


공주 송산리 6호분에서 분리한 진균의 생화학적 특성 분석 및 생장제어 연구

이민영* | 박희문** | 정용재***,1

*한국전통문화대학교 문화재예방보존연구소

**충남대학교 생명시스템과대학 미생물분자생명과학과

***한국전통문화대학교 문화유산융합대학원 수리복원학과



Biochemical Characteristics and Growth Control for fungi isolated from mural painting of Tomb No.6 at Songsan-ri, Gongju

Min Young Lee* | Hee Moon Park** | Yong Jae Chung***,1

*Institute of Preventive Conservation for Cultural Property, Korea National University of
Cultural Heritage, Buyeo, 323-812, Korea

**Department of Microbiology and Molecular Biology, College of Bioscience and Biotechnology,
Graduate School, Chungnam National University, Daejeon, Korea

***Department of Heritage Conservation & Restoration, Graduate School of Convergence Cultural Heritage,
Korea National University of Cultural Heritage, Buyeo, 323-812, Korea

¹Corresponding Author: iamchung@nuch.ac.kr, +82-41-830-7365

초록 공주 송산리 6호분에서 분리한 미생물의 배양조건에 따른 생화학적 특성을 확인하고 천연물 유효성분인 anethole과 eugenol의 항진균력을 평가하여 고분 또는 벽화에 대한 적용 가능성을 확인하였다. 송산리 6호분 내부 공기중 및 벽체에서 포집된 26종의 곰팡이는 자낭균류 15종, 접합균류 2종, 담자균류 1종으로 동정되었다. 분리된 곰팡이의 전분과 젤라틴에 대한 분해도 평가를 실시한 결과 SY-18, SY-23, SY-25 등에서 전분에 대한 분해능이 높게 나타났으며, SY-18, SY-21, SY-23 등에서 높은 젤라틴 분해능을 보였다. 각 기질의 분해능이 우수한 균주 3종을 액체배양하여 생화학적 특성을 확인하였다. 천연물 유효성분인 anethole과 eugenol의 항진균력 평가 결과, anethole과 eugenol의 혼합액(1:2)에서 곰팡이의 생장 억제력이 가장 크게 나타났다. 국내외에 동굴 또는 고분 벽화에 발생 가능한 곰팡이에 대해 강력한 항진균력을 보이는 천연물 유효성분을 이용하여 미생물의 발생을 억제할 수 있을 것으로 기대된다.

중심어: 고분 벽화, 곰팡이, 생화학적 특성, 항진균 감수성

ABSTRACT Fungi were isolated from mural painting in tomb no.6 at songsan-ri, Gong-ju. Antifungal susceptibility of essential oils extracted from natural medicine was tested and it confirmed applicability for mural painting in tombs. 26 species of fungi collected from air-borne and wall surfaces were identified to 15 species of Ascomycetes, 2 species of Zygomycetes, 1 of Basidiomycetes. Wheat starch and gelatin degradability were evaluated as isolated fungi. SY-18, SY-23, SY-25 showed high degradability of wheat starch. SY-18, SY-21, SY-23 were decomposed into gelatin. Biochemical characteristics of decomposing fungi to wheat starch glue and cowhide glue were analyzed by using

α -amylase and gelatinase activity. An Antifungal test was conducted in Anethole and Eugenol. Anethole and Eugenol mixture(1:2) showed high antifungal susceptibility. Natural adhesives help microbial growth and can cause structural damage in mural painting. The expectation of this study is the possibility to control microbial growth in wall painting using natural essential oils. It can be used as a data for conservation method to control microbial damages.

Key Words: Mural painting, Fungi, Biochemical characteristics, Antifungal susceptibility

1. 서 론

고분이란 과거에 시신을 매장하기 위해 만든 무덤으로, 일반적으로 땅을 파고 묻는 형태로 이루어진다. 따라서 시신이 매장된 공간은 외부와 차단된 별도의 공간으로 이루어지고, 매장 환경과 유사한 저온·고습의 환경 조건을 유지한다. 고분의 발굴 등에 의해 외부 공기가 들어오면 고분 내부의 자연적인 환경 조건을 변화시켜 온도차에 의한 결로현상, 외부에서 유입된 미생물 성장 등의 문제가 발생할 수 있다. 고분 내부에 발생하는 생물 피해는 미생물인 세균(Bacteria) 및 곰팡이(Fungi)에서 조류(Algae), 지의류(Lichen)에 이르기까지 다양하다(Chung, 2007).

벽화는 크게 벽체와 채색층으로 이루어지고(Park, 2013) 벽체는 다시 초벽, 중벽, 마감층으로 나뉘며 채색층은 바탕칠층과 안료층으로 구분된다. 일반적으로 벽체를 구성할 때는 모래, 황토 등의 토양 이외에 벽체의 강도를 향상시키기 위해 천연접착제를 첨가한다. 채색층에는 안료가 벽체에 잘 고착될 수 있도록 아교 또는 어교 등의 동물성 접착제를 사용한다. 그러나 접착제가 벽체에 포함되어 있을 경우 미생물의 영양원으로 작용하여 생장의 기반이 될 수 있고(Hwang, 2001) 보존처리에 사용된 복원재 또는 접착제로 인해 곰팡이가 발생하기도 한다(Sampo and Mosca, 1989; Karpovich-Tate and Rebricova, 1991). 곰팡이와 세균은 벽체의 구성 성분인 셀룰로오스, 단백질 등을 가수분해시키기 위해 cellulase, protease, beta- glucosidase와 같은 세포외효소를 분비한다(Rollke, 1996). 따라서 미생물이 안료층이나 초벽층 위에서 성장할 경우 벽화의 색채를 손상시키거나(Jang, 2002) 구조적인 손상을 줄 수 있다.

공주 송산리 6호분은 6세기 전반에 조성된 삼국시대 고분으로 벽돌을 쌓아 축조한 전축분으로, 현실 네 벽에는 전축의 벽면 위에 사신도가 그려져 있다. 벽면에 벽화 제작을 위한 점토 바탕층을 조성하였으며 진흙이 마르기 전에 연백(鉛白)으로 그림을 그린 습지벽화법으로 제작되었다

(Han, 2011). 특히 사신도 그림을 그리는 데 필요한 부분에 한정된 점토의 바닥면 구성은 삼국시대뿐만 아니라 동시기 중국에서도 찾아볼 수 없는 독특한 방식이다(Lee, 2003; Yoon, 2008). 1932년 고분이 발견되었으며, 1995년에 벽화 표면에 남조류인 *Lyngbya* spp., *Gloeocapsa* spp.가 발생하였다. 남조류 제거용 약제인 AC322와 AB57용액의 조성을 달리하여 개발된 K101 화학약제가 벽화 표면에 처리되었고 추가적으로 UV광원을 조사하여 남조류의 생육을 억제하였다(Suh, 1997). 그러나 화학약제의 잔류성분이 벽체 표면에 남아 침전되면서 이차적인 피해가 우려될 뿐만 아니라 UV광원을 통해 제거된 미생물은 적정 온습도 조건하에서 재발할 수 있다. 또한 앞서 개발된 화학약제는 남조류의 제거를 위해 개발된 약제이므로 곰팡이에 대한 제거 효과는 검증되지 않았다. 따라서 벽화에 손상을 유발하지 않고 인체에 무해하며, 세균 및 곰팡이의 제거가 가능한 친환경 살생물제의 개발 및 적용이 필요하다. 국내 문화재 및 보존과학분야에서는 실내 동산문화재의 미생물 발생을 제어하기 위해 약용식물 및 수목 추출물로부터 살충살균 물질을 분리하고 현장에 적용하기 위한 연구를 진행해 왔으며(Chung *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2007; Choi *et al.*, 2010), 최근에는 천연약재 추출물을 야외 석조문화재 생물막 제거에 적용한 연구 또한 수행되었다(Jeong, 2013). 그러나 고분에서 분리된 미생물에 대한 식물유래 추출물의 살충살균력 평가는 이루어진 바 없으며, 고습하고 밀폐된 조건에서의 적용 가능성 연구 또한 전무하다.

