

Chlorella 의 物質代謝에 미치는 微養元素의 缺乏效果(第 2 報)

—蛋白質, 리보核酸 및 磷脂質의 生合成能에 관하여—

李 永 祿 · 陳 平 · 沈 雄 燮

(高麗大學校 · 理工大 · 生物學科)

Effect of micronutritional-element deficiencies on the metabolism of *Chlorella* cells. (II)

On the biosynthetic activities of protein, nucleic acids and phospholipid

Lee, Yung Nok., Chin, Pyung and Sim, Woong Seop

(Department of Biology, Korea University)

ABSTRACT

Chlorella ellipsoidea cells were cultured in an iron, copper, zinc, manganese, molybdenum or boron-free medium. Biosynthetic activities of nucleic acids, protein and phospholipid in chlorella cells, which were growing in a microelement deficient medium were compared with those of the normal cells by measuring the contents of phosphate, amino acids or UV-absorbing substances in the various cell fractions.

When the algae were grown in a molybdenum-free medium, the amounts of phosphate in the acid-soluble fraction of the cells increased, whereas the amounts of alkali-stable protein and RNA decreased compared with the normal cells showing that the synthesis of protein and RNA from the early products of photosynthesis was inhibited.

When the algae were grown in a boron-free medium, amounts of alkali-labile protein and phospholipid of the cells decreased, while the amount of phosphate in acid-soluble fraction increased compared with the normal cells showing that the biosynthesis of protein and phospholipid from the early products of photosynthesis was retarded.

In general, amounts of protein and RNA in the microelement deficient cells significantly decreased compared with those of the normal cells. Phosphate content in the acid-soluble fraction of the algal cell grown in an zinc, copper, molybdenum, or boron-free medium increased considerably, whereas that of the algal cell grown in an iron or manganese-free medium decreased remarkably compared with that of the control. It is considered, therefore, that molybdenum, zinc, copper and boron etc. play an important role in the biosynthesis of macromolecule from acid-soluble phosphate compounds, in contrast to the principal action of iron and manganese on the photosynthetic process itself.

緒 論

前報(李 등, 1967)에서 著者들은 微養元素의 缺乏으로 由來하는 *Chlorella* 細胞의 發育遲延이 細胞

의 葉綠素形成能의 低下에 큰 原因이 있다는 것과 微養元素 缺乏細胞의 光合成能의 低下를 報告한 바 있다. 微養元素의 缺乏에 起因하는 *Chlorella* 細胞의 生長障害가 細胞의 葉綠素 形成能의 低下에 直

接的原因이 있다며는 葉綠素 形成에 先行되어 일어나는 細胞의 蛋白質 含量의 增加와 이에 앞선 RNA 含量의 增加等(Aoki, S. and E. Hase, 1964) 다른 體物質의 生合成 過程에 미치는 微養元素의 特異的 作用을 究明하는 것은 微養元素 缺乏細胞의 葉綠素 形成能의 低下와 關聯하여 극히 興味있는 일이라 생각된다.

本研究에서는 微養元素 缺乏培地에서의 培養과정에서 細胞를 收獲하여 여러가지 細胞構成物質을 分劃하고 그 含量을 定量하여 發育과정에서 있어서의 蛋白質, 核酸, 脂質 및 光合成의 初期生成物 등 主要한 體物質의 生合成能을 測定 比較함으로써 *Chlorella* 細胞의 物質代謝과정에서 있어서의 이들 微養元素 개개의 特異한 作用을 究明코저 하였다.

材料 및 方法

Chlorella ellipsoidea 를 M 4 N 培地(Tamiya et al, 1953)의 iron, manganese, zinc, copper, molybdenum 및 boron 등 微養元素의 하나가 缺乏된 培地에서 6日後 培養한 후 같은 缺乏培地에 接種하여 第2代 繼代培養을 하였다. 5日間 培養한 후에 細胞를 收獲하여 M/500 K₂SO₄ 溶液으로 씻은 다음에 여러가지 細胞構成 物質을 分析하였다.

