

종이변색균류의 배양적 특성 및 화학적 방법에 의한 변색제거 Cultural characteristics of fungal species associated with deterioration or foxing of paper and chemical removal

조성은¹, 김용태¹, 정소영², 조병목³, 이종균¹

강원대학교 수목병리학 및 균학연구실¹, 국립문화재연구소², 강원대학교 제지공학과³

ABSTRACT

The annals of Joseon dynasty, especially the volumes of King SeJong(1418-1450 A.D.), were heavily deteriorated by fungi. Investigations on the deteriorating and foxing fungi were carried out. Fungal structures on the beeswax, which were coated on the both side of Han-Ji, were suspected to be involved in the deterioration, and were observed by SEM. Isolation and culturing of these fungi were tried by scrubbing swab samples and placing on the artificial media. Culture-independent approaches were used to identify the fungal strains associated with damages of beeswax and foxing of the paper by the analyses based on DNA sequences data from the specific ITS region of rDNA regions. In addition, well-known paper staining fungi(PSF), i.e., *Aspergillus terreus* var. *terreus*, *Fusarium oxysporum*, *Chaetomium globosum*, *Cladosporium cladosporioides*, and *Alternaria solani*, were compared in the mycelial growth and stain on beeswax and papers under different environmental conditions (temperature, light, moisture, etc). Fungal strains isolated from the air samples in the storage room and shelves were identified as *Irpex* sp., *Arthrinium sacchari*, *Cladosporium tenuissimum*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Sistotrema brinkmannii*, and *Hypoxylon bovei* var. *microsporium*. The isolated strains were compared in growth and stain patterns on beeswax and papers(Han-Ji, Hwa-Ji, and Yang-Ji) whether these can cause damage or foxing on the annals or not.

1. 서론

조선왕조실록의 안전한 보존을 위한 문화재청의 다양한 노력에도 불구하고 생지본

(生紙本)은 상태가 상대적으로 양호하나 밀랍본(초기 실록)의 경우에는 손상이 심각하여 손상원인의 분석과 항구적 복원 및 보존 대책 강구가 시급하고 절실한 실정이다.

최근 연구는 세종 및 성종실록 밀랍본을 중심으로 손상 실태 파악과 원지 및 밀랍, 먹 등의 재료적 특성 등을 어느 정도 데이터베이스화하였고 산화, 가수분해 등에 따른 열화의 기본 예측 모델 구축 또한 부분적으로 가능한 수준까지 수행되었다. 그러나 생물학적(균류) 원인에 의한 열화 및 변색 특성에 대한 연구가 수행되어야만 밀납본의 열화 및 변색 원인을 확실하게 규명할 수 있을 것으로 판단되어진다

따라서 본 연구는 밀납본의 손상 원인 규명 및 보존, 복원 방안 수립을 위하여 생물학적(균류) 원인에 의한 열화 및 변색 특성을 분석함과 동시에 화학적 방법에 의한 변색제거를 시도하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 조선왕조실록 밀납본 열화관련 균류 분리 및 동정

서울대학교 관악캠퍼스내에 위치한 규장각에서 조선왕조실록 중 훼손이 심한 세종왕조실록 19권 (100-107권과 120-130권)의 훼손부위로부터 균류 채집을 시도하였다. 균류의 채집은 멸균 면봉으로 표면을 문질러 닦은 후 멸균 배지(MEA)상에서 배양하였다.

채집 시료는 광학현미경(LM)으로 균류의 균사 및 포자가 확인가능한 시료들을 주사전자현미경(SEM)과 투과전자현미경(TEM)을 사용하여 균류 구조체(포자, 균사 등)의 형태적 특징들을 관찰하였다.

