

Chlorella 의 成長에 미치는 無機營養의 影響에 關한
反應速度論的 研究

張 楠 基

(서울大學校 師範大學 生物科)

Mathematical analysis on the effect of mineral
nutrients on the growth rate of Chlorella

Nam Kee CHANG

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

ABSTRACT

The functional relation among the growth period t , the initial concentration of *Chlorella ellipsoidea* and the initial amounts of nitrogen, phosphorus, potassium, and magnesium for the tube growth in 20 ml *Chlorella* medium in 100 ml test tube at 26°C under 5000 lux is

$$dt = \frac{\partial t}{\partial n} dn + \frac{\partial t}{\partial p} dp + \frac{\partial t}{\partial k} dk + \frac{\partial t}{\partial m} dm + \frac{\partial t}{\partial c} dc = 2.5dn - 1.04dp - 0.1dk - 0.2dmg - \frac{30}{c} dc.$$

Integration of this equation gives

$$\begin{aligned} t &= -2.5n - 1.04p - 0.1k - 0.2mg - 30 \log_e C + u \\ &= -2.5n - 1.04p - 0.1k - 0.2mg - 69 \log_{10} C + u \end{aligned}$$

(u : integration constant).

In this experiment, $p=50$, $n=35$, $k=165$, $mg=40$, and $C=0.9$ give $t=132$, therefore $u=248.7$ and the above equation becomes

$$t = -2.5n - 1.04p - 0.1k - 0.2mg - 69 \log_{10} C + 248.7$$

緒 論

Chlorella 에 關한 研究는 여러學者에 依하여 形態的 機能的(Tamiya 1961, Lee & Shim 1963, Lee 1966, Yanagida *et al.* 1961)生理的(Morimura & Jamiya 1964, Shibada, 1964, Aoki & Hase 1964, a,b Ishikawa *et al.* 1964) 및 生化學的(Lee 1964, Lee *et al.* 1967, Lee & Kim 1964, Chin & Lee 1965) 으로 行하여 졌으나 population dynamics 에 關한 反應速度論的 分析은 아직 報告된바 없다. 그러므로 本 研究는 *Chlorella ellipsoidea* 를 材料로 하여 環境요인중 N, P, K, Mg 등

無機營養의 濃度와 成長과의 關係를 反應速度論的으로 分析하여 *Chlorella* 成長의 極相에 미치는 無機營養의 影響을 究明하였다.

材料 및 方法

本 實驗에 使用한 *Chlorella* 의 菌株는 Lee 와 Shim(1963)의 方法에 따라 純粹分離한 *Chlorella ellipsoidea* 의 Y₅₁₅ 이다.

1) *Chlorella media* 의 선택

Chlorella 의 成長에 미치는 無機營養中 N, P, K, Mg 의 影響을 究明하기 위하여 KNO₃ 0.26g, KH₂PO₄ 0.25g, MgSO₄·7H₂O 0.5g, FeSO₄·H₂O 0.002g 을 1 l 의 水道수에 溶해

시켜 NaOH와 HCl로 pH를 5.3으로 보정한 Nakamura 培養液를 基準으로 하여 N, P, K, Mg 이외의 他 無機養料의 影響을 可能한 限 避하였다.

Phosphorus와 nitrogen의 影響을 볼때에는 K의 減量은 KCl로 보충하였고 potassium의 影響을 볼 境遇에는 NaNO_3 와 Na_2HPO_4 로서 보정하여 Nakamura 培地의 基本量과 一致하도록 하였다.

2) 培養 條件

上記 無機養料의 濃度變化에 따른 各 *Chlorella media*에 正常的으로 培養한 Y_{515} 菌株를 接種한 후 培養溫度를 26°C 로 維持하였고 5000 lux의 光을 24時間 高르게 받도록 電光을 利用하였으며 一定하게 진탕하여 成長을 促進하였다.

