

靈芝의 모노뉴클레오티드 성분의 분포에 관한 연구

金 鍾 協 · 南 廷 淑*

同德女子大學 · 梨花女子大學校 藥學大學*

Studies on Distribution of the Mononucleotides in *Ganoderma lucidum*

Jong Hyup Kim and Jeong Sook Nam*

Dong-Duck Women's University, Seoul 132 and *College of Pharmacy

Ehwa Womans University, Seoul 120, Korea

Abstract: Ribonucleic acid contents and mononucleotides distribution from the mycelium and fruit bodies of *Ganoderma lucidum* were studied. P.E.I. cellulose TLC and HPLC were applied in this study. The obtained results are as follows; The levels of ribonucleic acids from the young basidiocarp mycelium were higher than those of mature basidiocarp. Guanosine 5'-monophosphate and xanthosine 5'-monophosphate were found in both young basidiocarp mycelium and mature basidiocarp. The levels of guanosine 5'-monophosphate and xanthosine 5'-monophosphate from the young basidiocarp were higher than those of the mature basidiocarp. However, inosine 5'-monophosphate was not detected.

Keywords: Basidiomycetes, *Ganoderma lucidum*, Mononucleotides, Ribonucleic acids, Guanosine-5'-monophosphate, Xanthosine 5'-monophosphate,

미생물이 분화를 할 때에는 2차 대사물질(secondary metabolite)이 생성된다(Smith and Berry, 1974) 새로운 종류의 효소에 의해 새로운 구조 및 기능단백질이 생합성되며, 이러한 단백질의 합성에는 고에너지 인산 그룹이 필요하다.(Lehninger, 1982) Kim 등은 검정곰팡이가 분화를 할 때 고인산화 뉴클레오티드가 생성하며, 또 그 함량이 있어서도 변동이 있음을 확인하였으며 특히 포자형성시 그 양이 증가함을 밝혔다.(Kim, 1982) Nakajima 등은 건조된 표고의 열수추출액에서 여러 종류의 뉴클레오티드들이 같은 mole 비로 존재함을 밝힌 바 있다.(Nakajima, 1961) David 등은 GMP와 guanosine이 버섯의 주된 핵산물질로서 존재한다고 하였다.(David and Velisek, 1975) 버섯의 발생에는 여러 단계가 필요하며 매 단계마다 새로운 효소나 물질이 필요하다.(Daividson, 1950)

본 실험에 사용된 영지는 전래로부터의 약으로 많이 이용되어 왔으며 최근에는 Kim등에 의해 항암작용이 있음과 항암성분이 단백질성 다당류임이 밝혀진 바 있

다.(Kim *et al.*, 1980) 특히 핵산물질은 단백질의 생합성에 필수적이며 각 발생단계에 따라 그 함유비율 및 성분이 변화한다고 생각된다. 따라서 버섯의 자실체 형성 전후에 있어서 어떤 종류의 뉴클레오티드들이 많이 생성하는가를 추궁한다면 자실체 및 담자포자의 형성과 관련된 대사의 유형을 규명할 수 있을 것으로 생각되어 본 연구를 실시하였다.

재료 및 방법

재 료

추출에 사용한 영지는 포자 접종 후 4주와 8주된 것이며 4주째 된 균사체는 자실체 형성전, 8주째 된 것은 자실체 형성후의 것이다.

Thin Layer Chromatography(이하 TLC라 한다)용으로는 polyethyleimine(이하 P.E.I.라 한다.) cellulose 완제품(Merck Co., 두께 0.5mm)을 사용하였다.

High Performance Liquid Chromatography(이하

HPLC라 한다.) 기기는 Waters Associates의 Model 6000 Solvent Delivery System과 Model 660의 Solvent Programmer, Model 440의 UV-Absorbance Detector, Omniscribe의 Recorder를 사용하였다.

Sodium dodecyl sulfate(이하 SDS라 한다.), D-ribose, adenosine 5'-monophosphate(이하 AMP라 한다), guanosine 5'-monophosphate(이하 GMP라 한다), uridine 5'-monophosphate(이하 UMP라 한다), xanthosine 5'-monophosphate(이하 XMP라 한다) 등은 모두 Sigma사 제품을 사용하였다.

