

## 방선균 SS-4993이 분비하는 살충물질의 화학적 성상 및 작용기작

이은정<sup>1</sup> · 강경돈<sup>1</sup> · 황교열<sup>2</sup> · 김두호<sup>3</sup> · 이상몽<sup>4</sup> · 김신덕<sup>5</sup> · 성수일<sup>1</sup>  
<sup>1</sup>수원대학교, <sup>2</sup>아람사료, <sup>3</sup>농촌진흥청, <sup>4</sup>밀양산업대학교, <sup>5</sup>서경대학교

### Chemical Properties of the Insecticidal Compound Produced by an Actinomycetes, SS-4993

Eun-Jung Lee<sup>1</sup>, Kyung-Don Kang<sup>1</sup>, Kyo-Yeol Hwang<sup>2</sup>, Du-Ho Kim<sup>3</sup>,  
Sang-Mong Lee<sup>4</sup>, Shin-Duk Kim<sup>5</sup>, Su-Il Seong<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The University of Suwon, <sup>2</sup>Aram Feed Co., LTD,  
<sup>3</sup>Rural Development Administration, <sup>4</sup>Miryang National University, <sup>5</sup>Seo-Kyung University

#### ABSTRACT

The insecticidal compound produced by *Streptomyces* SS-4993 strain was indicated to be a relatively stable small compound by pancreatin treatment. The active compound was adsorbed on HP-20 and eluted with 70% acetone. Then, the eluate was extracted with ethyl acetate. The content of the extract was determined by thin layer chromatography (Silica gel 60 F<sub>254</sub>, hexane-ethyl ether-acetic acid, 80 : 20 : 1). Three active bands (R<sub>f</sub> 0.08, 0.77, 0.88) were identified by dermal application using *Bombyx mori* larvae. Electrophoretic analysis revealed that the injection of strain SS-4993 culture broth into *B. mori* larvae induced the reduction of the hemolymph proteins level. Especially, the level of apolipoprotein-I was decreased drastically.

Key words : Biological insecticides, Actinomycetes, *Bombyx mori*, Apolipoprotein-I

#### 서 론

생물농약이란 항균 및 살충 또는 제초 효과를 갖는 동식물이나 미생물 및 이들로부터 생화학적인 방법에 의해 생산되는 농약 활성물질을 총칭하는 것으로, 생물농약은 다시 생화학농약과 미생물농약의 두 부류로 나눌 수 있다(Christine and Fulbright, 1996). 생화학농약은 생물에서 유래하는 화학물질로서 페로몬, 식물성장조절물질, 곤충성장조절물질, 효소 등이 있고, 미생물농약은 야생의 또는 돌연변이 유발이나 유전자 조작에 의해 변형된 병원성 미생물들로서 바이러스, 박테리아, 원생동물 그리고 곰팡이 등이 여기에 속한다(Darwell and Gunasekaran, 1996).

곤충성장조절물질을 이용한 생화학농약제는 곤충의 각종 생리적 기능을 제어하여 정상적인 발육을 저지시키는 농약제로서 지금까지 방선균을 비롯한 수종의 토양미생물로부터 다수 얻어지고 있다. 그 중 곤충의 탈피에 관여하는 효소, chitinase 및 chitin synthetase에 대한 저해물질이 발견되어 이들의 분리

와 동정이 이루어졌는데, 대표적인 chitin synthetase의 저해제로는 방선균으로부터 polyoxin과 nikkomycin이 발견되었고(Chen *et al.*, 1982), chitinase 저해제로는 *Streptomyces* sp. 균체 추출물로부터 allosamidin이 분리되어 이들의 분자구조가 밝혀진 바 있다(Koga *et al.*, 1987; Sakuda *et al.*, 1987; Nishimoto *et al.*, 1991; Zhou *et al.*, 1993).

그밖에도 곤충의 살충기작은 아직 밝혀지지 않은 생물농약이 *Streptomyces* 등의 각종 미생물들로부터 다수 발견되고 있다. Isogai *et al.*(1984)은 *Streptomyces halstedii*의 균체 추출물로부터 *Leucania separata*에 살충성을 보이는 leucanicidin을 분리하였으며, Fabre *et al.*(1988)은 6,280종의 토양 방선균으로부터 항균활성과 함께 *Musca domestica*에 대하여 살충효과를 나타내는 CL307-24라는 물질을 분리하였다. 또한 Reddy *et al.*(1991)은 5,000여 종의 토양미생물로부터 *Heliothis virescens*에 살충성을 나타내는 W719를, Kanbe *et al.*(1992), Urushibata *et al.*(1993)은 역시 *Streptomyces*균의 일종으로부터 살충물질 AB

3217-A, respirantin을 각각 검출한 바 있다.

