

韓國 Chlorella 에 對한 研究

李 周 植 · 沈 宗 浩

(서울大學校 師範大學 生物學教室)

Studies on the Chlorella in Korea

Lee, Zoo Shik and Shim, Jong Ho

(College of Education, Seoul National University)

(1962. 2. 3. 受理)

SUMMARY

According to the experiment on pure-isolation and the related contaminants of Chlorella, the phenomena of the ecological distributions of Chlorella in Korea have been manifested in several areas and also the aim that in going to do culture, biological and physiological study of Chlorella is carried out.

Contaminants very often occupied on the colony of the strains taken in order to fulfil pure-isolation of Chlorella, but in accordance with being piled up the minute research on this subject, I can obtain the desirable results as follows :

1. For the pure-isolation, the duration chose the time from May to September 1957 so that may easily isolate from contaminant water with utilizing the antibiotic substances.
2. To take long time, 36-48 hours until growth of nascent through the non-sporulated, it originates from the difference of the cultured media. In addition to the above mention, the mechanism of growth until nascent through the sporulated must not always require the light, However the supply of metabolic energy depend upon its nutritional conditions per phase.
3. The culture of Chlorella should be based on the lower culturing except adding especial conditions such as reagent concentration of media, artificial shake of media and other facts due to the natural conditions. And also these strains grew not only in distilled water but 2% NaCl solution without any abnormality in cell itself. I, therefore, guess it is possible to culture in sea-water under phasic environment.
4. In the experiment of ammonia detection, it is caused by the sampling surroundings to contain the minute quantity of ammonia in strain No. M 918; that is the place to be plenty of Carbohydrate on behalf of protein.
5. To compare the absorption curve of chlorophyll of higher plant with that of Chlorella, the absorption zone made mostly the same ones each other but a little absorption grade dose not clearly appear. The colony which formed giant type grows with intensive colour and green band on surrounding of the colony and after that it was changed into all the green colour and developed up to end.
6. At first phase for a week, the development of Chlorella suspends the normal condition as in vivo but after a few days, the colour of chlorophyll gradually changed into blue-yellow which secrete the mucous substances on the agar media. The cell was flew out the contained substances itself on leaving the cell wall only, or the various micro-organism diffused on the outer-region of the cell.

序 論

材料蒐集 및 純粹分離

Chlorella에 대한 研究는 1954年 H. Tamiya, E. C Wassink氏에 의해 分離와 大量培養에 成功하여 實際 應用으로 食品工業化되고 있으며 1960년에는 Michael K. Bach, J. Felling, Gerald S. Reiser, Rosek. Gering, John F. Thompson, Randolph T. Wedding M. Kay Black等 諸氏에 의해 生理的 性狀을 究明하여 廣範圍한 研究가 展開되어 있는 現實이다.

韓國에 있어서 Chlorella는 아직 그 分離 및 性狀 調査에 대한 報告가 전혀 없으므로 本人 등은 Chlorella에 對한 分布 및 分離에 對하여 調査實驗을 實施해 왔으나 雜菌의 混成이 甚하므로 그 純粹分離가 容易하지 않았다.

本人 등의 研究는 培養基에 對한 分離性狀 및 生物學的인 性狀調査를 目的으로 하였으며 純粹分離한 Chlorella株 E511, Chlorella株 Y511과 雜菌의 繁殖率이 甚한 Chlorella株 M917 Chlorella株 Y815 등을 얻을 수 있었다. 本實驗은 日本菌株 ellipsoidae를 對照로 한 實驗成績이다. 여기에 Chlorella 純粹分離成績과 雜菌에 對한 成績 및 그 除去實驗에 對한 實驗成績의 一端을 報告코자 한다.

自然界의 到處에 Chlorella가 繁殖하고 있으나 純粹分離가 微生物學的方法으로 不可能한 것은 아니지만 많은 難點이 介在한다. 卽 外界에서는 雜菌發育이 Chlorella보다 優劣하고 發育이 빠르기 때문에 實驗室內의 培養基上에 있어서도 Chlorella가 發育하기 前에 雜菌全面發育으로 Chlorella는 發育不振 혹은 雜菌에 強占當하고 만다.

