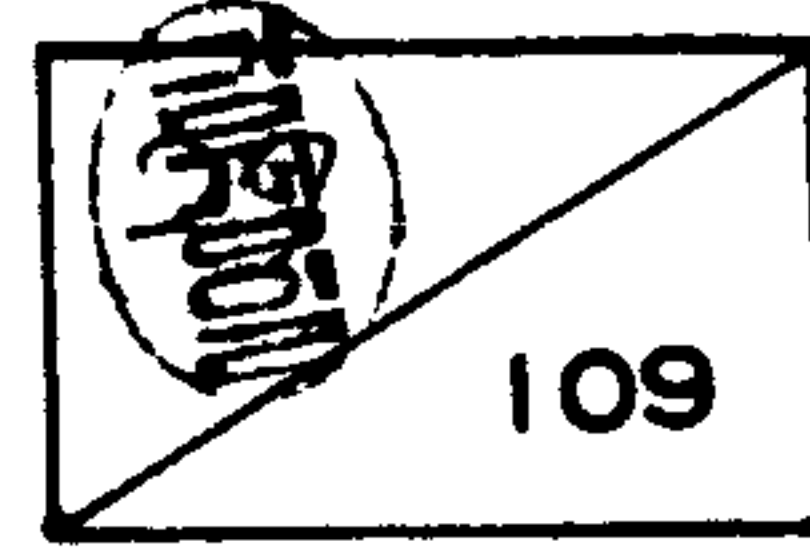


GOVP1199401320



73931
v.3

신규 살충성 천연물질 개발 연구 (Ⅲ)

Studies on the Development of New Insecticides
from Natural products(Ⅲ)

연구기관
한국과학기술연구원
부설 유전공학연구소

과 학 기 술 처



제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “신규 살충성 천연물질 개발 연구(Ⅲ)” 사업의 최종 보고서로 제출합니다.

1993 년 8 월

주관 연구 기관 : 한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소

연구책임자 : 김정일 (한국과학기술연구원 부설 유전공학연구소 책임연구원)

연구 원 : 이형규 (" " 선임연구원)

박승환 (" " 선임연구원)

박호용 (" " 선임연구원)

오세량 (" " 연구원)

구본탁 (" " 연구원)

신병식 (" " 연구원)

최수근 (" " 연구원)

연구 조 원 : 한창훈 (" " 기 능 원)

여 백

요 약 문

I. 제 목 : 신규 살충성 천연물질 개발 연구 (Ⅲ)

II. 연구개발의 목적 및 중요성

농업생산성 향상을 위하여 벼멸구, 이화명나방 등을 비롯한 해충방제에 수많은 종류와 많은 양의 화학합성 농약을 사용해 오던 현대 과학적 농업은 이제는 그러한 농약의 과도한 사용과 축적 또는 잔류성에 의해서 새로운 사회문제를 야기하게 되고(독성, 환경오염, 생태계 파괴 등), 한편으로는 기존 농약에 대한 해충들의 내성이 나타나기 시작하므로써 해충방제에 보다 더 진보된 기술을 필요로 하게 되었다. 이러한 문제는 비단 우리의 경우만이 아니고, 미국, 일본 등을 비롯한 선진국에서도 마찬가지여서 새로운 해결 방안 모색에 노력을 기울이고 있다. 그 방법중의 하나로 미생물의 대사산물을 이용한 해충방제를 시도해 오고 있으며, 성공적인 연구 결과로 avermectins, tetranactin, milbemycins 등의 살충제가 산업화되었거나 산업화 과정에 있다. 이 분야의 연구는 선진국에서도 아직 개발 초기단계에 있고, 산업화와 성공적인 예가 있어서 새로운 살충제 개발의 가능성은 매우 크다고 볼 수 있다. 더구나 토양방선균의 분포는 지역환경에 따라 매우 다양한 양상을 보이므로 우리의 자연환경중에 분포된 방선균을 대상으로 연구를 한다는 것은 그 가능성을 더욱 높여준다고 할 수 있다.

따라서 본 연구의 1년차 단계에서는 우리나라 각 지역의 토양을 채취하여 방선균을 분리하고, 일정한 조건하에서 배양하여 살충성 검정을 행하였고, 본 연구의 중요 기술부분인 살충성 검정 방법을 확립하였다. 2년차 단계에서는 확립된 방법에 따라 방선균 분리, 배양 및 살충성 검정을 계속하였고

(누계 7,000 균주 이상 검색), 3년차 단계에서는 살충성 재현 및 항균성 검정 등의 선발과정을 통하여 우수 균주를 선발하였으며, 이들이 생산하는 살충성 물질의 분리 및 구조분석을 수행하였다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1. 방선균 분리용 토양시료를 각지역(전국)의 각각 다른 환경에서 채취하였다.
2. 분리된 방선균은 확립된 검정법에 따라 살충성 검정을 실시하였다.
3. 검정 완료후 선발된 살충성 균주에 대해서 기존의 항균성 균주를 제외 시키기 위한 항균력 검정을 실시하였다.
4. 1차로 선발된 균주에 대해서 그들의 대사산물을 추출하여 살충력의 재현성, 항균력의 검정 등을 실시하여 최종 우수 균주를 선발하였다.
5. 최종 선발된 균주는 대량 배양하여 살충 성분을 분리, 정제하였으며 정제된 살충성 물질의 화학 구조를 동정하였다.

Ⅳ. 연구결과 및 활용에 대한 건의

1. 전국 각 지역으로부터 총 2,570점의 토양시료를 채취하였다. 지역별로는 서울·경기 127점, 충남 992점, 충북 212점, 전남 195점, 전북 391점, 경남 118점, 경북 244점, 강원도 291점 등이었다.
2. 방선균 분리용 선택배지는 Starch-casein-KNO₃ 배지를, Colony 순수 분리용 배지는 GAPY 배지를 사용하였으며, 각각 30℃에서 7일간 배양시킨 후 4℃에서 보관하였다. 동일 site에서 나온 각 균주들을 외관상 비교하여 가능한 한 다른 균주들을 선발하려고 노력하였다 그 결과 7,105 균주를 분리하였다.
3. 1차 살충력 검정에서 50% 이상 치사율을 나타낸 것은 597 균주(전

- 제 균주의 8.4%)였고, 성장조절 효과를 보인것은 25균주(0.35%)였다.
4. 1차 선발된 622 균주에 대해서 *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* 등을 이용한 항균력을 조사한 결과, *B. subtilis*에 양성인 것이 339 균주(살충 활성균주의 54.5%), *E. coli*에 양성인 것이 238 균주(38.2%), *C. albicans*에 양성인 것이 380 균주(61.1%)로 나타났고, 위 3가지 균주에 모두 음성인 것이 120 균주(19.3%)로서 총 6027 균주의 1.7% 확률을 보였다.
 5. 이상의 과정에서 선발된 120 균주에 대해서 살충력의 재현성 확인 및 활성물질의 분리과정에 활용하기 위한 방법으로 누에를 이용한 2차 살충성 검정을 행하였다. 균주 배양물을 아세톤으로 추출하여 누에의 인공사료에 투입하여 검정한 결과, 배양방법과 검정대상을 달리하여도 안정되게 살충력이 재현되는 21 균주를 선발하였고, 이들이 생산하는 살충활성물질을 G(+) 세균 3종, G(-) 세균 3종, 진균 1종등 7종의 피검균에 대한 항균력 검정을 실시한 결과 최종적으로 12 균주를 선발하였다.
 6. 선발된 균주는 대량 배양하여 살충성 물질을 분리정제하였다. 이 과정에서 동일 계열 물질들을 생산하는 것으로 확인된 물질들은 제외하였고 정제된 살충성 물질들을 구조 동정하였으며 그 결과는 다음과 같다.
 - 1) No. 46 균주로부터 piericidin C₁, C₂, C₃, D₁을 분리 및 구조동정을 하였고, No. 117 균주의 살충성분도 동일한 물질임을 확인하였다.
 - 2) No. 660 균주는 배양방식에 따라 각각 다른 살충성 물질을 생산하는데, fermentor 배양에서 3-nitropropanoic acid를 분리 및 동정하였고, flask 배양에서는 macrolide 계열로 추정되는 물질을 분리하였다. 현재 3-nitropropanoic acid를 부분구조로 하는 antibiotics가 보고된 바가 없고, No. 660 균주를 G(+) 3종, G(-) 3종,

진균 1종에 대한 항균력 검정과 6종의 항생물질에 대한 감수성을 조사한 결과, 기존의 항생물질을 생산하지 않을 가능성이 크다고 판단되므로, 앞으로 물질 생산에 필요한 배양 방법을 확립하고 살충성 물질을 분리 동정함이 필요하다.

- 3) No. 1166 균주로부터 macrolide 계열 화합물인 bafilomycin A₂, B₁을 분리 및 구조동정을 하였고, 유사 균주들인 NO. 1017, NO. 1263, NO. 1436, NO. 1455, NO. 2333, NO. 5090 등으로 부터 생산된 살충 성분도 동일한 계열의 화합물들임을 확인하였다.
- 4) No. 2077 균주로부터 macrolide 계열 화합물 albocycline을 분리 및 구조동정 하였다. albocycline은 G(+) 세균에 항균력을 나타내는 물질로서 보고되었으나, 살충활성에 대해서는 본 실험 연구 결과로서 처음으로 확인되었다. 이 물질은 인축독성이 거의없어(LD₅₀ (mouse): > 1,000 mg/kg), 앞으로 활성을 높이는 구조개량을 시도하기에 유망한 lead molecule로 평가된다.
- 5) No. 3369 균주로부터 macrolide 계열 화합물 oligomycin A를 분리 및 구조동정을 하였다.
- 6) No. 3369 균주의 살충성 물질로부터 변환된 화합물 3369 SM1과 3369 N을 분리 및 구조분석하였다. 3369 SM1과 3369 N은 원물질에 비해 살충활성이 1/100 이하로 낮으며, *Bacillus subtilis*에 새로운 항균활성을 나타내었다.

7. 본 연구의 수행 결과로서 다양한 방선균 균주를 확보하였으며, 살충성
검정 방법과 살충성 물질의 분리 방법을 확립하였다. 그리고, 분리 동
정된 물질에서 새로운 활성을 확인하거나 화학 변환된 물질로부터 새
로운 활성을 발견하였다. 따라서 기존 물질의 발견으로서도 새로운 용
도의 생리활성을 발견할 수 있고, 물질개량 방법으로 신규 물질을 발
견하여 생리활성을 증대시키거나 다양하게 적용할 수 있다는 가능성
을 확인할 수 있어, 본 연구는 신물질 연구에 중요한 기술과 자원을
확보하였다는데 큰 의의가 있다.

여 백

SUMMARY

I. Title

Studies on the Development of New Insecticides from Natural Products (III)

II. Objectives and Importance of the Research

Agricultural chemicals which are used massively as insecticides, herbicides and etc. for increasing the agricultural production have brought the unexpected social problems related with excessive use, abuse, cummulation, residue and etc., and further, induced resistant strains of pests. At present, the more improved techiques must be used for overcoming these problems.

Advanced nations including U.S.A. and Japan are trying to resolve these problems, and as a method, to use the metabolites of microorganisms for protection of crops, livestock and human. There are three cases of success from their research, that is, avermectins, tetranactin and milbemycins which were or is being commercialized by companies.

Because the research of this area is the early stage of development and there are successful examples, there is much possibility of development of the new pesticide. In

addition, we have the advantage of natural circumstances which may have different strains of microorganisms from other countries.

In the first year of this research, we collected soil samples from various sites, isolated different actinomycetes morphologically, cultured the strains under experimental conditions and screened insecticidal activities. We established the simple and more reproducible method of first screening for selecting active strains of actinomycetes.

In the second and third year, we continued to isolate and culture actinomycetes, and screen insecticidal activity. And we isolated insecticidal compounds from active strains and identified their structures with spectral data.

IV. Results and Recommendations

1. Soil samples of different circumstances were collected from various sites of the whole country.
2. The isolated strains were tested for their ability to produce insecticidal compounds by the method established in the first year of this research.
3. Antimicrobial tests with insecticidal active strains were carried out for excluding known strains,

and selected the strains showed insecticidal activity and no antimicrobial activity.

4. The first screened strains were retested to confirm the reproducibility of insecticidal activity and no antimicrobial activity.
5. After finally chosen strains were cultivated, insecticidal compounds were isolated and their structures identified

IV. Results and Recommendations

1. The total number of soil samples from various sites was 2,570, which was composed of 127 from Seoul and Kyonggi-Do, 1,204 from Choongchung-Do, 586 from Chulla-Do, 291 from Kangwon-Do and 362 from Kyongsang-Do.
2. Starch-casein-KNO₃ medium was used for isolation of actinomycetes from soil, and GAPY medium for single colony culture. Each colony was incubated at 30°C for a week and keep at 40°C. Total number of strains from soil samples was 7,105.
3. In first insecticidal screening, 597 strains showed above 50% of lethal rate and 25 strains showed regulation effect.
4. Antibiotic activity tests were examined against *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli* and *Candida albicans* with the

above 622 strains, As results, 399 strains against *B. subtilis*, 238 strains against *E. coli* and 380 strains against *C. albicans* showed positive activity, and 120 strains showed no activity against the above three microorganisms.

5. The second bioassay with the above 120 strains was done against larvae of *Bombyx mori* in order to confirm the reproducibility of insecticidal activity and use the results in the process of active compounds isolation, and 21 strains showed stable insecticidal activity. Insecticidal compounds from the extracts of them were rechecked antibiotic activity against G(+) 3 strains, G(-) 3 strains and candida 1 strain. Finally 12 strains were chosen.
6. Insecticidal compounds were isolated and their structures indentified with spectral data. The results are as follows.
 - 1) Piericidin C₁, C₂, C₃ and D₁ were isolated from.No46 strain, and also contained in the extract of No117 strain
 - 2) Two different insecticidal compounds were isolated from No 660 strain. One was 3-nitropropanoic acid from fermentor culture, while the other, isolated from flask culture, was suspected one of the macro-

lide compounds. From the results of antibiotic test against 7 test microorganisms and antibiotic sensitivity against 6 known antibiotics, it is expected that insecticidal compound from flask culture was not known antibiotic compound. Searching for suitable cultivation method is needed.

- 3) Bafilomycin A₂ and B₁ were isolated from No.1166 strain, and also contained in the extracts of No.1017, No.1263, No.1436, No.1455, No.2333 and No.5090.
- 4) Albocycline was isolated from No.2077 strain. It was the first time that albocycline, known as a weak antibiotic compound against G(+) bacteria, showed insecticidal activity. Because its mammal toxicity is reported very weak (LD₅₀ (mouse): >1,000 mg/kg), albocycline may be a good lead molecule to increase activity through chemical modification.
- 5) Oligomycin A was isolated from No.3369 strain.
- 6) Compound 3369 SM₁, produced during isolation compound of 3369 and compound 3369 N, chemically modified from compound 3369 were isolated and their structures identified. Both of them showed no insecticidal activity on *B. mori* and newly showed antibiotic

activity against *B. subtilis*.

7. we have secured various strains of actinomycetes and established screening method and accumulated know-how necessary for searching new compounds.
8. Through the research project, we have assured that new compounds and new bioactivities could be discovered from known compounds as well as new compounds.

CONTENTS

Chapter 1. Introduction	19
Chapter 2. Materials and Methods	31
1. Soil Sampling and Isolation of Actinomycetes	31
2. Test Insect and Bioassay Method	32
3. Isolation of Insecticidal compounds	35
4. Structure and Bioactivity of Compound 3369	47
Chapter 3. Result and Discussion	51
1. Soil Sampling and Culture of Isolated Actinomycetes	51
2. Isolation and structures of Insecticidal Compounds	59
3. Structure and Bioactivity of Compound 3369, 3369 SM ₁ and 3369 N	106
References	121

여 백

목 차

제 1 장	서 론	19
제 2 장	재료 및 방법	31
제 1 절	토양시료 채취 및 방선균 분리 배양	31
1.	토양시료의 채취	31
2.	방선균의 분리 및 배양	31
제 2 절	공시층의 확보 및 살충성 검정방법 확립	32
1.	공시층의 확보	32
2.	1 차 살충성 검정	33
3.	항균력 검정	33
4.	2 차 살충성 검정	34
제 3 절	살충성 물질의 분리 정제	35
1.	No. 46 균주의 살충성 물질 분리 정제	35
2.	No. 660 균주의 살충성 물질 분리 정제	38
3.	No. 1166 균주의 살충성 물질 분리 정제	41
4.	No. 2077 균주의 살충성 물질 분리 정제	43
5.	No. 3369 균주의 살충성 물질 분리 정제	45
제 4 절	살충성 물질 3369 의 구조 변화와 활성의 관계	47
1.	살충성 물질 3369 의 분해물질 분리 정제	47
2.	살충성 물질 3369 의 oxime화 물질 분리 정제	48
3.	살충성 물질 3369 와 변환된 화합물 3369 SM1 및 3369 N의 활성비교	49

제 3 장	결과 및 고찰	51
제 1 절	방선균 분리 및 균주 선발	51
1.	토양시료의 채취 및 방선균 분리	51
2.	살충활성 및 항균력 검정과 활성안정성 조사	54
제 2 절	살충성 물질 분리 및 구조 동정	59
1.	No. 46 균주의 살충성 물질 구조 동정	59
2.	No. 660 균주의 살충성 물질 구조 동정	70
3.	No. 1166 균주의 살충성 물질 구조 동정	77
4.	No. 2077 균주의 살충성 물질 구조 동정	88
5.	No. 3369 균주의 살충성 물질 구조 동정	96
제 3 절	살충성 물질 3369로부터 변환된 3369 SM1 과 3369 N의 구조 분석	106
1.	화합물 3369 SM1의 구조	106
2.	화합물 3369 N의 구조	113
3.	살충성물질 3369, 3369 SM1 및 3369 N의 활성비교	117
참 고 문 헌	121

제 1 장 서 론

오늘날 우리는 물질 특허제도의 도입으로 인하여 Royalty 지불 부담이 가중되었고, 우리나라를 강력한 경쟁대상국으로 여기고 있는 선진제국들에 대해서 경제적 예측상태로 갈 것인가 아니면 동등한 경쟁상태가 될 것인가 하는 중요한 시점에 이르게 되었다. 이러한 난관을 극복할 수 있는 방법으로서는, 천연자원이 부족한 우리의 여건으로 볼 때 높은 부가가치를 갖는 신물질 창출이 최선의 길이라 할 수 있다.

신물질 창출에는 여러가지 방법이 많이 있지만 그중에서도 미생물을 이용한 산업은 그 가능성이 높은 분야이며, 그동안 의약 부분에 있어서는 항생제, 항암제, 면역조절제, 효소저해제 등 다방면으로 집중연구가 이루어지고 있어서 개발된 산물도 상당수에 이르고 있다. 그러나 생물농약 부분에 있어서는 비교적 소극적 상태였던 관계로 많은 결과를 남기지 못하였으나, 근래에 들어서면서 적극적인 연구로 많은 관심을 불러 일으키고 있다. 토양 미생물중 특히 방선균은 수많은 생물학적 활성을 갖는 이차대사 산물을 생산하고 있어서 1930년대 이후 수천의 antibiotics들이 방선균에서 비롯된 것들이고,¹⁾ 최근에는 살충제의 자원으로서까지 가능성을 보여줌에 따라 높은 부가가치 창출에 지대한 희망을 안겨주게 되었다.

기존 화학합성 농약에 대한 심각한 사회적 문제는 비단 우리만의 경우가 아니고 세계적인 추세에 있어서도 마찬가지여서 일본, 미국등을 비롯한 선진국에서도 미생물의 대사산물을 이용한 진보된 해충방제 기술 개발에 역점을 두고 연구중이며, 성공적인 연구결과로 avermectins, tetranactin, milbemycins 등의 살충제가 산업화 되었거나 산업화 과정에 있다. 이러한 생물농약의 특징은 극미량에서 우수한 살충력을 가지면서도 그외의

동식물에 대해서는 아직까지 심각한 독성이 발견되지 않았다는 점이다.

이 분야에 대한 연구는 선진국에서도 개발 초기 단계에 있고, 산업화의 성공적인 예가 있어서 좋은 guide가 될 수 있으며, 더구나 토양중의 방선균은 각 지역적 특성에 따라 독특한 차이를 보이고 있으므로 자연환경이 다른 우리나라의 방선균 분리에 많은 기대를 가질 수 있기 때문에 중점적인 지원이 된다면 새로운 살충제 개발, 즉, 신물질 창출의 가능성은 매우 크다고 볼 수 있다.

【 병충해와 농약 】

농업에 있어서 농약 사용은 생산성 향상에 필수적 요소이다. FAO의 보고에 의하면 만일 농약을 사용하지 않을 경우 세계적으로 33.8%의 감수율을 보이게 되며 특히 아시아 지역(43.3%)이 더욱 심하게 피해를 입게 된다고 하였다.²⁾ 1980년 미국에 있어서 병충해 잡초에 의한 손실은 insects 13.0%, diseases 12.0%, weeds 12.0% 등 총 37.0%로서 (농약을 사용했음에도) 금액으로 볼 때 780억불에 이르고 있으며³⁾ 그중 해충에 의한 피해액은 점차 증가한다고 하였다. 이러한 상황에 대해서 원인 분석을 한것을 보면 1) 품종 개량된 작물이 곤충에 대해 감수성이 증가하였거나, 2) 해충의 천적이 소멸되므로서 살충제의 사용이 더 필요하게 되었고, 3) 살충제에 대한 저항력이 증가되었다. 4) 단일작물의 계속적인 재배증가로 작물의 윤작이나 종(種) 변화가 감소되었고, 5) 폐기된 작물이나 과일등의 방치로 곤충의 서식처를 제공하게 되는 비위생적인 환경 등을 지적하였다. 우리나라의 경우 1960년대 이후 소위 현대 과학적 농법이라 하여 벼멸구, 이화명나방 등을 비롯한 농작물의 해충을 없애기 위해서 수많은 종류와 많은 양의 살충제를 사용하게 되었고, 그로 인해서 농업 생산성을 상

당한 수준으로 높일 수 있었으나, 오늘에 이르러서는 그러한 농약의 독성, 오·남용, 축적 또는 환경 잔류성등이 새로운 사회 문제로 대두하게 되었다. 한해 농약으로 인한 중독 사망자가 약 1,400명에 이르고 있고 농민의 절반정도가 만성 중독 증세를 보이고 있으며, 환경오염에 의한 생태계의 변화로 자연계의 균형이 파괴되어 가고 있는 실정이다. 또한 기존 농약의 비선택적 살충성에 의한 해충의 천적 생물을 비롯한 유익 곤충의 격감과 농약에 대한 내성 발현 등으로 농약 사용량의 증가를 초래하였고, 최근에 이르러서는 농산물의 잔류 농약으로 인한 공해 식품 문제가 대두되면서 구매력의 감소가 발생하는 등 이제는 반드시 해결해야 할 커다란 사회문제가 되어버린 상황이다.

우리나라의 수도(水稻) 병충해 발생상황을 보면⁴⁾ (표 1), 중국으로부터 비래되는 해충으로서 매년 문제가 되는 방제 대상인 멸구류의 발생지역이 약 60만ha에 이르고, 나방류의 발생지역만도 30만ha 이상이며, 이들을 방제하기 위해서 연면적이 거의 4-10배에 이르고 있어서 매년 농약살포에 많은 인력과 경비가 소요되고 있는 실정이다. 1989년도의 국내 농약 수급 상황을 보면 농약 매출액은 총 2,945 억원으로 전년도에 비해 10.7% 증가되었고, 그중 살충제가 1,126 억원으로 38.2%를 차지하고 있으며 생산량을 볼 때에도 전년도에 비해서 12%의 증가를 보였다.⁵⁾ 수입된 약제를 살펴보면⁶⁾ (표 2) 原劑(99,344,000 불)중 살충제가 33.5%(33,253,000 불)을 차지하고 있고 기타 합성원료나 완제품을 포함시킨다면 액수는 더욱 늘어날 것이다. 한편, 세계의 농약시장은 1990년에 185억불로 추정되고 있고, 그중에서 살충제가 33.4%로 약 62억불에 이를 것으로 내다보았다.

(표 3)

Table 1. 수도(水稻)병충해 발생 및 방제 상황

(단위 : 만ha)

	1987년		1988년		1989년	
	발생	방제	발생	방제	발생	방제
멸구류	63.5	322.6	64.8	256.0	59.4	222.1
이화명나방	9.3	405.1	8.7	429.1	16.3	439.4
흑명나방	8.1		10.0		0.4	
기타	14.4		14.8		41.2	
도열병	10.6	423.4	7.0	355.7	14.4	354.9
앞집무늬마름병	52.2	233.8	65.7	201.3	52.7	173.3
흰잎마름병	4.3	87.7	2.0	47.7	2.4	46.4
기타	2.7	3.1	0.4	6.3	0.7	8.6

Table 2. 약제별 수입상황('89년도)

(unit : US 1,000 \$)

구분	내용	비율(%)	
원제(原劑)	살충제	33,253 (33.5%)	18.4
	살균제	36,502 (36.7%)	20.2
	제초제	28,693 (28.9%)	15.8
	생장조절제	720 (0.7%)	0.4
	전착제	177 (0.2%)	0.1
	소계	99,344 (100%)	54.9
합성원료	78,474	43.3	
완제품	3,330	1.8	
계	181,148	100	

Table 3. 세계의 농약 시장 추이 예측

년	1980	1981	1982	1983	1984	1985	1986	1990예측
살충제	4,025	4,300	4,350	4,280	4,400	5,000	5,450	6,175
살균제	2,175	2,850	2,925	2,820	2,500	2,800	3,250	3,940
제초제	4,750	5,100	5,250	4,950	5,950	7,075	7,600	7,100
식물성장 조절제 기타	650	750	775	750	900	1,025	1,100	1,285
합계	11,600	13,000	13,300	12,800	13,750	15,900	17,400	18,500

* 1983년을 기준으로 한 예측치

【미생물이 생산하는 살충성분】

1963년 *Streptomyces mobaraensis*에서 piericidin이 분리된 이후 미생물을 이용하여 살충성 물질을 찾으려는 연구는 외국의 유수한 농약 업체(Merck, Sharp & Dohme, Bayer, Pfizer, Sandoz 등)와 연구소(Kitasato 연구소 등)를 중심으로 차츰 활기를 띠게 되었고, 특히 방선균의 대사산물로부터 상당수의 살충성 물질이 분리·보고되었다. 보고되었 (Table 4)

지금까지 발견된 살충성 물질들은 거의 대부분이 누에, 진드기, 기생충 등 생물체를 직접 검정에 적용하여 그 활성을 조사한 후 얻어진 결과였으며, 작용기작의 일부를 이용한 chitinase, chitin synthetase 등의 inhibitor는 각 enzyme을 곤충에서 직접 추출하거나 시판하는 시약을 이용한 경우도 있었다.

PIERICIDINS : 1963년 Tamura⁷⁾ 등이 *Streptomyces mobaraensis* 에서 piericidin A (=A₁)와 B (=B₁)를 처음 분리한 이후 1977년 Yoshida 등⁸⁾이 *Streptomyces pactum*으로부터 많은 수의 piericidins (A₁₋₄, B₁₋₄, C₁₋₄, D₁₋₄)를 분리 보고하였다. 본 화합물은 치환된 pyridine ring에 불포화 측쇄 (unsaturated side chain)가 결합된 형태로서 구조상 Coenzyme Q와 매우 유사한 관계로 mitochondrial transport system에서 competitive inhibitor로 작용, 매우 낮은 농도에서도 respiration을 차단하여 살충성을 나타낸다. 그러나 이러한 respiration 차단 효과는 다른 동물에서도 현저하게 일어나기 때문에 실용화 되지는 못하였다.

Table 4. Some Pesticidal Compounds from microorganisms.

compound	structure classification	microorganism	activity	remark
piericidins ^{7) 8)}	alkaloid	<u>Streptomyces mobaraensis</u> <u>S. pactum</u>	insect	highly toxic to mammals
aureothin ⁹⁾	aliphatic nitrobenzene	<u>S. thioluteus</u>	insect mites	//
tetranactin ¹⁰⁾	cyclic polyester (macrotetrolide)	<u>S. aureus</u> S-3466	nematodes insects	commercialized in Japan (1973)
avermectins ¹¹⁾	macrolide lactone	<u>S. avermitilis</u> MA 4680	nematodes insects	commercialized by Merck & Co. (1986)
milbemycins ¹²⁾	macrolide lactone	<u>S. hygroscopicus</u> subsp. <u>aurelofaciens</u>	insects acarides	commercializing in Japan
nikkomycins ¹³⁾	nucleoside peptide	<u>S. tendae</u> Tu-901	insects acarides mites	chitin synthase inhibitor

(Continued)

compound	structure classification	microorganism	activity	remark
isariins ¹⁴⁾	cyclodepsipeptide	<u>Isaria felina</u> (imperfect fungus)	insects	
L-681,110 ¹⁵⁾	macrolide lactone	<u>Streptomyces</u> sp. MA-5038	insects nematodes	Na ⁺ - K ⁺ ATPase inhibitor
L-alanosine ¹⁶⁾	N-nitroso amino acid	<u>Streptomyces</u> sp.	insects	chitinase inhibitor
leucanicidine ¹⁷⁾	macrolide lactone	<u>S. halstedii</u>	insects	
L-155,175 ¹⁸⁾	macrolide lactone	<u>S. hygrosco-</u> <u>picus</u> MA-5285	insects	
allosamidine ¹⁹⁾	aminoglycoside	<u>Streptomyces</u> sp. No.1713	insects	chitinase inhibitor

DESTRUXINS 와 **BASSIANOLIDE** ; Kodaira²¹⁾ , Tamura²²⁾ 등, Suzuki²³⁾ 등이 곤충의 병원성 곰팡이류인 *Metarhizium anisoplias* 의 배양액에서 살충성분으로 19-membered depsipeptide류인 destruxins 를 분리 보고하였고, Kanaoka 등이²⁴⁾ 누에의 병원성 곰팡이류인 *Beauveria bassiana* 로부터 누에 유충의 근육을 이완시키고 결국에는 폐사시키는 성분으로서, D- α -hydroxyisovaleric acid와 L-N-methylleucine 이 차례로 4분자 축합된 cyclic depsipeptide 성분을 분리하여 bassianolide라 명명하였다.

이들 성분들은 접촉독성이 아니고, 또한 antifeedant effect가 있으며 온혈동물에도 독성이 강해서 살충제로서는 실용성이 없었으나, 최근에 들어서는 destruxin류가 insect model에서 immunodepressant activity를 나타냈고,²⁵⁾ 임상적으로 쓰이고 있는 면역억제제인 cyclosporin

과 구조적 유사성도 있기 때문에 destruxins의 새로운 용도 연구가 진행중이며, bassianolide는 각종 동물 실험을 통해서 근육 수축 작용을 갖는 약물(acetylcholine, carbachol, pilocarpine, histamine, prostaglandin E₂ 등)에 대해서 길항작용을 나타낸다는 사실이 밝혀져²⁶⁾ 새로운 관심을 불러 일으키고 있다.

TETRANACTIN: 1971년 Ando 등은^{27) 28)} 팥바구미(Azuki bean weevil)를 실험곤충으로 하여 살충제를 검색하던중, 일본 Saitama의 Tsugashima에서 채취한 토양으로부터 *Streptomyces aureus* S-3466를 분리하였고, 그것의 배양 filter cake으로부터 살충성이 뛰어난 tetranactin을 찾아내었다. 본 화합물은 응애(*Tetranychus telarius*)에도 양호한 살충력을 나타냈으며, Gram(+)균과 몇가지 식물병원성 fungi에도 효력을 나타냈으나 고등동물에는 거의 독성이 없는 것으로 보고(LD₅₀, > 15 g/kg, mouse)되어, 1973년 상업화되었다. 상업화이후 tetranactin의 acaricidal activity는 우수했으나 ovicidal effect는 미약했기 때문에 이를 극복하기 위해서 유기인제, carbamate 등을 혼합한 synergism을 이용한 상품이 만들어지기도 하였다. (예를들면, Mitecidin-C[®]는 tetranactin과 4-chlorophenyl 4'-chlorobenzene sulfonate의 혼합물이고, Mitecidin-B[®]는 Carbamate와의 혼합물임).

AVERMECTINS: 토양방선균에서 1979년 avermectin류가 분리 보고되면서^{11) 33) 34)} 살충제 연구는 새로운 전기를 맞이하게 되었다. Merck, Sharp and Dohme Research Laboratories에서는 기생충의 일종인 *Nematospiroides debius*를 mouse에 감염시킨 동물 모델을 이용하여 직

접 activity screening을 하였고, 일본의 Kitasato 연구소에서는 토양으로부터 독특한 토양 방선균을 선별하여 제공하던중, Shizuoka, Ito city, Kawana에서 채취한 토양으로부터 형태학적으로 전혀 다른 *Stereptomyces avermitilis* MA-4680을 분리하였고, 여기에서 역사적인 avermectins가 발견되게 되었다. 이 program에 동원된 screening System에서 특기할 사항은 독특한 방선균의 선별과 bioassay를 지적할 수 있다. 특히 bioassay는 처음부터 동물실험을 행함으로써 많은 노력, 시간 및 경비가 소요되었지만 물질의 효능과 독성을 동시에 확인할 수 있는 장점이 더 효과적으로 작용하였다. 따라서 여기에서 여과된 물질들은 합리적인 약리효과를 가지면서도 독성이 거의 없을 가능성이 매우 클 것이라고 생각하였고, 실제로 그렇게 되었다.²⁹⁾

Avermectins는 구조적으로 16-membered macrolide lactone을 기본골격으로 하여 2개의 oleandrose를 갖고 있는 형태의 화합물로서 가축의 주요기생충, 선충류(nematodes), 절족동물(Arthropods: insect, lice, mite, tick)에 대해서 모두 활성을³⁰⁾ 나타내며, 또한 기존의 구충제에 내성이 있는 기생충에도 효력을 나타낸다. 이것은 avermectin의 작용기전이 GABA에 의한 neurotransmission 중재를 차단하는 새로운 기전이기 때문이며^{31) 32)} 따라서 GABA system이 결여되어 있는 platyhelminthes (편형동물문: 촌충류, 흡충류)에는 효력이 없다. Nematode 기생충에 대해서는 기존의 구충제인 fenbendazole, levamisole, thiabendazole 등에 비해서 2-3 order 이상의 강력한 potency를 갖는다.

Avermectin series 화합물중 그 활성 강도로 볼 때 A-series 보다는 B-series가 더 생리활성이 강하고, B-series 중에서도 Art-

hropod pest에 대해서는 B₁a가 제일 활성이 강하며, corn rootworm인 *Diabrotica undecimpunctata*에 대해서 B₂a가 제일 활성이 강하게 나타났다. 이러한 사실들에 따라서 avermectin B₁은 작물 보호용(농업용)으로 개발되었다. 이후 avermectin B₁의 구조중 C22와 C23사이의 이중결합을 화학적으로 환원시킨 22,23-dihydro avermectin은 수의용과 의약용으로 개발하게 되었고 그 명칭도 Ivermectin이라고 하였다. 최근에는 Ivermectin을 African river blindness라고 알려진 onchocerciasis(사상충증)의 원인 microfilaria인 회선사상충(*Onchocerca volvulus*, 사람의 피하조직에 기생하여 피부종양, 구진성 피부염, 안질 등을 유발시킴)의 구제에 human drug(MECTIZAN[®])으로 사용되고 있다.³⁵⁾ 1979년 avermectin 보고 이후 7년후인 1986년 미국의 Merck, Sharp & Dohme Co.에서 상품화 되어 시장에 출하하게 되었고 세계 살충제 시장을 크게 차지할 것으로 예상하고 있다.

MILBEMYCINS : 1974년, Sankyo Laboratories에서 기존의 어떤 insecticide나 acaricide 보다도 마 강력한 biocidal activity를 갖는 macrolides를 crude 한 상태로 분리하였다고 하였다.³⁶⁾ 이 화합물은 일본의 Hokkaido 지방 Kuttian에서 채취한 토양으로부터 분리된 *Streptomyces* strain B41-146에 의해서 생산된 것이었으며, 후에 본 균주를 분류하는 과정에서 aerial mycelia상에 “golden-yellow teardrops” 모양의 산출물을 생성한다는 뜻에서 그 학명을 *Streptomyces hygrosopicus* subsp. *aureolacrimosus*라고 명명하였다.³⁷⁾ 본 균주로부터 활성 물질 분리를 시도한 결과, 1980년 13개의 milbemycin ($\alpha_1 - \alpha_{10}$, $\beta_1 - \beta_3$)을 분리하였고³⁸⁾ 그후 mutant 를 이

용한 다른 유도체들이 속속 분리 보고 되었다. milbemycins는 구조적으로 avermectins와 아주 유사한데, 가장 큰 차이는 C13 위치에 α -L-oleandrosyl- α -L-oleandrosyl group이 없다는 점이다. milbemycins의 활성은 acarus (진드기 속), aphids (진딧물) 및 insects 등에 모두 살충성을 갖고 있으며 현재 일본에서 산업화 과정에 있다.

여 백

제 2 장 재 료 및 방 법

제 1 절 토양시료 채취 및 방선균 분리 배양

1. 토양 시료의 채취

우리나라 전역의 토양을 대상으로 농지토양, 산림퇴적물, 농가부식토 등 다양한 토양 환경으로부터 시료를 채취하였다.

채취 방법은 지표면으로부터 5 - 10 cm 깊이의 토양을 취하여 지명, 날짜, 채취장소 등을 기입하였고 토양 시료의 pH와 수분함량을 측정한 후 실험실에 보관하였다.

2. 방선균의 분리 및 배양

건조된 토양 시료 0.5 g을 멸균된 생리식염수 5ml에 넣고 충분히 교반한 후 0.5 ml 씩을 취하여 0.05% SDS와 6% yeast extract가 첨가된 용액 4.5 ml에 가한후 40 °C 항온조에서 20분간 방치하였다. 이들 멸균 증류수에서 10^{-3} - 10^{-5} 으로 희석하고 희석액 0.1 ml를 50 mg/L의 cycloheximide와 20 mg/L의 nalidixic acid가 첨가된 방선균 분리용 배지에 도말하였다.

방선균 분리 배지는 30 °C 항온기에서 7일간 배양하고, 나타난 방선균 colony들을 백금이를 사용하여 GAPY 배지에서 순수 분리하였으며 분리된 각 균주들은 4 °C에서 보관하였다. 분리 및 배양에 사용된 배지 조성은 Table 5와 같다.

Table 5. Media used for the isolation and cultivation of actinomycetes

Media	Composition
Starch-Casein-KNO ₃ medium (pH 7.3)	Soluble Starch 10 Casein 0.3 KNO ₃ 2.0 NaCl 2.0 K ₂ HPO ₄ 2.0 CaCO ₃ 0.02 MgSO ₄ ·7H ₂ O 0.05 FeSO ₄ ·7H ₂ O 0.01 Agar 15.0
GAPY medium (pH 7.2)	Glucose 10.0 Soluble Starch 20.0 Bacto Soytone 5.0 Yeast Extract 5.0 CaCO ₃ 1.0 Agar 15.0

제 2 절 공시충의 확보 및 살충성 검정방법 확립

1. 공시충의 확보

미생물의 신규 살충성 물질 개발을 위한 연구에서 검정용 곤충으로 벼멸구, 집누에나방, 집파리를 선정하여 실내에서 계대 사육하면서 실험에 사용하였다.

1) 벼멸구 (*Nilaparvata lugens*)

벼멸구는 기주 식물로서 추청벼의 유묘를 공급하여 온실 (22-23 °C, 16 L: 8 D, R.H. 75%)에서 계대 사육하였으며, 살충성 검정시 성충을 사용하였다.

2) 집누에 나방 (*Bombyx mori*)

집누에 나방은 동 실험실에서 제조한 인공 사료를 공급하여 온실 (25 °C, 16 L:8D, R.H. 65%)에서 계대 사육하였으며, 살충성 검정시 3령 유충을 선발하여 사용하였다.

3) 집파리 (*Musca domestica*)

집파리는 온실 (25 - 28 °C, R.H. 75%)에서 계대 사육하였으며 유충에는 송아지 사료와 쌀겨를 물에 반죽하여 공급하였다. 살충성 검정시에는 용화직전의 유충을 사용하였다.

2. 살충성 검정

분리 방선균의 1차 살충성 검정은 집파리 (*Musca domestica*)를 대상으로 하였다.⁴⁰⁾

검정방법은 GAPY 고체 배지에서 7 - 10일간 배양된 균체를 포함하는 agar를 1/2로 절단한 후 각각에 용화직전의 유충을 10마리씩 넣고 4일후의 사충율을 조사하였으며 아울러 7일후 처리된 유충의 용화 및 우화율을 조사하였다. 살충성 검정은 처리유충에 대한 50% 이상의 치사율을 기준으로 판정하였다.

3. 항균력 검정

1차 살충성 검정에서 살충력이 인정되는 균주들을 대상으로 *Escherichia coli* BE1186, *Salmonella typhimurium* SL 1102, *Pseudomonas aureginosa* IFO 13130, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* R-209, *Candida albicans* IFO 1594 등 7가지의 미생물에 대한 항균력 검정을 실시하였다.

1) Agar plug 방법

LB 고체 배지위에 test 균주를 포함한 0.75% top agar를 부어 굳힌후 방선균이 배양된 GAPY 고체 배지의 agar를 한조각 떼어 top agar위에 올려놓고 생긴 생육저지환의 유무로 항균력을 판정하였다.

2) paper disc 방법

Agar plug방법에서 항균력을 나타내지 않는 균주들을 대상으로 항균성 물질을 체외로 분리하지 않는 균주들을 검정하기 위하여 paper disk 방법의 항균력 검정을 실시하였다. 방선균이 배양된 GAPY 고체 배지에 acetone을 넣고 충분히 교반한 후 추출물을 농축하고, agar plug 방법과 동일하게 준비된 top agar위에 paper disk를 올려 놓은 후 농축된 방선균 추출물을 paper disk 위에 처리하여 생긴 생육 저지환의 유무로 항균력을 판정하였다.

