

한국전통 식품의 원료인 메주와 누룩에서 분리된 접합균에 대한 연구

유기원 · 성창근 · 이상선 · 유진영

충남대학교 농과대학 식품공학과

한국교원대학교 생물과학

한국식품개발원 생물공학부

Studies on the Fungal Isolates of Mucorales Collected from Korean Home Made Mejus and Nuluks

Kee-Won Yu, Chang-Kun Seoung, Sang-Sun Lee and Jin-Young Yoo

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

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

ABSTRACT: The fungal isolates of Mucorales, directly collected from Korean traditional raw materials of Nuruk (raw material for Korean rice wine) and Meju (raw material for Korean soy-sauces), were compared with those of *Rhizopus oryzae* purchased. The fungal isolates of *Rhizopus*, *Mucor*, and *Absidia* mostly identified as based on the morphological observations, were evaluated with the PCR-polymorphic bands. The PCR-polymorphic bands of the genomic DNA reacted with the primers of OPD series tenmer were various, but showed averaged 4 to 6 in the agarose-electrophoresis. The dissimilarity coefficient (DC) between two isolates were compared by the cluster analyses, dendrograms and polar ordinations. The isolates of *R. oryzae* known showed several groupings within the lower value of DC and were divided to two groups of amylo-process and other fungi with other purposes. The isolates unidentified were identified by the DC made of this results. Taxonomy of these isolates made by the morphological observations were consistent with those resulted above in most case but not in all aspects. More works were needed with the isolates known for detail informations of Mucorales.

KEYWORDS: *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia*, PCR Polymorphism

서 론

우리나라에서 전통적인 술과 간장은 대단히 중요한 식품의 하나이다. 누룩은 우리나라에서 옛부터 이용되고 있는 주류의 원료이며, 당분해 효소와 전통적인 맛을 내는 성분이 포함된 것으로 알려지고 있다 (김과장, 1993). 이와 반면에 메주는 콩으로 만들어지는 것으로 우리의 간장과 된장의 주 원료 물질이며 콩 단백질과 단백질 분해효소를 함께 포함한 것

으로 알려져 있다 (Lee, 1995). 이러한 것은 모두 일 반가정에서 미생물의 발효과정으로 만들어지는 원료 물질이란 공통성을 갖고 있다. 아직, 우리에게 발효 과정에서 만들어지는 식품에서 주는 의미는 우리의 전통이란 독특한 의미로 맛과 향수를 갖고 있는 것으로 생각된다. 또한, 최근 사회가 핵 가족화됨에 따라 각각 가정에서 만들어지는 것이 가내 공업화를 촉진시키는 결과를 낳았으나, 제도화되지 못한 내용으로 문제점을 낳고있다. 이에 대한 우리 고유의 발효식품에 대하여 독창적인 무엇이 있으나, 우리의 과학으로 이해하지 못하고 있는 것들이 너무 많다.

*Corresponding author

전통 식품의 원료인 누룩과 메주는 각각의 가정에서 제조되어졌기에 각 제조과정에서 만들어지는 술과 간장에는 독특한 가정의 맛을 있는 것으로 생각된다. 아직 이러한 것에 대한 근본적인 연구는 진행되지 않고 있다; 발효에 관련되는 미생물과 발효 과정에 다른 온도 및 방법(김과장, 1993; 조와이, 1970). 위의 두 발효과정은 제조과정에서 가정에서 만들어지기에 각각의 생산에 있어 서로 다른 누룩과 메주를 만든다는 것이다. 여기서, 이러한 원료물질에 대한 발효과정의 중요한 것은 각 가정의 발효 방법에 의한 생산품의 품질이 다를 것으로 생각하고 있다. 대부분의 농가에서 만들어지는 누룩과 메주는 그 원료물질과 만드는 과정은 일반적으로 부분적인 차이점은 있으나, 대체적으로 동일할 것으로 생각된다. 그러나 이러한 발효에 따라서 각각 발효에 대한 균의 프로타는 지역과 시간에 따라서 많이 달라, 그 발효물질이 다를 것으로 예측된다 (Lee, 1995; Lee *et al.*, 1993). 이러한 것을 가정된 후에 각각의 전통 발효에 관련된 균을 분리하여 관찰하였다. 이러한 면에 각각의 발효물질에 서식하는 균의 프로타에 대한 기본적인 연구로 각각의 발효물질에서 분리된 균에 대한 분류학적인 연구는 중요하다 하겠다. 이는 발효물질에 대한 최소한 문제점을 해결하는 과정으로 생각된다.

현재, 전통식품의 발효에는 접합균이 초기단계에서 발견되는 균으로 보고되고 있다(Lee, 1995; Lee *et al.*, 1993; 이, 1995; 오, 1995). 접합균에 대한 분류는 3개의 목으로 나뉘고 있으나, 다른 연구자는 7 혹은 11개의 목으로 분류하고 있다(Alexopoulos *et al.*, 1996). 주로 접합균의 간단한 분류는 부생, 곤충 혹은 식물과 상호관계(공생, 기생)로 분류하고 있다. 접합아강의 균에서 균목의 분류는 균의 형태적인 면보다는 생태적인 용어로 분류하고 있어, 각각의 연구자들의 교류가 적고 다른 분류의 균목은 이해하기 힘들다. 여기서, 유독 Mucorales 만이 다른 생물과 상호작용을 하는 것 보다, 사물기생으로 곡물의 저장 기간에 부패 혹은 발효에 작용하는 균으로 알려졌다. 다른 균에 비해 연구의 필요성이 많음에도 불구하고 연구되지 않았다. 이 균들은 분리 동정에 대한 기초는 균사들이 접합을 하여, 유성생식기인 접합포자(zygosporangium)를 만드는 것으로 알고 있으나,

분류에 사용되는 면은 거의 없다. 무성생식기로는 바람에 의하여 산포되는 포자낭(sporangium)이 특징으로 분류에 중요한 특성이되고 있다(Zycha, 1969; Gilman, 68). 실제, 실험실에서 접합포자를 관찰하기는 쉽지 않으며, 무성생식기인 포자낭의 형태(columella)와 달린 가지(conidiophore)를 중점으로 분류하고 있다(Hesseltine & Ellis, 1970). 각각의 분리된 균인 *Rhizopus* (Scripper, 1984; Scripper, & Stalpers, 1984), *Mucor* (Domsch, Gams, & Anderson, 1980), 및 *Absidia* (Domsch, Gams, & Anderson, 1980)는 누룩과 메주에서 분리되어, 슬라이드배양을 통하여 현미경적인 형태를 기초로 동정되었다.

