

Rhizopus nigricans의 胞子形成에 關한 生物學的 究研

尹 京 河·李 永 祿
(高麗大學校 生物學科)

A physiological study on sporulation of *Rhizopus nigricans*

YOON, Kyung Ha, and Yung Nok LEE
(Depart. of Biology, Korea University)

ABSTRACT

The mycelium of *Rhizopus nigricans* was harvested at intervals during the sporulation periods, fractioned into various cell components and analyzed the contents of various cell materials in order to clarify the optimum conditions of sporulation and some characteristics of the metabolism during the sporulation periods. The changes in enzyme activities, such as amylase and protease, were also measured during the sporulation periods.

1. Mycelium in distilled water culture, as control, did not sporulate but mycelial mat cultured in Petridish without nutrient spourulated. Optimum temperature range for sporulation was 20~25°C.
2. During the sporulation and maturation periods, proteins, especially alkali-labile protein were decreased remarkably but free amino acid and ninhydrin reactive substances in acid soluble fraction were increased, compared with control.
3. Acid soluble polyphosphate was decreased but acid insoluble polyphosphate was increased, during the sporulation.
4. Carbohydrate and hexosamine in acid soluble fraction were increased, while carbohydrate in alkali insoluble residual fraction was decreased during the sporulation periods.
5. Amounts of UV-absorbing material in deoxyribonucleic acid fraction was increased a little but those in ribonucleic acid fraction was decreased, compared with control.
6. Intracellular amylases and proteases activities in sporulating mycelial mat were increased continuously during the sporulation and maturation periods.

緒 論

*Rhizopus nigricans*는 分類學的으로 Mucorales에 屬하는 菌類로서 1820년에 Ehrenberg

(Inui, *et al.*, 1965)에 의하여 처음으로 發見되었다. *Rh. nigricans*는 生長이 빠르고 棲息基質이 다양하고 生育溫度의 범위가 넓어 自然界에 널리 分布하며 有性胞子 혹은 無性胞子を 生成하여 増殖한다.

*Rh. nigricans*가 헤테로탈릭 接合胞子(heterothallic zygospore)를 形成한다는 것이 몇몇 연구자들에 의하여 밝혀진 後, 많은 사람들이 *Rh. nigricans*의 接合胞子(zygospore)形成에 關하여 關心을 모았다. Burgeff(1924)는 permeable collodion膜을 利用하여 (+)菌株와 (-)菌株를 分離하려고 시도했고, Foster(1939)등은 *Rh. nigricans*의 (+)菌株는 fumaric acid를 生産하나 (-)菌株는 生産하지 못한다고 하였다. Niethammer(1938)은 Zn가 없으면 接合胞子를 形成하지 못한다고 했으며, Vaganishi(1955)등은 *Rh. nigricans*는 *Choanephora cucurbitarum*의 (-)菌株에 對하여 性的 親和力이 있다고 보고하였다. 最近 Inui(1965)등은 *Rh. nigricans*의 接合胞子形成能을 회복하고자, 眞空속에서 胞子를 乾操시킨 後 여러 가지 基質과 培地上에서 오랫동안 培養했으나 실패하였다.

*Rh. nigricans*의 無性胞子形成은 胞子囊柄上端이 팽창하고, 隔膜이 生成되어 胞子囊이 만들어지고, 胞子囊속에서 分裂(cleavage)이 일어나 多核體가 形成된 後에 膜을 形成하여 胞子が 만들어 진다는 것을 Swingle(1903)이 관찰하였다. Inui(1965)등은 無性胞子形成에 미치는 溫度, 炭素源, 窒素源등 外的環境要因에 중점을 두고 特성을 연구하였다.

본 연구에서는 *Rh. nigricans*가 無性的으로 胞子를 形成할 때 胞子形成最適條件과 胞子形成期の 物質代謝의 特性을 밝히고자 胞子形成期和 成熟期에 있어서의 菌體의 構成成分 및 酵素活性등의 變化를 測定하여 몇가지 所見을 얻었기에 報告하는 바이다.

材料 및 方法

1. 實驗材料

本 研究에 使用한 菌株는 우리나라에서 分離, 同定(Lee et al., 1976)한 *Rh. nigricans*로 potato-glucose 培地上에서 5°C로 保存하고 있었다.

2. 培 養

Potato-glucose 培地上에 保存하고 있던 *Rh. nigricans*를 Pfeffer's 固體培地上에 이식하여 25°C로 7일간 前培養하였다. 前培養한 菌體를 수확하여 멸균수에 현탁시키고 현탁액을 glass wool로 여과하여 포자현탁액(1×10^8 spores/ml)을 만들었다. 5,000ml flask에 培地 2,000ml (sugar, 20gr NH₄VO₃ 4gr. Smith's mineral sol. 1ml/1,000 ml)를 넣어 여기에 포자현탁액 10ml를 接種하여 25°C에서 48時間동안 振盪培養(92 strokes/min)하였다.

3. 胞子形成의 誘發

振盪培養한 菌糸體를 수확하여 Buchner 여과기의 여과지(filter paper No. 2) 위에서 2회 멸균수로 세척을 하고 약 2mm 두께의 mycelial mat를 만들어, 一部는 100ml flask에 증류수 20ml를 넣고 그 속에 액침시켜 胞子形成을 억제하여 對照區로 삼고, 一部는 Petridish에 넣어 胞子形成을 誘發시켰다. 胞子形成區와 對照區를 各各 여러 가지 溫度條件下에서 培養하여 最適溫度條件을 求하였다.

4. 菌體의 構成成分의 分割

Petridish에 培養한 菌體를 胞子形成의 여러 時期에 따라 各各 수확하여 表 1과 같은 순서로 分割하였다. 核酸의 分離는 Schmidt-Tannhauser(1945)法에 의거하였고, 폴리인산(polyphosphate)의 分離는 Miyachi-Tamiya(1961)法을 다소 改良하여 다음과 같이 菌體를 처리하였다.

