

최 중  
연구보고서

변색균의 분자생물학적 진단시스템 및 친환경 방  
미제·방미법 개발

Development of environment-friendly  
chemicals as well as methods of anti-stain  
and Sapstain Fungal Diagnosis system  
using molecular biology

전북대학교  
군산대학교

농림수산식품부

# 제 출 문

농림수산식품부 장관 귀하

본 보고서를 “변색균의 분자생물학적 진단시스템 및 친환경 방미제·방미법 개발” 과제의 최종보고서로 제출합니다.

2008년 4월 일

주관연구기관명 : 전북대학교  
총괄연구책임자 : 이 양 수  
세부연구책임자 : 이 건 형  
연 구 원 : 한 상 섭  
연 구 원 : 벨무루간  
연 구 원 : 김 성 진  
연 구 원 : 권 오 훈  
연 구 원 : 최 시 혁  
연 구 원 : 신 용 환  
연 구 원 : 조 성 준  
연 구 원 : 최 창 윤

# 요 약 문

## I. 제 목

변색균의 분자생물학적 진단시스템 및 친환경 방미제·방미법 개발

## II. 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구의 최종 목적은 국내에 서식하는 수입목재 및 국내 자생 목재의 표면 오염과 변색을 일으키는 진균류를 채집하여 분리·동정하고 대표적인 목재변색균을 최신 분자학적 신기술을 도입하여 신속, 정확히 검출할 수 있는 특이 Primer의 검출법과 이들 목재 변색균들간의 분자학적 계통을 확립하여 정확한 변색균에 대한 체계를 확립하고자 한다. 또한, 목초액이나 죽초액 등을 기본 방미제로 하여 환경오염이 적은 물질을 사용하여 오염시키지 않으면서도 효과 좋은 방미제 및 방미법을 개발하고자 한다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

### 연구결과

#### - 주요 목재변색균의 방미효력 검증을 위한 생리적 특성

1. pH에 따른 성장속도 측정 결과 *Ophiostoma narcissi*를 제외한 모든 균주가 pH 6.0-8.0에서 양호한 성장을 나타내었다. *Ophiostoma polonicum*와 *Ceratocystis adiposa*는 pH변화에 민감한 성장을 보였으나 다른 균주는 pH 조건에 따른 특정한 조건에서 활발한 성장을 나타내지 않고 광범위하게 비슷한 성장률을 나타내었다.
2. *Ophiostoma ulmi*와 *Ceratocystis ips*는 30℃에서 가장 활발한 성장을 나타내었고, 다른 모든 균주는 25℃에서 최적의 군사생장을 나타내었다. *Ceratocystis ips*는 30℃에서 69mm 성장으로 시험 균주 중 가장 활발한 성장을 나타내었고 대부분의 균주가 성장하지 않은 35℃에서도 52.7mm의 성장으로 고온성 균이라 할 수 있겠다.

#### - 주요 목재변색균에 대한 목초액 및 죽초액의 방미효과

1. 모든 시료는 *Ophiostoma narccsi*를 제외한 다른 균주에 대해서는 방부 효과가 없었으며, *Certocystis adiposa*와 *Ophiostoma ulmi*에 대해서는 오히려 균사의 생장에 목초액이 촉진효과가 있었다.
2. 죽초액은 목초액과는 달리 뚜렷한 방부 능력을 나타내었으며, 대체로 2%이상에서부터 양호한 억제 능력을 가지고 있다고 사료된다. *Ophiostoma ulmi*는 다른 10개 균주와는 달리 죽초액 1% 이하에서는 억제 받지 않고 성장하는 것을 확인할 수 있었다.
3. 목초액은 5% 농도에서부터 시험에 사용된 모든 변색균의 성장을 저해한다고 볼 수 있으며 10% 농도에서부터 확연한 저해를 한다고 볼 수 있다.

#### - 목재서식 각종 세균에 대한 방미효과

1% HWE가 식중독균에 항균력을 나타내는지 알아보기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다. *Staphylococcus aureus*는 1%로 희석시킨 방미제 HWE에 대한 성장억제는 매우 높게 나타났으며 접종 후 2시간 후에 급격한 성장을 보이는 대조구에 비하여 접종 5시간 후에도 지속적인 항균효력을 보여주었다. *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus*는 1%의 HWE에 의해 거의 생장이 저지되는 것을 알 수 있다. 1% HWE가 *Listeria monocytogenes*에서는 양호한 항균력을 나타내었으나 기본적으로 다른 균주에 비하여 생장이 왕성한 *Escherichia coli*는 33%의 항균능력을 보여주었다. 1% HWE가 세균에 있어서 어느 정도 항균력을 보인 것으로 보아 변색균에도 방미효과를 보일 것으로 사료된다.

#### - 목재변색균의 목재조직 및 세포 침투 메카니즘

1. 목재변색균은 목재의 표면에 포자 혹은 균사형태로 집락을 형성하며 표면의 최외각층에서 세포내로 균사가 성장한다.
2. 세포내에 침투한 균사는 이차벽의 S2층과 같은 셀룰로오스층은 거의 분해하지 않으며 주로 이웃세포로의 이동을 위하여 세포벽을 분해하거나 파괴한다.
3. 균사는 목재세포의 내강에 집락을 형성하며 세포내강의 표면이나 S3층의 저분자 물질을 우선적으로 분해 흡수하여 성장한다.
4. 균사의 목재내부로 이동은 벽공막의 마르코의 파괴 혹은 벽공막의 분해에 의하여 이곳을 통하여 이웃 세포로 이동한다.
5. 세포벽을 통과하여 이웃세포로 이동하게 되는데 기계적인 힘에 의하여 세포벽을 뚫고 세포에서 이웃세포로 이동한다.

- 천연물질에 대한 방미효력 및 특성 연구

1. 목초액 및 죽초액으로 사용된 시료의 chloroform fraction은 GC-MS에 의하여 분석되었으며 두 종류 모두 2,6-dimethoxy phenol, dehydroacetic acid, 2,3,5-trimethoxytoluene 성분을 함유하고 있었다.
2. 이들 죽초액과 목초액은 목재 생산 산업체에서 친환경적인 방미 혹은 항산화 작용을 가진 천연방부제로 사용될 수 있다.
3. 목재 슬라이스시편 실험은 실험실내에서 효과적인 방미실험을 검증 할 수 있었다.

- Silver 및 Silica Beads + Silver Thiosulfate complex의 미생물 방미효력 검증

1. Silica Beads + Silver Thiosulfate complex는 안정적이며 열대한 저항성이 높으며 물에 쉽게 녹는다. 고분자물질과 혼합하게 된다면 이들의 물리적 특성은 변하지 않거나 변성하지 않는다.
2. 이 혼합물질은 세균, 진균, 조류 등에 매우 높은 방미효과를 보여주며 페인트, 섬유, 고무 등과 같이 쉽게 사용할 수 있다.
3. 자연환경에 비독성이며, 인간이나 사용자에게 안전한 혼합물질이다.

- Chitosan-glutaldehyde-silver ions membranes제조 및 항균력 측정

1. silver nanoparticles은 낮은 농도에서도 목재변색균에 대하여 매우 높은 방미효과를 보여준다.
2. 인간의 건강과 자연환경에서의 독성이 높은 CCA보다 우수한 성질의 방미제이다.
3. 자연환경과 경제적인 측면에서 목재산업체에서도 쉽게 생산해 낼 수 있다.

- 목재변색균에 대한 *Bacillus subtilis* EF 617317과 *B. licheniformis* EF 617325의 길항물질의 판명 및 부분 정제: 실험실 및 야외폭로 실험

1. *Bacillus subtilis* EF 617317과 *Bacillus licheniformis* EF 617325의 항진균성 활성은 목재변색균인 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181)와 *Ophiostoma ips*(363176)에 대하여 in vitro와 in vivo의 조건에서 분석되었다.
2. *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum* (363181)와 *Ophiostoma ips*(363176)에 대한 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*의 부분적으로 정제된 성분이 매우 강한 길항작용을 보여줌을 확인하였다.
3. *B. subtilis*의 경우 3302에서  $2856\text{cm}^{-1}$  과 1655에서  $1535\text{cm}^{-1}$  *B. licheniformis*의 경우는 3295에서  $2929\text{cm}^{-1}$  에서 관찰되었다. 이러한 약  $3300\text{cm}^{-1}$  주위의 넓은 밴드는 NH그룹에 기인하고 1655에서  $1535\text{cm}^{-1}$ 의 경우는 amid I과 amide II 밴드로

여겨진다.

4. *Pinus radiata*보다는 *Pinus densiflora* 에서 처리된 목재시편이 매우 높은 목재변색균에 의한 변색의 감소가 나타났다. 또한 *Ophiostoma ips*와 *O. flexusum*의 경우보다 *O. polonicum*, *O. tetropii* 균이 생물학적인 약제에 대하여 더욱 예민하게 반응을 하였다.

#### - 중요 변색균의 분자생물학적 분류체계 및 신속 진단법 개발

1. 사용한 *ophiostoma* 7균주에 대하여 ITS 1 및 ITS 4 프라이머를 이용하여 증폭한 결과 모두의 균주에서 약 600~700 bp 크기의 PCR 산물을 획득하였다. Lane 2 및 6의 경우에는 다른 균주들에서 보였던 PCR 크기보다 약간 작은 크기를 가지고 있는 것이 특징적이었다.
2. PCR에 의하여 증폭된 ITS 1 및 ITS 2 유전자를 제한효소 *Hha* I, *Hpa* II, *Hind* III, *Mse* I, *Mbo* I 등의 5가지 제한효소를 이용하여 PCR-RFLP분석하여 다양한 밴드패턴을 얻을 수 있었다.
3. *Ophiostoma* spp.균주를 특이적으로 증폭할 수 있는 특이 primer 선발을 위해 동정된 fungi의 ITS(internal transcribed spacer) 염기서열을 alignment 한 결과 ITS2 부분에서 *Ophiostoma* 만의 공통된 염기서열 보존지역을 발견하고 이 부분에서 ITS2-internal middle reverser primer(IMR primer 5'-GTTCGGTACTGCGCTCGGA-3')를 선택 할 수 있었다
4. *Ophiostoma* spp.균주에 대한 특이적 primer개발을 위하여 genbank에서의 *ophiostoma* spp. 및 유사한 균류의 ITS영역의 염기서열을 비교분석하여 *Ophiostoma* spp.균에서만 특징적으로 염기서열이 같은 부위에서 프라이머를 선발하였고, 기존의 White et. al., 1990이 이용한 ITS-1 및 ITS-4프라이머와 동일하게 multiple primer로 이용하였다
5. 사용한 *Ophiostoma* spp.균주들에 대하여 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S부위에 대하여 염기서열을 분석하고, DDBJ 및 NCBI Genbank database를 통하여 17균주의 염기서열과 비교분석한 결과 전체적으로 6개 큰 그룹으로 분류할 수 있었다. 분류군 중에서 Opi-363175 균주의 경우에는 비교분석한 어느 분류군에도 속하지 않아, 제일 유의성이 높고 근연의 유연관계를 보인 균주로는 *Ophiostoma canum*(Genbank accession no. AJ538342) *Ophiostoma brevisculum*(Genbank accession no. AB200420)등이 93%의 유의성을 보여주었다.

## IV. 연구개발 과제 및 활용에 관한 건의

### 제 1 항 연구개발 과제 문제점

국내·외에서 수행되고 있는 문제점은

- 1) 첫째: 연구의 연관성 부족  
국외의 선두 연구실은 연구의 특성을 잘 나타내고는 있으나 연구 분야간 연관성이 부족하여 총체적인 연구가 이루어지고 있지 않음.
- 2) 둘째: 지역적 한계  
목재의 수출입이 자유로워 목재의 변색균의 유입이 매우 쉬운 측면을 간과하고 있다. 특히, 목재변색균의 수입경로 및 균의 정보가 밝혀 있지 않아 방제하는데 어려움이 있음.
- 3) 셋째: 환경오염의 문제  
대부분의 연구가 화학적 방미제를 개발하거나 사용하여 환경오염의 문제를 야기하고 있음. 생물학적이거나 친환경적인 방미제는 경제적인 측면에서 화학약제에 비하여 목재산업체로부터 기피되고 있다.
- 4) 넷째: 국내·외 변색균의 연관성 연구 부족  
이들의 분자생물학적인 연구가 수행되지 않아 수입목재와 국내 채집 종간의 연관성에 관한 연구가 이루어지고 있지 않음.

따라서 본 연구에서는 분자학적 방법을 도입하여 목재변색균을 신속, 정확히 검출할 수 있는 특이 Primer의 검출법과 이들 목재변색균들간의 분자학적 계통을 확립하여 변색균의 정확한 체계를 확립하고, 목재 변색균에 대한 길항적 미생물에 대한 탐색을 통하여 목재 변색을 방지하고 목재상품의 가치를 유지시킬 수 있는 기초연구를 수행하였다.

### 제 2 항 연구과제 건의

본 연구의 과제 상 건의점은

- 1) 첫째: 친환경제품의 개발연구의 중요성과 업체의 실제 적용성과의 합의점 실용화 도출이 어려움.
- 2) 둘째: 현 연구 성과의 파일럿 시스템에 관한 비전이 제시되지 않아서 파일럿 스케일에 관한 예산지원이 요구됨.
- 3) 연구 성과의 결과를 산업화시키기 위한 후속 연구 지원시스템이 없어서 후속 특허 출원, 국제학술지 논문투고, 로열티협정 등의 지원제도를 신설하여 주시기 바람

## SUMMARY

Most deterioration and staining problems in wood are caused by fungi. *Ophiostoma* sp. is a major genera to produce staining in wood. In this study, natural resource materials, biological agents and polymers synthesized by natural resources were chosen for the study of the antifungal activity against wood staining fungi, *Ophiostoma* sp. The application of natural resources and biological control agents in wood preservation has not yet been reported. The purpose of our study was to evaluate the action of natural resources, bio-control agents and polymers against sapstaining fungi and inhibition mechanism of products were discussed briefly.

"Chikusaku-eki" and "Mokusaku-eki" are natural resources and acidic liquid by-products of bamboo and broad leaved trees charcoal burner. These products contain more than 200 ingredients, including phenols, poly phenols and acetic acids. These by-products were tested for their fungicidal activity against sapstaining fungi. These extracts were more effective against sapstaining fungi at minimum concentrations (0.10–1.0 %) used in 2 % MEA medium. Three Chikusaku-eki (CE-I, CE-II and CE-III) and 2 Mokusaku-eki (ME-I, ME-II) extracts were tested against 4 sapstaining fungal samples to evaluate the inhibition range on sapstaining fungal growth. *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma tetropii*, *Ophiostoma narcissi* and *Ophiostoma ips* were the sapstaining fungi used in this study against bamboo and wood extracts. The chloroform fractions of these extracts were analyzed by GC-MS and both the extracts contained 2,6-dimethoxy phenol, dehydroacetic acid and 2,3,5-trimethoxytoluene. Results revealed that compounds of "Chikusaku-eki" and "Mokusaku-eki" had remarkable fungal growth inhibitory effect at lower concentrations. The Chikusaku-eki and Mokusaku-eki has both antifungal and antioxidant properties and has a potential for use as natural preservative in wood industries. These extracts are easily available, inexpensive and non-toxic to environment, which validates its applications in wood industries. Wood slice tests were displayed the effective role of both extracts in laboratory level. Colonization and penetration of fungal hyphae into wood elements was evaluated by scanning electron microscope.

Another study was carried out to evaluate the exact role of phenolic compounds existing in wood vinegar towards the sapstaining fungal growth inhibition. To find out the clear mechanism behind antifungal activity of phenolic



compounds in wood vinegar, we neutralized (pH 7) wood vinegar with NaOH and hot water extracts of *Pinus densiflora* and *Quercus serratasaw* dusts were used in the media instead of sterilized distilled water to enhance the fungal growth inhibition property of neutralized wood vinegar. *Ophiostoma polonicum*, *O. ips*, *O. flexuosum*, *O. narcissi* and *O. tetropii* were the sapstaining fungi used in this study against neutralized wood vinegar, extracts of *Pinus densiflora* and *Quercus serrata*. Neutralized wood vinegar was active only above 2.5 % used. GC-MS analysis was performed to identify the phenolic compounds and other ingredients in both neutralized wood vinegar and acidic wood vinegar by chloroform extraction method. Eleven major compounds were identified in acidic wood vinegar and 7 major compounds in neutralized wood vinegar. The acidic wood vinegar contains 72.59 % phenolic compounds and neutralized wood vinegar contains 57.92 % phenolic compounds. The Scanning Electron Microscopy image of fungal growth on wood samples showed the phenomenon of fungal penetration into wood elements. *Pinus densiflora* was used as wood element for SEM analysis.

The antifungal activity of *Bacillus subtilis* EF 617317 and *Bacillus licheniformis* EF 617325 were demonstrated against sapstaining fungal cultures *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma tetropii*, *Ophiostoma narcissi* and *Ophiostoma ips* in both in vitro and in vivo conditions. The active supernatant fractions of 7 days old *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis* cultures inhibited the growth of sapstaining fungi in laboratory experiments. Four antifungal peptides were partially purified from *Bacillus licheniformis* and three antifungal peptides were partially purified from *Bacillus subtilis*. The partial purification was done using sephadex gel filtration chromatography and the compounds masses were determined by LC-MS spectrometry as m/z 1023, 1038, 1066 and 1081 in *B. licheniformis* and m/z 1036, 1058, and 1090 in *B. subtilis*. FT-IR was performed to confirm the surface chemical bonds of lipoproteins. According to our results, the partially purified lipopeptides may belong to surfactin and iturin family. Thermostability and pH stability of lipopeptides were analyzed. The lipopeptides were thermostable and inhibited sapstaining fungal growth in in vitro analysis as methanol-soluble fractions. In vivo analysis of antifungal activity of lipopeptides on wood was conducted in laboratory. In addition, fungal inhibition potential of extracts on surface and internal part of wood samples was analyzed by Scanning Electron Microscopy.

Chitosan membrane was prepared by mixing sterilized chitosan with gluteraldehyde solution then the membrane was dried at 37 °C at 48 hrs. Silver ions were embedded with membrane at different concentrations to produce antifungal activity. Wood staining fungi *Ophiostoma flexuosum*, *O. tetropii*, *O. polonicum* and *O. ips* were tested against Chi-Gla-Ag membrane for antifungal activity. Surface morphology of Chitosan, Chitosan-Gluterldehyde and Chi-Gla-Ag membranes were studied by scanning electron microscopy. The quality and structure of membranes were analyzed by Fourier Transform-Infrared Spectroscopy. Thermostability of the membranes was confirmed by Thermo Gravimetric Analysis. pH 5 was maintained in chitosan and all concentrations of silver ion solutions. SEM results show that the uniform appearance of membrane and addition of gluteraldehyde increases the membrane thickness, thermostability and water insolubility of membrane. The antifungal activity of chitosan membrane increased with increase in concentration of silver ions. In addition, different concentrations of pure chitosan were tested against wood fungi to understand the contribution of chitosan towards the antifungal activity and different concentrations of silver ions were also added with various concentrations of chitosan to demonstrate the antifungal activity by radial diffusion assay method, individually.

# CONTENTS

Part I. The compendium of the research development project	15
Chapter 1. The purpose and significance of the research development project	15
Chapter 2. Necessity of the research development project	15
1. Necessity of the research development project	15
Part II. The present condition of national and international technology development	16
Part III. The contents and results of the research development project	19
Chapter 1. Distribution of wood contaminating fungi and wood sapstaining fungi	19
1. Introduction	
2. Distribution of wood contaminating fungi and wood sapstaining fungi	
Chapter 2. The physiology of wood sapstaining fungi for antifungal activity	34
1. Introduction	
2. The physiology of anti sapstaining for fungal stain activity	
3. The activity of sapstaining	
Chapter 3. Anti-microorganisms activity of various microorganisms that contaminated on wood surface	48
1. Introduction	
2. Anti-microorganisms activity of various microorganisms that contaminated on wood surface	
3. Antifungal activity of wood contaminant fungi <i>in vivo</i>	
Chapter 4. Anti-microorganisms activity of various microorganisms that contaminated on wood surface	53
1. Introduction	
2. Fungal growth inside wood cell wall by SEM	
Chapter 5 Study of sapstaining fungal route of penetration into wood and growth inhibition of sapstaining fungi using natural and synthetic chemicals, biological and polymer products.	61
1. Introduction	
2. Study of sapstaining fungal route of penetration into wood and growth inhibition of sapstaining fungi using natural and synthetic chemicals, biological and polymer products.	
Chapter 6 Antifungal activity of neutralized wood vinegar with water extracts	

of <i>Pinus densiflora</i> and <i>Quercus serrata</i> saw dusts.	73
1. Introduction	
2 Antifungal activity of neutralized wood vinegar with water extracts of <i>Pinus densiflora</i> and <i>Quercus serrata</i> saw dusts.	
Chapter 7 Antifungal activity of Silver particle for wood sapstaining fungi	83
1. Introduction	
2. Fungal control of sapstain fungi by Silica Beads + Silver Thiosulfate	
3 Fungal control of sapstain fungi by silver nanoparticle	
Chapter 8. Identification and partial purification of antagonistic compounds from <i>Bacillus subtilis</i> EF 617317 and <i>B. licheniformis</i> EF 617325 against wood staining fungi: An in vitro and in vivo experiments	91
1. Introduction	
2. Identification and partial purification of antagonistic compounds from <i>Bacillus subtilis</i> EF 617317 and <i>B. licheniformis</i> EF 617325 against wood staining fungi: An in vitro and in vivo experiments	
Chapter 9. Comparison of antifungal agents for wood sapstaining fungi and their emulsification activity	105
1. Comparison of antifungal agents for wood sapstaining fungi and their emulsification activity	
2 Fungal control activity in vivo	
Chapter 10. Treatment methodology for protection of fungi colonisation by wood contaminated fungi and decolorization of contaminated wood	111
1. Introduction	
2. Protection of sapstaining fungi and decolourization wood	
Chapter 11 Preparation of silver nanoparticle impregnated chitosan membrane complex and exploiting its fungicidal activity against wood staining fungi	119
1. Introduction	
2. Prevention of wood contaminants with chitosan–glutaldehyde–silver ions membranes	
Chapter 12. Systematic classification of wood staining fungi and their rapid detection method	133
1. Introduction	
2 Molecular systematic classification of wood staining fungi and their rapid detection method	
Part IV. Achievement of purpose and contribution in the related industries	156
1. Collection and identification of wood sapstain fungi from all over the world	

2. Physiology and biochemical characteristic for wood sapstain fungi	
3 Systematic classification of wood staining fungi and their rapid detection method	
4. Development of enviornmental antifungal agent	
Part V. Application of the research results	158
1. Patents	
2. Transfer the research results	
3. Additional research need	
4. Application to other research work	
6. Industrial approach in future	
Part VI. Information from abroad contries during research period	161
1. Knowledge of wood sapstaining fungi	
2. Development of antifungal activity	
3. Purification of proteinase and lipase and gene encoding	
4. Wood staining and destaining mechanism	
5. Detection methodology of wood staining fungi	
Part VII Reference	163

# 목 차

제 1 장 연구개발과제의 개요	15
제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성	15
제 2 절 연구개발의 필요성	15
제 1 항 연구개발의 필요성	15
제 2 장 국내외 기술개발 현황	16
제 3 장 연구개발수행 내용 및 결과	19
제 1 절 목재 표면오염균 및 목재변색균의 분포 현황	19
제 1 항 서 설	19
제 2 항 목재 표면오염균 및 변색균의 분포 현황 과	
제 2 절 주요 목재변색균의 방미효력 검증을 위한 생리적 특성 구명	34
제 1 항 서 설	34
제 2 항 주요 목재변색균의 방미효력 검증을 위한 생리적 특성	34
제 3 항 주요 변색균의 방미 효력	34
제 4 항 목재생산공장내 세균의 분포와 죽초액 및 목초액에 대한 억제효과	42
제 3 절 목재를 오염시키는 각종 세균에 대한 방미 효력	48
제 1 항 서 설	48
제 2 항 목재를 오염시키는 각종 세균에 대한 방미 효력	48
제 3 항 야외 폭로시험에 의한 표면 오염균의 방미제 효력-붉은빵곰팡이를 중심으로-	51
제 4 절 목재 변색균에 의한 목재 침투 및 목재세포 분해 메카니즘 구명	53
제 1 항 서 설	53
제 2 항 목재 조직 내에서 전자현미경에 의한 균사 생장에 관한 연구	55
제 5 절 친환경적인 천연 물질 및 합성물질에 의한 목재변색균의 생장 억제조절	61
제 1 항 서 설	61
제 2 항 친환경적인 천연 물질 및 합성물질에 의한 목재변색균의 생장 억제조절	
제 6 절 소나무 및 참나무 추출액을 함유한 중성 목재추출액의 방미 효력검증	
제 1 항 서 설	73
제 2 항 소나무 및 참나무 온수추출액을 함유한 중성 목초액의 방미 효력검증	73
제 7 절 목재변색균에 대한 은의 방미효과 검증	83
제 1 항 서 설	83
제 2 항 Silica Beads + Silver Thiosulfate의 목재변색균에 대한 생육억제	84
제 3 항 silver nanoparticle의 목재변색균에 대한 생육 억제 효과	87

제 8 절 목재변색균에 대한 <i>Bacillus subtilis</i> EF 617317과 <i>B. licheniformis</i> EF 617325의 길항물질의 판명 및 부분 정제: 실험실 및 야외폭로 실험	91
제 1항 서 설	91
제 2 항 목재변색균에 대한 <i>Bacillus subtilis</i> EF 617317과 <i>B. licheniformis</i> EF 617325의 길항물질의 판명 및 부분 정제: 실험실 및 야외폭로 실험	92
제 9 절 개발 중인 변색 방지 처리 약품들의 성능 및 유화 성능 비교 평가	105
제 1 항 변색 방지 처리 약품들의 성능 및 유화 성능 비교 평가 시험	105
제 2 항 야외 폭로시험을 제재목에 대한 방미제의 방미 효력	109
제 10 절 표면오염균 발생방지 및 탈색을 위한 목재의 처리방법	111
제 1 항 서 설	111
제 2 항. 표면오염균 발생방지 및 탈색을 위한 목재의 처리법	111
제 11 절 키토산함유 방미필름제조 및 이들의 목재변색균에 대한 방미효과	119
제 1 항 서 설	119
제 2 항 chitosan-glutaldehyde-silver ions membranes제조 및 항균력 측정	119
제 12 절 중요 변색균의 분자생물학적 분류체계 및 신속 진단법 개발	133
제 1 항 서 설	133
제 2 항 중요 변색균의 분자생물학적 분류체계 및 신속진단법 개발	134
제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	156
제 1 항 국내 자생 및 해외 목재변색균 및 표면 오염균의 채집 및 동정	156
제 2 항 중요 변색균의 생리화학적 특성 및 목재 열화의 생화학적 특성 구명	
제 3 항 중요 변색균의 분자생물학적 분류체계 및 신속진단법 개발	157
제 4 항 친환경적인 생화학적 방미제 개발	157
제 5 장 연구개발결과의 활용계획	158
제 1 항 특 허	158
제 2 항 연구 결과 승계	158
제 3 항 추가 연구의 필요성	158
제 4 항 타 연구에의 응용	159
제 5 항 경제성 담보방안	160
제 6 항 실용화 및 기업화 추진 방향	160
제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보	161
제 1 항 목재의 변색을 야기하는 변색균의 파악	161
제 2 항 방미제의 개발 및 효력에 관한 연구	161
제 3 항 proteinase와 lipase의 정제 및 gene encoding	161
제 4 항 목재 변색 메카니즘에 관한 연구 및 탈색 메카니즘에 관한 연구	161
제 5 항 목재 변색균에 대하여 진단방법 연구	161
제 7 장 참고문헌	163

# 제 1 장 연구개발 과제의 개요

## 제 1 절 연구개발의 목적 및 중요성

본 연구의 최종 목적은 국내에 서식하는 수입목재 및 국내 자생 목재의 표면 오염과 변색을 일으키는 진균류를 채집하여 분리·동정하고 대표적인 목재변색균을 최신 분자학적 신기술을 도입하여 신속, 정확히 검출할 수 있는 특이 Primer의 검출법과 이들 목재 변색균들간의 분자학적 계통을 확립하여 정확한 변색균에 대한 체계를 확립하고자 한다. 또한, 목초액이나 죽초액 등을 기본 방미제로 하여 환경오염이 적은 물질을 사용하여 오염시키지 않으면서도 효과 좋은 방미제 및 방미법을 개발하고자 한다.

## 제 2 절 연구개발의 필요성

### 제 1 항 연구개발의 필요성

본 연구는 국외의 연구도 매우 초기단계에 있으며 국내에서는 연구가 전혀 이루어져 있지 않다. 목재 부후균에 대하여 신속한 검출방법으로 PCR을 이용한 검출방법의 확립 및 또한 변색균의 검출을 위한 특이 Primer의 설계에 의한 정확한 검출방법을 확립하며 또한 분자학적 방법을 도입하여 대표적인 목재변색균인 *Ophiostoma*속 에 대한 계통학을 세우고자 RRLP, 및 염기서열분석을 통하여 분자학적 계통분류를 그 목적이다.

특히 목재변색균에 대한 분자학적 검출방법은 세계적으로 일부 시도되고 있으나 우리나라에서는 이루어지고 있지 않다. 목재변색균에 대한 특이 Primer개발에 의한 신속하고 정확한 분석방법은 앞으로 해외에서 수입되는 목재의 목재변색균을 진단하는데 아주 중요할 것으로 사료된다. 또한 우리나라에서도 목재를 변색시키는 목재변색균에 대한 정확한 분자학적 계통분류를 확립함으로써 앞으로의 목재부후균 및 버섯균의 계통을 성립하는데 중요할 것으로 여겨진다. 그리고 뉴우질랜드의 라디아타소 나무등을 비롯한 여러 수입된 목재에서 발생하고 있는 목재 변색균의 정보를 사전에



인지함으로써 유입경로를 파악하고 목재변색균의 국내에 유입하는 유입경로를 차단하여 국내 목재 산업에 크게 이바지할 것으로 여겨진다.

최근 환경 오염문제를 야기 시키는 목재 방미 및 방부제의 사용을 억제하고 생물학적인 친환경적 변색균의 억제 방법을 개발함으로써 지구를 보존하는데 또한 매우 중요한 연구이다. 최종 목표는 생명공학의 기술과 지식을 목재산업에 적용함으로써 새로운 생명공학의 응용성을 부여함과 동시에 변색균의 분자생물학적 진단시스템 및 생화학적 방미법 개발에 있다.

## 제 2 장 국내·외 관련기술개발 현황

목재 표면의 색상을 변색시켜 상품가치를 하락시키는 변색균은 자낭균류와 불완전균류의 가해에 의하여 목재가 변색된다. 생물학적인 측면에서 목재 표면을 오염시키는 균류(*Aspergillus*, *Gliocladium*, *Penicillium*, *Rhizopus* 등)와 목재의 변재를 변색시키는 변재 변색균 (*Ceratocystis*, *Graphim*, *Hyalorhinoclastiella*, *Leptographium*, *Ophiostoma* 등)이 있다(Eaton & Hale, 1993; Zabel & Morrell, 1992; Seifert & Gylls, 1992). 이러한 균류들은 목재의 강도적인 측면의 손상은 없으나 재질적인 측면에서는 매우 큰 피해를 입힌다. 특히 목재의 변재를 변색시키는 Ophiostomatoid fungi는 변재부내 유세포에 침투하여 착색균사를 형성한다. 이는 변재부 세포를 균사가 형성하는 멜라닌색소로 청변 내지는 흑변을 야기시키는데 이를 청변이라 한다(Behrendt *et al.* 1998). 이러한 생물학적인 변색은 목재나 목제품의 가치를 하락시켜 경제적인 손실을 초래한다. 또한 변색된 목재를 펄프목이나 펄프칩 등 펄프원료로 사용할 경우 표백약품의 소비증가, 2차 부후균의 침투방제를 위한 방부제의 소비증가에 따른 환경오염을 가속화시키는 원인이 된다. 국외의 경우 연구동향은 Technical Bulletin이 미국 농무성에서 발간된 이래 많은 연구가 다양한 형태로 이루어지고 있고, 내용은 아래와 같음.

### ○ 목재의 변색을 야기하는 변색균의 파악

Kaarik(1980)은 온대 지방에서의 목재의 변색에 관여하는 균의 분리 및 동정한 결과 341종, 캐나다에서는 200여종이 관여하고 있음을 Breuil이 보고하고 있다. Kay(1995)는 뉴우질랜드 라디아타소나무의 변색에 관련하는 원인균에 대하여 보고하였다. 또한 진균류의 완전세대와 불완전세대에 따른 연관성과 분류학적 연구가 수행되어지고 있으며, Laval 대학과 Forinter 대학 공동으로 캐나다 전역에 대한 광범위한 연구에서 목재 변색의 주된 원인균은 *Ophiostoma* spp., *Ceratocystis* spp. 및 불완전세대인 *Leptographium* spp. 그룹이었음을 보고하였다(Breuil,1997). 그러나 국내의 연구는 극히 미비하여 단지, 뉴우질랜드 수입산에서 발생하는 변색균(Kim, 2001)과 국내 적송에서 발생하는 변색균(Song *et al.* 2003)에 관한 연구가 거의 유일.

### ○ 방미제의 개발 및 효력에 관한 연구

목재를 변색시키는 변색균의 생육을 억제하거나 방제할 방미제의 개발 및 효력에 관한 연구는 오래 전부터 서구유럽과 미주대륙을 중심으로 이루어지고 있다 (Hale & Eaton, 1993; Zabel & Morrell, 1992). 화학약품으로는 주로 Sodium pentachlorophenate 와 ethyl mercuryphosphate가 주로 사용되어 왔으나 현재에는 이들의 유독성 때문에 대체 방미제에 관한 연구가 꾸준히 수행되고 있고, 미 서부지방에는

NP-1, Britewood XL, Timbercote 2000 등이 사용되고 있다(Kim 2001; Song *et al.*, 2003). 한편 다른 미생물을 이용하여 방미효과 및 변색균에 의한 백변효과를 이용하여 방미 효과를 얻게된 보고도 있다.(Held *et al.*, 2003). 또한 목초액을 비롯한 임산 부산물의 추출액의 사용도 증가되고 있다.

○ proteinase와 lipase의 정제 및 gene encoding

Gutierrez *et al.* (1999)는 proteinase가 목재 질소원을, lipases는 목재 추출물을 분해 시킴이 밝혀내었고, Tamerlec *et al.* (2001)은 효소의 순수 정제 및 이들의 생리적인 특성을 연구하였다. 그러나 변색균에 의한 상기 두 효소계의 정제는 매우 초보 단계여서 산업화를 위한 많은 기초 연구가 필요하다. 특히 이 두 종류의 효소에 대한 유전학전 메카니즘에 대해서는 아직 밝혀지지 않아 이들 효소를 분비하는 유전자를 탐색하여 분자생물학적인 측면에서 효소의 기능을 구명하는 것이 필수적이다.

○ 목재 변색 메카니즘에 관한 연구 및 탈색 메카니즘에 관한 연구

캐나다의 Prof. Breuil의 연구실에서는 생화학적 및 분자학적인 면에서 멜라닌 합성 대사경로를 연구하고 있으나 아직까지는 초보 단계여서 분자학적 연구를 통하여 멜라닌 색소관련 유전자의 탐색과 이들 유전자를 찾아내어 색소의 경로에 대한 메커니즘을 밝히는 것이 시급하다. 하지만 이 분야에 대한 연구는 거의 몇 편의 논문만 보고되었을 뿐 아직까지 정확한 경로가 밝혀지지 않아 앞으로 이 분야에 대한 기초 연구가 시급히 이루어져야 할 것임. 또한 탈색에 관한 메카니즘은 Croan(1997)에 의하여 보고되어 졌으나 이 역시 매우 미약한 단계이다.

○ 목재 변색균에 대하여 진단방법 연구

최근 Kim *et al.*(1999)이 발표했듯이 PCR법이 이용되기 시작하여, 변색균에 대한 진단방법이 간단하고 명료해지고 있지만 아직은 보편화가 되어 있지 않아 변색균을 신속검출할 수 있는 특이 Primer의 개발과 특정부분 gene에 대한 분자학적 유연관계분석을 위하여 RFLP 및 염기서열분석 등을 이용한 변색균들간의 유연관계를 철저히 밝히고 이들의 계통학을 밝혀 분자학적으로 이들 변색균들에 대한 정확한 진단방법의 개발이 더욱 절실히 요구되고 있음.

○ 본 연구는 세계적으로 캐나다의 Prof. Breuil, 미국의 Prof. Brusell와 영국의 Prof. Eaton 등에 의하여 이루어지고 있으나, 현재는 보편화가 되어 있지 않아서 이 분야에 대한 정확한 연구가 분자학적 방법을 이용한 새로운 검출방법 및 특이 Primer 등의 개발을 통한 신속한 진단법 등이 요구되고 있어 이 분야에 대한 연구는 선진외국과 같은 수준의 연구를 위하여 절실히 요구됨.

## 제 3 장 연구개발 수행 내용 및 결과

### 제 1 절 목재 표면오염균 및 목재변색균의 분포 현황

#### Distribution of wood contaminating fungi and wood sapstaining fungi

### 제 1 항 서 설

목재의 자연적인 아름다움의 잇점 때문에 고래로 부터 현재에 이르기까지 가구, 건축재료, 생활용품, 미술품등으로 사용되어 왔으며 미래의 인간 삶과는 매우 깊은 관계를 유지하게 될 것이다. 그러나 불행하게도 이 목재는 천연유기물질로서 화학적이거나 생물학적인 요인들에 의하여 원형자체의 아름다움이 손상을 입게 된다거나 구조적인 문제를 입히게 되어서 본연의 가치를 하락시키게 된다. 그런데 이러한 목재의 변색은 장기간 저장을 한다거나 환경이 나쁜 곳에 저장됨으로써 주로 야기되는데 목재의 변재부위가 목재의 심재부위에 비해서 심하게 훼손을 받고 있다. 최근의 미국의 자료에 의하면 미국내 목재상품적인 가치에서 목재의 변색에 의하여 하락당하는 액수가 무려 50 million \$로 발표되었다. 물론 자연환경적인 요인과 화학적인 요인에 의하여 발생하는 수도 있으나 주된 인자는 생물학적인 인자로서 주로 곰팡이가 야기하는 것으로 여겨진다. 이러한 곰팡이의 성장이 변색을 발생시키는데 이는 목재가 처한 자연환경이나 인위적인 환경 때문에 이들이 서식하기 때문이다. 자낭균류 및 불완전균류의 목재의 침해는 목재를 생물학적으로 변색시켜 가치를 하락시키는 원인을 제공한다.

### 제 2 항 목재 표면오염균 및 변색균의 분포 현황 파악

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 공시 지역 및 균 분리용 시편의 채취방법

국내 서해안 지역에 위치한 목재를 취급하는 목재생산장, 목재야적장, 목재절삭장을 위주로 서해안 지역에서 목재를 주로 취급하는 지역인 3개 지역을 선정하였다. 수입목을 주로 취급하

는 국내 서해안지역의 북부지역인 인천의 △△목재회사, 수입목을 주로 취급하는 중부지역인 군산의 ◇◇목재회사와 국내 육송을 주로 취급하는 남부지역에 위치한 남원의 ○○조합의 목재집하장을 선정하였다.

멸균된 테이프를 직경 4cm의 크기의 원형으로 잘라내어 오염된 목재 혹은 대형톱 등에 5분을 접촉한 후 사전에 미리 준비한 영양배지인 2% MEA배지위에 올려놓고 곰팡이 균사 적정 성장온도로 알려진 온도 20℃에서 배양하여 그 빈도수를 측정하였다.

원목의 경우 멸균된 성장추를 이용하여 변색이 되어진 부분과 육안으로 변색이 이루어지지 않은 부분(목구멍 30 cm)을 선택하여 소형칩을 채취하였다. 이때 성장추는 사전에 120℃에서 20분정도 멸균시켰으며 시편 채취 시 성장추는 매번 알코올 및 화염으로 소독하여 성장추의 오염을 억제하였다. 그러나 환경이 다른 곳을 채집할 시는 준비된 다른 성장추를 이용하여 실험구별 오염을 억제하였다.

#### 나. 균의 분리 및 동정

현장에서 채집된 균주들은 순수분리를 위하여 채취된 균주들을 5종류의 각기 다른 배지를 이용하여 분리하였다. 일반적인 표면 오염균을 분리하기 위하여 일반 2% MEA배지를 사용하였으며, 특정 표면 오염균을 분리하기 위하여 CA배지를 특정 변색균을 분리하기 위하여 streptomycin 및 cycloheximide 항균제를 첨가한 2% MEA배지를 이용하였다.

채취된 균주들은 미리 준비된 별개의 멸균된 비닐용지에 넣어서 얼음박스로 실험실로 가능한 신속하게 이동하였다. 이들은 추후 실험에 이용될 때까지 2% MEA배지에 접종시켜 계대 배양하였다. 균의 순수분리는 해부현미경을 사용하여 균사콜로니의 연속적으로 배지를 사용하여 순수하다고 여겨질 때까지 지속적으로 분리를 하였다.

동정에 있어서는 본 실험실에서 가능한 수준의 진균류는 Taxonomical Systematic을 이용하여 각종 자료를 보완하여서 외부형태학적인 수준에서 분류하였다.

#### 다. 균의 생리학적 특성 구명

순수 분리되어진 곰팡이들은 주로 표면 오염균 및 변색균들로 간주하였으며 이들의 생리학적인 특징을 구명하기 위하여 균사의 성장력을 측정하였다. 공시배지는 2% MEA와 PDA배지를 사용하였으며 이들은 온도(4℃, 25℃, 35℃)별 배지(2% MEA, PDA)별로 각기 따로 실험하였다. 이때 사용되어진 균주들은 공시균주로서 대표적인 진균류를 이용하여 실험하였다.

#### 라. 균의 생리 억제 특성 구명

분리되어진 특정 균류를 대상으로 현재 연구진에서 개발하고 있는 방미제를 중심으로 균사의 성장력을 측정하였으며 이를 온도별 배지별로 각기 따라 실험하였다. 이는 방미제의 제조 및 효력을 측정하고 추후 연구의 기초자료로 이용하고자 이들의 생리학적 특성을 실험하였다.

#### 마. 친 환경적 방미제 제조 방법

기본 약제가 되는 은(Ag) 나노용액을 silver standard solution, 1000ppm 증류수에 50와 100ppm으로 희석하여 활성 은 나노용액을 목초액을 증류수에 10배, 20배 희석시킨다. 희석용액을 silver standard solution 1000ppm + 목초액(목초원액 + 우수 약제)을 질량비 1:1로 희석한 후 물에 20배 희석시켜 본 실험에 사용하였다.

#### 바. 시험방법

각 시료를 배지를 제조하기 전에 NA 배지용액에 희석하고 100mlTlr 제조하여 12 0℃에서 20분간 멸균하였다. 멸균된 용액을 항온수조에서 50℃에 이르렀을 시 각 시료를 포함하는 배지를 직경 87mm의 petri-dish에 20mlTlr 분주한 후 실온에서 냉각하였다. 대조구는 시료를 함유하지 않은 무처리로써 NA배지에 균주를 접종하였다. petri-dish에 5mm의 cork borer를 이용하여 각 배지당 3반복하여 동일하게 접종하여 각 시료의 군사생장률을 측정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 목재 야적장 및 제재목 생산장 내 환경

목재의 변색에 관여하는 목재 제재목 생산장 및 야적장 내의 여러부위에 목재를 변색시키거나 오염시키는 요인이 존재할 것이라는 전제하에 변색균의 분포 및 현황을 파악하였다. 그러나 목재가 적재되어 있는 외부환경은 목재미생물, 토양미생물은 물론 공중미생물 등이 포함되어있는 복합 오염환경이기 때문에 순수히 목재에 관련되어 있는 특정균을 찾을 수는 없었다. 또한 외부의 자연환경은 각종 진균류들의 발아 및 성장에 중요한 요소가 되고 있으나 장기 적재되어 있거나 벌채한 후의 기간이 정확하지 않아서 외부의 자연환경인 온도와 습도는 중요시 되지 않았다(표1, 그림 1).

Table 1. The measuring of contamination in various field conditions.

	목재 야적장	제재목 생산장	대형절삭기	기타 청결도
인천의 △△목재회사,	높음	중간	중간	낮음
군산의 ◇◇목재회사,	높음	중간	중간	낮음
남원의 ○○조합	높음	높음	높음	낮음

목재 제재목 생산장 및 야적장은 자연환경에 노출이 되어있는 관계로 매우 높은 각종 오염균에 노출이 되어있다. 특히 수입목을 야적하는 경우의 대부분은 외부에 완전노출이 되어 있으며 이들은 주로 목재, 목재부스러기, 노면, 대형톱 등의 다양한 부분이 각종 오염균의 출처

로 보여 졌다. 곰팡이에 의한 생물학적인 목재의 변색은 침엽수보다 활엽수에서 심하게 훼손을 초래하고 있다. 침엽수의 경우에 있어서 붓이나 먼지털이개를 사용하거나 대패를 사용하게 되면 표면에 발생하고 있는 변색을 제거할 수 있으나 활엽수의 경우에 있어서는 종종 매우 깊게 균사가 침입한 것을 볼 수 있었다.

일반적인 목재의 표면에 있는 전분을 이용하여 서식하는 곰팡이들은 색깔을 발생하게 되는데 이들은 자신들의 고유의 색상을 보여주고 있다(표2) . 이뿐만 아니라 몇몇의 곰팡이들은 알레르기를 발생시키는 원인균으로 간주되고 있어 야외야적장이나 제재목 생산장에서의 위생이 중요시 되고 있다. 야외에 위치한 목재야적장이나 제재목 적재장은 대체적으로 목재에 서식하는 미생물은 물론 토양미생물, 공기미생물 등이 혼재하고 있어서 목재외부에 존재하게 되는 목재세포나 목재표면에 존재하는 유기먼지 등에 서식하고 있다. 그러나 이러한 균들도 표면을 오염시켜 다양한 색상의 변화를 일으켜 변색을 유발하고 있다.

2차 침입자인 고등균류들도 종종 목재나 목구조물에서 종종 발견되고 있는데 바람에 포자 등이 날아와서 목재표면에 존재하는 전분과 같은 유기물을 분해하면서 서식하기 시작한다. 경우에 따라서는 목재세포벽내의 영양분과 빗물 등에 섞여있는 유기물을 분해하면서 영양원을 섭취하고 있다. 많은 현장 노무자들이나 연구자들에 의해서 여러 종의 담자균이 목재야적장에서 발견됨이 보고되었다. 본 연구의 현장 채집에서도 이와 같은 현상은 오랫동안 야적되어 있는 원목의 경우에 담자균류에 속한 대형버섯이 발생되는 것이 발견되기도 하였다. 이에 따라서 육안에 의한 분포를 파악하였다(표 2).

Figure 1. Wood products for bulk scale at field and wood contaminants.



Table 2. The important contaminants and their colorization.

	변색		기타
<i>Aspergillus</i> spp.	검정		알레르기 유발 가능성
<i>Fusarium</i> spp.	빨강	보라	
<i>Gliocladium</i> spp.	초록		
<i>Monila</i> spp.	노랑		알레르기 유발 가능성
<i>Penicillium</i> spp.	초록		
<i>Rhizopus</i> spp.	검정		
<i>Trichoderma</i> spp.	초록		
<i>Mucor</i> spp.	검정		

자료: Wood Microbiology (1992, Zabel and Morrell)

#### 나. 목재 생산장 및 야적장내 표면오염균 및 변색균의 분포

목재를 오염시키거나 변색시키는 자낭균류는 많은 종들이 불완전균류와의 연관성이 깊은 것으로 알려져 있다. 예를 들어 몇몇의 *Graphium*속의 균들은 완전세대의 상태에서 자낭균류로 알려져 있으나 이들의 불완전세대의 균들은 *Ophiostoma* 속에 속한 균일 것으로 추측되고 있다. 또한 대부분의 균들이 토양에서 주로 발견되는 *Aspergillus*속을 비롯하여 *Penicillium*속, *Trichoderma*속 및 *Mucor*속에 속하는 균들로 여겨지고 있어 기존의 연구자들의 연구결과와 매우 유사한 결과를 보여주고 있다. 이들이 보여주는 결과들은 목재를 야적하거나 집적하는 장소부터 제재목을 보관하는 장소에 이르기까지 매우 높은 오염가능성을 보여주고 있다. 또한 목재를 생산하기 위하여 사용하는 각종 대형톱판 및 대형톱날에 있어서도 높은 오염가능성을 보여주고 있다. 물론, 채집지에 있는 원목의 종류 및 벌채장소가 각기 다르고 목재를 야적한 장소의 위치, 원목의 야적기간, 제재한 후 보관기간, 톱날을 사용한 후 기간등의 변이가 있어 일률적인 상대비교 혹은 절대비교는 불가능하지만 매우 높은 오염가능성을 보여주고 있다.

중요 목재 변색균들은 변색균사를 가지고 있어 변재의 유세포에서 서식하며 변색을 야기한다. 이들은 주로 청색, 검정, 갈색 혹은 회색을 나타내고 있는데 몇몇의 종들은 노랑, 분홍, 보라 혹은 초록의 색상을 나타내고 있다. 특히, 목재를 절단하거나 제재하는 대형톱을 비롯한 각종 절삭기의 표면이나 톱날에 붙어있는 목재의 표면오염균이나 목재변색균들이 상당수 존재하는 것으로 나타나 있다. 따라서 상당수의 목재의 표면의 오염이나 변색이 목재를 절삭하는 기기나 공구에 의하여 전파될 수 있는 가능성이 높을 것으로 사료된다.



Table 3. Fungal frequency at various wood machinery and wood product plants.

	목재			절삭기		비고
	원목	제재목	부스러기	대형톱날	대형톱판	
인천 △△목재회사,	35/5	27/3	34/3	24/3	45/3	
군산 ◇◇목재회사,	45/5	22/3	65/3	22/3	12/3	청소됨
남원의 ○○조합	53/5	36/3	59/3	18/3	35/3	

Table 3은 목재를 제재하는 제재소에 위치한 다양한 품목에 따른 진균들의 발생 빈도수를 파악하였다. 이들은 목재부스러기보다는 원목이, 원목보다는 제재목의 표면이 진균류의 빈도수가 적게 나타났다. 그러나 야적되어 있는 원목이 수입되어질 경우 충분한 방역이 이루어졌음에도 불구하고 높은 빈도수를 보이는 것은 채집 샘플의 원목 위치가 지면과 가까운 곳에 위치한 관계로 토양이나 빗물 등에 의하여 심하게 오염이 되었을 것으로 사료된다. 특히 시일이 오래 경과된 일부 야적된 목재에서의 원구부분에 심하게 균사체가 형성되어 두꺼운 판 형상을 하고 있는 모양이 관찰되었다.

#### 다. 영양배지 및 선택배지를 이용한 균의 분포

라디아타소나무 및 국내 육송에 분포하는 각종 목재표면 오염균 및 변색균의 분포 성상을 파악하기 위하여 2% MEA배지 및 2% SCMEA를 이용하여 균을 분리 및 동정을 하였다.

현재 동정중인 균주가 많아서 정확한 숫치의 산출이 어려움이 많으나 분리 및 동정이 완료된 균주들의 내용은 다음과 같다 (Table 4). 가장 많이 발생하는 표면 오염균 및 변색균은 *Penicillium* 속에 속하는 균들로서 초록색의 변색을 야기한다. 그러나 이들은 목재 표면의 세포내 전분질이나 먼지 속에 있는 전분질을 이용하여 영양생장을 하는 것으로 알려져 있다. 또한 이들은 공중미생물로서의 빈도수가 높다고 알려져 있어서 실험도중에 공중 낙하된 균들이 많을 것으로 사료되어 정확한 목재오염균으로의 빈도수로는 정확성을 피하기 어렵다. *Penicillium* 속의 균들 다음으로 발생 빈도수가 높은 진균류는 *Rhizopus*와 *Mucor* 속에 속하는 균들로서 이들은 토양미생물이나 폐수미생물로서 널리 알려져 있다. 이는 목재야적장이 지면위에 포장이나 덮개로 덮여있지 않고 쌓여 있는 연유와 시편을 채집한 장소가 겨우 채집자의 손 높이거나 낮은 위치에서 행한 관계로 빗물이나 바람에 의한 먼지가 쌓여 있어서 쉽게 오염이 되었을 것으로 사료된다.

전 세계적으로 전형적인 목재를 변색시키는 변색균으로 널리 알려져 있는 *Ophiostoma*, *Cladosporium*, *Gliocladium*, *Alternaria* 등의 빈도수는 예상외로 적게 나타났다. 이는 표면오염균의 상대적으로 높게 나타난 연유로 사료되며 또한 이들 표면오염균들의 균사 성장력이나 포자의 발아력이 전형적인 목재 변색균보다 높아서 이들의 균사의 성장을 억제하였으리라 사료된다. 하지만 이들의 목재의 변재부위의 세포벽을 침투하는 능력은 우수하다고 알려져 있다.

Table 4. Collected fungal species and their identification stage.

	속 단위	종 단위	동정중/ 미동정	기타
1	<i>Aspergillus</i>	<i>A. niger</i> <i>A. fumigatus</i> <i>A. nidulans</i>	8	
2	<i>Fusarium</i>	<i>F. oxysporum</i>	4	
3	<i>Gliocladium</i>	<i>Gliocladium</i> sp.	3	
4	<i>Penicillium</i>	<i>P. purpurascens</i> <i>P. janthinellum</i> <i>P. funiculosum</i> <i>P. pupurogenum</i> <i>P. verruculosum</i>	about 19 strains	
5	<i>Rhizopus</i> sp.	<i>Rhizopus</i> sp.	8	
6	<i>Trichoderma</i>	<i>T. viride</i>	4	
7	<i>Cladosporium</i>	<i>C. funicola</i> <i>C. sladosporioides</i>		
8	<i>Alternaria</i>	<i>A. raphani</i> <i>A. logipes</i>	3	
9	<i>Aureobasium</i>	<i>A. pullulans</i>		
10	<i>Mucor</i>		15	
11	<i>Chaetominium</i>	<i>C. funicola</i>		
12	<i>Ophiostoma</i>		3	
13	unidentified under Order		50	

\*육안에 의한 분류동정으로 신뢰성이 부족한 동정 결과임.

