

*Rhizopus oryzae*의 생리·생화학적 카드뮴 해독기작

이기성 · 김영호 · *박영식 · **박용근

배재대학교 생물학과

*한양대학교 생물학과

**고려대학교 생물학과

Physio-biochemical Detoxification Mechanism against Cadmium in *Rhizopus oryzae*

Ki-Sung Lee, Young-Ho Kim, Young-Sik Park* and Yong-Keun Park**

Department of Biology, Paichai University

*Department of Biology, Hanyang University

**Department of Biology, Korea University

ABSTRACT: The mechanism of cadmium adaptation and detoxification in *Rhizopus oryzae* was investigated. The lag phase was lengthened as the concentration of cadmium increased. Detoxification of cadmium were postulated to be primarily operated by the induction of two cadmium binding proteins and increment of inorganic polyphosphate pools in adaptation phase. After adaptation, inorganic polyphosphate system has been involved in turnover and compartmentalization. The secondary system for cadmium adaptation and detoxification might be derepression of ACPase activity and the synthesis of phosphatidyl serine. It has been considered that the overall changes for cadmium adaptation and detoxification eventually influence on the morphology, resulting in the dispersed filamentous type which may be the most advantageous form.

KEYWORDS: Detoxification, adaptation, acid phosphatase, polyphosphate dispersed filamentous growth

세균류에서는 중금속 해독기작에 관련하여 폭 넓게 연구되므로서, 다양한 system이 중금속 적응 및 해독에 운용되어 진다는 것이 밝혀지고 있다. *Staphylococcus aureus*는 plasmid-encoded cd^{+2} effecx system에 의한 카드뮴 내성기작을 지니고 있다(Horitu 등, 1986; Perry and Silver, 1982; Smith and Novick, 1972; Weiss 등, 1978). 그리고 *Klebsiella aerogenes*에서는 세포내 불용성 cadmium : sulfide (Cd : S) 복합체나 무기인산이 카드뮴 해독기작에 관여한다(Aiking 등, 1984; Macaskie and Dean, 1984; Lee 등, 1990). 또한 McEntee, 등(1986)의 보문에 의하면 *Alcaligenes* sp.는 새로운 단백질이

유도되며, 이단백질이 카드뮴의 세포내 유입을 감소시키거나, 세포내에 축적된 카드뮴 이온들을 세포외 양이온과 교환하여 세포내 카드뮴 축적을 억제시키는 것으로 보고되고 있다.

균류 및 고등 동·식물에서는 주로 metallothionein과 같은 중금속 결합단백질 system(McEntee 등, 1986; Khazaeli and Mitra, 1981; Higham and Salder, 1984; Hamer, 1986)을 중심으로 한 연구가 대부분일 뿐 Cd : S와 poly-P : Cd complex system이 중금속 해독기작에 관련한다는 보문은 거의 전무한 실정이다.

따라서 본 연구에서는 무기인산 중합체 system을 지닌 균류임과 동시에 발효산업 및 herbicide, insecticide와 steroid 화합물의 biotransformation 과정

*Corresponding author

등에 매우 중요한 균류중의 하나인 *R. oryzae*를 재료로 하여, 균류에서도 methallothionein system 외 에 Cd : S와 poly-P : Cd complex system이 중금속 적응 해독기작에 실제로 관련하는 지를 조사하는 한편, 더 나아가 *R. oryzae*가 산업폐수 처리시 문제가 되는 중금속과 무기인산염을 동시에 제거할 수 있는 생물학적 filter로서 이용될 수 있는 지의 가능성 여부를 타진하고자 하였다.

이를 위하여 카드뮴 첨가배양에 따른 산가용성 무기인산 중합체의 세포내 축적량의 동태, inorganic sulfide의 양적동태, 무기인산의 분해에 관련하는 효소의 활성도 변화, 총단백질의 변화양상 및 막생리 및 에너지 축적에 관여하는 지질화합물의 동태 변화를 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주 및 배양조건

한양대학교 생물학과 미생물학 연구실에서 보관 중인 *Rhizopus oryzae*를 분양 받아 실험균주로 사용하였다. *R. oryzae*의 카드뮴에 대한 적응기 및 성장에 대한 카드뮴의 영향을 조사하기 위하여 카드뮴($CdCl_2$)을 PYE 영양액배지(glucose 30 g, peptone 10 g, yeast extract 3 g, DW. 1l)에 2배 희석 농도 구배법으로 0.5 mM에서 8 mM까지 처리하여 사용하였다. PYE 영양액배지에서 다량 전배양되어진 세포(St 실험군)를 당과 인산이 함유되지 않은 Czapek's minimal medium($NaNO_3$ 3.0 g, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g, KCl 0.5 g, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g, DW. 1l)에서 12시간(S-P⁻ 실험군) 배양하여 starvation 시켰다. 이렇게 starvation 되어진 세포중 일부를 $CdCl_2$ 0.5 mM로 처리된 PYE 영양액배지에 접종하여 24 시간(Cd^+ 24 hr. 실험군), 48시간(Cd^+ 48 hr. 실험군) 배양하였고, 일부는 카드뮴이 첨가되지 않은 배지에 접종하여 24시간(Cd^- 24 hr. 실험군), 48시간(Cd^- 48 hr. 실험군) 배양하였다. 배양중에 적량의 배양액을 취하여 분광광도계를 이용하여 660 nm에서 흡광도를 측정하였으며, 생중량을 측정하여 여러가지 생리·생화학적 실험의 시료로 사용하였다.