4. 2차 살충성 검정

1차 선발된 균주를 GAPY 액체 배지 50 ml에 접종하여 shaking incubator에서 28 °C, 7일간 배양하였다. 배양액은 원심 분리(5,000 rpm, 3 min)하여 균체와 배양 상등액으로 분리하고 균체는 acetone 50ml를 가하여 진탕한 후 여과하여 감압 농축하였고, 배양 상등액은 ethylacetate 30 ml로 추출하여 감압 농축한 후, 두 추출액을 검정에 사용하였다.

검정방법은 집누에 나방 유충(3령) 10마리가 포집된 처리구에 인공사료를 넣고 사료위에 일정량의 추출액을 가하는 방법을 사용하였으며 24시간 후의 사충율을 조사하였다.

제 3 절 살충성 물질의 분리 정제

1, 2 차의 살충성 검정에서 선발된 균주 중 살충력이 안정하게 재현되는 균주를 우선적으로 선발하여 이들이 생산하는 살충성 물질을 분리, 정제 하였다.

1. No. 46 균주의 대량 배양 및 살충성 물질 분리, 정제

선발된 NO.46 균주의 액체 배양 후 살충성 물질을 분리한 과정은 Fig.1 과 같다. 먼저, 살충성 물질의 분리능 및 항균력을 조사하기 위하여 flask 배양 (GAPY, 250 ml, 200 rpm, 28 °C, 5 days) 을 시도하였다. 배양액은 균체와 배양상등액으로 나뉘며, 균체는 acetone 30 ml 2회 추출 후 감압농축하고 농축된 수층을 CH₂Cl₂ 및 ethylacetate 각각 20ml 로 partition하여 유기용매층을 1 ml로 농축하였다. 배양상등액은 CH₂Cl₂ 30 ml 2회, ethylacetate 30ml 1회 추출하여 1 ml로 감압농축 하였다.

각각의 유기용매층과 수층을 동일 scale로 집주에나방 유충에 처리하여 살충능력을 조사한 결과, 살충성 물질은 균체 및 배양액에 모두 존재하였으며, 비수용성으로 유기용매층에서 살충력이 확인되었다. 추출액을 normal phase TLC (silica gel GF₂₅₄, hexane/acetone 2/1, v/v)와 reversed phase TLC (RP-18 F₂₅₄, methanol/H₂O 9/1, v/v)에 서 각각 전개한후 추출하여 살충성 물질의 위치의 확인과 살충력 및 항균력 검정에 사용하였다.

대량 배양은 위와 동일한 조건으로 배양한 후 원심분리 (5,000 rpm, 3 min.) 하여 배양 상등액과 균체 침전물로 나누고, 배양상등액은 column

(ϕ 15 × 50 cm)에 충전된 Amberlite XAD-4 (500 g)에 흡착시켜 증류수 1L와 20% acetone 1L로 세척한 후 acetone 1L로 용출하였고, 이를 다시 CH_2Cl_2 500 ml와 ethylacetate 500 ml로 추출하였다. 균체 침전물은 acetone 2L로 2회 추출하였으며, 배양 상등액 추출액과 합하여 농축하고, SiO_2 column (ϕ 5 × 50 cm) 상에서 hexane-acetone mixture (acetone 0 - 100%)를 사용하여 극성을 높여가며 용출시켰으며, 살충성 물질을 함유하는 분획을 모아 다시 Lobar Column RP-18 (ϕ 42 × 440 mm) 상에서 분리하였고, 최종적으로 HPLC RP-18 (ϕ 10 × 250 mm) 상에서 정제를 시도하였다.

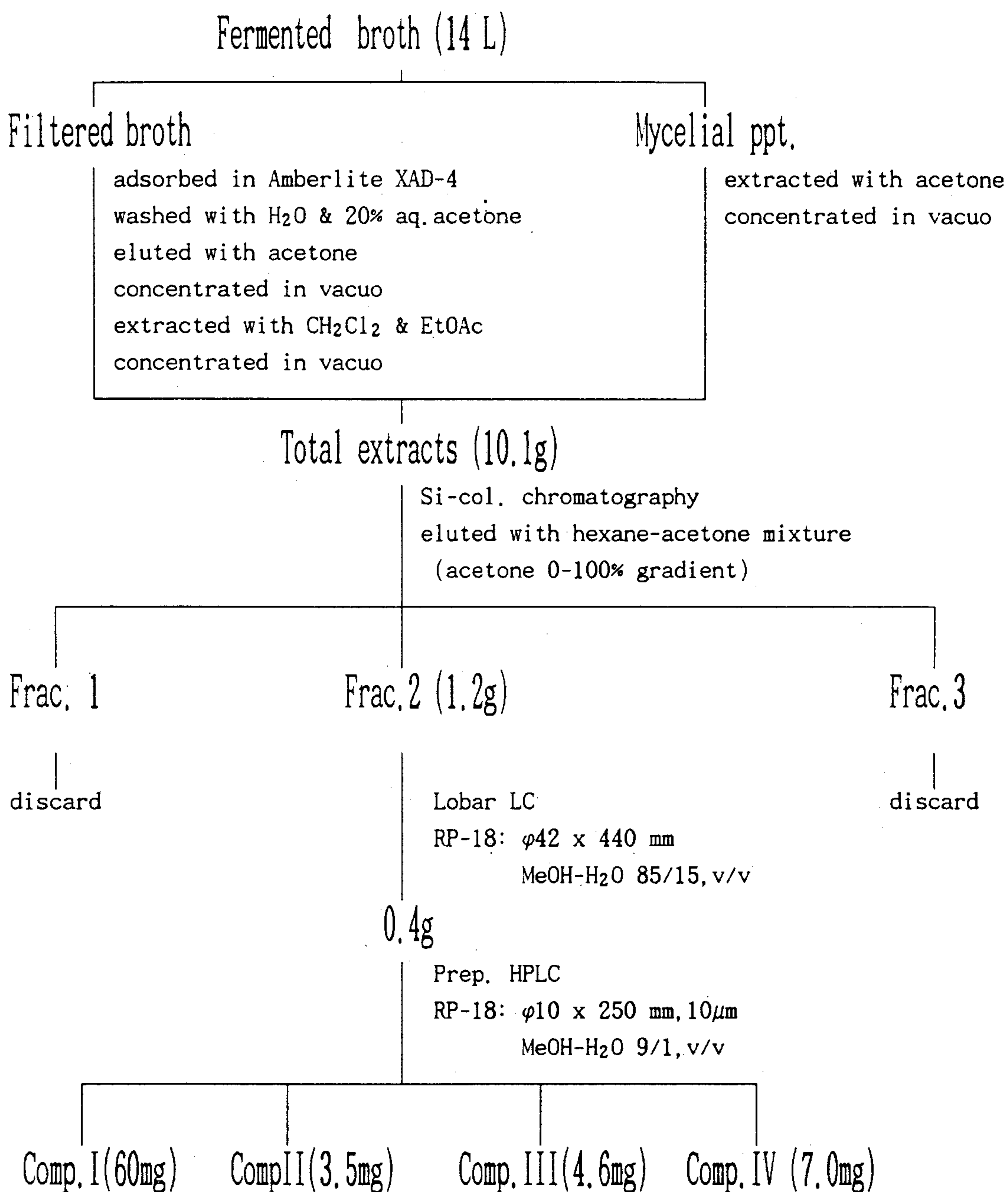


Fig. 1 Isolation procedure of insecticidal compounds from no. 46 strain

2. No 660 균주의 살충성 물질 분리, 정제

No 균주는 고체배양에서 배양액 및 용매 추출액의 살충 효과를 확인하였으나, 액체 배양에서는 살충성 물질의 생산이 일관되지 않았다. 그러나 flask 배양과 fermentor 배양에서 생산되는 살충성 물질이 다르다는 등, 균주의 생리가 특이한 것으로 판단되어 배양 방식에 따라 생산되는 물질을 비교해 보기 위하여 본 실험을 수행하였다.

먼저 fermentor 배양 (GAPY, 27 °C, 3 days) 후 살충성 물질을 분리한 과정은 fig.2와 같다.

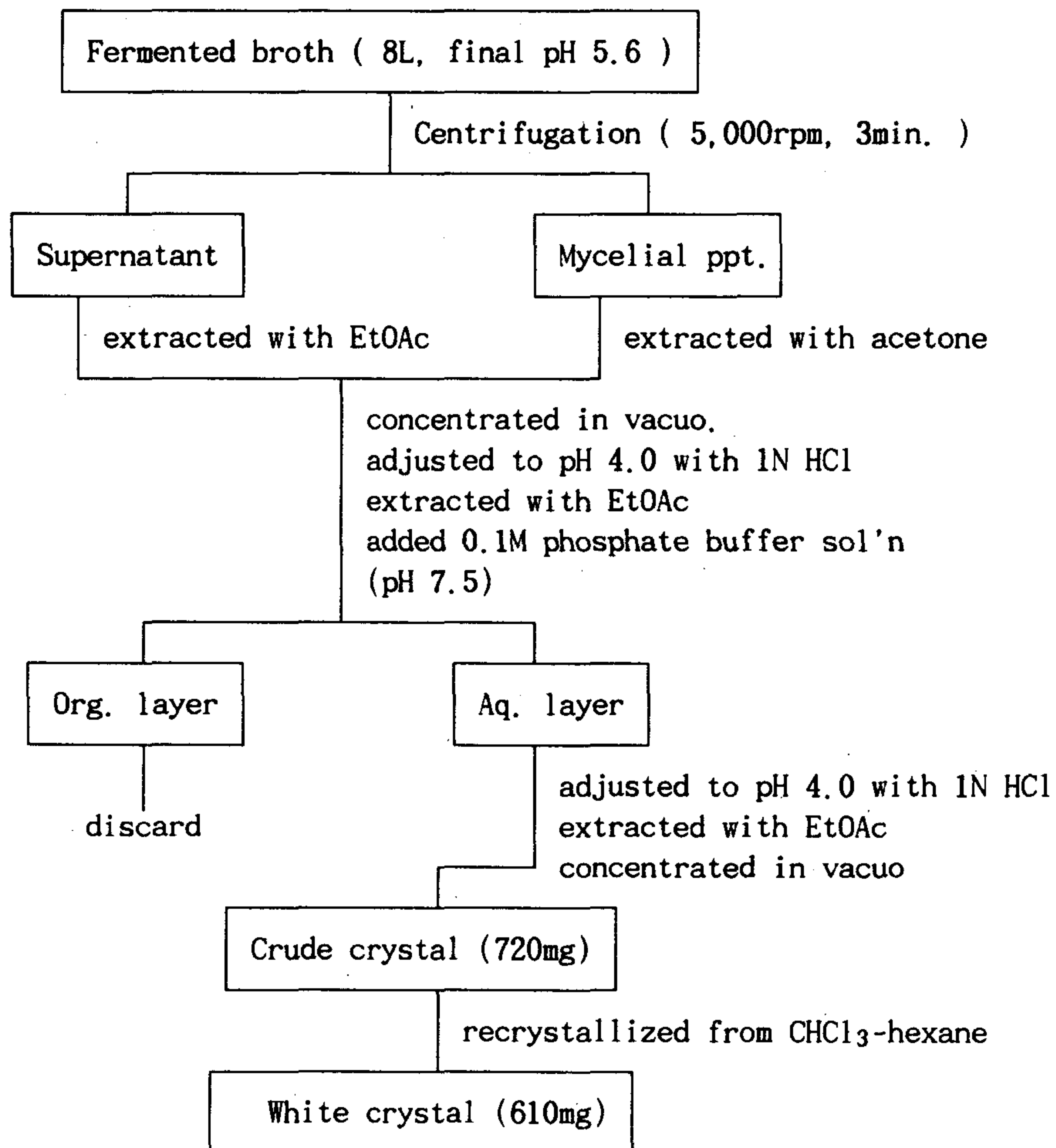


Fig.2 Isolation procedure of insecticidal compound 660-A after fermentor cultivation

배양상등액과 균체로부터 추출한 물질 660-A는 pH의 변화에 따라 용매에 대한 용해도가 크게 변화되는데, 이를 이용하여 partition 방법으로 살충성 물질 660-A를 분리하였고 재결정 방법으로 정제하였다.

flask 배양(GAPY, 27 °C 5 days)으로부터 살충성 물질을 분리한 과정은 fig.3와 같다.

배양 상등액과 균체로부터 추출한 살충성 물질 (660-B)은 fermentor 배양의 살충성 물질 660-A와는 다르게, 낮은 pH ($\text{pH} < 5.5$)에서 유기용매로 추출되지 않으며, 또한 분해되어 살충활성을 잃어버리기 때문에 pH의 조절없이 물질 분리를 수행하였다.

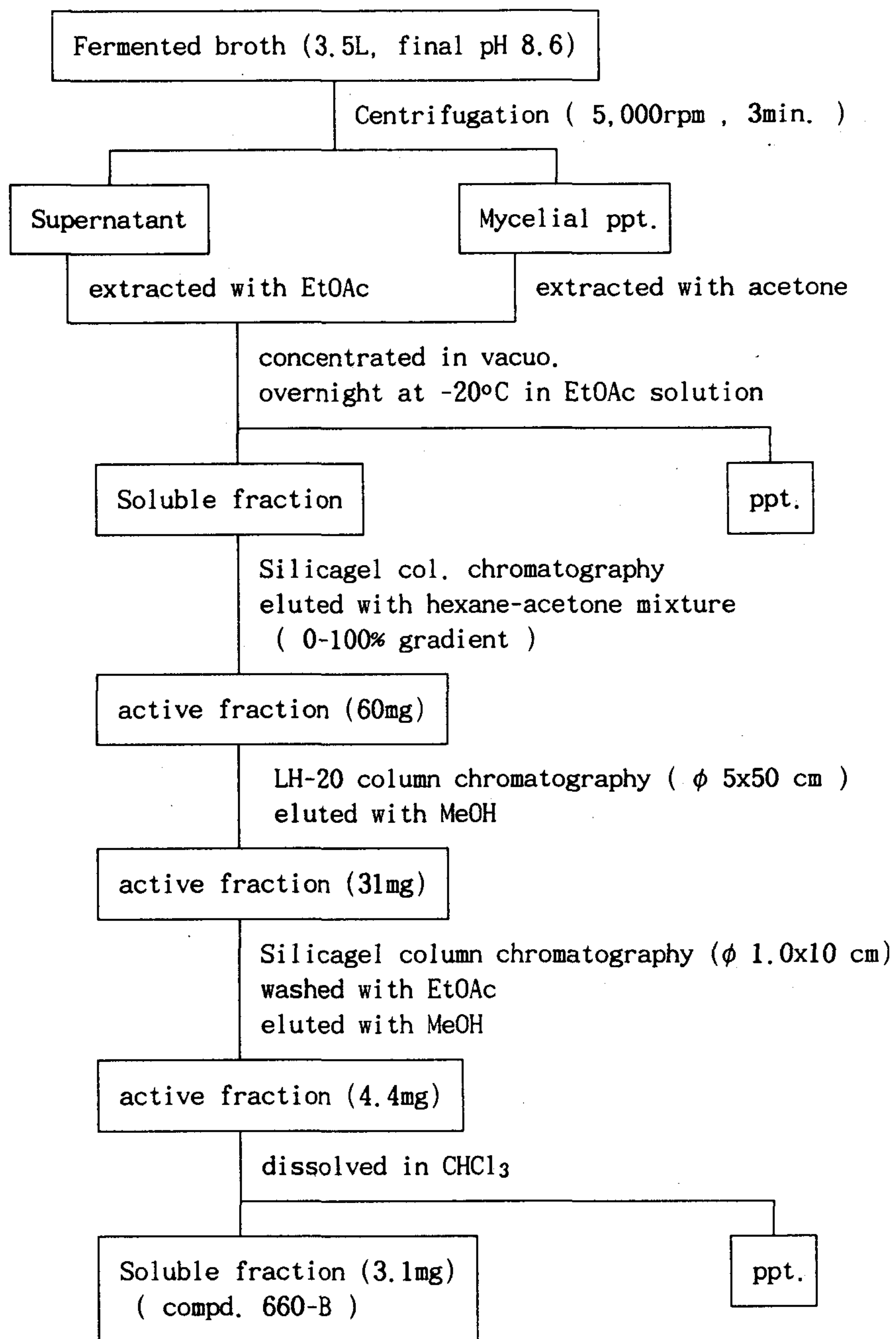


Fig.3 Isolation procedure of insecticidal compound 660-B after flask cultivation

3. No. 1166 균주의 대량배양 및 살충성 물질 분리, 정제

No 1166 균주의 액체배양 (GAPY, 27 °C, 48 hrs) 후 살충성 물질들을 분리한 과정을 Fig. 4와 같다. 살충성 물질들은 균체 및 배양 상등액에 모두 존재하였으며, 유기용매로 추출이 가능하며 초기 추출을 No. 46 균주의 방법과 동일하게 수행하였다. 총 추출물은 silica gel (300 g) 이 충전된 column ($\phi 5 \times 50 \text{ cm}$) 상에서 chloroform-methanol mixture (methanol 0 - 100%) 를 사용하여 극성을 높여가며 용출시켰다. 살충성 물질을 함유하는 분획은 chromatography 상 행태를 크게 달리하는 두 부분으로 나누어 분리를 시도하였는데, frac. 2 의 살충성 물질 분리에는 Lobar column (silica, $\phi 42 \times 440 \text{ mm}$) 상에서 hexane-isopropanol (9/1, v/v) 를 사용하였고, frac. 3에서는 동일 column 상에서 chloroform-methanol (95/5, v/v) 를 사용하여 분리작업을 수행하였다.

Frac. 2의 살충성 물질 함유 분획은 최종적으로 HPLC (RP-18, $\phi 10 \times 250 \text{ mm}$, acetonitrile-H₂O 85/15, v/v) 상에서 분리를 시도하였으며, frac. 3의 살충성 물질 함유 분획은 chloroform-hexane mixture (1/2, v/v) 에서 침전법으로 정제를 시도하였다.

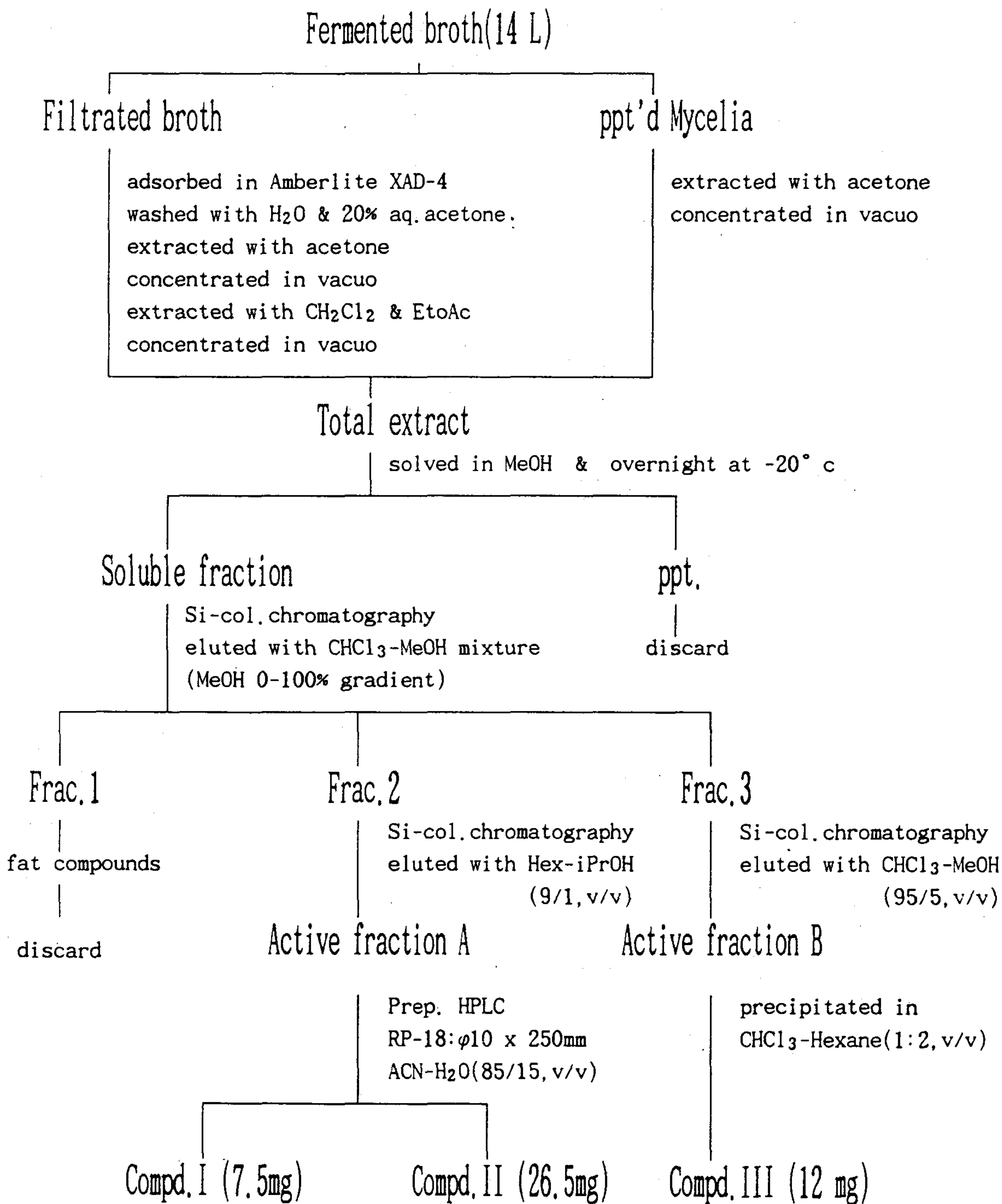


Fig. 4 Isolation procedure of insecticidal compounds from no.1166 strain

4. No 2077 균주의 살충성 물질 분리정제

No 2077 균주를 액체배양 (GAPY, 27 °C 5 days) 한 후, 살충성 물질의 분리한 과정은 fig.5와 같다.

살충성 물질은 균체 및 배양상등액에 모두 존재하였으며 유기 용매로 추출이 가능하였다. 배양상등액의 살충성 물질 추출은 column (ϕ 15 × 50 cm)에 충전된 Amberlite XAD-4 (500 g)에 흡착시켜 증류수 1L와 20% aq. acetone 1L로 세척한 후 acetone 1L로 용출하였고, 균체 침전물의 살충성 물질은 acetone 2L로 2회 추출하였으며, 두 추출액을 모아 농축한 후 CH_2Cl_2 500ml와 EtOAc 1L로 추출하였다. 총 추출액은 silica gel (250 g)이 충전된 column (ϕ 5 × 50 cm)상에서 hexane - acetone mixture (acetone 0-100% gradient)를 사용하여 극성을 높여가며 용출하였으며, 살충성 물질을 함유하는 분획을 모아 다시 Lobar column (RP-18, ϕ 42 × 440 mm) 상에서 분리하였고 최종적으로 HPLC (RP-18, ϕ 10 × 250 mm, MeOH / H₂O 9 / 1, v / v) 상에서 정제를 하였다.

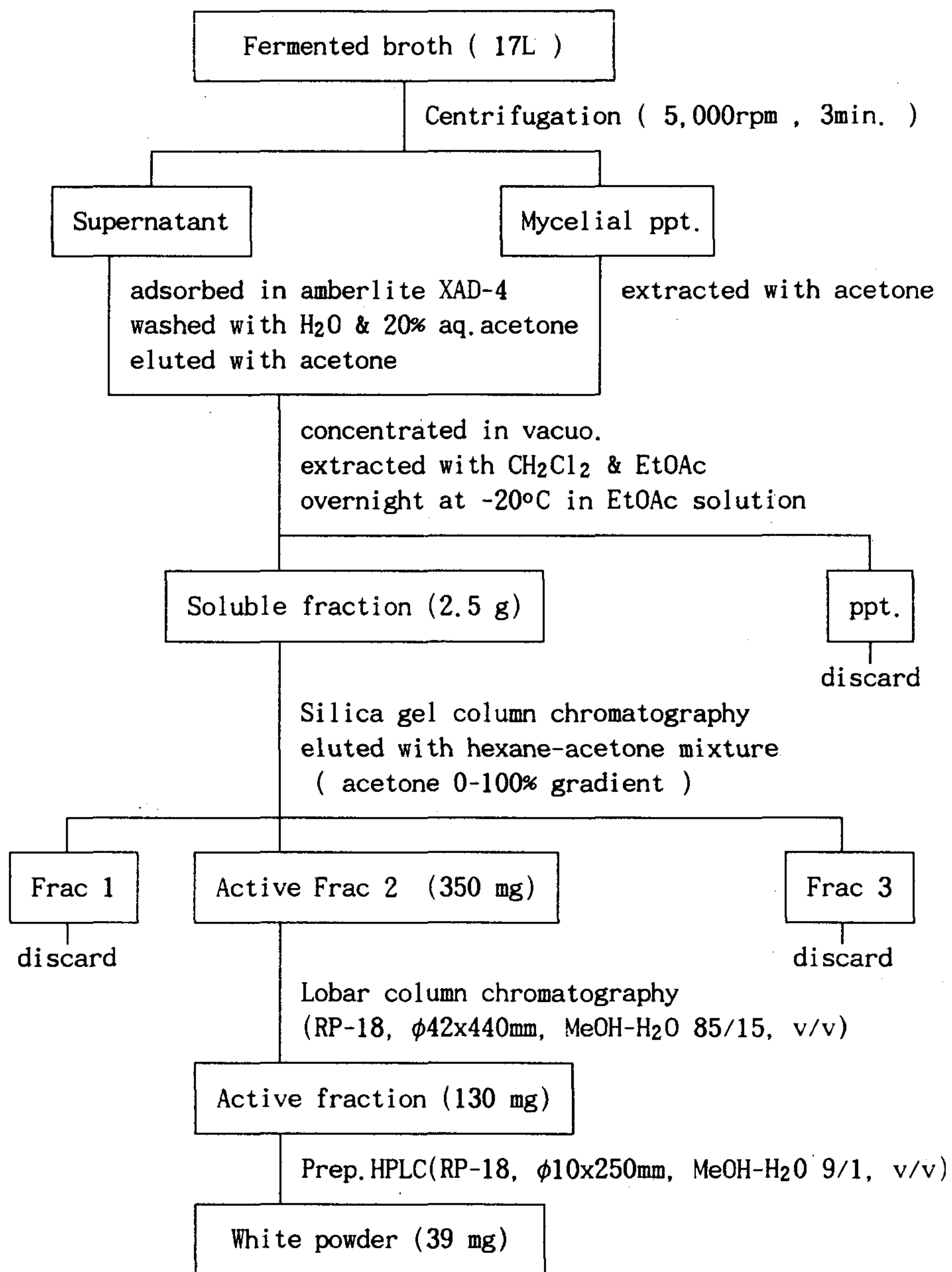


Fig. 5 Isolation procedure of insecticidal compound 2077

5. No. 3369 균주의 살충성 물질 분리정제

No. 3369 균주를 액체배양 (GAPY, 27 °C 3days) 한 후, 살충성 물질을 분리한 과정은 fig.6 과 같다.

살충성 물질은 대부분 균체내에 존재하여 배양액을 원심분리한 후, 균체 침전물만을 취하여 추출하였으며, 이 물질은 예비실험 결과, 분리과정에서 용매에 의한 분해는 일어나지 않으나 silica gel type의 충전제 (normal & RP-18) 를 사용하면 분해가 일어남을 발견하여, partition 방법을 사용하여 분리를 시도하였다. 즉, 총 추출물을 hexane/methanol-water mixture (3/1, v/v) 로 partition하여 비극성의 불순물을 제거하였으며 centrifugal type의 counter current chromatography 상에서 hexane/chloroform/acetone/methanol/water(8/4/1/6/0.75) mixture 중 lower phase를 stationary로 하고 upper phase를 mobile phase로 하여 살충성 물질을 분리하였고 최종적으로 재결정 방법으로 물질을 정제하였다.

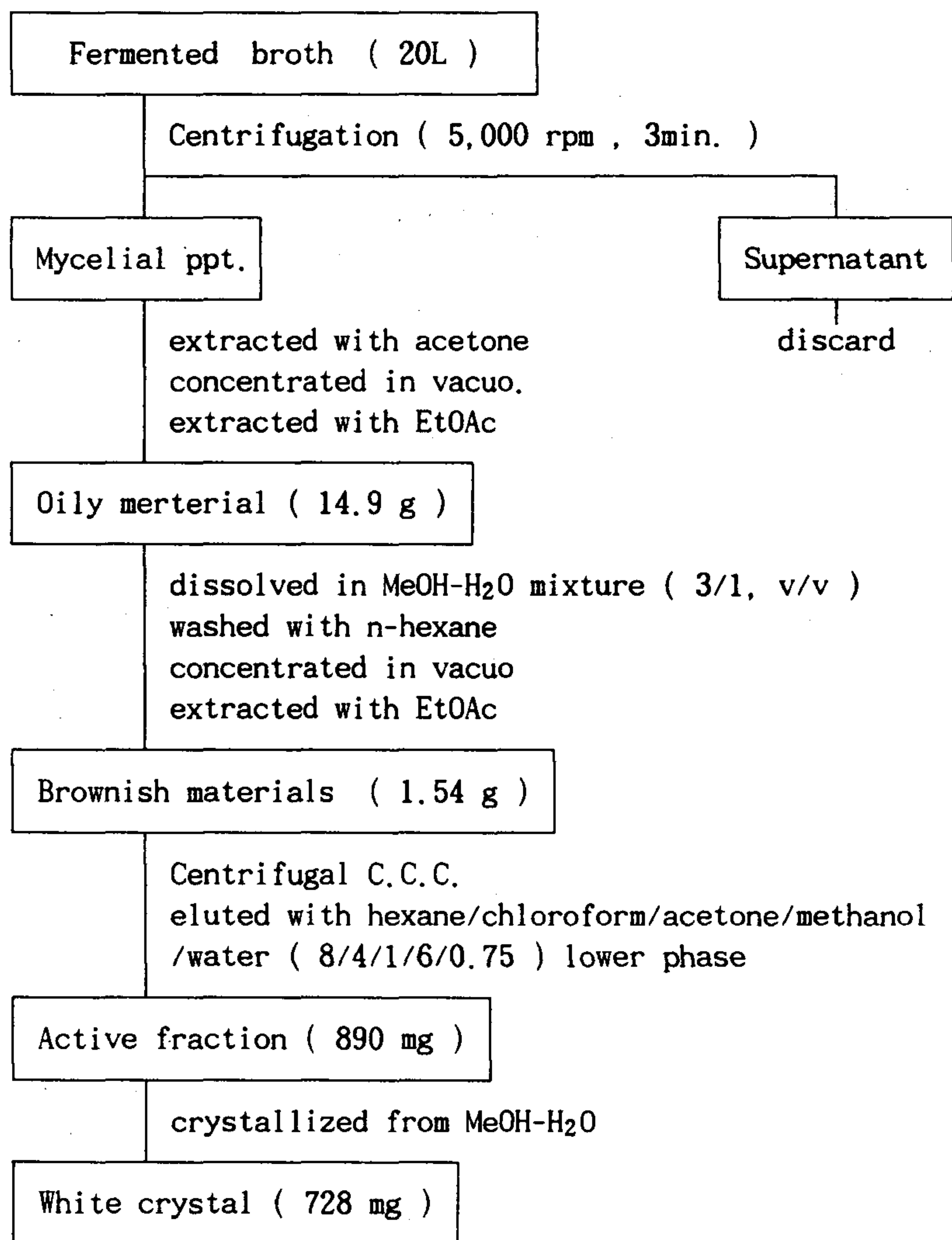


Fig.6 Isolation procedure of insecticidal compound 3369

제 4 절 살충성 물질 3369의 구조변화와 활성의 관계

1. 살충성 물질 3369의 분해물질 분리, 정제

살충성 물질 3369를 분리하는 과정에서 column chromatography 작업수행시 물질이 변화되어 몇가지의 분해산물을 생성한다는 것을 발견하였다. 예비 실험에서 3369 물질의 분해산물들은 살충활성이 나타나지 않았으나 그중 일부에서 원물질에서 발견되지 않았던 향균활성이 나타났기 때문에 물질 3369의 살충활성의 발현과 관련된 주요 구조와 아울러 향균 활성을 나타내는 물질의 구조를 조사하기 위하여 본 실험을 수행하였다.

화합물 3369를 분해가 일어나는 조건으로 반응시킨후 주요 분해산물을 분리한 과정은 fig.7과 같다. 반응후 생성된 화합물은 Lobar column (silica gel, $\phi 42 \times 440 \text{ mm}$)상에서 Hexane-acetone mixture (3/1, v/v)으로 신속히 분리하였고, 주요물질은 HPLC상에서 Styrene-DVB base의 polymer column (RP-18, $\phi 20 \times 250 \text{ mm}$)을 사용하여 정제를 시도하였다.

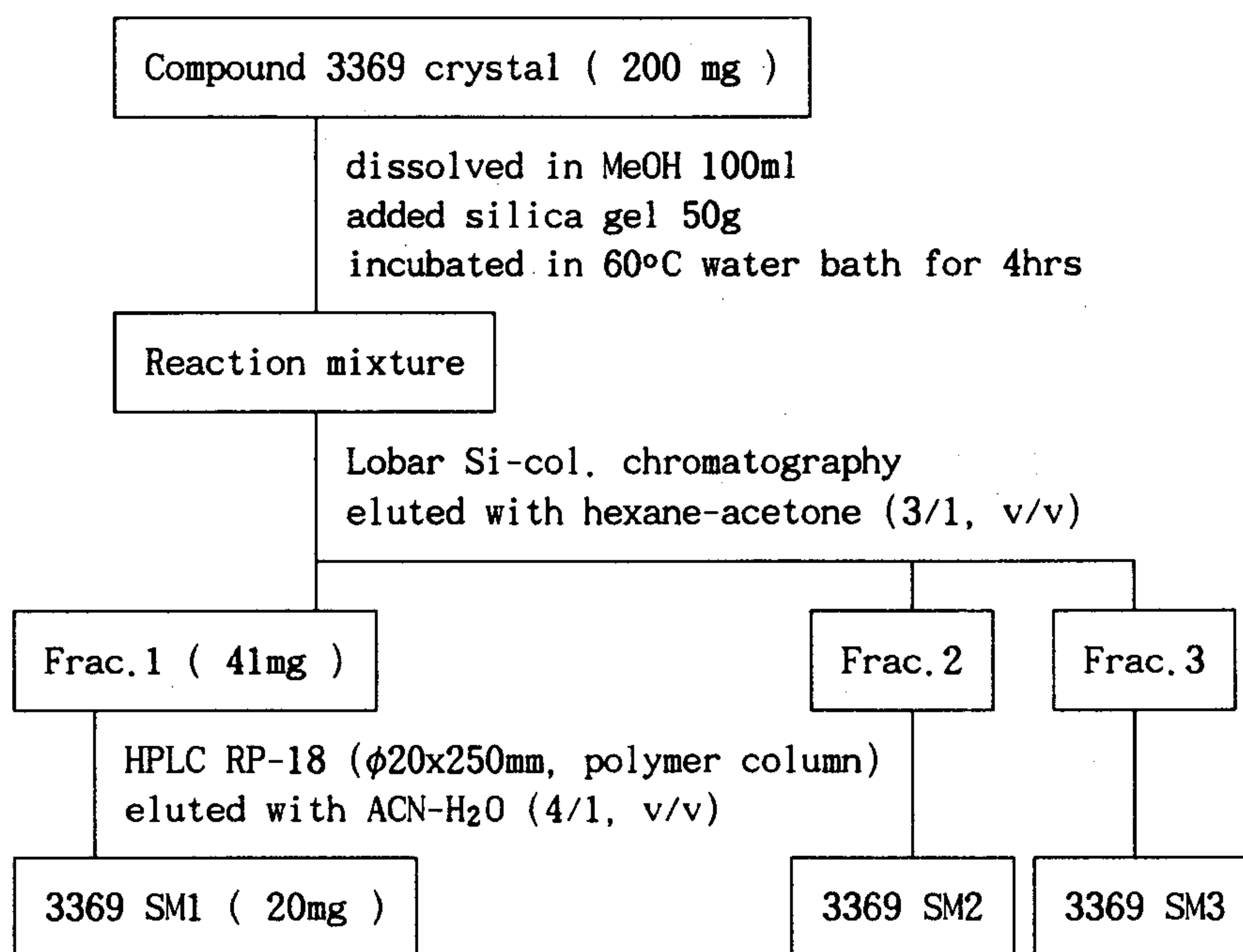


Fig.7 Isolation procedure of compound 3369 SM1

2. 살충성 물질 3369의 oxime화 물질 분리 정제

살충성 물질 3369의 분해반응으로부터 주요 변화가 일어난 carbonyl group이 살충력을 발현하는데 주요한 작용기인지 알아보기 위하여 본 실험을 수행하였다.

원물질 3369에 hydroxylamine · HCl을 처리한 후 생성된 반응물들은 Lobar column (silica gel, φ 42 × 440 mm) 상에서 hexane-acetone (2/1, v/v)로 신속히 분리한 후 주반응 화합물인 HPLC상에서 styrene-DVB base의 polymer column (RP-18, φ 20 × 250 mm)을 사용하여 정제하였다. (fig.8)

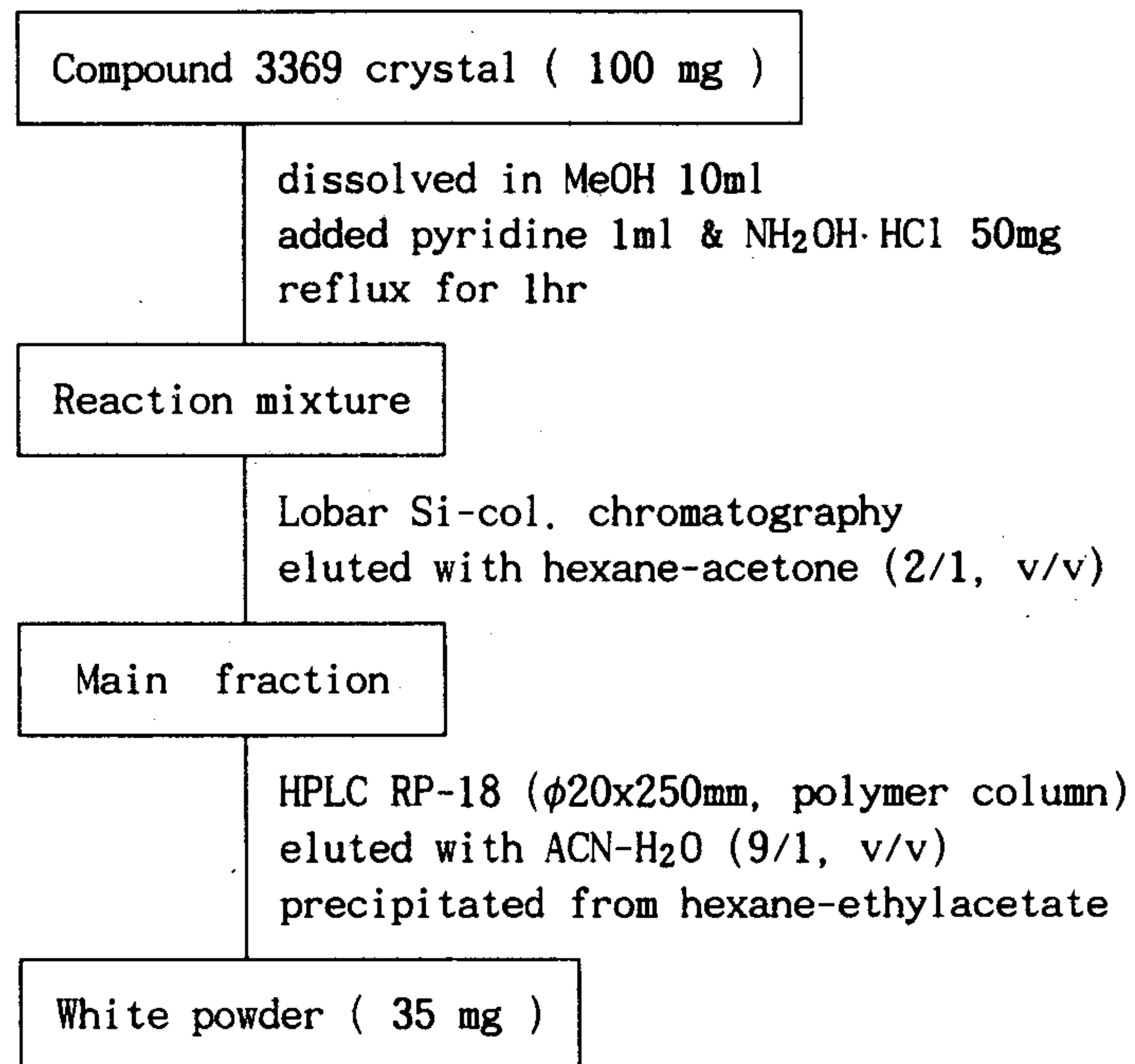


Fig.8 Isolation procedure of compound 3369N

3. 살충성 물질 3369와 변환된 화합물 3369 SM1 및 3369 N의 활성비교

살충성 물질 3369와 이로부터 유래된 3369 SM1, 3369 N에 대한 살충력 검정 및 항균력 검정을 수행하였다. 살충력 검정은 petri dish에 집누에나방 3령 유충 10마리와 일정량의 인공사료를 넣고 시료를 처리한 후, 24시간 후의 사충률을 조사하는 방법으로 각 농도별 3반복 실시하였다.

항균력 검정은 7종의 test microorganisms을 대상으로 하였으며, 각 물질은 paper disk 방법으로 농도별로 처리한 후 생육저지환의 형성 유무로 항균력을 판정하였다.

여 백

제 3 장 결과 및 고찰

제 1 절 방선균 분리 및 선발

1. 토양 시료의 채취 및 방선균 분리

전국의 각 지역을 대상으로 90년 9월부터 93년 1월에 걸쳐 총 2,570 점의 토양 시료를 채취하였다. 지역별로는 서울 경기 127 점, 충남 992 점, 충북 212 점, 전남 195 점, 전북 391 점, 경남 118 점, 경북 244 점 그리고 강원도 291 점 등이었다. 토양 시료로부터 방선균을 분리한 결과 총 7,105 주의 균주들을 확보하였다.