위와 같은 한국전통 발효 물질인 누룩(오, 1995)과 메주(이, 1995)에서 분리된 균을 이용하여, 우리의 전통 식품에 관여하는 누룩과 메주에 대한 균에 대한 특성을 파악하기 위하여 본실험은 수행되었다. 직접 발효식품에서 분리된 균과 구입된 균을 이용하여, PCR(Polymerase chain reaction)-polymorphic pattern 기법을 이용하여 균의 특성을 파악하였고, 이러한 내용을 식품에 관련된 균의 특징과 균의 역할을 파악하고자 하였다. 그 결과 각각의 발효식품의 원료물질인 누룩과 메주에 서식하는 균에 대한 정확한 자료를 알기위하여 PCR-polymorphic bands를 이용하여 수리분류학적인 유연관계를 보았다

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용된 접합균은 우리나라의 재래 발효식품의 재료물질인 메주와 누룩에서 각각 분리되었다. 메주에서 분리된 균들은 한국교원대학교 생물학과 미생물실험실(Lee, 95; Lee *et al.*, 93, 이, 95)에서 보관중이며, 누룩에서 분리된 접합균은 현재 충남대학교 식품공학과 발효공학실(오, 1995)에 보관되어 있다. 기타 균들은 ATCC, KCTC 와 KCCM 에서 구입하였다(Table 1).

배 양

보관중인 포자를 PDA 배지에서 7일간 배양하여

Table 1. The fungal isolates purchased by KCTC or KCCM, and collected from the hand made raw materials, meju or nuruks for the Korean traditional foodstuffs

Fungal isolate remarked	Purchase or The isolates	Descriptions
R-01	KCTC 1272	<i>Rhizopus oryzae</i> (IFO 4746) for alcohol production (J. hanzawa)
R-02	KCTC 1278	<i>R. oryzae</i> (ATCC 22581) for industrial alcohol production
R-03	KCTC 1279	<i>R. oryzae</i> (ATCC 20344) for glucoamylase and cell-separating enzyme
R-04	KCTC 1279	<i>R. oryzae</i> (ATCC 26612) for high production of alcohol at amyloprocess
R-05	KCCM 11276	<i>R. oryzae</i> (IFO 4716) for Kaoliangchui yeast cake
R-06	KCCM 11556	<i>R. oryzae</i> (ATCC 24794) for degradation of insecticide or herbisides
R-07	KCCM 11606	<i>R. oryzae</i> (IFO 4706) for kaoliangchui yeast cake
R-08	KCCM 11697	<i>R. oryzae</i> (ATCC 4858) for pectinase
R-09	KCCM 35223	<i>R. oryzae</i> (ATCC 11145) for insert moulting hormones and hydroxylation of
R-10	KCCM 60159	steroid
R-11	Koji (F-6)	<i>R. oryzae</i> (ATCC 9374) for starch conversion into amylo process
R-12	Maeju (R-7)	Not identified and isolated from Koji for Korean rice wine by Seong, Chang-
R-13	Maeju (R-1)	Kun ^a
R-14	(E-1)	Not identified and isolated from Maeju for Korean soysauce by Choi, Seong-
R-15	(S-2)	Hyeon ^a
R-16	(M-12)	<i>M. racemosus</i> isolated from Maeju for Korean soysauce wine by Park, Kwon-
R-17	(M-14)	Ho ^b
R-18	(M-17)	<i>Mucor hiemalis h</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Park, Kwon-Ho ^b
R-19	(M-18)	<i>Mucor hiemalis h</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Park, Kwon-Ho ^b
R-20	(M-19)	<i>M. racemosus</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Lee, Sang-Sun ^c
R-21	(M-35)	<i>Mucor hiemalis s</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Lee, Sang-Sun ^c
R-22	(R-2)	<i>M. racemosus</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Lee, Sang-Sun ^c
R-23	(M-10)	<i>Mucor hiemalis s</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Lee, Sang-Sun ^c
R-24	(M-23)	<i>Mucor hiemalis h</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Lee, Sang-Sun ^c
R-25	(M-24)	<i>M. racemosus</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Lee, Sang-Sun ^c
R-26	(M96-1)	Not identified and isolated from Koji for Korean rice wine by Choi, Seong-Hyeon-
R-27	(Dae-Jeon)	n ^a
R-28	(Shin-Tan-Jin)	<i>R. stolonifer</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Lee, Sang-Sun ^c
R-29	(Ryu-Seong)	<i>Absidia gluaca</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Lee, Sang-Sun ^c
R-30	(R-7)	<i>Absidia spinosa</i> isolated from Maeju for Korean soysauce by Lee, Sang-Sun ^c

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

^bThe fungal isolates were collected for the studies of Korean traditional say sauce at Lab of Mycology (Department of Biological Science and Education) in Korea National University of Education(1990 to 1994, Lee, *et al.*, 1993; Lee, 1995).

^cThe fungal isolates were collected for the studies of Korean traditional say sauce at Lab of Mycology (Department of Biological Science and Education) in Korea National University of Education(1995 to 1996, Lee *et al.*, 1993; Lee, 1995).

포자가 생산된 것을 접종원으로 사용하였다. 다음은 DNA를 균사체로부터 얻기위하여 PD broth에 3일간 진탕배양(250 rpm) 하였다. 액체배지의 균사체를 여과장치를 통하여 필터페이퍼에 모으고, 배지 성분을 제거하기위하여 멸균 증류수로 2번 세척하였다. 이와같은 과정을 거친 약 2 g 균사체를 -70°C에 보

관하여, DNA를 분리 시료로 사용하였다.

DNA추출

냉동보관된 균사체는 액체질소를 이용하여 막자 사발에서 곰팡이의 세포벽을 파괴하고, 여기에 부피 비 3배의 추출용액(100 mM NaCl, 10 mM Tris-

Cl (pH 8.0), 1 mM EDTA, 1% SDS, 0.5% 2-mecaptoethanol)을 첨가하였다. 이어서 동일한 부피로 PCI(phenol:chloroform:isoamylalcohol = 5:24:1)를 가하여 DNA를 추출하였다(Hwang *et al.*, 1991). 추출된 용액은 진공상태에서 용액을 증발시킨 다음에, 2-3 ml 완충용액 (TE buffer: 10 mM Tris Cl, 1 mM EDTA buffer pH 8.0)을 첨가하여, 단백질과 RNA를 제거하기위한 가수분해 효소(proteinase K & RNase A)로 처리하고, -70°C에 30분간 보관하여 처리한 후에 침점물에 3 ml TE buffer(pH 8.0)를 첨가하여, 37°C에 RNase 와 proteinase를 한시간 가량 처리하여 불순물을 제거하였다(Ausubel *et al.*, 1987; Weising *et al.*, 1995). 각각의 균사체에서 나온 DNA는 전기 영동을 통하여 그 DNA-Band를 확인하였으며, 확인된 DNA-genome 으로 PCR 조작으로 다양한 bands을 관찰하였다.