分割 I: 5% PCA (perchloric acid)로 2회(30分, 15分)

分割 II: 95%와 75% ethanol로 各各 1회

分割 III: Hot ethanol: ether(3; 1)로 3회

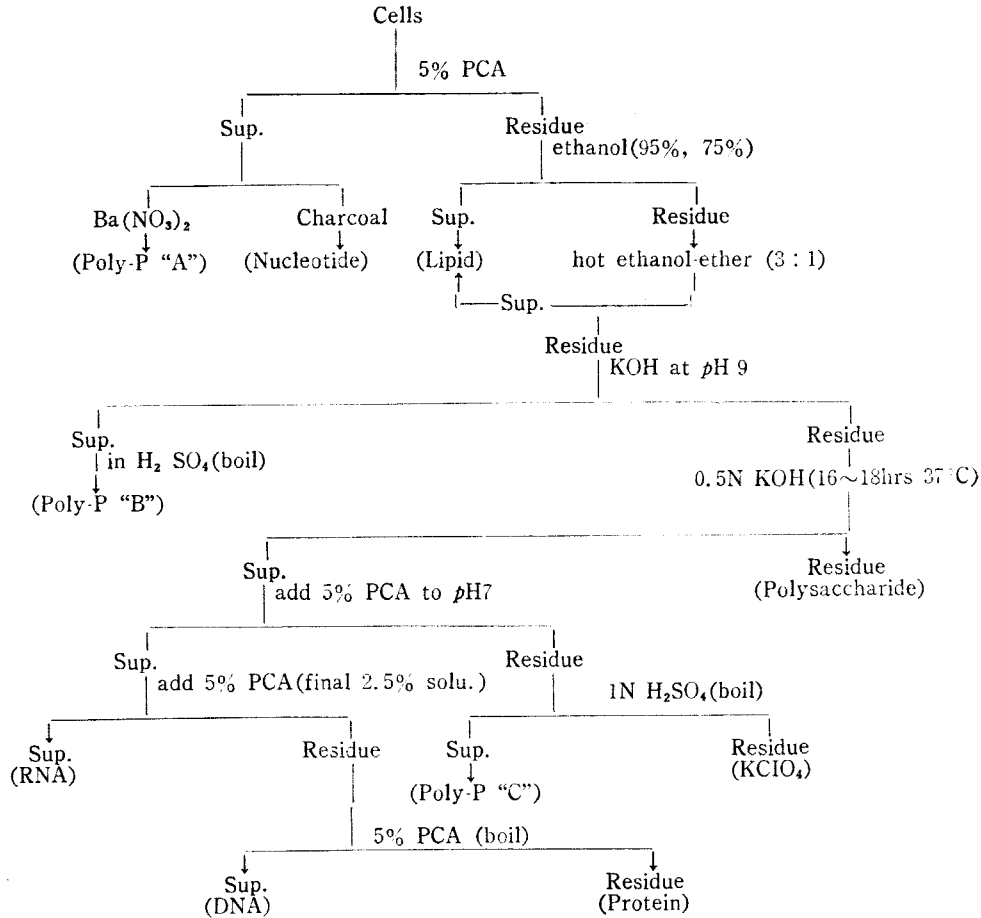
分割 IV: Cold KOH (10%)로 pH 9.0로 調節하여 2회(60分, 30分) 抽出한 後

分割 V: 0.5N KOH로 37°C에서 16~18 時間 處理하여 沈澱物을 除去하고

分割 VI: 上澄液을 PCA로 中和하여 폴리인산(polyphosphate)을 共沈시키고

分割 VII: 上澄液에 5% PCA를 加하여 2.5

Table 1. Fractionation of various compounds in mycelia of *Rhizopus*



% 溶液이 되게 한 다음.

分割Ⅷ: 沈澱된 DNA蛋白質은 5% PCA에 현탁하여 15分間 100°C에서 加熱하여 蛋白質을 沈澱시켰다.

5. 分析

1) 磷酸의 定量: 各 分割의 磷酸化合物을 Kjeldahl flask內에서 H₂SO₄로 加水分解시켜 遊離된 無機磷酸의 量을 Fiske-Subbarow(1925)法으로 測定하였다.

① 酸可溶性磷酸(acid soluble phosphate): 分割Ⅰ의 上澄液을 加水分解시켜 遊離된 無機磷酸을 定量하여 酸可溶性 總磷酸으로 간주하여 계산하였다.

② 폴리인산(polyphosphate): Miyachi-Tamiya(1961)法에 따라 *Rhizopus*에 存在하는 세가지 種類의 相異なる 폴리인산을 다음과 같이 定量하였다.

a. 酸可溶性폴리인산 "A" (Poly-P"A"): 分割Ⅰ의 上澄液에 沈한 Ba(NO₃)₂溶液과 actate 완충액(pH 4.0)을 加하여 5°C에서 24時間 反應시킨 後, 沈澱된 沈澱物을 원심 분리하고 1N HCl에 溶解시킨 다음 加水分解시켜 無機磷酸의 量을 測定하였다.

b. 酸不溶性폴리인산 "B" (poly-P"B"): 分割Ⅴ의 上澄液에 H₂SO₄(最終濃度 1N)를 加하여 10分間 비등시켜 加水分解해 된 無機磷酸의 量을 測定하였다.

c. 酸不溶性폴리인산 "C" (polyP"P"): 分割Ⅵ의 沈澱物을 1N H₂SO₄로 10分間 비등시켜 加水分解된 無機磷酸의 量을 測定하였다.

③ 磷脂質(phospholipid): 分割Ⅱ 및 Ⅲ의 上澄液을 少量 取하여 Kjeldahl flask內에서 H₂SO₄로 加水分解시켜 얻은 orthoph-

osphate의 量을 測定하였다.

④ RNA磷酸(RNA-P): 分割Ⅶ의 上澄液에서 磷酸含量을 測定하였다.

⑤ 磷蛋白質(Protein-P): 分割Ⅶ의 沈澱物을 2% KOH에 溶解시킨 後 Kjeldahl flask內에서 酸으로 加水分解시켜 유리된 無機磷酸의 量을 測定하였다.

2) Nucleotide, RNA, DNA의 測定

① Nucleotide: 分割Ⅰ의 上澄液에 charcoal(Norit SX-30)을 加하여 잘 흔들어서 分離하여 그 上澄液의 紫外部 吸光度를 DU-spectrophotometer로 測定하였다.

② RNA, DNA: 分割Ⅶ 및 Ⅷ의 各 上澄液을 DU-spectrophotometer로 紫外部 吸光度를 測定 比較하였다.

3) 炭水化物的 定量: 分割Ⅰ의 酸加溶性 分割, 分割Ⅱ와 Ⅲ의 脂溶性 分割 및 分割Ⅳ의 酸 및 알칼리 불용성 分割에 含有된 炭水化물을 anthrone法(Scott and Melrin, 1953)으로 定量하였다.

4) Ninhydrin反應物質의 定量: Troll-Cannon(1953)方法을 適用하여 分割Ⅰ의 上澄液에서 유리 아미노산, 分割Ⅶ의 上澄液에서 알칼리에 不安정한 蛋白質, 分割Ⅷ의 沈澱物에서 알칼리에 安定한 蛋白質을 各各 定量하였다.

5) Hexosamine의 定量: 分割Ⅰ의 上澄液에 含有된 hexosamine을 Elson-Morgan(1933)法으로 定量하였다.

6. 酵素液의 調製 및 酵素活性의 測定

1) 酵素液의 調製

Petridish에 培養한 菌糸體의 孢子形成期에 따라 菌體를 수확하여 소량의 석영사와 증류수를 glass homogenizer에 함께 넣고 菌體를 마쇄하였다. 菌體를 마쇄한 懸濁液을 여과지로 여과하여 선은 여과액으로 酵素活性을 測定하였다.