3) 無機養料의 定量方法

Nitrogen: Nitrophenol disulfuric acid를 利用하여 比色的으로 測定하였다.

Phosphorus: Dickman & Bray의 方法으로 比色定量하였다.

Potassium: 硝酸코발트를 써서 침전 시킨 다음 比色計를 使用하여 炭酸코발트로써 定量分析하였다.

Magnesium: Ca를 제거한 용액을 pyrophosphate 法으로 決定하였다.

4) *Chlorella* 濃度の 決定方法

*Chlorella*의 濃度は A filter를 넣고 clinical electrophotometer를 使用하여 logalim scale의 値로 決定表示하였고 *Chlorella cell*의 count는 Thoma Zeiss 計算器를 使用하여 算定하였다.

實驗 結果

1) *Chlorella*의 成長

a) 限界 濃度

Chlorella ellipsoidea Y_{515} 菌株를 Nakamura 培養液에 接種시키고 26°C 의 溫度를 維持하며 光 5000 lux를 주어 成長速度를 測定한 結果는 Fig. 1과 같다.

Fig. 1에서 보는 바와 같이 48, 72, 96, 120, 144時間까지는 成長速度가 상당히 빠르나 2時間 以上이 되면 漸次로 成長은 완

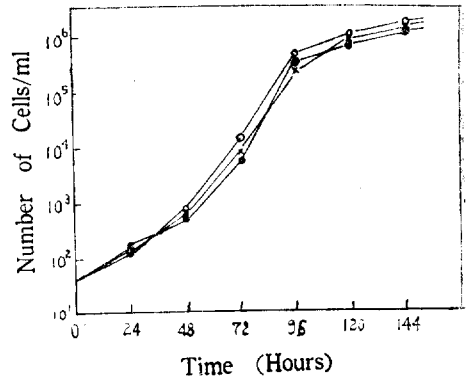


Fig. 1. Growth under the initial amounts ($0.54 \times 10^2/\text{ml}$) of *Chlorella ellipsoidea* in the media.

만하여 지며 거의 增加하지 않는 限界濃度에 到達하게 된다.

이 限界濃度를 좌우하는 要因은 光, 溫度以外에 무엇보다도 가장 重要한 것은 營養條件이다. 따라서 光度와 溫度가 一定한 조건下에서 Nakamura 培地를 使用한 *Chlorella* 增殖의 限界濃度は 本 實驗의 경우 $1 \pm 0.3 \times 10^6/\text{ml}$ 였다(Fig. 1).

이것은 *Chlorella* 成長이 無機養料의 濃度에 따라 그 限界濃度가 變化함을 暗示하여 주는 것이다.

b) 初期 *Chlorella*의 濃度에 따른 成長率의 變化

Chlorella ellipsoidea Y_{515} 의 種菌을 接種할 때에 最初의 濃度를 0.5×10^2 , 7.5×10^2 , 2.5×10^3 , 7.5×10^3 , $2.5 \times 10^4/\text{ml}$ 로 하였을 때 濃度가 $6.5 \times 10^5/\text{ml}$ 로 增加하는데 요하는 時間은 193, 180, 154, 96, 44時間이 소요되는 結果를 얻었으나 變化하는 樣狀으로 推定할때 어느 期間에 到達하면 *Chlorella*의 濃度は 一定하게 되어 初期의 *Chlorella*濃

度에는 그리 관련이 없다는 것을 알았다.

따라서 *Chlorella* 의 濃度差는 初期에는 成長速度에 큰 影響을 미치나 限界濃度에 가까워지면 질수록 그리 큰 影響을 주지 못하며 限界濃度 以上이 되면 營養狀態가 一定한 限 初期의 *Chlorella* 濃度에는 관계없이 同一한 濃度를 갖게 된다는 것을 알 수 있다 (Fig. 2).

