

종이의 산성화가 미생물의 분해능에 미치는 영향

Effect of the paper acidity on the cellulolytic activity of fungi

韓成熙 · 李奎植 · 鄭容在 · 李惠閔

Sung Hee Han, Kyu Shik Lee, Young Jae Chung and Hye Yun Lee

□ ABSTRACT The effect of pH on degradation of paper by some fungi, which able to degrade cellulose, was investigated. *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger* and *Penicillium nigulosum* were cultured at 28°C for 16 days in the selective medium (PH3, PH4, PH5, PH6, PH7, PH8, PH9, PH10, PHC) containing paper as substrate. Each paper was pretreated with each pH buffer (pH 3~pH 10, D.W.) prior to addition to the selective medium. Enzyme activities in the each culture medium were measured spectrophotometrically using C.M.C., Avicel, PNPG as the substrates for endoglucanase, exoglucanase and β -glucosidase, respectively. In all experimental fungi, the enzyme activities of PH3 and PH9 medium were usually much higher than those of other experimental groups. However in the PH6 medium, enzyme activity was lower than other groups. To analyze the concentration and pattern of protein in the each culture medium, the medium was concentrated by lyophilization. The protein concentration of PH3 and PH9 medium were relatively high (*T.koningii*; 6.31mg, 6.19mg, *A.niger*; 1.62mg, 1.96mg, *P.nigulosum*; 2.50mg, 2.73mg, respectively), but that of PH6 was relatively low. The protein pattern of each medium was analyzed by using SDS-PAGE and VDS Image Master Analysis Program. The concentrations of bands in the each lane were usually high at lane2 (PH3) and lane8 (PH9) and low at lane5 (PH6). Therefore, the increased cellulolytic activity of fungus against acidified paper could be result of structural change and deterioration of paper caused by being acidified.

I. 서 론

지류문화재의 보존환경이 부적절한 조건 특히 고온고습조건으로 되면 미생물에 의해 손상을 받게 된다는 것은 주지의 사실이다. 지류문화재에 미생물이 발생하게 되면 표면오염이나 지질의 변색 뿐만 아니라 종이섬유의 분해 및 지질을 경화시켜 서로 응고되거나 부서지게 만든다. 일반적으로 종이에 발생하는 사상균의 종류는 약 100여종이 알려져 있으며, 박테리아보다는 사상균에 의해 더 손상된다. 사상균중에는 *Candida*, *Monilia*, *Torula*, *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Chaetomium*, *Alternaria*, *Stachybotrys*, *Chrysosporium* 등이 있다. 이들 사상균의 대부분은 섬유소분해능을 갖고 있다(新井英夫, 1980). 천연 셀룰로스는 순수한 상태로는 존재하지 않고 많건 적건 간에 헤미셀룰로스, 리그닌, 펩틴 등을 포함하고 있다. 일반적으로 목재의 셀룰로스는 인피섬유의 셀룰로스보다 헤미셀룰로스나 리그닌과 견고하게 결합되어 있기 때문에 셀룰로스를 순수분리하는 데에는 상당히 까다로운 처리를 필요로 한다. 따라서 이러한 처리를 행한 셀룰로스는 원래의 셀룰로스보다 중합도가 저하하거나 소량의 헤미셀룰로스가 포함되어 있다(岡島와 右田, 1989). 이것은 한지가 양지보다 내구성과 내용성이 우수한 원인의 하나로 생각된다.

목재의 34~45%를 차지하는 셀룰로스는 β -1,4-glycosidic bond에 의한 셀로바이오스의 중합체로써 다발을 형성하여 식물성 섬유소를 이루는 간단한 화학적 구조를 하고 있으나 기본단위분자인 글루코스로는 쉽게 가수분해되지 않는다. 미생물이 종이를 분해하는 데에는 많은 종류의 효소가 필요하기 때문이다. 미생물에 의한 셀룰로스의 가수분해에는 3종류의 효소 즉 비결정영역을 공격하여 free chain end를 형성하는 endo-1,4- β -glucanase(E.C. 3.2.1.4), 셀룰로스 체인으로부터 이당류인 cellobiose를 분리하는 exo-1,4- β -glucanase(E.C. 3.2.1.91), 그리고 cellobiose를 glucose로 가수분해하는 β -glucosidase(E.C. 3.2.1.21)의 상호작용으로 이루어진다(Yazdi, *et al.*, 1990).

종이의 손상에 직접 영향을 미치는 셀룰로스의 가수분해는 미생물이 분비하는 효소의 작용에 의한 생물학적 분해 이외에 종이 표백과정 중 발생한 염소화된 기질의 잔기들이나, 번짐방지를 위해 사이즈제로 사용된 명반이나 aluminium sulphate 등과 같은 산성염에 의한 화학적 가수분해가 있다. 화학적 가수분해시 셀룰로스 중합체의 글루코시딕결합은 중성과 약알칼리성에서 안정하지만, 그 결합은 한편 강산과 강알칼리성에서는 빠르게 가수분해된다고 보고되었다(Mark and Harris, 1946). 이산화황, 질산 그리고 오존과 같은 대기오염물질이나 제지시 첨가되는 산성물질이 셀룰로스내에 존재하는 수산기(-OH)와 반응하여 종이의 산성도가 증가됨으로써 가수분해 즉 손상이 촉진된다고 보고하였다(寺村, 1984; 安江, 1986; 圖書館紀要編集委員會, 1990; 吉岡 等, 1990; 吉村 等, 1992; 한 등, 1996).

종이의 손상 과정은 물리적, 화학적, 그리고 생물적 요인 등에 의해서 이루어지지만, 이러한 손상은 하나의 요인에 의해서 독립적으로 발생하기보다는 주로 여러 요인의 상호작용에 의해서 복합적으로 발생하기 때문에 종이의 분해과정을 하나의 도식화 과정으로 설명하는 것은 매우 어렵다.

지금까지 미생물에 의한 종이의 생물학적 가수분해 그리고 종이의 산성화에 따른 화학적 가수분해에 대한 많은 연구가 수행되어져 왔으나 산성화(화학적 요인)에 의한 종이의 구조적 손상도에 따른 미생물의 지류분해능(생물학적 요인)에 관한 연구는 보고된 바 없다. 따라서 본고에서는 화학적 요인에 의한 종이의 산성화가 사상균의 셀룰로즈 분해능에 미치는 영향에 대해 효소학적으로 조사하였기에 보고하고자 한다.

