

韓國 *Rhizopus* 屬의 分類學的 研究(第 1 報)—메주에서 分離된 *Rhizopus* spp. 에 대하여—

印 鉉 周, 李 培 成

(建國大學校 應用微生物研究所)

Taxonomical studies of *Rhizopus* spp. in Korea.—*Rhizopus* spp. isolated from "Meju."—

Yihn, Hyon Jiu and Lee, Bae Ham

(Institute of Applied Microbiology, Kon-Kuk Univ.)

Summary.

As a taxonomical study of *Rhizopus* spp., 30 strains of *Rhizopus* spp. were isolated from 55 specimens of "Meju" which were collected through all over South-Korea.

Results of the experiments with the 30 strains of *Rhizopus* spp. are as follows;

1. One strain of them was classified in to *Rhizopus nigricans* group.
2. Eleven strains of them were classified in to *Rhizopus chinencis* group.
3. Three strains of them were classified in to *Rhizopus oryzae* sub-group.
4. Fifteen strains of them were classified in to *Rhizopus oryzae* *Japanicus* sub-group.

All these strains of *Rhizopus* spp. have not been reported yet, so far in South-Korea.

緒 論

Rhizopus 屬은 科 Mucoraceae 에 屬하며 1820 年 Ehrenberg 에 依하여 報告된 以來 1875 年에 Van Tieghem 는 *Rhizopus* 屬의 特徵으로서 ① Stolon 과 Rhizoid 가 있고 ② Rhizoid 가 着生한 基點에서 Sporangiphore 가 나오고 ③ Columellae 와 endospore 를 가진 Sporangia 의 形態는 一般의 球形이고 ④ Spore 는 무늬를 形成한다는 等의 點을 提示한 後 많은 分類學者들에 依해 繼續研究되어 本屬의 系統的 分類에 까지 이르렀다. 系統的 分類로서는 Phycomycetes 綱, Zygomycetes 亞綱에 屬하는 屬으로 規定했다. 本屬의 大部分은 生長이 빠른 點이 一般의 特徵이며 감자, 고구마 그리고 果實과 같은 穀物에 寄生할뿐 아니라 動物의 病源으로 寄生하는 種도 있어 動植物의 病理學的인 面에서 重要한 病源으로 研究되어 왔다. 그러나 더욱 重要한 點은 生理的 特徵을 工業面에 利用할 수 있는 點이다. 特히 Amylase 를 비롯한 酵素 生産

能에 依한 醱酵工業에 對한 應用이라 하겠다. 古來로부터 東洋諸國에서는 반죽한 穀類에 一定한 곰팡이를 接種 시키든지 或은 大氣中에 露出 시킴으로써 菌이 自然接種되도록 하여 酒精 或은 酒餅 등의 製造에 利用하여 알콜 醱酵을 시켜왔다. 西歐諸國에서는 東洋에서와는 달리 植物을 利用한 所謂 麥芽를 利用하여 醱酵에 使用하여 왔다. 그런데 우리나라 釀造業界에서는 麴子를 使用 하는데 亦是 이것도 곰팡이를 利用한 醱酵 方法이며 이 곰팡이의 많은 種類가 *Rhizopus* 인 것을 알았다. 이런 菌들은 澱粉을 糖化시키는 要因이 되고 알콜 醱酵나 有機酸 生成의 要因이 된다는 것을 알았다 이와 같은 *Rhizopus* 의 活用을 繼續 研究 함으로서 日本에서는 알콜 生産에 있어서 古來의 方法을 改革한 所謂 amylo-process 法으로 고구마를 알콜 生産에 大規模로 利用하여 (Rh. *Japanicus*) 醱酵工業을 發展 시켜왔다.

經濟開發이 時愈한 우리 나라에서도 이와 같은 *Rhizopus* 의 研究가 切實히 느껴 지지만 아직 本屬에 關한 分類學的인 研究 조차도 全然되어 있지

않았으므로 本人은 工業的인 活用研究에 앞서 于先 生物學의 研究가 時急한 것으로 思料되어 本屬의 分類學的 研究를 試圖하였다.

