

## 식물유래 곤충탈피 호르몬(Phytoecdysone)의 생리활성에 관한 연구

### I. 쇠무릎에서 추출한 곤충탈피 호르몬이 누에의 상족과 견질에 미치는 영향

김종길 · 김삼은 · 한수정 · 노시갑\*

농촌진흥청 잠사곤충연구소, 경북대학교 농과대학\*

## Studies on the Biological Activities of Phytoecdysone from *Acyranthes japonica*

### I. Effects of Molting Hormone Extracted from *A. japonica* on Mounting and Cocoon Characters of *Bombyx mori*

Jong-Gill Kim, Sam-Eun Kim, Soo-Jung Han and Si-Kab Noh\*

National Sericulture & Entomology Research Institute, R.D.A., Suwon, Korea

\*College of Agriculture, Kyungpook National University, Taegu, Korea

#### Abstract

A crude crystal of phytoecdysone was obtained 355 mg per Kg dry radix of *A. japonica*, and it was identified to  $\beta$ -ecdysone by TLC. Feeding silkworms on mulberry leaves sprayed with the extract, mounting time shortened and pupation ratio improved. The feeding effects of the extract was differed according to the rearing seasons, spring and summer. In spring season, only mounting time shortened without any difference in pupation ratio from the control. In summer season, not only mounting time shortened, but also pupation ratio remarkably advanced.

Key words : *Bombyx mori*, *Acyranthes japonica*, phytoecdysone, methanol extracts.

#### 서 론

상족은 전체 양잠작업 중에 차지하는 비율이 12%에 불과하지만 작업량이 가장 많은 5령 말기에, 더욱이 1-2일이라는 단기간 내에 숙잠처리가 완료되어야 하는 등, 노동력이 집중적으로 투입되어야 하는 작업이다. 이 때문에 상족작업은 호당 양잠규모를 확대하는데 커다란 장애요인으로 되어 있어, 대규모 양잠농가에서는 이 시기에 외부 노동력을 구입하는 경우가 많다. 따라서 양잠규모를 확대하고 경영을 안정화시키기 위해서는 보다 생력적인 상족기술의 개발이 요구되고 있다.

일반적으로 누에는 5령 말기가 되면 뽕먹기를 멈추고 고치짓기를 시작하는데 이때 누에는 누에자리에서 가능한 한 위로 올라갈려는 배지성을 보인다.

최근 누에의 배지성을 이용하여 개발된 자연상족법은 가지떨이 자연상족법과 더불어 그 이용빈도가 늘어나고 있다. 그러나 자연상족을 실시하기 위해서는 누에의 속도가 제일해서 짧은 시간내에 상족이 완료되어야 한다는 조건이 전제되어야 한다. 상족시간을 단축하여 일시에 대부분의 누에를 상족시키는 인위적인 보조수단으로 오래 전부터 상족촉진제의 개발이 연구되어 왔는데 여기에는 기피제와 숙화촉진제가 있다. 石川(1966)는 해충방제용 및 위생해충용의 곤충기피제 약 170종에 대해서 조사한 결과, Repper III, vetiver oil, lemon-grass oil, peppermint oil 등이 숙잠에 대해 기피효과를 나타낸다고 하였으며, 水田(1967)도 lauryl aldehyde, capryl aldehyde 등의 약제처리에 의한 숙잠의 등숙촉진을 유도하였으나, 이러한 상족촉진제는 나름대로의 문제점이 있어 현재

일선 농가에서 활용되고 있지 않다.