II. 재료 및 방법

1. 균주 및 실험재료

균주 3종(*Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nigulosum*)을 한국과학기술연구원 유전공학연구소 유전자지원센터 유전자은행(KCTC)에서 분양받아 실험균주로 사용하였으며, 종이분해능 측정용배지는 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.52g, $NaNO_3$ 6.0g, KCl 0.52g, KH_2PO_4 1.52g, $FeCl_3$ 2.5mg을 증류수 1ℓ에 혼합한 제한배지를 사용하였다. 여기에 첨가되는 섬유소원으로는 한지 10g을 각 pH별 완충용액(50mM) 1ℓ에 담가 80℃에서 1주일간 반응시켜 종이의 pH를 달리하였다. 이때 pH 3~pH 5까지는 sodium citrate 완충용액, pH 6~pH 7까지는 sodium phosphate 완충용액, pH 8은 Tris-HCl 완충용액, 그리고 pH 9~pH 10까지는 sodium carbonate-HCl 완충용액을 사용하였다. 그리고 대조군으로서 완충용액대신에 증류수로 처리한 한지를 사용하였다. 각 pH(pH 3~10)로 적정된 한지는 증류수 1ℓ에 담가 80℃에서 10일간 매일 새증류수로 교체하여 탈이온화처리를 하였다. 탈이온화처리를 마친 한지시편은 80℃에서 24시간 건조시킨 후 실험재료로 사용하였다.

2. 각 pH별 공시균주의 생육

각 pH 별로 처리한 한지에서 공시균주의 생육조건을 조사하기 위해 무균적으로 공시균주를 각각 접종한 다음 6종의 수분활성시약($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$, NH_4NO_3 , $NaCl$, KCl , KNO_3 , D.W)을 이용해서 습도를 맞춰주고 온도조건(15℃, 25℃와 35℃)에서 조사하였다.

3. 최적 배양기간 선정

실험균주 3종의 최적 배양기간을 선정하기 위해서 250ml 삼각플라스크에 기질로서 증류수로 적정된 한지시편(2%)을 사용한 제한배지(pH 6.0)를 100ml씩 넣고 121℃ 15분간 감압멸균하였다. 그리고 각각의 균주를 무균적으로 접종한 다음 진탕배양기(28℃, 180rpm)에서 24일동안 배양하면서 2일 간격으로 1ml씩 취하여 원심분리(12,000rpm, 15min, 4℃)한 후 상층액을 조효소로 셀룰로즈 분해효소의 활성을 측정하여 최적 배양기간을 선정하였다.

4. 배양배지의 최적 pH 선정

실험균주 3종의 배양배지의 최적 pH조건을 알아보기 위해 기질로 증류수로 적정된 한지시편(2%)을 사용하여 10M KOH로 pH 4, pH 7 그리고 pH 9으로 조절된 3종의 제한배지를 3개의 250ml 삼각플라스크에 100ml씩 넣고 121℃, 15분간 감압멸균하였다. 그리고 3종의 실험균주를 각각 접종하여 진탕배양기(28℃, 180rpm)에서 10일간 배양한 후 1ml을 취하여 원심분리(12,000rpm, 15min, 4℃)한 후 상층액을 조효소로 하여 셀룰로즈 분해효소의 활성을 측정하여 배양배지의 최적 pH 조건을 선정하였다.

5. 효소 활성도 측정

실험균주에 의한 분해효소활성을 측정하기 위해서 exoglucanase와 endoglucanase의 활성은 각각 C.M.C.와 Avicel 기질을 사용하여 기질이 분해되어 생성된 환원당을 검출하여 측정하였다. 즉 효소 0.1ml과 기질 50mg을 0.1M sodium citrate(pH 5.2) 완충용액 1ml에 혼합한 후 40℃에서 40분간 반응시켰다. 반응시킨 용액은 냉동원심분리기를 사용하여 원심분리(10,000rpm, 10min, 20℃)하고, 상등액의 효소활성은 Miller *et al.*(1960)의 방법에 따라 환원당 검출 kit(Sigma, USA)를 이용하여 분광광도계로 475nm에서 측정하였다. β -glucosidase의 활성을 Jeong등(1985)의 방법을 약간 수정하여 측정하였다. 즉 효소 0.2ml과 0.05M citrate(pH 4.8) 완충용액으로 제조한 1mM p-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside (PNPG) 0.8ml를 40℃에서 30분간 반응시켰다. 반응시킨 후 1M sodium carbonate 2.0ml를 첨가하여 반응을 정지시키고, 증류수 10ml로 희석한 다음 PNPG에서 방출된 p-nitrophenol(PNP)의 양을 분광광도계(Beckman DU-68, USA)로 420nm에서 측정하였다.

6. 조효소 추출

각 pH로 제조된 한지를 기질로 하여 배양된 배지는 냉동원심분리기(Jouan MR1822, USA)로 원심분리(12,000rpm, 15min, 4°C)하고 그 상등액 25ml을 수집하여 microfiltration(0.2 μ m)으로 균체 및 잔유성분을 제거하고 증류수로 24시간 투석한 후 진공동결 건조기를 이용하여 증류수 1.5ml로 농축하여 이를 단백질 정량과 전기영동을 통한 단백질분석 및 활성측정을 위한 조효소 27개(균주 3종×기질 9종 : 증류수, pH 3.0~10.0)를 제조하였다.

7. 단백질 정량

수집된 조효소 27개에 대한 단백질양을 측정하기 위해 Lowry(1951)의 방법에 따라 측정하였다. 이때 표준단백질로 bovine serum albumin을 사용하였다.

8. 전기영동을 통한 단백질 확인 및 비교

서로 다른 조건에서 배양된 배지에서 수집된 조효소의 단백질을 비교분석하기 위해서 Laemmli(1970)방법을 변형한 SDS-전기영동을 실시하였다. 이때 사용된 polyacrylamide의 농도는 12.5%인 것을 사용하였고 Multiphore-II (Pharmacia, Sweden)장치를 사용하여 600V, 50mA, 30W로 90분동안 전기영동 하였다. 영동이 끝난 젤은 coomassie brilliant blue R-250으로 염색하여 단백질 형태를 비교 분석하였다. 이때 사용한 표준단백질은 phosphorylase B(94kDa), bovine serum albumin(67kDa), ovalbumin(43kDa), carbonic anhydrase(30kDa), trypsin inhibitor(20.1kDa), α -lactalbumine(14.4kDa)등을 사용하였으며, 그들의 상대적 이동거리를 Image Master VDS analysis(Pharmacia, Sweden)기기 및 분석프로그램을 이용하여 측정하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 실험균주의 번식조건

실험균주 *Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nigulosum*에 대한 최적생육조건을 조사하기 위해 각 pH 별로 처리한 한지에 접종한 다음 각 온습도조건에서 생육상태를 조사한 결과 100% R.H.에서 *T. koningii*는 pH 3~6에서 번식하였으며,

*A. niger*와 *P. nigulosum*는 pH 3~10에서 번식하였다. 94% R.H.에서 *T. koningii*는 pH 3~4에서, *A. niger*는 pH 3~6에서, *P. nigulosum*는 pH 3에서만 번식하였다. 그리고 84% R.H.이하에서는 번식하지 않았다. 따라서 실험균주는 온도의 영향은 거의 받지 않고 습도의 영향을 주로 받는 것으로 나타났다. 그리고 실험균주 3종은 호산성균주인 것을 알수 있었다.