본 연구에서는 다양한 방선균을 확보하고자 토양 시료의 종류 및 특성에 따라 방선균의 분포를 조사하였는데, 조사된 941 점의 토양 시료를 채취 장소별로 크게 구분하면 농가의 퇴비 등이 14%, 산림토양 35% 그리고 농지 및 초지 토양이 51% 등 이었다. 채취 장소에 따라 방선균의 종류수를 조사한 결과는 다음과 같다.

토양의 pH를 측정해 본 결과 pH 5-6 토양시료가 전체의 약 40% 정도 이고 pH 6 이하의 산성 토양이 전체의 약 70%를 차지하였으며, pH 7 이상의 알칼리성 토양은 약 6% 정도로 나타났다. 토양시료의 채취 장소별로 pH에 따른 분리된 방선균의 종류의 수를 조사한 결과 pH 5-6의 토양시료의 경우에서 상대적으로 많은 종류의 방선균을 분리해 낼 수 있는 것으로 나타났다. (fig. 9)

토양의 수분 함량에 따른 분리된 방선균의 종류의 수를 조사한 결과 전반적으로 10-30%의 수분 함량을 갖는 일반 토양에서 방선균이 많이 분포함을 알 수 있었다. (fig. 10)

분포된 방선균의 총 개체수와 이로부터 분류한 서로 다른 방선균의 종류 수를 조사한 결과, 일정한 분리 방선균의 총 개체수로부터 얻을 수 있는 서로 다른 방선균의 수는 퇴비의 경우가 산림이나 농지 및 토양의 경우 보다 수월한 것으로 나타났다. (fig. 11)

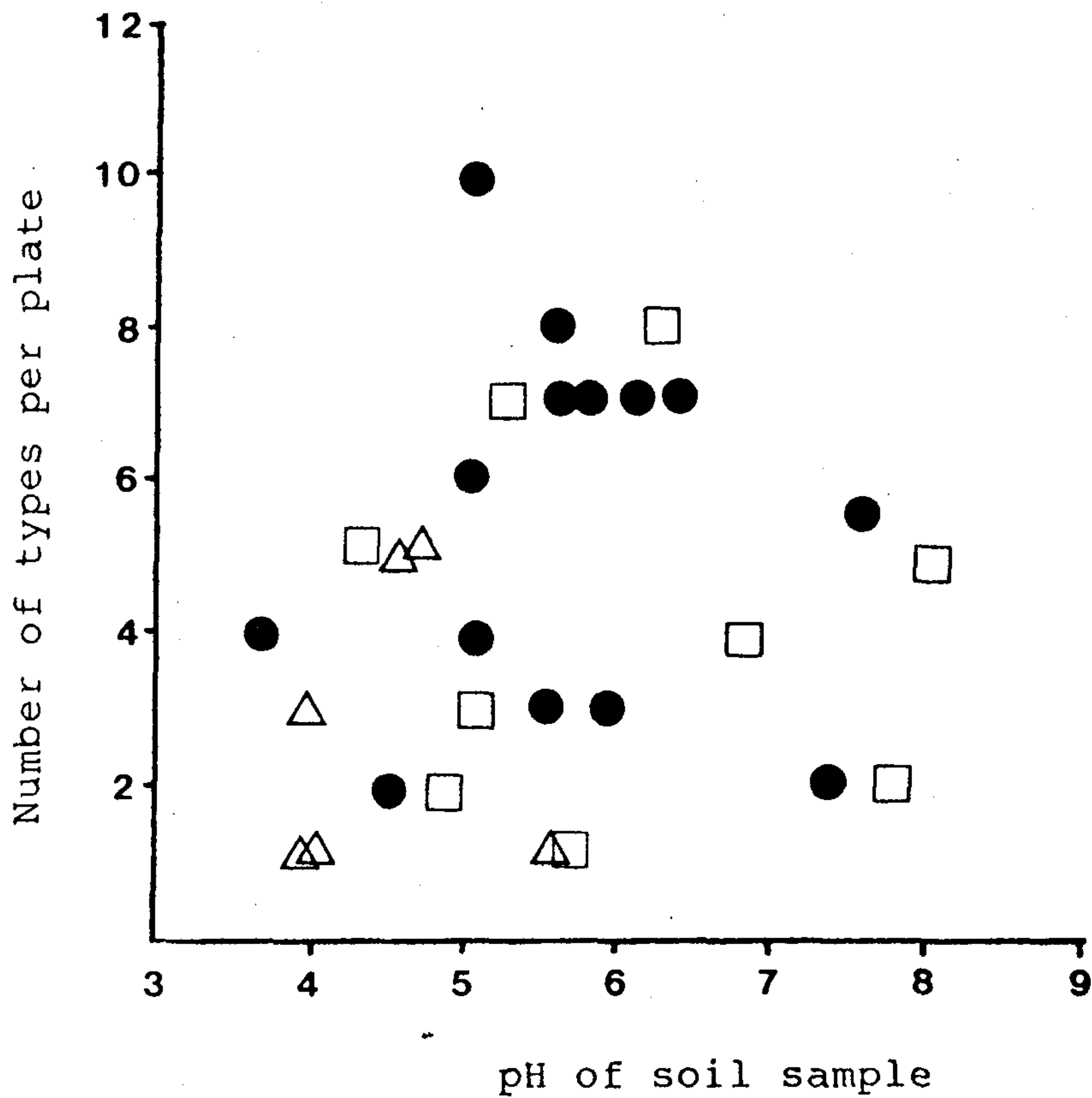


Fig. 9. Effect of soil pH on number of types of actinomycetes. Δ , forest soil; \square , grass vegetation; \bullet , cultivated soil

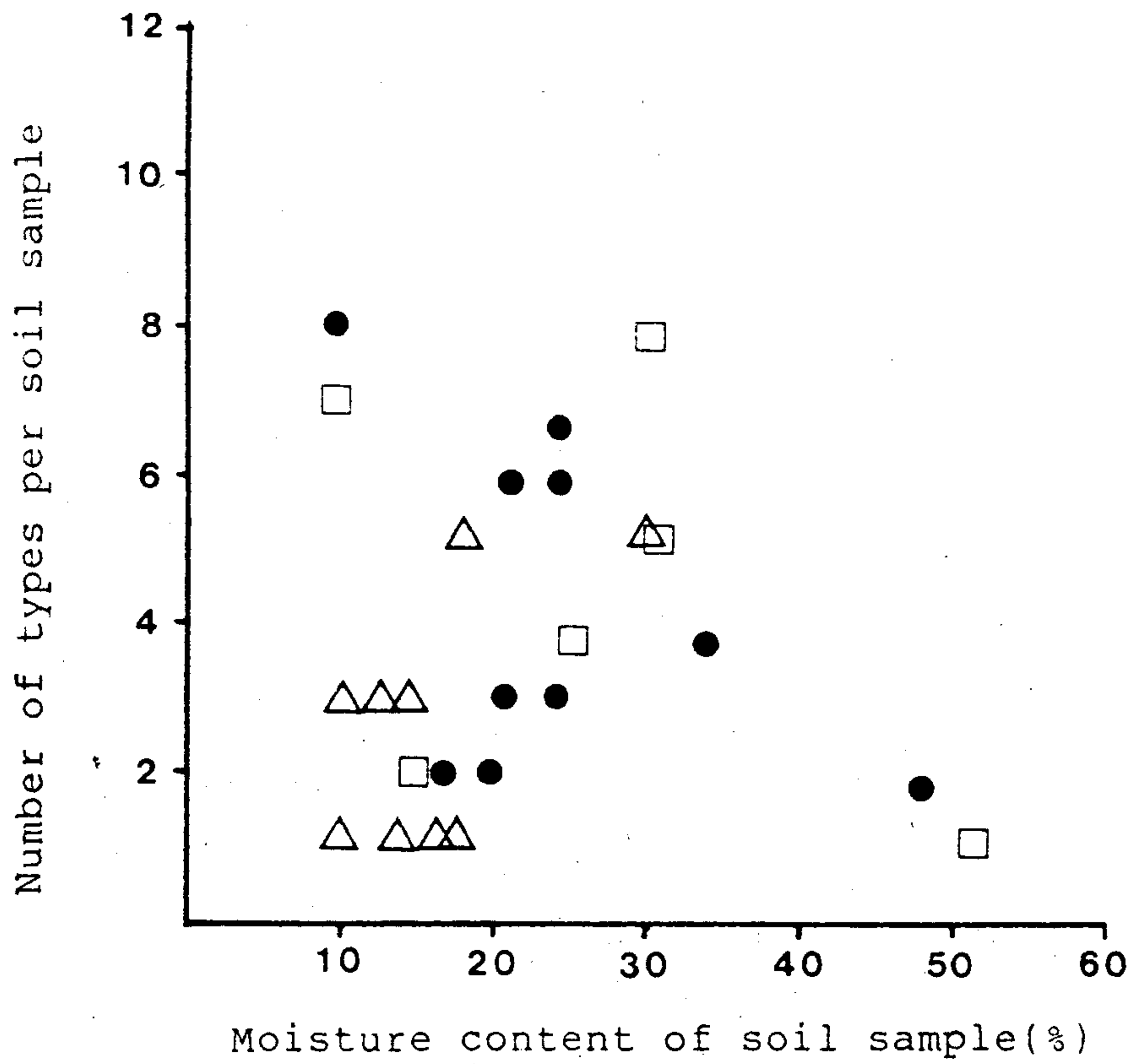


Fig. 10. Effect of soil moisture content on number of types of actinomycetes. Δ , forest soil ; \square , grass vegetation; \bullet , cultivated soil

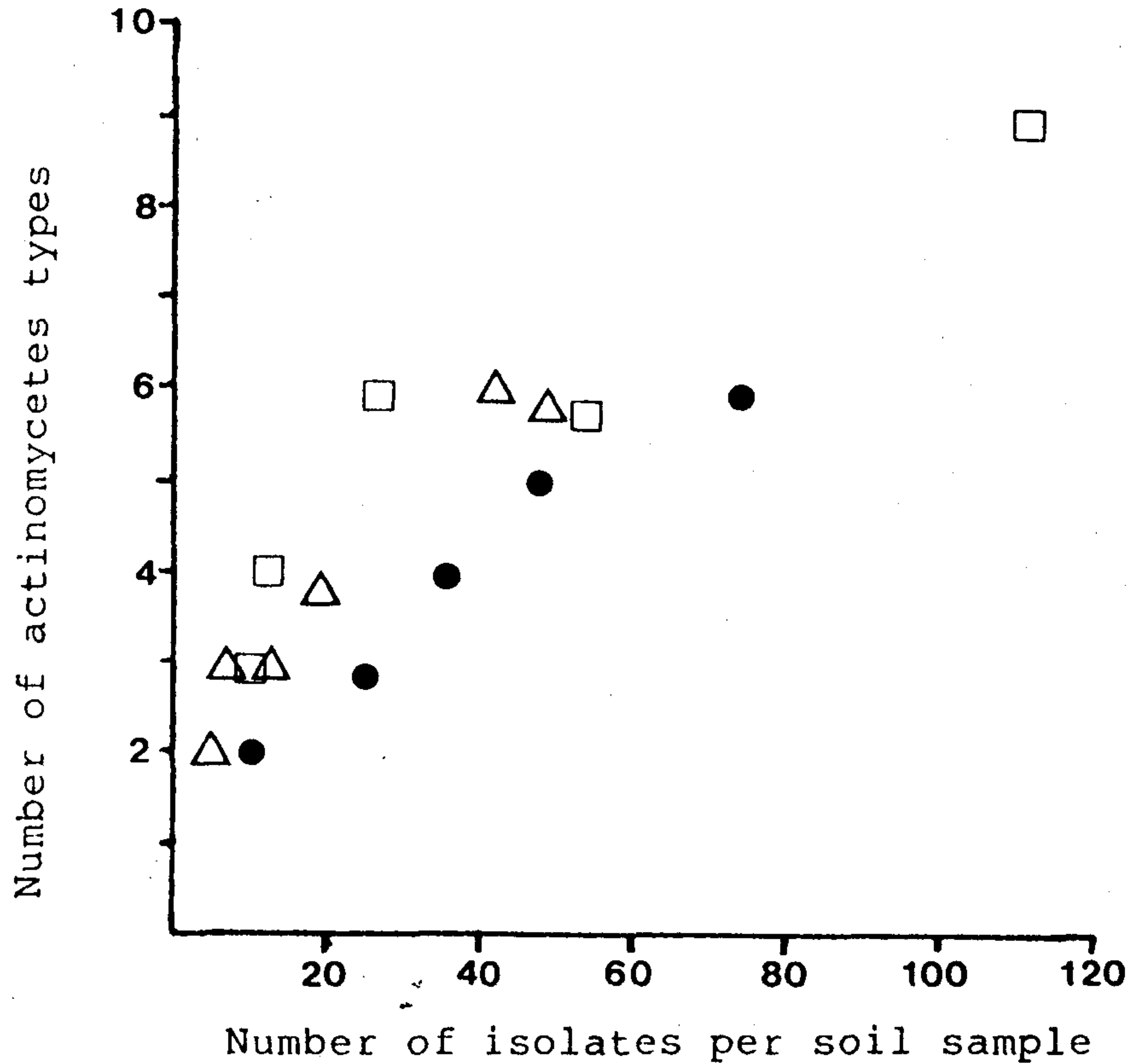


Fig. 11. Number of different types of actinomycetes in soil samples in relation to the number of isolated strains. ●, cultivated soil; △, forest soil; □, grass vegetation

2. 살충활성 및 항균력 검정과 선발 균주의 활성 안정성

토양에서 분리한 균주중 7,105 균주를 대상으로 집파리에 대한 살충력 검정 (fig. 12)을 수행한 결과 597 균주에서 살충력이 인정되었으며, 이들을 대상으로 agar plug 방법의 항균력 검정 (fig. 13)을 하여, 1차 선발 과정의 결과로 총 120 균주를 확보하였다. 그리고 1차 선발된 균주들은 대량 배양을 위한 액체 배양에서 물질생산과 관련된 균주의 살충성 물질생산 안정성과 paper disk 방법에 의한 배양액 추출물의 항생력 검정을 시도하였으며 그 결과를 기준으로 배양 방식과 검정대상 곤충을 달리하여도 안정하게 살충성이 재현되는 균주들을 우선적으로 선발하였다.

(fig.14) 최종적으로 선발하여 대량 배양을 시도한 균주는 12균주이
었다. (Table 6,7)

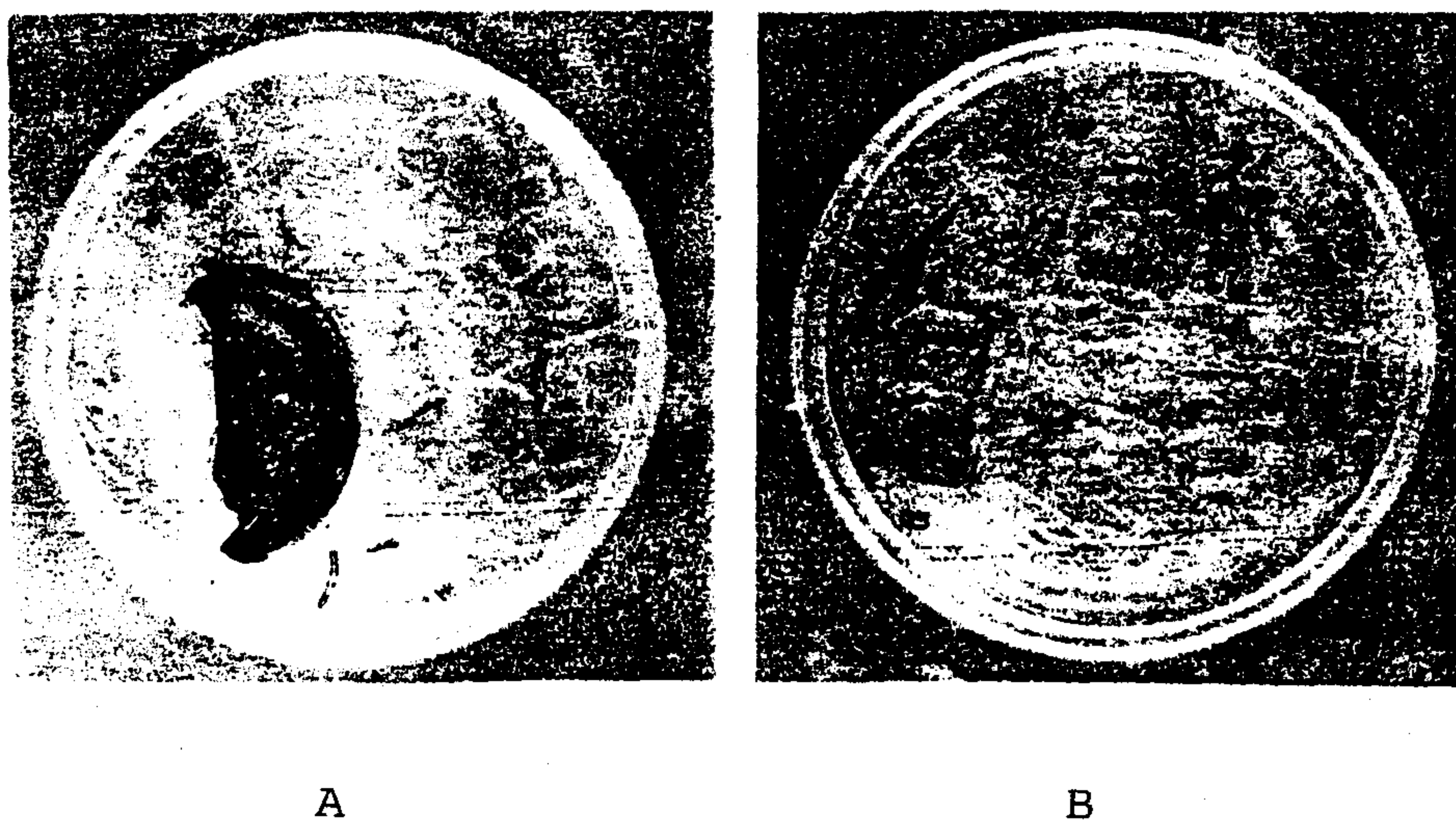


Fig.12 Photographs of bioassay on *M. domestica*
A : positive strain (dead)
B : negative strain (pupae-forming)

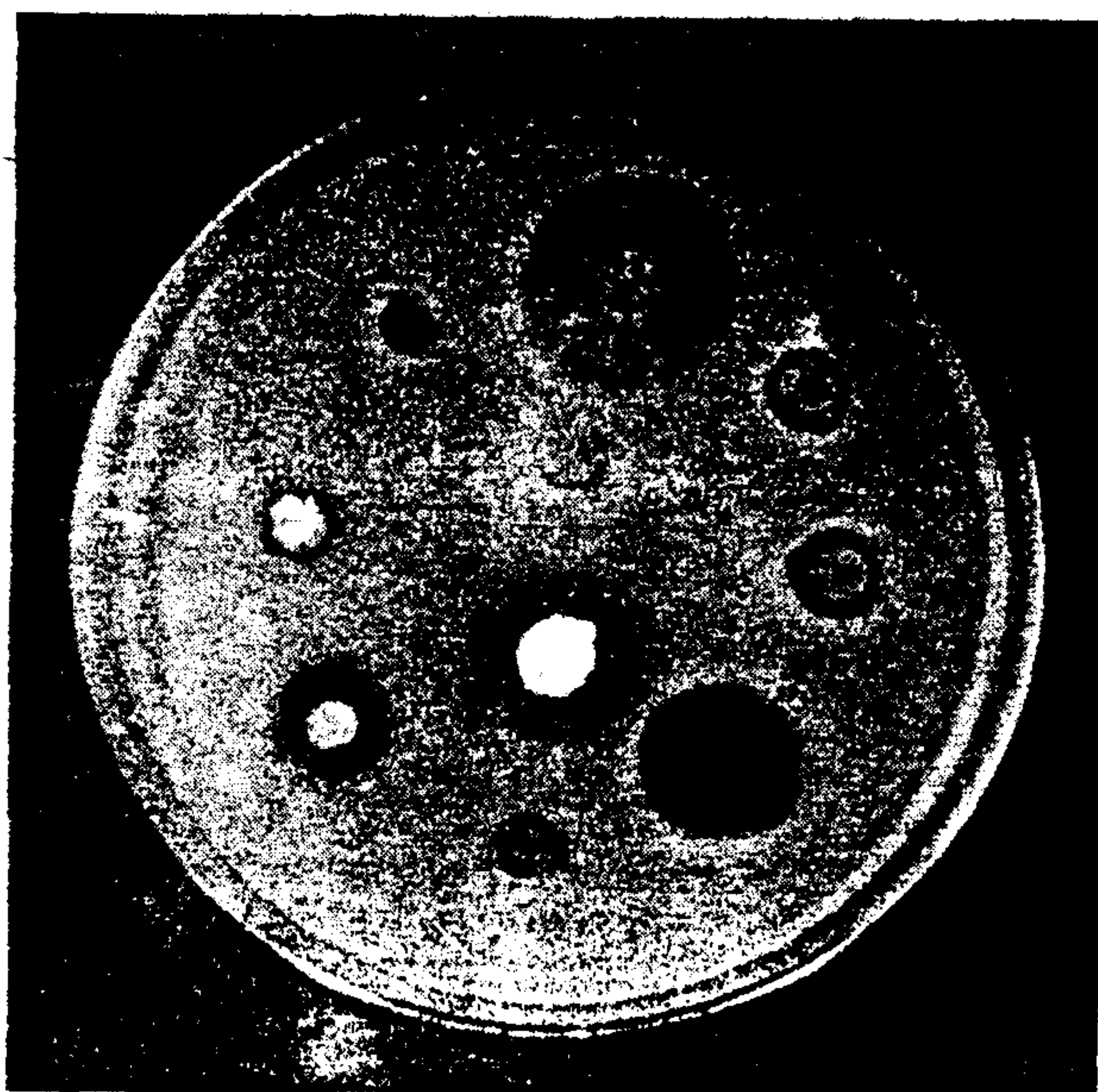
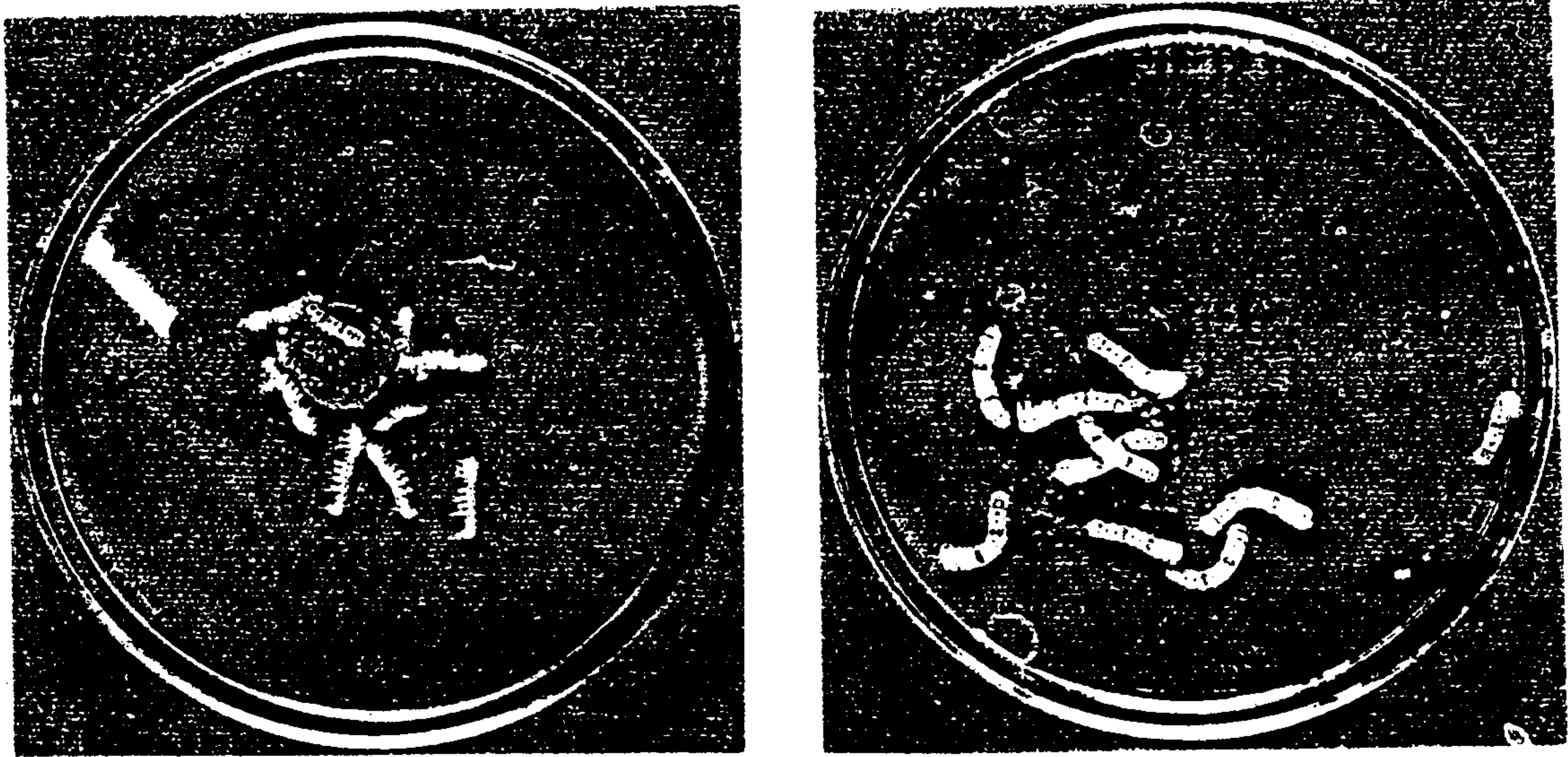


Fig.13 Agar plug test for antimicrobial activity



A

B

Fig.14 Bioassay results of the insecticidal compound from strain no. 3369 on *B. mori*.

A : compound 3369 $10\mu\text{g}$ / 1.5 g artificial diet disc
(all dead)

B : control

Table 6. Screening results of total strains isolated from soil

	No. of strains	ratio
Total isolated strains	7105	100%
Insecticidal active strains on <i>M. domestica</i>	597	8.4%
Antibiotic strains by agar plug method	377	5.3%
Selected strains from 1st screening	120	1.7%
Strains showed stable insecticidal activity	21	0.3%
Antibiotic strains by paper disk method	9	0.1%
Finally selected strains for isolation of insecticidal compounds	12	0.2%

Table 7. 3rd screening data of selected 120 strains

strain no.	Activity				strain no.	Activity				strain no.	Activity			
	MS ^{a)}	BS ^{b)}	BL ^{c)}	AM ^{d)}		MS	BS	BL	AM		MS	BS	BL	AM
46	++	++	++	+	1133	+	-			3075	+	-		
117	++	+	+	+	1166	++	++	++	-	3096	+	+	-	
637	+	+	-		1169	+	+	+	+	3208	++	++	+	+
642	+	-			1172	+	-			3273	+	-		
660	++	++	+	-	1263	+	+	+	-	3284	+	-		
673	±	-			1265	+	-			3329	++	-		
698	±	-			1436	++	++	+	-	3337	+	-		
716	±	+	-		1437	+	-			3369	++	++	++	-
725	±	+	-		1455	++	++	-	-	3439	+	-		
735	+	-			1591	++	+	-		3517	±	-		
741	+	-			1629	++	-			3526	+	-		
743	+	-			1765	++	-			3527	+	-		
744	+	-			1871	±	+	-		3588	±	-		
755	++	-			1889	+	+	±	+	3628	+	-		
756	±	-			1927	+	+	-		3758	++	-		
762	±	-			2015	+	+	-		3884	++	-		
785	±	-			2027	+	+	-		3931	+	+	+	+
786	±	-			2053	-	-			3949	+	+	+	+
789	±	-			2077	+	+	+	-	4104	+	-		
792	+	-			2105	++	-			4408	++	++	+	+
793	+	-			2210	+				4455	++	-		
796	+	-			2333	++	++	++	-	4547	++	++	+	+
849	+	+	-		2378	+	-			4549	+	-		
853	+	-			2492	±	-			4684	+	-		
856	±	-			2543	-	-			4699	+	+	+	+
860	±	-			2695	+	-			4730	+	-		
866	+	-			2766	±	-			4915	+	+	+	-
883	+	+	-		2795	±	-			5017	+	-		
890	+	+	-		2797	±	+	-		5058	++	-		
891	+	-			2821	±	-			5059	++	++	+	+
906	+	+	-		2823	+	+	-		5090	+	+	+	-
951	±	-			2824	+	-			5118	++	-		
979	+	-			2831	+	-			5140	++	-		
1017	++	++	+	-	2886	+	-			5158	+	-		
1045	+	-			2888	+	-			5222	+	-		
1058	±	-			2936	+	-			5278	+	±	±	+
1094	++	+	-		2952	+	+	+	-	5567	+	+	-	
1113	++	+	-		2986	+	-			5664	+	-		
1125	++	+	-		3011	+	-			5691	++	-		
1129	±	-			3028	+	+	+	-	5983	++	±	+	+

- a) insecticidal activity on *M. domestica* by solid culture
b) insecticidal activity of solid culture extracts on *B. mori*
c) insecticidal activity of liquid culture extracts on *B. mori*
d) antimicrobial activity of insecticidal compound from TLC on 3 test organisms by paper disk method

토양에서 총 분리된 방선균 7,105 균주중 최종 살충성 물질 분리대상으로 균주가 12 균주 (0.2%)로 줄어든 원인은 다음과 같다.

첫째로 1차 살충성 검정으로 선발된 균주중 빠른 시간내에 향균성 물질을 생산하는 균주를 제외할 목적으로, agar plug 방법으로 분리균주의 고체배양체를 직접 사용하였는데 이때 향균력을 보이지 않았던 균주중 균주 추출액을 사용한 paper disk 방법의 향균력 검정에서 활성 물질을 제외로 분리하지 않는 균주를 효과적으로 검정하여 제외하였기 때문이다.

둘째로 고체배양으로부터 액체배양으로 배양방법을 전환할때 일반적으로 생육이 제한을 받게 되는데 스크리닝의 속성상 물질 생산에 가장 효과적인 선택 배지를 각각의 균주마다 적용할 수 없었던 배양 기술상의 어려움이 있었다.

셋째로 선발과정에서부터 활성물질 분리를 위한 대량 배양시까지 균주의 장기 보관이 불가피하였는데 이때 활성을 잃어버리는 균주 자체의 생리적 문제를 극복하지 못하였던 점도 중요한 원인이었다.

제 2 절 살충성 물질 분리 및 구조 동정

1. No. 46 균주의 살충성 물질 구조동정

본 균주는 1차 screening 단계에서 살충력이 매우 강하였고, 누에에서의 2차 검정에서도 특이한 치사상태(토하는 양상등)를 보여서 먼저 대량 배양에 착수하였다.

No. 46 균주의 대량 배양후 HPLC (RP-18, ϕ 10 × 250 mm, methanol-H₂O 85 / 15, v/v) 상에서 최종적으로 분리된 물질들을 chromatogram 및 UV spectrum은 각각 Fig.15, Fig.16 과 같다.

분리 정제된 살충성 물질들은 모두 비수용성으로, methanol, acetone, chloroform, hexane 등 유기용매에 잘 용해되며, paper disk 방법의 항균력 검정에서 *B. subtilis*와 *C. albicans*에 모두 강한 항균효과를 나타내었다. 분리된 물질중 Comp.Ⅳ은 UV spectrum에서 최대 흡수 파장이 235 nm이고, comp.Ⅱ와 comp.Ⅳ도 이와 동일한 pattern을 보이며, comp.Ⅲ의 최대흡수 파장이 235 nm인데, 이들의 UV spectra는 Piericidins와 pattern이 유사하였다. 즉, Piericidin의 계열물질(PA, PB, PC, PD)들은 pyridine ring의 side chain에서 계열물질 상호간이나 동일계열 내의 말단기의 구조적 유사성과는 관계없이 5번 탄소위치에서 methyl group의 존재여부에 따라 UV spectrum이 2가지 pattern으로 나뉘는데⁴¹⁾ comp. Ⅰ~Ⅳ가 이들의 spectrum pattern과 매우 유사한 것으로 보아, 모두 Piericidin 계열물질로 추정되었다. (Fig.17-21, Table 8,9)

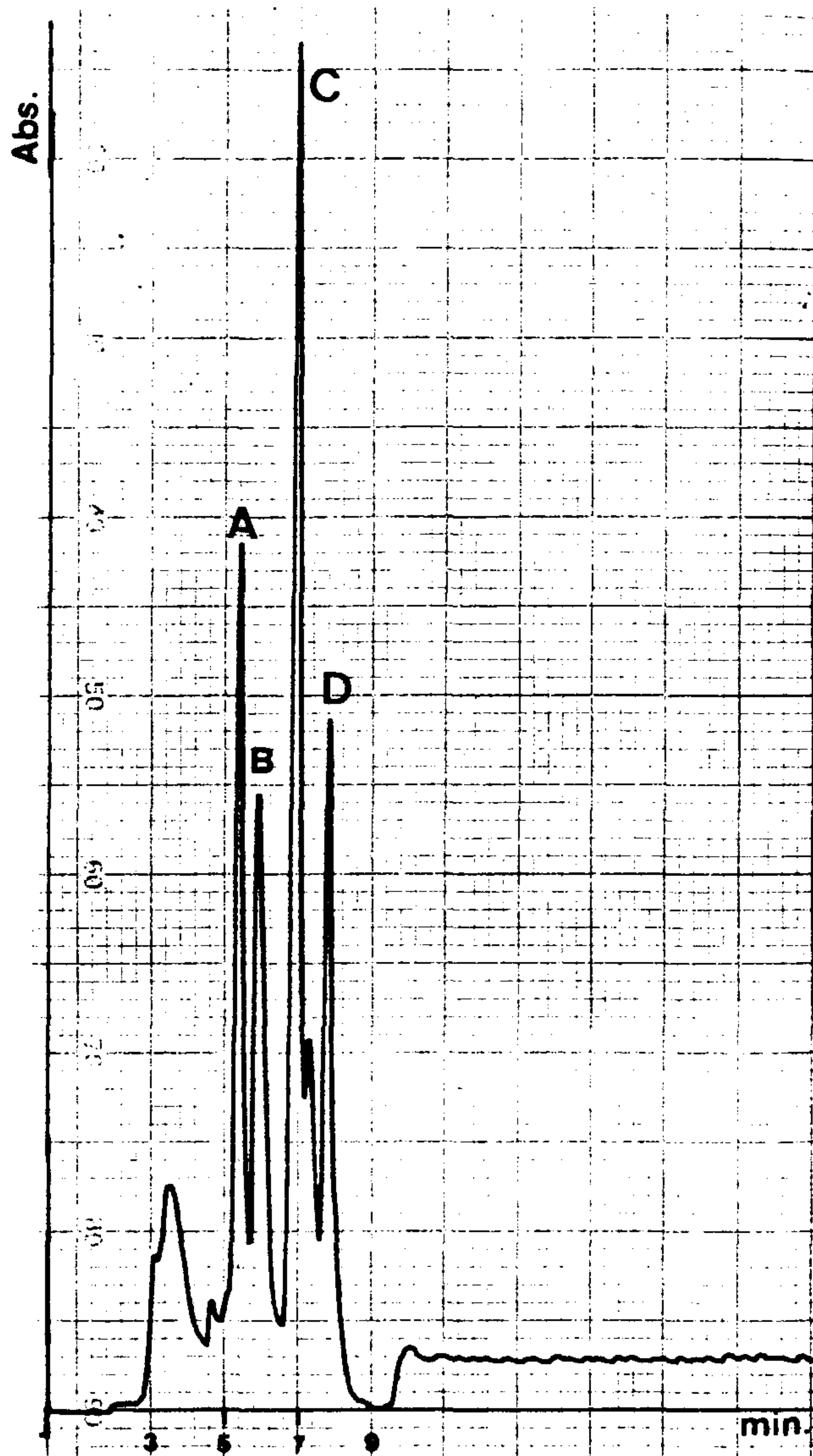


Fig. 15 HPLC chromatogram of isolated compounds from no.46 strain
 A: Comp. IV, B: Comp. III, C: Comp. II, D: Comp. I
 column : LichroCart RP-18, ϕ 10 x250mm
 elution : methanol-H₂O, 85/15, v/v
 detector : UV, 240nm

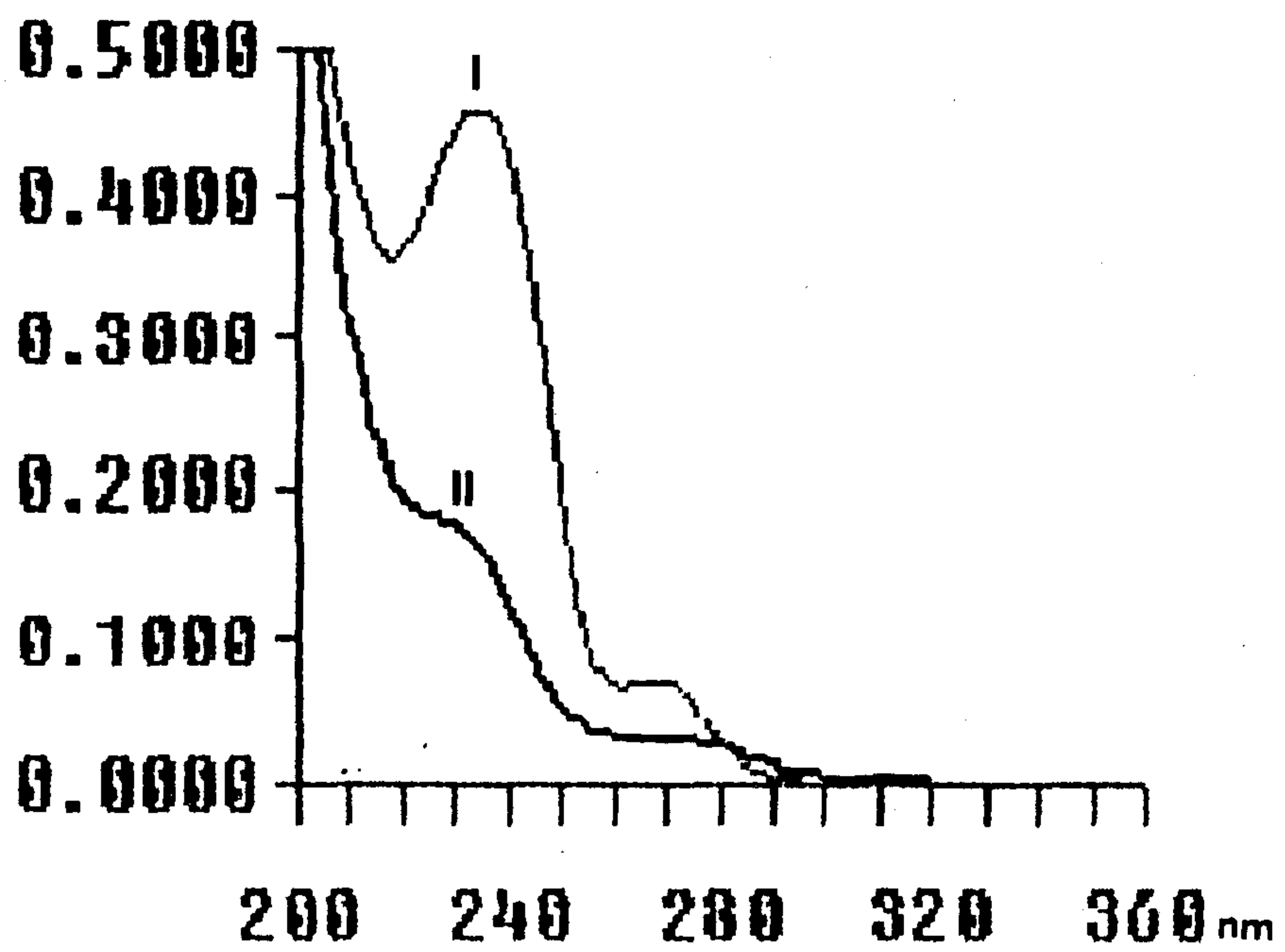
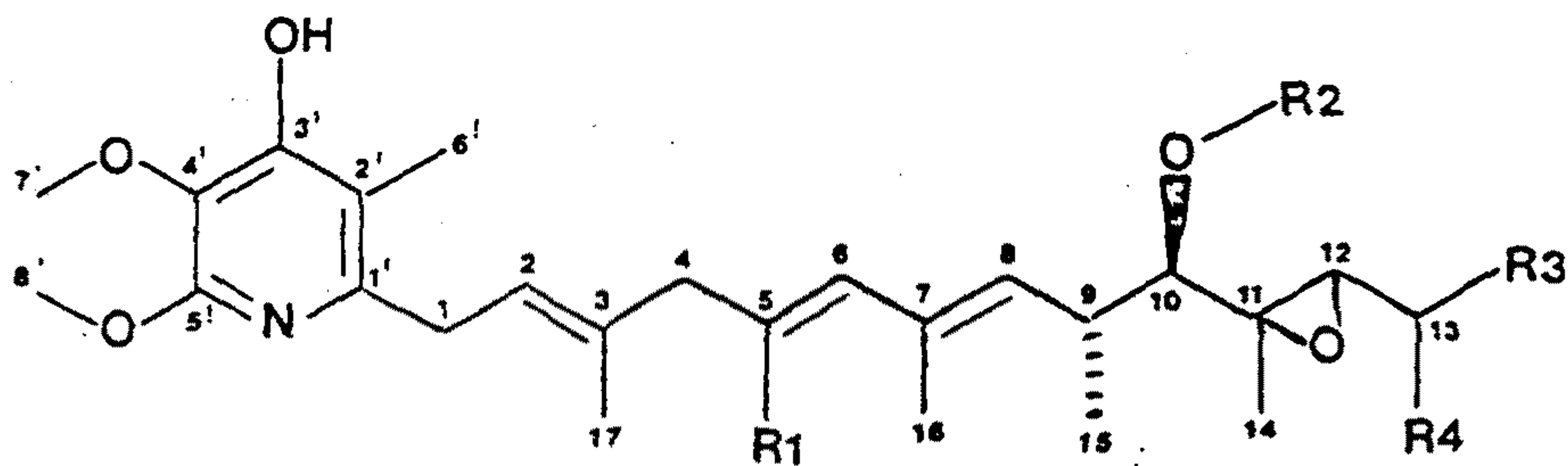
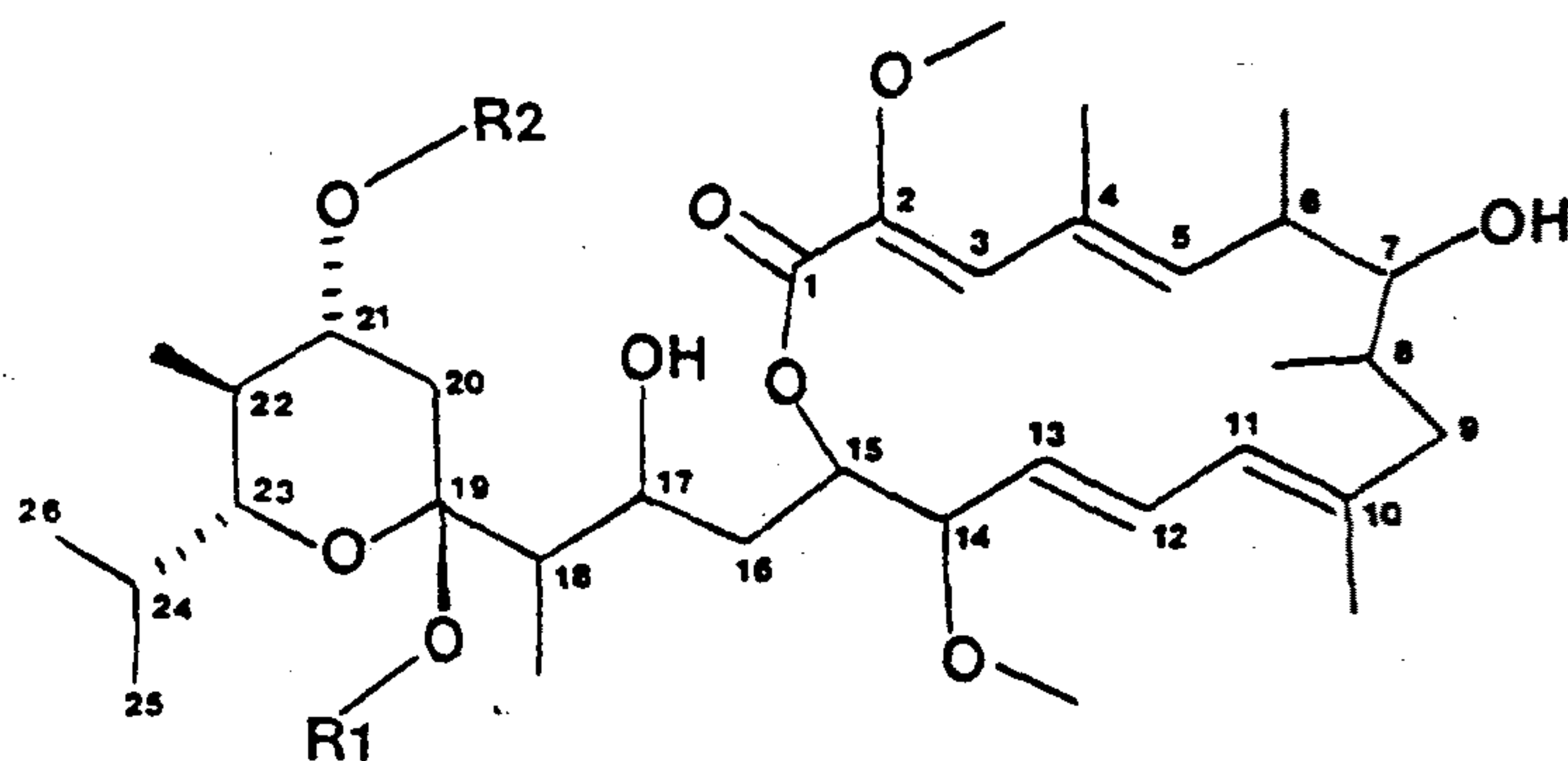


