

Undaria 細胞의 磷酸代謝에 관한 研究

李 鍾 三 · 林 英 福

(誠信女子大學 生物學科)

A Study on phosphate metabolism in Undaria cells

LEE, Chong Sam, Young Back LIM

(Department of Biology, Sungshin Women's University)

ABSTRACT

1. Each cells homogenized from Undaria were reacted in reaction mixture to persue the phosphate metabolism in Undaria cell. Aliquots of the cells were taken out at the beginning and at intervals during the reaction, and analyzed for the contents of total-P in various fractions of the cell constituents.
2. The P-contents in fractions of DNA, protein, and lipid increased during the reaction. And also the P-contents in fraction of polyphosphate "B" decreased remarkably, while that in fraction of RNA polyphosphate complex and polyphosphate "A" increased significantly, and of RNA-P and polyphosphate "C" showed slow increase.
3. As well as in Chlorella cells, inorganic phosphates in DNA-P, protein-P, and lipid-P were transferred from polyphosphate, RNA-P turnovered from inorganic phosphate that is in cytoplasm, and RNA polyphosphate complex from polyphosphate, and it was suggested that inorganic phosphates in polyphosphate "B" could transformed into polyphosphate "A" & "C", and polyphosphate "C" into polyphosphate "A".

緒 論

無機폴리磷酸은 *Saccharomyces cerevisiae* (Wiene, 1949), *Chlorella* (Wintermans, 1955), 細菌(Harold, 1966), 褐藻類와 紅藻類(李, 1978) 등의 微生物뿐만 아니라 下等植物(Keck와 Stich, 1957)과 高等植物인 시금치(Miyachi, 1961)에서도 分離되었다.

또한 酸不溶性 폴리磷酸 分劃에 存在하고 있는, RNA 폴리磷酸複合體는 *Mycobacteria* (Winder와 Denny, 1956), *Aspergillus* (Belozersky와 Kulayev, 1957), *Azotobacteria* (Zaitseva,

1960) 등에서 分離된 바 있고 특히 Correll 등 (1962, 1964, 1965)은 *Chlorella* 細胞에서 RNA 폴리磷酸複合體의 物理化學的 特性을 보고하였다.

이러한 無機폴리磷酸은 細胞內的 物質代謝에서 phosphate pool은 동시에 중요한 energy reservoir의 役割(Wiame, 1949; Winkler, 1953; Winder와 Denny, 1954; Mudd 등, 1958)을 하는 것으로 밝혀진 바 있으나 褐藻類에서는 無機폴리磷酸의 存在만이 밝혀졌을 뿐(李, 1978) 이들 細胞에서 폴리磷酸이 다른 有機化合物의 磷酸轉換課程에서 어떤 役割을 하는가에 대해서는 아직까지 追跡된 바가 거의 없다.

本 研究에서는 褐藻類인 *Undaria* 細胞內的 RNA 폴리인산複合體를 分離함과 동시에 여러 가지 인산화化合物的 量的 動態를 조사하였고, *Undaria* 細胞에서 無機폴리인산과 RNA 폴리인산複合體의 役割 특히 이들 폴리인산들이 物質代謝 課程중의 細胞 構成成分인 有機物, 즉 蛋白質, DNA, RNA, 脂質등으로의 磷酸轉換 課程을 追跡하였다.

材料 및 方法

1. 材料

材料로서는 1980年 7月 南海岸 忠武에서 채집한 미역(*Undaria*)을 사용하였다. 多細胞인 *Undaria*를 個個의 單細胞로 分離하기 위하여 먼저 *Undaria*를 tap water와 滅菌된 증류수로 다시 세척하였다. 큰 脈은 除去하고 잘게 切斷한 후 Waring blender로 2~3分 마쇄하였다. 이때의 grinding medium으로는 0.4 M sucrose를 포함한 0.3mM tris buffer(pH 7.5)를 사용하였다. 마쇄된 것을 4겹의 가제에 1~3회 여과한 후 그 여과액을 檢鏡하여 分離된 個個의 細胞를 確認하였다. 여과액을 150×g에서 5分間 遠心하였고, 그 沈澱物에서 grinding medium을 除去하기 위하여 0.5 M NaCl 溶液에 懸탁하여 150×g에서 다시 5分間 遠心하여 얻어진 沈澱物을 다음 實驗에 사용하였다(Table 1).

