

해인사 장경판전으로부터 분리한 곰팡이의 Xylanase 특성

홍진영* · 김영희 · 정미화 · 조창욱 · 최정은

국립문화재연구소 보존과학연구실

Characterization of Xylanase of Fungi Isolated from Janggyeong Panjeon in Haeinsa Temple

Jin-Young Hong*, Young-Hee Kim, Mi-Hwa Jung, Chang-Wook Jo and Jung-Eun Choi

Division of Conservation Science, National Research Institute of Cultural Heritage, Daejeon 305-380, Korea

(Received 21, September 2011., 1st Revised 25, October 2011., Accepted 8, November 2011)

ABSTRACT: This study was carried out to investigate occurrence of microbiales density and characteristics of xylanase produced by those in Janggyeong Panjeon. *Cladosporium cladosporioides* H1, *Penicillium citreonigrum* H3, *Penicillium toxicarium* H4, *Aspergillus versicolor* H6, *Acremonium alternarium* H7 isolated from Janggyeong Panjeon produced xylanase, which had different production rates and specialized activities in an acidic condition. *Cladosporium cladosporioides* H1, *Aspergillus versicolor* H6, and *Acremonium alternatum* H7 produced xylanase at a faster rate than other fungi. A xylanase of *Cladosporium cladosporioides* H1 and *Penicillium toxicarium* H4 showed a high thermostability in an acidic condition. As results, this study may lead to the development of a strategy for preservation of organic cultural heritages.

KEYWORDS: Activity of Xylanase, Airborne, Janggyeong Panjeon, Xylan

서 론

우리나라 문화재 중에는 지류, 섬유 및 목재와 같은 유기질 문화재가 상당수 차지하고 있다. 이러한 문화재들은 재질 특성상 곤충 및 미생물에 의한 생물학적 손상을 받기 쉬우며, 일단 생물피해가 시작되면 문화재 자체 재질이 잠식되어 손실되고 결국에는 소멸되므로 두 번 다시 복구할 수 없는 문화유산이 된다는 것을 유의할 필요가 있다 (한, 2005).

이러한 유기질 문화재는 그 주성분 요소가 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 그리고 리그닌으로 되어 있다. 이 중에서 헤미셀룰로오스는 셀룰로오스와 달리 결정성이 부족하고 목재의 강도에는 크게 기여하지 않지만 미생물에 의해 먼저 분해되거나 공격 받으며 셀룰로오스와 리그닌의 결합에 있어서 중요한 역할을 한다 (김 등, 2004). 여러 종류의 당이 다양하게 결합하는 양식을 지니고 있는 heteropolymer이며, 침엽수재와 활엽수재에 따라 구성 성분이 다르다는 점에서 셀룰로오스와 차이가 있다.

이러한 헤미셀룰로오스의 대표적인 다당류는 xylan이며 xylanase는 xylan을 가수분해하는데 가장 중요한 역할을 한다 (Dekker *et al.*, 1985). Xylanase는 미생물이 세포밖으로 분비하는 extracellular enzyme중의 하나로서 곰팡이와 세균과

같은 미생물들은 이러한 효소들을 분비하여 xylan을 분해시킬 수 있다. 특히, 곰팡이는 생물열화를 일으키는 주요 미생물로서 다양한 환경조건에 우수한 내성력을 지니고 있으며 박테리아나 방선균보다 낮은 습도에서도 잘 성장할 수 있다 (Kowalik, 1980).

본 연구에서는 경상남도 합천 해인사(海印寺)에 위치하고 있는 장경판전에서 내부 온습도를 측정하고 미생물 조사를 실시하였으며 조사를 통해 분리된 곰팡이들이 생산하는 xylanase의 특징에 관해 조사하였다. 장경판전은 고려시대에 만들어진 팔만여장의 대장경판 보관용 건물이며 장경판전과 대장경판은 각각 세계 문화유산과 세계 기록 유산으로 지정되었다. 장경판전은 자연의 조건을 이용하여 설계한 합리적이고 과학적인 점 등으로 인해 대장경판을 지금까지 잘 보존할 수 있었다고 평가받고 있으며 이는 문화재 보존을 위해 힘쓴 선조들의 지혜를 엿볼 수 있게 한다. 앞면 15칸, 옆면 2칸 크기의 두 건물을 나란히 배치하였는데, 남쪽 건물은 '수다라장'이라 하고 북쪽의 건물은 '법보전'이라 한다. 서쪽과 동쪽에는 앞면 2칸, 옆면 1칸 규모의 작은 서고가 있어서, 전체적으로는 긴 네모형으로 배치되어 있다. 보관 기능을 위해 창고의 크기를 남쪽과 북쪽을 서로 다르게 하고 각 칸마다 창을 내어 통풍이 잘 되게 하였으며 안쪽 흙바닥 속에 숯과 헛가루, 소금을 모래와 함께 차례로 넣음으로써 습도를 조절하도록 하였다 (박, 1999).

*Corresponding author <E-mail : hjy2009@naver.com>

그럼에도 불구하고 오랜 세월이 지나면서 내부 환경에 다양한 오염인자들이 축적되었고 그 중에서 특히, 미생물에 의한 영향이 점차 증가하고 있다. 장경판전과 대장경관은 목재로 이루어진 유기질 문화재로서 미생물에 의한 피해를 받을 가능성이 크다.

장경판전의 미생물 피해 조사에 대해 보고된 연구로는, 이 (1996)는 장경판전의 실내에 부유하는 곰팡이류를 동정하는 내용으로 미생물에 의한 생물열화 가능성을 조사하였으며 김 과 한 (2007)은 장경판전의 구조부재 중 큰 기둥과 실내 판가 기둥의 생물적 열화특성에 대해 보고한바 있다. 그 결과, 장경판전의 큰 기둥에서 초석에 접촉한 부위에서 미생물에 의한 부후현상이 나타났고 대부분 셀룰로오스 분해로 인해 표면에 나타나는 섬유에 직각방향으로의 균열로 갈색부후의 특징과 리그닌 성분이 대부분 분해되는 백색 부후의 특징을 보였다. 또한 실내 판가의 경우 표면 오염균에 의한 피해도 극심한 것으로 나타났다 (김 등, 2007).

