

이정민, 김영희, 홍진영,
조창욱, 김수지, 서민석

동춘당 생물학적 가해 미생물의 분리 및 특성

08»»

동춘당 생물학적 가해 미생물의 분리 및 특성

이정민*, 김영희, 홍진영, 조창욱, 김수지, 서민석

국립문화재연구소 보존과학연구실



Isolation and characterization of microorganisms biological damage of Dongchundang

Jeung-Min Lee*, Young-Hee Kim, Jin-Young Hong, Chang-Wook Jo,

Soo Ji Kim, Min Seok Seo

Conservation Science Division, National Research Institute of Cultural Heritage

*Corresponding Author : ais4527@naver.com

| 초록 |

본 연구는 문화재를 가해하는 미생물을 분리하여 그 특성을 파악한 것이다. PDA 배지를 이용하여 목조문화재 동춘당으로부터 미생물을 분리 동정을 하였다. 기질분해 실험을 통해 19종의 미생물을 분리하였다. 미생물을 배양하면서 흡광도를 통해 성장곡선을 측정하였고, pH의 변화량도 측정하였다. 72시간 배양한 결과, 시간에 따라 미생물이 증가함을 확인하였고, pH도 미생물 증가에 따라 증가하는 것을 확인하였다. DNS 시약을 통해 cellulose 분해 정도를 측정한 결과에서는 45시간 이후 DNS 시약과 결합하여 반응을 나타내는 환원당이 급격히 감소하는 결과를 확인하였다. 분리된 *Methylobacterium* sp.는 cellulase를 분비하여 목재를 분해하는 것을 확인하였다.

색인어: 동춘당, 생물열화, 목재부후균, cellulase, 메틸로박테리움

| ABSTRACT |

Microorganisms were isolated from Dongchundang(wooden cultural heritage) with PDA medium culture. Nineteen species shows the cellulolytic activity. Methylobacterium sp. was the most active in cellulose degradation. The growth curve and pH were measured during incubation of the microorganism for 72 hours. The pH was increased with the increasing of microbial growth. The degree of cellulose degradation was determined with the amount of reducing sugar by use of dinitrosalicylic acid (DNS) method. The amount of reducing sugar was decreased after 45 hours. As a results, It should suggested that wood component were deteriorated by Methylobacterium sp..

Keywords : Dongchundang, Methylobacterium sp., cellulose

1. 서론

문화재는 그 구성요소에 따라 유기질 문화재와 무기질 문화재로 나누어지며, 그 구성요소에 따라 보존 및 보관하는 방법에도 많은 차이를 나타낸다. 그 중 유기질 문화재는 목재, 섬유, 지류 등으로 구성되어 있으며, 이러한 유기질로 구성되어 있는 문화재는 보존 보관하기 위해서 주위 환경에 의해 많은 영향을 받는다. 특히, 온도와 습도를 조절하기 힘들기 때문에 보존 보관하는데 많은 어려움과 비용을 감수하고 있다(Kigawa R. et al, 1999).

유기질문화재의 손상원인으로는 물리화학적 피해와 생물화학적 피해로 나누어진다. 물리화학적 피해의 경우 화재, 홍수 및 산사태로 인한 피해로 문화재를 훼손하는 경우를 말하며, 생물화학적 피해는 주로 미생물이나 곤충해로 인해 발생하는 피해를 의미한다(강소영 등, 2007).

생물화학적 피해를 입은 목조 문화재에

서 분리되는 미생물의 종류로는 크게 곰팡이류와 균주로 나누어지며, 특히 균일 경우에는 공기 중에 부유하는 균과 목조의 구성성분을 분해하여 탄소원으로 이용하는 균으로 나누어진다.