2. 反應

Undaria 細胞가 生長할 수 있는 海水의 最適溫度가, 成葉은 5~10°C이며 柔葉은 12~13°C인데, 本 研究에서는 거의 다 자란 미역細胞를 사용하였으므로 10°C를 維持하여 反應시켰고, 反應液 등에는 증류수 대신 滅菌한 海水를 사용하였다. 細胞를 反應液(0.4 M sucrose, 50 mM glucose, 0.2μM alanine, 100mM KH_2PO_4)에 懸탁하여 8~10°C 下에서 5時間 反應시켰다.

3. 分劃

反應 初와 反應 中間期에 一定量의 細胞를 收穫하여 0.5M NaCl 溶液으로 세척한 다음, 細胞의 여러가지 構成成分은 常法(李, 1964; 李와 陳, 1966 a,b)을 다소 개선하여 分劃에 사용하

Table 1. Method of homogeneity of *Undaria* from multicell to each cell.

Undaria leaves	Wash with tap water and sterilized dist. water. Remove midrib.
Leaves	Homogenize in tris buffer (pH7.5) containing 0.4M Sucrose sol.
Homogenate	Filler through gauze
Filterate	Centrifuge 150×g 5min.
Precipitate	Resuspend in 0.5M NaCl sol. Centrifuge 150×g 5min.
Precipitate (each cell of <i>Undaria</i>)	

였다. 核酸의 分離는 Schmidt와 Tannhauser (1945) 法에 依據하였고, 폴리인산의 分離는 Miyachi와 Tamiya (1961 b) 法을 다소 改良하였으며, RNA 폴리인산複合體의 分劃은 Correll과 Tolbert (1962)의 方法을 사용하였다.

그 處理順序는 다음과 같다.

- I) cold 5% PCA로 2回(30', 15')
- II) ethanol (95%, 75%)로 각각 1回
- III) hot ethanol-ether(3:1)로 3~4回
- IV) dilute KOH를 사용하여 pH 11.5로 調節한 후 2回(60', 30')
- V) 上澄液은 RNA 폴리인산複合體 分劃에 사용
 - i) cold 10% acetic acid를 사용하여 pH 4.5로 調節하여 60'間 냉장처리
 - ii) 上澄液을 다시 dilute HCl을 사용하여 pH3.0으로 調節하여 2배의 ethanol添加
- VI) 沈澱物은 0.5N KOH로 37°C에서 16~18.時間 處理
- VII) 上澄液에 5% PCA를 加하여 2.5% 溶液이 되게 한 다음

VIII) 沈澱된 DNA 蛋白을 5% PCA에 현탁하여 15分間 100°C에서 加熱하여 分離

4. 分析

각 分劃의 磷酸化合物을 H₂SO₄로 加水分解시켜서 얻은, 遊離된 無機磷酸의 量을 Fiske와 Subbarow (1925) 法을 사용하여 測定하였다.

1) Orthophosphate: Berenblum 과 Chain (1938) 法에 依據하여, 操作 I)에서 얻은 上澄液에 H₂SO₄ (最終濃度: 0.1N)와 ammonium molybdate (最終濃度: 0.0016 M) 및 isobutanol 3ml를 加하여 세계 혼든 후 isobutanol 層을 取하여 그속에 含有된 無機磷酸의 量을 測定하였다.

2) Nucleotide labile phosphate: Crane 과 Lipman (1953) 法에 의해 操作 I)에서 얻은 上澄液에 活性炭素粉沫을 加하여 0°C에서 30分間 吸着시킨 다음 遠心分離하여 얻은 沈澱物에 H₂SO₄ (最終濃度: 1N)을 加하여 100°C에서 10分間 比등시켰다. 이를 冷却시킨 后 遠心分離하여 上澄液에 含有되어 있는 無機磷酸의 量을 測定하였다.