한편, 최종령기의 누에가 고치를 짓고 번데기로 변태하는 것은 전충선에서 분비되는 변태 호르몬의 작용결과임이 Chino *et al.*(1974)에 의해 밝혀져 있고, 최근에는 상족작업의 생력화에 탈피 호르몬을 이용하는 연구가 다수 행하여져 일본에서는 이미 상품으로까지 개발되어 있다. 그러나 이 상품은 대단히 고가로서, 보다 값싼 국내 제품의 개발이 시급한 실정이다. 탈피호르몬은 동물뿐 아니라 식물체 내에도 다량으로 함유되어 있는 경우가 많다. 식물유래의 곤충탈피 호르몬(phytoecdysone)에 대한 연구로는 竹本(1967 a) 등이 300여종의 식물이 갖는 곤충변태 활성물질에 대해 조사하여, 특히 *Acyranthes fauriei* 뿌리로부터 강력한 곤충탈피 호르몬 및 새로운 곤충변태 활성물질인 inokosterone을 분리한 바 있고, 이와같은 사실을 토대로 phytoecdysone의 이용기술에 관한 연구도(金 등 1974, 竹本 1967 b, 金 등 1983, 水澤 등 1991, 蟻木 등 1993) 활발히 진행되어 왔다. 특히 최근에는 *Agrobacterium*을 이용하여 식물의 모상근을 유발하는 식물조직 배양기술과 접목시켜 phytoecdysone을 생산하고 있으나 아직 실용화에는 이르지 못하고 있다(松本 1991).

이 연구는 phytoecdysone을 다량으로 함유하고 있는 것으로 알려져 있는 쇠무릎(*A. japonica*)에서 탈피 호르몬을 추출하여 누에의 상족촉진효과 및 고치의 실용형질에 미치는 영향을 조사하여, 양잠농가에서 사용할 수 있는 저렴한 상족촉진제 개발의 기초를 마련코자 수행되었다.

## 재료 및 방법

### 1. 공시재료

공시누에는 현 장려품종인 백옥잠을 이용하였으며, 누에에 대한 상족촉진효과를 검정하기 위한 phytoecdysone은 우리나라 전역에 걸쳐 자생하고 있는 *Acyranthes*속 식물(*Acyranthes japonica*; 쇠무릎 또는 우슬)에서 추출하였다.

### 2. phytoecdysone의 추출 및 정제

#### 1) 추출

채집한 쇠무릎은 그 뿌리만을 채취하여 생체 또는 60°C에서 10시간 정도 건조시킨후, 2-5 mm의 크기로 분쇄하였다. 분쇄한 쇠무릎 뿌리는 건물시료 100g당 메탄올 500 ml 중에서 80°C, 2시간씩 3회 가열환류한 후, 그 추출액을 rotary evaporator로 농축시킨 다음, 시료 100g당 50 ml의 에탄올과 50 ml의 증류

수로 용해하여 4°C에 1일 보관 후 여과 하였다. 이 여과액을 생물검정용 시료의 원액으로 사용하였다.

#### 2) 정제

竹本(1968b)의 방법에 따라 추출액을 rotary evaporator에서 완전히 농축시킨후 건물시료 100g당 100 ml의 메탄올로 다시 용해시키고 동량의 물을 첨가하여 여과하였다. 이 용액에 10 ml의 ether를 가하여 20-30회 흔들어 섞은 다음 하층액을 회수하여 다시 ether 세척하는 과정을 5회 반복하였다. 세척후의 메탄올 수용액에 10 ml의 ethylacetate를 가하여 흔들어 섞은 다음 상층액을 회수하는 과정을 10회 반복하였다. 회수된 ethylacetate 용액을 rotary evaporator에서 완전히 농축한 후, 최소량의 에탄올로 용해했다. 이 용액을, 중성 alumina를 충전제로 하고 ethylacetate : ethanol(4 : 1)을 용출용매로 하는 column chromatography에서 용출시키고, 용출액을 다시 rotary evaporator로 완전히 농축시켜 얻은 조절정을 생물검정용 시료로 사용하였다.

### 3. 정제한 조절정의 TLC 동정

薄層 chromatography에는 precoated TLC plate (silica gel 60, Merck Co.)를 사용하였으며, 전개를 양호하게 하기위해 100°C, 10분간 dry oven에서 전처리 하였다. 전개용매로는 ethyl acetate : ethanol(4 : 1)을 사용하였으며 phytoecdysone의 표준물질로는 시판의  $\alpha$ -ecdysone 및  $\beta$ -ecdysone(SIGMA Co.)을 사용하였다. 전개 후 10% 황산을 TLC plate에 분무한 후 100°C에서 15분간 발색시켰다.

