

한국전통 식품의 원료인 메주와 누룩에서 분리된 황곡균에 대한 연구

이상선* · 박대호 · 성창근¹ · 유진영²

한국교원대학교 대학원, ¹충남대학교 식품공학과, ²한국식품개발원 생물공학부

Studies on the Yellow Fungal Isolates (*Aspergillus* species) Inhabiting at the Cereals in Korea

Sang-Sun Lee*, Dae-Ho Park, Chang-Kun Sung¹ and Jin-Young Yoo²

Department of Biological Science and Education, Graduate School, Korea National University of Education, Chung-Puk 363-791, ¹Associate Professor at Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chung-Nam National University, Yu-Seong Ku, Taejon 305-764, ²Biotechnology Division, Korea Food Research Institute, Seongnam Bundang P.O. Box 2, Kyonggido 463-420, Korea

ABSTRACT: The yellow fungal isolates inhabiting at the cereals (Hwang-Kuk, HK-fungi) were widely collected from the mejus and nuluks in Korea; the meju is a raw material for Korean traditional foods for soysauce and soypaste, and the nuluk is a raw material for Korean traditional rice wine. These isolates, well known as an *Aspergillus oryzae* producing amylase for Korean rice wine or producing protease for soybeans, were compared with *Aspergillus* species known. All isolates were microscopically observed to be a species of *A. oryzae* or its related, but to be difficult to be identified. Thus, RAPD-DNA techniques were applied for these isolates and analyzed with numerical values using NT-system, or Ecological programs or Factorial analyses. Several common bands of RAPD-DNA in the 28 isolates were synthesized with the different OPD primers and speculated to be used for identification of HK fungi. The HK-fungi isolated were revealed to belong to the group of *A. flavus* previously defined. Particularly, the isolates collected from mejus were analyzed to be more closed to *A. flavus*. The species of *A. flavus*, *A. oryzae* and *A. sojae* were grouped at the values lower than those indicating the diversity of species. In other words, these three fungal species were not distinguishable and all isolates known as a HK-fungus were very closed to *A. flavus*. All isolates were not diversified at groupings of RAPD-DNA, and considered to be not the natural flora at the mejus or nuluks. The meju or nuluk having the above fungi as the fungal flora were speculated to be not termed "Korean traditional foodstuffs".

KEYWORDS: *A. flavus*, *A. oryzae*, *A. sojae*, RAPD bands, fermented soybean, Korean wine

*Aspergillus*는 우리 주변에서 가장 흔하게 볼 수 있는 불완전 균류로서, 분포 범위가 넓고 산업적으로 많이 이용되는 속의 균이다. 이 속의 균들은 효소(amylase & protease)활성이 강하기 때문에 아시아 각국에서는 오래 전부터 발효식품에 이용해 오고 있다(김과 장, 1993; Smith, 1994). *A. flavus* Group(편의상으로 사용되는 용어되는 subgenus 혹은 tribe로 사용됨; Raper & Fennell, 1973)은

황곡균으로 불리우며, *A. flavus* Link, *A. oryzae* (Ahlb.) Cohn, *A. sojae* Sakaguchi & Yamada, *A. tamarii* Kita 외에 수 종이 포함된다. 특히, 이 가운데서 *A. flavus*는 식품산업에서의 역할의 중요성과 더불어 aflatoxin을 생산하기 때문에 중요성하다. 이들 간의 분류는 형태적인 기준에만 의존하므로 서로 간에 구분하기 어려워, 비전통적인 새로운 분류법으로 DNA상보성을 이용한 분류(Kurtzman 등, 1986), 전기영동에 의한 isozyme과 ubiquinone system의 비교 분류(Yamatoya 등, 1990) 등이 시도되어 다양한 결과를 얻기도 하였다(Smith,

*Corresponding author
Fax 082-431-232-2330 or sslee
@knuucc-sun.knue.ac.kr.

1994). 이러한 연구는 식품의 균독소 생산에 의한 국민건강과도 관련되어 중요한 내용으로 인식되고 있다. 이 Group에 속하는 *A. oryzae*는 단백질과 녹말의 분해력이 우수하여 전통식품인 누룩과 메주에 많이 사용되는 균이기도 하다(조와 이, 1970). *A. sojae*는 앞의 황곡균과 형태적으로 비슷하며, 장류 산업에서는 일본 된장의 영향을 받아 1960년대 초부터 활발하게 연구되었다(박, 1993). *A. niger van Tieghem*는 쉽게 접할 수 있는 오염균으로 유기산 생성능력이 우수하며, *glucose oxidase*, *catalase*, *lipase*, *glucoamylase* 등 다양한 효소를 생산하여, 산업적으로 중요한 균으로 보고되고 있다(Smith, 1994; Powell 등, 1994). 또 이들이 분비하는 유기산은 배지의 pH를 떨어뜨려 다른 잡균의 번식을 억제하므로 누룩 등에 많이 쓰이며, 이 종이 돌연변이를 일으킨 백곡균은 탁주와 약주의 제조에 쓰이고 있다(김과 장, 1993). 이러한 면에서 메주와 누룩에 관련되는 발효균에 대한 기본적인 유전적인 차이점 혹은 균에 대한 분류적인 문제점을 해결하는 것은 생물학적으로나 산업적으로도 중요할 것으로 생각된다.