3) Polyphosphate: Correl 과 Tolbert (1962)의 方法에 따라 Undaria 細胞에 存在하는 4가지 폴리磷酸의 量을 測定하였다.

① 폴리磷酸 "A" (酸可溶性): 操作 I)에서 얻은 上澄液에 3% metaphosphate 소량을 carrier로 加하고 pH 4.0으로 조절한 后, pH 4.0 acetate buffer 및 진한 Ba(NO₃)₂ 溶液을 加하여 잘 혼든 후, 5°C에서 하루 밤을 維持하여 形成된 沈澱物을 遠心分離하여 1N HCl에 溶解시킨 다음, 加水分解된 無機磷酸의 量을 調査하였다.

② 폴리磷酸 "B" (酸不溶性): 操作 V)의 ii)에서 얻은 上澄液에 H₂SO₄ (最終濃度: 1N)을 加하여 10分間 沸騰 加水分解하여 얻어진 無機磷酸의 量을 調査하였다.

③ 폴리磷酸 "C" (酸不溶性): 操作 VII)에서 얻은 沈澱物에 1N H₂SO₄를 加하고 10分間 沸騰시켜 얻은 溶液의 無機磷酸의 量을 追跡하였다.

④ RNA 폴리磷酸複合體: 操作 V)의 ii)에서 얻은 沈澱物을 RNA 폴리磷酸複合體라 推定하고

Semimicrokjeldahl flask 內에서 5N H₂SO₄로 加水分解시켜 얻은 無機磷酸의 量을 定量하였다.

4) lipid-P: 操作 II)와 III)의 上澄液을 合한 것을 脂質 分劃으로 보고 이 溶液을 Semimicrokjeldahl flask 內에서 加水分解하여 遊離된 無機磷酸의 量을 測定하였다.

5) RNA-P, DNA-P Protein-P: 操作 VII)와 VIII)의 上澄液, 操作 VIII)의 沈澱物을 각각 RNA, DNA, Protein으로 보고 Semimicrokjeldahl flask 內에서 加水分解하여 이들에 포함된 無機磷酸의 量을 조사하였다. 또한 RNA 分劃과 DNA 分劃은 Beckman Spectrophotometer로 紫外部 吸收值를 測定하여 그 값은 比較 分析하였다.

結 果

反應 初와 反應 中間期에 收穫한 Undaria 細胞를 分劃하여 얻은 여러가지 磷酸化合物의 total-P의 含量과 紫外部 吸收值를 Table 2에 표시하였다.

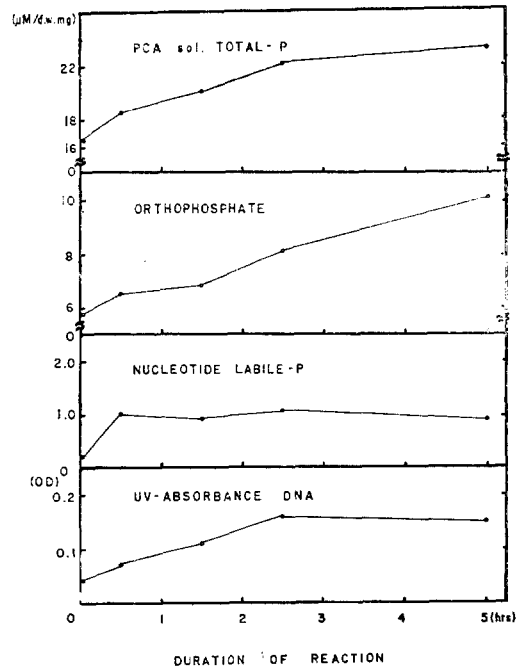


Fig. 1. Changes in amounts of total-P in PCA sol., ortho-P, & nucleotide labile fractions, and UV-absorbing material in DNA fraction of Undaria cells during the reaction under the light.

