

木材變色菌 및 表面汚染菌類에 對한  
*Streptomyces rimosus*의 抗菌代謝 ( I )<sup>\*1</sup>  
- 2次 代謝物質의 抗菌效能 -

姜奎榮<sup>\*2</sup> · 李東洽<sup>\*3</sup> · 吳正壽<sup>\*2</sup>

Antifungal Metabolisms of *Streptomyces rimosus*  
against Sapstain and Mold Fungi( I )  
- Antifungal Efficacy of Secondary Metabolites -  
Kyu-Young Kang<sup>\*2</sup> · Dong-Heub Lee<sup>\*3</sup> · Jung-Soo Oh<sup>\*2</sup>

ABSTRACT

The purpose of this study is to evaluate the efficacy of metabolites produced form *Streptomyces rimosus* in controlling the growth of sapwood - inhabiting fungi. In order to carry out this task, the following specific fungi were tested : sapstain fungi - *Ceratocystis pilifera*, *Ceratocystis piceae*, and *Aureobasidium pullulans*; mold fungi - *Trichoderma hazianum*, *Trichoderma viride*, *Penicillium citrinum*, and *Aspergillus niger*. Based on the tests, the following observations can be drawn.

1. The conidial germination of sapstain and mold fungi was completely inhibited leaving a clear zone around the paper disc treated with metabolites. The best inhibition was observed in *A. pullulans* plate and the least in *T. viride*.
2. Concentration of SB medium for the production of metabolites from *St. rimosus* affected antifungal activity of metabolites against sapwood - inhabiting fungi. Metabolites prepared from 1/3× SB medium showed the best activity and the least activity was observed in metabolites form 1/4× medium.
3. *in vivo* and *in vitro* test using wood blocks, treatment of pine sapwood blocks with metabolites also inhibited conidial germination and thus prevented discoloration.
4. Treatment with metabolites did not change the macroscopic structure of wood and did not cause the discoloration of the surface of wood by pigments produced form *St. rimosus*.

In conclusion the results of this study indicate that antifungal metabolites of *St. rimosus* could be used for the biological control of sapstain and mold fungi.

**Keywords** : Biological control, *Streptomyces rimosus*, sapstain fungi, mold fungi, antifungal activity, inhibition zone, wood block test

<sup>1</sup> 接受 1994年 12月 3日 Received December 3, 1994

<sup>2</sup> 東國大學校 生命資源科學大學 College of Biological Resources Science, Dongguk University, Seoul 100-715, Korea

<sup>3</sup> 林業研究院 Forestry Research Institute, Seoul 130-012, Korea

# 1. 緒 論

목재의 변색 및 표면오염균류의 방제에 사용되는 살균제는 화학합성 방부제가 대부분이며, 최근 화학 농약에 의한 환경오염의 가중과 더불어 광범위한 항균 스펙트럼이 표적외 생물에 대해서도 악영향을 미치며, 병해충에 대해 저항성을 높여주는 폐해가 인정되고 있어 그 사용규제의 범위가 점차 확대되고 있다.

따라서, 목재보존분야에서는 목표로 하는 목재변색균 및 표면오염균에 대해서는 저항성이 높으나, 다른 생물에 대해서는 저항성의 발현이 낮은 생물학적 방제에 대한 필요성이 강조되고 있으며, 최근 바이오 테크놀로지의 발달과 더불어 유용 미생물을 이용한 항균제의 개발 가능성이 높아지고 있다.

지금까지 유일하게 개발되어진 미생물제제 목재보존제인 Binab<sup>TM</sup> 페렛트는 *Trichoderma hazianum*의 추출물이며, 세포막 구성물질인 키틴을 억제하는 것으로 알려지고 있다.

*Trichoderma*는 환경 중에 널리 분포하지만 인축에 대해서 거의 무해하기 때문에 독성데이터의 요구 항목도 면제해줄 것이 청원중으로, 그 안전성이 높게 평가되고 있다.