2) 酵素活性의 測定

① Dextrinogenic amylase: Dextrinogenic amylase의 活性測定은 blue-value法에 依하여 0.2% soluble starch를 基質溶液으로 하여 測定하였다. 基質溶液 1ml와 0.4M

acetate 완충액 1ml를 加하여 37°C의 항온 수조에서 5分間 예열한 後 側定하고자하는 酵素液 1ml를 加하여 37°C에서 30分間 反應시킨 다음, 0.5N acetic acid 10ml를 加하여 反應을 정지시키고 그 1ml를 取하여 1/3,000N I₂溶液 10ml로 정색시켜 700nm에서 吸光度(OD)를 測定하였다. 酵素活性의 單位는 37°C에서 30分間에 靑色沃素 정색을 10% 저하시키는 starch의 mgr으로서 表示하였다.

DP 37°C 30'mgr st/mgr

$$= 4 \times \left(\frac{D_0 - D}{D_0} \right) \times 100 \div 10$$

DP(Dextrinizing power): soluble starch 分解力

D₀: 空試驗值

D: 試驗值

② Glucoamylase: Glucoamylase의 活性은 Somogyi-Nelson(1944)法에 依하여 測定하였다. 25ml試驗管에 基質溶液인 0.2% soluble starch 1ml와 0.4M acetate 완충액 (pH 5.0) 0.5ml, 그리고 酵素液 0.5ml를 각각 넣고 37°C에서 10分間 反應시킨 다음 low alkalinity Copper試藥 1ml를 加하여 20分間 실온에서 방치한 後 20ml의 증류수를 加하여 500nm의 파장에서 吸光度(OD)를 測定하였다. 酵素活性單位는 starch로부터 生成된 還元糖의 量을 glucose의 量으로 表示하였다.

③ Protease: 菌體內의 acid protease, neutral protease, 및 alkali protease의 活性은 1.5% milk-casein溶液을 pH 3.0, pH 6.0, pH 8.0으로 各各 調節하여 基質溶液으로 만든 後 Folin試藥으로 測定하였다. 基質溶液 1ml를 시험관에 넣고 37°C에서 5分間 예열한 後 여기에 酵素液 1ml를 加하여 37°C에서 60分間 反應시킨 다음 0.4M TCA (trichloroacetic acid) 2ml를 加하여 37°C에서 25分間 反應시켜 蛋白質을 除去한 後 여과시켰다. 여과액 1ml를 0.4M Na₂CO₃ 溶液 5ml와 Folin試藥(5배희석액) 1ml를 加하여 37°C에서 20分間 反應시킨 後 660nm

의 과정에서 吸光度(OD)를 測定하였다. 酵素의 力價는 試驗値의 吸光度의 差로서 나타냈다.

7. 菌體外로 分泌된 物質의 定量

胞子形成區의 菌體에서 菌體外로 分泌된 物質은 菌體의 세척액에 溶解된 物質을 定量하였고 對照區에 있어서는 증류수에 溶解된 物質의 量을 定量하였다. 炭水化合物은 anthrone法(Scott and Melrin, 1953)으로 磷酸은 Fisk-Subbarow法(1925)으로, 蛋白質은 Lowry(1951)으로 各各 定量하였다.

結 果

1. 胞子形成에 미치는 溫度의 영향

本 研究의 豫備實驗에서 菌體의 胞子形成 時期는 水分含量이 많을수록 遲延되고, 一定量의 水分을 含有하는 菌體는 培養溫度에 따라 胞子形成時期가 달라짐을 觀察하였다. 特히 33.5%의 水分을 含有하는 菌體의 胞子形成時期는 20°C미만의 培養溫度에서 상당히 遲延되었다. 그리하여 本 實驗에서

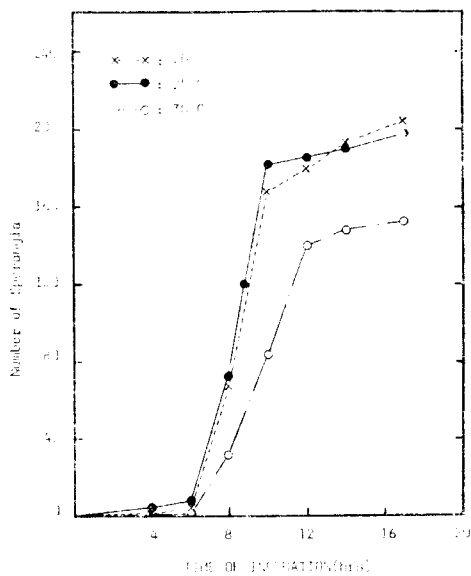


Fig. 1 Effect of temperature on the sporulation of *Rhizopus*. Figures mean numbers of sporangia per microscopic field in five counts on mycelial mat.

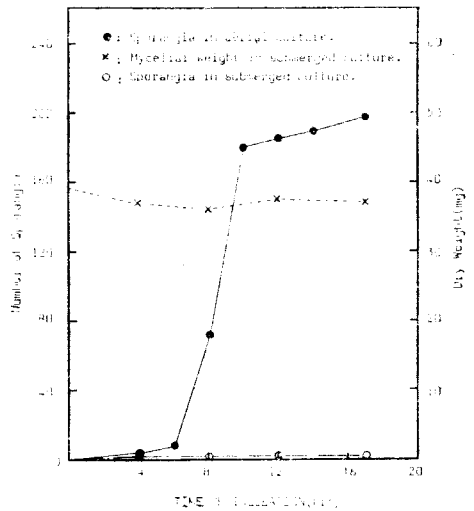


Fig. 2 Changes of mycelia weight or submerged distilled water culture and numbers of sporangia produced on the mycelial mat.

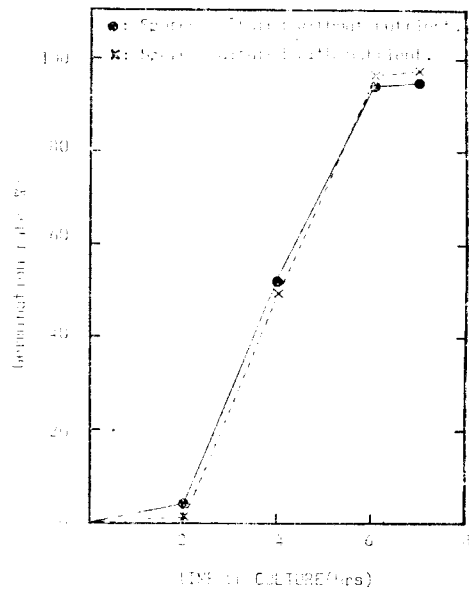


Fig. 3 Germination rate of spores cultured with nutrient and without nutrient.