Table 2. Amounts of total-P in each fraction of *Undaria* cells during the reaction.

	Duration of reaction(hr)	Control M/d.w.mg cell	UV-absorbance at 260nm
PAC sol.	0	16.500	
Total-P	0.5	19.500	
	1.5	20.100	
	2.5	22.150	
	5	23.250	
	Lipid-P	0	0.633
	0.5	0.768	
	1.5	1.179	
	2.5	1.822	
	5	1.976	
Orthr-P	0	5.764	
	0.5	6.508	
	1.5	6.827	
	2.5	8.089	
	5	10.055	
Nuclertide labile-P	0	0.220	
	0.5	1.013	
	1.5	0.910	
	2.5	1.077	
	5	0.908	
Poly-P"A"	0	1.232	
	0.5	0.982	
	1.5	2.193	
	2.5	1.589	
	5	2.422	
Poly-P"B"	0	2.178	
	0.5	1.735	
	1.5	1.362	
	2.5	0.942	
	5	0.633	
Poly-P"C"	0	0.002	
	0.5	0.002	
	1.5	0.003	
	2.5	0.003	
	5	0.009	

RNA Poly-P	0	0.062	
Complex	0.5	0.084	
	1.5	0.082	
	2.5	0.181	
	5	0.376	
	RNA-P	0	0.220
	0.5	0.256	0.13
	1.5	0.234	0.18
	2.5	0.298	0.24
	5	0.391	0.28
DNA-P	0	0.015	0.04
	0.5	0.025	0.07
	1.5	0.026	0.11
	2.5	0.056	0.16
	5	0.049	0.15
Protein-P	0	0.035	
	0.5	0.054	
	1.5	0.066	
	2.5	0.062	
	5	0.084	

反應期間 中の 酸可溶性 分劃, Orthophosphate, nucleotide labile-P의 total-P 및 DNA의 紫外部 吸收値의 變化를 Fig. 1에 나타내었다. Fig. 1에서 보는 바와 같이 酸可溶性 分劃의 total-P와 orthophosphate는 反應期間을 통하여 현저히 增加하였으며 nucleotide labile-P와 DNA의 紫外部 吸收値는 완만한 增加를 보여주었다.

Fig. 2에는 反應期間 中 *Undaria* 細胞에서의 세가지 種類的 無機폴리磷酸의 含量變化를 표시하였다. 폴리磷酸 "A" (酸可溶性)는 反應 全期間을 통하여 현저히 增加한 반면, 폴리磷酸 "B" (酸不溶性)는 뚜렷한 減小를 보여주었다. 또한 폴리磷酸 "C"는 反應期間 동안 완만하게 增加하였다.

反應期間 中 일어난 RNA 폴리磷酸複合體와 RNA의 total-P의 消長관계 및 RNA의 紫外部 吸收値를 Fig. 3에 나타내었다. RNA 폴리磷酸複合體의 total-P는 反應期間 동안 상당히 增加하였으나, RNA의 total-P와 紫外部 吸收値는 비슷한 경향을 나타내면서 다소 완만하게 增加

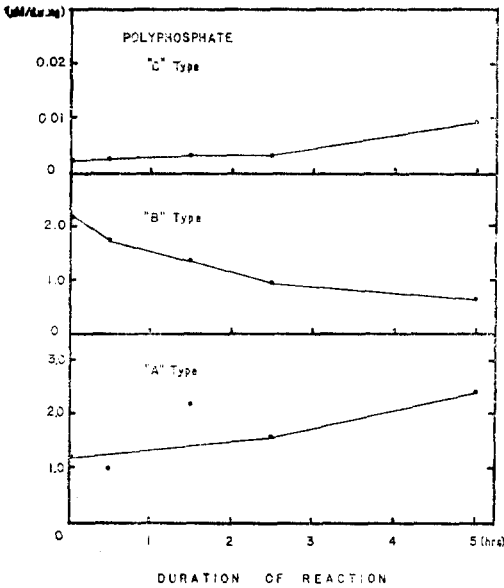


Fig. 2. Changes in amounts of total-P in various polyphosphate fraction of *Undaria* cells during the reaction under the light.