### 4. 생물검정

쇠무릎의 메탄올 추출원액, 추출후 정제한 조절정 및 상족촉진제(양잠용  $\beta$ -ecdysone, Tomen Co.)를 공시약제로 사용하였다.

5령 말기 숙잠이 2-3% 출현하였을 때 각 처리구 별로 누에 100두의 급상량에 해당하는 뽕잎에 20 ml의 공시약제 수용액을 분무하여 첨식시켰다. 공시약제의 투여농도는 메탄올 추출원액의 경우 100, 50, 30, 20 배액, 조절정의 경우 1, 10, 20, 30, 50 ppm, 시판 상족촉진제의 경우 10 ppm으로 하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. Phytoecdysone의 추출 및 정제

Phytoecdysone은 채집한 쇠무릎 뿌리의 생체 또는 건조시료에서 메탄올을 이용하여 추출하였다. 시료의 크기는 2-5 mm 정도가 수율이 양호하였으며 생체와

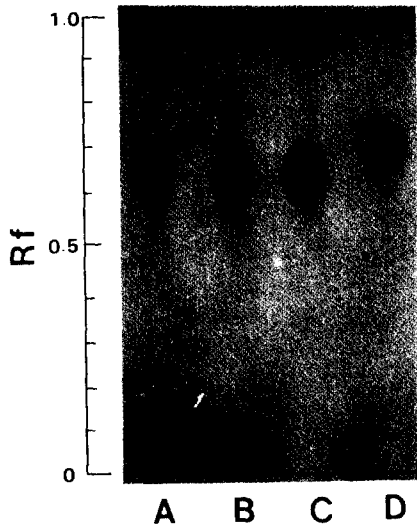


Fig. 1. Thin-layer chromatograms of the methanol extracts in solvent system of ethylacetate : ethanol(4 : 1). A;  $\beta$ -ecdysone(SIGMA Co.), B; methanol extract from fresh *A. japonica*, C; methanol extract from dry *A. japonica*, D;  $\alpha$ -ecdysone(SIGMA Co.).

건물시료 간에 수율 차이는 거의 없었다. 건물시료의 무게는 생체시료의 약 40% 정도 되었으며 추출후 정량한 결과 생체시료의 경우 시료 kg당 약 130 mg, 건물시료는 kg당 약 355 mg 정도의 조절정을 얻었다.

여기에서 얻은 조절정을 TLC로 동정한 결과는 그림 1과 같다. 생체 또는 건물상태의 쇠무릎에서 메탄올로 추출하여 얻은 조절정의 Rf치는 0.65 정도로 표준물질로 사용한  $\beta$ -ecdysone과 이동거리가 같았고 Rf치 0.7인  $\alpha$ -ecdysone과는 뚜렷이 구분할 수 있어, 竹本 등(1967 b)의 결과와 마찬가지로 쇠무릎의 메탄올 추출물이  $\beta$ -ecdysone임이 재 확인되었다.

## 2. 쇠무릎의 메탄올 추출물이 등족시간과 견질에 미치는 영향

### 1) Phytoecdysone의 투여농도별 등족을

쇠무릎의 메탄올 추출물과 부분 정제한 조절정을 농도별로 누에에 투여한 후 경과시간별 등족율을 알아보았다(그림 2). 조절정은 1, 10, 50 ppm, 메탄올 추출물은 100, 30, 20배액으로 희석하여 누에 100두당 20 ml를 뿔잎에 분무하였다. 5% 에탄올구는 처리구와 같은 양을 뿔잎에 분무하여 공시약제의 용매인 알콜에 의한 숙화촉진 효과 여부를 조사하였으며 control은 아무것도 처리하지 않은 뿔잎만을 급상하였다.

