

## 검정곰팡이의 분화에 따르는 모노뉴클레오티드 성분의 분포 변동에 관한 연구

金 姈 來 · 金 鍾 協\*  
梨花女子大學校 藥學大學 · 同德女子大學\*

### Studies on the Distribution of the Mononucleotides in *Aspergillus niger* during Differentiation

Boon-Lae Kim and Jong-Hyup Kim\*

College of Pharmacy, Ehwa Womans University, Seoul 120, and

\*Dong-Duck Women's University, Seoul 130, Korea

**Abstract:** *Aspergillus niger* IMI 41873 was cultured by the method of synchronous and submerged culture. Its sporulation occurred in the culture. Ribonucleic acids were extracted at each stage of life cycle. These RNAs were digested, separated and determined by P.E.I. cellulose TLC and HPLC methods. The levels of ribonucleic acids in sporulating mycelia were higher than those of conidiphore and phialide forming mycelia. Inosine 5-monophosphate and adenosine 5-monophosphate derivatives were found in HPLC separations. The levels of inosine 5-monophosphate and adenosine 5-monophosphate derivatives per ribonucleic acid were constant through differentiation. After the standard purine nucleosides and boiling water extracts from *A. bisporus*, *F. velutipes* and *L. edodes* were added into the culture, their effects on sporulation were examined. Sporulation was greatly enhanced in each adding experiment.

**Keywords:** *Aspergillus niger*, Sporulation, Differentiation, Ribonucleic acids.

곰팡이의 분화과정은 포자형성과 발아로 나누어 진행되며, 특히 포자형성은 분화의 근본적 형태로 간주되어 광범위하게 분화연구의 모델로 이용되고 있다.

Smith 및 Berry(1970, 1971, 1974)는 곰팡이가 포자형성을 하는데 있어서 유전적 소인과 포자형성을 유도하는 환경인자 사이에 연관성이 있다고 지적하였다. Dancer 및 Manderstam(1975)은 *B. subtilis*의 포자형성에 있어서 생화학적 변화가 일어남으로써 아밀라아제의 신생이 포자형성의 시기와 관련이 있다고 하였다. 또한 Hanson, Peterson 및 Yousten등(1970)은 박테리아의 포자형성시에는 단백질의 대사회전율이 증가하여 여러 종류의 효소가 새로이 생합성되거나 효소의 고유활성도가 변화한다고 보고하였다. Smith(1975)는 *A. niger* 생활사의 각 단계에서 EMP경로(Emden-Myerhof Pathway)의 중간대사 산물과 인산아데노신 함량이 포

자형성 균체의 추출물에서 높다고 보고하였다. Kim(金)등(1978)은 포자형성시에 *A. niger*의 체외효소 및  $\alpha$ -아밀라아제가 생성된다고 밝힌 바 있다.

이와 같이 분화에 있어서 생화학적 변화가 존재한다는 것이 확고하게 정립되었다. 검정곰팡이는 진핵 미생물로서 그 형태가 간단하며 분화의 시상과 한계가 뚜렷할 뿐 아니라 배양이 용이하므로 미생물의 분화연구에 있어서 중요성을 띠고 있다.

특히 Anderson과 Smith(1971)는 검정곰팡이의 액침 배양시 포자형성이 질소공급원의 종류와 배지내에서의 잔존농도에 좌우된다는 점(Galbraith *et al.*, 1969)을 고려하여 배양액의 성분과 물리적 환경조건인 온도, 산소공급량, pH 등을 조절하여 액침배양조(jar fermenter)에서 동조적으로 액침배양을 실시함으로써 검정곰팡이의 동조적 분화에 성공하였다.

이 방법으로 말미암아 분화를 시동하는 생화학적 기구와 격발작용의 본성을 추구할 수 있는 길이 트이게 되었다고 할 수 있다.

곰팡이의 분화에 관한 연구 보고들을 고찰할 때 포자형성이 이루어지는 시기에는 단백질의 합성이 현저히 고조되며  $\alpha$ -아밀라아제, 셀룰라아제 및 푸로테아제와 같은 체외성 효소들이 생성되고 활성화됨을 알 수 있다. 또한 세균세포내에 디피코린산이 특이물질로 나타나며 포자내 특이효소로 내열성 카탈라아제, 알카린 포스포타아제와 디피코린산 합성효소 등이 포자형성시 나타남이 보고되었다(Kim, 1973).

이와 같이 미생물은 분화의 기초가 되는 효소단백질을 분화에 앞서서 합성함을 알 수 있다. 본 연구에서는 이 단백질합성에 필수적인 모노뉴클레오티드의 분포라든가 또는 그 함량들이 검정곰팡이의 분화에 따라서 어떤 비율로 존재하고 있는가를 추구하고자 하였다.

특히 David등(1978)에 의해 m-benzenboronic acid가 *B. subtilis*의 포자형성을 선택적으로 저지한다는 보고와 Vaithilingam등(1981)의 포자형성의 억제제가 이노신에 의해서 해제된다는 보고는 상당한 흥미를 끌게 한다. 이노신은 무기염류배지에서 자라는 *B. subtilis*의 포자형성을 4~5배 촉진시키며, 포자형성시 나타나는 세포내성 포자형성인자(endogenous sporogenesis factor), 즉 sporogen이라 부르는 물질과 물리적 및 화학적 성질에서 매우 유사하다는 것을 지적하고 있다. 이 밖에도 퓨린 뉴클레오시드의 박테리아 포자형성에 대한 극적인 효과가 보고되었다(Manoil et al., 1980).

이러한 이노신은 이노신산의 대사물질이며, tRNA의 일부에 함유되어 있기도 하다. 이노신산은 핵산 생합성과정에서 아데닌산과 구아닌산의 전구물질이다. 즉 IMP로부터 AMP, ADP, ATP 등이 생합성되며, 이는 또 크산틴산을 경유하여 GMP, GDP, GTP로 생합성된다(Adams et al., 1981; Davidson, 1950; Lehninger, 1982).

