

고(문)서에 서식하는 미생물의 특성에 관한 연구

김기현*¹ · 신종순*² · 윤대현*¹

Studies on the Characteristics of Microorganisms Isolated from Ancient Archives

Kee-Hyun Kim,*¹ Jong-Sun Shin,*² and Dai-Hyun Yoon*¹

ABSTRACT

Habitative microorganisms were isolated from the floated air and surface of record materials of library with ancient archives. The major ecological fungi from them were isolated and identified as *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Neurospora sitophila*, *Mucor mucedo*, *Mucor rouxii*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus delemia*, *Rhizopus nigricans*, *Thamnidium elegans*, and *Trichoderma viridae*.

When the cellulase activity of fungi isolated from ancient archives and documents was analyzed, *Mucor rouxii* and *Penicillium notatum* showed the highest avicelase and filter paper activity, to 18.089 and 2.819 units, respectively, showing destructive ability of old archives and documents. Whereas, *Mucor mucedo* revealed the highest CMCase activity of exoglucanase to 7.044 units.

1. 緒論

미생물은 공기, 토양, 인체피부 등 거의 모든 곳에 서식하며, 포자가 공기 중으로 확산되어 물질표면에 낙하하면 수분·양분 등이 적당한 환경에서 균사체를 형성하여 다시 포자를 공기 중으로 발산한다. 특히 곰팡이의 균사체는 성장과정에서 각종 휘발성 유기산을 분비하여 독특한 냄새를 발생시키며 물질대사 능력도 매우 왕성하다.

뿐만 아니라 곰팡이는 약산성의 환경에서도 왕성하게 성장하므로 산성용지를 주로 사용했던 이제까지의 종이기록물에서 더욱 심각한 문제가 발생한다. 일부 특정한 곰팡이는 세포외로 Amylase,

Cellulase, Ligninase, Lipase, Protease 등의 효소를 분비하여 난분해성인 플라스틱과 도료까지도 분해한다. 그중 섬유소를 분해할 수 있는 세균으로는 *Cellulomonas*속,¹⁻⁵⁾ *Pseudomonas*속,⁶⁻⁸⁾ *Clostridium*속,⁹⁻¹¹⁾ *Cellobacterium*속,¹²⁻¹³⁾ *Acetivibrio*속,¹⁴⁻¹⁵⁾ *Cytophaga*속¹⁶⁾ 등이 알려지고 있으며 이들이 생산하는 cellulase는 avicelase(exo-1,4-β-glucanase, EC.3.2.1.91) CMCase(endo-1,4-β-glucanase, EC.3.2.1.4) β-1,4-glucosidase(cellobiase, β-D-glucoside glucohydrolase, EC.3.2.1.2) 중에서 결정성 cellulose를 분해하는 avicelase(β-1,4-D-glucanocellobiohydrolase)가 대부분이고 cellobiose나 short chain cel-

*1 정부기록보존소 보존과(Government Archives, Records Service and Preservation Division 920, Dunsan-Dong, Seon-Ku, Taejeon, 302-701, Korea).

*2 중부대학교 인쇄공학과(Dept. Graphical Art Engineering, Joong Bu University, Chung Nam, 312-940, Korea)

ooligosaccharide를 분해하는 β -glucosidase 활성은 없거나 곰팡이에 비해 미약한 것으로 보고되고 있다. 따라서 이런 미생물의 발생은 종이기록물의 보존에 문제를 일으키며 문서의 경우 종이의 주 성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌, 수지산 등의 물질을 분해하고 종이 표면에 색소 침착 및 악취를 발생시켜 기록물의 보존에 커다란 문제점을 유발한다.

근자에 문서를 비롯한 모든 기록물에서 미생물 방지대책으로 온·습도 등의 보존환경 조절과 항균물질을 사용하여 미생물로부터의 오염을 억제하는 방법에 대한 연구가 활발히 이루어지고 있다. 그 예로서 단풍나무, 황백 및 황련 등의 ginnalin, astemisis acid와 약용식물의 flavonoids, alkaloids, glycosides, polyphenols 등 각종 성분의 항균, 항암효과는 이미 널리 알려져 있다.¹⁷⁻²²⁾

특히, 천연항균제는 천연 자원이나 미생물 자원으로 부터 선택성이나 생화학적, 생리학적 차이를 극대화하여 바이러스, 세균, 효모, 곰팡이 등으로 부터 항균력이 우수하며 인체에 무해하게 개발된 제품이다. 이는 미생물의 세포벽 및 세포막의 기능을 약화시키고 효소 활성을 저해하면서 DNA/RNA에서 비롯되는 세포 증식 기작을 억제하여 미생물에 대한 살균 효과가 높으며, 식물성 천연 살균 소독제로서 독성 및 부식성이 없는 무색, 무취의 항균제로 보고 된 바 있다.

