

방선균 분리주 No. 2077이 생산하는 살충성 물질 SR 2077의 구조 동정

오세량 · 이형규 · 최수근 · 김정일
KIST 유전공학연구소 응용미생물 연구그룹

초록 : 국내 토양에서 분리한 방선균에서 살충성물질을 선별하는 연구과정 중 no. 2077 균주가 생산하는 살충성물질을 분리하였다. 살충성물질 SR2077은 UV, ¹H-NMR, ¹³C-NMR, C-H COSY 등의 방법으로 구조분석한 결과 albocycline으로 동정되었다(1994년 6월 24일 접수, 1994년 7월 29일 수리).

서 론

본 연구실에서는 우리나라 각 지역의 토양으로부터 방선균 7,105균주를 분리하였으며, 이들을 대상으로 살충활성이 있는 균주를 선별하고 살충성 물질을 분리하는 연구를 수행하여 왔다. 그중 No. 2077균주가 생산하는 살충성 물질 SR 2077을 분리, 구조를 동정하였기에 이를 보고하고자 한다.

배양 및 물질 분리

균주의 배양은 먼저 GAPY 액체배지(glucose 1%, soluble starch 2%, bacto soytone 0.5%, yeast extract 0.5%, CaCO₃ 0.1%, pH 7.2) 300 ml에 균주를 접종하여 배양(27°C, 200 rpm, 3 days)한 후, 이를 GAPY 액체배지 17 L에 2차 접종하여 배양(27°C, 200 rpm, 5 days)하였다. 배양액 중 살충성 물질생산 확인은, 배양액을 원심분리(5,000 rpm, 5 min)하여 배양 상등액과 균체를 각각 ethyl acetate와 acetone으로 추출한 후, 각 추출물의 일부를 취하여 김 등¹⁾이 사용한 *Bombyx mori* 3령 유충에 대한 살충활성 검정 방법으로 확인하였다. 그리고, 각 추출물을 순상 TLC(silicagel 60F₂₅₄, hexane/acetone 2/1, v/v)와 역상 TLC(RP-18 F₂₅₄, methanol/H₂O 85/15, v/v)상에서 분리하고 분리된 물질별로 살충활성을 검정한 결과, 살충성 물질의 위치는 상기한 순상 TLC 및 역상 TLC 조건에서 각각 R_f 0.55, 0.35로서 균체 및 배양상등액에 모두 존재하는 단일 물질임을 확인하여 SR 2077이라고 명명하고, TLC의 결과를 기준으로 분리를 시도하였다.

Key words : *Actinomycetes* isolate No. 2077, albocycline

*Corresponding author : S.-R. Oh

본 배양액 중 SR 2077의 분리는, 총 추출액을 순상 column chromatography(silica gel, hexane-acetone mixture, acetone 0~100% gradient)와 역상 column chromatography(RP-18, ethanol/H₂O, 85/15, v/v)방법으로 살충성분을 분리한 후, 최종적으로 HPLC(RP-18, methanol/H₂O, 9/1, v/v)상에서 정제하여 39 mg을 순수 분리하였다.

활성 검정

분리된 물질 SR 2077의 살충활성을 조사한 결과, 본 실험조건에서 *Bombyx mori* 3령 유충에 100 µg~200 µg 수준에서 0~100%의 살충효과를 보여, No. 46균주에서 분리된 piericidins와 기존의 살충제인 DDT, parathion 등이 10 µg 수준에서 100% 살충효과를 나타내었다는 오 등²⁾의 보고에 비하여 낮은 수준이었다. 항균활성 검정은, *Escherichia coli* BE 1186, *Salmonella typhimurium* SL 1102, *Pseudomonas aeruginosae* IFO 13130, *Bacillus subtilis* IFO 3513, *Staphylococcus aureus* R-209와 *Candida albicans* IFO 1594 등 6가지 피동균에 paper disc 방법으로 각각 20 µg을 처리한 결과, *Staphylococcus aureus* R-209에만 약한 항균력을 나타내었다.

구조 동정

분리된 물질은 비수용성으로 methanol, acetone, chloroform, hexane 등 유기용매에 잘 용해되며, UV region에서 특징적인 흡수 peak가 없는 end absorption

Table 1. NMR chemical shifts (δ , ppm) of SR 2077 and albocycline¹⁾

Carbon No.	SR 2077		Albocycline ²⁾	
	carbon	proton	carbon	proton
1	166.3 (C) ³⁾		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, 16.2×5.9)	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, 4.1×6.4)	75.6	4.62 (dq, 8)
OCH 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)
4-OH		3.45		—
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)

¹⁾ Measured in CDCl₃ at 300 MHz (¹H-NMR) and 75 MHz (¹³C-NMR) with TMS as an internal standard.

²⁾ Data from Harada's paper.³⁾

³⁾ Each carbon character was determined by INEPT.