위의 물질들은 모두 단백질합성에 관련되므로 포자형성에 대하여 가장 큰 효과를 주는 뉴클레오시드는 무엇인가를 알고자 하였다.

한편, Nakajima등(1961)이 건조된 표고버섯의 열수추출액에서 여러 종류의 뉴클레오티드들이 같은 물 비로 존재함을 밝힌 바 있으며, David등(1975)도 GMP와 구아노신이 버섯의 주된 핵산물질이라고 밝혔다. 최근 Kim(金)등(1984)은 영지버섯 *Ganoderma lucidum* (Fr.) Karsten의 자실체 형성 전후의 균사에서 모노뉴클레오티드의 분포상황을 보고한 바 있다.

따라서 이와 같은 핵산물질을 함유하고 있는 버섯들의 열수추출액이 곰팡이의 포자형성에 어떤 영향을 주는가를 추구하고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 재 료

본교 약학대학 보관균주인 *Aspergillus niger* IMI 41873을 실험균주로 사용하였다. 열수추출에 사용한 버섯은 양송이버섯 *Agaricus bisporus* (Lange) Sing., 팽나무 버섯 *Flammulina velutipes* (Fr.) Sing., 표고버섯 *Lentinus edodes* (Berk.) Sing.등이며 이들 모두 자실체 형성 후의 것이다.

### 배 지

a. 감자 글루코오스 사면배지(potato glucose slant agar) : 감자 60 g을 전 후 껍질을 벗기고 마쇄한 후 물 200 ml를 가하였다. 여액에 포도당 4 g, 한천 3 g을 넣고 끓인 후 고압멸균 하였다.

b. 진탕배양 배지(shake culture medium) : A배지로서는 기초 무기염류 용액(basal minerals)의 10배 농축액 20 ml, 황산암모늄 792 mg, 글루코오스 4 g을 증류수에 녹여 전체량을 200 ml가 되게 한 후 pH를 2.3으로 조절하였다. 이와 같이 제조한 배지를 250 ml 삼각 플라스크에 50 ml씩 넣고 멸균한 후 고압멸균하였다. 기초 무기염류 용액의 조성은 Table I과 같다.

### 액침배양 배지

액침배양 배지로서 동조배양을 위하여 3종류의 배지를 조제하였으며, 각종 배지의 조성은 Table II와 같다.

B배지는 저질소 배지(low nitrogen medium)이며, C는 시트르산 및 황산암모늄이 들어간 배지(citrate

Table I. Components of basal minerals for the liquid media.

Minerals	Contents
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	1,000(mg)
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{CuSO}_4 \cdot 8\text{H}_2\text{O}$	0.234
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	6.32
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1.1
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	3.5
$\text{CaCl}_2$	46.7
Distilled water	1,000(ml)

**Table II.** Components of three liquid media for submerged culture.

Components	B medium	C medium	D medium
Basal mineral( $\times 10$ )*	100ml	100ml	100ml
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.66g	1.98g	—
Glucose	10.0g	—	20.0g
Citric acid	—	12.6g	—
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	—	—	12.0g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	—	—	1.13g
NaNO <sub>3</sub>	—	—	5.1g
Polypropyleneglycol(P <sub>200</sub> )	1.0ml	1.0ml	1.0ml
Distilled water	900ml	900ml	900ml
pH	4.6	4.6	5.5

\*Contents are ten folds of that in Table I.

ammonium medium)이며, D는 질산나트륨과 글루코오스가 있는 배지(nitrate glucose medium)로서 B, C 및 D배지를 배양용기(jar fermenter 용량 1 l)에 넣은 다음 고압멸균 하였다. 또한 D배지에 이노신을 첨가하여 0.1%로 만들었으며 이들 각각에 소포제인 P<sub>200</sub>은 따로 멸균하여 배양전에 무균적으로 넣어 주었다.

#### 시 약

SDS와 표준품으로 사용한 yeast RNA, AMP, CMP, GMP, IMP, UMP, XMP 그리고 퓨린 뉴클레오시드인 아데노신, 구아노신, 이노신, 크산토신은 모두 Sigma Co. 제품을 사용하였다. TLC전개판으로는 P.E.I. 셀룰로오스 완제품(Merck Co., 두께 0.5mm)을 사용하였다.

#### 미생물의 배양

검정곰팡이의 분화단계를 관찰하기 위하여 Anderson과 Smith의 방법(Anderson *et al.*, 1971)을 따라 다음과 같이 3단계로 동조배양 하였다.

a. 사면배양: 계대배양된 검정곰팡이를 무균상태로 감자-글루코오스 사면배지에 접종하여 28°C에서 7일간 항온배양하여 포자를 얻었다.

b. 진탕배양: 멸균증류수를 사면배양된 검정곰팡이에 붓고 백금선으로 끊어 포자와 균사의 현탁액을 얻고, 이를 소결유리판(IG3)으로 포자를 여과한 후, 여액 1ml를 A배지에 접종시켜 진탕배양 하였다.