본 연구에서는 한번 발생이 되면 기록물의 원형 복원이 거의 불가능한 생물학적 피해에 대한 예방 대책과 기록물의 근원적인 보존성 향상을 위하여 기록물에 분포하는 미생물을 분리하고 균주의 형태학적, 생화학적 및 효소학적 특성을 조사하여 가해미생물의 생육을 억제하는 천연항균물질을 검색·보고하고자 한다.

2. 材料 및 方法

2.1 실험재료

인체에 무해하고 항균력이 뛰어난 천연항균제 (F)를 문서에서 분리한 10종류의 가해미생물에 대하여 항균력 측정을 PDA, MEP 배지를 사용하여 항균활성을 측정하였다(Table 1).

2.2 미생물 분리 및 동정(분석)

문서의 표면에 존재하는 균을 분리하기 위하여 기록물에 부착된 미생물을 멸균된 면봉으로 채취하였고, 각각의 선택배지 Potato Dextrose Agar(PDA), Malt Extract Plate(MEP) 위에서 기록물을 무균상태에서 10회 가량 흔들어 매 채부착균을 채취하였다. 가해미생물은 PDA, MEP배지에 채취, 배양하여 집락이 형성된 미생물을 30℃에서 72시간 동안 배양하면서 형태학적, 생화학적 특성을 조사하여 동정하였다.

2.3 Cellulase 생산균의 탐색 및 활성 측정

종이의 주성분인 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스를 분해하는 Cellulase 생산 미생물을 분리하기 위해 선택배지에서 순수분리하여 섬유소 분해효소의 효소활성도를 측정, 비교하였다.

2.3.1 Avicelase Activity

2%(w/v) avicel 현탁액 1 mL와 0.1M acetate buffer (pH 5.5) 1 mL에 효소액 0.4 mL를 가하고 45℃에서 60분간 진탕 반응시킨 후 100℃에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켜 상등액내의 환원당의 양을 DNS법²³⁾으로 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

Table 1. Compositions of medium used for isolating microorganisms from the ancient archives and documents

Medium	Composition(per liter)
Potato dextrose agar(PDA)	Potatoes, Infusion from: 200g, dextrose: 20g, agar: 15g (pH 4.5)
Malt extract plate(MEP)	Malt extract: 20g, glucose 20g, peptone: 1.0g, agar 20g

2.3.2 CMC Case Activity

2%(w/v) CMC용액 1mL와 0.1M acetate buffer(pH 5.5) 1mL에 효소액 0.2mL를 가하고 45℃에서 30분간 반응시킨 후 100℃에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켜 상등액내의 환원당의 양을 DNS법으로 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

2.3.3 Filter Paper Activity

Filter paper strip(0.5×12.0 cm) Whatman No.1을 0.05 M acetate buffer(pH 5.5) 2mL에 넣고 효소액 0.8mL를 가하여 45℃에서 60분간 진탕 반응시킨 후 100℃에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰다. 상등액내의 환원당의 양을 DNS법으로 550 nm에서의 흡광도를 측정하였다.

※ 효소 1.0 unit는 위의 조건하에서 1분 동안 cellulose로부터 1μmole의 glucose에 상응하는 환원당을 생성하는 효소의 양으로 정의하였다.

2.4 단백질의 정량

Bovin serum albumin(Sigma Chem. Co.)를 표준시료로 하여 Protein Assay Kit (Bio-Rad Lab., Richmond, Calif, USA)를 이용하여 Bradford의 방법으로 측정하였다.²⁴⁾

2.5 미생물 오염에 따른 지류의 강도변화

오염에 따른 지류의 강도변화를 측정하기 위하여 준비한 배지(PDA, MEP) 위에 미리 멸균한 시료(백상지)를 놓고 가해미생물 10종류를 무균적으로 접종한 다음, 28~37℃에서 3~5일간 배양하였다. 곰팡이의 균사를 제거한 시료는 내절강도 측정기로 10회 반복 측정(MD)하여 평균값을 대조구(오염되지 않은 종이 : 미생물 미처리 시료)와 비교하였다.