본 논문에서는 송산리 6호분 현실 및 벽화 표면에서 미생물을 분리 동정하고 고분 내부의 미생물 분포를 확인하였다. 또한 전분 및 아교를 대표적인 천연접착제로 선정하고, 접착제의 종류별 곰팡이의 분해능 및 배양조건에 따른 생화학적 특성을 확인하였다. 고분 내부에서 분리된 곰팡이에 대해 천연물 유효성분인 anethole과 eugenol의 항진균력을 평가하여 고분 또는 벽화에 대한 적용 가능성을 확인하였다.

2. 연구방법

2.1. 미생물의 분리 및 동정

2.1.1. 미생물 포집 및 배양

6호분 현실의 미생물 분포를 확인하기 위하여 2012년 10월, 2013년 1월 총 2회에 걸쳐 공기중부유균 포집 및 벽체 표면의 미생물 채집을 실시하였다. 공기포집기(BUCK, APB-70800, USA)를 이용하여 6호분 현실의 공기 100리터를 멸균된 PDA(Potato Dextrose Agar)를 통과시키는 방식으로 2회 포집하였다. 벽체 표면은 방위별로 동측과 서측은 각각 8지점, 남측 5지점, 북측 6지점을 정하고 멸균봉을 이용하여 채집한 뒤 PDA배지에 도말하였다(Figure 1). 미생물은 28℃에서 5일간 배양하고 개체수(CFU, Colony Forming Units)를 기록하였다. 배양된 미생물 중 곰팡이에 한하여 단군집 분리(single colony)를 통해 28℃, 7일간 배양을 실시하였다.

2.1.2. 유전자 분석

분류된 곰팡이의 종동정을 위해 18S rRNA region에 대한 염기서열 분석을 실시하였다. DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)를 사용하여 gDNA를 추출하고 ITS1/IST4 universal primer로 선택영역을 증폭하였다(Lee, 2014). 1.2% agarose gel에서 전기영동을 통해 확인된 target band를 정제하고 염기서열을 분석하였다. 분석된 염기서열은 genebank (NCBI, National Center for Biotechnology Information)에서 BlastN search를 수행하였다.

2.2. 천연접착제 분해 균의 선별

접착제의 성분에 따른 곰팡이의 분해능 평가를 실시하

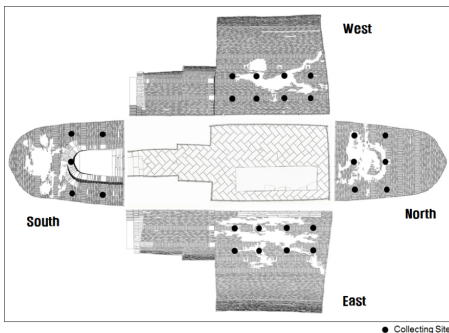


Figure 1. Sampling sites of wall surface microbes.

였다. 소맥전분풀의 주성분인 wheat starch(Sigma-aldrich, S5127), 아교의 주성분인 gelatin(Sigma-aldrich, G9382)이 포함된 선택배지를 제작하고(Table 1) 미생물을 접종하여 28℃, 10일간 배양하였다. 염색 후 나타나는 생육저해환(inhibition zone)의 크기를 측정하고 평균값과 표준오차를 계산하였으며 생육저해환의 크기가 클수록 기질의 분해력이 높은 것으로 판단하였다. 3회 측정값의 평균을 구하고 기질분해능이 우수한 균주를 각 기질별 3종씩 선별하였다.

2.3. 활성곰팡이의 생화학적 특성

2.3.1. 균주 및 제한배지

전분분해능 및 젤라틴분해능이 높은 것으로 확인된 곰팡이 3종씩을 각각 소맥전분풀과 아교 분해곰팡이로 선정하였다. 제한배지는 1% 기질, peptone 0.1%, yeast extract 0.1%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, NaCl 0.01%(pH 7.0)를 사용하였다. 소맥전분풀은(CJ 제일제당) 미국산 1등급 소맥 중력분을 24개월간 수침시킨 후 건조한 것(Chung *et al.*, 2012)을 제공받아 사용하였고, 아교는 인사동 화방에서 구입한 막대아교를 사용하였다.

2.3.2. 균주 배양 및 조효소액 추출

배양액 20ml에 균주를 접종하고 10일간 진탕배양(28℃, 160rpm)하였다. 1일 간격으로 배양액을 원심분리(4℃, 13,000rpm, 15min)하고 상층액을 취하여 조효소액으로 사용하였다.

2.3.3. 효소활성 측정

전분분해효소 활성은 Somogyi-Nelson법(Somogyi, 1952)으로 환원당을 측정하였다. 1% 소맥전분풀 기질액 250μl에 조효소액 50μl를 넣고 40℃, 30분간 반응시켰다. 구리 시약과 0.1M NaOH를 100μl씩 첨가하여 100℃ 항온수조에서 20분간 반응시켰다. Nelson 시약 100μl을 첨가하여 5

Table 1. Selective medium composition and staining solution.

Adhesive	Medium components	Staining sol.
wheat starch glue	1% starch from wheat, 3.9% PDA	lugol's iodine sol.
animal glue (cowhide)	1.5% gelatin, 0.4% peptone, 0.1% yeast extract, 1.5% agar	20% HCl + 15% Hg ₂ Cl ₂

분간 상온에서 방치하고 600 μ l 증류수를 넣어 희석시킨 후 520nm에서 흡광값을 측정하였다.

젤라틴분해효소 활성은 ninhydrin법으로 유리된 α -amino group을 측정하였다(Son, 2002). 1% 아교 기질액 300 μ l에 조효소액 200 μ l를 넣고 40 $^{\circ}$ C, 30분간 반응시킨 후 0.1M cold acetic acid 500 μ l를 가하여 반응을 정지시켰다. 10,000rpm, 15분간 원심분리하고 상층액 400 μ l에 2% ninhydrin reagent를 20 μ l 첨가하여 100 $^{\circ}$ C, 10분간 반응시켰다. 상온에서 5분 방치한 후 50% ethanol(v/v) 800 μ l를 넣고 570nm에서 흡광값을 측정하였다(Park *et al.*, 2001).

2.3.4. 최적 pH 및 온도조건

최적 pH는 pH 3.0~10.0까지 변화시킨 50mM 완충액에 조효소액을 넣고 40 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시킨 후 잔존 활성을 측정하였다. 이때 pH 3.0~5.0는 sodium citrate buffer, pH 6.0~7.0은 sodium phosphate buffer, pH 8.0~9.0는 tris-HCl buffer, pH 10.0은 carbonate-bicarbonate buffer를 사용하였다. 또한 최적 온도 조건 확인을 위해 sodium phosphate buffer(pH 7.0)에 조효소액을 넣고 20~80 $^{\circ}$ C까지 10 $^{\circ}$ C 간격으로 변화시켜 잔존 활성을 측정하였다.