카드뮴 분석

세포내 분획에 축적된 카드뮴을 정량하기 위해

여러가지 조건에서 배양한 세포를 적량 수확하여, 초음파 마쇄한 후 원심분리하여 얻은 상등액과 pellet에 conc. HCl을 첨가하여 95°C에서 40분 동안 용출시켜 atomic absorption spectrometer(AAS; Perkin-Elmer model 403)을 사용하여 측정하였다.

Sulfide 분석

세포를 1 ml의 6%(w/v) NaOH로 95°C에서 15분간 반응시켜 inorganic labile sulfide를 추출하였다(King and Moris, 1967).

무기인산 중합체의 분획

인산화합물 함량을 조사하기 위해 각각의 배양구간에서 세포를 수확하여 0.2 M NaCl 용액으로 세척한 후 세포의 분획을 얻었다(Schmidt and Tanhauser, 1945). 각각의 세포 분획은 4가지로 처리하였다; (1) 5% cold PCA로 2회 처리, (2) 95%, 75% ethanol로 각각 2회 처리, (3) hot ethanol : ether(3 : 1)로 3회 처리 및 (4) cold 1% KOH(pH 9.0)로 2회 처리.

이러한 절차로 분획된 인산화합물의 정량은 Fiske와 Subbarow(1925)의 방법을 사용하였다.

효소 활성도의 측정

각 실험 구간의 세포를 적량 수확하여 원심분리(5,000 rpm., 10분)한 다음 0.2 M NaCl 용액으로 2회 세척한 후, 4°C에서 초음파 마쇄하였다(Hughes, 1971). 효소추출액의 acid phosphatase와 alkaline phosphatase의 활성도를 측정하였다(Ernst, 1975). 이와 같이 조제된 반응액에 효소추출액 1 ml 씩 넣고 대조군에 동량의 증류수를 넣어 37°C에서 30분간 반응시켰다. 그 다음 TCA(trichloroacetic acid)를 0.5 ml 첨가하여 효소활성도를 정지시키고 10분 후 재발색시키기 위해 1 N NaOH 용액 2.5 ml을 넣은 후 원심분리(5,000 rpm., 10분)하여 얻어진 상등액으로 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법을 적용하였다.

총 단백질의 변화양상

각 실험 구간의 세포를 원심분리하여 수확한 후 0.1 M NaCl, 1% Triton X-100(Clark 등, 1982; Onishi 등, 1979)을 가하여 초음파 마쇄한 후 Laemmli

(1970)의 방법에 따라 Tris-HCl buffer(pH 8.8), 1% SDS, glycerol, 2-mercaptoethanol, bromophenol blue를 가한 후 가수분해시켜 전기영동 시료로 사용하였다. 전기영동용 완충용액은 0.025 M Tris-glycine buffer(pH 8.3)을 사용하였고, stacking gel은 3%, separating gel은 8%로 조제하여 prerunning (80 volt)한 후 150 volt로 전기영동하였다. polypeptide의 발색은 coomassie brilliant blue(R-250)을 사용하였다.

총 지질의 분리

각 실험 구간의 세포를 적량 수확하여 총지질을 추출하였다(Campbell and Leuking, 1983). 시료에 methanol과 chloroform를 첨가하여 초음파 마쇄한 후 원심분리(3,000 rpm., 10분)하여 chloroform 층만 취하고 N_2 gas로 농축하여 시료로 사용하였다. TLC plate는 silica gel GF 254(250 μ m thick, 20 \times 20 cm sigma Co.)를 사용하였고, 1차 전개용매는 chloroform : methanol : water(65 : 25 : 4, v/v/v)로, 2차 전개용매는 chloroform : acetone : methanol : acetic acid : water(50 : 20 : 10 : 15 : 5, v/v/v/v)로, 3차 전개용매는 hexane : diethyl ether : acetic acid (85 : 15 : 1, v/v/v)로 조제하여 사용하였다. 전개 후 총지질 발색을 위하여 sulfuric acid : ethanol(1 : 1, v/v) 용액을 분무하고 105 $^{\circ}$ C에서 5~10분 반응시켰다.

결 과

생장곡선의 변화

일련의 카드뮴 처리 농도(0.5~4 mM)에 따른 균주의 성장곡선은 카드뮴 처리 농도가 증가됨에 비례하여 긴 잠복기를 나타냈으며, 잠복기를 통해 적응된 세포를 최고 4 mM의 카드뮴 처리 배지에서 관찰할 수 있었다(Fig. 1). 대조군 배지에서 배양한 세포는 12시간 후 초기 exponential phase에 이르렀으나 0.5 mM 카드뮴 첨가 배지에서는 24시간, 1 mM의 카드뮴 첨가 배양한 세포는 50시간의 적응이 정상적인 성장을 위해 필요하다는 것을 관찰하였다. 따라서 카드뮴의 적응·해독과정에 수반되는 생리·생화학적 연구를 위해서는 0.5 mM 농도로 카드뮴을 처리한 실험군을 사용하였다. 특히하게 본 실험의

