

국내박물관에서 분리된 세균에 의한 견사의 물성 변화

이상준¹ · 조순자¹ · 윤수정¹ · 권영숙² · 전초현 · 조현혹*

¹부산대학교 미생물학과, ²부산대학교 전통복식연구소, 부산대학교 섬유신소재공학과

Characteristics Changes of the Silk Fibers by Isolated Bacteria from Domestic Museums

Sang-Joon Lee¹, Sun-Ja Cho¹, Su-Jeong Yoon¹, Young-Suk Kwon²,
Cho-Hyun Jeon and Hyun-Hok Cho*

¹Dept. of Microbiology, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

²Korean Traditional Costume Research Institute, Pusan National University, Busan 609-735, Korea
Dept. of Textile Engineering, Pusan National University, Busan 609-735, Korea

(Received August 17, 2006/Accepted November 30, 2006)

Abstract— There are several factors in the degradation of textiles. The crucial factors in textile weakening are humidity, dust, smoke, sunlight, microorganisms and so on. Especially silk fabrics are more susceptible to microorganisms than other fabrics, because they are mainly consisted of proteins. In this study, we investigated the activities for degrading casein and silk fibers with 2 strains, *Bacillus cereus* TX1 and *Pseudomonas fluorescens* TX 2, isolated from domestic museums. They were compared to those of standard control strains, *Klebsiella pneumoniae* and *Staphylococcus aureus*, usually used for the antibiotic test of fabrics. The caseinolytic activities of *K. pneumoniae* and *S. aureus* were higher than those of isolated strains. But in the cases of silk fiber degrading, *B. cereus* TX 1 showed the highest activity on both silk 1 and silk 2. Therefore, caseinolytic activities were not coincident with the activity to degrade silk fibers. All strains degraded silk 1(strength retention 100%) better than silk 2(strength retention 50%). It means that bacteria mainly participate in the early stage of degrading silk fabrics, but as time goes by, the importance of bacteria for degrading silk fabrics would decreased. Even though the importance of bacteria may decrease, controlling bacterial activity is necessary to preserve historic silk fabrics.

Keywords: Silk Fiber, Protease Activity, Isolated Strains, Degrade, Excavated Cloths, Museum

1. 서 론

견직물은 5000년 전부터 일상생활 및 예술품의 용도로 사용되어 왔으며, 국내 출토 복식유물 중 90% 이상이 견직물로 확인되었다¹⁾. 따라서 견직물의 열화에 대한 연구는 문화재 유물의 보존, 복원 등 보존 과학적 측면에서 상당히 의미가 있다. 견직물의 열화 원인은 여러 가지가 있는데 그 중에서 습도, 먼지, 매연, 일광, 미생물 등이 유기물인 섬유를 약화시키는 중요한 요인이다²⁾. 이러한 섬유류

유물은 주재료가 무기질인 유물과 달리 한번 손상 되면 원형 복원이 불가능하므로 기존의 상태를 잘 유지해 주는 것이 보존에 있어 최상의 방법이며, 예방적 보존처리가 다른 재질의 문화재보다도 더욱 중요하다³⁾. 특히 견직물은 미생물의 생육에 필요한 영양분의 하나인 단백질로 구성되어 있어 다른 섬유보다 미생물에 의한 손상을 받기 쉽다.

국외에서는 미생물에 의한 섬유류 유물의 분해에 관한 연구가 이미 진척되어 오고 있다. Watanabe 등에 의해 *Aspergillus spp.*와 *Penicillium spp.*에

*Corresponding author. Tel.: +82-51-510-2411; Fax: +82-51-512-8175; e-mail: hhcho@pusan.ac.kr

의한 면, 양모, 견 섬유의 형태학적 변형에 관한 연구가 수행되었으며⁴⁾, Sato에 의해 *Cladosporium cladosporioides*에서 분리된 효소가 Polyacrylonitrile filaments의 분해에 지대한 영향을 미치는 것이 밝혀졌다⁵⁾. Watanabe는 *Aspergillus flavus*에 의한 PET와 Nylon 섬유의 분해에 관한 연구를 수행하였다⁶⁾. 그러나 이러한 대부분의 연구가 균류에 국한되어 있다. 국내의 경우에는 미생물에 의한 견직물의 손상에 대한 연구는 아직 미비한 실정이며, 특히 세균에 의한 섬유류 유물의 분해에 관한 연구는 전무하다.