2. 최적 배양기간 및 성장곡선작성

실험균주 *T. koningii*, *A. niger*, *P. nigulosum*에 대한 최적 배양기간을 선정하기 위해서 기질로 증류수로 적정된 한지시편(2%)을 대조구로 사용한 제한배지(pH 6)에 각각의 균주를 접종하고 20일간 배양한 결과 균주마다 약간 차이는 있었으나 배양용액내의 활성은 6일부터 증가하기 시작하며 16일간 배양에서 최고의 활성을 보인 후 서서히 감소하였다.(Fig. 1) 따라서 본 실험에서는 각 pH별로 미생물의 지류분해능의 차이를 비교하기 위한 최적배양기간을 16일로 선정하였다.

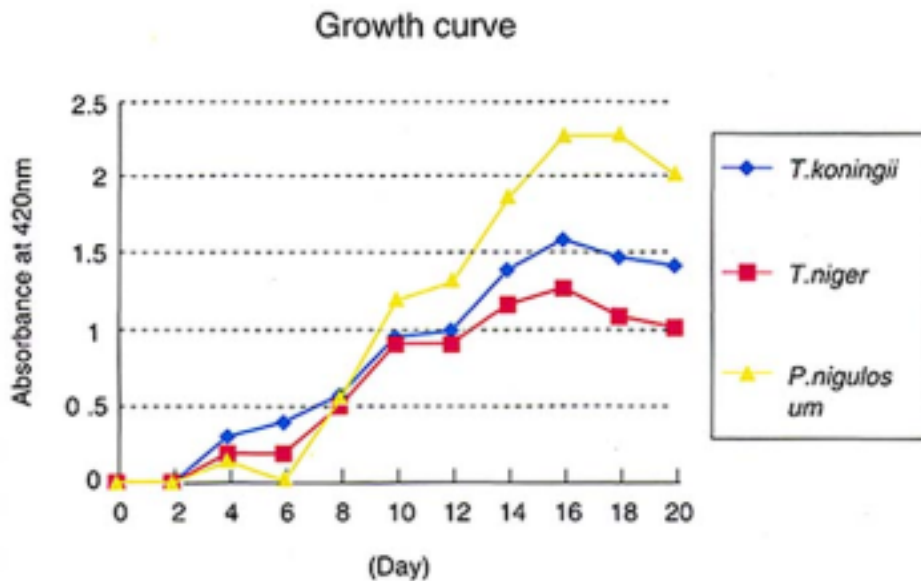


Fig. 1. Effect of cultivation time on the production of cellulase from *T. koningii*, *A. niger* and *P. nigulosum*

Fig. 1. Effect of cultivation time on the production of cellulase from *T. koningii*, *A. niger* and *P. nigulosum*

3. 실험균주에 대한 배양배지의 최적 pH 조건

실험균주에 대한 배양배지의 최적 pH조건을 선정하기 위한 기질로 대조구를 사용하여 10M KOH로 pH 4, pH 7 그리고 pH 9로 조절된 3종의 제한배지에서 10일간 배양하여 활성을 측정한 결과 3종의 균주 모두 pH 4에서 활성이 가장 높게 나타났으며 CMCase, Avicelase 그리고 PNPGase의 활성도 모두 pH 4에서 가장 높게 나타났다. 그러나 *T. koningii*는 pH 7에서도 어느정도 활성을 나타내는 것으로 보아 최적 pH 조건이 비교적 넓은 것으로 생각되나, *A. niger*와 *P. nigulosum*는 pH 4에서만 활성이 높게 나타났으므로 본실험에서 배양용배지의 최적 pH 조건은 pH 4로 선정하였다.(Fig. 2)

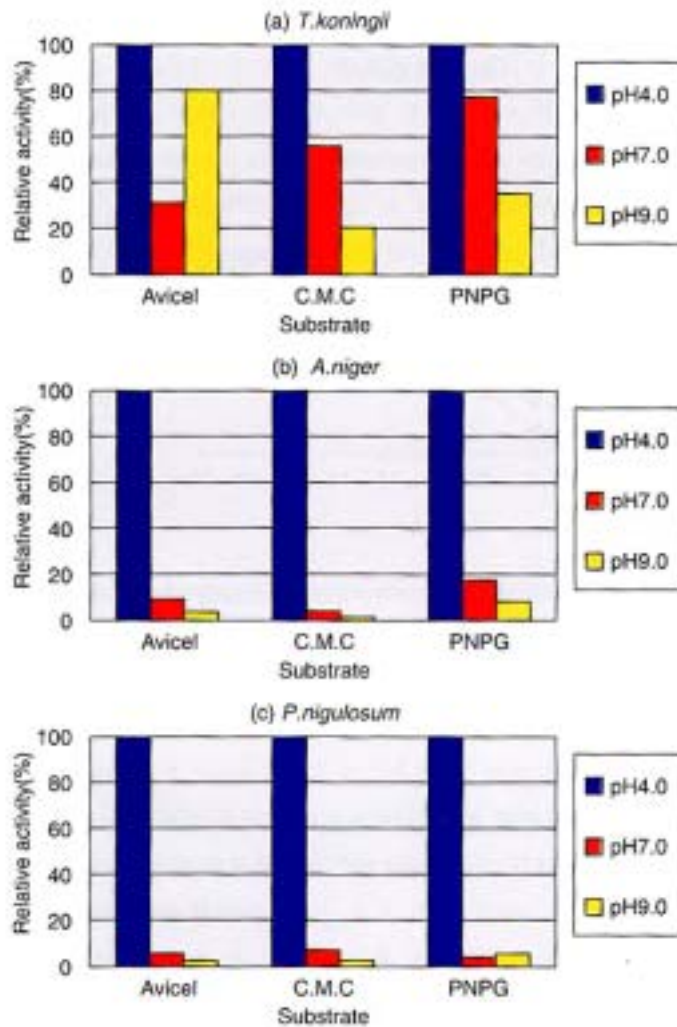


Fig. 2. Effect of initial pH of medium on the production of cellulase. pH were changed with 10M-KOH. (a) *T. koningii*, (b) *A. niger*, (c) *P. nigulosum*

Fig. 2. Effect of initial pH of medium on the production of cellulase. pH were changed with 10M-KOH. (a) *T. koningii*, (b) *A. niger*, (c) *P. nigulosum*

4. 효소 활성화 측정

각 pH별로 처리된 한지를 기질로 한 효소추출용 제한배지(pH 4)에 실험균주 3종을 접종하여 16일간 진탕배양기에서(28℃, 180rpm) 배양 후 배양액 1ml씩을 취하여 원심분리(12,000rpm, 15min, 4℃)한 후 그 상층액을 조효소로 하여 기질(C.M.C., Avicel 그리고 PNPg)과 반응시킨 다음 분광광도계의 흡광도를 측정하여 대조구에 대한 상대 활성화(%)로 나타내었다

가. *T. koningii*의 분해능 측정

*T. koningii*에 의한 상대 활성화는 C.M.C.에 대해서 pH 9에서 100%, pH 3에서 91.12%, pH 5에서 83.47%, pH 8에서 80.64%, pH 7에서 72.87%, pH 4에서 68.43%, 대조구에서 52.65%, pH 6에서 43.77%, pH 10에서 45.13%의 순으로 나타났으며, Avicel에 대해서 pH 7에서 100%, pH 3에서 95.21%, pH 8에서 94.8%, pH 5에서 93.22%, pH 9에서 86.85%, pH 4에서 58.56%, pH 6에서 53.38%, 대조구에서 42.63%, pH 10에서 38.64%의 순으로 나타났다. 그리고 PNPg에 대해서 pH 3에서 100%, pH 8에서 96.5%, pH 5에서 96.28%, pH 7에서 93.55%, pH 9에서 89.2%, pH 4에서 52.24%, pH 6에서 45.23%, pH 10에서 40.53%, 대조구에서 38.75%의 순으로 나타났다(Fig 3).