核酸의 分離는 Schmidt-Thannhauser 法(1945)에 依據하였다. 細胞를 먼저 5%의 冷 perchloric acid (PCA)로 두번 抽出하고 酸不溶性物質은 60°C에서 95% ethanol, 75% ethanol 및 ethanol ether (3:1)에 3回, 계속적으로 處理하여 脂質을 除去하였다. 非脂質, 酸不溶性 物質은 37°C에서 1 N KOH 로 18時間 동안 處理하여 RNA 를 加水分解 시킨 후 alkali 不溶性物質을 除去하고 곧 10% PCA 를 써서 中和시킨다. PCA 를 더 加하여(最終濃度: 2.5%) DNA 蛋白質을 沈澱시키고 遠心分離로 RNA fraction 을 分離한다. 殘餘 DNA 蛋白質에는 5% PCA 를 加하여 90°C에서 15分間 抽出하여 冷却후 蛋白質과 DNA 를 分離하였다. nucleotidic-labile phosphate의 分析은 Crane and Lipman 法(1953)에 따라 PCA-soluble fraction 의 一定量을 취하여 charcoal (Norit SX 30)을 加하고 잘 흔들어서 0°C에서 30分間 吸着시킨 다음 遠心分離로 charcoal 을 分離하고 H₂-SO₄ (最終濃度: 1 N)을 加하여 100°C에서 10分間 處理하였다. 冷却시킨 후 標品에 ammonium molybdate (最終濃度: 0.016 M)와 isobutanol 을 加하여 phosphomolybdate 의 量을 測定하였다. 酸可溶性 全磷酸化合物과 磷脂質의 量은 PCA-soluble fraction

과 lipid fraction 에서 그 少量을 취하여 각각 Kjeldal flask 內에서 H₂SO₄ 로 加水分解시켜 遊離된 無機磷酸의 量을 Fiske and Subbarow 法(1925)으로 測定하였다.

Schmidt-Thannhauser 法으로 分離한 *Chlorella* 細胞의 RNA fraction 에는 다량의 polyphosphate 가 溶出되므로(李, 1964) 核酸의 定量은 磷酸으로 測定하지 않고 DNA 및 RNA fraction 의 optical density 를 260 mμ 에서 각각 測定하였다. RNA 및 DNA 를 分離한 殘餘의 沈澱物(蛋白質)은 6 N HCl 을 加하여 加水分解시킨 다음 아미노酸의 量을 ninhydrin 反應으로 定量(Troll and Cannan, 1953)하였다. Schmidt-Thannhauser 法으로 分離한 *Chlorella* 細胞의 RNA fraction 에는 또한 多量의 蛋白質이 存在한다(Aoki, A. and E. Hase, 1964)는 것이 알려져 있으므로 RNA fraction 의 一部를 취하여 HCl 로 加水分解한 다음 아미노酸의 量을 ninhydrin 反應으로 定量하여 alkali-labile protein 의 量을 測定하였다.

實驗結果

微養元素 缺乏細胞가 第2代 繼代培養으로 該當 微養元素 缺乏培地에서 5日間에 形成한 여러가지 細胞構成物質의 量을 測定한 結果를 表 I 에 表示하고 微養元素의 缺乏에 起因된 細胞의 體構成 物質의 化學的組成의 變化를 表 II 에 表示하였다.

微養元素 缺乏培地에서 해당 微養元素 缺乏細胞가 形成한 PCA-可溶性 全磷酸 및 nucleotidic-labile phosphate 의 量과 磷脂質의 量을 Fig. 1 에 表示하였다. Fig. 1 에서 보는 바와 같이 Fe-및 Mo-, Zn-缺乏區에서는 酸可溶性 磷酸化合物이 對照區에 비해 현저히 減少되었으나 Mo-, Zn-, B-, Cu-缺乏區 등에서는 예상과는 달리 오히려 增加하였고 특히 Mo-缺乏區에 있어서는 酸可溶性 全磷酸化合物의 量이 對照區의 約 2.7 倍에 達하였다. 大部分의 光合成 初期 生成物은 PCA 可溶性 分劃으로 溶出되는데 이들 微養元素의 缺乏으로 光合成能이 抑制되었음에도 불구하고 酸可溶性 磷酸化合物의 量이 正常細胞에서 보다는 오히려 增加하였다는 것은 光合成의 初期 生成物로부터의 高分子 化合物의 生合成이 微養元素의 缺乏으로 抑制되었음을 나타내는 것이 된다.