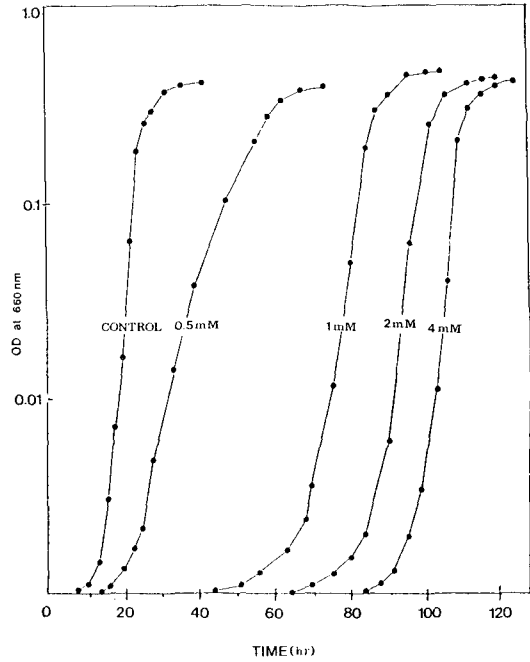


Fig. 1. The growth rate of *Rhizopus oryzae* in the PYE broth with the different concentration (0; control, 0.5, 1, 2, 4 mM) of cadmium.

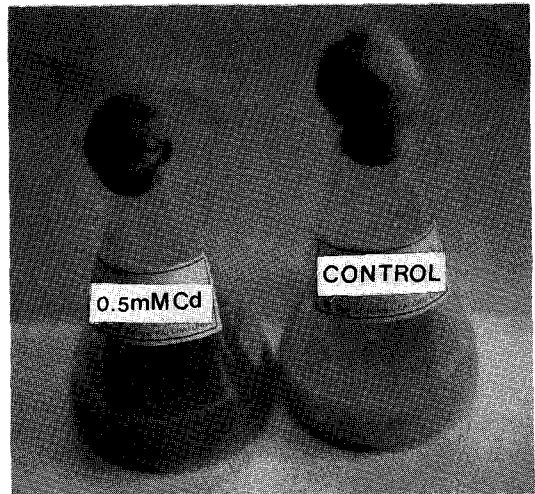


Fig. 2. Comparison of growth morphology of *Rhizopus oryzae* on stationary phase, 48 Hr-cultured; Flasks of control and 0.5 mM Cd^{2+} were cultivated in PYE broth without cadmium and with cadmium of 0.5 mM concentration, respectively. The former was shown in the clumped dispersed growth morphology and the latter in dispersed growth morphology.

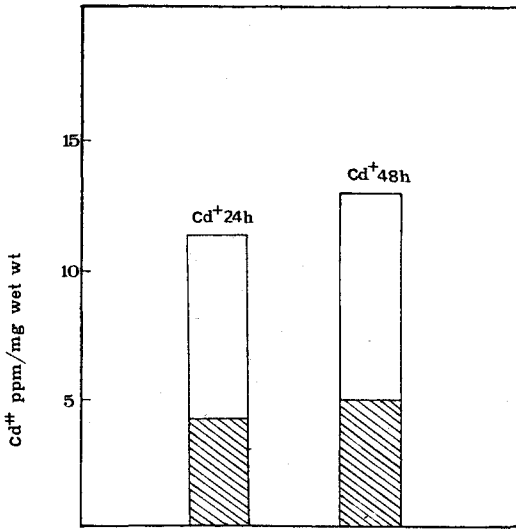


Fig. 3. Cadmium-accumulation in intracellular fraction under various cultured conditions. ▨: cell wall fraction, □: cytoplasm fraction

균주는 PYE 배지에서 정체기에 이른 전배양 세포에서 clumped dispersed filamentous type의 cluster를 형성하는 성장 형태를 보이다가 당과 인산이 함유되지 않은 배지에서 생육한 starvation 세포(S⁻P⁻)와 0.5 mM 카드뮴 첨가배지에서 48 hr 배양한 세포(cd²⁺ 48 hr)에서는 dispersed filamentous 성장 형태를 보였다(Fig. 2).

세포 분획에 따른 카드뮴 축적량의 변화

카드뮴이 첨가되지 않은 액체 영양배지에서 충분히 전배양한 후 당과 인산이 결핍된 배지에서 starvation 시킨 세포를 카드뮴을 0.5 mM 농도로 처리한 배지로 옮겨서 배양했을 때 나타나는 세포내 카드뮴 축적량을 Fig. 3에 표시하였다. 카드뮴을 첨가한 배지에서 시간이 지날수록 축적량은 소량씩 증가하였으며, 세포벽에 축적된 양보다 세포질 쪽에 축적된 양이 35% 정도 많았으나 세포벽에도 상당량이 축적되는 것으로 나타났다.