그러므로 chlorella pure culture는 chlorella가 外界에서 그 繁殖率이 높을 때를 利用하여 採取하는데 (temp 18~20°C pH 5.3~5.4 光度 25,000 lux) 時期的으로 5月~6月中 雨天後日이 最適期이다.

本實驗의 材料採取는 서울近郊에서 28個所 馬山에서 2個所를 定하여 純粹分離에 努力한 結果 서울에서 3株 馬山에서 1株를 分離하였다.

Chlorella media의 pH는 強酸性인데 此해 本實驗의 材料採取時의 捷息地의 pH는 약 Alkali性이었다.

純粹分離時의 培養基는 Green Algae media를 使用하였으며 稀釋培養法 (dilute culture method)로서 하였다.

Table I. 材料蒐集時의 環境

Strain No	PH	混濁度	日光關係	適 要
M 917	7.6	青色 透明	5-6 ^t (hrs) day	汚物버리는곳 주로 夏節의 果實皮가 많았음(수박, 참외) (마산)
Y 511	8.2	〃	8-9 ^t (hrs) day	논(番)으로 흐르고 있는 개울 녹조류가 많으며 불결하다. (서울)
Y 815	7.8	〃	〃	논 중턱에 人糞코아 푸는 곳 水中 植物은 볼 수 없다. (서울)
E 511	7.5	青色 透明	6-7 ^t (hrs) day	比較的 깨끗한 물이 흐르고 있는 시냇길. (서울)
J(cont.)				日本株 C. ellipsoidae

顯微鏡學的 檢査

Cell size의 測定은 Fluid media에서 Culture된 것 (Non-sporulated→Nascent)을 하면, Chlorophyll 顆粒體의 形成은 Non-sporulated에서는 거의 一定하고 Sporulated에서 서로 相異하게 形成되었다. 이 때 Endospore가 明確하게 觀察되지 않을 때가 많은데 이 때는 Agar media上에서 Nascent Cell의 Colony數로써 確認하였다. 觀察方法은 그림과 같은 裝置로서 Agar 상에 稀釋한 Media에 대응시켜 ×450로서 觀察함.

Agar media上에서의 Spore formation은 36~48시간의 眞時間이지만 Fluid media에서 보라多數의 細胞內의 Spore를 觀察할 수 있었다.

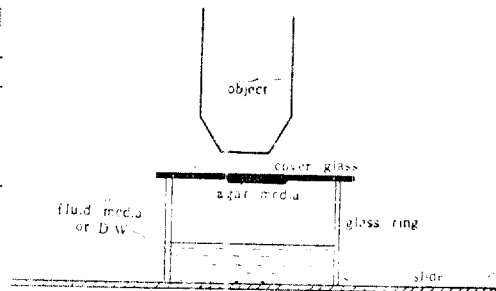


Fig. 1. 顯微鏡의 檢査

形態 Strain No.	diameter length(μ)	Form	Number of Spore	Chlorophyll 2 顆粒体的 形成
M917	3-6	ROUND	4	
Y511	3-4 3.5-5	ELLIP	4 OF 2	
Y815	3-6 3.5-7	ELLIP	4 OF 6	
E511	3-7.5	ROUND	3 OF 4	
J(cont)	3-4.5 3.5-5	ELLIP	8 OF 2	

生物學的 性狀

培養實驗

pH에 對한 培養: 既知의 Chlorella 培養基의 pH는 強酸性이다. (最適 pH-5.4), 그러나 本實驗材料의 蒐集의 接息地의 pH는 모두 Alkali 性이었으므로 本實驗에 있어서 酸性, 中性, Alkali 性別로 培養實驗함과 同時에 FeCl(pH 5.5)에 對한 Chlorella의 增殖率도 觀察하였다 (이때 3%의 Co₂ gas를 1日 50分씩 aeration). 그러나 pH7.5에서 Strain Y511은 그 增殖量이 가장 높으며 pH 7.0에서는 15,555g/l pH 6.5에서는 3,960g/l의 順序이며, Strain E511, M917은 反對로 pH 6.5에서 8,670g/l, 2,210g/l pH 7.0에서 3.230g/l, 1,445g/l, pH 7.5에서 1,785g/l, 0.739g/l의 順序로 되어 있음을 본다.