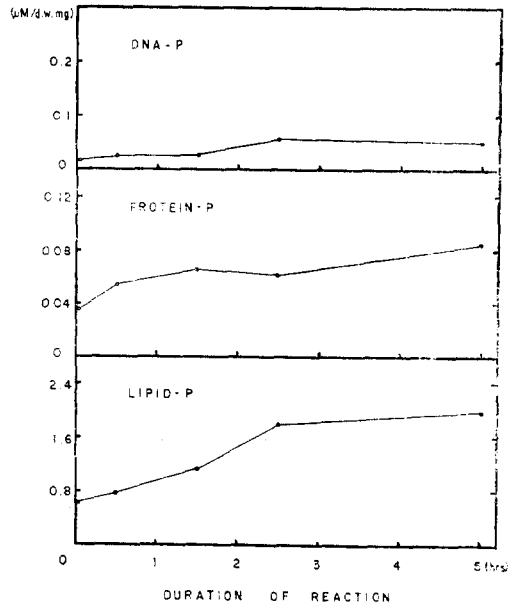


Fig. 4. Changes in amounts of total-P in the lipid, DNA & RNA fractions of *Undaria* cells during the reaction under the light.

하였다.

Fig. 4에는 DNA, 蛋白質 및 脂質 分劃의 total-P의 量的動態를 표시하였다. DNA 및 蛋白質의 total-P는 反應期間 동안 약간 增加하였으며, 脂質 分劃의 total-P는 현저히 增加하였다. 특히 DNA 分劃에 있어서 total-P의 含量變化는 紫外部 吸收物質의 變化와 비슷한 傾向으로 增加하였다.

考 察

無機폴리磷酸의 存在가 細菌, 菌類, 藻類 및 高等植物인 시금치에서도 밝혀졌으나, *Undaria* 細胞에서는 李(1978)에 의하여 最初로 폴리磷酸 "B"와 폴리磷酸 "C" 만이 밝혀져 있을 뿐인바 本 研究에서는 폴리磷酸 "A"의 存在를 밝힌과 아울러 RNA 폴리磷酸複合體도 처음으로 分離하였다.

Miyachi 等 (1961 a)은 *Chlorella* 細胞內에서 폴리磷酸 "C"가 폴리磷酸 "A"로 無機磷酸이 轉換되는 것을 觀察하였으며, 李 (1964)는 폴리磷酸 "C"의 磷酸이 폴리磷酸 "B"로 부터 導入

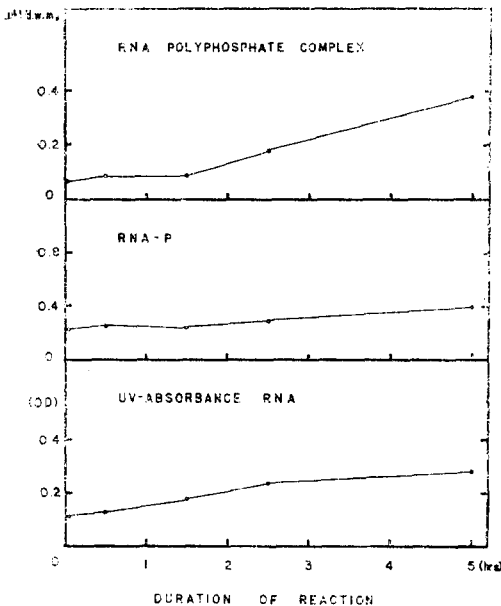


Fig. 3. Changes in amounts of total-P in RNA polyphosphate complex and RNA fractions, and UV-absorbing material in RNA fraction of *Undaria* cells during the reaction under the light.

