

*Chlorella*의 磷酸化合物 및 有機物含量에 미치는 重金屬의 影響

李 鍾 三 · 林 英 福

(誠信女子大學校 生物學科)

Effects of heavy metals on contents of various phosphate compounds and organic compounds in *Chlorella* cells

LEE, Chong-Sam, and Young-Bock LIM

(Department of Biology, Sungshin Women's University)

ABSTRACT

The effects of heavy metals on the growth rate and phosphate metabolism of *Chlorella ellipsoidea* cells were investigated. *Chlorella* cells were cultured in the media treated with Hg(0.3, 0.7, 0.9 ppm), Cd(1, 5, 15ppm), and Zn(1, 5, 50ppm) for 6 days.

Aliquots cells were taken out at the inoculation and at intervals during the culture, and measured packed cell volume and optical density. The inhibitions of heavy metals on the growth rate and chlorophyll contents were traced. Also after 6 days culture, the amounts of inorganic phosphate and organic compounds of various fractions in *Chlorella* cells were observed.

The turbid effects of heavy metals on the growth rate and chlorophyll contents of *Chlorella* cells were in order of $Hg > Cd > Zn$. Because heavy metals depressed the biosynthesis of inorganic polyphosphates and nucleic acids and turn over of inorganic phosphates, the amounts of various phosphate compounds were decreased. The inhibitory effect of photosynthesis by heavy metals resulted in lower contents of carbohydrate. Due to the turbidity of biosynthesis of amino acids by heavy metals, contents of protein were reduced in comparison with those of control.

It is suggested conclusively that the minimum concentrations affected by heavy metals on the growth rate and phosphate metabolism of *Chlorella* cells were 0.7ppm Hg, 15ppm Cd, 50ppm Zn.

緒 論

요즈음 각종 산업체로부터誘出되는 廢水와 重金屬 物質, 그리고 자동차의 排氣가스 및 타이어의 磨滅을 통하여 毒性을 가진 重金屬 元素가 大氣 環境에 放出됨으로 인하여 토양과 도로변 植物體에 다량 深積되는 現狀(Lagerwerff와 Specht, 1970)은 生態系에 커다란 影響을 주고 있는 실정이다. 따라서 이러한 毒性을 가진 重金屬에

의한 環境汚染과 이것이 人體 및 기타 生物體에 미치는 影響에 관하여 많은 研究가 이루어져 왔다.

즉, Lagerwerff(1972)는 環境汚染 物質인 Hg, Cd, Pb가 人間과 기타 動物體의 赤血球 파괴, 高血壓 誘發, 腎藏機能 障害等 毒性 影響을 초래한다고 報告하였으며, Foy等(1978)은 植物體에서 重金屬毒性이 초래하는 가장 일반적 影響은 生長 障害와 黃化現狀이라고 지적한 바 있다. 그리고 녹색 식물체의 葉綠素에 대한 重金屬의

파괴적 影響도 또한 觀察된 바 있다(Hampp와 Lendzian, 1974; De Filippis, 1979b).

여러 重金屬의 汚染에 관한 연구는 藻類와 地衣類에서부터 維管束植物에 이르기까지 이들의 呼吸과 光合成 및 蒸散에 대해 抑制影響을 미치는 것으로 糾明되었다. 예를 들면, 呼吸에 대한 障害는 Keck(1978)가 귀리 뿌리에서, Spalding(1979)이 전나무 잎에서, Sung等(1981)이 강낭콩과 녹두의 發芽 種子에서 밝혔으며, 光合成의 抑制效果는 海藻(Overnell, 1975), 地衣類(Puckett, 1976), 강낭콩(Huang等 1974), 옥수수과 해바라기(Bazzaz等, 1975; Carlson等, 1975) 등에서 이미 報告된 바 있다. 아울러 Bazzaz等(1974a)이 해바라기에서 Carlson과 Bazzaz(1977)는 양버즘나무에서 蒸散作用의 減小現狀을 觀察하였다. 이러한 阻害效果는 分離된 葉綠體와 미토콘드리아에서도 마찬가지로 나타난다(Koeppel와 Miller, 1970, 1972; Miles等, 1972).

本 研究는 Hg, Cd, Zn가 濃度別로 處理된 培地에 綠藻類인 *Chlorella*를 培養시켜 重金屬이 生長 및 葉綠素 含量에 미치는 抑制效果를 追跡하고 아울러 細胞內 여러가지 磷酸化合物의 含量 및 體物質 構成 成分의 生合成에 미치는 影響을 調査함으로써, 處理된 各各의 重金屬마다 *Chlorella*의 生長 및 物質代謝에 抑制效果를 초래하는 最低 濃度 區域을 設定하고자 한다.

材料 및 方法

1. *Chlorella*의 生長率 및 葉綠素 含量追跡

材料는 *Chlorella ellipsoidea*로서 M4N培地(Tamiya等, 1953)에 Hg(HgCl_2)는 0.3·0.7·0.9ppm, Cd(CdCl_2)은 1.5·15ppm, Zn(ZnSO_4)는 1.5·50ppm이 되게 處理한 後 一定量의 細胞를 接種하여 25°C에서 6日間 培養하였다. 培養期間中 계속하여 CO_2 enriched air로 bubbling시키면서 약 7000Lux의 照明을 유지시켜 주었다. 6일의 培養期間동안 1日 간격으로 一定量의 細胞를 收穫하여 packed cell volume으로서 生長量을 測定하였고 660m μ , 540m μ 에서 optical density를 각각 測定하여 葉綠素의 含量 變化를 追跡하였다.

2. 分 割

培養 末期에 一定量의 細胞를 收穫하여 1/500

M K_2SO_4 溶液으로 3回 洗滌한 다음 細胞의 여러가지 構成成分은 常法(李, 1964)을 다소 개선하여 사용하였다. 核酸의 分離는 Schmidt와 Tannhauser(1945)法에 의거하였으며 폴리磷酸의 分離는 Miyachi와 Tamiya(1961b)法을 다소 개량하였다. 그 處理 順序는 다음과 같다.

- (i) cold 5% PCA로 2回(30分, 15分)
- (ii) hot ethanol : ether(3 : 1)로 3~4回
- (iii) 沈澱物은 0.5N KOH로 37°C에서 16~18時間處理
- (iv) 上澄液에 5% PCA를 加하여 2.5% 溶液이 되게 한 다음
- (v) 沈澱된 DNA와 蛋白質을 5% PCA에 溶解하여 15時間 100°C에서 加熱하여 分離시켰다.

3. 分 析

(1) 磷酸化合物

各 分割의 磷酸化合物을 semimicrokjeldahl flask內에서 5N H_2SO_4 로 加水分解시켜서 얻은 遊離된 無機磷酸의 量을 Fiske와 Subbarow(1925) 法을 使用하여 測定하였다.

Orthophosphate : Berenblum과 Chain(1938)法에 따라 操作 (i)에서 얻은 上澄液에 H_2SO_4 (最終濃度 : 0.1N)와 ammonium molybdate(最終濃度 : 0.0016M) 및 isobutanol 3ml를 加하여 塞해 혼든 後 isobutanol層을 取하여 그 속에 含有된 無機磷酸의 量을 測定하였다.

Nucleotide labile phosphate : Crane과 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時間 吸着시킨 다음 遠心分離하여 얻은 沈澱物에 H_2SO_4 (最終濃度 : 1N)를 加하여 100°C에서 10時間 煮沸시켰다. 이를 冷却시킨 後 遠心分離하여 上澄液에 含有되어 있는 無機磷酸의 量을 測定하였다.