Phytoecdysone 투여후 50% 이상 누에가 등족하

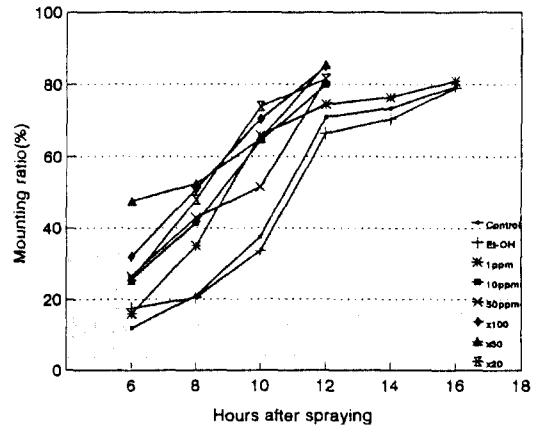


Fig. 2. Mounting effect of the methanol extracts in spring season. The mulberry leaves sprayed with the extract solution were fed to silkworms at the early stage of larval maturation. Et-OH shows 5% ethanol solution. The unit, ppm is used for crude crystal and X100, X30 and X20 for 100, 30 and 20 fold diluted solution of the methanol extracts, respectively.

는데 소요되는 시간은 대조구와 5% 에탄올구가 11시간 소요된데 비해 처리구는 8-9시간으로 단축되었다. 또한 80% 이상 누에가 등족하는데 소요되는 시간은 대조구가 16시간 내외인데 비해 처리구는 12시간 정도로 처리구가 4-5시간 단축되었다. 이와 같은 결과로 미루어 볼때 쇠무릎의 메탄올 추출물 및 조절정 모두 누에의 숙화촉진을 유도한다는 것을 알 수 있었으며, 이것은 金(1974) 등, 伊藤(1968) 등의 결과와도 일치했다.

투여농도별 숙화촉진 효과는 조절정의 경우 10 ppm 및 50 ppm에서 뚜렷한 효과를 인정할 수 있었으며, 메탄올 추출물의 경우는 모든 처리구에서 그 효과가 인정되었다. 이 결과를 재확인하기 위하여 조절정은 10 ppm 내외에서, 메탄올 추출물은 30배액 내외로 희석한 용액으로 '95 하잡기에 추시하였다(그림 3).

조절정의 경우 10 ppm 및 20 ppm이 대조구나 1 ppm구에 비해 숙화촉진 효과가 뚜렷이 나타났으며, 메탄올 추출물에서는 50배액 및 30배액이 대조구에 비해 숙화 소요시간이 단축되었다. 시판 상족촉진제는 메탄올 추출물 50배액 및 30배액 처리구와 거의 같은 효과를 나타냈다.

이상의 결과로 볼때 조절정 및 메탄올 추출물의 적정 투여농도는 각각 10 ppm 및 50배액이 적정 농도라고 생각되며, 특히 메탄올 추출물의 경우 정제된 탈피 hormone과 거의 같은 효과를 나타내는 것으로

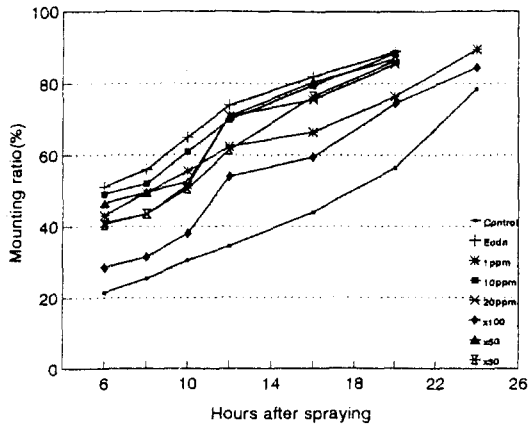


Fig. 3. Mounting effect of the methanol extracts in summer season. The unit, ppm is used for crude crystal and X100, X50 and X30 for 100, 50 and 30 fold diluted solution of the methanol extracts, respectively and Ecdn is for 10ppm  $\beta$ -ecdysone on the market.

보아 정제하지 않은 액상의 추출물을 그대로 상족축진제로 사용할 수 있다고 생각된다.