한편 *Streptomyces rimosus*는 원핵세포를 가진 세균중 방선균류로서 여러가지 항생물질의 생산력이 높기 때문에 의학이나 약학분야에서는 이미 오래전부터 이용되어 왔다. 그러나, 농업이나 목재보존분야에서는 1980년대 후반부터 이에 대한 연구가 본격화되고 있으나(Benko & Highley, 1990 ; Croan & Highley, 1992 ; Highley *et al.*, 1991) 아직 국내에서는 극히 초보적인 단계에 있으며, 실용화되기까지는 해결해야 될 문제점이 많이 있다.

Table 1. Test fungi and bacterium.

Sapstain fungi	<i>Ceratocystis pilifera</i> (Fries) Moreau (CPI) [ FRI 20261 ]
	<i>Ceratocystis piceae</i> (Munch) Bakshi (CEP) [ FRI 20171 ]
	<i>Aureobasidium pullulans</i> (de Bary) Arnaud (AUP) [ FRI 20142 ]
Mold fungi	<i>Trichoderma hazianum</i> Rifai (TRH) [ FRI 21034 ]
	<i>Trichoderma viride</i> S-611 (TRV) [ FRI 21051 ]
	<i>Penicillium citrinum</i> Thom (PEC) [ FRI 20751 ]
	<i>Aspergillus niger</i> van Trieghens (ASN) [ FRI 20132 ]
Bacterium	<i>Streptomyces rimosus</i> Sobin <i>et al.</i> [ KCCM 12222 ]

따라서, 본 연구에서는 *St. rimosus* 대사물질의 항균력을 검정하고, 목편을 이용한 방미효력 시험을 통하여 목재변색균 및 표면오염균류에 대해 보다 효과적이고 우수한 생물학적 방제제로서의 이용 가능성에 대하여 실험실적 방법을 통하여 검정하였다.

# 2. 材料 및 方法

## 2.1 공시재료

### 2.1.1 공시균

본 실험에 사용된 공시균은 Table 1과 같이 목재변색균 3종, 표면오염균 4종 및 이들에 대한 항생균 1종이며, 목재변색균과 표면오염균은 산림청 임업연구원(FRI)에서, 항생균은 사단법인 한국중균협회(KFCC) 부설 한국미생물보존센터(KCCM)에서 각각 분양받았다.

### 2.1.2 공시배양기

목재변색균과 표면오염균의 배양에는 영양 한천배지(nutrient agar medium supplemented peptone : NAP)를 사용하였으며, 항생물질 생산을 위한 항생균 배양에는 액체 육추배지(sporulation broth medium : SB)를 사용하였다. 각 배지는 120℃, 1.2기압에서 20분간 고압멸균한 것을 사용하였다. 배지 조성분은 Table 2와 같다.

### 2.1.3 공시편

방미효력 시험에 사용된 공시편은 소나무(*Pinus densiflora* Sieb. et Zucc.) 변재로서 산림청 임업연구원으로부터 분양받아 사용하였다.

목편의 크기는 5×18×40(T×W×L)mm로 하였으며, 목편의 멸균은 에틸렌옥사이드 가스 멸균을 하였다.

### 2.1.4 항균성 대사물질의 준비

*St. rimosus*가 생산하는 대사물질의 항균효력 검정에 사용한 항균성 대사물질은 Fig.1과 같은 경로

Table 2. Medium composition.

Medium	Composition	
NAP	Malt extract	20.0 g
	Peptone	10.0 g
	Agar	20.0 g
	Distilled water	1000 ml
SB	Yeast extract	1.0 g
	Beef extract	1.0 g
	Tryptose	2.0 g
	Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	trace
	Glucose	10.0 g
	Distilled water	1000 ml

를 거쳐 준비하였다.

SB 액체배지에서 *St. rimosus*를 3일간 진탕배양하여 소균구(小菌球)를 형성시킨 후,  $\frac{1}{3} \times$  SB 액체배지에 분주 집중하여 4일간 진탕배양한 여과액을 항균성 대사물질로 하였다.