무기인산 중합체의 축적량의 변화양상

당과 인산의 결핍(S⁻P⁻) 그리고 중금속 카드뮴의 영향(Cd⁺)에 따른 세포내 무기인산 중합체의 축적량의 변화(Fig. 4)는 다음과 같다. 산가용성 무기인산 중합체의 축적량 동태는 당과 인산의 결핍 배양세포

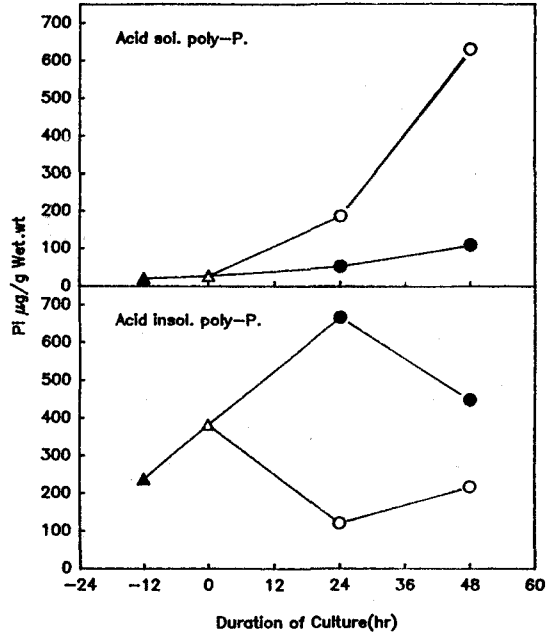


Fig. 4. Changes in amount of accumulated acid soluble inorganic polyphosphate and acid insoluble inorganic polyphosphate under various culture conditions in *Rhizopus oryzae*. ▲: St, △: S⁻P⁻, ●: Cd⁺, ○: Cd⁻

(S⁻P⁻) 및 카드뮴 첨가 배양세포(Cd⁺)는 전배양 세포(St)와 거의 유사하게 일정량을 유지하였으나, 카드뮴을 처리하지 않은 대조군의 세포(Cd⁻)에서는 배양시기가 경과함에 따라 지속적인 증가를 나타내었다. 그러나, 산불용성 무기인산 중합체의 축적량 변화는 반대 양상을 띄었다.

Sulfide 분석

전배양시킨 세포들에서는 상당량의 sulfide가 세포내 존재한다는 것을 관찰할 수 있었으며, starvation 시킨 세포의 sulfide는 무기인산 중합체(poly-P)의 축적량과 반대로 감소를 보였다. 또한 카드뮴 첨가 24시간 배양 세포와 카드뮴 비첨가 24시간 배양세포 모두 sulfide량의 감소를 보였으나, 카드뮴 첨가 48시간 배양한 세포는 카드뮴 결핍 48시간 배양한 세포보다 증가하였다(Fig. 5).

효소 활성도의 변화

ACPase의 활성도는 당과 인산을 결핍 배양시킨

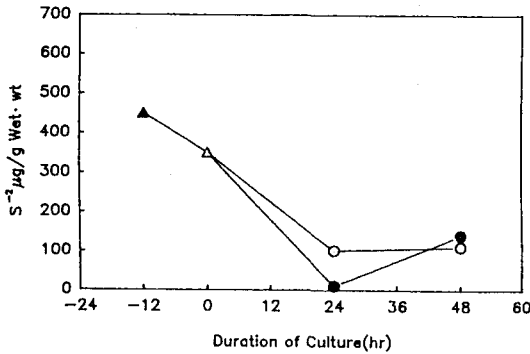


Fig. 5. Changes in amount of cellular inorganic sulfide accumulated under various cultured conditions.
▲: St, △: S⁻P⁻, ●: Cd⁺, ○: Cd⁻

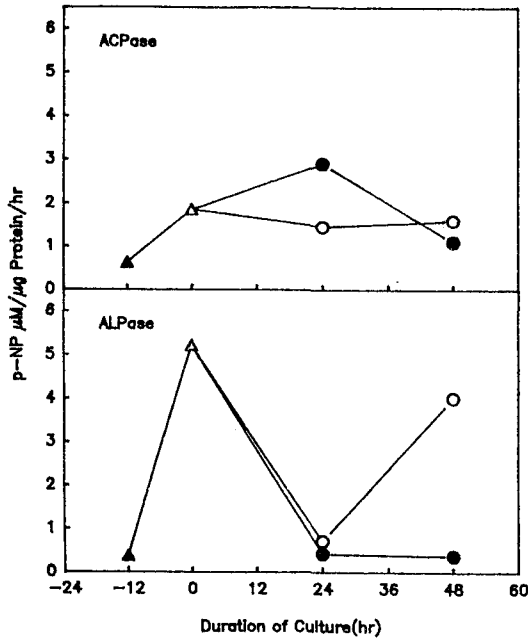


Fig. 6. Changes in activities of ALPase (alkaline phosphatase) and ACPase (acid phosphatase) in *Rhizopus oryzae* under culture conditions.
▲: St, △: S⁻P⁻, ●: Cd⁺, ○: Cd⁻

세포(S⁻P⁻)에서 전배양 세포(St)에 비하여 약 3배 정도 활성이 derepression 되었다. 특히 카드뮴 첨가 배양세포(Cd⁺ 24시간)에서는 계속적으로 ACPase의 활성이 derepression 되어 전배양세포에 비하여 6배 정도의 활성을 나타내었다. 그러나 카드뮴 비처리 실험군(Cd⁻)에서 ACPase의 활성은 거의 일