## 2) Phytoecdysone이 견질과 화용비율에 미치는 영향

농도별 phytoecdysone 투여후 견질, 화용비율 및 식하량에 미치는 영향을 표 1, 2에 나타냈다. 춘잠기의 화용비율은 처리구와 대조구간에 통계적 유의차를 인정할 수 없었으나, 견질은 투여농도가 높을수록 다소 떨어지는 경향이였다. 한편 하잠기의 견질은 춘잠기와 거의 같은 경향이였으나 화용비율은 처리구와 대조구간에 큰 차이를 보여 통계적으로도 그

유의차가 인정되었다. 즉, 대조구가 62.5%, 투여농도가 낮은 1 ppm과 100배액의 경우 75% 내외인데 비해 10 ppm, 20 ppm 및 50배액, 30배액은 80-90% 정도로 대조구에 비해 월등히 높았다.

Phytoecdysone 투여농도별 견질의 차이는 조기 숙화도에 따른 뽕잎 식하량의 다소에 의한 것이라 판단되므로, 약제처리 시기를 조절하므로서 견질이 떨어지는 것을 어느정도 방지할 수 있을 것으로 생각된다. 화용비율은 춘잠기에는 처리구와 대조구간에 통계적 유의차는 인정되지 않았으나, 하잠기에는 처리구가 대조구 보다 월등히 높아 고온다습한 하잠기에는 phytoecdysone을 누에의 숙화촉진 외에도 화용비율을 높이는 약제로 이용할 수 있음이 밝혀졌다.

한편 처리구와 대조구간의 식하량을 비교해보면 처리구가 대조구보다 적은 것으로 나타났으며, 이것은 처리구의 누에가 대조구 보다 숙화가 빠라지기 때문이라고 생각된다. 특히 정제하지 않은 메탄올 추출물이 부분 정제처리한 구와 같은 효과를 보이는 것으로 보아 완전 정제하지 않은 추출물중에 누에 성장을 저해하는 요소가 함유되어 있지 않은 것으로 생각된다. 따라서 정제하는데 소요되는 경비와 정제시의 목적물 유실을 막을 수 있다는 점에서, 메탄올 추출물을 그대로 이용하는 것이 경제적으로 유리할 것으로 생각된다.

쇠무릎의 메탄올 추출물이 누에의 숙화촉진에 탁월한 효과를 보였으므로 금후 본 약제 처리가 해서울 및 생시량비율 등에 미치는 영향에 관한 연구를 추시하여 메탄올 추출물을 상족축진제로 활용하는 방법이 검토되어야 할 것으로 생각된다.

Table 1. Influence of the methanol extracts on the pupation ratio, quantitative characters of cocoon and ingestion of mulberry leaves in spring season

spraying concentration	pupation ratio (%)	cocoon weight (g)	cocoon shell weight (cg)	cocoon shell ratio (%)	percentage of remained leaves (%)
control	96.0	2.46(A)	58.6(A)	23.8(A)	22.4
Et-OH	98.0	2.47(A)	58.9(A)	23.8(A)	29.2
1 ppm	95.0	2.47(A)	57.8(B)	23.4(B)	31.6
10 ppm	98.5	2.45(A)	57.9(AB)	23.6(AB)	29.0
50 ppm	95.5	2.44(A)	57.0(C)	23.4(B)	33.0
X 100	94.5	2.43(AB)	57.7(B)	23.7(AB)	40.8
X 30	98.5	2.40(BC)	57.1(C)	23.8(A)	62.0
X 20	95.5	2.38(BC)	57.0(C)	23.9(A)	54.8
LSD(0.05)	N.S.	0.035	0.326	0.326	-
C.V.(%)	1.89	0.62	0.24	0.60	-

( ): Duncan grouping. For the abbreviations, see Fig. 2.