酸可溶性 폴리磷酸(폴리磷酸 "A") : 操作 (i)에서 얻은 上澄液에 carrier대신 증류수 0.8ml를 加하고 pH 4.0으로 調節한 後 acetate buffer (pH4.0) 및 진한 $\text{Ba}(\text{NO}_3)_2$ 溶液을 加하여 잘 혼든 後 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하여 無機磷酸의 量을 定量하였다.

Lipid-P : 操作 (ii)에서 얻은 上澄液을 脂質分割으로 보고 이 溶液을 加水分解하여 遊離된 無

機磷酸의 量을 測定하였다.

RNA-P 및 DNA-P : 操作(iv)와 (v)에서 얻은 上澄液에 포함된 RNA와 DNA를 加水分解하여 이들에 포함된 無機磷酸의 量을 調査하였다. 또한 RNA分劃과 DNA分劃은 Beckman spectrophotometer(Model 24)로 紫外部 吸收値를 測定하여 그 값을 比較 分析하였다.

Protein-bound phosphate : 操作 (v)의 沈澱物을 1N H₂SO₄로 溶解시킨 後 加水分解하여 얻어진 無機磷酸의 量을 調査하였다.

(2) 蛋白質

操作 (i)에서 얻은 上澄液을 유리 아미노산, 操作(iv)에서 얻어진 上澄液을 alkali-labile protein, 操作 (v)에서 얻은 沈澱物을 alkali-stable protein으로 보고 ninhydrin 反應(Troll과 Cannon, 1953)을 이용하여 各分劃의 蛋白質 含量을 測定하였다.

(3) 炭水化物

操作 (i)에서 얻은 酸可溶性 分劃, 操作 (ii)

에서 取한 脂溶性 分劃, 操作 (iii)의 沈澱物에서 얻은 alkali 不溶性 分劃에 含有된 炭水化物을 Anthrone反應(Scott와 Melvin, 1953)으로 定量하였다.

結 果

1. *Chlorella*의 生長率

*Chlorella*의 生長 및 葉綠素 含量에 대한 Hg, Cd, Zn의 影響을 Table 1 및 Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3에 나타내었다.

Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3에서 보는 바와 같이 處理된 濃度 中 가장 낮은 濃度인 Hg 0.3ppm, Cd 1ppm, Zn 1ppm 處理區에서는 各各 對照區와 比較하여 別다른 抑制現狀이 나타나지 않았으나, Hg 0.9ppm, Cd 15ppm處理區는 各各 현저한 抑制效果를 보여주고 있다. 그러나 Zn 50ppm處理區는 對照區에 比하여 불과 32%의 抑制를 나타내었다.

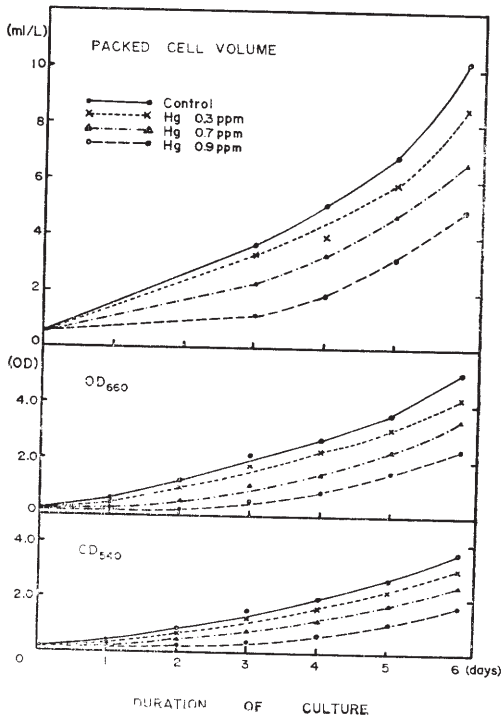


Fig. 1. Effect of mercury on the growth rate and chlorophyll contents of *Chlorella* cells during the culture.

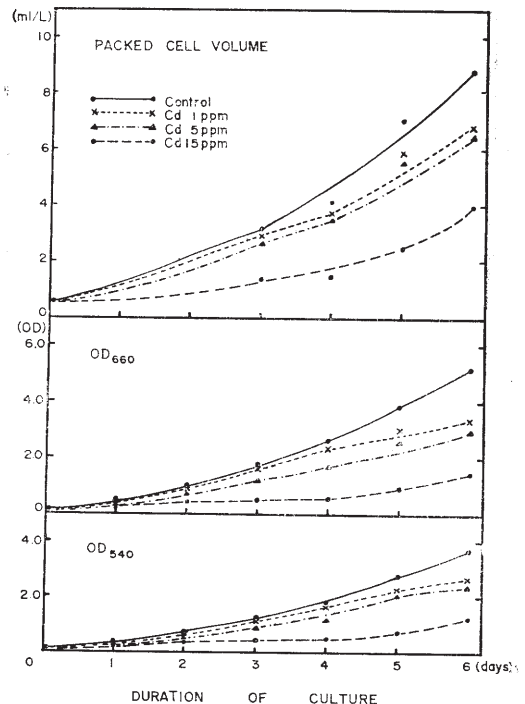


Fig. 2. Effect of cadmium on the growth rate and chlorophyll contents of *Chlorella* cells during the culture.

Table 1. Effects of heavy metals on the growth rate and chlorophyll contents of *Chlorella* cells which were cultured in Hg-, Cd-, and Zn-treated medium for 6 days.

Metal	Conc. of heavy metal (ppm)	Days of culture						
		0	1	2	3	4	5	6
		—Packed cell volume(ml/L)—						
Hg	cont.	0.53			3.71	5.10	6.85	10.24
	0.3	0.53			3.33	3.99	5.90	8.58
	0.7	0.53			2.29	3.33	4.76	6.66
	0.9	0.53			1.19	1.90	3.24	4.95
Cd	cont.	0.53			3.15	4.10	7.05	8.84
	1	0.53			3.25	3.70	5.90	6.80
	5	0.53			2.67	3.53	5.55	6.48
	15	0.53			1.39	1.45	2.48	4.00
Zn	cont.	0.55			3.33	5.15	6.85	8.30
	1	0.55			3.14	4.90	6.66	7.80
	5	0.55			2.95	4.55	6.10	7.42
	50	0.55			2.58	3.60	4.57	5.73
—Optical Density (OD ₆₆₀)—								
Hg	cont.	0.23	0.58	1.25	2.18	2.76	3.68	5.15
	0.3	0.23	0.46	1.02	1.80	2.36	3.15	4.30
	0.7	0.23	0.27	0.52	1.04	1.52	2.34	3.60
	0.9	0.23	0.20	0.21	0.54	0.90	1.60	2.40
Cd	cont.	0.13	0.49	1.00	1.78	2.64	3.84	5.20
	1	0.13	0.45	0.90	1.62	2.37	3.03	3.44
	5	0.13	0.37	0.76	1.22	1.70	2.58	3.00
	15	0.13	0.30	0.46	0.52	0.56	0.98	1.48
Zn	cont.	0.24	0.38	1.05	1.90	2.67	3.48	4.00
	1	0.24	0.36	0.86	1.80	2.43	3.06	3.45
	5	0.24	0.34	0.83	1.62	2.37	2.94	3.30
	50	0.24	0.32	0.76	1.36	2.07	2.37	3.05
—Optical Density (OD ₅₄₀)—								
Hg	cont.	0.17	0.41	0.88	1.54	2.00	2.70	3.70
	0.3	0.17	0.35	0.74	1.28	1.68	2.25	3.10
	0.7	0.17	0.24	0.49	0.82	1.20	1.77	2.45
	0.9	0.17	0.22	0.23	0.45	0.69	1.10	1.72
Cd	cont.	0.11	0.33	0.72	1.21	1.86	2.76	3.72
	1	0.11	0.30	0.66	1.16	1.80	2.28	2.64
	5	0.11	0.26	0.58	0.92	1.15	2.10	2.40
	15	0.11	0.21	0.39	0.44	0.50	0.75	1.28
Zn	cont.	0.17	0.29	0.74	1.38	1.89	2.49	2.95
	1	0.17	0.28	0.59	1.28	1.80	2.25	2.60
	5	0.17	0.25	0.58	1.14	1.74	2.13	2.43
	50	0.17	0.25	0.53	0.98	1.50	1.65	2.18

