

한국 전통 발효식품의 원료에서 채집된 *Rhizopus*속의 분류학적 관찰

이상선* · 윤영실 · 유기원¹ · 성창근¹

한국교원대학교 대학원, 생물과학 및 생물교육학 전공
¹충남대학교 농과대학 식품공학과

Taxonomic Observations of the Isolates of *Rhizopus* species Inhabiting at the Raw Materials for Korean Traditional Fermented Foods in Korea

Sang-Sun Lee*, Young-Sil Yoon, Kee-Won Yu¹ and Chang-Kun Sung¹

Department of Biological Science and Education, Graduate School, Korea National University of
Education, Chung Won 363-791,

¹Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Chung-Nam National
University, Yu-Seoung Ku, Taejon 305-764, Korea

ABSTRACT: The isolates of *Rhizopus* collected from Korean traditional fermented food meju and nuruk, were compared with the well known species of *Rhizopus* donated. The isolates of *Rhizopus* were identified with the numerical analyses calculated from RAPD-DNA bands, and confirmed with the microscopic observations of morphological features on PDA. The isolates of *R. oryzae* purchased were segregated through the results of RAPD or the morphological features. The species of *R. nigricans*, known as an illegitimate species, were different from those of *R. stolonife* and it is estimated that they are species of *Rhizopus*, again. According to microscopic observations and the result of RAPD, Some isolates of *R. oryzae* purchased belong to *R. nigricans* and are completely different from *R. oryzae* in their growth. The isolates of *R. nigricans* included with several isolates of *R. oryzae* identified for the different phenotypes and were heterogenous. The isolate of *R. oligosporus* were speculated to be different from morphological features of *Rhizopus*, but to be similar to the species of *Absidia* on the apophysis of sporangium. Its sporangiophore or mycelium was observed to be dark black, but the sporangia were not in those of *R. oligosporus*. The isolates collected from Korean traditional nuruk showed genetic diversity, and also considered to be different tastes in Korean rice wines.

KEYWORDS: Classification, Nuruk, Meju, RAPD, *Rhizopus*

메주와 누룩의 발효는 우리 생활에 필요한 식료품의 제조에 중요하며, 진균에 의한 작용으로 알려져 있다. 단백질 공급원인 간장과 된장의 주요 원료 물질인 메주는 대두를 발효시킨 것이고, 누룩은 곡주 제조시 전분 분해효소와 관련된 원료물질이다. 진균이 작용하는 동양의 발효식품은 지역에 따라 맛에 차이점을 보이고 있다(Hesseltine, 1985); 메주와 누룩은 지역에 따라 진균의 성격에서 차이점을 보이고 있다(이 등, 1993). 따라서, 각 지역의 전

통식품과 균특성을 연관시키려는 연구가 시도되고(오, 1995), 원료물질에 진균이 서식함에 따라서 생물학적인 발효와 물리화적인 변화가 동시에 일어나는 누룩과 메주는 진균의 서식이 중요한 것으로 생각된다(Lee와 Sung, 1995).

메주에 관한 초기 연구에서는 메주 발효에서 *Rhizopus*속의 종들이 언급되었으나, 연구가 진행됨에 따라서 황곡균(*Aspergillus*)에 대한 연구가 주를 이루었다(이 등, 1997). 현재 간장·된장 산업에서도 황곡균이 주로 사용되고 있으나, 최근 전통메주의 분리균에 대한 연구에서 보이는 것처럼 수집된

*Corresponding author

메주에서 계속하여 접합균(*Zygomycetes*)이 많이 분리되고 있다고 보고되고 있다(이 등, 1993; Lee와 Sung, 1995). 그러나 최근 산업의 방향이 대량화, 획일화보다는 지역 특성화와 더불어 상품의 다양성을 요구하는 쪽으로 변화됨에 따라 발효식품도 다양한 변화가 요구되고 있다. 이러한 면에서, 접합균(*Zygomycetes*)의 발효에서의 중요성이 새롭게 부각되어지고 있는 실정이다(유 등, 1996). 이에 대한 계통적 연구는 균학적 관점에서 아직 이루어지지 않고 있으므로, 전통 발효식품과 관련된 균에 대한 연구가 계통적으로 이루어져야 할 필요성이 있다.