접종후 진탕배양기내(120 strokes/min)에서 48시간 배양하여 포자를 받아서키고 균등한 연령의 균사를 얻었다.

c. 액침배양: 진탕배양 결과 얻어진 균사들을 취하

여 미리 멸균된 나이론제 치즈클로스로써 걸러내었다. 멸균증류수로 2회 세척하고 스파튜라로 떠서 750 ml의 B배지에 접종하였다. 접종된 균사의 무게는 압착상태로 약 2 g이었다. 소포제 P<sub>200</sub> 1 ml, ampicillin 5 ml (10 mg/ml)를 첨가하고 배양용기를 고정시킨 후 교반용 프로펠라를 Tachometer로 640 rpm의 속도가 되게 조절하여 30°C에서 배양시켰다. 온도는 수욕속에 배양시켰다. 온도는 수욕속에 배양조가 1/3정도 잠기게 하여 조정하였다. 이때 교반기의 1 cm 밑에 있는 통기관의 노즐을 통하여 공기를 공급하였으며 통기원은 기포발생기를 사용하였으며, 통기량은 유량조절계(Air flow meter 3 l/min용량)를 사용하여 조절하였다. 접종후 14시간까지는 25 ml/min로 그 이후 17시간 동안은 380 ml/min가 되도록 조절하였다.

총 36시간이 경과한 후 성숙된 균사를 현미경으로 관찰하고 수확하여 위에서와 같이 2 g을 C배지에 접종하였다. P<sub>200</sub>과 항생제 첨가후 배지량의 1/2에 해당하는 공기(380 ml/min)를 공급하는 조건에서 30°C에서 24시간 동안 배양하였다.

이 배양물을 취하여 D배지에 접종한 후 P<sub>200</sub>과 항생제를 넣고 교반기의 회전속도를 500 rpm으로 줄이고, 공기는 그대로 380 ml/min로 통해 주면서 포자가 형성될 때까지 12시간 동안 30°C에서 배양하였다.

한편 0.1% 이노신을 함유한 D배지를 만들어 C배지에서 추출한 균사를 위와 동일조건으로 접종 배양시켰다.

#### 균체의 RNA추출 및 그 가수분해

각 단계별 균사를 배양액에서 분리하여 증류수로 세척한 후 균사 RNA를 Crestfield법(1955, 1960)에 따라 추출하였다.

2% SDS, 4.5% 에탄올, 0.0125 M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.0125 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>를 함유한 SDS용액을 만들어 저으면서 끓을 때까지 가열한 후, 잘게 갈아놓은 균사를 넣고 저으면서 1분간 가열하여 92~94°C가 되게 하였다(균체량 150 g에 대해 SDS용액은 500 ml을 넣었다). 과잉의 기포방지를 위하여 끓는 물중탕에 옮겨 두었다.

이것을 얼음과 소금의 혼합물 속에 잠겨져 있는 비이커속으로 쏟아 4~8분 이내에 4°C가 되도록 냉각하였다.

이를 0°C, 2,000 rpm에서 30분간 원심분리한 후 상층액에 2배의 냉 에탄올을 첨가하여 다시 2,000 rpm으로 15분간 원심분리하였다. 침전을 67% 냉 에탄올로 2회 세척 후 2 N NaCl 용액을 5~10회 떨어뜨려 응집시킨 후 최소량의 80% 에탄올을 첨가하여 0~4°C에서

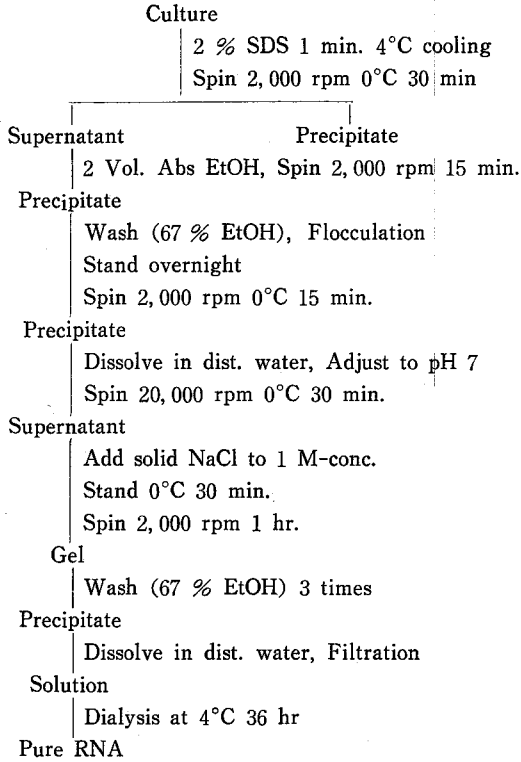


Fig. 1. Extraction scheme of total RNA from the culture.

하루밤 동안 방치하였다.

같은 조건으로 원심분리한 후 침전물을 소량의 증류수에 녹인 다음 1 N CH<sub>3</sub>COOH를 넣어 pH 7로 조절하였다. 다시 0°C 20,000 rpm으로 30분간 원심분리시키고 상층액에 고체 NaCl을 넣어 1 M 농도로 띄게 한 후에 0°C서 30분간 방치하였다. 계속하여 0°C, 2,000 rpm에서 1시간 동안 원심분리한 후 침전물을 2 N NaCl 0.5 ml를 첨가하면서 67 % 에탄올로 3회 세척후 원심분리하여 겔모양의 침전을 얻었다.

이 침전을 소량의 증류수에 녹여 4°C에서 36시간 동안 투석한 후 Büchner깔대기 위에서 유리솜을 깔고 여과하여 순수한 RNA를 얻었다. 이 방법을 요약한 것은 Fig. 1과 같다.

이렇게 하여 얻은 RNA를 0.3 N NaOH로 37°C에서 18시간 가수분해시켜 시료로 사용하였다. 과량의 NaOH는 묽은 HCl로 중화시켰다.

**총 RNA의 정량**

표준물질로서 yeast RNA를 각각 2.5, 5, 10, 12.5 및 25 µg/ml 취하여 자외선분광포도계에서 파장 260 nm 와 280 nm에서의 흡광도를 각각 측정하여 표준검량곡

선을 얻었다.

본 실험으로 앞에서 추출한 RNA를 표준물질과 동일한 조건에서 측정하여 표준곡선에 의하여 정량하였다.