2.3.5. 천연물 유효성분의 항진균력

팔각회향(*Illicium verum* Hooker fil.)의 유효성분인 anethole(Sigma-aldrich, 117870, 99%)과 정향(*Eugenia caryophyllata* Thunberg)의 유효성분인 eugenol(Sigma-aldrich, E51791, 99%)을 농도별로 1%, 3%, 5%, 10%, 20%, 30%, 50%로 희석하였다. 또한 anethole과 eugenol을 1:1, 1:2, 2:1 비율로 혼합한 뒤 1%, 3%, 5%, 10%, 20%로 희석하여 두 성분의 혼합에 따른 상승효과를 실험하였다. PDA 배지에 균주를 100 μ l씩 도말한 뒤 각각 anethole과 eugenol 40 μ l를 paper disc(Φ 8mm)에 주입하여 배지 위에 얹고 28 $^{\circ}$ C, 5일간 배양하였다(Park *et al.*, 2006). 대조군으로는 에탄올을 사용하였다.

2.4. 활성곰팡이의 천연접착제 가해도

2.4.1. 의사벽체 제작

의사벽체는 송산리 6호 벽화고분 바탕층 분석 결과(Chung, 2012)를 바탕으로 초벽층과 중벽층을 제외하고 마감층으로만 구성된 벽체를 제작하였다. 벽체는 1급모래, 황토 및 점토를 사용하여 제작하였다(Table 2). 벽화 제작 시 조건별로 1%, 5%, 10%의 농도의 소맥전분풀, 아교를

Table 2. Preparation condition of wall.

Mixing ratio	Adhesive	Size
fine sand : loess : clay = 2 : 1 : 1 (v/v)	wheat starch animal glue (cowhide)	Φ 60 \times h15mm

혼합하였으며, 대조군으로는 증류수를 사용하였다. 벽체 제작 후에는 23 $^{\circ}$ C, 50% 항온항습기에서 7일간 건조하였다.

2.4.2. 곰팡이 접종 및 배양

의사벽체를 24시간 자외선 멸균하고 벽체의 중심에 분해능이 우수한 곰팡이를 각각 200 μ l씩 접종하였다. 균주를 접종한 벽체는 항온항습기(28 $^{\circ}$ C, 99%)에서 40일간 배양하였다.

2.4.3. 항진균력 평가

천연물의 항진균 감수성 평가에서 효과가 가장 크게 나타난 용액을 곰팡이가 접종된 벽체에 300 μ l 주입하였으며 대조군으로는 증류수를 사용하였다. 벽체로부터 곰팡이 분해효소를 추출하여 생화학적 활성을 측정하였다. 멸균 증류수 30ml에 벽체를 넣고 수용성 물질을 용출한 후 원심 분리(4 $^{\circ}$ C, 13,000rpm, 15min)하여 상층액을 조효소액으로 사용하였다. 소맥전분풀을 포함한 벽체는 전분효소활성을 측정하였고, 아교를 포함한 벽체는 젤라틴분해효소 활성 측정을 실시하였다.

3. 연구결과

3.1. 곰팡이의 배양 및 동정

3.1.1. 고분 내 미생물 분포 현황

1차 조사에서 곰팡이 19개체, 세균 1개체가 확인되었고, 2차 조사에서 곰팡이 17개체, 세균 7개체로 나타났다(Table 3).

벽체 표면에서 채취한 미생물은 육안적 형태분류를 통해 종 개수를 확인하였다. 그 결과, 1차 조사에서 곰팡이 67종, 세균 15종, 2차 조사에서는 곰팡이 38종, 세균 10종이 확인되었다(Table 4). 방위에 따라 비교할 경우, 서벽에서 곰팡이 35종, 세균 8종으로 가장 많고 남벽에서 곰팡이 19종, 세균 5종으로 미생물 개체수가 가장 적었다.

3.1.2. 곰팡이 분류

공기중 및 벽체 표면에서 포집된 미생물 중 곰팡이에 대

Table 3. Distribution of airborne microorganisms (unit : CFUs).

Collection site	Primary (October, 2012)			Secondary (January, 2013)		
	fungi	bacteria	total	fungi	bacteria	total
Burial room (1)	4	0	4	8	3	11
Burial room (2)	15	1	16	9	4	13

Table 4. Distribution of wall surface microorganisms (unit : species).

Collection site	Primary (October, 2012)			Secondary (January, 2013)		
	fungi	bacteria	total	fungi	bacteria	total
East	16	4	20	10	2	12
West	21	5	26	14	3	17
South	14	3	17	5	2	7
North	16	3	19	9	3	12

Table 5. Fungal distribution according to the collecting sites.

No.	Primary (October, 2012)					Secondary (January, 2013)				
	A	E	W	S	N	A	E	W	S	N
SY-01		○	○	○	○	○		○		○
SY-02	○	○	○	○	○		○	○		
SY-03	○	○	○		○		○	○		
SY-04		○	○	○	○	○	○			○
SY-05		○	○	○	○			○		
SY-06		○	○	○	○		○	○	○	○
SY-07		○	○			○	○	○		○
SY-08		○		○						
SY-09									○	○
SY-10			○	○	○	○		○		
SY-11			○					○		
SY-12	○		○							
SY-13		○						○		
SY-14			○	○						
SY-15		○	○							
SY-16								○		
SY-17	○	○	○			○	○			
SY-18		○	○	○	○		○	○	○	○
SY-19		○	○	○	○			○		○
SY-20		○	○		○			○	○	
SY-21			○	○			○			
SY-22			○	○	○		○			
SY-23					○					○
SY-24								○		
SY-25							○			
SY-26		○							○	

A: Air-borne collection, E: East wall, W: West wall, S: South wall, N: North wall

Table 6. Identification of isolated fungi.

Strain No.	Description	Max ident (%)	Accession
SY-01	<i>Doratomyces stemonitis</i>	99	EF029213
SY-02	<i>Doratomyces nanus</i>	99	FJ914668
SY-03	<i>Acremonium furcatum</i>	99	HQ637291
SY-04	<i>Engyodontium album</i>	99	JX156368
SY-05	<i>Engyodontium album</i>	99	JQ781846
SY-06	<i>Fusarium solani</i>	95<	HF546377
SY-07	<i>Mortierella elongata</i>	95<	FJ161922
SY-08	<i>Phlebia tremellosa</i>	97	DQ384584
SY-09	<i>Fusarium proliferatum</i>	99	JN624893
SY-10	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	JN851048
SY-11	<i>Chaetomium piluliferum</i>	99	AB625587
SY-12	<i>Conidiobolus coronatus</i>	95<	AJ345094
SY-13	<i>Engyodontium album</i>	99	AB106650
SY-14	<i>Trichophyton terrestre</i>	95<	JX122379
SY-15	<i>Engyodontium album</i>	95<	KC311469
SY-16	<i>Acremonium furcatum</i>	99	HQ637291
SY-17	<i>Aspergillus ustus</i>	98	JN982695
SY-18	<i>Aspergillus creber</i>	98	JQ301889
SY-19	<i>Aspergillus versicolor</i>	99	JN851010
SY-20	<i>Aspergillus versicolor</i>	100	AM883156
SY-21	<i>Penicillium citrinum</i>	100	JQ697524
SY-22	<i>Aspergillus versicolor</i>	99	JX156356
SY-23	<i>Aspergillus versicolor</i>	99	JQ963339
SY-24	<i>Cylindrocarpon destructans</i>	95<	AM419062
SY-25	<i>Aspergillus sydowii</i>	95<	JN851041
SY-26	<i>Penicillium citreonigrum</i>	99	JF440604