PCR조작

앞에서 분리된 DNA-genome은 agarose 전기영동을 통하여 순수분리를 확인한 후에, PCR를 하였다(Sambrook *et al.*, 1989; Williams *et al.*, 1990; Nuovo, 1992). 사용된 primer는 오페론 기술사(Operon Technologys Ins. (<http://operon.com>. 100 Atlantic Av., Suite 108 Alameda, CA 94501, U.S.A., Fax. 82-810-865-5255)에서 구입된 것을 사용하였다(Erlich *et al.*, 1991; Kersulyte *et al.*, 1992; Roy, 1992; Saiki, 1985), 사

용된 primer에서 만들어지는 PCR-polymorphic band는 각각 표시되었다(Table 2).

수리분류

앞에서 추출된 균의 DNA에 각각의 다른 primer를 사용한 결과 전기 영동상에 나타나는 polymorphic bands 73개를 중심으로 나타나는 것과 없는 것을 1혹은 0로 표시하여 통계처리를 수행하였다. 통계처리는 SPSS PC plus에 있는 집괴분석(cluster analysis), Basic program로 짜진 Polar Ordination(Reynold & Ludwig, 1988), 및 NT system(Rohlf *et al.*, 1979)을 이용하여, 분리군 혹은 분양받은 균들을 서로 비교하였다. 기본적인 분석은 집괴분석을 통하여 나타난 두 분리군간의 거리를 기초로한 Dendrogram을 우선적으로 묶음을 하였으며, 다른 그림에 나타난 균들의 묶음을 비교하였다.

결 과

균수집

산업적으로 중요한 균인 33개의 균을 사용하였으며, 이들은 대부분이 메주와 누룩에서 분리한 것이다. 이들은 최근에 한국고원대학교 이상선 실험실에서 과거 조선 메주에서 서식한 균만 채집된 것으로 조선전통 메주에 중요한 12균들로 형태적인 동정된 균들이다. 그와 반면에 누룩에서 서식한 균들은 충남대학교 성창근 실험실에서 최근 3-4년간 분리 보관

Table 2. The primers of OPD series employed for PCR-polymorphism

Primers ^a	The sequences of Primers	The PCR-polymorphic bands checked at the raw data in Table-3 ^b
OPD 2	5' -GGACCCAACC- 3'	11, the column 1st to 11st
OPD 3	5' -GTCGCCGTCA- 3'	10, the column 12nd to 21st
OPD 4	5' -TCTGGTGAGG- 3'	7, the column 22nd to 28th
OPD 8	5' -GTGTGCCCA- 3'	4, the column 29th to 32nd
OPD 11	5' -AGCGCCATTG- 3'	11, the column 33rd to 43rd
OPD 13	5' -GGGGTGACGA- 3'	13, the column 44th to 56th
OPD 18	5' -GAGAGCCAAC- 3'	10, the column 57th to 66th
OPD 20	5' -ACCCGTCAC- 3'	7, the column 67th to 73rd

^aOPD primers was purchased (Operon Technologys Ins: <http://operon.com>. 100 Atlantic Av. Suite 108 Alameda, CA 94501, U.S.A. Fax. 82-810-865-5255)

^bThe characteristics represented by the PCR-DNA bands was indicated in Table-3 and Figs 1.

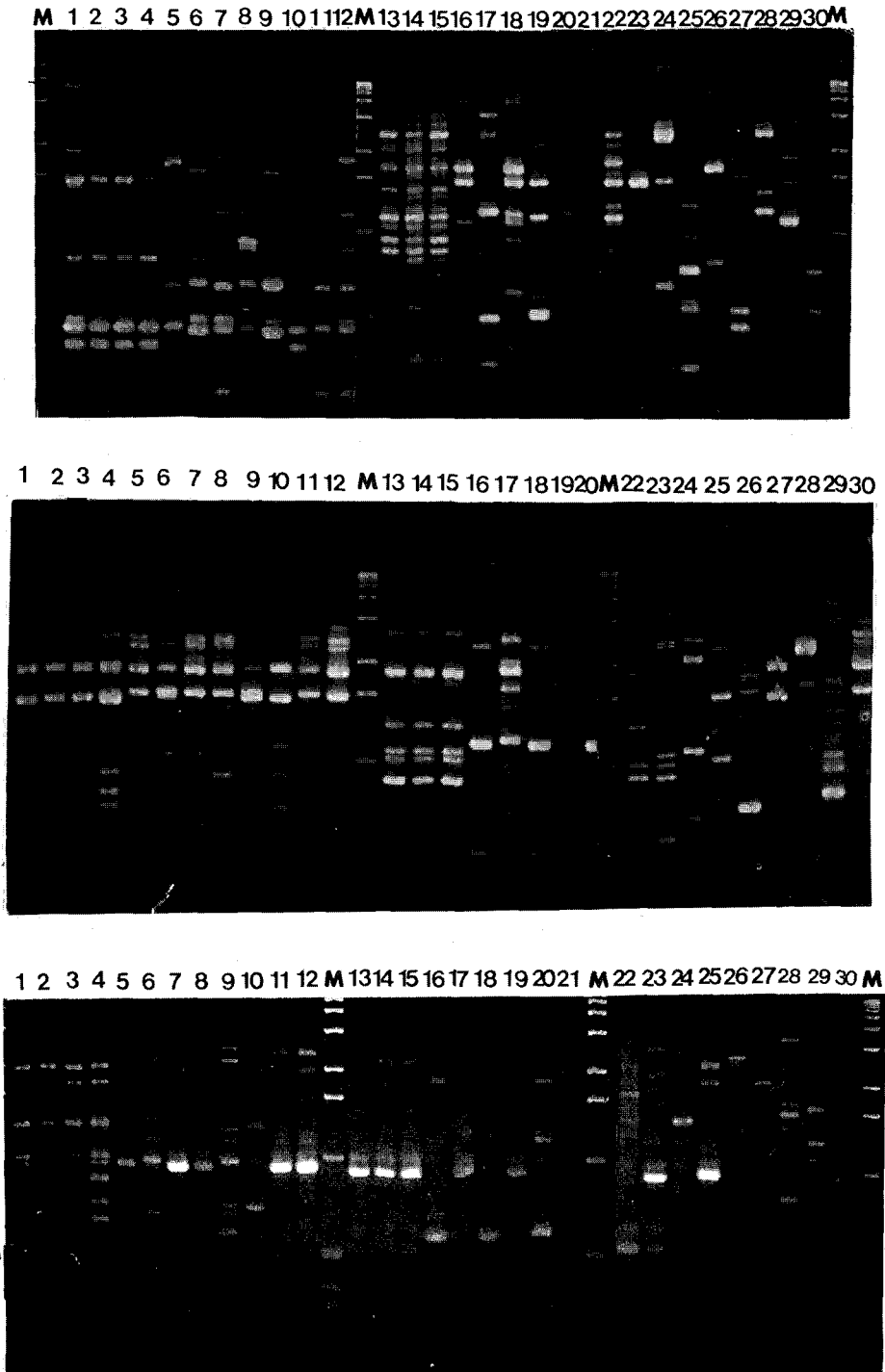


Fig. 1. The PCR-Polymorphic patterns of the 30 fungal isolate's genomic DNA made with the different primers mentioned in detail (Materials and Methods); reacted with OPD 2 (the upper), with OPD 18 (the middle) and with OPD 20 (the bottom).

