

2

식물성 농약의 개발 이용

항벽나무 수피 추출물질

사과나무부란병 방제에 효과적

정 영 호
농약연구소 농약화학과장

1. 머리말

병해충 및 잡초를 방제하기 위하여 사용되는 농약은 화학적인 합성에 의해 개발, 보급된 것이 거의 대부분이다. 식량증산을 위해서는 이들 합성농약의 사용이 바람직한 일이나 그것이 목적하는 병해충 또는 잡초를 방제한 후에도 일부는 토양 또는 자연환경중에 잔존하게 됨으로써 여러가지 나쁜 영향을 초래하는 경우가 허다하다. 이와같이 생태계에 미치는 부(負)의 영향을 줄이고 인축에 대한 독성을 경감시키면서 방제효과가 우수한 농약을 개발하기 위해 노력한 결과 오늘날에는 생물농약이 실용화에 이르게 되었다. 생물농약중 식물에서 유래한 것은 제충국, 담배 및 테리스 등이 대표적이다. 특히 제충국의 경우 주성분은 pyrethrin이며 이를 근간으로 하여 광분해(光分解)의 문제점을 보완하고 살충력을 상승시킨 합성pyrethroid계 농약은 기존의 카바메이트계나 유기인계 농약에 비해 저독성이며 고효성

(高効性)임과 동시에 선택성이 뛰어난 농약으로 각광받고 있다.

근래에는 동남아시아에서 널리 자생하고 있는 neem나무(*Azadirachta indica*)에 대해 관심이 집중되고 있는데 neem나무의 주성분은 azadirachtin, meliantriol 및 salamin 등이다. 그중에서 azadirachtin은 steroid계 화합물로서 해충에 대한 기피성, 선택독성이 우수할 뿐만 아니라 인축에 대한 독성도 거의 없어서 인도에서는 저곡해충 방제용으로 널리 사용되고 있다.

이러한 식물들로부터 여러가지 생리활성 물질을 추출, 분리하여 그 화학구조를 밝힘으로써 앞으로의 농약 개발을 위한 기초자료로 활용함과 동시에 전혀 새로운 형태의 화학물질을 창출하는 밑거름이 될 수 있다.

지금까지 알려진 식물유래의 특수성분을 대별해보면 배당체(配糖體), tannin, 색소, 특수amino산, purine염기, 인지질, alkaloid, 정유(精油), flavonoid, isoflavon, 탄수화물, saponin, 유기산 및 terpenoid 등이다. 이들중 alkaloid화합물은 생리활성이 강한 물질이 많아서 농약 개발을 위한 중요한 연구대상이 되고 있다. 식물체에 있는 이들 생리활성 성분을 추출하여 그 화학구조를 밝히고 생리활성과의 상관관계를 밝혀내면 새로운 저독성, 고효력 농약개발에 중요한 밑거름이 될 수 있다.

따라서 필자는, 우리나라 사과농사에서 가장 피해가 극심한 병종의 하나가 사과나무 부란병이며 이 병을 효과적으로 방제할 뛰어난 방제약제가 개발되어 있지 않다는 점에 착안하여 사과나무 부란병 방제용 식물성 살균제 개발을 위해 본 연구를 수행하였던 바 몇가지 연구결과를 기술코자 한다.

2. 항균성 식물 선발

국내의 풍부한 식물자원 중에서 옛부터 생리활성이 있다고 알려진 것으로 황벽나무를 비롯한 13종의 식물을 1984년 3월 하순부터 8월 초순에 걸쳐서 식물전체 또는 식물의 열매, 수피(樹皮) 및 잎 등을 각각 분리, 채취하여 사과나무 부란병에 대한 식물 조추출물(粗抽出物)들의 균총(菌叢) 생육억제 효과를 조사한 결과 표1과 같았다.