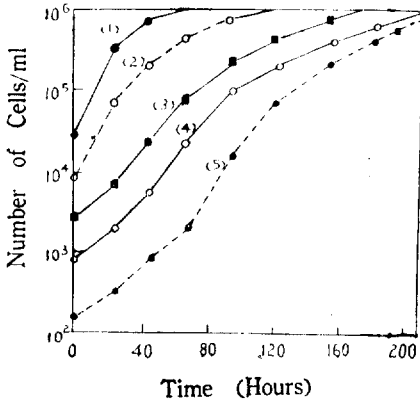


Fig. 2. Effect of the initial amounts of *Chlorella ellipsoidea* in the media on the growth per ml of inoculated *Chlorella* suspension:
 ① 2.5×10^4 /ml ② 7.5×10^3 /ml
 ③ 2.5×10^3 /ml ④ 7.5×10^2 /ml
 ⑤ 0.5×10^2 /ml

2). *Chlorella* 成長의 速度論的 解析

a) 初期窒素의 濃度를 變化할 境遇

初期窒素의 濃度를 5, 20, 35, 55mg/l로 變化하였을 때의 光電比色量 50.0 ± 3.3 에 *Chlorella* 의 濃度가 도달할 때까지 소요되는 時間은 Table 1에 表示하였다.

Table 1에 依하여 窒素의 初期濃度를 n 라 하면 다음 관계 式을 얻을 수 있다.

$$\frac{dt}{dn} = -2.5 \dots\dots\dots (1)$$

$$\therefore t = -2.5n + 0 \quad (0: \text{積分常數})$$

$n=35$ 일때 $t=132$ 이므로 $0=225.5$ 따라서 $t = -2.5n + 225.5$

窒素濃度의 變化에 따라 上記式과 같이 時間이 變함을 알 수 있다.

b) 初期 無機磷의 量을 變化하였을 境遇

100 ml 들이의 test tube 에 磷의 濃度가 13.6, 25.0, 50.0, 75.0 mg/l 의 Nakamura 培地 20 ml 를 넣고 여기에 1×10^6 /ml 의 *Chlorella* 液 1 ml 를 注入하여 培養하고 一定한 時間이 되면 clinical electrophotometer 로 成長度를 測定하였다.

光學比色量이 50.0 ± 3.3 에 到達할 때까지의 成長 時間을 계산한 結果는 Table 2와 같다.

Table 2에 依하여 初期磷의 濃度를 P mg/l, *Chlorella* 의 濃度가 5.00 ± 3.3 에 到達하는데 必要한 時間을 t hr. 라 하면

Table 1. Relation between the initial concentration of nitrogen and increase period

Nitrogen concentration mg/l	5	20	35	55
Concentration of <i>Chlorella</i>	50.0 ± 1.3	51.0 ± 2.7	50.3 ± 2.7	50.7 ± 2.4
Increase period (hours)	144	138	132	127

* tap water basis

$$\frac{dt}{dp} = -1.04 \dots\dots\dots (2)$$

$$\therefore t = -1.04p + l \quad (l: \text{積分常數})$$

$p=25.0$ 일때 $t=156$ 따라서 $t=182$ 이므로

$$t = -1.04p + 182$$

上記式이 p 의 濃度에 따라 變化하는 時間을 나타내는 式이다.

c) 初期加里의 濃度를 變化하는 境遇

Table 2. Relation between the initial concentration of phosphorus and increase period

Phosphorus concentration mg/l	13.6	25.0	50.0	75.0
Concentration of <i>Chlorella</i>	50.0±1.2	50.1±2.7	50.5±1.8	51.5±2.3
Increase period(hours)	168	156	132	108

* tap water basis.