최근에는 PCR 반응으로 증폭된 DNA 길이의 차이에 의해 유전적 다형성을 검출하는 방법인 RAPD(Randomly Amplified Polymorphic DNAs) 법이 주목을 받고 있다(Yu 등, 1996). 이 방법은 소량의 DNA만으로도 수행이 가능한 높은 감응도, 시험 과정이 빠르고 간편한 점, 특정한 부분만 선택적으로 증폭시킬 수 있는 선택성 등의 장점과 더불어(Weising 등, 1995), DNA fingerprint 법이나 RFLP(Restriction Fragment Length Polymorphism) 법과는 달리 복잡한 실험절차가 요구되지 않고 효과가 크다는 점에서 편리하다(이와 상, 1995). 그러나 많은 장점을 가진 이 기법을 이용하여 황곡균에 대한 유전적 다형성을 연구한 경우는 많지 않다. 이에 따라 본 연구에서는 전통식품의 원료인 메주와 누룩에서 28개체의 황곡균을 분리하여 관찰하였으며, RAPD 기법을 이용하여 이들간의 유전적 다형성을 분석하였다. 그 결과 황곡균의 각종 간에는 큰 차이점이 없는 것으로 판명되었다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용된 황곡균은 우리나라의 재래 발효식품의 재료물질인 메주와 누룩에서 분리하였다. 메주에서 분리된 균들은 한국교원대학교 생물학과 미생물실험실(Lee, 1995; Lee 등, 1993, 이, 1995)에서 보관중이며, 누룩에서 분리된 접합균은 현재 충남대학교 식품공학과 발효공학실(오, 1995)에 보관되어 있다. 기타 균들은 ATCC와 KCTC에서 구입하였다(Table 1).

DNA추출

보관중인 포자를 PDA 배지(Potato Dextrose Agar)에서 7일간 배양하여 포자가 생산된 것을 접종원으로 사용하였다. 다음은 DNA를 균사체로부터 얻기 위하여 PD broth에 2일간 진탕배양(150 rpm)하였다. 액체배지의 균사체를 여과장치를 통하여 멸균된 여과지에 모으고, 배지 성분을 제거하기 위하여 멸균 증류수로 여러 번 세척하였다. 이와 같은 과정을 거친 약 2g 균사체를 -70°C 에 보관하여, DNA를 분리 시료로 사용하였다. 멸균된 막자사발에 냉동 보관된 균사체를 넣고 액체질소를 부은 후 갈아 분말로 만들고 1g당 3 ml의 extraction buffer(25 mM Tris-HCl pH 8.0, 25 mM EDTA, 50 mM NaCl, 1% SDS)를 넣고 잘 혼합하여 원심분리한 상등액에 침전시켜서 얻었다(Yu 등, 1996). 이 침전물에 5 ml의 TE buffer(10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0)를 가하고 proteinase K와 RNase A를 처리한 후 동일 부피의 PCI(phenol 25 : chloroform 24 : isoamylalcohol 1)에 1회, CI 용액(chloroform : isoamylalcohol=24 : 1)에 3회 처리한 후 1/10 부피의 3M sodium acetate와 2부피의 ethanol을 가하여 -20°C 에서 30분간 침전시켰다. 이를 원심분리하여 얻은 침전물을 70%의 ethanol로 세척하고 건조시킨 후 500 μl 의 TE buffer를 넣어 DNA를 용해시켜 -20°C 에 보관하고 필요할 때마다 이용하였다.

PCR반응

Taq polymerase와 dNTP는 한국생공(주)에서, primer는 Operon Technologies Ins(Alameda, CA, U.S.A)에서 구입한 OPD kit(10 mer)를 이용하였다. PCR 반응은 일반적인 방법(Williams *et*

Table 1. The fungal isolates purchased^a and collected^b from the hand made raw materials, mejus or nuruks for Korean traditional foodstuffs

Isolates	Identified	Descriptions (References of sources)
AF-01	M-1	<i>A. oryzae</i> identified and collected from Meju (Lee, 1995)
AF-02	M-4	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (Lee, 1995)
AF-03	M-25	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (Lee, 1995)
AF-04	M-39	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (Lee, 1995)
AF-05	M96-21	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (Yoo, JY, 1996)
AF-06	SK-19 (unknown)	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (Sung, 1995)
AF-07	O4-5 (unknown)	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Ok-Cheon Meju (Sung, 1996)
AF-08	Unmarked	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (JM; Sung, 1996)
AF-09	1-A	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (JM; Sung, 1996)
AF-10	M96-4	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Zong-Pyung Meju (PM; Lee, 1996)
AF-11	Meju 6	Unknown
AF-12	SK-16	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (Sung, 1995)
AF-13	unmarked	Unknown but collected from the Nuluk on Shin-Tan-Jin
AF-14	Nuluk-1	Unknown but collected from Nuluk (Sung, 1996)
AF-15	Nuluk-2	Unknown but collected from Nuluk (Sung 1996)
AF-16	Nuluk-12	Unknown but collected from Nuluk (Sung 1996)
AF-17	SK-21	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (Sung 1995)
AF-18	A-7	Contaminant in Lab
AF-19	A-8	Contaminant in Lab
AF-20	AJ-1	<i>A. sojae</i> identified and obtained from Meju (JM; Sung, 1996)
AF-21	unmarked	<i>A. sojae</i> identified and obtained from Meju (JM; Sung, 1996)
AF-22	AO-12	Mutants, yellow colonies and short conidiophores
AF-23	AO-7	<i>A. oryzae</i> purchased ATCC 2114
AF-24	SK-24	<i>A. flavus</i> purchased KCTC 2117
AF-25	MT-15	Contaminants in Lab
AF-26	O4-6	Unknown but collected from Meju (Sung, 1996)
AF-27	AO-12	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (Sung, 1995)
AF-28	CM1-B	<i>A. oryzae</i> identified and obtained from Meju (JM; Sung, 1996)
AF-29	V-1	<i>A. terreus</i> identified and obtained from Meju (Lee, 1994)
AF-30	Unknown	<i>A. terreus</i> identified and obtained from Meju (Lee, 1994)
AF-31	M-29	<i>A. niger</i> identified and obtained from Meju (Lee, 1995)
AF-32	M-30	<i>A. niger</i> identified and obtained from Meju (Lee, 1995)
AF-33	M-26	<i>Penicillium</i> species obtained from Meju (Lee, 1995)
AF-34	M-44	<i>Penicillium</i> species obtained from Meju (Lee, 1995)

^aThe fungal isolate were purchased from American Type of Collection Center or Korean Center of Type Collection.