따라서 *T. koningii*가 분비하는 CMCases는 pH 9와 pH 3, Avicelase는 pH 7과 pH 3, 그리고 PNPgase는 pH 3과 pH 8에서 비교적 높은 상대활성을 나타내었으며, pH 6과 pH 10에서 활성이 가장 낮은 것으로 나타났다. 그러므로 *T. koningii*가 분비하는 분해 효소에 의한 종이의 분해능에 관해서는 유의성이 있는 강산과 강알칼리성에서 더 높은 활성이 나타나는 결과는 얻지 못했지만 대체로 3가지 효소가 대체로 pH 3과 pH 9에서 가장 높은 활성을 나타내었으며, pH 6과 pH 10에서 가장 낮은 활성을 보였다.

나. *A. niger*의 분해능 측정

*A. niger*에 의한 상대 활성화는 C.M.C.에 대해서 pH 7에서 100%, 대조구에서 64.4%, pH 4에서 42.2%, pH 9에서 39.4%, pH 5에서 30.9%, pH 8에서 17.8%, pH 3에서 9.7%, pH 10에서 6.1%, pH 6에서 5.7%의 순으로 나타났으며, Avicel에 대해서는 pH 7에서 100%, 대조구에서 69.4%, pH 9에서 30.5%, pH 4에서 19.7%, pH 5에서

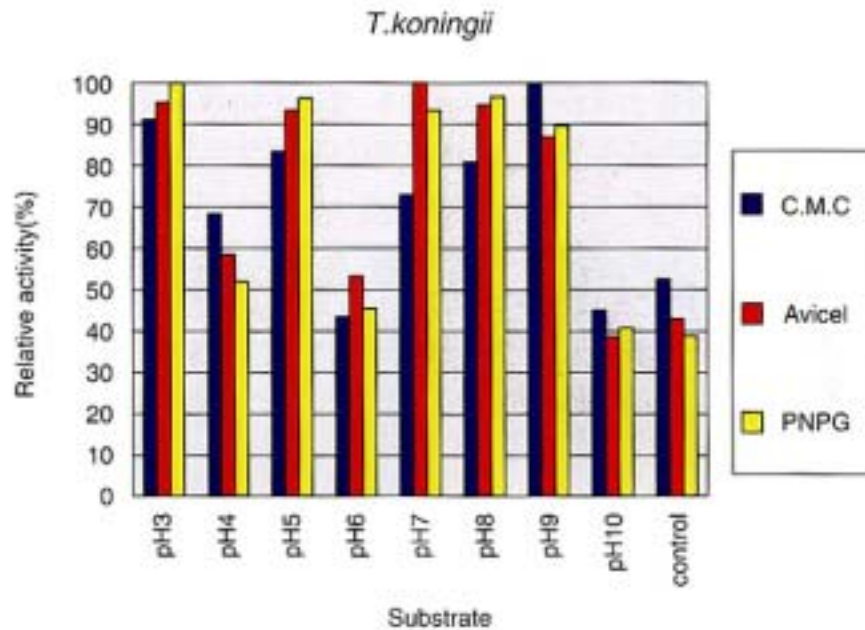


Fig. 3. Effect of substrates of medium on the production of cellulase from *T. koningii*

Fig. 3. Effect of substrates of medium on the production of cellulase from *T. koningii*

12.7%, pH 3과 8에서 4.6%, pH 10에서 2.9%, pH 6에서 2.3%의 순으로 나타났다. PNPG에 대해서 pH 7에서 100%, 대조구에서 90.1%, pH 9에서 41.5%, pH 4에서 38.6%, pH 5에서 23.1%, pH 3에서 8.3%, pH 8에서 7.5%, pH 6에서 3.9%, pH 10에서 3.2%의 순이었다.(Fig. 4)

따라서 *A. niger*가 분비하는 섬유소분해효소는 중성(pH 7)에서 가장 높은 상대활성을 나타내었으며, pH 10(알칼리성)과 약산성(pH 6)에서 활성이 가장 낮은 것으로 나타났다.

다. *P. nigulosum*의 분해능 측정

*P. nigulosum*에 의한 상대활성도는 C.M.C.에 대해서 pH 5에서 100%, pH 9에서 98.23%, 대조구에서 92.67%, pH 8에서 89.14%, pH 3에서 79.04%, pH 4에서 45.96%, pH 10에서 43.43%, pH 6에서 33.84%, pH 7에서 26.76%의 순으로 나타났으며, Avicel에 대해서 pH 9에서 100%, pH 8에서 62.93%, 대조구에서 62.07%, pH 5에서 43.97%, pH 3에서 40.51%, pH 10에서 34.48%, pH 4에서 24.13%, pH 6에서 18.97%, pH 7에서

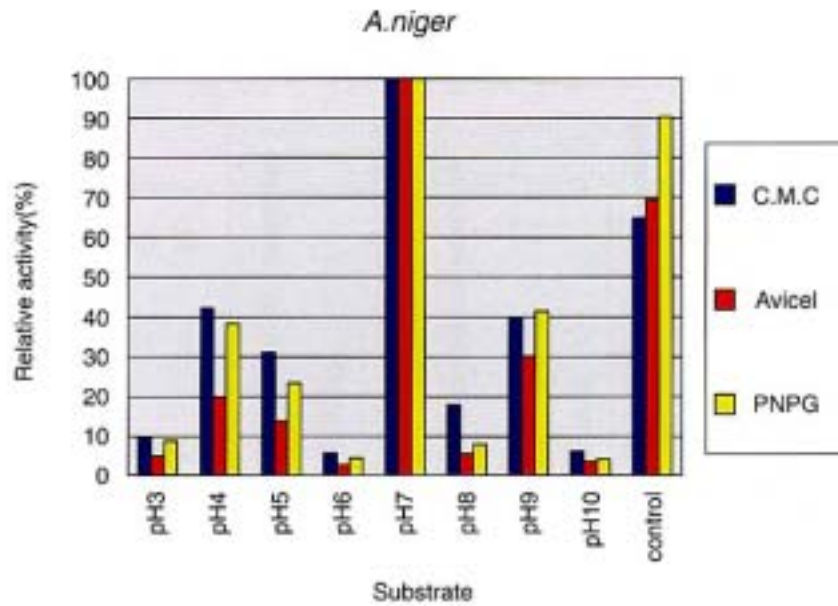


Fig. 4. Effect of substrates of medium on the production of cellulase from *A. niger*

Fig. 4. Effect of substrates of medium on the production of cellulase from *A. niger*

15.51%를 나타냈다. PNPg에 대해서 pH 3에서 100%, pH 8에서 89.01%, pH 5에서 82.38%, pH 9에서 69.01%, 대조구에서 62.93%, pH 4에서 23.85%, pH 10에서 20.2%, pH 6에서 13.11%, pH 7에서 10.78%를 보였다.(Fig. 5)

따라서 *P. nigulosum*가 분비하는 CMCases는 pH 5와 pH 7, Avicelase는 pH 9와 pH 8 그리고 PNPgase는 pH 3과 pH 8에서 가장 높은 상대활성을 나타내었으며, 3종 효소 모두 pH 6과 pH 7에서 활성이 가장 낮은 것으로 나타났다. 즉 *P. nigulosum*가 분비하는 섬유소 분해효소의 활성은 약산성과 알칼리성에서 높게 나타나고, 중성에서는 낮게 나타났다.