Fig.16 UV spectrum of isolated compounds from no.4 strain(MeOH)
type I : Comp.I, II and IV
type II : Comp.III



Piericidin C1 : R1=R2=R3=R4= H
 C2 : R1= CH3, R2=R3=R4= H
 C3 : R1=R2= H, R3=R4= CH3
 D1 : R1=R3=R4= H, R2= CH3



Bafilomycin A1 : R1=R2= H
 A2 : R1= CH3, R2= H
 B1 : R1= H,

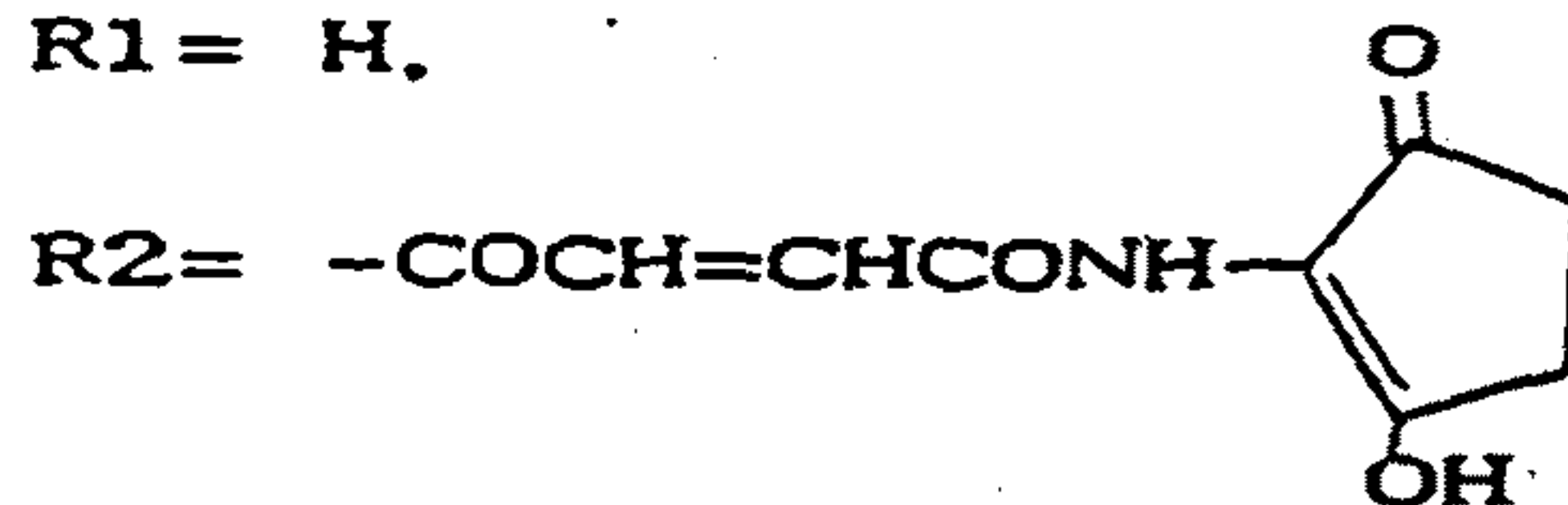
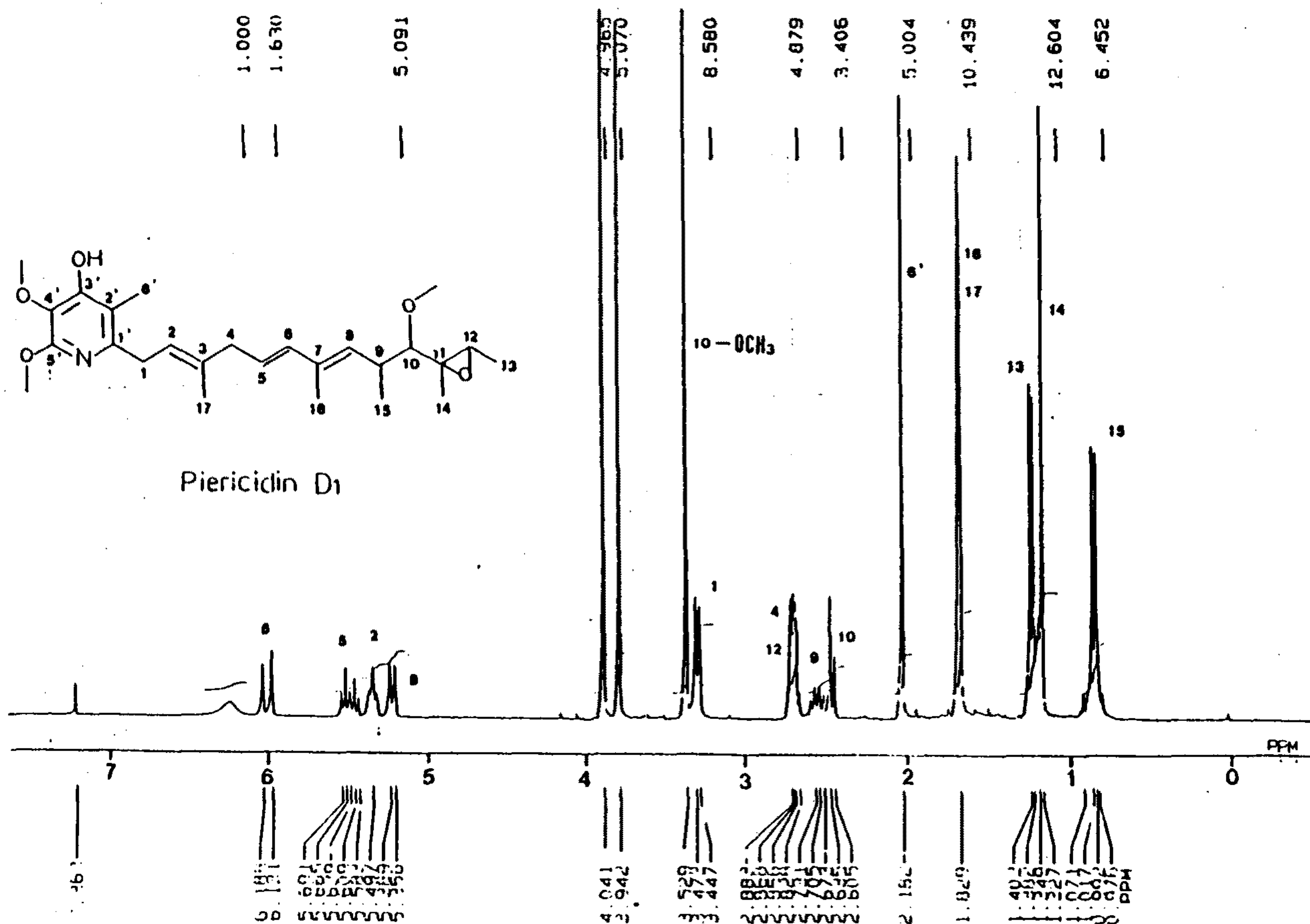


Fig.17 structures of insecticidal compounds from strain No.46 and No.1166

13-MAY-
EXMOD SGECM
SLVNT CCCL3
SCANS



-89-

Fig.18. Proton-NMR Spectra of Compound I (piericidin D1) from No. 46 strain (300 MHz, CDCl₃)

13-MAY-
EXMOD 568CM
SLVNT CDCL3
SCANS 151

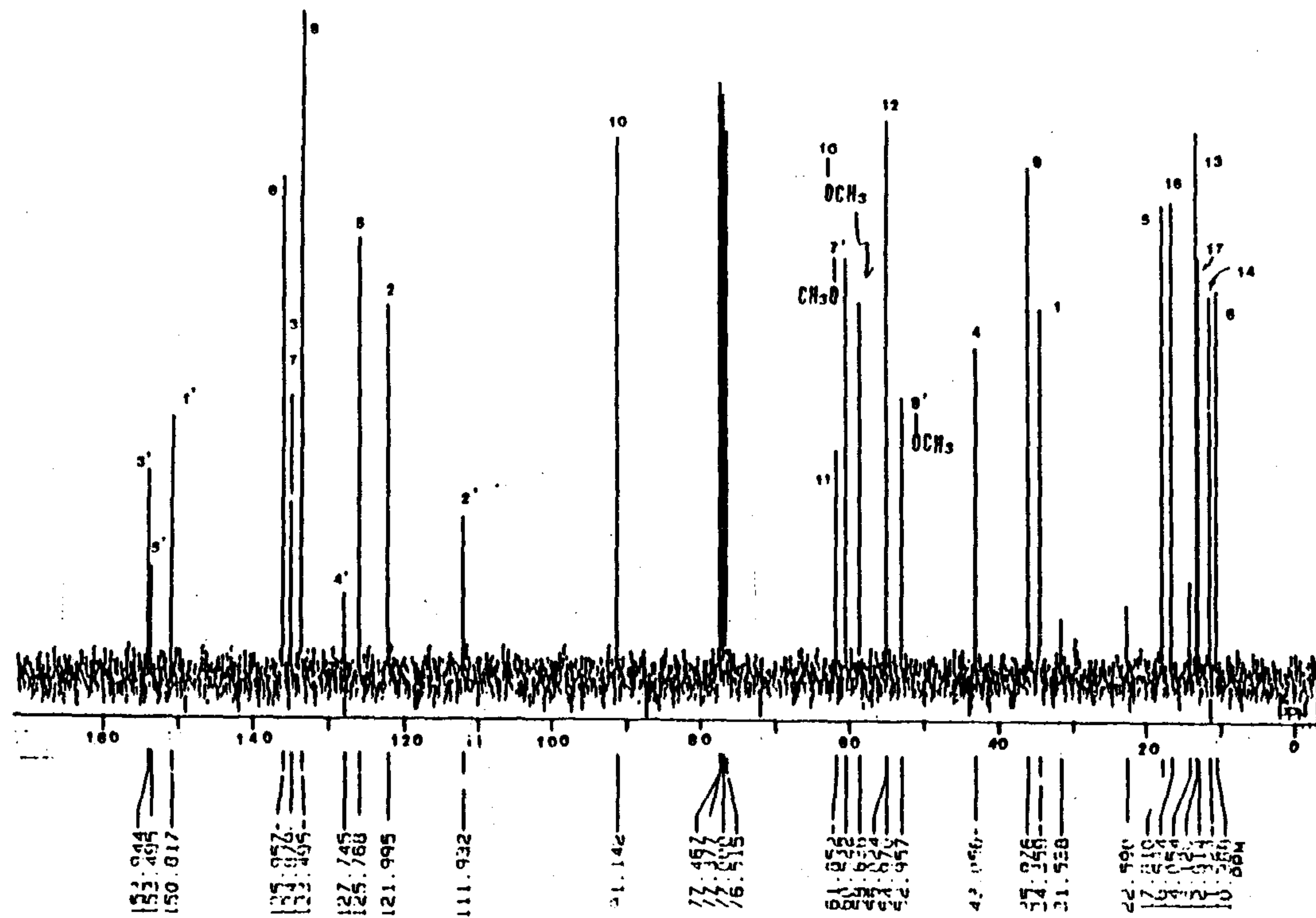
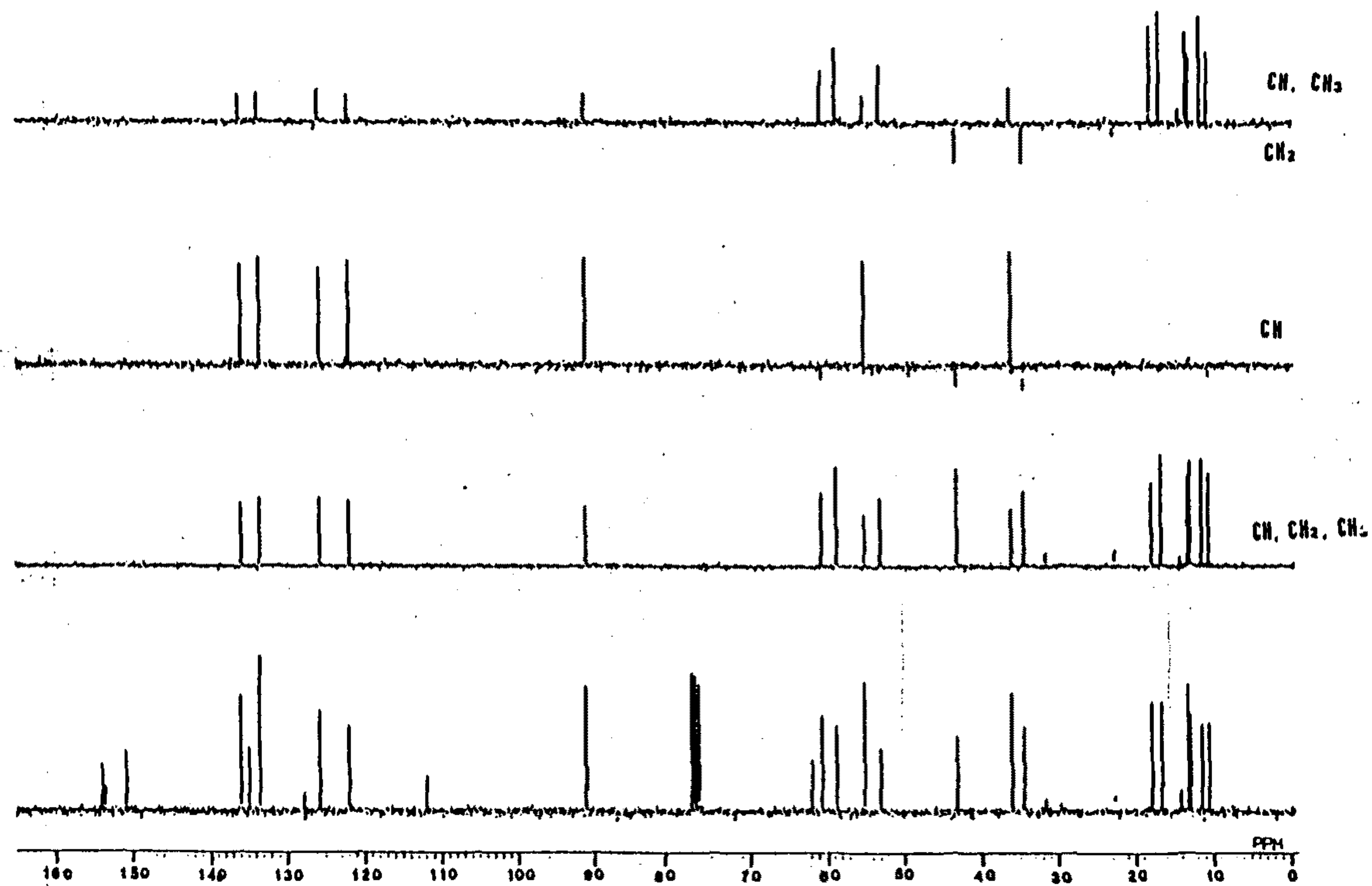


Fig. 19. Carbon-NMR spectra of compound I (pliericidin D1) from No. 46 strain (75 MHz, CDCl3)



JEOL

Fig. 20 Attached-proton-tested ^{13}C -NMR of compound I (piericidin D1) from No. 46 strain

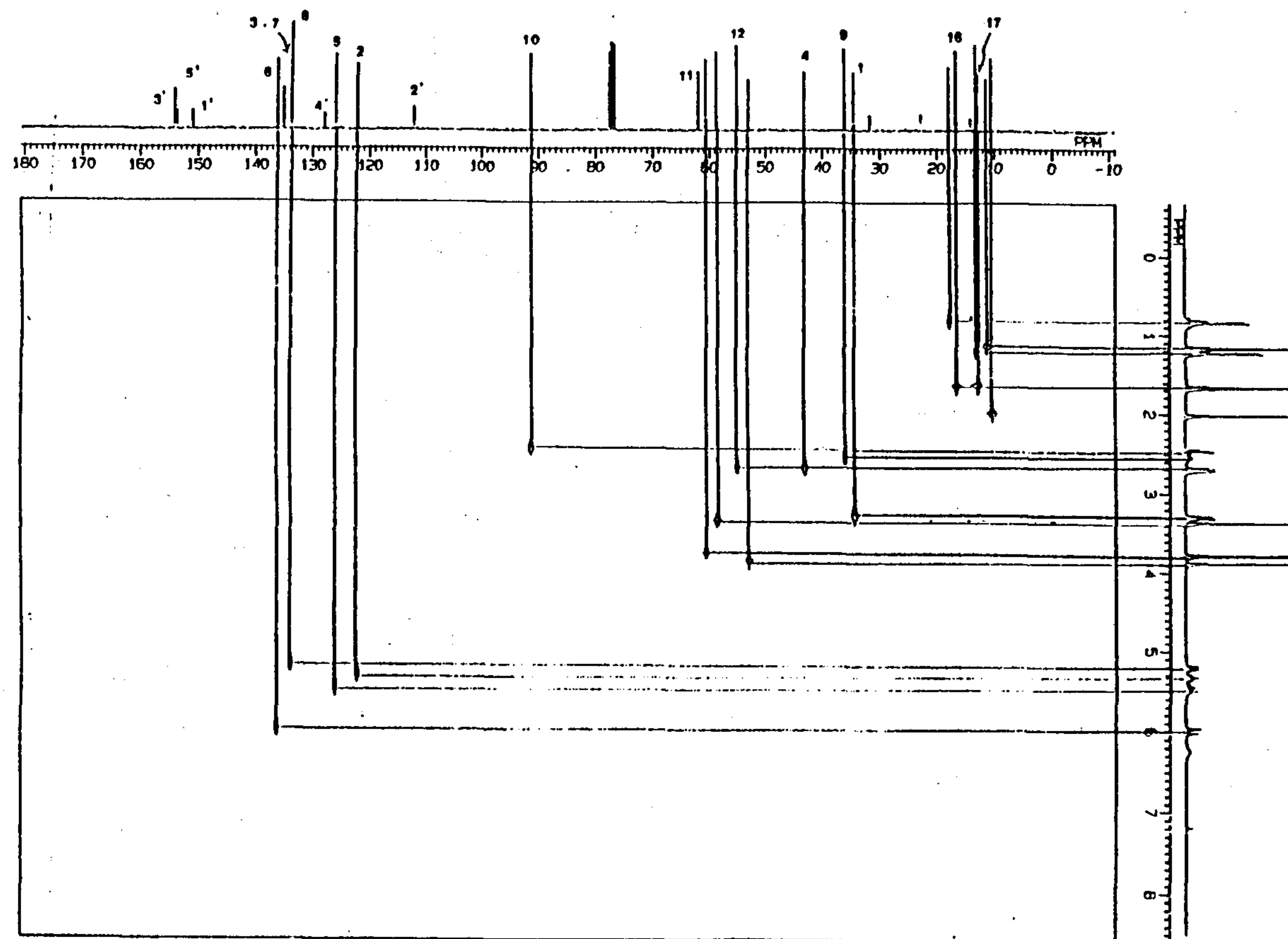


Fig. 21 Carbon-proton 2D NMR spectra of compound I (piericidin D1)
from No.46 strain

먼저 compound I의 경우 UV 흡수 pattern이 239nm에서 강한 흡수를 보이고 있어서 5번 탄소의 CH_3 가 탈락되어 있으며, proton-NMR data 상에서 0.9 ~ 1.1 ppm에서의 isopropyl group이 보이지 않는 것으로 볼때 A_1 , B_1 , C_1 또는 D_1 type의 골격을 갖고 있는 것으로 보인다. 또한 OCH_3 의 존재 ($^1\text{H-NMR}$: 3.53 ppm, $^{13}\text{C-NMR}$: 58.6 ppm)가 인정되므로 A_1 이나 C_1 은 아니며, $C_{11} - C_{12}$ 사이의 epoxy group이 있는 것 ($^1\text{H-NMR}$: 2.86 ppm, $^{13}\text{C-NMR}$: 55.0 및 61.9 ppm)으로 보아 본 화합물은 piericidin D_1 으로 동정된다. 그러나, Yoshida 등이 발표한 문헌⁴²⁾에 따르면, $^1\text{H-NMR}$ data 해석에서 12-H (q, 2.40 ppm) 4- H_2 (d, 2.47ppm), 9-H (m, 2.50 ppm), 및 10-H (d, 2.72 ppm), 으로 규정짓고 있다. 하지만 본 연구자의 분석결과를 보면, $^{13}\text{C}-^1\text{H}$ COSY data에서 C_4 (43.1 ppm)와 C_{12} (55.0 ppm)의 proton signal이 2.86 ppm에서 겹쳐서 나타나 있고, C_9 (36.0 ppm)의 proton은 2.69 ppm에서 dd로, C_1 (91.1 ppm)의 proton은 2.62 ppm에서 상관관계를 보여주고 있다. 따라서 본 화합물 즉 piericidin D_1 의 proton-NMR data는 10-H (d, 2.62 ppm), 9-H (dd, 2.69 ppm), 4- H_2 + 12-H (d+q, 2.86 ppm)으로 수정되어야 할 것이다.

Compound II의 경우도 compound I과 UV pattern이 유사하고 isopropyl group (0.95, 1.06 및 1.56 ppm)이 있으므로 기존 문헌치와 비교하여 본 화합물은 piericidin C_3 으로 동정하였다.

Compound III은 UV pattern이 C_5 위치에 methyl group이 존재하는 것과 유사하게 나타났고, NMR data에서도 5-H이 없어지고 4- H_2 가 2.67 ppm에서 singlet으로 보이며, isopropyl group이 없으므로 본 화합물은 piericidin C_2 로 동정하였다.

Table 8. ¹H-NMR data of insecticidal compounds from no. 46
(δ , 300MHz, CDCl₃)

Proton	Comp. I	Comp. II	Comp. III	Comp. IV	PD ₁ *
1-H ₂	3.46(d, 7.0Hz)	3.29(d, 6.8Hz)	3.35(d, 6.8Hz)	3.34(d, 7.0Hz)	3.30(d)
2-H	5.50(t)	5.37(t, 9.2Hz)	5.37(t, 6.8Hz)	5.38(t, 7.0H)	5.31(d)
4-H ₂	2.86(s)	2.75(d, 6.9Hz)	2.67(s)	2.76(d, 6.8Hz)	2.47(d)
5-H	5.64(dt)	5.55(dt)	-	5.50	5.45(m)
6-H	6.16(d, 15.6Hz)	6.04(d, 15.5Hz)	5.66(s)	5.60(dt, 15.5Hz)	5.98(m)
8-H	5.37(d, 8.9Hz)	5.20(d, 9.2Hz)	5.05(d, 9.5Hz)	5.18(d, 9.8Hz)	5.16(d)
9-H	2.69(dd)	2.65 (dd)	2.56(m)	2.65(m)	2.50(m)
10-H	2.62(d)	2.87(d, 8.9Hz)	2.86(d, 9.2Hz)	2.87(d, 9.0Hz)	2.72(d)
12-H	2.86		2.92	2.92	2.40(q)
13-H ₃	1.39(d, 5.5Hz)		1.30(d, 5.5Hz)	1.30(d, 5.6Hz)	1.24(d)
13-H		1.56(m)			
14-H ₃	1.33(s)	1.30(s)	1.28(s)	1.27(s)	1.14(d)
15-H ₃	1.00(d, 6.8Hz)	0.93(d, 6.6Hz)	0.90(d, 6.8Hz)	0.89(d, 6.8Hz)	0.87(d)
16-H ₃	1.83(s)	1.71(s)	1.65(s)	1.72(s)	1.68(s)
17-H ₃	1.83(s)	1.76(s)	1.76(s)	1.77(s)	1.73(s)
10-OCH ₃	6.30(s)				
6'-H ₃	2.18(s)	2.06(s)	2.06(s)	2.07(s)	2.04(s)
7'-H ₃	3.94(s)	3.82(s)	3.83(s)	3.88(s)	3.80(s)
8'-H ₃	4.04(s)	3.92(s)	3.92(s)	3.92(s)	3.89(s)

*data of Piericidin D₁ from S. Yoshida's paper⁴²⁾

Table 9. ^{13}C -NMR data of compound I and Piericidin D₁
(δ , 75MHz, CDCl_3)

carbon	compound I	PD ₁ *	carbon	compound I	PD ₁
1	34.4(CH ₂)	34.5(t)	15	17.8(CH ₃)	18.0(q)
2	122.0(CH)	122.3(t)	16	16.5(CH ₃)	16.6(q)
3	134.9(C)	134.7(s)	17	12.8(CH ₃)	12.9(q)
4	43.1(CH ₂)	43.1(t)			
5	125.8(CH)	125.8(d)	10-OCH ₃	58.6(CH ₃)	58.6(q)
6	136.0(CH)	136.1(d)			
7	134.9(C)	134.8(s)	1'	150.8(C)	150.7(s)
8	133.5(CH)	133.5(d)	2'	111.9(C)	112.1(s)
9	36.0(C)	36.0(d)	3'	153.9(C)	154.3(d)
10	91.1(CH)	91.2(d)	4'	127.7(C)	128.0(s)
11	61.9(C)	61.9(d)	5'	153.5(C)	153.7(s)
12	55.0(CH)	55.0(d)	6'	10.4(CH ₃)	10.5(q)
13	13.1(CH ₃)	13.2(q)	7'	60.5(CH ₃)	60.4(q)
14	11.3(CH ₃)	11.4(q)	8'	53.0(CH ₃)	52.9(q)

* data from S. Yoshida's paper⁴²⁾

2. No. 660 균주의 살충성 물질 분리동정

No. 660 균주는 액체배양 방식에 따라 생산되는 살충성 물질이 다른 특성이 있어 fermentor 배양과 flask 배양을 함께 실시한 후 각각의 살충성 물질을 분리하였다. 두 배양에서 생산되는 살충성 물질은 분리되는 행태부터 크게 다른데, 그 결과를 요약하면 Table 10 과 같다.

Table 10 Comparision of insecticidal activity from 2 type culture extracts

condition	activity*				TLC
	pH 3**	pH 5.5	pH 7.0	pH 8.6	Rf value***
Fermentor culture	10/10	10/10	0/10	0/10	0.75
Flask culture	0/10	0/10	10/10	10/10	0.1

* application of EtOAc responded to 5ml of cultured broth, respectively, on B.mori

** adjusted pH when extracted with EtOAc

*** developing solvent : CHCl₃ / EtAOC / MeOH (5/4/1, v/v/v)

Fermentor 배양액 (final pH 5.5) 의 살충성 물질 (660 - A) 은 낮은 pH에서 유기 용매로 추출이 가능하였지만 높은 pH에서는 수용성으로서 BuOH로는 일부가 추출되나 EtOAc, CHCl₃로는 추출이 되지 않았으며, 다시 낮은 pH로 복원하면 살충력의 소실없이 유기용매로 물질의 추출이 가능하였다.

이로서 물질은 acidic character를 가지고 있으며 pH의 변화에도 구조가 안정하였으므로 이를 이용하여 물질을 쉽게 분리, 정제할 수 있었다.

본 화합물은, IR spectrum에서 $3000-2500\text{ cm}^{-1}$ 의 broad band와 1710 cm^{-1} 의 band로 보아 -COOH group을 예측할 수 있었고, 1560 cm^{-1} 및 1350 cm^{-1} 의 강한 band는 -NO₂ group을 갖고 있음을 알 수 있었다. (Fig. 21) 그리고 proton NMR에서 다만 $\delta 9.60$ 의 acidic OH, $\delta 4.89$ 와 $\delta 3.21$ 의 미세하게 coupling 하고 있는 2개의 CH₂를 볼 수 있었고(Fig. 22-a), carbon NMR에서도 $\delta 171.39$ 의 -COOH, $\delta 70.01$ 과 $\delta 30.21$ 의 CH₂ 등 3개의 탄소만 검출되어 (Fig. 22-b), 이상의 결과를 종합하여 본 물질을 3-nitropropanoic acid로 동정되었다.

Flask 배양액은 final pH가 8.6으로 pH의 조절없이 유기용매로 살충성 물질을 추출할 수 있었으나 pH를 낮추면, 유기용매로 추출되지 않으며 pH를 원래 수준으로 복원하여도 추출액의 살충력은 재현되지 않아, pH의 변화에 대해 구조가 불안정한 물질로 추정되었다.

분리된 물질(660-A)을 NMR을 이용하여 구조동정을 시도한 결과, macrodide 계열 물질로 추정되었는데 (Fig. 23) 분리된 양이 적었고, 분리 후에도 분해가 일어나 정확한 구조를 동정할 수 없었다. 현재 균주의 배양을 재차 시도하고 있다.

Flask 배양시 살충성 물질 660-B의 생산은 불안정하지만, 3-nitropropanoic acid를 부분구조로 하는 antibiotics가 보고된 바가 없어 배양방식에 따라 전혀 다른 구조의 살충성 물질을 생산한다는 특징이 있고, 항균력 검정 결과(Table 11)와 항균력에 대한 감수성 결과(Table 12)로부터 기존의 항생물질을 생산하지 않을 가능성이 커, flask 배양액의 살충성 물질은 분리, 동정을 계속 시도할만한 가치가 있다고 판단 된다.

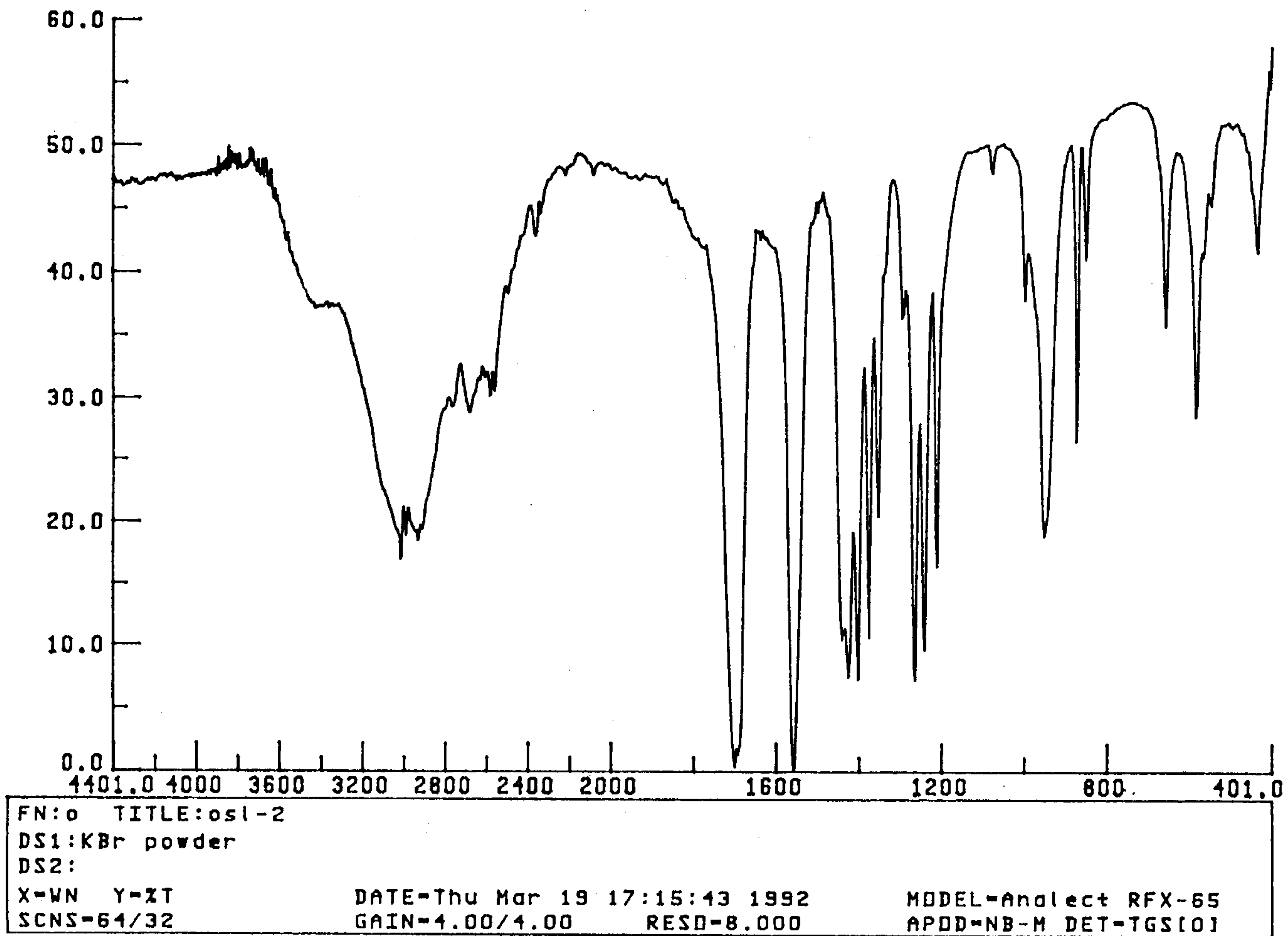


Fig.21 IR Spectra of compound 660-A (KBr disc)

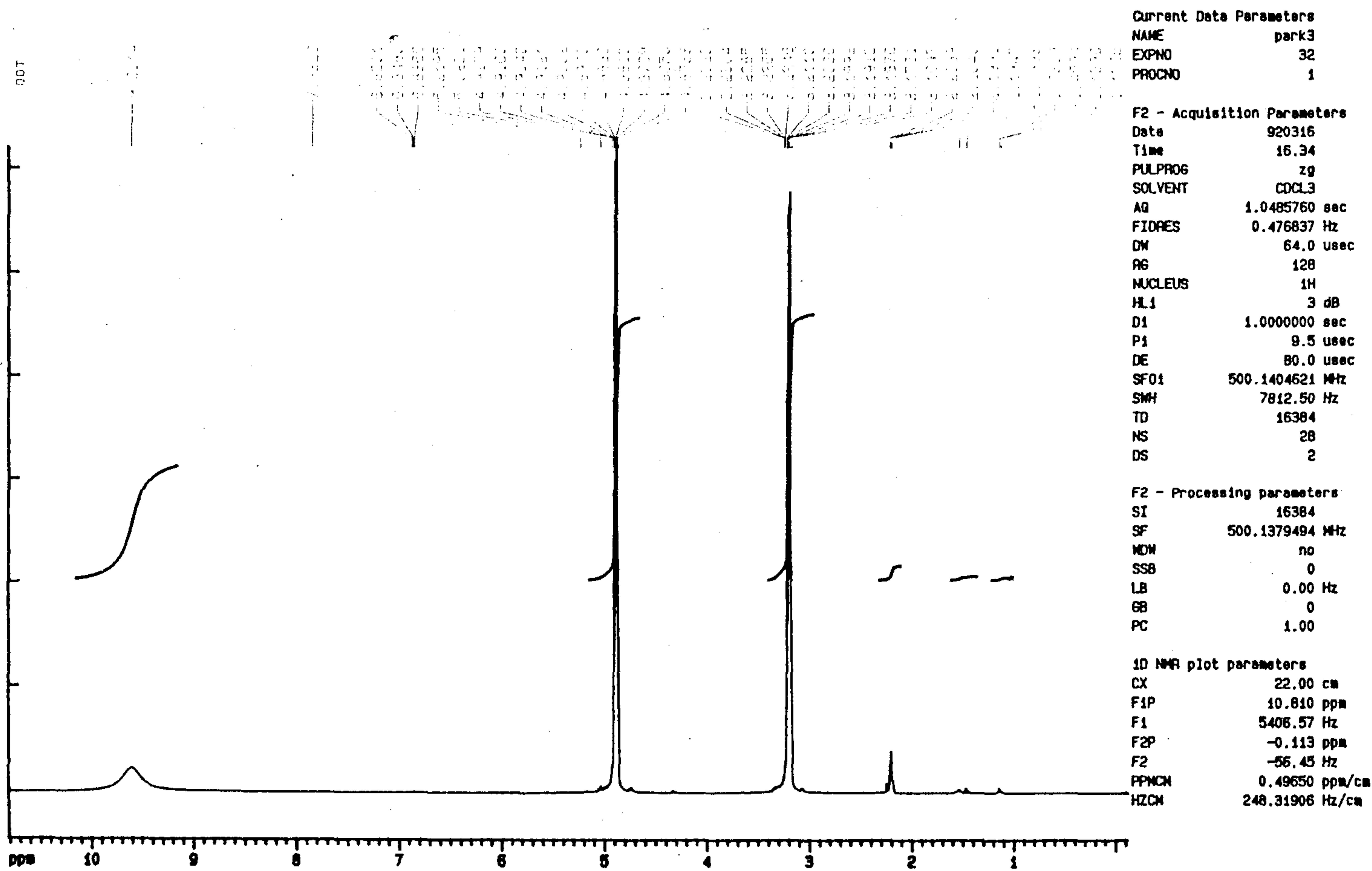


Fig.22-a ¹H-NMR Spectra of Compound 660-A (500 MHz, CD₃CN)