목조의 구성성분을 분해하는 균은 그 구성성분인 cellulose와 xylan을 분해하여 탄소원으로 이용한다. 그 중 cellulose는 고등식물의 세포벽을 구성하는 고분자 화합물로서 다수의 D-glucose가 β -1,4결합으로 이루어져 있다. 그래서 구성성분을 분해하는 균은 β -1,4결합으로 이루어진 cellulose를 분해할 때 생성되는 포도당을 탄소원으로 이용한다(Gurnagul. et al, 1992; Kroschwitz, 1990). 고등식물의 세포벽을 구성하는 cellulose가 분해될수록 그 식물 세포벽의 구조는 연약해지며, 그 구조가 단순해져 다른 생물화학적 피해를 초래한다. 균의 공격에 의해서 취약해진 목질 세포벽을 이차적으로 공격할 수 있는 생물로는 흰개미, 수염벌레류와 같은 곤충이 있다.

목조 문화재의 기둥이나 마루 등에 미

관상이나 형태학적으로 피해가 발생하면 복구 및 복원하는데 많은 비용이 필요하게 되며 이와 같은 비용이 해마다 크게 증가하여 심각한 문제로 대두되고 있다 (정소영 등, 2002).

그러므로 본 연구에서는 목조 문화재 생물피해 예방을 위한 기초 연구로서 균에 의한 피해가 예상되는 동춘당 목재로부터 미생물을 분리 동정하여, 그 특성을 파악함을 목적으로 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 미생물 분리, 동정 및 배지

본 실험에 사용된 미생물은 대전 목조 문화재인 동춘당 반침에서 직접 채취하여 사용하였다. 멸균봉을 이용하여 생물피해가 확인된 반침에서 미생물을 채취하여 생리식염수에 현탁한 후, potato dextrose agar (PDA; Becton, Dickinson & Company, USA) plate에 100 ul씩 도말하여 28℃에 배양한 후, 미생물 집락의 형태에 따라 미생물을 분리하였다. 분리 선별한 미생물을 각각 PDA 배지에 접종하여 28℃에서 48시간 배양한 후, 미생물 동정 의뢰 기관인 (주)제노텍에 의뢰하여 동정하였다.

2.2. 기질 분해 효소 활성 실험

분리 선별한 미생물을 carboxymethyl cellulose (CMC), xylan, lignin을 각각 함유한 선택배지(K_2HPO_4 0.07%,

KH_2PO_4 0.02%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.11%, Yeast extract 0.1%, Agar 1.5 %)에 균주를 도말하여 28℃에서 24시간 배양한다. CMC와 xylan을 기질로 분해한 효소를 가진 미생물의 경우 0.1% congo red 용액으로 30분간 염색할 경우 투명한 환을 형성하는 것을 확인할 수 있다. Lignin의 경우 염색을 하지 않더라도 육안으로 투명한 환의 유무를 확인할 수 있다. 투명한 환의 유무를 통해 CMC, xylan, lignin 기질을 분해하는 효소의 유무를 관찰할 수 있다.

2.3. 미생물 성장곡선 및 pH 변화량 측정

Potato dextrose broth (PDB; Becton, Dickinson & Company, USA) 배지에 접종하여 72시간동안 시간별로 sampling을 하였다. Sampling한 배지를 pH meter기를 이용하여 pH를 측정하고, 96 well plate에 sampling한 PDB 배지를 각각 200 ul씩 분주한 후, 흡광도 595 nm로 측정하였다.

2.4. CMC 분해 활성 효소 분리

기질 분해 효소 활성 실험으로 확인된 미생물은 CMC 분해 효소를 분리하기 위해 최적배지에서 28℃에서 72시간 배양을 하였다. 최적 배지의 조건은 sodium carboxymethyl cellulose 1%, K_2HPO_4 0.07%, KH_2PO_4 0.02%, $(NH_4)_2SO_4$ 0.1%, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.11%, Yeast extract 0.1%로 구성되어 있으며, 72시

간 배양 후, funnel을 이용하여 filter paper로 균을 제거하고, 배지에 함유되어 있는 효소를 용출시키기 위해 저온의 에탄올을 1:1 비율로 첨가한 후, 24시간 4℃에서 보관하였다. 그 후, 원심분리를 통해 효소단백질을 침전시켜 상층부분을 제거하고, 100 mM sodium acetate buffer (pH 5)를 이용하여 효소활성 실험에 이용하였다.