Rhizopus(Ehrenberg)속은 털곰팡이목(*Mucorales*)에 속하는 것으로, 가근(rhizoid)과 포복지(stolon)가 있고 가근의 반대쪽에 포자낭병(*Sporangioophore*)이 총생하는 것으로 정의되고 있다(Gilman, 1968; Zycha 등, 1969). 포자낭은 무색에서 검은색으로 변하고, 완전 성숙시에 포자낭포자도 포자낭과 같은 색깔로 변하여 육안으로 보았을 때 쉽게 동정된다고 설명하고 있다. 그런데, 과거의 이 속에 대한 분류는 포자낭병의 길이(Domsch 등, 1980) 혹은 포자낭 포자의 크기(Gilman, 1968)에 따라 분류를 하였다. 분류자에 따라서 2종(*R. oryzae*와 *R. stolonifer*) 또는 5종(Gilman, 1968)으로 나누었고, 종 속에서 변종 혹은 분리 종으로 설정하였다. 과거의 분류가 모호하여 최근에는 두 개의 종의 묶음(subspecies or strain)으로 나누고 있다(Schipper와 Stalpers, 1984); 가근과 포복지를 형성하면서 포자낭의 직경이 100 μm 이상인 종(*R. oryzae*와 *R. stolonifer*)과 포자낭의 직경이 100 μm 이하인 종(*R. microsporus*)만으로 나누고 있다. 그러나 이러한 분류로 나누어진 종들은 응용 과학에서 사용의 용도에 따른 종의 분류와 일치되지 않고, 너무 단순한 분류체제를 이루고 있다.

최근에는 형태학적 분류외, 유전적 다형성을 이용한 RAPD법, DNA fingerprint 법이나 RFLP를 이용한 계통분류가 행해지고 있다(김과 김, 1997; 이 등, 1997; Chou 등, 1991). PCR-RAPD 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 fingerprint법이나

RFLP법과는 달리 복잡한 실험절차가 요구되지 않고 효과가 크다는 점에서 편리하다(이와 상, 1995). 이러한 면에서 분자 생물학적인 기법과 현미경적인 형태 관찰을 서로 비교하는 것이 중요하다고 생각된다. 따라서, 본 연구는 메주와 누룩에서 분리된 *Rhizopus*속의 관찰을 통해 종분류를 하였다. 유성 세대인 접합자낭은 관찰할 수 없어 무성세대를 중심으로 관찰하였다. 분양 혹은 직접 분리한 *Rhizopus*속의 균주를 PCR-RAPD 방법을 통해 분류하고, 형태적으로 다른 모습을 나타내는 4균주를 선택해 무성생식기를 관찰하여 RAPD 결과와 비교하였다. 수집, 분리된 균의 현미경 관찰 결과와 분자 생물학적인 분류 내용을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

균주

본 실험에 사용된 *Rhizopus*속은 우리나라의 전통 발효식품의 재료물질인 메주와 누룩에서 분리하였다. 메주에서 분리된 균들은 한국교원대학교 생물교육학과 미생물실험실(이 등, 1993; Lee, 1995)에서 보관 중이며, 누룩에서 분리된 *Rhizopus*속의 균은 현재 충남대학교 식품공학과 발효공학실(오, 1995)에 보관되어 있다. 그 외의 균들은 유전공학센터(KCTC)와 연세대학교(KCCM)에서 분양 받았으며(Table 1), 이들은 모두 PDA에 보관하였다.

DNA추출

보관중인 포자를 PDA 배지에서 7일간 배양하여 포자가 생성된 것을 집종원으로 사용하였다. 다음은 genomic DNA를 균사체로부터 얻기 위하여 potato dextrose broth 에 2일간 진탕배양(150 rpm/min)하였다. 이때 얻어진 균사체를 여러 가지 처리를 통하여 균체 DNA를 얻었다(유 등, 1996).

PCR반응

Taq polymerase와 dNTP는 한국생공(주)에서, primer는 Operon Technologies Inc.(USA)에서 구입한 OPD kit(tenmer)를 이용하였다. PCR 반응은 일반적인 방법(Williams 등, 1990)을 기준하여 약간의 변형을 시도하였다. 각각의 용량이 25

Table 1. The *Rhizopus* isolates donated from KCTC or KCCM, or collected from raw materials of meju or nuruk, Korean traditional fermented foods

Isolates remarked	Isolates tested	Descriptions
R-01	KCTC 1278	<i>R. hizopus oryzae</i> (ATCC 22581) for industrial alcohol production
R-02	KCTC 1279	<i>R. oryzae</i> (ATCC 20344) for glucoamylase and cell-separating enzyme
R-03	KCTC 1279	<i>R. oryzae</i> (ATCC 26612) for high production of alcohol at amylo process
R-04	KCCM 11276	<i>R. oryzae</i> (IFO 4716) for Kaoliangchui yeast cake
R-05	KCCM 11556	<i>R. oryzae</i> (ATCC 24794) for degradation of insecticide or herbicides
R-06	KCCM 11606	<i>R. oryzae</i> (IFO 4706) for Kaoliangchui yeast cake
R-07	KCCM 11697	<i>R. oryzae</i> (ATCC 4858) for pectinase
R-08	KCCM 35223	<i>R. oryzae</i> (ATCC 11145) for insect moulting hormones and hydroxylation of steroid
R-09	KCCM 60159	<i>R. oryzae</i> (ATCC 9374) for starch conversion into amylo process
R-10	Koji (F-6)	Not identified and isolated from Koji for Korean rice wine by Seong, Chang-Kun ^a
R-11	Meju (R-7)	Not identified and isolated from Meju for Korean soy-sauce by Choi, Seong-Hyeon ^b
R-12	(Ryu-Seong I)	Not identified and isolated from Koji for Korean rice wine by Yu, Kee-Won ^b
R-13	(Ryu-Seong II)	Not identified and isolated from Koji for Korean rice wine by Yu, Kee-Won ^a
R-14	KCTC 1778	<i>R. oligosporus</i> ATCC 22959 for acid protease in temphe
R-15	KCTC 6062	<i>R. nigricans</i> ATCC 62276 for steroid and chiral alcohol
R-16	KCTC 6180	<i>R. stolonifer</i> ATCC 10404 for polygalacturonase.