이상과 같이 각 pH별로 처리한 한지시편에 대한 3종의 실험균주 *T. koningii*, *A. niger*, *P. nigulosum*의 활성도를 측정된 결과 유의성이 있는 결과는 나타나지 않았으나 일반적으로 산성(pH 3)과 알칼리성(pH 9)에서 상대적으로 높은 활성을 그리고 중성(pH 6)에서 낮은 활성을 공통적으로 확인할 수 있었다. 종이의 산성화에 따른 미생물에 의한 종이의 가수분해능은 일반적으로 균주자체의 성장조건에 따라 증진된다. 그러나 이번 실험을 통해서 어느정도 미생물에 의한 가수분해능은 산성화에 따른 종이자체의 구조적 변화 및 손상에 의해서도 증진되는 것을 볼 수 있었다.

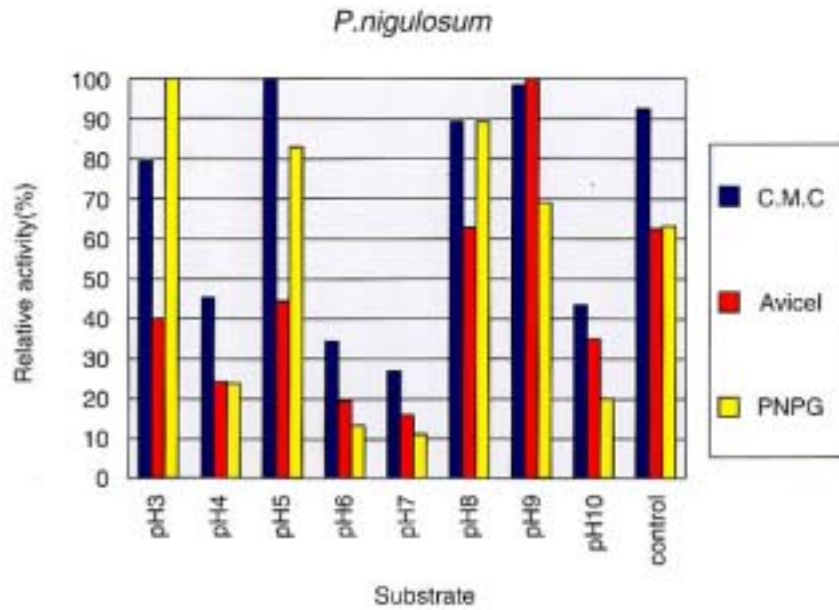


Fig. 5. Effect of substrates of medium on the production of cellulase from *P. nigulosum*

Fig. 5. Effect of substrates of medium on the production of cellulase from *P. nigulosum*

5. 단백질량 측정

미생물은 환경 및 성장조건에 따라 필요한 다양한 효소들을 생산하고 이를 분비하여 재질을 분해하여 성장하게 된다. 그러므로 배양액에는 균주가 성장함에 따라 균주 자체의 용균현상(미생물 자체의 분해)에 의한 세포내 구조단백질을 비롯하여 다양한 효소단백질들과 효소단백질에 의한 부산물들이 잔유하게 된다. 배양액내의 이러한 효소단백질 및 부산물의 증가는 균주의 성장속도가 빠를 때 증가하게 되며, 이것은 균주의 종에 따라, 배양조건, 온도, 영양원, 배지의 pH 등에 따라 다르게 나타난다. 동일 배양조건에서 각 pH별로 처리한 한지의 가수분해에 따라 생성된 단백질량을 측정하였다.(Table 1)

Table 1에서 보는 바와같이 실험균주에 의해 각 pH별로 처리한 한지로부터 생성된 단백질량은 *T. koningii*에서는 pH 3(6.31mg/ml), pH 9(6.19mg/ml), pH 8(6.08mg/ml), pH 5(5.97mg/ml), pH 7(4.97mg/ml), pH 4(4.45mg/ml), pH 6(3.81mg/ml) 그리고 pH 10(2.90mg/ml)의 순으로 높게 나타났다. 이것은 기질활성도 측정실험에서 pH 3과 pH 9에서 가장 높은 활성을 보이고 pH 6에서 가장 낮은 활성을 나타낸 결과와 거의 일치하였다.

Table 1. Concentration of protein produced from *T. koningii*, *A. niger* and *P. nigulosum*

substrate	<i>T. koningii</i>		<i>A. niger</i>		<i>P. nigulosum</i>	
	Absorbance (750nm)	Concentration (mg/ml)	Absorbance (750nm)	Concentration (mg/ml)	Absorbance (750nm)	Concentration (mg/ml)
pH 3	0.625	6.31	0.161	1.62	0.248	2.50
pH 4	0.441	4.45	0.143	1.44	0.226	2.28
pH 5	0.592	5.97	0.168	1.70	0.246	2.48
pH 6	0.379	3.81	0.122	1.23	0.235	2.37
pH 7	0.493	4.97	0.360	3.63	0.241	2.42
pH 8	0.603	6.08	0.167	1.68	0.276	2.78
pH 9	0.614	6.19	0.194	1.96	0.270	2.73
pH 10	0.288	2.90	0.119	1.20	0.199	2.01
대조구	0.332	3.32	0.309	3.01	0.244	2.46

*A. niger*에서는 pH 7(3.63mg/ml), pH 9(1.96mg/ml), pH 5(1.70mg/ml), pH 8(1.68mg/ml), pH 3(1.62mg/ml), pH 4(1.44mg/ml), pH 6(1.23mg/ml) 그리고 pH 10(1.20mg/ml)의 순으로 높게 나타났다. 특히 중성(pH 7)에서 상대적으로 상당히 많은 단백질량이 검출되었는데 이것은 균주 자체의 생리적 특이성 때문인 것으로 생각되어진다. 그리고 pH 7을 제외하면, 산성(pH 3과 pH 5) 그리고 알칼리성(pH 9)에서 상대적으로 높은 단백질량을 나타냈으며, pH 6에서 상대적으로 낮은 단백질량이 검출되었다. *P. nigulosum*에서의 단백질량은 활성도 측정결과와 달리 단백질량에서 뚜렷한 차이를 나타내지 않고 거의 미량으로 비슷하였다.