實驗 材料 및 方法

1. 材 料

全國 55 個 地域의 一般民家에서 在來方法으로 만든 “메주”를 蒐集하여 55 點을 標本으로 供試材料로 하였다.

2. 使用 培養基

(1) Czapeck's solution agar.

NaNO₃.....3 gr. KH₂PO₄.....1 gr.
KCl.....0.5 gr. MgSO₄ · 7H₂O.....0.01 gr.
FeSO₄ · 7H₂O.....0.01 gr Glucose.....30 gr
Agar.....1.5 gr. Dist. water.....1,000 cc

(2) Pfeffers media

Glucose.....50 gr. KH₂PO₄.....5 gr.
NH₄NO₃.....10 gr. MgSO₄.....2.5 gr.
FeCl₃.....trace Agar.....20 gr.
Dist. water.....1,000 cc

(3) malt. infusion-Czapeck's solution Agar.

malt extract 25 gr.를 Czapeck's solution ingredient에 넣어 만든것임.

(4) Pfeffers-oryzanin agar.

Pfeffer soution 100 cc에 0.5 gr.의 oryzanin을 가한다음 60°C에서 30 分間 끓인후 2%의 agar를 가하여 만든것임.

(5) potato glucose agar

상법에 따랐음.

(6) 糖 醱酵에 使用한 培地

糖을 뺀 Pfeffer solution에 glucose 5%를 가하여 만든 培地로 glucose 醱酵 實驗에 使用 하였고 galactose 5%, mannose 5%, raffinose 7.5%, inulin 7.5%, maltose 7.5%를 가하여 各各 醱酵實驗에 利用하였음.

即 單糖類는 5%, 二糖類 以上 多糖類는 7.5%를 加入 시킨것임.

3. 方 法

(1) 菌分離

500 mg.의 “메주”塊를 0.1% 승용수에 處理하여 滅菌수에 씻은後 5 cc의 滅菌수에 振盪하여 완전히 懸濁시킨후 0.1 cc 물 10⁻²로 稀釋시킨 溶液을 接種에 利用하였다. 接種은 稀釋溶液 0.1 cc를 Czapeck's media 와 malt-Czapeck's media 를 各各 plate로 만

든 培地에 各各 接種하여 30°C에서 2 週日間을 培養하면서 菌을 同定分離 하였다. 이것을 여러번 反復하여 純粹培養하여 *Rhizopus* 屬에 屬하는 30 菌株을 얻었다.

(2) 同定 方法

各 菌株을 Czapek's media plate 와 potato-glucose agar 및 Pfeffers solution agar 에 培養하여 一週後에 다음과 같은 形態의 項目에 依하여 檢鏡 結果로 同一種을 整理 하였다.

同定項目

가. 形態學上의 特徵

- (a) Sporangiphore (b) Sporangia
(c) Columella (d) Sporangiospore
(e) Chlamyospore (f) Zygospore
(g) Rhizoid (h) Stolon

나. 生理學上의 特徵

- (a) 培地에 따른 菌株의 生長 速度
(b) 溫度에 따른 菌株의 生長 速度
(c) 糖의 醱酵能

以上の 項目에 따라 形態的으로는 生長의 모양 크기 색깔 表面의 狀態를 光學 顯微鏡下에서 觀察 또는 測定하였으며 生理的으로는 各 培地에 菌을 接種하여 colony 形態와 生長의 速度등을 檢討하였다. 溫度에 依한 方法으로는 25°C, 37°C, 47°C로 差異를 두어 溫度差異에 依한 生長의 差異를 觀察 하였다.

糖의 醱酵性으로는 糖의 種에 따라 同一菌을 接種하여 2 週間 培養後 觀察 하였다. 醱酵 狀態를 確保하기 위하여 test-tube 内部에 Durham 管을 꺼꾸로 넣어 實驗하였다.