2.5. 효소활성 실험

CMC의 분해 정도를 수치상으로 정량하기 위해서 glucose 정량하는 방법인 DNS 시약을 이용하여 정량하고자 하였다. 이 방법은 Mehdi Dashtban의 cellulase의 활성을 알아보는 실험을 개량하여 계획하였다(Mehdi, et al, 2010). 실험관을 이용하여 1% sodium carboxymethyl cellulose (in buffer) 500 ul와 100 mM sodium acetate buffer (pH 5.0; SIGMA) 400 ul를 첨가하여 1분간 50℃ 항온수조에서 예열을 시켜준다. 그 다음 조효소 100 ul를 첨가한 후, 50℃에서 30분, 60분, 90분

으로 반응 시간을 달리하여 가열한 후, DNS reagent 시약 3 ml를 첨가하고, 100℃에서 5분간 물증탕으로 가열하고, 실온에서 냉각시킨 후, 550 nm의 흡광도를 측정하고, 경량선을 사용하여 정량하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 미생물 분리 및 동정

동춘당 반침(Fig. 1)으로부터 미생물을 분리하여 분리된 미생물은 (주)제노텍에 의뢰하여 동정한 결과로 Fig. 2와 같다. 총 19종류의 미생물을 분리하였으며, 2종을 제외한 나머지 17종의 미생물을 동정하였다. 단리 동정된 미생물은 주로 세균에 속하는 것으로서 동춘당의 목재 피해는 포화함수율이상의 습도가 매우 높은 상태에서 발생하였거나 본 실험의 시료 채취에 있어서 주로 세균성 미생물이 검출되었기 때문으로 추정할 수 있다.



Fig. 1. The closet of Dongchundang.

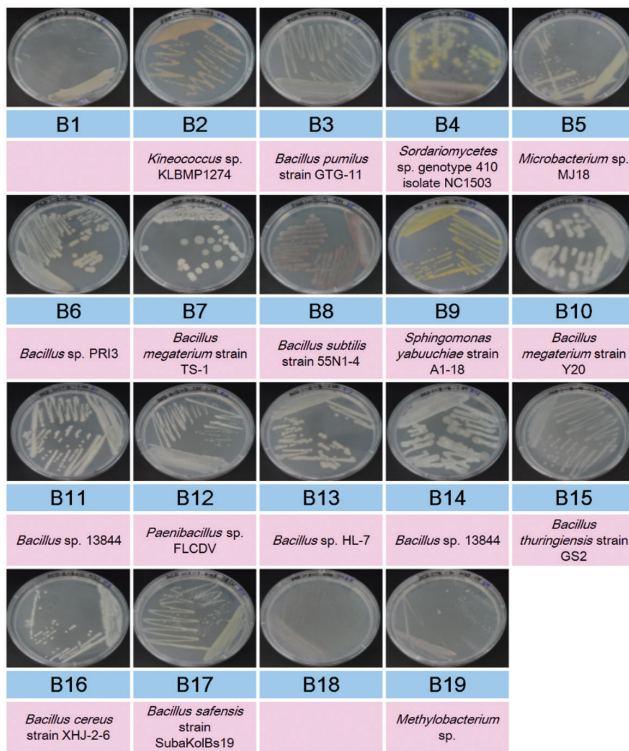


Fig. 2. Identification of microbial organisms.

3.2. 기질 분해 효소 활성 실험

분리를 통해 선별된 미생물 19종의 배양 실험 결과를 table 1에 나타내었다.

	Substrate for protease activity measurement			Substrate for protease activity measurement			
	CMC*	Xylan	Lignin	CMC	Xylan	Lignin	
B1	X	X	○	B11	X	X	X
B2	X	X	X	B12	X	X	X
B3	X	X	X	B13	X	X	X
B4	X	X	○	B14	○	X	X
B5	X	X	X	B15	X	X	X
B6	X	X	X	B16	X	X	X
B7	X	X	X	B17	X	X	X
B8	X	X	X	B18	X	X	X
B9	X	X	○	B19	○	X	○
B10	X	X	X				

Table 1. Substrate for protease activity measurement of microbial organisms.

