達하는데 必要한 時間을 일일이 成長을 測定하여 成長曲線을 그려보지 않아도 K 만 定해지면 쉽게 推定할 수 있다.

*Chlorella*의 濃도가 初期濃도 n_0 의 $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5, \dots, 10^m$ 倍로 增加하는데 必要한 時間 T 는 다음과 같이 計算할 수 있다.

本實驗의 結果로 測定된 phosphorus의 濃度에 따른 K의 差異에 依한 steady state에 到達하는데 必要한 理論的인 時間 T는 Table 2와 같다.

Table의 計算結果는 Fig 1의 成長曲線의 結果와 一致된다.

이것은 *Chlorella*의 大量生産을 爲한 連續培養法의 設計에 必要한 事項으로 반드시 考慮하여야 할 것이다.

Table 2. Time varieties between amounts of avail-

able phosphorus and cultured *Chlorella* Concentration.

Chlorella concentration	Pgm/l				
	Tap water	0.05	0.15	0.25	0.35
× 10 ¹ /ml	0.88	0.67	0.60	0.54	0.52
× 10 ² /ml	1.76	1.35	1.21	1.09	1.04
× 10 ³ /ml	2.65	2.03	1.81	1.62	1.56
× 10 ⁴ /ml	3.54	2.70	2.42	2.16	2.08

摘 要

本研究는 韓國에서 分離 培養한 *Chlorella ellipsoidea*(Y 511) 菌株에 對한 有効磷酸의 濃度에 따른 growth rate를 調査하여 mass culture를 爲한 基本的인 理論을 數學的으로 分析 究明하려고 實驗하였으며 그 結果는 다음과 같다.

① *Chlorella*의 培養液中에 含有되어 있는 有効磷酸量은 *Chlorella*의 成長率에 가장 큰 影響을 주는 하나의 環境要因이다.

② *Chlorella*의 成長率은

$$\frac{dn}{dt} = Kn$$

으로 表示되며 이 式에서 K는 Specific growth rate이다.

③ *Chlorella*의 Specific growth rate K는

$$K = \frac{2.303}{T} \log \frac{n+x}{n}$$

로 算定할 수 있다.

④ *Chlorella*의 成限長界濃度에 到達하는데 必要한 時間 T는

$$T = \frac{2.303}{K} \log \frac{n}{n_0}$$

로 推定할 수 있다.

References

- 1) Chang. N.K, 1967. Mathematical analysis on the growth rate in *Chlorella* and mineral nutrients. The college of Education Review 9(1): 141-146
- 2) Correll, D.L. and N.E. Jolbert, Ribonucleic acid-polyphosphate algae. I. Isolation and physiology. Plant physiol. 37: 627-636
- 3) _____ 1964. Ribonucleic acid polyphosphate from algae. II. Physical and Chemical properties of the isolated complexes. Plant & Cell physiol., 5: 171-191
- 4) _____ 1965. Ribonucleic acid-phosphate from algae III. Hydrolysis studies. Plant & Cell physiol., 6: 661-669
- 5) Dickman, S. and R.H. Bray. 1940 Colorimetric determination of phosphate. Industr. Engng. Chem. 12: 589-592
- 6) Lee. Y.N. 1964. Studies on the phosphate metabolism in *Chlorella* with special reference to polyphosphate, Kor. J. Micrabiol 2(1) 1-11
- 7) _____ and U.S. Shim. 1966. Turnover of ³²P in ³²P-labeled *Chlorella* cells in a P-free medium accepted. Kor. J.B 9(1)
- 8) _____ and P. Chin, 1966. Turnover of ³²P and Total P in ³²P-labeled *Chlorella* Cells in a Standard "Cold" Medium Kor. J. Microbiol. 4(1) 14-20
- 9) Miyachi S. and H. Tamiya, 1961. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells. plant & cell physiol 2: 405-414.
- 10) Wintermans, J.F.G.M., 1965. Polyphosphate formation in *Chlorella* in relation to photosynthesis. Mededel, Landbouwhogeschool Wageningen, 55, 69:126