

진균류의 Ubiquinone system의 분포에 관한 연구

박주영 · 정지원 · 신용국* · 조월순 · 서필수 · 박용하* · 이재동†

부산대학교 자연과학대학 미생물학과
*한국과학기술연구원 생명공학연구소 유전자은행

Distribution of Ubiquinone Systems in Fungi

Ju-Young Park, Ji-Won Chung, Yong-Kook Shin*, Wol-Soon Jo, Pil-Soo Seo,
Yong-Ha Park* and Jae-Dong Lee†

Department of Microbiology, College of Natural Science, Pusan National University, Pusan 609-735, Korea
*Korean Collection for Type Cultures, Korea Research Institute of Bioscience and Biotechnology,
Korea Institute of Science and Technology, P.O. Box 115, Yusong, Taejeon 305-600, Korea

Abstract

Isoprenoid quinones are essential compositions of the respiratory or photosynthetic electron transport systems of microorganisms. Their chemotaxonomic significance as well as their physiological importance has been fully realized. We determined the ubiquinone types of the genus *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Verticillium*, *Aspergillus*, and several mushroom such as *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Phellinus chrysoloma*, *Phellinus igniarius* and *Phellinus laevigatus*. Most of Deuteromycotina had Q-10(H₂), and all of mushroom had Q-9 as main ubiquinone type. Ubiquinone is considered as a valuable tool for chemotaxonomic classification for the fungi, and we need more data about ubiquinone type in other fungal taxa.

Key words : ubiquinone, *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Verticillium*, *Aspergillus*

서 론

Isoprenoid quinone은 미생물의 호흡계나 광합성의 전자 전달계의 필수적인 구성성분으로 생물계에 폭넓게 존재하며 화학적분류 뿐만 아니라 생리학적으로도 매우 중요하다. 또한 quinone 중에서도 ubiquinone과 menaquinone(MK)은 여러 종류의 isoprene 단위수와 side chain에 saturation degree를 가지며, bacterial taxonomy에 있어서는 속 단위의 동정에 유용한 수단으로 사용되어 왔으며, yeast와 yeast-like fungi에 있어서도 유용한 분류지표로 채택되어 왔다.

1985년 Kuraishi 등은 Ascomycotina, Basidiomycotina, Deuteromycotina의 주요 과에 포함되는 대표적인 종들에 대한 ubiquinone system의 일반적인 분포를 결정하였으며, 그 결과 ubiquinone system이 fungal taxonomy와 그들의 계통관계 파악에 매우 유용하다고 밝혔다. 1986년 Suzuki 등은 yeast-like fungi의 *Spothrix*속은 ubiquinone 분자의 isoprene unit로 볼 때 heterogenous인 것으로 보고하였다. 1988년 Sugiyama 등은 smut fungi와 rust fungi는 각각 Q-10, Q-9 system을 가짐을 밝혔으며, 이들 두 group의 분류에 ubiquinone system의 분석이 유용함을 밝혔다. 19

† Corresponding author

90년 Kuraishi 등은 *Aspergillus*속 및 *Penicillium*속에 있어서 ubiquinone의 isoprene unit가 형태적, 생리학적 성질과 매우 연관되어 있으며, infrageneric taxa와 ubiquinone system 사이에 일정한 상관관계가 있음을 보고하였다. 1991년 Kuraishi 등은 기보고된 fungi의 ubiquinone system 관련 1211개의 data를 총정리하여 속간의 ubiquinone type의 분포를 보고하였으며, 속 수준 이상의 분류체계를 구축함에 있어서 ubiquinone type은 중요한 분류지표임을 강조하였다.

본 실험에서는 1991년 Kuraishi 등의 보고에서 제외된 *Trichoderma*, *Verticillium*, *Gliocladium*속 및 관련 균주들을 대상으로 그들의 ubiquinone type을 결정하였다. 그 외에도 현재까지 그 분류학적 연구가 미흡한 중요 재배버섯에 대한 chemotaxonomy의 기초자료를 제공하기 위하여, 항암역할로 주목받고 있는 상황버섯(*Phellinus chrysoloma*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus laevigatus*)을 비롯한 표고(*Lentinus edodes*), 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 양송이(*Agaricus bisporus*), 팽이(*Flammulina velutipes*) 등의 식용버섯의 ubiquinone type을 분석하였다.