한 순수배양을 실시하고 형태에 따라 총 26종으로 분류하였다. 이 중 10월과 1월 조사에서 모두 확인된 균주는 17종(SY-01, SY-02, SY-03, SY-04, SY-05, SY-06, SY-07, SY-10, SY-11, SY-13, SY-17, SY-18, SY-19, SY-20, SY-21, SY-22, SY-23)이었다. 벽체 표면으로부터 분리된 종은 대부분 인접한 방위의 벽면에서도 같은 종이 확인되며, 네 방위에서 모두 확인되는 균주는 7종(SY-01, SY-02, SY-04, SY-05, SY-06, SY-18, SY-19)이었다(Table 5).

3.1.3. 고분 내 곰팡이 종 동정

공기중 및 벽체로부터 분리된 26종의 곰팡이는 *Acremonium*

furcatum, *Aspergillus* spp., *Chaetomium piluliferum*, *Cylindrocarpon destructans*, *Doratomyces* spp., *Engyodontium album*, *Fusarium solani*, *Fusarium proliferatum*, *Penicillium* spp., *Trichophyton terrestre* 등 자낭균류 15종, *Conidiobolus coronatus*와 *Mortierella elongata* 접합균류 2종, *Phlebia tremellosa* 담자균류 1종으로 동정되었다(Table 6). 또한 18종 중 4종이 *Aspergillus* 계열로 나타나, 고분 내부의 우점종인 것으로 확인되었다. 현실 공기중에 분포하는 곰팡이는 *Acremonium furcatum*, *Aspergillus ustus*, *Aspergillus versicolor*, *Conidiobolus coronatus*, *Doratomyces nanus*, *Doratomyces stemonitis*, *Engyodontium*

Table 7. Substrate degradability (unit : mm).

Strain No.	Species	Starch		Gelatin	
		M.D.*	S.E.**	M.D.	S.E.
SY-01	<i>Doratomyces stemonitis</i>	3.0	±0.0	14.0	±1.2
SY-02	<i>Doratomyces nanus</i>	1.3	±0.3	6.0	±0.6
SY-06	<i>Fusarium solani</i>	2.0	±0.0	1.7	±0.3
SY-07	<i>Mortierella elongata</i>	0.0	±0.0	1.3	±0.3
SY-08	<i>Phlebia tremellosa</i>	0.0	±0.0	0.0	±0.0
SY-09	<i>Fusarium proliferatum</i>	3.0	±0.6	1.3	±0.3
SY-11	<i>Chaetomium piluliferum</i>	1.2	±0.4	0.0	±0.0
SY-12	<i>Conidiobolus coronatus</i>	0.0	±0.0	0.0	±0.0
SY-14	<i>Trichophyton terrestre</i>	5.0	±0.0	5.3	±0.3
SY-15	<i>Engyodontium album</i>	2.7	±0.3	1.0	±0.0
SY-16	<i>Acremonium furcatum</i>	1.3	±0.3	8.7	±0.3
SY-17	<i>Aspergillus ustus</i>	2.7	±0.3	13.3	±0.7
SY-18	<i>Aspergillus creber</i>	6.7	±0.3	22.0	±0.0
SY-21	<i>Penicillium citrinum</i>	3.7	±0.3	21.7	±0.3
SY-23	<i>Aspergillus versicolor</i>	9.3	±0.3	19.3	±0.9
SY-24	<i>Cylindrocarpon destructans</i>	6.0	±0.0	9.3	±0.3
SY-25	<i>Aspergillus sydowii</i>	9.0	±0.6	17.0	±0.6
SY-26	<i>Penicillium citreonigrum</i>	5.3	±0.3	1.0	±0.0

* : Mean diameter, ** : Standard error

album, *Mortierella elongata* 8종으로 동정되었다. *Doratomyces stemonitis*, *Doratomyces nanus*, *Engyodontium album*, *Fusarium solani*, *Aspergillus versicolor*, *Aspergillus creber* 6종은 벽체의 네 방위에서 모두 확인되었다.

3.2. 천연접착제 분해 균의 선별

SY-18(*Aspergillus creber*, 98%), SY-23(*Aspergillus versicolor*, 99%), SY-25(*Aspergillus sydowii*, >95%)는 각각 생육억제환의 크기가 6.7mm, 9.3mm, 9.0mm로 나타나 전분분해능이 높은 균주로 선정하였다. SY-18(*Aspergillus creber*, 98%), SY-21(*Penicillium citrinum*, 100%), SY-23(*Aspergillus versicolor*, 99%)는 각각 22.0mm, 21.7mm, 19.3mm로 젤라틴분해능이 높은 균주로 확인되었다(Table 7, Table 8).

3.3. 천연접착제 분해곰팡이의 생화학적 특성

3.3.1. 최적 배양조건 및 효소활성

3.3.1.1. 전분분해 곰팡이의 최적 배양조건 및 효소 활성

SY-23는 최적 배양기간이 5일이었으며, SY-18, SY-25

는 배양 6일차에서 가장 높은 활성을 보였다. pH 조건의 경우, SY-23는 pH 7.0에서 가장 높았고, SY-18, SY-25는 pH 9.0~10.0의 알칼리성 영역에서 활성이 증가하였으며, pH 9.0에서 가장 높은 활성을 보였다. 온도에 따른 분해효소 활성 결과, SY-18, SY-23에서는 20~40℃까지 활성이 증가하였고, 40℃에서 최고 활성을 나타냈다. SY-25는 온도가 높아질수록 활성이 증가하다가 70℃에서 활성이 가장 높았다. 20℃ 온도조건에서는 SY-18, SY-25는 최적 온도조건 대비 효소 활성이 20% 이하로 나타났으나, SY-23는 약 60%의 활성을 보임에 따라 세 균주 중 저온에서도 분해효소 활성이 있는 균주로 확인되었다(Figure 2).

3.3.1.2. 아교분해 곰팡이의 최적 배양조건 및 효소 활성

젤라틴분해효소에 대한 측정 결과, SY-18, SY-21는 배양 6일차에서 최고 활성을 나타내었으며, SY-23는 8일차 배양액에서의 활성이 가장 높았다. SY-18, SY-21는 pH 7.0에서 높은 활성을 나타내었고, SY-23는 산성영역인 3.0~5.0 범위의 효소활성이 크게 나타났으며, pH 5.0에서 최고 활성을 나타내었다. SY-18, SY-21는 30℃, SY-23는 40℃에서 최고 활성을 보였다. 3종의 곰팡이의 최적 생장

Table 8. Substrate degradability.