RNA의 추출 및 가수분해

a. 총 RNA의 표준검량선 작성

표준물질로는 yeast ribonucleic acid(이하 RNA라 한다. Sigma Co.)를 사용하였다. 50mg의 yeast RNA를 평량하여 0.3N NaOH 3.5ml에 용해시켜 37°C 18시간 가수분해한 후, NH₄Cl로 중화하고 실온으로 하여 2.5, 5, 10, 15, 20 및 25 µg/ml농도의 표준시료용액을 제조하였다. 이 용액을 Shimadzu Co.의 Recording Spectrophotometer UV-240을 이용하여 260nm에서 흡광도를 측정하여 표준 RNA의 농도에 대한 흡광도를 플롯하였다.

b. 영지 자실체로부터 RNA의 추출 및 가수분해

RNA추출방법은 Crestfield법을 이용하였다(Crestfield *et al.*, 1955; Crestfield *et al.*, 1966). 2%의 SDS와 4.5%의 ethanol, 0.0125M의 NaH₂PO₄, 0.0125M의 Na₂HPO₄가 함유된 250ml의 용액을 뚜껑이 있는 용기에 넣고 가열하여 끓기 시작하면 잘게 자른 75g의 영지를 넣고 1분간 더 가열하였다. 100°C 수욕상에서 2분간 가열하여 거품을 제거한 후 즉시 dry ice로 채워 냉각된 용기에 쏟아부어 4~8분내에 4°C로 냉각시켰다 이것을 0°C 2000rpm에서 30분간 원심분리 후 상층액에 2배의 냉 ethanol을 첨가하여 2000rpm으로 15분간 원심분리하였다. 침전물을 67% 냉 ethanol 75ml로 2회 세척한 후 2N NaCl 용액 5~10적을 떨어뜨려 flocculation 시킨 다음 최소량의 80% ethanol을 첨가하여 0°C~4°C에서 하룻밤 방치하였다.

침전물을 소량의 증류수에 녹인 후 1N CH₃COOH를 넣어 pH 7로 맞추었다. 0°C 20,000rpm으로 30분간 원심분리 후 상층액에 고체 NaCl을 넣어 1M 농도로 한 후 0°C에서 30분간 방치하였다. 0°C 2000rpm에서 1시간 원심분리 후 침전물을 2N NaCl 0.5ml가 함유된 75ml의 67% ethanol로 3회 세척한 후 소량의 증류수에 녹여 4°C에서 36시간 투석하였다. Büchner-funnel위에서 glass-wool로 여과한 후 동결건조하였다.

G. lucidum (Mycelium & Basidiocarp)

2% SDS, 1 min. 4°C cooling
spinning 2000 rpm. 0°C 30 min.

Supernatant

2 vol. Abs EtOH, spinning 2000 rpm. 15 min.

Precipitate

Washing (67% EtOH), Flocculation. Standing overnight. spinning 2000 rpm. 0°C 15 min.

Precipitate

Dissolveing in dist. water, Adjusting to pH7
spinning 20,000rpm, 0°C 30 min

Supernatant

Add. solid NaCl to 1 M-conc. stand at 0°C 30 min. spinning 2000 rpm. 1hr.

Gel

Washing (67% EtOH) 3 times.

Precipitate

Dissolving in dist. water.

Solution

Dialysis at 4°C. 36hr.

Flitration

Lyophilization.

Pure RNA

Fig. 1. Scheme of extraction of total RNA from *G. lucidum*.

이 방법을 요약한 것은 Fig. 1와 같다. 동결건조로 얻은 RNA를 0.3N NaOH로 37°C에서 18시간 가수분해하였다. 과량의 NaOH는 NH₄Cl로 중화한 후 260nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량선을 이용하여 정량하였다. 표준검량선은 yeast ribonucleic acid(Sigma사)를 표준품으로 해서 작성하였다.