따라서 본 연구에서는 국내 박물관에서 분리된 protease 생성균⁷⁾과 직물 항균성 시험의 공시균이며 섬유에 상주하면서 섬유 분해에 영향을 끼친다고 알려져 있는 *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*를 이용하여⁸⁾ 단백질 분해능을 비교해 보고, 각 균주들에 의한 견사의 열화 정도를 살펴보았다.

2. 재료 및 방법

2.1 실험균주

본 실험에서는 국내 박물관에서 분리한 두 종류의 protease 생성균 및 직물의 항균성 시험의 표준 균주인 *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*가 사용되었다. 국내 박물관에서 분리된 균주들 중에서 skim milk agar 평판(1% casein peptone, 0.5% yeast extract, 0.5% sodium chloride, 1% skim milk, 1.5% agar)에 접종, 배양하면서, protease 생성균을 선별하였다. 그 중에서도 protease 분비로 인해 형성되는 투명한 크기가 큰 두 균주를 선정하여 실험균주로 하였으며 이들 균주는 형태적, 생리적 및 생화학적인 특성에 의해 동정되었다. 생화학적 특성은 API kit를 사용하였으며, 분자생물학적 동정은 16S rRNA 유전자 염기서열의 결과를 NCBI(National Center of Biotechnology Information)에서 blast search를 통해 동정하였다⁹⁾.

2.2 견사 시료

본 실험에 사용된 견사는 Table 1에 나타낸 시험포에서 채취한 것을 사용하였다. 실험에 사용된

시험포는 두 가지 종류로서, 하나는 대조군으로 NaOH를 처리하지 않은 견 평직물(강력유지율 100%, silk 1)이며, 다른 하나는 NaOH를 처리한 견 평직물(강력유지율 50%, silk 2)을 이용하였다¹⁰⁾.

본 실험에서는 Silk 1은 견직물 유물의 초기 상태를 대표하며, Silk 2는 이미 분해가 진행된 견직물 유물을 대표하기 위해 사용되었다. Silk 2를 얻기 위한 알칼리 처리 방법은 Silk 1을 10% NaOH와 함께 액비(material:liquid ratio) 1:125로 혼합한 후, 25℃에서 강력유지율이 Silk 1의 50% 수준에 도달하도록 하였다. 처리된 시료는 증류수에서 40분간 세척 후 상온에서 건조시켰으며, 다음 측정에서 사용하기 전까지 실온에서 진공상태로 보관하였다.

2.3 견사분해도의 측정

견사의 분해정도는 견사를 구성하고 있는 단백질의 분해로 인하여 생성된 아미노산의 양을 Hull 방법¹¹⁾에 따라 다음과 같이 측정하였다.

2.3.1 조효소액의 제조

조효소액은 skim milk 액체배지에 시험균을 30℃, 24 시간 배양한 후, 배양액을 12,000rpm에서 20분간 원심분리한 상등액을 조효소액으로 간주하고 실험에 사용하였다¹²⁾.

2.3.2 견사 분해 활성

두 종류의 견사(Silk 1, Silk 2, 5cm × 12개)를 기질로 사용하였으며, 이것을 50mM sodium phosphate 완충용액(pH 7.4) 5.0mL에 넣은 것으로 하였다.

이 기질용액에 조효소액 0.5mL를 첨가하여 30℃에서 30분, 60분, 90분간 반응시키고 20% trichloroacetic acid를 5.0mL 첨가하여 30℃에서 20분간 방치시켜 효소 반응을 정지시킨 후 14,000rpm에서 20분간 원심분리하여 protease의 활성을 측정하였다.

대조군은 20% trichloroacetic acid를 첨가하기 직전에 조효소액을 넣어 반응을 정지시켰다. 이는 수용액 상에서 효소에 의한 분해가 아닌 단순 용해된 단백질의 양을 측정하기 위함이다. Protease 활성으로 생성된 아미노산은 원심분리를 이용하여 단백질을 가라앉히게 되면 그 상등액에 남아있게 된다.