진탕배양조건은 30°C/200rpm으로 회전 진탕배양하였으며, 여과액은 0.2 $\mu$ m millipore filter (MFS 25 disposable syringe filter unit, cellulose nitrate)로 여과·멸균하였다.

## 2.2 실험방법

### 2.2.1 *St. rimosus*의 항균력

*St. rimosus* 대사물질의 항균효력은 각 시험균의 포자현탁액 200 $\mu$ l(0.05% 계면활성제, polyoxyethylene sorbitan monolaurate[Tween 20]로 희석한 것)를 각각 영양 한천평판 위에 도말한 다음 paper disc를 평판의 양끝에 고정하고, 한쪽 paper disc 위에 미리 준비된 *St. rimosus* 배양 여과액 30 $\mu$ l를 처리하였으며, 다른 한쪽은 대조구로서 멸균수 30 $\mu$ l로 처리하였다. 배양은 27°C, 상대습도 70%에서 24시간동안 배양한 후 디스크 주위에 형성된 생육 억제원의 직경을 10회 측정하여 항균효력을 검정하였다.

### 2.2.2 *St. rimosus* 대사물질의 최대항균력 발회 농도 탐색

*St. rimosus*의 대사물질이 최대의 항균력을 발휘하는 생산배지(SB 액체배지)의 농도 조건을 찾기 위

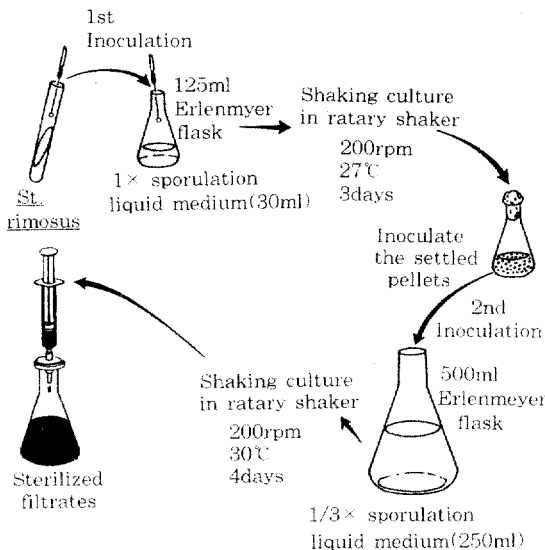


Fig. 1. Preparation of the antifungal metabolites from *St. rimosus*.

하여 생산배지의 농도를 1 $\times$ ,  $\frac{1}{2} \times$ ,  $\frac{1}{3} \times$  및  $\frac{1}{4} \times$ 의 4가지로 구분하고, 한천평판 배양기에서 각 농도별로 형성된 생육 억제원의 크기를 기준으로 적정농도를 구하였다.

### 2.2.3 방미효력 검정

#### 2.2.3.1 항균처리 목편의 준비

목편을 24시간동안 멸균수에 담귀 함수율을 높인 뒤 무균상태로 표면건조후 *St. rimosus* 항균성 대사물질에 1시간 동안 침지하였다. 동일한 조건으로 대조구는 멸균수에 1시간동안 침지한 것을 사용하였다.

#### 2.2.3.2 *in vivo* 시험

영양한천평판에 미리 배양(27°C, 상대습도 70%에서 20일동안 배양)해 놓은 각 시험균 상에 항균처리된 목편과 무처리 목편(대조구)을 균층에 목편이 닿지 않게 멸균 플라스틱네트를 간 위에 올려놓고 27°C, 상대습도 70%에서 8주동안 배양하면서 1주마다 변색 및 오염도를 측정하였다.

#### 2.2.3.3 *in vitro* 시험

2% 한천평판에서 항균처리된 목편과 무처리 목편을 올려놓고 각 시험균의 포자 현탁액 200 $\mu$ l를 목편 위에 고르게 분무한 후 27°C, 상대습도 70%에서 8주동안 배양하면서 1주마다 변색 및 오염도를 측정하고 각각의 오염도를 등급별로 판정하였다.

