

Chlorella 의 有機酸代謝에 關한 研究

陳 平·李 永 祿

(高麗大學校·理工大學)

Studies on the Organic Acids Metabolism in Chlorella Cells.

Chin, Pyung and Lee, Yung Nok

(College of Sciences and Engineering, Korea University)

Abstract

Using the synchronous culture method and the manometric technique, changes in respiratory activities, utilization of some organic acids (succinate, malate, lactate and acetate etc.) and its effect on glucose metabolism in *Chlorella* cells at different growing stages were measured.

1). Endogenous respiration of the cells was not active at growing stage and was almost constant throughout the early ripening, maturing and division stages.

2). Lactate was utilized as respiratory substrate better than other organic acids tested. Exogenous respiration of glucose was most active at growing and maturing stages and was decreased strikingly at division stage.

3). Succinate and citrate inhibited endogenous and glucose respiration of the cells throughout the all life cycle.

4). Malate and acetate were utilized in the cells at early growing and division stages better, and malate enhanced the glucose respiration while in case of acetate it was depressed.

5). Calcium ion inhibited not only permeability of respiratory substrate but endogenous respiration itself.

緒 論

藻類細胞에서 糖이 주로 解糖過程과 TCA 回路에 따라서 酸化된다는 것은 의심할 바가 없으나 다른 metabolic pattern 에 대해서는 아직도 廣範圍한 實驗의 根據에 의한 理論을 必要로 하고 있다. 光合成生物이 呼吸基質로 어떠한 有機物들을 利用할 수 있으며 中間代謝產物의 蓄積이 正常呼吸에 어떠한 影響을 미치게 되는가 그리고 이러한 影響이 發育時期에 따른 細胞의 生理的活性과 어떤 連關을 가지는가 하는 것은 극히 興味있는 일이다.

本 研究에서는 *Chlorella* 를 同調培養法으로 培養하여 細胞의 生育時期에 따른 呼吸能의 變化와 各種 有機酸의 利用與否 그리고 正常呼吸에 미치는 이들 有機酸의 影響을 調査하여 *Chlorella* 細胞의

代謝樣式에 對해서 考察하였다.

材料 및 方法

實驗에 使用한 材料는 *Chlorella ellipsoidea* 로서 同調培養은 Tamiya 등(1961)에 따른 "DLD-method" 를 採擇하였다. 培地의 組成은 l 당 5.0 g KNO_3 , 2.5 g $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$, 1.2 g KH_2PO_4 , 1 ml 의 M/100 $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ 및 1 ml 의 ARNON's (1938) A_5 溶液을 含有하고 培養期間中 繼續하여 CO_2 -enriched air 로 bubbling 시키고 約 10 killolux 의 照明과 $25^\circ C$ 의 溫度를 維持하였다. 培養에 使用한 vessel 은 polyethylene 으로 된 長方形의 flat culture chamber 였다.

同調培養은 Fig. 1 에서 보이는 바와 같이 32 時間으로 그 한 cycle 이 늘었다.

Table I. Manometer flask constituents.

Type of expt.	Container	Main chamber	Center well	Side arm	Gas	Vf
Endo. resp. (Control)		Phosphate buffer (pH 6.0), 1/20* molar Chlorella cells, 10-12 mg dry wt.	20% KOH 0.2 ml.		in air	3.2
Exog. resp.		Phosphate buffer (pH 6.0 1/20* molar Chlorella cells, 10-15 mg dry wt.	20% KOH 0.2 ml.	Substrate, * 100 μ moles	in air	3.2
pH effet		M/15 phosphate buffer, 1 ml. Cell suspension (10-12 mg dry wt.), 0.5 ml.	20% KOH 0.2 ml.	1/5M Substrate, 0.5 ml.	in air	2.2

* in a total volume of 3.0 ml.