Orcinol 반응(Norris and Ribbons, 1971)을 이용한 RNA의 검량곡선 작성

a. Ribose의 표준검량선 작성

표준물질로서 D-ribose(Sigma Co.)를 사용하였다. 50mg의 D-ribose를 평량하여 증류수에 녹인 후 희석하여 12.5, 25, 50, 75 및 100 µg/ml농도의 표준시료용액을 제조하였다. Orcinol시약은 FeCl₃·6H₂O 90mg을 100ml의 HCl (Sp. gr. 1.186)에 용해시킨 용액과 orcinol 0.25g을 25ml의 증류수에 용해시킨 용액을 4:1의 비율로 섞어 사용직전에 조제하였다. Glass-stoppered test tube에 시료 1ml를 넣은 후 사용직전에 조제한 orcinol 시약 3ml를 첨가한 후 100°C 수욕상에서 20분간 가열하였다. Cold tap water로 냉각시킨 후 n-butanol을 넣어 15ml가 되게 한 후 672nm에서 흡광도를 측정하여 표준 ribose의 농도에 대한 흡광도를 플

로트 하였다.

b. Orcinol 반응을 이용한 영지의 총 RNA 정량
추출한 RNA를 알카리로 가수분해 한 후 그 가수분
해액에 대해 orcinol 반응으로 총 RNA양을 정량하였
다. 672nm에서 흡광도를 측정하여 표준검량곡선을 이
용하여 정량하였다.

**P.E.I. Cellulose를 이용한 TLC 크로마토그램 작
성**

a. P.E.I. Cellulose를 이용한 표준뉴클레오티드의
TLC크로마토그램 작성

Randerath와 Randerath의 stepwise development 방
법(Randerath, 1961, 1962; Randerath and Randerath
1965; Neuhard *et al.*, 1965; Randerath and Randerath)
을 적용하였다. P.E.I. cellulose 완제품(0.5mm,
Merck Co.)를 사용하였으며 전개용매로는 0.5M, 1.0
M 및 1.5M LiCl용액을 사용하여 표준뉴클레오티드
의 TLC를 실시하였다.

전개하기 전에 sheet를 10% NaCl 용액으로 5cm까
지 전개시킨 후 증류수로 끝까지 전개시켰다. 적어도
2시간을 실온에서 건조시킨 후 다시 증류수로 끝까지

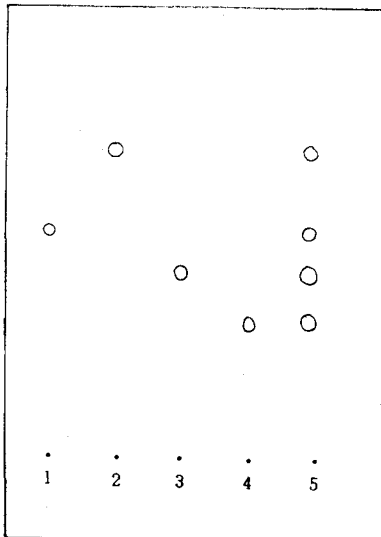


Fig. 2. Features of the nucleotides in P.E.I. cellulose TLC. TLC conditions:

Layer: P.E.I. cellulose (0.5mm, Merck Co.)
Solvent: Stepwise development with lithium chloride solvents

0.5M 5min, 1.0M 10min, and 1.5M 35min.

1. AMP 2. UMP 3. GMP 4. XMP 5. Com
pounds 1, 2, 3, and 4

Table I. R_f values of the nucleotides on thinlayer chromatogram with P.E.I. cellulose.

Compounds	R _f values
AMP	0.59
UMP	0.80
GMP	0.51
XMP	0.41

Running conditions of stepwise development of TLC

0.5M	LiCl	5min
1.0M	LiCl	10min
1.5M	LiCl	35min

전개시켜 sheet를 완전히 활성화시켰다. AMP, UMP,
GMP 및 XMP를 10 μ g/ μ l의 농도로 물에 용해시킨 후
2 μ l씩 P.E.I. cellulose sheet 위에 spotting하였다. 불
순물을 제거하기 위해 300ml의 무수메탄올에 약 15분
간 넣어 흔들어 주었다. Sheet를 꺼내어 실온에서 건조
시킨 후 0.5M LiCl에 5분, 1.0M LiCl용액에 10분 그
리고 1.5M LiCl용액에 35분간 전개시켜 총 50분 간을
stepwise development를 진행시켰다. Sheet를 꺼내어
건조시킨후 UV-lamp로 암소에서 spot의 위치를 확인
하였다.