酸可溶性 nucleotide 의 生合成能도 缺乏한 微養元素의 種類에 따라 正常細胞에서 보다는 오히려 增加한 것도 있었는데 그 傾向은 대체로 酸可溶性 全磷酸量의 경우와 비슷하였다. 即 Fe-및 Mn-缺乏細

胞를 除外하고는 Mo-, Zn-, B-, Cu-缺乏區 중에서 오히려 增加하였는데 이것 또한 nucleotide 로 부터의 核酸의 生合成이 微養元素의 缺乏으로 抑制되었는 것을 나타내는 것 같다.

한편 微養元素 缺乏細胞의 磷脂質 生合成能은 微養元素의 種類에 따라 抑制되는 程度가 多樣한데 生長抑制의 傾向과는 달리 B-缺乏細胞 및 Fe-缺乏細胞에서 가장 낮았고 그 다음이 Zn-, Cu-, Mo-缺乏細胞들로 서로 비슷한 障害를 받았으며 Mn-缺乏區에 있어서는 正常細胞와 거의 비슷한 値를 나타내었다.

特記할 만 한 것은 B-缺乏區에 있어서는 細胞의 生長에 미치는 抑制效果에 비하여 磷脂質의 生合成能의 抑制가 더욱 顯著하다는 것이다. B-缺乏細胞의 生長은 正常細胞에 비해 약간 지연되기는 하였으나 Fe-缺乏細胞에 비해서는 훨씬 왕성한 生長을 할데 비하여 B-缺乏細胞의 磷脂質 生合成能은 Fe-缺乏細胞와 비슷하고 正常細胞의 約 60%에 지나지 않았다.

微養元素 缺乏培地에 있어서 *Chlorella* 細胞의 DNA 및 RNA 의 生合成能을 正常細胞의 그것과 비교하여 Fig. 2에 각각 표시하였다. Fig. 2에서

Table I. Amounts of phosphate, amino acids and UV-absorbing substances (per liter medium) in the various fractions of *Chlorella* cells raised in a micro-element deficient medium for 5 days in the second subculture. The cells were precultured in respective micro-element deficient medium for 6 days before the inoculation. (unit; micro-mole)

Fraction Medium	Normal	-B	-Mn	-Zn	-Cu	-Mo	-Fe
Lipid-P	36.60	22.44	34.69	29.53	28.27	31.96	21.29
PCA-sol. total P	30.85	51.46	20.15	61.14	47.55	69.14	1.73
Nucleotidic-labile P	3.35	4.05	2.03	6.11	4.56	6.04	0.16
Total protein (a.a. residue)	221	132	121	186	166	162	104
Alkali-stable protein	108	88	48	86	72	52	28
Alkali-labile protein	113	44	73	100	94	110	76
RNA*	1.49	1.30	1.28	1.22	1.23	1.08	0.79
DNA*	0.102	0.100	0.102	0.105	0.100	0.082	0.078

* Relative optical density at 260 m μ

Table II. Amounts of phosphate, amino acids or UV-absorbing substances (per milli-liter-packed cell volume) in the various fractions of *Chlorella* cells raised in a microelement deficient medium. (unit; micro-mole)

Fraction Medium	Normal	-B	-Mn	-Zn	-Cu	-Mo	-Fe
Lipid-P	15.51	8.80	16.60	13.30	12.91	15.98	14.99
PCA-sol. total P	13.07	20.18	9.64	27.54	21.71	34.57	1.22
Nucleotidic-labile P	1.42	1.69	0.97	2.75	2.08	3.02	0.11
Total protein (a.a. residue)	94	57	58	84	76	81	74
Alkali-stable protein	46	38	23	39	33	26	20
Alkali-labile protein	48	19	35	45	43	55	54
RNA*	0.68	0.58	0.61	0.55	0.56	0.54	0.56
DNA*	0.043	0.043	0.049	0.047	0.046	0.041	0.054
Packed cell volume in 2nd subculture (ml/l)	2.36	2.33	2.09	2.22	2.19	2.00	1.42