同調培養의 各時期에 一定量의 細胞를 收穫하여 M/500 K₂SO₄ 溶液으로 두번 씻고 M/20 phosphate buffer 로 suspension 을 마련한 다음 곧 實驗에 使用 하였다. 呼吸의 測定은 Warburg (1957) manometric method 로 測定하였고 反應 chamber 의 組成은 各 各 Table I 과 같다.

反應은 25°C 에서 10 分間의 溫度平衡을 시킨 다음 side arm 으로 부터 基質을 添加하여 始作되었고 光合成으로 인한 酸素의 放出을 막기 위하여 完全한 暗處에서 2 時間 동안 行하였다.

結 果

Chlorella 를 基本培地에서 混合培養한 後 그들의 exogenous respiration 에 미치는 pH 의 影響을 調査한 結果는 Fig. 2 와 같다.

Fig. 2 에서 보는 바와 같이 succinate 呼吸과 glu-

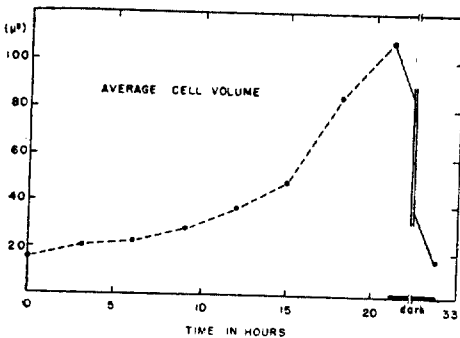


Fig. 1 Changes in average cell volume during the course of synchronous culture.

cose 呼吸에 關與하는 酵素群의 總括的인 最適 pH 는 約 5.8 이었다. 그러나 succinate 呼吸은 一般의 으로 주어진 pH range 에서 대개 一定하였고, glucose 呼吸은 顯著한 差異를 보였다.

Chlorella 의 生活史를 통한 呼吸能의 變化 및 各 基質의 添加에 對한 感應을 調査한 結果는 Table II 와 같다.

Fig 3 에서 보이는 바와 같이 Chlorella 의 發育時期에 따른 endogenous respiration 은 全生活史를 통하여 큰 變化가 없었으나 growing stage 에서는 상당히 增加하였다.

한편 glucose 呼吸에 있어서 酸素消費量은 growing stage 및 post ripening stage 에서 各各 增加하였고 early ripening stage 및 division stage 에서는 減少하였다.

또한 Fig. 3 에는 Chlorella 呼吸에 미치는 Ca 의 影響과 glucose 呼吸에 미치는 Na-lactate 의 影響을

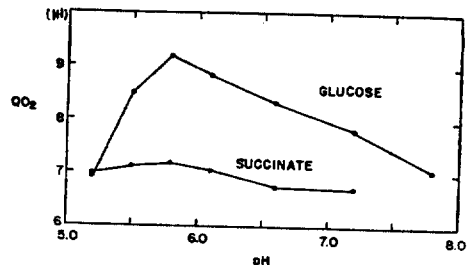


Fig. 2. Effects of pH on oxidations of succinate and glucose by Chlorella ellipsoidea.

Table II. The rate of oxygen uptake under various conditions in *Chlorella* cells during the course of their life cycle.

		($\mu\text{l O}_2/\text{mg. dry wt./hr.}$)							
Ages		T ₀	T ₃	T ₆	T ₉	T ₁₂	T ₁₅	T ₁₈	T ₂₁
Additions									
E. R.		7.94	10.56	7.73	7.15	8.05	8.20	7.17	8.14
Glucose		9.84	11.91	12.52	11.07	8.40	8.76	12.36	8.20
Na-succinate		7.96	7.32	6.94	6.08	7.57	8.11	7.17	8.12
Na-citrate		8.25	8.19	7.67	7.40	8.04	8.10	8.12	8.34
Na-malate		10.85	11.25	10.76	9.66	8.91	8.84	10.20	10.92
Na-lactate		—	—	9.67	—	—	—	—	—
Ca-lactate		2.54	7.85	6.54	3.12	2.40	1.93	2.16	2.37
Na-acetate		11.67	13.46	11.22	7.63	8.97	8.23	10.90	11.24
Glu+Na-succ.		8.04	7.50	8.17	7.32	7.27	6.87	7.60	7.12
Glu+Na-cit.		8.17	7.60	7.57	5.76	7.31	7.92	9.92	8.81
Glu+Na-mal.		11.69	12.45	12.75	11.62	7.08	7.58	12.67	13.27
Glu+Na-lact.		15.34	14.37	15.05	12.55	9.10	10.18	14.76	16.60
Glu+Na-acet.		7.55	7.02	7.55	5.01	4.01	4.38	6.70	5.09