되어 形成되는 것을 밝혔다. 本 研究에서도 *Undaria* 細胞의 폴리인산 "B"가 反應期間을 통하여 현저히 減小을 나타낸 반면 폴리인산 "A"는 反應末期까지 상당히 增加하였고 폴리인산 "C"는 完만한 增加를 나타내었다. 이와 같이 反應期間 동안 3가지 종류의 無機 폴리인산의 增減 變化를 考察하여 보건대, 폴리인산 "B"는 폴리인산 "A"와 폴리인산 "C"가 形成될때 磷酸을 供給하고 또한 폴리인산 "A"는 폴리인산 "C"로 부터 磷酸이 轉換되어 形成되어진다고 생각된다. 이와 같이 褐藻類인 *Undaria* 細胞의 磷酸轉換 課程은 綠藻類인 *Chlorella* 細胞內에서 일어나는 課程과 비슷한 pattern을 나타내는 것으로 사료된다.

無機 폴리인산이 生理的으로 P-reservoir로서 役割을 한다는 報告(Miyachi 등, 1961 b)가 있었고, RNA 폴리인산複合體가 metachromasy 反應을 나타내며 (Correll, 1964), 磷酸缺乏細胞에 있어서는 RNA 폴리인산複合體의 含量이 減小한다는 結果(李와 陳, 1966 a)와 아울러 *Chlorella*의 正常培地에 있어서 酸不溶性 폴리인산(폴리인산 "B")으로부터 RNA 폴리인산複合體로 磷酸轉換이 隨行되어지기 때문에 *Chlorella* 細胞의 final P-reservoir는 RNA 폴리인산複合體이며 이것이 volutin granule의 構成成分이라는 것을 보고한 바 있다(李와 陳, 1966 b).

本 研究에서도 폴리인산 "B"의 뚜렷한 減小에 수반하여 RNA 폴리인산複合體는 상당히 增加하였는데, 이것은 綠藻類인 *Chlorella* 細胞와 마찬가지로 褐藻類인 *Undaria* 細胞에서도, 無機 폴리인산 "B"로 부터 RNA 폴리인산複合體로 磷酸이 導入되었다는 사실(李와 陳, 1966 a)과 잘 부합된다.

한편 Miyachi 등 (1961 b, c)은 *Chlorella* 細胞의 磷酸化 反應에서 DNA와 蛋白質에 있는 無機 폴리인산으로부터 磷酸이 導入된다고 하였는데 本 研究에서 DNA 分割과 蛋白質 分割의 無機 磷酸의 量的 動態가 反應 初부터 反應 末期까지 계속적인 증가를 나타낸 것은 單細胞 微細 綠藻類인 *Chlorella*와 같이 *Undaria* 細胞의 磷酸 代謝에서도 外部 環境에 存在하고 있는 無機 磷酸이 아니라 細胞質의 phosphate pool인 無

機 폴리인산으로부터 磷酸이 導入되어 形成된 것으로 解析된다.

無機 磷酸이나 폴리인산이 枯渴狀態일때 RNA 폴리인산複合體가 phosphate pool로서 役割을 하여 磷酸은 酸不溶性 폴리인산을 통하여, 또는 직접 ADP를 거쳐서 DNA-P 및 磷蛋白 形成에 이용되므로 그 含量이 減小한다(李와 陳, 1966 a)고 하였는데, 本 實驗에서는 無機 磷酸이나 폴리인산이 豊富히 存在하기 때문에 RNA 폴리인산複合體는 反應 期間 동안 현저한 增加를 나타내었다.

單細胞 微細 綠藻類인 *Chlorella* 細胞의 磷酸 代謝에서 RNA에 含有된 無機 磷酸은 外部 環境에 있는 無機 磷酸을 導入한다는 (Miyachi 등, 1961 b, c) 것은 이미 밝혀진 사실인데 本 研究에서 *Undaria* 細胞의 RNA-P의 含量變化는 反應 期間 동안 계속하여 完만한 增加를 보여주었다. 이와 같은 경향은 *Undaria* 細胞內의 RNA를 構成하고 있는 無機 磷酸도 *Chlorella* 細胞와 같이 細胞內에 存在하고 있는 無機 폴리인산이 아닌 外部에 있는 無機 磷酸을 직접 導入하여 形成된다고 생각된다.