재료 및 방법

1. 사용균주

Trichoderma 7균주, *Gliocladium* 5균주, *Verticillium* 5균주, *Aspergillus* 13균주, 그외의 불완전균류에 해당하는 *Chrysosporium pannorum*, *Cladosporium resinae*, *Scopulariopsis* sp., *Tremella encephala*, *Ustilago raven*, 그리고 상황버섯 5균주 (*Phellinus chrysoloma*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus laevigatus*), *Agaricus bisporus* (양송이버섯), *Lentinus edodes* (표고버섯), *Pleurotus ostreatus* (느타리버섯), *Flammulina velutipes* (팽이버섯)를 대상으로하여 총 43균주의 ubiquinone type을 분석하였다(Table 1).

2. quinone의 추출

공시균주를 액체배지에 접종한 후 25°C에서 2주가량 정치배양한 다음 집균하여 50mM의 potassium-phosphate buffer로 세척한 후 동결건조한다. 1.5-2.5g의 건조균체를

500ml의 배지병(screw-capped bottle, pyrex)에 넣은 후, 물 50ml, methanol 150ml, pyrogallol 5g, sodium hydroxide 20g을 넣고 잘 녹인 후, 뚜껑을 닫는다. 증탕으로 90°C에서 1시간동안 열을 가하면서 반응을 시킨다. 가끔 배지병을 흔들어 반응액의 균일성을 유지한다. 반응이 끝나면 흐르는 수돗물에서 실온까지 냉각한 후, 100ml의 hexane을 넣고 격렬하게 흔들어, 반응액에 추출된 isoprenoid quinone을 hexane 층으로 옮겨 분리를 쉽게 한다. 배지병을 정치시킨 후 2개의 층으로 분리되면, 상등액인 hexane 층을 pasteur pipette으로 evaporator flask에 옮긴 뒤, evaporator로 건조시킨다. 다시 100ml의 hexane의 추출을 행한다. hexane층을 evaporator로 완전히 건조시킨 후, 소량의 acetone을 evaporator flask에 넣어 isoprenoid quinone을 추출한다. 이 과정을 3번 되풀이하여 isoprenoid quinone을 농축한다.

3. TLC에 의한 quinone의 분리, 정제

최종적으로 상등액을 농축한 evaporator flask에 소량의 acetone을 넣고, 이것을 silica-gel의 Thin Layer Chromatography (TLC) (Merck Kiesel-gel 60 F₂₅₄ 0.5mm thickness)에 spot하여 petroleum benzene/diethylether (9 : 1, v/v) 전개액으로 전개시킨다. 전개 후 UV 254nm에서 isoprenoid quinone band를 확인하고, silica-gel TLC에서 그 band를 긁어내어 eppendorf tube에 모아서 소량의 acetone을 넣고 잘 섞은 다음 4°C에서 15,000rpm으로 10분간 원심분리한다. 원심분리 후 상등액 반을 깨끗한 tube에 모은다. 이 과정을 3번 되풀이한다. 모은 상등액을 질소가스로 농축하여 유리로 된 microtube에 옮겨서 시료로 사용한다. 추출된 quinone은 HPLC (High Performance Liquid Chromatography)로 분석한다.

4. HPLC 분석

HPLC 사용법은 각 제조회사마다 다르지만 다음과 같은 조건으로 isoprenoid quinone을 분석하였다. column의 길이 : 4.6×250mm, eluent : methanol-isopropyl ether (3 : 1, [v/v] for ubiquinone : 4 : 1, [v/v] for menaquinone), 유속 : 1ml/min : 검출파장 : 275nm. isoprenoid quinone을 분석하기 위해 필요한 standard는 기존에 보고 되어진 균주에서 추출하여 사용하였다(Figure 1).