**P.E.I. 셀룰로오스에 의한 RNA의 TLC**

Randerath등(1962, 1964, 1965)과 Stahl(1973)의 단계별전개법을 적용하였다. 먼저 P.E.I. 셀룰로오스 완제품(0.5 mm, Merck Co.)을 10 % NaCl 용액으로 5 cm 전개시킨 후 증류수로 끝까지 전개시켰다. 적어도 2시간동안을 실온에서 건조시킨 후 다시 증류수로 판의 끝까지 전개시켜 전개판을 완전히 활성화시켰다.

표준 모노뉴클레오티드의 R<sub>f</sub>값을 결정하기 위하여 정성용 표준물질로 AMP, CMP, GMP, IMP, XMP 및 이들 혼합 뉴클레오티드를 각각 10 µg/µl의 농도로 하여 램다 피펫을 사용하여 2入씩 활성화된 전개판 위에 점적하였다. 불순물을 제거하기 위하여 300 ml 무수 메탄올에 15분간 넣어 흔들어 주었다. 전개판을 꺼내어 실온에서 건조시킨 후 0.5 M, 1.0 M, 1.5 M의

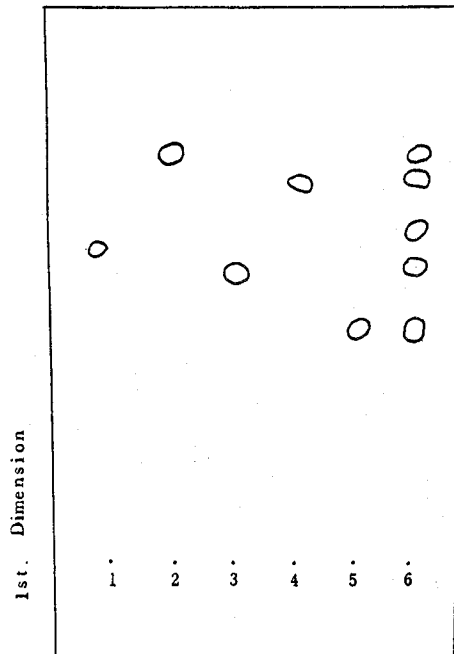


Fig. 2. Thin layer chromatogram of the standard mononucleotides.

Layer: P.E.I. cellulose(0.5 mm, Merck Co.)  
Solvent: Lithium chloride solution  
Development: 0.5 M 5 min, 1.0 M 10 min, and 1.5 M 35 min.

Samples: 1. AMP 2. CMP 3. GMP 4. IMP  
5. XMP 6. Mixture of 1, 2, 3, 4 and 5.

**Table III.** R<sub>f</sub> values of the standard mononucleotides on the thin layer chromatogram with P. E.I. cellulose.

Compounds	R <sub>f</sub> values
AMP	0.61
CMP	0.75
GMP	0.54
IMP	0.70
XMP	0.46

LiCl용액에서 각각 5분, 10분, 35분 동안 단계별로 전개시켰다.

전개판을 건조시킨 후 자외선 램프의 단파장을 사용하여 어두운 곳에서 표준위치를 검출하였다. 표준물질의 전개상태를 Fig. 2에 나타내었으며 그 R<sub>f</sub>는 Table III과 같다.

본 실험으로 검정곰팡이를 분화의 각 단계마다 추출하여 가수분해 시킨 RNA용액을 활성화시킨 P.E.I.셀룰로오스 전개판에 10μ씩 점적하여 표준물질과 동일한 조건으로 전개시켰다.

**HPLC에 의한 모노뉴클레오티드의 분리 및 정량**

표준물질로서 AMP, CMP, GMP, IMP, UMP 및 XMP를 각 50 ng/μ 농도로 제조하여 분석, 정량하였다 (Anderson *et al.*, 1976; Rustum, 1978; Timothy *et al.*, 1980; Brown *et al.*, 1982)

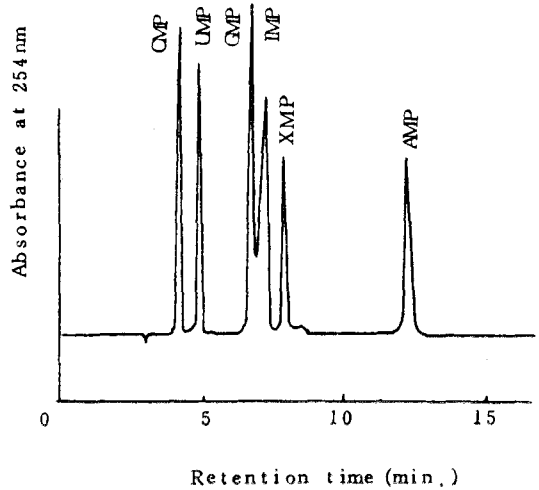
모든 수용액은 Millipore filter(Type HA 0.45 μm)로, 유기용매는 Millipore filter(Type HF 0.5 μm)로 탈기, 여과하여 사용하였으며 시료용액도 또한 모두 탈기, 여과하였다.

칼럼은 HPLC용 메탄올과 증류수로 충분히 세척한 후 기저선이 안정되면 4% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>(pH 4.5)용액을 통해 주었으며 시료주입 후 나타나는 각 피이크의 머무른 시간, 흡광도 및 높이를 측정하였다. 기기의 가동조건과 표준물질의 HPLC크로마토그램은 Fig. 3과 같다.

각 물질의 정량을 위해 표준물질을 50 ng/μ로 조제하여 각각 2, 4, 6 및 8 μl 주입하여 표준검량곡선을 작성하였다.

본 실험으로 검정곰팡이 분화에 따라 추출한 RNA의 가수분해물과 0.1% 이노신이 함유된 배지에서 성장한 균사의 추출 RNA의 가수분해물을 표준품과 동일조건으로 HPLC를 사용하여 분리하였다.