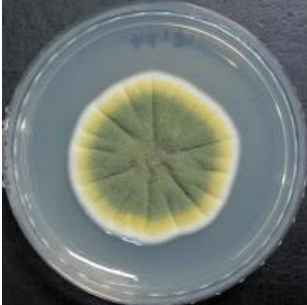
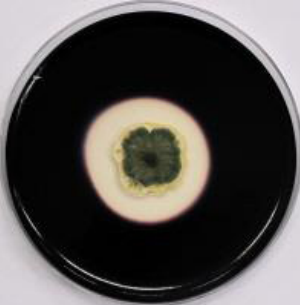


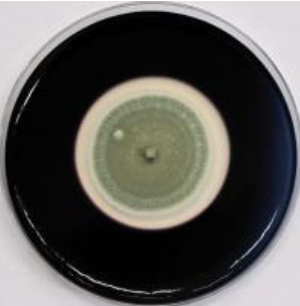
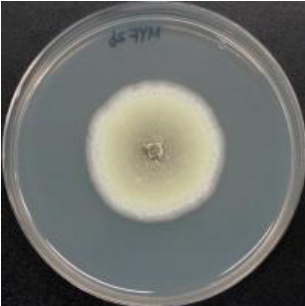
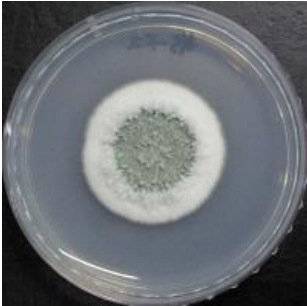

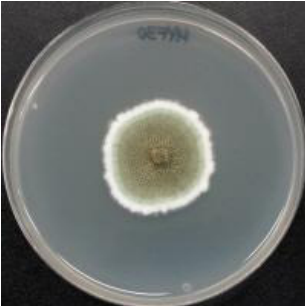
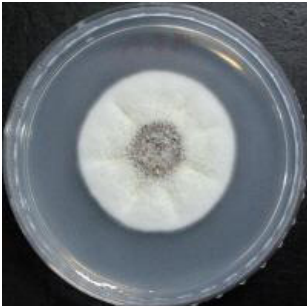
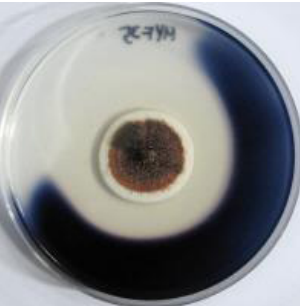
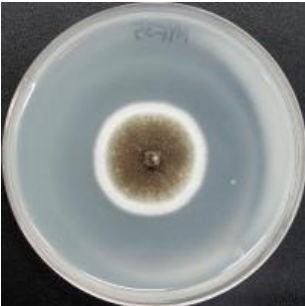
Strain No.	PDA	Starch	Gelatin
SY-18			
SY-21			
SY-23			
SY-25			

Table 9. Dose dependent effects of antifungal susceptibility.


















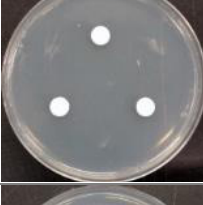

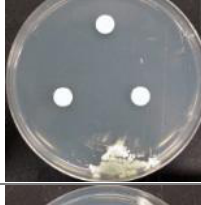

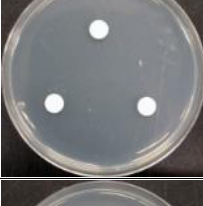






Concentration	SY-18		SY-23	
	anethole	eugenol	anethole	eugenol
1%				
3%				
5%				
10%				
20%				
30%				
50%				

Table 10. Dose dependent effects of antifungal susceptibility in anethole:eugenol mixture.

Concentration	SY-18			SY-23		
	1:1	1:2	2:1	1:1	1:2	2:1
1%						
3%						
5%						
10%						
20%						

온도 대비, 20℃에서 모두 40% 이상의 상대 활성을 보였고, 50℃ 이상의 고온에서는 활성이 급격히 낮아졌다(Figure 3).

3.3.2. 천연물 유효성분의 항진균력 평가

Anethole을 처리했을 경우, 농도가 높아질수록 항진균력이 상승하는 양상을 보였으며, 30% 이상의 농도에서 눈에 띄는 항진균력을 보였다(Table 9). 또한 2종의 균주에서 동일한 양상의 항진균력을 확인하였다. Eugenol을 SY-18에 처리하였을 때, 5% 농도부터 매우 높은 항진균력을 보였으며, 10% 이후에서는 곰팡이의 생육이 완전히 억제된 것을 확인하였다. SY-23에 처리한 결과에서도 5% 농도부터 눈에 띄는 항진균력을 보였으나, 50% 농도까지 처리하였을 때에도 배지 상의 균체의 생육이 완전히 억제되지 않았다.

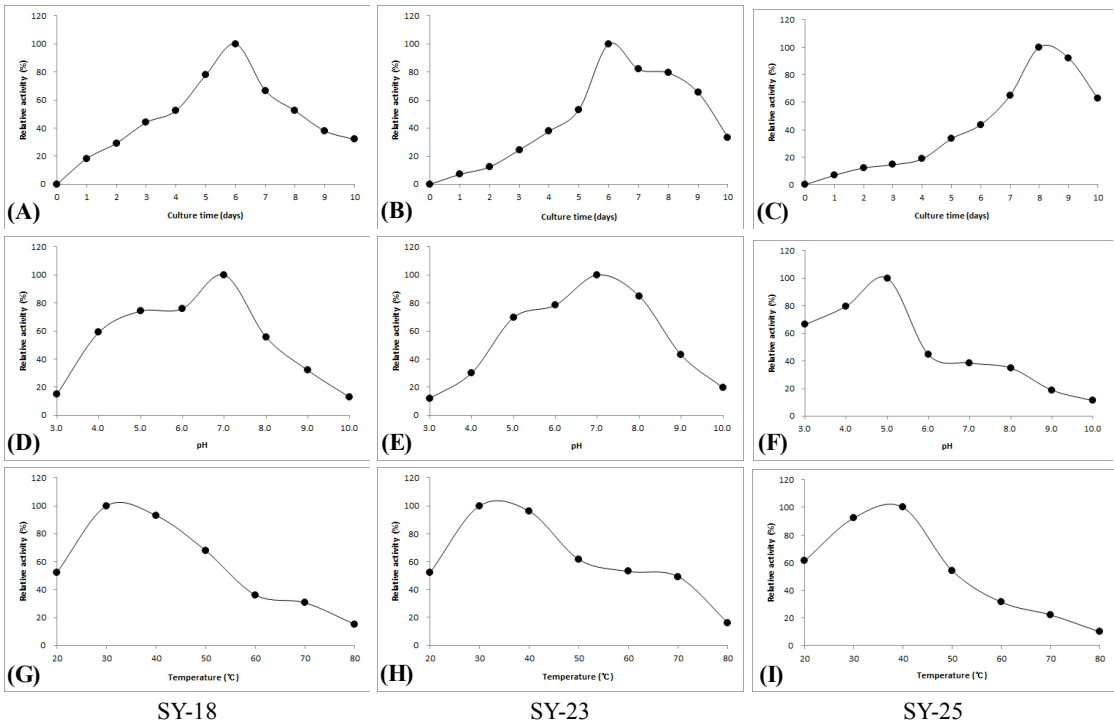
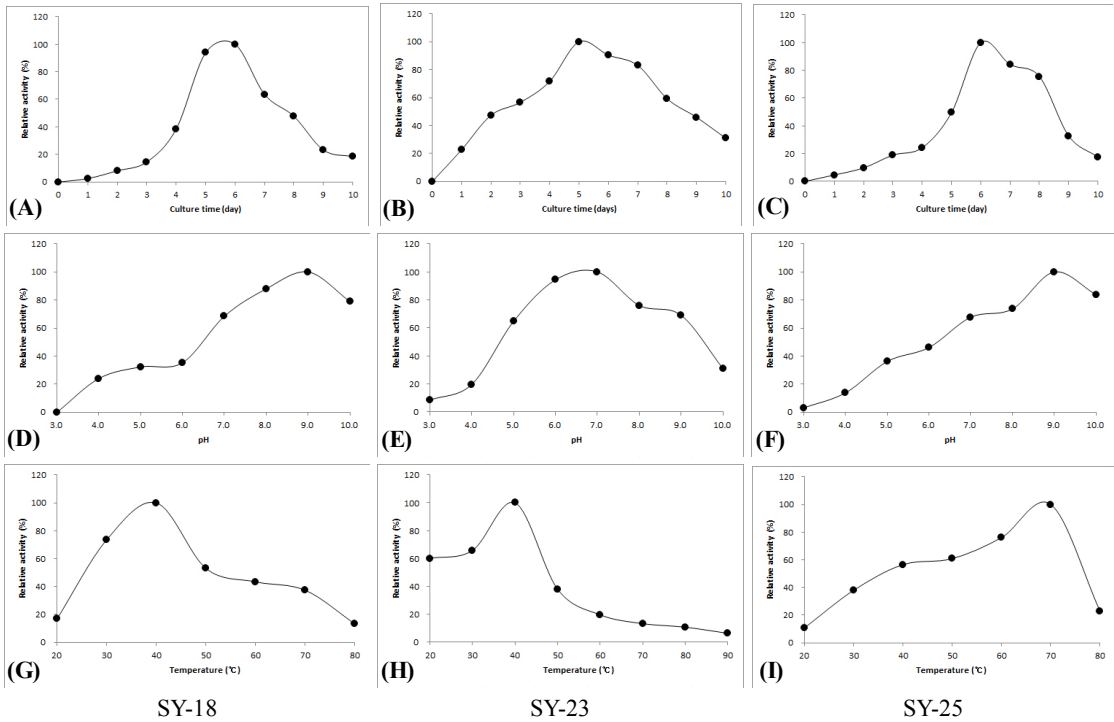
Anethole과 eugenol의 혼합액 처리에서는 10% 농도에서 두 종의 곰팡이의 생장이 모두 억제되는 것을 확인하였