#### 2.2.3.4 변색 및 오염도의 판정

목편의 변색 및 오염도는 Table 3의 기준에 의하여 5등급으로 구분, 실제현미경으로 판정하였으며 시험편의 표면이 균사가 피복되지 않고 건전한 것을 등급 0, 표면의 40% 이상을 균사가 피복하고 있는 것을 등급 4로 하였다.

## 3. 結果 및 考察

### 3.1 *St. rimosus*의 항균력

목재변색균과 표면오염균에 대한 *St. rimosus* 대사물질의 항균효력 검정 결과는 Table 4 및 Fig. 2와 같다.

*St. rimosus* 대사물질에 의해 가장 큰 억제효과를 나타낸 것은 섬유상물질의 청변균인 *Aureobasidium pullulans*였으며(억제경 38.4mm), 소나무류의 목구멍이나 수간부의 상처를 통해 목부면에 침투하는 청변균인 *Ceratocystis pilifera*와 *Ceratocystis piceae*도 생육억제경이 각각 36.5mm, 34.2mm로 비교적 높은 억제효과를 나타냈다.

복재표면오염균의 대표적인 균주로 *Penicillium*속과 *Aspergillus*속이 알려져 있으며, 후자의 경우는 고침투압, 저습도의 기질에서도 발육이 되는 균주이므로 언제나 제 1차 침입균이 되고 있다(倉田 等, 1975).

Table 3. Rate of fungal growth and discoloration on wood blocks.

0	Clean	no stain or mold
1	Minor	stain or mold covering less than 5 % of upper surface
2	Light stain	stain or mold covering 5-20 % of upper surface
3	Moderate stain	stain or mold covering 20-40 % of upper surface
4	Heavy stain	stain or mold covering more than 40 % of upper surface

*St. rimosus* 대사물질은 이러한 *P. citrinum*과 *A. niger*에 대해서도 각각 32.4mm와 29.6 mm의 생육억제경을 나타냈다.

담자균류의 균체 구성물질인 키틴활성을 갖고 있는 *T. hazianum*과 *T. viride*는 이러한 길항적 성질이 이용되어 최근 미국 환경보호국(Environmental Protection Agency, EPA)에서 신규 생물농약으로 등록<sup>17)</sup>된 바 있다. 이들 균류는 표고버섯 가해 균으로도 알려져 있으나, *St. rimosus* 대사물질에 의해 생육이 각각 28.5mm와 26.7mm 억제되었다.

### 3.2 *St. rimosus* 대사물질의 최대항균력 발휘 농도의 탐색

*St. rimosus* 대사물질이 최대의 항균력을 발휘하는 생산배지의 농도조건을 탐색한 결과는 다음과 같다.

최대의 항균력을 나타낸 것은 균중에 관계없이 1/3 × 배지의 것으로서 최단시간에 1×보다 적게는 11%에서 많게는 17%까지 생육억제경이 확대되었다. 이

Table 4. Inhibitor zone diameter measurement between test fungi and metabolites from *St. rimosus* in plate bioassay.

Fungi	Inhibitor zone diameter(mm)
<i>Ceratocystis pilifera</i>	36.5
<i>Ceratocystis piceae</i>	34.2
<i>Aureobasidium pullulans</i>	38.4
<i>Trichoderma hazianum</i>	28.5
<i>Trichoderma viride</i>	26.7
<i>Penicillium citrinum</i>	32.4
<i>Aspergillus niger</i>	29.6

들의 증가비율은 *St. rimosus*의 항균력에 관계없이 *A. niger*가 비교적 높은 증가율을 나타냈다. 이어서 1/4×에서는 1×보다 적게는 13%에서 많게는 28% 감소하는 경향이 전 균종에서 나타났다.