본 연구실에서도 우리 나라의 전 지역에서 수집한 5,000여 토양방선균으로부터 항균 및 살충성을 나타내는 유효 균주를 선별하여 이들 균주의 형태학적, 생리학적 및 화학적 성상을 토대로 균 동정을 실시한 바 있다(이 등, 1998). 이들 선발균 가운데 SS-4993균은 특히 항균 및 살충 효과가 뛰어나 장래 유망한 생물농약원으로 기대가 큰 바, 본 연구는 이 균이 생산하는 살충성 물질에 대한 화학적 성상과 물질분리 및 이 물질의 곤충체내에서의 살충기구를 해명함으로써 장차 무공해 살충농약제 개발을 위한 기초 자료를 얻고자 하였다.

본 연구는 농촌진흥청 농업특정연구개발사업(1996-1999)의 연구비에 의해 수행되었으며, 본 연구를 위해 곤충시료를 제공해 주신 농촌진흥청 잠사곤충부 관계관 여러분께 깊은 감사 드립니다.

## 재료 및 방법

### 1. 방선균 배양

본 연구에 사용한 방선균 SS-4993은 파밤나방을 비롯한 나비목 곤충에 강력한 살충성을 나타내며 동시에 곰팡이와 효모 등에 대한 항균효과도 높은 균으로 보고되었다(이 등, 1998). 균은 Bennet's 평판배지(1.0% glucose, 0.2% peptone, 0.1% beef extract, 0.1% yeast extract, 1.5% agar, 5 ppm nystatin)에서 순수 배양한 후 Bennet's 액체배지에 접종하여 29.5°C에서 180 rpm의 진탕 속도로 10일간 배양하였다. 배양이 완료된 후 배양산물액을 8,000 rpm에서 15분간 원심 분리하여 균체를 제거하고 얻어진 상등액을 살충성분의 화학적 성상조사, 물질분리 및 살충기작 해명 등의 실험에 사용하였다.

### 2. 실험곤충

균 배양액의 살충성 검정 및 살충기작 해석을 위한 실험 곤충으로는 누에(*Bombyx mori*)유충을 사용하였다. 누에는 인공사료(동방우량)에 의해 25°C에서 정온 사육하였다.

### 3. Pancreatin 처리와 살충성 조사

선발 균주의 배양산물액에 효소 pancreatin을 처리하고 얻어진 배양산물액의 살충성 여부를 조사함으로써 살충성분의 화학적 성상을 검토하였다. Pancreatin 처리는 효소의 활성을 극대화하기 위해 배양

산물액을 pH 7로 조정하고 여기에 pancreatin (Sigma)을 배양액 1 ml당 1 mg의 농도로 처리하여 37°C의 항온조에서 30분간 반응시켰다. 효소 반응액의 살충성 여부를 조사하기 위해 3령 1일 누에 유충에 20 µl의 효소 반응액을 경구 투여하였고 이후 나타나는 살충성 여부에 의해 동성분의 효소에 대한 안정성 판정 및 화학적 성상을 검토하였다(김, 1992).

### 4. Thin Layer Chromatography(TLC) 분석

방선균 배양액을 합성흡착제 Diaion HP-20으로 충전시킨 column(Mitsubishi Co.)에 통과시킨 후 증류수로 충분히 세정하고, 30% methanol, 50% acetone, 70% acetone의 순으로 용출하였다. 각 용매별 용출액은 rotary evaporator(Büchi Rotavapor R-124)를 이용하여 감압건조하고 flask내의 건조시료는 증류수로 처음 배양액 양에 대해 10배 농축하여 3령 1일 누에 유충에 20 µl씩 경구투여 하였다. 살충성이 확인된 시료구는 농축한 배양액과 동량의 ethyl acetate 용매를 첨가한 후 재추출하였으며, 얻어진 물층과 용매층은 분리하여 rotary evaporator로 각각 감압건조하였다. 감압건조한 시료의 용매층은 아세톤에, 물층은 증류수로 각각 최초의 시료 배양액 양에 대해 30배로 농축 용해한 후, 3령 1일 누에 유충을 사용하여 아세톤에 녹인 시료는 피부에 20 µl씩 적하하고, 증류수에 녹인 시료는 20 µl씩 경구 투여하여 살충성을 검정하였다. 살충효과가 나타난 시료구는 TLC(Silica gel 60 F<sub>254</sub>, Merck) plate상에 일정량 점적하여 hexane-ethyl ether-acetic acid(80 : 20 : 1)의 혼합 용매에서 chromatography하고, 전개가 완료된 TLC plate는 완전히 건조한 후 UV transilluminator(UVP TL33-E, USA)를 사용하여 spot을 검출하였다. UV에서 관찰된 spot들은 TLC plate로부터 박탈하여 각 spot별로 최초 배양액 양에 대해 60배로 acetone 추출하고 20 µl씩을 3령 1일 누에유충에 적하하여 살충성 여부를 조사하였다(Boyer, 1986; Cooper, 1991; 김, 1992).