大體로 Control strain J는 Strain Y511과 並行한 增殖曲線이나 pH 7.5에서는 相反된

다. 全體的인 Strain增殖率은 pH 6.5, 7.0에서 높다. 그리고 pH 5.5에서 本實驗의 增殖은 Tap water에서의 增殖量과 비슷하다. pH 6.5~7.0은 높은 增殖率을 보이고 pH 5.5, 7.5에서 低率을 보이고 있다. FeCl에 對한 培養은 Chlorella media (pH 5.5)보다 良好하다.

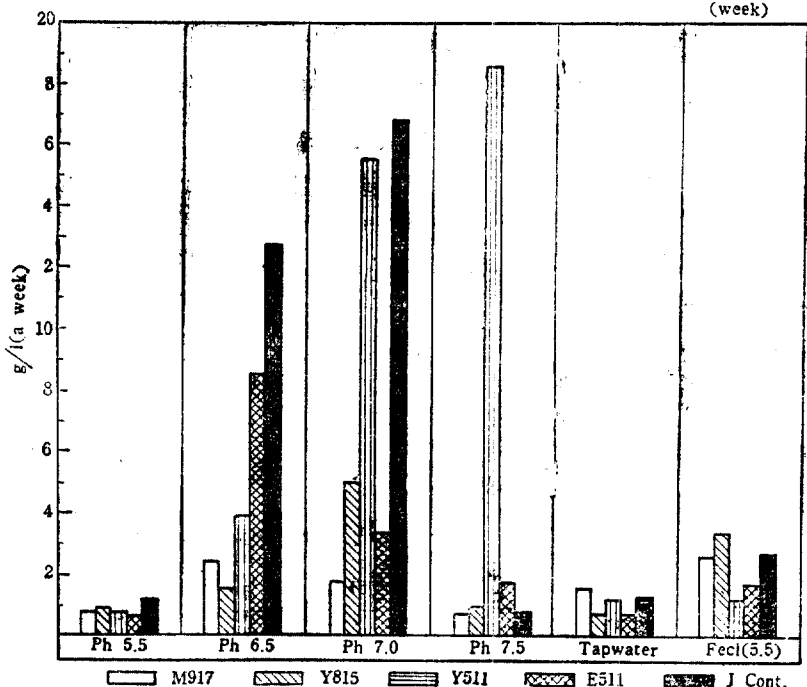
太陽光線과 Colonies形成: 光度에 對한 chlorella增殖量의 實驗은 培養器內의 光度測定關係上 Plate Agar media上에서 實驗하였다. 照射度는 太陽光線을 3區分하여 直射(42k. lux) 半透過射(30k. lux) 暗所(unlight)로 나누어 Chlorella cell의 發育 및 增殖度를 觀察하였다.

Chlorella 增殖은 直射보다 半透過射에서 Colonies 發育狀態가 빠르며 暗所에서 각 Strain 移植直時 暗所에 保管하여 4日 後 1分間 照射 10日 後에 觀察한 結果 Control strain에 比해 Chlorophyll 形成은 弱하지만 strain E511 Y511은 Green, Strain Y815, M917은 淡靑色으로 前者와 顯著하게 區別되었다.

Colonies 發育實驗은 미리 培養된 稀釋 Chlorella 培養液을 Pipette 1cc中の 細胞數를 算定하여 Plate agar media에 1cc씩 分注한 後 發生한 Colony 數의 對照가 360±20이므로 Chlorella cell의 全數發育으로 보

Fig. 2.