## 라. 성장추를 이용한 균의 분포

원목 및 제재목의 경우 멸균된 성장추를 이용하여 변색이 되어진 부분과 육안으로 변색이 이루어지지 않은 부분(목구멍 30 cm)을 선택하여 소형칩을 채취하였다. 이때 성장추는 사전에 120℃에서 20분정도 멸균시켰으며 시편 채취시 성장추는 매번 알코올 및 화염으로 소독하여 성장추의 오염을 억제하였다. 그러나 환경이 다른 곳을 채집할 시는 준비된 다른 성장추를 이용하여 실험구별 오염을 억제하였다. 이는 성장추가 오염이 되었을 시 모든 실험의 결과의 신뢰성을 상실하기 때문이다. 이때 성장추에 의한 목재의 시편은 목재 표면에서 부터 30cm의 깊이로 채집하였으며 이를 오염원으로부터 철저히 격리시켜 약 5cm의 크기로 나누어 미리 준비되어진 배지에 올려놓아 배양하였다. 이는 표면 오염균 및 목재의 변재부위를 침투한 진균류를 모두 채집고저 각 부위별로 5반복을 하여 수행하였다.

본 실험에서 목재외부 및 내부에서 가장 일반적으로 발생하는 진균류는 *Penicillium* spp., *Aspergillus* spp., *Mucor* spp., *Rhizopus* spp., *Trichoderma* spp. 등으로 목재의 외부와 깊이 5cm 내에 서식하고 있다. 전형적인 목재의 토양진균류인 *Trichoderma* spp.는 토양과 높이 면에서 가까운 목재 내에서 주로 발생함으로써 토양으로부터 감염되었음을 알 수가 있다.

또한 성장추의 목재내 깊이 15cm이상의 깊이에서는 곰팡이가 거의 발생되지 않았다. 이는 남원 산림조합 목재집하장에 있는 육송의 대부분이 오래 동안 저장되지 않았던 생재가 대부분이었던 이유로 사료된다. 그러나 타 지역의 경우에는 심재의 부근에 이르기까지 목재변색균이 발생하였다는 보고가 있어 당 연구지역의 목재집하장의 목재들도 저장 기간이 길어지면 길어질수록 목재변색균의 침해가 심각할 결로 사료된다. 하지만 이 또한 현재 진행되고 있는 균의 동정이 완료되게 된다면 보다 확실하고 신뢰성이 있는 자료가 될 것이라 사료된다.

Table 5. Some important fungal strains collected from wood products plants

Fungus	Existence of identified fungi				
	A	B	C	D	E
<i>Aspergillus. fumigatus</i>	o	o	—	—	—
<i>A. niger</i>	o	o	—	—	—
<i>A. nidulans</i>	o		—	—	—
<i>Altanaria logipes</i>		o	—	—	—
<i>A. raphani</i>			—	—	—
<i>Aureobasium pullulans</i>	o	o	—	—	—
<i>Chaetominium funicola</i>		o	o	—	—
<i>Cladosporium funicola</i>	o	o	—	—	—
<i>Fusarium oxysporum</i>	o	o	—	—	—
<i>Gliocladium sp.</i>	o	o	—	—	—
<i>Mucor sp.</i>	o	o	o	—	—
<i>Ophitoma. sp.</i>		o	o	—	—
<i>Penicillium purpurascens</i>		o	—	—	—
<i>P. janthinellum</i>		o	—	—	—
<i>P. funiculosum</i>		o	—	—	—
<i>P. verruculosum</i>		o	—	—	—
<i>Rhizopus sp.</i>	o	o	—	—	—
<i>Trichoderma viride</i>	o	o	—	—	—
<i>Trichoderma hazianum</i>	o		—	—	—
unidentified strains	o	o	—	—	—

A: 3cm length, B: 6cm length, C: 9m length, D: 12cm length, E: 15cm length,

\*육안에 의한 분류동정으로 신뢰성이 부족한 동정결과임.

### 제 3 항 목재생산공장내 세균의 분포와 죽초액 및 목초액에 대한 억제효과

본 실험은 목재에서 분리한 균주를 대상으로 각 첨가물질에 대해 어떠한 성장성을 나타내는지 알아보기 위해 실험하였다. 대상 실험 균주를 분리하기 위하여 2007년 10월 한양목재 펄프 공장에 야적되어있는 폐목재 더미에서 시료를 채취하였다. 채취된 시료는 4℃를 유지하여 실험실로 운반하여 미생물학적 분석에 사용되었다. 균주를 분리하기 위해 시료 1g을 취한 후 9 ml의 멸균된 생리식염수 (0.85% NaCl)에 넣고 vortex를 이용하여 200 rpm으로 30분간 진탕한 다음 Nutrient agar (Difco) 배지에 희석 도말 하여 25 ± 2℃에서 40~72시간 배양한 후 우점하는 미생물을 선별하여 순수분리 하였다.

목재에서 분리된 일반중속영양세균에 대해 성장성 실험을 실시하기 위하여 시중에서 상용화 되어 판매중인 3종류의 Bamboo extract와 2종류의 Wood extract, Chitosan, Chitosan + dithizone + Ag, Silica Bead + Silver Thiosulfate Complex Ag 15000 ppm, Streptomycin PA-04을 대상으로 실시 하였다. 시중에 판매중인 Bamboo extract와 Wood extract의 pH가 낮아 실험상에 문제가 있기 때문에 Sample No. 1~5번까지는 pH를 7.0에 맞추어 실험을 수행하였다.

항균실험에 사용될 11 균주는 NA broth (Difco)에 접종하여 30℃에서 200rpm으로 24시간 진탕 배양한 후 실험에 사용되었다. NA plate에 0.1, 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3% 농도별로 9가지의 sample을 첨가하여 실험하였다. 각 농도별 배지에 목재더미에서 분리 동정된 11균주를 접종하였고, 30℃ ± 2℃에서 48시간 배양 하여 나타나는 균체 수를 구하여 생존율을 측정하였다.

#### 가. 16s rDNA PCR product 의 정제

16s rDNA를 증폭한 tube에 3 volume의 6M GuHCl 용액을 넣어 섞어준 다음 1분간 실온에 반응시킨 후 96 well FiltrEX™ PVDF(Corning, USA) 에 옮겨 넣고 2,250×g에서 5분간 원심 분리하여 DNA를 glass fiber에 부착시켰다. 각각의 well에 80% ethanol 을 150μl씩 넣고 2,250×g에서 5분간 원심분리하여 filter를 세척하고 20 μl의 TE(10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA, pH 8.0)넣어 2,250×g에서 5분간 원심분리하여 DNA를 elution 시켜 -20 ℃에 보관하였다.

#### 나. 16s rDNA Sequencing

0.2ml PCR tube에 정제된 16s rDNA 30ng, 4pM의 primer, 3 $\mu$ l 의 5 $\times$ Sequencing reaction buffer, 0.5 $\mu$ l 의 BigDye<sup>®</sup> Terminator version 3.1 (Applied biosystems, USA)를 혼합한 후 증류수를 넣어 총량을 10 $\mu$ l로 조정하였다. Cycling PCR은 GeneAmp<sup>®</sup> PCR System 9700 (Applied biosystems, USA)을 이용하여 96 $^{\circ}$ C에서 10초, 50 $^{\circ}$ C에서 5초, 60 $^{\circ}$ C에서 4분간의 반응을 25 cycle을 수행하였다. 반응이 끝난 각각의 tube에 6M의 KI를 7 $\mu$ l씩 넣고 1분간 실온에 반응시킨 후 96 well FiltrEX<sup>™</sup> PVDF(Corning, USA)에 옮겨 넣고 2,250 $\times$ g에서 5분간 원심분리하여 dye가 부착된 DNA를 glass fiber에 부착시켰다. 각각의 well에 80% ethanol 을 150 $\mu$ l씩 넣고 2,250 $\times$ g에서 5분간 원심분리하여 filter를 세척한 후 15 $\mu$ l의 멸균증류수를 넣어 2,250 $\times$ g에서 5분간 원심분리하여 elution 시켰다. 모세관전기영동은 ABI PRISM<sup>®</sup> 3130xl Genetic Analyzer(Applied Biosystems, USA)를 이용하여 길이 50cm, 직경 0.2 $\mu$ m의 capillary에 POP-7 polymer(Applied Biosystems, USA)를 충전하여 StdSeq50\_POP7 run module을 선택해 전기영동을 실시하였다. 각각의 염기서열 정보는 Sequencing analyzer version 5.2(Applied biosystems, USA)에서 분석하였다.

목재에서 분리한 세균들의 16S rDNA의 부분 염기 서열은 Blast network service를 이용하여 EMBL/GenBank dataase의 염기서열을 비교하여 속명을 확정하였다.

#### 다. 죽초액 및 목초액의 박테리아 항균력 측정

본 실험결과 Bamboo extract A, B, C 와 Wood extract A, B 는 각 균주들의 생장에 영향을 미치는 것을 볼 수 있으나 Chitosan, Chitosan + dithizone +Ag, Silica Bead + Silver Thiosulfate Complex Ag 15000 ppm, Streptomycine PA-04는 생장에 대해 별다른 영향을 볼 수 없었다.

Bamboo extract A는 3%, Bamboo extract B는 1%, Bamboo extract C는 1.5%에서 100%의 사멸율을 보였고 Wood extract A와 Wood extract B는 3% 첨가농도에서 64%와 82%의 사멸율을 나타내었다. 그러나 Chitosan, Chitosan + dithizone +Ag, Silica Bead + Silver Thiosulfate Complex Ag 15000 ppm, Streptomycine PA-04에서는 0%의 사멸율을 보이는 것으로 확인되었다.

Bamboo extract A를 첨가한 배지에서의 각 균들의 생장을 살펴보면 최종 농도인 2.5%에서 생존하는 균주는 *Arthrobacter humicola*, *Bacillus cereus*로 나타났고, Bamboo extract B를 첨가한 배지에서는 최종 균체가 확인되는 0.5%에서는 *Arthrobacter humicola* 만이 관찰 되었다. Bamboo extract C를 첨가한 배지에서 최종 균체가 확인되는 1%에서는 *Arthrobacter humicola* 만이 확인되었다. Wood extract A에서는 3%에서 *Arthrobacter humicola*, *Bacillus arbutiniborans*, *Rhodococcus equi*, *Bacillus cereus* 가 생장을 나타내었고 Wood extract B에서는 최종농도 3%에서 *Arthrobacter humicola*와 *Bacillus cereus* 만이 성장하였다. *Arthrobacter humicola*는 Bamboo extract A, B, C, Wood extract A, B가 첨가된 배지에서 최종적으로 나타나는 균주임을 확인할 수 있었다.

Table 1. The list of bacterial isolations from wood products company.

Serial No.	Closest Genbank library and accession No.	Similarity (%)
W1	<i>S.nondiasticum</i> SN16S4384	1397/1401 (99%)
W2	<i>Arthrobacter humicola</i> AB279890	1419/1440 (98%)
W3	<i>Sinorhizobium morelense</i> AM181737	1419/1425 (99%)
W4	<i>Variovorax koreensis</i> DQ432053	1379/1382 (99%)
W5	<i>Pseudomonas putida</i> AY512611	1377/1397 (98%)
W6	<i>Bacillus gibsonii</i> AY737309	1394/1400 (99%)
W7	<i>Paenibacillus amylolyticus</i> AB115960	1444/1450 (99%)
W8	<i>Bacillus arbutinivorans</i> AF519469	1430/1451 (98%)
W9	<i>Rhodococcus equi</i> AF490539	1393/1397 (99%)
W10	<i>Bacillus cereus</i> EU236730	1449/1451 (99%)
W11	<i>Ensifer adhaerens</i> EF198418	1386/1391 (99%)



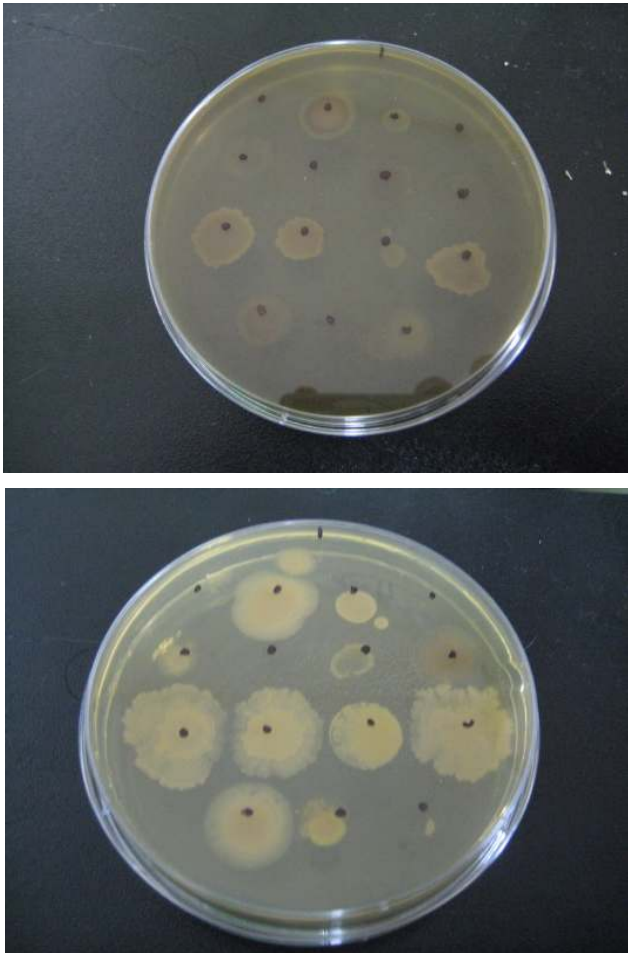
Table 2. pH conditions on various wood and bamboo extracts tested.

Sample No.	Sample
1	Bamboo extract pH 3.00
2	Bamboo extract pH 3.25
3	Bamboo extract pH 3.25
4	Wood extract pH 3.5
5	Wood extract pH 3.5
6	Chitosan
7	Chitosan + dithizone + Ag
8	Silica Bead + Silver Thiosulfate Complex Ag 15000 ppm
9	Streptomycine PA-04

Table 3. Antifungal activities at various concentrations of samples

각 샘플 농도별 생존율							
	0.1	0.5	1	1.5	2.0	2.5	3
sample 1	100	100	45.45	27.27	18.18	18.18	0
sample 2	54.54	9.09	0	0	0	0	0
sample 3	63.63	18.18	9.09	0	0	0	0
sample 4	72.72	72.72	36.36	45.45	45.45	36.36	36.36
sample 5	72.72	72.72	54.54	45.45	45.45	18.18	18.18
sample 6	100	100	100	100	100	100	100
sample 7	100	100	100	100	100	100	100
sample 8	100	100	100	100	100	100	100
sample 9	100	100	100	100	100	100	100

Figure 1. Antibacterial activity methodology collected and tested in this study.



## 제 2 절 주요 목재변색균의 방미효력 검증을 위한 생리적 특성 구명

### The physiology of wood sapstaining fungi for antifungal activity

#### 제 1 항 서 설

변색균은 목재의 강도에 미치는 영향은 크지 않지만, 변색으로 인한 목재의 가치손실은 대단히 크다. 목재의 변색은 변색부위에 따라 변재변색균(sapstain fungi)과 표면오염균(molds)으로 분류한다. 변재변색균은 주로 침엽수, 특히 소나무류의 벌채 직후 목구면에 침투하여 소나무류의 변재를 녹색, 청색으로 변하게 한다. 변재변색을 일으키는 균들은 대체로 자낭균에 속하며 대표적인 균은 *Ophiostoma*와 *Ceratocystis*이다(Wingfield 등, 1993). 변색균과 표면오염균은 목재부후균과 달리 보존체에 대한 내성이 매우 높아서 부후균에는 치명적인 농도의 방부제에서도 살아갈 수 있다. 이는 변색균이 방부제를 분해시키거나 해독시킬 수 있는 능력을 갖고 있기 때문이다(Burgel 등, 1996). 침엽수재의 변색은 거의 변재변색균인 *Ophiostoma spp.*의 가해에 의해 발생한다(김·김, 1999). 따라서 변재변색균의 방부, 방미처리를 위해서는 이러한 대표적인 변색균의 생장특성을 먼저 알아야 할 필요가 있다. 본 실험은 목재에 심각한 변재변색을 나타내는 *Ophiostoma spp.*와 *Ceratocystis spp.*의 균사의 생장특성을 조사하여 방부, 방미 실험에 기초 자료로 이용될 것이다.

#### 제 2 항 주요 목재변색균의 방미효력 검증을 위한 생리적 특성

##### 1. 재료 및 방법

##### 가. 공시균주

본 실험에 사용된 균주는 *Ophiostoma piceae*-1, *O. piceae*-2, *O. ulmi*, *O. flexuosum*, *O. quercus*, *O. polonicum*, *O. tetropii*, *O. narcissi*, *Ceratocystis pilifera*, *C. adiposa*, *C. ips*으로 *Ophiostoma*속 7종, *Ceratocystis*속 3종의 총 11개

균주로 실험을 진행하였다. 균주는 MEA(Blekeslee's Formula) 배지에 이식하여 25°C에서 4일간 배양 후 4°C 냉장 보관하였고, 같은 배지인 MEA(Blekeslee's Formula)에 계대배양하면서 실험을 진행하였다.

#### 나. 균주의 배양

각각의 균주에 대해 배지나 환경조건을 달리하여 petri-dish 상에 배양 후 균사체의 생장을 측정하였다. 성장길이의 측정은 각 균주의 접종원을 Cork-borer를 이용하여 동일 크기(직경 5 mm)로 petri-dish의 중앙부에 접종하고, 균사생장이 배지의 70% 정도 되었을 때 균사체의 길이를 측정하였다.

#### 다. 최적 성장 조건

각 균주에 대해 MEA(Blekeslee's Formula) 배지상에서 균사생장에 적합한 pH를 구명하기 위하여 0.1N HCl 또는 0.1N NaOH를 사용하여 pH 4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0으로 배지를 조절한 후, 25°C에서 4일간 배양하였다.

균사생장에 적합한 온도를 구명하기 위하여 0.1N HCl 또는 0.1N NaOH를 사용하여 pH 6.0으로 조절 후 MEA(Blekeslee's Formula) 배지에 각 균주를 접종하고, 배양온도를 15, 20, 25, 30, 35°C로 다양하게 변화시켜 4일간 배양 후 성장 길이를 측정하였다.

배지에 따른 균사의 성장속도를 비교하기 위하여 조성이 다른 각종배지를 0.1N HCl 또는 0.1N NaOH를 사용하여 pH 6.0으로 조절하고 각각의 균주를 접종한 후 25°C에서 4일간 배양 후 균사의 성장 길이를 측정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

변재변색균의 균사생장에 적합한 최적 pH를 구명하기 위해 MEA(Blekeslee's formula)배지에서 pH를 1.0 간격으로 4.0~8.0으로 조절하여 petri-dish 상에서 4일간 배양하여 균사의 성장 길이를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

pH에 따른 성장속도 측정 결과 *Ophiostoma narcissi*를 제외한 모든 균주가 pH 6.0-8.0에서 양호한 생장을 나타내었다. *Ophiostoma polonicum*와 *Ceratocystis adiposa*는 pH변화에 민감한 생장을 보였으나 다른 균주는 pH 조건에 따른 특정한 조건에서 활발한 생장을 나타내지 않고 광범위하게 비슷한 성장률을 나타내었다. 11개 균주 중 *Ophiostoma polonicum*이 pH 8.0에서 62mm로 가장 생장이 뛰어났으며,

*Ceratocystis adiposa*가 56.7mm로 양호한 성장을 나타내었다. *Ophiostoma narcissi*는 시험 균주 중 가장 낮은 성장을 나타내었고, 다른 균주가 pH 6.0 - 8.0에서 활발한 성장을 한 반면 pH 4.0 조건에서 13mm의 성장으로 가장 양호한 성장을 나타내었다.

*Ophiostoma spp.*와 *Ceratocystis spp.*의 균사생장에 적합한 배양온도를 구명하기 위해 배양온도를 5°C 간격으로 15 - 35°C까지 4일간 배양하면서 균사의 성장 길이를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다. 배양온도에 따른 균사체의 성장에 있어서 *Ceratocystis ips*를 제외한 모든 균주는 35°C에서 거의 성장을 하지 않았다.

*Ophiostoma ulmi*와 *Ceratocystis ips*는 30°C에서 가장 활발한 성장을 나타내었고, 다른 모든 균주는 25°C에서 최적의 균사생장을 나타내었다. *Ceratocystis ips*는 30°C에서 69mm 성장으로 시험 균주 중 가장 활발한 성장을 나타내었고 대부분의 균주가 성장하지 않은 35°C에서도 52.7mm의 성장으로 고온성 균이라 할 수 있겠다. *Ophiostoma narcissi*는 25°C에서 양호한 성장을 보였으나 16mm의 성장으로 시험 균주 중 가장 낮게 나타났다.

10가지의 다양한 배지를 pH 6.0으로 조절하여 각각의 균주를 접종하고, 25°C상에서 4일간 배양하여 균사체의 성장을 조사한 결과는 Fig. 3 및 Table 1과 같다.

시험 균주 중 *Ophiostoma polonicum*이 V8-juice agar에서 73mm의 성장으로 가장 활발하였으며 *Ceratocystis adiposa*가 61.7mm의 성장으로 양호한 결과를 나타내었다.

*Ophiostoma quercus*는 MEA(Blekeslee's formula)에서 가장 양호한 성장을 보였으나 22.7mm로 시험 균주 중 가장 낮은 성장을 나타내었다. 10개 배지 중 CZA는 가장 낮은 균사밀도와 성장을 나타낸 반면, TGY는 가장 높은 균사밀도와 양호한 성장을 나타내었다. 높은 영양분을 가지고 있는 YEPD는 균사밀도는 약간 치밀한 반면 CZA와 GYA를 제외한 다른 배지에 비하여 저조한 성장을 나타내었다.

Table 1. Mycelial density of sapstain fungi on various culture media.

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K
YEPPD	SC	ST	ST	ST	ST	SC	ST	ST	ST	SC	SC
4%MA	T	T	T	ST	T	T	T	ST	ST	T	ST
CZA	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
YMA	ST	T	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
PDA	ST	T	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST
TGY	ST	ST	SC	SC	SC	ST	ST	SC	ST	ST	SC
SDAY	SC	T	ST	ST	ST	ST	ST	ST	ST	SC	SC
V8 juice	SC	ST	ST	ST	ST	T	ST	SC	ST	SC	ST
GYA	T	T	T	ST	T	ST	T	ST	ST	T	T
MEA(B.F)	T	T	T	ST	ST	ST	ST	SC	ST	T	ST

C: compact, SC: somewhat compact, ST: somewhat thin, T: thin, N: none

A: *Ceratocystis pilifera*, B: *Ceratocystis adiposa*, C: *Ceratocystis ips*, D: *Ophiostoma piceae-1*, E: *Ophiostoma ulmi*, F: *Ophiostoma flexuosum*, G: *Ophiostoma piceae-2*, H: *Ophiostoma quercus*, I: *Ophiostoma polonicum*, J: *Ophiostoma tetropii*, K: *Ophiostoma narcissi*

Table 2. Compositions of the media used in this study.

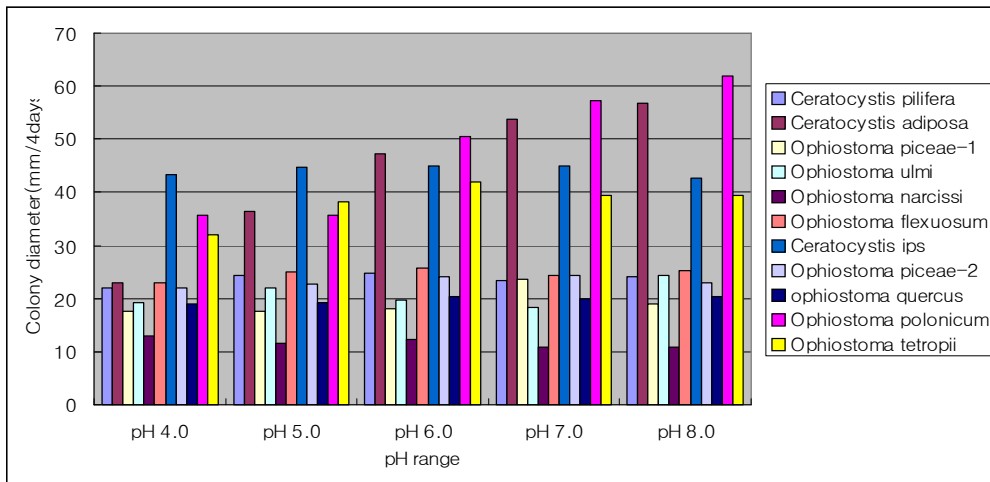
Media compounds	GYA	MEA (B.F)	PDA	4%MA	TGY	YMA	YEPD	V8 juice	CZA	SDAY
Malt extract		20g		40g		3g				
Potato			200g							
Y e a s t extract	10g				5g	3g	10g			5g
Peptone		1g				5g	20g			2.5g
Glucose	20g	20g			1g					
Dextrose						10g	20g			10g
Tryptone					5g					
CaCO3	20g							4g		
K2HPO4					1g					
V8 juice								163ml		
Czapek dox									35g	
Agar	20g	20g	20g	20g	20g	20g	20g	20g	20g	20g

목재의 주요 변재변색균인 *Ophiostoma*속과 *Ceratocystis*속의 균사의 생리를 알아보기 위해 배지나 환경조건을 달리하여 petri-dish 상에 배양 후 균사체의 생장을 측정 한 결과는 다음과 같다.

pH에 따른 성장속도 측정 결과 pH 4.0에서 양호한 성장을 나타낸 *Ophiostoma narcissi*를 제외한 모든 균주가 pH 6.0 - 8.0에서 양호한 성장을 나타내었다. 배양온도에 따른 균사체의 생장에 있어서 *Ceratocystis ips*를 제외한 모든 균주는 35°C에서

거의 생장을 하지 않았다. *Ophiostoma ulmi*와 *Ceratocystis ips*는 30°C에서 가장 활발한 생장을 나타내었고, 다른 모든 균주는 25°C에서 최적의 균사생장을 나타내었다. 이로써 목재의 주요 변재변색균인 *Ophiostoma spp.*와 *Ceratocystis spp.*는 중고온성 균임을 알 수 있었다. 10가지의 다양한 배지를 pH 6.0으로 조절하여 25°C상에서 배양한 결과, V8 juice와 MEA(B.F)에서 양호한 생장을 나타내었으며 TGY에서 치밀한 균사밀도를 나타낸 반면 CZA에서는 낮은 균사밀도를 보였고 성장속도도 다른 배지에 비하여 매우 낮았다. 따라서 본 실험에 이용된 균주를 토대로 볼 때 *Ophiostoma spp.*와 *Ceratocystis spp.*는 탄소원만으로는 양호한 생장을 할 수 없다는 것을 알 수 있었다. 25°C 배양하에서는 *Ophiostoma polonicum*이 pH 8.0 조건과 V8 juice에서 시험 균주 중 가장 뛰어난 생장을 나타내었고, 온도 변화 실험에서는 30°C 조건에서 *Ceratocystis ips*가 모든 균주 중 가장 활발한 생장을 보여주었다.

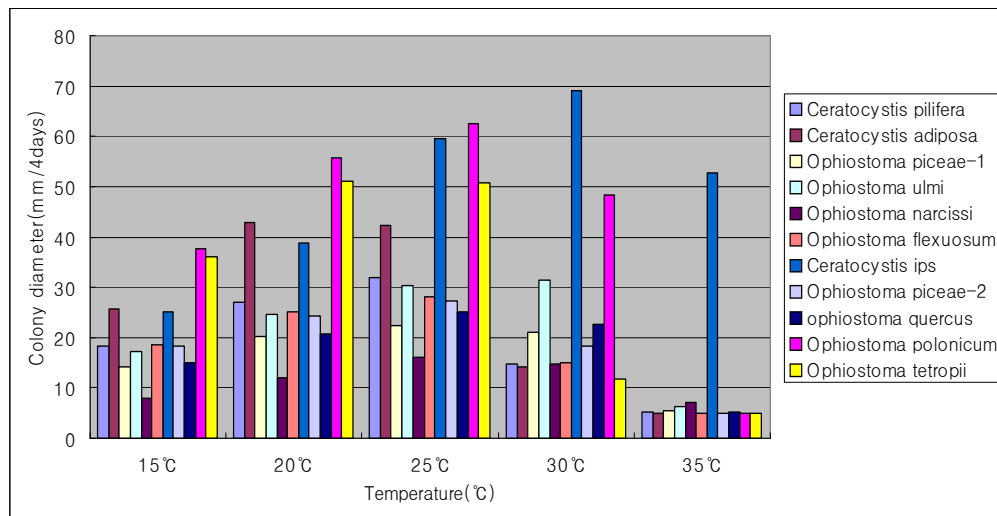
Figure 1. Effect of pH ranges on mycelial growth of sapstain fungi in MEA(Blekeslee's formula) at 25°C.



A: YEPD, B: 4%MA, C: CZA, D: YMA, E: PDA, F: TGY, G: SDAY, H: V8 JUICE, I: GYA, J: MEA(Blekeslee's formula)

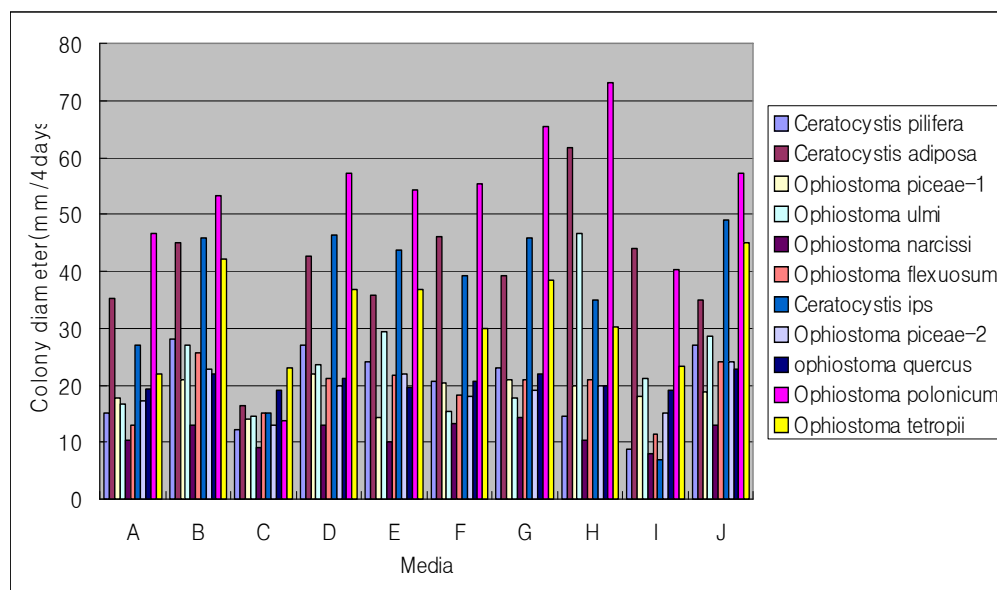


Figure 2. Effect of temperature on mycelial growth of sapstain fungi in MEA(blekeslee's formula) at pH 6.0.



A: YEPD, B: 4%MA, C: CZA, D: YMA, E: PDA, F: TGY, G: SDAY, H: V8 JUICE, I: GYA, J: MEA(Blekeslee's formula)

Figure 3. Effect of various media on mycelial growth of sapstain fungi in 25°C at pH 6.0.



A: YEPD, B: 4%MA, C: CZA, D: YMA, E: PDA, F: TGY, G: SDAY, H: V8 JUICE, I: GYA, J: MEA(Blekeslee's formula)

### 3. 결 론

1. pH에 따른 성장속도 측정 결과 *Ophiostoma narcissi*를 제외한 모든 균주가 pH 6.0-8.0에서 양호한 성장을 나타내었다. *Ophiostoma polonicum*와 *Ceratocystis adiposa*는 pH변화에 민감한 성장을 보였으나 다른 균주는 pH 조건에 따른 특정한 조건에서 활발한 성장을 나타내지 않고 광범위하게 비슷한 성장률을 나타내었다.
2. *Ophiostoma ulmi*와 *Ceratocystis ips*는 30°C에서 가장 활발한 성장을 나타내었고, 다른 모든 균주는 25°C에서 최적의 균사생장을 나타내었다. *Ceratocystis ips*는 30°C에서 69mm 성장으로 시험 균주 중 가장 활발한 성장을 나타내었고 대부분의 균주가 성장하지 않은 35°C에서도 52.7mm의 성장으로 고온성 균이라 할 수 있겠다.
3. 시험 균주 중 *Ophiostoma polonicum*이 V8-juice agar에서 73mm의 성장으로 가장 활발하였으며 *Ceratocystis adiposa*가 61.7mm의 성장으로 양호한 결과를 나타내었다.
4. *Ophiostoma quercus*는 MEA(Blekeslee's formula)에서 가장 양호한 성장을 보였으나 22.7mm로 시험 균주 중 가장 낮은 성장을 나타내었다.
5. 10개 배지 중 CZA는 가장 낮은 균사밀도와 성장을 나타낸 반면, TGY는 가장 높은 균사밀도와 양호한 성장을 나타내었다.
6. *Ophiostoma spp.*와 *Ceratocystis spp.*는 탄소원만으로는 양호한 성장을 할 수 없다는 것을 알 수 있었다. 25°C 배양하에서는 *Ophiostoma polonicum*이 pH 8.0 조건과 V8 juice에서 시험 균주 중 가장 뛰어난 성장을 나타내었고, 온도 변화 실험에서는 30°C 조건에서 *Ceratocystis ips*가 모든 균주 중 가장 활발한 성장을 보여주었다.

### 제 3 항 주요 변색균의 방미 효력

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 공시균주

본 실험에 사용된 균주는 *Ophiostoma piceae*-1, *O. piceae*-2, *O. ulmi*, *O. flexuosum*, *O. quercus*, *O. polonicum*, *O. tetropii*, *O. narcissi*, *Ceratocystis pilifera*, *C. adiposa*, *C. ips*으로 *Ophiostoma*속 7종, *Ceratocystis*속 3종의 총 11개 균주로 실험을 진행하였다. 분양받은 균주는 MEA(Blekeslee's Formula) 배지에 이식하여 25℃에서 4일간 배양 후 4℃ 냉장 보관하였고, 같은 배지인 MEA(Blekeslee's Formula)에 계대배양하면서 실험을 진행하였다.

##### 나. 균주의 배양

각각의 균주에 대해 배지나 환경조건을 달리하여 petri-dish 상에 배양 후 균사체의 생장을 측정하였다. 생장길이의 측정은 각 균주의 접종원을 Cork-borer를 이용하여 동일 크기(직경 5 mm)로 petri-dish의 중앙부에 접종하고, 균사생장이 배지의 70% 정도 되었을 때 균사체의 길이를 측정하였다.

##### 다. 목초액과 죽초액의 농도에 따른 변색균에 대한 방미효과 - 1

각 균주에 대해 MEA(Blekeslee's Formula) 배지상에서 목초액과 죽초액의 농도에 따른 방부력을 보기 위해 각각 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%로 달리하여 변색균에 대한 방부력을 측정하였다. pH는 5.4로 조절하여 접종 후 25℃에서 4일간 배양 하였다. 목초액 및 죽초액은 상용되는 타사 제품을 사용함.

##### 라. 목초액과 죽초액의 농도에 따른 변색균에 대한 방미효과 - 2

각 균주에 대해 MEA(Blekeslee's Formula) 배지상에서 목초액과 죽초액의 농도에 따른 방부력을 보기 위해 각각 5%, 10% 로 달리하여 변색균에 대한 방부력을 측정 하였다. pH는 5.4로 조절하여 접종 후 25℃에서 7일간 배양 하였다. 목초액 및 죽초액은 상용되는 타사 제품을 사용함.

##### 마. 은 농도에 따른 변색균에 대한 방미효과

각 균주에 대해 MEA(Blekeslee's Formula) 배지상에서 은의 농도에 따른 방부력을 보기 위해 5ppm, 10ppm, 20ppm, 50ppm, 100ppm으로 달리하여 변색균에 대한 방부력을 측정하였다. pH는 5.4로 조절하여 접종 후 25℃에서 4일간 배양 하였다. 목초액 및 죽초액은 상용되는 타사 제품을 사용함.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 목초액의 농도에 따른 변색균에 대한 방부효과

변재변색균의 균사생장을 저해할 수 있는 최적의 목초액 농도를 규명하기 위해 MEA(Blekeslee's formula)배지에서 목초액의 농도를 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%로 달리하고 petri-dish 상에서 4일간 배양하여 균사의 성장 길이를 측정한 결과는 Fig. 1과 같다.

모든 시료는 *Ophiostoma narcissi*를 제외한 다른 균주에 대해서는 방부 효과가 없었으며, *Certocystis adiposa*와 *Ophiostoma ulmi*에 대해서는 오히려 균사의 성장에 목초액이 촉진효과가 있었다. *C. adiposa*와 *O. ulmi*를 제외한 다른 균주는 목초액 3%에서 5개 조건중 양호한 방부 능력을 나타내었으나 그 효과가 뚜렷하다고 볼 수는 없었다. 따라서 목초액 5%와 10%에 대하여 추가적으로 실험을 진행하기로 하였다.

### 나. 죽초액의 농도에 따른 변색균에 대한 방부효과

변재변색균의 균사생장을 저해할 수 있는 최적의 죽초액 농도를 규명하기 위해 MEA(Blekeslee's formula)배지에서 죽초액의 농도를 0.1%, 0.5%, 1%, 2%, 3%로 달리하고 petri-dish 상에서 4일간 배양하여 균사의 성장 길이를 측정한 결과는 Fig. 2와 같다.

죽초액은 목초액과는 달리 뚜렷한 방부 능력을 나타내었으며, 대체로 2%이상에서부터 양호한 억제 능력을 가지고 있다고 사료된다. *Ophiostoma ulmi*는 다른 10개 균주와는 달리 죽초액 1% 이하에서는 억제 받지 않고 성장하는 것을 확인 할 수 있었다. *O. flexuosum*, *O. narcissi*, *O. piceae-1*, *O. polonicum*은 2%농도에서 균사가 자라지 않았다. 따라서 목초액보다는 죽초액의 어떤 성분이 변색균이 성장하는데 확연한 저해를 한다고 볼 수 있으므로 방미제를 개발함에 있어 죽초액의 이용이 유용하리라 사료된다.

Figure 1. Fungal growth on various concentrations of wood extracts.

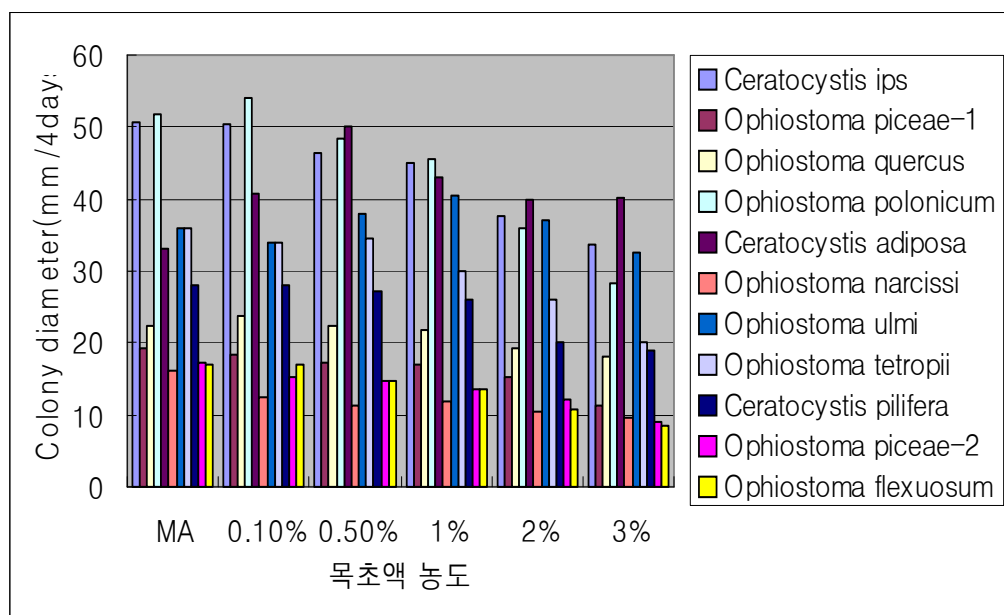
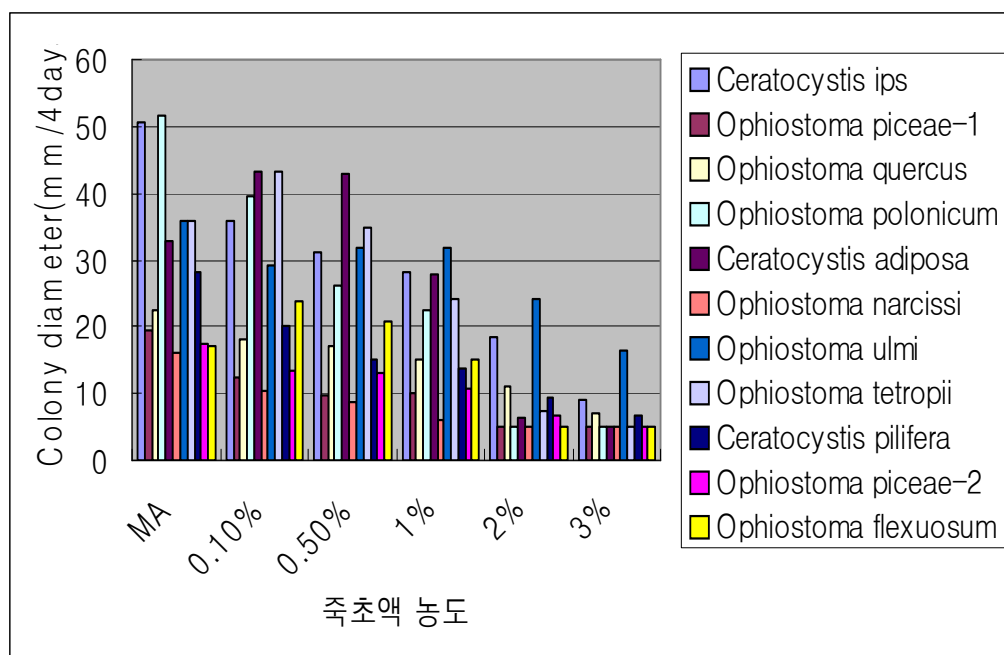


Figure 2. Fungal growth on various concentrations of bamboo extracts.

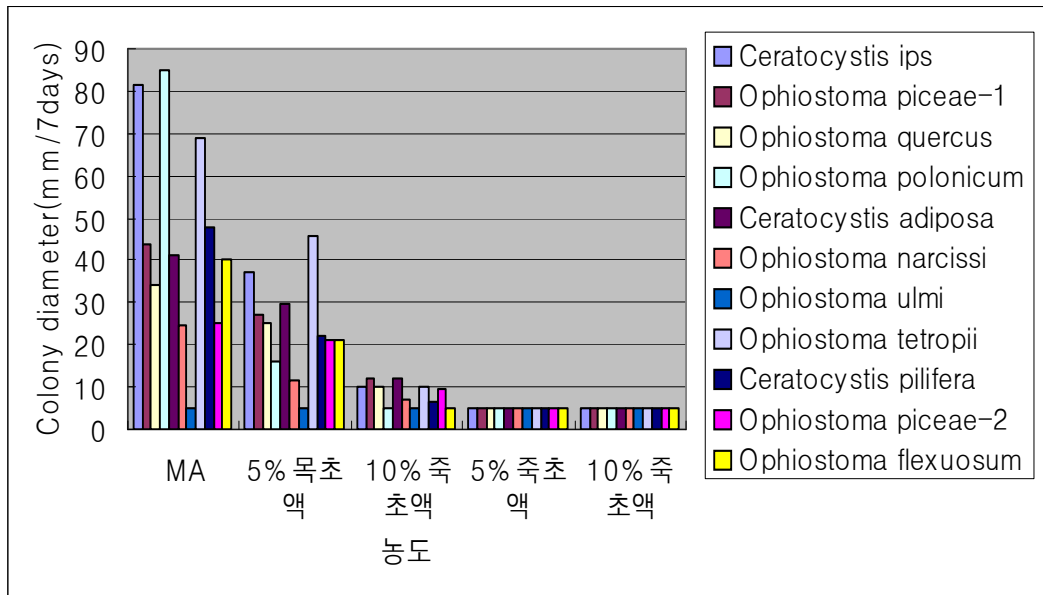


다. 목초액과 죽초액의 농도에 따른 변색균에 대한 방부효과 - 2

각 균주에 대해 MEA(Blekeslee's Formula) 배지상에서 목초액과 죽초액의 농도에 따른 방부력을 보기 위해 각각 5%, 10% 로 달리하여 25°C에서 7일간 배양 한 결과는 다음과 같다. (Fig. 3)

목초액의 3% 농도에서도 변색균들의 생장이 저해 받지 않아서 목·죽초액의 5%와 10%의 농도로 균사를 배양시킨 결과는 죽초액에서는 모든 균들이 생장을 하지 않았다. 목초액은 5% 농도에서부터 시험에 사용된 모든 변색균의 생장을 저해한다고 볼 수 있으며 10% 농도에서부터 확연한 저해를 한다고 볼 수 있다.

Figure 3. Fungal growth on various concentrations of bomboo extracts.



라. 활성은(Ag) 농도에 따른 변색균에 대한 방부효과

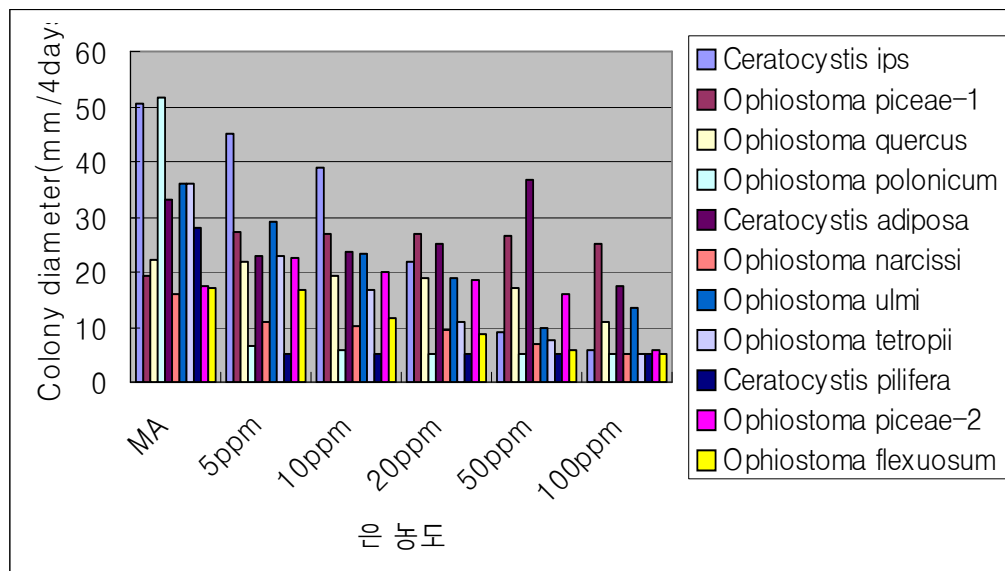
각 균주에 대해 MEA(Blekeslee's Formula) 배지상에서 은의 농도에 따른 방부력을 보기 위해 5ppm, 10ppm, 20ppm, 50ppm, 100ppm으로 달리하여 변색균에 대한 방부력을 측정하였다. pH는 5.4로 조절하여 접종 후 25°C에서 4일간 배양한 결과는 Fig. 4와 같다.

변색균의 생장에 있어서 은의 효과는 극소량의 첨가만으로도 균사생장을 억제 시키는 것으로 나타났다. 그 효과는 *O. polonicum*과 *C. pilifera*에서 가장 눈에 띄었는데 은의 5ppm 첨가만으로도 99.9%의 억제율을 나타내었다. 반면 *O. piceae-1*에서는 은

의 영향을 전혀 받지 않았는데, 다른 결과를 참조했을때 이는 어떤 내·외부적인 영향을 받아서 은의 영향을 받지 않고 정상적인 생육을 하였다고도 볼 수 있다. 그러나 은 농도가 증가함에 따라 미세하게 균사의 생장이 저조한 것으로 보아 은의 첨가가 *O. piceae*-1에서는 다른 균들에 비하여 민감한 효과를 나타내지 않는다고 할 수 있다. 100ppm에서는 대부분의 균주가 생장을 하지 않거나 저조한 생장을 나타내는 것으로 보아 은의 효과는 100ppm 이상에서부터 탁월하다고 볼 수 있겠다. 이 외에도 pH를 조절하지 않고 은 농도를 변화하여 실험을 하였을 때 20ppm 이상에서 탁월한 효과를 나타내었는데, 이는 은이 강산이기 때문에 은의 역할과 함께 pH의 효과가 같이 나타난 것으로 이번 실험을 통해 확인하게 되었다.

이 같은 실험을 종합하여 보면 친환경 방부·방미제를 개발할 때 은이나 죽초액의 쓰임이 유용할 것이라 사료되므로 이러한 시료를 안정적으로 결합시키는 기술을 개발할 필요가 있다.

Figure 4. Fungal growth on various concentrations of Ag ions.



### 3. 결 론

1. 모든 시료는 *Ophiostoma narcssi*를 제외한 다른 균주에 대해서는 방부 효과가 없었으며, *Certocystis adiposa*와 *Ophiostoma ulmi*에 대해서는 오히려 균사의 성장에 목초액이 촉진효과가 있었다.
2. 죽초액은 목초액과는 달리 뚜렷한 방부 능력을 나타내었으며, 대체로 2%이상에서부터 양호한 억제 능력을 가지고 있다고 사료된다. *Ophiostoma ulmi*는 다른 10개 균주와는 달리 죽초액 1% 이하에서는 억제 받지 않고 성장하는 것을 확인할 수 있었다.
3. 목초액은 5% 농도에서부터 시험에 사용된 모든 변색균의 성장을 저해한다고 볼 수 있으며 10% 농도에서부터 확연한 저해를 한다고 볼 수 있다.
4. 변색균의 성장에 있어서 은의 효과는 극소량의 첨가만으로도 균사생장을 억제 시키는 것으로 나타났다. 그 효과는 *O. polonicum*과 *C. pilifera*에서 가장 눈에 띄었는데 은의 5ppm 첨가만으로도 99.9%의 억제율을 나타내었다.
5. 100ppm에서는 대부분의 균주가 성장을 하지 않거나 저조한 성장을 나타내는 것으로 보아 은의 효과는 100ppm 이상에서부터 탁월하다고 볼 수 있겠다. 이 외에도 pH를 조절하지 않고 은 농도를 변화하여 실험을 하였을 때 20ppm 이상에서 탁월한 효과를 나타내었는데, 이는 은이 강산이기 때문에 은의 역할과 함께 pH의 효과가 같이 나타난 것으로 이번 실험을 통해 확인하게 되었다.



### 제 3 절 목재를 오염시키는 각종 세균에 대한 방미 효력

#### Anti-microorganisms activity of various microorganisms that contaminated on wood surface

##### 제 1 항 서 설

목재의 자연적인 아름다움의 잇점 때문에 고래로 부터 현재에 이르기까지 가구, 건축재료, 생활용품, 미술품등으로 사용되어 왔으며 미래의 인간 삶과는 매우 깊은 관계를 유지하게 될 것이다. 그러나 불행하게도 이 목재는 천연유기물질로서 화학적이나 생물학적인 요인들에 의하여 원형자체의 아름다움이 손상을 입게 된다거나 구조적인 문제를 입히게 되어서 본연의 가치를 하락시키게 된다. 그런데 이러한 목재의 변색은 장기간 저장을 한다거나 환경이 나쁜 곳에 저장됨으로써 주로 야기되는데 목재의 변색부위가 목재의 심재부위에 비해서 심하게 훼손을 받고 있다. 최근의 미국의 자료에 의하면 미국 내 목재상품적인 가치에서 목재의 변색에 의하여 하락당하는 액수가 무려 50 million \$로 발표되었다. 물론 자연환경적인 요인과 화학적인 요인에 의하여 발생하는 수도 있으나 주된 인자는 생물학적인 인자로서 주로 곰팡이가 야기하는 것으로 여겨진다. 이러한 곰팡이의 성장이 변색을 야기 시키는데 이는 목재가 처한 자연환경이나 인위적인 환경 때문에 이들이 서식하기 때문이다.

자낭균류 및 불완전균류의 목재의 침해는 목재를 생물학적으로 변색시켜 가치를 하락시키는 원인을 제공한다. 따라서 당해년도의 연구수행은 주로 목재를 변색시키는 여러 자낭균류 및 불완전균류를 채집하였으며 이들의 생리학적인 성장력을 측정하였다. 또한 실험실내에서 제조한 변색균 방미제를 제조하는 실험을 수행하여 이들의 생리학적인 측면에서 억제력을 파악하였다.

##### 제 2 항 목재를 오염시키는 각종 세균에 대한 방미 효력

###### 1. 목재 오염 세균에 대한 방미 효력

세균에 의한 목재의 피해는 심하지 않으나 표면 오염이나 변색으로 인한 목재의 가치손실은 크다. 목재의 변색은 변색부위에 따라 변재변색이나 표면오염으로 분류되는데 주로 세균에 의한 피해는 주로 표면오염에 국한된다. 그러나 이들은 목재에 대한 직접적인 피해보다는 주위환경을 오염시키고 나아가서는 목재를 다루는 인간에게

지대한 피해를 야기시킬 수 있다. 이들 목재의 표면을 오염시키는 세균은 목재부후균과 달리 보존제에 대한 내성이 매우 높아서 부후균에는 치명적인 농도의 방부제에서도 살아갈 수 있다. 이는 변색균이 방부제를 분해시키거나 해독시킬 수 있는 능력을 갖고 있기 때문이다(Burgel 등, 1996).