이와 같이 미생물에 의한 생물학적 손상이 심하게 발생하는 실정이지만 국내 보존기술 분야 중 미생물에 대한 보존 기술 분야는 초보적인 수준이라고 할 수 밖에 없다. 문화재에 미생물이 미치는 영향은 막대하며 문화재 보존분야에서 미생물에 의한 오염과 손상은 보존 장소의 습기와 온도, 먼지나 재료의 영양원이 되는 성분에 따라 다양하게 이루어지고 있다. 따라서 보존관리 차원에서 볼 때 다른 요인에 비하여 생물학적 손상과 그에 따른 보존대책에 비중을 두어 고려해야 하며 이를 위해 문화재의 미생물에 대한 피해조사, 손상과정 및 미생물 방제 등의 연구가 바탕이 되어야 할 것이다.

따라서 우리는 유기질 문화재의 보관처에 존재하고 있는 미생물들의 특징을 조사하였다. 또한 장경판전과 팔만대장경판으로 부터 수집한 미생물 중에서 유기질 문화재에 손상을 줄 가능성이 높은 미생물들을 순수 분리하였으며 xylan을 분해하는 균주를 선별하여 각각의 효소 활성과 특성을 조사하였다. 이는 유기질 문화재의 피해 미생물 방제를 위한 기초 자료로서 제공하고자 한다.

재료 및 방법

균주의 분리 및 배양

경상남도 합천 해인사에 있는 장경판전의 부유 및 대장경판 표면으로부터 멸균된 면봉과 공기포집기 (M air T, Millipore, USA)를 이용하여 미생물을 채취하여 분리·동정 하였다. 포집된 미생물들은 각각의 개체수 (CFU/100 L : colony forming unit per 100 L)를 세어 기록하였으며 간단한 기질 테스트를 통해 대표 균주를 선별한 다음, 선별된 균주들을 (주) 제노텍에 의뢰하여 다음과 같은 방법으로 염기서열을 분석하였다. 각 균주에서 추출한 genomic DNA를 ITS 1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)과 ITS 4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) primer를 이용하여 PCR하였으며, ABI BigDye terminator cycle sequencing

ready reaction kit v3.1 (ABI)를 이용한 cycle sequencing 방법으로 염기서열을 해독하였다 (3730XL DNA Analyzer, ABI). 각각의 primer로 분석된 2개의 결과를 하나의 contig로 assemble한 다음, BLAST search하여 순수 분리된 미생물들을 동정하였다. 또한 미생물들의 형태학적 특징을 알아보기 위해 SEM (Scanning Electron Microscopy: JSM-5910LV, Jeol, Japan)을 이용해 관찰하였다. 시료 준비는 배양중인 균주들의 포자를 마운트에 미리 붙인 carbon tape에 묻힌 다음, gold coating하여 관찰하였다. 또한, 분리된 균주들이 생산하는 xylanase의 특성을 비교하기 위해 *Aspergillus niger* KACC 43547를 함께 이용하였다. *Aspergillus niger*는 문화재의 손상을 일으키는 대표 생물열화원으로 알려져 있으며 현재, 다양한 유기질 문화재 및 동산 문화재 보관처의 훈증 처리를 확인하는 공시균으로 이용되고 있다.

포자 현탁액 준비 및 조효소액 추출

시험 균주를 액체 배양하기 위해 포자 현탁액을 준비하였다. PDA (potato dextrose agar, Difco)를 이용한 사면배지에서 각 균주를 접종한 다음 28°C에서 배양하였다. 포자가 넓게 퍼져있으면 멸균수를 첨가하여 유리봉을 이용해 균의 포자를 긁어 수거한 다음 멸균된 이중의 거즈로 여과하여 포자현탁액을 준비하였다. 제조된 포자 현탁액의 포자수는 haemocytometer (Marienfeld, Germany)를 이용하여 광학 현미경하에서 세었으며 모든 균주에 대해 각각 3×10^6 spores로 맞추어 액체 배양에 이용하였다.

Xylanase assay를 하기 위해 0.5% oat spelt xylan이 첨가된 액체배지 (0.1% yeast extract, 0.07% K_2HPO_4 , 0.02% KH_2PO_4 , 0.1% $(NH_4)SO_4$, 0.11% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, pH 7.0) 50 ml에 포자현탁액을 접종하여 28°C에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 배양 일에 따라 일부 채취하여 xylanase 활성을 측정하였다. 채취한 배양액은 4°C에서 17,000 rpm으로 10분 동안 원심 분리하여 균체를 제거한 후 상등액을 수거하여 효소 활성을 측정하는데 이용되었다.

Xylanase activity 측정

Xylanase activity는 oat spelt xylan를 기질로 하여 효소 반응을 한 후에 유리된 환원당을 3,5-dinitrosalicylic (DNS) 방법 (Miller, 1959)으로 다음과 같이 정량화함으로써 측정하였다. 1% (w/v) oat spelt xylan 용액 500 μ l와 100 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0) 400 μ l를 첨가하여 50°C에서 1분 동안 예열시킨 다음, 조효소액 100 μ l를 각각 첨가하여 50°C에서 30분 동안 반응시켰다. DNS 시약을 3 ml 첨가하여 반응을 중지시키고, 끓는 물에서 5분 동안 발색시켰다. 그런 다음, 찬물에서 식힌 후에 20 ml의 증류수를 첨가하여 잘 섞어준 후 UV spectrophotometer (UV-2550, Shimadzu)를 이용하여 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. xylose를 표준시료로 사용하여 동일 조건하에서 발색시켜 조사한 흡광도와

비교함으로써 유리된 환원당의 양을 결정하였다 (Khasin *et al.*, 1993). Blank는 조효소액을 끓여서 이용하였다.