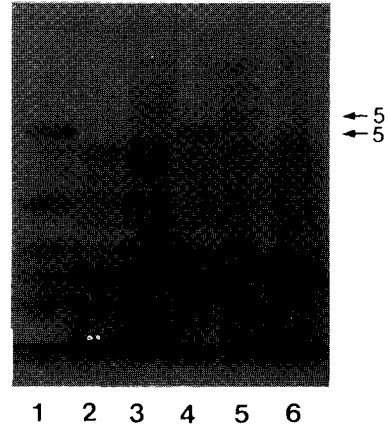


Fig. 7. Total protein profiles by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) in *Rhizopus oryzae* under various culture conditions.
1. St, 2. S⁻P⁻, 3. Cd⁻ 24 hr, 4. Cd⁻ 48 hr, 5. Cd⁺ 24 hr, 6. Cd⁺ 48 hr

정하였다. ALPase의 활성도는 ACPase와는 대조적으로 전배양 세포에 비하여 당과 인산이 결핍된 세포에 비하여 10배 이상 활성이 증가하였으나, 영양액채배지에 옮겨 배양(24 hr)할 경우 카드뮴 첨가 및 비처리 실험군 모두 효소활성이 repression 되었으며, 카드뮴첨가 배양세포에서는 활성도가 회복되지 않았다(Fig. 6).

단백질의 변화양상

카드뮴 첨가 배양할 경우 특이하게 유도되는 단백질의 존재 여부를 알기 위해 SDS-PAGE로 총 단백질을 분석하였다. 카드뮴 첨가 배양한 세포(Cd⁺ 24 hr)들의 protein profile을 카드뮴 결핍배양 세포와 비교할 때 2개의 새롭게 유도되는 단백질이 관찰되었으며(Fig. 7), St세포, S⁻P⁻세포 및 Cd⁻세포에서는 고분자량을 지닌 몇 개의 단백질은 감소되었다(Fig. 7). 이처럼 배양 조건에 따라 총 단백질의 변화는 심하게 나타났지만, 변화되는 단백질 중 새롭게 생성되는 2개의 단백질은 매우 specific 하게 카드뮴 첨가시에만 induction 되었다.