으며, 특히 anethole과 eugenol의 1:2 부피비 혼합액에서 억제력이 가장 큰 것으로 나타났다(Table 10).

3.4. 활성곰팡이의 천연접착제 가해도

전분을 포함한 의사벽체의 생활활성 결과, 1% 농도에서는 균주를 접종하지 않은 대조군에 비해 활성에 큰 차이가 없는 것으로 보아 균주의 생장이 거의 없는 것으로 판단된다. 그러나 농도가 증가하면서 대조군에 비해 효소 활성이 증가함에 따라 접착제의 농도가 높을수록 곰팡이 SY-23의 발생 및 성장이 더 큰 것을 확인하였다(Figure 4). 아교를 포함한 의사벽체에서도 아교 농도가 증가할수록 대조군 대비 효소 활성이 증가하는 것으로 보아, 의사벽체 내에 접착제를 SY-18 곰팡이가 영양원으로 하여 성장한 것으로 확인되었다(Figure 5).

10% anethole과 eugenol 혼합액(1:2)을 처리한 의사벽체



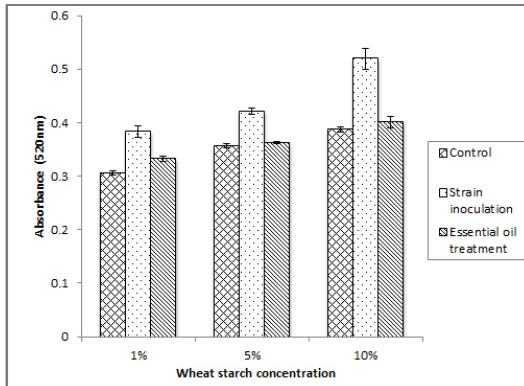


Figure 4. Crude enzyme extracts from wall specimen on α-amylase activity of SY-23.

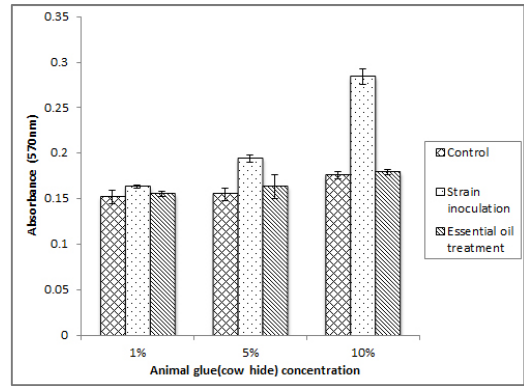


Figure 5. Crude enzyme extracts from wall specimen on protease activity of SY-18.

의 경우 균주를 접종하지 않은 대조군과 유사한 정도로 활성이 거의 없었으며, 기질이나 균주에 상관없이 항진균력이 크게 작용하여 곰팡이의 성장을 억제시킨 것으로 판단된다.

4. 고찰 및 결론

벽화 표면의 미생물은 습기, 알칼리성 pH 조건, 유기 및 무기영양원 등 다양한 조건에 의해 발생하며(Weirich, 1989), 벽화를 구성하는 재료와는 상관없이 습도, 온도, 영양원의 세 조건이 곰팡이의 성장에 중요한 요소가 된다(Garg *et al.*, 1995). 벽화에 미생물이 발생하면 생물막을 형성하여 채색층을 변색(Herrera *et al.*, 2004)시키고 곰팡이 포자는 균사를 통해 기질 내부로 파고들어 광물화, 열화를 비롯한 물리적인 손상을 준다(Berner *et al.*, 1997). 따라서 고분 내부에 존재하는 벽화를 보존하기 위해서는 미생물을 동정하고, 성장 특성을 파악하는 것이 중요하며 더불어 미생물에 의해 손상된 벽화를 미생물로부터 보호할 수 있는 항진균제의 개발이 필요하다(Ripka, 2005).

송산리 6호분 내부 공기중 및 벽체에서 포집된 26종의 곰팡이는 *Acremonium furcatum*, *Aspergillus* spp. 등 자낭균류 15종, 접합균류인 *Conidiobolus coronatus*, *Mortierella elongata* 2종, 담자균류인 *Phlebia tremellosa* 1종으로 동정되었다. 일본, 인도, 이탈리아, 스페인 등 외국의 벽화에서 분리된 미생물 중 *Aspergillus* sp., *Chaetomium* sp., *Fusarium* sp., *Penicillium* sp. 등이 높은 비율을 차지한다는 보고(Emoto, 1974; Curri, 1979; Garg and Dhawan, 1994)와 같이 *Aspergillus* spp.는 고분 내부 동정된 균주의 22.2%를 차지하여 우점종으로 확인되었다.