葉綠素 含量 또한 540m μ 이나 660m μ 에서 비슷한 경향을 나타내면서 *Chlorella*의 生長率과 동일한 抑制效果를 보여주었다.

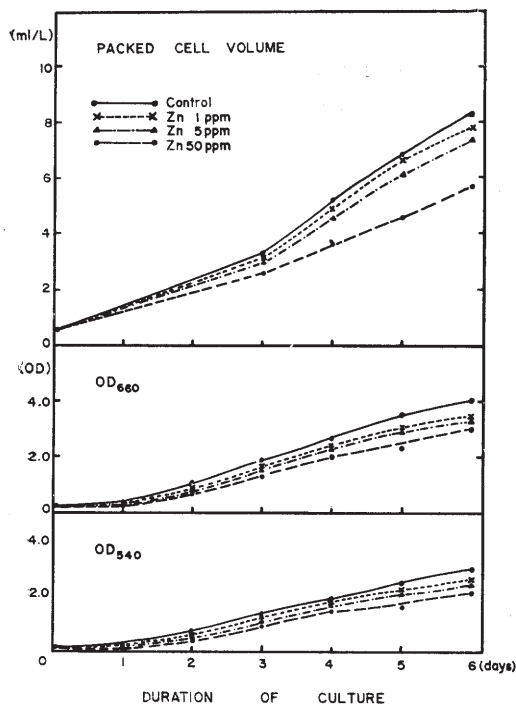


Fig. 3. Effect of zinc on the growth rate and chlorophyll contents of *Chlorella* cells during the culture.

2. 酸可溶性 磷酸化合物과 磷脂質의 含量變化

酸可溶性 分劃인 酸可溶性 폴리인산, nucleotide labile-P, ortho-P 및 total-P의 含量과 磷脂質 含量 變化에 미치는 Hg, Cd, Zn의 抑制現狀을 Table 2, Fig. 4에 나타내었다. Hg處理區는 濃度가 增加함에 따라 심한 阻害現狀을 나타내어서 對照區와 比較할 때 磷酸含量이 현저하게 減小되었다. Cd處理區 역시 重金屬의 濃度가 增加함에 따라 磷酸含量이 減小되기는 하였으나, 그 抑制效果가 Hg處理區보다는 뚜렷하지 못하였다. Zn는 다만 酸可溶性 分劃, 脂質分劃, 無機폴리인산의 磷酸含量이 50ppm 處理區에 있어서 對照區와 比較하여 완만한 抑制現狀을 보여주었으며, ortho-P와 nucleotidelabile-P는 對照區에 比하여 오히려 약간 增加하였다.

3. 核酸의 量的 動態

DNA 및 RNA에 含有된 無機인산의 量的 動態에 미치는 重金屬의 影響과 紫外部 吸收値를 Table 2와 Fig. 5에 表示하였다.

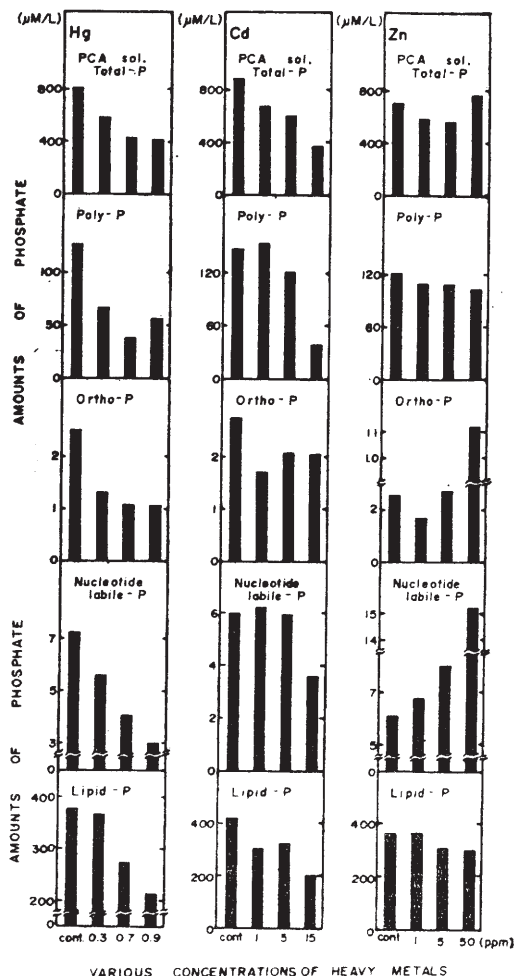


Fig. 4. Amounts of phosphates in acid soluble and lipid fraction of *Chlorella* cells treated with heavy metals after 6 days culture.

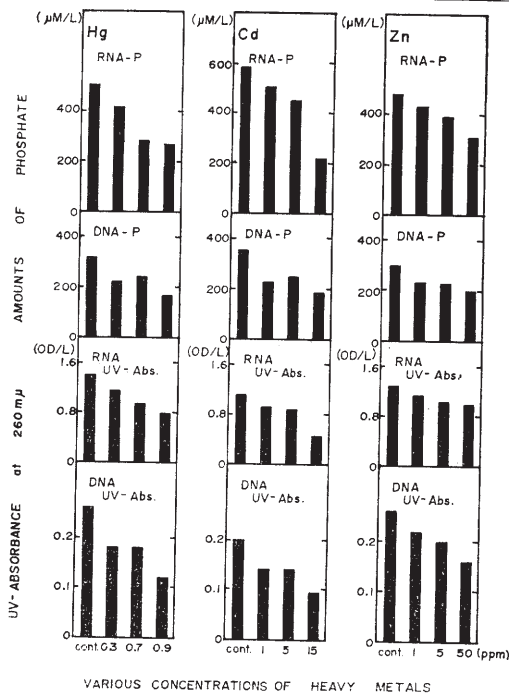
RNA의 磷酸含量에 있어서 특히 Hg의 0.7, 0.9ppm과 Cd의 15ppm 處理區가 對照區에 比하여 현저한 抑制現狀을 나타냈고 Zn 處理區는 완만한 減小를 보여주고 있다. DNA의 磷酸含量 역시 對照區에 比하여 減小되었으나 濃度에 따른 차이는 현저하지 못하였다. 紫外部 吸收値는 各의 核酸에 대한 磷酸 含量의 動態와 비슷한 정도의 減小現狀을 나타내었다.

Table 2. Amounts of various phosphate compounds and UV-absorbing materials in each fraction of *Chlorella* cells treated with heavy metals after 6 days culture.