총 지질의 pattern 변화

TLC로 분리된 지질은 크게 인지질, 중성지방, 스테롤, 당지질, 지방산 등으로 대별할 수 있다. Phos-

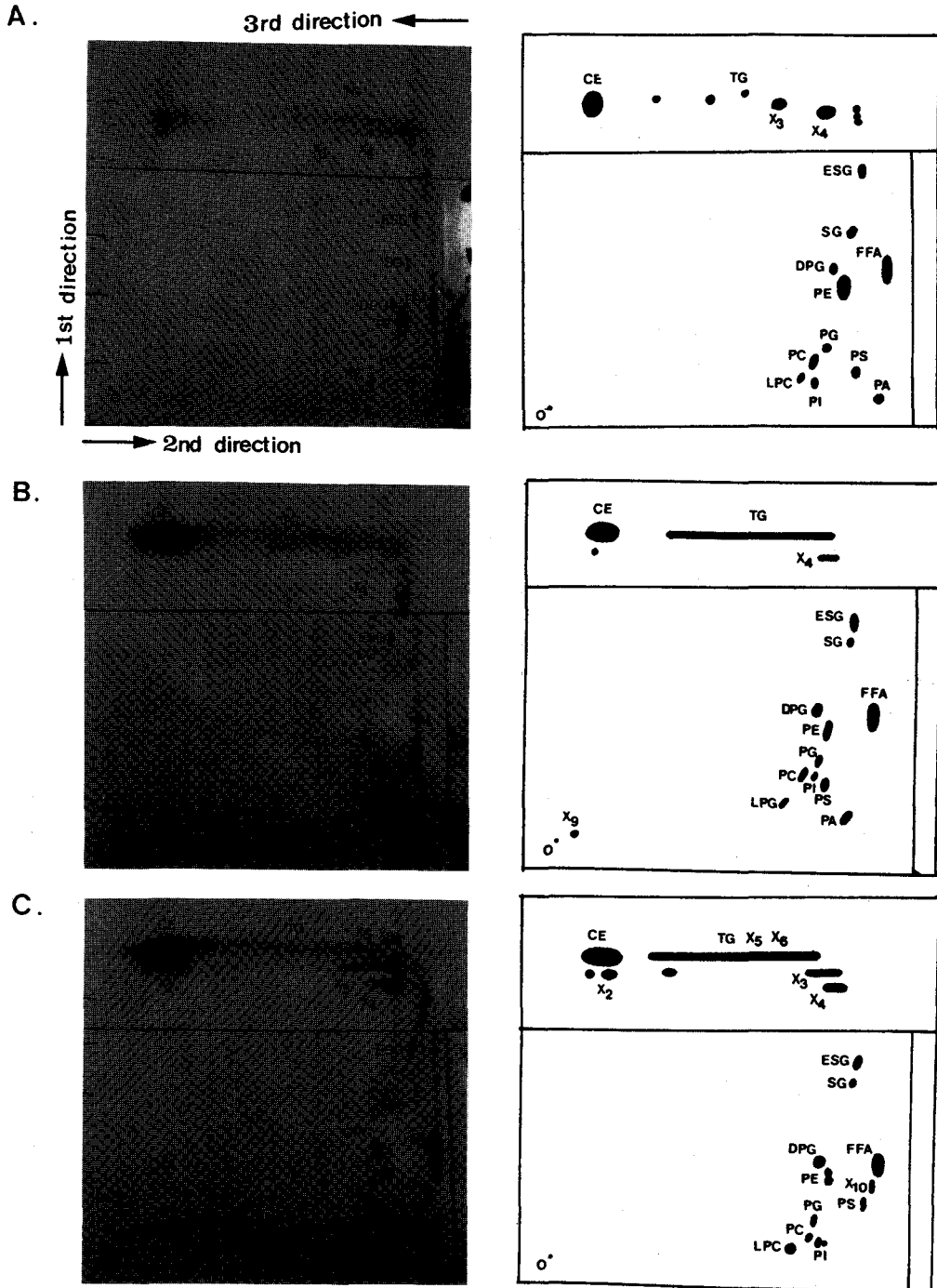


Fig. 8. 3-Dimensional TLC chromatograms of total lipids of *Rhizopus oryzae* under various culture conditions. A. precultured in nutrient broth medium (St); B. cultivated for 24 hrs upon the cadmium (0.5 mM) supplemented PYE medium (Cd⁺ 24 hr); C. cultivated for 48 hrs upon the cadmium (0.5 mM) supplemented PYE medium (Cd⁺ 48 hr).

pholipid계열의 지질은 PA(phosphatidic acid), PC(phosphatidyl choline), PI(phosphatidyl inositol), PG(phosphatidyl glycerol), PE(phosphatidyl ethanolamine), DPG(diphosphatidyl glycerol), LPC(lysophosphatidyl choline), PS(phosphatidyl serine) 및 동정되지 않은 X_9 등이 탐지되었다. neutral fat 계열의 지질은 TG(triglycerol) 및 동정되지 않은 X_3 , X_4 , X_5 , X_6 , X_7 등이, sterol 계열은 CE(cholesterol ester) 및 동정되지 않은 X_1 , X_2 등이, glycolipid 계열은 ESG(esterfide steryl glycoside), SG(steryl glucoside) 등이 FFA(free fatty acid) 계열은 1 spot로 검출되었다.

동일한 양의 시료를 취하여 총 지질을 분획하고 TLC에 적용하였을 때 *R. oryzae*는 배양 조건에 따라 각 종류의 지질의 종류와 양적인 변화는 매우 특이하게 나타났다. 즉 당과 인산이 결합된 $S^{-}P^{-}$ 처리의 세포에서는 전배양 세포 및 다른 배양 조건에 비하여 중성지방 계열의 지질(TG, X_3 - X_8)과 sterol 계열의 지질(CE, X_1 , X_2) 등이 양과 종류에 있어 많이 그리고 다양하게 검출되었으며, 인지질은 정반대로 종류와 양에 있어 감소되었고 또한 FFA는 검출되지 않았다(Fig. 8-B). 또한 중금속 카드뮴을 첨가한 세포에서는 다른 배양 조건에서 배양되어진 세포에 비하여 지질의 종류에 있어서는 인지질 X_9 이 새롭게 검출되었고 PS와 PA의 양이 큰 spot로 나타난 것을 볼 수 있었다(Fig. 8-E, F).

고 찰

본 연구에 사용되어진 *Rhizopus oryzae*는 카드뮴의 첨가농도가 증가함에 따라 거의 비례적으로 카드뮴의 적응 및 해독을 위한 잠복기가 길어졌다. *Rhizopus* sp.의 경우, 성장률에는 clumped dispersed 균사 성장형태가, 대사산물의 형성에서는 균질한 dispersed 균사 성장형태가 적합하다(Morrin and Ward, 1990)는 보고와 같이 본 연구에 사용한 *R. oryzae*는 중금속 카드뮴 영향 하에서는 성장률에 이로운 clumped dispersed 균사 성장형태를 취하지 않고, 대사산물 형성에 이로운 dispersed 균사 성장형태를 보였다. 무기인산 중합체(poly-P) 축적량 변화는 카드뮴 첨가 배양세포(Cd^{+} 24 hr)가 대조군(Cd^{-} 24 hr)에 비해 산불용성 무기인산 중합체는 약 5배 정

도, 총 무기인산 중합체는 2배 이상 높게 축적되었고, 카드뮴 첨가 배양세포(Cd^{+} 48 hr)는 산불용성 무기인산 중합체는 감소하였고, 산가용성 무기인산 중합체가 증가하는 양상을 볼 때 카드뮴에 대한 계속적인 해독 및 적응을 위하여 무기인산 중합체는 세포내에서 계속적으로 turnover가 일어나고, 무기인산 중합체 system은 compartmentalization 되면서 카드뮴 해독기작에 관여한다(Lee 등, 1984; 1990; Kulaev, 1979)는 것을 추정해 볼 수 있다.