表示하였다.

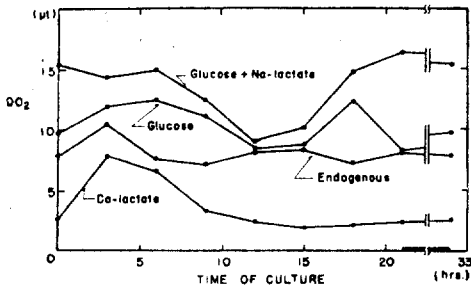


Fig. 3. Changes in endogenous respiratory activity, glucose, and Ca-lactate respiration and effects of Na-lactate on glucose respiration in *Chlorella* during the course of life cycle.

Na-lactate가 glucose 호흡에添加되었을 때 그 酸素消費量은 *Chlorella*의 全生育時期에 걸쳐 增加되었는데 growing stage 및 division stage에서 가장 높았고 early ripening stage에서 낮았다.

한편 Ca-lactate는 *Chlorella*에 依해서 거의 利用되지 않았는데 Ca는 *Chlorella*의 endogenous respiration을 抑制하는 것 같다.

*Chlorella*의 生育時期에 따른 succinate 및 citrate의 利用과 이들이 glucose 호흡에 添加되었을 때의 影響을 Fig. 4에 表示하였다.

Succinate 및 citrate는 *Chlorella*의 全生活史를 通해 呼吸基質로서 거의 利用되지 않았고 endogenous

respiration 마저 抑制하는 것 같다. 또한 glucose와 同時에 各各 添加되었을 때 그 呼吸能은 減少하여 glucose 呼吸도 抑制하는 것 같이 생각된다.

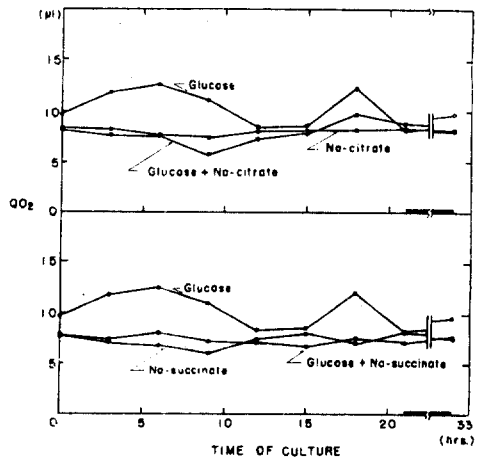


Fig. 4. Changes in the rate of oxygen uptake in the presence of succinate and citrate and their effects on glucose respiration in *Chlorella* during the course of life cycle.

한편 Fig. 5에서 보는 바와 같이 malate 및 acetate는 *Chlorella*의 全生育時期를 通해 呼吸基質로서 잘 利用되었는데 그 利用率은 growing stage 및 late ripening stage에서 增加하였고 early ripening stage에서 약간 減少하였다.

또한 malate 가 glucose 와 함께 添加되었을 때 그 酸化率은 약간 累積的인 增加를 보였는데 growing stage 및 complete ripening stage 에서 높았고 early ripening stage 에서는 顯著히 減少하였다.