加里의 濃度를 65, 115, 165, 215 mg/l로 變換 했을 境遇 *Chlorella*의 濃度가 50.0±3.3 에 이르는데 必要한 時間은 Table 3 과 같다. 初期加里의 濃度를 k 라하면 Table 3 에 依

Table 3. Relation between the initial concentration of potassium and increase period

Potassium concentration mg/l	65	115	165	215
Concentration of <i>Chlorella</i>	50.0±2.0	50.4±2.1	50.0±0.9	51.0±1.1
Increase period (hours)	143	137	132	127

* tap water basis

하여 다음과 같이 관계식을 전개할 수 있다

$$\frac{dt}{dk} = -0.1 \dots \dots \dots (3)$$

$$\therefore t = 0.1k + q \quad (q: \text{積分常數})$$

그런데 $t=132$ 일때 $k=165$ 이며 따라서 $q=148.5$ 이다.

上記式에 이것을 代入하면

$$t = -0.1k + 148.5$$

이것이 加里의 濃度에 따른 t 의 變換들 나타내는 式이다.

d) 初期 苦土의 濃度를 變換하는 境遇

*Chlorella media*의 初期 Mg의 濃度를 10, 25, 40, 45, mg/l로 變換하였을 때까지의 時間 t 의 變換은 Table 4에 나타나는 바와 같다.

Table 4. Relation between the initial concentration of magnesium and increase period

Magnesium concentration mg/l	10	25	40	45
Concentration of <i>Chlorella</i>	49.5±1.8	50.0±2.3	51.4±2.1	51.5±1.5
Increase period (hours)	138	135	132	129

* tap water basis.

初期 Mg의 濃度들 mg 라하면 Table 4에 따라 다음과 같이 관계식을 誘導할 수 있다.

$$\frac{dt}{dmg} = -0.2 \dots \dots \dots (4)$$

$$\therefore t = -0.2mg + r \quad (r: \text{積分常數})$$

따라서 $t=132$ 일때 $mg=40$ 이므로 $r=140$ 이다.

그러므로 上記式은

$$t = 0.2mg + 140$$

이식이 Mg에 對한 時間 t 의 관계식이다.

e) 初期 *Chlorella*의 濃度를 變換하는 境遇

Nakamura 培地에 初期 *Chlorella*의 濃度를 光電比色量으로 0.3, 1.0, 3.0, 9.0으로 變動시켰을 때의 *Chlorella*의 濃度가 50.0±3.3으로 增加 할 때까지 必要되는 時間과의 관

계는 Table 5 와 같다.

Table 5 의 結果에 依하여 最初의 *Chlorella* 濃度를 C 라 表示하면 다음과 같은 式을 推定할 수 있다.

$$\frac{dt}{dc} = -\frac{30}{c} \quad (5)$$

$$\therefore t = -30 \log_e C + S \quad (S: \text{積分常數})$$

上記式은 結果的으로 一定한 濃度에 到達

Table 5. Relation between the initial amounts of the *Chlorella* and increase period

<i>Chlorella</i> initial amount	0.3	1.0	3.0	9.0
Concentration of <i>Chlorella</i>	50.0±1.5	51.0±1.2	50.0±2.1	50.0±2.3
Increase period (hours)	220	164	104	44
Range of <i>Chlorella</i>	Δt	Δc	$\frac{\Delta t}{\Delta c} C$	
0.3~1.0	-56	0.7	24	
1.0~3.0	-6.0	2.0	30	
3.0~9.0	-6.0	6.0	30	

* tap water basis

하는데 初期의 *Chlorella* 濃度는 大端히 큰 影響을 미치지 않는다는 것을 나타 낸다.

(1), (2), (3), (4), (5)式에 依하여 t, n, p, m, c 間의 關係式은

$$dt = \frac{\partial t}{\partial n} dn + \frac{\partial t}{\partial p} dp + \frac{\partial t}{\partial k} dk + \frac{\partial t}{\partial mg} dmg + \frac{\partial t}{\partial c} dc = -2.5 dn - 1.04 dp - 0.1 dk - 0.2 dmg - \frac{30}{c} dc$$

$$\therefore t = -2.5n - 1.04p - 0.1k - 0.2mg - 30 \log_e C + u$$

$$= -2.5n - 1.04p - 0.1k - 0.2mg - 69 \log_{10} c + u \quad (u: \text{積分常數})$$

本 實驗結果에 依하여 $p=50, n=35, k=165, mg=40, c=0.9, t=132$ 로 하여 積分常數를 구하면 $u=248.7$ 이다.