식물부위별 조추출물 사이에 항균력(抗菌力) 효과가 뚜렷하였으며 부란병에 대한 균총생육 억제율이 가장 높았던 것은 황벽나무 수피의 조추출물로서 그 억제율이 80% 이상이었다. 할미꽃 전초(全草), 담배 전초 및 쇠비름 전초는 50~80%, 황벽나무 열매, 멀구슬나무 수피, 독미나리 잎과 줄기, 여뀌 줄기, 봉선화 전초, 취의 잎 및 민들레 전초는 20~50%,

표 1. 고휘배지상의 사과나무 부란병균에 대한 식물조추출물들의 항균활성

식물명	학명	식물부위	활성*
황벽나무	<i>Phellodendron amurense</i> Rupr.	과실수피 잎	± ++ -
멀구슬나무	<i>Melia azedrach</i> L.	과실수피 잎	- ± -
할미꽃	<i>Pulsatilla Koreana</i> Nakai	전초	+
독미나리	<i>Cicuta virosa</i> L.	잎 줄기	± ±
담배	<i>Nicotiana tabacum</i> L.	전초	+
여뀌	<i>Persicaria hydropiper</i> Spach.	잎 줄기	- ±
봉선화	<i>Impatiens balsamina</i> L.	전초	±
취	<i>Pueraria thunbergiana</i> Benth.	잎 뿌리	± -
오동나무	<i>Paulownia coreana</i> Uyeki	잎	-
협죽도	<i>Nerium odorum</i> Soland	잎	-
쇠비름	<i>Portulaca oleracea</i> L.	전초	+
민들레	<i>Taraxacum platycarpum</i> Dahlst.	전초	±
만병초	<i>Rhododendron typicum</i> Nakai	잎	-

* 균총생육억제율 ++ : 100~80% + : 80~50% ± : 50~20% - : 20~0%

황벽나무 잎, 취 뿌리, 오동나무 잎, 협죽도(夾竹桃) 잎 및 만병초(萬病草) 잎 등의 조추출물은 균총생육 억제율이 20% 미만이었다.

이와같은 결과로 공시식물(供試植物) 중 황벽나무 수피가 사과나무 부란병에 대하여 항균력이 가장 높은 것으로 판명되었다.

3. 항균성분의 단리 및 화학구조

항균력이 가장 강한 황벽나무 수피의 조추출물에서 그림 1 과 같은 방법으로 항균성분을 단리(單離)하였다.

황벽나무 수피를 methanol 로 추출하여 얻은 조추출물은 흑갈색의 점성

(粘性)이 있는 반고상(半固相)이었다. 이 조추출물중 사과나무 부란병에 대하여 강한 항균력을 나타낸 항균성분을 단리한 결과 황벽나무 수피 1 kg에서 10.5g의 황색분말을 얻을 수 있었다. 단리과정중 항균성 물질은 용액의 산도를 알칼리화함으로써 유기용매층으로 이동되었으므로 염기성

화합물임을 알 수 있었고, Reinecke-salt에 의해 침전이 일어났으며 Mayer 시약과 Dragendorff 시약에 의해 염색되는 것으로 미루어 4급 amine형 alkaloid성 화합물로 추정되었다. 이 화합물의 용점(融點)은 204℃, ethanol에 녹여서 UV spectrometer로 측정된 결과 분자중에 치환벤젠환

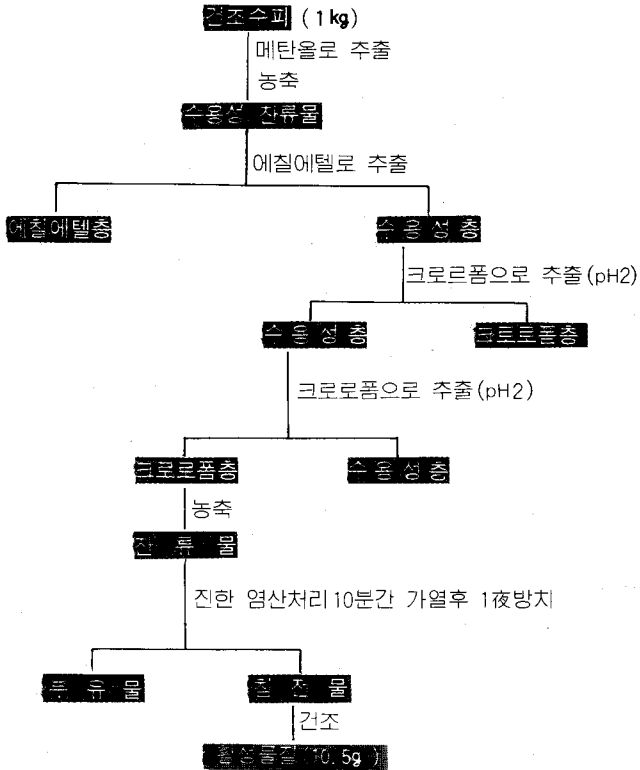


그림 1. 황벽나무 수피에서 활성물질의 단리

이 존재하는 것으로 추정되었다.