^aThe fungal isolates were collected for the studies of Korean traditional rice wine at the Lab of Fermentation (Department of Food Science) in Chung Nam National University (오, 1995).

^bThe fungal isolates were collected for the studies of Korean traditional soy-sauce at the Lab of Mycology (Department of Biological Science and Education) in Korea National University of Education (Lee, *et al.*, 1995).

μ l인 PCR 반응액은 10x reaction buffer 2.5 μ l, dNTP 10 nM, Taq polymerase 1 unit, primer 0.2 pM, DNA 25 ng 등을 혼합하였다(유 등, 1996). 반응 조건은 94°C에서 반응시킨 후, 94°C에서 1분 → 35°C에서 1분 → 72°C에서 2분간 반응시킨 것을 1 cycle로 하여 총 35 cycle 진행시켰고, 최종적으로 72°C에서 5분간 반응시킨 후 4°C에서 보관하였다. 전기영동에서는 lamda(λ) phage를 Hind III로 절단한 절편을 이용하여 marker로 사용하였다.

분석

증폭된 RAPD-DNA에 대해 1x TAE buffer(40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 7.9)를 사용하여 1.4% agarose gel에서 전기영동을 실시하였다. 0.5 μ g/ml ethidium bromide로 15분간 염색하고 증류수에서 20분간 염색액을 제거한 다음, UV transilluminator 상에서 polaroid film 667을 이용하여 각각의 나타난 band들을 촬영하였다(Sambrook 등, 1989). 증폭된 DNA band

의 유무를 1과 0으로 코드화하여, 수리분류를 시도하였다 (Table 2). 앞에서 얻는 자료를 분리군의 일반적인 특성으로 간주하여, 집괴분석, 요인분석 등을 이용하여 비교하였다(Ludwig와 Reynold, 1988).

현미경 관찰

각각의 균에서 대표적인 것을 중심으로 PDA에 배양하였으며, 성장하는 과정을 1~2주 동안 관찰하였다. 배양된 균은 slide culture를 통하여 포자낭(sporangium)을 관찰하였고, 미세한 균사를 현미경을 통하여 보았다. 각각 미세한 균의 무성생식은 PVLG(polyethylene vinyl lactophenol glycerol)에 영구보관 하였으며, cotton blue로 염색하여 미세구조를 관찰하였다.

결 과

RAPD

액체배양을 통해 얻은 균사체에서 DNA를 추출

Table 2. Numerical representation of PCR-polymorphic bands of the fungal isolates made by the different primer of OPD and OPP series^a. The experimental bands were shown in Fig. 1

Marked	The bands of PCR-DNA made with the different primers					Remarks
	1	10	20	30	39	
R-01	111101010001000101001100011010110111010					<i>R. oryzae</i>
R-02	111101011001000101001100011010110111010					<i>R. oryzae</i>
R-03	111101011001000101001100011010110111010					<i>R. oryzae</i>
R-04	011000100000010100001000000010001000100					<i>R. oryzae</i>
R-05	01100010101010101110001011001010101001011					<i>R. oryzae</i>
R-06	011011110000110110001011001010101000100					<i>R. oryzae</i>
R-07	111010100000110100011000010010101000101					<i>R. oryzae</i>
R-08	001010100000000100001010010010101001011					<i>R. oryzae</i>
R-09	111000001001101110001100011010110110000					<i>R. oryzae</i>
R-10	111001110001000101011010110010001000100					Not identified
R-11	110011110000110100011010010010101000100					Not identified
R-12	110001011001000101001100011010110111010					Not identified
R-13	110011111000110100011000000010001000100					Not identified
R-14	010000000100010000100000011001001111101					<i>R. oligosporus</i>
R-15	110011010000110100001010000000001000100					<i>R. nigricans</i>
R-16	110000111000000000000000100100011011010					<i>R. stolonifer</i>

^aThe representatives of bands made by PCR-polymorphic bands shown on the column 1 to 4 were reacted with the OPD 2; 5 to 11 with OPD 5; 12 to 18 with OPD 11; 19 to 24 with OPP 1; 25 to 31 with OPP 2; and 32 to 39 with OPD 18.