한 13군 들이다. 이들은 대부분이 형태적으로, 더 정확히 현미경으로 형태적인 모양을 기초로 동정한 내용으로 *Rhizopus*, *Mucor*, *Absidia* 속의 균만을 사용하였다. 대조균에 사용된 균(*R. oryzae*)은 KCTC와 KCCM에서 구입하였으며, 실험 혹은 사용 목적에 따라서, 전분분해 효소 빵제조 및 steroid에 관련되는 균들이다(Table 1).

균의 PCR-polymorphic bands

사용된 균은 모두 액체배양을 3-4일 동안 진탕배

양시킨 후에, pellet 채집하여 액체질소를 넣어서 DNA를 분리하였다. 이 접합균들의 액체배양은 점종하고, 배양기간 동안 오염이 다른 불완전균인 *Aspergillus* 혹은 *Penicillium*속 종균보다 심하였다. 이렇게 배양된 균의 Pellet은 위에서 언급된 균의 pellet과는 다른 형태로 길고 물렁물렁하게 만들어졌다. 분리된 genomic DNA는 우선 단일밴드가 나오는 것을 확인한 후에, PCR반응을 8개의 primer 을 이용하여 반응시켰다(Table 2). 그림 1은 대표적으로 primer(OPD 2, 18, 20)를 사용하

Table 3. The raw materials obtained from each bands of PCR-polymorphic bands of the fungal isolates made by the different primer of OPD series. The experimental bands were shown in Fig. 1

Marked	The bands of PCR-DNA of the fungal isolates made with the different primers of OPD														
	1	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60	65	70
R-01	100010000000001110010011111100010111011011001010100011000100110011100010														
R-02	1000100000000011100100011111100010111011011001010100010000100110011100010														
R-03	1000100000000011100100111111100010111011011001010000000000100110011100010														
R-04	1001100000000011100100011111100010111010011101010000000000100110001100010														
R-05	100110000000001000000001110100000000011100100111101111000001100001000101														
R-06	1001100100011010000110010110100010010110100100111100011010111110001010100														
R-07	1101100100011010000010001110000010010111100100111001101000001110001000101														
R-08	11011000000101100001000111010000000011000100111000001010001100001000100														
R-09	10001000000010000001101101101000000011010010111000000001011110001010100														
R-10	1000100000000001000100010100000010011010011100010000000010110110001100010														
R-11	1001100000001010100010001110000000000011100100010000000000011100001000100														
R-12	100110000000100000010001110000010000011100100110000100000011100001000101														
R-13	1000011101000100001000000000010011001111110000001001100100010101010010001														
R-14	1000011101000100001000000000010011001111110000001001100100010101010010001														
R-15	1000011101000100001000000000010011001111110000001001100100010100010010001														
R-16	00010000101001000000001000000110011011111001001000100010000000010000111000														
R-17	1000100010010010000000000000010000111100000101110011001000000111010000011														
R-18	0001000010100100000000100000011001101111100100000100010001001110000111000														
R-19	00000000000000000001000001000001000101100010000100100010100110110100001010														
R-20	000100001010010010000010100001100000111110010000010001000101111000000000														
R-21	00														
R-22	000001100001010001101100011001001010110010000001000100000110101100011001														
R-23	001101110011110001100100001001101010111101000100000000100110101100001001														
R-24	0101000110011000011000000000100000001101000010100000000000010001000001011														
R-25	00001010000000000010110001010011000110001001000001100111000001000011000100														
R-26	1000000000010010010000010001000000100000001001001010000000010001000010000														
R-27	1000100000000001000000010001101001111010011001010010000000000100001100010														
R-28	010000000000000000110000000000000100														
R-29	001000100001000011100001000001100000010100000001000101000010010000001000														
R-30	110110000000000100011000110000000000011000100010001000000001000011000100														

The representatives of bands made by PCR-polymorphic bands shown on the column 1 to 11 were reacted with the OPD 2; 12 to 21 with OPD 3; 22 to 28 with OPD 4; 29 to 32 with OPD 8; 33 to 43 with OPD 11; 44 to 56 with OPD 13; 57 to 66 with OPD 18; 67 to 73 with OPD 20;

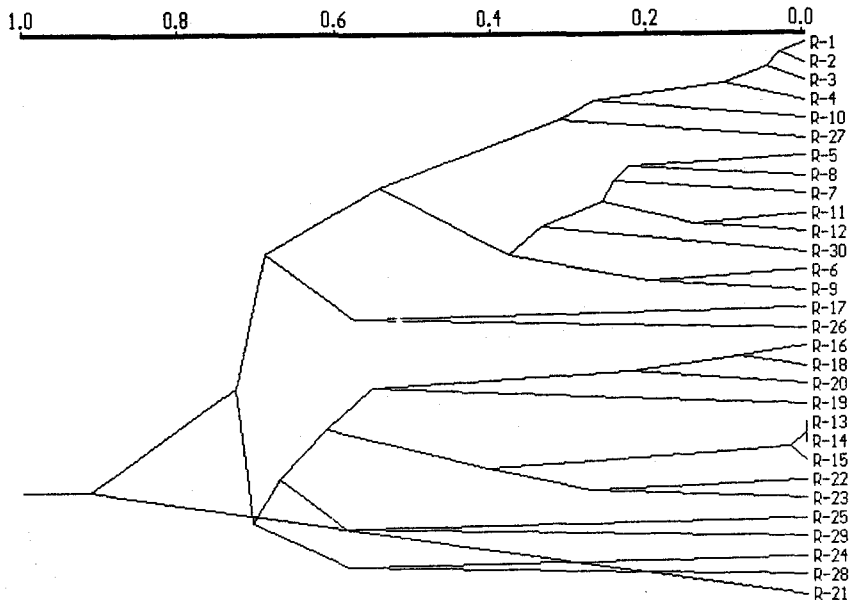


Fig. 2. Dendrogram of the 30 fungal isolates calculated by the unweighted pair grouping methods.