따라서 목재를 오염시키는 오염 세균의 방제처리를 위해서는 이러한 대표적인 인간 피해 세균의 성장특성을 파악하고 천연 방부재료에 대한 효력을 검증하고자 한다.

## 2. 재료 및 방법

### 가. 공시균주

본 실험에 사용된 균주는 *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* O-157 (ATCC 43888), *Listeria monocytogenes* (ATCC 15313), *Bacillus cereus* (ATCC 13601)로 분양받은 균주는 NA 배지에 이식하여 25°C에서 3일간 배양 후 4°C 냉장 보관하였고, NA배지에 계대배양하면서 실험을 진행하였다.

### 나. 공시 약제

HWE (현 개발중인 방미제 일종임)

### 다. 균주의 배양

300ml 삼각플라스크에 120ml의 nutrient broth를 넣고 121°C, 1.5기압에서 15분간 멸균 후 클린벤치에서 냉각하였다. 각각 세균의 배양이 완료된 petri-dish에서 백금으로 떼내어 nutrient broth에 접종하고 25°C에서 24시간 배양하였다.

### 라. 시험방법

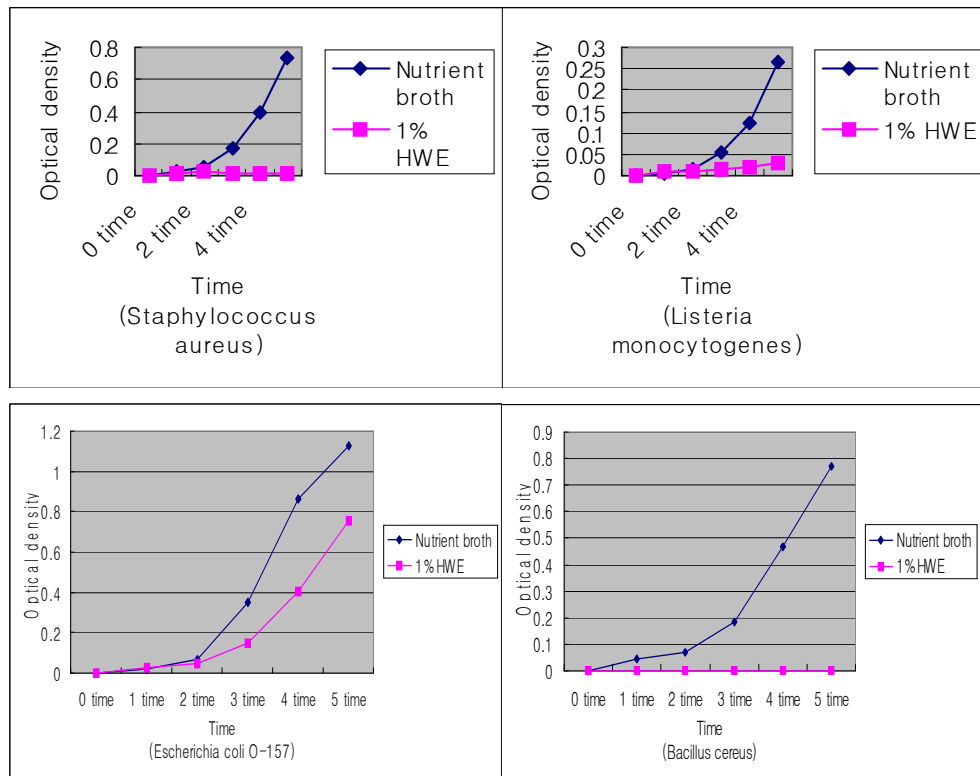
1% HWE가 식중독균에 항균력이 있는지를 알아보기 위하여 흡광도를 이용하여 실험을 진행하였다. Nutrient broth에 HWE를 1%로 희석하여 120ml씩 삼각플라스크에 넣고 121°C에서 멸균 후 실온에서 냉각하였다. 대조구로는 120ml의 nutrient broth를 사용하였다. 1%의 HWE가 들어있는 삼각플라스크에 배양이 완료된 균주를 1ml씩 접종하였다. 모든 시험은 3반복하였다. 접종된 삼각플라스크는 25°C, 200rpm에 배양하였다. 처음 접종된 시간을 0time으로 하여 흡광도를 측정하고 5시간동안 매 시간마다 흡광도를 측정하였다.

본 실험은 참여업체와 연구주관기관과 공동으로 연구결과를 도출하였다.

### 3. 결과 및 고찰

1% HWE가 식중독균에 항균력을 나타내는지 알아보기 위하여 실험한 결과는 다음과 같다. *Staphylococcus aureus*는 1%로 희석시킨 방미제 HWE에 대한 생장억제는 매우 높게 나타났으며 접종 후 2시간 후에 급격한 성장을 보이는 대조구에 비하여 접종 5시간 후에도 지속적인 항균효력을 보여주었다. *Staphylococcus aureus*와 *Bacillus cereus*는 1%의 HWE에 의해 거의 생장이 저지되는 것을 알 수 있다. 1% HWE가 *Listeria monocytogenes*에서는 양호한 항균력을 나타내었으나 기본적으로 다른 균주에 비하여 생장이 왕성한 *Escherichia coli*는 33%의 항균능력을 보여주었다. 1% HWE가 세균에 있어서 어느 정도 항균력을 보인 것으로 보아 변색균에도 방미효과를 보일 것으로 사료된다.

Figure 1. Anti-bacterial activation of HWE in vitro at room temperature.



### 제 3 항 야외 폭로시험에 의한 표면 오염균의 방미제 효력

- 붉은빵곰팡이를 중심으로 -

#### 1. 재료 및 방법

##### 가. 공시 목재시편

전라북도 군산시 소재 제재소에 집하된 무변색 라디에타 원목으로부터 4.0 cm(두께) × 10 cm(폭) × 100 cm(길이)인 시편을 제재하여 정상적인 재면이 변재부 100%인 시편을 선별하여 공시 시편으로 선정하였다. 중간에 홈을 만들어 시편의 외부 표면적을 넓게 하여 주었다.

본 연구는 참여업체가 현장실험을 중점적으로 수행하였다.

##### 나. 약제처리 및 야외폭로

방미제 처리농도(5 ppm) 공시시편을 방미제 수용액에 1분간 침지한 후, 각 판재들을 폭 5개, 높이 6개의 층으로 block-stack 하였다. 무처리 판재는 대조구로 사용되었다. 또한 block-stack된 pile의 맨 위층에는 수분손실과 강우에 의한 약제의 씻겨짐을 예방하기 위해 polyethylene 필름으로 덮어 두었다. 약제처리가 완료된 라디에타 소나무 판재는 군산시 소재 제재소의 원목 야적장 인근에 야외 폭로하였다. 본 야외 폭로시험은 변색원인균의 활동이 왕성한 하절기인 6월 말에서 9월말까지 수행되었다.

Figure 1. Antifungal activities on wood panel contaminated by *Neurospora crassa*.

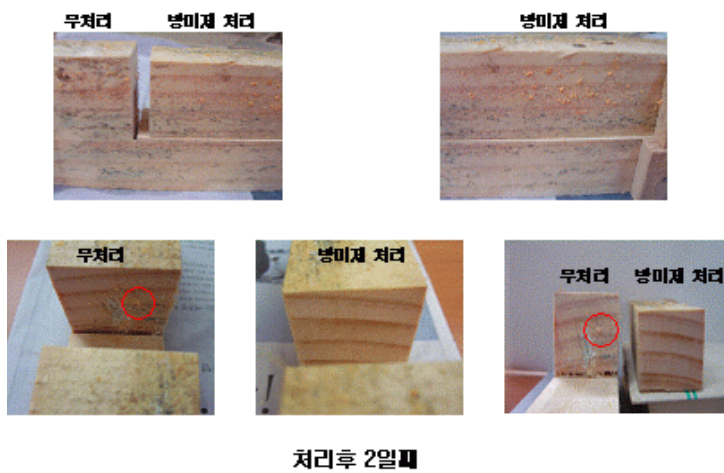
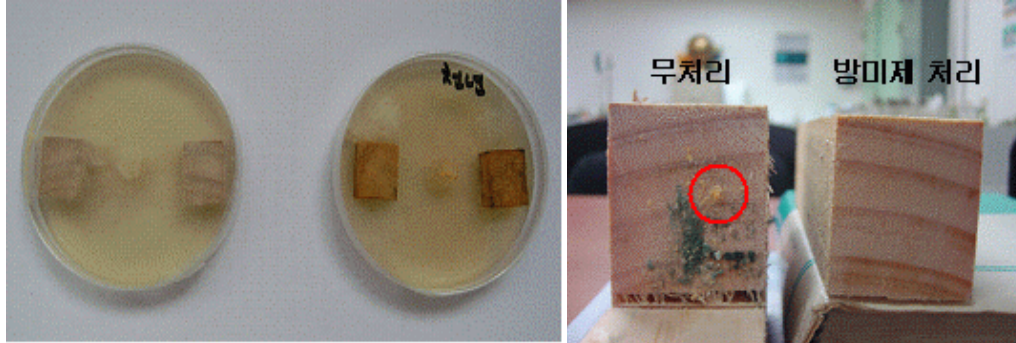


Figure 2. Comparison of untreated wood and treated wood by *Neurospora crassa* *in vivo* and *in vitro*.



자낭균류로서 자낭 포자를 형성하는 특징이 있다. 오렌지색 또는 담홍색 포자(분생자)가 가루와 같은 덩어리가 되어 착생하여 육안으로는 붉은 빵가루가 묻쳐 있는 것처럼 보인다. 분생포자에는 포자에는 카로틴이 다수 함유되어 있어 붉게 보여 이를 빵곰팡이 혹은 붉은빵곰팡이라 한다. 이들은 포자형성 기간이 매우 짧아 포자 형성이 빠르고 균사 성장력도 강하다. 이들의 주요 서식처는 옥수수 속이나 빵, 그리고 불에 타고 남은 나무 등으로 주로 전분, 헤미셀룰로오스 혹은 셀룰로오스 등의 다당류를 분해한다.

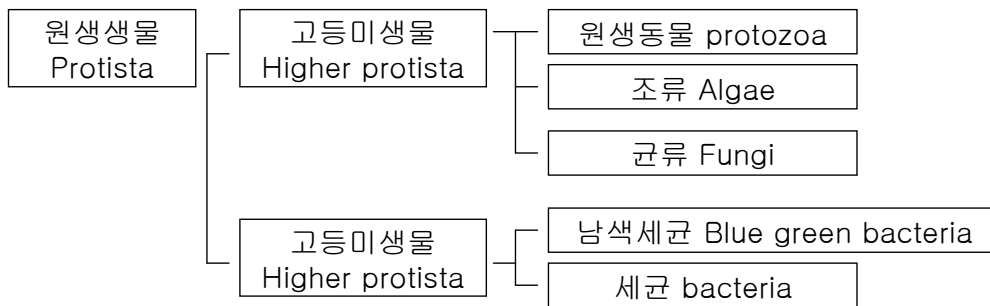
## 제 4 절 목재 변색균에 의한 목재 침투 및 목재세포 분해 메카니즘 구명

### Study of sapstaining fungal route of penetration into wood and their mechanism of wood cell degradation

#### 제 1 절 서 설

##### 목재변색균의 목재 침투 경로

목재는 유기물이므로 환경조건에 매우 민감하여 물리적, 화학적 성능이 저하되어 저분자물질로 저하되어 분해되거나 소모되는데 이런 현상을 목재의 열화라고 한다. 목재를 분해하는 미생물에는 세균을 포함하여 곰팡이 및 원생동물과 같은 진핵생물 혹은 원핵생물이 포함되어 있다.



이들 중 균류는 특히 목재에 서식하여 목재를 침해하며 목재세포를 분해하며 구성 조직을 열화시키는데 이들은 효소 등의 작용에 의한 생화학적 반응이 초래한다. 목재는 자연상태에서 여러 가지의 미생물이 단계적 천이를 일으키며 한 종류의 목재에 정착하게 되는데 이와 같은 목재의 부후균은 정도의 차이는 있지만 담자균류, 자낭균류 혹은 불완전균류 등이 많이 발견되나 여러 원핵균류들인 세균이나 방선균도 발견되고 있다. 이런 목재부후균이 목재에 서식하면서 발생하는 화학적인 반응이 표면에 나타내는 변색이나 표징 등에 의하여 백색부후균, 갈색부후균 혹은 연부후균으로 대별되고 있다.

곰팡이의 포자가 포자특성에 맞게 목재의 표면에 부착된 후에 포자가 발아하여 목재가 완전히 분해될 때 까지 부후과정이 계속된다. 포자가 목재의 표면에 정착하게 되면 적당한 수분과 온도 및 여타 환경이 알맞게 되면 포자가 발아하여 균사를 생성한다. 이들 목재 침해 균사들은 목재에 침입하여 콜로니화되며 효소를 분비하여 목재의 세포벽을 구성하는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌 등을 분해하여 고분자 물질을 저분자화하여 균체 내로 흡수하고 저분자물질을 영양원으로 하여 영양생장을 하게 된다.

이러한 목재를 침해하는 균들 중에 생물학적인 목재표면에 변색을 일으키게 되는 현상을 나타나게 되는데 이는 목재의 미적인 가치와 재산적인 가치를 감소시킨다. 목재의 변색에 원인이 되는 인자는 주로 네가지로 구별될 수 있는데 첫째는 벌채나 제재 후 목재 속에 함유되어 있는 화학물질이나 효소에 의해 순간적으로 목재 표면이나 내부에서 발생하는 변색이며, 둘째는 화학약품이 목재에 접촉하였을 때 발생하는 변색이며 셋째는 부후 초기에 발생하는 재색의 변화이며 넷째는 목재 표면이나 내부에서 생육하는 균사에 의한 변색 등이다. (신과 안,1996).

목재의 표면을 오염시키거나 변색시키는 곰팡이를 목재 표면오염균 혹은 목재 변재 변색균으로 불리 운다. 표면오염균은 건조되지 않은 습재나 제재목에서 발생하게 되는데 이들은 상품의 저하를 초래하는데 주로 멜라닌색소를 진하게 지닌 포자가 생산되기 때문이다. 표면오염균의 균사는 무색의 상태로 제재목의 표층 유조직에 존재하는 전분이나 단당류를 분해 흡수하며 생육한다. 이들 표면오염균의 대표적인 곰팡이는 *Aspergillus*, *Fusarium*, *Monilia*, *Penicillium*, *Rhizopus*, *Trichoderma*속 등에 속하여 있다. 이들은 목재표면의 유세포나 도관 혹은 방사조직을 통하여 침입을 하게되며, 유연벽공의 파괴된 마르고(margo)를 통하여 가도관세포에서 인접의 가도관세포로 침투하게 된다. 변재변색균이란 보통 갈색이나 청흑색을 띠고 있으나 현미경에 의한 관찰로는 갈색을 띠고 있으나 목재에서 빛의 산란에 의하여 청색 혹은 흑색으로 보이게 되는데 이들은 셀룰로오스를 분해하는 능력이 매우 적어서 목재의 물리적인 강도의 저하를 초래하지 않는다고 알려져 있다. 따라서 목재의 청색 혹은 흑색의 변색은 목재 표면 감염 후에 유세포에서 균사의 급속한 콜로니화에 기인한다.

목재 변재변색균 및 표면 오염균의 목재내 침투의 경로를 밝히고 이들의 목재 세포벽의 분해 메카니즘을 구명하기 위하여 본 연구를 수행하였다. 연구를 위한 실험재료는 국내에서 목재 변색에 심한 피해를 야기하는 소나무류를 선정하여 실험재료로 선정하였는데 이는 국내에 서식하는 한국산 소나무류인 육송(*Pinus densiflora*)와 수입목재인 뉴질랜드송 (*Pinus radiata*)이 국내에 대다수 유통되고 있기 때문이다.

또한, 목재 변색균은 크게 두그룹으로 나누게 되는데 *Ophiostoma*와 *Ceratocystis*와 같이 곤충의 매개에 의해 전달되는 곤충의 생활사와 밀접한데 목재의 벌채에서부터 목재야적장은 물론 건조되지 않은 판재에 이르기까지 이 곰팡이의 피해를 받게 된다. 따라서 본 연구에 있어서 변재변색균 및 표면오염균의 피해에 따른 목재 조직내 세포의 분해 메카니즘은 *Ophiostoma*의 세포벽 분해를 기준으로 세포벽부후 메카니즘으로 하였다.

## 제 2 항 목재 조직 내에서 전자현미경에 의한 균사 생장에 관한 연구

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 공시재료

##### 목재선정

본 연구에 사용되어진 목재는 전라북도 군산시에 위치한 목재회사에서 구입하였다. 국내 소나무의 일반적인 육송(*Pinus densiflora*)를 실험 목재로 곰팡이에 침해를 받지 않은 건전목을 선정하였다. 소나무시편은 직경이 20cm 이상의 목재에서 채취하였다.

#### 나. 목재시편

목재 시편은 사전에 멸균되어진 성장추(직경 5mm)를 이용하여 목재를 수피층에서부터 수를 향하여 방사방향으로 깊게 뚫어 채취하였다. 이때 성장추는 매 사용시마다 70% 에탄올을 이용하여 소독하고 화염살균하여 사용하였다.

목재시편은 무작위 방법으로 건전재에서 채취하였으며 시편의 크기는 수피를 제외하고 대략 폭 5mm, 깊이 10cm였으며 성장추로 채취한 후 곧바로 멸균된 플라스틱봉투에 넣고 번호를 매긴 후 실험실로 가져와 냉장보관 하였다. 이들 보관된 시편은 120℃ 1기압에서 20동안 고압살균하였다. 멸균된 목재시편은 약 5cm 길이로 멸균된 수술용 칼을 이용하여 2등분하였다.

#### 다. 공시 균주

본 실험에 사용된 균주는 *Ophiostoma flexuosum*(363175)를 선정하였다. 실험을 위하여 최적의 생장을 나타내는 MEA배지에 생육시켜 2달 간격으로 계대배양을 하였다. 균의 목재내 접종을 위하여 사전에 2% MEA배지에서 2주간 배양된 균주를 직경 6mm 가량의 블럭을 잘라내어 새로운 2% MEA배지의 중간에 접종하였다. 접종된



*O. flexuosum*은 직경 9cm 패트리디쉬의 균사가 전면을 덮게 되었을때 사전에 멸균된 목재시편을 균사위에 올려놓아 20℃에서 4주간 배양하였다.

#### 다. 전자현미경 관찰

본 실험에 사용된 목재시편은 2% MEA 영양배지에서 4주간 접종 배양한 시편을 선정하였다. 목재 시편은 4주간 접종 배양 후 패트리디쉬 2% MEA배지에서 꺼내어 목재표면의 균사체를 멸균된 거즈를 이용하여 깨끗이 제거하였다. 목재시편은 액체 질소에서 1-2분 정도 동결시킨 후 멸균된 면도칼을 이용하여 작은 조각으로 세분하였으며 이 세분된 목재시편 조각은 에탄올 탈수과정(20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 그리고 70%, 10분 동안)을 거쳐 탈수하였다. 탈수된 목재시편 조각은 기건하고 ion sputtering(JEOL JC-1200 fine coater)를 이용하여 골드코팅을 하였으며 주사전자현미경(SEM, JSM-5200)을 이용하여 관찰하였다.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 목재 조직 내 세포벽 침투

본 연구에서는 *O. flexuosum*에 의해 처리된 목재시편은 흑색으로 변색되었으며 이들은 목재의 표면에 국한되어 나타났다. 주사전자현미경에 의한 관찰은 *Pinus densiflora*의 벽공막과 벽공막의 분해발달 과정의 메카니즘에 관한 정보를 확연히 보여주었다. 그림 2는 유연벽공막의 분해에 관하여 자세히 보여주었다. 또한, 목재조직의 표면에서 세포벽의 최외각층인 S3층의 세포벽내 침투하여 세포내강의 전분이나 여타 저분자물질을 분해 흡수함을 보여주었다. 몇몇의 목재변색균의 균사는 벽공막을 분해하지 않고 벽공막의 최외각층에 균사를 접촉시켜 영양생장을 하였으나 그림 4는 벽공막의 분해에 있어서 기계적인 힘에 의하여 세포벽을 관통하는 균사가 관찰되어 이는 목재변색균의 균사는 벽공막의 분해에 있어서 세포의 효소의 분비에 의한 고분자물질의 저분자화 분해 및 흡수보다는 기계적인 힘이 주된 역할을 한다고 보여진다. 물론 여기에는 그림 6에서 보여지는 바와 같이 세포의 효소에 의한 중간층(ML층)과 S3층의 분해는 생화학적 반응에 의한 목재세포벽의 분해 메카니즘이 보여진다.

### 나. 목재 조직 내 균사 침투 경로

진균류에 의한 목재 분해에 있어서 목재 조직내 균사의 침투경로는 다음과 같다. 첫째로 곰팡이는 포자나 혹은 균사의 형태로 목재의 표면에 정착하여 콜로니를 형성한다. 집락을 형성한 균사는 목재의 표면 부위의 세포의 최외각층의 세포내로 침투

하게 되며 주로 벽공막의 분해에 의하여 세포에서 이웃 세포로의 이동이 이루어진다. 또한, 몇몇의 균사들은 물리적인 힘에 의하여 목재의 세포벽을 통과하여 이웃의 세포로 이동하기도 하며 이는 그림 1-8에서 볼 수 있다. 방사단면에서 세포내강속의 균사의 집락형성은 그림 1에서 보여지며 그림 4는 세포벽을 통하여 한 세포에서 이웃세포로의 직접적 이동을 보여주고 있다. 유연벽공의 분해는 그림 5에서 볼 수 있다. 그림 6과 그림7은 부분적 혹은 완전한 세포내 벽공막의 분해를 보여주며 목섬유의 분해는 그림 8과 같다.

다. 목재변색균과 목재부후균과의 목재열화 특성 비교

목재의 횡단면에서 발생한 변색균의 균사의 생장은 균사의 집락형성 후 24시간 이내에 축단방향에서는 0.5mm, 경단방향에서는 1mm, 섬유방향에서는 5mm 정도 성장할 수 있다. 그러나 이러한 빠른 생육은 목재의 파괴된 가도관이나 노출된 방사조직을 통하여 침투하게 되는데 균사는 방사조직의 유세포나 수지구를 둘러 싸고 있는 유세포에서 신속하게 집락을 형성하게 된다.

Table 1. Comparison of three different wood degrading phenomena.

	백색부후	갈색부후	목재 변색
목재표면 색	백색	갈색	흑색 혹은 청색
세포벽 공격 양식	내강으로부터 외부로 단계적 침입	2차벽의 S2층의 불규칙한 파괴	내강으로부터 물리적힘으로 세포벽 침입
물리적 열화	심각한 구조적 열화	수축과 균열이 발생	물리적 강도 변화 미약
화학적 열화	리그닌 선택부후 혹은 구성성분의 동시부후	셀룰로오즈의 선택부후	저분자 물질 선택 흡수

Figure 1. Development of fungal hyphae on wood cell wall.

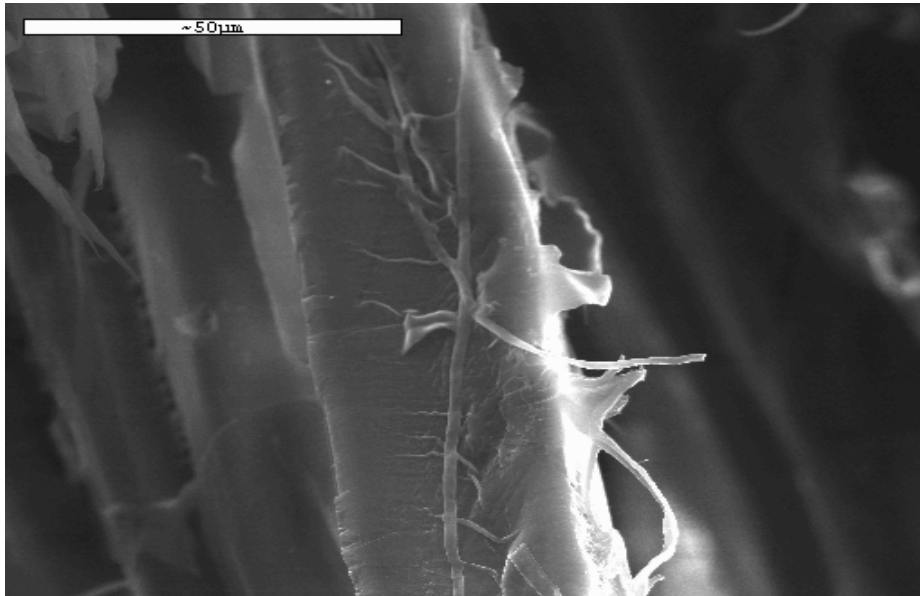


Figure 2. The intact pit membrane between fungal hypha and wood fibres. Traces of fungal hyphae (arrow).

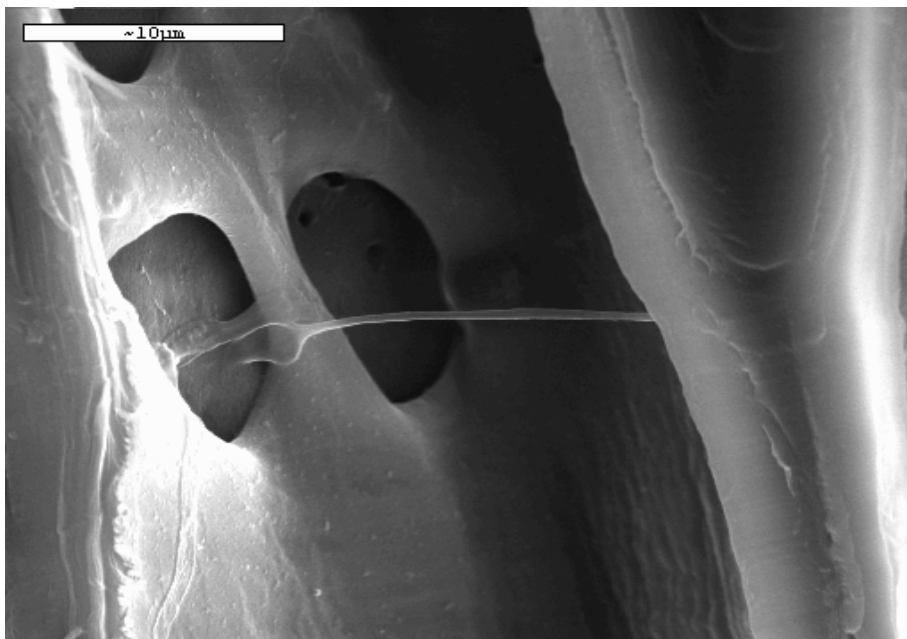


Figure 3. Fungal hypha penetration through the cell wall and bordered pit degradation (arrow).

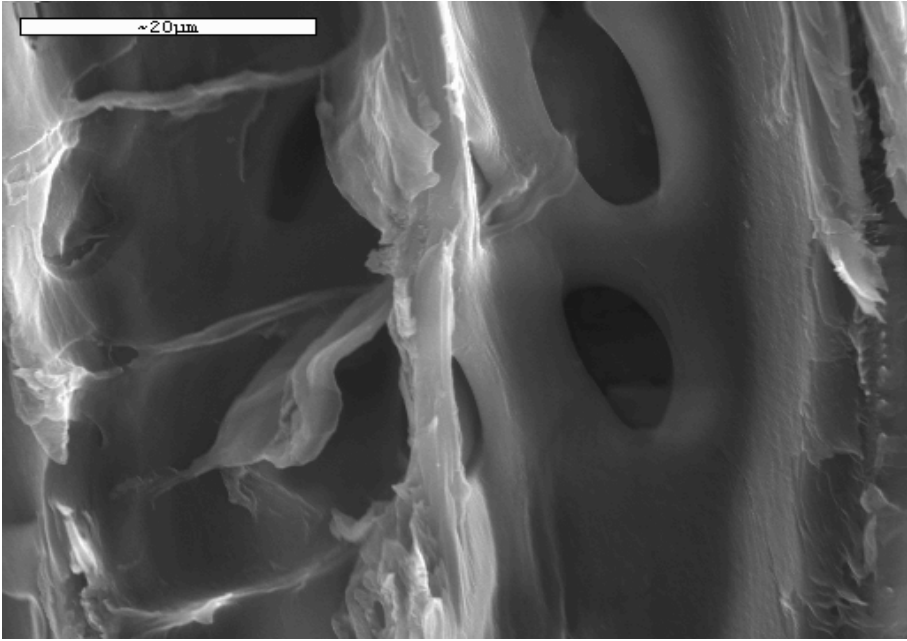
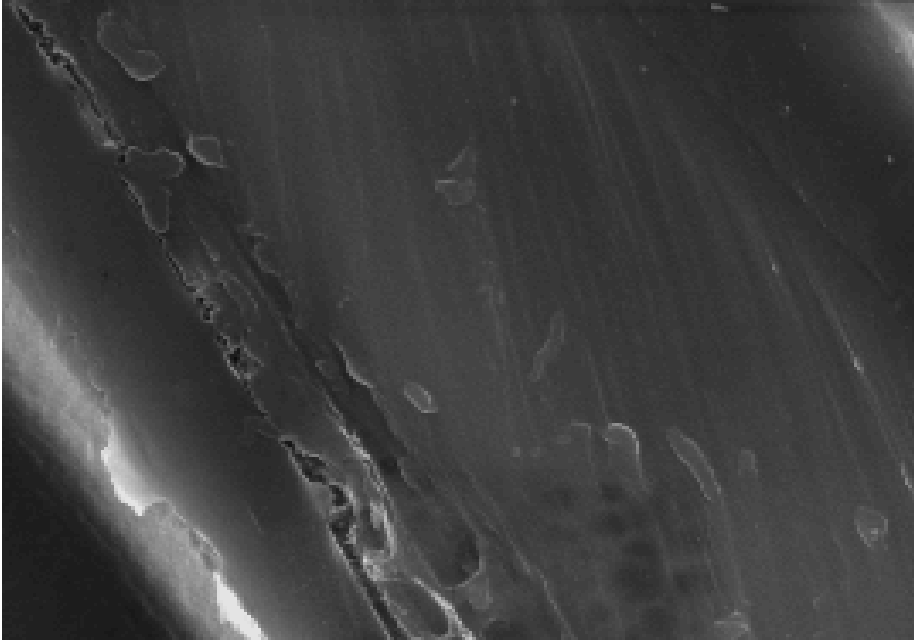


Figure 4. Disruption of wood cell wall by fungal hyphae (~Bar in 20 μm).



### 3. 결 론

1. 목재변색균은 목재의 표면에 포자 혹은 균사형태로 집락을 형성하며 표면의 최외각층에서 세포내로 균사가 성장한다.
2. 세포내에 침투한 균사는 이차벽의 S2층과 같은 셀룰로오스층은 거의 분해하지 않으며 주로 이웃세포로의 이동을 위하여 세포벽을 분해하거나 파괴한다.
3. 균사는 목재세포의 내강에 집락을 형성하며 세포내강의 표면이나 S3층의 저분자 물질을 우선적으로 분해 흡수하여 성장한다.
4. 균사의 목재내부로 이동은 벽공막의 마르코의 파괴 혹은 벽공막의 분해에 의하여 이곳을 통하여 이웃 세포로 이동한다.
5. 세포벽을 통과하여 이웃세포로 이동하게 되는데 기계적인 힘에 의하여 세포벽을 뚫고 세포에서 이웃세포로 이동한다.
6. 세포벽의 파괴는 균사의 세포외 효소와 같은 세포벽 분해물질에 의하여 생화학적 반응에 의하여 주로 발생한다.
7. 따라서 목재변색균은 셀룰로오스와 같은 고분자 물질의 분해는 미약하여 목재의 물리적인 강도는 크게 영향을 주지 않고 있다.

## 제 5 절 친환경적인 천연 물질 및 합성물질에 의한 목재 변색균의 성장 억제조절

Study of sapstaining fungal route of penetration into wood and growth inhibition of sapstaining fungi using natural and synthetic chemicals, biological and polymer products.

### 제 1 항 서 설

목초액(木酢液)이란 일본에서 만든 용어로 '나무로 만든 초(酢)란 뜻'이다. 목초액은 초산을 주성분으로 하는 pH3 정도의 산성액체로 목재 원목의 성분을 열로 분해하여 얻어진다고 알려져 있다. 즉, 나무로 숯을 만드는 과정에서 나오는 연기를 액화하여 얻는 것으로 나무가 탄화되면서 나무의 모든 에너지가 기체화되어 응축된 에너지로 볼 수 있다.

목재를 연기 중에서 가열하면 타서 재가 되는데, 예를 들면 숯가마 속과 같이 공기가 적은 곳에서 가열하면 '탄화' 현상이 일어나 목재는 숯으로 된다. 그 과정에서 연기가 피어오르는데 이 연기를 잘 관찰하면 시간이 지남에 따라 색이나 냄새가 미묘하게 변함을 알 수 있다.

목초액의 원료가 되는 원목의 주성분은 탄수화물인 셀룰로오스성분(헤미셀룰로오스와 셀룰로오스로 전체의 70~75%)과 탄화수소인 리그닌(전체의 20~25%)인데 이것이 전체의 95%를 차지하고 있다. 숯가마에 목재를 넣고 가마 속의 온도를 상승시키면 이들 성분의 열분해가 이루어진다. 대략 200℃ 에서 셀룰로오스 성분이, 300-400℃에서 리그닌이 차례로 탄화된다.

목재를 탄화시키면 맨 처음에는 수증기가 많은 연기가 피어오르고, 온도가 상승함에 따라 헤미셀룰로오스 성분이 탄화되는데 이때 자극성있는 연기가 생성된다. 이를 물연기에서 황금연기로의 변화가 있음을 나타낸다. 이후 온도를 올려주어 리그닌을 분해 할 수 있는 정도가 되면 완전한 분해가 뒤따르고 연기가 발생하게 되는데 이때 발새되는 연기를 자연적으로 냉각시켜 액상으로 된 것을 회수하는 것이다. 그럼으로써 연기 종류에 따라 그 성분과 성상이 커다란 차이가 있을 수 있으며, 최초로 나오는 '물연기'는 축축 하고 비중이 가볍지만 '목초액으로는 사용할 수 없는' 타르, 메탄올, 페놀 성분이 많으며 또한 발암성 물질인 벤조피렌 등의 유해물질이 검출된다.

목초액의 분리는 조목초액의 정제 - 조목초액의 숙성 - 목초액의 분리 - 목초액의 정제 과정으로 분류될 수 있다. 숯 연기에서 갓 채취한 목초액에서 유해물질을 제거하여 정제된 목초액을 만드는 방법에는 몇 가지가 있다. 그러나 가장 간단한 방법은 중량의 차이를 이용한 비중분리법이다. 이때 발생하는 조목초액을 장기간 용기에 넣어두면 상.중.하의 세 층으로 분리되는데, 중층의 물에 녹는 액이 목초액이다. 그리고 상층과 하층의 기름에 녹는 액이 각각 '경유질' 과 '타르' 이다. 목초액은 채취 후 수개월에서 1년 정도 숙성 및 정제를 한 후 타르 성분을 충분히 분리시켜 사용하며 이는 타르분에 크레졸과 같은 유해성분이 들어 있기 때문으로 알려져 있다.

이러한 목초액을 이용하여 천연방미제로 사용하기 위하여 이들의 성분을 분석하고 실험실내에서 혹은 실험실 밖의 자연환경에서 이들의 효력을 검증하였다. 또한 목초액과 죽초액을 사용하여 이들의 방미효력을 검증하였으며 방미효력의 검증을 위하여 대표적인 목재변색균인 *Ophiostoma*속의 균을 선정하였다.

## 제 2 항 친환경적인 천연 물질 및 합성물질에 의한 목재변색균의 생장 억제조건

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 공시균주

본 실험에 사용된 공시균주는 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma narcissi*(349579)와 *Ophiostoma ips*(363176)을 선정하였으며 모든 균주들은 국제 공시균으로 영국 예전에 국제 진균 연구소(International Mycological Institute, IMI)로 불려졌던 CABI에서 분양받았다. 모든 균주들은 2% MEA 영양배지에서 4-7일 동안 사전 접종되어 배양되었다.

#### 나. 목초액 및 죽초액

본 실험에 사용된 목초액 및 죽초액은 국내의 각기 다른 지역에서 구입하였으며 구입에 관한 내역 및 생리학적 특성을 표1에 기술한 내용과 같다. 구입한 목초액 및 죽초액의 자세한 내역은 본 실험에 의하여 수치화로 기술되었다.

#### 다. GC-MS 분석

GC-MS 분석을 수행하기 위하여 잠재적으로 높은 향균제 특성을 가진 CE-II 시료와 ME-II 시료를 선정하였다. GC-MS 분석을 위한 시료의 준비는 아래의 과정에 따라 수행하였다. 500ml의 시료를 1ml의 chloroform으로 흔들어주며 섞어주고

13,000rpm으로 10분동안 원심 분리하였다. chloroform을 분리한 후 1ul의 시료를 가스 크로마토그래프에 주입하였다(GC HP 6980 series, Hewlett Packard, USA). 성분의 분리는 DB-5 column (J & W scientific company, 30 cm length, 0.25 mm ID, 0.25 um film thickness)를 사용하여 수행하였다. 건조기의 온도는 90℃에서 300℃까지 10℃/10분의 비율로 올려주었으며 최종 온도인 300℃에서는 5분 동안 유지시켰다. 이 GC-MS는 70eV에서 electron ionization (EI) 안에서 작동하였다. Interface temperature는 230℃에 맞추었다. 성분의 피크는 가능한 표준물질을 비교함으로써 분석하였다.

#### 라. 실험실 내에서 죽초액 및 목초액의 방미효력 검증

본 실험은 실험실내 조건에서 목재의 시편을 이용하여 목초액 및 죽초액의 방미 효력을 검증하고자 수행하였다. 전북대학교 및 전라북도 남원군 산림조합 목재 집하장에서 오염되지 않은 *Pinus densiflora* 목재 블럭을 채취하였다. 이 목재 블럭은 손대패를 이용하여 매우 얇게 슬라이스 시편으로 제작하였으며 제작된 즉시 멸균된 상자에 집어넣어 신속히 실험실로 운반하였다. 슬라이스시편은 멸균된 면도칼을 이용하여 매우 작은 조각(약 10 mm x 10 mm)으로 하여 121℃에서 20분 동안 고압멸균하였다. 멸균된 목재 슬라이스시편은 각기 다른 비율(0.25, 0.5, 1.0%)의 목초액 및 죽초액으로 5분 동안 처리한 후 air flow chamber의 선반에서 기건시켰다. 대조구는 멸균된 증류수로 사용하였다.

#### 마. 공시균주의 접종 및 실험방법

본 실험에 사용된 슬라이스시편은 2% MEA배지에 *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma tetropii*, *Ophiostoma narcissi*와 *Ophiostoma ips*를 접종한 후에 패트리 디쉬 MEA배지위에 살며시 올려놓았다. 대조구 및 슬라이스시편은 각각의 균에 4개의 방향으로 나누어 올려놓았으며 3회에 걸쳐 반복하였다.

## 2. 결과 및 고찰

죽초액과 목초액은 천연 향균자원이며 대나무와 활엽수의 목탄의 부산물로 얻어지는 산성물질이다. 이러한 생산물은 phenol, poly phenol, acetic acids를 포함한 200가지의 성분을 가지고 있다. 이 추출물은 2% MEA 영양배지에서 (0.10~1.0%)의 최소 농도에서 목재변색균에 대하여 매우 높은 방미활성을 보여주고 있다. 3가지 죽초액(CE-I, CE-II, CE-III)와 2가지 목초액(ME-I, ME-II) 추출물은 4종의 변재변색균을 공시균주로 사용하여 변재변색균의 방미효과를 검증하고자 하였다.



#### 가. 죽초액의 방미 효력 검증

목재변색균에 대한 CE-I, CE-II, CE-III의 방미 효력을 평가하였다. 그림 9-12는 2% MEA 배지에서 방미 효력을 보여주고 있다. 죽초액의 3개 시료 중에서 CE-II, CE-III는 매우 효과가 우수하였으며 1.0%의 농도의 죽초액에서는 완벽한 목재변색균의 성장 억제능력을 보여주었다. 반면에 CE-I의 경우에는 1.0% 농도의 죽초액에서도 최소의 항균능력을 보여주었다. 그림 11에서 보는 바와 같이 CE-II와 CE-III의 0.5%의 농도에서는 *O. flexuosum*의 성장을 완벽하게 억제하였으며 그림 9와 12에서 보는 바와 같이 CE-II와 CE-III는 *O. tetropii*와 *O. ips*의 성장을 0.5%의 농도에서 완벽하게 성장을 억제하였다. 대체적으로 CE-I은 본 실험에 사용된 3개의 각기 다른 농도에서 목재변색균에 대하여 낮은 성장억제력을 보여주고 있다.

*Ophiostoma narcissi*는 그림 10에서 보는 바와 같이 3개의 각기 다른 농도에서 매우 높은 항방미제 효력을 보여주고 있으며 대조구로 사용된 농도인 0.001%, 0.01%과 0.1%의 농도에서 거의 동일한 결과를 보여주고 있다. 반면에 *O. tetropii*와 *O. ips*는 0.001%와 같이 최소의 실험 농도에서도 성장 억제의 효력이 나타났다. 따라서, *O. tetropii*와 *O. ips*는 죽초액에 대한 매우 민감한 방미 효력을 보여주고 있다.

#### 나. 목초액의 방미 효력 검증

대체적으로 죽초액에 비하여 목초액은 목재변색균의 방미 효력이 그다지 양호하지 않았다. 목초액의 모든 시료는 1.0%의 높은 농도에서도 효과적인 균사의 성장 억제 효력을 보여주지 않았다. *Ophiostoma flexuosum*은 목초액의 0.001%, 0.01%, 0.1%의 목초액농도에서 완벽한 균사의 성장을 보여줌으로써 목초액에 대하여 상대적으로 높은 저항성을 보여주었다(그림 11). 결론적으로 목초액의 효력은 죽초액에 비하여 상대적으로 약하였으며(그림 9-14), 이와 같은 결과는 목초액은 목재관련 생산 산업체에서 목재변색균을 제어하기위한 천연방미제로서는 그 효용성이 낮다고 여겨진다. 그러나 죽초액과 목초액을 혼합하여 사용한다거나 죽초액에 다른 항균물질을 첨가함으로써 방미효력에 대한 시너지효과를 기대할 수도 있다.

#### 다. CE-II와 ME-II의 GC-MS 정성 분석

CE-II의 GC-MS 정성 분석에 있어서 6개의 분광피크가 검출되었다(그림 13). 이들 피크는 RT 6.64, 8.36, 9.68, 10.69, 11.97, 12.97에서 검출되었다. 이들 6개의 피크중에서 5개의 피크는 Mass spectroscopy에 의하여 식별할 수 있었으며 이들 구성성분들은 아마도 CE-II의 항균 활성에 관여하는 성분으로 여겨진다. 이 성분들은 2-methoxy phenol (6.64), 2-methoxy-4-methyl phenol (8.36), 2,6-dimethoxy phenol (10.69), dehydroacetic acid (11.97)과 2,3,5-trimethoxytoluene (12.97)로 여겨

진다.

ME-II의 chloroform fraction의 GC-MS 정성 분석은 4개의 크게 구별되는 피크에 의하여 매우 잘 구별된다. 즉, 1, 2, 3과 4의 성분은 RT 10.70, 11.97, 12.98, 13.98 min에서 검출될 수 있다. 주된 피크는 RT 10.70에서 얻을 수 있었다. 이들 4개의 피크의 성분은 ME-II의 다른 구성 성분 중에서 매우 높은 항균 활성능력을 보여주고 있다. 이 성분들은 MS 분석에 의하여 2,6-dimethoxy phenol, dehydroacetic acid, 2,3,5-trimethoxy toluene, hydroxy-3--oxo-2-propionyl-gamma-1-acetone-4-heptnoic acid이 확인 할 수 있다. 표 2는 CE-II, ME-II의 정성분석을 보여주었다. 죽초액과 목초액의 방미 효력 활성은 실험실 조건하에서 검증할 수 있었다(그림 15, 16). 대조구로 사용된 목재 슬라이스시편은 모든 공시균주에 의하여 7일 이내에 완전히 목재의 표면을 덮어버렸다. *Ophiostoma polonicum*과 *O. flexuosum* 균사는 CE-II의 1.0% 농도에서 균사의 생장이 억제되었다(그림 15, B and D). 반면에 *O. tetropii*의 균사의 생장은 CE-II 1.0% 농도로 처리된 목재 슬라이스시편에서 균사의 생장이 관찰되었다.

결과적으로 본 실험은 균사생장 억제실험의 피트리디쉬 배지상의 실험 결과와 동일한 결과를 보여주었다. 이는 사전 실험에서 보여준 것과 같이 목초액은 죽초액에 비하여 방미효력이 우수하지 못하였다. 모든 공시균주들은 (*O. flexuosum*을 제외한) 1.0% 목초액의 농도에서도 균사가 생장 할 수 있는 활성을 가졌다.

Figure 1. Mycelial growth of *Ophiostoma ips* on 2 % MEA with the supplement of different concentrations of Chikusaku-eki and Mokusaku-eki on day 7.

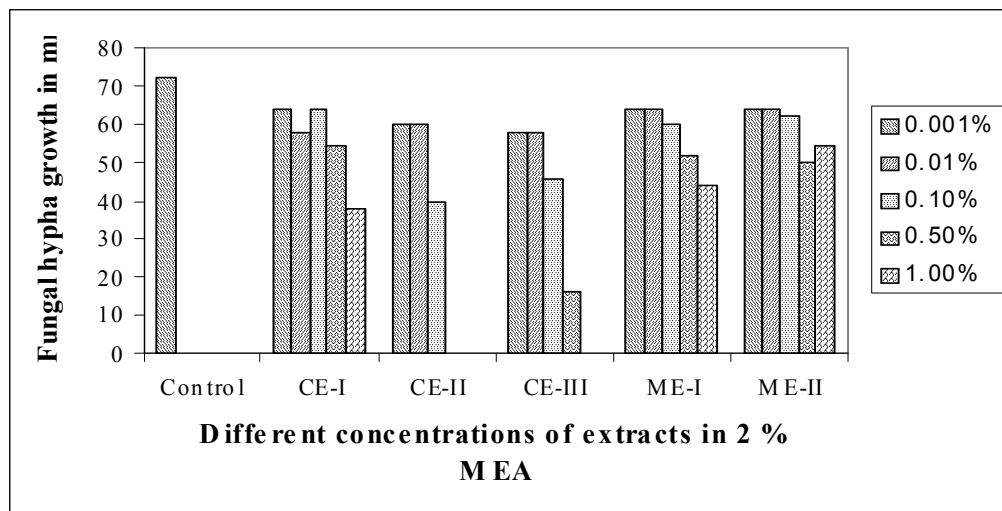


Figure 2. Mycelial growth of *Ophiostoma narcission* 2 % MEA with the supplement of different concentrations of Chikusaku-eki and Mokusaku-eki on day 7.

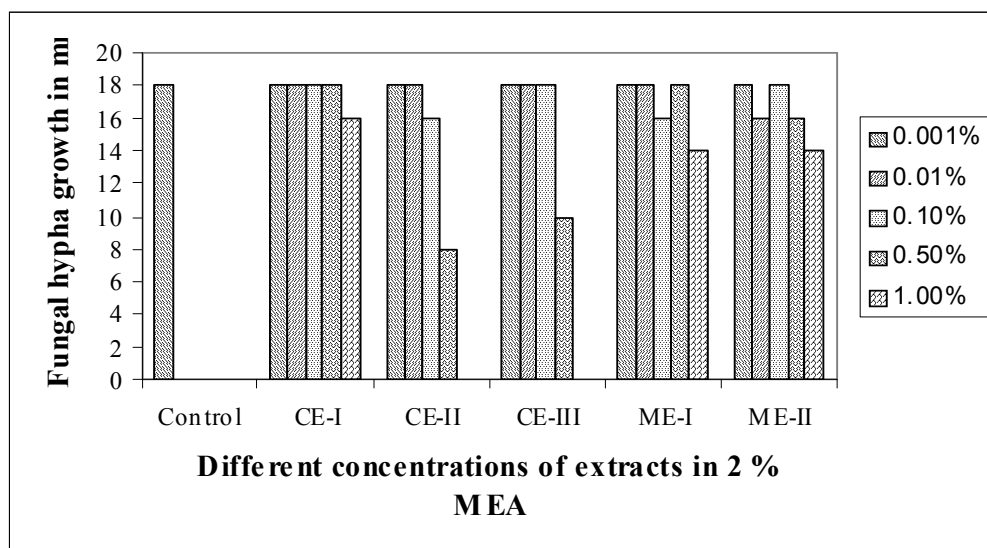


Figure 3. Mycelial growth of *Ophiostoma flexuosum* on 2 % MEA with the supplement of different concentrations of Chikusaku-eki and Mokusaku-eki on day 7.

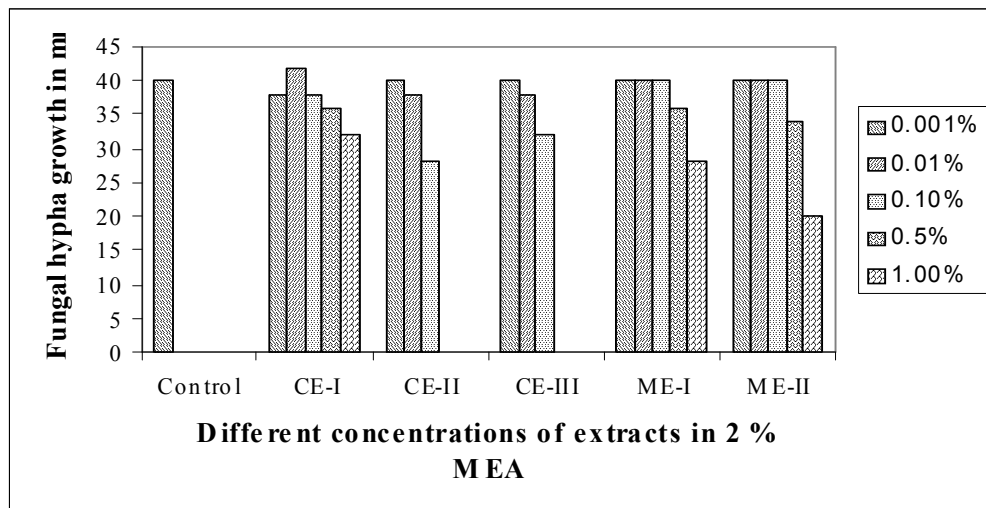


Figure 4. Mycelial growth of *Ophiostoma tetropion* 2 % MEA with the supplement of different concentrations of Chikusaku-eki and Mokusaku-eki on day 7.

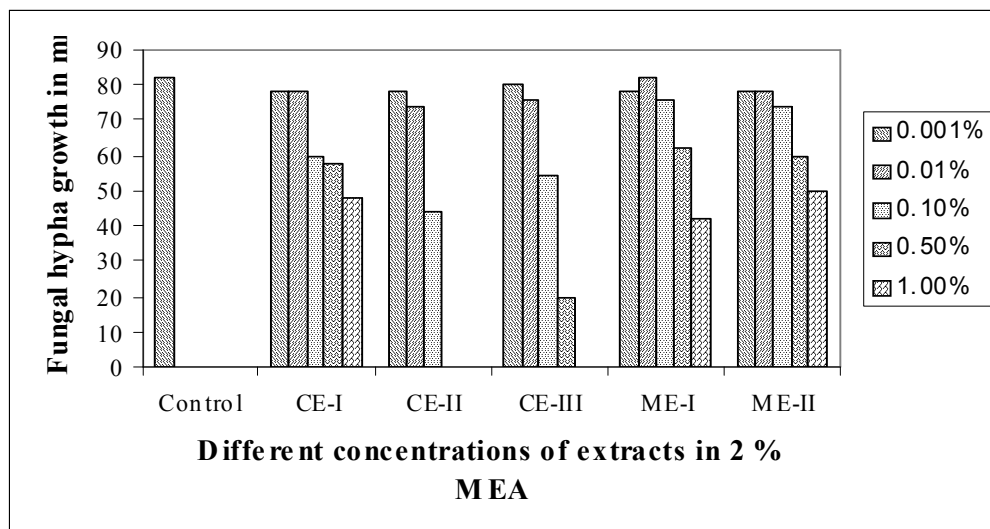


Figure 5. GC chromatogram of Chikusaku-eki 2 (CE-II) sample; Column DB-5 with 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film thickness used for analysis.

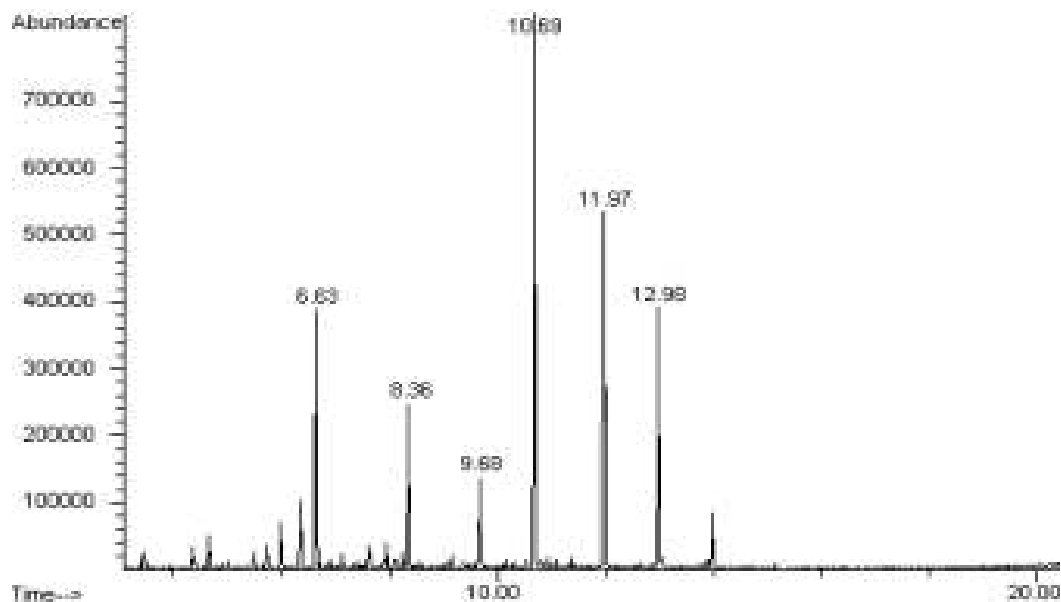


Figure 6. GC chromatogram of Mokusaku-eki 2 (ME-II) sample; Column DB-5 with 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film thickness used for analysis.