항균성분은 무기분석에 의하여 화학구조를 동정하였는데 원소분석 결과, KBr disc법으로 측정된 IR분석치, 화합물을 D₂O에 녹여서 분석한 ¹H-NMR spectrometer의 spectrum, ¹³C-NMR spectrometer의 spectrum, 70eV로 하여 측정된 mass spectrometer의 spectrum 결과를 종합하여 볼 때 그림 2와 같이 화합물의 분자량이 337이고 C₂₀H₁₈O₄NCl·2H₂O의 시성식(示性式)을 가진 7, 8, 13, 13a-tetrahydro-9, 10-dimethoxy-2, 3-(methylenedioxy)berberinium chloride (염산 베르베린)로 추측되었으며 silicagel 60g의 plate에 spotting하여 TLC scanning한 결과 berberine-Cl 표준품과 동일한 R_f치를 얻을 수 있었으므로 이 화합물이 berberine-Cl로 확인, 동정되었다.

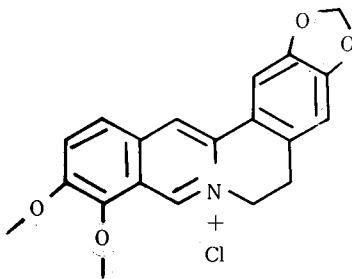


그림 2. 염산베르베린의 화학구조

4. 유도체합성 및 동정

황벽나무 수피로부터 추출, 단리한 염산베르베린 및 이것으로부터 베르베린유도체를 Perkin의 합성법을 일부 변경하여 합성한 결과 이들의 외관, 용점, 자외선, 최대흡광치 및 원소분석치는 표 2와 같았으며 합성수율은 95% 이상이었다.

Tetrahydroberberine 및 Oxyberberine을 제외한 유도체들은 4급 amine 기 위치에 여러가지 염기를 치환하여 합성하였으며 tetrahydroberberine 및 oxyberberine은 각각 berberine 모체를 환원 및 산화하여 3급 amine형으로 그 골격을 변경시켰다. 이들 합성 유도체는 UVspectrophotometer, Elemental analyzer, IR, NMR, mass spectrometer 등 기기분석 결과 그 화학구조가 확인되었다.

Berberine 유도체들의 항균력측정은 약체회석법에 준하였으며 각 유도체의 2% acetone 용액을 potato dextrose agar (PDA) 배지에 첨가하여 배지중의 농도를 각각 7.8, 15.6, 31.2, 62.5, 125 및 250ppm 되게 조절하였다. 이것을 사레당 20ml씩 평판회석한 다음 직경 5mm의 함균한천편(舍菌寒天片)을 사레의 한가운데에 접촉하여 26±1°C의 항온기내에서 7일간 진탕배양한 후 균총생육억제율을 조사한 결과 표 3과 같이 사과나무 부