면봉으로 닦아낸 시료에서 배양된 균류는 순수분리 균주를 확보하고, 균주가 존재하지만 생존하지 않는 경우에는 밀납이나 종이에 존재하는 균류의 사체에서 DNA를 추출하고 primer를 이용하여 rDNA의 ITS영역을 PCR로 증폭하고 염기서열을 분석하여 NCBI search에 의하여 균류를 분류 동정하였다. 균류의 total DNA를 추출하기 위하여 QIAGEN Plant Mini Kit를 사용하였으며 추출한 DNA의 ITS영역을 PCR로 증폭하기 위하여 GeneAmp® PCR System 2700 (Applied Biosystem)를 사용하였다. PCR product의 sequencing작업을 통하여 염기서열을 분석하고 GenBank의 NCBI BLAST search에서 염기서열의 상동성이 가장 높은 것을 찾아 균주를 동정하였다.

2.2. 규장각 서고내 공기중 균류 채집 및 동정

규장각 서고에 존재하는 균류의 종류 및 밀도를 조사하기 위하여 규장각 서고내 7개의 다른 위치(A,B,C,D,E,F,G)와 선반 위 공기를 채집하였다. 공기 시료로부터 미생물의 분리는 미생물 증식용 배양배지(PDA + sterptomycin)가 담긴 petri plate 두껍을 각 위치에서 각각 10, 20, 30분씩 열었다가 닫고 배양하였다. 배양 균류들의 균사체로부터 DNA를 추출하고 primer를 이용하여 rDNA의 ITS영역을 PCR로 증폭하여 염기서열을 분석하고 NCBI search에 의한 균류의 분류 동정을 시도하였다

2.3 균류들의 종이 및 밀납에서의 성장 및 변색

밀납 및 종이에서의 균류 성장 및 변색을 유발 여부를 확인하기 위하여 균류를 배양한 후 cork borer를 사용하여 접종원을 절취하고 밀납과 종이 위에 접종, 배양한 후 균류의 성장 정도 및 변색여부를 비교하였다.

균류는 세종실록에서 분리동정한 5종(No.2, 4, 44, 78, 98)과 종이 변색균 5종(KACC 40570, 41239, 41302, 41871, 42180) 및 규장각 서고에서 분리한 6종(A, B, C, E, F, G) 등 총 16종이었으며 종이(한지, 화지, A4용지)는 유리 petri dish에 정사각형(6mm×6mm)으로 잘라 넣고 cooking hoil로 싸서 고압멸균기(121℃-1.5kg/cm²)에서 20분간 멸균 후, 멸균된 petri plate(9mm)에 한 장씩 넣고 pipette으로 종이가 젖을 정도로 멸균수를 첨가하였다. 균주 접종은 각 균주를 cork borer(3호)로 떼어 중앙에 올렸으며 접종 petri dish는 parafilm으로 감고 25℃에서 암배양하였다. 균사생장량은 calipers (Vernier)를 사용하여 48시간 이후부터 48시간 간격으로 측정하였다.

밀납(한국산, 중국산)은 작은 조각으로 잘라 플라스크에 담고, 고압멸균기에서 20분간 멸균 후, petri plate(6mm)에 두께 2-3mm되게 부어 굳힌다. 균주 접종 및 배양, 균사생장량 측정은 종이와 동일한 방법으로 실행하였다. 모든 실험은 처리별로 3반복씩 수행하였으며 평균을 산출하여 비교하였다.

2.4. 화학적 방법에 의한 변색의 제거

균류에 의한 종이변색을 제거하기 위하여 용매를 사용하였다. 5종의 종이 변색균을 한지, 화지, A4용지에 접종 배양하여 변색이 유발된 종이 시료에 6종류의 용매(di-methyl sulfoxide, 1,4-di-oxane, N,N-dimethyl-formamide, tri-ethylamine,

pyridine, 1,4-butanediol di-glycidyl ether)를 사용하여 변색의 제거 유무를 확인하였다. 첫째 funnel을 사용하여 종이 시료를 funnel에 넣고 각 용매를 5 ml씩 funnel을 통과시켜 얻은 여과액을 육안검사하여 비교하였다. 둘째 방법은 변색된 종이상료를 용매에 24시간 침지한 후에 funnel방법과 동일하게 여과액의 육안검사를 실시하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 조선왕조실록 밀납본 열화관련 균류 분리 및 동정