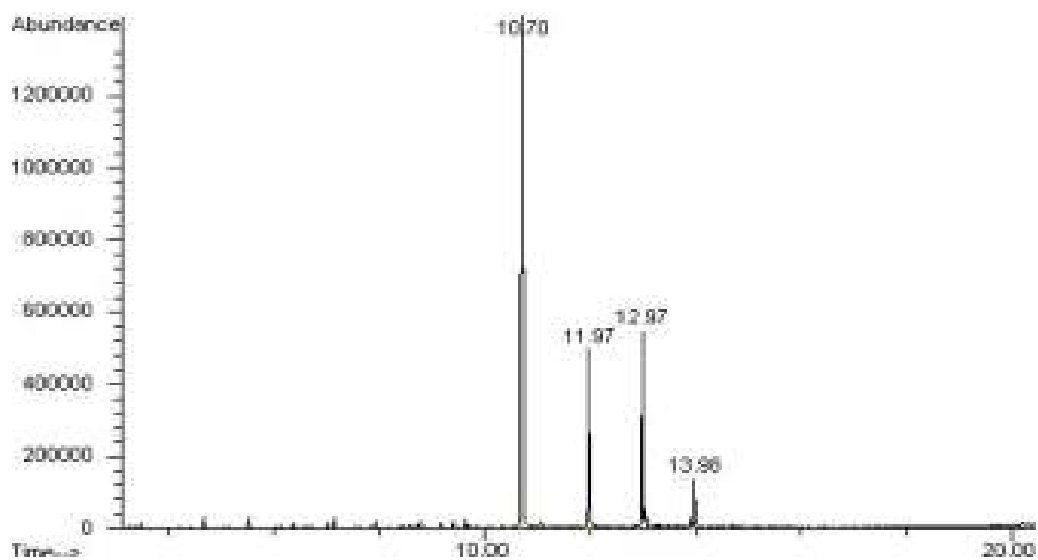


Figure 7. Inhibition of (A) *Ophiostoma tetropii*, (B) *Ophiostomapolonicum*, (C) *Ophiostoma ips*, (D) *Ophiostoma flexuosum* wood slices treated by different concentrations of Chikusaku-eki (CE-II).

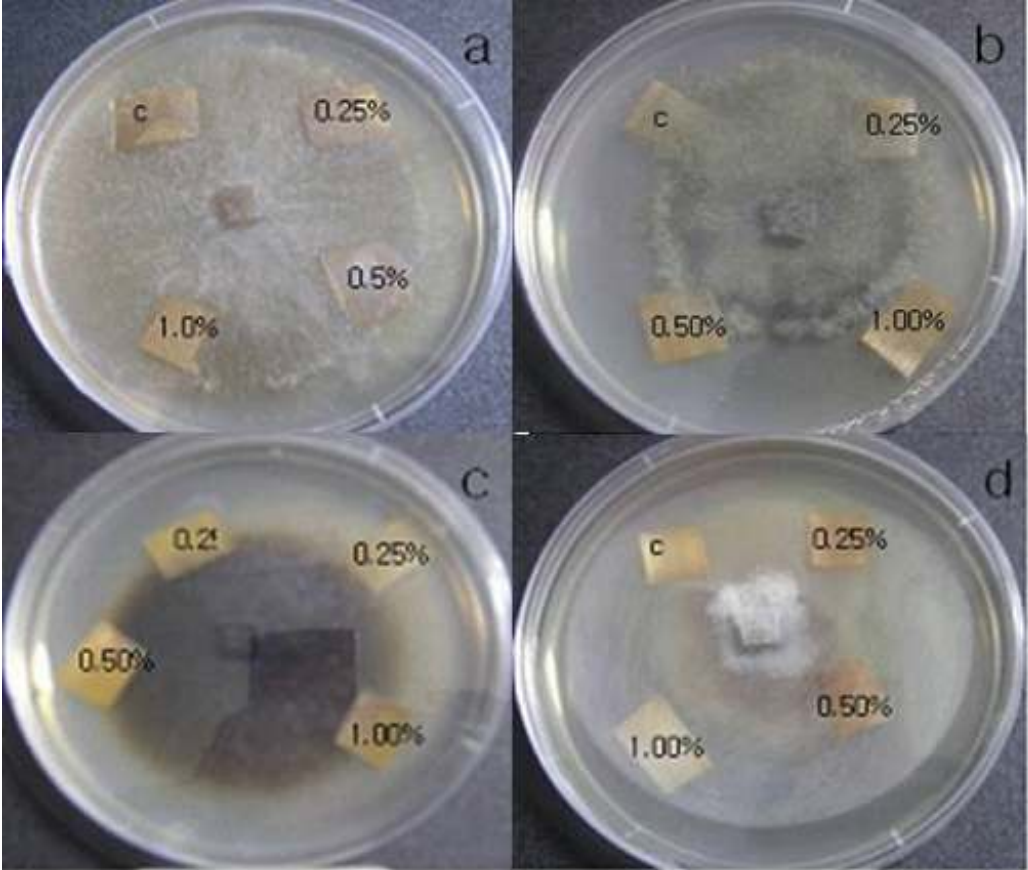


Figure 8. Inhibition of (A) *Ophiostoma tetropii*, (B) *Ophiostomapolonicum*, (C) *Ophiostoma flexuosum*, (D) *Ophiostoma ips* wood slices treated by different concentrations of Mokusaku-eki (ME-II).

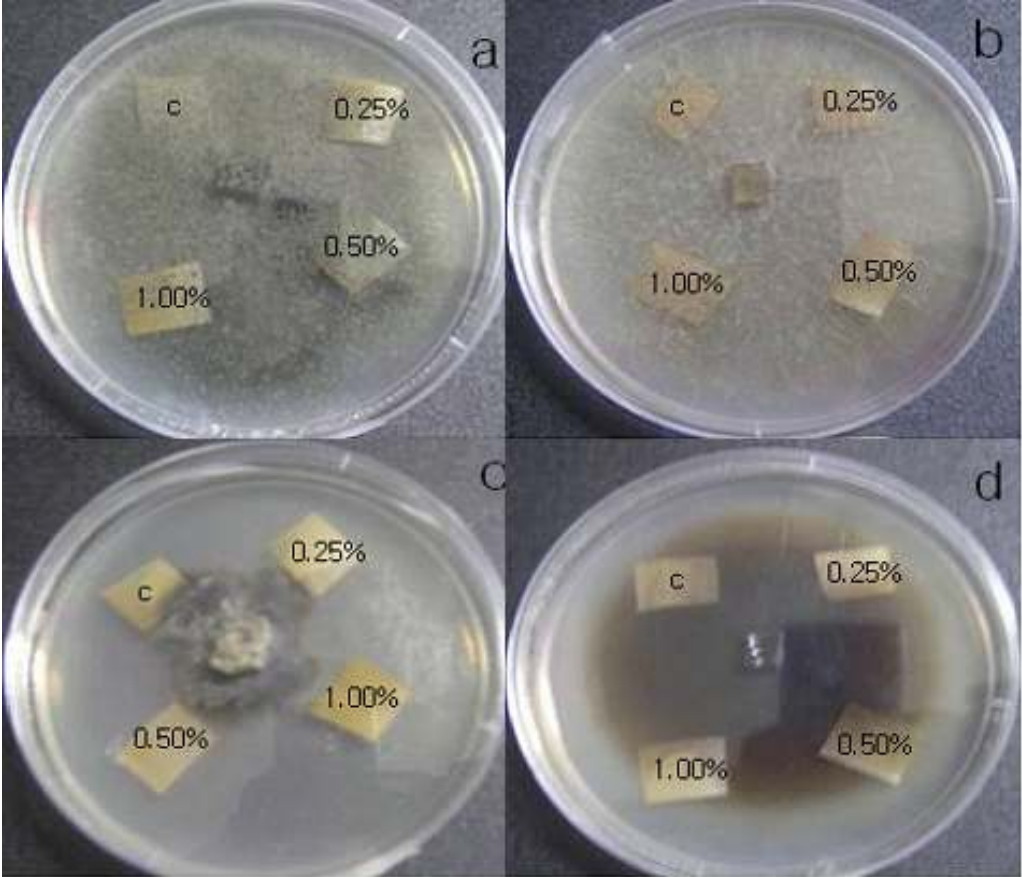


Table 1. Source and physiological conditions of Chikusaku-eki and Mokusaku-eki.

Samples	Wood Source	Company	pH	Color
CE-I	<i>Phyllostachys nigro</i>	Sacheon city wood industry	3.0	Dark brown
CE-II	<i>Phyllostachys pubescens</i>	Bamboonara wood company, Damyang	3.25	Dark brown
CE-III	<i>Phyllostachys nigro</i>	Bamboonara wood company, Damyang	3.25	Dark brown
ME-I	<i>Quercus serrata</i>	Sacheon city wood industr	3.5	Light brown
ME-II	<i>Quercus serrata</i>	Jin-Jeop town wood industry	3.5	Dark brown

Table 2. Major compounds in Chikusaku-eki (CE-II) and Mokusaku-eki (ME-II).

RT (min)	Compounds	Area %	
		Mokusaku-eki -2 (ME-II)	Chikusaku-eki-2 (CE-II)
6.63	2-Methoxy phenol	–	16.55
8.36	2-Methoxy-4-methyl phenol	–	11.37
10.69	2,6-Dimethoxy phenol	58.06	34.72
11.97	Dehydroacetic acid	18.60	21.89
12.97	2,3,5-Trimethoxy toluene	18.19	15.47
13.98	5-Hydroxy-3-oxo-2-propionyl-1gamma-1-acetone-4-heptnoic acid	5.15	



Table 3. Chemical compositions of Chikusaku-eki-2 (CE-II) and Mokusaku-eki-2 (ME-II).

Component	Chikusaku-eki-2 (%)	Mokusaku-eki-2 (%)
Organic acids	23.75	23.75
Phenolics	62.64	58.06
Toluene	15.47	18.19

### 3. 결 론

1. 본 실험에 사용된 균주는 *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma tetropii*, *Ophiostoma narcissi*와 *Ophiostoma ips*이었다.
2. 목초액 및 죽초액으로 사용된 시료의 chloroform fraction은 GC-MS에 의하여 분석되었으며 두 종류 모두 2,6-dimethoxy phenol, dehydroacetic acid, 2,3,5-trimethoxytoluene 성분을 함유하고 있었다.
3. 이들 죽초액과 목초액은 목재 생산 산업체에서 친환경적인 방미 혹은 항산화 작용을 가진 천연방부제로 사용될 수 있다.
4. 목재 슬라이스시편 실험은 실험실내에서 효과적인 방미실험을 검증 할 수 있었다.

## 제 6 절 소나무 및 참나무 추출액을 함유한 중성 목재추출액의 방미 효력검증

### Antifungal activity of neutralized wood vinegar with water extracts of *Pinus densiflora* and *Quercus serrata* saw dusts.

#### 제 1 항 서 설

본 실험은 목재변색균의 성장을 억제할 방미제로서의 효력을 검증하기 위하여 페놀 성분 및 여타 냉수 및 열수추출물이 함유되어 있는 목초산(wood vinegar)의 실제적 역할을 구명하고자 수행하였다. 목초산에서 페놀성분의 방미효과 이외의 명확한 방미메카니즘을 구명하고자 본 실험에서는 목초산을 NaOH를 첨가하여 중성(pH 7)으로 하였다. 배지를 제조할 때 사용되는 증류수를 대체하여 *Pinus densiflora*와 *Quercus serrata*의 톱밥을 이용한 중성목초산을 사용하였는데 이는 중성 목초산의 균사 억제 능력의 특성을 증가시키기 위하고자 하였다. *Ophiostoma polonicum*, *O. ips*, *O. flexuosum*, *O. narcissi*, *O. tetropii*를 공시균주로 사용하여 본 목재변색균의 방미실험을 수행하였다.

본 실험에 언급하는 목초산(wood vinegar)은 목탄의 증류과정에 발생하게 되는 목초액과는 매우다른 성질의 물질로서 목초산은 냉수 및 열수에 의하여 목재내부에 존재하는 저분자물질 및 저분자 페놀성분 등을 함유하고 있는 반면 목초액은 300℃ 이상의 온도에서 발생하게 되며 이를 조목초액이라 하며 이를 다시금 증류하게 되면 용해타르가 제거되어지고 황색의 증류 목초액이 된다. 이때 소량의 황산을 가해 증류하면 용해타르 및 페놀류와 알데하이드류와의 축합에 의해 생성된 수지와 고온에 의해 중합된 물질이 완전히 제거 되게 된다. 이러한 제반의 공정에 의하여 얻어지는 산물이 목초액이다.

이러한 목초산(wood vinegar)을 이용하여 천연방미제로 사용하기 위하여 이들의 성분을 분석하고 실험실내에서 혹은 실험실 밖의 자연환경에서 이들의 효력을 검증하였다. 또한 목초의 방미효력을 검증하기위하여 2종의 각기 다른 소나무(침엽수)와 참나무(활엽수)를 선정하였다. 또한 방미효력의 검증을 위하여 대표적인 목재변색균인 *Ophiostoma*속의 균을 선정하였다.

## 제 2 항 소나무 및 참나무 온수추출액을 함유한 중성 목초액의 방미 효력검증

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 공시균주

본 실험에 사용된 공시균주는 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma narcissi*(349579), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)을 선정하였으며 모든 균주들은 국제 공시균으로 영국 예전에 국제 진균 연구소(International Mycological Institute, IMI)로 불려졌던 CABI에서 분양받았다. 모든 균주들은 2% MEA 영양배지에서 4-7일 동안 사전 접종되어 25℃에서 배양되었다.

#### 나. 목초액의 시료 제조

소나무(*Pinus densiflora*)와 참나무(*Quercus serrata*)는 전라북도 남원시 산림조합 목재집하장에서 채집하였다. 이들 2종의 목재 톱밥은 1년 이내의 저장된 건전목재에서 톱밥을 켄 즉시 채집하여 사전에 멸균된 플라스틱봉지에 넣어 신속하게 실험실로 운반하였다. 운반된 톱밥 시료는 즉시 냉장 보관하고 미생물에 의한 오염을 방지하기 신속하게 실험을 수행하였다. 채집된 톱밥의 5 mg은 멸균된 증류수에 일정기간 동안 침전시키고 약 90℃에서 15분 동안 각기 별도로 증탕하였다. 온수추출액은 Whatman No. 1 필터페이퍼를 사용하여 톱밥을 걸러내고 목초산을 제조하였다. 상업적으로 판매되는 목초액은 경기도 남양주시 진접읍에 위치한 목재생산업체에서 구하였다. 산도가 3.5인 암갈색의 목초액은 NaOH를 이용하여 중화시켰다.

#### 다. 영양배지 제조 및 방미효력 검증

소나무(*Pinus densiflora*) 온수추출액 및 참나무(*Quercus serrata*) 온수추출액과 목초액은 3종류의 2% MEA 배지를 사용하였다. 첫 번째 영양배지는 일반적인 멸균된 증류수를, 두 번째 영양배지는 멸균된 증류수를 대신하여 침엽수 *Pinus densiflora* 온수추출액을, 세 번째 영양배지는 증류수를 대신하여 활엽수 *Quercus serrata* 온수추출액을 함유하였다. 모든 영양배지는 121℃에서 20분간 멸균하였다. 멸균한 후 영양배지는 50℃에서 서서히 냉각시킨 후 각기 다른 농도(0.333, 0.667, 1.333, 2.5, 3.0%)의 중화된 목초액을 모든 영양배지에 용해하였다. 모든 영양배지에 목초액을 용해시킬때 필터페이퍼를 이용하여 불순물을 제거하였으며, 영양배지는 페트리디쉬에 20ml씩 분주하였다.

*Ophiostoma polonicum*, *O. flexuosum*, *O. tetropii*, *O. narcissi*, *O. ips*를 각기 다른 목초액 농도를 포함한 3 종류의 2% MEA배지에 각기 접종하였다. 대조구는 온수추

출액을 제거한 접종원이었다. 실험구는 20℃에서 배양하였으며 온수추출액 및 목초액의 방미 활성 범위를 측정하였다.

#### 라. GS-MS 분석

산성의 목초액 및 중성 목초액의 GC-MS 정성분석을 위한 시료의 준비는 아래의 과정에 따라 수행하였다. 500ml의 시료를 1ml의 chloroform으로 흔들어주며 섞어주고 13,000rpm으로 10분동안 원심 분리하였다. chloroform을 분리한 후 1ul의 시료를 가스크로마토그래프에 주입하였다(GC HP 6980 series, Hewlett Packard, USA). 성분의 분리는 DB-5 column (J & W scientific company, 30 cm length, 0.25 mm ID, 0.25 um film thickness)를 사용하여 수행하였다. 건조기의 온도는 90℃에서 300℃까지 10℃/10분의 비율로 올려주었으며 최종 온도인 300℃에서는 5분 동안 유지시켰다. 이 GC-MS는 70eV에서 electron ionization (EI) 안에서 작동하였다. Interface temperature는 230℃에 맞추었다. 성분의 피크는 가능한 표준물질을 비교함으로써 분석하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 중성 목초액의 방미효력

목재변색균의 균사 생육 억제비율을 측정하기 위하여 영양배지상 균사의 생장을 측정하였다. 아래의 그림은 다양한 농도의 중성 목초액을 함유하고 있는 2% MEA 배지상에서 균사의 생장을 보여주고 있다. *Ophiostoma polonicum*, *O. flezuosum*, *O. tetropii*, *O. narcissi*, *O. ips*의 생장은 각각 직경 44, 82, 80, 20,와 72mm를 보여주었다. 그러나 중성목초액의 농도가 0.33, 0.67, 1.33% 농도가 포함되어 있을 경우는 균사 생장 억제 활성이 매우 낮았으나 2.5%농도 이상이 포함되어 있을 경우에는 활성이 매우 높았고 3.0% 이상이 포함되어 있을 경우에는 무려 50%이상의 높은 균사 생장 억제 활성을 보여주고 있다. *Ophiostoma narcissi*는 목초액에 대하여 매우 높은 저항성을 보여주고 있으며 목초액의 농도가 0.33, 0.67, 1.33% 농도가 포함되어 있을 경우는 균사 생장 억제 활성이 매우 낮아 균사의 생장에 영향을 미치지 못하였다. *Ophiostoma polonicum*, *O. flezuosum*, *O. tetropii*, *O. ips*의 생장은 목초액의 농도가 0.67, 1.33% 농도가 포함되어 있을 경우에 매우 미약한 균사 생장 억제 활성을 보여주었다.

중성 목초액 및 *Pinus densiflora* 온수추출액을 포함한 영양배지에서 매우 현격한 목재변색균의 균사생장 억제 활성을 보여주었다. *Ophiostoma polonicum*은 소나무 온수추출액에 대하여 높은 반응을 보여주었다. 3.0%의 중성 목초액 및 소나무 온수

추출액을 포함한 영양배지에서는 균사의 생장이 14mm이내를 보여주었다. 반면에 3.0% 중성목초액과 소나무 온수추출액을 포함한 영양배지에서는 *O. flexuosum*에 대하여 매우 높은 균사생육 억제 활성을 보여주었으며 8mm이하의 균사 생장을 보여주었다. 중성목초액 및 소나무추출액을 함유한 영양배지에서는 함유된 이들의 농도에 관계없이 높은 상관관계를 보여주었으며 단지 소나무 온수추출액을 함유한 영양배지에서는 최소 농도인 0.33%의 중성 목초액에 대해서도 높은 상관관계를 보여주었다.

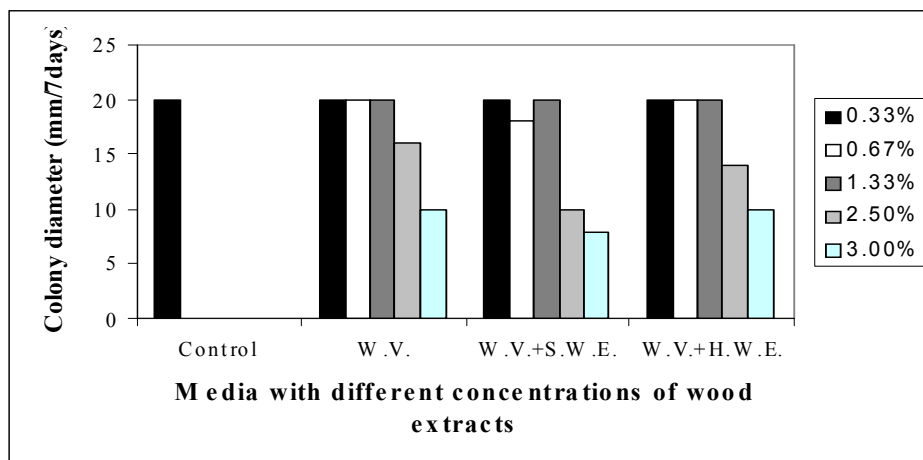
반면에 중성목초액과 *Quercus serrata* 온수추출액의 혼합액에 대한 방미효과는 거의 나타나지 않았다. *Ophiostoma naricissi*는 참나무 온수추출액 및 중성 목초액의 혼합액에 대하여 상대적으로 높은 저항성을 보였다. *Ophiostoma flexuosum*은 2.5%와 3.0%를 사용하였을 시 비교적 높은 연관성을 보여주었다.

#### 나. GC-MS 분석

산성목초액 및 중성목초액은 GC-MS 스펙트럼으로 분석하였다. 산성목초액에서 피크는 RT 4.27, 4.67, 6.00, 6.37, 6.64, 8.35, 9.67, 10.68, 11.96, 12.97, 13.97 minutes에서 검출되었다. 7개의 페놀성 성분이 메스스펙트럼으로 확인되었으며 주된 페놀성 성분은 RT 10.68에서 확인된 2,6-dimethoxy phenol이었다. 다른 페놀성 화합물은 Phenol(Isal), 2-methyl phenol(o-cresol), 4-methyl phenol (p-cresol), 2-methoxy phenol (Guaiacol), 2-methoxy-4 methyl phenol과 4-ethyl-2-methoxy phenol로 판명되었다. 표1은 산성목초액에서 판명된 화학성분의 일람표이다. 2-furancarboxalehyde와 2,3,5-trimethoxy toluene는 또한 RT 4.38과 12.97에서 각각 판명되었다. 산성목초액에서 총 페놀성 성분의 함량은 72.59%였으며 acetic acid의 총 함량은 14.14%로 나타났다.

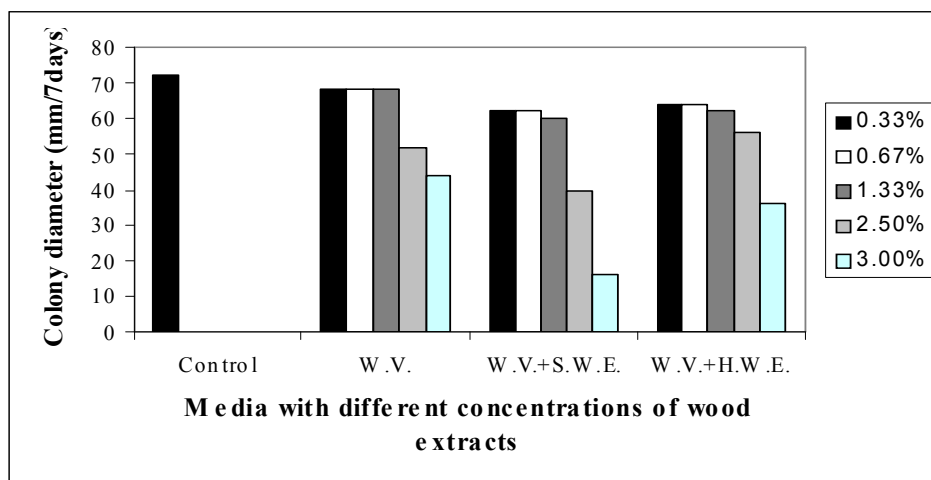
4-methyl pheono (6.37), 2-methoxyh phenol(6.64), 2,6-dimethoxy phenol (10.68)은 중성목초액에서 페놀성 성분으로 판명되었으며 1,4-dimethoxy benzene, 2-methoxy benzene ethanol과 2,3,5-trimethoxy toluene는 또한 RT 8.35, 9.67, 12.97에서 각각 판명되었다. 표4에 기술되어진 바와 같이 actic acid는 15.0%, 페놀성 성분은 58.0%가 중성목초액에서 보여준 함량이며 2,6-dimethoxy phenol (10.38)은 중성목초액에서 주된 주성분으로 판명되었다. 표5는 acidic acid와 중성목초액의 정량분석을 보여주는 일람표이다.

Figure 1. Effect of neutralized wood vinegar on mycelial growth of *O. narcissi* in MEA.



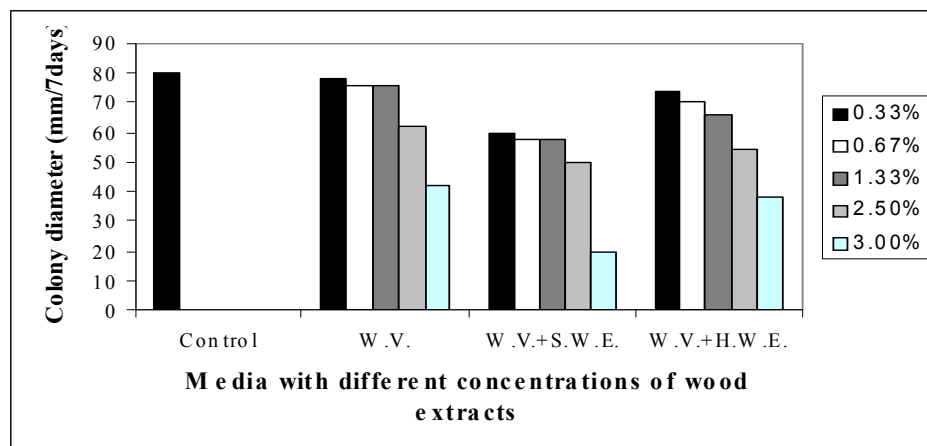
W. V. = Wood Vinegar; S. W. E. = Soft Wood Extract; H. W. E. = Hard Wood Extract

Figure 2. Effect of neutralized wood vinegar on mycelial growth of *O. ips* in MEA.



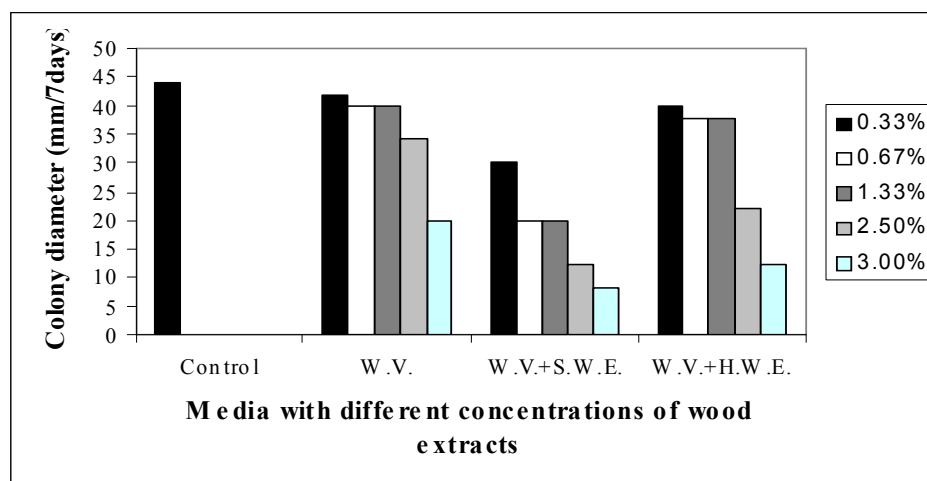
W. V. = Wood Vinegar; S. W. E. = Soft Wood Extract; H. W. E. = Hard Wood Extract

Figure 3. Effect of neutralized wood vinegar on mycelial growth of *O. tetropii* in MEA.



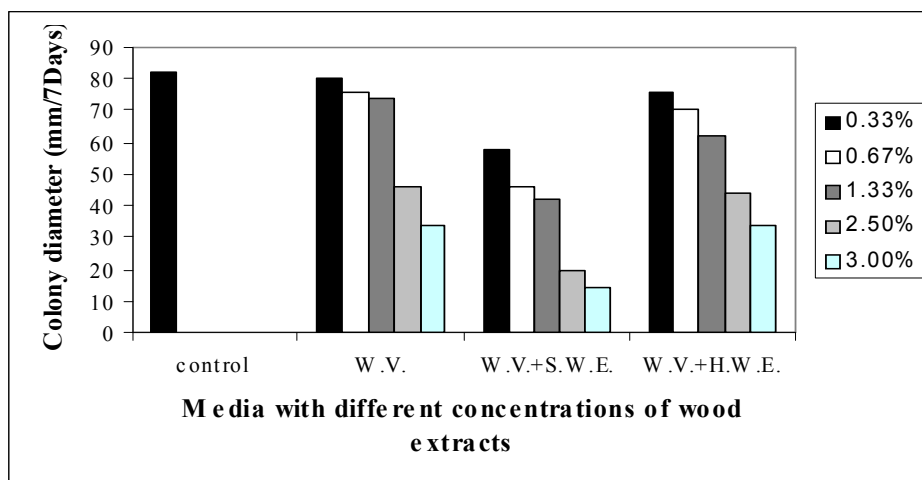
W. V. = Wood Vinegar; S. W. E. = Soft Wood Extract; H. W. E. = Hard Wood Extract

Figure 4. Effect of neutralized wood vinegar on mycelial growth of *O. flexuosum* in MEA.



W. V. = Wood Vinegar; S. W. E. = Soft Wood Extract; H. W. E. = Hard Wood Extract

Figure 5. Effect of neutralized wood vinegar on mycelial growth of *O. polonicum* in MEA.



W. V. = Wood Vinegar; S. W. E. = Soft Wood Extract; H. W. E. = Hard Wood Extract



Figure 6. GC chromatograph of acidic wood vinegar (Column DB-5, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film thickness).

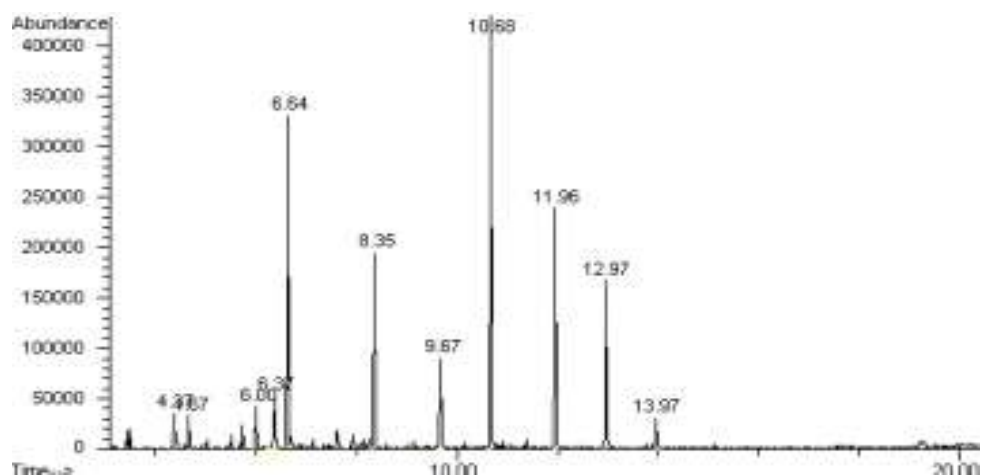


Figure 7. GC chromatograph of neutralized wood vinegar (Column DB-5, 0.25 mm ID, 0.25  $\mu$ m film thickness).

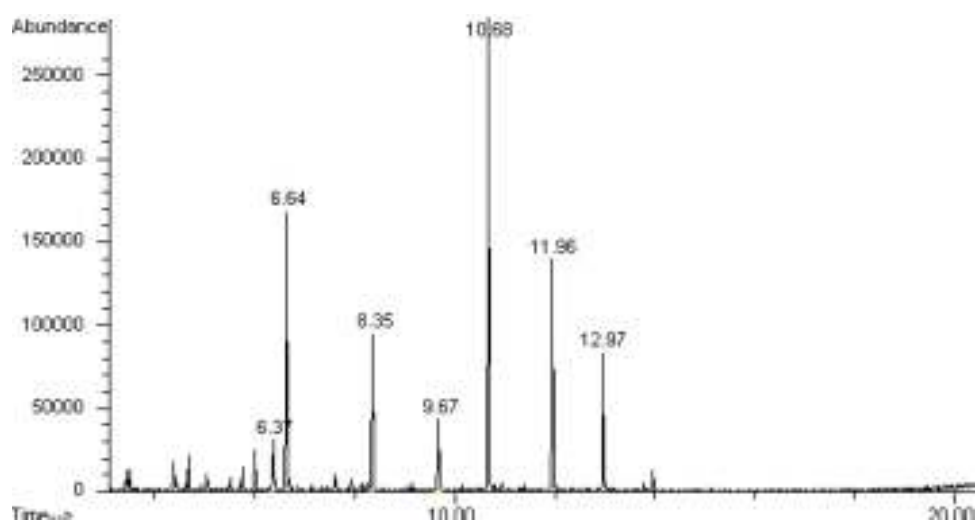


Table 1. Peak allocation and peak area percentage of chloroform fractions of acidic wood vinegar and neutralized wood vinegar.

RT (min)	Compounds	Area %	
		Acidic wood vinegar	Neutralized wood vinegar
4.38	4-Furancarboxaldehyde	1.64	–
4.67	Phenol (Izal)	1.88	–
6.00	2-Methyl phenol (o-cresol)	2.11	–
6.37	4-Methyl phenol (p-cresol)	4.59	5.46
6.64	2-Methoxy phenol (guaiacol)	19.53	20.40
8.35	2-Methoxy-4-methyl phenol	12.39	–
9.67	4-Ethyl-2-methoxy phenol	6.77	–
10.68	2,6-Dimethoxy phenol	25.32	32.06
12.97	2,3,5-Trimethoxy toluene	9.68	9.13
11.96	Dehydroacetic acid	14.14	15.02
13.97	Unknown	1.95	
8.35	1,4-Dimethoxy benzene		11.77
9.67	2-Methoxy benzene ethanol		6.16

Table 2. Percentages of compounds present in chloroform fraction of acidic wood vinegar and neutralized wood vinegar.

Compounds	Acidic wood vinegar	Neutralized wood vinegar
Phenols	100.00	57.92
Acetic acid	14.14	15.02
Others	13.27	27.06
Tota	100.00	100.00

#### 4. 결 론

1. 중성화된 목초액(wood vinegar)은 농도가 2.5%이상에서만 방미효력을 보여주었다.
2. GC-MS 정성분석은 chloroform extraction방법에 의하여 중성 목초액과 산성 목초액 모두 페놀성분과 여타 성분을 분석하였다.
3. 산성의 목초액에서 11개의 주된 성분이 검출되었으며, 중성 목초액에서는 7개의 주된 성분이 검출되었다.
4. 산성화된 목초액의 72.59%의 페놀성분을 함유하였으며 중성 목초액은 57.92% 페놀 성분을 함유하였다.
5. 주된 페놀성 성분은 RT 10.68에서 확인된 2,6-dimethoxy phenol이었다. 다른 페놀성 화합물은 Phenol(Isal), 2-methyl phenol(o-cresol), 4-methyl phenol(p-cresol), 2-methoxy phenol (Guaiacol), 2-methoxy-4 methyl phenol과 4-ethyl-2-methoxy phenol로 판명되었다.
6. 4-methyl pheono (6.37), 2-methoxyh phenol(6.64), 2,6-dimethoxy phenol (10.68)은 중성목초액에서 페놀성 성분으로 판명되었으며 1,4-dimethoxy benzene, 2-methoxy benzene ethanol과 2,3,5-trimethoxy toluene는 또한 RT 8.35, 9.67, 12.97에서 각각 판명되었다.

## 제 7 절 목재변색균에 대한 은의 방미효과 검증

### Antifungal activity of Silver particle for wood sapstaining fungi

#### 제 1 항 서 설

본 실험은 목재변색균의 생장을 억제할 방미제로서의 효력을 검증하기 위하여 실리카입자를 선정하였다. 실리카입자는 그동안 강한 항미생물 활성을 지닌 복합물질로 널리 사용되어져 왔다. 실리카는 다공성 성질과 모세공극을 가진 물질이다. 만약에 실리카입자가, 구리, 아연, 수은, 납, 카드미움, 트로미움 등의 항생물질과 혼합된다면 매우 높은 방부제 혹은 방미제 효능을 보여주게 될 것이다. 화학성분들은 실리카비드와 쉽게 연결되고 실리카 모세공극의 활성 표면에서 안정적인 결합을 이루게 된다. 이 항생물질 성분은 실리카 비드안에서 공극의 표면에 획일적이며 안정적으로 분산되어 정착을 하며 이러한 항생물질의 금속 이온은 공극 내에서 신속하게 분산되어 결합하게 되는데 이들은 세균이나 진균의 생장을 억제하는 인자와 쉽게 결합한다. 이들 혼합성분은 액체 용액으로 사용할 수 있으며 그럼으로써 세균이나 진균은 물론이거니와 조류의 성장에도 높은 억제능력을 보여주고 있다.

실리카비드 항생물질 성분의 알카리 성능은 제올라이트와 같은 상업적으로 구입가능한 생산품보다 매우 약하다. 그러함으로 환경오염 문제를 야기하지 않는다.

본 실험에서는 Sillica beads + silver thiosulfate, silver complex를 이용하여 목재를 변색시키는 진균에 대한 방미효과를 구명하였으며, 목재변색균에 대한 잠재적인 효과 또한 실험실 수준에서 구명하였다.

은 이온은 항생제 혹은 항균제로서 오랫동안 사용되어져 왔다. 이 은 이온은 매우 낮은 농도에서도 매우 높은 방부제 혹은 방미제로 이용되어져 왔는데 이러한 은의 항생제 효능은 수은, 구리, 납, 크로미움과 같은 여타 금속보다 매우 높은 효과를 보여주고 있다. 산소의 존재하에서 silver oxide는 유리 은이온을 생산해 내며 결국에는 은의 활성 표면에 따라서 항생효과가 나타난다. 낮은 농도에서 은 이온은 세포 침입에 의한 세포외각층을 직접적으로 피해를 입히고 은이온은 DNA와 결합을 하게 되는데 이러한 복합물질은 DNA의 복제를 저해하게 된다. 항균 활성이 높은 silver nanoparticles은 산업적인 적용에 매우 유용한 처리법을 제공하게 된다. 그러나 무분별한 은이온의 활용은 이러한 자연환경이나 생태계에 예상하지 않은 결과를 초래할 수 있다. 본 실험에서는 실험실내에서 목재변색균에 대한 합성 은입자의 잠재적인 방미효과를 실험하며 이들의 합성과 가치를 검증하고자 한다.

## 제 2 항 Silica Beads + Silver Thiosulfate의 목재변색균에 대한 생육억제 Inhibition of sapstaining fungal cultures by Silica Beads + Silver Thiosulfate complex containing 15,000ppm

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 공시균주

본 실험에 사용된 공시균주는 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma narcissi*(349579), *Ophiostoma polonicum*(363181)와 *Ophiostoma ips*(363176)을 선정하였으며 모든 균주들은 국제 공시균으로 영국 예전에 국제 진균 연구소(International Mycological Institute, IMI)로 불려졌던 CABI에서 분양받았다. 모든 균주들은 2% MEA 영양배지에서 4-7일 동안 사전 접종되어 25℃에서 배양되었다.

#### 나. 공시 배지 및 제조

Silica Beads + Silver Thiosulfate complex의 다양한 농도를 포함하는 2% MEA 영양배지 상에서 균사의 생장을 측정함으로써 목재변색균의 억제율을 검증하였다. 4개의 각기 다른 농도(0.5, 1.0, 1.5, 2.0%)의 Silica Beads + Silver Thiosulfate complex은 방미 효력 활성실험에 사용하였다. 2% MEA배지는 각각 예시된 혼합비율로 Silica Beads + Silver Thiosulfate complex을 함유하였다. MEA 배지에 Silica Beads + Silver Thiosulfate complex을 함유시키기 전에 filter sterilization을 사전처리 하였다.

사전에 배양된 *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma tetropii*, *Ophiostoma narcissi*, *Ophiostoma polonicum*와 *Ophiostoma ips*의 6 mm 한천배지 조각은 0.5, 1.0, 1.5, 2.0%농도가 함유된 2% MEA배지에 접종하였다. 대조구는 Silica Beads + Silver Thiosulfate complex를 함유하지 않은 순수 2% MEA영양배지를 선정하였다.

#### 다. 방미효과 검증

방미효력을 검증하기 위하여 Silica Beads + Silver Thiosulfate complex을 함유한 배지상에서 공시균주의 7일간의 생장 활성을 측정함으로써 방미효과를 검증하였다. 대조구의 균사가 페트리디쉬의 외각부근에 닿게 되면 방미효력 지수는 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{방미 효력 지수 (\%)} = (1 - Dt/Dc) \times 100$$

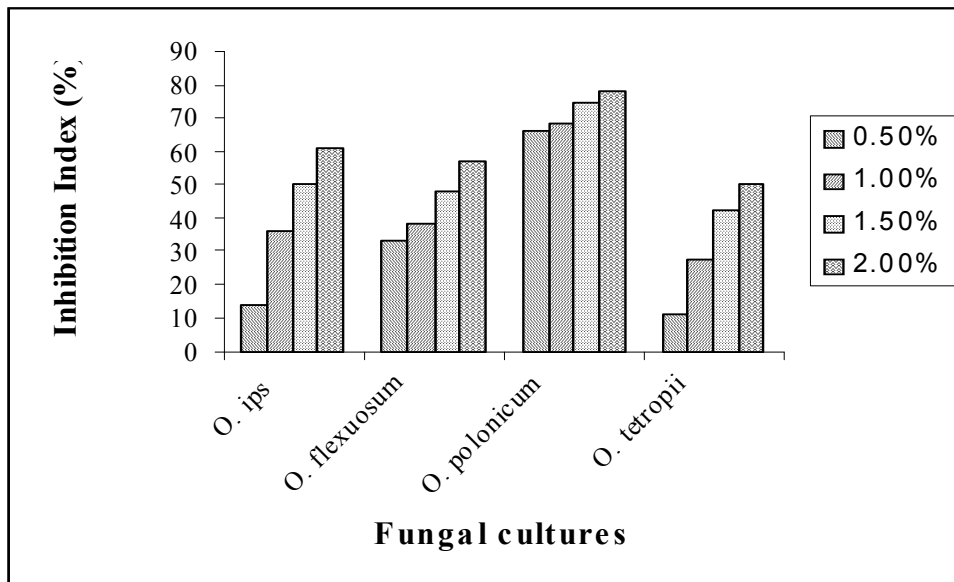
Dt는 실험배지에서 성장구역의 직경을 의미하며 Dc는 대조구의 성장구역의 직경을 의미한다. 각각의 실험은 3반복을 하였으며 평균으로 결과치를 나타내었다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. Silica Beads + Silver Thiosulfate complex의 방미효과 활성

아래의 그림은 Silica Beads + Silver Thiosulfate complex의 방미효과 활성을 나타내며 이는 2% MEA배지상에서 균사생장의 활성의 결과치를 인용하였다. *O. polonicum*는 2% Silica Beads + Silver Thiosulfate complex를 함유하였을 시 78%의 억제율을 보여주었다. *Ophiostoma tetropii*가 Silica Beads + Silver Thiosulfate complex에 대하여 높은 저항을 보여준 반면에 Silica Beads + Silver Thiosulfate complex가 2.0%의 높은 농도로 함유되었을 경우에 50%의 균사생장을 감소하였다. 또한 *Ophiostoma ips*와 *O. flexuosum*은 Silica Beads + Silver Thiosulfate complex가 2.0%의 높은 농도로 함유되었을 경우 각각 61%와 57%의 효과를 보여주었다.

Figure 1. Mycelial growths of *Ophiostoma flexuosum*, *O. polonicum*, *O. narcissi* and *O. ips* on 2 % MEA with supplement of different concentrations of Silica bead + silver thiosulfate complex.



#### 4. 결 론

1. Silica Beads + Silver Thiosulfate complex는 안정적이며 열대한 저항성이 높으며 물에 쉽게 녹는다. 고분자물질과 혼합하게 된다면 이들의 물리적 특성은 변하지 않거나 변성하지 않는다.
2. 이 혼합물질은 세균, 진균, 조류 등에 매우 높은 방미효과를 보여주며 페인트, 섬유, 고무 등과 같이 쉽게 사용할 수 있다.
3. 자연환경에 비독성이며, 인간이나 사용자에게 안전한 혼합물질이다.

### 제 3 항 silver nanoparticle의 목재변색균에 대한 생육 억제 효과

#### Inhibition of mycelial growth of sapstaining fungi on 2% MEA by silver nanoparticles (50nm)

##### 1. 재료 및 방법

###### 가. 공시균주

본 실험에 사용된 공시균주는 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181)와 *Ophiostoma ips*(363176)을 선정하였으며 모든 균주들은 국제 공시균으로 영국 예전에 국제 진균 연구소(International Mycological Institute, IMI)로 불려졌던 CABI에서 분양받았다. 모든 균주들은 2% MEA 영양배지에서 4-7일 동안 사전 접종되어 25℃에서 배양되었다.

###### 나. 공시 배지 및 제조

Silica nanoparticle의 다양한 농도를 포함하는 2% MEA 영양배지 상에서 균사의 생장을 측정함으로써 목재변색균의 억제율을 검증하였다. 4개의 각기 다른 농도(1ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm)의 Silver nanoparticle은 방미 효력 활성실험에 사용하였다. 2% MEA배지는 각각 예시된 혼합비율로 Silica nanoparticle을 함유하였다. MEA 배지에 Silver nanoparticle을 함유시키기 전에 멸균 사전처리 하였다.

사전에 배양된 *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma tetropii*, *Ophiostoma polonicum*와 *Ophiostoma ips*의 6 mm 한천배지 조각은 1ppm, 10ppm, 50ppm, 100ppm농도가 함유된 2% MEA배지에 접종하였다. 대조구는 Silver particle를 함유하지 않은 순수 2% MEA영양배지를 선정하였다.

##### 3. 결과 및 고찰

###### 가. Silver nanoparticle의 방미효과 활성

목재변색균의 균사생장 억제율을 측정함으로써 Silver nanoparticle의 방미효과 활성을 도출하였다. 이러한 결과를 도출하기 위하여 2% MEA 영양배지에서 균사의 생장을 측정하였다. 아래의 그림은 각기 다른 농도의 Silver nanoparticle을 함유한 2%



MEA배지에서 균사의 성장 결과를 보여준다. 실험기간 동안 *Ophiostoma polonicum*, *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma tetropii*,와 *Ophiostoma ips*의 생장은 각각 배지상에서 집락의 직경은 76, 2, 72, 56 mm 을 보여주었다. 이러한 결과는 본 실험에서 사용된 최소한의 Silver nanoparticle에 대하여 높은 상관관계를 보여주었다. *Ophiostoma flexuosum*은 Silver nanoparticle에 대하여 매우 높은 연관성을 보여주며 높은 농도(100ppm)의 Silver nanoparticle에 대하여 균사의 성장을 전혀 보이지 않았다 따라서 높은 농도의 Silver nanoparticle은 *O. flexuosum*에 대하여 매우 높은 방미효과를 보여주었다. 반면에 *O. ips*는 Silver nanoparticle에 대하여 약간의 저항성을 보여주어 그다지 높은 방미효과를 나타내지 않았다. 100ppm의 Silver nanoparticle을 함유한 2%MEA배지에서 *O. ips*는 30mm의 약간 높은 균사생장을 보여주었다. 또한 *O. polonicum*과 *O. tetropii*는 100ppm의 Silver nanoparticle을 포함한 경우 24, 12 mm의 낮은 집락의 직경을 보여주었다.

Figure 1. Effect of Silver nanoparticle on mycelial growth of *O. ips* on 2 % MEA.

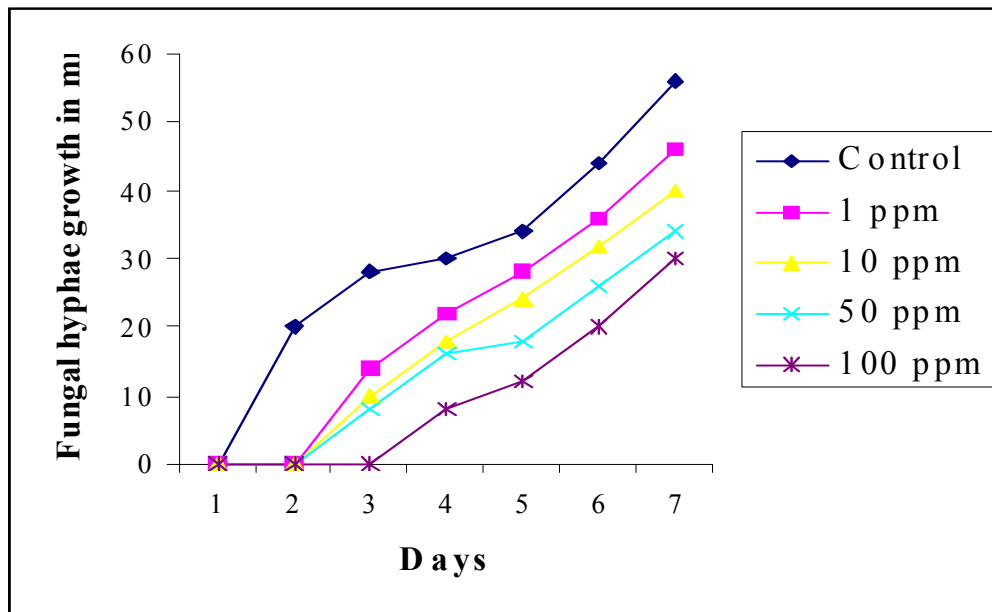


Figure 2. Effect of Silver nanoparticle on mycelial growth of *O. flexuosum* on 2% MEA.

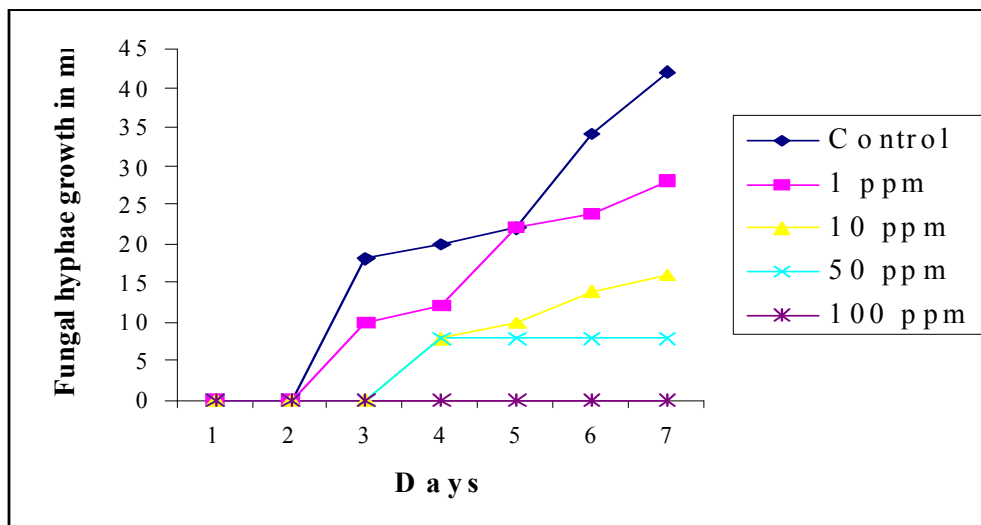


Figure 3. Effect of Silver nanoparticle on mycelial growth of *O. polonicum* on 2% MEA.