표준물질의 전개상태는 Fig. 2에 나타나 있으며 그
R_f치는 Table I과 같다.

b. P.E.I. cellulose를 이용한 영지의 뉴클레오티드의
TLC크로마토그램 작성

알카리로 가수분해한 영지의 RNA 용액을, 활성화하
시킨 P.E.I. cellulose sheet에 10 μ l씩 spotting하여 실
온에서 건조시켰다.

이 sheet를 무수메탄올 300ml가 담긴 plate에 담가불
순물을 제거한 후 꺼내어 완전히 건조시킨 후 0.5M,
1.0M, 및 1.5M LiCl 용액에서 총 50분간 stepwise
development를 행하였다. 다시 건조시킨 후 UV-lamp
로 암소에서 모노뉴클레오티드의 이동 위치를 확인하
였다.

**HPLC를 이용한 각 모노뉴클레오티드의 분리와
정량¹⁹⁻²⁴⁾**

a. 표준물질에 의한 표준뉴클레오티드의 크로마토그
램 작성

Brockman등(1977), Hartwick등(1975), Anderson등
(1976), Kennedy등(1970), Rustum등(1978) 및 Brown등
(1982)의 보문을 참고로 표준물질인 AMP, UMP, GMP
및 XMP를 각 50ng/ μ l의 농도로 제조하여 실시하였다.

모든 수용액은 Millipore type HA 0.45 μ m filter로 유기용매는 type HF 0.5 μ m filter로 탈기, 여과하여 사용하였다. 시료용액 또한 모두 탈기, 여과하였다.

Column을 HPLC용 methanol과 증류수로 충분히 세척한 다음 baseline이 안정이 되면 A pump에는 0.01M NH₄H₂PO₄ (pH 3.0) 용액을 통해 주었고 B pump에는 0.125M NH₄H₂PO₄ (pH 5.0) 용액을 통해 주었다. 시료를 주입함과 동시에 B pump의 0.125M NH₄H₂PO₄ 용액이 30분간 0%에서 50%의 농도로 linear gradient로 column안을 하도록 하였다. 시료를 주입한 후 나타나는 각 peak의 retention time, 흡광도 및 높이를 측정하였다.

표준물질을 각 50ng/ μ l로 조제한 용액을 1 μ l, 2 μ l, 3 μ l 및 5 μ l씩 주입하여 표준검량곡선을 작성하였다.

표준물질의 정성은 retention time으로 하였으며 표준검량선의 작성은 각 표준물질의 농도에 대한 peak height를 기준으로 하였다.

b. 영지로부터 추출한 RNA 가수분해물의 HPLC 크로마토그램 작성

영지로부터 추출한 RNA의 알카리 가수분해물을 NH₄Cl로 중화시킨 후 HPLC를 사용하여 분리하였다. 각 peak에 대한 확인은 표준물질의 첨가법 (Brockman *et al.*, 1977)을 이용하였다. Peak height를 측정할 후 표준검량선을 참조하여 정량하였다.

결 과

표준물질로 사용한 yeast RNA의 표준검량곡선을 기준으로 하여 정량한 결과, 자실체 형성 전의 영지에는 총 94.68mg%의 RNA가 함유되어 있고, 자실체 형성 후의 영지에는 총 60.95mg%의 RNA가 함유되어 있음을 알 수 있었다.

P.E.I. cellulose를 이용하여 영지의 RNA를 TLC한 결과는 Fig. 3과 같다.

영지의 RNA에는 GMP와 XMP가 있음이 확인되었으며 unknown spot는 CMP (Stahl 1973)라고 생각된다.

Table II. Levels of the nucleotides in alkaline hydrolytes of RNA extracted from *G. lucidum*.

	Mycelium mg%	Basidiocarp mg%
GMP	7.19	4.02
XMP	8.43	3.67

HPLC를 사용하여 영지의 RNA 가수분해물을 분석한 결과는 Fig. 4과 같으며 표준검량선에 의해 정량한 결과는 Table II과 같다.