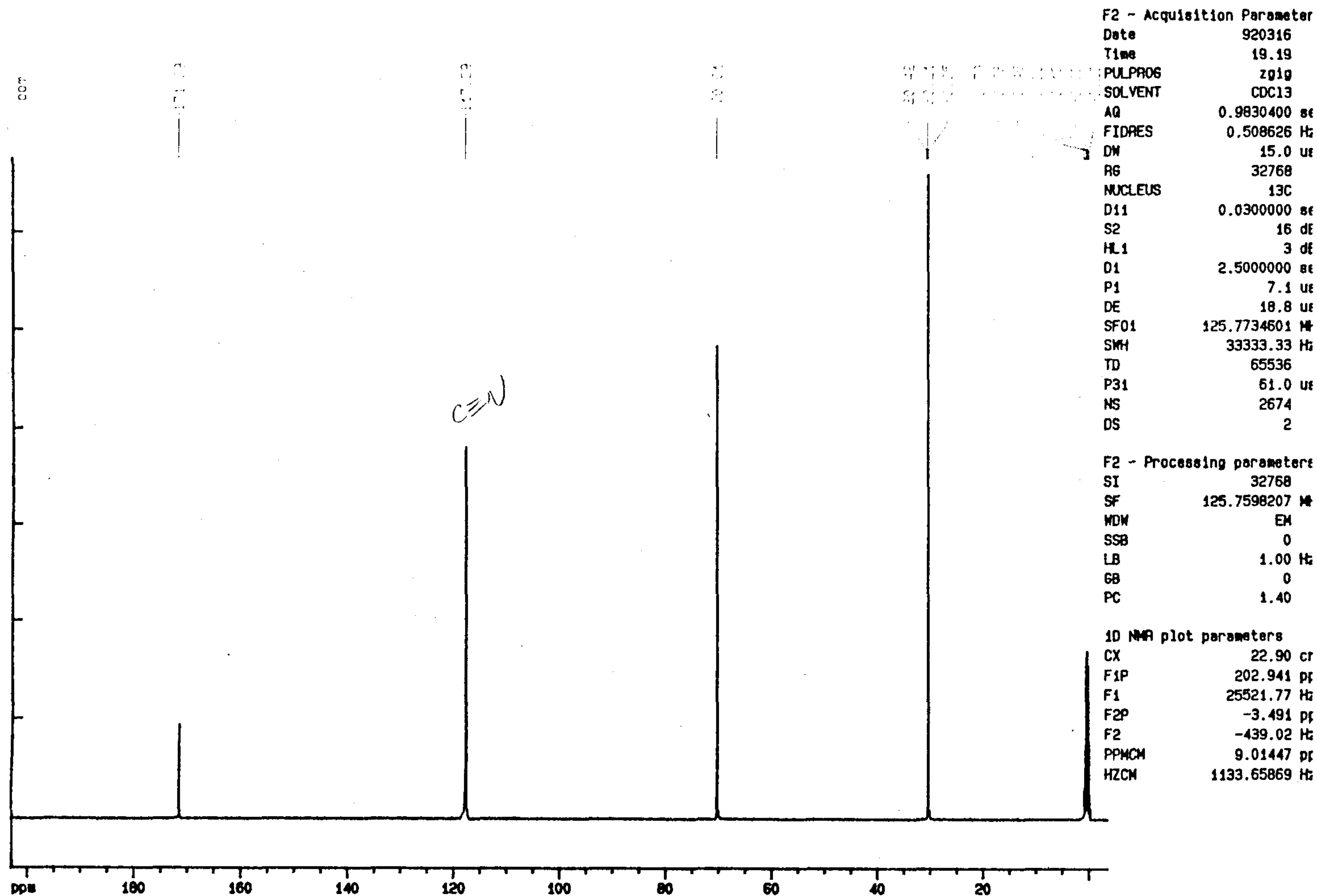


Fig.22-b ¹³C-NMR Spectra of Compound 660-A (125MHz, CD₃CN)

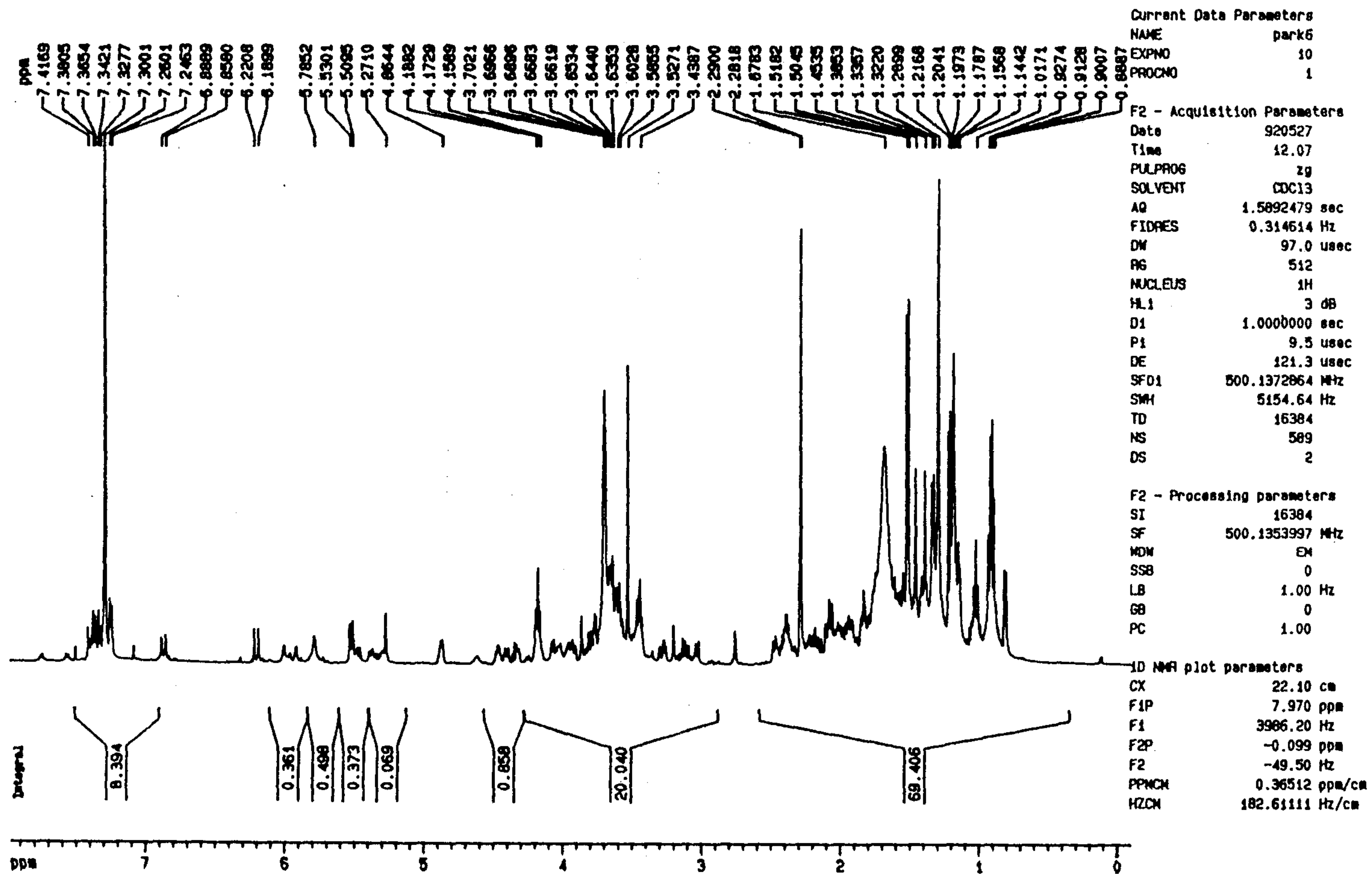


Fig.23 ¹H-NMR Spectra of Compound 660-B (500MHz, CDCl₃)

Table 11 Antibiotic activity of compound 660 from flask culture

Test organism	activity*
Escherichia coli BE 1186	-
Salmonella typhimurium SL 1102	-
Pseudomonas aeruginosa IFO 13130	-
Bacillus subtilis	-
Staphylococcus aureus R-209	-
Candida albicans IFO 1594	-

* Paper disk method (loading dosage : 20 μ g)

Table 12 Comparison of sensitivity against various antibiotics*

	No. 660	No. 9063**	No. 2077***
Kanamycin	++	++	-
Gentamycin	++	++	++
Streptomycin	++	++	-
Erythromycin	+	++	++
Rifamycin	+	+	++
Tetracycline	++	++	-

* paper disk method

** avermectin producing organism

*** albocycline producing organism

3. No. 1166 균주의 살충성 물질 구조동정

No. 1166 균주는 1차 스크리닝에서 살충효과가 뛰어나나, 추출물질을 paper disc 방법으로 항균력 검정을 한 결과, *B. subtilis* 에 강한 항균효과를 나타내어 본 연구수행 취지상 제외하려 하였으나, 선발된 균주중 morphology 와 균체 생산물 추출액의 TLC pattern이 No.1166 과 매우 유사한 균주가 5 종이나 되어, 이들이 생산하는 살충 항균성 물질을 확인해 보고자 본 실험을 수행하였다.

살충성 물질들은 균체 및 배양상등액에 모두 존재하였으며, 추출물은 normal TLC (chloroform-ethylacetate-methanol 5:4:1, v/v/v)에서 전개하고 분리된 물질들을 살충력 및 항균력 검정을 한 결과, 활성물질의 위치를 확인할 수 있었으며, 이들을 살충 효과만을 보이는 물질 Comp. I, Cnmp. II와 살충효과 및 *B. subtilis*에 항균효과를 보이는 물질 Comp. III로 구분하였다. 이들의 TLC Rf 값 및 발색반응은 각각 Table 13 및 Table 14와 같다.

Table.13 TLC Rf values of insecticidal compounds from No.1166 strain

	I *	II	III	IV	V
Comp. I	0.45	0.33	0.61	0.82	0.35
Comp. II	0.44	0.31	0.58	0.77	0.35
Comp. III	0.25	0.05	0.55	0.51	0.25

* I:hexane-acetone, 2:1, v/v, II:hexane-isopropanol, 9:1, v/v, III:chloroform-methanol, 9:1, v/v, IV:chloroform-ethylacetate-methanol, 5:4:1, v/v/v, V:methanol-H₂O, 9:1, v/v

Table 14. Color reaction of insecticidal compounds from No.1166 strain

	Comp. I	Comp. II	Comp. III
anisaldehyde-H ₂ SO ₄	purple	purple	brown
dragendorff's reagent	-	-	-
cobalt thiocyanate	blue	blue	-
iodine vapor	yellow	yellow	yellow
ninhydrin	-	-	-
18% methanolic HCl	pink	pink	pink

정제된 Comp. I (7.5 mg) 과 Comp. II (26.5 mg) 는 UV spectrum pattern이 동일하였으며, 최대 흡수 파장이 245 nm와 282 nm이었다. (fig. 24) 이들은 methanol, acetone, chloroform 등의 용매에 잘 용해되었으나 hexane과 H₂O에는 용해되지 않았고, methanol, H₂O 등 극성 용매내에서 쉽게 변환되어 몇가지 부산물을 생성하였는데, HPLC 로 조사해 본 결과 두 물질의 공통적인 부산물외에 Comp. I에서는 Comp. II가, Comp. II에서는 Comp. I으로 변환되어, I과 II는 interconversion이 일어나는 것으로 판단되었다. (Fig. 25) Comp. I과 II는 본 실험조건에서 집누에나방 유충에 10 μg을 처리할 때 100% 살충효과를 보여, 대상곤충 개체가 경험하는 물질의 양이 이보다 훨씬 적음을 감안할 때, 매우 강력한 살충력을 지닌 물질로 판단되었으며, (Table 15) paper disc 방법의 항균력 검정에서 사용한 피검균 *B. subtilis*, *E. coli*, *S. typhimurium*, *C. albicans*에 모두 20 μg 수준에서도 항균효과를 보이지 않았다.

Table 15. Insecticidal activity of No.1166 compounds on B.mori

	100 μ g	50 μ g	25 μ g	12.5 μ g	6.25 μ g	3.12 μ g	1.6 μ g
Comp. I	-	-	10/10**	10/10	9/10	1/10	0/10
Comp. II	-	-	10/10	10/10	9/10	6/10	2/10
Comp. II	10/10	10/10	5/10	0/10	-	-	-

* loading dosage on artificial diet 1g

** No. of dead insects/ applied insects

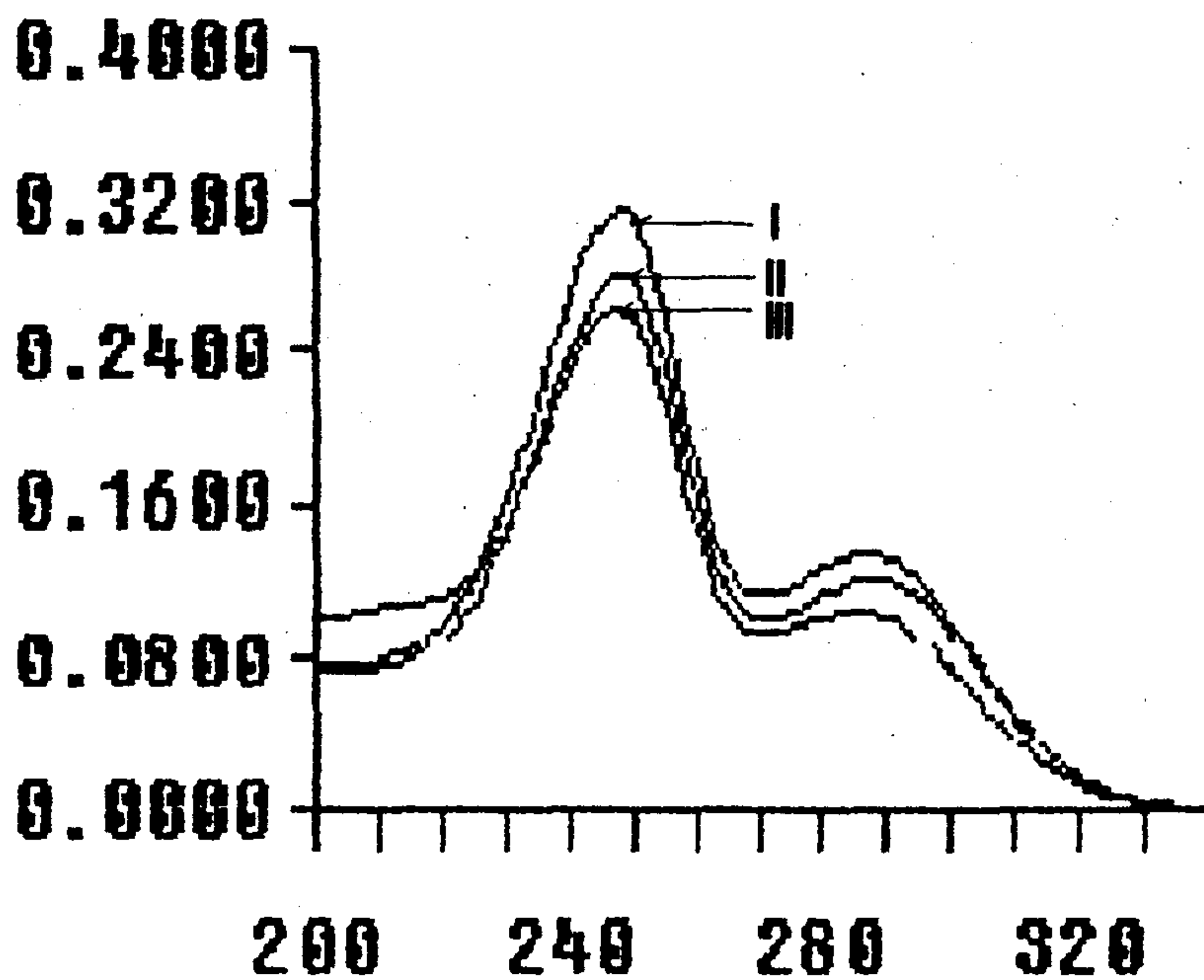


Fig.24 UV spectrum of isolated compounds from no.1166 strain (MeOH)

I : Comp. I, II : Comp. II, III : Comp. III

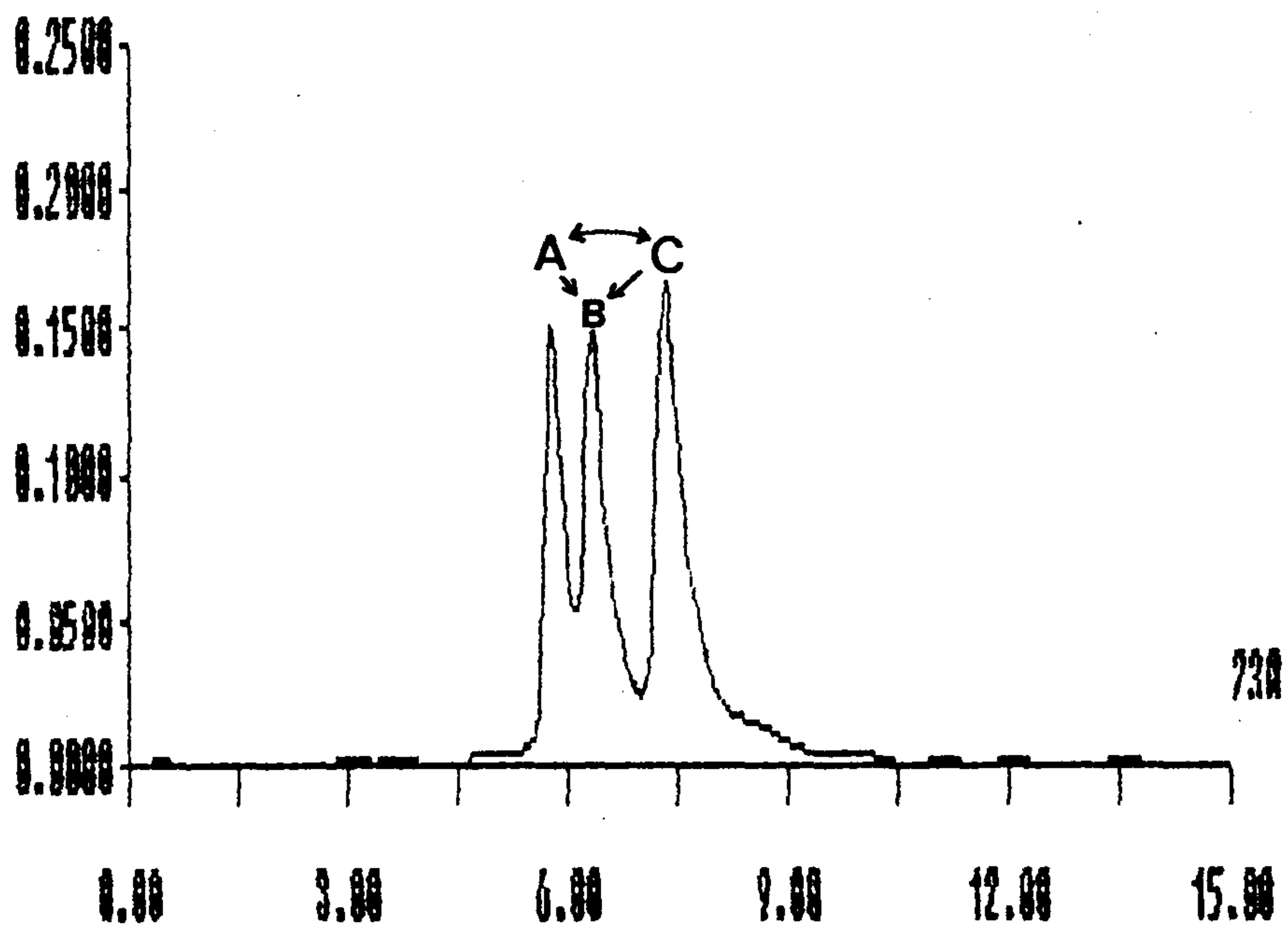


Fig. 25 HPLC chromatogram of isolated compounds from no.1166 strain
A : Comp. I, B : common byproducts of Comp. I & Comp. II, C :
Comp. II
column : LichroCart RP-18 ϕ 10 x 250mm
elution : methanol-H₂O 9/1, v/v
detector : UV 230nm

항균효과가 낮고 살충효과가 뛰어난 특징과 UV spectrum pattern 및 TLC 발색결과를 토대로 기존의 항생물질과 비교검색한 결과, 분리된 물질들은 macrolide 계열중 16 membered lactone ring의 Bafilomycins와 매우 유사하였다. Bafilomycin 계열물질로는 A₁, B₁, C₁, D, E 와 A₁, B₁, C₁의 19번 탄소위치가 methylation된 A₂, B₂, C₂ 등 8개 물질이 분리, 보고되었는데,⁴³⁾ 이들은 동일한 골격의 lactone ring을 소유하여 구조적으로 매우 유사하지만 side chain에 따라 항균력이 매우 크게 차이가 나며, 그 구조가 매우 불안정하여 분리과정중 쉽게 화학적 변화가 일어난다고 알려져 있다.⁴⁴⁾ 본 실험과정에서도 분리된 comp. I 과 II 는 쉽게 화학적 변화가 일어났다.

추출물중 Silica-column chromatography에서 얻은 frac. III는 재차 동일 column 상에서 chloroform-methanol mixture (95/5, v/v)를 사용하여 불순물을 제거하였고, 최종적으로 chloroform-hexane (1/2, v/v)에서 재결정을 시도하여 Comp. III를 얻었다. (Fig. 26) 분리된 Comp. III는 옅은 노란색의 비결정 침전물로서 acetone, ethylacetate, chloroform 등에는 용해 되었으나, methanol, acetonitrile, H₂O 등 극성 용매와 hexane 에는 용해되지 않았다. chromatography 상에서 tailing 이 일어나고 acid 첨가로 분리능이 좋아지는 특성으로 보아 분자내에 acidic character의 작용기가 존재하는 것으로 추정되었다. (Fig. 27, 28, Table 16, 17)

먼저 compound II의 화학구조를 보면 다음과 같다.

3개의 CH₃O group (¹H-NMR : 3.70, 3.24, 3.09ppm : ¹³C-NMR : 60.8, 56.2, 47.2 ppm)이 있고 그외 33개의 골격탄소가 나타나 있으며, 21번위치의 proton (3.59 ppm)과 carbon (71.3 ppm)이 L-155, 175 나

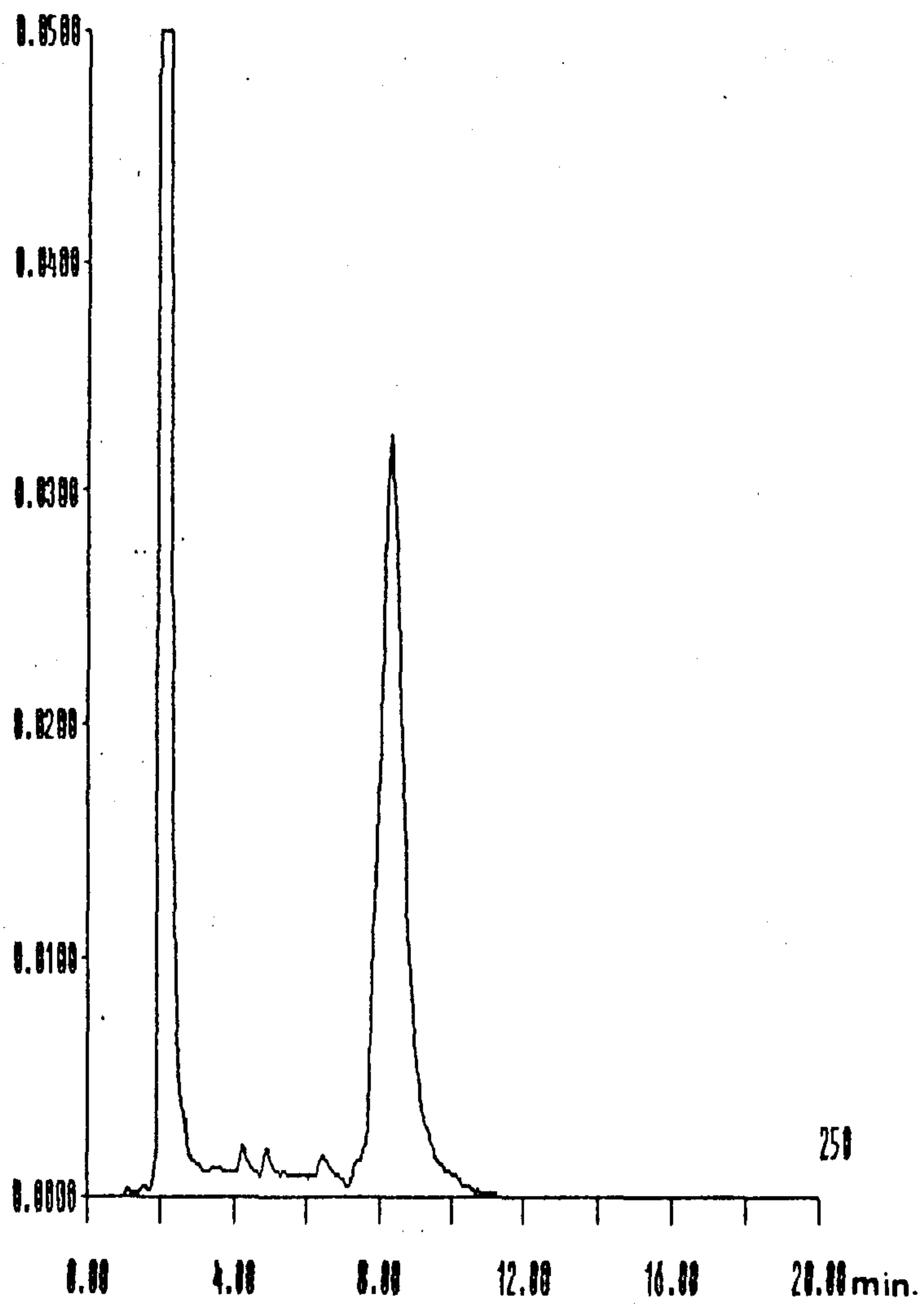


Fig.26 HPLC chromatogram of Comp.III from no. 1166 strain
column : LichroCart RP-18, $\phi 10 \times 250\text{mm}$
elution : ACN-NH₄H₂PO₄ buffer(pH 3.0, 0.01M) 9/1, v/v
detector : UV 230nm

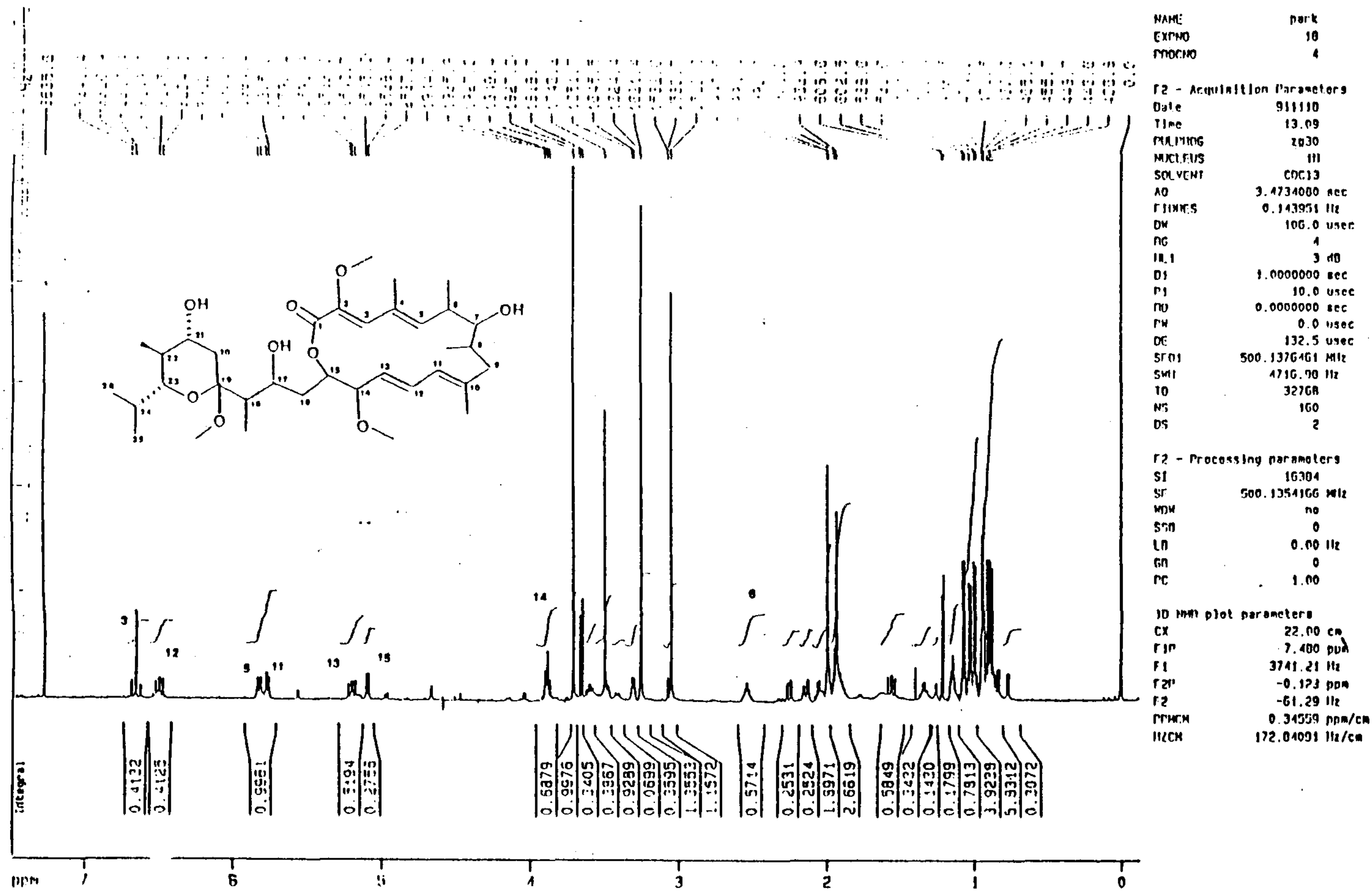


Fig.27 . Proton-NMR spectra of compound II (bafilomycin A2) from No.1166 strain (500 MHz, CDCl3)

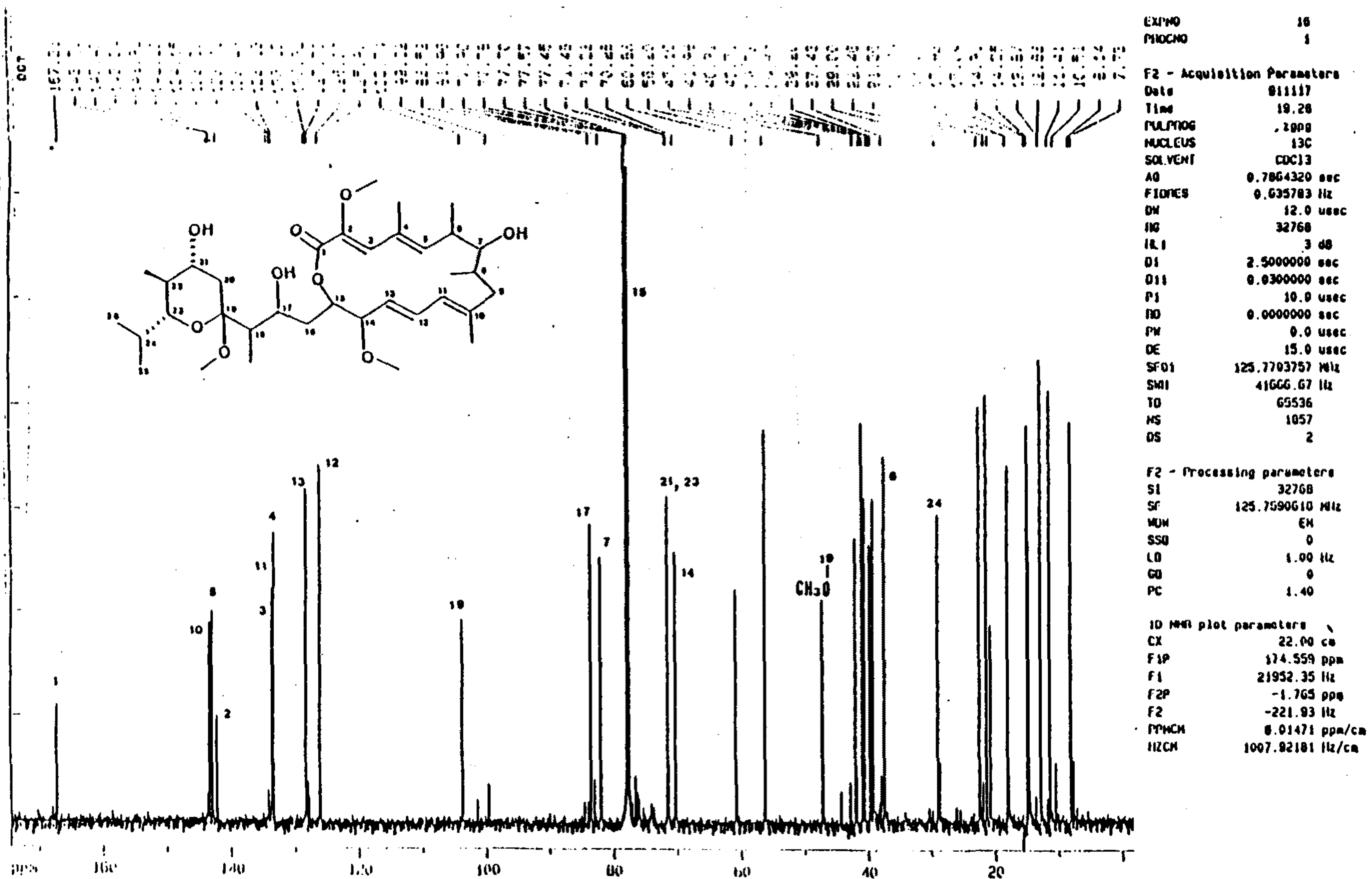


Fig.28 . Carbon-NMR spectra of compound II (bafilomycin A2) from
20 No.1166 strain (125MHz, CDCl₃)

Table 16 ¹H-NMR chemical shift data of Comp. II Comp. III (δ, 500MHz, CDCl₃)

Proton	Comp. II	Comp. III	BA ₁ *42)
2-OCH ₃	3.70(s)	3.74(s)	3.64
3-H	6.65(d, 6.5Hz)		6.68
5-H	5.76(d, 9.4Hz)		5.77
6-H	2.53(m)		2.54
6-CH ₃	1.07(d, 7.0Hz)	1.06(d, 7.3Hz)	1.07
7-H	3.30(m)		3.29
8-CH ₃	0.937(d, 6.5Hz)	0.94(d, 7.0Hz)	0.935
9-ax. H	1.95(dd, 14.5, 11.5Hz)		1.95
9-eq. H	2.13(m)		2.13
10-CH ₃	1.93(s)	1.96(s)	1.94
11-H	5.81(d, 10.6Hz)	5.84(d, 10.7Hz)	5.81
12-H	6.49(dd, 15.0, 10.6Hz)	6.55(dd, 8.6, 1.1Hz)	6.51
13-H	5.19(dd, 15.0, 9.2Hz)		5.16
14-H	3.88(dd, 8.6Hz)		3.89
14-OCH ₃	3.24(s)		3.25
15-H	5.08(dd, 8.4, 1.1Hz)	4.99(dd, 8.6, 1.1Hz)	4.95
16-CH ₃	0.88(d, 7.0Hz)	0.85(d, 6.8Hz)	0.83
18-CH ₃	1.03(d, 7.0Hz)	1.03(d, 7.0Hz)	1.05
20-ax. H	1.14(m)		1.16
20-eq. H	2.25(dd, 13.4, 4.8Hz)		2.30
21-H	3.59(ddd)		3.70
22-H	1.34(ddq, 6.5, 9.9, 10.2Hz)		1.33
22-CH ₃	0.942(d, 6.5Hz)	0.94(d, 6.5Hz)	0.941
23-H	3.47(dd)		3.49
25-H ₃	0.90(d, 7.0Hz)	0.88(d, 6.5Hz)	0.90
26-H ₃	0.99(d, 7.0Hz)	0.97(d, 6.5Hz)	0.77
2'-H		7.17(d, 15.2Hz)	
3'-H		6.93(d, 15.2Hz)	
7'-H ₂ +		2.65(m)	
8'-H ₂			
NH		8.33	

* BA₁ means bafilomycin A₁

Table 17 ¹³C-NMR chemical shift data of Comp. II and Comp. III (δ, 125MHz, CDCl₃)

Carbon	Comp. II	Comp. III	BA ₁ (42)	FM(44)
1	167.3	167.4	167.3	
2	142.2	142.2	141.1	
2-OCH ₃	60.8	60.9	59.9	
3	133.7	134.3	133.7	
4-CH ₃	14.7	14.7	14.0	
5	142.9	134.4	143.3	
6	37.4	37.4	36.8	
6-CH ₃	17.9	18.0	17.3	
7	82.0	82.0	80.8	
8-CH	39.2	38.2	40.2	
8-CH ₃	22.5	22.4	21.7	
9-CH ₂	42.0	42.7	41.3	
10	143.3	143.7	143.4	
10-CH ₃	20.7	20.8	20.2	
11	126.1	126.1	125.0	
12	133.3	133.4	133.2	
13	128.2	128.1	126.8	
14	70.3	70.2	82.3	
14-OCH ₃	56.2	56.2	55.5	
15	77.8	77.5	76.8	
16	39.6	39.4	37.2	
16-CH ₃	11.4	11.4	9.8	
17	83.5	83.4	70.6	
18	40.9	41.9	42.1	
18-CH ₃	8.1	8.1	7.1	
19	103.7	99.5	99.0	
19-OCH ₃	47.2	-	-	
20	39.7	40.5	43.5	
21	71.3	76.3	70.7	
22	40.5	40.7	40.9	
22-CH ₃	12.8	13.0	12.2	
23	71.5	71.3	75.9	
24	29.0	28.6	27.9	
25	14.9	14.8	14.0	
26	21.4	22.0	21.2	
1'		165.0		164.5
2'		133.7		133.7
3'		133.7		133.8
4'		164.3		164.3
5'		115.4		115.6
6'		175.4		176.1
7'		26.2		25.9
8'		32.8		32.3
9'		198.1		198.5

* BA₁ and FM mean bafilomycin A₁ and flavensomycinic acid part of L-155,175 respectively

L-681, 110 계열 화합물의 경우보다 (5.8 ~ 5.9, 73.5 ~ 76.3 ppm) upfield 에서 나타나는 것으로 보아 본 화합물은 21번 위치에 치환기가 없는 bafilomycin A 계열 화합물로 추정되었다. 일반적인 이 계열 화합물들의 16-membered lactone ring 에는 2개의 methyl group이 있는데, 본 화합물은 3개가 있으므로 나머지 하나는 lactone ring 이외의 곳에 결합된 것으로 볼수 있고, 특히 19번탄소의 hydroxyl 기는 methanol 용매하에서 쉽게 methylketal 이 형성되는 특성이 있으므로,⁴⁵⁾ 이 위치에 CH₃O가 존재할 가능성이 크며, NMR data 상으로도 (103.7 ppm) CH₃가 도입되지 않은 화합물에 비해서 (99.2 ~ 99.6 ppm) downfield shift 되어 있다. 따라서 본 화합물은 bafilomycin A₂ 로 확인 동정하였다.

Compound III는 미황색의 무정형 화합물로서, UV, proton 및 Carbon NMR data가 Compound II와 매우 유사하였다. 그러나 ¹H-NMR 에서 7.17 (d, J = 15.2Hz), 6.93 (d, J = 15.2Hz), 2.65 (4H, m) 및 8.33 (amide-NH) ppm, 그리고 ¹³C-NMR에서 164.5, 133.7, 133.8, 164.3, 176.1, 25.9, 32.3 및 198.5 ppm의 signal들은 L-155,175의 flavensomycinic acid part와 일치하였고, 19번탄소의 upfield shift (99.5 ppm)와 1개의 CH₃O group 소실은 이곳의 CH₃ 치환기가 없다는 증거이며 21번탄소의 down field shift는 (76.3 ppm) 이곳에 flavensomycinic acid가 ester 결합하고 있음을 보여주었다. 따라서 본 화합물은 bafilomycin B₁으로 동정하였으며, 이 화합물의 TLC 상에서의 tailing 현상이 HAC를 첨가함으로써 없어지는 특성등이 bafilomycin B₁임을 뒷받침 해 주었다.

Compound I은 현재 data 수집중이며, compound II와 inter conversion 되는 화합물임을 볼때 유사구조 화합물로 추정된다.

4. NO 2077 균주의 살충성 물질 구조동정

No.2077 균주에서 분리된 살충성 물질의 chromatogram 및 UV spectrum은 각각 Fig.29, Fig. 30 과 같다.