*Relative optical density at 260 m μ

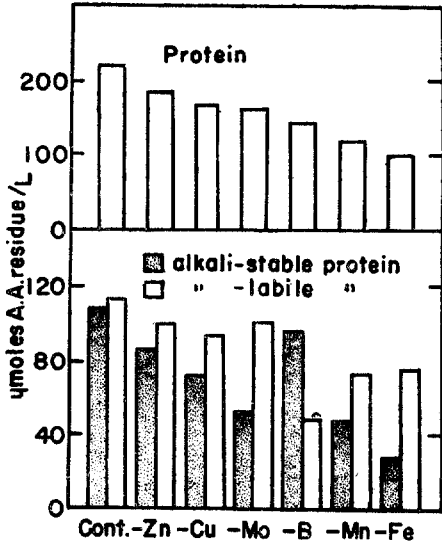


Fig. 1. Amounts of acid-soluble total phosphate, nucleotidic-labile phosphate and phospholipid compounds in the *Chlorella* cells raised in the micronutritional-element deficient medium.

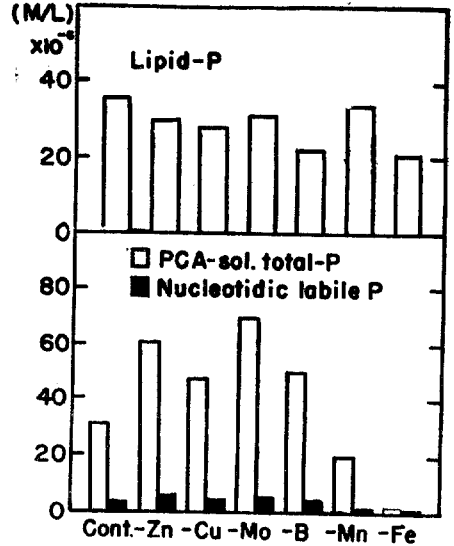


Fig. 3. Amounts of amino acid residues in the alkali-stable and alkali-labile protein fractions and total proteinous compound of *Chlorella* cells raised in the micronutritional-element deficient medium.

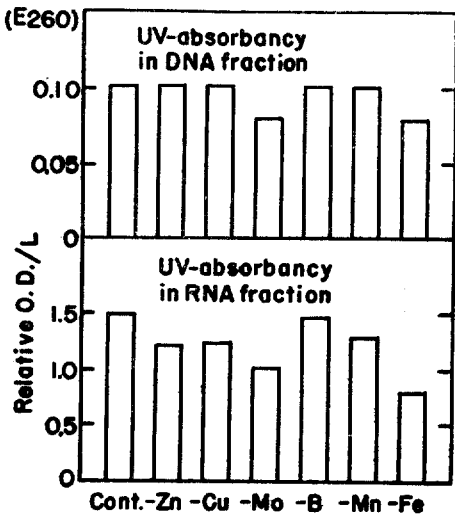


Fig. 2. Relative optical density of UV-absorbing materials in the DNA and RNA fractions of *Chlorella* cells raised in the micronutritional-element deficient medium.

보는 바와 같이 微養元素 缺乏細胞의 DNA 生合成能은 대체로 培養中の 細胞容量的 增加와 비슷한 傾向을 나타 내었다. 가장 甚한 生長障害를 나타내었던 Fe-缺乏區에서 DNA의 合成도 가장 低下하였고 그 다음이 Mo-缺乏區, Cu-缺乏區의 順이 었다.

細胞의 RNA 生合成能은 DNA의 生合成能에 비해 微養元素의 缺乏으로 현저히 抑制되었다. 가장 甚한 生長障害를 나타내었던 Fe-缺乏區에서 RNA의 生合成도 가장 減少하였고 그 다음이 Mo-, Mn-缺乏細胞의 順인데 Zn-, Ca-缺乏細胞의 RNA 生合成은 Mn-缺乏細胞와 비슷 하였다. 注目할 만한 事實은 酸可溶性 nucleotide의 含量이 가장 많았던 Mo-缺乏區에서 RNA의 生合成能은 현저히 低下되었다는 것이다.