^bThe isolates collected by Dr. Sung, CK for the studies of Korean traditional rice wine at Department of Food Science in Chung Nam National University (Oh, 1995); by Dr. Lee, SS for the studies of Korean traditional saysauce at Department of Biological Science and Education) in Korea National University of Education (1990 to 1994, Lee, *et al.*, 1993; Lee, 1995).

al., 1990)을 기준하여 약간의 변형을 가하였다; 각 각의 용량이 25 μ l인 PCR 반응액은 10 \times reaction buffer 2.5 μ l, dNTP 10 mM, Taq polymerase 1U, primer 0.2 pM, DNA 25 ng 등을 혼합하였다. 반응 조건은 94 $^{\circ}$ C에서 전반응시킨 후, 94 $^{\circ}$ C에서 1분 \rightarrow 35 $^{\circ}$ C에서 1분 \rightarrow 72 $^{\circ}$ C에서 2분간 반응시

킨 것을 1 cycle로하여 총 35 cycle진행시켰고, 최종적으로 72 $^{\circ}$ C에서 5분간 반응시킨 후 4 $^{\circ}$ C에서 보관하였다.

분 석

증폭된 PCR product에 대해 1 \times TAE buffer

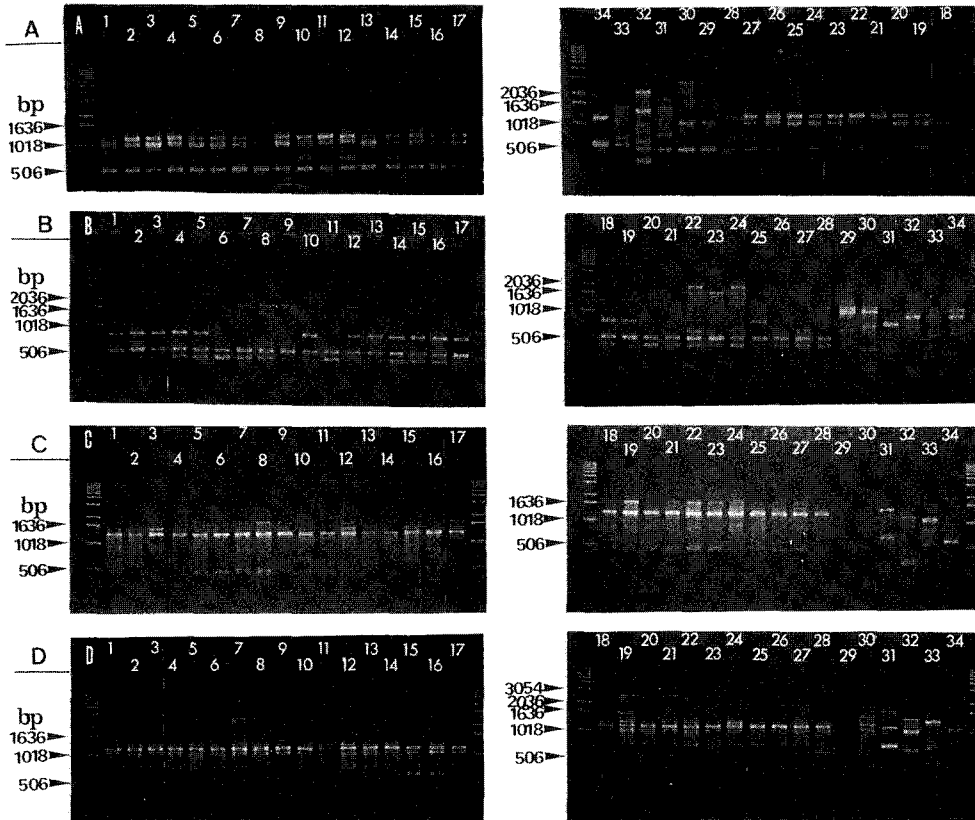


Fig. 1. The PCR-Polymorphic patterns of the 34 fungal isolate's genomic DNA made with the different primers mentioned; reacted with the primers of OPD 2(A), OPD 3(B), OPD-7(C) and OPD 13(D).

산업적으로 중요한 균인 34개의 분리균(황곡균 28개 포함)을 사용하였으며, 이들의 대부분은 메주와 누룩에서 분리한 것이고, 일부는 공기를 통해 오염된 것 또는 배양 중 돌연변이를 일으킨 것이다 (Table 1). 메주에서 분리한 균들은 한국교원대학교 미생물 실험실에서 보관되어, 최근에 현미경 관찰을 통하여 동정된 것 들이다. 누룩에서 분리한 균들은 충남대학교 발효공학 실험실에서 최근 3~4년간 분리 보관한 것들이며, 누룩과 메주에서 서식된 것이다. 이들은 모두 황록색의 포자를 형성하며, 현미경 관찰에서도 황곡균(*A. oryzae*)으로 동정되었다. 그러나 현미경을 통한 형태적 구분에는 많은 어려움이 있어, 세부적으로 분류하지 못하였다. 분리된 균들의 유전적인 차이점을 파악하기 위하여, *A. oryzae*(ATCC)와 *A. flavus*(KCTC)의 대조균을 사용하였으며, 다른 종 또는 다른 속과의 차이점을 파

악하기 위하여 6개의 분리균을 각각 이용하였다.