한편, 당과 인산의 결합 배양($S^{-}P^{-}$)하에서도 산불용성 무기인산 중합체가 축적된 현상은 무기인산의 제한이 무기인산 중합체의 합성을 억제하지 않는다(Bourne, 1990; Lee *et al.*: 1990)는 내용과 일치하였다. 이러한 면에서 영양 불균형(당·인산 결합)하에서 생존 및 삼투압 유지를 위하여 세포내 ion의 balance를 맞추는 pool로서의 역할을 poly-P가 수행한다는 것을 고려할 수 있다. 카드뮴 첨가 배양시 전배양세포에 비하여 ACPase 활성은 6배 정도 증가한 반면 ALPase 활성은 증가되지 않은 결과 세포 성장에 필요한 functional Pi의 주 기능이 ACPase에서 나타나는 것으로 생각된다. 이러한 것을 밀바침 하는 것으로, ALPase 활성은 카드뮴에 의해서 직접 억제되는 것으로 생각되어진다. 이는 카드뮴에 적응된 *E. coli*의 경우 카드뮴이 compartmentalization 되어 ALPase의 활성이 카드뮴에 의해 상실되지 않는다는 보고(Mitra 등, 1975)와 대조적이다. 따라서 세균류와는 달리 *R. oryzae*는 무기인산에 의한 카드뮴 축적에 관계하는 functional enzyme이 ACPase라고 생각되어진다.

카드뮴과 결합하여 Cd : S complex를 형성할 수 있는 inorganic sulfide의 세포내 양적 동태는 카드뮴 영향과 유의한 관계를 갖지 않아, 세균류와는 달리 (Aiking 등, 1982; Lee 등, 1990), *R. oryzae*에서는 Cd : S system이 카드뮴 적응·해독기작에 작용하지 않는 것으로 생각되어진다.

배양조건에 따른 단백질의 변화양상은 매우 다양하였으나, 카드뮴에 적응중인 세포에서만 발견되는 단백질은 2종류가 존재하였다. 이 단백질의 기능을 파악하기 위해서는 더 많은 연구가 필요하겠으나, 카드뮴 첨가 배양시 유도되는 포유류, 세균류, 균류의 cadmium binding protein(Khazaeli and Mitra, 1981), metallothionein(Hamer, 1986) 혹은 막단백질

(Higham and Salder, 1984)과 같은 성격을 지닌 단백질이라 추정해 볼 수 있다.

카드뮴 영향에 대한 총지질의 변화중 특기할 만한 것은 인지질 성분중 PS, PA와 동정되지 않은 X, 지질이 뚜렷하게 대조군에 비하여 증가되어진 현상이다. PS는 divalent cation 인 Mg^{2+} , Ca^{2+} 에 비하여 카드뮴과는 저농도에서도 더욱 친화력있게 결합할 수 있기 때문에 카드뮴 독성제거 및 카드뮴 유입 억제에 PS가 보완적으로 작용할 수 있다(Lee 등, 1990; Vallee and Ulmer, 1972). 따라서 *R. oryzae* 경우에는 카드뮴의 적응 해독기작에 membrane의 성분인 PS가 일부 역할을 담당할 것으로 생각되어진다.

결론적으로, *R. oryzae*에서 카드뮴 적응 및 해독기작에 관여하는 system은 카드뮴 첨가 배양시 특이하게 적응기 중에 유도되어져 cadmium binding protein 성격을 지닐 것으로 추정되어지는 2개의 단백질과 동일조건하에서 카드뮴에 적응되었을 때 유의하게 증가되는 무기인산 중합체의 pool에 의하여 1차적으로 운용되어질 것으로 사료된다.

또, 적응 후 계속적인 세포내 카드뮴의 해독을 위해서는 카드뮴결합단백질 system보다는 무기인산 중합체의 turnover와 compartmentalization을 통하여 이루어질 것으로 여겨진다. 특히 원핵세포인 세균류에서와는 달리 균류세포인 *R. oryzae*에서는 카드뮴 해독을 위해 Cd : S complex system이 유익하게 운용되지 않는 것은 매우 대조적이다.

카드뮴 적응해독기작에 1차적으로 주된 기능을 담당하는 카드뮴결합단백질 또는 무기인산 중합체 system의 운용을 위해서는 이들 system과 의존적으로 또는 독립적으로 운용되는 보완 system이 또한 필요하다. 카드뮴 적응 및 해독기작의 2차적, 보완적 system은 에너지대사에 필요한 Pi 공급과 무기인산 중합체의 turnover에 관여하는 ACPase의 derepression, PS의 합성증가 등의 방법을 통해 운용될 것으로 생각된다.

이러한 변화의 총화로 크게는 형태적인 수준에서도 변하게되어 카드뮴 적응 및 해독에 필요한 성장형태로 여러가지 산물 생성에 유리한 dispersed filamentous type을 취하게 된 것으로 생각되어진다.