열화 시료를 SEM 관찰 결과, 균류의 균사 또는 포자 구조체들이 밀납본의 밀납 표면위에 존재함을 확인할 수 있었으며 포자의 형태는 다양하였다. TEM 관찰 결과, 열화 균류의 포자 구조체들이 밀납내에서도 존재하는 것이 확인되었다. (Fig. 1A, B)

배양된 5균주는 *Biscogniauxia atropunctata*, *Aspergillus versicolor*, *Penicillium polonicum*, *Ceriporia lacerata*, *Irpex lacteus*로 동정되었다. 이들 균주는 목재부후균이나 부생균으로 목재 또는 공기 및 토양 등에 존재하는 균류이다.

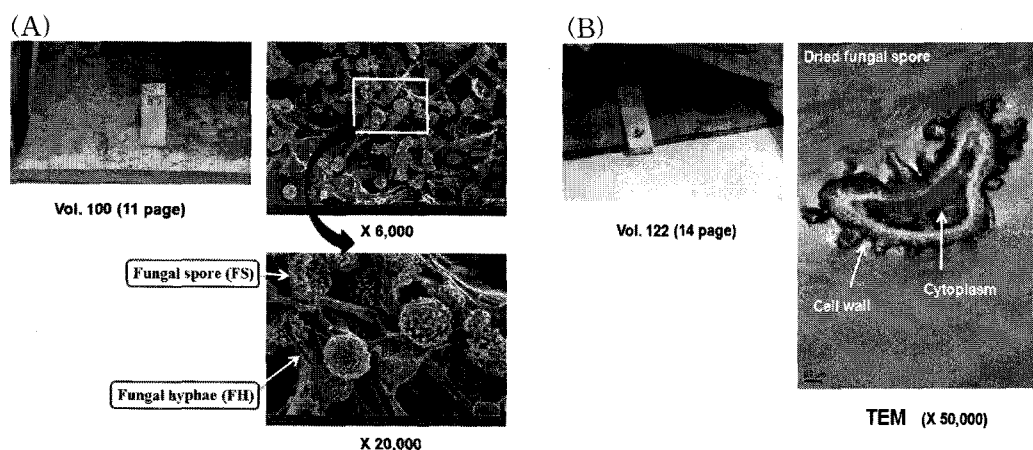


Fig. 1. Samples of the Annal of King Sejong, SEM and TEM observations. (A) Vol.100-11 page, (B) Vol.122-7 page. FS: fungal spore, FH: fungal hyphae.

3.2. 규장각 서고내 공기중 균류 채집 및 동정

규장각 서고내 미생물 분리빈도는 입구에서 멀리 떨어진 모서리인 D, E, F, G보다

입구에서 가까우며 일직선 상에 위치한 A, B, C에서 더 많은 균류와 세균이 분리되었다. (Table 1, Fig. 2) 공기 포집 시간별로는 10분과 20분간에는 큰 차이가 없었으나 20분간 포집시 B와 D에서 균류가 분리되었고, 30분 채집시에는 10분과 20분 채집시보다 균류 및 세균의 분리가 더 잘 되었다. 이 결과는 입구 출입시 외부로부터 오염된 공기가 서고내로 유입되는 것으로 추측되며 이들 균류는 적합한 환경하에서 규장각에 보관 중인 실록들에 다시 변색이나 열화를 유발시킬 가능성이 있는 것으로 판단된다.

분리된 균류는 *Irpex* sp., *Arthrimum sacchari*, *Cladosporium tenuissimum*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Sistotrema brinkmannii*, *Hypoxyylon bovei* var. *microsporum*로 동정되었으며, 자낭균문과 담자균문에 속하고 기생 또는 부생성이다.