Fraction	Heavy metal		Hg		Cd		Zn	
	ppm	$\mu\text{M/L}$	ppm	$\mu\text{M/L}$	ppm	$\mu\text{M/L}$	ppm	$\mu\text{M/L}$
PCA sol. total-P	cont.	810.6	cont.	885.2	cont.	700.8		
	0.3	570.9	1	671.8	1	584.4		
	0.7	427.7	5	595.2	5	555.9		
	0.9	415.9	15	371.3	50	757.6		
Lipid-P	cont.	376.4	cont.	422.7	cont.	362.6		
	0.3	365.2	1	303.8	1	366.2		
	0.7	273.0	5	324.7	5	308.1		
	0.9	214.3	15	202.8	50	300.1		
Ortho-P	cont.	2.463	cont.	2.763	cont.	2.551		
	0.3	1.293	1	1.712	1	1.710		
	0.7	1.149	5	2.072	5	2.702		
	0.9	1.067	15	2.108	50	11.214		
Nucleotide labile-P	cont.	7.225	cont.	6.006	cont.	6.130		
	0.3	5.603	1	6.216	1	6.782		
	0.7	4.705	5	5.946	5	8.046		
	0.9	3.038	15	3.568	50	15.230		
Poly phosphate	cont.	127.1	cont.	147.7	cont.	121.4		
	0.3	67.2	1	154.1	1	109.1		
	0.7	38.2	5	121.6	5	108.3		
	0.9	57.1	15	38.1	50	103.0		
RNA-P	cont.	507.6	cont.	588.2	cont.	477.0		
	0.3	410.9	1	507.3	1	429.0		
	0.7	285.8	5	450.3	5	391.4		
	0.9	270.2	15	223.3	50	312.5		
DNA-P	cont.	310.8	cont.	356.2	cont.	300.7		
	0.3	223.3	1	230.9	1	234.5		
	0.7	244.3	5	252.1	5	233.9		
	0.9	168.7	15	188.6	50	202.3		
Protein-P	cont.	184.9	cont.	236.0	cont.	211.7		
	0.3	157.4	1	160.8	1	175.9		
	0.7	121.0	5	178.4	5	169.8		
	0.9	87.8	15	101.4	50	125.7		
—UV-Absorbancy at 260m μ —								
	ppm	OD/L	ppm	OD/L	ppm	OD/L		
RNA	cont.	1.41	cont.	1.13	cont.	1.29		
	0.3	1.16	1	0.92	1	1.15		
	0.7	0.97	5	0.87	5	1.05		
	0.9	0.80	15	0.46	50	0.90		
DNA	cont.	0.26	cont.	0.20	cont.	0.26		
	0.3	0.18	1	0.14	1	0.22		
	0.7	0.18	5	0.14	5	0.20		
	0.9	0.12	15	0.09	50	0.15		

Table 3. Amounts of ninhydrin reactive substance in each fraction of *Chlorella* cells treated with heavy metals after 6 days culture.

Fraction	Heavy metal		Hg		Cd		Zn	
			ppm	$\mu\text{M/L}$	ppm	$\mu\text{M/L}$	ppm	$\mu\text{M/L}$
Free Amino acid		cont.		540.3	cont.	565.6	cont.	417.3
		0.3		258.7	1	219.9	1	270.9
		0.7		163.0	5	249.5	5	243.6
		0.9		119.5	15	213.4	50	155.8
Alkali-labile protein		cont.		902.1	cont.	908.4	cont.	893.7
		0.3		484.3	1	557.5	1	386.7
		0.7		347.6	5	585.6	5	769.2
		0.9		270.4	15	107.1	50	838.5
Alkali-stable protein		cont.		496.2	cont.	531.7	cont.	491.8
		0.3		557.0	1	301.8	1	715.2
		0.7		379.8	5	205.3	5	621.8
		0.9		120.2	15	117.8	50	672.6
Total protein		cont.		1398.3	cont.	1440.1	cont.	1385.5
		0.3		1041.3	1	859.2	1	1101.9
		0.7		727.4	5	790.8	5	1391.0
		0.9		390.6	15	224.9	50	1511.1

**Fig. 5.** Amounts of phosphates and UV-absorbing materials in DNA and RNA fraction of *Chlorella* cells treated with heavy metals after 6 days culture.

4. 蛋白質의 消長

protein-bound phosphate의 無機磷酸과 유리 아미노산, alkali-labile protein, alkali-stable protein 및 total protein의 重金屬에 의한 含量減小을 Table 3과 Fig. 6에 表示하였다.

Fig. 6이 보여주고 있는 것과 같이 alkali-stable protein에 있어서만 Hg 0.3ppm處理區가 別다른 抑制效果를 나타내지 못하였을 뿐 다른 分割에 있어서는 모두 Hg에 의해 현저한 含量減小을 보여주고 있다. Cd의 모든 處理區의 抑制現狀은 유리 아미노산과 alkali-stable protein, total protein에서 심하게 나타났으며 alkali-labile protein에서는 15ppm處理區가 특히 심하게 減小되었다 Zn를 處理했을 경우는 protein-bound phosphate와 유리 아미노산만이 對照區에 比하여 減小된 含量을 보여주었고, 반면 alkali-stable protein은 약간 增加한 것으로 나타났다.

5. 炭水化合物의 含量 變化

Table 4와 Fig. 7은 重金屬(Hg, Cd, Zn)이 炭水化合物 含量에 미친 結果를 나타내었다.

Hg를 0.7, 0.9ppm으로 處理했을 경우 炭水化合物의 含量에 대하여 重金屬은 현저한 阻害效果

를 가지지만 0.3ppm處理區는 커다란 抑制效果는 없었다. Cd를 處理한 경우 15ppm處理區는 調査된 모든 炭水化物的 含量을 減小시키지만

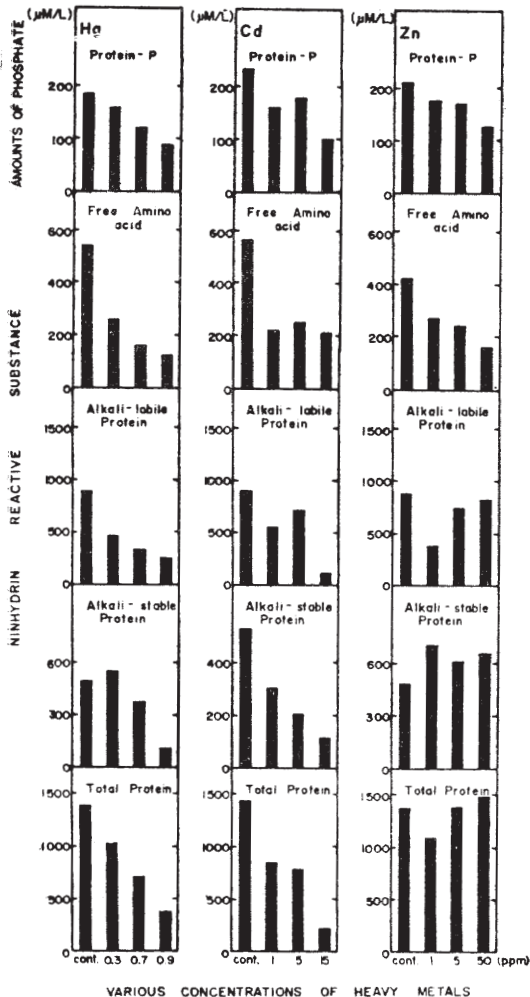


Fig. 6. Amounts of ninhydrin reactive substance in each fraction and protein-bound phosphate of *Chlorella* cells treated with heavy metals after 6 days culture.