各 培養基에 있어서의 增殖量



고 本實驗은 Colony發育에 對한 觀察結果를 보았다.

Table II. 太陽光線과 Colonies 形成

Strain No.	亮度		Dark Field	
	42 k. lux	25 k. lux	1 次	2 次
M 917	+	++	-	-
Y 511	+	++	-	-
Y 815	+	++	-	-
E 511	+	+	-	+
J (cont)	++	++	-	++

+—2mm(++—2-5mm(diameter)
N=anzr Wolffhugel 計算盤使用

糖分解實驗 및 Ammonia 檢出

Protein test에 있어서 硫化水素와 Indol reaction은 Negative로 나타나지만 Ammonia의 含有量은 Strain E511이 7.5γ로서 Control Strain J에 가장 가까운 量을 나타내고 있으며, 다음이 Strain Y815, Y511이 同量을 나타내고 있다.

糖分解에 있어서는 大體로 多糖類에서 Negative로 나타나는 現象이나 Control Strain J는 Alkali로 變하는 境遇에 比하여 Strain Y815, Y511은 Glucose와 Sucrose에서 Gas의 發生을 보이며, Starch에서는 Negative로 分解差가 甚하다.

Chlorophyll의 檢出

*Chlorella*의 Chlorophyll과 高等植物의 Chlorophyll은 比色計에 依한 吸收滯量 比較 觀察함을 目的으로 Green algae fluid media에 Culture한 *Chlorella*의 Chlorophyll을 測定한 것이다.

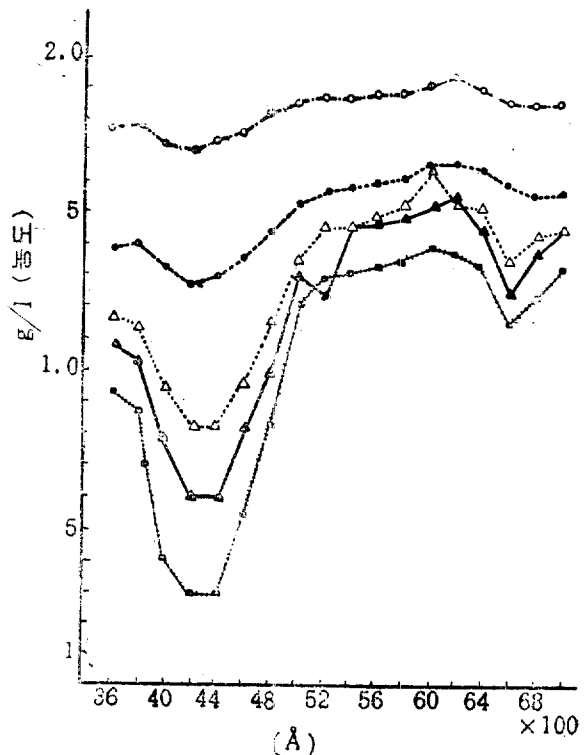
Table III. 糖分解實驗 및 Ammonia 檢出

檢出物 및 糖	Glucose	Lactose	Sucrose	Starch	Ammonia 7.5cc
M 917	+	+	-	-	1.5γ
Y 511	G	-	G	-	5.75γ
Y 815	+	-	G	-	5.75γ
E 511	-	+	-	+	7.5γ
J (cont)	+	+	+	+	10.0γ

*Chlorella*의 Chlorophyll 吸收帶는

I 3,800Å~5,000Å II 5,000Å~5,420Å
III 6,000Å~7,000Å이나 波長 3,600Å에서 5,000Å까지는 吸收區로 나타나고 波長 5,000Å에서 6,200Å까지는 不투과 曲線을 보이고 다시 6,400Å에서 吸收區를 나타내고 있다.

Fig. 3. Chlorophyll 吸收曲線



雜菌에 對한 實驗

繁殖狀況

Chlorella culture에 있어서 Contamination되는 Bacteria는 많으나 그 중에서도 培養途中 혹은 培養初期부터 混合發育하는 것이 있다.