2.6 미생물 발생에 따른 지류의 착색상태 조사

미생물의 발생으로 인한 지류의 착색상태조사는 주기적으로 시료를 채취하여 colorimeter (Minolta model CR-200)로 측정하여 KS A 0063에 따라 L*, a*, b* 값으로부터 색차를 계산하였다. 이때 색차 E={ $(\Delta L)^2 + (\Delta a)^2 + (\Delta b)^2$ }^{1/2}의 공식을 사용하였으며, 색도 측정시 시료는 검은색 판위에 놓고 측정하였다.

2.7 항균활성 측정

전배양을 2일간 실시하고 4일간의 본배양이 끝난 배양액을 3,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 상등액과 균체를 분리하여 *in vitro* 항균활성 검정을 실시하였다. 곰팡이는 PDA·MEP배지를 사용하였고, 검정평판은 균의 종류에 따라 중층검정평판과 단층검정평판을 조제하여 사용하였다. 중층검정평판의 조제는 배지 20 mL를 petri dish에 부어 응고시켜 하층을 만들고 진탕 또는 정지 배양한 사용균주를 동일배지에 접종하여 4~5 mL를 하층배지위에 중층으로 만들었으며, 단층검정평판은 균을 접종한 배지 약 5 mL를 단층으로 하여 평판을 조제하여 사용하였다. 항균활성 측정은 paper disc method에 따라 행하였으며, 항균제를 일정량씩 점적하여 28~37℃, 18~48시간 배양하여 평판에 나타난 저지원(clear zone)의 직경(m)을 측정하여 그 항균활성으로 나타내었다.

3. 結果 및 考察

3.1 미생물의 분리와 동정

미생물을 순수분리하고 동정(분석)하기 위하여 미리 준비한 PDA, MEP배지에 각각 재접종하여, 형태학적 특성과 생화학적 특성을 분석한 결과 *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Neurospora sitophila*, *Mucor mucedo*, *Mucor rouxii*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus dele-*

Table 2. Cultural characteristics of the microorganisms isolated from ancient archives.

Species	Making	Size(μ m)	Color	Clamydiospore	Growth on MEA at 25 $^{\circ}$ C(mm)
<i>Aspergillus niger</i>	smooth	100-120	pale green	absent	35-40
<i>Aspergillus oryzae</i>	rough	400-500	pale green	absent	32-34
<i>Mucor mucedo</i>	smooth	70-90	grey	absent	32
<i>Mucor rouxii</i>	rough	80-100	grey	present	55
<i>Neurospora sitophila</i>	rough	125-250	green	present	30-35
<i>Penicillium notatum</i>	smooth	100-250	light	absent	25-30
<i>Rhizopus delema</i>	rough	170-200	pale brown	present	35-60
<i>Rhizopus nigricans</i>	smooth	130-180	brow yellow	present	30-55
<i>Thamnidium elegans</i>	smooth	60-120	grey	absent	50
<i>Trichoderma viridae</i>	smooth	100-120	green	present	20-28

Table 3. Various enzyme activity of avicelase, CMCase and β -glucosidase from isolated strains

Species (Culture supernatant)	Specific Activity (units/mg)		
	Avicelase	CMCase	Filter Paper
<i>Aspergillus niger</i>	0.141	0.070	1.153
<i>Aspergillus oryzae</i>	1.037	1.021	0.011
<i>Mucor mucedo</i>	0.142	7.044	0.523
<i>Mucor rouxii</i>	18.089	0.031	0.010
<i>Neurospora sitophila</i>	0.898	1.435	0.814
<i>Penicillium notatum</i>	2.311	0.469	2.819
<i>Rhizopus delema</i>	0.033	0.899	0.022
<i>Rhizopus nigricans</i>	2.278	4.308	0.911
<i>Thamnidium elegans</i>	3.260	1.671	0.083
<i>Trichoderma viridae</i>	0.560	0.008	0.086

Enzyme activity was measured by the described in Material and Methods. Each substrate was added into standard reaction mixture.

ma, *Rhizopus nigricans*, *Thamnidium elegans*, *Trichoderma viridae* 10종류의 곰팡이를 동정하였다(Table 2).