이상과 같이 단백질량을 측정한 결과 대체로 산성(pH 3)과 알칼리성(pH 9)에서 높은 단백질량이 측정되었고, 중성(pH 6)에서는 낮은 단백질량이 측정되었다. 또한 실험균주별 단백질 생성량은 *T. koningii*, *P. nigulosum*, 그리고 *A. niger*의 순으로 나타나 실험균주 중 *T. koningii*가 가장 지류분해능이 높다는 것을 확인할 수 있었다.

6. 전기영동을 통한 단백질 확인 및 비교

pH별로 처리한 한지에 대한 3종의 균주의 배양액(25ml)을 진공동결건조기로 농축한 뒤 각각을 증류수 1.5ml로 다시 녹여 조효소를 제조하였다.(각 pH별 기질에 대해서 *T. koningii*에서 수집된 조효소는 TPHx, *A. niger*에 대해서는 APHx 그리고 *P. nigulosum*에 대해서는 PPHx로 표시하기로 한다) 준비된 조효소를 20 μ l씩 전기영동을 실시하였다. 이때 사용한 표준단백질은 lphosphorylase B(94kDa), bovine serum albumin(67kDa), ovalbumin(43kDa), carbonic anhydrase(30kDa), trypsin

inhibitor(20.1kDa), α -lactalbumine(14.4kDa) 등을 사용하였다. 각 실험군에 대한 전기영동 결과를 확인하고 각 lane별 그리고 분리된 단백질에 대한 정확하고 자세한 자료를 얻기 위해서 Image master VDS 분석 프로그램을 이용하여 분리된 단백질의 크기와 그리고 상대농도(%)를 확인하였다.

먼저 *T. koningii*에 대한 전기영동 실험결과를 보면 전기영동사진을 통해서 다양한 (약 12개정도) 단백질 band를 확인할 수 있었고 TPH3과 TPH8, TPH9의 조효소를 건 lane(2, 7, 8)에서 다른 lane(다른 조효소)보다 band가 더 진하게 염색된 것을 육안으로 관찰할 수 있었다.(Fig. 6-A) Image master VDS 분석 프로그램을 이용하여 분리된 단백질의 크기와 그리고 상대농도(%)는 전기영동사진의 결과로 이미 예측되어진 것과 같이 lane 2(TPH3)와 lane8(TPH9)에서 높은 농도 86.5%, 91.3%를 나타냈으며 lane 5(TPH6)에서는 상대적 낮은 수치인 68.6%를 나타내었다.(Fig. 6-B)

A. niger 경우에는 전기영동 결과 단지 lane 6(APH7)과 lane 8(APH9)에서만 약한 단백질 band를 확인할 수 있었는데(Fig. 7-A) 이는 단백질정량을 통해서 확인된 것과 같이 전체적으로 배양액에 단백질양이 적은 결과에 기인한 것이다.

Image master VDS 분석 프로그램을 이용하여 분석한 결과 lane 6과 lane 8에서 서로 크기가 다른 4종류(85kDa, 33kDa, 29.1kDa, 26kDa)의 단백질을 확인할 수 있었고 그 상대적 농도는 38.6% 와 26.6%로 나타났다.(Fig. 7-B)

*P. nigulosum*에서는 전기영동 결과 lane 2(PPH3)부터 lane 6(PPH6)까지는 희미하게 염색되어진 band가 나타났고 상대적으로 lane 8(PPH9)과 lane 10(대조구)에서 뚜렷한 band를 확인할 수 있었다.(Fig. 8-A) Image master VDS 분석 프로그램을 이용한 분석 결과 12 종류의 분리된 단백질을 확인하였고 단백질 크기는 25kDa에서 70kDa으로 다양하였다.

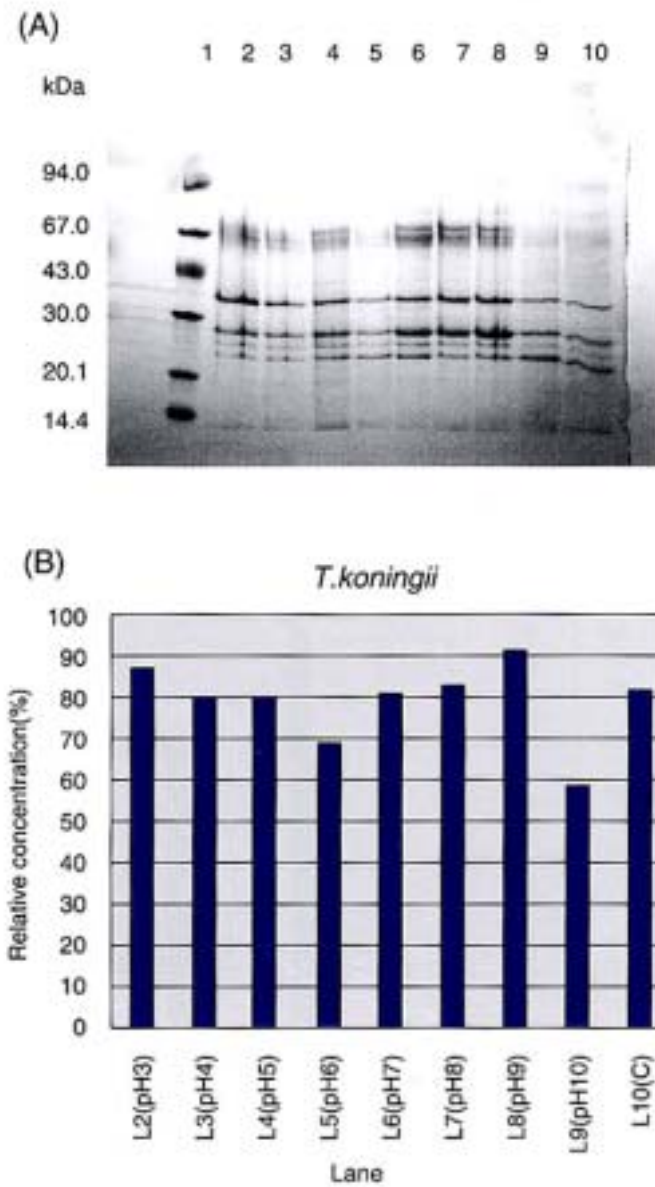


Fig. 6. 12.5% SDS-PAGE and Protein concentration analysis of crude extracts.
 (A) 12.5% SDS-PAGE analysis of crude extracts from *T. koningii*. Lane 1, marker protein; Lane 2-10, crude extracts from *T. koningii*.
 (B) Relative concentration of protein analysis by use of Image Master VDS analysis program.

Fig. 6. 12.5% SDS-PAGE and Protein concentration analysis of crude extracts.
 (A) 12.5% SDS-PAGE analysis of crude extracts from *T. koningii*. Lane 1, marker protein; Lane 2-10, crude extracts from *T. koningii*.
 (B) Relative concentration of protein analysis by use of Image Master VDS analysis program.