한편 glucose 와 同時에 acetate 가 添加되었을 때 酸素消費量은 顯著히 減少하여 endogenous respiration 보다 낮았다.

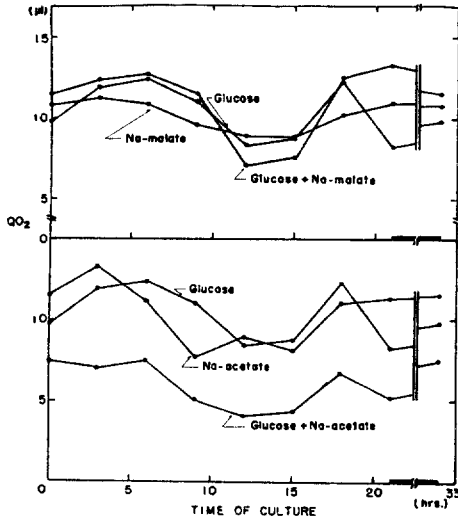


Fig. 5. Changes in the rate of oxygen uptake in the presence of malate and acetate and their effects on glucose respiration in *Chlorella* during the course [of life cycle.

Fig. 6 과 Fig. 7 에는 *Chlorella* 細胞의 growing stage 및 division stage 에서의 呼吸能의 變化와 各種 有機酸의 利用 및 glucose 呼吸에 미치는 이들 有機酸의 影響을 比較하여 各各 表示하였다.

Fig. 6 에서 보는 바와 같이 growing stage 에서는 glucose 가 가장 잘 利用되었고 malate, acetate 및 Na-lactate 등도 비교적 잘 利用되었다. 한편 Na-lactate 가 glucose 와 함께 添加되었을 때 그 酸化에 따른 酸素消費量은 어느 程度 相乘的이었으나 acetate 의 경우에는 오히려 減少하였다.

Division stage 에서는 glucose 가 別로 利用되지 않았고 acetate 의 添加에 따른 glucose 呼吸은 顯著히 減少하였다. 한편 Ca ion에 依해 呼吸能의 減少를 顯著히 나타낸다.

考 察

Chlorella 의 生活史에 따른 呼吸에 關한 研究로

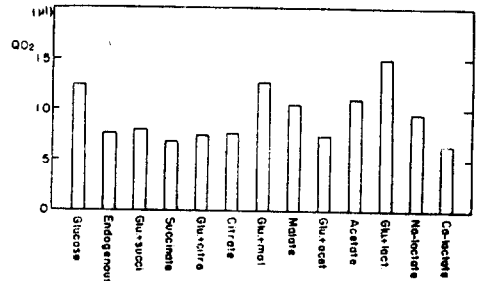


Fig. 6. Comparison of the rate of oxygen uptake in presence of added substrate at growing stage of *Chlorella* cells.

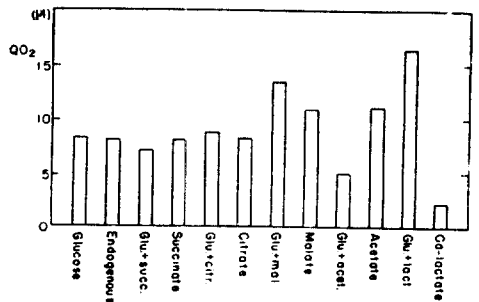


Fig. 7. Comparison of the rate of oxygen uptake in presence of added substrate at division stage of *Chlorella* cells.

는 Nihei et al (1954)이 있는데 그들은 *Chlorella pyrenoidosa* 를 材料로 使用하여 그 生育時期에 따른 光合成能과 呼吸能을 調査한 結果 光合成能은 ripening stage 보다 growing stage 에서 더 活潑하며 endogenous respiration 은 growing stage 보다 ripening stage 에서 더 높았음을 報告하고 成熟과 細胞分裂에는 더 많은 呼吸 energy 가 必要하기 때문이라고 하였다.

