

Chlorella培養에 있어서 N^{15} -標識와 生育經路에 관한 研究

黃 鎬 觀 · 柳 大 河

全北大學校 化學教育科
(1984년 8월 2일 접수)

A Study on the N^{15} -labelling and Path Way of Chlorella in the Course of Culture

Ho-Gwan Hwang and Dae-Ha Ryu

Department of Chemistry Education, Chon Buk National University, Chonju, Korea
(Received August 2, 1984)

Abstract

Since chlorella was found to be a source of protein in 1974, wide ranges of investigations on culture methods, its constituents and nutritional factors have been carried out, i. e. most of them were the reports on the nutritional evaluation. However, kinetics such as absorption, distribution, metabolism and elimination of chlorella protein have not been fully elucidated. So, on the assumption that using N^{15} labelled chlorella protein could accomplish good results for kinetics of chlorella in in vivo experiments, N^{15} was added to the culture fluid. From the result of this study, it is suggested that chlorella utilizes N as well as N^{15} in protein synthesis, and this N^{15} labelled chlorella protein can be useful tool for the study of kinetics of chlorella in in vivo experiments.

序 論

chlorella는 第1次, 2次 世界大戰 中 極度로 食糧에 困難을 받았던 獨逸에서 代用食品의 目的으로 研究되었으나 큰 成果를 얻지 못하고 終戰되었다. 그 後 1947年 美國의 Spoehr¹⁾의 本格的인 실험에 의해서 그 食用價値가 認定된 以來 世界的인 食糧難 解消에 重要한 단백질 源으로 注目되어²⁾ 世界 各國에서 chlorella의 培養法^{3,4)}, 組成成分^{5,6)}, 營養價値^{7,8)} 等 여러 分野에 걸쳐 研究를 하고 있다. 특히 그 營養價에 대한 報告가 많이 있으나, 그 中에는 Chlorella protein이 動物의 어느 器官에 많이 吸收되고 적게 吸收된다는 內容의 報告는 全然 없는 실

정이다. 따라서 本 著者들은 이와 같은 chlorella protein의 臟器內로의 吸收狀態 및 그 分布 等を 알려던 chlorella protein을 同位元素로 標識해야 한다는 점에 着眼하여 于先 chlorella를 生育할때 N^{15} 을 培養液에 加하여 N^{15} 로 標識된 chlorella protein을 얻을 수 있는가를 檢討하고자 本 研究를 試圖하였다.

材料 및 方法

A. 試料의 調製

1) Chlorella의 N^{15} 標識 및 培養

N^{15} chlorella는 다음의 Table 1과 같은 組成의 培

Table 1. Composition of the culture fluid of chlorella(Per liter)

KN ¹⁵ O ₃ (1.5 excess%)	5.000g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	2.500g
KH ₂ PO ₄	1.250g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.005g
Arnons* A ⁵ solution*	1 ml

*: H₃PO₄ 2.85g, MnCl₂·4H₂O 1.81g, ZnCl₂·7H₂O 0.22g, CuSO₄·5H₂O 0.078g, 3(NH₄)₂O₇MoBO₃ 0.171g diluted in 1ml

養液에다 *Chlorella ellipsoidea* 를接種하고 同調培養法에 의해 培養하였다.

투명한 아크릴로 培養槽를 製作하여 그곳에 20cm 의 길이로 培養液을 채우고 *Chlorella ellipsoidea* 를 接種시킨 다음 培養槽에 20cm 간격으로 세워진 플라스틱管으로 空氣(5% CO₂가 含有된 것)를 펌프에 의해 培養槽에 吹入시켜서 培養液을 攪拌시켰다. 또한 培養槽의 液面과 20cm 띄어서 螢光燈으로 照度를 9,000 lux 로 調節하였고 培養液의 pH는 培養期間中 6.0 으로, 培養液의 溫度는 21°C 로 維持시켰다.

2) N¹⁵ chlorella 의 處理

위에서 培養하여 얻은 N¹⁵ chlorella 는 高森²⁾의 chlorella 脫色方法에 따라 處理하였다. 即, 1,200 r.p.m 으로 10分間 遠沈하여 얻은 chlorella 에다 10倍量의 70% methanol 을 加해서 1時間동안 室溫에서 放置한 後, 1,200 r.p.m 으로 10分間 遠心分離하고, 다시 10倍量의 70% methanol 로 15分間 씻이는 것을 數回 反復하여 脫色시켰다. 이 殘渣를 減壓 데시케이터에서 乾燥시켜 N¹⁵ chlorella protein 으으로써 本 실험에 使用하였다.