RAPD

34개의 분리균을 배양하여 얻어진 균사체로부터 genomic DNA를 추출하였으며, 분리 정제된 genomic DNA는 일정한 크기를 가진 단일 band로 나타났다. 황곡균 28균주를 포함한 총 34균주에 대해 PCR을 실시하여 OPD-2 primer에서 23개, OPD-3 primer에서 16개, OPD-7 primer에서 12개, OPD-13 primer에서 17개 등 4개의 primer에서 총 68개의 polymorphic DNA band를 얻었다. 증폭된 DNA band의 크기는 대부분이 0.5~2 Kb 사이였으며, 0.5Kb와 1.1~1.2 Kb에서 황곡균에서만 나타나는 동일 band 4개를 발견되었다. OPD-2 primer의 경우 실험에 사용된 *Aspergillus* 속 32분리균에서 공통으로 나타나는 0.5 Kb 크기

Table 3. Cosine Similarity Coefficients between two fungal isolates*. The values (1.00) in the box indicated the identical form of the fungal isolate and calculated by SPSS PCPlus programs

Cases	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
2	.92																
3	.88	.96															
4	.88	.96	1.00														
5	.83	.90	.93	.93													
6	.74	.81	.85	.85	.86												
7	.71	.71	.75	.75	.77	.89											
8	.66	.74	.78	.78	.80	.92	.96										
9	.69	.76	.81	.81	.83	.88	.93	.96									
10	.76	.84	.81	.81	.83	.81	.78	.81	.84								
11	.80	.88	.84	.84	.86	.84	.81	.84	.88	.88							
12	.85	.93	.96	.96	.90	.82	.73	.75	.78	.85	.81						
13	.88	.96	.92	.92	.86	.77	.74	.77	.80	.88	.91	.89					
14	.81	.88	.85	.85	.86	.71	.69	.71	.74	.88	.84	.89	.92				
15	.78	.85	.89	.89	.83	.89	.80	.82	.78	.78	.74	.86	.81	.75			
16	.83	.83	.80	.80	.81	.80	.83	.80	.76	.83	.86	.77	.86	.80	.83		
17	.85	.93	.96	.96	.96	.89	.80	.82	.85	.85	.89	.93	.89	.82	.86	.83	
18	.81	.88	.92	.92	.93	.85	.82	.85	.88	.88	.92	.89	.92	.85	.82	.86	.96
19	.93	.85	.89	.89	.90	.82	.80	.75	.78	.78	.81	.86	.81	.75	.80	.83	.93
20	.72	.80	.84	.84	.86	.92	.89	.92	.96	.88	.91	.81	.83	.77	.81	.79	.89
21	.78	.78	.82	.82	.83	.82	.86	.82	.85	.89	.86	.81	.82	.73	.83	.86	
22	.71	.71	.75	.75	.76	.75	.85	.81	.84	.78	.81	.79	.74	.75	.73	.82	.79
23	.71	.71	.75	.75	.77	.82	.93	.89	.93	.85	.81	.80	.74	.75	.73	.77	.80
24	.66	.74	.78	.78	.80	.78	.82	.85	.88	.74	.84	.75	.77	.71	.69	.73	.82
25	.76	.84	.88	.88	.90	.81	.78	.81	.84	.84	.88	.85	.88	.81	.78	.83	.93
26	.64	.72	.77	.77	.79	.84	.81	.84	.88	.88	.83	.81	.75	.77	.74	.72	.81
27	.71	.78	.82	.82	.83	.82	.80	.82	.85	.85	.89	.86	.81	.82	.80	.83	.86
28	.69	.76	.81	.81	.76	.88	.85	.88	.84	.84	.80	.85	.80	.81	.85	.76	.78
29	.20	.20	.20	.20	.18	.20	.19	.20	.20	.20	.21	.19	.21	.20	.19	.18	.19
30	.35	.35	.33	.33	.31	.25	.24	.25	.26	.26	.36	.32	.36	.33	.24	.31	.32
31	.37	.37	.35	.35	.33	.35	.27	.28	.29	.29	.30	.34	.30	.28	.34	.26	.34
32	.38	.38	.36	.36	.40	.42	.35	.36	.38	.44	.39	.41	.33	.36	.35	.34	.41
33	.00	.00	.06	.06	.05	.06	.06	.06	.06	.00	.00	.06	.00	.00	.06	.00	.06
34	.00	.00	.07	.07	.07	.07	.07	.07	.08	.00	.00	.07	.00	.00	.07	.00	.07
Case	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	
19	.89																
20	.92	.81															
21	.89	.86	.89														
22	.81	.79	.81	.91													
23	.82	.80	.89	.93	.91												
24	.85	.75	.84	.82	.88	.82											
25	.96	.85	.88	.85	.78	.78	.88										
26	.84	.74	.91	.89	.81	.89	.84	.88									
27	.89	.80	.89	.93	.91	.86	.82	.85	.89								
28	.81	.71	.88	.85	.78	.85	.74	.76	.88	.85							
29	.20	.19	.21	.19	.17	.19	.20	.20	.21	.19	.20						
30	.33	.32	.27	.32	.29	.24	.25	.26	.18	.32	.26	.71					
31	.28	.34	.30	.27	.25	.27	.28	.29	.30	.27	.29	.20	.16				
32	.36	.41	.39	.41	.37	.41	.30	.31	.39	.41	.38	.17	.21	.36			
33	.06	.06	.06	.06	.05	.06	.06	.06	.06	.06	.06	.00	.00	.00	.00		
34	.07	.07	.08	.07	.06	.07	.07	.08	.08	.07	.08	.00	.00	.00	.00	.54	