33.5%의 水分을 含有하는 菌體를 20°C 以上에서 培養했을때 胞子形成에 미치는 溫度의 影響을 Fig.1에 表示하였다. Fig.1에서 보는바와 같이 20°C와 25°C에서 培養한 mycelial mat에서는 培養 6時間에서부터

10時間사이에서 거의 同調的으로 胞子囊을 形成하였다. 따라서 培養 6時間(接種 54時間)서부터 14時間(接種 62時間)까지를 胞子形成期, 培養 14時間以後를 胞子成熟期로 간주하였다.

2. 培養時間에 따른 乾量의 變化

一定量의 mycelial mat를 증류수에 液沈培養하였을 때의 菌體乾量의 變化와 胞子形成區에서의 培養時間에 따른 胞子囊의 數를 Fig. 2에 表示하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 液沈培養한 菌體에서는 胞子를 形成하지 못했고 또 菌體의 乾量의 變化도 거의 없었다.

3. 發芽能

Pfeffer's 固體培地上에서 形成된 胞子和 營養(nutrient)없이 mycelial mat에서 形成된 胞子の 發芽能은 Fig. 3에서 보는바와 같이 別 差異가 없다.

4. 菌體의 構成成分의 變化

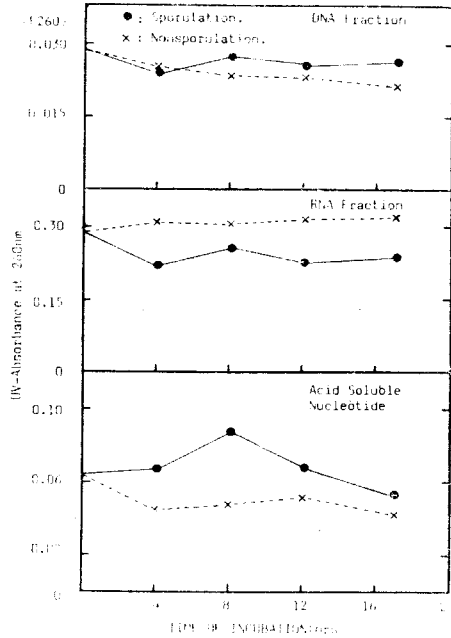


Fig. 4 Changes in amount of UV-absorbing material in the deoxyribonucleic acid fraction and the ribonucleic acid fraction, in amount of UV-absorbance of nucleotide in the acid soluble fraction of Rhizopus during sporulation and maturation.

1) Nucleotide, RNA, DNA.

胞子形成期和 成熟期の Nucleotide, RNA, DNA의 變化를 Fig. 4에 表示하였다. Fig. 4에서 보는 바와 같이 單位菌體當 DNA含量은 胞子形成期에 있어서도 큰 變化가 없었으나, 對照區에 比較해서는 약간 增加하였고 RNA含量은 對照區에 比較 오히려 減少하였다. 酸可溶性 nucleotide含量은 胞子形成期에 약간 增加하였다.

2) 폴리磷酸의 含量變化는 Fig. 5에서 보는 바와 같이 胞子形成期에 酸可溶性의 폴리磷酸含量이 현저히 減少한 반면에 酸不溶性 폴리磷酸의 含量은 相對的으로 增加하였다.

3) 기타의 磷酸化合物

酸可溶分割, 脂溶性分割, RNA分割, 蛋白質分割의 磷酸化合物은 Fig. 6에서 보는 바와 같이 酸可溶性 磷酸化合物이 胞子形成期

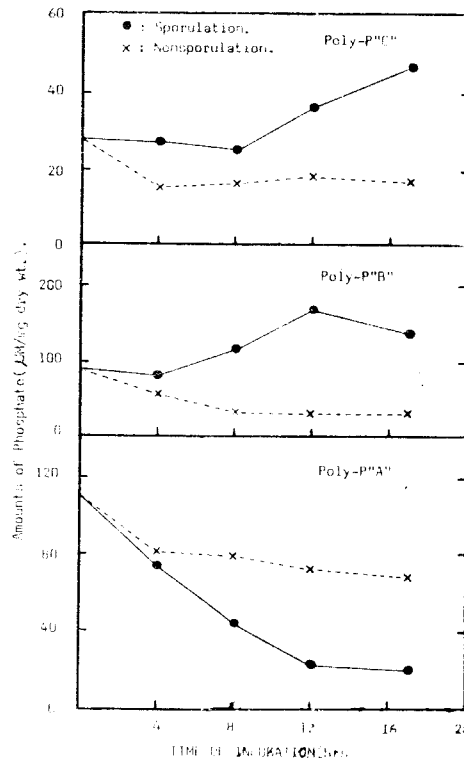


Fig. 5 Changes in amount of polyphosphate in acid soluble fraction, poly-P "B" fraction and poly-P "C" fraction of Rhizopus during sporulation.

와 成熟期를 통하여 계속적으로 減少하였고 脂溶性 磷酸化合物은 變化가 거의 없었다.

4) 炭水化物

酸可溶性分劃, 脂溶性分劃 및 酸, 알카리 不溶性分劃에 있어서의 炭水化物含量의 變化는 Fig.7에서 보는바와 같이 孢子形成期와 成熟期에 있어서 酸可溶性分劃과 脂溶性分劃에서 炭水化物的 含量이 對照區에 比하여 현저히 增加하였으나, 酸, 알카리 不溶性分劃에서는 相對적으로 減少하였다.

5) Ninhydrin 反應物質

酸可溶性分劃의 ninhydrin反應物質과 유리 아미노산, 그리고 알카리에 不安定한 蛋白質의 含量變化는 Fig.7과 Fig.9에서 보는바와 같이 알카리에 不安定한 蛋白質含量은 孢子形成期와 成熟期에 있어서 현저히 減少하였으나, 유리 아미노산과 酸可溶性 ninhydrin反應物質은 對照區에 比해 현저히 增加하였다.

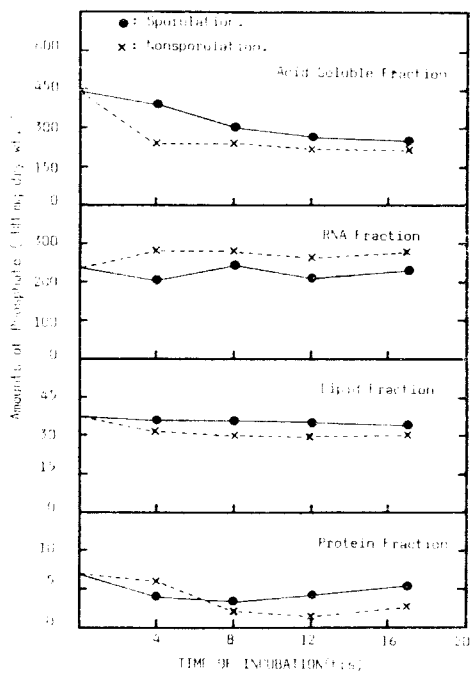


Fig. 6 Changes in amount of phosphate compounds in acid soluble fraction, ribonucleic acid fraction, lipid fraction and protein fraction of *Rhizopus* during sporulation and maturation.