표 2. 함성베르베린 유도체의 물리·화학적 분석

화합물명	분자식	외관	용점 (°C)	U. V xmax(EtOH)	원소분석					
					이론치			실측치		
					C	H	N	C	H	N
Berberine-Cl	$C_{28}H_{34}NO_4Cl \cdot 2H_2O$	황색분말	204	350.5, 266, 229.5	58.98	5.44	3.44	59.10	5.44	3.46
Berberine-I	$C_{27}H_{31}INO_4$	황색침상	260-262	349.5, 266.5, 225	51.85	3.92	3.02	52.10	4.15	2.95
Berberine-acetone	$C_{27}H_{31}NO_5 \cdot H_2O$	황색분말	175	351.5, 266.5, 227	67.14	6.12	3.41	67.15	6.15	3.39
Tetrahydro berberine	$C_{26}H_{27}NO_4$	백색프리즘	168	285.5, 234	70.78	6.24	4.13	70.75	6.29	4.24
Berberine-SO ₄	$C_{28}H_{34}N_2O_7 \cdot S \cdot H_2O$	황색침상	258-260	348.5, 265.5, 228	61.06	4.87	3.56	61.48	4.88	3.54
Oxyberberine	$C_{28}H_{31}NO_5$	황갈색침상	198	342, 224.5	68.37	4.88	3.99	68.40	4.81	4.01
Berberine-picrate	$C_{28}H_{31}N_3O_{11}$	황색침상	238-239	351, 264.5, 229.5	57.14	3.69	10.26	57.48	3.78	10.21
Berberine-Br	$C_{28}H_{31}NO_4Br$	황색침상	239-240	350.5, 266, 229.5	57.70	4.36	3.37	57.62	4.33	3.37
Berberine	$C_{28}H_{31}NO_4$	황색침상	145	350.5, 265.5, 230	71.41	5.39	4.17	71.48	5.40	4.16

관병에 대한 균총생육억제율을 나타냈다.

Berberine 유도체들중 4급 amine 형의 염기치환유도체들은 대체로 부관병균에 대하여 항균력이 높았으며 그 중에서 특히 berberine-SO₄ 및 berberine-I는 PDA 배지에 7.8ppm 처리시 균사생장을 전혀 볼 수 없는 것으로 미루어 항균력이 가장 높았으나 4급 amine 형에서 3급 amine 형으로 기본 화학구조가 바뀐 tetrahydroberberine 및 oxyberberine은 부관병균에 대하여 대체로 항균력이 낮았다.

이들 유도체중 항균력이 우수하여 선발한 berberine-SO₄ 및 berberine

-I의 EC₅₀ 농도를 구하기 위하여 potato sucrose (PS) 배지에 1백금선(白金線) 싹 부관병균을 접종하고 유도체를 각각 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 1.0 및 5ppm 처리하여 26±1°C의 항온기내에서 7일간 진탕배양한 후 균체를 여과하여 건조한 중량치는 그림 3 및 4와 같았다.

대조구 및 각 약제의 0.1ppm 처리구에서 균은 정상생육을 하여 균사가 1.75mg/ml 얻을 수 있었으나 균사가 반으로 줄어드는 EC₅₀ 농도는 berberine-SO₄가 0.5~1.0ppm이고 berberine-I는 0.4~0.5ppm이었다.

표 3. 베르베린 유도체의 사과나무 부란병균 균총생육억제 효과

화합물명	무처리시 균총생장율(mm)	농도(μg/ml)별 균총생육 저해율(%)					
		7.8	15.6	31.2	62.5	125	250
Berberine-Cl		70.3	81.8	97.1	100	100	100
Berberine-I		100	100	100	100	100	100
Berberine-acetone		79.8	82.3	86.7	100	100	100
Tetrahydro berberine		3.8	8.6	16.2	35.2	41.9	46.7
Berberine-SO ₄	52.5	100	100	100	100	100	100
Oxyberberine		22.3	33.3	42.9	66.7	66.7	70.5
Berberine-picrate		92.4	100	100	100	100	100
Berberine-Br		90.5	100	100	100	100	100
Berberine		84.8	92.4	100	100	100	100

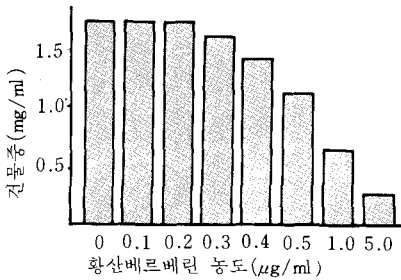


그림 3. 액체배지(7일간 배양)에서 황산베르베린의 사과나무 부란병균 균총생육 저해효과

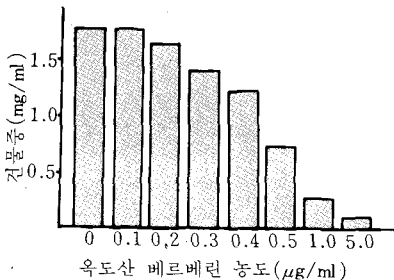


그림 4. 액체배지(7일간 배양)에서 옥도산베르베린의 사과나무 부란병균 균총생육 저해효과

5. 포장 약효검정

황벽나무 수피로부터 추출, 단리한 후 합성한 berberine 유도체중 *in vitro* 시험에서 사과나무 부란병에 가장 강한 항균력을 나타낸 berberine-SO₄ 및 berberine-I를 각각 표 4와 같은 방법으로 주사제 및 도포제를 제조하여 약효를 조사하였다.