* These results obtained by NT-system was also compared with those obtained by SPSS PC+: Command by CLUSTER A TO BI /PRINT DIST /MEASURE EUCLID /METHOD SINGLE/PLOT DENDROGRAM, by CLUSTER A TO BI /PRINT DISTANCE /PLOT DENDROGRAM/METHOD CENTROID, or by CLUSTER A TO BI /PRINT DISTANCE /PLOT DENDROGRAM/METHOD COMPLETE/MEASURE COSINE.

의 동일 band를 발견할 수 있었다(Fig. 1A lane 1-32). 또, OPD-3 primer의 경우 0.5 Kb, OPD-7 primer의 경우 1.2 Kb, OPD-13 primer의 경우 1.1 Kb 크기에서 황곡균에서만 나타나는 동일 bands 가 발견되었는데(Fig. 1D lane 1-28), *A. niger*와 *A. terreus*에서는 이 band가 발견되지 않았다. 한편, 이와 같은 결과는 anealing 온도를 32°C~38°C로 변화시키거나, anealing 시간을 30초~1분까지 변화시켜도 큰 차이가 없었다. 각 분리군 별 분리지역이나 분리원에 따른 특징적인 polymorphic DNA pattern은 발견되지 않았다.

유사도

Table 2에서 나타난 자료에 대해 일반적으로 많이 사용하는 NT-system을 이용하여 유사도지수 (Similarity Coefficient)를 구하였다. 또한, 앞에서 언급된 바와 같은 SPSS PCplus을 이용하여 여러 가지 수식을 이용한 결과와 비교하였다. Basic program를 통한 집괴분석을 하였으며, 이들은 대체적으로 동일한 결과를 나타냈으나, 가장 뚜렷한 유사도를 나타내는 COSINE방법을 채택하였다 (Table 3). 본 분석에서 나타난 숫치는 유사도 지수로, 분리군 AF-3과 AF-4의 관계에서 숫치는 1로서 유전자적인 차이가 없는 동일 개체인 것으로 나타났다. 이와 반면에, *Penicillium*속인 AF-33과 AF-34는 분리군 AF-1, 2, 10, 11, 13, 14, 16, 29, 30, 31, 32 등과 유사도 지수가 0 으로서 서로 간에 유전적인 관련이 없는 것으로 확인되었으며, 그 밖의 다른 분리군과도 유사도 지수가 0.05~0.08로 유사성이 거의 없었다(Table 2).

집괴분석

유사도 지수에서 나타난 결과를 토대로 각 분리군 간의 관계를 서로 비교하여 보기 쉽게 나타낸 것이 유사도이며(Fig. 2), SPSS PCplus를 이용하여 구하였다. 이 자료에서는 분리군 간의 거리를 상대적으로 표시하여 유사도가 가장 큰 것의 거리값을 0, 가장 작은 것의 거리값을 25로 표시하였다. 유사도 상에서는 28개의 황곡균이 2개의 대집단을 형성하고, 이것은 다시 거리값 5 이하인 6개의 소집단으로 분리되어 나타났다. 이 소집단을 ABCDEF로

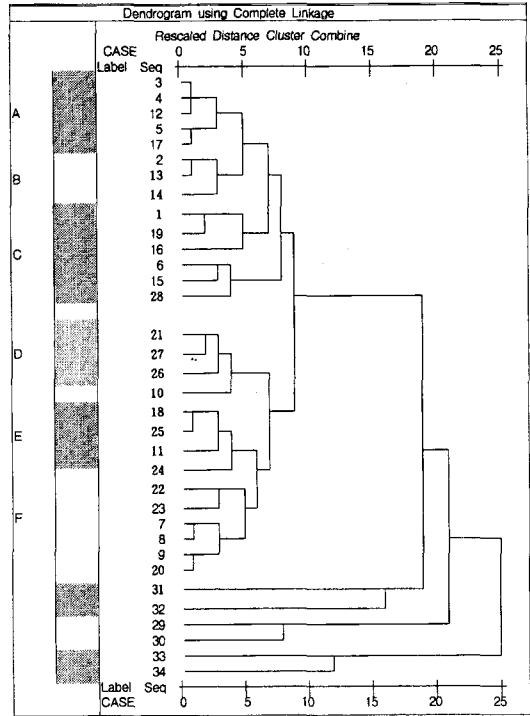


Fig. 2. Dendrogram of the 34 fungal isolates calculated by the unweighted pair grouping methods (the scale shown here indicated the cosine similarity coefficient).

세분하여 표시하였다. 각 소집단은 3~8개의 분리군을 포함하며 소집단 A, B와 C는 거리값 7에서, D, E와 F는 거리값 6.5에서 대집단을 형성하였다. 황곡균과 *Penicillium*속은 거리값 25로 가장 유사성이 작았으며, 황곡균과 *A. niger*는 거리값 18, 황곡균과 *A. terreus*는 거리값 21로 나타났다. 종(또는 Group)내의 관계를 살펴보면 황곡균의 경우는 거리값 10이내에서 동일 집단을 형성하였으며, 다른 종의 균에대 대한 거리값은 8(*A. niger*), 16(*A. terreus*) 12 (*Penicillium*)이며, 각종들이 묶음을 형성하였다. 이와같이 사용된 균들의 속간 또는 종간 비교에 의하면, 황곡균은 모두 10이하의 값으로 큰 유사성을 나타내는 것을 알 수 있다.