하여 여러종류의 primer로 PCR을 한 후, RAPD-DNA band(RAPD band)를 관찰하여 균의 다양성을 확인하였다. Primer는 OPD 와 OPP series 모두 사용했으나, RAPD band가 나타나지 않는 것은 결과에서 제외시켰다(Fig. 1). 이 연구의 결과는 숫적으로 많고 분명한 RAPD band를 보이는 것만을 활용하였고, 0.5 kbp 이하에서 RAPD band를 형성하는 것은 제외시켰다. 그 결과 5개의 primer에 39개의 RAPD band를 얻었다(Table 2). 이는 평균 한 primer에 6.5개의 RAPD DNA band가 나타난 것으로, 특히 primer OPD-18은 많은 수의 RAPD band를 형성하였다. Primer OPP-1의 1.05 kbp(A), OPP-2의 0.55 kbp(B), OPD-11의 0.6 kbp(C) 및 OPD-5의 1.6 kbp(D)는 실험에 사용된 균에서 RAPD band의 공통성을 보여주었다. 그림의 RAPD band(Table 2 and Fig. 1)에서 B는 *R. oryzae*에서만 공통적으로 보여주었고, A와 C, D는 실험균 모두에 공통적으로 나타났다. 실험에서 다양하게 변화시킨 조건을 통해 PCR을 반복하였으나, 재료 및 방법에 기록된 것이 가장 많은 RAPD band를 만들었다.

유사도

위와 같이 얻어진 자료를 통계 프로그래밍을 사용하여 수리 분류를 하였다. 이 프로그램의 처리 방법은 다양하나, cosine similarity의 방법을 사용하였다(Fig. 2). 또, 다른 처리방법(예; Euclid distance)을 이용했을 때도 거의 유사한 결과를 얻었으나, 미소한 부분의 묶음에서 차이를 나타냈다. 이 연구의 결과는 유사도에서 1은 동일한 것을 의미한다. 그 결과로 R-2와 R-3는 동일한 균으로 간주되었고(Table 3), 0.975의 값을 나타낸 R-1과 R-2, R-1과 R-3는 매우 유사한 균으로 보여진다. 또한, R-14는 다른 모든 균들과의 비교에서 가장 작은 유사도 지수를 보여주었고, R-16이 그 다음으로 작은 유사도 지수를 나타냈다. 유사도 지수로 균 주사이의 관계를 나타낸 Fig. 2에서, 단위 16을 기준으로 나누면 다섯 묶음(A-E)을 나타냈다. 이 때, R-14 (*R. oligosporus*; 묶음E) 균주 하나만이 다른 4개의 묶음에 속한 균주들과 나누어져 다른 균주들과 유전적 속성이 다름을 보여주고 있다. 4개의 작은 묶음은 다시 2개의 중간 묶음(묶음A, B; 묶음C, D)을 만들었다. *R. stolonifer*(R-16; 묶음B)와 *R.*