3.2 효소활성 측정

Cellulase 생성최적 조건하에서 미생물을 배양하여, 거름종이로 1차 여과하고 원심분리로 효소액을 분리하여 효소학적 측정방법으로 측정한 결과는 *Mucor rouxii*에서 18.089units의 Avicelase, *Mucor mucedo*에서 7.044units의 CMCase, *Penicillium notatum*에서 2.819units의 Filter Paper Activity를 나타내었다. 이는 Chey 등²⁵⁾이 보고한 *cellulomonas* sp YE-5가 생산하는

cellulase specific activity보다 높은 효소활성을 나타내었으며, 기존의 미생물보다 서고 내에서 분리된 미생물의 효소활성도가 높은 것으로 나타났다(Table 3).

3.3 미생물 오염에 따른 지류의 강도변화

문서에서 분리한 가해미생물을 시료(백상지)에 접종·배양하여 시료의 내질강도를 측정된 후 오염되지 않은 대조구와 비교해 본 결과, 미생물에 오염된 시료는 전반적으로 지류의 강도가 떨어짐을 볼 수 있었고, 특히 *Mucor mucedo*, *Mucor rouxii*, *Thamnidium elegans* 등의 3균주가 다른 가해미생물보다 강도가 심하게 떨어져 지류의

Table 4. Effect of folding endurance under contaminated paper

Fungi	Paper properties		Folding Endurance (MD, cycle/kg)								Average
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
Base paper	36	34	30	27	28	28	35	27	22	43	31
<i>Aspergillus niger</i>	16	24	23	17	18	24	25	17	20	23	21
<i>Aspergillus oryzae</i>	23	26	21	24	24	21	17	21	23	24	22
<i>Mucor mucedo</i>	15	16	15	15	12	11	11	13	15	23	15
<i>Mucor rouxii</i>	15	11	15	10	12	9	11	14	15	12	12
<i>Neurospore sitophile</i>	20	23	19	24	28	23	21	22	24	27	23
<i>Penicillium notatum</i>	14	18	12	18	21	22	15	16	11	16	16
<i>Rhizopus delimer</i>	23	28	30	24	19	21	22	19	23	24	23
<i>Rhizopus nigricans</i>	14	18	19	20	12	16	14	15	15	16	16
<i>Thamnidium elegans</i>	11	11	13	17	13	15	17	13	11	11	13
<i>Tricoderma viridae</i>	22	27	21	20	19	22	20	19	22	23	22

Table 5. Color decrease under contaminated paper (E)

Fungi	days					
	0	3	6	9	12	15
<i>Aspergillus niger</i>	81	54(27)	50(31)	44(37)	39(42)	36(45)
<i>Aspergillus oryzae</i>	81	71(10)	62(19)	55(26)	52(29)	46(35)
<i>Mucor mucedo</i>	80	76(4)	72(8)	69(11)	65(51)	64(16)
<i>Mucor rouxii</i>	79	74(5)	72(7)	69(10)	67(12)	61(18)
<i>Neurospore sitophile</i>	80	67(13)	63(17)	59(21)	55(25)	53(27)
<i>Penicillium notatum</i>	78	60(18)	59(19)	53(25)	50(28)	46(32)
<i>Rhizopus delimer</i>	79	67(12)	64(15)	59(20)	55(24)	52(27)
<i>Rhizopus nigricans</i>	80	72(8)	68(12)	62(18)	58(22)	54(26)
<i>Thamnidium elegans</i>	80	77(3)	75(5)	73(7)	72(8)	71(9)
<i>Tricoderma viridae</i>	78	50(28)	48(30)	41(37)	38(40)	35(43)

열화를 촉진시키는 것으로 나타났다(Table 4).