phosphate pool에서 磷脂質이 合成(李, 1967)되고, 磷脂質이 合成될때 phosphate pool에서의 磷酸의 轉換이 光線 下에서 더욱 촉진(Smirnov, 1960; Nakamura와 Yamada, 1975)되며, 磷脂質로 轉換되는 P^{32} 는 유기산 pool을 통해 지나가기 때문에 이 pool이 磷脂質 合成의 precursor pool이 된다(Koehler와 Varner, 1973)는 것이 觀察되었다. 또한 李와 李 (1976)가 分離한 葉綠體에 있어서도 磷脂質 合成에 대한 위의 같은 사실을 뒷받침해 주고 있다. 이와 같은 結果를 근거로 하여 *Undaria* 細胞 역시 反應 期間 동안 磷脂質의 현저한 增加를 보여준 것은 磷脂質 合成에 필요한 磷酸은 폴리인산으로부터 導入되는 것으로 생각된다.

그리하여 이와 같은 考察에 대한 結論을 내리던 *Chlorella* 細胞에서 밝혀진 磷酸代謝(李, 1964; 李와 陳, 1966 a, b)와 마찬가지로 *Undaria* 細胞內에 磷酸代謝는 DNA-P, 磷蛋白, 磷脂質은 폴리인산에서 轉換되며 RNA-P는 代謝 環境에 있는 無機 磷酸이 이용되어지고 RNA 폴리인

酸複合體는 酸不溶性인 폴리인산 “B”로부터 形成되는 P-reservoir로 作用한다고 생각된다.

摘 要

1. *Undaria* 細胞內의 磷酸代謝물 追跡하기 위하여 개개의 細胞로 조개 材料를 反應液에 넣어 反應 初와 反應 中間期에 一定量의 細胞를 收穫하여 여러가지 細胞 分割의 total-P의 含量을 測定하였다.
2. 反應期間을 통하여 DNA, 蛋白質, 脂質 分割의 total-P는 增加하였으며, poly-P “B”가 현저히 減소한 반면 RNA 폴리인산複合體와 poly-P “C”는 현저히 增加하였고, RNA-P와 poly-P “C”는 完만한 增加를 나타내었다.
3. 單細胞 微細 綠藻類인 *Chlorella* 와 같이 DNA-P, 磷蛋白, 磷脂質은 폴리인산으로부터, RNA-P는 細胞質 內의 無機인산으로부터 그리고 RNA 폴리인산複合體는 poly-P “B”로부터 無機인산을 導入하였으며, 동시에 poly-P “B”는 poly-P “A”와 “C”로, poly-P “C”는 poly-P “A”로 無機인산이 轉換되는 것으로 생각된다.