조효소액의 열안정성

효소 활성에 있어 최적의 pH를 알아보기 위해 pH 5.0, 7.0, 9.0의 조건에서 활성을 측정하였다. 각각의 버퍼는 citrate buffer, sodium phosphate buffer와 glycine-NaOH buffer를 사용하였으며 그 외의 조건은 동일하게 수행하였다. 또한, 조효소액의 열안정성을 알아보기 위해, 55°C, 60°C와 65°C의 온도에서 각각 1, 2, 3시간 동안 처리한 다음, 잔존 효소의 활성을 측정함으로써 pH와 열에 대한 안정성을 조사하였다.

결과 및 고찰

미생물 조사

2008년 8월에 경상남도 합천군에 위치하고 있는 해인사의 장경판전과 대장경판으로부터 미생물을 포집하여 대표 미생물을 분리하였다. 미생물 조사는 대장경판이 보관되고 있는 법보전과 수다라장 및 외부환경에서 이루어졌으며 21 사이트의 대장경판 표면으로부터 부착 미생물을 채취하고 장경판전 내 12 사이트를 지정하여 공기 중 부유 미생물을 포집하였다. 그 결과, 다양한 박테리아와 곰팡이가 발견되었으며 미생물의 개체수 (Colony Forming Unit)는 위치에 따라 다르게 나타났다.

법보전의 경우, 5개의 사이트에서 16번의 air sampling한 결과, 평균 28.7 ± 31.13 CFU/100L가 포집되어 위치에 따라 많은 편차를 보였고, 동수다라장과 서수다라장은 각각 2사이트에서 6번의 air sampling으로 17.5 ± 6.28 CFU/100L와 16.3 ± 3.56 CFU/100L의 개체수가 조사되었다. 또한, 수다라장과 법보전의 외부환경에서도 실시하였는데 총 9번의 air sampling을 통해 평균 17.22 ± 5.43 CFU/100L의 미생물이 포집되었다. 이때의 최저와 최고의 온·습도는 각각 다음과 같다. 법보전에서의 온도는 최저 18.9°C, 최고 20.1°C를 나타냈으며 상대습도는 최저 57%, 최고 77%로 조사되었고 동수다라장의 온도는 19.8°C와 21.4°C, 상대습도는 55%와 76%였으며 서수다라장의 온도는 20.4°C와 21°C, 상대습도는 58%와 68%인 것으로 조사되었다 (정 등, 2008). 일반적으로 목재 유물의 보존에 적합한 온·습도 범위는 18~20°C와 50~65%인 것으로 알려져 있다 (동산문화재의 보존과 관리, 2004). 특히, 습도는 목재유물의 보존에 있어서 매우 중요한 인자가 되는데, 너무 높으면 썩기 쉽고 너무 낮아도 뒤틀리는 특성이 있어 적정치를 지속적으로 유지해야한다. 미생물 조사 당시 외부 온도는 평균 23.5°C로 20°C 안팎으로 일정하게 유지되는 내부 환경보다 3~4°C가량 높았다. 이 조사로 건물 벽에 위아래로 다른 크기의 창살이 공기의 흐름을 원활하게 하여 환기를 시켜주고 내부의 온도를 낮게 유지할 수 있게 한다는 보고를 확인할 수 있었다 (박, 1999). 또한, 장경판전 주변 환경에서 상대습도는 평균 57%로 조사되어 법보전과

수다라장(동)의 내부 공기의 습도가 오히려 높은 것으로 나타났다. 특히, 법보전과 수다라장(동)의 동북향쪽에서 상대습도가 75% 내외로 측정되었고 보다 많은 미생물이 포집된 것으로 확인되었다. 이러한 결과는 김 등 (2007)이 법보전의 전면보다는 후면에 위치한 판가 부재의 부후가 심하고 판가기둥에 표면오염이 나타났고 북향에 위치한 수다라장의 기둥에서 생물적 열화가 관찰되었다고 보고한 내용을 뒷받침할 수 있는 조사라고 사료된다.

이렇듯 유기질 문화재의 보존 환경에 있어서 공기 중 습도가 높아지면 유기질의 함수율이 증가하면서 미생물의 번식이 가능하다. 따라서 유기질 문화재의 보존에 있어서 일차적으로 요구되는 일은 온·습도 조건을 일정하게 유지시켜 주는 것이라고 할 수 있다.