표준물질 및 각 시료의 정성은 머무른 시간으로 하였으며 각 피이크에 대한 확인은 표준물질 첨가법(Ha-



**Fig. 3.** Separation of the standard mononucleotides by HPLC.

Conditions of HPLC.

1. Column:  $\mu$ -Bondapak C<sub>18</sub>(4 mm ID × 30 cm)
2. Solvent: 4% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (pH 4.5)
3. Flow rate: 1.0 ml/min.
4. U.V.: 254 nm 0.1 AUFS
5. Pressure: 500 psi.
6. Chart paper speed: 5 cm/10 min.

**Table IV.** Peak heights and retention time of IMP and AMP on chromatogram by HPLC.

IMP		AMP	
Tr. min, sec.	Peak height X Attenuation	Tr. min, sec.	Peak height X Attenuation
7min 35sec ±0.21*	6.2cm ±0.27	13min 55sec ±0.19*	3.1cm ±0.19

\*mean ± SD, n=7

rtwick, 1975)을 이용하였고, 피이크의 높이를 측정 한 후 표준검량곡선을 참고하여 정량하였다(Table IV).

**퓨린 뉴클레오티드의 첨가 실험**

정량과 경자가 형성된 검정곰팡이를 C배지에서 D배지로 옮기기 직전에 D배지에 아데노신, 구아노신, 이노신 및 크산토신을 각각 0.02 mM, 0.1 mM 및 1 mM이 되게 첨가하였다. 핵산을 첨가하지 않은 D배지를 대조군으로 하여 검정곰팡이를 옮긴 후 진탕배양하였다. 12시간 간격으로 균사의 형태를 관찰하였다.

퓨린 뉴클레오티드의 포자형성 촉진효과를 알기 위하여 퓨린뉴클레오티드 처리군 및 정상군의 배양액 일 정량을 취하여 소결유리판(IG3)으로 거른 후 포자수를 혈구계산기로 측정하였다.

각종 버섯의 열수 추출물의 첨가 실험

자연건조시킨 양송이버섯, 팽나무버섯, 표고버섯을 잘게 잘라 각각 8.5 g 취하여 증류수에 넣고 15분간 가열한 후 여과하여 여액이 모두 50 ml가 되도록 멸균증류수를 가하였다.

이를 D배지에 각각 10 ml씩 첨가하여 이를 처리하지 않은 D배지를 대조군으로 하여 일정량의 균사를 접종한 후 72시간 동안 진탕 배양시켰다. 배양액을 일정량 취하여 앞에서와 같은 방법으로 포자수를 측정하였다.

한편 버섯의 열수추출액을 50배로 묽히고, 자외선분광광도계로 파장 260 nm 및 280 nm에서 흡광도를 측정하였다.

결 과

검정곰팡이는 배지를 A, B, C 및 D의 4단계로 나누어 주면서 일정한 조건에서 배양하였을 때 생활사의 형태를 균일하게 나타내었다.

사면배지에서 배양한 포자를 취하여 A배지에서 48시간 동안 진탕 배양하였을 때 배양초기에는 포자의 구형팽창이 일어났고 중기에는 발아가 일정하게 일어났으며, 후기에는 발아된 균사가 일정하게 성장하기 시작하였다.

A배지에서 배양시킨 균체를 B배지에 옮겨 36시간 동안 배양하였을 때 균사의 성장이 왕성하였으며 영양균사의에 격벽이 없는 생식형 균사인 포자병이 출현하

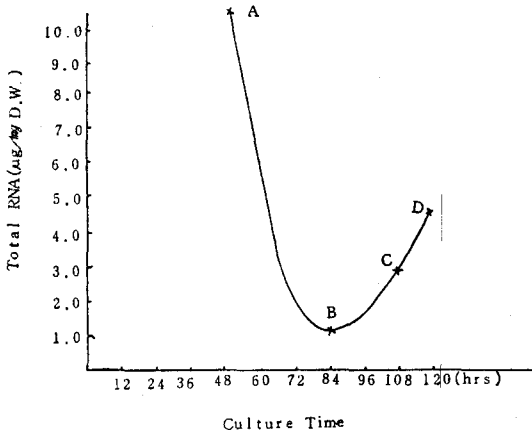


Fig. 4. Levels of RNA in *A. niger* throughout the replacement culture system.

- A: Culture in A medium
- B: Culture in B medium
- C: Culture in C medium
- D: Culture in D medium

Table V. Absorption ratios in 260 nm versus 280 nm U.V. with extracted RNA.

	280/260nm U.V.	Growth phases
Yeast RNA (Sigma Co.)	0.48	Standard
Sample A	0.48	Germinating spore
Sample B	0.56	Hyphae
Sample C	0.53	Vesicle and conidia
Sample D	0.49	Mature spore
Sample E	0.63	Mature spore in medium D plus Inosine

였다.