1, 5ppm處理는 별다른 抑制效果가 없었다. Zn의 50ppm處理區에서 alkali不溶性 分劃과 total carbohydrate의 含量이 심하게 減小되었고, 酸可溶性 分劃과 脂質 分劃에 대하여 Zn의 모든 處理區는 對照區에 比하여 비교적 完만한 減小를 나타내었다.

考 察

重金屬은 低濃度에서도 動物의 여러가지 대사

작용에 阻害效果를 가지며, 植物에 대하여는 生長障害 및 黃化現狀을 초래한다는 것은 이미 잘 밝혀져 있다(Schroeder와 Vinton, 1962; Perry等, 1974; Luckey等 1975; Lee等, 1976; Agarwala, 1977; Lamoreaux等 1977; Levings, 1977).

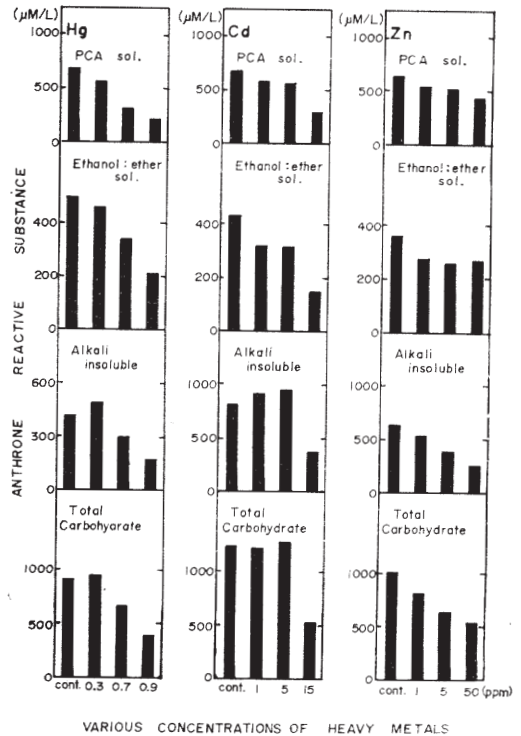


Fig. 7. Amounts of carbohydrate (glucose equivalent) in each fraction of *Chlorella* cells treated with heavy metals after 6 days culture.

本 實驗에서 使用된 Hg, Cd, Zn의 thiol group에 대한 親和力은 $Hg > Cd > Zn$ 의 順으로 나타난다. 또한 subgroup II B에 속하는 이들 금속의 毒性은 原子量이 增加함에 따라 增加하므로 Hg의 毒性이 가장 큰 것으로 밝혀져 있다(Venugopal과 Luckey, 1978).

微量 必須元素로 알려진 Zn의 경우 그 缺乏時 生合成에 대한 抑制效果 (Randall과 Bouma, 1973) 및 첨가시 促進效果 (Price Millar, 1962; McHan와 Johnson, 1979)를 나타내지만, 過多로 處理되었을 때는 毒性을 가지는 것으로 觀察되는데 이러한 것은 Cu, Fe, Mg, Ca과 같은 다른 必須元素와 複合體를 이루므로 해서 생기는 相互作用으로부터 초래된다(Venugopal과 Luckey, 1978).

Table 4. Amounts of carbohydrate (glucose equivalent) in each fraction of *Chlorella* cell treated with heavy metals after 6 days culture.

Fraction	Heavy metal		Hg		Cd		Zn	
	ppm	$\mu\text{M/L}$	ppm	$\mu\text{M/L}$	ppm	$\mu\text{M/L}$	ppm	$\mu\text{M/L}$
PCA sol. (glucose equivalent)	cont.	689.2	cont.	674.0	cont.	641.6		
	0.3	569.0	1	577.1	1	540.4		
	0.7	342.7	5	560.4	5	515.8		
	0.9	219.1	15	287.5	50	437.2		
Ethanol : ether sol.	cont.	494.3	cont.	430.8	cont.	361.1		
	0.3	457.0	1	317.7	0	277.2		
	0.7	341.9	5	312.4	5	258.5		
	0.9	210.3	15	147.8	50	270.4		
Alkali insoluble	cont.	414.7	cont.	817.9	cont.	639.1		
	0.3	495.0	1	910.2	1	539.5		
	0.7	295.7	5	963.0	5	381.7		
	0.9	171.3	15	378.1	50	264.3		
Total carbohydrate	cont.	909.0	cont.	1248.7	cont.	1000.2		
	0.3	952.0	1	1227.9	1	816.7		
	0.7	637.6	5	1275.4	5	640.2		
	0.9	381.6	15	525.8	50	534.7		

Zn가 過多로 存在하는 경우, 植物의 表 表面의 微生物相에 있어서 變化가 초래되며 (Bewley, 1979), *Chlorella* 細胞膜에서 K^+ 의 손실 (De Filippis, 1979a) 및 葉綠素 生合成의 抑制 (De Filippis, 1979b), nitrate reductase活性的 減小 (Mathys, 1975), Mg-dependent ATPase의 活性抑制 (Venugopal과 Luckey, 1978) 등의 現狀을 초래한다고 보고되어 있다.

*Chlorella*의 生長과 葉綠素 含量에 대한 各 重金屬의 阻害濃度を 設定함에 있어서 Hg를 1ppm으로 處理하였더니 24時間 以內에 심한 黃化現狀을 일으키며 死滅하였고, Cd의 경우 50ppm을 *Chlorella*에 處理했을 경우 48時間 以內에 Hg 1ppm處理區와 동일한 現狀을 나타내었다. 이와 같이 *Chlorella*에서 Hg는 Cd이나 Zn보다도 심한 生長 抑制效果를 가진다. 葉綠素 含量 變化도 生長率과 거의 같은 傾向으로 나타나므로써 *Chlorella* 生長과 葉綠素의 形成能사이는 相互 有關한 것으로 推定되어진다.

따라서 處理된 重金屬들이 *Chlorella*의 生長과 葉綠素 含量에 미치는 抑制 影響은 $\text{Hg} > \text{Cd} > \text{Zn}$

의 順으로 調查되었다. 이것은 Sung等(1981)에 의하여 調查된 ATP및 呼吸에 미치는 여러가지 重金屬의 抑制效果 順序와 일치되는 것이다. 또한 De Filippis와 Pallaghy(1976)는 Zn와 Hg가 葉綠素 生合成과정의 酸化·還元단계에 영향을 미치며, De Filippis(1979b)는 葉綠素分子의 酸化로 인하여 葉綠素의 파괴가 초래되는데 이 酸化力은 금속이온의 산화·환원 전위계열과 관계가 있다고 하였는데 本 實驗에서 觀察된 重金屬의 抑制效果 順序와 산화·환원 전위계열의 順序와 일치되었다.

앞에서 서술한 바와 같이 많은 研究들은 여러 가지 重金屬에 의하여 光合成이 抑制된다고 報告하였다. 附屬하면 옥수수과 해바라기에 있어서 Cd(Bazzaz等, 1974b) 및 Pb(Bazzaz等, 1975)의 影響, 강남콩에 있어서 Cd, Pb의 影響 (Huang等, 1974), 地衣類에 있어서 Hg, Cd, Pb의 影響 (Puckett, 1976), 은단풍에 있어서 Cd의 影響 (Lamoreaux等, 1978), 자주개자리에 있어서 Cd, Zn의 效果 (Porter等, 1981) 등을 觀察하였는데 이러한 光合成 抑制現狀은 重金屬에 의한 葉綠素

과괴에 기인하는 것으로 思料된다.