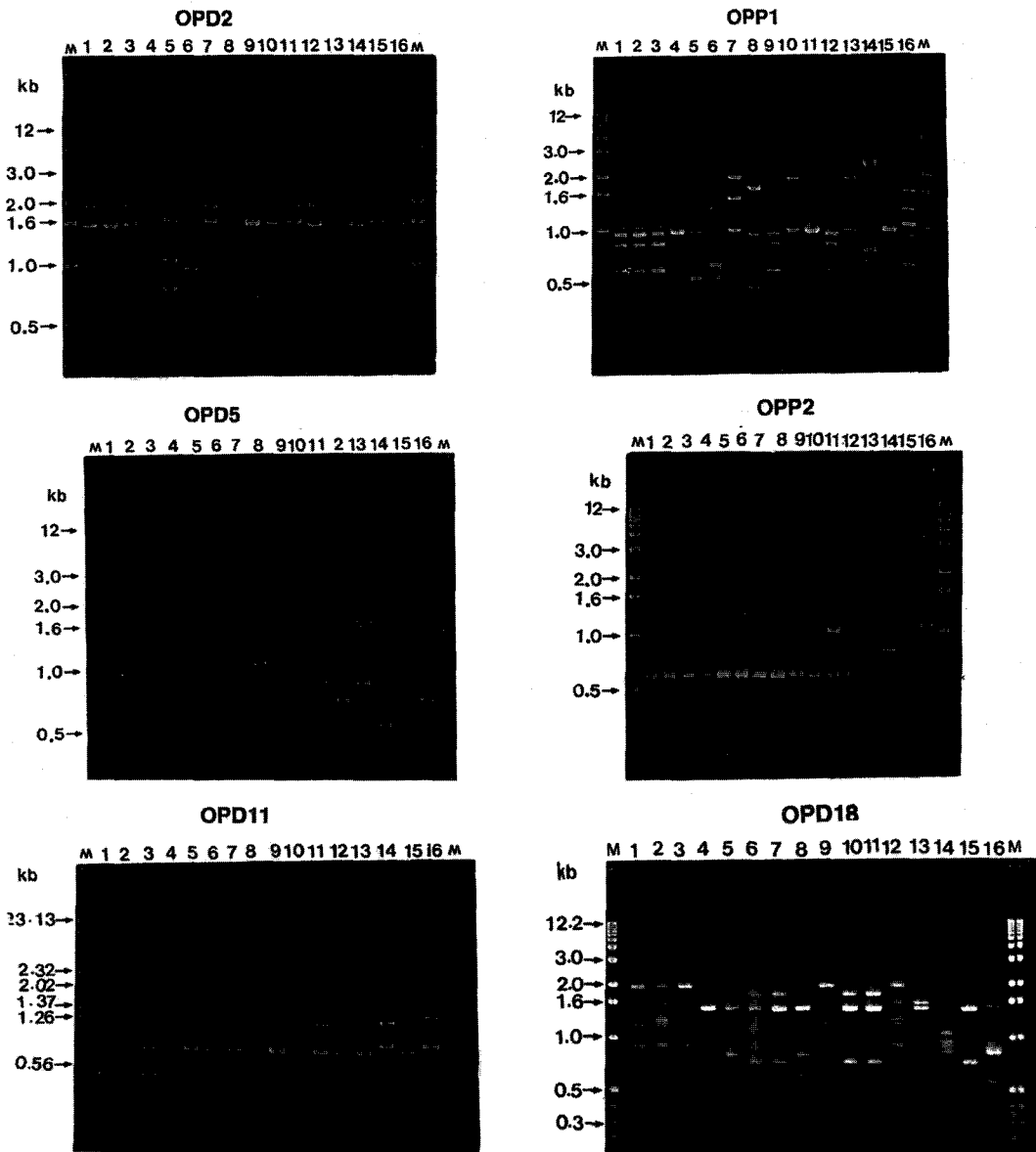


Fig. 1. Polymorphic of RAPD bands made by the different 16 isolates. The numbers in each photograph with the different primers indicate the isolates collected or the species shown in Table 1. The 'M' indicates the standard molecular weight of *Hind*III-digested lambda phage DNA.

oryzae(묹음A)는 한 개의 중간 묹음 속에서 A와 B로 나누어졌으며, 곤충의 호르몬과 관련된 균인 R-5, 8이 *R. oryzae*중 내에서도 다른 유전적 속성을 갖는 것으로 나타났다(묹음C). 누룩과 메주에서 분리된 균들(R-10, 11, 12, 13)은 묹음D 또는 묹음A에 포함되었다. 유사도지수(Table 3)를 PCA 분

석을 하여 eigen value를 계산하였다. 그림 3은 3개의 factor에 의해 계산된 값은 65.9%이다(Fig. 3). Fig. 3을 보면, 분리균 R-1, 2, 3 및 9, 12가 포함된 묹음A와 R-14(묹음E), R-16(묹음B)은 앞의 결과(Fig. 2)와 일치하였다. 그러나 묹음C와 D는 Fig. 2와 다른 결과를 나타냈다. Fig. 3에서 묹음D

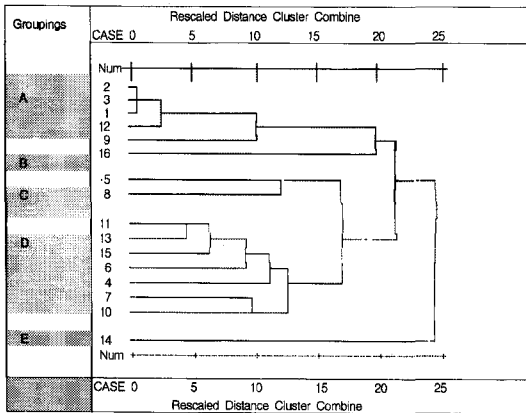


Fig. 2. Dendrogram of the 16 fungal isolates calculated by the unweighted pair grouping methods (the scale shown here indicated the cosine similarity coefficient, and centroid method). The rescaled distances originated from the programmings of SPSS WIN or PCplus by PLOT DENDROGRAM/METHOD COMPLETE.

는 R-10, 11, 13, 15와 R-4, 6, 7로 나눌 수 있다. 묶음 C의 R-5와 8 두 분리균은, 묶음B와 E의 거리차이를 참고했을 때 서로 다르게 나눌 수 있다. 이상의 분석 자료에서 서로간의 미소한 차이점은 관찰되었지만, 큰 차이점은 발견할 수 없었다.