B배지에서 배양시킨 균체를 C배지에 옮겨 24시간

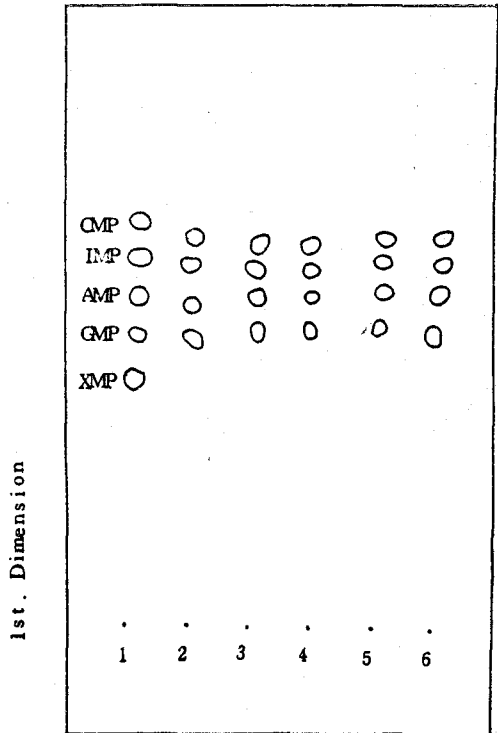
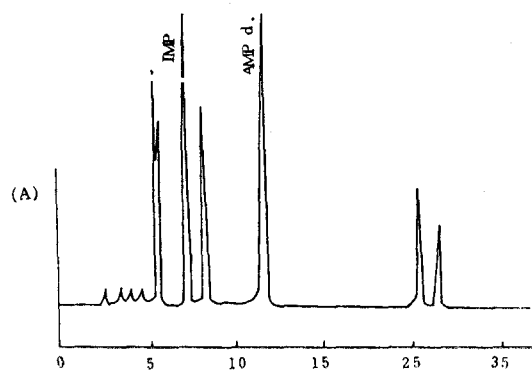
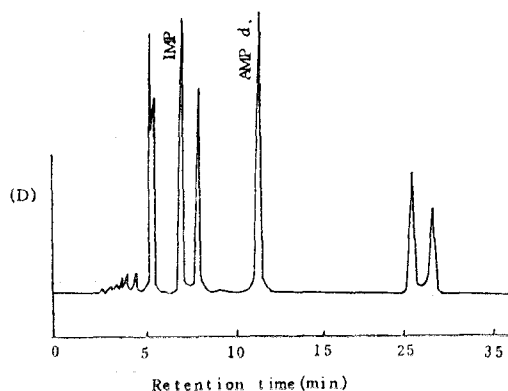


Fig. 5. TLC chromatogram of the mononucleotides from *A. niger*.

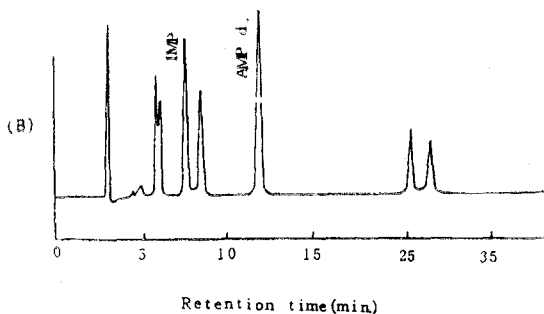
1. Standard mononucleotides
2. Sample from culture in A medium
3. Sample from culture in B medium
4. Sample from culture in C medium
5. Sample from culture in D medium
6. Sample from culture in D medium plus inosine



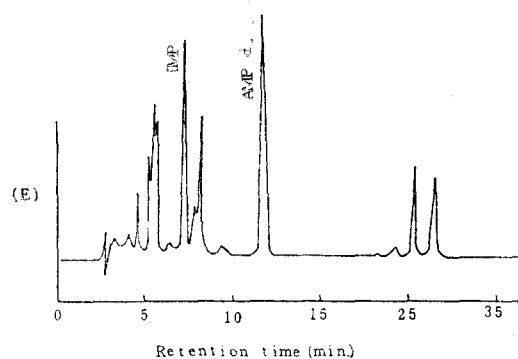
A: Sample A (Conc. 1.94 mg/ml) 1.5  $\mu$ l was injected.



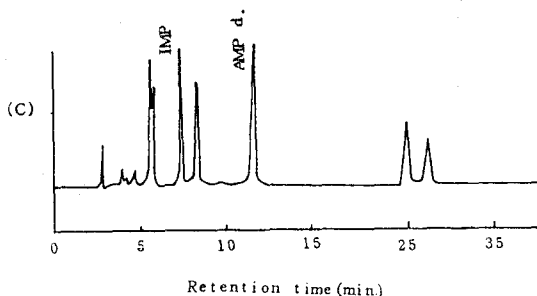
D: Sample D (Conc. 0.98 mg/ml) 3.0  $\mu$ l was injected.



B: Sample B (Conc. 0.23 mg/ml) 6.0  $\mu$ l was injected.



E: Sample E (Conc. 0.58 mg/ml) 5.0  $\mu$ l was injected.



C: Sample C (Conc. 0.30 mg/ml) 6.0  $\mu$ l was injected.

배양하였을 때 포자병으로부터 정낭과 제 1 경자, 제 2 경자가 형성되었다.

C 배지에서 배양된 균사, 포자병, 정낭 및 경자가 달린 균체를 다시 D 배지에 옮기고 12시간 배양하였을 때 무성포자가 생성되는 것을 관찰하였다.

A, B, C 및 D 배지에서 성장한 균체들의 총 RNA 양을 표준검량곡선을 기준으로 정량한 결과, 균의 성장 및 분화에 따르는 RNA 함량변화는 Fig. 4와 같다.

또한 0.1% 이노신을 첨가한 D 배지의 배양균체에서

**Fig. 6.** Separation of the mononucleotides extracted and digested prior to HPLC. Chromatographic conditions were same as in Fig. 3.

는 단위건조중량에 대해 4.9  $\mu$ g/mg의 RNA가 함유되어 있었다.

추출된 RNA시료들을 260 nm 및 280 nm에서 측정된 흡광도비는 Table V와 같다.

표준물질인 yeast RNA의 흡광도비에 비하여 시료 B와 C, 즉 균사의 성장 증반기와 포자형성 전인 경자기에서는 흡광도비가 높아졌다. 이것은 단백질성인 물질이 RNA핵산과 강하게 결합하고 있기 때문이라 추측된다. 포자가 형성할 때에는 0.49로서 표준물질과 비슷하였다. 즉 단백질성 물질이 쉽게 떨어져나간 상태 되었다고 할 수 있다.