微養元素 缺乏培地에 있어서의 *Chlorella* 細胞의 alkali-stable protein 과 alkali-labile protein 의 生合成 및 이들로 부터 算出한 全蛋白質의 量을 Fig. 3에 표시 하였다. 蛋白質의 生合成은 實驗한 모든 微養元素 缺乏區에서 현저히 減少하였는데 특히 Fe-, Mn-, Mo-, B-缺乏區 등에서 현저 하였다.

Fig. 3에서 보는 바와 같이 alkali-stable protein

의 생합성은 모든 缺乏區에서 抑制되었으나 특히 Fe-, Mn-, Mo-缺乏區에서는 더욱 顯著하여 對照區에서의 생합성량의 半 以下로 減少하였다. 한편 alkali-labile protein의 생합성은 B-, Mn- 및 Fe-缺乏區에서는 상당히 減少되었으나 다른 缺乏區에서는 그 程度가 심하지는 않았다. B-缺乏細胞의 alkali-labile protein의 생합성과 Mo-缺乏細胞의 alkali-stable protein의 생합성이 顯著히 低下하였다는 것은 비록 遊離아미노酸의 量은 測定하지 않았더라도 이들 缺乏區에서 酸可溶性 全磷酸化合物의 含量이 對照區에서 보다도 현저히 增加하였다는 事實로 미루어 보아 B 및 Mo 은 光合成의 初期產物로부터의 蛋白質의 생합성에 꼭 必要한 것으로 生覺된다.

考 察

Fe가 缺乏된 *Chlorella* 細胞에 있어서 酸可溶性 全磷酸化合物의 含量은 다른 微養元素 缺乏區나 對照區에 비해 현저히 減少하였는데, 이러한 事實은 Fe-缺乏細胞에 있어서는 葉綠素의 생합성 뿐만 아니라 光合成 自體가 抑制된 위에 呼吸能마저 低下되어 細胞의 生長이 현저히 지연되었으리라는 前報의 見解를 더욱 確實히 說明해 주고 있다.

Noack and Pirson(1939), Alberts-Dietert(1941) 등은 *Chlorella*의 窒素代謝에 關한 그들의 研究에서 nitrate의 還元에 Mn이 관여하며 Fe는 그 補助的 役割을 한다는 見解를 발표한 바 있는데 窒素源으로 nitrate를 使用한 本 研究에서 특히 Mn 및 Cu-缺乏區에서 蛋白質의 생합성이 현저히 減少하였다는 事實은 그러한 見解를 뒷받침해 주는 것이 된다.

Cu-缺乏細胞의 PCA 可溶性 全磷酸量과 nucleotide의 생합성량은 正常細胞에서 '보다도 오히려 增加하였고 反面에 蛋白質과 脂質 및 RNA의 含量은 正常細胞에 비해 상당히 減少하였다. 이러한 事實은 光合成의 初期生成물이 대부분 酸可溶性 分劃에 溶出되는 것으로 보아 光合成 產物로부터의 蛋白質 및 脂質의 생합성과 nucleotide로부터의 RNA의 생합성이 銅의 缺乏으로 減少되었음을 나타내는 것으로 본다.

Porphyrin의 pyrrole 環은 porphobilinogen(PBG)으로 부터 形成되는데 PBG은 두 分子의 δ -amino-laevulinic acid(ALA)의 縮合으로 形成된다. 그 反應은 ALA dehydrase에 의하여 촉매되는데 ALA dehydrase는 Cu를 含有하고 있고 (Gibson and Scott, 1961) 또한 ALA의 생합성 과정은 有機酸

의 合成, 呼吸, 또는 아미노酸 代謝와도 關聯되어 있다 (Bogorad, L. 1965). Cu는 ALA dehydrase 이외에도 ascorbic acid oxidase, laccase, polyphenol oxidase 등과 같은 酸化還元 酵素의 構成要素가 되므로 Cu-缺乏細胞의 葉綠素, 脂質, 蛋白質 및 RNA 등의 合成이 減少된 것으로 生覺된다.