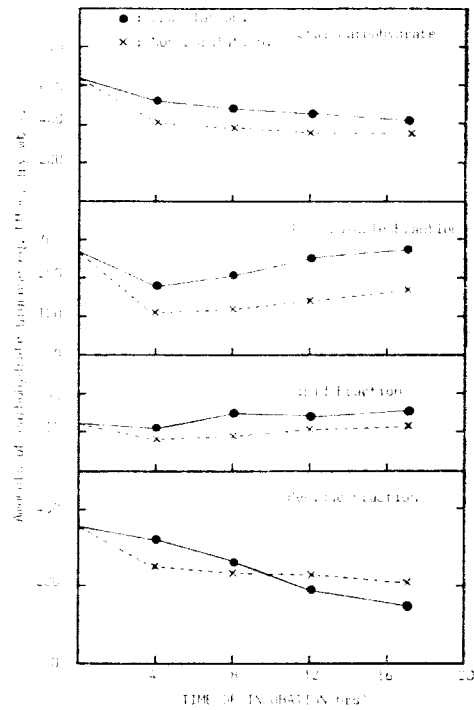


Fig. 7 Changes in amount of carbohydrate in acid soluble, lipid and alkali insoluble residual fraction of *Rhizopus* during sporulation and maturation.

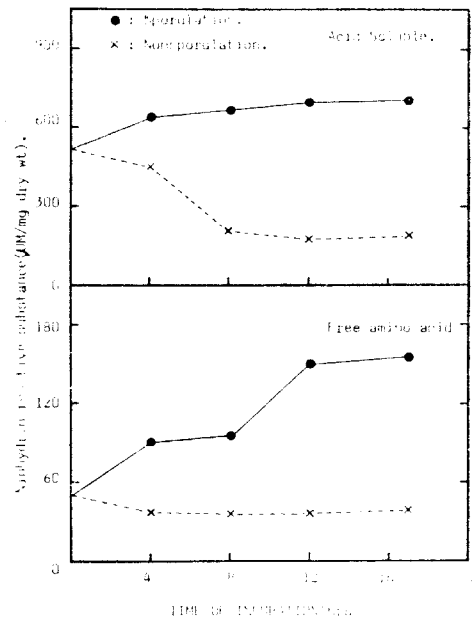


Fig. 8 Changes in amounts of ninhydrin reactive substances and free amino acid soluble fraction of *Rhizopus* during sporulation and maturation.

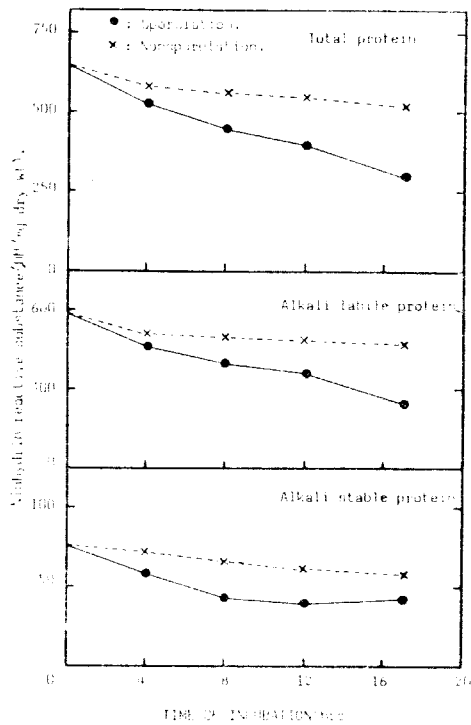


Fig. 9 Changes in amount of alkali stable protein in protein fraction and alkali labile protein ribonucleic acid fraction of Rhizopus during sporulation and maturation.

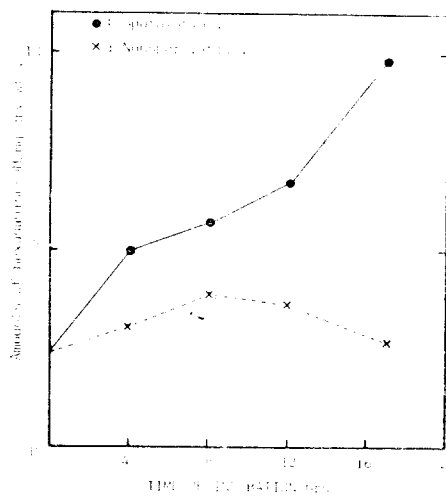


Fig. 10 Changes in amount of hexamine in acid soluble fraction of Rhizopus, during sporulation and maturation.

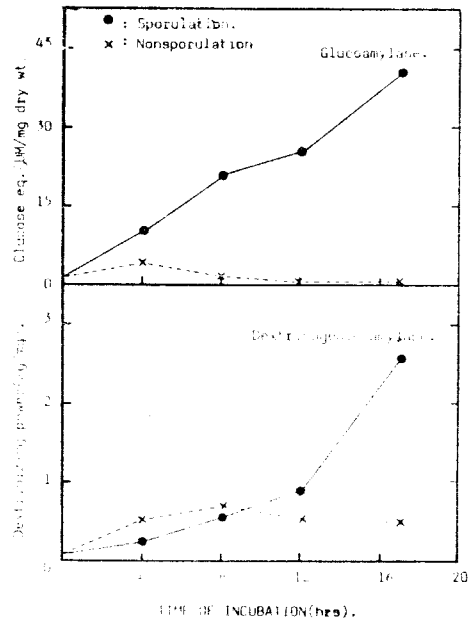


Fig. 11 Changes of amylases activities, during sporulation and maturation of Rhizopus.

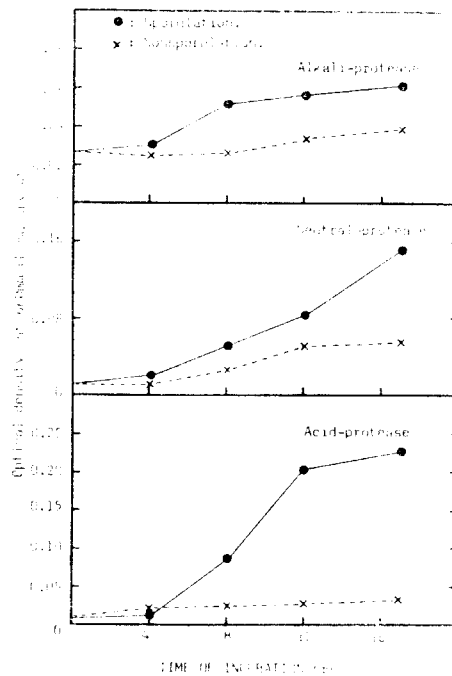


Fig. 12 Changes of protease activities, during sporulation and maturation of Rhizopus.