따라서

$$t = -2.5n - 1.04p - 0.1k - 0.2mg - 30 \log_e C + 248.7 = -2.5n - 1.04p - 0.1k - 0.2mg - 69 \log_{10} C + 248.7 \quad (6)$$

이것이 26°C 에서 100 ml 의 test tube 內의 Nakamura 培地 20 ml 에 *Chlorella ellipsoidea* Y₅₁₅ 菌株을 接種하였을 때의 *Chlorella* 의 濃度가 50.0±3.3 에 到達하는데 必要한 時

間을 N, P, K, Mg, C 等の 濃度에 對한 自變數로 表示한 關係式이다.

考 察

光度가 5000 lux 이며 溫度를 26°C 로 維持한 條件하에서 體積이 100 ml 이며 直徑이 64 mm 인 test tube 에 培養하였을 때의 T, P, N, H, Mg 等に 對한 關係式은 (6)과 같이 表示된다는 것을 本 實驗結果로 입증되었다.

式 (1), (2), (3), (4), (5)에서 時間 t 에 對한 窒素, 燐, K, Mg 等 4 個의 無機養料와의 關係를 個別的으로 表示하는 graph 는 Fig. 3 과 같다.

여기에서 알 수 있는 바와 같이 各各의 方向계수를 比較하면 $N(2.5), P(1.04), K(0.1), Mg(0.2)$ 로 *Chlorella ellipsoidea* 의 濃度의 變化에 다른 時間의 變化는 $N > P > Mg > K$ 의 順序로 影響을 받는다 고 생각 할 수 있으나 *Chlorella ellipsoidea* 의 濃度變化에 對한 time 의 函數曲線 $t = -69 \log C + 164$ 에 始終 가장 큰 影響을 주는 것은 Fig. 3 에서 보는 바와 같이 P 가 가장 밀접한 關係가 있고 그다음으로 N, Mg, K 의 順序로 影響을 미

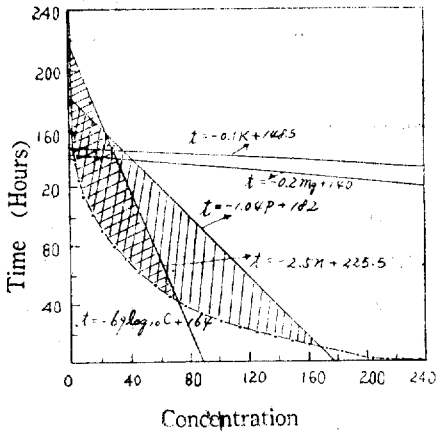


Fig. 3. Graphical analysis for determining the increase period of *Chlorella ellipsoidea*.

친다는 것을 알 수 있다.

Nakamura 培養液의 境遇 無機養料의 影響에 依한 *Chlorella*의 成長率의 變化는 Fig. 1과 2에서 볼 수 있다.

그리고 無機養料가 成長率에 미치는 濃度의 限界는 Fig. 3에서 알 수 있는 바와 같이 無限히 0에 수렴할 때와 必要以上の 無機營養의 濃度에는 (6)式에 正確히 부합되지 않는다는 事實을 推定할 수 있다.

그러므로 大量培養을 할때는 最少量의 無機養料를 使用하여 最大의 收穫을 기대하는 것임으로 Nakamura 培養液의 各無機養料의 濃度를 基準으로 하여 생각할때 大端히 잘 부합된다.

勿論 培養용기에 따라 $\frac{dt}{dc}$ 가 變化하며 반드시 용기의 體積도 고려하여야 된다고 믿는다.