Table 1. Quinone profiles of the fungi

The genus	The species	Source	Quinone system
<i>Aspergillus</i>	<i>A. fumigatus</i> Fres		Q-10(H ₂)
	<i>A. awamori</i> var, <i>fumeus</i>	KCTC 6902	Q-9
		KCTC 6903	Q-9
		KCTC 6904	Q-9
	<i>A. nidulans</i> var. <i>roseus</i>	KCTC 6058	Q-10(H ₂)
		<i>A. niger</i>	KCTC 6911
	KCTC 6912		Q-9
	<i>A. usamii</i> mut. <i>shiro-usamii</i>	KCTC 6954	Q-9
		KCTC 6955	Q-9
		KCTC 6956	Q-9
		KCTC 6957	Q-9
		KCTC 6958	Q-9
KCTC 6959		Q-9	
<i>Trichoderma</i>	<i>T. harziaum</i>	IAM 12506	Q-10(H ₂)
	<i>T. koningii</i>	IAM 12534	Q-10(H ₂)
	<i>T. pseudokoningii</i>	KCTC 6046	Q-10(H ₂)
	<i>T. reesei</i>	KCTC 1285	Q-10(H ₂)
	<i>T. viride</i>	IAM 5141	Q-10(H ₂)
	<i>T. ghanense</i>	IAM 13109	Q-10(H ₂)
	<i>T. saturnisporum</i>	JCM 1884	Q-10(H ₂)
<i>Gliocladium</i>	<i>G. virens</i>	KCTC 6146	Q-10(H ₂)
	<i>G. roseum</i>	KCTC 6160	Q-10(H ₂)
	<i>G. viride</i>	KCTC 6161	Q-10(H ₂)
	<i>G. deliquescens</i>	KCTC 6173	Q-10(H ₂)
	<i>G. catenulatum</i>	IAM 10523	Q-10(H ₂)
<i>Verticillium</i>	<i>V. bulbillosum</i>	JCM 9213	Q-9
	<i>V. dahliae</i>	JCM 9509	Q-10(H ₂)
		JCM 9511	Q-10(H ₂)
	<i>V. albo-atrum</i>	KCTC 6055	Q-10(H ₂)
Other fungi	<i>Chrysosporium pannorum</i>		Q-10(H ₂)
	<i>Cladosporium resinae</i>	KCTC 6019	Q-9+α
	<i>Scopulariopsis</i> sp.	KCTC 6088	Q-9+α
	<i>Tremella encephala</i>		Q-10(H ²)
	<i>Ustilago raben</i>		Q-10(H ²)
<i>Phellinus</i> 속	<i>P. chrysoloma</i>	IMSNU 30076	Q-9
		IMSNU 30077	Q-9
	<i>P. igniarius</i>	IMSNU 30078	Q-9
	<i>P. laevigatus</i>	IMSNU 30079	Q-9
		IMSNU 30080	Q-9
Other mushroom	<i>Agaricus bisporus</i>		Q-9
	<i>Lentinus edodes</i>		Q-9
	<i>Pleurotus ostreatus</i>		Q-9
	<i>Flammulina velutipes</i>		Q-9

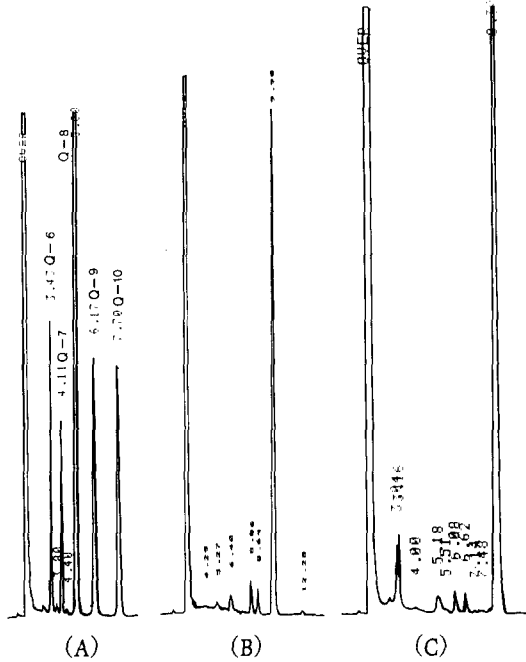


Fig. 1. 본 실험에 공시된 균주의 HPLC로 분석한 ubiquinone type.