여 나타난 PCR-polymorphic bands이다(Fig. 1). 여기서, 각각의 그림에서 중간에 촘촘히 나타난 밴드는 표준 DNA를 사용하였다(표시로 M lanes). 그리고, 각각의 열(lane)에서 4-6개의 밴드가 나타났으나, 평균적으로 8-9개의 밴드가 나타났다. 여기서 9개 이상의 밴드가 나온 primer는 OPD 2, 3, 13 및 18 것으로 접합균의 DNA와 반응을 하여 많은 밴드를 나타냈다. 특히, primer(OPD 20)으로 반응시킨 것은 그림과 같이 다양한 밴드가 보이고 있다(Fig. 2). 지금, 나타난 그림은 각각 사진 찍은 배틀을 달라서 다르게 나타났으나, 이것은 컴퓨터 스캐너를 사용하여 크기를 정정하여 각각의 밴드를 비교하였다. 여기서 나온 밴드는 표준분자량으로 표시하여 각각의 균에서 분리된 genomic DNA와 비교하였다. 여기서 사용된 6개의 primer와 접합균의 DNA는 73의 PCR-polymorphic band로 확인하였다. 이때는 나타난 밴드에서 나온 것은 "1"로 나오지 않는 밴드는 "0"로 표시하였다(Table 3). 이때, 나온 자료는 한 분리균에서 나온 genomic DNA는 사용된 Primer의 종류에 따라서 다양한 밴드가 확인되었으나(Fig. 1), 본실험에서는 각각의 primer에 따른 그림은 생략하였다.

집괴분석

각각 분리균에 대한 PCR-polymorphic bands에 대한 자료를 최근 각실험실에서 사용하는 NT-sys의 프로그램을 사용하였다. 이때, 나타난 결과는 두 개의 분리균 간의 수학적으로 계산한 결과를 나타낸 것으로, Dissimilarity Coefficient(DC)로 계산된 분류 단위로 표현하였다(Table 4). 즉, 여기에 나타난 값은 일반적으로 분류학에서 DC로 설명되고 수학적인 값으로 여러개의 형질을 함께 합한 것으로 분류를 위한 상대적인 값으로 사용되는 것이다. 두 분리균간에 동질성을 나타낸 것으로 값(DC) 1에 가까울수록, 동질성이 큰 것으로 계산되었다. 집괴분석 결과 나온 DC값에 따라서, 분리균 R-15는 분리균 R-13 및 R-14와 가까운 균으로 나타났다. 다른 말로는 이들의 균들은 본실험에서 나타난 결과로 다른 어떤 분리 균보다는 유전적으로 가깝다는 것이다. 분리균 R-21은 다른 분리균(R-13, R-14, R-15)와는 전혀 동질성이 나타나지 않으나, R-19가 DC(0.18)로 가장 가까운 것으로 나타났다. 분리균인 R-30은 다른 분리균(R-26, R-19, R-22)과 유전적으로 거리가 멀고, 분리균(R-8, R-11)와 가장 가까운 것으로 나타났다. 이러한 자료를 다시 확인하기 위하여, SPSS PC 통계처리 프로그램을 이용

Table 4. Euclidean Dissimilarity Coefficient between two fungal isolates. The values (1.00) inside indicated the identical form of fungal isolate

Cases	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
R-01	1.00															
R-02	0.96	1.00														
R-03	0.95	0.95	1.00													
R-04	0.87	0.90	0.91	1.00												
R-05	0.51	0.50	0.43	0.48	1.00											
R-06	0.56	0.55	0.50	0.57	0.64	1.00										
R-07	0.46	0.45	0.45	0.50	0.75	0.76	1.00									
R-08	0.49	0.47	0.48	0.52	0.77	0.68	0.76	1.00								
R-09	0.50	0.49	0.53	0.54	0.54	0.80	0.59	0.64	1.00							
R-10	0.69	0.71	0.73	0.78	0.38	0.57	0.41	0.43	0.58	1.00						
R-11	0.45	0.47	0.48	0.53	0.66	0.62	0.70	0.77	0.65	0.42	1.00					
R-12	0.40	0.41	0.42	0.47	0.76	0.64	0.79	0.73	0.66	0.45	0.85	1.00				
R-13	0.27	0.28	0.28	0.21	0.35	0.33	0.42	0.20	0.26	0.29	0.26	0.37	1.00			
R-14	0.27	0.28	0.28	0.21	0.35	0.33	0.42	0.20	0.26	0.29	0.26	0.37	1.00	1.00		
R-15	0.27	0.28	0.29	0.22	0.36	0.33	0.42	0.20	0.27	0.29	0.26	0.38	0.98	0.98	1.00	
R-16	0.32	0.30	0.26	0.27	0.34	0.35	0.30	0.21	0.33	0.22	0.23	0.27	0.37	0.37	0.38	1.00
R-17	0.45	0.43	0.44	0.45	0.36	0.41	0.50	0.33	0.36	0.39	0.27	0.30	0.36	0.36	0.32	0.34
R-18	0.35	0.32	0.29	0.30	0.36	0.37	0.32	0.25	0.36	0.26	0.31	0.30	0.40	0.40	0.40	0.91
R-19	0.39	0.40	0.33	0.34	0.23	0.30	0.20	0.14	0.27	0.35	0.15	0.20	0.31	0.31	0.32	0.45
R-20	0.36	0.33	0.30	0.31	0.42	0.39	0.37	0.30	0.37	0.27	0.47	0.40	0.37	0.37	0.38	0.72
R-21	0.16	0.17	0.17	0.18	0.06	0.05	0.11	0.07	0.06	0.15	0.08	0.07	0.00	0.00	0.00	0.15
R-22	0.23	0.24	0.25	0.25	0.27	0.40	0.38	0.20	0.34	0.25	0.26	0.37	0.61	0.61	0.58	0.33
R-23	0.27	0.28	0.29	0.29	0.28	0.39	0.41	0.25	0.31	0.25	0.30	0.40	0.58	0.58	0.56	0.48
R-24	0.15	0.16	0.16	0.16	0.22	0.30	0.36	0.27	0.22	0.14	0.20	0.29	0.35	0.35	0.31	0.34
R-25	0.47	0.45	0.38	0.31	0.51	0.42	0.45	0.43	0.29	0.22	0.38	0.40	0.25	0.25	0.25	0.27
R-26	0.29	0.29	0.31	0.32	0.10	0.29	0.17	0.15	0.25	0.22	0.17	0.11	0.25	0.25	0.20	0.11
R-27	0.66	0.66	0.70	0.72	0.34	0.32	0.26	0.35	0.38	0.65	0.29	0.27	0.25	0.25	0.26	0.27
R-28	0.09	0.09	0.10	0.10	0.11	0.13	0.14	0.05	0.16	0.12	0.06	0.12	0.33	0.33	0.28	0.18
R-29	0.20	0.20	0.17	0.13	0.19	0.27	0.29	0.14	0.18	0.15	0.16	0.15	0.37	0.37	0.38	0.30
R-30	0.43	0.43	0.45	0.46	0.65	0.46	0.61	0.71	0.50	0.45	0.68	0.65	0.22	0.22	0.23	0.20
Case	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30		
R-17	1.00															
R-18	0.33	1.00														
R-19	0.33	0.42	1.00													
R-20	0.30	0.82	0.45	1.00												
R-21	0.07	0.14	0.18	0.15	1.00											
R-22	0.36	0.36	0.40	0.29	0.00	1.00										
R-23	0.35	0.46	0.48	0.44	0.00	0.72	1.00									
R-24	0.41	0.27	0.37	0.29	0.00	0.40	0.54	1.00								
R-25	0.30	0.30	0.25	0.31	0.07	0.33	0.29	0.09	1.00							
R-26	0.42	0.10	0.12	0.05	0.00	0.35	0.26	0.24	0.22	1.00						
R-27	0.44	0.31	0.30	0.18	0.08	0.12	0.22	0.15	0.27	0.40	1.00					
R-28	0.23	0.17	0.28	0.06	0.00	0.38	0.28	0.41	0.12	0.33	0.06	1.00				
R-29	0.29	0.29	0.34	0.35	0.09	0.46	0.44	0.38	0.41	0.32	0.10	0.22	1.00			
R-30	0.28	0.23	0.05	0.30	0.09	0.09	0.12	0.16	0.45	0.06	0.30	0.21	0.05	1.00		