### 3.3 방미효력 시험

#### 3.3.1 *in vivo* 시험

균사가 만연된 영양 한천평판상에서의 *in vivo* 시험 결과, *St. rimosus* 대사물질에 1시간동안 침지처리한 목편은 Table 6과 같이 배양 8주 후에도 7종의 공시균 모두에 대하여 등급 0의 무오염도를 유지하였으며, 균사가 목편에 접촉하여도 표면에는 전혀 기생하지 못하였다(Fig. 3).

반면에 동일한 조건에서 멸균수에 침지했던 대조구는 배양 8주 후, 7종의 공시균 모두에서 등급4의 시편의 표면 전부 또는 40% 이상의 심한 오염도를 나타내었다.

*St. rimosus* 대사물질 중 항균활성을 갖는 물질은 oxytetracycline, chlorotetracycline, tetracycline

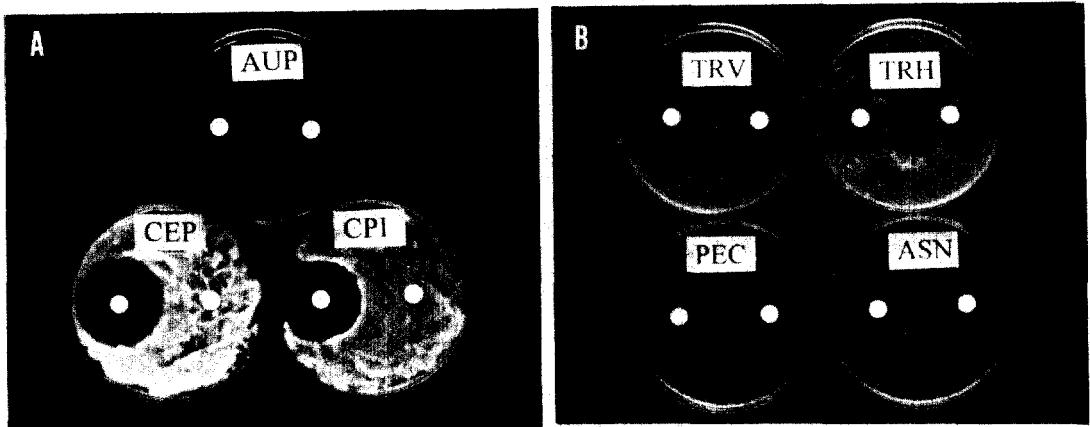


Fig. 2. Plate bioassays. (A : Sapstain fungi, B : Mold fungi)

Table 5. Effect of medium concentration on activity of metabolites from *St. rimosus* in plate bioassay .

FungiSB medium concentration	Inhibition zone diameter (mm)						
	CPI	CEP	AUP	TRH	TRV	PEC	ASN
1×	36.5	34.2	38.4	28.5	26.7	32.4	29.6
½×	38.7 (6)	37.3 (9)	40.1 (4)	30.2 (6)	28.8 (8)	34.6 (7)	31.0 (5)
⅓×	41.3 (13)	39.8 (16)	42.8 (11)	31.7 (11)	30.9 (16)	37.3 (15)	34.5 (17)
¼×	29.7 (-19)	28.7 (-16)	33.6 (-13)	21.8 (-24)	19.3 (-28)	25.8 (-20)	23.5 (-21)

Note : values in parentheses are percent differences of antifungal activity of metabolites produced from undiluted SB medium (1×).

및 anhydrotetracycline 등이 지금까지 알려져 왔으며, 이들 물질은 세균, 진핵세포 리보솜의 양 서브유닛에 결합하며, aminoacyl-tRNA와 결합하여 펩티드 저해반응으로 termination을 저해하는 것으로 알려지고 있다<sup>16)</sup>. 본 시험의 결과에서도 시험균주들이 목재표면에 접근할 수 없었던 것은 *St. rimosus* 대사물질중 tetracycline계 물질이 시험균주의 termination을 저해하기 때문으로 추정되며, 이에 대해서는 현재 대사물질의 분리동정과 각 성분

Table 6. Inhibition of discoloration on pine sapwood blocks treated with sterilized filtrates of metabolites from *St. rimosus* in vivo test.