實驗 結果 및 考察

以上の 項目에 따라 다음의 結果를 얻었다. Table 1은 Yamamoto, Takoda, Iizuba 諸氏들의 分類法을 參照하여 作成한 것이다.

Table 1에 나타난 形態의 特性 및 測定値에 依하여 分類하면 다음과 같다.

1. 形態의 特性

(1) Rh.16-2 strain;

本 strain에 屬하는 菌株는 *Rhizopus* 屬 30 菌株中에서 1 菌株였으며 다음과 같은 形態의 特性을 보아 *nigricans* group에 屬하는 菌株라고 生覺한다.

- (a) mycelia의 地上 部位가 잘 發達되지 않았다.
(b) Sporangiphore는 直立 하였고 褐色을 나타

morphological characters		Strain No.			
		Rh. 54-1	Rh. 18-2	Rh. 16-2	Rh. 51-2
Sporangiophores	Shape	straight. curved	straight. branch	straight	straight. curved
	Wall	smooth. rough	smooth	smooth. rough	smooth
	Color	brown	yellowish. brown	yellowish. brown	grayish. brown
	Size	210-700 μ , 5-105 μ	50-200 μ , 8-10 μ	500-1000 μ , 13-29 μ	200-600 μ , 8 μ
Sporangia	Shape	globose	globose	globose	globose
	Wall	spinous	smooth	smooth	spinous
	Color	black	gray. yellowish	black	black
	Size	60 μ	57. 5 μ	200-250 μ	50 μ
Columella	Shape	globose oblate	globose oval	globose oblate	globose. oblate
	Wall	smooth	smooth	smooth	smooth
	Color	pale brown	brown. white	pale brown	pale brown
	Size	30-35 μ	20-40 μ	50-80 μ	30-60 μ
Sporangiospores	Shape	elliptical. globose	globose. sub-globose.	globose. sub-smooth	elliptical. globose
	Wall	smooth	smooth	smooth	smooth
	Color	light gray	light gray	light gray	light gray
	Size	5-8 μ	4-7 μ	4-12 μ	5-11 μ
Chlamydospore	Shape	globose. lemon	globose. elliptical	absent	globose. cylindrical
	Wall			on stolon	
	Color	pale brown	yellowish brown		pale grayish brown
	Size	20 \times 25 μ , 8 \times 13 μ	13-21. 13 \times 18 μ		13-23, 8 \times 16 μ
Zygospores	Shape	not observed	not observed	not observed	not observed
	Wall				
	Color				
	Size				
Rhizoid	Shape	root-shaped	finger shaped	root-shaped	root-finger shaped
	Wall				
	Color	brown	y-brown	brown	abundant
	Size	abundant	poor	abundant	abundant
Stolon	Shape	smooth. rough	smooth	rough	smooth
	Wall				
	Color				
	Size	5-18 μ	10-12 μ	13-20 μ	10-12 μ

Table 1. Morphological characters of 4 strains of *Rhizopus* spp.

내외 표면은 고르지 못하고 크기가 다른 종 보다 큰편으로 500-1,000 μ 이다.

(c) Sporangia는球形으로 표면은 고르며 黑色을 나타내며 크기가 200-260 μ 정도로 다른 것에 비해 큰 편이다.

(d) Columella는球形 또는扁圓形을 이루고 넓은 複色을 하고 크기는 50-80 μ 이다.

(e) Stolon 위에 chlamydospore를 發見할수 없었

으며 Rhizoids는 豊富한 편이며 stolon은 13-20 μ 의 굵기를 가지고 있어 다른 종에 比하여 굵은 편이다. 이상의 형태적 特性을 綜合하여 *Rh. nigricans* group이라 生覺한다.

(2) Rh. 18-2 strain;

(a) 地上 部位 mycelia 部分이 잘 發達 되어 있지 않았다.