다음에 *Chlorella*의 成長期間의 計算値와 實測値를 가장 影響이 큰 無機磷酸의 濃度에 따라 다른 無機養料의 濃度를 一定하게 하고 比較 검토한 結果는 Fig. 4와 Fig. 5

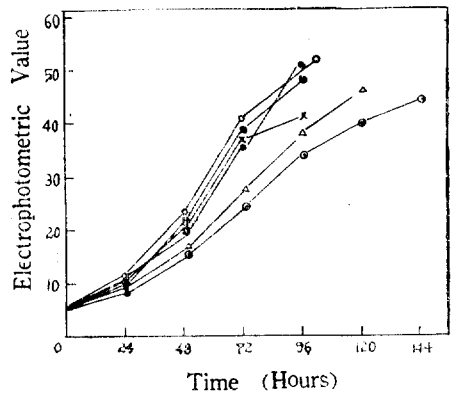


Fig. 4. Effect of the initial concentration of available phosphorus and the initial amounts of the *Chlorella* on the growth.

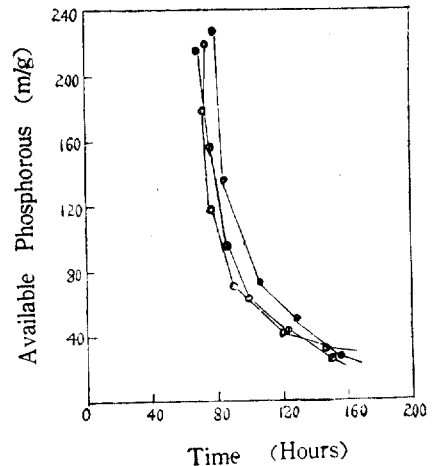


Fig. 5. Correspondence between theoretical and measured growth period (steady state).

와 같다.

Fig. 4와 Fig. 5는 實測値와 理論値가 一致한다는 것을 입증하여 주는 것으로 培地에 含有되어 있는 無機磷酸量이 250 mg/l 以下인 境遇는 實測値와 잘 一致하나 그以上이 되면 과잉의 無機磷酸量을 고려하여 計算하

지 않으면 안된다는 것을 알 수 있다. 그러나 우리가 大量培養을 目標로 할 때는 施肥가 문제됨으로 無機磷酸의 最適濃度와 最適 *Ch-*

lorella 濃度에 對한 最適期를 推定할 수 있으므로 연속적 大量培養設計에 基本原理가 된다고 思料된다.

摘 要

韓國에서 分離한 *Chlorella ellipsoidea* Y₅₁₅ 株에 對한 N, P, K, Mg 等の 無機養料과 成長率과의 關係를 反應速度論의 由로 究明하였으며 그 結果는 다음과 같다.

1) Y₅₁₅ 菌株의 懸液의 $0.54 \times 10^9/ml$ 로 Nakamura 培養液에 接種하였을 때의 26°C, 5000 lux 下에서 限界濃度에 到達하는데 必要한 時間은 144 時間 以上이었다.

2) *Chlorella* 의 培養에 있어서 거의 初期濃度에는 關係없이 一定한 限界濃度에 到達한다.

3) *Chlorella* 의 濃도가 50.0 ± 3.3 에 列達하는데 必要한 時間 t 에 對한 N, P, K, Mg, 等の 無機養料間의 函數關係는 直徑이 24 mm 인 100 cc. 體積의 test tube 에 20 cc. 의 *C. ellipsoidea* 를 넣고 26°C, 5000 lux 下에서

$$dt = \frac{\partial t}{\partial n} dn + \frac{\partial t}{\partial p} dp + \frac{\partial t}{\partial k} dk + \frac{\partial t}{\partial mg} dmg + \frac{\partial t}{\partial c} dc = -2.5dn - 1.04dp - 0.1dk - 0.2dmg - \frac{30}{c} dc$$