Rate of fungal growth & discoloration	CPI CEP AUP TRH TRV PEC ASN						
	Treated	0	0	0	0	0	0
No treatment	4	4	4	4	4	4	4

들의 작용기작에 대하여 검토중에 있다.

### 3.3.2 in vitro 시험

실제 적용력을 시험하기 위한 Petri 평판상에서의 in vitro 소규모 폭로 시험에서도 *St. rimosus*의 항균성 대사물질에 1시간 침지처리한 목편은 7종의 시험균 모두에서 등급 0의 무오염도를 나타내었으나, 대조구는 등급 4의 강한 오염도를 나타내었다.

in vitro 시험의 결과는 Table 7과 같으며, 8주간의 시험 종료후의 시험편의 표면의 현미경 관찰에서 무처리재의 경우와 차이가 없었으며, 조직내의 변색 오염 착색물질에 의한 착색도 없었다.

*St. rimosus*는 목재를 변색시키거나 목재에 물리적 피해를 주지 않기 때문에 이 균의 대사물질은 목재식균류에 대한 억제효과만 확실하다면 가장 우수한 생물학적 방제제가 될 것이라고 전망한 결과(Croan et al. 1992)는 본 시험의 결과에서도 입증되었다.

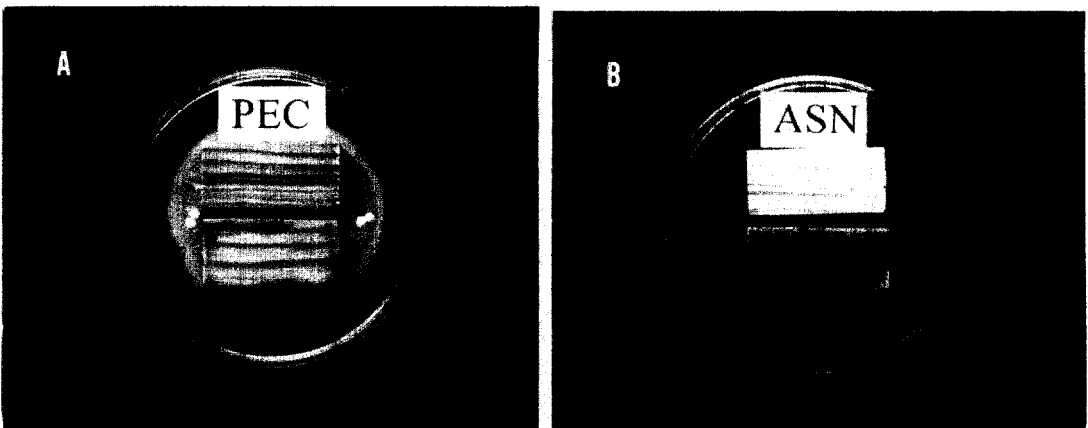


Fig. 3. Pine sapwood block tests.

A : After 3 weeks exposure in *P. citrinum*

Upper : treated with metabolites from *St. rimosus*. Lower : no treatment (control).

B : After 8 weeks exposure in *A. niger*

Upper : treated with metabolites from *St. rimosus*. Lower : no treatment (control).

Table 7. Inhibition of discoloration on pine sapwood blocks treated with sterilized filtrates of metabolites from *St. rimosus* in vivo test.

Rate of fungal growth & discoloration	CPI	CEP	AUP	TRH	TRV	PEC	ASN
Treated	0	0	0	0	0	0	0
No treatment	4	4	4	4	4	4	4

#### 4. 結 論

*St. rimosus* 대사물질의 항균효력 검정과 목판에 적용한 방미효력시험 결과, 목재변색군 및 표면오염군 7종에 대한 항균력이 매우 크게 나타났으며, 특히 목판에 직접 처리한 *in vivo*, *in vitro*의 결과에서도 항균력이 높음이 입증되었다. 이들은 항균성 대사물질 처리에 의해 목재표면의 오염이나 착색현상은 나타나지 않았으며, 외관상에서 관찰한 목재조직 구조의 변화도 없었다.