REFERENCE

1. Belozersky, H.N. and I.S. Kulayev, 1957. A study of the physiological role of polyphosphates in the development of *Aspergillus niger*, using radiophosphorus (P^{32}). *Biochem.*, (Russia) **22**, 545—554 (English translation)
2. Berenblum, I. and E. Chain, 1938. An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.*, **32**, 295—298
3. Correll, D.L. and N.E. Tolbert, 1962. Ribonucleic acid-poly-phosphate from algae. I. Isolation and physiology. *Plantphysiol.*, **37**, 627—636
4. Correll, D.L. 1964. Ribonucleic acid-polyphosphate from algae. II. Physical and chemical properties of the isolated complexes. *Plant & Cell Physiol.*, **5**, 171—181
5. Correll, D.L. 1965. Ribonucleic acid-polyphosphate from algae. III. Hydrolysis studies. *ibid.*, **6**, 661—669
6. Crane, R.H. and F. Lipman, 1953. The effects of arsenate on ascorbic phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **201**, 235—243
7. Fiske, C.H. and Subbarow, Y., 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *ibid.*, **66**, 375
8. Harold, F.M. 1966. Inorganic polyphosphate in biology; structure, metabolism, and function, *Bacteriol. Rev.*, **30**, 772—794
9. Keok, K. and H. Stich, 1957. The widespread occurrence of polyphosphate in lower plants. *Ann. Bot.*, **21**, 611—619
10. Koehler, D.E. and J.E. Varner, 1973. Hormonal control of orthophosphate incorporation into phospholipid of Barky Aleuone layers. *Plant Physiol.*, **52**, 208—214
11. 李永祿, 1964, *Chlorella*의 磷酸代謝에 관한 研究, 微學誌, **2**, **1**, 1—11
12. Lee, Y.N., 1967. Incorporation of phosphate into protein and other nitrogenous compounds in *Chlorella* cells. *Kor. Jour. Microbiol.*, **5**, 19—26
13. 李永祿, 陳平, 1966. a. *Chlorella*의 物質代謝에 있어서의 細胞內 폴리인산의 役割, 高大理工論集, 제 8집, 173—184
14. 李永祿, 1966. b. ^{32}P -labeled *Chlorella*의 正常 培地에 있어서의 ^{32}P 및 Total-P의 轉換. 식학지 **4**, **1**, 14—20
15. 李鍾三, 李永祿, 1976. 시금치에서 分離한 葉綠體의 磷酸代謝에 관한 研究, 식학지 **19**, **3**, 71—84
16. 李鍾三, 1978. 紅藻類와 褐藻類細胞의 無機폴리인산의 存在에 關하여, 誠信女師大 論文集, 제11집 87—94
17. Miyachi, S., 1961. Inorganic polyphosphate in spinach leaves. *J. Biochem.*, **50**, 364—371
18. Tamiya, H. and S. Miyachi, 1961. a. Modes of formation of phosphate compounds and their turnover in *Chlorella* cells during the process of life cycle as studied by the techn-

- ique of synchronous culture. *Plant & Cell Physiol.*, **2**, 415—424
19. Miyachi, S. and H. Tamiya, 1961. b. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells. *ibid.*, **2**, 405—414
 20. Miyachi, S. 1961. c. Some observation on phosphorus metabolism in growing *Chlorella* cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **46**, 200—202
 21. Mudd, S., Yoshida, A., and Koike, M., 1958. Polyphosphate as accumulator of phosphorus and energy. *J. Bacteriol.*, **75**, 224—235
 22. Nakamura, Y. and Y. Yamada, 1975. Fatty acid synthesis by spinach chloroplast I. Property of fatty acid synthesis from acetate. *Plant & Cell Physiol.*, **16**, 139—149
 23. Schmidt, G. and S.J. Tannhauser, 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissues. *J. Biol. Chem.*, **161**, 83—89
 24. Smirnov, B.P., 1960. The biosynthesis of higher acids from acetate in isolated chloroplasts of *Spinacia Oleracea* leaves. *Biokhimija.*, **25**, 545—555
 25. Smirnov, B.P. 1949. The occurrence and physiological behavior of two metaphosphate fractions in *Yeast*. *J. Biol. Chem.*, **178**, 916—929
 26. Winder, F. and Denny, J.M., 1954. Metaphosphate in mycobacterial metabolism. *Nature*, **174**, 353—354
 27. Winder, F. 1956. Phosphorus metabolism of Mycobacteria: Determination of phosphorus compounds in some Mycobacteria. *J. Gen. Microbiol.*, **15**, 1—185
 28. Winkler, A., 1953. The metachromatic granula of bacterial cytology. *Suppl. to Rend. Ist. super. sanitá*, 39—44
 29. Wintermans, J.F.G.H., 1955. Polyphosphate formation in *Chlorella* in relation to photosynthesis *Mededel. Landbaushogelschool Wageningen*, **55**, 69, New York.
 30. Zaitseva, G.N., A.N. Belczersky, and L. Yu. Frolova, 1960. Oxidative phosphorylation and synthesis of polyphosphate in the cells of *Azotobacter vinlandii*. *Doklady, Akad Naak. S.S.S.R.*, **132**, 470—473. (C.A. 55:5649 C, 1961)