관찰

Domsch 등(1980)과 Gilman(1968)의 검색표를 이용하여 균의 형태적인 특징을 관찰하였다. 분양하여 수집된 균(Table 1)들은 우선적으로 위의 분류키를 이용하여 현미경 관찰을 통해 *Rhizopus*속임을 확인하였다. 그러나 구입된 균 중 R-14는 다른 균들과 형태적 특성이 달랐다. *Rhizopus*속의 분류는 포자낭의 형태 및 색깔 그리고 포자낭병 생성 부위의 가근(rhizoid)을 특징으로 확인하였다. 그 결과, *R. oligosporus*(R-14)는 포자낭의 형태와 가근

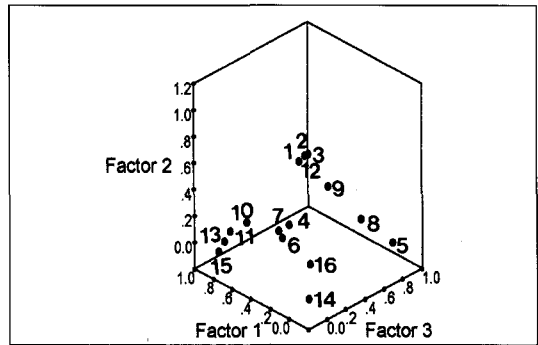


Fig. 3. Distributions of the 16 isolates calculated from Principal factorial analyses. The Factors 1, 2, and 3, (sum of three factors) represented the 65.9% from the calculations of eigen values.

Table 3. Cosine similarity coefficients between two fungal isolates^a. The values (1.00) in the box indicated the identical form of the fungal isolate and calculated by SPSSWIN programs

	R-1	R-2	R-3	R-4	R-5	R-6	R-7	R-8	R-9	R-10	R-11	R-12	R-13	R-14	R-15
R-2	.975														
R-3	.975	1.000													
R-4	.372	.363	.363												
R-5	.461	.500	.500	.535											
R-6	.474	.462	.462	.707	.703										
R-7	.447	.436	.436	.750	.573	.707									
R-8	.496	.484	.484	.554	.699	.588	.693								
R-9	.737	.771	.771	.392	.594	.500	.530	.392							
R-10	.596	.582	.582	.646	.445	.628	.667	.538	.457						
R-11	.488	.476	.476	.646	.500	.800	.848	.605	.457	.764					
R-12	.923	.951	.951	.305	.473	.432	.401	.445	.757	.556	.500				
R-13	.404	.450	.450	.688	.473	.730	.774	.429	.426	.688	.876	.473			
R-14	.372	.363	.363	.369	.318	.326	.416	.307	.326	.269	.336	.381	.286		
R-15	.387	.378	.378	.577	.397	.748	.649	.400	.340	.630	.840	.397	.819	.320	
R-16	.451	.504	.504	.288	.397	.272	.288	.320	.340	.420	.350	.529	.447	.320	.333

^aThese results obtained by SPSSWIN was also compared with those obtained by NT-system.

Table 4. Microscopic observations of *Rhizopus* isolates used in this study

Morphological features	<i>R. oryzae</i> (R-01)	<i>R. oligosporus</i> (R-14)	<i>R. nigricans</i> (R-15)	<i>R. stolonifer</i> (R-16)
Sporangium	black, 90 μm spherical bends ^a	grey, 40 μm apophyses	black, 85 μm spherical bends ^a	black, 140 μm spherical bends ^a
Sporangiospore	ovoid, 5.5 μm , striate	irregular shapes, 5 μm	ovoid or subglobose, 12 μm , striate	ovoid or subglobose, 5.5 μm , striate
Rhizoids	complicated	none	simple	complicated
Sporangiophores	brown mycelia & no branching 550 μm 10 μm	whorl branching black mycelium	hyaline hyphae & getting brown, dichotomous 1400(2000) μm 20 μm	brown mycelia, dichotomous 550 $\mu\text{m} \times 1\text{-}2 \mu\text{m}$
Stolon and sporangiophore	3-4 sporangiophores ^b	no stolon and no rhizoid	3-4 sporangiophores ^b	1 sporangiophore ^b
Purposes for use	amylolytic alcohol	<i>Absidia</i> -like	various	polygalacturonase

의 위치 등에서 *Rhizopus*속의 특징을 가지고 있지 않았으며, 이러한 것들이 *Absidia*속과 가까운 것으로 관찰되었다. 각각의 관찰된 균종에 대한 특징은 Table 4와 같다. 균총의 관찰에서 R-15와 R-16은 포자낭 생성시 갈색에서 검은색으로 변화하였다. 그러나 R-1은 흰색에서 검은색으로 변화하여 R-15, R-16과는 구별되었다. 균총과 형태적인 특징의 관찰 결과는 대부분 RAPD-DNA band를 수리 분류한 내용과 대부분 일치함을 발견하였다.