Table 1. Characteristics of the silk fabrics

Type	Strength retention	Basic properties
Silk 1	100 %	Weave: plain Fabric counts: 55×165 (warp × weft/5 cm) Thickness (mm) : 0.219
Silk 2	50 % (by NaOH treatment)	-

이것을 자외선 흡광광도계를 이용하여 280nm에서 흡광도를 측정하여 견사분해 정도를 산출하였다. 효소 1unit은 상기 조건에서 1분당 흡광도 0.01을 증가시키는데 필요한 효소량으로 하였다.

2.3.3 Casein 분해 활성

기질용액은 50mM 나트륨인산 완충용액(pH 7.4)에, 기질로서 casein을 사용하기 직전에 0.6%(w/v)가 되도록 용해시켜 사용하였다. 이것을 기질 용액으로 하여, 견사분해 활성의 측정과 동일한 방법으로 생성된 아미노산을 정량 측정하여 casein 분해 활성을 측정하였다.

2.4 고유점도 측정

Silk 1과 Silk 2를 NaOH 10%용액에 각각 2.5×10^2 , 2×10^2 와 1.6×10^2 (g/mL)의 세 가지 농도가 되도록 첨가한 후 80°C에서 용해시켰다. 이 액을 모세관 점도계를 사용하여 각각의 농도에서의 상대점도를 측정하여 농도와 상대점도와의 평균 절편인 고유점도[η]를 얻었다.

2.5 표면 관찰

세균에 의한 견사의 열화정도를 나타내는 형태학적 특성은 주사 전자 현미경(Scanning Electron Microscope : SEM, Hitachi S-3500N)을 통하여 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 Protease 생성 균주의 검색 및 동정

국내 박물관에서 분리한 균주들 중에서 콜로니 모양이 다르게 관찰된 131개의 콜로니를 skim milk 평판배지에 접종하여, 24 시간 배양한 후 직경이 큰 투명한을 형성한 8 균주를 1차적으로 선별하였다. 그 중에서 Gram염색 및 oxidase test 등 간단한 생화학적 테스트를 거쳐 Gram(+) 균과 Gram(-) 균 중에서 protease 활성이 가장 높은 균주를 각각 하나씩 선별하였다. Gram 양성으로 염색결과를 보인 분리균주는 포자를 형성하는 Gram양성의 막대형의 간균으로 관찰되었으며, Gram 음성으로 염색결과를 보인 분리균주는 편모를 가져서 운동성이 있는 전형적인 Gram 음성간균으로 관찰되었다. 또 이렇게 선정된 균주의 16S rRNA 유전자중 약 1.5 kb 크기의 염기서열을 분석한 결과를 NCBI (National Center for Biotechnology Information)

의 blast search를 통해 가장 상동성이 높은 균주를 검색하였다.

결과에 의하면, Gram 양성균은 *Bacillus cereus* (AJ315492)와 98.9%의 상동성을 나타냈으며, Gram 음성균은 *Pseudomonas fluorescens*(AB247137)와 99.8%의 높은 상동성을 보여주었다. 이상의 결과를 바탕으로 박물관에서 분리된 두 균주는 각각 *Bacillus cereus* TX 1과 *Pseudomonas fluorescens* TX 2로 동정하였다. 형태학적, 생화학적 특성 및 이들 분리균주의 생리학적 특징은 Table 2에 나타내었다.

Table 2. Morphological and physiological characteristics of isolated strains

Characteristics	Isolated strains	
	<i>B. cereus</i> TX1	<i>P. fluorescens</i> TX2
Morphological characteristics		
Gram staining	Positive	Negative
Spore staining	Positive	Negative
Form	Rod	Rod
Motility	-	Positive
Cultural characteristics		
LB agar	Irregular, Flat, Lobate	Circular, Convex, Entire
Physiological characteristics		
Catalase test	Positive	Positive
Oxidase test	-	Positive
β-galactosidase test	Negative	Negative
Arginine hydrolase test	Positive	-
Lysine decarboxylase test	Negative	-
Ornithine decarboxylase test	Negative	-
H ₂ S production	Negative	Negative
Urease test	Negative	Negative
Tryptophane deaminase test	Negative	-
Indole production	Negative	Negative
VP test	Positive	-
Gelatin liquefaction	Positive	Negative
Nitrate reduction	Positive	Positive