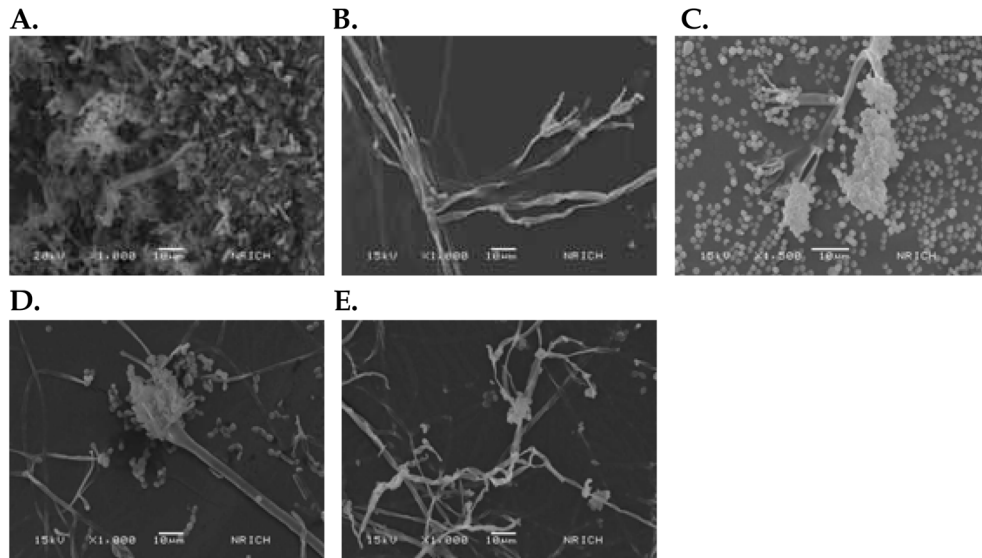
Xylanase 생산균의 분리 및 동정

포집된 미생물들 중에서 xylan을 분해시켜 유기질 문화재를 손상시킬 가능성이 있는 미생물을 분리하기 위해 선별과정을 수행하였다. 포집된 미생물들을 단일 종으로 순수 분리한 다음, xylan이 포함된 평판 배지에서 congo red 방법 (홍 과 정, 2009)에 의해 투명환이 생성되는 균주를 선별하였다. 선별된 균주는 xylanase 생산성 미생물로서 5종류의 곰팡이들이며 각각 H1, H3, H4, H6와 H7로 명명하였다. 이들을 동정하기 위해서 ITS (Internal transcribed spacer) region primers를 이용하여 PCR을 통해 염기서열을 확인하였다. 다른 균주들의 ITS 영역의 염기서열들과 비교한 결과, 각각 *Cladosporium cladosporioides*, *Penicillium citreonigrum*, *Penicillium toxicarium*, *Aspergillus versicolor*와 *Acremonium alternatum*들과 99% 이상의 상동성을 나타내었다. 따라서 각각을 *Cladosporium cladosporioides* H1, *Penicillium citreonigrum* H3, *Penicillium toxicarium* H4, *Aspergillus versicolor* H6, *Acremonium alternatum* H7로 최종 동정하였으며, KACC (Korean Agricultural Culture Collection)에 기탁하여 등록 번호를 부여받았다. 분리된 미생물들의 특허 기탁 번호와 채취된 장소 및 채취 당시의 온·습도를 Table 1에 표시하였다.

또한, 분리한 곰팡이들의 형태학적 특성을 주사 전자현미경(Scanning Electron Microscopy)을 이용하여 관찰하였으며 사진은 Fig. 1에 나타내었다. 일반적으로 알려져 있는 곰팡이의 형태와 비교했을 때 특이적인 부분은 발견하지 못했다. *C. cladosporioides* H1의 포자는 타원형의 형태로 연쇄상으로 형성되어 있었으며 *P. citreonigrum* H3와 *P. toxicarium* H4은 분생자병 끝에 phialide(경자)가 빗자루 모양으로 배열되어 있으며 두 균주는 유사한 형태를 보였다. *A. versicolor* H6은 분생자병 끝에 정낭(vesicle)이 있고 그 위에 phialide와 분생자가 착생하여 동그란(곤봉) 형태를 이루고 있었다. 또한, *A. alternatum* H7의 포자는 H1과 유사하게 타원형 형태를 나타내었으며 균사는 큰 줄기에서 많은 양의 분지가 뻗어나가 복잡하게 얽혀있는 특징을 관찰하였다.

Table 1. Fungi isolated from the Janggyeong Panjeon

Fungi	Reg. No.	Sources(Site)	Temperature (°C)	Humidity (%)	Density (%)
<i>C. cladosporioides</i> H1	KACC93098P	Beopbojeon, between 43 and 44 shelf	18.9	71	36.8
<i>P. citreonigrum</i> H3	KACC93100P	Beopbojeon, 4543 block in 46 shelf	-	-	10.5
<i>P. toxicarium</i> H4	KACC93101P	Beopbojeon, the front of 4 shelf	20.1	59	15.8
<i>A. versicolor</i> H6	KACC93103P	Sudarajang (east) the front of 87 shelf	19.8	76	5.3
<i>A. alternatum</i> H7	KACC93104P	Beopbojeon, the front of 4 shelf	20.1	59	5.3

**Fig. 1.** Observation and structure of fungi by SEM. A: *Cladosporium cladosporioides* H1; B: *Penicillium citreonigrum* H3; C: *Penicillium toxicarium* H4; D *Aspergillus versicolor* H6; E: *Acermonium alternatum* H7.

성장곡선 및 pH 변화

분리된 미생물들의 생태를 알아보기 위하여 균주들의 성장 곡선 및 pH 변화를 관찰하였다. 균주의 성장을 관찰할 때 미생물 집단의 생체량 (biomass) 혹은 세포수를 측정함으로써 성장을 평가하는데, 본 연구에서는 균체의 건조 중량을 측정하여 생체량으로 삼고 pH 측정과 함께 성장패턴을 관찰하였다.

분리된 대표 균주들을 potato dextrose broth 배지 (pH 5.1)에 접종하여 28°C에서 150 rpm으로 30일 동안 진탕배양하면서 시료를 채취하였다. 각 균주의 배양액의 상등액은 pH를 측정하고 균체는 60°C에서 건조시켜 건조중량을 측정하여 성장곡선의 지표로 삼았다.