결과를 토대로 CMC 기질을 분해 가능한 균주로는 B14와 B19이며, lignin을 분해하는 균주로는 B1, B4, B9와 B19로 확인되었으며, xylan의 경우에는 분해 가능한 균주가 확인되지 않았다. 특히, B19의 경우에는 lignin과 CMC를 기질로 이용하여 탄소원으로 사용하는 것을 확인하였다.

3.3. 미생물 성장곡선 및 pH 변화량 측정

CMC와 lignin 기질 분해 활성을 가지는 미생물인 *Methylobacterium* sp. (B19)의 성장곡선은 측정하기 위해 PDB

배지를 이용하여 시간별로 시료를 채취하여 배양액 흡광도 (Optical Density, OD)를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3와 같이 미생물의 성장주기인 적응기, 대수증식기, 정지기, 사멸기를 확인할 수 있었다. 또한 미생물의 수가 증가할수록 pH의 수치가 점점 중성화가 되면서 최종적으로 pH 8부근에서 멈추는 것을 확인하였다.

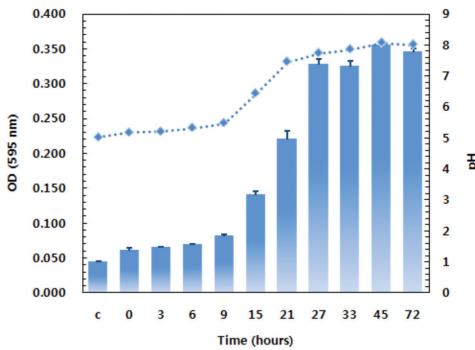


Fig. 3. Growth curves and pH of *Methylobacterium sp.* (B19)

시간에 따라 채취한 시료의 CMC 활성을 수치상으로 정량하기 위해 배지에 함유되어 있는 효소를 이용하여 Mehdi Dashtban의 cellulase 활성을 알아보는 실험을 실시하였다. 그 결과 Fig. 4과 같은 결과를 확인하였다. 실험을 통해 *Methylobacterium sp.* (B19)가 cellulase를 배출하여 배지에 함유되는 것을 확인하여 시간에 따라 그 결과를 알아보면, 균의 수가 증가할수록 효소의 분비되는 양이 증가하여 분해되는 환원당의 함량이 증가하는 것을 확인하였으나, 72시간의 경우에는 그 활성이 급격하게 저하되는 것을 확인하였다. 결과적으로 Fig. 3의 성장곡선과 Fig. 4의

CMC 활성 결과를 참고로 확인한 결과, 흡광도를 통한 OD값의 측정은 미생물주 기인 사멸기를 정확히 판별하기가 어렵다. 하지만 CMC 활성 결과를 확인한 결과 72시간에서 미생물이 사멸하면서 분비되는 효소의 양이 감소되어 CMC 활성 정도가 감소하는 것을 확인하였다.

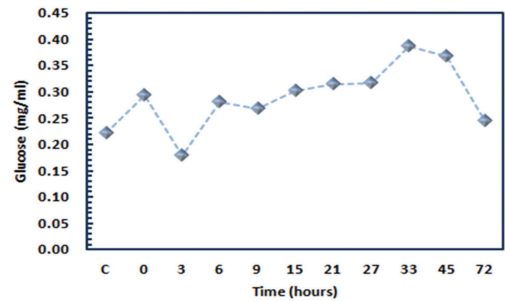


Fig. 4. CMCase (Carboxymethylcellulase) activity of *Methylobacterium sp.* (B19)