- A. ubiquinone standard
- B. *Aspergillus niger*의 ubiquinone type, Q-9
- C. *Trichoderma harzianum*의 ubiquinone type, Q-10 (H₂)

결과 및 고찰

본 실험에서는 개개종에서 발견되는 type의 90% 이상을 구성하고 있는 ubiquinone의 한 type을 major ubiquinone type으로 간주하였다. 본 실험에 공시된 불완전균류 중에서는 *Aspergillus*속을 제외한 대부분의 공시균주가 major ubiquinone type으로 Q-10(H₂)을 나타내었다. 특히 분류학적으로 상호간에 밀접한 관련을 가지는 *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Verticillium*속은 *Verticillium bulbillosum*을 제외하고는 동일하게 Q-10(H₂)를 나타내었고, *Verticillium bulbillosum*은 예외적으로 Q-9을 나타내었다. 이는 Lee 등에 의한 ribosomal DNA의 internal transcribed spacers(ITS)의 sequencing을 통한 분석결과와도 일치한다. 즉, 이들 *Trichoderma*, *Verticillium*, *Gliocladium*속은 서로간에 명확한

속간의 경계를 가지지 않을만큼 유사성을 나타내는데 반해, *Verticillium bulbillosum*은 예외적으로 일반적인 *Trichoderma*, *Verticillium*, *Gliocladium*속과는 먼 유연관계를 나타낼 뿐만 아니라 오히려 *Penicillium*속과 더 밀접한 연관관계를 가지는 것으로 나타났다(unpublished data).

*Aspergillus*속의 경우는 Q-9이 대부분이었고, *A. fumigatus*와 *A. nidulans* var. *roseus*의 두 균주만 Q-10(H₂)로 나타나 *Aspergillus*속내에서도 이들은 다른 group에 속하는 것을 나타내었다. *Aspergillus*, *Penicillium*속과 같은 수십 혹은 수백의 종을 가진 속의 경우에는 그 아속의 구분이 생리학적, 생화학적 성상으로 구분되어지며, ubiquinone type의 분포가 이들의 생화학적 성상의 구분과 일치된다고 보고된 바가 있으며(Kuraish et al., 1990 and 1991), 본 실험에서의 결과도 이러한 아속간의 구별된 분포와 일치한다고 보여진다.

그 외의 불완전균류 가운데에서도, 총생불완전균목(Order Hypomycetales)에 속하는 *Chrysosporium pannorum*, *Cladosporium resinae*의, ubiquinone type이 각각 Q-10(H₂), Q-9으로 나타났는데, 이들은 이제까지의 ubiquinone type 분석에서 제외되었던 균종들로 현재까지 보고된 바가 없기 때문에 정확한 비교는 어려울 것으로 보인다. 또한 *Scopulariopsis* sp.가 본 실험의 결과에서 Q-9의 type으로 결정된 데 반해, 1991년 보고된 *Scopulariopsis brevicaulis*는 Q-10(H₂)이기 때문에, 좀 더 광범위한 연구결과를 바탕으로 한다면 이 속에 대한 아속의 개념을 확립하기 위한 보충자료가 될 수 있을 것이다.

담자균류 가운데, 균심균강, 다실담자균아강, 흰목이목에 속하는 *Tremella encephala*와 반담자균강, 갸부기균목에 속하는 *Ustilago raben*은 이들의 분류기준인 유성생식의 형태에 의해서는 각각 다른 분류군에 속하지만, 공통적으로 생활환의 일부에 효모와 같은 시기를 거치기 때문에 yeast-like fungi에 포함되며, 이들에 대한 분류학적인 검증이 관심의 대상이 되고 있다. 본 실험에서 *Tremella encephala*와 *Ustilago raben*의 2균주의 ubiquinone type은 Q-10(H₂)으로 나타났다. Yeast-like fungi의 ubiquinone type에 관한 연구는 Yamada 등에 의해 집중적으로 실시되어 왔는데(Yamada et al., 1987), 이 보고에서 *Tremella*속의 전 균주는 Q-10이었으며, *Ustilago antheratum*과 *Ustilago onumae*를 제외한 전체 *Ustilago*속은 Q-10으로 나타났다. 본 실험에서 사용된 *Ustilago raben*은 Q-10(H₂)를 main ubiquinone type으로 하고 있으며, 상기의 예외적인 2균주와

일치하였다.