사과품종 육오 45년생인 대형 사과나무에 1986년 3월 28일에 균을 접종하여 4월 20일에 수용성인 berberine-SO₄를 주사제로 제조하여 주사한 후 같은해 11월 17일에 병반진전 상황을 조사한 결과 표 5와 같았다.

이때 접종율은 58.8%이었으며 3,000ppm 처리구에서 병반면적이 줄어들면서 callus가 형성되어 치료되었으

표 4. 황산베르베린 주사제 및
옥도산베르베린 도포제의
제조처방

(주사제)

황산베르베린	0.15
물	나머지
계	100.00(%)

(도포제)

Berberine-I	0.15
Pyrophyllite	25.00
Talc	15.00
White carbon	3.00
Tween 80	2.85
Propylene glycol	나머지
계	100.00(%)

나 무처리구에서는 평균 18.6cm²의 병
반진전을 보였다.

물에 난용성인 berberine-I₂는 도
포제로 제조하여 동일품종에 1986년
3월28일 부란병균을 접종하고 4월
20일 도포제처리후 10월30일 재발율
(再發率) 및 callus 형성율을 조사한

결과 표 6 과 같았다.

부란병균의 접종율은 100%였으며
재발율에 대해 통계적 유의성이 인정
되지 않았으나 callus형성율은 berber-
ine-I 도포제, Balcoat 도포제 및 무
처리구가 각각 95.4%, 82.3% 및
66.7%로서 유의성이 있었으며 ber-
berine-I 도포제 처리구에서 callus 형
성율이 가장 우수하였다.

6. 살균기작

사과나무 부란병균(*Valsa ceratos-
perma*)의 살균기작을 구명하기 위하
여 PS배지에 berberine-SO₄를 처리
하여 균체의 총지방(總脂肪), 脂肪酸,
ergasterol 및 단백질의 함량변화를
조사하였다.

PS배지에 1ppm의 berberine-SO₄
를 처리한 것과 무처리하여 배양한
균사를 현미경으로 관찰한 결과 약체
처리구의 균사형태가 비정상적임을
볼 수 있었다.

표 5. 부란병에 감염된 사과나무의 황산베르베린 수간주사 효과

구 분	병 반 수	처 리 전 병반면적 (cm ²)	처 리 후 병반면적 (cm ²)	증 감 치 (cm ²)
1,000ppm	11	14.7	19.2	+ 4.5
2,000ppm	16	6.4	9.9	+ 3.5
3,000ppm	10	5.7	4.6	- 1.1
대 조 구	10	9.0	27.6	+18.6

*45년생 사과나무

표 6. 부란병에 감염된 사과나무의 옥도산베르베린 도포효과

구분	병반면적	재발		재발율 (%)	평균	DMRT* (5%)	칼루스형성율 (%)	평균	DMRT** (5%)
		계	병반수						
옥도산	10		0	0			99.6		
베르베린	10	30	1	2	10	6.7	a	94.4	a
도포	10		1		10		92.3		
발코트도포	10		1		10		85.5		
	10	30	1	3	10	10.0	a	81.3	b
	10		1		10		80.2		
대조구	10		2		20		64.4		
	10	30	1	5	10	16.7	a	67.8	c
	10		2		20		67.8		

● 45년생 사과나무 *L.S.D(0.05) = 11.94 **L.S.D(0.05) = 5.80

부란병균을 PS배지에 접종하여 6일간 배양한 후 berberine-SO₄ 50 ppm을 처리하고 약제처리 0, 18시간, 3일 및 7일후 균사를 취하여 균사중 총지방, ergosterol 및 지방산 함량을 각각 정량한 결과 표7과 같다.