분리 정제된 물질 2077은 항균력 검정에서 *B. subtilis*와 *S. aureus* R-209에 약한 항균력을 나타내었으며 (Table 18), *B. mori*에 대한 살충력도 본 실험 조건에서 200 μ g 수준으로 No.46 균주의 piericidins 나 No.1166 균주의 bafilomycins가 10 μ g 수준에서 살충력을 나타내는데 비하여 미약한 수준이었다. (Table 19)

Table 18 Antimicrobial activity of compound 2077

Test organism	activity*
<i>Escherichia coli</i> BE 1186	-
<i>Salmonella typhimurium</i> SL 1102	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IFO 13130	-
<i>Bacillus subtilis</i>	+
<i>Staphylococcus aureus</i> R-209	+
<i>Candida albicans</i> IFO 1594	-

* paper disk method (loading dosage : 20 μ g)

Table 19 Comparision of insecticidal activity of compound 2077 with other compounds

COMPOUND	200 μ g*	100 μ g ...	10 μ g	1 μ g
2077	10/10**	0/10 ...	0/10	-
1166 (bafilomycin A)	-	- ...	10/10	0/10
DDT	-	- ...	10/10	0/10
Parathion	-	- ...	10/10	0/10
Carbofuran	-	- ...	10/10	10/10

* loading dosage on artificial diet 1.5g

** No. of dead larvae / applied larvae

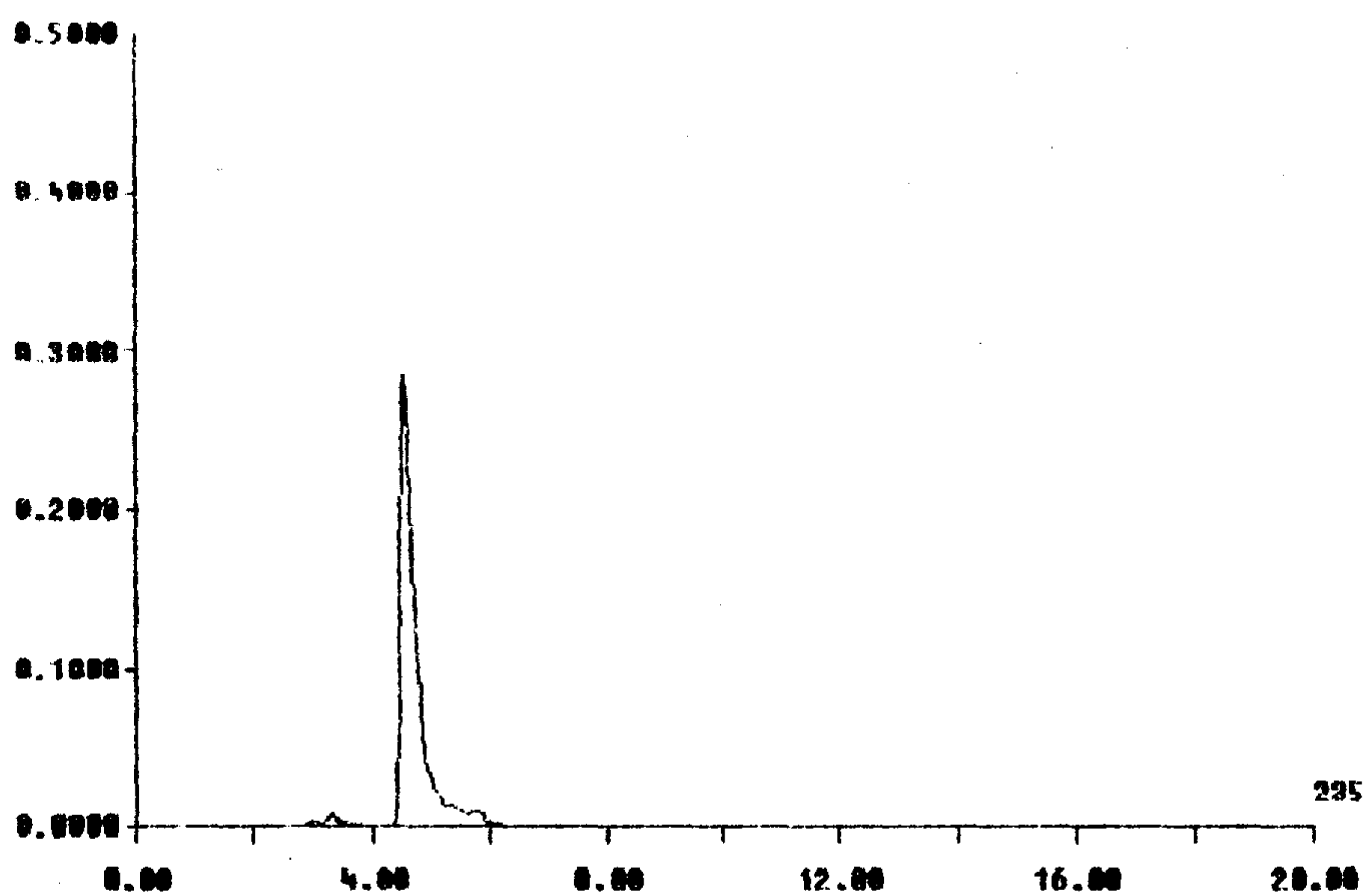


Fig.29 HPLC Chromatogram of isolated compound from No.2077 strain
 column : Lichro Cart RP-18, ϕ 4.6 \times 250 mm
 elution : MeOH -H₂O 85/15, v/v
 detector : UV 235 mm

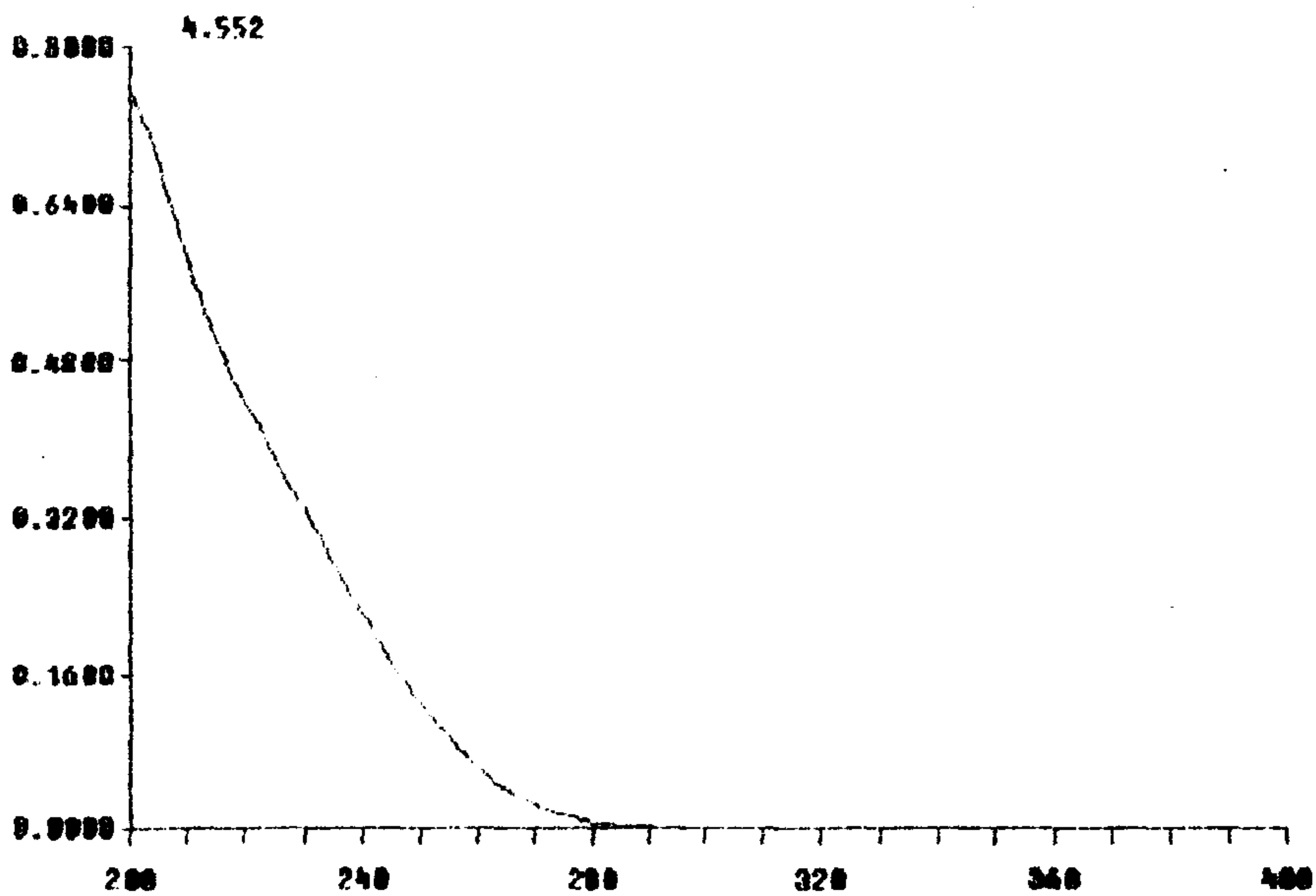


Fig.30 UV Spectrum of isolated compound from No.2077 strain (MeOH)

물질 2077은 비수용성으로 methanol, acetone, chloroform, hexane 등 유기용매에 잘 용해되며 UV region에서 특징적인 흡수 peak가 없는 end absorption type의 물질로서, NMR을 이용하여 구조분석을 한 결과는 다음과 같다.

^{13}C -NMR에서 총 18개의 탄소가 검출되었고, 그중 APT에 의한 탄소의 특성을 보면 3개의 CH_3 , 1개의 OCH_3 , 2개의 CH_2 , 8개의 CH , 2개의 4급탄소 및 1개의 $\text{C}=\text{O}$ 로 나타났으며, proton NMR에서도 2개의 singlet CH_3 , 2개의 doublet CH_3 , 1개의 OCH_3 가 보였다.

(Table 20, Fig. 31-a,b) 또한 3개의 double bond에 의한 5개의 proton이 검출되었다. 본 화합물은 UV 및 NMR의 pattern이 lactone ring의 구조를 하고 있는 macrolide로 추정되었으며 각 탄소와 그곳에 결합된 수소의 위치를 ^{13}C - ^1H COSY의 2D spectra를 이용하여 연결시킨 결과(Fig. 32), 문헌의 albocycline과 거의 일치하였다. 그러나 K. Harada 등이 보고⁴⁶⁾한 탄소 5번과 8번의 설정이 잘못된 것을 발견하였다. 즉, K. Harada 등이 136.6 및 136.1 ppm의 peak가 5번 및 8번으로 결정하였던 것은, 당시 NMR의 분리능이 좋지 않은 것(25 MHz)을 사용하였기 때문에 거의 중첩되어 보이는 2개의 peak를 정확하게 해석할 수 없었던 것으로 생각되며, 이번 본 연구진에서는 확실하게 분리된 peak와 APT에 의해서 5번과 8번탄소가 각각 136.0 및 136.5 ppm의 것으로 정정하는 바이다. (Fig. 33)

Table 20. NMR Chemical shifts (δ , ppm) of compound 2077 and albocycline

Carbon No.	compound 2077		albocycline ⁴⁶⁾	
	carbon	proton	carbon	proton
1	166.3(C)*		166.4	
2	115.3(CH)	5.84(d, 15.5)	115.4	5.94(d, 16)
3	154.8(CH)	6.86(d, 15.5)	155.0	6.98(d)
4	73.1(C)		73.1	
5	136.0(CH)	5.75(d, 16.2)	136.6	5.90(d, 16)
6	130.6(CH)	5.62(dd, 16.2x5.9)	130.6	5.64(dd, 5)
7	84.8(CH)	4.04(d, 5.9)	85.0	4.12(d)
8	136.5(C)		136.1	
9	129.2(CH)	5.25(t, 6.8)	129.1	5.35(t, 6)
10	24.7(CH ₂)	2.13(m), 1.82(m)	24.7	
11	34.1(CH ₂)	1.20 (m)	34.2	
12	39.0(CH)	1.39 (m)	39.0	
13	75.6(CH)	4.52(dq, 4.1x6.4)	75.6	4.62(dq, 8)
CH ₃	57.0(CH ₃)	3.27 (s)	56.9	3.34(s)
4-CH ₃	27.0(CH ₃)	1.51 (s)	27.0	1.55(s)
8-CH ₃	13.9(CH ₃)	1.61 (s)	13.7	1.67(s)
12-CH ₃	15.6(CH ₃)	0.85(d, 6.8)	15.7	0.89(d, 6)
13-CH ₃	17.8(CH ₃)	1.18(d, 6.4)	17.9	1.22(d, 6)

* Each carbon character was determined by INEPT

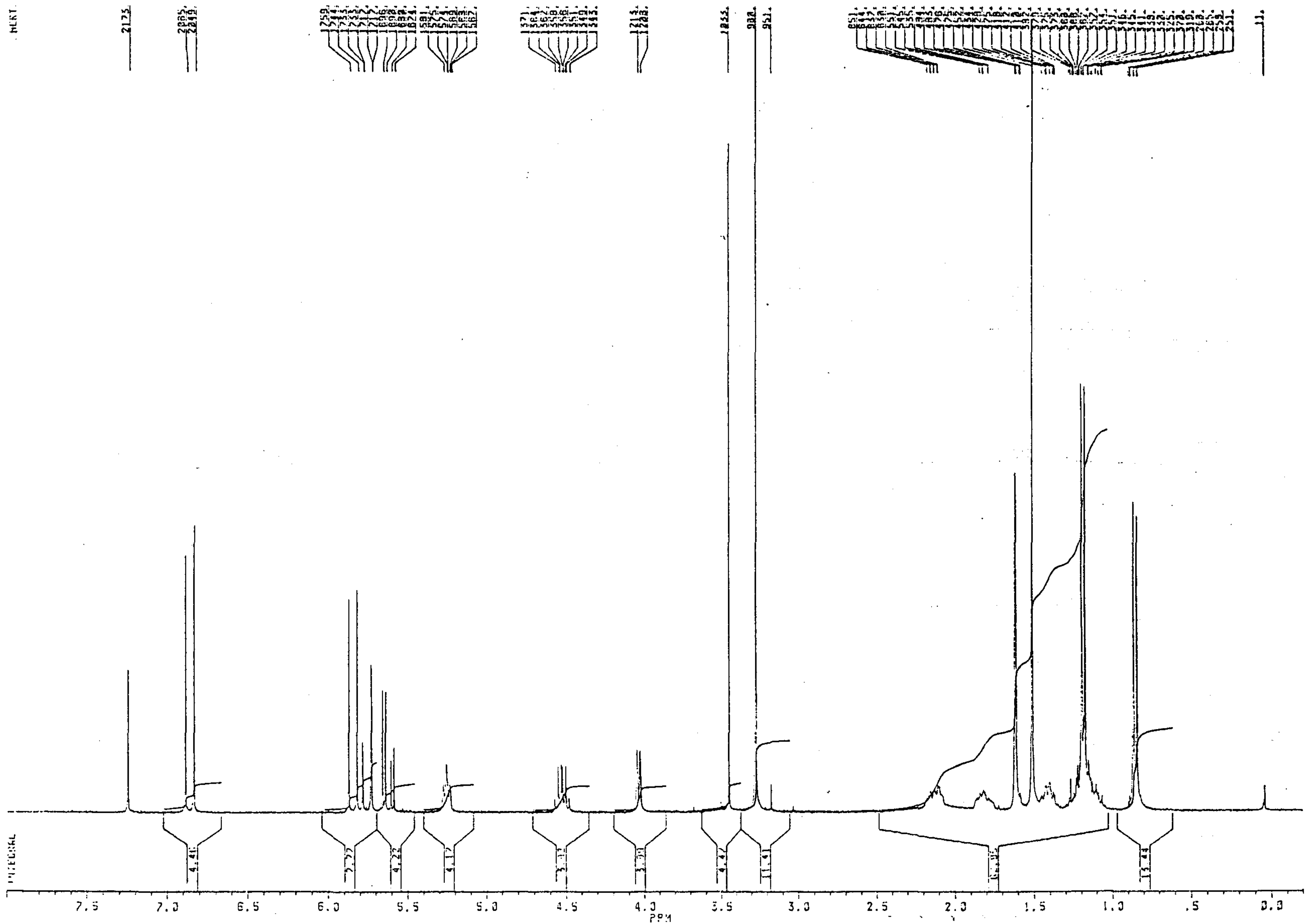


Fig.31-a ¹H-NMR Spectra of Compound 2077 (300MHz, CDCl₃)

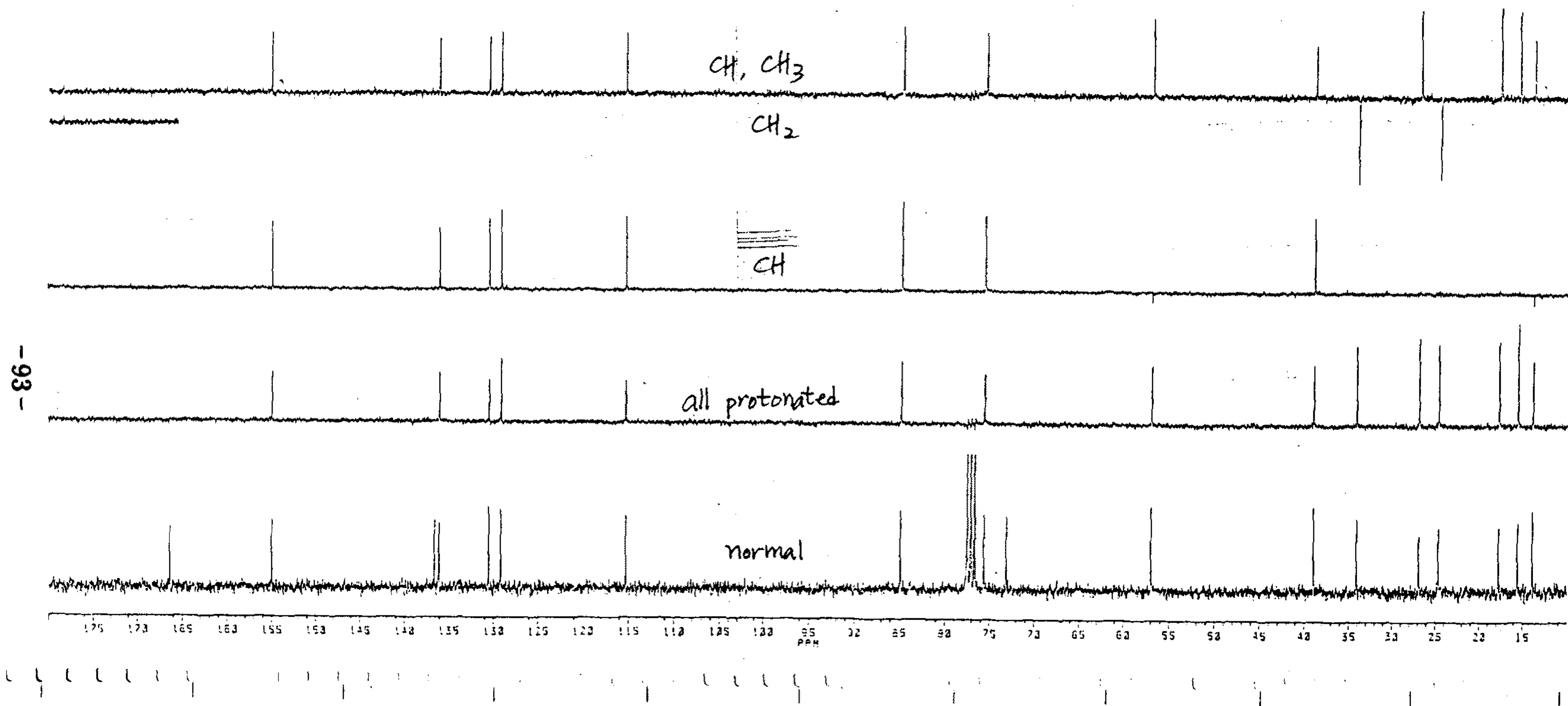


Fig.31-b ^{13}C -NMR Spectra (INEPT) of Compound 2077 (75MHz, CDCl_3)

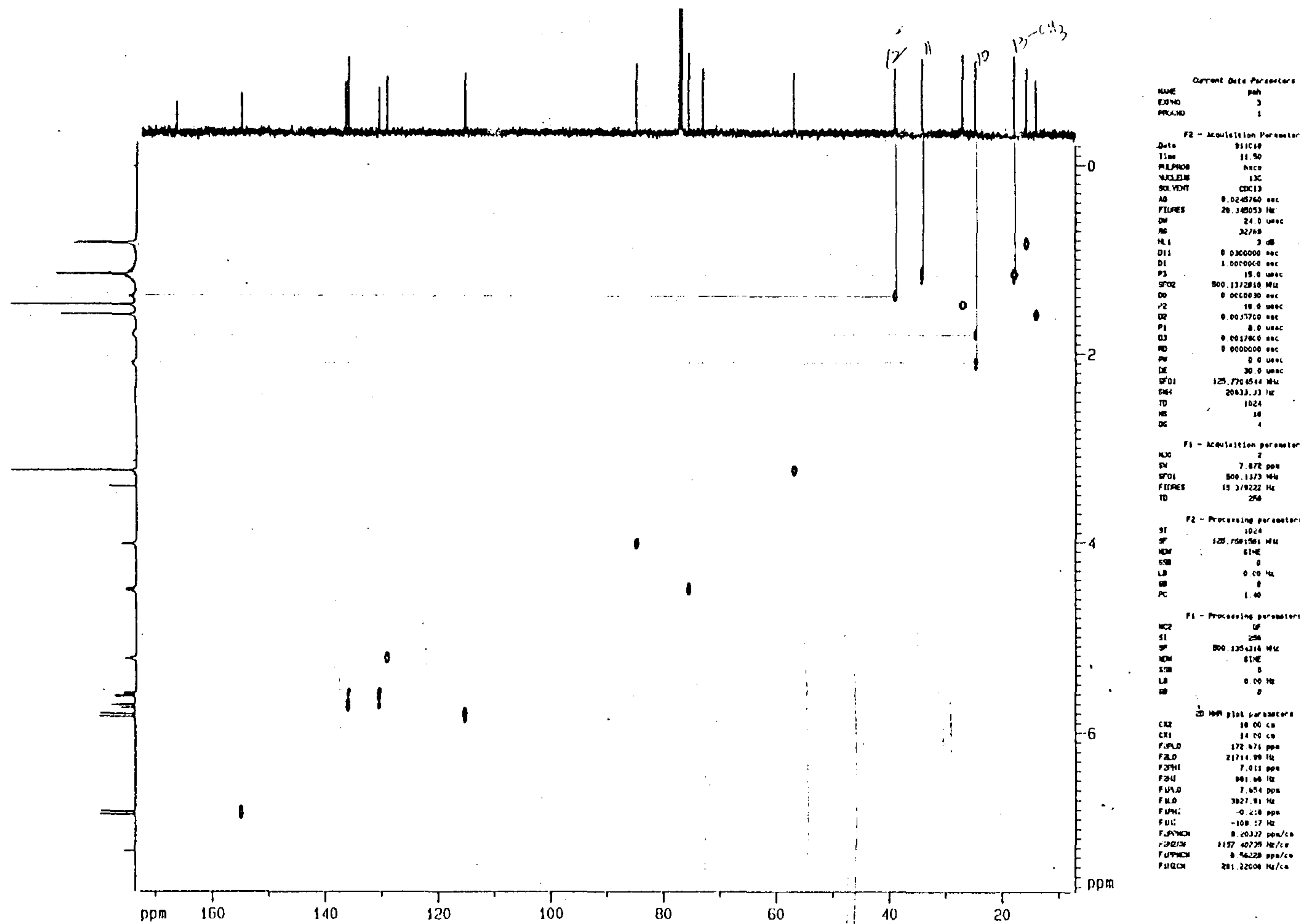


Fig.32 C-H COSY Spectra of Compound 2077 (500MHz,CDCl₃)

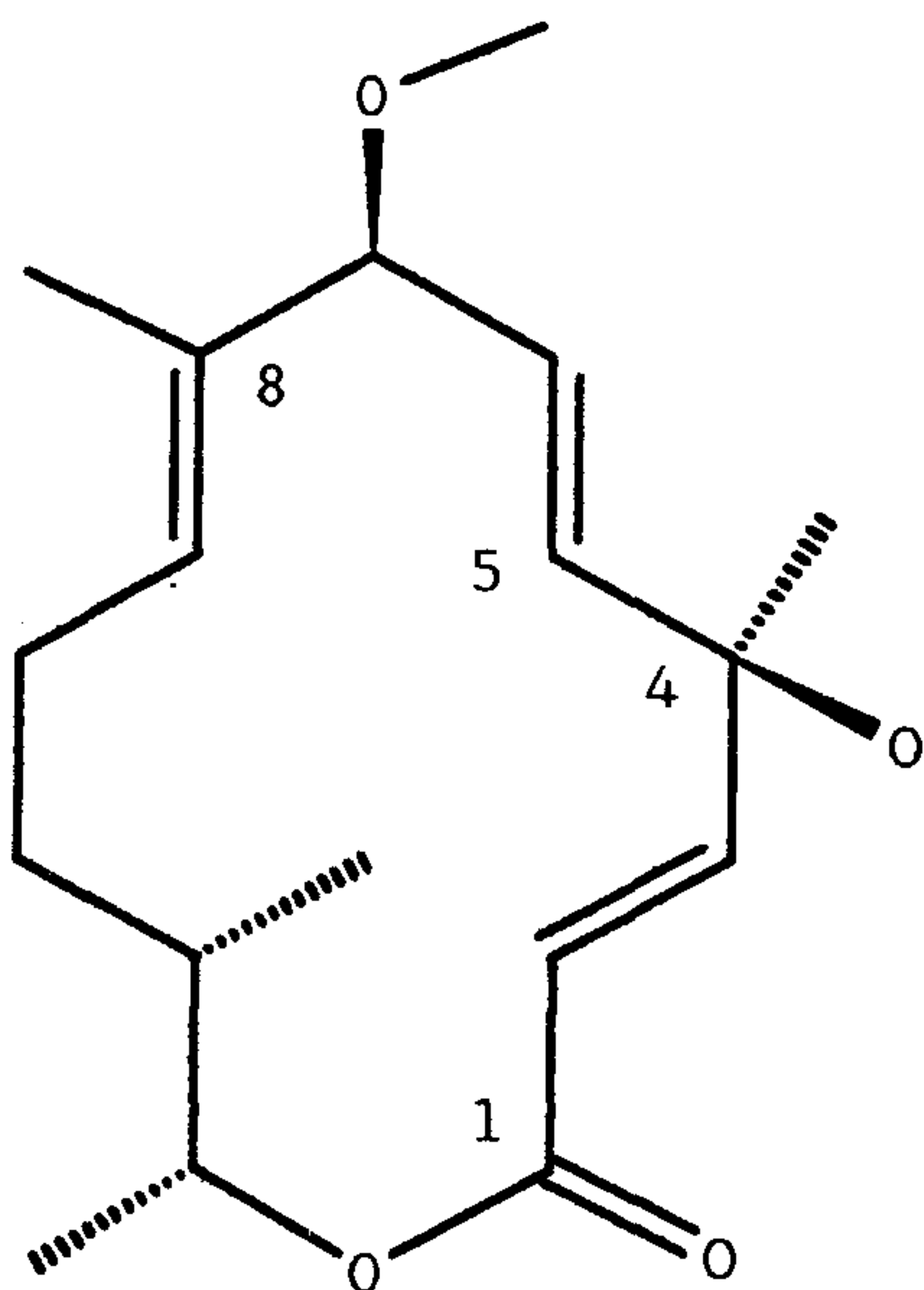


Fig.33 Structure of compound 2077 (Albocycline)

Albocycline은 G(+) bacteria에 항균력을 나타내는 물질로서 보고된 바 있으나⁴⁷⁾, 살충 활성에 대해서는 본 실험의 결과로서 처음으로 발견된 것이며, 이 물질은 LD₅₀ (mouse)가 > 1,000 mg/kg으로 인축독성이 거의 없어, 앞으로 활성을 높이는 구조 개량을 시도하기에 유망한 lead molecule로 평가된다.

5. No. 3369 균주가 생산하는 살충성 물질 구조동정

No. 3369 균주를 액체배양 (GAPY, 27 °C, 3days) 한 후 분리정제한 살충성 물질은 강한 살충효과가 있고 (Table 21), 항균력이 검정되지 않아 (Table 22) 선발과정에서부터 높이 평가된 물질이다.

Table 21 Insecticidal activity of compound 3369 on B.mori

	10 μ g*	5 μ g	2.5 μ g	1 μ g
compound 3369	10/10**	10/10	6/10	0/10

* loading dosage on artificial diet 1.5g

** dead larvae / applied larvae (mean of 3 repetition)

Table 22 Antibiotic activity of compound 3369

Test organism	activity*
Escherichia coli BE 1186	-
Salmonella typhimurium SL 1102	-
Pseudomonas aeruginosae IFO 13130	-
Bacillus subtilis	-
Staphylococcus aureus R-209	-
Candida albicans IFO 1594	-

* Paper disk method (loading dosage : 20 μ g)

분리정제된 물질 3369의 UV spectrum 및 IR spectrum은 Fig.34와 같다.

이 물질은 UV spectrum 상에서 225nm 및 232 nm의 2 max peaks, IR spectrum 상에서 1640 cm^{-1} 의 흡수 peak로부터 구조중 conjugated diene의 존재를 확인할 수 있었으며, IR spectrum의 1700 cm^{-1} 에서 강한 흡수 peak로 α,β -unsaturated lactone의 존재를 확인할 수 있었다.

본 화합물은 $^{13}\text{C-NMR}$ (Fig. 35-a)에서 총 45개의 탄소가 검출되었고, 그중 CH_3 가 11개, CH_2 가 7개, double bond의 CH가 6개, OCH가 7개, 남은 CH가 9개, 2개의 ketone, 1개의 lactone carbonyl, 4급 탄소가 2개로 구성되어 있었다 (Fig. 35-b). $^1\text{H-NMR}$ (Fig. 35-c)에서는 1개의 triplet CH_3 , 1개의 singlet CH_3 , 9개의 doublet CH_3 , conjugated diene 구조의 CH가 4개, isolated double bond의 CH 2개 등이 확인되었다. 본 화합물은 많은 methyl기와 골격탄소가 있고 lactone의 구조를 갖는 것으로 보아 macrolide로 추정되었고, oligomycin 계열 화합물들의 문헌 data와 비교한 결과 oligomycin A로 동정하였다. (Table 23, Fig 36)

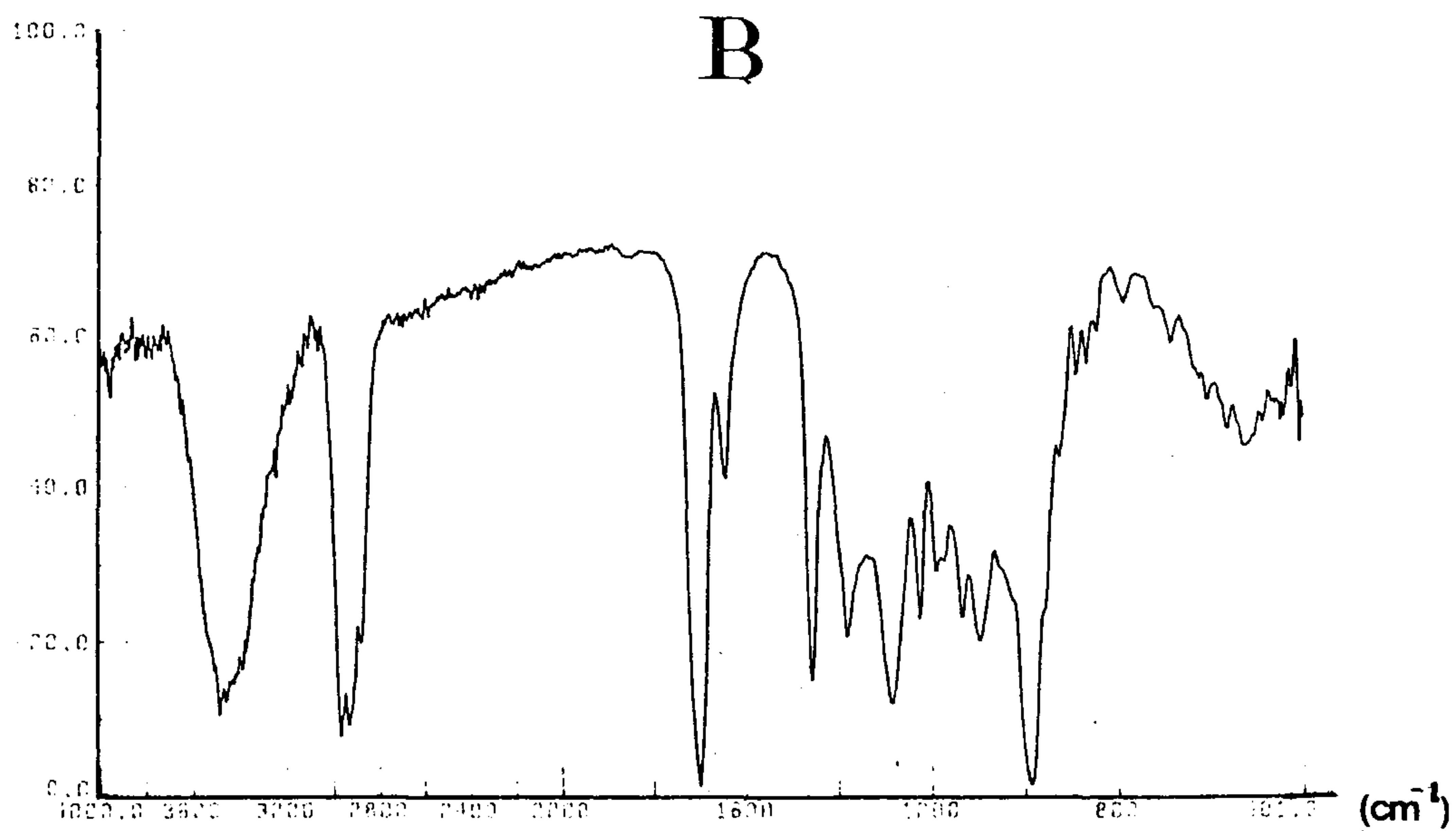
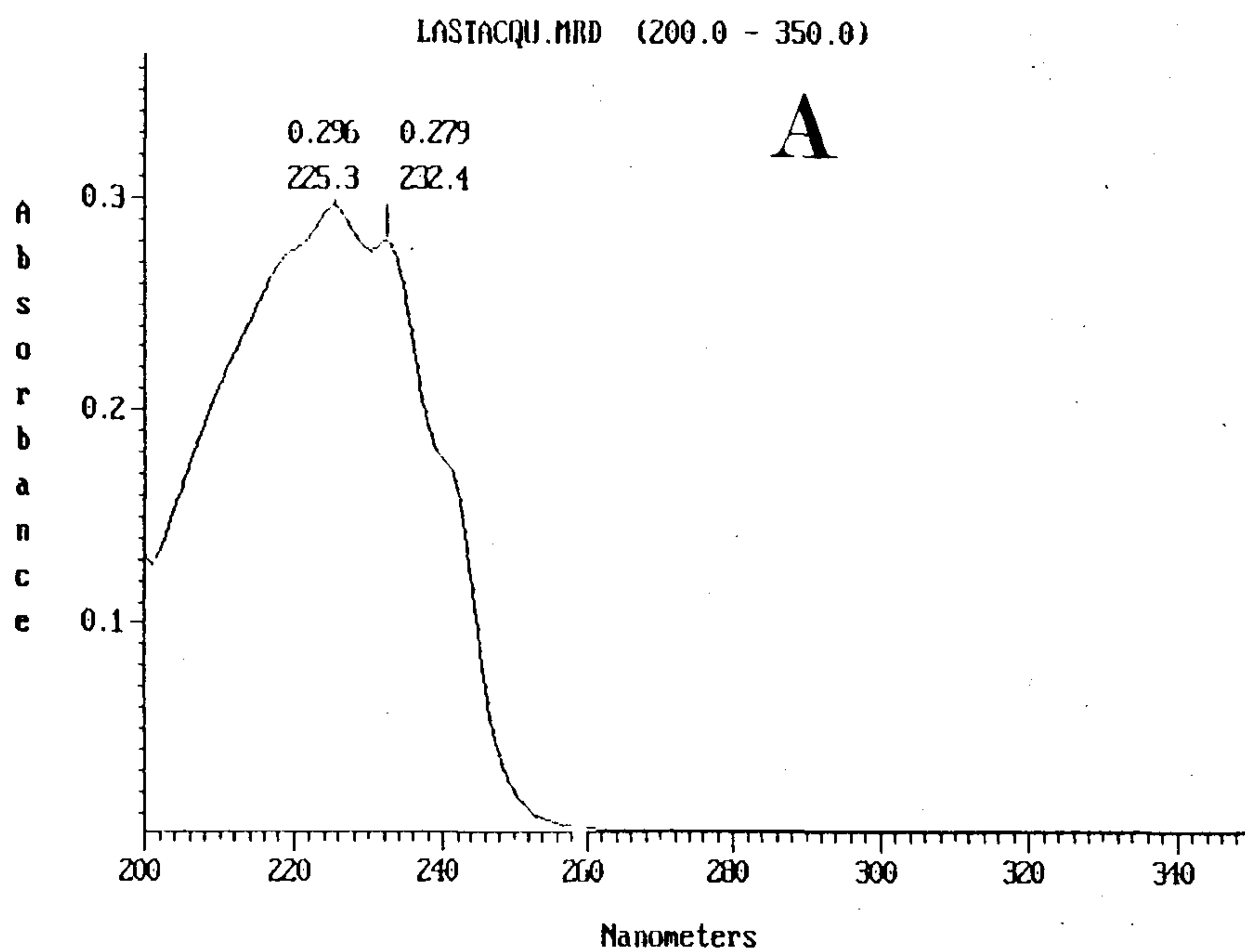


Fig. 34 UV(A) and IR(B) spectra of compound 3369

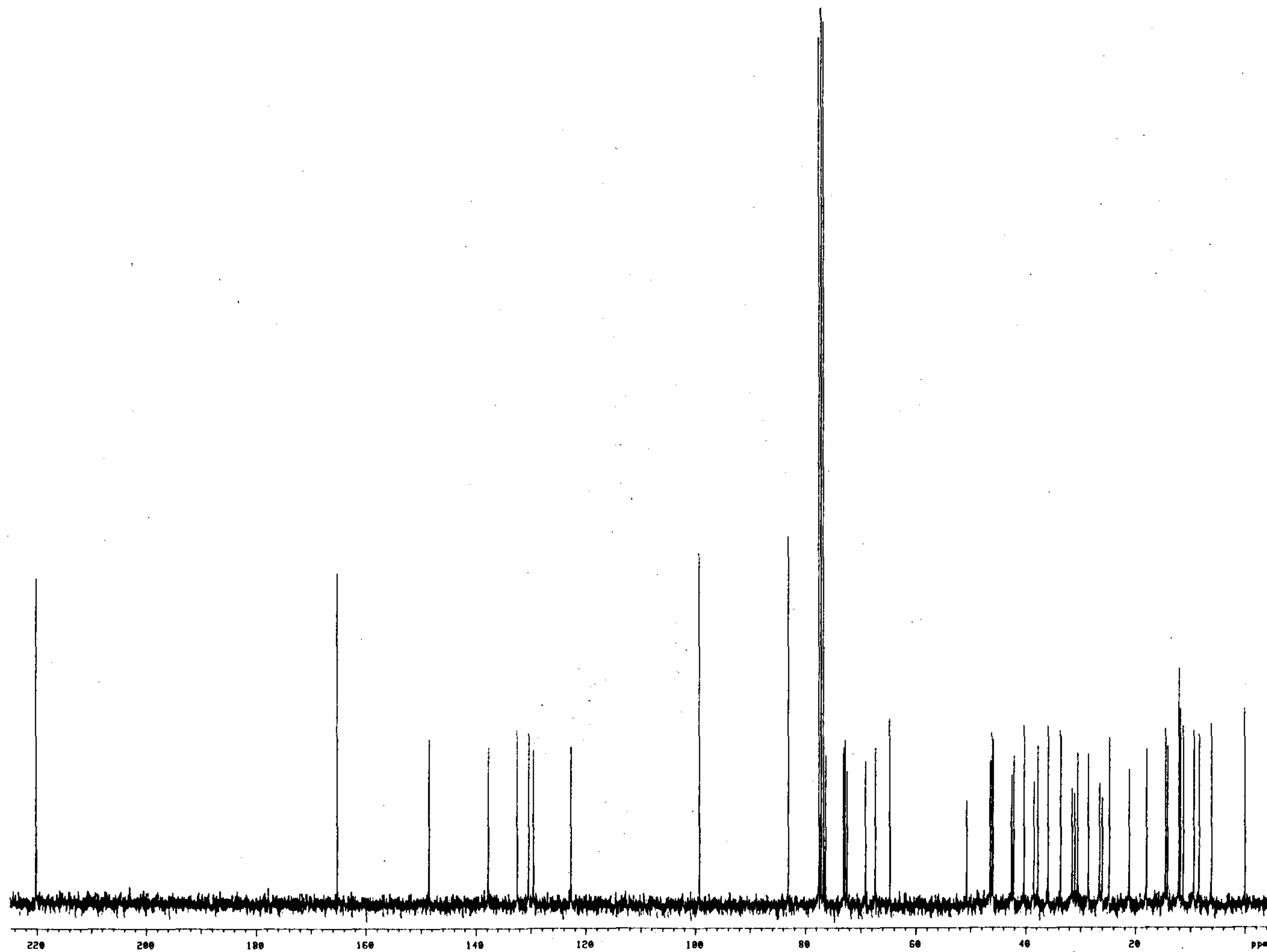


Fig.35-a ^{13}C -NMR Spectra of Compound 3369 (75MHz, CDCl_3)

92113-3369-1D in CDCl₃, 25C
PULSE SEQUENCE dept
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.429 MHz
SPECTRAL WIDTH 28997.4 Hz
ACQUISITION TIME 0.501 sec
RELAXATION DELAY 4.000 sec
PULSE WIDTH 15.0 usec
TEMPERATURE 25.0 deg. C.
NO. REPETITIONS 8
DECOUPLE H1
HIGH POWER J8
DECOUPLER GATED ON DURING ACQUISITION
DECOUPLER GATED OFF DURING DELAY
WALTZ-16 MODULATED
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 2.5 Hz
F1 SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 1 minutes

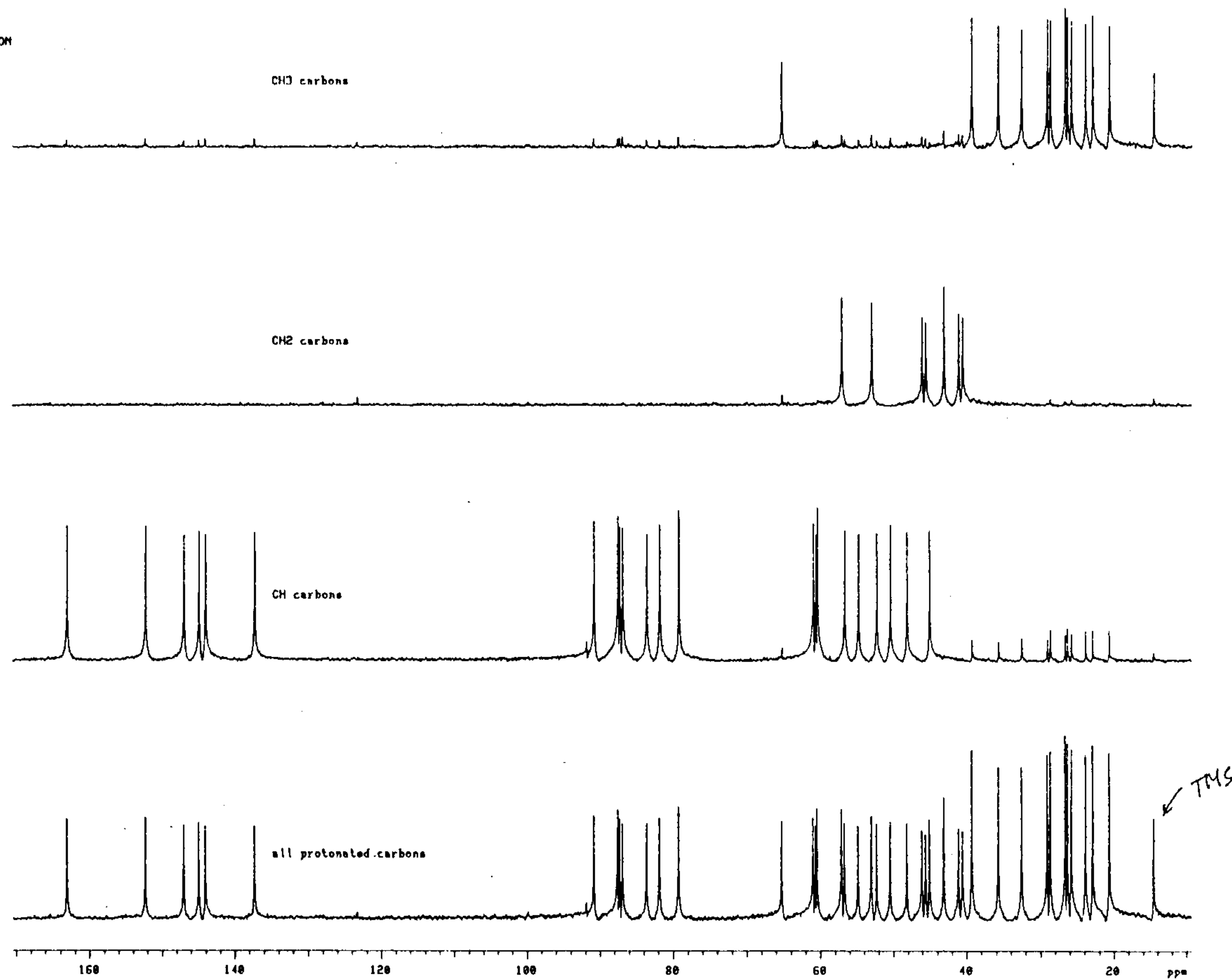


Fig.35-b INEPT ¹³C-NMR Spectra of Compound 3369 (75MHz, CDCl₃)