*This result obtained by NT-system was also compared with that obtained by SPSSPC+: CLUSTER CA TO BX/PRINT DISTANCE/PLOT DENDROGRAM/METHOD CENTROID or CLUSTER CA TO BX/PRINT DISTANCE/PLOT DENDROGRAM/METHOD CENTROID.

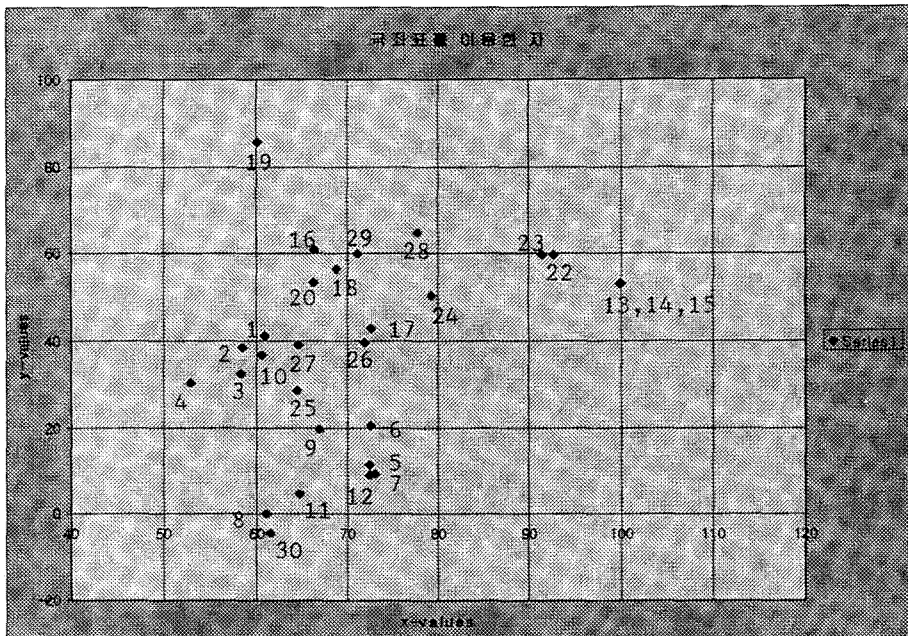


Fig. 3. Polar ordinations of the 30 fungal isolates calculated by Bray-Curtis method calculated from Basic programs.

하여 계산하였다. 그 결과 여기서 표시되지 않았지만 표 4와 같은 결과를 나타냈었다. 이 통계프로그램을 사용하여, 다양한 DC거리를 계산하였으나 동일한 결과를 얻었다. 그 계산된 DC의 값은 상당한 차이를 보이고 있으나, 보편적으로 비슷한 값을 나타내었다. 이러한 것은 한 개 한 개의 분리균에 대한 비교를 할수가 없어, Dendrogram의 내용과 일치하는 것을 확인 비교되었다(Fig. 2).

NT-sys에 있는 dendrogram을 그렸으며, 크게 두 개의 묶음으로 나타나고 있다(Fig. 2). 우선 앞에서 나온 묶음(A; R-1,2, to 17, 26 in Fig. 2)은 비교적 적은 DC값으로 단위 묶음으로 나타났다. 그러나 다음의 큰 묶음(B; R-16, 18, to 24, 28 in Fig. 2)은 분리균(R-16, 17, 20)의 적은 묶음을 제외하고는 큰 DC값에서 묶음이 형성되었다. 이러한 것을 고려한다면, group A는 group B에 비해, 동질성의 분리균들의 균들로 구성되었다(Fig. 3, Table 5). 그러나, group B는 상당히 이질적인 분리균들이 모인 것으로 나타났다. 이러한 dendrogram는 또한 위에서 언급된 통계 프로그램을 사용하였으며, 그결과는 DC값에 대한 미소한 차이

점은 있으나 대동소이한 결과를 나타냈다.

Polar ordination

집괴분석과 dendrogram의 결과는 일반적인 분석으로 각각의 분리 균들의 묶음을 결정하기가 어려웠다. 일단, 과거 수리 분류학에 많이 사용된 Bray-Curtis의 방법인 극좌표(Polar ordination)를 사용하였다. 이는 생태학의 생태지 분석에 사용되는 Basic 프로그램을 이용하여 계산하였다. 여기서 수학적으로 벡터계산에 의하여 단 2개의 좌표로 나타내어 Fig. 3에 표현하였다. 우선, 분리균(R-21)는 다른 분리균과 많이 떨어져, 전혀 이들의 분리균과 동질성이 보이지 않았다. 여기에서 나타난 것으로, R-19는 R-21에 비해서 큰차이가 있지만, 다른 분리균들에 비해 떨어져 있었다. 여기서 R-13, 14, 15는 동일한 점으로 나타났고, R-22 및 R-23과 가깝게 나타났다. 이러한 것은 집괴분석(Table 3)과 텐드로그램(Fig. 2)의 결과와 동일한 것이었다.