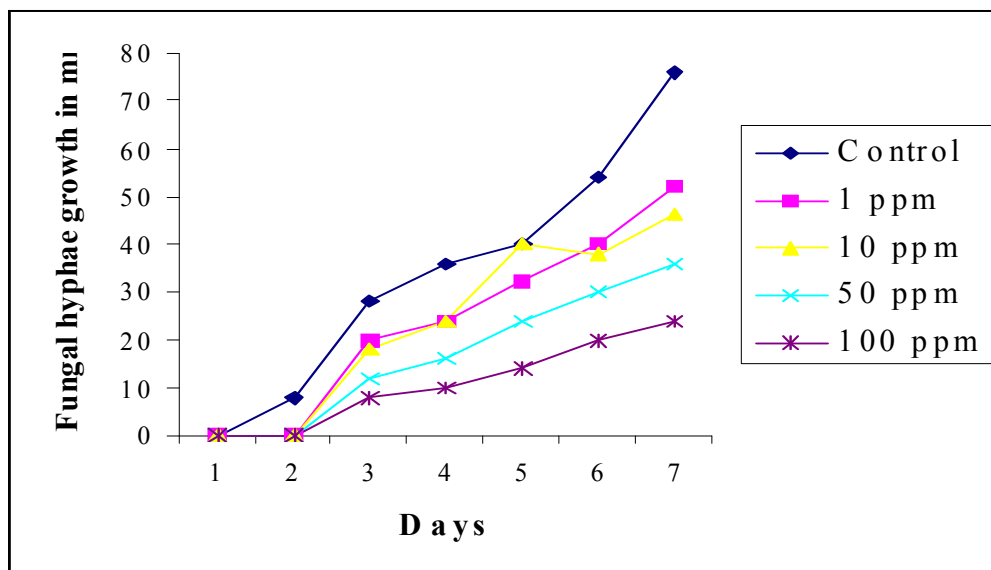
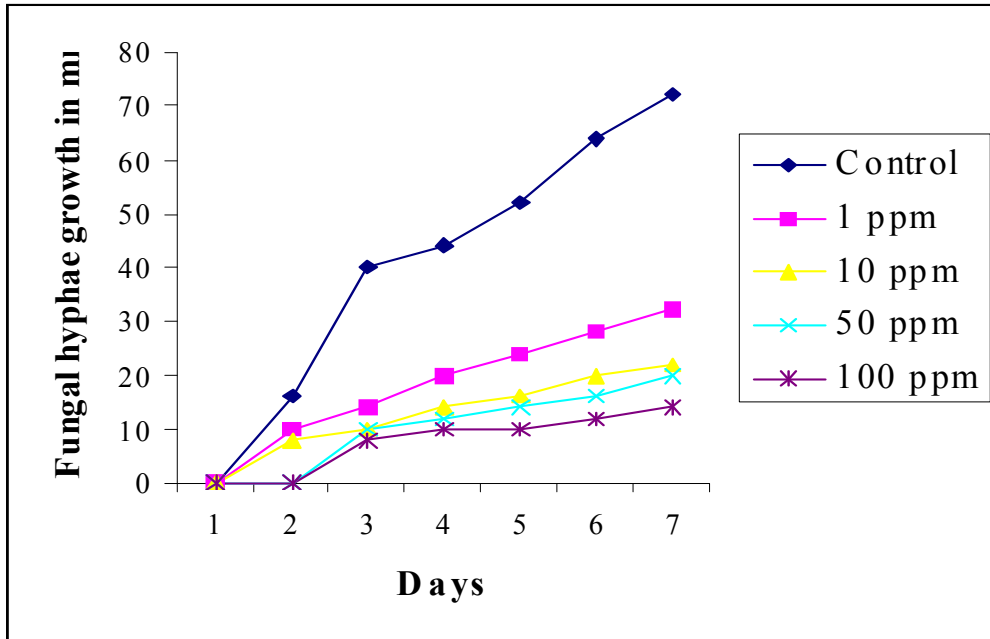


Figure 4. Effect of Silver nanoparticle on mycelial growth of *O. tetropii* on 2 % MEA.



#### 4. 결 론

1. silver nanoparticles은 낮은 농도에서도 목재변색균에 대하여 매우 높은 방미효과를 보여 준다.
2. 인간의 건강과 자연환경에서의 독성이 높은 CCA보다 우수한 성질의 방미제이다.
3. 자연환경과 경제적인 측면에서 목재산업체에서도 쉽게 생산해 낼 수 있다.

제 8 절 목재변색균에 대한 *Bacillus subtilis* EF 617317  
과 *B. licheniformis* EF 617325의 길항물질의  
판명 및 부분 정제: 실험실 및 야외폭로 실험  
Identification and partial purification of  
antagonistic compounds from *Bacillus*  
*subtilis* EF 617317 and *B. licheniformis* EF  
617325 against wood staining fungi: An in  
vitro and in vivo experiments

제 1항 서 설

목재의 천연색상은 목재변색균이나 목재오염균에 의하여 매우 심각한 경제적인 손실을 초래하고 있다. 이러한 손실은 국내뿐만 아니라 전 세계적으로 퍼져있다. 그러나 목재변색균에 의한 목재 강도 혹은 화학적구성성분의 감소는 그다지 크지 않다. 이들이 가지고 있는 균사체의 멜라닌 색소가 목재구성성분과 결합하거나 공기 중에 산화되어서 나타나는 현상이다. *Ophiostoma* 속의 균들은 목재변색균 중의 대표적인 곰팡이이다. 그동안 많은 연구들이 흑재 내에서 변색에 관한 연관성, 목재변색균의 억제력을 위한 몇몇의 방미제 혹은 방부제 등에 국한되었다. 화학적 방부제들은 목재변색균의 균사생장을 억제하기 위하여 화학적인 방부제를 주로 사용하였다. 그러나 이러한 방부제 들은 매우 높은 독성을 가지는데 이는 자연환경과 인간의 삶에 중대한 영향을 미치게 된다. 그러므로써 많은 연구자들이 현시대에 들어와서는 천연물질과 생화학적 물질을 이용하여 생분해성 혹은 친환경성 방부제 혹은 방미제에 관하여 연구를 수행하고 있다. 이러한 목재변색균의 생육억제를 위한 생물학적 조절은 목재산업체에서 매우 중요한 경제적 가치를 조장 할 수 있다. 그러기에 많은 연구자들이 생물학적인 목재보존에 관하여 연구결과를 보고하고 있다.

생물학적 조절 약제들은 농업, 약제업과 임산업을 포함하는 많은 특성을 포함하게 된다. *Bacillus* sp.는 대다수의 자연환경에서 생물학적 조절 균주로 사용되어져 왔다. *Bacillus* sp.는 이들이 가지고 있는 강한 2차 대사산물의 다양한 적용때문에 많은 연구자들의 주목을 받고 있으며 이는 현장에서 많이 이루어 지고 있기도 하난. 이 2차 대사산물들은 자연환경에서 강한 안정성을 보여주며 알카리 혹은 산성의 조건 하에서도 높은 활성을 보이고 있다. *Bacillus*에 의하여 생성된 대다수의 2차 대사산물들은 2000 Da의 분자량을 보이고 있으며 일반적으로 7 아미노산의 구성되고 펩타이드

연결에서 베타아미노 지방산으로 구성되어 있다.

많은 연구자들은 식물의 병원성 미생물 그룹에 효과가 좋은 lipopeptides의 특성과 분리, 정제 등에 관하여 지속적으로 연구결과를 발표하고 있다. 그럼으로써 본 연구에서는 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*가 특히 목재변색균에 대한 항균성 구성성분을 판명 분리하고 정제하고자 하였다. 현재의 작업은 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*로 부터 강한 항균성 구성성분을 동정, 분리, 정제와 특성을 파악하고 이들 정제된 구성성분을 in vitro와 in vivo 상태에서 이들의 효력을 검증하였다.

## 제 2 항 목재변색균에 대한 *Bacillus subtilis* EF 617317과 *B. licheniformis* EF 617325의 길항물질의 판명 및 부분 정제: 실험실 및 야외폭로 실험

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 공시 목재변색균주

본 실험에 사용된 목재변색균은 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)을 선정하였으며 모든 균주들은 국제 공시균으로 영국 예전에 국제 진균 연구소 (International Mycological Institute, IMI)로 불러졌던 CABI에서 분양받았다. 모든 균주들은 2% MEA 영양배지에서 4-7일 동안 사전 접종되어 25°C에서 배양되었다.

#### 나. 공시 세균균주

*Bacillus subtilis*(SB3) strain EF 617317과 *Bacillus licheniformis* (SB11) strain EF 617325는 전북대학교 농업과학연구소 Biocontrol Lab.에서 분양받았다. *Bacillus subtilis* EF 617317 and *B. licheniformis* EF 617325 는 토양으로 부터 분리하였으며 분리 동정한 후 배양균주는 LB(Becton, Dickinson and Company, USA) 한천배지에서 배양 보관하였다.

#### 다. 길항작용 활성 분석

*Bacillus subtilis* EF 617317 and *B. licheniformis* EF 617325의 길항작용의 활성은 페트리디쉬 분석법으로 검증하였다. 사전에 배양되어 생리활성이 왕성한 공시 목재변색균주인 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)을 LB 한천배지의 중앙 부위에 에 접종하고 양 반대편 중앙부위에 *Bacillus licheniformis* (SB11) strain EF

617325를 접종하였다. 접종한 페트리디쉬는 20°C에서 7일 동안 배양하였다.

#### 라. 세균 배양균주의 길항성분 분석

*Bacillus subtilis* EF 617317 and *B. licheniformis* EF 617325의 세균 배양균주는 0.5g Yeast extract, 1.0g Peptone, 1.0g NaCl을 함유한 LB broth 100ml에서 25°C에서 배양하였으며 이때 pH 7.2로 조절하였다. 7일간의 배양 후에 배양균주는 4°C에서 20분동안 10,000rpm으로 원심분리하고 상등액은 버리고 남겨진 약간의 pellet는 40% 메탄올로 용해시키고 나머지는 FT-IR 분석을 위하여 건조하였다.

#### 마. 활성 상청액의 FT-IR 분석

*Bacillus subtilis* EF 617317 and *B. licheniformis* EF 617325의 활성 pellet는 37°C에서 각각 완전 건조를 시켰다. 완전 건조된 상청액 활성 pellet는 potassium bromide로 각각 적당량을 첨가하여 혼합하였다. 이 혼합물은 절구공이를 이용하여 분쇄하고 높은 압력(18 psi)를 가하여 1mm 두께 x 1cm 직경의 작은 pellet으로 조제하였다. 이 조제된 pellet는 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Spectrum GX, USA)로 surface functional group을 시험하기 위하여 사용되어졌으며 pellet 들은 4 cm<sup>-1</sup> resolution에서 4,000에서 400<sup>-1</sup>으로 스캔하였다.

#### 바. 활성성분의 부분 정제

활성된 40%의 메탄올 분획은 sephadex gel filtration chromatography에 의하여 정제하였다. Sephadex G-50(Sigma-Aldrich)는 Econo-Pac disposable chromatography column (Bio-Rad)로 구성되었다. 이 컬럼은 분당 1ml의 속도로 100ml의 40% 메탄올이 흐르도록 조절하였다. 40% 메탄올의 용리를 한 후 활성 fraction은 Sephadex column으로 분당 1 ml의 속도로 정제하였다.

#### 사. LC-MS에 의한 활성 성분의 동정

40% 메탄올 분획으로 부분 정제된 성분은 Reverse Phase HPLC (Agilent 1100)으로 동정하였다. 40% 메탄올 분획은 분당 0.27 ml의 속도로 reverse phase CB-18 column (20 RBAX 300 SB)로 크로마토그래프 분석하였다. HPLC에 사용된 용매는 1% 포름릭산에서 5 D.W.과 0.1% 포름릭산에서 아세토니트릴을 사용하였다. 구별되는 피크는 Mass spectrometry (Agilent 1100 series LC/MSD Trap)로 판별하였으며 건조 온도가 320°C에서 50에서 2000의 범위에서 스캔하였으며 MS condition은 target mass 1,000, bebulizer 19 psi와 dry gas 6 L/분으로 하였다.

#### 야. Cell free fraction의 항진균 활성의 측정

Cell free fraction의 항진균 활성은 2% MEA 한천배지에서 disc diffusion 방법으로 측정하였다. 필터페이퍼(What. no 1)는 disc(diameter 직경 6 mm)의 크기로 준비하였다. disc는 121°C에서 20분 동안 멸균하였다. *Bacillus licheniformis* (SB11) strain EF 617325의 20ul cell free fraction은 멸균된 이스크에 한방울 떨어뜨리고 laminar air flow에서 기건시켰다. *Bacillus licheniformis* (SB11) strain EF 617325의 활성 디스크는 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176) 공시 목재변색균의 양쪽 부위에 접종시키고 12일 동안 배양시켰다.

#### 자. 활성 분획의 pH안정성 및 열 안정성

7일간 배양된 *Bacillus subtilis* EF 617317 and *B. licheniformis* EF 617325의 활성 상층액 분획은 열 안정성 실험에 사용하였다. 활성 상층액은 20, 37, 50, 70, 100°C에서 30분 동안 항온수조에서 유지시켜주며 항진균 분석은 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)에 대하여 수행되었다. 활성 상층액 분획은 pH 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9와 10의 조건으로 25°C에서 24시간동안 고정시켰다. 이들의 항진균성 활성을 측정하기 위하여 4개의 목재변색균을 대상으로 각기 다른 pH fractions를 실험하였다. disc diffusion 방법은 열안정성 및 pH 안정성의 특성을 구명하기 위하여 실험을 수행하였다.

#### 차. 목재 시편상에서 세균 활성 상층액 활성의 야외 실험 분석

##### - 목재에서 활성 상층액 분획의 항진균성 활성 분석 -

목재변색균에 대한 활성 상층액의 길항작용 활성을 측정하기 위하여 야외조건하에서 부가적인 배양방법을 사용하였다. *Pinus densiflora*와 *Pinus radiata* 원목 단편을 본 실험에 사용하였다. 오염되지 않은 건전 원목을 국내 군산에 위치한 목재회사에서 구입하였다. 목재블러는 무작위 방법으로 선택하였으며 준비된 멸균봉투에 넣어서 신속하게 실험실로 운반하였다. 목재시편은 전북대학교 목공센터에서 작은 육면체 조각(60mm x 40 mm x 10 mm)의 크기로 준비하였다. 목재시편은 121°C에서 20분동안 멸균하였으며 pickle-jar를 본실험에 사용하였다. 60 ml의 2% MEA 영양배지를 pickle-jar에 분주한후 4개의 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)를 접종하였으며 균사가 배지표면의 가장자리에 도달할 때 까지 20°C에서 6-7일간 배양하였다. 공시 목재변색균의 균사가 배지 표면을 완전히 덮은 후에 두 종의 목재시편을

올려놓았다. 각각의 목재변색균에 대한 실험은 8회 반복실험을 행하였다. *Pinus densiflora*와 *Pinus radiata*의 목재시편은 15분동안 *Bacillus subtilis* EF 617317 and *B. licheniformis* EF 617325의 cell free active supernatant fraction에 저장하였다. laminar air flow chamber안에서 기건시켰다. 처리된 목재 시편은 pickle-like jar안에서 2% MEA배지상에서 배양되는 각각의 목재변색균에 올려놓았다. *Pinus densiflora*와 *Pinus radiata*의 각각의 처리된 목재시편을 pickle-like jar에 올려놓았다. 각각의 실험은 4회 반복실험을 행하였다. Pickle-like jar는 파라필름으로 봉하여지고 항온항습기(120%정도의 항습)안에서 배양되었다.

#### 카. 목재시편에서 균사생장 분석

16주간의 목재시편을 목재변색균에 노출시킨 후에 목재시편은 pickle-jar에서 꺼내고 목재시편의 표면에 발생하는 변색의 정도에 따라서 카테고리를 정하고 변색정도를 결정하였다. 이들의 육안에 의한 변색의 정도는 Thwaites et al.의 방법에 의하여 분석하였다. 목재변색균에 의한 목재시편에서의 집락형성과 목재시편에서 발생하는 균사의 세포내 침투는 전자현미경(SEM)을 이용하여 관찰하였다. SEM 관찰은 주로 목재내부에서 발생하는 화학적 성분의 파괴를 생화학적 분석의 자료로 사용하였다.

목재시편은 액체질소에서 1-2분 정도 동결시킨 후 멸균된 면도칼을 이용하여 작은 조각으로 세분하였으며 이 세분된 목재시편 조각은 에탄올 탈수과정(20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70% 그리고 70%, 10분 동안)을 거쳐 탈수하였다. 탈수된 목재시편 조각은 기건하고 ion sputtering(JEOL JC-1200 fine coater)를 이용하여 골드코팅을 하였으며 주사전자현미경(SEM, JSM-5200)을 이용하여 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*의 항진균 활력 분석

*Bacillus subtilis* EF 617317 and *B. licheniformis* EF 617325의 세균들은 2% MEA 영양배지상에서 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)의 생육을 억제하였다. 육안에 의한 생육 억제구역이 생육억제율로 분석되었으며 이는 표 1에 기술되어 있는 바와 같다.



#### 나. Cell free bacterial fractions의 길항작용 활성

cell free bacterial fractions의 길항작용 활성은 실험실내에서 disc diffusion법에 의하여 검증되었다. 목재변색균인 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)는 cell free fraction에 의하여 균사의 생장이 억제되었다. 모든 활성화된 disc의 주위에는 매우 확연하게 생육억제환이 형성되었다. 이 실험은 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)에 대한 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*의 부분적으로 정제된 성분이 매우 강한 길항작용을 보여줌을 확인하였다.

#### 다. 부분 정제된 분획의 분석

*Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*의 부분 정제된 분획은 LC-MS에 의하여 분석되었고 FT-IR에 의하여 표면의 그룹이 결정되었다. 그림 2는 활성 상청액 분획의 FT-IR 스펙트럼을 나타내고 있다. 이 그룹들은 *B. subtilis*의 경우 3302에서  $2856\text{cm}^{-1}$  과 1655에서  $1535\text{cm}^{-1}$  *B. licheniformis*의 경우는 3295에서  $2929\text{cm}^{-1}$  에서 관찰되었다. 이러한 약  $3300\text{cm}^{-1}$  주위의 넓은 밴드는 NH그룹에 기인하고 1655에서  $1535\text{cm}^{-1}$ 의 경우는 amid I과 amide II 밴드로 여겨진다. 이러한 분자량은 *B. subtilis*와 *B. licheniformis*의 경우는 LC-MS 스펙트로미터로 분석하였다. 네 개의 peptide는  $m/z$  1023, 1038, 1066과 1081에서 판명되었고 *B. subtilis*의 경우는  $m/z$  1036, 1058, 1090에서 관찰되었다. 이들의 peptide는 이들이 지방산체인의 길이에 따라 각각 다르게 보여진다.

#### 라. 활성 분획의 열안정성 및 pH 안정성 분석

*Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*의 활성 분획의 열안정성 및 pH 안정성 분석은 여러 실험에 의하여 해하여 졌다. 두개의 분획에서 초기의 활성은 20, 37, 50, 70과  $100^{\circ}\text{C}$ 에서 30분 동안 유지하였다. 이러한 활성의 비슷한 결과는 pH 안정성 실험에서도 또한 보여주었다. 이들은  $25^{\circ}\text{C}$ 에서 24시간동안 pH 2, 2.5, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10사이에서 심한 활성의 감소는 보이지 않았다.

#### 마. *in vivo* 조건하에서 활성 상청액의 길항작용 활성

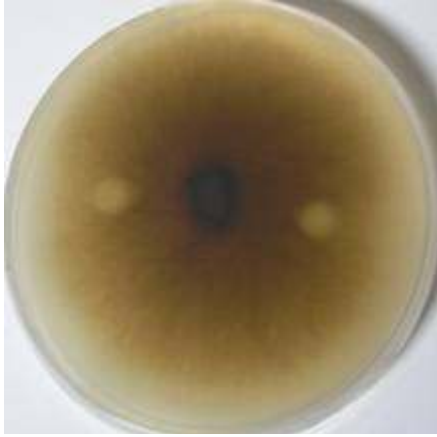
처리된 목재시편이나 대조구 시편은 15주 동안의 배양후에 관찰되었다. 이들의 육안에 의한 변색정도는 확연하게 구별되었다. 목재변색균에 의한 변색의 정도는 숫치화한 데이터로 정하였다. 이러한 목재변색의 정도는 최소변색(1-10%)에서 최대변색(81-100%)으로 정하였다. 그리고 이러한 목재시편별 반복실험에서 실험별 정도의 차이는 나타나지 않았다. *in vivo* 조건하에서 얻어진 결과는 표3에서 보는 바와 같다.

모든 처리된 목재시편에서 목재변색의 정도는 감소하여 나타났다. *Pinus radiata*보다는 *Pinus densiflora*에서 처리된 목재시편이 매우 높은 목재변색균에 의한 변색의 감소가 타타났다. 이는 아마도 *Pinus densiflora*의 polyphenolic group의 유전적으로 존재하는 양에 의하여 기인되었을 것을 사료된다. *Ophiostoma ips*와 *O. flexuosum*의 경우보다 *O. polonicum*, *O. tetropii* 균이 생물학적인 약제에 대하여 더욱 예민하게 반응을 하였다.

SEM 연구는 목재의 표면과 목재내부 세포벽 열화의 과정에서 목재변색균의 성장 억제에 중요한 정보를 제공하였다. 균사는 세포벽에서 이웃의 세포벽으로 향하는 균사침투경로는 주로 벽공을 통하여 밝혀졌다(그림 4c). 이러한 균사의 높은 생장억제는 목재시편의 내부표면에서도 밝혀졌다.

Figure 1. Photographs of the antifungal test results of the cell free supernatant: *O. ips* (a), *O. polonicum* (b), *O. flexuosum* (c), *O. tetropii* (d).

(a)



(b)



(c)



(d)



Figure 2. FT-IR spectrum of active supernatant fractions of *Bacillus licheniformis* EF 617325 (a) and *Bacillus subtilis* EF 617317 (b).

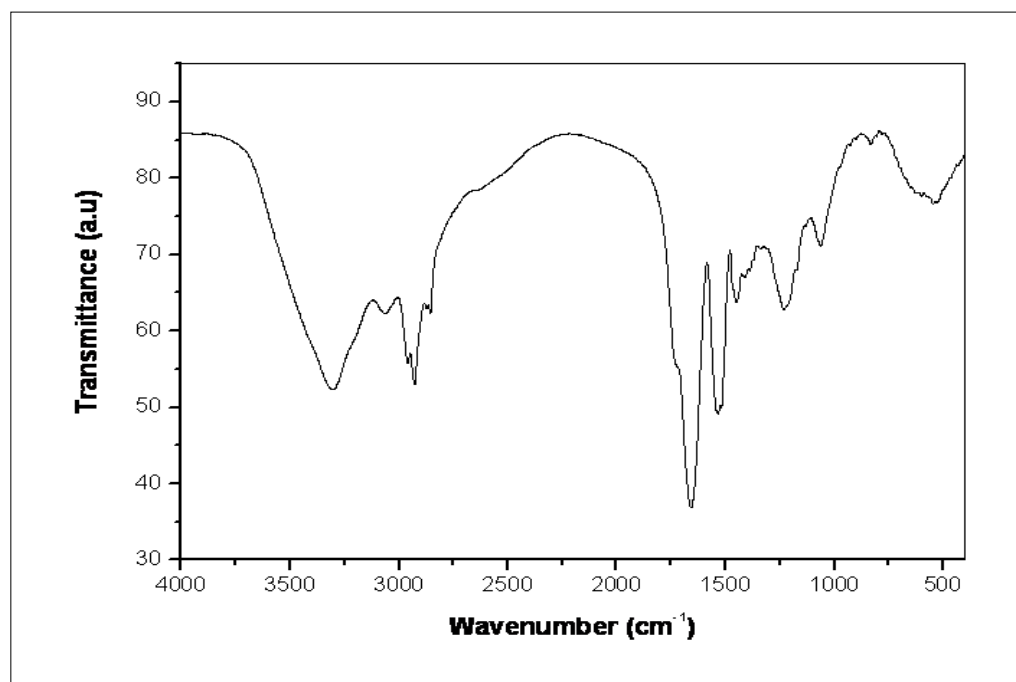
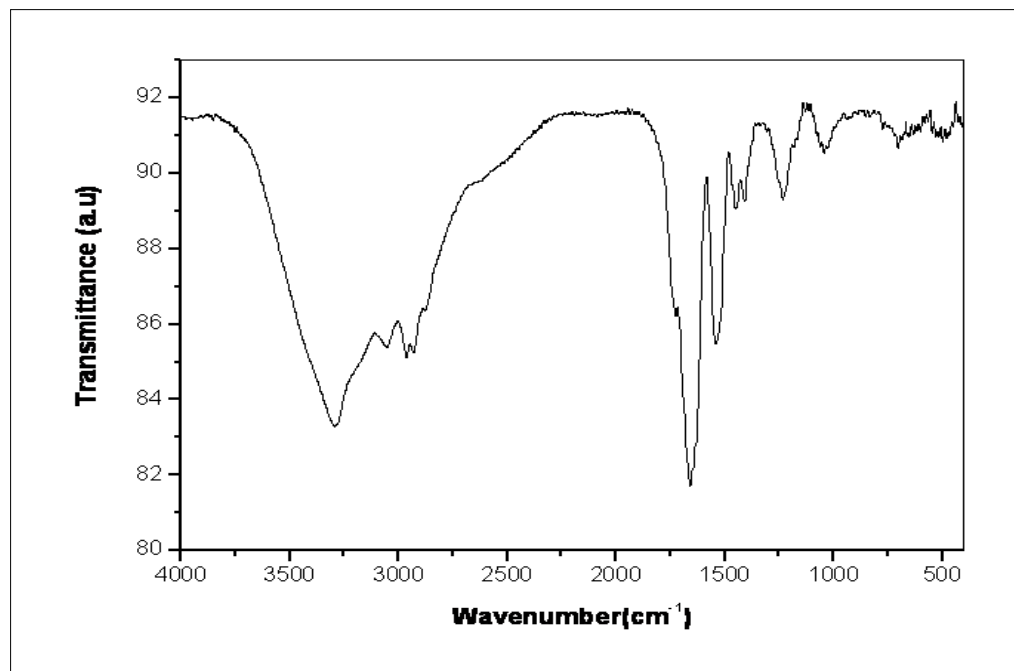


Figure 3. MS spectrum of partially purified compounds of *Bacillus licheniformis* EF 617325 (a) and *Bacillus subtilis* EF 617317 (b).

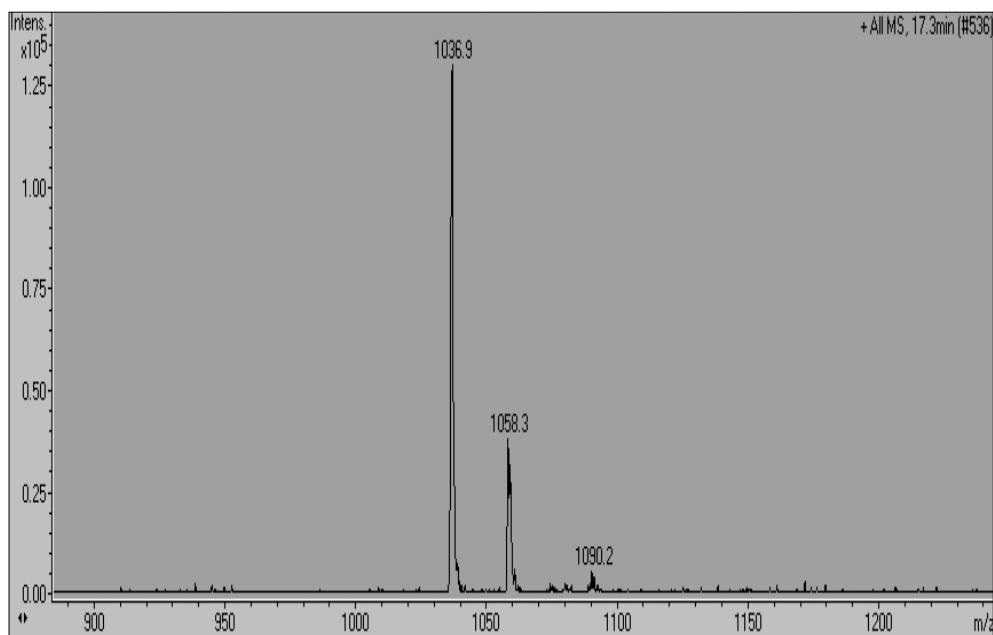
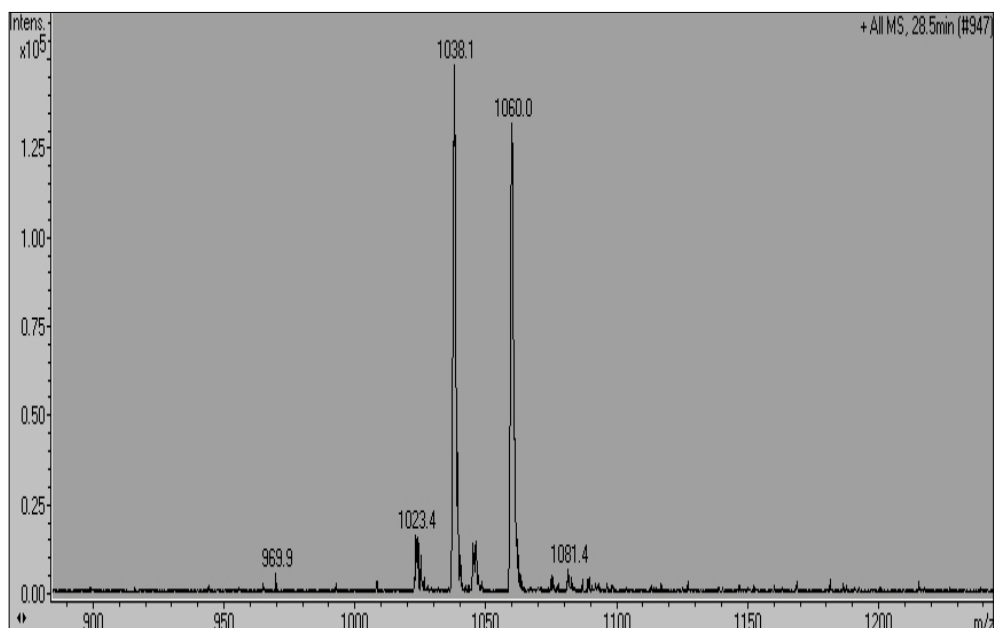


Figure 4. Scanning Electron Microscopy photographs of inside of the longitudinal sections of wood blocks inoculated with *O. flexuosum*: Inside longitudinal section of wood block(control block [bar in scale~1000 $\mu$ m]) (a), Fungal hypha growth on wood block surface (control block [bar in scale~1000 $\mu$ m]) (b), Fungal hypha penetration in pit membranes (control blocks [bar in scale~50 $\mu$ m]) (c), Uncontaminated pit membranes (treated blocks [bar in scale~50 $\mu$ m]) (d).

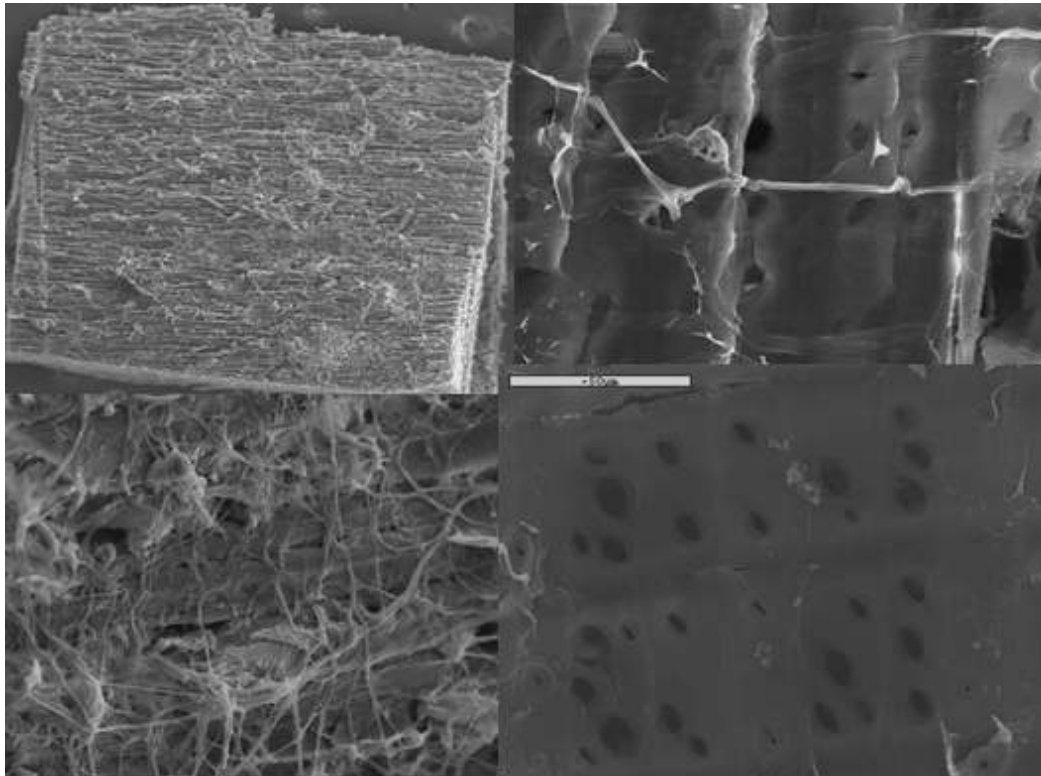


Table 1. Antifungal activity of *Bacillus subtilis* EF 617317 and *Bacillus licheniformis* EF 617325 on LB agar.

Fungal samples	<i>Bacillus subtilis</i> (mm)	<i>Bacillus licheniformis</i> (mm)
<i>Ophiostoma polonicum</i>	7,8	5,8
<i>O. ips</i>	4,6	5,10
<i>O. tetropii</i>	6,4	4,6
<i>O. flexuosum</i>	4,6	5,8

Table 2. Visual fungal staining category and description used to analyze *in vivo* experiments.

Growth category	Description
0	No stain (0 %)
1	Minimal growth (1–10%)
2	Mild growth (11–20%)
3	Moderate growth (21–50%)
4	Heavy growth (51–80%)
5	Severe growth (81–100%)

Table 3. Fungal staining severity on control and treated wood blocks of *Pinus radiata* and *Pinus densiflora*.

Fungal sample	Number of replicates	<i>Pinus radiata</i> Control	<i>Pinus radiata</i>	<i>Pinus Densiflora</i> Control	<i>Pinus densiflora</i>
<i>O. polonicum</i>	8	3		4	
<i>O. flexuosum</i>	8	4		4	
<i>O. tetropii</i>	8	3		4	
<i>O. ips</i>	8	4		4	

Table 4. Identification and structural characterization of Antagonistic compounds from *B. subtilis* and *B. licheniformis* using LC-MS and FT-IR.

Biological agents	Identified compounds	Molecular weight determination by MS analysis (m/z) (Da.)	FR-IR predicted peaks ( $cm^{-1}$ )
<i>B. subtilis</i>	Iturin	1036.9 1058.3 1090.2	3302.16 – NH group 3064.65, 2959.91, 2928.29, 2856.00 CH Stretching vibration in the alkyl chain 1655.94 amide I (C–O–N bond) 1535.18 amide II (C–N stretching mode).
<i>B. licheniformis</i>	Iturin Surfactin	969.9 1023.4 1038.1 1060.0 1081.4	3295.98 NH group 3053.22, 2962.66, 2929.97 CH Stretching vibration in the alkyl chain 1725.87 lactone carbonyl absorption typical for surfactin 1659.04 amide I (C–O–N bond) 1540.76 amide II (C–N stretching mode).



#### 4. 결 론

1. *Bacillus subtilis* EF 617317과 *Bacillus licheniformis* EF 617325의 항진균성 활성은 목재변색균인 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)에 대하여 in vitro와 in vivo의 조건에서 분석되었다.
2. *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum* (363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)에 대한 *Bacillus subtilis*와 *Bacillus licheniformis*의 부분적으로 정제된 성분이 매우 강한 길항작용을 보여줌을 확인하였다.
3. *B. subtilis*의 경우 3302에서  $2856\text{cm}^{-1}$  과 1655에서  $1535\text{cm}^{-1}$  *B. licheniformis*의 경우는 3295에서  $2929\text{cm}^{-1}$  에서 관찰되었다. 이러한 약  $3300\text{cm}^{-1}$  주위의 넓은 밴드는 NH그룹에 기인하고 1655에서  $1535\text{cm}^{-1}$ 의 경우는 amid I과 amide II 밴드로 여겨진다.
4. *Pinus radiata*보다는 *Pinus densiflora* 에서 처리된 목재시편이 매우 높은 목재변색균에 의한 변색의 감소가 나타났다. 또한 *Ophiostoma ips*와 *O. flexuosum*의 경우보다 *O. polonicum*, *O. tetropii* 균이 생물학적인 약제에 대하여 더욱 예민하게 반응을 하였다.

## 제 9 절 개발 중인 변색 방지 처리 약품들의 성능 및 유화 성능 비교 평가

### Comparison of antifungal agents for wood sapstaining fungi and their emulsification activity

#### 제 1 항 변색 방지 처리 약품들의 성능 및 유화 성능 비교 평가 시험

##### 1. 재료 및 방법

###### 가. 공시 균주

본 실험에 사용된 균주는 한국미생물보존센터에서 구입하였으며 장기 보관을 위하여 냉장보관을 하였다. 공시균주는 Beef extract agar(배지조성(pH 6.0): beef extract 3 g, peptone 5 g, agar 30 g, distilled water 1 L) 배지에 접종하여 3개월마다 계대배양을 하였으며 실험 전에는 약 2주 동안 배양된 균주를 사용하였다. 사용된 공시균주는 *Aspergillus niger*(KCCM 11724), *Chaetomium globosum*(KCCM 31212), *Penicillium pinophilum*(KCCM 60085)

###### 나. 공시 약품

개발 중인 목재방미제는 HU-10(7,500배 희석), HU-5(15,000배 희석), HU-2(35,000배 희석), EHU-10(7,500배 희석), EHU-5(15,000배 희석), EHU-2(35,000배 희석)이며 이를 상온에서 10일 방치 후 상징액을 희석하였다

수입 상용 목재 방미제: NZ-10(7,500배 희석), NZ-5(15,000배 희석), NZ-2(35,000배 희석), ENZ-10(7,500배 희석), ENZ-5(15,000배 희석), ENZ-2(35,000배 희석): 10일 방치 후 상징액을 희석하였다.

###### 다. 실험방법

각 보존제품을 NA배지에 7,500배, 15,000배, 35,000배로 희석하고 개발제품은 HU-10, HU-5, HU-2로 수입 상용 목재 방미제는 NZ-10, NZ-5, NZ-2로 각각 표기하였다. 유화 안정성에 따른 성능 비교를 위해 각 보존제품을 물과 1:100 비율로 희석하고 상온에 그대로 방치하여 10일 경과 후 개발 약품과 침전이 발생한 수입 상용 목재 방미제 희석액의 상징액으로부터 시

료를 채취하고 NA배지에 7,500배, 15,000배, 35,000배로 희석한 후 이를 EHU-10, EHU-5, EHU-2로 수입 상용 목재 방미제는 ENZ-10, ENZ-5, ENZ-2로 표기한 후 각 100 ml씩 제조하여 멸균하였다. 각 방미제를 포함하는 배지를 직경 87 mm의 petri-dish에 20 ml씩 분주한 후 실온에서 냉각하였다. 대조구는 방미제를 함유하지 않는 무처리로서 NA배지(배지조성(pH 6.0): beef extract 3 g, peptone 5 g, agar 30 g, distilled water 1 L)에 각 균주를 접종하였다. Petri-dish에 5 mm의 cork borer를 이용하여 각 배지 당 3반복하여 동일하게 접종하였다. 본 연구는 참여업체와 주관기관의 공조연구를 수행하였다.

## 2. 결과 및 고찰

목재 보존제의 성능평가 시험에서 대표 목재오염균 *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*과 *Penicillium pinophilum*의 무처리 대표 균주가 petri-dish상에서 각각의 균주에 대해 72%, 44%, 56%의 성장률을 나타내었으나 개발제품의 경우 희석배율을 달리하더라도 100% 균주 성장을 억제하는 것으로 나타났다. 그러나 수입 상용 목재 방미제의 경우 유효 분산된 상태에서 취한 시료를 희석하여 사용했지만 NZ-2 농도에서 *Aspergillus niger* 균주가 17 mm 성장하는 것으로 나타나 개발중인 약제의 균주 저해성능이 높은 것으로 판단되었다.

유효 안정성을 평가하기위해 방미제 원액을 100 배 희석한 후 10일 동안 방치하였을 때 개발제품의 경우 안정한 투명 액상을 유지한 반면에 수입 상용 목재 방미제의 경우 약제 침전이 발생한 것이 육안으로 확인되었다.

각각의 용해부(상등액)로부터 시료를 취하여 목재 변색균류에 대해 성장 저해 정도를 측정된 결과 EHU-10, EHU-5, EHU-2의 모든 시료에서 *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*과 *Penicillium pinophilum*의 성장을 100% 저해하는 것으로 나타났다. 그러나 수입 상용제품의 경우 ENZ-10, ENZ-5, ENZ-2의 시료에서 *Chaetomium globosum*과 *Penicillium pinophilum* 균주에 대해서는 100% 저해율을 보였으나 일반적인 약제에 대하여 최소 생육저지 농도가 높은 *Aspergillus niger* 균주에 대해서는 모든 시료에서 각각 24 mm, 36 mm, 49 mm의 균주성장을 나타내어 전체적으로 수입 상용제품에 비하여 약제 안정성이 높은 개발 약제가 역시 탁월한 균주 성장저해율을 보이는 것으로 판단되었다. 특히 침엽수재에 만연한 *Aspergillus niger* 균주에 대하여 ENZ시료 전체에서 균주의 성장을 저해하지 못한 결과는 *Aspergillus niger*에 대한 선택적인 저해 활성을 갖는 유효성분들이 약제의 formulation 불안정성으로 인해 침전물로 발생하여 그 효력이 감소한 것으로 판단된다.

Table 1. Comparison of antifungal activity between developing products and imported products. [colony diameter(mm/4~5 days)]

균 주	Control	HU-10	HU-5	HU-2	NZ-10	NZ-5	NZ-2
<i>Aspergillus niger</i>	72	0	0	0	0	0	17
<i>Chaetomium globosum</i>	44	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium pinophilum</i>	56	0	0	0	0	0	0

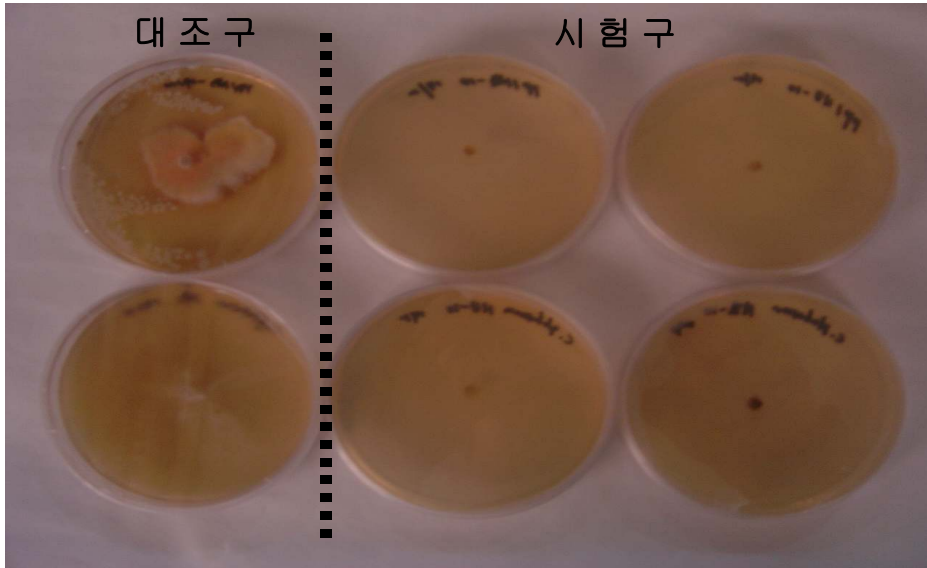
Table 2. Comparison of antifungal activity between developing products and imported products for stabilities of products.

[colony diameter(mm/4~5 days)]

균 주	Control	EHU-10	EHU-5	EHU-2	ENZ-10	ENZ-5	ENZ-2
<i>Aspergillus niger</i>	80	0	0	0	24	36	49
<i>Chaetomium globosum</i>	60	0	0	0	0	0	0
<i>Penicillium pinophilum</i>	48	0	0	0	0	0	0

EHU: 개발제품, ENZ: 수입상용 제품, 0: 균주 성장 저해율 100%

Figure 1. Photograph of Comparison between control and tested.



### 3. 결 론

1. 재 보존제의 성능평가 시험에서 대표 목재오염균 *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*과 *Penicillium pinophilum*의 무처리 대표 균주가 petri-dish상에서 각각의 균주에 대해 72%, 44%, 56%의 성장률을 나타내었으나 개발제품의 경우 희석배율을 달리하더라도 100% 균주 성장을 억제하는 것으로 나타났다.
2. 개발 약제중인 EHU-10, EHU-5, EHU-2의 모든 시료에서 *Aspergillus niger*, *Chaetomium globosum*과 *Penicillium pinophilum*의 성장을 100% 저해하는 것으로 나타났다.
3. 침엽수재에 만연한 *Aspergillus niger* 균주에 대하여 ENZ시료 전체에서 균주의 성장을 저해하지 못한 결과는 *Aspergillus niger*에 대한 선택적인 저해 활성을 갖는 유효성분들이 약제의 formulation 불안정성으로 인해 침전물로 발생하여 그 효력이 감소한 것으로 판단된다.

## 제 2 항 야외 폭로시험을 제재목에 대한 방미제의 방미 효력

### 1. 재료 및 방법

#### 가. 공시 목재시편

전라북도 군산시 소재 제재소에 집하된 무변색 라디에타 원목으로부터 4.0 cm(두께) × 10 cm(폭) × 100 cm(길이)인 시편을 제재하여 용이, 수지구, 육안으로 변색부위가 보이지 않는 100% 변재 혹은 적어도 넓은 한 재면이 변재부 100%인 시편을 선발하여 공시 시편으로 선정하였다.

#### 나. 약제처리 및 야외폭로

방미제 처리농도(0.5, 1.0, 2.0%)별 30개의 공시시편을 방미제 수용액에 1분간 침지한 후, 각 판재들을 폭 5개, 높이 6개의 층으로 block-stack 하였다. 무처리 판재는 대조구로 사용되었다. 또한 block-stack된 pile의 맨 윗층에는 수분손실과 강우에 의한 약제의 씻겨짐을 예방하기 위해 polyethylene 필름으로 덮어 두었다. 약제처리가 완료된 라디에타 소나무 판재는 군산시 소재 제재소의 원목 야적장 인근에 야외 폭로하였다. 본 야외 폭로시험은 변색원인균의 활동이 왕성한 하절기인 6월 말에서 9월 말까지 수행되었다.

#### - 변색정도의 평가

시편의 상부 표면적에 대한 변색면적의 백분율로 평가기준을 적용하였다.

Rating	Degree of damage
0	no stain
10	minor stain or mold (<5% coverage)
20	stain increasing (10~15% coverage)
30	15~20% coverage
40	20~30% coverage
50	30~50% coverage
60	50~60% coverage
70	60~75% coverage

80	75~90% coverage
90	Heavy stain, all surfaces (90~95% stain coverage)
100	Severe stain, some decay maybe also be evident

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. 라디에타 소나무 제재목에 대한 방미제별 농도에 따른 변색정도

Table 1. Anti-microorganism activities based on dilution of products.

방 미 제	농 도 (%)	폭 로 기 간 (주)		비 고 (방미효력)
		5	12	
대 조 구	0.00	48.0	72.1	-
수입상용 방미제 (HEO)	0.5	2.4	25.3	12주의 변색방제 기간 필요시 2% 이상의 농도 필요
	1.0	1.2	21.2	
	2.0	0	12.1	
개발중인 방미제	0.5	0	0	모든 처리 농도에서 탁월한 방미효력
	1.0	0	0	
	2.0	0	0	

상기의 희석배율에 따른 개발 중인 제품과 수입 상용 방미제와의 목재 오염균 저해 측정 결과는 매우 우수하였으나 이들은 매우 중대한 결점을 보여주고 있다. 결과 자료에는 보고되지 않고 있으나 수입 방미제나 개발 중인 방미제는 침전의 약점이 있다. 이 침전의 약점은 단순한 침전에 그치지 않고 주요 약품의 침전에 따른 효능의 감소는 매우 지대하였다. 따라서 이러한 침전물을 용해시키고저 강산을 처리하게 되어 약제의 산성이 매우 강하였다. 이러한 약제의 단점은 추후 3차년도 연구과제에서 필히 연구가 수행되어야 하며 성공적인 방미제의 개발에는 매우 필요하다.

## 제 10 절 표면오염균 발생방지 및 탈색을 위한 목재의 처리방법

### Treatment methodology for protection of fungi colonisation by wood contaminated fungi and decolorization of contaminated wood

#### 제 1 항 서 설

목재를 고유색상을 변화시키거나 표면을 오염시키는 진균들의 생리학적인 측면은 주로 균사의 생장률 기본으로 한다. 생리학적인 측면은 균사의 특징 및 균사 생장, 포자의 발아 및 발아력을 주로 하며 이러한 생리학적인 데이터는 추후 생화학적인 연구의 기본 자료로 높은 활용도를 가져온다.

본 연구에서 균사의 생리적인 면은 크게 나누어 3개의 부분으로 구분할 수 있는데 첫째는 변색 목재의 탈색화 가능성을 파악하였다. 왜냐하면, 미생물 등의 외부 인자에 의하여 목재는 변색화가 형성되는데 이를 인위적으로 방어하지 못한 경우에는 자연적 혹은 인위적으로 탈색을 수행해야 한다. 둘째로는 목재표면에 서식하는 표면 오염균 및 변색균에 대한 탈색제 효력 검증. 이는 균사억제력을 기준으로 하거나 백색도의 검증을 통하여 탈색제의 약효 효력 실험을 수행하는 것이다. 이는 본 연구과제에서 자체 제조하고 있는 방미제를 이용하여 탈색 효과를 적용시키거나 방미 및 탈색제 기능의 접목을 이용하여 이를 토대로 추후 우수한 방미제를 개발함에 그 목적을 두었다.

#### 제 2 항. 표면오염균 발생방지 및 탈색을 위한 목재의 처리법

청변은 모든 목재수종의 변재에서 흔히 침입하게 되는 미생물인 균에 의해서 일어나게 된다. 청변이 목재의 강도적 성질을 저하시키지는 않으나 청변이 발생할 수 있는 조건하에서는 심각한 목재의 부후가 일어날 수도 있으므로 주의하여야 한다. 청변의 대표적인 것으로 들 수 있는 것이 소나무나 곰솔에 발생하게 되는 청변이다. 벌채 직후의 원목이나 제재목의 미건조재에 대한 피해가 가장 심하다. 이를 예방하기 위해서는 온난하고 습도가 높은 조건에서는 방미제를 사용하면 청변의 발생을 미연에 예방할 수 있다. 그러나 청변이 발생하였을 경우 그 면을 깨끗하게 조정해 주지 않고 그 위에 그대로 방미제 처리를 하게 되면 청변균이 방미제 처리 층을 뚫고 나와 자라게 된다. 이러한 경우에 새로 재처리를 해주어야 하기 때문에 많은 번거로



움이 발생하게 된다.

따라서 가장 흔하게 발생하는 청변균 변색을 제거하여 목재 고유의 색상을 최대한 회복시켜 방미제 처리를 하여 줌으로써 제재목의 상품가치를 재고할 수 있는 변색제거 기술의 개발 및 보급이 시급한 실정이다.

표백제 및 표면 오염균 제거제는 염소계 표백제와 과산화수소계 표백제로 나누어진 다. 그런데 차아염소산나트륨을 주성분으로 하는 염소계는 표백력이 강하기 때문에 의류의 표백, 또는 주거용 벽 또는 가구에 발생한 곰팡이의 표백에 사용되고 있다. 그러나 염소계 표백제는 표백력이 우수하기는 하나, 제품을 변색 및 퇴색 시키며, 염소로 인해 특유의 냄새를 발생시켜 사용자에게 불쾌감을 주며, 사용시 염소기체에 의해 중독될 위험이 있다는 단점이 있다.

한편, 과산화물계 표백제는 염소계 표백제에 비해 사용 범위가 넓고 불쾌한 냄새가 없다는 등의 이유로 그 사용량이 가정용을 중심으로 점차 증가되고 있다. 과산화수소 변색제거 방법은 상업적 규모에서 가장 효과적으로 수행될 수 있다. 그러나 과산화물 단독으로 사용되는 경우 염소계 표백제에 비해 그 표백력이 충분하지 못하다. 과산화수소 용액은 철, 구리, 납, 티타늄, 망간등과 같은 중금속 및 다가금속 이온으로 보통 표시되는 분해 촉매에 분해된다. 따라서 과산화수소 용액에 약간의 안정제를 첨가해야 한다. 이것에 사용되는 안정제로는, 예부터 규산나트륨이 사용되고 있고, 이것에 의하여 안정효과가 우수하며, 우수한 백도 향상을 가져오는 것이 발견되고 있으나, 그 반면에 그 방법에 의하면 피처리물에 규산스케일이 부착하거나, 또 장치에 규산스케일이 침착하는 등의 결점도 있다. 또한 현재로서는 규산나트륨 이외에도 EDTA, DTPA 등의 유기 킬레이트제, 축합인산염 등의 무기 킬레이트제, 대두단백질, 카제인 등의 수용성단백질이 이 목적에 사용할 수 있는 것이 알려져 있다. 과산화수소 표백안정제로서 용수에 함유되어 있는 금속이온과 반응하여 급격히 과산화수소가 분해되는 것을 방지하고 지속적이며 균일한 발생기 산소를 생성하므로 표백효과를 증진시킨다.

그러나 이와 같은 화학약품에 의한 청변균의 구제는 청변균의 번식이 미미한 상태에서만이 가능하고 목재 내부에까지 번식한 상태에서는 곤란하다.

따라서 본 실험은 실제 자연 상태에서 변색된 제재목의 청변균 탈색화의 가능성을 파악하고 이를 토대로 탈색제를 개발하기 위하여 수행되었다. 실제 자연상태에서 변색된 제재목의 변색 부위를 표백·제거할 수 있는 표백제의 농도와 최대 표백효과를 발휘할 수 있는 이들의 처리 조건을 구명하였다.

## 1. 재료 및 방법

### 가. 변색시편의 준비

자연상태에서 심하게 변색된 소나무 변재부 제재목으로부터 5mm(두께) × 50mm(폭) × 50mm(길이)인 시편을 준비한 후, 색차계(NIPPON DENSHOKU, Model: NF333)를 이용하여 각 시편의 표백 전 색도값(L\*a\*b\*)을 측정하였다.