本 研究에서 endogenous respiration 은 色素含量이 높고 (Lee et al., 1964) 光合成能이 旺盛한 early growing stage 에 더 活潑하였는데 이와 類似한 結果는 Sorokin 등(1957)에 依해 報告되었다. 그들은 *Chlorella* 의 thermophilic strain 을 使用하여 그 生育時期에 따른 endogenous respiration 및 glucose respiration 의 變化를 調査하고 이들 兩者의 呼吸은 early growing stage 에서 높고 次後時期에 점차 減少하여 細胞分裂時期에는 急速히 減少한다고 하였다.

한편 Reid 등(1963)은 *Chlorella* 의 endogenous respiration 은 early growing stage 및 early ripening

stage에서 活潑하고 middle ripening stage 및 division stage에서는 낮으며 glucose respiration은 middle growing stage 및 complete ripening stage에서 높았고 late growing stage에서는 낮다는 것을 最近 報告하였다.

따라서 本 實驗에서 얻어진 *Chlorella*의 生育時期에 따른 endogenous respiration의 變化를 살펴보면 *Chlorella*의 呼吸能은 대체로 細胞의 光合成能이 높은 時期에 더 活潑한 것 같이 생각된다. 이러한 點은 glucose respiration의 結果와 잘 調和되는데, 本 研究에서 glucose respiration은 細胞分裂時期에 현저히 減少하였다. 이러한 事實은 glucose가 *Chlorella*의 光合成을 억제하여 細胞分裂를 현저히 지연시킨다는(Griffiths, 1963) 見解로 미루어 보면 細胞의 光合成能이 높은 時期에 呼吸能이 活潑하다는 것이 잘 부합된다.

Syrett(1951)는 *Chlorella*의 endogenous respiration이 外的基質의 添加로 抑制된다는 報告를 하였다. 또 Myers (1947)도 이러한 報告를 하였고 Taylor (1950)는 *Scenedesmus*를 使用하여 同一한 結果를 얻었다. 反面 [Pirson et al (1955), Moses et al (1955) 및 Kandler (1958) 등은 C^{14} -labeled *Chlorella*를 使用하여 glucose를 添加한 後에 $C^{14}O_2$ 의 放出이 增加하였고 acetate의 效果도 glucose와 類似함을 觀察하고 *Chlorella*의 endogenous respiration은 呼吸基質의 提供으로 多少 刺戟되거나 影響을 받지 않는다고 結論하였다. 本 研究에서는 succinate 및 citrate가 外的呼吸基質로서 提供되었을때 呼吸能에 아무런 效果가 없었고 오히려 *Chlorella*의 全 生育時期를 通해서 endogenous respiration이나 glucose respiration을 多少 抑制하는 것 같은데 이러한 事實은 *Chlorella*의 代謝 pool에서 succinate나 citrate가 有用한 中間代謝產物로서 急速히 酸化되지 못하는데 起因하는 것 같다. 한편 malate 및 acetate는 *Chlorella*에 依해서 잘 利用되었는데 이러한 數種 有機酸에 對한 利用率의 差異 및 生育時期에 따른 變化는 細胞內 反應系의 感應이 그 生理的 狀態에 따라 相異한 結果로서 Ca-lactate는 growing stage에서 어느 程度 利用되었으나 division stage에서는 거의 呼吸을 抑制하는 傾向을 보인다.

主로 海洋藻類가 그들의 細胞膜의 構成成分으로 Ca ion을 吸收하여 $CaCO_3$ 로 蓄積한다는 것은 널리 알려진 事實인데 Knauss 등(1954)은 Ca이 낮은 濃度에서는 培地內의 Ca 濃도에 比例하여 *Chlorella*

*pyrenoidosa*에 吸收되는 것을 觀察하였다. 한편 Ca이 呼吸에 미치는 影響에 對해서는, Said et al (1962)이 carrot의 根片을 使用하여 $CaCl_2$ 가 sucrose와 함께 주었졌을때 $CaCl_2$ 는 培地內에서 糖의 轉化를 妨害하지만 呼吸에 미치는 影響은 別無하였다고 報告하였다.