### 5. 전기영동

방선균 배양액 투여 후 누에 유충 체액단백질 변화를 전기영동 분석에 의해 경시적으로 조사하였다. 즉, 방선균 배양액과 대조구로서 순수한 배양액 25 µl를 각각 누에 5령 1일 유충의 복강 내에 주사하고, 3, 6, 12시간 경과 후의 체액을 채취하여 단백질질을 분석하였다. 단백질 분석은 관행에 따라 native-

polyacrylamide gel 전기영동(native-PAGE, Davis, 1964) 및 SDS-polyacrylamide gel 전기영동(SDS-PAGE, Laemmli, 1970)법을 이용하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 살충성분의 화학적 성상 및 분리

방선균 SS-4993균주는 이미 높은 항균 및 살충성이 검증된 균주로서 장차 무공해 생물농약 개발을 위한 유용 균주임이 확인된 바 있다(이 등, 1998). 따라서 SS-4993균 배양액의 살충성분의 화학적 특성 파악과 물질분리는 장차 미생물농약의 제제화 및 실용화를 위해 반드시 해결되어야 할 과제이다.

SS-4993균 배양액의 효소 안정성 및 화학적 성상을 검토하기 위해 균 배양액을 pancreatin으로 소화하고 그 산물을 사료를 통해 누에에 섭식시킨 결과, 효소 무처리구와 동일하게 누에가 모두 폐사함으로써 배양액중의 살충성분은 pancreatin에 의해 거의 영향을 받지 않음이 확인되었다(Table 1). 즉, 균 배양액 중의 살충성분은 이들 효소에 비교적 안정하였으며 동시에 본 실험에 사용한 pancreatin이 amylase, trypsin, lipase 등의 효소성분을 모두 함유하고 있는 점을 감안할 때 이 균주가 생산하는 살충성 물질은 적어도 다당류나 단백질 또는 지방과 같은 고분자 물질은 아닌 분자량 5,000이하의 저분자 물질일 것으로 추정되었다.

다음, SS-4993균 배양액의 살충성분에 대한 물질 분리를 시도하였다. 우선 배양액을 합성 흡착제 Diaion HP-20에 통과시키고 30% MeOH, 50% acetone, 70% acetone의 순으로 용출한 후 각 용매별로 생물검정한 결과 70% 아세톤구에서 살충성이 확인되었다. 이 70% acetone구를 감압 건조하고 ethyl acetate로 추출하여 그 용매층에 살충성이 있음을 확인하였다. 이 활성 분획을 TLC로 분리하여  $R_f$  0.08, 0.31, 0.35, 0.69, 0.77, 0.88 등 6개의 spot을 얻었

고, 이들 6개의 spot을 TLC plate로부터 각각 박탈한 후 아세톤으로 추출하여 누에 유충의 피부에 처리한 결과,  $R_f$  0.08, 0.77 및 0.88의 3개 spot에서 살충활성이 인정되었다(Fig. 1).

이상의 결과로부터, SS-4993균의 살충성분은 분자량 5,000이하의 저분자 물질로서 그 구성은 2종 이상의 congener 또는 화학적 성질을 달리하는 2~3종의 복합 성분임을 확인할 수 있었다. 이와 같은 사실은 SS-4993균을 생물농약으로 제제화하여 야외에 살포하였을 때 자연환경의 각종 물리, 화학적 요인에 의해 약효 성분이 쉽게 분해되지 않고 장기간 안정된 상태로 보존될 수 있음을 의미하는 것으로 본 생물농약의 큰 장점이라 할 수 있겠다. 앞으로 각종 chromatography를 비롯한 NMR, MS, UV 등 정밀한 기기 분석법을 이용하여 살충성분의 정확한 구조를 확인하고, 그 결과를 data base 검색을 통해 신규물질 여부를 검토할 예정이다.