또한 0.1% 이노신 첨가배지에서의 추출된 RNA시료는 0.63으로 현저히 높았다.

P.E.I.셀루로오스를 이용하여 점경곰팡이의 RNA를 전개시킨 것은 Fig. 5과 같다.

**Table VI.** Percentages of the IMP and AMP in the digested RNA extracted from *A. niger*.

Growth phase	Mononucleotides ratio IMP/ RNA (%)	AMP derivatives/ RNA (%)
Germinating spore	14.66	20.76
Hyphae	14.09	25.65
Vesicle and conidia	11.48	17.70
Mature spores	12.11	19.70
Mature spores	12.28	20.49
Cultured in D medium plus inosine		

**Table VII.** The effects of various nucleosides on sporulation of *A. niger*

Conc. of nucleoside	Nucleoside			
	Adenosine	Guanosine	Inosine	Xanthosine
0.02mM	$1.34 \times 10^6$	$1.44 \times 10^6$	$2.25 \times 10^6$	$5.02 \times 10^6$
0.1mM	$2.96 \times 10^6$	$1.31 \times 10^6$	$2.06 \times 10^6$	$2.56 \times 10^6$
1 mM	$1.81 \times 10^6$	$3.53 \times 10^6$	$2.25 \times 10^6$	$2.41 \times 10^6$
Control	0.11 × 10 <sup>6</sup> spores/ml			

(Numbers are those of spores)

**Table VIII.** The U.V. absorbance of hot-water extract at 260nm and 280nm and the spore number of *A. niger* in D medium.

	260nm	280nm	Spore number (spores/ml)
<i>A. bisporus</i>	1.406	0.721	$2.56 \times 10^6$
<i>F. velutipes</i>	1.130	0.599	$3.31 \times 10^6$
<i>L. edodes</i>	1.319	0.733	$3.44 \times 10^6$
Control			$1.90 \times 10^6$

검정곰팡이의 RNA 가수분해물에는 IMP와 AMP 유도체가 확인되었으며, 기타 모노뉴클레오티드와 매우 유사한 물질이 2개 존재하였다.

HPLC를 사용하여 검정곰팡이의 RNA 가수분해물을 분석한 결과는 Fig. 6와 같으며 표준검량곡선에 의하여 검량된 결과는 Table V와 같다.

퓨린 뉴클레오티드 처리군에서는 60시간을 전후하여 일체히 포자형성이 시작되었으며 배양액도 적갈색을 나타내었다. 반면 정상군에서는 72시간 후에 포자형성이 시작되었다.

그 포자수를 혈구계산기로 측정한 결과는 Table VI와 같다.

각 버섯의 열수추출액 처리군과 정상군 모두가 72시간을 전후하여 포자가 형성되었으며, 대략 1.5~2배 가량 촉진됨을 확인하였다.

각 버섯의 열수추출액은 50배로 묽혀 파장 260 nm 및 280 nm에서 자외선분광광도계로 측정한 결과와 포자형성의 정도는 Table VIII과 같다.

## 고 찰

검정곰팡이를 A, B, C 및 D로 구별되는 4종류의 배지에서 배양시 탄소원과 질소원, 그밖의 구성성분 및 이들 각 배지의 pH, 배양시간, 진탕속도 또는 회전속도 및 산소공급량 등의 여러 환경조건을 바꾸어 그 분화과정을 인위적으로 조절하면서 포자형성까지의 생활사를 진행시켰다. 이때 A배지에서는 발아가, B배지에서는 포자병 형성이, C배지에서는 정낭과 경자의 형성이 동조적으로 일어났으며 D배지에서는 무성 포자의 형성이 정확히 일어났다. 이 사실은 검정핵생물인 곰팡이의 분화가 환경의 변화에 따라 시상(Sequence)의 순서대로 일어났음을 나타낸 Anderson과 Smith의(1971) 결과와 같다.

분화에 따라 검정곰팡이의 균사체에서 추출한 총 RNA양은 균사의 성장에 따라 점차 감소하다가 포자형성을 전후하여 증가하였는데, 이는 포자형성 직전에 단백질, RNA, 세포벽 및 효소의 합성이 활발하여 지는데 기인한다고 할 수 있다(Hanson *et al.*, 1970)

분화의 각 단계에서 추출한 RNA를 가수분해시켜 P.E.I. Cellulose TLC 및 HPLC로 분석한 결과 IMP와 AMP 유도체가 확인되었다. IMP는 AMP, XMP 및 GMP의 전구물질이 되는 중요한 모노뉴클레오티드이며 AMP는 단백질 합성시 아미노산을 활성화시키는데 필요한 ATP의 전구체이므로 포자형성시 단백질 합성이 왕성한 것과 연관시킬 수 있다고 추론할 수 있다.

총 RNA에 있어서 IMP와 AMP유도체의 비율은 큰 변동이 없었으나, 전체적인 RNA함량이 포자형성시 증가하므로 이에 따라 균체에서의 IMP와 AMP유도체의 총 함량은 증가되었다. 따라서 IMP와 AMP 유도체의 대사 산물이 이노신과 아데노신이므로, 이는 포자형성시 퓨린 뉴클레오티드 포스포릴라아제와 이노신이 증가한다는 Robert와 Arthur(1967) 및 아데노신 포스포릴라아제와 아데노신이 증가한다고 보고한 Senesi(1976)의 연구결과와 연관성이 있다고 할 수 있다.



또한 0.1 % 이노신을 첨가한 배지에서 추출한 균체 RNA 가수분해물에서는 D배지에서 추출한 RNA 가수분해물에서보다 IMP와 AMP유도체 함량비가 다소 높았으나 큰 차이는 없다고 할 수 있다.