無機폴리燐酸의 生合成에는 ATP와 pyrophosphate가 作用(Kulaev, 1979)하는데 이때 光合成의 燐酸化反應동안 形成된 pyrophosphate가 利用되므로써 폴리燐酸의 生合成과 光合成은 間接的으로 연관된다(Baltchevskii等 1971; Kulaev等, 1974). 아울러 uncoupling을 誘導시키는 물질은 폴리燐酸의 形成에 間接的 影響을 준다는 여러 報告가 있다(Kulaev, 1979).

이와 아울러 Miller等 (1973)과 Koeppe와 Miller(1970)는 Cd과 Pb가 基質酸化에 연관된 燐酸化를 抑制하므로써 전자와 energy전달에 影響을 준다고 報告하였으며, Mustafa와 Cross(1971), Searls等(1961)은 Cd이 전자전달 反應 中에 dehydrogenase反應에 阻害影響을 미치므로써 전자전달을 차단시킨다고 不張하였다.

또한 Jacobs等(1956)과 Bittell等 (1974)은 Pb, Cd, Zn에 의해 基質酸化가 抑制될 뿐만 아니라 낮은 濃度에서도 uncoupling이 誘導된다고 하였다. 아울러 Cd은 mitochondrial ATPase(Mustafa와 Cross, 1971) 및 myosin의 ATPase(Lipkan, 1970)를 抑制하고 mitochondrial respiration의 抑制와 uncoupling結果, ATP level를 減小(Keck 1978)시키며 Hg 역시 ATPase의 活性을 현저히 減小시킨다(Chang等, 1973). ATP의 加水分解에 미치는 重金屬의 抑制影響은 重金屬이 ATP를 抑制한다기 보다는 ATPase를 不活性化시키기 때문이다(Sung等, 1981).

위와 같이 重金屬에 의해 光合成의 減小, 전자전달의 차단, uncoupling의 誘導, ATP level의 減小로 인하여 無機폴리燐酸의 生合成이 抑制되는 現狀은 本實驗에서 調査된 無機폴리燐酸의 含量減小와 잘 符合된다.

*Chlorella*에서 無機폴리燐酸의 轉換과정에 대하여, Miyachi等 (1961a)은 폴리燐酸 "C"가 폴리燐酸 "A"로 無機燐酸이 轉換되며, 李(1964)는 폴리燐酸 "C"의 燐酸이 폴리燐酸 "B"로부터 導入되어 形成된다고 하였는데, 本 研究에서는 *Chlorella*에 存在하는 세가지 無機폴리燐酸(폴리燐酸 "A", "B", "C") 中 酸可溶性 폴리燐酸인 폴리燐酸 "A"만을 分離하였다. 따라서 分離하지 않은 폴리燐酸 "B"나 폴리燐酸 "C"로부터 燐酸 "A"로의 無機燐酸 전환과정이 重金屬에 의해 抑制

되었기 때문에 酸可溶性 폴리燐酸의 含量이 더욱 減小된 것으로 思料된다.

Protein-bound phosphate(Miyachi等, 1961b, c), 燐脂質(Lee, 1967)의 無機燐酸은 無機폴리燐酸으로부터 轉換된다고 하였는데, 本 實驗에서는 重金屬에 의하여 無機폴리燐酸의 生合成이 阻害되었을 뿐 아니라 無機폴리燐酸으로부터 protein-bound phosphate 및 燐脂質의 無機燐酸으로의 轉換이 抑制되어 含量이 減小된 것으로 推定된다. 또한 Chu等(1972)은 Zn가 葉의 肉속에 있는 燐脂質 含量을 減小시킨다고 하였는데 이러한 점은 本 研究 結果와도 일치된다.

核酸의 形成과 無機폴리燐酸의 生合成은 pyrophosphate形成에 의해 증개되므로써 相互 연관되어 있다. 즉 ATP, GTP, CTP, UTP(TTP)로부터 pyrophosphate와 核酸(RNA, DNA)이 合成되며, 여기서 생긴 pyrophosphate는 無機폴리燐酸을 合成하게 된다(Kulaev, 1979). 그러나 上記에 報告된 바와 같이 重金屬에 의해 전자전달이 깨어지므로써 energy전달이 影響받아서 ATP 등의 合成이 抑制되고, 따라서 RNA 및 DNA의 合成이 減小될 뿐만 아니라 無機폴리燐酸의 形成도 抑制된 것으로 思料된다. 아울러 methyl mercury는 精子形成과정에서 DNA合成의 初期 抑制를 초래(Sakai, 1972)하며, 신경세포의 RNA含量을 減小(Venugopal等, 1978)시킨다.

이와 같은 DNA 혹은 RNA合成의 抑制와 아울러, Miyachi等(1961b, c)은 *Chlorella*의 燐酸代謝 과정에서 DNA의 無機燐酸은 無機폴리燐酸으로부터 轉換되며 RNA에 含有된 無機燐酸은 培地內에 있는 無機燐酸을 導入한다고 하였다. 本 研究에서 DNA-P의 減小는 無機폴리燐酸이 枯渴狀態일 뿐만 아니라 無機폴리燐酸으로부터 燐酸의 轉換이 阻害되었기 때문인 것으로 생각되며 RNA-P는 外部環境에 있는 無機燐酸의 導入과정이 重金屬에 의해 抑制되었기 때문에 對照區와 比較하여 減小된 傾向을 나타낸 것으로 推定할 수 있다.

結果에서 본 것과 같이 Hg, Cd, Zn 모두 炭水化物 含量에 있어서 減小現狀을 나타내고 있다. 이것은 重金屬에 의해 光合成이 抑制되기 때문이며 또한 炭水化物 濃度の 減小는 적어도 일부분이 nitrogenase 活性이 抑制(Huang等, 1974)

되기 때문이라고 思料된다. 또한 Hg가 glucose의 細胞內 吸收로 減小시킨다(Venugopal等, 1978)고 하였는데, 本 實驗에서 酸可溶性 分割(glucose equivalent)의 炭水化物 含量이 다른 重金屬에 比하여 현저히 減小된 것은 위의 報告와 일치된다.

細胞質로 吸收된 重金屬은 protein, purines, pteridines, porphyrins의 cysteinyl과 histidyl 측쇄와 반응하며, Hg와 Cd은 thiol group과 더 잘 反應하는 반면 Zn는 carboxyl group과 더 큰 親和力을 가진다(Vallee와 Ulmer, 1972). 또한 nitrogen이 아미노산으로 合成되는 경우 TCA cycle의 중간산물인 α -ketoglutaric acid와 oxalacetic acid를 利用한다. 그러나 重金屬에 의하여 呼吸이 抑制된다는 많은 報告(Jacobs等, 1956; Keck, 1978; Spalding, 1978, 1979; Sung等, 1981)가 있으며 光合成 또한 重金屬에 의하여 阻害되고 있는 바 아미노산 合成이 抑制되므로해서 蛋白質 含量 역시 減小된다(Huang等, 1974). 그러나 Zn의 處理區가 유리 아미노산의 含量이 감

소됨에도 불구하고 alkali-labile protein과 alkali-stable protein이 약간의 增加를 나타낸 것은 아미노산으로부터 alkali-labile protein과 alkali-stable protein의 合成에는 Zn가 그다지 抑制影響을 나타내지 못했기 때문인 것으로 생각된다.