이것을 積分하면

$$t = -2.5n - 1.04p - 0.1k - 0.2mg - 3 \log C + u = -2.5n - 1.04p - 0.1k - 0.2mg - 9 \log_{10} C + u$$

(u : 積分常數)

本 實驗의 結果 $n=35$, $p=50$, $k=195$, $mg=40$, $c=0.9$, 일때 $t=132$ 이므로

$$t = -2.5n - 1.04p - 0.1k - 0.2mg - 69 \log_{10} C + 248.7$$

4) *Chlorella* 의 培養에 있어서 時間 t 와 N, P, K, Mg 等 4 個의 無機養料과의 函數關係중 方向 係數의 크기를 비교하면 $N > P > Mg > K$ 의 順序이고

5) *Chlorella* 의 成長率에 미치는 無機養料의 影響의 크기는 $P > N > Mg > K$ 의 順序이다.

REFERENCES

1. Aoki, S., and E. Hase, 1964a. De and Regeneration of chloroplast in the cell of *Chlorella protothecoides*. I. Synthesis of nucleic acid and protein in relation to the process of degeneration of chloroplast. *Plant & Cell Physiol.*, 5, 473-484.
2. Aoki, S., and E. Hase, 1964b. De and Regeneration of chloroplast in the cell of *Chlorella protothecoides*. II. Effects of Actinomycin or greening of glucose-bleached and etiolated algal cell. *Plant and Cell Physiol.*, 5, 485-493.
3. Chin, P., and Y.N. Lee, 1965. Studies on the organic acids metabolism in *Chlorella* cell. *Kor. Jour. Microbiol.*, 3(2), 15-21.
4. Ishikama, I.S., and E. Hase, 1964. Nutritional control of cell pigmentation in *Chlorella protothecoides* with special reference to degeneration of chloroplast induced by glucose. *Plant & Cell Physiol.*, 5, 227-240.
5. Lee, Y.N., 1964. Studies on the phosphate metabolism in *Chlorella* with special reference to polyphosphate. *Kor. Jour. Microbiol.*, 2 (1), 1-11.
6. Lee, Y.N., and C.K. Kim, 1964. Changes in pigment contents of *Chlorella* cells during the course of their life cycle. Dr. Lee, Hui Jae' Memorial Issue. 145-152.
7. Lee, Y.N., P., Chin, and W.S. Sim, 1967. Effect of micronutritional-element deficiencies on the metabolism of *Chlorella* cells. (I). On the growth rate, respiration and photosynthesis. *Kor. Jour. Microbiol.*, 5 (1), 15-17.

8. Lee, Z.S., 1966. Studies on the fine structure in *Chlorella* cells with special reference to the pyrenoid and cell wall. *Seoul Univ. Jour. Biol. and Agri.*, (B) 17, 202-221.
9. Lee, Z.S., and T.H. Shim., 1963. Studies on the *Chlorella* in Korea. *Kor. Jour. Microbiol.*, 7, 1(1), 38-44.
10. Morimura, Y., S., Yanagi, and H. Jainza., 1964. Synchronous mass-culture of *Chlorella* plant. *Jour. Cell Physiol.*, 5, 281-289.
11. Shibata, K., Y., Morimura, and H. Tamiza., 1964. Precise measurement of the change of statistical distribution of cell size occurring during the synchronous culture of *Chlorolla* plant. *Jour. Cell Physiol.*, 5, 315-320.
12. Jakashima, K., I.S., Ishikawa, and E. Hase, 1964. Further notes on the growth and chlorophyll formation of *Chlorella prothecoid*. *Plant and Cell Physiol.*, 5, 321-332.
13. Yanagida, T., H. Hukumi, and T. Uemura, 1960. Life cycle and synchronus of the *Chlorella*. *Physiology of Microorganism*(Asakura. Co.) 662-664.