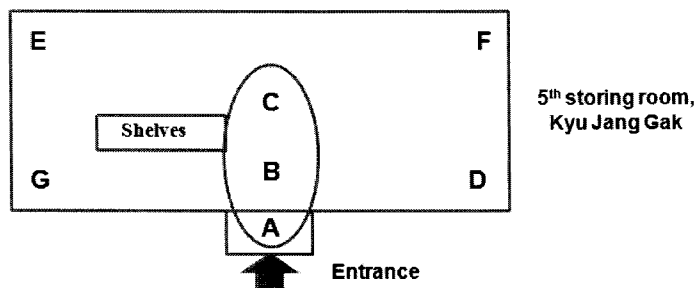


Fig. 2. Three sampling points(A, B, C), where isolation frequency of fungal and bacterial isolates was relatively high, are shown within the red circle.

Table 1. The number of fungal and bacterial strains isolated from the storing room and shelves of Kyu Jang Gak

| Pos. | A | B | C | D | E | F | G | Shelves |
|--------|------|-------|---|-----|---|---|---|---------|
| 10 min | 1* | (1)** | 1 | (1) | - | 1 | - | - |
| 20 min | 1 | 1 | 1 | 1 | - | - | - | 1 |
| 30 min | 1(2) | 2 | 1 | - | - | - | 1 | (2) |

*number indicate the number of fungal isolates,

**the number in parenthesis indicate the number of bacterial isolates.

3.3. 균류들의 종이 및 밀납에서의 성장 및 변색

밀납에서의 균사생장은 균류 종류에 따라서 다소 차이가 있었다. 실록에서 분리한

열화균의 경우 *Biscogniauxia atropunctata*, *Aspergillus versicolor*, *Ceriporia lacerata*는 한국 밀납보다 중국 밀납에서 생장이 양호하였으며, 서고 분리균 중 *Irpex* sp.는 중국 밀납에서 생장이 양호하였고 *Arthrinium sacchari*, *Hypoxylon bovei* var. *microsporum*는 한국 밀납에서 오히려 생장이 양호하였다. 종이 변색균 중에서는 *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus terreus* var. *terreus*가 한국 밀납에서 생장이 양호하였다.

종이 종류별 균류들의 균사 성장량은 배양 7일째 측정 결과, *Cladosporium tenuissimum*, *Hypoxylon bovei* var. *microsporum*, *Penicillium polonicum* 등은 A4복사용지에서 다른 균주들에 비하여 상대적으로 빠르게 성장하였다. 배양 30일째, 대부분의 균주는 한지와 화지에서 생장이 거의 동일하게 측정되었으나 규장각 서고에서 분리한 *Irpex lacteus*와 *Ceriporia lacerata*는 다른 균주들에 비하여 한지와 화지에서 균사 생장이 양호하였다. A4 복사용지에서는 한지와 화지에서 생장보다 오히려 생장이 저조한 균주들이 많았는데, 특히 *Irpex* sp., *Sistotrema brinkmannii*, *Irpex lacteus*, *Aspergillus terreus* var. *terreus*는 한지와 화지에서 균사생장에 비하여 50%에도 미치지 못하였다.

배양 30일 후 종이 변색은, 한지에서는 규장각 서고 분리균 중에서 *Irpex* sp., *Arthrinium sacchari*, *Cladosporium tenuissimum*, *Sistotrema brinkmannii*, 실록 열화균 중에서 *Biscogniauxia atropunctata*, *Penicillium polonicum*, *Ceriporia lacerata*, 종이변색균 중에서 *Alternaria solani*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus terreus* var. *terreus*, *Fusarium oxysporum* 등이 변색을 유발하였다.