3.2 분리 균주에 의한 견사의 물성변화

3.2.1 분리 균주의 견사 단백질 분해 특성

미생물에 의한 견사 분해 실험에서는 Table 3에 나타난 것처럼 박물관에서 분리된 균주인 *B. cereus* TX 1이 Silk 1과 Silk 2 모두에 대하여 protease 활성이 각각 10.1 U/mL와 8.3 U/mL로 가장 높은 분해 활성을 보여 주었다. 그러나 일반적으로 세균의 단백질 분해활성을 알아보기 위해 사용하는 casein의 분해에 있어서는 직물의 항균성 표준균주인 *K. pneumoniae* 8.7 U/mL와 *S. aureus* 7.5 U/mL가 박물관에서 분리된 균주인 *Bacillus cereus* TX 1의 4.9 U/mL와 분리균 *P. fluorescens* TX 2의 4.6 U/mL보다 높은 것으로 나타났다.

따라서 casein 분해활성과 견사의 분해 활성은 일치하지 않음을 알 수 있었다. 이는 일반적인 단백질 분해 활성과 견사의 분해 활성이 서로 다르며, 견사의 분해 활성을 알아보기 위해서는 별도의 실험이 필요할 것으로 보인다.

또한, 4종의 시험균 모두 Silk 1이 Silk 2보다 잘 분해한다는 것을 알 수 있었는데 특히 *P. fluorescens* TX 2는 Silk 2에서 낮은 분해 활성(4.8 U/mL)을 보이는 데 반해, Silk 1에서는 높은 분해 활성(9.3 U/mL)을 보였다(Fig. 1). 이는 NaOH에 의한 세리신의 분해와 관계가 있는 것으로 추정되며, 이에 대한 연구는 세리신과 피브로인의 정량을 수반한 실험을 통해 향후 규명되어야 할 것이다.

3.2.2 분리 균주에 의한 견사의 점도 변화

Fig. 2는 효소 처리된 견사의 점도를 나타낸 것으로, 반응시간이 경과함에 따라 분자량과 비례관계에 있는 점도는 감소하는 경향을 나타내었다. 전체적으로는 Silk 1의 점도가 Silk 2보다 높았으며, Silk 1과 Silk 2 모두에서 균주를 넣지 않은 대조군에서보다 균주를 첨가한 시험군에서 효소반응시간이 지남에 따라 견섬유를 구성하는 단백질의 점도가 낮아진다는 것을 알 수 있었다.

반응 후 90분 후의 점도를 비교하였을 때, Silk 1의 경우, 균주를 넣지 않은 대조군은 점도가 160.0 mg·g⁻¹로 나타났다. *K. pneumoniae*는 125.1 mg·g⁻¹로 나타나 대조군에 비해 그다지 분해가 많이 일어나지 않은 것으로 보인다. 그리고 *S. aureus*, *Bacillus cereus* TX 1과 *Pseudomonas fluorescens* TX 2의 경우에는 각각의 점도가 46.3, 43.1, 68.3 mg·g⁻¹로 나타나 대조군 점도의 약 27~43%수준으로 크게 감소하였다. 한편 Silk 2의 경우, 반응 90분 후의 점도를 비교하였을 때 균주를 넣지 않은 대조군의 경우 점도가 67.3mg g⁻¹로 감소하는 반면 *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *Bacillus cereus* TX 1과 *Pseudomonas fluorescens* TX 2의 경우에는 24.5, 15.3, 13.1, 22.5mg·g⁻¹로 감소하였으며, 이는 대조군 점도의 약 19~36%수준이다.