Stegmann(1940)은 Zn의 缺乏으로 因한 *Chlorella* 細胞의 chlorophyll 含量과 光合成能의 低下를 報告한 바 있는데 本 研究에서도 光合成能은 低下하였으나 (第1報) 細胞内の 光合成 產物과 酸可溶性 nucleotides의 含量은 正常細胞에서 보다도 오히려 增加하였고 그 대신 RNA 및 蛋白質의 含量은 減少되었다. 光合成能의 低下는 Zn이 carbonic anhydrase의 構成成分이 된다는 (Keilin and Mann, 1940) 것과 關聯이 있는 것으로 生覺되는데 光合成 產物の 增加는 이로부터의 蛋白質의 생합성이 減少되고 nucleotides로부터의 RNA의 생합성도 Zn의 缺乏으로 減少된 데에 起因하는 것으로 생각된다. Tsui(1948)는 도마도 植物의 tryptophane의 생합성에 Zn이 必要하고 Zn의 缺乏으로 植物의 IAA (indol acetic acid)의 含量이 減少되었다고 하는데 Zn의 缺乏으로 야기된 *Chlorella* 細胞의 生長障害가 IAA와 같은 生長촉몬의 含量과 관련이 있는 것인지의 與否는 아직 確實하지가 않다.

Mo이 缺乏된 細胞에 있어서 酸可溶性 物質의 全磷酸 含量은 正常細胞의 約 2.6 배에나 達하였고 Nucleotides의 含量도 현저히 增加하였다. 그러나 alkali-stable protein과 RNA의 含量은 현저히 減少하였고 生長障害도 Fe-缺乏細胞 다음으로 가장 현저하였다. *Nostoc*나 *Anabaena*와 같은 藍藻類의 窒素固定에 Mo이 必要하다는 것은 널리 알려져 있는데, Walker(1953)는 窒素源으로 nitrate를 使用하는 *Chlorella*의 生育에도 Mo이 必要하다는 것을 관찰한 바 있다. Mo은 nitrate reductase의 cofactor로서 作用할 (Nicholas and Nason, 1955)뿐만 아니라 光合成 產物로부터의 蛋白質 특히 alkali-stable protein의 생합성에도 必要한 것 같다. 그리고 nucleotides로부터의 RNA의 생합성에도 Mo이 관여하고 있는 것 같다.

Briggs(1943), Scripture and McHargue(1945)등은 B-缺乏植物에서 炭水化合物과 NH_4 -化合物 및 다른 可溶性N-化合物이 蓄積됨을 관찰한 바 있는데 硼素가 缺乏된 *Chlorella* 細胞에서는 PCA-soluble fraction의 total phosphate가 현저히 增加된 反面에 lipid fraction의 phosphate와 蛋白質 특히 alkali-labile

protein의含量은 현저히減少하였다. 뿐만아니라呼吸能의減少도 가장 현저하였다.(前報)따라서 보론은物質代謝 과정을 통하여光合成產物로부터의蛋白質 및脂質의生合成에關與하고 있는 것으로 생각된다.

結論的으로, 本研究에서實驗한 모든微養元素缺乏細胞의蛋白質含量이減少된 데에 비추어 보아細胞의生長障害에對한 보다根本的인原因은細胞의蛋白質生合成이抑制된 데에 있는 것 같다. 即 Fe, Cu, Mn, Zn, Mo, B 등과 같은微養元

素는細胞의物質代謝 과정에서蛋白質의生合成에 큰役割을 하는 것 같다. 그리하여 이들元素가缺乏된細胞에서는蛋白質의生合成이抑制된結果chlorophyll形成에도 지장을 초래하게 되고 그結果로光合成의低下가加重되어細胞의生長이 지연되고增殖이抑制된 것으로 생각할 수 있다. 缺乏細胞에 있어서의呼吸能의減少(前報) 또한chlorophyll, 蛋白質등과 같은體物質의合成能을低下하는데 이바지 하였을 것으로 생각된다.

摘 要

培養中の微養元素(Fe, Zn, Cu, Mn, Mo, 및 B 등)缺乏細胞를收穫하여 여러가지細胞構成物質로分割하고 그含量을測定하여蛋白質, 核酸, 脂肪 및 酸可溶性 磷酸化合物 등의生合成能을正常細胞의 그것과比較하였다.