6) Hexosamine

*Rhizopus*의 細胞壁의 主要成分은 gluco-samine의 重合體인 chitin인데 酸可溶性分劑의 hexosamine의 含量變化는 Fig. 10에서 보는바와 같이 孢子形成期과 成熟期를 通하여 크게 增加하였다.

5. 酵素活性의 變化

1) Amylase의 活性

Amylase酵素活性의 變化는 Fig. 11에서 보는바와 같이 孢子形成期과 成熟期에 dextrinogenic와 glucoamylase活性이 對照區에 比해 현저히 增加하였다.

2) Protease의 活性

Protease酵素活性의 變化는 Fig. 12에서 보는바와 같이 孢子形成期과 成熟期에 對照區에 比해 增加하였는데, 特히 acid protease의 活性은 孢子形成期에서 현저히 增加하였다.

6. 菌體外로 分泌된 物質의 量的 變化

菌體外로 分泌된 磷酸化合物, 炭水化物 그리고 蛋白質의 量的 變化는 Fig. 13에서 보는바와 같이 孢子形成期과 成熟期를 通하여

계속적으로 增加하였다.

考 察

*Rh. nigricans*의 生長 最高溫度는 37°C (Takeda, 1949; Inui *et al.*, 1965; Lee *et al.*, 1973, 1976)로 다른 *Rhizopus*菌株에 比해 溫度에 민감하다. Yamazaki(1934)는 *Rhizopus*를 培養溫度에 따라 分類하였는데 *Rh. nigricans*의 孢子形成最高溫度는 30°C이고 最適溫度範圍는 15°C~25°C라고 하였다. 本研究에서 mycelial mat를 Petridish에 培養하였을때 孢子形成의 最適溫度範圍는 20°C~25°C로서 Yamazaki(1934)의 實驗結果와 同一한 所見을 얻었다(Fig. 1).

一般的으로 生物의 細胞數의 增加는 DNA의 量的 增加를 수반하는데 本 연구의 *Rhizopus*의 孢子形成期에 있어서 單位 菌體當의 DNA含量이 對照區에 比해 약간 增加한 것은 지극히 당연한 것이라 생각된다. 그러나 그 差異가 현저하지 않은 것은 孢子形成期에 形成된 孢子의 量이 mycelial mat의 量에 比하여 대단히 작기 때문이라고 생각된다.

細胞內의 poly-P의 動向에 對하여 Kaltwasser(1962)는 *Hydrogenomonas*에서 폴리인산이 安定한 酸不溶性物質로 轉換된다고 하였고, Harold(1962)는 ³²P로 label한 *Neurospora*를 P-free 培地에서 培養했을때 poly-P는 ATP와 orthophosphate등 酸可溶性物質로 轉換됨을 觀察하고 ATP는 poly-P에서 직접 만들어지는 것이 아니고 orthodiphosphate로부터 만들어 진다고 하였다. Miyachi(1961)등은 *Chlorella* 細胞內에서 poly-P“C”는 poly-P“A”로 轉換됨을 관찰하였고, Lee(1964)는 poly-P“B”에서 poly-P“C”로 轉換된다고 하였다. 本 研究에서 孢子形成期과 成熟期를 通하여 poly-P“A”는 계속적으로 減少하고 poly-P“B”와 poly-P“C”가 增加한 點으로 보아 酸可溶性 poly-P는 孢子形成期에 酸不溶性 poly-P로 轉換되어 磷酸의 貯藏物質로서 細胞內에 保化되는 것으로

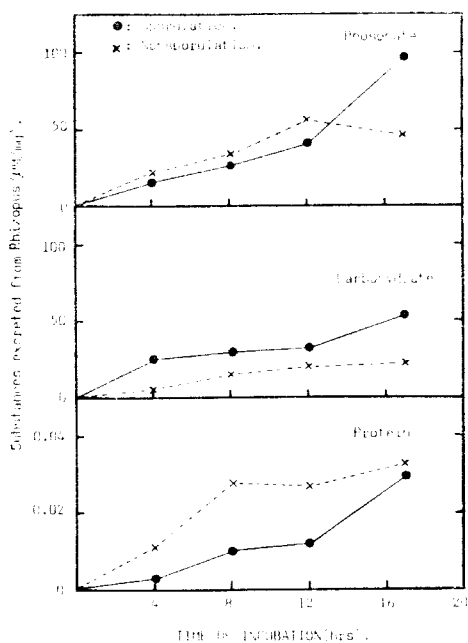


Fig. 13 Changes in amounts of substances excreted from *Rhizopus*, during sporulation and maturation.

생각된다(Fig. 5).

Rhizopus의 胞子形成期와 成熟期에 있어서 炭水化物的 含量變化는 酸알카리 不溶性 分割의 多糖類는 減少하고 反面에 酸可溶性 分割의 糖과 脂溶性 分割의 糖은 增加하였다(Fig. 7). 그리고 amylase의 酵素活性도 계속적으로 增加하였다(Fig. 11). Kitamoto(1976)등은 *Flammulina velutipes*의 子實體와 菌糸體가 發生할때 細胞內的 炭水化物的 分布를 調査하였는데 glycogen은 mycelium의 主要 貯藏物質이며 子實體에도 貯藏되어 있다고 하였다. 한편 少量의 glycogen을 含有하는 큰 子實體가 生長할 때는 mycelium과 작은 子實體에 貯藏되어 있는 glycogen은 分解되며 작은 子實體의 細胞壁多糖類도 最大 45%까지 分解된다고 하였다. 細胞壁多糖類가 分解된다는 Kitamoto(1976) 등의 結果는 本 研究에서의 酸·알카리 不溶性 分割의 多糖類가 減少하였다는 것과 一致한다.

Bromberg(1978)등은 高等菌類인 *Schizophyllum commune*가 有性的으로 胞子를 形成할때 glucoamylase 活性은 vegetative dikaryon과 胞子에서는 거의 같은 活性을 가지나 hymenium에서는 vegetative dikaryon과 胞子에서의 活性보다 12배나 높다고 하였다. Schwall(1971)는 homokaryon의 *Schizophyllum commune*가 子實體를 生成할때 amylase 活性은 發生初期에 나타나서 子實體가 成熟될때까지 계속적으로 增加한다고 하였고 이와같은 amylase 活性의 증가는 外的 營養條件에 영향을 받지 않는다고 하였다. 이러한 結果는 本 研究에서의 amylase 活性이 胞子形成期와 成熟期에 있어서 계속적으로 增加했다는 것과 잘 符合된다.