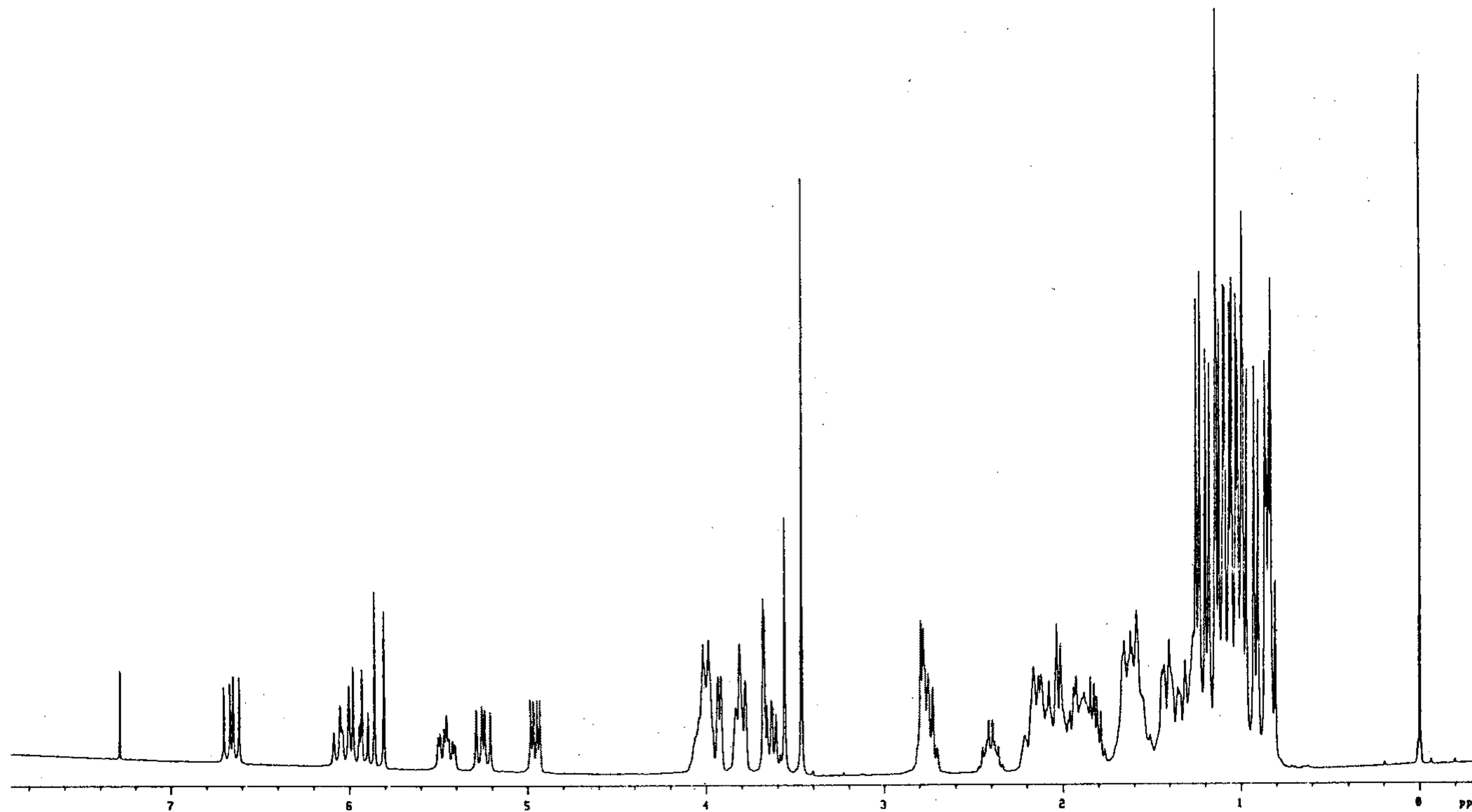


Fig.35-c ¹H-NMR Spectra of Compound 3369 (300MHz, CDCl₃)

921119-MC-3369 by Lee
In CDCl₃ 25deg
PULSE SEQUENCE hctcor
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.429 MHz
SPECTRAL WIDTH 18665.4 Hz
2D SPECTRAL WIDTH 3000.1 Hz
ACQUISITION TIME 0.855 sec
RELAXATION DELAY 1.500 sec
PULSE WIDTH 15.0 usec
TEMPERATURE 25.0 deg. C.
NO. REPETITIONS 320
NO. INCREMENTS 128
DECOUPLE H1
HIGH POWER 38
DECOUPLER GATED ON DURING ACQUISITION
DECOUPLER GATED OFF DURING DELAY
WALTZ-16 MODULATED
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
SINE BELL 0.029 sec
FT SIZE 2048
F1 DATA PROCESSING
SINE BELL 0.013 sec
FT SIZE 2048
TOTAL ACQUISITION TIME 18.1 hours

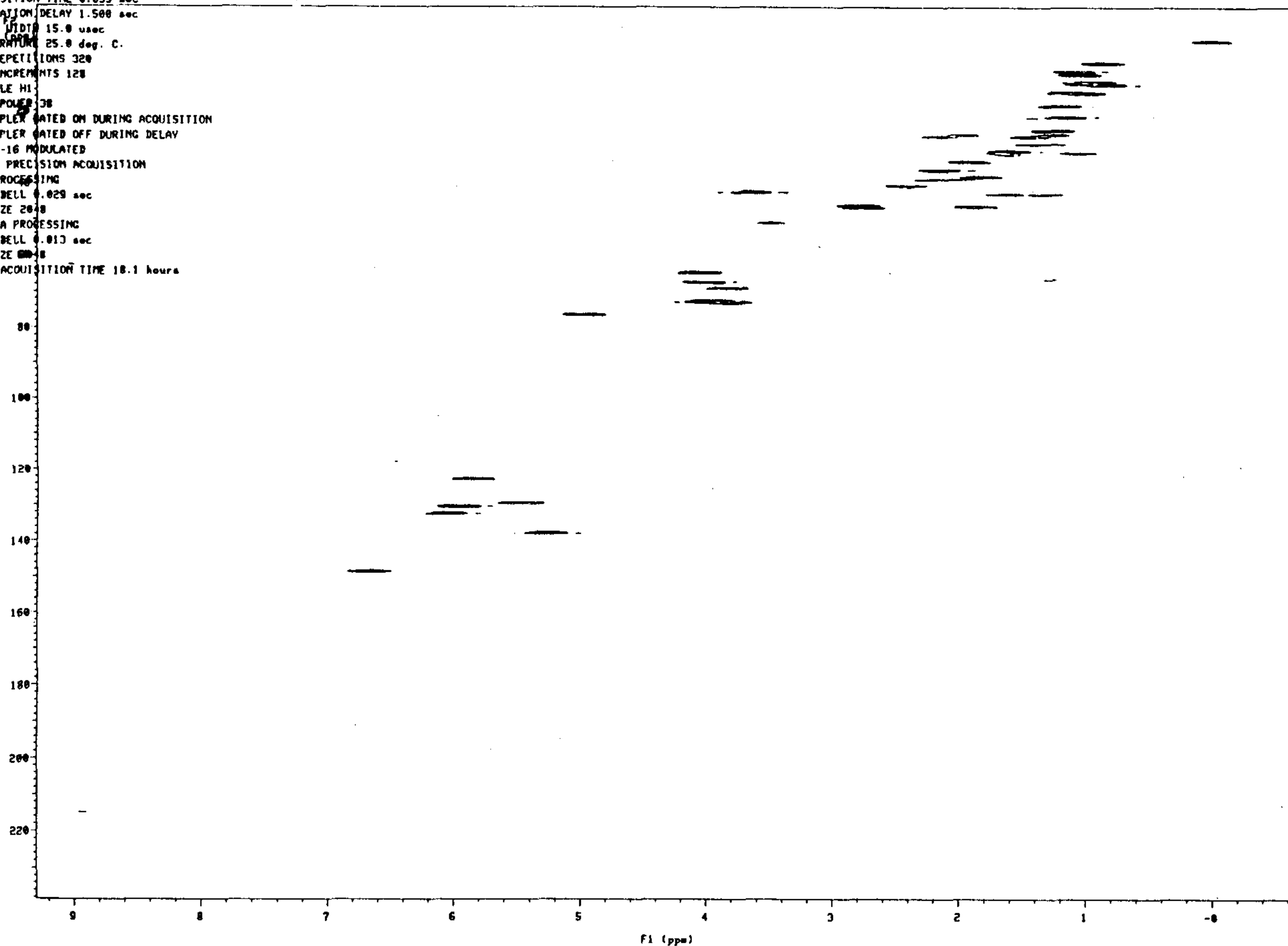


Fig.35-d C-H COSY Spectra of Compound 3369 (300MHz, CDCl₃)

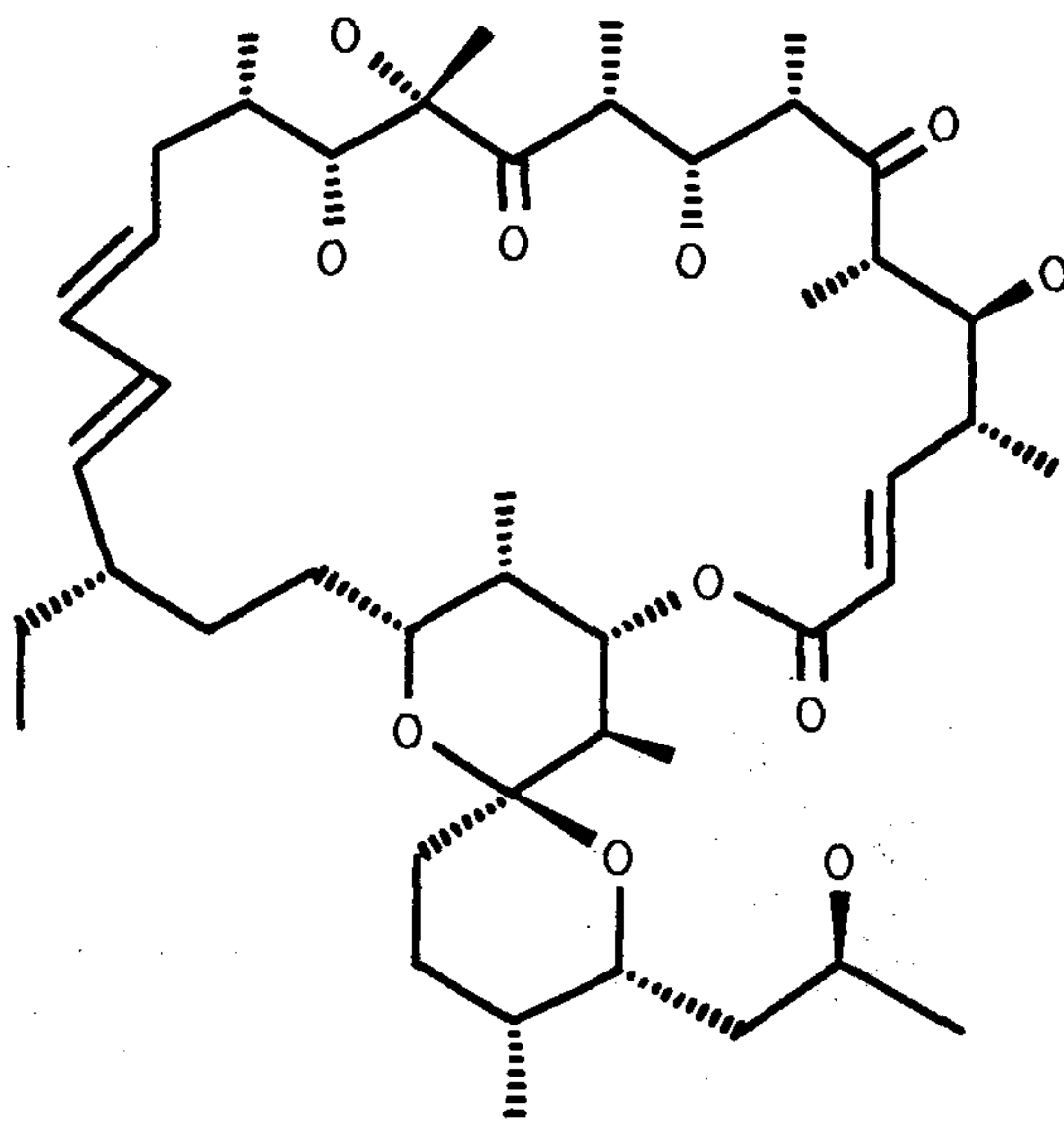
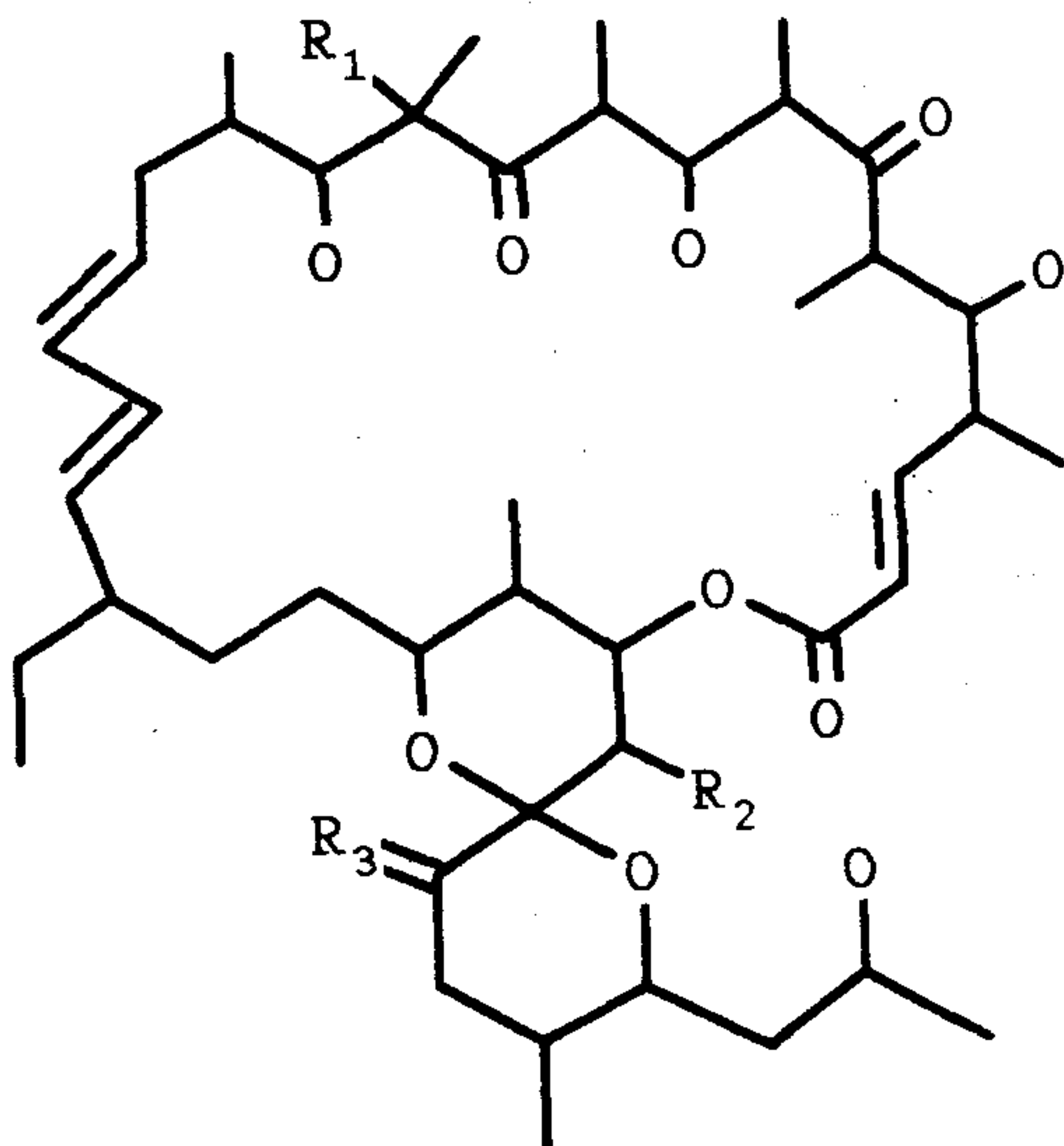


Fig.36 COMPOUND 3369 ISOLATED FROM STRAIN NO.3369

Table 23. ^{13}C -NMR data of compound 3369 and oligomycin A

Carbon No.	3369	Oligomycin A	Carbon No.	3369	Oligomycin A
1	165.20	165.11	24	35.88	35.86
2	122.72	122.75	25	76.28	76.21
3	148.48	148.38	26	37.73	38.46
4	40.24	40.16	27	99.23	99.23
5	73.02	72.99	28	26.01	26.01
6	46.43	46.56	29	26.53	26.53
7	220.15	219.95	30	30.49	30.52
8	45.88	45.71	31	67.30	67.27
9	72.76	72.66	32	42.54	42.63
10	42.14	41.96	33	64.70	64.70
11	220.19	220.26	34	24.75	24.78
12	83.05	83.01	35	17.99	17.94
13	72.38	72.28	36	9.34	9.28
14	33.57	33.52	37	8.39	8.30
15	38.46	38.46	38	14.12	14.09
16	129.49	129.36	39	21.15	21.02
17	132.44	132.43	40	14.53	14.49
18	130.38	130.29	41	28.55	28.53
19	137.71	137.80	42	12.11	12.08
20	46.07	46.03	43	6.11	6.07
21	31.51	31.46	44	11.80	11.79
22	31.02	30.97	45	11.27	11.23
23	69.06	69.06			

Oligomycin A의 계열 물질들은 현재 7종이 분리 보고되었는데 (Fig. 37), 일반 세균에 대한 항균작용은 없으나 *Blastomyces dermatitis* 등 일부 진균과 식물성 병원성 진균들에 독특한 antifungal activity가 있으며⁴⁸⁾, 그중 oligomycin E와 44-homooligomycin I,II (Fig. 38)는 antitumor activity를 갖는 물질로 특허 등록이 된 물질이다.⁴⁹⁾ 그러나 oligomycins는 mitochondria의 ATPase에 대한 강력한 저해물질로서 인축독성이 매우 강하여 (ex. oligomycin A의 LD₅₀ : 2.5 mg/kg mouse), 의약품 약제로서는 개발되지 못하였고 현재 연구용 시약으로 사용되고 있다.⁵⁰⁾



oligomycin A (3369) ;

R₁ = OH, R₂ = Me, R₃ = H₂

oligomycin B ;

R₁ = OH, R₂ = Me, R₃ = O

oligomycin C ;

R₁ = H, R₂ = Me, R₃ = H₂

oligomycin D ;

R₁ = OH, R₂ = H, R₃ = H₂

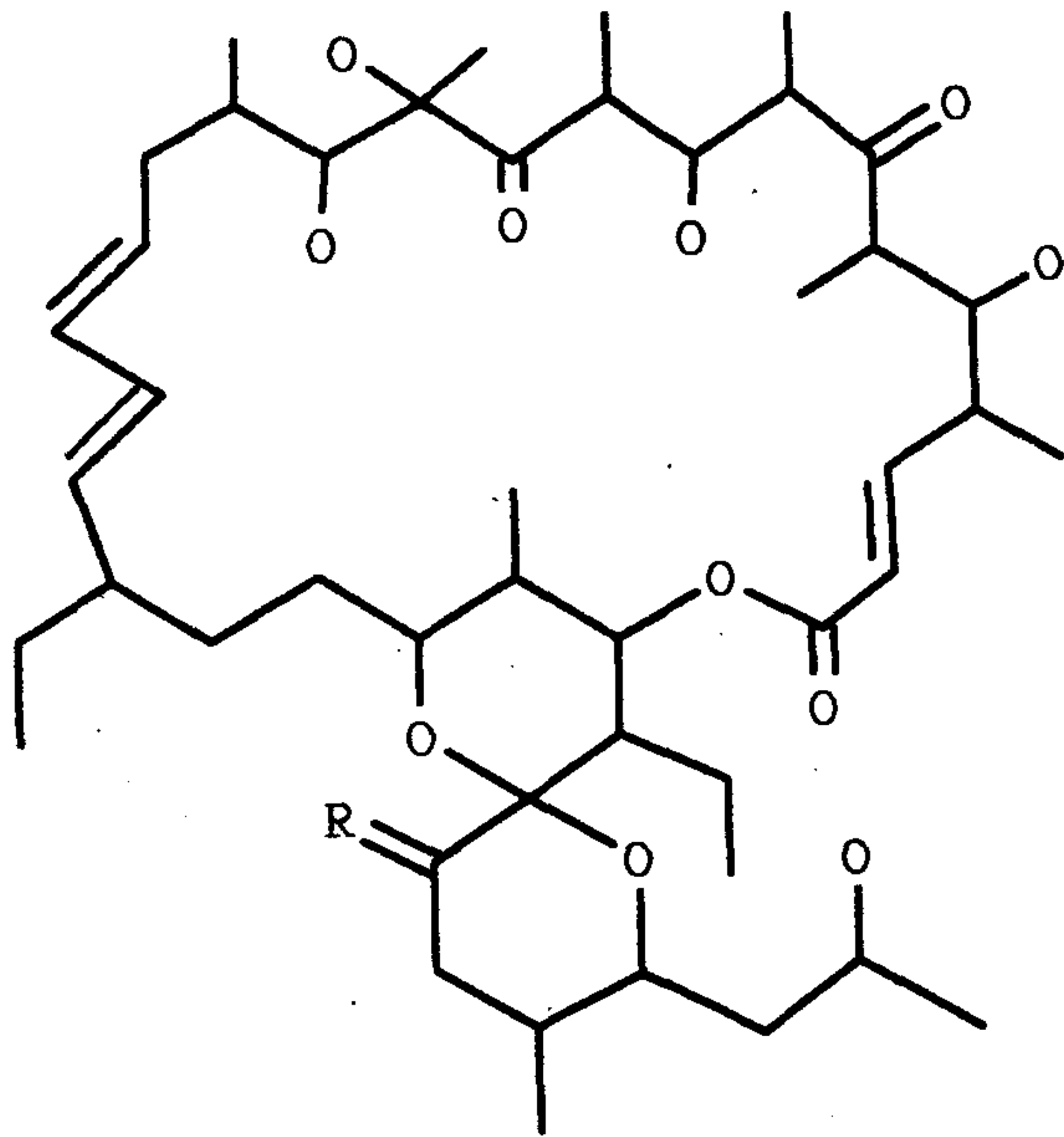
oligomycin E ;

R₁ = OH, R₂ = OH & Me, R₃ = O

12-Deoxyoligomycin D ;

R₁ = H, R₂ = H, R₃ = H₂

Fig.37 OLIGOMYCINS FROM VARIOUS MICROORGANISMS



44-Homooligomycin A
R = H₂

44-Homooligomycin B
R = O

Fig. 38 Homooligomydins isolated from *Streptomyces bottropensis* NK86-0279

제 3 절 살충성 물질 3369로부터 변환된 3369 SM1 과 3369 N의 구조분석

1. 3369 SM1의 구조분석

살충성 물질 3369를 분리하는 과정에서 silica gel type의 column을 사용할때 물질의 분해가 일어남을 확인하였는데, 분해가 일어난 과정을 조사해 본 결과, 물질 3369는 사용한 용매에 의해서나 단순히 silica gel에 흡착, 건조되었을 때에는 분해가 일어나지 않으나, silica gel에 흡착시킨 후 용매로 포화시키면 분해가 일어나 살충 활성이 상실된다는 것을 확인하였다. (Table 24)

Table 24 Insecticidal activity changes of compound 3369

TREATMENT	ACTIVITY*
MeOH 60°C 4hrs	10/10
H ₂ O 100°C 1hr	10/10
MeOH + silica gel 60°C 4hrs	0/10
acetone + silicagel 60°C 4hrs	0/10
ethylacetate + silicagel 60°C 4hrs	0/10
Impregnated on silicagel & drying	10/10

* loading dosage : equivalent to compound 3369 20 μ g scale

항균활성이 확인된 물질은 MeOH-H₂O를 사용하였을때 분해된 물질로서 이를 TLC 및 HPLC상에서 확인하고 분리한 결과는 fig.39, fig.40 과 같다.

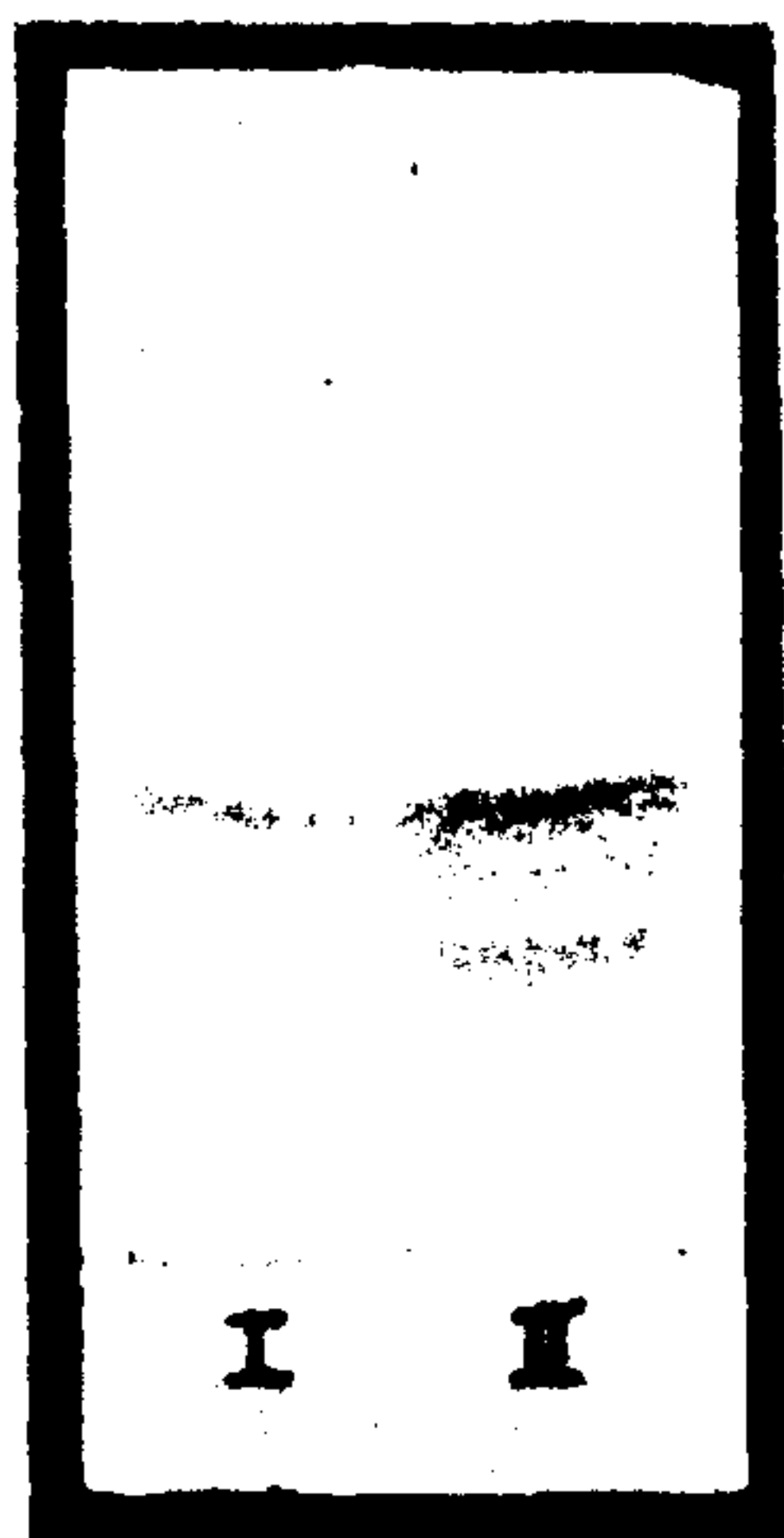


Fig.39 TLC of compound 3369(I) and its degradation products(II) by silica gel developing solvent: hexane-acetone 2/1, v/v

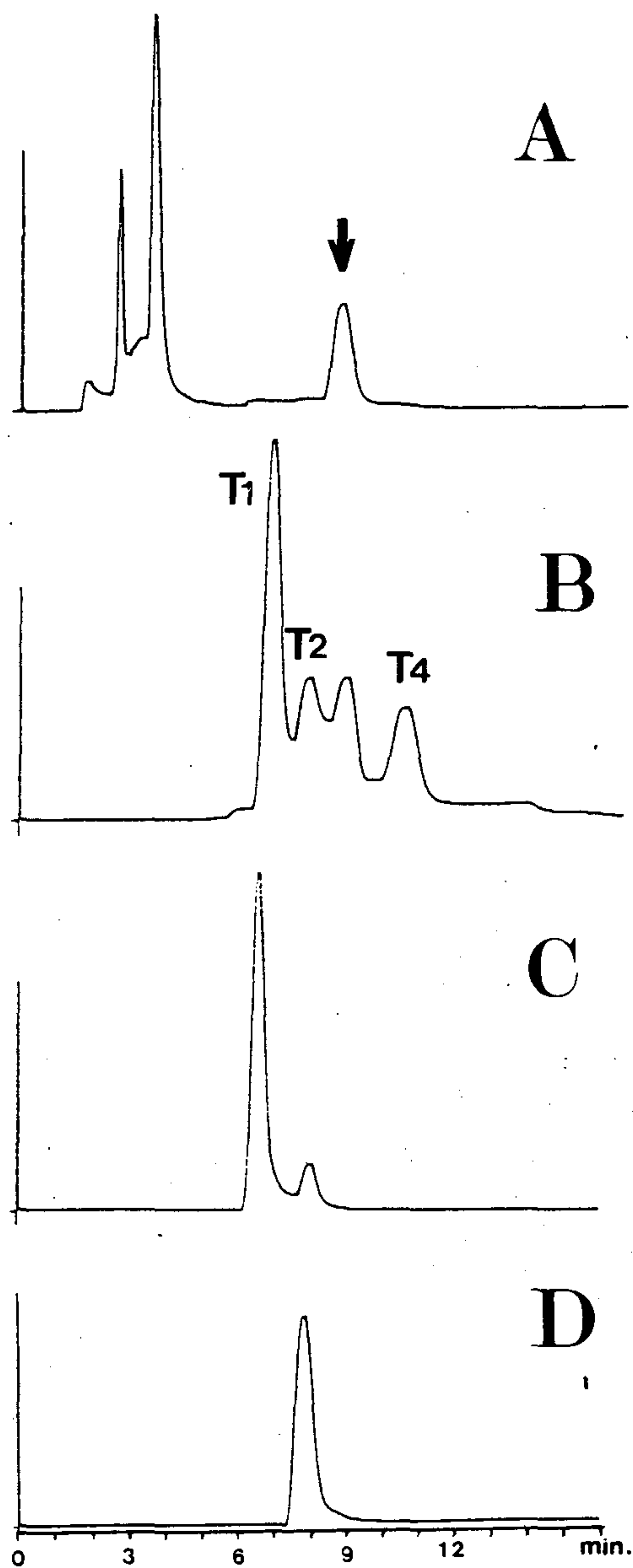


Fig.40 HPLC chromatograms of compound 3369 and its related compounds ;
(Lichrocart RP-18, ϕ 10x250mm, acetonitrile-water(3-1), UV240nm)
A: total cell extract, B: reaction mixture with silica gel,
C: purified 3369SMI, D: purified 3369N

3369 SM₁은 UV spectrum상에서 원물질과 동일한 흡수 pattern 을 보였으며, NMR을 이용하여 구조분석을 시도한 후에 원물질과 비교하여 구조의 변화를 추정하여 보면 다음과 같다.

먼저 ¹³C-NMR에서 (Fig. 41-a) 총 45개의 탄소가 검출되어 원물질의 탄소중 탈락된 것은 없으며, aldehyde 가 새로이 나타났고 (204.9 ppm, 9.66 ppm). 2중결합 부분은 변화가 없었다. 또한 2개의 ketone이 소실되었고 2개의 4급탄소(81.1 ppm, 99.19 ppm)가 새로 나타났다. 그리고 CH₃ proton과 carbon NMR에서 11개로 관찰되어 (Fig. 41-a, b Fig. 42), fig. 43 과 같은 구조로 추정되었다.

이상의 data를 종합한다면, 화합물 3369의 구조중 탄소 12번과 13번에 존재하는 vicinal diol group에 의해서 화학적으로 쉽게 분해될 수 있다는 점을 감안할때, 먼저 탄소 12번과 13번 사이가 끊어지면서 탄소 13번이 aldehyde로 산화되고, 이어서 11번 탄소와 7번 탄소 사이에 새로운 ether linkage가 만들어지고 12번 탄소는 acetal로 산화된 것으로 추정된다.

930605-1C-3369anal in CDCl3 25deg

- 110 -

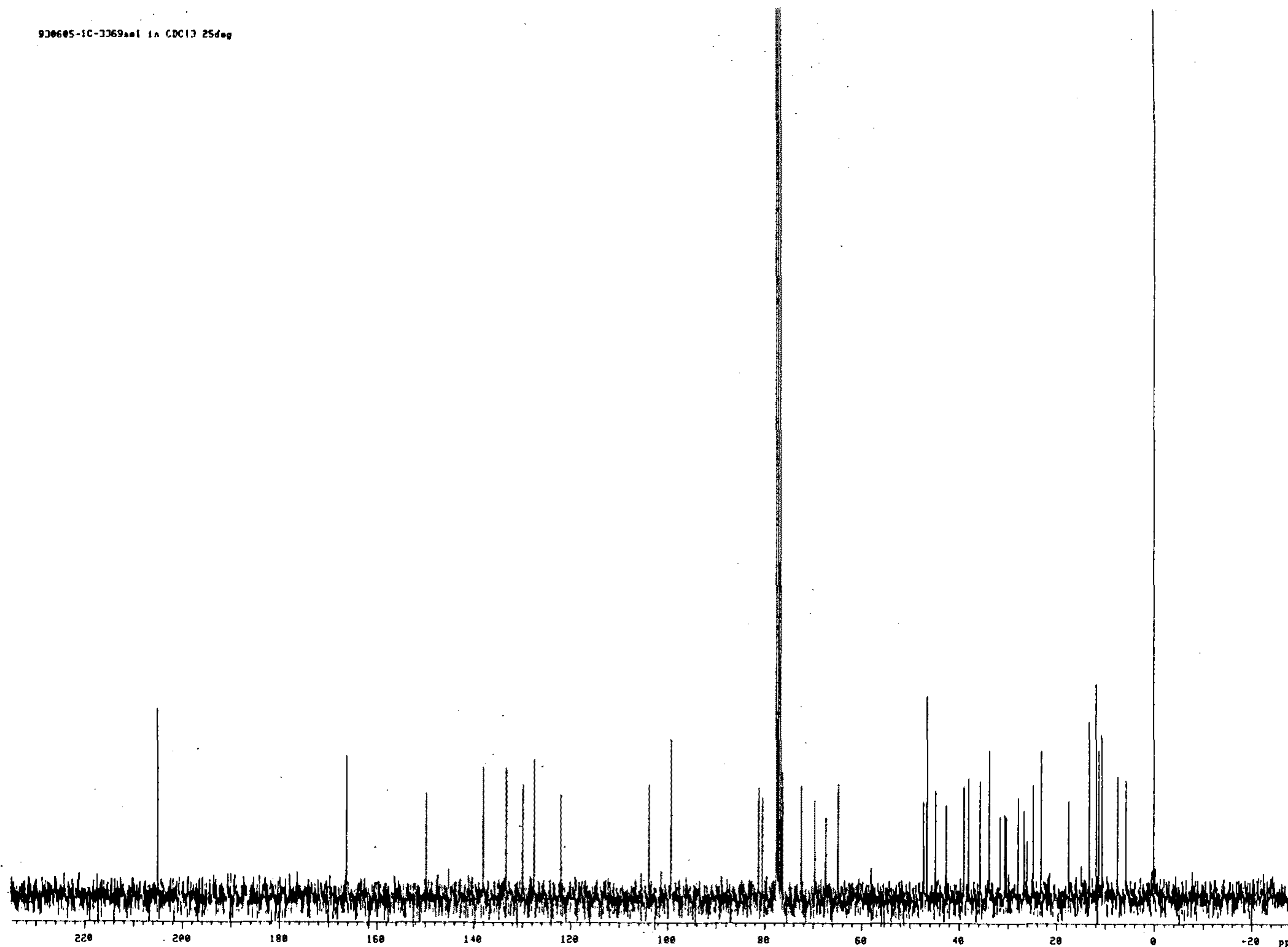
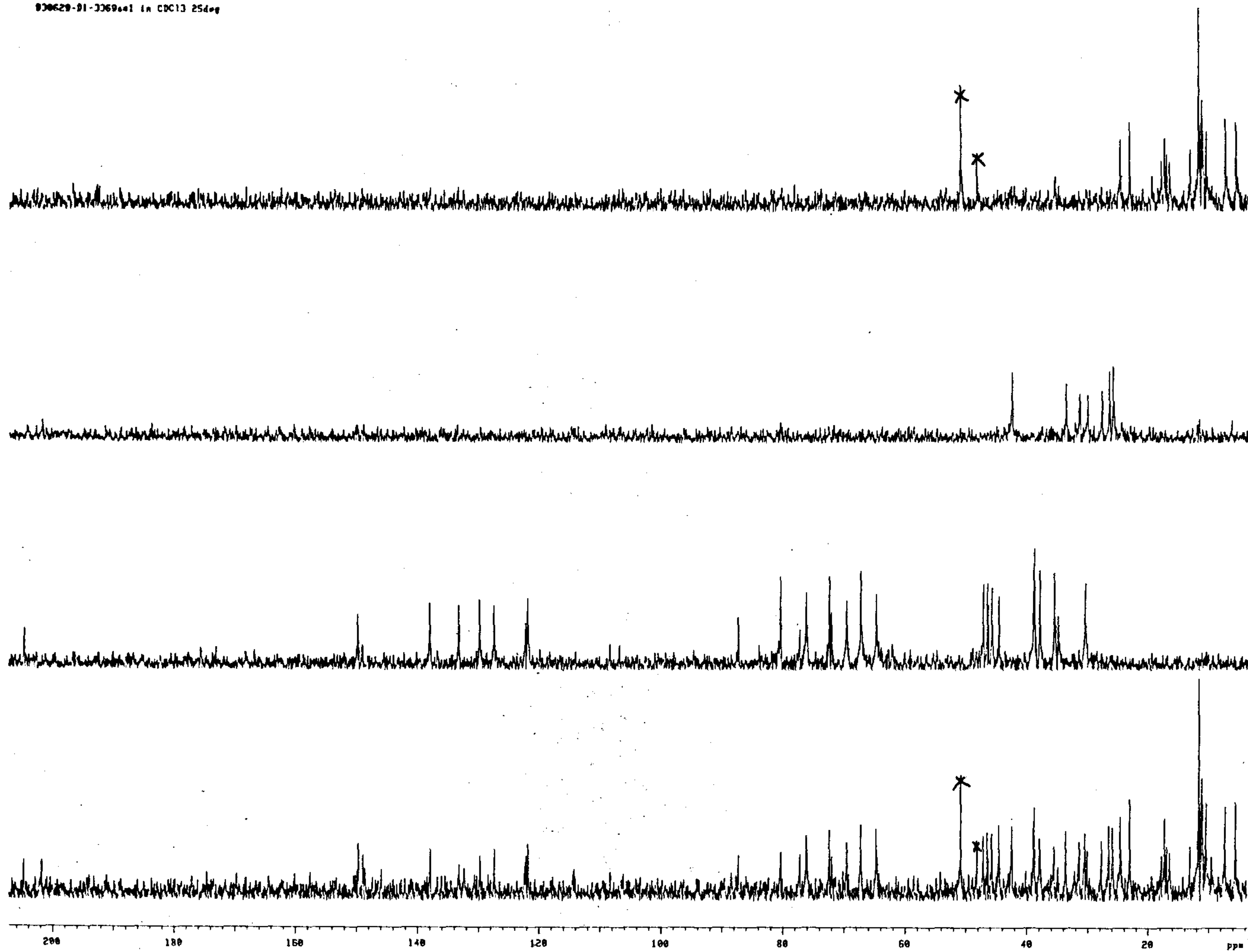


Fig.41-a ^{13}C -NMR Spectra of Compound 3369 SM1 (75 MHz, CDCl_3)



-111-

Fig.41-b INEPT ^{13}C -NMR Spectra of Compound 3369 SM1 (75MHz, CDCl_3)