B. 化學的 分析方法

1) N¹⁵ 의 定量

N¹⁵ 는 Nier¹⁰⁾에 의한 mass spectrometry 로 定量하였다. 그 處理는, 試料를 分解해서 ammonium 鹽으로 하고 이것을 알칼리성 sodium hypobromite 로 變化시켜서 질소가스로 이온화 시킨 후, 이것을 加速해서 磁場을 통과시켜 方向을 바꾸면 atomic mass 에 따라 이온流의 屈折에 差異가 생기는데 이 分離된 이온流를 2個의 collector 에 모아서 各 이온의 電流比를 얻었다.

質量 28(N¹⁴N¹⁴) 및 29(N¹⁴N¹⁵)의 各 이온의 電流의 比를 $R = N^{14}N^{14} / N^{14}N^{15}$ 로 하면 試料의 atom per

cent 는 다음 式으로 얻어진다.

$$\text{Atom per cent} = 100 / 2R + 1$$

上式에서 구한 값에서 N¹⁵ 의 natural abundance 인 0.37 atom per cent 를 빼면 그 試料의 atom per cent excess 가 된다. N¹⁵mg 은 $N_{mg} \times N^{15} \text{excess} \% \times 1/100$ 로 算出하였다. 그리고 mass spectrometer 는 RMI 2 型을 使用하였다.

2) Total nitrogen 의 定量

Total nitrogen 은 semi-micro kjeldahl法¹¹⁾으로 定量하였다.

結 果

1) N 및 N¹⁵excess% 의 經時的 變化

培養槽에 10ℓ의 培養液을 넣고 培養條件을 맞춘 다음 *chlorella ellipsoidea* 를 接種시켜 培養하고 經時的으로 N 와 N¹⁵excess% 의 含量을 測定한 結果는 다음의 Table 2 와 같다.

但, D_a의 packed cell volume(per liter)는 0.45 이다.

Table 2. Content of the N and N¹⁵ excess% in chlorella algae

	D _a	L ₁	L ₃	D _n
Sample	4.60 ℓ	2.60 ℓ	1.30 ℓ	1.18 ℓ
Nitrogen	33.74 mg	31.62 mg	39.81 mg	39.37 mg
N ¹⁵ excess%	0.128	0.500	0.516	0.580

D_a : cultured 4 hrs

L₁ : cultured 14 hrs

L₃ : cultured 32 hrs

D_n : cultured 15 hrs under the dark state

실험에 使用할 試料는 다음의 計算에 의해서 採取하였다.

D_a의 경우 packed cell volume(per liter)이 0.45 이므로 1ℓ中에 含有된 질소는

$$0.45 \times 0.25 \times 7 / 100 = 0.00786 \text{ g}$$

또, 質量分析에 있어서 assay range 가 0.5mg 이고 本 실험에 使用한 KN¹⁵O₃ 는 1.5 excess % 이므로 1ℓ中에 含有된 N¹⁵ 은

$$7.86 \times 1.5 / 100 = 0.118 \text{ mg}$$

따라서, 測定하는데 絕對必要한 最小量은 D_a의 경우 0.5/0.118=4.2ℓ이다. L₁, L₃, D_n의 경우도 各各 packed cell volume 의 값에 의해서 計算하였고 絕對必要한 最小量보다 조금 많이 採取한 것이

다. 그리고, N^{15} excess %는 質量分析의 結果이며 kjeldahl法에 의해서 질소를 定量하고 그 試料를 再 증류해서 1 ml 程度로 농축하고 Nier¹⁰⁾法에 따라 測定하였다.

2) N 및 N^{15} 의 經時的 變化

Table 2에 의해서 N 및 N^{15} 의 1ℓ當 含量을 計算한 값은 Table 3과 같다.

Table 3. Content of the N and N^{15} in chlorella algae(Per liter)

	D _a	L ₁	L ₃	D _n
N	7.34 mg	12.16 mg	30.62 mg	30.16 mg
N^{15}	0.0094 mg	0.061 mg	0.153 mg	0.175 mg

Table 3의 N^{15} 은 Table 2의 N^{15} excess %에다 Table 3의 N값과 1/100을 곱하여 얻은 것이다. 즉, D_a의 경우 $0.128 \times 7.34 \times 1/100 = 0.0094$ mg이다.