송산리 6호분 현실 및 벽화 표면에서 분리된 곰팡이의

소맥전분풀, 아교의 표준물질인 전분과 젤라틴에 대한 분해도 평가를 실시한 결과, SY-18, SY-23, SY25 등에서 전분에 대한 분해능이 높게 나타났고 SY-18, SY-21, SY-23 등에서 높은 젤라틴 분해능을 보였다. 특히 SY-18, SY-23는 전분과 젤라틴에 대한 분해력이 모두 우수하였다. 이는 *Aspergillus awamori*, *Aspergillus oryzae*, *Aspergillus niger*에서 amylase 또는 protease의 생산력이 높다고 보고됨에 따라 *Aspergillus* sp.에 속하는 균주의 공통된 특징일 것으로 판단된다(Chung *et al.*, 1990; Sen and Chakarabarty, 1984; Negi, 2011).

각 기질의 분해능이 우수한 균주 3종을 액체배양하여 효소활성 등 생화학적 특성을 확인하였다. 소맥전분풀에 대한 효소활성 측정 결과, SY-18와 SY-23은 20~40℃까지 활성이 증가하였고 40℃에서 최고 활성을 나타냄에 따라 25~37℃에서 활성이 높은 중온균에 속하는 것으로 판단된다(Ramachandran *et al.*, 2004; Francis *et al.*, 2003). 그러나 SY-25는 최적 온도조건이 70℃로 나타남에 따라, 높은 온도에서도 활성을 보이는 고온균에 속하는 것으로 확인되었다(Mubarik, 2003). SY-18, SY-23, SY-25 균주는 소맥전분풀 기질에서 최적 pH는 7.0~9.0의 알칼리성 조건에서 효소활성이 가장 높게 나타났다.

아교에 대한 효소활성 측정 결과, SY-18과 SY-21은 30℃에서 활성이 높게 나타났고, SY-23은 40℃에서 최고 활성을 보였다. 또한 3종의 균주는 최적생장 온도 대비 모두 20℃에서 40% 이상의 상대 활성을 보였고, 50℃ 이상의 고온에서는 활성이 급격히 낮아졌다. SY-18과 SY-21은 pH 7.0, SY-23은 pH 5.0으로 소맥전분풀 분해활성과는 달리 중성 및 약산성 영역에서 활성이 높았다.

특히 SY-23의 경우 α-amylase와 protease의 상대활성

이 최적온도(40℃) 대비 20℃의 온도조건에서 약 60%로 확인되었다. 따라서 연중온도가 12~21℃로 유지되는 송산리 6호분 벽화에 영양원이 존재할 경우 곰팡이 발생이 가능할 것으로 판단된다. 또한 고구려고분 내 침출수의 평균 pH가 7.0~9.0인 중성 및 알칼리였고(Ahn *et al.*, 2007), 능산리고분군 동하층 고분 내 침출수가 pH 7.0의 중성이라는 보고(Chung, 2008) 등을 통해 고분 내 중성인 벽체표면은 전분 및 아교분해 곰팡이의 서식에 알맞은 환경조건이 될 수 있는 것으로 판단된다.

벽체 보강제에 혼합되는 유기매체의 종류에 따른 곰팡이 생장 실험에서 전분풀이 혼합될 경우 곰팡이 발생에 상당히 취약하며, 특히 *Penicillium chrysogenum*이 빠르게 성장하였다고 보고하였다(Lee, 2013). 이에 천연접착제를 혼합한 벽체를 농도별 제작하여 미생물의 성장도를 평가한 결과, 전분과 아교 벽체 모두 접착제 농도가 10% 이상일 경우 곰팡이 효소 활성이 크게 증가하는 것을 확인하였다.

고분 및 동굴 내부에 발생된 미생물의 제어를 위해 일본과 유럽에서 benzalkonium chloride 등 화학적 살생물제를 사용해왔다(Sire, 2006; Kigawa *et al.*, 2006). 그러나 화학약품 처리 이후 세균이 재발생하거나(Geneste, 2008), 수년간 동일한 화학약제를 처리함에 따라 약제에 대한 강력한 내성을 가지는 균주가 성장하는 등의 문제가 발생하였다(Kigawa *et al.*, 2007; Kigawa *et al.*, 2008; Bastian *et al.*, 2009). 따라서 고분 벽화에 발생된 미생물 제거 및 보존을 위한 새로운 살생물제 개발이 시급한 상황이며, 이에 친환경 제거약제로써 기존 유기질문화재 보존을 위해 사용하고 있는 천연 정유(essential oil)의 항진균력을 확인하였다. anethole과 eugenol이 항진균력(Yoo *et al.*, 2006; Lee *et al.*, 2009) 및 항진균력(Chung, 2001)을 나타낸다는 보고와 같이 anethole과 eugenol 혼합액(1:2)에서 SY-18, SY-23의 성장 억제력이 가장 크게 나타났다. 또한 곰팡이를 접종한 의사벽체에 anethole과 eugenol 혼합액(1:2) 10%를 처리했을 경우 균주 성장이 거의 발생하지 않은 것으로 확인되었다. 따라서 벽화 표면에 미생물 발생억제 및 제거를 위한 정유의 적용 가능성이 확인되었으며, 향후 국내외에 동굴 또는 고분벽화의 장기 보존을 위한 친환경 살생물제로 적용될 수 있을 것으로 기대된다.

REFERENCES

Ahn B.C., Hong J.O., 2007, Current preservation states of Koguryo mural tombs under the joint operation of the

South and North Korea II 'Pigment analysis of Koguryo mural tombs', National Institute of Cultural Heritage, 180-218.

Bastian, F., Jurado, V., Nováková, A., Alabouvette, C., Saiz-Jimenez, C., 2010, The microbiology Lascaux Cave, *Microbiology*, 156, 644-652.

Berner, M., Wanner, G., Lubitz, W., 1997, A comparative study of the fungal flora present in Medieval wall paintings in the chapel of the castle Herberstein and in the Paris Church of St.Goeorgen in Styria, Austria. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 40, 53-61.

Choi J.E., Kim Y.H., Hong J.Y., Jung M.H., Jo C.W., 2010, Research on antifungal and insecticidal activity of Natural extracts for Protecting Organic Cultural heritages, *Conservation studies*, 31, 90-102.

Chung K.Y., 2008, Conservation environmental investigation of Neungsanri ancient tombs in Buyeo, Buyeo-gun, 183-214.

Chung M.J., Hou W.N., Jeong J.H., 1990, Studies on the Development and the Characteristics of the Powerful Raw Starch Digesting Enzyme, *Korean Journal of Microbiology and Biotechnology*, Vol.18 No.3, 251-259.

Chung Y.J., Lee K.S., Han S.H., Kang D.I., Lee M.H., 2001, Antifungal and Insecticidal Activity of Ohyang (Five Medicinal Plants), *Journal of Conservation Science*, Vol.10 No.1, 21-30.

Chung Y.J., 2001, Identification of biocide active components isolated from *Illicium verum hooker filius* and *Eugenia caryophyllata THUNBERG*, Doctor Thesis, Chung-ang University.

Chung Y.J., 2007, Current preservation states of Koguryo mural tombs under the joint operation of the South and North Korea II 'Investigation on organism environment of Koguryo mural tombs', National Institute of Cultural Heritage, 219-253.

Chung Y.J., 2012, Study on the Coservation environment of mural painting in tomb No.6 at Sonsanri, Gongju, Korean National University of Cultural Heritage, Gongju-si.