3.4 미생물의 발생에 따른 지류의 착색상태

지류에 곰팡이 시험균주를 접종하여 배양한 다음 세척하여 건조시켜 색차를 측정하였다(Table 5). 그 결과 곰팡이 발생으로 인한 색차는 *Aspergillus niger* 45, *Tricoderma viridae* 43으로 가장 컸으며, *Thamnidium elegans*는 9로 가장 적게 나타났다. 이상의 결과로부터 *Aspergillus niger*, *Tricoderma viridae*는 재질의 표면에 발생할 뿐만 아니라 내부에 까지 침투하여 번식함으로써 재질을 분해시키고, 분비물에 의한 변화 외에도 지섬유 내에 균체가 침투·번식하여 균체 고유의 색차에 기인하는 것으로 생각된다.

3.5 가해미생물에 대한 항균력 측정

가해미생물에 대한 항균활성은 천연항균제(F)가 모든 가해미생물에 대하여 항균력이 뛰어났으며, *Neurospore sitophile*에서 가장 높은 항균력을 보였으며, 항균활성도는 *Mucor mucedo*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Thamnidium elegans*, *Mucor rouxii*, *Tricoderma viridae*, *Rhizopus delema*, and *Penicillium notatum* 순으로 항균활성을 나타내었다.

4. 結 論

종이기록물은 미생물의 침투로 재질의 분해, 잠

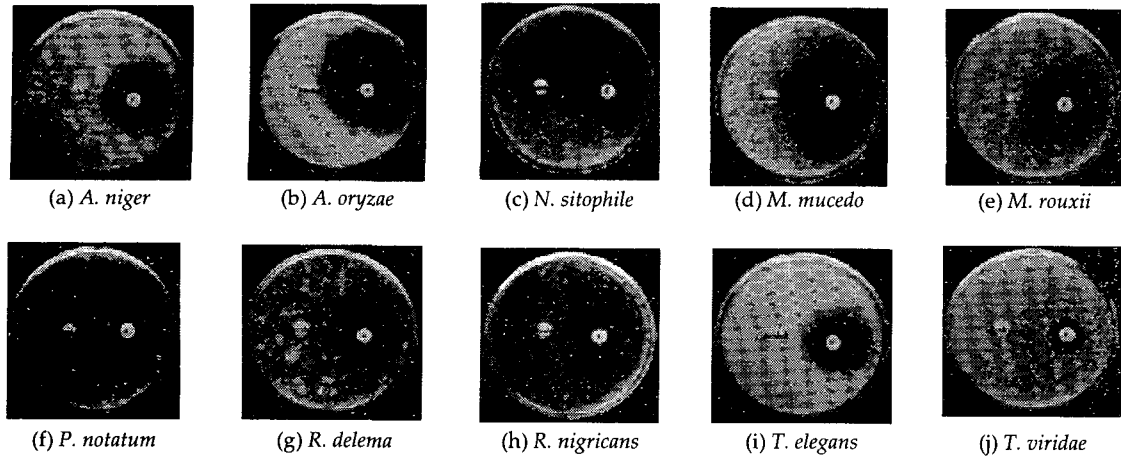


Fig. 1. Antimicrobial activity of isolated microorganisms.

식, 표면의 오염, 색상의 변색이나 퇴색 촉진, 재질의 경화 등 생물학적 손상을 유발하며 일단 발생된 미생물의 피해는 원형복원이 거의 불가능하기 때문에 이에 대한 예방대책을 마련하기 위하여 문서에 서식하는 미생물을 분리하고 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 조사하였다. 분리 결과 *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Neurospora sitophila*, *Mucor mucedo*, *Mucor rouxii*, *Penicillium notatum*, *Rhizopus delema*, *Rhizopus nigricans*, *Thamnidium elegans*, *Trichoderma viridae* 10종류의 곰팡이를 동정하였다. 또한 가해미생물에 대한 효소학적 특성은 *Mucor rouxii*에서 18.089 units의 Avicelase, *Mucor mucedo*에서 7.044 units의 CMCase, *Penicillium notatum*에서 2.819 units의 filter paper activity의 높은 효소 역가가 곰팡이에서 나타났다.

미생물 오염에 따른 종이의 강도변화와 색변화(E)는 시료(백상지)에 곰팡이를 접종·배양하여 내절강도를 측정하여 오염되지 않은 대조구와 비교해 본 결과, 미생물에 오염된 지류는 전반적으로 강도가 떨어짐을 볼수 있었다. 특히 *Mucor mucedo*, *Mucor rouxii*, *Thamnidium elegans* 3균주가 다른 가해미생물보다 강도가 심하게 떨어짐을 보였고, 지류의 열화를 촉진시키는 것으로 나타났다.