本實驗에 있어서 純粹分離한 *Chlorella* strain을 培養하는데 있어서 初期에는 *Chlorella* 發育에 異常없으나 培養途中(移植後 1週日) Colony가 黃綠色으로

變하여 時日이 經過함에 全體가 淡黃色의 Muccid質로 되고, Gram's Negative의 桿菌을 볼 수 있다.

이는 Culture前에 Contamination된 것이 아닌가 보고 純粹分離實驗을 거듭하였으나 Bacteria의 Colonies나 菌體는 찾아볼 수 없고, Chlorella cell內에 寄生하는 것도 아니었으며, Chlorella가 어느 程度 發育한 後에 以上과 같은 現狀이 일어난다는 것을 보았다.

Chlorella strain M815에서 Contamination Bacteria를 Strain CM1917, Chlorella Strain Y815에서 Strain M2815를 定하여 Chlorella colony에 接種함으로써 混侵狀況을 觀察하였다.

- ① CM1917 菌株가 培養된 곳
- ② Chlorella Strain M917의 Colony에 CM1917을 接種.
- ③ CM 2815菌株가 培養된 곳
- ④ Chlorella Strain Y 815의 Colony에 CM2815를 接種.

(a) 雜菌의 混侵이 大端히 빠르며 (1日째) Strain (A) Colony 性狀

CM2815와 같이 Chlorophyll이 全然 없어지는 것이 아니고 正常에서 若干 黃綠色을 保有하고 있다. 時日이 갈수록 Bacteria發育이 Colony全面에 培養되고 Bacteria. Colony 上에서 며칠간 Chlorophyll을 持續한다.

- (b) 1型에서와는 달리 Chlorella colonies는 잘 發育하나 4日째부터 Chlorella colony周邊이 黃綠色으로 變하기 始作한다.
- (c) StrainCM2851는 1型과는 反對로 混侵이 느리나 (3日째) 侵蝕當한 部分은 Chlorophyll이 消失되고 있으며 아직 侵蝕되지 못한 部分과 區別된다.
- (d) Strain CM2815는 Green algae media에 培養이 不良하나, Chlorella와 混合培養하니 Chlorella 周邊에서부터 發育하기 始作한다. 即 Chlorella colony 周邊에서 發育이 良好하다.

以上은 Green algae agar media上에서의 實驗成績이다.

雜菌의 生物學的 性狀

Table IV. Colonies 形態觀察

形態	大小	形狀	厚	光澤	周邊	表面構造	透明度	粘 度	色 調
Strain No. CM 2815	粟粒大	類圓形	扁 平	光澤性	正圓形	同質性 (輪狀)	不透明	乾 燥 性	白 色
Strain No. CM 1917	粟粒大 針頭大	獸 狀 類圓形	中央陷	光澤性	不定形	同質性 (輪狀)	半透明	混 性	橙 黃 色

(Plate meat agar media culture)

(B) 生理及 生化學的 性狀

Table V. 糖類分解性

糖類	Dextro.	Mann.	Adoni.	Dulci.	Sucro.	Inoci.	Lact.	Sali.
Strain No. CM 2815	-	-	-	-	-	-	-	-
Strain No. CM 1917	-	-	-	-	-	-	-	-

生理 生化學的 性狀

Strain No.	Indol.	Gelat.	H ₂ S.	Citra.	Urea.	Motil.	Catal.	Nitrat.	AM. Phos.
CM 2815	-	-	-	-	-	-	-	+	+
CM 1917	-	-	-	+	-	-	-	+	-

雜菌除去

純粹分離에 分量이 아니고 Mass culture 時에 가장 難題中의 하나이다. Mass culture 時에 無菌의 으로 다루어지고 있으나 雜菌의 混入量에 따라 어느 정

도 無視하면서 培養하고 있는 形便이다. 더구나 Chlorella mass culture가 一般化가 될 시에는 보다 큰 難題가 될 뿐 아니라, 汚染物에서 純粹分離時에 苦難을 덜기 爲해 本人들은 몇가지 抗生物質로서 實驗한 結果 意外로 雜菌除去에 良好한 結果를 얻었다.