고 찰

한국 전통 식품의 발효에 관여하는 진균들은 외국에서 규명된 종과 그 다양성과 효소생성능, 발효능이 다를 것으로 생각된다. 식품의 응용에 많이 사용되는 균은 사용자의 목적과 요구에 따라서 중요성을 가질 수 있다. 따라서 그 적용의 척도에 따라 균종을 분류할 필요성이 있다. 이러한 의미에서 우리의 전통 식품에 대한 균의 분류는 전통 식품의 맛과 향의 차이점에 의하여 분류가 이루어져야겠다. 우리 식품에 식감이 없는 외국의 전문가에 의한 균의 분류는 발효균의 미묘한 차이점을 파악할 수 없는 한계를 갖기에, 이러한 균의 연구는 우리나라의 연구가에 의해 이루어져야 한다고 생각된다. 우리

나라의 전통 식품에 관여되는 *Rhizopus*속의 연구는 우리나라의 균학자에 의하여 만들어져야 하며, 균 특성에 일반적으로 관찰되는 형태적 특징 외에 식품의 맛도 첨가되어야 할 것이다. 이 연구는 외국의 균 분류 연구사례와 다르게 많은 균을 확보할 수 없는 한계점을 가지나, 메주나 누룩에서 분리된 균들의 유전적인 차이점과 이들 균종의 형태적 특성을 파악하려고 노력하였다.

*Rhizopus*속의 종들을 정의 하는데에는 여러 종류의 분류 검색표를 이용하였으나, 대부분의 분류 검색표는 Zycha(1969)의 연구에서 비롯된 것으로 추측된다. Schipper(1984)의 연구에서는 *Rhizopus*를 크게 두 개의 묶음으로 나누었다; 형태적으로 큰 포자낭을 갖는 균종을 *R. oryzae*와 *R. stolonifer*로 나누었고, *R. nigricans*은 잘못 기재된 것으로 보고하였다. 그 후에 작은 포자낭을 가진 *Rhizopus*는 *R. microsporus*로 나누었고, 그 아래 낮은 분류의 단위(variety or f. sp.)로 *R. oligosporus*를 구분하였다. 본 연구의 결과는 RAPD-DNA band의 수리 분류와 형태 분류가 거의 일치하고 있는데, *R. nigricans*(R-15, 묶음 D)가 *R. oryzae*와 다른 종으로 구별되었다(Fig. 3, Table 4). 이 결과는 Schipper(1984)와는 다르고, Gilman(1969)의 분류와 일치하는 것이다. 본 실험에서는 구입된 *R.*

*oligosporus*는 다른 *Rhizopus* 균과는 많은 차이점이 나타났고, 이러한 차이점은 다른 연구 결과와 일치하였다(Zhou 등, 1991). 이 실험에서 얻은 특이한 사실은 구입된 9개의 *R. oryzae* 균주가 대조구로 사용되었는데, 그 중 3개의 균주인 R-4, 6, 7이 *R. nigricans*와 유사한 것으로 나타났다. 또한, 사용 용도에 따라 유전적인 차이를 보여주어 서로 다른 묶음으로 나누어졌다. 이러한 결과는 이전 연구인 *R. oryzae*의 분류 결과(유 등, 1996)와 일치하는 것이다. 본 연구는 RAPD-DNA band의 수리 분류 결과와 형태적인 관찰을 토대로 종을 분류할 때, *R. nigricans*가 하나의 종으로 인정되어야 함을 말해주고 있다. 또한 *R. oryzae*로 분리된 균주들도 그들의 생리적·생태적 특성에 의해 새롭게 동정되어야 할 것이다. 특히, 곤충 호르몬이나 살충제 분해를 위해 분리된 *R. oryzae*인 R-5, 8은 *Rhizopus*속 내에서 재분류되어야 하므로, *Rhizopus*속은 최소한 4종으로 인정되어야 한다.

전통 발효 식품에 관련된 4개(R-10, 11, 12, 13)의 *Rhizopus* 분리균들은 서로 다르게 묶음되었다. 유성에서 채집한 누룩에서 분리된 균은 *R. oryzae*로 나타났으며, 다른 것은 모두 *R. nigricans*와 유사하였다. 그러나, R-10, R-11, R-13은 같은 묶음 내에서도 비교적 먼 거리를 유지하였다(Fig. 3). 이는 메주에 서식하는 분리균(R-11)과 누룩에 서식하는 분리균(R-10, 12, 13)사이의 생태적인 차이를 나타내는 근거가 되는 것으로서, 서식하는 장소에 따른 균의 차이점을 보여주는 예로 생각할 수가 있겠다. 누룩에서 분리된 균에 있어서 서로 다른 유전자를 갖는 *Rhizopus*가 관찰되어, 지역에 따라 다른 맛이 나오는 데 누룩발효균이 영향을 준다고 생각된다. 이러한 결론은 메주의 연구에서 균의 특성에 따라 간장의 다양한 색깔이 나타난다는 것과 일치한다(이, 1995). 본 실험 결과가 메주균에 대한 것과 일치한다면, 전통 술 제조에 사용되는 누룩균은 다양할 것으로 보이며 이 다양한 균이 분비하는 전분 분해효소가 술맛과 관련될 것으로 생각된다. 한국의 전통 술의 맛과 풍미가 균의 종류에 따른 것이라고 가정한다면, 이 연구의 결과는 RAPD-DNA band의 다양성에 기초해 서로 다양한 특성을 가진 균이 존재한다는 것을 보여주었다. 한국 술의 원료

인 누룩 혹은 메주의 다양성은 지역에 따른 균의 차이에 기인하므로, *Rhizopus*속은 한국 전통적인 술의 맛과 기호성에 의하여 새로운 분류 체계를 가져야 할 것이다.