本 研究에서 Rhizopus의 胞子形成期와 成熟期에 있어서 酸·알카리 不溶性 分割의 多糖類는 減少하고 反面에 酸可溶性糖과 脂溶性 分割의 糖의 含量은 增加하였다. 그러나 炭水化物的 總含量은 계속적으로 減少하였다. 따라서 이와같은 實驗結果는 菌體의 多

糖類는 胞子形成期와 成熟期에 있어서 계속적으로 分解되어 에너지原으로서 쓰일 뿐만 아니라 새로운 物質合成에 必要한 材料가 된다고 생각된다.

胞子形成區의 ninhydrin反應物質의 含量變化를 보면 蛋白質 特히 알카리에 不安정한 蛋白質含量은 胞子形成期 및 成熟期에 현저히 減少하였으나, 유리 아미산 및 酸可溶性 分割의 ninhydrin反應物質은 對照區에 비해 현저히 增加하였다(Fig. 8, Fig. 9). 그런데 기아상태에서는 細胞內的 蛋白質과 RNA分解가 일어난다는 것은 特徵적이다(Pine, 1972; Goldberg & John, 1974, 1976; Halvorson, 1958). Hopper(1974)등은 胞子形成을 하는 *Saccharomyces cerevisiae*에서 高分子物質의 代謝를 연구하였는데, 胞子形成하는 菌株는 胞子를 形成하지 않는 菌株에 비하여 RNA와 蛋白質의 分解率이 높음을 관찰했다. Labbe(1976)등은 *Clostridium perfringens*가 胞子를 形成할때 Bacillus의 合成率은 減少하고 蛋白質의 分解率은 營養細胞의 生長때 보다 4배나 높고 Bacillus의 蛋白質分解率보다는 낮다고 하였다. Lodi(1974)는 문곰팡이류 *Blastocladiella emersonii*의 生活史를 통해서 볼때 蛋白質分解率은 胞子形成때가 가장 높다고 하였다. Mandelstam(1968)등은 蛋白質을 分解하지 못하는 *Bacillus subtilis*의 變異株는 胞子를 形成하지 못한다고 하였다. 胞子를 形成하는 菌株에서 胞子形成期에 蛋白質分解가 旺盛하게 일어난다는 Hopper(1974), Labbe(1976) 그리고 Lodi(1974)의 實驗結果와 本 研究에서의 實驗結果가 一致한다. 이와같은 結果는 胞子形成에 직접 관여하지 않는 不必要한 蛋白質을 分解하여 새로운 物質合成을 위한 材料의 제공이라고 볼 수 있다.

Schaeffer(1969)와 Aronson(1971)등은 protease 活性과 蛋白質의 分解 및 胞子形成과는 밀접한 關係가 있다고 報告하였다. 細菌類가 胞子를 形成할때 protease 活性에 관한 研究는 주로 extracellular protease 活性에 관한 것이 많으나(Mandelstam, 1968;

Aronson *et al.*, 1971), Setlone(1973)은 *Bacillst megaterium*가 포자를 형성할 때 extracellular protease 활성을 발견하지 못하고 intracellular protease 활성은 영양세포에서 보다 50배나 높다고 하였다. 한편 Szulmajster(1975) 등은 protease 활성을 갖지 않는 *Bacillus subtilis*의 변이株는 단백질을 분해하지 못하며 포자도 형성하지 못한다고 하였다. Bromberg(1978) 등은 *Schizophyllum commune*이 形態發生때 protease 활성이 pH에 따라 달라짐을 관찰하고 하나 이상의 protease가 形態發生에 관여한다고 하였다. Heinrich(1976)와 Klar(1975) 등도 *Saccharomyces cerevisiae*가 포자形成때 단백질의 분해와 여러 종류의 protease 활성이 나타남을 보았다. 특히 Kleinrich(1976) 등은 단백질의 분해는 일정한 비률로 일어나며 子囊이 成熟될때까지 지속된다고 하였다.

本 究突에서 孢子形性期和 成熟期에 있어서 acidic protease, neutral protease, alkaline protease 활성이 對照區에 比하여 현저히 增加한 것은 Heinrich(1976)와 Bromberg(1978)의 見解와 一致한다.

Galbraith(1969) 등은 少量의 窒素源을 포함하는 培地에서 *Aspergillus niger*를 진탕배양하여 孢子形成을 유발시켰다. Morton(1954)과 Morton(1961)은 *Penicillium*을 액침배양할때 孢子形成의 가장 적절 한 條件은 利用可能한 炭素源의 存在下에 窒素源이 없거나 고갈된 상태라고 하였다. 이와같은 結果는 本 研究에서 孢子形成期和 成熟期에 增加하는 protease와 amylase의 生成은 菌體自體內에서 分解된 아미노산을 利用하여 合成된 것으로 생각되며 이들 酵素 특히 protease는 孢子形成과 밀접한 關係가 있다고 생각된다.

摘 要

*Rhizopus nigricans*의 孢子形成의 最適條件 및 孢子形成期에 있어서의 物質代謝의 特性을 밝히고서 孢子形成期和 成熟期에 一定量의 菌體를 收穫하여 여러가지 構成成分으로 分割하고 그 含量을 測定함과 同時에 菌體의 分化過程에 따른 酵素活性의 變化를 測定하여 對照區의 結果와 比較하였다.

1. 증류수에 액침배양한 對照區에서는 포자를 형성하지 못했고, 空氣中에 노출한 實驗區에서는 포자를 형성하였다. 이때 孢子形成의 最適溫度의 範圍는 20°C~25°C였다.
2. 단백질 특히 알칼리에 不安定한 蛋白質含量은 孢子形成期 및 成熟期에 현저히 減少하였으나 유리 아미노산 및 酸可溶性分割의 ninhydrin反應特質은 對照區에 比해 현저히 增加하였다.
3. 孢子形成期에 酸可溶性 poly-P 含量은 현저히 減少하였으나 酸不溶性 poly-P 含量은 相對적으로 增加하여 酸可溶性 poly-P로부터 酸不溶性 poly-P로 磷의 轉換이 일어나고 있음을 나타내었다.
4. 孢子成期에 酸可溶性分割의 炭水化合物과 hexosamine의 含量은 增加하나 酸·알칼리 不溶性分割의 多糖類는 減少하였다.
5. 孢子形成期에 單位 菌體當의 DNA含量은 對照區에 比해 약간 增加하였으나 RNA含量은 對照區에 比해 오히려 減少하였다.
6. Amylase活性과 protease 특히 acid protease 활성은 孢子形成期和 成熟期을 通하여 對照區에 比해 현저히 增加하였다.