本 研究에서 *Chlorella*에 依해 Na-lactate는 잘 利用된 反面 lactate가 Ca 鹽으로 添加되었을 때 顯著한 呼吸의 減少를 보였는데 이러한 事實은 *Chlorella*가 낮은 率로 Ca을 吸收한다는 點으로 미루어 볼 때 本 實驗에서 處理된 Ca-lactate의 Ca의 濃度가 細胞의 透過性에 미치는 害作用으로 因해 細胞의 osmotic balance가 維持되지 못한다 基因하는 것으로 생각된다. 한편 growing stage의 細胞들은 Ca-lactate가 添加되었을 때 呼吸에 큰 減少를 보이지 않았는데 이것은 細胞의 生理的 活性이 높은 時期에 비교적 外的 害作用에 對하여 더 방어되는 것으로 생각된다.

細胞에 어떤 基質을 添加하였을 때 그 物質의 酸化에 따른 酸素消費量이 添加된 基質의 全體酸化에 要求되는 量을 超過한다면 이러한 物質은 呼吸基質로서 의심스럽다. 本 研究에서 glucose는 *Chlorella* 細胞에 依해 잘 利用되었는데 이러한 glucose 呼吸에 미치는 malate 및 lactate의 影響은 glucose 呼吸을 增大시켰는데, *Chlorella* 細胞는 이들 有機酸을 보다 잘 利用할 수 있고 또한 細胞內 glucose 代謝過程에서 이들 malate나 lactate가 보다 잘 glucose 酸化와 相助되어 酸化되어 간다고 보겠다.

한편 glucose 呼吸에 acetate가 添加되었을 때 *Chlorella*의 呼吸은 顯著히 減少하였는데, *Chlorella*에서 glucose 酸化와 acetate 酸化間의 關係를 調査한 Merret 등(1960)은 "young" cell에서는 glucose와 acetate의 酸化率이 累積의으로 나타나지 않았고 "old" cell에서는 그 酸化率이 累積의인 것을 觀察하였는데, 다시 "old" cell에 glucose를 添加한 30分後에 acetate를 添加하면 이 "old" cell에서 物質은 相互影響이 없이 各各 獨立의으로 代謝된다는 것을 알았다. 따라서 *Chlorella* 細胞의 代謝 pool의 分離를 主張하였는데 本 研究에서 acetate의 添加로 因한 酸化率의 減少는 이러한 見解에 一致하는 것으로, 外的 基質이 細胞內 諸生理的 活性의 差異와 細胞內에 存在하는 生理的으로 分離된 回路에 依해서 各各 代謝되는 경우를 뜻하는 것 같다.

摘 要

Chlorella 를 同調培養法으로 培養하여 細胞의 生活史에 따른 呼吸能의 變化와 有機酸(succinate, malate, lactate, 및 acetate etc.)의 代謝活性을 manometric method 로 比較測定하고 同當代謝에 미치는 이들 有機酸의 作用을 各各 調査하여 *Chlorella* 細胞의 metabolic pattern 을 考察하였다.

1. *Chlorella ellipsoidea* 의 endogenous respiration 은 growing stage 에서 가장 活潑하고 early ripening stage 에서 division stage 까지는 一定值를 維持하였다.

2. Glucose 및 lactate 는 各各 呼吸基質로 잘 利用되었다. exogenous glucose respiration 은 growing stage 와 late ripening stage 에서 가장 活潑하고 early ripening stage 와 division stage 에서는 상당히 減少하였다.