전체적으로 분화에 따라 핵산 성분의 분포에는 큰 변화가 없었으나 B배지에서 추출한 RNA 가수분해물에서 CMP보다 앞선 피이크가 나타났다가 점차 없어졌다. 이 물질에 대한 동정과 분화의 연관성을 전혀 알 수 없었다. 따라서 이 물질에 대한 동정이 필요하다고 생각된다.

마지막으로 퓨린 뉴클레오시드 및 버섯의 열수추출액첨가 배지에서는 포자형성이 급격히 촉진되었는데 이는 이노신이 sporogen 물질과 매우 유사한 데 기인하며 구아노신, 아데노신, 크산토신도 대사과정시 이노신으로 전환되기 때문이라 생각된다. 또한 *B. subtilis*의 포자형성에 대한 퓨린 뉴클레오시드 첨가실험에서 극적인 촉진효과가 보고된 바 있으며 (Manoil *et al.*, 1980) 이는 이 실험결과와도 부합된다고 할 수 있다.

### 적 요

1. 분화과정에 따른 균체로부터 추출한 총 RNA량은 포자형성 직전에 증가함을 알았다.
2. 추출한 RNA를 가수분해하여 P.E.I. Cellulose TLC를 전개한 결과 AMP유도체와 IMP가 존재함을 확인하였다.
3. 포자형성을 전후하여 IMP와 AMP의 RNA에 대한 함량비율은 일정함을 알았다.
4. 포자형성 전기의 균체에 아데노신, 구아노신, 이노신, 크산토신을 처리한 바 포자형성이 10배 이상 촉진되었다.
5. 포자형성 전기의 균체에 *A. bisporus*, *F. velutipes*, *L. edodes*의 열수추출액을 처리한 바 포자형성이 1.5 ~ 2 배 촉진되었다.

### 문 헌

Adams, R.L.P., Burdon, R.H., Cambell, A.M., Leader, D.P. and Smellie, R.M.S. (1981): *The Biochemistry of the Nucleic acids*. Chapman and Hall, London and New York.

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.

Anderson, J.G. and Smith, J.E. (1971): Synchronous initiation and maturation of *A. niger*, conidiophores in culture. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 56:9-29.

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.

Dancer, B.N., and Manderstan, J. (1975): Criteria for categorizing early biochemical event occurring during sporulation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.*, 121:411-415.

David, J. and Velisek, J. (1975): *Food Science and Technical Abstract*. 3:1284.

Daividson, J.N. (1950): *The Biochemistry of the Nucleic Acids*. 131-132, London.

Davis, M.K., Lopez, I.P. and Hageman, J.H. (1978): Benzene boronic acid selectively inhibits the sporulation of *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, 136:625-630.

Galbraith, J.C. and Smith, J.E. (1969): Changes in activity of certain enzyme of the tricarboxylic and the glyoxylate cycle during the initiation of conidiation of *Aspergillus niger*. *Can. J. Microbiol.*, 15: 1207-1212.

Hanson, R.S., Peterson, I.A. and Yousten, A.A. (1970): Unique biochemical events in bacteroal sporulation. *Ann. Rev. of Microbiol.*, 24:53-90.

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.

Kim, J.H. (1978) Biosynthesis of the extra cellular enzyme in de novo during the differentiation of *A. niger*. *Kor. J. Mycol.*, 6:1-10.

Kim, J.H. (1973): Microbial differentiation and its Biochemical bases. *Kor. J. Microbiol.*, 11:101-106.

Kim, J.H. and Nam, J.S. (1984): Studies on distribution of the mononucleotides in *Ganoderma lucidum*. *Kor. J. Mycol.*, 12:111-115.

Lehninger, A.L. (1982): *Principles of Biochemistry*.

- Worth Publishers, New York.
- Manoil, C. and Kaiser, D. (1980), Purine containing compounds, including cyclic adenosine 3',5'-monophosphate, induce fruiting of *Myxococcus xanthus* by nutritional imbalance. *J. Bacteriol.*, 141:374-377.
- Nakajima (1961): 일본 농화학회지, 35(2):792-803.
- Pasternak, C.A. (1970): *Biochemistry of Differentiation*, Wiley Inter. Science, London.
- Preparation of ribonucleic acid from yeast and animal tissues. (1966): *Methods in Enzymology*. II Academic Press, New York.
- 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.
- Robert, G. and Arthur, K. (1967): Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. *J. Bacteriol.*, 242:2383-2388.
- Rustum, Y.M. (1978): High-pressure liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 90:289-299.
- Smith, J.E. (1971): Changes in intracellular concentration of glycolytic intermediates and adenosine phosphates during growth cycle of *A. niger*. *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 57:103-110.
- Smith, J.E. and Berry, D.R. (1974): *An Introduction to Biochemistry of Fungal Development*, Academy press, New York.
- Sonia, S., Falcone, G., Mure, U., Francesco, S. and Ipata, P.L. (1976): Adenosin phosphorylase from vegetative form and free Spores of *B. subtilis*. *Spore Research*, 1:312-334.
- Stahl, E. (1973): *Thin-Layer Chromatography*. 2nd. George Allen & Unwin Ltd., London.
- Timothy, F.W., Gustau, G., Malcolm, C.M. and Nelson, D.G. (1980): Separation of 5'-ribonucleoside monophosphates by ion-pair reverse-phase high performance liquid chromatography. *Anal. Biochem.*, 107:240-245.
- Turner, W.B. (1971): *Fungal Metabolites*, Academic Press, London and New York.
- Vaithilingam, S., Selma, P.W. and James, H.H. (1981): Induction of *Bacillus subtilis* sporulation by nucleoside. *J. Bacteriol.*, 154:489-493.

<Received March 21, 1985; Accepted April 5, 1985>