### 2. 체액단백질 변화

본 살충물질의 체내 대사에 미치는 영향을 알아보기 위해 방선균 SS-4993 배양액을 5령 누에 유충의 체강내에 투여한 후 체액단백질의 경시적 변화를 native-I 및 SDS-PAGE로 조사하였다. 균 배양액 투여구는 대조구에 비해 처리 후 3시간에 이미 단백질

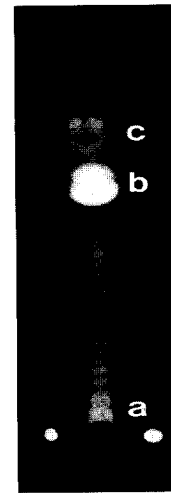


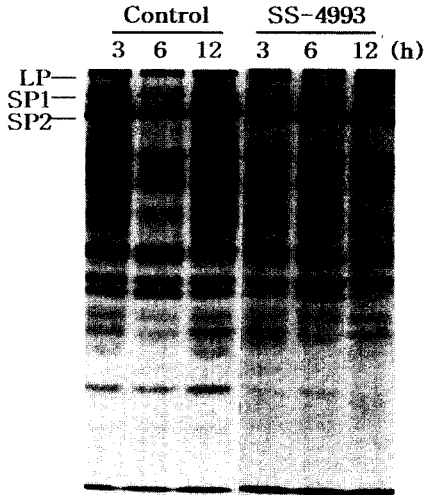
Fig. 1. Thin layer chromatogram of active compounds from culture broth of strain SS-4993 on silica gel plate, developed with hexane-ethyl acetate-acetic acid (80:20:1).

Three active compounds a( $R_f = 0.08$ ), b( $R_f = 0.77$ ) and c compound( $R_f = 0.88$ ), were identified.

Table 1. Mortality of silkworm, *Bombyx mori* after feeding on SS-4993 culture broths treated with pancreatin

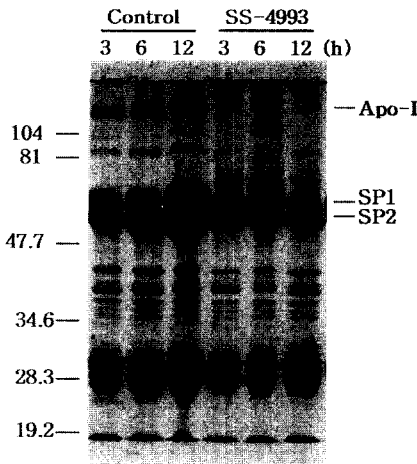
Specimens	Mortality (%)*	
	Treated pancreatin	Non-treated pancreatin
Control	0	0
SS-4993	100	100

\*The mortality was investigated by applying 20 larvae of silkworms in each samples.



**Fig. 2.** Native-PAGE analysis of hemolymph proteins in *B. mori* larvae injected with SS-4993 culture broth at the fifth instar.

Hemolymphs were collected at 3, 6 and 12 hr after treatment. Non-inoculated culture broth was injected for the control.



**Fig. 3.** SDS-PAGE analysis of hemolymph proteins in *B. mori* larvae injected with SS-4993 culture broth at the fifth instar.

Hemolymphs were collected at 3, 6 and 12 hr after treatment. Non-inoculated culture broth was injected for the control.

의 농도가 전체적으로 감소하였고, 특히 지질수송단백질인 apolipoprotein-I 이 거의 소실되었다(Fig. 2,

Fig. 3). 이러한 결과는 배양액 주사 후 6시간 및 폐사직전인 12시간에서도 거의 동일하게 나타남으로써 본 살충성분의 투여와 함께 체내 단백질은 급격한 분해 및 이에 따른 대사 이상이 일어남을 알 수 있었다.

이상의 누에 체액단백질의 분석결과로부터 균 배양액 처리에 의한 누에의 폐사는 살충물질에 의한 체내에서의 대사이상인 그 하나의 폐사요인일 것으로 추정되었으나 살충제에 의한 폐사기작에는 그밖에도 신경계의 교란 등 여러 요인이 복잡하게 연관되어 있으므로 본 살충성분에 의한 정확한 살충기작에 대해서는 금후 계속 연구 검토되어야 할 것으로 생각된다.