그리하여 이상과 같은 考察에 대한 結論을 내리면 *Chlorella*의 生長과 葉綠素含量에 대한 重金屬의 抑制는 重金屬別, 處理된 濃度別로 그 效果가 다양하였고 抑制效果는 $Hg > Cd > Zn$ 의 順으로 觀察되었다. 또한 無機폴리燐酸의 生合成, 無機燐酸의 轉換과정 및 核酸의 生合成이 重金屬에 의해 阻害되었으며, 이로 인하여 여러가지 燐酸化化合物의 含量이 減小되었다. 아울러 重金屬은 光合成을 抑制하므로써 炭水化物 含量을 낮추었고 아미노산 合成을 抑制하므로써 蛋白質 含量의 減小現狀을 보여주었다.

이러한 結論을 바탕으로 할 때 *Chlorella*의 生長 및 物質代謝에 억제효과를 미치는 重金屬의 最低 濃度로서 Hg는 0.7ppm, Cd은 15ppm, Zn는 50ppm인 것으로 調査되었다.

摘 要

本 研究는 *Chlorella ellipsoidea*에 미치는 重金屬의 影響을 調査하였다. 즉, *Chlorella*를 Hg(0.3·0.7·0.9ppm), Cd(1.5·15ppm), Zn(1.5·50ppm)가 處理된 培地에 6日間 培養시켰다. 接種時와 培養 中間期에 細胞를 收穫하여 packed cell volume 및 optical density(660m μ , 540m μ)를 測定하여 *Chlorella*의 生長과 葉綠素 含量에 미치는 重金屬의 抑制效果를 追跡하였다. 培養 末期에 一定量의 細胞를 收穫하여 여러가지 細胞 分割의 燐酸化化合物 含量 및 有機物의 合成能을 對照區와 比較하여 觀察하였다.

*Chlorella*의 生長과 葉綠素 含量에 대한 세가지 重金屬의 抑制效果는 $Hg > Cd > Zn$ 의 順으로 나타났다. 無機폴리燐酸의 生合成, 無機燐酸의 轉換과정, 核酸 生合成등이 重金屬에 의해 抑制되므로해서 여러가지 燐酸化化合物의 含量이 減小되었고, 또 光合成能이 阻害되어 炭水化物 含量이 減小되고, 아미노산 合成이 抑制되므로써 蛋白質의 含量이 對照區에 比하여 減小된 경향을 보여주었다.

따라서 處理된 세가지 化合物이 *Chlorella*의 生長과 物質代謝에 抑制效果를 초래하는 最低濃度は 각각 0.7ppm(Hg), 15ppm(Cd), 50ppm(Zn)인 것으로 調査되었다.

引用文獻

1. Agarwala, S.C., S.S. Bisht, and C.P. Sharma, 1977. Relative effectiveness of certain heavy metals in producing toxicity and symptoms of iron deficiency in barley. *Can. J. Bot.*, **55**, 1299~1307.
2. Baltschevskii, H., M. Baltschevskii, and L.V. Stedingk, 1969. 'Inorganic pyrophosphate, bacterial photophosphorylation and evolution of biological energy transformation' in: Progress in Photosynthesis Research, Ed. Metzner, H., Springer Verlag, Tübingen, **3**, 1313.
3. Bazzaz, F.A., R.W. Carlson, and G.L. Rolfe, 1974a. The effect of heavy metals on plants: Part I. Inhibition of gas exchange in sunflower by Pb, Cd, Ni, and Tl. *Environ. Pollut.*, **7**,

- 241~246.
4. _____, 1974b. Effect of Cd on photosynthesis and transpiration of excised leaves of corn and sunflower. *Physiol. Plant.*, **32**, 373~376.
 5. _____, 1975. Inhibition of corn and sunflower photosynthesis by lead. *ibid.*, **34**, 326~329.
 6. Berenblum, I. and E. Chain, 1938. An improved method for the colorimetric determination of phosphate. *Biochem. J.*, **32**, 295~298.
 7. Bewley, R.J.F., 1979. The effects of zinc, lead, and cadmium pollution on the leaf surface microflora of *Lolium perenne* L. *J. Gen. Microbiol.*, **110**, 2, 247~254.
 8. Bittell, J.E., D.E. Koeppe, and R.J. Miller, 1974. Sorption of heavy metal cations by corn mitochondria and the effects on electron and energy transfer reactions. *Physiol. Plant.*, **30**, 226~230.
 9. Carlson, R.W. and F.A. Bazzaz, 1977. American sycamore (*Plantanus occidentalis* L.) caused by Pb-Cd interaction. *Environ. Pollut.*, **12**, 243~253.
 10. Carlson, R.W., F.A. Bazzaz, and G.L. Rolfe, 1975. The effect of heavy metals on plants: II. Net photosynthesis and transpiration of whole corn and sunflower plants treated with Pb, Cd, Ni, and Tl. *Environ. Res.*, **10**, 113~120.
 11. Chang, L.W., R.A. Ware, and P.A. Desnoyers, 1973. A histochemical study on enzyme changes in the kidney, liver, and brain after chronic mercury intoxication in the rat. *Food Cosmet. Toxicol.*, **11**, 283~286.
 12. Chu, R.C. and D.H. Cox, 1972. Zinc, iron, copper, calcium, cytochrome oxidase, and phospholipid in rats of lactating mothers fed excess zinc. *Nutr. Rep. Int.*, **5**, 61~66.
 13. Crane, R.H. and F. Lipman, 1953. The effects of arsenate on ascorbic phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, **201**, 235~243.
 14. De Filippis, L.F., 1979a. The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells. *Z. Pflanzenphysiol.*, **92**, 1, 39~49.
 15. _____, 1979b. The effect of heavy metals on the absorption spectra of *Chlorella* cells and chlorophyll solutions. *ibid.*, **93**, 2, 129~137.
 16. _____, and C.K. Pallaghy, 1976. The effect of sub-lethal concentrations of mercury and zinc on *Chlorella*. II. Photosynthesis and pigment composition. *ibid.*, **78**, 314~322.
 17. Fiske, C.H. and Y. Subbarow, 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.*, **66**, 375.
 18. Foy, C.D., R.L. Chaney, and M.C. White, 1978. The physiology of metal toxicity in plants. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **29**, 511~566.
 19. Hamp, R. and K. Lenzian, 1974. Effect of lead ions on chlorophyll synthesis. *Naturwiss.*, **61**, 218~219.
 20. Huang, C.Y., F.A. Bazzaz, and L.N. Vanderhoef, 1974. The inhibition of soybean metabolism by cadmium and lead. *Plant Physiol.*, **54**, 122~124.
 21. Jacobs, E.E., M. Jacob, D.R. Sanadi, and L.B. Bradley, 1956. Uncoupling of oxidative phosphorylation by cadmium ion. *J. Biol. Chem.*, **223**, 147~156.
 22. Keck, R.W., 1978. Cadmium alteration of root physiology and potassium ion fluxes. *Plant Physiol.*, **62**, 94~96.
 23. Koeppe, D.E. and R.J. Miller, 1970. Lead effects on corn mitochondrial respiration. *Science*, **167**, 1376~1378.
 24. _____, 1972. Oxidation of reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by isolated corn mitochondria. *Plant Physiol.*, **49**, 353~357.
 25. Kulaev, I.S., 1979. The biochemistry of inorganic polyphosphates. John Wiley & Sons. **67~94**, 167~172 (translation R.F. Brookes).
 26. _____, A. Shadi, and S.E. Mansurova, 1974. Polyphosphates in the phototrophic bacterium *Rhodospirillum rubrum* under various culture conditions. *Biokhimiya.*, **39**, 656.
 27. Lagerwerff, J.V., 1972. Lead, mercury, and cadmium as environmental contaminants. In Micro-nutrients in Agriculture (J.J. Mortvedt, P.M. Giordano, and W.L. Lindsay eds.), Soil science society of America, Madison, Wisconsin. 619~628.
 28. _____, and A.W. Specht, 1970. Contamination roadside soil and vegetation with cadmium, nickel, lead, and zinc. *Environ. Sci. Technol.*, **4**, 583~586.
 29. Lamoreaux, R.J. and W.R. Chaney, 1977. Growth and water movement in silver maple seedlings