담자균류 가운데에서도, 항암성분의 발견으로 많은 관심의 대상이 되고 있는 상황버섯(*Phellinus chrysoloma*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus laevigatus*)은 균심균강, 단실담자균아강, 민주름살버섯목에 속하며, 그 외 표고(*Lentinus edodes*), 팽이(*Flammulina velutipes*), 느타리(*Pleurotus ostreatus*), 양송이(*Agaricus bisporus*)와 같은 대표적인 재배버섯은 송이목에 속한다. 본 실험에 공시된 이들 버섯은 모두 main ubiquinone type으로 Q-9을 공통적으로 가지는 것으로 나타났다. 현재까지 버섯에 대한 화학분류학적인 분류자료는 지극히 부족하므로, 본 실험의 자료를 바탕으로한 보다 광범위한 연구가 필요할 것으로 사료된다.

결론적으로, 이러한 ubiquinone type에 대한 분석자료는 fungi의 분류를 위한 중요한 분류지표로 간주될 수 있을 것이다. 또한 최근 균류의 계통발생학적 분류의 핵심을 이루고 있는 18S ribosomal DNA, 28S ribosomal DNA 및 internal transcribed spacers (ITS)의 sequencing을 통한 분류체계의 확립에 있어서도 ubiquinone type의 분석은 부가적인 자료로 활용될 수 있을 것이며, 속간, 혹은 아속간의 분류기준으로 의의가 있다고 보인다.

요 약

Isoprenoid quinones은 미생물의 호흡계나 관함성의 전자전달계의 필수적인 구성성분으로, 그들의 화학적분류 뿐만 아니라 생리학적인 중요성은 충분히 인식되어 있다. 본 실험에서는 *Trichoderma*, *Gliocladium*, *Verticillium*, *Aspergillus* 및 *Agaricus bisporus*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*, *Flammulina velutipes*, *Phellinus chrysoloma*, *Phellinus igniarius*, *Phellinus chrysoloma*를 포함한 일부 식용버섯의 ubiquinone type을 결정하였다. 대부분의 불완전균

류는 Q-10(H₂)를, 본 실험에 사용된 식용버섯 전체는 Q-9을 main ubiquinone type을 가지는 것으로 나타났다. 따라서 ubiquinone type은 진균류에 있어서도 화학적 분류의 유용한 수단으로 간주되며, 보다 광범위한 연구결과의 축적이 필요할 것이다.

참 고 문 헌

1. Shin, Y. K., Lee, J. S., Lee, K. C., Chun, C. O., Kim, H. J., Joo, W. H., Lee, J. D. and Park, Y. H. : Isoprenoid Quinone Profiles in Microbial Taxonomy, *Korean J. Life Sciences*, 5, 211-217(1995).
2. Kuraishi, H., Sugiyama, J. and Yomada, Y. : Distribution of Ubiquinone Systems in Fungi. *Bull. JFCC*, 7, 111-133(1991).
3. Kuraishi, H., Ithoh, M., Tsuzaki, N., Katayama, Y., Yokoyama T. and Sugiyama, J. : *The ubiquinone system and a taxonomic aid in Aspergillus and its teleomorphs*, pp.407-420, In R. A. Samson and J. I. Pitt (ed.), *Modern Concepts in Penicillium and Aspergillus Classification*(1990).
4. Kurashi, H., Aoki, M., Ithoh, M., Katayama, Y., Sugiyama, J. and Pitt, J. I. : Distribution of ubiquinone in *Penicillium* and related genera. *Mycol. Res.* 95, 705-711(1991).
5. Kurashi, H., Katayama-Fujimura, Y., Sugiyama, J. and Yokoyama, T. : Ubiquinone systems in fungi. I. Distribution of ubiquinones in the major families of ascomycetes, basidiomycetes, and deuteromycetes, and their taxonomic implications. *Trans. Mycol. Soc. Japan*, 26, 383-395(1985).
6. Yamada, Y., Banno, I., von Arx, J. A. and van der Walt, J. P. : *Taxonomic significance of the coenzyme Q system in yeast and yeast-like fungi*, pp.299-308, In G. S. De Hoog, M. Th. Smith and A. C. M. Weijman (ed.), *The expanding Realm of Yeast and Yeast-like Fungi* (1987).