미생물 발생으로 인한 색변화(ΔE)는 *Aspergillus niger* 45, *Trichoderma viridae* 43로 가장 컸고, *Thamnidium elegans*는 9로 가장 적

게 나타났다. 이상의 결과로부터 곰팡이는 지질의 표면에 발생할 뿐만 아니라, 내부까지 침투 번식하여 지질을 분해시키고 곰팡이 분비물에 의한 변화 외에도 지섬유내에 균체의 침투 번식으로 지류의 열화 및 변색을 촉진시키는 것으로 나타났다.

가해미생물에 대한 항균활성은 천연항균제가 모든 가해미생물에 대하여 항균력이 뛰어났으며, *Neurospora sitophila*에 가장 높은 항균력을 보였으며, 항균활성은 *Mucor mucedo*, *Aspergillus oryzae*, *Rhizopus nigricans*, *Aspergillus niger*, *Thamnidium elegans*, *Mucor rouxii*, *Trichoderma viridae*, *Rhizopus delema*, and *Penicillium notatum* 순으로 항균활성을 나타내었다.

이 결과를 바탕으로 분리된 미생물에 대하여 생육을 억제할 수 있는 항균제를 개발하여 기록물의 근원적인 보존성 향상을 위한 보존대책을 수립하고자 한다.

인용문헌

1. Nakamura, K. and Kitamura K., J. Ferment. Technol., 60:343 (1982).
2. Nakamura, K. and Kitamura K., J. Ferment. Technol., 61:379 (1983).
3. Beguin, P. and Eisen H., J. Gen. Microbiol., 101:191 (1977).
4. Beguin, P. and Eisen H., Eur. J. Biochem., 87

- :252 (1978).
5. Stewart, B. J. and Leatherwood J. M., *J. Bacteriol.*, 128:609 (1976).
 6. Yamane, K., Yoshikawa T., Suzuki H. and Nisizawa K., *J. Biochem.*, 69:771 (1971).
 7. Yoshikawa, T., Suzuki H. and Nisizawa K., *J. Biochem.*, 75:531 (1974).
 8. Ramasamy, k. and Verachtert H., *J. Gen. Microbiol.*, 117:181 (1980).
 9. Ng. T. K. and Zeikus J. G., *Biochem. J.*, 199:341 (1981).
 10. Ng. T. K. and Zeikus J. G., *J. Bacteriol.*, 50:1391 (1982).
 11. Johnson, E. A., Sakajoh M., Halliwell G., Madia A. and Demain A. L., *Appl. Environ. Microbiol.*, 43:1125 (1982).
 12. Oberkotter, L. V. and Rosenbergh F. A., *Appl. Environ. Microbiol.*, 36:205 (1978).
 13. Berg, B., Hofsten V. and Pettersson G., *J. Appl. Bacteriol.*, 35:201 (1972).
 14. Patel, G. B. and Mackenzie C. R., *Eur. J. Appl. Microbiol.*, 16:212 (1982).
 15. Mackenzie, C. R., Bilous D. and Patel G. B., *Appl. Environ. Microbiol.*, 50:243 (1985).
 16. Chang, W. T. H. and Thayer D. W., *Can. J. Microbiol.*, 23:509 (1977).
 17. 채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노영주, 한국 유용식물 자원 연구 총람:2(1988).
 18. 채영복, 김완주, 지옥표, 안미자, 노영주, 한국 유용식물 자원 연구 총람:215(1988).
 19. 한순성, 김수영, 유일준, 충북대학교 약학논문집 1:42(1996).
 20. 유영선, 박기문, 김영배, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21(6):628 (1993).
 21. Senji, S., Kim M., Taniguchi M., and Yamamoto T., *Agric. Biol. Chem.* 53(9):2307 (1989).
 22. Mizuno, M., Toda M., Ueno N., Danno G., and Kanazawa K., *Agric. Biol. Chem.* 53(4):959 (1989).
 23. Miller, G. L., *Anal. Chem.*, 31:426 (1959).
 24. Lowry, O. H., Roserbrough N. J., Farr A. L. and Randall R. J., *J. Biol. Chem.* 193:265 (1951).
 25. Chey, D. C. and Oh, D. H., *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotech.* 18(4):376 (1990).