우선, 집괴분석에서 DC의 값이 0.3 이하로 묶어지는 것은 group 1에서 4개의 분리균과 group 2의 분리균 전부, group 5의 3개의 분리균과 group

Table 5. Grouping of the thrity fungal isolaties and known fungal species

The species known ^a	Cluster analyses ^b and Polar ordination (numbers)	Soures of fungal isolates and the matrials collected
<i>Rhizopus oryzae</i>	R-01, R-02, R-03, R-04 R-10 R-27	1 Amylo process or Nuluk fungi 1 Starch hydrolysis 1 Nuruk fungi
<i>Rhizopus oryzae</i>	R-05, R-07, R-8 R-11, R-12 R-30 R-06, R-09	2 Yeast cake, Pectinase 2 Nuruk and meju (Seong's Lab) 2 Nuruk (Seong's Lab) 2 Degradation of insecticide or Hydroxylation of steroids
<i>Mucor hiemalis f. silvaticus</i>	R-17 R-26	3 Meju (Lee's Lab, M-14) 3 Mju (Lee's Lab, M96-1)
<i>Mucor racemous</i>	R-16, R-18	5 Meju (Lee's Lab, 94)
<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	R-20	5 Meju (Lee's Lab, M-19)
<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	R-19	6 Meju (Lee's Lab, N-18)
<i>Mucor hiemalis f. hiemalis</i>	R-13, R-14, R-15 R-22	4 Meju (Lee's Lab, 94) 4 Nuluk (Seong' s Lab)
<i>Absidia qluaca</i>	R-23 R-25	4 Meju (Lee's Lab, M-10) 3 Meju (Lee's Lab, M-23)
<i>Absidia spinosa</i>	R-29 R-24 R-28 R-21 (a)	5 Nuluk (Seong's Lab) 3 Meju (Lee's Lab, M-24) 5 Nuluk (Seong's Lab) Nat included for michanhting

^aThe fungal isolates identified as based on the microscopic observations.

^bThe grouping of each fungal isolates indicated that the different color indicated the different groups as based on the Cluster analysis(Table-4, Fig. 2). The different number indicated the different group on based on Polar ordinations and the letter a meaned other group beyond this work in Fig. 5

4에서 분리군 3개가 분류군이 있다. 그외에는 모두가 0.3-0.7 사이에서 묶음이 되었다(Table 5). 그러나, 다른 분리군과의 눈으로 보이는 거리(DC, Fig. 3)로 우선 묶음하여 Dendrogram에서 나타난 결과(Fig. 2)와 비교하였다. 위에 언급된 집괴분석을 기초로 하여, 극좌표의 분리군의 묶음을 아래와 같이 표시하였다; Group 1 (R-1, 2, 3, 4, 10, 27), Group 2 (R-5, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 30), Group 3 (R-17, 24, 25, 26), Group 4 (R-13, 14, 15, 22, 23), Group 5 (R-16, 18, 20, 28, 29) 그리고 Group 6 (R-19). 이러한 내용을 집괴분석한 내용과 결합하여 표 5와 같은 내용으로 분리군들을 배열하였다. 여기서 너무 DC값이 차이가 나고, 극좌표에서 동떨어진 R-21은 위의 묶음인 group에서 제외시켰다.

고 찰

우선, 앞에서 실험한 내용에서 우리의 형태적인

분류와 분자생물학적으로 한 내용이 어떻게 일치시켜서 분리군의 분류에 사용하는가 하는 것이 문제이다. 우선 과거는 형태적인 분류로 현미경 관찰에 대한 sporangia와 columella 및 sporaniophore 형태에 따라, *Rhizopus*, *Mucor* 및 *Absidia*가 분류되고 있다(Zycha, 1969; Domsch *et al.*, 1980; Gilman, 1968). 여기서 *Rhizopus*는 다른 집합군 속의 균과는 포자병의 발생과 stolon의 균사 형태가 다르기 때문에 쉽게 분리가 된다(Scripper, 1984; Scripper & Stalpers, 1984). 그러나, *Mucor*와 *Absidia*는 처음 균에 대한 현미경 관찰으로는 문제가 많다. 포자낭병의 가지의 모임이 *Absidia*는 다른 형태이고, columella에서도 차이가 확인되었다. 이러한 고전적인 형태적인 분류로 채집된 균으로 또한 대조균을 사용함으로 같은 균종 속에 있는 차이점을 파악하기 위하여 사용하였다.

분리균

균수집에서는 많은 어려운 점이 많았으며, 특히 균 동정에 대한 것이 어려운 점이 많았다. 비교적으로 끌고루 된 대조균을 사용하려고 하였으나, 외국에서 채집된 접합균에서는 메주나 누룩에 사용되는 접합균이 없었기에, 가장 비슷한 조건인 *R. oryzae*를 사용하였다(Table 1). 사용된 균으로 *R. oryzae*는 대부분 술제조 공정에서 사용된 것이 많고, 다른 용도로는 살충제 분해와 곤충 호르몬에 관련된 균들이다(Table 1). 표 5에서는 위에서 언급된 바로, 분리균의 집괴분석의 결과인 dendrogram과 극좌표의 결과를 종합한 내용이다. 우선, 한눈으로 관찰하기에는 *R. oryzae*는 여러개의 묶음으로 나뉘어져 있어, 전분분해, 누룩에 관련되는 균, 빵제조에 관련되는 균, 혹은 곤충과 관련되는 균으로 나타났다. 여기서, 구입된 대조균인 *R. oryzae*을 단일 종으로 인정한다면, dendrogram에서 나타난 DC의 값은 0.55-0.60 사이 값에서 한 균종으로 생각해야 한다. 그러면, 최소한 오차를 생각한다면, 7개의 균종으로 나타난다. 이는 현미경하에서 동정된 균종에 대하여 나온 결과와 일치되나, *Mucor* 종인 *M. hiemalis silvaticus*와 *M. racemous* 사이에 문제점이 있는 것으로 생각된다(Lee, 1995). 우선, 이 두균 종의 사이에는 형태적으로 균사 내부에 chlamydospore 형성으로 분류가 되고, 현미경상에서 뚜렷하게 관찰되는 내용이다. 만약, 이러한 것이 환경에 의하여 생성되고, 본 실험의 결과가 옳다고 생각하면, 과거의 Zycha(1967)의 분류에 문제점이 있는 것이다. 이러한 내용은 아직도 결론을 낼 수가 없는 것으로 좀더 상세한 실험을 요구하고 있다.

그러나, 여기서 나온 것으로 각 균종에 대한 오차를 생각하여 DC의 값을 크게 잡으면, 단순한 균종으로 이해하기 힘들게 된다. 그래서, *R. oryzae*에 대한 것을 두 개의 묶음으로 생각하면, 문제의 해결이 쉽게 될 것으로 생각된다. 여기에서 사용된 *R. oryzae*는 생태적으로 너무 다양한 변이 균을 사용해야 하고 많은 대조균을 사용했기 때문에 다른 종균의 균들이 오히려 더 큰 값을 갖는 것으로 생각한다면, 문제해결은 쉬울 것으로 생각된다. 우선, *R. oryzae*는 3개의 변종으로 나누고, 다른 것은 균속간 혹은 균종간의 변이로 추정하면, 표 5에 나온 결

과로 추정할 수가 있겠다. *R. oryzae*에 대한 중간변이를 고려하면, 균의 속간 변이와 균종간 변이를 고려하여 생각하는 것으로, 과거 실험한 형태적인 분류와 일치되는 것을 볼 수가 있다. 그러나, *M. hiemalis f. silvaticus*와 *M. racemous*에 대한 것은 아직도 문제 해결이 되지 않은 상태로 남아있다. 그리고 이러한 관계는 좀 상세한 실험 계획으로 진행되어야 겠다.