또, chlorella의 生育過程中 N와 N^{15} 의 吸收狀態를 더욱 一目瞭然하게 그래프로 표시하면 다음의 Fig. 1과 같다.

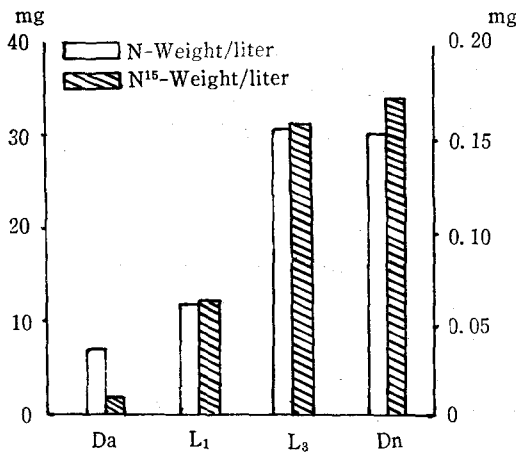


Fig. 1. Content of the N and N^{15} in chlorella algae(per liter).

考 察

1. 本 實驗에서는 cell number와 qacked cell volume의 測定, 照度의 調節 등을 해야하기 때문에 同調培養法이 適合하다.

Chlorella의 處理는 acetone, methanol 處理 등이 있으나 methanol中에서 끓이는 것이 가장 좋다. 이 方法으로 하면 protein外의 可溶性인 N-compound

가 모두 溶出되고 또 脫色되어 無臭한 白色粉末을 얻을 수 있어 長期間 保管에 有利하다.

2. Table 2 및 Table 3에 있어서 N 및 N^{15} 含量이 經時的으로 增加하나 照度를 없애고 어둡게 하면 그대로인 것을 볼 수 있다. 이것으로 chlorella는 어두운 狀態에서는 增殖은 하지 않는다는 것을 알 수 있고, 또 Fig. 1에서 볼 수 있는 것처럼 N 및 N^{15} 의 吸收狀態가 거의 平行이란 것도 알 수 있다.

이것으로 chlorella 藻體內에 N^{15} 가 吸收되고 chlorella protein이 N^{15} 로 標識된다는 것을 알 수 있다. 따라서 앞으로 研究하려는 chlorella protein의 臟器內로의 吸收狀態 調査 등이 可能하게 될 것 같다.

要 約

Chlorella protein의 臟器內로의 吸收狀態 및 그 分布 등을 알려면 chlorella protein을 同位元素로 標識해야 된다는 점에 着眼하여 chlorella를 生育할 때 N^{15} 를 培養液에다 添加하여 N^{15} 로 標識된 chlorella protein을 얻을 수 있는가를 檢討하였다.

培養液內의 N 및 N^{15} 의 含量은 培養期間中 經時的으로 增加하였으나 照度를 없앤 어두운 狀態에서는 增加하지 않았으며, N 및 N^{15} 의 吸收狀態는 거의 平行인 것으로 보아 chlorella 藻體內에 N^{15} 가 吸收되고 chlorella protein이 N^{15} 로 標識된다는 것을 알 수 있었다.

文 獻

1. Spoehr, H.A. and Milner, H.W. : *Plant Physiol.*, **24**, 120(1949)
2. Fink, H.Z. : *Physiol., chem.* **305**, 182(1957)
3. Tamiya, H. : *Proc. World Symp. on appl. Solar energy, Phoenix, Ariz.*, 231 (1955)
4. Takechi, Y. : *Hakko kyokaisii*, **23**, 370(1955)
5. Kandatsu, M. und Tadahiko, Y. : *J. Jap. Soc. Food and Nutr.*, **16**, 318(1963)
6. Iwata, I. and Narikawa, I. : *J. Jap. Soc. Food and Nutr.*, **18**, 352, (1966)
7. Fisher, A.W. : *Carnegie Institution of Washington Pub.*, **600**, 322(1953)
8. Kandatsu, M. und Tadahiko, Y. : *J. Jap. Soc. Food and Nutr.*, **16**, 411(1963)
9. 高森乙 : 松クロレラとその飼料價値(3) 畜産の研究 **20**, 921(1966)
10. Nier, A.O.C. : Preparation measurements of isotopic tracers, *Ann. Arbor*, 11(1946)
11. 東京大學 農學部 農藝化學 教室編 : 實驗農藝化學(上) 朝創書店, 385(1960)