그 결과, *P. toxicarium* H4와 *P. citreonigrum* H3은 배양을 시작하면서 pH가 조금씩 감소하다가 각각 10일과 15일 이후로 증가하였고 이 시기에 균체 증식이 가장 활발하였다. *P. toxicarium* H4는 배양 후 10일이 지났을 때 배양액의 pH가 3.21까지 감소했다가 15일에 pH 8.35으로 급격한 증가를 보였다. 이 시기에 많은 xylanase (3.36 unit)를 생산하였으며 그 활성도가 지속적으로 증가하면서 유지되었다. *P. citreonigrum* H3은 균체의 성장이 최고에 이른 배양 15일째에 pH 3.82에 이르렀다가 이후 증가하였으며 이 시기에

xylanase의 활성 (0.411 unit)이 증가하였다. 이들은 더딘 속도로 xylanase를 생산하였지만 다른 균주들에 비해 두 배 이상의 높은 활성도를 나타내어 유기질에 손상을 줄 가능성이 클 것으로 사료된다.

반면, *A. alternatum* H7은 다른 균주들에 비해 적은 양의 균체를 생산하였는데 배양 시작 후 5일에서 20일 까지 50 mg 정도의 균체량을 유지하면서 성장하였다. 또한, xylanase 활성도 조사 결과, 배양 후 5일에 5.03 unit의 최대 활성도를 나타냈으며 30일까지 지속되었다. 그리고 배양액의 pH는 앞서 설명한 균주들과는 달리 배양 직후 pH 6.44까지 증가하다가 3일 이후부터 감소하기 시작하여 배양 20일째에 pH 4.3에 이르렀으며 이후 다시 증가하여 30일째에는 pH 8.30까지 증가하는 양상을 나타내었다. *A. versicolor* H6은 균체의 성장이 최고에 이른 배양 7일에 pH 4.76까지 낮아졌다가 이후 지속적으로 증가하였다. 또한, 7일째 3.73 unit이었던 xylanase의 활성도는 이후 2배 이상 증가하여 15일째에는 8.42 unit의 활성도를 나타내었으며 이후로도 어느 정도 지속되었다. 마지막으로 *C. cladosporioides* H1의 경우, 균체의 성장이 가장 빠르게 이루어졌으며 배양액의 pH가 다른 균주들과는 다르게 배양 직후부터 계속적으로 증가하였다. 배양 3일째까지 pH가 가장 빠르게 증가하였는데

(pH 5.1에서 pH 6.47) xylanase의 활성도 역시 배양 3일째 2.27 unit을 나타내어 가장 높은 활성도를 나타내었다. *C. cladosporioides* H1는 다른 균주들보다 빠른 증식으로 많은 양의 균체를 생산했지만 xylanase의 활성도는 다른 균주들의 수준에 미치지 못하였다. *C. cladosporioides* H1과 함께 *A. versicolor* H6와 *A. alternatum* H7는 다른 균주들에 비해 배양 시작 후 빠른 속도로 xylanase를 생산하는 것으로 조사되었다. 이들 미생물들은 서식 환경이 조성된다면 유기질에 부착하여 빠르게 문화재를 손상시킬 가능성이 높을 것으로 사료된다.

이처럼 *C. cladosporioides* H1를 제외한 나머지 시험 균주들은 균체의 증식이 이루어지면서 배양액의 pH는 점차 낮아지는 전형적인 생장 패턴을 나타내었다. 또한, 배양일에 따라 xylanase 활성도를 배양액의 pH와 비교했을 때, 배양액의 pH가 다시 올라가는 시점에 xylanase의 활성도 역시 함께 증가하는 양상을 나타내었다. 이와 같은 균주들의 성장곡선과 pH 변화 및 xylanase 활성도를 Fig. 2와 Fig. 3에 나타내었다.

Xylanase 활성도에 대한 온도의 영향

장경판전 내부 환경이 20°C 내외의 온도로 유지되고 있는 조사 결과를 바탕으로 동일한 온도 조건에서 분리된 미생물들을 배양하거나 효소 반응을 시킨 다음 xylanase의 활성도를 조사하였다. 그 결과, 20°C와 28°C에서 배양하여 각각 얻어진 xylanase의 활성도는 28°C에서 배양한 미생물의 활성도

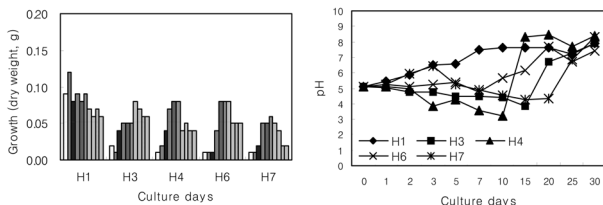


Fig. 2. Growth and pH of test fungi in PDB media at pH 5.1, 28°C for 30 days. H1: *Cladosporium cladosporioides* H1; H3: *Penicillium citreonigrum* H3; H4: *Penicillium toxicarium* H4; H6: *Aspergillus versicolor* H6; H7: *Acermonium alternatum* H7.

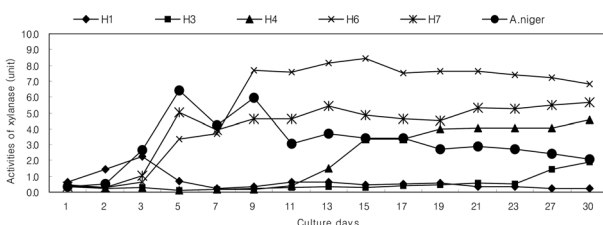


Fig. 3. Change on activities of xylanase produced from test fungi during 30 days in 0.5% xylan media at pH 7.0. H1: *Cladosporium cladosporioides* H1; H3: *Penicillium citreonigrum* H3; H4: *Penicillium toxicarium* H4; H6: *Aspergillus versicolor* H6; H7: *Acermonium alternatum* H7; *A. niger*: *Aspergillus niger* KACC 43547.