1. Fe 및 Mn-缺乏細胞에 있어서酸可溶性全磷酸化合物과 RNA 및蛋白質의含量은正常細胞에 비해顯著히減少하였다.
2. Mo-缺乏細胞의酸可溶性全磷酸化合物과 nucleotides의含量은正常細胞의 그것에 비해 현저히增加하였으나 RNA 및蛋白質 특히 alkali-stable protein의生合成은 현저히減少하였다.
3. B-缺乏細胞에서는磷脂質 및蛋白質 특히 alkali-labile protein의含量은正常細胞의 그것에 비해 현저히減少되었으나酸可溶性物質의含量은 현저히增加하였다.
4. 酸可溶性物質의含量은 Mo-, B-, Cu- 및 Zn-缺乏細胞 등에서增加하였고蛋白質 및 RNA의生合成은 모든微養元素缺乏細胞에서一般的으로減少되었다.

References

- 1) Albert-Dietert, F. (1941) Die Wirkung von Eisen und Mangan auf die Stickstoff-assimilation von *Chlorella*. *Planta* **32**, 88—117.
- 2) Aoki, S. and E. Hase (1964) De and re-generation of chloroplasts in the cells of *Chlorella protothecoides*. 1. Synthesis of nucleic acids and protein in relation to the process of regeneration of chloroplast. *Plant & Cell Physiol.*, **5**, 473—484.
- 3) Bogorad, L., (1965) Porphyrins and bile pigments. in "plant Biochemistry" (J. Bonner and J.E. Varner ed.) 723
- 4) Briggs, G.B., (1943) Effect of boron in the substrate on the rate of nitrate absorption and on nitrogen distribution in nasturtium. *Plant Physiol.*, **18**, 415—432.
- 5) Crane, R.K. and F. Lipman (1953) The effects of arsenate on ascorbic phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **201**, 235—243.
- 6) Gibson, K.D. and F.F. Scott (1961) in "Biochemists Handbook" (C. Long ed). 618.
- 7) Keilin, D. and Mann, T. (1940) Carbon hydrase, purification and nature of enzyme. *Biochem. J.*, **34**, 1164—1174.
- 8) 李永祿 (1964) *Chlorella*의 磷酸代謝에 關한 研究, 韓國微生物學會誌, **2**, 1—11.
- 9) 李永祿, 陳平, 沈雄燮 (1967) *Chlorella*의 物質代謝에 미치는 微養元素의 缺乏效果 (第一報) 生長, 呼吸 및 光合成能에 關하여, 韓國微生物學會誌, **5**, 15—19.
- 10) Nicholas, D.J. D. and Nason, A. (1955) Molybdenum and nitrate reductase. II. Molybdenum as a constituent of nitrate reduction. *J. Biol. Chem.*, **207**, 353—360.
- 11) Noack, K. and Pirson, A. (1939) Die Wirkung von Eisen und Mangan auf die Stickstoff assimilation von *Chlorella*. *Ber. Deut. Botan. Ges.*, **57**, 442—452.

- 12) Schmidt, F. and S.J. Tannhauser (1945) A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissue. *J. Biol. Chem.*, **161**, 83—89.
- 13) Scripture, P.N. and J.S. McHargue (1945) Boron supply in relation to carbohydrate metabolism and distribution in the radish. *J. Amer. Soc. Agron.*, **37**, 360—364.
- 14) Stegman, c. (1940) Die Bedeutung der Spurenelemente für Chlorella. *Z. Botan.*, **35**, 385—422.
- 15) Tamiya, H., Shibata, K., Sasa, T., Iwamura, T. and Morimura, Y., (1953) Carnegie Inst. Wash. Publ. No. 600, 76; 田宮博, 渡邊 篤 編集 藻類實驗法 74) 1965.
- 16) Troll, W. and R.K. Cannan (1953) A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. *J. Biol. Chem.*, **200**, 803—811.
- 17) Tsui, C. (1948) The role of zinc in auxin synthesis in the tomato plant. *Amer. J. Bot.*, **35**, 172—179.
- 18) Walker, J.B. (1953) Inorganic micronutrient requirements of Chlorella. I. Requirements for calcium (or Strontium), copper, and molybdenum. *Arch. Biochem. Biophys.*, **46**, 1—11.