화지에서는 규장각 서고 분리균 중에서 *Irpex* sp., *Aspergillus sclerotiorum*, *Sistotrema brinkmannii*, *Hypoxylon bovei* var. *microsporum*, 실록 열화균 중에서 *Biscogniauxia atropunctata*, *Aspergillus versicolor*, *Ceriporia lacerata*, 종이변색균 중에서 *Alternaria solani*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus terreus* var. *terreus*, *Fusarium oxysporum* 등이 변색을 유발하였다.

A4 복사용지에서는 규장각 서고 분리균 중에서 *Arthrinium sacchari*, *Cladosporium tenuissimum*, *Hypoxylon bovei* var. *microsporum*, 실록 열화균 중에서 *Aspergillus versicolor*, *Penicillium polonicum*, *Irpex lacteus*, 종이변색균류 중에서 *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* 등이 변색을 유발하였다.

3.4. 화학적 방법에 의한 변색의 효율적 제거

처리 용매별로 변색 제거효과는 다소 차이가 있으며 funnel을 이용한 변색의 제거는 용매가 통과하는 시간이 워낙 짧아서 변색 제거효과가 나타나지 않았으나 용매에 24시간 침지시킨 처리에서는 일부 용매에서 균류에 의한 변색의 제거효과가 육안으로 검정시 인정되었다. 침지처리에서 1,4, di-oxane의 경우, *Fusarium*과 *Penicillium*에 의한 제거효과가 있었고, N,N-dimethyl-formamide의 경우, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*에 대한 효과가 있었으며, pyridine의 경우 *Fusarium*에 의한 제거효과가 있었으나 di-methyl sulfoxide, 1,4-butanediol di-glycidyl ether, acetone, ethanol, xylene의 경우에는 제거효과를 인정할 수 없었다. (Table 2)

Table 2. Effects of solvent treatment on stain removal on the paper induced by paper staining fungi

| No | organic solvent | treatment | filtering | soaking |
|----|---------------------------------|-----------|-----------|---------|
| | | method | eye | eye |
| 1 | di-methyl sulfoxide (DMSO) | | X | X |
| 2 | 1,4-di-oxane | | X | F, P |
| 3 | N,N-dimethyl-formamide | | X | A,F,P |
| 4 | tri-ethylamine | | X | X |
| 5 | pyridine | | X | F |
| 6 | 1,4-butanediol diglycidyl ether | | X | X |
| 7 | acetone, ethanol, xylene | | X | X |

A: *Alternaria solani*, F: *Fusarium oxysporum*, P: *Penicillium polonicum*.

- : not examined.

4. 결 론

1. 세종왕조실록 밀납본의 밀납 표면 또는 밀납 내에서 다양한 균류의 균사 또는 포자 등을 SEM과 TEM으로 관찰하였으며, 이들 균류는 열화 또는 변색과 관련있는 것으로 추측된다. 세종왕조실록 밀납본에서 분리된 균은 *Biscogniauxia atropunctata*,

Aspergillus versicolor, *Penicillium polonicum*, *Ceriporia lacerata*, *Irpex lacteus*로 동정하였다.

2. 규장각 서고내 입구에서 가까우며 일직선 상에 위치한 지점인 A, B, C에서 모서리인 D, E, F, G에서 보다 더 많은 균류와 세균이 분리되었다. 공기 포집 시간이 길수록 균류 및 세균의 분리가 더 많이 되었다. 규장각 서고에서 분리된 균은 *Irpex* sp.,

Arthrimum sacchari, *Cladosporium tenuissimum*, *Aspergillus sclerotiorum*, *Sistotrema brinkmannii*, *Hypoxyton bovei* var. *microsporum*로 동정되었다.

3. 실록 열화균의 경우 *Biscogniauxia atropunctata*, *Aspergillus versicolor*, *Ceriporia lacerata*는 한국 밀납보다 중국 밀납에서 생장이 양호하였고, 서고 분리균 중 *Irpex* sp.는 중국 밀납에서 생장이 양호하였으며 *Arthrimum sacchari*, *Hypoxyton bovei* var. *microsporum*는 한국 밀납에서 오히려 생장이 양호하였다. 종이 변색균 중에서는 *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus terreus* var. *terreus*가 한국 밀납에서 생장이 양호하였다.