최근 화학제제 목재방부제의 독성이 인간과 동물 및 환경에 대한 오염을 가중시키고 있으며, 이에 대한 대체제로 생물학적 방제제의 개발에 대한 소리가 높아가고 있다. 그러나, 지금까지 개발되어진 것은 항균 스펙트럼이 매우 좁기 때문에 대상으로 하는 생물 이외의 적용은 불가능했으나, *St. rimosus* 대사물질의 경우는 항균 스펙트럼도 넓고, 항균력도 매우 뛰어나기 때문에 목재변색군과 표면오염군에 대한 생물학적 방제제로의 개발 이용가능성이 매우 높다.

따라서, 안정된 생물학적 방제제로의 이용개발을 위해서는 야외 폭로시험을 통한 장기 효력지속성과 대사물질의 분리동정에 의한 작용기작을 밝히고, 항균성 대사물질의 대량 생산을 위한 유전자 조작 등에 관한 지속적인 연구가 절실히 요구된다.

#### 參 考 文 獻

1. Benko, R. and T. L. Highley. 1990. Evaluation of bacteria for biological control of wood decay. The International Research Group on Wood Preservation, Document No. IRG/WP/1426
2. Bruce, A., W. J. Austin and B. King. 1984. Control of growth of *Lentinus lepideus* by volatiles from *Trichoderma* spp. *Trans. Brit. Mycol. Soc.* 82(3) : 423-428
3. Bruce, A. and T. L. Highley. 1991. Con-

4. Bruce, A. 1992. Biological control of wood decay. The International Research Group on Wood Preservation, Document No. IRG/WP/1531 - 92
5. Croan, S. C. and T. L. Highley. 1991. Control of sapwood-inhabiting fungi by fractionated extracellular metabolites from *Coniophora puteana*. The International Research Group on Wood Preservation, Document No. IRG/WP/1494
6. Croan, S. C. and T. L. Highley. 1992a. Biological control of sapwood-inhabiting fungi by living bacterial cells of *Streptomyces rimosus* as a bioprotectant. The International Research Group on Wood Preservation, Document No. IRG/WP/1564 - 92
7. Croan, S. C. and T. L. Highley. 1992b. Synergistic effect of boron on *Streptomyces rimosus* metabolites in preventing conidial germination of sapstain and mold fungi. The International Research Group on Wood Preservation, Document No. IRG/WP/1565 - 92
8. Croan, S. C. and T. L. Highley. 1991. Biological control of the blue stain fungus *Ceratocystis coerulea* with fungal antagonists. *Material und Organismen* 25(4) : 255-266
9. Highley, T. L., R. Benko and S. C. Croan. 1991. Laboratory studies on control of sapstain and mold on unseasoned wood by bacteria. The International Research Group on Wood Preservation, Document No. IRG/WP/1493
10. Hulme, M. A. and J. K. Shields. 1972. Interactions between fungi in wood blocks. *Canadian J. Botany* 50(6) : 1421-1427
11. Srinivasan, U., T. L. Highley, S. C. Croan and A. Bruce. 1988. Antagonistic effect of *Trichoderma* spp. against basidiospores. The International Research Group on Wood Preservation, Document No. IRG/WP/93 - 10027

12. 김성욱. 1992. 새로운 항생물질 탐색시 방선균의 발효과정. *微生物과 産業* 18(3) : 53~62
13. Thompson, R. 1991. The chemistry of wood preservation. The Royal Society of Chemistry, Cambridge : 275~281
14. Zabel, R. A. and J. J. Morrell. 1992. Wood microbiology : Decay and its prevention. Academic press, Inc. San Diego : 326~343
15. 倉田 浩 外 3 人. 1975. 微生物による木質劣化-その検査法と対策. 講談社 : 8~9
16. 日本生化学會 編. 1989. 生化学データブックエ. 東京化学同人 : 1442
17. (株)三菱化成安全科学研究所 編. 1993. 微生物農薬 の現状と安全性評價 : 273~280