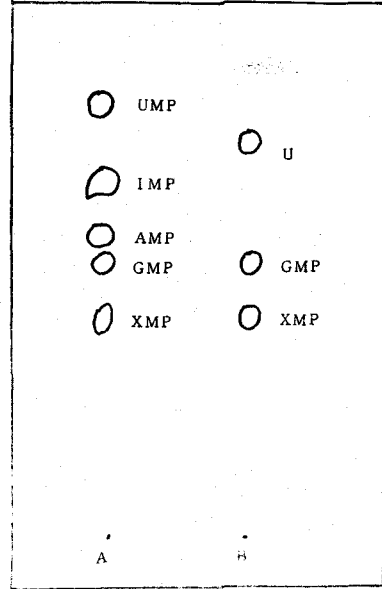


Fig. 3. Thin layer chromatogram of mononucleotides from *Ganoderma lucidum*.

- A. Features of the standards AMP, GMP, XMP and UMP.
- B. Features of the RNA hydrolytes of *G. lucidum*.

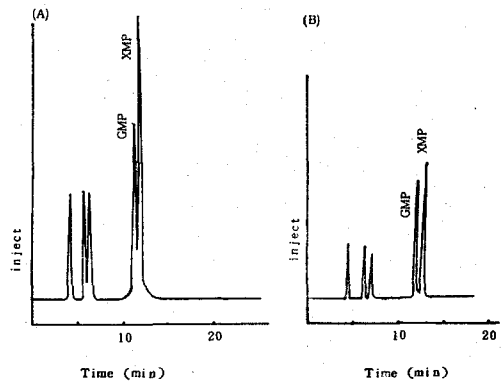


Fig. 4. HPLC chromatograms of mononucleotides from *Ganoderma lucidum*.

- A. Alkaline hydrolytes of RNA extracted from mycelium.
- B. Alkaline hydrolytes of RNA extracted from basidiocarp.

고 찰

영지의 자실체 형성 전후에 걸쳐서 basidiocarp 형성 이전의 균사체와 basidiocarp 형성 이후의 균사체를 실험재료로 하여 총 RNA를 Crestfield법으로 추출하여 그 함량을 분석한 결과는 각각 94.68mg%, 60.95mg%로 나타났다. 따라서 basidiocarp 형성전의 균사체의 RNA가 형성 후의 것 보다 55.34%가 많았다. 그러므로 자실체 형성 전에 핵산대사가 활발하며 핵산함량이 많음을 알 수 있었다. 이와 같은 경향은 Kim 등의 논문에서도 지적된 바 있다. (1982).

총 RNA 분석치는 Nakajima의 표고버섯건조물을 분석한 값과 상당히 유사하였다(1961).

일반적으로 pentose의 이론치는 42.93%이나 추출물에서의 pentose의 양은 43.79%로 거의 유사하였다.

버섯의 총 RNA함량은 yeast의 총 RNA함량 3.95% (건조 중량) 보다는 매우 적다. (Davidson, 1950)

P.E.I. cellulose TLC로 전개한 것에서는 XMP와 GMP의 존재가 확인되었고 CMP가 나타나는 위치에 spot가 있었다. 따라서 이것은 CMP로 추측된다(Stahl, 1973)

버섯의 RNA를 가수분해한 것을 HPLC로 분석한 결과 peak가 5개 있었으며 GMP와 XMP는 표준물질과 대조하여 확인되었으나 나머지는 확인되지 않았다. 다만 첫번째 peak는 CMP라 생각된다. (Brown *et al.*, 1982).

일반적으로 GMP는 대사과정상 XMP로부터 생성되며 XMP는 IMP로부터 생성된다. (Lehninger, 1982) 그러나 버섯의 RNA가수분해물에서는 IMP가 전혀 나타나지 않았으며 Nakajima의 문헌에서도 IMP의 존재가 증명되지 않았다. 따라서 버섯에는 IMP가 극히 미량이거나 또는 XMP가 다른 중간체로부터 대사된 것이 아닌가 생된다.

Ribosome상의 translation과정에서 GMP는 GTP의 전구물질이며 peptide elongation에 관하여는 중요한 뉴클레오티드이므로 basidiocarp가 생성되기 전에 GMP가 많다는 것은 protein 합성이 왕성함과 관련되는 것으로 생각된다. (Lehninger, 1982).

버섯의 basidiocarp형성시 유독히 GMP가 많이 존재한다는 것은 여러종류의 protein이 존재할 것이라고 생각되며 인체에 유익한 약리작용을 나타내는 물질의 생성에 관여할 지도 모른다고 생각된다.