3.2.3 분해된 견사의 표면 관찰

Fig. 3의 SEM을 통한 견사표면 관찰결과에 의하면 아무런 효소처리를 하지 않은 대조군은 반응시

Table 3. Protease activities of isolated microorganisms from different substrates

Strains	Casein	Silk 1	Silk 2
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8.7 U/mL	5.1 U/mL	3.3 U/mL
<i>Staphylococcus aureus</i>	7.5 U/mL	7.9 U/mL	7.7 U/mL
<i>Bacillus cereus</i> TX1	4.9 U/mL	10.1 U/mL	8.3 U/mL
<i>Pseudomonas fluorescens</i> TX2	4.6 U/mL	9.3 U/mL	4.8 U/mL

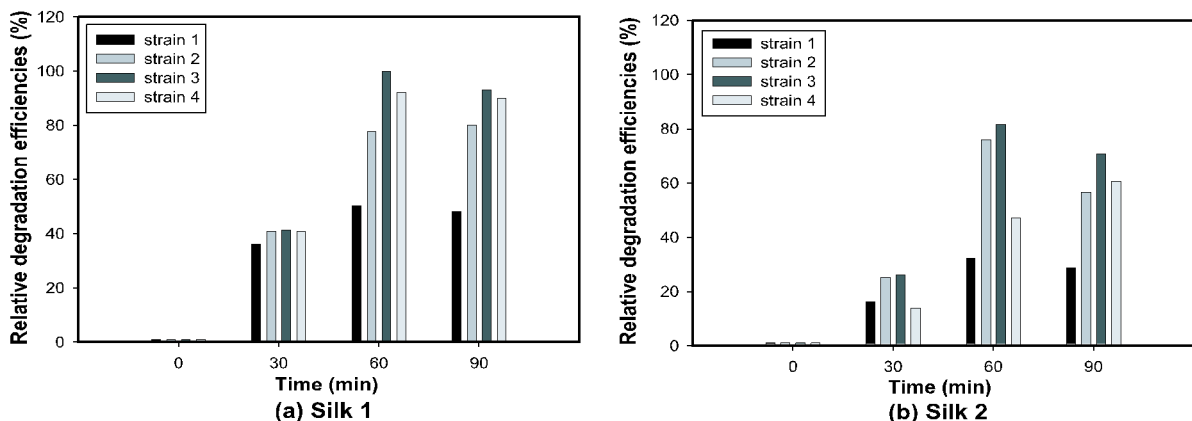


Fig. 1. Relative degradation efficiencies corresponding to amino acid production.(strain 1 : *K. pneumoniae*, strain 2 : *S. aureus*, strain 3 : *B. cereus* TX 1, strain 4 : *P. fluorescens* TX 2)

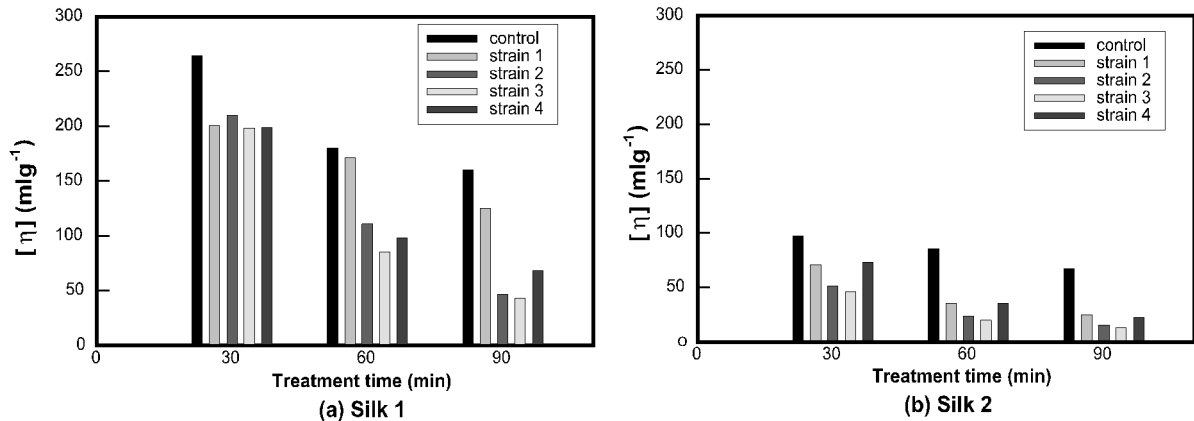


Fig. 2. Intrinsic viscosity of silk fibers treated with crude enzyme for 30 min, 60 min, 90 min. (strain 1 : *K. pneumoniae*, strain 2 : *S. aureus*, strain 3 : *B. cereus* TX 1, strain 4 : *P. fluorescens* TX 2)