적 요

*Rhizopus oryzae*의 카드뮴 적응 및 해독기작과 이에 관련된 세포내 생리·생화학적 변화를 조사하였다. *R. oryzae*는 카드뮴 첨가농도가 증가함에 따라 거의 비례적으로 잠복기가 길어졌다. 카드뮴의 해독에 관련하는 system은 카드뮴 첨가 배양시에만 적응기 중에 특이하게 유도, 생성되어져 카드뮴 결합단백질의 성격을 지닐 것으로 추정되는 2종류의 단백질과 동일한 시기, 조건하에서 유의하게 증가되는 무기인산중합체 pool에 의하여 1차적으로 운용되어질 것으로 사료되며, 2차적, 보완적 system은 ACPase의 derepression 그리고 phosphatidyl serine의 합성증가 등의 방법을 통하여 운용될 것으로 생각된다. 또한 총지질화합물의 조성변화 등과 같은 다양한 생리·생화학적 물질대사 경로의 변화를 일으켰다. 이러한 변화의 총화로 크게는 형태적 변화까지 일어나 카드뮴 적응 및 해독에 필요한 성장형태로서 여러가지 산물 생성에 유리한 dispersed filamentous type을 취하였다.

사 사

본 논문은 학술진흥재단 자유공모과제 연구비(1988. 6. 1.~1990. 6. 1.)의 일부로 수행되었음.

參考文獻

- Aiking, H., Kok, K., van Heerikhuizen, H. and van Triet, J. 1982. Adaptation to cadmium by *Klebsiella aerogenes* growing in continuous culture proceeds mainly via formation of cadmium sulfide. *Appl. Environ. Microbiol.* **44**: 934-944.
- Bligh, E.G. and dyer, W.J. 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Biochem. Physiol.* **37**: 911-917.
- Bourne, R.M. 1990. A³¹P-NMR study of phosphate transport and compartmentation in *Candida utilis*. *Biochem. Biophys. Acta.* **1055**: 1-9.
- Campbell, T.B. and Lueking, D.R. 1983. Light mediated regulation of phosphate synthesis in *Rhodospirillum rubrum*. *J. Bacteriol.* **155**: 806-816.

- Clark, D.W., Tkacz, J.S. and Lanpen, J.O. 1982. Asparagine-linked carbohydrate does not determine the cellular location of Yeast vacuolar nonspecific alkaline phosphatase. *An. Soc. Microbiol.* **152**: 865-873.
- Ernst, S.A. 1975. Transport ATPase cytochemistry: Ultrastructural localization of potassium-dependent and potassium-independent phosphatase activities in rat kidney cortex. *J. Cell. Biol.* **66**: 584-608.
- Hamer, D.H. 1986. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* **55**: 913-915.
- Fiske, C.H. and Subbarow, Y. 1925. The colorimetric determination of phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**: 35.
- Higham, D.P. and Sadler, P.J. 1984. Cadmium-resistant *Pseudomonas putida* synthesizes novel cadmium proteins. *Science.* **225**: 1043-1046.
- Hughes, D.E. 1971. 'Methods in microbiology', Academic press. London and New York. **5B**: 27-30.
- Khazaeli, M.B. and Mitra, R.S. 1981. Cadmium-binding component in *Escherichia Coli* during accumulation to low levels of this ion. *Appl. Environ. Microbiol.* **41**: 46-50.
- King, T.E. and Morris, R.O. 1967. Determination of acidlabile sulfide and sulfhydryl groups. *Methods Enzymol.* **10**: 634-641.
- Kulaev, I.S. 1979. The Biochemistry of inorganic polyphosphatase. John Wiley and Sons. Ltd. New York.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄. *Nature.* **227**: 680-685.
- Lee, K.S. 1984. Studies on the regulation of phosphate metabolism in yeast (*Saccharomyces uvarum*). Ph.D. Thesis. Hanyang Univ.
- Lee, K.S., Kang, S.W., Kim, Y.H., Kim, E.A., Kim, K.H. and Choi, Y.K. 1990. Cadmium detoxification mechanism of Cd-resistant *Bacillus* sp. Isolated from industrial sewage. *Kor. J. Limnol.* **2**: 115-127.
- Lee, K.S., Song, I.G., Park, Y.S., Yoo S.A. and Choi, Y.K. 1990. Physio-biochemical changes correlated with cadmium adaptation and detoxification mechanism in *Klebsiella aerogenes*. *Kor. J. Microbiol.* **28**: 249-257.
- Lowry, O.M., Rosenbrough, N.J., Farr, A.L. and Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**: 265-275.
- Mitra, R.S., Gray, R.H., Chin, B. and Berenstein, I.A. 1975. Molecular mechanisms of accomodation in *Escherichia coli* to toxic levels of Cd²⁺. *J. Bacteriol.* **121**: 1180-1188.
- Miyachi, S. and Tamiya, H. 1961. Distribution and turnover of phosphate compounds in growing chlorella cells. *Plant and cell physiol.* **2**: 415-424.
- Morrin, M. and Ward, O.P. 1990. Relationships fungal growth, morphology and fumaric acid production by *Rhizopus arrhizus*. *Mycol. Res.* **94**: 505-510.
- Onishis, H.R., Tkacz, J.S. and Lampen, J.O. 1979. Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. *J. Biol. Chem.* **10**: 11943-11952.
- Schmidt, G. and Tannhauser, S.J. 1945. A method for the determination of deoxyribonucleic acid, ribonucleic acid and phosphoprotein in animal tissue. *J. Biol. Chem.* **161**: 83-89.
- Vallee, B. and Ulmer, D.D. 1972. Biochemical effects of mercury, cadmium, and lead. *Ann. Rev. Biochem.* **41**: 91-128.