3.4. CMC 분해 활성 효소 분리

기질분해 활성실험을 통해 cellulose를 분해하는 미생물인 B14와 B19를 선택배지에 첨가하여 72시간 배양을 통해 CMC 분해활성 효소를 분리하였다. 분리된 효소를 이용하여 cellulase 활성을 보기 위해 DNS 정량법을 따라 실험을 실시한 결과, Fig. 5와 같다. 반응 시간에 따라 cellulose가 분해되어 환원당의 함량이 증가를 하였다. 30 min에서는 *Bacillus sp.* (B14)에서 활성이 높았지만, 반응시간이 증가할수록 *Methylobacterium sp.* (B19)가 증가하는 것을 확인하였다. 선택배지에서 분리된 효소는 미생물이 CMC를 분해하기 위해 분비되는 효소인 cellulase로 CMC를 분해하여 탄소원으로 이용

하는 것을 확인하였다. 이러한 점을 토대로 동춘당에서 분리된 CMC를 분해하는 미생물인 *Bacillus* sp. (B14) 과 *Methylobacterium* sp. (B19)의 경우에는 cellulase를 균체 외로 분비하여 CMC를 분해하는 것을 확인하였으며, *Methylobacterium* sp. (B19)의 경우에는 Fig. 4와 Fig. 5를 통해 동일한 72시간에 DNS 정량한 결과를 확인하여 보면, 미생물과 배지에 포함된 효소와 배지에만 포함된 효소의 CMC 분해 차이를 확인할 수 있다.

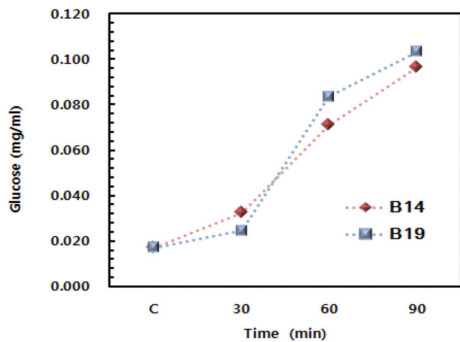


Fig. 5. CMCase (Carboxymethylcellulase) activity of *Bacillus* sp. (B14) and *Methylobacterium* sp. (B19)

4. 결론

대전 동춘당 반침에서 분리된 *Methylobacterium* sp. (B19)는 목재의 구성성분인 cellulose를 분해하여 탄소원으로 사용하였다. 하지만, cellulose의 경우 목재의 구조를 단단하게 하는 요소로서 그 양이 부족할 경우 목재의 함량이 감소한다. 즉, *Methylobacterium* sp.에

의해 목조문화재의 생물피해의 주된 원인이라고 할 수는 없지만, 가능성을 제시하였다. *Methylobacterium* sp.의 경우에는 미생물 내에 효소가 존재할 뿐만 아니라 외부로 분비한다는 것을 확인하였다.

감사의 글

본 연구는 문화재청 국립문화재연구소의 지원을 받아 문화유산융복합연구(R&D)사업의 일환으로 이루어졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- 강소영, 최윤아, 정용재, 2007. 목재문화재 보존을 위한 수목추출물의 부위별 생리활성탐색. 보존과학연구 28집. pp.59-74.
- 정소영, 이규식, 정용재, 2002. 해인사의 흰개미 모니터링 및 방제 방안. 보존과학연구 23집. pp.77-93.
- Gurnagul N, Page DH, and Paice MG, 1992. The effect of cellulose degradation on the strength of wood pulp fibres. Nord. Pulp Pap. Res. J. 7(3), pp.152-154.
- Kigawa, R, Miyazawa, Y, Koizumi, M, Sano, C, Nochide, H, Kimura, H, and Tomita, B. 1999. Evaluation of the effects of various pest controlling reagents

- on pigments and metals: effects of pesticides, fumigants, carbon dioxide and nitrogen. Bunkazai hozon-syuhuku gakkaisi 43, pp.12-21.
- Kroschwitz JI editor, 1990. In: Polymers, fibers and textiles, a compendium. Wiley-Interscience, New York, pp.237.
 - Mehdi, D, Miranda, M, Kam, TL, Canquan, M, and Wensheng, Q. 2010. cellulase activities in biomass conversion: measurement methods and comparison. Critical Reviews in Biotechnology 30(4), pp.302-309.