### 나. 최적 표백처리조건의 결정

표백제로는 과산화수소가 사용되었는데, 활성제로서 규산나트륨과 수산화나트륨이 중량기준으로 농도 변화에 따라 과산화수소 수용액에 첨가되었다. 이외에 계면활성제(폴리에틸렌 글리콜)가 첨가되었다.

### 다. 변색제거 정도 판정

표백이 주로 목재의 명도를 영향하는 점에 착안하여 표백 전후 표백에 의한 명도 개선정도에 의해 변색제거 정도를 판정하였다.

## 2. 결과 및 고찰

본 연구에서는 저온에서 과산화수소에 대한 변색목재의 표백성을 알아보기 위해 다음과 같은 실험을 하였다. 변색목재를 과산화수소로 표백할 때에 활성제로서 서로 다른 농도의 규산나트륨과 수산화나트륨을 대비시켜 적용하여 상온에서 처리하였다. 이들의 결과는 Color Difference Meter를 이용하여 비교 분석하였다.

규산나트륨, 수산화나트륨과 계면활성제의 농도를 1%, 0.5%과 0.5%로 일정하게 하고 과산화수소 농도를 1, 2, 3, 4, 5, 7, 10%로 변화시켜 가면서 변색제거 정도를 측정한 결과는 Figure 1과 같다.

Figure 1. Change of lightness according to hydrogen peroxide concentration.

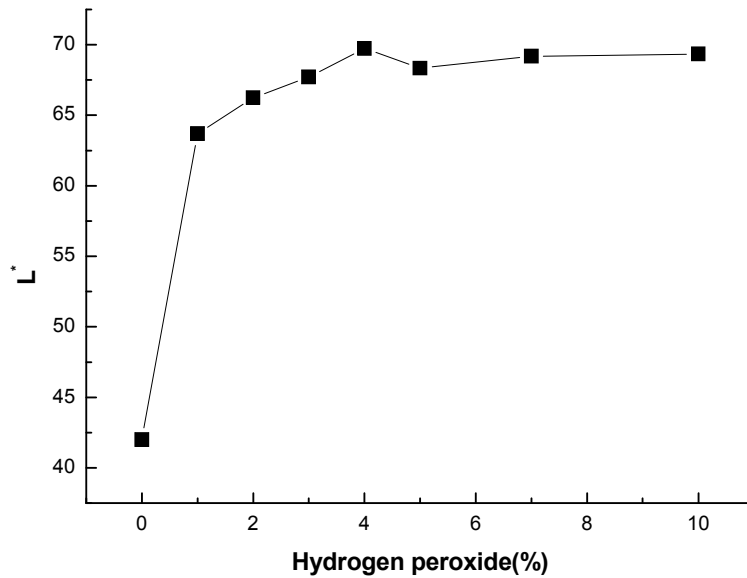
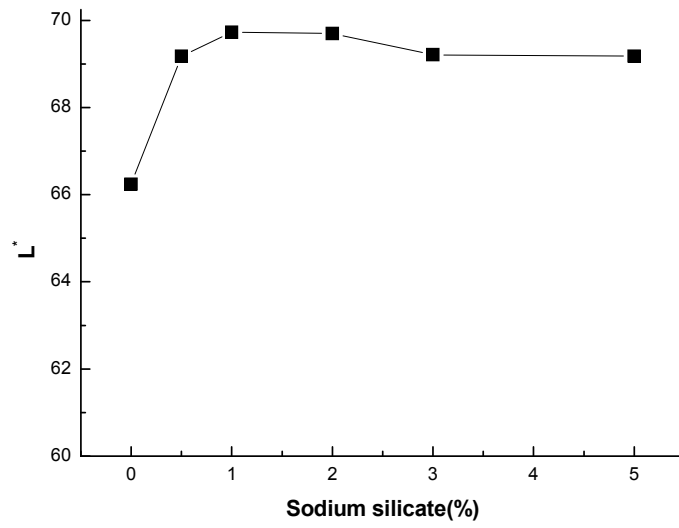


Figure 1과 같이 과산화수소 4% 용액 이후에는 변색 제거 정도가 큰 변화가 없는 것으로 나타났다. 2%와도 큰 차이는 없는 것으로 나타났다. 따라서 과산화수소 4% 용액이 변색 제거 정도가 가장 좋은 경향이였다.

따라서 과산화수소 농도를 4%로 정하고 규산나트륨의 농도를 0.5%, 1%, 2%, 3%, 5%로 변화 시켜 가면서 변색 정도를 측정하였다. 그 결과는 Figure 2와 같다. Figure 2와 같이 규산나트륨 1% 용액 이후에는 변색 제거 정도가 약간 떨어지는 것으로 나타났다. 그러나 0.5% 경우에도 1%와 큰 차이는 없었다. 따라서 규산나트륨 1% 용액이 과산화수소 활성화에 가장 적절할 것으로 판단되었다.

Figure 2. Change of lightness according to sodium silicate concentration.



과산화수소 농도를 4%로, 규산나트륨의 농도를 1%로 정하고, 수산화나트륨 농도를 0.1%, 0.5%, 1%, 2%로 변화 시켜 가면서 변색 제거 정도를 측정하였다. 그 결과는 Figure 3과 같다.

Figure 3. Change of lightness according to sodium hydroxide concentration.

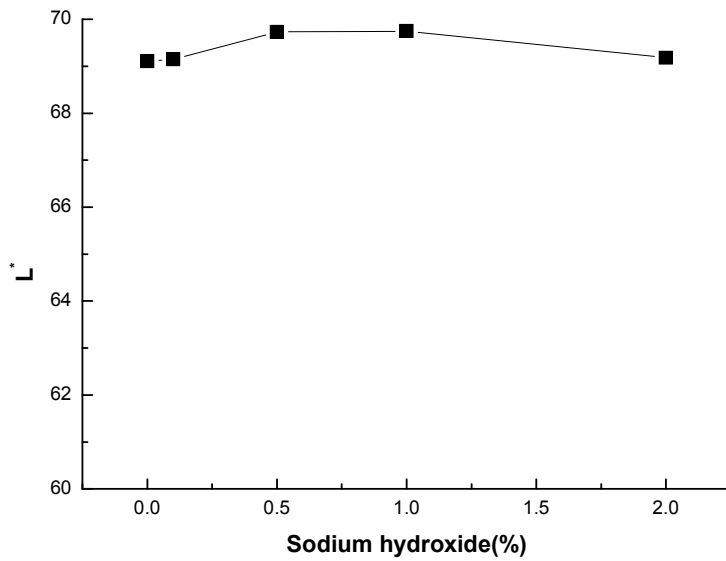


Figure 3에서 보는 바와 같이 수산화나트륨의 경우는 규산나트륨에 비해 과산화수소 활성화에 미치는 영향은 다소 적었으나, 다소나마 변색 제거의 효과가 나타났다. 따라서 수산화나트륨 0.5% 첨가시 과산화수소 활성화에 가장 적절할 것으로 판단되었다.

과산화수소 농도를 4%로, 규산나트륨의 농도를 1%로 정하고, 수산화나트륨 농도를 0.5%로 정하고, 계면활성제 농도를 0.1%, 0.5%, 1%, 2%로 변화 시켜 가면서 변색 제거 정도를 측정하였다. 그 결과는 Figure 4와 같다.

Figure 4. Change of lightness according to polyethylene glycol concentration.

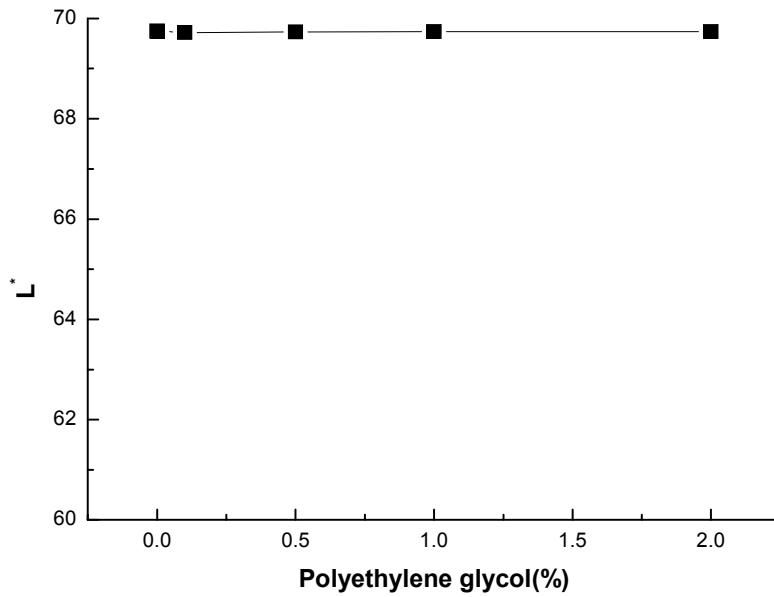
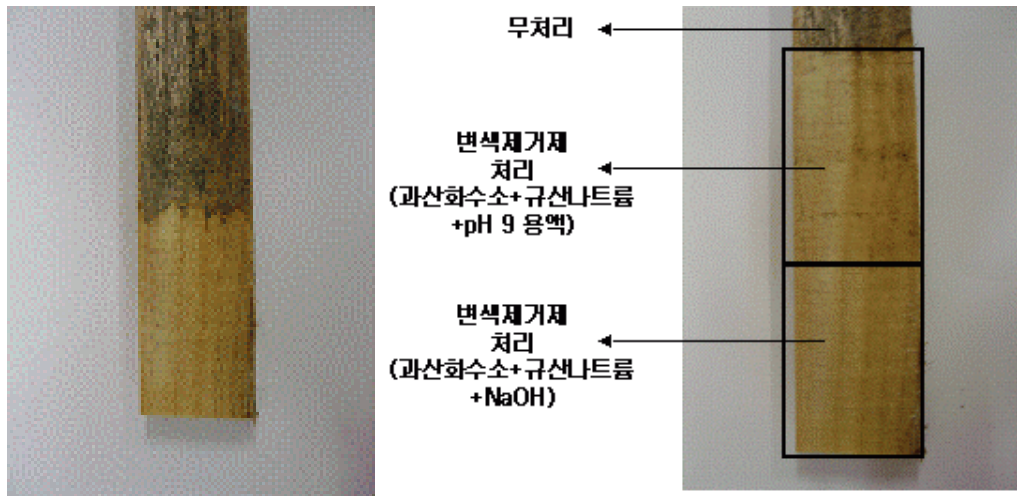


Figure 4에서 보는 바와 같이 계면활성제는 과산화수소 활성화에 미치는 영향은 없는 것으로 나타났다.

Figure 5는 인위적으로 변색시킨 소나무시편을 과산화수소를 이용하여 탈색을 시킨 결과를 보여주는데 대체적으로 매우 좋은 결과를 도출하였다. 이는 멜라닌색소에 의한 목재표면의 세포조직의 변색도 일정 깊이에 침투할 수 있는 액상인 과산화수소에 의하여 효과적인 탈색을 할 수 있어 추후 탈색제를 개발하거나 방미제에 탈색효과를 부여하기 위한 기초 자료로 매우 중대하다. 또한 과산화수소를 기본 약제로 하여 첨가하는 처리약제에 따라 탈색의 효과가 증대할 것이며 3차년도 연구의 자료로 활용될 것이다.

Figure 5. Change of lightness before/after bleaching of stained Korean pine samples using hydrogen peroxide



## 제 11 절 키토산함유 방미필름제조 및 이들의 목재변색균에 대한 방미효과

### Preparation of silver nanoparticle impregnated chitosan membrane complex and exploiting its fungicidal activity against wood staining fungi

#### 제 1 항 서 설

키토산은 매우 친환경적이며 키틴물질로부터 부분적으로 탈아세틸화되어진 비독성의 고분자물질이다. 많은 연구들이 다양한 용매를 사용하여 다양한 특성을 지닌 키토산필름을 합성하는데 심혈을 기울이고 있으며 이는 약제, 음식의 보관 및 포장, 생분해성 물질의 생산 및 분리공정 등 다양한 분야에 적용되고 있다. 키토산이란 of  $\beta$ -(1-4)-N-acetyl-D-glucosamine으로 구성된 고분자 물질로서 게, 새우, 조개 등의 주된 성분이다.

#### 제 2 항. 표면오염균 발생방지 및 탈색을 위한 목재의 처리법

이들 키토산은 매우 높은 방미활성을 보여주고 있는데 이는 키토산의 탈아세틸화의 정도, 분자량, 배지의 pH와 최적온도 등의 인자에 따라 달라진다. 비록 많은 연구자들에 의하여 키토산의 방미활성 능력이 보고되었지만 이들 키토산의 정확한 방미메카니즘에 대하여는 밝혀지지 않고 있다. 몇몇의 연구자들에 양성 전하를 가진 키토산 분자들과 음성 전하를 가진 미생물 세포막들 사이의 상호작용이 proteinaceous와 다른 세포내 구성물질들의 누출을 유도한다고 보고되었다.. 이 반응이 키틴과 비교해 키토산이 더 강한데, 그 이유는 물에서의 용해도가 키토산이 더 높기 때문이다. 그리고 키토산은 킬레이팅제로도 작용하는데, 이는 선택적으로 미량 금속들과 결합하여 독소의 발생과 미생물의 성장을 억제한다. 또한 숙주 조직(host tissue)에서 몇몇 방어 과정을 활성화시키고, water binding agent로 작용하고 다양한 효소들을 억제한다. DNA와 키토산의 결합 및 mRNA 합성의 억제는 키토산이 미생물의 핵에 침투하여 mRNA와 단백질의 합성을 방해할 때 일어난다고 보고되기도 하였다.

은이온은 세균이나 진균에 대한 높은 억제활성을 보여준다고 밝혀졌다. 이 은이온은 매우 낮은 농도에서도 높은 방미효과를 보여주는데 수은, 구리, 납, 크롬 등의 중금속에 비하여 매우 높은 방미활성을 나타낸다. Silver (I) oxide는 산소의 존재 하에서 은이온을 발생시키는데 은의 방미활성은 은의 표면활성에 기인한다. 키토산에



의한 silver (I) oxide로부터 은이온 방출은 매우 신속히 이루어진다. 낮은 농도에서 은이온은 세포벽의 침투에 의하여 세포외층을 직접적으로 침해하고 은은 DNA와 결합을 하게 되며 은과 결합된 DNA는 자기복제에 방해받게 된다. 더불어 은의 양이온에 의한 항균 및 살균 작용은 세균의 -SH, -COOH, -OH기 등과 강하게 결합하여 세균의 세포막을 파괴 혹은 세포의 기능을 교란시킨다고 알려졌으며 콜로이드 은이 촉매작용을 하여 산소가 활성산소 ( $O_2^-$ ,  $O_2^+$ ,  $O$ )로 전환되어 살균작용을 하기도 하고 다른 금속이나 일반 은과 달리 20nm이하로 나노화 되어 있는 나노은은 100-200nm의 미생물이 이를 섭취 가능하고, 섭취 시 대사 장애로 균의 생장이 억제된다.

키토산의 일반적인 활용은 주로 식품, 환경, 축산업 등에 다양하게 이루어지고 있다. 키토산은 천연 고분자 물질이 지닌 강한 흡착력의 특성을 활용하여 방사능 원소나 중금속의 제거에 사용될 수 있으며 다이옥신을 억제하는 효과가 탁월한 것으로 알려져 있다. 또한 식물의 면역성을 강화하여 성장촉진 작용을 함으로서 비료와 농약을 절감시켜 줄 수 있을 뿐만 아니라 토양에 대해서도 지력을 유지시켜주는 토양개량효과를 지니고 있다고 알려져 있다. 수술시 사용되는 봉합사, 의료용솜, 거즈, 붕대, 반창고 등의 소모품으로도 활용될 수 있으며, 인공피부나 암치료제, 항종양제, 항감염증약과 같은 고도의 의료 기술에도 사용된다.

본 연구에서는 주로 식품산업이나 환경산업, 의료산업에 주로 사용되어지는 키토산을 목재에 서식하여 목재의 가치를 하락시키는 표면오염균이나 목재변색균을 억제하고자 실험을 수행하였다. 이러한 키토산의 항균능력을 배가시키기 위하여 나노은을 첨가하여 활성나노은을 함유한 키토산필름을 제조하여 목재표면 처리제로 그 적용성을 검증하였다. 키토산필름은 글루타알데하이드 용액을 이용하여 제조하였으며 활성나노은은 필름내에 물리적으로 결합시켰으며 합성된 필름은 실험실 내에서 목재변색균에 대한 항균 활성을 측정하였다. 부가적으로 순수 키토산의 항균활성과 다양한 활성나노은의 농도에 따른 항균력도 측정하였다.

## 1. 재료 및 방법

### 가. 필름제조

키토산(M.W. 100,000, 80% deacetylation degree)는 전북대학교 섬유공학과에서 보유하고 있는 순수키토산을 사용하였다. Gluteraldehyde, Isopropanol, Hydrochloric

acid and Silver nitrate 는 시중에서 구입하였다(Sigma - Aldrich, USA). 필름을 제조하기전에 키토산은 121°C 에서 20분간 멸균과정을 거쳤다. 멸균된 키토산은 유기용매를 사용하여 film castin technique를 사용하여 준비하였으며 멸균된 키토산과 gluteraldehyde 용액은 충분히 혼합하여주고 혼합된 용액은 유리판위에 넓게 펼쳐주고 37 °C에서 48시간동안 기건하였다.

silver nitrate 입자는 각기 다른 농도(1, 2, 3 m mol L<sup>-1</sup>)로 물리적인 혼합에 의하여 키토산-글루타알데하이드 필름에 혼합되었다. 모든 silver nitrate 용액은 ph 5에 고정시켰으며 필름은 4시간동안 silver nitrate 용액과 같이 혼합시켰으며 이후에는 멸균된 증류수로 세척하였다. 그리고 상온에서 기건하였다.

#### 나. 필름의 특성

현미경에 의한 형태학적인 필름의 특성은 주사전자현미경(JSM-5200)으로 관찰하였다. 기건된 시편은 gold ion sputtering(JEOL JFC-1200 fine coater)로 골드코팅을 하였다. 이 필름의 특성은 FT-IR로서 구조적 특성을 구명하였다. FT-IR spectra는 상온에서 기록하였으며 400에서 3000cm<sup>-1</sup> region 내에서 Fourier Transform Infrared Spectroscopy (Spertrum GX, USA)를 사용하였다. 키토산알데하이드 필름의 thermal behavior는 Perkin Elmer instrument를 사용하여 측정하였다. TGA의 측정은 질소의 존재 하에 가열비율은 20분/30~800°C에서 수행하였다.

#### 다. 항균 활성

본 실험에 사용된 목재변색균은 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181)와 *Ophiostoma ips*(363176)을 선정하였으며 모든 균주들은 국제 공시균으로 영국 예전에 국제 진균 연구소(International Mycological Institute, IMI)로 불러졌던 CABI에서 분양받았다. 모든 균주들은 2% MEA 영양배지에서 4-7일 동안 사전 접종되어 25°C에서 배양되었다.

#### 라. 키토산필름의 항균력

진균 및 세균에 대한 키토산필름의 항균력을 측정하기 위하여 Inhibition zone method(IB method)를 사용하였다. 키토산필름을 작은 조각으로 나누기 위하여 멸균 증류수에 1시간동안 침지시킨 후에 작은 조각(약 6 mm diam.)으로 자르고 건조기내에서 기건시켰다. *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181)와 *Ophiostoma ips*(363176)은 2% MEA배지에 접종하였으며 접종 후에. 모든 필름시편은 각각의 균주에 대하여 3개의 다른 방향에 올려놓았다. 이 실험용 배지는 20°C 에서 7일 동안 배양하였다.

#### 마. 키토산-글루타알데하이드 필름의 항균력 평가

목재변색균의 억제비율은 키토산-질산은의 다양한 비율에 따라 방사방향 균사의 생장을 근거로 평가하였다. 9개의 각기 다른 비율(1.0 % + 1 ppm, 1.0 % + 5 ppm, 1.0 % + 10 ppm, 1.5 % + 1 ppm, 1.5 % + 5 ppm, 1.5 % + 10 ppm, 2.0 % + 1 ppm, 2.0 % + 5 ppm and 2.0 % + 10 ppm)의 키토산-질산은 용액을 사용하였다. 2% MEA배지는 위의 비율에 따라 키토산-질산은 함유배지를 제조하였고 사전에 배양되어진 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)는 실험배지위에 접종하였다. 대조구는 4개균 모두 방미제를 첨가하지 않고 순수 배양하였다. 이 실험용 배지는 20℃에서 7일 동안 배양하였고 24시간 간격으로 기록하였다.

#### 바. 통계 분석

모든 실험구는 모든 공시균에 대하여 9개의 각기 다른 농도에서 4반복을 수행하였다. 각각의 반복구에서는 매우 낮은 변이를 부여주어 항균력 표분석 (antifungal index analysis, AI)를 위하여 평균치를 산출하였다. AI값은 Zhong 등(2007)의 방법의 의거 산출하였다.

$$\text{Antifungal index (\%)} = (1 - Dt/Dc) \times 100$$

Where Dt = diameter of mycelial growth zone in test plate; Dc = diameter of mycelial growth zone in control plate. Results with significant difference  $P < 0.05$  were considered statistically.

## 2. 결과 및 고찰

### 가. 필름의 특성

각각의 다른 제조된 필름의 두께는 육안에 의하여 구별하였다. 순수 키토산필름은 키토산-글루타알데하이드 필름에 비하여 얇았으나 키토산-글루타알데하이드필름은 색상면에 있어서 검었다. 이러한 필름의 두께는 오랜 기간의 건조에 기인한다고 알려져 왔다. 얇은 필름은 검은 필름에 비해 유연성이나 투과성이 높았다. SEM에 의한 전자현미경적 필름의 영상은 잘 분산되어졌다(Fig. 2). 키토산필름의 표면에 은이온의 분산과 결합은 또한 Fig. 2에 관찰되었다. Figure 3은 순수한 키토산과 혼합키토산 필름의 FT-IR spectra를 보여주고 있다. 순수키토산필름의 특성은 아래에 보여진다(Fig. 3a): 탄수화물구조안에서 C-O-C 연결의 stretching vibration에 의해 1155, 1067, 1030과 894  $\text{cm}^{-1}$ 이 관찰되었다. 다른 밴드는 1324와 1380 $^{-1}$ 에서 C-N bond(amide III)와 메틸렌의 C-H bond의 stretching vibration를 반영하고 있다.

1600cm<sup>-1</sup>은 NH<sub>2</sub>의 흡수밴드로 사료된다. 질산은을 첨가하였을때, 1632에서 1661 cm<sup>-1</sup> 아미드피크를 보여주었고, 이는 필름 내에 은이온의 결합이 되었음을 보여준다. 이러한 변이는 키토산의 MH<sub>2</sub> 그룹과 은이온 사이의 결합에 의한 것으로 소위 유도효과라 말하여진다.

준비된 필름의 열안정성은 Thermo Gravimetric Anyalysis(Fig. 4)에 의하여 확실히 측정되었다. 순수키토산필름과 키토산-글루타알데하이드 필름의 중량감소율은 이 두 단계에서 보여진다. 처음 단계에서는 50-350 °C에서 중량감소가 이루어졌으며 350 °C에서 50% 이상의 높은 중량감소율을 보였다. 이러한 중량의 감소는 흡수되거나 결합된 수분의 중량에 기인한다고 볼 수 있다. 두번째 중량감소율은 400-650°C에서 관찰되는데 이는 키토산의 분해에 기인한다고 볼 수 있다. 순수키토산에 비하여 키토산-글루타알데하이드 필름의 중량감소율이 낮았다. 키토산-글루타알데하이드 필름은 650°C에서 60.4%의 중량감소를 보였다. 이는 키토산-글루타알데하이드 필름의 고온에서의 열안정성을 보여주고 있다.

#### 나. 키토산-글루타알데하이드 필름의 항균력 측정

목재는 매우 다양한 종류의 진균류에 의하여 쉽게 침해를 받게 되는데 목재부후균과 목재변색균으로 대별되고 있다. 목재변색은 일명 목재 표면을 오염시키거나 변재를 변색시키는 진균류의 멜라닌 색소의 발현에 의하여 일어나게 된다. 이는 주로 방사유조직이나 세포내강에서 발생한다. 목재는 변색균에 의하여 물리적인 침해는 받지 않으나 목재의 원래 색상에 심각한 피해를 받고 있다.

*Ophiostoma* 속에 많은 균들은 대표적인 변색균으로 대별되고 있다. 많은 연구자들은 화학적, 생물학적 혹은 천연물질을 이용하여 이들 변색균을 조절하고자 시도하였다. 키토산은 주로 식품산업이나 연관산업에서 균의 조절물질로 널리 사용되고 있다. 이들의 항균력은 Figure 5에 볼 수 있다. 키토산-글루타알데하이드 필름에 끼워 넣어진 키토산-글루타알데하이드-은이온 필름은 *Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176) 등의 목재변색균에 대하여 매우 높은 항균력을 보여주고 있다. *Ophiostoma polonicum* 과 *O. flexuosum*은 *O. ips*와 *O. etropii*보다 키토산-글루타알데하이드-은이온 필름에 더욱 민감한 결과를 보여주었다. 본 실험에서 키토산필름의 항균력은 주로 키토산의 농도와 pH에 기인한다. 키토산에 대한 연구는 Ma (2008) 등에 의하여 연구가 수행되어져 왔다. He 등(2006)는 키토산용액내에서 은이온의 항균력을 보고하였다. 따라서 본 실험에서는 이전의 연구결과를 바탕으로 키토산의 농도와 pH를 정하였다. Figure 5에서 볼 수 있듯이 필름의 항균력은 은이온의 농도가 증가할수록 높았다. 그러나 키토산의 항균력은 실험 균주에 따라 매우 상이하게 나타났으며 이는 많은 연구에서도 같은 결과를 보여주었다. 더우기 본 실험에서는 순수키토산의 항균력은 매우 낮은 것으로 나타났다. 이는 키토산 이온과 균사의 세포벽에 존재하는 음이온 사이에서 낮은 반감을 보여주기 때문이다.

본 실험에 의하면 키토산용액의 항균력은 키토산필름에 비하여 높은 항균력을 보여주고 있다. 키토산의 IB method에 의한 항균력 측정에 의하면 은이온의 증가에 따라 키토산필름의 항균력이 증가하는 것을 볼 수 있다. 결과적으로 은이온이 항균력의 활성화에 깊이 관여함을 볼 수 있다.  $Ag^+$ 의 항균력은 많은 연구보고가 있었으며 목재방부제에서  $Ag^+$ 의 잠재적 역할은 Dorau 등(2004)에 의하여 연구가 되었다. 은이온은 매우 낮은 농도에서도 높은 방미효과를 보여주는데 수은, 구리, 납, 크롬 등의 중금속에 비하여 매우 높은 방미활성을 나타낸다. Silver (I) oxide는 산소의 존재 하에서 은이온을 발생시키는데 은의 방미활성은 은의 표면활성에 기인한다. 키토산에 의한 silver (I) oxide로부터 은이온 방출은 매우 신속히 이루어진다. 낮은 농도에서 은이온은 세포벽의 침투에 의하여 세포외층을 직접적으로 침해하고 은은 DNA와 결합을 하게 되며 은과 결합된 DNA는 자기복제에 방해받게 된다. 더불어 은의 양이온에 의한 항균 및 살균 작용은 세균의  $-SH$ ,  $-COOH$ ,  $-OH$ 기 등과 강하게 결합하여 세균의 세포막을 파괴 혹은 세포의 기능을 교란시킨다고 알려졌으며 콜로이드 은이 촉매작용을 하여 산소가 활성산소 ( $O_2^-$ ,  $O_2^+$ ,  $O$ )로 전환되어 살균작용을 하기도 하고 다른 금속이나 일반 은과 달리 20nm이하로 나노화 되어 있는 나노은은 100-200nm의 미생물이 이를 섭취 가능하고, 섭취 시 대사 장애로 균의 생장이 억제된다.

은이온의 농도에 의하여 항균력의 차이가 심한 것으로 보아 항균력의 활성화에 은이온이 깊이 연관되어 있다. 항균력은 은이온(1 mmol ~ 3 mmol)의 농도증가에 따라 항균력도 증가하였다. 이러한 항균력은 1~2 mmol까지는 그다지 높은 항균력의 차이를 보여주지 않았으나 3mmol 은이온이 첨가되었을 경우 매우 높은 목재변색균에 대하여 항균력을 보여주었다. 각기 다른 농도에 따른 항균력의 측정은 은이온의 항균연관성을 구명하는데 높이 활용되었다.

본 실험에서는 키토산필름은 은이온의 carrier역할을 하며 은이온은 키토산필름에 쉽게 첨가되며 이 키토산-글루타알데하이드-은이온 필름은 매우 높은 항균력을 보여주었다.

#### 다. 항균력 측정

*Ophiostoma flexuosum*(63175), *Ophiostoma tetropii*(363182), *Ophiostoma polonicum*(363181))와 *Ophiostoma ips*(363176)의 균사생장은 키토산-은이온이 함유된 영양배지에서 생장이 감소하였다. 9개의 각기 다른 키토산-은이온 용액의 농도를 첨가하였을 때 1.5~2.0%의 키토산-은이온 용액은 거의 | 비슷한 균사 성장억제력을 보여주었으나 1.0% 첨가시 보다는 높은 균사 성장억제율을 보여주었다. *Ophiostoma tetropii*는 키토산-은이온의 모든 농도에서 가장 높은 민감성을 보여주었으며 약 36!38%의 균사 성장억제율을 보여주었다. 10 ppm의 은이온을 첨가한 1.0% 키토산용액은 *Ophiostoma flexuosum*에 대하여 높은 항균력을 보여주었으며 당 농도에서는

33%의 군사 생장억제율을 보여주었다. 본 결과는 낮은 농도의 키토산이 높은 농도의 키토산보다 높은 항균력을 보여주었다. *Ophiostoma polonicum*의 군사 생장억제율은 10ppm의 은나노를 첨가한 1.0, 1.5, 2.0% 키토산 용액에서 각각 24, 29, 32%의 억제율을 보여주었다. 본 실험의 결과는 은이온과 키토산이 공조하여 항균력의 활성을 보여주었다. 많은 연구가 항균력과 키토산과의 관계를 발표하였으나 주된 키토산과 은이온에 의한 항균 메카니즘은 세포막, 단백질, DNA에 대한 키토산의 연관성이다.

순수한 키토산은 키토산-은이온 복합체에 비하여 항균력이 낮았다. 몇몇의 진균류는 순수한 키토산에 대하여 높은 저항성을 보여주는데 이는 군사자체내에 키토산을 함유한 연유이다. 본 연구에서는 목재에서 서식하는 진균류는 순수한 키토산에 대하여 높은 저항성을 보여주나 키토산 용액에 여타의 항균제인 은이나 zinc, thiourea 등을 첨가하였을 때 매우 높은 항균력을 보여주며 많은 종류의 박테리아에 항균력을 보여주고 있다.

### 3. 결론

1. 키토산-은나노 필름과 용액은 목재변색균에 대하여 높은 잠재적 항균력을 보유하고 있다.
2. 키토산-은나노 용액은 실험에서 최소의 용액에서도 항균력을 보여주었다.
3. 키토산필름은 목재방부제 생산에 있어서 좋은 활성 은나노의 carrier가 될 수 있다.
4. 은이온을 함유한 키토산 필름은 목재방부제로서 활용될 수 있다.
5. 본 연구는 in vitro 연구에서 키토산-은나노 필름의 항균력에 관한 심도깊은 연구를 제공하였다.

Figure 1. Chemical structure of chitosan (a), and gluteraldehyde (b)

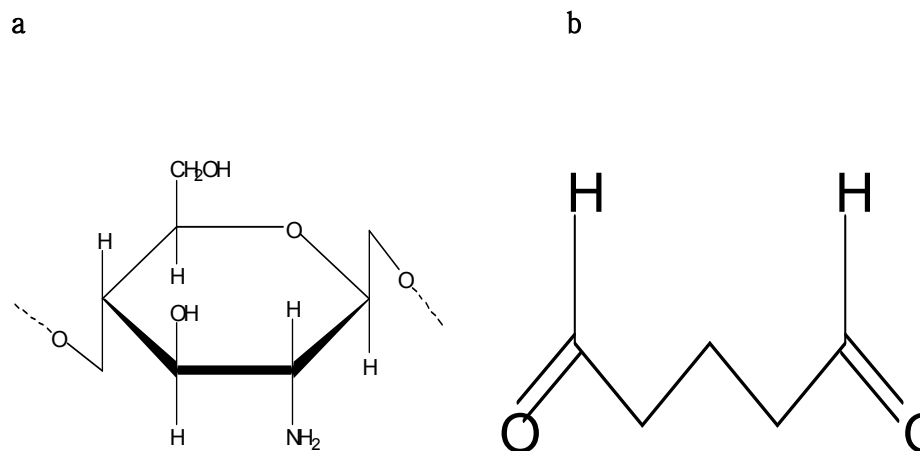
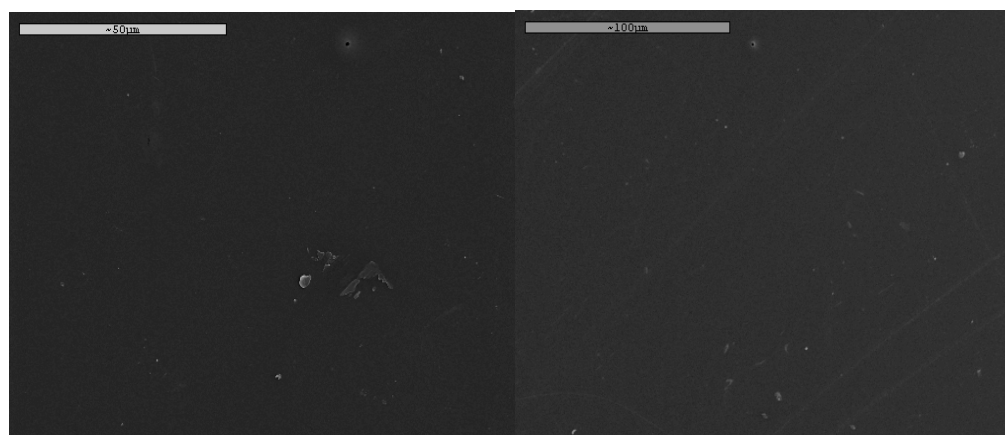


Figure 2. Scanning Electron Microscopy images of surface of Chitosan membranes. Chitosan membrane (a), Chitosan - Gluteraldehyde membrane (b), Chi-Glu-1mM Ag<sup>+</sup> (c), Higher magnification of Chi-Glu-1mM Ag<sup>+</sup> (d), Chi-Glu-2mM Ag<sup>+</sup> ~ Bar 10  $\mu\text{m}$  (e), Higher magnification of Chi-Glu-2mM Ag<sup>+</sup> ~ Bar 5  $\mu\text{m}$  (f), Chi-Glu-3mM Ag<sup>+</sup> ~ Bar 10  $\mu\text{m}$  (g), Higher magnification of Chi-Glu-3mM Ag<sup>+</sup> ~ Bar 5  $\mu\text{m}$  (h),



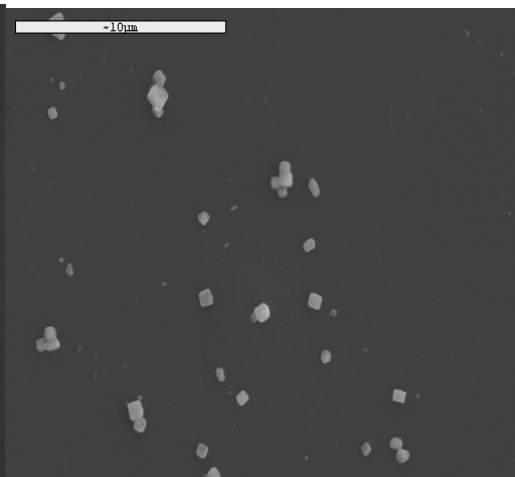
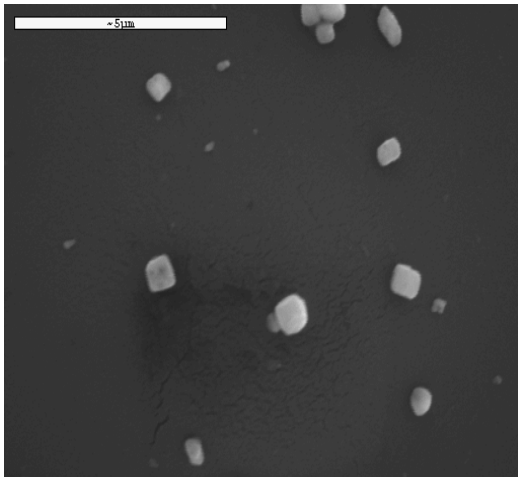
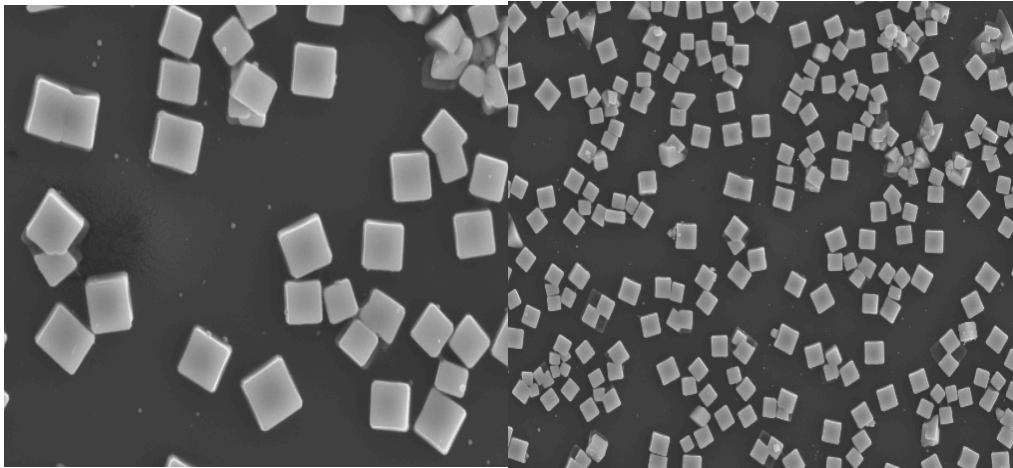
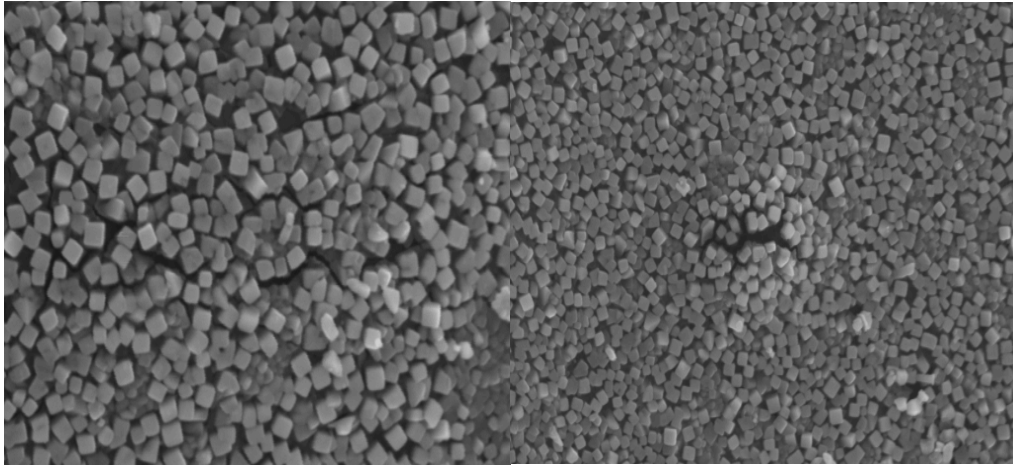




Figure 3. FT-IR of Chitosan membrane (a), and chi-glu and chi-glu-Ag + membranes (b)

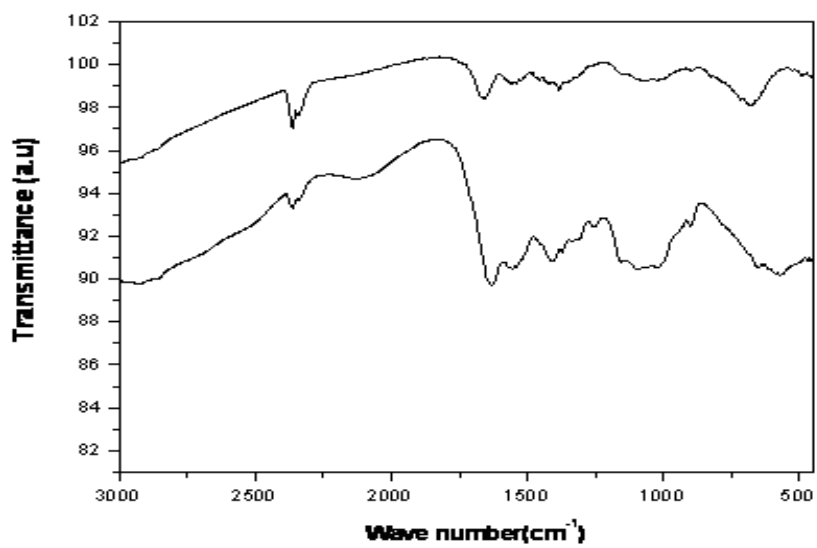
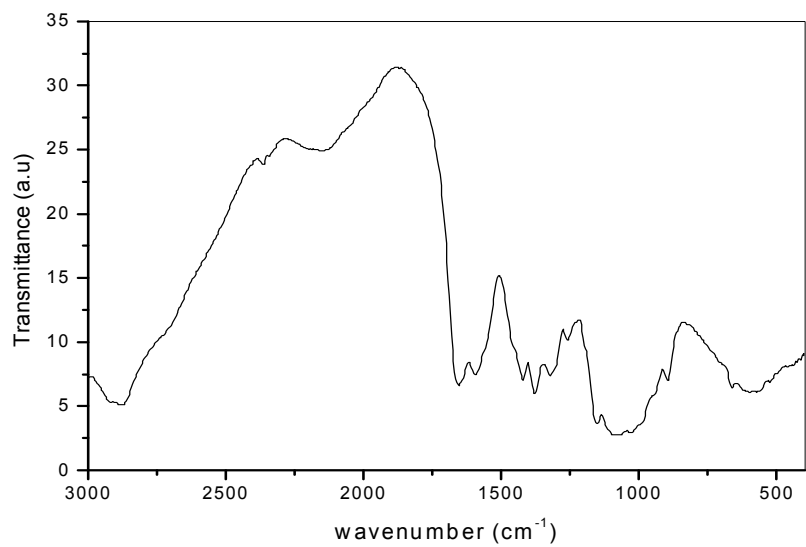


Figure 4. Thermogravimetric analysis of Chitosan and Chitosan–Gluderaldehyde membranes

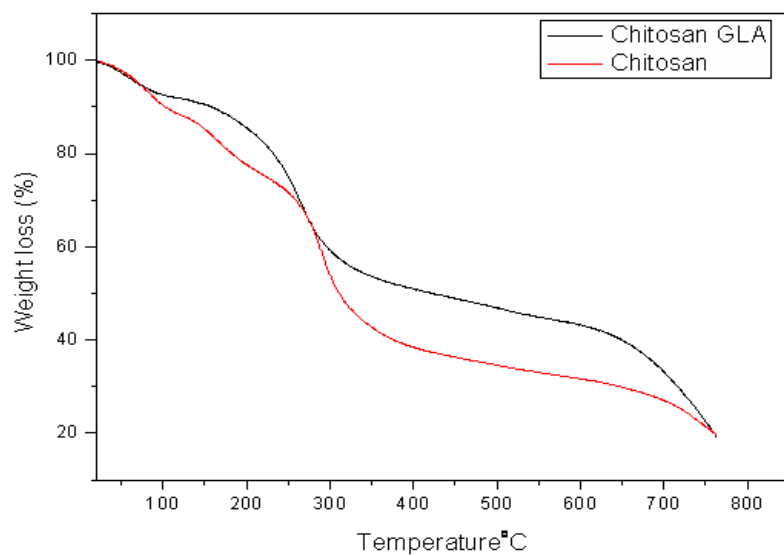


Figure 5. Photographs of the antifungal test results of chitosan–glutaldehyde membranes with different concentrations of Silver ions: a, *Ophiostoma tetropii* b, *Ophiostoma ips* c, *Ophiostoma polonicum* d. *Ophiostoma flexuosum*

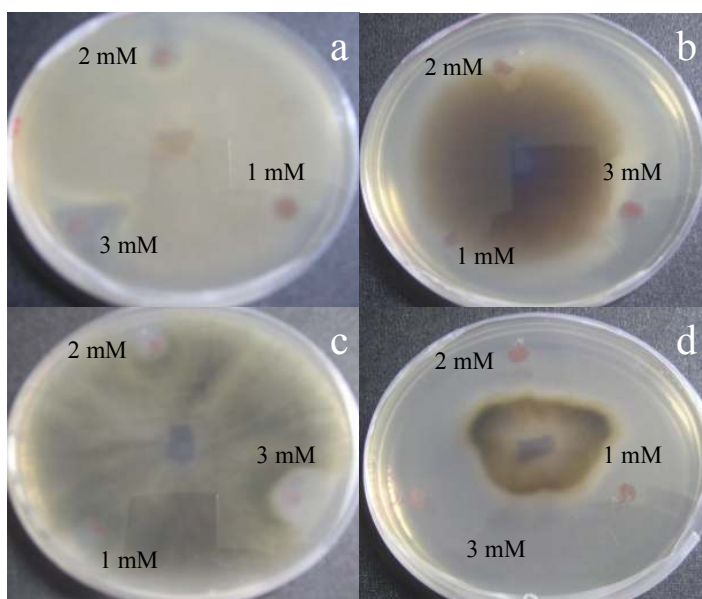


Figure 6. Mycelial growths of *O. ips* on 2 % MEA with supplement of different concentrations of Chitosan with different concentrations of Ag

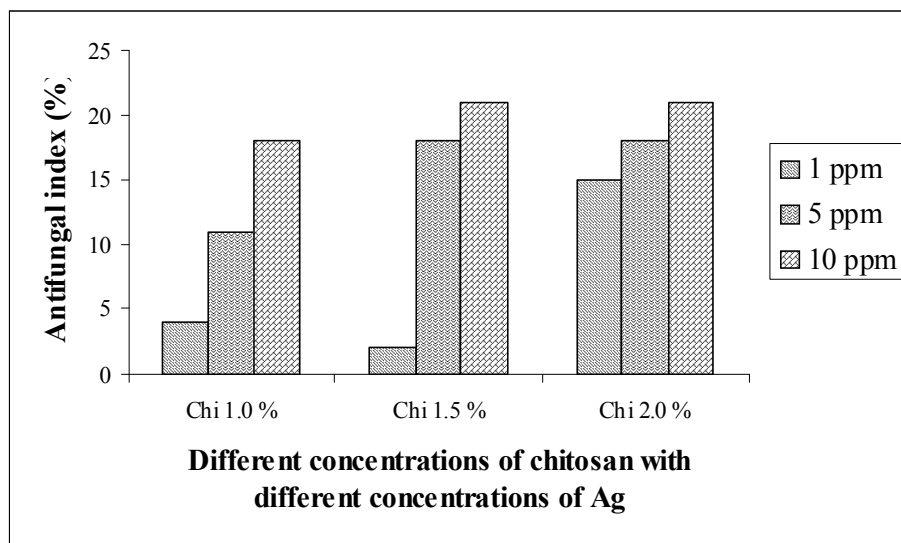


Figure 7. Mycelial growths of *O. flexuosum* on 2 % MEA with supplement of different concentrations of Chitosan with different concentrations of Ag

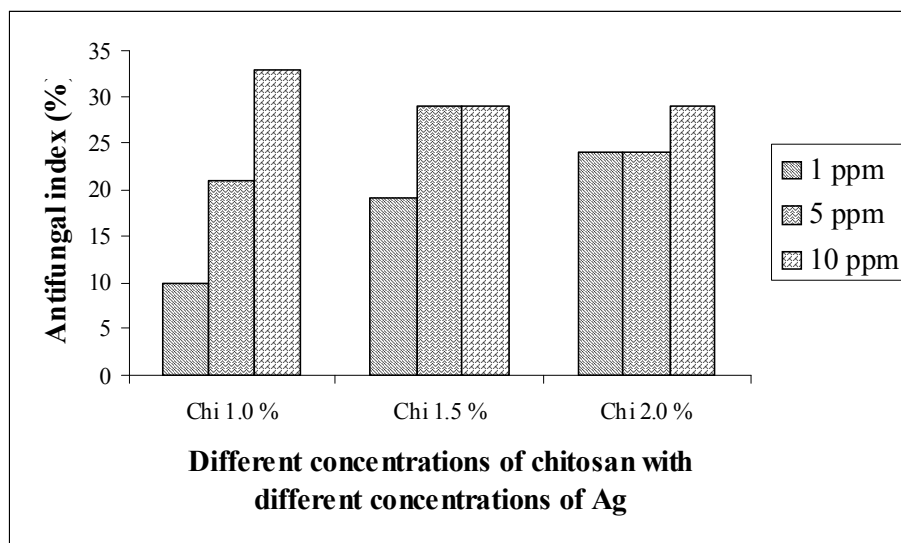


Figure 8. Mycelial growths of *O. polonicum* on 2 % MEA with supplement of different concentrations of Chitosan with different concentrations of Ag

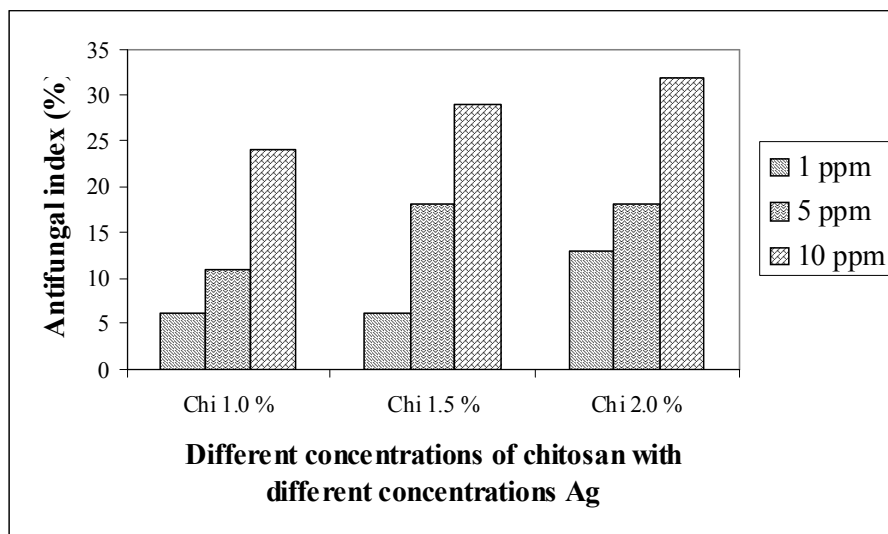


Figure 9. Mycelial growths of *O. tetropii* on 2 % MEA with supplement of different concentrations of Chitosan with different concentrations of Ag

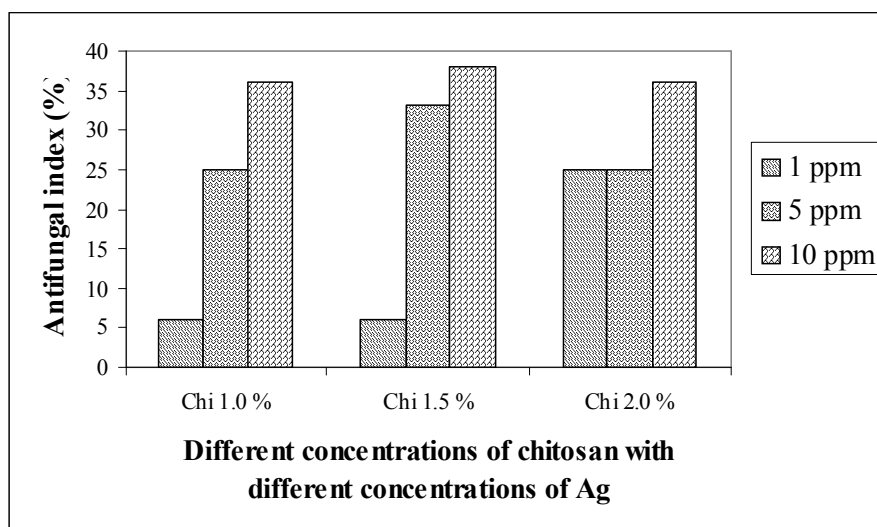


Table 1. Thermostability of Chitosan and Chitosan–Gluteraldehyde membrane

Temperature (°C)	Chitosan membrane weight loss (%)	Chitosan–Gluteraldehyde membrane weight loss (%)
100	10.14	7.12
200	22.54	13.77
250	27.99	25.26
400	62.19	49.5
650	70.08	60.37

## 제 12 절 중요 변색균의 분자생물학적 분류체계 및 신속 진단법 개발

### Molecular systematic classification of wood staining fungi and their rapid detection method

#### 제 1 항 서 설

목재의 주요 변색균의 일종인 *Ophiostoma* sp.에 대한 신속정확한 진단법 개발을 위하여 조기 진단용 PCR 프라이머의 경우 ITS-1 및 ITS-4 프라이머에 IMR 프라이머(5'-GTTTCGGTACTGCGCTCGGA-3')을 혼합하여 multiple-PCR 할 경우에 *Ophiostoma* sp.만을 증폭할 수 있다. 또한 여러 제한효소를 이용하여 ITS부위 유전자에 대한 염기서열 분석 결과 *Hha* I, *Hpa* II 및 *Mbo* I 제한효소에서 *Ophiostoma* sp. 균주들의 유연관계를 분석할 수 있었다. 염기서열분석결과에서는 사용한 균주들은 6계통으로 분류되었으며, 이 중 Opi-363175균주는 비교한 균주들과 유연관계가 적게 나타나 *Ophiostoma* sp. 균의 새로운 계통으로 밝혀졌다. Opi-349579균주는 *Ophiostoma stenoceras* sp.에 속하여 있었으며, Opi-363176균주의 경우에는 *Ophiostoma ips* strain KUC2(Genebank accession no. AY172021)균주와 99%이상의 유의성을 보였으며, 다음으로는 *Ophiostoma ips* strain KMW9(Genebank accession no. AY546698)과 98%이상의 유의성을 나타냈고, *Ophiostoma puninisporum* (Genebank accession no. AY546713)균주와는 96%의 유의성을 보였다. Opi-363180균주와 Opi-200385균주의 경우에는 같은 계통으로 분석되었는데 이들 간의 유의성은 98% 이상으로 높게 나타났으며, 또한 *Ophiostoma querci* CMW7658 (Genebank accession no. AF493251), *Ophiostoma querci* CMW7645 (Genebank accession no. AF493246), *Ophiostoma quercus* (Genebank accession no. EF429089), 및 *Ophiostoma querci* (Genebank accession no. AJ293883)균주들과 98% 이상의 유의성을 보여 같은 계통의 분류군으로 나타났다. Opi-363182균주의 계통은 *Ophiostoma tetropii* (Genebank accession no. AY934524) 균주의 99% 이상의 유의성을 보여 같은 계통으로 분류되었으며, Opi-363179균주는 *Ophiostoma piceae* CMW7646(Genebank accession no. AF493247) 균주와 99% 이상의 제일 높은 유의성을 보였으며, *Ophiostoma brevisculum*의 계통이나 (Genebank accession no. AB200420 및 AB200421), *Ophiostoma piceae*의 계통 (Genebank accession no. AF493240 및 AF493245)이나, 또는 *Ophiostoma*

*canum*(Genebank accession no. AJ538342)의 계통들과 98% 이상의 높은 유의성을 보여 같은 계통으로 분류되었다.