3. Succinate 및 citrate 는 *Chlorella* 의 全生活史를 通하여 endogenous respiration 이나 glucose respiration 을 모두 抑制하였다.

4. malate 및 acetate 는 early growing stage 및 division stage 에서 잘 利用되었고, malate 는 glucose 의 酸化와 相助作用을 나타내었으나 acetate 의 경우는 glucose 呼吸의 酸化率을 현저히 減少시켰다.

5. Ca ion 의 存在는 呼吸基質의 透過를 抑制할 뿐만 아니라 內呼吸도 抑制하는 것 같다.

References

- 1) Arnon, D.I., 1938. Microelements in culturesolution experiments with higher plants. *Am. J. Bot.*, **25**, 322—325.
- 2) Griffiths, D.J., 1953. The effect of glucose on cell division in *Chlorella vulgaris*, *Beijerinck* (Emerson strain). *Ann. Bot.*, **27** (107), 493—504.
- 3) Kandler, O., 1958. The effect of 2,4-dinitrophenol on respiration, oxidative assimilation, and photosynthesis in *Chlorella*. *Physiol. Plantarum*, **II**, 675—684.
- 4) Knauss, H.J., and Poter, J.W., 1954. The absorption of inorganic ions by *Chlorella pyrenoidosa*. *Plant Physiol.*, **29**, 229—234.
- 5) Lee, Y.N. and Kim, C.K., 1964. Changes in pigment contents of *Chlorella* cells during the course of their life cycle. *Dr. Lee Fui Jae's Memorial Issue.*, 145—152.
- 6) Merrett, M.J., and Syrett, P.J., 1960. The relationship between glucose oxidation and acetate oxidation in *Chlorella vulgaris*. *Physiol. Plantarum*, **13**, 237—249.
- 7) Moses, V., and Syrett, P.J., 1955. The endogenous respiration of microorganisms. *J. Bacteriol.*, **70**, 201—204.
- 8) Myers, J., 1947. Oxidative assimilation in relation to photosynthesis in *Chlorella*. *J. Gen. Physiol.*, **30**, 217—227.
- 9) Nihei, T., Miyachi, S., Suzuki, K., and Tamimiya, H. 1954. Change of photosynthetic activity of *Chlorella* cells during the course of their normal life cycle. *Arch. Mikrobiol.*, **21**, 155—164.
- 10) Pirson, A., Daniel, A.L., and Becker, E.W., 1955. Zur Beziehung zwischen endogener Atmung und Glucoseatmung bei *Chlorella*. *Arch. Mikrobiol.*, **22**, 214—218.
- 11) Reid, A., Soeder, C., J., and Müller, I., 1963. Respiration in synchronized cultures of *Chlorella*. I. Changes in respiratory gaseous exchange during the course of the developmental cycle. *Arch. Microbiol.*, **45**(4), 343—358.
- 12) Said, Hssein Fawzy, and Kamel Saddik, 1962. Respiration and carbohydrate metabolism of carrot root slices immersed in water, calcium chloride, MgCl and sucrose solutions alone or in mixtures. *Jour. Bot., UAR*, **4**, 123—135.
- 13) Sorokin, C., and Myers, J., 1957. The course

- of respiration during the life cycle of *Chlorella* cells. *J. Gen. Physiol.*, **40**, 579—592.
- 14) Syrett, P.J., 1951. The effect of cyanide on the respiration and the oxidative assimilation of glucose by *Chlorella vulgaris*. *Ann. Bot.*, **14**, 473—482.
- 15) Tamiya, H., Morimura, Y., Yokota, M., and Kunieda, R., 1961. Mode of nuclear division in synchronous culture of *Chlorella*. Comparison of various methods of synchronization. *Plant and Cell Physiol.*, **2**, 383—403.
- 16) Taylor, F.J., 1950. Oxidative assimilation of glucose by *Scenedesmus quadricauda*. *J. Exptl. Bot.*, **1**, 301—321.
- 17) Umbreit, W.W., Burris, R.H., and Stauffer, J.F., 1957. "Manometric techniques." Burgess, Minneapolis, Minnesota.