유사도 상에 나타난 황곡균 28분리군을 6개의 소집단 별로 살펴보면, 소집단 A는 8개의 분리군이 포함되며, 본 실험실에서 분리한 메주균이 많이 포함되었다. 소집단 B와 C는 여러 가지 분리원에서

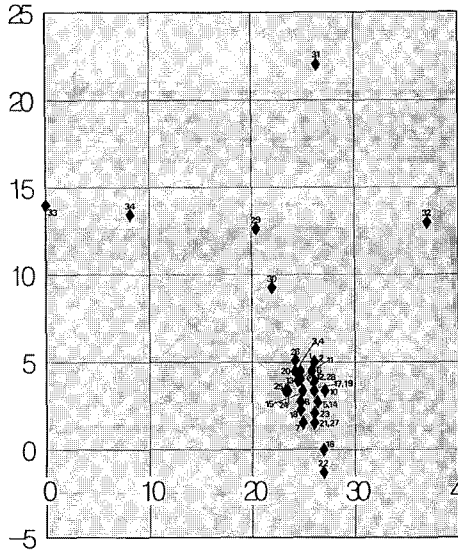


Fig. 3. Polar Ordinations of the 34 fungal isolates calculated by Bray-Curtis method calculated from Basic programs (the absolute distance methods).

분리된 것들이며, 소집단 D는 모두 메주에서 분리된 균으로 이 중에는 *A. sojae*로 동정된 것이 포함되어 있었다. 소집단 E는 일부 오염균과 함께 *A. flavus*로 동정된 것이 포함되어 있었고, F는 장류 업체에서 사용하는 제곡균이 많이 포함되어 있었다. 특히, 소집단 F의 경우 *A. oryzae*와 *A. sojae*로 동정된 분리균이 함께 포함된 점과 변이를 일으킨 것으로 추정되는 분리균(AF-22)이 함께 포함되어 있었다. AF-22는 현미경 관찰 하에서는 *A. oryzae*와 동일한 형태적 특징을 나타내지만 PDA 배지 상에서 colony가 연노랑색으로 녹색을 전혀 띠지않고, 포자낭병(conidiophore)의 길이가 아주 짧은 특징이 있었다.

Table 2의 자료에 대하여 수리 분류학에서 많이 사용되는 Bray-Curtis method에 의한 극좌표(PO)분석으로 absolute distance methods을 이용한 내용이다(Ludwig & Reynolds, 1980)과 요인 분석인(PCA)를 실시한 결과는 Fig. 3 및 Fig. 4와 같다. 34개의 분리균 전체를 대상으로한 극좌표 분석 결과는 유사도의 결과와 유사한 것으로 나타났다. 우선, 28 분리균의 황곡균은 좌표 상에 일정한 거리 이내에서 한 개의 집단으로 군집화되어 있고,

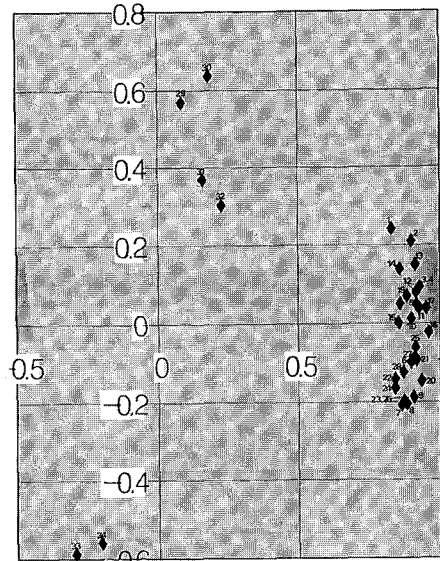


Fig. 4. Principal Component Analyses of the 34 fungal isolates calculated by Factorial Analyses (SPSSWIN; Factor 1 and 2 indicated the eigenvalues of 22.65 (66.6%) and 2.10(6.2%), respectively, but the total values of two factors was 72.8% against total eigen values).

같은 종인 *A. terreus* 분리균 2개와 *A. niger* 분리균 2개도 같은 종끼리 군집화되어 있었다. 또한, 같은 속의 *Penicillium* 분리균 2개도 일정한 거리를 두고 군집화되었다. 요인분석은 황곡균을 구분하기 위해 eigen 값으로 4개의 좌표(여기서는 Factor 1, 2, 3, 4)를 사용하여 분석되었으며, 그 중 Fig. 4로 표시된 Factor 1과 2는 전체 표시된 것 중에서 72.8%를 포함하는 값이다. 이 결과는 대부분 극좌표와 비슷한 양상을 나타냈으나, 극좌표에 비해 황곡균 전체의 범위가 좁게 나타난다는 것과 황곡균 이외의 6개 분리균 내의 거리값이 크게 나타난다는 점에서 다소 차이가 있었다.

고 찰

Aspergillus 속의 분류는 vesicle에서 나온 uniseriate phialide와 biserate phialide의 종류와 colony의 색깔 등으로 Group을 분류하고, phialide의 수, conidiospore 표면의 돌기 유무, 여러

배지에서의 생장 특징에 따라 각 종으로 분류한다 (Raper & Fennell, 1973). 이와 같이 분류하는 데는 오랜 기간의 숙련과 전문적인 기술, 전자현미경과 같은 관찰 기구가 필요하다. 특히, 산업적으로 많이 이용되는 *A. oryzae*와 *A. sojae*는 균독소를 생산하는 *A. flavus*와 형태적인 차이점을 구별하기 어려워, 식품 관계 연구에서는 구분없이 사용하는 예가 많을 것으로 생각된다. 또, 슬라이드 배양(Boothe, 1994)을 통하여 *aspergilli*의 세부적인 구조 관찰도 어려워 동정에 문제가 많은 것으로 생각된다.