### 적 요

방선균 SS-4993의 살충성분에 대한 화학적 특성을 pancreatin 처리에 의해 조사한 결과, 이 활성물질은 효소에 비교적 안정하고 분자량 5,000이하의 저분자 물질임이 밝혀졌다. 균 배양산물을 합성 흡착제 Diaion HP-20에 통과시킨 후 70% acetone으로 용출하고 다시 ethyl acetate로 처리하여 살충활성 분획을 얻었다. 이 활성 분획을 TLC로 분리하고 얻어진 spot들을 각각 acetone으로 추출하여 누에 유충의 피부에 처리한 결과,  $R_f$  0.08, 0.77 및 0.88의 3개 spot에서 살충성분이 확인되었다. 한편, SS-4993균 배양액을 5령 누에유충 체강 내에 주사한 결과, 체액단백질의 농도가 전체적으로 감소하였으며 특히 apolipoprotein-I의 급격한 감소를 나타냈다.

### 인용문헌

Boyer, R. F. (1986) Modern experimental biochemistry. Addison-Wesley Publishing Company, Inc.  
 Chen, A. C., R. T. Mayer and J. R. Deloach (1982) Purification and characterization of chitinase from the stable fly, *Stomoxys calcitrans*. *Archs Biochem. Biophys.* **216**:314-321.  
 Christine, D. S. and D. W. Fulbright (1996) Molecular biology of fungal diseases. Molecular Biology of the Biological Control of Pests and Diseases of Plants, CRC Press, Inc., pp. 57-70.  
 Cooper, T. G. C. (1991) The Tools of Biochemistry. John Wiley & sons, Inc.  
 Darrell, J. W. and M. Gunasekaran (1996) Approaches to the control of pests and diseases of plants, CRC Press, Inc., pp. 1-14.  
 Davis, B. J. (1964) Disc electrophoresis-II. Method and

- application to human serum proteins. In gel electrophoresis. by J. F. Fredrich. *Ann. New York Acad. Sci.* **121**: 404.
- Fabre, B., E. Annau, G. Etienne, F. Legendre and G. Tiraby (1988) A simple screening method for insecticidal substances from actinomycetes. *J. Antibiotics* **41**: 212-219.
- Isogai, A., S. Sakuda, S. Matsumoto, M. Ogura, K. Furihata, H. Seto and A. Suzuki (1984) The structure of leucanicidin, a novel insecticidal macrolide produced by *Streptomyces halstedii*. *Agric. Biol. Chem.* **48**: 1379-1381.
- Kanbe, K., Y. Mimura, T. Tamamura, S. Yatagai, Y. Sato, A. Takahashi, K. Sato, H. Naganawa, T. Takeuchi and Y. Iitaka (1992) AB3217-A, a novel anti-mite substance produced by a strain of *Streptomyces platensis*. *J. Antibiotics* **45**:458-464.
- 김창진 (1992) 미생물로부터 생리활성물질의 분리 정제. *생물화공*. **6**:8-12.
- Koga, D., A. Isogai, S. Sakuda, S. Matsumoto, A. Suzuki and S. Kimura (1987) Specific inhibition of *Bombyx mori* chitinase by allosamidin. *Agric. Biol. Chem.* **51**: 471-476.
- Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature(London)* **227**:680-685.
- 이은정, 강경돈, 황교열, 김두호, 김신덕, 성수일 (1998) 농작물 해충 및 진균류 방제를 위한 방선균의 분리 및 동정. *한국잡사학회지*. **40**:63-69.
- Nishimoto, Y., S. Sakuda, S. Takayama and Y. Yamada (1991) Isolation and characterization of new allosamidins. *J. Antibiotics* **44**:716-721.
- Reddy, K., G. Jewett, R. Fatig, M. Brockman, C. Hatton, P. Savickas, D. Hasha and C. Snipes (1991) New insecticidal metabolites from soil isolate W719. *J. Antibiotics* **44**:962-968.
- Sakuda, S., A. Isogai, S. Matsumoto and A. Suzuki (1987) Search for microbial insect growth regulators allosamidin, a novel insect chitinase inhibitor. *J. Antibiotics* **40**:296-300.
- Urushibata, I., A. Isogai, S. Matsumoto and A. Suzuki (1993) Respirantin, a novel insecticidal cyclodepsipeptide from streptomycetes. *J. Antibiotics* **46**:701-703.
- Zhou, Z. Y., S. Sakuda, M. Kinoshita and Y. Yamada (1993) Biosynthetic studies of allosamidin. *J. Antibiotics* **46**:1582-1588.