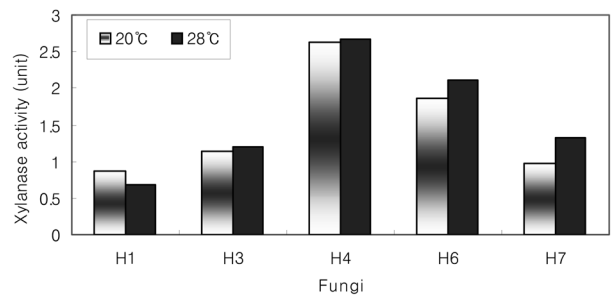


Fig. 4. Xylanase activities of fungi in 0.5% xylan media (pH 7.0) at 20°C and 28°C for 5 days. H1: *Cladosporium cladosporioides* H1; H3: *Penicillium citreonigrum* H3; H4: *Penicillium toxicarium* H4; H6: *Aspergillus versicolor* H6; H7: *Acermonium alternatum* H7.

가 조금 더 높았지만 비교적 큰 차이를 보이지 않았다 (Fig. 4). 그러나 다른 균주들과는 다르게 *C. cladosporioides* H1은 20°C에서 배양했을 때 28°C에서보다 0.183 unit의 활성도가 더 높게 측정되었다. 이는 다른 곰팡이들에 비해 *C. cladosporioides* H1가 장경판전의 내부 온도 조건에서 생존하기에 더욱 적합한 환경이 될 수 있다고 생각된다. 이는 박 등(2006)은 *Cladosporium* sp.의 최적 온도 조건은 20°C 내외라고 보고한 내용과 유사하며 실제 장경판전 부유 미생물 중에서 *C. cladosporioides* H1이 차지하는 비율이 36.8%로 가장 높았음을 뒷받침 하는 결과이다 (Table 1).

또한, 20°C와 28°C에서 배양하여 분리한 xylanase를 20°C에서 반응시킨 결과, 50°C에서 반응시킨 활성도와 비교하였다. 그 결과 *C. cladosporioides* H1은 각각 66.45%와 99.18%, *P. citreonigrum* H3은 94.23%와 99.37%, *P. toxicarium* H4는 63.26%와 81.69%, *A. versicolor* H6은 79.18%와 66.41% 그리고 *A. alternatum* H7는 72.85%와 66.73%의 활성도를 나타내어 저온에서도 강한 분해력을 갖는 효소를 생산하였다. 따라서 장경판전에서 분리한 미생물들은 그 환경에 생존하면서 문화재를 손상시킬 가능성이 클 것으로 생각되며 다른 환경요인의 조절을 통해 이들의 발생 및 증식을 제어해야 할 것으로 사료된다.

Xylanase 활성도에 대한 pH의 영향

xylanase의 활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위하여 세 가지의 pH 조건 (pH 5.0, 7.0, 9.0)에서 효소 활성을 측정하였다. 그 결과, *A. alternatum* H7의 xylanase 활성도는 pH 7.0에서 높았던 반면, 나머지 모든 균주들은 pH 5.0에서 가장 높은 xylanase 활성도를 나타냈다. pH 5.0에서는 pH 9.0의 조건보다 2배에서 최대 30배 가까이 높았다. 시험균주들 중에서 *P. citreonigrum* H3과 *P. toxicarium* H4가 가장 높은 xylanase 활성도를 보였으며 이들의 활성도는 대조균으로 이용한 *A. niger*의 xylanase 보다 각각 1.36배, 1.45배가 높은 값이다 (Table 2).

미생물이 생산하는 xylanase의 최적 pH를 조사한 연구

Table 2. Effect of pH reaction on xylanase activity in test fungi

Fungi	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0
<i>C. cladosporioides</i> H1	3.79	2.88	0.41
<i>P. citreonigrum</i> H3	7.17	3.38	0.78
<i>P. toxicarium</i> H4	7.66	4.05	0.26
<i>A. versicolor</i> H6	3.25	2.69	1.63
<i>A. alternatum</i> H7	1.61	2.48	1.28
<i>A. niger</i> KACC 43547	5.26	3.35	1.84

보고서에 따르면, 윤 등 (2007)은 *F. palustris*가 생산하는 xylanase의 최적 pH를 측정된 결과 4.0~5.0범위의 pH에서 최적의 활성도를 확인하였으며 배 와 서 (1989)는 XB-33 효모의 xylanase 역시 4.0~5.0의 약산성 범위에 있다고 보고하였다. Wong 등 (1988)은 대부분의 균류가 생산하는 xylanase의 최적 pH는 일반적으로 산성 pH를 나타낸다고 하였다. 그러나 이밖에도 *A. nidulans* KK-99 (pH 8.0 : Taneja *et al.*, 2002), *Streptomyces* sp. S-510 (pH 8.0 : Rhyum *et al.*, 1993) 및 *A. terreus* (pH 7.0 : Ghane *et al.*, 2000)과 같이 약알칼리성 및 중성 pH를 갖는 xylanase와 *Cryptococcus* sp. (pH 2.0 : Iefuji *et al.*, 1996) 및 *Penicillium* sp. (pH 2.0 : Kimura *et al.*, 2000)과 같이 강산성 pH를 갖는 xylanase에 관한 연구도 보고되었다.

이렇게 미생물에 의해 세포 밖으로 생산되는 xylanase는 그 활성이 pH 조건에 많은 영향을 받는다. 장경판전에서 분리된 곰팡이의 xylanase는 대부분 염기성인 조건에서 그 활성이 저해되는 것으로 나타났으며 일반적으로 곰팡이는 약산성인 조건에서 잘 생장하는 것으로 알려져 있다. 따라서 유기질 문화재의 보존환경에서 미생물의 발생을 억제하고 좀 더 나은 문화재의 보존 관리를 위해서는 미생물의 특성을 잘 활용하는 것도 좋은 방법이 될 수 있다.