균사중 총지방 함량은 6.7~8.0%이며 ergosterol 함량은 0.46~0.49%로서 약제처리구 및 무처리구의 균사간에 뚜렷한 변화가 관찰되지 않았

으며 지방산의 함량 또한 약제처리로 인하여 함량변화가 인정되지 않았다.

동결건조시킨 시료 0.6g을 Laemmli법을 변형시켜 균체의 단백질을 추출한 후 Lowry법으로 단백질을 정량하고(그림5) protein band는 electrophoresis 상에서 확인하였다. 단백질저해는 1 ppm에서 90.6%, 5 ppm에서 67.5%로 무처리에 비해 크게 저해되었다.

표 7. 황산베르베린 처리에 따른 균총의 총지질, 에르고스테롤 및 지방산 구성비

처리후시간	총지질 (%)	에르고스테롤 (%)	지방산 구성비 (%)				
			16:0	18:0	18:1	18:2	Rest
0	8.0	0.48	0.03	0.08	0.17	0.40	0.13
18시간	7.0	0.47	0.03	0.09	0.16	0.36	0.13
3일	6.9	0.46	0.03	0.08	0.16	*0.36	0.13
7일	6.7	0.49	0.04	0.07	0.14	0.34	0.13

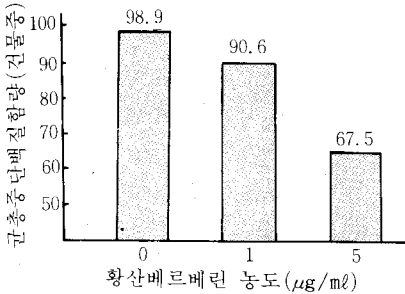


그림 5. 황산베르베린 처리에 따른 사과나무 부란병 균총중 단백질 함량

따라서 berberine 유도체는 3,000 ppm의 주사제가 사과부란병 방제에 효과적이었으며 그 살균작용은 지방산합성저해가 아니라 단백질 합성저해임이 판명되었다.

7. 맺음말

우리나라 사과나무재배에 크게 문제가 되고 있는 난방제 병중의 하나인 사과나무 부란병을 효과적으로 방제할 수 있는 식물성 농약의 개발, 이용을 위해 국내자생 또는 재배식물로부터 항균성 물질을 추출하여 그 화학구조를 확인하였다. 이어서 항균력 증강을 도모하기 위해 합성한 유도체들중 우수한 항균력을 가진 것은 포장실증시험을 실시하여 기존의 부란병약과 약효를 비교하였으며 아울러 살균작용도 연구하였다.

각종식물의 조추출물은 부란병균에 대해 상대적인 항균력을 비교한 결과 황벽나무 수피로부터 추출한 조

추출물의 균총생육억제율이 가장 높았으며 그의 할미꽃, 담배, 쇠비름 등의 추출물도 대체로 항균력이 강한 것으로 나타났다.

공식식물중 부란병에 대해 가장 항균력이 강한 황벽나무 수피의 조추출물중 항균성 물질을 추출, 단리하여 순수화(純粹化)한 후 각종 분석기기 및 문헌을 통해 확인한 결과 4급 amine 형 alkaloid 화합물인 7, 8, 13, 13a-tetrahydro-9, 10-dimethoxy-2, 3-(methylenedioxy)berbinium chloride (염산베르베린)임을 확인, 동정했다.

염산베르베린을 기본물질로 하여 더욱 우수한 항균성 물질을 얻기 위해 산화, 환원 및 염기치환등의 방법으로 각종 유도체들을 합성한 후 이들의 항균력을 비교한 결과 황산베르베린 및 옥도산(沃度酸) 베르베린이 가장 강하였다.

이들 두 화합물은 물에 대한 용해도가 크게 상이하였으므로 물에 쉽게 녹는 황산베르베린은 주사제로, 난용성인 옥도산베르베린은 도포제로 각각 제조하여 부란병균을 접종시킨 사과나무에 대조약제와 함께 처리하여 방제효과를 비교하였다. 황산염주사제 처리구의 병반면적은 켈루스가 형성되면서 줄어들었으며 옥도산염도포제 처리구에 비하여 켈루스형성율이 우수하였다.