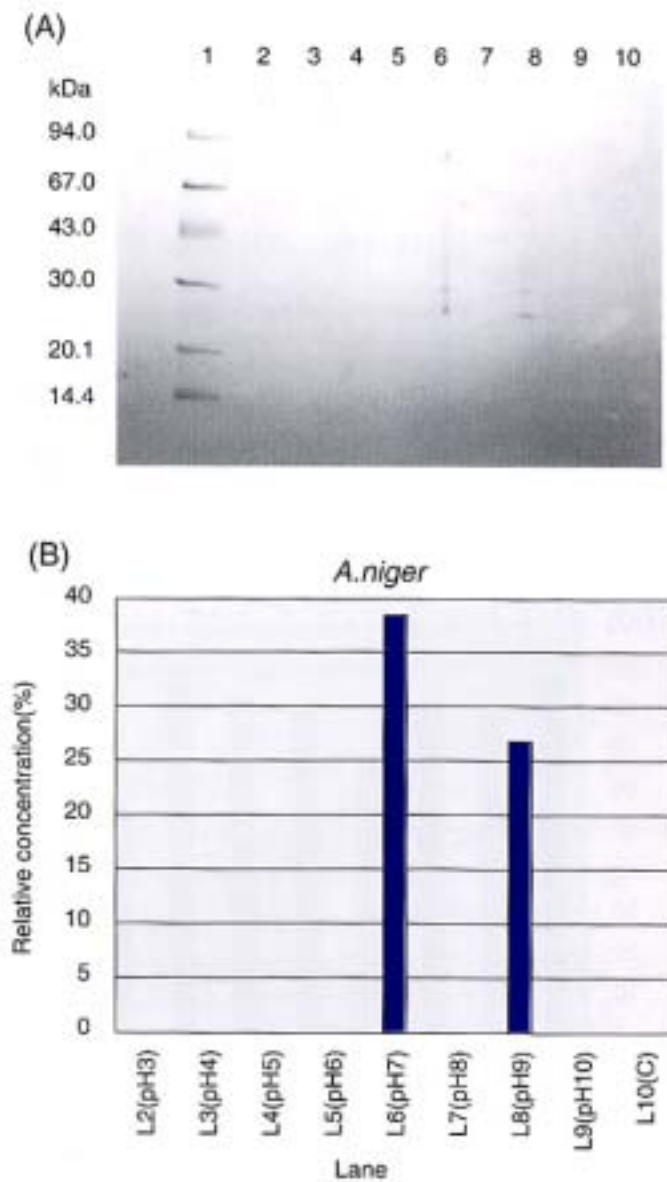


Fig. 7. 12.5% SDS-PAGE and Protein concentration analysis of crude extracts.
 (A) 12.5% SDS-PAGE analysis of crude extracts from *A. niger*. Lane 1, marker protein; Lane 2-10, crude extracts from *A. niger*.
 (B) Relative concentration of protein analysis by use of Image Master VDS analysis program.

Fig. 7. 12.5% SDS-PAGE and Protein concentration analysis of crude extracts.
 (A) 12.5% SDS-PAGE analysis of crude extracts from *A. niger*. Lane 1, marker protein; Lane 2-10, crude extracts from *A. niger*.
 (B) Relative concentration of protein analysis by use of Image Master VDS analysis program.

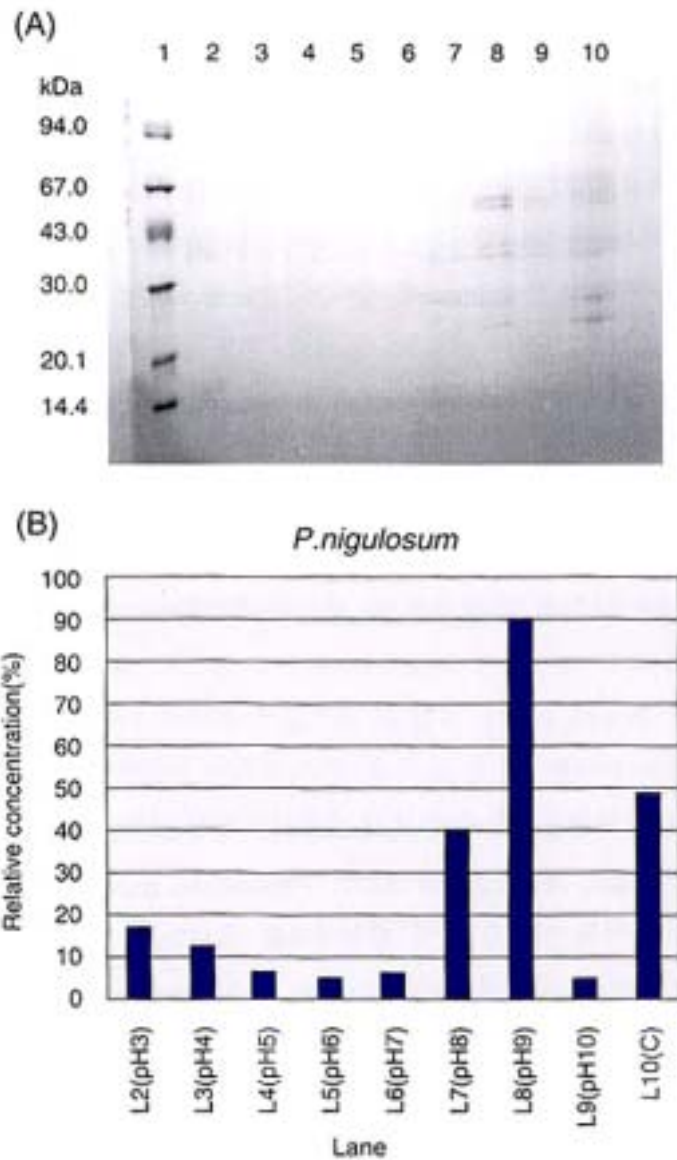


Fig. 8. 12.5% SDS-PAGE and Protein concentration analysis of crude extracts.
 (A) 12.5% SDS-PAGE analysis of crude extracts from *P. nigulosum*. Lane 1, marker protein; Lane 2-10, crude extracts from *P. nigulosum*.
 (B) Relative concentration of protein analysis by use of Image Master VDS analysis program.

Fig. 8. 12.5% SDS-PAGE and Protein concentration analysis of crude extracts.
 (A) 12.5% SDS-PAGE analysis of crude extracts from *P. nigulosum*. Lane 1, marker protein; Lane 2-10, crude extracts from *P. nigulosum*.
 (B) Relative concentration of protein analysis by use of Image Master VDS analysis program.

lane별 단백질 농도는 lane 8(PPH9)에서 90.2%로 상당히 높게 나타났으며, lane 6(PPH6)에서 가장 낮은 4.98%를 나타내었다.(Fig. 8-B) 이상과 같이 전기영동을 실시한 결과 균주별 다양한 형태로 분리된 단백질 band가 나타났다. 같은 균주에서 기질별로 농축된 조효소에 대한 단백질의 수 및 형태는 어느 정도 같았으나(Fig. 6-A) 균주간에는 서로 차이가 나타났다. 이는 균주간의 서로 다른 생리적 차이에 의한 결과로써 같은 영양원(기질)을 취한다 하더라도 중간 그것을 분해하고 대사산물의 생성에는 차이가 있다는 것을 의미한다. Image master VDS 분석프로그램을 통해서 분리되어진 단백질 band의 상대적 농도를 측정한 결과 3종의 균주 모두에서 일반적으로 pH 9과 그리고 pH 3에서 높은 농도를 나타내었고 *T. koningii* 와 *P. nigulosum*에서는 pH 6에서 상대적으로 가장 낮은 농도의 단백질 band를 확인할 수 있었다.