Xylanase의 열안정성

각 균주에서 생산된 xylanase가 온도 pH에 대해 얼마나 안정한지를 알아보았다. 이를 위해 각 세 가지의 pH 조건으로 55, 60와 65°C에서 각각 1, 2, 3시간 동안 처리한 후 잔존 활성을 측정하였으며 그 결과는 Fig. 5에 나타내었다. 60°C 이상의 열처리에서는 모든 균주의 잔존 효소 활성이 pH와 관계없이 50% 이하로 감소하였다. pH 5.0에서 비교적 안정한 *C. cladosporioides* H1과 *P. toxicarium* H4의 xylanase 활성은 55°C에서 2시간 이상 처리 후, 잔존 활성이 60% 이하로 감소하였다. 또한, 시험균주 중에서 *P. citreonigrum* H3의 xylanase는 pH 5.0에서 가장 높은 활성도 (7.17 unit)를 나타냈지만 55°C에서 1시간 이상을 처리했을 때 28%만이 활성이 유지되었다. 반면, pH 9.0에서는 76%의 활성이 유지되어 열에 대한 xylanase의 안정성이 알칼리성 조건에서 높게 유지되는 것으로 나타났지만, 60°C이상의 고온에서 2시간 이상의

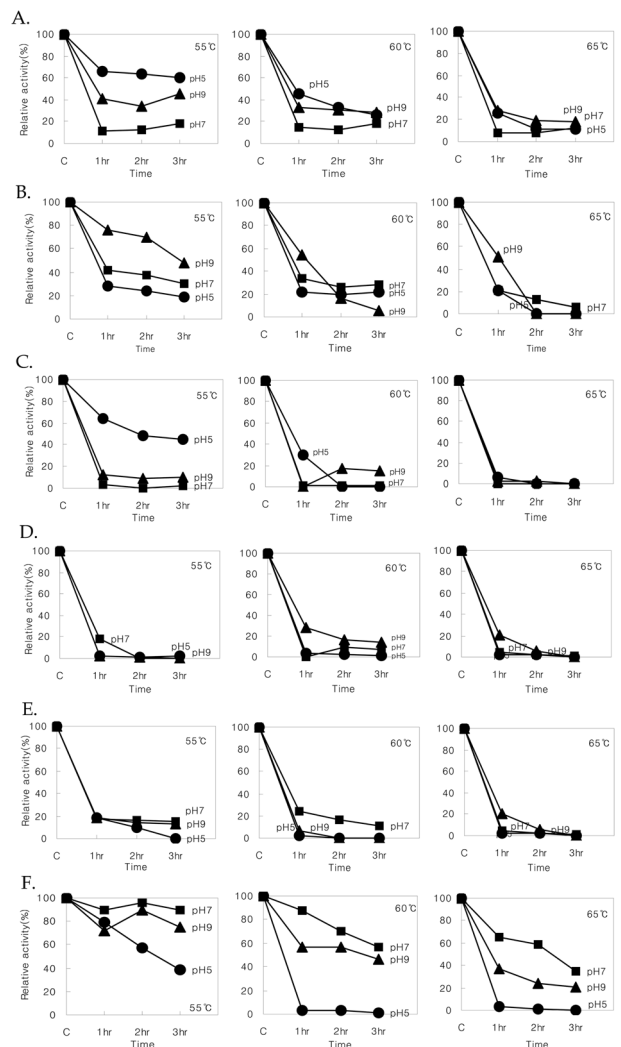


Fig. 5. Thermal stability of xylanase determined at 55°C, 60°C, 65°C at pH 5.0 (Circle symbols), pH 7.0 (Square symbols), pH 9.0 (Triangle symbols). A: *Cladosporium cladosporioides* H1; B: *Penicillium citreonigrum* H3; C: *Penicillium toxicarium* H4; D: *Aspergillus versicolor* H6; E: *Acetmonium alternatum* H7; F: *Aspergillus niger* KACC 43547.

열처리를 한 후 xylanase의 잔존활성이 급격히 감소하는 것을 알 수 있었다. 그러나 pH 9.0 조건에서 자체 xylanase 활성이 낮기 때문에 상대적인 잔존활성도(%)가 높은 값을 나타내도 고온에서 열처리 후 pH 7.0에서 남아있는 활성도는 pH 9.0에서 보다 3배 가까이 높은 값으로 유지되는 것으로 나타났다. 또한, *P. citreonigrum* H3과 함께 pH 5.0에서 높은 활성을 보인 *P. toxicarium* H4의 경우에는 55°C에서 3시간 처리 후에도 산성인 조건에서 45%이상의 활성을 유지한 반면, 다른 pH에서는 55°C이상의 열에 대부분 xylanase의 활성을 잃었다. *A. versicolor* H6와 *A. alternatum* H7의 xylanase는 열에 아주 약한 특성을 보여 잔존 활성이 대부분 20%를 밑도는 것으로 나타났다. 대조군으로 이용한 *A. niger*의

xylanase는 pH가 높아질수록 낮은 활성도를 보였지만 열처리 후 잔존활성을 비교한 결과, pH 7.0 > pH 9.0 > pH 5.0의 순으로 열에 대한 안정도가 감소하였다. pH 7.0에서는 65°C에서 2시간 처리 후에도 60%의 잔존활성을 나타내어 산성에 비해 중성에서 보다 안정성을 유지하는 것으로 나타났다.