(b) Sporangiphore는 直立 하였고 때로는 分枝

하며 表面은 一定하며 黃褐色을 나타내고 크기는 59—200 μ 으로 一般的으로 다른 種에 比해 짧은 편이다.

(c) Sporangia는 一般的으로 球形이며 灰色 혹은 黃褐色을 나타낸다. 表面은 一般的으로 一定하며 크기는 57.5 μ 으로 다른 種에 比해 작은 편이다.

(d) Columella의 形態는 球形 혹은 卵形을 이루고 一定한 表面을 보이고 褐色 혹은 黑色을 나타내며 20—100 μ 이다.

(e) Chlamyospore는 Stolon에 散在하고 있으며 形態는 球形 혹은 橢圓形이며 13×21 μ , 13×18 μ 의 크기를 나타낸다. 이상의 結果 *Rh. chinencis* group이라 生覺한다.

(3) Rh. 54-1 strain;

(a) mycelia의 地上 部位가 잘 發達되었다. colony character로써 mycelia의 color가 거의 白色 혹은 연한 黃褐色을 가진다.

(b) Sporangiophore는 直立 혹은 屈節하여 生長하며 表面이 均一하거나 혹은 不均一하다. 크기는 210~700 μ 이며 褐色을 나타낸다.

(c) Sporangia는 球形이며 表面에는 鬚 形狀의 침이 着生하고 黑色을 나타내고 60 μ 의 크기를 가진다.

(d) columella의 形態는 球形 혹은 扁圓形이며 一定한 表面을 보이고 연한 褐色을 나타낸다. 30—35 μ 의 크기이다.

(e) chlamydosphore는 球形 혹은 lemon形의 것을 볼 수 있으며 20×25 μ , 8×13 μ 의 크기를 가진다. 이런 特性으로 *oryzae* sub group이라 生覺한다.

(4) Rh. 51-2 strain;

(a) 形態的으로나 生理的인 特性으로는 거의 *oryzae* sub-group과 비슷하나 colony의 特性으로 mycelia의 地上 部位의 色이 灰褐色 혹은 暗褐色을 나타내어 *oryzae* sub-group과는 다른 形狀을 보였다. 고로 區別하여 *oryzae japonicus* sub-group이라 生覺한다.

2. 生理的 特性

Weimer, J.L., and L.L. Harter氏와 Takeda, liguka氏 등의 實驗方法을 引用하여 温度的 特性 培地에 따른 生長率, 및 醱酵性 등을 觀察하였다.

(1) 種에 따른 温度的 條件

(a) Table 2에서 나타난 바와 같이 Rh. 18-2 strain은 47°C에서 가장 잘 生長한다.

Table 2. The relationships between temperature and growth rate of the strains of *Rhizopus* spp.

Strain No.	Temperature		
	25°C	37°C	47°C
Rh 18-2	±	±	++
Rh 16-2	+++	±	-
Rh 54-1	+++	+++	-
Rh 51-2	++	+++	-

(b) Rh. 16-2 strain, 25°C에서 가장 잘 生長하고 37°C와 47°C의 高温에서는 生長을 하지 않았다. 그리고 다른 種에 比하여 低温에서 生長한다. 고로 *nigricans* group이라 生覺한다.

(c) Rh. 54-1, Rh. 51-2 Strain, 이들은 거의 25°C에서 37°C에서 잘 자란다. 이 2 strain은 거의 같은 特性을 보인다.

(3) 培地 및 糖 醱酵에 관한 特性.

Table 3. The relationships between medium conditions and growth rate of the strains of *Rhizopus* spp.

Strain no.	media			
	Czapeck's	malt-czapeck's	pfeffer	potato-glucose
Rh 18-2	++	++	++	++
Rh 16-2	++	++	+	++
Rh 54-1	+++	+++	+++	+++
Rh 51-2	+++	+++	+++	+++

Table 4. The relationships between carbohydrate and fermentable rate of the strains of *Rhizopus* spp.