930603-1H-3369sm1 in CDCl3 25deg

12-

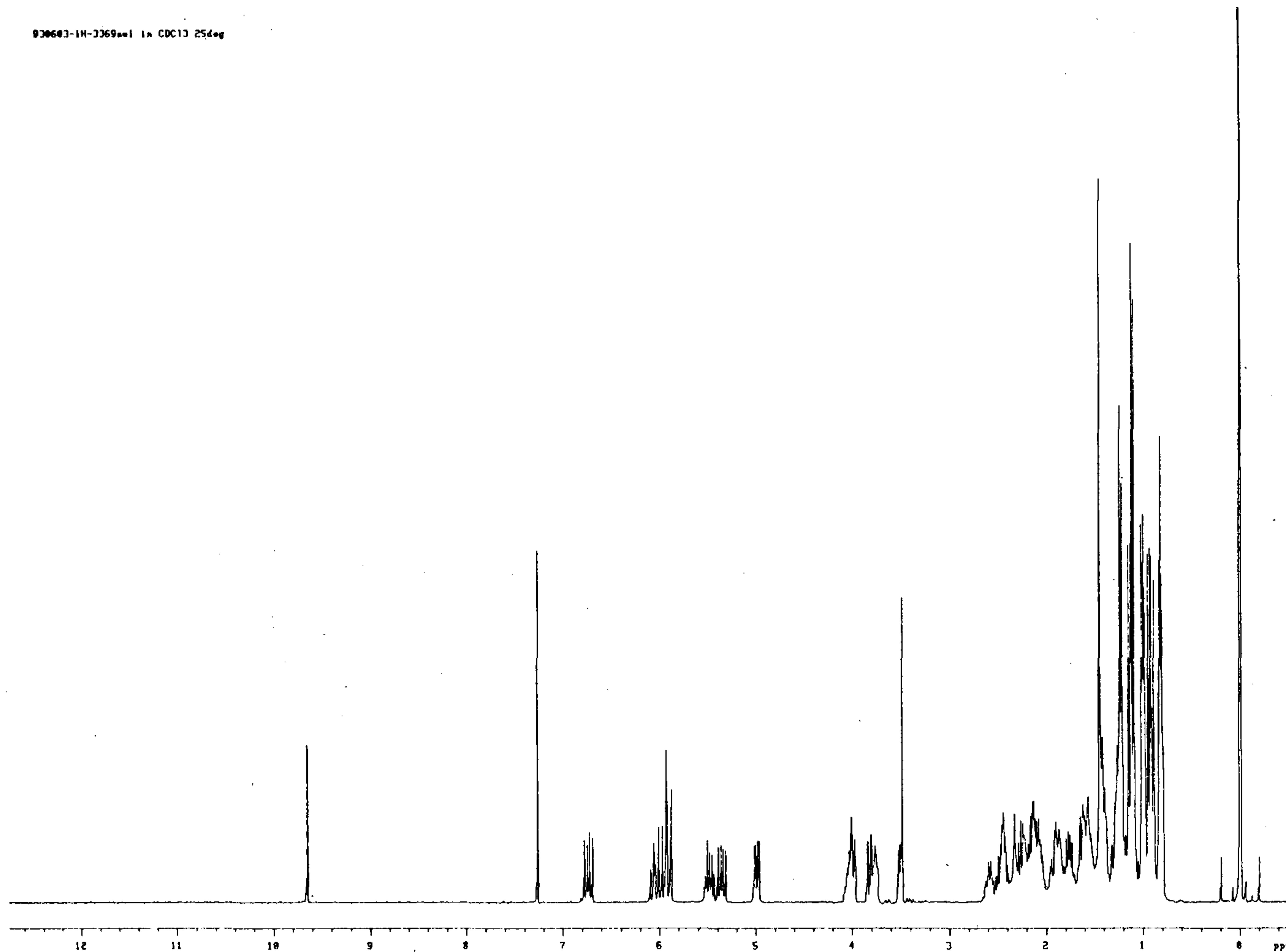


Fig.42 $^1\text{H-NMR}$ Spectra of Compound 3369 SM1 (300MHz, CDCl_3)

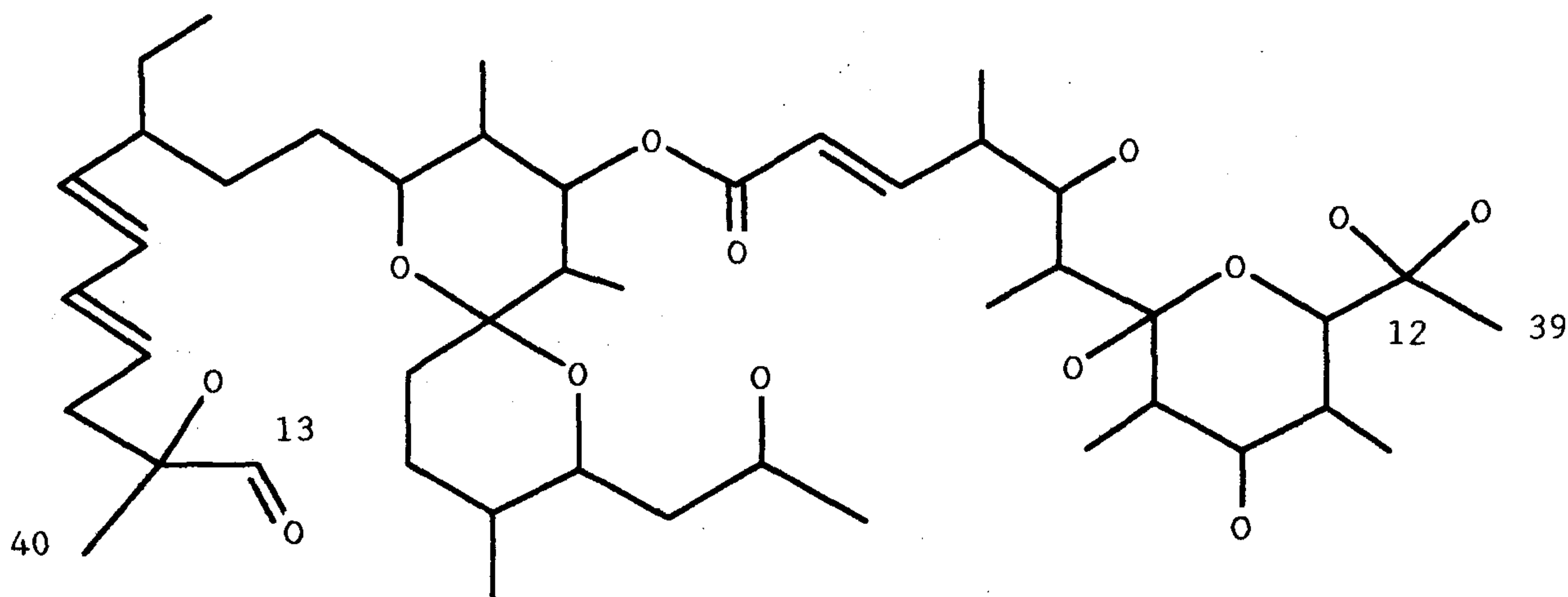


Fig. 43 tentative structure of 3369 SM1 from 3369 treated with $\text{SiO}_2\text{-MeOH-H}_2\text{O}$

2. 3369 N의 구조분석

3369 SM1의 구조분석으로부터 살충성 물질 3369의 살충활성 소실은 구조중 C_7 과 C_{11} 의 carbonyl group의 변화와 관계있을 것으로 판단되었으므로 본 실험은 carbonyl group에 직접 변화를 주었을때 살충활성과 항균활성이 변화가 있는지 알아보기 위하여 수행하였다.

물질 3369에 hydroxylamine·HCl을 처리한 후 변환된 물질 3369N을 분리, 정제하였으며, NMR을 이용, 구조분석을 시도한 결과 구조의 변화를 추정하여 보면 다음과 같다.

먼저 $^{13}\text{C-NMR}$ 에서 총 45개의 탄소가 원물질 3369와 같이 검출되었고 (Fig.44-a), 하나의 carbonyl이 남아있으며, 2중결합 탄소 2개가 소실되고 CH가 2개 늘어났다. (Fig.44-b) proton NMR에서도 탄소 2번과 3번 사이의 2중결합에 관여하는 proton이 없어졌으며 (6.661 ppm 및 5.835 ppm), 11개의 CH_3 는 그대로 관찰되었다. (Fig. 45)

이로써 본 화합물은 oxime화 반응에 의해서 7번의 carbonyl만이 oxime으로 전환되고, α, β -unsaturated lactone 위치의 double bond가 변화되었다고 추정된다. (Fig. 46)

930186-C13-3369N CDCl3 25deg

-114-

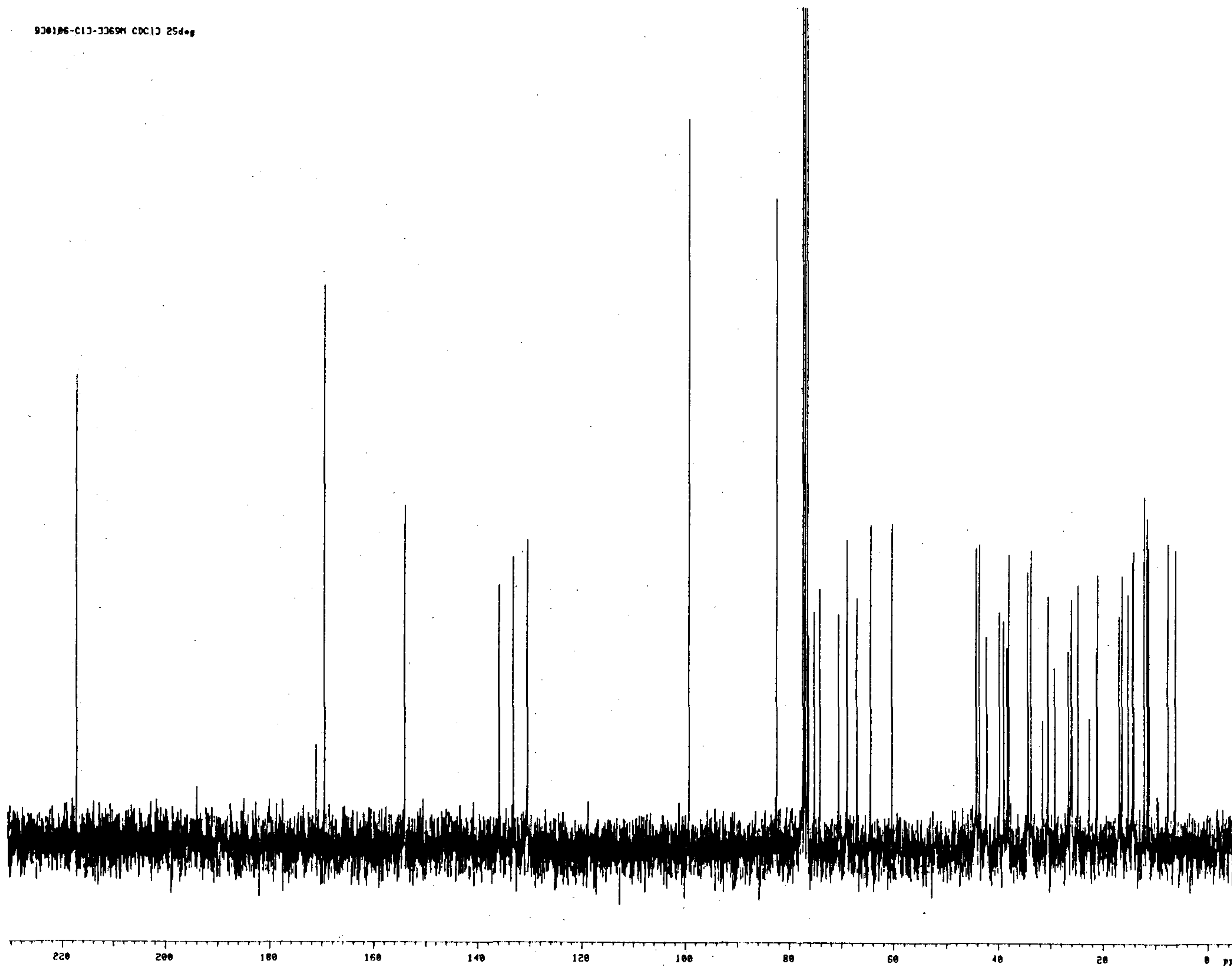


Fig.44-a ^{13}C -NMR Spectra of Compound 3369 N (75 MHz, CDCl_3)

930106-10-3369N CDC13 25deg
PULSE SEQUENCE dept
OBSERVE C13
FREQUENCY 75.428 MHz
SPECTRAL WIDTH 20997.4 Hz
ACQUISITION TIME 0.501 sec
RELAXATION DELAY 4.000 sec
PULSE WIDTH 15.0 usec
TEMPERATURE 25.0 deg. C.
NO. REPETITIONS 904
DECOUPLE H1
HIGH POWER J8
DECOUPLER GATED ON DURING ACQUISITION
DECOUPLER GATED OFF DURING DELAY
WALTZ-16 MODULATED
DOUBLE PRECISION ACQUISITION
DATA PROCESSING
LINE BROADENING 2.5 Hz
FT SIZE 32768
TOTAL ACQUISITION TIME 4.5 hours

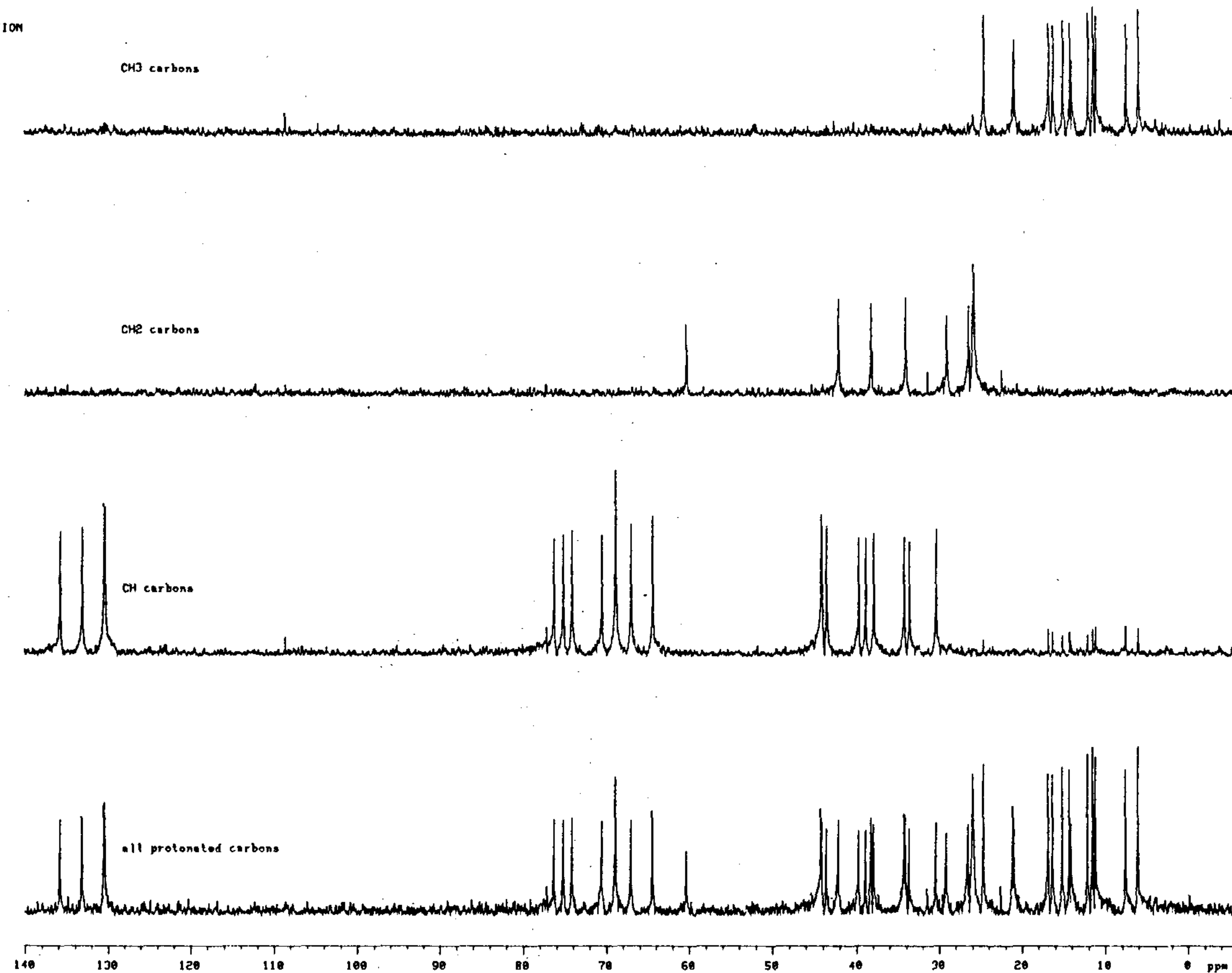


Fig.44-b INEPT ^{13}C -NMR Spectra of Compound 3369N (75MHz, CDCl_3)

930106-1H-3369N in CDCl3 254mg

-116-

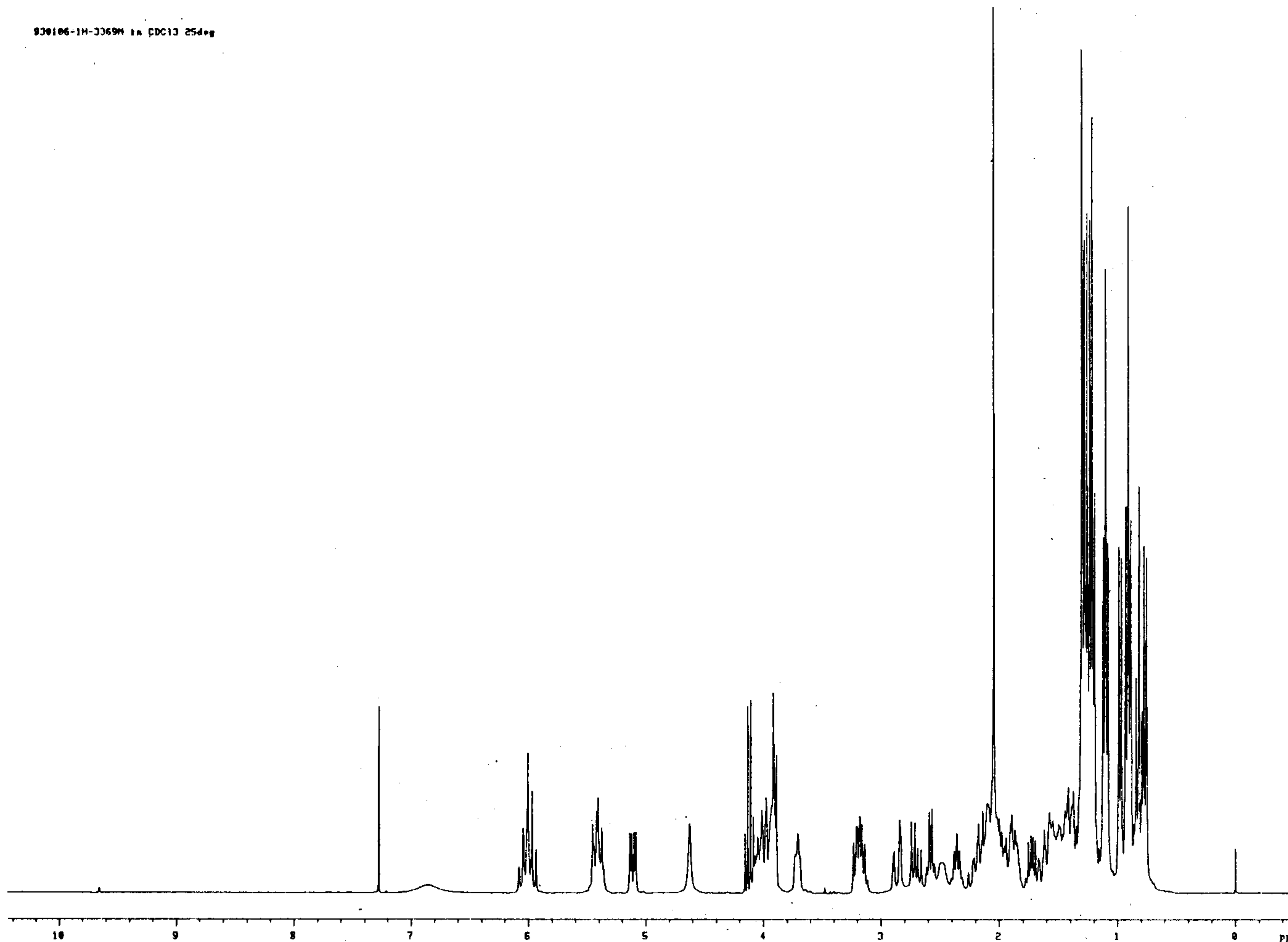


Fig.45 $^1\text{H-NMR}$ Spectra of Compound 3369 N (300MHz, CDCl_3)

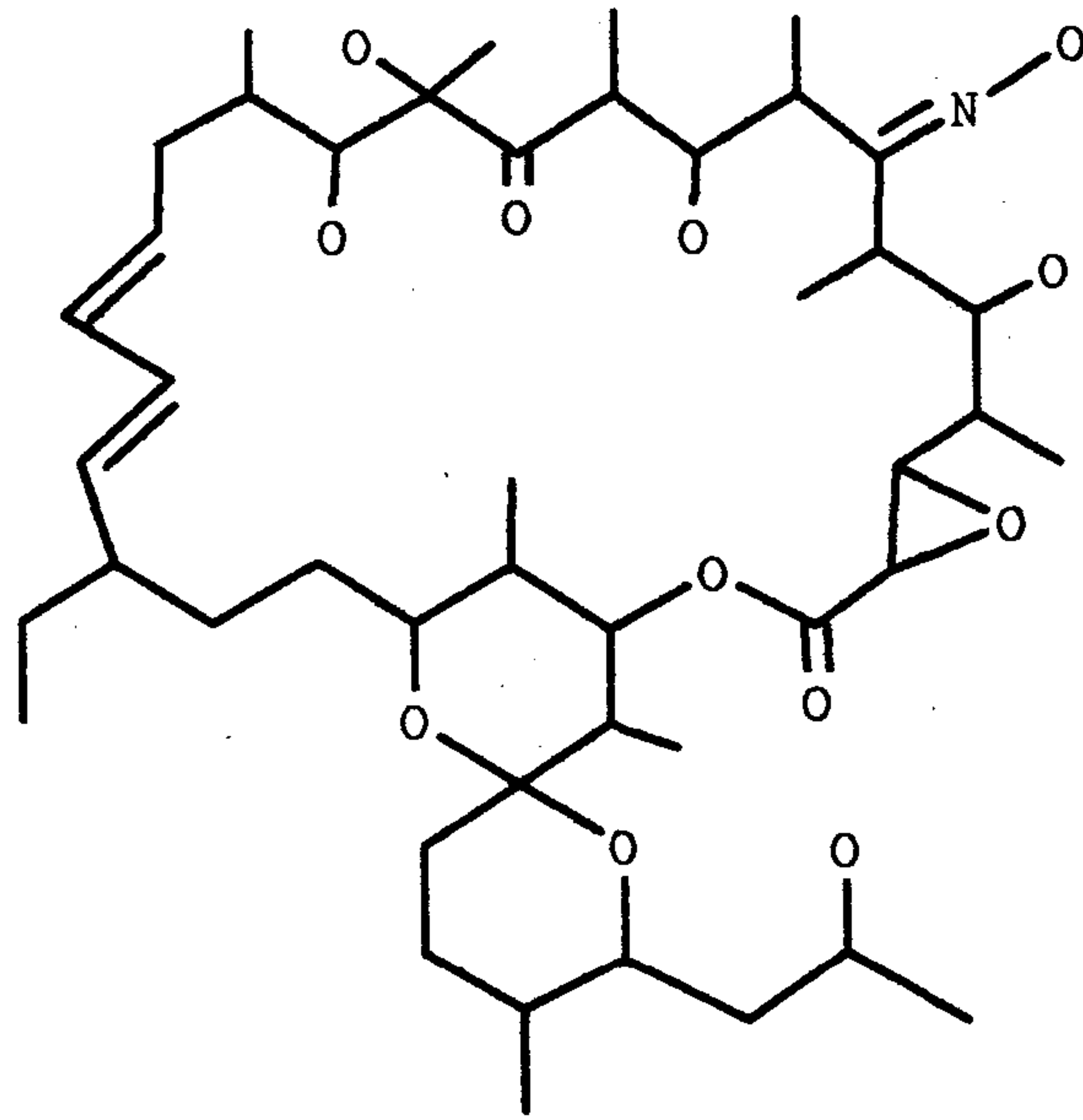


Fig. 46 Compound 3369N from compound 3369 treated with Hydroxylamine HCl

3. 3369와 변환된 3369 SM1 및 3369 N의 활성비교

먼저 살충성 물질 3369와 이로부터 유래된 3369 SM1 및 3369 N의 살충력을 비교하면 Table 25와 같다.

Table 25 Insecticidal activity of 3369, 3369 SM1 and 3369N

	1mg* 10 μ g	5 μ g	2.5 μ g	1 μ g
3369	- ... 10/10**	10/10	6/10	0/10
3369SM1	0/10 ... -	-	-	-
3369N	0/10 ... -	-	-	-

* loading dosage on artificial diet 1.5g

** dead larvae / applied larvae (mean of 3 repetition)

3369 SM1과 3369 N 물질은 원물질과 비교할때, 탄소수의 증감은 없어 골격 구조상의 큰 변화는 없으나 구조내 C₂, C₃간의 2중결합, C₇과 C₁₁의 carbonyl group, C₁₂, C₁₃간의 결합등이 변화되었으며 (Fig.47); 이로써, C₇을 중심으로 하는 주변의 구조 유지가 살충력을 나타내는데 중요한 것으로 판단되었다.

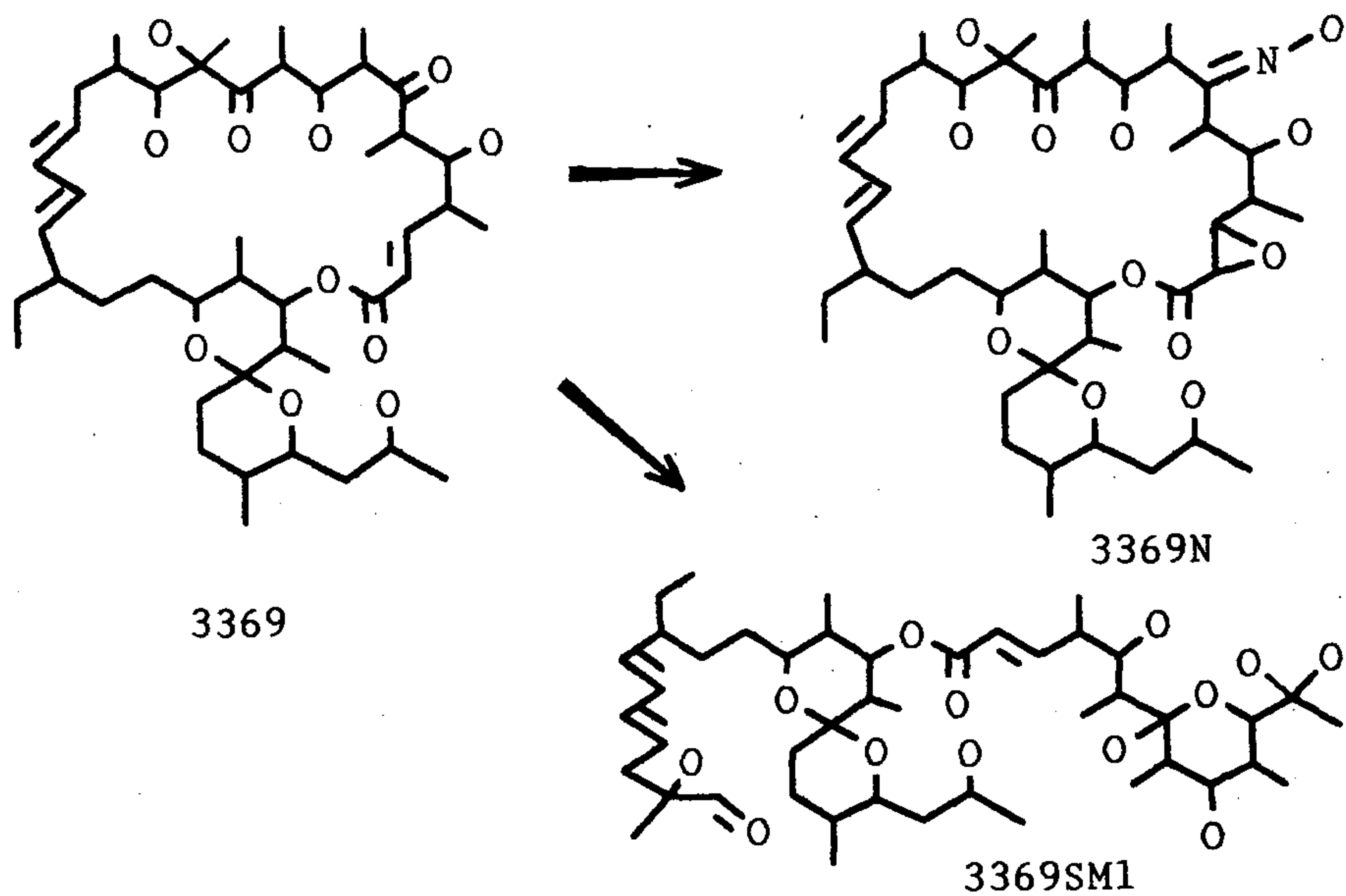


Fig. 47 Compounds derived from compound 3369 (OILGOMYCIN A)

이 물질의 항균활성을 비교한 결과는 Table 26, fig. 48 과 같다.

Table 26 Antibiotic activity of 3369, 3369SM1 and 3369N*

Test organism	3369	3369SM1	3369N
Escherichia coli BE 1186	-	-	-
Salmonella typhimurium SL 1102	-	-	-
Pseudomonas aeruginosae IFO 13130	-	-	-
Bacillus subtilis	-	+	++
Staphylococcus aureus R-209	-	-	-
Candida albicans IFO 1594	-	-	-

* Paper disk method (loading dosage : 3369 : 100 μ g, 3369SM1 & 3369N : 20 μ g)

물질이 활성을 나타내는 중요한 작용기가 변화되어 고유의 활성을 잃어버리는 것은 흔히 발견되는 경우이나, oligomycin A가 구조내 몇가지 작용기가 변화됨으로서 살충활성을 잃어버리고 동시에 새로운 활성이 나타나는 본 실험의 결과는 처음으로 보고되는 것이다. 현재 3369 SM1과 3369 N을 다량 확보하여 여러가지 활성을 조사하기 위한 실험이 현재 진행중인데 살충력을 상실하였다는 점이 oligomycin A의 toxicity에 큰 변화가 있음을 예상할 수 있고, oligomycin E와 44-homoolicomycin I,II가 antitumor activity가 있다는 보고를 감안할때, 변환된 물질 3369 SM1과 3369 N은 새로운 생리 활성 물질로서 기대해 볼만하다고 본다.

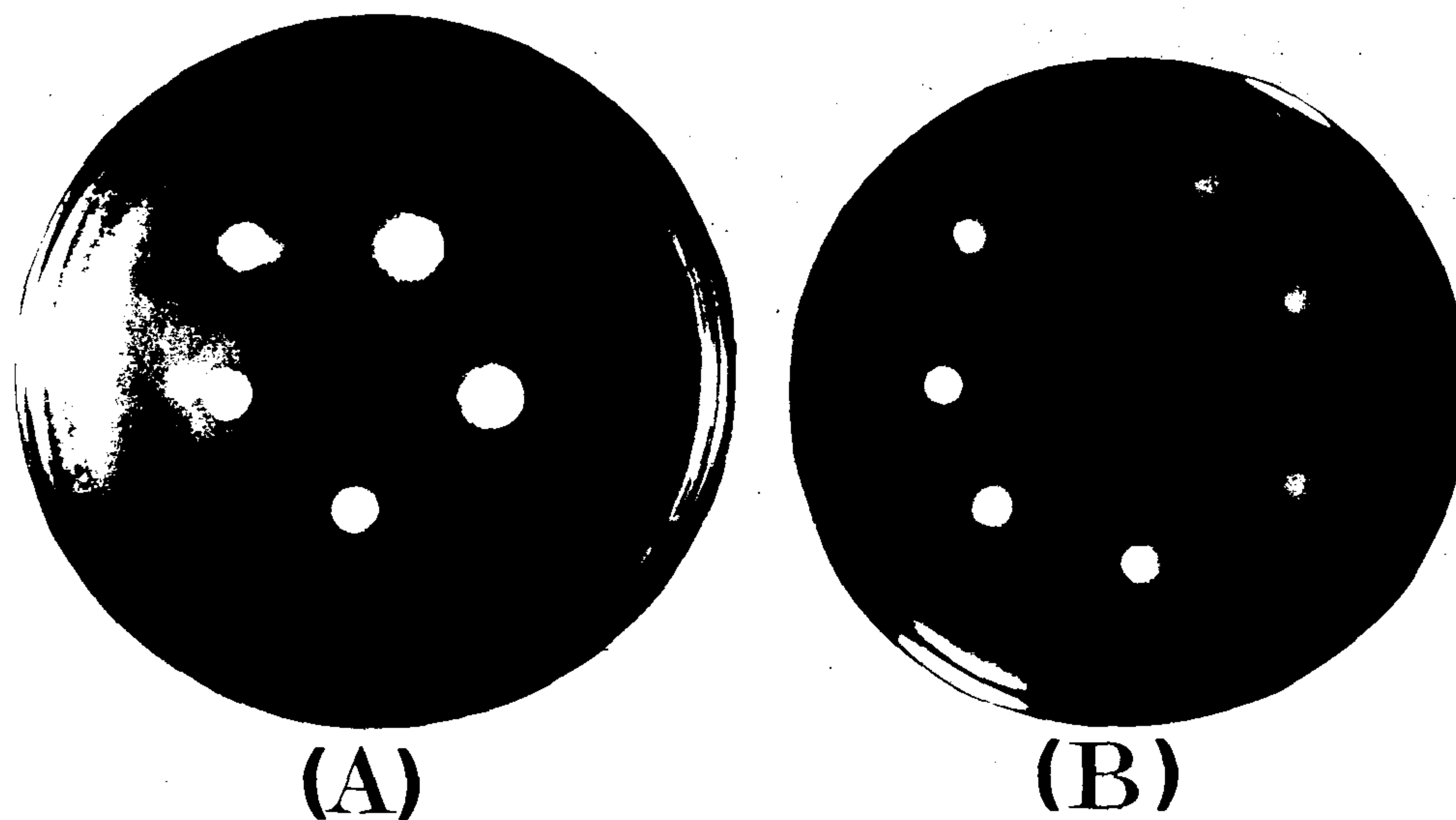


Fig.48 Antibacterial activity of 3369 SM1(A) and 3369 N(B) on *B. subtilis*

여 백

References

1. M.S.Verrall, : Discovery and Isolation of Microbial Products, Ellis Horwood Ltd. p.9 (1985)
2. 이승환 : 식물보호연구 제 5 호 p.24 (1990)
3. N.B.Mandava : Handbook of Natural Pesticides : Methods, Vol.1, p.3 (1985)
4. 농약공업협회 : 농약년보 - 1990 - p.409
5. 농약공업협회 : 농약년보 - 1990 - p.4
6. 농약공업협회 : 농약년보 - 1990 - p.228
7. S.Tamura, N.Takahashi, S.Miyamoto, S.Suzuki and J Nakatsu : Agric. Biol. Chem., 27(8), 576(1963)
8. S.Yoshida, K.Yoneyama, S.Shiraishi, A.Watanabe, and N.Takahashi ; Agric. Biol. Chem., 41(5), 849 (1977)
9. H.Oishi, T.Hosokawa, T.Okutomi, K.Suzuki and K.Ando ; Agric. Biol. Chem., 33(12), 1790(1969)
10. K.Ando, H.Oishi, S.Hirano, T.Okutomi, K.Suzuki, H Okazaki, M.Sawada and T.Sagawa ; J. Antibio. 14(6), 347 (1971)
11. RW.Burg, B.M.Miller, E.E.Baker, J.Birnbaum, S.A.Currie, R.Hartman, U.L.Kong, R.L.Managhan, G.Olson, I Putter, J.B.Tunac, H.Wallick, E.O.Stapley, R.Oiwa and S.Omura ; Antimicrob. Agents and Chemother. 15(3) 361 (1979)

12. Y.Takiguchi, H.Mishima, M.Okuda and M.Terao; J. Anti-bio. 33(10)
13. U.Dahn, H.Hagenmaier, H.Hohne, W.A.Konig, G.Wolf and H.Zahner; Arch. Mikrobiol., 107, 143 (1976)
14. R.Baute, D.G.Deffieax, M.A.Merlet and A.Neveu; J. Antibio. 34, 1261 (1981)
15. L.Huang, G.Albers-Schonberg, R.L.Monaghan, K.Jakbas, S.S.Pong, O.D.Hensens, R.W.Burg, D.A.Ostlind, J. Conroy and E.O.Stapley; J. Antibio. 37(9), 970 (1984)
16. S.Matsumoto, S.Sakuda, A.Isogai and A.Suzuki; Agric. Biol. Chem., 48(3), 827 (1984)
17. A.Isigal, S.Sakuda, S.Matsumoto, M.Ogura, K.Furihara, H.Seto and A.Suzuki; Agric. Biol. Chem., 48(5), 1379 (1984)
18. M.A.Goetz, P.A.McCormick, R.L.Monaghan and D.A.Ostlind; J. Antibio. 38(2), 161 (1985)
19. S.Sakuda, A.Isogai, S.Matsumoto and A.Suzuki; J. Antibio., 40(3), 296 (1987)
20. Gy.Matolcsy, M.Nadasy and V.Andriska; Pesticide Chemistry, Elsevier, p.41 (1988)
21. Y.Kodaira; Agric. Biol. Chem., 25, 261 (1961)
22. S.Tamura, S.Kuyama, Y.Kodaira and S.Higashikawa; Agric. Biol. Chem., 28, 137 (1964)

23. A.Suzuki, H.Taguchi and S.Tamura; Agric. Biol. Chem.,
34, 813 (1970)
24. M.Kanaoka, A.Isogai, S.Murakoshi, M.Ichinoe, A.Suzuki
and S.Tamura; Agric. Biol. Chem., 42, 629 (1978)
25. J.R.Steiner and C.L.Barnes; Int. J. Pept. Protein
Res. 31(2), 212 (1988)
26. S.Nakajyo, K.Shimizu, A.Kometani, K.Kato, J.Kamizaki,
A.Isogai and N.Urakawa; Japan. J. Pharmacol. 32,
55 (1982)
27. K.Ando, H.Oishi, S.Hirano, T.Oaktomi, K.Suzuki, M.
Sawada and T.Sagawa; J. Antibio. 24(6), 347 (1971)
28. K.Ando, Y.Murakami and Y.Nawata; J. Antibio. 24(7),
418 (1971)
29. G.H.Wagman and R.Cooper: Natural Products Isolation,
p. 350 (1989)
30. G.Albers-Schonberg, H.Wallick, R.E.Ormond, T.W.
Miller and R.W.Burg; U.S.Patent 4, 310, 519 (1982)
31. S.Kass, C.C.Wang, J.P.Walrond, A.O.W.Stretton; Proc.
Nat'l. Acad. Sci. USA. 77, 6211 (1980)
32. L.C.Fritz, C.C.Wang, A.Gorio; Ibid. 76, 2062 (1979)
33. J.R.Egerton, D.A.Ostlind, L.S.Blair, C.H.Eary, D.
Suhayda, et al; Antimicrob. Agents Chemother. 15,
372 (1979)

34. T.W.Miller, L.Chaiet, D.J.Coli, J.E.Flor, R.T. Goegelman, et al; *Antimicrob. Agents Chemother.* 15, 368(1979)
35. J.A.Lasota and R.A.Dybas; *Annu. Rev. Entomol.* 36, 91(1991)
36. H.Mishima, M.Kurabayashi, C.Tamura, S.Sato, H.Kuwano, A.Saito and A.Aoki; *Abstract Papers 18th Symp. Chem. Nat. Prod., Kyoto*, p.309(1974), [H.G.Davies and R.H. Green; *Nat. Prod., reports* 3, 87(1986)]
37. T.Okazaki, M.Ono, A.Aoki and R.Fukude; *J. Antibio.*, 36. 438(1983)
38. Y.Takiguchi, H.Mishima, M.Okuda and M.Terao; *J. Antibio.*, 33. 1120(1980)
39. Y.Takiguchi, M.Ono, S.Muramatsu, J.Ide, H.Mishima and M.Terao; *J. Antibio.*, 36. 509(1983)
40. B.Fabre, E.Armay, G.Etienne, F.Legendre and G.Tiraby; *J. Antibio.*, 61(2), 212(1988)
41. S.Yoshida, K.Yoneyama, S.Shiraishi, A.Watanabe and N.Takahashi; *Agric. Biol. Chem.*, 41(5), 849(1977)
42. S.Yoshida, K.Yoneyama, S.Shiraishi and G. Tiraby; *Agric. Biol. Chem.*, 41(5), 855(1977)
43. G.Werner, H.Hygenmaier, K.Albert and H.Kohlshorn; *Tetrahedron Lett.*, 24(47), 5193(1983)
44. G.Werner, H.Hagenmaier; *J. Antibio.* 37(2), 110(1984)

45. M.A.Goetz, P.A.McCormick, R.L.Monaghan, D.A.Ostlind, O.D.Hensens, J.M.Liesh and G.Albers-Schonberg; J. Antibio., 38(2), 161(1985)
46. K.Harada, F.Nishida, H.Takagi and M.Suzuki; J. Antibio. 37(10), 1187(1984)
47. N.Nagahama, M.Suzuki, S.Awataguchi and T.Okuda; J. Antibio., 20(5) 261(1967)
48. S.Masamune, J.M.Sehgal, E.E.Van Tamelen, F.M.Strong and W.H. Peterson; J. Amer. Chem. Soc. 80, 6092(1958)
49. M.Yamazaki, T.Yamashida, T.Harada, T.Nishikiori, S.Saito, N.Shimada and A.Fujii; J. Antibio., 45(2), 171(1993)
50. G.T.Carter; J. Org. Chem. 51, 4264(1986)