## 제 2 항 주요 변색균의 분자생물학적 분류체계 및 신속진단법 개발

### 1. 서론

목재변색의 주요 원인은 변색곰팡이 (stain fungi)에 의하여 나타나며, 주로 변재부위의 유세포에서 자라는 균의 채색 균사에 의하여 발생하며, 크게 Ascomycotina나 Deuteromycotina에 속하여 있다. Ophiostomatoid fungi에 속하는 *Ophiostoma*, *Ceratocystis*, *Leptographium*, *Graphium*등은 변재부위에 변색을 유발하여 목재의 변색을 유발시킨다.

*Ophiostoma*속에 관한 연구는 변색균과 목재의 화학적 성분에 관한 연구, 부후균의 목재내 침입경로, 부후균에 저항성인 성분 구명, 부후균이 분비하는 효소에 의한 목재성분등에 관한 연구, 새로운 변색균의 분리 및 동정, 변색균의 대사적 작용에 관한 연구들이 주로 이루어져 왔다. 또한 변색균의 분류는 주로 형태학적, 생리학적으로 분류하여 왔으나, 최근에는 PCR 기법을 응용한 신속 정확한 부후균 조기 진단법 및 분자학적 분류법이 활발한 연구가 진행되어 분자학적 분류가 이루어지고 있다.

*Ophiostoma*, *aureobasidium*, *Ceratocystis*, *Leptographium*속들의 small subunit ribosomal DNA (SSrDNA)유전자 부위에 대한 PCR-RFLP법에 의하여 분류를 하였으며(Kim et al, 1999), 이후 *ophiostoma* 속에 대하여 ITS 유전자의 분석에 의한 분류연구가 활발하게 이루어지게 되었으며, PCR-RFLP, 염기서열 분석 등의 결과에 의하여 *ophiostoma*속에 대한 계통분류가 정립되어 가고 있다.

본 연구에서는 *ophiostoma*속에 속하는 균주들에 대하여 조기진단 가능한 PCR 프라이머의 제작과, 또한 PCR-RFLP법을 이용한 분자학적 유연관계 분석 및 염기서열분석을 통한 분자학적 분류체계를 정립하는 기초자료를 제공하고자 한다.

### 2. 재료 및 방법

본 연구에 사용된 *ophiostoma* spp.류 균주들은 2006년부터 2007년에 걸쳐 국내에서 채집하여 분리한 균주를 사용하였으며, ITS 부위의 염기서열 비교를 위하여 NCBI 및 DDBJ genebank에 등록된 *ophiostoma* spp.의 유전정보를 이용하였다. 각 균주에 대한 자세한 설명은 Table 1.과 같다.

#### 가. 균사체 분리 및 배양

균사체의 분리는 *Ophiostoma* spp.류에 속하는 자실체를 75% 에탄올에 약 10초간 표본을 소독한 후 5% 차아염소산으로 표면을 살균하였다. 살균된 균주는 멸균 증류수로 3번 세척한 후 수분을 제거하고 PDA(Potato Dextrose Agar)배지에서 계대배양하면서 순수 분리하였다. 배양조건은 25°C에서 14일에서 21일간 배양하였으며, 전체 DNA를 추출하기 위하여 균사배양은 배지 상에서 균사체의 직경이 5cm 이상 되었을 때 균사 조직을 약 0.5cm 크기로 잘라내어 표면에 멸균된 셀로판지를 깔아 놓은 MEA 배지에 접종하여 7일간 배양하였다.

#### 나. Total genomic DNA 분리

각각의 *ophiostoma* spp.류 균주들은 Potato-Dextrose Agar (PDA; 0.4% potato extract, 2% dextrose, 1.5% agar)배지에서 충분히 배양한 후 배양균주 선단부분의 균을 Potato-Dextrose Broth(PDB; 0.4% potato starch, 2% dextrose) 액체배지에 옮겨 1달 이상 배양한 후 mycelia가 플라스크에 가득 자라면 dehydration 시킨 후 -20°C에 보관하면서 DNA추출에 사용하였다.

전체 DNA추출은 Graham(1994)의 방법을 약간 수정하여 사용하였으며 냉동 건조시킨 0.5g의 균사체를 액체 질소에 넣고 곱게 마쇄한 다음 CTAB 추출용액 (2.5 M NaCl, 0.25 M EDTA, 0.5 M Tris-HCl (pH8.0), 0.5% polyvinylpyrrolidone-10, 1% hexadecyl trimethyl ammonium bromide) 3 ml와 2-mecaptoethanol 6  $\mu$ l를 첨가하여 다시 마쇄한 후, 현탁액을 1.5 ml tube에 넣어 65°C에서 45분간 반응시키고, 1,200 $\times$ g에서 5분간 원심분리 시켰다. 원심분리하여 얻어진 상층액에 같은 양의 phenol:chloroform: isoamylalcohol (25:24:1)을 넣어 잘 섞고, 다시 1,200 $\times$ g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상층액의 70%에 해당하는 양의 isopropanol을 넣어 -20°C에서 12시간 정도 침강시킨 후, 1,200 $\times$ g에서 10분간 원심분리하여 얻어진 pellet에 70% ethanol 1 ml를 넣어 1회 세척하고 충분히 건조시킨 다음 pellet을 멸균증류수 150  $\mu$ l에 녹여 DNA 농도를 측정하였다. 전체 DNA는 -80°C에 보관사용하였다.



Table 1. The list of species and Genebank accession number of *Ophiostoma* taxa and its allies used in this study.

	Species or Accession	Strains	Geographical
1	Opi-200385	<i>Ophiostoma</i> spp.	Korea
2	Opi-349579	"	"
3	Opi-363175	"	"
4	Opi-363176	"	"
5	Opi-363179	"	"
6	Opi-363180	"	"
7	Opi-363182	"	"
8	AF493246	<i>Ophiostoma querci</i> CMW7645	
9	EF429089	<i>Ophiostoma quercus</i> isolate	
10	AF484460	<i>Ophiostoma stenoceras</i> strain	
11	AF484458	<i>Ophiostoma stenoceras</i> strain	
12	AB122053	<i>Ophiostoma stenoceras</i> qene	
13	AJ538342	<i>Ophiostoma canum</i> 18S rRNA	
14	AB200420	<i>Ophiostoma breviusculum</i> gene	
15	AF493245	<i>Ophiostoma piceae</i> CMW7644	
16	AY172021	<i>Ophiostoma ips</i> strain KUC2	
17	AY546698	<i>Ophiostoma ips</i> strain CMW9	
18	AY546713	<i>Ophiostoma pulvinisporums</i>	
19	AF493247	<i>Ophiostoma piceae</i> CMW7646	
20	AF493240	<i>Ophiostoma piceae</i> CMW2468	
21	AF493251	<i>Ophiostoma querci</i> CMW7658	
22	AJ293883	<i>Ophiostoma querci</i> 18S rRNA	
23	AY934524	<i>Ophiostoma tetropii</i> strain	
24	AB200421	<i>Ophiostoma breviusculum</i> gene	

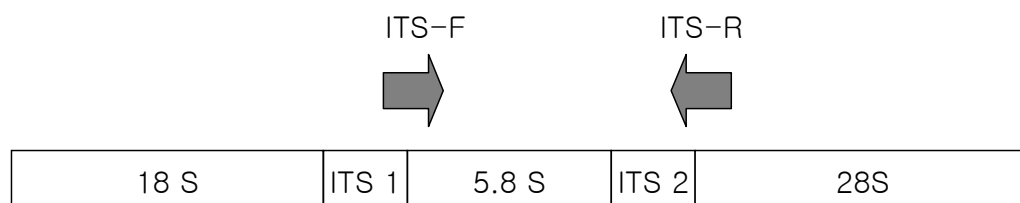
다. Primer and PCR

*Ophiostoma* spp.류 균주의 ITS영역을 증폭하기 위하여 White등(1990)에 의해 보고된 ITS 영역 증폭 primer인 ITS 1(forward primer): 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3'과 ITS 4(reverse primer): 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'을 사용하여 PCR를 실시하였다(Fig 1). PCR 조건은 50-100 ng/μl total DNA, 1× PCR buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH8.3), 2.0 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM forward primer, 0.5 mM reverse primer, 각 200 μM 썩의 dNTPs, 1U AmpliTaq Gold DNA polymerase (Perkin-Elmer)를 넣고, 최종 volume을 멸균 증류수로 30 μl가 되게 맞추었다.

반응 조건은 먼저 denaturation을 95°C에서 10분간 행한 후, denaturation을 94°C에서 30초, annealing 58°C에서 30초, extension은 72°C에서 1분으로 35회 반응시킨 후 마지막 extension은 10분간 하였으며, 각 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동을 하고, ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 DNA band를 확인하였다.

Figure 1. Structure of rRNA gene cluster of higher fungi and primer design for PCR amplification and sequencing of ITS region used in this study.

ITS 1 (forward primer):5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGC-3'(19mer), ITS 4 (reverse primer):5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'(20mer).



라. *Ophiostoma* 종의 특이적 PCR primer의 제작

*Ophiostoma*의 특이적 primer 선발을 위하여 선발된 균주의 ITS 부위의 염기서열을 기초로 하여 alignment하였다. Alignment를 위하여 사용한 프로그램은 DNAsis Max 2.7 및 ChromasPro 1.34 version를 이용하였다(Table 2).

마. RFLP 분석

증폭된 PCR 산물의 RFLP 분석을 위하여 제한효소 *Hha* I, *Hpa* II, *Hind* III, *Mse* I 및 *Mbo* I등을 이용하였다. 각 각의 제한효소 5 unit에 PCR 산물 5 μl를 혼합하

여 최종 부피를 10  $\mu$ l로 한 다음 37°C 항온수조에서 2시간 반응한 후 8% polyacrylamide gel을 이용하여 150V에서 2시간 전기영동을 하고, ethidium bromide 로 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 다형성을 조사하였다.

Table 2. The list of Genbank accession number of *Ophiostoma* spp. and *trichoderma* spp. taxa. for select of specific primer pairs.

곰팡이 DNA	Blast 검색 결과
144601-2-ITS1	<i>Ceratocystis major</i> strain CBS 138.34
363176-3-ITS1	<i>Ophiostoma ips</i> strain KUC2120
363176-6-ITS1	<i>Ophiostoma brevisculum</i> genes
363179-7-ITS4	<i>Ophiostoma piceae</i> CMW7646
363180-8-ITS4	<i>Ophiostoma querci</i> CMW7658
363181-9-ITS4	<i>Trichoderma atroviride</i>
349579-11-ITS4	<i>Ophiostoma narcissi</i> strain IMI3495
363182-10-ITS4	<i>Ophiostoma tetropii</i> strain CBS428

#### 바. Cloning 및 sequencing

PCR로 증폭된 rDNA ITS 영역의 염기서열을 조사하기 위해서 먼저 이들 유전자 단편을 pGEM-T vector system(promega Co.)을 이용해 재조합하였다. 염기서열을 결정하기 위해서 Sanger(1977) 등의 dideoxy chain termination method를 응용한 T7 Sequencing Kit(Pharmacia Biotech)를 사용하였다.

#### 사. 염기서열을 이용한 유연관계 분석 및 염기서열 등록

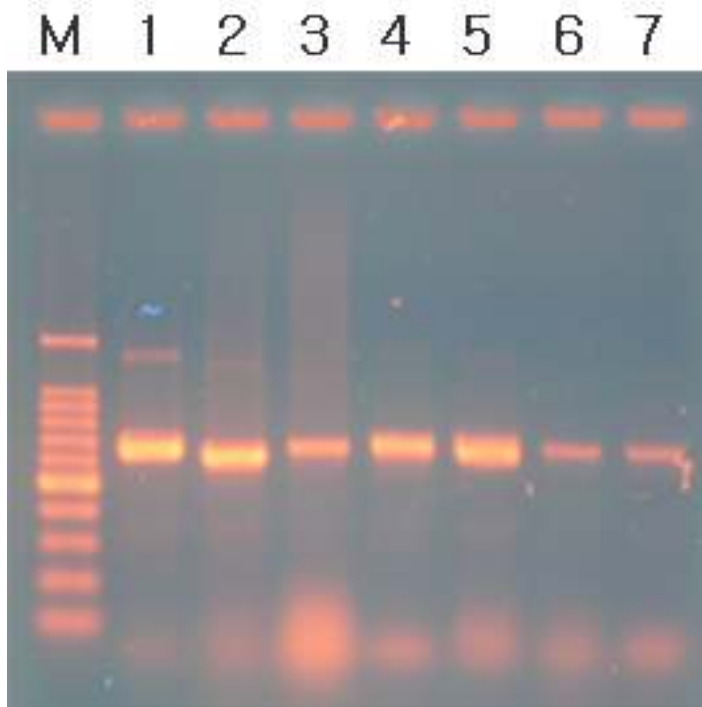
계통 분류도 작성을 위해 이용된 rDNA ITS 부위의 염기서열은 Clustal W 프로그램을 이용하여 정렬(alignment)시킨 후 수작업으로 보정하였다. 계통분류도는 DNASIS ver 2.0, DNA TYX ver 4.0 및 GeneBank Clustal W을 이용하여 작성하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 가. PCR 증폭

사용한 *ophiostoma* 7균주에 대하여 ITS 1 및 ITS 4 프라이머를 이용하여 증폭한 결과 모두의 균주에서 약 600~700 bp 크기의 PCR 산물을 획득하였다(Fig 2). Lane 2 및 6의 경우에는 다른 균주들에서 보였던 PCR 크기보다 약간 작은 크기를 가지고 있는 것이 특징적이었다.

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of PCR-amplified ITS gene of rDNA from genomic DNA of *Ophiostoma* spp. The source of target DNA is given above each lane. Samples designations are as listed in Table 1.



#### 나. RFLP 분석

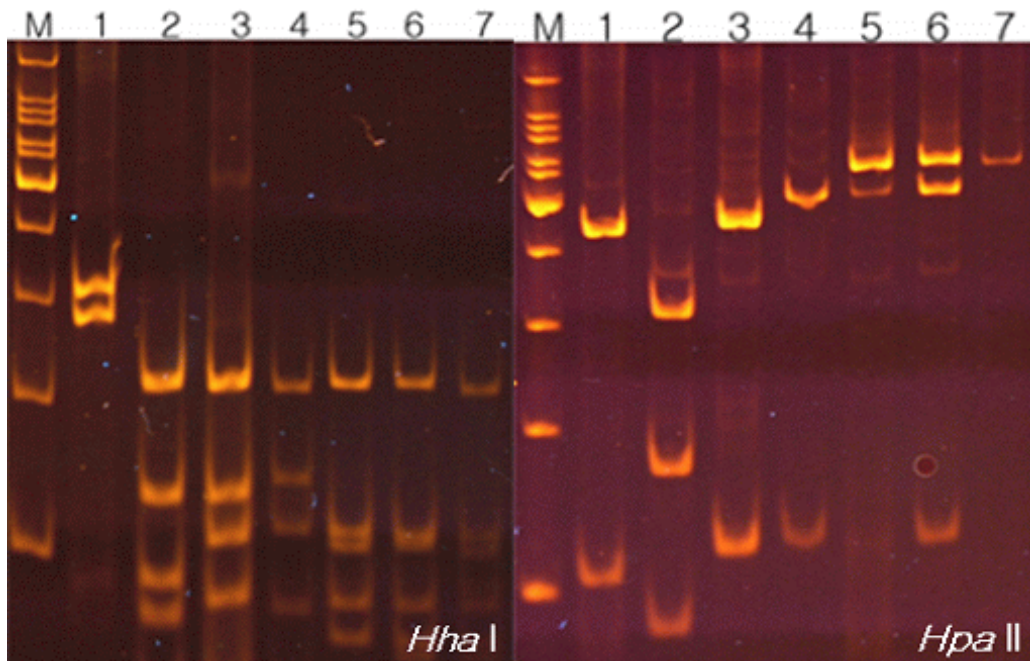
PCR에 의하여 증폭된 ITS 1 및 ITS 2 유전자를 제한효소 *Hha* I, *Hpa* II, *Hind* III, *Mse* I, *Mbo* I 등의 5가지 제한효소를 이용하여 PCR-RFLP 분석하여 다양한 밴드

패턴을 얻을 수 있었다.

*Hpa* I 제한효소를 사용하여 RFLP 분석 결과에서는 Opi-363179, Opi-363180 및 Opi-63182균주가 같은 밴드패턴을 보였으며, Opi-363175, Opi-363176균주가 같은 밴드패턴을 보였고, Opi-200385 및 Opi-349579균주가 각각 독립된 밴드패턴을 보였다. (Fig 3). *Hpa* II 제한효소의 경우에는 Opi-349579균주는 다른 *ophiostoma sp.* 균주들과 뚜렷이 구별되었고, 또한 Opi-363182 균주도 다른 균주들과 뚜렷한 밴드차이를 보였다. Opi-363179 및 Opi-363180균주는 같은 밴드패턴을 보였으며, 다른 균주들 간에는 약간의 밴드 다양성을 나타냈다(Fig 3).

*Hind* III 제한효소를 사용한 경우에는 Opi-200385균주를 제외한 다른 균주에서 동일한 단일밴드패턴을 보였으며, Opi-200385균주는 다른 균주들과 뚜렷한 밴드차이를 보였다. *Mse* I 제한효소를 사용한 경우에서도 Opi-200385균주에서 약간 낮은 위치에서 밴드가 나타났을 뿐 다른 균주들과는 뚜렷한 밴드차이가 없었다(Fig 4).

Figure 3. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Hha* I and *Hpa* II digest of ITS 1 and ITS 2 gene amplified by PCR using a primer pair ITS 1/ITS 4 M, 100 bp DNA marker. The source of target DNA is given above each lane. Samples designations are as listed in Table 1.



*Mbo* I 제한효소의 경우에도는 Opi-200385균주의 경우 다른 균주들과 뚜렷한 밴드 패턴을 보였으며, Opi-349579, Opi-363179 및 Opi-363180균주들이 같은 밴드패턴을 보였고, Opi-349579 및 Opi-363176균주간에 약간의 차이가 있는 밴드패턴을 보였으며, Opi-363182의 경우에는 다른 균주들과 뚜렷한 차이를 발견할 수 있었다(Fig 5).

Figure 4. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Hind* III and *Mse* I digest of ITS 1 and ITS 2 gene amplified by PCR using a primer pair ITS 1/ITS 4 M, 100 bp DNA marker. The source of target DNA is given above each lane. Samples designations are as listed in Table 1.

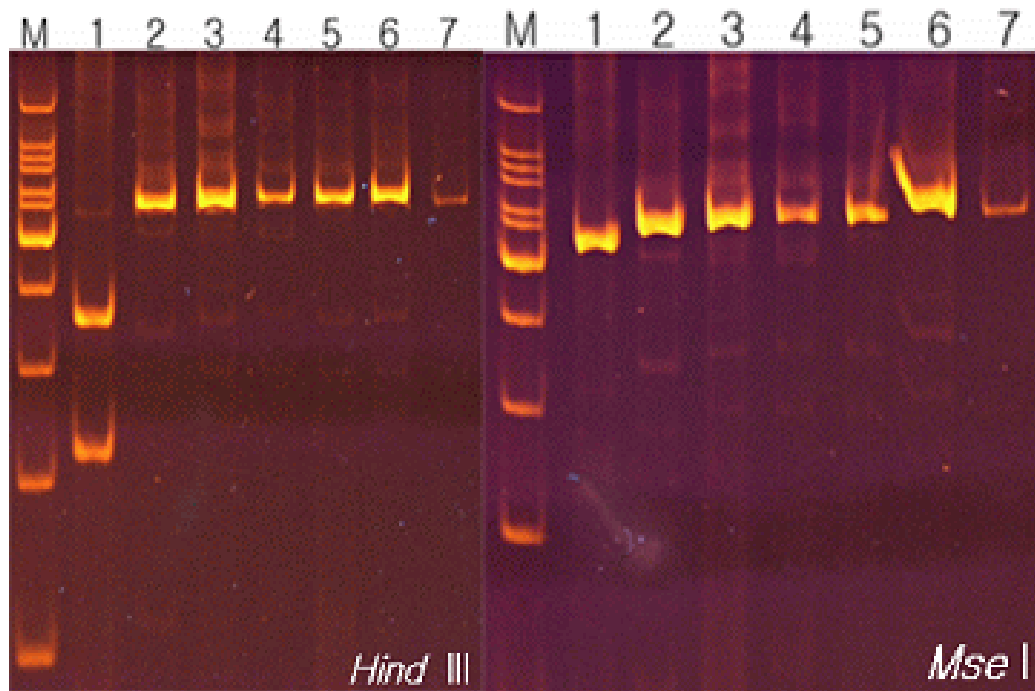
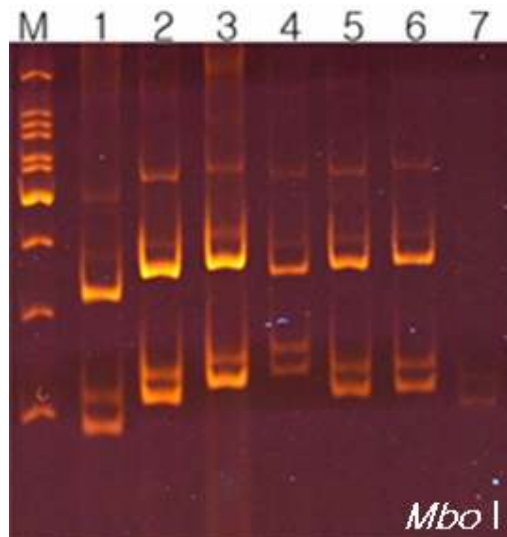


Figure 5. Polyacrylamide gel electrophoresis of *Mbo* I digest of ITS 1 and ITS 2 gene amplified by PCR using a primer pair ITS 1/ITS 4 M, 100 bp DNA marker. The source of target DNA is given above each lane. Samples designations are as listed in Table 1.



*Hha* I, *Hpa* II, *Hind* III, *Mse* I 및 *Mbo* I 등의 5가지 제한효소를 이용하여 *ophiostoma* sp. 균주들에 대하여 RFLP 분석 결과 *Hha* I, *Hpa* II 및 *Mbo* I의 제한효소의 경우에서 다양한 밴드패턴을 보여주었으며, *Hind* III, *Mse* I의 제한효소의 경우에는 다양한 밴드패턴을 얻을 수 없었다. 앞으로 다양한 제한효소를 이용하여 RFLP 분석을 한다면 각 균주간의 특이한 밴드패턴을 얻을 수 있을 것으로 보이며, 또한 *ophiostoma* sp. 균주들 간의 유연관계를 구분할 수 있는 RFLP 밴드다양성을 얻을 수 있을 것으로 사료된다.

다. *Ophiostoma* 종의 특이적 PCR primer의 선발

*Ophiostoma* spp. 균주를 특이적으로 증폭할 수 있는 특이 primer 선발을 위해 동정된 fungi의 ITS(internal transcribed spacer) 염기서열을 alignment 한 결과 ITS2 부분에서 *Ophiostoma* 만의 공통된 염기서열 보존지역을 발견하고 이 부분에서 ITS2-internal middle reverser primer(IMR primer 5'-GTTCGGTACTGCGCTCGGA-3')를 선택 할 수 있었다(Fig 6).

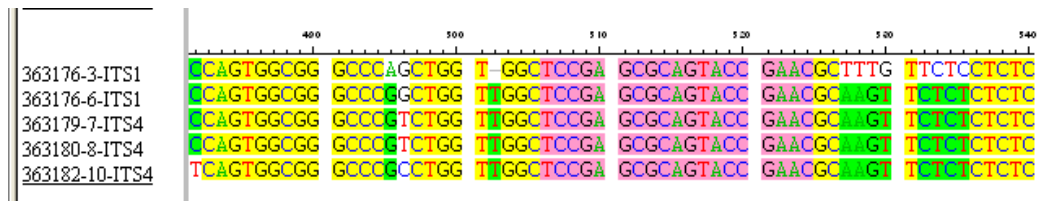


Figure 6. Alignment of nucleotide sequence for selection of specific primer pair from various of *Ophiostoma* spp.

따라서 fungi의 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S부분을 증폭할 수 있는 universal primer ITS1과 ITS4(White et. al., 1990)의 primer와 본 실험에서 고안해낸 IMR primer를 조합해 *Ophiostoma* 종의 fungi가 존재하면 PCR 증폭산물이 625 bp와 505 bp에서 두 개의 DNA밴드로 나타나게 할 수 있었다.

IMR primer가 효과적으로 *Ophiostoma*에만 결합하는지 알아보기 위해 GeneBank에 등록된 *Ophiostoma* 종들과 primer의 염기서열을 alignment 한 결과 PCR을 통해 증폭될 수 있는 종은 *Ophiostoma*가 유일함을 알 수 있었다(Fig 7).



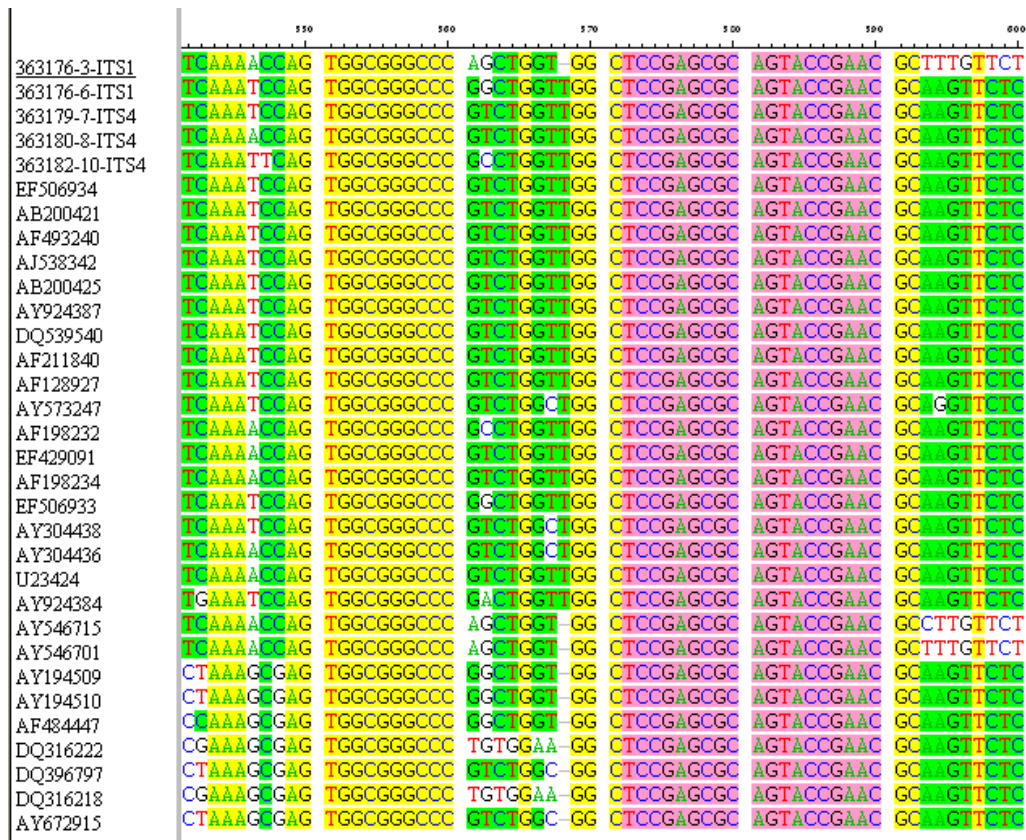


Figure 7. Comparison of *Ophiostoma* spp. nucleotide sequence.

라. *Ophiostoma* 종의 특이적 PCR

*Ophiostoma* spp. 균주에 대한 특이적 primer 개발을 위하여 genbank에서의 *Ophiostoma* spp. 및 유사한 균류의 ITS 영역의 염기서열을 비교분석하여 *Ophiostoma* spp. 균에서만 특징적으로 염기서열이 같은 부위에서 프라이머를 선발하였고, 기존의 White et. al., 1990이 이용한 ITS-1 및 ITS-4 프라이머와 동일하게 multiple primer 로 이용하였다(Table 3).

Table 3. Sequence of multiple primer of *Ophiostoma* spp.

Primer	Sequence	Remark
ITS-1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	(White et. al., 1990)
IMR	GTTCGGTACTGCGCTCGGA	This study
ITS-4	TCCTCCGCTTATTGATATGC	(White et. al., 1990)

Bases on cDNA sequences of *Ophiostoma* spp. of ITS region in GeneBank

PCR은 50-100 ng/μl 의 total DNA, 10x Ex Taq buffer(50mM KCl, 10mM Tris-HCl, pH8.3), 각 250 uM 씩의 dNTPs, 7.5 pM ITS-1 primer, 6.0 pM ITS-4 primer, 0.6 pM IMR primer, 1 Unit Ex Taq DNA polymerase (Takara)를 넣고, 최종량을 멸균 증류수로 20 μl가 되게 맞추었다(Table 4).

Table 4. PCR protocol for DNA amplification from *Ophiostoma* spp.

Ingredient	Reaction mixture
Total DNA solution	50-150ng
10x Ex Taq buffer	2ul
dNTP Mixture(2.5mM each)	250uM
ITS-1	7.5 pM
IMR	0.6 pM
ITS-4	6.0 pM
Ex Taq	1 unit
Total volume	20

반응조건은 먼저 denaturation을 95°C에서 10분간 행한 후, denaturation을 94°C에서 30초, annealing은 57°C에서 40초, extension은 72°C에서 40초로 하여 35회 반응시킨 후 마지막 extension은 72°C에서 10분간 하였다. 각 PCR 산물은 1.5% agarose gel에 전기영동을 하고, ethidium bromide로 염색한 후 UV transilluminator를 이용하여 DNA band를 확인하였다(Table 5).

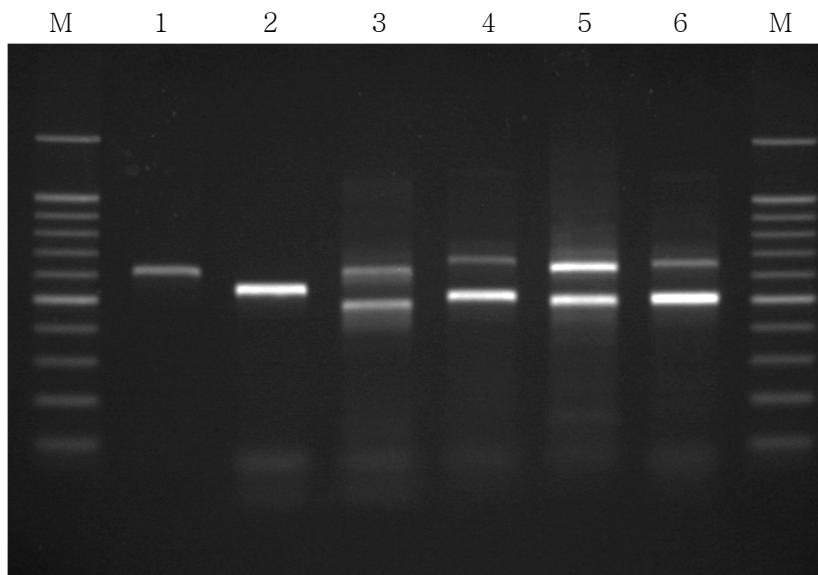
Table 5. PCR conditions for ITS1 an ITS4 gene amplification from *C. sinensis*.

Cycle	Condition
First cycle	Denaturation for 10min. at 95°C
2-35 cycles	Denaturation for 30 sec. at 94°C
	Annealing for 40 sec. at 57°C
	Extension for 40 sec. at 72°C
Last cycle	Extension for 10min. at 72°C

#### 4. 결과 및 고찰

##### 가. PCR 결과

Figure 8. Agarose gel electrophoresis of multiple PCR-amplified ITS gene of rDNA from genomic DNA of *Ophiostoma* spp.



M: 100bp DNA ladder, lane 1: *Saccharomyces cerevisiae* lane 2: *Ceratocystis major*, lane 3 :*Ophiostoma brevisculum*, lane 4:*Ophiostoma querci*, lane 5:*Ophiostoma ips*, and lane 6:*Ophiostoma tetropii*

Multiple PCR 결과 *Saccharomyces cerevisiae* 및 *Ceratocystis major*의 균주에서는 약 600–650 bp 사이에서 PCR 산물이 나타났지만 Lane 3,4,5 및 6에 속하는 *Ophiostoma* spp. 균주에서는 약 600–700 bp의 크기로 프라이머 ITS 1/4의 PCR 산물이 획득되었으나, IMR 프라이머가 작용한 약 500bp 크기에서 PCR 산물이 모두의 *Ophiostoma* spp. 균주에서 나타나 *Ophiostoma* spp. 균주만을 증폭하기 위해서는 ITS1/4 프라이머에 IMR 프라이머를 혼합하여 multiple PCR을 할 경우 *Ophiostoma* spp. 균주만을 증폭할 수 있었다(Fig 8). 많은 종류의 *Ophiostoma* spp. 균주를 이용하여 PCR을 수행한다면 더욱 정밀한 multiple primer 및 종 특이적 primer의 제작이 가능할 것으로 보인다. 본 연구에서는 몇 가지의 *Ophiostoma* spp. 균주와 유사한 미생물을 이용하여 PCR을 수행하여 비교분석하여 정밀한 분석 결과에는 아직 미비한 점이 많지만 본 연구에서 개발한 multiple primer를 이용한다면 용이하게 *Ophiostoma* spp.의 종류인가 아닌가는 쉽게 알 수 있을 것이다.

#### 나. 염기서열 분석

사용한 *Ophiostoma* spp. 균주들에 대하여 18S-ITS1-5.8S-ITS2-26S부위에 대하여 염기서열을 분석하고, DDBJ 및 NCBI Genebank database를 통하여 17균주의 염기서열과 비교분석한 결과 전체적으로 6개 큰 그룹으로 분류할 수 있었다. 분류군 중에서 Opi-363175 균주의 경우에는 비교분석한 어느 분류군에도 속하지 않아, 제일 유의성이 높고 근연의 유연관계를 보인 균주로는 *Ophiostoma canum*(Genebank accession no. AJ538342) *Ophiostoma breviusculum*(Genebank accession no. AB200420)등이 93%의 유의성을 보여주었다(Fig 9, 14). 이 균주에 대해서는 더욱 정밀한 분석을 통하여 새로운 *Ophiostoma* 에 속하는지 아니면 기존의 database와 비교하여 어떤 종류의 균주인지를 밝혀야 할 것으로 보인다.

Opi-349579균주의 경우에는 *Ophiostoma stenoceras* spp.에 속하는 Genebank accession no. AB122053, AF484460 및 AF484458균주들과 약 97%이상의 유의성을 보여 같은 분류군에 속하였다(Fig 9, 13). Opi-363176균주의 경우에는 *Ophiostoma ips* strain KUC2(Genebank accession no. AY172021)균주와 99% 이상의 근연의 유의성을 보였으며, 다음으로는 *Ophiostoma ips* strain KMW9(Genebank accession no. AY546698)과 98%이상의 유의성을 나타냈고, *Ophiostoma punisporum* (Genebank accession no. AY546713)균주와는 96%의 유의성을 보였다(Fig 9, 12).

Opi-363180균주와 Opi-200385균주의 경우에는 같은 계통으로 분석되었는데 이들간의 유의성은 98%이상으로 높게 나타났으며, 또한 *Ophiostoma querci* CMW7658 (Genebank accession no. AF493251), *Ophiostoma querci* CMW7645 (Genebank

accession no. AF493246), *Ophiostoma quercus* (Genebank accession no. EF429089), 및 *Ophiostoma querci* (Genebank accession no. AJ293883) 균주들과 98% 이상의 유의성을 보여 같은 계통의 분류군으로 나타났다(Fig 9, 10).

Opi-363182 균주의 계통은 *Ophiostoma tetropii* (Genebank accession no. AY934524) 균주의 99% 이상의 유의성을 보여 같은 계통으로 분류되었으며(Fig 9, 11), Opi-363179 균주는 *Ophiostoma piceae* CMW7646 (Genebank accession no. AF493247) 균주와 99% 이상의 제일 높은 유의성을 보였으며, *Ophiostoma breviusculum*의 계통이나 (Genebank accession no. AB200420 및 AB200421), *Ophiostoma piceae*의 계통 (Genebank accession no. AF493240 및 AF493245)이나, 또는 *Ophiostoma canum* (Genebank accession no. AJ538342)의 계통들과 98% 이상의 높은 유의성을 보여 같은 계통으로 분류되었다(Fig 9, 15). 본 염기서열 분석결과 사용한 균주 7개를 기준으로 하여 염기서열을 분석한 후 genebank database를 이용하여 유의성을 검정한 결과 총 6개 계통으로 분류되었으며, Opi-363175만이 이들 데이터와 유의성이 적게 나타나 새로운 분류군으로 의심되며, 앞으로 이 균주에 대해서는 더욱 정밀한 연구 조사가 필요할 것으로 보인다.

Figure 9. Phylogenetic tree based on the ITS 1, 5.8S rDNA and ITS 2 sequences of the *Ophiostoma* spp. by clustal W method.

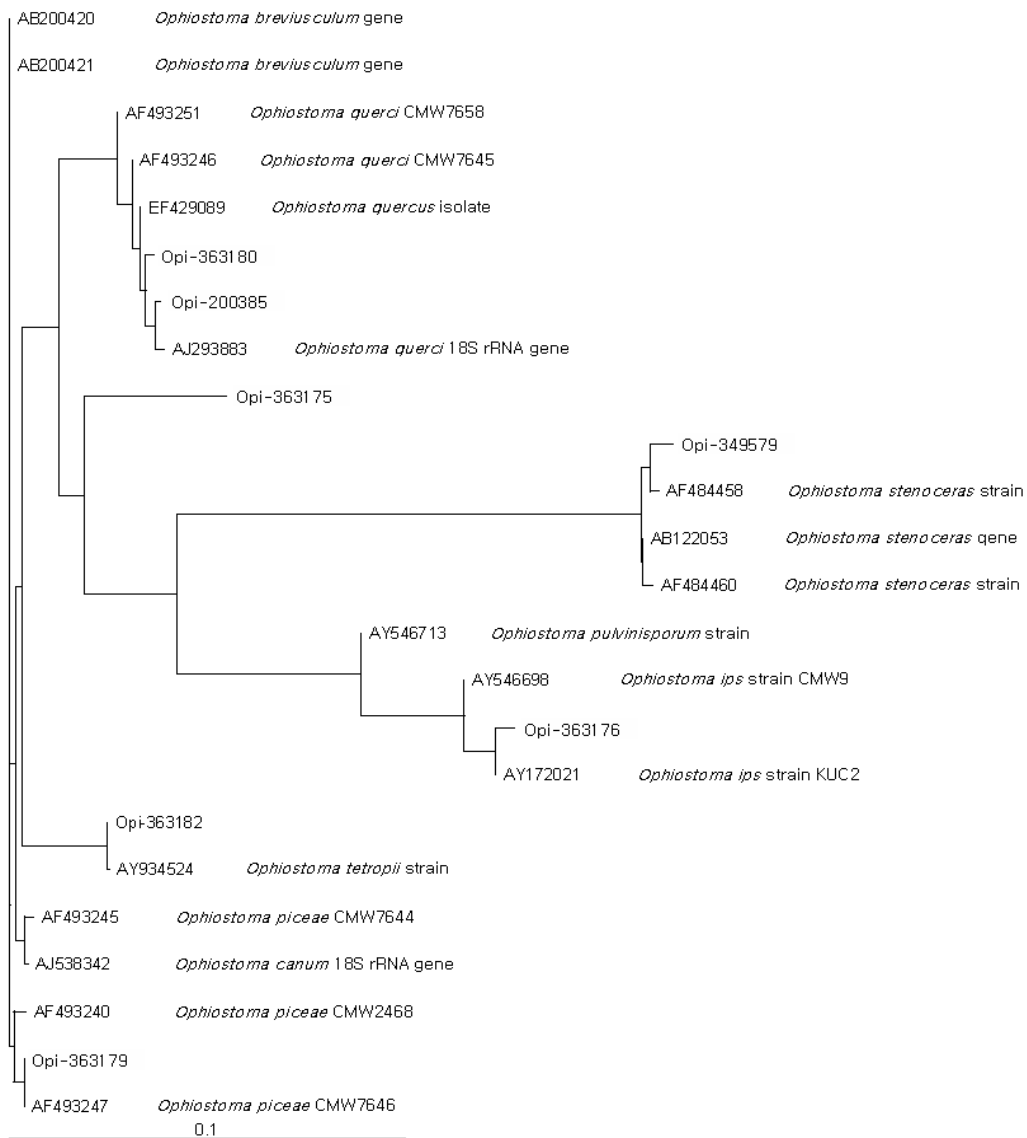


Figure 10. Alignment and comparison of the ITS 1, 5.8S rDNA and ITS 2 region sequences of *Ophiostoma* spp.

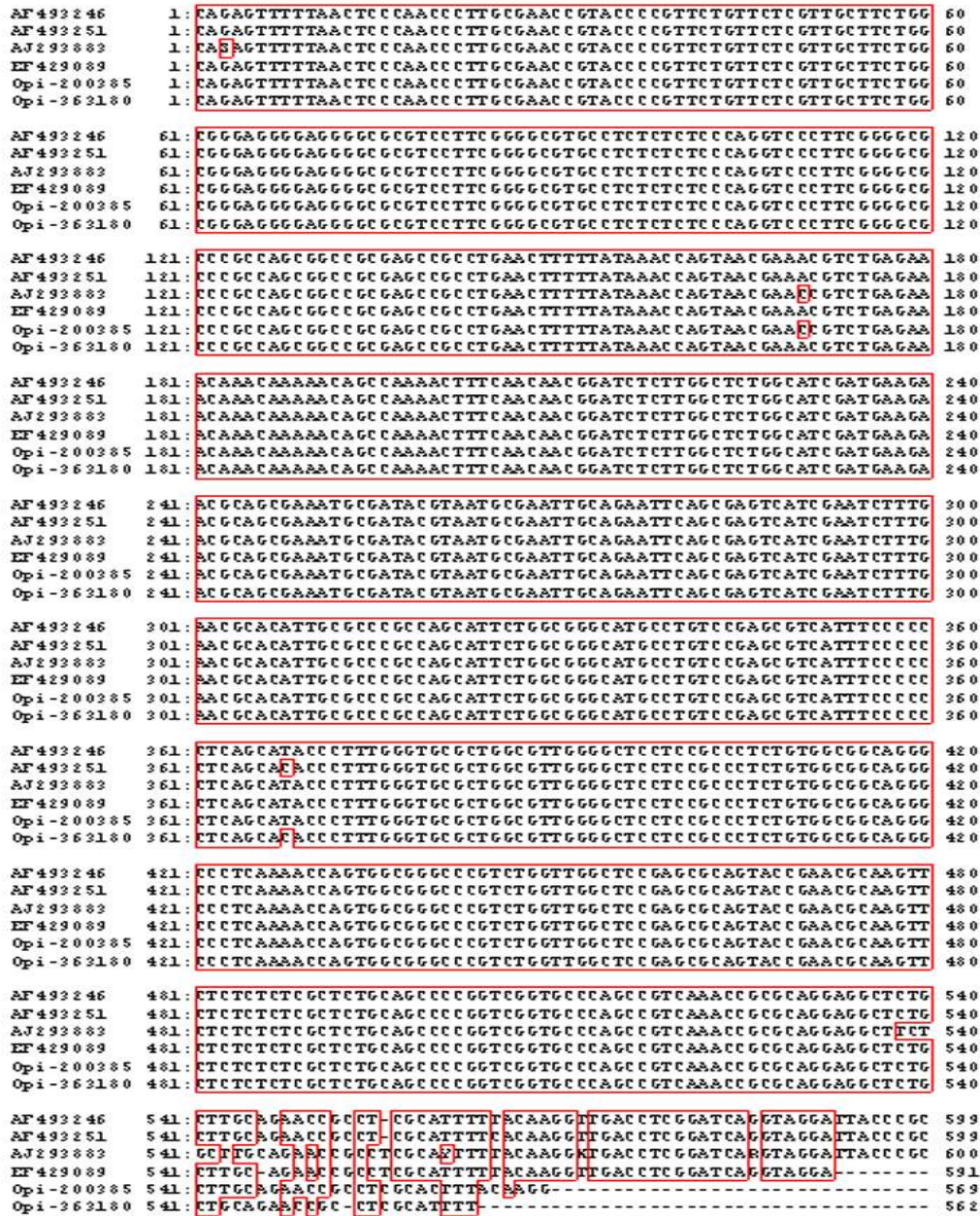


Figure 11. Alignment and comparison of the ITS 1, 5.8S rDNA and ITS 2 region sequences of *Ophiostoma* spp.

```

AY934524    1: SCGAGTTTTCAACTCCAAACCCTTGCGAACC GTACC CCGTTCTGTTC GTTGCTTCTGG 60
Opi-363182 1: SCGAGTTTTCAACTCCAAACCCTTGCGAACC GTACC CCGTTCTGTTC GTTGCTTCTGG 60

AY934524    61: CGGGAGGGGAGGGGCGCGTCCTTCGGGGCGGCCTCTCTCTCCCAGGTC CTTTCGGGGCG 120
Opi-363182 61: CGGGAGGGGAGGGGCGCGTCCTTCGGGGCGGCCTCTCTCTCCCAGGTC CTTTCGGGGCG 120

AY934524    121: CCCGCCAGCGGCTGC GAGCCGCCTGAAC TTTTTTAAACC GTAACGAAC CGCTCGAGAAA 180
Opi-363182 121: CCCGCCAGCGGCTGC GAGCCGCCTGAAC TTTTTTAAACC GTAACGAAC CGCTCGAGAAA 180

AY934524    181: CAAAACAAAACAGCCAAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGCTCTGGCATCGATGAAGAA 240
Opi-363182 181: CAAAACAAAACAGCCAAAAC TTTCAACAACGGATCTCTTGCTCTGGCATCGATGAAGAA 240

AY934524    241: CGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATT CAGCGACTCATCGAATCTTTGA 300
Opi-363182 241: CGCAGCGAAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAATT CAGCGACTCATCGAATCTTTGA 300

AY934524    301: ACGCACATTGCGCCCGCCAGCAATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTC 360
Opi-363182 301: ACGCACATTGCGCCCGCCAGCAATTCTGGCGGGCATGCCTGTCCGAGCGTCATTTC 360

AY934524    361: TCAGCATACCC TCTGGGTGCGCTGGCGTTGGGGCTC CTCCGCCCTCTGTGGCGGCAGGGC 420
Opi-363182 361: TCAGCATACCC TCTGGGTGCGCTGGCGTTGGGGCTC CTCCGCCCTCTGTGGCGGCAGGGC 420

AY934524    421: CCTCAAATTCAGTGGCGGGCCCGCCTGGTTGGCTCC GAGCGCAGTACC GAACGCAAGTTC 480
Opi-363182 421: CCTCAAATTCAGTGGCGGGCCCGCCTGGTTGGCTCC GAGCGCAGTACC GAACGCAAGTTC 480

AY934524    481: TCTCTCTCGCTCTGCAGCCC CAGTCGGTGCCCAGCCGTCAAGCC GCGCAGGCGACTCTTT 540
Opi-363182 481: TCTCTCTCGCTCTGCAGCCC CAGTCGGTGCCCAGCCGTCAAGCC GCGCAGGCGACTCTTT 540

AY934524    541: CGAGGGCCGCTCGCACTTTTCAAGGTTGACC 573
Opi-363182 541: CGAGGGCCGCTCGCACTTTTCAAGG ----- 566

```

Samples designations are as listed in Table 1.



Figure 12. Alignment and comparison of the ITS 1, 5.8S rDNA and ITS 2 region sequences of *Ophiostoma* spp.

Samples designations are as listed in Table 1.

AB122053	1:	AACTATAACCAT	ACTGTTCTCGTTGCTTCCGCGGGGACGGGGCGGGGTGCTCTCTCGA	60
AF484458	1:	ACCATACCAT	ACTGTTCTCGTTGCTTCCGCGGGGACGGGGCGGGGTGCTCTCTCGA	59
AF484460	1:	ACCATACCAT	ACTGTTCTCGTTGCTTCCGCGGGGACGGGGCGGGGTGCTCTCTCGA	59
Opi-249579	1:	ACCATACCAT	ACTGTTCTCGTTGCTTCCGCGGGGACGGGGCGGGGTGCTCTCTCGA	59
AB122053	61:	CGCCCTCCCTCCCGCGCCGGGGCGGGCCCTATGAACTTTATATCTCAACCAAC	120	
AF484458	60:	CGCCCTCCCTCCCGCGCCGGGGCGGGCCCTATGAACTTTATATCTCAACCAAC	119	
AF484460	60:	CGCCCTCCCTCCCGCGCCGGGGCGGGCCCTATGAACTTTATATCTCAACCAAC	119	
Opi-249579	60:	CGCCCTCCCTCCCGCGCCGGGGCGGGCCCTATGAACTTTATATCTCAACCAAC	119	
AB122053	121:	TAGAAACCCTCTGA	GAAACAACAAAATAATCAAAAATTTCAACCAACGGATCTCTTGCC	179
AF484458	120:	TAGAAACCCTCTGA	GAAACAACAAAATAATCAAAAATTTCAACCAACGGATCTCTTGCC	178
AF484460	120:	TAGAAACCCTCTGA	GAAACAACAAAATAATCAAAAATTTCAACCAACGGATCTCTTGCC	178
Opi-249579	120:	TAGAAACCCTCTGA	GAAACAACAAAATAATCAAAAATTTCAACCAACGGATCTCTTGCC	179
AB122053	180:	CTGGCATCGATGAAAGACGCAGCGAAATGCGATACGTAAATGTAATTCAGAAATTCAGC	239	
AF484458	179:	CTGGCATCGATGAAAGACGCAGCGAAATGCGATACGTAAATGTAATTCAGAAATTCAGC	238	
AF484460	179:	CTGGCATCGATGAAAGACGCAGCGAAATGCGATACGTAAATGTAATTCAGAAATTCAGC	238	
Opi-249579	180:	CTGGCATCGATGAAAGACGCAGCGAAATGCGATACGTAAATGTAATTCAGAAATTCAGC	239	
AB122053	240:	GAAACATCGAATCTTTGAAAGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTC	299	
AF484458	239:	GAAACATCGAATCTTTGAAAGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTC	298	
AF484460	239:	GAAACATCGAATCTTTGAAAGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTC	298	
Opi-249579	240:	GAAACATCGAATCTTTGAAAGCACATTGCGCCCGCCAGTATTCTGGCGGGCATGCTGTC	299	
AB122053	300:	CGAGCGTCATTTCCCTCCAGCGCCCGGTTGCGCGCTGCTGTTGGGGCTCCTCTGCT	359	
AF484458	299:	CGAGCGTCATTTCCCTCCAGCGCCCGGTTGCGCGCTGCTGTTGGGGCTCCTCTGCT	358	
AF484460	299:	CGAGCGTCATTTCCCTCCAGCGCCCGGTTGCGCGCTGCTGTTGGGGCTCCTCTGCT	358	
Opi-249579	300:	CGAGCGTCATTTCCCTCCAGCGCCCGGTTGCGCGCTGCTGTTGGGGCTCCTCTGCT	359	
AB122053	360:	GGCAGAGGGCCCCCAAAGCGAGTGGCGGGCCCGGCTGCTGCTCCGAGCGCAGTACCAG	419	
AF484458	359:	GGCAGAGGGCCCCCAAAGCGAGTGGCGGGCCCGGCTGCTGCTCCGAGCGCAGTACCAG	418	
AF484460	359:	GGCAGAGGGCCCCCAAAGCGAGTGGCGGGCCCGGCTGCTGCTCCGAGCGCAGTACCAG	418	
Opi-249579	360:	GGCAGAGGGCCCCCAAAGCGAGTGGCGGGCCCGGCTGCTGCTCCGAGCGCAGTACCAG	419	
AB122053	420:	CGCAAGTTCTCCATCTCCTCGGACGCCCGCTCGCC	478	
AF484458	419:	CGCAAGTTCTCCATCTCCTCGGACGCCCGCTCGCC	477	
AF484460	419:	CGCAAGTTCTCCATCTCCTCGGACGCCCGCTCGCC	477	
Opi-249579	420:	CGCAAGTTCTCCATCTCCTCGGACGCCCGCTCGCC	479	
AB122053	479:	TGACGTGCAACTCTTTTACAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTT	538	
AF484458	478:	TGACGTGCAACTCTTTTACAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTT	537	
AF484460	478:	TGACGTGCAACTCTTTTACAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTT	537	
Opi-249579	480:	TGACGTGCAACTCTTTTACAAAGG-----	503	
AB122053	539:	AA-----	540	
AF484458	538:	AAACATATCAATAAGCGGA---	556	
AF484460	538:	AAACATATCAATAAGCGGAGGA	559	
Opi-249579	504:	-----	504	

Figure 13. Alignment and comparison of the ITS 1, 5.8S rDNA and ITS 2 region sequences of *Ophiostoma* spp.