Chung Y.J., Kim M.J., Nam S.J., Jeong S.H., 2012, Physicochemical Characteristics Study on Wheat Starch Adhesive - Based on Wheat Starch Adhesive fermenting period less than two years, *Journal of Korea TAPPI*, Vol.44

- No.2, 35-41.
- Curri, S.B., 1979, Biocides testing and enzymological study on damaged stone and frescoes surfaces: preparation of antibiograms, *Biochem. Exp. Biol.*, 15, 97-104.
- Emoto, Y., 1974, Microbiological investigation of ancient tombs with paintings. *Sci. Conserv.*, 12, 95-102.
- Francis F., Sabu A., Nampoothiri K.M., Ramachandran S., Ghose S., Szakacs G. and Pandey A., 2003, Use of response surface methodology for optimizing process parameters for the production of α -amylase by *Aspergillus oryzae*, *Biochemical Engineering Journal*, 15, 107-115.
- Garg, K.L. and S. Dhawan, 1994, Biodeterioration of wall paintings, *Building Mycology*, 239-259.
- Garg, K.L., Jain, K.K., Mishra, A.K., 1995, Role of fungi in the deterioration of wall paintings, *The Science of the Total Environment*, 167, 255-271.
- Geneste, J.-M., 2008, Lascaux. *Conservation d'une grotte ornee*, Doss d'Archeol 15, 68-79.
- Han K.S., 2011, Making Technique Studies of Mural Paintings in the No. 6 Tomb of Songsanri, Gongju, *Journal of Conservation Science*, Vol.27 No. 4, 451-458.
- Herrera, L.H., Arroyave, C., Guiamet, P., Saravia, S.G., Videla, H., 2004, Biodeterioration of peridotite and other constructional materials in a building of the Colombian Cultural Heritage. *Int. J. Biodet. Biodeg.*, 53, 135-141.
- Hwang C.K., 2001, Restoration Techniques of the Modern Oil Paintings : Based on Lining Method, Master Thesis, Hanseo University.
- Jang E.H., 2002, Study on the comparison between traditional and modern materials used for conservation of the surface of clay wall painting, Master Thesis, Yong-in University.
- Jeong S.H., 2013, Removing biofilm using natural medicines to the stone cultural properties, Master Thesis, Chung-ang University.
- Kang S.Y., Choi Y.A., Chung Y.J., 2007, Studies of biological activities of tree extracts for conservation of wooden cultural properties, 28, 60-73.
- Karpovich-Tate, N. and Rebricova, N.L., 1991, Microbial communities on damaged frescoes and building materials in the Cathedral of the Nativity of the Virgin in the Pafnutii-Borovskii Monastery, *Int. Biodeter.*, 27, 281-296.
- Kigawa, R., Mabuchi, H., Sano, C., Miura, S., Investigation of biological issues in Kitora Tumulus during its restoration work (2), *Science for Conservation*, 45, 93-106 (2006)
- Kigawa, R., Sano, C., Mabuchi, H., Miura, S., Investigation of biological issues in Kitora Tumulus during its restoration work (3), *Science for Conservation*, 46, 227-233 (2007)
- Kigawa, R., Mabuchi, H., Sano, C., Miura, S., Biological issues in Kitora Tumulus during relocation work of the mural paintings (2007), *Science for Conservation*, 47, 129-134 (2008)
- Lee H.S., 2013, An analytical study of material characteristics for the Conservation of Korean Buddhist mural paintings, Doctor Thesis, Dongguk University.
- Lee M.Y., 2014, Conservation environmental assessment and microbial distribution of the Songsan-ri ancient Tombs, Gongju, Korea, *Journal of Conservation Science*, Vol.30 No.2, 169-179.
- Lee S.Y., Kim J.G., Baik B.J., Yang Y.M., Lee K.Y., Lee Y.H., Kim M.A., 2009, Antimicrobial effect of essential oils on oral bacteria, *Journal of the Korean Academy of Pediatric Dentistry*, Vol.36 No.1, 1-11.
- Lee T.H., 2003, A Study on the Mode of Expression Used in Four-Gods Mural Paintings of Goguryeo and Baekje in the Late Three Kingdoms Period, *Koguryo Balhae Research*, Vol.16, 287-310.
- Mubarik, N.R., Damayanti, E., Listyowati, S., 2003, Isolation and Characterization of Alcalotolerant Fungal Amylases from Cassava Starch Liquid Waste, *Biota jurnal ilmiah ilmu-ilmu hayati*, 7, 1-8.
- Negi, S., Gupta S., Banerjee, R., 2011, Extraction and Purification of Glucoamylase and Protease Produced by *Aspergillus awamori* in a Single-Stage Fermentation, *Food Technol. Biotechnol.*, 49, 310-315.
- Park, J.Y., 2013, A Scientific Analysis of glue in Chosun murals of temples by using FT-IR, Master Thesis, Konkuk University.
- Park S.M., Lee J.S., Park C.D., Lee J.H., Chung H.J., Yoo D.S., 2006, Antagonistic Bacterium *Bacillus subtilis* KMU-13 against Cucumber scab, *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576, *KSBB Journal*, Vol.21 No.1, 42-48.

- Park, S.W., Kim, Y.I., Chung, K.H., Kim, S.W., 2001, Quantitative analysis of the degree of silanization by the ninhydrin method and its application to the immobilization of GL-7-ACA acylase and cellulolytic enzyme, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 11, 199-203.
- Ramachandran S., Patel K.A., Nampoothiri K.M., Francis F., Nagy V., Szakacs G. and Pandey A., 2004, Coconut oil cake--a potential raw material for the production of α -amylase, *Bioresource Technology*, 93, 169-174.
- Ripka, K., Identification of micro-organisms on stone and mural paintings using molecular methods, Ph.D Thesis, University of Vienna, 2005.
- Rölleke, S., Witte, A., Wanner, G., Lubitz, W., 1998, Medieval wall painting-a habitat for archaea: identification of archaea by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) of PCR amplified gene fragments coding 16S rRNA in a medieval wall painting. *In. Biodet. Biodeg.*, 41, 85-92.
- Sampo, S. and Mosca A.M.L., 1989, A study of the fungi occurring on 15th century frescoes in Florence, *Int. Biodeter.*, 25, 343-353.
- Sire, M.-A., 2006, De l'élimination des champignons au constat d'état, *Monumental* 2, 68-75.
- Sen, S., Chakarabarty, S.L., 1984, Amylase from *Lactobacillus cellobiosus* isolated from vegetable wastage, *Journal of Fermentation Technology*, 62, 407-413.
- Somogyi, M., 1952, Notes on sugar determination, *Journal of Biological Chemistry*, 195, 19-23.
- Son S.H., 2002, Studies on the purification and properties of the collagenase from *Bacillus subtilis* JS-17, Master Thesis, Pusan National University.
- Suh M.C., 1997, In-situ Status and Conservation Strategy of the Songsanri Tomb Site, Basic Science Institute, Kongju University.
- Weirich, G., 1989, Investigations of the microflora of mural paintings. *Mater. Org.*, 24, 139-159.
- Yoo M.J., Kim Y.S., Shin D.H., 2006, Antibacterial Effects of Natural Essential Oils from Various Spices against *Vibrio* Species and Their Volatile Constituents, *Korean Journal of Food Science and Technology*, Vol.38 No.3, 438-443.
- Yoon Y.H., 2008, Sa-shin-do Mural Painting of No.6 Tomb in Kongju-Songsanri, *Korean History News*, Vol.33, 479-508.