분석/동정

여기서 분리되었으나, 동정되지 않은 몇 개의 균에 대한 것에 결론을 내려야 할 것으로 생각된다. 메주에서 분리된 R-17, 26은 *M. hiemalis f. silvaticus*로 생각되며, *Absidia*(R-25, 24)와 상당히 밀접한 관계를 가진 것으로 극좌표에서는 나타났다(Fig. 3). 그러나, 집괴분석과 Dendrogram의 분석에서 다르게 나타나서, 다르게 표현되었다(Table 5). 이러한 내용은 균총의 성장에서 많은 차이점을 나타내기에 서로 다른 것으로 생각하였다. 또한, 서로 목적이 다른 것, 즉 메주와 누룩에서 채취된 것으로 온 결과로 생각된다(앞의 *R. oryzae* 분석 결과와 비슷함). 여기서, 나온 결과로 R-29와 R-28은 *Absidia gluaca*와 *A. spinosa*로 각각 동정하였다. 누룩에서 분리된 R-22, 23 역시 *M. hiemalis f. hiemalis*로 동정되었으나, 차이점은 있는 것으로 생각된다. 우선, 접합균 내에서 Mucorales에 대한 분류는 과거 50여년 전의 Zycha 분류체계와 분류 Key 그대로 사용하기 때문에 문제점은 없는 것이 아니다(Lee et al., 1993; Lee, 1995). 이러한 것은 너무 명확하여 현재도 계속하여 사용한다는 면은 포함되지만, 균종 속에 너무 많은 변종(*f. = foma specilias*)의 개념을 사용하기에 불편한 점이 많다. 우선, 분류에서 균종은 현미경적인 형태를 중점으로 하기에 나온 문제로 생각된다. 그러나, 최근 발달되는 학문에 비하여 이러한 개념은 너무 고정되어 응용분야에서는 적용하기가 어렵다. 우선 우리나라에서 중요한 메주나 누룩에 사는 균으로 접합균은 상업적으로 새롭게 정의되고 동정되어야 한다는 것이며, 이러한 것을 해결하는 것이 분류학자의 의무라고 생각된다. 즉, 균의 현미경적인 형태와 산업적으로 사용되는 생리현상과 일치되는 것이 가장 좋

은 분류의 개념으로 생각된다. 이직, 여기서 사용된 자료는 이러한 것을 이용한 결론 내리기가 어려운 점이 많으며, 좀 더 많은 대조균을 사용하여야 할 것으로 생각된다. 그러나, 여기서 나온 것은 일차적으로 누룩과 메주에 사는 균의 동정과 그 차이점을 파악한 중요한 자료로 생각된다. 분자 생물학적인 PCR-polymorphic bands 결과나 현미경적인 형태의 결과로 나온 접합균의 종의 차이점은 크게 다르지 않고, 다만 미세한 차이점이 발견되었다. 좀 더 많은 대조균의 접합균을 사용하여 명확히 하는 것이 다음의 과제로 생각된다.

사 사

이 연구는 부분적으로 선도과학기술 연구로 "천통 장류용 메주의 산업화를 위한 기반기술 연구(한식연 N1036-0627)"의 일환으로 과학기술처의 연구비로 한국식품연구원의 위탁과제로 연구되었다.

참고문헌

- Alexopoulos, C.J., Mims, C.W., and Blackwell, M. 1996. *Introductory Mycology*. 4th eds. John Wiley & Sons, Inc. see pg 309.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Smith, J.A., Seidman, J.G., and Struhl, K. 1987. *Current Protocols in Molecular Biology*. Greene Publishing Associate and Wiley-Interscience. see p 231-232.
- Domsch, K.H., Gams, W., and Anderson, T.H. 1980. *Compendium of soil fungi*. Academic Press. London.
- Erlich, H.A., Gelfand, D.H., and Sninsky, J.J. 1991. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science* **252**: 1643-1651.
- Gilman, J.C. 1986. *A manual of soil fungi*. The Iowa State University Press.
- Hesseltine, C.W., and Ellis, J.J. 1970. Mucorales. In pp 187-217; *The Fungi*. Ainsworth, G.C., Sparrow, F.K., and Sussman, A.S. eds. Academic Press. N.Y.
- Hwang, B.K., Deck, A.W., Bhnweg, G., Prell, H.H., and Heitefuss, R. 1991. Restriction fragment length polymorphisms of mitochondrial DNA among *Phytophthora capsici* isolated from pepper (*Capsicum annuum*) system. *Appl. Microbiol.* **14**: 111-116.
- Kersulyte, D., Woods, J.P., Keath, E.J., Goldman, W.E., and Berg, E.E. 1992. Diversity among clinical isolates of *Histoplasma capsulatum* detected by polymerase chain reaction with arbitrary primers. *J. Bacteriology* **174**: 7075-7079.
- 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. *Korean Mycol.* **21**: 172-187.
- Lee, S.S. 1995. Meju fermentation for a Raw material of Korean traditional Soy-sauce. *Korean Mycol.* **23**: 161-175.
- Ludwig, J.A. and Reynolds, J.F. 1988. *Statistical Ecology*. John Wiley & Sons. p 165-202.
- Nuovo, G.J. 1992. *PCR in situ hybridization; Protocol and application* Raven Press.
- Rohlf, F., Kishpaugh, J., and Kirk, D. 1979. NTSYS numerical taxonomy system of multivariate statistical program. State University of New York. Stony Brook.
- Roy, A.N., Mackay, F.J., and Bousquet, J. 1992. Segregating random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) in *Betula alleghaniensis*. *Theor. Appl. Genet.* **85**: 173-180.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491.
- Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, P., Mullis, K. B., Horn, G.T., Erlich, H.A., and Arnheim, N. 1985. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia.

- Science* **230**: 1350-1354.
- 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.
- Scripper, M.A.A., and Stalpers, J.A. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. II. The *Rh. microsporus*-group. *Studies in Mycology* **25**(JUNE, 1): 20-34.
- Scripper, M.A.A. 1984. A revision of the genus *Rhizopus*. 1. The *Rh. stolonifer*-group and *Rh. oryzae*. *Studies in Mycology* **25**(JUNE, 1): 1-19.
- 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.
- Wkide, J., Waugh, R., and Powell, W. 1992. Genetic fingerpinting of *Theobroma* clones using randomly amplified polymorphic DNA markers. *Theor. Appl. Genet.* **83**: 871-877.
- Zycha, H. and Spieman, P. 1969. *Mucorales*. Verlag von J. Cramer.
- 김찬조, 장지현, 1993. 식품미생물학, 수학사: 76-81.
- 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. 전통 장류용 메주의 산업화를 위한 기반기술 연구(전통발효식품의 과학화 연구) 한국식품개발연구원. 과학기술처.
- 조덕현, 이우진. 1970. 한국 재래식 간장의 발효 미생물에 관한 연구. 한국 농화학회지, **13**: 35-42.