- affected by cadmium. *J. Environ. Qual.*, **6**, 201~205.
30. _____, 1978. The effect of cadmium on net photosynthesis, transpiration, and dark respiration of excised silver maple leaves. *Physiol. Plant.*, **43**, 3, 231~236.
 31. 李永祿, 1964. *Chlorella*의 磷酸代謝에 관한 研究 微學誌, **2**, 1, 1~11.
 32. Lee, Y.N., 1967. Incorporation of phosphate into protein and other nitrogenous compounds in *Chlorella* cells. *ibid.*, **5**, 2, 19~26.
 33. Lee, K.C., B.A. Cunningham, G.M. Paulsen, G. H. Liang, and R.B. Moore, 1976. Effects of cadmium on respiration rate and activities of several enzymes in soybean seedlings. *Physiol. Plant.*, **36**, 4~6.
 34. Levings, M.K., 1977. Effects of cadmium chloride on growth and pigments in *Glycine max* L., *Quercus rubra* L., *Acer saccharinum* L., and *Cucumis sativus* L. Masters Thesis, Forestry and Natural Resources, Purdue University.
 35. Lipkan, G.N., 1970. The effect of unithiol on the enzymatic activity of myosin and myosinoid proteins and the content of sulfhydryl groups in the presence of metals reacting with thiols. *Farmakol. Toksikol. Respub. Mezhvedom.*, S.B. **5**, 191.
 36. Luckey, T.D., B. Venugopal, and D. Hutcheson, 1975. Heavy metal toxicity, safety, and hormology. Academic Press, New York., pp.120.
 37. Mathys, W., 1975. Enzymes of heavy-metal-resistant and non-resistant population of *Silene cucubalus* and their interaction with some heavy metals *in vivo* and *in vitro*. *Physiol. Plant.*, **33**, 161~165.
 38. McHan, F. and G.T. Johnson, 1979. Some effects of zinc on the utilization of nitrogen sources by *Monascus purpureus*. *Mycologia*, **71**, 1, 160~169.
 39. Miles, C.D., J.R. Brandle, D.J. Daniel, O. Chuder, P.D. Schnare, and D.J. Uhlik, 1972. Inhibition of photosystem II in isolated chloroplasts by lead. *Plant Physiol.*, **49**, 820~825.
 40. Miller R.J., J.E. Bittell, and D.E. Koeppe, 1973. The effect of cadmium on electron and energy transfer reactions in corn mitochondria. *Physiol. Plant.*, **28**, 166~171.
 41. Miyachi, S. and S. Miyachi, 1961a. Modes of formation of phosphate compounds and their turnover in *Chlorella* cells during the process of life cycle as studied by the technique of synchronous culture. *Plant & Cell Physiol.*, **2**, 415~424.
 42. _____, and H. Tamiya. 1961 b. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells, *ibid.*, **2**, 405~414.
 43. _____, 1961 c. Some observation on the phosphorus metabolism in growing *Chlorella* cells. *Biochem. Biophys. Acta*, **46**, 200~202.
 44. Mustafa, M.G. and C.E. Cross, 1971. Pulmonary alveolar macrophage. Oxidative metabolism of isolated cells and mitochondria and effect of cadmium ion on electron- and energy-transfer reactions. *Biochem.*, **10**, 23, 4176~4185.
 45. Overnell, J., 1975. The effect of heavy metals on photosynthesis and loss of cell potassium in two species of marine algae, *Dunaliella tertiolecta* and *Phaeodactylum tricornutum*. *Marine Biol.*, **29**, 99~103.
 46. Perry, H.M., Jr. and Erlanger, M.W., 1974. Metal-induced hypertension following chronic feeding of low doses of cadmium and mercury. *J. Lab. Clin. Med.*, **83**, 541~547.
 47. Porter, J.R. and R.P. Sheriden, 1981. Inhibition of nitrogen fixation in alfalfa by arsenate, heavy metals, fluoride, and stimulated acid rain. *Plant Physiol.*, **68**, 143~148.
 48. Price, C.A. and E. Millar, 1962. Zinc, growth, and respiration in *Euglena*. *ibid.*, **37**, 423~427.
 49. Puckett, K.J., 1976. The effect of heavy metals on some aspects of lichen physiology. *Can. J. Bot.*, **54**, 2695~2703.
 50. Randall, P.J. and D. Bouma, 1973. Zinc deficiency, carbonic anhydrase, and photosynthesis in leaves of spinach. *Plant. Physiol.*, **52**, 229~232.
 51. Sakai, K., 1972. Effect of methyl mercuric chloride on rat spermatogenesis. *Kumamoto Med. J.*, **25**, 3, 94~100.
 52. 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.

53. Schroeder, H.A. and W.H. Vinton, Jr., 1962. Hypertension induced in rats by small doses of cadmium. *Am. J. Physiol.*, **202**, 515~518.
54. Scott, T.A. and E.H. Melvin, 1953. Methods in carbohydrate analysis. *Anal. Chem.*, **25**, 1650.
55. Searls, R.L., J.M. Peters, and D.R. Sanadi, 1961. α -Ketoglutaric dehydrogenase. *J. Biol. Chem.*, **236**, 2317~2322.
56. Spalding, B.P., 1978. The effect of biocidal treatments on respiration and enzymatic activities of douglas-fir needle litter. *Soil. Biol. Biochem.*, **10**, 6, 537~543.
57. _____, 1979. Effects of divalent metal chlorides on respiration and extractable enzymatic activities of douglas-fir needle litter. *J. Environ. Qual.*, **8**, 1, 105~109.
58. Sung, M.W., W.J. Yang, and B.K. Kwon, 1981. Toxicity of various heavy metals on ATP and respiration in germinating seeds. *J. of Gyeong-sang Nat. Univ.*, **20**, 237~258.
59. Tamiya, H., K. Shibata, T. Sasa, T. Iwamura, and Y. Morimura, 1953. Effect of diurnally intermittent illumination on the growth and some cellular characteristics of *Chlorella*. *Carnegie Inst. Wash. Publ.*, **600**, 76~81.
60. Troll, W. and R.K. Cannon, 1953. A modified photometric ninhydrin method for the analysis of amino and imino acids. *J. Biol. Chem.*, **200**, 803~811.
61. Vallee, B.L. and D.D. Ulmer, 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Annu. Rev. Biochem.*, **41**, 91~128.
62. Venugopal, B. and T.D. Luckey, 1978. Metal toxicity in mammals. 2. Plenum Press N.Y. pp. 68, 98.