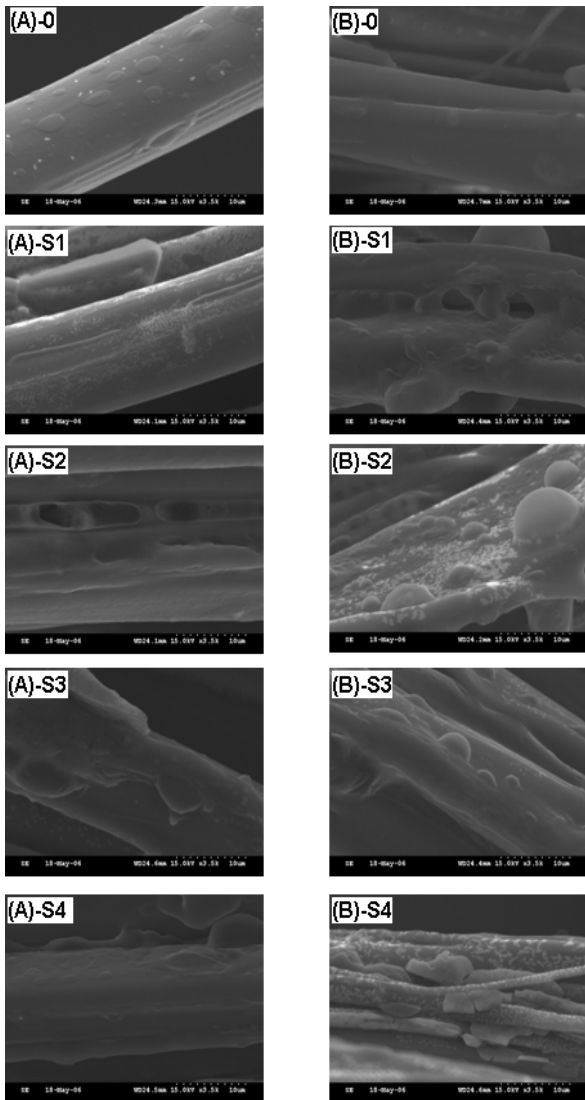


Fig. 3. Scanning electron micrographs of silk fibers treated with crude enzyme for 90 min. (A) : silk 1(strength retention 100%), (B) : silk 2 (strength retention 50%), [0 : control, S1 : *K. pneumoniae*, S2 : *S. aureus*, S3 : *B. cereus* TX 1, S4 : *P. fluorescens* TX 2]

간이 증가하여도 아미노산 생성이나 점도가 변하지 않아 SEM 상에서도 크게 외형적 차이를 보이지 않았다. 그러나 대조적으로 균주들이 생성한 효소를 처리한 견사는 시간이 지남에 따라 견사가 부풀어 오르거나 갈라지거나 표면이 거칠어지면서 분해되는 것을 SEM을 통해 확인할 수 있다.

4. 결 론

국내 박물관에서 분리한 131개의 분리 균주들 중에서 protease 활성이 가장 높은 Gram 양성균과 Gram 음성균에서 각각 1 균주씩 두 균주를 선정하여 동정한 결과, *Bacillus cereus* TX 1과 *Pseudomonas fluorescens* TX 2로 동정되었다. 견사에 대한 세균의 열화작용에 의한 물성변화를 조사하기 위하여 본 실험에서는 이들 분리 균주 외에 직물의 항균성 실험에서의 표준 균주인 *K. pneumoniae*와 *S. aureus*를 대조균으로 비교 실험한 결과는 다음과 같다. 견사 분해 실험에서는 박물관에서 분리된 균주가 대조균주보다 전반적으로 더 높은 분해 활성을 나타내었다. 특히 분리균주 *B. cereus* TX 1은 견사 단백질 분해 활성이 가장 높았으며, 그 결과는 아미노산 분석과 점도, SEM을 통해 확인할 수 있었다.