Procaine Penicillin G (Crystalline) 300,000units에 Normal Saline 1.2cc로 稀釋.

Dihydrostreptomycin Sulfate (Crystalline 1.5cc for 500mg/cc)에 Normal Saline 2cc로 稀釋.

以上의 試藥을 各各 原液으로 하여 Nutriant Agar에서 抵抗實驗함.

Table VI. 抗生物質에 의한 雜菌의 抑制

CM 2815											
抗生物質	加한 物質	1	2	3	4	5	6	7	8	9	cont
Penicilline	Peni. 原液	2 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	
	Normal Saline		1 cc	"	"	"	"	"	"	"	"
	成績	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	稀釋培數	a*	2a	4a	8a	16a	32a	64a	128a	256a	
Streptomycine	St. mycine 原液										
	Normal Saline		1 cc	"	"	"	"	"	"	"	"
	成績	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	稀釋培數	500mg/1	500mg/2	500mg/4	500mg/8	500mg/16	500mg/32	500mg/64	500mg/128	500mg/256	

CM 1917											
抗生物質	加한 物質	1	2	3	4	5	6	7	8	9	cont
Penicilline	Peni. 原液	2 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	
	Normal Saline		1 cc	"	"	"	"	"	"	"	"
	成績	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	稀釋培數	a*	2a	4a	8a	16a	32a	64a	128a	256a	
Streptomycine	St. mycine 原液	2 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	1 cc	
	Normal Saline		1 cc	"	"	"	"	"	"	"	"
	成績	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	稀釋培數	500mg/1	500mg/2	500mg/4	500mg/8	500mg/16	500mg/32	500mg/64	500mg/128	500mg/256	

* a—Procaine Penicillin G 1.2cc diluent + Colonies 1~15
 ++ " " 16~

以上 實驗에서 Medium을 10cc씩 加하므로 Strain CM 1917은 Penicillin 4a×10, Streptomycine 500mg/8a×10 까지 抑制되며 Strain CM 2815는 Penicillin 16a×10, Streptomycin 500mg/32a×10에서 抑制되고 있다.

綜合 및 結論

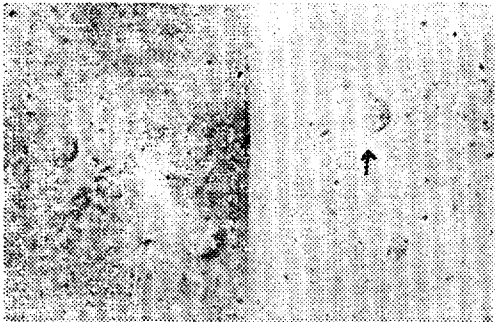
*Chlorella*에 對한 純粹分離 및 關與雜菌에 對한 實驗에 依해 本人 등은 國內 *Chlorella* 分布狀況을 數個所에서 證明할 수 있었고 그 純粹分離에 成功하였으며 分離 *Chlorella*에 對한 生物學的 性狀調查의 成績을 取할 수 있었다. 本研究에 있어서 純粹分離에 往往雜菌의 混成이 問題되었으므로 그 調査를 綿密하게 追究한 綜合과 結果는 다음과 같다.

1. 純粹分離의 時期는 5~9月 사이에 施行하였으며 이때 雜菌抑制로서 抗生物質을 利用하여 *Chlorella*를 容易하게 汚染物에서 分離되었을 것이다.
2. Nascent에서 Non-sporulated까지 36~48時間의 長時間이 所要되는 것은 Agar media 基因한다고 生覺된다. 이때 Sporulated에서 Nascent로 分裂할 때 日光이 必須要因이 아니다.
3. Ammonia의 檢出에 있어서 Strain M918의 微含量은 材料蒐集時의 炭水化合物의 多量包含의 環境이었으나 一定하지 않다.
4. 高等植物의 Chlorophyll의 吸收曲線에 比하면 吸收帶는 大體로 前者에 並行하나 微吸收帶의 出現은 著明하지 않다.
5. *Chlorllea*의 Gaint colony는 約 3週內 培養에서 黃綠色을 나타내며 二次 移植에서 完全한 綠色 Colony를 얻었다.