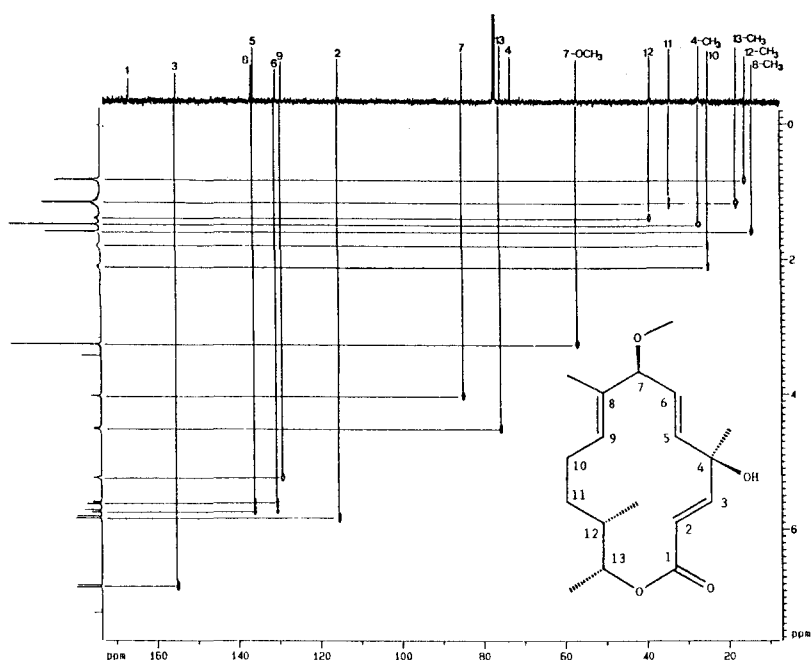


Fig. 1. Carbon-proton 2D NMR spectra of compound SR 2077 from *Actinomycetes* sp. No. 2077.

type의 물질로서, NMR을 이용하여 구조분석을 시도하였다.

^{13}C -NMR에서는 총 18개의 탄소가 검출되었고, APT에 의한 탄소의 특성조사 결과, 3개의 CH_3 , 1개의 OCH_3 , 2개의 CH_2 , 8개의 CH , 2개의 4급 탄소 및 1개의 $\text{C}=\text{O}$ 으로 나타났다. ^1H -NMR에서는 2개의 singlet CH_3 , 2개의 doublet CH_3 , 1개의 OCH_3 와, 3개의 double bond에 의한 5개의 proton peak가 검출되었다(Tabel 1). 그리고, 각 탄소와 결합된 수소의 위치를 ^{13}C - ^1H COSY의 2D spectra로 확인한 결과(Fig. 1), K. Harada 등³⁾이 보고한 albocycline의 NMR data와 일치하여 본 물질을 albocycline으로 동정하였다. 그러나, K. Harada 등은 탄소 5번과 8번의 탄소 peak를 각각 136.6 ppm, 136.1 ppm으로 결정하였는데, 당시 ^{13}C -NMR을 분리능이 좋지 않은 것(25 MHz)을 사용하였기 때문에 거의 중첩되어 보이는 2개의 peak를 정확하게 해석할 수 없었던 것으로 생각되며, 이를 확실하게 분리된 ^{13}C -NMR peak와 APT에 의해서 5번과 8번 탄소를 각각 136.0 ppm 및 136.5 ppm으로 정정하는 바이다.

Albocycline은 G(+) bacteria 중 주로 *Staphylococci*에 항균력을 나타내며 그밖의 G(+), G(-) bacteria나 fungi에는 항균력이 매우 미약한 것으로 보고⁴⁾된 바 있으나, 살충활성에 대해서는 본 실험의 결과로부터 처음으로 발견되었다.

감사의 글

본 연구는 과학기술처의 특정연구 개발사업으로 수행된 연구결과와 일부이며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. 김정일 등 (1992) 과학기술처 보고서 BSN80440-413-4
2. 오세량, 이형규, 구분탁, 최수근, 박상구, 신병식, 박승환, 김정일 (1994) 한국농화학회지 37, 110-114
3. Harada, K., F. Nishida, H. Takagi and M. Suzuki (1984) J. Antibiot., 37, 1187-1197
4. Nagahama, N., M. Suzuki, S. Awataguchi and T. Okuda (1967) J. Antibiot., 20, 261-266

Identification of insecticidal compound SR 2077 from *Actinomyces* isolate No. 2077

Sei Ryang Oh, Hyeong Kyu Lee, Soo Keun Choi, Jeong IL Kim (Applied Microbiology Research Group, Genetic Engineering Research Institute, Korea Institute of Science and Technology, Taejeon, Korea)

Abstract : During the screening of insecticidal compounds from soil microorganisms, SR 2077 was isolated from the metabolites of *Actinomyces* isolate No. 2077 and identified as albocycline by UV and NMR data analyses.

注 : APT(Attached Proton Test)
COSY(Correlated Spectroscopy)