결론

전통 메주와 누룩에 서식하는 *Rhizopus*속의 진균을 분리하여, 구입된 *Rhizopus*종과 비교 검토하였다. 우선 각각의 분리균과 구입된 균은 RAPD 방법을 통하여 수리 분류되었으며, 이 결과를 현미경 관찰을 통하여 형태적 특성과 비교하였다. 분양받은 *R. oryzae*는 형태적인 면과 RAPD 결과에서, 분류적인 차이점이 관찰되었다. 과거 동일 종으로 분류되었던 *R. nigricans*는 본 연구에서는 다른 종으로 인식되었으며, 과거 *R. oryzae*로 동정되었던 여러 종이 이 종과 같았다. *R. nigricans*는 *R. oryzae*와 *R. stolonifer*와는 형태적인 모양과 균의 성숙 단계가 완전히 달랐고, 수리분류의 분석결과에서도 다른 묶음으로 나타났다. 그리고 실험에 사용된 *R. oligosporus*(KCTC 1778)는 형태적 특징이 *Absidia*속과 유사하였다. 전통 누룩에서 분리된 균들은 유전적으로 많은 차이를 나타내어, 지역적인 전통 술의 맛은 균에 의한 것으로 생각되었다.

감사의 글

이 연구의 일부분은 과학기술처의 선도과학기술사업(G-7)으로 전통 장류용 메주의 산업화를 위한 기반기술 연구(한식연: N1036-0627)의 일환으로 한국식품연구원 위탁과제의 일부분으로 보고합니다.

참고문헌

- 김태영, 김흥기. 1997. 재조합 DNA probe에 의한 *Fusarium oxysporum* 분화형간의 분류 및 유전적인 변이 분석. 한국균학회지 25: 362-368.
- 오만진. 1995. 전통혼성주의 품질 향상 및 산업화 기술연구. 전통발효식품의 과학과 연구. 충남대학교, 과학기술처.
- 유기원, 성창근, 이상선, 유진영. 1996. 한국전통 식품의 원료인 메주와 누룩에서 분리된 접합균에 대한 연구. 한국균학회지 24: 280-292.

- 이상선, 박광호, 최경진, 원순애. 1993. 제주에서 분리한 집합균의 분리 동정. 한국균학회지 21: 172-187.
- 이창수, 상병찬. 1995. RAPD 분석법에 의한 소 품종 판별용 표지 인자의 검출 최적화 연구. 한국식품과학회지 15: 35-39.
- 이태수, 박원철, 강호덕, 김세권, 변병호, 이창근, 이원규, 민두식. 1997. RADP(Random Amplified Polymorphic DNA) 검정을 이용한 한국 표고 균주의 계통적인 분류. 한국균학회지 25: 219-225.
- 조덕현, 이우진. 1970. 한국 재래식 간장의 발효 미생물에 관한 연구. 한국 농화학회지 13: 35-42.
- Domsch, K. H., Gams, W. and Anderson, T. H. 1980. Compendium of soil fungi. Academic Press. London.
- Gilman, J. C. 1968. A manual of soil fungi. The Iowa State University Press.
- Hesseltine, C. W. 1985. Fungi, People, and Soybeans. *Mycologia* 77: 505-525.
- Lee, S. S. and Sung, C. K. 1995. The fungi inhabiting on the Korean home-made maeju cakes collected. The proceedings of the second China-Korea joint seminar for Mycology. November 13-17, 1995, Beijing, China
- Lee, S. S. 1995. Meju fermentation for a raw material of Korean traditional soy products. *Korean J. Mycol.* 23: 161-175.
- Ludwig, J. A. and Reynolds, J. F. 1988. *Statistical Ecology*. John Wiley & Sons. pp. 165-202.
- 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
- Schipper, M. A. A. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. 1. The *Rh. stolonifer*-group and *Rh. oryzae*. *Studies in Mycology* 25: 1-19.
- Schipper, M. A. A. and Stalpers, J. A. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. II. The *Rh. microsporus*-group. *Studies in Mycology* 25: 20-34.
- Weising, K., Nybom, H., Wolff, K. and Meyer, W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. CRC Press. pp 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.
- Zhou, Z. W., Haung, H. and Zheng, R. Y. 1991. Base composition of DNA and classification of the Mucorales. *Mycosystema* 4: 1-14 (China).
- Zycha, H., Siepman, R. and Linnemann, G. 1969. Mucorales, eine reschreibung aller Gattungen und arten dieser Piltzgrue Lehre.