REFERENCES

1. Aronson, A., N. Angelo and S. Holt, 1971. Regulation of extracellular protease production in *Bacillus cereus* T. *J. Bact.* **106**, 1016~1025.
2. Bromberg, S. K. and M. N. Schwalb, 1978. Sporulation in *Schizophyllum commune*. *Mycologia* **70**, 418~486.
3. Burgeff, H., 1924. Untersuchungen über sexualität und parasitismus bei *Mucern-*

- ieen. I. Bot. Abh.* **4**, 5~155.
4. Elson, L.A. and W.T.J. Morgan, 1933. *Biochem. J.* **27**, 1824. In methods of biochemical analysis (David Glick ed. **6**, 1958.
 5. Fiske, C.H. and Y. Subbarow, 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375.
 6. Foster, J.W., and S.A. Waksman, 1939. Fumaric acid formation associated with sexuality in a strain of *Rhizopus nigricans*. *Science* **89**, 37.
 7. Galbraith, J. C. and J. E. Smith, 1969. Sporulation of *Aspergillus niger* in submerged liquid culture. *J. Gen. Microbiol.*, **59**, 31~45.
 8. Goldberg, A. L. and A.C. St. John, 1974. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. *Annu. Rev. Biochem.* **43**, 835~869.
 9. Goldberg, A.L., and A.C. St. John. 1976. Intracellular protein degradation in mammalian and bacterial cells. part 2. *Ann. Rev. Biochem.* **45**, 747~809.
 10. Halvorson, H. 1958. Intracellular protein and nucleic acid turnover in resting yeast cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **27**, 255~265.
 11. Harold, F.M., 1962. Depletion and replenishment of the inorganic polyphosphate pool in *Neurospora crassa*. *J. Bact.* **83**, 1047~1057.
 12. Heinrich, B. and U. Weiser, 1976. Protein degradation and proteinase during sporulation. *Eur. J. Biochem.* **62**(1), 65~76.
 13. Hopper, A.K., P.T. Magee, S.K. Welch, M. Friedman, and B. D. Hell. 1974. Macromolecule synthesis and breakdown in relation to sporulation and meiosis. *J. Bact.* **119**, 619~628.
 14. Inui, T., Y. Takeda and H. Iizuka, 1965. Taxonomical studies on Genus *Rhizopus*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **11**, 2^o Suppl. 1~121.
 15. Kaltwasser, H., 1962. Die rolle per polyphosphate in phosphats toffwechsel eines Knallgasbakteriums. *Arch. Mikrobiol.* **41**, 382~406.
 16. Kitamoto, Y. and H.E. Gruen, 1976. Distribution of cellular carbohydrates during development of the mycelium and fruit bodies of *Flammulina velutipes*. *Plant Physiol.* **58**, 485~491.
 17. Klar, A.J. S. and H.O. Halvorson, 1975. Proteinase activities of *Saccharomyces cerevisiae* during sporulation. *J. Bact.* **124**(2), 836~869.
 18. Labbe, R. and C.L. Duncan, 1976. Synthesis of deoxyribonucleic acid, rebonucleic acid and protein during sporulation of *Clostridium perfringens*. *J. Bact.* **125**, 444~452.
 19. Lee, Y., 1964. Studies on the phosphate metabolism in *Chlorella* with special references to polyphosphate. *Kor. J. Microbiol.* **2**, 1~11.
 20. Lee, Y. and H. Yoon, 1973. Studies on the amylase of *Rhizopus* (1). *Kor. J. Microbiol.* **11**, 31~50.
 21. Lee, Y. N., *et al.*, 1976. Studies on the enzyme activities of *Rhizopus* distributed in South Korea (1). *Kor. J. Microbiol.* **14**, 49~56.
 22. Lodi, W.R. and D. R. Sonnehorn, 1974. Protein degradation and protease activity during the life cycle of *Blastocladiella emersonni*. *J. Bact.* **117**(3), 1035~1042.
 23. Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall, 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265~275.
 24. Mandelstam, J. and W. Waites, 1968. Sporulation in *Bacillus subtilis*. The role of exoprotease. *Biochem. J.* **109**, 793~801.
 25. Miyachi, S. and H. Tamiya, 1961. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing *Chlorella* cells. *Plant & Cell Physiol.* **2**, 405~414.

26. Miyachi, S. and S. Miyachi, 1961. 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.
27. Morton, A. G., 1961. The induction in mould fungi. *Proc. R. Soc. B.* **153**, 548.
28. Morton, A. G. and A. MacMillan, 1954. The assimilation of nitrogen from ammonium salts by fungi. *J. Epx. Botany* **232**.
29. Naganishi, H., and N. Kawakami, 1955. Faculty Engineering. Hiroshima Univ. (Japan) **4**, 303.
30. Nalson, N., 1944. A photomeric adaption of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.* **153**, 375~380
31. Niethammer, A., 1938. Wachstum versuche mit mikroskopischen Boden pilzen. *Arch. Mikrobiol.* **9**, 23~30.
32. Pine, M. J., 1972. Turnover of intracellular protein. *Ann. Rev. Microbiol.* **26**, 103~126.
33. Schaeffer, P., 1969. Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes, and exotoxins. *Bacteriol. Rev.* **33**, 48~71.
34. Schmidt, G., and S. J. Tannhauser, 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, rebonucleic acid and phosphoprotein in animal tissues. *J. Biol. Chem.* **161**, 83~89.
35. Schwalb, M. N., 1971. Developmental regulation of amylase activity during fruiting of *Schizophyllum commune*. *J. Bact.* **108**, 1205~1209.
36. Scott, T. A. and E. H. Melvin, 1953. *Anal. Chem.* **25**, 1656. In methods in carbohydrate chemistry, Vol. 1. (Whitler, R. L. et al., ed.) 1972. Academic Press Inc.
37. Sestlow, P., 1973. Dexnribonucleic acid synthesis and deoxynucleotide metabolism during bacterial spore germination. *J. Bact.* **114**, 1099~1107.
38. Swingle, D. B., 1903. Formation of spores in the sproangia of *Rhizopus nigricans* and *Phycomyces nitens*. *U.S. Dept. Agr. Bur. Plant Ind. Bull.* **37**, 1~40.
39. Szulmajster, J., E. Keryer and P. Duie, 1975. Isolation and properties of thermosensitive sporulation mutant of *Bacillus subtilis* deficient in intracellular protease activity. pp. 281~278. In P. Gerhardt., R. Costilow and H. Sadoff (ed.), Spores IV. American Society for Microbiology. Washington, D.C.
40. 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.
41. Takeda, Y., 1949. The Classification of the genus *Rhizopus*. A manual of fermentation industry., pp. 267~269, Osaka, Japan: Sobunkan, 6th ed.
42. Yamajaki, M., 1934. On the classification of *Rhizopus* species. *Bull. Utsunomiya Agr. Coll.* **5**, 1~16.