4. 대부분의 균류들은 배양 30일후 한지와 화지에서 생장이 거의 동일하게 측정되었으나 규장각 서고에서 분리한 *Irpex lacteus*와 *Ceriporia lacerata*가 다른 균주들에 비하여 생장이 양호하였다. A4 복사용지에서는 한지와 화지에서보다 오히려 생장이 저조한 균들이 많았는데, 특히 *Irpex* sp., *Sistotrema brinkmannii*, *Irpex lacteus*, *Aspergillus terreus* var. *terreus*는 한지와 화지에서의 생장에 비하여 50%에도 미치지 못하였다.

5. 균류들의 변색유발은 한지에서는 규장각 서고 분리균 중에서 *Irpex* sp., *Arthrimum sacchari*, *Cladosporium tenuissimum*, *Sistotrema brinkmannii*, 실록 열화균 중에서 *Biscogniauxia atropunctata*, *Penicillium polonicum*, *Ceriporia lacerata*, 종이변색균 중에서 *Alternaria solani*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus terreus* var. *terreus*, *Fusarium oxysporum* 등이 변색을 유발하였고, 화지에서는 규장각 서고 분리균 중에서 *Irpex* sp., *Aspergillus sclerotiorum*, *Sistotrema brinkmannii*, *Hypoxyton bovei* var. *microsporum*, 실록 열화균 중에서 *Biscogniauxia atropunctata*, *Aspergillus versicolor*, *Ceriporia lacerata*, 종이변색균 중에서 *Alternaria solani*, *Cladosporium cladosporioides*, *Aspergillus terreus* var. *terreus*, *Fusarium oxysporum* 등이 변색을 유발하였으며, A4 복사용지에서는 규장각 서고 분리균 중에서 *Arthrimum sacchari*, *Cladosporium tenuissimum*, *Hypoxyton bovei* var. *microsporum*, 실록 열화균 중에서

Aspergillus versicolor, *Penicillium polonicum*, *Irpex lacteus*, 종이변색균 중에서 *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* 등이 변색을 유발하였다.

5. 인용문헌

1. 이종규, 김남규, 김용태. 조성은. Isolation and characterization of fungal species associated with foxing on the Annals of the Joseon Dynasty. International Symposium on Conservation Science for Cultural Heritage. 서울교육문화회관, 서울. (2008)
2. Arai, H. Foxing caused by fungi: twenty-five years of study. Int'l Biodeter. & Biodeg. 46: 181-188. (2000)
3. Corte, A.M., Ferroni, A., and Salvo, V.S. Isolation of fungal species from test samples and maps damaged by foxing, and correlation between these species and the environment. Int'l Biodeter. & Biodeg. 51: 167-173. (2003)
4. Ghose, T.K. Measurement of cellulase activities. Pure & Appl. Chem. 59(2): 257-268. (1987)
5. Rakotonirainy, M.S., Heude, E., and Lavendrine, B. Isolation and attempts of biomolecular characterization of fungal strains associated to foxing on a 19th century book. Journal of Cultural Heritage 8: 126-133. (2007)
6. Silva, M.D., Moraes, A.M.L., Nishikawa, M.M., Gatti, M.J.A., Alencar, M.A.V., Brandao, L.E., and Nobrega, A. Inactivation of fungi from deteriorated paper materials by radiation. Int'l Biodeter. & Biodeg. 57(3): 163-167. (2007)
7. Szczepanowska, H.M. and Lovett, C.M. A study of the removal and prevention of fungal stains on paper. Journal of American Institute for Conservation. 31(2):147-160. (2008)
8. Zotti, M., Ferroni, A., and Calvini, P. Microfungal biodeterioration of historic paper: Preliminary FTIR and microbiological analyses. Int'l Biodeter. & Biodeg. 61: (2008)