AY172021	1:	AACCGTACCCCGTTCCGTTCTCGTTGCTTCTGGCCGGGAGCCGGGAGGGGGGACCGCTCC	59
AY546698	1:	AACCGTACCCCGTTCCGTTCTCGTTGCTTCTGGCCGGGAGCCGGGAGGGGGGACCGCTCC	60
AY546713	1:	AACCGTACCCCGTTCCGTTCTCGTTGCTTCTGGCCGGGAGCCGGGAGGGGGGACCGCTCC	59
Opi-363176	1:	AACCGTACCCCGTTCCGTTCTCGTTGCTTCTGGCCGGGAGCCGGGAGGGGGGACCGCTCC	59
AY172021	60:	CTCCTTCGGGGGGCCGCGCCGCCCTCCCTCCCTAGGTCCTCCCTCGGGGGCCCGCCCA	118
AY546698	61:	CTCCTTCGGGGGGCCGCGCCGCCCTCCCTCCCTAGGTCCTCCCTCGGGGGCCCGCCCA	119
AY546713	60:	CTCCTTCGGGGGGCCGCGCCGCCCTCCCTCCCTAGGTCCTCCCTCGGGGGCCCGCCCA	119
Opi-363176	60:	CTCCTTCGGGGGGCCGCGCCGCCCTCCCTCCCTAGGTCCTCCCTCGGGGGCCCGCCCA	118
AY172021	119:	CGGCCAGCGAGCCGCCGGAACCTTATCAATCAACAGCAACCGTTCCGTCTGAGCAACAAC	178
AY546698	120:	CGGCCAGCGAGCCGCCGGAACCTTATCAATCAACAGCAACCGTTCCGTCTGAGCAACAAC	179
AY546713	120:	CGGCCAGCGAGCCGCCGGAACCTTATCAATCAACAGCAACCGTTCCGTCTGAGCAACAAC	179
Opi-363176	119:	CGGCCAGCGAGCCGCCGGAACCTTATCAATCAACAGCAACCGTTCCGTCTGAGCAACAAC	178
AY172021	179:	AAAAATTAGCAAAACTTTCAACAAAGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAAGAACCGCAG	238
AY546698	180:	AAAAATTAGCAAAACTTTCAACAAAGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAAGAACCGCAG	239
AY546713	180:	AAAAATTAGCAAAACTTTCAACAAAGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAAGAACCGCAG	239
Opi-363176	179:	AAAAATTAGCAAAACTTTCAACAAAGGATCTCTTGGCTCTGGCATCGATGAAAGAACCGCAG	238
AY172021	239:	CGAAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAAATTCAGCGAGTCATCGAATCTTTGAAACGCA	298
AY546698	240:	CGAAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAAATTCAGCGAGTCATCGAATCTTTGAAACGCA	299
AY546713	240:	CGAAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAAATTCAGCGAGTCATCGAATCTTTGAAACGCA	299
Opi-363176	239:	CGAAATGCGATACGTAATGCGAATTGCAGAAATTCAGCGAGTCATCGAATCTTTGAAACGCA	298
AY172021	299:	CATTGCCGCCCGCCAGCATTTCTGGCCGGCATGCCCTGTCGAGCGGTCATTTCCCGCCTCAGC	358
AY546698	300:	CATTGCCGCCCGCCAGCATTTCTGGCCGGCATGCCCTGTCGAGCGGTCATTTCCCGCCTCAGC	359
AY546713	300:	CATTGCCGCCCGCCAGCATTTCTGGCCGGCATGCCCTGTCGAGCGGTCATTTCCCGCCTCAGC	359
Opi-363176	299:	CATTGCCGCCCGCCAGCATTTCTGGCCGGCATGCCCTGTCGAGCGGTCATTTCCCGCCTCAGC	358
AY172021	359:	CGCCTCTCCGCTGGCGTTGGGGCTCCCTCCGCCCTCCGGCCGGCAGGGCCCTCAAAACCAAG	418
AY546698	360:	CGCCTCTCCGCTGGCGTTGGGGCTCCCTCCGCCCTCCGGCCGGCAGGGCCCTCAAAACCAAG	419
AY546713	360:	CGCCTCTCCGCTGGCGTTGGGGCTCCCTCCGCCCTCCGGCCGGCAGGGCCCTCAAAACCAAG	419
Opi-363176	359:	CGCCTCTCCGCTGGCGTTGGGGCTCCCTCCGCCCTCCGGCCGGCAGGGCCCTCAAAACCAAG	418
AY172021	419:	TGGCCGGCCCAAGCTGGTGGCTCCGAGCCGACGTACCGAACGCTTTGTTCTCCCTCTCGCTCT	478
AY546698	420:	TGGCCGGCCCAAGCTGGTGGCTCCGAGCCGACGTACCGAACGCTTTGTTCTCCCTCTCGCTCT	479
AY546713	420:	TGGCCGGCCCAAGCTGGTGGCTCCGAGCCGACGTACCGAACGCTTTGTTCTCCCTCTCGCTCT	479
Opi-363176	419:	TGGCCGGCCCAAGCTGGTGGCTCCGAGCCGACGTACCGAACGCTTTGTTCTCCCTCTCGCTCT	478
AY172021	479:	GCAGCTCCGGCCGGCGCTCTGCGCTCAAGCCGCGCGGGTGGCCAGCGCTTTTTCGCTGCC	538
AY546698	480:	GCAGCTCCGGCCGGCGCTCTGCGCTCAAGCCGCGCGGGTGGCCAGCGCTTTTTCGCTGCC	539
AY546713	480:	GCAGCTCCGGCCGGCGCTCTGCGCTCAAGCCGCGCGGGTGGCCAGCGCTTTTTCGCTGCC	539
Opi-363176	479:	GCAGCTCCGGCCGGCGCTCTGCGCTCAAGCCGCGCGGGTGGCCAGCGCTTTTTCGCTGCC	538
AY172021	539:	GCCCCGCACTTTGTACCAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAG	598
AY546698	540:	GCCCCGCACTTTGTACCAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAG	599
AY546713	540:	GCCCCGCACTTTGTACCAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAG	599
Opi-363176	539:	GCCCCGCACTTTGTACCAAAGTTGACCTCGGATCAGGTAGGACTACCCGCTGAACTTAAG	598
AY172021	599:	CATATCAATAAGCGGAGGAAA	620
AY546698	600:	CATATCAATAAGCGGAGGAAA	621
AY546713	600:	CATATCAATAAGCGGAGGAAA	619
Opi-363176	599:	CATATCAATAAGCGGAGGAAA	620

Samples designations are as listed in Table 1.





## 제 4 장 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 항 국내 자생 및 해외 목재변색균 및 표면 오염균의 채집 및 동정

#### 1. 목표 달성도:

- 가. 국내에서 발생하는 목재 표면오염균을 채집하고 동정하였음.
- 나. 특히 목재 야적장이나 집하장에 존재하거나 목재절삭 기자재에 존재하는 각종 균류를 파악함
- 다. 목재변색균에 대한 종의 다양성이 높지 않아 채집과 동정에 어려움이 많음.

따라서, 목표의 달성도는 그다지 높지 않음.

#### 2. 관련분야 기여도:

- 가. 목재산업체에 존재하는 목재야적장, 목재집하장, 목재생산공장, 목재가구공장 등 여타 산업에서 목재가치를 하락시키는 목재변색에 대한 중요성 습득
- 나. 목재 변색에 관한 관심으로 방미제 필요성 증가에 따른 방미제 시장의 증가

따라서 목재 관련 산업 및 방미제 관련 산업에 높은 기여도 제공

### 제 2 항 중요 변색균의 생리화학적 특성 및 목재 열화의 생화학적 특성 구명

#### 1. 목표 달성도:

- 가. 목재산업체에 존재하는 목재야적장, 목재집하장, 목재생산공장, 목재가구공장 등 여타 산업에서 목재가치를 하락시키는 목재변색균의 생리 파악
- 나. 천연물질인 목재의

따라서 목재 관련 산업 및 방미제 관련 산업에 높은 기여도 제공

#### 2. 관련분야 기여도:

- 가. 변색균의 최적 환경 조사 및 이를 토대로한 방어환경 조사

- 나. 기타 관련 산업에 제공 가능성 확보  
따라서 목재 관련 산업 및 방미제 관련 산업에 높은 기여도 제공

### 제 3 항 중요 변색균의 분자생물학적 분류체계 및 신속진단법 개발

#### 1. 목표 달성도:

- 가. Ophiostomatoid fungi계통에 대하여 RFLP 및 염기서열 분석  
분자 계통학적 유연 관계 설정을 설정하고 미생물 유전 정보 확보
- 나. Ophiostomatoid fungi계통만을 신속진단을 위한 특정부위 상관 특이  
Primer 개발

따라서, 높은 목표달성을 보여줌

#### 2. 관련분야 기여도:

- 따라서 목재 관련 산업 및 방미제 관련 산업에 높은 기여도 제공

### 제 4 항 친환경적인 생화학적 방미제 개발

#### 1. 목표 달성도:

- 가. 목초액, 죽초액을 근간으로 한 천연물질 혹은 저독성 물질을 이용한 방미제  
개발
- 나. 환경친화적인 방미제를 개발하는데 산업자료 제공  
따라서 매우 높은 목표 달성도를 보여줌

#### 2. 관련분야 기여도:

- 가. 키토산, 목초액 및 죽초액, 은나노산업은 물론 방미제 사업에 산업자료 제  
공
- 나. 기타 관련 산업에 제공 가능성 확보  
따라서 목재 관련 산업 및 방미제 관련 산업에 높은 기여도 제공

## 제 5 장 연구개발결과의 활용계획

### 제 1 항 특 허

1. 2개 항에 걸친 특허 출원  
현재 2개의 특허를 출원하였음.
2. 결과에 따른 특허를 출원  
추가 실험에 따른 특허를 2개 출원 예정

### 제 2 항 연구 결과 승계

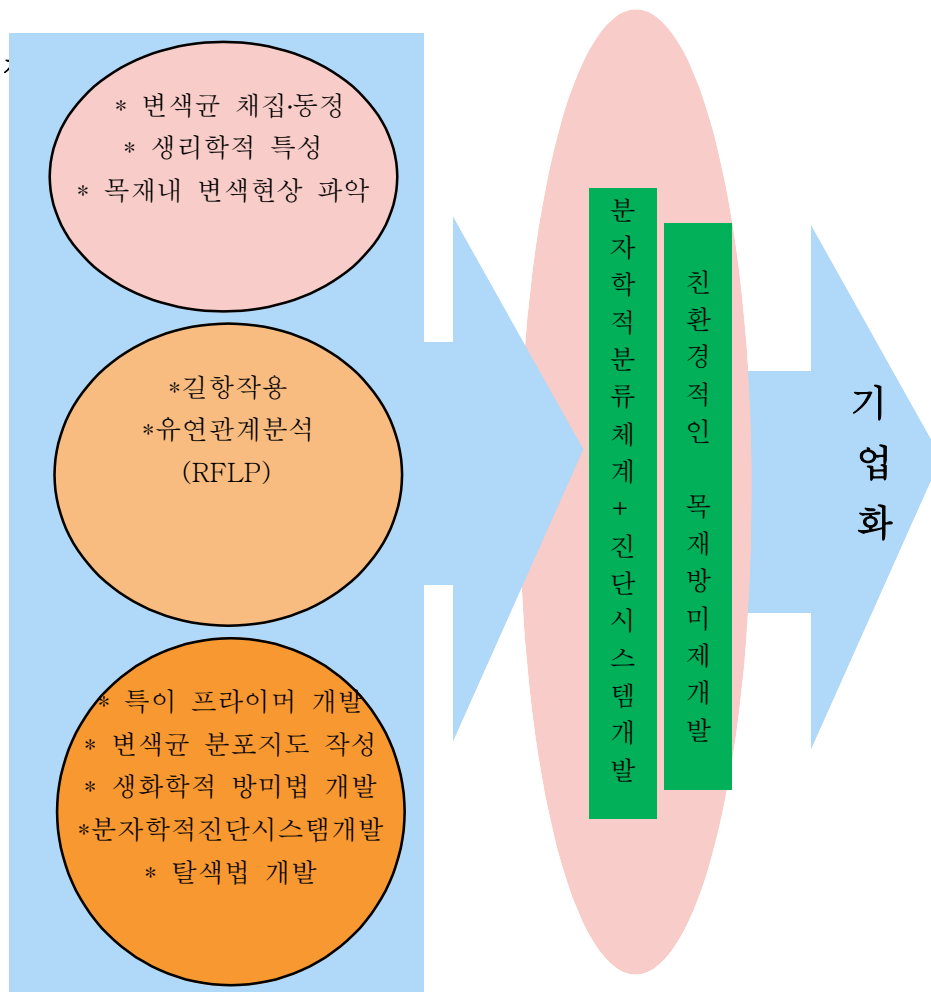
1. 참여업체 '휴나'를 중심으로 관련업체와의 연구결과 승계 협약
2. 산업체의 연구결과 승계에 따른 로열티 협약
3. 참여업체 '휴나'에 협약 우선권 제공

### 제 3 항 추가 연구의 필요성

1. 목재 생산시 활용이 요구되는 방미제를 방사선 감마를 이용하여 목재생산은 물론 목재 생산 후 2차적으로 발생하는 변색목재의 탈색과정에 대한 연구가 절실히 요구됨
2. 암브로시아 곤충과 목재변색균의 연관성 및 방제기술을 위하여 연구가 필요함.  
곤충의 발생시기가 정하여 있는 관계로 수년에 걸친 지속연구가 절실히 요구됨
3. 천연유기물질은 자연환경에서 약효 안정성이 매우 낮다. 따라서, 키토산 및 옷 등의 천연고분자의 안정성에 관한 연구가 절실히 요구됨

#### 제 4 항 타 연구에의 응용

1. 방사선조사 등의 환경오염이 적은 방법을 이용하여 진균류의 멜라닌색소 반응기작을 분쇄시켜 백색도를 증가시키므로, 목재 생산 산업은 물론, 펄프, 제지 산업 분야에 대한 응용 연구가 이루어져야 함.
2. 친환경적인 미생물을 이용한 방법과 같은 길항작용 혹은 천적 등을 이용한 생물산업에 관한 분야에 대한 연구의 확대가 절실히 요구되어 짐.





## 제 5 항 경제성을 담보 방안

1. 친환경품질제도 및 생산자이력제의 도입에 대비하여 기술을 개발 촉진
2. 저가의 죽초액을 근간으로 한 방미제 제품 출시에 심혈을 기울임.
3. Bacillus 추출액의 고정화 연구를 기반으로 생물학제제 제충 출시에 심혈을 기울임.

## 제 6 항 실용화 및 기업화 추진방향

1. 참여업체 '휴나'를 중심으로 관련업체와의 연구결과 승계 협약을 유도하고 산업체의 연구결과 승계에 따른 로열티 협약을 유도한다.
2. 지속적으로 시중을 모니터링하고 제품의 출시현황을 모니터링하여 제품 출시 시기를 꺾는다.

## 제 6 장 연구개발과정에서 수집한 해외 과학기술정보

### 제 1 항 목재의 변색을 야기하는 변색균의 파악

Kaarik(1980)은 온대 지방에서의 목재의 변색에 관여하는 균의 분리 및 동정한 결과 341종, 캐나다에서는 200여종이 관여하고 있음을 Breuil이 보고하고 있다. Kay(1995)는 뉴우질랜드 라디아타소나무의 변색에 관련하는 원인균에 대하여 보고하였다. 또한 진균류의 완전세대와 불완전세대에 따른 연관성과 분류학적 연구가 수행되어지고 있으며, Laval 대학과 Forinter 대학 공동으로 캐나다 전역에 대한 광범위한 연구에서 목재 변색의 주된 원인균은 *Ophiostoma* spp., *Ceratocystis* spp. 및 불완전세대인 *Leptographium* spp. 그룹이었음을 보고하였다(Breuil,1997). 그러나 국내의 연구는 극히 미비하여 단지, 뉴우질랜드 수입산에서 발생하는 변색균(Kim, 2001)과 국내 적송에서 발생하는 변색균(Song *et al.* 2003)에 관한 연구가 거의 유일.

### 제 2 항 방미제의 개발 및 효력에 관한 연구

목재를 변색시키는 변색균의 생육을 억제하거나 방제할 방미제의 개발 및 효력에 관한 연구는 오래 전부터 서구유럽과 미주대륙을 중심으로 이루어지고 있다 (Hale & Eaton, 1993; Zabel & Morrell, 1992). 화학약품으로는 주로 Sodium pentachlorophenate 와 ethyl mercuryphosphate가 주로 사용되어 왔으나 현재에는 이들의 유독성 때문에 대체 방미제에 관한 연구가 꾸준히 수행되고 있고, 미 서부지방에는 NP-1, Britewood XL, Timbercote 2000 등이 사용되고 있다(Kim 2001; Song *et al.*, 2003). 한편 다른 미생물을 이용하여 방미효과 및 변색균에 의한 백변효과를 이용하여 방미 효과를 얻게된 보고도 있다.(Held *et al.*, 2003). 또한 목초액을 비롯한 임산 부산물의 추출액의 사용도 증가되고 있다.

### 제 3 항 proteinase와 lipase의 정제 및 gene encoding

Gutierrez *et al.* (1999)는 proteinase가 목재 질소원을, lipases는 목재 추출물을 분해 시킴이 밝혀내었고, Tamerlec *et al.* (2001)은 효소의 순수 정제 및 이들의 생리적인 특성을 연구하였다. 그러나 변색균에 의한 상기 두 효소체의 정제는 매우 초보 단계여서 산업화를 위한 많은 기초 연구가 필요하다. 특히 이 두 종류의 효소에 대한 유전학전 메카니즘에 대해서는 아직 밝혀지지 않아 이들 효소를 분비하는 유전자를 탐색하여 분자생물학적인 측면에서 효소의 기능을 구명하는 것이 필수적이다.

### 제 4 항 목재 변색 메카니즘에 관한 연구 및 탈색 메카니즘에 관한 연구

캐나다의 Prof. Breuil의 연구실에서는 생화학적 및 분자학적인 면에서 멜라닌 합성

대사경로를 연구하고 있으나 아직까지는 초보 단계여서 분자학적 연구를 통하여 멜라닌 색소관련 유전자의 탐색과 이들 유전자를 찾아내어 색소의 경로에 대한 메커니즘을 밝히는 것이 시급하다. 하지만 이 분야에 대한 연구는 거의 몇 편의 논문만 보고되었을 뿐 아직까지 정확한 경로가 밝혀지지 않아 앞으로 이 분야에 대한 기초 연구가 시급히 이루어져야 할 것임. 또한 탈색에 관한 메커니즘은 Croan(1997)에 의하여 보고되어 졌으나 이 역시 매우 미약한 단계이다.

#### **제 5 항 목재 변색균에 대하여 진단방법 연구**

최근 Kim *et al.*(1999)이 발표했듯이 PCR법이 이용되기 시작하여, 변색균에 대한 진단방법이 간단하고 명료해지고 있지만 아직은 보편화가 되어 있지 않아 변색균을 신속검출할 수 있는 특이 Primer의 개발과 특정부분 gene에 대한 분자학적 유연관계분석을 위하여 RFLP 및 염기서열분석 등을 이용한 변색균들간의 유연관계를 철저히 밝히고 이들의 계통학을 밝혀 분자학적으로 이들 변색균들에 대한 정확한 진단방법의 개발이 더욱 절실히 요구되고 있음.

본 연구는 세계적으로 캐나다의 Prof. Breuil, 미국의 Prof. Brusell와 영국의 Prof. Eaton 등에 의하여 이루어지고 있으나, 현재는 보편화가 되어 있지 않아서 이 분야에 대한 정확한 연구가 분자학적 방법을 이용한 새로운 검출방법 및 특이 Primer 등의 개발을 통한 신속한 진단법 등이 요구되고 있어 이 분야에 대한 연구는 선진외국과 같은 수준의 연구를 위하여 절실히 요구됨.

상기의 내용은 제2장에 언급된 내용과 일치하는 것으로 이는 국내의 연구가 거의 이루어 지지 않고 있어서 해외과학 기술정보에 의존하기 때문임.

## 제 7 장 참고문헌

- Behrendt C.J. and Blanchette R.A. 1997. Biological processing of pine logs for pulp and paper production with *Phlebiopsis gigantea*. Appl. Environ. Microbiol. 63:
- Behrendt C.J., Blanchette R.A. and R.L. Farrell. 1998. Biological control of blue-stain fungi in wood. Phytopathology 85:
- Bortolomeazzi, R., Sebastianutto, N., Toniolo, R., and Pizzariello, A. 2007. Comparative evaluation of the antioxidant capacity of smoke flavouring phenols by crocin bleaching inhibition, DPPH radical scavenging and oxidation potential. Food Chemistry 100, 1481-1489.
- Chirra, F. 1995. Ohio pesticide application training. In: Wood Preservation Student Workbook. The Ohio State University Extension.
- Croan, S.C. 1997. Decolorization of wood sapstain. In: Dashek, W.V., ed. Methods in plant biochemistry and molecular biology. CRC Press:23-26
- Eaton, R.A. and M.D.C. Hale. 1993. Wood: Decay, pest and protection. Chapman and Hall. New York, NY. USA.
- Halmschlager, E., R. Messner, T. Kowalski, H. Prillinger. (1994): Differentiation of *Ophiostoma piceae* and *Ophiostoma quercus* by morphology and RAPD analysis. System. Appl. Microbiol. 17, 554-562.
- Hausner, G., J. Reid, G. R. Klassen. 1993. On the phylogeny of *Ophiostoma*, *Ceratocystis* s.s, and *Microascus*, and relationships within *Ophiostoma* based on partial ribosomal DNA sequences. Can. J. Bot. 71, 1249-1265.
- Hausner, G., Reid, J and Klassen, G.R. 1993. Grouping of isolates and species of *Ceratocystis* sensu lato on the basis of molecular and morphological characters. In: *Ceratocystis* and *Ophiostoma* taxonomy, Ecology and Pathogenicity (Wingfield, M.J., Seifert, K.A. and Webber, J.F., Eds.), pp. 93-104. The American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN.
- Held, B.W., Thwaites, J.M., Farrell R.L. and Blanchette, R.A. 2003. Albino strains of *Ophiostoma* species for biological control of sapstaining fungi. *Holzforschung* 57:237-242
- Ikegami, F., Sekine, T., and Fujii, Y. 1998. Anti-dermatophyte activity of phenolic compounds in "Mokusaku-eki". *Yakugaku Zasshi* 118, 27-30.
- Imamura, and Eiyuu. 2007. Anti-allergy composition comprising wood vinegar- or

- bamboo vinegar distilled solution. United States Patent 7214393.
- Kaarik, A. 1998. Fungi causing sap stain in wood. Internation Research Group on Wood Preservation, Document No. IRG/WP/199. Stockholm, Sweden.
- Kajiyama, T. and Ohkatsu, Y. 2001. Effect of para-substituents of phenolic antioxidants. *Polymer Degradation and Stability* 71, 445–452.
- Kay, S.J. 1995. The biological control of sapstain of *Pinus radiata* with microorganism. Ph.D. thesis. Universith of Aucklan, Auckland, New Zealand.
- Kim, J.J 2001. Biological discoloration of radiata pine and its prevention. Ph.D thesis, Korea University, Korea
- Kim, S. H., Han, A., Kronstad, J. and Breuil, C. 1999. Differentiation of sapstain fungi by restriction fragment length polymorphism patterns in nuclear small subunit ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 177, 151–157.
- Kim, S. H., Han, A., Uzunovic, A. and Breuil, C. 1998. Specificity of the universal ribosomal DNA primers against softwood sapstain fungi. *Mat. Org.* 32, 183–193.
- Kim, S. H., Uzunovic, A. and Breuil, C. 1999. Rapid detection of *Ophiostoma piceae* and *O. quercus* in stained wood by PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 65, 287–290.
- Kimura, Y., Suto, S., and Tatsuka, M. 2002. Evaluation of Carcinogenic/Co-carcinogenic activity of chikusaku-eki, a bamboo charcoal by-product used as folk remedy, in BALAB/c 3T3 cells. *Biol. Pharm. Bull.* 25 (8), 1026–1029.
- Land, C. J., Banhidi, Z. G., and Albertsson, A. 1987. Cold-tolerant (psychrotrophic) moulds and blue stain fungi from softwood in Sweden, growth rates in relation to pH and temperature. *Nord. J. Bot.* 207, 97–106.
- Maria, D., Guillen, and Manzanos, M. J. 2002. Study of the volatile composition of an aqueous oak smoke preparation. *Food Chemistry* 79, 283–292.
- Markin, D., Dwek, L., and Berdicevsky, I. 2002. In vitro antimicrobial activity of Olive leaves. *Mycoses* 46, 132–136.
- Mun, S. P., Ku, C. S., Park, S. B. 2007. Physiochemical characterization of pyrolyzates produced from carbonization of lignocellulosic biomass in a batch-type mechanical kiln. *J. Ind. Eng. Chem* 13, 127–132.
- Ogata, M., Hoshi, M., Shimotohno, K., Urano, S., and Endo, T. 1997. Antioxidant activity of magnolol, honokiol, and related phenolic compounds. *Journal of the American Oil Chemists Society* 74, 557–562.

- Panasenko, V. T. 1967. Ecology of microfungi. *The Botanical Review* 33 (3), 189–215.
- Panbianco, C. 1991. An investigation of the growth of lignicolous marine fungi with special reference to the interference competition in vitro and in the field. *FEMS Microbiology Ecology* 14:19–24
- Pereira, A. P., Ferreria, I. C. F. R., Marcelino, F., Valentao, P., Andrade, P. B., Seabra, R., Estevinho, L., Bento, A., and Pereira, J. A. 2007. Phenolic compounds and antimicrobial activity of Olive (*Olea europaea* L. Cv. Cobrancosa) Leaves. *Molecules* 12, 1153–1162.
- Prats, E., Bazzalo, M. E., Leon, A., and Jorrin, J. V. 2003. Accumulation of soluble phenolic compounds in sunflower capitula correlates with resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Euphytica* 132, 321–329.
- Rauha, J. P., Remes, S., Heinonen, M., Hopia, A., Kahkonen, M., Kujala, T., Pihlaja, K., Vuorela, H., and Vuorela, P. 2000. Antimicrobial effects of Finnish plant extracts containing flavonoids and other phenolic compounds. *Int. J. Food Microbiol* 56, 3–12.
- Saitou, N. and Nei, M. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstruction phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425.
- Schoeman, M.W., Webber, J.F. and Dickinson D.L. 1995. Chain-saw application of *Trichoderma harzianum* Rifai to reduce fungal deterioration of freshlu felled pine logs. *Material und Organismen* 28:243–250
- Schroeder, S., Kim, S.H., Cheung, W.T., Sterflinger, K. and Breuil, C. 2001. Phylogenetic relationship of *Ophiostoma piliferum* to other sapstain fungi based on the nuclear rRNA gene, *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 163–167.
- Schwarze, F. W. M. R. 2007. Wood decay under the microscope. *Fungal Biology Reviews.* 21, 133–170.
- Seifert, K.A. 1993. Sapstain of commercial lumber by species of *Ophiostoma* and *Ceratocystis*. In: *Ceratocystis and Ophiostoma taxonomy, ecology and pathogenicity* (Eds. Wingfield, J.J., K.A. Seifert, and J.F. Webber). ASM. St. Paul MN. USA.
- Shearer, C.A. and H. Zare-Maivan. 1988. In vitro hyphal interactions among wood-leaf-inhabiting ascomycetes and fungi imperfecti freshwater habitats. *Mycologia* 80: 31–37.
- Song, D.S., Kim, J.J and G.H. Kim. 2003. Fungi colonizing tower: identification and their decay capabilities. *Proceeding of the IAWPS2003.* 184–189

- Spatafora, J. W., M. blackwell. 1994. The polyphyletic origins of the ophiostomatoid fungi. *Mycol. res.* 98, 1–9.
- Suki, C. and Highley T.L. 1996. Fungal removal of wood sapstain caused by *Ceratocystis coerulea*. *Materials und Organismen* 30:45–51
- Tamerler, C.B., Martinez, A.T. and T. Keshavarz. 2001. Production of lipolytic enzymes in batch cultures of *Ophiostoma piceae*. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 76: 991–996.
- Vaughn, S. F. and Gardner, H. W. 1993. Lipoxygenase-derived aldehydes inhibit fungi pathogenic on soybean 1. *Journal of Chemical Ecology* 19 (10), 2337–2345.
- Vilgalys, R. and Hester, M. 1990. Rapid genetic identification and mapping of enzymatically amplified ribosomal DNA from several *Cryptococcus* species. *J. Bacteriol.* 172, 4238–4246.
- Voda, K., Boh, B., and Vrtacnik, M. 2004. A quantitative structure–antifungal activity relationship study of oxygenated aromatic essential oil compounds using data structuring and PLS regression analysis. *J. Mol. Model* 10, 76–84.
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis, M. A., Gelfand, D. H., Sninsky, J. J. and White, T. J., Eds.), pp. 315–322. Academic Press, New York.
- Zabel, R.A. and J.J. Morrell. 1992. *Wood microbiology: Decay and its prevention.* Academic Press, Inc. San Diego, CA, USA.
- 김재진, 김규혁. 2000. 라디에타소나무 원목으로부터 분리된 *Trichoderma* 속의 형태학적 특징에 의한 분류 및 RAPD-PCR 기법에 의한 종간 유연관계. 한국목재공학회 '2000 춘계학술발표논문집, pp. 156–161

*Changing Scenarios in  
Fungal Research and Innovation*



ABSTRACTS



**ASIAN MYCOLOGY CONGRESS  
(AMC 2007)**  
&  
**X<sup>th</sup> INTERNATIONAL MARINE  
AND FRESHWATER MYCOLOGY  
SYMPOSIUM (IMFMS)**

**2-6 DECEMBER 2007**

**PARKROYAL PERANG,  
MALAYSIA**

Organised by:



**AMC**



**NOD**

Supported by:



*Malaysia 50th Anniversary*





### Activities and Comparison of Various Antifungal Agents for Controlling Fungal Contaminants on Wood

Velmurugan Natarajan, Sun-Sik Chum, Sung-Jin Kim, Yang-Soo Lee\*

Department of Forest Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University,  
561-756, Republic of Korea

(\*Corresponding Author: yssoolee@chonbuk.ac.kr)

The antifungal activity of 6 chemical compounds from different companies was evaluated against microorganisms in laboratory conditions. The test compounds HU-10, HU-5, HU-2 and NZ-10, NZ-5, NZ-2 dissolved in sterile distilled water in 7500 dilution range for incubation period of 10 days then 100 ml of supernatant was taken from each compounds and dissolved in media containing beef extract 3 g, peptone 5 g, agar 30 g and distilled water 1 l (pH6). The microorganisms *Aspergillus niger* (KCCM 11724), *Chaetomium globosum* (KCCM 31212) and *Penicillium pinophilum* (KCCM 60085) were grown in this media. While the control has maintained with out test compounds. The result has shown that there was a 24, 36, 49 mm (4-5 days) growth of *Aspergillus niger* in NZ-10, NZ-5, NZ-2 chemical containing media, respectively. There was no growth in other agar plates. It is clear from the results that growth of microorganisms completely inhibited by HU company chemicals compare than NZ company chemicals. There was a 17 mm (4-5 days) growth of *Aspergillus niger* in NZ-2 chemical containing medium when the test compound dilution added into the media without incubation period. There was no growth in other agar plates. In this experiment result showed that HU company chemicals having more potential to act against fungi compare than NZ company chemicals, because there was no growth in HU company chemical containing agar plates. The final result has showed that HU chemical more effective against microorganisms better than NZ chemicals.

This study was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (No. 104625001).

### Antifungal Agent Efficiency For Controlling Sapstaining Fungi On Red Pine And Korean Pine

Yang-Soo Lee<sup>\*</sup>, Sun-Sik Chun, Velmurugan Natarajan, Choi-Mee Suk.

Department of Forest Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, 561-756, Republic of Korea

(\*Corresponding Author: yssoolee@chonbuk.ac.kr)

The efficiency of antifungal agents controlling sapstaining fungi on red pine and Korean pine was evaluated in the laboratory. The antifungal components and percentage used for controlling sapstain fungi on red pine and Korean pine are given in the below table:

Antifungal Agent	Percentage Used
BSC	0.50, 1.00, 1.50, 2.00
BXC	0.75, 1.00, 1.25, 1.50
HCO	0.75, 1.00, 1.25, 1.50
HEO	0.13, 0.25, 0.50, 0.75
NPO	1.25, 1.50, 1.75, 2.00
WGD	0.75, 1.00, 1.25, 1.50

While the control was maintained with out antifungal agents. Growth coverage of fungi on both wood types were registered in 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week. These results show that 1 % WGD has significantly reduced the fungal growth on red pine and 0.25 %, 0.75 % WGD has reduced the fungal growth on Korean pine. The minimum concentration of antifungal agent required for fungal inhibition on red pine was evaluated by other experiment. It shows result that 0.75 % HCO, 0.13 % HEO required in 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks then 0.75 % WGD used in 2<sup>nd</sup> week and 1 % WGD required in 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks. The result clearly shown that HE was the better chemical providing complete control at the lowest concentration. The same kind of experiment was carried out in Korean pine. The results show that 0.25 % HEO required in 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup> week and 0.50 % required in 8<sup>th</sup> week. 0.75 % HCO required in 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> weeks. 0.75 % WGD used in 4<sup>th</sup> and 8<sup>th</sup> week. 0.50 % WGD used in 2<sup>nd</sup> week. This was also shown the potential of HE chemical against fungi at low concentration. The study found that the eradication of fungi by antifungal agents depended on antifungal agents concentration and incubation period.

This study was supported by Technology Development Program for Agriculture and Forestry, Ministry of Agriculture and Forestry, Republic of Korea (No. 104625001).

### **Growth Inhibition of Sapstain Fungi on Japanese Red Pine and Korean Pine by Various Antifungal Agents**

**Yang-Soo Lee<sup>\*</sup>, Sun-Sik Chun, Velmurugan Natarajan and Choi-Mee Suk**

Department of Forest Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University,  
561-756, Republic of Korea

(\*Corresponding Author: yssoolee@chonbuk.ac.kr)

Sapstain does not reduce the strength of wood, which affect the appearance of wood due to colonization caused by the melanin like pigmented fungal hyphae, which are responsible for bluish-black or black discoloration of the wood. Some Chemical control strategy targeted against this type of decay would therefore be considered successful if it inhibited fungal growth. The current experiment presents the results of a study to examine the role of various antifungal agents produced by different companies. 6 chemicals from different companies inhibited the growth of sapstain fungi on Japanese Red Pine wood and Korean Pine wood in different concentration. Growth inhibition of fungi was tested for 6 weeks and results were registered 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, and 6<sup>th</sup> week respectively. The result showed that 0.13 % HEO inhibit fungal growth on Japanese Pine Wood (JPW) up to 100 % in 2<sup>nd</sup> week, 98 and 93 % in 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> week respectively and 1 % WGD inhibit fungal growth on JPW up to 96 % in 2<sup>nd</sup> week and 92, 82 % in 4<sup>th</sup> and 6<sup>th</sup> week respectively. BXC, HCO and BSC inhibit the fungal growth on JPW up to 80 % only at 1.5, 1.5 and 2.0 % concentration used. This result showed that HEO has high potential to inhibit fungal growth on JPW at very low concentration. Another experiment result suggested that 0.5 % WGD inhibit fungal growth on Korean Pine Wood (KPW) up to 100 % in 2<sup>nd</sup> and 4<sup>th</sup> week and 82 % inhibition in 6<sup>th</sup> week. 0.5 % NPO inhibit fungal growth on KPW 99.3, 97.1, 92.1 % in 2<sup>nd</sup>, 4<sup>th</sup>, 6<sup>th</sup> week respectively. BXC, HCO and HEO inhibit the fungal growth on KPW only at 1.0 % concentration used. It was clear result showed that WGD has more potential to inhibit fungal growth at very low (0.5 %) concentration. In concert, these experiments may develop important information on chemicals role in sapstain inhibition on wood.

**A Field Trial: The Effect of Antifungal Agents for Controlling Sapstain Fungi on *Pinus radiata***

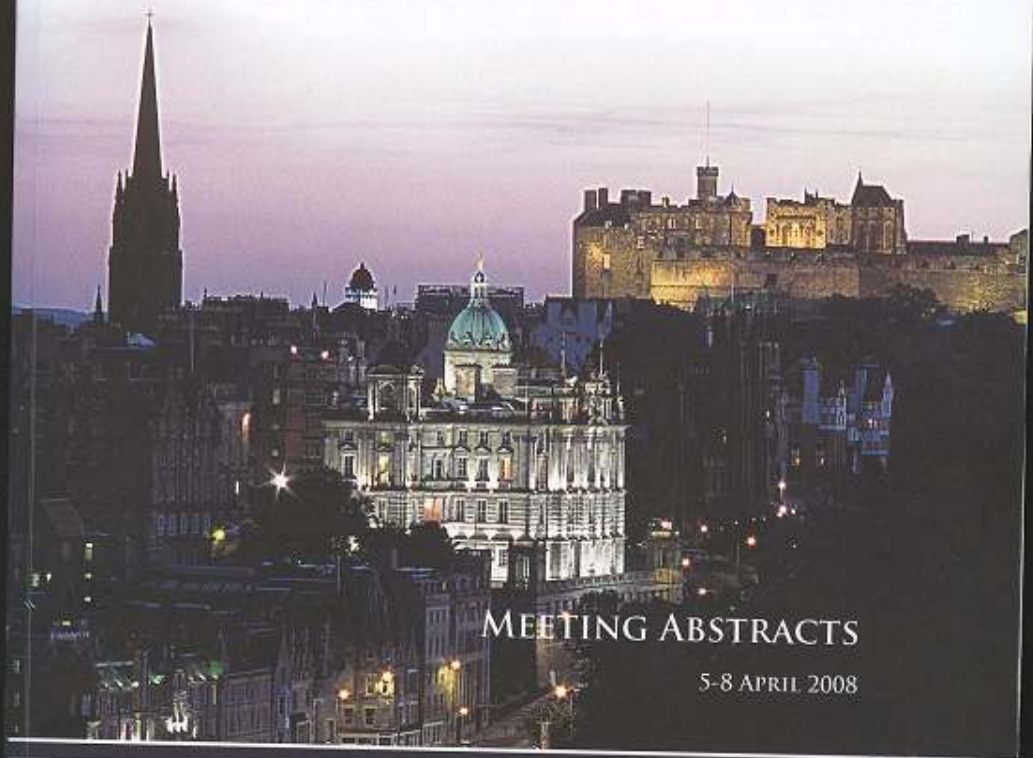
**Velmurugan Natarajan, Sun-Sik Chun, Sung-Jin Kim and Yang-Soo Lee\***,  
Department of Forest Science, College of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University,  
561-756, Republic of Korea

(\*Corresponding Author: [ysoolee@chonbuk.ac.kr](mailto:ysoolee@chonbuk.ac.kr))

A field trial has been set up to assess the antifungal control of sapstaining fungi in *Pinus radiata*. The wood sample has taken from Gunsan city, Jeonbuk in the length of 4.0 cm x 10 cm x 100 cm. Which was very clean, without bark and decontaminated wood sample. We have treated the wood samples with two company chemicals (HEO and HU). 30 wood panels were inoculated with 0.5, 1.0, 2.0 % of chemicals in sterile distilled water while control has maintained with out chemical compounds. Treated and Untreated wood samples were arranged as block stack pile arrangement, separately for 3 months (July 2005 to September 2005). The block stack has covered by polythene pack to prevent the contamination. The rating has given depends on degree of damage on wood samples by fungi. Present result has showed that when 0.5 % HEO chemical used 2.4 and 25.3 % fungal coverage occur in wood after 5 and 12 weeks respectively, and when 2 % of same chemical used 12.1 % fungal coverage occur after 12 weeks, but there was no fungal coverage in wood until 5 weeks in same condition. It shows that HEO chemical is effective only in 2 % concentration and which can prevent 87.9 % fungal growth only. But in the similar case while we using HU chemical there was no fungal coverage occur in all chemical concentrations (0.5, 1.0, 2.0 %) until 12 weeks. It is clear result that HU chemical can prevent fungal growth on *Pinus radiata* at minimum chemical concentration. It is concluded that HU chemical has more potential against sapstaining fungi on *Pinus radiata*.

ECFG 9

9<sup>TH</sup> EUROPEAN CONFERENCE  
ON FUNGAL GENETICS



MEETING ABSTRACTS

5-8 APRIL 2008

UNIVERSITY OF EDINBURGH

**PR7.56**

**Phylogenetic analysis of some wood xylariaceae isolated from East Asian countries**

Natarajan Velmurugan<sup>1</sup>, Cherdchai Phosri<sup>2</sup>, Sang-Sub Han<sup>3</sup>, Dong-Min Sa<sup>3</sup>, Yang-Soo Lee<sup>1</sup>, Mi-Suk Choi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Forest Science and Technology, Institute of Agricultural and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Chonbuk, Republic of Korea, <sup>2</sup>Department of Sciences, Faculty of Sciences & Technology, Piboonsongkram Rajabhat University, 156 Moo 5 Tambon Plichumpoi Amphor Muang, Phitsanulok 65000, Thailand, <sup>3</sup>Institute of Agricultural and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Chonbuk, Republic of Korea, <sup>4</sup>College of Agriculture, Life & Environments Sciences, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Republic of Korea

The nucleotide sequence of ITS 1, 5.8S rDNA and ITS 2 of 14 strains belong to Xylariaceae sp. were determined. On the analysis of sequences, a total number of 14 strains were identified and grouped into 8. The XY-3008 and XY-3009 strains were belong to same group, and showed 89.96% identities with *Xylaria bambusicora* (Genebank accession no. EF026123). This results suggested that the XY-3008 and XY-3009 strains was clearly distinct with *X. bambusicora* sp. XY-3003 strain was high homologies with those of *X. apiculata* CBS 365 (Genebank accession no. AF263027) and *X. bambusicora*. XY-3013 and XY-3014 were grouped with *Daldinia* sp. (Genebank accession no. AM749927) and *Entonaema cinnabarium* (Genebank accession no. AM292043) and XY-3005 was high identified with *Hypoxylon monticulosum* (Genebank accession no DQ223749). In group V, 97% similarity was observed between *Hypoxylon stygium* (Genebank accession no AJ390409), *Annulohypoxylon stygium* Genebank accession no DQ2237361) and XY-3004, XY-3012, XY-3012 strains. XY-3002, XY-3006 and XY-3007 strains were homologies with those of *Xylaria multiplex* (Genebank accession no DQ322155) and *Rosellinia* sp. ST2310 strains (Genebank accession no DQ322077). XY-3011 strain was clearly distinct those of deposited Xylariaceae in Genebank database, and only showed homologies 90% with *Nemania illita* (Genebank accession no EF026122). In this results indicated that the strains of XY-30008, XY-3009 and XY-3011, respectively, might represent a new group or subgroup into Xylariaceae.

**PR7.57**

**Investigating global futures for regulation on ABS of genetic resources**

Eun-Mi Kim<sup>1</sup>, Natarajan Velmurugan<sup>2</sup>, Dong-Min Sa<sup>3</sup>, Yang-Soo Lee<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Department of International Trade, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Chonbuk, Republic of Korea, <sup>2</sup>Department of Forest Science & Technology, Institute of Agriculture & Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Chonbuk, Republic of Korea, <sup>3</sup>College of Agriculture, Life & Environments Sciences, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Republic of Korea

Conservation and innovation are in conflict with one another because innovation cannot be made without a change. While the South part possessing genetic resources advocates conservation of genetic resource, the North part using the resources has a preference public use of genetic resources but need private property right for bio-industrial products. These contradict interests led to the negotiation and establishment of Convention on Biological Diversity (CBD) and the Trade Related Intellectual Property rights (TRIPs). The CBD negotiations originally focused on conservation alone. Soon, however, the negotiators included national sovereignty to genetic resources and a threefold objective- Conservation, Sustainable, Access and Benefit Sharing (ABS)- to reflect the worldwide concern to prevent unfair exploitation of the rich genetic wealth and traditional knowledge of the developing countries by the developed world. TRIPs agreement stimulates technological innovation through harmonization and strengthening of domestic patent legislation by all WTO members. The industrialized countries advocated it in order to ensure revenue from innovations in all technological fields, including biotechnology. Several scholars maintain that there is a potential conflict between CBD and TRIPs with regard to ABS because the two regimes operate with different approaches to property rights pertaining to genetic resources - hence, different objectives. This paper tries to anticipate the future for global regulation on ABS of genetic resources using a realist and ideational perspective. According to these theoretical frameworks implementation of the ABS of genetic resources would be hindered by the stronger regulatory force of the TRIPs for the following reasons. First while ABS advocates are generally politically weaker stakeholders the TRIPs is supported by stronger stakeholders including the US and the agribusiness and pharmaceutical industries. Second by industrialized member states pushed by strong multinational corporations, the WTO is stronger organization having capital and information necessary for negotiation. Third the WTO enforcement mechanism is strong enough to force member states to respect TRIPs.

**PR7.45**

**The fungal path for D-galacturonate catabolism**

Satu Hilditch<sup>1</sup>, Suvi Berghäll<sup>2</sup>, Janis Liepins<sup>3</sup>, Merja Penttilä<sup>1</sup>, Peter Richard<sup>1</sup>

<sup>1</sup>VTT Technical Research Centre of Finland, Espoo, Finland, <sup>2</sup>University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Helsinki, Finland, <sup>3</sup>University of Latvia, Institute of Microbiology and Biotechnology, Riga, Latvia

Pectin is a major component of the primary cell wall of plants and mainly consists of D-galacturonate. D-galacturonate is an important carbon source for microorganisms living on decaying plant material. Bacterial catabolic pathways have been described but a eukaryotic pathway has remained unknown. We show that the D-galacturonate pathway in the mold *Hypocrea jecorina* (*Trichoderma reesei*) is different than the pathways in bacteria.

In the fungal catabolic pathway D-galacturonate is first reduced to L-galactonate by an NADPH-utilizing D-galacturonate reductase (GAR1). Then a water molecule is removed from L-galactonate by an L-galactonate dehydratase (LGD1) and L-threo-3-deoxy-hexulose is produced. Subsequently an L-threo-3-deoxy-hexulose aldolase (LGA1) splits L-threo-3-deoxy-hexulose to L-glyceraldehyde and pyruvate, and an NADPH-utilizing L-glyceraldehyde reductase (GLD1) converts L-glyceraldehyde to glycerol.

The activity of GAR1, LGD1 and LGA1 was induced when *H. jecorina* mycelia were grown on D-galacturonate but not when grown on other carbon sources. GLD1 was equally present on all the tested carbon sources. Deletion of the *gar1*, *lgd1* or *lga1* gene in *H. jecorina* resulted in a strain unable to grow on D-galacturonate. All the four genes of the pathway were identified, cloned from *H. jecorina* cDNA library, functionally expressed in the heterologous host *S. cerevisiae*, and the kinetic properties of the enzymes were determined.

**PR7.46**

**Inhibitory effect of bamboo vinegar and wood vinegar towards sapstaining fungal growth**

Natarajan Velmurugan<sup>1</sup>, Sang-Sub Han<sup>2</sup>, Dong-Min Sa<sup>2</sup>, Yang-Soo Lee<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Forest Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Chonbuk, Republic of Korea, <sup>2</sup>Institute of Agriculture and Life Sciences, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Chonbuk, Republic of Korea, <sup>3</sup>College of Agriculture, Life & Environment Sciences, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Republic of Korea

The antifungal activity of bamboo vinegar and wood vinegar were investigated by radial mycelial growth measurement technique and characterisation of both extracts were performed by GC-MS analysis. Both bamboo and wood vinegar are natural resources and acidic dark brown liquid by-products of bamboo and broad leaved trees charcoal burner. Two percentage MEA plates were prepared amended with 0.001, 0.01, 0.1, 0.5 and 1.0 % of both bamboo vinegar and wood vinegar. Six mm plugs from the plates growing *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma tetropii*, *Ophiostoma narcissi* and *Ceratocystis ips* were transferred to 2 % MEA plates contain different concentrations of both extracts. The results revealed that both extracts were highly active at minimum concentrations (0.1-1.0 %) used. GC-MS analysis was performed to search for compounds with antifungal activity. The chloroform fractions of compounds were identified as 2,6-dimethoxy phenol, dehydroacetic acid, 2,3,5-trimethoxy toluene and 5-hydroxy-3-oxo-2-propionyl-1-gamma-1-acetone-4-heptanoic acid in bamboo vinegar and 2-methoxy phenol, 2-methoxy-4-methyl phenol, 2,6-dimethoxy phenol, dehydroacetic acid and 2,3,5-trimethoxytoluene in wood vinegar by MS analysis. These phenolic compounds have powerful antifungal activity. Organic acids comprises 21.89 % in bamboo vinegar and 18.60 % in wood vinegar, the total phenolic content was 58.06 % in wood vinegar and 62.64 % in bamboo vinegar. The antifungal activity of bamboo vinegar and wood vinegar may arise from its phenolic content and pH. These extracts are easily available, inexpensive and non-toxic to environment, hence the applications of these extracts in wood industries are beneficial and uncomplicated.

CLEAN - Soil, Air, Water

**CLEAN** SOIL  
AIR  
WATER

**Antifungal activity of neutralized wood vinegar with water extracts of  
*Pinus densiflora* and *Quercus serrata* saw dusts**

Journal:	CLEAN - Soil, Air, Water
Manuscript ID:	draft
Wiley - Manuscript type:	Research Paper
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Velmurugan, Natarajan; Chonbuk National University, Institute of Agriculture and Life Sciences, Department of Forest Science and Technology Han, Sang-Sub; Chonbuk National University, Institute of Agriculture and Life Sciences, Department of Forest Science and Technology Lee, Yang-Soo; Chonbuk National University, Forest Science and Technology, Institute of Agriculture and Life Sciences
Keywords:	Antifungal activity, wood vinegar, Phenolic compounds, <i>Pinus densiflora</i> water extract, <i>Quercus serrata</i> water extract

 scholarONE  
Manuscript Central

Wiley-VCH



Manuscript Number:

Title: CHARACTERIZATION OF "CHIKUSAKU-EKI" AND "MOKUSAKU-EKI" AND ITS INHIBITORY EFFECT ON SAPSTAINING FUNGAL GROWTH IN LABORATORY SCALE

Article Type: Original Paper (max 10,000 words)

Keywords: Chikusaku-eki; Mokusaku-eki; Sapstaining fungi; Phenolic compounds; Antifungal activity.

Corresponding Author: Dr. Yang-Soo Lee, Ph.D.

Corresponding Author's Institution: Chonbuk National University

First Author: Natarajan Velmurugan, M. Sc.

Order of Authors: Natarajan Velmurugan, M. Sc.; Sang-Sub Han, Ph. D.; Yang-Soo Lee, Ph.D.

Abstract: "Chikusaku-eki" and "Mokusaku-eki" are natural resources and acidic liquid by-products of bamboo and broad leaved trees charcoal burner. These products contain more than 200 ingredients, including phenols, poly phenols and acetic acids. These by-products were tested for their fungicidal activity against sapstaining fungi. These extracts were more effective against sapstaining fungi at minimum concentrations (0.10-1.0 %) used in 2 % MEA medium. Three Chikusaku-eki (CE-I, CE-II and CE-III) and 2 Mokusaku-eki (ME-I, ME-II) extracts were tested against 4 sapstaining fungal samples to evaluate the inhibition range on sapstaining fungal growth. *Ophiostoma flexuosum*, *Ophiostoma tetropii*, *Ophiostoma narcissi* and *Ophiostoma ips* were the sapstaining fungi used in this study against bamboo and wood extracts. The chloroform fractions of these extracts were analyzed by GC-MS and both the extracts contained 2,6-dimethoxy phenol, dehydroacetic acid and 2,3,5-trimethoxytoluene. Results revealed that compounds of "Chikusaku-eki" and "Mokusaku-eki" had remarkable fungal growth inhibitory effect at lower concentrations. The Chikusaku-eki and Mokusaku-eki has both antifungal and antioxidant properties and has a potential for use as natural preservative in wood industries. These extracts are easily available, inexpensive and non-toxic to environment, which validates its applications in wood industries. Wood slice tests were displayed the effective role of both extracts in laboratory level. Colonization and penetration of fungal hyphae into wood elements was evaluated by scanning electron microscope.



**Preparation of Ag<sup>+</sup> impregnated chitosan membrane complex and exploiting its fungicidal activity against wood staining fungi**

Journal:	<i>Polymer International</i>
Manuscript ID:	draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Velmurugan, Natarajan; Chonbuk National University, Department of Forest Science and Technology Kumar, George; Chonbuk National University, Specialized Graduate School of Hydrogen and Fuel Cell Engineering Han, San; Chonbuk National University, Department of Forest Science and Technology Nahm, Kee; Chonbuk National University, Specialized Graduate School of Hydrogen and Fuel Cell Engineering Lee, Yang; Chonbuk National University, Department of Forest Science and Technology; Chonbuk National University, Department of Forest Science and Technology
Key Words:	Chitosan, Silver Nitrate, Chitosan membrane, Wood staining fungi, Antifungal activity



## 주 의

1. 이 보고서는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구보고서입니다.
2. 이보고서의 내용을 발표할 때에는 농림수산식품부에서 시행한 농림기술개발사업의 연구결과임을 밝혀야 한다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.