**Table 2.** Influence of the methanol extracts on the pupation ratio, quantitative characters of cocoon and ingestion of mulberry leaves in summer season

spraying concentration	pupation ratio (%)	cocoon weight (g)	cocoon shell weight (cg)	cocoon shell ratio (%)	percentage of remained leaves (%)
control	62.5(D)	2.33(DC)	52.0(E)	22.3(CD)	37.6
1 ppm	78.0(BC)	2.38(A)	53.9(A)	22.6(BC)	60.3
10 ppm	83.0(ABC)	2.37(AB)	53.3(B)	22.5(BCD)	62.7
20 ppm	85.5(AB)	2.36(ABC)	52.4(CD)	22.2(D)	61.5
X 100	73.0(C)	2.31(DE)	51.5(F)	22.3(A)	53.8
X 50	92.5(A)	2.34(BCD)	53.0(B)	22.6(BC)	61.8
X 30	90.5(A)	2.35(ABC)	52.5(C)	23.3(A)	69.0
ecdn	91.0(A)	2.30(E)	52.1(DE)	22.7(B)	62.8
LSD(0.05)	9.63	0.326	0.326	0.326	-
C.V.(%)	5.10	0.60	0.27	0.62	-

( ) ; Duncan grouping. For the abbreviations, see Fig. 3.

적 요

비름과 다년생 초본류의 *Acyranthes*속 식물인 쇠무릎에서 phytoecdysone을 추출하여 누에에 침식시킨 후 누에의 등족촉진효과에 관한 생물검정을 실시하였다.

1. 쇠무릎에서 추출정제한 phytoecdysone을 정량한 결과, 건물 1 Kg당 355 mg이 회수되었으며, TLC 동정 결과 β-ecdysone과 동일한 물질로 판명되었다.

2. Phytoecdysone 투여후 약 4시간째부터 처리구가 대조구에 비해 등족율이 높아졌으며, 등족완료시간도 짧았다.

3. Phytoecdysone 투여 효과는 춘잠기와 하잠기(불량 환경)간에 차이를 보였다. 춘잠기에는 등족촉진효과 만이 인정되었을뿐 견질 및 화용비율은 대조구와 큰 차이가 없었으나, 하잠기에는 등족촉진효과 뿐만 아니라 화용 비율도 크게 향상되었다.

인 용 문 헌

Chino, H., S. Sakurai, T. Ohtake, N. Ikekawa, H. Miyazaki, M. Ishibayashi, and H. Abuki (1974) Biosynthesis of α-ecdysone by prothoracic glands *in vitro*. *Science*. **183**: 529-530.  
 石川 誠男, 平尾 常男 (1966) 家蠶幼蟲의 嗅覺에 關する

研究.(IV) 熟蠶의 各種藥劑에 對する忌避性. *日蠶試報* **20**: 411-428.  
 伊藤 智夫·水泉 二郎·柳川 弘明 (1968) 植物體より得られた昆蟲脫皮 호르몬による熟蠶化促進. *蠶試彙報* **92**: 21-40.  
 Kiguchi, K. and N. Agui (1981) Ecdysteroid levels and developmental events during larval molting in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.* **27**: 805-812.  
 金正一·李在鎔·金春洙·朴光儀 (1983) 韓國產 牛膝의 ecdysterone 抽出과 그 生理活性에 關한 研究. *韓蠶學誌* **25**(1): 1-20.  
 金潤植·金洛相 (1974) 上簇促進劑 開發에 關한 研究. *韓蠶雜* **16**(2): 127-131.  
 松本 武·田中 伸和 (1991) 毛狀根培養による昆蟲脫皮 호르몬의生産. *Bio Industry* **8**(2): 84-88.  
 水田 美照·桑野 恒雄 (1969) 라우린알데히드와 카프린알데히드가熟蠶의登簇性に及ぼす影響. *日蠶雜* **38**: 316-320.  
 水澤 久成·小境 泰典·若林 巳喜雄·丸山 長治 (1991) 廣食性蠶の飼育 及び上簇法. *蠶昆研報* **3**: 77-88.  
 蟪木 理·丸山 長治·水澤 久成 (1993) 超省力飼育裝置による蠶の飼育と α-ecdysoneの上簇への利用. **9**: 7-17.  
 竹本 常松·小川 俊太郎 (1967 a) 生藥および植物の昆蟲變態活性(その1). *藥學雜誌* **87**(11): 1914-1418.  
 竹本 常松·小川 俊太郎 (1967 b) 牛膝の成分研究(第4報). 台灣產イノコズチから昆蟲變態ホルモンの單離. *藥學雜誌* **87**(12): 1478-1480.