Strain no	carbohydrate					
	Galactose	Maltose	Inulin	Mannose	Raffinose	Glucose
Rh. 18-2	+	+	-	+	+	+
Rh. 16-2	-	-	-	-	-	-
Rh. 54-1	+	+	-	+	-	+
Rh. 51-2	+	+	-	+	-	+

(a) Rh. 18-2는 Table 2의 培地에서 보통 자라며 Table 3에서 糖은 inulin을 除外한 다른 糖類를 醱酵한다. 고로 *chinencis* group이라 生覺된다.

(b) Rh. 16-2 pfeffer 培地에서 생장이 不良하며 모든 糖을 醱酵하지 않았다. 고로 *nigricans* group이라 生覺한다.

(c) Rh. 54-1, Rh. 51-2는 거의 같은 生理的 特性을 나타낸다. 즉 각 培地에서의 生長이 良好하며 糖의 醱酵도 inulin과 raffinose를 除外한 다른 糖을 醱酵했다. 고로 *oryzae*-group이라 生覺한다.

以上の實驗을 통해서 볼때 *Rhizopus*의 形態에 따른 分類로서는 그 크기의 差異와 形態 變異가 넓은 關係로 一定한 數値로 確固한 種을 規定하기가 困難하였다. 故로 形態의 特性보다는 生理的 特性과 生活史 등에 依存한 分類法이 이루어져야 할 줄로

生覺되며 本 實驗에서 分離한 것은 材料의 對象이 메주에 局限했으므로 앞으로 더 많은 種이 다른 여러 材料에서 分離될 수 있으리라 期待하는 바이다.

摘 要

全國 55 個 地域에서 蒐集된 메주 55 點을 實驗材料로 供試한 結果 *Rhizopus* 層에 屬하는 菌株 30 株를 分離 하였다. 以上の 30 菌株를 分類한 結果 다음과 같은 結論을 얻었다.

1. *Rhizopus nigricans* group: 形態上으로 다른 種보다 큰 편이며 生理的으로는 다른 種에 比하여 比較的 低溫에서 자라며 糖酸酵를 잘 일으키지 않는 點으로 보아 *nigricans* group 이라 結論한다.

2. *Rhizopus chinencis* group: 形態上으로 다른 種에 比해 작은 편이며 生育適溫도 比較的 高溫이고 糖酸酵도 大概 일으킨다. 故로 *chinencis* group 이라 結論한다.

3. *Rhizopus oryzae* sub-group colony의 形態로 mycelia의 色이 거의 白色 혹은 연한 黃褐色을 가진다. 크기로는 普通의 크기를 보인다. 學도 一般的으로 잘 酸酵하며 適溫은 25°C~37°C이다. 故로 *oryzae* sub-group 이라 結論한다.

4. *Rhizopus oryzae-japanicus* sub-group: 本 group의 形態上 및 生理上의 特徵은 *oryzae* sub-group 과 거의 同一하여 區別이 困難하나 colony의 mycelia 色의 差異가 灰褐色 혹은 暗褐色으로 나타내어 *oryzae* sub-group의 colony와는 顯著한 差異가 있으므로 이 2種을 區別하여 *japanicus* sub-group 이라 結論한다.