RAPD결과에서 보면, AF-21(*A. sojae*)과 AF-26, 27(*A. oryzae*)이 소집단 D에 함께 포함되며, AF-20(*A. sojae*)과 AF-23 (*A. oryzae*)이 소집단 F에 함께 포함되는 등 형태적으로 서로 다른 종이라고 동정되는 것들이 같은 집단에 포함되었다. 종 내의 유사도 지수에서도 AF-29과 AF-30 (*A. niger*) 사이가 0.71, AF-31과 AF-32(*A. terreus*) 사이가 0.36인데 비해 황곡균 간에는 거의 대부분의 유사도 지수가 0.7 이상으로 동질성이 많았다. 또, 본 실험에 사용된 황곡균은 균종의 형태적 특징에서도 뚜렷한 차이를 나타내지 않았으며, 현미경 관찰이나 여러 가지 배지에서의 생장 특징 등을 통해서도 쉽게 구분되지 않는 분리균이 많았다. 따라서, 이들 간의 유전적 차이점은 *A. niger* 혹은 *A. terreus* 분리균의 관계로 볼 때, 종을 달리 할 정도는 아닌 것으로 생각된다. 물론 RAPD 분석만으로 종을 동정하거나 분류하는 데에도 문제점이 없는 것은 아니지만, 다른 방법을 통해 분류하기 힘들 경우에는 RAPD가 도움이 된다는 것을 말하고자 한다. 이런 관점에서 본 실험에 사용된 *A. oryzae*, *A. sojae* 및 *A. flavus*는 같은 종으로 추정할 수 있다. 또한 본 실험을 통하여, *A. flavus*종은 크게 2개의 group로 나눌 수가 있겠다.

식품 산업에서는 균주의 선택시 색, 맛, 향과 함께 효소역가 등 생산성과 관련된 부분을 중요시 한다. 분류학에서는 현미경적 형태에 기초한 종 개념(Alexopoulos 등, 1996)이 오래 전 부터, 인정되고 있다; 같은 종 내에서 변이는 균의 생리, 생태 등과 관련하여 *Foma specialis*(f. sp)를 이용하고 있다. 이러한 면에서 *A. flavus* Group은 분류에 있어 많은 문제점이 있으며, 이 체계도 적합치 않다. 소집단

A, B, C, D, E에서는 산업 현장에서 이용되는 제국균이 몇 개 포함되어 있는데, 여기에는 큰 의미가 있다. 우선, 각 가정에서 자가 제조되는 메주와는 달리 제국균은 일정한 균주를 직접 접종시키며, 이 때 일정한 경로를 통해 비슷한(또는 같은) 균주를 구입하여 사용했을 가능성이 있다는 점이다. 또, 어느 정도의 시간 간격을 두고 한 업체에서 사용했던 여러 균주의 포자가 제조 공정 내에서 서로 섞여질 가능성도 있다. 이런 이유로 인해 본 연구와 같은 집괴 결과가 나왔으며, 우리나라에서 사용되는 대부분의 제국균은 일정한 곳에서 얻어진다고 생각된다. 그리고, 균독소를 생산하는 *A. flavus*외에도 새로이 대사 과정에 대한 것이 연구되어야 하겠다. 또, 본 내용에 따르면 황곡균을 제국에 사용되는 것은 제고해야 한다. 여러 지역의 가정에서 자가 제조된 메주로부터 분리된 황곡균의 경우 제국균 보다는 다양한 편이지만, 극좌표와 PCA 결과(Fig. 4)로 볼 때 이들 간에도 상당한 유사성이 있다는 것을 알 수 있었다. 이에 대해서는 제국균에서와는 다른 관점으로 보아야 할 것 같다. 메주와 누룩은 오랜 기간 전해 내려오는 전통 식품이고, 균류의 입장에서 볼 때는 큰 변화가 없는 일정한 배지인 썸이다. 따라서 오랜 기간 지나는 동안 메주와 누룩에서 잘 성장하는 변이주들만이 선택되어 이들 간의 유전적인 차이점은 그리 크지 않을 것이다. 누룩에서 분리된 균이 첫째 대집단인 A, B, C 소집단에서만 발견된다는 사실은 이 점을 간접적으로 인정하는 것이며, *A. flavus* 종과도 RAPD 상에서 차이점이 있는 것으로 나타났다. 자가 생산되는 메주에서 나타나는 황곡균들은 소집단 A, B, C에서 모두 제국균(*A. oryzae* & *A. sojae*)과는 다른 것으로 나타났다. 이는 조선 전통 간장, 된장의 제조과정에 어떤 인위적인 요소가 가미된 것으로 판단된다; 지역적으로 차이가 나는 황곡균(Lee, 1995) 간에 차이가 클 것으로 기대되었기 때문이다.

본 실험에서 사용된 primer는 tenmer 크기이며, GC content는 70%였다. 이 경우 annealing 온도는 34°C로 계산되지만, 실험에서는 32~38°C까지 온도 범위를 달리 하여도 실험 결과에 영향을 끼치지 않았다. 또 annealing 시간도 30초~1분 범위에서는 큰 영향을 주지 않았다. 이와 같은 결과는 본 실험

은 반복 재현성이 크다는 것과 사용된 primer가 적절하다는 것을 의미한다. 또, Fig. 1에서 나타난 *Aspergillus* 또는 *A. flavus* Group 만의 공통 band를 이용하면 균종의 확인이 가능하며, 따라서 균종의 확인과 실험적인 조건에 대한 연구로써 앞으로 많이 이용될 것으로 기대된다.