그러나 이들의 casein 분해능에 있어서는 대조균으로 사용한 대조균주인 *K. pneumoniae*와 *S. aureus*가 박물관에서 분리된 균주들보다 높은 것으로 나타났다. 일반적으로 세균의 단백질 분해능을 알아보는 데 쓰이는 casein 분해능은 견사의 분해 활성 결과와 일치하지 않았으며, 박물관에서 분리된 균주들이 대조균에 비해 견사의 분해 활성이 높아 견직물의 분해에 더 큰 영향을 미친다는 것을 알 수 있다. 또한 본 실험의 결과에 의하면 4종의 모든 시험균이 Silk 2보다는 Silk 1을 더 잘 분해하는 것을 알 수 있었다.

이러한 결과로 볼 때 세균이 견직물의 초기 분해에는 적극적으로 관여하지만 견직물의 분해가 진행될수록 견직물의 분해에 있어서 세균의 중요도는 감소할 것으로 추정된다. 그렇지만 중요도가 감소된다고는 하나 꾸준히 세균에 의한 분해가 일어나므로 이러한 세균의 활동을 억제하는 것이 견직물의 보존에 반드시 고려되어야 할 사항이다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구 (R01-2003-000-10276-0)의 지원으로 수행되었음.

참고문헌

1. H. S. Cho, Characteristics of the Excavated Fabrics from Jang-Gi Jung 's Tomb, *The Korean Society of Costume*, **51**(4), 1229-6880(2001).
2. H. J. Jeong, S. H. Han, H. K. Ahn and K. H. Min, Originals: Studies on the cellulase properties of *Aspergillus clavatus* from the Cellulose - Cultural Properties, *Korean J. of Mycology*, **15**(1), 29-37(1987).
3. H. K. Ahn, The Scientific Conservation of Paper and Textile Materials, *KOMUNHWA*, **22**, 89-97(1983).
4. Takashi Watanabe, Kimi Morita and Hiroko Tsuwaki, Morphological Deterioration of Cotton, Wool, Silk and Rayon Textiles by Microorganisms (*Aspergillus* spp. and *Penicillium* spp.), *SEN-I GAKKAISHI*, **36**(9), 75-80(1980).
5. Mutsuko Sato, Deterioration of Polyacrylonitrile Filaments with Enzyme from *Cladosporium cladosporioides* FERM J-8, *SEN-I GAKKAISHI*, **40**(8), 50-57(1984).
6. Takashi Watanabe, Morphological Deterioration of Poly(*p*-Phenylene Terephthalamide) (PPTA) Fiber(KEVLAR 49) by *Aspergillus flavus*, *SEN-I GAKKAISHI*, **43**(4), 192-197(1987).
7. S. J. Lee, J. D. Lee, M. S. Cha, N. E. Lee, S. J. Yoon, H. H. Cho and Y. S. Kwon, Distribution of Microorganisms in Domestic Museum Environments, *Korean J. of the Environmental Sciences*, **14**(8), 1225-4517(2005).
8. American Association for Textile Chemists and Colorists Test Method 100-2004, Antibacterial Finishes on Textile Materials.
9. S. Ozeki, I. Baba, N. Taiaya and H. Shoun. A Novel Cl-Utilizing Aerobic Denitrifier *Alcaligenes* sp. STC1 and Its Genes for Copper-Containing Nitrite Reductase and Azurin. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **65**, 1206-1210(2001).
10. C. H. Jeon, Y. S. Kwon, S. J. Lee and H. H. Cho, A Study on the Alkaline Degradation Properties of Silk Fabrics for Costume Heritage Restoration, *J. Korean Soc. of Dyers and Finishers*, **17**(4), 41-47(2005).
11. Hull M. E. Studies on Milk Proteins II. Colrimetric Determination of the Partial Hydrolysis of the Proteins in Milk, *J. Dairy Sci.*, **30**, 881-884(1974).
12. C. H. Rhee, C. J. Woo, D. H. Bae and K. P. Kim, Purification and Characterization of Protease from *Bacillus subtilis* PANH765, *Korean J. of Food Preservation*, **10**(2), 246-251(2003).