REFERENCE

- Calmette, A., (1892), Ann. Tnst. Pasteur, T. VT, 604.
- Blakeslee, A.F. (1904), Sexual reproduction in the Mucorineae. Proc. Am. Acad. Arts Sci., 40; 206-319.
- Blakeslee, A.F. (1913), Conjugation in the heterogamic genus zygorhynchus. Myco. Centralbl., 2; 241-244 2 pls.
- C. Wehmer (1907), Mucoraceengattung (F. Lafar: Handbuch der technischen Mykologi, 4, 489.
- Constantine John Alexopolulos, (1962), Introductory Mycology. Jhon Wiley & Sons, Inc., ed. 2. p. 184-210.
- Cutter, V.M. (1942), Nuclear behaivar in mucorales; The Rhizopus, phycomyces and Sporodinia patterns, Bull. Torrey Botan. Club,
- Ernest Athearn Bessey, (1961), Morphology and Taxonomy of Fungi. Hafner Publishing Comapny, ed. 1. p. 150-191.
- Fischer, A.(1892), Phycomyces.(Rabenhorst's Kryptogamenflora Deutschlands, 2, Aufl., J. 4. Abt., p. 229-230).
- Hanzawa, J. (1912, 1914), Studien uber einige Rhizopus-Arten. (Mycologisches Centralblatt, Bd. J. 408 (1912); ibid., Bd. V, 231-239 (1914).
- Lender, A. (1908), Les Mucorinees de la Suisse (T. III, fasc. ides Materiaux pour la flora Cryptogamique Sulsse), Berrone, p. 113-115).
- 微生物ハンドブック編集委員會, (1962), 微生物學ハンドブック, 救報堂, ed. 2. p. 655-665.
- Naumov, N. Cles des Mucorinees (Mucorales). (Translated by S. Buchet and I. Mouraviev) (Encyclopedia Mycologique Vol. 9, p. 64-73, Paris: Paul Lechevalier).
- P.A Saccardo: Sylloge fungorum omnium hucusque cognitorum, 7, 212; 11, 240; 14, 435; 16, 385; 21, 822.
- Swingle, D.B. (1903), Formation of Spores in the sporangia of Rhizopus nigricans and of Phycomyces nitens. U.S. Dept. Agr. Bur. Plant Industry Bull. 37: 1-40.
- Takahashi, T. and Sakaguchi, K. (1925),

- Studies on the acids formed by *Rhizopus*. (J. Agr. Chem. Soc., Japan, 1, 344).
16. Takahashi, K. and Asai, T., (1926), Studies on the acids formed by *Rhizopus*. (J. Agr. Chem. Soc., Japan, 2, 396),
 17. Takeda, Y. (1949), The classification of the genus *Rhizopus*. (A Manual of Fermentation Industry, p. 267-269, Osaka, Japan: Sobunkan, 6th ed.)
 18. Takeda, Y. (1935), Studies on *Rhizopus* species. III. (J. Agr. Chem. Soc., Japan, 11, p. 845; Report No. 147 of the Dept. Industry, Gov. Research Inst., Formosa).
 19. Taiji, Inui, Yoshito Takeda and Hiroshi Iizuka. (1965), Taxonomical studies on genus *Rhizopus* (The Journal of General and Applied Microbiology Vol. II, Supplement. Tokyo, Japan).
 20. T.T. McClure. (1958), Brown and *Rhizopus* rots of peaches as affected by hydrocooling, fungicides, and temperature. *Phytopathology* 48 (6); 322-323.
 21. T.T. McClure. (1959), *Rhizopus* decay of Sweet-potatoes as affected by chilling, recurring, and hydrowarming after storage. *Phytopathology* 49(6); 359-369.
 22. Weimer, J.L., and L.L. Harter. (1923), Temperature relations of eleven species of *Rhizopus*. *J. Agr. Research* 24; 1-40.
 23. W.L. Smith, Jr., and T.T. McClure. (1960), *Rhizopus* rot peaches as affected by postharvest temperature and moisture. *Phytopathology* 50 (7); 558-561.
 24. Yamamoto, Y. (1930), Ein Beitrag zur Kenntnis der Gattung *Rhizopus* (J. Facult. Agr., Hokkaido Imp. Univ., Sapporo, Japan, 28, Pt. 1, p. 68-69).
 25. Yamazaki, M. (1934), On the classification of *Rhizopus* species. (Bull. of the Utsunomiya Agr. Col., Utsunomiya, Japan, No. 5).
 26. Zycha, H. (1935), Mucorineae. (Kryptogamenflora der Mark Brandenburg, Bd VI a, Pilze II, p. 109-110, Leipzig: Gebrüder Bornträger)