적 요

Ganoderma lucidum (Fr.) Karsten을 실험재료로 하여 자실체형성 전후의 RNA를 추출 정량하였다.

버섯의 자실체 형성 전후에 걸쳐 총 RNA함량에 차이가 있었으며 자실체 형성 전에 총 RNA함량이 두드러지게 많았다.

버섯의 추출물인 RNA를 알칼리 가수분해한 것을 P. E.I. cellulose TLC로 전개한 결과 GMP와 XMP가 확인되었으며 미확인물질로서 한개의 spot가 나타났다.

이것은 위치로 보아 CMP가 아닌가 생각된다.

영지의 RNA추출물을 HPLC로 분석한 결과는 XMP와 GMP가 확인되었으며 그 함량은 각각, 자실체 형성 전의 GMP는 7.19mg%, XMP는 8.43mg%, 형성 후의 GMP는 4.02mg%, XMP는 3.67mg%의 함량분포를 나타내었다.

문 헌

- Anderson, F.S., and Murphy, R.C. (1976): Isocratic separation of some purine nucleotide, nucleoside and base metabolites from biological extracts by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatog.* 121:251~262.
- Brockman, R.W., Shaddix, S.C., and Rose, L.M. (1977): Biochemical aspects of chemotherapy of mouse colon acarcinoma. *Cancer* 40:2681~2691.
- Brown, E.G., Newton, R.P., and Shaw, N.M. (1982) Analysis of the free nucleotide pools of mammalian tissues by high-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* 123:378~388.
- Crestfield, A.M., Smith, K.C., and Allen, F.W. (1955): The preparation and characterization of ribonucleic acids from yeast. *J. Biol. Chem.* 216:185~193.
- Davidson, J.N. (1950): *The Biochemistry of the Nucleic Acids.* 131~132 London.
- David, J., and Velisek, J. (1975): *Food Science and Technical Abstract.* 3, 11S 1284.
- Hartwick, R.A., and Brown, P.R. (1975): The performance of microparticle chemically-bonded anion-exchange resins in the analysis of nucleotides. *J. Chromatog.* 112:651~662.
- Kennedy, W.P., and Lee, J.C. (1970): Analysis of

- ribonucleotides and deoxyribonucleotides using high-pressure liquid column chromatography. *J. Chromatog.* **51**:203-209.
- Kim, B.K., Chung, H.S., Chung, K.S., and Yang, M.S. (1980): *Kor. J. Mycol.* **8**, 107.
- Kim, J.H. (1982): Studies on the highlyphosphorylated nucleotides during the differentiation of *A. niger*. *Kor. J. Mycol.* **10**:57~64.
- Lehninger, A.L. (1982): *Principles of Biochemistry*. Worth Publishers, New York. Nakajima, (1961): **35**:797~803.
- Neuhard, J., Randerath, E., and Randerath, K. (1965): Ion-exchange thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.* **13**:211-222.
- Norris and Ribbons (1971): Determination of pentoses by the orcinol method. *Methods in Microbiology*. **5B**, 287 Academic Press. London.
- Randerath, K. (1961): A Comparison between thin-layer chromatography and paper chromatography of nucleic acid derivatives. *Biochem. Biophys. Reser. Comm.* **6**:452~457.
- Randerath, K. (1962): A simple method for preparing cellulose anion-exchanger powders and papers. *Angew. Chem. Internat. Edit.* **1**. 553.
- Randerath, K., and Randerath, E. (1964): Ion-exchange chromatography of nucleotides on poly-(ethyleneimine)-cellulose thin layers. *J. Chromatog.* **16**:111~125.
- Randerath, K., and Randerath, E. (1965): Ion-exchange thin-layer chromatography. *Anal. Biochem.* **12**:83~93.
- Rustum, Y.M. (1978): High-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.* **90**:289~299.
- Smith, J.E. and Berry, D.R. (1974): *An Introduction to Biochemistry of Fungal Development*. Academy Press, New York.
- Stahl, E. (1973): *Thin-layer chromatography*. 2nd. George Allen & Unwin Ltd. London.

<Received August 30, 1984>