결 론

현재 우리나라에서 산업적으로 사용되는 메주와 누룩에 서식되는 균들과 전통적으로 만들어지는 메주균을 분리하였으며, 이들이 대부분이 황곡균으로 동정이 되었다. 이들은 모두가 목적에 따라서 다른 균들로 표기되었으나 현미경관찰에서는 어떠한 차이점을 구분하기가 어려웠다. RAPD 결과 나타난 DNA band를 이용하여 NT-system, 극좌표 및 요인분석을 하였다. 이러한 균을 다른 알려진 대조균과 비교한 결과, 분리된 황곡균은 중으로 분류된 *A. flavus*, *A. oryzae* 및 *A. sojae*와 동일한 것으로 나타났다. 이들의 대조균도 모두가 같은 종류의 균으로 유사도가 표기되었다. 같은 묶음 속에 있는 황곡균 네에서, 유사도와 극좌표 및 요인분석의 결과로 본다면, 메주균과 누룩균의 묶음과 제국균으로 나타났다. 현재의 분석으로 메주균과 누룩균의 차이점은 뚜렷하지 않고, 다만 제국에 사용되는 황곡균은 전혀 다른 것으로 묶음이었다. 자연적인 발효로 만들어지는 메주균과 누룩균들도 지역에 대한 차이점보다는 인위적인 요인으로 같은 균을 사용한 예로 본실험의 결과가 나왔다. 즉 전통식품의 원료로 생각되어지는 자연산 메주와 누룩은 자연적인 지역의 균서식 양상에 기인되기보다는 제조자의 균 구입에 의존되어 사용되었기에, 조선 전통의 의미를 찾아 보기가 힘들었다.

참고문헌

김찬조, 장지현. 1993. 식품미생물학, 수확사: 76-81.
박광호. 1993. 재래 메주 발효과정 중 나타나는 미생물에 대한 연구, 한국교원대학교 석사학위논문.
오만진. 1995. 전통발효식품의 과학과 연구, 전통혼성주의 품질 향상 및 산업화 기술연구, 충남대학교, 과학기술처.

이상선. 1995. 전통메주에 관련된 미생물의 생물학적인 분류 및 안정성 연구(위탁-5) pg 393-464; 전통장류용 메주의 산업화를 위한 기반기술 연구(전통발효식품의 과학화 연구), 한국식품개발연구원, 과학기술처.
이창수, 상병찬. 1995. RAPD분석법에 의한 소 품종 판별용 표지 인자의 검출 최적화 연구, 한국식품학회지 15: 35-39.
조덕현, 이우진. 1970. 한국 재래식 간장의 발효 미생물에 관한 연구. 한국농화학회지 13: 35-42.
Alexopoulos, C.J., Mims, C.W. and Blackwell, M. 1996. Introductory Mycology, 4th eds. John Wiley & Sons Inc. see pg 309.
Boothe, C. 1971. Methods in microbiology. Vol 4. Academic Press. London.
Kurtzman, C.P., Smiley, M.J., Robnett, C.J. and Wicklow, D.T. 1986. DNA relatedness among wild and domesticated species in the *Aspergillus flavus* group. *Mycologia* 78: 955-959.
Lee, S.S, Park, K.H., Choi, K.J. and Won, S.A. 1993. Identification and Isolation of Zygomyceteous fungi found on Maeju, a Raw Material of korean Traditional soysauces. *Kor. J. Mycol.* 21: 172-187.
Lee, S.S. 1995. Meju fermentation for a Raw material of Korean traditional Soy-sauce. *Kor. J. Mycol.* 23: 161-175.
Ludwig, J.A. and Reynolds, J.F. 1988. *Statistical Ecology*. John Wiley & Sons. pp 165-202.
Powell, K.A., Renwick, A. and Peberdy, J.F. 1994. *The Genus Aspergillus*, Plenum Press: 1-188.
Raper, K.B. and Fennell, D.I. 1973. *The genus Aspergillus*. Robert E. Krieger Publishing Company, Huntington, New York.
Rohlf, F., Kishpaugh, J., and D, Kirk. 1979. *Numerical analysis*. State University of New York. Stony Brook.
Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatic, T. 1989. *Molecular cloning-A Laboratory manual*. 2nd eds. Cold Spring Harbor Lab. Press, Cold Spring Harbor, N.Y. pp. 6.1-6.19.
Smith, J.E. 1994. *Aspergillus: Biotechnology Handbook* 7, Plenum Press. pp.1-18
Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. *DNA Fingerprinting in Plants and Fungi*, CRC Press. see pg 24-135.
Williams, J.G.K., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucl. Acids Res.*

18: 6531-6535.

Yamatoya, T., Sugiyama, J. and Kuraishi, H. 1990. Electrophoretic comparison of enzymes as a chemotaxonomic acid among *Aspergillus* taxa (2). *Aspergillus* sect. *Flavi*. p395-406 In: *Modern Concepts of Penicillium and Aspergillus*

Classification (R.A. Samson and J.I. Pitt, eds), Plenum Press, New York and London.

Yu, KW, Seong, CK, Lee, SS, and Yoo, JY. 1996. Studies on the fungal isolates of Mucorales collected from Korean home made meju and nuluks. *Kor. J. Mycol.* 24: 280-292.