6. 雜菌과 *Chlorella*와의 相互關係는 Bacteria의 Contaminant로 粘液性物質이 생기고 이것의 分泌物로 因해 綠色の Colony가 無色化가 된다.
7. 抗生物質加培地에서의 分離는 雜菌을 抑制할 수 있었으나 今後의 成績追加가 必要하다.

REFERENCES

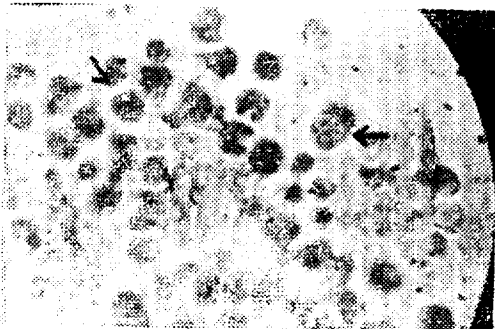
1. E. C. Wassink, Mass culture of Algae in relation to the world energy situation Lab of Plant Physi Res Agri. Univ. Wag., Holland.
2. B. Kok, & J.L.P. Van Oorschot, Improved yield in Algae Mass culture. Acta. Bot. Neerlandica Vol. 3. (4). 1954.
3. L. H. J. Bongers. Kinetic aspects of nitrate reduction Net. J. Agri. Sci. Vol. 6. (2). 1958.
4. L.H.J. Bongers, Aspects of nitrogen assimilation by culture of Green Algae. Med. Lan. Wag. Nederland Vol. 56 (15). 1-52. 1956.
5. J. L. P. Van Oorschot, Conversion of light energy in Algae culture. H. Vee. & Zonen. Weg 1955.
6. H. Tamiya, K. Shibata, Effect of diurnally intermittent illumination on the Growth and some cellular Characteristics of *Chlorella*. St. Toku. Ins. Bio. Res. Vol. 7 (2). 1954.
7. H. Tamiya. E. Hase, Kinetics of Growth of *Chlorella*. with special reference to its dependence on quantity of available light & on Temperature St. Toku. Ins. Bio. Res. Vol. 7 (2) 1954.
8. A. Mituya, T. Nyunoya, & H. Tamiya, Pre-Pilot Plant experiments on Algae Mass culture. St. Toku. Ins. Bio. Res. Vol. 7 (2) 1954.
9. T. Sasa, & T. Nihei, Effect of temperature & light intensity upon The Growth of *Chlorella* in High Population Density, Bot. Mag. T. J. Vol. 17 (789-790) 1954.
10. G. S. Reisner, R. K. Gering, & John F. Thomson, The Metabolism of Nitrate & Ammonia by *Chlorella*. Pl. Phy. Vol. 35 (1) 1960.
11. M. K. Bach, & J. Felling, Stimulation of the Respiration of *Chlorella Vulgaris* by Purines & Purine Analogues, Pl. Phy. Vol. 35 (1) 1960.



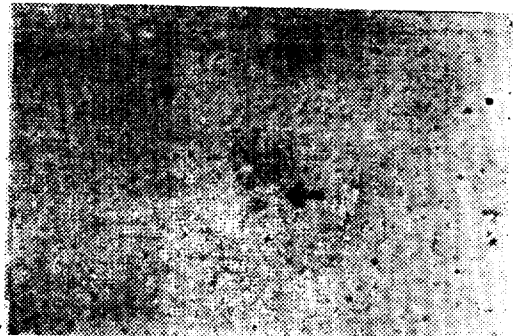
nascent



non-sporulated



sporulated



division