전기영동 실험결과 이미 앞에서 확인된 활성측정 실험결과와 그리고 단백질정량 실험결과에 대한 자료를 다시 확인할 수 있었고 단백질을 그 크기별로 분리시켜 확인함으로써 중간 대사산물(효소 및 부산물)의 차이를 확인할 수 있었다.

IV. 요약

종이의 산성화가 미생물의 지질분해에 미치는 영향을 조사하기 위해 3종의 균주 (*Trichoderma koningii*, *Aspergillus niger*, *Penicillium nigulosum*)를 각 pH별 완충 용액으로 처리한 한지를 기질로 하여 번식상태를 조사하고, 제한배지(pH 4)에서 16일간 배양후 배양액 1ml을 취하여 exoglucanase, endoglucanase 그리고 β -glucosidase 3종의 셀룰로즈 분해효소의 활성을 기질 C.M.C., Avicel 그리고 PNPG를 이용하여 측정하였다. 그 결과는 다음과 같다.

- ① 각 pH 별로 처리한 한지에 접종한 다음 생육상태를 조사한 결과 *T. koningii*는 pH 3~6에서 번식하였으며, *A. niger*와 *P. nigulosum*은 pH 3~10에서 번식하였다. 따라서 *T. koningii*는 pH의 영향을 받는 것으로 나타났지만 *A. niger*와 *P. nigulosum*는 종이의 pH보다는 온습도의 영향을 받는 것으로 나타났다.
- ② 실험균주의 섬유소분해효소 추출용배지의 최적배양기간은 16일로 하였으며, 최적 pH는 pH 4로 하였다.
- ③ 각 pH 별로 처리한 한지에 대한 실험균주의 섬유소분해효소의 활성을 측정한 결과 유의성이 있는 결과는 나타나지 않았다. 그러나 일반적으로 산성(pH 3)과 알칼리성(pH 9)에서 상대적으로 높은 활성을, 그리고 중성(pH 6)에서 상대적으로 낮은 활성이 모든 실험균주에서 공통적으로 나타났다. 이러한 결과는 산성화에 따른 종이 자체의 구조적 변화 및 손상에 의해서도 미생물에 의한 가수분해능이 증진된다는 것을 어느 정도 확인할 수 있었다.

- ④ 단백질량을 측정한 결과 실험군주중 단백질 생성량은 *T. koningii*가 가장 많았으며, 산성(pH 3)과 알칼리성(pH 9)에서 상대적으로 많았고, 중성(pH 6)에서는 대체로 적었다.
- ⑤ 조효소에 대한 SDS-전기영동 결과 3종의 실험군주별 서로 다른 형태의 band(단백질)가 관찰되었고, Image Master VDS 분석프로그램을 이용하여 단백질양의 상대적 농도를 측정한 결과 일반적으로 pH 3과 pH 9의 조효소에서 상대적으로 높은 단백질 농도를 그리고 pH 6에서 상대적으로 낮은 단백질 농도를 확인하였다.

이상과 같이 각 pH별로 처리한 한지 중 pH 3과 pH 9에서 미생물에 의한 분해능이 높게 나타났고, pH 6으로 제조된 한지가 미생물의 분해능에 대해서 가장 안정하다는 것을 알수 있었다. 그러나 이것은 조효소로 실험한 것이기 때문에 정확한 pH의 한계를 정하기가 어려웠다. 따라서 앞으로 이들 효소를 순수정제하여 이들 효소에 대한 물리화학적 특성과 분자생물학적인 실험을 실시하면 좀 더 정확한 결과를 얻을 수 있을 것으로 생각한다.

□ 参考文献 □

1. 新井英夫. 1980. 書籍, 古文書等の微生物被害とその対策, 書籍・古文書等のむし・かび害保存の知識, 文化財虫害研究所, 1-24.
2. 岡島三郎斗 右田伸彦. 1989. パルプ原料とその化学, 紙と天然繊維, 大日本圖書, pp. 27-28.
3. Mark, H., Harris, M. 1946. Kinetics of degradation reaction. Cellulose and Cellulose Derivates, Vol(V), pp. 150-199
4. Yazdi, M.T., A. Radford, J.N. Keen and J.R. Woodward. 1990. Cellulase production by *Neurospora crassa* : Purification and characterization of cellulolytic enzymes. *Enzyme Microb. Technol.*, 12, pp. 120-123.
5. 寺村由比子. 1984. 国立国会図書館における資料の劣化状況調査報告, 図書館研究シリーズ 24号, pp. 165-176, pp. 209-232.
6. 安江明夫. 1986. <調査報告> 書籍用紙の酸性度と劣化, 図書館研究シリーズ 26号, pp. 207-239.
7. 図書館紀要編集委員会. 1990. 早稲田大学図書館における所蔵資料劣化度調査報告, 早稲田大学図書館紀要, 32号, pp. 1-34.
8. 吉岡千里・二宮純恭・落石清. 1990. 国立大学図書館における酸性紙資料 劣化の実態調査について, 大学図書館研究, 36号, pp. 12-20.
9. 吉村秀夫・白柳榮一・津村正一・南方政英. 1992. 公立大学図書館における資料劣化状況の実態について, 大学図書館研究, 40号, pp. 49-67.
10. 한성희, 이규식. 1996. 紙類・纖維質 遺物에 對한 大氣有害가스(SO₂, NO₂)의 影響, 보존과학연구, 17, pp. 63-86.
11. Jeong, J. M., H. M. Park, S. W. Hong and Y. C. Hah. 1985. Aspects of cellulose induction by sophorose in *Trichoderma reesei* QM9414., *Kor.J.Microbiol.*, 23(2), pp. 77-83
12. Miller, G. L., Blum, R., Glennon, W. E. & Burton, A. L. 1960. Measurement of carboxymethylcellulase activity. *analytical Biochemistry* 2, pp. 127-132.
13. Lowry, O. H., N. J. rosebrugh, A. L. Farr, and R. J. Randal. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193, pp. 265-275.
14. Laemmli, D.K. 1970. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, pp. 680-685.
15. Chirico, W.J. and R.D. Brown, Jr. 1987. Purification and cahracterization of a β -glucosidase from *Trichoderma reesei*., *Eur.J.Biochem.*, 165, pp. 333-341

16. 奥澤美佐, 慶應義塾大學研究・教育情報センターにおける資料の劣化状況調査, 圖書館資料の保存とその対策(論集・圖書館學研究の歩み, 第5集), pp. 117-148.