적요

팔만대장경판과 이를 보존하고 있는 건물인 장경판전으로부터 미생물조사를 실시하였고 조사를 통해 분리된 미생물들이 생산하는 xylanase의 특성을 조사하였다. 조사 당시에 장경판전의 내부 온도는 20°C 안팎으로 적절하게 유지되고 있었지만 상대습도는 최대 80%에 이르는 곳도 있어 미생물과 같은 생물적 열화원의 발생으로 문화재의 손상 가능성이 있을 것으로 생각된다. 분리된 5종류의 미생물인 *Cladosporium cladosporioides* H1, *Penicillium citreonigrum* H3, *Penicillium toxicarium* H4, *Aspergillus versicolor* H6, *Acremonium alternatum* H7은 모두 재질의 표면을 오염시키고 유기질 (cellulose, xylan, lignin)을 분해시킬 수 있는 곰팡이였다. 이들은 20°C의 저온에서도 성장이 활발하여 xylanase의 생산도 활발히 이루어졌다. 이들에 의해 생산되는 xylanase는 균주의 종류에 따라 생산 속도의 차이가 있었으며 대부분 산성인 조건에서 xylan을 효과적으로 분해하는 것으로 조사되었다. 또한, *Cladosporium cladosporioides* H1와 *Penicillium toxicarium* H4의 xylanase는 산성 조건에서 열에 안정한 것으로 나타났지만 그 외 균주들이 생산한 xylanase는 열에 대한 안정성은 높지 않은 것으로 조사되었다. 이러한 조사 결과는 문화재의 보존 환경의 조절이나 보존제 개발을 하는데 기초자료로 활용될 수 있을 것으로 보이며 생물학적 열화를 일으키는 미생물을 제어할 수 있는 대안을 마련하는데 도움을 줄 것으로 기대된다.

감사의 글

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

참고문헌

- 김영숙, 윤정희, 강호양, 박상진. 2007. 목조문화재 열화 및 보존 기술에 관한 연구 (제1보), 장경각 구조부재중 큰기둥의 생물적 열화 특성. 목재공학. 35:51-63.
- 김영숙, 한상미. 2007. 목조문화재 열화 및 보존기술에 관한 연구 (제2보), 장경각 구조부재중 실내판가 기둥의 생물적 열화 특성. 목재공학. 35:64-72.
- 김윤수, 김규혁, 김영숙. 2004. 목재보존과학. 전남대학교 출판부. pp. 29-32.
- 문화재청. 동산문화재의 보존과 관리. 2004. 문화재청 · 국립문화재연구소. pp 18.
- 박상진. 1999. 다시 보는 팔만대장경판 이야기. (주)윤송신문사. pp 95-102.
- 박성민, 이준석, 박치덕, 이정훈, 정혁준, 유대식. 2006. 검은별무늬병균 *Cladosporium cucumerinum* KACC 40576에 대한 길항균주 *Bacillus subtilis* KMU-13의 선발 및 항진균 활성. 한국 생물공학회지. 21:42-48
- 배명애, 서정훈. 1988. Xylanase를 분비하는 효모 균주의 분리 및 성질. 한국미생물 · 생명공학회. 16:499-504.000
- 윤정준, 이영민, 최두역, 김영균, 김영숙. 2007. 벚꽃분해과정 중에 생산하는 *Fomitopsis palustris* 균체 외 Xylanase의 분리정제 및 효소 특성. 목재공학 35:159-165.
- 이태영. 1996. 고려대장경판 보존을 위한 기초학술 연구. 해인사 고려대장경 연구소.
- 장영훈. 2002. 셀룰라아제에 의한 지류 문화재의 분해. 한국 생물공학회. 17:549-554.
- 정용재, 임진아, 강소영. 2008. 해인사 장경판전 미생물 조사. 보존과학실. 국립문화재 연구소.
- 한성희. 2005. 보존과학 기초 연수교육 자료. 유기질 문화재 보존과 관리. pp. 40.
- 홍진영, 정미화. 2009. 유기질문화재로부터 분리한 생물학적 열화원에 대한 참나무 목초액의 항진균 활성 조사. 보존과학연구. 30:157-170.
- Dekker, R. F. H. 1985. Biodegradation of the hemicellulose. In *Biosynthesis and Biodegradation of Wood Components*. ed Higuchi. T. Tokyo: Academic Press. pp. 505-533.
- Ghanen, N. B., H. H. Yusef, and H. K. Mahrouse. 2000. Production of *Aspergillus terreus* xylanase in solid-state cultures: application of the Plackett Burman experimental design to evaluate nutritional requirements. *Bioresour. Technol.* 73:113-121.
- Iefuji, H., M. Chino, M. Kata, and Y. Iimura. 1996. Acid xylanase from yeast *Cryptococcus* sp. S-2: purification, characterization, cloning, and sequencing. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:1331-1338.
- Khasin, A., I. Alchanati, and Y. Shoham. 1993. Purification and characterization of a thermostable xylanase from *Bacillus stearothermophilus* T-6. *Appl. Environ. Microbiol.* 59:1725-1730.
- Kimura, T., J. Ito, A. Kawano, T. Makino, H. Kondo, S. Karita, K. Sakka, and K. Ohmiya. 2000. Purification, characterization and molecular cloning of acidophilic xylanase form *Penicillium* sp. 40. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 64: 1230-1237.
- Kowalik, R. 1980. Microbio deterioration of library materials. Part 1. *Restaurator.* 4:99-114.
- Kowalik, R. 1980. Microbio decomposition of basic organic library materials. Microbio deterioration of library materials. Part 2. *Restaurator.* 4:135-219.
- Miller, G. L. 1959. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31:426-428.
- Rhyum, Sun-Boon, Myeong-Kyu Kang, Pil-Jae Maeng, Hee-Moon Park, and Young-Ha Rhee. 1993. Purification and Characterization of Xylanase from Alkalophilic *Streptomyces* sp. S-510. *Kor. Jour. Microbiol.* 31:436-444.
- Taneja, K., S. Gupta, and R. C. Kuhad. 2002. Properties and application of a partially purified alkaline xylanase from an alkalophilic fungus *Aspergillus nidulans* KK-99. *Bioresour. Technol.* 85:39-42.
- Wong, K. K. Y., L. U. L. Tan, and J. N. Saddler. 1998. Multiplicity of β -1,4-xylanase in microorganisms, functions and applications. *Microbiol. Rev.* 52:305-317.